[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 14/575
C07K 14/435
C07K 14/47
A61K 38/17
A61K 38/22
A61P 29/00
A61P 19/02

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410087909.1

[43] 公开日 2005 年 7 月 27 日

[11] 公开号 CN 1644586A

[22] 申请日 1999.3.29
[21] 申请号 200410087909.1
分案原申请号 99805957.9
[30] 优先权
[32] 1998. 3.28 [33] GB [31] 9806632.7
[71] 申请人 格拉斯哥大学董事会
地址 英国格拉斯哥
共同申请人 皇家肿瘤研究院
罗伯特·邓肯·史蒂文森
[72] 发明人 罗伯特·邓肯·史蒂文森
安东尼·约翰·劳伦斯 约翰·扬
达里尔·约翰·塞西尔·帕皮宁
[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 李 悦
B29K511：14,B29L7：00 A61P 19/04
A61P 9/14 A61P 11/00 A61P 17/00
A61P 1/00 A61P 7/00 A61P 31/00
A61P 43/00 A61P 37/06

权利要求书 4 页 说明书 24 页 附图 15 页

[54] 发明名称 氧化胸腺素 β4

[57] 摘要

本发明涉及氧化胸腺素 β4 在治疗中的应用，尤其是在治疗与炎症反应或感染性休克有关的病症中的应用。 本发明也提供含有氧化胸腺素 β4 和适宜赋型剂的药物制剂。

ISSN1008-4274

1. 一种合成的分离的氧化胸腺素 β4 或具有氧化胸腺素 β4 活性的变体，或其药用盐。

2. 权利要求 1 所定义的氧化胸腺素 β4 或其变体，其具有至少 90%的纯度。

3. 权利要求 1 所定义的氧化胸腺素 β4 或其变体，其具有至少 80%的纯度。

4. 权利要求 1 所定义的变体，其中所述变体是截短、缺失或突变形式的氧化胸腺素 β4。

5. 权利要求 4 所定义的变体，其中氧化胸腺素 β4 的氨基酸残基被保守氨基酸残基替代。

6. 权利要求 5 所定义的变体，其中氧化胸腺素 β4 的氧化蛋氨酸的硫被 VI B 族元素替代。

7. 权利要求 6 所定义的变体，其中所述 VI B 族元素是硒，碲或钋。

8. 权利要求 4 所定义的变体，其中所述氧化胸腺素 β4 的氧化蛋氨酸是蛋氨酸 sulphoximime。

9. 权利要求 4 所定义的变体，其中所述氧化胸腺素 β4 的氧化蛋氨酸是氧化的含硫氨基酸。

10. 权利要求 4 所定义的变体，其包含 D 氨基酸，或包含乙酰基。

11. 权利要求 4 所定义的变体，其包含化学修饰的氧化胸腺素 β4。

12. 权利要求 4 所定义的变体，其为氧化胸腺素 β4 的模拟物。

13. 权利要求 4 所定义的变体，其为氧化胸腺素 β4 的肽模拟物。

14. 一种治疗炎性病症的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的权利要求 1 的化合物，由此治疗所述炎性病症。

15. 权利要求 14 所定义的方法，其中所述炎性病症选自炎性关节病、结缔组织病、脉管炎综合征、呼吸系统疾病、皮肤病、胃肠道疾病、血液病、移植或修复的病症，和感染。

16. 权利要求 15 所定义的方法，

其中所述炎性关节病是类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、结晶性关节炎、反应性关节炎、僵直性脊椎炎、感染性关节炎、青少年慢性关节炎，

其中所述结缔组织病是系统性红斑狼疮、斯耶格伦氏综合征、多肌痛风湿或颅动脉炎，

其中所述脉管炎综合征是韦格内氏肉芽肿病、结节性多动脉炎或 Churg Strauss 综合征，

其中所述呼吸系统疾病是哮喘、慢性阻塞性肺病、纤维性小泡炎、过敏性肺炎、肉样瘤病、变应性曲霉病、起因不明的肺嗜酸性粒细胞增多症或毛细支气管炎闭塞性组织性肺炎，

其中所述皮肤病是牛皮癣、湿疹或荨麻疹，

其中所述胃肠道疾病是溃疡性结肠炎、局限性回肠炎或狼疮性肝炎，

其中所述血液病是溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜、多发性骨髓瘤、或淋巴瘤/白血病，

其中所述移植或修复的病症是移植排斥，对宿主疾病的移植，与植入假体的组织反应，和

其中所述感染是结核、疟疾、卡氏肺囊虫肺炎或麻风。

17. 一种治疗炎症的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的权利要求 1 的化合物，由此减轻所述炎症。

18. 一种治疗皮肤病的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的权利要求 1 的化合物。

19. 一种伤口愈合的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的权利要求 1 的化合物，由此愈合所述伤口。

20. 一种组合物，其包含权利要求 1 所定义的化合物和药用载体。

21. 权利要求 20 所定义的组合物，其另外包含一种药物。

22. 权利要求 21 所定义的组合物，其中所述药物是细胞因子。

23. 一种合成氧化胸腺素 β4 的方法，其包含氧化合成的胸腺素 β4 以形成氧化的胸腺素 β4。

24. 权利要求 23 所定义的方法，其中所述氧化步骤包含用过氧化氢处理所述合成的胸腺素 β4。

25. 权利要求 23 所定义的方法，其中所述氧化步骤包含将合成的胸腺素 β4 暴露于空气，由此促进自身氧化。

26. 权利要求 24 所定义的方法，其中以大于约 30%的量形成氧化的胸腺素 β4。

27. 一种抑制嗜中性粒细胞活性的方法，其包含向需要其的受试者施用权利要求 1 所定义的化合物，由此抑制嗜中性粒细胞活性。

28. 一种治疗炎性病症的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的天然胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4 的混合物，或合成胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4 的混合物，或其药用盐，由此治疗所述炎性病症。

29. 权利要求 28 所定义的方法，其中所述炎性病症选自炎性关节病、结缔组织病、脉管炎综合征、呼吸系统疾病、皮肤病、胃肠道疾病、血液病、移植或修复的病症，和感染。

30. 权利要求 29 所定义的方法，

其中所述炎性关节病是类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、结晶性关节炎、反应性关节炎、僵直性脊椎炎、感染性关节炎、青少年慢性关节炎，

其中所述结缔组织病是系统性红斑狼疮、斯耶格伦氏综合征、多肌痛风湿或颅动脉炎，

其中所述脉管炎综合征是韦格内氏肉芽肿病、结节性多动脉炎或 Churg Strauss 综合征，

其中所述呼吸系统疾病是哮喘、慢性阻塞性肺病、纤维性小泡炎、过敏性肺炎、肉样瘤病、变应性曲霉病、起因不明的肺嗜酸性粒细胞增多症或毛细支气管炎闭塞性组织性肺炎，

其中所述皮肤病是牛皮癣、湿疹或荨麻疹，

其中所述胃肠道疾病是溃疡性结肠炎、局限性回肠炎或狼疮性肝炎，

其中所述血液病是溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜、多发性骨髓瘤、或淋巴瘤/白血病，

其中所述移植或修复的病症是移植排斥，对宿主疾病的移植，与植入假体的组织反应，和

其中所述感染是结核、疟疾、卡氏肺囊虫肺炎或麻风。

31. 一种治疗炎症的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的天然胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4 的混合物，或合成胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4 的混合物，或其药用盐，由此减轻所述炎症。

32. 一种治疗皮肤病的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的天然胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4 的混合物，或合成胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4 的混合物，或其药用盐。

33. 一种伤口愈合的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的天然胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4 的混合物，或合成胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4 的混合物，由此愈合所述伤口。

34. 一种组合物，其包含合成胸腺素 β4 和氧化胸腺素 β4。

35. 权利要求 34 的组合物，其中所述氧化胸腺素 β4 以至少 30%的量存在和其中其余的为胸腺素 β4。

36. 权利要求 35 的组合物，其中所述氧化胸腺素 β4 以至少 60%的量存在和其中其余的为胸腺素 β4。

37. 权利要求 34 的组合物，其中所述氧化胸腺素 β4 以至少 80%的量存在和其中其余的为胸腺素 β4。

38. 权利要求 34 的组合物，其中所述氧化胸腺素 β4 以至少 90%的量存在和其中其余的为胸腺素 β4。

39. 一种治疗伤口愈合的方法，其包含向需要其的受试者施用有效量的胸腺素 β4，由此愈合所述伤口。

40. 一种合成权利要求 1 所定义的氧化胸腺素 β4 或变体的方法，其通过将氧化的氨基酸引入肽而形成氧化胸腺素 β4 或变体。

氧化胸腺素β4

本发明涉及从类固醇处理过的单核细胞中分离出来的肽因子。尤其是，本发明涉及用于替代类固醇治疗的肽因子。

类固醇被有效地用于抗炎症性疾病，例如哮喘、湿疹、过敏反应和风湿性疾病如类风湿性关节炎。然而，类固醇具有严重的副作用，因而仅在非类固醇抗炎药物不能奏效的情况下使用。

单核细胞是重要的免疫效应细胞，在细胞免疫中发挥着至关重要的作用。除了其在炎症部位的抗原呈递和吞噬活性外，外周血单核细胞还参与多种与调节嗜中性白细胞反应有关的炎性酶原和多肽细胞因子的合成和释放。这些成分的产生可被糖皮质激素抑制，因此，认为这即是糖皮质激素抗炎反应的基础。

关注类固醇诱导的因子对嗜中性白细胞迁移的影响，最初是为了阐明抗炎机制。皮质类固醇使许多前炎症介质下调(Lew 等, 1988; Almawi 等 1991; Standford 等 1992)，而有些作用则可以解释为使抗炎介质上调。

嗜中性白细胞迁移刺激类固醇诱导的因子的活性，提示分散移动旨在防止细胞聚集在一个部位，而这对于终止炎症反应是很重要的。

Stevenson (1973, 1974, 1978)证实：人单核细胞在与抗炎皮质类固醇一起孵育时释放蛋白酶敏感因子，后者增加嗜中性白细胞从短毛细管中的细胞团迁移。

后来的研究证实，用采集自接受类固醇治疗的患者的白细胞也观察到刺激嗜中性白细胞迁移的现象。

最近，Chettibi 等(1993, 1994) 使用能够研究细胞在蛋白包被的玻璃盖玻片上迁移过程的自动细胞跟踪分析法研究了类固醇诱导的对嗜中性白细胞迁移行为的刺激作用。这些研究是如下测定的：

1. 类固醇-处理的单核细胞上清液(STMS)使得人嗜中性白细胞移动速度显著增加，而使人嗜中性白细胞对蛋白包被的玻片的粘附显著下降。

相反，对照单核细胞上清液对嗜中性白细胞的移动速度影响较小，但是粘附性大大增加。

2. 在有或没有血清的条件下，37℃与 10^{-6} M 地塞米松孵育 24 h 后制得的上清液的活性相同。

3. 类固醇-处理的单核细胞上清液对人外周血嗜中性白细胞移动速度的作用不受兔抗脂蛋白 1-6 多克隆抗血清的影响。

4. 能够阻断 IL-8 对人嗜中性白细胞移动速度作用的兔抗白介素-8 抗体,并不能拮抗类固醇-处理的单核细胞上清液的移动刺激作用。

5. 人单核白细胞胞外释放的因子提示它可能是糖皮质激素体内抗炎作用的介质。

然而，尚未揭示 STMS 中该活性物质到底是什么。

Huff T.等(1995)和 Heintz D.等(1994)描述涉及β-胸腺素的研究，和生物分子络合物中β-胸腺素如何与 G-肌动蛋白相互作用及抑制 F-肌动蛋白在高盐条件下的聚合。氧化形式的胸腺素β4 是作为抑制肌动蛋白聚合反应而被披露的，然而，其抑制作用只是在高于胸腺素β4 20 倍的浓度时才会出现。没有文献推断氧化胸腺素β4 的任何医疗作用。事实上，文章似乎教导人们不要去考虑氧化胸腺素β4 的积极作用。

US5578570(Goldstein 等)公开了施用胸腺素β4 治疗感染性休克的方法。然而，其中没有披露氧化胸腺素β4，也没有提示氧化胸腺素β4 具有治疗感染性休克的作用。

本发明的一个目的是提供类固醇治疗的替代疗法。

本发明部分基于本发明者的观察：与嗜中性白细胞移动有关的因子是氧化形式的胸腺素β4。

本发明首先是提供氧化胸腺素β4 或其生理活性变体在治疗中的应用。

代表性的氧化胸腺素β4 是胸腺素β4 的一种, 胸腺素β4 中的一个蛋氨酸残基（距 N-末端 6 个氨基酸）(Met6)被氧化，从而该残基转化为硫氧蛋氨酸。而且，蛋氨酸残基(Met6)可进一步氧化为砜蛋氨酸，后一形式也包括在本发明之内。还可涉及(evisaged)蛋氨酸残基的其它修饰，如硫与金属络合，从而产生类似于本文描述的氧化胸腺素β4 的活性形式的胸

腺素β4。

氧化胸腺素β4 可以通过天然胸腺素β4 在氧化条件下反应而获得，例如，与过氧化氢反应形成氧化胸腺素β4。这样，首先得到天然胸腺素β4，然后将其氧化成氧化形式。

已经观察到，天然胸腺素β4 含有认为是自动氧化结果的少量如 10%氧化胸腺素β4。然而，本发明者首先将此氧化形式胸腺素β4 与生理活性联系起来。因此，总体上讲，本发明提供纯化的氧化胸腺素β4 的应用。具有代表性地，本发明提供含有占残基未氧化胸腺素β4 至少 30%，优选 60%，更优选 80%，最优选 90%的纯化氧化胸腺素β4 的制剂的应用。然而，氧化胸腺素β4 制剂优选地含有大体上全部是氧化胸腺素β4(即，基本上不含有未氧化胸腺素β4)。

氧化或未氧化胸腺素β4 可以从任何适宜来源获得，例如，由类固醇处理的单核细胞中得到。此外，胸腺素β4 可以来自任何适宜种属，但是通常来源于哺乳动物，如牛、马、鼠和人。注意到牛、马、鼠、大鼠和人胸腺素β4 在序列上完全相同。因此，例如，牛胸腺素β4 可以作为胸腺素β4 的适宜来源以便进一步氧化并施用于其它种属如人。

氧化胸腺素β4 的生理活性变体理解为那些显示出氧化胸腺素β4 相同或相似生理特性的变体。含有氧化蛋氨酸的变体是优选的，但是变体可以是截短的、缺失的或变异的形式。

应当理解，对于本文所涵盖的特定氧化胸腺素β4 而言，可以存在变异体（天然或其它）。通过全序列氨基酸差异或通过所述序列中氨基酸缺失、取代、插入、反转或增加可以证实这些变异体。只要变异体具有生理活性（即，显示出本文所定义的氧化胸腺素β4 的活性），那么所有这些变异体均包括在本发明范围内。例如，为达到本发明目的，可以在下列组的氨基酸之间进行保守替换：

(I) 丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸；

(II) 谷氨酸和天冬氨酸；

(III) 精氨酸和赖氨酸；

(IV) 天冬酰胺和谷胺酰胺；

(V) 异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸；

(VI) 苯丙酰胺、酪氨酸和色氨酸;

(VII) 蛋氨酸和其它蛋氨酸同系物;

(VIII) 蛋氨酸和硫被 VIB 组元素（如，硒、碲、钋）取代的其它蛋氨酸同系物。

(IX) 氧化蛋氨酸和其它氧化蛋氨酸同系物（如，VIB 组同系物，硫氧蛋氨酸）

(X) 蛋氨酸和包括含硫氨基酸（如，半胱氨酸）氧化同系物在内的其它含硫氨基酸。

早期分子模型研究提示，蛋氨酸残基(met-6)在肽的三个螺旋之一的顶部。分子模型应当有助于确定那些可能具有观测到的 STMS 和氧化胸腺素β4 活性并且将是用于制备具有抗炎活性药物的优选分子的短肽。

的确，这将有助于开发具有氧化胸腺素β4 相同生理功能的肽模拟物。

另外，通过利用适当的化学修饰（如乙酰化）或使用 D 氨基酸来增加氧化胸腺素β4 或其生理活性变体的半衰期是可能的。

分离的氧化胸腺素β4 可以具有封闭的 N-末端。

本发明也提供合成的氧化胸腺素β4，其中含有氧化胸腺素β4 或其生理活性变体的肽序列。

如上所述，合成的氧化胸腺素β4 可以被修饰和/或被氨基酸取代，只要其仍保留生理活性即可。例如，可以引入硒基蛋氨酸来代替蛋氨酸并以同样的方式氧化。

本发明进一步提供本文描述的氧化肽在制备治疗慢性或急性炎性病症的药物中的应用。该炎性病症包括炎性关节病，如类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、结晶性（crystal）关节炎、反应性关节炎、僵直性脊椎炎、感染性关节炎、青少年慢性关节炎；结缔组织病，如系统性红斑狼疮、斯耶格伦氏综合征、多肌痛风湿、颅动脉炎；脉管炎综合征，如韦格内氏肉芽肿病、结节性多动脉炎、Churg Strauss 综合征；呼吸系统疾病，如哮喘、慢性阻塞性肺病、纤维性小泡炎、过敏性肺炎、肉样瘤病、变应性曲霉病、起因不明的肺嗜酸性粒细胞增多症、毛细支气管炎闭塞性组织性肺炎；皮肤病，如炎症性皮炎包括牛皮癣、湿疹、荨麻疹；胃肠道疾病，如溃疡性结肠炎、局限性回肠炎、狼疮性肝炎；血液病，如

溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜、多发性骨髓瘤、淋巴瘤/白血病；移植术/修复术，如移植排斥，对宿主疾病的移植，与植入假体的组织反应；以及感染，如结核、疟疾、卡氏肺囊虫肺炎、麻风。

此外，氧化胸腺素β4 可以与其它药物联合给药，例如细胞因子如具有可以诱导炎症反应副作用的干扰素进行联合。因此，一方面，氧化胸腺素β4 可以作为减少或降低以不适当的炎症为特征的生理或疾病状态。

另外，应当理解上述氧化胸腺素β4 的应用不仅仅用于人类病症。所以，氧化胸腺素β4 可以用于治疗患有上述类似病症的动物如猫、狗、马、牛、羊、猪和山羊。

本发明进一步提供氧化胸腺素β4 在制备治疗感染性休克的药物中的应用。通常，氧化胸腺素β4 呈上述的提纯形式。

本发明还提供含有本文所述氧化胸腺素β4 的药物组合物。

本发明进一步提供具有能够编码本文所述胸腺素β4 的核苷酸分子序列在为后续制备氧化胸腺素β4 中的应用。

本发明特别实施方案中，提供含有核苷酸分子的载体在制备氧化胸腺素β4 和本文所述的截短、缺失或变异形式的氧化胸腺素β4 中的应用。

另外，本发明提供含有核苷酸分子的载体在制备含有氧化胸腺素β4 和其截短、缺失或变异形式用于治疗炎症性病症的药物中的应用。

用本文所述氧化胸腺素β4 代替类固醇治疗，将减轻那些通常与使用类固醇有关的副作用。

氧化胸腺素β4 可用于治疗那些为避免类固醇副作用而在目前使用非类固醇抗炎药物的病人。

使用高度纯化的氧化胸腺素β4，或者使用合成的或表达的胸腺素β4 然后进行氧化而得到的氧化胸腺素β4，是安全可靠的，因为当把它施用于机体后，它通常不是机体的异物。

可以施用精确的量。

诚然，有效治疗所需的氧化胸腺素β4 的量是不同的，而且最终任凭医师或兽医处理。应当考虑的因素包括治疗的病症，给药途径和制剂的性质，接受治疗者的体重、表面积、年龄和体质，以及所施用的特定化合物。适宜的有效剂量范围为约 0.001～约 120 mg/kg 体重，例如，0.01～

约 120 mg/kg 体重，优选范围为约 0.01～约 50 mg/kg，如 0.05～20 mg/kg。每日总剂量，可以按单次剂量给药或按多次剂量如每日 2 到 6 次给药，或者按照选定的期间经静脉注射方式施用。例如，对于一个 75 kg 雄性哺乳动物(例如，人)，剂量范围可以是每日约 8～9000 mg，代表剂量可以是每日约 50 mg。如果指明用分散的多剂量给药方式，那么有代表性的治疗可能是氧化胸腺素β4 15 mg，每日 4 次。

尽管将活性化合物单独给药是可能的，但是，优选将本发明活性化合物以药物制剂形式给药。本发明制剂，用于医疗的目的，包括氧化胸腺素β4 或其盐与一种或多种可药用载体和任选的其它治疗成分在一起。载体应当是可药用的，为的是与制剂的其它成分相容并且对受治疗者没有损害作用。

因此，本发明进一步提供含有氧化胸腺素β4 或其可药用盐或其生理功能衍生物与可药用载体在一起的药物制剂。

本发明还提供制备药物制剂的方法，所述药物制剂含有生成的有关氧化胸腺素β4 或其可药用盐或其生理功能衍生物和其可药用载体。

本发明制剂包括 biolistic 如 Powderject 给药在内的适宜于口服、鼻腔、局部、阴道、直肠或非肠道（包括皮下、关节内、肌内和静脉内）给药的那些剂型。优选的制剂是那些适宜于口服、局部用或非肠道给药的剂型。

制剂可以方便地呈单位剂量规格并使用药学领域众所周知的任何方法制备。所有方法均包括将活性化合物与载体相掺合的步骤，所述载体组成一种或多种辅料。通常，制剂是这样制备的：将活性化合物均匀和紧密地与液态载体或微细粉碎的固体载体或者液态与固体两种载体进行掺合，然后，如果必要，将产品制成所需形状制剂。

适宜口服给药的本发明制剂，可以是分散单位规格如胶囊、扁囊剂、片剂、锭剂，活性成分包含在调味基中，调味基通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶；润喉糖锭，活性成分含在惰性基如明胶、甘油、蔗糖或阿拉伯胶中；漱口液，活性成分含在适宜的液体载体中。每种制剂一般含有预定剂量的活性化合物；粉末或颗粒形式；或者在含水或不含水液体中的溶液或悬浮液形式，如糖浆剂、酏剂或饮剂等。

片剂，通过压片或模制而制得，任选地与一种或多种辅料一起压片或模制。压片，在适宜机器中通过压制自由流动形式（如粉末或颗粒）的活性化合物来制备，任选地与粘合剂（如，聚乙烯吡咯酮、明胶、羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（如，羟乙酸淀粉钠，交联的聚乙烯吡咯酮，交联的羧甲基纤维素钠）、表面活性或分散剂混合。模制片，在适宜机器中把用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物模塑来制备。可以任选地将片剂包衣或刻痕，以及可以制成能够提供缓慢或控制释放活性成分的片剂，例如，使用不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放模式。

糖浆剂，将活性化合物加入到浓缩的糖水溶液中而制得，如蔗糖溶液，还应当向蔗糖溶液中加入任何辅料。所述辅料包括调味剂、阻止糖结晶的试剂或增加任何其它成分溶解性的组分，例如聚多元醇（如甘油或山梨醇）。

直肠给药的制剂，可以是与适宜载体(如，椰子油)一起制成的栓剂。

适宜非肠道给药的制剂，通常为含有活性化合物的最好与接受治疗者的血液等渗的无菌含水制剂。该非肠道制剂适宜含有与受治疗者血液等渗的药学上和药理学上可接受的氧化胸腺素β4 盐溶液。

适宜的制剂也包括含有氧化胸腺素β4 的浓缩溶液或固体，将浓缩溶液或固体用适当溶剂稀释后即可得到上述非肠道给药用溶液。

本文公开的氧化胸腺素β4 或其生理活性变体，可以通过任何适宜方式施用于受治疗者的肺部，但是优选通过产生由可吸入微粒组成的气雾剂的方式给药，所述可吸入微粒由活性化合物组成，受治疗者吸入这些微粒（即，吸入给药）。可吸入颗粒可以是液态的，也可以是固态的。

用于本发明的氧化胸腺素β4 组成的微粒，应当包括可吸入大小的微粒，这就是，微粒要足够小以便吸入时通过口腔和咽喉并进入支气管和肺的肺泡。通常，约 0.5～10 微米（尤其是小于约 5 微米）大小的微粒是可吸入的。气雾剂中非吸入大小的微粒将会沉积在咽喉部并被吞咽下去，优选将气雾剂中的非吸入微粒的量减至最小。对于鼻内投药，优选微粒大小范围在 10-500 μm 以确保滞留在鼻腔。

用于产生气雾剂的液体药物组合物或氧化胸腺素β4，可以通过将氧

化胸腺素β4 与适宜载体结合来制备，所述载体例如无菌的无致热原水。含有可吸入的微粒化氧化胸腺素β4 干微粒的固体微粒组合物，可以通过使用臼和杵将干燥的氧化胸腺素β4 研磨来制备，然后将微粒化的组合物过 400 目筛以破碎或分离出较大团块。含有氧化胸腺素β4 的固体微粒组合物，可以任选地含有作为促进气雾剂形成的分散剂。适宜的分散剂是乳糖，乳糖可以与氧化胸腺素β4 以任何适宜比例（如，以 1:1 的重量比）混合。

含有氧化胸腺素β4 的液态微粒气雾剂，可以通过任何适宜方式来制备，例如喷雾器。参见例如美国专利 4501729 号。喷雾器是由市售途径可以得到的装置，它通过加速压缩气体（代表性地是空气或氧气）通过狭窄的文氏口(Venturi rifice) 或者通过超声振荡而将氧化胸腺素β4 的溶液或悬浮液转化为治疗气雾剂烟雾。用于喷雾器的适宜组合物由液体载体中的氧化胸腺素β4 组成，氧化胸腺素β4 在组合物中所占比例可高达 40%w/w，但是，优选小于 20%w/w，代表性载体是水或稀释的含水醇溶液，优选地，通过加入例如氯化钠而制成与机体体液等渗。如果组合物不是无菌制备的话，任选的添加剂包括防腐剂如羟基苯甲酸甲酯，抗氧剂、调味剂、挥发油、缓冲剂和表面活性剂。

类似地，含有氧化胸腺素β4 的固体微粒气雾剂，可以使用固体微粒医药气雾剂发生器来制备。在把固体微粒药物对受治疗者给药的气雾剂发生器中产生如上面所解释的可吸入微粒，并且按照适宜人给药的速度产生一定体积的含有用计量器计量的预定剂量药物的气雾。

对于外周组织（如皮肤）感染，制剂优选是含有活性成分的局部用软膏或霜，其中活性成分的量是，例如 0.075～20% w/w，优选 0.2～15% w/w，更优选 0.5～10% w/w。当制成软膏时，活性成分可以使用石蜡基或水混溶性软膏基。或者，制成活性成分含在水包油霜基中的霜剂。

如果需要，霜的水相可以包括，例如，至少 30%w/w 的多元醇，即含有两个或多个羟基的醇，如丙二醇、丁-1,3-二醇、甘露醇、山梨醇、甘油和聚乙二醇以及它们的混合物。局部用制剂可以根据需要而含有增加活性成分经皮肤或其它受累及区域吸收和穿透力的的化合物。此类透皮增强剂的实例包括二甲基硫氧(dimethylsulphoxide) 和相关的同系物。

本发明乳剂的油相可以用已知方式由已知成分组成。尽管油相可以仅含有一种乳化剂，但是，期望含有至少一种乳化剂与脂或油或者与脂、油二者的混合物。优选地，同时含有亲水乳化剂与起稳定剂作用的亲脂乳化剂。也优选同时包括油和脂。乳化剂（一个或多个）一起或与稳定剂一起构成所谓的乳化蜡，而蜡与油和/或脂一起构成所谓的乳化软膏基，软膏基形成霜制剂的油性分散相。

适用于本发明制剂的乳化剂和乳化稳定剂包括吐温 60、司盘 80、鲸蜡硬脂醇、肉豆蔻醇、甘油一硬脂和十二烷基硫酸钠。

为制剂选择适宜油或脂是基于达到所需的润肤特性而定的，因为活性化合物在可能会在药物乳液制剂中使用的大多数油中的溶解度是非常低的。因此，优选地，霜应当是不油腻、不染色和可清洗的产品，并且具有适宜的粘稠度以避免从管或其它容器中渗漏。可以使用直链或支链单-或双烷基酯如二-isoadipate、硬脂酸异鲸蜡酯、椰子脂肪酸的丙二醇二酯、肉豆寇酸异丙酯、油酸癸基酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸 2-乙基己基酯或称作 Crodamol CAP 的支链酯混合物。优选的酯是硬脂酸丁酯、棕榈酸 2-乙基己基酯、称作 Crodamol CAP 的支链酯混合物。根据所需的特性，可以单独使用或者联合使用这些酯。或者，可以使用高熔点酯如软石蜡和/或液体石蜡或其它矿物油。

除了上述提到的组分之外，本发明制剂可以进一步包括一种或多种辅料，所述辅料选自稀释剂、缓冲剂、调味剂、粘合剂、表面活性剂、增稠剂、润滑剂、防腐剂（包括抗氧剂）等。

下面的实施例描述肽因子的纯化及部分纯化因子和类固醇-处理的单核细胞上清液的特性。后面的实施例描述按氧化胸腺素提纯的因子的特性和氧化胸腺素β4 的活性。

结合附图描述实施例，其中

图 1 描述 STMS 对人嗜中性白细胞移动的作用。使用微机化示踪分析法跟踪细胞 2 分钟。按照 5 秒的间歇进行测定，细胞速度平均值为 15.2 μm/分，外推扩散系数和存留时间分别为 1.02 μm^2/秒和 63 秒。

图 2 描述 37℃培养 24 小时的人单核细胞上清液在有或没有 10^{-6} M 地塞米松存在时对人嗜中性白细胞对于牛主动脉单层内皮细胞粘附作用

的影响。(a) 培养基中不含地塞咪松；(b) 培养基中含有 10^{-6} M 地塞咪松；(c) 对照单核细胞上清液(CMS)；(d) 类固醇处理的单核细胞上清液(STMS)。均值±标准误（垂直棒），n = 3。$p < 0.001$ 用**表示。

图 3 描述使用扫描电子显微镜对用 STMS 和不同嗜中性白细胞移动刺激剂处理后的人嗜中性白细胞的形态学进行的比较。

(a) 10^{-8} M fMLP; (b) IL-8 和(c) STMS。棒 2μm。

图 4 描述使用扫描电子显微镜对用 STMS 和不同嗜中性白细胞移动刺激剂处理并接种在牛主动脉单层内皮细胞上的人嗜中性白细胞的形态学进行的比较。

(a) 10^{-8} M fMLP; (b) STMS。棒 2μm。

图 5 描述用 STMS 和不同嗜中性白细胞移动刺激剂处理后的人嗜中性白细胞内 F-肌动蛋白分布的比较。

(a) 培养基含有和不含有 10^{-6} M 地塞咪松；(b) 10^{-8} M fMLP; (c) TNF; (d) STMS。棒 2μm。

图 6 描述使用改良的 Boyden 室分析法测得的 STMS 对 fMLP-诱导的人中性粒趋化的抑制。

(a) 上室－培养基含有地塞咪松；下室－10^{-8} M fMLP; (b) 上室－STMS；下室－10^{-8} M fMLP; (c) 上室－10^{-8} M fMLP；下室－10^{-8} M fMLP; (d) 上室－培养基含有地塞咪松；下室－STMS。计数那些迁移距离达到阳性对照(a)的平均迁移距离一半的细胞数。

□ 细胞-前迁移距离。

对于每一滤膜随机选取 5 个区域进行计数。数值用均值±标准误（垂直棒）表示。$p < 0.001$ 用**表示。

图 7 表示肽 1 的数据，显示出观察到的用 SPA 衍化后低-能 CID 的离子序列。键：Coff Collision offset (伏特); Xle 亮氨酸(Leu)或异亮氨酸(Ile); Kpy 亮氨酸 ε -N-(3-吡啶基)醋酸酯；Mso 硫氧蛋氨酸；和*代表在 CID 谱中观察到的离子。

图 8a-d 描述(a) 嗜中性白细胞对胸腺素β4(Tβ4)和氧化胸腺素β4(Tβ4so) 反应而发生的分散移动；(b) 在改良的 Boyden 室中，fMLP 诱导的人嗜中性白细胞趋化被 Tβ4so 抑制的程度大于未修饰肽。观察到 Tβ4

和 Tβ4so 抑制趋化的剂量依赖效应，氧化肽的抑制作用是天然肽的 10 倍；(c) 在样本刮痕分析中硫氧胸腺素β4 促进伤口愈合。证明蛋氨酸残基(met 6)的氧化增加刮痕愈合速度，刮痕是在组织培养塑膜上的单层内皮细胞上制造的。

图 9a-9c 显示在角叉菜胶诱导的水肿实验中 Tβ4 和 Tβ4so 的测定结果。

实施例

材料与方法

试剂

IL-8 和 TNF 购自 Genzyme，溶解于磷酸缓冲盐溶液(PBS)并以 1 μg/ml 贮存于-70℃。地塞米松和 fMLP 购自 Sigma 化学公司。用乙醇配制 10^{-2} M 的地塞米松贮液，用二甲亚砜(DMSO)配制 10^{-2} M 的 fMLP 贮液。

嗜中性白细胞纯化

按照 Chettibi 等[1993]描述的方法获取嗜中性白细胞。简要讲，全血样本与 5%葡聚糖 1:1 v/v 混合，于 37℃沉降 1 小时。此富含白细胞血浆经 Nycoprep 1.077 分层并用 750 g 离心 15 分钟。用低渗溶解法除去离心沉淀中的红细胞，平衡盐溶液(BSS)洗涤嗜中性白细胞两遍。用台盘兰排除法检测细胞活力（一般大于 96%）。

细胞跟踪分析

按照前述文献[Chettibi 等, 1993]描述的方法制作自动细胞跟踪迁移室，将该迁移室放置在控温 (37℃)透明箱中的倒置相差显微镜的平台上，通过与黑白监视器以及与配有 Watford 数字转换器的 Acorn A5000 计算机连接的电视摄相机来观察移动，所述数字转化器已被编程以便每 5 秒钟捕获和分析信息图像一次。从最多 80 个精选细胞得到的数据用于计算瞬时速度、2-二维扩散系数和移动停留时间，使用文献描述的程序消除系统漂移的影响[Chettibi 等, 1994]。

粘附测定

在直径 13 mm 玻璃盖玻片的多孔盘中的 Dulbecco's 改良的 Eagles 培养基中培养并融合牛主动脉内皮细胞，培养基含有 10%胎小牛和 10%马

血清。通过将悬浮于 BSS 0.1%牛血清蛋白(BSA)中的人嗜中性白细胞以 1×10^6 细胞/ml 与铬酸钠[^{51}Cr]培养 1 小时，20 μCi/ml 定期搅拌，而将嗜中性白细胞进行标记。用 BSS 0.1% BSA 洗涤三次以除去游离的 ^{51}Cr。200μl 嗜中性白细胞与 800 μl STMS 肽因子或其它测试物质混合，加到孔中，于 37℃孵育 10 分钟。用 BSS 0.1% BSA 轻轻洗涤三次除去未-附着细胞，将盖玻片放进 Wilj γ计数仪中。

电子显微镜

用各种激动剂刺激嗜中性白细胞 20 分钟，然后在 2%缓冲的 gluteraldehyde 中固定 1 小时并用 PBS 洗涤两次。在四氧化锇中进行后-固定后，蒸馏水洗涤。接着向样本中加入醋酸双氧铀并在暗处停放至少 1 小时，然后再用水洗涤。细胞通过 30%至纯干品范围的梯度丙酮（或乙醇），然后临界点干燥并封固。

可供选择的替代临界点干燥的方法是冷冻干燥。使用冷冻干燥时，在已将四氧化锇从细胞洗涤后，将细胞投进液氮（仅适用于粘着在固体物质上的细胞）。之后，标本在金中包埋并使用扫描电子显微镜(SEM)进行观察。

肌动蛋白染色和共焦显微镜

将纯化的嗜中性白细胞放在白蛋白-包被的玻璃盖玻片上，然后用各种刺激物处理并于 37℃孵育 30 分钟。室温下，细胞在 1%低聚甲醛溶液中固定 30 分钟，用 BSS 洗涤，用 1%Triton x-100 通透(permeabilised) 15 分钟。室温下，细胞用 BSS 中洗涤三次并用标记毒伞素(phalloidin)的 0.1 mg/ml TRITC 处理 20 分钟。以 5 分钟的间隔在 BSS 中洗涤细胞 3 次，用 50%甘油将细胞封固在玻片上。使用共焦显微镜分析结果。

趋化实验

切下滤膜(Sartorius 膜滤器 3 μm 孔)并胶接改良的 1 ml 注射针筒。300 μl 2×10^6/ml 嗜中性白细胞中加入 300 μl 拮抗剂，200 μl 悬浮液加入到上室（注射针筒）。下室（5 ml 烧杯）含有 3.6 ml 激动剂。45 分钟后，在 70%乙醇中固定细胞 5 分钟。还要通过溶解胶而将滤膜从注射针筒中取出。滤膜放在多孔盘中，并进行如下处理：

蒸馏水 2 分钟，Harris 苏木精 1 分钟，蒸馏水 1 分钟，Scotts 自来水(0.7%

碳酸氢钠: 4%硫酸镁，1:1 (v/v))5 分钟，70％乙醇 3 分钟，95％乙醇 3 分钟和 80％:20％的乙醇:丁醇(v/v) 5 分钟。在二甲苯中清洗滤膜 5 分钟，然后将滤膜封固在 DEPEX 上，于 40 倍接物镜的明场照明下检测。每一滤膜中随机选择 5 个视野进行计数。

刮伤实验：人脐静脉内皮细胞(HUVEC)在多孔盘(Corning)上生长并融合，用无菌吸管尖横跨每一孔的直径制造刮痕。在加入 Tβ4 或 Tβ4so 之前(约 1 mm)和之后测量所制作的伤口，间隔为 45 分钟。

诱导对角叉菜胶的炎症反应

在各组小鼠的一只后爪皮下注射 300 μg 角叉菜胶与胸腺素β4（天然或硫氧化的）的混合物，终体积为 50 μl。对照动物注射相同体积的生理盐水。使用弹簧刻度卡尺测量脚掌肿胀程度，并用注射角叉菜胶爪与未注射、对照对面爪的肿胀差表示。用同样剂量的胸腺素β4(天然或硫氧化的)给动物腹腔注射(i.p)，于 6、24、48 和 72 小时测量脚掌。

实施例 1

制备类固醇处理的单核细胞上清液(STMS)并部分纯化 STMS 肽因子

类固醇处理的单核细胞上清液是这样获取的：以每 ml 5×10^7 细胞的浓度在含有热灭活的 10％胎小牛血清(FCS)的 Hams F-10 培养基上铺板培养人单核细胞 60 分钟，用磷酸缓冲液盐水(PBS)漂净，然后在含有 10^{-6} M 地塞米松而不含有 FCS 的条件下培养 24 小时。

STMS 肽因子制备

STMS 基本上按照 Chettibi 等[1993]描述的方法得到：以大约每 ml 5×10^7 细胞的浓度在含有热灭活的 10％胎小牛血清(FCS)的 Hams F-10 培养基上培养人单核细胞 60 分钟，用 PBS 漂净，然后在含有 10^{-6} M 地塞米松而不含有 FCS 的条件下培养 24 小时。用作制备对照单核细胞上清液(CMS)的平行培养基中不含有地塞米松。通过使用 2-二维扩散系数确定活性成分来进行 STMS 肽因子的纯化。使用凝胶过滤和单-Q 树脂离子交换色谱完成部分纯化。通过另外使用反相 HPLC 来得到高度纯化的产品。

由于假定加帽 N-末端，所以最初的肽因子序列分析未能成功。

这些观察提示，STMS 处理的嗜中性白细胞诱导极不寻常模式的细胞架组织(附图 5d)，但是对于持续移动的发生基础并未预示任何直接线

索。于是，对于光学显微镜下行为与粘附之间的关系，使用 EM 和共焦显微镜进行了进一步研究。

实施例 2

STMS 肽因子的生物学研究

对 STMS 肽因子的生物学兴趣建立在其作为糖皮质激素的某些或所有抗炎作用的介质的潜在角色上。使用与肽因子相对的上清液的许多初步观察均支持这一角色，但是，其它的，如分散性移动现象，不是明显的抗炎反应。然而，低粘附性（似乎是引起分散移动的原因之一）则具有清楚的抗炎涵义。

嗜中性白细胞移动的趋化

使用其浓度能够引起类似于基础运动次最大刺激的激动剂。前面实验的粗或部分纯化的 STMS 肽因子显示出在始终如一的浓度梯度时能够刺激嗜中性白细胞发生高度分散移动。这明显与对其它试剂尤其是对 fMLP 的反应相反，对 fMLP 的移动特性提示尽管细胞是高度能动的，但是不能打破细胞对底物的最初粘附。这里表明，部分纯化的 STMS 在引起类似于 10 nm fMLP 自发速度的浓度时也产生分散反应（图 1，2）。

除了定量测定移动参数，在实验期间还对细胞进行了观察，表明当用不同刺激剂处理细胞时，显示出非常清晰的活动特征。嗜中性白细胞暴露于 STMS，很快变成与变平和附着相一致的暗-相，但是，然后又恢复明亮相状态并变成能动的。相反地，IL-8 诱导细胞呈可逆性暗相和明相的周期性活动特征，而用 fMLP 处理的细胞则保持明相。STMS 处理的细胞也显示出极具特色的现象，给人的主观印象是细胞附着于底物的单个位点上，同时上面的细胞体在动态活动。所有其它刺激剂实验显示引起嗜中性白细胞形成数个底物附着点。该观察与先前粘附实验的结果一致，先前粘附实验表明 STMS 处理的嗜中性白细胞极易从蛋白包被的玻璃表面洗脱下来。

嗜中性白细胞极化和膜形态学

用部分纯化的 STMS 肽因子处理的嗜中性白细胞，在相-差显微镜下看起来是伸长的，它们对蛋白包被的玻璃表面的粘附特性表明它们可能是附着于单个位点。通过洗涤细胞相对容易被分离开，这种表现也提示

大部分未附着细胞体以其伸长的突起连接于玻璃表面。

扫描电子显微镜

研究结果证实，fMLP 或 IL-8 处理的细胞显示出典型的极化，即具有丰富的波状膜区域而没有清晰的前沿(图 3a, b, c)。除了由与基层接触的清晰可见点所显示的皱褶，细胞体上面的膜高度卷曲。虽然 fMLP 和 IL-8 诱导的膜上的差异清晰可见，但是很难定义。相反，STMS 诱导的形态学是独特的并便于描述（图 3c）。

细胞是伸长的双极形状，但是，可能涉及与基层接触粘附的两个末端却不完全相同。膜相对光滑具有无数小突起，细胞体和明显的伪足间的表面观无特别明确的差异。

嗜中性白细胞接种在单层牛主动脉内皮细胞上 30 分钟，并用于制备 SEM。这种处理使膜表面表观出现微小的差异，对 IL-8 和 fMLP 反应时膜表面是皱褶的，而对 STMS 反应时相对光滑。最明显的差异是当 fMLP 和 IL-8 处理的嗜中性白细胞几乎全是在内皮细胞接点处被发现时，STMS 处理的嗜中性白细胞却倾向于在内皮细胞胞体处被发现（图 4a, b）。

共焦显微镜

为研究形状差异的发生机制和弄明白分散移动的性质，我们检测了细胞中聚合的肌动蛋白的分布。对照非激活嗜中性白细胞显示出弱的、相当点状的荧光分布，但是没有相当于皮层肌动蛋白相对平均分布的主要极化灶的迹象（图 5a）。由 fMLP 得到的结果与其他工作者[Coates 等, 1992]提供的结果相似，并且与肌动蛋白聚合较对照细胞明显致密以及肌动蛋白聚合与活跃移动聚集的粘附接触点有关的解释一致(图 5b)。对 CMS 或对 TNF 反应而高度扩散的细胞显示出 F-肌动蛋白非常典型的点分布(图 5c)。STMS-处理的细胞中肌动蛋白染色的现象极不寻常并且清晰。染色仅仅出现在双极细胞的极端，而对于这似乎是粘附接触点的两个末端，始终如一地是一端较另一断更致密地染色(图 5d)。

嗜中性白细胞对内皮细胞粘附的调节

部分纯化的肽因子减少嗜中性白细胞对单层内皮细胞的粘附。嗜中性白细胞/内皮细胞相互作用的扫描 EM 研究显示：与其它刺激物显著不同，上清液肽因子阻止粘附和内皮细胞接点处的侵入。

抑制嗜中性白细胞分泌

部分纯化的肽因子抑制细胞松弛素处理的嗜中性白细胞分泌弹性蛋白酶(未显示数据)。

实施例 3

STMS 和肽因子的详细生物学研究

嗜中性白细胞与牛主动脉内皮细胞的粘附

前面的数据表明 STMS 减少嗜中性白细胞与蛋白包被的玻璃的粘附[Chettibi 等, 1993]，使用更为生理性底物--牛主动脉内皮细胞进行进一步研究(图 2)。

趋化性

使用改良的 Boyden 室对嗜中性白细胞趋化性的初步观察揭示了对 STMS 和 fMLD 反应之间的惊人差异。然而，当用前沿方法检测滤膜时却清楚地显示仅少量 STMS-处理过的细胞能够成功浸润，与预测的持续移动保持一致 。这些观察提示需要更适宜的分析法来测量总浸润或测定处于前沿和滤膜表面之间的细胞数量。图 6 表示使用前沿和平均浸润两种方法分析趋化实验。结果表明：STMS 本身不是趋化性的，但当存在于上室时则戏剧性地抑制对 fMLP 的反应。在均一浓度的 fMLP 时（即，在两个室均含有）显著降低浸润。

由于 STMS 是经抗炎类固醇诱导而产生的，因此，没有理由相信该分子会是真正的抗炎介质。迄今显示的大多数特性与是嗜中性白细胞的前-炎症反应抑制因子的作用一致，然而，其最大特性－在靶细胞诱导持续移动，决不是预期的抗炎反应。前-炎症细胞因子具有高、低剂量效应的复杂程序，当细胞暴露于此类分子的梯度浓度时，高、低剂量产生极为不同的程序反应。例如，fMLP 的许多动力效应主要地被解释为对浓度梯度的反应。相反，STMS 对嗜中性白细胞的效应并没有表明在低和高浓度梯度时将会观察到数量上的显著不同。用均一浓度激动剂的研究进一步强调浓度梯度对于趋化反应的关键作用，因此，尽管用均一浓度的 fMLP 或 IL-8 处理的嗜中性白细胞具有高度活跃的运动突起，但是细胞不能产生有效的移位。相反，STMS 处理细胞显示出的相似程度的运动活性则引起了非常有效的移动。

已经确认肌动蛋白聚合是 fMLP 刺激嗜中性白细胞的早期反应。Coates 等[1992]已经提供证据表明肌动蛋白聚合是测定形状变化和描述极化特异现象的早期和主要事件。据信 fMLP 受体和这些早期膜事件之间的联系是由蛋白激酶 C(PKC)激活提供的，蛋白激酶 C 激活后能导致小的胞质 GTP-结合蛋白激活[Ridley, 1994]。

另外，最近 Janme [1995]综述了 PKC 在 MARCKs 磷酸化中的作用以及磷酸化和钙结合在决定肌动蛋白与质膜之间的相互作用中的作用。目前的观察提示以肌动蛋白为基础的移动突起是在细胞外周竞争，如果激动剂梯度造成位于细胞前沿的此类突起不均匀活动时，仅导致生产性位移。另一模式是梯度作用主要导致细胞尾端的粘附减弱。

在许多重要方面对 STMS 的反应模式是不同寻常的。肌动蛋白池看起来是高度活力的，但是 F-肌动蛋白的分布主要强制在一个末端，从而在双极细胞中造成肌动蛋白的单极分布。覆盖大部分胞体的膜保持相对光滑，在悬浮液中的细胞和粘附于内皮的细胞垛(尽管松弛)细胞的表面均观察到这种缺乏皱褶。有趣的是，缺乏皱褶可能是这些嗜中性白细胞本身不能识别内皮细胞间隙的表现，因而抑制炎症反应。

倾斜实验（细胞移动被引力场高度极化）得到的数据显示，激活细胞总是保持一个点与底物稳定粘附。因此，接下来为了保持此极性，肌动蛋白聚合块必须循环重复地从细胞的一个末端向另一末端移动。此激活方式的确趋向于提示细胞的双极性是由预先存在的至今尚未被描述的结构特征所决定的。

作为抗炎介质的 STMS 肽因子的行为的最重要方面之一是其调节细胞对前-炎症介质的反应。这在上述使用运动性刺激作为活性比较的基础参数的工作中已被验证过。在 STMS 和 fMLP 或 IL-8 作为移动刺激因子是等效的条件下，对 STMS 反应的形态学、粘附和移动倾向于占优势，细胞保持明相、双极和发生分散移动。

更为显著的是，STMS 肽因子本身不是趋化性的，但它能够抑制对 fMLP 反应的趋化。有趣的是这里讨论趋化中持续性的作用。根据概念的本来含义，任何定向移动均具有持续性。这在倾斜实验[Chettibi 等, 1994]中看的更清楚，实验中对 STMS 的反应显示出大于 90%的定向运动，而

持续性尽管无限但是基本上变成毫无疑义的概念。对于在均一浓度 STMS 中的移动，持续性反映移动系统中的某种惰性。请记住：在低雷诺氏数 (Reynold's number)条件下，此惰性必然与组织结构有关，在移动期间细胞骨架作用于组织结构或者其本身重新分布。

对在内皮层上的 STMS 处理的细胞的电子显微镜观测证实：细胞不去寻找内皮细胞间的接点，而且即使遇到间隙的话，也不具有穿透这种间隙的适宜的探测引导板。

可以得出这样的结论：类固醇诱导的因子所引起的嗜中性白细胞移动的持续性是对肌动蛋白分布和聚合作用影响的结果。这种类型的移动看起来致使嗜中性白细胞抵抗趋化刺激以及阻止嗜中性白细胞粘附于内皮细胞和经内皮细胞接点迁移。由于该因子表现为抗炎糖皮质激素作用的重要介质，那么纯化的肽因子就可能被有效地用于替代类固醇来治疗慢性炎症性病症。

实施例 4

活性因子的鉴定

STMS（类固醇处理的单核细胞上清液）定义为从类固醇处理的单核细胞的培养基中提取的活性物质，它影响人嗜中性白细胞的移动，特别是引起以高度 2-二维扩散系数为特征的分散或持续移动。

使用离子交换和凝胶过滤步骤相结合的方法，将 Chettibi 博士等描述的物质进行高度纯化，但是，关键步骤是使用一个 HPLC 柱和下述组成的梯度洗脱液的反相 HPLC：

A) 0.1% 三氟醋酸

B) 在 50%乙腈中的 0.1%三氟醋酸。

活性物质在 34% B 或其附近洗脱。

涉及极端 pH 或离子强度的分离方法极大地影响剂量-效应曲线。

由该方法制备的最具活性物质的浓缩溶液呈浅粉红色，物质的特征在于洗脱分析显示吸收峰在 214 nm 处并具有清楚的肩峰。进一步的拆分是不可能的，而且并不能将活性与峰或肩峰联系起来。质谱显示 1331 Da 质量的单个主组分和裂解分析得到 1186 Da 和 991Da 的组分。全长分析 (Dr Pappin ICRF)确认主峰是 acyanocobalmin－维生素 B_{12} 的衍生物。推测

维生素 B_{12} 事实上是污染物或起遮盖真正的肽因子的作用。因此，制备 STMS 和接下来纯化肽因子时省略维生素 B_{12}。此时发现细胞对从 HPLC 洗脱下来的物质的反应最适浓度至少较培养基中含有的浓度低 10^4 倍。该观察提示活性因子是小分子与载体蛋白的复合物。

由培养基中制备省略维生素 B_{12} 的 STMS 得到高产率的活性物质。使用加压透析(在真空中)纯化将 100 ml 培养基浓缩到少于 20 ml。用蒸馏水洗涤 dialisand 2 次。然后，通过从 Mono Q 阴离子交换树脂吸收和洗脱及在高盐浓度时在 Pharmacia 肽柱上进行凝胶过滤来纯化样本。接着，使用上述反相 HPLC 对样本进行纯化。最高度纯化的物质以单个峰洗脱下来而不含有色素。

现在质谱仪分析揭示单个主峰平均质量为 4980 Da (+/- 2 Da)。肽物质少部分酯化后进行的质谱测量表明含有 11 个酸性氨基酸残基（天冬氨酸和谷氨酸）。

然后，于 25℃在含有 15%v/v 正-丙醇和 0.5%己基-B-吡喃葡萄糖(HBG)的 6 μl 50 mM 碳酸氢铵(pH 7.8)中的 100 ng 胰蛋白酶(Boenringer，改良的) 对肽进行过夜消化。然后，将消化的肽与 N-琥珀酰亚胺基-2(3-吡啶)醋酸盐(SPA)反应以增强 b-离子丰度和便于串联质谱仪(Sherman 等, 1995)进行序列分析。在冰浴中，用在含有 15% v/v 乙腈的 0.5 M HEPES (用 NaOH 调节 pH 为 7.8) 中的 1% w/v N-琥珀酰亚胺基-2(3-吡啶)醋酸盐 7 μl 来处理干燥的肽成分 20 分钟。用 1 μl 七氟丁酸(HFBA)终止反应，立即将溶液注入用 POROS R2/H 物质(Perseptive Biosystems, MA)填充的毛细管反相柱(300 μm×15 cm)中，用 2% v/v 乙腈/0.05% v/v TFA 平衡，流速为 3 μl/min。用 10% v/v 乙腈/0.05% v/v TFA 以 3 μl/min 的流速无梯度洗脱吸收的肽 30 分钟，以洗脱出过量试剂和 HEPES 缓冲液。然后，用单阶梯度 75% v/v 乙腈/0.1% v/v 甲酸洗脱衍生肽并按每份 4 μl 收集。接下来，通过使用配有纳电喷射源的 Finnigan MAT TSQ7000 三联四极 MS(Hunt 等, 1986; Wilm 和 Mann, 1996)用低能碰撞诱导解离(CID)对 5 种衍生肽进行全序列分析。进行 CID 操作时使用碰撞偏移电压-13V ~ -33V 的 2-3 m Torr 氩。以 500 amu/秒 Q3 扫描采集产物-离子光谱。

得到的 5 个序列为：

1) Ac-SDKPDMAE[LI] EKFDK Ac-乙酰基; Met 氧化为 Met-硫氧(+16 Da)

2) TETQEK

3) NP[LI]PSK

4) ET[LI] EQEK

5) QAGES 游离酸在 C-末端

鉴定肽 1 并确定蛋氨酸氧化为硫氧蛋氨酸的数据示于图 7。

注意：不能分辨 Leu 和 Lie [LI]，因为它们是同分异构体。序列精确地与人胸腺素β4 的胰蛋白酶消化片段相对应。

现在从人嗜中性白细胞制备胸腺素β4 使用的方法是用 HPLC 纯化高氯酸上清液。用质谱分析得到的四个主峰。其中两个主峰被确定为在 37%B 洗脱出来的胸腺素β4(主峰)和在 34%B 洗脱出来的氧化胸腺素β4。另外两个峰没有给出 MW。

Pappin 博士还合成了胸腺素β4，但是终产物具有不同的修饰，认为发生在在 C-末端的丝氨酸。

目前，我们试图使用过氧化氢将胸腺素β4 氧化并且使用测定所用 HPLC 洗脱方式。室温下用 HO(50 vol.)处理胸腺素β45 分钟产生足量的转化。

Pappin 博士证明分子的平均质量为 4980 Da (+/- 2 Da)。

实施例 5

Tβ4so 的活性，在嗜中性白细胞移动实验中显示出在低浓度时是分散性运动，而在高于最适浓度时是刺激性非分散性移动，图 8a。在这些实验中，天然 Tβ4 确实不引起明显的分散性移动。众所周知嗜中性白细胞移动实验难以标准化，因此，我们试图使用独立分析一趋化抑制来确定因子的身份。早期的工作已经证实 STMS 抑制嗜中性白细胞对 fMLP 的趋化(Young 等, 1997)。现在，我们在 Boyden 室实验中测定 Tβ4 和 Tβ4so 的活性，证明二者均无趋化性，但是二者抑制对 fMLP 的趋化，而且氧化形式 Tβ4 具有一个数量级的更大效力，图 8b。这些结果支持 Tβ4so 可能是 Tβ4 的细胞外生物活性形式的观点，对此我们通过比较二者在内皮细胞层伤口闭合实验中的活性而作了研究，内皮细胞伤口闭合实验是

分析 Tβ4 活性的更接近的生物分析实验(Malinda 等)。Tβ4 作用的结果与公开的数据完全吻合，但是 Tβ4so 的活性高于天然肽至少有一个数量级，图 8c。用更多氧化产物污染天然 Tβ4 (此例中是 7%),得到的结果与 Tβ4so 是唯一生物活性形式的假说一致。进一步研究使用的是用 HPLC 纯化的干燥 Tβ4，贮存于-20℃液氮下，使用前即时溶解。这些结果，尤其是抑制趋化，使得有理由相信 Tβ4so 能够减弱与嗜中性白细胞有关的炎症过程，于是，将体外观测进一步扩展到使用角叉菜胶诱导炎症模型的体内实验上，所述模型的特征是大量嗜中性白细胞浸润并伴有水肿形成(Ianaro, 1994)。在将角叉菜胶注射到 BALB/c 小鼠后足掌前 30 分钟、注射同时和注射后 6 小时时施用 Tβ4so，明显减轻肿胀，6 小时后效果显著并且作用持续高达 24 小时(图 9a)。抑制是剂量应答性的和特异的，因为施用 10 或 100 ng Tβ4so，或 PBS 或 Tβ4(1000 ng)没有效果（图 9b）。实验中进行的 800 ng Tβ4so 和 Tβ4 的比较清楚地显示只有氧化肽显著降低角叉菜胶诱导的肿胀(图 9c)。这些数据表明：要达到 Tβ4so 的体内抗炎活性，蛋氨酸氧化是关键，而且强力地支持体外实验发现的生物推论。

参考文献

Almawi, W.Y., Lipman, M.L., Stevens, A.C., Zanker, B., Hardo, E.T., and Strom, T.B. (1991):通过IL-1, IL-2和TNFγ的协同作用抵销类固醇糖皮质激素介导的T细胞增殖抑制. 免疫学杂志 (J. Immunol) 146, 3523-3527。

Arnaout, M.A. (1993):白细胞内-皮细胞相互作用的动力和调节, Curr. Opin. Haemotol. 1,113-122。

Bevilacqua, M.P.和 Nelson, R.M. (1993). 选择蛋白(Selectins). J. Clin. Invest. 91, 379-387。

Chettibi, S., Lawrence, A.J., Stevenson, R.D., 和 Young, J.D. (1993):在存在地塞米松时由单核细胞释放的刺激嗜中性白细胞移动的因子. 英国药理学杂志(Br. J. Pharmocol.) 108, 248-254。

Chettibi, S., Lawrence, A.J., Young, J.D. Lawrence, P.D. and Stevenson, R.D.(1994):人嗜中性白细胞对提取自单核细胞的类固醇诱导的因子反应而进行的分散性运动. 细胞科学杂志(J. Cell Sci.) 107. 3173-3181。

Coates, T.D., Watts, T.G. Hartman, H. and Howard, T.H.(1992): 人多核嗜中性白细胞中 F-肌动蛋白分布与极形状发育的关系。细胞生物学杂志(J. Cell Biol.) 117, 765-774。

Cronstein, B. N., Kimmel, S.C., Levin, R. I., Martinuik, F.和 Weissmann, G. (1992): 皮质激素抗炎作用机制. 糖皮质激素受体调节白细胞粘附于内皮细胞并表达内皮性白细胞粘附分子-1和细胞内粘附分子-1. Nat. Acad. Sci. USA 89, 9991-9995。

Hannapell E., Davoust S., Horecker D. L., (1982) "由牛胸腺提取肽" ("Isolation of peptides from calf thymus") Biochem. Bisphys. Res. Commun. 第 104 卷 266-271 页。

Hogg, N., 和Berlin, C. (1995): 白细胞运输中粘附受体的结构和功能. 今日免疫学(Immunology today) 16, 327-330。

Hunt, D.F., Yates, J. F., Shabanowitz, J., Winston, S. 和 Hauer, C. R. (1986) 串联质谱仪分析蛋白质序列. Proc. Natnl. Acad. Sci. USA 84,

6233-6237。

Lanqro, A., O'Donnell, C.A., Di Rosa, M., &Liew, F.Y. 在角叉菜胶诱导的小鼠水肿模型中，一氧化氮合成抑制剂减轻炎症、下调炎性细胞因子以及增加细胞因子-10 的产量. 免疫学 (Immunology), 82, 370-375 (1994)。

Jamney, p.A. (1995): 作为细胞调节剂的磷酸肌醇和钙的结合和分离. Ann. Rev. Physiol. 56, 169-191。

Kwon, O. J., Collins, P.D., Au, B., Adccok, I.M., Yacoub, M., Chung, K.F., Barnes, P.J. (1993): 糖皮质激素抑制原代培养的人气道上皮细胞中 TNF-α-诱导的 IL-8 基因表达. American rev. resp. dis., 147。

Lew, W., Oppenheim, J.J.和 Matsushima, K. (1988): 使用糖皮质激素分析人外周血单核粘连细胞中 IL-1α 和 IL-1β 生成的抑制. 免疫学杂志(J. Immunol.)140, 1895-1902。

Malinda, K.M., Goldstein, A.L. & Kleinman, H.M.胸腺素 β_4 刺激人脐静脉内皮细胞定向迁移. FASEB J. 11: 472-481 (1997)。

Ridley, A.J. (1994): 膜皱褶和信号转导. 定量生物学冷泉港口专题讨论会(Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology) 16, 321-327。

Sherman, N.E., Yates, N.A., Shabarowitz, J. Hunt, D.F. Jeffery W., Bartlet-Jones, N. 和 Pappin, D.J.C. (1995)为单一化肽片段而设计的新 N-末端衍生物.质谱和联合应用论题第 43 届 ASMS 大会论文集(Proceeding of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Tropics), 亚特兰大, 乔治亚州, 5 月 21-26, 第 626-627 页。

Standiford, T.J., Kunel, S.L., Rolfe, M.W., Evanoff, H.L., Allen, R.M., 和 Strieter, R.M. (1992): 前列腺素 E_2 和地塞咪松对人肺泡巨噬细胞和血单核细胞衍生白介素-8 的调节. 美国呼吸细胞分子生物学杂志(Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.) 6, 75-81。

Stevenson, R.D. (1973): 氢化可的松和人白细胞的迁移: 单核细胞介导的间接作用. 临床实验免疫学(Clin. Exp. Immunol.) 14, 417-426。

Stevenson, R.D. (1974): 多形核白细胞迁移刺激剂,--一种由氢化可的松处理的白细胞产生的新的因子.临床实验免疫学(Clin. Exp. Immunol.)

17, 601-606。

Stevenson, R.D. (1978). 毛细血管多形核白细胞迁移刺激: 对微管功能的非直接糖皮质激素作用. 临床实验免疫学 (Clin. Exp. Immunol.) 33, 478-485。

Stossel, T.P. (1988): 白细胞的机械反应.在炎症中:基本原则和临床联系(In Inflammation: Basic principles and clinical correlates) (著者: J. I. Gallin, I.M. Goldstein and R. Snyderman) 第 325-342. Raven 出版社, 纽约。

Wilm, M.,和 Mann, M. (1996). 微电喷射离子源的特性分析. 分析化学(Anal. Chem.) 68, 1-8。

Wong, W.T., Frost, S.C.和 Nick, H.S. (1991): 糖皮质激素对膜联蛋白 I 的蛋白合成依赖性诱导. 生物化学杂志(Biochem. J.) 275, 313-319。

Young, J.D., Maclean, A.G., Lawrence, A.J., Stevenson, R.D. Chettibi, S.人嗜中性白细胞形态学和肌动蛋白分布与类固醇诱导的因子引起的分散移动之间的关系. Experimental Biology Online. 2, 7 (1997)。

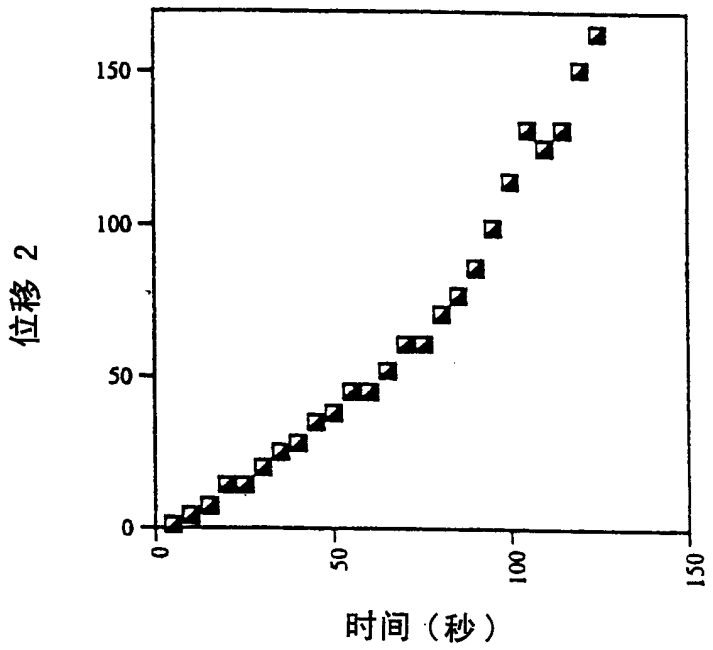


图 1

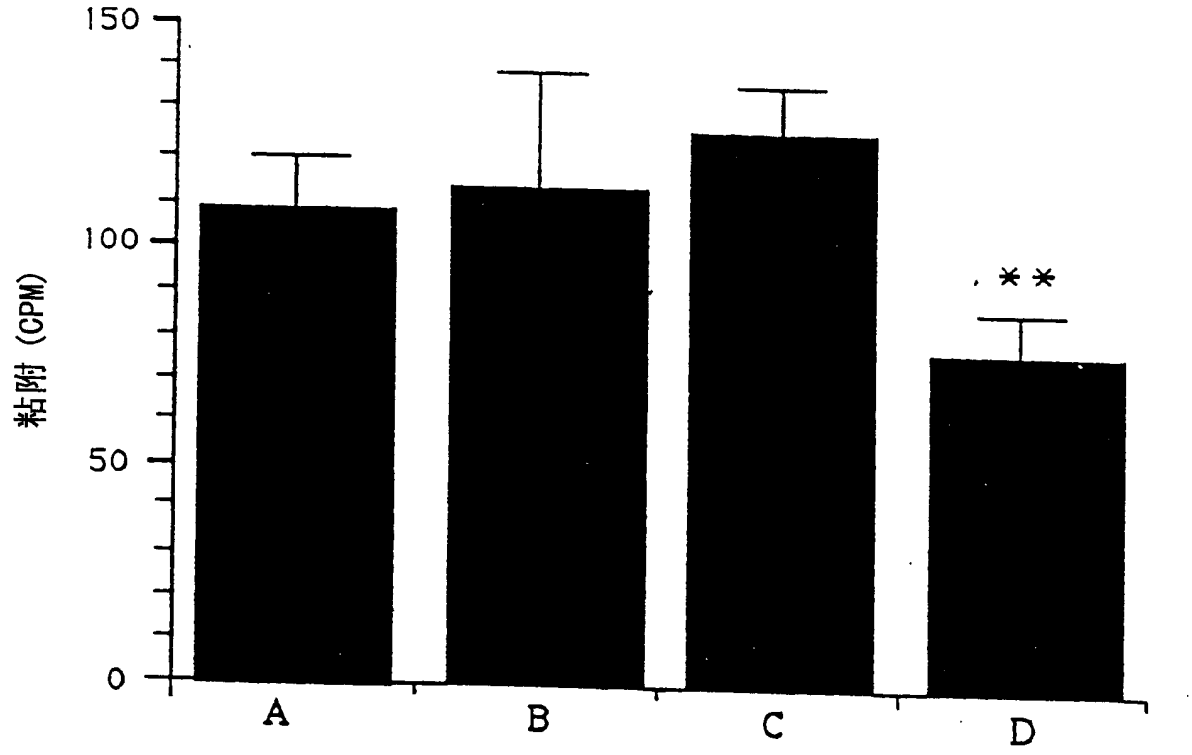


图 2



图 3a



图 3b

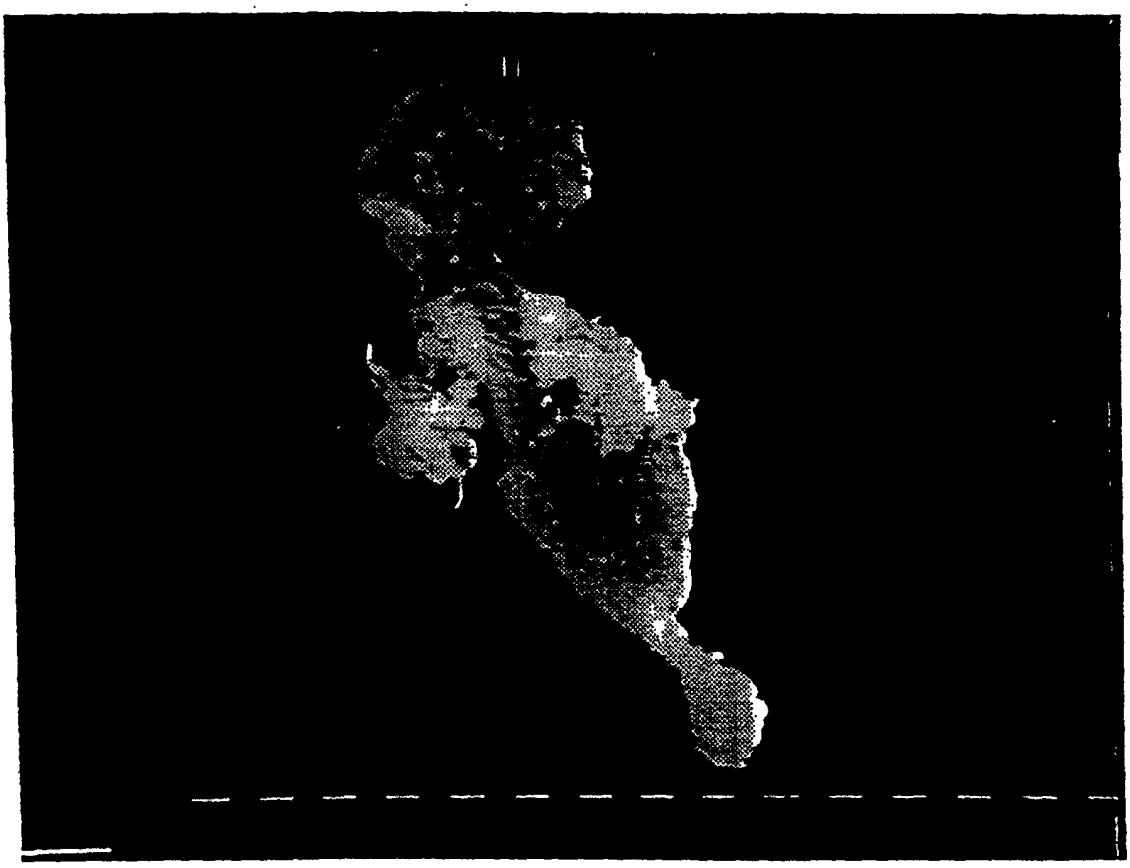


图 3c



图 4a



图 4b

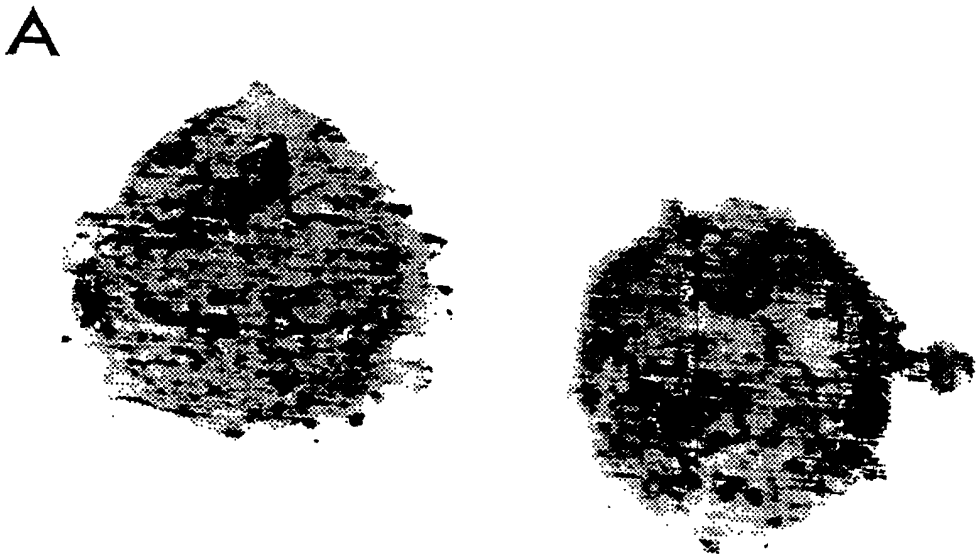


图 5a



图 5b



图 5c

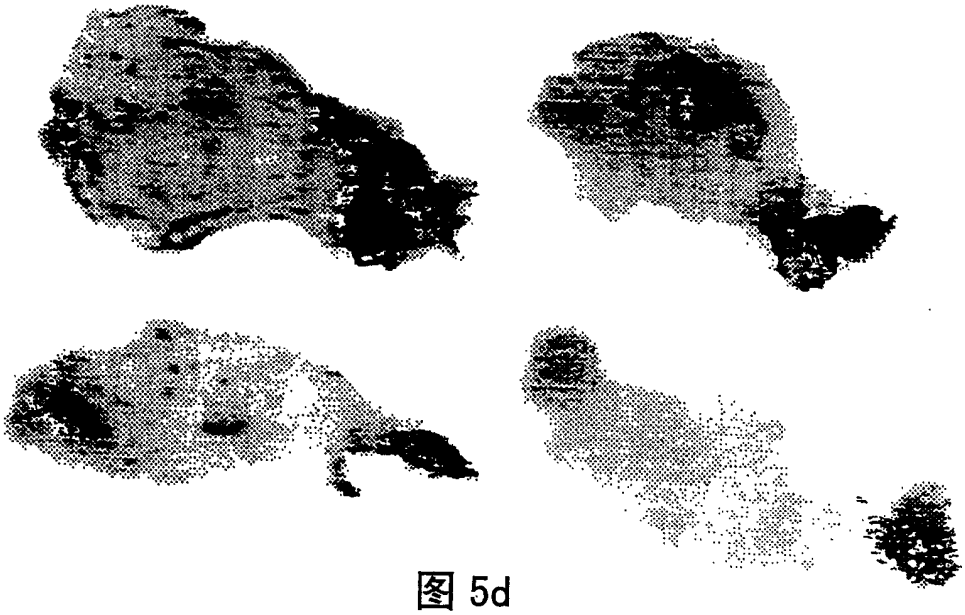


图 5d

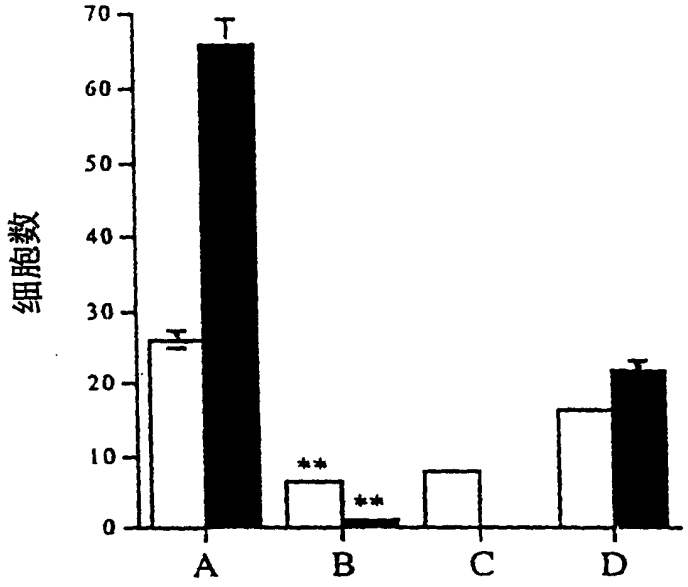


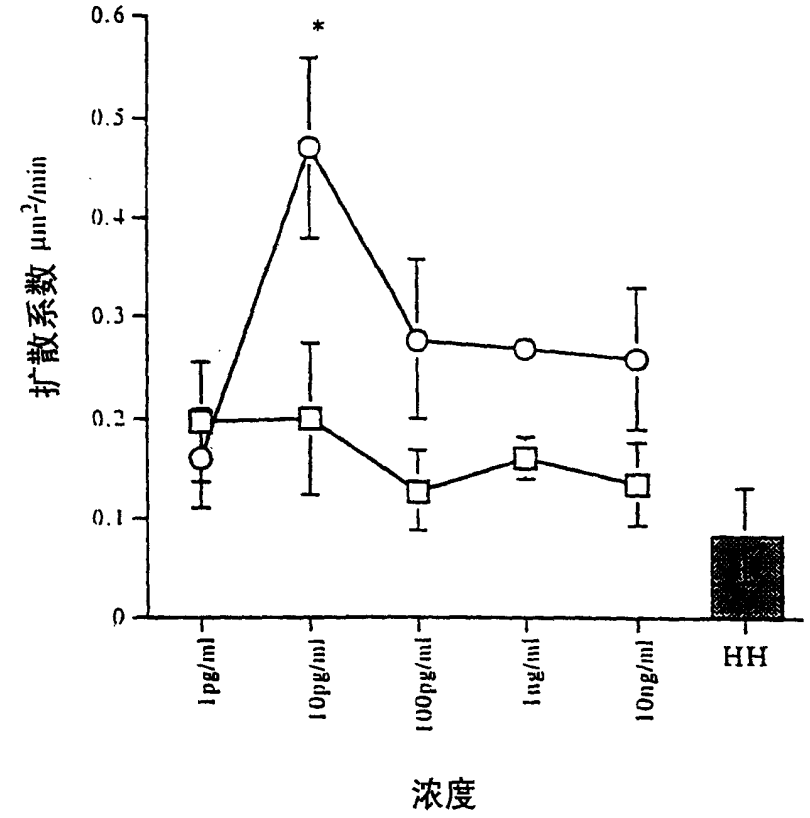
图 6

多肽 1:[M+2H]2+离子 于 1035.1 Da, COFF 于 -25V

N-末端 : 乙酰基 C-末端 : 游离酸

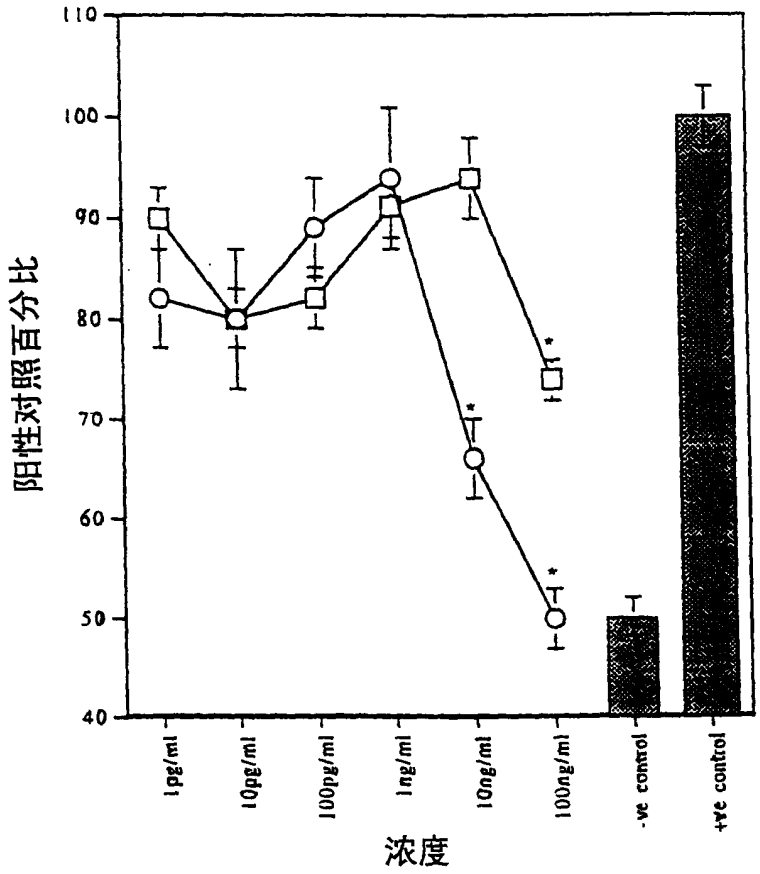
序号	序列	A	A-NH3	B	B-NH3	Y	Y-NH3	序号
1	Ser	102.1	85.0*	130.1*	113.0	2025.9	2008.9	14
2	Asp	217.1*	200.1*	245.1*	228.1*	1938.9	1921.8	13
3	Kpy	464.2*	447.2*	492.2*	475.2*	1823.8*	1806.8	12
4	Pro	561.3*	544.2*	589.3*	572.2*	1576.7*	1559.7*	11
5	Asp	676.3*	659.3*	704.3*	687.3*	1479.6*	1462.6	10
6	Mso	823.3*	806.3*	851.3*	834.3	1364.6*	1347.6	9
7	Ala	894.4*	877.3*	922.4*	905.3*	1217.6*	1200.6*	8
8	Glu	1023.4	1006.4	1051.4*	1034.4*	1146.5*	1129.5	7
9	Xle	1136.5*	1119.5	1164.5*	1147.5*	1017.5*	1000.5	6
10	Glu	1265.5*	1248.5*	1293.5*	1276.5*	904.4*	887.4*	5
11	Kpy	1512.7*	1495.6	1540.7*	1523.6	775.4*	758.4	4
12	Phe	1659.7*	1642.7	1687.7*	1670.7*	528.2*	511.2*	3
13	Asp	1774.8*	1757.7	1802.8	1785.7	381.2*	364.2*	2
14	Kpy	2021.9	2004.9	2049.9	2032.9	266.2*	249.1	1

图 7



天然 □ 氧化的 ○, * p<0.05

图 8a



天然 □ 氧化的 ○, * p<0.05

图 8b

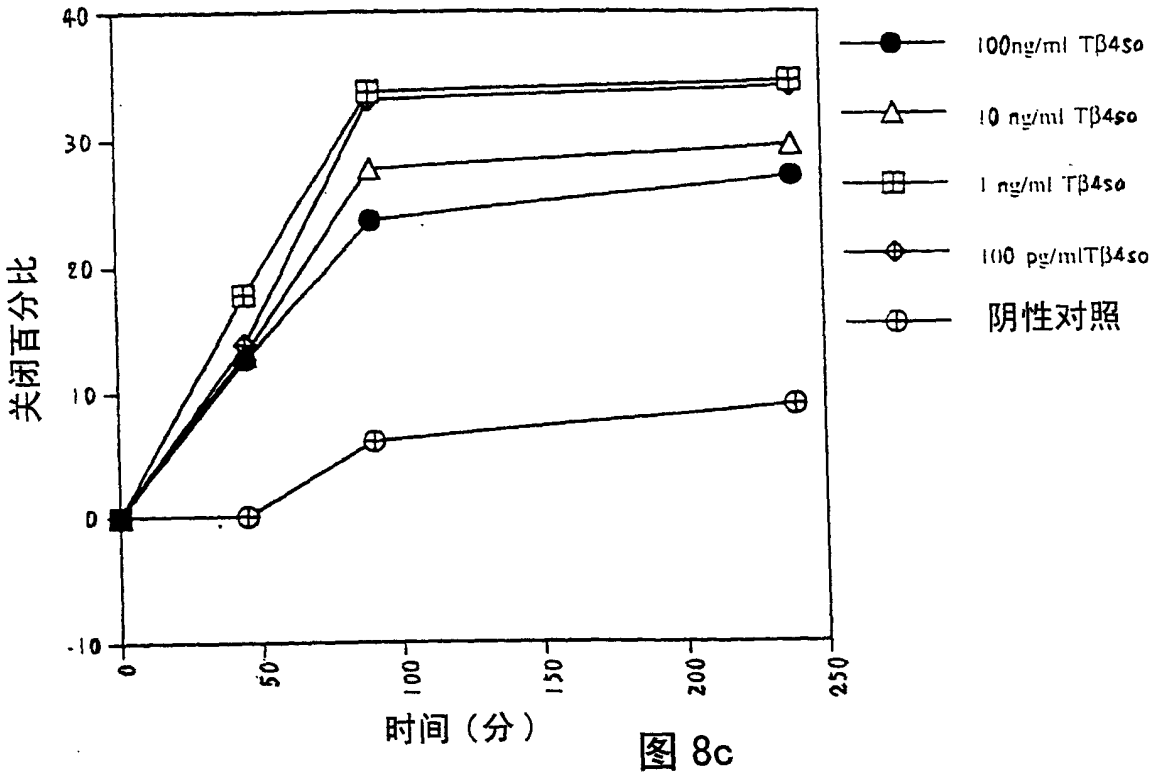

关闭百分比
时间（分）
100ng/ml Tβ4so
10 ng/ml Tβ4so
1 ng/ml Tβ4so
100 pg/mlTβ4so
阴性对照

图 8c

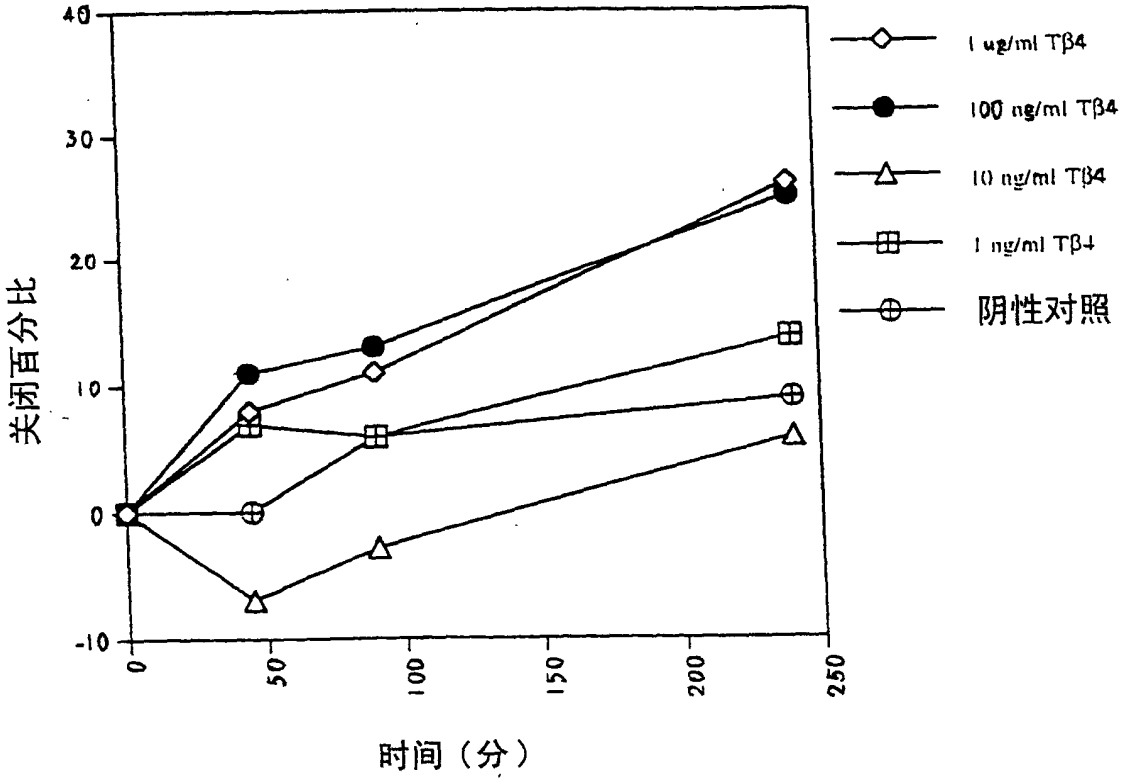

关闭百分比
时间（分）
1 ug/ml Tβ4
100 ng/ml Tβ4
10 ng/ml Tβ4
1 ng/ml Tβ4
阴性对照

图 8d

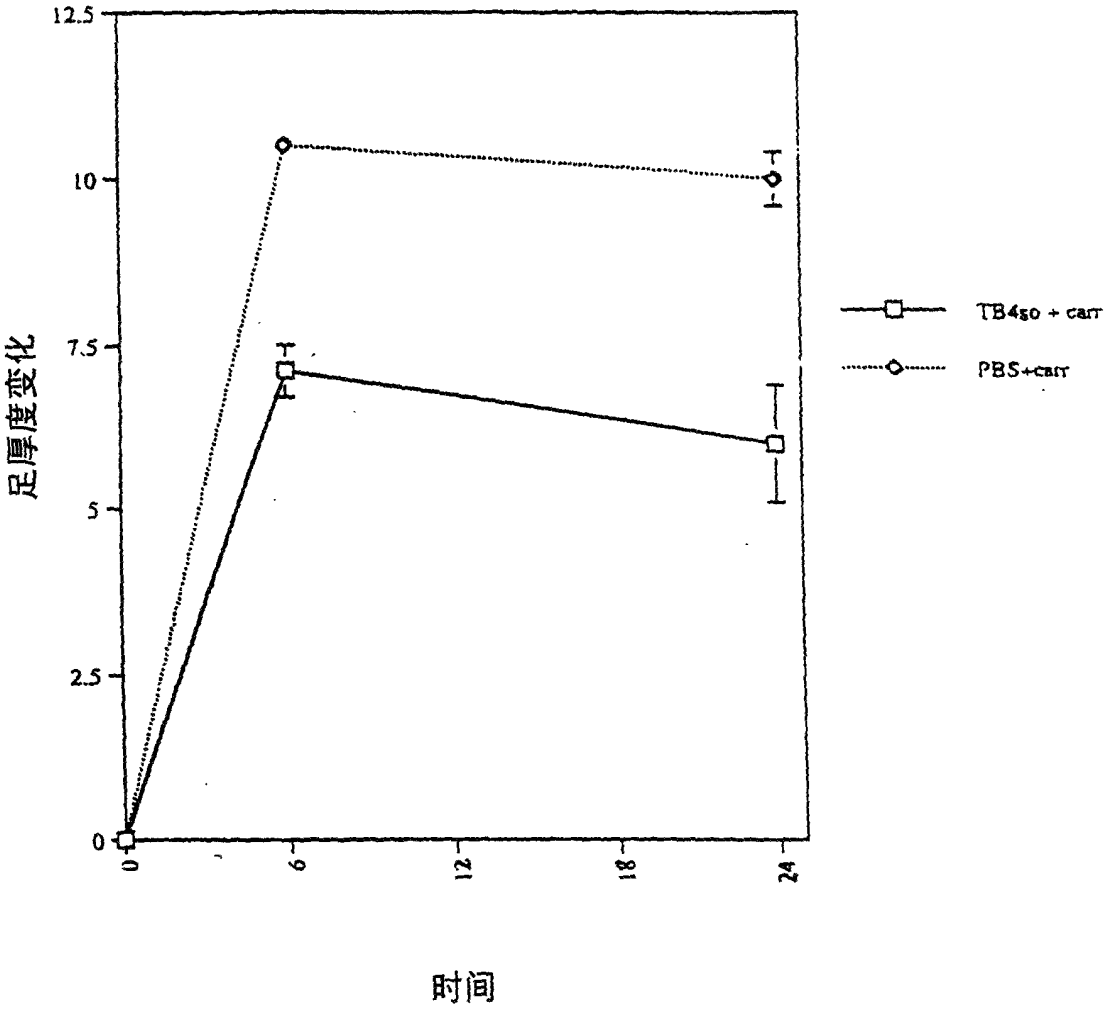


图 9a

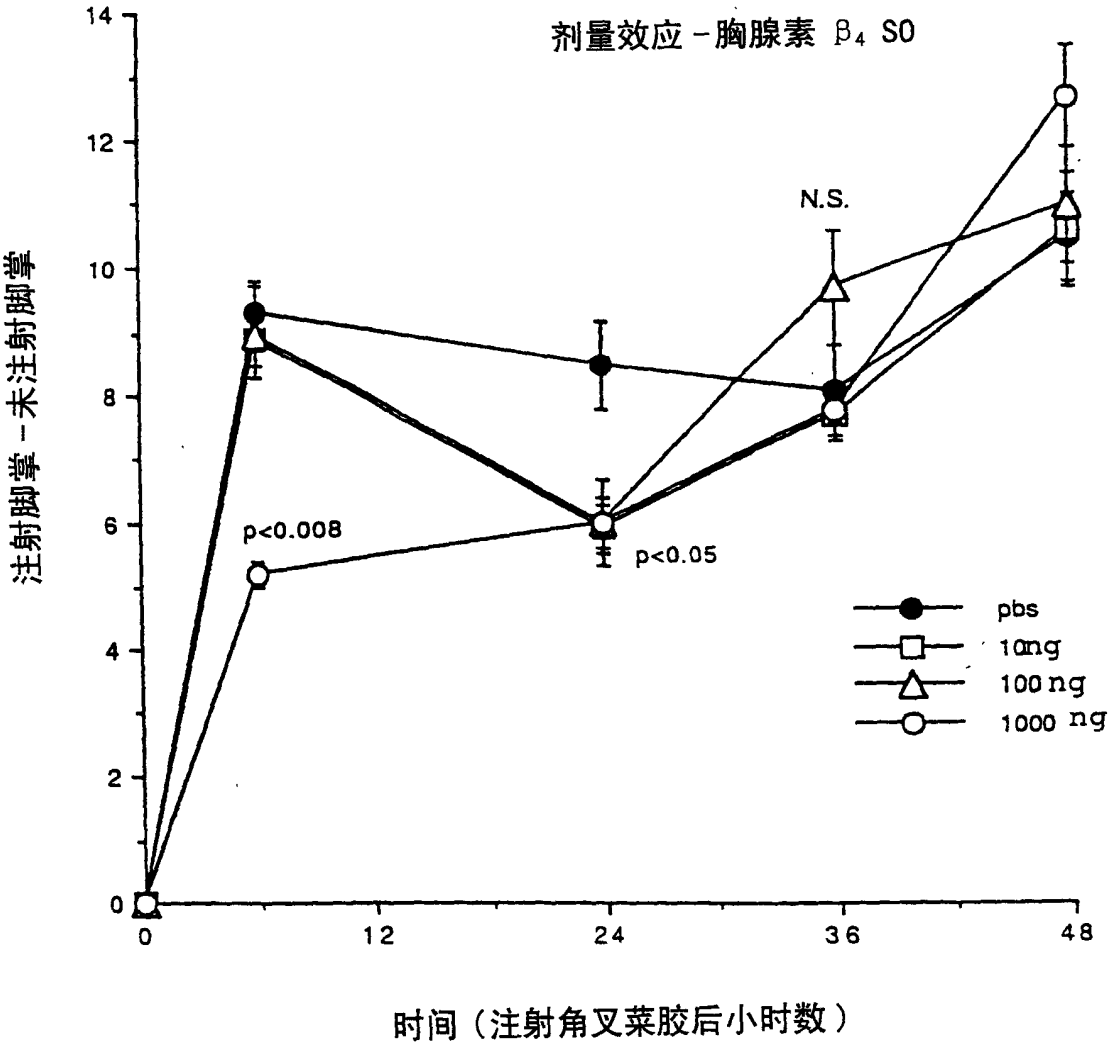

剂量效应－胸腺素 β4 S0
注射脚掌－未注射脚掌
时间（注射角叉菜胶后小时数）
N.S.
p<0.008
p<0.05
pbs
10ng
100 ng
1000 ng
0
2
4
6
8
10
12
14
0
12
24
36
48

图 9b

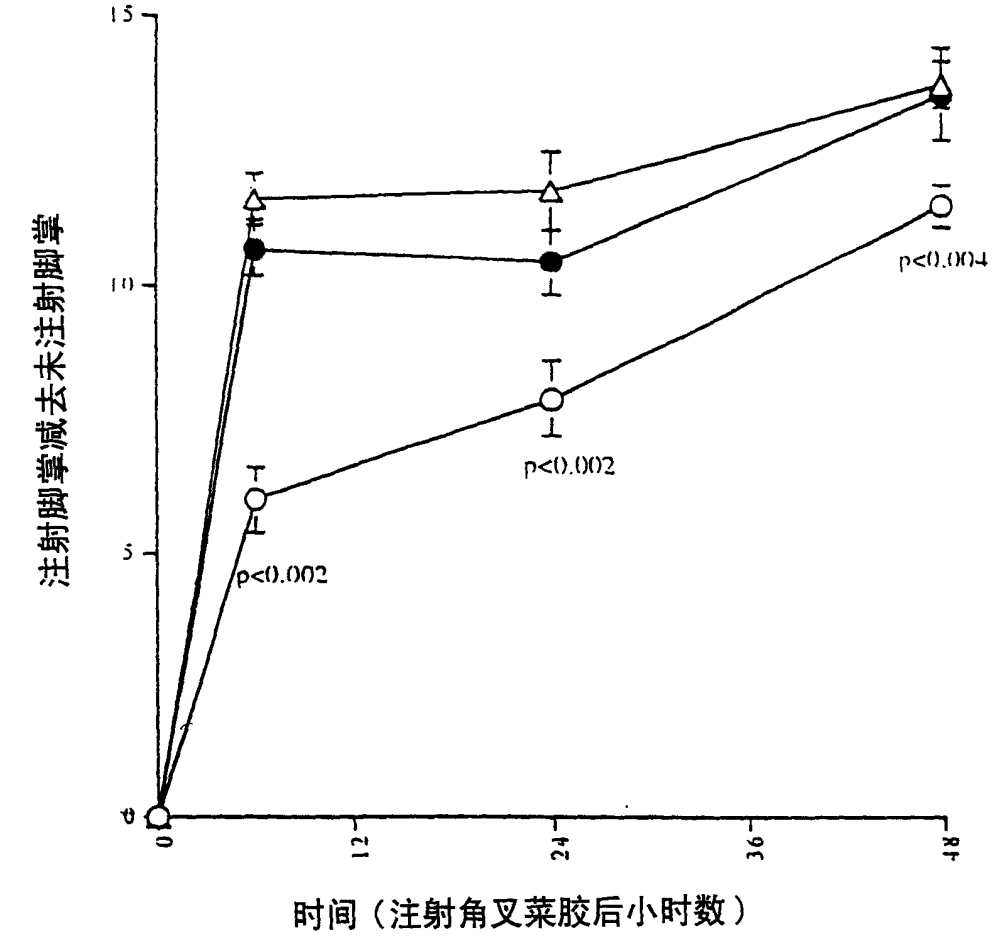

注射脚掌减去未注射脚掌
15
10
5
0
0
12
24
36
48
p<0.002
p<0.002
p<0.004
时间（注射角叉菜胶后小时数）
天然 △ 氧化的 ○ 、PBS ●

图 9c