

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1120077 B
CN 101210244 B

[12]

STANDARD PATENT SPECIFICATION
標準專利說明書

[21] Application No. 申請編號
08114115.3

[51] Int.Cl.⁸ C12N C07K A61K A61P
G01N

[22] Date of filing 提交日期
31.12.2008

[54] NEUTROKINE-ALPHA AND NEUTROKINE-ALPHA SPLICE VARIANT NEUTROKINE- α 和 NEUTROKINE- α 剪接變體

[30] Priority 優先權
14.01.2000 US 60/176,015
[43] Date of publication of application 申請發表日期
20.03.2009
[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期
25.10.2013
CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期
CN 200710153785.6 22.02.2000
CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期
CN 101210244 02.07.2008
Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期
23.01.2013

[73] Proprietor 專利所有人
HUMAN GENOME SCIENCES, INC.
9410 Key West Avenue
Rockville, MD 20850
UNITED STATES/UNITED STATES OF AMERICA
人體基因組科學有限公司
美國/美利堅合眾國
[72] Inventor 發明人
CRAIG A. ROSEN 克雷格·A·羅森
JIAN NI 倪健
REINHARD EBNER 萊因哈德·埃布納
GUO-LIANG YU 余國良
[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
NTD Patent & Trade Mark Agency Ltd.
Units 1805-6, 18/F
Greenfield Tower, Concordia Plaza
No. 1 Science Museum Road
Tsimshatsui East, kowloon HONG KONG



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101210244 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 23

(21) 申请号 200710153785. 6

A61P 17/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2000. 02. 22

A61P 21/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 3/10 (2006. 01)

60/176, 015 2000. 01. 14 US

A61P 7/04 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61K 39/395 (2006. 01)

00806541. 1 2000. 02. 22

G01N 33/53 (2006. 01)

C12N 5/18 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

PTA-1158 2000. 01. 07

PTA-1159 2000. 01. 07

97768 1996. 10. 22

203518 1998. 12. 10

(56) 对比文件

WO 98/27114 A2, 1998. 06. 25, 摘要、第 2 页第 31 至第 3 页第 37 行、第 5 页第 1-2 行、第 6 页第 26 行至第 8 页第 34 行、第 16 页第 12 行至第 17 页第 17 行、第 27 页第 10-16 行、第 37 页第 10 行至第 40 页第 30 行。

(73) 专利权人 人体基因组科学有限公司

地址 美国马里兰州

WO 99/12964 A2, 1999. 03. 18, 摘要、第 1 页第 3-8 行、第 5 页第 20-26 行、第 6 页第 14 行至第 7 页第 10 行。

(72) 发明人 克雷格·A·罗森 倪健

莱因哈德·埃布纳 余国良

CN 1234833 A, 1999. 11. 10, 参见说明书第 7 页的第 3 段至第 12 页第 2 段、第 26 页第 2 段至第 28 页第 3 段、说明书 33 页第 4 段和图 1 或权利要求 1-21。

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

WO 99/33980 A2, 1999. 07. 08, 摘要、第 2 页第 8 行至第 4 页第 17 行、第 14 页第 11 行至第 15 页第 12 行、第 30 页第 12-2 行、第 33 页第 26 行至第 35 页第 8 行。

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006. 01)

C07K 14/435 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

A61K 38/17 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 35/02 (2006. 01)

A61P 37/00 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

EP 0869180 A1, 1998. 10. 07, 摘要、第 3 页第 1-12 行、第 10 页第 20 行至第 11 页第 48 行、第 12 页第 8-53 行、第 14 页第 10-58 行。

审查员 王莉

权利要求书 4 页 说明书 220 页 附图 16 页

(54) 发明名称

Neutrokin- α 和 Neutrokin- α 剪接变体

及生产它们的重组方法及其应用。

(57) 摘要

本发明涉及一种新的被称为 Neutrokin- α 的细胞因子。另外,已鉴别了一种 Neutrokin- α 的剪接变体,称为 Neutrokin- α SV。在具体的实施方案中,本发明提供了编码 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽的核酸分子。在另外的实施方案中,还提供了 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽,以及载体,宿主细胞,以

1. 一种分离的蛋白质,由融合于毒素蛋白的 Neutrokin- α 蛋白组成,其中所述 Neutrokin- α 蛋白由 SEQ ID NO:2 的 134-285 位氨基酸残基的氨基酸序列组成。

2. 一种杀死 B 淋巴细胞的体外方法,其包括使所述 B 淋巴细胞接触权利要求 1 的蛋白质。

3. 权利要求 1 的蛋白质在制备用于杀死 B 淋巴细胞的药物中的用途。

4. 权利要求 1 的蛋白质在制备用于治疗需要其的患者中的 B 细胞恶性肿瘤或自身免疫性疾病的药物中的用途。

5. 权利要求 4 的用途,其中所述 B 细胞恶性肿瘤选自:

- (a) 非 Hodgkin's 淋巴瘤;
- (b) 多发性骨髓瘤;
- (c) 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL);
- (d) 急性淋巴细胞性白血病 (ALL);
- (e) 浆细胞瘤;和
- (f) Waldenstrom's 巨球蛋白血症。

6. 权利要求 4 的用途,其中所述自身免疫性疾病选自:

- (a) 类风湿性关节炎;
- (b) 系统性红斑狼疮;
- (c) 多发性硬化;
- (d) 重症肌无力;
- (e) Sjogren's 综合征;
- (f) 1 型糖尿病;
- (g) 特发性血小板减少性紫癜;
- (h) Gullian-Barre 综合征;
- (i) Hashimoto's 甲状腺炎;
- (j) Graves' 病;和
- (k) 血管炎。

7. 权利要求 1 蛋白质在制备用于治疗、预防或缓解移植物或移植排斥的药物中的用途。

8. 权利要求 1 的蛋白质,其中所述毒素蛋白选自:

- (a) 核糖体失活蛋白;
- (b) 细胞毒素;和
- (c) 胞毒性前体药物。

9. 一种杀死 B 淋巴细胞的体外方法,其包括使所述 B 淋巴细胞接触权利要求 8 所述的蛋白质。

10. 权利要求 8 的蛋白质在制备用于杀死 B 淋巴细胞的药物中的用途。

11. 权利要求 8 的蛋白质在制备用于治疗需要其的患者中的 B 细胞恶性肿瘤或自身免疫性疾病的药物中的用途。

12. 权利要求 11 的用途,其中所述 B 细胞恶性肿瘤选自:

- (a) 非 Hodgkin's 淋巴瘤;

- (b) 多发性骨髓瘤；
- (c) 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)；
- (d) 急性淋巴细胞性白血病 (ALL)；
- (e) 浆细胞瘤；和
- (f) Waldenstrom' s 巨球蛋白血症。

13. 权利要求 11 的用途,其中所述自身免疫性疾病选自：

- (a) 类风湿性关节炎；
- (b) 系统性红斑狼疮；
- (c) 多发性硬化；
- (d) 重症肌无力；
- (e) Sjogren' s 综合征；
- (f) 1 型糖尿病；
- (g) 特发性血小板减少性紫癜；
- (h) Gullian-Barre 综合征；
- (i) Hashimoto' s 甲状腺炎；和
- (j) Graves' 病；和
- (k) 血管炎。

14. 权利要求 8 蛋白质在制备用于治疗、预防或缓解移植物或移植排斥的药物中的用途。

15. 权利要求 1 的蛋白质,其中所述毒素蛋白为胸苷激酶、内切核酸酶、RNA 酶、 α 毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素、假单胞菌外毒素 A、白喉毒素、皂草素、单根菌素、白树素、美洲商陆抗病毒蛋白、 α 八叠球菌或霍乱毒素。

16. 一种杀死 B 淋巴细胞的体外方法,其包括使所述 B 淋巴细胞接触权利要求 15 的蛋白质。

17. 权利要求 15 的蛋白质在制备用于杀死 B 淋巴细胞的药物中的用途。

18. 权利要求 15 的蛋白质在制备用于治疗需要其的患者中的 B 细胞恶性肿瘤或自身免疫性疾病的药物中的用途。

19. 权利要求 18 的用途,其中所述 B 细胞恶性肿瘤选自：

- (a) 非 Hodgkin' s 淋巴瘤；
- (b) 多发性骨髓瘤；
- (c) 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)；
- (d) 急性淋巴细胞性白血病 (ALL)；
- (e) 浆细胞瘤；和
- (f) Waldenstrom' s 巨球蛋白血症。

20. 权利要求 18 的用途,其中所述自身免疫性疾病选自：

- (a) 类风湿性关节炎；
- (b) 系统性红斑狼疮；
- (c) 多发性硬化；
- (d) 重症肌无力；

- (e) Sjogren' s 综合征 ;
- (f) 1 型糖尿病 ;
- (g) 特发性血小板减少性紫癜 ;
- (h) Gullian-Barre 综合征 ;
- (i) Hashimoto' s 甲状腺炎 ;
- (j) Graves' 病 ;和
- (k) 血管炎。

21. 权利要求 15 蛋白质在制备用于治疗、预防或缓解移植物或移植排斥的药物中的用途。

22. 一种分离的蛋白质,由融合于毒素蛋白的 Neutrokin- α 蛋白组成,其中所述 Neutrokin- α 蛋白由 SEQ ID NO:2 的 134-285 位氨基酸残基的氨基酸序列组成;且其中所述毒素蛋白由选自以下一组的氨基酸序列组成:

- (i) 由全长白树素多肽组成的多肽;
- (ii) 由全长白树素多肽的 47-297 位氨基酸组成的多肽;
- (iii) 由全长白树素多肽的 47-297 位氨基酸组成的多肽,其中 297 位的天冬氨酸变为半胱氨酸。

23. 一种杀死 B 淋巴细胞的体外方法,其包括使所述 B 淋巴细胞接触权利要求 22 的蛋白质。

24. 权利要求 22 的蛋白质在制备用于杀死 B 淋巴细胞的药物中的用途。

25. 权利要求 22 的蛋白质在制备用于治疗需要其的患者中的 B 细胞恶性肿瘤或自身免疫性疾病的药物中的用途。

26. 权利要求 25 的用途,其中所述 B 细胞恶性肿瘤选自:

- (a) 非 Hodgkin' s 淋巴瘤;
- (b) 多发性骨髓瘤;
- (c) 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL);
- (d) 急性淋巴细胞性白血病 (ALL);
- (e) 浆细胞瘤;和
- (f) Waldenstrom' s 巨球蛋白血症。

27. 权利要求 25 的方法,其中所述自身免疫性疾病选自:

- (a) 类风湿性关节炎;
- (b) 系统性红斑狼疮;
- (c) 多发性硬化;
- (d) 重症肌无力;
- (e) Sjogren' s 综合征;
- (f) 1 型糖尿病;
- (g) 特发性血小板减少性紫癜;
- (h) Gullian-Barre 综合征;
- (i) Hashimoto' s 甲状腺炎;
- (j) Graves' 病;和

(k) 血管炎。

28. 权利要求 22 蛋白质在制备用于治疗、预防或缓解移植物或移植排斥的药物中的用途。

Neutrokin- α 和 Neutrokin- α 剪接变体

[0001] 本申请为申请日为 2000 年 2 月 22 日、申请号为 00806541.1 (国际申请号为 PCT/US00/04336)、发明名称为“Neutrokin- α 和 Neutrokin- α 剪接变体”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及一种新的已被称为 Neutrokin- α 的细胞因子。另外,已鉴别了一种 Neutrokin- α 的表观剪接变体,称为 Neutrokin- α SV。在具体的实施方案中,本发明提供了编码 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽的核酸分子。在另外的实施方案中,还提供了 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽,以及载体,宿主细胞,以及生产它们的重组方法。

[0003] 相关技术

[0004] 人肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和 (TNF- β , 或淋巴毒素) 是一大类别的多肽介体的相关成员,该类别包括干扰素,白细胞介素和生长因子,统称为细胞因子 (Beutler, B. 和 Cerami, A. 免疫学分析研究 7 :625-655 (1989))。对细胞因子受体进行序列分析已阐述了一些膜蛋白的亚家族:(1) Ig 超家族,(2) 血细胞生成素 (细胞因子受体超家族),和 (3) 肿瘤坏死因子 (TNF/ 神经生长因子 (NGF) 受体超家族 (参考 TNF 超家族,见于 Gruss 和 Dower, 血液 85 (12) :3378-3404 (1995) 和 Aggarwal 和 Natarajan, Eur. Cytokine Netw. 7 (2) :93-124 (1996))。TNF/NGF 受体超家族含有至少 10 种不同的蛋白质 (Gruss 和 Dower, 如前)。这些受体的配体已经鉴别属于至少二种细胞因子超家族 (Gruss 和 Dower, 如前)。

[0005] 肿瘤坏死因子 (TNF- α 和 TNF- β 的混合物) 最初是由于它们的抗肿瘤活性而发现的,然而现在识别它们是具有多种生物活性的多效细胞因子,包括具有使一些转化的细胞程序性死亡,介导细胞的活化和增殖,且在免疫调节和炎症中也起重要作用。

[0006] 已知的 TNF 配体超家族的成员包括 TNF- α , TNF- β (淋巴毒素- α), LT- β , OX40L, Fas 配体, CD30L, CD27L, CD40L, 和 4-1BBL。TNF 配体超家族的配体是酸性的,在胞外域中具有大约 20% (12% -36% 范围) 序列同源的类 TNF 分子,并主要呈现具有三聚体 / 多多聚体复合物的生物活性形式的膜结合形式。TNF 配体超家族的可溶形式目前只鉴别有 TNF, β -LT, 和 Fas 配体 (参见 Gruss, H 和 Dower, S. k., 血液 85 (12) :3378-3404 (1995), 以它们的全部并入参考。这些蛋白质包含于细胞增殖,活化和分化的调节中,包括通过编程性细胞死亡或细胞毒性控制细胞的存活或死亡 (Armstrong, R. J., Curr. Opin. Immunol. 6 :407 (1994) 和 Smith, C. A., 细胞 75 :959 (1994))。

[0007] 肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 也称为恶液质素;后文称为“TNF”) 最初是通过单核细胞和巨噬细胞对外毒素或其它刺激子应答而分泌的,是一种可溶的 17 KD 蛋白质亚单位的同源三聚体 (Smith, R. A. 等,生物化学杂志 262 :6951-6954 (1987))。也已阐述了一种 TNF 的膜结合的 26 KD 的前体形式 (Kriegler, M. 等,细胞 53 :45-53 (1988))。

[0008] 所累积的研究结果表明 TNF 是一种具有多效生物活性的调节性细胞因子。这些活性包括:抑制脂蛋白脂肪酶合成 (“恶液质素”活性 (Beutler, B. 等,自然 316 :552 (1985)), 激活多形核白细胞 (Klebanoff, S. J. 等,免疫学杂志 136 :4220 (1986); Perussia, B. 等,免疫学杂志 138 :765 (1987)), 抑制细胞生长或刺激细胞生长 (Vilcek, J. 等, J. Exp.

Med. 163 :632(1986) ;Sugarman, B. J. 等, 科学 230 :943(1985) ;Lachman. L. B. 等, 免疫学杂志 138 :2913(1987)), 对某些转化的细胞的细胞毒性作用 (Laehman, L. B. 等, 如前; Darzynkiewicz, Z. 等, 癌症研究 44 :83(1984), 抗病毒活性 (Kohase, M. 等, 细胞 45 :659(1986) ;Wong, G. H. W. 等, 自然 323 :819(1986), 刺激骨再吸收 (Bertolini, D. R. 等, 自然 319 :516(1986) ;Saklatvala, J., 自然 322 :547(1986), 刺激胶原酶和前列腺素 F2 产生 (Dayer, J. -M. 等, J. Exp. Med. 162 :2163(1985) ;和免疫调节活性, 包括激活 T 细胞 (Yokota, S. 等, 免疫学杂志 140 :531(1988), 激活 B 细胞 (Kehrl. J. H. 等, J. Exp. Med. 160 :786(1987)), 激活单核细胞 (Philip, R. 等, 自然 323 :86(1986), 激活胸腺细胞 (Ranges, G. E. 等, J. Exp. Med. 167 :1472(1988)), 及刺激主要组织相容性复合体 (MHC) I 类和 II 类分子在细胞表面表达 (Couins, T. 等, 美国科学院院报 83 :446(1986) ;Pujol-Borrel, R. 等, 自然 326 :304(1987))。

[0009] 注意到 TNF 具有促炎症作用, 导致组织损伤, 如诱导血管内皮细胞上促凝作用 (Poher, J. S. 等, 免疫学杂志 136 :1680(1986), 提高嗜中性白细胞和淋巴细胞的黏附 (Poher, J. S. 等, 免疫学杂志 138 :3319(1987)), 及刺激从巨噬细胞, 嗜中性白细胞和血管内皮细胞中释放血小板激活因子 (Camussi, G. 等, J. Exp. Med. 166 :1390(1987)). 最近的研究结果是关于 TNF 在许多感染 (Cerami. A 等, 现代免疫学 9 :28(1988)), 免疫失调, 致瘤性病理, 如伴随一些恶性肿瘤的恶液质 (Oloff, A 等, 细胞 50 :555(1987)), 及在自身免疫病理学和移植物对宿主病理学 (Piguet, P. F. 等, J. Exp. Med. 166 :1280(1987)) 中的病理作用。TNF 与癌症和感染病理学的关系通常涉及宿主的分解代谢状态。癌症患者的一个主要问题是体重下降, 一般与厌食有关。持续消耗下去的结果导致已知的“恶病质” (Kern, K. A. 等, J. Parent. Enter. Nutr. 12 :286-298(1988)). 恶病质包括进行性体重下降, 厌食, 和恶性肿瘤生长导致持久侵蚀体质。因此恶病质状态与明显的病态相关, 且与多数癌症死亡率相关, 许多研究已推测 TNF 是癌症感染性病理中和其它分解代谢状态中的恶病质的一种重要介体。

[0010] TNF 被认为在革兰氏阴性脓毒和内毒性休克的病理生理结果中起作用 (Michie, H. R. 等, Br. J. Surg. 76 :670-671(1989) ;Debets, J. M. H 等, Second Vienna Shock Forum, P 463-466(1989) ;Simpson, S. Q. 等 Crit. Care. Clin 5 :27-47(1989), 包括发热, 身体不适, 厌食和恶液。内毒素是一种潜在的单核细胞 / 巨噬细胞激活剂, 刺激 TNF (Kornbluth, S. K. 等, 免疫学杂志 137 :2585-2591(1986)) 和其它细胞因子的产生和分泌。由于 TNF 能模拟许多内毒素的生物活性, 被认为是与内毒素相关疾病的临床现象相关的主要介体。TNF 和其它单核细胞衍生的细胞因子介导对内毒素的代谢性和神经激素性应答 (Midhie, H. R. 等, N. Eng. J. Med. 318 :1481-1486(1988))。将内毒素施用于人志愿者, 产生具有类似流行性感冒症状的急性疾病, 这些症状包括发热, 心动过速, 代谢率和应激激素释放增加 (Revhaury, A. 等, Arch. Surg. 123 :162-170(1988))。也已发现在患有革兰氏阴性脓毒的患者体内循环 TNF 水平提高 (Waage, A. 等, Lancet 1 :355-357(1987)) ;Hammerle, A. F 等, Second Vienna Shock Forum p. 715-718(1989) ;Debets, J. M. H. 等 Crit. Core. Med. 17 :489-497(1989) ;Colandra T. 等, J. Infec. Dis. 161 :982-987(1990))。

[0011] 旨在中和 TNF 水平的被动免疫治疗对革兰氏阴性脓毒和内毒血症具有令人满意的作用, 如上述基于在这些病理状态中 TNF 产生增加及 TNF 水平提高。Cerami 等 (EPO 专

利公开 0212 489,1987 年 3 月 4 日)揭示了针对鉴别为恶液质素的“调节剂”(稍后发现与 TNF 相同)的抗体。这种抗体可用于诊断性免疫分析和治疗细菌感染中的休克。Rubrn 等(EPO 专利公开 0218 868,1987 年 4 月 22 日)揭示了人 TNF 的单克隆抗体,分泌这种抗体的杂交瘤,生产这种抗体的方法,及在 TNF 的免疫分析中这种抗体的使用。Yone 等(Epo 专利公开 0288088,1988 年 10 月 26 日)揭示了抗 TNF 抗体包括 mAbs,及它们在病理尤其 Kawasaki's 病理和细胞感染的免疫分析诊断中的作用。具有 Kawasaki's 病理(小儿急性发热性粘膜与皮肤的淋巴结综合征;Kawasaki, T., Auergg 16:178(1967);Kawasaki, T., Shonica(Pediatrics)26:935(1985)的患者体液含有的 TNF 水平提高,这与病理进程相关(Yone 等,如前)。

[0012] 其它研究人员阐述了特异于重组人 TNF 的 mAbs,其在体外具有中和活性(Liang, C-M. 等,生物化学生物生理学研究综述 137:847-854(1986);Medger, A. 等,杂交瘤 6:305-311(1987);Hirai, M. 等,免疫学方法杂志 96:57-62(1987);Mouer, A. 等,细胞因子 2:162-169(1990))。这些 mAbs 中有一些用于对人 TNF 的表位作图及开发酶免疫分析(Fendly 等,如前;Hirai 等,如前;Mouer 等,如前),以及助于纯化重组 TNF(Bringman 等,如前)然而,这些研究不能提供生产在体内有诊断或治疗作用的 TNF 中和抗体的基础,因为免疫原性,缺失特异性和/或药物适应性所致。

[0013] TNF 的中和抗血清或 mAbs 以示出在除了男人之外的哺乳动物中,可消除不利的生理变化及防止在进行内毒血症和菌血症的实验性致死研究之后死亡。此作用已例如在啮齿动物致死性分析及灵长目动物病理模型系统中证实(Mathison, J. C. 等临床研究杂志 81:1925-1937(1988);Beutler, B. 等,科学 229:869-871(1985);Tracey, K. J. 等,自然 330:662-664(1987);Shimamoto, Y. 等,免疫学通信 17:311-318(1988);Silva, A. T. 等,感染性疾病杂志 162:421-427(1990);Opal, S. M. 等,感染性疾病杂志 161:1148-1152(1990);Hinshaw, L. B. 等, Circ. Shock 30:279-292(1990))。

[0014] 应注意在人体内用抗 TNF mAb 进行治疗的试验受到限制,但示出令人满意的治疗结果,例如在治疗关节炎和脓毒中。例如参见 Elliott, M. J. 等, Baillieres Clin. Rheumatol 9:633-52(1995);Feldmann M. 等, Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 766:272-8(1995);Poll, T. 等, 休克 3:1-12(1995);Wheny 等, Crit. Care. Med. 21:s436-40(1993);Tyacey, K. J. 等, Crit. Care. Med. 21:S 415-22(1993)。

[0015] 哺乳动物发育依赖于细胞的增殖和分化,以及通过编程性细胞死亡而发生程序细胞死亡 L. Walker 等, Methods Achiev. Exp. Pathol. 13:18(1988)。细胞程序死亡在识别自身抗原的免疫胸腺细胞的破坏中起关键作用。此正常消除过程失常可引起自身免疫性疾病(Gammon 等,现代免疫学 12:193(1991))。

[0016] Itoh 等(细胞 66:233(1991))阐述了一种细胞表面抗原,是介导细胞程序死亡且包含于 T 细胞克隆缺失中的 Fas/CD95。Fas 在活化的 T 细胞, B 细胞,嗜中性粒细胞中表达,及除了在活化的 T 细胞, B 细胞和嗜中性粒细胞之外在成年鼠的胸腺,肝,心和肺及卵巢中表达。在单克隆 Ab 与 Fas 交联的试验中,细胞程序性死亡是诱导的(Yonehare 等,实验方法杂志 169:1747(1989);Trauth 等,科学 245:301(1989)),另外,有单克隆 Ab 与 Fas 结合在一定条件下刺激 T 细胞这样一个实例(Alderson 等,实验方法杂志 178:2231(1993))。

[0017] Fas 抗原是 45 Kd 的相关 MW 的细胞表面蛋白。人和鼠的 Fas 基因已经由

Watanabe-Fukunaga 等 (免疫学杂志 148 :1274(1992)) 和 Itoh 等 (细胞 66 :233(1991)) 克隆。由这些基因编码的蛋白质均是神经生长因子 / 肿瘤坏死因子受体超家族具有结构同源性的跨膜蛋白, 该超家族包括二种 TNF 受体, 低亲和性神经生长因子受体和 CD40, CD27, CD30 和 OX40。

[0018] 最近已经阐述了 Fas 配体 (Suda 等, 细胞 75 :1169(1993))。氨基酸序列表明 Fas 配体是属于 TNF 家族的 II 型跨膜蛋白。因此, Fas 配体多肽包含 3 个主要结构域: 在氨基末端的短胞内域, 在羧基末端的较长胞外域, 连接这二个结构域的亲水性跨膜域。Fas 配体在脾细胞和胸腺细胞中表达, 与 T 细胞介导的胞毒性相一致。纯化的 Fas 配体具有 40 Kd 的 MW。

[0019] 近年来已证实 Fas/Fas 配体之间的相互作用是在 T 细胞活化之后的细胞程序性死亡所需的 (Ju 等, 自然 373 :444(1995); Brunner 等, 自然 373 :441(1995))。T 细胞的活化诱导细胞表面的二种蛋白质。随后配体和受体之间的相互作用导致细胞程序性死亡。这支持了在正常免疫应答期间由 Fas/Fas 配体之间的相互作用而诱导的细胞程序性死亡这一可能的调节作用。

[0020] 因此, 需要提供参与病理症状中类似于 TNF 的细胞因子。这类新的细胞因子可用于生产结合这些类 TNF 细胞因子的新抗体或其它拮抗剂, 以诊断及治疗与类 TNF 细胞因子相关的疾病。

[0021] 发明概述

[0022] 根据本发明的一个实施方案, 提供了一种新的 Neutrokin- α 多肽的胞外域, 和一种新的 Neutrokin- α SV 多肽的胞外域, 以及其有生物活性的和诊断或治疗用途的片段, 类似物和衍生物。

[0023] 根据本发明的另一实施方案, 提供了编码人 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 的分离的核酸分子, 包括 mRNA, DNA, cDNA, 基因组 DNA, 以及其有生物活性的和诊断或治疗用途的片段和衍生物。

[0024] 本发明提供的分离的核酸分子包含或由一种多核苷酸组成, 该多核苷酸编码结构上与 TNF 和相关的细胞因子相似, 且具有相似生物作用和活性的细胞因子及其表观剪接变体。此细胞因子称为 Neutrokin- α , 且本发明包括的 Neutrokin- α 多肽具有至少一部分图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列, 或具有至少一部分由在 1996 年 10 月 22 日保藏在 ATCC 中, 保藏号为 97768 的 cDNA 克隆 (HNEDU15) 编码的氨基酸序列。通过对保藏的 Neutrokin- α 克隆测序确定的核苷酸序列, 示于图 1A 和 1B (SEQ ID NO :1), 其含有编码 285 个氨基酸残基的完整多肽的开放读框, 该 285 个氨基酸包括 N 末端甲硫氨酸, 大约 46 个氨基酸残基的推导的胞内域, 大约 26 个氨基酸残基的推导的跨膜域, 大约 213 个氨基酸的推导的胞外域, 且推导此完整的蛋白质的分子量大约为 31KDa。如其它 II 型跨膜蛋白一样, 可溶形式的 Neutrokin- α 包括裂解自跨膜域的所有或部分胞外域, 及包含缺失跨膜域的完整 Neutrokin- α 多肽的多肽, 即连于胞内域的胞外域。

[0025] Neutrokin- α 的表观剪接变体称为 Neutrokin- α SV, 且本发明包括的 Neutrokin- α SV 包含或由图 5A 和 5B (SEQ ID NO :19) 所示氨基酸序列的至少一部分, 或由 1998 年 12 月 10 日保藏在 ATCC 中保藏号为 203518 的 cDNA 克隆 HDPMC52 编码的氨基酸序列的至少一部分组成。通过对保藏的 Neutrokin- α SV 克隆进行测序确定的核苷酸序

列示于图 5A 和 5B (SEQ ID NO :18), 其含有一编码 266 个氨基酸的完整多肽的开放读框, 该 266 个氨基酸包括 N 末端甲硫氨酸, 大约 46 个氨基酸的推定的胞内域, 大约 26 个氨基酸的推定的跨膜域, 大约 194 个氨基酸的推定的胞外域, 且推导此完整的蛋白质的分子量大约 29KDa。与其它 II 型跨膜蛋白一样, 可溶形式的 Neutrokin- α SV 包括裂解自跨膜域的所有或一部分胞外域, 和包含缺失跨膜域的完整 Neutrokin- α SV 多肽的多肽, 即连于胞内域的胞外域。

[0026] 因此本发明的一个实施方案提供了一种分离的核酸分子, 其包含或由具有选自以下一组核苷酸序列的多核苷酸组成: (a) 编码全长 Neutrokin- α 多肽的核苷酸序列, 该多肽具有图 1A 和 1B 所示 (SEQ ID NO :2) 的或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (b) 编码 Neutrokin- α 多肽推定的胞外域的核苷酸序列, 该胞外域具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 所示的 73-285 位氨基酸序列, 或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (c) 编码具有 Neutrokin- α 功能活性 (即生物活性) 的 (b) 多肽的片段的核苷酸序列; (d) 编码一种多肽的核苷酸序列, 该多肽包含 Neutrokin- α 胞内域 (推定为图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 的大约 1-46 位连续氨基酸残基), 或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (e) 编码一种多肽的核苷酸序列, 该多肽包含 Neutrokin- α 跨膜域 (推定为图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 的大约 47-72 位连续氨基酸残基), 或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (f) 编码具有胞外域和胞内域但缺失跨膜域的可溶性 Neutrokin- α 多肽的核苷酸序列; 和 (g) 互补于以上 (a), (b), (c), (d), (e) 或 (f) 中任何核苷酸序列的核苷酸序列。

[0027] 本发明的其它实施方案包括分离的核酸分子, 其包含或由多核苷酸组成, 该多核苷酸具有与以上 (a), (b), (c), (d), (e) (f) 或 (g) 中任何核苷酸序列有至少 80%, 85% 或 90% 相同性, 优选至少 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的核苷酸序列, 或者该多核苷酸在严格杂交条件下与以上 (a), (b), (c), (d), (e) (f) 或 (g) 中的多核苷酸杂交。其杂交的多核苷酸在严格条件下不与具有只由 A 残基或只由 T 残基组成的核苷酸序列的多核苷酸杂交。

[0028] 本发明的另一实施方案提供了一种分离的核酸分子, 其包含或由具有选自以下一组核苷酸序列的多核苷酸组成: (a) 编码全长 Neutrokin- α SV 多肽的核苷酸序列, 该多肽具有图 5A 和 5B (SEQ ID NO :19) 所示完整氨基酸序列, 或具有由在 1998 年 12 月 10 日保藏的 ATCC 保藏号 203518 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (b) 编码 Neutrokin- α SV 多肽推定的胞外域的核苷酸序列, 该胞外域具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 所示 73-266 位氨基酸序列或由在 1998 年 12 月 10 日保藏的 ATCC 保藏号 203518 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (c) 编码包含 Neutrokin- α SV 胞内域 (推定为图 5A 和 5B (SEQ ID NO :19) 的大约 1-46 位连续氨基酸残基) 的多肽的多核苷酸序列, 胞内域或由 1998 年 12 月 10 日保藏的 ATCC 保藏号 203518 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (d) 编码包含 Neutrokin- α SV 跨膜域 (推定为图 5A 和 5B (SEQ ID NO :19) 的大约 47-72 位连续氨基酸残基) 的多肽的多核苷酸序列, 跨膜域或由 1998 年 12 月 10 日保藏的 ATCC 保藏号 203518 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (e) 编码可溶性 Neutrokin- α SV 多肽的核苷酸序列, 该多肽具有胞外域和胞内域但无跨膜域; 和 (f) 互补于以上 (a), (b), (c), (d), 或 (e) 中任何核苷酸序列的核苷酸序列。

[0029] 本发明的其它实施方案包括分离的核酸分子, 其包含或由多核苷酸组成, 该多核

核苷酸具有与以上 (a), (b), (c), (d), (e) 或 (f) 中任何核苷酸序列具有至少 80%, 85% 或 90% 相同性, 优选至少 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的核苷酸序列, 或者该多核苷酸在严格杂交条件下与以上 (a), (b), (c), (d), (e) 或 (f) 中的多核苷酸杂交。其杂交的多核苷酸在严格杂交条件下不与具有只由 A 残基或只由 T 残基组成的核苷酸序列的多核苷酸杂交。

[0030] 在一个实施方案中, Neutrokin- α 的表观剪接变体包含或由图 5A 和 5B (SEQ ID NO: 19) 所示序列 Gly142-Leu266 氨基酸的, 或由 1998 年 12 月 10 日保藏在 ATCC 中保藏号为 203518 的 cDNA 克隆 HDPMC52 编码的氨基酸序列的至少一部分组成。

[0031] 在其它实施方案中, 本发明的核酸分子包含或由多核苷酸组成, 该多核苷酸编码具有以上 (a), (b), (c), (d), (e) (f) 或 (g) 中氨基酸序列的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 的携带表位部分的氨基酸序列。本发明的另一核酸实施方案涉及一种分离的核酸分子, 其包含或由多核苷酸组成, 该多核苷酸编码 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列, 所述多肽具有含有至少 1 个但不超过 50 个, 优选不超过 40 个, 更优选不超过 30 个, 最优选不超过 20 个氨基酸添加, 取代和 / 或缺失的氨基酸序列。当然, 尤为优选的是编码 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列的多核苷酸的氨基酸序列含有不超过 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 或 1 或 1-100, 1-50, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 或 1-5 个氨基酸添加, 取代和 / 或缺失, 优选保守取代。

[0032] 本发明还涉及重组载体, 其包括本发明分离的核酸分子, 还涉及含有重组载体的宿主细胞, 以及生产这种载体和宿主细胞的方法, 以及用它们通过重组技术生产 Neutrokin- α 多肽的方法。

[0033] 根据本发明的另一实施方案, 提供了一种通过重组技术生产这种多肽的方法, 包括在促进所述多肽表达的条件下, 培养含有本发明 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 核酸序列的重组原核和 / 或真核宿主细胞, 随后回收所述多肽。

[0034] 本发明还提供了分离的 Neutrokin- α 多肽, 其包含或由选自以下一组的氨基酸序列组成: (a) 具有图 1A 和 1B 所示完整氨基酸序列 (即 SEQ ID NO: 2 的 1-285 位), 或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 质粒编码的全长 Neutrokin- α 多肽的氨基酸序列; (b) 具有 SEQ ID NO: 2 所示完整氨基酸序列除外 N 末端甲硫氨酸 (即 SEQ ID NO: 2 的 2-285 位氨基酸序列) 的全长 Neutrokin- α 多肽的氨基酸序列; (c) 具有 Neutrokin- α 功能活性 (即生物活性) 的 (b) 多肽的片段; (d) Neutrokin- α 多肽推定的胞外域的氨基酸序列, 该胞外域具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 73-285 位氨基酸序列, 或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 克隆编码; (e) 编码 Neutrokin- α 多肽的核苷酸序列, 具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 134-285 位氨基酸序列; (f) Neutrokin- α 多肽胞内域的氨基酸序列 (推定的图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 的大约 1-46 位连续氨基酸), 该胞内域或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 质粒编码; (g) Neutrokin- α 跨膜域氨基酸序列 (推定的图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 中大约 47-72 位连续氨基酸残基), 此跨膜域或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 质粒编码; (h) 具有胞外域和胞内域但无跨膜域的可溶性 Neutrokin- α 多肽的氨基酸序列, 其中所述这些结构域如上所限定; 和 (i), (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) 或 (h) 多肽的片段。本发明的多肽还包括与以上 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 或 (i) 氨基酸序列具有至少 80%, 优选至少 85% 或 90%, 更优

选至少 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的氨基酸序列的多肽, 以及具有与以上氨基酸序列有至少 80%, 85%, 或 90%, 更优选至少 95% 相似性的氨基酸序列的多肽。本发明另外的实施方案涉及一种多肽, 其包含或由具有以上 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 或 (i) 中所述氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的携带表位部分的氨基酸序列组成。本发明的 Neutrokin- α 多肽包括这种多肽的具有至少 4 个, 至少 5 个, 至少 6 个, 至少 7 个, 至少 8 个, 优选至少 9 个, 至少 10 个, 至少 11 个, 至少 12 个, 至少 13 个, 至少 14 个, 至少 15 个, 至少 20 个, 至少 25 个, 至少 30 个, 至少 40 个, 至少 50 个, 更优选至少大约 30-50 个氨基酸的一部分, 当然任何长度的直至包括本发明多肽全部氨基酸序列的携带表位的多肽也包括在本发明内。

[0035] 本发明尤其优选的实施方案涉及核酸分子, 其包含或由一种多核苷酸组成, 该多核苷酸具有的核苷酸序列与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 80%, 85%, 90% 相同性, 优选具有至少 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 或 100% 相同性, Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 134-285 位氨基酸序列。本发明优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子, 该多核苷酸具有的核苷酸序列与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列具有至少 90% 相同性, Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 134-285 位氨基酸序列。本发明更为优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子, 该多核苷酸具有的核苷酸序列与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列具有至少 95% 相同性, Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 134-285 位氨基酸序列。本发明更为优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子, 该多核苷酸具有的核苷酸序列与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列具有至少 96% 相同性, Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 134-285 位氨基酸序列。

[0036] 另外, 本发明更为优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子, 该多核苷酸具有的核苷酸序列与编码具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列具有至少 97% 相同性。另外, 本发明更为优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子, 该多核苷酸具有的核苷酸序列与编码具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列具有至少 98% 相同性。另外, 更为优选的实施方案是涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子, 该多核苷酸具有的核苷酸序列与编码具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列具有至少 99% 相同性。

[0037] 本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的以上多核苷酸序列。由这些多核苷酸和核酸分子编码的多肽也包含在本发明内。

[0038] 本发明进一步提供了分离的 Neutrokin- α SV 多肽, 其包含或由选自以下一组的氨基酸序列组成: (a) 全长 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列, 该多肽具有图 5A 和 5B 所示完整氨基酸序列 (即 SEQ ID NO: 19 的 1-266 位氨基酸), 或由 1998 年 12 月 10 日保藏在 ATCC 中保藏号为 203518 的 cDNA 克隆编码; (b) 全长 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列, 该多肽具有 SEQ ID NO: 19 所示除 N 末端甲硫氨酸之外的完整氨基酸序列 (即 SEQ ID NO: 19 的 2-266 位氨基酸); (c) Neutrokin- α SV 多肽的推定胞外域的氨基酸序列, 该胞外域具有图 5A 和 5B (SEQ ID NO: 19) 所示 73-266 位氨基酸序列, 或由 1998 年 12 月 10 日保

藏在 ATCC 中保藏号为 203518 的 cDNA 克隆编码 ;(d)Neutrokin- α SV 多肽胞内域的氨基酸序列,该胞内域推定是图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 所示大约 1-46 位连续氨基酸残基,或由 1998 年 12 月 10 日保藏在 ATCC No. 203518 的 cDNA 克隆编码 ;(e)Neutrokin- α SV 跨膜域的氨基酸序列,该跨膜域推定是图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 所示大约 47-72 位连续氨基酸残基,或由 1998 年 12 月 10 日保藏在 ATCC No. 203518 的 cDNA 克隆编码 ;(f) 可溶性 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列,该多肽具有胞外域和胞内域但无跨膜域,其中每个结构域如上所限定 ;和 (g) 以上 (a), (b), (c), (d), (e), 或 (f) 多肽的片段。本发明的多肽还包括具有与以上 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 或 (g) 所述序列有至少 80%, 优选至少 85% 或 90%, 更优选至少 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的氨基酸序列的多肽, 以及具有与上述序列有至少 80%, 85% 或 90% 相似性, 优选至少 95% 相似性的氨基酸序列的多肽。本发明另一实施方案涉及一种多肽, 该多肽包含或由 Neutrokin- α SV 多肽的携带表位部分的氨基酸序列组成, 该多肽具有以上 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 或 (g) 中所述氨基酸序列。具有本发明 Neutrokin- α SV 多肽的携带表位部分的氨基酸序列的肽或多肽, 包括这种多肽的具有至少 4 个, 至少 5 个, 至少 6 个, 至少 7 个, 至少 8 个, 优选至少 9 个, 至少 10 个, 至少 11 个, 至少 12 个, 至少 13 个, 至少 14 个, 至少 15 个, 至少 20 个, 至少 25 个, 至少 30 个, 至少 40 个, 至少 50 个, 更优选至少 30-50 个氨基酸的一部分, 当然任何长度的直至包括本发明多肽全部氨基酸序列的携带表位的多肽也包括在本发明内。

[0039] 本发明的一些非限制性的实施方案涉及一种多肽, 其具有 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽的携带表位部分的氨基酸序列, 该 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽具有以上 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 或 (i) 中所述氨基酸序列。在其它实施方案中, 本发明提供了分离的抗体, 其特异性 (即唯一地) 结合具有以上 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 或 (i) 中所述氨基酸序列的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽。

[0040] 本发明还提供了分离抗体的方法, 该抗体特异地 (即唯一地) 结合具有以上所述氨基酸序列的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽。这种抗体如下所述用于诊断或治疗。

[0041] 本发明还提供了药物组合物, 其包含可溶的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽, 尤其人 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽, 和 / 或抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体, 它们可以用于, 例如治疗, 预防, 预后和 / 或诊断肿瘤和肿瘤转移, 细菌感染, 病毒及其它寄生虫感染, 免疫缺陷, 炎症, 淋巴腺疾病, 自身免疫疾病, 移植物对宿主疾病, 刺激外周耐受性, 破坏一些转化的细胞系, 介导细胞活化, 存活和增殖, 以介导免疫调节和炎症应答, 及增强或抑制免疫应答。

[0042] 在一些实施方案中, 施用本发明可溶性的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或其激动剂, 以治疗, 预防, 预后和 / 或诊断免疫缺陷疾病 (例如 X 连锁重度联合免疫缺损 (SCID), 常染色体 SCID, 腺苷脱氨酶缺损 (ADA 缺损), X 连锁血中丙球蛋白过少 (XLA), Bruton's 病, 先天性血中丙球蛋白过少, X 连锁小儿血中丙球蛋白过少, 获得性血中丙球蛋白过少, 成年发作血中丙球蛋白过少, 晚期发作血中丙球蛋白过少, 反常的血中丙球蛋白过少, 血丙球蛋白过少, 小儿暂时性血丙球蛋白过少, 非特异的血中丙球蛋白过少, 血中丙球蛋白过少, 普通可变性免疫缺陷 (CVID) (获得性), Wiskott-Aldrich 综合征 (WAS), X 连锁

高 IgM 免疫缺陷, 非 X 连锁高 IgM 免疫缺陷, 选择性 IgA 缺陷, IgG 亚类缺陷 (有或无 IgA 缺陷), 具有正常或增高水平 IgS 的抗体缺陷, 胸腺瘤免疫缺陷, Ig 重链缺失, K 链缺损, B 细胞淋巴增殖性疾病 (BLPD), 选择性 IgM 免疫缺陷, 隐性血中丙球蛋白过少 (Swiss 型), 网状细胞发育不全, 新生儿嗜中性白细胞减少症, 重度先天性白细胞减少, 胸腺淋巴组织发育不全 - 发育不全或发育异常免疫缺陷, 运动失调性毛细血管扩张, 短肢侏儒, X 连锁淋巴增殖综合征 (XLP), Nezelof 联合 IgS 免疫缺陷综合征, 嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 缺损, MHC II 类缺损 (Bare 淋巴细胞综合征), 和重度联合免疫缺损), 或与免疫缺陷相关的疾病。

[0043] 在一特异的实施方案中, 施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸, 或它们的激动剂, 以治疗, 预防, 预后和 / 或诊断普通可变量免疫缺陷。

[0044] 在一特异的实施方案中, 施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸, 或它们的激动剂, 以治疗, 预防, 预后和 / 或诊断 X 连锁血中丙球蛋白过少症。

[0045] 在另一特异的实施方案中, 施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸, 或它们的激动剂, 以治疗, 预防, 预后和 / 或诊断重度联合免疫缺陷 (SCID)。

[0046] 在另一特异的实施方案中, 施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸, 或它们的激动剂, 以治疗, 预防, 预后和 / 或诊断 Wiskott-Aldrich 综合征。

[0047] 在另一特异的实施方案中, 施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸, 或它们的激动剂, 以治疗, 预防, 预后和 / 或诊断 X 连锁高 IgM 水平的 Ig 缺陷。

[0048] 在另一实施方案中, 施用 Neutrokin- α 拮抗剂和 / 或 Neutrokin- α SV 拮抗剂 (例如抗 Neutrokin- α 抗体), 以治疗, 预防, 预后和 / 或诊断自身免疫疾病 (例如风湿性关节炎, 系统性红斑狼疮, 原发性血小板减少性紫癜, 自身免疫性溶血性贫血, 抗磷脂 (antiphospholipid) 综合征, 皮炎, 过敏性脑脊髓炎, 心肌炎, 复发性多软骨炎, 风湿性心脏病, 肾小球肾炎 (例如 IgA 肾病), 多发性硬化, 神经炎, 眼色素层炎眼病, 紫癜 (如 Henoch-Schoenlein 紫癜), Reiter's 病, Stiff-Man 综合征, 自身免疫性肺炎, 格林巴利综合征, 胰岛素依赖型糖尿病, 和自身免疫性眼炎, 自身免疫性甲状腺疾病, 甲状腺功能减退 (即 Hashimoto's 甲状腺疾病), Goodpasture's 综合征, 天疱疮, 受体自身免疫性如 (a) Grave's 病, (b) Myasthenia Grave, 和 (c) 胰岛素抗性, 自身免疫性溶血性贫血, 自身免疫性血小板性紫癜, 抗胶原抗体 scleroderma, 结缔组织疾病, 多肌炎 / 皮肌炎, 恶性贫血, 原发性 Addison's 病, 不孕症, 肾小球肾炎如原发性肾小球肾炎和 IgA 肾病, 大疱性天疱疮, Sjogren's 综合征, 糖尿病, 和类肾上腺素药物抗性 (包括哮喘或胆囊纤维化的肾上腺素类药物抗性), 慢性活动性肝炎, 原发性胆囊硬化, 其它内分泌腺失调, 白癜风, 脉管炎, MI 后, 心切术综合征, 风疹, 特异性皮炎, 哮喘, 炎症性肌病, 和其它炎症, granulomatous, 退化, 和萎缩) 或与自身免疫疾病相关的疾病。在一特异的优选实施方案中, 用本发明的抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体和 / 或其它拮抗剂治疗, 预防, 预后和 / 或诊断风湿性关节炎。在另一特异的优选实施方案中, 用抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体和 / 或其它的拮抗剂治疗, 预防, 预

后和 / 或诊断系统性红斑狼疮。在另一优选实施方案中,用抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体和 / 或其它拮抗剂治疗,预防,预后和 / 或诊断原发性血小板性紫癜。在另一优选的实施方案中,用本发明的抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体和 / 或其它拮抗剂治疗,预防,预后和 / 或诊断 IgA 肾病。在一优选的实施方案中,用抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体治疗,预防,预后和 / 或诊断与以上疾病和功能失调相关的自身免疫性疾病,和功能失调和 / 或病变。

[0049] 本发明进一步提供了一种组合物,其包含 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸, Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽,和 / 或抗 Neutrokin- α 抗体或抗 Neutrokin- α SV 抗体,施用于体外的细胞,来自体内的细胞,体内的细胞,或多细胞生物体。在优选的实施方案中,本发明的组合物包含 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸,以在宿主机体内表达 Neutrokin- α 多肽和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽,从而治疗疾病。在一更优选的实施方案中,本发明的组合物包含 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸,以在宿主机体内表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽,从而治疗免疫缺陷性疾病或与免疫缺陷相关的疾病。尤为优选的是在病人体内表达以治疗与 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 基因异常内源性活性相关的功能失调,(例如通过增加 B 细胞数或提高 B 细胞寿命而增强异常 B 细胞功能的表达)。

[0050] 本发明还提供了一种筛选方法,以鉴别能增强或抑制由 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 诱导的细胞应答的化合物,该方法包括表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的细胞与侯选的化合物相接触,分析细胞应答,并与标准细胞应答相比较,标准应答是在没有候选化合物的情况下分析的;从而细胞应答高与标准应答表明此化合物是一激动剂,细胞应答低于标准应答表明此化合物是一拮抗剂。

[0051] 在另一实施方案中,提供了一种鉴别 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体的方法,以及用这种受体筛选分析激动剂和拮抗剂的方法。该分析包括确定候选化合物对 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体的影响。特别地,此方法包括将 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体与本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽及候选化合物相接触,并确定由于存在候选化合物, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体的结合是提高还是降低。拮抗剂可用于预防败血症休克,炎症,脑症, HIV 病毒活化,移植物 / 宿主排斥,骨再吸收,风湿性关节炎,恶病质(消耗性或营养不良性),免疫系统功能失调,淋巴瘤,和自身免疫性功能失调(例如风湿性关节炎和系统性红斑狼疮)。

[0052] 本发明人还揭示了 Neutrokin- α 不仅在单核细胞系表达,也在肾,肺,外周血细胞,骨髓, T 细胞淋巴瘤, B 细胞淋巴瘤,活化的 T 细胞,骨癌,平滑肌,巨噬细胞,和脐带血组织中表达。本发明人进一步揭示 Neutrokin- α SV 呈现只在原始树状细胞中高表达。这些组织和细胞的一些失调,如肿瘤和肿瘤转移,细菌,病毒和其它寄生虫感染,免疫缺陷(如慢性可变性免疫缺陷),败血症休克,炎症,脑虐, HIV 病毒活化,移植物 / 宿主排斥,骨再吸收,风湿性关节炎,自身免疫性疾病(如风湿性关节炎,和系统性红斑狼疮),和恶液质(消耗性或营养不良性)。可以确信在取自具有这种失调的个体一些组织(如骨髓)或体液(如血清,血浆,尿,浸液或脑脊液)中可检测到明显较高或较低水平的 Neutrokin- α

和 / 或 Neutrokin- α SV 基因表达,“标准”Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 基因表达水平即是在取自无这种失调的个体的组织或体液中的表达水平。因此,本发明提供了在诊断疾病期间所用的诊断方法,包括 (a) 分析在个体细胞或体液中 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因表达水平;(b) 将此表达水平与标准 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因表达水平相对比,对比结果比标准水平高或低表明疾病的存在。

[0053] 本发明的其它实施方案涉及一种治疗需要提高或保持体内 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性水平的个体的方法,包括对这种个体施用一种组合物,该组合物包含治疗有效量的本发明的分离的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或它们的激动剂。

[0054] 本发明的另一实施方案涉及一种治疗需要降低体内 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性水平的个体的方法,包括对这种个体施用一种组合物,该组合物包含治疗有效量的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 拮抗剂。用于本发明的优选的拮抗剂是 Neutrokin- α 特异性抗体和 / 或 Neutrokin- α SV 特异性抗体。

[0055] 附图简述

[0056] 以下附图举例说明本发明的实施方案,而不限本发权利要求范围。

[0057] 图 1A 和 1B 示出 Neutrokin- α 的核苷酸 (SEQ ID NO :1) 和推导的氨基酸 (SEQ ID NO :2) 序列。1-46 位氨基酸代表推定的胞内域,47-72 位氨基酸代表推定的跨膜域 (下划双线处),73-285 位氨基酸代表推定的胞外域 (其余的序列)。潜在的天冬酰胺连接的糖基化位点在图 1A 和 1B 中用黑体的天冬酰胺符号 (N) 在 Neutrokin- α 氨基酸序列中表示,编码 Neutrokin- α 核苷酸序列中天冬酰胺残基的第一个核苷酸上有黑体的 # 号。潜在的 N 连接的糖基化序列发现在 Neutrokin- α 氨基酸序列的以下位置 :N124-Q127 (N-124, S-125, S-126, Q-127) 和 N242-C245 (N-242, N-243, S-244, C-245)。

[0058] Neutrokin- α , Neutrokin- α SV, TNF- α , TNF- β , LT- β , 和密切相关的 Fas 配体之间高度相同的区域 (图 2 示出这些序列的对比) 在图 1A 和 1B 中下划线。这些区域不是限制性的,在图 1A 和 1B 中标记作保守的结构域 (CD)-I, CD-II, CD-III, CD-IV, CD-V, CD-VI, CD-VII, CD-VIII, CD-IX, CD-X, 和 CD-XI。

[0059] 图 2A 和 2B 示出 Neutrokin- α (SEQ ID NO :2) 和 Neutrokin- α SV (SEQ ID NO :19), 和 TNF- α (图 2A 和 2B 中“TNF- α ”, GenBank No. Z15026 ;SEQ ID NO :3), TNF- β (图 2A 和 2B 中“TNF- β ”, GenBank No. Z15026 ;SEQ ID NO :4), 淋巴毒素- β (图 2A 和 2B 中“LT- β ”, GenBankNo. L11016 ;SEQ ID NO :5), 和 FAS 配体 (图 2A 和 2B 中“FASL”, GenBankNo. U11821 ;SEQ IDNO :6) 的氨基酸序列之间相同的区域,其通过“MegAlign”程序确立,该程序是称作“DAN*STAR”计算机程序的一部分。与共有序列匹配的残基用阴影表示。

[0060] 图 3 示出 Neutrokin- α 氨基酸序列分析。用所述计算机程序的默认参数对 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列进行推定,示出 α 区, β 区,转角区和卷曲区;亲水性和疏水性;两亲区;柔性区;抗原指数和表面概率。在“抗原指数-Jameson-Wolf”图中,指明了 Neutrokin- α 的高抗原性区域的位置,该区即从中可获得本发明携带表位肽的区域。抗原性多肽包括 SEQ ID NO :2 的大约 Phe115 ~ Leu147, Ile150 ~ Tyr163, Ser171 ~ Phe194, Glu223 ~ Tyr246, Ser271 ~ Phe278。

[0061] 图3中的数据也以表形式在表1中示出。列用“残基”，“位置”和罗马数字 I-XIV 标记。列的标记指图3和表1中所示氨基酸序列的以下特征：“残基”指 SEQ ID NO:2 和图 1A 和 1B 的氨基酸残基；“位置”指 SEQ ID NO:2 和图 1A 和 1B 内相应残基的位置；I： α 区 -Garnier-Robson；II： α 区 -Chou-Fasman；IH： β 区 -Garnier-Robson；IV： β 区 -Chou-Fasman；V：转角区 -Garnier-Robson；VI：转角区 -Chou-Fasman；VII：卷曲区 -Garnier-Robson；VIII：亲水性图 -Kyte-Doolittle；IX：疏水性图 -Hopp-Woods；X： α 两亲区 -Eisenberg；XI： β 两亲区 -Eisenberg；XII：柔性区 -Karplus-Schulz；XIII：抗原指数 -Jameson-Wolf；和 XIV：表面概率图 -Emini。

[0062] 图 4A, 4B 和 4C 示出被称为 HSOAD55 (SEQ ID NO:7), HSLAH84 (SEQ ID NO:8) 和 HLTBM08 (SEQ ID NO:9) 的本发明相关的人 cDNA 克隆, 与从保藏在 ATCC No. 97768 的人 cDNA 克隆中确定的 Neutrokin- α 核苷酸序列的序列对比。

[0063] 图 5A 和 5B 示出 Neutrokin- α SV 蛋白的核苷酸序列 (SEQ ID NO:18) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO:19)。1-46 位氨基酸代表推定的胞内域, 47-72 位氨基酸代表推定的跨膜域 (下划双线), 73-266 位氨基酸代表推定的胞外域 (其余部分序列)。潜在的天冬酰胺连接的糖基化位点在图 5A 和 5B 中用黑体的天冬酰胺符号 (N) 在 Neutrokin- α SV 氨基酸序列中标记, 在编码 Neutrokin- α SV 核苷酸序列中天冬酰胺残基的第一个核苷酸之上以黑体 # 号标出。潜在的 N 连接的糖基化序列发现在 Neutrokin- α SV 氨基酸序列中的以下位置: N124 ~ Q127 (N124, S125, S126, Q127), 和 N223 ~ C226 (N223, N224, S225, C226)。抗原性多肽包括 SEQ ID NO:19 氨基酸序列的大约 Pro32 ~ Leu47, Glu116 ~ Ser143, Phe153-Tyr173, Pro218-Tyr227, Ala232-Gln241, Ile244-Ala249, 和 Ser252-Val257。

[0064] Neutrokin- α , Neutrokin- α SV, TNF- α , TNF- β , LT- β , 和密切相关的 Fas 配体之间高度相同性区域 (这些序列的对比示于图 2) 在图 1A 和 1B 中下划线处。(Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 的) 这些保守的区域在图 5A 和 5B 中标记为保守域 (CD)-I, CD-II, CD-III, CD-V, CD-VI, CD-VII, CD-VIII, CD-IX, CD-X, 和 CD-XI。Neutrokin- α SV 不含有图 1A 和 1B 附图说明中所述的 CD-IV 序列。

[0065] Neutrokin- α 多肽序列 (SEQ ID NO:2) 与 APRIL, TNF- α , LT- α 的序列对比示于图 7A。在图 7A 中, 示出 β 折叠区, 其如下述在图 7A 附图说明中描述。

[0066] 图 6 示出 Neutrokin- α SV 氨基酸序列分析, 用所述计算机程序的默认参数推定 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的 α 区, β 区, 转角区和卷曲区; 亲水性和疏水性; 两亲区; 柔性区; 抗原指数和表面概率。Neutrokin- α 蛋白的高抗原性区域的位置在“抗原性指数 -Jameson-Wolf”图中示出, 该区域即是从中可获得本发明携带表位肽的区域。抗原性多肽包括但非限于包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的以下氨基酸的多肽: 约 Pro32-Leu47, 约 Glu116-Ser143, 约 Phe153-Tyr173, 约 Pro218-Tyr227, 约 Ser252-Thr258, 约 Ala232-Gln241, 约 Ile244-Ala249, 约 Ser252-Val257。

[0067] 图 6 所示数据可以类似于表 1 所示数据的表格形式代表。这种代表图 6 所示精确数据的表格可用 DNA*STAR 计算机序列分析程序包的 MegAlign 组分, 设立默认参数而产生。这与用于产生图 3 和图 6 的程序相同。

[0068] 图 7A: Neutrokin- α 的氨基酸序列, 及其推定的配体结合域与 APRIL, TNF- α , LT- α 的配体结合域的序列对比 (具体地, 人 APRIL 多肽 (SEQ ID NO:20; ATCC 保藏号

No. AF046888) 的 115-250 位氨基酸残基, TNF- α (SEQ ID NO :3 ;GenBankNo. Z15026) 的 88-233 位氨基酸残基, 和 LT- α (也称作 TNF- β , SEQ IDNO :4) 的 62-205 位氨基酸残基 ; GenBankNo. Z15026)。示出 Neutrokin- α 的推定的跨膜区, 且 Neutrokin- α 的裂解位点用斜体字表示。下划线的序列 (A-H) 代表推定的 β 折叠区域。

[0069] 图 7B :Neutrokin- α mRNA 表达。用 Neutrokin- α 开放读框作探针, 在得自一系列人组织类型和所选择的癌细胞系的聚 (A)+RNA 印迹 (Clonetech) 上, 进行 Northern 杂交分析。检测到一个 2.6Kb 的 Neutrokin- α mRNA 在胎盘, 心脏, 肺, 胎肝, 胸腺和胰腺中高水平表达。此 2.6Kb 的 Neutrokin- α mRNA 也在 HL-60 和 K562 细胞系中检测到。

[0070] 图 8A 和 8B :在通过 IFN- γ 激活人单核细胞后, Neutrokin- α 的表达提高。图 8A :在体外培养的单核细胞上, Neutrokin- α 蛋白表达的流式细胞计量分析。纯化的细胞在有或无 IFN- γ (100U/ml) 的情况下培养 3 天。然后将细胞用 Neutrokin- α 特异性 mAb (2E5) (实线) 或同种型匹配的对照 (IgG1) (点划线) 染色。用在三个独立的试验中纯化自三个不同供体的单核细胞获得可比结果。图 8B :制备 Neutrokin- α 特异性 TagMan 引物, 并用于确定在未刺激的及 IFN- γ (100U/ml) 处理的单核细胞中, Neutrokin- α mRNA 的相对表达水平。TagMan 引物的核苷酸序列如下 : (a) 探针 :5' -CCA CCA GCT CCA GGA GAA GGC AAC TC-3' (SEQ ID NO :24) ; (b) 5' 扩增引物 :5' -ACC GCG GGA CTG AAA ATC T-3' (SEQ ID NO :25) ; 和 (c) 3' 扩增引物 :5' -CAC GCT TAT TTC TGC TGTCT GA-3' (SEQ ID NO :26)。

[0071] 图 9A 和 9B :Neutrokin- α 是一种潜在的 B 淋巴细胞刺激剂。图 9A :在标准 B 淋巴细胞联合刺激分析中, 利用金黄色葡萄球菌 cowan 1 (SAC) 作引导剂, 确定 Neutrokin- α 的生物活性。单用 SAC 产生 1427 ± 316 的背景计数。所报道的数值是在三份孔中所得结果的平均值 $\pm$ 偏差。用纯化自稳定的 CHO 转染体和瞬时转染的 HEK293T 细胞的重组 Neutrokin- α 获得相似结果。图 9B :用 Neutrokin- α 和其与抗 IgM 联合刺激扁桃体 B 细胞的增殖。如用 SAC 进行分析所述进行生物分析, 除了各个孔用山羊抗人 IgM 抗体预先包被, 抗体浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ PBS。

[0072] 图 10A 和 10B :Neutrokin- α 受体在正常人外周血单核细胞和肿瘤细胞系中的表达。图 10A :人外周血成核细胞得自正常志愿者, 并通过密度梯度离心分离。细胞用生物素酰化的 Neutrokin- α 染色, 随后用 PE 缀合的链亲和素和 FITC 或 PerCP 偶联的特异于 CD3, CD20, CD14, CD56 和 CD66b 的 mAbs 染色。在 Becton Dickinson FACScan 上用 CellQuest 软件分析细胞。数据代表 4 个独立试验之一。图 10B :Neutrokin- α 与组织细胞细胞系 U-937 和骨髓瘤细胞系 IM-9 的结合。

[0073] 图 11A, 11B, 和 11C :在 BALB/cAn NCR 小鼠体内施用 Neutrokin- α 的体内效应。图 11A :将福尔马林固定的脾用石蜡包埋, 并将 5 微米的切片用苏木精和伊红染色 (上面一组)。下面一组是取自相同动物的切片, 该动物用抗 CD45R (B220) mAb 染色, 并用辣根过氧化物酶偶联的兔抗鼠 Ig (小鼠吸附的) 和底物四盐酸二氨基联苯胺 (DAB) 显色。玻片用 Mayer' s 苏木精负染。CD45R (B220) 表达细胞呈褐色。图 11B :用 PE-CD45R (B220) 和 FITC-ThB (LybD) 染色的正常 (左侧一组) 和 Neutrokin- α 处理的 (右侧一组) 的流式细胞计量分析。图 11C :在正常和 Neutrokin- α 处理的小鼠中血清 IgM, IgG 和 IgA 的水平。

[0074] 详细描述

[0075] 本发明提供了分离的核酸分子, 其包含编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸, 该

多肽具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列,此序列是通过 cDNA 克隆测序而确定的。图 1A 和 1B 所示的核苷酸序列 (SEQ ID NO :1) 是通过 HNEU15 克隆测序而得的,该克隆在 1996 年 10 月 22 日保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC),保藏号 ATCC No. 97768, ATCC 位于弗吉尼亚州马纳萨斯市大学道 20110-2209,邮编 10801。保藏的克隆包含于 pBluescriptSK(-) 质粒 (Stratagene, La Jolla, CA) 中。

[0076] 本发明还提供了分离的核酸分子,其包含编码 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸,该多肽具有图 5A 和 5B (SEQ ID NO :19) 所示氨基酸序列,此序列是通过 cDNA 克隆测序而确定的。图 5A 和 5B 所示的核苷酸序列 (SEQ ID NO :18) 是通过 HDPMC52 克隆测序而得的,该克隆在 1998 年 12 月 10 日保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC),保藏号 ATCC No. 203518。保藏的克隆包含于 pBluescript SK(-) 质粒 (Stratagene, La Jolla, CA) 中。

[0077] 本发明的 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽与 TNF- α , TNF- β , LT- β , Fas 配体, APRIL 和 LT- α 的人 mRNAs 的翻译产物呈序列同源 (见图 2A, 2B 和 7A)。如上所示, TNF- α 被认为是在细胞毒性,坏死,细胞程序性死亡,共同刺激,增殖,淋巴管形成,免疫球蛋白类别转换,分化,抗病毒活性,和调节粘着分子及其它细胞因子和生长因子中起作用的一个重要细胞因子。

[0078] 核酸分子

[0079] 除非特别指出,所有通过对本文中 DNA 分子测序而确定的核苷酸序列是用自动 DNA 测序仪 (如 Model 373 型, Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA) 确定的,且由本文确定的 DNA 分子编码的多肽的所有氨基酸序列是通过翻译以上确定的 DNA 序列而推定的。因此,本领域已知如同通过这种自动方法确定的任何 DNA 序列一样,在此确定的任何核苷酸序列可存在一些误差。自动方法确定的核苷酸序列典型地与测序的 DNA 分子的真实核苷酸序列有至少大约 90%,更典型地有至少大约 95%~99.9% 的相同性。真实序列可更精确地通过其它方法确定,包括本领域熟知的人工 DNA 测序法。本领域也已知,与真正序列相比,确定的核苷酸序列中一个单一的插入或缺失,将导致在核苷酸翻译中移码,由此从这种插入或缺失的那一点开始,由确定的核苷酸序列编码的推定的氨基酸序列将完全不同于由测序的 DNA 分子编码的真实氨基酸序列。

[0080] 核酸分子或多核苷酸的“核苷酸序列”,就 DNA 分子或多核苷酸而言是脱氧核糖核苷酸序列,就 RNA 分子或多核苷酸而言是相应的核糖核苷酸序列 (A, G, C 和 U),其中特异的脱氧核糖核苷酸序列中的每个胸苷 (T) 脱氧核糖核苷酸由核糖核苷酸尿苷 (U) 置换。

[0081] 利用本文所提供的信息,如图 1A 和 1B 中的核苷酸序列,编码 Neutrokin- α 多肽的本发明的核酸分子可用标准克隆和筛选方法获得,如用 mRNA 作起始物克隆 cDNA 的方法。如本发明所示,图 1A 和 1B 所述核酸分子 (SEQ ID NO :1) 是在衍生自嗜中性粒细胞的 cDNA 文库中发现的。相应于 Neutrokin- α cDNA 一部分的表达序列标记也发现在肾,肺,外周血白细胞,骨髓, T 细胞淋巴瘤, B 细胞淋巴瘤,活化的 T 细胞,胃癌,平滑肌,巨噬细胞,和脐带血组织中。另外,用图 5A 和 5B 中提供的核苷酸信息,编码 Neutrokin- α SV 多肽的本发明的核酸分子可用标准克隆和筛选方法获得,如用 mRNA 作起始物克隆 cDNA 的方法。如本发明所示,图 5A 和 5B 所示核酸分子 (SEQ ID NO :18) 是在衍生自原始树状细胞的 cDNA 文库中发现的。

[0082] ATCC 保藏号 97768 的 Neutrokin- α 质粒 HNEU15 含有一个编码有大约 285 个

氨基酸残基的蛋白质的开放读框,一个大约 46 个氨基酸的推定的胞内域(图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)的大约 1-46 位氨基酸残基),一个大约 26 个氨基酸的推定的跨膜域(图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中大约 47-72 位下划线的氨基酸残基),一个大约 213 个氨基酸的推定的胞外域(图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中大约 73-285 位氨基酸);推导的分子量为大约 31KDa。图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中所示 Neutrokin- α 多肽与人 TNF- α 有大约 20%相似性和大约 10%相同性,TNF- α 在 GenBank 中登记号为 No. 339764。

[0083] ATCC 保藏号 203518 的 Neutrokin- α SV 质粒 HDPMC52 含有一个编码大约有 266 个氨基酸残基的蛋白质的开放读框,一个大约 46 个氨基酸的推定的胞内域(图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19)中大约 1-46 位氨基酸残基),一个大约 26 个氨基酸的推定的跨膜域(图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19)中大约 47-72 位下划线的氨基酸残基),一个大约 194 个氨基酸的推定的胞外域(图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19)中大约 73-266 位氨基酸残基);推导的分子量为大约 29KDa。

[0084] 图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19)所示 Neutrokin- α SV 多肽与在 GenBank 中登记号为 339764 的人 TNF- α 有大约 33.9%相似性和大约 22.0%相同性。

[0085] 熟练技术人员知道,由于如上所述测序可能存在误差,分别包含大约 285 和 266 个氨基酸的,由保藏的 cDNA 编码的真实完整的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽有时可稍短。特别地,确定的 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 编码序列含有一个普通的第二个甲硫氨酸密码子,其可作为开放读框翻译的起始密码子,该密码子位于图 1A 和 1B(SEQ ID NO:18)所示 64-66 位核苷酸。更一般地,真正开放读框可在推定自图 1A 和 1B(SEQ ID NO:1)和图 5A 和 5B(SEQ ID NO:18)所示 N 末端第一个或第二个甲硫氨酸密码子的 ± 20 个氨基酸,尤其 ± 10 个氨基酸的范围内的任何位置。应进一步意识到,本文所述多肽结构域是由计算机分析确定,因此,根据用于鉴别各种结构域的分析标准,Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽的胞外域,胞内域和跨膜域的准确位置可以有所不同。例如,图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)和图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19)中 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 胞外域的准确位置根据所用限定结构域的标准可有轻微变化(例如,位置可以“移动”大约 1-20 个残基,尤其大约 1-5 个残基)。在这种情况下,跨膜域的终端和胞外域的起点在鉴别以上所示位置中疏水氨基酸序列的基础上加以推定,如图 3 和 6 及表 1 所示。如下所述,本发明进一步提供了具有各种缺失自完整多肽 N 末端和 / 或 C 末端的各种残基的多肽,包括缺失一或多个本文所述胞外域 N 末端氨基酸的多肽,其构成可溶形式的 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽的胞外域。

[0086] 本发明的核酸分子和多核苷酸可以是 RNA 形式,如 mRNA,或 DNA 形式,包括通过克隆或合成产生而获得的 cDNA 和基因组 DNA。此 DNA 可以是双链或单链的。单链 DNA 或 RNA 可以是编码链,也称为有义链,或可以是非编码链,也称作反义链。

[0087] “分离”的核酸分子是指从其天然环境中分离出的核酸分子(DNA 或 RNA)。例如,本发明载体中包含的重组 DNA 分子被认为是分离的。分离的 DNA 分子另外例如包括保持在异源宿主细胞中的重组 DNA 分子,或溶液中纯化(部分或基本纯化的)DNA 分子。分离的 RNA 分子包括本发明 DNA 分子的体内或体外 RNA 转录物。然而,包含在克隆中的核酸,或分离或移自细胞或细胞裂解物的染色体(如核型“染色体涂片”)在本发明中不是分离的,所述克隆是未与文库中其它成员(如含有此克隆及其它文库成员的同源溶液形式)分离的文

库（如基因组或 cDNA 文库）成员。如本发明进一步所述，根据本发明的分离的核酸分子可以是天然，重组或合成产生的。

[0088] 本发明分离的核酸分子包括 DNA 分子，此 DNA 分子包含或由具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO :1) 所示核苷酸序列的 147-149 位的起始密码子的开放读框 (ORF) 组成。另外，本发明分离的核酸分子包括的 DNA 分子包含或由基本不同于以上所述序列，但由于遗传密码的简并性，仍编码 Neutrokin- α 蛋白的序列组成。当然，遗传密码是本领域熟知的。因此，本领域技术人员可常规产生上述简并的变体。在另一实施方案中，本发明提供的分离的核酸分子包含或由编码 Neutrokin- α 多肽的序列组成，Neutrokin- α 多肽具有由 ATCC 保藏号 97768 的质粒中包含的 cDNA 编码的氨基酸序列。优选地，此核酸分子包含或由编码多肽的胞外域或多肽的成熟或可溶多肽序列组成，该多肽由 ATCC 保藏号 97768 的质粒中的 cDNA 编码。

[0089] 本发明的分离的核酸分子还包括这样的 DNA 分子，其包含具有图 5A 和 5B (SEQ ID NO :18) 所示核苷酸序列的 1-3 位的起始密码子的开放读框 (ORF)。另外，本发明分离的核酸分子包括的 DNA 分子包含或由基本不同于以上所述序列，但由于遗传密码的简并性，仍编码 Neutrokin- α SV 多肽的序列组成。当然，遗传密码是本领域熟知的。因此，本领域技术人员可常规生产上述简并变体。在另一实施方案中，本发明提供的分离的核酸分子包含或由编码 Neutrokin- α SV 多肽的序列组成，Neutrokin- α SV 多肽具有由 ATCC 保藏号 203518 的质粒中包含的 cDNA 编码的氨基酸。优选地，此核酸分子包含或由编码多肽胞外域或成熟可溶多肽序列的序列组成，该多肽由 ATCC 保藏号 203518 的质粒中包含的 cDNA 编码。

[0090] 本发明进一步提供的核酸分子包含或由图 1A 和 1B (SEQ ID NO :1) 所示核苷酸序列，或包含于 ATCC No. 97768 的质粒中的 Neutrokin- α cDNA 的核苷酸序列，或具有互补于以上序列之一的序列的核苷酸序列组成。另外，本发明提供的分离的核酸分子包含或由图 5A 和 5B (SEQ ID NO :18) 所示核苷酸序列，或包含于 ATCC No. 203518 的质粒中的 Neutrokin- α SV cDNA 的核苷酸序列，或具有互补于以上序列之一的序列的核苷酸序列组成。这种分离的分子尤其 DNA 分子，具有包括但非限于作为通过与染色体原位杂交进行基因作图的探针，及例如通过 Northern 或 Western 印迹分析，检测人组织中 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 的表达等作用。

[0091] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO :22 所示序列组成。SEQ ID NO :22 所示序列从得自 GenBank 的一些重叠小鼠 EST 序列 (AI 182472, AA 422749, AA 25047 和 AI 122485) 构建。对 EST 序列进行对比产生 SEQ ID NO :22 所示类 Neutrokin- α 多核苷酸序列。得自 SEQ ID NO :22 翻译的氨基酸序列如 SEQ ID NO :23 所示。SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 所示序列的片段，变体和衍生物也涵盖在本发明内。

[0092] 在另一实施方案中，本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO :27 所示序列，和 / 或编码 SEQ ID NO :28 所示氨基酸序列的序列，其片段，变体和衍生物组成。这些多核苷酸也涵盖在本发明内。例如，本发明的一些实施方案涉及的多核苷酸包含或由编码一多肽序列的序列组成，此多肽序列与 SEQ ID NO :28 的 68-219 位氨基酸有至少 80%，85%，90%，92%，95%，96%，97%，98% 或 99% 相同性。得自 SEQ ID NO :27 翻译的氨基酸序列如 SEQ ID NO :28 所示。包含或由 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列组成的多肽和 SEQ ID NO :28 所示

序列的片段,变体和衍生物也包涵在本发明内。例如,本发明的一些实施方案涉及的多肽包含或由与 SEQ ID NO:28 的 68-219 位氨基酸具有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的多肽序列组成。具有 SEQ ID NO:27 所示序列的核酸分子是通过 RT-PCR 经二种简并引物从 cyanomologous 猴 (即 *Macaca irus*) PBMC 中获得。简而言之,总 RNA 通过用 Trizol (购自 Life Technologies, Inc, Rockville, MD) 根据生产商的指导制备自 cyanomologous 猴 PBMC。然后,用寡 -dT 引物从 cyanomologous 猴 PBMC 制备物中用标准方法合成单链的 cDNA。Neutrokin- α 特异性引物基于鼠和人 Neutrokin- α 分子 (分别为 SEQ ID NO:22 和 1) 之间的保守区域进行设计。然后通过 PCR 用 cDNA 模板组合以下两种简并的寡核苷酸引物产生 cyanomologous 猴 Neutrokin- α 核酸分子。5' 引物:5' -TAC CAG ITG GCI GCC ITG CAA G-3' (SEQ ID NO:35) 和 3' 引物:5' -GTI ACA GCA GTT TIA IIG CAC C-3' (SEQ ID NO:36)。在简并的引物序列中 (SEQ ID NO:35 和 36),“I” 代表脱氧肌苷或二脱氧肌苷。

[0093] 在另一实施方案中,本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO:29 所示序列,和 / 或编码 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列的序列,其片段,变体和衍生物组成。这些多核苷酸也涵盖在本发明范围内。例如,本发明的一些实施方案涉及的多核苷酸包含或由编码与 SEQ ID NO:30 所示序列 68-219 氨基酸有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的多肽序列的序列组成。得自 SEQ ID NO:29 翻译的氨基酸序列如 SEQ ID NO:30 所示。包含或由 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列,和 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 所示序列的片段,变体和衍生物也涵盖在本发明内。例如,本发明的一些实施方案涉及的多肽包含或由与 SEQ ID NO:30 的 68-219 位氨基酸有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的多肽序列。具有 SEQ ID NO:29 所示序列的核酸分子是通过 RT-PCR,用两种简并引物从猕猴 PBMC 中获得的。简而言之,总 RNA 通过用 Trizol (购自 Life Technologies, Inc, Rockville, MD), 根据生产商的指导,从猕猴 PBMC 中制备。然后,用寡 dT 引物从猕猴 PBMC 制备物中,用标准方法合成单链 cDNA。Neutrokin- α 特异性引物是基于鼠和人 Neutrokin- α 分子 (分别为 SEQ ID NO:22 和 1) 之间的保守区域进行设计。然后,猕猴 Neutrokin- α 核酸分子是通过 PCR,用 cDNA 模板组合以下两种简并的寡核苷酸引物产生。5' 引物:5' -TAC CAG ITG GCI GCC ITG CAA G-3' (SEQ ID NO:35) 和 3' 引物:5' -GTI ACA GCA GTT TIA IIG CAC C-3' (SEQ ID NO:36)。在简并的引物的序列中 (SEQ ID NO:35 和 36),“I” 代表脱氧肌苷或二脱氧肌苷。

[0094] 本发明还提供了一种核酸分子,其具有与 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:18 的延伸部分相关的核苷酸序列,所述核苷酸序列已从以下相关的 cDNA 克隆中确定:HSOAD 55 (SEQ ID NO:7), HSLAH84 (SEQ ID NO:8), 和 HLTBM08 (SEQ ID NO:9)。

[0095] 本发明进一步涉及编码本文所述核苷酸序列一部分的核酸分子,以及该分离的核酸分子的片段。在一实施方案中,本发明提供了具有代表 SEQ ID NO:1 的一部分的核苷酸序列的多核苷酸,该部分由 SEQ ID NO:1 的 1-1001 位核苷酸组成。在另一实施方案中,本发明提供了具有代表 SEQ ID NO:18 的一部分的核苷酸序列的多核苷酸,该部分由 SEQ ID NO:18 的 1-798 位核苷酸组成。

[0096] 本发明进一步涉及本文所述核酸分子 (即多核苷酸) 的片段。具有例如以下核苷酸序列的核酸分子片段是指长度为至少 15 个,优选至少 20 或 25 个,更优选至少 30 个,最

优选至少 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 325, 350, 375, 400, 450, 或 500 个核苷酸, 所述核苷酸序列例如是: ATCC 保藏号 97768 的质粒中包含的 cDNA 的核苷酸序列, 编码由 ATCC 保藏号 97768 的质粒中包含的 cDNA 编码的多肽序列的核苷酸序列, SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列, 编码 SEQ ID NO: 2 的多肽序列的核苷酸序列, ATCC 保藏号 203518 的质粒中包含的 cDNA 的核苷酸序列, SEQ ID NO: 18 的核苷酸序列, 编码 SEQ ID NO: 20 多肽序列的核苷酸序列, 或它们的互补链。这些片段有许多用途, 包括但非限于如本文所述的诊断探针和引物。当然, 较大的片段如长度为 501-1500 个核苷酸的片段根据本发明也是有用的, 该片段相当于大多数 (如果不是全部) 以下核苷酸序列: ATCC 保藏号 97768 的质粒中包含的 cDNA 的核苷酸序列, SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列, ATCC 保藏号 203518 的质粒中包含的 cDNA 的核苷酸序列, 和 SEQ ID NO: 18 的核苷酸序列。本发明优选的核酸片段包括编码一种多肽的核酸分子, 该多肽包含或由图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 2) 和图 5A 和 5B (SEQ ID NO: 19) 中分别示出的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的携带表位部分组成, 并见以下详述。由这些多核苷酸片段编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0097] 具有例如以下核苷酸序列的核酸分子片段是指长度至少为 15 个, 优选至少 20 或 25 个, 更优选至少 30 个, 最优选至少 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 325, 350, 375, 400, 450 或 500 个核苷酸, 所述核苷酸序列例如是: SEQ ID NO: 21 的核苷酸序列, SEQ ID NO: 22 的核苷酸序列, SEQ ID NO: 27 的核苷酸序列, SEQ ID NO: 29 的核苷酸序列, 编码 SEQ ID NO: 23 的多肽序列的核苷酸序列, 编码 SEQ ID NO: 28 的多肽序列的核苷酸序列, 编码 SEQ ID NO: 30 的多肽序列的核苷酸序列或它们的互补链。这些片段有许多用途, 包括但非限于如本文所述用作诊断探针和引物。当然, 较大的片段如长度为 501-1500 个核苷酸的片段根据本发明也是有用的, 此片段相当于以下大多数 (如果不是全部) 核苷酸序列: SEQ ID NO: 21 的核苷酸序列, SEQ ID NO: 22 的核苷酸序列, SEQ ID NO: 27 的核苷酸序列, SEQ ID NO: 29 的核苷酸序列, 编码 SEQ ID NO: 23 的多肽序列的核苷酸序列, 编码 SEQ ID NO: 28 的多肽序列的核苷酸序列, 编码 SEQ ID NO: 30 的多肽序列的核苷酸序列, 或它们的互补链。由这些多核苷酸片段编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0098] 本发明的 Neutrokin- α 多核苷酸片段的代表性片段例如包括: 包含或由 SEQ ID NO: 1 的或其互补链或 ATCC 保藏号 97768 的 cDNA 的大约 1-50, 51-100, 101-146, 147-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 600-650, 651-700, 701-750, 751-800, 800-850, 851-900, 901-950, 951-1000, 1001-1050 和 / 或 1051-1082 位核苷酸序列组成的片段。文中“大约”包括特别指出的范围, 以及在任一端或两端比此范围稍多或稍少几个 (5, 4, 3, 2, 或 1 个) 核苷酸的范围。

[0099] 本发明的 Neutrokin- α SV 多核苷酸片段的代表性片段例如包括: 包含或由 SEQ ID NO: 18 的或其互补链, 或 ATCC 保藏号 203518 的 cDNA 的大约 1-50, 51-100, 101-146, 147-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 601-650, 651-700, 701-750, 751-800, 801-850, 和 / 或 851-900 位核苷酸序列组成。文中“大约”包括特指的范围, 以及在任一端或两端比此范围稍多或稍少几个 (5, 4, 3, 2, 或 1 个) 核苷酸的范围。

[0100] 在某些优选的实施方案中, 本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO: 1 的 571-627, 580-627, 590-627, 600-627, 610-627, 571-620, 580-620, 590-620, 600-620, 571-610,

580-610, 590-610, 571-600, 580-600 和 / 或 571-590 位核苷酸残基组成。

[0101] 在某些其它优选的实施方案中, 本发明的多核苷酸包含或由 SEQID NO:18 的以下核苷酸残基组成: 1-879, 25-879, 50-879, 75-879, 100-879, 125-879, 150-879, 175-879, 200-879, 225-879, 250-879, 275-879, 300-879, 325-879, 350-879, 375-879, 400-879, 425-879, 450-879, 475-879, 500-879, 525-879, 550-879, 575-879, 600-879, 625-879, 650-879, 675-879, 700-879, 725-879, 750-879, 775-879, 800-879, 825-879, 850-879, 1-850, 25-850, 50-850, 75-850, 100-850, 125-850, 150-850, 175-850, 200-850, 225-850, 250-850, 275-850, 300-850, 325-850, 350-850, 375-850, 400-850, 425-850, 450-850, 475-850, 500-850, 525-850, 550-850, 575-850, 600-850, 625-850, 650-850, 675-850, 700-850, 725-850, 750-850, 775-850, 800-850, 825-850, 1-825, 25-825, 50-825, 75-825, 100-825, 125-825, 150-825, 175-825, 200-825, 225-825, 250-825, 275-825, 300-825, 325-825, 350-825, 375-825, 400-825, 425-825, 450-825, 475-825, 00-825, 525-825, 550-825, 575-825, 600-825, 625-825, 650-825, 675-825, 700-825, 725-825, 750-825, 775-825, 800-825, 1-800, 25-800, 50-800, 75-800, 100-800, 125-800, 150-800, 175-800, 200-800, 225-800, 250-800, 275-800, 300-800, 325-800, 350-800, 375-800, 400-800, 425-800, 450-800, 475-800, 500-800, 525-800, 550-800, 575-800, 600-800, 625-800, 650-800, 675-800, 700-800, 725-800, 750-800, 775-800, 1-775, 25-775, 50-775, 75-775, 100-775, 125-775, 150-775, 175-775, 200-775, 225-775, 250-775, 275-775, 300-775, 325-775, 350-775, 375-775, 400-775, 425-775, 450-775, 475-775, 500-775, 525-775, 550-775, 575-775, 600-775, 625-775, 650-775, 675-775, 700-775, 725-775, 750-775, 1-750, 25-750, 50-750, 75-750, 100-750, 125-750, 150-750, 175-750, 200-750, 225-750, 250-750, 275-750, 300-750, 325-750, 350-750, 375-750, 400-750, 425-750, 450-750, 475-750, 500-750, 525-750, 550-750, 575-750, 600-750, 625-750, 650-750, 675-750, 700-750, 725-750, 1-725, 25-725, 50-725, 75-725, 100-725, 125-725, 150-725, 175-725, 200-725, 225-725, 250-725, 275-725, 300-725, 325-725, 350-725, 375-725, 400-725, 425-725, 450-725, 475-725, 500-725, 525-725, 550-725, 575-725, 600-725, 625-725, 650-725, 675-725, 700-725, 1-700, 25-700, 50-700, 75-700, 100-700, 125-700, 150-700, 175-700, 200-700, 225-700, 250-700, 275-700, 300-700, 325-700, 350-700, 375-700, 400-700, 425-700, 450-700, 475-700, 500-700, 525-700, 550-700, 575-700, 600-700, 625-700, 650-700, 675-700, 1-675, 25-675, 50-675, 75-675, 100-675, 125-675, 150-675, 175-675, 200-675, 225-675, 250-675, 275-675, 300-675, 325-675, 350-675, 375-675, 400-675, 425-675, 450-675, 475-675, 500-675, 525-675, 550-675, 575-675, 600-675, 625-675, 650-675, 1-650, 25-650, 50-650, 75-650, 100-650, 125-650, 150-650, 175-650, 200-650, 225-650, 250-650, 275-650, 300-650, 325-650, 350-650, 375-650, 400-650, 425-650, 450-650, 475-650, 500-650, 525-650, 550-650, 575-650, 600-650, 625-650, 1-625, 25-625, 50-625, 75-625, 100-625, 125-625, 150-625, 175-625, 200-625, 225-625, 250-625, 275-625, 300-625, 325-625, 350-625, 375-625, 400-625, 425-625, 450-625, 475-625, 500-625, 525-625, 550-625, 575-625, 600-625, 1-600, 25-600, 50-600, 75-600, 100-600, 125-600, 150-600, 175-600, 200-600, 225-600, 250-600, 275-600, 300-600,

325-600, 350-600, 375-600, 400-600, 425-600, 450-600, 475-600, 500-600, 525-600, 550-600, 575-600, 1-575, 25-575, 50-575, 75-575, 100-575, 125-575, 150-575, 175-575, 200-575, 225-575, 250-575, 275-575, 300-575, 325-575, 350-575, 375-575, 400-575, 425-575, 450-575, 475-575, 500-575, 525-575, 550-575, 1-550, 25-550, 50-550, 75-550, 100-550, 125-550, 150-550, 175-550, 200-550, 225-550, 250-550, 275-550, 300-550, 325-550, 350-550, 375-550, 400-550, 425-550, 450-550, 475-550, 500-550, 525-550, 1-525, 25-525, 50-525, 75-525, 100-525, 125-525, 150-525, 175-525, 200-525, 225-525, 250-525, 275-525, 300-525, 325-525, 350-525, 375-525, 400-525, 425-525, 450-525, 475-525, 500-525, 1-500, 25-500, 50-500, 75-500, 100-500, 125-500, 150-500, 175-500, 200-500, 225-500, 250-500, 275-500, 300-500, 325-500, 350-500, 375-500, 400-500, 425-500, 450-500, 475-500, 1-475, 25-475, 50-475, 75-475, 100-475, 125-475, 150-475, 175-475, 200-475, 225-475, 250-475, 275-475, 300-475, 325-475, 350-475, 375-475, 400-475, 425-475, 450-475, 1-450, 25-450, 50-450, 75-450, 100-450, 125-450, 150-450, 175-450, 200-450, 225-450, 250-450, 275-450, 300-450, 325-450, 350-450, 375-450, 400-450, 425-450, 1-425, 25-425, 50-425, 75-425, 100-425, 125-425, 150-425, 175-425, 200-425, 225-425, 250-425, 275-425, 300-425, 325-425, 350-425, 375-425, 400-425, 1-400, 25-400, 50-400, 75-400, 100-400, 125-400, 150-400, 175-400, 200-400, 225-400, 250-400, 275-400, 300-400, 325-400, 350-400, 375-400, 1-375, 25-375, 50-375, 75-375, 100-375, 125-375, 150-375, 175-375, 200-375, 225-375, 250-375, 275-375, 300-375, 325-375, 350-375, 1-350, 25-350, 50-350, 75-350, 100-350, 125-350, 150-350, 175-350, 200-350, 225-350, 250-350, 275-350, 300-350, 325-350, 1-325, 25-325, 50-325, 75-325, 100-325, 125-325, 150-325, 175-325, 200-325, 225-325, 250-325, 275-325, 300-325, 1-300, 25-300, 50-300, 75-300, 100-300, 125-300, 150-300, 175-300, 200-300, 225-300, 250-300, 275-300, 1-275, 25-275, 50-275, 75-275, 100-275, 125-275, 150-275, 175-275, 200-275, 225-275, 250-275, 1-250, 25-250, 50-250, 75-250, 100-250, 125-250, 150-250, 175-250, 200-250, 225-250, 1-225, 25-225, 50-225, 75-225, 100-225, 125-225, 150-225, 175-225, 200-225, 1-200, 25-200, 50-200, 75-200, 100-200, 125-200, 150-200, 175-200, 1-175, 25-175, 50-175, 75-175, 100-175, 125-175, 150-175, 1-150, 25-150, 50-150, 75-150, 100-150, 125-150, 1-125, 25-125, 50-125, 75-125, 100-125, 1-100, 25-100, 50-100, 75-100, 1-75, 25-75, 50-75, 1-50, 25-50, 和 / 或 1-25

[0102] 在另外一些优选的实施方案中, 本发明的多核苷酸包含或由 SEQID NO:1 的以下核苷酸残基组成: 400-627, 425-627, 450-627, 475-627, 500-627, 525-627, 550-627, 575-627, 600-627, 400-600, 425-600, 450-600, 475-600, 500-600, 525-600, 550-600, 575-600, 400-575, 425-575, 450-575, 475-575, 500-575, 525-575, 550-575, 400-550, 425-550, 450-550, 475-550, 500-550, 525-550, 400-500, 425-500, 450-500, 475-500, 400-475, 425-475, 450-475, 400-450, 425-450, 571-800, 600-800, 625-800, 650-800, 675-800, 700-800, 725-800, 750-800, 775-800, 571-775, 600-775, 625-775, 650-775, 675-775, 700-775, 725-775, 750-775, 571-750, 600-750, 625-750, 650-750, 675-750, 700-750, 725-750, 571-725, 600-725, 625-725, 650-725, 675-725, 700-725, 571-700,

600-700, 625-700, 650-700, 675-700, 571-675, 600-675, 625-675, 650-675, 571-650, 600-650, 625-650, 571-625, 600-625, 和 / 或 571-600

[0103] 在另一些优选的实施方案中, 本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO :1 的以下核苷酸残基组成: 147-500, 147-450, 147-400, 147-350, 200-500, 200-450, 200-400, 200-350, 250-500, 250-450, 250-400, 250-350, 300-500, 300-450, 300-400, 300-350, 350-750, 350-700, 350-650, 350-600, 350-550, 400-750, 400-700, 400-650, 400-600, 400-550, 425-750, 425-700, 425-650, 425-600, 425-550, 450-1020, 450-1001, 450-950, 450-900, 450-850, 450-800, 450-775, 500-1001, 500-950, 500-900, 500-850, 500-800, 500-775, 550-1001, 550-950, 550-900, 550-850, 550-800, 550-775, 600-1001, 600-950, 600-900, 600-850, 600-800, 600-775, 650-1001, 650-950, 650-900, 650-850, 650-800, 650-775, 700-1001, 700-950, 700-900, 700-850, 700-800, 700-775, 825-1082, 850-1082, 875-1082, 900-1082, 925-1082, 950-1082, 975-1082, 1000-1082, 1025-1082, 和 / 或 1050-1082

[0104] 优选地, 本发明的多核苷酸片段编码表明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性的多肽。具有“功能活性”的多肽是指能显示一或多种与全长和 / 或分泌的 Neutrokin- α 多肽和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽相关的已知功能活性的多肽。这种功能活性包括但非限于生物活性 (如刺激 B 细胞增殖, 存活分化和 / 或激活的能力), 抗原性 (结合 (或与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽竞争性结合) 抗 Neutrokin- α 和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体的能力), 免疫原性 (产生结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的抗体的能力), 与本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽形成多聚体的能力, 及结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽受体或配体的能力。

[0105] 在其它特异的实施方案中, 本发明的多核苷酸片段编码的多肽包含或由 Neutrokin- α 推定的胞内域 (SEQ ID NO :2 的 1-46 位氨基酸), 推定的跨膜域 (SEQ ID NO :2 的 47-72 位氨基酸), 推定的胞外域 (SEQ ID NO :2 的 73-284 位氨基酸), 推定的 TNF 保守域 (SEQ ID NO :2 的 191-284 位氨基酸) 组成。在另一实施方案中, 本发明的多核苷酸片段包含或由 1, 2, 3 或全部 4 个上述结构域的任意组合组成。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0106] 在另一特异的实施方案中, 本发明的多核苷酸片段编码的多肽包含或由 Neutrokin- α SV 的推定的胞内域 (SEQ ID NO :19 的 1-46 位氨基酸), 推定的跨膜域 (SEQ ID NO :19 的 47-72 位氨基酸), 推定的胞外域 (SEQ ID NO :19 的 73-266 位氨基酸), 或推定的 TNF 保守域 (SEQ ID NO :19 的 172-265 位氨基酸) 组成。在另外的实施方案中, 本发明的多核苷酸片段编码的多肽包含或由 1, 2, 3 或全部 4 个上述结构域的任意组合组成。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0107] 在另一实施方案中, 本发明的多核苷酸片段包含或由一种多核苷酸组成, 该多核苷酸编码选自 SEQ ID NO :2 的 Met 1-Lys113, Leu114-Thr141, Ile142-Lys160, Gly161-Gln198, Val199-Ala248 和 Gly250-Leu285 的氨基酸序列。另外, 编码 2, 3, 4, 5 或更多个这些氨基酸序列的任意组合的多核苷酸也涵盖在本发明内。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0108] 在另一实施方案中, 本发明的多核苷酸片段包含或由一种多核苷酸组成, 该

多核苷酸编码选自 SEQ ID NO:19 的 Met 1-Lys113, Leu114-Thr141, Gly142-Gln179, Val180-Ala229, Gly230-Leu266 残基的氨基酸序列。另外,编码 2,3,4,5 或更多个这些氨基酸序列的任意组合的多核苷酸也涵盖在本发明内。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0109] 在另一实施方案中,本发明的多核苷酸片段包含或由一种多核苷酸组成,该多核苷酸编码选自 SEQ ID NO:23 的 Met 1-Lys106, Leu107-Thr134, Glu135-Asn165, Ile167-Lys184, Gly185-Gln224, Val225-Ala272 和 Gly273-Leu309 残基的氨基酸序列。另外,编码 2,3,4,5 或更多个这些氨基酸序列的任意组合的多核苷酸也涵盖在本发明内。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0110] 在另一实施方案中,本发明的多核苷酸片段包含或由一种多核苷酸组成,该多核苷酸编码选自 SEQ ID NO:28 的 Tyr 1-Lys47, Leu48-Thr75, Ile76-Lys94, Gly95-Gln132, Val133-Ala182 和 Gly183-Ala219 残基的氨基酸序列。另外,编码 2,3,4,5 或更多个这些氨基酸序列的任意组合的多核苷酸也涵盖在本发明内。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0111] 在另一实施方案中,本发明的多核苷酸片段包含或由一种多核苷酸组成,该多核苷酸编码选自 SEQ ID NO:30 的 Tyr 1-Lys47, Leu48-Thr75, Ile76-Lys94, Gly95-Gln132, Val 133-Ala182 和 Gly183-Ala219 残基的氨基酸序列。另外,编码 2,3,4,5 或更多个这些氨基酸序列的任意组合的多核苷酸也涵盖在本发明内。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0112] 在另一实施方案中,本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO:21 所示序列组成。SEQ ID NO:21 所示序列编码一种多肽,该多肽起始甲硫氨酸残基及相连的 SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 多肽序列的 Ala134-Leu285 残基的组成。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0113] 在某些其它的优选实施方案中,本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO:21 的以下核苷酸残基组成:1-459,15-459,30-459,45-459,60-459,75-459,90-459,105-459,120-459,135-459,150-459,165-459,180-459,195-459,210-459,225-459,240-459,255-459,270-459,285-459,300-459,315-459,330-459,345-459,360-459,375-459,390-459,405-459,420-459,435-459,450-459,1-450,15-450,30-450,45-450,60-450,75-450,90-450,105-450,120-450,135-450,150-450,165-450,180-450,195-450,210-450,225-450,240-450,255-450,270-450,285-450,300-450,315-450,330-450,345-450,360-450,375-450,390-450,405-450,420-450,435-450,1-435,15-435,30-435,45-435,60-435,75-435,90-435,105-435,120-435,135-435,150-435,165-435,180-435,195-435,210-435,225-435,240-435,255-435,270-435,285-435,300-435,315-435,330-435,345-435,360-435,375-435,390-435,405-435,420-435,1-420,15-420,30-420,45-420,60-420,75-420,90-420,105-420,120-420,135-420,150-420,165-420,180-420,195-420,210-420,225-420,240-420,255-420,270-420,285-420,300-420,315-420,330-420,345-420,360-420,375-420,390-420,405-420,1-405,15-405,30-405,45-405,60-405,75-405,90-405,105-405,120-405,135-405,150-405,165-405,180-405,195-405,210-405,225-405,240-405,255-405,270-405,285-405,300-405,315-405,330-405,

345-405, 360-405, 375-405, 390-405, 1-390, 15-390, 30-390, 45-390, 60-390, 75-390, 90-390, 105-390, 120-390, 135-390, 150-390, 165-390, 180-390, 195-390, 210-390, 225-390, 240-390, 255-390, 270-390, 285-390, 300-390, 315-390, 330-390, 345-390, 360-390, 375-390, 1-375, 15-375, 30-375, 45-375, 60-375, 75-375, 90-375, 105-375, 120-375, 135-375, 150-375, 165-375, 180-375, 195-375, 210-375, 225-375, 240-375, 255-375, 270-375, 285-375, 300-375, 315-375, 330-375, 345-375, 360-375, 1-360, 15-360, 30-360, 45-360, 60-360, 75-360, 90-360, 105-360, 120-360, 135-360, 150-360, 165-360, 180-360, 195-360, 210-360, 225-360, 240-360, 255-360, 270-360, 285-360, 300-360, 315-360, 330-360, 345-360, 1-345, 15-345, 30-345, 45-345, 60-345, 75-345, 90-345, 105-345, 120-345, 135-345, 150-345, 165-345, 180-345, 195-345, 210-345, 225-345, 240-345, 255-345, 270-345, 285-345, 300-345, 315-345, 330-345, 1-330, 15-330, 30-330, 45-330, 60-330, 75-330, 90-330, 105-330, 120-330, 135-330, 150-330, 165-330, 180-330, 195-330, 210-330, 225-330, 240-330, 255-330, 270-330, 285-330, 300-330, 315-330, 1-315, 15-315, 30-315, 45-315, 60-315, 75-315, 90-315, 105-315, 120-315, 135-315, 150-315, 165-315, 180-315, 195-315, 210-315, 225-315, 240-315, 255-315, 270-315, 285-315, 300-315, 1-300, 15-300, 30-300, 45-300, 60-300, 75-300, 90-300, 105-300, 120-300, 135-300, 150-300, 165-300, 180-300, 195-300, 210-300, 225-300, 240-300, 255-300, 270-300, 285-300, 1-285, 15-285, 30-285, 45-285, 60-285, 75-285, 90-285, 105-285, 120-285, 135-285, 150-285, 165-285, 180-285, 195-285, 210-285, 225-285, 240-285, 255-285, 270-285, 1-270, 15-270, 30-270, 45-270, 60-270, 75-270, 90-270, 105-270, 120-270, 135-270, 150-270, 165-270, 180-270, 195-270, 210-270, 225-270, 240-270, 255-270, 1-255, 15-255, 30-255, 45-255, 60-255, 75-255, 90-255, 105-255, 120-255, 135-255, 150-255, 165-255, 180-255, 195-255, 210-255, 225-255, 240-255, 1-240, 15-240, 30-240, 45-240, 60-240, 75-240, 90-240, 105-240, 120-240, 135-240, 150-240, 165-240, 180-240, 195-240, 210-240, 225-240, 1-225, 15-225, 30-225, 45-225, 60-225, 75-225, 90-225, 105-225, 120-225, 135-225, 150-225, 165-225, 180-225, 195-225, 210-225, 1-210, 15-210, 30-210, 45-210, 60-210, 75-210, 90-210, 105-210, 120-210, 135-210, 150-210, 165-210, 180-210, 195-210, 1-195, 15-195, 30-195, 45-195, 60-195, 75-195, 90-195, 105-195, 120-195, 135-195, 150-195, 165-195, 180-195, 1-180, 15-180, 30-180, 45-180, 60-180, 75-180, 90-180, 105-180, 120-180, 135-180, 150-180, 165-180, 1-165, 15-165, 30-165, 45-165, 60-165, 75-165, 90-165, 105-165, 120-165, 135-165, 150-165, 1-150, 15-150, 30-150, 45-150, 60-150, 75-150, 90-150, 105-150, 120-150, 135-150, 1-135, 15-135, 30-135, 45-135, 60-135, 75-135, 90-135, 105-135, 120-135, 1-120, 15-120, 30-120, 45-120, 60-120, 75-120, 90-120, 105-120, 1-105, 15-105, 30-105, 45-105, 60-105, 75-105, 90-105, 1-90, 15-90, 30-90, 45-90, 60-90, 75-90, 1-75, 15-75, 30-75, 45-75, 60-75, 1-60, 15-60, 30-60, 45-60, 1-45, 15-45, 30-45, 1-30, 和 / 或 15-30。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0114] 因此, 本发明的特异实施方案涉及编码一种多肽的多核苷酸, 该多肽包含或由图 7A 和实施例 6 中所示 β 折叠区 A, A', B, B', C, D, E, F, G 或 H 的氨基酸序列组成。本发

明的其它实施方案涉及编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸,该多肽包含或由 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或所有 10 个图 7A 和实施例 6 所示 β 折叠区 A-H 的任意组合组成。本发明另外优选的实施方案涉及一种多肽,该多肽包含或由图 7A 和实施例 6 中所示 β 折叠区 A,A',B,B',C,D,E,F,G 或 H 的 Neutrokin- α 氨基酸序列组成。本发明的另外实施方案涉及 Neutrokin- α 多肽,其包含或由图 7A 和实施例 6 所示 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或所有 10 个 β 折叠区 A-H 的任意组合组成。

[0115] 在某些其它的优选实施方案中,本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO:21 的 34-57,118-123,133-141,151-159,175-216,232-255,280-315,328-357,370-393 和 / 或 430-456 位核苷酸残基组成。这些多核苷酸和多肽相当于图 7A 中所示推定的 β 折叠区。在某些实施方案中,本发明的多核苷酸包含或由与编码 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个上述 β 折叠区的多核苷酸序列有至少 90%,95%,96%,97%,98% 或 99% 相同性的多核苷酸组成。本发明还涵盖融合异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内。在另一实施方案中,本发明提供了分离的核酸分子,其包含在严格杂交条件下与 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个上述本发明的 β 折叠多核苷酸杂交的多核苷酸。在此所用的“严格条件”如前所述。

[0116] 在另外优选的实施方案中,本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO:1 的 576-599,660-665,675-683,693-701,717-758,744-803,822-857,870-899,912-935,和 / 或 972-998 位核苷酸残基组成。由这些多核苷酸片段编码的多肽也涵盖在本发明内。这些多核苷酸和多肽片段相当于图 7A 所示推定的 β 折叠区。

[0117] 在另外优选的实施方案中,本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO:18 的 457-462,472-480,490-498,514-555,571-600,619-654,667-696,699-732 和 / 或 769-795 位核苷酸残基组成。由这些多核苷酸片段编码的多肽也涵盖在本发明内。这些多核苷酸和多肽片段相当于图 7A 所示推定的 β 折叠区。

[0118] 在另外优选的实施方案中,本发明的多核苷酸包含或由 SEQ ID NO:22 的 124-129,139-147,157-165,181-222,238-267,286-321,334-363,376-399 和 / 或 436-462 位核苷酸残基组成。由这些多核苷酸片段编码的多肽也涵盖在本发明内。这些多核苷酸和多肽片段相当于图 7A 所示推定的 β 折叠区。包含或由 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 或全部这些区域的任意组合的氨基酸序列组成的多肽也涵盖在本发明内。

[0119] 鼠 Neutrokin- α (SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:23) 的几个内含子 / 外显子边界的相对位置是基于鼠基因组 DNA 的序列分析而确定。鼠 Neutrokin- α 基因组克隆 5' 末端的表观第二个外显子 (预先称为“外显子 2”),由 SEQ ID NO:23 所示序列 Tyr187-Gln222 组成。鼠 Neutrokin- α 基因组克隆 5' 末端的表观第三个外显子 (预先称为“外显子 3”)包含 SEQ ID NO:23 所示序列的 Val 223-Gly273。

[0120] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由 SEQ ID NO:23 的 Tyr187-Gln222 的氨基酸序列组成。本发明还涉及一种核酸分子,其包含或由与编码上述鼠 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,95%,96%,97%,98% 或 99% 相同性的多核苷酸序列组成。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0121] 在另一个实施方案中,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由 SEQ ID NO:23 的 Val223-Gly273 残基的氨基酸序列组成。本发明还涉及包含或由与编码上述鼠 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,95%,96%,97%,98% 或 99% 相同性的多核苷酸序列组成的核酸分子。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0122] 另外,人 Neutrokin- α (SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2) 中相应内含子 / 外显子边界的相对位置是基于鼠和人 Neutrokin- α 多肽的序列对比确定的。人 Neutrokin- α 5' 末端的表观第二个外显子 (也预先称为“外显子 2”) 由 SEQ ID NO:2 所示序列的 Tyr163-Gln198 组成。人 Neutrokin- α 5' 末端的表观第三个外显子 (也预先称为“外显子 3”) 由 SEQ ID NO:2 所示序列的 Val 199-Gly249 组成。

[0123] 因此,在一个实施方案中,本发明提供编码包含或由 SEQ ID NO:2 所示 Tyr163-Gln198 氨基酸序列组成的多肽的多核苷酸。本发明还涉及一种核酸分子,其包含或由与编码上述 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,95%,96%,97%,98% 或 99% 相同性的多核苷酸序列组成。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0124] 在另一个实施方案中,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由 SEQ ID NO:2 的 Val199-Gly249 氨基酸序列组成。本发明还涉及一种核酸分子,其包含或由与编码上述 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,95%,96%,97%,98% 或 99% 相同性的多核苷酸序列组成。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0125] Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽,及其片段,变体衍生物,和类似物的功能活性,可通过本文所述的及本领域熟知的各种方法分析。

[0126] 例如,在一个实施方案中,就分析结合或与全长 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽竞争性结合抗 Neutrokin- α 和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体,或结合 B 细胞上 Neutrokin- α 受体和 / 或 Neutrokin- α SV 受体的能力而言,可使用本领域已知各种免疫分析,包括但非限于用以下方法的竞争性和非竞争性分析:放射免疫分析,ELISA (酶联免疫吸附测定),“夹心”免疫分析,免疫放射分析,凝胶扩散沉淀反应,免疫扩散分析,原位免疫分析 (用例如胶体金,酶或放射性同位素标记),Western 印迹,沉淀反应,凝集分析 (如凝胶凝集分析,血凝分析),补体固定分析,免疫荧光分析,A 蛋白分析,和免疫电泳分析等。在一实施方案中,抗体结合是通过检测原始抗体上的标记而检测的。在另一实施方案中,一抗是通过检测二抗和试剂与一抗的结合而检测的。在又一实施方案中,二抗是标记的。本领域已知许多检测免疫分析中结合的方法,并在本发明范围内。

[0127] 在另一实施方案中,当鉴别 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 配体,或评价本发明多肽片段,变体或衍生物多聚体化的能力时,可对结合进行分析,例如通过本领域熟知方法如还原或非还原凝胶层析,蛋白质亲和性层析,和亲和印迹。见 Phizicky, E. 等,1995,微生物学研究 59:94-123。在另一实施方案中,对 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 结合其底物的生理相关性进行分析。

[0128] 另外,本文所述的分析 (如见实施例 6 和 7) 及本领域已知其它分析可常规地用于测定 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽及其片段,变体衍生物和类似物激

发 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 相关的生物活性的能力 (如刺激或抑制 (在 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 拮抗剂的情况下) B 细胞增殖, 分化和 / 或活化和 / 或延长 B 细胞在体外或体内的存活) 。

[0129] 本领域技术人员熟知其它方法并也包括在本发明内。

[0130] 在另外的实施方案中, 本发明的多核苷酸编码具有 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 的功能特点的多肽。为此目的的本发明优选的实施方案包括包含或由 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽的以下区域组成的片段: α 螺旋和 α 螺旋形成区 (“ α 区”), β 折叠和 β 折叠形成区 (“ β 区”), 转角和转角形成区 (“转角区”), 卷曲和卷曲形成区 (“卷曲区”), 亲水区, 疏水区, α 两亲区, β 两亲区, 柔性区, 表面形成区和高抗原指数区。

[0131] 可以确信图 7A 中所示 Neutrokin- α 的一或多个 β 折叠区对二聚体化和 Neutrokin- α 及其配体间相互作用是重要的。

[0132] 为此目的的一些优选的区域示于图 3 (表 1) 。图 3 和表 1 所示数据仅代表当用 DNA*STAR 计算机程序的默认参数分析 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序列时获得的相同结果的不同形式。

[0133] 图 3 和表 1 所示上述优选的区域包括但非限于通过分析图 1A 和 1B 所示氨基酸序列鉴别的前述各类型区域。如图 3 和表 1 所示, 这种优选的区域包括 Garnier-Robson α 区, β 区, 转角区, 和卷曲区, Chou-Fasman α 区, β 区和卷曲区, Kyte-Doolittle 亲水区和疏水区, Eisenberg α 和 β 两亲区, Karplus-Schulz 柔性区, Emini 表面形成区, 和 Jameson-Wolf 高抗原指数区。非常优选的多核苷酸是那些编码由 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的区域组成的多肽的多核苷酸, 所述区域组合了上述一些 (如 1, 2, 3, 或 4 种) 特点。

[0134] 另外, 表 1 的 VIII, IX, XIII 和 XIV 列中的数据可常规用于确定呈高度潜在抗原性的 Neutrokin- α 的区域 (表 1 的 VIII 列代表根据 Kyte-Doolittle 的亲水性; 表 1 的 IX 列代表根据 Hopp-Woods 的疏水性; 表 1 的 XIII 列代表根据 Jameson-Wolf 的抗原指数; 表 1 的 XIV 列代表根据 Emini 的表面概率) 。高抗原性的区域是从 VIII, IX, XIII, 和 / 或 XIV 所示数据中, 通过选择代表在一定环境中易于在多肽表面暴露的多肽区域的数值而确定, 所述环境是在免疫应答初始可发生抗原识别的环境。图 6 所示数据也可常规地用相似的表形式代表, 通过用设定默认参数的 DNA*STAR 模式和程序简便地检测图 6 (SEQ ID NO : 19) 中所示氨基酸序列而得。如上所述, 图 6 中所示氨基酸序列也可用于确定呈高度潜在抗原性的 Neutrokin- α 的区域, 可以以图 (如图 6) 或以表 (如表 1) 形式代表。

[0135] 表 1

[0136]

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Met	1	A	.	.	.	.	.	0.73	-0.71	.	.	.	0.95	1.39
Asp	2	A	.	.	.	T	.	1.12	-0.66	*	.	.	1.15	1.56
Asp	3	A	.	.	.	T	.	1.62	-1.09	*	.	.	1.15	2.12
Ser	4	A	.	.	.	T	.	2.01	-1.51	.	.	.	1.15	4.19
Thr	5	A	.	.	.	T	.	2.40	-2.13	.	.	F	1.30	4.35
Glu	6	A	A	.	.	.	.	2.70	-1.73	*	*	F	0.90	4.51
Arg	7	A	A	.	.	.	.	2.81	-1.34	*	*	F	0.90	4.51
Glu	8	A	A	.	.	.	.	2.00	-1.73	*	*	F	0.90	-6.12
Gln	9	A	A	.	.	.	.	1.99	-1.53	*	*	F	0.90	2.91
Ser	10	A	.	.	B	.	.	2.00	-1.04	*	*	F	0.90	2.15
Arg	11	A	.	.	B	.	.	1.33	-0.66	*	*	F	0.90	1.66
Leu	12	A	.	.	B	.	.	0.41	-0.09	*	*	F	0.45	0.51
Thr	13	A	.	.	B	.	.	0.46	0.20	*	*	F	-0.15	0.32
Ser	14	A	A	.	.	.	.	0.50	-0.19	*	*	.	0.30	0.32
Cys	15	A	A	.	.	.	.	0.91	-0.19	*	*	.	0.30	0.78
Leu	16	A	A	.	.	.	.	0.80	-0.87	*	*	F	0.90	1.06
Lys	17	A	A	.	.	.	.	1.61	-1.36	.	*	F	0.90	1.37
Lys	18	A	A	.	.	.	.	1.32	-1.74	.	*	F	0.90	4.44
Arg	19	A	A	.	.	.	.	1.67	-1.70	.	*	F	0.90	5.33
Glu	20	A	A	.	.	.	.	1.52	-2.39	.	*	F	0.90	5.33
Glu	21	A	A	.	.	.	.	2.38	-1.70	.	*	F	0.90	2.20
Met	22	A	A	.	.	.	.	2.33	-1.70	.	*	F	0.90	2.24
Lys	23	A	A	.	.	.	.	1.62	-1.70	*	*	F	0.90	2.24
Leu	24	A	A	.	.	.	.	0.66	-1.13	*	*	F	0.75	0.69
Lys	25	A	A	.	.	.	.	0.36	-0.49	.	*	F	0.45	0.52
Glu	26	A	A	.	B	.	.	-0.53	-0.71	*	*	.	0.60	0.35
Cys	27	A	A	.	B	.	.	-0.74	-0.03	*	*	.	0.30	0.30
Val	28	A	A	.	B	.	.	-1.00	-0.03	*	*	.	0.30	0.12
Ser	29	A	A	.	B	.	.	-0.08	0.40	*	*	.	-0.30	0.11
Ile	30	A	.	.	B	.	.	-0.08	0.40	*	*	.	-0.30	0.40
Leu	31	A	.	.	B	.	.	-0.08	-0.17	*	.	.	0.45	1.08
Pro	32	.	.	.	B	.	C	0.29	-0.81	*	.	F	1.10	1.39
Arg	33	.	.	.	T	.	.	0.93	-0.81	.	*	F	1.50	2.66
Lys	34	.	.	.	T	.	.	0.93	-1.07	.	*	F	1.84	4.98
Glu	35	.	.	.	.	.	C	0.97	-1.37	*	*	F	1.98	4.32
Ser	36	.	.	.	.	T	C	1.89	-1.16	*	*	F	2.52	1.64
Pro	37	.	.	.	.	T	C	1.80	-1.16	*	*	F	2.86	1.60
Ser	38	.	.	.	T	T	.	1.39	-0.77	*	.	F	3.40	1.24
Val	39	A	.	.	.	T	.	1.39	-0.39	*	*	F	2.36	1.24
Arg	40	A	.	.	.	.	.	1.39	-0.77	*	*	F	2.46	1.60
Ser	41	A	.	.	.	.	.	1.34	-1.20	*	*	F	2.46	2.00
Ser	42	.	.	.	.	T	.	1.60	-1.16	.	*	F	3.06	2.67
Lys	43	.	.	.	T	T	.	1.09	-1.80	.	*	F	3.06	2.72
Asp	44	.	.	.	T	T	.	1.13	-1.11	*	*	F	3.40	1.67
Gly	45	A	.	.	.	T	.	0.43	-0.81	*	*	F	2.66	1.03
Lys	46	A	A	.	.	.	.	0.14	-0.70	.	.	F	1.77	0.52
Leu	47	A	A	.	.	.	.	0.13	-0.20	*	.	.	0.98	0.31
Leu	48	A	A	.	.	.	.	-0.72	0.29	*	.	.	0.04	0.46
Ala	49	A	A	.	.	.	.	-1.53	0.54	.	*	.	-0.60	0.19
Ala	50	A	A	.	.	.	.	-2.00	1.23	.	.	.	-0.60	0.19
Thr	51	A	A	.	.	.	.	-2.63	1.23	.	.	.	-0.60	0.19
Leu	52	A	A	.	.	.	.	-2.63	1.04	.	.	.	-0.60	0.19
Leu	53	A	A	.	.	.	.	-2.63	1.23	.	.	.	-0.60	0.15
Leu	54	A	A	.	.	.	.	-2.34	1.41	.	.	.	-0.60	0.09
Ala	55	A	A	.	.	.	.	-2.42	1.31	.	.	.	-0.60	0.14
Leu	56	A	A	.	.	.	.	-2.78	1.20	.	.	.	-0.60	0.09
Leu	57	A	.	.	.	T	.	-2.78	1.09	.	.	.	-0.20	0.06

[0137] 表 1(续)

[0138]

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Ser 58	A	.	.	.	.	T	.	-2.28	1.09	.	.	.	-0.20	0.05
Cys 59	A	.	.	.	.	T	.	-2.32	1.07	.	.	.	-0.20	0.09
Cys 60	A	.	.	.	.	T	.	-2.59	1.03	.	.	.	-0.20	0.08
Leu 61	.	.	B	B	.	.	.	-2.08	0.99	.	.	.	-0.60	0.04
Thr 62	.	.	B	B	.	.	.	-1.97	0.99	.	.	.	-0.60	0.11
Val 63	.	.	B	B	.	.	.	-1.91	1.20	.	.	.	-0.60	0.17
Val 64	.	.	B	B	.	.	.	-1.24	1.39	.	.	.	-0.60	0.33
Ser 65	.	.	B	B	.	.	.	-1.43	1.10	.	.	.	-0.60	0.40
Phe 66	A	.	.	B	.	.	.	-1.21	1.26	.	.	.	-0.60	0.40
Tyr 67	A	.	.	B	.	.	.	-1.49	1.11	.	.	.	-0.60	0.54
Gln 68	A	.	.	B	.	.	.	-1.44	0.97	.	.	.	-0.60	0.41
Val 69	A	.	.	B	.	.	.	-0.59	1.27	.	.	.	-0.60	0.39
Ala 70	A	.	.	B	.	.	.	-0.63	0.89	.	.	.	-0.60	0.43
Ala 71	A	.	.	B	.	.	.	0.07	0.56	.	*	.	-0.60	0.25
Leu 72	A	.	.	.	.	T	.	-0.50	0.16	.	*	.	0.10	0.55
Gln 73	A	.	.	.	.	T	.	-1.09	0.20	.	.	F	0.25	0.45
Gly 74	A	.	.	.	.	T	.	-0.53	0.20	.	.	F	0.25	0.45
Asp 75	A	.	.	.	.	T	.	-0.76	0.09	.	*	F	0.25	0.73
Leu 76	A	A	.	.	.	.	.	-0.06	0.09	.	*	F	-0.15	0.35
Ala 77	A	A	.	.	.	.	.	0.17	-0.31	.	*	.	0.30	0.69
Ser 78	A	A	.	.	.	.	.	0.17	-0.24	.	*	.	0.30	0.42
Leu 79	A	A	.	.	.	.	.	-0.30	-0.24	.	*	.	0.30	0.88
Arg 80	A	A	.	.	.	.	.	-0.30	-0.24	.	*	.	0.30	0.72
Ala 81	A	A	.	.	.	.	.	0.17	-0.34	.	*	.	0.30	0.93
Glu 82	A	A	.	.	.	.	.	0.72	-0.30	.	*	.	0.45	1.11
Leu 83	A	A	.	.	.	.	.	0.99	-0.49	.	*	.	0.30	0.77
Gln 84	A	A	.	.	.	.	.	1.21	0.01	.	*	.	-0.15	1.04
Gly 85	A	A	.	.	.	.	.	1.10	0.01	.	*	.	-0.30	0.61
His 86	A	A	.	.	.	.	.	1.73	0.01	*	*	.	-0.15	1.27
His 87	A	A	.	.	.	.	.	0.92	-0.67	.	*	.	0.75	1.47
Ala 88	A	A	.	.	.	.	.	1.52	-0.39	.	*	.	0.45	1.22
Glu 89	A	A	.	.	.	.	.	0.93	-0.39	.	.	.	0.45	1.39
Lys 90	A	A	.	.	.	.	.	0.93	-0.39	*	.	F	0.60	1.03
Leu 91	A	.	.	.	.	T	.	0.38	-0.46	*	.	.	0.85	1.01
Pro 92	A	.	.	.	.	T	.	0.07	-0.46	.	.	.	0.70	0.59
Ala 93	A	.	.	.	.	T	.	0.07	-0.03	.	.	.	0.70	0.29
Gly 94	A	.	.	.	.	T	.	-0.14	0.47	.	.	.	-0.20	0.36
Ala 95	A	.	.	.	.	.	.	-0.14	0.21	.	*	.	-0.10	0.36
Gly 96	A	.	.	.	.	.	.	0.08	-0.21	.	.	F	0.65	0.71
Ala 97	A	.	.	.	.	.	.	-0.06	-0.21	.	.	F	0.65	0.72
Pro 98	A	.	.	.	.	.	.	-0.28	-0.21	.	*	F	0.65	0.71
Lys 99	A	A	.	.	.	.	.	0.07	-0.03	.	.	F	0.45	0.59
Ala 100	A	A	.	.	.	.	.	0.66	-0.46	.	.	F	0.60	1.01
Gly 101	A	A	.	.	.	.	.	0.41	-0.96	.	.	F	0.90	1.13
Leu 102	A	A	.	.	.	.	.	0.79	-0.89	.	.	F	0.75	0.57
Glu 103	A	A	.	.	.	.	.	0.41	-0.46	*	.	F	0.45	0.88
Glu 104	A	A	.	.	.	.	.	-0.49	-0.46	*	.	F	0.45	0.89
Ala 105	A	A	.	.	.	.	.	-0.21	-0.24	.	.	.	0.30	0.81
Pro 106	A	A	.	.	.	.	.	-0.46	-0.44	.	.	.	0.30	0.67
Ala 107	A	A	.	.	.	.	.	0.01	0.06	.	.	.	-0.30	0.39
Val 108	A	A	.	.	.	.	.	-0.80	0.49	.	*	.	-0.60	0.38
Thr 109	A	A	.	.	.	.	.	-0.76	0.67	.	*	.	-0.60	0.20
Ala 110	A	A	.	.	.	.	.	-1.06	0.24	*	*	.	-0.30	0.40
Gly 111	A	A	.	.	.	.	.	-1.54	0.43	*	*	.	-0.60	0.38
Leu 112	A	A	.	.	.	.	.	-0.96	0.57	*	*	.	-0.60	0.23
Lys 113	.	A	B	.	.	.	.	-0.31	0.09	*	*	.	-0.30	0.39
Ile 114	.	A	B	.	.	.	.	-0.21	0.01	*	.	.	-0.30	0.61

[0139] 表 1(续)

[0140]

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Phe 115	.	A	B	.	.	.	.	-0.21	0.01	*	.	.	0.15	1.15
Glu 116	.	A	.	.	.	.	C	-0.08	-0.17	*	.	F	1.25	0.58
Pro 117	.	A	.	.	.	.	C	0.39	0.26	*	*	F	1.10	1.28
Pro 118	.	.	.	.	.	.	C	0.34	-0.00	.	.	F	2.20	1.47
Ala 119	.	.	.	.	.	T	C	0.89	-0.79	.	*	F	3.00	1.47
Pro 120	.	.	.	.	.	T	C	1.59	-0.36	.	*	F	2.25	0.94
Gly 121	.	.	.	.	T	T	.	1.29	-0.39	.	*	F	2.15	0.98
Glu 122	.	.	.	.	T	T	.	1.20	-0.43	.	.	F	2.00	1.30
Gly 123	.	.	.	.	.	.	C	1.41	-0.54	.	.	F	1.60	1.12
Asn 124	.	.	.	.	.	T	C	2.00	-0.57	.	.	F	1.50	1.97
Ser 125	.	.	.	.	.	T	C	1.91	-0.60	.	*	F	1.50	1.82
Ser 126	.	.	.	.	.	T	C	2.37	-0.21	.	*	F	1.54	2.47
Gln 127	.	.	.	.	.	T	C	2.37	-0.64	.	*	F	2.18	3.01
Asn 128	.	.	.	.	.	.	C	2.76	-0.64	.	.	F	2.32	3.61
Ser 129	.	.	.	.	.	T	C	2.87	-1.03	.	.	F	2.86	5.39
Arg 130	.	.	.	.	T	T	.	2.58	-1.41	*	.	F	3.40	6.09
Asn 131	.	.	.	.	T	T	.	2.02	-1.31	*	.	F	3.06	3.83
Lys 132	.	.	.	.	T	T	.	2.02	-1.07	*	.	F	2.72	2.12
Arg 133	.	.	.	.	T	.	.	1.68	-1.06	*	.	F	2.18	1.88
Ala 134	.	.	.	.	.	.	C	1.77	-0.63	*	.	F	1.64	1.15
Val 135	.	.	.	.	.	.	C	1.66	-0.60	*	.	F	1.49	0.89
Gln 136	.	.	.	.	.	.	C	1.66	-0.60	*	.	F	1.83	0.79
Gly 137	.	.	.	.	.	T	C	1.30	-0.60	*	.	F	2.52	1.35
Pro 138	.	.	.	.	.	T	C	0.33	-0.61	*	.	F	2.86	2.63
Glu 139	.	.	.	.	T	T	.	0.61	-0.61	*	.	F	3.40	1.13
Glu 140	A	.	.	.	.	T	.	1.47	-0.53	*	.	F	2.66	1.64
Thr 141	A	.	.	.	.	.	.	1.47	-0.56	.	.	F	2.12	1.84
Val 142	A	.	.	.	.	.	.	1.14	-0.99	.	.	F	1.78	1.77
Thr 143	A	.	.	.	.	T	.	0.54	-0.41	.	.	F	1.19	0.55
Gln 144	A	.	.	.	.	T	.	0.54	0.27	*	.	F	0.25	0.31
Asp 145	A	.	.	.	.	T	.	-0.27	0.19	*	.	F	0.25	0.73
Cys 146	A	.	.	.	.	T	.	-0.84	0.23	*	.	.	0.10	0.42
Leu 147	A	A	.	.	.	.	.	-0.58	0.43	*	.	.	-0.60	0.17
Gln 148	A	A	.	.	.	.	.	-0.27	0.53	*	.	.	-0.60	0.10
Leu 149	A	A	.	.	.	.	.	-0.57	0.53	*	*	.	-0.30	0.32
Ile 150	A	A	.	.	.	.	.	-0.57	0.34	*	.	.	0.30	0.52
Ala 151	.	A	.	.	.	.	C	-0.21	-0.34	.	*	.	1.40	0.52
Asp 152	.	.	.	.	T	T	.	0.39	-0.26	.	*	F	2.45	0.91
Ser 153	.	.	.	.	.	T	C	0.08	-0.51	.	.	F	3.00	2.00
Glu 154	.	.	.	.	.	T	C	-0.00	-0.71	.	.	F	1.70	2.86
Thr 155	.	.	.	.	.	T	C	0.89	-0.53	*	.	F	2.40	1.20
Pro 156	.	.	.	B	.	.	C	1.52	-0.13	*	.	F	1.56	1.55
Thr 157	.	.	.	B	T	.	.	1.18	-0.51	*	.	F	1.92	1.79
Ile 158	A	.	.	B	.	.	.	1.18	-0.09	.	.	F	1.08	1.23
Gln 159	.	.	.	.	T	T	.	0.93	-0.19	.	.	F	2.04	1.07
Lys 160	.	.	.	.	T	T	.	0.93	0.14	*	.	F	1.60	1.16
Gly 161	.	.	.	.	T	T	.	0.44	0.14	*	.	F	1.44	2.38
Ser 162	.	.	.	.	T	T	.	-0.10	0.24	*	.	F	1.28	1.19
Tyr 163	.	.	.	B	T	.	.	0.58	0.49	*	.	.	0.12	0.44
Thr 164	.	.	B	B	.	.	.	0.29	0.91	*	.	.	-0.44	0.69
Phe 165	.	.	B	B	.	.	.	-0.57	1.40	*	.	.	-0.60	0.54
Val 166	.	.	B	B	.	.	.	-1.03	1.70	.	.	.	-0.60	0.29
Pro 167	.	.	B	B	.	.	.	-1.03	1.63	.	.	.	-0.60	0.16
Trp 168	A	.	.	B	.	.	.	-1.49	1.53	.	*	.	-0.60	0.25
Leu 169	A	.	.	B	.	.	.	-1.13	1.53	*	.	.	-0.60	0.29
Leu 170	A	.	.	B	.	.	.	-0.32	0.89	*	.	.	-0.30	0.38

[0141] 表 1(续)

[0142]

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Ter	171	A	.	.	.	.	.	0.19	0.46	*	.	.	0.20	0.71
Phe	172	.	.	.	T	.	.	0.10	-0.03	*	.	.	1.80	0.85
Lys	173	.	.	.	T	T	.	-0.20	-0.33	*	.	F	2.60	1.38
Arg	174	.	.	.	.	T	C	-0.20	-0.51	.	.	F	3.00	1.04
Gly	175	.	.	.	.	T	C	0.61	-0.21	.	.	F	2.25	0.99
Ser	176	A	.	.	.	T	.	0.91	-1.00	*	.	F	2.05	0.86
Ala	177	A	A	.	.	.	.	1.66	-1.00	*	.	F	1.35	0.76
Leu	178	A	A	.	.	.	.	1.61	-1.00	.	.	F	1.20	1.54
Glu	179	A	A	.	.	.	.	1.50	-1.43	.	.	F	0.90	1.98
Glu	180	A	A	.	.	.	.	1.89	-1.41	*	.	F	0.90	3.16
Lys	181	A	A	.	.	.	.	1.30	-1.91	*	.	F	0.90	7.66
Glu	182	A	A	.	.	.	.	1.08	-1.91	.	.	F	0.90	3.10
Asn	183	A	A	.	.	.	.	1.03	-1.23	*	*	F	0.90	1.48
Lys	184	A	A	.	.	.	.	1.08	-0.59	*	.	F	0.75	0.55
Ile	185	A	A	.	.	.	.	1.08	-0.59	*	*	.	0.60	0.63
Leu	186	A	A	.	.	.	.	0.72	-0.59	*	*	.	0.60	0.68
Val	187	A	A	.	.	.	.	0.38	-0.50	.	*	.	0.30	0.49
Lys	188	A	A	.	.	.	.	0.13	-0.07	*	*	F	0.45	0.69
Glu	189	A	.	.	.	T	.	-0.61	0.00	*	*	F	0.40	1.32
Thr	190	.	.	.	T	T	.	-0.42	0.10	.	*	F	0.80	1.54
Gly	191	.	.	.	T	T	.	-0.50	0.24	*	.	F	0.65	0.67
Tyr	192	.	.	.	T	T	.	0.11	0.93	*	*	.	0.20	0.27
Phe	193	.	.	B	B	.	.	-0.28	1.69	.	.	.	-0.60	0.29
Phe	194	.	.	B	B	.	.	-0.28	1.63	.	*	.	-0.60	0.29
Ile	195	.	.	B	B	.	.	-0.82	1.60	.	.	.	-0.60	0.32
Tyr	196	.	.	B	B	.	.	-1.29	1.49	.	.	.	-0.60	0.28
Gly	197	.	.	.	B	T	.	-1.29	1.39	.	.	.	-0.20	0.26
Gln	198	.	.	.	B	T	.	-0.90	1.36	.	.	.	-0.20	0.59
Val	199	.	.	.	B	.	C	-0.20	1.16	.	.	.	-0.40	0.54
Leu	200	.	.	.	B	.	C	0.73	0.40	.	.	.	-0.10	0.92
Tyr	201	.	.	.	T	T	.	0.67	-0.03	.	.	.	1.25	1.06
Thr	202	.	.	.	T	T	.	0.77	0.06	.	.	F	0.80	2.06
Asp	203	.	.	.	T	T	.	0.18	0.17	.	.	F	0.80	3.91
Lys	204	A	.	.	.	T	.	0.43	-0.01	.	.	F	1.00	2.52
Thr	205	A	A	.	.	.	.	0.90	-0.16	.	.	F	0.60	1.73
Tyr	206	A	A	.	.	.	.	1.11	-0.21	.	.	.	0.45	1.03
Ala	207	A	A	.	.	.	.	0.61	0.29	.	.	.	-0.30	0.70
Met	208	A	A	.	.	.	.	-0.28	0.97	.	.	.	-0.60	0.40
Gly	209	A	A	.	B	.	.	-0.32	1.17	*	.	.	-0.60	0.18
His	210	A	A	.	B	.	.	0.10	0.81	*	.	.	-0.60	0.31
Leu	211	A	A	.	B	.	.	0.39	0.31	.	.	.	-0.30	0.61
Ile	212	A	A	.	B	.	.	1.02	-0.30	.	.	.	0.45	1.22
Gln	213	A	A	.	B	.	.	0.77	-0.73	.	*	.	0.75	1.80
Arg	214	A	A	.	B	.	.	1.08	-0.59	.	*	F	0.90	1.62
Lys	215	A	A	.	B	.	.	0.26	-0.77	*	*	F	0.90	3.14
Lys	216	A	A	.	B	.	.	0.37	-0.81	.	*	F	0.90	1.35
Val	217	.	A	B	B	.	.	0.91	-0.43	*	*	.	0.30	0.60
His	218	.	A	B	B	.	.	0.91	-0.00	.	*	.	0.30	0.29
Val	219	.	A	B	B	.	.	0.80	-0.00	*	*	.	0.30	0.25
Phe	220	.	.	B	B	.	.	-0.06	-0.00	*	.	.	0.30	0.57
Gly	221	A	.	.	B	.	.	-0.40	0.04	.	*	.	-0.30	0.25
Asp	222	A	.	.	.	.	.	-0.36	-0.07	*	.	.	0.50	0.63
Glu	223	A	.	.	.	.	.	-1.18	-0.03	*	.	.	0.50	0.60
Leu	224	A	.	.	B	.	.	-0.63	-0.17	.	.	.	0.30	0.45
Ser	225	A	.	.	B	.	.	-0.74	-0.11	.	.	.	0.30	0.39
Leu	226	A	.	.	B	.	.	-1.10	0.57	.	*	.	-0.60	0.18
Val	227	A	.	.	B	.	.	-0.99	1.36	.	*	.	-0.60	0.19

[0143] 表1(续)

[0144]

残基位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Thr 228	A	.	.	B	.	.	.	-1.66	0.67	*	*	.	-0.60	0.28
Leu 229	A	.	.	B	.	.	.	-1.73	0.86	*	.	.	-0.60	0.18
Phe 230	A	.	.	B	.	.	.	-1.43	0.86	*	.	.	-0.60	0.17
Arg 231	A	.	.	B	.	.	.	-0.62	0.61	*	.	.	-0.60	0.21
Cys 232	.	.	.	B	T	.	.	-0.37	0.53	*	.	.	-0.20	0.41
Ile 233	.	.	.	B	T	.	.	-0.27	0.46	*	.	.	-0.20	0.46
Gln 234	.	.	.	B	T	.	.	0.54	0.10	*	.	.	0.10	0.37
Asn 235	.	.	.	B	.	.	C	0.93	0.10	*	.	.	0.05	1.19
Met 236	.	.	.	B	.	.	C	0.01	0.01	*	.	F	0.20	2.44
Pro 237	.	.	.	B	.	.	C	0.47	0.01	*	.	F	0.44	1.16
Glu 238	.	.	.	.	T	.	.	1.36	0.04	*	.	F	1.08	1.12
Thr 239	.	.	.	.	.	.	C	1.36	0.04	*	.	F	1.12	1.82
Leu 240	.	.	.	.	.	.	C	1.06	-0.17	*	.	F	1.96	1.89
Pro 241	.	.	.	.	T	.	.	0.99	-0.21	.	.	F	2.40	1.46
Asn 242	.	.	.	.	T	.	.	0.96	0.36	.	.	F	1.41	0.54
Asn 243	.	.	.	.	T	T	.	0.66	0.63	.	.	F	1.22	1.03
Ser 244	.	.	.	.	T	T	.	0.38	0.33	.	.	F	1.13	0.89
Cys 245	.	.	.	.	T	T	.	0.84	0.40	.	.	.	0.74	0.56
Tyr 246	.	.	.	.	T	T	.	0.17	0.43	.	.	.	0.20	0.35
Ser 247	A	.	.	.	.	.	.	-0.42	0.71	.	.	.	-0.40	0.18
Ala 248	A	A	.	.	.	.	.	-0.38	0.83	.	.	.	-0.60	0.34
Gly 249	A	A	.	.	.	.	.	-0.89	0.26	.	.	.	-0.30	0.43
Ile 250	A	A	.	.	.	.	.	-0.22	0.19	*	.	.	-0.30	0.27
Ala 251	A	A	.	.	.	.	.	0.02	-0.20	*	.	.	0.30	0.46
Lys 252	A	A	.	.	.	.	.	-0.02	-0.70	.	.	.	0.60	0.80
Leu 253	A	A	.	.	.	.	.	0.57	-0.70	.	.	F	0.90	1.13
Glu 254	A	A	.	.	.	.	.	0.91	-1.39	.	.	F	0.90	1.87
Glu 255	A	A	.	.	.	.	.	0.99	-1.89	.	.	F	0.90	1.62
Gly 256	A	A	.	.	.	.	.	1.58	-1.20	.	*	F	0.90	1.62
Asp 257	A	A	.	.	.	.	.	0.72	-1.49	.	*	F	0.90	1.62
Glu 258	A	A	.	.	.	.	.	0.94	-0.80	*	*	F	0.75	0.77
Leu 259	A	A	.	.	.	.	.	0.06	-0.30	*	*	.	0.30	0.79
Gln 260	A	A	.	.	.	.	.	-0.16	-0.04	*	.	.	0.30	0.33
Leu 261	A	A	.	.	.	.	.	0.30	0.39	*	.	.	-0.30	0.30
Ala 262	A	A	.	.	.	.	.	0.30	0.39	*	.	.	-0.30	0.70
Ile 263	A	A	.	.	.	.	.	0.30	-0.30	.	*	.	0.30	0.70
Pro 264	A	.	.	.	.	T	.	0.52	-0.30	.	*	F	1.00	1.37
Arg 265	A	.	.	.	.	T	.	0.52	-0.49	.	*	F	1.00	1.37
Glu 266	A	.	.	.	.	T	.	0.44	-0.59	*	*	F	1.30	3.38
Asn 267	A	.	.	.	.	T	.	0.73	-0.59	*	*	F	1.30	1.53
Ala 268	A	.	.	.	.	.	.	0.81	-0.63	*	*	.	0.95	1.05
Gln 269	A	.	.	.	.	.	.	1.02	0.06	*	*	.	-0.10	0.50
Ile 270	A	.	.	.	.	.	.	0.57	0.06	.	*	.	0.15	0.52
Ser 271	.	.	.	.	.	.	C	0.57	0.09	.	*	.	0.60	0.51
Leu 272	.	.	.	.	.	.	C	-0.29	-0.41	.	*	F	1.60	0.49
Asp 273	.	.	.	.	T	T	.	-0.01	-0.17	.	*	F	2.25	0.52
Gly 274	.	.	.	.	T	T	.	-0.71	-0.37	.	*	F	2.50	0.56
Asp 275	.	.	.	.	T	T	.	-0.52	0.03	.	*	F	1.65	0.59
Val 276	A	.	.	.	.	T	.	-0.57	0.13	.	*	F	1.00	0.30
Thr 277	A	.	.	B	.	.	.	-0.34	0.56	.	*	.	-0.10	0.30
Phe 278	A	.	.	B	.	.	.	-1.16	0.63	.	*	.	-0.35	0.18
Phe 279	A	.	.	B	.	.	.	-0.77	1.31	.	*	.	-0.60	0.20
Gly 280	A	A	.	.	.	.	.	-1.58	0.67	.	*	.	-0.60	0.28
Ala 281	A	A	.	.	.	.	.	-1.53	0.87	.	*	.	-0.60	0.27
Leu 282	A	A	.	.	.	.	.	-1.61	0.77	*	.	.	-0.60	0.26
Lys 283	A	A	.	.	.	.	.	-1.30	0.41	*	.	.	-0.60	0.33
Leu 284	A	A	.	.	.	.	.	-0.99	0.41	.	.	.	-0.60	0.42
Leu 285	A	A	.	.	.	.	.	-1.03	0.34	*	.	.	-0.30	0.65

[0145] 本发明其它优选的核酸片段包括包含或由编码一或多个 Neutrokin- α 的携带表位部分的序列组成的核酸分子。尤其本发明这种核酸片段包括包含或由编码选自以下多肽的序列组成的核酸分子: SEQ ID NO:2 氨基酸序列的大约 Phe115-Leu147, Ile150-Tyr163, Ser170-Phe194, Glu223-Tyr246, Ser271-Phe278。文中“大约”指特定的范围以及在氨基和羧基端一端或两端多或少 5, 4, 3, 2, 或 1 个氨基酸残基的此范围。由这些核

酸分子编码的多肽也涵盖在本发明内。携带 Neutrokin- α 的抗原性表位的多肽片段,可用上述 Jameson-Wolf 抗原指数分析由本领域技术人员轻易确定,如图 3 所示。确定其它这种 Neutrokin- α 的表位携带部分的方法详见下述。

[0146] 本发明其它优选的核酸片段包括包含或由编码一或多个 Neutrokin- α SV 的表位携带部分的序列组成的核酸分子。尤其本发明的这种核酸片段包括包含或由编码选自以下多肽的序列组成的核酸分子:SEQ ID NO:19 氨基酸序列的大约 Pro32-Leu47, Glu116-Ser143, Phe153-Tyr173, Pro218-Tyr227, Ser252-Thr258, Ala232-Gln241, Ile244-Ala249, Ser252-Val257。文中“大约”指特定的范围,以及在氨基端和羧基端一端或两端多或少 5, 4, 3, 2, 或 1 个氨基酸残基的此范围。携带 Neutrokin- α 抗原性表位的多肽片段可用上述 Jameson-Wolf 抗原指数分析,由本领域技术人员轻易确定。确定其它这种 Neutrokin- α SV 的携带表位部分的方法详见下述。

[0147] 在特异的实施方案中,本发明的多核苷酸长度小于 100,000kb, 50,000kb, 10,000kb, 1,000kb, 500kb, 400kb, 350kb, 300kb, 250kb, 200kb, 175kb, 150kb, 125kb, 100kb, 75kb, 50kb, 40kb, 30kb, 25kb, 20kb, 15kb, 10kb, 7.5kb, 或 5kb。

[0148] 在另一实施方案中,本发明的多核苷酸包含 Neutrokin- α 编码序列的至少 15, 至少 30, 至少 50, 至少 100 或至少 250, 至少 500, 至少 1000 个连续核苷酸,但由在图 1A 和 1B(SEQ ID NO:1) 或图 5A 和 5B(SEQ ID NO:18) 所示 5' 或 3' 编码核苷酸旁侧的少于或等于 1000kb, 500kb, 250kb, 200kb, 150kb, 100kb, 75kb, 50kb, 30kb, 25kb, 20kb, 15kb, 10kb 或 5kb 的基因组 DNA 组成。在另一实施方案中,本发明的多核苷酸包含 Neutrokin- α 编码序列的至少 15, 至少 30, 至少 50, 至少 100 或至少 250, 至少 500, 或至少 1000 个连续核苷酸,但不包含任何 Neutrokin- α 内含子的全部或部分。在另一实施方案中,包含 Neutrokin- α 编码序列的核酸不含有基因组侧翼基因的编码序列(即基因组中 Neutrokin- α 基因的 5' 或 3' 序列)。在其它实施方案中,本发明的多核苷酸不含有超过 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 或 1 个基因组侧翼基因的编码序列。

[0149] 在另一实施方案中,本发明提供了分离的核酸分子,其包含在严格条件下与上述本发明核酸分子中多核苷酸的一部分杂交的多核苷酸,例如:互补于图 1A 和图 1B(SEQ ID NO:1) 所示的编码和/或非编码序列,ATCC 保藏号 97768 的 cDNA 克隆的序列,互补于图 5A 和 5B(SEQ ID NO:18) 所示的编码和/或非编码序列,保藏在 ATCC 保藏号 203518 的 cDNA 克隆的序列,互补于 SEQ ID NO:21 所示的编码和/或非编码序列,(即转录的,未翻译的)的序列,互补于 SEQ ID NO:22 所示的编码和/或非编码序列的序列,互补于 SEQ ID NO:27 所示的编码和/或非编码序列的序列,互补于 SEQ ID NO:29 所示的编码和/或非编码序列的序列,或这些序列的片段(例如其开放读框或片段)。“严格杂交条件”是指在含有以下物质的溶液在 42℃温育过夜,随后在大约 65℃用 0.1xSSC 冲洗滤膜,所述溶液包含:50% 甲酰胺,5xSSC(750mM NaCl, 75mM 柠檬酸三钠), 50mM 磷酸钠 (PH7.6), 5X Denhardt's 液, 10% 葡聚糖硫酸酯,和 20 μ g/ml 变性剪切鲑精 DNA

[0150] 与多核苷酸“一部分”杂交的多核苷酸是指与长度为至少 15 个,优选至少 20 个,更优选至少 30 个,最优选至少 30 ~ 70(如 40, 50, 或 60 个),特别优选 30 ~ 70 或 80 ~ 150 范围内任何整数个核苷酸,甚至优选全长参照多核苷酸杂交的多核苷酸(DNA 或 RNA)。这些多核苷酸的用途包括但非限于用作诊断探针和引物,并详见下述。长度“至少为大约 20

个核苷酸”的多核苷酸的一部分,例如是指包括特定的范围。大于或小于参考多核苷酸的核苷酸序列的一端或两端的 5,4,3,2,1 或 0 个氨基酸(如两个保藏的 cDNA 的任一或二个序列,图 1A 和 1B(SEQ ID NO:1) 所示核苷酸序列的互补链,图 5A 和 5B(SEQ ID NO:18) 所示核苷酸序列的互补链,SEQ ID NO:21 所示核苷酸序列的互补链,SEQ ID NO:22 所示核苷酸序列的互补链,SEQ ID NO:27 所示核苷酸序列的互补链,和/或 SEQ ID NO:29 所示核苷酸序列的互补链)。当然,仅与以下序列杂交的多核苷酸不包括在本发明用于杂交本发明核酸的一部分的多核苷酸内,因为这种多核苷酸会杂交含有聚(A) 序列或其互补序列的任何核酸分子(如,实际上用寡 dT 作引物产生的任何双链 cDNA 克隆),所述序列是聚(A) 序列(如图 1A 和 1B(SEQ ID NO:1) 所示 Neutrokin- α cDNA 的 3' 末端聚(A) 序列段,图 5A 和 5B(SEQ ID NO:18) 所示 Neutrokin- α SV cDNA 的 3' 末端聚(A) 序列段,或 SEQ ID NO:22 所示 Neutrokin- α SV cDNA 的 3' 末端聚(A) 序列段),或者是一段 T(或 U) 残基互补序列。

[0151] 如上所示,编码 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽的本发明的核酸分子可以包括但非限于:本身编码相应多肽胞外域的氨基酸序列的多核苷酸;相应多肽的胞外域的编码序列及额外序列,如编码胞内域和跨膜域序列的序列,或前蛋白,蛋白原或前蛋白原序列;有或无前述额外编码序列的相应多肽胞外域的编码序列。

[0152] 本发明核酸还编码具有额外的非编码序列的上述蛋白质序列,例如包括但非限于内含子和非编码的 5' 和 3' 序列,如在转录,mRNA 加工包括剪接和聚腺苷酸化信号中例如染色体结合及 mRNA 稳定性方面起作用的转录的、未翻译的序列;额外的编码序列,编码额外的氨基酸,如那些提供额外功能的氨基酸。

[0153] 因此,编码多肽的序列可融合于标记序列,如编码促进融合多肽纯化的肽的序列。在本发明的一些优选的实施方案中,标记氨基酸序列是 6-组氨酸肽,如 pQE 载体(QIAGEN, Inc,9259 Eton, Avenue, Chatsworth, CA,91311) 中提供的标签,其中许多可商购。如 Gentz 等,在美国科学院院报 86:821-824(1989) 中所述,6-组氨酸使融合蛋白常规纯化。“HA” 标签是另一种用于纯化的肽,其相当于衍生自流感血凝素蛋白的表位,以由 Wilson 等阐述,细胞 37:767(1984)。如下所述,其它这种融合蛋白包括在 N 或 C 末端融合于 Fc 的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽。

[0154] 本发明还涉及本发明核酸分子的变体,其编码 SEQ ID NO:2 的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽的一部分,类似物或衍生物。变体可以是天然发生的,如天然等位基因变体。“等位基因” 变体是指占据机体染色体上给定基因座的基因的一些变化形式之一。见基因 II, Lewin, B. ed, John Wiley & Sons, 纽约(1985)。非天然发生的变体可用本领域已知的诱变方法产生,包括但非限于寡核苷酸介导的诱变,丙氨酸扫描,PCR 诱变,定点诱变(例如见 Carter 等,核酸研究 13:4331(1986);和 Zoller 等,核酸研究 10:6487(1982),盒诱变(例如见 Wells 等,基因 34:315(1985)),限制性选择诱变(例如见 Wells 等,Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317:415(1986))。

[0155] 这种变体包括那些通过核苷酸取代,缺失或添加而产生的变体。此取代,缺失或添加可包含一或多个氨基酸。变体可以是在编码区,非编码区或这二区内变化。编码区内变化可产生保守或非保守氨基酸取代,缺失或添加。其中尤为优选的是沉默取代,添加和缺失,其不改变 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽或其一部分的性质和活性。同样尤

为优选的是保守氨基酸取代。

[0156] 本发明其它的实施方案涉及分离的核酸分子,其包含编码如下 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列的多核苷酸,该多肽的氨基酸序列含有至少 1 个但不超过 50 个,优选不超过 40 个,更优选不超过 30 个,尤其优选不超过 20 个,10-20 个,5-10 个,1-5 个,3-5 个,或 1-3 个保守氨基酸取代。当然,优选次序依次是编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的含有不超过 10,9,8,7,6,5,4,3,2,或 1 个保守氨基酸取代的氨基酸序列的多核苷酸。

[0157] 其它的实施方案包括分离的核酸分子,其包含或由选自以下一组多核苷酸有至少 80%,85%或 90%相同性,优选至少 95%,96%,97%,98%,或 99%相同性的核苷酸序列的多核苷酸组成:(a) 编码具有图 1A 和 1B 所示完整氨基酸序列(即 SEQ ID NO:2 的 1-285 位)的 Neutrokin- α 多肽的核苷酸序列;(b) 编码具有图 1A 和 1B 所示除 N 末端甲硫氨酸外完整氨基酸序列(即 SEQ ID NO:2 的 2-285 位氨基酸)的 Neutrokin- α 多肽的核苷酸序列;(c) 具有 Neutrokin- α 功能活性(如抗原性或生物活性)的(b)多肽的片段;(d) 编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中 73-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的推定的胞外域的核苷酸序列;(e) 编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的核苷酸序列;(f) 编码 Neutrokin- α 多肽的核苷酸序列,该多肽具有由保藏在 ATCC 保藏号 97768 的 cDNA 克隆编码的完整氨基酸序列;(g) 编码 Neutrokin- α 多肽胞外域的核苷酸序列,该多肽具有由保藏在 ATCC 保藏号 97768 的 cDNA 编码的氨基酸序列;和(h) 互补于以上(a),(b),(c),(d),(e),(f),(g)或(h)的任何核苷酸序列的核苷酸序列。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些多核苷酸和核酸分子编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0158] 本发明尤为优选的实施方案涉及核酸分子,其包含或由具有与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%相同性,优选至少 95%,96%,97%,98%,99%或 100%相同性的核苷酸序列的多核苷酸组成,所述 Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中 134-285 位氨基酸序列。本发明优选的实施方案涉及核酸分子,其包含或由具有与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 90%相同性的核苷酸序列的多核苷酸组成,所述 Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中 134-285 位氨基酸序列。本发明更优选的实施方案涉及核酸分子,其包含或由具有与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 95%相同性的核苷酸序列的多核苷酸组成,所述 Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中 134-285 位氨基酸序列。本发明更优选的实施方案涉及核酸分子,其包含或由具有与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 96%相同性的核苷酸序列的多核苷酸组成,所述 Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中 134-285 位氨基酸序列。

[0159] 另外,本发明更优选的实施方案涉及核酸分子,其包含或由具有与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 97%相同性的核苷酸序列的多核苷酸组成,所述 Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中 134-285 位氨基酸序列。本发明更优选的实施方案涉及核酸分子,其包含或由具有与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 98%相同性的核苷酸序列的多核苷酸组成,所述 Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2)中 134-285 位氨基酸序列。本发明更优选的实施方案涉及核酸分子,

其包含或由具有与编码 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 99% 相同性的核苷酸序列的多核苷酸组成,所述 Neutrokin- α 多肽具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2) 中 134-285 位氨基酸序列。

[0160] 本发明另一实施方案涉及包含多核苷酸的分离的核酸分子,该多核苷酸编码 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列(如本文所述 Neutrokin- α SV 多肽片段)含有至少 1 个但不超过 50 个,优选不超过 40 个,更优选不超过 30 个,最优选不超过 20 个保守氨基酸取代。当然,特别优选的多核苷酸是编码 Neutrokin- α 多肽氨基酸序列的,具有含有不超过 7-10,5-10,3-7,3-5,2-5,1-5,1-3,10,9,8,7,6,5,4,3,2,或 1 个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0161] 其它实施方案包括包含或由多核苷酸组成的分离的核酸分子,该多核苷酸具有与选自以下一组多核苷酸有至少 80%,85%,90% 相同性,优选至少 95%,96%,97%,98%,或 99% 相同性的核苷酸序列:(a) 编码具有图 5A 和 5B 所示完整氨基酸序列(即 SEQ ID NO:19 的 1-266 位)的 Neutrokin- α SV 多肽的核苷酸序列;(b) 编码具有图 5A 和 5B 所示除 N 末端甲硫氨酸之外完整氨基酸序列(即 SEQ ID NO:19 的 2-266 位)的 Neutrokin- α SV 多肽的核苷酸序列;(c) 编码具有 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 中 73-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α SV 多肽的推定的胞外域的核苷酸序列;(d) 编码 Neutrokin- α SV 多肽的核苷酸序列,该 Neutrokin- α SV 多肽具有由保藏在 ATCC 保藏号 203518 的 cDNA 克隆编码的完整氨基酸序列;(e) 编码 Neutrokin- α SV 多肽胞外域的核苷酸序列,该胞外域具有由保藏在 ATCC 保藏号 203518 的 cDNA 克隆编码的氨基酸序列;和 (f) 互补于上述 (a), (b), (c), (d) 或 (e) 中任何核苷酸序列的核苷酸序列。

[0162] 另外,本发明包括的多核苷酸包含或由至少 90% 或 95% 等同于图 1A 和 1B(SEQ ID NO:1) 中 1-1082 核苷酸序列的至少大约 10,20,25 或 30 个连续核苷酸,优选至少大约 40 或 50 个连续氨基酸的任何部分的序列组成,优选不包括从上述 4 个 cDNA 克隆中确定的核苷酸序列及 797-1082,810-1082,和 346-542 位核苷酸序列。本发明也包括一种多核苷酸,其包含或由至少 90% 或 95% 等同于图 5A 和 5B(SEQ ID NO:18) 所示序列的大约 10,20,25 或 30 个连续核苷酸,优选至少大约 40 或 50 个核苷酸的任何部分的序列组成,优选不包括从上述 4 个 cDNA 克隆中确定的核苷酸序列。本发明还包括一种多核苷酸,其包含或由至少 90% 或 95% 等同于 SEQ ID NO:21 所示序列的大约 10,20,25 或 30 个连续核苷酸,优选至少大约 40 或 50 个连续核苷酸的任何部分的序列组成,优选不包括从上述 4 个 cDNA 克隆中确定的核苷酸序列。本发明还包括一种多核苷酸,其包含或由至少 90% 或 95% 等同于 SEQ ID NO:22 所示序列的大约 10,20,25 或 30 个连续核苷酸,优选至少大约 40 或 50 个连续核苷酸的任何部分的序列组成,优选不包括从上述 4 个 cDNA 克隆中确定的核苷酸序列。本发明还包括一种多核苷酸,其包含或由至少 90% 或 95% 等同于 SEQ ID NO:27 所示序列的至少大约 10,20,25 或 30 个连续核苷酸,优选至少大约 40 或 50 个连续核苷酸的任何部分的序列组成,优选不包括从上述 4 个 cDNA 克隆中确定的核苷酸序列。本发明还包括一种多核苷酸,其包含或由至少 90% 或 95% 等同于 SEQ ID NO:29 所示序列的至少大约 10,20,25 或 30 个连续核苷酸,优选至少大约 40 或 50 个连续核苷酸的任何部分的序列组成,优选不包括从上述 4 个 cDNA 克隆中确定的核苷酸序列。文中“大约”包括特定的范围,以及在一端或两端多或少几个(即 5,4,3,2 或 1 个)氨基酸。

[0163] 具有与编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的参照核苷酸序列有例如至少 95% “相同性”的核苷酸序列的多核苷酸,是指此多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相同,除了此多核苷酸序列可以包括编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的参照序列的每 100 个核苷酸中有 5 个以上的错配。换言之,为获得具有与参照序列有至少 95% 相同性的核苷酸序列的多核苷酸,参照序列中接近 5% 的核苷酸可缺失或用其它核苷酸取代,或者占参照序列总核苷酸数目 5% 的核苷酸可插入参照序列中。参照序列中的这些突变可发生在参照核苷酸序列的 5' 或 3' 末端位置,或在这些末端位置之间的任何部位,分散在参照序列中各个核苷酸或者一或多个连续组之间。参照 (参比) 序列可以是编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的全部核苷酸序列,分别如图 1A 和 1B (SEQ ID NO:1) 和图 5A 和 5B (SEQ ID NO:18) 所示,或者是任何 Neutrokin- α 例如 SEQ ID NO:21,22,27,28 所示 Neutrokin- α 多核苷酸,或者是任何本文所述的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸的片段。

[0164] 实际上,任何特定的核酸分子是否至少 80%,85%,90%,95%,96%,97%,98% 或 99% 等同于例如图 1A 和 1B 所示核苷酸序列,或图 5A 和 5B 所示核苷酸序列,或保藏的 cDNA 克隆的核苷酸序列,或任何 Neutrokin- α 多核苷酸如 SEQ ID NO:21,22,27 或 28 所示 Neutrokin- α 多核苷酸或其片段,可常规地用已知计算机程序确定 (Wisconsin 序列分析程序包, Version 8 for Unix, 遗传学计算机小组, 大学研究园, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)。Bestfit 使用 Smith 和 Waterman 的局部同源序列对比程序发现两个序列间的最佳同源节段 (应用数学进展 2:482-489 (1981))。当使用 Bestfit 或任何其它序列对比程序以确定特定序列是否与本发明的参照序列具有例如 95% 相同性时,当然要设定参数,从而在全长参照核苷酸序列之上计算相同性百分率,且允许参照序列中有占总核苷酸数 5% 的同源缺口。

[0165] 在一特异的实施方案中,参照 (参比) 序列 (本发明的序列) 和目标序列之间的相同性,也称作整体序列对比,是用基于 Brutlag 及其同事的序列对比的 FAS TDB 计算机程序确定的 (Comp. App. Biosci 6:237-245 (1990))。在一序列对比中,参比序列与目标序列均是 DNA 序列。RNA 序列可通过将 U 转换为 T 而加以对比。所述整体序列对比的结果以相同性百分率表示。用于 DNA 序列的 FASTDB 序列对比以计算相同性百分率的优选参数是:Matrix = Unitary, k-tuple = 4, Mismatch Penalty = 1, Joining Penalty = 30, Randomization Group Length = 0, Cutoff Score = 1, Gap Penalty = 5, Gap Size Penalty = 0.05, Window Size = 500 或目标核苷酸序列长度,取更短的。根据此实施方案,如果目标序列因为 5' 或 3' 缺失而非因为内在缺失而比参比序列短,要对结果进行人工调整,因为 FASTDB 程序在计算相同性百分率时,未考虑到目标序列 5' 和 3' 截短。就相对于参比序列在 5' 和 3' 末端截短的目标序列而言,通过计算目标序列的 5' 和 3' 的参比序列的未匹配 / 对比的碱基数占参比序列总碱基数的百分比来调整相同性百分率。确定核苷酸是否是匹配 / 对比是通过 FASTDB 序列对比结果而确定。然后将此百分率从用特定参数通过上述 FASTDB 程序计算出的相同性百分率中减去,得到最后的相同性百分率。此调整的结果用于此实施方案的目的。只有通过 FASTDB 序列对比显示在目标序列的 5' 和 3' 碱基之外的,未与参比序列匹配 / 对比的碱基,需要计算以人工调整相同性百分率结果。例如,90 个碱基的目标序列与 100 个碱基的参比序列对比确定相同性百分率。缺失发生在目标序列的 5' 末端,因

而 FASTDB 序列对比未示出在 5' 末端前 10 个碱基的匹配 / 对比。此 10 个未配对的碱基代表 10% 的序列 (在 5' 和 3' 末端未匹配的碱基数 / 参比序列总碱基数), 因此这 10% 应从通过 FASTDB 程序计算的相同性百分率结果中减去。如果剩余的 90 个碱基充分匹配, 则最终相同性百分率为 90%。在另一实施例中, 90 个碱基的目标序列与 100 个碱基的参比序列相对比。这次缺失是内在缺失, 因此在目标序列的 5' 和 3' 端设有未与参比序列匹配 / 对比的碱基。在这种情况下, 由 FASTDB 计算的相同性百分率不需要人工调整。同样, 只有目标序列的 5' 和 3' 碱基未与参比序列匹配 / 对比, 才需要人工调整。此实施方案不需要进行其它人工调整。

[0166] 本发明涉及与本文揭示的核酸序列 (即多核苷酸) 有至少 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的核酸分子, 不论它们是否编码具有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性 (如生物活性) 的多肽, 本文所揭示的核酸序列例如是图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 1) 所示序列或保藏的 cDNA 的核苷酸序列。另外, 本发明还涉及与图 5A 和 5B (SEQ ID NO: 18) 所示核酸序列或保藏的 cDNA 的核酸序列有至少 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的核酸分子, 不论它们是否编码具有 Neutrokin- α SV 活性的多肽。另外, 本发明还涉及与 SEQ ID NO: 21, 22, 27 或 28 所示核酸序列有至少 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的核酸分子, 不论它们是否编码具有 Neutrokin- α 活性的多肽。这是因为即使一特定核酸分子不编码具有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性的多肽, 本领域技术人员也知道怎样使用此核酸分子例如作为杂交探针或聚合酶链反应 (PCR) 引物。本发明的不编码具有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性的多肽的核酸分子的用途包括: (1) 在 cDNA 文库中分离 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因或其等位基因变体; (2) 与中期染色体涂片原位杂交 (如“FISH”), 以提供 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因的准确染色体位置, 如 Verma 等, 人染色体基本方法手册, Pergamon 出版社, 纽约 (1988) 中所述; 及用于 Northern 印迹分析以检测 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SVmRNT 在特异组织中的表达。

[0167] 然而, 优选的与本文所揭示的核酸序列 (如图 1A 和 1B (SEQ ID NO: 1) 所示核苷酸序列, 或和保藏的 cDNA 的核酸序列, 或它们的片段) 有至少 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的核酸分子, 并且其事实上编码具有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽。同样优选的有与图 5A 和 5B (SEQ ID NO: 18) 所示的核酸序列, 或保藏的 cDNA 的核酸序列有至少 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的核酸分子, 并且其事实上编码具有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽。同样优选的是具有与 SEQ ID NO: 21, 22, 27, 或 28 所示核酸序列有至少 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 或 98% 相同性的序列的核酸分子, 并且其事实上编码具有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽。

[0168] “具有 Neutrokin- α 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽” 和 “具有 Neutrokin- α SV 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽”, 是指在特定的功能分析 (如免疫学或生物学分析) 中测定的, 与本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的胞外域或全长多肽的活性呈现基本相似, 但不必相同的活性的多肽。例如, Neutrokin- α

和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的功能活性可通过所述多肽序列与完整的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 或者 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的胞外域形成多聚体 (如同源二聚体和同源三聚体) 的能力, 及结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽配体的能力而测定。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽功能活性也可通过确定本发明多肽诱导淋巴细胞 (如 B 细胞) 增殖, 分化或活化和 / 或延长 B 细胞存活时间的能力而测定。这些功能分析可用本文所述方法 (例如见实施例 6) 和本领域已知其它方法常规进行。另外, 本发明的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽调节细胞增殖, 胞毒性, 细胞存活及细胞死亡。可通过使用本领域熟知的且通常可购买的检测细胞复制和 / 或死亡的试剂进行体外细胞增殖, 胞毒性, 细胞存活及细胞死亡分析, 以测定蛋白质对某些细胞的作用。例如, 许多对 TNF 相关蛋白活性的这种分析见于各种参考文献中。简而言之, 这种分析例如包括收集人或动物 (如鼠) 细胞, 并将它们与 (1) 含有 Neutrokin- α 蛋白 (或候选多肽) 的转染的宿主细胞上清, 或 (2) 对照的未转染的宿主细胞上清混合, 在温育一定时间之后, 测定对细胞数目或生存力的影响。这种在此类分析中可测定的细胞增殖和 / 或存活调节活性可用于治疗肿瘤, 肿瘤转移, 感染, 自身免疫疾病, 炎症和其它免疫相关的疾病。

[0169] Neutrokin- α 在上述分析中, 以剂量依赖性方式调节细胞增殖和分化。因此, 优选的“具有 Neutrokin- α 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽”, 包括在上述分析中以剂量依赖性方式也呈现任何一些细胞调节 (尤其免疫调节) 活性的多肽。尽管剂量依赖性活性的程度不需要等同于 Neutrokin- α 多肽, 但优选地“具有 Neutrokin- α 多肽功能活性的多肽”与 Neutrokin- α 多肽相对比, 在给定的活性中基本呈现相似的剂量依赖性 (即候选多肽比参考的 Neutrokin- α 多肽呈现较高活性, 或不低于 25 倍优选不低于 10 倍活性)。

[0170] 在某些优选的实施方案中, “具有 Neutrokin- α 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽”和“具有 Neutrokin- α SV 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽”, 包括也呈现图 8A, 8B, 9A, 9B, 11, 10, 12A 和 12B 和实施例 6 中所述任何相同 B 细胞 (或其它细胞) 调节 (尤其免疫调节) 活性的多肽。

[0171] 与 TNF 家族其它成员相似, Neutrokin- α 呈现对血细胞例如包括单核细胞, 淋巴细胞 (如 B 细胞) 和中性粒细胞起作用。因此, Neutrokin- α 在诱导这些细胞增殖, 分化和迁移中是活性的。这种活性用于免疫增强或抑制, 骨髓保护, 干细胞迁移, 控制急性和慢性炎症, 及治疗白血病。本领域已知测定这种活性的方法。例如见 Peters 等, 现代免疫学 17:273(1996); Young 等, 实验方法杂志 182:1111(1995); Caux 等, 自然 390:258(1992); 和 Santiago-Schwarz 等, 生物学实验方法进展 378:7(1995) 所述。

[0172] 当然, 由于遗传密码的简并性, 本领域技术人员将立即认识到大量核酸分子将编码“具有 Neutrokin- α 多肽功能活性 (如生物活性)”的多肽, 所述核酸分子具有至少 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 等同于 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的 cDNA 克隆包含的核酸序列, 或图 1A 和 1B (SEQ ID NO:1) 所示核酸序列, 或它们的片段的序列。本领域技术人员也将立即意识到大量核酸分子编码“具有 Neutrokin- α SV 多肽功能活性 (如生物活性) 的多肽”, 所述核酸分子具有与 ATCC 保藏号 203518 的 cDNA 克隆中包含的核酸序列, 或图 5A 和 5B (SEQ ID NO:18) 中所示核酸序列, 有至少 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的序列。事实上, 由于这些核苷酸序列的

简并变体都编码相同多肽,即使不进行上述对比分析,本领域技术人员也清楚这一点。本领域进一步意识到不是简并变体的这种核酸分子,有一些也编码具有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性的多肽。这是因为本领域技术人员充分意识到氨基酸取代几乎不明显影响或不明显影响蛋白质功能(如用另一个脂族氨基酸置换一个脂族氨基酸),详见下述。

[0173] 相似地,编码含有全部或部分 SEQ ID NO:2 的 V142-K160 区域的多肽的多核苷酸,似乎是检测和 / 或改变 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸表达的有诊断和治疗价值的多核苷酸。另外,跨越 SEQ ID NO:19 所示 Neutrokin- α SV 多肽 T141 和 G142 氨基酸残基结合部(在之间明显地插入 Neutrokin- α 的 V142-K160 氨基酸序列)的多核苷酸,似乎也有诊断和治疗作用。这种 T141/G142 跨越多核苷酸呈现与 Neutrokin- α SV 多核苷酸杂交比与 Neutrokin- α 多核苷酸更高的可能性。由本发明的多核苷酸编码的这种 Neutrokin- α SV 的部分非限制性非排除性例子包含或由选自以下的氨基酸序列组成: SEQ ID NO:19 的 G121-E163;E122-E163;G123-E163;N124-E163;S125-E163;S126-E163;Q127-E163;N128-E163;S129-E163;R130-E163;N131-E163;K132-E163;R133-E163;A134-E163;V135-E163;Q136-E163;G137-E163;P138-E163;E139-E163;E140-E163;T141-E163;G142-E163;S143-E163;Y144-E163;T145-E163;F146-E163;U147-E163;P148-E163;W149-E163;L150-E163;L151-E163;S152-E163;F153-E163;K154-E163;R155-E163;G156-E163;S157-E163;A158-E163;L159-E163;E160-E163;E161-E163;K162-E163;G121-K162;G121-E161;G121-E160;G121-L159;G121-A158;G121-S157;G121-G156;G121-R155;G121-K154;G121-F153;G121-S152;G121-L151;G121-L150;G121-W149;G121-P148;G121-V147;G121-F146;G121-T145;G121-Y144;G121-S143;G121-G142;G121-T141;G121-E140;G121-E139;G121-P138;G121-G137;G121-Q136;G121-V135;G121-A134;G121-R133;G121-K132;G121-N131;G121-R130;G121-S129;G121-N128;G121-Q127;G121-S126;G121-S125;G121-N124;G121-G123;和 G121-E122。

[0174] 由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。

[0175] 载体和宿主细胞

[0176] 本发明还涉及一种包括本发明分离的 DNA 分子的载体,用此重组载体基因工程化的或其他方式工程化的产生本发明多肽的宿主组载体基因工程化的或其他方式工程化的产生本发明多肽的宿主细胞,及通过重组或合成方法生产 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的方法。

[0177] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸与载体(如克隆或表达载体)连接。载体例如可以是噬菌体,质粒,病毒或逆转录病毒载体。逆转录病毒载体可以是能复制的或复制缺陷的。在后者的情况下,病毒增殖一般只发生在互补的宿主细胞中。多核苷酸可与含有可选择的标记的载体连接以在宿主中增殖。将载体构建体导入宿主细胞可通过本领域已知技术进行,包括但非限于磷酸钙转染,DEAE-葡聚糖介导的转染,阳离子脂质体介导的转染,电穿孔,转导,感染或其它方法。这些方法见于许多标准实验手册中所述,如 Davis 等,分子生物学基本方法(1986)。

[0178] 一般地,重组表达载体包括复制起点和允许宿主细胞转化的选择标记,如大肠杆菌的氨苄青霉素抗性基因和啤酒糖酵母 TRP1 基因,及衍生自高表达基因的指导下游结构

序列的转录的启动子。这种启动子可衍生自编码糖酵解酶如 3- 磷酸甘油酸激酶 (PGK), α 因子, 酸性磷酸酶, 或热休克蛋白等操纵子。异源结构序列以具有翻译起始和终止序列, 优选能直接将翻译的蛋白质分泌入周质空间或胞外培养基中的前导序列的适当状态进行装配。任选地, 异源序列可编码一种融合蛋白, 其包括具有所需特征的 N 末端鉴别肽, 例如稳定或简便地纯化表达的重组产物。

[0179] 在一个实施方案中, 本发明的 DNA 与适当的异源调节因子 (如启动子或增强子) 相结合, 如 λ -噬菌体 PL 启动子, 大肠杆菌 Lac, Trp, PhoA 和 tac 启动子, SV40 早期和晚期启动子, 和逆转录病毒 LTRs 的启动子等。本领域也已知其它适当启动子。

[0180] 如上所述, 表达载体优选包括至少一个选择标记。这种标记包括针对真核细胞培养的二氢叶酸还原酶, G418 或新霉素抗性基因和针对大肠杆菌和其它细菌培养的四环素, 卡那霉素或氨基糖苷类抗生素抗性基因。适当宿主例如包括但非限于细菌细胞如大肠杆菌, 链霉菌属, 鼠伤寒沙门氏杆菌; 真菌细胞如酵母细胞 (如酿酒酵母或巴斯德毕赤氏酵母 (ATCC No. 201178)); 昆虫细胞如果蝇 S2 和草地夜蛾 Sf 9 细胞; 动物细胞如 CHO, COS, 293 和 Bowes 黑素瘤细胞; 及植物细胞。本领域已知上述宿主细胞的适当的培养基和培养条件。

[0181] 宿主细胞可以是高等真核细胞, 如哺乳动物细胞 (例如人衍生的细胞), 或低等真核细胞如酵母细胞, 或者宿主细胞可以是原核细胞如细菌细胞。可选择以所需特殊方式调节插入的基因序列的表达, 或修饰和加工基因产物的宿主菌株。可在存在某些诱导物的情况下提高从某些启动子中的表达; 因此基因工程化的多肽的表达可以控制。另外, 不同的宿主细胞具有翻译和翻译后加工和修饰 (如磷酸化, 裂解) 蛋白的特征和特殊机制。可选择适当的细胞系以增强外源表达的蛋白质的所需修饰和加工。在宿主细胞中表达的适当载体和启动子的选择是本领域所熟知的, 且表达载体构建, 将载体导入宿主并在宿主中表达的必需方法本领域技术人员也已知。

[0182] 用于细菌的有效的表达载体是通过将编码所需蛋白的结构 DNA 序列, 与适当的翻译起始和终止信号一起插入具有功能性启动子的可操纵阅读框而构建。载体包含一或多个表型选择标记和一个复制起点以维持载体, 且如果需要, 则提供在宿主内扩增。进行转化的适当原核细胞宿主包括大肠杆菌, 枯草芽孢杆菌, 鼠伤寒杆菌, 和假单胞菌属, 链霉菌属和葡萄球菌属内的各种菌种, 尽管其它菌种也可选择应用。用于细胞的表达载体代表性而非限制性地可包含一个选择标记和细菌复制起点, 细菌复制起点衍生自商购的包含熟知的克隆载体 pBR 322 (ATCC 37017) 的遗传因子的质粒。这种购买的载体例如包括 pKK 223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 和 GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA)。这些 pBR322“骨架”部分与适当的启动子和被表达的结构序列组合。优选的用于细菌的载体包括购自 QIAGEN 公司的 pHE4-5 (ATCC No. 209311; 及其变异体), pQE70, pQE60, 和 pQE-9; 购自 Stratagene 的 pBS 载体, Phagescript 载体, Bluescript 载体, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A; 购自 Pharmacia 的 ptrc 99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5。用于酵母系统的优选表达载体包括但非限于 pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZ α , pPIC 9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC 3.5K, pPIC9K, 和 PA0815 (均可购自 Invitrogen, Carlsbad, CA)。优选的真核细胞载体是购自 Stratagene 的 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 和 pSG; 和购自 Pharmacia 的 pSVK3, pBPV, pMSG, 和 pSVL。

[0183] 其它适当载体本领域技术人员也已知。

[0184] 在适当的宿主菌株转化及生长至适当细胞密度之后,通过适当方法诱导选择的启动子(如温度变换或化学诱导),并将细胞另外培养一段时间。细胞通过离心收获,通过物理或化学方法破坏,并保留所得粗提物以进一步纯化。

[0185] 用于蛋白质表达的微生物细胞可通过任何常规方法破坏,包括冷冻-融化循环,超声处理,机械破坏,或使用细胞裂解剂,这些方法本领域技术人员是熟知的。

[0186] 在一个上述实施方案中,巴斯德毕赤氏酵母用于真核细胞系统中表达 Neutrokin- α 蛋白。巴斯德毕赤氏酵母是一种甲基营养酵母,能代谢作为其唯一的碳源的甲醇。甲醇代谢途径中的一个主要步骤是甲醇与 O_2 氧化为甲醛。此反应通过醇氧化酶催化。为代谢作为其唯一的碳源甲醇,巴斯德毕赤氏酵母必须产生高水平的醇氧化酶,因为醇氧化酶与 O_2 的亲合性较低。所以,在甲醇作为主要碳源的生长培养基中,一或二个醇氧化酶基因(AOX 1)的启动子区是高活性的。在存在甲醇的情况下,产自 AOX 1 基因的醇氧化酶包含巴斯德毕赤氏酵母中总可溶蛋白的约 30%以上。见 Ellis, S.B. 等,细胞分子生物学 5:1111-21(1985);Koutz, P.J. 等,酵母 5:167-77(1989);Tschopp, J.F. 等,核酸研究 15:3859-76(1987)。因此,异源编码序列如本发明的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽,在全部或部分 AOX 1 调节序列的转录调节下,在存在甲醇的情况中生长的毕赤氏酵母中以罕见的高水平表达。

[0187] 在一个实施例中,质粒载体 pPIC 9K 用于在毕赤氏酵母系统中表达编码 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽的 DNA,毕赤氏酵母酵母系统基本如“毕赤氏酵母方案:分子生物学方法”,D.R.Higgins 和 J.Cregg 编辑,Humana 出版社, Totowa, NJ, 1998 所述。此表达载体借助于与位于多克隆位点上游的巴斯德毕赤氏酵母碱性磷酸酶(PHO)分泌信号肽(即引导序列)连接的强 AOX 1 启动子,使本发明的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 蛋白质表达和分泌。

[0188] 本领域技术人员意识到许多其它酵母载体可用于置换 pPIC9K,如 pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZ α , pPIC 9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC 3.5K, 和 PA0815,只要所提议的表达构建体提供了转录,翻译,分泌(如果需要)等的适当的定位信号,包括所需的框内 AUG。

[0189] 在一个实施方案中,异源编码序列如本发明的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸的高水平表达,可通过将本发明的异源多核苷酸克隆入表达载体如 pGAPZ 或 pGAPZ α 中,并在无甲醇情况下培养酵母物而获得。

[0190] 编码本发明多肽的 DNA 通过高等真核生物的转录,通过将增强子序列插入载体而得以提高。增强子是 DNA 的顺式作用因子,通常长度为 10-300bp,其作用于启动子以提高其转录。例如包括在复制起点晚期一侧 100-270 个 bp 的 SV40 增强子,巨细胞病毒早期启动子增强子,在复制起点晚期一侧的多瘤病毒增强子,和腺病毒增强子。

[0191] 各种哺乳动物细胞培养系统也可用于表达重组蛋白。哺乳动物表达系例如包括由 Gluzman 所述的猴肾成纤维细胞的 COS-7 细胞系(细胞 23:175(1981)),和能表达相容性载体的其它细胞系,例如 C127, 3T3, CHO, HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体包含一个复制起点,一个适当的启动子和增强子,及任何必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' 侧翼未转录的序列。衍生自 SV40 剪接体的 DNA 序列,及聚腺苷酸化位点也可用于提供所需的未转录的遗传因子。

[0192] 在一特异的实施方案中,优选表达 Neutrokin- α 的胞外域的一部分(如 Ala 134-Leu285 氨基酸残基)的构建体。本领域技术人员能使用分别由 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19 所示的多核苷酸和多肽序列设计多核苷酸引物以产生这种表达构建体。

[0193] 在另一实施方案中,优选表达 Neutrokin- α 的全部推定的胞外域(即 Gln73-Leu285 氨基酸残基)的构建体。本领域技术人员能使用分别由 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19 所示的多核苷酸和多肽序列设计多核苷酸引物以产生这种表达构建体。

[0194] 除了涵盖含有所述载体构建体的宿主细胞之外,本发明还涵盖了原代,继代,和无限增殖的脊椎动物来源的,尤其哺乳动物来源的宿主细胞,该宿主细胞已经工程化缺失或置换内源性遗传物质(如 Neutrokin- α 编码序列),和/或包括遗传物质(如异源多核苷酸序列),该遗传物质与本发明的 Neutrokin- α 多核苷酸相关,并激活,改变和/或扩增 Neutrokin- α 多核苷酸。例如,本领域已知方法可用于通过同源组合可操纵地结合异源控制区(如启动子和/或增强子)和内源性 Neutrokin- α 多核苷酸序列(例如见 1997 年 6 月 24 日颁发的美国专利 No. 5641670;1996 年 9 月 26 日公布的国际出版物 No. WO 96/29411;1994 年 8 月 4 日公布的国际出版物 No. WO 94/12650;Koller 等,美国科学院院报 86:8932-8935(1989);和 Zijtstra 等,自然 342:435-438(1989),以所示文献的全部并入参考)。

[0195] 前述宿主细胞可以常规方式使用,以产生由重组序列编码的基因产物。或者,无细胞翻译系统也可用衍生自本发明的 DNA 构建体的 RNA 产生本发明的多肽。

[0196] 本发明的多肽可以修饰的形式表达或合成,如融合蛋白(包括通过肽键与(不同蛋白质)的异源蛋白质序列结合的多肽),且可以不仅包括分泌信号,也包括另外的异源功能区。这种融合蛋白可通过将本发明的多核苷酸与编码所需氨基酸序列的所需核酸序列在适当读框中彼此连接,并通过本领域已知方法表达融合蛋白产物。或者,这种融合蛋白可通过蛋白质合成方法生产,如使用肽合成仪。因此,例如额外的氨基酸区域,尤其极性氨基酸,可以加入多肽的 N 末端以在纯化期间,或在随后的保持和储存期间改良稳定性和持续性。同样,肽组成成分可加入多肽中以促进纯化。这种区域可在最终制备多肽之前除去。在多肽中加入肽组分以产生分泌或排泄,或改良稳定性及促进纯化等,是本领域熟知并常用的方法。

[0197] 在一个实施方案中,编码本发明 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸可融合于 pelB 果胶酸酯裂合酶信号序列,以提高在革兰氏阴性细菌中这种多肽的表达和纯化效力。见美国专利 No. 5576195 和 5846818,以它们的全部并入参考。

[0198] 一优选的融合蛋白包含免疫球蛋白的一异源区域,其用于稳定和纯化蛋白质。例如 EP-A-0464533(加拿大对应申请 2045869)揭示了包含免疫球蛋白分子的恒定区的各部分及其它人体蛋白或其部分的融合蛋白。在许多情况下,融合蛋白中的 Fc 部分用于治疗 and 诊断是非常有利的,因而例如改良药物动力学性质(EP-A 0232262)。另一方面,在融合蛋白已经以上述有利方式表达,检测及纯化之后,需要能将此 Fc 部分除去。这是在当 Fc 部分成为治疗与诊断中的障碍的情况中,例如当融合蛋白用作免疫接种的抗原时。在药物开发中,例如人体蛋白如 hIL-5 已与 Fc 部分融合,用于高产量筛选分析以鉴别 hIL-5 的拮抗

剂。见 D. Bennett 等, 分子识别杂志 8 :52-58 (1995) 和 K. Johanson 等, 生物化学杂志 270 : 9459-9471 (1995)。

[0199] 本发明的多肽包括天然纯化的产物, 化学合成的产物, 和通过重组方法从原核或真核宿主中产生的产物, 宿主例如包括细菌, 酵母, 高等植物, 昆虫和哺乳动物细胞。根据重组生产方法中使用的宿主, 本发明的多肽可以是糖基化或非糖基化的。另外, 本发明的多肽也可包括由宿主介导的加工所致的初始修饰的甲硫氨酸残基。

[0200] 本发明的多肽可用本领域已知技术化学合成 (例如 : Creighton, 1983, 蛋白质结构和分子学原理, W. H. Freeman & Co., N. y., 和 Hunkapiller, M., 等, 1984, 自然 310 : 105-111)。例如, 相当于本发明完整 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽的片段的肽, 可使用肽合成仪合成。另外, 如果需要, 非经典的氨基酸或化学氨基酸类似物可作为取代物或添加物导入 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸序列。非经典的氨基酸包括但不限于限于普通氨基酸的 D 异构体, 2, 4- 二氨基丁酸, α - 氨基异丁酸, 4- 氨基丁酸, Abu, 2- 氨基丁酸, g-Abu, e-Ahx, 6- 氨基己酸, Aib, 2- 氨基异丁酸, 3- 氨基丙酸, 鸟氨酸, 正亮氨酸, 正缬氨酸, 羟脯氨酸, 肌氨酸, 瓜氨酸, 正瓜氨酸, 胱氨酸, 叔丁基甘氨酸, 叔丁基丙氨酸, 苯甘氨酸, 环己基丙氨酸, b- 丙氨酸, 氟代氨基酸, 设计者 (designer) 氨基酸如 b- 甲基氨基酸, Ca- 甲基氨基酸, Na- 甲基氨基酸, 和氨基酸的一般类似物。另外, 氨基酸可以是 D (右旋的) 或 L (左旋的)。

[0201] 本发明涵盖了在翻译期间或之后特异修饰的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽, 例如通过糖基化, 乙酰化, 磷酸化, 酰胺化, 通过已知保护 / 阻断基团的衍生化, 蛋白酶切, 与抗体分子或其它细胞配体连接等。任何化学修饰可通过已知方法进行, 包括但不限于通过溴化氰, 胰蛋白酶, 糜蛋白酶, 木瓜蛋白酶, V8 蛋白酶, NaBH_4 化学裂解, 乙酰化, 甲酰化, 氧化, 还原, 在存在衣霉素的情况下代谢合成等。

[0202] 本发明涵盖的其它翻译后修饰例如包括 N- 连接的或 O- 连接的碳水化合物链, N 或 C 末端的加工, 化学组分附着于氨基酸骨架, N 连接或 O 连接的碳水化合物链的化学修饰, 及由于原核生物宿主细胞表达所致 N 末端甲硫氨酸残基的添加或缺失。多肽也可用可检测标记修饰, 如可检测及分离蛋白质的酶标记, 荧光素标记, 同位素或亲和性标记。另外, 本发明的多肽可通过碘化作用而修饰。

[0203] 在一个实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽也可用生物素标记。在另外一相关的实施方案中, 生物素酰化的本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽, 例如可用作鉴别一或多种 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体或其它共同受体或共同配体分子的显影剂或工具。

[0204] 本发明还提供了 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 的化学修饰的衍生物, 其具有额外的优点如增加可溶性, 稳定性和多肽的体内或体外循环时间, 或降低免疫原性 (见美国专利 No. 4179337)。用于衍生化的化学组分可选自水溶性聚合物如聚乙二醇, 乙二醇 / 丙二醇共聚物, 羧甲基纤维素, 葡聚糖, 聚乙烯醇等。多肽可在分子内的随机位置修饰, 或在分子内预定位置修饰, 且可包括 1, 2, 3, 或多个附着的化学组分。

[0205] 聚合物可以是任何分子量的, 且可以有分支或无分支。就聚乙二醇而言, 优选的分子量在大约 1-100KDa 之间 (术语“大约”指在聚乙二醇的制备中, 一些分子重或轻于标准分子量) 以易于使用及生产。根据所需治疗原则 (如所需持续释放的持续时间, 对生物活

性的影响,易于使用,抗原性的程度或丧失,及聚乙二醇对治疗性蛋白质或类似物的已知作用),可使用其它大小的聚乙二醇。例如聚乙二醇的平均分子量可以是大约 200,500,1000,1500,2000,2500,3000,3500,4000,4500,5000,5500,6000,6500,7000,7500,8000,8500,9000,9500,10,000,10,500,11,000,11,500,12000,12500,13000,13500,14000,14500,15000,15500,16000,16500,17000,17500,18000,18500,19000,19500,20000,25000,30000,35000,40000,50000,55000,60000,65000,70000,75000,80000,85000,90000,95000 或 100,000KDa。

[0206] 如上所示,聚乙二醇可具有分支结构。分支的聚乙二醇例如由美国专利 No. 5643 575 ;Morpurgo 等,生物化学生物技术应用 56 :59-72(1996) ;Vorobjev 等,核苷核苷酸 18 :2745-2750(1999) ;和 Caliceti 等,生物缀合化学 10 :638-646(1996) 所述,所述文献以其全部并入参考。

[0207] 聚乙二醇分子(或其它化学组分)附着于蛋白质上时应考虑其对蛋白质功能域或抗原性结构域的影响。本领域已知许多附着方法,如 EPO 401 384(PEG 与 G-CSF 偶合),也见于 Malik 等,Exp. Hematol. 20 :1028-1035(1992) (用 tresyl chloride 对 GM-CSF 进行 pegylation) 所述。例如,聚乙二醇可以通过反应基团如游离氨基或羧基共价结合氨基酸残基。反应基团是那些活化的聚乙二醇分子可以结合的基团。具有游离氨基的氨基酸残基可例如包括赖氨酸残基和 N 末端氨基酸残基;具有游离羧基的氨基酸残基可包括天冬氨酸残基,谷氨酸残基和 C 末端氨基酸残基。巯基也可用作附着聚乙二醇分子的反应基团。治疗目的优选的是在氨基附着,如附着在 N 末端或赖氨酸基团。

[0208] 如上所示,聚乙二醇可通过与任何氨基酸连接而附着于蛋白质。例如,聚乙二醇可通过与赖氨酸,组胺,天冬氨酸,谷氨酸或半胱氨酸的共价键而连于蛋白质上。一或多种反应化学性可用于聚乙二醇附着于蛋白质的特异的氨基酸残基(如赖氨酸,组织胺,天冬氨酸,谷氨酸或半胱氨酸),或蛋白质的一种以上氨基酸残基(如赖氨酸,组织胺,天冬氨酸,谷氨酸或半胱氨酸及其组合)

[0209] 人们可以特别地需求在 N 末端化学修饰的蛋白质。以聚乙二醇为例,可选择各种聚乙二醇分子(通过分子量,分支等),聚乙二醇分子与蛋白质(或肽)分子在反应混合物中的比例,进行 PEG 化(pegylation) 反应的类型,获得选择的 N 末端 PEG 化蛋白质的方法。获得 N 末端 PEG 化制备物的方法(即如果需要从其它单 PEG 化的组分中分离此组分)可以通过将 N 末端 PEG 化物质从 PEG 化的蛋白质分子群中纯化。在 N 末端修饰的化学修饰的选择的蛋白质可通过还原烷化反应而达到,该反应利用适于在特殊蛋白质中衍生化的不同类型的原始氨基团(相对 N 末端的赖氨酸)的不同反应性。在适当的反应条件下,基本达到蛋白质在 N 末端用含有聚合物的羰基团的选择性衍生化。

[0210] 如上所示,本发明蛋白质的 PEG 化可通过许多方法达到。例如,聚乙二醇可直接或通过间插接头附着于蛋白质。将聚乙二醇附着于蛋白质的接头系统见于 Delgado 等,Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys, 9 :249-304(1992) ;Francis 等,Intern. J of Hematol. 68 :1-18(1998) ;美国专利 No. 4002531 ;美国专利 No. 5349052 ;WO 95/060 58 ;和 WO98/32466 所述。上述文献以其全部并入参考。

[0211] 一个将聚乙二醇不用间插接头而直接附着于蛋白质的氨基酸残基的系统利用 tresylated 的 MPEG, tresylated 的 MPEG 是用 2,2,2- 三氟乙烷磺酰氯 ($\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$) 修饰

单甲氧基聚乙二醇 (MPEG) 而产生的。基于蛋白质与 tresylated MPEG 的反应, 聚乙二醇直接附着于蛋白质的胺基团。因此, 本发明包括通过本发明的蛋白质与具有 2,2,2-三氟乙烷磺酰基团的聚乙二醇分子反应而产生的蛋白质-聚乙二醇缀合物。

[0212] 聚乙二醇也可用许多不同的间插接头附着于蛋白质。例如美国专利 No. 5612460 (以其全文并入参考) 揭示了将聚乙二醇与蛋白连接起来的尿烷接头。在其中聚乙二醇是通过接头附着于蛋白质的蛋白质-聚乙二醇缀合物, 也可通过蛋白质与化合物反应而产生, 所述化合物如 MPEG-琥珀酰亚氨基琥珀酸酯, 用 1,1'-羰基二咪唑活化的 MPEG, MPEG-2,4,5-三氯苯基碳酸酯, MPEG-对硝基苯酚碳酸酯, 和各种 MPEG-琥珀酸酯衍生物。另外一些聚乙二醇附着于蛋白质的聚乙二醇衍生物和反应化学过程见 WO 98/32466 所述, 以其全文并入参考。用本文所述化学反应过程产生的 PEG 化蛋白质产物包括在本发明内。

[0213] 附着于本发明每种蛋白质的聚乙二醇组成成分的数目 (即取代程度) 也可以变化。例如, 本发明 PEG 化的蛋白质平均可连接 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,17,20, 或更多个聚乙二醇分子。相似地, 平均取代程度在如 1-3,2-4,3-5,4-6,5-7,6-8,7-9,8-10,9-11,10-12,11-13,12-14,13-15,14-16,15-17,16-18,17-19, 或 18-20 个聚乙二醇组分/蛋白质分子。确定取代程度的方法见 Delgado 等, Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9: 249-304 (1992) 所述。

[0214] Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽可通过已知方法回收和纯化, 所述方法包括但非限于硫酸铵或乙醇沉淀, 酸提取, 阴离子或阳离子交换层析, 磷酸纤维素层析, 疏水作用层析, 亲和性层析, 羟磷灰石层析, 和凝集素层析。优选高效液相层析 (“HPLC”) 用于纯化。

[0215] Neutrokin- α 多肽

[0216] 本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽可以是单体或多聚体 (即二聚体, 三聚体, 四聚体, 及更高的多聚体)。因此, 本发明涉及本发明 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽的单体和多聚体, 它们的制备及包含它们的组合物 (优选药物组合物)。在特异的实施方案中, 本发明的多肽是单体, 二聚体, 三聚体或四聚体。在另外的实施方案中, 本发明的多聚体至少是二聚体, 三聚体或四聚体。

[0217] 本发明涵盖的多聚体可以是同源聚合物或异源聚合物。本文所用术语“同源聚合物”是指只含有本发明 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽 (包含 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 的片段, 变体和融合蛋白) 的多聚体。这些同源聚合物可含有具有相同或不同氨基酸序列的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽。在一特异的实施方案中, 本发明的同源聚合物是只含有具有相同氨基酸序列的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽的多聚体。在另一特异的实施方案中, 本发明的同源聚合物是含有具有不同氨基酸序列的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽的多聚体。在特异的实施方案中, 本发明的多聚体是同源二聚体 (如含有具有相同或不同氨基酸序列的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽), 或同源三聚体 (如含有具有相同或不同氨基酸序列的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽)。在一优选的实施方案中, 本发明的多聚体是同源三聚体。在另一实施方案中, 本发明的同源多聚体至少是同源二聚体, 同源三聚体或同源四聚体。

[0218] 文中所用术语“异源聚合物”是指含有除本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽之外,含有异源多肽(即不同蛋白质的多肽)的多聚体。在一特异的实施方案中,本发明的多聚体是异源二聚体,异源三聚体或异源四聚体。在另外的实施方案中,本发明的异源聚合物至少是异源二聚体,异源三聚体或异源四聚体。在另一未除外的实施方案中,本发明的异源聚合物含有 CD40 配体多肽序列,或其有生物活性的片段或变体。

[0219] 本发明的多聚体可以是疏水的,亲水的,离子的和 / 或共价缔合和 / 或可以是间接连接的,例如通过脂质体形成连接。因此在一个实施方案中,本发明的多聚体如同源二聚体,或同源三聚体,是在当本发明的多肽在溶液中与另一多肽接触时形成的。在另一的实施方案中,本发明的异源聚合物如异源三聚体或异源四聚体,是在当本发明的多肽在溶液中与本发明多肽的抗体(包括本发明融合蛋白中异源多肽序列的抗体)接触时形成的。在其它实施方案中,本发明的多聚体是通过与和 / 或本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽之间的共价关系而形成的。这种共价关系可包含一或多个包含于多肽序列中的氨基酸残基(多肽序列如是 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:19 所示序列或与本发明相关的保藏的 cDNA 克隆编码的多肽的序列)。在一种情况下,共价缔合是位于多肽序列中在天然(即天然发生的)的多肽中相互作用的半胱氨酸残基之间的交联。在另一种情况下,共价缔合是化学或重组操作的结果。或者,这种共价关系可包含 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 融合蛋白中的异源多肽序列所包含的一或多个氨基酸残基。在一个实施例中,共价缔合是本发明融合蛋白中包含的异源序列之间的共价缔合(见例如美国专利 No. 5478925 所述)。在一特异的实施例中,共价缔合是本发明 Neutrokin- α -Fc 和 / 或 Neutrokin- α SV-Fc 融合蛋白中包含的异源序列间的共价缔合。在另一特异的实施例中,本发明融合蛋白的共价缔合是来自另一 TNF 家族配体 / 受体成员的异源多肽序列间的共价缔合,所述异源多肽序列能形成共价缔合的多聚体,例如 osteoprotegerin(见国际公布 No. W098/49305 所述,其内容全部并入参考)。在另一特异的实施方案中,本发明融合蛋白的共价缔合是来自 CD40L 或其可溶性片段的异源多肽序列之间的共价缔合。在另一实施方案中,二或多个本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽是通过合成接头(如肽,碳水化合物或可溶的聚合物接头)连接的。这些肽接头例如由美国专利 No. 5073627 所述(并入参考)。包含通过肽接头分离的多个 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的蛋白质可用常规重组 DNA 方法产生。

[0220] 制备本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的多聚体的另一方法,包括使用融合于亮氨酸拉链或异亮氨酸拉链多肽序列的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽。亮氨酸拉链或异亮氨酸拉链结构域是促进在其中发现拉链结构的蛋白质多聚体化的多肽。亮氨酸拉链最初是在一些 DNA 结合蛋白中鉴别的(Landschulz 等,科学 240:1759(1988)),且已在许多不同的蛋白质中发现。已知的亮氨酸拉链或异亮氨酸拉链是天然发生二聚体或三聚体化的肽及其衍生物。适于产生可溶的多聚体的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白质的亮氨酸拉链例如由并入参考的 PCT 申请 wo 94/10308 所述。包含融合于在溶液中二聚体或三聚体化的肽的可溶的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的重组融合蛋白在适当的宿主细胞中表达,并用本领域已知方法从培养物上清中回收所得可溶的多聚体化的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV。

[0221] 蛋白质 TNF 家族的一些成员确信呈三聚体形式(Beutler 和 Hufel,科学 264:

667,1994 ;Banner 等,细胞 73 :431,1993)。因此,三聚体化的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 具有增强的生物活性。优选的亮氨酸拉链组分是优先形成三聚体的那些组分。如 Hoppe 等 (FEBS 通信 344 :191, (1994) 和美国专利申请系列 No. 08/446 922 所述,揭示了一个衍生自肺表面活性蛋白 D (SPD) 的亮氨酸拉链。其它衍生自天然发生的三聚体蛋白的肽可用于制备三聚体化的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV。

[0222] 在另一实施例中,本发明的蛋白是通过包含于 Flag[®]-Neutrokin- α 或 Flag[®]-Neutrokin- α SV 融合蛋白中的 Flag[®] 多肽序列间的相互作用而联系的。在另一实施方案中,本发明的蛋白是通过包含于 Flag[®]-Neutrokin- α 或 Flag[®]-Neutrokin- α SV 融合蛋白的异源多肽序列与抗 Flag[®] 抗体之间的相互作用而缔合的。

[0223] 本发明的多聚体可用本领域已知的化学方法产生。例如,需包含在本发明多聚体中的多肽可用本领域已知的接头分子和接头分子长度最佳化方法而化学交联 (见并入参考的美国专利 No. 5478925)。另外,本发明的多聚体可用本领域已知的方法产生,所述方法是在位于需包含于多聚体中的多肽的序列中的半胱氨酸残基之间,形成一或多个分子内交联。(见并入参考的美国专利 No. 5478925)。另外,本发明的多肽可通过在多肽的 C 或 N 末端加入半胱氨酸或生物素而常规修饰,且可用本领域已知的方法产生含有一或多个这些修饰的多肽的多聚体 (见并入参考的美国专利 No. 5478925)。另外,可用本领域已知的方法产生含有需包含在本发明多聚体中的多肽组分的脂质体 (见并入参考的美国专利 No. 5478925)。

[0224] 或者,本发明的多聚体可用本领域已知的基因工程方法产生。在一实施方案中,包含在本发明多聚体中的多肽是用本文所述的融合蛋白方法或本领域已知其它方法重组产生的 (见并入参考的美国专利 No. 5478925)。在一特异的实施方案中,编码本发明同源二聚体的多核苷酸是通过将编码本发明多肽的多核苷酸序列与编码接头多肽的序列连接,然后从起点 C 末端至 N 末端反方向 (缺失引导序列) 连接于编码多肽翻译产物的合成的多核苷酸 (见并入参考的美国专利 No. 5478925)。在另一实施方案中,用本文所述的重组方法或本领域已知其它方法产生本发明的重组多肽,该多肽含有跨膜域并可通过膜重建方法掺入脂质体中 (见并入参考的美国专利 No. 5478925)。

[0225] 在一实施方案中,本发明提供了分离的 Neutrokin- α 多肽,该多肽具有由 ATCC 保藏号 97768 的 cDNA 克隆编码的氨基酸序列,或具有图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列,或者本发明提供了分离的包含上述多肽一部分 (即片段) 的多肽。在另一实施方案中,本发明提供了分离的 Neutrokin- α SV 多肽,该多肽具有由 ATCC 保藏号 203518 的 cDNA 克隆编码的氨基酸序列,或具有图 5A 和 5B (SEQ ID NO :19) 所示氨基酸序列,或者提供了包含上述多肽一部分与 (即片段) 的多肽。

[0226] 本发明的多肽片段包括一种多肽,该多肽包含或由 (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列,由 ATCC 保藏号 97768 的质粒中 cDNA 编码的氨基酸序列,或由与保藏的克隆中包含的核苷酸序列或图 1A 和 1B (SEQ ID NO :1) 所示核苷酸序列互补链杂交 (如在严格杂交条件下) 的核酸编码的氨基酸序列组成。

[0227] 另外,本发明的多肽片段包括一种多肽,该多肽包含或由 (SEQ ID NO :19) 所示的氨基酸序列,由 ATCC 保藏号 203518 的质粒中包含的 cDNA 编码的氨基酸序列,或由与保藏

的克隆中包含的核苷酸序列或图 5A 和 5B (SEQ ID NO:18) 所示核苷酸序列互补链杂交 (如在严格杂交条件下) 的核酸编码的氨基酸序列组成。

[0228] 另外, 本发明的多肽片段包括一种多肽, 该多肽包含或由与 SEQ ID NO:21 所示核苷酸序列互补链杂交 (如在严格杂交条件下) 的核酸编码的氨基酸序列组成。

[0229] 本发明的多肽片段还包括一种多肽, 该多肽包含或由与 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列, 或由与 SEQ ID NO:22 所示核苷酸序列互补链杂交 (如在严格杂交条件下) 的核酸编码的氨基酸序列组成。

[0230] 另外, 本发明的多肽片段包括一种多肽, 该多肽包含或由 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列, 或由与 SEQ ID NO:27 所示核苷酸序列互补链杂交 (如在严格杂交条件下) 的核酸编码的氨基酸序列组成。

[0231] 另外, 本发明的多肽片段包括一种多肽, 该多肽包含或由 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列, 或由与 SEQ ID NO:29 所示核苷酸序列互补链杂交 (如在严格杂交条件下) 的核酸编码的氨基酸序列组成。

[0232] 本发明的多肽片段包括一种多肽, 该多肽包含或由 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列, 由保藏的克隆中包含的 cDNA 编码的氨基酸序列, 或由与保藏的克隆中包含的、或图 1A 和 1B (SEQ ID NO:1) 所示的、或其互补链的核苷酸序列杂交 (如在严格杂交条件下) 的核酸编码的氨基酸序列。蛋白质片段可以是“自由存在的”, 或包含在较大的多肽中, 片段形成多肽的一部分或一个区域, 优选作为一个单独的连续区域。本发明的多肽片段代表性地例如包括包含或由 SEQ ID NO:2 的 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 和 / 或 251-285 位氨基酸残基组成的片段。另外, 多肽片段的长度可以是至少 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175 或 200 个氨基酸。

[0233] 在特异的实施方案中, 本发明的多肽片段包含或由图 1A 和 1B (SEQ ID NO:2) 所示序列的 1-46, 31-44, 47-72, 73-285, 73-83, 94-102, 148-152, 166-181, 185-209, 210-221, 226-237, 244-249, 253-265 和 / 或 277-284 位氨基酸残基组成。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0234] 本领域技术人员将意识到定向于本发明 Neutrokin- α 多肽的一区域的突变可影响到 Neutrokin- α 多肽的所观测到的生物活性, 所述区域涵盖了在 Neutrokin- α SV 多肽序列中未发现的 19 个氨基酸的插入体 (即图 1A 和 1B 及 SEQ ID NO:2 所示序列的 Val 142-Lys 160 氨基酸残基)。更特别地, 可定向诱变的 Neutrokin- α 多肽序列的这种残基非限制性地包括 SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 多肽的以下氨基酸残基: V142; T143; Q144; D145; C146; L147; Q148; L149; I150; A151; D152; S153; E154; T155; P156; T157; I158; Q159 和 K160。编码在 SEQ ID NO:2 的 V142-K160 区域内有一或多个突变的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸是所期望的。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明范围内。

[0235] 多肽片段可以是“自由存在的”, 或包含在较大多肽内, 片段形成多肽的一部分或区域, 优选作为一单独的连续区域。本发明的多肽片段代表性地例如包括包含或由 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的大约 1-15, 16-30, 31-46, 47-55, 56-72, 73-104, 105-163, 163-188, 186-210 和 210-284 位氨基酸残基组成的片段。本发明的多肽片段另外例如包括包含或由 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的大约 1-143, 1-150, 47-143, 47-150, 73-143, 73-150,

100-150, 140-145, 142-148, 140-150, 140-200, 140-225 和 140-266 位氨基酸残基组成的片段。另外多肽片段的长度可以是至少 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175 或 200 个氨基酸。文中“大约”是指特定的范围, 以及在氨基端或羧基端或氨基端和羧基端的多或少一些, 几个, 5, 4, 3, 2, 1 个氨基酸残基的此范围。编码这些多肽片段的多核苷酸也涵盖在本发明内

[0236] 其它优选的实施方案涵盖的多肽片段包含或由以下结构组成: Neutrokin- α 推定的胞内域 (SEQ ID NO: 2 的 1-46 位氨基酸残基), Neutrokin- α 的推定的跨膜域 (SEQ ID NO: 2 的 47-72 位氨基酸残基), Neutrokin- α 的推定的胞外域 (SEQ ID NO: 2 的 73-285 位氨基酸残基), Neutrokin- α 的推定的 TNF 保守的结构域 (SEQ ID NO: 2 的 191-284 位氨基酸残基), 和包含或由 Neutrokin- α 的融合于推定胞外域的推定胞内域 (即 SEQ ID NO: 2 的 1-46 位氨基酸残基融合于 73-285 位氨基酸残基) 组成的多肽。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0237] 另外优选的实施方案涵盖的多肽片段包含或由以下结构组成: Neutrokin- α SV 的推定的胞内域 (SEQ ID NO: 19 的 1-46 位氨基酸残基), Neutrokin- α SV 的推定的跨膜域 (SEQ ID NO: 19 的 47-72 位氨基酸残基), Neutrokin- α SV 的推定的胞外域 (SEQ ID NO: 19 的 73-266 位氨基酸残基), Neutrokin- α SV 的推定的 TNF 保守的结构域 (SEQ ID NO: 19 的 172-265 位氨基酸残基), 和包含或由 α SV-Neutrokin 的推定胞内域与胞外域的融合体 (SEQ ID NO: 19 的 1-46 位氨基酸残基与 73-266 位氨基酸残基融合) 组成的多肽。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0238] 本发明另一些实施方案涵盖的多肽片段包含或由图 7A 中鉴别的推定的 β 折叠区域组成。本发明的这些多肽片段包含或由 SEQ ID NO: 2 的 Gln144-Ala151, Phe172-Lys173, Ala177-Glu179, Asn183-Ile185, Gly191-Lys204, His210-Val219, Leu226-Pro237, Asn242-Ala251, Gly256-Ile263 和 / 或 Val276-Leu284 位氨基酸残基组成。在另外的一些实施方案中, 本发明的这些多肽片段还包含或由 SEQ ID NO: 19 的 Phe153-Lys154, Ala158-Glu160, Asn164-Ile166, Gly172-Lys185, His191-Val200, Leu207-Pro218, Asn223-Ala232, Gly237-Ile244, 和 / 或 Val257-Leu256 位氨基酸残基组成, 及由 SEQ ID NO: 23 的 Phe42-Lys43, Ala47-Glu49, Asn53-Ile55, Gly61-Pro74, His80-Val89, Leu96-Pro107, Asn112-Ala121, Gly126-Ile133 和 / 或 Asp146-Leu154 位氨基酸残基组成。在另一些实施方案中, 本发明的这些多肽片段还包括或包含 SEQ ID NO: 28 的 Gln78-Ala85, Phe106-Lys107, Ala111-Glu113, Asn117-Ile119, Gly125-Lys138, His144-Val153, Leu160-Pro171, Asn176-Ala185, Gly190-Ile197, 和 / 或 Val210-Leu218 位氨基酸残基组成, 及由 SEQ ID NO: 30 的 Gln78-Ala85, Phe106-Lys107, Ala111-Glu113, Asn117-Ile119, Gly125-Lys138, His144-Val153, Leu160-Pro171, Asn176-Ala185, Gly190-Ile197, 和 / 或 Val210-Leu218 位氨基酸残基组成。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0239] 本发明的一些多肽非限性地例如包含或由本发明的氨基酸序列的组合组成, 例如包括 SEQ ID NO: 2 的 [Met1-Lys113] 和 [Leu114-Thr141] 和 [Ile142-Lys160] 和 [Gly161-Gln198] 和 [Val199-Ala248] 和 [Gly250-Leu285] 的融合体; SEQ ID NO: 2 的 [Met 1-Lys113] 和 [Ile142-Lys160] 和 [Gly161-Gln198] 和 [Val199-Ala248] 和

[Gly250-Leu285] 的融合体;或 SEQ ID NO:2 的 [Met1-Lys113] 和 [Leu114-Thr141] 和 [Ile142-Lys160] 和 [Gly161-Gln198] 和 [Val199-Ala248] 和 [Gly250-Leu285] 的融合体。或 SEQ ID NO:2 的 [Met1-Lys113] 和 [Leu114-Thr141] 和 [Ile142-Lys160] 和 [Gly161-Gln198] 和 [Gly250-Leu285] 的融合体。其它组合可包括除上述组合之外的多肽片段(如 SEQ ID NO:2 的 [Leu114-Thr141] 和 [Val199-Ala248] 和 [Gly250-Leu285] 和 [Ile142-Lys160] 的融合体)。其它组合也可包括本文所述的异源多肽片段和/或本发明的其它多肽或多肽片段(如 SEQ ID NO:2 的 [Met1-Lys113] 和 [Leu114-Thr141] 和 [Ile142-Lys160] 和 [Gly161-Gln198] 和 [Gly250-Leu285] 与 FLAG 标记的融合体)。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0240] 另外,本发明的多肽非限性地例如包括或由氨基酸序列组合组成,例如包括 SEQ ID NO:19 的 [Met1-Lys113] 和 [Leu114-Thr141] 和 [Gly142-Gln179] 和 [Val180-Ala229] 和 [Gly230-Leu266] 的融合体;SEQ ID NO:19 的 [Met1-Lys113] 和 [Gly142-Gln179] 和 [Val180-Ala229] 和 [Gly230-Leu266] 的融合体;或 SEQ ID NO:19 的 [Met1-Lys113] 和 [Leu114-Thr141] 和 [Gly142-Gln179] 和 [Gly230-Leu266] 的融合体。其它组合可包括除上述组合之外的多肽片段(如 SEQ ID NO:19 的 [Leu114-Thr141] 和 [Val180-Ala229] 和 [Gly230-Leu266] 和 [Gly142-Gln179] 的融合体)。其它组合还可包括本文所述的异源多肽片段和/或本发明的其它多肽或多肽片段(如 SEQ ID NO:19 的 [Met1-Lys113] 和 [Leu114-Thr141] 和 [Gly142-Gln179] 和 [Gly230-Leu266] 与 FLAG 标记的融合体)。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0241] 本发明的多肽另外非限性地例如包含或由氨基酸序列组合组成,例如包括 SEQ ID NO:23 的 [Met1-Lys106] 和 [Leu107-Thr134] 和 [Ile167-Lys184] 和 [Gly185-Gln224] 和 [Val225-Ala272] 和 [Gly273-Leu309] 的融合体;SEQ ID NO:23 的 [Met1-Lys106] 和 [Glu135-Asn165] 和 [Ile167-Lys184] 和 [Gly185-Gln224] 和 [Val225-Ala272] 和 [Gly273-Leu309] 的融合体,或 SEQ ID NO:23 的 [Met1-Lys106] 和 [Leu107-Thr134] 和 [Glu135-Asn165] 和 [Ile167-Lys184] 和 [Gly185-Gln224] 和 [Gly273-Leu309] 的融合体。其它组合可包括除上述组合之外的多肽片段(如 SEQ ID NO:23 的 [Met1-Lys106] 和 [Gly185-Gln224] 和 [Ile167-Lys184] 和 [Val225-Ala272] 和 [Leu107-Thr134] 和 [Gly273-Leu309] 的融合体)。其它组合还可包括本文所述的异源多肽片段和/或本发明的其它多肽或多肽片段(如 SEQ ID NO:23 的 [Met1-Lys106] 和 [Glu135-Asn165] 和 [Ile167-Lys184] 和 [Gly185-Gln224] 和 [Val225-Ala272] 和 [Gly273-Leu309] 与 FLAG 标记的融合体)。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0242] 本发明的多肽另外非限性地例如包含或由氨基酸序列组合组成,例如包括 SEQ ID NO:28 的 [Tyr1-Lys47] 和 [Leu48-Thr75] 和 [Ile76-Lys94] 和 [Gly95-Gln132] 和 [Val133-Ala182] 和 [Gly183-Ala219] 的融合体;SEQ ID NO:28 的 [Tyr1-Lys47] 和 [Leu48-Thr75] 和 [Ile76-Lys94] 和 [Val133-Ala182] 的融合体;或 SEQ ID NO:28 的 [Tyr1-Lys47] 和 [Leu48-Thr75] 和 [Ile76-Lys94] 和 [Val133-Ala182] 和 [Gly183-Ala219] 的融合体。其它组合可包括除上述组合之外的多肽片段(如 SEQ ID NO:28 的 [Tyr1-Lys47] 和 [Gly183-Ala219] 和 [Val133-Ala182] 和 [Leu48-Thr75] 的融合体)。其它组合还可包括本文所述的异源多肽片段和/或本发明的其它多肽或多肽片段(如

SEQ ID NO:28 的 [Leu48-Thr75] 和 [Ile76-Lys94] 和 [Gly95-Gln132] 和 [Val133-Ala182] 与 Fc 受体标记的融合体)。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0243] 本发明的多肽另外非限性地例如包含或由氨基酸序列组合组成,例如包括 SEQ ID NO:30 的 [Tyr1-Lys47] 和 [Leu48-Thr75] 和 [Ile76-Lys94] 和 [Gly95-Gln132] 和 [Val133-Ala182] 和 [Gly183-Ala219] 的融合体;SEQ ID NO:30 的 [Tyr1-Lys47] 和 [Leu48-Thr75] 和 [Ile76-Lys94] 和 [Val133-Ala182] 的融合体;或 SEQ ID NO:30 的 [Tyr1-Lys47] 和 [Ile76-Lys94] 和 [Val133-Ala182] 和 [Gly183-Ala219] 的融合体。其它组合可包括除上述组合之外的多肽片段(如 SEQ ID NO:30 的 [Tyr1-Lys47] 和 [Gly183-Ala219] 和 [Val133-Ala182] 和 [Leu48-Thr75] 的融合体)。其它组合还可包括本文所述的异源多肽片段和/或本发明的其它多肽或多肽片段(如 SEQ ID NO:30 的 [Leu48-Thr75] 和 [Ile76-Lys94] 和 [Gly95-Gln132] 和 [Val133-Ala182] 与 Fc 受体标记的融合体)。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0244] 本发明的其它实施方案涵盖的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽片段包含或由本发明多肽的功能区域组成,如 Garnier-Robson 的 α 区, β 区,转角区和卷曲区,Chou-Fasman 的 α 区, β 区和卷曲区,Kyte-Doolittle 亲水区和疏水区,Eisenberg 的 α 和 β 两亲区,Karplus-Schulz 柔性区,Emini 表面形成区和 Jameson-Wolf 高抗原指数区,如图 3,6 及表 1 所示。在一优选的实施方案中,本发明的多肽片段是抗原性的。表 1 中的 VIII, IX, XIII 和 XIV 列所示数据可用于常规确定呈高度潜在抗原性的 Neutrokin- α 的区域。高抗原性区域是通过从 VIII, IX, XIII 和/或 IV 列所示数据中,选择代表在一定环境下易于在多肽表面上暴露的多肽区域的数值而确定,所述环境是在其中抗原识别可发生在免疫应答初始的过程中。本发明尤为优选的片段是那些包含组合了一些结构特点如上述的一些(如 1,2,3 或 4) 特点的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 的区域的片段。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0245] 在另一实施方案中,本发明提供了包含或由本发明多肽的携带表位部分组成的多肽。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。多肽的表位部分是本发明多肽的免疫原性或抗原性表位。“免疫原性表位”是指当整个蛋白质是免疫原时激发抗体应答的蛋白质的一部分。另一方面,“抗原性表位”是指抗体可结合的蛋白质分子的区域。蛋白质的免疫原性表位数目一般少于抗原性表位数目。例如见于 Geysen 等,美国科学院院报 81:3998-4002(1983)。

[0246] 为选择携带抗原性表位的多肽(即含有抗体可结合的蛋白质分子的区域),本领域熟知模拟部分蛋白质序列的相对短的合成肽,通常能激发与部分模拟蛋白反应的抗血清。例如见 Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N. 和 Lerner, R. A(1983) “与蛋白质上预定位点反应的抗体”,科学 219:660-666 所述。能激发蛋白质反应性血清的肽通常在蛋白质的一级序列中体现,可通过一些简便化学规则定性,并限定为既不是完整蛋白的免疫优势区域(即免疫性表位),也不是氨基或羧基末端。本发明携带抗原性表位的肽或多肽因此用于产生抗体,包括特异结合本发明多肽的单克隆抗体。例如参见 Wilson 等,细胞 37:767-778(1984),在 p777 页。

[0247] 本发明携带抗原性表位的肽或多肽优选含有至少 4 个,至少 5 个,至少 6 个,至少 7 个,优选至少 8 个,至少 9 个,至少 10 个,至少 11 个,至少 12 个,至少 13 个,至少 14 个,至少

15 个,至少 20 个,至少 25 个,至少 30 个,至少 40 个,至少 50 个,更优选在大约 15-30 个包含在本发明多肽的氨基酸序列内的氨基酸组成的序列。包含免疫原性或抗原性表位的优选的多肽的长度为至少 10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95 或 100 个氨基酸残基。其它优选的抗原性表位包括本文所揭示的抗原性表位以及其一部分。

[0248] 可用于产生 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 特异性抗体的抗原性多肽或肽非限制性地例如包括:包含或由图 1A 和 1B(SEQID NO:2) 所示大约 Phe115-Leu147 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2) 所示大约 Ile150-Tyr163 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2) 所示大约 Ser171-Phe194 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 1A 和 1B(SEQID NO:2) 所示 Glu223-Tyr246 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2) 所示大约 Ser271-Phe278 位氨基酸残基组成的多肽;。文中“大约”是指特定的范围,以及在此范围内在氨基端或羧基端或二端的多或少一些,几个,5,4,3,2 或 1 个氨基酸。这些多肽片段通过 Jameson-Wolf 抗原指数分析,已确定携带 Neutrokin- α 多肽的抗原性表位,如图 3 和表 1 所示。

[0249] 可用于产生 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 特异性抗体的抗原性多肽或肽非限制性地例如包括:包含或由图 5A 和 5B(SEQID NO:19) 所示大约 Pro32-Leu47 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 所示大约 Glu116-Ser143 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 所示大约 Phe153-Tyr173 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 5A 和 5B(SEQID NO:19) 所示大约 Pro218-Tyr227 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 所示大约 Ala232-Gln241 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 所示大约 Ile244-Ala249 位氨基酸残基组成的多肽;包含或由图 5A 和 5B(SEQID NO:19) 所示大约 Ser252-Val257 位氨基酸残基组成的多肽。文中“大约”是指特定的范围,以及此范围内在氨基端或羧基端或二端多或少一些,几个,5,4,3,2 或 1 个氨基酸残基。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。这些多肽片段通过 Jameson-Wolf 抗原指数分析已确定携带 Neutrokin- α SV 多肽的抗原性表位,如图 6 所示和由 DNA*STAR 计算机程序的 Protean 组件产生的表形式的数据所示。

[0250] 本发明的携带表位的肽和多肽可通过任何常规方法生产。例如见 Houghten, R. A. (1985) 快速固相合成大量肽的一般方法:在个体氨基酸水平抗原-抗体相互作用的特异性,美国科学院院报 82:5131-5135;“同时多种肽合成(SMPS)”的方法 Houghten 等 (1986) 的见美国专利 No. 4631211 所述。

[0251] 本发明的携带表位的肽和多肽的用途包括但非限于根据本领域熟知方法诱导抗体。例如见 Sutcliffe 等,如前;Wilson 等,如前;Chow, M. 等,美国科学院院报 82:910-914;和 Bittle, F. J. 等,基因病毒杂志 66:2347-2354(1985)。本发明携带免疫原性表位的肽,即当整个蛋白质是免疫原时,激发抗体应答的蛋白质的一部分,是根据本领域已知方法鉴别的。例如见 Geysen 等,如前述。另外,Geysen 的美国专利 No. 5194392 阐述了一种检测或确定单体(氨基酸或其它化合物)序列的方法,该单体是互补于相应抗体的特殊抗原互补位(抗原结合位点)的表位的拓扑等价物(即 mimotope)。Geysen(1989) 的美国专利阐述了一种检测或确定单体序列的方法,该单体是互补于相应特殊受体的配体结合位点的配体的拓扑等价物。相似地,Houghten, R. A. 等(1996) 关于过烷基化的寡肽混合物的美国专

利 No. 5480971, 揭示了线性 C1-C7- 烷基 - 过烷基化的寡肽及这种肽的文库, 以及用这种寡肽文库确定优先与相应受体分子结合的过烷基化的寡肽序列的方法。因此, 本发明携带表位的肽的非肽类似物也可通过这些方法常规生产。

[0252] 本发明涵盖一种多肽, 其包含或由以下多肽的表位组成: 具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽, 或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏物所含的的克隆中包含的多核苷酸序列编码的多肽, 或由与 SEQ ID NO:1 的序列或 ATCC 保藏号 97768 中包含的 cDNA 序列的互补序列杂交 (如在所述杂交条件下) 的多核苷酸编码的多肽。本发明还涵盖了多核苷酸序列, 其包含或由编码本发明多肽表位的序列 (如 SEQ ID NO:1 所示序列), 编码本发明表位的多核苷酸序列的互补链的多核苷酸序列, 和与互补链杂交 (在所述杂交条件下) 的多核苷酸序列组成。

[0253] 本发明还涵盖了一种多肽, 其包含或具有 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的多肽的表位, 或由 ATCC 保藏号 203518 所包含的多核苷酸序列编码的多肽序列的表位, 或由与 SEQ ID NO:18 所示序列的互补序列或 ATCC 保藏号 203518 包含的 cDNA 序列杂交 (如在所述杂交条件下) 的多核苷酸编码的多肽序列的表位组成。本发明还涵盖了一种多核苷酸序列, 其包含或由编码本发明多肽 (如 SEQ ID NO:18 所示序列) 的表位, 编码本发明表位的多核苷酸序列的互补链的多核苷酸序列, 和与互补链杂交 (如在所述杂交条件下) 的多核苷酸序列。

[0254] 文中所用术语“表位”是指在动物, 优选哺乳动物, 更优选在人体内具有抗原性或免疫原性活性的多肽的一部分。在一优选的实施方案中, 本发明涵盖了一种包含表位的多肽以及编码这种多肽的多核苷酸。“免疫原性表位”是指激发动物体体内抗体应答的蛋白质的一部分, 如通过本领域已知任何方法确定, 例如通过如前述产生抗体的方法 (见例如 Geysen 等, 美国科学院院报 81:3998-4002 (1983) 所述)。术语“抗原性表位”是指抗体能免疫特异性结合其抗原的蛋白质的一部分, 如通过本领域熟知的任何方法确定, 例如通过所述的免疫分析确定。免疫特异性结合不包括非特异性结合, 但不是必须不包括与其它抗原的交叉反应性。抗原性表位非必须是免疫原性的。

[0255] 作为表位的片段可通过任何常规方法生产 (见例如 Houghten, 美国科学院院报 82:5131-5135 (1985), 另外见于美国专利 No. 4631211 所述)

[0256] 在本发明中, 抗原性表位优选含有至少 4 个, 至少 5 个, 着色 6 个, 至少 7 个, 更优选至少 8 个, 至少 9 个, 至少 10 个, 至少 11 个, 至少 12 个, 至少 13 个, 至少 14 个, 至少 15 个, 至少 20 个, 至少 25 个, 至少 30 个, 至少 40 个, 至少 50 个, 最优选大约 15-30 个氨基酸的序列。优选包含免疫原性或抗原性表位的多肽长度至少为 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 或 100 个氨基酸残基。其它优选的抗原性表位包括本文所揭示的抗原性表位, 以及 2, 3, 4, 5 或多个这些抗原性表位的任何组合。抗原性表位可用作免疫分析中的靶分子 (例如 Wilson 等, 细胞 37:767-778 (1984); Sutcliffe 等, 科学 219:660-666 (1983) 所述)。

[0257] 相似地, 免疫原性表位例如根据本领域熟知方法可用于诱导体抗体 (见例如 Sutcliffe 等, 如前; Wilson 等, 如前; Chow 等, 美国科学院院报 82:910-914; 和 Bittle 等, 基因病毒杂志 66:2347-2354 (1985) 所述)。优选的免疫原性表位包括本文揭示的免疫原性表位, 以及 2, 3, 4, 5 或多个这些免疫原性表位的组合。包含一或多个免疫原性表位的多

肽可与载体蛋白如白蛋白一起存在,以激发动物系的(如兔或鼠)的抗体应答,或者如果多肽是足够长的(至少大约 25 个氨基酸),此多肽可不用载体。然而,包含少如 8-10 个氨基酸的免疫原性表位已示出有效产生能结合至少变性的多肽中的线性表位的抗体。(如在 Western 印迹中)。

[0258] 本发明携带表位的多肽可根据本领域熟知方法用于诱导体抗体,所述方法包括但不限于体内免疫接种,体外免疫接种和噬菌体展示方法。见例如 Sutcliffe 等,如前;Wilson 等,如前;和 Bittle 等,基因病毒杂志 66:2347-2354(1985)。如果使用体内免疫接种法,动物可用游离肽接种;然而,抗肽抗体滴度可通过将肽与大分子载体偶联而加强,所述载体如是匙孔血蓝蛋白(KLH)或破伤风毒素。例如,含有半胱氨酸残基的肽可用接头如间-马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)偶联于载体,而其它肽可用更一般的连接剂如戊二醛偶联于载体。动物如兔,大鼠和小鼠用游离肽或与载体偶联的肽免疫接种,例如通过腹膜内和/或皮内注射一种乳液而接种,所述乳液含有大约 100mg 肽或载体蛋白和 Freud's 佐剂或任何其它已知刺激免疫应答的佐剂。需要进行一些加强注射,例如每隔大约二周进行一次,以提供有效滴度的抗肽抗体,该抗体例如可通过使用吸附于固体表面的游离肽经 ELISA 分析而检测。免疫接种的动物血清中抗肽抗体的滴度可通过选择抗肽抗体而提高,例如通过将肽吸附于固体支持物上并根据本领域熟知方法洗脱选择的抗体。

[0259] 本领域技术人员意识到及如上所述,包含免疫原性或抗原性表位的本发明的多肽可融合于其它多肽序列。例如,本发明的多肽可与免疫球蛋白(IgA, IgE, IgG, IgM)的恒定区,或其一部分(CH1, CH2, CH3 或其任意组合及其一部分)融合产生嵌合多肽。这种融合蛋白易于纯化并且体内的半衰期可提高。已示出嵌合蛋白由人 CD4 多肽的前两个结构域和哺乳动物重链或轻链的恒定区的各种结构域组成。例如见于 Ep394827;Tyaunecker 等,自然, 331:84-86(1988)所述。抗原穿过上皮屏障输送至免疫系统增强已示出抗原(如胰导素)与 FcRn 结合配偶体如 IgG 或 Fc 片段缀合(见例如 PCT 公布 WO 96/22024 和 WO 99/04813)。由于 IgG 部分的脱硫键而具有二硫键连的二聚体结构的 IgG 融合蛋白,也已发现比单体的多肽或其片段具有更有效的结合及中和其它分子的能力。见例如 Fountoulakis 等,生物化学杂志 270:3958-3964(1995)。编码上述表位的核酸也可与作为表位标记的相应基因(如血凝素(HA)标记或 flag 标记)重组,以助于检测和纯化表达的多肽。例如,由 Janknecht 等阐述的一系统易于纯化在人细胞系表达的未变性的融合蛋白(Janknecht 等,美国科学院院报 88:89072-897)。在此系统中,相应的基因被亚克隆入痘苗重组质粒中,这样此基因的开放读框经翻译融合于由 6 个组氨酸残基组成的氨基端标记。该标记作为融合蛋白的基质结合域。将用重组痘苗病毒感染的细胞的提取物加样于 Ni²⁺ 次氨基乙酸琼脂糖层析柱上,且组氨酸标记的蛋白质可选择性地用含有咪唑的缓冲液选择性洗脱。

[0260] 在另一实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽及其携带表位的片段是与异源抗原(如多肽,碳水化合物,磷脂或核酸)融合的。在特异的实施方案中,异源抗原是免疫原。

[0261] 在更特异的实施方案中,异源抗原是 HIV 的 gp120 蛋白或其片段。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0262] 在另一实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽及其携带表位的片段,是与另一 TNF 配体家族成员的多肽序列(或其生物活性片段或其变体)

融合的。在一特异的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽是与 CD40L 多肽序列融合的。在优选的实施方案中,CD40L 多肽序列是可溶的。

[0263] 基因改组,基序改组,外显子改组和 / 或密码子改组(统称为“DNA 改组”)的方法,可用于调节 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的活性,从而有效地产生 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的激动剂与拮抗剂。见美国专利 No. 5605793, 5811238, 5830721, 5834252, 和 5837458, 及 Patten, P.A. 等, 生物技术通用意见 8: 724-33(1997); Harayama, S. 生物技术趋势 16(2): 76-82(1998); Hansson, L. O, 等, 分子生物学杂志 287: 265-76(1999); 和 Lorenzo, M.M. 和 Blasco, R. 生物技术 24(2): 308-13(1998) 所述, 所述文献均并入参考。在一实施方案中, 对 Neutrokin- α 和或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和相应多肽进行改动可通过 DNA 改组而进行。DNA 改组包括通过同源性或位点特异性重组, 将两或多个 DNA 区段装配入所需的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 分子中。在另一实施方案中, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和相应多肽可通过在重组之前经易错聚合酶链反应随机诱变, 随机插入核苷酸或其它方法而加以改变。在另一实施方案中, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的一或多个组分, 基序, 区段, 部分, 结构域, 片段等可与一或多个异源分子的一或多个组分, 基序, 区段, 部分, 结构域, 片段等重组。在优选的实施方案中, 异源分子例如是 TNF- α , 淋巴毒素- α (LT- α , 也称为 TNF- β), LT- β (在异源三聚体 LT- α 2- β 复合物中发现的), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF- γ (国际公开 No. WO 96/14328), AIM-I (国际公开 WO 97/33899), AIM-II (国际公开 WO 97/34911), APRIL (实验方法杂志 188(6): 1185-1190), endokine- α (国际公开 WO 98/07880), OPG, OX40, 和神经生长因子 (NGF), 和可溶形式的 Fas, CD 30, CD27, CD40 和 4-1BB, TR2 (国际公开 WO 96/34095), DR3 (国际公开 WO 97/33904), DR4 (国际公开 WO 98/32856), TR5 (国际公开 WO 98/30693), TR6 (国际公开 WO 98/30694), TR7 (国际公开 WO 98/41629), TRANK, TR9 国际公开 WO 98/56892), TR10 国际公开 WO 98/54202), 312C2 (国际公开 WO 98/06842), TR12, CDA 和 V-FLIP。在另一些实施方案中, 异源分子是 TNF 家族的任何成员。

[0264] 在优选的实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽 (包括其生物活性片段或变体) 与可溶的 CD40L 多肽或其生物活性片段或变体融合。

[0265] 为改良或改变 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的特征, 可进行蛋白质工程。在本领域技术人员已知的重组 DNA 方法可用于产生新的突变体蛋白或“突变蛋白”, 其包括一个或多个氨基酸取代, 缺失, 添加或融合蛋白。这种修饰的多肽可显示例如增强的活性或提高的稳定性。另外, 它们与相应天然的多肽相比, 至少在某些纯化和储存条件下, 可以高产量纯化并较好的稳定性。例如, 就许多蛋白质而言, 包括成熟形式的分泌蛋白的胞外域, 本领域已知 N 末端或 C 末端可缺失一或多个氨基酸而基本不丧失生物功能。例如, Ron 等, 生物化学杂志, 268: 2984-2988 (1993) 报道了修饰的 KGF 蛋白, 其即使丢失 3, 8 或 27 个氨基端氨基酸, 但仍具有肝素结合活性。

[0266] 由于本发明的蛋白质是 TNF 多肽家族成员, 图 1A 和 1B (SEQ IDNO: 2) 的 N 末端氨基酸直至 191 位的 Gly (G) 残基的缺失, 仍可保留一些生物活性如刺激淋巴细胞 (如 B 细胞) 增殖, 分化和 / 或活化, 及对适当靶细胞具有胞毒性的能力。具有进一步 N 末端包括 Gly (G) 残基缺失的多肽不期望保留生物活性, 因为已知 TNF 相关多肽中的此残基是生物活性所需

的保守结构域的起点。然而,即使蛋白质 N 末端缺失一或多个氨基酸而丧失了蛋白质的一或多种功能,其它功能活性仍可保留。因此,缩短的蛋白质诱导和 / 或结合识别完整蛋白质或其胞外域的抗体的能力,当完整蛋白质或其胞外域的少部分残基自 N 末端除去时,仍可保留。缺失完整蛋白 N 末端残基的特殊多肽是保留这种免疫活性,可通过本文所述常规方法及本领域已知其它方法确定。

[0267] 因此,本发明进一步提供了一种多肽及编码这种多肽的多核苷酸,所述多肽具有缺失自图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2) 所示 Neutrokin- α 的氨基酸序列氨基端直至 191 位甘氨酸残基(氨基端的 Gly191)的一或多个残基。尤其地,本发明提供的多肽包含或由 SEQ ID NO:2 的 n^1 -285 位残基的氨基酸序列组成,其中 n^1 是 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的 2-190 位氨基酸位置中的一个整数。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。更特别地,本发明提供的编码多肽的多核苷酸包含或由选自以下一组的氨基酸序列组成: SEQ ID NO:2 的 2-285,3-285,4-285,5-285,6-285,7-285,8-285,9-285,10-285,11-285,12-285,13-285,14-285,15-285,16-285,17-285,18-285,19-285,20-285,21-285,22-285,23-285,24-285,25-285,26-285,27-285,28-285,29-285,30-285,31-285,32-285,33-285,34-285,35-285,36-285,37-285,38-285,39-285,40-285,41-285,42-285,43-285,44-285,45-285,46-285,47-285,48-285,49-285,50-285,51-285,52-285,53-285,54-285,55-285,56-285,57-285,58-285,59-285,60-285,61-285,62-285,63-285,64-285,65-285,66-285,67-285,68-285,69-285,70-285,71-285,72-285,73-285,74-285,75-285,76-285,77-285,78-285,79-285,80-285,81-285,82-285,83-285,84-285,85-285,86-285,87-285,88-285,89-285,90-285,91-285,92-285,93-285,94-285,95-285,96-285,97-285,98-285,99-285,100-285,101-285,102-285,103-285,104-285,105-285,106-285,107-285,108-285,109-285,110-285,111-285,112-285,113-285,114-285,115-285,116-285,117-285,118-285,119-285,120-285,121-285,122-285,123-285,124-285,125-285,126-285,127-285,128-285,129-285,130-285,131-285,132-285,133-285,134-285,135-285,136-285,137-285,138-285,139-285,140-285,141-285,142-285,143-285,144-285,145-285,146-285,147-285,148-285,149-285,150-285,151-285,152-285,153-285,154-285,155-285,156-285,157-285,158-285,159-285,160-285,161-285,162-285,163-285,164-285,165-285,166-285,167-285,168-285,169-285,170-285,171-285,172-285,173-285,174-285,175-285,176-285,177-285,178-285,179-285,180-285,181-285,182-285,183-285,184-285,185-285,186-285,187-285,188-285,189-285, 和 190-285。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。本发明还涉及一种核酸分子,该核酸分子包含或由与编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的多核苷酸序列组成。本发明还涵盖了与异源多核苷酸序列融合的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内,这些多肽是包含或由与上述氨基酸序列与至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列组成的多肽,编码这种多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0268] 另外,由于本发明 Neutrokin- α 多肽的推定的胞外域可自身激发生物活性,该多肽推定的胞外域(跨越 SEQ ID NO:2 的 Gln73-Leu285 位氨基酸)缺失 N 末端和 C 末端

氨基酸残基仍可保留一些生物活性,例如配体结合,刺激淋巴细胞增殖,分化和/或活化,及调节细胞复制或调节靶细胞活性。然而,即使 Neutrokin- α 多肽推定的胞外域 N 末端缺失一或多个氨基酸导致此多肽的一或多种生物功能丧失,其它功能活性仍可保留。因此,缩短的多肽诱导和/或结合识别完整多肽或其胞外域的抗体的能力,当完整或成熟多肽或其胞外域的少部分残基自 N 末端除去时,仍可保留。缺失完整多肽 N 末端残基的特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述常规方法及本领域已知其它方法确定。

[0269] 因此,本发明还提供了一种多肽及编码这种多肽的多核苷酸,该多肽具有缺失自 SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 氨基酸序列氨基端直至 280 位甘氨酸残基的一或多个残基。尤其地,本发明提供的多肽包含或由 SEQ ID NO:2 的 n²-285 位氨基酸序列组成,其中 n² 是 SEQ ID NO:2 的 73-280 位氨基酸位置数中的一整数位,73 位是 Neutrokin- α 多肽 (SEQ ID NO:2) 推定的胞外域 N 末端的第一个残基位。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。更特别地,在某些实施方案中,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由选自以下一组氨基酸序列组成:SEQ ID NO:2 的 Q-73 至 L-285;G-74 至 L-285;D-75 至 L-285;L-76 至 L-285;A-77 至 L-285;S-78 至 L-285;L-79 至 L-285;R-80 至 L-285;A-81 至 L-285;E-82 至 L-285;L-83 至 L-285;Q-84 至 L-285;G-85 至 L-285;H-86 至 L-283;H-87 至 L-285;A-88 至 L-285;E-89 至 L-285;K-90 至 L-285;L-91 至 L-285;P-92 至 L-285;A93 至 L-285;G-94 至 L-285;A-95 至 L-285;G-96 至 L-285;A-97 至 L-285;P-98 至 L-285;K-99 至 L-285;A-100 至 L-285;G-101 至 L-285;L-102 至 L-285;E-103 至 L-235;E-104 至 L-285;A-105 至 L-285;P-106 至 L-285;A-107 至 L-285;V-108 至 L-285;T-109 至 L-285;A-110 至 L-285;G-111 至 L-285;L-112 至 L-285;K-113 至 L-285;I-114 至 L-285;F-115 至 L-285;E116 至 L-285;P-117 至 L-285;P-118 至 L-285;A-119 至 L-285;P-120 至 L-285;G-121 至 L-235;E-122 至 L-285;G-123 至 L-285;N-124 至 L-285;S-125 至 L-285;S-126 至 L-285;Q-127 至 L-285;N-128 至 L-285;S-129 至 L-285;R-130 至 L-285;N-131 至 L-285;K-132 至 L-285;R-133 至 L-285;A-134 至 L-285;V-135 至 L-285;Q-136 至 L-285;G-137 至 L-285;P-138 至 L-285;E-139 至 L-285;E-140 至 L-285;T-141 至 L-285;V-142 至 L-285;T-143 至 L-285;Q-144 至 L-285;D-145 至 L-285;C-146 至 L-285;L-147 至 L-285;Q-148 至 L-285;L-149 至 L-285;I-150 至 L-285;A-151 至 L-280;D-152 至 L-285;S-153 至 L-285;E-154 至 L-285;T-155 至 L-285;P-156 至 L-285;T-157 至 L-285;I-158 至 L-285;Q-159 至 L-285;K-160 至 L-285;G-161 至 L-285;S-162 至 L-285;Y-163 至 L-285;T-164 至 L-285;F-165 至 L-285;V-166 至 L-285;P-167 至 L-285;W-168 至 L-285;L-169 至 L-285;L-170 至 L-285;S-171 至 L-285;F-172 至 L-285;K-173 至 L-285;R-174 至 L-285;G-175 至 L-285;S-176 至 L-285;A-177 至 L-235;L-178 至 L-285;E-179 至 L-285;E-180 至 L-285;K-181 至 L-285;E-182 至 L-285;N-183 至 L-285;K-184 至 L-285;I-185 至 L-285;L-186 至 L-285;V-187 至 L-285;K-188 至 L-285;E-189 至 L-285;T-190 至 L-285;G-191 至 L-285;Y-192 至 L-285;F-193 至 L-285;F-194 至 L-280;I-195 至 L-285;Y196 至 L-285;G-197 至 L-285;Q-198 至 L-285;V-199 至 L-285;L-200 至 L-285;Y-201 至 L-285;T-202 至 L-285;D-203 至 L-285;K-204 至 L-285;T-205 至 L-285;Y-206 至 L-285;A-207 至 L-285;M-203 至 L-285;G-209 至 L-285;H-210 至 L-285;L-211 至 L-285;I-212 至 L-285;Q-213 至 L-285;R-214 至 L-285;K-215 至 L-285;K-216 至 L-285;V-217 至 L-285;H-218 至 L-285;V-219 至 L-285;F-220 至

L-285 ;G-221 至 L-285 ;D-222 至 L-285 ;E-223 至 L-285 ;L-224 至 L-285 ;S-225 至 L-285 ;L226 至 L-285 ;V-227 至 L-285 ;T-228 至 L-285 ;L-229 至 L-285 ;F-230 至 L-285 ;R-231 至 L-285 ;C-232 至 L-285 ;I-233 至 L-285 ;Q-234 至 L-235 ;N-235 至 L-285 ;M-236 至 L-285 ;P-237 至 L-285 ;E-238 至 L-285 ;T-239 至 L-285 ;L-240 至 L-285 ;P-241 至 L-285 ;N-242 至 L-285 ;N-243 至 L-285 ;S-244 至 L-285 ;C-245 至 L-285 ;Y-246 至 L-285 ;S-247 至 L-285 ;A-248 至 L-285 ;G-249 至 L-285 ;I-250 至 L-285 ;A-251 至 L-285 ;K-252 至 L-285 ;L-253 至 L-285 ;E-254 至 L-285 ;E-255 至 L-285 G-256 至 L-285 ;D-257 至 L-285 ;E-258 至 L-285 ;L-259 至 L-285 ;Q-260 至 L-285 ;L-261 至 L-285 ;A-262 至 L-285 ;I-263 至 L-285 ;P-264 至 L-285 ;R-265 至 L-285 ;E-266 至 L-285 ;N-267 至 L-285 ;A-268 至 L-285 ;Q-269 至 L-285 ;I-270 至 L-285 ;S-271 至 L-285 ;L-272 至 L-285 ;D-273 至 L-285 ;G-274 至 L-285 ;D-275 至 L-285 ;V-276 至 L-285 ;T-277 至 L-285 ;F-278 至 L-285 ;F-279 至 L-285 ;和 G-280 至 L-285。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。本发明还涉及一种核酸分子,该核酸分子包含或由与编码上述 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的多核苷酸序列组成。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列融合的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内,这些多肽是包含或由与以上氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列组成,编码这种多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0270] 本发明尤为优选的实施方案涉及一种核酸分子,该核酸分子包含或由具有一种核苷酸序列的多核苷酸组成,该核苷酸序列与编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO :2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 95%,96%,97%,98%,99%或 100%相同性。本发明优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子,该多核苷酸具有一种核苷酸序列,该核苷酸序列与编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO :2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 90%相同性。本发明更优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子,该多核苷酸具有一种核苷酸序列,该序列与编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO :2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 95%相同性。本发明更优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子,该多核苷酸具有一种核苷酸序列,该序列与编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO :2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 96%相同性。

[0271] 另外,本发明更优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子,该多核苷酸具有一种核苷酸序列,该序列与编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO :2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 97%相同性。另外,本发明更优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子,该多核苷酸具有一种核苷酸序列,该序列与编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO :2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 98%相同性。另外,本发明更优选的实施方案涉及包含或由多核苷酸组成的核酸分子,该多核苷酸具有一种核苷酸序列,该序列与编码具有图 1A 和 1B(SEQ ID NO :2) 所示 134-285 位氨基酸序列的 Neutrokin- α 多肽的多核苷酸序列有至少 99%相同性。

[0272] 在特异的实施方案中,由以下 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的 N 末端缺失多肽片段之一组成的多肽是优选的:SEQ ID NO:2 的 Ala71-Leu285 位氨基酸残基, Ala81-Leu285 位氨基酸残基, Leu112-Leu285 位氨基酸残基, Ala134-Leu285 位氨基酸残基, Leu147-Leu285 位氨基酸残基,和 Gly161-Leu285 位氨基酸残基,编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0273] 相似地,已知许多生物功能性 C 末端缺失突变蛋白。例如, γ 干扰素通过缺失其蛋白质羧基端的 8-10 个氨基酸残基而提高 10 倍活性 (Dobeli 等,生物技术杂志 7: 199-216(1988)). 由于本发明蛋白是 TNF 多肽家族的一员,C 末端氨基酸直至 284 位亮氨酸残基的缺失,期望保留大部分生物活性,例如配体结合,刺激淋巴细胞 (如 B 细胞) 增殖,分化和 / 或活化的能力,调节细胞复制的能力。缺失直至大约 10 个另外 C 末端或残基 (即直至 274 位甘氨酸残基) 的多肽,也可保留一些活性,如受体结合活性,尽管这种多肽丧失一部分延伸至 SEQ ID NO:2 的 Leu284 的保守的 TNF 结构域。然而,即使蛋白质 C 末端缺失一或多个氨基酸导致丧失一或多种蛋白质的生物功能,其它功能仍可保留。因此,当完整或成熟蛋白质的少量残基自 C 末端除去时,缩短的蛋白质诱导和 / 或结合识别完整或成熟蛋白的抗体的能力仍保留。缺失完整蛋白 C 末端残基的特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述常规方法和本领域已知其它方法确定。

[0274] 因此,本发明进一步提供了一种多肽和编码这种多肽的多核苷酸,该多肽具有缺失自图 1A 和 1B (SEQ ID NO:2) 所示氨基酸序列羧基端直至 274 位甘氨酸 (Gly274) 的一或多个残基。特别地,本发明提供了包含或由 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的 1- m^1 位残基的氨基酸序列组成的多肽,其中 m^1 是 SEQ ID NO:2 的 274-284 位氨基酸残基之间的任一整数。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。更特别地,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由选自以下一组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:2 的 1-274,1-275,1-276,1-277,1-278,1-279,1-280,1-281,1-282,1-283,和 1-284 位残基组成的氨基酸序列。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。本发明还涉及一种核酸分子,其包含或由与编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的多核苷酸序列组成。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,这些多肽是包含或由与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列组成,编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0275] 本发明还提供了一种多肽,其包含或由缺失自氨基端和羧基端的一或多个氨基酸组成,可描述为具有 SEQ ID NO:2 的 n^1 - m^1 残基,其中 n^1 和 m^1 是如前述的整数。本发明还包括编码多肽的核苷酸序列,该多肽包含或由 ATCC 保藏号 97768 的保藏的 cDNA 克隆编码的完整 Neutrokin- α 氨基酸序列的一部分组成,其中该部分不包括完整氨基酸序列 (或这些 N- 和 C- 末端缺失体的任意组合) 氨基端的 1-190 位氨基酸,或 C 末端的 1-11 位氨基酸。编码所有上述缺失多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0276] 相似地,自 Neutrokin- α 推定的胞外域的 C 末端残基直至 SEQ ID NO:2 的 79 位亮氨酸残基缺失体可保留一些生物活性,如配体结合,刺激淋巴细胞 (如 B 细胞) 增殖,分化和 / 或活化,及调节细胞复制或调节靶细胞活性。具有进一步 C 末端缺失包括 SEQ ID NO:

2 的 Leu79 的多肽不期望保留生物活性。

[0277] 然而,即使多肽 C 末端缺失一或多个氨基酸导致丧失一或多种多肽生物功能,其它生物活性仍可保留。因此,缩短的多肽诱导和 / 或结合识别完整,成熟多肽或其胞外域的抗体的能力,当完整,成熟多肽或其胞外域的少量残基自 C 末端除去时,仍可保留。缺失推定胞外域 C 末端残基的特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述常规方法及本领域已知其它方法确定。

[0278] 因此,本领域还提供了多肽及编码这种多肽的多核苷酸序列,该多肽具有缺失自 SEQ ID NO :2 所示 Neutrokin- α 多肽推定胞外域的氨基酸序列羧基端直至 79 位亮氨酸的一或多个残基。尤其地,本发明提供了包含或由 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的 73- m^2 残基组成的氨基酸序列组成的多肽,其中 m^2 是 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的 79-285 氨基酸残基位中的一整数位,78 位残基是 Neutrokin- α 多肽 (SEQ ID NO :2) 推定胞外域 C 末端的第一个残基。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。更特别地,在某些实施方案中本发明提供了编码包含或由选自以下一组氨基酸序列组成的多肽的多核苷酸:SEQ ID NO :2 的 Q-73 至 Leu-285 ;Q-73 至 L-284 ;Q-73 至 K-283 ;Q-73 至 L-282 ;Q-73 至 A-281 ;Q-73 至 G-280 ;Q-73 至 F-279 ;Q-73 至 F-278 ;Q-73 至 T-277 ;Q-73 至 V-276 ;Q-73 至 D-275 ;Q-73 至 G-274 ;Q-73 至 D-273 ;Q-73 至 L-272 ;Q-73 至 S-271 ;Q-73 至 I-270 ;Q-73 至 Q-269 ;Q-73 至 A-268 ;Q-73 至 N-267 ;Q-73 至 E-266 ;Q-73 至 R-265 ;Q-73 至 P-264 ;Q-73 至 I-263 ;Q-73 至 A-262 ;Q-73 至 L-261 ;Q-73 至 Q-260 ;Q-73 至 L-259 ;Q-73 至 E-258 ;Q-73 至 D-257 ;Q-73 至 G-256 ;Q-73 至 E-255 ;Q-73 至 E-254 ;Q-73 至 L-253 ;Q-73 至 K-252 ;Q-73 至 A-251 ;Q-73 至 I-250 ;Q-73 至 G-249 ;Q-73 至 A-248 ;Q-73 至 8-247 ;Q-73 至 Y-246 ;Q-73 至 C-245 ;Q-73 至 S-244 ;Q-73 至 N-243 ;Q-73 至 N-242 ;Q-73 至 P-241 ;Q-73 至 L-240 ;Q-73 至 T-239 ;Q-73 至 E-238 ;Q-73 至 P-237 ;Q-73 至 M-236 ;Q-73 至 N-235 ;Q-73 至 Q-234 ;Q-73 至 I-233 ;Q-73 至 C-232 ;Q-73 至 R-231 ;Q-73 至 F-230 ;Q-73 至 L-229 ;Q-73 至 T-228 ;Q-73 至 V-227 ;Q-73 至 L-226 ;Q-73 至 S-225 ;Q-73 至 L-224 ;Q-73 至 E-223 ;Q-73 至 D-222 ;Q-73 至 G-221 ;Q-73 至 F-220 ;Q-73 至 V-219 ;Q-73 至 H-218 ;Q-73 至 V-217 ;Q-73 至 K-216 ;Q-73 至 K-215 ;Q-73 至 R-214 ;Q-73 至 Q-213 ;Q-73 至 I-212 ;Q-73 至 L-211 ;Q-73 至 H-210 ;Q-73 至 G-209 ;Q-73 至 M-208 ;Q-73 至 A-207 ;Q-73 至 Y-206 ;Q-73 至 T-205 ;Q-73 至 K-204 ;Q-73 至 D-203 ;Q-73 至 T-202 ;Q-73 至 Y-201 ;Q-73 至 L-200 ;Q-73 至 V-199 ;Q-73 至 Q-198 ;Q-73 至 G-197 ;Q-73 至 Y-196 ;Q-73 至 I-195 ;Q-73 至 F-194 ;Q-73 至 F-193 ;Q-73 至 Y-192 ;Q-73 至 G-191 ;Q-73 至 T-190 ;Q-73 至 E-189 ;Q-73 至 K-188 ;Q-73 至 V-187 ;Q-73 至 L-186 ;Q-73 至 I-185 ;Q-73 至 K-184 ;Q-73 至 N-183 ;Q-73 至 E-182 ;Q-73 至 K-181 ;Q-73 至 E-180 ;Q-73 至 E-179 ;Q-73 至 L-178 ;Q-73 至 A-177 ;Q-73 至 S-176 ;Q-73 至 G-175 ;Q-73 至 R-174 ;Q-73 至 K-173 ;Q-73 至 F-172 ;Q-73 至 S-171 ;Q-73 至 L-170 ;Q-73 至 L-169 ;Q-73 至 W-168 ;Q-73 至 P-167 ;Q-73 至 V-166 ;Q-73 至 F-165 ;Q-73 至 T-164 ;Q-73 至 Y-163 ;Q-73 至 S-162 ;Q-73 至 G-161 ;Q-73 至 K-160 ;Q-73 至 Q-159 ;Q-73 至 I-158 ;Q-73 至 T-157 ;Q-73 至 P-156 ;Q-73 至 T-155 ;Q-73 至 E-154 ;Q-73 至 S-153 ;Q-73 至 D-152 ;Q-73 至 A-151 ;Q-73 至 I-150 ;Q-73 至 L-149 ;Q-73 至 Q-148 ;Q-73 至 L-147 ;Q-73 至 C-146 ;Q-73 至 D-145 ;Q-73 至 Q-144 ;Q-73 至 T-143 ;Q-73 至 V-142 ;Q-73 至 T-141 ;Q-73 至 E-140 ;Q-73 至 E-139 ;Q-73 至 P-138 ;Q-73 至 G-137 ;Q-73 至 Q-136 ;Q-73 至 V-135 ;Q-73 至 A-134 ;Q-73 至 R-133 ;Q-73 至 K-132 ;Q-73 至 N-131 ;Q-73 至

R-130 ;Q-73 至 S-129 ;Q-73 至 N-128 ;Q-73 至 Q-127 ;Q-73 至 S-126 ;Q-73 至 S-125 ;Q-73 至 N-124 ;Q-73 至 G-123 ;Q-73 至 E-122 ;Q-73 至 G-121 ;Q-73 至 P-120 ;Q-73 至 A-119 ;Q-73 至 P-118 ;Q-73 至 P-117 ;Q-73 至 E-116 ;Q-73 至 F-115 ;Q-73 至 I-114 ;Q-73 至 K-113 ;Q-73 至 L-112 ;Q-73 至 G-111 ;Q-73 至 A-110 ;Q-73 至 T-109 ;Q-73 至 V-108 ;Q-73 至 A-107 ;Q-73 至 P-106 ;Q-73 至 A-105 ;Q-73 至 E-104 ;Q-73 至 E-103 ;Q-73 至 L-102 ;Q-73 至 G-101 ;Q-73 至 A-100 ;Q-73 至 K-99 ;Q-73 至 P-98 ;Q-73 至 A-97 ;Q-73 至 G-96 ;Q-73 至 A-95 ;Q-73 至 G-94 ;Q-73 至 A-93 ;Q-73 至 P-92 ;Q-73 至 L-91 ;Q-73 至 K-90 ;Q-73 至 E-89 ;Q-73 至 A-88 ;Q-73 至 H-87 ;Q-73 至 H-86 ;Q-73 至 G-85 ;Q-73 至 Q-84 ;Q-73 至 L-83 ;Q-73 至 E-82 ;Q-73 至 A-81 ;Q-73 至 R-80 ;Q-73 至 L-79。由这些多核苷酸编码的多肽也涵盖在本发明内。本发明还涉及包含或由一种多核苷酸序列组成的核酸分子,该多核苷酸序列与编码上述 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性,本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,这些多肽是包含或由与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列组成的多肽,编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0279] 本发明还提供了具有缺失自 Neutrokin- α 推定胞外域氨基端和羧基端的一或多个氨基酸的多肽,其可描述为具有 SEQ ID NO:2 的 n^2 - m^2 残基,其中 n^2 和 m^2 为如前述的整数。

[0280] 在另一实施方案中,一核苷酸序列编码由 Neutrokin- α 氨基酸序列胞外域的一部分组成的多肽,Neutrokin- α 氨基酸序列由 ATCC 中 No. 97768 的 cDNA 质粒编码,所述胞外域的一部分不包括 Neutrokin- α 氨基酸序列胞外域氨基端的 1-206 位氨基酸,或羧基端的 1-206 位氨基酸,或上述氨基端和羧基端缺失的任意组合。

[0281] 如上所述,即使多肽 N 末端缺失一或多个氨基酸导致丧失多肽的一或多种功能活性(即生物活性),其它功能或生物活性仍可保留。因此,缩短的 Neutrokin- α 突变蛋白诱导和 / 或结合识别全长或成熟形式多肽或其胞外域的抗体的能力,当完整或成熟多肽或其胞外域的少量残基自 N 末端除去时,仍可保留。缺失完整多肽 N 末端残基的特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述方法和本领域已知方法确定。缺失大量 N 末端氨基酸残基的 Neutrokin- α 突变蛋白仍保留一些功能(如生物或免疫)活性不是不可能的事实上,由少如 6 个 Neutrokin- α 氨基酸残基组成的肽通常也可激发免疫应答。

[0282] 因此,本发明提供了一种多肽和编码这种多肽的多核苷酸,该多肽具有缺失自 SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 的推定的全长氨基酸序列氨基端直至 280 位甘氨酸残基的一或多个残基。尤其本发明提供了包含 SEQ ID NO:2 所示序列 n^3 -285 残基组成的氨基酸序列的多肽,其中 n^3 是 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列 1-280 氨基酸残基位中的一整数。

[0283] 更特别地,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由选自以下一组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:2 的 D-2 至 L-285 ;D-3 至 L-285 ;S-4 至 L-285 ;T-5 至 L-285 ;E-6 至 L-285 ;R-7 至 L-285 ;E-8 至 L-285 ;Q-9 至 L-285 ;S-10 至 L-285 ;R-11 至 L-285 ;L-12 至 L-285 ;T-13 至 L-285 ;S-14 至 L-285 ;C-15 至 L-285 ;L-16 至 L-285 ;K-17 至 L-285 ;K-18 至 L-285 ;R-19 至 L-285 ;E-20 至 L-285 ;E-21 至 L-285 ;M-22 至 L-285 ;K-23 至 L-285 ;L-24 至 L-285 ;K-25 至 L-285 ;E-26 至 L-285 ;C-27 至 L-285 ;V-28 至 L-285 ;S-29 至 L-285 ;I-30

至 L-285 ;L-31 至 L-285 ;P-32 至 L-285 ;R-33 至 L-285 ;K-34 至 L-285 ;E-35 至 L-285 ;S-36 至 L-285 ;P-37 至 L-285 ;S-38 至 L-285 ;V-39 至 L-285 ;R-40 至 L-285 ;S-41 至 L-285 ;S-42 至 L-285 ;K43 至 L-285 ;D-44 至 L-285 ;G-45 至 L-285 ;K-46 至 L-285 ;L-47 至 L-285 ;L-48 至 L-285 ;A-49 至 L-285 ;A-50 至 L-285 ;T-51 至 L-285 ;L-52 至 L-285 ;L-53 至 L-285 ;L-54 至 L-285 ;A-55 至 L-285 ;L-56 至 L-285 ;L-57 至 L-285 ;S-58 至 L-285 ;C-59 至 L-285 ;C-60 至 L-283 ;L-61 至 L-285 ;T-62 至 L-285 ;V-63 至 L-285 ;V-64 至 L-285 ;S-65 至 L-285 ;F-66 至 L-285 ;Y-67 至 L-285 ;Q-68 至 L-285 ;V-69 至 L-285 ;A-70 至 L-285 ;A-71 至 L-285 ;L-72 至 L-285 ;Q-73 至 L-285 ;G-74 至 L-285 ;D-75 至 L-285 ;L-76 至 L-285 ;A-77 至 L-285 ;S-78 至 L-285 ;L-79 至 L-285 ;R-80 至 L-285 ;A-81 至 L-285 ;E-82 至 L-285 ;L-83 至 L-285 ;Q-84 至 L-285 ;G-85 至 L-285 ;H-86 至 L-285 ;H-87 至 L-285 ;A-88 至 L-285 ;E-89 至 L-285 ;K-90 至 L-285 ;L-91 至 L-285 ;P-92 至 L-285 ;A-93 至 L-285 ;G-94 至 L-285 ;A-95 至 L-285 ;G-96 至 L285 ;A-97 至 L-285 ;P-98 至 L-285 ;K-99 至 L-285 ;A-100 至 L-285 ;G-101 至 L-285 ;L-102 至 L-285 ;E-103 至 L-285 ;E-104 至 L-285 ;A-105 至 L-285 ;P-106 至 L-285 ;A-107 至 L-285 ;V-108 至 L-285 ;T-109 至 L-285 ;A-110 至 L-285 ;G-111 至 L-285 ;L-112 至 L-285 ;K-113 至 L-285 ;I-114 至 L-285 ;F-115 至 L-285 ;E-116 至 L-285 ;P-117 至 L-285 ;P-118 至 L-285 ;A-119 至 L-285 ;P-120 至 L-285 ;G-121 至 L-285 ;E-122 至 L-285 ;G-123 至 L-285 ;N-124 至 L-285 ;S-125 至 L-285 ;S-126 至 L-285 ;Q-127 至 L-285 ;N-128 至 L-285 ;S-129 至 L-285 ;R130 至 L-285 ;N-131 至 L-285 ;K-132 至 L-285 ;R-133 至 L-285 ;A-134 至 L-285 ;V-135 至 L-285 ;Q-136 至 L-285 ;G-137 至 L-285 ;P-138 至 L-285 ;E-139 至 L-285 ;E-140 至 L-285 ;T-141 至 L-285 ;V-142 至 L-285 ;T-143 至 L-285 ;Q-144 至 L-285 ;D-145 至 L-285 ;C-146 至 L-285 ;L-147 至 L-285 ;Q-148 至 L-285 ;L-149 至 L-285 ;I-150 至 L-285 ;A-151 至 L-285 ;D-152 至 L-285 ;S-153 至 L-285 ;E-154 至 L-285 ;T-155 至 L-285 ;P-156 至 L-285 ;T-157 至 L-283 ;I-158 至 L-285 ;Q-159 至 L-285 ;K-160 至 L-285 ;G-161 至 L-285 ;S-162 至 L-285 ;Y-163 至 L-285 ;T-164 至 L-285 ;F-165 至 L-285 ;V-166 至 L-285 ;P-167 至 L-285 ;W-168 至 L-285 ;L-169 至 L-285 ;L-170 至 L-285 ;S-171 至 L-285 ;F-172 至 L-285 ;K-173 至 L-285 ;R-174 至 L-285 ;G-175 至 L-285 ;S-176 至 L-285 ;A-177 至 L-285 ;L-178 至 L-285 ;E-179 至 L-285 ;E-180 至 L-285 ;K-181 至 L-285 ;E-182 至 L-285 ;N-183 至 L-285 ;K-184 至 L-285 ;I-185 至 L-285 ;L-186 至 L-285 ;V-187 至 L-285 ;K-188 至 L-285 ;E-189 至 L-285 ;T-190 至 L-285 ;G-191 至 L-285 ;Y-192 至 L-285 ;F-193 至 L-285 ;F-194 至 L-285 ;I-195 至 L-285 ;Y-196 至 L-285 ;G-197 至 L-285 ;Q-198 至 L-285 ;V-199 至 L-285 ;L-200 至 L-285 ;Y-201 至 L-285 ;T-202 至 L-285 ;D-203 至 L-285 ;K-204 至 L-285 ;T-205 至 L-285 ;Y-206 至 L-285 ;A-207 至 L-285 ;M-208 至 L-285 ;G-209 至 L-285 ;H-210 至 L-285 ;L-211 至 L-285 ;I-212 至 L-285 ;Q-213 至 L-285 ;R-214 至 L-285 ;K-215 至 L-285 ;K-216 至 L-285 ;V-217 至 L-285 ;H-218 至 L-285 ;V-219 至 L-285 ;F-220 至 L-285 ;G-221 至 L-285 ;D-222 至 L-285 ;E-223 至 L-285 ;L-224 至 L-285 ;S-225 至 L-285 ;L-226 至 L-285 ;V-227 至 L-285 ;T-228 至 L-285 ;L-229 至 L-285 ;F-230 至 L-285 ;R-231 至 L-285 ;C-232 至 L-285 ;I-233 至 L-285 ;Q-234 至 L-285 ;N-235 至 L-285 ;M-236 至 L-285 ;P-237 至 L-285 ;E-238 至 L-285 ;T-239 至 L-285 ;L-240 至 L-285 ;P-241 至 L-285 ;N-242 至 L-285 ;N-243 至 L-285 ;S-244 至 L-285 ;C-245 至 L-285 ;Y-246 至 L-285 ;S-247 至 L-285 ;A-248 至 L-285 ;G-249 至 L-285 ;I-250 至

L-285 ;A-251 至 L-285 ;K-252 至 L-285 ;L-253 至 L-285 ;E-254 至 L-285 ;E-255 至 L-285 ;G-256 至 L-285 ;D-257 至 L-285 ;E-258 至 L-285 ;L-259 至 L-285 ;Q-260 至 L-285 ;L-261 至 L-285 ;A-262 至 L-285 ;I-263 至 L-285 ;P-264 至 L-285 ;R-265 至 L-285 ;E-266 至 L-285 ;N-267 至 L-285 ;A-268 至 L-285 ;Q-269 至 L-285 ;I-270 至 L-285 ;S-271 至 L-285 ;B-272 至 L-285 ;D-273 至 L-285 ;G-274 至 L-285 ;D-275 至 L-285 ;V-276 至 L-285 ;T-277 至 L-285 ;F-278 至 L-285 ;F-279 至 L-285 ;以及 G-280 至 L-285。本发明还涉及包含或由一种多核苷酸序列组成的核酸分子,该多核苷酸序列与编码上述 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性,本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和/或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,这些多肽包含与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列,编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0284] 如上所述,即使蛋白质 C 末端缺失一或多个氨基酸导致蛋白质丧失一或多种功能活性(如生物活性),其它功能活性仍可保留。因此,当完整或成熟多肽或胞外域的少量残基自 C 末端除去时,缩短的 Neutrokin- α 突变蛋白诱导和/或结合识别完整或成熟多肽或胞外域的抗体的能力仍可保留。缺失完整多肽 C 末端特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述方法和本领域已知其它方法确定。缺失大量 C 末端氨基酸残基的 Neutrokin- α 突变蛋白仍保留一些功能(如生物或免疫)活性不是不可能的。事实上,由少如 6 个 Neutrokin- α 氨基酸残基组成的肽通常也可激发免疫应答。

[0285] 因此,本发明提供了具有缺失自 SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 氨基酸序列羧基端直至在 6 位的谷氨酸的一或多个残基的多肽,还提供了编码这种多肽的多核苷酸。尤其本发明提供了包含 SEQ ID NO:2 的 1-m³ 残基组成的氨基酸序列的多肽,其中 m³ 是 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列 6-284 氨基酸残基位中的一整数位。

[0286] 更特别地,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由选自以下一组氨基酸序列组成:SEQ ID NO:2 的 M-1 至 L-284 ;M-1 至 K-283 ;M-1 至 L-282 ;M-1 至 A-281 ;M-1 至 G-280 ;M-1 至 F-279 ;M-1 至 F-278 ;M-1 至 T-277 ;M-1 至 V-276 ;M-1 至 D-275 ;M-1 至 G-274 ;M-1 至 D-273 ;M-1 至 L-272 ;M-1 至 S-271 ;M-1 至 I-270 ;M-1 至 Q-269 ;M-1 至 A-268 ;M-1 至 N-267 ;M-1 至 E-266 ;M-1 至 R-265 ;M-1 至 P-264 ;M-1 至 I-263 ;M-1 至 A-262 ;M-1 至 L-261 ;M-1 至 Q-260 ;M-1 至 L-259 ;M-1 至 E-258 ;M-1 至 D-257 ;M-1 至 G-256 ;M-1 至 E-255 ;M-1 至 E-254 ;M-1 至 L-253 ;M-1 至 K-252 ;M-1 至 A-251 ;M-1 至 I-250 ;M-1 至 G-249 ;M-1 至 A-248 ;M-1 至 S-247 ;M-1 至 Y-246 ;M-1 至 C-245 ;M-1 至 S-244 ;M-1 至 N-243 ;M-1 至 N-242 ;M-1 至 P-241 ;M-1 至 L-240 ;M-1 至 T-239 ;M-1 至 E-238 ;M-1 至 P-237 ;M-1 至 M-236 ;M-1 至 N-235 ;M-1 至 Q-234 ;M-1 至 I-233 ;M-1 至 C-232 ;M-1 至 R-231 ;M-1 至 F-230 ;M-1 至 L-229 ;M-1 至 T-228 ;M-1 至 V-227 ;M-1 至 L-226 ;M-1 至 S-225 ;M-1 至 L-224 ;M-1 至 E-223 ;M-1 至 D-222 ;M-1 至 G-221 ;M-1 至 F-220 ;M-1 至 V-219 ;M-1 至 H-218 ;M-1 至 V-217 ;M-1 至 K-216 ;M-1 至 K-215 ;M-1 至 R-214 ;M-1 至 Q-213 ;M-1 至 I-212 ;M-1 至 L-211 ;M-1 至 H-210 ;M-1 至 G-209 ;M-1 至 M-208 ;M-1 至 A-207 ;M-1 至 Y-206 ;M-1 至 T-205 ;M-1 至 K-204 ;M-1 至 D-203 ;M-1 至 T-202 ;M-1 至 Y-201 ;M-1 至 L-200 ;M-1 至 V-199 ;M-1 至 Q-198 ;M-1 至 G-197 ;M-1 至 Y-196 ;M-1 至 I-195 ;M-1 至 F-194 ;M-1 至 F-193 ;M-1 至 Y-192 ;M-1 至 G-191 ;M-1 至 T-190 ;

M-1 至 E-189 ;M-1 至 K-188 ;M-1 至 V-187 ;M-1 至 L-186 ;M-1 至 I-185 ;M-1 至 K-184 ;M-1 至 N-183 ;M-1 至 E-132 ;M-1 至 K-181 ;M-1 至 E-180 ;M-1 至 E-179 ;M-1 至 L-178 ;M-1 至 A-177 ;M-1 至 S-176 ;M-1 至 G-175 ;M-1 至 R-174 ;M-1 至 K-173 ;M-1 至 F-172 ;M-1 至 S-171 ;M-1 至 L-170 ;M-1 至 L-169 ;M-1 至 W-168 ;M-1 至 P-167 ;M-1 至 V-166 ;M-1 至 F-165 ;M-1 至 T-164 ;M-1 至 Y-163 ;M-1 至 S-162 ;M-1 至 G-161 ;M-1 至 K-160 ;M-1 至 Q-159 ;M-1 至 I-158 ;M-1 至 T-157 ;M-1 至 P-156 ;M-1 至 T-155 ;M-1 至 E-154 ;M-1 至 S-153 ;M-1 至 D-152 ;M-1 至 A-151 ;M-1 至 I-150 ;M-1 至 L-149 ;M-1 至 Q-148 ;M-1 至 L-147 ;M-1 至 C-146 ;M-1 至 D-145 ;M-1 至 Q-144 ;M-1 至 T-143 ;M-1 至 V-142 ;M-1 至 T-141 ;M-1 至 E-140 ;M-1 至 E-139 ;M-1 至 P-138 ;M-1 至 G-137 ;M-1 至 Q-136 ;M-1 至 V-135 ;M-1 至 A-134 ;M-1 至 R-133 ;M-1 至 K-132 ;M-1 至 N-131 ;M-1 至 R-130 ;M-1 至 S-129 ;M-1 至 N-128 ;M-1 至 Q-127 ;M-1 至 S-126 ;M-1 至 S-125 ;M-1 至 N-124 ;M-1 至 G-123 ;M-1 至 E-122 ;M-1 至 G-121 ;M-1 至 P-120 ;M-1 至 A-119 ;M-1 至 P118 ;M-1 至 P-117 ;M-1 至 E-116 ;M-1 至 F-115 ;M-1 至 I-114 ;M-1 至 K-113 ;M-1 至 L-112 ;M-1 至 G-111 ;M-1 至 A-110 ;M-1 至 T-109 ;M-1 至 V-108 ;M-1 至 A-107 ;M-1 至 P-106 ;M-1 至 A-105 ;M-1 至 E-104 ;M-1 至 E-103 ;M-1 至 L-102 ;M-1 至 G-101 ;M-1 至 A-100 ;M-1 至 K-99 ;M-1 至 P-98 ;M-1 至 A-97 ;M-1 至 G-96 ;M-1 至 A-95 ;M-1 至 G-94 ;M-1 至 A-93 ;M-1 至 P-92 ;M-1 至 L-91 ;M-1 至 K-90 ;M-1 至 E-89 ;M-1 至 A-88 ;M-1 至 H-87 ;M-1 至 H-86 ;M-1 至 G-35 ;M-1 至 Q-84 ;M-1 至 L-83 ;M-1 至 E-82 ;M-1 至 A-81 ;M-1 至 R-80 ;M-1 至 L-79 ;M-1 至 S-78 ;M-1 至 A-77 ;M-1 至 L-76 ;M-1 至 D-75 ;M-1 至 G-74 ;M-1 至 Q-73 ;M-1 至 L-72 ;M-1 至 A-71 ;M-1 至 A-70 ;M-1 至 V-69 ;M-1 至 Q-68 ;M-1 至 Y-67 ;M-1 至 F-66 ;M-1 至 S-65 ;M-1 至 V-64 ;M-1 至 V-63 ;M-1 至 T-62 ;M-1 至 L-61 ;M-1 至 C-60 ;M-1 至 C-59 ;M-1 至 S-58 ;M-1 至 L-57 ;M-1 至 L-56 ;M-1 至 A-55 ;M-1 至 L-54 ;M-1 至 L-53 ;M-1 至 L-52 ;M-1 至 T-51 ;M-1 至 A-50 ;M-1 至 A-49 ;M-1 至 L-48 ;M-1 至 L-47 ;M-1 至 K-46 ;M-1 至 G-45 ;M-1 至 D-44 ;M-1 至 K-43 ;M-1 至 S-42 ;M-1 至 S-41 ;M-1 至 R-40 ;M-1 至 V-39 ;M-1 至 S-38 ;M-1 至 P-37 ;M-1 至 S-36 ;M-1 至 E-35 ;M-1 至 K-34 ;M-1 至 R-33 ;M-1 至 P-32 ;M-1 至 L-31 ;M-1 至 I-30 ;M-1 至 S-29 ;M-1 至 V-28 ;M-1 至 C-27 ;M-1 至 E-26 ;M-1 至 K-25 ;M-1 至 L-24 ;M-1 至 K-23 ;M-1 至 M-22 ;M-1 至 E-21 ;M-1 至 E-20 ;M-1 至 R-19 ;M-1 至 K-18 ;M-1 至 K-17 ;M-1 至 L-16 ;M-1 至 C-15 ;M-1 至 S-14 ;M-1 至 T-13 ;M-1 至 L-12 ;M-1 至 R-11 ;M-1 至 S-10 ;M-1 至 Q-9 ;M-1 至 E-8 ;M-1 至 R-7 ;和 M-1 至 E-6。本发明还涉及包含或由一种多核苷酸序列组成的核酸分子,该多核苷酸序列与编码上述 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,该多肽包含与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列,编码这种多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0287] 本发明还提供了具有缺失自 Neutrokin- α 多肽氨基端和羧基端的一或多个氨基酸的多肽,其可描述为具有 SEQ ID NO:2 的 n^3 - m^3 位残基,其中 n^3 和 m^3 为如前述的整数。

[0288] 另外,由于本发明 Neutrokin- α SV 多肽的推定胞外域可自身激发功能活性(如生物活性),在 SEQ ID NO:19 的 Gln73-Leu266 位的多肽的推定胞外域 N 和 C 末端氨基酸缺失仍可保留一些功能活性,如配体结合,刺激淋巴细胞(如 B 细胞)增殖,分化和 / 或活化,调节细胞复制,调节靶细胞活性和 / 或免疫活性。然而,即使 Neutrokin- α SV 多肽的

推定胞外域的 N 末端缺失一或多个氨基酸导致丧失一或多种功能活性,其它功能活性仍可保留。因此,缩短的多肽诱导和 / 或结合识别完整或成熟多肽或其胞外域的抗体的能力,当成熟或完整多肽或胞外域的少量残基自 N 末端除去时,仍可保留。缺失完整多肽 N 末端残基的特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述常规方法和本领域已知其它方法确定。

[0289] 因此,本发明还提供了一种多肽和编码这种多肽的多核苷酸,该多肽具有缺失自 Neutrokin- α SV 氨基酸序列氨基端直至 261 位甘氨酸残基的一或多个残基。尤其本发明提供了包含 SEQ ID NO:19 的 n⁴-266 氨基酸序列的多肽,其中 n⁴ 是 SEQ ID NO:19 氨基酸序列 73-261 氨基酸残基位中的一整数位,且 261 位是 Neutrokin- α SV (如 SEQ ID NO:19 所示) 多肽的推定胞外域 N 末端的第一个残基位。

[0290] 更特别地,在某些实施方案中,本发明提供了编码一种多肽的多核苷酸,该多肽包含或由选自以下一组的氨基酸序列组成:SEQ IDNO:19 的 Q-73 至 L-266;G-74 至 L-266;D-75 至 L-266;L-76 至 L-266;A-77 至 L-266;S-78 至 L-266;L79 至 L-266;R-80 至 L-266;A-81 至 L-266;E-82 至 L-266;L-83 至 L-266;Q-84 至 L-266,G-85 至 L-266;H-86 至 L-266;H-87 至 L-266;A-88 至 L-266;E-89 至 L-266;K-90 至 L-266;L-91 至 L-266;P-92 至 L-266;A-93 至 L-266;G-94 至 L-266;A-95 至 L-266;G-96 至 L-266;A-97 至 L-266;P-98 至 L-266;K-99 至 L-266;A-100 至 L-266;G-101 至 L-266;L-102 至 L-266;E-103 至 L-266;E-104 至 L-266;A-105 至 L-266;P-106 至 L-266;A-107 至 L-266;V-108 至 L-266;T-109 至 L-266;A-110 至 L-266;G-111 至 L-266;L-112 至 L-266;K-113 至 L-266;I-114 至 L-266;F-115 至 L-266;E-116 至 L-266;P-117 至 L-266;P-118 至 L-266;A119 至 L-266;P-120 至 L-266;G-121 至 L-266;E-122 至 L-266;G-123 至 L-266;N-124 至 L-266;S-125 至 L-266;S-126 至 L-266;Q-127 至 L-266;N-128 至 L-266;S-129 至 L-266;R130 至 L-266;N-131 至 L-266;K-132 至 L-266;R-133 至 L-266;A-134 至 L-266;V-135 至 L-266;Q-136 至 L-266;G-137 至 L-266;P-138 至 L-266;E-139 至 L-266;E-140 至 L-266;T-141 至 L-266;G-142 至 L-266;S-143 至 L266;Y-144 至 L-266;T-145 至 L-266;F-146 至 L-266;V-147 至 L-266;P-148 至 L-266;W-149 至 L-266;L-150 至 L-266;L-151 至 L-266;S-152 至 L-266;F-153 至 L-266;K-154 至 L-266;R-155 至 L-266;G-156 至 L-266;S-157 至 L-266;A-158 至 L-266;L-159 至 L-266;E-160 至 L-266;E-161 至 L-266;K-162 至 L-266;E-163 至 L-266;N-164 至 L-266;K-165 至 L-266;I-166 至 L-266;L-167 至 L-266;V-168 至 L-266;K-169 至 L-266;E-170 至 L-266;T-171 至 L-266;G-172 至 L-266;Y-173 至 L-266;F-174 至 L-266;F-175 至 L-266;I-176 至 L-266;Y-177 至 L-266;G-178 至 L-266;Q-179 至 L-266;V-180 至 L-266;L-181 至 L-266;Y-182 至 L-266;T-183 至 L-266;D-184 至 L-266;K-185 至 L-266;T-186 至 L-266;Y-187 至 L-266;A-188 至 L-266;M-189 至 L-266;G-190 至 L-266;H-191 至 L-266;L-192 至 L-266;I-193 至 L-266;Q-194 至 L-266;R-195 至 L-266;K-196 至 L-266;K-197 至 L-266;V-198 至 L-266;H-199 至 L-266;V-200 至 L-266;F-201 至 L-266;G-202 至 L-266;D-203 至 L-266;E-204 至 L-266;L-205 至 L-266;S-206 至 L-266;L-207 至 L-266;V-203 至 L-266;T-209 至 L-266;L-210 至 L-266;F-211 至 L-266;R-212 至 L-266;C-213 至 L-266;I-214 至 L-266;Q-215 至 L-266;N-216 至 L-266;M-217 至 L-266;P-218 至 L-266;E-219 至 L-266;T-220 至 L-266;L-221 至 L-266;P-222 至 L-266;N-223 至 L-266;N-224 至 L-266;S-225 至

L-266 ;C-226 至 L-266 ;Y-227 至 L-266 ;S-228 至 L-266 ;A-229 至 L-266 ;G-230 至 L-266 ;I-231 至 L-266 ;A-232 至 L-266 ;K-233 至 L-266 ;L-234 至 L-266 ;E-235 至 L-266 ;E-236 至 L-266 ;G-237 至 L-266 ;D-238 至 L-266 ;E-239 至 L-266 ;L-240 至 L-266 ;Q-241 至 L-266 ;L-242 至 L-266 ;A-243 至 L-266 ;I-244 至 L-266 ;P-245 至 L-266 ;R246 至 L-266 ;E-247 至 L-266 ;N-248 至 L-266 ;A-249 至 L-266 ;Q-250 至 L-266 ;I-251 至 L-266 ;S-252 至 L-266 ;L-233 至 L-266 ;D-254 至 L-266 ;G-255 至 L-266 ;D-256 至 L-266 ;V-257 至 L-266 ;T-258 至 L-266 ;F-259 至 L-266 ;F-260 至 L-266 ;和 G-261 至 L-266。本发明还涉及包含或由一种多核苷酸序列组成的核酸分子,该多核苷酸序列与编码上述 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列具有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,该多肽包含与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列,编码这种多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0291] 相似地,Neutrokin- α SV 的推定胞外域的 C 末端氨基酸直至 SEQ ID NO:19 第 79 位亮氨酸的缺失可保留一些功能活性,如配体结合,刺激淋巴细胞(如 B 细胞)增殖,分化和 / 或活化,调节细胞复制,调节靶细胞活性和 / 或免疫原性。具有进一步 SEQ ID NO:19 的 C 末端缺失包括 Leu79 缺失的多肽不期望能保留生物活性。

[0292] 然而,即使多肽 C 末端缺失一或多个氨基酸导致多肽丧失一或多种功能活性(如生物活性),其它功能活性仍可保留。因此,缩短的多肽诱导和 / 或结合识别完整多肽,成熟多肽或其胞外域的抗体的能力,当成熟,完整多肽或胞外域的少量残基自 C 末端除去时,仍可保留。缺失推定胞外域的 C 末端残基的特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述常规方法和本领域已知其它方法确定。

[0293] 因此,本发明进一步提供了一种多肽和编码这种多肽的多核苷酸,该多肽具有缺失自 SEQ ID NO:19 所示 Neutrokin- α SV 的推定胞外域的氨基酸序列羧基端直至 79 位亮氨酸的一或多个残基。尤其本发明提供了具有 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的 73- m^4 位残基组成的氨基酸序列的多肽,其中 m^4 是 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的 79-266 位氨基酸残基位中的一个整数位。

[0294] 更特别地,在某些实施方案中,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由选自以下一组的氨基酸序列组成:SEQ IDNO:19 的 Q-73 至 K-264 ;Q-73 至 L-263 ;Q-73 至 A-262 ;Q-73 至 G-261 ;Q-73 至 F-260 ;Q-73 至 F-259 ;Q-73 至 T-258 ;Q-73 至 V-257 ;Q-73 至 D-256 ;Q-73 至 G-255 ;Q-73 至 D-254 ;Q-73 至 L-253 ;Q-73 至 S-252 ;Q-73 至 I-251 ;Q-73 至 Q-250 ;Q-73 至 A-249 ;Q-73 至 N-248 ;Q-73 至 E-247 ;Q-73 至 R-246 ;Q-73 至 P-240 ;Q-73 至 I-244 ;Q-73 至 A-243 ;Q-73 至 L-242 ;Q-73 至 Q-241 ;Q-73 至 L-240 ;Q73 至 E-239 ;Q-73 至 D-238 ;Q-73 至 G-237 ;Q-73 至 E-236 ;Q-73 至 E-235 ;Q-73 至 L-234 ;Q-73 至 K-233 ;Q-73 至 A-232 ;Q-73 至 I-231 ;Q-73 至 G-230 ;Q-73 至 A-229 ;Q-73 至 S-228 ;Q-73 至 Y-227 ;Q-73 至 C-226 ;Q-73 至 S-225 ;Q-73 至 N-224 ;Q-73 至 N-223 ;Q-73 至 P-222 ;Q-73 至 L-221 ;Q-73 至 T-220 ;Q-73 至 E-219 ;Q-73 至 P-218 ;Q-73 至 M-217 ;Q-73 至 N-216 ;Q-73 至 Q-215 ;Q-73 至 I-214 ;Q-73 至 C-213 ;Q-73 至 R-212 ;Q-73 至 F-211 ;Q-73 至 L-210 ;Q-73 至 T-209 ;Q-73 至 V-208 ;Q-73 至 L-207 ;Q-73 至 S-206 ;Q-73 至 L-205 ;Q-73 至 E-204 ;Q-73 至 D-203 ;Q-73 至

G-202 ;Q-73 至 F-201 ;Q-73 至 V-200 ;Q-73 至 H-199 ;Q-73 至 V-198 ;Q-73 至 K-197 ;Q-73 至 K-196 ;Q-73 至 R-195 ;Q-73 至 Q-194 ;Q-73 至 I-193 ;Q-73 至 L-192 ;Q-73 至 H-191 ;Q-73 至 G-190 ;Q-73 至 Q-73 ;Q-73 至 A-188 ;Q-73 至 Y-187 ;Q-73 至 T-186 ;Q-73 至 K-185 ;Q-73 至 D-184 ;Q-73 至 T-183 ;Q-73 至 Y-182 ;Q-73 至 L-181 ;Q-73 至 V-180 ;Q-73 至 Q-179 ;Q-73 至 G-178 ;Q-73 至 Y-177 ;Q-73 至 I-176 ;Q-73 至 F-175 ;Q-73 至 F-174 ;Q-73 至 Y-173 ;Q-73 至 G-172 ;Q-73 至 T-171 ;Q-73 至 E-170 ;Q-73 至 K-169 ;Q-73 至 V-168 ;Q-73 至 L-167 ;Q-73 至 I-166 ;Q-73 至 K-165 ;Q-73 至 N-164 ;Q-73 至 E-163 ;Q-73 至 K-162 ;Q-73 至 E-161 ;Q-73 至 E-160 ;Q-73 至 L-159 ;Q-73 至 A-158 ;Q-73 至 S-157 ;Q-73 至 G-156 ;Q-73 至 R-155 ;Q-73 至 K-154 ;Q-73 至 F-153 ;Q-73 至 S-152 ;Q-73 至 L-151 ;Q-73 至 L-150 ;Q-73 至 W-149 ;Q-73 至 P-148 ;Q-73 至 V-147 ;Q-73 至 F-146 ;Q-73 至 T-145 ;Q-73 至 Y-144 ;Q-73 至 S-143 ;Q-73 至 G-142 ;Q-73 至 T-141 ;Q-73 至 E-140 ;Q-73 至 E-139 ;Q-73 至 P-138 ;Q-73 至 G-137 ;Q-73 至 Q-136 ;Q-73 至 V-135 ;Q-73 至 A-134 ;Q-73 至 R-133 ;Q-73 至 K-132 ;Q-73 至 N-131 ;Q-73 至 R-130 ;Q-73 至 S-129 ;Q-73 至 N-128 ;Q-73 至 Q-127 ;Q-73 至 S-126 ;Q-73 至 S-125 ;Q-73 至 N-124 ;Q-73 至 G-123 ;Q-73 至 E-122 ;Q-73 至 G-121 ;Q-73 至 P-120 ;Q-73 至 A-119 ;Q-73 至 P-118 ;Q-73 至 P-117 ;Q-73 至 E-116 ;Q-73 至 F-115 ;Q-73 至 I-114 ;Q-73 至 K-113 ;Q-73 至 L-112 ;Q-73 至 G-111 ;Q-73 至 A-110 ;Q-73 至 T-109 ;Q-73 至 V-108 ;Q-73 至 A-107 ;Q-73 至 P-106 ;Q-73 至 A-105 ;Q-73 至 E-104 ;Q-73 至 E-103 ;Q-73 至 L-102 ;Q-73 至 G-101 ;Q-73 至 A-100 ;Q-73 至 K-99 ;Q-73 至 P-98 ;Q-73 至 A-97 ;Q-73 至 G-96 ;Q-73 至 A-95 ;Q-73 至 G-94 ;Q-73 至 A-93 ;Q-73 至 P-92 ;Q-73 至 L-91 ;Q-73 至 K-90 ;Q-73 至 E-89 ;Q-73 至 A-88 ;Q-73 至 H-87 ;Q-73 至 H-86 ;Q-73 至 G-85 ;Q-73 至 Q-84 ;Q-73 至 L-83 ;Q-73 至 E-82 ;Q-73 至 A-81 ;Q-73 至 R-80 ;Q-73 至 L-79 ;以及 Q-73 至 S-78。本发明还涉及包含或由一种多核苷酸序列组成的核酸分子,该多核苷酸序列与编码上述 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列具有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,这种多肽含有与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列,编码这种多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0295] 本发明还提供了具有缺失自 Neutrokin- α SV 的推定胞外域氨基端和羧基端的一或多个氨基酸的多肽,其可描述为具有 SEQ IDNO:19 的 n^4 - m^4 位残基,其中 n^4 和 m^4 为如前述的整数。

[0296] 在另一实施方案这,一核苷酸序列编码一种多肽,该多肽由 ATCC 保藏号 203518 的保藏的 cDNA 克隆编码的 Neutrokin- α SV 氨基酸序列的胞外域的一部分组成,所述胞外域的一部分不包括胞外域氨基端的 1-260 位氨基酸,或胞外域羧基端的 1-187 位氨基酸,或胞外域上述氨基端和氨基端缺失的任意组合。

[0297] 如上所述,即使多肽 N 末端缺失一或多个氨基酸导致丧失一或多种多肽功能活性(如生物活性),其它功能活性仍可保留。因此,当全长或成熟多肽或其胞外域的少量残基自 N 末端除去时,缩短的 Neutrokin- α SV 突变蛋白诱导和 / 或结合识别全长或成熟多肽或其胞外域的抗体的能力仍保留。缺失完整多肽 N 末端残基的特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述常规方法和本领域已知其它方法确定。大量缺失 N 末端氨基酸残基

的 Neutrokin- α SV 突变蛋白仍保留功能（如免疫原性）活性不是不可能的。事实上，由少如 6 个 Neutrokin- α SV 氨基酸残基组成的肽也可通常引发免疫应答。

[0298] 因此，本发明提供了一种多肽和编码这种多肽的多核苷酸，该多肽具有缺失自 SEQ ID NO:19 所示 Neutrokin- α SV 的推定的全长氨基酸序列氨基端直至 261 位甘氨酸的一个或多个残基。尤其本发明提供了包含 SEQ ID NO:19 所示序列的 n⁵-266 位残基组成的氨基酸序列，其中 m⁵ 是 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的 1-261 氨基酸残基位中的一整数位。

[0299] 更特别地，本发明提供了编码多肽的多核苷酸，该多肽选自以下一组的氨基酸序列：SEQ ID NO:19 的 D-2 至 L-266；D-3 至 L-266；S-4 至 L-266；T-5 至 L-266；E-6 至 L-266；R-7 至 L-266；E-8 至 L-266；Q-9 至 L-266；S-10 至 L-266；R-11 至 L-266；L-12 至 L-266；T-13 至 L-266；S-14 至 L-266；C-15 至 L-266；L-16 至 L-266；K-17 至 L-266；K-18 至 L-266；R-19 至 L-266；E-20 至 L-266；E-21 至 L-266；M-22 至 L-266；K-23 至 L-266；L-24 至 L-266；K-25 至 L-266；E-26 至 L-266；C-27 至 L-266；V-28 至 L-266；S-29 至 L-266；I-30 至 L-266；L-31 至 L-266；P-32 至 L-266；R-33 至 L-266；K-34 至 L-266；E-35 至 L-266；S-36 至 L-266；P-37 至 L-266；S-38 至 L-266；V-39 至 L-266；R-40 至 L-266；S-41 至 L-266；S-42 至 L-266；K-43 至 L-266；D-44 至 L-266；G-45 至 L-266；K-46 至 L-266；L-47 至 L-266；L-48 至 L-266；A-49 至 L-266；A-50 至 L-266；T-51 至 L-266；L-52 至 L-266；L-53 至 L-266；L-54 至 L-266；A-55 至 L-266；L-56 至 L-266；L-57 至 L-266；S-58 至 L-266；C-59 至 L-266；C-60 至 L-266；L-61 至 L-266；T-62 至 L-266；V-63 至 L-266；V-64 至 L-266；S-65 至 L-266；F-66 至 L-266；Y-67 至 L-266；Q-68 至 L-266；V-69 至 L-266；A-70 至 L-266；A-71 至 L-266；L-72 至 L-266；Q-73 至 L-266；G-74 至 L-266；D-75 至 L-266；L-76 至 L-266；A-77 至 L-266；S-78 至 L-266；L-79 至 L-266；R-80 至 L-266；A-81 至 L-266；E-82 至 L-266；L-83 至 L-266；Q-84 至 L-266；G-85 至 L-266；H-86 至 L-266；H-87 至 L-266；A-88 至 L-266；E-89 至 L-266；K-90 至 L-266；L-91 至 L-266；P-92 至 L-266；A-93 至 L-266；G-94 至 L-266；A-95 至 L-266；G-96 至 L-266；A-97 至 L-266；P-98 至 L-266；K-99 至 L-266；A-100 至 L-266；G-101 至 L-266；L-102 至 L-266；E-103 至 L-266；E-104 至 L-266；A-105 至 L-266；P-106 至 L-266；A-107 至 L-266；V-108 至 L-266；T-109 至 L-266；A-110 至 L-266；G-111 至 L-266；L-112 至 L-266；K-113 至 L-266；I-114 至 L-266；F-115 至 L-266；E-116 至 L-266；P-117 至 L-266；P-118 至 L-266；A-119 至 L-266；P-120 至 L-266；G-121 至 L-266；E-122 至 L-266；G-123 至 L-266；N-124 至 L-266；S-125 至 L-266；S-126 至 L-266；Q-127 至 L-266；N-128 至 L-266；S-129 至 L-266；R-130 至 L-266；N-131 至 L-266；K-132 至 L-266；R-133 至 L-266；A-134 至 L-266；V-135 至 L-266；Q-136 至 L-266；G-137 至 L-266；P-138 至 L-266；E-139 至 L-266；E-140 至 L-266；T-141 至 L-266；G-142 至 L-266；S-143 至 L-266；Y-144 至 L-266；T-145 至 L-266；F-146 至 L-266；V-147 至 L-266；P-148 至 L-266；W-149 至 L-266；L-150 至 L-266；L-151 至 L-266；S-152 至 L-266；F-153 至 L-266；K-154 至 L-266；R-155 至 L-266；G-156 至 L-266；S-157 至 L-266；A-158 至 L-266；L-159 至 L-266；E-160 至 L-266；E-161 至 L-266；K-162 至 L-266；E-163 至 L-266；N-164 至 L-266；K-165 至 L-266；I-166 至 L-266；L-167 至 L-266；V-168 至 L-266；K-169 至 L-266；E-170 至 L-266；T-171 至 L-266；G-172 至 L-266；Y-173 至 L-266；F-174 至 L-266；F-175 至 L-266；I-176 至 L-266；Y-177 至 L-266；G-178 至 L-266；Q-179 至 L-266；V-180 至 L-266；L-181 至 L-266；Y-182 至 L-266；T-183 至 L-266；D-184 至 L-266；

K-185 至 L-266 ;T-186 至 L-266 ;Y-187 至 L-266 ;A-188 至 L-266 ;M-189 至 L-266 ;G-190 至 L-266 ;H-191 至 L-266 ;L-192 至 L-266 ;I-193 至 L-266 ;Q-194 至 L-266 ;R-195 至 L-266 ;K-196 至 L-266 ;K-197 至 L-266 ;V-198 至 L-266 ;H-199 至 L-266 ;V-200 至 L-266 ;F-201 至 L-266 ;G-202 至 L-266 ;D-203 至 L-266 ;E-204 至 L-266 ;L-205 至 L-266 ;S-206 至 L-266 ;L-207 至 L-266 ;V-208 至 L-266 ;T-209 至 L-266 ;L-210 至 L-266 ;F-211 至 L-266 ;R-212 至 L-266 ;C-213 至 L-266 ;I-214 至 L-266 ;Q-215 至 L-266 ;N-216 至 L-266 ;M-217 至 L-266 ;P-218 至 L-266 ;E-219 至 L-266 ;T-220 至 L-266 ;L-221 至 L-266 ;P-222 至 L-266 ;N-223 至 L-266 ;N-224 至 L-266 ;S-225 至 L-266 ;C-226 至 L-266 ;Y-227 至 L-266 ;S-223 至 L-266 ;A-229 至 L-266 ;G-230 至 L-266 ;I-231 至 L-266 ;A-232 至 L-266 ;K-233 至 L-266 ;L-234 至 L-266 ;E-235 至 L-266 ;E-236 至 L-266 ;G-237 至 L-266 ;D-238 至 L-266 ;E-239 至 L-266 ;L-240 至 L-266 ;Q-241 至 L-266 ;L-242 至 L-266 ;A-243 至 L-266 ;I-244 至 L-266 ;P-245 至 L-266 ;R-246 至 L-266 ;E-247 至 L-266 ;N-248 至 L-266 ;A-249 至 L-266 ;Q-250 至 L-266 ;I-251 至 L-266 ;S-252 至 L-266 ;U-253 至 L-266 ;D-254 至 L-266 ;G-255 至 L-266 ;D-256 至 L-266 ;V-257 至 L-266 ;T-258 至 L-266 ;F-259 至 L-266 ;F-260 至 L-266 ;以及 G-261 至 L-266。本发明还涉及包含或由多核苷酸序列组成的核酸分子,该多核苷酸序列与编码上述 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列具有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99% 相同性。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,这些多肽具有与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99% 相同性的氨基酸序列,编码这些多肽的多核苷酸也在本发明内。

[0300] 如上所述,即使蛋白质 C 末端缺失一或多个氨基酸导致丧失一或多种蛋白质功能活性(如生物活性),其它功能活性仍可保留。因此,缩短的 Neutrokin- α SV 突变蛋白诱导和 / 或结合识别完整或成熟多肽或其胞外域的抗体的能力,当完整或成熟多肽或胞外域的少量残基自 C 末端除去时仍可保留。缺失完整多肽 C 末端残基的特殊多肽是否保留这种免疫活性,可通过本文所述常规方法和本领域已知其它方法确定。大量缺失 C 末端氨基酸残基的 Neutrokin- α SV 突变蛋白仍保留一些功能(如免疫原性)活性不是不可能的。事实上,由少如 6 个 Neutrokin- α SV 氨基酸残基组成的肽通常也可激发免疫应答。

[0301] 因此,本发明提供了一种多肽及编码这种多肽的多核苷酸,该多肽具有缺失自 SEQ ID NO:19 所示 Neutrokin- α SV 氨基酸序列羧基端直至在第 6 位的谷氨酸的一或多个残基。尤其本发明提供了包含 SEQ ID NO:19 的 1- m^5 残基氨基酸序列的多肽,其中 m^5 是 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列 6-265 氨基酸残基位中的一整数位。

[0302] 更特别地,本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由选自以下一组氨基酸序列组成:SEQ ID NO:19 的 M-1 至 G-265;M-1 至 G-264;L-263;M-1 至 A-262;M-1 至 G-261;M-1 至 F-260;M-1 至 F-259;M-1 至 T-258;M-1 至 V-257;M-1 至 D-256;M-1 至 G-255;M-1 至 D-254;M-1 至 L-253;M-1 至 S-252;M-1 至 I-251;M-1 至 Q-250;M-1 至 A-249;M-1 至 N-248;M-1 至 E-247;M-1 至 R-246;M-1 至 R-245;M-1 至 I-244;M-1 至 A-243;M-1 至 L-242;M-1 至 Q-241;M-1 至 L-240;M-1 至 E-239;M-1 至 D-238;M-1 至 G-237;M-1 至 E-236;M-1 至 E-235;M-1 至 L-234;M-1 至 K-233;M-1 至 A-232;M-1 至 I-231;M-1 至 G-230;M-1 至 A-229;M-1 至 S-228;M-1 至 Y-227;M-1 至 C-226;M-1 至 S-225;M-1 至 N-224;M-1 至 N-223;

M-1 至 P-222 ;M-1 至 L-221 ;M-1 至 T-220 ;M-1 至 E-219 ;M-1 至 P-218 ;M-1 至 M-217 ;M-1 至 N-216 ;M-1 至 Q-115 ;M-1 至 I-214 ;M-1 至 C-213 ;M-1 至 R-112 ;M-1 至 F-211 ;M-1 至 L-210 ;M-1 至 T-209 ;M-1 至 V-208 ;M-1 至 L-207 ;M-10 至 S-206 ;M-1 至 L-205 ;M-1 至 E-204 ;M-1 至 D-203 ;M-1 至 G-202 ;M-1 至 F-201 ;M-1 至 V-200 ;M-1 至 H-199 ;M-1 至 V-198 ;M-1 至 K-197 ;M-1 至 K-196 ;M-1 至 R-195 ;M-1 至 Q-194 ;M-1 至 I-193 ;M-1 至 L-192 ;M-1 至 H-191 ;M-1 至 G-190 ;M-1 至 M-189 ;M-1 至 A-188 ;M-1 至 Y-187 ;M-1 至 T-186 ;M-1 至 K-185 ;M-1 至 D-184 ;M-1 至 T-183 ;M-1 至 Y-182 ;M-1 至 L-181 ;M-1 至 V-180 ;M-1 至 Q-179 ;M-1 至 G-178 ;M-1 至 Y-177 ;M-1 至 I-176 ;M-1 至 F-175 ;M-1 至 F-174 ;M-1 至 Y-173 ;M-1 至 G-172 ;M-1 至 T-171 ;M-1 至 E-170 ;M-1 至 K-169 ;M-1 至 V-168 ;M-1 至 L-167 ;M-1 至 I-166 ;M-1 至 K-165 ;M-1 至 N-164 ;M-1 至 E-163 ;M-1 至 K-162 ;M-1 至 E-161 ;M-1 至 E-160 ;M-1 至 L-159 ;M-1 至 A-158 ;M-1 至 S-157 ;M-1 至 G-156 ;M-1 至 R-155 ;M-1 至 K-154 ;M-1 至 F-153 ;M-1 至 S-152 ;M-1 至 L-151 ;M-1 至 L-150 ;M-1 至 W-149 ;M-1 至 P-148 ;M-1 至 V-147 ;M-1 至 F-146 ;M-1 至 T-145 ;M-1 至 Y-144 ;M-1 至 S-143 ;M-1 至 G-142 ;M-1 至 T-141 ;M-1 至 E-140 ;M-1 至 E-139 ;M-1 至 P-138 ;M-1 至 G-137 ;M-1 至 Q-136 ;M-1 至 V-135 ;M-1 至 A-134 ;M-1 至 R-133 ;M-1 至 K-132 ;M-1 至 N-131 ;M-1 至 R-130 ;M-1 至 S-129 ;M-1 至 N-128 ;M-1 至 Q-127 ;M-1 至 S-126 ;M-1 至 S-125 ;M-1 至 N-124 ;M-1 至 G-123 ;M-1 至 E-122 ;M-1 至 G-121 ;M-11 至 P-120 ;M-1 至 A-119 ;M-1 至 P-118 ;M-1 至 P-117 ;M-1 至 E-116 ;M-1 至 F-110 ;M-1 至 I-114 ;M-1 至 K-113 ;M-1 至 L-112 ;M-1 至 G-111 ;M-1 至 A-110 ;M-1 至 T-109 ;M-1 至 V-108 ;M-1 至 A-107 ;M-1 至 P-106 ;M-1 至 A-105 ;M-1 至 E-104 ;M-1 至 E-103 ;M-1 至 L-102 ;M-1 至 G-101 ;M-1 至 A-100 ;M-1 至 K-99 ;M-1 至 P-98 ;M-1 至 A-97 ;M-1 至 G-96 ;M-1 至 A-95 ;M-1 至 G-94 ;M-1 至 A-93 ;M-1 至 P-92 ;M-1 至 L-91 ;M-1 至 K-90 ;M-1 至 E-89 ;M-1 至 A-88 ;M-1 至 H-87 ;M-1 至 H-86 ;M-1 至 G-85 ;M-1 至 Q-84 ;M-1 至 L-83 ;M-1 至 E-82 ;M-1 至 A-81 ;M-1 至 R-80 ;M-1 至 L-79 ;M-1 至 S-78 ;M-1 至 A-77 ;M-1 至 L-76 ;M-1 至 D-75 ;M-1 至 G-74 ;M-1 至 Q-73 ;M-1 至 L-72 ;M-1 至 A-71 ;M-1 至 A-70 ;M-1 至 V-69 ;M-1 至 Q-68 ;M-1 至 Y-67 ;M-1 至 F-66 ;M-1 至 S-65 ;M-1 至 V-64 ;M-1 至 V-63 ;M-1 至 T-62 ;M-1 至 L-61 ;M-1 至 C-60 ;M-1 至 C-59 ;M-1 至 S-58 ;M-1 至 L-57 ;M-1 至 L-56 ;M-1 至 A-55 ;M-1 至 L-54 ;M-1 至 L-53 ;M-1 至 L-52 ;M-1 至 T-51 ;M-1 至 A-50 ;M-1 至 A-49 ;M-1 至 L-48 ;M-1 至 L-47 ;M-1 至 K-46 ;M-1 至 G-45 ;M-1 至 D-44 ;M-1 至 K-43 ;M-1 至 S-42 ;M-1 至 S-41 ;M-1 至 R-40 ;M-1 至 V-39 ;M-1 至 S-38 ;M-1 至 P-37 ;M-1 至 S-36 ;M-1 至 E-35 ;M-1 至 K-34 ;M-1 至 R-33 ;M-1 至 P-32 ;M-1 至 L-31 ;M-1 至 I-30 ;M-1 至 S-29 ;M-1 至 V-28 ;M-1 至 C-27 ;M-1 至 E-26 ;M-1 至 K-25 ;M-1 至 L-24 ;M-1 至 K-23 ;M-1 至 M-22 ;M-1 至 E-21 ;M-1 至 E-20 ;M-1 至 R-19 ;M-1 至 K-18 ;M-1 至 K-17 ;M-1 至 L-16 ;M-1 至 C-15 ;M-1 至 S-14 ;M-1 至 T-13 ;M-1 至 L-12 ;M-1 至 R-11 ;M-1 至 S-10 ;M-1 至 Q-9 ;M-1 至 E-8 ;M-1 至 R-7 ;和 M-1 至 E-6。本发明还涉及包含或由多核苷酸序列组成的核酸分子,该多核苷酸序列与编码上述 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列具有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,这些多肽包含与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列,编码这些多肽的多核苷酸也在本发明内。

[0303] 本发明还提供了具有缺失自 Neutrokin- α SV 多肽氨基端和羧基端的一或多个氨基酸的多肽,其可描述为具有 SEQ ID NO:19 的 n^5 - m^5 残基,其中 n^5 和 m^5 是上述的整数。在另外的实施方案中,本发明提供了包含 SEQ ID NO:2 的 134- m^6 位残基的氨基酸序列的多肽,其中 m^6 是 SEQ ID NO:2 所示序列 140-285 位氨基酸残基中的一整数。例如本发明提供了编码多肽的多核苷酸,该多肽包含或由选自以下一组氨基酸序列组成:SEQ ID NO:2 的 A-134 至 Leu-285;A-134 至 L-284;A-134 至 K-283;A-134 至 L-282;A-134 至 A-281;A-134 至 G-280;A-134 至 F-279;A-134 至 F-278;A-134 至 T-277;A-134 至 V-276;A-134 至 D-275;A-134 至 G-274;A-134 至 D-273;A-134 至 L-272;A-134 至 S-271;A-134 至 I-270;A-134 至 Q-269;A-134 至 A-268;A-134 至 N-267;A-134 至 E-266;A-134 至 R-265;A-134 至 P-264;A-134 至 I-263;A-134 至 A-262;A-134 至 L-261;A-134 至 Q-260;A-134 至 L-239;A-134 至 E-258;A-134 至 D-257;A-134 至 G-256;A-134 至 E-255;A-134 至 E-254;A-134 至 L-253;A-134 至 K-252;A-134 至 A-251;A-134 至 I-250;A-134 至 G-249;A-134 至 A-248;A-134 至 S-247;A-134 至 Y-246;A-134 至 C-245;A-134 至 S-244;A-134 至 N-243;A-134 至 N-242;A-134 至 P-241;A-134 至 L-240;A-134 至 T-239;A-134 至 E-238;A-134 至 P-237;A-134 至 M-236;A-134 至 N-235;A-134 至 Q-234;A-134 至 I-233;A-134 至 C-232;A-134 至 R-231;A-134 至 F-230;A-134 至 L-229;A-134 至 T-228;A-134 至 V-227;A-134 至 L-226;A-134 至 S-225;A-134 至 L-224;A-134 至 E-223;A-134 至 D-222;A-134 至 G-221;A-134 至 F-220;A-134 至 V-219;A-134 至 H-218;A-134 至 V-217;A-134 至 K-216;A-134 至 K-215;A-134 至 R-214;A-134 至 Q-213;A-134 至 I-212;A-134 至 L-211;A-134 至 H-210;A-134 至 G-209;A-134 至 M-208;A-134 至 A-207;A-134 至 Y-206;A-134 至 T-205;A-134 至 K-204;A-134 至 D-203;A-134 至 T-202;A-134 至 Y-201;A-134 至 L-200;A-134 至 V-199;A-134 至 Q-198;A-134 至 G-197;A-134 至 Y-196;A-134 至 I-195;A-134 至 F-194;A-134 至 F-193;A-134 至 Y-192;A-134 至 G-191;A-134 至 T-190;A-134 至 E-189;A-134 至 K-188;A-134 至 V-187;A-134 至 L-186;A-134 至 I-185;A-134 至 K-184;A-134 至 N-183;A-134 至 E-182;A-134 至 K-181;A-134 至 E-180;A-134 至 E-179;A-134 至 L-178;A-134 至 A-177;A-134 至 S-176;A-134 至 G-175;A-134 至 R-174;A-134 至 K-173;A-134 至 F-172;A-134 至 S-171;A-134 至 L-170;A-134 至 L-169;A-134 至 W-168;A-134 至 P-167;A-134 至 V-166;A-134 至 F-165;A-134 至 T-164;A-134 至 Y-163;A-134 至 S-162;A-134 至 G-161;A-134 至 K-160;A-134 至 Q-159;A-134 至 I-158;A-134 至 T-157;A-134 至 P-156;A-134 至 T-155;A-134 至 E-154;A-134 至 S-153;A-134 至 D-152;A-134 至 A-151;A-134 至 I-150;A-134 至 L-149;A-134 至 Q-148;A-134 至 L-147;A-134 至 C-146;A-134 至 D-145;A-134 至 Q-144;A-134 至 T-143;A-134 至 V-142;A-134 至 T-141;以及 A-134 至 E-140。本发明还涉及包含或由一种多核苷酸序列组成的核酸分子,该多核苷酸与编码上述 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的多核苷酸序列具有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性。本发明还涵盖了融合于异源多核苷酸序列的上述多核苷酸序列。由这些核酸和 / 或多核苷酸序列编码的多肽也涵盖在本发明内,这些多肽具有与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列,编码这些多肽的多核苷酸也在本发明内。

[0304] 本发明其它优选的多肽片段包含或由选自以下一组氨基酸序列组成:SEQ ID NO:

2 的 M-1 至 C-15 ;D-2 至 L-16 ;D-3 至 K-17 ;S-4 至 K-18 ;T-5 至 R-19 ;E-6 至 E-20 ;R-7 至 E-21 ;E-8 至 M-22 ;Q-9 至 K-23 ;S-10 至 L-24 ;R-11 至 K-25 ;L-12 至 E-26 ;T-13 至 C-27 ;S-14 至 V-28 ;C-15 至 S-29 ;L-16 至 I-30 ;K-17 至 L-31 ;K-18 至 P-32 ;R-19 至 R-33 ;E-20 至 K-34 ;E-21 至 E-35 ;M-22 至 S-36 ;K-23 至 P-37 ;L-24 至 S-38 ;K-25 至 V-39 ;E-26 至 R-40 ;C-27 至 S-41 ;V-28 至 S-42 ;S-29 至 K-43 ;I-30 至 D-44 ;L-31 至 G-45 ;P-32 至 K-46 ;R-33 至 L-47 ;K-34 至 L-48 ;E-35 至 A-49 ;S-36 至 A-50 ;P-37 至 T-51 ;S-38 至 L-52 ;V-39 至 L-53 ;R-40 至 L-54 ;S-41 至 A-55 ;S-42 至 L-56 ;K-43 至 L-57 ;D-44 至 S-58 ;G-45 至 C-59 ;K-46 至 C-60 ;L-47 至 L-61 ;L-48 至 T-62 ;A-49 至 V-63 ;A-50 至 V-64 ;T-51 至 S-65 ;L-52 至 F-66 ;L-53 至 Y-67 ;L-54 至 Q-68 ;A-55 至 V-69 ;L-56 至 A-70 ;L-57 至 A-71 ;S ~ 58 至 L-72 ;C-59 至 Q-73 ;C-60 至 G-74 ;L-61 至 D-75 ;T-62 至 L-76 ;V-63 至 A-77 ;V-64 至 S-78 ;S-65 至 L-79 ;F-66 至 R-80 ;Y-67 至 A-81 ;Q-68 至 E-82 ;V-69 至 L-83 ;A-70 至 Q-84 ;A-71 至 G-85 ;L-72 至 H-86 ;Q-73 至 H-87 ;G-74 至 A-88 ;D-75 至 E-89 ;L-76 至 K-90 ;A-77 至 L-91 ;S-78 至 P-92 ;L-79 至 A-93 ;R-80 至 G-94 ;A-81 至 A-95 ;E-82 至 G-96 ;L-83 至 A-97 ;Q-84 至 P-98 ;G-85 至 K-99 ;H-86 至 A-100 ;H-87 至 G-101 ;A-83 至 L-102 ;E-89 至 E-103 ;K-90 至 E-104 ;L-91 至 A-105 ;P-92 至 P-106 ;A-93 至 A-107 ;G-94 至 V-108 ;A-95 至 T-109 ;G-96 至 A-110 ;A-97 至 G-111 ;P-98 至 L-112 ;K-99 至 K-113 ;A-100 至 I-114 ;G-101 至 F-115 ;L-102 至 E-116 ;E-103 至 P-117 ;E-104 至 P-118 ;A-105 至 A-119 ;P-106 至 P-120 ;A-107 至 G-121 ;V-103 至 E-122 ;T-109 至 G-123 ;A-110 至 N-124 ;G-111 至 S-125 ;L-112 至 S-126 ;K-113 至 Q-127 ;I-114 至 N-128 ;F-110 至 S-129 ;E-116 至 R-130 ;P-117 至 N-131 ;P-118 至 K-132 ;A-119 至 R-133 ;P-120 至 A-134 ;G-121 至 V-135 ;E-122 至 Q-136 ;G-123 至 G-137 ;N-124 至 P-138 ;S-125 至 E-139 ;S-126 至 E-140 ;Q-127 至 T-141 ;N-123 至 V-142 ;S-129 至 T-143 ;R-130 至 Q-144 ;N-131 至 D-145 ;K-132 至 C-146 ;R-133 至 L-147 ;A-134 至 Q-148 ;V-135 至 L-149 ;Q-136 至 I-150 ;G-137 至 A-151 ;P-138 至 D-152 ;E-139 至 S-153 ;E-140 至 E-154 ;T-141 至 T-155 ;V-142 至 P-156 ;T-143 至 T-157 ;Q-144 至 I-158 ;D-145 至 Q-159 ;C-146 至 K-160 ;L-147 至 G-161 ;Q-148 至 S-162 ;L-149 至 Y-163 ;I-150 至 T-164 ;A-151 至 F-165 ;D-152 至 V-166 ;S-153 至 P-167 ;E-154 至 W-168 ;T-155 至 L-169 ;P-156 至 L-170 ;T-157 至 S-171 ;I-158 至 F-172 ;Q-159 至 K-173 ;K-160 至 R-174 ;G-161 至 G-175 ;S-162 至 S-176 ;Y-163 至 A-177 ;T-164 至 L-178 ;F-165 至 E-179 ;V-166 至 E-180 ;P-167 至 K-181 ;W-168 至 E-182 ;L-169 至 N-183 ;L-170 至 K-184 ;S-171 至 I-185 ;F-172 至 L-186 ;K-173 至 V-187 ;R-174 至 K-188 ;G-175 至 E-189 ;S-176 至 T-190 ;A-177 至 G-191 ;L-178 至 Y-192 ;E-179 至 F-193 ;E-180 至 F-194 ;K-181 至 I-195 ;E-182 至 Y-196 ;N-183 至 G-197 ;K-184 至 Q-198 ;I-185 至 V-199 ;L-186 至 L-200 ;V-187 至 Y-201 ;K-188 至 T-202 ;E-189 至 D-203 ;T-190 至 K-204 ;G-191 至 T-205 ;Y-192 至 Y-206 ;F-193 至 A-207 ;F-194 至 M-208 ;I-195 至 G-209 ;Y-196 至 H-210 ;G-197 至 L-211 ;Q-198 至 I-212 ;V-199 至 Q-213 ;L-200 至 R-214 ;Y-201 至 K-215 ;T-202 至 K-216 ;D-203 至 V-217 ;K-204 至 H-218 ;T-205 至 V-219 ;Y-206 至 F-220 ;A-207 至 G-221 ;M-208 至 D-222 ;G-209 至 E-223 ;H-210 至 L-224 ;L-211 至 S-225 ;I-212 至 L-226 ;Q-213 至 V-227 ;R-214 至 T-228 ;K-215 至 L-229 ;K-216 至 F-230 ;V-217 至 R-231 ;H-218 至 C-232 ;V-219 至 I-233 ;F-220 至 Q-234 ;G-221 至 N-235 ;D-222 至 M-236 ;E-223 至 P-237 ;L-224 至 E-238 ;S-225 至 T-239 ;L-226 至 L-240 ;V-227 至 P-241 ;T-228 至

N-242 ;L-229 至 N-243 ;F-230 至 S-244 ;R-231 至 C-245 ;C-232 至 Y-246 ;I-233 至 S-247 ;Q-234 至 A-248 ;N-235 至 G-249 ;M-236 至 I-250 ;P-237 至 A-251 ;E-238 至 K-252 ;T-239 至 L-253 ;L-240 至 E-254 ;P-241 至 E-255 ;N-242 至 G-256 ;N-243 至 D-257 ;S-244 至 E-258 ;C-245 至 L-259 ;Y-246 至 Q-260 ;S-247 至 L-261 ;A-248 至 A-262 ;G-249 至 I-263 ;I-250 至 P-264 ;A-251 至 R-265 ;K-252 至 E-266 ;L-253 至 N-267 ;E-254 至 A-268 ;E-255 至 Q-269 ;G-256 至 I-270 ;D-257 至 S-271 ;E-258 至 L-272 ;L-259 至 D-273 ;Q-260 至 G-274 ;L-261 至 D-275 ;A-262 至 V-276 ;I-263 至 T-277 ;P-264 至 F-278 ;R-265 至 F-279 ;E-266 至 G-280 ;N-267 至 A-281 ;A-268 至 L-282 ;Q-269 至 K-283 ;I-270 至 L-284 ;和 S-271 至 L-285。优选地,这些多肽片段具有本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的一或多种功能活性(如生物活性,抗原性和免疫原性),且可例如用于产生或筛选抗体,如下所述。本发明还涉及包含或由与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98% 或 99% 相同性的氨基酸序列组成。本发明还涵盖了融合于异源氨基酸序列的上述氨基酸序列。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0305] 本发明其它优选的多肽片段包含或由选自以下一组氨基酸序列组成:SEQ ID NO: 19 的 M-1 至 C-15 ;D-2 至 L-16 ;D-3 至 K-17 ;S-4 至 K-18 ;T-5 至 R-19 ;E-6 至 E-20 ;R-7 至 E-21 ;E-8 至 M-22 ;Q-9 至 K-23 ;S-10 至 L-24 ;R-11 至 K-25 ;L-12 至 E-26 ;T-13 至 C-27 ;S-14 至 V-28 ;C-15 至 S-29 ;L-16 至 I-30 ;K-17 至 L-31 ;K-18 至 P-32 ;R-19 至 R-33 ;E-20 至 K-34 ;E-21 至 E-35 ;M-22 至 S-36 ;K-23 至 P-37 ;L-24 至 S-38 ;K-25 至 V-39 ;E-26 至 R-40 ;C-27 至 S-41 ;V-28 至 S-42 ;S-29 至 K-43 ;I-30 至 D-44 ;L-31 至 G-45 ;P-32 至 K-46 ;R-33 至 L-47 ;K-34 至 L-48 ;E-35 至 A-49 ;S-36 至 A-50 ;P-37 至 T-51 ;S-38 至 L-52 ;V-39 至 L-53 ;R-40 至 L-54 ;S-41 至 A-55 ;S-42 至 L-56 ;K-43 至 L-57 ;D-44 至 S-58 ;G-43 至 C-59 ;K-46 至 C-60 ;L-47 至 L-61 ;L-48 至 T-62 ;A-49 至 V-63 ;A-50 至 V-64 ;T-51 至 S-65 ;L-52 至 F-66 ;L-53 至 Y-67 ;L-54 至 Q-68 ;A-55 至 V-69 ;L-56 至 A-70 ;L-57 至 A-71 ;S-58 至 L-72 ;C-59 至 Q-73 ;C-60 至 G-74 ;L-61 至 D-73 ;T-62 至 L-76 ;V-63 至 A-77 ;V-64 至 S-78 ;S-65 至 L-79 ;F-66 至 R-80 ;Y-67 至 A-81 ;Q-68 至 E-82 ;V-69 至 L-83 ;A-70 至 Q-84 ;A-71 至 G-85 ;L-72 至 H-86 ;Q-73 至 H-87 ;G-74 至 A-88 ;D-75 至 E-89 ;L-76 至 K-90 ;A-77 至 L-91 ;S-78 至 P-92 ;L-79 至 A ~ 93 ;R-80 至 G-94 ;A-81 至 A-95 ;E-82 至 G-96 ;L-83 至 A-97 ;Q-84 至 P-98 ;G-85 至 K-99 ;H-86 至 A-100 ;H-87 至 G-101 ;A-88 至 L-102 ;E-89 至 E-103 ;K-90 至 E-104 ;L-91 至 A-105 ;P-92 至 P-106 ;A-93 至 A-107 ;G-94 至 V-108 ;A-95 至 T-109 ;G-96 至 A-110 ;A-97 至 G-111 ;P-98 至 L-112 ;K-99 至 K-113 ;A-100 至 I-114 ;G-101 至 F-115 ;L-102 至 E-116 ;E-103 至 P-117 ;E-104 至 P-118 ;A-105 至 A-119 ;P-106 至 P-120 ;A-107 至 G-121 ;V-108 至 E-122 ;T-109 至 G-123 ;A-110 至 N-124 ;G-111 至 S-125 ;L-112 至 S-126 ;K-113 至 Q-127 ;I-114 至 N-128 ;F-115 至 S-129 ;E-116 至 R-130 ;P-117 至 N-131 ;P-118 至 K-132 ;A-119 至 R-133 ;P-120 至 A-134 ;G-121 至 V-135 ;E-122 至 Q-136 ;G-123 至 G-137 ;N-124 至 P-138 ;S-125 至 E-139 ;S-126 至 E-140 ;Q-127 至 T-141 ;N-128 至 G-142 ;S-129 至 S-143 ;R-130 至 Y-144 ;N-131 至 T-145 ;K-132 至 F-146 ;R-133 至 V-147 ;A-134 至 P-148 ;V-135 至 W-149 ;Q-136 至 L-150 ;G-137 至 L-151 ;P-138 至 S-152 ;E-139 至 F-153 ;E-140 至 K-154 ;T-141 至 R-155 ;G-142 至 G-156 ;S-143 至 S-157 ;Y-144 至 A-158 ;T-145 至 L-159 ;F-146 至 E-160 ;V-147 至 E-161 ;P-148 至 K-162 ;W-149 至 E-163 ;L-150 至 N-164 ;

L-151 至 K-165 ;S-152 至 I-166 ;F-153 至 L-167 ;K-154 至 V-168 ;R-155 至 K-169 ;G-156 至 E-170 ;S-157 至 T-171 ;A-158 至 G-172 ;L-159 至 Y-173 ;E-160 至 F-174 ;E-161 至 F-175 ;K-162 至 I-176 ;E-163 至 Y-177 ;N-164 至 G-178 ;K-165 至 Q-179 ;I-166 至 V-180 ;L-167 至 L-181 ;V-168 至 Y-182 ;K-169 至 T-183 ;E-170 至 D-184 ;T-171 至 K-185 ;G-172 至 T-186 ;Y-173 至 Y-187 ;F-174 至 A-188 ;F-175 至 M-189 ;I-176 至 G-190 ;Y-177 至 H-191 ;G-178 至 L-192 ;Q-179 至 I-193 ;V-180 至 Q-194 ;L-181 至 R-195 ;Y-182 至 K-196 ;T-183 至 K-197 ;D-184 至 V-198 ;K-185 至 H-199 ;T-186 至 V-200 ;Y-187 至 F-201 ;A-188 至 G-202 ;M-189 至 D-203 ;G-190 至 E-204 ;H-191 至 L-205 ;L-192 至 S-206 ;I-193 至 L-207 ;Q-194 至 V-208 ;R-195 至 T-209 ;K-196 至 L-210 ;K-197 至 F-211 ;V-198 至 R-212 ;H-199 至 C-213 ;V-200 至 I-214 ;F-201 至 Q-213 ;G-202 至 N-216 ;D-203 至 M-217 ;E-204 至 P-218 ;L-205 至 E-219 ;S-206 至 T-220 ;L-207 至 L-221 ;V-208 至 P-222 ;T-209 至 N-223 ;L-210 至 N-224 ;F-211 至 S-225 ;R-212 至 C-226 ;C-213 至 Y-227 ;I-214 至 S-228 ;Q-215 至 A-229 ;N-216 至 G-230 ;M-217 至 I-231 ;P-218 至 A-232 ;E-219 至 K-233 ;T-220 至 L-234 ;L-221 至 E-235 ;P-222 至 E-236 ;N-223 至 G-237 ;N-224 至 D-238 ;S-225 至 E-239 ;C-226 至 L-240 ;Y-227 至 Q-241 ;S-228 至 L-242 ;A-229 至 A-243 ;G-230 至 I-244 ;I-231 至 P-245 ;A-232 至 R-246 ;K-233 至 E-247 ;L-234 至 N-245 ;E-235 至 A-249 ;E-236 至 Q-250 ;G-237 至 I-251 ;D-238 至 S-252 ;E-239 至 L-253 ;L-240 至 D-254 ;Q-241 至 G-250 ;L-242 至 D-256 ;A-243 至 V-257 ;I-244 至 T-258 ;P-245 至 F-259 ;R-246 至 F-260 ;E-247 至 G-261 ;N-248 至 A-262 ;A-249 至 L-263 ;Q-250 至 K-264 ;I-251 至 L-265 ;以及 S-252 至 L-266。优选地,这些多肽片段具有本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的一或多种功能活性 (如生物活性,抗原性和免疫原性),且可例如用于产生或筛选抗体,如下所述。本发明还涉及包含或由与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98% 或 99% 相同性的氨基酸序列组成的多肽。本发明还涵盖了融合于异源氨基酸序列的上述氨基酸序列。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0306] 本发明其它优选的多肽片段包含或由选自以下一组氨基酸序列组成:SEQ ID NO: 38 的 M-1 至 F-15 ;D-2 至 C-16 ;E-3 至 S-17 ;S-4 至 E-18 ;A-5 至 K-19 ;K-6 至 G-20 ;T7 至 E-21 ;L-8 至 D-22 ;P-9 至 M-23 ;P-10 至 K-24 ;P-11 至 V-25 ;C-12 至 G-26 ;L-13 至 Y-27 ;C-14 至 D-28 ;F-15 至 P-29 ;C-16 至 I-30 ;S-17 至 T-31 ;E-18 至 P-32 ;K-19 至 Q-33 ;G-20 至 K-34 ;E-21 至 E-35 ;D-22 至 E-36 ;M-23 至 G-37 ;K-24 至 A-38 ;V-25 至 W-39 ;G-26 至 F-40 ;Y-27 至 G-41 ;D-28 至 I-42 ;P-29 至 C-43 ;I-30 至 R-44 ;T-31 至 D-45 ;P-32 至 G-46 ;Q-33 至 R-47 ;K-34 至 L-48 ;E-35 至 L-49 ;E-36 至 A-50 ;G-37 至 A-51 ;A-38 至 T-52 ;W-39 至 L-53 ;F-40 至 L-54 ;G-41 至 L-55 ;I-42 至 A-56 ;C-43 至 L-57 ;R-44 至 L-58 ;D-45 至 S-59 ;G-46 至 S-60 ;R-47 至 S-61 ;L-48 至 F-62 ;L-49 至 T-63 ;A-50 至 A-64 ;A-51 至 M-65 ;T-52 至 S-66 ;L-53 至 L-67 ;L-54 至 Y-68 ;L-55 至 Q-69 ;A-56 至 L-70 ;L-57 至 A-71 ;L-58 至 A-72 ;S-59 至 L-73 ;S-60 至 Q-74 ;S-61 至 A-73 ;F-62 至 D-76 ;T-63 至 L-77 ;A-64 至 M-78 ;M-65 至 N-79 ;S-66 至 L-80 ;L-67 至 R-81 ;Y-68 至 M-82 ;Q-69 至 E-83 ;L-70 至 L-84 ;A-71 至 Q-85 ;A-72 至 S-86 ;L-73 至 Y-87 ;Q-74 至 R-88 ;A-75 至 G-89 ;D-76 至 S-90 ;L-77 至 A-91 ;M-78 至 T-92 ;N-79 至 P-93 ;L-80 至 A-94 ;R-81 至 A-95 ;M-82 至 A-96 ;E-83 至 G-97 ;L-84 至 A-98 ;Q-85 至 P-99 ;S-86 至 E-100 ;Y-87 至 L-101 ;R-88 至 T-102 ;G-89 至 A-103 ;S-90

至 G-104 ;A-91 至 V-105 ;T-92 至 K-106 ;P-93 至 L-107 ;A-94 至 L-108 ;A-93 至 T-109 ;A-96 至 P-110 ;G-97 至 A-111 ;A-98 至 A-112 ;P-99 至 P-113 ;E-100 至 R-114 ;L-101 至 P-115 ;T-102 至 H-116 ;A-103 至 N-117 ;G-104 至 S-118 ;V-105 至 S-119 ;K-106 至 R-120 ;L-107 至 G-121 ;L-108 至 H-122 ;T-109 至 R-123 ;P-110 至 N-124 ;A-111 至 125 ;A-112 至 R-126 ;P-113 至 A-127 ;R-114 至 F-128 ;P-115 至 Q-129 ;H-116 至 G-130 ;N-117 至 P-131 ;S-118 至 E-132 ;S-119 至 E-133 ;R-120 至 T-134 ;G-121 至 E-135 ;H-122 至 Q-136 ;R-123 至 D-137 ;N-124 至 V-138 ;R-125 至 D-139 ;R-126 至 L-140 ;A-127 至 S-141 ;F-128 至 A-142 ;Q-129 至 P-143 ;G-130 至 P-144 ;P-131 至 A-145 ;E-132 至 P-146 ;E-133 至 C-147 ;T-134 至 L-148 ;E-135 至 P-149 ;Q-136 至 G-150 ;D-137 至 C-151 ;V-138 至 R-152 ;D-139 至 H-153 ;L-140 至 S-154 ;S-141 至 Q-105 ;A-142 至 H-156 ;P-143 至 D-157 ;P-144 至 D-158 ;A-145 至 N-159 ;P-146 至 G-160 ;C-147 至 M-161 ;L-148 至 N-162 ;P-149 至 L-163 ;G-150 至 R-164 ;C-151 至 I-165 ;R-152 至 I-166 ;H-153 至 I-167 ;S-154 至 Q-168 ;Q-155 至 D-169 ;H-156 至 C-170 ;D-157 至 L-171 ;D-158 至 Q-172 ;N-159 至 L-173 ;G-160 至 I-174 ;M-161 至 175 ;N-162 至 D-176 ;L-163 至 S-177 ;R-164 至 D-178 ;N-165 至 T-179 ;I-166 至 P-180 ;I-167 至 A-181 ;Q-163 至 L-182 ;D-169 至 E-183 ;C-170 至 E-184 ;L-171 至 K-185 ;Q-172 至 E-186 ;L-173 至 N-187 ;I-174 至 K-188 ;A-175 至 I-189 ;D-176 至 V-191 ;S-177 至 V-191 ;D-178 至 R-192 ;T-179 至 Q-193 ;P-180 至 T-194 ;A-181 至 G-195 ;L-182 至 Y-196 ;E-183 至 F-197 ;E-184 至 F-198 ;K-185 至 I-199 ;E-186 至 Y-200 ;N-187 至 S-201 ;K-188 至 Q-202 ;I-189 至 V-203 ;V-190 至 L-204 ;V-191 至 Y-205 ;R-192 至 T-206 ;Q-193 至 D-207 ;T-194 至 P-203 ;G-195 至 I-209 ;Y-196 至 F-210 ;F-197 至 A-211 ;F-198 至 M-212 ;I-199 至 G-213 ;Y-200 至 H-214 ;S-201 至 V-215 ;Q-202 至 I-216 ;V-203 至 Q-217 ;L-204 至 R-218 ;Y-205 至 K-219 ;T-206 至 K-220 ;D-207 至 V-221 ;P-208 至 H-222 ;I-209 至 V-223 ;F-210 至 F-224 ;A-211 至 G-225 ;M-212 至 D-226 ;G-213 至 E-227 ;H-214 至 L-228 ;V-215 至 S-229 ;I-216 至 L-230 ;Q-217 至 V-231 ;R-218 至 T-232 ;K-219 至 L-233 ;K-220 至 F-234 ;V-221 至 R-235 ;H-222 至 C-236 ;V-223 至 I-237 ;F-224 至 Q-238 ;G-225 至 N-239 ;D-226 至 M-240 ;E-227 至 P-241 ;L-228 至 K-242 ;S-229 至 T-243 ;L-230 至 L-244 ;V-231 至 P-245 ;T-232 至 N-246 ;L-233 至 N-247 ;F-234 至 S-248 ;R-235 至 C-249 ;C-236 至 Y-250 ;I-237 至 S-250 ;Q-238 至 A-252 ;N-239 至 G-253 ;M-240 至 I-254 ;P-241 至 A-253 ;K-242 至 R-256 ;T-243 至 L-257 ;L-244 至 E-253 ;P-245 至 E-259 ;N-246 至 G-260 ;N-247 至 D-261 ;S-248 至 E-262 ;C-249 至 I-263 ;Y-250 至 Q-264 ;S-251 至 L-265 ;A-252 至 A-266 ;G-253 至 I-267 ;I-234 至 P-268 ;A-255 至 R-269 ;R-256 至 E-270 ;L-257 至 N-271 ;E-258 至 A-272 ;E-259 至 Q-273 ;G-260 至 I-274 ;D-261 至 S-275 ;E-262 至 R-276 ;I-263 至 N-277 ;Q-264 至 G-278 ;L-265 至 D-279 ;A-266 至 D-280 ;I-267 至 T-281 ;P-268 至 F-282 ;R-269 至 F-283 ;E-270 至 G-284 ;N-271 至 A-285 ;A-272 至 L-286 ;Q-273 至 K-287 ;I-274 至 L-288 ;以及 S-275 至 L-289。优选地,这些多肽片段具有本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的一或多种活性,且可以例如用于产生或筛选抗体,如下所述。本发明还涉及包含或由与上述氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,92%,95%,96%,97%,98%或 99%相同性的氨基酸序列组成的多肽。本发明还涵盖了融合于异源氨基酸序列的上述氨基酸序列。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0307] 本领域技术人员意识到一些 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列可以改变而不明显影响多肽的结构或功能。如果这种序列差异是期望的,应记得存在确定多肽活性的关键区域。

[0308] 因此,本发明还提供了 Neutrokin- α 多肽的变体,其呈现 Neutrokin- α 多肽的功能活性(如生物活性)或其包括 Neutrokin- α 多肽的区域,如本文所述的多肽片段。本发明还包括 Neutrokin- α SV 多肽的变体,其呈现 Neutrokin- α SV 多肽的功能活性(如生物活性),或其包括 Neutrokin- α SV 多肽的区域,如本文所述的多肽片段。这种突变体包括根据本领域已知一般规则而选择的插入,缺失,转换,重复和模式取代,因此对活性影响较小。例如,关于怎样产生表型沉默氨基酸取代的指导见于 Bowie, J. U. 等,“耐受氨基酸取代的蛋白质序列中信息释义”,科学 247:1306-1310(1990),其中作者指出有二种主要方法研究氨基酸序列对变化的耐受性。第一种方法依赖于进化过程,其中突变是通过自然选择而接受或排斥的。第二种方法是用基因工程在克隆的基因的特异位置进行氨基酸变化,并进行选择或筛选以鉴别保持功能性的序列。

[0309] 如作者所述,这些研究已证实蛋白质令人惊奇地耐受氨基酸取代。作者还指出氨基酸变化在蛋白质的一些位置是允许的。例如,大多数隐蔽氨基酸残基要求非极性侧链,而表面侧链通常是保守的。其它这种表型沉默取代见于 Bowie, J. U. 等,如前,及本文所示参考文献所述。显而易见的保守取代是脂族氨基酸 Ala, Val, Leu 和 Ile 之间的置换;羟基残基 Ser 和 Thr 之间的互换,酸性残基 Asp 和 Glu 之间的交换,酰胺残基 Asn 和 Gln 之间的取代,碱性残基 Lys 和 Arg 之间的交换,及芳香族残基 Phe, Tyr 之间的置换。

[0310] 因此,图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2) 所示多肽或保藏 cDNA 质粒编码的多肽的片段,衍生物或类似物可以是如下的一种:(i) 其中一或多个氨基酸残基用保守的或非保守的氨基酸残基取代(优选保守的氨基酸残基),且这种取代的氨基酸残基可以或不是由遗传密码编码的;(ii) 其中一或多个氨基酸残基包括一取代基;或(iii) 其中多肽的胞外域与另一化合物融合,如提高多肽的半衰期的化合物(例如聚乙二醇);或(iv) 其中其它氨基酸与多肽胞外域融合,如 IgG FC 融合区肽或前导或分泌序列或用于纯化多肽胞外域的序列或前蛋白序列。这种片段,衍生物和类似物被本领域技术人员根据本文教导认为在本发明范围内。

[0311] 另外,图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 所示的或由保藏 cDNA 质粒编码的多肽的片段,衍生物或类似物可以是这样的一种:(i) 其中一或多个氨基酸残基用保守的或非保守的氨基酸残基(优选保守的氨基酸残基)取代,且这种取代的氨基酸残基可以或不是由遗传密码编码的,或(ii) 其中一或多个氨基酸残基包括一取代基,或(iii) 其中多肽的胞外域与另一化合物融合,如提高多肽的半衰期的化合物(例如聚乙二醇),或(iv) 其中其它氨基酸与多肽的胞外域融合,如其它 TNF 配体家族成员(如 CD40 配体)的可溶生物活性片段, IgGFC 融合区肽或前导或分泌序列,或用于纯化多肽胞外域的序列或前蛋白序列。这种片段,衍生物和类似物被本领域技术人员根据本文教导认为在本发明范围内。

[0312] 因此,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽可包括一或多个氨基酸取代,缺失或添加,其经天然突变或人为操纵。如上所述,变化优选是较小的,如基本不影响蛋白质折叠或活性的保守氨基酸取代(见表 2)。

[0313] 表 2 保守氨基酸取代

[0314]

芳香族	苯丙氨酸 色氨酸 酪氨酸
疏水性	亮氨酸 异亮氨酸 缬氨酸
极性	谷氨酰胺 天冬酰胺
碱性	精氨酸 赖氨酸 组氨酸
酸性	天冬氨酸 谷氨酸
小分子	丙氨酸 丝氨酸 苏氨酸 甲硫氨酸 甘氨酸

[0315] 在本发明的一实施方案中,多肽包含或由Neutrokin- α 和/或Neutrokin- α SV多肽的氨基酸序列组成,该Neutrokin- α 和/或Neutrokin- α SV多肽的氨基酸序列含有至少1个但不超过50个,优选不超过40个,更优选不超过30个,尤为优选不超过20个保守氨基酸取代。当然最优选的是含有至少1个但不超过10,9,8,7,6,5,4,3,2或1个保守氨基酸取代。

[0316] 例如,在Neutrokin- α 的氨基酸水平的定点诱变可通过用保守取代基置换特殊的氨基酸而进行。SEQ ID NO:2所示Neutrokin- α 氨基酸序列中优选的保守取代突变包括:用A,G,I,L,S,T或V取代M1;用A,G,I,L,T,或V置换M1;用E置换D2;用E置换D3;用A,G,I,L,T,M或V置换S4;用A,G,I,L,S,M或V置换T5;用D置换E6;用H,或K置换R7;用D置换E8;用N置换Q9;用A,G,I,L,T,或V置换S10;用H,或K置换R11;用A,G,I,S,T,M或V置换L12;用A,G,I,L,S,M或V置换T13;用A,G,I,L,T,M或V置换S14;用A,G,I,S,T,M或V置换L16;用H,或R置换K17;用H,或R置换K18;用H,或K置换R19;用D置换E20;用D置换E21;用A,G,I,L,S,T,置换M22;用H,或R置换K23;用A,G,I,S,T,M或V置换L24;用H,或R置换K25;用D置换E26;用A,G,I,L,S,T或M置换V28;用A,G,I,L,T,M或V置换S29;用A,G,L,S,T,M或V置换I30;用A,G,I,S,T,M或V置换L31;用H,或K置换R33; ;用H,或R置换K34;用D置换E35;用A,G,I,L,T,M或V置换S36;用A,G,I,L,T,M或V置换S38;用A,G,I,L,S,T或M置换V39;用H,或K置换R40;用A,G,I,L,T,M或V置换S41;用A,G,I,L,T,M或V置换S42;用H,或R置换K43;

用 E 置换 D44 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G45 ;用 H, 或 R 置换 K46 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L47 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L48 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A49 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A50 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T5 1 ;用 A, G, I, S, T, M, 或 V 置换 L52 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L53 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L54 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A55 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L56 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L57 ;用 A, G, I, L, T, 或 V 置换 S58 ;用 A, G, I, L, S, T, M 或 V 置换 L61 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T62 ;用 A, G, I, L, S, T, 或 M 置换 V63 ;用 A, G, I, L, S, T, 或 M 置换 V64 ;用 A, G, I, L, T, M, 或 V 置换 S65 ;用 W, 或 Y 置换 F66 ;用 F, 或 W 置换 Y67 ;用 N 置换 Q68 ;用 A, G, I, L, S, T, 或 M 置换 V69 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A70 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A71 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L72 ;用 N 置换 Q73 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G74 ;用 E 置换 D75 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L76 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A77 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S78 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L79 ;用 H, 或 K 置换 R80 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A81 ;用 D 置换 E82 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L83 ;用 N 置换 Q84 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G85 ;用 K 或 R 置换 H86 ;用 K 或 R 置换 H87 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A88 ;用 D 置换 E89 ;用 H 或 R 置换 K90 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L91 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A93 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G94 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A95 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G96 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A97 ;用 H 或 R 置换 K99 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A100 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G101 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L102 ;用 D 置换 E103 ;用 D 置换 E104 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A105 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A107 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V108 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T109 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A110 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G111 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L112 ;用 H 或 R 置换 K113 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I114 ;用 W 或 Y 置换 F115 ;用 D 置换 E116 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A119 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G121 ;用 D 置换 E122 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G123 ;用 Q 置换 N124 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S125 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S126 ;用 N 置换 Q127 ;用 Q 置换 N128 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S129 ;用 H, 或 K 置换 R130 ;用 Q 置换 N131 ;用 H 或 R 置换 K132 ;用 H, 或 K 置换 R133 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A134 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V135 ;用 N 置换 Q136 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G137 ;用 D 置换 E139 ;用 D 置换 E140 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T141 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V142 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T143 ;用 N 置换 Q144 ;用 E 置换 D145 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L147 ;用 N 置换 Q148 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L149 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I150 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A151 ;用 E 置换 D152 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S153 ;用 D 置换 E154 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T155 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T157 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I158 ;用 N 置换 Q159 ;用 H 或 R 置换 K160 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G161 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S162 ;用 F 或 W 置换 Y163 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T164 ;用 W 或 Y 置换 F165 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V166 ;用 F 或 Y 置换 W168 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L169 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L170 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S171 ;用 W 或 Y 置换 F172 ;用 H 或 R 置换 K173 ;用 H 或 K 置换 R174 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G175 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S176 ;用 G, I, L S, T, M 或 V 置换 A177 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L178 ;用 D 置换 E179 ;用 D 置换 E180 ;用 H 或 R 置换 K181 ;用 D 置换 E182 ;用 Q 置换 N183 ;用 H 或 R 置换 K184 ;用 A, G, L, S, T, M

或 V 置换 I185 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L186 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V187 ;用 H 或 R 置换 K188 ;用 D 置换 E189 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T190 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G191 ;用 F 或 W 置换 Y192 ;用 W 或 Y 置换 F193 ;用 W 或 Y 置换 F194 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I195 ;用 F 或 W 置换 Y196 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G197 ;用 N 置换 Q198 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V199 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L200 ;用 F 或 W 置换 Y201 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T202 ;用 E 置换 D203 ;用 H 或 R 置换 K204 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T205 ;用 F 或 W 置换 Y206 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A207 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M208 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G209 ;用 K 或 R 置换 H210 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L211 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I212 ;用 N 置换 Q213 ;用 H 或 K 置换 R214 ;用 H 或 R 置换 K215 ;用 H 或 R 置换 K216 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V217 ;用 K 或 R 置换 H218 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V219 ;用 W 或 y 置换 F220 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G221 ;用 E 置换 D222 ;用 D 置换 E223 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L224 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S225 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L226 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V227 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T228 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L229 ;用 W 或 Y 置换 F230 ;用 H 或 K 置换 R231 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I233 ;用 N 置换 Q234 ;用 Q 置换 N235 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M236 ;用 D 置换 E238 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T239 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L240 ;用 Q 置换 N242 ;用 Q 置换 N243 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S244 ;用 F 或 W 置换 Y246 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S247 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A248 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G249 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I250 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A251 ;用 H 或 R 置换 K252 ; ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L253 ;用 D 置换 E254 ;用 D 置换 E255 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G256 ;用 E 置换 D257 ;用 D 置换 E258 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L259 ;用 N 置换 Q260 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L261 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A262 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I263 ;用 H 或 K 置换 R265 ;用 D 置换 E266 ;用 Q 置换 N267 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A268 ;用 N 置换 Q269 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I270 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S271 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L272 ;用 E 置换 D273 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G274 ;用 E 置换 D275 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V276 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T277 ;用 W 或 Y 置换 F278 ;用 W 或 Y 置换 F279 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G280 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A281 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L282 ;用 H 或 R 置换 K283 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L284 ;和 / 或用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L285。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。对所得本发明 Neutrokin- α 蛋白质可进行常规筛选 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质 (如增强或降低的稳定性和 / 或溶解性)。优选地, 本发明所得蛋白质具有提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性。更优选地, 本发明所得 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白具有一种以上提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质。

[0317] 在另一实施方案中, 在 Neutrokin- α SV 氨基酸水平的定点诱变可通过用保守取代基置换特定氨基酸而进行。SEQ ID NO:19 所示 Neutrokin- α SV 氨基酸序列的优选保守取代突变包括 :用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M1 ;用 E 置换 D2 ;用 E 置换 D3 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S4 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T5 ;用 D 置换 E6 ;用 H 或 K 置换 R7 ;用 D 置换 E8 ;用 N 置换 Q9 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S10 ;用 H 或 K 置换 R11 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V

置换 L12 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T13 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S14 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L16 ;用 H 或 R 置换 K17 ;用 H 或 R 置换 K18 ;用 H 或 K 置换 R19 ;用 D 置换 E20 ;用 D 置换 E21 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M22 ;用 H 或 R 置换 K23 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L24 ;用 H 或 R 置换 K25 ;用 D 置换 E26 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V28 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S29 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I30 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L31 ;用 H 或 K 置换 R33 ;用 H 或 R 置换 K34 ;用 D 置换 E35 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S36 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S38 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V39 ;用 H 或 K 置换 R40 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S41 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S42 ;用 H 或 R 置换 K43 ;用 E 置换 D44 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G45 ;用 H 或 R 置换 K46 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L47 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L48 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A49 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A50 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T51 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L52 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L53 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L54 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A55 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L56 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L57 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S58 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L61 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T62 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V63 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V64 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S65 ;用 W 或 Y 置换 F66 ;用 F 或 W 置换 Y67 ;用 N 置换 Q68 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V69 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A70 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A71 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L72 ;用 N 置换 Q73 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G74 ;用 E 置换 D75 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L76 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A77 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S78 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L79 ;用 H 或 K 置换 R80 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A81 ;用 D 置换 E82 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L83 ;用 N 置换 Q84 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G85 ;用 K 或 R 置换 H86 ;用 K 或 R 置换 H87 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A88 ;用 D 置换 E89 ;用 H 或 R 置换 K90 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L91 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A93 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G94 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A95 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G96 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A97 ;用 H 或 R 置换 K99 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A100 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G101 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L102 ;用 D 置换 E103 ;用 D 置换 E104 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A105 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A107 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V108 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T109 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A110 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G111 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L112 ;用 H 或 R 置换 K113 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I114 ;用 W 或 Y 置换 F115 ;用 D 置换 E116 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A119 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G121 ;用 D 置换 E122 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G123 ;用 Q 置换 N124 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S125 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S126 ;用 N 置换 Q127 ;用 Q 置换 N128 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S129 ;用 H 或 K 置换 R130 ;用 Q 置换 N131 ;用 H 或 R 置换 K132 ;用 H 或 K 置换 R133 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A134 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V135 ;用 N 置换 Q136 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G137 ;用 D 置换 E139 ;用 D 置换 E140 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T141 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G142 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S143 ;用 F 或 W 置换 Y144 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T145 ;用 W 或 Y 置换 F146 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V147 ;用 F 或 Y 置换 W149 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L150 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L151 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S152 ;用 W 或 Y 置换 F153 ;用 H 或 R 置换 K154 ;用 H 或 K 置换 R155 ;用 A, I, L, S, T, M 或

V 置换 G156 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S157 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A158 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L159 ;用 D 置换 E160 ;用 D 置换 E161 ;用 H 或 R 置换 K162 ;用 D 置换 E163 ;用 Q 置换 N164 ;用 H 或 R 置换 K165 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I166 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L167 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V168 ;用 H 或 R 置换 K169 ;用 D 置换 E170 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T171 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G172 ;用 F 或 W 置换 Y173 ;用 W 或 Y 置换 F174 ;用 W 或 Y 置换 F175 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I176 ;用 F 或 W 置换 Y177 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G178 ;用 N 置换 Q179 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V180 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L181 ;用 F 或 W 置换 Y182 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T183 ;用 E 置换 D184 ;用 H 或 R 置换 K185 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T186 ;用 F 或 W 置换 Y187 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A188 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M189 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G190 ;用 K 或 R 置换 H191 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L192 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I193 ;用 N 置换 Q194 ;用 H 或 K 置换 R195 ;用 H 或 R 置换 K196 ;用 H 或 R 置换 K197 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V198 ;用 K 或 R 置换 H199 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V200 ;用 W 或 Y 置换 F201 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G202 ;用 E 置换 D203 ;用 D 置换 E204 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L205 ; ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S206 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L207 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V208 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T209 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L210 ;用 W 或 Y 置换 F211 ;用 H 或 K 置换 R212 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I214 ;用 N 置换 Q215 ;用 Q 置换 N216 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M217 ;用 D 置换 E219 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T220 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L221 ;用 Q 置换 N223 ;用 Q 置换 N224 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S225 ;用 F 或 W 置换 Y227 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S228 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A229 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G230 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I231 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A232 ;用 H 或 R 置换 K233 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L234 ;用 D 置换 E235 ;用 D 置换 E236 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G237 ;用 E 置换 D238 ;用 D 置换 E239 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L240 ;用 N 置换 Q241 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L242 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A243 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I244 ;用 H 或 K 置换 R246 ;用 D 置换 E247 ;用 Q 置换 N248 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A249 ;用 N 置换 Q250 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I251 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S252 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L253 ;用 E 置换 D254 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G255 ;用 E 置换 D256 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V257 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T258 ;用 W 或 Y 置换 F259 ;用 W 或 Y 置换 F260 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G261 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A262 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L263 ;用 H 或 R 置换 K264 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L265 ;和 / 或用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L266。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。对所得本发明 Neutrokin- α 蛋白质可进行常规筛选 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质 (如增强或降低的稳定性和 / 或可溶性)。优选地, 所得本发明蛋白质具有提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性。更优选地, 所得本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白质具有一种以上提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质。

[0318] 在另一实施方案中, 在 Neutrokin- α 氨基酸水平的位点直接诱变可通过用保守取代基置换特殊的氨基酸而进行。SEQ ID NO :23 所示 Neutrokin- α 氨基酸序列的优选保

守取代突变包括:用 H 或 K 置换 R1;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V2;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V3;用 E 置换 D4;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L5;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S6;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A7;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A10;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L13;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G15;用 H 或 K 置换 R17;用 K 或 R 置换 H18;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S19;用 N 置换 Q20;用 K 或 R 置换 H21;用 E 置换 D22;用 E 置换 D23;用 Q 置换 N24;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G25;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M26;用 Q 置换 N27;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L28;用 H 或 K 置换 R29;用 Q 置换 N30;用 H 或 K 置换 R31;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T32;用 F 或 W 置换 Y33;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T34;用 W 或 Y 置换 F35;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V36;用 F 或 Y 置换 W38;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L39;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L40;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S41;用 W 或 Y 置换 F42;用 H 或 R 置换 K43;用 H 或 K 置换 R44;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G45;用 Q 置换 N46;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A47;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L48;用 D 置换 E49;用 D 置换 E50;用 H 或 R 置换 K51;用 D 置换 E52;用 Q 置换 N53;用 H 或 R 置换 K54;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I55;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V56;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V57;用 H 或 K 置换 R58;用 N 置换 Q59;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T60;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G61;用 F 或 W 置换 Y62;用 W 或 Y 置换 F63;用 W 或 Y 置换 F64;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I65;用 F 或 W 置换 Y66;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S67;用 N 置换 Q68;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V69;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L70;用 F 或 W 置换 Y71;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T72;用 E 置换 D73;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I75;用 W 或 Y 置换 F76;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A77;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M78;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G79;用 K 或 R 置换 H80;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V81;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I82;用 N 置换 Q83;用 H 或 K 置换 R84;用 H 或 R 置换 K85;用 H 或 R 置换 K86;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V87;用 K 或 R 置换 H88;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V89;用 W 或 Y 置换 F90;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G91;用 E 置换 D92;用 D 置换 E93;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L94;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S95;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L96;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V97;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T98;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L99;用 W 或 Y 置换 F100;用 H 或 K 置换 R101;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I103;用 N 置换 Q104;用 Q 置换 N105;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M106;用 H 或 R 置换 K108;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T109;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L110;用 Q 置换 N112;用 Q 置换 N113;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S114;用 F 或 W 置换 Y116;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S117;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A118;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G119;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I120;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A121;用 H 或 K 置换 R122;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L123;用 D 置换 E124;用 D 置换 E125;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G126;用 E 置换 D127;用 D 置换 E128;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I129;用 N 置换 Q130;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L131;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A132;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I133;用 H 或 K 置换 R135;用 D 置换 E136;用 Q 置换 N137;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A138;用 N 置换 Q139;用 A, G, L;S, T, M 或 V 置换 I140;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S141;用 H 或 K 置换 R142;用 Q 置换 N143;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G144;用 E 置换 D145;用 E 置换 D146;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T147;用 W 或 Y 置换 F148;用 W 或 Y 置换 F149;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G150;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A151;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换

L152 ;用 H 或 R 置换 K153 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L154 ;和 / 或用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L155。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。对所得本发明 Neutrokin- α 蛋白可进行常规筛选 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质 (如增强或降低的稳定性和 / 或可溶性)。优选地,所得本发明蛋白质具有提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性。更优选地,所得本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白质具有一种以上提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质。

[0319] 在另一实施方案中,在 Neutrokin- α 氨基酸水平的位点直接诱变可通过用保守取代基置换特殊的氨基酸而进行。SEQ ID NO :38 所示 Neutrokin- α 氨基酸序列的优选保守取代突变包括 :用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M1 ;用 E 置换 D2 ;用 E 置换 D3 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S4 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A5 ;用 H 或 R 置换 K6 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T7 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L8 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L13 ;用 W 或 Y 置换 F15 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S17 ;用 D 置换 E18 ;用 H 或 R 置换 K19 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G20 ;用 D 置换 E21 ;用 E 置换 D22 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M23 ;用 H 或 R 置换 K24 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V25 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G26 ;用 F 或 W 置换 Y27 ;用 E 置换 D28 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I30 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T31 ;用 N 置换 Q33 ;用 H 或 R 置换 K34 ;用 D 置换 E35 ;用 D 置换 E36 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G37 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A38 ;用 F 或 Y 置换 W39 ;用 W 或 Y 置换 F40 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G41 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I42 ;用 H 或 K 置换 R44 ;用 E 置换 D45 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G46 ;用 H 或 K 置换 R47 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L48 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L49 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A50 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A51 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T52 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L53 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L54 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L55 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A56 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L57 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L58 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S59 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S60 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S61 ;用 W 或 Y 置换 F62 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T63 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A64 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M65 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S66 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L67 ;用 F 或 W 置换 Y68 ;用 N 置换 Q69 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L70 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A71 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A72 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L73 ;用 N 置换 Q74 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A75 ;用 E 置换 D76 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L77 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M78 ;用 Q 置换 N79 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L80 ;用 H 或 K 置换 R81 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M82 ;用 D 置换 E83 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L84 ;用 N 置换 Q85 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S86 ;用 F 或 W 置换 Y87 ;用 H 或 K 置换 R88 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G89 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S90 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A91 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T92 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A94 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A95 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A96 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G97 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A98 ;用 D 置换 E100 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L101 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T102 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A103 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G104 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V105 ;用 H 或 R 置换 K106 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L107 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L108 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T109 ;用 G, I, L, S, T, M

或 V 置换 A111 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A112 ;用 H 或 K 置换 R114 ;用 K 或 R 置换 H116 ;
用 Q 置换 N117 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S118 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S119 ;用 H 或 K
置换 R120 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G121 ;用 K 或 R 置换 H122 ;用 H 或 K 置换 R123 ;用 Q
置换 N124 ;用 H 或 K 置换 R125 ;用 H 或 K 置换 R126 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A127 ;用 W
或 Y 置换 F128 ;用 N 置换 Q129 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G130 ;用 D 置换 E132 ;用 D 置换
E133 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T134 ;用 D 置换 E135 ;用 N 置换 Q136 ;用 E 置换 D137 ;用
A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V138 ;用 D 置换 E139 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L140 ;用 A, G, I,
L, T, M 或 V 置换 S141 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A142 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A145 ;
用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L148 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G150 ;用 H 或 K 置换 R152 ;用
K 或 R 置换 H153 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S154 ;用 N 置换 Q155 ;用 K 或 R 置换 H156 ;用
E 置换 D157 ;用 E 置换 D158 ;用 Q 置换 N159 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G160 ;用 A, G, I, L,
S, T 或 V 置换 M161 ;用 Q 置换 N162 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L163 ;用 H 或 K 置换 R164 ;
用 Q 置换 N165 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I166 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I167 ;用 N 置
换 Q168 ;用 E 置换 D169 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L171 ;用 N 置换 Q172 ;用 A, G, I, S, T,
M 或 V 置换 L173 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I174 ; ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A175 ;用
E 置换 D176 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S177 ;用 E 置换 D178 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换
T179 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A181 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L182 ;用 D 置换 E183 ;
用 D 置换 E184 ;用 H 或 R 置换 K185 ;用 D 置换 E186 ;用 Q 置换 N187 ;用 H 或 R 置换 K188 ;用
A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I189 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V190 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置
换 V191 ;用 H 或 K 置换 R192 ;用 N 置换 Q193 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T194 ;用 A, I, L,
S, T, M 或 V 置换 G195 ;用 F 或 W 置换 Y196 ;用 W 或 Y 置换 F197 ;用 W 或 Y 置换 F198 ;用 A,
G, L ;S, T, M 或 V 置换 I199 ;用 F 或 W 置换 Y200 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S201 ;用 N 置
换 Q202 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V203 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L204 ;用 F 或 W 置换
Y205 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T206 ;用 E 置换 D207 ;用 A, G, L ;S, T, M 或 V 置换 I209 ;
用 W 或 Y 置换 F210 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A211 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M212 ;用
A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G213 ;用 K 或 R 置换 H214 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V215 ;用 A,
G, L ;S, T, M 或 V 置换 I216 ;用 N 置换 Q217 ;用 H 或 K 置换 R218 ;用 H 或 R 置换 K219 ;用 H
或 R 置换 K220 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V221 ;用 K 或 R 置换 H222 ;用 A, G, I, L, S, T 或
M 置换 V223 ;用 W 或 Y 置换 F224 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G225 ;用 E 置换 D226 ;用 D 置
换 E227 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L228 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S229 ;用 A, G, I, S,
T, M 或 V 置换 L230 ;用 A, G, I, L, S, T 或 M 置换 V231 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T232 ;用
A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L233 ;用 W 或 Y 置换 F234 ;用 H 或 K 置换 R235 ;用 A, G, L, S, T, M
或 V 置换 I237 ;用 N 置换 Q238 ;用 Q 置换 N239 ;用 A, G, I, L, S, T 或 V 置换 M240 ;用 H 或
R 置换 K242 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T243 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L244 ;用 Q 置
换 N246 ;用 Q 置换 N247 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S248 ;用 F 或 W 置换 Y250 ;用 A, G, I,
L, T, M 或 V 置换 S251 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A252 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G253 ;
用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I254 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A255 ;用 H 或 K 置换 R256 ;用
A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L257 ;用 D 置换 E258 ;用 D 置换 E259 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换
G260 ;用 E 置换 D261 ;用 D 置换 E262 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I263 ;用 N 置换 Q264 ;用

A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L265 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A266 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I267 ;用 H 或 K 置换 R269 ;用 D 置换 E270 ;用 Q 置换 N271 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A272 ;用 N 置换 Q273 ;用 A, G, L, S, T, M 或 V 置换 I274 ;用 A, G, I, L, T, M 或 V 置换 S275 ;用 H 或 K 置换 R276 ;用 Q 置换 N277 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G278 ;用 E 置换 D279 ;用 E 置换 D280 ;用 A, G, I, L, S, M 或 V 置换 T281 ;用 W 或 Y 置换 F282 ;用 W 或 Y 置换 F283 ;用 A, I, L, S, T, M 或 V 置换 G284 ;用 G, I, L, S, T, M 或 V 置换 A285 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L286 ;用 H 或 R 置换 K287 ;用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L288 ;和 / 或用 A, G, I, S, T, M 或 V 置换 L289。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。对所得本发明 Neutrokin- α 蛋白可进行常规筛选 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质 (如增强或降低的稳定性和 / 或可溶性)。优选地,所得本发明蛋白质具有提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性。更优选地,所得本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白质具有一种以上提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质。

[0320] 为功能所必需的本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽中的氨基酸可通过本领域已知方法鉴别,如位点直接诱变或丙氨酸扫描诱变 (Cunnirgham 和 Wells, 科学 244 :1081-1085(1989))。后一方法是在分子中每个残基进行单个丙氨酸突变。然后测试所得突变体的功能活性,如配体结合和刺激淋巴细胞 (如 B 细胞) 增殖,分化和 / 或活化的能力。

[0321] 特别感兴趣的是用其它荷电或中性氨基酸取代荷电氨基酸,可产生具有所需改良特征如低聚集性的蛋白质。聚集性不仅降低活性,而且也是制备药物配方时的一个问题,因为聚集物可以是免疫原性的 (Pinckard 等,临床实验免疫学 2 :331-340(1967) ;Robbins 等,糖尿病 36 :838-845(1987) ;Cleland 等,Crit. Rev. Therepeutic DrugCarrien Systems 10 :307-377(1993))。

[0322] 在另一实施方案中,本发明提供了具有含有 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列非保守取代的氨基酸序列的多肽。例如,SEQ IDNO :2 所示 Neutrokin- α 蛋白质序列的非保守取代包括 :用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M1 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D2 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D3 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S4 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T5 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E6 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R7 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E8 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q9 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S10 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R11 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L12 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T13 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S14 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C15 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L16 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K17 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K18 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R19 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E20 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E21 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 M22 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K23 ;

用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L24 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K25 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E26 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C27 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V28 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S29 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I30 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L31 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P32 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R33 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K34 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E35 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S36 ;用 D, E, H, K, R, , A, G, I, L, , ST, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P37 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S38 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V39 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R40 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S41 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S42 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K43 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D44 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G45 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K46 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L47 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L48 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A49 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A50 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T51 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L52 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L53 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L54 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A55 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L56 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L57 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S58 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C59 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C60 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L61 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T62 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V63 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V64 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S65 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F66 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 Y67 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q68 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V69 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A70 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A71 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L72 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q73 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G74 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D75 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L76 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A77 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S78 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L79 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R80 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A81 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E82 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L83 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q84 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G85 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H86 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H87 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A88 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E89 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K90 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F,

W, Y, P, 或 C 置换 L91 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P92 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A93 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G94 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A95 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G96 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A97 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P98 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K99 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A100 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G101 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L102 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E103 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E104 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A105 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P106 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A107 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V108 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T109 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A110 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G111 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L112 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K113 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I114 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F115 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E116 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P117 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P118 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A119 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P120 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G121 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E122 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G123 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N124 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S125 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S126 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q127 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N128 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S129 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R130 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N131 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K132 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R133 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A134 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V135 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q136 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G137 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P138 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E139 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E140 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T141 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V142 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T143 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q144 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D145 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C146 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L147 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q148 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L149 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I150 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A151 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D152 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S153 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E154 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T155 ;用 D,

E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P156 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T157 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I158 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q159 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K160 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G161 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S162 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 Y163 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T164 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F165 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V166 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P167 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 W168 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L169 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L170 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S171 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F172 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K173 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R174 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G175 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S176 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A177 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L178 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E179 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E180 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K181 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E182 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N183 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K184 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I185 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L186 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V187 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K188 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E189 ; ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T190 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G191 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 Y192 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F193 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F194 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I195 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 Y196 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G197 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q198 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V199 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L200 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 Y201 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T202 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D203 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K204 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T205 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 Y206 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A207 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 M208 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G209 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H210 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L211 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I212 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q213 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R214 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K215 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K216 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V217 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H218 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V219 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T,

M, V, P 或 C 置换 F220 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G221 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D222 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E223 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L224 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S225 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L226 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V227 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T228 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L229 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F230 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R231 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C232 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I233 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q234 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N235 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 M236 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P237 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E238 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T239 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L240 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P241 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N242 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N243 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S244 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C245 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 Y246 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S247 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A248 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G249 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I250 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A251 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K252 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L253 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E254 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E255 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G256 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D257 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E258 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L259 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q260 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L261 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A262 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I263 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P264 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R265 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E266 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N267 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A268 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q269 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I270 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S271 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L272 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D273 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G274 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D275 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T276 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T277 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F278 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F279 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G280 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A281 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L282 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K283 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L284 ;和 / 或用 D, E, H, K,

R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L285。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。对所得本发明的 Neutrokin- α 蛋白可进行常规筛选本文所述及本领域已知的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质 (如增强或降低的稳定性和 / 或可溶性)。优选地, 所得本发明的蛋白质具有增强和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性。更优选地, 所得本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白质具有一种以上提高和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质。

[0323] 在另一实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 多肽包含一个以上 (如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 和 50 个) 用上述氨基酸置换的氨基酸 (保守或非保守性的)。

[0324] 在本发明另一实施方案中, SEQ ID NO: 19 所示 Neutrokin- α SV 蛋白质序列中的非保守性取代包括: 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 M1; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D2; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D3; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S4; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T5; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E6; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R7; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E8; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, W, Y, P, 或 C 置换 Q9; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S10; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R11; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L12; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T13; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S14; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C15; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L16; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K17; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K18; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R19; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E20; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E21; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 M22; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K23; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L24; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K25; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E26; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C27; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V28; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S29; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I30; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L31; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P32; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R33; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K34; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E35; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S36; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P37; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S38; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V39; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R40; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S41; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S42; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K43; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D44; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G45; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K46; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L47; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L48; 用 D,

E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A49 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A50 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T51 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L52 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L53 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L54 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A55 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L56 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L57 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S58 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C59 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C60 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L61 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T62 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V63 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V64 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S65 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F66 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 Y67 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q68 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V69 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A70 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A71 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L72 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q73 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G74 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D75 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L76 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A77 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S78 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L79 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R80 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A81 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E82 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L83 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q84 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G85 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H86 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H87 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A88 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E89 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K90 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L91 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P92 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A93 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G94 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A95 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G96 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A97 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P98 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K99 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A100 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G101 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L102 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E103 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E104 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A105 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P106 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A107 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V108 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T109 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A110 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G111 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L112 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K113 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I114 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 F115 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E116 ; 用 D, E, H, K, R, A,

G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P117 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P118 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A119 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P120 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G121 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E122 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G123 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N124 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S125 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S126 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q127 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N128 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S129 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R130 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N131 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K132 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R133 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A134 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V135 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, , W, Y, P, 或 C 置换 Q136 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G137 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P138 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E139 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E140 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 T141 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G142 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S143 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y144 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T145 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F146 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V147 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P148 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P 或 C 置换 W149 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L150 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L151 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S152 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F153 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K154 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R155 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G156 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S157 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A158 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L159 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E160 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E161 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K162 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E163 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N164 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K165 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I166 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L167 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V168 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K169 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E170 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T171 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G172 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y173 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F174 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F175 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I176 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y177 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G178 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, M, V, P, 或 C 置换 Q179 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V180 ;用 D, E,

H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L181 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y182 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T183 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D184 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K185 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T186 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y187 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A188 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 M189 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G190 ;用 D, E, , A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 H191 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L192 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I193 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, M, V, P, 或 C 置换 Q194 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R195 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K196 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K197 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V198 ;用 D, E, , A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 H199 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V200 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F201 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G202 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D203 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E204 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L205 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S206 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L207 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V208 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T209 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L210 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F211 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R212 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C213 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I214 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, M, V, P, 或 C 置换 Q215 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N216 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 M217 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P218 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E219 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T220 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L221 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P222 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N223 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N224 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S225 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C226 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y227 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S228 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A229 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G230 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I231 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A232 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K233 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L234 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E235 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E236 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G237 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D238 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E239 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L240 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, M, V, P, 或 C 置换 Q241 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L242 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A243 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I244 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换

P245 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R246 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E247 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N248 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A249 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, M, V, P, 或 C 置换 Q250 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I251 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S252 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L253 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D254 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G255 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D256 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V257 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T258 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F259 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F260 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G261 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A262 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L263 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K264 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L265 ;和 / 或用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L266。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。对所得本发明的 Neutrokin- α 蛋白质可进行常规筛选本文所述及本领域已知的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质 (如增强或降低的稳定性和 / 或可溶性)。优选地, 所得本发明的蛋白质具有增强和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性。更优选地, 所得本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白质具有一种以上增强和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质。

[0325] 在另一实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 多肽包含用上述取代氨基酸 (保守或非保守的) 置换的一个以上 (如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 和 50 个) 氨基酸。

[0326] 例如, SEQ ID NO: 23 所示 Neutrokin- α 蛋白质序列的优选非保守性取代包括: 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R1 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V2 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V3 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D4 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L5 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S6 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A7 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P8 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P9 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A10 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P11 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C12 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L13 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P14 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G15 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P 置换 C16 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R17 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 H18 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S19 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q20 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 H21 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D22 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D23 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N24 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G25 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M26 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N27 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L28 ;

用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R29 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N30 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R31 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T32 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y33 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T34 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F35 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V36 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P37 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 W38 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L39 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L40 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S41 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F42 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K43 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R44 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G45 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N46 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A47 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L48 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E49 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E50 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K51 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E52 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 N53 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K54 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I55 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V56 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V57 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R58 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q59 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T60 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G61 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y62 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F63 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F64 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I65 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y66 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S67 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q68 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V69 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L70 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y71 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T72 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D73 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P74 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I75 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F76 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A77 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M78 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G79 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, , N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H80 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V81 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I82 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q83 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R84 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K85 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K86 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V87 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, , N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H88 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 V89 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F90 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G91 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D92 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置

换 E93 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L94 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S95 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L96 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V97 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T98 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L99 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F100 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R101 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C102 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I103 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q104 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N105 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 M106 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P107 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K108 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T109 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L110 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P111 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N112 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N113 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S114 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C115 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y116 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S117 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A118 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G119 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I120 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A121 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R122 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L123 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E124 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E125 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G126 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 D127 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E128 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I129 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q130 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L131 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A132 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I133 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P134 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R135 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 E136 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N137 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A138 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 Q139 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I140 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S141 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 R142 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N143 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G144 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 D145 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 D146 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T147 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F148 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F149 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G150 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A151 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L152 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K153 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L154 ;和 / 或用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L155。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。对所得本发明的 Neutrokin- α 蛋白质可进行常规筛选本文所述及本

领域已知的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或可溶性。优选地, 所得本发明的蛋白质具有增强或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性。更优选地, 所得本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白质具有一种以上增强或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质。

[0327] 在另一实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 多肽包含用上述取代氨基酸 (保守或非保守的) 替换的一个以上 (如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 和 50 个) 氨基酸。

[0328] 例如, SEQ ID NO: 38 所示 Neutrokin- α 蛋白质序列的优选非保守取代包括: 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M1; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D2; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E3; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S4; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A5; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K6; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T7; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L8; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P9; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P10; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P11; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C12; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L13; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C14; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F15; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C16; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S17; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E18; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K19; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G20; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E21; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D22; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M23; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K24; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V25; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G26; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y27; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D28; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P29; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I30; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T31; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P32; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q33; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K34; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E35; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E36; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G37; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A38; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 W39; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F40; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G41; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I42; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C43; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R44; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D45; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G46; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R47; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L48; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L49; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A50; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A51; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T52; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L53; 用 D,

E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L54 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L55 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A56 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L57 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L58 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S59 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S60 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S61 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F62 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T63 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A64 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M65 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S66 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L67 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y68 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q69 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L70 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A71 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A72 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L73 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q74 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A75 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D76 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L77 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M78 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N79 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L80 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R81 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M82 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E83 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L84 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q85 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S86 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y87 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R88 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G89 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S90 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A91 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T92 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P93 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A94 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A95 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A96 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G97 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A98 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P99 ; 用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E100 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L101 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T102 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A103 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G104 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V105 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K106 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L107 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L108 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T109 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P110 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A111 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A112 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P113 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R114 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P115 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H116 ; 用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N117 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S118 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S119 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R120 ; 用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G121 ; 用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F,

W, Y, P, 或 C 置换 H122 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R123 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N124 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R125 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R126 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A127 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F128 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q129 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G130 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P131 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E132 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E133 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T134 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E135 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q136 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D137 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V138 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D139 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L140 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S141 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A142 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P143 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P144 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A145 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P146 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C147 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L148 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P149 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G150 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C151 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R152 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H153 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S154 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q155 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H156 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D157 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D158 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N159 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G160 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M161 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N162 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L163 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R164 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N165 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I166 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I167 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q168 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D169 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C170 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L171 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q172 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L173 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I174 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A175 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D176 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S177 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D178 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T179 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P180 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A181 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L182 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E183 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W,

Y, P 或 C 置换 E184 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K185 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E186 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N187 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K188 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I189 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V190 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V191 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R192 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q193 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T194 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G195 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y196 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F197 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F198 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I199 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y200 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S201 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q202 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V203 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L204 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y205 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T206 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D207 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P208 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I209 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F210 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A211 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M212 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G213 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H214 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V215 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I216 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q217 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R218 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K219 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K220 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V221 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 H222 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V223 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F224 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G225 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D226 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E227 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L228 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S229 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L230 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 V231 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T232 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L233 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F234 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R235 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C236 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I237 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q238 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N239 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 M240 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P241 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K242 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T243 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L244 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P245 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N246 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N247 ;用 D, E, H, K, R, N, Q,

F, W, Y, P, 或 C 置换 S248 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 P, 置换 C249 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 Y250 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S251 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A252 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G253 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I254 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A255 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R256 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L257 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E258 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E259 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G260 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D261 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E262 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I263 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q264 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L265 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A266 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I267 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, 或 C 置换 P268 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R269 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 E270 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N271 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A272 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P 或 C 置换 Q273 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 I274 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 S275 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 R276 ;用 D, E, H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, F, W, Y, P, 或 C 置换 N277 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G278 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D279 ;用 H, K, R, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P 或 C 置换 D280 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 T281 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F282 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, A, G, I, L, S, T, M, V, P, 或 C 置换 F283 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 G284 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 A285 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L286 ;用 D, E, A, G, I, L, S, T, M, V, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 K287 ;用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L288 ;和 / 或用 D, E, H, K, R, N, Q, F, W, Y, P, 或 C 置换 L289。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。对所得本发明的 Neutrokin- α 蛋白质可进行常规筛选本文所述及本领域已知的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质 (如增强或降低的稳定性和 / 或可溶性)。优选地, 所得本发明的蛋白质具有增强和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性。更优选地, 所得本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白质具有一种以上增强和 / 或降低的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能活性和 / 或物理性质。

[0329] 在另一实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 多肽包含用上述取代氨基酸 (保守或非保守的) 置换的一个以上 (如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 和 50 个) 氨基酸。

[0330] 氨基酸的置换也可改变配体与细胞表面受体的选择性结合。例如 Ostade 等, 自然 361 :266-268 (1993) 阐述了一些突变导致 TNF- α 选择性地只与二种已知 TNF 受体之一结合。由于 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 是 TNF 多肽家族成员, 类似于 TNF- α 中的那些突变在 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 中具有相似作用。

[0331] 配体 - 受体结合的关键位点也可通过结构分析确定, 如结晶, 核磁共振, 或放射亲和性标记 (Smith 等, 分子生物学杂志 224 :899-904 (1992) 和 Uos 等, 科学 255 :

306-312(1992))。

[0332] 由于 Neutrokin- α 是 TNF 相关蛋白家族的成员,为调节而不是完全消除 Neutrokin- α 的功能活性(如生物活性)可对编码 TNF 保守的结构域中的氨基酸的序列进行突变,所述氨基酸即图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2) 所示 Gly191-Leu284 位内的氨基酸,优选是此区域内在全部,大多数或一些 TNF 家族成员(如 TNF- α , TNF- β , LT-3, 和 Fas 配体)中是不保守的氨基酸残基(见图 2A-B)。通过在这种保守的氨基酸典型地在相关 TNFs 中发现的位置进行 Neutrokin- α 中特异突变,Neutrokin- α 突变蛋白将作为拮抗剂起作用,因而具有抑制淋巴细胞(如 B 细胞)增殖,分化和/或活化作用。因此,本发明的多肽包括 Neutrokin- α 突变体。这种 Neutrokin- α 突变体包含或由图 1A 和 1B(SEQ ID NO:2) 所示 Neutrokin- α 氨基酸序列的全长或优选胞外域的片段,变体或衍生物组成。编码上述 Neutrokin- α 突变体的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0333] 由于 Neutrokin- α SV 是 TNF 相关蛋白家族的成员,为调节而不是完全消除 Neutrokin- α SV 的功能活性,可对编码 TNF 保守结构域中氨基酸的序列进行突变,所述氨基酸即图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 中 Gly172-Leu265 位内的氨基酸,优选是此区域内在全部,大多数或一些 TNF 家族成员(如 TNF- α , TNF- β , LT- β , 和 Fas 配体)中是非保守的氨基酸残基(见图 2A-B)。通过在这种氨基酸在相关 TNFs 中典型发现的位置进行 Neutrokin- α SV 中特异突变,Neutrokin- α SV 突变蛋白将作为拮抗剂起作用,因而具有例如抑制淋巴细胞(如 B 细胞)增殖,分化和/或活化作用。因此,本发明的多肽包括 Neutrokin- α SV 突变体。这种 Neutrokin- α SV 突变体包含或由图 5A 和 5B(SEQ ID NO:19) 所示 Neutrokin- α SV 氨基酸序列的全长或优选胞外域的片段,变体或衍生物组成。编码上述 Neutrokin- α SV 突变体的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0334] 另外,本领域技术人员意识到定向于本发明 Neutrokin- α 多肽一些区域的突变可影响 Neutrokin- α 多肽所观测到的功能活性(如生物活性),所述区域涵盖在 Neutrokin- α SV 多肽序列中未发现的 19 个氨基酸残基插入序列(即图 1A 和 1B 及 SEQ ID NO:2 所示序列的 Val142-Lys160 位氨基酸残基)。更特别地,可定向突变的 Neutrokin- α 多肽序列的这种残基非限制性地例如包括以下 SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 多肽序列的氨基酸残基:V142;T143;Q144;D145;C146;L147;Q148;L149;I150;A151;D152;S153;E154;T155;P156;T157;I158;Q159;和 K160。

[0335] 本领域已知的重组 DNA 方法(见例如 DNA 改组,如前述)可用于产生新的突变体蛋白或突变蛋白,包括单个或多个氨基酸取代,缺失,添加或融合蛋白。这种修饰的多肽可呈现例如增强的活性或提高的稳定性。另外,它们至少在一定纯化和储存条件下,与相应的天然多肽相比,可高产量纯化及呈现较好的可溶性。

[0336] 因此,本发明还涵盖了 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 的衍生物和类似物,它们具有一或多个氨基酸残基缺失,添加或取代,以产生更适于在选择的宿主细胞中表达,放大的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽。例如,半胱氨酸残基可缺失或用其它氨基酸残基取代以消除二硫键;N 连接的糖基化位点可改变或消除以例如达到同源产物的表达,该同源产物更易于从酵母宿主中回收和纯化,酵母宿主已知具有超糖基化位点。因此,在 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽中一或多个糖基化识别序列的第一个或第三个氨基酸位或这二位上的各种氨基酸取代,和/或在一或多个这种识别序列的第

二个氨基酸位上的氨基酸缺失,将阻止 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在修饰的三肽序列糖基化(参见 Miyajimo 等,EMBO 杂志 5(6):1193-1197)。

[0337] 另外,本发明多肽的一或多个氨基酸残基(如精氨酸和赖氨酸残基)可缺失或用其它残基取代,以通过蛋白酶如弗林蛋白酶或 Kexins 消除不希望的加工。这种突变的一个可能结果是本发明的 Neutrokin- α 多肽不被切割并从细胞表面释放。

[0338] 在一特异的实施方案中,SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 序列的 Lys132 和 / 或 Arg133 突变为其它氨基酸残基或一起缺失,以阻止或减少可溶形式的 Neutrokin- α 从表达 Neutrokin- α 的细胞中释放。在更特异的实施方案中,SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 序列的 Lys132 突变为 Ala132。在另一实施方案中,SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 序列的 Arg133 突变为 Ala133。这些突变的蛋白质和 / 或编码这些蛋白质的多核苷酸具有例如体外治疗或基因治疗的作用,以工程化表达保留在工程化细胞表面的 Neutrokin- α 多肽的细胞。

[0339] 在一特异的实施方案中,SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 序列的 Cys146 突变为其它氨基酸残基或缺失,以例如有助于阻止或减少当在表达系统中表达时 Neutrokin- α 多肽突变体的寡聚体化(基本如实施例 1 所述)。在一特异的实施方案中,Cys146 用丝氨酸残基置换。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0340] 在另一特异的实施方案中,SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 序列的 Cys232 突变为其它氨基酸残基或缺失,以有助于阻止或减少当在表达系统中表达时 Neutrokin- α 多肽突变体的寡聚体化(基本如实施例 1 所述)。在一特异的实施方案中,Cys232 用丝氨酸残基置换。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0341] 在另一特异的实施方案中,SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 序列的 Cys245 突变为其它氨基酸残基或缺失,以例如有助于阻止或减少当在表达系统中表达时 Neutrokin- α 多肽突变体的寡聚体化(基本如实施例 1 所述)。在一特异的实施方案中,Cys245 用丝氨酸残基置换。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0342] 本发明的多肽优选是分离形式的,且优选是基本纯化的。重组生产的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽可通过 Smith 和 Johnson 在基因 67:31-40(1988) 中所述的一步法而基本纯化。

[0343] 本发明的多肽包括由保藏的 cDNA(ATCC 保藏号 97768) 编码的完整多肽,包括由保藏的 cDNA 编码的多肽的胞内域,跨膜域和胞外域,由保藏的 cDNA 编码的成熟可溶的多肽,蛋白质的胞外域减去胞内域和跨膜域,图 1A 和 1B 的完整多肽(SEQ ID NO:2 的 1-285 位氨基酸残基),图 1A 和 1B 的成熟可溶多肽(SEQ ID NO:2 的 134-285 位氨基酸残基),图 1A 和 1B 的胞外域(SEQ ID NO:2 的 73-285 位氨基酸残基)减去胞内域和跨膜域,以及与上述多肽有至少 80%,85%,90%,优选至少 95%,更优选至少 96%,97%,98%或 99%相似性的多肽。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0344] 本发明的多肽包括由保藏的 cDNA(ATCC 保藏号 203518) 编码的完整多肽,包括由保藏的 cDNA 编码的多肽的胞内域,跨膜域和胞外域,由保藏的 cDNA 编码的成熟可溶的多肽,蛋白质的胞外域减去胞内域和跨膜域,图 5A 和 5B 的完整多肽(SEQ ID NO:19 的 1-266 位氨基酸残基),图 5A 和 5B 的胞外域(SEQ ID NO:2 的 73-266 位氨基酸残基)减去胞内域和跨膜域,以及与上述多肽有至少 80%,85%,90%,优选至少 95%,更优选至少 96%,

97%, 98% 或 99% 相似性的多肽。编码这些多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0345] 本发明的其它多肽包括与保藏的 cDNA (ATCC No. 97768) 编码的或图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 所示多肽有至少 80% 或 85%, 优选至少 90% 或 95%, 更优选至少 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的多肽, 也包括这种多肽的具有至少 30 个, 优选至少 50 个氨基酸的一部分。编码这种多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0346] 本发明的其它多肽包括与保藏的 cDNA (ATCC No. 203518) 编码的或图 5A 和 5B (SEQ ID NO :19) 所示多肽有至少 80% 或 85%, 优选至少 90% 或 95%, 更优选至少 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性的多肽, 也包括这种多肽的具有至少 30 个, 优选至少 50 个氨基酸的一部分。编码这种多肽的多核苷酸也涵盖在本发明内。

[0347] 两个多肽之间的“相似性百分率”是指用 Bestfit 程序 (Wisconsin 序列分析软件包, 用于 Unix 的 8 版本遗传学计算机小组, 大学研究园, 575 Science Drive, Madison, WI53711) 及设立默认参数对比两个多肽的氨基酸序列, 以确定相似性而产生的相似性范围。Bestit 使用 Smith 和 Waterman 的局部同源序列对比 (Advances in Applied Mathematics 2 :482-498, 1981), 以发现两个序列间最佳相似区段。

[0348] 具有与参照的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列有例如至少 95% “相同性”的氨基酸序列的多肽, 是指此多肽的氨基酸序列与参照序列是相同的, 除了此多肽序列可包括参照 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的氨基酸序列的每 100 个氨基酸有至多 5 个改变。换言之, 为获得含有与参照氨基酸序列有至少 95% 相同性的氨基酸序列的多肽, 参照序列中 5% 的氨基酸残基可缺失或用其它氨基酸取代, 或占参照序列总氨基酸残基数 5% 的氨基酸可插入到参照序列中。参照序列的这些变化可发生在参照序列的氨基端或羧基端, 或发生在这些末端之间的任何位置, 分散在参照序列各个残基之间或在参照序列的一或多个连续组中。

[0349] 实际上, 任何特殊的多肽是否与以下序列有至少 80%, 85%, 90%, 95% 96%, 97%, 98% 或 99% 相同性, 可用已知计算机程序如 Bestfit 程序 (如前) 确定, 所述序列是例如图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 所示氨基酸序列, 由保藏的 cDNA 克隆 HNEDU15 (ATCC NO. 97768) 编码的氨基酸序列, 或它们的片段, 或例如是图 5A 和 5B (SEQ ID NO :19) 所示氨基酸序列, 由保藏的 cDNA 克隆 HDPMC52 (ATCC NO. 203518) 编码的氨基酸序列或它们的片段。当用 Bestfit 或任何其它序列对比程序以确定一特殊序列是否与本发明的参照序列有例如至少 95% 相同性时, 当然要设立参数, 这样在全长参照序列上计算相同性百分率, 且允许有占参考序列总氨基酸残基数 5% 的同源缺口。

[0350] 在特异的实施方案中, 参照 (参比) 序列 (本发明的序列) 和目标序列之间的相同性, 也称作整体序列对比, 是用基于 Brutlag 等的序列对比的 FASTDB 计算机程序 (Comp. App. Biosei. 6 :237-245 (1990) 确定的。用于 FASTDB 氨基酸序列对比的优选参数是 :Matrix = PAM 0, K-tuple = 2, Mismatch Penalty = 1, Joining Penalty = 20, Randomization Group Length = 0, Cutoff Score = 1, Window Size = 序列长度, Gap Penalty = 5, Gap Size Penalty = 0.05, Window Size = 500 或目标序列长度, 取更短的。根据此实施方案, 如果目标序列由于 N 或 C 末端缺失而非因为内在缺失而短于参比序列, 对结果要进行人工调整, 因为 FASTDB 程序在计算整体相同性百分比时, 未考虑到目标序列 N 和 C 末端的截短。就相对于参比序列, 目标序列在 N 和 C 末端截短而言, 相同性百分率通过计算不与相应目标

序列匹配的是目标序列 N 和 C 末端的参比序列的残基数而调整,作为参比序列总碱基数的百分比。确定一个残基是否匹配是通过 FASTDB 序列对比结果确定的。然后将此百分率从通过 FASTDB 程序用特定参数计算出来的相同性百分率中减去,得到最终相同性百分率范围。此最终相同性百分率才可用于本发明。只有目标序列的 N 和 C 末端残基不与参比序列匹配,才需要人工调整相同性百分率。即只有参比序列残基位在目标序列的最远 N 和 C 末端残基之外。例如,一个 90 个氨基酸残基的目标序列与 100 个残基的参比序列对比确定相同性百分率。缺失发生在目标序列的 N 末端,因而 FASTDB 对比未显示出在 N 末端前 10 个残基的匹配。此 10 个未成对的残基代表序列的 10% (在 N 和 C 末端未匹配的残基数 / 参比序列中总残基数),因此将此 10% 从经 FASTDB 程序计算的相同性百分比中减去。如果剩余的 90 个残基充分匹配,则最终相同性百分比为 90%。在另一实施方案中,一个 90 个残基的目标序列与 100 个残基的参比序列对比。这次缺失是内在缺失,因此在目标序列的 N 和 C 末端没有未与参比序列匹配的残基。在此情况下,经 FASTDB 计算的相同性百分率不同人工调整。再者,只有位于目标序列 N 和 C 末端外的残基不与参比序列匹配,如 FASTDB 序列对比所示,此时需要人工调整。本发明不需要进行其它人工调整。

[0351] 本发明多肽的用途包括但非限于在 SDS-PAGE 凝胶上或在分子筛凝胶过滤柱上,使用本领域熟知方法作为分子量标记。另外,如以下详述,本发明多肽的用途包括但非限于产生多克隆和单克隆抗体,用于检测 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的表达,或作为能增强或抑制 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 功能的激动剂和拮抗剂。本发明的多肽还具有如下述的治疗作用。另外,这种多肽能用于酵母双杂交系统以“捕捉”也是本发明候选激动剂和拮抗剂的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 结合蛋白。此酵母双杂交系统见于 Fields 和 Song,自然 340:245-246(1989) 所述。转基因与“剔除”

[0352] 本发明多肽也可在转基因动物中表达。任何物种动物包括但非限于大鼠,小鼠,兔,仓鼠,豚鼠,猪,小猪,山羊,绵羊,奶牛和非人灵长目动物如狒狒,猴,和黑猩猩可用于产生转基因动物。在一特异的实施方案中,本文所述方法及本领域已知其它方法用于在人体内表达本发明多肽,作为基因疗法的一部分。

[0353] 本领域任何已知方法可用于将转基因(即本发明的多核苷酸)导入动物体内,以产生转基因动物的建立者品系。这种方法包括但非限于前核微注射(Paterson 等,应用微生物学生物技术 40:691-698(1994);Carver 等,生物技术(NY)11:1263-1270(1993);Wright 等,生物技术(NY)9:830-834(1991);和 Hoppe 等,美国专利 No. 4873191(1989));逆转录病毒介导的基因转移至生殖细胞系中(Vander putten 等,美国科学院院报 82:6148-6152(1985),胚泡或胚胎中;胚胎干细胞中基因定向(Thompson 等,细胞 56:313-321(1989));细胞或胚胎的电穿孔(Lo,1983,分子细胞生物学 3:1803-1814(1983));用基因枪导入本发明的多核苷酸(见 Ulmer 等,科学 259:1745(1993);将核酸构建体导入胚胎多能性干细胞中并将此干细胞再移回胚泡中;及精子介导的基因转移(Lavitrano 等,细胞 57:717-723(1989);等。对这些方法的综述见 Gordon,“转基因动物”,Int' l Rev Cytol. 115:171-229(1989) 所述,其全文并入参考。也见于美国专利 No. 5464764(Capecchi 等,阳性 / 阴性选择方法及载体);美国专利 No. 5631153(Capecchi 等,含有预定的基因组修饰的细胞和非人生物体及生产它们的阳性 / 阴性选择方法及载体);美国专利 No. 4736866(Leder 等,转基因非人动物);和美国专利 No. 4873191(Wagner 等,受精卵的遗

传转化) ;以上文献均全文并入参考。

[0354] 本领域已知的任何方法均可用于生产含有本发明多核苷酸的转基因克隆,例如,将细胞核移至诱导为静止状态的培养的胚胎,胎儿或成体细胞的去核卵母细胞中(Campell等,自然 380 :64-66(1996) ;Wilmut 等,自然 385 :810-813(1997))。

[0355] 本发明提供了在其所有细胞中均携带转基因的转基因动物,以及在其一些而不是全部细胞中携带转基因的动物,即镶嵌或嵌合动物。此转基因可以作为单一转基因或多个拷贝如多联体例如头头串联或头尾串联形式整合。转基因也可选择性地导入特定细胞类型中并在其中活化,例如通过 Lasko 等教导(Lasko 等,美国科学院院报 89 :6232-6236(1992))。为这种细胞类型特异性活化所需的调节序列依赖于相应的特殊细胞类型而定,并为本领域技术人员所显而易见。当需要将多核苷酸转基因整合入内源基因的染色体位置时,优选基因定向。简而言之,当使用这种方法时,设计含有同源于内源基因的一些核苷酸序列的载体,整合入内源基因的核苷酸序列中并破坏其功能,所述载体是通过用染色体序列同源重组的。转基因也可选择性地导入特定细胞类型中,因此灭活只在此细胞类型中的内源基因,例如由 Gu 等教导(Gu 等,科学 265 :103-106(1994))。为这种细胞类型特异性灭活所需的调节序列将依赖于相应的特殊细胞类型而言,并为本领域技术人员所显而易见。除了在转基因动物中以遍在或组织特异性方式表达本发明多肽之外,产生通过各种其它方式调节多肽表达的构建体(例如发育性或化学性调节的表达),对本领域技术人员而言也是轻而易举的。

[0356] 一旦已产生转基因动物,可利用标准方法分析重组基因的表达。初始可通过 Southern 印迹分析或 PCR 筛选,以分析动物组织查证转基因整合是否已经发生。转基因在转基因动物组织内的 mRNA 表达水平也可用以下方法确定,所述方法包括但非限于对得自动物的组织样品进行 Northern 印迹分析,体内杂交分析,逆转录酶-PCR(rt-PCR) ;和 TagMan PCR。表达转基因的组织样品也可用特异于转基因产物的抗体进行免疫细胞化学性或免疫组织化学性评价。

[0357] 一旦产生建立者动物,可将它们繁殖,近亲繁殖,远亲繁殖或杂交繁殖以产生特定动物群落。这种繁殖方法例如包括但非限于远亲繁殖具有一个以上整合位点的建立者动物以建立分离的品系;近亲繁殖分离的品系以产生在高水平表达转基因的转基因化合物,高水平表达是因为每个转基因的表达累加的影响所致;交叉繁殖杂合子转基因动物产生给定整合位点的动物纯合子以增大表达及消除通过 DNA 分析筛选动物之需;交叉繁殖分离的纯合子品系以产生杂合子或纯合子品系化合物;将转基因在适于试验模型的不同背景中繁殖;并将转基因动物繁殖为携带不同转基因或剔除突变的其它动物。

[0358] 本发明的转基因及“剔除”动物的用途包括但非限于用于在阐述 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽生物功能,研究与异常 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 表达相关的疾病,及筛选改善这种疾病的有效化合物中作为动物模型系统。

[0359] 在本发明另外的实施方案中,将基因工程化的表达或不表达(如剔除)本发明多肽的细胞在体内施用于患者。这种细胞可得自患者(即动物,包括人)或 MHC 相容的供体,且可包括但非限于成纤维细胞,骨髓细胞,血细胞(如淋巴细胞),脂肪细胞,肌细胞,内皮细胞等。细胞是在体外用重组 DNA 方法基因工程化的,将本发明多肽的编码序列导入细

胞,或者破坏本发明多肽的编码序列和 / 或与之相关的内源性调节序列,如通过转导(用病毒载体,优选将转基因整合入细胞基因组的载体),或转染法包括但非限于用质粒,粘粒,YACs,裸DNA,电穿孔,脂质体等。本发明多肽的编码序列可置于强组成型或诱导型启动子或启动子 / 增强子的控制下,以表达优选分泌本发明的多肽。表达且优选分泌本发明多肽的工程化细胞可全身性地导入患者体内,如在循环中或腹膜内导入。

[0360] 或者,此细胞可掺入基质中并植入体内,如基因工程化的成纤维细胞可作为皮肤移植物的一部分而植入;基因工程化的内皮细胞可作为淋巴管或血管移植物的一部分而植入(见例如 Anderson 等,美国专利 No. 5399349;和 Mulligan 和 Wilson,美国专利 No. 5460959 所述,均并入参考)。

[0361] 当施用的细胞是非自身的或非 MHC 相容性的细胞时,可将它们通过使用熟知的组织宿主对导入的细胞产生免疫应答的方法施用。例如,细胞可以胶囊形式导入,使组分立即与胞外环境交换,而不使导入的细胞被宿主免疫系统识别。

[0362] 抗体

[0363] 本发明其它的多肽涉及抗体及 T 细胞抗原受体 (TCR),其免疫特异性地结合本发明的 SEQ ID No.:2 和 / 或 SEQ ID No.:19 的多肽,多肽片段或变体,和 / 或表位(通过本领域熟知的分析特异性抗体-抗原结合的免疫分析确定)。本发明的抗体包括但非限于多克隆抗体,单克隆抗体,多特异性抗体,人抗体,人化抗体或嵌合抗体,单链抗体, Fab 片段, F(ab') 片段,由 Fab 表达文库产生的片段,抗独特型(抗 Id)抗体(包括抗本发明抗体的抗独特型抗体)及以上任何抗体的表位结合片段。术语“抗体”是指免疫球蛋白分子及其免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。本发明的免疫球蛋白分子可以是任何类型(如 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 和 IgY),类别(如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 和 IgA2)或亚类免疫球蛋白分子。免疫球蛋白可以是重链或轻链的。一批 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 和 IgY 重链可以与 κ 或 λ 形式的轻链配对。

[0364] 最优选的抗体是本发明的结合人抗原的抗体片段,包括但非限于 Fab, Fab', 和 F(ab')₂, Fd, 单链 Fvs(scFv), 单链抗体,二硫键连的 Fvs(sdFv) 和包含 VL 或 VH 结构域的片段。结合抗原的抗体片段,包括单链抗体,可只包含可变区或包含与所有或部分以下区域的组合:绞链区, CH1, CH2, 和 CH3 结构域。本发明还包括也包含可变区与绞链区, CH1, CH2, 和 CH3 结构域任意组合的结合抗原的片段。本发明的抗体可来自任何动物包括鸟和哺乳动物。优选地,抗体是人,鼠(如大鼠和小鼠),驴,兔,山羊,豚鼠,骆驼,马或鸡。文中所用“人”抗体包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并包括分离自人免疫球蛋白文库或分离自用一或多种人免疫球蛋白转基因的且不表达内源性免疫球蛋白的动物的抗体,如前所述及 Kucherlapati 等美国专利 No. 5939598 所述。

[0365] 本发明的抗体可以是单特异性,双特异性,三重特异性或更多重特异性的。多特异性抗体可以是特异于本发明多肽的不同表位,或可以特异于本发明多肽以及异源表位如异源多肽或固体支持物。例如见于 PCT 出版物 WO 93/17715;WO 92/08802;WO 91/00360;WO 92/05793;Tutt 等,免疫学杂志 147:60-69(1991);美国专利 No. 4474893;4714681;5573920;5601819;Kostelny 等,免疫学杂志 148:1547-1553(1992)。

[0366] 本发明的抗体可以用它们识别或特异结合的本发明多肽的表位或部分等术语加以阐述。所述表位或多肽的一部分可以例如通过 N 末端和 C 末端位置,连续氨基酸残基

的大小,或列于表及图中加以阐述说明。特异结合本发明任何表位或多肽的抗体也可被排除。因此,本发明包括特异结合本发明多肽的抗体,并允许排除相同的抗体。

[0367] 在特异的实施方案中,本发明的抗体与包含以下氨基酸序列的多肽结合: SEQ ID No :2 的 Phe115-Leu147, Ile150-Tyr163, Ser171-Phe194, Glu223-Tyr246, 和 Ser271-Phe278 的氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体与包含以下氨基酸序列的多肽结合: SEQ ID No :2 的 Phe115-Leu147, Ile150-Tyr163, Ser171-Phe194, Glu223-Tyr246, 和 Ser271-Phe278 的氨基酸序列。在一优选的实施方案中,本发明的抗体与包含 SEQ ID No :2 的 Glu223-Tyr246 的多肽结合。在另一优选的实施方案中,本发明的抗体与由 SEQ ID No :2 的 Glu223-Tyr246 组成的多肽结合。在一更优选的实施方案中,本发明的抗体与由 SEQ ID No :2 的 Phe230-Asn242 组成的多肽结合。在另一优选的实施方案中,本发明的抗体通过特异性结合抑制本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的一或多种生物活性。在更优选的实施方案中,本发明的抗体抑制 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的 B 细胞增殖。

[0368] 本发明的抗体还可以其交叉反应性加以阐述或说明。本发明包括不结合本发明多肽的任何其它类似物,直向同源物,或同源物的抗体。本发明还包括结合与本发明多肽有至少 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% 及 50% 相同性(用本领域已知方法及本文所述方法计算的)的多肽的抗体。在特异的实施方案中,本发明的抗体与人体蛋白的大鼠,小鼠和 / 或兔同源物及其相应表位交叉反应。本发明还包括不结合与本发明多肽的相同性少于 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50% (用本领域已知方法及本文所述方法计算的)的多肽的抗体。在一特异的实施方案中,上述交叉反应性是关于任一特异性抗原性或免疫原性多肽,或 2, 3, 4, 5 或多个特异抗原性和 / 或免疫原性多肽的组合的。本发明还包括结合一种多肽的抗体,该多肽由在杂交条件下(如本文所述)与本发明多核苷酸杂交的多核苷酸编码。本发明的抗体还可以其与本发明多肽的结合亲和性加以阐述或说明。优选的结合亲和性包括那些具有解离常数或 K_d 少于 $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-5}M$, $5 \times 10^{-6}M$, $10^{-6}M$, $5 \times 10^{-7}M$, $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-9}M$, $10^{-9}M$, $5 \times 10^{-10}M$, $10^{-10}M$, $5 \times 10^{-11}M$, $10^{-11}M$, $5 \times 10^{-12}M$, $10^{-12}M$, $5 \times 10^{-13}M$, $10^{-13}M$, $5 \times 10^{-14}M$, $10^{-14}M$, $5 \times 10^{-15}M$, 或 $10^{-15}M$ 的抗体。

[0369] 本发明还提供了竞争性抑制抗体与本发明表位结合的抗体,如通过本领域已知确定竞争性结合的任何方法确定,例如本文所述的免疫分析法。在优选的实施方案中,抗体竞争性抑制与表位的结合有至少 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 或 50%。

[0370] 本发明的抗体可作为本发明多肽的激动剂或拮抗剂。例如,本发明包括部分或全部破坏受体 / 配体与本发明多肽相互作用的抗体。优选地,本发明的抗体结合本文所述的抗原性表位或其一部分。本发明包括受体特异性抗体和配体特异性抗体。本发明还包括不阻止配体结合但阻止受体活化的受体特异性抗体。受体活化(即信号)可通过本文所述或本领域已知其它方法确定。例如,受体活化可通过检测受体或其底物的磷酸化(如酪氨酸或丝氨酸 / 苏氨酸)加以确定,检测是通过免疫沉淀随后进行 Western 印迹分析(如前述)进行的。在特异的实施方案中,提供了抑制配体活性或受体活性的抗体,所抑制的活性比无抗体存在情况下至少抑制 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 或 50%。

[0371] 本发明还包括阻止配体结合和受体活化的受体特异性抗体,以及识别受体-配体复合物,优选不特异识别未结合的受体或未结合的配体的抗体。本发明还包括结合配

体并阻止配体与受体结合的中性化抗体,以及结合配体,从而阻止受体活化但不阻止配体与受体结合的抗体。本发明另外包括激活受体的抗体。这些抗体可作为受体激动剂,即增强或激活全部或部分配体介导的受体活化的生物活性,例如通过诱导受体二聚体化而进行。抗体可作为激动剂,拮抗剂或反向激动剂加以说明其生物活性,包括本发明肽的特异生物活性。上述抗体激动剂可用本领域已知方法生产。见例如 PCT 公布 W092/40281; 美国专利 No. 581109; Deng 等, 血液 92(6):1981-1988(1998); Cher 等, 癌症研究 58(16):3668-3678(1998); Harrop 等, 免疫学杂志 161(4):1786-1794(1998); Zhu 等, 癌症研究 58(15):3209-3214(1998); Yoon 等, 免疫学杂志 160(7):3170-3179(1998); Prat 等, 细胞科学杂志 111(Pt2):237-247(1998); Pitard 等, 免疫学方法杂志 205(2):177-190(1997); Liautard 等, 细胞因子 9(4):233-241(1997); Carlson 等, 生物化学杂志 272(17):11295-11301(1997); Taryman 等, 神经元 14(4):755-762(1995); Muller 等, 结构 6(9):1153-1167(1998); , Bartunek 等, 细胞因子 8(1):14-20(1996) (所有文献均全文并入参考)。

[0372] 本发明的抗体可例如用于但非限于纯化, 检测及定向本发明的多肽, 包括用于体外和体内诊断及治疗方法。例如, 抗体可用于免疫分析中以定量及定性测定生物样品中本发明多肽的水平。见例如 Harlow 等, 抗体实验手册 (冷泉港实验室出版, 第二卷, 1988) (全文并入参考)。

[0373] 如下更详尽的阐述, 本发明的抗体可单独或与其它组合物组合使用。抗体可在 N 或 C 末端融合于异源多肽, 或化学缀合于 (包括共价和非共价缀合) 多肽或其它组合物。例如, 本发明的抗体可重组融合或缀于用作检测分析中标记的分子及效应器分子如异源多肽, 药物, 放射性核素或毒素。见例如 PCT 公布 W0 92/08495; W091/14438; W0 89/12624; 美国专利 No. 5314995; 和 EP 396387。

[0374] 本发明的抗体包括修饰的衍生物, 即通过任何类型分子共价附着于抗体, 这样共价附着不阻止抗体产生抗独特型应答。抗体衍生物例如但非限于包括通过以下方式修饰的抗体: 例如通过糖基化, 乙酰化, PEG 化, 磷酸化, 酰胺化, 通过已知保护 / 阻断基团的衍生化, 蛋白酶切, 与细胞配体或其它蛋白质连接等。可通过已知方法进行任何化学修饰, 包括但非限于特殊化学裂解, 乙酰化, 甲酰化, 衣霉素的代谢合成等。另外, 衍生物可含有一或多个非经典的氨基酸。

[0375] 本发明的抗体可通过任何本领域已知方法产生。相应抗原的多克隆抗体可通过本领域熟知的各种方法产生。例如, 可将本发明的独特施用于各种宿主动物包括但非限于兔, 大鼠, 小鼠等, 以诱导含有特异于抗原的多克隆抗体的血清产生。根据宿主物种可使用各种佐剂以提高兔免疫应答, 佐剂包括但非限于 Freund' s (完全或不完全) 佐剂, 无机物凝胶如氧化铝, 表面活性剂如溶血卵磷脂, 多醇, 聚阴离子, 肽, 油乳胶, 匙孔贼血蓝蛋白, 二硝基苯酚, 和潜在有效的人佐剂如 BCG (卡介苗), 和短小棒杆菌。这些佐剂已为本领域所熟知。

[0376] 单克隆抗体可用各种本领域已知方法制备, 包括使用杂交瘤, 重组, 和噬菌体展示法, 或将它们组合使用。例如, 单克隆抗体可用杂交瘤方法产生, 该方法包括本领域已知的那些方法并如 Harlow 等, 抗体实验手册 (冷泉港实验室出版, 第二卷, 1988); Hammerling 等, 单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤 563-681 (Elsevier, N. Y. 1981) 所教导 (所述文献全文并入参考)。术语“单克隆抗体”非限于通过杂交瘤方法产生的抗体。术语“单克隆抗体”指衍

生自单一克隆包括任何真核,原核或噬菌体克隆的抗体,而不是指生产其的方法。

[0377] “单克隆抗体”可包含或由两种蛋白质组成,即重链和轻链。

[0378] 用杂交瘤方法生产及筛选特异抗体的方法为本领域所熟知,并详见于实施例中所述(如实施例 9)。在一非限制性的实施例中,可用本发明的独特或表达这种独特的细胞接种。一旦检测到免疫应答,如在鼠血清中检测到特异于抗原的抗体,将鼠的脾摘下并分离脾细胞。然后将脾细胞通过熟知方法融合于任何适当的骨髓瘤细胞,例如得自 ATCC 的 SP20 细胞系的细胞。选择杂交瘤并通过限制性稀释克隆。然后通过本领域已知方法分析杂交瘤克隆的分泌能结合本发明独特的抗体的细胞。通常含有高水平抗体的腹水可通过用阳性杂交瘤克隆接种鼠而产生。

[0379] 因此,本发明提供了产生单克隆抗体的方法以及通过此方法产生的抗体,该方法包括培养分泌本发明抗体的杂交瘤细胞,其中优选地此杂交瘤是通过融合脾细胞与骨髓瘤细胞而产生的,脾细胞分离自本发明抗原免疫接种的鼠,然后筛选得自融合体的杂交瘤,选择分泌能结合本发明独特的抗体的杂交瘤克隆。

[0380] 识别特异性表位的抗体片段可通过已知方法产生。例如,本发明的 Fab 和 F(ab')₂ 片段可通过蛋白酶解免疫球蛋白分子而产生,使用的酶如是木瓜蛋白酶(以产生 Fab 片段),或胰蛋白酶(产生 F(ab')₂ 片段)。F(ab')₂ 片段含有可变区,轻链恒定区和重链的 CH1 结构域。

[0381] 例如,本发明的抗体也可用本领域已知的各种噬菌体展示法产生。在噬菌体展示法中,功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒表面。在特异的实施方案中,这种噬菌体可用于展示表达自所有组成成分或组合抗体文库的抗原结合结构域。表达结合相应抗原的抗原结合结构域的噬菌体可用抗原选择或鉴别,如用标记的抗原或结合或捕捉于固体表面或珠的抗原。这些方法中使用的噬菌体是典型的丝状噬菌体,包括表达自噬菌体的 fd 和 M13 结合结构域,该噬菌体具有重组融合于噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白质的 Fab, Fv 或二硫键稳定的 Fv 抗体结构域。可用于生产本发明抗体的噬菌体展示法例如包括以下参考文献所述的那些方法:如 Brinkman 等,免疫方法杂志 182:41-50(1995);Ames 等,免疫方法杂志 184:177-186(1995);Kettleborough 等,欧洲免疫学杂志 24:952-958(1994);Persic 等,基因 187:9-18(1997);Burton 等,免疫学进展 57:191-280(1994);PCT 申请 No. PCT/GB91/01134;PCT 公布 WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/20401;和美国专利 No. 5698426,5223409,5403484,5580717,5427908,5750753,5821047,5571698,5427908,5516637,5780225,5658727,5733743,和 5969108 所述,以上文献均全文并入参考。

[0382] 如以上参考文献所述,在噬菌体选择之后,噬菌体中的抗体编码区可分离并用于产生整个抗体,包括人抗体,或任何其它所需的抗原结合片段,并可在任何所需宿主包括哺乳动物细胞,昆虫细胞,植物细胞,酵母和细菌中表达,如以下详述。例如,重组产生 Fab, Fab' 和 F(ab')₂ 片段的方法也可通过本领域已知方法应用,如 PCT 公布 WO 92/22324;Mullinax 等,生物技术 12(6):864-869(1992);和 Sawai 等,AJRI 34:26-34(1995);和 Better 等,科学 240:1041-1043(1988) 所述,所述文献均全文并入参考。

[0383] 可用于产生单链 Fvs 及抗体的方法例如包括美国专利 4946778 和 5258498;Huston 等,酶学方法 203:46-88(1991);Shu 等,PNAS90:7995-7999(1993);和 SKerra 等,

科学 240 :1038-1040(1988) 所述的那些方法。对于一些应用,包括在人体内使用抗体及体外检测分析而言,优选使用嵌合,人化或人抗体。嵌合抗体是一种分子,其中抗体的不同部分衍生自不同物种的动物,如抗体具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区及人免疫球蛋白恒定区。产生嵌合抗体的方法本领域已知。见例如 Morrison,科学 229 :1202(1985); Oi 等,生物技术 4 :214(1986); Gillies 等 (1989),免疫方法杂志 125 :191-202;美国专利 No. 5807715,4816567 和 4816397 所述。人化抗体是来自非人物种抗体的抗体分子,其结合具有非人物种的一或多个互补决定区 (CDR) 和人免疫球蛋白分子的框架区的所需抗原。通常,人框架区域内的框架残基将用 CDR 供体抗体的相应残基取代,以改变优选改良抗原结合。这些框架取代是通过本领域熟知方法鉴别的,如通过建立 CDR 与框架残基的相互作用模型,以鉴别对抗原结合重要的框架残基,并进行序列对比以鉴别在特殊位置的独特的框架残基(见例如 Queen 等,美国专利 No. 5585089; Riechmann 等,自然 332 :323(1988),全文并入参考)。抗体可用本领域已知多种方法人源化,例如包括 CDR 移位 (EP239400; PCT 出版物 ;/09967 美国专利 No. 5225539,5530101,和 5585089),Veneering 或重新表面化 (EP592106; EP 519596; Padlan,分子免疫学 28(4/5) :489-498(1991); Studnicka 等,蛋白质工程 7(6) :805-814(1994); Roguska 等,PNAS 91 :969-973(1994)),和链改组(美国专利 No. 5565332)。

[0384] 完全人抗体是治疗病人所特需的。人抗体可通过本领域已知各种方法生产,包括上述使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示法。见于美国专利 No. 4444887,和 4716111;及 PCT 出版物 WO 98/46645,WO 98/50433,WO 98/24893,WO 98/16654,WO96/34096,WO 96/33735 和 WO 91/10741 所述,每个文献均以全文并入参考。

[0385] 人抗体也可用转基因鼠产生,该转基因鼠不能表达功能内源性免疫球蛋白,但能表达人免疫球蛋白基因。例如,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物可随机导入或同源重组入鼠胚胎干细胞中。或者,除了人重链和轻链基因之外,人可变区,恒定区和多变区可导入鼠胚胎干细胞中。鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可以非功能性分离或通过同源重组同时导入人免疫球蛋白基因座。尤其地,JH 区的纯合缺失阻止内源抗体产生。将修饰的胚胎干细胞扩展并微注射到胚泡中以产生嵌合鼠。然后繁殖嵌合鼠产生表达人抗体的纯合子代。将转基因鼠以正常方式用选择的抗原如本发明多肽的全部或部分免疫接种。直接抗抗原的单克隆抗体可得自用常规杂交瘤方法免疫接种的转基因鼠。人免疫球蛋白转基因通过转基因鼠在 B 细胞分化期间重排,随后进行类别转换和体细胞突变。因此,使用这种方法可能产生有治疗用途的 IgG, IgA, IgM 和 IgE 抗体。关于这种产生人抗体的方法的一般研究见 Lonberg 和 Huszar,免疫学研究 Int. 13 :65-93(1995) 所述。产生人抗体和人单克隆抗体的方法及产生这种抗体的方案详见例如 PCT 出版物 WO 98/24893,WO 92/01047,WO96/34096,WO 96/33735;欧洲专利 No. 0598877;美国专利 No. 5413923,5625126,5633425,5569825,5661016,5545806,5814318,5885793,5916771 和 5939598 所述,以上文献均全文并入参考。另外,Abgenix 公司 (Freemont,CA) 和 Genpharm 公司 (San Jose,CA) 可提供直接抗选择的抗原的人抗体,使用类似于上述那些方法生产。

[0386] 识别选择的表位的完全人抗体可用称作“指导选择”的方法产生。在此方法中,选择的非人单克隆抗体如鼠抗体,用于指导选择识别相同表位的完全人抗体 (Jespersen 等,生物技术 12 :899-903(1988))。

[0387] 另外,本发明多肽的抗体可用于产生“模拟”本发明多肽的抗独特型抗体,使用本领域熟知的方法(见例如 Greenspan 和 Bona, FASEB 杂志 7(5):437-444, (1989) 和 Nissinoff, 免疫学杂志 147(8):2429-2438(1991))。例如,结合并竞争性抑制多肽多聚体化和/或本发明多肽与配体结合的抗体,可用于产生“模拟”多肽多聚体化和/或结合结构域,并因此结合并中和化多肽和/或其配体的抗独特型。这种中和抗独特型抗体或这种抗独特型抗体的 Fab 片段可用于治疗方案中以中和多肽配体。例如,这种抗独特型抗体可用于结合本发明的多肽和/或结合其配体/受体,从而阻断其生物活性。

[0388] 编码抗体的多核苷酸

[0389] 本发明还提供了包含编码本发明抗体的核苷酸序列及其片段的多核苷酸。本发明还涵盖了在严格或低严格杂交条件下(如前所述),与编码抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸,所述抗体优选特异地结合本发明的多肽,更优选地结合具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽。在另一优选的实施方案中,抗体特异地结合具有 SEQ ID NO:19 氨基酸序列的多肽。在另一优选的实施方案中,抗体特异地结合具有 SEQ ID NO:23 氨基酸序列的多肽。在另一优选的实施方案中,抗体特异地结合具有 SEQ ID NO:28 氨基酸序列的多肽。在另一优选的实施方案中,抗体特异地结合具有 SEQ ID NO:30 氨基酸序列的多肽。

[0390] 多核苷酸可通过本领域已知任何方法获得,且多核苷酸的核苷酸序列可通过本领域已知任何方法确定。例如,如果已知抗体的核苷酸序列,编码抗体的多核苷酸可装配自化学合成的寡核苷酸(如 Kutmeier 等,生物技术 17:242(1994)所述),简而言之,包括合成含有编码抗体的序列一部分的重叠寡核苷酸,退火并连接这些寡核苷酸,然后经 PCR 扩增连接的寡核苷酸。

[0391] 或者,编码抗体的多核苷酸可产生自适当来源的核酸。如果含有编码特定抗体的核酸的克隆不能获得,但已知抗体分子的序列,则编码免疫球蛋白的核酸可化学合成,或使用可与待鉴别的特定基因序列,例如来自编码抗体的 cDNA 文库的 cDNA 克隆的 3' 和 5' 末端杂交的合成引物经 PCR 扩增得自适当来源或用特异于该序列的寡核苷酸探针经克隆得自适当来源(例如抗体 cDNA 文库,或产生自表达抗体的任何组织或细胞如选择用于表达本发明的抗体的杂交瘤细胞的 cDNA 文库,或分离自表达抗体的任何组织或细胞的核酸、优选聚 A+RNA)。通过 PCR 产生的扩增的核酸然后可用本领域任何熟知方法克隆入可复制的克隆载体中。

[0392] 一旦确定抗体的核苷酸序列和相应的氨基酸序列,可用本领域熟知方法操纵抗体的核苷酸序列,如重组 DNA 方法,定点诱变,PCR 等(见例如 Sambrook 等,1990,分子克隆实验手册,第二版,冷泉港实验室,冷泉港,NY 和 Ausubel 等编辑,1998,分子生物学通用方法,John Wiley 和 Sons,NY 所述所述文献全文并入参考),以产生具有不同氨基酸序列的抗体,例如产生氨基酸取代,缺失和/或插入。

[0393] 在一特异的实施方案中,对重链和/或轻链可变结构域的氨基酸序列进行检查,以鉴别互补决定区(CDR)的序列,通过本领域熟知方法检查,如对比其它重链和轻链可变区的已知氨基酸序列,以确定序列高度可变性的区域。使用常规重组 DNA 方法,可将一或多个 CDR 插入框架区中,如插入人框架区中以人源化非人抗体,如前所述。框架区可以是天然发生的或是共有框架区,且优选是人框架区(见例如 Chothia 等,分子生物学杂志 278:457-479(1998)所列的人框架区)。优选地,通过组合框架区和 CDR 产生的多核苷酸编码特

异结合本发明多肽的抗体。优选地,如前所述,在框架区内可进行一或多个氨基酸取代,且优选地,此氨基酸取代改良抗体与其抗原的结合。另外,这种方法可用于产生参与链内二硫键的一或多个可变区半胱氨酸残基的氨基酸取代或缺失,以产生缺失一或多个链内二硫键的抗体分子。多核苷酸的其它变化也涵盖在本发明内。

[0394] 另外,可以使用生产“嵌合抗体”的方法(Morrison等,美国科学院院报 81:851855(1984);Neuberger等,自然 312:604-608(1984);Takeda等,自然 314:452-454(1985)),通过剪接来自适当抗原特异性的鼠抗体分子的基因,与来自适当生物活性的人抗体分子的基因而进行。如前所述,嵌合抗体是一种分子,其中不同部分衍生自不同物种动物,如那些具有衍生自鼠 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的嵌合抗体,例如人化抗体。

[0395] 或者,可使用产生单链抗体的方法(美国专利 No. 4946778;Bird,科学 242:423-42(1988);Huston等,美国科学院院报 85:5879-5883(1988);和Ward等,自然 334:544-54(1989),产生单链抗体。单链抗体是通过氨基酸桥连接 Fv 区的重链和轻链片段,产生单链抗体。也可使用在大肠杆菌中装配功能性 Fv 片段的方法(Skerra等,科学 242:1038-1041(1988))。

[0396] 生产抗体的方法

[0397] 本发明的抗体可通过本领域已知的任何合成抗体,尤其通过化学合成或优选通过重组表达方法而生产。本发明的抗体或其片段,衍生物或类似物(如本发明抗体的重链或轻链,或本发明的单链抗体)的重组表达,要求构建一个含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。一旦已经获得编码本发明抗体分子或其重链或轻链或其一部分(优选含有重链或轻链可变结构域的部分)的多核苷酸,生产抗体分子的载体可用本领域熟知的方法通过重组 DNA 方法产生。因此,本文阐述了通过表达含有抗体编码序列的多核苷酸制备蛋白质的方法。可用本领域熟知的方法构建含有抗体编码序列和适当转录及翻译控制信号的表达载体。这些方法例如包括体外重组 DNA 方法,合成法,及体内遗传重组。因此本发明提供了一种可复制载体,其包含可操纵地连于启动子,编码本发明抗体分子或其重链或轻链,或重链或轻链可变区的核苷酸序列。这种载体可包括编码抗体分子恒定区的核苷酸序列(见例如 PCT 出版物 W0 86/05807;PCT 出版物 W0 89/01036;和美国专利 No. 5122464),且抗体的可变结构域可克隆入这种载体中以表达全部重链或轻链。

[0398] 将表达载体通过常规方法移至宿主细胞中,然后将转染的细胞通过常规方法培养以产生本发明的抗体。因此,本发明包括含有可操纵地连于异源启动子,编码本发明抗体,其重链或轻链,或本发明单链抗体的多核苷酸的宿主细胞。在表达双链抗体的优选的实施方案中,编码重链和轻链的载体可在宿主细胞中共同表达,以表达全部免疫球蛋白分子,如下所述。

[0399] 可用各种宿主表达载体系统表达本发明的抗体分子。这种宿主表达系统代表一种载体,通过它可产生相应的编码序列并随后纯化,但也代表一种细胞,当用适当核苷酸编码序列转化或转染时,该细胞可原位表达本发明的抗体分子。这些宿主表达系统包括但非限于微生物,如用含有抗体编码序列的重组细菌噬菌体 DNA,质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌,枯草杆菌);用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(如糖酵母,毕赤氏酵母);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(如杆状病毒)感

染的昆虫细胞系统；用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体（如花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒 TMV）感染的，或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体（如 Ti 质粒）转化的植物细胞系统；或具有含有衍生自哺乳动物细胞基因组的启动子（如金属硫蛋白启动子）或衍生自哺乳动物病毒的启动子（如腺病毒晚期启动子；痘苗病毒 7.5k 启动子）的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统（如 COS, CHO, BHK, 293, 3T3 细胞）。优选地，细菌细胞如大肠杆菌，更优选地，尤其表达整个重组抗体分子的真核细胞用于表达重组抗体分子。例如，哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞（CHO），与载体联合是抗体的有效表达系统，该载体如是人巨细胞病毒的主要中早期基因启动子因子（Foecking 等，基因 45：101（1986）；Cockett 等生物 / 技术 8：2（1990）。

[0400] 在细菌系统中，根据被表达的抗体分子所用，可选择许多有利的表达载体。例如，当生产出大量这种蛋白质时，为产生抗体分子的药物组合物，需要直接高水平表达易于纯化的融合蛋白产物的载体。这种载体包括但非限于大肠杆菌表达载体 pUR278（Ruther 等，EMBO 杂志 2：1791（1983）），其中抗体编码序列单独连接具有 LacZ 编码区的框架中的载体中，产生融合蛋白；pIN 载体（Inouye 和 Inouye，核酸研究 13：3101-3109（1985）；Van Heeke 和 Schuster，生物化学杂志 24：5503-5509（1989））等。pGEX 载体也可用于表达作为与谷胱甘肽-S-转移酶（GST）的融合蛋白的外源多肽。通常地，这种蛋白是可溶的，且易于从裂解的细胞中纯化，通过吸附并结合于基质谷胱甘肽-琼脂糖珠，随后在存在游离谷胱甘肽的情况下洗脱而纯化。pGEX 载体包括凝血酶或因子 Xa 蛋白酶解位点，以便克隆的靶基因产物可从 GST 组分中释出。

[0401] 在昆虫系统中，苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病毒（AcNPV）用作表达外源基因的载体。该病毒在草地夜蛾细胞中生长。抗体编码序列可单独克隆入病毒的非必需区（例如多角体蛋白基因），并置于 AcNPV 启动子（例如多角体蛋白启动子）的控制下。

[0402] 在哺乳动物宿主细胞中，可使用许多基于病毒的表达系统。当腺病毒用作表达载体的情况下，相应的抗体编码曲线可连于腺病毒转录 / 翻译控制复合物，如晚期启动子和三联前导序列。然后此嵌合基因可通过体外或体内重组插入腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区（如 E1 区或 E3 区）的插入产生重组病毒，其是存活的，且能在感染的宿主中表达抗体分子（例如见 Logan 和 Shenk，美国科学院院报 81：355-359（1984））。也可需要特异的起始信号以有效地翻译抗体编码序列。这些信号包括 ATG 起始密码子和相邻的序列。另外，起始密码子必须具有所需编码序列的读框，以保证全部插入体均翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是各种起源的，如天然和合成的。表达效力可通过包含适当的转录增强子因子，转录终止子等得以加强（见 Bitther 等，酶学方法 153：51-544（1987））。

[0403] 另外，可选择调节插入序列的表达或以特异所需方式修饰及加工基因产物的宿主细胞菌株。蛋白质产物的这种修饰（如糖基化）和加工（如切割），对蛋白质的功能是重要的。不同的宿主细胞具有特殊的及特异的翻译后加工和修饰蛋白质和基因产物的机制。可选择适当的细胞系或宿主系统以保证正确修饰和加工要表达的外源蛋白。为此，可使用具有正确加工初级转录物，使基因产物糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。这种哺乳动物宿主细胞包括但非限于 CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, 尤其乳腺癌细胞系和 BT 483, Hs 578T, HTB2, HT20, 和 T47D, 及正常乳腺细胞系如 CRL 7030 和 Hs 578Bst。

[0404] 就长期高产量生产重组蛋白质而言,优选稳定表达。例如,稳定表达抗体分子的细胞系可以基因工程化。除非使用含有病毒复制起源的表达载体,宿主细胞可用由适当的表达控制因子(如启动子,增强子,序列,转录终止子,聚腺苷酸化位点等)和可选择的标记控制的 DNA 转化。在导入外源 DNA 之后,工程化的细胞在滋养培养基中生长 1-2 天,然后转换为选择性培养基。重组质粒中的可选择标记赋予选择抗性,并使细胞稳定地将质粒整合至其染色质中,并生长形成集落,随之可被克隆并扩展至细胞系。此方法可用于基因工程化表达抗体分子的细胞系。这种工程化的细胞系可特别地用于筛选和评价直接或间接与抗体分子相互作用的化合物。

[0405] 许多选择系统可以使用,包括但非限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler 等,细胞 11:223(1977)),次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska & Szybalski,美国科学院院报 48:202(1992)),和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy 等,细胞 22:817(1980))基因分别可用于 tk-, hgpvt- 或 apvt- 细胞。同样,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,其授与氨基喋呤抗性(Wigler 等,美国科学院院报 77:357(1980));0' Hare 等,美国科学院院报 78:1527(1981));gpt,其授与霉酚酸抗性(Mulligan & Berg,美国科学院院报 78:2072(1981));neo,其授与氨基糖苷类 G418 抗性(临床药理学 12:488-505;Wu 和 Wu,生物治疗 3:87-95(1991);Tolstoshev,药物毒性分析研究 32:573-596(1993);Mulligan,科学 260:926-932(1993);及 Morgan 和 Anderson,生物化学分析研究 62:191-217(1993);May, 1993, TIB, TECH 11(5):155-215);和 hygromycin,其授与潮霉素抗性(Santerre 等,基因 30:147(1984))。本发明已知的重组 DNA 方法可常规用于选择所需的重组克隆,这种方法例如由 Ausubel 等,(编辑),分子生物学通用方法,John Wiley & Sons, NY(1993);Kriegler,基因转移和表达实验手册,Stockton 出版社, NY(1990);及 Dracopoli 等(编辑),人类基因学常用方法,第 12 和 13 章,John Wiley & Sons, NY(1994);Colbene-Garapin 等,分子生物学杂志 150:1(1981)所述,在此均全文并入参考。

[0406] 抗体分子的表达水平可通过载体扩增而提高(参见 Bebbington, 和 Hentschel, 使用基于基因扩增的载体在哺乳动物细胞中表达克隆的基因, DNA 克隆, 第三卷(科学出版社, 纽约, 1987))。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时,宿主细胞培养物中的抑制剂水平提高将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体基因相关,因此抗体产量也增加(Crouse 等,分子细胞生物学 3:257(1983))。

[0407] 宿主细胞可用本发明的两种表达载体共同转染,第一种载体编码重链衍生的多肽,第二种载体编码轻链衍生的多肽。这两种载体可含有相同的选择的标记,这种标记能相同表达重链和轻链多肽。或者可使用一个他,该载体编码且能表达重链及轻链多肽。在这种情况下,轻链应置于重链之前,以避免毒性游离重链过多(Proudfoot,自然 322:52(1986);Kohler,美国科学院院报 77:2197(1980))。重链和轻链的编码序列可包含 cDNA 或基因组 DNA。

[0408] 一旦本发明的抗体分子已通过动物,化学合成,或重组表达而产生,其可通过本领域已知的纯化免疫球蛋白分子的任何方法而纯化,例如,通过层析(例如离子交换层析,亲和层析,尤其通过在蛋白 A 之后的特异抗原亲和层析,及大小柱层析),离心,不同的溶解性,或通过任何其它纯化蛋白质的标准方法。另外,本发明的抗体或其片段可融合于本文所述或本领域已知其它异源序列,以促进纯化。

[0409] 本发明涵盖了重组融合或化学缀合于（包括共价和非共价转化）本发明多肽（或其一部分，优选至少 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 或 100 个氨基酸的多肽）的抗体，以产生融合蛋白。融合不必是直接的，也可通过接头序列发生。抗体可特异于不同于本发明多肽（或其一部分，优选至少 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 或 100 个氨基酸的多肽）的抗原。例如，抗体可用于在体外或体内将本发明的多肽定向于特殊类型细胞，通过将本发明多肽融合或缀合于特异于特殊细胞表面受体的抗体而进行。融合或缀合于本发明多肽的抗体也可用于体外免疫分析和纯化方法。见例如 Harbor 等，如前，和 PCT 出版物 WO 93/21232；EP 439095；Naramura 等，免疫学通信，39：91-99(1994)；美国专利 5474981；Gillies 等，PNAS89：1428-1432(1992)；Fec1 等，免疫学杂志 146：2446-2452(1991)；在此均全文并入参考。

[0410] 本发明还包括一种组合物，该组合物包含融合或缀合于除可变区外其它抗体结构域的本发明的多肽。例如，本发明的多肽可融合于或缀合于抗体的 Fc 区域，或其一部分。融合于本发明的多肽的抗体部分可包括恒定区，绞链区，CH1 结构域，CH2 结构域，和 CH3 结构域，或所有结构域的任意组合或其一部分。多肽也可融合或缀合于上述抗体一部分以形成多聚体。例如，融合于本发明多肽的 Fc 部分可通过 Fc 部分之间的二硫键形成二聚体。较高的多聚体形式可通过多肽与 IgA 和 IgM 的一部分融合而产生。本领域已知将本发明多肽融合或缀合于抗体的方法。见例如美国专利 No. 5336603；5622929；5359046；5349053；5447851；5112946；EP 307434；EP367166；PCT 出版物 WO 96/04388；WO 91/06570；Ashkenazi 等，美国科学院院报 88：10535-10539(1991)；Zheng 等，免疫学杂志 154：5590-5600(1995)；和 Vil 等，美国科学院院报 89：11337-11341(1992) 所述，在此均全文并入参考。

[0411] 如前所述，相应于 SEQ ID NO：2 多肽，多肽片段或其变体的多肽可融合或缀合于上述抗体部分，以提高多肽的体内半衰期，或用于免疫分析中。另外，相当于 SEQ ID NO：19 的多肽，可融合或缀合于上述抗体部分以促进纯化。例如一篇报道阐述了由人 CD4- 多肽的前两个结构域和哺乳动物免疫球蛋白的轻链或重链的恒定区的各种结构域组成的嵌合蛋白。(EP 394827；Traunecker 等，自然 331：84-86(1988))。融合或缀合于具有二硫键连的二聚体结构（由于 IgG 所致）的抗体的本发明多肽，也可比单体的分泌蛋白或其片段更有效地结合及中和其它分子 (Fountoulakis 等，生物化学杂志 270：3958-3964(1995))。在许多情况下，融合蛋白中的 Fc 部分对治疗和诊断是有利的，因此可例如改进药物动力学性质 (EP A232262)。或者，可在融合蛋白已表达，检测和纯化后缺失 Fc 部分。例如，如果融合蛋白用作免疫接种的抗原，Fc 部分可阻碍治疗和诊断。在药物开发中，例如人体蛋白如 hIL-5 以与 Fc 部分融合以进行高产量筛选分析而鉴别 hIL-5 的拮抗剂。（见 Bennett 等，分子识别杂志 8：52-58(1995)；Johanson 等，生物化学杂志 270：9459-9471(1995)）。

[0412] 另外，本发明的抗体或其片段可融合于标记序列，如与肽融合以促进纯化。在优选的上述方案中，标记氨基酸序列是 6 组氨酸肽，如 pQE 载体中提供的标记 (QIAGEN, Inc.，9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)，其中许多可以商购。如 Gentz 等，美国科学院院报 86：821-824(1989)，所述，6 组氨酸可以常规纯化融合蛋白。用于纯化的其它肽标记包括但非限于“HA”标记，其相当于衍生自流感血凝素蛋白的表位 (Wilson 等，细胞 37：767(1984))，和“flag”标记。

[0413] 本发明还涵盖了缀合于诊断或治疗剂的抗体或其片段。此抗体例如可诊断性地用于监测肿瘤的发育或进展,作为临床测试的一部分,以例如确定治疗方案的效果。将抗体偶联于可检测的物质可便于检测。可检测的物质例如包括各种酶,辅基,荧光物,发光物,生物发光物,放射性物质,使用各种正电子发射计算机化断层显象的正电子发射金属,和非放射性顺磁金属离子。可检测的物质可使用本领域已知方法直接偶联或缀合于抗体(或其片段),或间接地通过中间体(如本领域已知的接头)偶联或缀合于抗体(或其片段)。见例如美国专利 No. 4741900 阐述了可缀合于抗体的金属离子,其根据本发明可用作诊断剂。适当的酶例如包括辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,β-半乳糖苷酶,或乙酰胆碱酯酶;适当的辅基复合物例如包括链霉素亲和素/生物素亲和素/生物素;适当的荧光物包括伞形酮,荧光素,异硫氰酸荧光素,罗丹明,二氯三嗪胺,丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物例如包括鲁米诺;生物发光物例如包括荧光素酶,荧光素和水母蛋白;适当的放射性物质包括 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , 或 ^{99}Tc 。

[0414] 另外,抗体或其片段可缀合于治疗性组分如细胞毒素例如细胞抑制剂或杀细胞剂,治疗剂或放射性金属离子例如 α-发射体例如 ^{213}Bi 。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何制剂。例如包括 paclitaxol,细胞松弛素 B,短杆菌肽 D,溴化乙锭,吐根碱,丝裂霉素,表鬼臼毒,表鬼臼毒噻吩糖苷,长春新碱,长春花碱,秋水仙素,阿霉素,道诺红菌素,二羟炭疽菌素,mitoxantrone,光神霉素,放线菌素 D,1-脱氢睾酮,糖皮质激素,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,心得安,和嘌呤霉素及它们的类似物或同系物。治疗剂包括但非限于抗代谢物(例如氨甲喋呤,6-巯基嘌呤,6-硫代鸟嘌呤,阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶 decarbazine),烷化剂(例如二氯甲基二乙胺,thioepa 苯丁酸氮芥,苯丙氨酸氮芥,卡氮芥(BSNU)和环己亚硝脲(CCNU),cyclothosphamide,白消安,二溴甘露糖醇,链脲菌素,丝裂霉素 C,和二氯二胺顺铂(II)(DDP),蒽环类抗生素(例如道诺红菌素,(从前的道诺霉素)和阿霉素),抗生素(如道诺霉素(从前的放线菌素),博来霉素,光神霉素,氨基霉素(AMC)),和抗有丝分裂剂(如长春新碱和长春花碱)。

[0415] 本发明的缀合物可用于修饰给定的生物应答,治疗剂或药物组分不必限于传统的化疗剂。例如,药物组分可以是具有所需生物活性的蛋白质或多肽。这种蛋白质可例如包括毒素如相思豆毒蛋白,蓖麻毒蛋白,假单胞杆菌外毒素,或白喉毒素;蛋白质如肿瘤坏死因子,α-干扰素,β-干扰素,神经生长因子,血小板衍生的生长因子,组织纤溶酶原激活物,细胞程序死亡剂如 α-TNF, β-TNF, AIMI(见国际出版物 No. WO 97/33899), AIMII(见国际出版物 No. WO 97/34911), Fas 配体(Takahashi 等,免疫学研究 6:1567-1574(1994)), VEGI(见国际出版物 No. WO 99/23105), CD 40 配体,血栓形成(thrombotic)剂或抗血管生成剂例如制管张素或 endostatin;或生物应答修饰剂如淋巴因子,白细胞介素-1("IL-1"),白细胞介素-2(IL-2),白细胞介素-6(IL-6),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),粒细胞集落刺激因子(G-CSF),或其它生长因子。

[0416] 抗体也可附着于固体支持物,其特别用于靶抗原的免疫分析或纯化。这种固体支持物包括但非限于玻璃,纤维素,聚丙烯酰胺,尼龙,聚苯乙烯,聚氯乙烯,或聚丙烯。

[0417] 将这种治疗组分与抗体缀合的方法是熟知的,见例如 Arnon 等,“癌症治疗中药物免疫定向的单克隆抗体”,单克隆抗体与癌症治疗,Reisfeld 等(编辑)。P243-56(Alan R. Liss, Inc. 1985);Hellstrom 等,“药物输送的抗体”,控制的药物输送(第二版),

Robinson 等 (编辑), 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “癌症治疗中胞毒剂的抗体载体”, 单克隆抗体 84: 生物与临床应用, Pinchera 等 (编辑), P475-506 (1985); “癌症治疗中治疗性使用放射标记的抗体的分析, 结果及预期结果”, 癌症检测与治疗中的单克隆抗体, Balolwin 等, P303-16 (科学出版社 1985), 和 Thorpe 等, “抗体-毒素缀合物的制备与胞毒性”, 免疫学研究 62: 119-58 (1982)。

[0418] 或者, 抗体可与另一种抗体缀合形成抗体异源缀合物, 如 Segal 在美国专利 No. 4676980 中所述, 在此全文并入参考。

[0419] 有或无治疗性组分缀合于其的抗体, 单独或与胞毒因子和 / 或细胞因子组合施用可用于治疗。

[0420] 免疫分型

[0421] 本发明的抗体可用于细胞系和生物样品的免疫分型。本发明基因的翻译产物可用作细胞特异性标记, 或更特别地用作在特殊类型细胞的各个分化和 / 或成熟阶段不同表达的细胞标记。直接抗特异的表位或表位组合的单克隆抗体, 可以筛选表达标记的细胞群。可利用各种用单克隆抗体筛选表达标记的细胞群的方法, 包括用抗体包被的磁珠进行磁性分离, 用附着于固体基质 (即平板) 的抗体淘选, 及流式细胞计量术 (见例如美国专利 5985660; 和 Morrison 等, 细胞 96: 737-49 (1999))。

[0422] 这些方法用于筛选细胞的特殊群落, 如可以发现血癌 (即急性白血病人中的 MRD) 和移植的“非自身”细胞, 以预防移植物 / 宿主疾病 (GVHD)。或者, 这些方法可用于筛选能增殖和 / 或分化的造血干细胞和祖细胞, 这些细胞可见于人脐带血中。

[0423] 抗体结合分析

[0424] 本发明的抗体可通过本领域已知任何方法进行免疫特异性结合分析。可使用的免疫分析包括但非限于竞争性或非竞争性分析系统, 如用 Western 印迹分析, 放射性免疫分析, ELISA (酶联免疫吸附测定), “夹心”免疫分析, 免疫沉淀分析, 沉淀素反应, 凝胶扩散沉淀素反应, 免疫扩散分析, 凝集分析, 补体结合分析, 免疫放射分析, 荧光免疫分析, 蛋白 A 免疫分析, 等等。这种分析对本领域而言是常用的且熟知的 (见例如 Ausubel 等编辑, 1994, 分子生物学通用方法, 第一卷, John Wiley & Sons, Inc., 纽约; 在此全文并入参考)。以下简要地举例阐述了一些免疫分析 (但无限制之意)。

[0425] 免疫沉淀方法一般包括在补加蛋白质磷酸酶和 / 或蛋白酶抑制剂 (如 EDTA, PMSF, 抑蛋白酶肽, 钒酸钠) 的 RIPA 缓冲液 (1% NP-40 或 Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 0.01% SDS, 0.15M NaCl, 0.01M 磷酸钠, pH 7.2, 1% Trasyol) 中裂解细胞群, 将相应的抗体加入细胞裂解物中, 在 4℃ 保温一段时间 (如 1-4 小时), 将蛋白 A 和 / 或蛋白 G 琼脂糖凝胶珠加入细胞裂解物中, 在 4℃ 保温大约 1 小时或更长时间, 在裂解液中冲洗此珠, 并将其再悬浮于 SDS / 样品缓冲液中。相应抗体免疫沉淀特殊抗原的能力可通过例如 Western 印迹分析确定。本领域技术人员知道可修改参数以提高抗体与抗原的结合及降低背景 (如用琼脂糖凝胶珠预先清理细胞裂解物)。关于免疫沉淀方法的进一步阐述见例如 Ausubel 等编辑, 1994, 分子生物学通用方法, 第一卷, John Wiley & Sons, Inc., 纽约, 在 10.16.1 阐述。

[0426] Western 印迹分析一般包括制备蛋白质样品, 在聚丙烯酰胺凝胶中电泳蛋白质样品 (如根据抗原的分子量选用 8% -20% SDS-PAGE), 将蛋白质样品从聚丙烯酰胺凝胶中移至膜上, 如硝基纤维素, PVDF 或尼龙膜上, 在封闭液 (如具有 3% BSA 的 PBS 或脱脂乳) 中

封闭此膜,在冲洗缓冲液中冲洗此膜(如在 PBS-Tween 20 中),用在封闭液中稀释的一抗(相应抗体)封闭此膜,在冲洗缓冲液中冲洗此膜,用二抗(其识别一抗,如抗人抗体)封闭此膜,该二抗在封闭液中稀释,缀合于酶促底物(如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)或放射性分子(如 ^{32}P 或 ^{125}I),在冲洗液中冲洗此膜,并检测抗原的存在情况。本领域技术人员知道可修改参数以提高检测的信号及降低背景干扰。关于 Western 印迹方法的进一步阐述见例如 Ausubel 等编辑,1994,分子生物学通用方法,第一卷,John Wiley & Sons, Inc.,纽约,在 10.8.1 阐述。

[0427] ELISAs 包括制备抗原,用抗原包被 96 孔微滴定平板,向孔中加入与可检测化合物如酶底物(如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)缀合的相应抗体,保温一段时间,检测抗原的存在情况。在 ELISAs 中,相应抗体不必一定连接于可检测化合物;相反,缀合于可检测化合物的二抗(其识别一抗)可加入孔中。另外,可不用抗原包被孔而代之以用抗体包被孔。在这种情况下,缀合于可检测化合物的二抗可在向包被的孔中加入相应的抗原之后加入。本领域技术人员知道可对参数进行修改以提高检测信号,也知本领域已知的 ELISAs 的其它变化。关于 ELISA 的进一步阐述见例如 Ausubel 等编辑,1994,分子生物学通用方法,第一卷,John Wiley & Sons, Inc.,纽约,在 11.2.1 中阐述。

[0428] 抗体与抗原的结合亲和性和抗体-抗原相互作用的脱离率可通过竞争性结合分析确定。竞争性结合分析例如是放射性免疫分析,包括用相应的抗体在存在增加量的未标记抗原的情况下,温育标记的抗原(例如 ^3H 或 ^{125}I),并检测与标记的抗原结合的抗体。相应抗体与特殊抗原的亲和性和结合脱离率,可从 Scatchard 印迹分析所得数据中确定。与第二种抗体的竞争也可用放射免疫分析确定。在这种情况下,抗原用缀合于标记的化合物(如 ^3H 或 ^{125}I)的相应抗体,在存在增加量的未标记的另一种抗体的情况下温育。

[0429] 治疗用途

[0430] 本发明还涉及一种基于抗体的治疗方法,包括将本发明的抗体施用于动物,优选哺乳动物,更优选人,病人,以治疗一或多种所述疾病,功能失调或病理状况。本发明的治疗化合物包括但非限于本发明的抗体(包括其片段,类似物和衍生物),和编码本发明抗体(包括其片段,类似物和衍生物及所述抗独特型抗体)。本发明的抗体可用于治疗,抑制或预防与本发明多肽异常表达和/或活性相关的疾病。功能失调或病理状况,包括但非限于本文所述的任一或多种疾病,功能失调或病理状况(例如自身免疫性溶血性贫血,自身免疫性新生儿血小板减少,自发的血小板减少性紫癜,自身免疫性细胞减少症;溶血性贫血,抗磷脂综合征,皮炎,过敏性脑脊髓炎,心肌炎,复发性多发性软骨炎,风湿性心脏病,肾小球肾炎(如 IgA 肾病),多发性硬化,神经炎,眼色素层炎,多发性内分泌疾病,紫癜(如 Henloch-Schoenlein 紫癜),Reiter's 病,Stiff-Man 综合征,自身免疫性肺炎,Guillain-Barre 综合征,胰导素依赖型糖尿病,和自身免疫性眼炎,自身免疫性甲状腺炎,甲状腺功能低下(即 Hashimoto's 甲状腺炎),系统性红斑狼疮,Goodpasture's 综合征,天疱疮,受体自身免疫性例如 (a) Graves 病, (b) Myasthenia Gravis, 和 (c) 胰导素抗性,自身免疫性溶血性贫血,自身免疫性血小板减少性紫癜,风湿性关节炎,具有抗胶原抗体的 scleroderma,混合的结缔组织病,多发性肌炎/皮肤肌炎,恶性贫血,自发性 Addison's 病,不孕症,肾小球肾炎如原发性肾小球肾炎和 IgA 肾病,大疱性天疱疮, Sjogren's 综合征,糖尿病,和肾上腺素类药物抗性(包括治疗哮喘或膀胱纤维化的肾上腺素类药物抗

性),慢性活动性肝炎,原发性胆汁性肝硬化,其它内分泌腺病变,白癜风,血管炎,后 MI,心肌综合征,荨麻疹,遗传性过敏性皮炎,哮喘,炎症性肌病,和其它炎症,granulomatous,退化,及萎缩性功能失调)。

[0431] 在一特异的实施方案中,本发明的抗体用于治疗,抑制,预后,诊断或预防风湿性关节炎。

[0432] 在另一特异的实施方案中,本发明的抗体用于治疗,抑制,预后,诊断或预防系统性红斑狼疮。

[0433] 与本发明多肽异常表达和 / 或活性相关的疾病,失调或病理状况的治疗和 / 或预防,包括但非限于减轻与这些疾病,失调或病理状况相关的症状。本发明的抗体也可用于定向和杀死在其表面表达 Neutrokin- α 的细胞,或在其表面有 Neutrokin- α 结合的细胞。本发明的抗体可以本领域已知的或本文所述的药物适当组合物形式提供。

[0434] 本发明抗体可治疗性使用的方法包括局部或系统地在体内结合本发明的多核苷酸或多肽,或通过抗体的直接细胞毒性,如由补体 (CDC) 或效应器细胞 (ADCC) 介导。以下更详细地阐述了一些这样的方法。通过本文教导,本领域技术人员知道怎样使用本发明的抗体,以进行诊断,监测或治疗而不用过多的试验。

[0435] 本发明的抗体与其它单克隆或嵌合抗体,或与淋巴因子或造血生长因子 (如 IL-2, IL-3 和 IL-7) 组合使用是有利的,例如提高与抗体相互作用的效应器细胞的数目或活性。

[0436] 本发明的抗体可单独或其它类型治疗方案组合施用 (如放疗,化疗,激素疗法,免疫治疗,抗肿瘤剂,抗生素,和免疫球蛋白)。通常地,优选施用与患者相同物种的物种来源或物种反应性 (在抗体的情况下) 产物。因此,在一优选的实施方案中,人抗体,片段衍生物,类似物或核酸施用于人类患者以进行治疗或预防。

[0437] 优选使用高亲和性和 / 或强有力在体内抑制和 / 或中和抗本发明多肽或多核苷酸的抗体,以对与本发明的多核苷酸或多肽包括其片段相关的疾病进行免疫分析和治疗。这种抗体,片段或区域优选与本发明的多核苷酸或多肽包括其片段有亲和性。优选的结合亲和性包括解离常数或 K_d 小于 $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-5}M$, $5 \times 10^{-6}M$, $10^{-6}M$, $5 \times 10^{-7}M$, $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-9}M$, $10^{-9}M$, $5 \times 10^{-10}M$, $10^{-10}M$, $5 \times 10^{-11}M$, $10^{-11}M$, $5 \times 10^{-12}M$, $10^{-12}M$, $5 \times 10^{-13}M$, $10^{-13}M$, $5 \times 10^{-14}M$, $10^{-14}M$, $5 \times 10^{-15}M$, 和 $10^{-15}M$ 。

[0438] 基因治疗

[0439] 在一特异的实施方案中,施用包含编码抗体或其功能衍生物的序列的核酸,以通过基因疗法治疗,抑制或预防与本发明多肽异常表达和 / 或活性相关的疾病或功能失调。基因疗法指通过为治疗对象施用表达的或可表达的核酸进行的治疗。在本发明的此实施方案中,核酸产生介导治疗效应的其编码的蛋白质。

[0440] 本领域中任何适当的基因治疗的方法根据本发明可以使用。例如以下所述的方法。

[0441] 关于基因治疗的一般研究见 Goldspiel 等,临床药理学 12:488-505(1993);Wu 和 Wu,生物治疗 3:87-95(1991);Tolstoshev,药物毒性学分析研究 32:573-596(1993);Mulligan,科学 260:926-932(1993);和 Morgan 和 Anderson,生物化学分析研究 62:191-217(1993);May, TIB TECH 11(5):155-215(1993) 所述。可使用的本领域熟知的重组

DNA 技术见 Ausubel 等 (编辑), 分子生物学通用方法, John Wiley & Sons, NY(1993); 和 Kriegler, 基因转移和表达实验手册, Stockton 出版社, NY(1990) 所述。

[0442] 在一优选的实施方案中, 化合物包含编码抗体的核酸序列, 所述核酸序列是在适当宿主中表达抗体或其片段或嵌合蛋白或重或轻链的表达载体的一部分。尤其地, 这种核酸序列有可操纵地连于抗体编码区的启动子, 所述启动子是可诱导的或组成型的, 及任选地是组织特异性的。在另一特殊的实施方案中, 使用的核酸分子其中抗体编码序列和任何其它所需序列是位于在基因组所需位点中启动同源重组的区域两侧, 因此提供抗体编码核酸在染色体表达 (Koller 和 Smithies, 美国科学院院报 86 :8932-8935(1989); Zijlstra 等, 自然 342 :435-438(1989)。在特异的实施方案中, 表达的抗体分子是单链抗体; 或者, 核酸序列包括编码抗体重链和轻链或其片段的序列。

[0443] 核酸输送至患者可以是直接或间接的, 直接方式是患者直接暴露于核酸或携带核酸的载体, 间接方式是首先用核酸在体外转化细胞, 然后移植入患者体内。这两种方法分别已知为体内或源于体内的基因治疗。

[0444] 在一特异的实施方案中, 核酸序列是直接在体内施用的, 其在体内表达产生编码的产物。这可通过本领域已知的各种方法进行, 例如, 将它们构建为适当的核酸表达载体的一部分, 并施用以使它们成为细胞内物质, 例如通过用缺陷的或弱化的逆转录病毒或其它病毒载体感染 (见美国专利 No. 4980286), 或通过直接注射裸露的 DNA, 或使用微粒子轰击 (如基因枪; Biolistic, Dupont), 或用脂质或细胞表面受体或转染剂包被, 用脂质体, 微粒或微囊胶囊化, 或通过已知进入核的肽连接施用, 通过与配体连接施用进行受体介导的胞吞 (见例如 Wu 和 Wu, 生物化学杂志 262 :4429-4432(1987) 所述) (其可用于定向特异表达受体的细胞类型)。在另一实施方案中, 可形成核酸-配体复合物, 其中配体包含融合病毒肽以破坏核内体, 使核酸免于被溶酶体降解。在另一实施方案中, 核酸可通过定向-特异受体而在体内定向于特异吸收和表达的细胞 (见例如 PCT 出版物 WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 92/20221)。或者, 核酸可通过同源重组导入细胞内及掺入宿主细胞 DNA 中以表达 (Koller 和 Smithies, 美国科学院院报 86 :8932-8935(1989); Zijlstra 等, 自然 342 :435-438(1989))。

[0445] 在一特异的实施方案中, 使用含有编码本发明抗体的核酸序列的病毒载体。例如, 可使用逆转录病毒载体 (见 Miller 等, 酶学方法 217 :581-599(1993)。这些逆转录载体含有正确包装病毒基因组和整合 λ 宿主细胞 DNA 所必需的组分。将编码基因治疗中使用的抗体的核酸序列克隆 λ 一或多个载体中, 所述载体促进基因输送至患者体内。关于逆转录病毒的更详细阐述见于 Boesen 等, 生物治疗 6 :291-302(1994), 其阐述了使用逆转录载体将 *mdr 1* 基因输送至造血干细胞, 以产生对化疗更有抗性的干细胞。基因治疗中使用逆转录病毒载体的其它例证见于 Clowes 等, 临床研究杂志 93 :644-651(1994); Kiem 等, 血液 83 :1467-1473(1994); Salmons 和 Gunzberg, 人体基因治疗 4 :129-141(1993); 及 Grossman 和 Wilson, 遗传和发育中的通用观点 3 :110-114(1993)。

[0446] 腺病毒是可用于基因治疗的其它病毒载体。腺病毒是将基因输送至呼吸道上皮的特别适用的运载工具。腺病毒天然地感染呼吸道上皮, 导致轻微疾病。基于腺病毒的输送系统的其它目标是肝, 中枢神经系统, 内皮细胞和肌。腺病毒具有能感染未分化的细胞的优势。Kozansky 和 Wilson, 遗传和发育通用观点 3 :499-503(1993) 提出了一种基于腺病

毒的基因治疗方法。Bout 等, 人体基因治疗 5 :3-10(1994) 阐述了使用腺病毒载体将基因移至哮喘猴呼吸道上皮的腺病毒载体。基因治疗中腺病毒使用的其它参考见于 Rosenfeld 等, 科学 252 :431-434(1991) ;Rosenfeld 等, 细胞 68 :143-155(1992) ;Mastrangeli 等, 临床研究杂志 91 :225-234(1993) ;PCT 出版物 WO 94/12649 ;和 Wang 等, 基因治疗 2 :775-783(1995)。在一优选的实施方案中, 使用腺病毒载体。

[0447] 腺伴随病毒 (AAV) 为此已用于基因治疗中 (Walsh 等, 美国科学院院报 204 :289-300(1993) ;美国专利 No. 5436146)。

[0448] 另一种基因治疗方法包括通过如电穿孔, 脂转染, 磷酸钙介导的转染, 或病毒感染等方法, 将基因移至组织培养物中的细胞中。通常地, 转移方法包括将一可检测的标记移至细胞。然后分离已处理的并表达转移基因的细胞。接着将这些细胞施用于病人。

[0449] 在此实施方案中, 在体内施用所得重组细胞之前, 将核酸导入细胞中。这种导入可通过本领域已知的任何方法进行, 包括但非限于转染, 电穿孔, 微注射, 用含有核酸序列的病毒或噬菌体载体感染, 细胞融合, 染色体介导的基因转移, 微细胞介导的基因转移, 原生质球融合等。本领域已知许多将外源基因导入细胞的方法 (见例如 Loeffler 和 Beht, 酶学方法 217 :599-618(1993) ;Cohen 等, 酶学方法 217 :618-644(1993) ;临床药物治疗 29 :69-92m(1985), 根据本发明可以使用这些方法, 且不破坏受体细胞的基本发育和生理功能。所用方法应稳定地将核酸移至细胞, 以便核酸可由细胞表达且优选可由其细胞子代遗传和表达。

[0450] 所得重组细胞可通过本领域已知的各种方法施用于患者。重组血细胞 (如造血干细胞或祖细胞) 优选静脉内施用。所用细胞数量根据所需效应, 患者状态等而定, 且可由本领域技术人员确定。

[0451] 为进行基因治疗而将核酸导入其中的细胞涵盖了任何所需的适当的细胞类型, 包括但非限于上皮细胞, 内皮细胞, 角质形成细胞, 成纤维细胞, 肌细胞, 肝细胞, 血细胞如 T 淋巴细胞, B 淋巴细胞, 单核细胞, 巨噬细胞, 中性粒细胞, 嗜伊红性粒细胞, 巨核细胞, 粒细胞 ;各种干或祖细胞, 尤其造血干细胞或祖细胞, 如得自骨髓。脐带血, 外周血, 胎儿肝脏等的细胞。

[0452] 在优选的实施方案中, 用于基因治疗的细胞是患者自身的。

[0453] 在重组细胞用于基因治疗的实施方案中, 将编码抗体的核酸序列导入细胞, 由此它们可由细胞或细胞子代表达, 接着将重组细胞在体内施用进行治疗。在一特异的实施方案中, 使用于或祖细胞。任何可分离并在体外维持的干和 / 或祖细胞, 根据本发明的此实施方案均可使用 (见例如 PCT 出版物 WO 94/08598 ;Stemple 和 Anderson, 细胞 71 :973-985(1992) ;Rheinwald, 细胞生物学方法 21A :229(1980) ;和 Pittelkow 和 Scott, Mayo Clinic Proc. 61 :771(1986)。

[0454] 在特异的实施方案中, 为进行基因治疗所导入的核酸包含可操纵地连于编码区的可诱导的启动子, 由此核酸的表达可通过控制有或无适当的转录诱导子存在而控制。

[0455] 治疗或预防活性的证明

[0456] 本发明的化合物或药物组合物优选先在体外测试, 然后在体内测试所需治疗或预防活性, 之后再用于人体。例如, 体外分析证实化合物或药物组合物的治疗或预防活性包括化合物对细胞系或病人组织样品的效应。化合物或组合物对细胞系或病人组织样品的作用

可利用本领域已知的方法确定,包括但非限于花结形成分析和细胞裂解分析。根据本发明,可用于确定施用的特异的化合物是否是指明的体外分析,包括体外细胞培养分析,其中将病人组织样品在培养基中生长,暴露于或施用化合物,并观测这种化合物对组织样品的作用。

[0457] 治疗和 / 或预防性施用方法及组合物

[0458] 本发明提供了通过为治疗对象施用有效量的本发明的化合物或药物组合物,优选本发明抗体,而达到治疗,抑制和预防目的的方法。在一优选的实施方案中,化合物是基本纯化的(如基本没有限制其作用或产生非所需副作用的物质)。治疗对象优选是动物,包括但非限于是奶牛,猪,马,鸡,猫,狗等,优选是哺乳动物,且最优选是人。

[0459] 当化合物包含核酸或免疫球蛋白时,可使用的施用配方和方法如上所述;另外的适当配方和施用途径可选自以下所述内容。

[0460] 已知各种输送系统并可用于施用本发明的化合物,例如在脂质体中胶囊化,微粒,微囊,能表达化合物的重组细胞,受体介导的胞吞(见例如 Wu 和 Wu, 生物化学杂志 262 : 4429-4432(1987)),将核酸构建为逆转录病毒或其它载体的一部分等。导入方法包括但非限于皮内,肌肉,腹膜内,静脉内,舌下,鼻内,表皮或口服。化合物或组合物可通过常规途径施用,例如通过融合或大丸药注射,通过上皮或粘膜与皮肤分界线处吸收(如口腔粘膜,直肠和小肠粘膜等),且可与其它生物活性剂一起施用。可全身或局部施用。另外,可通过任何适当途径将本发明的药物化合物或组合物导入中枢神经系统,包括静脉内和动脉内注射;静脉内注射通过静脉内导管而简化,例如吸附于液槽如 Ommaya 液槽。也可经肺施用,如使用吸入器或喷雾器,及具有烟雾剂的配方。

[0461] 在一特异的实施方案中,需要在需要治疗的部位局部施用本发明的药物化合物或组合物;这可通过例如在手术期间局部灌注,局部应用,如在手术后与伤口敷料一起应用,通过注射,通过导管,通过栓剂,或通过植入而应用,所述植入体是有孔,无孔,或胶状物,包括膜,如 sialastic 膜,或纤维。优选地,当施用本发明的蛋白质包括抗体时,必须注意要使用蛋白质不吸收的物质。

[0462] 在另一实施方案中,化合物或组合物可在小泡尤其脂质体中输送(见 Langer, 科学 249 :1527-1533(1990); Treat 等,感染性疾病和癌症治疗中的脂质体, Lopez-Berestein 和 Fidler(编辑), Liss, 纽约, p353-365(1989); Lopez-Berestein, 如上, p317-327)。

[0463] 在另一实施方案中,化合物或组合物可在受控释放系统中输送。在一实施方案中,可使用泵(见 Langer, 如前; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 :201(1987); Buchwald 等, 外科学 88 :507(1980); Saudek 等, N. Engl. J. Med. 321 :574(1989))。在另一实施方案中,可使用聚合物(见控制释放的医学应用, Langer 和 Wise(编辑), CRC 出版社, Boca Raton, Florida(1974); 控制的药物生物利用度, 药品设计与生产, Smolen 和 Ball(编辑), Wiley, 纽约(1984); Ranger 和 Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 :61(1983); 也见于 Levy 等, 科学 228 :190(1985); During 等, 神经学研究 25 :351(1989); Howanot 等, Neurosurg 杂志 71 :105(1989))。在另一实施方案中,控制释放系统可置于治疗目标即脑的附近,这样只需要全身剂量的一部分(见例如, Goodson, 控制释放的医学应用, 如前, 第二卷, p115-138(1984))。

[0464] 其它控制释放系统见 Langer 所述(科学 249 :1527-1533(1990))。

[0465] 在其中本发明的化合物是编码蛋白质的核酸的一特异的实施方案中,核酸可在体内施用以启动其编码的蛋白质的表达,通过将其构建为适当的核酸表达载体的一部分并施用,使其成为细胞内的一部分,例如通过使用逆转录病毒载体(见美国专利 No. 4980286),或通过直接注射,或通过使用微粒轰击(如基因枪;Biolistic, Dupont),或用脂质或细胞表面受体或转染剂包被,或通过已知能进入核内的类同源框肽连接施用(见例如 Joliot 等,美国科学院院报 88:1864-1868(1991))等。或者,核酸可通过同源重组导入细胞内及掺入宿主细胞 DNA 中进行表达。

[0466] 本发明还提供了药物组合物。这种组合物包含治疗有效量的化合物,和药物合适的载体。在一特异的实施方案中,术语“药物合适的”指经联邦或政府结构允许的或美国药品管理结构所列的,或其它一般认为可用于动物尤其是人的物品。术语“载体”指与治疗剂一起施用的稀释剂,佐剂,赋形剂或运载体。这种药物载体可以是无菌液如水和油,包括石油,动物油,植物油或合成油,如花生油,大豆油,矿物油,芝麻油等。当药物组合物是经静脉内施用时,水是优选的载体。盐水和葡萄糖液和甘油液也可用作液体载体。适当的药物赋形剂包括淀粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,明胶,麦芽,水稻,面粉,石灰,二氧化硅凝胶,硬脂酸钠,单硬脂酸甘油, talc,氯化钠,脱脂乳,甘油,丙烯,二醇,水,乙醇等。如果需要,组合物也可含有少量的润湿剂或乳化剂,或 pH 缓冲剂。这些组合物可以是溶液,悬浮液,乳状液,片剂,丸剂,胶囊,粉末,持续释放的配方等。组合物可用传统的结合剂和载体如甘油三酯配制为栓剂。口服配方可包括标准载体如药物级别的甘露糖醇,乳糖,淀粉,硬脂酸镁,糖精钠,纤维素,碳酸镁等。适当的药物载体例如由 E. W. Martin 在“Remington's 药物科学”中所述。这种组合物含有治疗有效量的化合物,优选纯化形式的化合物,和适量的载体,以提供正确施用予患者的剂型。

[0467] 在一优选的实施方案中,组合物是根据常规制备适于静脉内施用于人体的药物方法配制的。典型地,静脉内施用的组合物是无菌等渗溶液。如果需要,组合物还可包括稳定剂和局麻剂如利诺卡因,以减轻注射部位的痛感。通常地,配料可单独或以单位剂量混合提供,例如在密封的容器中以无水的冻干粉末或无水浓缩物存在,所述容器如安瓿或表明活性剂数量的袋。当组合物通过灌注施用,其可用含有无菌药物级别的水或盐水的灌注瓶分液。当组合物通过注射施用,可用无菌注射用水或盐水的安瓿,以在施用之前混合配料。

[0468] 本发明的化合物可配制为中性的或盐形式。药物合适的盐包括与阳离子如产自盐酸,磷酸,乙酸,草酸,酒石酸等的阳离子,或与阴离子如产自氢氧化钠,氢氧化钾,氢氧化铵,氢氧化钙,氢氧化铁,异丙基胺,三乙胺,2-乙氨基乙醇,组胺,普鲁卡因等的阴离子形成的盐。

[0469] 有效地治疗,抑制和预防与本发明多肽的异常表达和/或活性相关的疾病或功能失调的本发明化合物的数量,可通过标准临床技术确定。另外,可任选地应用体外分析以助于鉴别最佳剂量范围。配方中应用的实际剂量也依赖于施用途径,疾病的严重程度而定,并应根据医生的诊断和病人的情况而定。有效剂量可通过从体外或动物模型试验系统中产生的剂量应答曲线中确定。

[0470] 就抗体而言,施用于病人的剂量为 0.1-100mg/kg 体重之间,更优选地,在 1-10mg/kg 体重之间。通常地,人抗体比其它物种的抗体在人体内的半衰期长,这是由于对外源多

肽的免疫应答所致。因此,可以施用较少剂量的人抗体,且施用频率也可较长。另外,本发明抗体的施用剂量和频率,通过对抗体加以修饰如脂化从而增强抗体的吸收和组织通透性(如入脑)而减少。

[0471] 本发明还提供了包含一或多个装有本发明药物组合物的一或多种配料的容器的药物包装或试剂盒。任选地与这种容器相关的是政府机构调节生产,使用或销售药物或生物制品所做的告示,该告示反映了许可的生产,使用或销售施用于人的生物制品或药物。

[0472] 诊断与成象

[0473] 与相应的肽特异结合的标记的抗体,及其衍生物和类似物,可用于诊断生地检测,诊断或监测量与本发明多肽异常表达和/或活性相关的疾病和/或功能失调。本发明提供了检测相应多肽异常表达的方法,包括(a)用特异于相应多肽的一或多种抗体,在个体的细胞或体液中分析相应多肽的表达,和(b)将此基因表达水平与标准基因表达水平相对比,从而与标准基因表达水平相对比,分析的多肽基因表达水平提高或降低表明异常表达。

[0474] 本发明提供了诊断功能失调的诊断分析,包括(a)用特异于相应多肽的一或多种抗体,在个体的细胞或体液中,分析相应多肽的表达,和(b)将此基因表达水平与标准基因表达水平相对比,从而与标准表达水平相比,分析的多肽基因表达水平的提高或降低表明特定的功能失调,就癌症而言,个体活检组织中存在相对高量的转录物可表示疾病发生的易患性,或可在真实临床症状出现之前提供检测疾病的方法,一更确定的诊断可使健康从业者较早地应用预防措施或大胆治疗,从而防止癌症的发生或进一步发展。

[0475] 本发明的抗体可用本领域技术人员已知的传统免疫组织学方法,用于在生物样品中分析蛋白质水平(见例如 Jalkanen 等,细胞生物学杂志 101:976-985(1985);Jalkanen 等,细胞生物学杂志 105:3087-3096(1987))。用于检测蛋白质基因表达的其它基于抗体的方法包括免疫分析,如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射性免疫分析(RIA)。本领域已知适当的抗体分析标记,包括酶标记如葡萄糖氧化酶;放射性同位素如碘(^{131}I , ^{125}I , ^{121}I),碳(^{14}C),硫(^{35}S) 氚(^3H),铟(^{115}mIn , ^{113}mIn , ^{112}In , ^{111}In),和锝(^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$),铪(^{201}Ti),镓(^{68}Ga , ^{67}Ga),钯(^{103}Pd),钼(^{99}Mo),氙(^{138}Xe),氟(^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru ;发光标记如 Luminol;和荧光标记如荧光素,和罗丹明,和生物素。

[0476] 可用本领域已知的方法标记本发明的抗体。这种方法包括但非限于使用双功能缀合剂(见例如美国专利 No. 5756065;5714631;5996239;5652361;5505931;5489425;5435990;5428139;5342604;5274119;4994560;和 5808003 所述,以上文献均全文并入参考)。

[0477] 本发明的一实施方案是在动物优选哺乳动物更优选在人体内,检测和诊断与相应多肽异常表达相关的疾病或功能失调。在一实施方案中,诊断方法包括(a)为诊断对象施用特异结合相应多肽的有效量的标记的分子,如通过非肠道,皮下或腹膜内施用;(b)在施用之后等待一段时间,使标记的分子在多肽表达的部位优先浓缩(并清除未标记的分子);(c)确定背景水平;和(d)检测诊断对象中标记的分子,这样检测的标记分子高于背景水平表明诊断对象有与相应多肽异常表达相关的特殊疾病或功能失调。背景水平可通过各种方法确定,包括将检测的标记分子数量与预先在特定系统中确定的标准值相对比。如本文所述,本发明特异的实施方案是使用本发明的抗体定量或定性浓缩 B 细胞系的细胞或单核细胞系的细胞。

[0478] 也如本文所述,本发明的抗体可用于治疗,诊断或预防具有免疫缺陷的个体,在一特异的实施方案中,本发明的抗体用于治疗,诊断和/或预防具有 CVID 或其亚型的个体。在另一实施方案中,本发明的抗体用于诊断,预防,治疗特征在于血清免疫球蛋白产生缺陷,复发性感染,和/或免疫系统功能失调的疾病。

[0479] 同样如本文所述,本发明的抗体可用于治疗,诊断或预测具有自身免疫疾病或功能失调的个体。在一特异的实施方案中,本发明的抗体用于治疗,诊断和/或预测具有系统性红斑狼疮或此疾病亚型的个体。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体用于治疗,诊断和/或预测具有风湿性关节炎或其亚型的个体。

[0480] 本领域应知治疗对象的大小和所用的显象系统将确定需要产生诊断图象的显象组分的数量。在放射性同位素组分的情况下,就人而言,注射的放射性数量正常在大约 5-20 毫居里 ^{99m}Tc 之间。标记的抗体或抗体片段然后在含有特异蛋白质的细胞中优先积累。体内肿瘤显象见于 S. W. Burchiel 等,“放射标记的抗体及其片段的免疫药动学”(肿瘤显象中第 13 章:癌症的放射化学检测, S. W. Burchiel 和 B. A. Rhocles 编辑, Masson Publishing Inc. (1982)) 所述。

[0481] 根据一些变量,包括所用标记类型和施用模式,施用后间隔的时间是 6-48 小时,或 6-24 小时或 6-12 小时,间隔一定时间是使标记的分子优先在目标位浓缩,及将未结合的标记分子清除于背景水平。在另一实施方案中,施用后的时间间隔为 5-20 天或 5-10 天。

[0482] 在一实施方案中,通过重复诊断疾病的方法对疾病或功能失调加以监测,例如在初始诊断一个月之后,6 个月之后,一年之后等。

[0483] 在病人体内标记分子的存在与否可用本领域已知的体内扫描方法检测。这些方法依赖于所用标记的类型。熟练技术人员能确定检测特殊标记的适当方法。可用于本发明诊断方法中的方法和仪器包括但非限于计算机化断层显象 (CT),全身扫描如正电子发射断层扫描 (PET),核磁共振 (MRI) 和超声。

[0484] 在一特异的实施方案中,分子用放射性同位素标记并在病人体内用辐射应答性外科仪器检测 (Thurston 等,美国专利 No. 5441050)。在另一实施方案中,分子用荧光化合物标记,并在病人体内用荧光应答扫描仪检测,在另一实施方案中,分子用发射正电子的金属标记,并在病人体内用正电子发射断层扫描检测。在另一实施方案中,分子用顺磁性标记物标记,并在病人体内用核磁共振 (MRI) 检测。

[0485] 试剂盒

[0486] 本发明提供了能用于上述方法中的试剂盒。在一实施方案中,试剂盒包括一或多个容器,其中含有本发明的抗体,优选纯化的抗体,在一特异的实施方案中,本发明的试剂盒含有基本分离的多肽,该多肽包含与试剂盒中的抗体特异性免疫反应的表位。优选地,本发明的试剂盒还包含不与相应的多肽反应的对照抗体。在另一特异的实施方案中,本发明的试剂盒包含识别本发明多肽的相同和/或不同序列或区域的两或多种抗体(单克隆和/或多克隆)。在另一特异的实施方案中,本发明的试剂盒包含检测抗体与相应多肽结合的设施(例如抗体可与可检测的底物缀合,如荧光化合物,酶促底物,放射性化合物,或发光化合物,或者识别第一种抗体的第二种抗体可与可检测底物缀合)。

[0487] 在本发明的另一特异实施方案中,试剂盒是用于筛选含有特异抗增殖性和/或癌症多核苷酸和多肽的抗体的血清的诊断性试剂盒。这种试剂盒可包括不与相应多肽反应的

对照抗体。这种试剂盒可包括基本分离的多肽抗原,该抗原包含与至少一种抗多肽抗原的抗体特异性免疫反应的表位。另外,这种试剂盒包括检测所述抗体与抗原结合的手段(例如抗体可缀合于荧光化合物如可通过流式细胞术检测的荧光素或罗丹明)。在特异的实施方案中,试剂盒可包括重组产生的或化学合成的多肽抗原。试剂盒的多肽抗原也可附着于固体支持物。

[0488] 在一更特异的实施方案中,上述试剂盒的检测手段包括所述多肽抗原附着的固体支持物,这种试剂盒也可包括未附着的受体标记的抗人抗体。在此实施方案中,抗体与多肽抗原的结合可通过所述受体标记的抗体的结合而检测。

[0489] 在另一实施方案中,本发明包括用于筛选含有本发明多肽抗原的血清的诊断试剂盒。此诊断试剂盒包括与多核苷酸或多肽抗原特异性免疫反应的基本分离的抗体,及检测多核苷酸或多肽抗原与抗体结合的手段。在一实施方案中,抗体附着固体支持物,在一特异的实施方案中,抗体可以是单克隆抗体。试剂盒中的检测手段可包括第二种标记的单克隆抗体。或者,检测是可包括标记的竞争抗原。

[0490] 在一诊断构型中,测试血清与固相试剂反应,此固相试剂具有通过本发明的方法获得的表面结合抗原。在特异抗原的抗体与试剂结合及通过冲洗除去结合的血清组分之后,试剂与受体标记的抗人抗体反应,受体与试剂结合比例是固体支持物上抗抗原的抗体数量。再一次冲洗试剂除去未结合的标记的抗体,并确定与试剂相关的受体的数量。特别地,受体是一种酶,其通过在存在适当的荧光,发光或比色底物的情况下温育固相而检测(Sigma, St. Louis, Mo)。

[0491] 上述分析中的固体表面试剂是通过本领域已知的将蛋白质附着于固体支持物的方法制备的,如聚合物珠,浸渍条,96孔平板或滤膜。这些附着方法一般包括蛋白质非特异性吸附支持物,或蛋白质通过游离氨基共价附着于固体支持物上的化学反应基因,如活性的羧基,羟基或醛基。或者,链霉亲和素包被的平板可用于与生物素酰化的抗原的缀合中。

[0492] 因此,本发明提供了进行这种诊断方法的分析系统或试剂盒。此试剂盒一般包括具有表面结合重组抗原的支持物,和受体标记的抗人抗体,以检测表面结合的抗抗原的抗体。

[0493] 本发明还涉及作为本发明多肽的激动剂或拮抗剂的抗体。例如,本发明包括部分或全部破坏受体/配体与本发明多肽相互作用的抗体,这包括受体特异性抗体和配体特异性抗体两种。其中受体特异性抗体不阻止配体结合但阻止受体活化。受体活化(即信号化)可通过本文所述的或本领域已知的方法确定。即阻止配体结合又阻止受体活化的受体特异性抗体也包括在内。另外,还包括结合配体及阻止配体与受体结合的中性抗体,以及结合配体从而阻止受体活化,但不阻止配体与受体结合的抗体,另外包括活化受体的抗体。这些抗体可作为激动剂,通过配体介导的受体活化影响全部或部分生物活性。抗体可特异地作为包含本文所述特异活性的生物活性的激动剂或拮抗剂。另外包括的是无论 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 是否与 Neutrokin- α 受体结合,而结合 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 的抗体。这些抗体作为 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 激动剂,在存在这些抗体的情况下,提高对 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 与 Neutrokin- α 受体结合应答的细胞增殖。上述抗体激动剂可用本领域已知方法产生。见例如 WO 96/40281;美国专利 5811097;Deng, B. 等血液 92(6):1981-1988(1998);

Chen, Z. 等, 癌症研究 58(16) :3668-3678(1998) ;Harrop, J. A. 等, 免疫学杂志 161(4) :1786-1794(1998) ;Zhu, Z. 等, 癌症研究 58(15) :3209-3214(1998) ;Yoon, D. Y. 等, 免疫学杂志 160(7) :3170-3179(1998) ;Prat, M. 等, 细胞科学杂志 111(Pt2) :237-247(1998) ;Ptard, V. 等, 免疫学方法杂志 205(2) :177-190(1997) ;Lautard, J. 等, 细胞因子 9(4) :233-241(1997) ;Carlson, N. G. 等, 生物化学杂志 272(17) :11295-11301(1997) ;Taryman, R. E. 等, 神经元 14(4) :755-762(1995) ;Muller, Y. A. 等, 结构 6(9) :1153-1167(1998) ;Bartunek, P. 等, 细胞因子 8(1) :14-20(1996) 所述(所述文献的全文并入参考)。

[0494] 现已产生抗 Neutrokin- α 的至少 14 个单克隆抗体, 这些单克隆抗体称为 12D6, 2E5, 9B6, 1B8, 5F4, 9A5, 10G12, 11G12, 16B4, 3D4, 16C9, 13D5, 15C10, 和 12C5。对这些抗体的初步分析表明在 Western 印迹分析中及当 Neutrokin- α 蛋白质与 ELISA 平板结合时, 均与 Neutrokin- α 结合。然而对 12D6, 2E5, 9B6, 1B8, 5F4, 9A5, 10G12, 11G12 和 16B4 抗体的进一步分析表明, 只有 12D6, 9B6, 2E5, 10G12, 9A5 和 11G12 抗体与膜结合形式的 Neutrokin- α 结合。因此, 已确定产生的抗 Neutrokin- α 的单克隆抗体的亚型, 只与膜结合形式的 Neutrokin- α 结合(即此亚型不与相当于 SEQ ID NO:2 的 134-285 位氨基酸的可溶形式的 Neutrokin- α 结合), 如本文所述, 其限于在单核细胞和树状细胞上表达。

[0495] 现已发现 9B6 抗体特异地结合膜结合形式的 Neutrokin- α , 但不与可溶形式的 Neutrokin- α 结合。

[0496] 抗体 9B6 的表位图表明此抗体特异地结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Ser171-Phe194 氨基酸残基中的氨基酸序列。更特别地, 表位图表明抗体 9B6 特异地结合包含 SEQ ID NO:2 的 Lys 173-Lys188 氨基酸残基的肽。

[0497] 相反, 已发现抗体 16C9 和 15C10 结合可溶形式的 Neutrokin- α (即 SEQ ID NO:2 的 134-285 位氨基酸), 并抑制 Neutrokin- α 介导的 B 细胞增殖。见例如实施例 10, 已发现 15C10 抗体抑制 Neutrokin- α 与其受体的结合。抗体 15C10 的表位图已表明此抗体特异地结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Glu223-Tyr246 位氨基酸残基中的氨基酸序列。更特别地, 表位图表明抗体 15C10 特异地结合包含 SEQ ID NO:2 的 Val227-Asn242 位氨基酸残基的肽。抗体 15C10 也特异地结合包含 SEQ ID NO:2 的 Phe 230-Cys245 位氨基酸残基的肽。

[0498] 如上所述, 现已制备抗 Neutrokin- α 的单克隆抗体。产生 9B6 和 15C10 抗体的杂交瘤保藏在 ATCC 中, 保藏号分别为 PTA-1158 和 PTA-1159。在一实施方案中, 本发明的抗体具有一或多种与由保藏号 PTA-1158 或 PTA-1159 的杂交瘤细胞系分泌的抗体相同的生物特性。“生物特性”是指抗体的体外或体内活性或性质, 例如结合 Neutrokin- α 的能力(如 SEQ ID NO:2 的多肽, 成熟形式的 Neutrokin- α , 膜结合形式的 Neutrokin- α , 可溶形式的 Neutrokin- α (SEQ ID NO:2 的 134-285 位氨基酸), 和 Neutrokin- α 的抗原区和/或表位区), 基本阻断 Neutrokin- α 与其受体结合的能力, 或阻断 Neutrokin- α 介导的生物活性的能力(如刺激 B 细胞增殖和免疫蛋白产生)。任选地, 本发明的抗体结合与所特指的至少一种抗体相同的表位。这种表位结合可用本领域已知方法常规确定。

[0499] 因此, 在一实施方案中, 本发明提供了特异结合膜结合形式而不结合可溶形式 Neutrokin- α 的抗体。这些抗体的用途包括但不限于作为诊断探针, 鉴别和/或分离表达膜结合形式 Neutrokin- α 的单核细胞系。例如, 在活化的单核细胞上, 膜结合形式的 Neutrokin- α 表达提高, 因此, 本发明涵盖的抗体可用于检测和/或确定活化的单核细胞

的水平。另外,只结合膜结合形式 Neutrokin- α 的抗体可用于将毒素定向于致瘤性的,预致瘤性的,和 / 或表达膜结合形式 Neutrokin- α 的其它细胞 (如单核细胞和树状细胞)。

[0500] 在另一实施方案中,本发明的抗体只特异结合可溶形式的 Neutrokin- α (SEQ ID NO :2 的 134-285 位氨基酸)。这些抗体的用途包括但非限于用作诊断探针以分析生物样品中可溶形式的 Neutrokin- α ,及用作治疗剂,将毒素导向表达 Neutrokin- α 受体的细胞 (如 B 细胞),和 / 或降低或阻断体外或体内 Neutrokin- α 介导的生物活性 (如刺激 B 细胞增殖和 / 或免疫球蛋白产生)。

[0501] 本发明还提供了特异地结合膜结合及可溶形式 Neutrokin- α 的抗体。

[0502] 如上所述,本发明涵盖了抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在体内和 / 或体外结合其受体的能力的抗体,在一特异的实施方案中,本发明的抗体抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在体外结合其受体的能力的抗体,在另一特异的实施方案中,本发明的抗体抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在体内结合其受体的能力的抗体。这种抑制可用本文所述的或本领域已知的方法分析。

[0503] 本发明还涵盖了特异结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV,但不抑制 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在体外和 / 或体内结合其受体能力的抗体。在一特异的实施方案中,本发明的抗体不抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在体外结合其受体的能力。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体不抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在体内结合其受体的能力。

[0504] 如上所述,本发明涵盖了抑制或降低在体外和 / 或体内 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的生物活性的抗体。在一特异的实施方案中,本发明的抗体抑制或降低在体外 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的 B 细胞增殖。这种抑制可通过本文所述或本领域已知的常规修饰 B 细胞增殖的方法加以分析。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在体内介导的 B 细胞增殖。在一特异的实施方案中,本发明的抗体是 15C10,或其人化形式。在另一优选的特异实施方案中,抗体是 16C9,或其人化形式。因此,在本发明特异的实施方案中,16C9 和 / 或 15C10 抗体或其人化形式,用于结合可溶形式的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV,和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,从而抑制 (部分或完全地) B 细胞增殖。

[0505] 或者,本发明还涵盖了特异结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV,但不抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的体外和 / 或体内生物活性 (如刺激 B 细胞增殖) 的抗体。在一特异的实施方案中,本发明的抗体不抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的体外生物活性。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体不抑制或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的体内生物活性。在一特异的实施方案中,本发明的抗体是 9B6,或其人化形式。

[0506] 如上所述,本发明涵盖了在体外的和 / 或体内特异结合与所特指的至少一种抗体相同的表位的抗体。

[0507] 在一特异的实施方案中,本发明的抗体在体外特异结合包含于 SEQ ID NO :2 的 Ser171-Phe194 位氨基酸残基中的氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体内特异结合包含于 SEQ ID NO :2 的 Ser171-Phe194 位氨基酸残基中的氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体外特异结合包含于 SEQ ID NO :2 的 Lys173-Lys188

位氨基酸残基中的氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体内特异结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Lys173-Lys188 位氨基酸残基中的氨基酸序列。

[0508] 在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体外特异结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Glu223-Tyr 246 位氨基酸残基中的氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体内特异结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Glu 223-Tyr 246 位氨基酸残基中氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体外特异结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Val227-Asn242 位氨基酸残基中氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体内特异结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Val227-Asn242 位氨基酸残基中的氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体外特异结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Phe 230-Cys245 位氨基酸残基中的氨基酸序列。在另一特异的实施方案中,本发明的抗体在体内特异结合包含于 SEQ ID NO:2 的 Phe230-Cys245 位氨基酸残基中的氨基酸序列。

[0509] 本发明还提供了竞争性抑制由保藏的 PTA-1159 产生的 9B6 单克隆抗体与本发明多肽,优选 SEQ ID NO:2 多肽,更优选具有 SEQ ID NO:2 的 Ser171-Phe194 位残基的氨基酸序列的多肽结合的抗体。竞争性抑制可通过本领域已知任何方法确定,例如用本文所述的竞争性结合分析法。在优选的实施方案中,此抗体竞争性抑制 9B6 单克隆抗体与 SEQ ID NO:2 多肽、优选具有 SEQ ID NO:2 的 Ser171-Phe194 位氨基酸序列的多肽结合的至少 95%,90%,85%,80%,75%,70%,60%,50%。

[0510] 本发明还提供了竞争性抑制由保藏的 PTA-1158 杂交瘤产生的 15C10 单克隆抗体,与本发明的多肽,优选 SEQ ID NO:2 多肽,更优选具有 SEQ ID NO:2 的 Glu223-Tyr246 位氨基酸序列的多肽的结合的抗体。在优选的实施方案中,此抗体竞争性抑制 15C10 单克隆抗体与 SEQ ID NO:2 多肽,优选具有 SEQ ID NO:2 的 Glu223-Tyr246 位氨基酸序列的多肽结合的至少 95%,90%,85%,80%,75%,70%,60%,50%。

[0511] 本发明另外的实施方案涉及 9B6 抗体及表达此抗体的杂交瘤细胞系。表达 9B6 抗体的杂交瘤细胞系于 2000 年 1 月 7 日保藏在 ATCC 中,保藏号为 PTA-1159。在一优选的实施方案中,抗体 9B6 是人化的。

[0512] 本发明另外的实施方案涉及 15C10 抗体及表达此抗体的杂交瘤细胞系。表达抗体 15C10 的杂交瘤细胞系于 2000 年 1 月 7 日保藏在 ATCC 中,保藏号为 PTA-1158。在一优选的实施方案中,抗体 15C10 是人化的。

[0513] 在一特异的实施方案中,上述特异的抗体是用本文所述的或本领域已知的方法人化的,然后用作治疗剂。

[0514] 在另一特异的实施方案中,上述任一抗体是以可溶形式使用的。

[0515] 在另一特异的实施方案中,上述任一抗体是与毒素或标记(如前述)缀合的。这种缀合的抗体用于杀死特殊的细胞群,或定量特殊的细胞群。在一优选的实施方案中,这种缀合的抗体用于杀死在其表面表达 Neutrokin- α 受体的 B 细胞。在另一优选的实施方案中,这种缀合的抗体用于定量在其表面表达 Neutrokin- α 受体的 B 细胞。

[0516] 在另一特异的实施方案中,上述任一抗体是与毒素或标记(如前述)缀合的。这种缀合的抗体用于杀死特殊的细胞群或定量特殊的细胞群。在一优选的实施方案中,这种缀合的抗体用于杀死表达膜结合形式的 Neutrokin- α 的单核细胞。在另一优选的实施方案中,这种缀合的抗体用于定量表达膜结合形式的 Neutrokin- α 的单核细胞。

[0517] 本发明的抗体还具有治疗和 / 或预防用途, 包括但不限于活化单核细胞或阻断单核细胞活化和 / 或杀死单核细胞系, 此单核细胞在其表面表达膜结合形式的 Neutrokin- α (例如治疗, 预防和 / 或诊断骨髓白血病, 单核细胞基础上的白血病和淋巴瘤, 单核细胞增多症, 单核细胞减少症, 风湿性关节炎, 和其他与活化的单核细胞相关的病症或病理状态)。在一特异的实施方案中, 本发明的抗体固定补体。在其它特异的实施方案中, 本发明的抗体 (或其片段) 与异源多肽或核酸结合 (例如毒素, 如结合并活化内源胞毒性效应器系统的化合物, 和放射性同位素; 及胞毒性药物)。

[0518] 在另一实施方案中, 产生了一或多种单克隆抗体, 它们识别或结合 Neutrokin- α 和 / 或其突变蛋白, 但不识别或结合 Neutrokin- α SV 和 / 或其突变蛋白。在一相关的实施方案中, 产生了一或多种单克隆抗体, 其中它们识别或结合 Neutrokin- α 和 / 或其突变蛋白, 但不识别或结合 Neutrokin- α 和 / 或其突变蛋白。

[0519] 如上所述, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的抗体, 可用于产生“模拟”Neutrokin- α 的抗独特型抗体, 使用的是本领域技术人员熟知的方法 (见例如 Greenspan & Bona, FASEB 杂志 7(5):437-444(1989), 和 Nissionff, 免疫学杂志 147(8):2429-2438(1991)。例如, 结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 及竞争性抑制 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多聚体和 / 或与配体结合的抗体, 可用于产生“模拟”Neutrokin- α TNF 多聚体化和 / 或结合结构的抗独特型抗体, 从而结合并中和 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 和 / 或其配体。这种中和抗独特型抗体或其 Fab 片段, 可用于治疗方案中以中和 Neutrokin- α 配体。例如, 这种抗独特型抗体可用于结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV, 或结合在 B 细胞表面的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体, 从而阻断 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的 B 细胞活化, 增殖和 / 或分化。

[0520] 免疫系统相关疾病的诊断

[0521] Neutrokin- α 在肾、肺、外周血白细胞, 骨髓, T 细胞淋巴瘤, B 细胞淋巴瘤, 活化的 T 细胞, 胃癌, 平滑肌, 巨噬细胞, 和脐血组织及单核细胞系的特殊细胞中表达。另外, Neutrokin- α SV 在初始树状细胞中表达。另外, Neutrokin- α 在以下的非造血性肿瘤细胞系的细胞表面表达: 结肠癌 HCT 116(ATCC 保藏号 NO. CCL-247) 和 HT-29(ATCC 保藏号 NO. HTB-38); 结肠腺癌 Caco-2(ATCC 保藏号 NO. HTB-37), COLO 201(ATCC 保藏号 NO. CCL-224) 和 WiDr(ATCC 保藏号 NO. CCL-218); 乳腺癌 MDA-MB-231(ATCC 保藏号 NO. HTB-26); 膀胱鳞癌 SCaBER(ATCC 保藏号 NO. HTB-3); 膀胱癌 HT-1197(ATCC 保藏号 NO. CRL-1473); 肾癌 A-498(ATCC 保藏号 NO. HTB-44); Caki-1(ATCC 保藏号 NO. HTB-46), 和 Caki-2(ATCC 保藏号 NO. HTG-47); 肾 Wilms 肿瘤 SK-NEP-1(ATCC 保藏号 NO. HTB-48); 和胰腺癌 Hs766T(ATCC 保藏号 NO. HTB-134); MIA PaCa-2(ATCC 保藏号 NO. CRL-1420) 和 SU. 86. 86(ATCC 保藏号 NO. CRL-1837)。就许多免疫系统相关的疾病而言, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因表达水平与标准水平相比的变化 (提高或降低), 可在取自具有这种疾病的个体的免疫系统组织或其它细胞或体液 (如血清, 血浆, 尿液, 滑液或脑脊液) 中检测, “标准”Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因表达水平, 是在取自无免疫系统疾病的个体的免疫系统组织或体液中的表达水平。因此, 本发明提供了在诊断免疫系统疾病期间使用的一种诊断方法, 包括在取自个体的免疫系统组织或其它细胞或体液

中,测定编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的基因的表达水平,并与标准 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因表达水平相对比,此基因表达水平提高或降低表明有免疫系统疾病或正常活化,增殖,分化和 / 或死亡。

[0522] 特别地,据信在某些患有癌症的哺乳动物的组织中,与“标准”水平相比,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽及编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 和 mRNA 的表达水平明显提高或降低。另外,据信在这种患有癌症的哺乳动物的一些体液(如血清,血浆、尿液,和脑脊液)或细胞或组织中,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的表达水平与无癌症的相同物种的血清相对比所表现的提高或降低,可以检测。

[0523] 例如,如本文所述,Neutrokin- α 在单核细胞系的细胞中高度表达。因此,本发明的多核苷酸(如互补于全部或部分 Neutrokin- α mRNA 和 / 或 Neutrokin- α SV mRNA 的多核苷酸序列)和抗本发明多肽的抗体(及抗体片段),可用于定量或定性在其表面表达 Neutrokin- α 的单核细胞系的细胞(如单核细胞性白血病细胞)的浓度。这些抗体另外在检测 Neutrokin- α 基因表达水平异常,或 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的结构和 / 或时序,组织,细胞或亚细胞定位中的异常中有诊断用途。这些诊断分析可在体内或体外进行,例如在血液样品,活检组织或尸检组织中进行。

[0524] 另外,如本文所述,Neutrokin- α 受体初始在 B 细胞系的细胞上表达。因此,本发明的 Neutrokin- α 多肽(包括标记的 Neutrokin- α 多肽和 Neutrokin- α 融合蛋白),和抗本发明多肽的抗 Neutrokin- α 抗体(包括抗 Neutrokin- α 抗体的片段),可用于定量或定性在其表面表达 Neutrokin- α 受体的 B 细胞系细胞(如 B 细胞相关的白血病或淋巴瘤细胞)的浓度。这些 Neutrokin- α 多肽和抗体另外在检测 Neutrokin- α 受体基因表达水平异常,或 Neutrokin- α 受体的结构和 / 或时序,组织,细胞或亚细胞定位中的异常,和 / 或诊断与 Neutrokin- α 相关的信号途径中的活性 / 缺陷中,有诊断用途。这些诊断分析可在体内或体外进行,例如在血液样品或活检组织用本文所述的或本领域已知的方法进行。

[0525] 在一实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,或 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的激动剂或拮抗剂(如抗 Neutrokin- α 和 / 或抗 Neutrokin- α SV 的抗体),用于治疗,预防,诊断或预测患有免疫缺陷的个体。

[0526] 可以用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α 多核苷酸或多肽,或 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 激动剂或拮抗剂(如抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的抗体)治疗,预防,诊断和 / 或预测的免疫缺陷包括但不限于一或多种选自以下的免疫缺陷:X 连锁的重度联合免疫缺损(SCID),常染色体 SCID;腺苷脱氨酶缺陷(ADA 缺陷),X 连锁的丙种球蛋白缺乏症,(XLA),Bruton's 病,先天性丙种球蛋白缺乏症,X 连锁的婴儿丙种蛋白缺乏症,获得性丙种球蛋白缺乏症,成人发作的丙种球蛋白缺乏症,晚期发作的丙种球蛋白缺乏症,异常 γ 球蛋白血症,低 γ 球蛋白血症,丙种球蛋白缺乏症,普通可变量免疫缺陷(CVID)(获得性),Wiskott-Aldrich 综合征(WAS),X 连锁的高 IgM 免疫缺陷,非 X 连锁的高 IgM 免疫缺陷,选择性 IgA 缺陷,IgG 亚类缺陷(有或无 IgA 缺陷),正常或提高的 IgS 的抗体缺陷,胸腺瘤免疫缺陷,Ig 重链缺失,k 链缺损,B 细胞淋巴增殖性疾病(BLPD),选择性 IgM 免疫缺陷,隐性丙种球蛋白缺乏症(Swiss 型),网状细胞发育

不全,新生儿嗜中性白细胞减少症,重度同类白细胞减少,免疫缺陷性胸腺淋巴组织发育不全-发育不全或发育异常,共济失调-毛细血管扩张,短肢侏儒症,X连锁的淋巴增殖综合征(XLP),联合 IgS 免疫缺陷的 Nezelof 综合征,嘌呤核苷酸磷酸酶缺陷(PNP),MHC II 类缺陷(Bare 淋巴细胞综合征),和重度联合免疫缺陷。

[0527] 根据此实施方案,患有免疫缺陷的个体与无免疫缺陷的个体相比,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的水平异常地低。本文所述的或本领域已知的任何方法均可以用于检测本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽(如 FACS 分析或 ELISA 检测及杂交或 PCR 检测),及用于确定本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽在生物样品中的表达模式。

[0528] 患有免疫缺陷的人的生物样品特征是与无免疫缺陷个体中观察到的结果相对比,其 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的表达水平低。因此,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,和 / 或其激动剂或拮抗剂,可根据本发明的方法用于诊断和 / 或预测免疫缺陷。例如,可分析得自怀疑患有免疫缺陷的人的生物样品(“目标”)的本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽的相关表达水平。然后将本发明的一或多个这些分子的表达水平与相同分子在已知无免疫缺陷的人体内的表达水平相对比。在得自目标和对照样品之间,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽,和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂的表达水平明显不同,提示目标患有免疫缺陷。

[0529] 在另一实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,或其激动剂或拮抗剂(如抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的抗体),用于治疗,诊断和 / 或预测患有普通可变量免疫缺陷疾病,(CVID,也称作获得性丙种球蛋白缺乏症,和获得性低丙种球蛋白血症)或其亚类疾病的个体。根据此实施方案,患者 CVID 或其亚类的个体表现为当与无 CVID 的个体相对比时,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体在其 B 细胞和 / 或单核细胞上的表达水平异常。本文所述的及本领域已知的任何方法可用于检测本发明的 Neutrokin- α 多核苷酸或多肽和 / 或其受体多肽(例如检测多肽的 FACS 分析或 ELISA,及检测多核苷酸的杂交或 PCR 方法),并用于确定本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽及其受体多肽,在含有至少单核细胞或其一些组分(如 RNA)的样品中,与在含有至少 B 细胞或其组分(如 RNA)的样品中,不同的表达模式。在确定在至少含有单核细胞或其一些组分(如 RNA)的样品中,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽表达增强,及确定在至少含有 B 细胞或其一些组分(如 RNA)的样品中,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽表达水平低于正常的情况下,此样品可提示患有 CVID(即获得性丙种球蛋白缺乏症,或获得性低丙种球蛋白血症)。

[0530] 患有 CVID 的人特征是当与在无 CVID 的人体中观测的结果相对比时,Neutrokin- α 及其受体(NAR)在外周血或循环血 B 细胞中表达水平平均高。相反,未患 CVID 的人的特征是在外周或循环血 B 细胞中 Neutrokin- α 表达水平低,而 NAR 表达水平高。因此,本发明的 Neutrokin- α , Neutrokin- α SV 多肽和 / 或 NAR 多肽,多核苷酸,和 / 或其激动剂或拮抗剂,可根据本发明的方法用于此 CVID 亚型的不同诊断当中,例如,对得自疑患有 CVID 的人(目标)的外周血 B 细胞样品进行分析本发明 Neutrokin- α ,

Neutrokin- α SV 和 / 或 NAR 多核苷酸和 / 或多肽的相关表达水平。将本发明的一个或多个这些分子的表达水平与相同分子在已知无 CVID 的人体 (对照) 中的表达水平相对比。在目标和对照样品之间,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,和 / 或 NAR 多肽表达水平的明显不同,提示目标患有 CVID 亚型疾病。

[0531] 在一特异的实施方案中,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽,或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 和 / 或抗 Neutrokin- α SV 的抗体),用于诊断,预测,治疗或预防特征在于血清免疫球蛋白产生缺陷,反复发生的感染和 / 或免疫系统功能失调的疾病。另外,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的抗体),可用于诊断,预测,治疗或预防关节,骨,皮肤和 / 或腮腺的感染,血液感染 (如败血症,脑膜炎,败血症性关节炎,和 / 或骨髓炎),自身免疫系统疾病 (如本文所述的),炎症,及恶性肿瘤和 / 或与这些疾病,感染,功能失调和 / 或恶性肿瘤相关的任何疾病或功能失调或病理状态,包括但非限 CVID,其它原发的免疫缺陷, HIV 疾病, CLL, 反复发生的支气管炎, 瘰管, 中耳炎, 结缔组织炎, 肺炎, 肝炎, 脑膜炎, 带状疱疹 (如重度带状疱疹) 和 / 或 pneumocystiscapnii。

[0532] 在另一实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的抗体),用于治疗,诊断或预测患有自身免疫系统疾病的个体。

[0533] 可用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的抗体) 治疗,诊断或预测的自身免疫疾病包括但非限于一或多种以下疾病:自身免疫性溶血性贫血,自身免疫性新生儿血小板减少症,自发性血小板减少性紫癜,自身免疫性血细胞减少症,溶血性贫血,抗磷脂综合征,皮炎,过敏性脑脊髓炎,心肌炎,复发性多发性软骨炎,风湿性心脏病,肾小球肾炎 (如 IgA 肾病),多发性硬化,神经炎,眼色素层炎,多发性内分泌疾病,紫癜 (如 Henloch-Schoenlein 紫癜), Reiter' s 病, Stiff-Man 综合征,自身免疫性肺炎, Guillain-Barre 综合征,胰导素依赖型糖尿病,和自身免疫性眼炎,自身免疫性甲状腺炎,甲状腺功能低下 (即 Hashimoto' s 甲状腺炎),系统性红斑狼疮, Goodpasture' s 综合征,天疱疮,受体自身免疫性例如 (a) Graves 病, (b) Myasthenia Gravis, 和 (c) 胰导素抗性,自身免疫性溶血性贫血,自身免疫性血小板减少性紫癜,风湿性关节炎,具有抗胶原抗体的 scleroderma, 混合的结缔组织病,多发性肌炎 / 皮肤肌炎,恶性贫血,自发性 Addison' s 病,不孕症,肾小球肾炎如原发性肾小球肾炎和 IgA 肾病,大疱性天疱疮, Sjogren' s 综合征,糖尿病,和肾上腺素类药物抗性 (包括治疗哮喘或膀胱纤维化的肾上腺素类药物抗性),慢性活动性肝炎,原发性胆汁性肝硬化,其它内分泌腺病变,白癜风,血管炎,后 MI,心肌综合征,荨麻疹,遗传性过敏性皮炎,哮喘,炎症性肌病,和其它炎症, granulomatous, 退化,及萎缩性功能失调)。

[0534] 根据此实施方案,患有自身免疫疾病或功能失调的个体表现为与无自身免疫疾病或功能失调的个体相对比,其 Neutrokin- α , Neutrokin- α SV 和 / 或 NAR 的表达水平异常高,本文所述的及本领域已知的任何方法均可用于检测本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,和 / 或 NAR 多肽 (例如检测多肽的 FACS 分析或 ELISA,及检测多核苷酸的杂交或 PCR),并可用于确定本发明的 Neutrokin- α 和 / 或

Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 多肽, 和 / 或 NAR 多肽在生物样品中的表达模式。

[0535] 患有自身免疫疾病的人体生物样品的特征是当与无自身免疫疾病或功能失调的个体中观测的结果相比时, Neutrokin- α , Neutrokin- α SV 和 / 或 NAR 的表达水平高。因此, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽, 和 / 或其激动剂或拮抗剂, 可根据本发明的方法用于诊断和 / 或预测自身免疫疾病或功能失调。例如, 可分析得自疑有自身免疫疾病或功能失调的人 (目标) 生物样品中, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽和 / 或 NAR 多肽的相关表达水平。然后将本发明的一或多个这些分子的表达水平与相同分子在已知无自身系统疾病的人体中的表达水平相对比。在得自目标和对照体的样品之间, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽, 和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂, 和 / 或 NAR 多肽表达水平的明显不同, 提示目标体患有自身免疫疾病或功能失调。

[0536] 在另一实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽, 或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 和 / 或抗 NEUTROKINE-ASV 的抗体), 用于治疗, 诊断或预测患有系统性红斑狼疮或其亚型疾病的个体。根据此实施方案, 患有系统性红斑狼疮或其亚型的个体, 当与无系统性红斑狼疮的个体相比时, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的表达水平异常高。本文所述的及本领域已知的任何方法均可用于检测本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽 (例如检测多肽的 FACS 分析或 ELISA, 及检测多核苷酸的杂交或 PCR 方法), 并用于确定本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽在生物样品中的表达模式。

[0537] 患有系统性红斑狼疮的人生物样品特征是当与无系统性红斑狼疮的个体中观测的结果相比时, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的表达水平高。因此, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽, 和 / 或其激动剂或拮抗剂, 根据本发明的复发可用于诊断和 / 或预测系统性红斑狼疮或其亚型。例如, 对得自疑患有系统性红斑狼疮的病人 (目标) 的生物样品进行分析本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽的相关表达水平。然后将一或多个本发明的这些分子的表达水平与相同分子在已知无系统性红斑狼疮的人体中的表达水平相对比。在得自目标与对照体的样品之间, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽, 和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂中表达水平的明显不同, 提示目标体患有系统性红斑狼疮或其亚型。

[0538] 另外, 系统性红斑狼疮或其亚型的病情程度与本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸 (RNA) 和 / 或多肽之间有直接关系。因此, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸 (RNA), 多肽和 / 或激动剂或拮抗剂, 根据本发明的方法可用于预测系统性红斑狼疮或其亚型疾病程度。例如, 分析得自疑患有系统性红斑狼疮病人 (目标) 的生物样品中, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽的相对表达水平。然后将一或多个本发明这些分子的表达水平与相同分子在已知代表这种疾病不同程度的一组病中的表达水平相对比。根据这种方法, 表达水平符合这一组病人中的哪一个成员, 则表明具有这个成员的程度。

[0539] 在另一实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的抗体),

用于治疗,诊断或预测患有风湿性关节炎或其亚型的个体。根据此实施方案,患有风湿性关节炎或其亚型的个体与无风湿性关节炎或其亚型的个体相对比,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的表达水平异常高。本文所述的和本领域已知的任何方法均可用于检测本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽(例如检测多肽的 FACS 分析或 ELISA,及检测多核苷酸的杂交或 PCR 方法),并可用于确定本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽在生物样品中的表达模式。

[0540] 患有风湿性关节炎的病人的生物样品特征是当与在无风湿性关节炎的个体中观测的结果相对比时,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的表达水平提高。因此,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽,和 / 或其激动剂或拮抗剂,可根据本发明的方法用于诊断和 / 或预测风湿性关节炎或其亚型。例如,分析得自疑似患有风湿性关节炎的病人(目标)的生物样品中,本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽的相对表达水平。然后将一或多个本发明这些分子的表达水平与相同分子在已知无风湿性关节炎的人体中的表达水平相对比。在得自目标和对照体的样品之间,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸和 / 或多肽,和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂的表达水平明显不同,提示目标体患有风湿性关节炎或其亚型。

[0541] 因此,本发明提供了一种在诊断免疫系统功能失调包括此系统癌症,及免疫缺陷和 / 或自身免疫疾病中的有效诊断方法,包括测定编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的基因,在个体的免疫系统组织或其它细胞或体液中的表达水平,并将此表达水平与标准 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因表达水平相对比,从而与标准水平相比提高或降低则表明患有免疫系统疾病。

[0542] 诊断免疫系统疾病包括但非限于诊断肿瘤,免疫缺陷,和 / 或自身免疫疾病,已根据常规方法进行,本发明用作预测指示剂,从而病人呈现 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因表达水平增强或降低,相对于基因表达水平接近标准水平的病人,所表现的临床结果更加严重。

[0543] 分析或确定编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的基因的表达水平,是指直接或间接地定量或定性测定或估计 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的 mRNA 在第一个生物样品的表达水平,直接测定是确定或估计绝对蛋白质水平或 mRNA 水平,间接测定是与在第二个生物样品中的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽水平或 mRNA 水平比较。优选地,测定或估计第一个生物样品中 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽水平或 mRNA 水平,并与标准 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽水平或 mRNA 水平相对比,标准水平得自正常人体的第二个生物样品,或通过确定正常人体的平均水平而得。本领域技术人员知道,一旦已知标准 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽水平或 mRNA 水平,其可重复用作对照标准。

[0544] “生物样品”是指得自含有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或 mRNA 的个体,体液,细胞系,组织培养物或其它来源的任何生物样品。如上所述,生物样品包括体液(如血清,血浆,尿液,滑液和脑脊液),其含有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的游离胞外结构域,免疫系统组织,和其它发现表达完整或游离 Neutrokin- α 和 / 或

Neutrokin- α SV 或其受体的胞外结构域的组织。本领域熟知从哺乳动物获得活检组织和体液的方法。当生物样品包括 mRNA 时,活检组织是优选的来源。

[0545] 本发明的化合物用于诊断,预测或治疗哺乳动物优选人体内的各种免疫系统相关的疾病。这种疾病包括但非限于肿瘤(如 B 细胞和单核细胞性白血病和淋巴瘤)及肿瘤转移,细菌,病毒及其它寄生虫感染,免疫缺陷,炎症,淋巴腺病,自身免疫疾病(如风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,Sjogren 综合征,混合的结缔组织疾病,及炎症性肌病),及移植物/宿主疾病。

[0546] 用任何适当的方法可从生物样品中分离出总细胞 RNA,如 Chomczynski 和 Sacchi 在生物化学分析 162:156-159(1987)中所述的一步硫氰酸胍-苯酚-氯仿法。然后用任何适当的方法分析编码 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽的 mRNA 水平。这些方法包括 Northern 印迹分析, S1 核酸酶作图,聚合酶链反应(PCR),逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),和逆转录-连接酶链反应(RT-LCR)。

[0547] 可用基于抗体的方法分析生物样品中 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽水平。例如,组织中 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽的表达可用传统的免疫组织学方法研究(Jalkanen, M., 等,细胞生物学杂志 101:976-985(1985);Jalkanen, M. 等,细胞生物学杂志 105:3087-3096(1987))。基于抗体的其它检测 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽基因表达的方法包括免疫分析,如酶联免疫吸附测定(ELISA)放射免疫分析(RIA)。本领域已知适当的抗体分析标记,包括酶标记如葡萄糖氧化酶,和放射性同位素如碘(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I),碳(^{14}C),硫(^{35}S),氚(^3H),铟($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{112\text{m}}\text{In}$, $^{111\text{m}}\text{In}$),和锝($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Tc),钛(^{201}Ti),镓(^{68}Ga , ^{67}Ga),钯(^{103}Pd),钼(^{99}Mo)氙(^{133}Xe),氟(^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru ;发光标记如鲁米诺,和荧光标记如荧光素和罗丹明,及生物素。

[0548] 本领域已知的方法可用于标记本发明的抗体。这种方法包括但非限于使用双功能缀合剂(见例如美国专利 No. 5756065;5714631;5696239;5652361;55055931;5489425;5435990;5428139;5342604;5274119;4994560;和 5808003;以上文献全文并入参考)。

[0549] 所分析的组织或细胞类型一般包括已知或怀疑表达 Neutrokin- α 基因的细胞或组织(如单核细胞系细胞),或已知或怀疑表达 Neutrokin- α 受体基因的细胞或组织(如 B 细胞系和脾细胞)。本发明所用的蛋白质分离方法例如由 Harlow 和 Lane 所述的方法(Harlow, E 和 Lane, D., 1988, “抗体实验手册”,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约),以其全文并入参考。分离的细胞可衍生自细胞培养物或病人。分析取自培养物的细胞是确定此细胞能用作基于细胞的基因治疗方法的一部分,或测试化合物 Neutrokin- α 基因或 Neutrokin- α 受体基因表达的作用所必需的一个步骤。

[0550] 例如,本文所述的抗体或其片段可用于定量或定性检测 Neutrokin- α 基因产物或其保守的变体或肽片段的存在情况。这可例如通过免疫荧光方法进行,用光学显微镜,流式细胞计量术或荧光测定法检测荧光标记的抗体。

[0551] 本发明的抗体(或其片段)或 Neutrokin- α 多肽可另外用于组织学分析如免疫荧光分析,免疫电子显微镜或非免疫学分析中,以原位检测 Neutrokin- α 基因产物或其保守的变体或肽片段,或结合 Neutrokin- α 受体的 Neutrokin- α 。原位检测可通过从病人体内取组织学样品,或对其施用本发明标记的抗体或 Neutrokin- α 多肽。抗体(或

片段)或 Neutrokin- α 多肽优选通过将标记的抗体(或片段)覆盖在生物样品上而施用。通过使用这种方法,不仅可确定 Neutrokin- α 基因产物,或保守的变体或肽片段,或 Neutrokin- α 多肽结合,还可确定其在测试组织中的分布。使用本发明,本领域技术人员将易于理解可对许多组织学方法(如染色方法)加以修改,以进行原位检测。

[0552] 对 Neutrokin- α 基因产物或其保守的变体或肽片段进行的免疫和非免疫分析,包括在存在能鉴别 Neutrokin- α 基因产物或其保守的变体或肽片段的可检测标记的抗体的情况下,温育样品如生物液,组织提取物,新收集的细胞,或在细胞培养物中温育的细胞裂解物,并通过本领域熟知的许多方法检测结合的抗体。

[0553] 对 Neutrokin- α 受体基因产物或其保守的变体或肽片段进行的免疫和非免疫分析,包括在存在能鉴别 Neutrokin- α 受体基因产物或其保守的变体或肽片段的可检测或标记的 Neutrokin- α 多肽存在的情况下,温育样品如生物液,组织提取物,新收集的细胞或在细胞培养物中温育的细胞裂解物,并通过本领域熟知的许多方法检测结合的 Neutrokin- α 多肽。

[0554] 生物样品可与固相支持物或载体接触并固定于其上,如固定于硝基纤维素或能固定细胞,细胞颗粒或可溶蛋白的其它固体支持物。然后将此支持物用适当的缓冲剂冲洗,随后用可检测标记的抗 Neutrokin- α 抗体或可检测的 Neutrokin- α 多肽处理。然后将此固相支持物用缓冲液再冲洗一次,以除去未结合的抗体或多肽。任选地此抗体是随后标记的。固体支持物上结合的标记数量然后可通过常规方法检测。

[0555] “固相支持物或载体”是指能结合抗原或抗体的任何支持物。熟知的支持物或载体,包括玻璃,聚苯乙烯,聚丙烯,聚乙烯,葡聚糖,尼龙,淀粉酶,天然和修饰的纤维素,聚丙烯酰胺,辉卡岩,和磁铁矿。载体的性质可以是在一些情况下可溶的,或为本发明目的而不溶的。固体支持物实际上可有任何可能的构型,只要偶联的分子能结合抗原或抗体。因此,支持物构型可以是球形的如珠,或圆柱体如在试管的内表面,或棒的外表面。或者,此表面可以是平坦的如薄片,试纸等。优选的支持物包括聚苯乙烯珠。本领域技术人员已知许多结合抗体或抗原的其它适当载体,或能使用常规试验确定。

[0556] 除了在得自个体的生物样品中分析 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽水平或多核苷酸水平,Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸也可在体内通过显象而检测。例如,在本发明的一个实施方案中,Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽和/或抗 Neutrokin- α 抗体用于显象 B 细胞淋巴瘤。在另一实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽和/或抗 Neutrokin- α 的抗体和/或 Neutrokin- α 多核苷酸(如互补于全部或部分 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV mRNA 的多核苷酸),用于显象淋巴瘤(如单核细胞和 B 细胞淋巴瘤)。

[0557] 用于体内显象 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽的抗体标记或标志物包括可通过 X 线,NMR,MRI,CAT 扫描,或 ESR 检测的标记。就 X 线而言,适当的标记包括放射性同位素如钼或铯,其发射可检测的射线,但对测试对象无明显伤害。进行 NMR 和 ESR 的适当标记包括具有可检测特征性自旋的标记如氘,其可通过标记相关杂交瘤的营养素而掺入抗体中。在体内显象用于检测 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽水平增强时以对人体进行诊断时,优选使用人抗体或“人化的”嵌合单克隆抗体。这种抗体可用于本文所述的或本领域已知方法产生。例如,本领域已知产生嵌合抗体的方法。见例如,Morrison,

科学 229 :1202(1985) ;Oi 等, 生物技术 4 :214(1986) ;Cabilly 等, 美国专利 4816567 ; Taniguchi 等, EP171496 ;Morrison 等, EP173494 ;Neuberger 等, WO 8601533 ;Robinson 等, WO 8702671 ;Boulianne 等, 自然 312 :643(1984) ;Neuberger 等, 自然 314 :268(1985)。

[0558] 或者, 可施用其存在可被检测的任何 Neutrokin- α 多肽。例如, 可施用经不透射线的或其它适当化合物标记的 Neutrokin- α 多肽, 并如上所述在体内评价标记的抗体。另外这种 Neutrokin- α 多肽可用于体外诊断方法。

[0559] 将已用适当的可检测显象组分标记的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽特异性抗体或抗体片段, 导入哺乳动物中 (如经非肠道, 皮下或腹膜内施用) 以检测免疫系统疾病, 所述可检测的显象组分例如是放射性同位素 (例如 ^{131}I , ^{112}In , ^{99}mTc , (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 碳 (^{14}C), 硫 (^{35}S), 氚 (^3H), 铟 (^{115}mIn , ^{113}mIn , ^{112}In , ^{111}In ,), 和锝 (^{99}Tc , ^{99}mTc), 钛 (^{201}Ti), 镓 (^{68}Ga , ^{67}Ga), 钯 (^{103}Pd), 钼 (^{99}Mo) 氙 (^{133}Xe), 氟 (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru), 不透射线的物质, 或通过核磁共振可检测的物质。本领域技术人员应知测试对象的大小及所用的显象系统将确定产生诊断影像的显象组分。在使用放射性同位素的情况下, 就人而言, 注射的放射活性数量一般为大约 5-20 毫居里的 ^{99}mTc 。然后标记的抗体和抗体片段优先在含有 Neutrokin- α 蛋白的细胞处累积。体内肿瘤成象见于 S. W. Burchiel 等, “放射标记的抗体及其片段的免疫药理学” (第 13 章, 肿瘤成象 :癌症的放射化学检测, S. W. Burchiel 和 B. A. Rhodes 编辑, Masson Publishing Inc. (1982))。

[0560] 就抗体而言, 其中抗 Neutrokin- α 的抗体可检测地标记的方式之一是将其与酶连接, 并在酶免疫分析中 (EIA) 使用连接的产物 (Voller, A. “酶联免疫吸附测定 (ELISA)”, 1978, 诊断水平 2 :1-7, 微生物学相关四分出版物, Walkersville, MD) ;Voller 等, 临床病理学杂志 31 :507-520(1978) ;Bulter, J. E. 酶学方法 73 :482-523(1981) ;Maggio, E. 等 (编辑) 1980, 酶免疫分析, CRC 出版社, Boca Raton, FL ;Ishikawa, E. 等 (编辑), 1981, 酶免疫分析, Kagaku Shoin, Tokyo)。与抗体结构的酶将与适当底物反应, 优选与显色底物反应, 以此方式产生可通过例如分光光度法, 荧光测定法或目测法检测的化学组分。可用于可检测地标记抗体的酶包括但非限于苹果酸脱氢酶, 葡萄糖球菌核酸酶, δ -5- 类固醇异构酶, 酵母乙醇脱氢酶, α -甘油磷酸酯, 脱氢酶, 丙糖磷酸异构酶, 辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶, 天冬酰胺酶, 葡萄糖氧化酶, β -半乳糖苷酶, 核糖核酸酶, 脲酶, 过氧化氢酶, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 葡萄糖淀粉酶, 和乙酰胆碱酯酶。另外, 可通过使用与酶反应的显色底物的比色法进行检测。也可通过目测将底物与酶的反应情况与相似制备的标准相对比进行检测。

[0561] 也可用任何其它免疫分析进行检测。例如, 通过放射性标记抗体或抗体片段, 可经放射免疫分析 (RIA) 检测 Neutrokin- α (见例如 Weintraub, B., 放射免疫分析原理, 对放射配体分析方法的第 7 次 training Course, The Endocrine Society, March, 1986, 以其全文并入参考)。放射性同位素可通过包括但非限于 γ 计数器, 闪烁计数器或放射自显影等方法检测。

[0562] 也可用荧光化合物标记抗体。当荧光标记的抗体暴露于适当波长的光线之下时, 由于荧光素而可检测其存在情况。常用的荧光标记化合物是异硫氰酸荧光素, 罗丹明, 藻红蛋白, 藻蓝蛋白, 别藻蓝蛋白, ophthaldehyde 和荧光胺。

[0563] 抗体也可用发射荧光的金属如 ^{152}Eu , 或其它镧系金属可检测地标记。这些金属可

用这种金属的螯合基团如二乙三胺五乙酸 (DTPA) 或乙二胺四乙酸 (EDTA) 而附着于抗体。

[0564] 抗体也可通过将其与化学发光化合物偶联而可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中出现的发光现象,而确定化学发光物标记的抗体。尤为有效的化学发光标记化合物例如是鲁米诺,异鲁米诺,theromatic acridinum ester,咪唑,acridinium 盐和草酸盐。

[0565] 另外,生物发光化合物可用于标记本发明的抗体。生物发光物是一种在生物系统中发现的化学发光物,其中催化蛋白提高化学发光物反应的效力。生物发光蛋白的存在情况可通过检测发光物的存在情况而检测。进行标记的重要生物发光化合物包括但非限于荧光素,荧光素酶,和水母蛋白。

[0566] 免疫系统相关疾病的治疗

[0567] 如上所述,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽和多核苷酸及抗 Neutrokin- α 的抗体,用于诊断 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性的异常高或低表达的疾病。提供其中 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 被表达的以及其活性由 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 调节的细胞和组织,与标准或“正常”水平相比个体中 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的表达水平发生变化(提高或降低),产生与其中 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 是表达的和 / 或活性的机体系统相关的病理改变。

[0568] 本领域技术人员还知道,由于本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽是 TNF 家族的成员,代表性蛋白质的胞外结构域可以可溶形式从表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的细胞中,通过蛋白酶解而释放,且因此当 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽(尤其可溶形式的代表性胞外结构域)从外源加入个体的组织,细胞或机体时,此多肽呈现对个体的任何其靶细胞经调节的活性。同样,表达此 II 型跨膜蛋白的细胞可加入个体的细胞,组织或机体中,从而加入的细胞与表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体的细胞结合,由此,表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的细胞可对携带受体的靶细胞产生作用(如增殖或胞毒性)。

[0569] 在一实施方案中,本发明提供了为定向的细胞输送含有本发明多肽的组合物(如含有与异源多肽,异源核酸,毒素或前体药物相关的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或抗 Neutrokin- α 和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体的组合物)的方法,所述定向的细胞如是表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体的 B 细胞,或表达细胞表面结合形式的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的单核细胞。本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体,通过亲水性,疏水性,离子和 / 或共价相互作用而与异源多肽,异源核酸,毒素或前体药物相结合。

[0570] 在一实施方案中,本发明提供了一种将本发明的组合物特异地输送至细胞的方法,通过施用与异源多肽或核酸相关的本发明的多肽(如 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或抗 Neutrokin- α 和 / 或抗 Neutrokin- α 的抗体)进行。在一实施例中,本发明提供了一种将治疗性蛋白质输送至定向的细胞的方法。在另一实施例中,本发明提供了一种将单链的核酸(如反义或核酶分子),或双链的核酸(如能整合入细胞的基因组或附加复制及能转录的 DNA)。

[0571] 在另一实施方案中,本发明提供了一种特异破坏细胞(如破坏肿瘤细胞)的方法,通过施用与毒素或胞毒性前体药物相结合的本发明多肽(如 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽或抗 Neutrokin- α 和/或抗 Neutrokin- α SV 抗体)而进行。

[0572] 在一特异的实施方案中,本发明提供了一种特异破坏 B 细胞系细胞(如 B 细胞相关的白血病或淋巴瘤)的方法,通过施用与毒素或胞毒性前体药物相结合的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽而进行。

[0573] 在另一特异的实施方案中,本发明提供了一种特异破坏单核细胞系细胞(如单核细胞性白血病或淋巴瘤)的方法,通过施用与毒素或胞毒性前体药物相关的抗 Neutrokin- α 和/或抗 Neutrokin- α SV 抗体而进行。

[0574] “毒素”是指结合并激活内源性胞毒性效应器系统的化合物,放射性同位素,全毒素,修饰的毒素,毒素的催化亚基,胞毒素(胞毒剂),或在限定的导致细胞死亡的非正常地存在于或在细胞表面的任何分子或酶。根据本发明的方法可使用的毒素包括但非限于本领域已知的放射性同位素,化合物如结合固有的或诱导的内源性胞毒性效应器系统的抗体(或含有其一部分的补体固定区),胸苷激酶,内切核酸酶, RNase, α -毒素,蓖麻毒蛋白,红豆毒素,假单胞杆菌属外毒素 A,白喉毒素,皂草素,苦瓜定, gelonin, 商陆抗病毒蛋白, α -sarcin 和霍乱毒素。“毒素”还包括细胞抑制剂或杀细胞剂,治疗剂或放射性金属离子,如 α -发射体例如 ^{213}Bi , 或其它放射性同位素例如 ^{133}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , ^{90}Y , ^{117}Sn , ^{186}Re , ^{166}Yb 和 ^{188}Re , 发光标记如鲁米诺;和荧光标记如荧光素和罗丹明,和生物素。

[0575] 本领域已知的方法可用于标记本发明的抗体。这种方法包括但非限于使用双功能缀合剂(见例如美国专利 5756065;5714631;5696239;5652361;5505931;5489425;5435990;5428139;5342604;5274119;4994560;和 5808003;所述文献均全文并入参考)。胞毒素或胞毒剂包括对细胞不利的任何制剂。例如包括 paclitaxol, 细胞松弛素 B, 短杆菌肽 D, 溴化乙锭, 吐根碱, 丝裂霉素, 表鬼臼毒素吡喃葡萄糖苷, 表鬼臼毒噻吩糖苷, 长春新碱, 长春花碱, 秋水仙碱, 阿霉素, 道诺红菌素, 二羟炭疽菌素 dione mitoxantrone, 光神霉素, 放线菌素 D, 1-脱氢睾酮, 糖皮质激素, 普鲁卡因, 丁卡因, 利多卡因, 心得安, 和嘌呤霉素及其类似物或同源物。治疗剂包括但非限于抗代谢物(如氨甲喋呤, 6-巯基嘌呤, 6-硫代鸟嘌呤, 阿糖胞苷, 5-氟尿嘧啶 decarbazine), 烷化剂(例如二氯甲基二乙胺, thioepa 苯丁酸氮芥, 苯丙氨酸氮芥, 卡氮芥(BSNU)和环己亚硝脒(CCNU), cyclophosphamide, 白消安, 二溴甘露糖醇, 链脲菌素, 丝裂霉素 C, 和二氯二胺顺铂(II)(DDP), 蒽环类抗生素(例如道诺红菌素, (从前的道诺霉素)和阿霉素), 抗生素(如道诺霉素(从前的放线菌素), 博来霉素, 光神霉素, 氨基糖苷类(AMC)), 和抗有丝分裂剂(如长春新碱和长春花碱)。

[0576] “胞毒性前体药物”是指通过细胞内正常存在的酶转换为胞毒性化合物的非毒性化合物。根据本发明的方法可使用的胞毒性前体药物包括但非限于安息香酸芥子烷化剂的谷氨酰胺衍生物, 表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷或丝裂霉素 C 的磷酸盐衍生物, 阿糖胞苷, 道诺红菌素和阿霉素的苯氧基乙酰胺衍生物。

[0577] 应知由个体中 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 活性水平低于标准或正常水平所致的疾病, 尤其免疫系统疾病, 可通过施用 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽(以可溶的胞外结构域或表达完整蛋白的细胞形式)或激动剂而处理。因此, 本

发明还提供了一种治疗需要提高 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性水平的个体的方法,包括给这种体施用一种药物组合物,该组合物包含一定数量的分离的本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或其激动剂,有效地提高这种个体中 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性水平。

[0578] 还应知道由个体 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性水平高于标准或正常水平所致的疾病,尤其免疫系统疾病,可通过施用 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽(可溶的胞外结构域或表达完整蛋白的细胞形式)或其拮抗剂(如抗 Neutrokin- α 的抗体)而进行治疗。因此本发明还提供了一种治疗需要降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性的个体的方法,包括为这种个体施用一种药物组合物,该组合物包含一定量的本发明分离的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽,或其拮抗剂,以有效地降低这种个体中的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性水平。

[0579] 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽或其拮抗剂,可用于治疗感染性疾患。例如,通过提高免疫应答尤其提高 B 细胞增殖和分化,可治疗感染性疾患。免疫应答可通过增强现存的免疫应答,或通过启动新的免疫应答而得以提高。或者,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽或其拮抗剂,也可直接抑制感染性因素,而不需激发免疫应答。

[0580] 病毒例如是一种能产生疾病或临床症状的感染因子,这种疾病或临床症状可通过 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽或其激动剂而加以治疗。病毒例如包括但非限于以下 DNA 和 RNA 病毒及病毒科:虫媒病毒,腺病毒,沙粒病毒,动脉炎病毒,双 RNA 病毒,布尼亚病毒,杯状病毒,Circoviridae,冠状病毒,登革病毒,EBV, HIV, 黄病毒,嗜肝 DNA 病毒(肝炎病毒),疱疹病毒(如巨细胞病毒,单纯疱疹病毒,带状疱疹病毒), Mononegavirus(如副粘病毒,麻疹病毒,弹状病毒),正粘病毒(如甲型流感病毒,乙型流感病毒和副流感病毒),乳头瘤病毒,乳多空病毒,细小病毒,小 RNA 病毒,痘病毒(如天花或痘苗病毒),呼肠病毒(如轮状病毒),逆转录病毒(HTLV-I, HTLV-II, 慢病毒属),和披膜病毒(如风疹病毒)。这些家族中的病毒可导致各种疾病或临床症状,包括但非限于关节炎,支气管炎,呼吸道合胞病毒,脑炎,眼部感染(如结膜炎,角膜炎),慢性疲劳综合征,肝炎(甲,乙,丙,戊型,慢性活动型, δ 型),日本 B 型脑炎,Junin,Chikungunya,Rift Valley 热,黄热病,脑膜炎,机会感染(如 AIDS),肺炎,Burkitt's 淋巴瘤,水痘,出血热,麻疹,流行性腮腺炎,副流感,狂犬病,普通感冒脊髓灰质炎,白血病,风疹,性病,皮肤病(如 Kaposi' 疣)和病毒血症。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽或其激动剂或拮抗剂,可用于治疗,预防,诊断和 / 或检测任一种这些症状或疾病。在特异的实施方案中,Neutrokin- α - 多核苷酸,多肽或激动剂用于治疗,预防和 / 或诊断:脑膜炎,登革热,EBV,和 / 或肝炎(如乙型)。在另一特异的实施方案中,Neutrokin- α - 多核苷酸,多肽或激动剂用于治疗对一或多种其它商购肝炎疫苗无应答的病人。在另一特异的实施方案中,Neutrokin- α 多核苷酸,多肽或激动剂用于治疗,预防和 / 或诊断 AIDS。在另一特异的实施方案中,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 和 / 或其受体多核苷酸,多肽,激动剂和 / 或拮抗剂用于治疗,预防和 / 或诊断隐孢子虫病。

[0581] 相似地,可引起疾病或临床症状并可用 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV

多核苷酸或多肽,或其激动剂或拮抗剂治疗的细菌或真菌病因包括但不限于以下革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌和细菌科及真菌:放线目(如棒杆菌,分枝杆菌,诺卡氏菌),新型隐球酵母,曲霉,芽孢杆菌科(如炭疽菌,梭状芽孢杆菌属),类菌科,芽生菌,包特菌属,疏螺旋体(如 *Borrelia Burgdorferi*),布鲁氏杆菌,念珠菌属,弯曲菌属,球孢子菌,隐球菌, *Dermatocycoses*, 大肠杆菌(如肠产毒性大肠杆菌和肠出血性大肠杆菌),肠杆菌属(克雷伯杆菌属,沙门氏菌属(如伤寒杆菌,副伤寒杆菌), *Serratia*, 耶尔森菌属),丹毒丝菌,卷旋杆菌,军团菌属,钩端螺旋体属,李斯特菌属(如 *Listeria monocytogenes*),支原体,麻风杆菌,霍乱弧菌,奈瑟菌属(如放线杆菌, *Gonorrhea*, 脑膜炎球菌), *Meissneria meningitidis*, 巴氏菌属感染(如放线芽孢杆菌,嗜血杆菌(如 B 型流感嗜血杆菌),巴氏菌属),假单胞菌属,立克次氏体,衣原体,梅毒,志贺菌属,葡萄球菌属,脑膜炎球菌,肺炎球菌,和链球菌(如肺炎链球菌和 B 组链球菌)。这些细菌或真菌科可产生以下疾病或症状,包括但不限于细菌血症,心内膜炎,眼部感染(结膜炎,结核,眼色素层炎),牙龈炎,机会感染(如 AIDS 相关的感染),甲沟炎,假体相关的感染, *Reiter's* 病,呼吸道感染,如百日咳或积脓,败血症, *Lyme* 病, *Cat-Scratch* 病,痢疾,副伤寒,食物中毒,伤寒,肺炎,淋病,脑膜炎(如甲型,乙型脑膜炎),衣原体病,梅毒,白喉,麻风,副结核,结核,狼疮,肉毒中毒,坏疽,破伤风,脓疱病,风湿热,猩红热,性病,皮肤病(如蜂窝组织炎, *dermatocycoses*),毒血症,尿路感染,伤口感染。 *Neutrokin-α* 和 / 或 *Neutrokin-α SV* 多核苷酸或多肽,或其激动剂或拮抗剂,可用于处理,预防,诊断和 / 或检测任一种这些病疾或症状。在特异的实施方案中, *Neutrokin-α* 多核苷酸,多肽或其激动剂用于治疗,预防和 / 或诊断:破伤风, *Diphtheria*, 肉毒中毒和 / 或乙型脑膜炎。

[0582] 另外,导致疾病或症状且能用 *Neutrokin-α* 和 / 或 *Neutrokin-α SV* 多核苷酸或多肽,或其激动剂治疗的寄生虫病因,包括但不限于以下家族或类型:阿米巴病,巴贝西虫病,球孢子,隐孢子虫病, *Dientamoebiasis*, 疟疾, *Ectoparasitic*, 贾第鞭毛虫病,蠕虫病,利什曼病,泰勒尔梨浆虫病,弓形体病,锥虫病,和毛滴属及孢子虫(如 *Plasmodium virax*, 恶性疟原虫,疟疾疟原虫和 *Plasmodium ovale*)。这些寄生虫可导致各种疾病或症状,包括但不限于疥疮,秋恙虫病,眼部感染,肠道疾病(如痢疾,贾第鞭毛虫病),肝脏疾病,肺部疾病,机会感染(如 AIDS 相关的感染),疟疾,孕期并发症,和弓形体病。 *Neutrokin-α* 和 / 或 *Neutrokin-α SV* 多核苷酸或多肽,或其激动剂或拮抗剂,可用于治疗,预防,诊断和 / 或检测任何这些症状或疾病。在特异的实施方案中, *Neutrokin-α* - 多核苷酸,多肽或其激动剂用于治疗,预防和 / 或诊断疟疾。

[0583] 在另一实施方案中,本发明的 *Neutrokin-α* 和 / 或 *Neutrokin-α SV* 多核苷酸或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,用于治疗,预防和 / 或诊断内耳感染(如中耳炎),以及其它特征在于肺炎链球菌及其它病原微生物所致感染。

[0584] 在一特异的实施方案中, *Neutrokin-α* 和 / 或 *Neutrokin-α SV* 多核苷酸或多肽,或其激动剂或拮抗剂(如抗 *Neutrokin-α* 和 / 或 *Neutrokin-α SV* 的抗体),用于治疗或预防特征在于血清免疫球蛋白产生缺陷,复发感染和 / 或免疫系统功能失调的疾病。另外 *Neutrokin-α* 和 / 或 *Neutrokin-α SV* 多核苷酸或多肽,或其激动剂或拮抗剂(如抗 *Neutrokin-α* 和 / 或 *Neutrokin-α SV* 的抗体),可用于治疗或预防关节,骨,皮肤和 / 或腮腺感染,血液所致感染(如败血症,脑膜炎,败血症性关节炎,和 / 或骨髓炎),自身免疫

系统疾病（如本文所述的），炎症，和恶性肿瘤，和 / 或与这些感染，疾病，功能失调或恶性肿瘤相关的任何疾病或功能失调或病理改变，包括但不限于 CVID，其它原发免疫缺陷，HIV，CLL，复发性支气管炎，窦炎，中耳炎，结膜炎，肺炎，肝炎，脑膜炎，带状疱疹（如重度带状疱疹），和 / 或卡氏肺囊虫。

[0585] Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽，或其激动剂或拮抗剂，可用于诊断，预测，治疗或预防一或多种以下疾病或功能失调，或病理状态：原发免疫缺陷，免疫介导的血小板性贫血，Kawasaki 综合征，骨髓移植（如成人或儿童的骨髓移植），慢性 B 细胞淋巴性白血病，HIV 感染（如成人或儿童 HIV 感染），慢性炎症性脱髓鞘多神经病，和输血后紫癜。

[0586] 另外，本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽，或其激动剂或拮抗剂，可用于诊断，预测，治疗或预防一或多种以下疾病，功能失调或病理状态：Guillain-Barre 综合征，贫血（如与细小病毒 B19 相关的贫血，具有稳定的多个骨髓瘤的病人，其感染的危险性很高（如复发感染），自身免疫性溶血性贫血（如发热型自身免疫性溶血性贫血），血小板性贫血（如新生儿血小板性贫血），和免疫介导的神经性贫血），移植（如 CMV 阳性器官的 CMV 阴性受体），低丙种球蛋白血症（如具有感染或发病危险因素的新生儿低丙种球蛋白血症），癫痫（如难治的癫痫），全身性血管综合征，肌无力（如肌无力中的心脏代偿失调），皮炎，和多发性肌炎。

[0587] 本发明另外的优选实施方案包括但不限于将 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽，多核苷酸及其功能激动剂，用于以下应用中：

[0588] 施用于动物（如小鼠，大鼠，兔，仓鼠，豚鼠，猪，小猪，鸡，骆驼，山羊，马，牛，羊，狗，猫，非人灵长目，和人，优选人），以辅助免疫系统产生增加量的一或多种抗体（如 IgG，IgA，IgM 和 IgE），诱导较高亲和性抗体产生（如 IgG，IgA，IgM 和 IgE），和 / 或提高免疫应答。在一特异的实施方案中，施用本发明的 Neutrokin- α 多肽和 / 或其激动剂，以辅助免疫系统产生增加量的 IgG。在另一特异的实施方案中，施用本发明的 Neutrokin- α 多肽和 / 或其激动剂，以辅助免疫系统产生增加量的 IgA。在另一特异的实施方案中，施用本发明的 Neutrokin- α 多肽和 / 或其激动剂，以辅助免疫系统产生增加量的 IgM。

[0589] 施用于动物（包括但不限于以上所列的还包括转基因动物），所述动物不能产生功能性内源抗体分子，或具有另外组成的内源免疫系统，但不能通过从另外动物中重建或部分重建免疫系统而产生人免疫球蛋白分子（见例如 PCT 出版物 No. WO 98/24893，WO 96/34096，WO 96/33735 和 WO 91/10741 所述）。

[0590] 一种疫苗佐剂增强对特异抗原的免疫应答。在一特异的实施方案中，疫苗佐剂是本文所述的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽。在另一特异的实施方案中，疫苗佐剂是在此所述的 Neutrokin- α 和 / 或 α SV 多核苷酸（即 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸是一种遗传的疫苗佐剂）。如本文所述，本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸可使用本领域已知的方法施用，包括但不限于脂质体输送，重组载体输送，注射裸 DNA，及基因枪输送。

[0591] 一种佐剂增强肿瘤特异性免疫应答。

[0592] 一种佐剂增强抗病毒免疫应答。抗病毒免疫应答可用本发明的组合物作佐剂而增强，抗病毒免疫应答包括但不限于本发明所述的或本领域已知的病毒与病毒相关的疾病或

症状。在特异的实施方案中,本发明的组合物用作佐剂,以增强对选自以下的病毒疾病或症状的免疫应答: AIDS, 脑膜炎, 登革热, EBV, 和肝炎(如乙肝)。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物用作佐剂,以增强对选自以下的病毒,疾病或症状的免疫应答: HIV/AIDS, 呼吸道合胞病毒, 登革热, 轮状病毒, 日本 B 型脑炎, 甲型和乙型流感, 副流感, 麻疹, 巨细胞病毒, 狂犬病, Junin, Chikungunya, Rift Valley 热, 单纯疱疹, 和黄热病。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物用作佐剂增强对 HIV gp120 抗原的免疫应答。

[0593] 一种佐剂增强抗菌或抗真菌免疫应答。可用本发明的组合物作佐剂增强的抗菌或抗真菌免疫应答,包括本文所述及本领域已知的细菌或真菌及与细菌或真菌相关的疾病或症状。在特异的实施方案中,本发明的组合物用作佐剂以增强对选自以下细菌或真菌,疾病或症状的免疫应答: 破伤风, 白喉, 肉毒中毒, 和乙型脑膜炎。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物用作佐剂,以增强对选自以下的细菌或真菌,疾病或症状的免疫应答: 霍乱弧菌, 麻风杆菌, 伤寒杆菌, 副伤寒杆菌, *Meisseria meningitidis*, 肺炎链球菌, B 组链球菌, 志贺菌, 肠产毒性大肠杆菌, 肠出血性大肠杆菌, *Borrelia burgdorferi*, 疟原虫属(疟疾)。

[0594] 一种佐剂增强抗寄生虫免疫应答。可用本发明的组合物作佐剂增强的抗寄生虫免疫应答,包括本文所述或本领域已知的寄生虫及与寄生虫相关的疾病或症状。在特异的实施方案中,本发明的组合物用作佐剂增强对寄生虫的免疫应答。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物用作佐剂以增强对疟原虫属(疟疾)的免疫应答。

[0595] 作为 B 细胞对病原体应答的刺激剂。

[0596] 作为在接受免疫抑制治疗之前,评价个体免疫状态的因子。

[0597] 作为诱导高亲和性抗体的因子。

[0598] 作为提高血清免疫球蛋白浓度的因子。

[0599] 作为加速免疫包含个体回收的因子。

[0600] 作为辅助老年人免疫应答的因子。

[0601] 作为在骨髓移植和/或其它移植(如同种或异种器官移植)之前,期间或之后,免疫系统的增强子。考虑到移植,本发明的组合物可在移植之前,同时,和/或之后施用。在一特异的实施方案中,本发明的组合物在移植之后,开始回收 T 细胞之前施用。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物首先在移植后开始恢复 T 细胞群之后,但在完全恢复 B 细胞之前施用。

[0602] 作为辅助 B 细胞免疫缺陷个体的免疫应答的因子,例如部分或完全脾切除术后患者。可通过施用本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂而得以改善或治疗的 B 细胞免疫缺陷症包括但非限于 X 连锁的重度联合免疫缺陷(SCID),常染色体 SCID,腺苷脱氨酶缺陷(ADA 缺陷),X 连锁的丙种球蛋白缺乏症(XLA),Bruton's 病,先天性丙种球蛋白缺乏症,X 连锁的婴儿丙种球蛋白缺乏症,获得性丙种球蛋白缺乏症,成人发作性丙种球蛋白缺乏症,晚期发作性丙种球蛋白缺乏症,丙种球蛋白异常血症,低丙种球蛋白血症,婴儿短暂性低丙种球蛋白血症,非特异性低丙种球蛋白血症,丙种球蛋白缺乏症,普通变异的免疫缺陷(CVID)(获得性),Wiskott-Aldrich 综合征(WAS),X 一连锁的高 IgM 免疫缺陷,非 X 连锁的高 IgM 免疫缺陷,选择性 IgA 缺陷, IgG 亚类缺陷(有或无 IgA 缺陷),正常或高 IgS 抗体缺陷,胸腺瘤免疫缺陷, Ig 重链缺失, k 链缺损, B 细胞淋巴增殖性疾病(BLPD),选择性 IgM 免疫缺陷,隐性丙种球蛋白缺乏症(Swiss 型),网状

组织发育不全,新生儿嗜中性白细胞减少症,重度先天性白血病,免疫缺陷性胸腺淋巴组织发育不全,运动失调性毛细血管扩张症,短肢侏儒,X连锁的淋巴增殖性综合征(XLP),联合 Igs 免疫缺损的 Nozelof 综合征,嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)缺陷,MHCII 类缺陷(Bare 淋巴细胞综合征),和重度联合免疫缺损。

[0603] 作为具有 B 细胞功能获得性丧失个体的加强免疫应答制剂,可通过施用本发明 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂而得以改善或治疗的导致获得性 B 细胞功能丧失的疾病包括但非限于 HIV 感染, AIDS, 骨髓移植, 和 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0604] 作为辅助暂时性免疫缺损个体免疫应答的因子。可通过施用本发明 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂而得以改善或治疗的导致暂时免疫缺损的疾病包括但非限于病毒感染(如流感),与营养不良相关的疾病,单核细胞增多症感染,或与应激相关的疾病,麻疹,输血,外科手术。

[0605] 作为通过单核细胞,树状细胞和/或 B 细胞进行抗原呈递的调节剂。在一实施方案中,Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽(可溶,膜结合或跨膜形式)或多核苷酸,在体外或体内增强抗原呈递或拮抗抗原呈递。另外,在相关的实施方案中,抗原呈递的这种增强或拮抗作用可用于抗肿瘤治疗或调节免疫系统。

[0606] 作为粘膜免疫应答的介导剂。单核细胞表达 Neutrokin- α 及 B 细胞对其它应答提示,其可包含于 B 细胞和单核细胞之间或它们分化的子代之间信号交换中。此活性在许多方面与 B 细胞和 T 细胞之间 CD40-CD154 信号相同。因此,Neutrokin- α 可以是对环境病原的 T 细胞非依赖性免疫应答的重要调节剂。尤其与粘膜处相关的及可对人体内许多天然免疫应答的非常规 B 细胞群(CD5+),可对 Neutrokin- α 应答,因此增强个体的防护性免疫状况。

[0607] 作为指导个体免疫系统发生与 TH1 细胞应答相反的体液应答(即 TH2)的因子。

[0608] 作为诱导肿瘤增殖的因子,且因此使其更适于抗肿瘤剂。例如,多发性骨髓瘤是一种缓慢分化的疾病,且因此实际上对所有抗肿瘤方法都不起作用。如果使这些细胞更快增殖,其对抗肿瘤方法的接受能力将得以改善。

[0609] 作为 B 细胞特异性结合蛋白,细胞生长的特异性激活剂或抑制剂可附着于其。结果是将这种激活剂或抑制剂的活性集中于正常的,疾病态的或肿瘤性 B 细胞群。

[0610] 作为通过其特异性而检测 B 细胞系细胞的因子。此应用可要求用生物素或其它制剂(如本文所述的)标记蛋白质,以进行检测。

[0611] 作为在一些疾病中 B 细胞产生的刺激剂,如 AIDS,慢性淋巴细胞功能失调和/或普通可变量免疫缺损。

[0612] 作为选择 B 细胞的方法的一部分,其功能是从各类细胞的异源混合物中分离 B 细胞。Neutrokin- α 可与固体支持物偶联,然后 B 细胞与其特异结合。冲洗掉未结合的细胞,随后洗脱结合的细胞。这种选择的一种非限制性应用是使在移植前,将肿瘤细胞从例如骨髓或周围血中清除。

[0613] 用作在手术,外伤或遗传缺损之后生成和/或再生淋巴组织的疗法。

[0614] 用作如在 SCID 病人中观测到的导致无免疫能力的遗传疾病的基因疗法。

[0615] 作为生成抑制或增强 Neutrokin- α 介质的应答的抗原。

[0616] 作为激活单核细胞 / 巨噬细胞的物质以抵御作用于单核细胞的寄生虫疾病,如利什曼病。

[0617] 在移植之前作为骨髓样品的预处理剂。这种处理提高 B 细胞再呈递,并因此加速回收。

[0618] 作为调节分泌的细胞因子的物质,该细胞因子的分泌由 Neutrokin- α 激发。

[0619] 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂可用于在体外或体内调节 IgE 浓度。

[0620] 另外,本发明的 Neutrokin- α 或 Neutrokin- α SV 多肽或核苷酸,或其激动剂可用于治疗,预防和 / 或诊断 IgE 介导的变态反应。这种变态反应包括但非限于哮喘,鼻炎和湿疹。

[0621] 在一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善选择性 IgA 缺陷。

[0622] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善运动失调性毛细血管扩张症。

[0623] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善普通变异的免疫缺损。

[0624] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善 X 连锁的丙种球蛋白缺乏症。

[0625] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善重度联合免疫缺损 (SCID)。

[0626] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善 Wiskott-Aldrich 综合征。

[0627] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善 X 连锁的高 IgM 的 Ig 缺损。

[0628] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 抗体),以治疗,预防,诊断和 / 或诊断慢性骨髓性白血病,急性骨髓性白血病,白血病,histiocytic 白血病,单核细胞性白血病 (如急性单核细胞性白血病),网状细胞增多性白血病,Shilling 型单核细胞性白血病,和 / 或衍生自单核细胞和 / 或单核的细胞和 / 或组织的其它白血病。

[0629] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善单核细胞性白血病性反应,例如见于结核。

[0630] 在另一特异的实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其激动剂,以治疗,预防,诊断和 / 或改善,单核细胞性白细胞增多症,单核细胞性白细胞减少症,单核细胞性贫血和 / 或单核细胞增多症。

[0631] 在一特异的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,和 / 或抗 Neutrokin- α 的抗体和 / 或其激动剂或拮抗剂,用于治疗,预防,检测和 / 或诊断原发 B 淋巴细胞功能失调和 / 或与之相关的疾病和 / 或病理状态。在一实施方案中,这种原发性 B 淋巴细胞功能失调,疾病和 / 或病理状态,特征是完全或部分丧失体

液免疫。特征在于完全或部分丧失体液免疫,且可用本发明的组合物预防,治疗,检测和/或诊断的原发性B淋巴细胞功能失调,疾病和/或病理状态,包括但非限于X连锁的血中丙球蛋白贫乏(XLA),重度联合免疫缺损(SCID),和选择性IgA缺损。

[0632] 在一优选的实施方案中,Neutrokin- α 和/或Neutrokin- α SV多核苷酸,多肽和/或其激动剂或拮抗剂,用于治疗,预防和/或诊断与机体的一或多种各种粘膜相关的疾病。这种疾病包括但非限于粘膜炎,粘膜毁除术,粘液性结肠炎,粘膜与皮肤利什曼病(例如美洲利什曼病,鼻咽利什曼病,和新世界利什曼病),粘膜与皮肤淋巴法综合征(例如Kawasaki病),粘液性肠炎,粘液性表皮样癌,粘液性表皮样肿瘤,粘膜上皮发育不良,粘液性腺癌,粘液性变性,粘液样变性;粘液瘤变性;多发性粘液瘤,粘液样中层高性(如囊中层坏死),粘脂病(包括I型粘脂病,II型粘脂病,III型粘脂病,和IV型粘脂病),粘液性肠炎,粘多糖病(如I型粘多糖尿(即Hurler's综合征),IS型粘多糖病(即Scheie's综合征或V型粘多糖病),II型粘多糖病(即Hunter's综合征),III型粘多糖病(即Sanfilippo's综合征),IV型粘多糖病(即Morquio's综合征),VI型粘多糖病(即Narotiaux-Lamy综合征),VII型粘多糖病(即由于 β -葡糖醛酸酶缺陷所致粘多糖病),和(粘液硫酸盐症)粘多糖尿,粘液脓性结膜炎,粘液性脓,毛霉菌病,粘膜病(即牛病毒腹泻),粘液性结肠炎(如粘液性和粘液膜性结肠炎),和胰纤维性囊肿病(如胰囊性纤维化,Carke-Hadfield综合征,胰纤维囊性病变,胰纤维性囊肿病)。在一特别优选的实施方案中,Neutrokin- α 和/或Neutrokin- α SV多核苷酸,多肽和/或其激动剂和/或拮抗剂,用于治疗,预防和/或诊断粘膜炎,尤其与化疗相关的粘膜炎。

[0633] 在一优选的实施方案中,Neutrokin- α 和/或Neutrokin- α SV多核苷酸,多肽和/或其激动剂和/或拮抗剂,用于治疗,预防和/或诊断与鼻窦炎相关的疾病。

[0634] Neutrokin- α 和/或Neutrokin- α SV多核苷酸或多肽,或其激动剂可以治疗,预防和/或诊断的另一种疾病或症状是骨髓炎。

[0635] Neutrokin- α 和/或Neutrokin- α SV多核苷酸或多肽,或其激动剂可以治疗,预防和/或诊断的另一种疾病或症状是心内膜炎。

[0636] 所有上述应用均可用于兽医制药。

[0637] Neutrokin- α 的拮抗剂包括结合和/或抑制性抗体,反义核酸,核酶,和本发明的Neutrokin- α 多肽。这些可期望逆转上述配体的一些活性,以及发现一些临床或实际应用,如:

[0638] 用于阻断对外源或自身物质的各方面免疫应答。例如包括自身免疫疾病如狼疮,和关节炎,以及对皮肤过敏,炎症,肠道疾病,损伤和病原体的免疫应答。尽管现有数据直接说明了Neutrokin- α 在B细胞和单核细胞相关的病理学中的潜在作用,其它类型细胞也可能表达或应答Neutrokin- α 。因此,Neutrokin- α 如同CD40及其配体一样,可由免疫系统的状况及细胞所处的微环境而调节。

[0639] 用于防止与自身免疫疾病相关的B细胞增殖和Ig分泌的治疗中,如自发性血小板减少性紫癜,系统性红斑狼疮和MS。

[0640] 作为移植物与宿主相对抗的疾病或移植排斥的抑制剂。

[0641] 治疗B细胞恶性肿瘤如ALL,Hodgkins病,非Hodgkins淋巴瘤,慢性淋巴细胞性白血病,浆细胞瘤,多发性骨髓瘤,Burkitt's淋巴瘤,和EBV-转化的疾病。

[0642] 治疗慢性高丙种球蛋白血症,如在未确定重要性的单细胞的丙种球蛋白病(MGUS),Waldenstrom's 病,相对自发性单细胞丙种球蛋白病,和浆细胞瘤中。

[0643] 治疗大 B 细胞淋巴瘤的细胞增殖降低。

[0644] 降低与慢性骨髓性白血病相关的 B 细胞和 Ig 关连物。

[0645] 作为免疫抑制剂。

[0646] 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其拮抗剂可用于在体外或体内调节 IgE 浓度。

[0647] 在另一实施方案中,施用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸,或其拮抗剂,可用于治疗,预防和 / 或诊断 IgE 介导的变态反应,包括但非限于哮喘,鼻炎和湿疹。

[0648] 作为包含 ERK1,COX2 和 Cyclin D2 的信号途径的抑制剂,该途径与 Neutrokin- α 诱导的 B 细胞活化相关。

[0649] 上述应用在众多宿主中均可使用。这种宿主包括但非限于人,鼠,兔,山羊,豚鼠,骆驼,马,小鼠,大鼠,仓鼠,猪,小猪,鸡,牛,绵羊,狗,猫,非人灵长目动物,和人。在特异的实施方案中,宿主是小鼠,兔,山羊,豚鼠,鸡,大鼠,仓鼠,猪,羊,狗或猫。在优选的实施方案中,宿主是哺乳动物。在更优选的实施方案中,宿主是人。

[0650] 激动剂和拮抗剂可与药物合适的载体组合应用。

[0651] 拮抗剂例如可用于抑制 Neutrokin- α 介导的和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的趋化和活化巨噬细胞及其前体,和嗜中性白细胞,嗜碱性粒细胞,B 淋巴细胞,和一些 T 细胞子集如活化的和 CD8 胞毒性 T 细胞,及天然杀伤细胞,在一些自身免疫疾病和慢性炎症及感染性疾病中。自身免疫疾病例如包括多发性硬化,和胰岛素依赖型糖尿病、拮抗剂也可用于治疗,预防和 / 或诊断感染性疾病,包括矽肺,肉状瘤病,原发性肺纤维化,可通过阻止单核吞噬细胞征集和活化而进行。它们也可用于治疗,预防和 / 或诊断原发性嗜伊红性粒细胞综合征,通过阻止嗜伊红性粒细胞产生和迁移而进行。内毒性休克也可由此拮抗剂治疗,通过阻止巨噬细胞迁移和其产生本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽而进行。此拮抗剂还可用于治疗动脉硬化,通过阻止单核细胞浸润动脉壁而进行。此拮抗剂还可用于治疗,预防和 / 或诊断组胺介导的变态反应和免疫功能失调,包括晚期变态反应,慢性荨麻疹,和特应性皮炎,通过抑制趋化因子诱导的肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱粒和组胺释放而进行。也可治疗 IgE 介导的变态反应如过敏性哮喘,鼻炎和湿疹。拮抗剂也可用于治疗,预防和 / 或诊断慢性和急性炎症,通过阻止单核细胞侵入损伤区域而进行。它们也可用于调节正常肺部巨噬细胞群,因为慢性和急性肺部炎症与肺内单核巨噬细胞的汇集有关。拮抗剂还可用于治疗,预防和 / 或诊断风湿性关节炎,通过阻止单核细胞侵入病人关节内的滑液而进行。单核细胞流入量和活化在退化性和炎症性关节病变中起重要作用。拮抗剂可用于干扰由 IL-1 和 TNF 所致的对身体有害的级联反应,通过阻止其它炎症性细胞因子的生物合成而进行。在此方式中,拮抗剂可用于预防炎症。拮抗剂还用于抑制由 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 诱导的前列腺素非依赖性发热。拮抗剂还可用于治疗,预防和 / 或诊断骨髓病变,例如再生障碍性贫血和 myelodysplastic 综合征。拮抗剂还可用于治疗,预防和 / 或诊断哮喘和变态反应,通过阻止肺内嗜伊红性粒细胞累积而进行。拮抗剂还可用于治疗,预防和 / 或诊断亚上皮基底膜纤维化,这是哮喘肺的一个明显特

征。拮抗剂还可用于治疗,预防和/或诊断淋巴瘤(如一或多种本文所列举的淋巴瘤,但非限于此)。

[0652] 所有上述应用均可用于兽医制药。

[0653] 本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和/或其激动剂和/或拮抗剂,可用于治疗,预防,和/或诊断哺乳动物优选人体的各种免疫系统相关疾病。许多自身免疫疾病是由免疫细胞对自身物作为外源物的非适当识别所致。这种非适当识别导致破坏宿主组织的免疫应答。因此,施用本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和/或其激动剂和/或拮抗剂,可抑制免疫应答,尤其 B 细胞的增殖和/或免疫球蛋白的产生,可有效地治疗和/或预防自身免疫疾病。因此,在优选的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 拮抗剂(如 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 的多肽片段和抗 Neutrokin- α 抗体),用于治疗,预防和/或诊断自身免疫疾病。

[0654] 可用本发明 Neutrokin- α 多核苷酸,多肽和/或拮抗剂(如抗 Neutrokin- α 抗体)治疗,预防和/或诊断的自身免疫疾病,包括但非限于自身免疫性溶血性贫血,自身免疫性新生儿血小板减少,原发性血小板减少性紫癜,自身免疫细胞减少,溶血性贫血,抗磷脂综合征,皮炎,过敏性脑脊髓炎,心肌炎,复发性多发软骨炎,风湿性心脏病,肾小球肾炎(即 IgA 肾病),多发性硬化,神经炎,眼色素层炎,多发内分泌病,紫癜(如 Henloch-Schoenlein 紫癜),Reiter's 病,Stiff-Man 综合征,自身免疫性肺炎,Guillain-Barre 综合征,胰岛素依赖型糖尿病和自身免疫性眼部炎症。

[0655] 可用本发明的组合物治疗,预防和/或诊断的另外的自身免疫性疾病,包括但非限于自身免疫性甲状腺炎,亚甲状腺炎(即 Hashimoto's 甲状腺炎),(通常特征是由细胞介导的和体液甲状腺毒性),系统性红斑狼疮(通常特征是血液循环和局部产生免疫复合物),Goodpasture's 综合征(通常特征是抗基底膜抗体),受体自身免疫性如(a)Grave's 病(通常特征是 TSH 受体抗体),(b)Myasthenia Gravis(通常特征为乙酰胆碱受体抗体)和(c)胰岛素抗性(通常特征为胰岛素受体抗体),自身免疫性溶血性贫血(通常特征为抗体敏化的 RBCs 的吞噬作用),自身免疫性血小板减少性紫癜(通常特征为抗体敏化的血小板的吞噬作用)。

[0656] 可用本发明的组合物治疗,预防和/或诊断的另外的自身免疫疾病,包括但非限于风湿性关节炎(通常特征为关节中的免疫复合物定性),具有抗胶原抗体的 scleroderma(通常特征在于核仁抗体及其它核抗体),混合的结缔组织疾病(通常特征在于可提取核抗原的抗体(如核糖核蛋白)),多发性肌炎/表皮肌炎(通常特征在于非组 ANA),恶性贫血(通常特征为抗胃壁细胞,微粒体,和内因子抗体)原发性 Addison's 病(通常特征为体液和细胞介导的肾上腺毒性),不育症(通常特征为抗精子抗体),肾小球肾炎(通常特征为肾小球基膜抗体或免疫复合物)如原发性肾小球肾炎和 IgA 肾病,大疱性天疱疮(通常特征为基膜中的 IgG 和补体),Sjogren's 综合征(通常特征为多组织抗体和/或非组 ANA(SS-B)),糖尿病(通常特征为细胞介导的和体液胰岛细胞抗体),和肾上腺素药物抗性(包括哮喘或囊性纤维化肾上腺素药物抗性)(通常特征为 β 肾上腺素能受体抗体)。

[0657] 可用本发明的组合物治疗,预防和/或诊断的另外的自身免疫疾病,包括但非限

于慢性活动性肝炎（通常特征为平滑肌抗体），原发性胆汁性肝硬化（通常特征为线粒体抗体），其它内分泌腺病变（通常特征为一些情况中的特异组织抗体），白癜风（通常特征为黑色素细胞抗体），血管病变（通常特征为血管壁内的 Ig 和补体和 / 或低血清补体），MI 后遗症（特征在于心肌抗体），心脏术后综合征（通常特征为心肌抗体），荨麻疹（通常特征为 IgE 的 IgG 和 IgM 抗体），特应性皮炎（通常特征为 IgE 的 IgG 和 IgM 抗体），哮喘（通常特征为 IgE 的 IgG 和 IgM 抗体），炎症性肌病和许多其它炎症，granulomatous，退化性和其它萎缩性疾病。

[0658] 在一优选的实施方案中，上述自身免疫性疾病和功能失调和 / 或病理状态，用抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体治疗，预防和 / 或诊断。

[0659] 在一特异的优选实施方案中，风湿性关节炎用本发明的抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或抗 Neutrokin- α SV 抗体和 / 或其它拮抗剂治疗，预防和 / 或诊断。

[0660] 在一特异的优选实施方案中，狼疮用本发明的抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体和 / 或其它拮抗剂治疗，预防和 / 或诊断。

[0661] 在一特异的优选实施例中，与狼疮相关的肾炎用本发明的抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体和 / 或其它拮抗剂治疗，预防和 / 或诊断。

[0662] 在一特异的实施方案中，Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽，或其拮抗剂（如抗 Neutrokin- α 抗体和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体），用于治疗或预防系统性红斑狼疮和 / 或与之相关的疾病。可用本发明的 Neutrokin- α 抗体和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽，或其拮抗剂治疗的与狼疮相关的疾病，包括但不限于血液疾病（如溶血性贫血，白血病，淋巴细胞性贫血，和血小板性贫血），免疫性疾病（如抗 DNA 抗体，和抗 Sm 抗体），皮疹，光敏性，口腔溃疡，关节炎，发热，疲劳，体重降低，浆液性疾病（如胸膜炎），肾脏疾病（如肾炎），神经病变（如发作性周围神经病变，CNS 相关的疾病），胃肠道疾病，Raynaud 现象，如心包炎。在一优选的实施方案中，Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽，或其拮抗剂（如抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体），用于治疗或预防与系统性红斑狼疮相关的肾脏疾病。在一更优选的实施方案中，Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽，或其拮抗剂（如抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体），用于治疗或预防与系统性红斑狼疮相关的肾炎。

[0663] 相似地，变态反应疾病如哮喘（尤其过敏性哮喘）或其它呼吸道疾病，也可用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂治疗。另外，这些分子可用于治疗，预防和 / 或诊断对抗原分子的过敏性，超敏性，或血液基团的不相容性。

[0664] 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽，和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂，也可用于治疗，预防和 / 或诊断器官排斥或移植宿主排斥疾病（GVHD）和 / 或与之相关的疾病。移植的组织通过免疫应答破坏宿主免疫细胞而发生器官排斥。相似地，在 GVHD 中也包含免疫应答，但在这种情况下，外源移植的免疫细胞破坏宿主组织。施用抑制免疫应答，尤其抑制 T 细胞增殖，分化或趋化性的本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和 / 或其激动 / 或拮抗剂，可有效地防止器官排斥或 GVHD。

[0665] 相似地,本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,也可用于调节炎症。例如,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,可抑制炎症应答中细胞的增殖和分化。这些分子可用于治疗,预防和 / 或诊断急性和慢性炎症,包括慢性前列腺炎,肉芽肿前列腺炎,和软化斑,与感染相关的炎症(如败血症休克,或全身性炎症反应综合征(SIRS)),局部缺血再灌注损伤,内毒素致死性疾病,关节炎,补体介导的过急性排斥,肾炎,细胞因子或趋化因子诱导的肺部损伤,炎症性肠道疾病, Crohn's 病,或由于细胞因子(如 TNF 或 IL-1) 过量产生所致疾病。

[0666] 在一特异的实施方案中,本发明的抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体用于治疗,预防,调节,检测和 / 或诊断炎症。

[0667] 在一特异的实施方案中,本发明的抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体用于治疗,预防,调节,检测和 / 或诊断炎症性疾病。

[0668] 在另一特异的实施方案中,本发明的抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体用于治疗,预防,调节,检测和 / 或诊断变态反应和 / 或高敏感性疾病。

[0669] 抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 抗体可用于结合和抑制 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 活性,以通过在损伤后阻止中性粒细胞浸润肺部而治疗,预防和 / 或诊断 ARDS。本发明的激动剂和拮抗剂可与药物合适的载体组合应用,如后文所述。

[0670] 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 和 / 或 Neutrokin- α 受体多核苷酸或多肽,和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,用于治疗,预防和 / 或诊断肺系疾病(如支气管疾病,例如 sinopulmonary 和支气管感染,及与之相关的疾病及其它呼吸道疾病)。在特异的实施方案中,这种疾病包括但非限于支气管腺瘤,支气管哮喘,肺炎(如支气管肺炎,和结核性支气管肺炎),慢性阻塞性肺部疾病(COPD),支气管息肉,支气管扩张(如干性支气管扩张,桶状支气管扩张,和囊状支气管扩张),支气管腺癌,支气管癌,细支气管炎(如渗出性细支气管炎,纤维瘤闭塞性细支气管炎和增殖性支气管炎),支气管-肺泡癌,支气管哮喘,支气管炎(如哮喘性支气管炎, Castellani's 支气管炎,慢性支气管炎,哮喘性支气管炎,纤维蛋白性支气管炎,出血性支气管炎,感染性禽支气管炎,闭塞性支气管炎,可塑性支气管炎,假膜性支气管炎,腐败性支气管炎,和蠕虫性支气管炎),支气管中心性肉芽肿病,支气管性水肿,支气管食管病,支气管原发性癌,支气管原发性囊肿,支气管结石病,支气管软化,支气管真菌病(如支气管肺曲霉病),支气管肺螺旋体病,出血性支气管炎,支气管粘液溢,支气管痉挛,支气管出血,支气管狭窄, Biot's 呼吸音,支气管呼吸音, Kussmaul 呼吸音, Kussmaul-kien 呼吸音,呼吸性酸中毒,呼吸性碱中毒,新生儿呼吸窘迫综合征,呼吸功能不全,呼吸道硬结病,呼吸道合胞病毒,等。

[0671] 在一特异的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,用于治疗,预防,和 / 或诊断慢性阻塞性肺部疾病(COPD)。

[0672] 在另一实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,用于治疗,预防和 / 或诊断与纤维化相关的病变,例如但非限于囊性纤维化(包括胰腺囊性纤维化, Clarke-Hadfield 综合征,胰纤维性囊肿,

和粘液性病变), 心肌纤维化, 原发性腹膜后纤维化, 柔脑脊膜纤维化, 纵隔纤维化, 表皮下小结纤维化, 中枢周围纤维化, 肌周纤维化, 声带纤维化, 外膜下纤维化和 Symmer' s 粘土纤维化。

[0673] 已知 TNF 家族配体是最多效的细胞因子, 诱导大量细胞应答, 包括胞毒性, 抗病毒活性, 免疫调节活性, 和一些基因的转录调节 (D. V. Goeddel 等, “肿瘤坏死因子: 基因结构与生物活性”, *Symp. Quant. Biol.* 51:597-609(1986), 冷泉港; B. Beutler 和 A. Cerami, *生物化学分析研究* 57:505-518(1988); L. J. Old. *Sci. Am.* 258:59-75(1988); W. Fiers, *FEBs 通信* 284:199-224(1991))。TNF 家族配体, 包括本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV, 通过与 TNF 家族受体结合而诱导这样的各种细胞应答。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽确信激发有效的细胞应答, 包括细胞, 细胞系, 组织。组织培养物或病人的基因型, 表型和 / 或形态改变。如上所述, 这种细胞应答不仅包括正常的对 TNF 家族配体的生理应答, 还包括与细胞程序死亡增加或抑制相关的疾病。细胞程序死亡是一种生理机制, 包含于免疫系统外周 B 和 / 或 T 淋巴细胞的缺失中, 且其功能失调可导致许多不同的病理变化 (J. C. Ameisen, *AIDS* 8:1197-1213, (1994); P. H. Krammer 等, *免疫学通用观点* 6:279-289(1994))。

[0674] 可用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽, 及其激动剂和拮抗剂诊断, 治疗或预防的与细胞存活性提高或细胞程序死亡抑制相关的疾病, 包括癌 (如囊性淋巴瘤, p53 突变所致的癌, 和激素依赖性肿瘤, 包括但非限于结肠癌, 心肌肿瘤, 胰管癌, 黑素瘤, 视网膜神经胶质瘤, 恶性胶质瘤, 肺癌, 肠癌, 睾丸癌, 骨癌, 成神经细胞瘤, 粘液瘤, 肌瘤, 淋巴瘤, 内皮瘤, 成骨 C 瘤, 破骨细胞瘤, 骨肉瘤, 软骨肉瘤, 腺瘤, 乳腺癌, 前列腺癌, Kaposi' s 肉瘤和卵巢癌); 自身免疫系统疾病 (如系统性红斑狼疮, 和免疫相关的肾小球肾炎, 风湿性关节炎); 病毒感染 (如疱疹病毒, 痘病毒, 和腺病毒); 炎症; 移植物抗宿主; 急性移植排斥和慢性移植排斥。因此, 在优选的实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和 / 或其激动剂或拮抗剂, 用于治疗, 预防和 / 或诊断自身免疫系统疾病和 / 或抑制, 癌症的生长, 进展和 / 或转移, 包括但非限于本文所述的那些癌症, 例如淋巴细胞性白血病 (包括例如 MLL, 和慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 和淋巴滤泡瘤。在另一实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽用于激活癌细胞或组织 (如 B 细胞系相关的癌症 (如 CLL 和 MLL), 淋巴细胞性白血病, 或淋巴瘤) 的分化或增殖, 从而使细胞更易接受癌症治疗 (如化疗或放疗)。

[0675] 另外, 在其它实施方案中, 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽或其激动剂或拮抗剂, 用于抑制恶性肿瘤及相关疾病的生长, 进展和 / 或转移, 这些疾病如白血病 (包括急性白血病 (如急性淋巴细胞性白血病, 急性骨髓细胞性白血病 (包括原粒 C 性白血病, 早幼粒细胞性白血病, 髓单核细胞性白血病, 单核细胞性白血病, 和红白血病)) 和慢性白血病 (如慢性髓细胞性 (粒细胞) 白血病和慢性淋巴细胞性白血病)), 真性红细胞增多, 淋巴瘤 (Hodgkin' s 病和非 Hodgkin' s 病), 多发性髓瘤, Waldenstrom' s 巨球蛋白血症, 重链病, 和固态肿瘤包括但非限于肉瘤和癌如纤维肉瘤, 粘液肉瘤, 脂肉瘤, 软骨肉瘤, 成骨肉瘤, 脊髓瘤, 血管肉瘤, 内皮肉瘤, 淋巴血管肉瘤, 淋巴血管内皮肉瘤, 滑膜瘤, 间皮瘤, Ewing' s 瘤, 平滑肌肉瘤, 横纹肌肉瘤, 结肠癌, 胰腺癌, 乳腺

癌,卵巢癌,前列腺癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,囊腺癌,髓癌,支气管原癌,肾细胞癌,肝细胞癌,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎癌,Wilm's 瘤,宫颈癌,睾丸癌,肺癌,小细胞肺癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,星形细胞癌,成神经管细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,成血管细胞瘤,听神经瘤,少突神经胶质瘤,黑色素瘤,成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0676] 可用本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽及其激动剂和拮抗剂诊断,治疗或预防的与细胞程序死亡增加的疾病,包括 AIDS ;神经变性疾病 (如 Alzheimer's 病, Parkinson's 病,肌萎缩性脊髓侧索硬化,视网膜炎,小脑变性);骨髓发育不良综合征 (如再生障碍性贫血),局部缺血损伤 (如心梗,中风和再灌注损伤),毒素引起的肝脏疾病 (如由乙醇所致),败血症休克,恶病质,和厌食。因此,在优选的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和 / 或其激动剂或拮抗剂,用于治疗,预防和 / 或诊断上述疾病。

[0677] 在优选的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽和 / 或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 抗体),以剂量依赖性方式抑制人组织细胞淋巴瘤 U-937 细胞的生长。在另一优选的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽和 / 或其激动剂或拮抗剂 (如抗 Neutrokin- α 抗体),抑制 PC-3 细胞, HT-29 细胞, HeLa 细胞, MCF-7 细胞和 A293 细胞的生长。在另一更优选的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽和 / 或其激动剂 (如抗 Neutrokin- α 抗体),用于抑制前列腺癌,结肠癌,宫颈癌和乳腺癌的生长,进展和 / 或转移。

[0678] 因此,在另一优选的实施方案中,本发明涉及增加通过 TNF 家族配体诱导的细胞程序死亡的方法,包括为表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体的细胞施用有效量的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV,或其激动剂或拮抗剂,能提高或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的信号。优选地, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的信号化提高或降低可治疗,预防和 / 或诊断其中细胞程序死亡降低或细胞因子和吸附分子表达降低的疾病。激动剂或拮抗剂可包括可溶形式的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 及直接抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的单克隆抗体。

[0679] 另一方面,本发明涉及一种抑制由 TNF 家族配体诱导的细胞程序死亡的方法,其包括为表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体的细胞施用有效量的能提高或降低 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的信号化的激动剂或拮抗剂。优选地, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的信号化提高或降低可治疗,预防和 / 或诊断其中细胞程序死亡或 NF- κ B 表达提高的疾病。激动剂或拮抗剂可包括可溶形式的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 及直接抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的单克隆抗体。

[0680] 由于 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 属于 TNF 超家族,此多肽也应调节血管生成。另外,由于 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 抑制免疫细胞功能,此多肽具有广泛的抗炎活性。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 可用作抗新血管生成剂,以治疗,预防和 / 或诊断固态肿瘤,通过刺激宿主防御细胞如胞毒性 T 细胞和巨噬细胞侵袭和

活化,及通过抑制肿瘤的血管生成而进行。本领域技术人员可识别其中血管增殖是非所需的其它非癌指征。它们也可用于增强宿主抗慢性和急性感染的抗性,例如通过引诱和活化杀微生物的白细胞而抗肌细菌性感染。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 也可通过抑制 IL-2 生物合成而抑制 T 细胞增殖,以治疗 T 细胞介导的自身免疫疾病和淋巴细胞性白血病(包括例如慢性淋巴细胞性白血病(CLL))。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 也可用于刺激伤口愈合,通过募集碎片清除和启动炎症细胞的结缔组织而进行。以相同的方式,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 也可用于治疗,预防和 / 或诊断其它纤维化疾病,包括肝硬化,骨关节炎和肺纤维化。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 还增加嗜伊红性粒细胞的含量,该细胞具有杀伤侵染组织的大量寄生虫的独特功能,如血吸虫、毛线虫和蛔虫。其也可用于调节血细胞生成,通过调节各种造血细胞祖细胞的激活和分化而进行,例如从化疗后的骨髓中释放成熟白细胞,即在干细胞转移中。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 还可用于治疗,预防和 / 或诊断脓毒症。

[0681] 本发明的多核苷酸或 / 或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂可用于诊断和治疗或预防许多疾病和 / 或病理变化。这种疾病和病理变化包括但非限于癌症(如免疫细胞相关的癌症,乳腺癌,前列腺癌,卵巢癌,淋巴滤泡瘤,与 p53 突变或改变相关的癌症,脑瘤,膀胱癌,宫颈癌,结肠癌,结肠直肠癌,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,胃癌等),淋巴增殖性疾病(如淋巴腺病变),微生物(如病毒,细菌等)感染,(如 HIV-1 感染,HIV-2 感染,疱疹病毒感染(包括但非限于 HSV-1,HSV-2,CMV,VZV,HHV-6,HHV-7,EBV),腺病毒感染,痘病毒感染,人乳头瘤病毒感染,肝炎病毒感染(如 HAV,HBV,HCV 等),幽门螺旋菌感染,葡萄球菌等),寄生虫感染,肾炎,骨病(如骨质疏松症),动脉粥样硬化,疼痛,心血管疾病(如新血管生成,血管生成减少,或循环血量减少(如缺血性疾病)如心肌梗塞,中风等)),AIDS,变态反应,炎症,神经变性疾病(如 Alzheimer's 病,Parkinson's 病,肌萎缩性侧索硬化,色素沉着性视网膜炎,小脑变性等),移植排斥(急性和慢性),移植物抗宿主病,骨髓发育不良所致疾病(如再生障碍性贫血等),风湿病中关节组织破坏,肝脏疾病(如急性和慢性肝炎,肝损伤和肝硬化),自身免疫性疾病(如多发性硬化,风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,免疫复合物肾小球肾炎,自身免疫性糖尿病,自身免疫性血小板减少性紫癜,Grave's 病,Hashimoto's 甲状腺炎等),心肌病(如扩张性心肌病),糖尿病,糖尿病并发症(如糖尿病性肾病,糖尿病性神经病变,糖尿病性视网膜病变),流感,哮喘,牛皮癣,肾小球肾炎,败血症休克和溃疡性结肠炎。

[0682] 本发明的多核苷酸和 / 或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂用于促进血管生成,伤口愈合(如创伤,烧伤和骨折)。本发明的多核苷酸和 / 或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,还用作佐剂以增强对特异抗原的免疫应答,抗病毒免疫应答。

[0683] 通常地,本发明的多核苷酸和 / 或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,用于调节(即激发或降低)免疫应答。例如,本发明的多核苷酸和 / 或多肽可用于准备或自外科手术,外伤,放疗,化疗和移植中恢复,或可用于在年老者 and 免疫损害者中辅助免疫应答和 / 或恢复。或者,本发明的多核苷酸和 / 或多肽和 / 或其激动剂和 / 或拮抗剂,用作免疫抑制剂,例如在治疗或预防自身免疫疾病中。在特异的实施方案中,本发明的多核苷酸和 / 或多肽用于治疗或预防慢性炎症,变态反应或自身免疫疾病,如本文所述的及本领域已知的其它疾病。

[0684] 优选地,用 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸或多肽,和 / 或其激动剂或拮抗剂(如抗 Neutrokin- α 抗体),可通过将有效量的本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽,或其激动剂或拮抗剂,施用于病人;或自病人移出细胞,用 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多核苷酸供养此细胞,然后将此工程化的细胞再施用于病人(来自体内治疗)。另外,如本文进一步所述 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽或多核苷酸可用作疫苗中的佐剂,以产生抗感染性疾病的免疫应答。

[0685] 配方和施用方法

[0686] 考虑各个病人的临床条件(尤其只用 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的副作用), Neutrokin- α 和 / 或多肽组合物的输送位置,施用方法,施用程序,及其它已知因素,为取得良好医疗应用,配制 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽组合物(优选含有是可溶形式 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 胞外域的多肽),和确定剂量。“有效量”的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽因此通过这种条件而确定。

[0687] 一般情况下,非肠道施用的每剂 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的总药物有效量范围在大约 $1 \mu\text{g/kg}$ 天至 10mg/kg 体重 / 天,尽管如上所述将进行治疗性决定。优选地此剂量为至少 0.01mg/kg 体重 / 天,更优选在 $0.01\text{--}1\text{mg/kg}$ 体重 / 天。

[0688] 在另一实施方案中,施用于人的本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的剂量在 $0.0001 \sim 0.045\text{mg/kg}$ 体重 / 天之间,优选在 $0.0045 \sim 0.045\text{mg/kg}$ 体重 / 天之间,更优选为 $45 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 天;施用于小鼠的剂量为大约 3mg/kg 体重 / 天。

[0689] 如果连续应用, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽施用剂量为大约 $1 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 小时 $\sim 50 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 小时,每天注射 1-4 次或连续皮下灌注,例如用微泵。也可使用静脉内输液。

[0690] 治疗时间根据根据效应而加以确定。

[0691] 在一特异的实施方案中,非肠道施用每剂 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的总药物有效量范围为大约 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 天 $\sim 45 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 天,尽管如上所述要进行治疗性决定。优选地,此剂量至少为 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 天,更优选施用于人的剂量在 $0.01 \sim 50 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 天之间。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 可连续灌注,每天多次注射(如每天三次或更多次,或每天两次,每天注射一次,或间歇注射(如每日二次,每日一次,隔日一次,每周二次,一周一次,二周一次,一月一次,二月一次,三月一次)。如果连续应用, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽施用剂量为大约 $0.001 \sim 10 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 小时 $\sim$ 大约 $50 \mu\text{g/kg}$ 体重 / 小时,每天注射 1-4 次或连续皮下灌注,例如使用微泵。

[0692] 施用的本发明组合物的有效剂量可通过本领域已知方法确定,注明参数如生物半衰期,生物效力,和毒性。这种测定已为本领域技术人员所熟知。

[0693] 在治疗期间机体对 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的生物暴露在确定性和 / 或药物有效量中也起重要作用。剂量的变化如重复施用相对低剂量的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽相对长的一段时间,与重复施用相对高剂量的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽相对短的一段时间,具有不同的治疗和 / 或药理学效应。见例如实施例 6 所示的血清免疫球蛋白水平试验。

[0694] 使用 Freireich, E. J. 等(癌症化疗报道 50(4):219-44(1966))提供的

等价表面积剂量转变因子,本领域技术人员能常规将得自使用 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在给定试验中的数据,转换为在另一试验系中每剂施用的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的药物有效量的准确估定值。通过在小鼠中施用 Neutrokin- α 所得的试验数据(见例如实施例 6),可通过 Freireich 等提供的转换因子,准确地估定 Neutrokin- α 在大鼠,猴,狗和人中的药物有效量。以下转换表(表 3)概述了 Freireich 等提供的数据。表 3 提供了将在一个物种中以 mg/kg 体重表示的剂量转换为在另一物种中以 mg/kg 体重表示的等价表面积剂量的近似因子。

[0695] 表 3 等价表面积剂量转换因子

[0696]

自从	小鼠 (20g)	大鼠 (150g)	猴 (3.5kg)	狗 (8kg)	人 (60kg)
小鼠	1	1/2	1/4	1/6	1/12
大鼠	2	1	1/2	1/4	1/7
猴	4	2	1	3/5	1/3
狗	6	4	5/3	1	1/2
人	12	7	3	2	1

[0697] 因此,例如使用表 3 中所提供的转换因子,在小鼠中 50mg/kg 的剂量转换为在猴中为 12.5mg/kg 的适当剂量,因为 $(50\text{mg/kg}) \times 1/4 = 12.5\text{mg/kg}$ 。另外,在小鼠中使用 0.02, 0.08, 0.8, 2 和 8mg/kg 的剂量等于在人中使用 1.667 $\mu\text{g/kg}$, 6.67 $\mu\text{g/kg}$, 66.7 $\mu\text{g/kg}$, 166.7 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.667mg/kg 的剂量所起的作用。

[0698] 含有本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的药物组合物可通过口服,直肠,非肠道,皮下, intracistemally, 阴道内,腹膜内,局部(通过粉末,软膏,滴剂或贴膏形式),颊部,或经口腔或鼻腔喷雾(如蒸气或粉末吸入)等施用。在一实施方案中,“药物合适的载体”是指无毒的固体,半固体或液体充填剂,稀释剂,胶囊化物或任何类型的配方辅助剂。在一特异的实施方案中,“药物合适的”是指政府管理机构美国药管部门许可用于动物尤其人的物品。根据此实施方案适当的药物载体非限制性地例如由 E. W. Martin 在“Remington's 药物科学”中所提供的,并包括无菌液体,如水和油,包括源自石油,动物,植物或合成的,如花生油,豆油,矿物质油,芝麻油等。当药物组合物是静脉内注射时,水是优选的载体。盐水溶液和葡萄糖溶液及甘油溶液可用作液体载体,尤其用作可注射的溶液,如果需要,此组合物也可含有微量的润湿剂或乳化剂,或 PH 缓冲剂。这些组合物可以是溶液,悬浮液,乳状液,片剂,丸剂,胶囊,粉末,缓释配方等形式。

[0699] 术语“非肠道”是指包括静脉内,腹膜内,皮下和动脉内及臀肌注射和灌注的施用模式。

[0700] 在一优选的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 组合物(包括多肽,多核苷酸及其抗体,激动剂和 / 或拮抗剂)是经皮下施用的。

[0701] 在另一优选的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 组合物(包括多肽,多核苷酸及其抗体,激动剂和 / 或拮抗剂)是经静脉内施用的。

[0702] 本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 组合物也可通过缓释系统而适

当施用。缓释组合物例如包括适当的聚合物（如半透性聚合基质，如薄膜或微囊），适当的疏水物（如适当油乳液），或离子交换树脂，和少量可溶衍生物（如少量可溶盐）。

[0703] 缓释基质包括聚乳酸（美国专利 No. 3773919, EP58481），L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物（Sidman, V. 等, 生物聚合物 22 :547-556(1983)），聚（乙-羟乙基甲基丙烯酸酯）（R. Langer 等, J. Biomed. Mater. Res. 15 :167-277(1981)），和 R. Langer. 化学技术 12 :98-105(1982)，乙基乙烯乙酸酯（R. Langer 等, Id.）或聚-D-3-羟丁酸（EP 133988）。

[0704] 缓释组合物还包括脂质体载留的本发明组合物（见 Langer, 科学 249 :1527-1533(1990)）;Treat 等, 感染性疾病和癌症治疗中的脂质体, Lopez-Berestein 和 Fidler(编辑), Liss, 纽约, p317-327 和 353-365(1989)。含有 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的脂质体可通过已知方法制备, 见 DE 3218121 ;Epstein 等, 美国科学院院报 82 :3688-3692(1985) ;Hwang 等, 美国科学院院报 77 :4030-4034(1980) ;EP 52322 ;EP 36676 ;EP 88046 ;EP 143949 ;EP 142641 ;日本专利申请 83-118008 ;美国专利 No. 4485045 和 4544545 ;及 EP 102324。通常地, 脂质体是小单片状的（大约 200-800Angstroms），其中脂质含量大于 30mol 胆固醇, 调节选择比例以最佳进行 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽治疗。

[0705] 在另一实施方案中, 本发明的缓释组合物包括本领域已知的晶体配方。

[0706] 在另一实施方案中, 本发明的组合物通过泵输送（见 Langer, 如前 ;Sefton, CRC Crit Ref. Biomed. Eng. 14 :201(1987) ;Buchwald 等, 外科学 88 :507(1980) ;Saudek 等, N. Engl. J. Med 321 :574(1989)）。

[0707] 其它控制释放系统见于 Langer 所述（科学 249 :1527-1533(1990)）。

[0708] 就非肠道施用而言, 在一实施方案中, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽一般以所需纯度, 以单位剂量可注射形式（溶液, 悬浮液或乳状液），与药物合适载体, 即在应用剂量和浓度对受体无毒性并与配方中其它配料可相容的载体。例如, 配方优选不包括氧化剂和已知对多肽不利的其它化合物。

[0709] 一般地, 通过将 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽与液体载体或充分分开的固体载体或二者均匀和密切接触而配制配方。然后, 如果需要, 将产物制成所需形状。优选地, 此载体是非肠道载体, 更优选是与受体血液等渗的溶液。这种载体例如包括水, 盐水, 林格氏液, 和葡萄糖溶液。非水相载体如固定脂和乙基油酸以及脂质体在此也可使用。

[0710] 载体适当地含有少量添加剂如增强等渗性和化学稳定性。这种物质在应用剂量和浓度对受体是无毒的, 包括缓冲剂如磷酸, 柠檬酸, 琥珀酸, 乙酸及其它有机酸或其盐 ;抗氧化剂如抗坏血酸 ;低分子量（小于 10 个残基）多肽如聚精氨酸或三肽 ;蛋白质如血清白蛋白, 明胶或免疫球蛋白 ;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮 ;氨基酸如甘氨酸, 谷氨酸, 天冬氨酸或精氨酸 ;单糖, 二糖或其它碳水化合物包括纤维素或其衍生物, 葡萄糖, 甘露糖, 蔗糖或糊精 ;螯合剂如 EDTA ;糖醇如甘露糖醇或山梨糖醇 ;反荷离子如钠离子 ;防腐剂如甲酚、苯酚、氯丁醇, 苄乙醇, 和对羟基苯甲酸酯类和 / 或非离子性表面活性剂如聚山梨醇酯, poloxamers 或 PEG。

[0711] 在这种载体中配制的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的浓度为大

约 0.001mg/ml ~ 100mg/ml, 或 0.1mg/ml ~ 100mg/ml, 优选 1-10mg/ml, 或 1-10mg/ml, PH 为大约 3-10, 或 2-8, 优选 5-8, 更优选 6-7。应知使用一些前述受体, 载体或稳定剂将导致 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 形成盐。

[0712] 用于治疗性施用的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽必须是无菌的。可通过无菌滤膜 (如 0.2micron 的膜) 过滤而达到无菌。治疗性 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽多肽组合物一般置于具有无菌通道的容器内, 例如静脉内注射溶液包或具有可由皮下注射针头穿入的瓶塞的小瓶内。

[0713] Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽通常在单位剂量或多剂量容器内贮存, 例如密封安瓿或小瓶, 以水溶液形式或可重建的冻干形式。冻干配方例如是 10ml 小瓶内装有 5ml 无菌过滤的 1% (w/v) Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽水溶液, 将所得混合物冻干。灌注液通过用无菌注射用水重建冻干的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽而制备。

[0714] 或者, 将 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽以冻干形式贮存在单剂量容器内。此灌注液用无菌注射载体重配。

[0715] 本发明还提供了药物包装或试剂盒。包含一或多个充填一或多种本发明药物组合物配料的容器。这种容器还附有由负责生产, 使用或销售药物或生物制品审批的政府机构出具的许可用于人体的通知。另外, 本发明的多肽可与其它治疗性化合物联合应用。

[0716] 本发明的组合物可单独或其它佐剂组合施用。可与本发明的组合物组合使用的佐剂, 包括但非限明矾, 明矾加上脱氧胆酸盐 (Immuno Ag), MTP-PE (Biocine Corp.) QS21 (Genentech, Inc.), BCG 和 MPI。在一特异的实施方案中, 本发明的组合物与 QS-21 组合施用。可与本发明组合物组合使用的其它佐剂包括但非限单磷酸脂质免疫调节剂, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, 铝盐, MF-59 和病毒佐剂。可与本发明组合物使用的疫苗包括但非限于 MMR (麻疹, 流行性腮腺炎, 风疹) 疫苗, 脊髓灰质炎疫苗, 水痘疫苗, 破伤风疫苗, 白喉疫苗, 甲肝疫苗, 乙肝疫苗, 嗜血杆菌乙型流感疫苗, 百日咳疫苗, 肺炎疫苗, 流感疫苗, Lyme's 病疫苗, 霍乱疫苗, 黄热病疫苗, 流脑疫苗, 狂犬病疫苗, 伤寒热疫苗, 百日咳疫苗和 / 或 PNEUMOVAX-23™。可伴随性组合施用, 如作为混合物, 分离地但同时施用; 或可相继组合施用, 此包括呈递, 其中组合剂作为治疗混合物一起施用, 还包括组合剂分别地但同时地如经过分别的静脉通道注入同一个体内。“组合”施用还包括分别先施用一种化合物, 然后再施用另一种。

[0717] 在另一特异的实施方案中, 本发明的组合物与 PNEUMOVAX-23™ 组合使用, 治疗, 预防和 / 或诊断感染性疾病和 / 或与之相关的任何疾病。在一实施方案中, 本发明的组合物与 PNEUMOVAX-23™ 组合施用, 治疗, 预防和 / 或诊断任何革兰氏阳性菌感染和 / 或与之相关的任何疾病。在另一实施方案中, 本发明的组合物与 PNEUMOVAX-23™ 组合施用, 治疗预防和 / 诊断与肠杆菌属和 / 或链霉菌属一或多个成员相关的感染。在另一实施方案中, 本发明的组合物与 PNEUMOVAX-23™ 组合使用, 治疗, 预防和 / 或诊断与一或多个乙型链球菌属成员相关的疾病。在另一实施方案中, 本发明的组合物与 PNEUMOVAX-23™ 组合使用, 治疗, 预防和 / 或诊断与肺炎链球菌相关的疾病。

[0718] 本发明的组合物可单独施用, 或其它治疗剂组合施用, 包括但非限于化疗剂, 抗生素, 抗病毒剂, 类固醇和非类固醇抗炎症剂, 常规免疫治疗剂和细胞因子。组合施用可伴

随施用如作为混合物,分别地但同时施用;或相继施用。包括组合剂作为治疗性混合物一起施用,也包括组合剂分别地但同时施用,如通过分别的静脉通道同时注入相同个体中,“组合”施用还包括分别先施用一种化合物,然后再施用另一种。

[0719] 在一实施方案中,本发明的组合物与 TNF 家族的其它成员组合施用。可与本发明组合物组合施用的 TNF, TNF 相关的或类 TNF 分子包括但非限于可溶形式的 TNF- α 和 / 或 α -淋巴毒素 (α -LT, 也称为 TNF- β), LT- β (在异源三聚体 LT- α 2- β 复合物中发现的), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 40-1BBL, DcR3, OX40L, γ -TNF (国际公开 WO 96/14328), AIM-I (国际公开 WO 97/33899), AIM-II (国际公开 WO 97/34911), APRIL (J. Exp. Med. 188(6):1185-1190), α -内因子 (国际公开 WO98/07880), TR6 (国际公开 WO 98/30694), OPG 和 Neutrokin- α (国际公开 WO 98/18921), OX40 和神经生长因子 (NGF) 和可溶形式的 Fas, CD30, CD27, CD40 和 4-1BB, TR2 (国际公开 WO98/34095), DR3 (国际公开 WO 97/33904), DR4 (国际公开 WO98/32856), TR5 (国际公开 WO 98/30693), TR6 (国际公开 WO98/30694) TR7 (国际公开 WO 98/41629), TRANK, TR9 (国际公开 WO 98/56892), TR10 (国际公开 WO 98/54202), 312C2 (国际公开 WO 98/06842) 和 TR12。

[0720] 在一优选的实施方案中,本发明的组合物与 CD40 配体 (CD40L), 可溶形式的 CD40L (如 AVRENDTM), CD40L 的生物活性片段, 变体或衍生物, 抗 CD40L 抗体 (如激动性或拮抗性抗体), 和 / 或抗 CD40 抗体 (如激动性或拮抗性抗体)。

[0721] 在一些实施方案中,本发明的组合物与抗逆转录病毒制剂, 核苷逆转录酶抑制剂, 非核苷逆转录酶抑制剂, 和 / 或蛋白酶抑制剂组合施用。可与本发明组合物组合施用的核苷逆转录酶包括但非限于 RETROVIRTM (zidovudine/AZT), VIDEXTM (didanosine/ddI), HIVIDTM (zalcitabine/ddC), ZERITTM (stavudine/d4T), EPIVIRTM (lamivudine/3TC), 和 COMBIVIRTM (zidovudine/lamivudine)。可与本发明组合物组合施用的非核苷逆转录酶包括但非限于 VIRAMUNETM (nevirapine), RESCRIPTORTM (delavirdine), 和 SUSTIVATM (efavirenz)。可与本发明组合物组合施用的蛋白酶抑制剂包括但非限于 CRIXIVANTM (indinavir), NORVIRTM (ritonavir), INVIRASETM (saquinavir), 和 VIRACEPTTM (nelfinavir)。在一特异的实施方案中, 抗病毒剂, 核苷逆转录酶抑制剂, 非核苷逆转录酶抑制剂, 和 / 或蛋白酶抑制剂可与本发明组合物任意组合, 治疗, 预防和 / 或诊断 AIDS 和 / 或治疗, 预防和 / 或诊断 HIV 感染。

[0722] 在其它实施方案中, 本发明的组合物可与抗机会感染剂组合使用。可与本发明组合物组合施用的抗机会感染剂包括但非限于 TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLETM, DAPSONETM, PENTAMIDINETM, ATOVAQUONETM, ISONIAZIDTM, RIFAMPINTM, PYRAZINAMIDETM, ETHAMBUTOLTM, RIFABUTINTM, CLARITHROMYCINTM, AZITHROMYCINTM, GANCICLOVIRTM, FOSCARNETTM, CIDOFOVIRTM, FLUCONAZOLETM, ITRACONAZOLETM, KETOCONAZOLETM, ACYCLOVIRTM, FAMCICOLVIRTM, PYRIMETHAMINETM, LEUCOVORINTM, NEVPOGENTM (filgrastim/G-CSF), 和 LEUKINETM (sargramostim/GM-CSF)。在一特异的实施方案中, 本发明的组合物可与 TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLETM, DAPSONETM, PENTAMIDINETM 和 / 或 ATOVAQUONETM 任意组合, 以预防性治疗, 预防和 / 或诊断机会性 *Pneumocystis carinii* 感染。在另一特异的实施方案中, 本发明的组合物与 ISONIAZIDTM, RIFAMPINTM, PYRAZINAMIDETM 和 / 或 ETHAMBUTOLTM 任意组合, 以预防性治疗, 预防和 / 或诊断机会性 *Mycobacterium avium* 复合物感染。在另

一特异的实施方案中,本发明的组合物与 RIFABUTIN™, CLARITHROMYCIN™ 和 AZITHROMYCIN™ 任意组合,以预防性治疗,预防和 / 或诊断机会性结核杆菌感染。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与 GANCICLOVIR™, FOSCARNET™ 和 / 或 CIDOFOVIR™ 任意组合,以预防性治疗,预防和 / 或诊断机会性巨细胞病毒感染。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与 FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™, 和 / 或 KETOCONAZOLE™ 任意组合,以预防性治疗,预防和 / 或诊断机会性真菌感染。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与 ACYCLOVIR™ 和 / 或 FAMCICOLVIR™ 任意组合,以预防性治疗,预防和 / 或诊断机会性 I 型或 II 型单纯疱疹病毒感染。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与 PYRIMETHAMINE™ 和 / 或 LEUCOVORIN™ 任意组合,以预防性治疗,预防和 / 或诊断机会性 *Toxoplasma gondii* 感染。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与 LEUCOVORIN™ 和 / 或 NEUPOGEN™ 任意组合,以预防性治疗,预防和 / 或诊断机会性细菌感染。

[0723] 在另一实施方案中,本发明的组合物与抗病毒剂组合施用。可与本发明组合物组合施用的抗病毒剂包括但不限于无环鸟苷,病毒唑,金刚胺和 remantidine。

[0724] 在另一实施方案中,本发明的组合物与抗生素组合施用。可与本发明组合物组合施用的抗生素包括但不限于阿莫西林,氨基糖苷类抗生素,β-内酰胺(糖肽),β-内酰胺酶,氯洁霉素,氯霉素,头孢菌素,卷须霉素,红霉素,荧光醌霉素,大环内酯,2-甲基-5-硝基-1-咪唑基乙醇,青霉素,醌霉素,利福平,链霉素,氨磺酰,四环素,三甲氧苄二氢嘧啶,三甲氧苄二氢嘧啶-磺胺咪唑,和万古霉素。

[0725] 可与本发明组合物组合施用的常规非特异性免疫抑制剂,包括但不限于类固醇,环孢菌素,环孢菌素类似物环磷酰胺,环磷酰胺 IV,甲基强的松龙,强的松龙,硫唑嘌呤,FK-506,15-脱氧 spargualin 和其它抑制应答 T 细胞功能的免疫抑制剂。

[0726] 在特异的实施方案中,本发明的组合物与免疫抑制剂组合施用。可与本发明组合物组合施用的免疫抑制剂制备物包括但不限于 ORTHOCLONE™(OKT3), SANDIMUNE™/NEORAL™/SANGDYA™(环孢菌素), PROGRAF™(tacrolimus), CELLCEPT™(霉酚酸盐),硫唑嘌呤,glucocorticosteroids,和 RAPAMUNE™(sirolimus)。在一特异的实施方案中,免疫抑制剂可用于预防器官或骨髓移植的排斥反应。

[0727] 在一优选的实施方案中,本发明的组合物与类固醇治疗组合施用。可与本发明组合使用的类固醇包括但不限于口服肾上腺皮质素,强的松,和甲基强的松(如 IV 甲基强的松)。在一特异的实施方案中,本发明的组合物与强的松组合施用。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与强的松和免疫抑制剂组合施用。可与本发明组合物及强的松组合施用的免疫抑制剂如本文所述的那些,包括但不限于硫唑嘌呤,环磷酰胺和环磷酰胺 IV。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与甲基强的松组合施用。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与甲基强的松和免疫抑制剂组合使用。可与本发明组合物和甲基强的松组合施用的免疫抑制剂如本文所述的那些,包括但不限于硫唑嘌呤,环磷酰胺和环磷酰胺 IV。

[0728] 在一优选的实施方案中,本发明的组合物与抗疟疾剂组合施用。可与本发明组合物组合施用的抗疟疾剂包括但不限于羟基氯喹,氯喹,和 / 或喹吖因。

[0729] 在一优选的实施方案中,本发明的组合物与 NSAID 组合施用。

[0730] 在一实施方案中,本发明的组合物与一,二,三,四,五,十或多种以下药物组合施用:NRD-101(Hoechst Marion Roussel),环氟拉嗪(Dimethaid),恶丙嗪

钾 (Monsanto), mecasermin(Chiron), T-614(Toyama), pemetrexed disodium(Eli Lilly), atreleuton(Abbott), valdecocixib(Monsanto), eltenac(Byk Gulden), campath, AGM-1470(Takeda), CDP-571(Celltech Chiroscience), CM101(CarboMed), ML-3000(Merckle), CB-2431(KS Biomedix), CBF-BS2(KS Biomedix), IL-1Ra 基因治疗 (Valentis), JTE-522(JapanTobacco), paclitaxel(Angiotech), DW-166HC(Dong Wha), darbufelonemesylate(Warner-Lambert), 可溶的 TNF 受体 1(Synergen; Amgen), IPR-6001(Institute for Pharmaceutical Research), trocade(Hoffman-La Roche), EF-5(Scotia Pharmaceuticals), BIIL-284(BoehringerIngelheim), BIIF-1149(Boehringer Ingelheim), Leuko Vax(Inflammatics), MK-663(Merck), ST-1482(Sigma-Tau), 和 butixocort propionate(Warner Lambert)。

[0731] 在一优选的实施方案中,本发明的组合物与以下一,二,三,四,五或多种药物组合施用:氨甲喋呤,水杨酸偶氮磺胺吡啶,金硫苹果酸钠,醋硫葡金,环孢霉素,青霉胺,咪唑硫嘌呤,抗疟疾药(如本文所述),环磷酰胺,瘤可宁,金,ENBREL™(Etanercept),抗 TNF 抗体,和强的松龙。

[0732] 在一更优选的实施方案中,本发明的组合物与抗疟疾药,氨甲喋呤,抗 TNF 抗体, ENBREL™ 和 / 或水杨酸偶氮磺胺吡啶组合施用。在一实施方案中,本发明的组合物与氨甲喋呤组合施用。在另一实施方案中,本发明的组合物与抗 TNF 抗体组合施用。在另一实施方案中,本发明的组合物与氨甲喋呤和抗 TNF 抗体组合施用。在另一实施方案中,本发明的组合物与水杨酸偶氮磺胺吡啶组合施用。在另一特异的实施方案中,本发明的组合物与 ENBREL™ 组合施用。在另一实施方案中,本发明的组合物与 ENBREL™, 氨甲喋呤, 和水杨酸偶氮磺胺吡啶组合施用。在其它实施方案中,一或多种抗疟疾药与上述组合之一组合施用。在一特异的实施方案中,本发明的组合物与抗疟疾药(如羟基氯喹),水杨酸偶氮磺胺吡啶,抗 TNF 抗体,和氨甲喋呤组合施用。

[0733] 在另一实施方案中,本发明的组合物单独施用或与一或多种静脉内注射的免疫球蛋白组合施用。可与本发明组合物组合施用的静脉内免疫球蛋白包括但不限于 GAMMAR™, IVEEGAM™, SANDOGLOBULIN™, GAMMAGARD S/D™, 和 GAMIMUNE™。在一特异的实施方案中,本发明的组合物与静脉内免疫球蛋白组合施用于移植疗法中(如骨髓移植)。

[0734] CD40 配体 (CD40L), 一种可溶形式的 CD40L(如 AUREND™), CD40L 的生物活性片段, 变体或衍生物, 抗 CD40L 抗体(如激动性或拮抗性抗体), 和 / 或抗 CD40 抗体(如激动性或拮抗性抗体)。

[0735] 在另一实施方案中,本发明的组合物单独施用或与抗炎剂组合施用。可与本发明组合物组合施用的抗炎剂包括但不限于糖皮质激素和非激素类抗炎剂, 氨芳基羧酸衍生物, 芳基乙酸衍生物, 芳基丁酸衍生物, 芳基丁酸衍生物, 芳基羧酸衍生物, 芳基丙酸衍生物, 吡唑, 吡唑啉, 水杨酸衍生物, 氨甲酰噻嗪, e- 乙酰氨基己酸, S- 腺苷甲硫氨酸, 3- 氨基 -4- 羟丁酸, amixetrine, 苯吡酸, 6- 苄基腺嘌呤, 布可龙, 双苯哌醋胺, 双苯唑醇, emorfazone, 愈创奥, 萘丁美酮, 尼美舒利, orgotein, oxaceprol, paranyline, perisoxal, pifoxine, proquazone, proxazole, 和替尼达帕。

[0736] 在另一实施方案中,本发明的化合物与化疗剂组合施用。可与本发明的组合物组合施用的化疗剂包括但不限于抗生素衍生物(如阿霉素, 博来霉素, 道诺红菌素和道诺霉

素);抗雌激素(如三苯氧胺);抗代谢物(如氟尿嘧啶,5-FU,氨甲喋呤,5-氟尿嘧啶脱氧核苷, α -干扰素 2b,谷氨酸,光神霉素,巯基嘌呤,和 b-硫代鸟嘌呤);胞毒剂(如卡氮芥,BCNU,1 环己亚硝脲,CCNU,阿糖胞苷,环磷酰胺,磷雌氮芥,羟脲,甲基苄肼,丝裂霉素,白消安,顺铂,和长春新碱硫酸盐);激素(如甲孕酮,雌氮芥磷酸钠,乙烯雌醇,雌二醇,乙酸孕甾酮,甲基睾甾酮,己烯雌酚二磷酸酯,三对甲氧苯氯乙烯,和睾丸内酯);氮芥衍生物(如 mephalen, chorambucil, mechlorethamine(氮芥)和三胺硫磷);类固醇及组合物(如 bethamethasone 磷酸钠);及其它物质(如 dicarbazine,天冬酰胺酶,米托坦,硫酸长春新碱,硫酸长春花碱和表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷)。

[0737] 在一特异的实施方案中,本发明的组合物与 CHOP(环磷酰胺,阿霉素,长春新碱和强的松)或与 CHOP 组分的任意组合物组合施用。在另一实施方案中,本发明的组合物与 Rituximab 组合施用。在另一实施方案中,本发明的组合物与 Rituximab 和 CHOP,或 Rituximab 与 CHOP 组分的任意组合物组合施用。

[0738] 在另一实施方案中,本发明的组合物与细胞因子组合施用。可与本发明组合物组合施用的细胞因子包括但不限于 GM-CSF, G-CSF, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, 抗 CD40, CD40L, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , TNF- β 。在另一实施方案中,本发明的组合物可与任何白细胞介素组合施用,包括但不限于 IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21 和 IL-22。在优选的实施方案中,本发明的组合物与 IL4 和 IL10 组合施用。本发明人观测到 IL4 和 IL10 均增强 Neutrokin- α 介导的 B 细胞增殖。

[0739] 在另一实施方案中,本发明的组合物与趋化因子组合施用。在另一实施方案中,本发明的组合物与趋化因子 β -8,趋化因子 β -1,和 / 或巨噬细胞炎症蛋白 4 组合施用。在一优选的实施方案中,本发明的组合物与趋化因子 β -8 组合施用。

[0740] 在另一实施方案中,本发明的组合物与 IL-4 拮抗剂组合施用。可与本发明组合物组合施用的 IL-4 拮抗剂包括但不限于可溶的 IL-4 受体多肽,多聚合形式的可溶 IL-4 受体多肽;结合 IL-4 受体但不转导由 IL-4 激发的生物信号的抗 IL-4 受体抗体;阻断 IL-4 与一或多个 IL4 受体结合的抗 IL-4 抗体,和结合 IL4 受体但不转导由 IL4 激发的生物信号的 IL4 突变蛋白。优选地,根据此方法使用的抗体是单克隆抗体(包括抗体片段,如本文所述)。

[0741] 在另一实施方案中,本发明的组合物与造血生长因子组合施用。可与本发明组合物组合施用的造血生长因子包括但不限于 LEUKINE™(SARGRAMOSTIM™) 和 NEUPOGEN™(FILGRASTIM™)。

[0742] 在另一实施方案中,本发明的组合物与成纤维细胞生长因子组合施用。可与本发明组合物组合施用的成纤维细胞生长因子包括但不限于 FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, 和 FGF-15。

[0743] 另外,本发明的组合物可单独施用或与其它治疗方法组合施用,包括但不限于放疗。这种组合疗法可相继和 / 或伴随施用。

[0744] 激动剂和拮抗剂 - 分析及分子

[0745] 本发明还提供了一种筛选化合物的方法,以鉴别增强或阻断 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽对细胞的作用,如其与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV

结合分子如受体分子相互作用的化合物。激动剂是一种增强 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 天然生物功能,或与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 相似方式的功能的化合物,而拮抗剂是降低或消除这种功能的化合物。

[0746] 在另一实施方案中,本发明提供了一种特异结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的受体蛋白或其它配体结合蛋白的方法。例如,细胞区室如细胞膜或其制备物,可制备自表达结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的分子的细胞。将此制备物用标记的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 温育,分离结合受体的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 或其它结合蛋白的复合物,并根据本领域已知常规方法定性。或者,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 可与固体支持物结合,以便自细胞溶解的结合分子与层析柱结合,然后根据常规方法洗脱及定性。

[0747] 在本发明的激动剂或拮抗剂分析中,细胞区室如细胞膜或其制备物,可制备自表达结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的分子的细胞,该分子如是通过 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 调制的信号或调节途径分子。此制备物用标记的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在有或无候选分子的情况下温育,该候选分子可以是 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 激动剂或拮抗剂。候选分子与结合分子的结合的能力反映于标记的配体结合降低中。单方面结合的分子即不诱导 Neutrokin- α 对 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 结合分子结合的作用的分子,是良好的拮抗剂。良好结合并激发相似或密切相关于 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的作用的分子是激动剂。

[0748] 潜在的激动剂和拮抗剂的类 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 作用,可例如通过确定候选分子与细胞或适当的细胞制备物相互作用之后,第二信使系统的活性,并与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 或激发与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 相同作用的分子的作用相对比,而加以确定。可用于此的第二信使系统包括但不限于 AMP 鸟苷酸环化酶,离子通道或磷酸水解第二信使系统。

[0749] Neutrokin- α 和 / 或 α SV 拮抗剂的另一种分析例如是竞争分析,其是在适当的条件下组合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 和潜在的拮抗剂,与膜结合的受体分子或重组 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体分子,进行竞争性抑制分析。Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 可例如通过放射性标记,这样结合受体分子的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 分子的数目可准确测定,以证实潜在拮抗剂的效力。

[0750] 潜在的拮抗剂包括结合本发明多肽的小有机分子,肽,多肽(如 IL-13)和抗体,从而抑制或灭绝其活性。潜在的拮抗还可以是结合在结合分子如受体分子上相同位点的小有机分子,肽,多肽如密切相关的蛋白质或抗体,而不诱导 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 诱导的活性,从而通过排阻 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 结合而阻止 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的作用。

[0751] 其它潜在拮抗剂包括反义分子。反义方法可用于通过反义 DNA 或 RNA 或通过三螺旋形成而控制基因表达。反义方法例如由 Okara,神经化学杂志 56:560(1991);“作为基因表达的反义抑制剂的寡脱氧核苷酸”,CRC 出版社,Boca Raton,FL(1988)所述。三螺旋形成例如由 Lee 等,核酸研究 6:3073(1979);Cooney 等,科学 241:456(1988);和 Dervan 等,科

学 251 :1360(1991)。此方法基于多核苷酸与互补 DNA 或 RNA 的结合。例如,编码本发明多肽胞外域的多核苷酸的 5' 编码部分,可用于设计长度大约为 10-40 碱基对的反义 RNA 寡核苷酸。设计一个互补于转录中包含的基因的区域 DNA 寡核苷酸,从而防止 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的转录和产生。此反义 RNA 寡核苷酸在体内与 mRNA 杂交,并阻断 mRNA 翻译为 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽。上述寡核苷酸也可输送至细胞,这样反义 RNA 或 DNA 可在体内表达,以抑制 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的产生。

[0752] 在一实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 反义核酸是在细胞内通过从外源序列中转录而产生的。例如,转录产生本发明反义核酸 (RNA) 的一载体或其一部分。这种载体含有编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 反义核酸的序列。这种载体可保持附加型或成为染色体整合的载体,直至其可被转录产生所需的反义 DNA。这种载体可通过本领域标准的重组 DNA 方法构建。载体可以是质粒,病毒,或本领域已知其它物质,用于在脊椎动物细胞中复制和表达。编码 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV,或其片段的序列,可通过本领域已知的任何启动子在脊椎动物尤其人体细胞中表达。这种启动子可以是可诱导的或组成型的。这种启动子包括但非限于 SV40 早期启动子区 (Bernoist 和 Chambon,自然 29 :304-310(1981),包含于 Rous 肉瘤病毒的 3' 长末端重复中的启动子 (Yamamoto 等,细胞 22 :787-797(1980)),疱疹胸苷启动子 (Wagner 等,美国科学院院报 78 :1441-1445(1981),金属硫蛋白基因的调节序列 (Brinster 等,自然 296 :39-42(1982)),等。

[0753] 本发明的反义核酸包含互补于 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因的 RNA 转录物至少一部分的序列。然而,绝对互补性尽管是优选的,但不是所需的。“互补于 RNA 至少一部分”的序列是指具有良好的互补性,能与 RNA 杂交形成稳定的双链体的序列;在双链 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 反义核酸的情况中,可测试单链的双螺旋 DNA,或分析三螺旋形成、杂交能力依赖于反义核酸的互补程度和反义核酸的长度。通常地,较大的杂交核酸,与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV RNA 的碱基错配越多,其可含有并仍可形成稳定的双螺旋 (或三螺旋)。本领域技术人员使用标准方法可查明错配的允许程度,以确定杂交复合物的熔点。

[0754] 互补于信使 5' 末端如接近并包括 AUG 起始密码子的 5' 未翻译序列的寡核苷酸,应更有效地抑制翻译。然而,互补于 mRNA 的 3' 未翻译序列的序列已示出有效地抑制 mRNA 的翻译。见 Wagner, R. 1994,自然 372 :333-335 所述。因此,图 1A-B 和 5A-B 所示的分别互补于 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的 5' 或 3' 未翻译的非编码区的寡核苷酸,可用于反义方法中以抑制内源 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV mRNA 的翻译。互补于 mRNA 的 5' 未翻译区的寡核苷酸应包括 AUG 起始密码子的互补序列。互补于 mRNA 编码区的反义寡核苷酸是微效翻译抑制剂,但根据本发明可以使用。不论是否与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV mRNA 的 5', 3' 或编码区杂交,反义核酸长度应为 6 个核苷酸,优选长度为 6 ~ 50 个核苷酸。特别地,此寡核苷酸长度为至少 10, 17, 25 或至少 50 个核苷酸。

[0755] 本发明的多核苷酸可以是 DNA 或 RNA 或其嵌合混合物或衍生合或修饰的形式,可以是单链或双链的。可在碱基组分,糖组分或磷酸盐骨架对寡核苷酸进行修饰,例如以改良分子的稳定性,杂交作用等。此寡核苷酸可包括其它所附基团如肽 (如在体内定

向宿主细胞受体),或促进跨膜转运的制剂(见例如 Letsinger 等,1989,美国科学院院报 86:6553-6556;Lemaitre 等,美国科学院院报 84:648-652(1987);PCT 出版物 No. W0 88/09810,1988年12月15日出版)或穿过血脑屏障的制剂(见例如 PCT 公开 W0 89/10134,1988年4月25日公开),杂交引发的裂解剂(见例如 Kro1 等,生物技术 6:958-976(1988))或嵌入剂(见例如 Zon,药物研究 5:539-549(1988))。因此,寡核苷酸可与另一分子缀合,如肽,杂交引发的交联剂,转运剂,杂交引发的裂解剂等。

[0756] 反义寡核苷酸可包含一种修饰的碱基组分,选自包括但不限于 5- 氟尿嘧啶,5- 溴尿嘧啶,5- 氯尿嘧啶,5- 碘尿嘧啶,次黄嘌呤,黄嘌呤,4- 乙酰胞嘧啶,5- 羧羟甲基尿嘧啶,5- 羧甲基氨基甲基-2- 硫尿嘌呤,5- 羧甲基氨基甲基尿嘧啶,二氢尿嘧啶,β-D- 半乳糖 queosine,肌苷,N6- 异戊烯腺嘌呤,1- 甲基鸟嘌呤,1- 甲基肌苷,2,2- 二甲基鸟嘌呤,2- 甲基腺嘌呤,2- 甲基鸟嘌呤,3- 甲基胞嘧啶,5- 甲基胞嘧啶,N6- 腺嘌呤,7- 甲基鸟嘌呤,5- 甲氨基甲基尿嘧啶,5- 甲氧氨基甲基-2- 硫尿嘧啶,β-D-mannosylqueosine,5- 甲氧羧甲基尿嘧啶,5- 甲氧尿嘧啶,2- 甲硫-N6- 异戊烯腺嘌呤,尿嘧啶-5- 氧乙酸(v),Wybutoxiosine,假尿嘧啶,queosine,2- 硫胞嘧啶,5- 甲基-2- 硫尿嘧啶,2- 硫尿嘧啶,4- 硫尿嘧啶,5- 甲基尿嘧啶,尿嘧啶-5- 氧乙酸甲酯,尿嘧啶-5- 氧乙酸(v),5- 甲基-2- 硫尿嘧啶,3-(3- 氨-3-N- 羧丙基)尿嘧啶,(acp3)w,和 2,6- 二氢嘌呤。

[0757] 反义寡核苷酸还可包含至少一个修饰的糖组分,选自包括但不限于阿拉伯糖,2- 氟阿拉伯糖,木酮糖和己糖。

[0758] 在另一实施方案中,反义寡核苷酸包含至少一个修饰的磷酸盐骨架,选自包括但不限于二硫代磷酸酯,硫代磷酸酯,硫代膦酰酯,亚磷酰胺,亚磷二酰胺,甲基磷酸酯,烷基磷酸三酯,formacetal 或其类似物。

[0759] 在另一实施方案中,反义寡核苷酸是 α- 端基异构寡核苷酸。α 端基寡核苷酸与互补 RNA 形成特异的双链杂交体,其中与一般的 β 单位相反,链彼此相互平行(Gautier 等,核酸研究 15:6625-6641(1987))。寡核苷酸是 2-O- 甲基核糖核苷酸(Inoue 等,核酸研究 15:6131-6148(1987)),或嵌合 RNA-DNA 类似物(Inoue 等,FEBS 通信 215:327-330(1997))。

[0760] 本发明的多核苷酸可通过本领域已知标准方法合成,例如使用自动 DNA 合成仪)如可购自 Biosearch, Applied Biosystems 等)。例如,硫代磷酸酯可通过 Stein 等的方法合成(核酸研究 16:3209(1988)),甲基磷酸酯寡核苷酸可通过控制孔玻璃聚合物支持体制备(Sarin 等,美国科学院院报 85:7448-7451(1988))等。

[0761] 可使用互补于 Neutrokin-α 和 / 或 Neutrokin-α SV 编码区序列的反义核苷酸,优选互补于转录的未翻译区的反义核苷酸。

[0762] 本发明潜在的拮抗剂还包括催化性 RNA 或核酶(见例如 PCT 国际公开 W0 90/11364,1990年10月4日公开;Sarver 等,科学 247:1222-1225(1990))。可以使用在位点特异性识别序列裂解 mRNA 的核酶,以破坏 Neutrokin-α 和 / 或 Neutrokin-α SV mRNA,优选使用锤头状核酶。锤头状核酶裂解位于与靶 mRNA 形成互补碱基对的区域两侧的 mRNAs。唯一的需求是靶 mRNA 具有 5'-UG-3' 序列。本领域熟知锤头状核酶的构建和产生,并详见于 Haseloff 和 Gerlach,自然 334:585-591(1988) 所述。Neutrokin-α 和 / 或 Neutrokin-α SV 的核苷酸序列内有许多潜在的锤头状核酶切割位点(分别见于图 1A-B

和 5A-B)。优选地,对此核酶进行工程化,以使切割识别位点位于 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SVmRNA 的 5' 末端附近,即提高效力及使非功能性 mRNA 转录物的胞内积累最小化。

[0763] 在反义方法中,本发明的核酶可由修饰的寡核苷酸组成(如改良稳定性,定向等),并应输送于在体内表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的细胞。编码核酶的 DNA 构建体可如上述相同方式导入细胞中,以导入反义编码 DNA。优选的输送方法包括使用在强组成型启动子如 polIII,或 polIII 启动子的控制下,“编码”核酶的 DNA 构建体,这样转染的细胞将产生足量的核酶,以破坏内源性 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 信使,并抑制翻译。由于核酶不像反义分子是催化性的,需要较低的胞内浓度以增加效力。

[0764] 内源性基因表达也可通过用定向同源重组,灭活或“剔除”Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因和 / 或其启动子而降低(如 Smithies 等,自然 317:230-24(1985); Thomas 和 Capechi,细胞 51:503-512(1987);Thompson 等,细胞 5:313:321(1989);以上文献均全文并入参考)。例如,可使用在同源于内源性多核苷酸序列的 DNA(基因的编码区或调节区)两侧的本发明突变的非功能性多核苷酸(或互补的不相关的 DNA 序列),其有或无可选择的标记和 / 或阴性可选择的标记,以转染在体内表达本发明多肽的细胞。在另一实施方案中,使用本领域已知方法在细胞中产生剔除,该细胞含有但不表达相应基因。通过定向的同源重组插入 DNA 构建体,导致定向的基因灭活。这种方法尤其适于研究和农业领域,其中对胚胎干细胞的修饰可用于产生具有灭活的定向基因的动物子代(如表 Thomas 和 Capechi1987 和 Thompson1989 如前)。然而,此方法可常规适用于人体,提供的重组 DNA 构建体使用适当的病毒载体,直接施用于或定向于体内所需位点,这对本领域技术人员是显而易见的。所引用的文献均全文并入参考。

[0765] 在其它的实施方案中,本发明的拮抗剂包括可溶形式的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV(如图 1A-B 所示的 Neutrokin- α 的片段,包括配体结合结构域, TNF 保守的结构域,和 / 或 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的胞外结构域,及图 5A-B 所示 Neutrokin- α SV 的片段,包括配体结合结构域, TNF 保守的结构域,和 / 或 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的胞外结构域)。这种可溶形式的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV,其可以是天然发生的或合成的,通过与天然 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 竞争结合 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 受体(如 DR5(见国际公开 WO 98/41629), TR10(见国际公开 WO 98/54202), 312C2(见国际公开 WO 98/06842) 和 TR11, TR11SV1 和 TR11SV2(见美国专利 No. 09/176200)),或通过形成可结合或不结合受体,但不能诱导信号转导的多聚体,而拮抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的信号。优选地,这些拮抗剂抑制 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的刺激淋巴细胞(如 B 细胞)增殖,分化和 / 或激活。本发明的拮抗剂还包括特异于 TNF 家族配体(如 CD30)以及 Neutrokin- α -Fc 和 / 或 Neutrokin- α SV-Fc 融合蛋白的抗体。

[0766] “TNF 家族配体”是指天然发生的,重组的和合成的配体,其能结合 TNF 受体家族成员,并诱导和 / 或阻断配体 / 受体信号途径。TNF 配体家族成员包括但不限于 TNF- α , 淋巴毒素- α (LT- α , 也称为 TNF- β), LT- β (在异源三聚体 LT- α -2- β 复合物中发现的), FasL, CD40L, (TNF- γ (国际公开 WO 96/14328), ATIM-I (国际公开 WO 97/33899), AIM-II (国际公开 WO 97/34911), APRIL(J. Exp. Med. 188(6):1185-1190), α -内因子(国

际公开 WO 98/07880), α -神经因子(国际公开 WO 97/18921), CD27L, CD30L, 4-1BBL, OX40L, CD27, CD30, 4-1BB, OX40 和神经生长因子(NGF)。在优选的实施方案中,本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV TNF 家族配体是 DD5(见国际公开 WO 98/41629), TR10(见国际公开 WO 98/54202), 312C2(见国际公开 WO 98/06842) 和 TR11, TR11SV1 和 TR11SV2(见美国专利申请 No. 09/176200)。

[0767] 本发明的拮抗剂还包括特异于 TNF 家族受体或本发明 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽的抗体。本发明的抗体可用本发明的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 免疫原通过各种标准方法制备。这种 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 免疫原包括分别由图 1A-B(SEQ ID NO:2) 和图 5A-B(SEQ ID NO:19) 所示完整的 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽(可包括或不包括前导序列), 和 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 多肽片段, 包含例如配体结合结构域, TNF 保守的结构域, 胞外结构域, 跨膜域, 和/或胞内结构域, 或它们的任意组合。

[0768] 本发明的多克隆和单克隆抗体激动剂或拮抗剂, 可根据 Tartaglia 和 Goeddel, 生物化学杂志 267(7):4304-4307(1992); Tartaglia 等, 细胞 73:213-216(1993) 和 PCT 申请 WO 94/09137 所示的方法产生, 且优选是特异于(即只结合)具有 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的本发明多肽。术语“抗体”(Ab) 或“单克隆抗体”(mAb) 是指包括能结合抗原的完整分子以及其片段) 如 Fb 和 F(ab') 片段)。Fab, Fab' 和 F(ab') 片段缺失 Fc 片段完整抗体, 更迅速地从循环中清除, 且可具有较小的完整抗体的非特异性组织结合(Wahl 等, 核酸方法杂志 24:316-325(1983))。

[0769] 在一优选的方法中, 本发明的抗体是 mAbs。这种 mAbs 可用杂交瘤方法制备(Kohler 和 Millstein, 自然 256:495-497(1975) 和美国专利 No. 4376110; Harlow 等, 抗体实验手册, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, NY, 1988; 单克隆抗体与杂交瘤:生物学分析中的新进展, Plenum 出版社, 纽约, NY, 1980; Campbell, “单克隆抗体技术”, 生物化学和分子生物学中的实验方法, 第 13 卷(Burdor 等编辑), Elsevier, Amsterdam(1984))。

[0770] 结合 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 结构域的蛋白质及其它化合物也是本发明的候选激动剂和拮抗剂。这种结合化合物可用酵母双杂交系统“捕捉”(Fields 和 Song, 自然 340:245-246(1989))。Roger Brent 及其同事对酵母双杂交系统已做了修饰(Gyuris, 细胞 75:791-803(1993); Zervos 等, 细胞 72:223-232(1993))。优选地, 根据本发明使用酵母双杂交系统, 捕捉结合 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 的配体结合结构域, 胞外结构域, 胞内结构域, 跨膜域, 和死亡域的化合物。这种化合物是本发明良好的候选激动剂和拮抗剂。

[0771] 例如, 使用上述双杂交分析, Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 受体的胞外域胞内结构域, 或其一部分, 可用于鉴别与 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 受体在体内相互作用的细胞蛋白。这种分析也可用于鉴别具有 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 受体在体内相互作用的细胞蛋白。这种分析也可用于鉴别具有 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 受体功能的潜在激动或拮抗活性的配体。此筛选分析先前用于鉴别与小鼠 TNF-RII 的胞质区相互作用的蛋白质, 并鉴别两种受体相关的蛋白。Rothe 等, 细胞 78:681(1994)。结合 Neutrokin- α 和/或 Neutrokin- α SV 受体的胞质区的这种蛋白质和氨基酸序列是本发明的良好候选激动剂和拮抗剂。

[0772] 其它筛选方法包括使用表达本发明多肽的细胞（如转染的 CHO 细胞）测定由受体活化导致的胞外 pH 改变，如科学 246 :181-296 (1989) 所述。在另一实施例中，潜在的激动剂或拮抗剂可与表达本发明多肽的细胞相接触，并可测定第二信使应答如信号转导，以确定潜在的拮抗剂或激动剂是否有效。

[0773] 本发明的激动剂包括天然发生的和合成的化合物，如 TNF 家族配体肽片段，转化生长因子，神经递质（如谷氨酸，多巴胺，N-甲基-D-天冬氨酸），肿瘤抑制因子（p53），溶细胞性 T 细胞和抗代谢物。优选的激动剂包括化疗药物和顺铂，阿霉素，博来霉素，阿糖胞苷，氮芥，氨甲喋呤和长春新碱。其它激动剂包括乙醇和淀粉肽（科学 267 :1457-1458 (1995)）。

[0774] 优选的激动剂是刺激淋巴细胞（如 B 细胞）增殖，分化和 / 或活化的本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 片段。进一步优选的激动剂包括抗本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽，或其片段产生的多克隆和单克隆抗体。这种抗 TNF 家族受体产生的激动剂抗体见于 Tartaglia 等，美国科学院院报 88 : 9292-9296 (1991) ;和 Tartaglia 等，生物化学杂志 267 :4304-4307 (1992) 所示。也见于 PCT 申请 WO 94/09137 所述。

[0775] 在另一实施方案中，免疫调节分子如 IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, 抗 CD40, CD40L, IFN- γ 和 TNF- α , 可用作本发明 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的激动剂，其刺激淋巴细胞（如 B 细胞）增殖，分化和 / 或活化。在一特异的实施方案中，IL4 和 / 或 IL10 用于增殖 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 介导的 B 细胞增殖。

[0776] 在本发明另一实施方案中，将工程化的以表达本发明多肽的细胞，或工程化的不表达本发明多肽的细胞（如剔除）在体内施用于病人。这种细胞可得自患者（即动物，包括人），或 MHC 相容供体，并可包括但非限于成纤维细胞，骨髓细胞，血细胞（如淋巴细胞），脂肪细胞，肌细胞，内皮细胞等。细胞在体外用重组 DNA 方法遗传工程化，以将本发明多肽的编码序列导入细胞中，或者破坏与本发明多肽相关的编码序列和 / 或内源性调节序列，如通过转导（用病毒载体，及优选将转基因整合入细胞基因组的载体），或转染方法，包括但非限于用质粒，粘粒，YACs, 裸 DNA, 电穿孔，脂质体等进行。本发明多肽的编码序列可置于强组成型启动子或可诱导的启动子或启动子 / 增殖子的控制下，以表达优选分泌本发明的多肽。表达及优选分泌本发明多肽的遗传工程化细胞可全身性地如通过循环或腹膜内注射而导入患者体内。

[0777] 或者，细胞可掺入基质中并植入机体内，如遗传工程化的成纤维细胞可作为皮肤移植物的一部分植入；遗传工程化的内皮细胞可作为淋巴管或血管移植物的一部分植入（见例如 Anderson 等，美国专利 No. 5399349 ;和 Mulligan 和 Wilson, 美国专利 No. 5460959, 均全文并入参考）。

[0778] 当施用的细胞是非自身的或非 MHC 相容的细胞时，可将它们用熟知的防止宿主对导入的细胞产生免疫应答的方法施用。例如细胞可以胶囊形式导入，使组分立即交换至胞外环境中，但不使导入的细胞被宿主免疫系统识别。

[0779] 在本发明另一实施方案中，Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的活性可由“显性失活”而降低。为此，编码缺陷的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽如缺失全部或部分 TNF 保守结构域的突变体的构建体，可用于基因疗法中，以削弱

Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 对适当靶细胞的活性。例如,指导宿主细胞表达 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽的核苷酸序列可导入单核细胞或其它细胞或组织中(通过在体内或源自体内的基因疗法或本领域已知其它方法),所述核苷酸序列中全部或部分 TNF 保守的结构域已改变或缺失。或者,可利用定向同源重组,以将这种缺失体或突变体导入受试个体单核细胞中的内源性 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因中。工程化的细胞将表达无功能的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽(即配体(如多聚体),其能结合但不能诱导信号转导)。

[0780] 染色体分析

[0781] 本发明的核酸分子还可用于染色体鉴别。此序列特异地定向并能杂交个体人染色体的特殊位置。另外,常需要鉴别染色体上的特殊位点。基于真实序列数据(重复多态性)的少数染色体标记试剂适于标记染色体位置。本发明染色体的 DNA 作图是确定这些序列与疾病相关基因相关的重要第一步。

[0782] 在一些优选的实施方案中,本文所示的 cDNA 和 / 或多核苷酸用于克隆 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 基因的基因组 DNA。这可用各种熟知的方法和可商购的文库进行。此基因组 DNA 然后用于用熟知的方法进行原位染色体作图。

[0783] 另外,在一些情况中,可通过从 cDNA 中制备 PCR 引物(优选 15-25bp)将序列在染色体上定位。对基因的 3' 未翻译区进行的计算机分析,用于迅速选择在基因组内跨越不超过一个外显子,否则使扩增变得复杂的引物。这些引物然后用于 PCR 筛选含有个体人染色体的体细胞杂合体。cDNA 克隆对中期染色体涂片的荧光原位杂交(FISH)可用于在一个步骤中提供精确的染色体定位。此方法可使用取自 cDNA 的短如 50 或 60bp 的探针。关于此方法的阐述见 Verma 等,人体染色体基本技术手册, Pergamon 出版社,纽约(1988)。

[0784] 一旦序列精确定位在染色体上,染色体上序列的物理位置可与遗传学图数据相关。这种数据见例如 V. McKusick, Mendelian Inheritance In Man, 在线购自 Johns Hopkins 大学, Welch 医学图书馆。已定位于相同染色体区的基因与疾病间的关系然后通过谱系分析鉴别(自然在比邻基因的联合遗传特征)。

[0785] 接下来需要确定患病的和未患病的个体之间 cDNA 或基因组序列的不同。如果在一些或全部患病个体中观测到突变而在正常个体中无突变,则此突变即是疾病的产生原因。

[0786] 通过物理学图和遗传学图方法的分辨,cDNA 在染色体上的精确定位与 50 ~ 500 种潜在致病基因所致疾病相关。(假定 1 兆碱基图分辨力,和每 20kb 一个基因)。

[0787] 利用上述方法,对 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的染色体位置,组合使用体细胞杂种和辐射杂种,可非常有把握地确定在染色体 13g34 上。

[0788] 实施例

[0789] 本发明参考以下实施例将便于理解,实施例只是举例说明而非限制本发明。以下实施例中许多是特别阐述本发明的 Neutrokin- α 多核苷酸和多肽的。每个实施例实际上也适用于产生和 / 或检测本发明的 Neutrokin- α SV 多核苷酸和多肽。本领域技术人员能易于通过以下实施例而进行关于 Neutrokin- α SV 的实施例。 实施例 1a:在大肠杆菌中表达和纯化“His 标记的”Neutrokin- α 在此实施例中用细菌表达载体 pQE9(pD10) 进行细菌表达。

[0790] (QIAGEN 公司,如前)。pQE9 编码氨苄青霉素抗性 (“Ampr”),并含有一个细菌复制起源 (“ori”),一个 IPTG 可诱导的启动子,一个核糖体结合位点 (“RBS”),编码组氨酸残基的 6 个密码子,和适当的单一限制酶切割位点,所述组氨酸残基可用 QIAGEN 公司所售的镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 亲和树脂进行亲和纯化。排列这些因子,这样编码多肽的插入的 DNA 片段编码具有 6 个组氨酸残基 (即 6X His 标记) 的多肽,这 6 个组氨酸残基共价地连于该多肽的氨基端。

[0791] 编码包含胞外域序列的 Neutrokin- α 蛋白所需部分的 DNA 序列,是用 PCR 寡核苷酸引物扩增自保藏的 cDNA 克隆,PCR 寡核苷酸引物分别退火至蛋白质所需部分的氨基端序列,和保藏构建体序列中 cDNA 编码序列的 3'。将含有 pQE9 载体中促进克隆的限制位点的额外核苷酸分别加入 5' 和 3' 引物序列中。

[0792] 为克隆蛋白质的胞外域,5' 引物的序列为 5' -GTG GGA TCCAGC CTC CGG GCA GAG CTG-3' (SEQ ID NO:10),其含有下划线的 Bam HI 限制位点,后接图 1A 和 1B 所示序列的胞外域的氨基端编码序列的 18 个核苷酸。当然,本领域技术人员知道蛋白质编码序列中 5' 引物起始的位置可以变化,以扩增编码完整 Neutrokin- α 蛋白的任何所需部分的 DNA 区段,此完整 Neutrokin- α 蛋白比胞外域长或短。3' 引物的序列为 5' -GTG AAG CTT TTA TTACAG CAG TTT CAA TGC ACC-3' (SEQ ID NO:11),其含有下划线的 Hind III 限制位点,后接 2 个终止密码子,和互补于图 1A 和 1B 所示 DNA 序列的 3' 端编码序列的 18 个核苷酸。

[0793] 扩增的 DNA 片段和载体 pQE9 用 Bam HI 和 Hind III 消化,然后将消化的 DNAs 连接在一起。插入在限制的 pQE9 载体中的 DNA 将蛋白质编码区置于 IPTG 可诱导启动子的下游并与起始 AUG 和 6 个组氨酸密码子同框。

[0794] 用标准方法将连接混合物转化至合适的大肠杆菌细胞中,所用方法如 Sambrook 等,分子克隆实验手册,第二版;冷泉港实验室出版社,冷泉港, NY (1989) 所述。含有多个拷贝的质粒 pREP4 的大肠杆菌菌株 M15/rep4 用于进行本文举例说明的实施例,所述质粒 pREP4 表达 lac 阻抑物并赋予卡那霉素抗性 (Kan^r)。此菌株仅是适于表达蛋白质的许多菌株中的一种,其可购自 QIAGEN 公司。转化体通过其在存在氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 平板上的生长能力而加以鉴别。从抗性克隆中分离质粒 DNA 并通过限制性分析,PCR 和 DNA 测序确定克隆的 DNA。含有所需构建体的克隆,在补加氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 和卡那霉素 (25 μ g/ml) 的液态 LB 培养基中生长过夜 (O/N)。用此 O/N 培养物接种大培养物,稀释度大约为 1 : 25 至 1 : 250。细胞生长至在 600nm 的光密度 (OD₆₀₀) 在 0.4-0.6 之间。

[0795] 然后加入 IPTG 至终浓度为 1mM,以通过灭活 lac 阻抑物,从 lac 阻抑物敏感启动子诱导转录。接着将细胞再温育 3-4 小时。然后通过离心收集细胞。

[0796] 接着将细胞在 4°C 在 6M 盐酸胍, pH8 中搅动 3-4 小时。经离心除去细胞碎片,将上清加样于镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 亲和树脂层析柱 (购自 QIAGEN 公司) 中。具有 6XHis 标记的蛋白质与 Ni-NTA 树脂高亲和性结合,并可用简便的一步方法纯化 (详见 QIAexpressionist,1995, QIAGEN 公司)。简而言之,将上清加样于 6M 盐酸胍, pH8 中的层析柱中,该柱首先用 10 体积的 6M 盐酸胍, pH6 冲洗,并最后用 6M 盐酸胍, pH5 洗脱 Neutrokin- α 和 Neutrokin- α SV 多肽。

[0797] 纯化的蛋白质然后通过用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或 50mM 乙酸钠, pH6 缓冲液加上 200mM NaCl 透析而复性。或者,蛋白质可成功的再折叠同时固定于 Ni-NTA 层析柱上。适用

的条件如下：在含有蛋白酶抑制剂的 500mM NaCl, 20% 甘油, 20mM Tris/HCl pH7.4 中, 以线性 6M-1M 尿素梯度复性。复性应进行 1.5 小时或更长时间。在复性之后, 蛋白质可通过加入 250mM 咪唑而洗脱。通过用 PBS 或 50mM 乙酸钠 pH6 缓冲液加上 200mM NaCl 最后透析除去咪唑。将纯化的蛋白质贮存在 4℃ 或冷冻在 -80℃。

[0798] 实施例 1b：在大肠杆菌中表达和纯化 Neutokine- α SV

[0799] 在此实施例中用细菌表达载体 pQE60 进行细菌表达。(QIAGEN 公司, 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)。pQE60 编码氨苄青霉素抗性 (“Ampr”), 并含有一个细菌复制起源 (“ori”), 一个 IPTG 可诱导的启动子, 一个核糖体结合位点 (“RBS”), 编码组氨酸残基的 6 个密码子, 和适当的单一限制酶切割位点, 所述组氨酸残基可用 QIAGEN 公司所售的镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 亲和树脂进行亲和纯化。这些元件的排列是使得编码多肽的 DNA 片段插入后编码具有 6 个组氨酸残基 (即 6X His 标记) 的多肽, 这 6 个组氨酸残基共价地连于该多肽的氨基端。然而, 在此实施例中, 插入多肽编码序列, 由此防止 6 个组氨酸密码子翻译, 且因而产生无 6 个组氨酸标记的多肽。

[0800] 编码包含胞外域序列的蛋白质所需部分的 DNA 序列, 是用 PCR 寡核苷酸引物扩增自保藏的 cDNA 克隆, PCR 寡核苷酸引物分别退火至蛋白质所需部分的氨基端序列, 和保藏构建体的序列中的 cDNA 编码序列的 3'。将含有 pQE9 载体中促进克隆的限制位点的额外核苷酸分别加入 5' 和 3' 引物序列中。

[0801] 为克隆蛋白质的胞外域, 5' 引物的序列为 5'-GTG TCA TGAGCC TCC GGG CAG AGC TG-3' (SEQ ID NO:12), 其含有下划线的 Bsp HI 限制位点, 后接图 1A 和 1B 所示序列的胞外域的氨基端编码序列的 17 个核苷酸。当然, 本领域技术人员知道蛋白质编码序列中 5' 引物起始的位置可以变化, 以扩增编码完整蛋白质的任何所需部分, 此完整蛋白质比胞外域长或短。3' 引物的序列为 5'-GTG AAG CTT TTA TTA CAG CAG TTT CAA TGC ACC-3' (SEQ ID NO:13), 其含有下划线的 Hind III 限制位点, 后接 2 个终止密码子, 和互补于图 1A 和 1B 所示 DNA 序列的 3' 端编码序列的 18 个核苷酸。

[0802] 扩增的 DNA 片段和载体 pQE60 用 Bsp HI 和 Hind III 消化, 然后将消化的 DNAs 连接在一起。插入在限制的 pQE60 载体中的 DNA 将蛋白质编码区置于 IPTG 可诱导启动子的下游并与起始 AUG 和 6 个组氨酸密码子同框。相关的终止密码子防止在插入点下游的 6 个组氨酸密码子翻译。

[0803] 用标准方法将连接混合物转化至合适的大肠杆菌细胞中, 所用方法如 Sambrook 等, 分子克隆实验手册, 第二版; 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, NY (1989) 所述。含有质粒 pREP4 的多个拷贝的大肠杆菌菌株 M15/rep4 用于进行本文举例说明的实施例, 该质粒 pREP4 表达 lac 阻抑物并赋予卡那霉素抗性 (Kan^r)。此菌株是适于表达蛋白质的许多菌株中的一种, 其可购自 QIAGEN 公司。转化体通过其在存在氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 平板上的生长能力而加以鉴别。从抗性克隆中分离质粒 DNA 并通过限制性分析, PCR 和 DNA 测序确定克隆的 DNA。

[0804] 本领域技术人员意识到许多细菌表达载体的任一种均可用于代替此实施例中表达方法所用的 pQE9 和 pQE60。例如, 新的 pHE4 细菌表达载体系列, 尤其 pHE4-5 载体可用于此实施例中的细菌表达 (ATCC No. 209311; 及其变体)。ATCC 保藏号 209311 的称为 pHE4-5/MPIFD23 的质粒 DNA, 是含有编码另一种 ORF 的插入体的载体质粒 DNA。此构建体于 1997

年 9 月 30 日保藏在美国典型培养物保藏中心,该中心位于弗吉尼亚州马纳萨斯市大学道 20110-2209,邮编 10801。使用在不相关的 MPIF ORF 插入体两侧的 Nde I 和 Asp 718 限制位点,本领域技术人员易于使用当前的分子生物学方法,用本发明的 Neutrokin- α ORF 置换 pHE4-5 载体中不相关的 ORF。

[0805] pHE4-5 细菌表达载体包括进行选择的新霉素磷酸转移酶基因,一个大肠杆菌复制起点,一个 T5 噬菌体启动子序列,两个 lac 操纵子序列,一个 Shine-Delgarno 序列,和乳糖操纵子阻抑物基因 (lacIq)。这些元件的排列是使得编码多肽的 DNA 片段插入后表达具有 6 个组氨酸残基 (即 6 $\times$ His 标记) 的多肽,此 6 个组氨酸残基共价连于此多肽氨基端。pHE4-5 载体的启动子和操纵子序列是合成产生的。本领域熟知核酸序列的合成产生方法 (CLONETECH 95/96 Catalog, p215-216, CLONETECH, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA94303)。

[0806] 含有所需 Neutrokin- α SV 构建体的克隆,在补加氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 和卡那霉素 (25 μ g/ml) 的液态 LB 培养基中生长过夜 (O/N)。用此 O/N 培养物接种大培养物,稀释度大约为 1 : 25 至 1 : 250。细胞生长至在 600nm 的光密度 (OD600) 在 0.4-0.6 之间。然后加入 IPTG 至终浓度为 1mM,以通过灭活 lac 阻抑物,从 lac 阻抑物敏感启动子诱导转录。接着将细胞再温育 3-4 小时。然后通过离心收集细胞。

[0807] 接着将细胞在 4 $^{\circ}$ C 在 6M 盐酸胍, pH8 中搅动 3-4 小时。经离心除去细胞碎片,将含有 Neutrokin- α 的上清用补加 200mM NaCl 的 50mM 乙酸钠 pH6 缓冲液透析。或者,蛋白质可用含有蛋白酶抑制剂的 500mM NaCl, 20% 甘油, 25mM Tris/HCl pH7.4 透析,而成功地再折叠。在复性之后,蛋白质可通过离子交换,疏水性相互作用及大小排阻层析而纯化。或者,亲和层析如抗体层析柱可用于获得纯化的蛋白质。将纯化的蛋白质贮存在 4 $^{\circ}$ C 或冷冻在 -80 $^{\circ}$ C。

[0808] 在一些实施方案中,优选产生如本实施例所述的表达构建体,以突变 Neutrokin- α 多肽序列中 3 个半胱氨酸残基的一或多个。Neutrokin- α 多肽序列中的半胱氨酸残基位于 SEQ ID NO:2 所示的 147, 232, 和 245 位,及位于 SEQ ID NO:19 所示的 213 和 226 位 (Neutrokin- α SV 多肽序列没有相当于 Neutrokin- α 多肽序列中 Cys-147 的半胱氨酸,因为 Neutrokin- α SV 多肽序列中不存在 Neutrokin- α 多肽序列的 143-160 位氨基酸残基)。

[0809] 实施例 2:在杆状病毒表达系统中克隆,表达,和纯化 Neutrokin- α 蛋白

[0810] 在此实施例中,质粒穿梭载体 pA2GP 用于将编码蛋白质胞外域,缺失其天然相关的胞内和跨膜序列的克隆的 DNA,插入杆状病毒中,以表达 Neutrokin- α 蛋白的胞外域,使用杆状病毒前导序列和如 Summers 等,杆状病毒和昆虫细胞培养方法手册, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987) 所述的方法。此表达载体含有 AcMNPV 的强多角体蛋白启动子,后接杆状病毒 gp67 蛋白的分泌信号肽 (前导序列),和常规的限制位点如 BamHI, Xba I 和 Asp 718 限制位点。猴病毒 40 (SV40) 的聚腺苷酸化位点用于有效的聚腺苷酸化。为易于选择重组病毒,质粒含有同向的在弱果蝇启动子控制下的来自大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因,后接多角体蛋白基因的聚腺苷酸化信号。插入的基因位于病毒序列的两侧,以用野生型病毒 DNA 进行细胞介导的同源重组,产生表达克隆的多核苷酸的活病毒。

[0811] 许多其它杆状病毒载体可用于代替上述载体,如 pAc373, pVL941, 和 pAcIM1, 只要本领域技术人员意识到此构建体提供了适当位置的转录, 翻译, 分泌等信号, 包括所需的信号肽和框内 AUG。这种载体例如 Luckow 等, 病毒学 170 :31-39(1989) 所述。

[0812] 保藏克隆中编码 N 末端缺失形式的 Neutrokin- α 蛋白胞外域的, 缺失 AUG 起始密码子, 天然相关的胞内和跨膜结构域序列, 和图 1A 和 1B (SEQ ID NO :2) 所示 Gln-73 至 Leu-79 位氨基酸的 cDNA 序列, 是用相当于基因 5' 和 3' 序列的 PCR 寡核苷酸引物扩增的。5' 引物序列为 5' -GTG GGA TCC CCG GGC AGA GCTGCA GGG C-3' (SEQ ID NO :14), 其含有下划线的 Bam HI 限制酶位点, 后接图 1A 和 1B 所示 Neutrokin- α 蛋白胞外域序列的 18 个核苷酸, 起于所示的蛋白质胞外域的 N 末端。3' 引物序列为 5' -GTG GGA TCC TTA TTA CAG CAG TTT CAA TGC ACC-3' (SEQ ID NO :15), 其含有下划线的 Bam HI 限制酶位点, 后接两个终止密码子, 和互补于图 1A 和 1B 所示 3' 编码序列的 18 个核苷酸。

[0813] 在一些其它的实施方案中, 优选表达 Neutrokin- α 全部推定的胞外域 (即 Gln-73 至 Leu-285 位氨基酸残基) 的构建体。本领域技术人员能使用 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 分别提供的多核苷酸和多肽序列, 设计多核苷酸引物, 以产生这种克隆。

[0814] 在一优选的实施方案中, pA2GP 表达构建体编码 SEQ ID NO :2 所示 Neutrokin- α 多肽序列的 Leu-112 至 Leu-285 位氨基酸残基。

[0815] 在另一优选的实施方案中, pA2GP 表达构建体编码 SEQ ID NO :2 所示 Neutrokin- α 多肽序列的 Ser-78 至 Leu-285 位氨基酸残基。

[0816] 扩增的片段用商购的试剂盒 (Geneclean, BIO 101 公司, La Jolla, Ca.), 分离自 1% 琼脂糖凝胶。然后用 BamHI 消化此片段, 并再在 1% 琼脂糖凝胶中纯化。此片段在此称为 F1。

[0817] 质粒用限制酶 BamHI 消化, 并任选地用本领域已知的常规方法用小牛小肠磷酸酶去磷酸化。然后将 DNA 用商购的试剂盒 (Geneclean, BIO 101 公司, La Jolla, Ca.), 从 1% 琼脂糖凝胶中分离。此载体 DNA 在此称为 V1。

[0818] 将片段 F1 和去磷酸化的质粒 V1 用 T4 DNA 连接酶连接。用此连接混合物转化大肠杆菌 HB101 或其它适当的大肠杆菌宿主如 XL-1 Blue 细胞 (Statagene Cloning Systems, La Jolla, Ca.), 并涂布于培养平板上。通过用 BamHI 消化各个菌落的 DNA, 及接着通过凝胶电泳分析消化产物, 鉴别含有具有人体基因的质粒的细菌。通过 DNA 测序确定克隆片段的序列。此质粒在此称为 pA2GP-Neutrokin- α 。

[0819] 将 5 μ g 的质粒 pA2GP-Neutrokin- α 与 1.0 μ g 商购的线性杆状病毒 DNA (BaculoGold™ 杆状病毒 DNA, Pharmingen, San Diego, CA) 共转染, 使用如 Felgner 等, 美国科学院院报 84 :7413-7417(1987) 所述的脂染法。将 1.0 μ g 的 BaculoGold™ 病毒 DNA 与 5 μ g 的质粒 pA2GP-Neutrokin- α , 在含有 50 μ l 的无血清 Grace' s 培养基 (Life Technologies 公司, Gaithersburg, MD) 的微滴定平板的无菌孔中混合。之后, 加入 10 μ l Lipofectin 和 90 μ l Grace' s 培养基, 混合并在室温温育 15 分钟。然后将转染混合物滴加至 Sf9 昆虫细胞 (ATCC CRL 1711) 中, Sf9 昆虫细胞种植在含有 1ml 无血清 Grace' s 培养基的 35mm 组织培养平板中。接着将此平板在 27°C 温育 5 小时。然后从平板中除去转染液, 并加入补加 10% 小牛血清的 1ml Grace' s 昆虫培养基。然后在 27°C 持续培养 4 天。

[0820] 4 天后, 收集上清并进行噬斑分析, 如 Summers 和 Smith 所述。使用具有 "Blue

Gal” (Life Technologies 公司, Rockville, Maryland) 的琼脂糖凝胶, 便于鉴别和分离产生蓝染的噬斑的 gal 表达克隆。(关于此型噬斑分析的详细阐述, 也可见于 Life Technologies 公司, Rockville, Maryland 的昆虫细胞培养和杆状病毒分布使用指导, p9-10 所述)。在适当温育后, 用微量移液管 (如 Eppendorf) 的尖端挑取蓝染的噬斑。然后将含有重组病毒的琼脂再悬浮于含有 200 μ l Grace’ s 培养基的微离心管中, 并将含有重组杆状病毒的悬浮液用于感染种植于 35mm 平皿的 Sf9 细胞中。4 天后, 收集这些培养平皿中的上清, 然后在 4℃ 贮存。此重组病毒称为 V-Neutrokin- α 。

[0821] 为检验 Neutrokin- α 基因的表达, 将 Sf9 细胞在补加 10% 热灭活的 FBS 的 Grace’ s 培养基中生长。将此细胞用重组杆状病毒 V-Neutrokin- α , 在感染复数 (MOI) 大约为 2 的情况下感染。如果需要放射标记的蛋白质, 6 小时后除去此培养基, 而用减去甲硫氨酸和半胱氨酸的 SF900 II 培养基 (购自 Life Technologies 公司, Rockville, Maryland) 代替。42 小时之后, 加入 5 微居里的 ^{35} S- 甲硫氨酸和 5 微居里的 ^{35} S- 半胱氨酸 (购自 Amersham)。将细胞温育 16 小时之后, 通过离心收集。上清中的蛋白质以及胞内蛋白质, 通过 SDS-PAGE 接着通过放射自显影 (如果是放射标记的) 加以分析。

[0822] 可使用对纯化蛋白质氨基端的氨基酸序列进行微测序, 以确定蛋白质胞外域的氨基端序列, 且因此确定切割位点和分泌信号肽的长度。

[0823] 在一特异的实施例, 重组 Neutrokin- α 纯化自杆状病毒感染的 Sf9 细胞上清, 如下所述。将昆虫细胞生长于具有 1% (v/v) 小牛血清的 EXCEL401 培养基 (JRH Scientific) 中。在感染 92 小时后, 将收集的上清通过在 18000 $\times$ g 离心, 接着通过在 0.45m 深度过滤而澄清。也可使用脱脂过滤步骤, 以除去脂质污染物, 并随之改善 Neutrokin- α 蛋白的初始捕捉。

[0824] 将上清随机加样于一系列 Poros HS-50/H-50 中。或者, 可使用 Toyopearl QAE, Toyopearl Super Q (Tosohass), Q-Sepharose (Pharmacia) 及等价树脂。此步骤用作阴性纯化步骤以除去强阴离子结合污染物。将流经原料的 HS/HQ 用 1M Tris-HCl pH8 调节为 pH7.5, 用等体积的 50mM 的 Tris-HCl pH8 稀释, 并加样于多孔 PI-20 或 PI-50 层析柱中。将 PI 层析柱首先用 4 体积的 50mM Tris-HCl pH7.5 中 75mM NaCl 冲洗, 然后用 3-5 柱体积的 50mM Tris-HCl pH7.5 中 300mM, 750mM, 1500mM NaCl 洗脱。Neutrokin- α 蛋白在简化的 SDS-PAGE 上呈现一条 17KD 条带, 并存在于 0.75M-1.5M NaCl 部分中。

[0825] 将该 PI 部分经过 Sephacryl S100 HR (Pharmacia) 大小排阻层析柱进一步纯化, 该层析柱用 0.15M NaCl, 50mM 乙酸钠, pH6 平衡。将 S200 部分用 NaCl 混合为终浓度为 3M, 并加样于 Toyopearl Hexyl 650C (Tosohass) 层析柱中。Hexyl 层析柱用 5-10 体积的, 在 50mM 乙酸钠 pH6 中的 3M-0.05M 线性梯度的 NaCl 洗脱。Hexyl 层析中此 NaCl 梯度也可用 50mM 乙酸钠 pH6 中的 1M-0M 梯度的硫酸胺代替。组合含有经过 SDS-PAGE 分析纯化的 Neutrokin- α 的部分, 并用含有 150mM NaCl, 50mM 乙酸钠, pH6 透析。

[0826] 在本文所述的杆状病毒系统表达的最终纯化的 Neutrokin- α 蛋白, 具有起自 SEQ ID NO:2 的 Ala-134 氨基酸残基的 N 末端序列。RP-HPLC 分析示出高于 95% 纯度的单一峰值。内毒素水平在 LAL 分析的检测限值以下。

[0827] 在另一实施例, 重组 Neutrokin- α 纯化自含有 0.25% 牛血清的杆状病毒感染的 Sf9 细胞, 如下所述。

[0828] Sf9 上清通过在 $18000 \times g$ 离心收集。然后将上清用 10mM CaCl_2 ，在弱碱条件下处理 10-15 分钟，接着进行离心和 $0.22 \mu\text{m}$ 深度过滤。然后将所得 Sf9 细胞上清稀释 2 倍，并加样于 Poros PI-50 层析柱（购自 PE 生物系统）中。该层析柱用 $50\text{mM Tris}(\text{pH} = 7.4)$ 平衡。将 PI-50 层析柱用 1CV 的 $50\text{mM Tris}(\text{pH} = 7.4)$ 冲洗，然后用 3CV 以上的 $50\text{mM NaOAc}(\text{pH} = 6)$ 中的 1.5M NaCl 洗脱。将 PI 部分加样于用 $50\text{mM NaOAc}(\text{pH} = 6)$ ， 125mM NaCl 平衡的 Sephacryl S200 层析柱上。将 S200 部分与盐混合至终浓度为 0.7M 硫酸铵和 0.6M NaCl ，并加样于 Toyopearl Hexyl 650C 层析柱（购自 Tosoh Haas）中，该层析柱已用含有 $50\text{mM NaOAc}(\text{pH} = 6)$ 中 0.6M NaCl ， 0.7M 硫酸铵的缓冲液平衡。然后将此层析柱用 2CV 的相同缓冲液冲洗。重组 Neutrokin- α 然后用 3CV 的 $50\text{mM NaOAc}(\text{pH} = 6)$ 洗脱，接着用 2CV 的 20% 的乙醇冲洗。然后重组 Neutrokin- α 蛋白在硫酸铵梯度（ $0.3\text{--}0\text{M}$ ）末端洗脱。集合适当的部分，并用含有 $50\text{mM NaOAc}(\text{pH} = 6)$ 的缓冲液透析，然后经过多孔的 50HQ 层析柱。将 HQ 流通物稀释 4 倍，并加样于 Toyopearl DEAE 650M 层析柱中，然后用 25mM 柠檬酸钠， 125M NaCl 洗脱。

[0829] 在另一实施例中，重组 Neutrokin- α 是用 Sf+ 昆虫细胞中的杆状病毒载体系统表达和纯化的。

[0830] 首先，将编码图 1A 和 1B 所示 Neutrokin- α 多肽序列的 Ser-78 至 Leu-285 氨基酸残基（等于 SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 多肽序列的 Ser-78 至 Leu-285 氨基酸残基）的多核苷酸，亚克隆入杆状病毒转移构建体 PSC 中，以产生杆状病毒表达质粒。衍生自 pVL941 的 pA2GP 转移载体，含有 gp67 信号肽，修饰的多克隆位点，和克隆在 *Drosophila* 热休克启动子下游的 lac 基因，以选择蓝染噬斑。使用 Neutrokin- α (SEQ ID NO:2) 序列，和 pA2GP 载体序列，设计一种克隆方法，将 PSC 信号肽编码序列紧密融合在 Neutrokin- α 编码序列 (SEQ ID NO:2 和图 1A 和 1B) 的 Ala-134 上，并将其插入 PSC 杆状病毒转移质粒中。此方法包含使用两次聚合酶链反应 (PCR)。首先，设计扩增 Neutrokin- α 序列的引物。5' 引物由编码 Ala-134 和以下残基 (5' -GGT CGC CGT TTC TAA CGC GGCCGT TCA GGG TCC AGA AG-3'; SEQ ID NO:31) 的序列组成，位于编码 PSC 信号肽 C 末端的序列之前。3' 引物 (5' -CTG GTTCGG CCC AAG GTA CCA AGC TTG TAC CTT AGA TCT TTT CTAGAT C-3')，由位于 Neutrokin- α 编码序列紧邻下游的 pA2GP 载体序列的反向互补序列组成，位于 Kpn I 限制性内切酶位点和间隔序列（以提高 Kpn I 切割效力）之前。用含有 Neutrokin- α 质粒模板的 pA2GP 和引物 0-1887 和 0-1888 进行 PCR，所得 PCR 产物用标准方法纯化。

[0831] 用 PSC 杆状病毒转移质粒 pMGS12 作模板进行另一个 PCR 反应。此 pMGS12 质粒由插入 pUC8 的 AcNPV EcoRI “I” 片段组成，在 ATG 起始密码子之后的多角体蛋白编码序列用 PSC 信号肽和一多接头位点置换。PCR 反应用 pMGS12 作模板，5' 引物 (5' -CTGGTA GTT CTT CGG AGT GTG-3'; SEQ ID NO:33) 在唯一的 NgoMIV 和 EcoRV 位点上游的 AcNPV ORF603 中退火，3' 引物 (5' -CGCGTT AGA AAC GGC GAC C-3'; SEQ ID NO:34) 退火至编码 PSC 信号肽的序列的 3' 末端。

[0832] 为产生其中 PSC 信号肽紧密融合于 Neutrokin- α 编码序列 Ala-134 的 PCR 产物，将此 PCR 产物与 PSC 信号肽-多角体蛋白上游区 PCR 产物组合，并进行再一次 PCR 循环。由于 PSC 信号肽 PCR 产物 (pMGS12/0-959/0-1044) 的 3' 末端与用引物 0-1887/0-1888 制备的 Neutrokin- α PCR 产物的 5' 末端重叠，组合这两个 PCR 产物并用引物 0-959 和 0-1888

通过 PCR 重叠延伸。

[0833] 将含有融合于 Neutrokin- α 序列的 PSC 信号肽的所得重叠延伸的 PCR 产物,插入杆状病毒转移质粒 pMGS12 中。此 PCR 产物用 NgoM IV 和 Kpn I 消化,纯化片段并连接于 NgoM IV-Kpn I 切割的 pMGS12 中。在用此连接混合物转化感受态大肠杆菌 DH5 α 细胞之后,挑取菌落并微量制备质粒 DNA。每个连接反应的一些阳性克隆通过质粒 DNA 的限制性消化分析鉴别,并选择 3 个克隆 (pAcC9669, pAcC9671, pAcC9672) 进行大规模质粒纯化。对所得质粒 DNA 进行 DNA 序列分析以确定并测序 Neutrokin- α 插入体。

[0834] 以下步骤阐述了从 Sf+ 昆虫细胞中回收和纯化重组 Neutrokin- α 的方法。除非特别指明,该方法在 2-8°C 进行。

[0835] 回收

[0836] 第一步:CaCl₂ 处理

[0837] 通过在 8000×g 离心收集 Sf+ 细胞上清。将回收缓冲液 -1 (1M CaCl₂) 加入上清中,由此 CaCl₂ 的终浓度为 10mM。(在一优选的实施方案中,用 1M ZnCl₂ 代替 1M CaCl₂)。此溶液的 pH 用回收缓冲液 -2 (1M Tris pH8 (±0.2)) 调节为 7.7±。将此溶液温育 15 分钟,然后在 8000×g 离心。

[0838] 纯化

[0839] 第一步:在多孔 PI-50 层析柱上层析

[0840] 将 Sf+ 细胞上清加样于多孔 PI-50 层析柱 (PE Biosystem) 上,该层析柱用 PI-1 缓冲液 (50mM Tris, 50mM NaCl, pH7.4 (±0.2)) 平衡。将 PI-50 层析柱用 1-2CV 的 PI-1 缓冲液冲洗,然后用 PI-2 缓冲液 (50mM 柠檬酸钠, pH6 (±0.2)) 经 3CV 线性梯度洗脱。监测洗脱液在 280nm 的紫外线 (UV) 吸光度。收集越过洗脱峰值的组分并通过 SDS-PAGE 分析。集合适当的组分。

[0841] 第二步:在 Toyopearl Hexyl 650C 层析柱上层析

[0842] 将集合的 PI 与盐混合至 (NH₄)₂SO₄ 的终浓度为 0.7M,并加样于 Toyopearl Hexyl 650C 层析柱上,该层析柱用 HIC-1 缓冲液 (50mM NaOAc, 0.6M NaCl, 0.7M (NH₄)₂SO₄ pH6 (±0.2)) 平衡。然后将此层析柱用 2CV 的 HIC-1 缓冲液冲洗。接着,重组 Neutrokin- α 用 3-5CV HIC-2 缓冲液 (50mM NaOAc pH6 (±0.2)) 洗脱,然后用 2CV 的 20% 乙醇冲洗。监测洗脱液在 280nm 的紫外线 (UV) 吸光度和传导性。收集洗脱峰值的组分并通过 SDS-PAGE 分析。集合适当的组分。

[0843] 第三步:在 SP 琼脂糖凝胶 FF 上层析

[0844] 透析 Hexyl 组分并用 SP-1 缓冲液 (50mM 乙酸钠, pH4.5 (±0.2)) 将 pH 调节为 4.5,稀释 4 倍,并加样于 SP 琼脂糖凝胶 (阳离子交换剂, Pharmacia) 层析柱,该层析柱用 SP-1 缓冲液 (50mM 乙酸钠, pH4.5 (±0.2)) 平衡。然后用 SP-2 缓冲液 (50mM 乙酸钠, pH5.5 (±0.2)) 在 pH5.5 从 SP 层析柱洗脱重组 Neutrokin- α 蛋白。然后监测洗脱液在 280nm 的紫外线 (UV) 吸光度。收集越过洗脱峰值的组分并通过 SDS-PAGE 分析。集合适当的组分。

[0845] 第四步:透析重组 Neutrokin- α

[0846] 将 SP 组分置于 6-8kd 截断膜装置中,然后在透析缓冲液 (10mM 柠檬酸钠, 140mM NaCl, pH6 (±0.2)) 中透析或渗滤过夜。

[0847] 第五步:过滤和填充

[0848] 第六步的重组 Neutrokin- α 溶液的蛋白质浓度通过双辛可宁酸 (BCA) 蛋白质分析确定。用适当的缓冲液将重组 Neutrokin- α 调节为终蛋白质浓度,并在控制的条件下过滤。将过滤物贮存在 -20°C 以下的适当无菌容器中。

[0849] 在一特异的实施方案中,将如前所述产生的本发明的 Neutrokin- α 蛋白调节为终蛋白质浓度为 $1\text{--}5\text{mg/ml}$,并用 10mM 柠檬酸钠, 140mM NaCl , $\text{pH} = 6.0 (\pm 0.4)$ 缓冲,并贮存在 -20°C 以下的 1 型玻璃瓶中。

[0850] 在层析期间,监测在 280nm 的紫外线 (UV) 吸光度。当适用时,测试层析中间物电导率, pH 并通过 SDS 和 / 或 RP-HPLC 监测。

[0851] 清洁层析柱和纯化设备,并用 0.2 或 0.5M NaOH 和去离子水清洗,然后用 0.1 或 0.5M 乙酸清洗。将层析柱和纯化设备用去离子水冲洗,如果需要,贮存在适当的贮存液中。在使用之前,将此设备用适当缓冲液 (如本文所述或本领域熟知的缓冲液) 平衡。

[0852] 在一优选的实施方案中,在上述回收的第一步中,用 1M ZnCl_2 代替 1M CaCl_2 。同样,在此实施方案中,可使用组合的 ZnCl_2 和 CaCl_2 。 0.1M ZnCl_2 和 0.9M CaCl_2 的一些组合可用于重组 Neutrokin- α 蛋白的回收方法中,例如但非限于 0.1M ZnCl_2 和 0.9M CaCl_2 , 0.2M ZnCl_2 和 0.8M CaCl_2 , 0.3M ZnCl_2 和 0.7M CaCl_2 , 0.4M ZnCl_2 和 0.6M CaCl_2 , 0.5M ZnCl_2 和 0.5M CaCl_2 , 0.6M ZnCl_2 和 0.4M CaCl_2 , 0.7M ZnCl_2 和 0.3M CaCl_2 , 0.8M ZnCl_2 和 0.2M CaCl_2 , 0.9M ZnCl_2 和 0.1M CaCl_2 等。然而,EDTA 的存在将抑制回收过程。另外,回收缓冲液 1 中存在 ZnCl_2 和 / 或 CaCl_2 将引导大量高分子量 Neutrokin- α 多聚体形成。

[0853] 实施例 3:在哺乳动物细胞中克隆和表达 Neutrokin- α

[0854] 典型的哺乳动物表达载体含有介导 mRNA 转录起始的启动子因子,蛋白质编码序列,和为转录终止和转录物聚腺苷酸化所需的信号。其它元件包括增强子, Kozak 序列和两侧为 RNA 剪接供体和受体位点的间插序列。用 SV40 的早期和晚期启动子,逆转录病毒的长末端重复 (LTRs) 如 RSV, HTLV1, HIV1 和巨细胞病毒 (CMV) 的早期启动子,可达到高效转录。然而,也可使用细胞因子 (如人肌动蛋白启动子)。用于本发明的适当表达载体例如包括 pSVL 和 pMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) 和 pBC12MI (ATCC 67109)。可使用的哺乳动物宿主细胞包括人 HeLa, 293, H9 和 Jurkat 细胞,小鼠 NIH3T3 和 C127 细胞, Cos 1, Cos 7 和 CV1,令人恐惧的 QC1-3 细胞,小鼠 L 细胞,中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞,和 HEK 293 细胞。

[0855] 或者,基因可在适当的细胞系中表达,该细胞系含有整合入染色体的基因。与可选择的标记如 dhfr, gpt, 新霉素,潮霉素共转染可鉴别和分离转染的细胞。

[0856] 转染的基因也可扩增以表达大量的编码的蛋白质。DHFR (二氢叶酸还原酶) 标记用于显示携带几百个甚至几千个相应基因的拷贝的细胞系。另一种有效的选择标记是谷氨酰胺合酶 (GS) (Murphy 等,生物化学杂志 227:277-279(1991);Bebbington 等,生物/技术 10:169-175(1992))。使用这些标记,细胞在选择的培养基中生长,并选择最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合入染色体的扩增的基因。中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞和 NSO 细胞通常用于产生蛋白质。

[0857] 表达载体 pC1 和 pC4 含有 Rous 肉瘤病毒的强启动子 (LTR) (Cullen 等,分子和细胞生物学,438-447(1985 年 3 月)) 加上 CMV- 增强子的片段 (Boshart 等,细胞 41:521-530(1985))。多克隆位点如具有限制酶切割位点 BamHI, XbaI 和 Asp718,促进相应基

因的克隆。载体另外含有鼠前胰岛素原基因的 3' 内含子,聚腺苷酸化和终止信号。

[0858] 实施例 3(a):在 COS 细胞中克隆和表达

[0859] 表达质粒 pNeutrokin- α -HA 是通过将编码蛋白质的胞外域的保藏的 cDNA 的一部分,克隆入表达载体 pcDNA1/Amp 或 pcDNAIII (其可得自 Invitrogen 公司) 中而产生。为产生可溶的分泌形式的多肽,将胞外域融合于人 IL-6 基因的分泌前导序列。

[0860] 表达载体 pcDNA1/Amp 含有:(1) 在大肠杆菌和其它原核细胞中有效增殖的大肠杆菌复制起点;(2) 选择含有质粒的原核细胞的氨苄青霉素抗性基因;(3) 在真核细胞中增殖的 SV40 复制起点;(4) CMV 启动子,多接头,SV40 内含子;(5) 编码血凝素片段(即促进纯化的 HA 标记)的一些密码子,后接终止密码子和聚腺苷酸化信号,由此 cDNA 可方便地置于 CMV 启动子的表达控制下,并通过多接头内的限制位点可操纵地连于 SV40 内含子和聚腺苷酸化信号。此 HA 标记相当于衍生自流感血凝素蛋白的表位,如 Wilson 等,细胞 37:767(1984) 所述。HA 标记与靶蛋白的融合使易于检测和回收具有识别 HA 表位的抗体的重组蛋白质。另外,pcDNAIII 含有可选择的新霉素标记。

[0861] 将编码 Neutrokin- α 多肽的胞外域的 DNA 片段克隆入载体的多接头区域,以便重组蛋白质由 CMV 启动子指导表达。质粒构建策略如下。将保藏克隆的 Neutrokin- α cDNA,用含有常规限制位点的引物扩增,多数如以上在大肠杆菌中构建表达 Neutrokin- α 的载体的方法所述。适当的引物包括以下用于此实施例中的的引物。含有下划线的 BamHI 位点, Kozak 序列, AUG 起始密码子,编码人 IL-6 基因的分泌前导肽的序列,和 Neutrokin- α 蛋白胞外域的 5' 编码序列的 18 个核苷酸的 5' 引物,具有以下序列: 5'-GCGGGA TCC GCC ACC ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GCC TTCGGT CCA GTT GCC TTC TCC CTG GGG CTG CTC CTG GTG TTGCCT GCT GCC TTC CCT GCC CCA GTT GTG AGA CAA GGG GACCTG GCC AGC-3' (SEQ ID NO:16)。含有下划线的 BamHI 限制位点,和互补于在终止密码子之前的 3' 编码序列的 18 个核苷酸的 3' 引物,具有以下序列:5'-GTG GGA TCC TTA CAG CAG TTTCAA TGC ACC-3' (SEQ ID NO:17)。

[0862] 将 PCR 扩增的 DNA 片段和载体 pcDNA1/Amp,用 BamHI 消化然后连接。将此连接混合物转化入大肠杆菌菌株 SURE (购自 Stratagene Cloning Systems,11099 North Torrey Pines Road,La Jolla,CA 92037),并将此转化培养物铺板于氨苄青霉素培养基上,然后温育此平板使氨苄青霉素抗性菌落生长。从抗性菌落中分离质粒 DNA,并通过限制分析或其它方法检测编码 Neutrokin- α 胞外域的片段存在情况。

[0863] 为表达重组 Neutrokin- α ,将 COS 细胞用如上述的表达载体,使用 DEAE-DEXTRAN 进行转染,例如 Sambrook 等,分子克隆实验手册,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(1989) 所述。将细胞在通过载体表达 Neutrokin- α 的条件下温育。

[0864] Neutrokin- α -HA 融合蛋白的表达通过放射标记和免疫沉淀进行检测,使用如 Harlow 等,抗体实验手册,第二版;冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约(1988) 所述方法。在转染两天后,将细胞通过在含有 ^{35}S -半胱氨酸的培养基中温育 8 小时而标记。收集细胞和培养基,用含有去污剂的 RIPA 缓冲液冲洗并裂解细胞:150mMNaCl,1% NP-40,0.1% SDS,1% NP-40,0.5% DOC,50mM TRIS,pH7.5,如上述 Wilson 等所述。从细胞裂解物和培养基中用 HA 特异性单克隆抗体沉淀蛋白质。然后将沉淀的蛋白质通过 SDS-PAGE 和放射自显影分析。期望大小的表达产物见于细胞裂解物中,在阴性对照中未见到。

[0865] 实施例 3(b) :在 CHO 细胞中克隆和表达

[0866] 载体 pC4 用于表达 Neutrokin- α 蛋白。质粒 pC4 是质粒 pSV2-dhfr(ATCC 保藏号 No :37146) 的衍生物。为产生可溶的分泌形式的多肽,将胞外域融合于人 IL-6 基因的分泌前导序列。载体质粒含有在 SV40 早期启动子控制下的鼠 DHFR 基因。用这些质粒转染的缺失二氢叶酸活性的中国仓鼠卵巢或其它细胞,可通过将细胞在补加化疗剂氨甲蝶呤的选择性培养基(α 减去 MEM, LifeTechnologies) 中生长而加以选择。DHFR 基因在对氨甲蝶呤(MTX) 有抗性的细胞中的扩增已充分证实(见例如 Alt, F. W., Kellems, R. M., Bertino, J. R., 和 Schimke, R. T., 1978, 生物化学杂志 253 :1357-1370, Hamlin, J. L. 和 Ma, C. 1990, 生物化学及生物生理学学报 1097 :107-143, Page, M. J. 和 Sydenham, M. A. 1991, 生物技术 9 :64-68)。生长在浓度增加的 MTX 中的细胞,通过过量产生定向的酶 DHFR, 结果 DHFR 基因扩增而对药物产生抗性。如果另一种基因连于 DHFR 基因,其通常被共扩增和过表达。本领域已知此方法可用于产生携带扩增的基因的 1000 个以上拷贝的细胞系。接着,当氨甲蝶呤除去后,获得含有整合入宿主细胞一或多个染色体中的扩增的基因的细胞系。

[0867] 质粒 pC4 含有表达相应基因的 Rouse 肉瘤病毒的长末端重复(LTR) 的强启动子(Cullen 等, 分子和细胞生物学, 1985 年 3 月 :438-447), 加上分离自人巨细胞病毒(CMV) 的立即早期基因的增强子的片段(Boshart 等, 细胞 41 :521-530(1985))。启动子的下游是以下允许基因整合的一个限制酶切割位点:BamHI, XbaI, 和 Asp718。在这些克隆位点之后, 质粒含有鼠前胰岛素原基因的 3' 内含子和聚腺苷酸化位点。其它高效启动子也可用于表达, 例如人 β -肌动蛋白启动子, SV40 早期或晚期启动子, 或其它逆转录病毒如 HIV 和 HTLVI 的长末端重复。Clontech's Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统及相似的系统可用于在哺乳动物细胞中以调节的方式表达 Neutrokin- α (Gossen, M., & Bujard, H. 1992, 美国科学院院报 89 :5547-5551)。为聚腺苷酸化 mRNA 其它信号, 例如可使用人生长激素或球蛋白基因。携带整合入染色体的相应基因的稳定细胞系, 也可在用可选择的标记如 gpt, G418 或潮霉素共转染的基础上选择。在开始时使用一种以上的标记如 G418 加上氨甲蝶呤是有利的。

[0868] 将质粒 pC4 用限制酶 BamHI 消化, 然后用牛小肠磷酸酶通过本领域已知方法去磷酸化。然后从 1% 琼脂糖凝胶中分离载体。

[0869] 编码 Neutrokin- α 蛋白胞外域的 DNA 序列, 是用相当于基因的 5' 和 3' 序列的 PCR 寡核苷酸引物扩增的。含有下划线的 BamHI 位点, Kozak 序列, AUG 起始密码子, 编码人 IL-6 基因的分泌前导肽的序列, 和 Neutrokin- α 蛋白胞外域的 5' 编码序列的 18 个核苷酸的 5' 引物, 具有以下序列: 5'-GCG GGA TCC GCC ACC ATGAAC TCC TTC TCC ACA AGC GCC TTC GGT CCA GTT GCC TTCTCC CTG GGG CTG CTC CTG GTG TTG CCT GCT GCC TTC CCTGCC CCA GTT GTG AGA CAA GGG GAC CTG GCC AGC-3' (SEQID NO :16)。含有下划线的 BamHI 限制位点, 和互补于在终止密码子之前的 3' 编码序列的 18 个核苷酸的 3' 引物, 具有以下序列: 5'-GTG GGA TCC TTA CAG CAG TTT CAA TGC ACC-3' SEQ IDNO :17)。

[0870] 扩增的片段用内切核酸酶 BamHI 消化, 然后在 1% 琼脂糖凝胶上再纯化。此分离的片段和去磷酸化的载体然后用 T4 DNA 连接酶连接。然后转化大肠杆菌 HB101 或 XL-1 Blue 细胞, 并鉴别含有插入质粒 pC4 的片段的细菌, 例如用限制酶分析法鉴别。

[0871] 缺失活性 DHFR 基因的中国仓鼠卵巢细胞用于转染。将 5 μ g 的表达质粒 pC4 与 0.5 μ g 的质粒 pSVneo 用脂染法共转染(Felgner 等, 如前)。质粒 pSV2-neo 含有一显性选

择标记,编码赋予抗生素抗性的酶包括 G418 的 Tn5 的 neo 基因。将细胞种植于补加 1mg/ml G418 的 α 减 MEM 培养基中。2 天后,将细胞用胰蛋白酶消化,种植于补加 10, 25, 或 50ng/ml 氨甲喋呤和 1mg/ml G418 的 α 减 MEM 培养基中的杂交瘤克隆平板 (Greiner, 德国) 中。大约 10-14 天后,用胰蛋白酶消化各个克隆,并用不同浓度的氨甲喋呤 (50, 100, 200, 400, 800nm) 种植于 6 孔培养皿或 10ml 培养瓶中。然后将在最高浓度氨甲喋呤中生长的克隆移至新的含有更高浓度氨甲喋呤 (1, 2, 5, 10, 20 μ M) 的 6 孔平板中。重复相同的步骤直至获得在 100-200 μ M 浓度生长的克隆。通过例如 SDS-PAGE 和 Western 印迹或通过反向 HPLC 分析所需基因产物的表达。

[0872] 本发明人已产生了至少 6 个 Neutrokin- α 表达构建体,以促进不同规格的及在一些系统中产生 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽。这种表达构建体如下: (1) pNa. A71-L285 (表达 Ala71-Leu285 位氨基酸残基), (2) pNa. A81-L285 (表达 Ala81-Leu285 位氨基酸残基), (3) pNa. L112-L285 (表达 Leu112-Leu285 位氨基酸残基), (4) pNa. A134-L285 (表达 Ala134-Leu285 位氨基酸残基), (5) pNa. L147-L285 (表达 Leu147-Leu285 位氨基酸残基), (6) pNa. G161-L285 (表达 Gly161-Leu285 位氨基酸残基)。

[0873] 在优选的实施方案中,表达构建体用于表达细菌,杆状病毒和哺乳动物系统的各种 Neutrokin- α 的突变蛋白。

[0874] 在另一些优选的实施方案中,此构建体表达在 N 或 C 末端融合于异源多肽的 Neutrokin- α 多肽片段,异源多肽例如是人 IL-6 的信号肽,CK- β 8 的信号肽 (PCT 出版物 PCT/US95/09058 所揭示的 CK- β 8 序列的 -21 至 -1 位氨基酸),或人 IgG Fc 区。本领域技术人员已知其它可以使用的序列。

[0875] 实施例 4: Neutrokin- α mRNA 表达的组织分布

[0876] 进行 Northern 印迹分析以检测在人体组织中 Neutrokin- α 基因的表达,使用如 Sambrook 等所述方法。含有 Neutrokin- α 蛋白 (SEQID NO:1) 全部核苷酸序列的 cDNA 探针,使用 rediprime™ DNA 标记系统 (Amersham Life Science),根据生产者的指导用 ^{32} P 标记。在标记之后,将探针用 CHROMA SPIN-100™ 层析柱 (Clontech Laboratories 公司),根据生产者的方案号 PT1200-1 而纯化。然后将纯化的标记的探针用于检测各种人体组织的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV mRNA。

[0877] 含有各种人体组织 (H) 或人免疫系统组织 (IM) 的多组织 Northern (MTN) 印迹,得自 Clontech,使用 ExpressHyb™ 杂交液 (Clontech),根据生产者的方案号 PT1190-1 用标记的探针检测。在杂交和冲洗之后,将印迹在 -70°C 过夜曝光于胶片上,胶片根据标准方法显色。

[0878] 为确定 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的表达模式,对一组多组织 Northern 印迹进行探查。表明一个 2.6kb mRNA 在周围血白细胞,脾,淋巴结和骨髓中明显表达,在胎盘,心脏,肺,胎儿肝脏,胸腺和胰腺中可检测到表达。对一组细胞系进行分析表明,Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 在 HL60 细胞中高度表达,在 K562 中可检测到表达,但在 Raji, HeLa, 或 MOLT-4 细胞中不表达。所有分析均显示 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV mRNA 表达在免疫系统中富集。

[0879] 实施例 5: 用内源性 Neutrokin- α 基因进行基因治疗

[0880] 根据本发明的另一种基因疗法,包括通过同源重组将内源性 Neutrokin- α 序列

与启动子可操纵地联合,如 1997 年 6 月 24 日授权的美国专利 No :5641670 ;国际公开 WO 96/29411,1996 年 9 月 26 日出版 ;国际公开 WO 94/12650,1994 年 8 月 4 日出版 ;Koller 等,美国科学院院报 86 :8932-8935(1989) ;和 Zijlstra 等,自然 342 :435-438(1989) 所述。此方法包括激活存在于靶细胞中,但在细胞中不表达或低水平表达的基因。产生含有启动子和定向序列的多核苷酸构建体,其同源于启动子两侧的内源性 Neutrokin- α 的 5' 非编码序列。定向序列在 Neutrokin- α 的 5' 末端附近,由此启动子通过同源重组与内源性序列可操纵地连接。启动子和定向序列可用 PCR 扩增。优选地,扩增的启动子在 5' 和 3' 末端含有独特的限制酶位点。优选地,第一个定向序列的 3' 末端含有与扩增的启动子的 5' 末端相同的限制酶位点,第二个定向序列的 5' 末端含有与扩增的启动子的 3' 末端相同的限制酶位点。

[0881] 扩增的启动子和扩增的定向序列用适当的限制酶消化,然后用牛小肠磷酸酶处理。在存在 T4 DNA 连接酶的情况下,将消化的启动子和消化的定向序列一起加入。将所得混合物保持在适于这两个片段连接的条件。将构建体在琼脂糖凝胶上按大小进行分级分离,然后通过苯酚提取和乙醇沉淀而纯化。

[0882] 在此实施例中,多核苷酸构建体作为裸多核苷酸通过电穿孔而施用。然而,多核苷酸构建体也可与转染促进剂一起施用,如脂质体,病毒序列,病毒颗粒,沉淀剂等。本领域已知这种输送。

[0883] 一旦细胞被转染,进行同源重组,使启动子可操纵地连于内源性 Neutrokin- α 序列。这使 Neutrokin- α 在细胞中表达。表达可通过免疫染色或本领域已知的任何其它方法检测。

[0884] 成纤维细胞得自对象的皮肤活检组织。将所得组织置于 DMEM+10% 胎牛血清中。将按指数生长的或早期稳定期成纤维细胞用胰蛋白酶消化,并用营养培养基将其从塑胶表面冲洗下。移出一部分细胞悬浮液进行计数,剩余细胞进行离心。吸出上清,将粒状沉淀重悬浮于 5ml 电穿孔缓冲液 (20mM HEPES pH7.3,137mM NaCl,5mM KCl,0.7mM Na₂HPO₄,6mM 葡萄糖) 中。将细胞再离心,吸出上清,将细胞重悬浮于含有 1mg/ml 乙酰化的牛血清白蛋白的电穿孔液中。终细胞悬浮液含有大约 3×10^6 个细胞 /ml。电穿孔应在重悬浮之后马上进行。

[0885] 根据标准方法制备质粒 DNA。例如,为构建定向于 Neutrokin- α 基因座的质粒,将质粒 pUC18 (MBI Fermentans,Amherst,NY) 用 HindIII 消化。将 CMV 启动子通过 PCR 扩增使之在 5' 末端含 XbaI 位点和在 3' 末端含 BamHI 位点。通过 PCR 扩增两个 Neutrokin- α 非编码序列:一个 Neutrokin- α 非编码序列 (Neutrokin- α 片段 1) 扩增后在 5' 末端含 HindIII 位点和在 3' 末端含 XbaI 位点;另一个 Neutrokin- α 非编码序列 (Neutrokin- α 片段 2) 扩增后在 5' 末端含 BamHI 位点和在 3' 末端含 HindIII 位点。CMV 启动子和 Neutrokin- α 片段用适当的酶消化 (CMV 启动子用 XbaI 和 BamHI ;Neutrokin- α 片段 1 用 XbaI ;Neutrokin- α 片段 2 用 BamHI 消化),并连接在一起。将所得连接产物用 HindIII 消化,并用 HindIII 消化的 pUC18 质粒连接。

[0886] 将质粒 DNA 加入具有 0.4cm 电极间隙的无菌试管 (Bio-Rad) 中。终 DNA 浓度为至少 120 μ g/ml。然后将 0.5ml 的细胞悬浮液 (含有大约 1.5×10^6 个细胞) 加入试管中,并将细胞悬浮液和 DNA 溶液轻微混合。用 Gene-Pulser 仪 (Bio-Rad) 进行电穿孔。电容和电

压分别设为 960 μ F 和 250-300V。随着电压提高,细胞存活降低,但稳定地将导入的 DNA 掺入其基因组的存活细胞的百分率明显提高。给定这些参数,应观测到大约 14-20 毫秒的脉冲时间。

[0887] 将电穿孔的细胞在室温保持大约 5 分钟,然后将试管的内容物用无菌移液管轻轻移出。将细胞直接加入 10cm 平皿中的 10ml 预温的营养培养基(具有 15% 小牛血清的 DMEM)中,并在 37°C 温育。第二天,吸出培养基并用 10ml 新鲜培养基置换,再温育 16-24 小时。

[0888] 然后将基因工程成纤维细胞注射入宿主体内,单独或在生长至铺满 cytodex 3 微载体珠之后注射。现在成纤维细胞产生蛋白质产物。然后可将此成纤维细胞导入病人体内,如上所述。

[0889] 实施例 6 :Neutrokin- α , 一种作为 B 淋巴细胞刺激物的肿瘤坏死因子配体家族的新成员

[0890] 在人嗜中性粒细胞 / 单核细胞衍生的 cDNA 文库中,鉴别出一种 285 个氨基酸的蛋白质,在其推定的胞外受体 - 配体结合结构域中,与 APRIL (28.7%) (Hahne, M. 等,实验方法杂志 188,1185-90 (1998)), TNF- α (16.2%) (Pennica, D. 等,自然 312,724-729 (1984)) 和 LT- α (14.1%) (Gray, 自然 312,721-724 (1984)) 呈现明显同源(图 7A)。我们将此细胞因子称为 Neutrokin- α (基于其生物活性,也称其为 B 淋巴细胞刺激物 (BlyS))。Neutrokin- α 蛋白序列的疏水性分析表明,在 47-73 位氨基酸残基之间的一个潜在的跨膜结构域位于非疏水性氨基酸之前,提示与其它 TNF 配体家族一样,Neutrokin- α 是一种 II 型膜结合蛋白 (Cosman, D., 干细胞 12:440-55 (1994))。此 cDNA 在哺乳动物细胞 (HEK293 和中国仓鼠卵巢细胞) 和 Sf9 昆虫细胞中的表达,鉴别一个具有起自第 134 位丙氨酸的 N 末端序列的 152 个氨基酸的可溶形式(图 7A)。对质量和电荷比率的重新构建,确定 Neutrokin- α 的分子量为 17038 Daltons,这个数值与推定的具有一个二硫键的此 152 个氨基酸的蛋白质的分子量 (17037.5 Daltons) 一致。

[0891] 使用人 / 仓鼠体细胞杂种和辐射杂种作图,发现编码 Neutrokin- α 的基因与标记 SHGC-36171 连锁,其定位于人染色体 13q34,一个与基因的 TNF 超家族的任何其它成员不相关的区域 (Cosman, D. 干细胞 12:440-55 (1994))。

[0892] Neutrokin- α 的表达模式通过 Northern 印迹 (图 7B) 和流式细胞计量分析 (表 5 和图 8) 确定。Neutrokin- α 由一个 2.6kb 的 mRNA 编码,发现其在周围血白细胞,脾,淋巴结和骨髓中高水平表达。在胎盘,心脏,肺,胎儿肝脏,胸腺和胰腺中检测到低水平表达。在这一组细胞系中,在 HL-60 和 K562 中检测到 Neutrokin- α mRNA,但在 Raji, HeLa, 或 MOLT-4 细胞中未检测到。这些结果使用 Neutrokin- α 特异性 mAb 2E5 通过流式细胞计量分析可证实。如图 5 所示,Neutrokin- α 表达在 T 或 B 细胞系上未检测到,而是限于骨髓起源的细胞。对正常血细胞的进一步分析表明,在静止的单核细胞上明显表达,在将细胞暴露于 IFN- γ (100U/ml) 下 3 天后,正调节大约 4 倍 (图 8A)。还检测到 Neutrokin- α 特异性 mRNA 的伴随增加 (图 8B)。相反,Neutrokin- α 在新分离的周围血粒细胞, T 细胞, B 细胞或 NK 细胞中不表达。

[0893] 确定纯化的重组 Neutrokin- α (rNeutrokin- α) 在各种基于细胞的分析中,诱导细胞活化,增殖,分化或死亡的能力,所述细胞包括 B 细胞, T 细胞,单核细胞, NK 细胞,造血祖细胞,和各种内皮和上皮源的细胞。在这些分析中,特别发现 Neutrokin- α 在标准联

合刺激分析中提高 B 细胞增殖,其中纯化的扁桃体 B 细胞,在存在福尔马林固定的金黄色葡萄球菌 Cowan I (SAC) 或固定的抗人 IgM 作为引发剂的情况下培养 (Sieckmann, D. G., 等, 实验方法杂志 147 :814-29 (1978) ;Ringden, O. 等, Scand. J. Immunol. 6 :1159-69 (1977))。如图 9A 所示,重组 Neutrokin- α 诱导扁桃体 B 细胞剂量依赖性增殖。此应答类似于 rIL2 在 0.1-10000ng/ml 剂量范围的应答。当用固定的抗 IgM 抗体共同刺激细胞培养时, Neutrokin- α 还诱导 B 细胞增殖 (图 9B)。在存在固定浓度的 IL2 或 rNeutrokin- α 的情况下,随着交联剂数量增加而易于观测到剂量依赖形式的应答。

[0894] 在将对 B 细胞的特异生物活性与受体表达联系起来的尝试中,纯化的 Neutrokin- α 是生物素酰化的。在标准 B 细胞增殖分析中,所得生物素酰化的 Neutrokin- α 保留生物功能。人体周围全血细胞的谱系特异性分析表明,生物素酰化的 Neutrokin- α 的结合在 T 细胞,单核细胞, NK 细胞和粒细胞上未检测到,这分别通过 CD3, CD14, CD56 和 CD66b 确定 (图 10A)。相反,生物素酰化的 Neutrokin- α 结合周围血 CD20⁺B 细胞。在 B 细胞肿瘤系 REH, ARH-77, Raji, Namalwa, RPMI8226 和 IM-9 中还检测到受体表达,但在任何测试的骨髓衍生的细胞系包括 THP-1, HL-60, K-562 和 U-937 中未检测到。骨髓瘤细胞系 IM-9 和组织细胞系 U-937 的代表性流式细胞计量模式示于图 10B。用生物活性的 FLAG 标记的 Neutrokin- α 蛋白代替化学修饰的生物素酰化的 Neutrokin- α 可获得相似结果。这些结果证实 Neutrokin- α 在其受体分布和生物活性中均显示明显的 B 细胞向性。这些结果还示出细胞活化是否可诱导 Neutrokin- α 受体在周围血细胞,其它正常细胞或建立的细胞系中表达。

[0895] 为测试 Neutrokin- α 的物种特异性,将小鼠脾 B 细胞在存在人 Neutrokin- α 和 SAC 的条件下培养。结果表明 rNeutrokin- α 诱导鼠脾 B 细胞在体外增殖,并结合在这些细胞上细胞表面受体。令人感兴趣的是,分离自小鼠骨髓的不成熟的表面 Ig 阴性 B 细胞前体,既不应答 Neutrokin- α 而增殖,也不结合配体。

[0896] 为确定 rNeutrokin- α 的体内活性,将 BALB/c 小鼠 (3 个 / 组) 每天注射 (i. p.) 两次缓冲液,或 0.08mg/kg, 0.8mg/kg, 2mg/kg 或 8mg/kg 的 rNeutrokin- α 。将小鼠连续 4 天进行这种处理,之后处死,收集各种组织和血清进行分析。在另一实施方案中,将 BALB/c 小鼠每天注射 (i. p.) 两次在 0.01-10mg/kg 范围内任何剂量的 rNeutrokin- α 。在一优选的实施方案中,将 BALB/c 小鼠每天注射 (i. p.) 两次在 0.01-3mg/kg 范围内任何剂量的 rNeutrokin- α (在此实施方案中特别优选的剂量包括但不限于 0.01mg/kg, 0.02mg/kg, 0.03mg/kg, 0.04mg/kg, 0.05mg/kg, 0.06mg/kg, 0.07mg/kg, 0.08mg/kg, 0.09mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg, 0.5mg/kg, 0.6mg/kg, 0.7mg/kg, 0.8mg/kg, 0.9mg/kg, 1.0mg/kg, 1.1mg/kg, 1.2mg/kg, 1.3mg/kg, 1.4mg/kg, 1.5mg/kg, 1.6mg/kg, 1.7mg/kg, 1.8mg/kg, 1.9mg/kg, 2.0mg/kg, 2.1mg/kg, 2.2mg/kg, 2.3mg/kg, 2.4mg/kg, 2.5mg/kg, 2.6mg/kg, 2.7mg/kg, 2.8mg/kg, 2.9mg/kg, 和 3.0mg/kg)。在另一优选的实施方案中,将 BALB/c 小鼠每天注射 (i. p.) 两次在 0.02-2mg/kg 范围内任何剂量的 rNeutrokin- α (在此实施方案中特别优选的剂量包括但不限于 0.02mg/kg, 0.03mg/kg, 0.04mg/kg, 0.05mg/kg, 0.06mg/kg, 0.07mg/kg, 0.08mg/kg, 0.09mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg, 0.5mg/g, 0.6mg/kg, 0.7mg/kg, 0.8mg/kg, 0.9mg/kg, 1.0mg/kg, 1.1mg/g, 1.2mg/kg, 1.3mg/kg, 1.4mg/kg, 1.5mg/kg, 1.6mg/kg, 1.7mg/kg, 1.8mg/kg, 1.9mg/kg, 2.0mg/kg)。

[0897] 施用 Neutrokin- α 的作用,在显微镜下用 HE 染色的和用特异于 CD45R(B220) 的 mAb 免疫组织化学染色的脾组织切片中非常明显 (图 11A)。正常脾结构发生改变,白质边缘区明显延伸,红髓的细胞结构明显增加 (图 11A)。边缘区延伸是由于表达 B 细胞标记 CD45R(B220) 的淋巴细胞数量增加所致。另外, T 细胞密集的动脉周围淋巴鞘 (PALS) 区域也被适量的 CD45R(B220) 阳性细胞浸润。这提示白质变化是由于 B 细胞数量增加所致。通常充填于红髓的密集填充细胞群不被 CD45R(B220) 染色。需要进行另外的试验以对所包含的所有类型细胞加以定性,及进一步确定 0.08mg/kg,0.8mg/kg,2mg/kg 改变脾结构的机制。

[0898] 对取自用 2mg/kg Neutrokin- α 处理的小鼠脾组织进行的流式细胞计量分析表明,与对照鼠相比, Neutrokin- α 提高成熟 (CD45R(B220)^{dull}, ThB^{bright}) B 细胞比例近 10 倍 (图 11B)。另外进行的其中小鼠是用缓冲液,0.08mg/kg,0.8mg/kg,2mg/kg,或 8mg/kg 的 Neutrokin- α 处理的分析表明,与对照鼠相比,0.08mg/kg,0.8mg/kg,2mg/kg 的 Neutrokin- α 均提高成熟 (CD45R(B220)^{dull}, ThB^{bright}) B 细胞比例近 10 倍,而缓冲液和 8mg/kg 的 Neutrokin- α 产生大约相同比例的成熟 B 细胞。见表 4。

[0899] 表 4 :小鼠脾 B 细胞群的 FACS 分析

[0900]

Neutrokin- α (mg/kg)	成熟 B 细胞百分率 (R2)	CD45R 阳性百分率 (R1)
对照 (缓冲液)	1.26	52.17
0.08mg/kg	16.15	56.53
0.8mg/kg	18.54	57.56
2mg/kg	16.54	57.55
8mg/kg	1.24	61.42

[0901] 体内成熟 B 细胞表现度增加的潜在结果是血清 Ig 滴定相对增加。因此,对比缓冲液和 Neutrokin- α 处理的小鼠之间血清 IgA, IgG 和 IgM 水平 (图 11C)。施用 Neutrokin- α 使血清中 IgA 和 IgM 水平分别增加 2 和 5 倍。另人注目的是 IgG 的循环水平不增加。

[0902] 另外,在用各种数量的 Neutrokin- α 处理 4 天的小鼠的血清 IgA 滴定中,观测到剂量依赖性应答,而施用相同量的 Neutrokin- α 处理 2 天未观测到明显剂量依赖性。在施用 4 天的情况下,施用 8,2,0.8,0.08 和 0mg/kg 的 Neutrokin- α 所致血清 IgA 滴定大约为 800 μ g/ml,700 μ g/ml,400 μ g/ml,200 μ g/ml,和 200 μ g/ml。即施用 8,2,0.8,和 0.08mg/kg 的 Neutrokin- α 4 天后,与只施用缓冲液观测到的背景或基本 IgA 血清水平相对比, IgA 血清水平分别提高大约 4,3.75,2 和最小倍数。在一另外的实施方案中,这些试验可用在 0.01-10mg/kg 范围内任何数量的 rNeutrokin- α 进行。在一优选的实施方案中,施用 0.01-3mg/kg 范围内的 Neutrokin- α (在此实施方案中,特别优选的剂量例如包括但不限于 0.01mg/kg,0.02mg/kg,0.03mg/kg,0.04mg/kg,0.05mg/kg,0.06mg/kg,0.07mg/kg,0.08mg/kg,0.09mg/kg,0.1mg/kg,0.2mg/kg,0.3mg/kg,0.4mg/kg,0.5mg/kg,0.6mg/kg,0.7mg/kg,0.8mg/kg,0.9mg/kg,1.0mg/kg,1.1mg/kg,1.2mg/kg,1.3mg/kg,1.4mg/kg,1.5mg/kg,1.6mg/kg,1.7mg/kg,1.8mg/kg,1.9mg/kg,2.0mg/kg,2.1mg/kg,2.2mg/kg,

2.3mg/kg, 2.4mg/kg, 2.5mg/kg, 2.6mg/kg, 2.7mg/kg, 2.8mg/kg, 2.9mg/kg, 3.0mg/kg)。在另一优选的实施方案中,施用 0.02-2mg/kg 范围内的 Neutrokin- α (在此实施方案中,特别优选的剂量例如包括但不限于 0.02mg/kg, 0.03mg/kg, 0.04mg/kg, 0.05mg/kg, 0.06mg/kg, 0.07mg/kg, 0.08mg/kg, 0.09mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.4mg/kg, 0.5mg/kg, 0.6mg/kg, 0.7mg/kg, 0.8mg/kg, 0.9mg/kg, 1.0mg/kg, 1.1mg/kg, 1.2mg/kg, 1.3mg/kg, 1.4mg/kg, 1.5mg/kg, 1.6mg/kg, 1.7mg/kg, 1.8mg/kg, 1.9mg/kg, 2.0mg/kg)。

[0903] 本文所示论据阐明 Neutrokin- α 是 TNF-配体超家族的一个新成员,其在体内和体外均诱导 B 细胞增殖和分化。通过其单核细胞特异性基因/蛋白表达模式,和其对 B 淋巴细胞的特异性受体分布和生物活性, Neutrokin- α 不同于其它 B 细胞生长和分化因子如 IL2 (Metzger, D. W. 等,免疫学研究 146:499-505(1995)), IL4 (Armitage, R. J. 等,生物学实验方法进展 292:121-30(1991); Yokota, T. 等,美国科学院院报 83:5894-98(1986)); IL5 (Takatsu, K. 等,美国科学院院报 84:4234-38(1987); Bertolini, J. N. 等,欧洲免疫学杂志 23:398-402(1993)), IL6 (Poupart, P. 等,EMBO 杂志 6:1219-24(1987); Hirano, T, 自然 324:73-76(1986)), IL7 (Goodwin, R. G. 等,美国科学院院报 86:302-06(1989); Namen, A. E. 等,自然 333:571-73(1988)), IL13 (Punnonen, J. 等,变态反应 49:576-86(1994)), IL15 (Armitage, R. J. 等,免疫学杂志 154:483-90(1995)), CD40L (Armitage, R. J. 等,自然 357:80-82(1992); Van Kooten, C. 和 Banchereau, J. Int. Arch. Allergy. Immunol 113:393-99(1997)) 或 CD27L (CD70) (Oshima, H. 等, Int. Immunol. 10:517-26(1998); Lens, S. M. 等, Semin. Immunol. 10:517-26(1998))。这些论据提示 Neutrokin- α 包含于 B 细胞和单核细胞或它们分化的子代之间的信号交换中。尽管所有 B 细胞可利用此信号模式,此限制的表达模式和 Ig 分泌提示 Neutrokin- α 在激活 CD5⁺ 或“非常规”B 细胞应答中的作用。这些 B 细胞提供先天的免疫系统的重要组分,及通过其分泌多反应性的 IgM 和 IgA 抗体而提供抵御环境中的病原体 (Pennell, C. A. 等,欧洲免疫学杂志 19:1289-95(1989); Hayakawa, K. 等,美国科学院院报 81:2494-98(1984))。或者, Neutrokin- α 可作为 T 细胞非依赖性应答的调节剂,该应答与 CD40 和 CD40L 在 T 细胞依赖性抗原活化中的应答方式相同 (Eertwegh, A. J. 等,实验方法杂志 178:1555-65(1993); Grabstein, K. H. 等,免疫学杂志 150:3141-47(1993))。这样, Neutrokin- α , 其受体或相关的拮抗剂用于治疗与自身免疫性,瘤形成和/或免疫缺损综合征相关的 B 细胞疾病。

[0904] 方法

[0905] 小鼠: BALB/cAnNCR(6-8周)购自 Charles River 实验室,并根据推荐的标准(国家研究委员会,和使用实验动物指导(1999)),在具有重复利用的纸垫的小隔离笼(Harlan Sprague Dawley 公司, Indianapolis, IN)中饲养,并提供小球状啮齿动物食物(Harlan Sprague Dawley 公司),及在底部随意放置瓶装饮用水。在此研究中使用的动物方案是参考并经动物饲养和使用委员会的 HGS 制度核准的。

[0906] 分离全长 Neutrokin- α 的 cDNA:使用 BLAST 程序探查人体基因组科学有限公司表达序列标记(EST)数据库,寻求与 TNF 家族的受体结合结构域同源的序列。对全长 Neutrokin- α 克隆进行鉴别,测序并提交至基因库(登记号 AF132600)。Neutrokin- α 开放读框是利用 5' 引物和 3' 引物经 PCR 扩增的,5' 引物(5'-CAGACT GGA TCC GCC ACC ATG GAT GAC TCC ACA GAA AG-3')在预定的起始密码子退火,3' 引物(5'-CAG ACT GGT

ACC GTCCTG CGT GCA CTA CAT GGC-3') 在预定的下游终止密码子退火。所得扩增子用 BamHI 和 Asp718 限制位点加尾,并亚克隆入哺乳动物表达载体中。Neutrokin- α 也在 p-CMV-1(Sigma Chemicals) 中表达。

[0907] 重组人 Neutrokin- α 的纯化:将编码 Neutrokin- α 的全长 cDNA 亚克隆入杆状病毒表达载体 pA2 中,并转染入 Sf9 昆虫细胞中(Pater.V.P. 等,表达方法杂志 185:1163-72(1997))。重组 Neutrokin- α 纯化自感染 92 小时后的细胞上清,组合使用阴离子交换,大小排阻和疏水作用层析等方法。纯化的蛋白质在含有 0.15M NaCl,50mM NaOAc, pH6 的缓冲液中配制,无菌过滤并贮存在 4℃ 直至所需时。SDS-PAGE 和 RP-HPLC 分析均表明 rNeutrokin- α 是 95% 以上纯化的。内毒素水平低于在 LAL 分析中的检测限值(Associates of Cape Cod, Falmouth, MA)。最终纯化的 Neutrokin- α 蛋白的 N 末端的序列为 Ala-Val-Gln-Gly-Pro。这相当于衍生自全长 Neutrokin- α 基因稳定转染的 CHO 细胞系的可溶的 Neutrokin- α 的序列。

[0908] 产生单克隆抗体:将 BALB/cAnNCR 小鼠用悬浮在完全 Freund's 佐剂的 50 μ g 的 His 标记的 Neutrokin- α 免疫接种,接着在不完全 Freund's 佐剂中攻击 2 次。如述制备杂交瘤和单克隆抗体(Geffer, M.L. 等, Somatic Cell Genet. 3:231-36(1977); Akerstrom, B. 等,免疫学杂志 135:2589-92(1985))。

[0909] 细胞系:所有人细胞系购自 ATCC(美国典型培养物保藏中心,马纳萨斯,VA)。

[0910] FACS 分析:Neutrokin- α 表达在人细胞系,新分离的正常周围血有核细胞,和体外培养的单核细胞,小鼠抗人 Neutrokin- α mAb 2E5(IgG1),和小鼠 IgG 的 PE 缀合的 F(ab')₂ 山羊抗体(CALTAG 实验室, Burlingame, CA) 上评估。用 FACScan(Becton Dickinson 免疫细胞计量系统, San Jose, CA) 分析细胞,用碘化丙锭排除死亡的细胞。Neutrokin- α 结合用经 N-羟基琥珀酰亚胺生物素试剂(Pierce, Rockford, IL),和 PE 缀合的链亲和素(Dako Corp, Glostrup, Denmark) 生物素酰化的 rNeutrokin- α 确定。

[0911] 染色体作图:为确定 Neutrokin- α 基因的染色体位置,将保留个体染色体的一组单染色体的体细胞杂种(Quantum Biotechnology, 加拿大),用 Neutrokin- α 特异引物通过 PCR 筛选(5' 引物:5'-TGG TGT CTT TCT ACC AGG TGG-3'), 3' 引物:5'-TTTCTT CTG GAC CCT GAA CGG-3')。推定的 233bp 的 PCR 产物只在人染色体 13 杂种中检测到。使用一组 83 个辐射杂种(Research Genetics, St. Louis, MO) 和斯坦福人类基因组中心数据库(<http://www.shgc.stanford.edu.RH/rhserver>)。发现 Neutrokin- α 与染色体 13 上的 SHGC-36171 标记连锁。用人染色体 13 的细胞发生图对此图超定位确定人 Neutrokin- α 在染色体带 13q34 上。

[0912] B 淋巴细胞增殖分析:人扁桃体 B 细胞通过用磁珠(MACS) 耗竭 CD3 阳性细胞而纯化。所得细胞群通过 CD19 和 CD20 的表达确定其 95% 以上是 B 细胞。将的人 rNeutrokin- α 或对照蛋白重组人 IL2 的各种稀释物置于 96 孔平板的各个孔中,向其中加入悬浮在培养液中的 10^5 个 B 细胞,总体积为 150 μ l,所用培养液为含有 10% FBS, 5×10^{-5} M 的 2ME, 100U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素,和 10^{-5} M 的 Pansorbin(SAC) 或抗 IgM 抗体的 RPMI1640。在加入上述因子 72 小时之后,通过 ^{3} H-胸苷(6.7Ci/Mm) 的 20 小时脉冲(1 μ Ci/孔),对增殖进行定量。

[0913] 组织学分析:将脾组织在 10% 中性缓冲的福尔马林中固定,包埋于石蜡中,切成 5 μ m 的切片,置于载玻片上,并用 HE 染色或通过对 CD45R(B220) 进行酶标记的间接免疫组

组织化学方法染色 (Hilbert, D. M., 欧洲免疫学杂志 23 :2412-18 (1993))。

[0914] 表 5 :Neutrokin- α 的细胞表面表达

[0915]

细胞系	细胞形态学	Neutrokin- α 细胞表面表达
单核细胞系 U-937 BL-60 K-562 THP-1	淋巴瘤, 组织细胞 / 巨噬细胞 白血病, 急性骨髓细胞性 白血病, 慢性骨髓细胞性 白血病, 急性单核细胞性	+ + + +
T 细胞系 Jurkat SUP-T13 MOLT-4	白血病, T 淋巴细胞性 白血病, T 淋巴母细胞性 白血病, T 淋巴母细胞性	- - -
B 细胞系 Daudi Namalwa Raji Reh ARH-77 IM9 RPMI 8226	Burkitt' s, 淋巴母细胞 Burkitt' s, 淋巴细胞 Burkitt' s, 淋巴细胞 白血病, 淋巴细胞性 白血病, 浆细胞 骨髓瘤 骨髓瘤	- - - - - - -

[0916] 实施例 7 :检测刺激或抑制 B 细胞增殖和分化的分析

[0917] 功能性体液免疫应答的产生要求在 B 细胞系及其微环境之间的可溶和关联的信号。信号可给予一阳性刺激, 使 B 细胞系细胞持续其程序发育, 或给予一阴性刺激, 指导细胞抑制其当前的发育途径。现已发现许多刺激和抑制信号影响 B 细胞应答, 包括 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL14 和 IL15。令人感兴趣的是, 这些信号是通过自身微弱的效应器但可与各种共刺激蛋白组合, 以诱导 B 细胞群的活化, 增殖, 分化, 归巢, 耐受和死亡。最佳的 B 细胞共刺激蛋白之一是 TNF 超家族。已发现此家族中的 CD40, CD27 和 CD30 及其各自的配体 CD154, CD70 和 CD153 调节各种免疫应答。检测和 / 或观测这些 B 细胞群及其前体的增殖和分化的分析, 在确定各种蛋白质在增殖和分化期间可对这些 B 细胞群的作用中是非常有用的。以下列出的是检测 B 细胞群及其前体的分化, 增殖或抑制的两种分析。

[0918] 体外分析 :确定纯化的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白或其截短形式, 诱导 B 细胞群及其前体活化, 增殖, 分化或抑制和 / 或死亡的能力。Neutrokin- α 和 /

或 Neutrokin- α SV 蛋白对纯化的人扁桃体 B 细胞的作用,在 0.1-10000ng/ml 剂量范围内定量测定,在标准 B 淋巴细胞共刺激中确定,其中纯化的扁桃体 B 细胞在存在福尔马林固定的金黄色葡萄球菌 Cowan I (SAC),或固定的抗人 IgM 抗体作为引发剂条件下培养。第二信号如 IL-2 和 IL-15 协同 SAC 和 IgM 交联激发 B 细胞增殖通过掺入含氚胸苷而测定。新协同剂使用此分析可易于鉴别。此分析包括通过磁珠 (MACS) 耗竭 CD3 阳性细胞而分离人扁桃体 B 细胞。所得细胞群通过 CD45R (B220) 的表达确定 95% 以上是 B 细胞。将每个样品的各种稀释物置于 96 孔平板的各个孔中,向其中加入悬浮在培养液中的 10^5 个 B 细胞,总体积为 150 μ l,所用培养液为含有 10% FBS, 5×10^{-5} M 的 2ME, 100U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素,和 10^{-5} Pansorbin (SAC) 的 RPMI 1640。在加入上述因子 72 小时之后,通过 ^3H - 胸苷 (6.7Ci/Mm) 的 20 小时脉冲 (1 μ Ci/ 孔),对增殖进行定量。阳性和阴性对照组分别为 IL2 和培养基。

[0919] 激动剂 (包括 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 多肽片段) 证明,当与相同数目的 B 细胞与相同浓度的引发剂接触时所观测的结果相比时, B 细胞增殖增加。根据本发明的拮抗剂当与对照组相比时呈现 B 细胞增殖降低,对照组含有相同数目的 B 细胞,相同浓度的引发剂,和相同浓度可溶形式的激发 B 细胞增殖活性提高的 Neutrokin- α (例如 SEQ ID NO:2 所示 Neutrokin- α 多肽的 71-285, 81-285, 112-285 或 134-285 位氨基酸), 没有拮抗剂。

[0920] 体内分析: 将 BALB/c 小鼠每天注射 (i.p.) 两次缓冲液, 或 2mg/kg 的 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白, 或其截短形式。将小鼠连续 4 天接受这种处理, 然后处死, 并收集各种组织和血清以进行分析。对比正常的 HE 组织切片和 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白处理的脾组织, 鉴别 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白对脾细胞的作用的结果, 如动脉周围淋巴鞘的扩散, 和 / 或红髓区的成核细胞结构明显增加, 可表明 B 细胞群分化和增殖的激活。使用 B 细胞标记, 抗 CD45R (B220) 的免疫组织化学研究, 用于确定脾细胞的任何生理改变如脾组织结构改变, 是否是由于浸润建立的 T 细胞区的松散确定的 B 细胞区带内 B 细胞表现度提高所致。

[0921] 对经 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白处理的小鼠的脾组织进行的流式细胞计量分析, 用于表明与对照鼠相比, Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 是否特异的提高 ThB+, CD45R (B220) 空 B 细胞的比例。

[0922] 另外, 在体内成熟 B 细胞表现度提高的推定结果是在血清 Ig 滴定中相对提高。因此, 对比缓冲液与 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 蛋白处理的小鼠之间血清 IgM 和 IgA 水平。

[0923] 实施例 8: Neutrokin- α 及其激动剂在治疗移植物对抗宿主疾病相关的小鼠淋巴萎缩和发育不全中的作用

[0924] 使用 Neutrokin- α 治疗, 预防和 / 或诊断移植物对抗宿主疾病 (GVHD) 相关的小鼠淋巴萎缩和发育不全的分析, 是通过使用 C57BL/6 亲代移植至 (BALB/c X C57BL/6) F1 (CBF1) 小鼠模型中而进行的。此进入 F1 小鼠模型的亲代是充分定性的, 是在骨髓移植患者中 GVHD 的可再生动物模型, 这是本领域技术人员熟知的 (见 Gleichmann 等, 现代免疫学 5:324, 1984)。可溶的 Neutrokin- α 预期诱导 B 淋巴细胞增殖和分化, 并纠正在 GVHD 的动物模型中观测到的淋巴萎缩和发育不全 (Piguet 等, J. Exp. Med. 166:1280 (1987);

Hattori 等,血液 90 :542(1997))。

[0925] GVHD 开始是通过将大约 $1-5 \times 10^8$ 个 C57BL/6 的脾细胞,经静脉内注射入 (BALB/c X C57BL/6)F1 小鼠中 (均购自 Jackson Lab, Bar Harbor, Maine)。在注射亲代细胞后,当淋巴萎缩和发育不全是轻度 (大约 5 天),中度 (大约 12 天) 或重度 (大约 20 天) 时,开始将 6-8 只小鼠每天腹膜内,肌内或皮内注射 0.1-5.0mg/kg 的 Neutrokin- α 或对照缓冲液。Neutrokin- α 对脾的淋巴萎缩和发育不全的作用,在 10-30 天之间的多个时间点 (3-4) 通过 FACS 和组织病理学分析。简而言之,从正常的 CBF1, GVHD, 或 Neutrokin- α 处理的小鼠中制备脾细胞,用荧光素藻红蛋白缀合的抗 H-2Kb 抗体,生物素缀合的抗 H-2Kd 抗体,和 FITC- 缀合的抗 CD4 抗体,抗 CD8 抗体,或抗 B220 抗体,接着用 CyChrome 缀合的亲素染色。所有这些抗体均可购自 PharMingen (San Diego, CA)。然后在 FACSscan 上 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 分析细胞。受体和供体淋巴细胞分别鉴别为 H-2Kb+Kd+ 和 H-2Kb+Kd- 细胞。受体或供体的 CD4+T, CD8+T 和 B220+B 细胞的数目,是从回收的脾细胞总数中计算的,每个亚群的百分率是通过三色分析确定的。对其它 GVHD 相关的器官 (肝, 皮肤和小肠) 中组织损伤的相对程度的组织学评价,在处死动物后进行。

[0926] 最后, Neutrokin- α 和缓冲液处理的动物每隔一天进行一次临床评价,确定恶病质,体重和致死性。

[0927] 在此急性 GVHD 小鼠模型中也可测试 Neutrokin- α 的激动剂和拮抗剂。

[0928] 实施例 9 :从 scFvs 文库中分离抗 Neutrokin- α 多肽的抗体片段

[0929] 将分离自人 PBLs 的天然发生的 V 基因构建成抗体片段的大文库,该文库含有抗 Neutrokin- α 和 / 或 Neutrokin- α SV 的反应性,其可接触或不接触供体 (见美国专利 5885793,在此全文并入参考)。

[0930] 文库的拯救

[0931] scFvs 文库构建自人 PBLs 的 RNA,如 WO 92/01047 所述 (在此全文并入参考)。为拯救噬菌体展示抗体片段,大约 10^9 个携带噬菌粒的大肠杆菌,用于接种含有 1% 葡萄糖和 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 50ml 的 2 $\times$ TY (2 $\times$ TY-AMP-GLU),并摇动生长至 O.D. 为 0.8。将 5ml 该培养物用于接种 50ml 的 2 $\times$ TY-AMP-GLU,加入 2×10^8 TU 的 δ 基因 3 辅助基因 (M13 δ 基因 III,见 WO 92/01047),并将培养物在 37 $^{\circ}$ C 不摇动温育 45 分钟,然后在 37 $^{\circ}$ C 摇动温育 45 分钟。将此培养物在 4000r.p.m. 离心 10 分钟,并将沉淀物重悬浮于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素的 2L 的 2 $\times$ TY 中,生长过夜。如 WO 92/01047 所述制备噬菌体。

[0932] M13 δ 基因 III 如下制备 :M13 δ 基因 III 辅助噬菌体不编码基因 III 蛋白,然而噬菌体 (粒) 展示抗体片段具有较强的结合抗原的能力。感染的 M13 δ 基因 III 颗粒,是通过在噬菌体形态发生期间,将辅助噬菌体在携带提供野生型基因 III 蛋白的 pUC19 衍生物的细胞中生长而产生。将此培养物在 37 $^{\circ}$ C 不摇动温育 1 小时,然后在 37 $^{\circ}$ C 摇动温育 1 小时。将细胞倒转 (IEC-Centra 84000revs/分,10 分钟),重悬浮于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 25 μ g/ml 卡那霉素的 300ml 2 $\times$ TY 肉汤 (2 $\times$ TY-AMP-KAN) 中,在 37 $^{\circ}$ C 摇动生长过夜。通过两次 PEG 沉淀 (Sambrook 等,1990),从培养基中纯化和浓缩噬菌体颗粒,重悬浮于 2ml PBS 中,并经过 0.45 μ m 滤膜 (MinisartNML ;Sartorius) 过滤,至终浓度为大约 10^{13} 个转导单位 /ml (氨苄青霉素抗性克隆)。

[0933] 淘选文库

[0934] 将免疫试管 (Nunc) 在 PBS 中用 4ml 的 100 μ g/ml 或 10 μ g/ml 的本发明的多肽包被过夜。将试管用 2% Marvel-PBS 在 37°C 封阻 2 小时, 然后用 PBS 冲洗 3 次。在试管中加入大约 10^{13} TU 的噬菌体, 并在室温翻转温育 30 分钟, 然后静置 1.5 小时。将试管用 PBS 0.1% Tween-20 冲洗 10 次, 及用 PBS 冲洗 10 次。加入 1ml 的 100mM 三乙胺洗脱噬菌体, 上下转动 15 分钟, 之后立即用 0.5ml 的 1.0M Tris-HCl, pH7.4 中和。然后通过用细菌在 37°C 温育洗脱的噬菌体 30 分钟, 而将噬菌体用于感染 10ml 的对数中期大肠杆菌 TG1。将大肠杆菌铺板于含有 1% 葡萄糖和 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 TYE 平板上。所得细菌文库然后用上述 δ 基因 3 辅助噬菌体淘选, 以制备噬菌体进行接下来的选择。重复进行此步骤共 4 次, 将用 PBS, 0.1% Tween-20 冲洗试管的亲纯化增加为 20 次, 用 PBS 冲洗 20 次。

[0935] 定性结合物

[0936] 经过第三和第四次选择的洗脱的噬菌体用于感染大肠杆菌 HB2151, 并从单一的菌落中产生可溶的 scFv (Marks 等, 1991)。用在 50mM 碳酸氢盐, pH9.6 中的 10pg/ml 本发明的多肽包被的微滴定平板进行 ELISAs。对 ELISA 中的阳性克隆通过 PCR 指纹分析进一步定性 (见 WO 92/01047), 然后测序。

[0937] 实施例 10 : 用抗 Neutrokin- α 单克隆抗体中和 Neutrokin- α / Neutrokin- α 受体间相互作用

[0938] 根据以下方法产生抗 Neutrokin- α 蛋白的单克隆抗体。简而言之, 将小鼠皮下注射通过实施例 2 的方法产生的 50 μ g 的 His 标记的 Neutrokin- α , 所述 Neutrokin- α 在 100 μ l 完全 Freund's 佐剂中乳化的 100 μ l PBS 中。间隔两周皮下注射一次在非完全 Freund's 佐剂中的 25 μ g Neutrokin- α , 共注射三次。将动物静息一个月, 最后经腹膜内推进 25 μ g 的在 PBS 中的 Neutrokin- α 。四天后处死动物, 取脾细胞进行融合。

[0939] “融合”过程是通过将取自脾的细胞与 2×10^7 P3X63Ag8.653 浆细胞瘤细胞融合而进行的, 使用 PEG1500 (Boehringer Mannheim), 根据生产者的指导进行 (见 Gefter, M. L. 等, Somatic Cell Genet 3 : 231-36 (1977) ;Boehringer Mannheim PEG1500 (Cat. No. 783641), 产品描述)。

[0940] 在融合之后, 将细胞重悬浮于补加 20% FBS 和 4% 杂交瘤补剂 (Boehringer Mannheim) 的 400ml HAT 培养基中, 并以 200 μ l/孔的密度分布于 96 孔平板中。在融合 7 天后, 将 100 μ l 的培养基吸出并换以 100 μ l 的新鲜培养基。在融合 14 天后, 筛选杂交瘤以进行抗体产生。

[0941] 将杂交瘤上清通过 ELISA 筛选, 以与固定在平板上的 Neutrokin- α 蛋白结合。将平板用 Neutrokin- α 通过温育浓度为 2 μ g/ml 在 PBS 中的 100 μ l/孔的 Neutrokin- α 过夜而包被。将杂交瘤上清用 PBS 稀释为 1 : 10, 置于 Neutrokin- α 包被的平板的各个孔中, 并在 4°C 温育过夜。第二天, 将平板用含有 0.1% Tween-20 的 PBS 冲洗 3 次, 并用抗鼠 IgG ABC 系统 (Vector Laboratories) 进行显色反应。加入 25ml/孔的 2M H_2SO_4 终止显色反应。在 450nm 阅读平板。

[0942] 用 Isostrips 检测杂交瘤上清的 Ig 同种型。通过在 HT 培养基上限制性稀释的方法进行克隆。将在 0.9ml 的 HBSS 中的大约 3×10^6 细胞注射入降植烷引发的小鼠中。在 7-9 天后, 用 19g 注射器收集腹水。所有抗体用 Acta FPLC 系统 (Pharmacia) 通过蛋白 G 亲

和层析而纯化。

[0943] 在开始及两次连续的皮下注射之后,所有的三只小鼠均呈现强免疫应答;通过在 Neutrokin- α 包被的平板上进行 ELISA 确定血清滴定为 $10E-7$ 。

[0944] 在一试验中,使用阳性小鼠的脾细胞产生 1000 个以上的初级杂交瘤。筛选其中的 917 个产生抗 Neutrokin- α 抗体。用 1 : 1 稀释的上清进行筛选以检测所有阳性克隆。筛选的 917 个杂交瘤中,发现 76 个是阳性的,其中 17 个是 IgG 的生产者。在亲和测试和克隆后,选择其中 9 个进一步扩展和纯化。

[0945] 所有纯化的单克隆抗体在 Western 印迹分析和 ELISA 中,均能结合不同形式的 Neutrokin- α (包括 His 标记的和产自杆状病毒系统的蛋白质(见实施例 2))。这 9 个克隆中的 6 个还能在 THP-1 细胞表面结合 Neutrokin- α 。然而,没有一个测试的抗体能从溶液中捕捉 Neutrokin- α 。

[0946] 产生高亲和性的抗 Neutrokin- α 单克隆抗体,其识别在细胞表面表达的 Neutrokin- α ,但不能识别在溶液中的 Neutrokin- α ,所述抗体可用于在体内的中和研究,和在体外的单核细胞和 B 细胞分析。这些抗体还用于在 Western 印迹分析中对 Neutrokin- α 进行敏感检测。

[0947] 在一试验中,使用阳性小鼠的脾细胞产生 1000 个以上的初级杂交瘤。筛选其中的 729 个产生抗 Neutrokin- α 抗体。用 1 : 10 稀释的上清在严格条件下进行筛选,以挑取较高亲和性的最合适的克隆。筛选的 729 个杂交瘤中,23 个是阳性的,包括 16 个 IgM 和 7 个 IgG 生产者(后者中有 4 个提供强 IgM 背景)。在此试验中,IgG 杂交瘤的同种型分布偏向于 IgG2 亚类。7 个 IgG 杂交瘤有 3 个产生 IgG2a 亚类的抗体,有 2 个产生 IgG2b 亚类的抗体,剩余 2 个是 IgG1 生产者。

[0948] 测试在第二个试验中产生的所有阳性杂交瘤的上清抑制 Neutrokin- α 介导的 B 细胞增殖的能力。在第一个筛选试验中,检测产生 IgG 中和抗体(这些是抗体 16C9 和 12C5)的两个杂交瘤。在另一个试验中,确定杂交瘤(即 16C9 和 12C5)的 IgG 中和活性,另两个杂交瘤 15C10 和 4A6 的强中和上清未鉴别。

[0949] 随后将这 3 个克隆在体内扩展(一个克隆即 15C10 也在中空纤维系统中扩展),提供亲和层析纯化抗体。所有这三个克隆均能在 THP-1 细胞表面结合 Neutrokin- α ,且也能从溶液结合(即捕捉)Neutrokin- α 。

[0950] 特别地,用上述第二个试验中所述的抗 Neutrokin- α 单克隆抗体进行试验,确定抗体是否中和 Neutrokin- α /Neutrokin- α 受体结合。简而言之,用 EZ 连接的 TNHS-生物素试剂(Pierce, Rockford, IL)对 Neutrokin- α 蛋白进行生物素酰化。然后将生物素酰化的 Neutrokin- α 用于鉴别结合 Neutrokin- α 的细胞表面蛋白。初步试验表明 Neutrokin- α 结合 B 淋巴细胞上的受体。

[0951] 在上述第二个试验中产生的抗 Neutrokin- α 抗体中和 Neutrokin- α 与 Neutrokin- α 受体的结合。在一特异的实施方案中,抗 Neutrokin- α 抗体 15C10 中和 Neutrokin- α 与 Neutrokin- α 受体的结合。

[0952] 因此,在上述第二个试验中产生的抗 Neutrokin- α 抗体(尤其抗体 15C10)识别并结合膜结合的及可溶的 Neutrokin- α 蛋白,并在体外中和 Neutrokin- α 与 Neutrokin- α 受体的结合。

[0953] 应清楚本发明可不同于前文特别所述和实施例而实际应用。根据以上教导及在所附权利要求范围内,可对本发明加以各种修改。

[0954] 所引用的所有出版物(包括专利,专利申请,杂志文章,实验手册,书籍或其它文献)在此全文并入参考。

[0955] 另外,在此提交的序列表,及 1998 年 1 月 12 日提交的申请 09/005874,1997 年 1 月 14 日提交的 US 60/036100,和 1996 年 10 月 25 日提交的 PCT/US96/17957 中提交的序列表,均全部并入参考。

[0956]

序列表

[0957] <110> 人体基因组科学有限公司

[0958] <120>Neutrokin- α 和 Neutrokin- α 剪接变体

[0959] <130>PF343PCT2

[0960] <140> 未给出

[0961] <141>2000-02-22

[0962] <150>60/122, 388

[0963] <151>1999-03-02

[0964] <150>60/124, 097

[0965] <151>1999-03-12

[0966] <150>60/126, 599

[0967] <151>1999-03-26

[0968] <150>60/127, 598

[0969] <151>1999-04-02

[0970] <150>60/130, 412

[0971] <151>1999-04-16

[0972] <150>60/130, 696

[0973] <151>1999-04-23

[0974] <150>60/131, 278

[0975] <151>1999-04-27

[0976] <150>09/255, 794

[0977] <151>1999-02-23

[0978] <150>60/131, 673

[0979] <151>1999-04-29

[0980] <150>60/136, 784

[0981] <151>1999-05-28

[0982] <150>60/142, 659

[0983] <151>1999-07-06

[0984] <150>60/145, 824

[0985] <151>1999-07-27

[0986] <150>60/167, 239

[0987] <151>1999-11-24

[0988] <150>60/168,624
 [0989] <151>1999-12-03
 [0990] <150>60/171,108
 [0991] <151>1999-12-16
 [0992] <150>60/171,626
 [0993] <151>1999-12-23
 [0994] <150>60/176,015
 [0995] <151>2000-01-14
 [0996] <160>38
 [0997] <170>PatentIn Ver. 2.1
 [0998] <210>1
 [0999] <211>1100
 [1000] <212>DNA
 [1001] <213>Homo sapiens
 [1002] <220>
 [1003] <221>CDS
 [1004] <222>(147).. (1001)
 [1005] <400>1
 [1006] aaattcagga taactctcct gaggggtgag ccaagccctg ccatgtagtg cacgcaggac 60
 [1007] atcaacaaac acagataaca ggaaatgate cattccctgt ggtcacttat tctaaaggcc 120
 [1008] ccaaccttca aagtccaagt agtgat atg gat gac tcc aca gaa agg gag cag 173
 [1009] Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln
 [1010] 1 5
 [1011] tca cgc ctt act tct tgc ctt aag aaa aga gaa gaa atg aaa ctg aag 221
 [1012] Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys
 [1013] 10 15 20 25
 [1014] gag tgt gtt tcc atc ctc cca cgg aag gaa agc ccc tct gtc cga tcc 269
 [1015] Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser
 [1016] 30 35 40
 [1017] tcc aaa gac gga aag ctg ctg gct gca acc ttg ctg ctg gca ctg ctg 317
 [1018] Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 [1019] 45 50 55
 [1020] tct tgc tgc ctc acg gtg gtg tct ttc tac cag gtg gcc gcc ctg caa 365
 [1021] Ser Cys Cys Leu Thr Val Val Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln
 [1022] 60 65 70
 [1023] ggg gac ctg gcc agc ctc cgg gca gag ctg cag ggc cac cac gcg gag 413
 [1024] Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu
 [1025] 75 80 85
 [1026] aag ctg cca gca gga gca gga gcc ccc aag gcc ggc ctg gag gaa gct 461

[1027]	Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala	
[1028]	90	95 100 105
[1029]	cca gct gtc acc gcg gga ctg aaa atc ttt gaa cca cca gct cca gga	509
[1030]	Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly	
[1031]	110	115 120
[1032]	gaa ggc aac tcc agt cag aac agc aga aat aag cgt gcc gtt cag ggt	557
[1033]	Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly	
[1034]	125	130 135
[1035]	cca gaa gaa aca gtc act caa gac tgc ttg caa ctg att gca gac agt	605
[1036]	Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser	
[1037]	140	145 150
[1038]	gaa aca cca act ata caa aaa gga tct tac aca ttt gtt cca tgg ctt	653
[1039]	Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu	
[1040]	155	160 165
[1041]	ctc agc ttt aaa agg gga agt gcc cta gaa gaa aaa gag aat aaa ata	701
[1042]	Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile	
[1043]	170	175 180 185
[1044]	ttg gtc aaa gaa act ggt tac ttt ttt ata tat ggt cag gtt tta tat	749
[1045]	Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr	
[1046]	190	195 200
[1047]	act gat aag acc tac gcc atg gga cat cta att cag agg aag aag gtc	797
[1048]	Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val	
[1049]	205	210 215
[1050]	cat gtc ttt ggg gat gaa ttg agt ctg gtg act ttg ttt cga tgt att	845
[1051]	His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile	
[1052]	220	225 230
[1053]	caa aat atg cct gaa aca cta ccc aat aat tcc tgc tat tca gct ggc	893
[1054]	Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly	
[1055]	235	240 245
[1056]	att gca aaa ctg gaa gaa gga gat gaa ctc caa ctt gca ata cca aga	941
[1057]	Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg	
[1058]	250	255 260 265
[1059]	gaa aat gca caa ata tca ctg gat gga gat gtc aca ttt ttt ggt gca	989
[1060]	Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala	
[1061]	270	275 280
[1062]	ttg aaa ctg ctg tgacctactt acaccatgtc tgtagctatt ttccctccctt	
[1063]	1041	
[1064]	Leu Lys Leu Leu	
[1065]	285	

[1066] tctctgtacc tctaagaaga aagaatctaa ctgaaaatac caaaaaaaaa aaaaaaaaa
 [1067] 1100
 [1068] <210>2
 [1069] <211>285
 [1070] <212>PRT
 [1071] <213>Homo sapiens
 [1072] <400>2
 [1073] Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 [1074] 1 5 10 15
 [1075] Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 [1076] 20 25 30
 [1077] Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 [1078] 35 40 45
 [1079] Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 [1080] 50 55 60
 [1081] Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 [1082] 65 70 75 80
 [1083] Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 [1084] 85 90 95
 [1085] Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 [1086] 100 105 110
 [1087] Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 [1088] 115 120 125
 [1089] Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 [1090] 130 135 140
 [1091] Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
 [1092] 145 150 155 160
 [1093] Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 [1094] 165 170 175
 [1095] Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
 [1096] 180 185 190
 [1097] Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
 [1098] 195 200 205
 [1099] Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
 [1100] 210 215 220
 [1101] Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 [1102] 225 230 235 240
 [1103] Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
 [1104] 245 250 255

[1105]	Asp	Glu	Leu	Gln	Leu	Ala	Ile	Pro	Arg	Glu	Asn	Ala	Gln	Ile	Ser	Leu
[1106]					260					265						270
[1107]	Asp	Gly	Asp	Val	Thr	Phe	Phe	Gly	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu			
[1108]					275					280						285
[1109]	<210>3															
[1110]	<211>233															
[1111]	<212>PRT															
[1112]	<213>Homo sapiens															
[1113]	<400>3															
[1114]	Met	Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala
[1115]	1				5					10					15	
[1116]	Leu	Pro	Lys	Lys	Thr	Gly	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Cys	Leu	Phe
[1117]					20					25					30	
[1118]	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe
[1119]					35					40					45	
[1120]	Cys	Leu	Leu	His	Phe	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	Glu	Phe	Pro
[1121]					50					55					60	
[1122]	Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser
[1123]	65					70						75				80
[1124]	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His	Val	Val	Ala	Asn	Pro
[1125]					85					90					95	
[1126]	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu
[1127]					100					105					110	
[1128]	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Ser
[1129]					115					120					125	
[1130]	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly
[1131]					130					135					140	
[1132]	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	Ser	Arg	Ile	Ala
[1133]	145					150					155					160
[1134]	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro
[1135]					165					170					175	
[1136]	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Trp	Tyr	Glu
[1137]					180					185					190	
[1138]	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Leu
[1139]					195					200					205	
[1140]	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu	Ser	Gly
[1141]					210					215					220	
[1142]	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu							
[1143]	225									230						

[1144] <210>4
 [1145] <211>205
 [1146] <212>PRT
 [1147] <213>Homo sapiens
 [1148] <400>4
 [1149] Met Thr Pro Pro Glu Arg Leu Phe Leu Pro Arg Val Arg Gly Thr Thr
 [1150] 1 5 10 15
 [1151] Leu His Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Leu Pro Gly Ala
 [1152] 20 25 30
 [1153] Gln Gly Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Gln Thr Ala
 [1154] 35 40 45
 [1155] Arg Gln His Pro Lys Met His Leu Ala His Ser Thr Leu Lys Pro Ala
 [1156] 50 55 60
 [1157] Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg
 [1158] 65 70 75 80
 [1159] Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly Phe Ser Leu Ser Asn
 [1160] 85 90 95
 [1161] Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile Tyr Phe Val Tyr Ser Gln
 [1162] 100 105 110
 [1163] Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr Ser Pro Lys Ala Thr Ser Ser Pro
 [1164] 115 120 125
 [1165] Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe
 [1166] 130 135 140
 [1167] His Val Pro Leu Leu Ser Ser Gln Lys Met Val Tyr Pro Gly Leu Gln
 [1168] 145 150 155 160
 [1169] Glu Pro Trp Leu His Ser Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr
 [1170] 165 170 175
 [1171] Gln Gly Asp Gln Leu Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val
 [1172] 180 185 190
 [1173] Leu Ser Pro Ser Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu
 [1174] 195 200 205
 [1175] <210>5
 [1176] <211>244
 [1177] <212>PRT
 [1178] <213>Homo sapiens
 [1179] <400>5
 [1180] Met Gly Ala Leu Gly Leu Glu Gly Arg Gly Gly Arg Leu Gln Gly Arg
 [1181] 1 5 10 15
 [1182] Gly Ser Leu Leu Leu Ala Val Ala Gly Ala Thr Ser Leu Val Thr Leu

[1183]	20	25	30
[1184]	Leu Leu Ala Val Pro Ile Thr Val Leu Ala Val Leu Ala Leu Val Pro		
[1185]	35	40	45
[1186]	Gln Asp Gln Gly Gly Leu Val Thr Glu Thr Ala Asp Pro Gly Ala Gln		
[1187]	50	55	60
[1188]	Ala Gln Gln Gly Leu Gly Phe Gln Lys Leu Pro Glu Glu Glu Pro Glu		
[1189]	65	70	75
[1190]	Thr Asp Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Pro		
[1191]	85	90	95
[1192]	Leu Lys Gly Gln Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Lys Glu Gln Ala Phe		
[1193]	100	105	110
[1194]	Leu Thr Ser Gly Thr Gln Phe Ser Asp Ala Glu Gly Leu Ala Leu Pro		
[1195]	115	120	125
[1196]	Gln Asp Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Leu Val Gly Tyr Arg Gly Arg		
[1197]	130	135	140
[1198]	Ala Pro Pro Gly Gly Gly Asp Pro Gln Gly Arg Ser Val Thr Leu Arg		
[1199]	145	150	155
[1200]	Ser Ser Leu Tyr Arg Ala Gly Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Thr Pro Glu		
[1201]	165	170	175
[1202]	Leu Leu Leu Glu Gly Ala Glu Thr Val Thr Pro Val Leu Asp Pro Ala		
[1203]	180	185	190
[1204]	Arg Arg Gln Gly Tyr Gly Pro Leu Trp Tyr Thr Ser Val Gly Phe Gly		
[1205]	195	200	205
[1206]	Gly Leu Val Gln Leu Arg Arg Gly Glu Arg Val Tyr Val Asn Ile Ser		
[1207]	210	215	220
[1208]	His Pro Asp Met Val Asp Phe Ala Arg Gly Lys Thr Phe Phe Gly Ala		
[1209]	225	230	235
[1210]	Val Met Val Gly		
[1211]	<210>6		
[1212]	<211>281		
[1213]	<212>PRT		
[1214]	<213>Homo sapiens		
[1215]	<220>		
[1216]	<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :n 等于		
[1217]	a, t, g, 或 c		
[1218]	<400>6		
[1219]	Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp		
[1220]	1	5	10
[1221]	Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys		

205

- [1261] a, t, g, 或 c
[1262] <220>
[1263] <221>misc_特征
[1264] <222>(3)
[1265] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1266] <220>
[1267] <221>misc_特征
[1268] <222>(58)
[1269] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1270] <220>
[1271] <221>misc_特征
[1272] <222>(67).. (71)
[1273] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1274] <220>
[1275] <221>misc_特征
[1276] <222>(212)
[1277] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1278] <220>
[1279] <221>misc_特征
[1280] <222>(255)
[1281] <223>n 等于 a, t, g 或 c
[1282] <220>
[1283] <221>misc_特征
[1284] <222>(297)
[1285] <223>n 等于 a, t, g 或 c
[1286] <220>
[1287] <221>misc_特征
[1288] <222>(300)
[1289] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1290] <220>
[1291] <221>misc_特征
[1292] <222>(320)
[1293] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1294] <220>
[1295] <221>misc_特征
[1296] <222>(335)
[1297] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1298] <400>7
[1299] ggntaactct cctgaggggt gageccaagcc ctgccatgta gtgcacgcag gacatcanca 60

[1300] aacacannnn ncaggaaata atccattccc tgtggtcact tattctaaag gcccacacct 120
[1301] tcaaagttca agtagtgata tggatgactc cacagaaagg gagcagtcac gccttacttc 180
[1302] ttgccttaag aaaagagaag aaatgaaact gnaaggagtg tgtttccatc ctcccacgga 240
[1303] aggaaagccc ctctntccga tcttccaaag acggaaagct gctggctgca accttgntgn 300
[1304] tggcattgtg ttcttgctgn ctcaaggtgg tgttntt 337
[1305] <210>8
[1306] <211>509
[1307] <212>DNA
[1308] <213>Homo sapiens
[1309] <220>
[1310] <223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :n 等于
[1311] a, t, g, 或 c
[1312] <220>
[1313] <221>misc_ 特征
[1314] <222>(10)
[1315] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1316] <220>
[1317] <221>misc_ 特征
[1318] <222>(13)
[1319] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1320] <220>
[1321] <221>misc_ 特征
[1322] <222>(209)
[1323] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1324] <220>
[1325] <221>misc_ 特征
[1326] <222>(315)
[1327] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1328] <220>
[1329] <221>misc_ 特征
[1330] <222>(322)
[1331] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1332] <220>
[1333] <221>misc_ 特征
[1334] <222>(325)
[1335] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
[1336] <220>
[1337] <221>misc_ 特征
[1338] <222>(334)

- [1339] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1340] <220>
- [1341] <221>misc_ 特征
- [1342] <222>(343)
- [1343] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1344] <220>
- [1345] <221>misc_ 特征
- [1346] <222>(347)
- [1347] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1348] <220>
- [1349] <221>misc_ 特征
- [1350] <222>(351)
- [1351] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1352] <220>
- [1353] <221>misc_ 特征
- [1354] <222>(356)
- [1355] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1356] <220>
- [1357] <221>misc_ 特征
- [1358] <222>(409).. (410)
- [1359] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1360] <220>
- [1361] <221>misc_ 特征
- [1362] <222>(416)
- [1363] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1364] <220>
- [1365] <221>misc_ 特征
- [1366] <222>(422)
- [1367] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1368] <220>
- [1369] <221>misc_ 特征
- [1370] <222>(424)
- [1371] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1372] <220>
- [1373] <221>misc_ 特征
- [1374] <222>(426).. (427)
- [1375] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1376] <220>
- [1377] <221>misc_ 特征

- [1378] <222>(429)
- [1379] <222>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1380] <220>
- [1381] <221>misc_ 特征
- [1382] <222>(431)
- [1383] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1384] <220>
- [1385] <221>misc_ 特征
- [1386] <222>(433)
- [1387] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1388] <220>
- [1389] <221>misc_ 特征
- [1390] <222>(438).. (439)
- [1391] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1392] <220>
- [1393] <221>misc_ 特征
- [1394] <222>(443).. (444)
- [1395] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1396] <220>
- [1397] <221>misc_ 特征
- [1398] <222>(446).. (447)
- [1399] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1400] <220>
- [1401] <221>misc_ 特征
- [1402] <222>(449).. (450)
- [1403] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1404] <220>
- [1405] <221>misc_ 特征
- [1406] <222>(452).. (453)
- [1407] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1408] <220>
- [1409] <221>misc_ 特征
- [1410] <222>(458)
- [1411] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1412] <220>
- [1413] <221>misc_ 特征
- [1414] <222>(461).. (462)
- [1415] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1416] <220>

[1417] <221>misc_特征
 [1418] <222>(466)
 [1419] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1420] <220>
 [1421] <221>misc_特征
 [1422] <222>(469)
 [1423] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1424] <220>
 [1425] <221>misc_特征
 [1426] <222>(471).. (472)
 [1427] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1428] <220>
 [1429] <221>misc_特征
 [1430] <222>(474)
 [1431] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1432] <220>
 [1433] <221>misc_特征
 [1434] <222>(478).. (481)
 [1435] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1436] <220>
 [1437] <221>misc_特征
 [1438] <222>(496)
 [1439] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1440] <220>
 [1441] <221>misc_特征
 [1442] <222>(498)
 [1443] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1444] <220>
 [1445] <221>misc_特征
 [1446] <222>(504)
 [1447] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1448] <400>8
 [1449] aattcggcan agnaaactgg ttactttttt atatatgggc aggttttata tactgataag 60
 [1450] acctacgcca tgggacatct agttcagagg aagaaggccc atgtcttttg ggatgaattg 120
 [1451] agtctggtga ctttgttttc atgtattcaa aatatgcctg aaacactacc caataattcc 180
 [1452] tgctattcag ctggcattgc aaaactggna ggaaggagat gaactccaac ttgcaatacc 240
 [1453] aggggaaaaat gcacaattat cactgggatg gagatgttca catTTTTTTgg gtgccattga 300
 [1454] aactgctgtg acctncttac ancangtgct gttingctatt ttncctncct nttctntggt 360
 [1455] aacctcttag gaaggaagga ttcttaactg ggaaataacc caaaaaaann ttaaanggggt 420

- [1456] angngnnana ngnggggngng ttncncngnn gnnttttngg nntatntnt nntngggnnn 480
- [1457] ngtaaaaaatg gggccnangg gggnttttt 509
- [1458] <210>9
- [1459] <211>497
- [1460] <212>DNA
- [1461] <213>Homo sapiens
- [1462] <220>
- [1463] <221>misc_ 特征
- [1464] <222>(168)
- [1465] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1466] <220>
- [1467] <221>misc_ 特征
- [1468] <222>(213)
- [1469] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1470] <220>
- [1471] <221>misc_ 特征
- [1472] <222>(288)
- [1473] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1474] <220>
- [1475] <221>misc_ 特征
- [1476] <222>(325)
- [1477] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1478] <220>
- [1479] <221>misc_ 特征
- [1480] <222>(346)
- [1481] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1482] <220>
- [1483] <221>misc_ 特征
- [1484] <222>(406)
- [1485] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1486] <220>
- [1487] <221>misc_ 特征
- [1488] <222>(415)
- [1489] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1490] <220>
- [1491] <221>misc_ 特征
- [1492] <222>(419)
- [1493] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
- [1494] <220>

- [1495] <221>misc_特征
 [1496] <222>(437)
 [1497] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1498] <220>
 [1499] <221>misc_特征
 [1500] <222>(442)
 [1501] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1502] <220>
 [1503] <221>misc_特征
 [1504] <222>(467)
 [1505] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1506] <220>
 [1507] <221>misc_特征
 [1508] <222>(473)
 [1509] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1510] <220>
 [1511] <221>misc_特征
 [1512] <222>(476)
 [1513] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1514] <220>
 [1515] <221>misc_特征
 [1516] <222>(481)
 [1517] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1518] <220>
 [1519] <221>misc_特征
 [1520] <222>(483).. (484)
 [1521] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1522] <220>
 [1523] <221>misc_特征
 [1524] <222>(494)
 [1525] <223>n 等于 a, t, g, 或 c
 [1526] <400>9
 [1527] aattcggcac gagcaaggcc ggcctggagg aagctccagc tgtcaccgcg ggactgaaaa 60
 [1528] tctttgaacc accagctcca ggagaaggca actccagtca gaacagcaga aataagcgtg 120
 [1529] ccgttcaggg tccagaagaa acagtcactc aagactgctt gcaactgntt gcagacagtg 180
 [1530] aaacaccaac tatacaaaaa ggctcccttc tgntgccaca tttgggccaa ggaatggaga 240
 [1531] gattttcttcg tcttgaaaca ttttgccaaa ctcttcagat actcttttnt ctctgggaat 300
 [1532] caaaggaaaa tctctactta gattnacaca tttgttccca tgggtntctt aagttttaaa 360
 [1533] aggggagtg ccttaggagg aaaaggggat aaatattggc caagnactg gttantttnt 420

[1534]	aaatatggtc aggtttntat anctggtagg cctcgccatg ggcattnatt cangngagg	480
[1535]	ncnntctttt gggntga	497
[1536]	<210>10	
[1537]	<211>27	
[1538]	<212>DNA	
[1539]	<213>Homo sapiens	
[1540]	<220>	
[1541]	<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述 :x =	
[1542]	脱氧肌苷	
[1543]	<400>10	
[1544]	gtgggatcca gcctccgggc agagctg	27
[1545]	<210>11	
[1546]	<211>33	
[1547]	<212>DNA	
[1548]	<213>Homo sapiens	
[1549]	<400>11	
[1550]	gtgaagcttt tattacagca gtttcaatgc acc	33
[1551]	<210>12	
[1552]	<211>26	
[1553]	<212>DNA	
[1554]	<213>Homo sapiens	
[1555]	<400>12	
[1556]	gtgtcatgag cctccgggca gagctg	26
[1557]	<210>13	
[1558]	<211>33	
[1559]	<212>DNA	
[1560]	<213>Homo sapiens	
[1561]	<400>13	
[1562]	gtgaagcttt tattacagca gtttcaatgc acc	33
[1563]	<210>14	
[1564]	<211>28	
[1565]	<212>DNA	
[1566]	<213>Homo sapiens	
[1567]	<400>14	
[1568]	gtgggatccc cgggcagagc tgcagggc	28
[1569]	<210>15	
[1570]	<211>33	
[1571]	<212>DNA	
[1572]	<213>Homo sapiens	

[1573]	<400>15	
[1574]	gtgggatcct tattacagca gtttcaatgc acc	33
[1575]	<210>16	
[1576]	<211>129	
[1577]	<212>DNA	
[1578]	<213>Homo sapiens	
[1579]	<400>16	
[1580]	gcgggatccg ccacatgaa ctctttctcc acaagcgcct tcgggtccagt tgcctttctcc	60
[1581]	ctggggctgc tcctggtgtt gcctgctgcc ttccctgccc cagttgtgag acaaggggac	120
[1582]	ctggccagc	129
[1583]	<210>17	
[1584]	<211>30	
[1585]	<212>DNA	
[1586]	<213>Homo sapiens	
[1587]	<400>17	
[1588]	gtgggatcct tacagcagtt tcaatgcacc	30
[1589]	<210>18	
[1590]	<211>903	
[1591]	<212>DNA	
[1592]	<213>Homo sapiens	
[1593]	<220>	
[1594]	<221>CDS	
[1595]	<222>(1).. (798)	
[1596]	<400>18	
[1597]	atg gat gac tcc aca gaa agg gag cag tca cgc ctt act tct tgc ctt	48
[1598]	Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu	
[1599]	1 5 10 15	
[1600]	aag aaa aga gaa gaa atg aaa ctg aag gag tgt gtt tcc atc ctc cca	96
[1601]	Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro	
[1602]	20 25 30	
[1603]	cgg aag gaa agc ccc tct gtc cga tcc tcc aaa gac gga aag ctg ctg	144
[1604]	Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu	
[1605]	35 40 45	
[1606]	gct gca acc ttg ctg ctg gca ctg ctg tct tgc tgc ctc acg gtg gtg	192
[1607]	Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Lcu Thr Val Val	
[1608]	50 55 60	
[1609]	tct ttc tac cag gtg gcc gcc ctg caa ggg gac ctg gcc agc ctc cgg	240
[1610]	Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg	
[1611]	65 70 75 80	

[1612]	gca gag ctg cag ggc cac cac gcg gag aag ctg cca gca gga gca gga	288
[1613]	Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly	
[1614]	85 90 95	
[1615]	gcc ccc aag gcc ggc ctg gag gaa gct cca gct gtc acc gcg gga ctg	336
[1616]	Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu	
[1617]	100 105 110	
[1618]	aaa atc ttt gaa cca cca gct cca gga gaa ggc aac tcc agt cag aac	384
[1619]	Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn	
[1620]	115 120 125	
[1621]	agc aga aat aag cgt gcc gtt cag ggt cca gaa gaa aca gga tct tac	432
[1622]	Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Gly Ser Tyr	
[1623]	130 135 140	
[1624]	aca ttt gtt cca tgg ctt ctc agc ttt aaa agg gga agt gcc cta gaa	480
[1625]	Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu	
[1626]	145 150 155 160	
[1627]	gaa aaa gag aat aaa ata ttg gtc aaa gaa act ggt tac ttt ttt ata	528
[1628]	Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile	
[1629]	165 170 175	
[1630]	tat ggt cag gtt tta tat act gat aag acc tac gcc atg gga cat cta	576
[1631]	Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu	
[1632]	180 185 190	
[1633]	att cag agg aag aag gtc cat gtc ttt ggg gat gaa ttg agt ctg gtg	624
[1634]	Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val	
[1635]	195 200 205	
[1636]	act ttg ttt cga tgt att caa aat atg cct gaa aca cta ccc aat aat	672
[1637]	Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn	
[1638]	210 215 220	
[1639]	tcc tgc tat tca gct ggc att gca aaa ctg gaa gaa gga gat gaa ctc	720
[1640]	Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu	
[1641]	225 230 235 240	
[1642]	caa ctt gca ata cca aga gaa aat gca caa ata tca ctg gat gga gat	768
[1643]	Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp	
[1644]	245 250 255	
[1645]	gtc aca ttt ttt ggt gca ttg aaa ctg ctg tgacctactt acaccatgtc	818
[1646]	Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu	
[1647]	260 265	
[1648]	tgtagctatt ttcctccctt tctctgtacc tctaagaaga aagaatctaa ctgaaaatac	878
[1649]	caaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	903
[1650]	<210>19	

[1651] <211>266
 [1652] <212>PRT
 [1653] <213>Homo sapiens
 [1654] <400>19
 [1655] Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 [1656] 1 5 10 15
 [1657] Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 [1658] 20 25 30
 [1659] Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 [1660] 35 40 45
 [1661] Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 [1662] 50 55 60
 [1663] Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 [1664] 65 70 75 80
 [1665] Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 [1666] 85 90 95
 [1667] Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 [1668] 100 105 110
 [1669] Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 [1670] 115 120 125
 [1671] Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Gly Ser Tyr
 [1672] 130 135 140
 [1673] Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu
 [1674] 145 150 155 160
 [1675] Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile
 [1676] 165 170 175
 [1677] Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu
 [1678] 180 185 190
 [1679] Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val
 [1680] 195 200 205
 [1681] Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn
 [1682] 210 215 220
 [1683] Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu
 [1684] 225 230 235 240
 [1685] Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp
 [1686] 245 250 255
 [1687] Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 [1688] 260 265
 [1689] <210>20

[1690] <211>136
 [1691] <212>PRT
 [1692] <213>Homo sapiens
 [1693] <400>20
 [1694] His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp
 [1695] 1 5 10 15
 [1696] Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg
 [1697] 20 25 30
 [1698] Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val
 [1699] 35 40 45
 [1700] Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met
 [1701] 50 55 60
 [1702] Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe
 [1703] 65 70 75 80
 [1704] Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser
 [1705] 85 90 95
 [1706] Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Leu Ser
 [1707] 100 105 110
 [1708] Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro His Gly
 [1709] 115 120 125
 [1710] Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
 [1711] 130 135
 [1712] <210>21
 [1713] <211>462
 [1714] <212>DNA
 [1715] <213>Homo sapiens
 [1716] <400>21
 [1717] atggetgttc agggctccgga agaaaccgtt actcaggact gccttcagct gategcagac 60
 [1718] tctgaaactc cgaccatcca gaaaggttct tacacctttg ttccttggct gctttcttctc 120
 [1719] aaacgtgggt ctgccctgga agagaaagaa aacaaaatcc tggttaaaga aactgggttac 180
 [1720] ttcttttatct acggtcaggt tctttacact gataagacct acgccatggg tcacctgatt 240
 [1721] cagcgtaaga aagttcacgt tttcgggtgac gagctgtctc tggttactct gtttcgctgc 300
 [1722] attcagaaca tgccggaaac tcttcctaac aactcctgct actctgctgg catcgcaaaa 360
 [1723] ctggaagagg gtgatgaact gcagctggca attcctcgtg aaaacgcaca aatttctctg 420
 [1724] gacggtgatg taaccttctt tgggtgactg aaacttctgt aa 462
 [1725] <210>22
 [1726] <211>1040
 [1727] <212>DNA
 [1728] <213>Homo sapiens

[1729]	<220>	
[1730]	<221>CDS	
[1731]	<222>(1)..(468)	
[1732]	<400>22	
[1733]	cgc gtg gta gac ctc tca gct cct cct gca cca tgc ctg cct gga tgc	48
[1734]	Arg Val Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro Ala Pro Cys Leu Pro Gly Cys	
[1735]	1 5 10 15	
[1736]	cgc cat tct caa cat gat gat aat gga atg aac ctc aga aac aga act	96
[1737]	Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly Met Asn Leu Arg Asn Arg Thr	
[1738]	20 25 30	
[1739]	tac aca ttt gtt cca tgg ctt ctc agc ttt aaa aga gga aat gcc ttg	144
[1740]	Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu	
[1741]	35 40 45	
[1742]	gag gag aaa gag aac aaa ata gtg gtg agg caa aca ggc tat ttc ttc	192
[1743]	Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe	
[1744]	50 55 60	
[1745]	atc tac agc cag gtt cta tac acg gac ccc atc ttt gct atg ggt cat	240
[1746]	Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His	
[1747]	65 70 75 80	
[1748]	gtc atc cag agg aag aaa gta cac gtc ttt ggg gac gag ctg agc ctg	288
[1749]	Val Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu	
[1750]	85 90 95	
[1751]	gtg acc ctg ttc cga tgt att cag aat atg ccc aaa aca ctg ccc aac	336
[1752]	Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn	
[1753]	100 105 110	
[1754]	aat tcc tgc tac tcg gct ggc atc gcg agg ctg gaa gaa gga gat gag	384
[1755]	Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu	
[1756]	115 120 125	
[1757]	att cag ctt gca att cct cgg gag aat gca cag att tca cgc aac gga	432
[1758]	Ile Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly	
[1759]	130 135 140	
[1760]	gac gac acc ttc ttt ggt gcc cta aaa ctg ctg taa ctcaacttgct	478
[1761]	Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu	
[1762]	145 150 155	
[1763]	ggagtgcgtg atcccccttcc ctcgtctttct ctgtacctcc gagggagaaa cagacgactg	538
[1764]	gaaaaactaa aagatgggga aagccgtcag cgaaagtittt ctcgtgaccc gttgaatctg	598
[1765]	atccaaacca ggaaatataa cagacagcca caaccgaagt gtgccatgtg agttatgaga	658
[1766]	aacggagccc gcgtcagaa agaccggatg aggaagaccg ttttctccag tcctttgcc	718
[1767]	acacgcaccg caaccttgct ttttgccttg ggtgacacat gttcagaatg cagggagatt	778

[1768] tccttgTTTT gcgatttgcc atgagaagag ggcccacaac tgcaggtcac tgaagcattc 838
 [1769] acgctaagtc tcaggattta ctctcccttc tcatgctaag tacacacacg ctcttttcca 898
 [1770] ggtaatacta tgggatacta tggaaagggt gtttgTTTT aaatctagaa gtcttgaact 958
 [1771] ggcaatagac aaaaatcctt ataaattcaa gtgtaaaata aacttaatta aaaaggttta
 [1772] 1018
 [1773] agtgtgaaaa aaaaaaaaaa aa
 [1774] 1040
 [1775] <210>23
 [1776] <211>155
 [1777] <212>PRT
 [1778] <213>Homo sapiens
 [1779] <400>23
 [1780] Arg Val Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro Ala Pro Cys Leu Pro Gly Cys
 [1781] 1 5 10 15
 [1782] Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly Met Asn Leu Arg Asn Arg Thr
 [1783] 20 25 30
 [1784] Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu
 [1785] 35 40 45
 [1786] Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe
 [1787] 50 55 60
 [1788] Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His
 [1789] 65 70 75 80
 [1790] Val Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu
 [1791] 85 90 95
 [1792] Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn
 [1793] 100 105 110
 [1794] Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu
 [1795] 115 120 125
 [1796] Ile Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly
 [1797] 130 135 140
 [1798] Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 [1799] 145 150 155
 [1800] <210>24
 [1801] <211>26
 [1802] <212>DNA
 [1803] <213>Homo sapiens
 [1804] <400>24
 [1805] ccaccagctc caggagaagg caactc 26
 [1806] <210>25

[1807]	<211>19	
[1808]	<212>DNA	
[1809]	<213>Homo sapiens	
[1810]	<400>25	
[1811]	accgcgggac tgaaaatct	19
[1812]	<210>26	
[1813]	<211>23	
[1814]	<212>DNA	
[1815]	<213>Homo sapiens	
[1816]	<400>26	
[1817]	cacgcttatt tctgctgttc tga	23
[1818]	<210>27	
[1819]	<211>657	
[1820]	<212>DNA	
[1821]	<213>Homo sapiens	
[1822]	<400>27	
[1823]	taccaggtgg cggccgtgca aggggacctg gccagcctcc gggcagagct gcagggccac	60
[1824]	cacgcggaga agctgccagc aagagcaaga gcccccaagg ccggtctggg ggaagctcca	120
[1825]	gctgtcaccg caggactgaa aatctttgaa ccaccagctc caggagaagg caactccagt	180
[1826]	cagagcagca gaaataagcg tgctattcag ggtgcagaag aaacagtcac tcaagactgc	240
[1827]	ttgcaactga ttgcagacag tgaacacca actatacaaa aaggatctta cacatttggt	300
[1828]	ccatggcttc tcagctttta aaggggaagt gccctagaag aaaaagagaa taaaatattg	360
[1829]	gtcaaagaaa ctggttactt ttttatatat ggtcaggttt tatacactga taagacctat	420
[1830]	gccatgggac atctaattca gaggaaaaaa gtccatgtct ttggggatga attgagtctg	480
[1831]	gtgactttgt ttcgatgtat tcaaaatatg cctgaaacac tacccaataa ttcctgctat	540
[1832]	tcagctggca ttgcaaaact ggaagaagga gatgaacttc aacttgcaat accacgagaa	600
[1833]	aatgcacaaa tatactgga tggagatgtc acattttttg gtgccctcaa actgctg	657
[1834]	<210>28	
[1835]	<211>219	
[1836]	<212>PRT	
[1837]	<213>Homo sapiens	
[1838]	<400>28	
[1839]	Tyr Gln Val Ala Ala Val Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu	
[1840]	1 5 10 15	
[1841]	Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Arg Ala Arg Ala Pro	
[1842]	20 25 30	
[1843]	Lys Ala Gly Leu Gly Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile	
[1844]	35 40 45	
[1845]	Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Ser Ser Arg	

[1846]	50	55	60
[1847]	Asn Lys Arg Ala Ile Gln Gly Ala Glu Glu Thr Val Ile Gln Asp Cys		
[1848]	65	70	75
[1849]	Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser		
[1850]	85	90	95
[1851]	Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu		
[1852]	100	105	110
[1853]	Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe		
[1854]	115	120	125
[1855]	Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His		
[1856]	130	135	140
[1857]	Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu		
[1858]	145	150	155
[1859]	Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn		
[1860]	165	170	175
[1861]	Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu		
[1862]	180	185	190
[1863]	Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly		
[1864]	195	200	205
[1865]	Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu		
[1866]	210	215	
[1867]	<210>29		
[1868]	<211>657		
[1869]	<212>DNA		
[1870]	<213>Homo sapiens		
[1871]	<400>29		
[1872]	taccaggtgg cgccgtgca aggggacctg gccagcctcc gggcagagct gcagagccac	60	
[1873]	cacgeggaga agctgccagc aagagcaaga gcccccaagg ccggtctggg ggaagctcca	120	
[1874]	gctgtcaccg cgggactgaa aatctttgaa ccaccagctc caggagaagg caactccagt	180	
[1875]	cagagcagca gaaataagcg tgctattcag ggtgcagaag aaacagtcac tcaagactgc	240	
[1876]	ttgcaactga ttgcagacag tgaacacca actatacaaa aaggatctta cacatttggt	300	
[1877]	ccatggcttc tcagctttta aaggggaagt gccctagaag aaaaagagaa taaaatattg	360	
[1878]	gtcaaagaaa ctggttactt ttttatatat ggtcagggtt tatacactga taagacctat	420	
[1879]	gccatgggac atctaattca gaggaaaaaa gtccatgtct ttggggatga attgagtctg	480	
[1880]	gtgactttgt ttgatgtat tcaaaatatg cctgaaacac tacccaataa ttctgtctat	540	
[1881]	tcagctggca ttgcaaaact ggaagaaggg gatgaacttc aacttgcaat accacgagaa	600	
[1882]	aatgcacaaa tatcactgga tggagatgtc acattttttg gtgccctcaa actgctg	657	
[1883]	<210>30		
[1884]	<211>219		

[1885] <212>PRT
 [1886] <213>Homo sapiens
 [1887] <400>30
 [1888] Tyr Gln Val Ala Ala Val Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu
 [1889] 1 5 10 15
 [1890] Leu Gln Ser His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Arg Ala Arg Ala Pro
 [1891] 20 25 30
 [1892] Lys Ala Gly Leu Gly Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile
 [1893] 35 40 45
 [1894] Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Ser Ser Arg
 [1895] 50 55 60
 [1896] Asn Lys Arg Ala Ile Gln Gly Ala Glu Glu Thr Val Ile Gln Asp Cys
 [1897] 65 70 75 80
 [1898] Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser
 [1899] 85 90 95
 [1900] Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu
 [1901] 100 105 110
 [1902] Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe
 [1903] 115 120 125
 [1904] Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His
 [1905] 130 135 140
 [1906] Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu
 [1907] 145 150 155 160
 [1908] Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn
 [1909] 165 170 175
 [1910] Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu
 [1911] 180 185 190
 [1912] Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly
 [1913] 195 200 205
 [1914] Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 [1915] 210 215
 [1916] <210>31
 [1917] <211>38
 [1918] <212>DNA
 [1919] <213>Homo sapiens
 [1920] <400>31
 [1921] ggatcgccgtt tctaacgcgg ccgttcaggg tccagaag 38
 [1922] <210>32
 [1923] <211>49

- [1924] <212>DNA
[1925] <213>Homo sapiens
[1926] <400>32
[1927] ctggttcggc ccaaggtacc aagcttgtac cttagatctt ttctagatc 49
[1928] <210>33
[1929] <211>21
[1930] <212>DNA
[1931] <213>Homo sapiens
[1932] <400>33
[1933] ctggtagttc ttcggagtgt g 21
[1934] <210>34
[1935] <211>19
[1936] <212>DNA
[1937] <213>Homo sapiens
[1938] <400>34
[1939] cgcgtagaa acggcgacc 19
[1940] <210>35
[1941] <211>22
[1942] <212>DNA
[1943] <213>Homo sapiens
[1944] <220>
[1945] <221>misc_ 特征
[1946] <222>(7)
[1947] <223>n 等于脱氧肌苷
[1948] <220>
[1949] <221>misc_ 特征
[1950] <222>(12)
[1951] <223>n 等于脱氧肌苷
[1952] <220>
[1953] <221>misc_ 特征
[1954] <222>(16)
[1955] <223>n 等于脱氧肌苷
[1956] <400>35
[1957] taccagntgg cngccntgca ag 22
[1958] <210>36
[1959] <211>22
[1960] <212>DNA
[1961] <213>Homo sapiens
[1962] <220>

- [1963] <221>misc_ 特征
- [1964] <222>(3)
- [1965] <223>n 等于脱氧肌苷
- [1966] <220>
- [1967] <221>misc_ 特征
- [1968] <222>(14)
- [1969] <223>n 等于脱氧肌苷
- [1970] <220>
- [1971] <221>misc_ 特征
- [1972] <222>(16).. (17)
- [1973] <223>n 等于脱氧肌苷
- [1974] <400>36
- [1975] gtnacagcag tttnanngca cc 22
- [1976] <210>37
- [1977] <211>866
- [1978] <212>DNA
- [1979] <213>Mus musculus
- [1980] <400>37
- [1981] atggatgagt ctgcaaagac cctgccacca ccgtgcctct gtttttgctc cgagaaagga 60
- [1982] gaagatatga aagtgggata tgatcccatc actccgcaga aggaggaggg tgcctggttt 120
- [1983] gggatctgca gggatggaag gctgctggct gctaccctcc tgctggccct gttgtccage 180
- [1984] agtttcacag cgatgtcctt gtaccagttg gctgccttgc aagcagacct gatgaacctg 240
- [1985] cgcatggagc tgcagagcta ccgaggttca gcaacaccag ccgccgcggg tgctccagag 300
- [1986] ttgaccgctg gagtcaaact cctgacaccg gcagctcctc gacccacaaa ctccagccgc 360
- [1987] ggccacagga acagacgcgc ctccagggga ccagaggaaa cagaacaaga tgtagacctc 420
- [1988] tcagctcctc ctgcaccatg cctgcctgga tgccgccatt ctcaacatga tgataatgga 480
- [1989] atgaacctca gaaacatcat tcaagactgt ctgcagctga ttgcagacag cgacacgccg 540
- [1990] gccttgaggagg agaaagagaa caaaatagtg gtgaggcaaa caggctattt ctcatctac 600
- [1991] agccaggttc tataacagga ccccatcttt gctatgggtc atgtcatcca gaggaagaaa 660
- [1992] gtacacgtct ttggggacga gctgagcctg gtgaccctgt tccgatgtat tcagaatatg 720
- [1993] cccaaaacac tgcccaacaa ttctgtctac tcggctggca tcgcgaggct ggaagaagga 780
- [1994] gatgagattc agcttgcaat tcctcgggag aatgcacaga tttcacgcaa cggagacgac 840
- [1995] accttctttg gtgccctaaa actgct 866
- [1996] <210>38
- [1997] <211>177
- [1998] <212>DNA
- [1999] <213>Mus musculus
- [2000] <400>38
- [2001] mdsaktcccs kgdmkvgydt kgawgcrdgr aatassstam syaaadmnmr syrgsataaa 60

[2002]	gatagvktaa rhnssrghrn rragtdvdsa acgerhshdd ngmnrndcad sdtaknkvv	120
[2003]	tgyysvytda mghvrkkvhv gdsvtrenmk tnnscysaga rgdarnasrn gddtgak	177

图1A

Neutrokin- α

1	AAATTCAGGATAACTCTCTCTGAGGGGTGAGCCAGCCCTGCCATGTAGTGCACGCAGGAC	60
61	ATCAACAAACACAGATAACAGGAAATGATCCATCCCTGTGGTCACTTATTTAAAGGCC	120
121	CCAACCTTCAAAGTTCAAGTAGTGATATGGATGACTCCACAGAAAGGGAGCAGTCACGCC	180
1	M D D S T E R E Q S R L	12
181	TTACTTCTTGCCCTTAAGAAAAGAGAAGAAATGAACTGAAGGAGTGTGTTTCCATCCTCC	240
13	T S C L K K R E E M K L K E C V S I L R	32
	CD-I	
241	CAOGBAAGGAAAGCCCTCTGTCCGATCCTCCAAGACGGAAAGCTGCTGGCTGCAACCT	300
33	R K E S P S V R S S K D G K L L A A T L	52
	CD-I	
301	TGCTGTGGCACTGTGTCTGTCTGCCTCACGGTGGTGTCTTTCTACCAGGTGGCCGCC	360
53	L L A L L S C C L T V V S F Y Q V A A L	72
361	TGCAAGGGGACCTGGCCAGCCTCCGGGCAGAGCTGCAGGGCCACCACGGGAGAAGCTGC	420
73	Q G D L A S L R A E L Q G H H A E K L P	92
	CD-II	
421	CAGCAGGAGCAGGAGCCCCAAGGCCGGCCTGGAGGAAGCTCCAGCTGTCACCGCGGGAC	480
93	A G A G A P K A G L E E A P A V T A G L	112
	CD-III	
481	TGAAATCTTTGAACCACCAGCTCCAGGAGAAGGCAACTCCAGTCAGAACAGCAGAAATA	540
113	K I F E P P A P G E G N S S Q N S R N K	132
541	AGCGTGCCGTTTCAGGGTCCAGAAGAAACAGTCACTCAAGACTGCTTGCAACTGATTGCAG	600
133	R A V Q G P E E T V T Q D C L Q L I A D	152
	CD-IV	
601	ACAGTGAAACACCAACTATACAAAAGGATCTTACACATTTGTTCCATGGCTTCTCAGCT	660
153	S E T P T I Q K G S Y T F V P W L L S F	172
	CD-V	
661	TTAAAGGGGAAGTGCCCTAGAGAAAAAGAGAATAAAATATTGGTCAAAGAAACTGGTT	720
173	K R G S A L E E K E N K I L V K E T G Y	192
	CD-V	
	CD-VI	
721	ACTTTTATATATATGGTCAGGTTTATATATACTGATAAGACCTACGCCATGGGACATCTAA	780
193	F F I Y G O V L Y T D K T Y A M G H L I	212
	CD-VI	
	CD-VII	

图1B

Neutrokin- α

781	TTCAGAGGAAGAAGGTCCATGTTCTTTGGGGATGAATTGAGTCTGGTGACTTTGTTTCGAT	840
213	<u>Q R K K V H V F G D E L S L V T L F R C</u>	232
	CD-VII	CD-VIII
841	GTATTCAAATATGCCTGAACACTACCCAATAATCCTGCTATTCAGCTGGCATTGCAA	900
233	<u>I O N M P E T L P M N S C Y S A G I A K</u>	252
	CD-VIII	CD-IX
901	AACTGGAAGAAGGAGATGAACCTCCAACCTTGCAATACCAAGAGAAAATGCACAAATATCAC	960
253	<u>L E E G D E L Q L A I P R E N A Q I S L</u>	272
	CD-X	
961	TGGATGGAGATGTCACATTTTTTGGTGCAATGAACTGCTGTGACCTACTTACACCATGT	1020
273	<u>D G D V T F F G A L K L L</u>	285
	CD-XI	
1021	CTGTAGCTATTTTCTCCCTTTCTCTGTACCTCTAAGAAGAAGAATCTAACTGAAAATA	1080
1081	CCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1100

图2A

	10	20	30	
1	M S T E S M I R D V E L	- - - - -	- - - - - A E E A	TNF α
1	M - - - - -	- - - - -	- - - - - T P P E R L	TNF β
1	M G A - - - - -	- - - - -	- - - - -	LT β
1	M Q Q P F N Y P Y P Q I Y W	- V D S S A S S P W A P P G T V		Fas 配体
1	M D D S T E R E Q S R L	T S C L K K R E E M K L	K E C V S I	Neutrokin α
1	M D D S T E R E Q S R L	T S C L K K R E E M K L	K E C V S I	Neutrokin α SV
	40	50	60	
17	L P K K T G G P Q	- - - - - G S R R	- - - - -	TNF α
8	F - - - - -	- - - - -	- - - - -	TNF β
4	- - - - - L G L E G R	G G - - - - -	- - - - -	LT β
30	L P C P T S V P R R P G	Q R R P P P P P P P P P	L P P P P P	Fas 配体
31	L P R R E S P S V R S S K D	- - - G K L L A A T L	L L L A L L	Neutrokin α
31	L P R R E S P S V R S S K D	- - - G K L L A A T L	L L L A L L	Neutrokin α SV
	70	80	90	
30	- - - - -	- - - - - C L F L S L F S		TNF α
9	- - - - - L P R V R G	T T L H L L L L G L L L V L	L P	TNF β
12	- - - - - R L Q G R	G S L L L A V A G A T S L V T		LT β
60	P P P L P P L P L P P L K K R G	N H S T G L C L L V M F F M		Fas 配体
58	S C C L T V V S F Y Q V A A L	Q G D L A S L R A E L Q G H H		Neutrokin α
58	S C C L T V V S F Y Q V A A L	Q G D L A S L R A E L Q G H H		Neutrokin α SV
	100	110	120	
38	F L - - - I V A G A T T L F C	L L H F G V I G P Q R E E F P R		TNF α
31	G A Q G L P G V G L - - - - -	- - - - -	- - - - -	TNF β
32	L L L A V P I T V L A V L A	L V P Q D Q G G L V T E T A D P		LT β
90	V L V A L V G L G L G M F Q	L F H L Q K E L A E L R E S T S		Fas 配体
88	A E K L P A G A G A P K A G L E E A P A V T	A G L K I F E P		Neutrokin α
88	A E K L P A G A G A P K A G L E E A P A V T	A G L K I F E P		Neutrokin α SV
	130	140	150	
66	D L S L I S - P L A - Q A V R S S S R T P S D	- - - K P V A		TNF α
41	- - - T P S - A A Q - T A R Q H P K M H L A H S T	L K P A A		TNF β
62	G A Q A Q Q - G L G F Q K L P E E E P E T D L S P G L P A A			LT β
120	Q M H T A S - S L E - K Q I G H P S P P P E K K E L R K V A			Fas 配体
118	P A P G E G N S S Q N S R N K R A V Q G P E E T V T Q D C L			Neutrokin α
118	P A P G E G N S S Q N S R N K R A V Q G P E E T	- - - - -		Neutrokin α SV
	160	170	180	
91	H V V A N P Q A E G - Q - - - - -	L Q W L N R R A N A L L		TNF α
66	H L I G D P S K Q N - S - - - - -	L L W R A N T D R A F L		TNF β
91	H L I G A P L K - G Q G - - - - -	L G W E T T K E Q A F L		LT β
148	H L T G K S N S R S M P - - - - -	L E W E D T Y G I V L L		Fas 配体
148	Q L T A D S E T P T I Q K G S Y T F V P W L	- - - - - L S F K		Neutrokin α
142	- - - - - G S Y T F V P W L	- - - - - L S F K		Neutrokin α SV

图2B

	190	200	210		
114	ANGVELLRDN-Q	L	VVPSEGLYLLYSQVLFKIG	TNF α	
89	QDGFSLSN-N	S	L	VPTSGIYFVYSQVVFSG	TNF β
114	TSGTQFSLDAE	G	L	ALPQDGLYLYC LVGYRG	LT β
172	-SGVKYKKG-	G	L	VINETGLYFVYSKVYFRG	Fas 配体
174	RGSALEEKENKI	L	V	KETGYFFIYGGQVLYTD	Neutrokin α
155	RGSALEEKENKI	L	V	KETGYFFIYGGQVLYTD	Neutrokin α SV
	220	230	240		
143	QGC	P	- - - -	STHVLITHTISRIAVSYQTK	TNF α
118	KAYS	P	- - - -	KATSSPILYLAHEVQLFSQYPPFH	TNF β
144	RA	PPG	G	GD PQGRSVTLRSSLYRAGGAYGPG	LT β
200	QSCN	- - - -	- - - -	NLPLSHKVYMRNSKYPQD	Fas 配体
204	KT	YAMG	- - - -	HLLIQRKKVHVFGDELS	Neutrokin α
185	KT	YAMG	- - - -	HLLIQRKKVHVFGDELS	Neutrokin α SV
	250	260	270		
167	VN	- -	LLS	AIKSPCORETPE - - - - GA EAKPWYE	TNF α
146	VP	- -	LLS	SO K(M)VYP - - - - GLQEPWLH	TNF β
174	TP	ELL	LEG	GAETVTPVLDPARROGYGFLWYT	LT β
222	LV	- -	MM	EGKMMSYC - - - - TTGQHWAR	Fas 配体
226	LV	TL	FR	CIQNMPE TL PN - - - - N	Neutrokin α
207	LV	TL	FR	CIQNMPE TL PN - - - - N	Neutrokin α SV
	280	290	300		
193	PI	YLG	GV	FQLEKGDRLSAEINRIPDYLDFAE	TNF α
166	SH	YHG	AA	FQLTQGDQLSTHTDGIPHVLVLS P	TNF β
204	SV	GFG	GL	VQLRRGERVYVNI SHPDHVDFAAR	LT β
242	SS	YLG	AV	FNLTSA D HLYVNVSEL SLVNFEE	Fas 配体
244	SC	YS	AG	IAKLEEGDELQLAIPREN AQISLD	Neutrokin α
225	SC	YS	AG	IAKLEEGDELQLAIPREN AQISLD	Neutrokin α SV
	310				
223	SG	QVY	FG	IIAL	TNF α
196	S	-	TV	FFGAFA L	TNF β
234	-G	K	TF	FGAVMVG	LT β
272	S	-	QT	FFGLYKL	Fas 配体
274	GD	V	TF	FGALKLL	Neutrokin α
255	GD	V	TF	FGALKLL	Neutrokin α SV

图3
Neutrokin- α

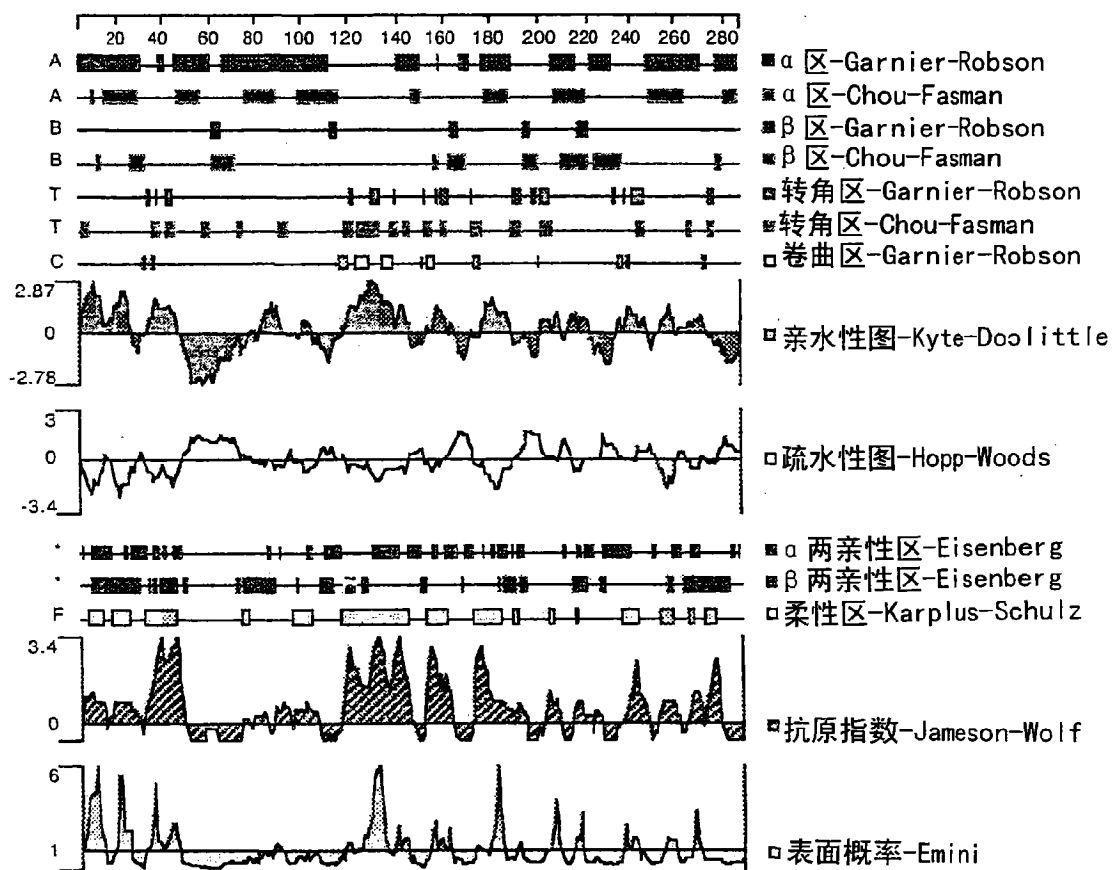


图4A

	1		50
HSOAD55R	A GGNTAACTCT CCTGAGGGGT GAGCCAAGCC CTGCCATGTA		
HNEDU15X	...AAATTCA GGATAACTCT CCTGAGGGGT GAGCCAAGCC CTGCCATGTA		
HSLAH84R	.AATTCGGCA NAGNAACTG GTTACTTTT TATATATGGT CAGGTTTTAT		
HLTBM08R	AATTCGGCAC GAGCAAGGCC GGCCTGGAGG AAGCTCCAGC TGTCAACGCG		
	51		100
HSOAD55R	GTGCACGCAG GACATCANCA A..ACACANN NNNCAGGAAA TAATCCATTTC		
HNEDU15X	GTGCACGCAG GACATCAACA A..ACACAGA TAACAGGAAA TGATCCATTTC		
HSLAH84R	ATACTGATAA GACCTACGCC ATGGGACATC TAGTTCAGAG GAAGAAGGTC		
HLTBM08R	GGACTGAAAA TCTTTGAACC ACCAGCTCCA GGAGAAGGCA ACTCCAGTCA		
	101		150
HSOAD55R	CCTGTGGTCA CTTATTCTAA AGGCCCCAAC CTTCAAAGTT CAAGTAGTGA		
HNEDU15X	CCTGTGGTCA CTTATTCTAA AGGCCCCAAC CTTCAAAGTT CAAGTAGTGA		
HSLAH84R	CATGTCTTTG GGGATGAATT GAGTCTGGTG ACTTTGTTTC GATGTATTCA		
HLTBM08R	GAACAGCAGA AATAAGCGTG CCGTTCAGGG TCCAGAAGAA ACAGTCACTC		
	151		200
HSOAD55R	TATGGATGAC TCCACAGAAA GGGAGCAGTC ACGCCTTACT TCTTGCCTTA		
HNEDU15X	TATGGATGAC TCCACAGAAA GGGAGCAGTC ACGCCTTACT TCTTGCCTTA		
HSLAH84R	AAATATGCCT GAAACACTAC CCAATAATTC CTGCTATTCA GCTGGCATTG		
HLTBM08R	AAGACTGCTT GCAACTGNNT GCAGACAGTG AAACACCAAC TATACAAAAA		
	201		250
HSOAD55R	AGAAAAGAGA AGAAATGAAA CTGNAAGGAG TGTGTTTCCA TCCTCCCACG		
HNEDU15X	AGAAAAGAGA AGAAATGAAA CT.GAAGGAG TGTGTTTCCA TCCTCCCACG		
HSLAH84R	CAAAAGTGGN AGGAAGGA...GATGAAC TCCAAGTTC AATACCAGGG		
HLTBM08R	GGCTCCCTTC TGNTGCCACA TTTGGGCCAA GGAATGGAGA GATTTCCTTC		
	251		300
HSOAD55R	GAAGGAAAGC CCCTCTNTCC GATCCTCCAA AGACGGAAAG CTGCTGGCTG		
HNEDU15X	GAAGGAAAGC CCCTCTGTCC GATCCTCCAA AGACGGAAAG CTGCTGGCTG		
HSLAH84R	GAAAATGCAC AATTATCACT GGGATGGAGA TGTTACATT TTTTGGGTGC		
HLTBM08R	TCTGGAAACA TTTTGCCAAA CTCTTCAGAT ACTCTTNTCT CTCTGGGAAT		
	301		350
HSOAD55R	CAACCTTGNT GNTGGCATTG TGTTCTTGCT GNCTCAAGGT GGTGTTNTT.		
HNEDU15X	CAACCTTGCT GCTGGCACTG CTGTCTTGCT GCCTCACGGT GGTGTCTTTC		
HSLAH84R	CATTGAAACT GCTGTGACCT NCTTACANCA NGTGTGTN GCTATTTTNC		
HLTBM08R	CAAAGGAAAA TCTCTACTTA GATTNACACA TTTGTTCCCA TGGGTNTCTT		
	351		400
HSOAD55R			
HNEDU15X	TACCAGGTGG CCGCCCTGCA AGGGGACCTG GCCAGCCTCC GGGCAGAGCT		
HSLAH84R	CTNCCTNTTC TNTGGTAACC TCTTAGGAAG GAAGGATTCT TAACTGGGAA		
HLTBM08R	AAGTTTTAAA AGGGGAGTGC CCTTAGGAGG AAAAGGGGAT AAATATTGGC		

图4B

	401		450
HSOAD55R			
HNEDU15X	GCAGGGCCAC	CACGCGGAGA	AGCTGCCAGC AGGAGCAGGA GCCCCCAAGG
HSLAH84R	ATAACCCAAA	AAAAANNTTAA	ANGGGTANGN GNNANANGNG GGGNNGTTNN
HLTBM08R	CAAGGNACTG	GTTANTTTNT	AAATATGGTC AGGTTTNTAT ANCTGGTAGG
	451		500
HSOAD55R			
HNEDU15X	CCGGCCTGGA	GGAAGCTCCA	GCTGTCACCG CGGGACTGAA AATCTTTGAA
HSLAH84R	CNNGNNGNNT	TTTNGGNNTA	TNTTNTNNTN GGGNNNGTA AAAATGGGGC
HLTBM08R	CCTCGCCATG	GGCATTNATT	CANGGNGAGG NCNNTCTTTT GGGNTGA...
	501		550
HSOAD55R			
HNEDU15X	CCACCAGCTC	CAGGAGAAGG	CAACTCCAGT CAGAACAGCA GAAATAAGCG
HSLAH84R	CNANGGGGGN	TTTTT.....	
HLTBM08R			
	551		600
HSOAD55R			
HNEDU15X	TGCCGTTTCT	GGTCCAGAAG	AAACAGTCAC TCAAGACTGC TTGCAACTGA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	601		650
HSOAD55R			
HNEDU15X	TTCGAGACAG	TGAAACACCA	ACTATACAAA AAGGATCTTA CACATTTGTT
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	651		700
HSOAD55R			
HNEDU15X	CCATGGCTTC	TCAGCTTTAA	AAGGGGAAGT GCCCTAGAAG AAAAAGAGAA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	701		750
HSOAD55R			
HNEDU15X	TAAAATATTG	GTCAAAGAAA	CTGGTTACTT TTTTATATAT GGTGAGGTTT
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	751		800
HSOAD55R			
HNEDU15X	TATATACTGA	TAAGACCTAC	GCCATGGGAC ATCTAATTCA GAGCAAGAAG
HSLAH84R			
HLTBM08R			

图4C

	801		850
HSOAD55R			
HNEDU15X	GTCCATGTCT	TTGGGGATGA	ATTGAGTCTG GTGACTTTGT TTCGATGTAT
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	851		900
HSOAD55R			
HNEDU15X	TCAAAATATG	CCTGAAACAC	TACCCAATAA TTCCTGCTAT TCAGCTGGCA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	901		950
HSOAD55R			
HNEDU15X	TTGCAAAACT	GGAAGAAGGA	GATGAACTCC AACTTGCAAT ACCAAGAGAA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	951		1000
HSOAD55R			
HNEDU15X	AATGCACAAA	TATCACTGGA	TGGAGATGTC ACATTTTTTG GTGCATTGAA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	1001		1050
HSOAD55R			
HNEDU15X	ACTGCTGTGA	CCTACTTACA	CCATGTCTGT AGCTATTTTC CTCCCTTTCT
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	1051		1100
HSOAD55R			
HNEDU15X	CTGTACCTCT	AAGAAGAAAG	AATCTAACTG AAAATACCAA AAAAAAAAAA
HSLAH84R			
HLTBM08R			
	1101		
HSOAD55R			
HNEDU15X	AAAAAA		
HSLAH84R			
HLTBM08R			

图5A

Neutrokin- α SV

1	ATGGATGACTCCACAGAAAGGGAGCAGTCACGCCTTACTTCTTGCCCTTAAGAAAAGAGAA	60
1	M D D S T E R E Q S R L T S C L K K R E	20
61	GAAATGAACTGAAGGAGTGTGTTCCATCCTCCACGGAAGGAAAGCCCTCTGTCCGA	120
21	E M K L K E C V S I L P R K E S P S V R	40
	CD-I	
121	TCCTCCAAAGACGGAAAGCTGCTGGCTGCAACCTTGCTGCTGGCACTGCTGTCTTGCTGC	180
41	S S K D G K L L A A T L L L A L L S C C	60
	CD-I	
181	CTCAGGTGGTGTCTTCTACAGGTGGCGCCCTGCAAGGGGACCTGGCCAGCCTCCGG	240
61	L T V V S F Y Q V A A L Q G D L A S L R	80
	CD-II	
241	GCAGAGCTGCAGGGCCACCACGGGAGAGCTGCCAGCAGGAGCAGGAGCCCCAAGGCC	300
81	A E L Q G H H A E K L P A G A G A P K A	100
	CD-II	
	CD-III	
301	GGCTGGAGGAAGCTCCAGCTGTCAACCGGGGACTGAAAATCTTTGAACCACCAGCTCCA	360
101	G L E E A P A V T A G L K I F E P P A P	120
	CD-III	
361	GGAGAAGGCACTCCAGTCAGAACAGCAGAAATAAGCGTGCCGTTGAGGGTCCAGAAGAA	420
121	G E G N S S Q N S R N K R A V Q G P E E	140
421	ACAGGATCTTACACATTTGTTCATGGCTTCTCAGCTTTAAAGGGGAAGTGCCTTAGAA	480
141	T G S Y T F V P W L L S F K R G S A L E	160
	CD-IV	
481	GAAAAGAGAATTAATAATTTGGTCAAGAAACTGGTTACTTTTTATATATGGTCAGGTT	540
161	E K E N K I L V K E T G Y F F I Y G O V	180
	CD-IV	
	CD-V	
541	TTATATACTGATAAGACCTACGCCATGGGACATCTAATTCAGAGGAAGAAGGTCCATGTC	600
181	L Y T D K T Y A M G H L I O R K K V H V	200
	CD-VI	
	CD-VII	
601	TTTGGGGATGAATTGAGTCTGGTGACTTTGTTTCGATGTATTCAAAATATGCCTGAAACA	660
201	F G D E L S L V T L F R C I O N H P E T	220
	CD-VIII	
	CD-VIII	
661	CTACCCAATAATTCCTGCTATTTCAGCTGGCATTGCAAACTGGAAGAAGGAGATGAACTC	720
221	L P W N S C Y S A G I A K L E E G D E L	240
	CD-IX	
	CD-X	

图5B

Neutrokin- α SV

```
721 CAACTTGCAATACCAAGAGAAAATGCCAAATATCACTGGATGGAGATGTCACATTTTTT 780
241 Q L A I P R E N A Q I S L D G D V T F F 260
      CD-X                               CD-XI

781 GGTGCATGAAACTGCTGTGACCTACTTACACCATGTCTGTAGCTATTTCCCTCCCTTC 840
261 G A L K L L 266
      CD-XI

841 TCTGTACCTCTAAGAAGAAGCAATCTAACTGAAAATACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 900
901 AAA 903
```

图6
Neutroline- α SV

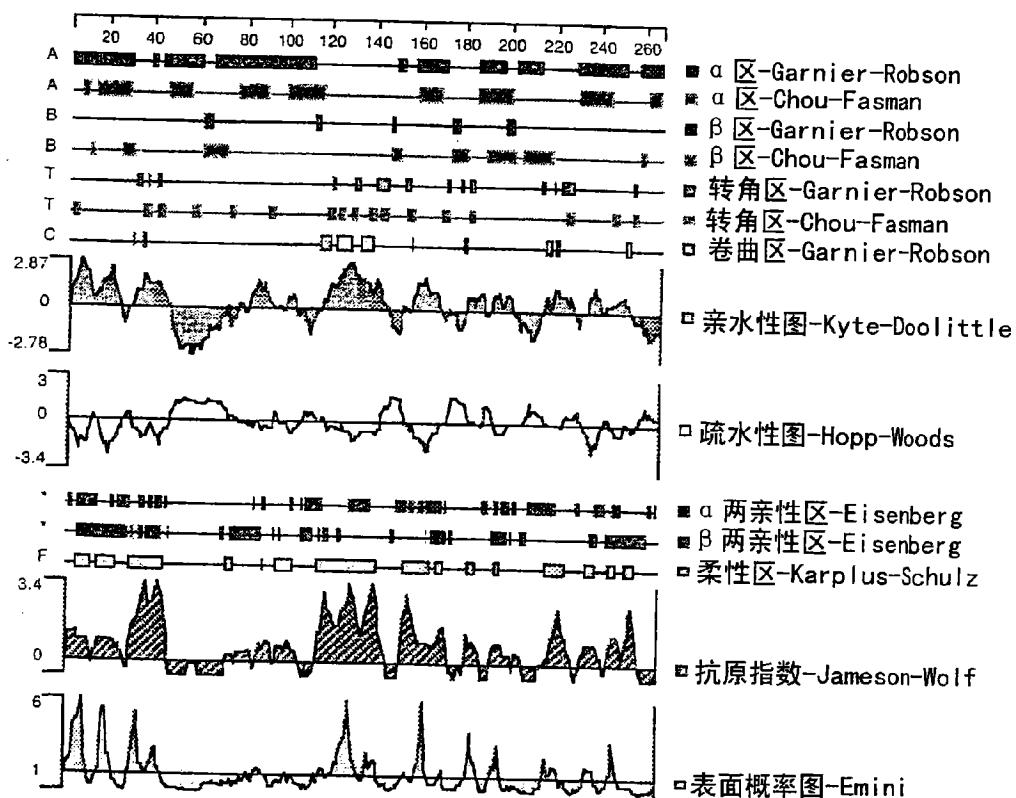


图 7A

leutokine-
alpha M DDSTEREQSRLTSCCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRS 41

跨膜区

SKD GKLLAATLLALLSCCLTVVSFYQVAALQGDLASLRAE 82

LQGHHA EKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKIFEPPAPGEG 123

↓

NSSQNSRNKRAVQGP EETVT A QDC LQLIADSETPTIQKGSYT 164

April HSV LHLVPINATSK-DDSDVT 134

TNF KPV AHVVANPQAEGQ----- 102

LT α KPA AHLIGDPSKQNS----- 77

A' B' B C

FVPWLLS-----FKRGS ALEEK ENKILVKETGYFFIYGQV L 200

EVMWQPA-----LRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQV L 170

-LQWLNRRANALLANGVELRD--NQLVVPSEGLYLYYSQV L 139

-LLWRANTDRAFLQDGFSLSN--NSLLVPTSGIYFVYSQV V 114

D E

YTDKTY-----AMGH LIQRKKVHVHFGDELSLVTLFR CIQNMP 237

FQDVTF-----TMGQVVSRE-----GQGRQETLFR CIRSM P 201

FKGQGCP-----STHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLS AIKSP 176

FSGRAYSPKATSSSPLYLAHEVQLFSSQYPFHVPLLLSSQKM V 155

F G

E--TLP-----NNSCYSAGIAKLEEGDELOLAIPRENA 268

SHPDRA-----YNSCYSAGVFLHQQGDILSVIIPRARA 234

CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDY 217

YP-----GLQEPWLHSMYHGAAFLTQGDQLSTHTDGI PH 190

H

QISLDGDVTFEGALKLL 285

KLNLSPHGTFLGFVKL 250

LDFAESGQVYEGIIAL 233

LVLS-PSTVFEAFAL 205

图 7B

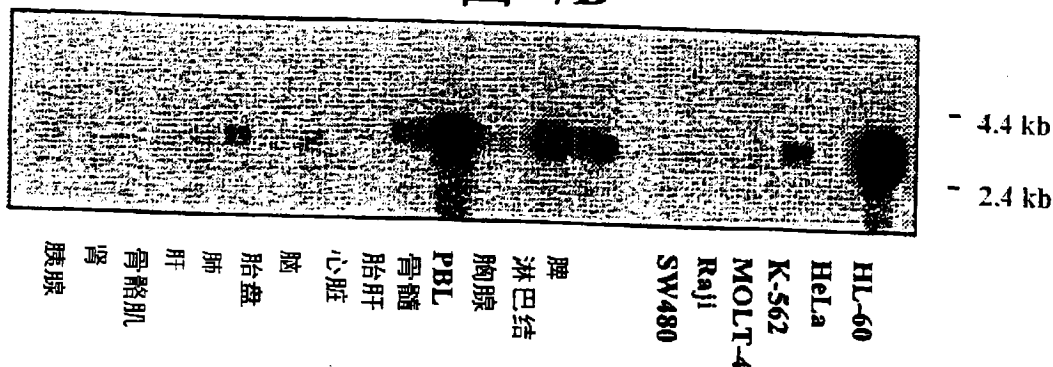


图8A

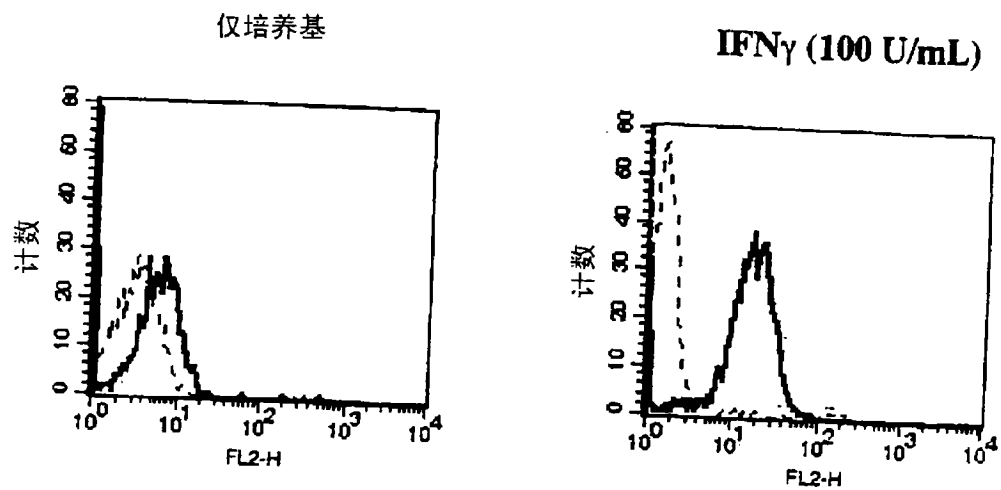


图8B

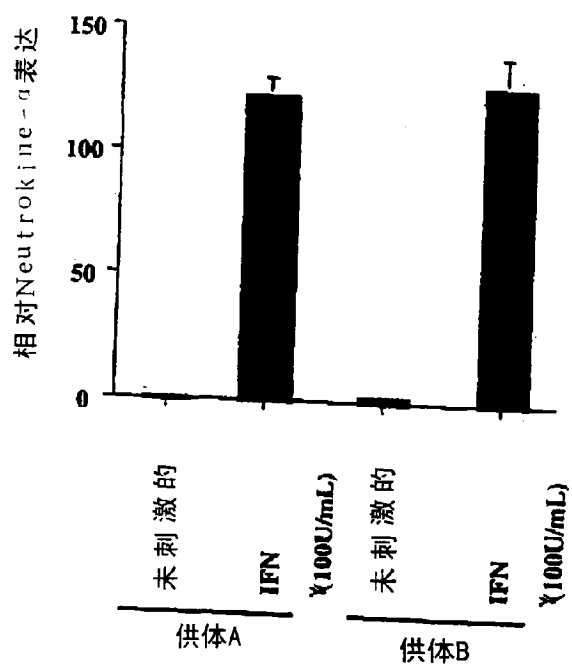


图9A

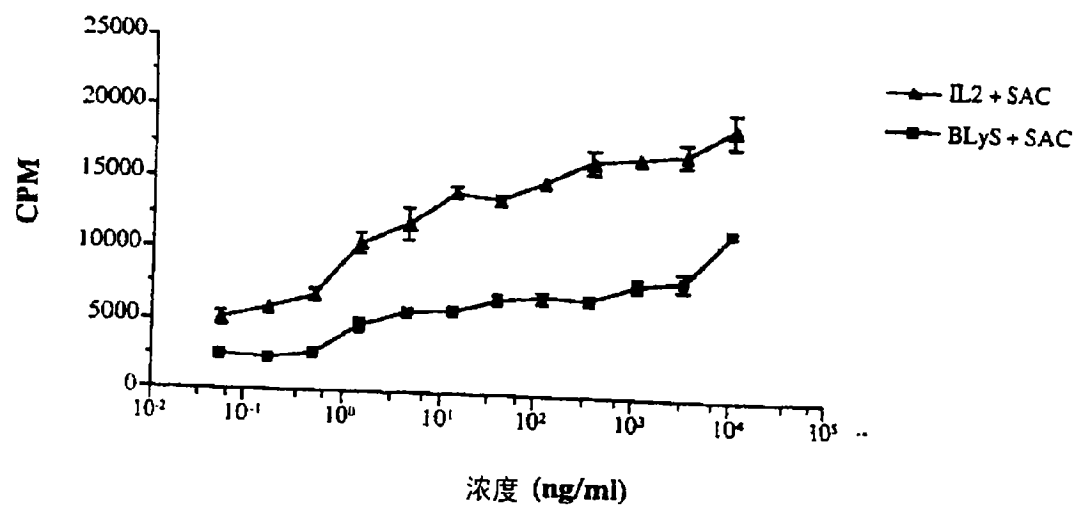


图9B

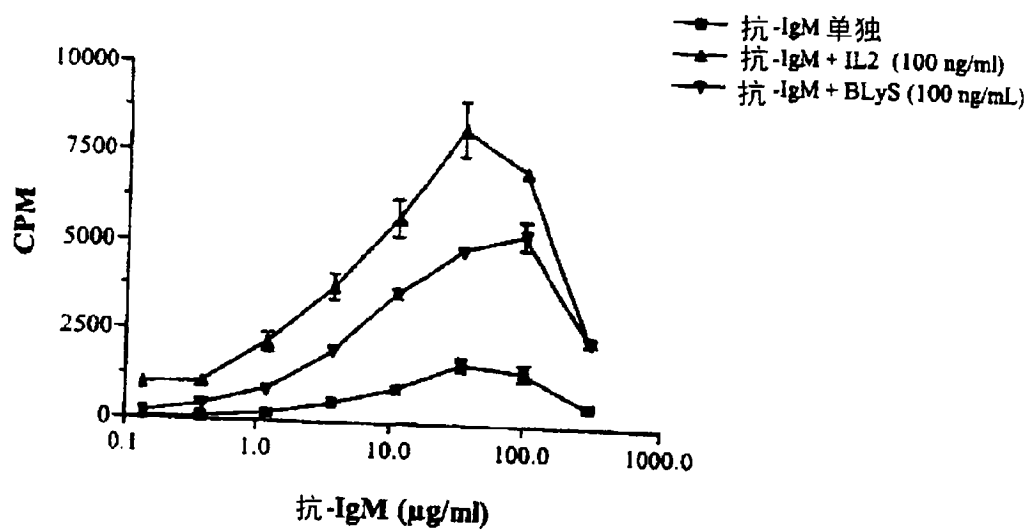


图10A

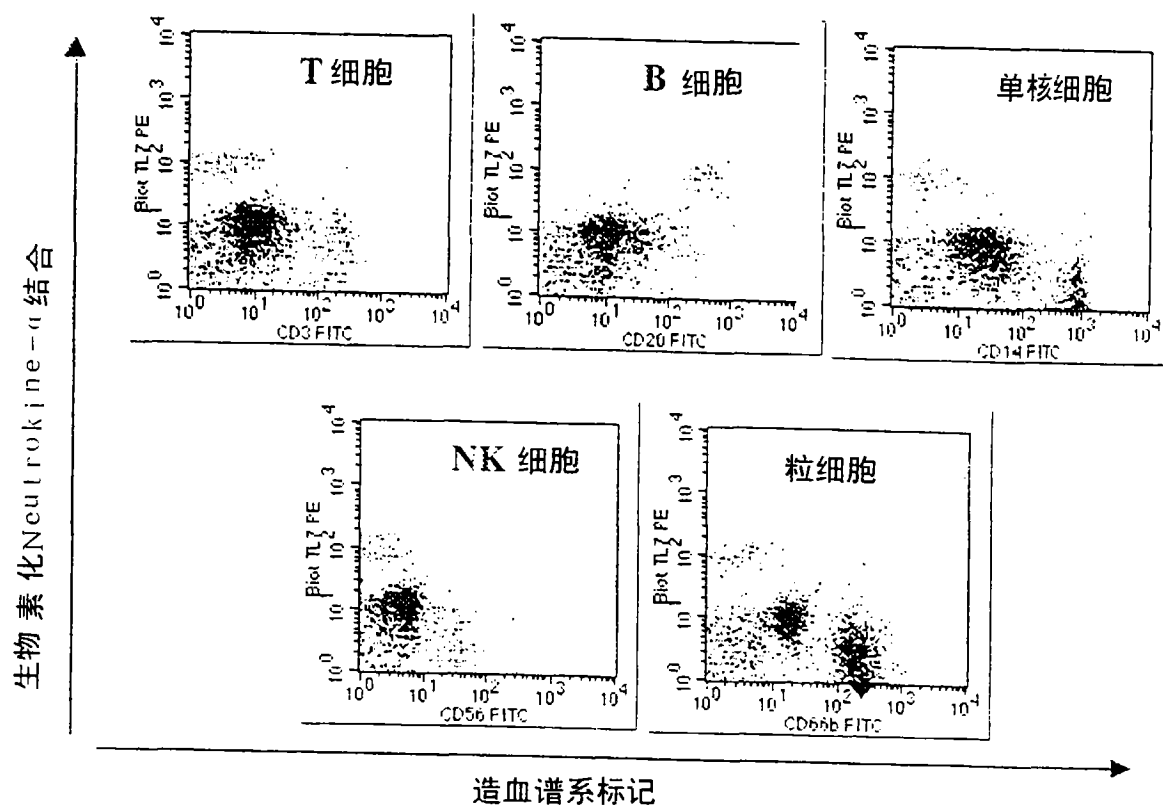


图10B

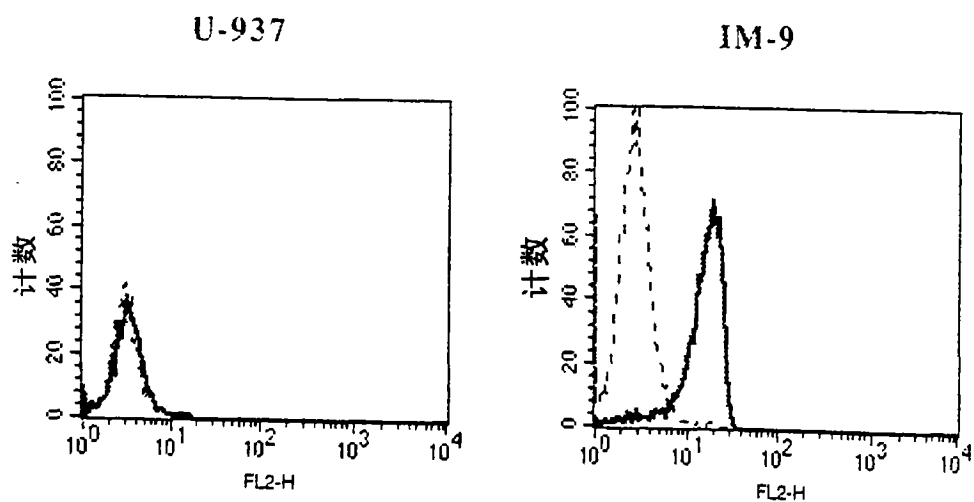


图11A

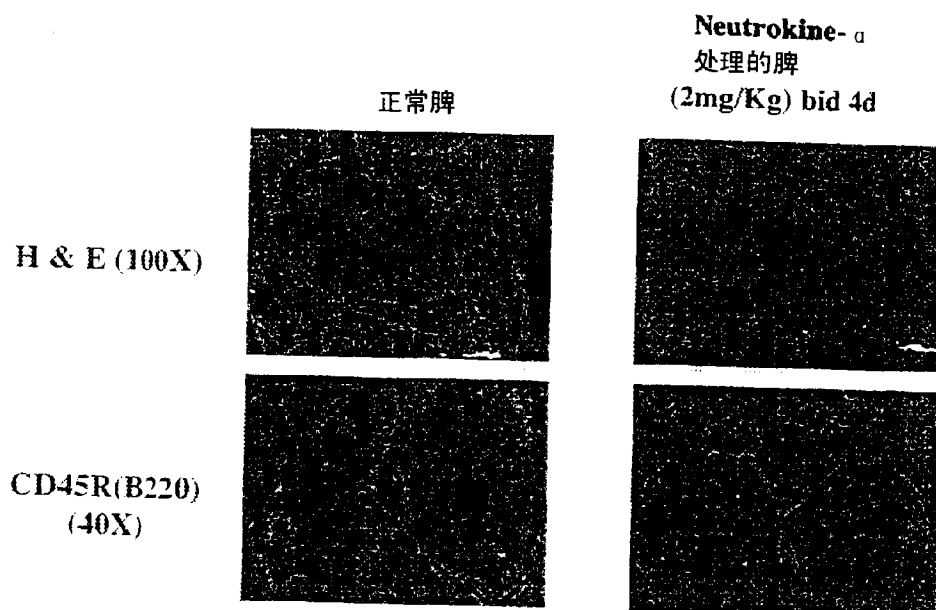


图11B

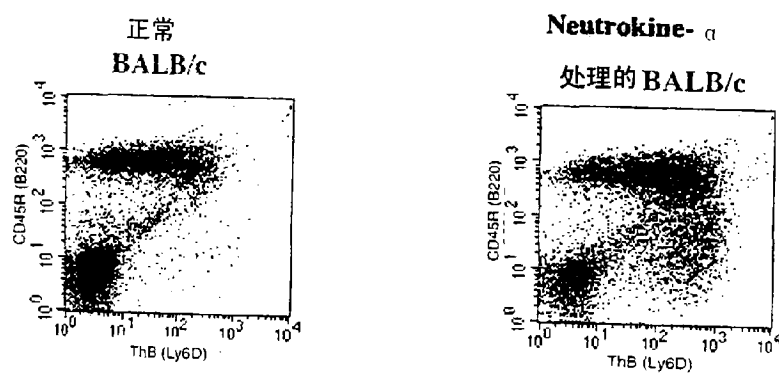


图11C

