

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07K 14/54

A61K 38/20

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97193092.9

[43]公开日 1999年8月25日

[11]公开号 CN 1226899A

[22]申请日 97.1.16 [21]申请号 97193092.9

[30]优先权

[32]96.1.18 [33]WO [31]PCT/DK96/00029

[86]国际申请 PCT/DK97/00021 97.1.16

[87]国际公布 WO97/26279 英 97.7.24

[85]进入国家阶段日期 98.9.15

[71]申请人 史廷诺研究集团有限公司

地址 丹麦奥登舍

[72]发明人 C·格伦霍拉森 B·热塞

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

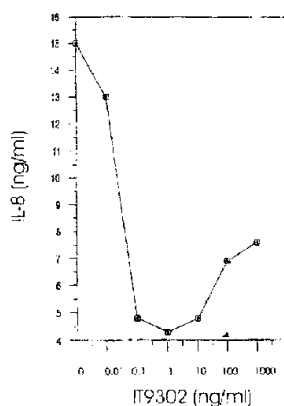
代理人 齐曾度

权利要求书 4 页 说明书 62 页 附图页数 14 页

[54]发明名称 合成的 IL-10 类似物

[57]摘要

本发明涉及根据式 $X_1 - X_2 - X_3 - \text{Thr} - X_4 - \text{Lys} - X_5 - \text{Arg} - X_6$ (SEQ ID No:22) 的物质或多肽和以其为基础设计的肽模拟物用于制备药用组合物的用途,其中 X_1 是 Ala 或 Gly, X_2 是 Tyr 或 Phe, X_3 、 X_4 和 X_5 独立地选自 Met、Ile、Leu 和 Val; 以及 X_6 选自 Asp、Gln、Gln; 至少 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 和 X_6 中的一个可任选地独立地被非天然或稀有氨基酸置换代和/或该肽被环化和/或该肽被稳定化和/或所述氨基末端氨基酸残基被酰化和/或所述羧基末端氨基酸残基被酰胺化; 所述药用组合物用于减少 TNF α 的产生和/或胰腺炎的预防和治疗和/或病毒感染(诸如获得性免疫缺陷综合症(AIDS)或皮肤 HPV-感染的预防和治疗。特别是本发明涉及上式的肽类似物,其中至少 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 和 X_6 中的一个独立地被非天然或稀有氨基酸取代和/或所述肽被环化和/或所述肽被稳定化和/或所述氨基末端氨基酸残基被酰化和/或所述羧基末端氨基酸残基被酰胺化,以及以上式为基础设计的肽模拟物。



IT9302 抑制淋巴细胞的粘附和趋化作用, 抑制 IL-8 的产生。
(*) 表示使用 IL-10 (100 ng/ml) 时 IL-8 的水平。

专利文献出版社出版

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 按照下式的物质或多肽以下式为基础设计的肽模拟物用于制备药用组合物的用途

5 $X_1-X_2-X_3\text{-Thr-}X_4\text{-Lys-}X_5\text{-Arg-}X_6$ (SEQ ID NO: 22)

其中

X_1 是Ala或Gly,

X_2 是Tyr或Phe

X_3 、 X_4 和 X_5 独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

10 X_6 选自Asp、Gln、Glu;

至少 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 和 X_6 中的一个可任选地独立地被非天然或稀有氨基酸置换代和/或该肽被环化和/或该肽被稳定化和/或所述氨基末端氨基酸残基被酰化和/或所述羧基末端氨基酸残基被酰胺化; 所述药用组合物用于减少 $\text{TNF}\alpha$ 的产生。

15 2. 按照下式的物质或多肽和以下式为基础设计的肽模拟物用于制备药用组合物的用途

$X_1-X_2-X_3\text{-Thr-}X_4\text{-Lys-}X_5\text{-Arg-}X_6$ (SEQ ID NO:22)

其中

X_1 是Ala或Gly,

20 X_2 是Tyr或Phe

X_3 、 X_4 和 X_5 独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

X_6 选自Asp、Gln、Glu;

至少 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 和 X_6 中的一个可任选地独立地被非天然或稀有氨基酸置换代和/或该肽被环化和/或该肽被稳定化和/或所述氨基末端氨基酸残基被酰化和/或所述羧基末端氨基酸残基被酰胺化; 所述药用组合物用于预防和治疗胰腺炎。

25 3. 按照下式的物质或多肽和以下式为基础设计的肽模拟物用于制备药用组合物的用途

$X_1-X_2-X_3\text{-Thr-}X_4\text{-Lys-}X_5\text{-Arg-}X_6$ (SEQ ID NO:22)

其中

X_1 是Ala或Gly,

X_2 是Tyr或Phe

5 X_3 、 X_4 和 X_5 独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

X_6 选自Asp、Gln、Glu;

至少 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 和 X_6 中的一个可任选地独立地被非天然或稀有氨基酸置换代和/或该肽被环化和/或该肽被稳定化和/或所述氨基末端氨基酸残基被酰化和/或所述羧基末端氨基酸残基被酰胺化; 所述药用组合物用于制备预防和治疗病毒性感染, 诸如获得性免疫缺陷综合

10 症(AIDS)或皮肤HPV感染。

4. 具有下式的物质或多肽

$X_1-X_2-X_3\text{-Thr-}X_4\text{-Lys-}X_5\text{-Arg-}X_6$ (SEQ ID NO:22)

其中

15 X_1 是Ala或Gly,

X_2 是Tyr或Phe

X_3 、 X_4 和 X_5 独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

X_6 选自Asp、Gln、Glu;

其中至少 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 和 X_6 中的一个独立地被非天然或稀有氨基酸置换代, 所述物质或多肽具有至少一项IT9302的生物学活性。

20

5. 具有下式的物质或多肽

$X_2-X_3\text{-Thr-}X_4\text{-Lys-}X_5\text{-Arg-}X_6$ (SEQ ID NO:21)

其中

X_2 是Tyr或Phe

25 X_3 、 X_4 和 X_5 独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

X_6 选自Asp、Gln、Glu;

其中至少 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 和 X_6 中的一个独立地被非天然或稀有氨基酸置换代, 所述物质或多肽具有至少一项IT9302的生物学活性。

6. 具有下式的物质或多肽



其中

X₃、X₄和X₅独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

5 X₆选自Asp、Gln、Glu;

其中至少X₃、X₄、X₅和X₆中的一个独立地被非天然或稀有氨基酸置换代, 所述物质或多肽具有至少一项IT9302的生物学活性。

7. 具有下式的物质或多肽



10 其中

X₄和X₅独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

X₆选自Asp、Gln、Glu;

其中至少X₃、X₄、X₅和X₆中的一个独立地被非天然或稀有氨基酸置换代, 所述物质或多肽具有至少一项IT9302的生物学活性。

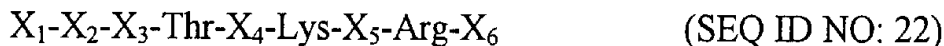
15 8. 按照权利要求4-7的任何一项的物质或肽, 它被环化。

9. 按照权利要求4-7的任何一项的物质或肽, 它被稳定化。

10. 按照权利要求4-7的任何一项的物质或肽, 其中所述氨基末端氨基酸残基被酰化。

11. 按照权利要求4-7的任何一项的物质或肽, 其中所述羧基末端氨基酸残基被酰胺化。

12. 以下式为基础设计的肽模拟物



其中

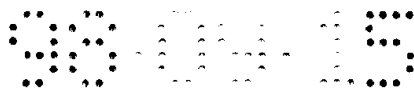
X₁是Ala或Gly,

25 X₂是Tyr或Phe

X₃、X₄和X₅独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

X₆选自Asp、Gln、Glu;

所述肽模拟物具有至少一项IT9302的生物学活性。



13. 包含按照权利要求4-12任何一项的物质或多肽的药用组合物。

14. 按照权利要求4-12的任何一项的物质或多肽用于治疗或预防表1和2提到的一种或多种疾病的用途。

5 15. 按照权利要求4-12的任何一项的物质或多肽用于生产用于治疗或预防表1和2提到的一种或多种疾病的药用组合物的用途。

16. 治疗和/或预防表1和2提到的一种或多种疾病的方法，该方法包括给与病人治疗或预防有效剂量的按照权利要求4-12的任何一项的物质或多肽。

10 17. 按照权利要求4-12的任何一项的物质或肽用固相肽合成(SPPS)法的合成，所述合成过程包括以下步骤：

a) 以N- α -被保护、可任选的侧链-保护反应性衍生物的形式，将C-末端氨基酸或直接或通过合适的连接物共价偶联到固相载体上，

b) 去掉所述N- α -保护性基团，

15 c) 按照所需的序列，以分段方式加入后续的被保护的氨基酸，

d) 侧链保护性基团如果存在的话，将其去掉。

e) 组装完整的肽链时，从所述树脂上切下所述肽，以及可任选地

f) 环化和/或稳定所述肽和/或酰化所述氨基末端的氨基酸残基和/或酰胺化所述羧基末端的氨基酸残基。

5 发明领域

发明背景

发明概述

X₁-X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO:22)

其中

X₁是Ala或Gly,

X₂是Tyr或Phe

25 X_3 、 X_4 和 X_5 独立地选自Met、Ile、Leu和Val; 以及

X₆选自Asp、Gln、Glu;

至少X₁、X₂、X₃、X₄、X₅和X₆中的一个可任选地独立地被非天然或稀有氨基酸置换代和/或该肽被环化和/或该肽被稳定化和/或所述氨基末

端氨基酸残基被酰化和/或所述羧基末端氨基酸残基被酰胺化；所述药用组合物用于减少TNF α 的产生和/或胰腺炎的预防和治疗。

此外，本发明涉及具有下式的物质或多肽和以下式为基础设计的肽模拟物，

5 X₁-X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO:22)

其中

X₁是Ala或Gly,

X₂是Tyr或Phe

X₃、X₄和X₅独立地选自Met、Ile、Leu和Val;

10 X₆选自Asp、Gln、Glu; 至少X₁、X₂、X₃、X₄、X₅和X₆中的一个可任选地独立地被非天然或稀有氨基酸置换和/或该肽被环化和/或该肽被稳定化和/或该氨基末端氨基酸残基被酰化和/或该羧基末端氨基酸残基被酰胺化，所述的物质或多肽具有至少一个下列性质：

a) 诱导人单核细胞自发性IL-8生产的抑制作用，

15 b) 诱导人外周血单核细胞(PBMC)IL-1 β 诱导的IL-8生产的抑制作用，

c) 诱导人单核细胞白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IRAP)的产生，

d) 在体外诱导CD8+人T淋巴细胞的趋化性迁移，

e) 脱敏人CD8+T淋巴细胞，导致对rhIL-10无反应性，

20 f) 抑制CD4+人T淋巴细胞对 IL-8的趋化反应，

g) 抑制人单核细胞对MCAF/MCP-1的趋化反应，

h) 抑制IFN- γ 刺激的人单核细胞上的 II 类MHC分子的表达，

i) 诱导培养的正常人 CD4+T细胞产生IL-4，

j) 在人混合白细胞反应中降低TNF α 的产生，

25 k) 减量调节胆汁酸诱导的急性胰腺炎的兔模型中TNF α 和IL-8的产生，并降低所述处理的兔的肺中嗜中性白细胞的渗入。

设想(如下面的免疫机制解释的详细说明)该作用机制是通过干扰免疫系统介质的作用，所述介质特别是细胞因子，诸如单核因子、淋

巴因子、化学激活素和单核因子-受体拮抗剂。即本发明的物质干扰/抑制某些细胞因子的产生和/或作用，这样就抑制了导致组织损伤的病理过程，而且本发明的物质诱导天然单核因子-受体拮抗剂的产生，这样就干扰/抑制了某些细胞因子如TNF α 或IL-1的作用，并借此抑制导致组织损伤的病理过程。

这样，本发明的一个重要实施例涉及药用组合物，它包含作为一活性成分的本发明的物质。

另一方面，本发明涉及本发明物质用于生产实质上抑制与细胞因子相关的生物学作用的药用组合物的用途，即用本发明的物质作为IL-1受体拮抗蛋白/肽、淋巴因子、单核因子、白细胞介素、干扰素、化学激活素或集落刺激因子的用途。另一方面涉及本发明的物质在生产用于预防和治疗与细胞因子系统失调相关联的药用组合物的用途，所述细胞因子系统即该IL-1受体拮抗蛋白/肽、淋巴因子、单核因子、白细胞介素、干扰素、化学激活素或集落刺激因子系统。在另一方面，本发明还涉及与细胞因子体系失调相关联的人的疾病的治疗方法，该方法包括对受治疗者给与有效剂量的本发明物质。

细胞免疫系统参与诸如感染性、炎性和肿瘤性疾病的失调性的形成。免疫感受态细胞和它们的产物可能在炎性疾病的起始、发展和形成的可能慢性性质中起重要作用。这些失调通常是病因不明的，并包括普通疾病，例如糖尿病、类风湿性关节炎、胃肠道和皮肤的炎性疾病。然而，除了这些例子，细胞介导的免疫性或原炎性介质成为许多其它炎性疾病和增生性疾病的原因之一(见表1)

表1

巨噬细胞/T-淋巴细胞介导的免疫反应
被认为是重要病原的一些疾病

	皮肤疾病:
5	牛皮癣
	专一性皮炎
	接触性皮炎
	皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)
	Sezary综合症
10	寻常性天疱疮
	大疱状类天疱疮
	结节性红斑
	硬皮病
15	自身免疫(包括类风湿)疾病:
	葡萄膜炎
	Bechet病
	Boeck类肉瘤病
	Sjogren综合症
20	类风湿性关节炎
	少年关节炎
	Reiter综合症
	痛风
	骨关节病
25	系统性红斑狼疮
	多肌炎
	心肌炎
	原发性胆汁性肝硬化

Crohn病

溃疡性结肠炎

多发性硬化和其它脱髓鞘病

再生障碍性贫血

5 特发性血小板减少紫癜

多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤

Simmon全垂体机能减退

突眼性甲状腺肿和Grave眼病

亚急性甲状腺炎和桥本氏病

10 Addison病

胰岛素依赖性糖尿病(1型)

其它疾病

15 有关血管炎的各种临床综合症(例如结节性多动脉炎、Wegener肉芽肿病、巨细胞动脉炎、发热、身体不适)。

食欲缺乏(例如: 在急性和慢性炎性和传染性疾病中)

播散性血管内血凝固(DIC)

动脉硬化(动脉粥样硬化)

休克(例如: 在革兰氏阴性脓毒症中)

20 恶病质(例如: 在肿瘤、慢性传染性和慢性炎性疾病中)

移植排斥和移植物抗宿主病

自发性流产的预防

IL-10对细胞因子产生的活性:

25 hIL-10抑制单核细胞/巨噬细胞和/或T淋巴细胞的多种细胞因子的生产, 所述细胞因子包括干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞-CSF(G-CSF)、IL- α 、IL- β 、IL-2、IL-6、IL-8 和单核细胞趋化多肽-1(MCP-1/MCAF)的产生

治疗上需要考虑的事:

例如在WO 96/01318中总结的这些体内结果/数据和其它数据, 强烈地提示IL-10在控制细胞介导的和单核因子放大的免疫炎症中的体内平衡作用, 并指出在以IL-10的产生和/或活性降低/不足为特征的一些疾病的治疗中, IL-10或具有IL-10样活性的药物的宽范围的治疗应用。表1和表2列出了一些疾病, 这些疾病中, 如IL-10的免疫调节物或具有IL-10样活性的免疫调节物被认为在治疗上具有重要的意义:

表2

一些疾病, 在这些疾病中具有IL-10样活性的免疫调节物, 由于它诱导IRAP产生和/或抑制细胞因子的产生和/或活性, 因此这种免疫调节物可能具有治疗上的重要意义。(参考文献: 20-74 + 109)

-
- 由感染或其它疾病引起的早产(pre-term labour)
 - 类风湿性关节炎
 - Lyme 关节炎
 - 痛风
 - 脓毒症
 - 体温过高
 - 溃疡性结肠炎或小肠结肠炎
 - 骨质疏松
 - 巨细胞病毒
 - 牙周炎
 - 肾小球性肾炎
 - 慢性、非感染性肺部炎症(例如类肉瘤病和吸烟者的肺)
 - 肉牙肿形成
 - 肝纤维变性
 - 肺纤维变性

- 移植排斥
- 移植物抗宿主病
- 慢性髓细胞性白血病
- 急性髓细胞性白血病
- 5 其它瘤形成疾病
- 支气管哮喘
- 糖尿病, I 型(胰岛素依赖型)
- 动脉硬化/动脉粥样硬化
- 牛皮癣
- 10 慢性B淋巴细胞白血病
- 普通可变性免疫缺陷
- 使用其它生物学反应修饰物的副作用
- 播散性血管内凝血
- 全身性硬皮病
- 15 脑脊髓炎
- 肺部炎症
- 高IgE综合症
- 小肠结肠炎
- 肿瘤转移和生长
- 20 继承性免疫治疗
- 获得性呼吸窘迫综合症
- 脓毒症
- 重灌注综合症
- 手术后炎症
- 25 器官移植
- 秃发
- AIDS
- 皮肤HPV-感染

本发明的详细说明

开发具有 IL-10 样活性的 IL-10 同源九肽

按照所述序列应具有vIL-10和hIL-10之间的高度同源性、但是与mIL-10的同源性应尽可能低的原则，来选择具有9个氨基酸长度的hIL-10的部分序列。已发现一种合成九肽IT9302具有一些如下面的实
5 施例进一步详细描述、模拟hIL-10的免疫抑制活性。IT9302对应于hIL-10 C末端的九肽序列，具有下列氨基酸序列：

NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn-COOH (SEQ ID NO:1)

九肽 IT9302对诱导不同的功能非常有效, 并且非常稳定, 假设它不能错误地与受体偶联。已被选择出一个九肽, 因为通常9 个氨基酸的多肽序列对蛋白质是独特的。尽管如此, 应该注意到位于hIL-10最末端的6个氨基酸似乎是最重要的氨基酸。因此包含氨基酸序列Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn (SEQ ID NO:1)的亚序列的物质或多肽在本发明的范围之内。

15 可能认为一些氨基酸置换对本文定义的hIL拮抗剂活性没有副作用，只要苏氨酸、赖氨酸和精氨酸存在，并且有一个氨基酸位于它们之间。

本发明特别涉及到按照下式的物质或多肽和以上式为基础设计的肽模拟物用于制备药用组合物和/或用于胰腺炎的预防和治疗用途:

X₁-X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO:22),

其中

X₁是Ala或Gly,

X₂是Tyr或Phe

25 X₃、X₄和X₅是从包含Met、Ile、Leu和Val的组合中独立选择出来的；
X₆是从包含Asp、Gln、Glu的组合中选择出来的；可任意选择的至少X₁、
X₂、X₃、X₄、X₅和X₆其中的一个能独立的被非天然或稀有氨基酸置换
和/或该肽被环化和/或该肽被稳定化和/或氨基末端的氨基酸残基被酰

化和/或羧基末端的氨基酸残基被酰胺化; 所述药用组合物假设通过用IRPA封闭IL-1受体来降低IL-1诱导的TNF α 的产生。

假定可用来降低TNF α 产生和/或预防或治疗胰腺炎的专一性多肽的实例如下:

- 5 1. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Ile-Lys-Met-Arg-Asn-COOH (SEQ ID NO:2)
2. NH₂-Ala-Phe-Met-Thr-Leu-Lys-Leu-Arg-Asn-COOH (SEQ ID NO:3)
3. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Val-Arg-Glu-COOH (SEQ ID NO:4)
4. NH₂-Gly-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:5)
5. NH₂-Ala-Phe-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:6)
6. NH₂-Ala-Tyr-Ile-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:7)
7. NH₂-Ala-Tyr-Leu-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:8)
- 10 8. NH₂-Ala-Tyr-Val-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:9)
9. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Ile-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:10)
10. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Leu-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:11)
11. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Val-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:12)
12. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:13)
13. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Met-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:14)
14. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Val-Arg-Asp-COOH (SEQ ID NO:15)
- 15 15. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Gln-COOH (SEQ ID NO:16)
16. NH₂-Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Glu-COOH (SEQ ID NO:17)

本发明特别涉及具有下式的多肽和以下式为基础设计的肽模拟物,

- Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO:19),
- 20 具有下式的多肽
- X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO:20),
- 具有下式的多肽
- X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO:21),
- 具有下式的多肽
- 25 X₁-X₂-X₃-Thr-X₄-Lys-X₅-Arg-X₆ (SEQ ID NO:22)

其中

X₁是Ala或Gly,

X₂是Tyr或Phe

X₃、X₄和X₅是从包含Met、Ile、Leu和Val的组合中独立选择出来的；
X₆选自含Asp、Gln、Glu；至少X₁、X₂、X₃、X₄、X₅和X₆中的一个可
任选地独立地被非天然或稀有氨基酸置换代和/或该肽被环化和/或该
肽被稳定化和/或该氨基末端氨基酸残基被酰化和/或该羧基末端氨基
酸残基被酰胺化；所述的类似物具有至少下面性质中的一条：

- a) 诱导人单核细胞自发性IL-8生产的抑制作用，
- b) 诱导人外周血单核细胞(PBMC)IL-1 β 诱导的IL-8生产的抑制作用，
- c) 诱导人单核细胞白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IRAP)的产生，
- d) 在体外诱导CD8+人T淋巴细胞的趋化性迁移，
- e) 脱敏人CD8+T淋巴细胞，导致对rhIL-10无反应性，
- f) 抑制CD4+人T淋巴细胞对 IL-8的趋化反应，
- g) 抑制人单核细胞对MCAF/MCP-1的趋化反应，
- h) 抑制IFN- γ 刺激的人单核细胞上的 II 类MHC分子的表达，
- i) 诱导培养的正常人 CD4+T细胞产生IL-4，
- j) 在人混合白细胞反应中降低TNF α 的产生，
- k) 减量调节胆汁酸诱导的急性胰腺炎的兔模型中TNF α 和IL-8的产生，并降低所述处理的兔的肺中嗜中性白细胞的渗入。

在本说明书和权利要求中，利用术语“至少一项IT9302的生物学活性”，是指参比为至少一项上述性质。

本发明的任何设想的肽都可以具有一个酰化(如乙酰化或苯甲酰化)氨基末端的氨基酸残基。而且任何设想的肽都可以具有一个酰胺化的羧基末端的氨基酸残基。

本发明还设想通过以下形成的肽类似物和仿照鉴定为IL-10拮抗剂肽制造的肽模拟化：其它保守氨基酸置换而非前面所提出的特定置换、稀有或非天然氨基酸的置换、肽的稳定化、肽的环化。

保守氨基酸置换的原理是某些氨基酸对与侧链基团匹配，以至于当一个氨基酸取代另一个氨基酸后，在该肽的三级结构和结合亲和力

上仅有最小的变化。保守性置换原则在(78)中解释。

本文所用的“保守”表示 (i) 所述改变尽可能地构象上为中性，也就是说，与所述天然蛋白质相比，设计在所述突变多肽三级结构上产生最小变化。(ii) 所述改变尽可能在抗原上是中性的，也就是与天然蛋白质相比，设计在所述突变多肽的抗原决定簇上产生最小变化。5 构象中性是保持生物活性所需的，抗原中性是为了避免在用本发明的物质治疗病人或动物中触发免疫应答所需的。尽管选择具有完全确定性构象和抗原中性的改变是困难的，但存在能够指导那些专业技术人员制造具有在构象和抗原中性的高度可能性改变的原则。见例如(77)和(78)。一些重要的原则包括(1)疏水性氨基酸的置换较少可能产生抗原性上的变化，因为它们可能位于蛋白质内部，例如：Berzofsky(前面已引用)和Bowie(前面已引用)所述；(2)物理化学上相似的(即同义)残基置换，较小可能产生构象上的改变，因为所述置换氨基酸能和被置换的氨基酸一样，行使同样的结构功能；以及(3)改变进化上保守的序列可能产生有害的构象影响，因为进化上的保守性提示：这些序列在功能上可能是重要的。除了这类用于选择突变蛋白质序列的基本原则，还可利用分析确认所述工程分子的生物学活性和构象法。构象上的改变至少能够用两种熟知的分析来测试，例如在(79)和(80)中、广泛用于蛋白质三级结构进化研究的微量补体固定方法；和与几套构象专一性单克隆抗体的亲和性，例如(81)所述方法。本发明的物质的生物学检验在实施例中有更完整的描述：10 15 20

如实施例1概述的，用所述合成物质或肽代替 IT9302，来检验人单核细胞自发性IL-8的生产的抑制作用。如用1ng/ml的该物质或肽时，所述IL-8的产生被抑制到不高于50%时，该物质或肽就在本发明的范围之内。25

如实施例2概述的，用所述合成物质或肽代替 IT9302，来检验人外周血单核细胞(PBMC)IL-1 β 诱导的IL-8生产的抑制作用。如当用1ng/ml的该物质或肽时，IL-8生产的抑制百分比至少为50%时，该物质

或肽即在本发明的范围之内。

如实施例3概述的，用所述合成物质或肽代替 IT9302，来检验人单核细胞白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IRAP)的产量。如用10 ng/ml的该物质或肽时，诱导至少30 ng/ml的IRPA，那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

如实施例4概述的，用所述合成物质或肽代替 IT9302，在体外检测CD8+人T淋巴细胞趋化性迁移的诱导。如用10mg/ml浓度的该物质或肽时，该物质或肽的效力存在，即为2或更高，那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

如实施例5概述的，用所述合成物质或肽代替 IT9302来检验导致对rhIL-10无应答性的人CD8+T细胞的脱敏作用。如果用该物质或肽予培育细胞导致大致完全被抑制CD8+细胞对hrIL-10的应答性，也就是说，如果在该物质或肽的浓度为10ng/ml下的数据大约为1，诸如0.8-1.2，那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

如实施例6概述的，用所述合成物质或肽代替 IT9302来检验CD4+人淋巴细胞对 IL-8 的趋化反应的抑制作用。如果将该物质或肽加入人CD4+ T淋巴细胞的悬浮液中，导致大致完全抑制CD4+细胞对IL-8应答的作用；即如果该物质或肽的浓度为10ng/ml下的数据大约为1，如0.8-1.2，那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

如实施例7概述的，用所述合成物质或肽代替 IT9302来检验人单核细胞对MCAF/MCP-1的趋化的抑制作用。如果将该物质或肽加入到人单核细胞的悬浮液中，导致大致完全抑制该单核细胞对MCAF/MCP-1的趋化反应；也就是该物质或肽的浓度为10ng/ml下的数据大约为1，如0.8-1.2，那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

如实施例8概述的，用所述合成的物质或肽代替 IT9302来检验用IFN- γ 刺激的人单核细胞上II类MHC分子的表达抑制作用。IFN- γ 向上调节细胞群落中MHC II抗原的表达，从36.8%提高到58.4%；这种刺激用10ng/ml的rhIL-10阻断或减量调节到25.2%，用 1 ng/ml IT9302阻断

或减量调节到31.2% (图12)。如果当所述物质或肽的加入量为1-10ng/ml时, 该物质或肽阻断或减量调节单核细胞上II类MHC的表达至非刺激水平, 那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

5 如果当该物质或肽的浓度为1-10ng/ml时, 加入该物质或肽能够阻断IFN- γ 的刺激作用, 那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

如实施例9概述的, 用所述合成物质或肽代替 IT9302来检验诱导培育的正常人CD4+ T细胞产生IL-4的作用。如果所述物质或肽的浓度为10ng/ml时, 加入该物质诱导CD4+ T淋巴细胞中IL-4的产生, 那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

10 如实施例10概述的, 用所述合成物质或肽代替 IT9302来检验混合白细胞反应中TNF α 产生的减少。如果加入该物质或肽以10ng/ml的浓度、在24小时之内显著降低人混合细胞反应中TNF α 的产生, 那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

15 如实施例14概述的, 用所述合成物质或肽代替 IT9302来检验在胆汁酸诱导的急性胰腺炎的兔模型中TNF α 和IL-8产生的减量调节作用和经处理的兔的肺中嗜中性白细胞浸润的降低作用。如果当该物质或肽的浓度为10 μ g/kg时, 加入该物质显著降低所述试验动物的死亡率, 那么该物质或肽即在本发明的范围之内。

20 本发明的一个重要实施方案因此涉及一多肽, 这种多肽的至少一个氨基酸残基被一不同的氨基酸残基置换和/或其中至少一个氨基酸残基缺失或增加, 以至于产生包含不同于如下面定义的氨基酸序列或所述的氨基酸序列的亚序列的氨基酸序列的多肽。但是必须具有如上面定义的hIL-10拮抗剂活性。

25 合成肽的类似物还能通过用非天然或稀有氨基酸置换个别的残基来制得。具有生物活性的序列最初是从由自然产生的20个L-氨基酸残基组成的蛋白质衍生而来的。然而, 用来构建合成肽的化学合成过程允许替代残基的置换, 包括D-氨基酸、 β -氨基酸、N-取代的氨基酸、稀有产生的天然氨基酸、或非天然合成的氨基酸类似物(93)。在本发

明中有用的氨基酸的非限制性的例子有:

Aad	2-氨基己二酸
bAad	3-氨基己二酸
bAla	β -丙氨酸, α -氨基丙酸
Abu	2-氨基丁酸
4Abu	4-氨基丁酸, 哌啶酸
Acp	6-氨基己酸
Ahe	2-氨基庚酸
Aib	2-氨基异丁酸
bAib	3-氨基异丁酸
Apm	2-氨基庚二酸
Dbu	2,4-二氨基丁酸
Des	锁链素
Dpm	2,2'-二氨基庚二酸
Dpr	2,3-二氨基丙酸
EtGly	N-乙基甘氨酸
EtAsn	N-乙基天冬酰胺
Hyl	羟基赖氨酸
aHyl	别羟基赖氨酸
3Hyp	3-羟基脯氨酸
4Hyp	4-羟基脯氨酸
Ide	异锁链素
alle	别异亮氨酸
MeGly	N-甲基甘氨酸, 肌氨酸
Melle	N-甲基异亮氨酸
MeLys	6-N-甲基赖氨酸
MeVal	N-甲基缬氨酸

Nva	正缬氨酸
Nle	正亮氨酸
Orn	鸟氨酸

稀有发生的、非天然氨基酸或建立阻断的其它和非限制的例子如下： Novabiochem 1994/95 目录 (Calbiochem-Novabiochem AG, Weidenmattweg 4, CH-4448 Laufelfingen/Switzerland), 第65-125页；
 5 Bachem FeinKemiKalien AG 1995 目录 (Bachem Feinkemikalien AG, Hauptstrasse 144, CH-4416 Bubendorf/瑞士), 第753-831页； Neosystem Laboratoire 目录 1997/98 (Neosystem Laboratoire, 7 rue de Boulogne, 67100 Strasbourg, 法国), 第131-176页。

10 以上所描述的替代残基能用于(a)置换化学反应性残基并提高合成肽对例如酶促降解和蛋白质酶解降解的稳定性。(b)提供用于检测该合成肽的分析标记, 以及(c)通过增强或降低该肽对IL-10受体的结合亲和力, 例如通过引入降低特定化学键旋转自由度的构象限制, 来调节该合成肽的生物活性。

15 在本发明的范围内有其它物质, 其中上式中的Thr、Lys或Arg的一个或更多的残基被前面提到的非天然或稀有氨基酸置换。在本说明书和权利要求中全部多肽序列, 如果没有明确的说明, 也都是按传统形式从N末端到C末端书写的。

20 用于所述肽和它们的类似物合成的选择方法是固相肽合成法(SPPS)。这种方法是由Merrifield (100)在1963年引入的, 从那时起就有许多肽用这种技术合成出来。关于目前肽和蛋白质的化学合成的一个很好的综述是S.B.H. kent (101)给出的。

25 实际上, 肽是按分段SPPS装配的。C末端氨基酸是以N- α -被保护的形式存在的, 如果必要, 侧链保护反应性衍生物或直接或通过一合适的连接物共价偶联到固相载体(如聚合树脂)上, 这种树脂在有机溶剂种溶胀。然后去掉N- α 保护基团, 并按分段方式, 加入按照所需序

列随后的被保护的氨基酸。当一完整的肽链装配后，去掉侧链保护基团，将该肽从树脂上切下来，这一过程能同时或分步骤完成。

在几年内出现的几个不同的偶联策略中，两个目前在广泛使用，这些方案是以不同的N- α -保护性基团和相配的侧链保护性基团为基础的。Merrifield用叔丁氧羰基(Boc)作为N- α -保护基团，而Carpino和Han(102)引入9-芴基甲氧羰基(Fmoc)。这两个策略的实际应用包括：选择固相载体、侧链保护基团、活化步骤、切割步骤、装设仪器、和分析及监测技术已在几个专著中给出，其中应该提到的有下列：Stewart和Young(10)，Atherton 和Sheppard (104)以及Pennington和Dunn(105)。本发明中的肽和它们的具有稀有或非天然氨基酸的类似物按这些方案可方便地合成。

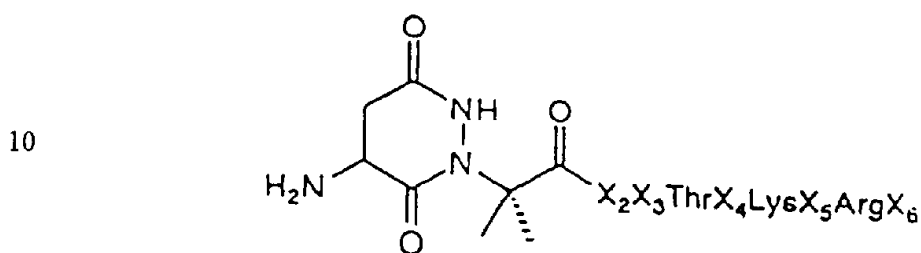
通过将所述结构化学转化为环状形式，能制造合成线性肽的类似物。线性肽的环化能通过增加或降低靶蛋白质对该肽的结合亲合力来调节生物活性(94)。线性肽的挠性非常强，在溶液中趋向处于许多不同构象。环化作用就约束可得到的构象数，这样就有利于形成该肽更加有活性或非活性的结构。合成肽的免疫原性与实验中观察到的构象在溶液中的优先取向相关联(95)。免疫原性上的差异可能表示专一性抗体对环状肽在结合亲合力上的差异。

线性肽的环化或通过在游离N-末端和C-末端间形成肽键来完成(同源杂键环状肽)，或通过在氨基酸骨架和/或侧链基团间形成一个新的共价键(异源杂键环状肽)(93)。后一种环化用另一化学策略来形成共价键，例如二硫化物、内酯(两种也存在于天然肽中)、醚或硫醚。多于五个残基的线性肽能相对容易地环化。该肽在中心的四个残基形成一 β 转角构象的倾向促使同源和异源杂键环状肽的形成。在N-或C-末端脯氨酸或甘氨酸残基的存在也促使环化肽的形成，特别是由长度上短于6个残基的线性肽形成环化肽。

形成肽的二硫键和其它环化反应的方案的例子在Pennington 和Dunn (105)的第7、和11章中给出。

肽模拟技术就是设计肽的分子模拟物。成功地设计这种分子的能力依赖于对所述线性肽序列的性质和对这种分子呈现在IL-10受体的构象的了解。模拟物的合成能提供显示有较大生物活性、较高溶解度和稳定性的化合物(96)。

5 作为一例子，下面的肽模拟物是从在US 5,446,128 (97) 中公开的、以细胞因子C-末端的肽模拟物的 α -螺旋模板与有关IL-10的C-末端是以 α -螺旋存在的知识相结合为基础衍生而来的(98)。



15 通过将小分子连接到该肽的N-末端，稳定该合成肽的 α -螺旋结构，制备的该肽对蛋白酶降解更具有抗性。其它肽模拟物可在US 5,446,128中公开的为基础衍生。置换发生在非X₁的其它残基上和/或置换发生在上式所示N末端分子以外的分子上的这些物质在本发明的范围之内。

20 按照本发明，术语“该肽的类似物”包括在上式基础上衍生而来的任何在有药理学活性和可接受的并显示出至少一项类似于IT9302的生物活性的化合物，包括这些类似物的衍生物，特别是药理学上可接受的盐、酯和它们的溶剂化物。

下列名词“细胞因子”、“淋巴因子”、“白细胞介素”、“单核因子”、“化学激活素”、“干扰素”、“集落刺激因子”和“多肽”按WO 96/01318中的定义使用。

25 本发明的一个有意义的实施方案涉及到本发明的一个多肽，这种多肽的氨基酸数目的总数从6、7、8、9或10一直到大约100个氨基酸，例如11、12、13、14或15个氨基酸或甚至更大，诸如20个氨基酸或30个氨基酸。

在本发明的优选实施方案中，该物质或多肽是以大致纯形式使用。为了得到这种形式，可能需要纯化多肽。用于纯化多肽的方法的例子是：(i) 用抗体进行免疫沉淀或亲和色谱，(ii) 用合适的配体进行亲和色谱，(iii)其它的色谱方法，诸如凝胶过滤、离子交换或高效液相色谱或以上任何一种方法的演变形式，(iv) 电泳方法，如聚丙烯酰胺凝胶电泳、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳和等电聚焦，
5 (v) 任何其它的特定加溶和/或纯化技术。

包含本发明的物质或多肽和药学上可接受的赋形剂的药用组合
物也在本发明的范围之内。该组合物可包含例如已纯化的合成蛋白质
10 或已纯化的重组多肽。

本发明所用的IL-10拮抗剂可制备为药物学上可接受的介质中的制剂，这些介质例如为盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、Ringer溶液、右旋糖/盐水、Hank溶液和葡萄糖。该组合物可包含所需的药学上可接受的辅助物质以接近生理条件，所述辅助物质例如为缓冲剂、张力调节
15 剂、润湿剂、去污剂等等。添加剂也可包括其它活性成分，例如杀菌剂或稳定剂。给与病人的用药量随待给与的药物、给药目的(诸如预防或治疗)、所述宿主的状态、给药式等等而变化。

所述药用组合物通常需要经皮或胃肠外给药，例如静脉注射、皮下注射或肌肉注射。也需要口服形式，可以通过修饰该组合物来绕过
20 肠胃环境来提供。该组合物可以用于预防性治疗和治疗性治疗。

适合于局部用药的本发明药用组合物可以是例如乳膏、软膏剂、洗剂、搽剂、凝胶、溶液、悬液、糊剂、条状物(stick)、喷雾剂或粉剂。这些组合物可浸渍或散布到例如药垫、药膏或药条中，可方便一日使用1-10次。

所述局部组合物一般包含所述制剂总重量的1-80%的活性化合物，诸如0.001-25% w/w的活性化合物，例如0.1-10%、0.5-5%或2-5%。该组合物可根据常规药学实践，用常规的用于局部使用的药用赋型剂来配制。能用用于组合物中的非水载体可包括固体或液体，诸如润滑
25

药、溶剂、湿润剂、增稠剂和粉剂。

该组合物的pH原则上可在一很宽的范围内，诸如3-9，尽管最好pH值为大约4-8。可以使用常规的缓冲剂来得到所需的pH。

5 作为一个例子，经皮给药的组合物可以包含溶解在1g的乳膏主药的1mg物质(IT9302)，所述基底诸如含有0.05% 水杨酸的Moistion中性乳膏(Arhus Kommunehospital药剂学)，该组合物能以在手术下0.4-0.5mg的量用于皮肤上。该组合物用于实施例16和17中。

10 药用组合物可选择地静脉内给药。这样，本发明提供包含溶于或悬浮于可接受载体(最好是水性载体)的IL-10拮抗剂物质的药用组合物。这些组合物能用常规的灭菌技术来灭菌，或通过无菌过滤。产生的水溶液可包装使用，或冷冻干燥，冷冻干燥的制剂在给药以前与无菌水性载体相混合。该IL-10拮抗剂还可与第二种生物学活性药剂(诸如标准化学治疗剂)一起给药。这些药剂包括但不限于：长春新碱、道诺红菌素、天冬酰胺酶、mitoxantron 和amsacrine。

15 在治疗应用中，将该药用组合物给与病人，其用量足以产生所需作用，称为“治疗有效剂量”。IL-10拮抗剂的治疗有效剂量将随以下条件而变化：例如进行治疗的特别用途、给药方式、病人的健康和状态、给与处方医师的判断。例如，连续灌输的剂量通常为500ng/kg/天和50μg/kg/天之间。在IL-10在人体的随机化控制试验的基础上计算该剂量(90)。

20 IL-10拮抗剂在药用制剂中的浓度变化范围可以很宽，即大约10μg/ml 到大约5mg/ml，最好为大约100μg/ml 和大约2mg/ml之间。该浓度一般根据所选择的特定给药方式，主要通过流体体积、粘度等来选择。这样，用于静脉灌输的典型药用组合物可以由含有250ml葡萄糖/盐水溶液和2.5μg IL-10拮抗剂组成。

25 对于固体组合物，可以使用的常规的无毒固相载体，这些载体包括例如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等等。对于口服，通过加入通常使用的

赋形剂(诸如前面列出的那些载体)和通常为10-95%的活性成分(即IL-10拮抗剂物质), 形成药学上可接受的无毒组合物, 所述活性成分最好为25-75%。

5 对于气雾剂给药, 所述IL-10拮抗剂最好以细碎的形式和表面活性剂和抛射剂一供给。IL-10拮抗剂典型百分比是0.01-20%(重量), 最好为1-10%。当然, 该表面活性剂必须是无毒的, 最好可溶于所述抛射剂。这类试剂的代表是含有6-22个碳原子的脂肪酸(诸如己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、olestercic acid和油酸)和脂族多元醇或其环酐(诸如乙二醇、甘油、赤鲜糖醇、阿拉伯糖醇、甘露醇、山梨醇、从山梨醇衍生来的己糖醇酐)的部分酯, 以及这些酯的聚氧乙烯和聚氧丙烯衍生物。可使用混合酯, 例如混合或天然的甘油酯。

10 所述表面活性剂可构成药用组合物重量的0.1-20%, 最好为0.25-5%。该组合物的剩余部分一般是抛射剂。液化抛射剂在周围条件下通常是气体, 在压力下变为液体。在合适的液化抛射剂中有含多至5个碳原子的低级链烷, 诸如丁烷和丙烷; 最好是氟化或氟氯化的链烷。还可用以上链烷的混合物。在气雾剂的生产中, 用含有一种或多种磨碎的多肽和表面活性剂的合适抛射剂装满装备有合适阀门的容器。所述组分一直保持在较高压力下, 直到通过阀门的作用释放。

20 为了提高血清的半衰期, 可以将所述IL-10拮抗剂囊封, 引入到脂质体的腔内, 制备成胶体, 或可以利用提供该多肽较长寿命的其它常规技术。因此, 在某些实施方案中, 所述IL-10拮抗剂可被囊封在脂质体中。可利用各种各样的方法制备脂质体, 如在(83)、(84)、(85)和(86)中描述的。

25 如上所述, 已发现IT9302及其类似物和变异体可用于防止已知在病原学上参与前述的病理状态的细胞因子的作用。

因此, 设想了使用本发明的多肽或其类似物或衍生物的治疗潜力, 并需研究在期望hIL-10和/或IRPA具有治疗效果的所有疾病中治疗潜力。(见上面, 表1和表2)

附图说明

图1图示IT9302抑制纯化的培养人单核细胞自发性IL-10的产生。

图2图示IT9302抑制人外周血单核细胞的IL-1诱导的(1 ng/ml) IL-8的产生。

5 图3说明IT9302刺激的人单核细胞的IRAP的产生。

图4说明IL-10刺激的人单核细胞的IPAR的产生。

图5说明IT9302对CD8+ T细胞的趋化活性。

图6说明IT9302对CD8+ T细胞的脱敏作用，导致CD8+ T细胞对IL-10 (10ng/ml) 诱导的趋化无反应性。

10 图7说明IT9302对CD4+ T细胞上的IL-8活性的抑制。

图8图示IT9302抑制MCAF/MCP-1诱导的单核细胞趋化。

图9用ECL-Western印迹法显示在CD4+ T细胞胞液部分中IL-4的产生。

15 图10 用ECL-Western印迹法显示在人混合白细胞培养物的胞液部分中TNF- α 的产生。如在材料和方法中描述的IL-4进行TNF- α Western印迹分析，但是用兔抗人TNF- α 抗体(Pepro Tech. Inc., 伦敦, 英国)和辣根过氧化物酶标记的第二抗体(Cat.no. 第217页, Dako, 丹麦)。

图11表示IL-10和IT9302对T细胞增殖的调节。

图12表示人单核细胞上HLA-DR的表达。(流式细胞计数仪)。

20 图13表示LPS诱导的休克和白细胞减少是受IT9302调节的，通过总白细胞计数来表示。

图14表示将鼠的IT9302在诱导胰腺炎之前注射入兔中预防白细胞减少。

实施例

材料和方法

细胞因子和化学吸引剂

从Pepro Tech Inc., NJ.得到重组hIL-10 (Cat. No. 200 10)。重组hIL-1 β 和重组hIL-8是Dainipponn Pharmaceutical Company(Osaka, 日本)的友好赠品。培养基是按照Limulus变形细胞溶胞产物鉴定(Sigma E-TOXATE试剂盒 Cat. No. 210-A1)为无LPS的RPMI 1640 GIBCO。rhMCP-1是日本Kanazawa的Kouji Matsushima教授的友好赠品。

白细胞趋化性检定

T细胞趋化性

从肝素化的正常捐献人血液中纯化以表达或CD4或CD8抗原为特征的CD4⁺和CD8⁺ T淋巴细胞亚群。这样，通过用Hank平衡盐溶液(HBSS)1:1稀释100ml血，从肝素化的血中纯化外周血单核细胞(PBMC)，然后将所述细胞铺放在Lymphopac™ (Nycomed Pharm, Oslo, 挪威)上，接着以2000 rpm梯度离心20分钟。将所述单核细胞在HBSS中清洗三次；将细胞沉淀物稀释在4ml的含有1%胎牛血清的HBSS中，并在4℃下用包被针对CD4或CD8抗原的单克隆抗体(Dynabead M-450 CD4 Cat. No.111.16, Dynabeads M-450 CD8 Cat. No. 111.08, DETACHaBEAD Cat. No. 125.04)的Dynabead来分类。珠粒:细胞的比例是10:1，温育时间为1小时。按照生产商的指示通过加入多克隆抗鼠抗体来除去珠粒。

趋化性检定是如先前描述的(74; 见文献3和文献14)48孔微室技术(Neuroprobe, Rockville, MD)。将化学吸引素稀释于含有1%的无菌过滤的胎牛血清的RPMI 1640 (GIBCO Cat. No. 61870-010)，然后置于小于25 μ l的下层室中。就测定T细胞的趋化性来说，将T细胞(5×10^6 /ml)悬浮在培养基中，将50 μ l放入用包被有IV型胶原蛋白(Sigma Cat. No. C

0543)的5 μ m孔径大小的无聚乙烯吡咯烷酮的聚碳酸酯滤膜(Nucleopore Corp., Pleasanton, CA)与下层室隔开的上层室中。让细胞在37℃下、在5%的CO₂中迁移2小时。然后小心地取出滤膜,将滤膜固定在70%的甲醇中并在考马斯亮蓝中染色5分钟。附着在该滤膜下表面的细胞用一连接用于数字分析的计算机系统并用软件支持的显微镜上的摄像机,通过计算它们的面积来计数,以客观地确定趋化迁移。大约5%相当于12,000-13,000细胞的T细胞将自发性迁移;该结果可能一天与一天不同,但在同一天的实验中变化很小。如前面已描述的(参考文献3和参考文献14),因此选择以该样本和阴性对照中细胞迁移数之间的比例报道结果,这一比例反映了自发性迁移。这个比例称为趋化指数(CI)。所有的样本分析三次,并且在估计面积的平均值之前在三个视野中测量每一孔中的细胞迁移。在一些实验中,趋化膜没有包被胶原蛋白,在该检定系统中迁移细胞将因此落到趋化室下层孔的低部。

在一实验中,如上面描述的,通过检验加入到下层室中的IT9302系列稀释液并评价趋化性,来进行IT9302对CD8+T细胞的趋化活性检定。

在第二个实验中,通过在趋化前30分钟将IT9302加入到靶细胞中,研究IT9302脱敏CD8+T细胞作为对 rhIL-10(10 ng/ml)反应而迁移的能力。IT9302以系列浓度加入,如上面描述的评价rhIL-10的趋化反应。

在第三个实验中,通过在执行趋化前30分钟将IT9302加入到靶细胞中,研究IT9302抑制CD4+T细胞对rhIL-8 (10 ng/ml)的趋化反应的能力。IT9302以系列浓度加入,如上面描述的评价rhIL-8的趋化反应。

25 单核细胞趋化性

如前面对于T细胞所描述的,用同样的Boyden 室装置来测量单核细胞的趋化性。将化学吸引剂MCAF/MCP-1稀释在含0.5% BSA的RPMI 1640培养基中,然后以10 ng/ml的浓度加入到下层室中。将如上

面所描述的、从正常人PBMC、通过标准可塑料粘附技术纯化得到的单核细胞悬浮在含0.5% BSA的RPMI 1640培养基中，然后在不同浓度的IT9302的存在下温育30分钟。随后，将所述细胞以 10^6 细胞/ml的浓度加入到上层趋化室中。用8 μ m孔径大小的无聚乙烯吡咯烷酮的聚碳酸酯滤膜(Nucleopore, Pleasanton, CA)来分开上层和下层室。该室在37℃保温90分钟。如上面描述的，处理包含迁移细胞的膜，并按照上述技术计算趋化指数。

正常人外周血单核细胞(PBMC)的IL-8的产生

从肝素化的正常人捐献者血液中纯化PBMC。接着用Lymphoprep™ (Nycomed Pharm, Oslo, 挪威)梯度离心，在含有1%的无菌过滤的热失活胎牛血清和青霉素(10,000 IE/ml)、链霉素(10mg/ml)和庆大霉素(2.5mg/ml)的无LPS的RPMI 1640培养基(GIBCO Cat. No. 6187-010)中。将细胞在24孔Nunc微板中(nunc, Denmark)，在不同浓度(0、1 μ g、100ng、10ng、1ng、0.1ng、0.01 ng/ml)的IT9302存在下培养24小时。培养24小时后，再次加入另一剂量的IT9302，一小时后将r-hIL-1 β (1 ng/ml)加入到所述细胞培养物中。在总共48小时温育后收集上清液，用IL-8 ELISA试剂盒(Danippon Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, 日本)通过IL-8 ELISA来测定分泌的 IL-8的浓度。简要地说，将标准和细胞上清液以2份在20℃下、在微板摇床上保温1小时复制。接着冲洗后，将第二抗体加入1小时，接着和过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG一起保温1小时。清洗后，用O-苯二胺来延续该反应。30分钟后用1.6 N硫酸终止反应。在ELISA读板仪中，在490 nm处测定光密度(OD)。通过未知浓度对IL-8标准品浓度的吸收校正曲线来计算IL-8的浓度。

测定IRAP 的浓度

如上面描述的纯化PBMC。将PBMC培养在RPMI 1640、10%的无菌热失活胎牛血清中(包括青霉素10,000 IE/ml、链霉素10mg/ml、庆大

5 霉素2.5mg/ml), 细胞的浓度是 2×10^6 细胞/ml。然后用标准塑料粘附技术纯化单核细胞。然后将单核细胞培养在含2% FCS和具有不同稀释度的rhIL-10或IT9302的RPMI 1640中(2.5×10^6 细胞/ml), 将所述细胞刺激24小时后, 收集上清液以测定IRAP。用R&D Systems Europe Ltd的人IL-1ra Quantikit 免疫分析试剂盒(Cat. No. DRA 00, Abingdon, Oxon, UK))进行IRAP ELISA。

T细胞增殖的确定

10 增殖检验: 将PBMC (2×10^5)在加有10% FCS和加有 $0.5 \mu\text{l/ml}$ PHA和rhIL-10(1、10、100ng/ml)或IT9302 (0.1、1、10ng/ml)的200 μl 的 RPMI培养基中以三份保温72小时。在最后18小时。加入 $0.5 \mu\text{Ci/孔}$ ^3H -胸苷(Amersham, 丹麦)。将所述细胞收获在滤膜上(玻璃纤维滤膜, Whatman, Cat. No. 1822 849), 并加入闪烁液体(Ultima, Gold MV, Packard), 在Tri-Card 1600型TR(Packard)上进行闪烁计数。

15

确定单核细胞上 II 类MHC 抗原的表达

20 人单核细胞上HLA-DR的表达. 在 37°C 从通过在含10% FCS的 RPMI 1640中吸附到塑料上, 从新鲜的肝素化血液中分离单核细胞。保温后, 去掉上清液, 加入Hank溶液(4°C 、含1% FCS), 通过在 -20°C 冷却15分钟并轻轻的撞击到桌上将细胞脱离。将单核细胞(2×10^6 细胞/ml)在加有2%FCS与IFN- γ (10ng/ml)、或在IFN- γ 加入前加入rhIL-10 (100、10、1 ng/ml)、或在IFN- γ 加入前加入IT9302 (10、1、0.1 ng/ml)的RPMI中刺激40小时。如前面一样通过冷却将细胞从孔中脱离下来。用针对HLA-DR的抗人抗体, 将新鲜的非固定细胞用于表面分型。将
25 细胞悬浮在含有1%FSC、 1×10^6 细胞/ml的Hank溶液中, 加入与FITC结合的鼠抗人HLA DR 、DP、DK抗体(F 0817, DAKO, 丹麦)45分钟。在Hank溶液中将细胞清洗三次, 在Coulter-Epic XL-MCL流式细胞仪上、在458nm波长处进行FACS分析。用非相关的Fitch结合抗体(鼠抗山羊

DAKO F 479)来确定非专一性结合。

或者，将细胞固定在10% DMSO、40% RPMI和50%无菌的FCS中，并储存在-80℃用于DNA分型。

5 单核细胞中细胞凋亡的测定

被刺激的单核细胞中DNA的分型。将所述固定细胞在70%乙醇中温育60分钟，在Hank溶液中清洗两次。将 1×10^6 细胞悬浮在含有250 μ l的1 μ g/ml RNase的1.12%柠檬酸钠pH 8.4(核糖核酸酶A, Pharmacia No. 17-0442-01)中，并在37℃下温育3分钟。然后加入250 μ l 的碘化丙锭 (prodidiumiodide) (50 μ g/ml、在Hank溶液中)，将细胞在暗处保温30分钟。此后，将细胞在Hank溶液中清洗两次(Jensen等, (110))。用流式细胞仪在Coulter-Epic XL-Mcl上于波长 550nm处测定DNA的含量。

结果

15 IL-10和IT9302对T细胞增殖的调节

如前面所描述的，用PHA刺激PBMC，并加入rhIL-10和IT 9302 72小时，在最后18小时测定掺入的³H-胸苷。在最适浓度的100ng/ml rhIL-10和10ng/ml IT9302中，rhIL-10和IT9302都向下调节细胞增殖，见图11。

20 人单核细胞上HLA-DR的表达

如前面所述的纯化单核细胞，用IFN- γ (10ng/ml)和/或在TFN- γ 前30分钟加入rhIL-10和/或IT9302刺激单核细胞40小时。通过与FITC结合的鼠抗人HLA DR、DP、DK抗体一起温育，来研究MHL II 抗原的表达。如图12所看到的，IFN- γ 向上调节MHC II 抗原的表达，而10ng/ml rhIL-10和1ng/ml IT-9302以类似的方式向下调节MHL II 抗原的表达。

被刺激的单核细胞DNA分型

将来自以上的IFN- γ 刺激的单核细胞和碘化丙锭一起温育，用流式细胞仪测定DNA的含量。测定处于细胞增殖的G1或G2期的表达DNA的细胞部分，同样测定表达细胞凋亡的部分。如图12看到的，非刺激的单核细胞表达6.6%的细胞凋亡，IFN- γ 刺激将细胞凋亡向下调节到4.1%；而IL-10、IFN- γ 和IT0302 + IFN- γ 刺激细胞分别诱导细胞凋亡部分到10.3%和9.3%。

确定CD4+T淋巴细胞的IL-4的产生

细胞培养

从肝素化正常人血液中纯化CD4+ T淋巴细胞。Lymphoprep™ (Nycomed Pharm, Oslo, 挪威)梯度离心后，在4℃下用包被有单克隆抗CD4抗体的Dyncbead (Dynal AS, 挪威)对单核细胞进行进一步分类。通过加入多克隆抗鼠抗体(Dynal AS, 挪威)来脱离珠粒。用FACS分析法判断的阳性选择的细胞的纯度高于99%。当检查IL-8刺激的T细胞的IL-4的重新产生时，T细胞是在含有1%的无菌过滤热失活胎牛血清(FCS)、青霉素(10,000 IU/ml)、链霉素(10 mg/ml)和庆大霉素(25 mg/ml)的无LPS的RPMI 1640中 5×10^6 细胞/ml的培养物。

用rIL-8 (100ng/ml)、rIL-10 (100ng/ml)、IT9302 (10ng/ml)和IFN- γ (10ng/ml)刺激T细胞3天。重组人IL-8(rh IL-8)是Dainippon pharmaceutical Co. Ltd. (Osaka, 日本)的友好赠品，IFN- γ 是从德国Boehringer Ingelheim Am Rhein购买。为获得IL-8刺激的专一性抑制，使用中和单克隆抗IL-8抗体(WS.4)(日本K. Matsushima博士的友好赠品)。从Pepro Tec. Inc (英国伦敦)购买重组IL-10。

用于凝胶电泳的细胞材料和培养物上清液的制备

培养的T细胞和培养基通过在2000 rpm下离心5分钟得到分离。将上清液冷冻干燥，然后溶解在100 μ l的溶胞缓冲液中。将细胞直接悬浮

在100 μ l的凝胶溶胞缓冲液中(9)。将该材料保持在-80℃中直到进一步检验。

CD4+ T细胞来源蛋白质的ECL-Western印迹分析

5 将细胞或冷冻干燥的细胞培养物上清液用于IL-4蛋白质含量测定。将来自单向15% SDS-PAGE凝胶的蛋白质通过印迹转移到Hybond-ECL硝化纤维素膜(Amersham RPN 2020D,UK)上,在含有0.1%吐温-20的Tris缓冲液盐水pH7.8中用5%牛血清白蛋白封闭。然后印迹与多克隆山羊抗人IL-4抗体(R&D Systems, UK)和一起保温,接着与辣根过氧化物酶标记的第二抗体 (Cat. no.RPN 2106 ECL, Amersham, UK)
10 保温,通过将胶片(Kodak X-OMAT-S, 美国)曝光90秒来检测免疫染色。

实施例1

15 人单核细胞自发性 IL-8 产生的抑制

如在“正常人外周单核细胞(PBMC)的IL-8的产生”中所描述的,进行的该试验。用塑料吸附技术来纯化单核细胞,将 3.0×10^6 细胞/ml刺激40小时。如图1所示, IT9302抑制单核细胞产生IL-8, 0.1ng/ml的IT9302将IL-8的产量抑制到体外自发性产量的35%。培养一天后的细胞
20 存活率通常超过80%, 在该实施例和下面的实施例中, 在0.1和1000ng/ml之间的任何浓度的IT9302 (IT9302 分子量: 1,127道尔顿, rhIL-10预计分子量: 18,400道尔顿)不影响存活率。

实施例2

25 抑制IL-1 β 诱导的人外周单核细胞(PBMC)IL-8的产生

如在“正常人外周单核细胞(PBMC)的IL-8的产生”中所描述的,进行的试验。如图2所示, IT9302以剂量依赖方式,在体外抑制通过IL-1 β 诱导的人外周血单核细胞的IL-8的产生。IT9302的浓度在0.01和



100ng/ml 之间时, 对IL-8产生的抑制趋于稳定。

实施例3

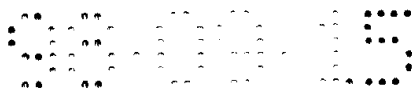
人单核细胞产生白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IRAP)

5 如在“IRPA浓度的测定”所描述的进行试验。如图3所示, IT9302
剂量依赖性地诱导人单核细胞产生IRAP。当用高于10ng/ml浓度的
IT9302时, 产量大幅度提高。图4显示通过 rhIL-10诱导 IRAP, 因为
hIL-10大约比IT9302大20倍, 以克分子浓度计算, 5ng/ml的IT9302等于
100ng/ml的IL-10。因此就低浓度IRAP的诱导而论, IT9302和rhIL的效力
10 相当, 大约相等。当IT9302的浓度超过10ng/ml时, IRPA的诱导增加,
并达到60ng/ml的最高水平。此外, 测试专一性针对IT9302的抗体诱导
的专一性。在一单独的实验中, 单核细胞自发地产生3.5 ng/ml的IRAP,
它们通过1-10ng/ml的IT9302诱导IRAP的产量至最大值: 10.6±0.6
ng/ml, 这种生产能被IT9302的多克隆抗体所阻断, 在加入10ng/ml的
15 IT9302前30分钟加入2μg/ml的该抗体, 因此IRAP的水平向下调节至
2.9±0.3ng/ml。所述结果和用针对IL-10的抗体19F1所得到的结果形成对
比, 后者以同样的方式加入(在加入10ng/ml IT9302前30分钟加入
2μg/ml), 不阻断IRAP的产生, 却相反第向上调节至22 ng/ml。这一结
果能用该抗体能中和内源性IL-10但不能中和IT9302这一事实来解
20 释。在细胞培养物中自发产生的IL-10对通过IT9302的IRAP产生有一负
的自主调节作用。

实施例4

对人CD8+ T淋巴细胞的趋化作用

25 如“白细胞趋化性检验”中描述的进行该实验。如图5所示, IT9302
在体外诱导CD8+人T淋巴细胞趋化性迁移, 而对CD4+ T淋巴细胞没有
作用(没有显示数据)。而且在这实验中所显示的IT9302的效力可与以前
显示的(14)rhIL-10的效力相比。



实施例5

人CD8⁺ T细胞的脱敏作用导致对rhIL-10无反应性

如在“白细胞趋化性检验”中描述的进行实验。将IT9302加入到CD8⁺ T细胞的悬浮液中30分钟后，检验这些细胞对rhIL-10的趋化反应。如图6所示，细胞与IT9302的预温育导致CD8⁺ T细胞对rhIL-10的抑制的无反应性。这表明IT9302能影响rhIL-10与IL-10受体的结合。

实施例6

CD4⁺ T淋巴细胞对IL-8趋化反应的抑制

如在“白细胞趋化性检验”中描述的进行实验。如图7所示，加入到人CD4⁺ T细胞悬浮液中的IT9302以剂量依赖性方式抑制CD4⁺ T细胞对IL-8的反应。

实施例7

人单核细胞对MCAF/MCP-1趋药反应的抑制

如在“白细胞趋化性检验”中描述的进行实验。如图8所示，如图7所示，加入到人单核细胞悬浮液中的IT9302以剂量依赖性方式抑制所述单核细胞对MCAF/MCP-1的趋化反应。

实施例8

当用IFN- γ 刺激时抑制人单核细胞上II类MHC分子表达

在一新的实验模型中(流式细胞仪)，已表明用IFN- γ 刺激的单核细胞向上调节它们的MHC II 抗原的表达，并且这种诱导能被IL-10和IT9302 以类似的方式阻断。同时，两种肽都向上调节单核细胞中显示细胞凋亡的细胞数(见图12)。这些实验说明IL-10和IT9302能够通过依靠向下调节II类MHC的表达来减弱单核细胞的抗原呈递能力式，抑制单核细胞/巨噬细胞依赖性的T细胞增殖(见12)。

如³H-胸苷的渗入所示，PHA刺激的PMBC开始增殖，这也能被



IL-10和IT9302向下调节。PHA通过激活Ca²⁺依赖性通道来刺激T细胞增殖。当细胞与IF-10预温育时，人T细胞克隆中Ca²⁺通量减少(Taga,K.等, 1992)。目前的实验显示：T细胞增殖是通过IT9302、还通过Ca²⁺依赖性通道的控制向下调节。

5

与实验有关的讨论

目前的数据证实合成九肽IT9302对反映前炎症活性的过程(包括IL-8的产生和单核细胞和/或T细胞迁移)的剂量依赖性抑制作用。因此，IT9302能够抑制过夜培养的人单核细胞的自主性IL-8的产生。这可以用对IL-8 mRNA产生和/或后续的蛋白质产生和/或释放的直接抑制作用来解释。在体外培养的单核细胞表达和生产IL-10，产生的IL-10再诱导IL-8的产生，这一事实可用来解释另一种机制。下面的事实支持这一点：已证明IT9302有效地诱导从单核细胞产生IRAP。因此IT9302也可以通过干扰IL-1的活性来抑制自发性IL-8的产生。观察到的通过IT9302的IRAP的诱导似乎诱导生物学活性的IRAP，因为加入到所示培养物中的IT9302阻碍IL-1-诱导的IL-8的产生，但仅仅当将IL-10加入到培养物的至少16小时前加入时才有这一作用。这可能意味着IT9302通过诱导IRAP的产生，IRAP再通过其受体阻断IL-1活性，来抑制IL-1-诱导的IL-8的产生。如果IT9302直接抑制IL-8的产生，那么预期在加入前1小时将IT9302加入到培养物中应该抑制IL-8的产生；而这不是事实(未显示数据)。因此，观察到的IT9302对IL-8产生的抑制可能是由于诱导IPAR的产生，而不是直接抑制IL-8产生。IT9302通过诱导IRPA，专一性地阻断IL-1受体，依此诱导其它的IL-1诱导的其它细胞因子，如TNF α 、IL-8和可能的许多其它细胞因子和因子。我们的IT9302的抗体能够阻断IRAP的诱导，证实该诱导的专一性。另外的IL-10抗体19F1不阻断IT9302诱导的IRAP的产生。

IT9302还通过抑制CD4⁺T细胞作为对IL-8应答的迁移的能力，来模拟IL-10的活性。因为IL-8和炎症的许多不同状态相联系，并且因为

CD4⁺ T细胞早在T细胞介导的免疫炎症(诸如皮肤过敏)的浸润中出现, 这一特征可证明对T细胞介导的免疫炎症的控制有显著的治疗价值。

5 已证实的CD8⁺ T细胞的IT9302的趋化活性也和IL-10的趋化活性平行, 因此IT9302可能激活具有有助于中止T细胞介导的免疫炎症的抑制活性的T细胞群。因此根据以上说明的实施例, IT9302在IL-10和/或IRAP可能也有治疗价值的一些疾病的治疗上具有治疗价值。另外, IT9302可能在IL-8和/或MCAF和/或IL-1被认为有致病作用的疾病的治疗上具有治疗价值。本发明描述了IT9302的类似物, 即具有至少一些
10 上述性质的物质或肽。

实施例9

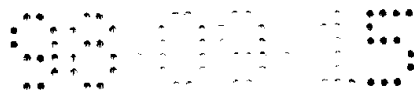
在CD4⁺ T淋巴细胞中诱导IL-4的产生

15 背景

象IL-10一样, IL-4是T_H2型CD4⁺ T细胞的产物。观察到重组人IL-10诱导培养的人CD4⁺ T细胞产生IL-4。这意味着IL-10除了它自身的免疫抑制功能外, 还诱导另一免疫抑制性细胞因子IL-4的产生。因此这证明是否IT9302也诱导CD4⁺T细胞产生IL-4。

20 因此, 将按照在“T细胞趋化性的方法”中所述纯化的、并按照在“测定CD4⁺T淋巴细胞的IL-4的产生”章节中所述培养的CD4⁺ T细胞, 用IT9302 (10 ng/ml)或IL-10(100 ng/ml)刺激三天。收集胞液部分, 并用Western印迹法(图9)和山羊抗人IL-4多克隆抗体分析它们的IL-10含量。

25 如在图9中证实的, 观察到IL-10和IT9302诱导培养的正常人CD4⁺ T细胞的IL-4的产生。



实施例10

在混合白细胞反应(MLR)中抑制TNF- α 的产生

已证实混合白细胞反应部分地依赖于该反应期间TNF- α 的产生。已经表明IT9302不显著降低MLR，但发现在MLR期间的TNF- α 的生产显著下降。

因此，通过纯化人白细胞然后培养来自异源供体的1百万细胞/ml四天来进行MLR。在建立培养物前，用 β 辐射照射一组细胞2分钟。按照在“测定CD4+T淋巴细胞的IL-4的产生”章节中描述的，纯化胞液蛋白质部分，并用兔抗人TNF- α 抗体进行Western印迹分析。

如在图10中证实的，在人混合白细胞反应期间观察到TNF- α 产量的显著降低。

实施例11

调节猪中LPS诱导的休克和白细胞减少症

因为已发现IT9302调节细胞因子(包括TNF- α 和IL-8)的产生，并由已公开的猪IL-10序列(88)所支持，已试验了IT9302是否能够调节LPS诱导的猪白细胞减少症的过程(图13)。

在初步实验中，已试验了静脉注射0.1mg/kg的IT9302如何调节在猪中(N = 3)静脉注射2 μ g/kg的LPS的作用。在注射LPS前30分钟注射IT9302，按照在图13所述取出血液样本。确定白细胞总数和分化细胞数目，在这些结果的基础上计算嗜中性白细胞的总数。

如已证实的，已观察到注射LPS引起暂时性白细胞减少。然而，如图中证实的，注射IT9302阻止白细胞减少。

实施例12

在小鼠中给与LPS后与人IT9302同源的鼠IT9302对血浆中TNF- α 释放的作用

在动物中已证实：重组鼠IL-10能保护鼠免于致死性内毒素血症

(89), 另外已证实对人给与 IL-10对T-细胞有抑制作用, 并且抑制前炎性细胞因子的产生(90)。该研究的目的是测试IT9302是否能抑制给与LPS后受到内毒素诱导的休克作用的鼠中TNF- α 的产生(图14)。

5 使用8周龄的BALB/C小鼠(得自动物研究中心, Bomholtgaard, Bomholtvej 10, DK-8680 Ry, 丹麦)。来源于大肠杆菌的LPS是Sigma生产的(批号3444114), 鼠IT9302来自Schafer-N, Lersø Parkalle 42, DK-2100 Copenhagen, 丹麦。

10 给小鼠腹膜内注射1ml 0.9 M NaCl中的100 μ g LPS。在注射LPS前60分钟, 给与小鼠相当于0.1 μ g、1 μ g和10 μ g人IL-10的鼠IT9302。1、2、3和4小时后, 分别麻醉5只动物的小组(Imobilon, Pherrovet, Malmo, 瑞典), 然后通过心脏穿刺术抽取最大量的全血。将血液冷冻离心, 收集血清并储存在-70 $^{\circ}$ C, 以用于随后的、用ELISA的 TNF- α 含量分析(TNF- α 小鼠免疫诊断试剂盒, Genzyme, 剑桥, MA, 美国)。

15 如已证实的, 已观察到与不用mIT9302处理的对照组相比, 10 μ g的鼠IT9302 明显抑制小鼠血清中的TNF- α (见表3)。

表3

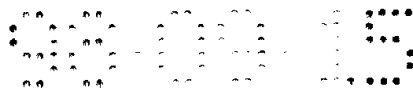
小鼠血清中的m-TNF- α ng/ml + SEM

LPS加入前60分钟加入的相当于hIL-10的鼠IT9302					
		0	0.1 μ g	1 μ g	10 μ g
1	h	2.48 $\pm$ 0.16	1.92 $\pm$ 0.48	2.64 $\pm$ 0.38	1.84 $\pm$ 0.16
2	hs	1.43 $\pm$ 0.17	1.68 $\pm$ 0.27	1.16 $\pm$ 0.21	0.62 $\pm$ 0.14
3	hs	0.48 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.05	0.0
4	hs	0.09 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.01

20 实施例13

用鼠IT9302调节胆汁酸诱导的急性胰腺炎

啮齿类、小鼠和兔在动物模型中经常应用, 最近 Genzyme



Diagnostics推出用于细胞因子研究产品的交叉反应试剂盒。特别是，能用小鼠免疫分析试剂盒测定兔TNF- α 和IFN- γ 。因为我们是在兔模型中进行试验的，研究IL-8在实验性急性胰腺炎的病理生理作用，我们研究了鼠IT9302对诱导型白细胞减少的作用(图14)。我们的假说是：
5 IL-10在鼠中和兔中甚至可能是相同，并且IL-10对在急性胰腺炎期间的胰腺中，IL-8诱导的白细胞的侵入有作用。

实验模型

将重1.7-4.0 kg的新西兰白兔(*Oryctolagus Cuniculus*)禁食18-24小时。按照Banerjee等1994 (91)和Hong等1962 (92)执行程序，在兔中
10 通过将5%胆汁酸引入到胰腺导管中，来诱发急性胰腺炎。在给与胆汁前30分钟，通过主静脉给与鼠IT9302 (100 μ g/kg)，随后以100 μ g/kg兔的剂量立刻皮下注射鼠IT9302。按照图14收集血浆样品。

如已证实的，如图中所显示的。已观察到诱导胰腺炎前，将鼠
15 IT9302注射入兔中能防止白细胞减少。

实施例14

用人IT9302调节兔中胆汁酸诱导的急性胰腺炎

如实施例13一样，用同样的实验模型，不同的是用人IT9302代替
20 鼠IT9302。通过导管内注射2 ml的5%化学脱氧胆汁酸来诱发急性胰腺炎(10只动物)。用人IT9302处理另一组动物(8只动物)。第一次剂量(100 μ g/kg)为皮下注射，第二次剂量(100 μ g/ml)为静脉内注射，在诱导急性胰腺炎前半小时注射。在诱导急性胰腺炎后以0、1、3、6 和12小时的时间间隔收集血清样本，用于细胞因子测定。

25

测定兔血清中TNF- α 和IL-6的方法

用一修饰形式的Genzyme鼠TNF- α ELISA试剂盒(编码号80-3807-00)进行兔血清中TNF- α 的测定。这种试剂盒是用捕获存在于血清中的

TNF- α 的固相单克隆仓鼠抗小鼠TNF- α 抗体和过氧化物酶结合的多克隆山羊抗小鼠TNF- α 抗体、底物和着色剂TMB制得的。将血清和标准TNF- α 的保温时间延长为4小时，底物保温的扩展时间是30分钟。

5 用专门的IL-8 ELISA试剂盒进行兔血清中兔IL-8的测定，试剂盒是Konji Mastsushima教授(日本东京)赠送的。简要地说，单克隆抗IL-8、豚鼠抗兔IL-8和碱性磷酸酶结合的兔抗豚鼠免疫球蛋白G抗体分别用作捕获抗体、第二抗体和检测抗体。关于方法见Ikeda等(106)。

结果

10

表4

用5%胆汁酸诱导的急性胰腺炎的兔血清中TNF- α 的含量(pg/ml $\pm$ SEM)

0	1	3	6	9	12
1210 $\pm$ 396	1206 $\pm$ 239	1918 $\pm$ 374	1662 $\pm$ 357	1884 $\pm$ 698	915 $\pm$ 431

15

急性胰腺炎，5%胆汁酸处理前30分钟用人IT9302治疗，血清中TNF- α 的含量(pg/ml $\pm$ SEM)

0	1	3	6	9	12
347 $\pm$ 77	739 $\pm$ 339	697 $\pm$ 146	658 $\pm$ 156	872 $\pm$ 594	463 $\pm$ 203

表5

急性胰腺炎，用5%胆汁酸处理，血清中IL-8的含量(pg/ml $\pm$ SEM)

0	1	3	6	9	12
1154 $\pm$ 351	780 $\pm$ 153	2210 $\pm$ 459	2690 $\pm$ 468	2196 $\pm$ 1058	1833 $\pm$ 1114

20



急性胰腺炎, 5%胆汁酸处理前30分钟用人IT9302治疗, 血清中TNF- α 的含量(pg/ml $\pm$ SEM)

0	1	3	6	9	12
875 $\pm$ 181	695 $\pm$ 205	900 $\pm$ 178	1037 $\pm$ 244	1207 $\pm$ 210	1087 $\pm$ 216

5 总结

最大量的TNF- α 诱导在3小时达到, 最大量的IL-8在6小时达到。血液循环中TNF- α 和IL-8的水平都显著向下调节0-12小时。还测定了血液中胰腺酶的水平(淀粉酶、脂肪酶和类胰蛋白酶), 这些酶在急性胰腺炎诱导后的3-6小时后都显示峰值, 这些酶中没有一种似乎受IT9302处理影响。在两组中观察到组织学上相似的胰腺变化, 同时肺中间质嗜中性白细胞浸润显著降低。

结论

IT9302在胆汁酸诱导的急性胰腺炎模型中向下调节TNF- α 和IL-8的生产, 并阻断这些被处理兔肺中的嗜中性白细胞浸润, 并借此阻止这些动物中ARDS状综合症的发展, 导致12小时后死亡率从60%下降到0%。白细胞介素1 β 被认为是作为重要的急性胰腺炎诱导物(见文献107), 由此支持我们的假说: IL-930能够阻断所有IL-1的诱导作用。IT9302可以用于兔模型的原因能用Dan Gaur等所做的、并同年发表在Nature (108)上的观察进行解释, 在这些观察中, 他显示兔(Lagomaorpha)蛋白质在系统发育上比其它啮齿类(小鼠、大鼠...)的蛋白质更接近灵长类(人类)的蛋白质。

实施例15

25 作为癌的治疗剂和预防转移中的IT9302

最近证实(111): 全身性给与细胞IL-10, 诱导针对小鼠体内已建立

的肿瘤的有效、专一和长期的免疫应答。提示这种作用部分地用IL-10对各种各样的细胞类型的著名作用来解释，所述作用包括：T细胞增殖的共刺激作用、CD8+ T细胞的化学吸引和淋巴-激活的杀伤细胞活性的刺激作用。他们还观察到人IL-10能够逆转病毒IL-10的局部免疫抑制作用。另一研究组证实癌症中给与IL-10的潜在治疗作用(112)，因为他们具有不同的肿瘤，包括具有包括转移性恶性黑素瘤在内的各种肿瘤的小鼠体内实验中，观察到IL-10通过天然杀伤细胞依赖性机制来抑制肿瘤转移。Kundu等(1996)(113)报道了IL-10在人乳腺癌的鼠模型中行使抗转移和抗肿瘤作用。

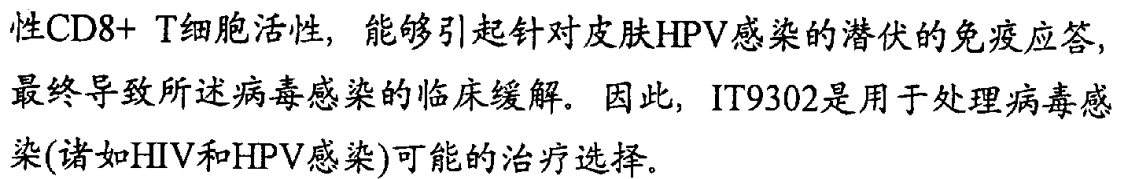
这些观察表明，给与人IL-10和人IT9302在癌症的生物学治疗的潜在作用。

实施例16

IT9302作为治疗病毒性感染的佐剂。

已经知道IL-10具有某些抗病毒能力。因此，Kollmann等(1996)(114)发现IL-10抑制具有人胎儿胸腺和肝脏的SCID鼠的急性体内HIV感染。我们观察到两个申请人/研究组，在背部皮肤上使用在塑料包裹吸藏物(plastic wrapping occlusion)下的乳膏剂中的IT9302 (总剂量400-500 μ g) 24小时后，导致CD8+ T细胞总数增加(分别为60%和90%)，并且使血清的IRAP浓度从1ng/ml增加到2ng/ml。在7个未处理的志愿者中。IRAP浓度从来没有超过1.1ng/ml。作为偶然的未预料的观察，两个研究组都观察到普通疣(由于皮肤HPV感染)在使用含IT9302的乳膏3-4天后，在疣周围显示明显的发红和发痒的炎症迹象。炎症反应同时发生在其中一个受试人的几个手指上，而其它人仅在一个手指有一个疣。这两种情况中，所述疣的大小在接下来的4-7天快速和逐渐减小，以至于10-11天后没有残留疣感染的临床病征。在接着的2个月的控制后，没有感染复发的迹象。

我们因此发现：IT9302可能通过全身性激活NK细胞和/或细胞毒



IT9302 作为在治疗炎性关节疾病(关节炎)中的免疫佐剂

- 40 -

参考文献

1. Bendtzen K. Lymphokines in inflammation. Inflammation Basic Mechanisms Tissue Injuring Principles and Clinical Models (P Venge 和 A Lindbom 编辑) 1985; Almqvist & Wiksell international. Stockholm:187-217.
5
2. Bendtzen K. 感染、炎症和免疫中的白细胞介素-1、白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子。Immunol Lett 1988;19: 183-192.
3. Larsen C.G. 人皮肤中细胞介导的免疫反应中的白细胞激活和趋化细胞因子。Acta Dermatovenerol. 1991; Suppl. 160: 1-48.
- 10 4. Fiorentino D.F., M. W. Bond和T. R. Mosmann. 1989. 两种类型的小鼠辅助性T细胞.IV. Th2克隆分泌一种抑制Th1克隆产生细胞因子的因子。J. Exp. Med., 170: 2081.
5. Viera P., R. de Wall-Malefyt, M.-N. Dang, K. E. Johnson, R. Kastelein, D. F. Fiorentino, J. E. de Vries, M.-G. Roncarolo, T. R. Mosmann和K. W. Moore. 1991. 人细胞因子合成抑制因子 (CSIF/IL-10) cDNA克隆的分离和表达: 与EB病毒开放阅读框架 BCRFI的同源性。Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88: 1172.
15
6. Moore, K.W. O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira, Mosmann T. R. 1993. 白细胞介素-10, Annu Rev. Immunol, 11: 165-90.
- 20 7. Kim, J.M., Brannan, C. I. Copeland N.G., Jenkins, N.A., Khan, T.A., Moore, K.W. 1992. 小鼠白细胞介素-10基因的结构和所述小鼠与人基因的染色体定位。J. Immunol 148:3618-23.
8. Carter, D. B., Deibel, M.R-Jr, Dunn, C.J. 等, 1990. 一种白细胞介素-1受体拮抗蛋白的纯化、克隆、表达和生物学特征记述。
25 NATURE 344: 633-638.
9. Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P. 等, 1990. 一种人白细胞介素-1抑制剂的白细胞介素-1受体拮抗剂活性。Nature 343:336-40.
10. Firestein, G.S., Boyle, D.L., Yu, C.等, 1994., 在类风湿性关节炎中

滑膜白细胞介素-1受体拮抗剂和白细胞介素-1的平衡。 *Arthritis Rheum* 37: 644-652.

11. Fisher, C.J.-Jr., Slotman, G.J., Opal, S.M., Pribble, J.P.等, 1994. 重组白细胞介素-1受体拮抗剂治疗败血症的初步评价: 一随机化的、开放标记的、安慰剂对照的多中心试验。 IL-1RA败血症研究组。 *Crit-Care-Med.* 22:12-21.
12. de Waal-Malefyt, R., Haanen J., Spits, H.等, 1991. IL-10和病毒 IL-10通过向下调节 II 类MHC表达减弱单核细胞抗原呈递能力来强烈地降低抗原专一性人T细胞的增殖。 *J. Exp. Med.* 174:915-24.
13. Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Jame, S.L., Sher, A.,1992. IL-10抑制 IFN- γ -激活的巨噬细胞杀伤寄生虫和产生氧化氮。 *J. Immunol.* 148:1792-96.
14. Jinquan, T., Larsen, C.G., Gesser, B., Matsushima, K., Thestrup-pedersen, K. 1993. 人IL-10是CD8⁺ T淋巴细胞的化学吸引剂和IL-8诱导的CD4⁺ T淋巴细胞迁移的抑制剂。 *Journal of Immunology*, 151: 4545-4551.
15. Rousset F., E. Garcia, T. Defraces, C. Peronne, D.-H. Hsu, R. Kastelein, K. W. Moore和J. Banchereau. 1992. IL-10是活化人B淋巴细胞的有效生长和分化因子。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 175:671.
16. Howard, M., O'Garra, A., Ishida, H., de Waal Malefyt, R., de Vries, J. 1992. 白细胞介素-10 的生物学性质。 *J. Clin. Immunol* 12: 239-47.
17. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick. D., Rajewsky, K., Muller, W. 1993. 白细胞介素-10缺陷小鼠呈现慢性小肠结肠炎。 *Cell* 75:263-74.
18. Sher, A., Fiorentino, D. F., Caspar, P., Pearce, E., Mosmann, T. 1991. CD4⁺淋巴细胞产生IL-10与蠕虫感染中Th1细胞因子合成的减量调节相关联。 *J. Immunol.* 147:2713-16.
19. Clerici, M., Shearea, G. M. 1993 *Immunology Today*. 14: 107-111.

20. Bry, K., Lappalainen, U. 1994. 白细胞介素-4和转化生长因子- β 1
调节蜕膜细胞的白细胞介素-1受体拮抗剂和前列腺素E2的产生。
Am-J-obstet-Gynecol 170(4): 1194-1198.
21. Firestein, G., S., Boyle, D. L., Yu, C., Paine, M. M., Whisenand, T.
5 D., Zvaifler, N. J., Arend, W. P. 1994. 类风湿性关节炎中滑液白细
胞介素-1受体拮抗剂和白细胞介素间的平衡。 Arthritis-Rheum,
37/5: 644-652.
22. Roberge, C. J., De-Medicis, R., Dayer, J. M., Rola-Pleszczyński,
M., Naccahe, P. H., Poubelle, P. E. 1994. 晶体诱导的嗜中性白细胞的
10 激活: V. 生物学活性的IL-1受体拮抗剂的差别产生。 J. Immunol
152/11: 5485-5494.
23. McCall, R. D., Haskill, S., Zimmermann, E. M., Lund, P. K.,
Thompson, R. C., Sartor, R. B. 1994. 抗性和易感性大鼠的小肠结
肠炎中组织白细胞介素1和白细胞介素-1受体拮抗剂的表达。
15 Gastroenterology (4):960-72.
25. Kimble, R. B., Vannice, J. L., Bloedow, D. C., Thompson, R. C.,
Hopfer, W., Kung, V. T., Brownfield, C., Pacifici, R. 1994. 白细胞
介素受体拮抗剂减少卵巢切除的大鼠的骨损失和骨的再吸收。 J.
Clin Invest. 93/5:1959-1967.
26. Kline, J. N., Geist, L. J., Monick, M. M., Stinski, M. F., Hunninghake,
20 G. W., 1994. J. Immunol. 152 (5):2351-7.
27. Tompkins, R. G. 1994. 治疗败血症中的人重组白细胞介素-1受体
拮抗剂(编辑的; 注释)。 Crit-Care-Med. 22(1): 3, 22(1): 12-21.
28. Everaerd, B., Brouckaert, P., Fiers, W. 1994. 重组IL-1受体拮抗剂保
25 护小鼠免于TNF诱导的致死。 J. Immunol. 152/10:5041-5049.
29. Fischer, C. J. Jr., Slotman, G. J., Opal, S. M., Pribble, J. P., Bone, R.
C., Emmanuel, G., Ng, D., Bloedow, D. C., Catalano, M. A. 1994. 用
于治疗败血症的人重组白细胞介素-1受体拮抗剂的初步评价: 随

- 机的、开放标记的、安慰剂对照的多中心试验。IL-1RA 败血症研究组(见注释)。Crit-Care-Med. 22(1):12-21, 22(1):3.
30. Gomez-Reino-Carnoto, J.J. 1994. 类风湿性关节炎的新疗法。Med-Clin 543-545.
- 5 32. Nishihara, T., Ohsaki, Y., Ueda, N., Saito, N., Mundy, G. R. 1994. 伴放线放线菌脂多糖诱导的小鼠白细胞介素-1受体拮抗剂阻断白细胞介素-1对骨重吸收和破骨细胞状细胞形成的作用。Infect-Immun. 62(2): 390-7.
- 10 33. Simon, C., Frances, A., Piquette, G. N., el-Danasouri, I., Zurawski, G., Dang, W., Polan, M. L. 1994. 小鼠中的胚胎移植被白细胞介素-1受体拮抗剂阻遏。(见注释)。Endocrinology. 134(2):521-8,134(2):519-20.
- 15 34. Baergen, R., Benirschke, K., Ulich, T. R., 1994. 胎盘中细胞因子的表达。在绒毛膜炎和分娩中白细胞介素1和白细胞介素1受体拮抗剂表达的作用。Arch-Pathol-Lab-Med. 118(1): 52-5.
35. Tang, W. W., Feng, L., Vannice, J. L., Wilson, C. B. 1994. 白细胞介素-1受体拮抗剂减轻试验性抗血管小球基底膜抗体相关的flomeulonephritis. J. Clin-Invest. 93(1):279-9.
- 20 36. Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F., Bonara, S. 1994
37. 白细胞介素10(IL-10)通过延缓mRNA的降解向上调节脂多糖刺激的人多形核白细胞的IL-1受体拮抗剂的产生。J. Exp-Med. 179/5:1695-1699
- 25 38. Mancini, R., Bendetti, A., Jezeguel, A. M.1994. 一白细胞介素-1受体拮抗剂减少由二甲基亚硝胺诱导的鼠肝中纤维变性。Virchows-Arch. 424/1:25-31.
39. Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., Burdick, M. D., Lincoln, P. M., Strieter, R. M. 1993.

40. 白细胞介素-1受体拮抗剂阻断混合淋巴细胞反应中化学激活素的产生。 *Blood*. 82(12): 3668-74.
41. Bandara, G., Mueller, G. M., Galea-Lauri, J., Tindal, M. H., Georgescu, H. I., Suchanek, M. K. Hung, G. L., Gloriso, J. C., Robbins, P. D., Evans, C. H. 1993.
42. 通过活体外转移的生物学活性白细胞介素1-受体-拮抗蛋白质的关节内表达。 *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*.90(22):10764-8.
43. Dinarello, C. A. 1994.用于败血性休克综合症治疗的抗白细胞介素-1的策略。 *Can-J-infect-Dis*. 5(suppl.A):9A-16A.
44. Oelmann, E., Topp, M. S., Reufi, B., Papadimitriou, C., Koeningsmann, M., Oberberg, D., Thiel, E., Berdel, W. E. 1994. *Int-J-Oncol*. 4/3:555-558.
45. Estrov, Z. 1993.自身内分泌和旁分泌生长刺激机制的中断:慢性髓细胞性白血病的新治疗策略。 *Semin-Hematol*.30 (3 suppl 3): 35-6.
46. Wooley, P. H., Whalen, J. D., Chapman, D. L., Berger, A. E., Richard, K. A., Aspar, D. G., Staite, N. D. 1993.一白细胞介素-1受体拮抗蛋白对小鼠中II型胶原蛋白诱导的关节炎和抗原诱导的关节炎的作用。 *Arthritis Rheum*. 36(9):1305-1314.
47. Peterson, C. M., Hales, H. A., Hatasaka, H. H., Mitchell, M. D., Rittenhouse, L., Jones, K. P. 1993. 白细胞介素-1 β (IL-1 β)调节前列腺素的产生和中性IL-1受体拮抗剂抑制最适刺激的大鼠卵巢灌注模型中的排卵。 *Endocrinology* 133 (5):2301-2306.
48. Estrov, Z. Kurzrock, R., Talpaz, M. 1993. 白细胞介素-1抑制性分子在急性和慢性髓细胞性白血病的治疗中的作用。 *Leuk. Lymphoma* 10(6): 407-418.
49. Chensue, S.W., Bienkowski, M., Eessalu, T. E., Warmington, K. S., Hershey, S.D., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L. 1993 nous IL-1受体拮抗蛋白(IRAP)调节血吸虫卵肉牙肿的形成和区域性淋巴反应。

- J. Immunol. 151 (7):3654-3662
50. Bowyer, J.F., Davies, D. L., Schmued, L., Broening, H. W., Newport, G.D., Slikker, W Jr., Holson, R. R. 1994. 在去氧麻黄碱神经毒性中f 体温过高的作用的进一步研究。 J. Pharmacol. Exp. Ther. 268/3: 1571-1580.
51. Cole, O. F., Sullivan, M. H. F., Elder, M. G. 1993. “白细胞介素-1受体拮抗剂”是一种人蜕膜细胞的前列腺素合成的部分激动剂。 Prostaglandins 46/6: 493-498.
52. Jenkins, J. K., Arend, W.P.1993. 人单核细胞中白细胞介素1受体拮抗剂的产生是由IL-1 α 、 IL-3和IL-4以及GM-CSF所诱导。 Cytokine 5/5: 407-415.
53. Coceani, F. Lees, J., Redford, J., Bishai, I. 1992. 白细胞介素-1受体拮抗剂: 对白细胞介素-1发热的效力。 Can. J. Pharmacol. 70 (12): 1590-1596.
54. Schiro, R., Longoni, D., Rossi, V., Maglia, O., Doni, A., Arsura, M., Carrara, G., Masera, G., Vannier, E., Dinarello, C. A., Rambaldi, A., Biondi, A. 1994. 白细胞介素-1受体拮抗剂对少年慢性髓细胞性白血病集落生长的抑制。 Blood 83/2: 460-465.
55. Watson, M. L., Smith, D., Bourne, A. D., Thompson, R. C., Westwick, J. 1993. 细胞因子是气道机能障碍反应过度的原因之一, 用白细胞介素-1受体拮抗剂预处理的肺部嗜酸性细胞积累和肿瘤坏死因子的产生。 Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 8(4): 365-369.
56. Abhyankar, S., Gilliland, D. G., Ferrara, J. L. M. 1993. 细胞因子在移植物抗宿主病中异常调节次要组织相容性抗原期间, 白细胞介素-1是一关键性的效应分子。 Transplantation 56/6: 1518-1523.
57. Lan, H. Y., Nikolic Paterson, D. J., Zarama, M., Vannice, J. L., Atkins, R. C., 1993. 白细胞介素-1受体拮抗剂对实验性新月形肾小球肾炎的抑制。 Kindey Int. 43 (2): 479-485.

58. Herve, P. 1993. 急性GvHD的预防和治疗-新用药程式. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 35/3: 295-297.
59. Conti, P., Panara, M. R., Barbacane, R. C., Placido, F. C., Bongrazio, M., Reale, M., Dempsey, R. A., Fiore, S. 1992. 阻断白细胞介素-1受体抑制人单核细胞培养物中白细胞三烯B4和前列腺素E2的产生. *Cell Immunol.* 145 (1): 199-209.
60. Kristensen, M., Deleuran, B., Eedy, D. J., Feldmann, M., Breathnach, S. M., Brennan, F. M. 1992. 白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IRAP)、白细胞介素-1受体和白细胞介素-1 α 在正常和牛皮癣皮肤中的分布, IRPA在牛皮癣病灶表皮中的减弱表达. *Br. J. Dermatol.* 127(4): 305-311.
61. Romero, R., Sepulveda, W., Mazor, M., Brandt, F., Cotton, D. B., Dinarello, C. A., Mitchrll, M. D. 1992. 足月和不足月分娩中的天然白细胞介素-1受体拮抗剂. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167 (4 Pt 1): 863-872.
62. Dinarello, C. A. 1992. 通过降低白细胞介素-1的产生或通过专一性受体拮抗作用来减轻炎症. *Int. J. Tissue. React.* 14(2): 65-75.
63. Conti, P., Panara, M. R., Barbacane, R. C., Bongrazio, M., Dempsey, R. A., Reale, M. 1993. 人重组IL-1受体拮抗剂(IL-1Ra)抑制脂多糖(LPS)刺激的人单核细胞悬浮液中白细胞三烯B4的产生. *Clin. Exp. Immunol.* 91/3: 526-531.
64. Deforge, L. E., Tracey, D. E., Kenney, J. S., Remick, D. G. 1992. 白细胞介素-1受体拮抗蛋白抑制脂多糖刺激的人全血中白细胞介素-8的表达. *Am. J. Pathol.* 140 (5): 1045-1054.
65. Porat, R., Poutsiaika, D. D., Miller, L. C., Granowitz, E. V., Dinarello, C. A. 1992. 白细胞介素-1 (IL-1)受体阻断减少人单核细胞中的内毒素和博氏疏螺旋体刺激的IL-8的合成. *Faseb. J.* 6 (7): 2482-2486.
66. Boormeester, M. A., van Leeuwen, P. A. M., Schneider, A. J.,

- Houdijk, A. P. J., Ferwerda, C. C., Wesdorp, R. I. C. 1993. 白细胞介素-1受体拮抗剂: 一种治疗败血症的新型治疗剂。Ned. Tijdschr. Geneesks. 137/7: 337-342.
- 5 67. Smith, R. J., Chin, J. E., Sam, L. M., Justen, J. M. 1991. 白细胞介素-1受体拮抗蛋白对白细胞介素-1刺激的软骨侵蚀和软骨细胞反应性的生物学作用。Arthritis Rheum. 34 (1): 78-83.
68. Conti, P., Barbacane, R. C., Panara, M. R., Reale, M., Placido, F. C., Fridas, S., Bongrazio, M., Dempsey, R. A. 1992. 人重组白细胞介素-1受体拮抗剂(hrIL-1ra)增强白细胞介素-2对于针对MOLT-4靶细胞的天然杀伤细胞活性的刺激作用。Int. J. Immunopharm. 14/6: 987-993.
- 10 69. Selig, W., Tocker, J. 1992. 白细胞介素-1受体拮抗剂对豚鼠中抗原诱导的肺部反应的作用。Eur. J. Pharmacol. 213/3: 331-336.
70. McCarthy, P. L. Jr., Abhyankar, S., Neben, S., Newman, G., Sieff, C., Thompson, R. C., Burakoff, S. J., Ferrara, J. L. M. 1991. 白细胞介素-1受体拮抗剂对白细胞介素-1的抑制预防移植物抗宿主病。Blood 78/8: 1915-1918.
- 15 71. Estrov, Z., Kurzrock, R., Wetzler, M., Kantarjian, H., Blake, M., Harris, D., Gutterman, J. U., Talpaz, M. 1991. 白细胞介素-1(IL-1)受体拮抗剂和可溶性IL-1受体对慢性髓细胞性白血病集落生长的抑制: IL-1活性抑制剂的新应用。Blood 78/6: 1476-1484.
- 20 72. Thomas, T. K., Will, P. C., Srivastava, A., Wilson, C. L., Harbison, M., Little, J., Chesonis, R. S., Pignatello, M., Schmolze, D., Symington, J., Kilin, P. L., Thompson, R. C. 1991. 在大鼠的乙酸诱导的结肠炎模型中白细胞介素-1受体拮抗剂的评价。Agents Actions 34/1-2: 187-190.
- 25 73. Carter, D. B., Deibel, M. R. Jr., Dunn, C. J., Tomich, C. S. C., Laborde, A. L., Slightom, J. L., Berger, A. E., Bienkowski, M. J., Sun,

- F. F., McEwan, R. N., Harris, P. K. W., Yem, A. W., Waszak, G. A., Chosay, J. G., Sieu, L. C., Hardee, M. M., Zurcher Neely, H. A., Reardon, I. M., Heinrikson, R. L.等 1990. 一种白细胞介素-1受体拮抗蛋白的纯化、克隆表达和生物学特征记述. *Nature* 344/6267: 633-638.
74. Larsen C. G., Anderson A. O, Apella E., Oppenheim J. J., Matsushima K.,1989. *Science* 243: 1464;
75. Larsen C. G., Jinqian T., Deleurant B., Thestrup-Pedersen K. 1993, IL-10是单核细胞, 但不是粒细胞的趋化反应的有效调节剂. *J. Invest. Dermatol.* 第100卷 第6期.
76. Sankoff和Kruskal, "Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison"的第一章 (Addison-Wesley, Reading, Mass.1983).
77. Berzofsky, *Science* 229, (1985) 932-940
78. Bowie 等, *Science* 247,(1990) 1306-1310
79. Wasserman 等, *J. Immunol.* 87. 1961, 290-295
80. Levine 等, *Methods in Enzymology* 11, 1967, 928-936
81. Lewis 等, *Biochemistry* 22, 1983, 948-954
82. Rene de Waal Malefyt, John Abrahams, Bruce Bennet, Carl G. Figdor 和Jan E. de Vries (1991), 白细胞介素10(IL-10)抑制人单核细胞的细胞因子合成: 一种单核细胞产生的IL-10的自主调节作用. *J. Exp. Med.* 174, 1209-1220
83. Szoka 等, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9, 1980, 467
84. 美国专利4,235,871号
85. US 4,501,728
86. US 4,837,028.
87. Walter H. Gotlieb, John S. Abrams, Joanna M. Watson, Thierry J. Velu, Jonathan S. Berek, Otoniel Martinez-Meza (1992), 有卵巢癌

- 和其它腹内癌症的病人的腹水中白细胞介素10(IL-10)的存在。
Cytokine 4 第5期, 385-390
88. Blanche G., P. Gianello, Sh. Germana, M. Baetscher, D. H. Sachs 和
Chr. LeGuern (1995), 猪白细胞介素10的分子鉴定: 在肾脏异源移
5 植模型中表达的调节。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 2800-2804
 89. Howard, M., T. Muchamuel, S. Andrade, S. Menon (1993), 白细胞
介素10保护鼠小免于致死性内毒素血症。J. Exp. Med. 177, 1205-
1208
 90. Chernoff, A. E., E. V. Granowitz, L. Shapiro, E. Vannier, G.
10 Lonnemann, J. B. Angel, J. S. Kennedy, A. R. Rabson, S. Wolff, C.
A. Dinarello (1995), IL-10在人体中的随机的对照试验。炎性细胞
因子产生和免疫应答的抑制。J. Immunol. 154, 5492-5499
 91. Banerjee, A. K., S. W. Galloway 和A. N. Kingsnorth (1994), 急
性胰腺炎的实验模型。Br. J. Surg. 81, 1096-1103
 92. Hong, S. S., D. S. Chin, T. S. Cho, S. E. Kim (1992), 兔中乙醇
15 和胆汁诱导的实验性胰腺炎。Annals of Surgery 156 (6), 929-939
 93. Bodansky, M. (1984), Principles of Peptide Synthesis, Springer-
Verlag, Berlin
 94. Pelton, J. T., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 233-239
 95. Dyson, H., 等 (1988), Annual Review of Biophysics and
20 Biophysical Chemistry 17, 305-324.
 96. Nakanishi, H., 等, (1993), 免疫球蛋白超基因家族的肽模拟物 -
综述。Gene 137, 51-56
 97. US 5,446,128
 98. Walter 等, (1995), Biochemistry 34, 12118-25
 99. Marshall, G. R. (1993), Tetrahedron 49, 3547-3558
 100. Merrifield, R. B. (1963), J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-54.
 101. Kent, S. B. H. (1988), Annu. Rev. Biochem. 57, 957-989

102. Carpino, L. A. 和 Han, G. Y. (1972), J. Org. Chem. 37, 3404-3409
103. Stewart, J. M. 和 Young, J. D. (1983), "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Company, Rockford, 依里诺
104. Atherton, E. 和 Sheppard, R. C. (1989), "Solid Phase Peptide Synthesis", 牛津大学出版社的 IRL Press
105. Pennington, M. W. 和 Dunn, B. M. (编辑) (1994), "Peptide Synthesis Protocols", Humana Press, Totowa, 新泽西
106. Ikeda, N. 等, (1995), Infection and Immunity, 4812-4817
107. Fink, G. W. 和 Norman, J. G. (1996), "急性胰腺炎期间特定的白细胞群落的胰腺内白细胞介素-1 β 基因的表达", J. Surgical Research 63, 369-373
108. Gaur, D.等, (1996), 所述目兔类动物(兔类、野兔类和起源上关联的动物)的系统发育位置", Nature, 379, 333-335
109. Poli, G. 等 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 108-112
110. Jensen, I. M. 等 (1993), Analyt. Cell. Pathol. 5, 213-223
111. Berman, R. M., Suzuki, T.等, (1996), "细胞IL-10的系统给药诱导对鼠中已存在肿瘤的有效的、专一性的、长期的免疫应答" J. Immunol. 157, 231-238
112. Zheng, L. M., Ojcius, D. M. 等(1996), "IL-10通过一种NK细胞依赖性机制抑制肿瘤转移", J. Exp. Med. 184, 579-584
113. Kundu, N., Beaty, T. L.等, (1996), "IL-10在鼠乳房癌模型中的抗转移和抗肿瘤活性", J. Natl. Cancer Inst. 88, 479-480
114. Kollmann, T. R., Pettoello-Mantovani, M.等 (1996), "通过人IL-10处理移植有人胎儿胸腺和肝脏的SCID小鼠抑制急性体内HIV感染", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3126-3131
115. Maini, R. N. (1996), "抗细胞因子和抗T细胞引导的治疗类风湿性关节炎的前景", Clin. Exp. Rheumatol. 13, suppl. 12, S35-40

序列表

(1) 一般资料

(i) 申请人:

- 5 (A) 收信人: Steeno Research Group A/S
 (B) 街道: Dunbirkevej 6
 (C) 城市: Odense SV
 (E) 国家: 丹麦
 (F) 邮政编码: 5250

10

(ii) 发明名称: 合成的 IL-10 类似物

(iii) 序列数: 23

15

(v) 计算机可读形式

- (A) 媒体类型: 软盘
 (B) 计算机: IBM PC 兼容机
 (C) 操作系统: PC-DOC/MSDOS
 (D) 软件: PatentIn Release #1.0, 版本 1.30 (EPO)

20

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 顺序特征:

- (A) 长度: 9 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型:
 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 1:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 1 5

25

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 2:

Ala Tyr Met Thr Ile Lys Met Arg Asn
1 5

5 (2) SEQ ID NO: 3 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 3:

Ala Phe Met Thr Leu Lys Leu Arg Asn
1 5

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸

- (C) 链型:
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 4:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Val Arg Glu
1 5

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 5:

5 Gly Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 6:

Ala Phe Met Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 7 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 7:

5 Ala Tyr Ile Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 8 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 8:

Ala Tyr Leu Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 9 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 9:

5 Ala Tyr Val Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 10 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 10:

Ala Tyr Met Thr Ile Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 11 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 11:

Ala Tyr Met Thr Leu Lys Ile Arg Asp
1 5

5 (2) SEQ ID NO: 12 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 12:

Ala Tyr Met Thr Val Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 13 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸

- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 13:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 14 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 14:

5 Ala Tyr Met Thr Met Lys Met Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 15 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 15:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Val Arg Asp
1 5

(2) SEQ ID NO: 16 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 16:

5 Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Gln
1 5

(2) SEQ ID NO: 17 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 17:

Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Glu
1 5

(2) SEQ ID NO: 18 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 18:

5 Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu
1 5

(2) SEQ ID NO: 19 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 6 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 19:

Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

(2) SEQ ID NO: 20 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 7 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- (ix) 假设: 否
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 20:

Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

5

(2) SEQ ID NO: 21 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 8 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- (ix) 假设: 否
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 21:

Xaa Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

10

(2) SEQ ID NO: 22 的信息:

- (i) 顺序特征:

- (A) 长度: 9 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 22:

Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

(2) SEQ ID NO: 23 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 27 个核苷酸
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: DNA (基因组)

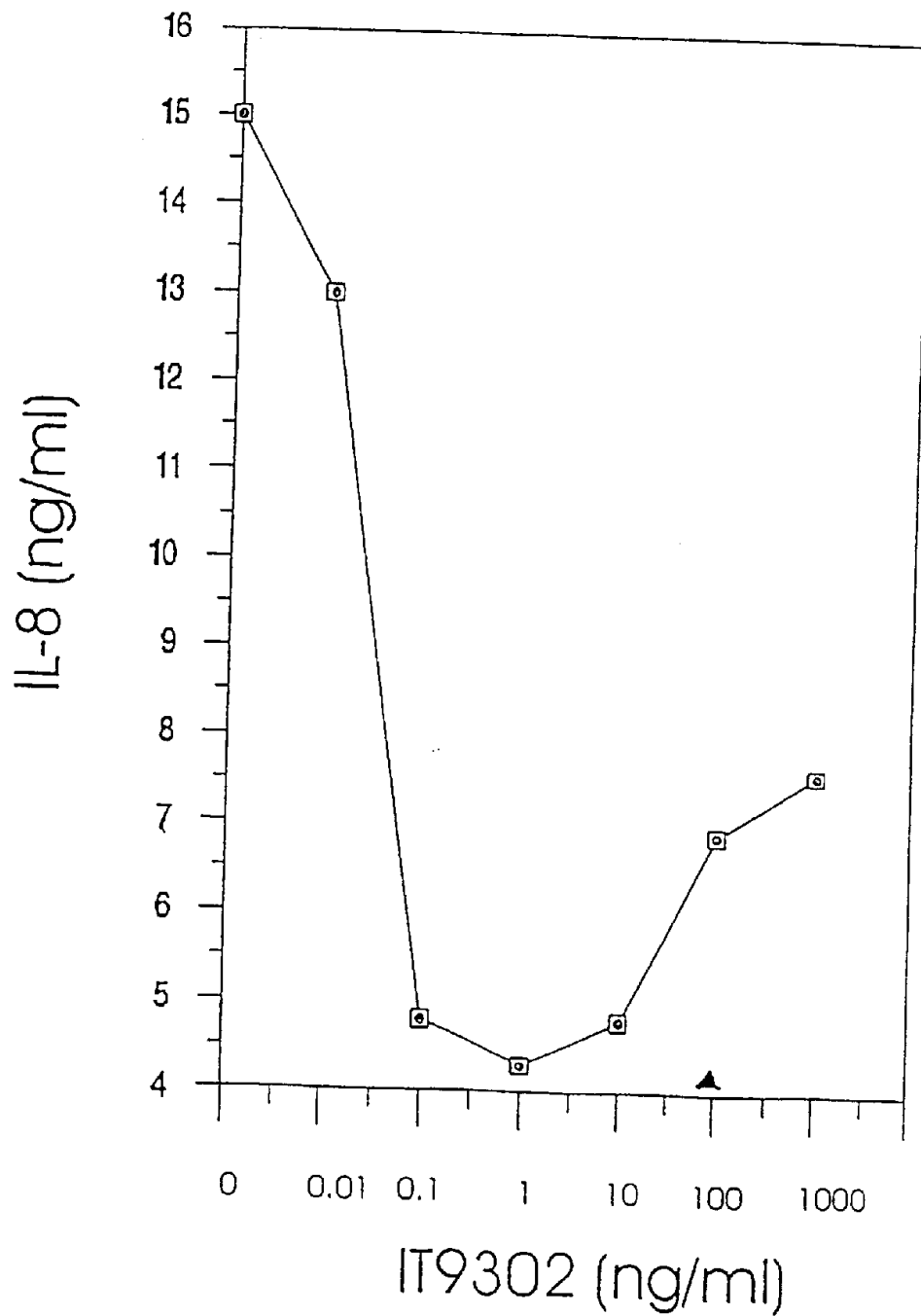
(ix) 假设: 否

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 23:

5 GCCTACATGA CAATGAAGAT ACGAAAC

27

说明书附图



IT9302抑制纯化的培养单核细胞自发性IL-8的产生。
(▲)表示使用rh IL-10 (100 ng/ml)时IL-8的水平。

图1

IT9302抑制人外周血单核细胞中IL-1诱导的
(1 ng/ml) IL-8产生。

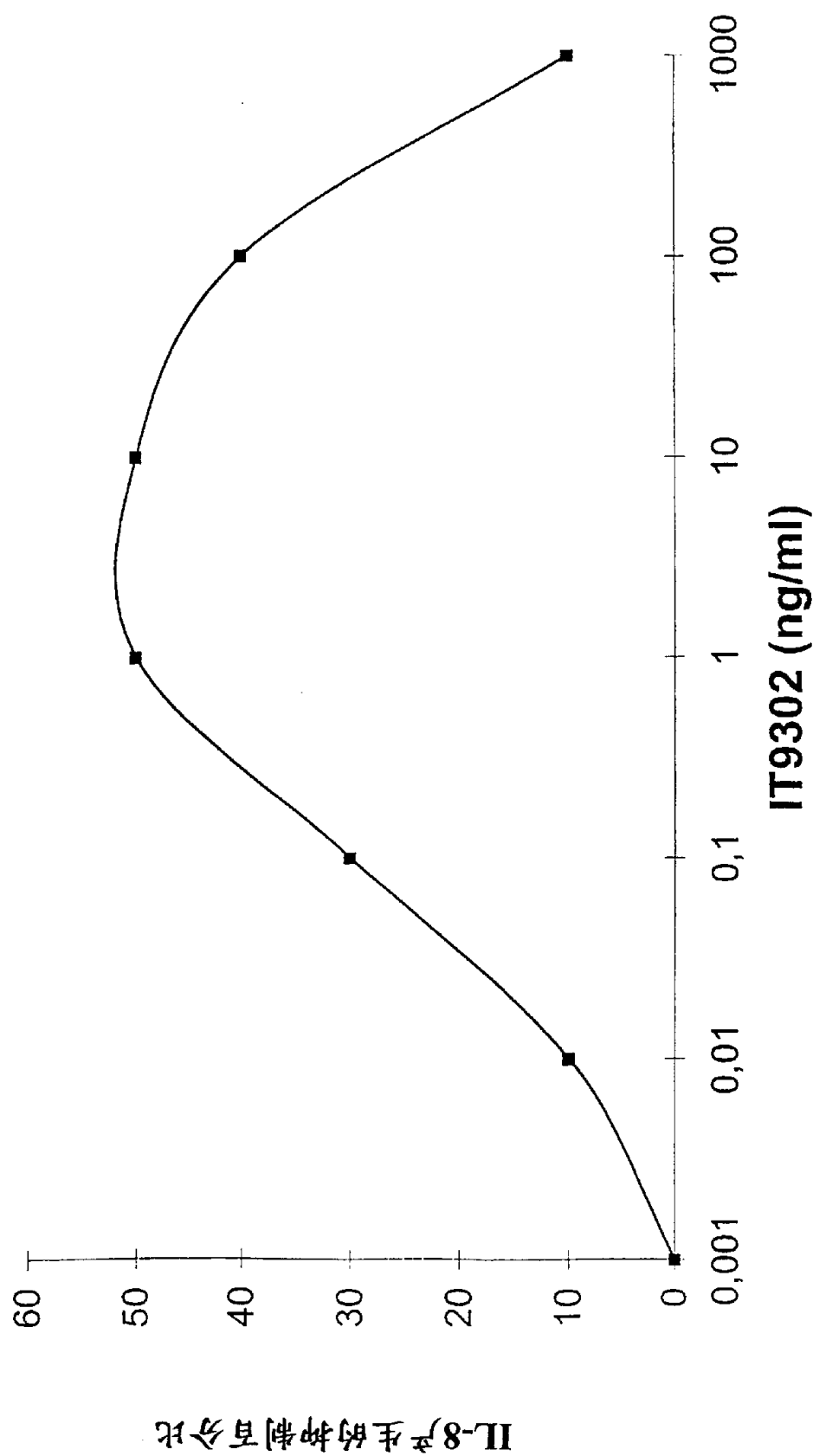


图2

IT9302刺激的人单核细胞

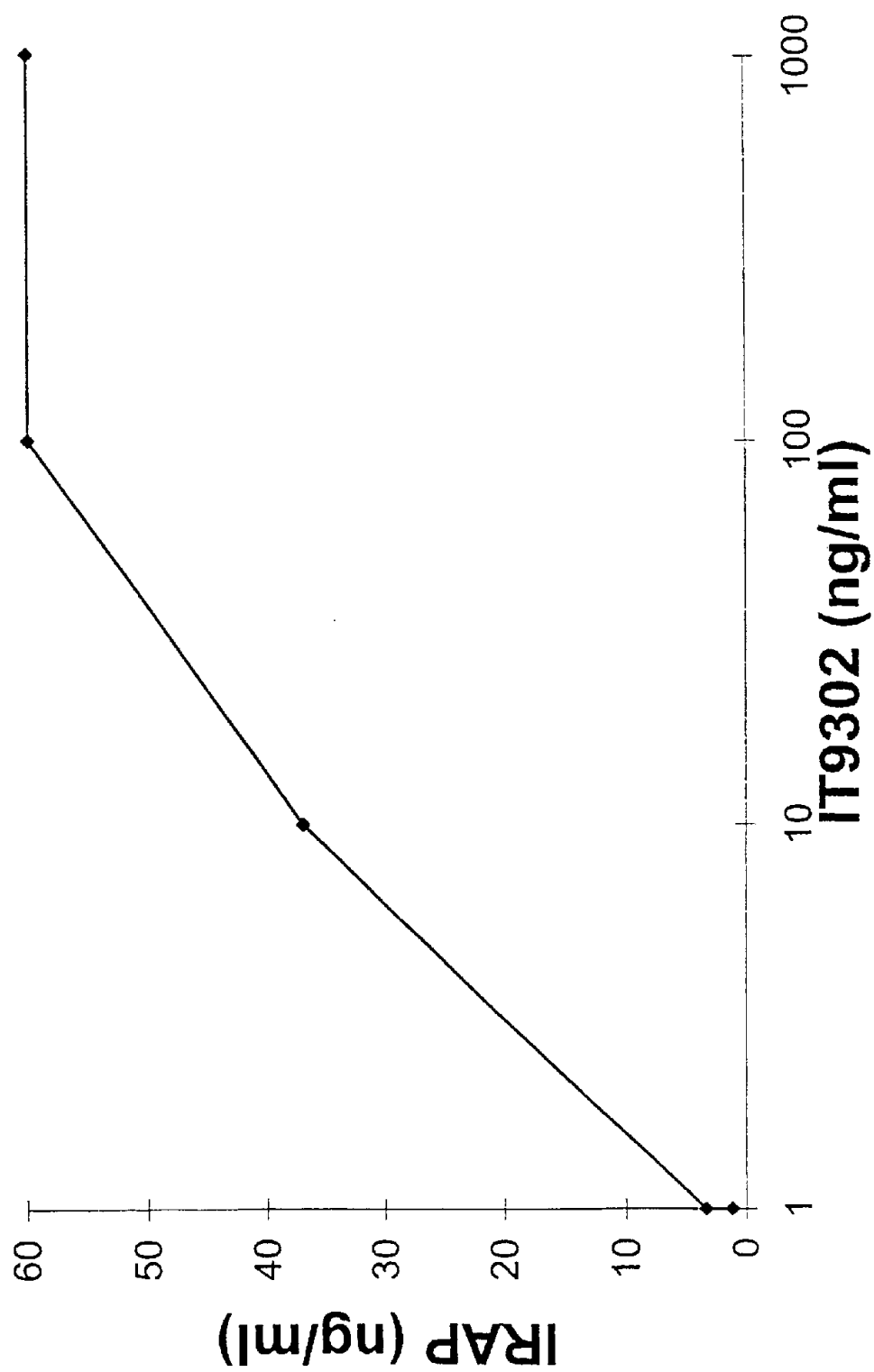


图3

930215

IL-10 刺激的人单核细胞

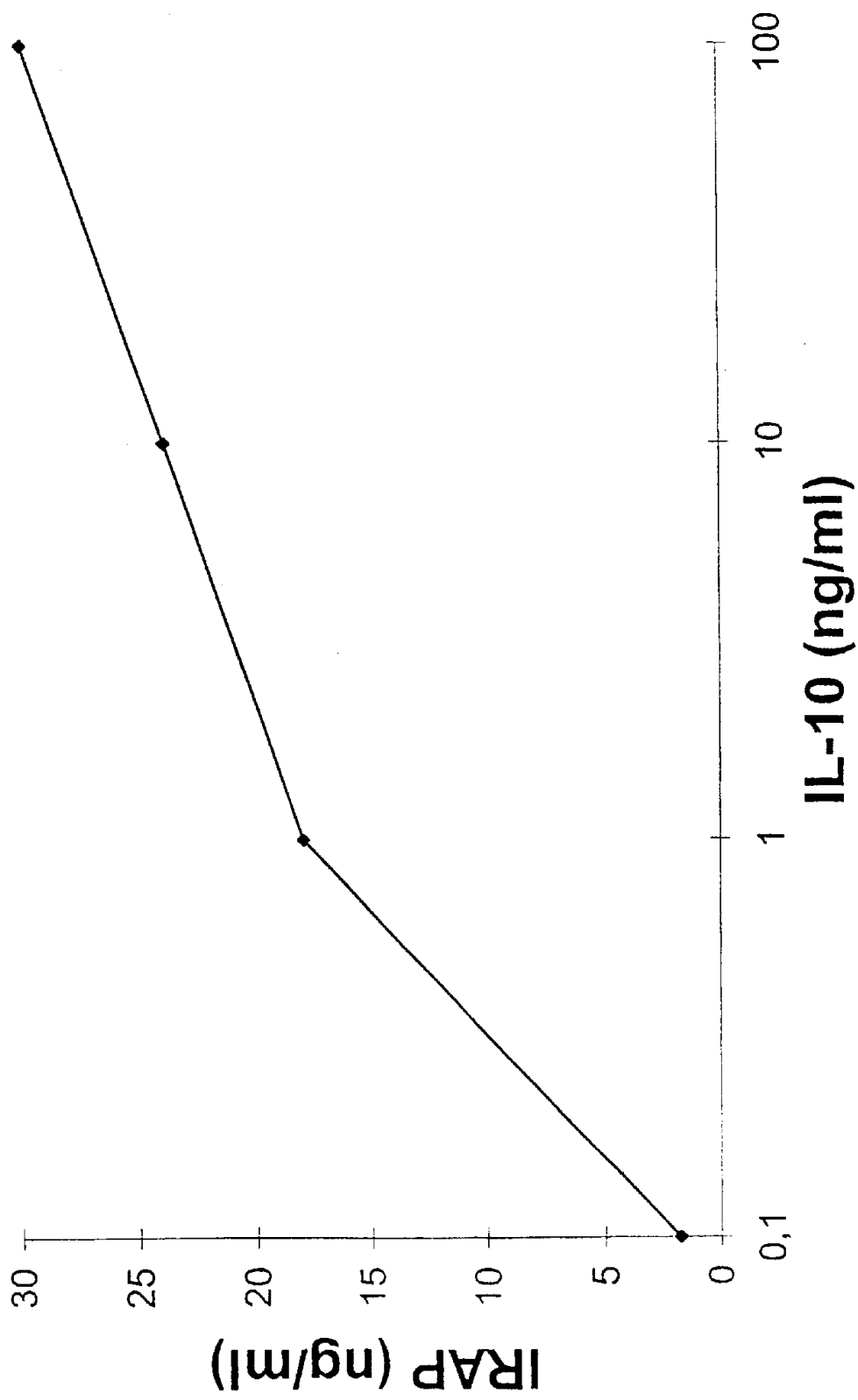


图4

93 03 15

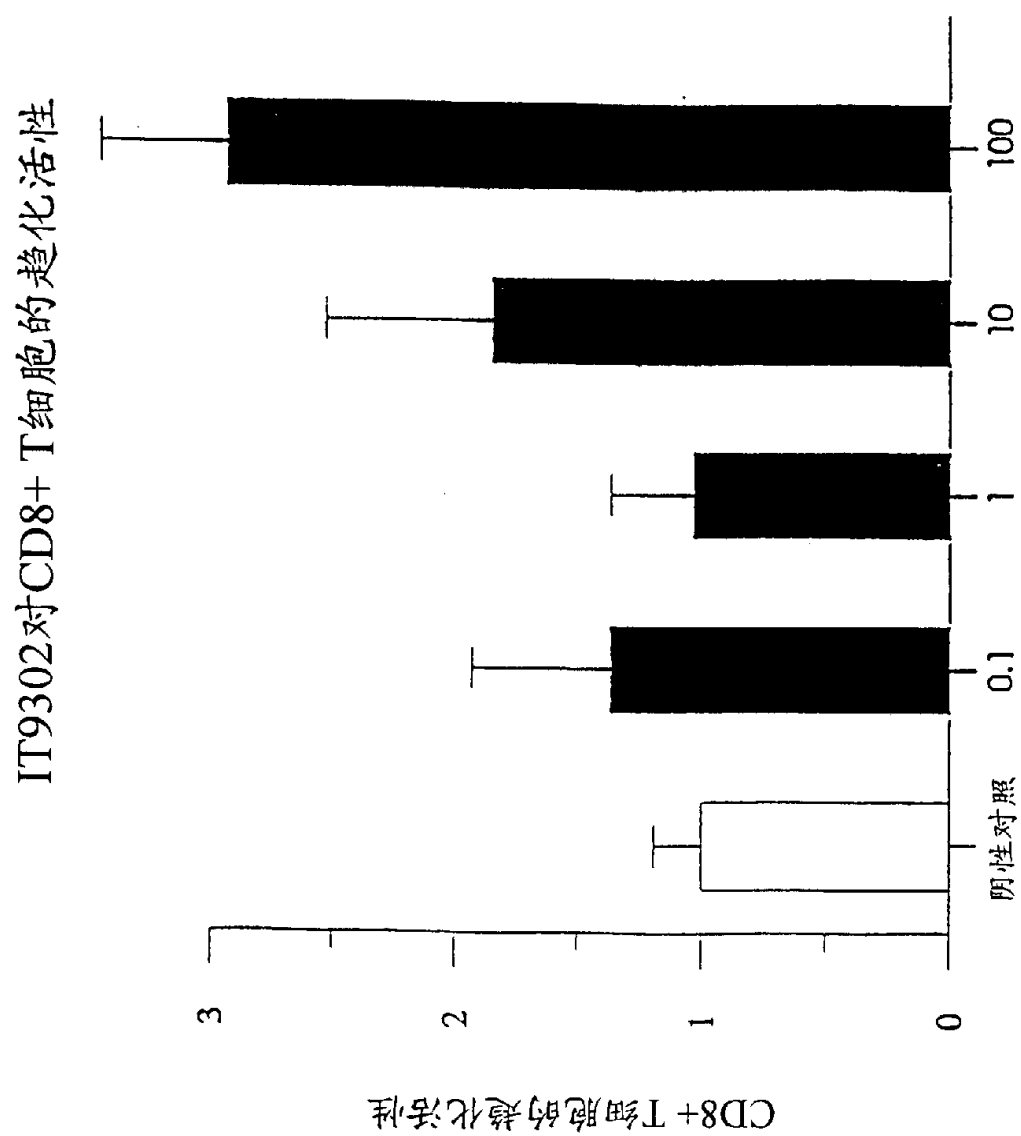


图5

IL-10 (10 ng/ml)对CD8+ T细胞的趋化活性

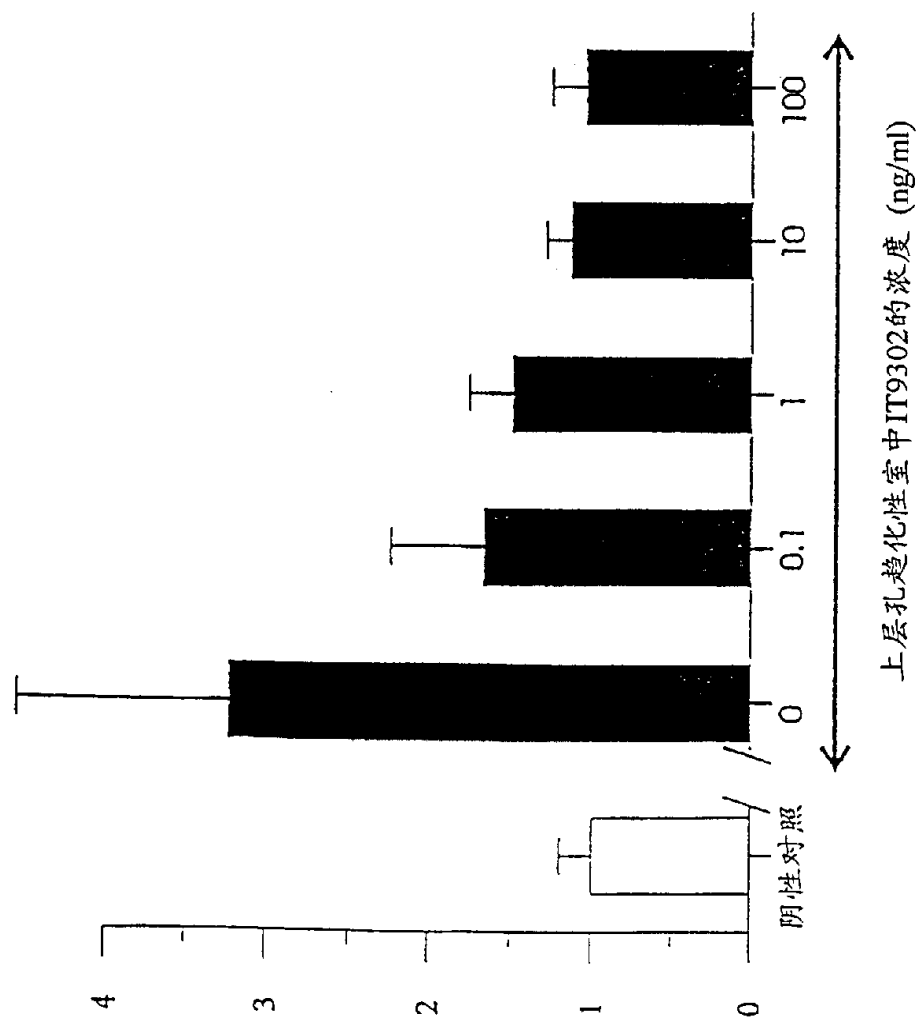


图6

IT9302对CD8+ T细胞产生的脱敏现象，
导致CD8+ T细胞对IL-10 (10 ng/ml)诱导的趋化性的非应答性。

IT9302对IL-8活性的抑制

IT9302对IL-8 (10 ng/ml)介导的趋化性

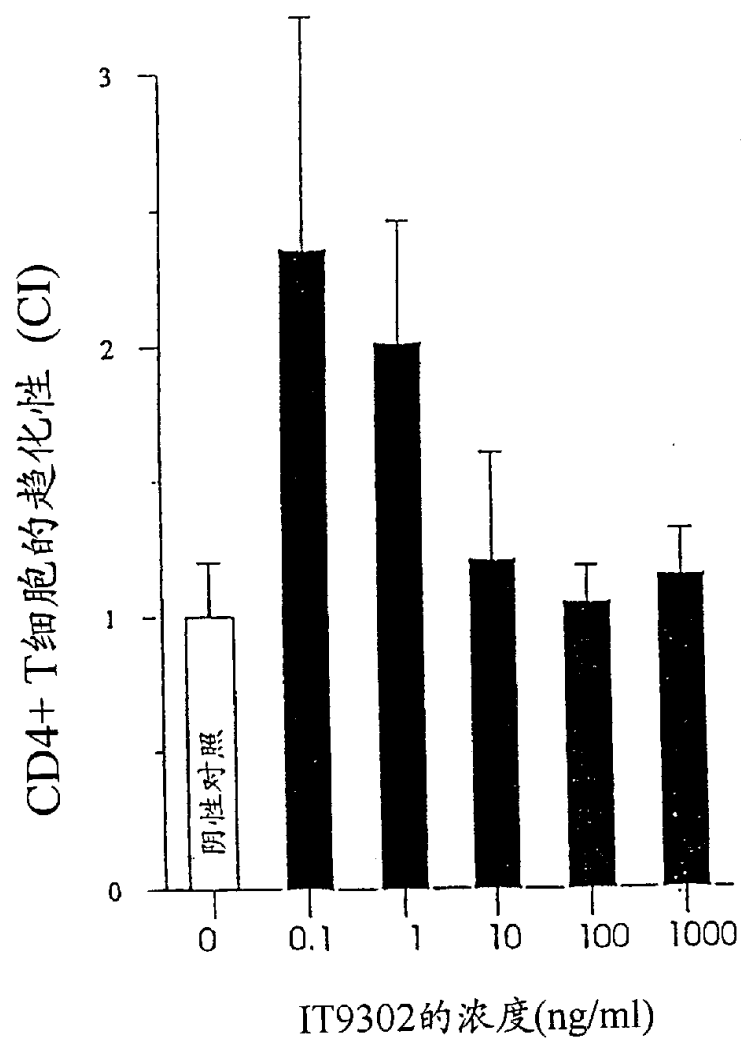


图7

IT9302抑制MCAT/MCP-1诱导的
单核细胞趋化性

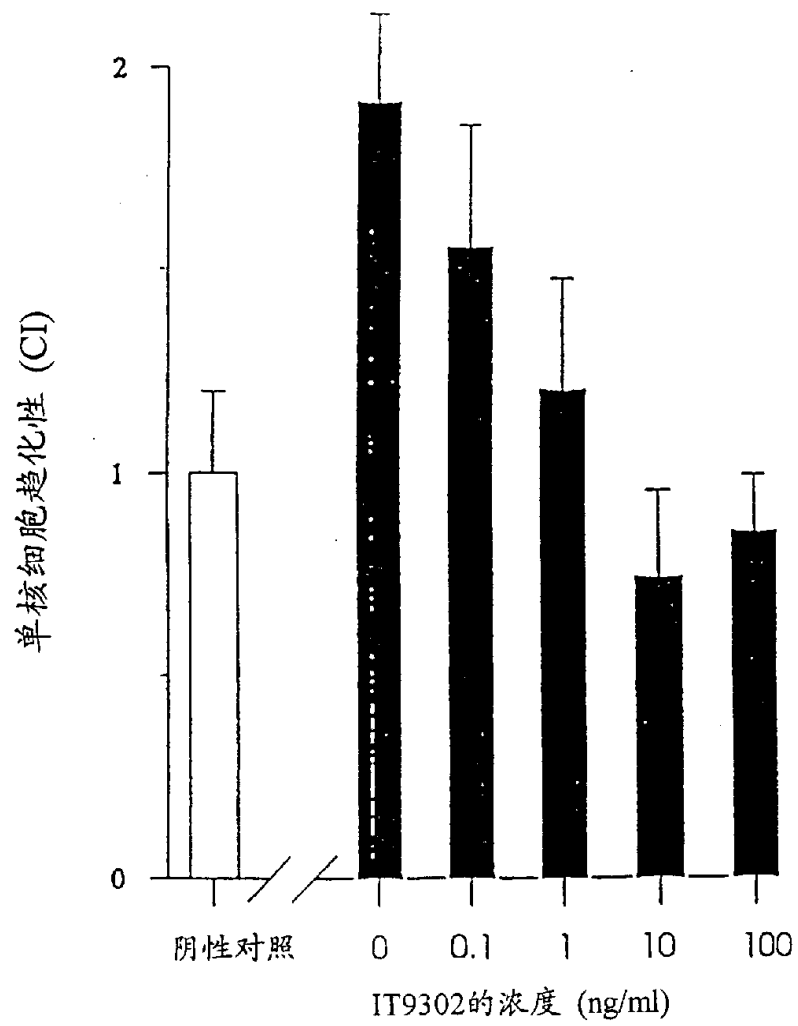


图8

用山羊抗人IL-4抗体进行的CD4⁺ T细胞胞液蛋白的
ECL-Western印迹分析



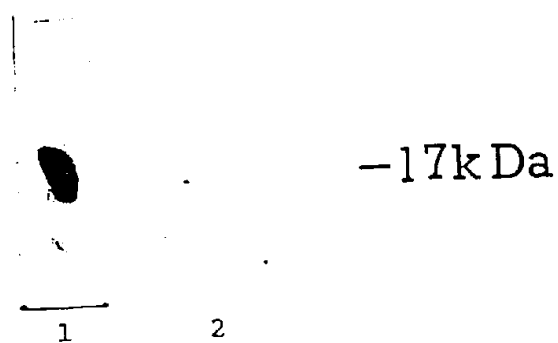
用以下物质刺激3天:

1. 对照
2. 单抗IL-8抗体 WS.4 10 μ g/ml,
3. rIL-8 100 ng/ml,
4. rIL-10 100 ng/ml,
5. IT9302 10 ng/ml,
6. rIFN γ 10 ng/ml.

图9

100 75 50 25

用兔抗人TNF- α 抗体进行的人混合白细胞培养物
胞液蛋白的ECL-Western印迹分析



用以下物质刺激24小时:

1. 对照
2. IT9302 10 ng/ml

图10

IL-10和IT9302对T细胞增殖的调节

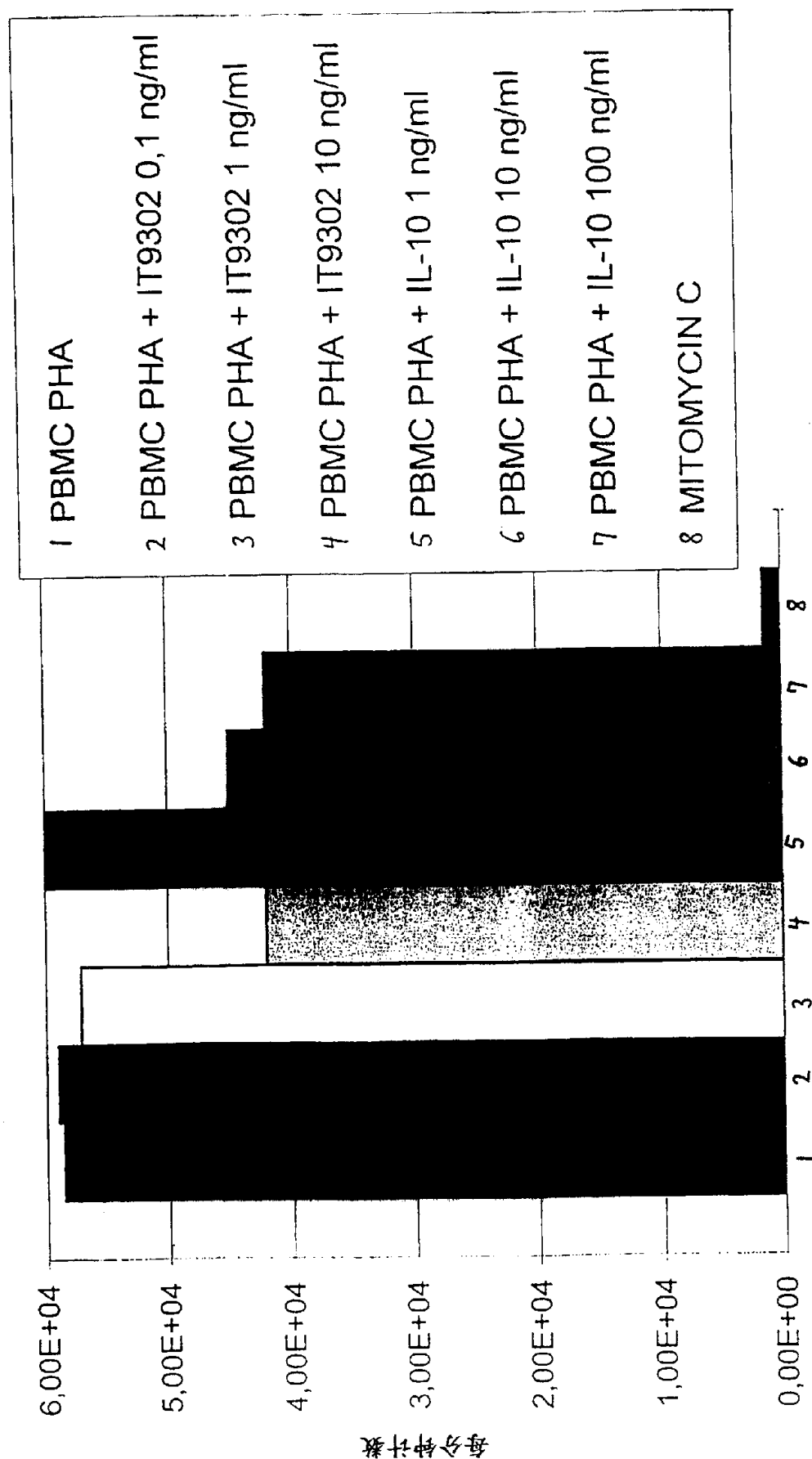
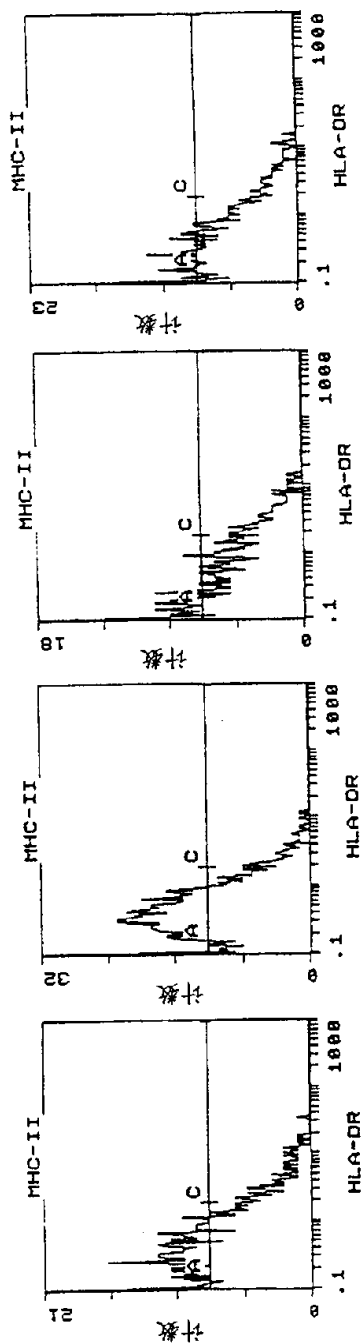


图11

人单核细胞上HLA-DR的表达(流式细胞计数器)



非刺激的细胞

+ IFN- γ (10ng/ml)

+IL-10 (10 ng/ml)+IFN(10 ng/ml)

+IT9302 (1 ng/ml)+IFN(10 ng/ml)

表达HLA-DR细胞%:

36.8

58.4

25.2

31.2

细胞凋亡中的细胞%:

9.9

4.1

10.3

9.3

图12

IT9302对LPS诱导的“败血性”白细胞减少的作用

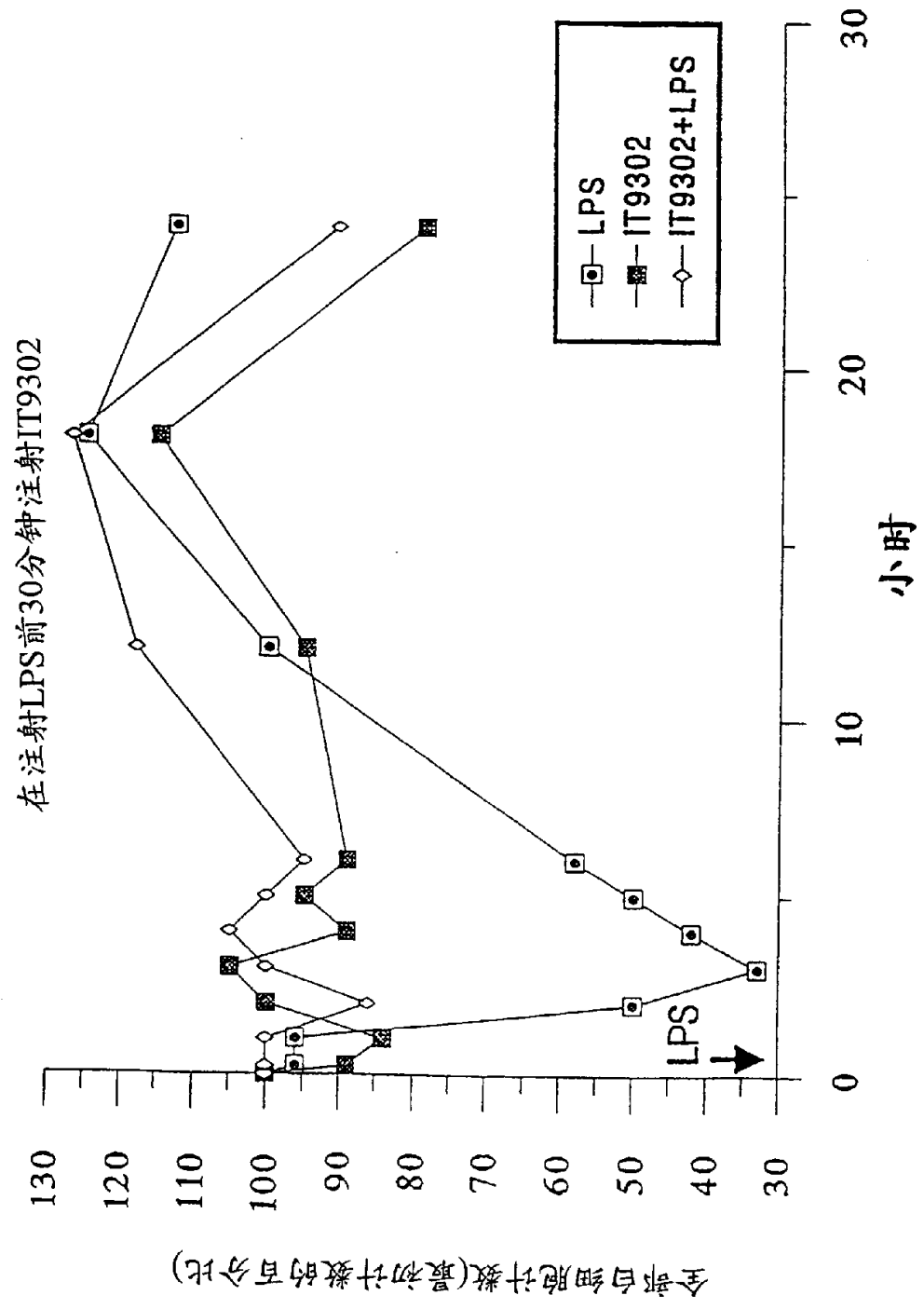


图13

诱导急性胰腺炎(5%胆汁酸)后外周血(兔)中的白细胞计数

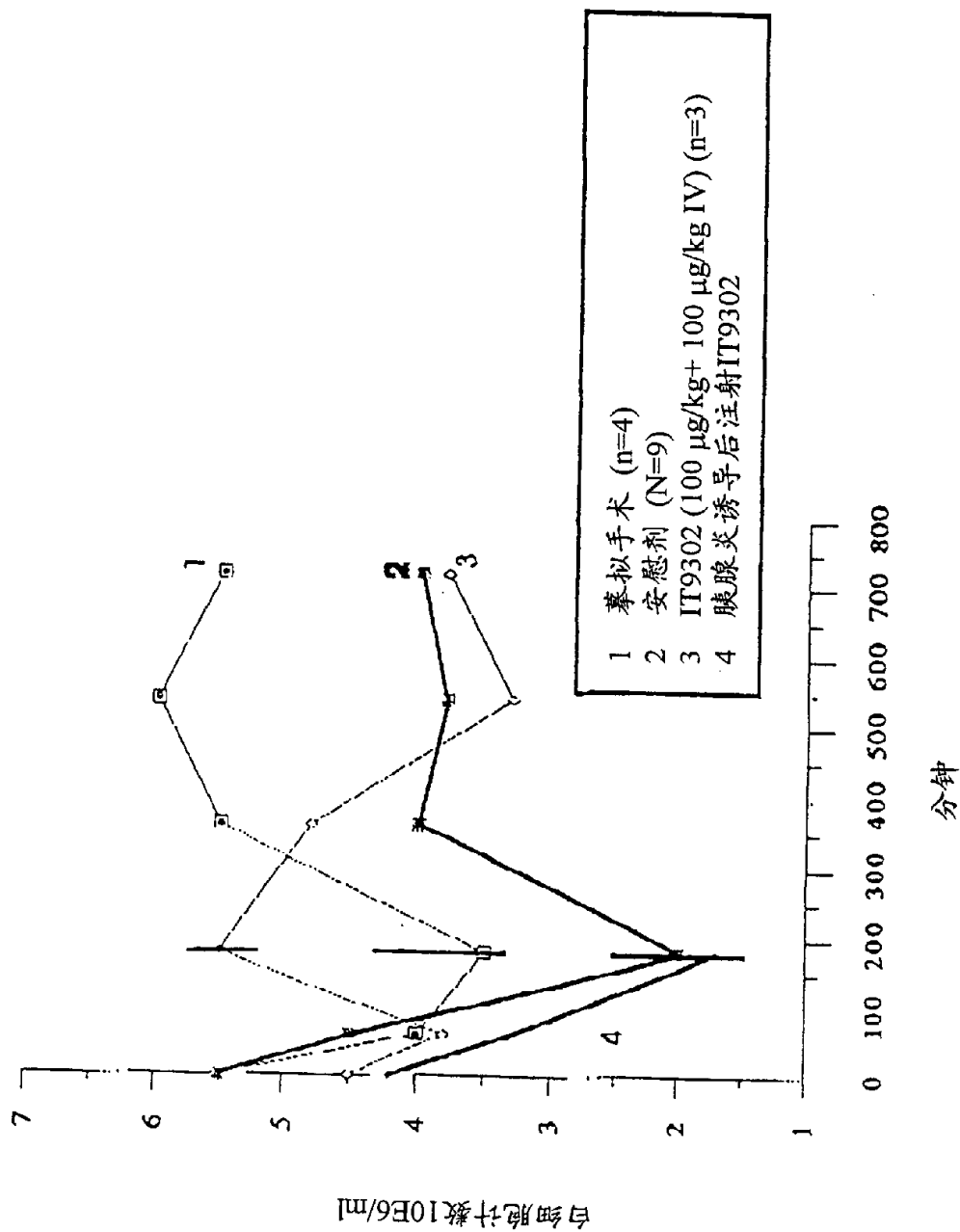


图14