



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105744946 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(21)申请号 201480015618.3

梅莉莎·E·温

(22)申请日 2014.03.17

(74)专利代理机构 北京中恒高博知识产权代理有限公司 11249

(30)优先权数据

13/843,773 2013.03.15 US

代理人 夏晏平

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.09.15

(51)Int.Cl.

A61K 38/16(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/030117 2014.03.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/145368 EN 2014.09.18

(71)申请人 希拉布朗治疗有限公司

地址 美国马里兰州罗克维尔市

(72)发明人 爱普瑞·L·皮隆

哈姆恰·K·哈里普拉卡什

理查德·S·克莱顿

权利要求书2页 说明书17页

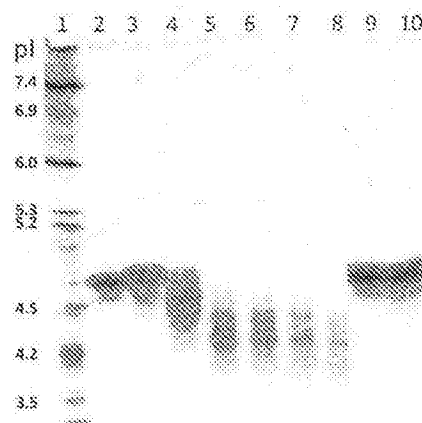
序列表6页 附图19页

(54)发明名称

人分泌球蛋白的修饰和新型组合物

(57)摘要

已经在体外通过化学修饰纯的蛋白质产生重组人CC10蛋白的新型组合物。已经通过利用活性氧物质和活性氮物质处理产生含有化学修饰rhCC10的亚型的几种新型合成制剂。这些制剂含有rhCC10已被表征与未修饰的蛋白质相比具有增强的或改变的生物学特性的新型亚型。含新颖亚型制剂可以用作标准,以确定和表征从血液或尿液天然CC10蛋白的天然存在的亚型,并最终以测量新型基于CC10的生物标记以评估患者疾病状态。这些制剂也可用于治疗呼吸、自身免疫性、炎症及用未修饰的蛋白质不能有效治疗的其他病症。



rhCC10 NaOCl反应的等电聚焦

1. 一种组合物, 包括化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白, 具有一个或多个修饰的氨基酸。

2. 如权利要求1所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白具有一个或多个甲硫氨酸亚砷。

3. 如权利要求1所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白具有一个或多个硝基酪氨酸、氯代酪氨酸、或二酪氨酸。

4. 如权利要求1所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白具有一个或多个谷胱甘肽半胱氨酸或HNE-半胱氨酸。

5. 如权利要求1所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白具有一个或多个羰基。

6. 如权利要求1所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白具有一个或多个羟基脯氨酸或吡咯烷酮。

7. 如权利要求1所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白具有一个或多个 α -氨基己二酸半醛、氯胺、MDA-赖氨酸、HNE-赖氨酸、丙烯醛-赖氨酸、羧甲基赖氨酸、或PHA-赖氨酸。

8. 如权利要求1所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白具有一个或多个2-氨基-3-酮丁酸、氯胺、羟基色氨酸、硝基色氨酸、犬尿氨酸、缬氨酸或亮氨酸过氧化物、草酸或丙酮酸、羟基苯丙氨酸2-氧代组氨酸或HNE-His。

9. 如权利要求1所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白具有一个或多个标记、化合物、脂质、或肽类连接到谷氨酰胺或赖氨酸残基。

10. 一种组合物, 包括化学或酶促氧化合成的CC10, 具有一个或多个修饰的氨基酸。

11. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个甲硫氨酸亚砷。

12. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个硝基酪氨酸、氯代酪氨酸、或二酪氨酸。

13. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个谷胱甘肽半胱氨酸或HNE-半胱氨酸。

14. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个羰基。

15. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个羟基脯氨酸或吡咯烷酮。

16. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个羟基脯氨酸或吡咯烷酮。

17. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个 α -氨基己二酸半醛、氯胺、MDA-赖氨酸、HNE-赖氨酸、丙烯醛-赖氨酸、羧甲基赖氨酸、或PHA-赖氨酸。

18. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个2-氨基-3-酮丁酸、氯胺、缬氨酸或亮氨酸过氧化物、草酸或丙酮酸、或羟基苯丙氨酸。

19. 如权利要求10所述的组合物, 其中化学或酶促氧化合成的CC10具有一个或多个标

记、化合物、脂质、或肽类连接到谷氨酰胺或赖氨酸残基。

人分泌球蛋白的修饰和新型组合物

技术领域

[0001] 本发明的领域涉及化学或酶修饰的合成的分泌球蛋白制剂,与未修饰版本相比具有改变或增强的性能。更具体地,利用活性氧物质(ROS)、活性氮物质(RNS)、酶催化修饰的重组人分泌球蛋白蛋白质的修饰,如髓过氧化物酶加的过氧化氢,或转谷氨酰胺酶催化修饰。本发明进一步涉及的修饰分泌球蛋白的新亚型的特性,修饰分泌球蛋白的优化工艺,及分泌球蛋白亚型的分离。本文中的术语“亚型”是指包含一个或多个化学修饰的氨基酸的一种分泌球蛋白或CC10单体、二聚体、或其它包含长度为至少60个氨基酸的完整单体的多聚体复合物。本发明还涉及生物活性的改变,结构构象的变化,或通过它的一个或多个氨基酸化学或酶修饰的分泌球蛋白的生物化学特性。本发明还涉及通过用ROS、RNS、和酶催化的氨基酸修饰的化学修饰增强rhCC10的抗病毒活性。本发明还涉及通过用ROS、RNS、和酶催化的氨基酸修饰的化学修饰增强抑制中性粒细胞的迁移。

[0002] 发明背景

[0003] 分泌球蛋白是包括四螺旋束单体以形成二硫化物二聚体、四聚体和更高的多聚体结构上相关蛋白质的一族。有8个已知的人分泌球蛋白(图1)及克拉拉细胞(Clara Cell) 10kDa蛋白(CC10),也被称为子宫珠蛋白、克拉拉细胞16kDa蛋白(CC16)、克拉拉细胞分泌蛋白(CCSP)、子宫球蛋白、尿蛋白-1,及分泌球蛋白1A1(SCGB1A1),是这一族中最丰富的和众所周知的成员。分泌球蛋白和CC10被认为在所有脊椎动物存在。虽然这些蛋白质生理作用和具体机制,包括CC10尚不清楚,但是认为基于所知的CC10、分泌球蛋白在调节免疫反应中起作用。

[0004] 哺乳动物分泌球蛋白的主要来源是肺和气管上皮细胞,尤其是无纤毛支气管气道上皮细胞(主要是克拉拉细胞),及他们在成人肺的细胞外液中是非常丰富的局部产生的蛋白质。它们也在鼻腔上皮细胞中分泌。在血清和尿液中也存在呼吸分泌球蛋白,其在很大程度上是来自于肺源。CC10也由生殖组织(子宫、精囊)、外分泌腺(前列腺、乳腺、胰腺)、内分泌腺(甲状腺、垂体、肾上腺和卵巢)以及由胸腺和脾脏产生(Mukherjee, 1999; Mukherjee, 2007)。人CC10体内的主要是同型二聚体,由两个相同的70个氨基酸的单体组成,具有4.7-4.8的等电点。虽然它在SDS PAGE上以约10kDa的表观分子量迁移,但是其分子量为15.8kDa。单体以反向平行构型排列,具有与其它C-末端相邻的N-末端,及以完全氧化形式的二聚体,在Cys3单体和其它Cys69之间通过两个二硫键连接(Mukherjee, 1999)。

[0005] 修饰蛋白质上的氨基酸残在有许多化学和酶促方法。所述分泌球蛋白经受N-末端信号肽的裂解,这是在哺乳动物细胞中分泌过程的一个组成部分。但是不知道他们是被糖基化还是脂质化。然而,在炎症反应期间分泌球蛋白通过相同的过程在细胞外环境中影响所有其他蛋白质。天然CC10在体内进行化学修饰及在患者样本中已经确定的天然CC10的新亚型在来自正常人的样本中不存在(Lindhal, 1999; Ramsay, 2001; Ariaz-Martinez, 2012)。假定修饰是由炎症过程导致的,因为新亚型只在来自患有特征在于持续的或急性炎症的呼吸病症患者的气道内膜液(ALF)的样本中被确定。尽管有些人推测,修饰CC10是与由炎症反应所产生的活性氧物质反应的结果,但是修饰的性质目前是未知的。此外,氧化修饰天然

CC10被认为代表损坏蛋白质,其抗炎活性和免疫调节功能受损,从而促进患有呼吸窘迫的早产儿慢性肺病的发展(Ramsay,2001)。

[0006] 合成CC10蛋白可通过重组或化学合成方法进行(Barnes,1996;Mantile,1993;Nicolas,2005)。CC10是结构相关的蛋白质统称分泌球蛋白的族中最知名的一个成员(Klug,2000)。八种人分泌球蛋白成熟分泌序列的氨基酸序列如图1中所示。N-末端是基于共识的信号肽切割位点的预测,并没有通过天然蛋白质的N-末端测序确认。所有分泌球蛋白共享一个保守的四螺旋束的二级结构,因此,一般认为介导相似的生理功能。

[0007] 生成活性氧物质(ROS)和活性氮物质(RNS)为与衰老和疾病相关的慢性炎症过程的一部分,或作为严重的炎症反应的结果,以对抗感染和其他急性损伤,如烟雾吸入。常见体内介导蛋白质氧化的ROS和RNS的化学试剂包括过氧化氢(H_2O_2)、 Fe^{2+} 、 Cu^{1+} 、谷胱甘肽、 $HOCl$ 、 $HOBr$ 、 1O_2 、和 $ONOO^-$,ROS和RNS可以作为酶的活性的结果在体内合成或释放,如髓过氧化物酶、黄嘌呤氧化酶、和P-450酶、和活化吞噬细胞的活性氧迸发的结果。脂质过氧化物如4-羟基-2-反式-壬烯醛(HNE)、(MDA)和丙烯醛是ROS和RNS的与脂质反应的产物,反过来,高反应性并能与蛋白质形成加合物。臭氧和紫外线,以及在 O_2 和线粒体电子传递链泄漏存在下的 γ 照射,也引起蛋白质氧化。

[0008] ROS和RNS的是不加区别化学反应剂,破坏的基本生物组分,包括核酸、脂质(包括膜和表面活性剂的磷脂)、和蛋白,在病原体 and 宿主二者中,往往造成明显的组织损伤比原来的感染或炎症反应的其他原因可能更危及生命。例如,急性呼吸窘迫综合征(ARDS)通常是由急性肺部感染(肺炎)引发,其导致ROS和RNS的释放,并且因肺组织损伤包括肺功能损害通常具有40-60%的死亡率,甚至在病原体引起的感染使用抗菌药物被控制之后还是一样。

[0009] 有几种类型的氧化蛋白质修饰,其中最常见的是硫氧化,在其中在半胱氨酸(Cys),S-巯基化,和甲硫氨酸(Met)亚砷之间的二硫键中形成。蛋白质的羰基也是常见的氧化修饰,其中氨基酸侧链被转化成醛和酮,特别是赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)和脯氨酸(Pro)。脂肪族氨基酸可被转化为它们的羟基(过氧)衍生物。可能会出现氯胺和脱氨基化合物。某些氨基酸可被转化成其它氨基酸,如组氨酸(His)与天冬酰胺(ASN),而其他的可能形成的脂质过氧化加成物、氨基酸氧化加成物(例如p-羟基苯乙醛)、和糖基化加成物(例如羧甲基赖氨酸)。在宏观蛋白质水平,暴露于ROS和RNS可能会出现交联、聚合和肽键裂解的结果。

[0010] 有12种氨基酸通过ROS和RNS被在体内修饰成几个生理氧化产物,如表1中所示。在一般情况下,氨基酸半胱氨酸(Cys)和甲硫氨酸(Met)是最易被氧化的,不像其他氨基酸氧化,Met和Cys的氧化是可逆的(甲硫氨酸亚砷还原酶和谷胱甘肽和硫氧化还原蛋白氧化还原系统)(Stadtman,2002)。

[0011] 表1:ROS和RNS引起的氨基酸修饰

[0012]

氨基酸	生理氧化产物	每个 CC110 单体的数目
半胱氨酸 (Cys)	二硫化物, 谷胱甘肽化, HNE-Cys	2
甲硫氨酸 (Met)	甲硫氨酸亚砷	4
酪氨酸 (Tyr)	二酪氨酸, 硝基酪氨酸, 氯代酪氨酸, 二羟苯丙氨酸	1
苯基丙氨酸 (Phe)	酪氨酸 (羟基苯丙氨酸)	2
缬氨酸 (Val) & 亮氨酸 (Leu)	过氧化物 (氢氧化物)	9
谷氨酸 (Glu)	草酸, 丙酮酸	6
脯氨酸 (Pro)	羟基脯氨酸, 吡咯烷酮, 谷氨酸半醛	4
苏氨酸 (Thr)	2-氨基-3-酮丁酸	3
精氨酸 (Arg)	谷氨酸半醛, 氯胺	3
赖氨酸 (Lys)	α -氨基己二酸半醛、氯胺、MDA-Lys、HNE-Lys、丙烯醛-Lys、羧甲基赖氨酸、或 PHA-Lys	5
色氨酸 (Trp)	羟基色氨酸, 硝基-色氨酸、犬尿氨酸	0
组氨酸 (His)	2-氧代组氨酸、天冬酰胺酸、天冬氨酸盐、HNE-His	0

[0013] 修饰分泌球蛋白也可酶促介导的, 而不是仅仅由通过酶例如MPO产生的ROS和RNS的下游效应, 而且还通过转谷氨酰胺酶(TGs)。TGs是在自然界中普遍存在, 在从微生物到哺乳动物所有生命形式中都可以发现。TGs在哺乳动物几个之间和细胞内的过程是必不可少的, 包括细胞外基质合成、嗜中性粒细胞和单核细胞粘附和运动、受体的胞吞作用、胞饮作用、抗原摄取和加工、血液凝固、G蛋白信号传导和细胞凋亡(reviewed in Lorand, 2003)。TGs是介导至少一个主要的酶活性的多功能酶; 经典转谷氨酰胺酶活性, 其中在一个蛋白质中的谷氨酰胺残基作为酰基供体和第二蛋白中的一个赖氨酸残基作为酰基受体。TGs也介导蛋白质的脱酰胺和酯化, 以及创建和重排半胱氨酸残基之间的二硫键。所有这些活动的没有能量要求及所需的唯一的辅因子是钙。

[0014] 转谷氨酰胺酶在炎症和免疫反应中发挥着重要的作用, 尤其是TG2或组织转谷氨酰胺酶。它大多存在于细胞质中, 但部分与膜相关的酶在细胞表面上及众所周知的为一种纤连蛋白的受体。TGs也表明交联蛋白质至细胞膜特定脂质部分, 允许在皮肤的结构蛋白支架上创建脂质屏障(Lesort, 2000; Nemes, 1999)。最近, TGs在病毒感染的新的作用已被确认

(reviewed in Jeon, 2006)。胞内TG2通常存在于惰性状态,及被由病毒感染导致的氧化应激和钙动员激活。活化的细胞内TG2通过直接修饰/灭活病毒蛋白质,以及病毒进入、复制或转运所需的细胞蛋白质的修饰介导其抗病毒活性。CC10先前已证明是TG2的一个底物(Mukherjee, 1988)。CC10通过TG2交联到其它CC10分子,以形成在SDS-PAGE凝胶和蛋白印迹观察到的共价连接的多聚体和聚集体。然而,CC10或其它分泌球蛋白没有其他的TG-介导反应产物被表征过。

发明内容

[0015] 发明目的

[0016] 上述提供了通过本发明实施方式所实现的目的的非排他性列举:

[0017] 本发明的一个主要目的是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的分泌球蛋白(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0018] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的CC10(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0019] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的SCGB3A2(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0020] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的SCGB3A1(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0021] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的SCGB2A1(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0022] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的SCGB2A2(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0023] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的SCGB1D1(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0024] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的SCGB1D2(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0025] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括化学或酶促氧化合成的SCGB1D4(无论是通过重组方法或化学方法)。

[0026] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个甲硫氨酸亚砷。

[0027] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个谷胱甘肽半胱氨酸。

[0028] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个HNE-半胱氨酸。

[0029] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个硝基酪氨酸。

[0030] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个二酪氨酸。

[0031] 本发明进一步的目的是是一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个

羰基。

[0032] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括两个或多个选自于由甲硫氨酸亚砷、硝基酪氨酸、或二酪氨酸构成的组合的氨基酸的组合。

[0033] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个氯代酪氨酸。

[0034] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个羟基脯氨酸、吡咯烷酮或谷氨酸半醛。

[0035] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个2-氨基-3-酮丁酸。

[0036] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个氯胺。

[0037] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个 α -氨基二酸半醛、氯胺、MDA-Lys、HNE-Lys、丙烯醛-Lys、羧甲基赖氨酸、或PHA-Lys。

[0038] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个羟基色氨酸、硝基-色氨酸或犬尿氨酸。

[0039] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个缬氨酸或亮氨酸过氧化物。

[0040] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个草酸或丙酮酸。

[0041] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个二羟基苯丙氨酸。

[0042] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个谷氨酸半醛。

[0043] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括修饰合成的分泌球蛋白,包括一个或多个2-氧代组氨酸或HNE-His。

[0044] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括未修饰合成的分泌球蛋白和氧化或酶促修饰合成的分泌球蛋白的组合,其中未修饰和修饰制剂是相同的分泌球蛋白。

[0045] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括未修饰合成的分泌球蛋白和氧化或酶促修饰合成的分泌球蛋白的组合,其中未修饰和修饰制剂不是相同的分泌球蛋白。

[0046] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括两个或多个氧化或酶促修饰合成的分泌球蛋白的组合,其中未修饰和修饰制剂为是相同的分泌球蛋白。

[0047] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括两个或多个氧化或酶促修饰合成的分泌球蛋白的组合,其中未修饰和修饰制剂为不是相同的分泌球蛋白。

[0048] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括一个或多个未修饰合成的分泌球蛋白和一个或多个氧化或酶促修饰合成的分泌球蛋白的组合,其中未修饰和修饰制剂是相同的分泌球蛋白。

[0049] 本发明进一步的目的是提供一种组合物包括一个或多个未修饰合成的分泌球蛋白和一个或多个氧化或酶促修饰合成的分泌球蛋白的组合,其中未修饰和修饰制剂不是相同的分泌球蛋白。

[0050] 本发明次要的目的是一种药物组合物包括一种修饰合成的分泌球蛋白,可用作治疗试剂。

[0051] 本发明进一步的目的是是一种药物组合物包括两种或多种修饰合成的分泌球蛋白的组合,可用作治疗试剂。

[0052] 本发明进一步的目的是是一种药物组合物包括修饰和未修饰合成的分泌球蛋白的组合,可用作治疗试剂。

[0053] 本发明进一步的目的是施用一种修饰合成的分泌球蛋白给患有炎症病症或的病毒感染的患者。

[0054] 本发明进一步的目的是施用一种修饰合成的分泌球蛋白给患有呼吸疾病或的病症、自身免疫性疾病或病症,纤维变性病症,代谢疾病,感染性疾病,或任何急性或慢性炎症疾病或病症的患者。

[0055] 本发明进一步的目的是施用一种修饰合成的分泌球蛋白给患者,施用特征在于施用对应于所述施用合成分泌球蛋白缺乏的天然分泌球蛋白的亚型。

[0056] 本发明进一步的目的是施用一种修饰合成的分泌球蛋白以治疗或防止患有潜在慢性疾病或病症的患者潜在病症的严重加重。

[0057] 本发明进一步的目的是施用一种修饰合成的CC10给患有炎症病症或病毒感染的患者。

[0058] 本发明进一步的目的是施用一种修饰合成的CC10给患有呼吸疾病或的病症、自身免疫性疾病或病症,纤维变性病症,代谢疾病,感染性疾病,或任何急性或慢性炎症疾病或病症的患者。

[0059] 本发明进一步的目的是施用一种修饰合成的CC10给患者,施用特征在于施用对应于所述施用合成CC10缺乏的天然CC10的亚型。

[0060] 本发明进一步的目的是施用一种修饰合成的CC10以治疗或防止患有潜在慢性疾病或病症的患者潜在病症的严重加重。

[0061] 本发明进一步的目的是用一种修饰合成的分泌球蛋白,可用于开发诊断分析,以评估患者样本。

[0062] 本发明进一步的目的是用一种修饰合成的分泌球蛋白作为标准,可用于诊断分析,以评估患者样本。

[0063] 本发明进一步的目的是用一种修饰合成的CC10,可用于开发诊断分析,以评估患者样本。

[0064] 本发明进一步的目的是用一种修饰合成的CC10作为标准,可用于诊断分析,以评估患者样本。

[0065] 本发明进一步的目的是用一种修饰合成的分泌球蛋白作为标准,以使能够从生物来源如血液、尿液、或组织纯化修饰天然分泌球蛋白。

[0066] 本发明进一步的目的是用一种修饰合成的分泌球蛋白作为标准,以使能够发展从生物来源如血液、尿液、或组织纯化修饰天然分泌球蛋白的过程。

[0067] 本发明进一步的目的是用一种修饰合成的分泌球蛋白作为标准,以使能够监控从生物来源如血液、尿液、或组织纯化修饰天然分泌球蛋白的过程。

[0068] 本发明进一步的目的是用一种修饰合成的分泌球蛋白作为标准,以控制从生物来

源如血液、尿液、或组织纯化修饰天然分泌球蛋白的质量。

[0069] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用化学氧化将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0070] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用一种活性氧物质(ROS)将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0071] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用一种活性氮物质(RNS)将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0072] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用次氯酸钠(NaOCl)将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0073] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用次氯酸根(HOCl)将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0074] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用间氯过苯甲酸(mCPBA)将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0075] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用过氧化氢(H_2O_2)将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0076] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用一种酶将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0077] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用髓过氧化物酶将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0078] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用转谷氨酰胺酶将未修饰合成的分泌球蛋白转换成修饰合成的分泌球蛋白。

[0079] 本发明进一步的目的是提供一种方法,其中用转谷氨酰胺酶附着标记、化合物、脂质、或肽段至未修饰合成的分泌球蛋白。

[0080] 附图简述

[0081] 图1:分泌球蛋白的氨基酸序列。示出了8种人分泌球蛋白单体形式的氨基酸序列。所有序列均取自基因库及转录产物的信号肽已被移除以示出各单体预测N-末端。所有分泌球蛋白共享一个保守的四螺旋束的二级结构及形成同型二聚体、异型二聚体、四聚体、和大的多聚体。

[0082] 图2:rhCC10与 NaOCl 反应的HPLC图谱。未修饰rhCC10和rhCC10制剂与氧化剂当量的量增加的 NaOCl 反应用C-18柱通过反相HPLC进行分析。箭头指向的反应混合物中未修饰rhCC10的峰。每次HPLC运行装载大约25mcg的蛋白质以显示HPLC。

[0083] 图3:rhCC10 NaOCl 反应的SDS-PAGE。使用10-20%甘氨酸SDS-PAGE凝胶。用增量的 NaOCl 修饰rhCC10制剂;示出了为每个泳道的氧化剂当量数。所有样本,每个含~5mcg蛋白质,用1mM DTT还原在SDS上样缓冲液,并凝胶上样之前加热至65°C 15分钟。

[0084] 图4:rhCC10 NaOCl 反应的等电聚焦(IEF)。IEF凝胶覆盖的pH值范围从3-7。用增量的 NaOCl 修饰rhCC10制剂;示出了为每个泳道的氧化剂当量数。所有样本,每个含~5mcg蛋白质,样本未还原,暴露于在SDS,并凝胶上样之前加热。

[0085] 图5:使用抗rhCC10抗体的rhCC10 NaOCl 反应的IEF凝胶的蛋白印迹。IEF凝胶覆盖的pH值范围从3-7及印迹到PVDF膜上,然后用蛋白质-A纯化的兔多克隆抗体监测使用未修

饰的rhCC10为抗原。修饰rhCC10制剂与NaOCl反应的条件在泳道的描述中示出。所有样本，每个含~5mcg蛋白质，样本未还原，暴露于在SDS，并凝胶上样之前加热。

[0086] 图6：使用抗DNP抗体的DNPH处理的rhCC10NaOCl反应的蛋白印迹。10-20%甘氨酸SDS-PAGE凝胶上运行修饰的rhCC10制剂。NaOCl反应产物与MPO和mCPBA反应产物并排运行。将该凝胶印迹到PVDF上然后用兔多克隆抗DNP抗体(可商购)监测。样本未还原，但混合用SDS PAGE上样缓冲液，并上样之前加热至65℃15分钟。未修饰rhCC10和MPO和mCPBA反应产物没有在使用的条件下通过抗体识别。只有在NaOCl反应产物含有可检测到的DNP，表示这些制剂中的存在羰基。

[0087] 图7：mCPBA氧化产物的HPLC分析。未修饰rhCC10和rhCC10制剂与氧化剂当量的量增加的mCPBA反应用C-18柱通过反相HPLC进行分析。箭头指向的反应混合物中未修饰rhCC10的峰。每次HPLC运行装载大约25mcg的蛋白质以显示HPLC。

[0088] 图8：rhCC10mCPBA反应的等电聚焦。IEF凝胶覆盖的pH值范围从3-7。用增量的mCPBA修饰rhCC10制剂；示出了为每个泳道的氧化剂当量数及对两种不同的温度进行了测试。所有样本，每个含~25mcg蛋白质，样本未还原，暴露于在SDS，并凝胶上样之前加热。

[0089] 图9：使用抗rhCC10抗体的rhCC10mCPBA反应的IEF凝胶的蛋白印迹。IEF凝胶覆盖pH范围3-7，并印迹到PVDF膜，然后针对rhCC10用蛋白质-A纯化的兔多克隆抗体监测。用量增加的mCPBA修饰rhCC10制剂，及示出了为每个泳道的氧化剂当量数和对两种不同的温度进行了测试。所有样本，每个含~25mcg蛋白质。样本未还原，暴露于在SDS，并凝胶上样之前加热。

[0090] 图10：rhCC10mCPBA反应的等电聚焦；附加条件。IEF凝胶覆盖的pH值范围从3-7。在附加条件下用mCPBA修饰rhCC10制剂，包括CaCl₂的存在及对比高得多氧化剂当量数。所有样本，每个含~25mcg蛋白质，样本未还原，暴露于在SDS，并凝胶上样之前加热。

[0091] 图11：mCPBA反应产物：CC10亚型的纯化&质谱分析。C-18RP-HPLC用于从mCBPA反应混合物分离表示为不同的峰的八个个体CC10亚型中的每个。在这个例子中，峰值#3收集，重新运行到HPLC来估计纯度，然后发送质谱分析(电喷雾法)。箭头指出了在该实施例中纯化的峰值。所有样本中含有~25mcg的蛋白质。ESI-MS分析的结果显示在面板D。

[0092] 图12：MPO-H₂O₂反应的优化；CaCl₂的作用。使用C-18RP-HPLC比较有和没有2mM CaCl₂的MPO-H₂O₂反应来监控反应。所有反应均在黑暗中进行，在pH 5.0的柠檬酸盐缓冲液中，50当量的氧化剂H₂O₂，在37℃下，共60分钟。箭头指向对应于未修饰rhCC10的峰，所有样本中含有~25mcg的蛋白质。

[0093] 图13：MPO-H₂O₂氧化产物的HPLC分析。有2mM CaCl₂的MPO-H₂O₂反应用C-18RP-HPLC监控MPO和H₂O₂递增量。所有反应均在黑暗中进行，在pH 5.0的柠檬酸盐缓冲液中，50当量的氧化剂H₂O₂，在37℃下，共30分钟。箭头指向对应于未修饰rhCC10的峰，所有样本中含有~25mcg的蛋白质。

[0094] 图14：rhCC10MPO+H₂O₂反应的等电聚焦。IEF凝胶覆盖的pH值范围从3-7。用增量的MPO修饰rhCC10制剂。所有反应均在黑暗中进行，在pH 5.0的柠檬酸盐缓冲液中，50当量的氧化剂H₂O₂，在37℃下，1或24小时。所有样本中含有~25mcg的蛋白质。样本未还原，暴露于在SDS，并凝胶上样之前加热。

[0095] 图15：使用抗rhCC10抗体的rhCC10MPO和H₂O₂反应的IEF凝胶的蛋白印迹。IEF凝胶

覆盖pH范围3-7,并印迹到PVDF膜,然后针对rhCC10用蛋白质-A纯化的兔多克隆抗体监测。用量增加的MPO修饰rhCC10制剂,及示出了为每个泳道的氧化剂当量数和对两种不同的温度进行了测试。所有反应均在黑暗中进行,在pH 5.0的柠檬酸盐缓冲液中,50当量的氧化剂H₂O₂,在37℃下,1或24小时。所有样本中含有~25mcg的蛋白质。样本未还原,暴露于在SDS,并凝胶上样之前加热。

[0096] 图16:MPO和H₂O₂反应的CC10亚型的纯化&质谱分析。C-18RP-HPLC用于从MPO和H₂O₂反应混合物分离表示为不同的峰,编号为9-17的八个个体CC10亚型中的每个。在这个例子中,峰值#10收集,重新运行到HPLC来估计纯度,然后发送质谱分析(电喷雾法)。箭头指出了在该实施例中纯化的峰值。所有样本中含有~25mcg的蛋白质。ESI-MS分析的结果显示在面板D。

[0097] 图17:过氧化亚硝酸盐氧化产物的HPLC分析。有过氧化亚硝酸盐的rhCC10反应用C-18RP-HPLC监控氧化剂当量递增量。所有反应均在水中进行,在室温下在黑暗中进行1小时。箭头指向对应于未修饰rhCC10的峰,所有样本中含有~25mcg的蛋白质。

[0098] 图18:pH和CaCl₂在过氧化亚硝酸盐介导rhCC10氧化中的作用,有过氧化亚硝酸盐的rhCC10反应在存在或不存在CaCl₂及在不同pH时用C-18RP-HPLC监测随氧化剂当量的数字被监视的存在和不存在。反应用10当量的氧化剂监控氧化剂当量递增量,在室温下,在黑暗中进行1小时。箭头指向对应于未修饰rhCC10的峰,所有样本中含有~25mcg的蛋白质。

[0099] 图19:过氧化亚硝酸盐的反应产物的蛋白印迹分析。10-20%甘氨酸SDS-PAGE凝胶上运行修饰的rhCC10制剂。将该凝胶印迹到PVDF上然后用兔多克隆抗硝基酪氨酸抗体(可商购)监测。样本中含有~10mcg的蛋白质,样本未还原,但混合用SDS PAGE上样缓冲液,并上样之前加热至65℃15分钟。未修饰rhCC10通过抗体识别。

[0100] 图20:rhCC10蛋白质检测ROS和RNS的分泌球蛋白反应产物。用rhCC10观察氧化修饰反应产物的示意图;氧加成至甲硫氨酸,硝基加成至酪氨酸,形成羰基是与DNPH反应的。

[0101] 图21:通过转谷氨酰胺酶修饰rhCC10。用TG2+4.5mm的钙的rhCC10与两种不同的生物素化胺化合物体外反应的蛋白印迹。该反应在25mM Tris/150mM NaCl pH 8.0下,与1.5mM DTT,在使用5微单元TG2酶,在37℃下进行60分钟完成反应。反应在10-20% SDS-PAGE甘氨酸凝胶上运行,印迹到PVDF膜上,并用链霉亲和素-HRP复合物监测,其确认生物素。所有泳道包含还原剂以消除二硫键。

[0102] 图22:通过修饰rhCC10增强病毒复制的抑制作用。中性红测定指示有和没有通过两株流感的感染及在1mg/ml未修饰和修饰的rhCC10存在下细胞的存活。

[0103] 图23:通过修饰rhCC10增强中性粒细胞的趋化性的抑制作用。PLB-985细胞迁移分化、存在100mcg/ml未修饰rhCC10(CC10-A)、NaOCl修饰rhCC19(CC10-B)、和mCBPA-修饰rhCC10(CC10-C)的迁移分化的荧光测量。

[0104] 发明概要

[0105] 本发明涉及化学和/或酶促修饰合成的分泌球蛋白,以改变或增强与未修饰版本相比的生物或生化特性。化学试剂如活性氧物质(ROS)、和活性氮物质(RNS),或酶,如髓过氧化物酶或转谷氨酰胺酶,用于实现所述氨基酸修饰。加入脂质和其他部分至分泌球蛋白也由TGs介导的。本发明还涉及化学或酶-介导方法的优化,实现氨基酸修饰,以及修饰分泌球蛋白混合物的生化和物理特征,及个体分泌球蛋白亚型的分离和表征。本文中的术语“亚

型”是指一种分泌球蛋白单体,二聚体,或其它多聚体复合物,其中包含至少60个氨基酸长度的单体单元,但优选全长单体是至少75%与如图1中所示的氨基酸序列相同,包含一个或多个化学修饰的氨基酸。生物特性,包括但不限于,在化学修饰的分泌球蛋白混合物和亚型中可改变或增强病毒复制的抑制作用和中性粒细胞趋化性的抑制作用。

具体实施方式

[0106] 通过ROS,RNS的分泌球蛋白的修饰,及酶促活性如MPO和TG2没有被详细研究过。初步报告表明,天然CC10在体内急性炎症反应如在呼吸窘迫期间修饰,从而产生迄今确定交叉反应性抗CC10抗体和等电点与未修饰的CC10($p_i \sim 4.8$)不同的新亚型,这是生物流体样本中的主要形式。它也被报道,CC10是体外组织转谷氨酰胺酶的底物。除了稳定的多聚体和控制访问中央疏水空腔的Cys残基的作用,存在用于任何氨基酸中任何分泌球蛋白氧化没有已知的生理作用。我们认为,Cys和Met的残基可逆氧化是一种保护性的生理机制,CC10和其它分泌球蛋白能够从局部的环境清除有害ROS,从而在炎症反应期间备用组织。我们还认为,含有Cys和Met残基分泌球蛋白氧化状态会影响生化和生物特性,但并不代表蛋白质损伤,其导致功能丧失,而是对氧化分泌球蛋白的特性和功能进行调制。同样地,氧化和/或酶促修饰其他分泌球蛋白氨基酸如酪氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、精氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、和色氨酸不代表蛋白质损害,而是调制生化和生物学特性,使其不同的或增强活性。

[0107] 大多数已知的,具体的ROS,RNS,及MPO介导的氨基酸修饰与蛋白质损伤和功能丧失相关。氧化蛋白的积累与疾病和衰老过程(Berlett and Stadtman,1997)然而,识别可逆氧化正在成为一个监管机制,改变蛋白质功能,而不仅仅是破坏失活蛋白一种形式。所有八种人分泌球蛋白含有Cys残基,被认为是自然氧化状态,二硫键之间的保守的半胱氨酸残基存在的N-和C-末端稳定同质和异质二聚体,四聚体,和更高的多聚体。在分泌球蛋白所有半胱氨酸可能易于氧化及形成分子内或分子间二硫键,特别是呼吸分泌球蛋白、CC10、SCGB3A1和SCGB3A2。在CC10N-和C-末端Cys之间的二硫键在否则二聚体将分裂成单体的条件下当然稳定同型二聚体,如在非还原SDS-PAGE的条件。同样,SCGB3A2的内部Cys(Cys60序列如图1中所示)在体外稳定同型二聚体。没有特别的功能是归因于二聚体与单体或CC10或SCGB3A2的其他多聚体。然而,由于CC10和SCGB3A2都在体外自发无氧化剂的任何要求形成同型二聚体,它尚未能够评价其它形式与二聚体在生化特性或生物活性的差别。尽管在任何给定的水性环境下单体和二聚体之间有一个平衡及可以改变缓冲液条件有利于单体和/或四聚体相对于二聚体的更高的百分比,但是这些同二聚体在体外非常稳定。尽管该二聚体是给药于人类和动物的初始形式,许多可还原和非还原形式可以从生物流体来回收(Antico,2006)。生理上,在体内的谷胱甘肽氧化还原体系在肺部可能介导了呼吸分泌球蛋白和其它可能在肺部中找到的分泌球蛋白的二硫键的可逆氧化。

[0108] CC10的生理作用已被认为被认为是清除可以占据或结合到中央的疏水空腔的有毒的或有害的疏水基团从而从局部组织环境中除去(Peter,1992;Hard,1995;Umland,1992;1994)。在每个CC10二聚体单体组分的Cys残基之间的二硫键(Cys3和Cys69)被认为像一个门由Cys残基的可逆氧化打开和关闭形成和打破二硫键以允许疏水部分进入中央疏水空腔,然后捕获它。一些研究报告体内CC10配体诸如多氯联苯和孕激素的强结合假定,二聚

物内及特定残基例如Phe6和Tyr21的稳定配体结合(Callebaut, 2000)。

[0109] 所有分泌球蛋白含有相当比例的易于氧化和酶促氨基酸修饰的氨基酸。CC10的每70个氨基酸单体共包含42种氨基酸(超过70个; $>50\%$),在表1中列出,可以通过涉及ROS和RNS的生理方法被氧化,造成可能释放大量的ROS和RNS的反应产物,又名亚型。TG也可通过他们的谷氨酰胺、赖氨酸和半胱氨酸残基将脂质或其它部分连接至分泌球蛋白,不仅仅是将分泌球蛋白交联其他蛋白质。如以下实施例所示,这里我们发现的是rhcc10的案例,其中氧化和酶促修饰产生可以分离并表征的多种亚型。含有氧化修饰rhCC10制剂也介导病毒复制和中性粒细胞趋化性的抑制作用的增强,代表在现有未经修饰的CC10药物制剂显著的改善。此外,使用rhCC10制剂体外修饰作为标准来评估包含CC10亚型在内,或从生物样品中分离,使天然CC10亚型的评估作为在慢性疾病和急性病症下肺状态的生物指标。因此,在不存在氧化或酶促氨基酸修饰时,分泌球蛋白可能对特定细胞类型没有影响,但修饰后具有不同的效果,因为修饰激活或禁止结合到细胞表面受体、细胞信号分子、脂质、配体、结构蛋白、或其它胞内或胞外组分。由于氧化和/或酶促氨基酸修饰在分泌球蛋白的生物化学和生物学特性上的影响,因此,开辟了在介导药理作用上以前不可能使用未修饰制剂时使用修饰分泌球蛋白的新的可能性,以及用作标准以评价天然分泌球蛋白新的亚型作为不同患者疾病状态下的生物指标,包括,但不限于患有癌症、呼吸疾病、自身免疫性疾病、急性或慢性感染、过敏、代谢性疾病、心血管疾病、血液病、和暴露于烟雾、化学污染物、毒素或其他损害的患者。

[0110] 实施例

[0111] 实施例1:通过ROS:次氯酸钠(NaOCl)的rhCC10的化学修饰

[0112] 每个反应启动在 $\sim 4^{\circ}\text{C}$ (冰上),NaOCl(9.2 μl ;0.05%水溶液,62.1nmol,5当量)加入至10mM磷酸盐缓冲液,pH值7.4或普通水的蛋白质溶液(0.2mg,12.42nmol)中,短暂混合并在暗处冰上孵育15分钟(总体积0.2ml)。该反应通过加入L-甲硫氨酸(9.3 μl ;10mM在水中,93.15nmol)淬灭,然后孵育20分钟并温热至室温。

[0113] 几个反应用范围为1-100的氧化剂的当量(“氧化剂当量”)进行。使用HPLC监测rhCC10的氧化进行,其中新的修饰亚型出现了新的HPLC峰,比未修饰rhCC10较早洗脱,如图2所示。反应通过SpeedVac浓缩,然后在水中重悬。每次大约25 μg 样品注射到HPLC柱(VYDAC聚合C18柱300 $\text{\AA}$ 5 μm ,2.1mm $\times$ 250mm,Cat#218TP52)在Agilent1100系统上使用的移动相如下:A:水;B:95%乙腈+5%水(均含有0.1%TFA)以0.3mL/min的流速。输出通过在214nm处UV吸收监测。

[0114] NaOCl氧化剂当量数的增加增加了rhCC10亚型的数量以及峰高,表明每种亚型的数量随着反应的进行增加。在20氧化剂当量,HPLC表明所有的未修饰rhCC10基本上不见了,只有修饰亚型依然存在。这些制剂的SDS-PAGE在还原条件下显示出如预期的单体蛋白质(6kDa),但也显示出二聚体($\sim 12\text{kDa}$),四聚体($\sim 24\text{kDa}$),六聚体($\sim 32\text{kDa}$),和其余的更高多聚体残留带,如图3所示。这是由CC10形成的四聚体及在不存在转谷氨酰胺酶活性的还原SDS-PAGE条件下稳定的第一次报道。单体的存在和优势表明对于rhCC10氨基酸序列大量是完整的。甚至在100氧化剂当量下,虽然大多数蛋白质缺失,似乎被多氧化当量破坏,但是在SDS-PAGE上也有微弱CC10单体、二聚体、四聚体、及较高的多聚体带。

[0115] 修饰和未修饰rhCC10与C-18柱的相互作用反映在蛋白质和层析树脂之间的疏水

作用力。修饰后的亚型洗脱比未修饰的rhCC10更快,这表明修饰蛋白表面上的氨基酸残基比未修饰蛋白质的疏水性低。表面疏水性模式的变化可能与表面电荷变化相一致,这可以通过等电点来测量。样品用pH 3-7等电聚焦凝胶通过等电聚焦分析,如图4所示。有一个在 p_i 逐步转向更多的酸性亚型小于4.5。在具有2和5当量消失在20当量的反应中还有一个在 $p_i \sim 5.5$ 的带,可以代表反应中间体。这些反应的分析由IEF凝胶的蛋白印迹表明,所有的酸性的NaOCl亚型 <4.5 由兔多克隆抗rhCC10抗体确认,如图5所示,然而,四聚体没有通过多克隆抗rhCC10抗体识别。

[0116] rhCC10的化学反应和修饰程度可以通过反应性羰基的检测来估计。在ROS-反应的rhCC10样品中羰基的存在可通过用2,4-二硝基苯肼(DNPH)标记的羰基来检测,它增加了一个二硝基苯腙基(DNP),然后使用抗DNP抗体通过蛋白印迹分析该反应产物,如图6所示。无论ROS反应中使用的类型,在未修改CC10中有单体和四聚体的基线信号(泳道8),它超过了所有其它样品。因此,所有的ROS反应产生了一些含有羰基的物种。未修饰的二聚物和二聚物在MP0中和加入mCPBA修饰制剂显示没有反应性,甚至堵塞了背景(参见泳道2,3和8中二聚体位置上的“鬼带”)。在NaOCl反应中rhCC10浓度和缓冲液似乎有一种组合效果。在泳道4中的信号强度比泳道5大10X,这比目前蛋白中预期的2倍差异更大。这表明反应在水中进行时更高rhCC10浓度提供了一种比低浓度时更广泛的反应。尽管泳道7含有一半的蛋白质,在泳道4和7中的信号强度是相等的,这表明该反应在10mM磷酸盐缓冲液, pH 7.4中比在水中更高效的。尽管该蛋白质的相同量存在,在泳道6中的信号强度比在泳道7低得多。这些观察表明, rhCC10浓度较低在缓冲液存在时该NaOCl反应是更有效的。因此,在水和缓冲液中rhCC10浓度对反应效率的影响是相反的。这些差异说明如何用NaOCl的rhCC10化学修饰的工艺优化。例如,对于NaOCl介导CC10的化学修饰的优化方法将涉及在低强度的磷酸盐缓冲液的存在中性pH中使用较低浓度的rhCC10。

[0117] 实施例2:通过ROS:mCPBA的rhCC10的化学修饰

[0118] 每个反应启动在 $\sim 24^\circ\text{C}$ (室温),间-氯苯甲酸(mCPBA)($6.21\mu\text{l}$; 2mM水溶液, 12.42nmol , 2当量)加入至蛋白质水溶液(0.1mg , 6.21nmol)中,在暗处 24°C 偶尔搅拌孵育15分钟(总体积 0.2ml)。该反应通过加入L-甲硫氨酸($1.8\mu\text{l}$; 10mM在水中, 18.6nmol)淬灭,然后在 24°C 孵育20分钟。几个反应应用的mCPBA的氧化剂当量范围从2-100进行。

[0119] 使用HPLC监测rhCC10的氧化进行。反应通过SpeedVac浓缩,然后在水中重悬。每次大约 $25\mu\text{g}$ 样品注射到HPLC柱,与的NaOCl反应。新的修饰亚型出现了新的HPLC峰,比未修饰rhCC10较早洗脱,如图7所示。mCPBA反应的等电聚焦,如图8所示,表明生成了多个新的亚型,包括新亚型的 p_i 4.5-5.2范围内的簇(4.6、4.7、4.9、5.1、5.2),两种亚型在5.3以上($\sim 5.5, \sim 5.8$),一个亚型低于4.5(4.3 $\sim$)。这些额外的8个带与原来未修饰rhCC10不同,在 P_i 4.8有一主带和在4.65有一小带。反应优化的重要参数是温度。该反应的温度, 4°C 对 21°C ,并没有影响到产品或每个产品的表现比重。IEF凝胶的蛋白印迹,如图9所示,证明了大多数的这些亚型是通过兔多克隆抗体对抗rhCC10确认的。但是,像由NaOCl反应所产生的四聚体,在 p_i 4.3的带没有通过抗rhCC10抗体确认,表明当mCPBA使用当量10时该蛋白质的结构被显著改变。根据IEF凝胶染色的强度,在主要免疫反应带为4.8的下面的亚型,也表现出比预期更少的信号。反应条件的进一步分析表明, CaCl_2 的存在阻止rhCC10修饰mCPBA(图10, 泳道2),即100当量的mCPBA完全消除了所有的原始未修改的蛋白质只留下更多的酸性亚型

(Pis 4.0、4.3、4.5;泳道4),及如果反应过长,rhCC10被破坏(泳道3)。

[0120] 为了进一步表征mCPBA反应中产生的CC10亚型,每个蛋白质样品收集8个分离的HPLC主峰(编号为1-8),用SpeedVac浓缩,并通过重复HPLC来验证表示单峰;例如峰3,如图11所示。然后将样品通过电喷雾质谱(ESI-MS)分析,得到每个亚型的分子量。表2示出了含有个体HPLC峰的亚型的质谱分析的结果。所有CC10亚型比未修饰的形式有较大的分子量(MW),其具有16,110道尔顿(Da)。加成一个氧的添加16Da。mCPBA反应是在修饰其它氨基酸之前氧化甲硫氨酸残基的。这是明确的,因为8个峰的平均质量5通过倍数16增加(例如,峰2、4、5、6、和8)。峰3没有通过倍数16增加;此峰含有二聚体,其中氧的平均数目是5.25或可表示比简单氧气的成更复杂的修饰。峰1和7没有产生可用质谱。

[0121] 表2:分离mCPBA CC10亚型的质谱分析

峰编号	质量 (道尔顿)	质量变化 (道尔顿)	增加氧原子 数
1	没得到		
2	16206.5	+~96	6
3	16194	+~84	5.25
4	16190.7	+~80	5
5	16174.1	+~64	4
6	16173.5	+~64	4
7	没得到		1
8	16125.1	+~16	

[0123] 实施例3:通过ROS:髓过氧化物酶(MPO)和过氧化氢(H₂O₂)的rhCC10的化学修饰

[0124] 通过MPO加H₂O₂的rhCC10的修饰用HPLC监控。在观察到任何CC10修饰之前rhCC10与MPO-H₂O₂的反应需要大量的优化。初始反应在磷酸盐缓冲盐水(PBS),pH 7.4中进行,不存在氯化钙(CaCl₂)时反应是不成功的。在呈中性pH的磷酸盐缓冲液中随MPO和过氧化氢量的增加,新的HPLC峰的数目和高度达到非常温和增加。然而,pH值用柠檬酸盐缓冲液降低到5和加入CaCl₂剧烈增加了CC10反应产物,可检测到新的HPLC峰,如图12所示。一旦加入钙和将pH值优化,MPO和H₂O₂氧化当量的量重新优化及可再现的HPLC峰图谱呈现出明显可观察到的MPO-和H₂O₂-浓度和时间依赖性峰进展。简要地说,蛋白质溶液(0.1mg,6.21nmol)在2mM CaCl₂和10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 5)中在黑暗中孵育30分钟。反应在37℃下通过加入MPO(2.5μl;10μg/ml在水中,25ng)和H₂O₂(1.55μl;100mM在水中,155.25nmol,25当量)启动,并在黑暗中孵育30分钟在37℃下偶尔搅拌。另一等分MPO(25ng)和H₂O₂(1.55μl)的溶液加入并孵育另外30分钟,在该温度下搅拌(总体积0.2ml)。该反应通过加入L-甲硫氨酸(4.66μl;0.1M在水中,0.466μmol)淬灭,并在37℃孵育30分钟。使用HPLC监测rhCC10的氧化进行。反

应通常在SpeedVac中浓缩,然后在水中重悬。每次大约25 μ g样品注射到HPLC柱,与的NaOCl和mCPBA反应。修饰亚型出现了新的HPLC峰,比未修饰rhCC10较早洗脱,如图13所示。

[0125] MPO和H₂O₂反应的等电聚焦,如图14所示,显示只产生2类亚型具有变化等电点,包括一种亚型在5.5,及一个或多个亚型低于4.7。未修饰CC10有时会在IEF凝胶出现在4.8的一主带加在4.7的一小带(可能分别为二聚物和单体)。凝胶装载有25mcg每个制剂,使不会错过小带。因此,通过HPLC观察到的多个峰(n=8)与IEF上新带的数目(N $\geq$ 2)不匹配。这表明,显著地,在疏水性相互作用的基础上通过HPLC分离的至少6种亚型保留于未修改CC10相同的表面电荷。相同的IEF凝胶的蛋白印迹,如图15所示,证明这些pI 4.8亚型通过兔多克隆抗体对抗未修饰rhCC10确认。

[0126] 为了进一步表征在MPO-H₂O₂反应中产生的CC10亚型,每个蛋白质样品收集8个分离的HPLC主峰(编号为9-17),用SpeedVac浓缩,并通过重复HPLC来验证表示单峰;例如峰10,如图16所示。然后将样品通过电喷雾质谱(ESI-MS)分析,得到每个亚型的分子量。表3示出了MS分析的结果。所有CC10亚型比未修饰的形式有较大的分子量(MW),其具有16,110道尔顿(Da)。与mCPBA亚型相对比,没有MPO-H₂O₂亚型表现出分子量增加16的倍数(如:简单加氧)。在测试条件下修饰可以包括添加氧、氯、或其它加合物、以及羰基的形成的一些组合。

[0127] 表3:分离MPO-H₂O₂CC10亚型的质谱分析

峰编号	质量 (道尔顿)	质量变化 (道尔顿)	增加氧原子数
9	没得到		
10	16234.7	124.7	7.79
11	16211.6	101.6	6.35
12	16218.9	108.9	6.81
13	16194.3	84.3	5.27
14	16191.7	81.7	5.11
15	16171.1	61.1	3.82
16	16188.1	78.1	4.88
17	16177	67	4.19

[0130] 实施例4:通过RNS:过氧亚硝酸盐的rhCC10的化学修饰

[0131] 通过过氧亚硝酸盐的rhCC10的修饰用HPLC监控。每个反应启动在 $\sim$ 23 $^{\circ}$ C(室温),市售的过氧化亚硝酸盐试剂(10-100当量)加入至0.1mg蛋白质(总反应体积0.2ml),短暂搅拌并在暗处孵育1小时。反应通常在SpeedVac中浓缩,然后在水中重悬。每次大约25 μ g样品注射到HPLC柱,与其它反应。新的修饰亚型出现了新的HPLC峰,比未修饰rhCC10较早和较晚

都洗脱,如图17所示。四个新主要的峰是明显的,用10个当量,除了一个峰在与未修饰CC10相同的保留时间洗脱。使用超过20当量导致峰丢失,拓宽成一个长凸点集中在一个点,洗脱略早于未修改CC10。这种广泛的凹凸图谱表明,产生了大量的修饰和亚型。由于HPLC峰分辨率的损失,10当量是在进一步的实验中使用的最大限度。在pH范围从3-6(10mM柠檬酸盐缓冲液)中进行进一步的优化,具有和不具有2mM CaCl_2 如图18所示。对比 $\text{MPO-H}_2\text{O}_2$ 和mCPBA,其中钙和pH是对反应一个显著效果,对过氧亚硝酸盐的反应产物没有明显的影响。

[0132] 每个CC10单体包含单个酪氨酸,这些结果表明在RNS存在下易受硝化。随与过氧亚硝酸盐反应的进行,分子间键可以在不同的单体形成二-酪氨酸复合物。由过氧亚硝酸盐的反应中产生的亚型大部分是完整的CC10,具有较大的共价连接的复合物,如图19中的SDS-PAGE的蛋白印迹所示。CC10过氧亚硝酸盐反应在1~10%的SDS-PAGE甘氨酸凝胶非还原条件下进行,将其印迹到PVDF膜上,用4%脱脂乳堵住,并用兔多克隆抗硝基酪氨酸抗体探测。该印迹显示了免疫反应CC10二聚体、四聚体、以及较高分子量的复合物“污斑”,探测CC10单体中的酪氨酸残基易受修饰。酪氨酸硝化不会破坏二聚体或四聚体的稳定性。此图谱还表明酪氨酸硝化利于形成大复合物,可能是由两个二-酪氨酸和二硫键连接在一起的形成,但不产生在没有二-酪氨酸时通过简单的二硫键的重排达到热力学上是有利的多聚形成的不同的组。

[0133] 实施例5:通过转谷氨酰胺酶的CC10的修饰

[0134] CC10被证明是组织型转谷氨酰胺酶(又名TG2)的一种体外底物(Manjunath, 1984),及是通过谷氨酰胺和赖氨酸残基交联本身和其他蛋白质。使用生物素连接于两个不同的单胺的组进行谷氨酰胺在子宫珠蛋白作为酰基供体/胺受体的可用性的测定。纯化豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶和单胺生物素试剂;5-(烟酰胺)戊胺和(+)-生物素基-3,6-二氧杂辛二胺;从商业供应商购买。该反应在25mM Tris/150mM NaCl pH 8.0与1.5mM DTT中的进行。在适用情况下, CaCl_2 以4.5mM的终浓度使用。钙是谷氨酰胺和赖氨酸残基交联的必需的Tg辅助因子。在不存在钙和还原剂下,TG2介导的二硫键重排在CC10,导致形成多聚体的可用还原剂还原的“梯子”(未示出)。蛋白质和关注的胺在缓冲液中在有钙或没有钙下结合以测定0.1ml的体积。在转谷氨酰胺酶加入之前,样品在37℃下预培养30分钟。EDTA以50mM的终浓度加入到无钙样品机充当阴性对照。转谷氨酰胺酶预培养5μU后加入各个管中,使反应继续在37℃下进行60分钟。60分钟后的EDTA(50mM)加入到含钙管中以终止反应。100μl SDS样品缓冲液加还原剂(1mM的DTT)加入到各反应中,然后将其在SDS-PAGE凝胶上分离之前加热至95℃10分钟。将该凝胶印迹到PVDF膜上。阻挡用5%BSA(通过2微米的膜过滤)在室温下进行1小时。在孵育之间用PBS-Tween(0.4%)完成清洗。生物素基团在带标记的蛋白质(多个)上通过用链霉抗碱性磷酸酶结合物孵育进行检测。用比色试剂(NBT/BCIP)进行可视化,如图21所示。结果表明,在CC10上的谷氨酰胺和赖氨酸都是TG2反应的酰基供体和酰基受体。该反应是钙依赖性,并通过与螯合剂的除钙废止。非还原的高分子量带表明CC10含有至少两个反应性谷氨酰胺-赖氨酸对,由于高分子量的带代表每个复合物用至少一个谷氨酰胺-胺生物素胺交联CC10(例如,一个单一的单体是即标记有生物素标记又交叉连接到至少一个其它单体)。这还示出部分,例如标签、化学制品、脂类、和含有伯胺基团的肽可在钙和还原剂存在下使用TG2被添加到rhCC10同时含有巯基的其他部分在不存在还原剂下可以使用的TG添加到rhCC10。

[0135] 实施例6:对比未修饰rhCC10通过修饰rhCC10增强流感复制的体外抑制作用

[0136] 为了确定修饰对rhCC10的活性的影响,通过结合等份与NaOCl、mCPBA、MPO+H₂O₂、和过氧亚硝酸盐反应的rhCC10构建修饰rhCC10的单一的池。每个反应的HPLC峰均表示在池中。修饰和未修饰rhCC10制剂稀释为八个半对数MEM溶液中的稀释液,具有现有样品可用性的尽可能高的浓度。每种稀释液加至具有80-100%的融合MDCK细胞的96孔板的5个孔中。三个孔的每种稀释液感染了病毒(H1N1或H5N1),及两个孔仍然未感染作为毒性对照。每种病毒感染的复数(MOI)为0.1~1.0之间。培养基为有10单位/ml的胰蛋白酶的MEM溶液。未处理病毒对照孔达到最大致细胞病变效应(CPE)后,然后将板用中性红染料染色约2小时,然后上清液染料从孔中除去,及掺入的染料在50:50索伦森柠檬酸盐缓冲液/乙醇中萃取,然后在540nm的光密度上读取分光光度计。中性红染料吸收至活细胞,并用作病毒感染后剩余的细胞的度量。结果示于图22。令人惊讶的是,经修饰的rhCC10制剂证明针对两株流感将增强抗病毒活性而非通常氧化蛋白质修饰的结果功能丧失。

[0137] 实施例7:对比未修饰rhCC10通过修饰rhCC10增强中性粒细胞趋化性的体外抑制作用

[0138] 人PLB-985细胞是可在体外基本上分化成成熟的人嗜中性粒细胞的未成熟粒细胞白血病细胞系(Pedruzzi, 2002)。分化的PLB-985细胞可被用作从在中性粒细胞功能测定法外周血中分离的实际人中性粒细胞的替代物,如响应于各种刺激的趋化性,包括fMLP。fMLP的是甲酰化肽(Met, Leu, Pro),其仅由细菌产生及是细菌过度生长的在主体上的信号,即引发一种强效的抗炎反应,包括沿朝向fMLP的源的浓度梯度的中性粒细胞的迁移。未修饰和修饰rhCC10都被评价为在该模型中分化PLB-985(dPLB-985)的抑制剂。

[0139] 细胞生长在含有10%FBS, 100U/ml青霉素,和100μg/ml链霉素,在37℃在5%CO₂的潮湿气氛的RPMI 1640培养基中。为了诱导分化成成熟嗜中性粒细胞表型,PLB-985细胞在培养基每次实验前添加有300μM联丁酰基环状AMP培养3天。分化的PLB-985细胞以10⁷细胞/ml重新悬浮在含有10%FBS(RPMI/FBS)的RPMI-1640(无酚红)。将细胞用5pg/钙黄绿素-乙酰甲酯,在37℃下预孵育30分钟在黑暗中恒定搅拌。然后将细胞洗涤并以2×10⁶细胞/ml重新悬浮在RPMI/FBS中。所述dPLB-985细胞用100mcg/ml rhCC10制剂或PBS(50%)在37℃下孵育60分钟。使用96孔ChemoTX一次性趋化系统(神经探针)监测细胞迁移。该板的下室的孔中充满了32μl 10⁻⁸M的fMLP。聚碳酸酯过滤器(3μM)被定位在板上,并dPLB-985细胞(30μl; 60000个细胞/孔)置于过滤器上,并使其120分钟在37℃下,在存在5%CO₂黑暗中迁移。尚未迁移的细胞通过用组织轻轻擦拭过滤器移除。

[0140] 用分别使用的485和530nm的激发和发射波长的微孔板荧光阅读器,将细胞在过滤器中的荧光测定。通过将它们放置在底室及产生标准曲线(图23,板B),获得从已知的号码dPLB-985的荧光。图23显示了未修饰rhCC10(CC10-A),轻度抑制嗜中性粒细胞的迁移响应于fMLP的,而NaOCl修饰rhCC10(CC10-B)和mCPBA修饰rhCC10(CC10-C)都抑制嗜中性粒细胞迁移到显著更大的程度。令人惊讶地发现,这些反应增强rhCC10活性,而不是造成氧化修饰经常的结果典型的功能损失。

[0141] 定义

[0142] 分泌球蛋白:一类蛋白质,包括CC10家族中的人和非人蛋白质,具有保守的四螺旋束模体及从大小范围为约50-100个氨基酸长度。人分泌球蛋白如图1所示。

- [0143] 合成分泌球蛋白:一种分泌球蛋白,由化学或重组方法制备,而不是从天然来源中分离。
- [0144] 未修饰分泌球蛋白:一种分泌球蛋白单体、二聚体、或其它多聚体,不含有化学或酶促修饰的氨基酸残基,除了在同型二聚体和异型二聚体的半胱氨酸残基之间自发产生二硫键。
- [0145] 未修饰CC10蛋白:一种CC10单体、二聚体、或其它多聚体,不含有化学或酶促修饰的氨基酸残基,除了半胱氨酸残基之间的二硫键。
- [0146] 修饰分泌球蛋白:一种分泌球蛋白单体、二聚体、或其它多聚体,含有一个或多个化学或酶促修饰的氨基酸残基。
- [0147] 修饰合成的分泌球蛋白:一种合成的分泌球蛋白单体、二聚体、或其它多聚体,含有一个或多个化学或酶促修饰的氨基酸残基。
- [0148] 修饰CC10:一种CC10单体、二聚体、或其它多聚体,含有一个或多个化学或酶促修饰的氨基酸残基。
- [0149] 修饰重组人CC10:一种CC10单体、由重组DNA方法制备,及含有一个或多个化学或酶促修饰氨基酸残基。
- [0150] 修饰合成CC10:一种CC10单体、由重组DNA方法或化学肽合成方法制备,及含有一个或多个化学或酶促修饰氨基酸残基。
- [0151] 修饰氨基酸残基:一种蛋白质的氨基酸,在其侧链已被修饰,从最初的蛋白质翻译完成时存在形式。20种天然未修饰的氨基酸的化学结构在蛋白质中发现可以在任何生化教科书中找到。
- [0152] 羰基:氨基酸侧链上的醛基或酮基。
- [0153] 缩写
- [0154] CC10:Clara细胞10kDa蛋白质,又名CC16、CCSP、子宫珠蛋白、尿蛋白1
- [0155] SCGB:分泌球蛋白
- [0156] RNS:活性氮物质
- [0157] ROS:活性氧物质
- [0158] MPO:髓过氧化物酶
- [0159] iNOS的:细胞内的一氧化氮合成酶
- [0160] mCPBA:间-氯苯甲酸
- [0161] DNP:2,4-二硝基苯胺
- [0162] DNPH:2,4-二硝基苯肼
- [0163] HNE:4-羟基-2-反式-壬烯醛(HNE);脂质过氧化产物
- [0164] MDA:丙二醛
- [0165] 虽然本发明已经结合目前被认为是最实用和优选的实施方案进行了描述,但是应当理解,本发明并不限于所公开的实施例,而是,相反,意在覆盖各种修饰和等效布置包括在所附权利要求的精神和范围内。

序列表

<110> 克拉莱森公司 (Clarassance, Inc.)

<120> 人分泌球蛋白的修饰和新型组合物 (Modification and Novel Compositions of Human Secretoglobins Proteins)

<130> 116142/00520

<140> 13/843,773

<141> 2013-03-15

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

[0001] <400> 1

Glu Ile Cys Pro Ser Phe Gln Arg Val Ile Glu Thr Leu Leu Met Asp
1 5 10 15

Thr Pro Ser Ser Tyr Glu Ala Ala Met Glu Leu Phe Ser Pro Asp Gln
20 25 30

Asp Met Arg Glu Ala Gly Ala Gln Leu Lys Lys Leu Val Asp Thr Leu
35 40 45

Pro Gln Lys Pro Arg Glu Ser Ile Ile Lys Leu Met Glu Lys Ile Ala
50 55 60

Gln Ser Ser Leu Cys Asn
65 70

<210> 2

<211> 86
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 2

Ala Ala Phe Leu Val Gly Ser Ala Lys Pro Val Ala Gln Pro Val Ala
1 5 10 15

Ala Leu Glu Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ala Gly Thr Leu Ala Asn Pro
20 25 30

Leu Gly Thr Leu Asn Pro Leu Lys Leu Leu Leu Ser Ser Leu Gly Ile
35 40 45

Pro Val Asn His Leu Ile Glu Gly Ser Gln Lys Cys Val Ala Glu Leu
50 55 60

[0002]

Gly Pro Gln Ala Val Gly Ala Val Lys Ala Leu Lys Ala Leu Leu Gly
65 70 75 80

Ala Leu Thr Val Phe Gly
85

<210> 3
<211> 73
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 3

Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro
1 5 10 15

Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu
20 25 30

Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg
 35 40 45

Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys
 50 55 60

Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
 65 70

<210> 4

<211> 95

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 4

[0003] Ser Gly Cys Lys Leu Leu Glu Asp Met Val Glu Lys Thr Ile Asn Ser
 1 5 10 15

Asp Ile Ser Ile Pro Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp
 20 25 30

Ser Asp Ala Ala Ala Glu Ala Met Gly Lys Phe Lys Gln Cys Phe Leu
 35 40 45

Asn Gln Ser His Arg Thr Leu Lys Asn Phe Gly Leu Met Met His Thr
 50 55 60

Val Tyr Asp Ser Ile Trp Cys Asn Met Lys Ser Asn Met Lys Leu Leu
 65 70 75 80

Met Val Leu Met Leu Ala Ala Leu Leu Leu His Cys Tyr Ala Asp
 85 90 95

<210> 5
<211> 93
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 5

Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys Thr Ile Asn Pro
1 5 10 15

Gln Val Ser Lys Thr Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp
20 25 30

Asp Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu
35 40 45

Asn Gln Thr Asp Glu Thr Leu Ser Asn Val Glu Val Phe Met Gln Leu
50 55 60

[0004]

Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu Phe Met Lys Leu Leu Met Val
65 70 75 80

Leu Met Leu Ala Ala Leu Ser Gln His Cys Tyr Ala Gly
85 90

<210> 6
<211> 90
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 6

Val Val Cys Gln Ala Leu Gly Ser Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ala
1 5 10 15

Gly Lys Pro Val Phe Lys Phe Gln Leu Ala Lys Phe Lys Ala Pro Leu
20 25 30

Glu Ala Val Ala Ala Lys Met Glu Val Lys Lys Cys Val Asp Thr Met
35 40 45

Ala Tyr Glu Lys Arg Val Leu Ile Thr Lys Thr Leu Gly Lys Ile Ala
50 55 60

Glu Lys Cys Asp Arg Met Arg Leu Ser Val Cys Leu Leu Leu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Ala Leu Cys Cys Tyr Arg Ala Asn Ala
85 90

<210> 7
<211> 90
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

[0005]

<400> 7

Glu Phe Cys Pro Ala Leu Val Ser Glu Leu Leu Asp Phe Phe Phe Ile
1 5 10 15

Ser Glu Pro Leu Phe Lys Leu Ser Leu Ala Lys Phe Asp Ala Pro Pro
20 25 30

Glu Ala Val Ala Ala Lys Leu Gly Val Lys Arg Cys Thr Asp Gln Met
35 40 45

Ser Leu Gln Lys Arg Ser Leu Ile Ala Glu Val Leu Val Lys Ile Leu
50 55 60

Lys Lys Cys Ser Val Met Lys Leu Ser Val Cys Leu Leu Leu Val Thr
65 70 75 80

Leu Ala Leu Cys Cys Tyr Gln Ala Asn Ala
85 90

<210> 8

<211> 83

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 8

Leu Cys Cys Tyr Gln Ala His Ala Leu Val Cys Pro Ala Val Ala Ser
1 5 10 15

[0006] Glu Ile Thr Val Phe Leu Phe Leu Ser Asp Ala Ala Val Asn Leu Gln
20 25 30

Val Ala Lys Leu Asn Pro Pro Pro Glu Ala Leu Ala Ala Lys Leu Glu
35 40 45

Val Lys His Cys Thr Asp Gln Ile Ser Phe Lys Lys Arg Leu Ser Leu
50 55 60

Lys Lys Ser Trp Trp Lys Met Arg Leu Ser Val Cys Leu Leu Met Val
65 70 75 80

Ser Leu Ala

蛋白质	氨基酸序列
SCGB1A1 (CC10)	EICPSFQVETILMDTPSSVEAAAMELSPDQDMREAGAQKKLVDLTPQKFPRESIIKLMKIAQSSLCN
SCGB3A1	AAFLVGSARKPVAAQVAALESAAGAGCTLANFLGTLNPKLILLSSLGIPVNHILIEGSQKCVAEIGPQAVGAVRAKALLGALTWFG
SCGB3A2	AFLINKVPLEPVDKLAFLPLDNLILPEMDPLKLLKLTIGISVEHLVEGLRKCVNELGPEASEAVKKLLEALSHLV
SCGB2A1	SGCKLLEDVMEKNTINSDISIPEYKELLQEFIDSDAAAEAMGKFKQCFINQSHRTLKNFGLMMHTVYDSIWCNMKSNMKLLMVLMLAALLLHCYAD
SCGB2A2	SGCPILLENVLSKTIINPQVSKTEYKELLQEFIDNATNAIDELKECFINQDETLNVEVFQMQLIYDSSSLCDLFNKLIMVEMLAALISQHCYAG
SCGB1D1	VVCQALGSEITGELLAGKPVFKFQAKFKAPLEAFAAKMEVKKCVDTMAYEKRVLITKTLGKIAEKCDRMRLSVCLLLLTLLALCCYRANA
SCGB1D2	EFCPALVSELIDFFFISEPLFKLSLAKFDAPPEAFAAKLGKVKRCTDQMSLOKRSLIAEVLVKILKKCSVMKLSVCLLLLVTLALCCYQANA
SCGB1D4	LCCYQAHALVCPAVASEITVTFELFSLDAAVNQLQVAKLNPPPEALAAKLEVKHCTDQISEKKRRLSLKKSWMKRLSVCLLNVSLA

图1:成人分泌球蛋白的氨基酸

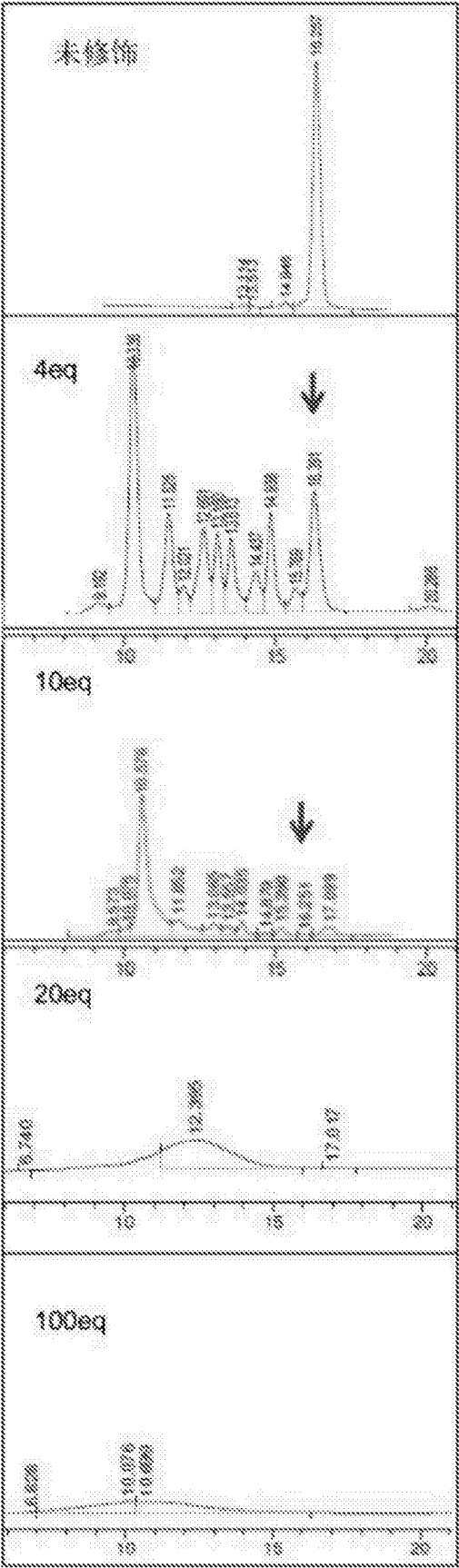


图2:NaOCl氧化产物的HPLC分析

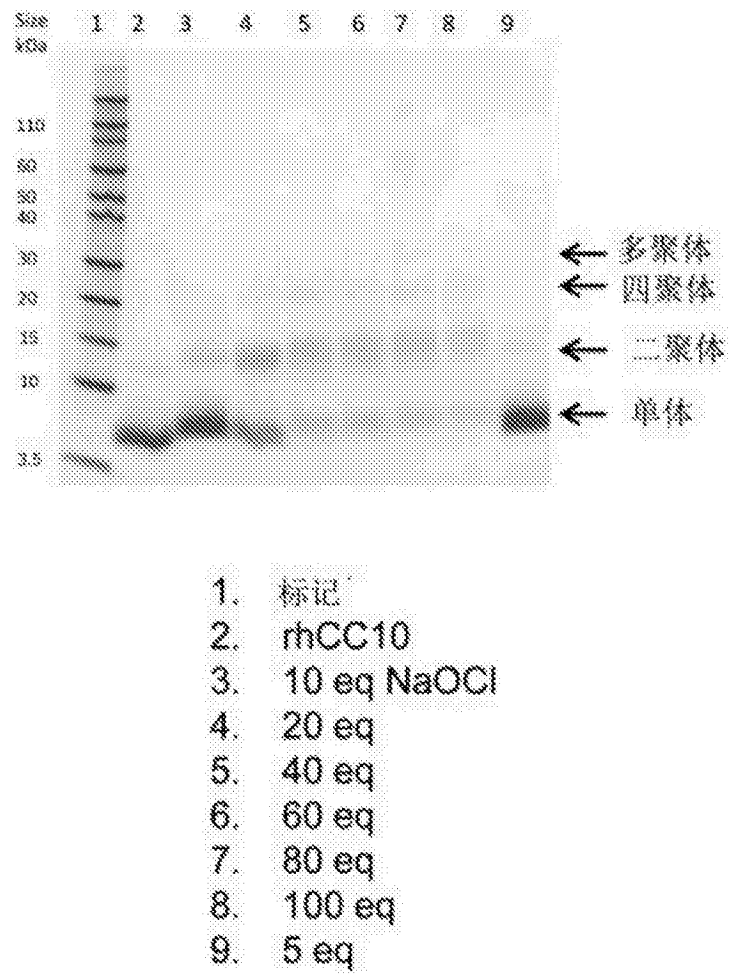


图3 rhCC10 NaOCl反应的SDS-PAGE

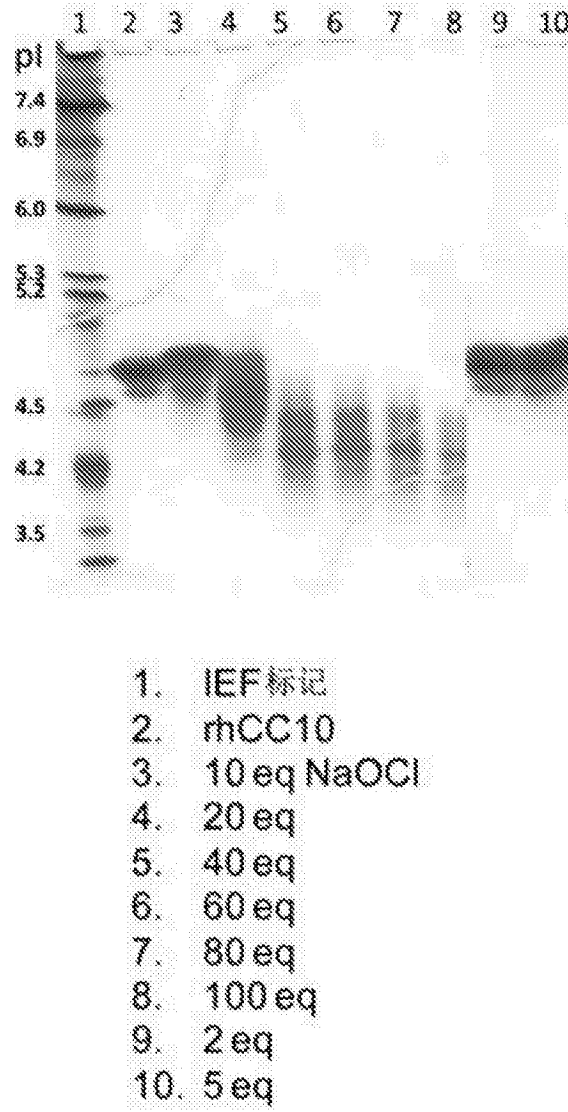


图4 rhCC10 NaOCl反应的等电聚焦

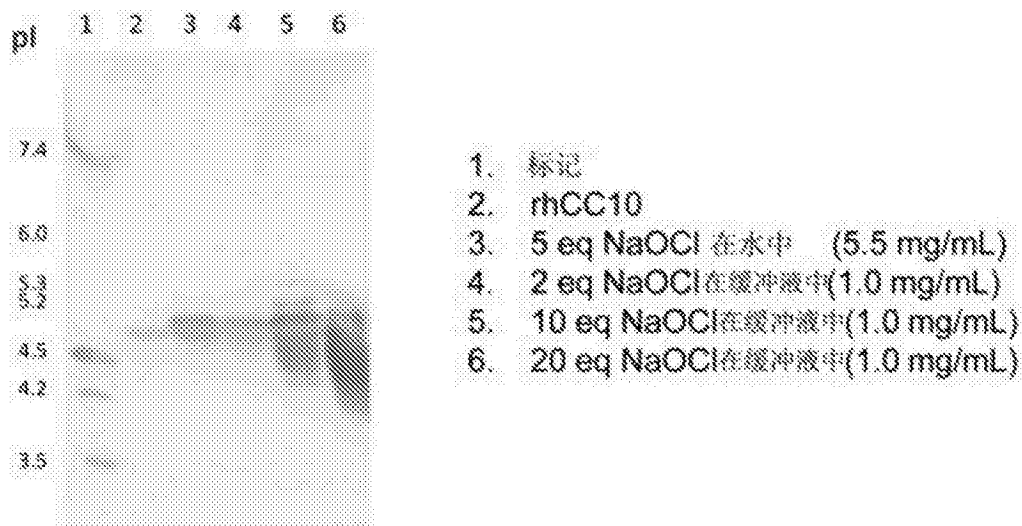
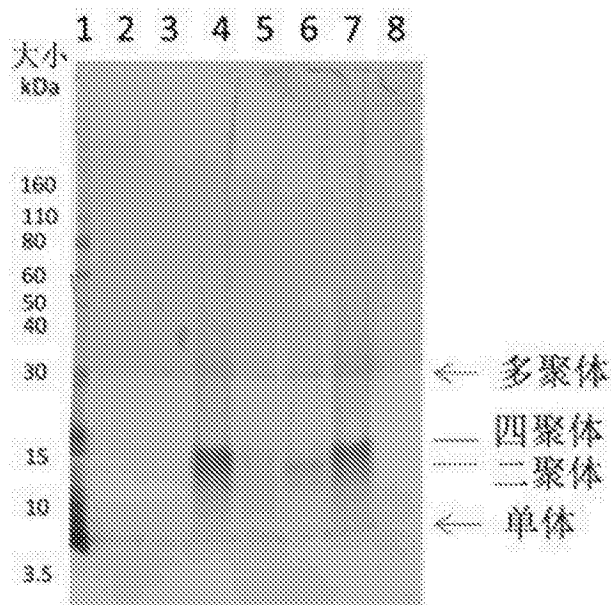


图5使用抗rhCC10抗体的rhCC10 NaOCl反应的IEF凝胶的蛋白印迹



- | | |
|---|--------|
| 1. 标记 | 自动装载 |
| 2. 50 ng MPO+ 50 eq H ₂ O ₂ | 10 mcg |
| 3. 2 eq mCPBA 在水中 (0.5 mg/mL) | 10 mcg |
| 4. 5 eq NaOCl 在水中 (5.5 mg/mL) | 10 mcg |
| 5. 5 eq NaOCl 在水中 (1.4 mg/mL) | 5 mcg |
| 6. 5 eq NaOCl 在缓冲液中 (2.7 mg/mL) | 5 mcg |
| 7. 5 eq NaOCl 在缓冲液中 (0.7 mg/mL) | 5 mcg |
| 8. rhCC10 | 5 mcg |

图6使用抗DNP抗体的DNPH处理的rhCC10 NaOCl反应的蛋白印迹

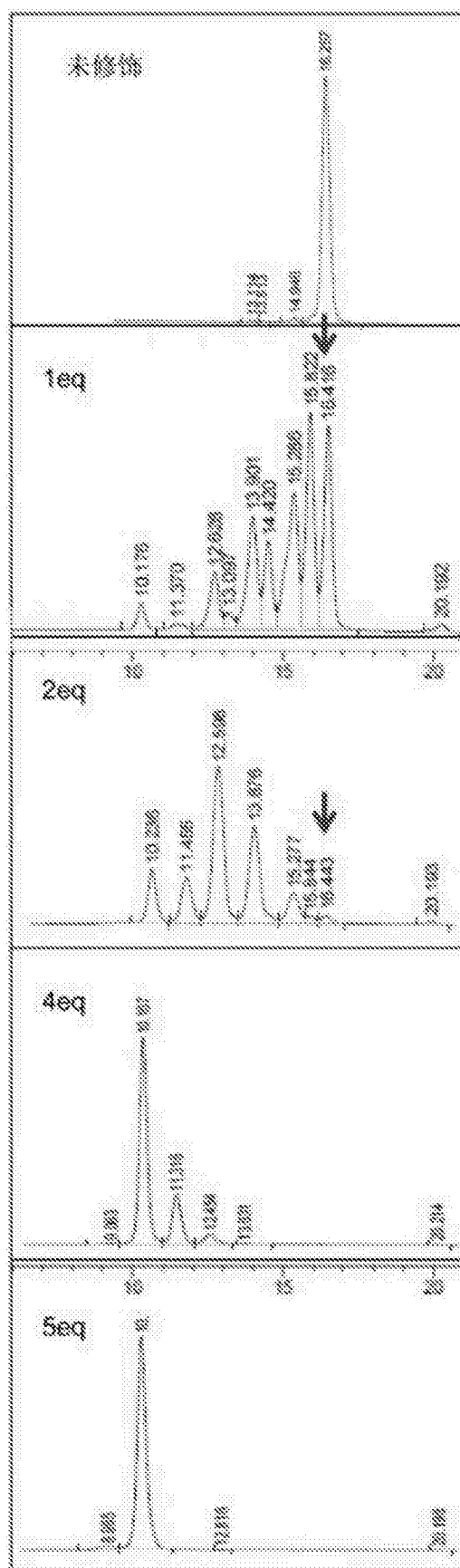
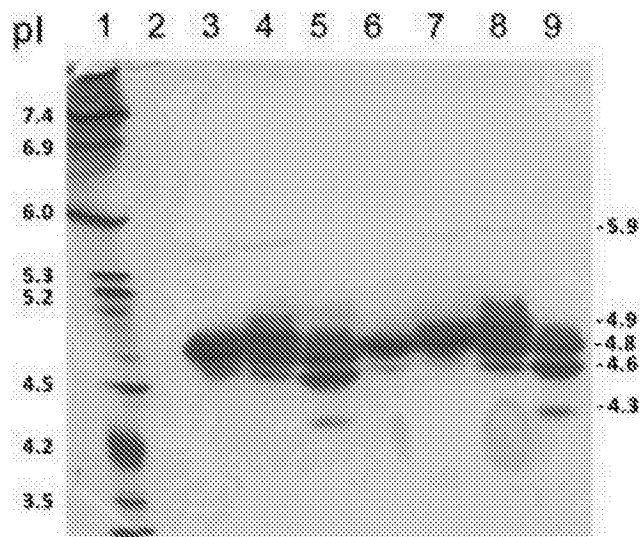


图7:mCPBA氧化产物的HPLC分析



1. 标记
2. 空白
3. 2 eq mCPBA; 4°C
4. 5 eq mCPBA; 4°C
5. 10 eq mCPBA; 4°C
6. rhCC10
7. 2 eq mCPBA; 21°C
8. 5 eq mCPBA; 21°C
9. 10 eq mCPBA; 21°C

图8:rhCC10 mCPBA反应的等电聚焦

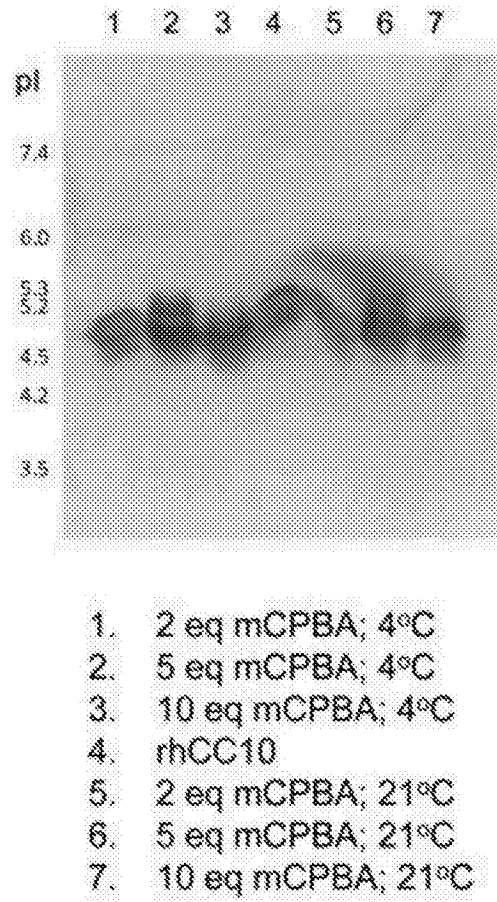
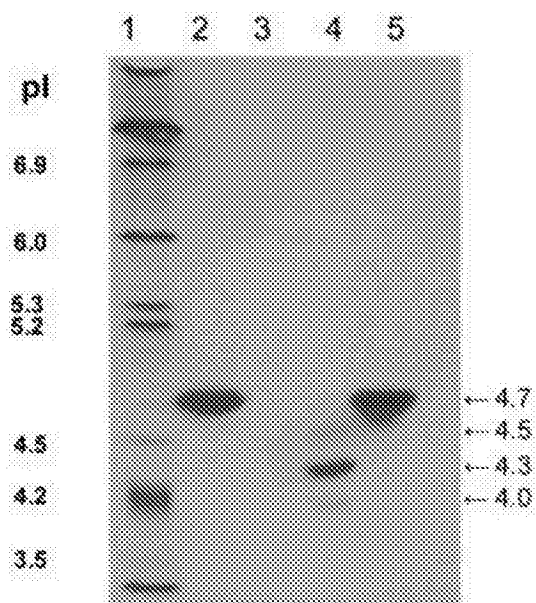


图9使用抗rhCC10抗体的rhCC10 mCPBA反应的IEF凝胶的蛋白印迹



1. IEF 标记
2. 2 eq mCPBA, with CaCl_2 , 15 min
3. 100 eq mCPBA, 9 days
4. 100 eq mCPBA, 15 min
5. rhCC10

图10 rhCC10 mCPBA反应的等电聚焦;附加条件

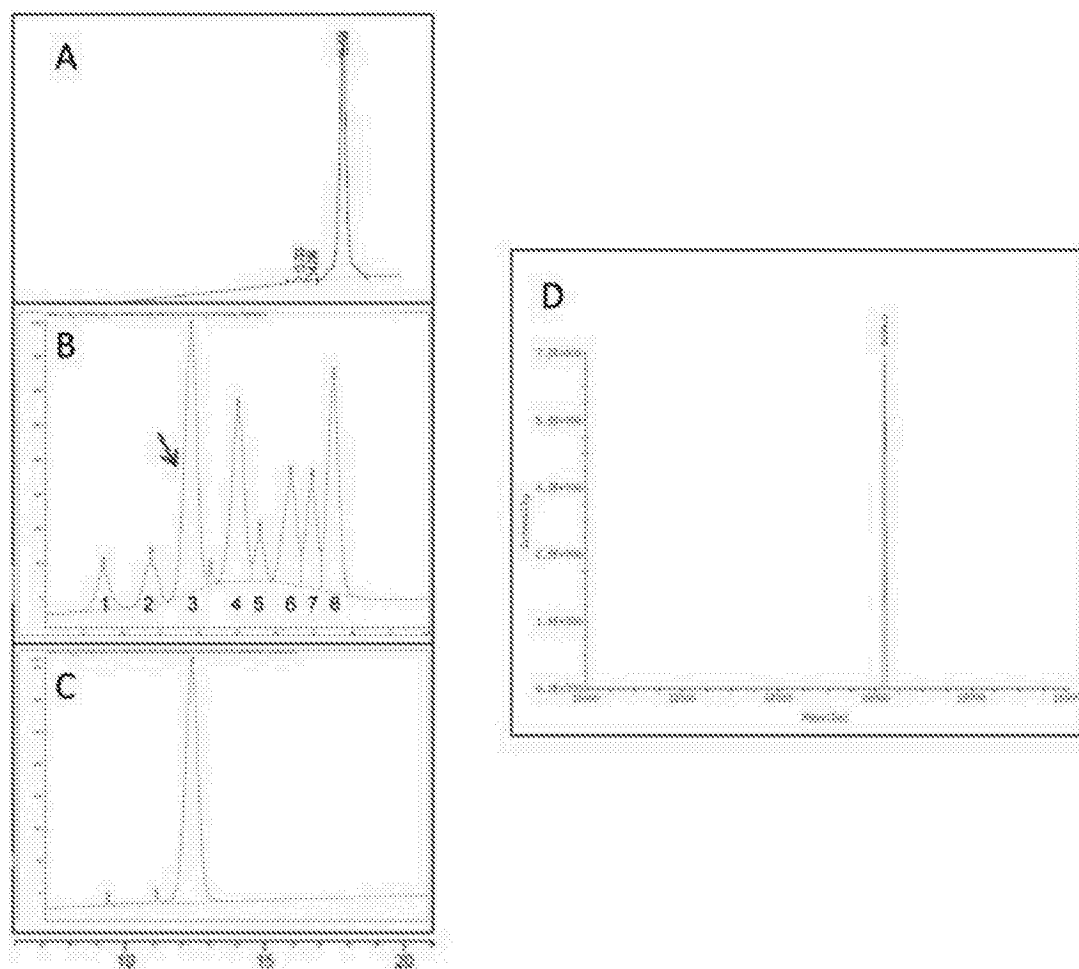
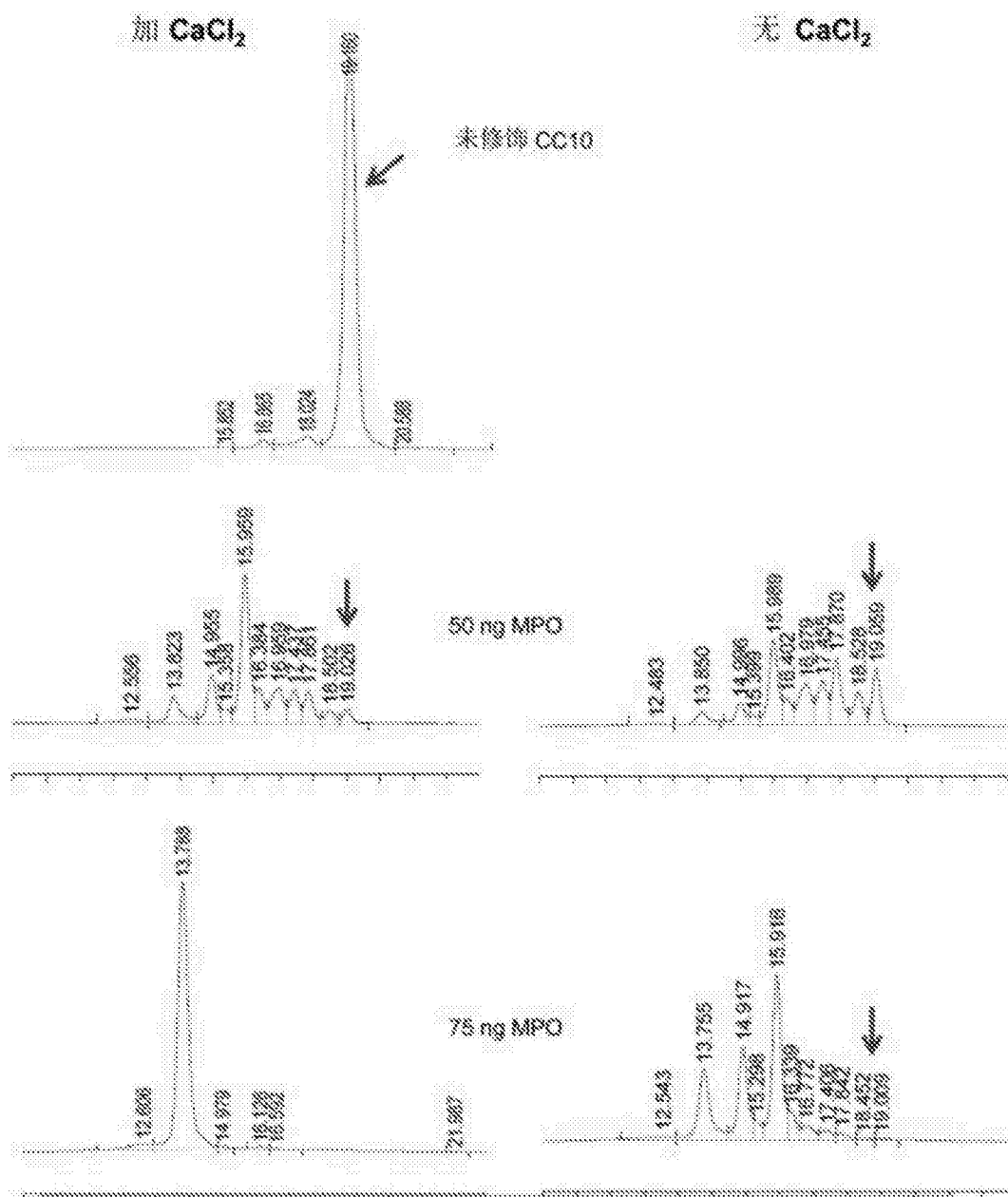
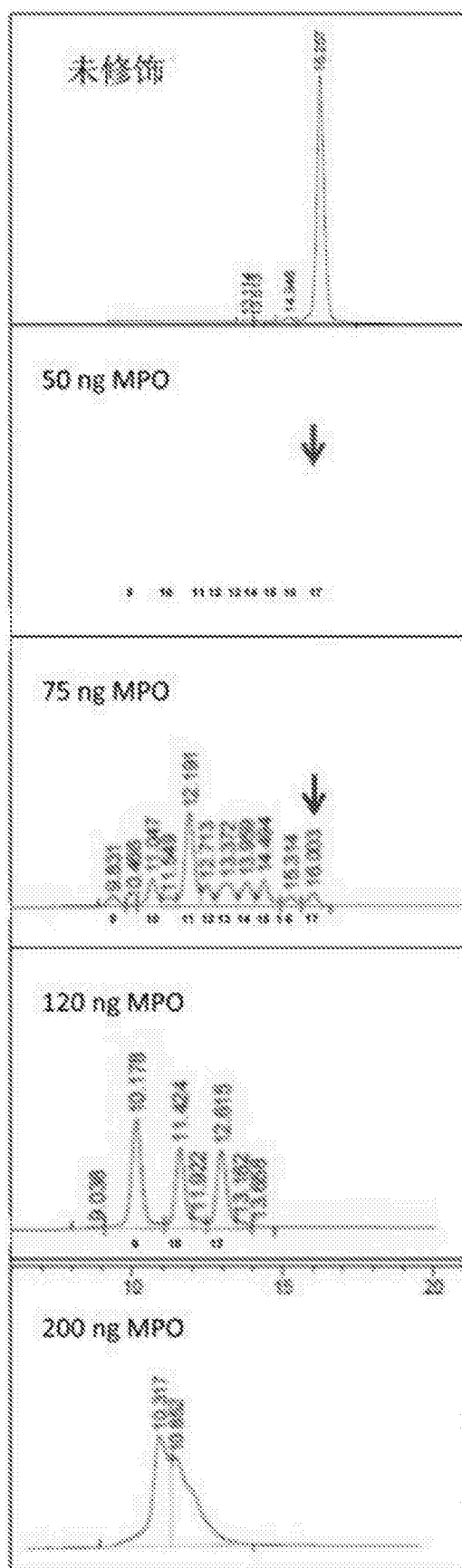
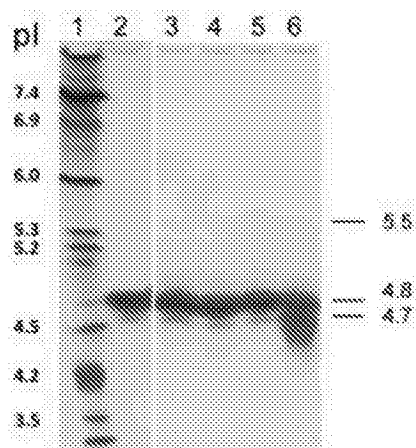


图11 mCPBA反应产物:CC10亚型的纯化&质谱分析

图12:MPO-H₂O₂反应的优化:CaCl₂的作用

图13:MPO-H₂O₂氧化产物的HPLC分析

1. 标记
2. rhCC10
3. 300ng MPO+50 eq H₂O₂; 1 hr
4. 600ng MPO+50 eq H₂O₂; 1 hr
5. 1000ng MPO+50 eq H₂O₂; 1 hr
6. 300ng MPO+50 eq H₂O₂; 24hr

图14 rnCC10 MPO-H₂O₂反应的等电聚焦分析

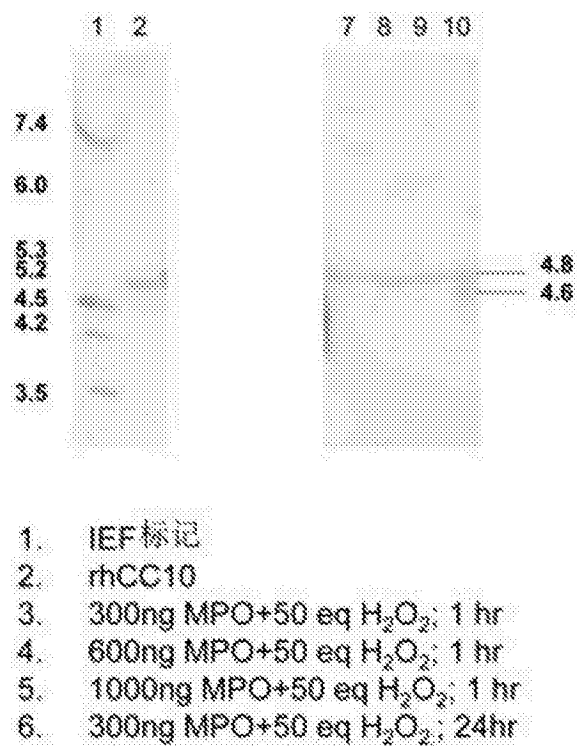


图15使用抗rhCC10抗体的rhCC10 MPO和H2O2反应的IEF凝胶的蛋白印迹

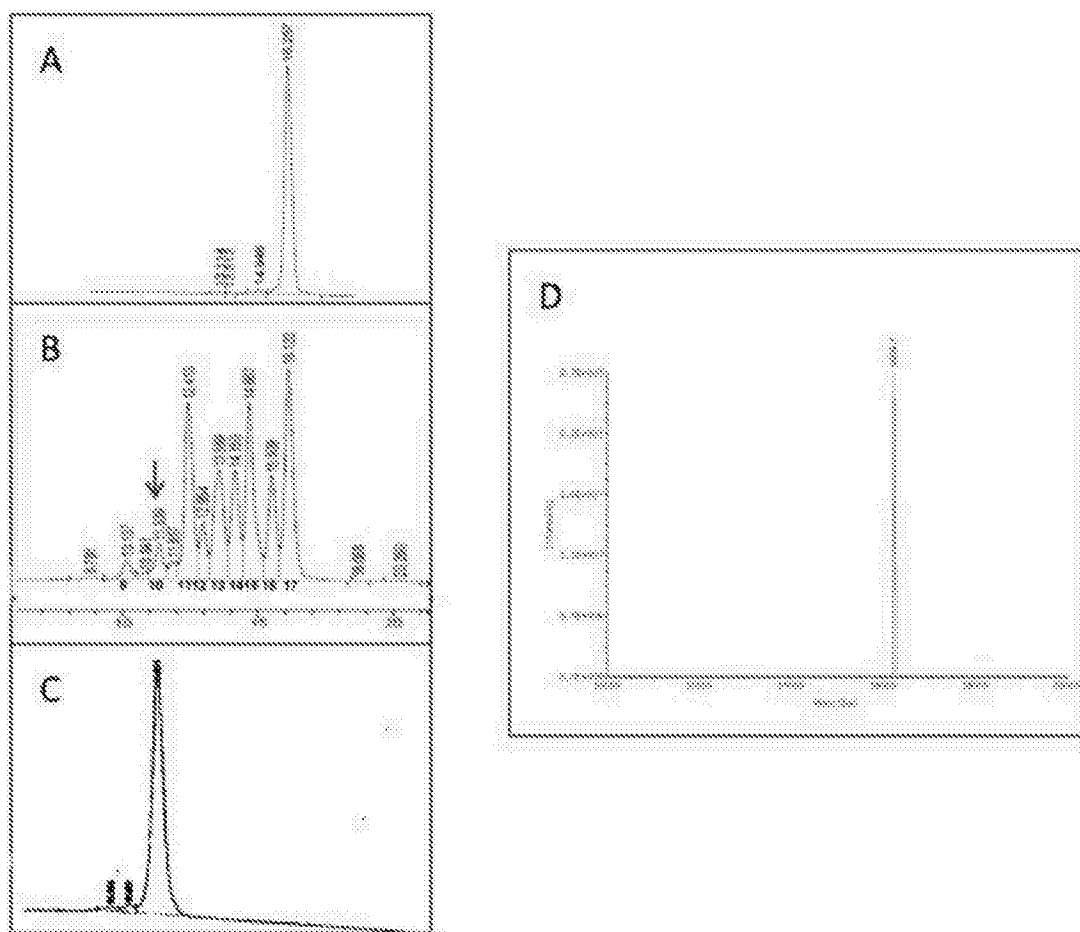


图16 MPO和H2O2反应的CC10亚型的纯化&质谱分析

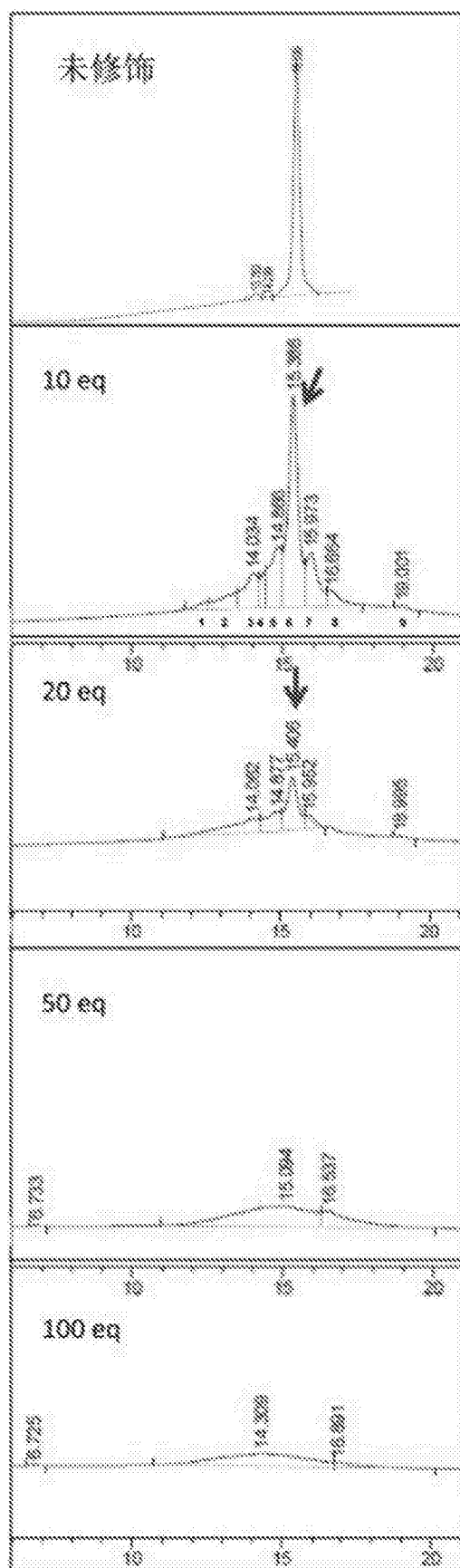


图17:过氧化亚硝酸盐氧化产物的HPLC分析

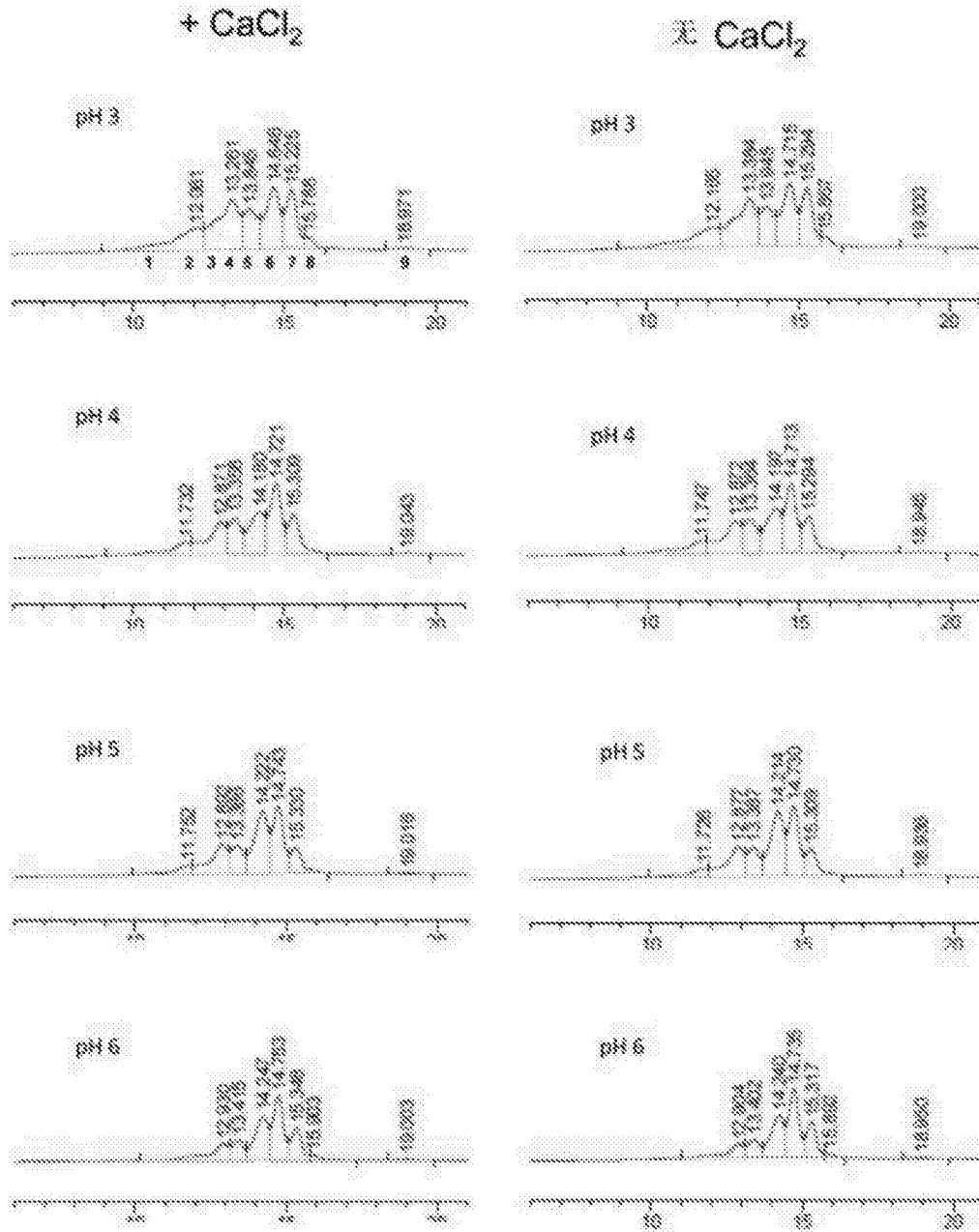


图18:pH和 CaCl_2 在过氧化亚硝酸盐介导rhCC10氧化中的作用

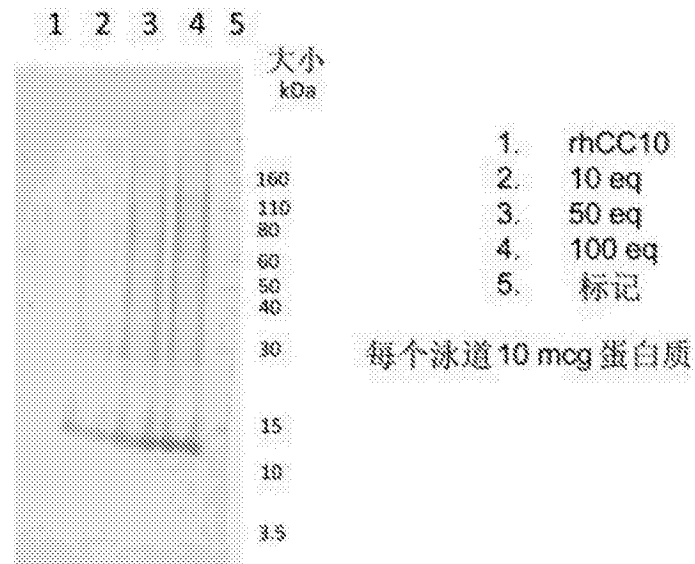


图19过氧亚硝酸盐的反应产物的蛋白印迹分析

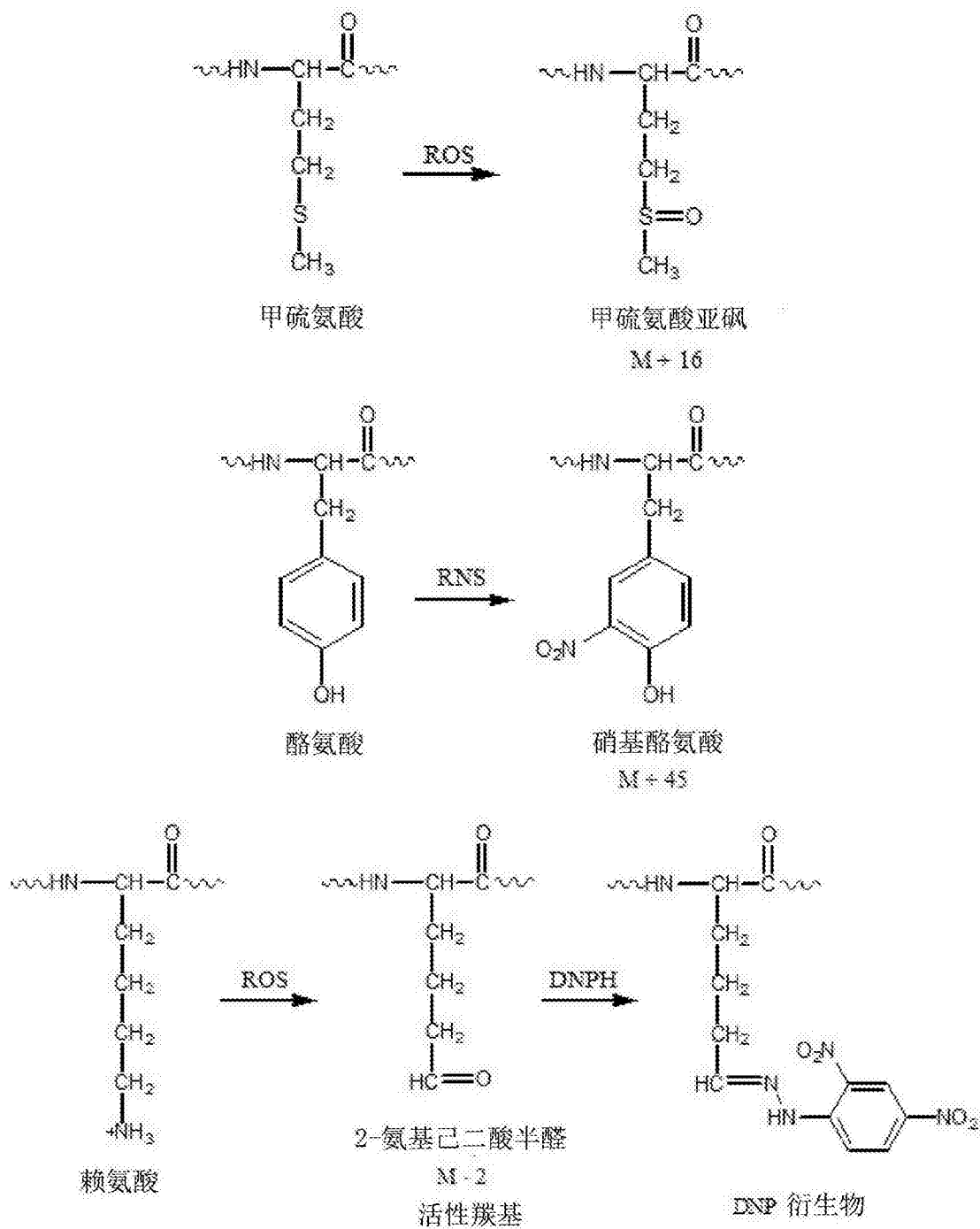


图20 rhCC10蛋白质检测ROS和RNS的分泌球蛋白反应产物

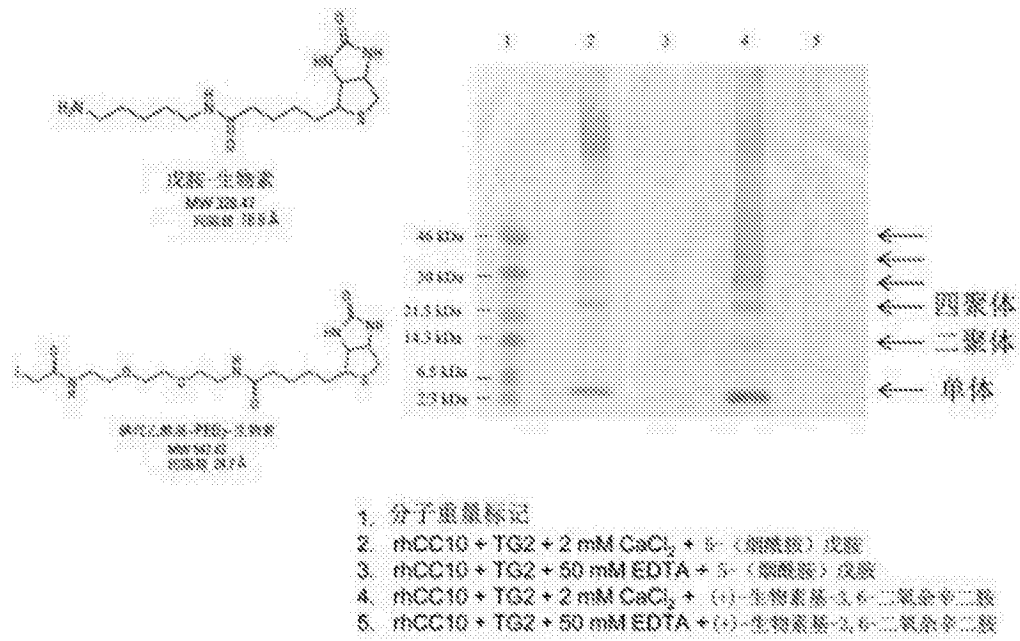


图21通过转谷氨酰胺酶修饰rhCC10

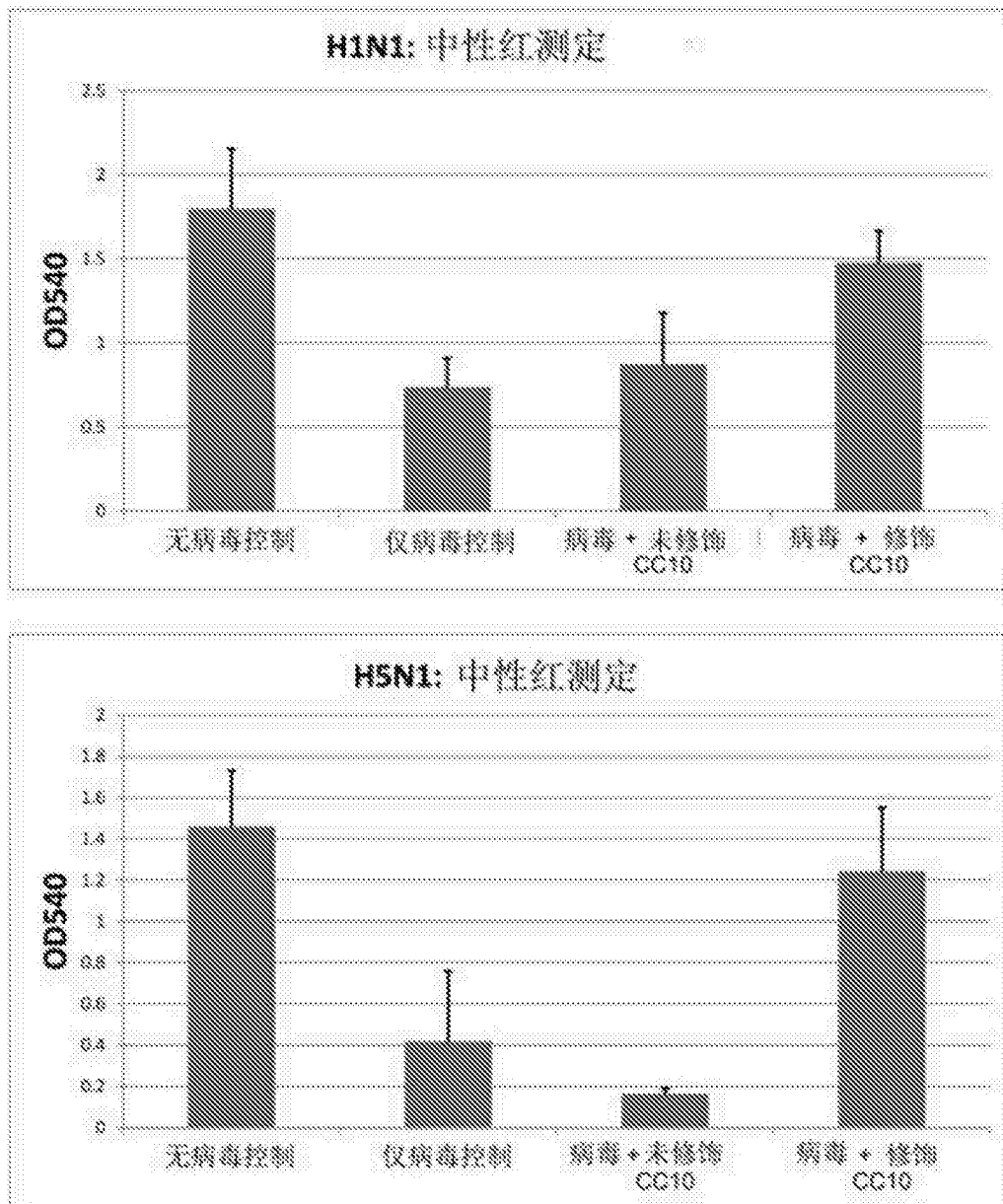


图22:通过修饰rhCC10增强抗病毒活性

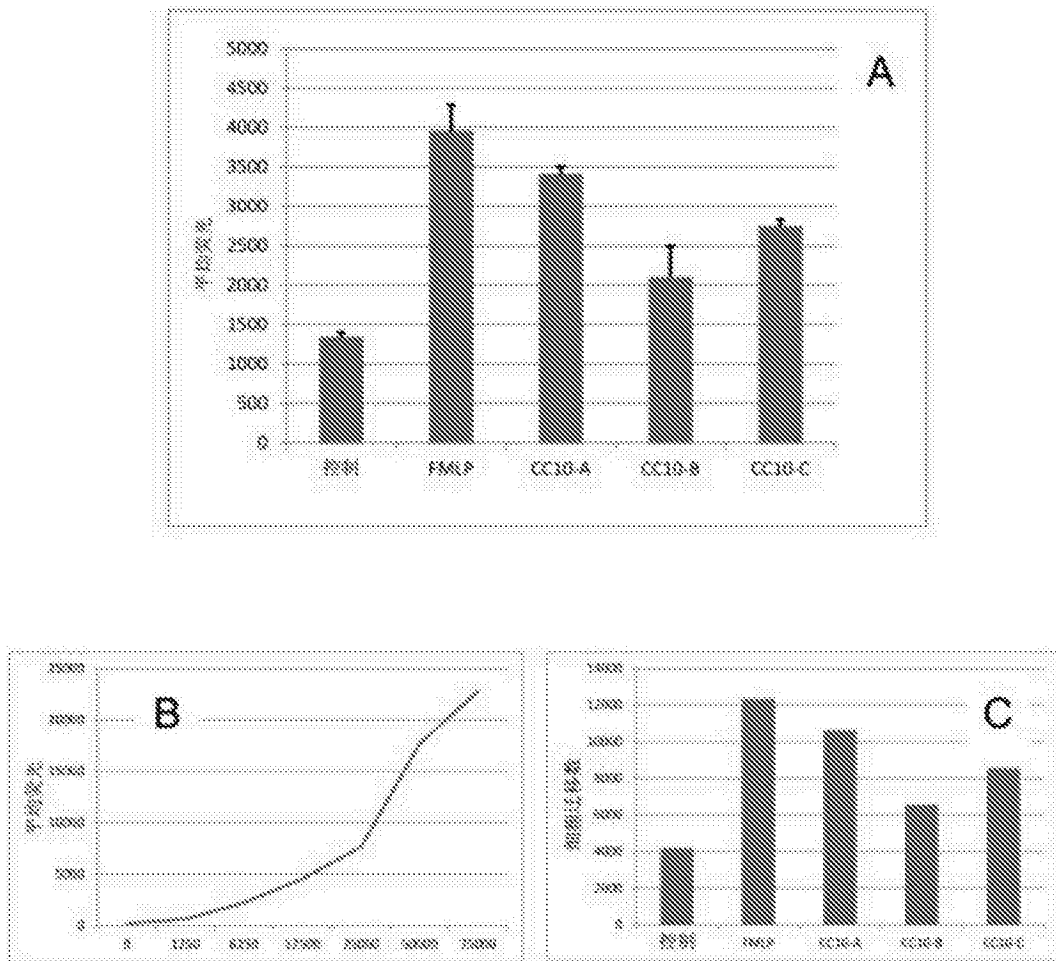


图23:通过修饰rhCC10 ROS & RNS产物增强中性粒细胞的趋化性的抑制作用