

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580026106.8

[51] Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 1 日

[11] 公开号 CN 101010430A

[22] 申请日 2005.8.3

[21] 申请号 200580026106.8

[30] 优先权

[32] 2004.8.3 [33] US [31] 60/598,362

[86] 国际申请 PCT/US2005/027694 2005.8.3

[87] 国际公布 WO2006/017643 英 2006.2.16

[85] 进入国家阶段日期 2007.2.1

[71] 申请人 转化技术制药公司

地址 美国北卡罗来纳

共同申请人 纽约市哥伦比亚大学理事会

[72] 发明人 A·M·M·米贾里

D·M·斯特恩 Y·E·田

J·C·韦伯斯特 R·罗思莱因

A·M·施密特 严世都

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 胡国群

权利要求书 5 页 说明书 67 页 序列表 54 页
附图 26 页

[54] 发明名称

RAGE 融合蛋白及使用方法

[57] 摘要

公开了包含 RAGE 多肽序列的 RAGE 融合蛋白，所述 RAGE 多肽序列与第二种非 RAGE 多肽连接。RAGE 融合蛋白可以利用 RAGE 多肽结构域，所述 RAGE 多肽结构域包含 RAGE 配体结合位点以及直接与免疫球蛋白 C_H2 结构域连接的域间连接体。此类融合蛋白可以提供与 RAGE 配体的特异且高亲和力的结合。还公开了所述 RAGE 融合蛋白作为 RAGE 介导的病理性治疗剂的用途。

1. 一种包含与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含 RAGE 配体结合位点。
2. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽与包含免疫球蛋白结构域或部分免疫球蛋白结构域的多肽连接。
3. 权利要求 2 的融合蛋白，其中所述包含免疫球蛋白结构域的多肽包含人 IgG 的 C_H2 或 C_H3 结构域中至少一个的至少一部分。
4. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述 RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。
5. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 8，相应于人 RAGE 的氨基酸 24 - 116。
6. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 14，相应于人 RAGE 的氨基酸 24 - 123。
7. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 18，相应于人 RAGE 的氨基酸 24 - 226。
8. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 5，相应于人 RAGE 或 sRAGE 的氨基酸 24 - 339。
9. 一种分离的核酸序列，其编码与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽，其中所述 RAGE 多肽包含 RAGE 配体结合位点。
10. 权利要求 9 的分离的核酸序列，其中所述 RAGE 多肽与包含免疫球蛋白结构域或部分免疫球蛋白结构域的多肽连接。
11. 权利要求 10 的分离的核酸序列，其中所述包含免疫球蛋白结构域的多肽包含人 IgG 的 C_H2 或 C_H3 结构域中至少一个的至少一部分。
12. 权利要求 9 的分离的核酸序列，其中所述 RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。
13. 权利要求 9 的分离的核酸序列，其包含 SEQ ID NO: 25 或其

片段。

14. 权利要求 9 的分离的核酸序列，其包含 SEQ ID NO: 26 或其片段。

15. 权利要求 9 的分离的核酸序列，其包含 SEQ ID NO: 28 或其片段。

16. 一种在药物学上可接受的载体中包含治疗上有效量的 RAGE 融合蛋白的组合物，其中所述 RAGE 融合蛋白包含与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽，其中所述 RAGE 多肽包含 RAGE 配体结合位点。

17. 权利要求 16 的组合物，其中所述 RAGE 多肽与包含免疫球蛋白结构域或部分免疫球蛋白结构域的多肽连接。

18. 权利要求 17 的组合物，其中所述包含免疫球蛋白结构域的多肽包含人 IgG 的 C_H2 或 C_H3 结构域中至少一个的至少一部分。

19. 权利要求 16 的组合物，其中所述 RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。

20. 权利要求 16 的组合物，其中所述 RAGE 多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 8，相应于人 RAGE 的氨基酸 24-116。

21. 权利要求 16 的组合物，其中所述 RAGE 融合蛋白被配制为可注射的溶液。

22. 权利要求 16 的组合物，其中所述 RAGE 融合蛋白被配制为无菌冻干粉剂。

23. 一种制造 RAGE 融合蛋白的方法，其包括将 RAGE 多肽与第二种非 RAGE 多肽共价连接的步骤，其中所述 RAGE 多肽包含 RAGE 配体结合位点。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述连接的 RAGE 多肽和第二种非 RAGE 多肽由重组 DNA 构建体编码。

25. 权利要求 24 的方法，其进一步包括将 DNA 构建体整合到表达载体中的步骤。

26. 权利要求 24 的方法，其进一步包括将所述表达载体插入到宿

主细胞中。

27. 一种检测 RAGE 调节剂的方法，其包括：(a) 提供包含与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含配体结合位点；(b) 将目的化合物和具有已知 RAGE 结合亲和力的配体与融合蛋白混和；和 (c) 在目的化合物存在下测量已知的 RAGE 配体与 RAGE 融合蛋白的结合。

28. 一种用于检测 RAGE 调节剂的试剂盒，其包含：(a) 具有已知 RAGE 结合亲和力的化合物，作为阳性对照；(b) 包含与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽的 RAGE 融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含配体结合位点；和 (c) 用法说明书。

29. 一种治疗受试者中 RAGE 介导的病症的方法，其包括对受试者施用包含 RAGE 多肽的多肽，其中所述 RAGE 多肽与第二种非 RAGE 多肽连接并且包含 RAGE 配体结合位点。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述 RAGE 多肽与包含免疫球蛋白结构域或部分免疫球蛋白结构域的多肽连接。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述包含免疫球蛋白结构域的多肽包含人 IgG 的 C_H2 或 C_H3 结构域中至少一个的至少一部分。

32. 权利要求 29 的方法，其中所述 RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。

33. 权利要求 29 的方法，其中所述 RAGE 多肽包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 8，相应于人 RAGE 的氨基酸 24-116。

34. 权利要求 29 的方法，其包括对受试者静脉内施用所述 RAGE 融合蛋白。

35. 权利要求 29 的方法，其包括对受试者腹膜内施用所述 RAGE 融合蛋白。

36. 权利要求 29 的方法，其包括对受试者皮下施用所述 RAGE 融合蛋白。

37. 权利要求 29 的方法，其中所述融合蛋白用于治疗糖尿病的症

状或糖尿病晚期并发症的症状。

38. 权利要求 37 的方法, 其中所述糖尿病或糖尿病晚期并发症的症状包括糖尿病性肾病。

39. 权利要求 37 的方法, 其中所述糖尿病或糖尿病晚期并发症的症状包括糖尿病性视网膜病。

40. 权利要求 37 的方法, 其中所述糖尿病或糖尿病晚期并发症的症状包括糖尿病性足部溃疡。

41. 权利要求 37 的方法, 其中所述糖尿病或糖尿病晚期并发症的症状包括心血管并发症。

42. 权利要求 37 的方法, 其中所述糖尿病或糖尿病晚期并发症的症状包括糖尿病性神经病变。

43. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗淀粉样变性。

44. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗阿尔茨海默病。

45. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗癌症。

46. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗与自身免疫相关的炎症。

47. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗与炎性肠病相关的炎症。

48. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗与类风湿性关节炎相关的炎症。

49. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗与牛皮癣相关的炎症。

50. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗与多发性硬化症相关的炎症。

51. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗与缺氧相关的炎症。

52. 权利要求 29 的方法, 其中所述融合蛋白用于治疗与中风相关的炎症。

53. 权利要求 29 的方法，其中所述融合蛋白用于治疗与心脏病发作相关的炎症。

54. 权利要求 29 的方法，其中所述融合蛋白用于治疗与出血性休克相关的炎症。

55. 权利要求 29 的方法，其中所述融合蛋白用于治疗与败血病相关的炎症。

56. 权利要求 29 的方法，其中所述融合蛋白用于治疗与器官移植相关的炎症。

57. 权利要求 29 的方法，其中所述融合蛋白用于治疗与伤口愈合不良相关的炎症。

58. 权利要求 29 的方法，其中所述融合蛋白用于治疗肾衰竭。

RAGE 融合蛋白及使用方法

与相关申请的交叉引用

本申请根据 35 USC 119(e) 要求于 2004 年 8 月 3 日提交的美国临时专利申请序列号 60/598,362 的优先权。美国临时专利申请 60/598,362 的公开内容因此整体引入本文作为参考。

发明领域

本发明涉及高级糖基化终产物的受体 (RAGE) 的调节。更具体而言, 本发明描述了包含 RAGE 多肽的融合蛋白, 制造此类融合蛋白的方法, 以及此类蛋白用于治疗基于 RAGE 的病症的用途。

发明背景

蛋白质或脂质与醛糖糖类一起孵育导致蛋白质上氨基的非酶促糖基化和氧化从而形成 Amadori 加合物。随着时间的进程, 该加合物经历另外的重排、脱水以及与其他蛋白质交联而形成已知为高级糖基化终产物 (AGEs) 的复合物。促进 AGEs 形成的因素包括延迟的蛋白质转换 (例如, 在淀粉样变性中)、具有高赖氨酸含量的大分子的积聚以及高血糖水平 (例如, 在糖尿病中) (Hori 等人, *J. Biol. Chem.* 270: 25752-761, (1995))。AGEs 已涉及各种病症, 包括与糖尿病相关的并发症, 和正常的衰老。

AGEs 显示出与在单核细胞、巨噬细胞、微血管系统的内皮细胞、平滑肌细胞、肾小球膜细胞 (mesangial cell) 和神经元上的细胞表面受体的特异性和可饱和性结合。高级糖基化终产物的受体 (RAGE) 是免疫球蛋白超基因家族分子的成员。RAGE 的胞外 (N-末端) 结构域包含三个免疫球蛋白类型区域: 一个 V (可变的) 类型结构域, 随后为两个 C-型 (恒定的) 结构域 (Neeper 等人, *J. Biol. Chem.*,

267:14998-15004 (1992); Schmidt 等人, *Circ. (Suppl.)* 96#194 (1997)). 单个跨膜穿越结构域和短的、高度带电荷的胞质尾部在胞外域之后。通过 RAGE 的蛋白质水解或通过分子生物学方法可以分离 N-末端的胞外域以产生包含 V 和 C 结构域的可溶性 RAGE (sRAGE)。

RAGE 表达于多种细胞类型中, 包括白细胞、神经元、小神经胶质细胞和血管内皮 (例如, Hori 等人, *J. Biol. Chem.*, 270:25752-761 (1995))。在衰老组织中 (Schleicher 等人, *J. Clin. Invest.*, 99 (3): 457-468 (1997)), 以及在糖尿病患者的视网膜、脉管系统和肾脏中 (Schmidt 等人, *Nature Med.*, 1:1002-1004 (1995)) 中也发现 RAGE 水平增加。

除了 AGEs 之外, 其他化合物也可结合并调节 RAGE。RAGE 结合多个在功能和结构上不同的配体, 包含淀粉样蛋白 β ($A\beta$)、血清淀粉样蛋白 A (SAA)、高级糖基化终产物 (AGEs)、S100 (钙粒蛋白家族的促炎性成员)、羧甲基赖氨酸 (CML)、两性蛋白 (amphoterin) 和 CD11b/CD18 (Bucciarelli 等人, *Cell Mol. Life Sci.*, 59: 1117-128 (2002); Chavakis 等人, *Microbes Infect.*, 6:1219-1225 (2004); Kokkola 等人, *Scand. J. Immunol.*, 61:1-9 (2005); Schmidt 等人, *J. Clin. Invest.*, 108:949-955 (2001); Rocken 等人, *Am. J. Pathol.*, 162:1213-1220 (2003))。

已显示配体例如 AGEs、S100/钙粒蛋白、 β -淀粉样蛋白、CML(N^ε-羧甲基赖氨酸) 和两性蛋白与 RAGE 的结合可以修饰各种基因的表达。这些相互作用随后可以启动信号转导机制, 包括 p38 活化、p21ras、MAP 激酶、Erk1-2 磷酸化以及炎性信号传导的转录介质 NF- κ B 的活化 (Yeh 等人, *Diabetes*, 50:1495-1504 (2001))。例如, 在许多细胞类型中, RAGE 与其配体之间的相互作用可以产生氧化应激, 它从而导致自由基敏感性转录因子 NF- κ B 的活化, 以及 NF- κ B 调节的基因的活化, 例如细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 。此外, RAGE 的表达经由 NF- κ B 上调, 并且在炎症或氧化应激位点处显示出表达增强 (Tanaka 等人, *J. Biol. Chem.*, 275:25781-25790 (2000))。因此, 由配体结

合启动的正反馈回路可以推动向上的并且通常是有害的盘旋上升。

在不同的组织和器官中的 RAGE 活化可以导致众多病理生理学的后果。RAGE 已涉及各种病状, 包括: 急性和慢性炎症(Hofmann 等人, *Cell* 97: 889-901 (1999)), 糖尿病晚期并发症的发展, 例如血管通透性增强(Wautier 等人, *J. Clin. Invest.*, 97: 238-243 (1995))、肾病(Teillet 等人, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11: 1488-1497 (2000))、动脉硬化(Vlassara 等人, *The Finnish Medical Society DUODECIM, Ann. Med.*, 28: 419-426 (1996)) 和视网膜病(Hammes 等人, *Diabetologia*, 42: 603-607 (1999))。RAGE 还涉及阿尔茨海默病(Yan 等人, *Nature*, 382: 685-691 (1996))以及肿瘤侵袭和转移(Taguchi 等人, *Nature*, 405: 354-357 (2000))。

尽管 RAGE 有着广泛表达及其在多种不同的疾病模型中的明显多效的作用, 但 RAGE 似乎并非正常发育所必需的。例如, RAGE 敲除的小鼠没有明显的异常表型, 这提示尽管 RAGE 在受长期刺激时能够在疾病病理中起作用, 但 RAGE 的抑制似乎并不有助于任何不希望的急性表型(Liliensiek 等人, *J. Clin. Invest.*, 113: 1641-50 (2004))。

生理学配体与 RAGE 的拮抗性结合可以下调由过量浓度的 AGEs 及其他 RAGE 配体引起的病理生理学改变。通过减少内源性配体与 RAGE 的结合, 可以减少与 RAGE 介导的病症相关的症状。可溶性 RAGE(sRAGE) 能够有效地拮抗 RAGE 配体与 RAGE 的结合。然而, 当在体内施用, sRAGE 可以具有可能太短以至于不能对一种或多种病症治疗有用的半寿期。因此, 需要开发拮抗 AGEs 及其他生理学配体结合 RAGE 受体的化合物, 其中该化合物具有所希望的药代动力学特性。

发明概述

本发明的实施方案包括 RAGE 融合蛋白及此类蛋白的使用方法。本发明可以以各种方式实施。本发明的实施方案可以包括包含 RAGE 多肽的融合蛋白, 所述 RAGE 多肽与第二种非 RAGE 多肽连接。在一个实施方案中, 融合蛋白包含 RAGE 配体结合位点。融合蛋白可以进一步包含

直接与包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或部分 C_H2 结构域的多肽连接的 RAGE 多肽。

本发明还包括制造 RAGE 融合蛋白的方法。在一个实施方案中，该方法包括将 RAGE 多肽与第二种非 RAGE 多肽连接。在一个实施方案中，RAGE 多肽包含 RAGE 配体结合位点。该方法可以包括将 RAGE 多肽直接与包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或部分 C_H2 结构域的多肽连接。

在其他实施方案中，本发明可以包括治疗受试者中 RAGE 介导的病症的方法和组合物。该方法可以包括对受试者施用本发明的融合蛋白。该组合物可以包含在药理学上可接受的载体(carrier)中的本发明的 RAGE 融合蛋白。

存在可能与本发明的具体实施方案相关的各种优点。在一个实施方案中，本发明的融合蛋白当施用于受试者时可以是代谢稳定的。此外，本发明的融合蛋白可以显示与 RAGE 配体的高亲和力结合。在某些实施方案中，本发明的融合蛋白以高 nM 至低 μ M 范围内的亲和力与 RAGE 配体结合。通过以高亲和力与生理学 RAGE 配体结合，本发明的融合蛋白可以用于抑制内源性配体与 RAGE 的结合，从而提供了改善 RAGE 介导的疾病的手段。

此外，本发明的融合蛋白可以以蛋白质或核酸的形式提供。在一个示例实施方案中，融合蛋白可以被全身性地施用并且停留在脉管系统中以有效力地治疗部分地由 RAGE 介导的脉管疾病。在另一示例实施方案中，该融合蛋白可以被局部施，以治疗其中 RAGE 配体有助于疾病病理的疾病。可替代地，通过使用合适的载体例如病毒或裸露的 DNA 可以将编码融合蛋白的核酸构建体输送到暂时的局部表达可以局部抑制 RAGE 配体和受体之间相互作用的位点处。因此，施用在性质上可以是暂时的（例如，当施用融合蛋白时）或较持久的（例如，当作为重组 DNA 施用融合蛋白时）。

本发明的另外的特征将在下文中描述。应当理解本发明在其应用方面不局限于下述权利要求、说明书和附图中所述的细节。本发明能够有其他的实施方案并且能够以各种方式被实践或施行。

附图简述

本发明的各种特征、方面和优点在参照下列附图后将变得更为明显。

图 1 显示了根据本发明可选实施方案的各种 RAGE 序列：图 A, SEQ ID NO: 1, 人 RAGE 的氨基酸序列；和 SEQ ID NO: 2, 不含信号序列氨基酸 1-22 的人 RAGE 的氨基酸序列；图 B, SEQ ID NO: 3, 不含信号序列氨基酸 1-23 的人 RAGE 的氨基酸序列；图 C, SEQ ID NO: 4, 人 sRAGE 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 5, 不含信号序列氨基酸 1-22 的人 sRAGE 的氨基酸序列；和 SEQ ID NO: 6, 不含信号序列氨基酸 1-23 的人 sRAGE 的氨基酸序列；图 D, SEQ ID NO: 7, 包含人 RAGE 的 V-结构域的氨基酸序列；SEQ ID NO: 8, 包含人 RAGE 的 V-结构域的可选氨基酸序列；SEQ ID NO: 9, 人 RAGE 的 V-结构域的 N-末端片段；SEQ ID NO: 10, 人 RAGE 的 V-结构域的可选 N-末端片段；SEQ ID NO: 11, 人 RAGE 氨基酸 124-221 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 12, 人 RAGE 氨基酸 227-317 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 13, 人 RAGE 氨基酸 23-123 的氨基酸序列；图 E, SEQ ID NO: 14, 人 RAGE 氨基酸 24-123 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 15, 人 RAGE 氨基酸 23-136 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 16, 人 RAGE 氨基酸 24-136 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 17, 人 RAGE 氨基酸 23-226 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 18, 人 RAGE 氨基酸 24-226 的氨基酸序列；图 F, SEQ ID NO: 19, 人 RAGE 氨基酸 23-251 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 20, 人 RAGE 氨基酸 24-251 的氨基酸序列；SEQ ID NO: 21, RAGE 域间连接体；SEQ ID NO: 22, 第二个 RAGE 域间连接体；SEQ ID NO: 23, 第三个 RAGE 域间连接体；SEQ ID NO: 24, 第四个 RAGE 域间连接体；图 G, SEQ ID NO: 25, 编码人 RAGE 氨基酸 1-118 的 DNA；SEQ ID NO: 26, 编码人 RAGE 氨基酸 1-123 的 DNA；和 SEQ ID NO: 27, 编码人 RAGE 氨基酸 1-136 的 DNA；图 H, SEQ ID NO: 28, 编码人 RAGE 氨基酸 1-230 的 DNA；和 SEQ ID NO: 29, 编码人 RAGE 氨基酸 1-251 的 DNA；图 I, SEQ ID NO: 38, 人 IgG C_H2 和 C_H3 结构

域的部分氨基酸序列; SEQ ID NO: 39, 编码人 IgG 的人 C_H2 和 C_H3 结构域的部分的 DNA; SEQ ID NO: 40, 人 IgG C_H2 和 C_H3 结构域的氨基酸序列; 图 J, SEQ ID NO: 41, 编码人 IgG 的人 C_H2 和 C_H3 结构域的 DNA; SEQ ID NO: 42, 人 IgG C_H2 结构域的氨基酸序列; SEQ ID NO: 43, 人 IgG C_H3 结构域的氨基酸序列; 和 SEQ ID NO: 44, 第 5 个 RAGE 域间连接体。

图 2 显示了根据本发明的一个实施方案的 RAGE 融合蛋白 (TTP-4000) 编码区的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 30)。以粗体突出的编码序列 1-753 编码 RAGE N-末端的蛋白质序列, 而序列 754-1386 编码人 IgG Fc (γ 1) 的蛋白质序列。

图 3 显示了根据本发明的一个实施方案的可选 RAGE 融合蛋白 (TTP-3000) 编码区的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 31)。以粗体突出的编码序列 1-408 编码 RAGE N-末端的蛋白质序列, 而序列 409-1041 编码人 IgG Fc (γ 1) 的蛋白质序列。

图 4 显示了根据本发明的可选实施方案的氨基酸序列 SEQ ID NO: 32 (TTP-4000)、SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 34, 每一个均编码四结构域的 RAGE 融合蛋白。RAGE 序列以粗字体突出。

图 5 显示了根据本发明的可选实施方案的氨基酸序列 SEQ ID NO: 35 (TTP-3000)、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37, 每一个均编码三结构域的 RAGE 融合蛋白。RAGE 序列以粗字体突出。

图 6, 图 A 显示人 RAGE 和人 IgG γ -1 Fc 蛋白的蛋白质结构域比较, 以及用于制造根据本发明的可选实施方案的 TTP-3000 (在位置 136 处) 和 TTP-4000 (在位置 251 处) 的裂解位点; 和图 B 显示根据本发明的可选实施方案的 TTP-3000 和 TTP-4000 的结构域结构。

图 7 显示了根据本发明的一个实施方案, sRAGE 以及 RAGE 融合蛋白 TTP-4000 (TT4) 和 TTP-3000 (TT3) 与 RAGE 配体即淀粉样蛋白- β (A- β)、S100b (S100) 和两性蛋白 (Ampho) 的体外结合测定。

图 8 显示了根据本发明的一个实施方案, 与仅包含免疫检测试剂 (“单独的复合物”) 的阴性对照相比, RAGE 融合蛋白 TTP-4000 (TT4)

(“蛋白质”)与淀粉样蛋白- β 的体外结合测定结果,以及 RAGE 拮抗剂 (“RAGE 配体”)对此类结合的拮抗作用。

图 9 显示了根据本发明的一个实施方案,与仅包含免疫检测试剂 (“单独的复合物”)的阴性对照相比,RAGE 融合蛋白 TTP-3000(TT3) (“蛋白质”)与淀粉样蛋白- β 的体外结合测定结果,以及 RAGE 拮抗剂 (“RAGE 配体”)对此类结合的拮抗作用。

图 10 显示了基于细胞的测定结果,所述测定测量根据本发明的一个实施方案的 RAGE 融合蛋白 TTP-3000(TT3)和 TTP-4000(TT4)以及 sRAGE 对 S100b-RAGE 诱导的 TNF- α 产生的抑制。

图 11 显示了根据本发明的一个实施方案的 RAGE 融合蛋白 TTP-4000 的药代动力学特性曲线图,其中每条曲线代表在相同实验条件下的一种不同的动物。

图 12 显示了根据本发明的一个实施方案,作为炎症应答的量度,由于受 RAGE 融合蛋白 TTP-4000 刺激和人 IgG 刺激而从 THP-1 细胞中释放的 TNF- α 的相对水平。

图 13 显示了根据本发明的可选实施方案使用 RAGE 融合蛋白 TTP-4000 减少了糖尿病动物中的再狭窄,其中图 A 显示与阴性对照(IgG)相比 TTP-4000 RAGE 融合蛋白减小了内膜/中膜比(intima/media ratio),和图 B 显示 TTP-4000 RAGE 融合蛋白以剂量-响应方式减少了血管平滑肌细胞增殖。

图 14 显示了根据本发明的可选实施方案使用 RAGE 融合蛋白 TTP-4000 减少了阿尔茨海默病(AD)动物中的淀粉样蛋白形成和认知障碍,其中图 A 显示 TTP-4000 RAGE 融合蛋白减少了大脑中的淀粉样蛋白的负荷,和图 B 显示 TTP-4000 RAGE 融合蛋白改善了认知功能。

图 15 显示了根据本发明的一个实施方案,TTP-4000 与各种被固定的已知 RAGE 配体的饱和-结合曲线。

发明详述

为了本说明书的目的,除非另有说明,本说明书中所使用的表示

成分的量、反应条件等等的所有数字被理解为在所有情况下被术语“大约”修饰。因此，除非有相反的说明，下述说明书中所列出的数字参数为近似值，它可以依据本发明所寻求获得的所需特性而改变。最低限度，并且不企图限制对于权利要求范围应用等同原则，每个数字参数应当至少根据所报告的有效数字的数目并且通过应用普通的舍入法进行解释。

虽然阐述出本发明的宽范围的数字范围和参数为近似值，但在具体实例中列出的数值尽可能精确地给出。然而，任何数值固有地包含由标准差必然引起的某些误差，所述标准差发现于它们各自的测试测量之中。此外，应理解本文所公开的所有范围涵盖其中所包含的任何及所有亚范围。例如，指定范围“1-10”应视为包含最小值1和最大值10之间（并包含1和10）的任何及所有亚范围；即，以1或更大的最小值开始的所有亚范围，例如1-6.1，和以10或更小的最大值结束的所有亚范围，例如5.5-10。另外，任何提及“在本文中引入”之处应理解为以其整体引入。

进一步指出的是，如本说明书中所使用的，除非清楚地限定为一个事物，否则单数形式的“a”、“an”和“the”包括复数。除非上下文另有明确说明，否则术语“或”与术语“和/或”可互换使用。

另外，术语“部分”和“片段”可互换地用于指多肽、核酸或其他分子构建体的部分。

如本文所使用的，术语“上游”在分子为蛋白质时指位于第二个残基 N-末端的残基，或者在分子为核酸时指位于第二个残基 5'端的残基。同样如本文所使用的，术语“下游”在分子为蛋白质时指位于第二个残基 C-末端的残基，或者在分子为核酸时指位于第二个残基 3'端的残基。

除非另外定义，本文所使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同的含义。关于本领域的定义和术语从业者特别可参见 Current Protocols in Molecular Biology (Ansubel)。氨基酸残基的缩写是本领域用于指 20 种常见 L-氨基酸之一的标准的 3

字母和/或 1 字母代码。

“核酸”是多核苷酸例如脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA)。该术语用于包括单链核酸、双链核酸以及由核苷酸或核苷类似物制造的 RNA 和 DNA。

术语“载体 (vector)”指可以用于将第二种核酸分子运送到细胞内的核酸分子。在一个实施方案中,载体允许插入到该载体中的 DNA 序列复制。载体可以包含启动子以增强核酸分子在至少某些宿主细胞中的表达。载体可以自主复制 (染色体外的) 或者可以整合到宿主细胞染色体中。在一个实施方案中,载体可以包括能够产生蛋白质的表达载体,所述蛋白质来源于插入到载体中的至少部分核酸序列。

如本领域已知的,核酸序列彼此杂交的条件可以被描述为从低到高严紧性的范围。一般地,高严紧性杂交条件指在低盐缓冲液中在高温下洗涤杂交物。杂交可以筛选出结合的 DNA,利用本领域的标准杂交溶液例如 0.5M NaHPO₄、7% 十二烷基硫酸钠 (SDS),在 65°C,并且在 0.25 M NaHPO₄、3.5% SDS 中洗涤,随后取决于探针的长度在室温至 68°C 在 0.1 × SSC/0.1% SDS 中洗涤 (参见,例如 Ausubel, F.M. 等人, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed., Chapter 2, John Wiley & Sons, N. Y)。例如,高严紧性洗涤包括在 6 × SSC/0.05% 焦磷酸钠中洗涤,对于 14 个碱基的寡核苷酸探针在 37°C,或对于 17 个碱基的寡核苷酸探针在 48°C,或对于 20 个碱基的寡核苷酸探针在 55°C,或对于 25 个碱基的寡核苷酸探针在 60°C,或对于长度约 250 个核苷酸的核苷酸探针在 65°C。核酸探针可以用含末端标记的放射性核苷酸例如 [γ -³²P]ATP,或通过随机引物标记而掺入的放射标记核苷酸例如 [α -³²P]dCTP 进行标记。可替代地,可以通过掺入生物素化的或荧光素标记的核苷酸来标记探针,并且利用链霉抗生物素蛋白或抗荧光素抗体来检测探针。

如本文所使用的,“有机小分子”是分子量小于 2,000 道尔顿的分子,它包含至少 1 个碳原子。

“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换地用于描述可以包含部分

或全长蛋白质的蛋白质分子。

术语“融合蛋白”指具有来源于两种或更多种蛋白质的氨基酸序列的蛋白质或多肽。融合蛋白还可包含在来源于分开的蛋白质的氨基酸部分之间的氨基酸连接区。

如本文所使用的，“非 RAGE 多肽”是不来源于 RAGE 或其片段的任何多肽。此类非 RAGE 多肽包括免疫球蛋白肽、二聚化性多肽、稳定化性多肽、两亲性肽或包含为靶向或纯化蛋白质提供“标签”的氨基酸序列的多肽。

如本文所使用的，“免疫球蛋白肽”可以包含免疫球蛋白重链或其部分。在一个实施方案中，重链的部分可以是 Fc 片段或其部分。如本文所使用的，Fc 片段包含以单体或二聚体形式的免疫球蛋白重链的重链铰链多肽以及 C_H2 和 C_H3 结构域。或者，C_H1 和 Fc 片段可以用作免疫球蛋白多肽。重链（或其部分）可以来源于任何一个已知的重链同种型：IgG（ γ ）、IgM（ μ ）、IgD（ δ ）、IgE（ ϵ ）或 IgA（ α ）。此外，重链（或其部分）可以来源于任何一个已知的重链亚型：IgG1（ $\gamma 1$ ）、IgG2（ $\gamma 2$ ）、IgG3（ $\gamma 3$ ）、IgG4（ $\gamma 4$ ）、IgA1（ $\alpha 1$ ）、IgA2（ $\alpha 2$ ），或者这些同种型或亚型的改变生物学活性的突变。可以被改变的生物学活性的实例包括例如通过铰链区的修饰来降低同种型结合某些 Fc 受体的能力。

术语“同一性”或“百分比同一”指两个氨基酸序列之间或两个核酸序列之间的序列同一性。百分比同一性可以通过比对两个序列来确定并且指在被比较的序列所共有的位置处的相同残基（即氨基酸或核苷酸）的数目。序列比对和比较可以利用本领域的标准算法（例如，Smith 和 Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman 和 Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson 和 Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85:2444）或通过公众可获得的这些算法的计算机化版本（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI）如 BLAST 和 FASTA 来进行。此外，通过 National Institutes of Health,

Bethesda MD 可获得的 ENTREZ 也可以用于序列比较。在一个实施方案中，两个序列的百分比同一性可以利用 GCG 以 1 的缺口权重来确定，从而使得每个氨基酸缺口是加权的，就好像它是两个序列之间的单个氨基酸错配。

如本文所使用的，术语“保守残基”指在具有相同结构和/或功能的多个蛋白质中为相同的氨基酸。保守残基区对于蛋白质结构或功能可能是重要的。因此，在三维蛋白质中鉴定出的邻接的保守残基对于蛋白质结构或功能可能是重要的。为了找出保守残基，或 3-D 结构的保守区，可以进行来自不同物种或相同物种的不同个体的相同或相似蛋白质的序列比较。

如本文所使用的，术语“同系物”是指与野生型氨基酸序列具有一定程度的同源性的多肽。同源性比较可以通过眼睛或更通常地借助于易获得的序列比较程序来进行。这些商业上可获得的计算机程序可以计算出两个或更多个序列之间的同源性百分数（例如 Wilbur, W. J. 和 Lipman, D. J., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 726-730）。例如，同源序列可以用于包括在可选实施方案中彼此具有至少 75% 的同一性、85% 的同一性、90% 的同一性、95% 的同一性或 98% 的同一性的氨基酸序列。

如本文所使用的，多肽或蛋白质“结构域”包括沿着多肽或蛋白质的区域，其包含独立单元。结构域可以依据结构、序列和/或生物学活性进行限定。在一个实施方案中，多肽结构域可以包含以基本上不依赖于蛋白质其余部分的方式进行折叠的蛋白质区域。利用结构域数据库例如，但不限于 PFAM、PRODOM、PROSITE、BLOCKS、PRINTS、SBASE、ISREC PROFILES、SAMRT 和 PROCLASS，可以鉴定结构域。

如本文所使用的，“免疫球蛋白结构域”是在结构上与免疫球蛋白结构域同源或相同的氨基酸序列。免疫球蛋白结构域的氨基酸序列的长度可以是任何长度。在一个实施方案中，免疫球蛋白结构域可以少于 250 个氨基酸。在一个示例实施方案中，免疫球蛋白结构域的长度可以是约 80-150 个氨基酸。例如，IgG 的可变区以及 C_H1、C_H2 和

C_H3 区每一个均为免疫球蛋白结构域。在另一实例中，IgM 的可变区以及 C_H1、C_H2、C_H3 和 C_H4 区每一个均为免疫球蛋白结构域。

如本文所使用的，“RAGE 免疫球蛋白结构域”是来自 RAGE 蛋白的氨基酸序列，其在结构上与免疫球蛋白结构域同源或相同。例如，RAGE 免疫球蛋白结构域可以包括 RAGE V-结构域、RAGE Ig-样 C2-型 1 结构域(“C1 结构域”)或 RAGE Ig-样 C2-型 2 结构域(“C2 结构域”)。

如本文所使用的，“域间连接体”包括将两个结构域连接在一起的多肽。Fc 铰链区是 IgG 中的域间连接体的实例。

如本文所使用的，“直接连接”鉴定了在两个不同基团(例如核苷酸序列、多肽、多肽结构域)之间的共价键，其在被连接的两个基团之间没有任何插入性原子。

如本文所使用的，“配体结合结构域”指负责结合配体的蛋白质结构域。术语配体结合结构域包括配体结合结构域的同系物或其部分。在这方面，只要配体结合结构域的结合特异性被保留，基于残基的极性、电荷、溶解性、疏水性或亲水性方面的相似性，就可以在配体结合位点处进行慎重的氨基酸置换。

如本文所使用的，“配体结合位点”包括蛋白质中直接与配体相互作用的残基，或参与配体定位并非常接近与配体直接相互作用的那些残基的残基。配体结合位点中的残基的相互作用可以通过残基与配体在模型或结构中的空间接近来定义。术语配体结合位点包括配体结合位点的同系物或其部分。在这方面，只要配体结合位点的结合特异性被保留，基于残基的极性、电荷、溶解性、疏水性或亲水性方面的相似性，就可以在配体结合位点处进行慎重的氨基酸置换。配体结合位点可以存在于蛋白质或多肽的一个或多个配体结合结构域中。

如本文所使用的，术语“相互作用”指配体或化合物或其部分或片段与第二种目的分子的一部分之间接近的情况。相互作用可以是非共价的，例如，由于氢键、范德华相互作用或静电或疏水相互作用，或者它可以是共价的。

如本文所使用的，“配体”指与配体结合位点相互作用的分子或

化合物或实体，包括底物或其类似物或部分。如本文所描述的，术语“配体”可以指与目的蛋白结合的化合物。配体可以是激动剂、拮抗剂或调节剂。或者，配体可以不具有生物效应。或者，配体可以阻断其他配体的结合从而抑制生物效应。配体可以包括，但不限于，小分子抑制剂。这些小分子可以包括肽、拟肽 (peptidomimetics)、有机化合物等。配体还可以包括多肽和/或蛋白质。

如本文所使用的，“调节剂化合物”指转变或改变目的分子的生物学活性的分子。调节剂化合物可以增加或减少目的分子的活性，或改变其物理或化学特征、或功能或免疫学特性。对于 RAGE，调节剂化合物可以增加或减少 RAGE 或其部分的活性，或改变其特征、或功能或免疫学特性。调节剂化合物可以包括天然的和/或化学合成的或人工的肽、修饰过的肽（例如磷酸肽）、抗体、糖类、单糖、寡糖、多糖、糖脂、杂环化合物、核苷或核苷酸或其部分、和有机或无机小分子。调节剂化合物可以是内源性生理学化合物，或者它可以是天然的或合成的化合物。或者，调节剂化合物可以是有机小分子。术语“调节剂化合物”还包括化学修饰的配体或化合物，并且包括异构体和外消旋形式。

“激动剂”包括与受体结合而形成复合物的化合物，它引起对所涉及的受体特异的药理学应答。

“拮抗剂”包括与激动剂或受体结合而形成复合物的化合物，它不引起实质的药理学应答并且可以抑制由激动剂诱导的生物学应答。

因此 RAGE 激动剂可以结合 RAGE 并刺激 RAGE 介导的细胞过程，和 RAGE 拮抗剂可以抑制 RAGE 介导的过程被 RAGE 激动剂激发。例如，在一个实施方案中，由 RAGE 激动剂激发的细胞过程包括 TNF- α 基因转录的活化。

术语“肽模拟物 (peptide mimetics)”指在分子间相互作用中充当肽替代物的结构 (Morgan 等人, 1989, *Ann. Reports Med. Chem.*, 24: 243-252)。肽模拟物可以包括合成的结构，所述合成的结构可以含有或不含氨基酸和/或肽键但保留肽或激动剂或拮抗剂的结构和功能

特征。肽模拟物还包括类肽 (peptoid)、寡类肽 (Simon 等人., 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:9367); 以及包含有设计长度的肽的肽文库, 其代表相应于本发明的肽或激动剂或拮抗剂的所有可能的氨基酸序列。

术语“进行治疗”指改善疾病或病症的症状并且可以包括治愈病症, 基本上阻止病症发作, 或改善受试者的病状。如本文所使用的, 术语“治疗”指对于患者所患有的给定病症的全方位治疗, 包括由那种病症引起的一种症状或大多数症状的减轻, 特定病症的治愈, 或阻止病症的发作。

如本文所使用的, 术语“EC50”被定义为导致 50% 被测量的生物效应的试剂浓度。例如, 具有可测量的生物效应的治疗剂的 EC50 可以包括该试剂显示 50% 生物效应时的值。

如本文所使用的, 术语“IC50”被定义为导致被测量的效应的 50% 抑制的试剂浓度。例如, RAGE 结合的拮抗剂的 IC50 可以包括拮抗剂将配体与 RAGE 的配体结合位点的结合减少 50% 时的值。

如本文所使用的, “有效量”是指对于在受试者中产生预期效果有效的试剂量。术语“治疗上有效量”表示将会引起所调查的动物或人的治疗应答的药物或药物试剂的量。包括有效量的实际剂量可以取决于给药途径、受试者的尺寸和健康状况、被治疗的病症等。

如本文所使用的, 术语“药学上可接受的载体”可以指适合于在人类或动物受试者中使用的化合物和组合物, 例如, 对于为了治疗 RAGE 介导的病症或疾病而施用的治疗组合物。

如本文所使用的, 术语“药物组合物”表示可以以包含常规的无毒性载体、稀释剂、佐剂、媒介物 (vehicle) 等的单位剂量制剂形式, 例如口服地、肠胃外地、局部地、通过吸入喷雾、鼻内地或直肠地施用于哺乳动物宿主的组合物。

如本文所使用的, 术语“肠胃外”包括皮下注射, 静脉内、肌内、脑池内注射或输注技术。

RAGE 融合蛋白

本发明的实施方案包括 RAGE 融合蛋白、制造此类融合蛋白的方法以及此类融合蛋白的使用方法。本发明可以以各种方式进行实施。

例如，本发明的实施方案提供了包含 RAGE 多肽的融合蛋白，所述 RAGE 多肽与第二种非 RAGE 多肽连接。在一个实施方案中，融合蛋白可以包含 RAGE 配体结合位点。在一个实施方案中，配体结合位点可以包含融合蛋白的最 N-末端结构域。RAGE 配体结合位点可以包含 RAGE 的 V 结构域或其部分。在一个实施方案中，RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。

在一个实施方案中，RAGE 多肽可以与包含免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白结构域的部分（例如，其片段）的多肽连接。在一个实施方案中，包含免疫球蛋白结构域的多肽包含人 IgG 的 C_H2 或 C_H3 结构域中至少一个的至少一部分。

RAGE 蛋白或多肽可以包含全长的人 RAGE 蛋白（例如 SEQ ID NO: 1），或人 RAGE 的片段。如本文所使用的，RAGE 多肽的片段的长度为至少 5 个氨基酸，可以大于 30 个氨基酸，但小于全部的氨基酸序列。在可选实施方案中，RAGE 多肽可以包含与人 RAGE 或其片段 70%、或 80%、或 85%、或 90% 同一的序列。例如，在一个实施方案中，RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 RAGE 或其片段（参见，例如 Neeper 等人，（1992））。或者，人 RAGE 可以包含去除信号序列的全长 RAGE（例如，SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3）（图 1A 和 1B）或那个氨基酸序列的一部分。

本发明的融合蛋白还可包含 sRAGE（例如 SEQ ID NO: 4）、与 sRAGE 或 sRAGE 的片段 90% 同一的多肽。如本文所使用的，sRAGE 是不包含跨膜区或胞质尾部的 RAGE 蛋白（Park 等人，*Nature Med.*, 4: 1025-1031 (1998)）。例如，RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 sRAGE 或其片段（参见，例如 Neeper 等人，（1992））。或者，RAGE 多肽可以包含去除信号序列的人 sRAGE（例如，

SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6) (图 1C) 或那个氨基酸序列的一部分。

在其他实施方案中, RAGE 蛋白可以包含 RAGE V 结构域(例如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8, 图 1D) (Neeper 等人, (1992); Schmidt 等人, (1997))。或者, 可以使用与 RAGE V 结构域或其片段 90% 同一的序列。

或者, RAGE 蛋白可以包含 RAGE V 结构域的片段(例如 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10, 图 1D)。在一个实施方案中, RAGE 蛋白可以包含配体结合位点。在一个实施方案中, 配体结合位点可以包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列, 或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。在另一实施方案中, RAGE 片段是合成肽。

因此, 用于本发明融合蛋白的 RAGE 多肽可以包含全长 RAGE 的片段。如本领域已知的, RAGE 包含三个免疫球蛋白样多肽结构域, 即 V 结构域以及 C1 和 C2 结构域, 每个结构域通过域间连接体相互连接。全长 RAGE 还包含位于 C2 结构域下游(C-末端)并与 C2 结构域连接的跨膜多肽和胞质尾部。

在一个实施方案中, RAGE 多肽不包含任何信号序列残基。RAGE 的信号序列可以包含全长 RAGE 的残基 1-22 或残基 1-23。

例如, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23-116 (SEQ ID NO: 7) 或与其 90% 同一的序列, 或人 RAGE 的氨基酸 24-116 (SEQ ID NO: 8) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 RAGE 的 V 结构域。或者, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 124-221 (SEQ ID NO: 11) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 RAGE 的 C1 结构域。在另一实施方案中, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 227-317 (SEQ ID NO: 12) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 RAGE 的 C2 结构域。或者, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23-123 (SEQ ID NO: 13) 或与其 90% 同一的序列, 或人 RAGE 的氨基酸 24-123 (SEQ ID NO: 14) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 RAGE 的 V 结构域以及下游的域间连接体。或者, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23-226 (SEQ ID NO: 17) 或与其 90% 同一的序列, 或人 RAGE 的氨基酸 24-226 (SEQ ID NO: 18) 或与其 90% 同一的序列,

相应于 V 结构域、C1 结构域以及连接这两个结构域的域间连接体。或者, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23-339 (SEQ ID NO: 5) 或与其 90% 同一的序列, 或人 RAGE 的 24-339 (SEQ ID NO: 6) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 sRAGE (即, 编码 V、C1 和 C2 结构域以及域间连接体)。或者, 可以利用这些序列中每一个的片段。

融合蛋白可以包含不来源于 RAGE 或其片段的几种类型的肽。融合蛋白的第二种多肽可以包括来源于免疫球蛋白的多肽。在一个实施方案中, 免疫球蛋白多肽可以包含免疫球蛋白重链或其部分 (即片段)。例如, 重链片段可以包含来源于免疫球蛋白 Fc 片段的多肽, 其中该 Fc 片段包含作为单体的免疫球蛋白重链的重链铰链多肽以及 C_H2 和 C_H3 结构域。重链 (或其部分) 可以来源于任何一个已知的重链同种型: IgG (γ)、IgM (μ)、IgD (δ)、IgE (ε) 或 IgA (α)。此外, 重链 (或其部分) 可以来源于任何一个已知的重链亚型: IgG1 (γ1)、IgG2 (γ2)、IgG3 (γ3)、IgG4 (γ4)、IgA1 (α1)、IgA2 (α2), 或这些同种型或亚型的改变生物学活性的突变。第二种多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或这些结构域中任何一个或两个的一部分。作为一个示例实施方案, 包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或其部分的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。

免疫球蛋白链的 Fc 部分在体内可以是促炎症的。因此, 在一个实施方案中, 本发明的 RAGE 融合蛋白包含来源于 RAGE 的域间连接体而不是来源于免疫球蛋白的域间铰链多肽。

因此, 在一个实施方案中, 融合蛋白可以进一步包含直接与包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或者免疫球蛋白 C_H2 结构域的片段或部分的多肽连接的 RAGE 多肽。在一个实施方案中, C_H2 结构域或其片段包含 SEQ ID NO: 42。在一个实施方案中, RAGE 多肽可以包含配体结合位点。RAGE 配体结合位点可以包含 RAGE 的 V 结构域或其部分。在一个实施方案中, RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列, 或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。

用于本发明融合蛋白的 RAGE 多肽可以包含 RAGE 免疫球蛋白结构

域。附加地或可替代地, RAGE 的片段可以包含域间连接体。或者, RAGE 多肽可以包含与上游(即更接近 N-末端)或下游(即, 更接近 C-末端)域间连接体连接的 RAGE 免疫球蛋白结构域。在另外一个实施方案中, RAGE 多肽可以包含两个(或更多个) RAGE 免疫球蛋白结构域, 每个结构域通过域间连接体相互连接。RAGE 多肽可以进一步包含通过一个或多个域间连接体相互连接的多个 RAGE 免疫球蛋白结构域, 并且有末端域间连接体连接在 N-末端 RAGE 免疫球蛋白结构域和/或 C-末端免疫球蛋白结构域上。RAGE 免疫球蛋白结构域和域间连接体的另外组合也在本发明的范围内。

在一个实施方案中, RAGE 多肽包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 域间连接体, 从而使得 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸连接至域间连接体的 N-末端氨基酸, 并且 RAGE 域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸。包含免疫球蛋白 C_H2 结构域的多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或这些结构域中任何一个或两个的一部分。作为一个示例实施方案, 包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或其部分的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。

如上所述, 本发明的融合蛋白可以包含单个或多个来自 RAGE 的结构域。此外, 包含与 RAGE 多肽结构域连接的域间连接体的 RAGE 多肽可以包含全长 RAGE 蛋白的片段。例如, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23-136 (SEQ ID NO: 15) 或与其 90% 同一的序列, 或者人 RAGE 的氨基酸 24-136 (SEQ ID NO: 16) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 RAGE 的 V 结构域以及下游的域间连接体。或者, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23-251 (SEQ ID NO: 19) 或与其 90% 同一的序列, 或者人 RAGE 的氨基酸 24-251 (SEQ ID NO: 20) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 V 结构域、C1 结构域、连接这两个结构域的域间连接体以及 C1 下游的第二个域间连接体。

例如, 在一个实施方案中, 融合蛋白可以包含来源于 RAGE 蛋白的两个免疫球蛋白结构域以及来源于人 Fc 多肽的两个免疫球蛋白结构

域。融合蛋白可以包含第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域和连接第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的第一个 RAGE 域间连接体以及第二个 RAGE 域间连接体,从而使得第一个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸,第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 N-末端氨基酸连接至第一个域间连接体的 C-末端氨基酸,第二个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸,以及 RAGE 第二个域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至 C_H2 免疫球蛋白结构域的 N-末端氨基酸。在一个实施方案中,四结构域的 RAGE 融合蛋白可以包含 SEQ ID NO: 32。在一个可选实施方案中,四结构域的 RAGE 融合蛋白包含 SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 34。

可替代地,三结构域的融合蛋白可以包含一个来源于 RAGE 的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。例如,融合蛋白可以包含经由 RAGE 域间连接体与 C_H2 免疫球蛋白结构域或部分 C_H2 免疫球蛋白结构域的 N-末端氨基酸连接的单个 RAGE 免疫球蛋白结构域。在一个实施方案中,三结构域的 RAGE 融合蛋白可以包含 SEQ ID NO: 35。在可选实施方案中,三结构域的 RAGE 融合蛋白可以包含 SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 37。

RAGE 域间连接体片段可以包含天然地位于 RAGE 免疫球蛋白结构域下游并因此与之连接的肽序列。例如,对于 RAGE V 结构域,域间连接体可以包含天然地位于 V 结构域下游的氨基酸序列。在一个实施方案中,连接体可以包含 SEQ ID NO: 21,相应于全长 RAGE 的氨基酸 117-123。或者,连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如,可以利用包含 SEQ ID NO: 21 的上游和下游数个氨基酸(例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸)的域间连接体。因此,在一个实施方案中,域间连接体包含 SEQ ID NO: 23,其包含全长 RAGE 的氨基酸 117-136。或者,可以利用从连接体的任何一端删除例如 1、2 或 3 个氨基酸的 SEQ ID NO: 21 的片段。在可选实施方案中,连接体可以包含与 SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 23 70% 同一、或 80% 同一或 90% 同一的序列。

对于 RAGE C1 结构域,连接体可以包含天然地位于 C1 结构域下游的肽序列。在一个实施方案中,连接体可以包含 SEQ ID NO: 22,相应于全长 RAGE 的氨基酸 222-251。或者,连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如,可以利用包含 SEQ ID NO: 22 的上游和下游数个氨基酸(例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸)的连接体。或者,可以利用从连接体的任何一端删除例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸的 SEQ ID NO: 22 的片段。例如,在一个实施方案中,RAGE 域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 24,相应于氨基酸 222-226。或者,域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 44,相应于 RAGE 的氨基酸 318-342。

产生 RAGE 融合蛋白的方法

本发明还包括制造 RAGE 融合蛋白的方法。因此,在一个实施方案中,本发明包括制造 RAGE 融合蛋白的方法,其包括共价连接与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽的步骤,其中该 RAGE 多肽包含 RAGE 配体结合位点。例如,被连接的 RAGE 多肽和第二种非 RAGE 多肽可以由重组 DNA 构建体编码。该方法可以进一步包括将所述 DNA 构建体整合到表达载体中的步骤。此外,该方法可以包括将表达载体插入到宿主细胞中的步骤。

例如,本发明的实施方案提供了包含 RAGE 多肽的融合蛋白,所述 RAGE 多肽与第二种非 RAGE 多肽连接。在一个实施方案中,融合蛋白可以包含 RAGE 配体结合位点。在一个实施方案中,配体结合位点可以包含融合蛋白的最 N-末端结构域。RAGE 配体结合位点可以包含 RAGE 的 V 结构域或其部分。在一个实施方案中,RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列,或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。

在一个实施方案中,RAGE 多肽可以与包含免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白结构域的部分(例如其片段)的多肽连接。在一个实施方案中,包含免疫球蛋白结构域的多肽包含人 IgG 的 C_H2 或 C_H3 结构域中至

少一个的至少一部分。

融合蛋白可以通过重组 DNA 技术进行改造。例如，在一个实施方案中，本发明可以包含分离的核酸序列，其编码与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽。在一个实施方案中，RAGE 多肽可以包含 RAGE 配体结合位点。

RAGE 蛋白或多肽可以包含全长的人 RAGE (例如, SEQ ID NO: 1) 或人 RAGE 的片段。在一个实施方案中, RAGE 多肽不包含任何信号序列残基。RAGE 的信号序列可以包含全长 RAGE (SEQ ID NO: 1) 的残基 1-22 或残基 1-23。在可选实施方案中, RAGE 多肽可以包含与人 RAGE 或其片段 70%、或 80%、或 90% 同一的序列。例如, 在一个实施方案中, RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 RAGE 或其片段 (参见, 例如 Neeper 等人, (1992))。或者, 人 RAGE 可以包含去除信号序列的全长 RAGE (例如, SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3) (图 1A 和 1B) 或那个氨基酸序列的一部分。本发明的融合蛋白还可以包含 sRAGE (例如 SEQ ID NO: 4)、与 sRAGE 或 sRAGE 片段 90% 同一的多肽。例如, RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 sRAGE 或其片段 (参见, 例如 Neeper 等人, (1992))。或者, 人 RAGE 可以包含去除信号序列的 sRAGE (例如, SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6) (图 1C) 或那个氨基酸序列的一部分。在其他实施方案中, RAGE 蛋白可以包含 V 结构域 (例如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8; 图 1D)。或者, 可以使用与 V 结构域或其片段 90% 同一的序列。或者, RAGE 蛋白可以包含含有部分 V 结构域的 RAGE 片段 (例如 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10; 图 1D)。在一个实施方案中, 配体结合位点可以包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列, 或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。在另外一个实施方案中, RAGE 片段是合成肽。

在一个实施方案中, 核酸序列包含 SEQ ID NO: 25 以编码人 RAGE 的氨基酸 1-118 或其片段。例如包含 SEQ ID NO: 25 的核苷酸 1-348 的序列可以用于编码人 RAGE 的氨基酸 1-116。或者, 该核酸可以包含 SEQ ID NO: 26 以编码人 RAGE 的氨基酸 1-123。或者, 该核酸可以

包含 SEQ ID NO: 27 以编码人 RAGE 的氨基酸 1-136。或者, 该核酸可以包含 SEQ ID NO: 28 以编码人 RAGE 的氨基酸 1-230。或者, 该核酸可以包含 SEQ ID NO: 29 以编码人 RAGE 的氨基酸 1-251。或者, 这些核酸序列的片段可以用于编码 RAGE 多肽片段。

融合蛋白可以包含不来源于 RAGE 或其片段的几种类型的肽。融合蛋白的第二种多肽可以包含来源于免疫球蛋白的多肽。重链 (或其部分) 可以来源于任何一个已知的重链同种型: IgG (γ)、IgM (μ)、IgD (δ)、IgE (ϵ) 或 IgA (α)。此外, 重链 (或其部分) 可以来源于任何一个已知的重链亚型: IgG1 (γ 1)、IgG2 (γ 2)、IgG3 (γ 3)、IgG4 (γ 4)、IgA1 (α 1)、IgA2 (α 2), 或这些同种型或亚型的改变生物学活性的突变。第二种多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或这些结构域中任何一个或两个的一部分。作为一个示例实施方案, 包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或其部分的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。免疫球蛋白肽可以由 SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 41 的核酸序列编码。

免疫球蛋白链的 Fc 部分在体内可以是促炎症的。因此, 本发明的 RAGE 融合蛋白可以包含来源于 RAGE 的域间连接体而不是来源于免疫球蛋白的域间铰链多肽。例如, 在一个实施方案中, 融合蛋白可以由重组 DNA 构建体编码。此外, 该方法可以包括将 DNA 构建体整合到表达载体中的步骤。此外, 该方法可以包括将该表达载体转染到宿主细胞中。

因此, 在一个实施方案中, 本发明包括制造 RAGE 融合蛋白的方法, 其包括将 RAGE 多肽与包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或部分免疫球蛋白 C_H2 结构域的多肽共价连接的步骤。在一个实施方案中, 融合蛋白可以包含 RAGE 配体结合位点。RAGE 配体结合位点可以包含 RAGE 的 V 结构域或其部分。在一个实施方案中, RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列, 或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。

例如, 在一个实施方案中, 本发明包含编码 RAGE 多肽的核酸, 所述 RAGE 多肽直接与包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其片段的多肽连接。

在一个实施方案中，C_H2 结构域或其片段包含 SEQ ID NO: 42。第二种多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域。作为一个示例实施方案，包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。免疫球蛋白肽可以由 SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 41 的核酸序列编码。

在一个实施方案中，RAGE 多肽可以包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 域间连接体，从而使得 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸连接至域间连接体的 N-末端氨基酸，并且 RAGE 域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸。包含免疫球蛋白 C_H2 结构域的多肽可以包括包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或这些结构域中任何一个或两个的一部分的多肽。作为一个示例实施方案，包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或其部分的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。

本发明的融合蛋白可以包含单个或多个来自 RAGE 的结构域。此外，包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的域间连接体的 RAGE 多肽可以包含全长 RAGE 蛋白的片段。例如，在一个实施方案中，融合蛋白可以包含来源于 RAGE 蛋白的两个免疫球蛋白结构域以及来源于人 Fc 多肽的两个免疫球蛋白结构域。融合蛋白可以包含第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域和连接第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的第一个域间连接体以及第二个 RAGE 域间连接体，从而使得第一个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸，第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 N-末端氨基酸连接至第一个域间连接体的 C-末端氨基酸，第二个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至 RAGE 第二个免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸，以及 RAGE 第二个域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸。例如，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 251 (SEQ ID NO: 19) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 251 (SEQ ID NO: 20) 或与其 90% 同一的序列，相应于 V 结构域、C1 结构域、连接这两个结构域的域间连接体以及 C1 下游的第二个域

间连接体。在一个实施方案中，包含 SEQ ID NO: 30 或其片段的核酸构建体可以编码四结构域的 RAGE 融合蛋白。

可替代地，三结构域的融合蛋白可以包含一个来源于 RAGE 的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。例如，融合蛋白可以包含经由 RAGE 域间连接体与包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸连接的单个 RAGE 免疫球蛋白结构域。例如，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 136 (SEQ ID NO: 15) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 136 (SEQ ID NO: 16) 或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 V 结构域以及下游的域间连接体。在一个实施方案中，包含 SEQ ID NO: 31 或其片段的核酸构建体可以编码三结构域的 RAGE 融合蛋白。

RAGE 域间连接体片段可以包含天然地位于 RAGE 免疫球蛋白结构域下游并因此与之连接的肽序列。例如，对于 RAGE V 结构域，域间连接体可以包含天然地位于 V 结构域下游的氨基酸序列。在一个实施方案中，连接体可以包含 SEQ ID NO: 21，相应于全长 RAGE 的氨基酸 117 - 123。或者，连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如，可以利用包含 SEQ ID NO: 21 的上游和下游数个氨基酸（例如 1 - 3、1 - 5、或 1 - 10、或 1 - 15 个氨基酸）的域间连接体。因此，在一个实施方案中，域间连接体包含 SEQ ID NO: 23，其包含全长 RAGE 的氨基酸 117 - 136。或者，可以利用从连接体的任何一端删除例如 1、2 或 3 个氨基酸的 SEQ ID NO: 21 的片段。在可选实施方案中，连接体可以包含与 SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 23 70% 同一、或 80% 同一、或 90% 同一的序列。

对于 RAGE C1 结构域，连接体可以包含天然地位于 C1 结构域下游的肽序列。在一个实施方案中，连接体可以包含 SEQ ID NO: 22，相应于全长 RAGE 的氨基酸 222 - 251。或者，连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如，可以利用包含 SEQ ID NO: 22 的上游和下游数个氨基酸（例如 1 - 3、1 - 5、或 1 - 10、或 1 - 15 个氨基酸）的连接体。或者，可以利用从连接体的任何一端删除例如 1 - 3、1 - 5、

或 1-10、或 1-15 个氨基酸的 SEQ ID NO: 22 的片段。例如，在一个实施方案中，RAGE 域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 24，相应于氨基酸 222-226。或者，域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 44，相应于 RAGE 的氨基酸 318-342。

该方法可以进一步包括将 DNA 构建体整合到表达载体中的步骤。因此，在一个实施方案中，本发明包括编码包含 RAGE 多肽的融合蛋白的表达载体，所述 RAGE 多肽直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或部分免疫球蛋白 C_H2 结构域的多肽。在一个实施方案中，RAGE 多肽包含具有与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 域间连接体的构建体，例如本文所描述的那些，从而使得 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸连接至域间连接体的 N-末端氨基酸，并且 RAGE 域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其部分的多肽的 N-末端氨基酸。例如，用于转染细胞的表达载体可以包含核酸序列 SEQ ID NO: 30 或其片段，或者 SEQ ID NO: 31 或其片段。

该方法可以进一步包括用本发明的表达载体转染细胞的步骤。因此，在一个实施方案中，本发明包括用表达本发明的 RAGE 融合蛋白的表达载体转染的细胞，从而使得该细胞表达包含 RAGE 多肽的融合蛋白，所述 RAGE 多肽直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或部分免疫球蛋白 C_H2 结构域的多肽。在一个实施方案中，RAGE 多肽包含具有与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 域间连接体的构建体，例如本文所描述的那些，从而使得 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸连接至域间连接体的 N-末端氨基酸，并且 RAGE 域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其部分的多肽的 N-末端氨基酸。例如，表达载体可以包含核酸序列 SEQ ID NO: 30 或其片段，或者 SEQ ID NO: 31 或其片段。

例如，可以通过将不同长度的人 RAGE 的 5' cDNA 序列与人 IgG1 Fc (γ 1) 的 3' cDNA 序列融合来构建表达 RAGE-IgG Fc 融合蛋白的质粒。利用标准重组技术可以将表达盒序列插入到表达载体例如 pcDNA3.1 表达载体 (Invitrogen, CA) 中。

此外,该方法还可以包括将表达载体转染到宿主细胞中。在一个实施方案中,该重组体可以被转染到中国仓鼠卵巢细胞中并优化地表达。在可选实施方案中,该细胞可以产生 0.1-20 克/升、或 0.5-10 克/升、或约 1-2 克/升。

如本领域所已知的,此类核酸构建体可以通过突变进行修饰,例如,通过用包含目的突变的引物对核酸模板进行 PCR 扩增。这样,可以设计具有不同的对于 RAGE 配体的亲和力的多肽。在一个实施方案中,突变的序列可以与起始 DNA 有 90% 或更高的同一性。照此,变体可以包括在严紧条件(即相当于在 1M 盐中低于 DNA 双链体的解链温度 (T_M) 约 20-27°C) 下杂交的核苷酸序列。

通过将表达载体转染到合适的宿主中可以表达编码序列。例如,重组载体可以稳定地转染到中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中,并且选择和克隆表达融合蛋白的细胞。在一个实施方案中,通过应用抗生素 G418 就质粒编码的新霉素抗性对表达重组构建体的细胞进行选择。可以选择单独的克隆,和可以扩展由细胞上清液的 Western 印迹分析而检测的表达高水平重组蛋白的克隆,并使用 A 蛋白柱通过亲和层析来纯化基因产物。

编码本发明融合蛋白的重组核酸的样品实施方案显示于图 2-5 中。例如,如上所述,由重组的 DNA 构建体产生的融合蛋白可以包含与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽。融合蛋白可以包含两个来源于 RAGE 蛋白的结构域以及两个来源于免疫球蛋白的结构域。图 2 (SEQ ID NO: 30) 显示了编码具有这种类型结构的融合蛋白 TTP-4000 (TT4) 的核酸构建体的实例。如图 2 中所示,编码序列 1-753 (以粗体突出) 编码 RAGE N-末端蛋白质序列,而 754-1386 的序列编码 IgG Fc 蛋白质序列。

当来源于 SEQ ID NO: 30 或与其 90% 同一的序列时,融合蛋白可以包含 SEQ ID NO: 32 的四结构域的氨基酸序列,或者去除信号序列的多肽 (例如 SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 34) (图 4)。在图 4 中,RAGE 氨基酸序列用粗字体突出。免疫球蛋白序列为 IgG 的 C_H2 和 C_H3

免疫球蛋白结构域。如图 6B 中所示, 全长的 TTP-4000 RAGE 融合蛋白的最初 251 个氨基酸包含下列序列作为 RAGE 多肽序列: 包含氨基酸 1-22/23 的信号序列、包含氨基酸 23/24-116 的 V 免疫球蛋白结构域(包括配体结合位点)、包含氨基酸 117-123 的域间连接体、包含氨基酸 124-221 的第二个免疫球蛋白结构域(C1)和包含氨基酸 222-251 的下游域间连接体。

在一个实施方案中, 融合蛋白不必包含第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域。例如, 融合蛋白可以包含一个来源于 RAGE 的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。图 3 (SEQ ID NO: 31) 显示了编码这种类型的融合蛋白的核酸构建体的实例。如图 3 中所示, 核苷酸 1-408 的编码序列(以粗体突出)编码 RAGE N-末端蛋白质序列, 而 409-1041 的序列编码 IgG1 Fc ($\gamma 1$) 蛋白质序列。

当来源于 SEQ ID NO: 31 或与其 90% 同一的序列时, 融合蛋白可以包含 SEQ ID NO: 35 的三结构域的氨基酸序列, 或去除信号序列的多肽(例如 SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 37) (图 5)。在图 5 中, RAGE 氨基酸序列用粗字体突出。如图 6B 中所示, 全长的 TTP-3000 RAGE 融合蛋白的最初 136 个氨基酸包含下列序列作为 RAGE 多肽: 包含氨基酸 1-22/23 的信号序列、包含氨基酸 23/24-116 的 V 免疫球蛋白结构域(包括配体结合位点)和包含氨基酸 117-136 的域间连接体。137-346 的序列包含 IgG C_H2 和 C_H3 免疫球蛋白结构域。

本发明的融合蛋白可以具有相对于不包含第二种多肽的 RAGE 多肽来说得到改善的体内稳定性。融合蛋白可以被进一步修饰以增加稳定性、有效性、效能和生物利用度。因此, 可以通过翻译后加工或通过化学修饰来修饰本发明的融合蛋白。例如, 可以合成制备融合蛋白以包含 L-氨基酸、D-氨基酸或非天然的氨基酸, α -双取代的氨基酸, 或 N-烷基氨基酸。此外, 蛋白质可以通过乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、附加脂质例如磷脂酰肌醇、二硫键形成等进行修饰。此外, 可以加入聚乙二醇以增加融合蛋白的生物稳定性。

RAGE 拮抗剂与 RAGE 融合蛋白的结合

本发明的融合蛋白可以具有众多应用。例如，本发明的融合蛋白可以用于结合测定法中以鉴别 RAGE 配体，例如 RAGE 激动剂、拮抗剂或调节剂。

例如，在一个实施方案中，本发明提供了检测 RAGE 调节剂的方法，其包括：(a) 提供包含与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含配体结合位点；(b) 将目的化合物和具有已知 RAGE 结合亲和力的配体与融合蛋白混和；和 (c) 在目的化合物存在下测量已知的 RAGE 配体与 RAGE 融合蛋白的结合。在一个实施方案中，配体结合位点包含融合蛋白的最 N-末端结构域。

RAGE 融合蛋白还可以提供用于检测 RAGE 调节剂的试剂盒。例如，在一个实施方案中，本发明的试剂盒可以包含：(a) 具有已知 RAGE 结合亲和力的化合物，作为阳性对照；(b) 包含与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽的融合蛋白，其中所述 RAGE 多肽包含配体结合位点；和 (c) 用法说明书。在一个实施方案中，配体结合位点包含融合蛋白的最 N-末端结构域。

RAGE 蛋白或多肽可以包含全长的人 RAGE（例如，SEQ ID NO: 1），或人 RAGE 的片段。在一个实施方案中，RAGE 多肽不包含任何信号序列残基。RAGE 的信号序列可以包含全长 RAGE（SEQ ID NO: 1）的残基 1 - 22 或残基 1 - 23。在可选实施方案中，RAGE 多肽可以包含与人 RAGE 或其片段 70%、80%、或 90% 同一的序列。例如，在一个实施方案中，RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 RAGE 或其片段（参见 Neeper 等人，(1992)）。或者，人 RAGE 可以包含去除信号序列的全长 RAGE（例如，SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3）（图 1A 和 1B）或那个氨基酸序列的一部分。本发明的融合蛋白还可以包含 sRAGE（例如 SEQ ID NO: 4）、与 sRAGE 或 sRAGE 片段 90% 同一的多肽。例如，RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 sRAGE 或其片段（参见，例如 Neeper 等人，(1992)）。或者，人 RAGE 可以包含去除信号序列的 sRAGE（例如，SEQ ID NO: 5

或 SEQ ID NO: 6) (图 1C) 或那个氨基酸序列的一部分。在其他实施方案中, RAGE 蛋白可以包含 V 结构域(例如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8; 图 1D)。或者, 可以使用与 V 结构域或其片段 90% 同一的序列。或者, RAGE 蛋白可以包含含有部分 V 结构域的 RAGE 片段(例如 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10; 图 1D)。在一个实施方案中, 配体结合位点可以包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列, 或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。在另外一个实施方案中, RAGE 片段是合成肽。

融合蛋白可以包含不来源于 RAGE 或其片段的几种类型的肽。融合蛋白的第二种多肽可以包含来源于免疫球蛋白的多肽。重链(或其部分)可以来源于任何一个已知的重链同种型: IgG (γ)、IgM (μ)、IgD (δ)、IgE (ϵ) 或 IgA (α)。此外, 重链(或其部分)可以来源于任何一个已知的重链亚型: IgG1 (γ 1)、IgG2 (γ 2)、IgG3 (γ 3)、IgG4 (γ 4)、IgA1 (α 1)、IgA2 (α 2), 或这些同种型或亚型的改变生物学活性的突变。第二种多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或这些结构域中任何一个或两个的一部分。作为一个示例实施方案, 包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或其部分的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。免疫球蛋白肽可以由 SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 41 的核酸序列编码。

免疫球蛋白链的 Fc 部分在体内可以是促炎症的。因此, 本发明的 RAGE 融合蛋白可以包含来源于 RAGE 而不是来源于免疫球蛋白链的 Fc 序列。在一个实施方案中, 融合蛋白可以包含与包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的多肽连接的 RAGE 免疫球蛋白结构域。在一个实施方案中, RAGE 多肽可以包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 域间连接体, 从而使得 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸连接至域间连接体的 N-末端氨基酸, 并且 RAGE 域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸。包含免疫球蛋白 C_H2 结构域的多肽可以包括包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或这些结构域中任何一个或两个的一部分的多肽。作为一个示例实施方案, 包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或其部分的多肽可以

包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。

本发明的融合蛋白可以包含单个或多个来自 RAGE 的结构域。此外，包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的域间连接体的 RAGE 多肽可以包含全长 RAGE 蛋白的片段。例如，在一个实施方案中，融合蛋白可以包含两个来源于 RAGE 蛋白的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。融合蛋白可以包含第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域和连接第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的第一个域间连接体以及第二个 RAGE 域间连接体，从而使得第一个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸，第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 N-末端氨基酸连接至第一个域间连接体的 C-末端氨基酸，第二个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至 RAGE 第二个免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸，以及 RAGE 第二个域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的 RAGE 多肽的 N-末端氨基酸。例如，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 251 (SEQ ID NO: 19) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 251 (SEQ ID NO: 20) 或与其 90% 同一的序列，相应于 V 结构域、C1 结构域、连接这两个结构域的域间连接体以及 C1 下游的第二个域间连接体。在一个实施方案中，包含 SEQ ID NO: 30 或其片段的核酸构建体可以编码四结构域的 RAGE 融合蛋白。

可替代地，三结构域的融合蛋白可以包含一个来源于 RAGE 的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。例如，融合蛋白可以包含经由 RAGE 域间连接体与包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的 RAGE 多肽的 N-末端氨基酸连接的单个 RAGE 免疫球蛋白结构域。例如，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 136 (SEQ ID NO: 15) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 136 (SEQ ID NO: 16) 或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 V 结构域以及下游的域间连接体。在一个实施方案中，包含 SEQ ID NO: 31 或其片段的核酸构建体可以编码三结构域的 RAGE 融合蛋白。

如本文所述，RAGE 域间连接体片段可以包含天然地位于 RAGE 免

疫球蛋白结构域下游并因此与之连接的肽序列。例如，对于 RAGE V 结构域，域间连接体可以包含天然地位于 V 结构域下游的氨基酸序列。在一个实施方案中，连接体可以包含 SEQ ID NO: 21，相应于全长 RAGE 的氨基酸 117-123。或者，连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如，可以利用包含 SEQ ID NO: 21 的上游和下游数个氨基酸（例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸）的域间连接体。因此，在一个实施方案中，域间连接体包含 SEQ ID NO: 23，其包含全长 RAGE 的氨基酸 117-136。或者，可以利用从连接体的任何一端删除例如 1、2 或 3 个氨基酸的 SEQ ID NO: 21 的片段。在可选实施方案中，连接体可以包含与 SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 23 70% 同一、或 80% 同一、或 90% 同一的序列。

对于 RAGE C1 结构域，连接体可以包含天然地位于 C1 结构域下游的肽序列。在一个实施方案中，连接体可以包含 SEQ ID NO: 22，相应于全长 RAGE 的氨基酸 222-251。或者，连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如，可以利用包含 SEQ ID NO: 22 的上游和下游数个氨基酸（例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸）的连接体。或者，可以利用从连接体的任何一端删除例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸的 SEQ ID NO: 22 的片段。例如，在一个实施方案中，RAGE 域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 24，相应于氨基酸 222-226。或者，域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 44，相应于 RAGE 的氨基酸 318-342。

例如，RAGE 融合蛋白可以用于结合测定法中以鉴别潜在的 RAGE 配体。在此类结合测定法的一个示例实施方案中，可以将已知的 RAGE 配体以约 5 微克/孔的浓度包被在固体基质（例如 Maxisorb 板）上，其中每个孔包含约 100 微升（ μL ）的总体积。板可以在 4℃ 孵育过夜以允许配体吸收。可替代地，可以采用在更高温度（例如室温）下的更短孵育期。允许配体与基质结合一段时间后，可以吸出测定孔中的液体并加入封闭缓冲液（例如含 1% BSA 的 50 mM 咪唑（imidazole）缓冲液，pH 7.2）以封闭非特异性结合。例如，可以在室温下将封闭

缓冲液加入板中并保持 1 小时。随后可以吸出板中液体和/或用洗涤缓冲液洗涤。在一个实施方案中, 含有 20 mM 咪唑、150 mM NaCl、0.05 % Tween-20、5 mM CaCl_2 和 5 mM MgCl_2 的 pH 7.2 的缓冲液可以用作洗涤缓冲液。随后以增加的稀释度将融合蛋白加入测定孔中。然后可以允许 RAGE 融合蛋白与固定的配体一起在测定板中孵育, 从而使得结合能够达到平衡。在一个实施方案中, 允许 RAGE 融合蛋白与固定的配体一起在 37°C 孵育约 1 小时。在可选实施方案中, 可以采用在更低温度下的更长孵育期。在融合蛋白和固定的配体已经孵育后, 可以洗涤板以去除任何未结合的融合蛋白。可以以各种方式检测与固定的配体结合的融合蛋白。在一个实施方案中, 采用 ELISA 进行检测。因此, 在一个实施方案中, 可以向固定在测定板中的融合蛋白加入包含单克隆小鼠抗人 IgG1、生物素化的山羊抗小鼠 IgG 和连接有抗生物素蛋白的碱性磷酸酶的免疫检测复合物。可以允许免疫检测复合物与固定的融合蛋白结合, 从而使得融合蛋白和免疫检测复合物之间的结合达到平衡。例如, 可以允许复合物在室温下与融合蛋白结合 1 小时。在那时, 可以通过用洗涤缓冲液洗涤测定孔来去除任何未结合的复合物。通过加入碱性磷酸酶底物磷酸对硝基苯酯 (PNPP), 并以在 405 nm 处吸光度的增加来测量 PNPP 至对硝基苯酚 (PNP) 的转化, 可以检测结合的复合物。

在一个实施方案中, RAGE 配体以纳摩尔浓度 (nM) 或微摩尔浓度 (μM) 的亲和力结合 RAGE 融合蛋白。图 7 中显示了图解说明 RAGE 配体与本发明的 RAGE 融合蛋白结合的实验。制备起始浓度分别为 1.082 mg/mL 和 370 $\mu\text{g/mL}$ 的 TTP-3000 (TT3) 和 TTP-4000 (TT4) 溶液。如图 7 中所示, 在各种稀释度下, 融合蛋白 TTP-3000 和 TTP-4000 能够结合固定的 RAGE 配体即淀粉样蛋白- β (Abeta) (来自 Biosource 的 Amyloid Beta (1-40))、S100b (S100) 和两性蛋白 (Ampho), 导致吸光度增加。在没有配体时 (即仅用 BSA 包被), 没有吸光度的增加。

本发明的结合测定法可以用于量化与 RAGE 结合的配体。在可选实

施方案中，RAGE 配体可以以 0.1 - 1000 纳摩尔浓度 (nM)、或 1 - 500 nM、或 10 - 80 nM 的结合亲和力与本发明的融合蛋白结合。

本发明的融合蛋白还可用于鉴别具有结合 RAGE 的能力的化合物。如图 8 和 9 中分别显示的，可以评测 RAGE 配体与固定的淀粉样蛋白 β 竞争结合 TTP - 4000 (TT4) 或 TTP - 3000 (TT3) 融合蛋白的能力。因此，可以看出，在起始 TTP - 4000 溶液 (图 8) 或 TTP - 3000 (图 9) 的浓度为 1:3、1:10、1:30 和 1:100 时，最终测定浓度 (FAC) 为 10 μ M 的 RAGE 配体可以取代 RAGE 融合蛋白与淀粉样蛋白- β 的结合。

细胞效应物的调节

本发明融合蛋白的实施方案可以用于调节由 RAGE 介导的生物应答。例如，可以设计融合蛋白以调节 RAGE 诱导的基因表达的增加。因此，在一个实施方案中，本发明的融合蛋白可以用于调节生物酶的功能。例如，RAGE 与其配体之间的相互作用可以产生氧化应激，并激活 NF- κ B，以及 NF- κ B 调节的基因，例如细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 等。另外，已显示几种其他的调节途径，例如涉及 p21ras、MAP 激酶、ERK1 和 ERK2 的那些，被 AGEs 和其他配体与 RAGE 的结合激活。

图 10 中显示了本发明融合蛋白调节细胞效应物 TNF- α 的表达的用途。可以在补充有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养 THP - 1 骨髓细胞，并且用 S100b 诱导其经由 RAGE 的刺激而分泌 TNF- α 。当此类刺激发生在 RAGE 融合蛋白存在下时，由 S100b 结合 RAGE 而对 TNF- α 的诱导可以得到抑制。因此，如图 10 中所示，10 μ g TTP - 3000 (TT3) 或 TTP - 4000 (TT4) RAGE 融合蛋白的加入使 TNF- α 的 S100b 诱导减少了约 50% - 75%。融合蛋白 TTP - 4000 在阻断 TNF- α 的 S100b 诱导方面至少与 sRAGE 一样有效 (图 10)。将 IgG 单独加入到经 S100b 刺激的细胞中的实验显示了对于 TTP - 4000 和 TTP - 3000 的 RAGE 序列的抑制特异性。IgG 和 S100b 加入到该测定中显示与 S100b 单独时相同的 TNF- α 水平。

RAGE 融合蛋白的生理学特征

尽管 sRAGE 在调节 RAGE 介导的疾病方面可以具有治疗益处,但基于 sRAGE 在血浆中相对较短的半寿期,人 sRAGE 作为独立治疗剂可能有限制。例如,当通过 sRAGE 免疫反应性保留进行评估时,虽然啮齿类动物的 sRAGE 在正常和糖尿病大鼠中的半寿期为大约 20 小时,但人 sRAGE 的半寿期小于 2 小时(Renard 等人, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290: 1458-1466 (1999))。

为了产生具有与 sRAGE 类似的结合特征但具有更稳定的药代动力学特性的 RAGE 治疗剂,可以使用包含与一个或多个免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 配体结合位点的 RAGE 融合蛋白。如本领域已知的,免疫球蛋白结构域可以包含免疫球蛋白重链的 Fc 部分。

免疫球蛋白的 Fc 部分可以赋予融合蛋白数种属性。例如, Fc 融合蛋白通常可以将此类融合蛋白的血清半寿期从数小时增加到数日。药代动力学稳定性的增加一般是 Fc 片段的 C_H2 和 C_H3 区域之间的连接体与 FcRn 受体相互作用的结果(Wines 等人, *J. Immunol.*, 164: 5313-5318 (2000))。

尽管包含免疫球蛋白 Fc 多肽的融合蛋白可以提供稳定性增加的优点,但当引入宿主中时免疫球蛋白融合蛋白可以引起炎症应答。炎症应答在很大程度上可能是由于融合蛋白的免疫球蛋白的 Fc 部分。如果靶表达在需要被清除的患病细胞类型(例如,癌细胞、导致自身免疫疾病的淋巴细胞或淋巴细胞群)上,那么促炎症应答可以是所希望的特征。如果靶为可溶性蛋白,由于大多数可溶性蛋白不激活免疫球蛋白,那么促炎症应答可以是中性的特征。然而,如果靶表达在其破坏将导致不利副作用的细胞类型上,那么促炎症应答可以是负面的特征。此外,如果在融合蛋白与组织靶结合的位点处炎性级联是确定的,那么促炎症应答可以是负面的特征,因为许多炎症的介质对周围组织可能是有害的,和/或可能导致全身效应。

免疫球蛋白 Fc 片段上的主要促炎症位点位于 C_H1 和 C_H2 之间的铰链区。这个铰链区与各种白细胞上的 FcR1-3 相互作用并引发这些细胞

攻击靶。(Wines 等人, *J. Immunol.*, 164:5313-5318 (2000))。

作为 RAGE 介导的疾病的治疗剂, RAGE 融合蛋白可以不需要炎症应答的产生。因此, 本发明 RAGE 融合蛋白的实施方案可以包括包含与免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 多肽的融合蛋白, 其中 Fc 铰链区从该免疫球蛋白中去除并用 RAGE 多肽代替。这样, 可以将 RAGE 融合蛋白与炎性细胞上的 Fc 受体之间的相互作用降到最低。然而, 重要的是维持融合蛋白的各种免疫球蛋白结构域之间的正确堆叠及其他三维结构的相互作用。因此, 本发明融合蛋白的实施方案可以用生物学惰性但结构上类似的将 RAGE 的 V 和 C1 结构域隔开的 RAGE 域间连接体, 或将 RAGE 的 C1 和 C2 结构域隔开的连接体, 来代替免疫球蛋白重链的正常铰链区。因此, 融合蛋白的 RAGE 多肽可以包含在 RAGE 免疫球蛋白结构域下游天然发现的域间连接体序列以形成 RAGE 免疫球蛋白结构域/连接体片段。这样, 可以维持由 RAGE 或免疫球蛋白支持的免疫球蛋白结构域之间的三维相互作用。

在一个实施方案中, 本发明的 RAGE 融合蛋白与 sRAGE 比较可以具有药代动力学稳定性的实质增加。例如, 图 11 显示, 一旦 RAGE 融合蛋白 TTP-4000 饱和了其配体, 它就可以保留大于 300 个小时的半寿期。这可以与 sRAGE 在人血浆中仅几小时的半寿期形成对照。

因此, 在一个实施方案中, 本发明的 RAGE 融合蛋白可以用于拮抗生理学配体与 RAGE 的结合, 以作为治疗 RAGE 介导的疾病的手段而不产生不可接受的量的炎症。本发明的融合蛋白与 IgG 比较可以显示出在产生促炎症应答方面的实质减少。例如, 如图 12 中所示, 在检测到人 IgG 刺激 TNF- α 释放的情况下, RAGE 融合蛋白 TTP-4000 不刺激 TNF- α 从细胞中释放。

用 RAGE 融合蛋白治疗疾病

本发明还包括治疗人类受试者中 RAGE 介导的病症的方法。在一个实施方案中, 该方法可以包括对受试者施用包含 RAGE 多肽的融合蛋白, 所述 RAGE 多肽包含 RAGE 配体结合位点且与第二种非 RAGE 多肽连

接。在一个实施方案中，融合蛋白可以包含 RAGE 配体结合位点。在一个实施方案中，配体结合位点包含融合蛋白的最 N-末端结构域。RAGE 配体结合位点可以包含 RAGE 的 V 结构域或其部分。在一个实施方案中，RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。

在一个实施方案中，RAGE 多肽可以与包含免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白结构域的部分（例如，其片段）的多肽连接。在一个实施方案中，包含免疫球蛋白结构域的多肽包含人 IgG 的 C_H2 或 C_H3 结构域中至少一个的至少一部分。

RAGE 蛋白或多肽可以包含全长的人 RAGE（例如，SEQ ID NO: 1）或人 RAGE 的片段。在一个实施方案中，RAGE 多肽不包含任何信号序列残基。RAGE 的信号序列可以包含全长 RAGE（SEQ ID NO: 1）的残基 1-22 或残基 1-23。在可选实施方案中，RAGE 多肽可以包含与人 RAGE 或其片段 70%、80%、或 90% 同一的序列。例如，在一个实施方案中，RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 RAGE 或其片段（参见，例如 Neepet 等人，（1992））。或者，人 RAGE 可以包含去除信号序列的全长 RAGE（例如，SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3）（图 1A 和 1B）或那个氨基酸序列的一部分。本发明的融合蛋白还可以包含 sRAGE（例如 SEQ ID NO: 4）、与 sRAGE 或 sRAGE 片段 90% 同一的多肽。例如，RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 sRAGE 或其片段（参见，例如 Neepet 等人，（1992））。或者，人 RAGE 可以包含去除信号序列的 sRAGE（例如，SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6）（图 1C）或那个氨基酸序列的一部分。在其他实施方案中，RAGE 蛋白可以包含 V 结构域（例如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8；图 1D）。或者，可以使用与 V 结构域或其片段 90% 同一的序列。或者，RAGE 蛋白可以包含含有部分 V 结构域的 RAGE 片段（例如 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10；图 1D）。在一个实施方案中，配体结合位点可以包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。在另外一个实施方案中，RAGE 片段是合成肽。

融合蛋白可以包含不来源于 RAGE 或其片段的几种类型的肽。融合蛋白的第二种多肽可以包含来源于免疫球蛋白的多肽。重链（或其部分）可以来源于任何一个已知的重链同种型：IgG（ γ ）、IgM（ μ ）、IgD（ δ ）、IgE（ ϵ ）或 IgA（ α ）。此外，重链（或其部分）可以来源于任何一个已知的重链亚型：IgG1（ $\gamma 1$ ）、IgG2（ $\gamma 2$ ）、IgG3（ $\gamma 3$ ）、IgG4（ $\gamma 4$ ）、IgA1（ $\alpha 1$ ）、IgA2（ $\alpha 2$ ），或这些同种型或亚型的改变生物学活性的突变。第二种多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或这些结构域中任何一个或两个的一部分。作为一个示例实施方案，包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或其部分的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。免疫球蛋白肽可以由 SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 41 的核酸序列编码。

例如，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 116 (SEQ ID NO: 7) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 116 (SEQ ID NO: 8) 或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 V 结构域。或者，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 124 - 221 (SEQ ID NO: 11) 或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 C1 结构域。在另一实施方案中，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 227 - 317 (SEQ ID NO: 12) 或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 C2 结构域。或者，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 123 (SEQ ID NO: 13) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 123 (SEQ ID NO: 14) 或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 V 结构域以及下游的域间连接体。或者，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 226 (SEQ ID NO: 17) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 226 (SEQ ID NO: 18) 或与其 90% 同一的序列，相应于 V-结构域、C1 结构域以及连接这两个结构域的域间连接体。或者，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 339 (SEQ ID NO: 5) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的 24 - 339 (SEQ ID NO: 6) 或与其 90% 同一的序列，相应于 sRAGE（即，编码 V、C1 和 C2 结构域以及域间连接体）。或者，可以利用这些序列中每一个的片段。

免疫球蛋白链的 Fc 部分在体内可以是促炎症的。因此，在一个实

施方案中，本发明的 RAGE 融合蛋白包含来源于 RAGE 的域间连接体而不是来源于免疫球蛋白的域间铰链多肽。

因此，在一个实施方案中，融合蛋白可以进一步包含直接与包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其片段的多肽连接的 RAGE 多肽。在一个实施方案中，C_H2 结构域或其片段包含 SEQ ID NO: 42。

在一个实施方案中，RAGE 多肽包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 域间连接体，从而使得 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸连接至域间连接体的 N-末端氨基酸，并且 RAGE 域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸。包含免疫球蛋白 C_H2 结构域的多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域。作为一个示例实施方案，包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。

本发明的融合蛋白可以包含单个或多个来自 RAGE 的结构域。此外，包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的域间连接体的 RAGE 多肽可以包含全长 RAGE 蛋白的片段。例如，在一个实施方案中，融合蛋白可以包含两个来源于 RAGE 蛋白的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。融合蛋白可以包含第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域和连接第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的第一个 RAGE 域间连接体以及第二个 RAGE 域间连接体，从而使得第一个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸，第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 N-末端氨基酸连接至第一个域间连接体的 C-末端氨基酸，第二个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至 RAGE 第二个免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸，以及 RAGE 第二个域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸。例如，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23-251 (SEQ ID NO: 19) 或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24-251 (SEQ ID NO: 20) 或与其 90% 同一的序列，相应于 V-结构域、C1 结构域、连接这两个结构域的域间连接体以及 C1 下游的第二个域间连接体。在一个实施方案中，包含 SEQ ID NO: 30 或其片段的核

酸构建体可以编码四结构域的 RAGE 融合蛋白。

可替代地,三结构域的融合蛋白可以包含一个来源于 RAGE 的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。例如,融合蛋白可以包含经由 RAGE 域间连接体与包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸连接的单个 RAGE 免疫球蛋白结构域。例如, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 136 (SEQ ID NO: 15) 或与其 90% 同一的序列,或人 RAGE 的氨基酸 24 - 136 (SEQ ID NO: 16) 或与其 90% 同一的序列,相应于 RAGE 的 V 结构域以及下游的域间连接体。在一个实施方案中,包含 SEQ ID NO: 31 或其片段的核酸构建体可以编码三结构域的 RAGE 融合蛋白。

RAGE 域间连接体片段可以包含天然地位于 RAGE 免疫球蛋白结构域下游并因此与之连接的肽序列。例如,对于 RAGE V 结构域,域间连接体可以包含天然地位于 V 结构域下游的氨基酸序列。在一个实施方案中,连接体可以包含 SEQ ID NO: 21,相应于全长 RAGE 的氨基酸 117 - 123。或者,连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如,可以利用包含 SEQ ID NO: 21 的上游和下游数个氨基酸(例如 1 - 3、1 - 5、或 1 - 10、或 1 - 15 个氨基酸)的域间连接体。因此,在一个实施方案中,域间连接体包含 SEQ ID NO: 23,其包含全长 RAGE 的氨基酸 117 - 136。或者,可以利用从连接体的任何一端删除例如 1、2 或 3 个氨基酸的 SEQ ID NO: 21 的片段。在可选实施方案中,连接体可以包含与 SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 23 70% 同一、或 80% 同一、或 90% 同一的序列。

对于 RAGE C1 结构域,连接体可以包含天然地位于 C1 结构域下游的肽序列。在一个实施方案中,连接体可以包含 SEQ ID NO: 22,相应于全长 RAGE 的氨基酸 222 - 251。或者,连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如,可以利用包含 SEQ ID NO: 22 的上游和下游数个氨基酸(例如 1 - 3、1 - 5、或 1 - 10、或 1 - 15 个氨基酸)的连接体。或者,可以利用从连接体的任何一端删除例如 1 - 3、1 - 5、或 1 - 10、或 1 - 15 个氨基酸的 SEQ ID NO: 22 的片段。例如,在一个

实施方案中, RAGE 域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 24, 相应于氨基酸 222 - 226。或者, 域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 44, 相应于 RAGE 的氨基酸 318 - 342。

在一个实施方案中, 本发明的融合蛋白可以通过各种途径施用。本发明 RAGE 融合蛋白的施用可以采用腹膜内 (IP) 注射。可替代地, RAGE 融合蛋白可以口服、鼻内或作为气雾剂施用。在另一实施方案中, 施用是静脉内的 (IV)。RAGE 融合蛋白还可以皮下注射。在另一实施方案中, 融合蛋白的施用是动脉内的。在另一实施方案中, 施用是舌下的。此外, 施用还可以采用定时释放胶囊。在另外一个实施方案中, 施用可以是经直肠的, 例如通过栓剂等。例如, 当希望自我给药时, 皮下施用可以用于治疗慢性病症。

各种动物模型已经用于验证作为治疗剂调节 RAGE 的化合物的用途。这些模型的实例如下:

a) 在糖尿病和正常大鼠中, 通过抑制经由 RAGE 的内皮细胞、平滑肌和巨噬细胞的激活, sRAGE 抑制在动脉损伤后再狭窄的大鼠模型中的新生内膜形成 (Zhou 等人, *Circulation* 107: 2238-2243 (2003));

b) 在全身性淀粉样变性的小鼠模型中, 利用 sRAGE 或抗 RAGE 抗体抑制 RAGE/配体相互作用减少了淀粉样蛋白斑的形成 (Yan 等人, *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000))。在被治疗的动物中, 伴随淀粉样蛋白斑减少的是炎性细胞因子白介素-6 (IL-6) 和巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 的减少以及 NF- κ B 的活化的减少;

c) 在 AD 小鼠模型中, RAGE 转基因小鼠 (RAGE 过表达的小鼠和 RAGE 显性失活表达的小鼠) 显示出斑形成和认知缺陷 (Arancio 等人, *EMBO J.*, 23: 4096-4105 (2004));

d) 用 sRAGE 治疗糖尿病大鼠降低了血管通透性 (Bonnardel-Phu 等人, *Diabetes*, 48: 2052-2058 (1999));

e) 用 sRAGE 治疗减少了在载脂蛋白 E 缺陷的糖尿病小鼠中的动脉粥样硬化损伤, 并在 db/db 小鼠中阻止了糖尿病性肾病的功能和形态学指征 (Hudson 等人, *Arch. Biochem. Biophys.*, 419: 80-88 (2003));

以及

f) 在胶原诱导型关节炎的小鼠模型 (Hofmann 等人, *Genes Immunol.*, 3:123-135 (2002))、实验性过敏性脑脊髓炎的小鼠模型 (Yan 等人, *Nat. Med.*, 9:28-293 (2003)) 以及炎性肠病的小鼠模型 (Hofmann 等人, *Cell*, 97:889-901 (1999)) 中, sRAGE 减弱了炎症的严重度。

因此, 在一个实施方案中, 本发明的融合蛋白可以用于治疗糖尿病的症状和/或经 RAGE 介导的由糖尿病引起的并发症。在可选实施方案中, 糖尿病的症状或糖尿病的晚期并发症可以包括糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病、糖尿病性足部溃疡、糖尿病的心血管并发症或糖尿病性神经病变。

最初被鉴别为其表达与糖尿病病理相关的分子的受体, RAGE 自身对于糖尿病并发症的病理生理学是必要的。在体内, 在多个糖尿病并发症和炎症模型中已显示, 抑制 RAGE 与其配体的相互作用是有治疗作用的 (Hudson 等人, *Arch. Biochem. Biophys.*, 419:80-88 (2003))。例如, 在糖尿病小鼠中, 两个月的抗 RAGE 抗体治疗使肾功能正常化并且减少了异常的肾组织病理 (Flyvbjerg 等人, *Diabetes* 53:166-172 (2004))。此外, 用结合 RAGE 配体并抑制 RAGE/配体相互作用的可溶形式的 RAGE (sRAGE) 进行治疗减少了在载脂蛋白 E 缺陷的糖尿病小鼠中的动脉粥样硬化损伤, 并且在 db/db 小鼠中减弱了糖尿病性肾病的功能和形态学病理 (Bucciarelli 等人, *Circulation* 106:2827-2835 (2002))。

此外, 还已显示, 在高血糖症及与全身或局部氧化应激相关的其他条件存在下, 在肾衰竭中, 在炎症位置处, 最终导致高级糖基化终产物 (AGEs) 形成的大分子非酶促糖氧化 (glycoxidation) 是增强的 (Dyer 等人, *J. Clin. Invest.*, 91:2463-2469 (1993); Reddy 等人, *Biochem.*, 34:10872-10878 (1995); Dyer 等人, *J. Biol. Chem.*, 266:11654-11660 (1991); Degenhardt 等人, *Cell Mol. Biol.*, 44:1139-1145 (1998))。AGEs 在脉管系统中的积聚可以在灶部发生, 如

在发现于透析相关的淀粉样变性患者中的由 AEG- β_2 -微球蛋白组成的关节淀粉样蛋白之中 (Miyata 等人, *J. Clin. Invest.*, 92:1243-1252 (1993); Miyata 等人, *J. Clin. Invest.*, 98:1088-1094 (1996)), 或者一般地, 如由糖尿病患者的脉管系统和组织所例证的 (Schmidt 等人, *Nature Med.*, 1:1002-1004 (1995))。糖尿病患者中 AGEs 随着时间过去而渐进的积聚提示, 内源性清除机制在 AGE 沉积位置处不能有效地发挥作用。此类积聚的 AGEs 能够通过众多机制改变细胞特性。尽管在正常组织和脉管系统中 RAGE 以低水平表达, 但已显示在受体的配体积聚的环境中 RAGE 变成上调 (Li 等人, *J. Biol. Chem.*, 272:16498-16506 (1997); Li 等人, *J. Biol. Chem.*, 273:30870-30878 (1998); Tanaka 等人, *J. Biol. Chem.*, 275:25781-25790 (2000))。在糖尿病的脉管系统中, RAGE 的表达在内皮、平滑肌细胞和浸润性单核吞噬细胞中是增加的。此外, 细胞培养中研究也已证实, AGE-RAGE 相互作用导致在血管内稳定中重要的细胞特性改变。

图 13 中图解说明了 RAGE 融合蛋白在治疗糖尿病相关病理中的用途。在再狭窄的糖尿病大鼠模型中评估 RAGE 融合蛋白 TTP-4000, 其中包括测量血管损伤后的平滑肌增殖和内膜扩张。如图 13 中所图解说明的, 在糖尿病相关的再狭窄中 TTP-4000 治疗可以以剂量-响应方式显著地减少内膜/中膜 (I/M) 比 (图 13A; 表 1)。此外, TTP-4000 治疗还可以以剂量-响应方式显著地减少再狭窄相关的血管平滑肌细胞增殖。

表 1
TTP - 4000 在大鼠再狭窄模型中的作用

	IgG (n=9)	TTP - 4000 (n=9) 低剂量** (0.3 mg/动物, qod × 4)	TTP - 4000 (n=9) 高剂量** (1.0 mg/动物, qod × 4)
腔面积 (mm ²)	0.2 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.16 ± 0.02
中膜面积 (mm ²)	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01
I/M 比	1.71 ± 0.27	1.61 ± 0.26	1.44* ± 0.15

* P < 0.05

** 对于高和低剂量, 均使用 3 mg/动物的负荷剂量。

在其他实施方案中, 本发明的融合蛋白还可用于治疗或逆转淀粉样变性和阿尔茨海默病。RAGE 是淀粉样蛋白 β ($A\beta$) 以及其他淀粉样变性原性 (amyloidogenic) 蛋白 (包括 SAA 和糊精 (amylin)) 的受体 (Yan 等人, *Nature*, 382: 685-691 (1996); Yan 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94: 5296-5301 (1997); Yan 等人, *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000); Sousa 等人, *Lab Invest.*, 80: 1101-1110 (2000))。此外, 在男性老年斑周围的组织中也发现了 RAGE 配体, 包括 AGEs、S100b 和 $A\beta$ 蛋白 (Luth 等人, *Cereb. Cortex* 15: 211-220 (2005); Petzold 等人, *Neurosci. Lett.*, 336: 167-170 (2003); Sasaki 等人, *Brain Res.*, 12: 256-262 (2001); Yan 等人, *Restor. Neurol. Neurosci.*, 12: 167-173 (1998))。已显示, RAGE 结合 β -折叠纤维状材料而不管亚基的组成 (淀粉样蛋白- β 肽、糊精、血清淀粉样蛋白 A、朊蛋白起源的肽) (Yan 等人, *Nature*, 382: 685-691 (1996); Yan 等人, *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000))。此外, 已显示, 淀粉样蛋白的沉积导致 RAGE 表达增强。例如, 在阿尔茨海默病 (AD) 患者的大脑中, 在神经元和神经胶质中 RAGE 表达增加 (Yan, 等人, *Nature* 382: 685-691 (1996))。与 RAGE 配体的表达同时发生的是, 在患有 AD 的个体的海马中的星形胶质细胞和小神经胶质细胞中 RAGE 是上调的, 但在没有 AD 的个体中不是上调的 (Lue 等人, *Exp. Neurol.*, 171: 29-45

(2001))。这些发现提示,在老年斑附近,表达 RAGE 的细胞经由 RAGE/RAGE 配体相互作用而被激活。此外,在体外, A β 介导的小神经胶质细胞的活化也可以被针对 RAGE 的配体结合结构域的抗体阻断 (Yan 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94: 5296-5301 (1997))。还证实, RAGE 可以充当原纤维装配的焦点 (Deane 等人, *Nat. Med.* 9: 907-913 (2003))。

此外,在全身性淀粉样变性的小鼠模型中,利用 sRAGE 或抗 RAGE 抗体体内抑制 RAGE/配体相互作用可以减少淀粉样蛋白斑的形成 (Yan 等人, *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000))。在神经元中过量表达人 RAGE 以及含 Swedish 和 London 突变的人淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) (突变体 hAPP) 的双转基因小鼠,早于它们的单突变体 hAPP 转基因对应物形成学习缺陷和神经病理学异常。与此相反,在相同的突变体 hAPP 背景下,双转基因小鼠由于神经元表达显性失活形式的 RAGE 而具有减少的 A β 信号传导能力,其与它们的单 APP 转基因对应物相比显示延迟的神经病理学和学习异常的发作 (Arancio 等人, *EMBO J.*, 23: 4096-4105 (2004))。

此外, RAGE - 淀粉样蛋白相互作用的抑制还已显示减少了细胞 RAGE 和细胞应激标记物的表达 (以及 NF- κ B 活化),并且减少了淀粉样蛋白沉积 (Yan 等人, *Nat. Med.*, 6: 643-651 (2000)),提示在富含淀粉样蛋白的环境中的细胞特性扰动中 (甚至在早期) 以及在淀粉样蛋白积聚中 RAGE - 淀粉样蛋白相互作用均起着作用。

因此,本发明的 RAGE 融合蛋白还可用于治疗淀粉样变性,以及减少与阿尔茨海默病 (AD) 相关的淀粉样蛋白斑和认知障碍。如上所述,在 AD 动物模型中, sRAGE 已显示减少大脑中淀粉样蛋白斑的形成以及后续的炎性标记物的增加。图 14A 和 14B 显示,与接受媒介物或人 IgG 阴性对照 (IgG1) 的动物相比,患有 AD 并且用 TTP - 4000 或小鼠 sRAGE 治疗 3 个月的小鼠具有较少的淀粉样蛋白 β (A β) 斑和较小的认知障碍。像 sRAGE 一样, TTP - 4000 也可减少与 AD 相关的炎性细胞因子 IL-1 和 TNF- α (数据未显示)。

此外，本发明的融合蛋白还可以用于治疗动脉粥样硬化及其他心血管病症。因此，已显示，缺血性心脏病在糖尿病患者中特别高 (Robertson 等人, *Lab Invest.*, 18:538-551 (1968); Kannel 等人, *J. Am. Med. Assoc.*, 241:2035-2038 (1979); Kannel 等人, *Diab. Care*, 2:120-126 (1979))。此外，研究已显示，与不患有糖尿病的患者相比，糖尿病患者中的动脉粥样硬化是更加速且更广泛的 (参见，例如 Waller 等人, *Am. J. Med.*, 69:498-506 (1980); Craill 等人, *Am. J. Med.* 64:221-230 (1978); Hamby 等人, *Chest*, 2:251-257 (1976); 以及 Pyorala 等人, *Diab. Metab. Rev.*, 3:463-524 (1978))。尽管在糖尿病背景下动脉粥样硬化加速的原因有很多，但已显示 AGEs 的减少可以减少斑的形成。

例如，本发明的 RAGE 融合蛋白还可用于治疗中风。当在疾病相关的中风动物模型中比较 TTP-4000 与 sRAGE 时，发现 TTP-4000 在梗塞体积方面提供了明显更大的减少。在这个模型中，结扎小鼠的颈中动脉并随后再灌注以形成梗塞。为了评估 RAGE 融合蛋白治疗或预防中风的有效性，在即将进行再灌注之前用 sRAGE 或 TTP-4000 或对照免疫球蛋白处理小鼠。如可以从表 2 中看出的，TTP-4000 在限制这些动物中的梗塞面积方面比 sRAGE 更有效，提示由于其在血浆中更佳的半寿期，TTP-4000 能够维持比 sRAGE 更大的保护。

表 2
中风中梗塞的减少

	% 梗塞的减少 ^{**}
sRAGE	15 % [*]
TTP-4000 (300 μg)	38 % [*]
TTP-4000 (300 μg)	21 % [*]
TTP-4000 (300 μg)	10 % [*]
IgG 同种型对照 (300 μg)	4 %

^{*} 显著至 $p < 0.001$; ^{*} 与盐水比较

在另一实施方案中,本发明的融合蛋白可以用于治疗癌症。在一个实施方案中,利用本发明的融合蛋白治疗的癌症包含表达 RAGE 的癌细胞。例如,可以用本发明的 RAGE 融合蛋白治疗的癌症包括某些肺癌、某些神经胶质瘤、某些乳突状瘤等。两性蛋白是已显示与 RAGE 相互作用的高迁移率组 I 非组蛋白染色体 DNA 结合蛋白(Rauvala 等人, *J. Biol. Chem.*, 262:16625-16635 (1987); Parkikinen 等人, *J. Biol. Chem.* 268:19726-19738 (1993))。已显示,两性蛋白促进神经突长出,并且在纤维蛋白溶解系统中充当蛋白酶复合体的装配表面(还已知有助于细胞运动性)。此外,在原发性肿瘤模型(C6 神经胶质瘤)、Lewis 肺转移模型(Taguchi 等人, *Nature* 405:354-360 (2000))以及在表达 v-Ha-ras 转基因的小鼠中自发出现的乳突状瘤(Leder 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9178-9182 (1990))之中观察到阻断 RAGE 具有局部肿瘤生长抑制作用。

在另外一个实施方案中,本发明的融合蛋白可以用于治疗炎症。例如,在可选实施方案中,本发明的融合蛋白被用于治疗与自身免疫相关的炎症、与炎性肠病相关的炎症、与类风湿性关节炎相关的炎症、与牛皮癣相关的炎症、与多发性硬化症相关的炎症、与缺氧相关的炎症、与中风相关的炎症、与心脏病发作相关的炎症、与出血性休克相关的炎症、与败血病相关的炎症、与器官移植相关的炎症或与伤口愈合不良相关的炎症。

例如,在溶栓治疗后,炎性细胞例如粒细胞渗入局部缺血的组织中并产生氧自由基,它可以破坏的细胞比缺氧杀死的细胞更多。用抗体或其他蛋白质拮抗剂抑制嗜中性粒细胞上负责嗜中性粒细胞能够渗入组织的受体已显示出可改善应答。因为 RAGE 是这种嗜中性粒细胞受体的配体,所以包含 RAGE 片段的融合蛋白可以充当诱饵,和阻止嗜中性粒细胞输送至再灌注位点并从而阻止进一步的组织破坏。通过研究可以表明 RAGE 在防止炎症中的作用,所述研究显示在糖尿病和正常大鼠中, sRAGE 抑制在动脉损伤后再狭窄的大鼠模型中的新生内膜扩张,

推测通过抑制经由 RAGE 的内皮细胞、平滑肌细胞增殖和巨噬细胞激活 (Zhou 等人, *Circulation*, 107:2238-2243 (2003))。此外, sRAGE 抑制炎症的模型, 包括迟发型超敏反应、实验性自身免疫性脑炎和炎性肠病 (Hofman 等人, *Cell*, 97:889-901 (1999))。

此外, 在一个实施方案中, 本发明的融合蛋白还可以用于治疗基于自身免疫的病症。例如, 本发明的融合蛋白可以用于治疗肾衰竭。因此, 本发明的融合蛋白可以用于治疗全身性狼疮肾炎或炎性狼疮肾炎。例如, S100/钙粒蛋白已显示出包括紧密相关的钙结合多肽家族, 其特征为由连接肽相连的两个 EF-手区 (Schafer 等人, *TIBS*, 21:134-140 (1996); Zimmer 等人, *Brain Res. Bull.*, 37:417-429 (1995); Rammes 等人, *J. Biol. Chem.*, 272:9496-9502 (1997); Luger 等人, *Eur. J. Clin. Invest.*, 25:659-664 (1995))。尽管 S100/钙粒蛋白缺少信号肽, 但早就知道它们可以进入细胞外间隙, 特别是在慢性免疫/炎症应答的部位, 如在囊性纤维病和类风湿性关节炎中。RAGE 是 S100/钙粒蛋白家族中许多成员的受体, 介导它们对细胞例如淋巴细胞和单核吞噬细胞的促炎症作用。此外, 对于迟发型超敏反应应答、IL-10 缺陷小鼠中的结肠炎、胶原诱导性关节炎以及实验性自身免疫性脑炎模型的研究还提示, RAGE-配体相互作用 (推测与 S100/钙粒蛋白) 在炎症级联中具有接近的作用。

因此, 在各种所选择的实施方案中, 本发明可以提供通过对受试者施用治疗上有效量的本发明融合蛋白来抑制受试者中 AGE 与 RAGE 相互作用的方法。利用本发明 RAGE 融合蛋白治疗的受试者可以是动物。在一个实施方案中, 受试者是人。受试者可以患有 AGE 相关的疾病, 例如糖尿病, 糖尿病并发症例如肾病、神经病变、视网膜病、足部溃疡、淀粉样变性或肾衰竭, 以及炎症。或者, 受试者可以是患有阿尔茨海默病的个体。在一个可选实施方案中, 受试者可以是患有癌症的个体。在另外其他的实施方案中, 受试者可以患有全身性红斑狼疮或炎性狼疮肾炎。其他疾病可以由 RAGE 介导, 因此可以利用本发明的融合蛋白进行治疗。因此, 在本发明的另外的可选实施方案中, 融

合蛋白可以用于治疗人或动物受试者中的克罗恩病、关节炎、脉管炎、肾病、视网膜病和神经病变。

治疗上有效量可以包括能够阻止受试者中 RAGE 与 AGE 或其他类型的内源性 RAGE 配体相互作用的量。相应地，所述量将依被治疗的受试者而改变。化合物的施用可以是每小时 1 次、每天 1 次、每周 1 次、每月 1 次、每年 1 次或作为单独事件。在各种可选实施方案中，融合蛋白的有效量范围可以是约 1 ng/kg 体重 - 约 100 mg/kg 体重，或约 10 μ g/kg 体重 - 约 50 mg/kg 体重，或约 100 μ g/kg 体重 - 约 10 mg/kg 体重。利用本领域的标准方法，通过剂量/响应测定法可以确定实际的有效量 (Johnson 等人, *Diabetes*. 42:1179, (1993))。因此，如本领域技术人员已知的，有效量可以取决于化合物的生物利用度、生物活性和生物降解性。

组合物

本发明可以包括包含与药物学上可接受的载体混合的本发明融合蛋白的组合物。融合蛋白可以包含与第二种非 RAGE 多肽连接的 RAGE 多肽。在一个实施方案中，融合蛋白可以包含 RAGE 配体结合位点。在一个实施方案中，配体结合位点包含融合蛋白的最 N-末端结构域。RAGE 配体结合位点可以包含 RAGE 的 V 结构域或其部分。在一个实施方案中，RAGE 配体结合位点包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或其 90% 同一的序列。

在一个实施方案中，RAGE 多肽可以与包含免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白结构域的部分（例如其片段）的多肽连接。在一个实施方案中，包含免疫球蛋白结构域的多肽包含人 IgG 的 C_H2 或 C_H3 结构域中至少一个的至少一部分。

RAGE 蛋白或多肽可以包含全长的人 RAGE（例如，SEQ ID NO: 1）或人 RAGE 的片段。在一个实施方案中，RAGE 多肽不包含任何信号序列残基。RAGE 的信号序列可以包含全长 RAGE（SEQ ID NO: 1）的残基 1 - 22 或残基 1 - 23。在可选实施方案中，RAGE 多肽可以包含与人 RAGE

或其片段 70%、80%、或 90% 同一的序列。例如，在一个实施方案中，RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 RAGE 或其片段（参见，例如 Neeper 等人，（1992））。或者，人 RAGE 可以包含去除信号序列的全长 RAGE（例如，SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3）（图 1A 和 1B）或那个氨基酸序列的一部分。本发明的融合蛋白还可以包含 sRAGE（例如 SEQ ID NO: 4）、与 sRAGE 或 sRAGE 片段 90% 同一的多肽。例如，RAGE 多肽可以包含以甘氨酸而不是甲硫氨酸作为第一个残基的人 sRAGE 或其片段（参见，例如 Neeper 等人，（1992））。或者，人 RAGE 可以包含去除信号序列的 sRAGE（例如，SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6）（图 1C）或那个氨基酸序列的一部分。在其他实施方案中，RAGE 蛋白可以包含 V 结构域（例如 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 8；图 1D）。或者，可以使用与 V 结构域或其片段 90% 同一的序列。或者，RAGE 蛋白可以包含含有部分 V 结构域的 RAGE 片段（例如 SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10；图 1D）。在一个实施方案中，配体结合位点可以包含 SEQ ID NO: 9 或与其 90% 同一的序列，或者 SEQ ID NO: 10 或与其 90% 同一的序列。在另外一个实施方案中，RAGE 片段是合成肽。

例如，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 116（SEQ ID NO: 7）或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 116（SEQ ID NO: 8）或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 V 结构域。或者，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 124 - 221（SEQ ID NO: 11）或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 C1 结构域。在另一实施方案中，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 227 - 317（SEQ ID NO: 12）或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 C2 结构域。或者，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 123（SEQ ID NO: 13）或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 123（SEQ ID NO: 14）或与其 90% 同一的序列，相应于 RAGE 的 V 结构域以及下游的域间连接体。或者，RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 226（SEQ ID NO: 17）或与其 90% 同一的序列，或人 RAGE 的氨基酸 24 - 226（SEQ ID NO: 18）或与其 90% 同一的序列，相应于 V 结构域、C1 结构域以及连接这两个结构域的域间连接体。或

者, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23-339 (SEQ ID NO: 5) 或与其 90% 同一的序列, 或人 RAGE 的 24-339 (SEQ ID NO: 6) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 sRAGE (即, 编码 V、C1 和 C2 结构域以及域间连接体)。或者, 可以利用这些序列中每一个的片段。

融合蛋白可以包含不来源于 RAGE 或其片段的几种类型的肽。融合蛋白的第二种多肽可以包括来源于免疫球蛋白的多肽。重链 (或其部分) 可以来源于任何一个已知的重链同种型: IgG (γ)、IgM (μ)、IgD (δ)、IgE (ϵ) 或 IgA (α)。此外, 重链 (或其部分) 可以来源于任何一个已知的重链亚型: IgG1 (γ 1)、IgG2 (γ 2)、IgG3 (γ 3)、IgG4 (γ 4)、IgA1 (α 1)、IgA2 (α 2), 或这些同种型或亚型的改变生物学活性的突变。第二种多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或这些结构域中任何一个或两个的一部分。作为一个示例实施方案, 包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域或其部分的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。免疫球蛋白肽可以由 SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 41 的核酸序列编码。

免疫球蛋白链的 Fc 部分在体内可以是促炎症的。因此, 在一个实施方案中, 本发明的 RAGE 融合蛋白包含来源于 RAGE 的域间连接体而不是来源于免疫球蛋白的域间较链多肽。

因此, 在一个实施方案中, 融合蛋白可以进一步包含直接与包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其片段的多肽连接的 RAGE 多肽。在一个实施方案中, C_H2 结构域或其片段包含 SEQ ID NO: 42。

在一个实施方案中, RAGE 多肽包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的 RAGE 域间连接体, 从而使得 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸连接至域间连接体的 N-末端氨基酸, 并且 RAGE 域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其片段的多肽的 N-末端氨基酸。包含免疫球蛋白 C_H2 结构域或其部分的多肽可以包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域。作为一个示例实施方案, 包含人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域的多肽可以包含 SEQ ID NO: 38 或 SEQ ID NO: 40。

本发明的融合蛋白可以包含单个或多个来自 RAGE 的结构域。此

外, 包含与 RAGE 免疫球蛋白结构域连接的域间连接体的 RAGE 多肽可以包含全长 RAGE 蛋白的片段。例如, 在一个实施方案中, 融合蛋白可以包含两个来源于 RAGE 蛋白的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。融合蛋白可以包含第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域和连接第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的第一个 RAGE 域间连接体以及第二个 RAGE 域间连接体, 从而使得第一个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至第一个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸, 第二个 RAGE 免疫球蛋白结构域的 N-末端氨基酸连接至第一个域间连接体的 C-末端氨基酸, 第二个域间连接体的 N-末端氨基酸连接至 RAGE 第二个免疫球蛋白结构域的 C-末端氨基酸, 以及 RAGE 第二个域间连接体的 C-末端氨基酸直接连接至包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的的多肽的 N-末端氨基酸。例如, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 251 (SEQ ID NO: 19) 或与其 90% 同一的序列, 或人 RAGE 的氨基酸 24 - 251 (SEQ ID NO: 20) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 V-结构域、C1 结构域、连接这两个结构域的域间连接体以及 C1 下游的第二个域间连接体。在一个实施方案中, 包含 SEQ ID NO: 30 或其片段的核酸构建体可以编码四结构域的 RAGE 融合蛋白。

可替代地, 三结构域的融合蛋白可以包含一个来源于 RAGE 的免疫球蛋白结构域以及两个来源于人 Fc 多肽的免疫球蛋白结构域。例如, 融合蛋白可以包含经由 RAGE 域间连接体与包含 C_H2 免疫球蛋白结构域或其片段的的多肽的 N-末端氨基酸连接的单个 RAGE 免疫球蛋白结构域。例如, RAGE 多肽可以包含人 RAGE 的氨基酸 23 - 136 (SEQ ID NO: 15) 或与其 90% 同一的序列, 或人 RAGE 的氨基酸 24 - 136 (SEQ ID NO: 16) 或与其 90% 同一的序列, 相应于 RAGE 的 V 结构域以及下游的域间连接体。在一个实施方案中, 包含 SEQ ID NO: 31 或其片段的核酸构建体可以编码三结构域的 RAGE 融合蛋白。

RAGE 域间连接体片段可以包含天然地位于 RAGE 免疫球蛋白结构域下游并因此与之连接的肽序列。例如, 对于 RAGE V 结构域, 域间连接体可以包含天然地位于 V 结构域下游的氨基酸序列。在一个实施方

案中，连接体可以包含 SEQ ID NO: 21，相应于全长 RAGE 的氨基酸 117-123。或者，连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如，可以利用包含 SEQ ID NO: 21 的上游和下游数个氨基酸（例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸）的域间连接体。因此，在一个实施方案中，域间连接体包含 SEQ ID NO: 23，其包含全长 RAGE 的氨基酸 117-136。或者，可以利用从连接体的任何一端删除例如 1、2 或 3 个氨基酸的 SEQ ID NO: 21 的片段。在可选实施方案中，连接体可以包含与 SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 23 70% 同一、或 80% 同一、或 90% 同一的序列。

对于 RAGE C1 结构域，连接体可以包含天然地位于 C1 结构域下游的肽序列。在一个实施方案中，连接体可以包含 SEQ ID NO: 22，相应于全长 RAGE 的氨基酸 222-251。或者，连接体可以包含具有天然 RAGE 序列的另外部分的肽。例如，可以利用包含 SEQ ID NO: 22 的上游和下游数个氨基酸（例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸）的连接体。或者，可以利用从连接体的任何一端删除例如 1-3、1-5、或 1-10、或 1-15 个氨基酸的 SEQ ID NO: 22 的片段。例如，在一个实施方案中，RAGE 域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 24，相应于氨基酸 222-226。或者，域间连接体可以包含 SEQ ID NO: 44，相应于 RAGE 的氨基酸 318-342。

药物学上可接受的载体可以包括任何一种本领域已知的标准的药物学上可接受的载体。载体可以包括稀释剂。在一个实施方案中，药物载体可以是液体，和融合蛋白或核酸构建体可以是溶液形式。在另一实施方案中，药物学上可接受的载体可以是粉末、冻干粉末或片剂形式的固体。或者，药物载体可以是凝胶、栓剂或乳膏。在可选实施方案中，载体可以包括脂质体、微胶囊、聚合物包封的细胞、或病毒。因此，药物学上可接受的载体涵盖，但不限于，任何一种标准的药物学上可接受的载体，例如水、醇、磷酸盐缓冲盐水溶液、糖（例如蔗糖或甘露醇）、油或乳状液例如油/水乳状液或甘油三脂乳状液、各种类型的湿润剂、片剂、包衣片剂以及胶囊。

本发明 RAGE 融合蛋白的施用可以采用各种途径。因此，本发明 RAGE 融合蛋白的施用可以采用腹膜内（IP）注射。可替代地，RAGE 融合蛋白可以口服、鼻内或作为气雾剂施用。在另一实施方案中，施用是静脉内的（IV）。RAGE 融合蛋白还可以皮下注射。在另一实施方案中，融合蛋白的施用是动脉内的。在另一实施方案中，施用是舌下的。此外，施用还可以采用定时释放胶囊。在另外一个实施方案中，施用可以是经直肠的，例如通过栓剂等。例如，当希望自我给药时，皮下施用可以用于治疗慢性病症。

药物组合物可以是在无毒的肠胃外可接受的溶剂或媒介物中的无菌注射液形式。可以采用的可接受的媒介物和溶剂包括水、林格氏溶液、3-丁二醇、等渗氯化钠溶液或水性缓冲液，例如，生理学上可接受的柠檬酸盐、乙酸盐、甘氨酸、组氨酸、磷酸盐、tris 或琥珀酸盐缓冲液。注射液可以包含稳定剂以防止化学降解和聚集物形成。稳定剂可以包括抗氧化剂例如丁基化羟基苯甲醚（BHA）和丁基化羟基甲苯（BHT），缓冲质（柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸）或表面活性剂（聚山梨酯 80、泊洛沙姆）。该溶液还可包含抗微生物性防腐剂，例如苯甲醇和对羟基苯甲酸酯。该溶液还可包含表面活性剂以减少聚集，例如聚山梨酯 80、泊洛沙姆或本领域已知的其他表面活性剂。该溶液还可包含其他添加剂，例如糖或盐水，以将组合物的渗透压调整至与人类血液相似。

药物组合物可以是无菌冻干粉剂形式，其用稀释剂重构后可用于注射。稀释剂可以是注射用水、抑菌性注射用水或无菌盐水。通过将融合蛋白溶液冷冻干燥以产生干燥形式的蛋白质，可以生产冻干粉剂。如本领域已知的，与蛋白质的液体溶液相比，冻干的蛋白质一般具有增加的稳定性和更长的保存期。冻干粉剂（块状物）可以包含缓冲质以调整 pH，所述缓冲质例如为生理学上可接受的柠檬酸盐、乙酸盐、甘氨酸、组氨酸、磷酸盐、tris 或琥珀酸盐缓冲质。冻干粉剂还可包含冷冻保护剂（lyoprotectant）以维持其物理和化学稳定性。通常使用的冷冻保护剂是非还原性糖和二糖例如蔗糖、甘露醇或海藻糖。冻

干粉剂可以包含稳定剂以防止化学降解和聚集物形成。稳定剂可以包括，但不限于，抗氧化剂（BHA、BHT）、缓冲质（柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸）或表面活性剂（聚山梨酯 80、泊洛沙姆）。冻干粉剂还可包含抗微生物性防腐剂，例如苯甲醇和对羟基苯甲酸酯。冻干粉剂还可包含表面活性剂以减少聚集，例如，但不限于，聚山梨酯 80 和泊洛沙姆。冻干粉剂还可包含添加剂（例如糖或盐水）以在对粉末进行重构后将渗透压调整至与人类血液相似。冻干粉剂还可包含填充剂，例如糖和二糖。

注射用的药物组合物还可以是油性悬浮液的形式。利用上述合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂，根据已知方法可以配制这种悬浮液。此外，无菌的固定油很方便用作溶剂或悬浮介质。为了这个目的，利用合成的甘油单酯或甘油二酯，可以采用任何温和的固定油。此外，还可以通过将活性成分悬浮在植物油例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油，或者矿物油例如液体石蜡中来配制油性悬浮液。例如，脂肪酸例如油酸可用于制备注射剂。油性悬浮液可以包含增稠剂例如蜂蜡、固体石蜡或鲸蜡醇。通过添加抗氧化剂例如抗坏血酸可以保存这些组合物。

本发明的药物组合物还可以是水包油乳状液或水性悬浮液形式。油相可以是植物油例如橄榄油或花生油，或矿物油例如液体石蜡，或其混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶例如阿拉伯胶或黄蓍胶，天然存在的磷脂例如大豆、卵磷脂，以及来源于脂肪酸和己糖醇脱水物的酯或偏酯例如脱水山梨糖醇单油酸酯，和所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇。

水性悬浮液还可包含与赋形剂混合的活性化合物。此类赋形剂可以包括悬浮剂例如羟甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶；分散剂或湿润剂，例如天然存在的磷脂例如卵磷脂，或氧化烯与脂肪酸的缩合产物例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物例如十七乙烯氧鲸蜡醇（heptadecaethyleneoxycetanol），或环氧乙烷与来源于

脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯，或环氧乙烷与来源于脂肪酸和己糖醇脱水物的偏酯的缩合产物例如聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。

适合于通过添加水制备水性悬浮液的可分散的粉剂和颗粒可以提供与分散剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性化合物。合适的防腐剂、分散剂和悬浮剂在上文中得到描述。

所述组合物还可以是用于本发明化合物的直肠给药的栓剂形式。通过将药物与合适的非刺激性赋形剂混合可以制备这些组合物，所述赋形剂在常温下是固体但在直肠温度下是液体，并因此将会在直肠中融化以释放药物。此类材料包括例如可可脂和聚乙二醇。

对于局部使用，可以采用包含本发明化合物的乳膏、软膏、胶冻剂、溶液或悬浮液。局部应用还可包括口腔洗剂和漱口剂。可以使用合适的防腐剂、抗氧化剂例如 BHA 和 BHT、分散剂、表面活性剂或缓冲质。

本发明的化合物还可以以脂质体递药系统的形式施用，例如小单层囊泡、大单层囊泡和多层囊泡。脂质体可以由各种磷脂例如胆固醇、硬脂胺或磷脂酰胆碱形成。

在某些实施方案中，本发明的化合物可以被修饰以进一步延缓被代谢酶从循环中清除。在一个实施方案中，所述化合物可以通过共价连接水溶性聚合物进行修饰，所述水溶性聚合物例如为聚乙二醇（PEG）、PEG 和聚丙二醇的共聚物、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯氨酸、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇等。此类修饰还可以增加化合物在水性溶液中的溶解度。聚合物例如 PEG 可以与一种或多种反应性氨基残基、巯基残基或羧基残基共价连接。已经描述了众多活化形式的 PEG，包括羧酸的活性酯类或碳酸酯衍生物，特别是其中离去基团为下列的那些：用于与氨基基团反应的 N-羟基琥珀酰亚胺、对硝基苯酚、咪唑或 1-羟基-2-硝基苯-3-砒，用于与巯基基团反应的多模态（multimode）或卤素乙酰基衍生物，以及用于与碳水化合物基团反应的氨基胍或酰胍衍生物。

制备可以与本发明融合蛋白进行使用的蛋白质制剂的另外方法在美国专利号 6,267,958 和 5,567,677 中得到描述。

在本发明的进一步的方面，以辅助治疗性处理或与其他已知治疗剂的组合治疗性处理的形式利用本发明的 RAGE 调节剂。下述为可以与本发明的 RAGE 融合蛋白调节剂组合使用的佐剂和另外的治疗剂的非详尽列表：

抗癌剂的药理学分类：

1. 烷化剂：环磷酰胺、亚硝基脲、卡铂、顺铂、丙卡巴肼
2. 抗生素：博来霉素、柔红霉素、多柔比星
3. 抗代谢药：甲氨蝶呤、阿糖胞苷、氟尿嘧啶
4. 植物生物碱：长春碱、长春新碱、依托泊苷、紫杉醇
5. 激素：他莫昔芬、醋酸奥曲肽、非那雄胺、氟他胺
6. 生物应答调节剂：干扰素、白细胞介素

类风湿性关节炎治疗的药理学分类：

1. 止痛剂：阿司匹林
2. NSAIDs（非甾体抗炎药）：布洛芬、萘普生、双氯芬酸
3. DMARDs（缓解疾病的抗风湿药）：甲氨蝶呤、金制剂、羟氯喹、柳氮磺吡啶
4. 生物应答调节剂，DMARDs：依那西普、英夫利昔单抗、糖皮质激素

糖尿病治疗的药理学分类：

1. 磺脲类：甲苯磺丁脲、妥拉磺脲、格列本脲、格列吡嗪
2. 双胍类：二甲双胍
3. 其他的口服药剂：阿卡波糖、曲格列酮
4. 胰岛素

阿尔茨海默病治疗的药理学分类:

1. 胆碱酯酶抑制剂: 他克林、多奈哌齐
2. 抗精神病药: 氟哌啶醇、硫利达嗪
3. 抗抑郁药: 地昔帕明、氟西汀、曲唑酮、帕罗西汀
4. 抗惊厥药: 卡马西平、丙戊酸

在一个实施方案中,本发明因此可以提供治疗 RAGE 介导的疾病的方法,该方法包括对此需要的受试者施用与治疗剂组合的治疗上有效量的 RAGE 融合蛋白,所述治疗剂选自烷化剂、抗代谢药、植物生物碱、抗生素、激素、生物应答调节剂、止痛剂、NSAIDs、DMARDs、糖皮质激素、磺脲类、双胍类、胰岛素、胆碱酯酶抑制剂、抗精神病药、抗抑郁药以及抗惊厥药。在一个进一步的实施方案中,本发明提供了如上所述的本发明药物组合物,其进一步包含一种或多种治疗剂,所述治疗剂选自烷化剂、抗代谢药、植物生物碱、抗生素、激素、生物应答调节剂、止痛剂、NSAIDs、DMARDs、糖皮质激素、磺脲类、双胍类、胰岛素、胆碱酯酶抑制剂、抗精神病药、抗抑郁药以及抗惊厥药。

实施例

在接下来的实施例中进一步举例说明了本发明所涵盖的发明构思的特征和优点。

实施例 1: RAGE-IgG Fc 融合蛋白的产生

构建两种质粒用于表达 RAGE-IgG Fc 融合蛋白。通过将不同长度的来自人 RAGE 的 5' cDNA 序列与来自人 IgG Fc ($\gamma 1$) 的相同的 3' cDNA 序列进行连接来构建这两种质粒。然后将这些表达序列(即连接产物)插入到 pcDNA3.1 表达载体(Invitrogen, CA)中。图 2 和 3 中显示了编码融合蛋白编码区的核酸序列。对于 TTP-4000 融合蛋白,核酸序列 1-753(以粗体突出)编码 RAGE N-末端蛋白质序列,而核酸序列 754-1386 编码 IgG Fc 蛋白质序列(图 2)。对于 TTP-3000,

核酸序列 1-408 (以粗体突出) 编码 RAGE N-末端蛋白质序列, 而核酸序列 409-1041 编码 IgG Fc 蛋白质序列 (图 3)。

为了产生 RAGE 融合蛋白, 将包含 SEQ ID NO: 30 或 SEQ ID NO: 31 的核酸序列的表达载体稳定地转染到 CHO 细胞中。就由质粒所赋予的新霉素抗性挑选出阳性转化子并进行克隆。将通过上清液的 Western 印迹分析而检测为高产克隆进行扩增, 并利用 A 蛋白柱通过亲和层析纯化基因产物。对表达进行优化从而使得细胞以约 1.3 克/升的水平产生重组 TTP-4000。

图 4-6 中图解说明了表达出的编码这两种融合蛋白的多肽。对于 TTP-4000 的四结构域结构, 最初的 251 个氨基酸 (在图 4 中以粗体显示) 包含人 RAGE 蛋白的信号序列 (1-22/23)、V 免疫球蛋白 (和配体结合) 结构域 (23/24-116)、第二个域间连接体 (117-123)、第二个免疫球蛋白结构域 (C_H1) (124-221) 以及第二个连接体 (222-251) (图 4, 6B)。序列 252-461 包含 IgG C_H2 和 C_H3 免疫球蛋白结构域。

对于 TTP-3000 的三结构域结构, 最初的 136 个氨基酸 (以粗体显示) 包含人 RAGE 蛋白的信号序列 (1-22/23)、V 免疫球蛋白 (和配体结合) 结构域 (23/24-116) 以及域间连接体序列 (117-136) (图 5, 6B)。此外, 对于 TT3, 序列 137-346 包含 IgG 的 C_H2 和 C_H3 免疫球蛋白结构域。

实施例 2: 测试 RAGE-IgG1 融合蛋白的活性的方法

A. 体外配体结合:

将已知的 RAGE 配体以 5 克/孔的浓度包被在 Maxisorb 板表面上。板在 4℃ 孵育过夜。配体孵育后, 吸出板中的液体, 和在室温下向板中加入含 1% BSA 的 50 mM 咪唑缓冲液 (pH 7.2) 这样的封闭缓冲液并保持 1 小时。然后吸出板中液体和/或用洗涤缓冲液 (20 mM 咪唑、150 mM NaCl、0.05% Tween-20、5 mM CaCl₂ 和 5 mM MgCl₂, pH 7.2) 洗涤。制备起始浓度为 1.082 mg/mL 的 TTP-3000 (TT3) 溶液和起始浓

度为 370 $\mu\text{g/mL}$ 的 TTP-4000 (TT4) 溶液。以增加的起始样品的稀释度加入融合蛋白。允许 RAGE 融合蛋白与固定的配体一起在 37°C 孵育 1 小时，孵育后对板进行洗涤并就融合蛋白的结合进行检测。通过添加免疫检测复合物来检测结合，所述免疫检测复合物包含以 1:11,000 稀释至最终测定浓度 (FAC) 为 21 ng/100 μL 的单克隆小鼠抗人 IgG1、以 1:500 稀释至 FAC 为 500 ng/ μL 的生物素化的山羊抗小鼠 IgG 以及连接有抗生物素蛋白的碱性磷酸酶。所述复合物与所述固定的融合蛋白一起在室温下孵育 1 小时，随后对板进行洗涤并加入碱性磷酸酶底物磷酸对硝基苯酯 (PNPP)。通过测量 PNPP 至对硝基苯酚 (PNP) 的转化，可以量化所述复合物与所述固定的融合蛋白的结合，所述转化通过分光光度法在 405 nm 处进行测量。

如图 7 中图解说明的，融合蛋白 TTP-4000 (TT4) 和 TTP-3000 (TT3) 与已知的 RAGE 配体淀粉样蛋白- β (Abeta)、S100b (S100) 和两性蛋白 (Ampho) 特异性地相互作用。在不存在配体时，即仅用 BSA 包被 (BSA 或 BSA + 洗涤) 时，吸光度没有增加而超过由免疫检测复合物非特异性结合引起的水平。当淀粉样蛋白 β 用作标记的配体时，可能需要在测定前预孵育淀粉样蛋白 β 。预孵育可以允许淀粉样蛋白 β 自聚集成褶皱片形式，因为褶皱片形式的淀粉样蛋白 β 可以优先与 RAGE 结合。

RAGE 融合蛋白 TTP-4000 和 TTP-3000 与 RAGE 配体之间特异性相互作用的另外证据在显示 RAGE 配体能够与已知的 RAGE 配体有效地竞争结合融合蛋白的研究中例证。在这些研究中，如上所述将淀粉样蛋白- β (A- β) 固定在 Maxisorb 板上并加入融合蛋白。此外，将 RAGE 配体与融合蛋白同时加入到某些孔中。

发现当 TTP-4000 以 123 $\mu\text{g/mL}$ 存在时 (1:3 稀释，图 8)，RAGE 配体可以以约 25% - 30% 的程度阻断 TTP-4000 (TT4) 结合。当 TTP-4000 起始溶液以 10 或 30 倍进行稀释时 (1:10 或 1:30)，融合蛋白与固定的配体的结合被 RAGE 配体完全抑制。类似地，当 TTP-3000 以 360 $\mu\text{g/mL}$ 存在时 (1:3 稀释，图 9)，RAGE 配体以约 50% 的程

度阻断 TTP-3000 (TT3) 结合。当 TTP-3000 起始溶液以 10 倍进行稀释时 (1:10), 融合蛋白与固定的配体的结合被 RAGE 配体完全抑制。因此, RAGE 融合蛋白与 RAGE 配体的特异性结合是剂量依赖性的。此外, 如图 8 和 9 中所示, 在不存在融合蛋白时, 即只使用免疫检测复合物 (“单独的复合物”), 基本上检测不到结合。

B. RAGE 融合蛋白在基于细胞的测定中的效用

先前的工作已显示, 骨髓 THP-1 细胞可以响应 RAGE 配体而分泌 TNF- α 。在这个测定中, 利用 ATCC 提供的规程, 在补充有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养 THP-1 细胞。在不存在和存在融合蛋白 TTP-3000 (TT3) 或 TTP-4000 (TT4) ($10\mu\text{g}$)、sRAGE ($10\mu\text{g}$) 和人 IgG ($10\mu\text{g}$) (即, 作为阴性对照) 的情况下, 使用 0.1mg/ml S100b 诱导细胞经由 RAGE 的刺激而分泌 TNF- α 。在蛋白质加到细胞培养物中之后 24 小时, 利用商业上可获得的用于 TNF- α 的 ELISA 试剂盒 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 测量由 THP-1 细胞分泌的 TNF- α 的量。图 10 中的结果证实, 融合蛋白在这些细胞中抑制 S100b/RAGE 诱导的 TNF- α 的产生。如图 10 中所示, 加入 $10\mu\text{g}$ TTP-3000 或 TTP-4000 RAGE 融合蛋白后, 由 S100b (0.1mg/ml FAC) 对 TNF- α 的诱导分别减少了约 45%-70%。融合蛋白 TTP-4000 在阻断 TNF- α 的 S100b 诱导方面至少与 sRAGE 一样有效 (图 10)。将 IgG 单独加入到经 S100b 刺激的细胞中的实验显示了对于 TTP-4000 和 TTP-3000 的 RAGE 序列的抑制特异性。IgG 和 S100b 加入到该测定中显示与 S100b 单独时相同的 TNF- α 水平。将 IgG 单独加入到经 S100b 刺激的细胞中的实验显示了, 就融合蛋白的 RAGE 序列来说 TTP-4000 和 TTP-3000 抑制 TNF- α 诱导的特异性。可以看出, 在测定中加入 IgG 即没有 RAGE 序列的人 IgG (以 $10\mu\text{g/孔}$ 加入 Sigma 人 IgG) 和 S100b 显示与 S100b 单独时相同的 TNF- α 水平。

实施例 3: TTP-4000 的药代动力学特性

为了确定 TTP-4000 与人 sRAGE 比较是否具有更优良的药代动力

学特性，对大鼠和非人灵长类给予 TTP - 4000 静脉内（IV）注射（5mg/kg），并随后就 TTP - 4000 的存在对血浆进行评估。在这些实验中，两只首次用于实验的雄猴在外周静脉中接受了单次 IV 大剂量的 TTP - 4000 (5mg/ml/kg)，随后为大约 1.0 毫升（mL）的盐水冲洗（flush）。在按剂量给药前（即，注射 TTP - 4000 之前）或在按剂量给药后 0.083、0.25、0.5、2、4、8、12、24、48、72、96、120、168、240、288 和 336 小时将血液样品（大约 1.0 mL）收集到含肝素锂的管中。收集后，将管放置在湿冰上（最多 30 分钟）直至在冷却（在 2 - 8℃）下以 1500 × g 离心 15 分钟。然后将每个收获的血浆样品冷冻贮存（-70℃ ± 10℃）直至如实施例 6 中所述利用 ELISA 在注射后的不同时间点上就 RAGE 多肽进行测定。

图 11 中所示的动力学特性曲线显示，一旦 TTP - 4000 已使其配体饱和（如在两个动物中由 α 阶段的相当陡的斜率所证明的），它就保持大于 300 小时的终末半寿期。这个半寿期明显大于人 sRAGE 在血浆中的半寿期（一般约 2 小时），并提供了对于急性和半慢性适应症进行单次注射的机会。在图 11 中，每条曲线代表在相同实验条件下的不同的动物。

实施例 4: TTP - 4000 Fc 激活

进行实验以测量与人 IgG 相比较 RAGE 融合蛋白 TTP - 4000 对于 Fc 受体的激活。通过测量表达 Fc 受体的 THP-1 细胞的 TNF-α 分泌来测量 Fc 受体的激活。在这些实验中，用 10 μg/孔的 TTP - 4000 或人 IgG 包被 96 孔板。Fc 刺激导致 TNF-α 分泌。通过酶联免疫吸附测定（ELISA）测量 TNF-α 的量。

因此，在这个测定中，根据 ATCC 的指导在补充有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中维持骨髓细胞株 THP-1（ATTC # TIB-202）。一般地，通过用 10 μg /孔的热聚集的（63℃，30 分钟）TTP - 4000 或人 IgG1 预包被孔，经由 Fc 受体刺激来诱导每孔 40,000-80,000 个细胞分泌 TNF-α。利用商业上可获得的 TNF ELISA 试剂盒（R&D Systems,

Minneapolis, MN # DTA00C) 并根据用法说明书, 在从经处理的孔中的 24 小时细胞培养物收集的上清液之中测量由 THP-1 细胞分泌的 TNF- α 的量。

结果显示于图 12 中, 其中可以看出 TTP-4000 产生少于 2 ng/孔的 TNF, 和 IgG 产生大于 40 ng/孔的 TNF。

实施例 5: TTP-4000 的体内活性

在几种人类疾病的体内模型中将 TTP-4000 的活性与 sRAGE 进行比较。

A. 在再狭窄动物模型中的 TTP-4000

在再狭窄的糖尿病大鼠模型中评估 RAGE 融合蛋白 TTP-4000, 其中涉及在血管损伤 21 天后测量平滑肌增殖和内膜扩张。在这些实验中, 使用标准操作程序在 Zucker 糖尿病和非糖尿病大鼠中进行左颈总动脉的球囊损伤 (balloon injury)。在损伤前 1 天腹膜内施用负荷剂量 (3mg/大鼠) 的 IgG、TTP-4000 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。损伤后每隔 1 天输送维持剂量直至第 7 天 (即, 在损伤后第 1、3、5 和 7 天)。维持剂量对于一个组高至 1 mg/动物, 对于第二个组低至 0.3 mg/动物。为了测量血管平滑肌细胞 (VSMC) 增殖, 在损伤后 4 天和 21 天处死动物。

为了测量细胞增殖, 4 天的动物在安乐死前 18、12 和 2 小时接受 50 mg/kg 的溴脱氧尿苷 (BrdU) 的腹膜内注射。处死后, 收获整个左和右颈动脉。包埋前样本在 Histochoice 中贮存至少 24 小时。利用小鼠抗 BrdU 单克隆抗体进行 VSMC 增殖的评估。应用荧光标记的山羊抗小鼠二抗。由对治疗方案毫不知情的两名观测者对每个切片的 BrdU-阳性细胞核数目进行计数。

剩余的大鼠在 21 天时被处死用于形态测定分析。由对研究组毫不知情的观测者利用计算机化的数字显微镜测面积法软件 Image-Pro Plus 对经 Van Gieson 染色法染色的颈动脉连续切片 (相隔 5 mm) 进行形态测定分析。所有数据表示为平均值 $\pm$ SD。使用 SPSS 软件进行统

计学分析。使用不成对 t 检验比较连续变量。 $P \leq 0.05$ 的值被认为具有统计学显著性。

如图 13A 和 13B 中所示, TTP-4000 处理以剂量-响应的方式显著减少了内膜/中膜比以及血管平滑肌细胞增殖。在图 13B 中, y 轴代表 BrdU 增殖性细胞的数目。

B. 在 AD 动物模型中的 TTP-4000

进行实验以评估 TTP-4000 在 AD 小鼠模型中是否能影响淀粉样蛋白形成和认知障碍。实验采用在 PDGF-B 链启动子控制下表达人 Swedish 突变型淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 的转基因小鼠。随着时间过去, 这些小鼠产生高水平的 RAGE 配体、淀粉样蛋白 β ($A\beta$)。早先, 3 个月的 sRAGE 处理已显示减少了大脑中淀粉样蛋白斑的形成并且在这个模型中减少了炎性标记物的相关增加。

通过在血小板衍生生长因子 B (PDGF-B) 链基因启动子控制下将人 APP 基因 (含 Swedish 和 London 突变) 微注射到小鼠卵细胞中来设计在这个实验中使用的 APP 小鼠 (雄性)。小鼠在 C57BL/6 背景下产生并由 Molecular Therapeutics Inc. 培育。让动物随意取食并通过兄弟姐妹交配进行维持。从这个构建体产生的小鼠在 6 个月大时开始形成淀粉样蛋白沉积物。让动物活 6 个月, 然后维持 90 天并处死用于定量淀粉样蛋白。

6 个月大时开始每隔 1 天 [qod (i. p.)] 对 APP 转基因小鼠施用媒介物或 TTP-4000 至 90 天。在实验结束时, 处死动物并检查大脑中的 $A\beta$ 斑负荷量 (即, 斑数目)。使用 6 个月的对照 APP 组来确定淀粉样蛋白沉积物的基线。此外, 在研究结束时, 对动物实施行为 (Morris 水迷宫) 分析。调查者对研究化合物毫不知情。样品以 0.25 ml/小鼠/每隔 1 天的方式给予小鼠。此外, 一组小鼠给予 200 μ g/天的人 sRAGE。

1. 淀粉样蛋白 β 沉积

关于组织学检查, 通过腹膜内注射 (IP) 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 来麻醉动物。动物经颈动脉灌注 4°C 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 随后为 4% 的低聚甲醛。取出大脑并放置在 4% 的低聚甲醛中过夜。用石蜡处

理大脑并进行包埋。获得 10 个穿过大脑的厚度为 $30\ \mu\text{m}$ 的连续切片。在 4°C 对切片施加一抗过夜 ($\text{A}\beta$ 肽抗体) 以便检测转基因动物大脑中的淀粉样蛋白沉积物 (Guo 等人, *J. Neurosci.*, 22:5900-5909 (2002))。用 Tris 缓冲盐水 (TBS) 洗涤切片, 和加入二抗并在室温下孵育 1 小时。洗涤后, 如 Vector ABC Elite 试剂盒 (Vector Laboratories) 中所指导的对切片进行孵育, 并用二氨基苯甲酸 (DAB) 染色。在水中停止反应, 并在用二甲苯处理后盖上盖玻片。用计算机辅助图像分析系统测定每个切片中的淀粉样蛋白面积, 所述系统由装备有 Quick Capture 帧接收卡的 Power Macintosh 计算机、架在 Olympus 显微镜上的 Hitachi CCD 照相机以及相机架组成。使用 NIH Image Analysis Software, v.1.55。捕获图像并测定 10 个切片上淀粉样蛋白的总面积。由对处理状况毫不知情的单名操作者进行所有测量。对切片的淀粉样蛋白体积进行总计并除以切片总数, 以计算淀粉样蛋白体积。

对于定量分析, 利用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测量 APP 转基因小鼠大脑中的人总 $\text{A}\beta$ 、 $\text{A}\beta_{\text{总}}$ 和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的水平 (Biosource International, Camarillo, CA)。如厂商所述, 通过盐酸胍从小鼠大脑中提取 $\text{A}\beta_{\text{总}}$ 和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 并进行定量。这个测定从大脑中提取了总 $\text{A}\beta$ 肽 (溶解的和聚集的)。

2. 认知功能

Morris 水迷宫测试如下进行: 在实验结束时在 Morris 水迷宫测试中对所有小鼠进行一次测试。在 1.2 m 开放场所水迷宫中训练小鼠。池中装入 30 cm 深的水并保持在 25°C 。逃离平台 (10 平方厘米) 放置在水面下方 1 厘米。在试验过程中, 从池中移开平台。在用白幕环绕以隐藏任何迷宫外线索 (extra-maze cue) 的池中进行经提示的测试。所有动物接受连续 3 天的非空间预训练 (NSP)。这些试验是为了准备动物以用于最终的行为测试作, 从而确定找到平台的记忆保留。这些试验没有被记录, 而是仅用于训练目的。对于训练和学习研究, 为了迷宫外线索去除幕布 (这允许鉴别有游泳障碍的动物)。在第 1 天,

将小鼠放置在隐藏的平台 20 秒（试验 1），对于试验 2-3 在水中在距离提示的平台或隐藏的平台（试验 4）10 厘米处释放动物并允许游泳至平台。在试验的第 2 天，隐藏的平台在池中心或每个四分之一区的中心之间随机移动。将动物释放到池中，随机面对壁，并允许 60 秒到达平台（3 次试验）。在第 3 次试验中，动物给予 3 次试验，2 次用隐藏的平台而 1 次用提示的平台。NSP 之后 2 天，对动物实施最后的行为试验（Morris 水迷宫测试）。对于这些试验（3 次/动物），将平台放置在池的一个四分之一区的中心，并随机地以面对壁的方式释放动物。允许动物有 60 秒（潜伏期，发现平台花费的时间）的时间发现平台或游泳。在 4-6 小时的按剂量给药中测试所有动物，并由对测试组毫不知情的操作者随机选择用于测试。

结果表示为平均值 $\pm$ 标准差（SD）。利用 t-检验分析淀粉样蛋白研究和行为研究中的差异显著性。在 6 个月大的 APP 对照组和 TTP-4000 处理的动物之间，以及 9 个月大的 APP 媒介物处理组和 TTP-4000 处理组之间进行比较。小于 0.05 的差异被认为是显著的。通过获取每组数据的总和并除以比较（即，1, i. p. / 6 个月的对照 = % 变化）来确定淀粉样蛋白和行为的变化的百分数。

图 14A 和 14B 显示，与经媒介物和阴性对照人 IgG1（IgG1）处理的动物相比，用 TTP-4000 或小鼠 sRAGE 处理 3 个月的小鼠具有较少的 A β 斑和较少的认知障碍。这个数据提示，TTP-4000 在转基因小鼠模型中于减少 AD 病理方面是有效的。还发现，与 sRAGE 相似，TTP-4000 可以减少炎性细胞因子 IL-1 和 TNF- α （数据未显示）。

C. TTP-4000 在中风动物模型中的有效性

TTP-4000 还在疾病相关的中风动物模型中与 sRAGE 进行比较。在这个模型中，结扎小鼠的颈中动脉 1 小时随后再灌注 23 小时，在那时处死小鼠并评估大脑中的梗塞面积。在即将进行再灌注之前用 sRAGE 或 TTP-4000 或对照免疫球蛋白处理小鼠。

在这些实验中，对雄性 C57BL/6 注射 250 μ l/小鼠的媒介物或 TTP 测试品（250 μ l/小鼠的 TTP-3000、TTP-4000）。在局部缺血开始

后 1 小时, 小鼠接受腹膜内注射。对小鼠实施 1 小时的脑缺血, 随后为 24 小时的再灌注。为了诱导局部缺血, 将每只小鼠进行麻醉并通过外部加温将体温维持在 36 - 37℃。通过在颈部的中线切口暴露左颈总动脉 (CCA)。将微型手术夹放置在颈内动脉 (ICA) 的起点周围。用丝线结扎 ECA 远端并进行横切。将 6-0 丝线松散地系在 ECA 残干周围。将尼龙缝线的用火烧过而变光的末端轻轻地插入 ECA 残干中。将 6-0 丝线圈在残干周围勒紧, 并使尼龙缝线向前进入并穿过颈内动脉 (ICA), 直至其停留在大脑前动脉中, 从而堵塞大脑前交通动脉和大脑中动脉。尼龙缝线放置 1 小时后, 将动物再次麻醉, 记录直肠温度并去除缝线和闭合切口。

通过腹膜内注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉动物并随后取出大脑, 来测定梗塞体积。然后将大脑切成 4 个穿过梗塞区的 2 毫米切片, 并在 2% 的氯化三苯基四氮唑 (TTC) 中放置 30 分钟。此后, 将切片放置在 4% 低聚甲醛中过夜。用计算机辅助图像分析系统确定每个切片中的梗塞面积, 所述系统由装备有 Quick Capture 帧接收卡的 Power Macintosh 计算机、架在相机架上的 Hitachi CCD 照相机组成。使用 NIH Image Analysis Software, v.1.55。捕获图像并确定所述切片上的梗塞总面积。由对处理状况毫不知情的单名操作者进行所有测量。对切片的梗塞体积进行总计从而计算出总梗塞体积。结果表示为平均值 ± 标准差 (SD)。利用 t-检验分析梗塞体积的差异显著性。

如表 2 中的数据所举例说明的, TTP-4000 在限制这些动物的梗塞面积方面比 sRAGE 更有效, 提示 TTP-4000 由于其在血浆中更佳的半寿期, 从而能够在这些小鼠中维持更大的保护。

实施例 6: 通过 ELISA 检测 RAGE 融合蛋白

最初, 50 μ l RAGE 特异性单克隆抗体 1HB1011 以在 1×PBS pH 7.3 中 10 μ g/mL 的浓度经由过夜孵育而包被在板上。当准备使用时, 用 300 μ L 的 1×咪唑-Tween 洗涤缓冲液将板洗涤 3 次并用 1% BSA 封闭。以 100 μ L 的终体积加入样品(稀释的)和标准稀释度的已知 TTP-4000

稀释物。允许样品在室温下孵育 1 小时。孵育后，将板洗涤 3 次。加入在含 1% BSA 的 1×PBS 中的山羊抗人 IgG1 (Sigma A3312) AP 缀合物并允许在室温下孵育 1 小时。将板洗涤 3 次。用磷酸对硝基苯酯显示颜色。

实施例 7: 与 RAGE 融合蛋白结合的 RAGE 配体的定量

图 15 显示 TTP-4000 与各种固定的已知 RAGE 配体的饱和结合曲线。将配体固定在微量滴定板上，并在浓度从 0 增加到 360 nM 的融合蛋白存在下进行孵育。利用与碱性磷酸酶缀合的多克隆抗体来检测融合蛋白-配体相互作用，所述多克隆抗体对融合嵌合体的 IgG 部分特异。利用 Graphpad Prizm 软件并与 RAGE-RAGE 配体值的确定文献值进行比较，从而计算出相对的 Kds。HMGB1 = Amptoterin, CML = 羧甲基赖氨酸, A beta = 淀粉样蛋白 β 1-40。

以上所述被视为仅例证本发明的原则。因为众多修改和变化对于本领域技术人员来说将是很容易想到的，所以并不希望将本发明限制于所显示和描述的确切实施方案，并且包括在所附权利要求书范围内的所有合适的修改方案和等价方案均被视为在本发明的构思之内。

<110> TransTech Pharma, Inc.

<120> RAGE 融合蛋白及使用方法

<130> 41305-318282

<150> US 60/598,362

<151> 2004-08-03

<160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 404

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
 100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
 115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
 130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
 145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
 165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
 180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
 195 200 205

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
 210 215 220

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
 245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
 260 265 270

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
275 280 285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
290 295 300

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
325 330 335

Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly
340 345 350

Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg
355 360 365

Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu
370 375 380

Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser
385 390 395 400

Thr Gly Gly Pro

- <210> 2
- <211> 382
- <212> PRT
- <213> 智人
- <400> 2

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
 85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
 100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
 115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
 130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
 165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
 180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
 195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
 210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro
 225 230 235 240

Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu
 245 250 255

Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln
 260 265 270

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
 275 280 285

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
 290 295 300

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
 305 310 315 320

Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile
 325 330 335

Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys
 340 345 350

Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln
 355 360 365

Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
 370 375 380

<210> 3
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala
225 230 235 240

Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp
260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
275 280 285

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu
305 310 315 320

Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly
325 330 335

Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala
340 345 350

Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser
355 360 365

Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser Thr Gly Gly Pro
370 375 380

<210> 4
<211> 339
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu

	50						55									60			
Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Pro				
65					70					75					80				
Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala	Val	Gly	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Ile				
				85					90						95				
Phe	Arg	Cys	Gln	Ala	Met	Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn				
			100					105						110					
Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp				
		115					120						125						
Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Cys				
	130					135						140							
Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Trp	His	Leu	Asp				
145					150						155				160				
Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Pro	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Lys	Glu	Gln				
				165						170					175				
Thr	Arg	Arg	His	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu				
			180						185					190					
Met	Val	Thr	Pro	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Cys				
		195					200						205						
Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	Pro	Arg	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro				
	210					215						220							
Ile	Gln	Pro	Arg	Val	Trp	Glu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Gln	Leu				

225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
260 265 270

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
275 280 285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
290 295 300

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
325 330 335

Gly Leu Gly

<210> 5
<211> 317
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro
225 230 235 240

Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu
245 250 255

Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln
260 265 270

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
275 280 285

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
290 295 300

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
305 310 315

<210> 6
<211> 316
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
 115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
 130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
 180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
 195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala
225 230 235 240

Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp
260 265 270

Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro Gln
275 280 285

Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly
290 295 300

Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly
305 310 315

<210> 7
<211> 94
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg
85 90

<210> 8
<211> 93
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg

85

90

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys

1

5

10

15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys

20

25

30

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys

1

5

10

15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys

20

25

<210> 11

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn

1

5

10

15

Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu
20 25 30

Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val
35 40 45

Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr
50 55 60

Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg
65 70 75 80

Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala
85 90 95

Leu Arg

- <210> 12
- <211> 91
- <212> PRT
- <213> 智人

<400> 12

Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val
1 5 10 15

Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr
20 25 30

Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met Lys Asp
35 40 45

Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu

50	55	60	
Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser			
65	70	75	80
Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser			
	85	90	
<210> 13			
<211> 101			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 13			
Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys			
1	5	10	15
Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn			
	20	25	30
Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly			
	35	40	45
Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu			
	50	55	60
Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met			
65	70	75	80
Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr			
	85	90	95
Gln Ile Pro Gly Lys			
	100		

<210> 14
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 14

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys
 100

<210> 15
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
 85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
 100 105 110

Ala Gly

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr

20					25					30						
Gly	Arg	Thr	Glu	Ala	Trp	Lys	Val	Leu	Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	
35					40					45						
Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Pro	Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	
50					55					60						
Ala	Val	Gly	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Ile	Phe	Arg	Cys	Gln	Ala	Met	Asn	
65					70					75					80	
Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	Gln	
85					90					95						
Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	
100					105					110						
Gly																
<210> 17																
<211> 204																
<212> PRT																
<213> 智人																
<400> 17																
Ala	Gln	Asn	Ile	Thr	Ala	Arg	Ile	Gly	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Lys	Cys	
1	5				10					15						
Lys	Gly	Ala	Pro	Lys	Lys	Pro	Pro	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Lys	Leu	Asn	
20					25					30						
Thr	Gly	Arg	Thr	Glu	Ala	Trp	Lys	Val	Leu	Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Gly	
35					40					45						

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
195 200

<210> 18

<211> 203

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
 20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
 85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
 100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
 115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
 130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
 165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
 180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln
 195 200

<210> 19
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 19

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
 85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro
225

<210> 20
<211> 228
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys

1	5	10	15
Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr			
	20	25	30
Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro			
	35	40	45
Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro			
	50	55	60
Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn			
65		70	75 80
Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln			
	85	90	95
Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala			
	100	105	110
Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro			
	115	120	125
Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn			
	130	135	140
Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr			
145		150	155 160
Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly			
	165	170	175
Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro			

180	185	190
Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu		
195	200	205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly		
210	215	220

Ala Val Ala Pro
225

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys
1 5

<210> 22
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu
1 5 10 15

Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro
20 25 30

<210> 23
<211> 20
<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu
1 5 10 15

Leu Thr Ala Gly
20

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Thr Ala Pro Ile Gln
1 5

<210> 25

<211> 354

<212> DNA

<213> 智人

<400> 25

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctgggcc tcagtctgtg gggggcagta 60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccgatt ggcgagccac tggctgtgaa gtgtaagggg 120
gcccccaaga aaccacccca gcggttgaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc cctgggaca gtgtggctcg tgccttccc 240
aacggctccc tcttcttccc ggtgtcgagg atccaggatg aggggatitc ccggtgccag 300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctac 354

<210> 26

<211> 369

<212> DNA
<213> 智人

<400> 26

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccgatt ggcgagccac tggctgctgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc cctgggaca gtgtggctcg tgccttccc	240
aacggctccc tcttcttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt	360
cctgggaag	369

<210> 27
<211> 408
<212> DNA
<213> 智人

<400> 27

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccgatt ggcgagccac tggctgctgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc cctgggaca gtgtggctcg tgccttccc	240
aacggctccc tcttcttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt	360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggtcgtg	408

<210> 28
<211> 690
<212> DNA
<213> 智人

<400> 28

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccgatt ggcgagccac tggctgtgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggttgaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tggaaggctc tgtctccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc	240
aacggctccc tcttcttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctaccagatt	360
cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctggtgt tccaataag	420
gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcaattggat	480
gggaagcccc tggctcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac	540
cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgacccagc ccggggagga	600
gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttcccagaca ccgggccttg	660
cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg	690

<210> 29

<211> 753

<212> DNA

<213> 智人

<400> 29

atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctggtcc tcagtctgtg gggggcagta	60
gtaggtgctc aaaacatcac agcccgatt ggcgagccac tggctgtgaa gtgtaagggg	120
gcccccaaga aaccacccca gcggttgaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct	180
tggaaggctc tgtctccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc	240
aacggctccc tcttcttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag	300
gcaatgaaca ggaatggaaa ggagaccaag tccaactacc ggtccgtgt ctaccagatt	360

cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctgggtgt tccaataag 420
 gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat 480
 gggaagcccc tggcgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgaccccagc ccggggagga 600
 gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca ccgggccttg 660
 cgcacagccc ccateccagc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg 720
 gtggtggagc cagaagggtg agcagtagct cct 753

<210> 30
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 智人

<400> 30
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gcgctgggcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggctgtgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180
 tggaaggtcc tgtctcccca gggaggaggc ccctgggaca gtgtggctcg tgccttccc 240
 aacggctccc tcttccttcc ggctgtcggg atccaggatg aggggatttt ccggtgccag 300
 gcaatgaaca ggaatgaaa ggagaccaag tccaactacc gagtccgtgt ctaccagatt 360
 cctgggaagc cagaaattgt agattctgcc tctgaactca cggctgggtgt tccaataag 420
 gtggggacat gtgtgtcaga ggggagctac cctgcaggga ctcttagctg gcacttggat 480
 gggaagcccc tggcgcctaa tgagaaggga gtatctgtga aggaacagac caggagacac 540
 cctgagacag ggctcttcac actgcagtcg gagctaattg tgaccccagc ccggggagga 600

gatccccgtc ccaccttctc ctgtagcttc agcccaggcc ttccccgaca cggggccttg	660
cgcacagccc ccatccagcc ccgtgtctgg gagcctgtgc ctctggagga ggtccaattg	720
gtggtggagc cagaaggagg agcagtagct cctccgtcag tcttctctt cccccaaaa	780
cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg	840
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat	900
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc	960
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa	1020
gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca	1080
caggtgtaca ccctgcccc atcccggtat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc	1140
tgcctgtgta aaggcttcta tccagcgac atgccgtgg agtgggagag caatgggcag	1200
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc	1260
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc	1320
gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt	1380
aatga	1386

<210> 31
 <211> 1041
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 智人

<400> 31
 atggcagccg gaacagcagt tggagcctgg gtgctgggcc tcagtctgtg gggggcagta 60
 gtaggtgctc aaaacatcac agcccggatt ggcgagccac tggtagctgaa gtgtaagggg 120
 gcccccaaga aaccacccca gcggctggaa tggaaactga acacaggccg gacagaagct 180

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
210 215 220

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 33
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 智人

<400> 33

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr
115 120 125

Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro
130 135 140

Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu
145 150 155 160

Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg
165 170 175

Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu
180 185 190

Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp
195 200 205

Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly
210 215 220

Gly Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 34

<211> 438

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 34

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro
115 120 125

Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn
130 135 140

Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln Thr Arg Arg His Pro Glu Thr
145 150 155 160

Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu Met Val Thr Pro Ala Arg Gly
165 170 175

Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro
180 185 190

Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu
195 200 205

Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu Val Val Glu Pro Glu Gly Gly
210 215 220

Ala Val Ala Pro Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
225 230 235 240

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
245 250 255

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
260 265 270

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
275 280 285

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
340 345 350

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
355 360 365

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
370 375 380

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
385 390 395 400

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
405 410 415

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
420 425 430

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435

<210> 35
<211> 346
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 35

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
145 150 155 160

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
165 170 175

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
180 185 190

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
195 200 205

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
210 215 220

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
225 230 235 240

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
245 250 255

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
260 265 270

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
275 280 285

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
290 295 300

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
305 310 315 320

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345

<210> 36
<211> 324
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 36

Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15

Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
20 25 30

Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
35 40 45

Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
50 55 60

Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
65 70 75 80

Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
85 90 95

Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
100 105 110

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
115 120 125

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
130 135 140

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
145 150 155 160

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
165 170 175

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
245 250 255

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
260 265 270

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
275 280 285

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
290 295 300

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

- <210> 37
- <211> 323
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 智人

<400> 37

Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys
1 5 10 15

Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr
20 25 30

Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro
50 55 60

Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln
85 90 95

Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala
100 105 110

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
115 120 125

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
130 135 140

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
145 150 155 160

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
165 170 175

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
195 200 205

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
210 215 220

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
225 230 235 240

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
245 250 255

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
260 265 270

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
275 280 285

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
290 295 300

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
305 310 315 320

Pro Gly Lys

<210> 38

<211> 210

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
1 5 10 15

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
20 25 30

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

35	40	45
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
50	55	60
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
65	70	75
		80
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	85	90
		95
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
100	105	110
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
115	120	125
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
130	135	140
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
145	150	155
		160
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	165	170
		175
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
180	185	190
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
195	200	205
Gly Lys		

210

<210> 39
<211> 633
<212> DNA
<213> 智人

<400> 39
ccgtcagtct tcttcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 60

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 120

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 180

agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 240

gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 300

aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 360

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 420

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 480

ctggactccg acggctcctt ctccctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 540

cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 600

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 633

<210> 40
<211> 220
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

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

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

195	200	205
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
210	215	220
<210> 41		
<211> 663		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 41		
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga cgcgcagtct tectcttccc cccaaaaccc	60	
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc	120	
cacgaagacc ctgaggtcaa gtccaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	180	
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc	240	
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc	300	
ctcccagccc ccatcgagaa aacctctctc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	360	
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	420	
ctgggtcaaag gcttctatcc cagegacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	480	
gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt ctctctctac	540	
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	600	
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	660	
tga	663	
<210> 42		
<211> 113		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 42		

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 44
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
20 25

图1A

人RAGE (SEQ ID NO: 1)

```

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLT LALALGILGG
LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
TGGP

```

不含信号序列的人RAGE (SEQ ID NO: 2)

```

                                AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLT LALALGILGG
LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
TGGP

```

图1B

不含信号序列的人RAGE (SEQ ID NO: 3)

```

                                QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLT LALALGILGG
LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
TGGP

```

图1C

人sRAGE (SEQ ID NO: 4)

```

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
E
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

```

不含信号序列的人sRAGE (SEQ ID NO: 5)

```

                AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
E
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

```

不含信号序列的人sRAGE (SEQ ID NO: 6)

```

                QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
E
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

```

图1D

人RAGE V-结构域 (SEQ ID NO: 7)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

人RAGE V-结构域 (SEQ ID NO: 8)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

人RAGE的V-结构域片段 (SEQ ID NO: 9)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

人RAGE的V-结构域片段 (SEQ ID NO: 10)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WK

人RAGE氨基酸124-221 (SEQ ID NO: 11)

PEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL R

人RAGE氨基酸227-317 (SEQ ID NO: 12)

PRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPPLP PPSVLILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVS

人RAGE氨基酸23-123 (SEQ ID NO: 13)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

图1E

人RAGE氨基酸 24-123 (SEQ ID NO: 14)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

人RAGE氨基酸 23-136 (SEQ ID NO: 15)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

人RAGE氨基酸 24-136 (SEQ ID NO: 16)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

人RAGE氨基酸 23-226 (SEQ ID NO: 17)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQ

人RAGE氨基酸 24-226 (SEQ ID NO: 18)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL E WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQ

图1F

人RAGE氨基酸 23-251 (SEQ ID NO: 19)

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

人RAGE氨基酸 24-251 (SEQ ID NO: 20)

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSFLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

RAGE连接体 (SEQ ID NO: 21)

VYQIPGK

RAGE连接体 (SEQ ID NO: 22)

TAPIQPRVWE PVPLEEVQLV VEPEGGAVAP

RAGE连接体 (SEQ ID NO: 23)

VYQIPGKPEI VDSASELTAG

RAGE连接体 (SEQ ID NO: 24)

TAPIQ

图1G

编码人RAGE 1-118的DNA(SEQ ID NO: 25)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTAC

编码人RAGE 1-123的DNA(SEQ ID NO: 26)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAG

编码人RAGE 1-136的DNA(SEQ ID NO: 27)

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCA GCGGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
 CGGCTGGT

图 1H

编码人RAGE 1-230的DNA(SEQ ID NO:28)

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG

```

编码人RAGE 1-251的DNA(SEQ ID NO:29)

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAGCCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
CCT

```

图1I

部分人C_H2和C_H3结构域(SEQ ID NO: 38)

```

      PSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
LHNHYTQKSL SLSPGK

```

编码部分人C_H2和C_H3结构域的DNA (SEQ ID NO: 39)

```

      CCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGTT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCTCTG ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

```

人C_H2和C_H3结构域(SEQ ID NO: 40)

```

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

图1J

编码人C_H2和C_H3结构域的DNA (SEQ ID NO: 41)

```

CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAGACCAC
GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTTAC AGCAAGCTCA
CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
TCCGGGTAAA TGA

```

人C_H2结构域 (SEQ ID NO: 42)

```

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA
LPAPIEKTIS KAK

```

人C_H3结构域 (SEQ ID NO: 43)

```

GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

RAGE连接体 (SEQ ID NO: 44)

```

ISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLGT LA

```

图 2

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GCGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GCGGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCA GCGGCTGGAA
TGGAAGCTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGTCC TGTCTCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAATACT GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTGT TCCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGGAAGCCC TGGTGCCTAA
TGAGAAGGGA GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCAGC CCGGGGAGGA
GATCCCGTCC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCAGGCC TTCCCGACA
CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
CCTCCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT
CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGA GGTGCATAAT
GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC
ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCCTCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

```

RAGE-Fc (TTP-4000) 编码区的DNA序列 (SEQ ID NO: 30)

图 3

```

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAAC TACC GAGTCCGTGT
CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACTCA
CGGCTGGTCC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC
ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
GTGGTCAGCG TCCTCACCCT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA
GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA
CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG
CCCCCATCCC GGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG A

```

RAGE-Fc (TTP-3000)编码区的DNA序列 (SEQ ID NO: 31).

图 4

SEQ ID NO: 32

MAAGTAVGAW ALVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
 WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI
 SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ
 PENNYKTTTP VLDS DGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 33

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDS DGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 34

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLNTGRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSLEFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDS DGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

编码四结构域RAGE-Fc IgG融合蛋白的可选序列

图5

SEQ ID NO: 35

MAAGTAVGAW VLVL~~SL~~WGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL
WKLN~~TGR~~TEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGS~~LFL~~PAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL
 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS~~NKAL~~PAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTT~~PPV~~LDS
 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSV~~MHEA~~ LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 36

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLN~~TGR~~TEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGS~~LFL~~PAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVS~~NKAL~~PAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTT~~PPV~~LDS GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSV~~MHEA~~ LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 37

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRL WKLN~~TGR~~TEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGS~~LFL~~PAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVS~~NKAL~~PAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTT~~PPV~~LDS GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSV~~MHEA~~ LHNHYTQKSL SLSPGK

编码三结构域RAGE-Fc IgG融合蛋白的可选序列

图 6A

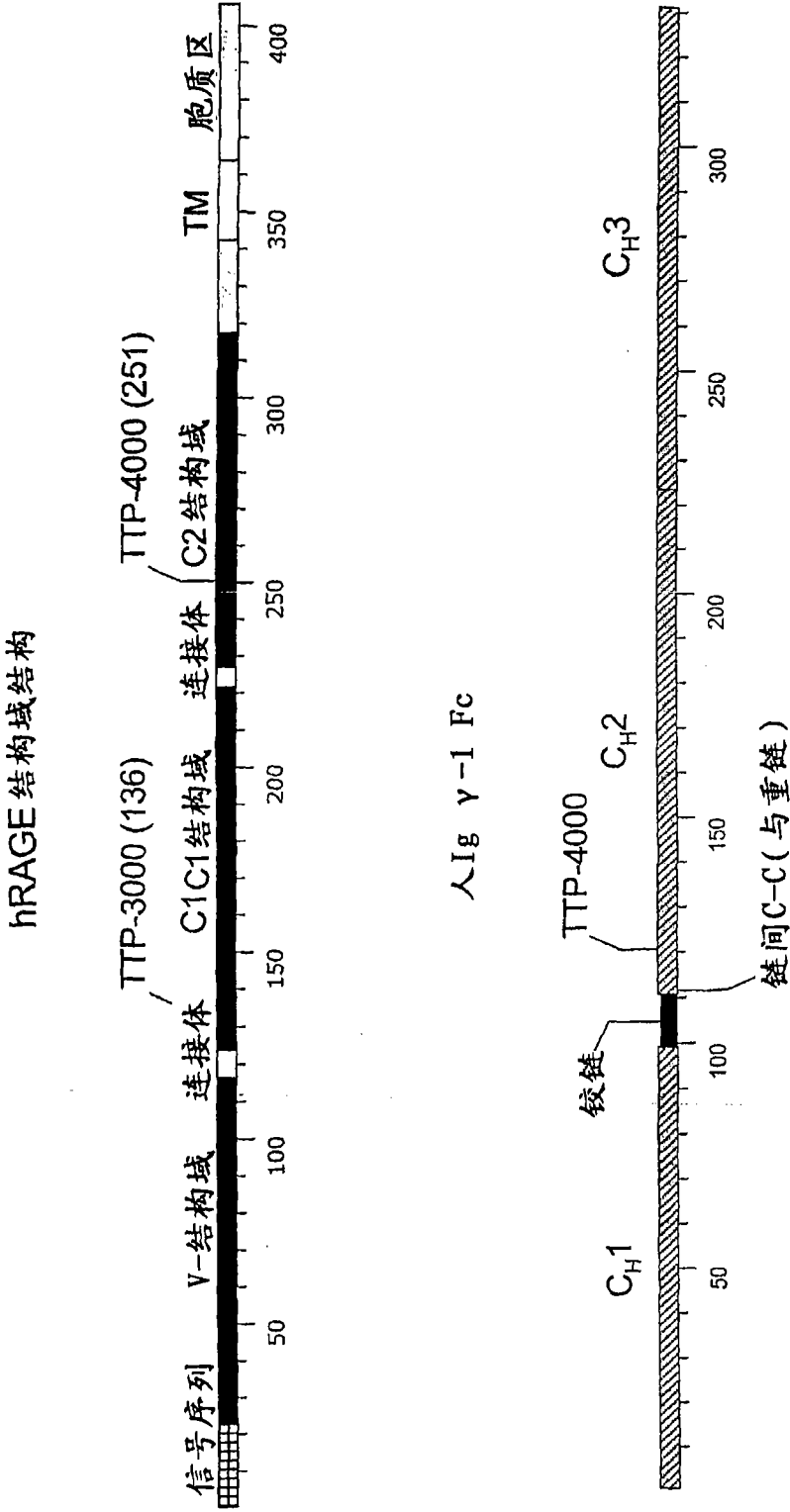


图 6B

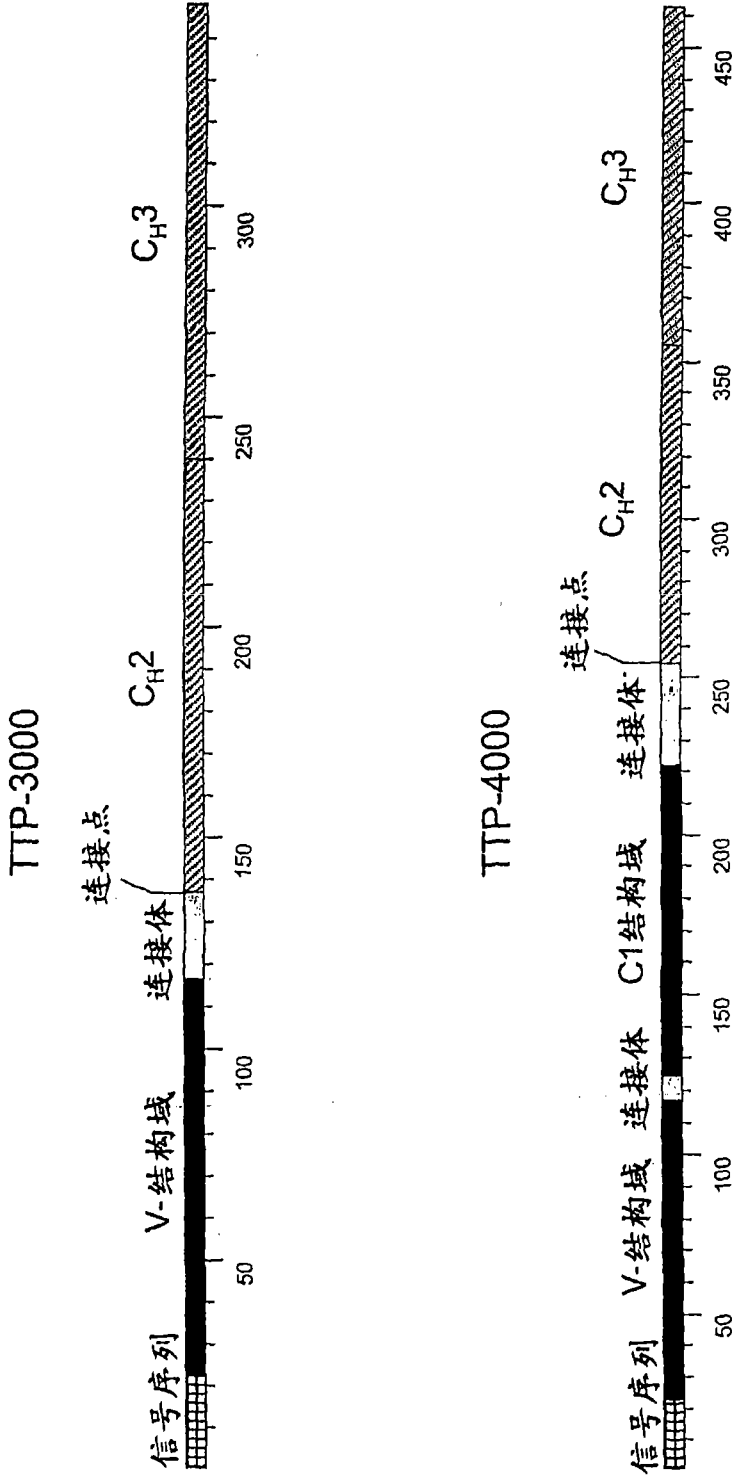


图7

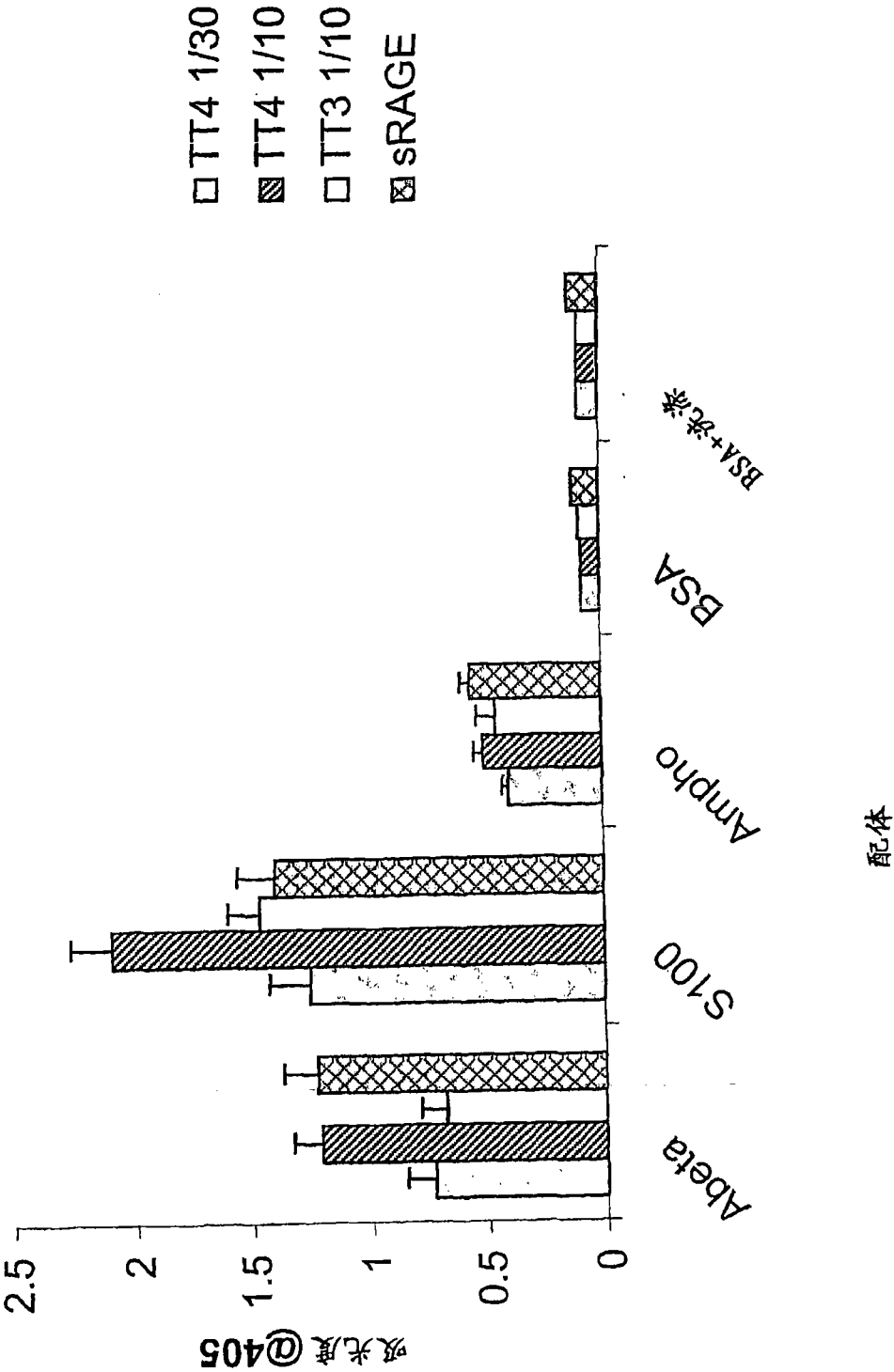
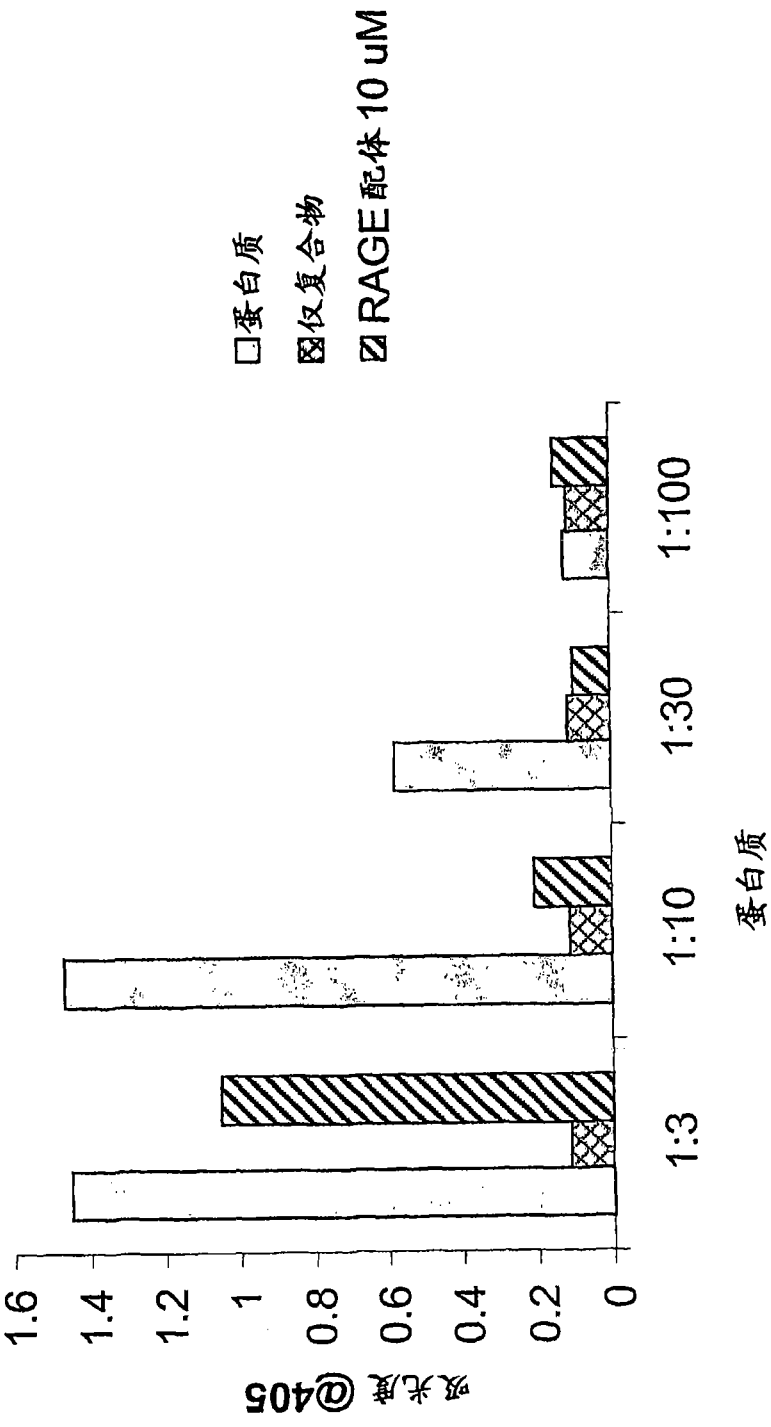
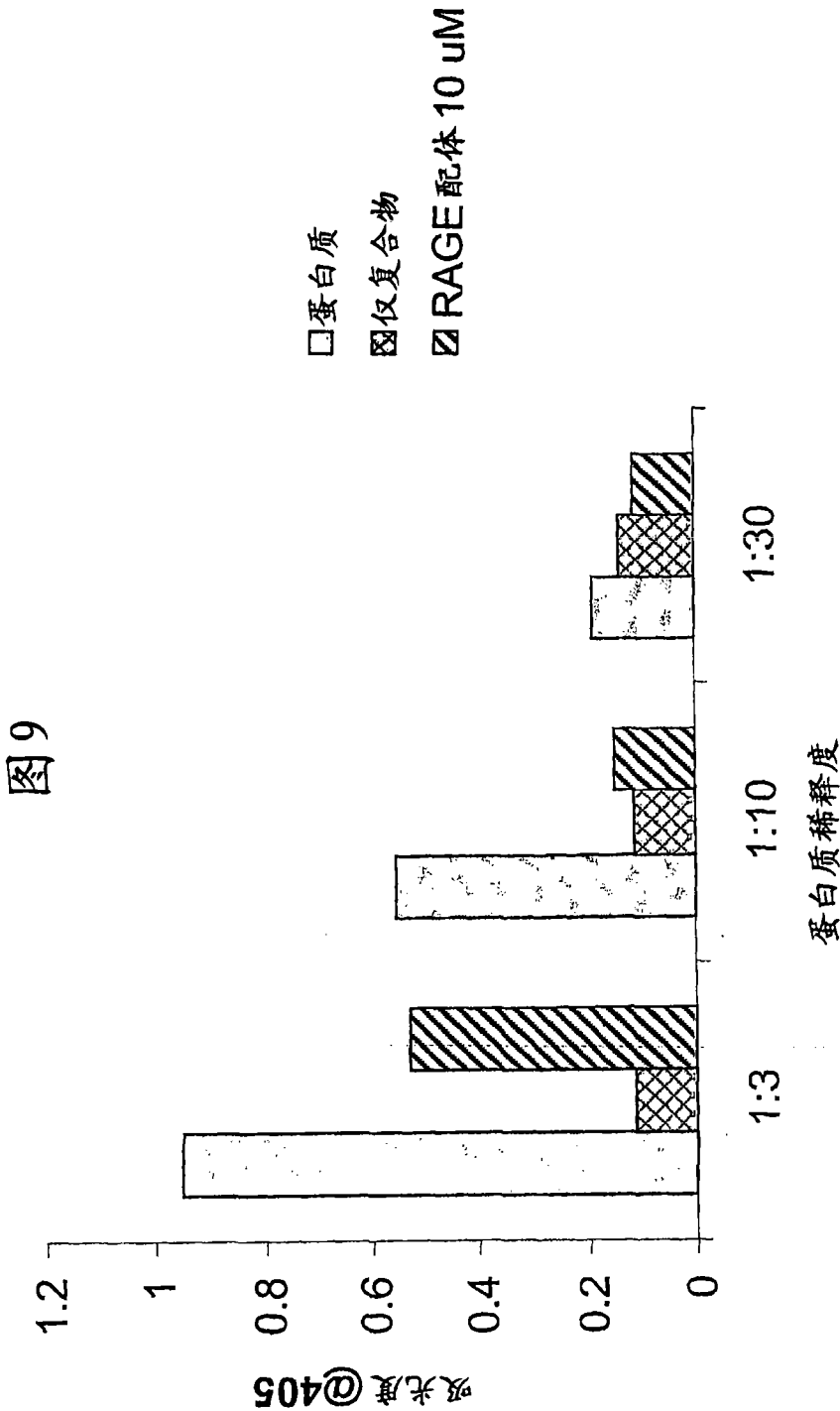
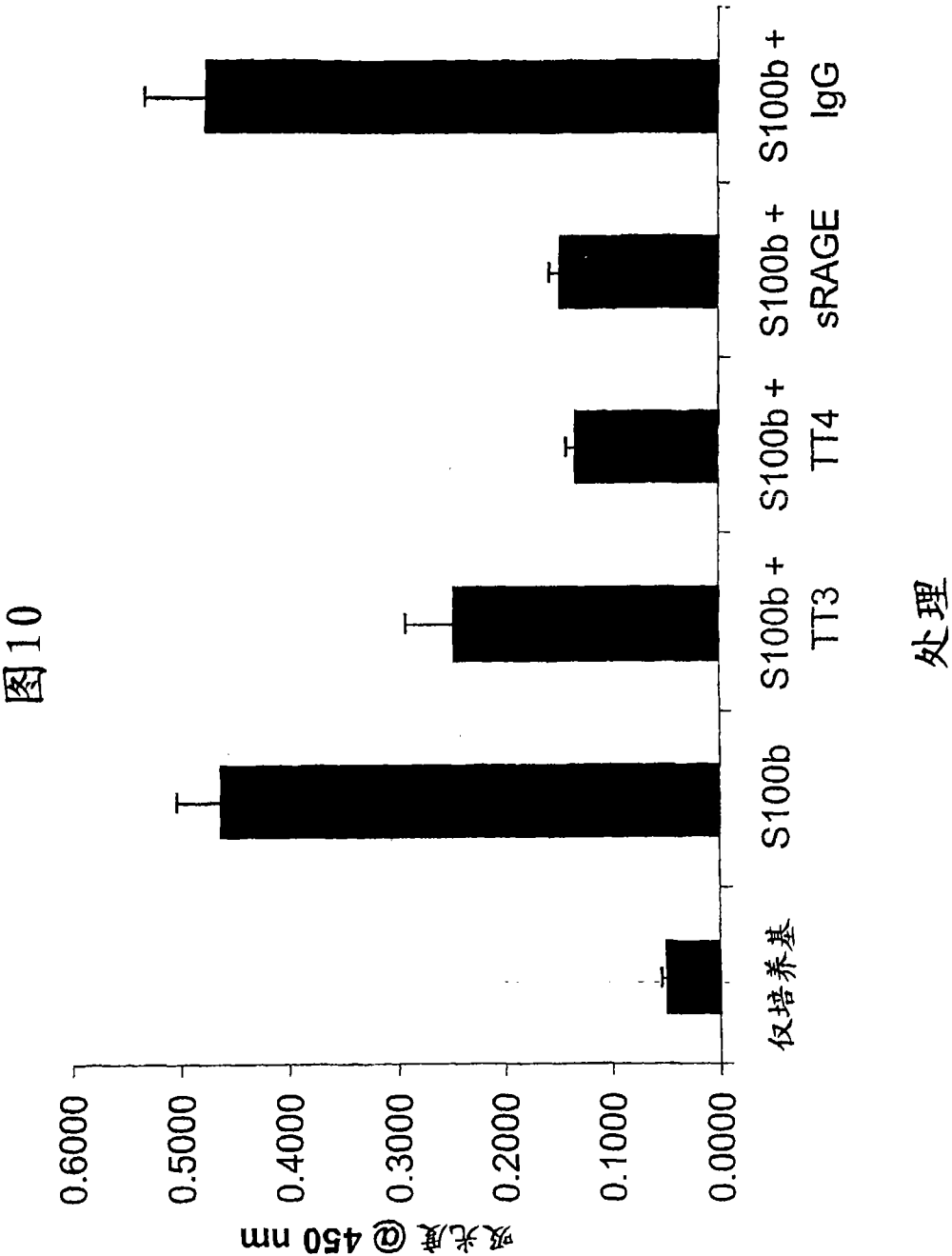


图8







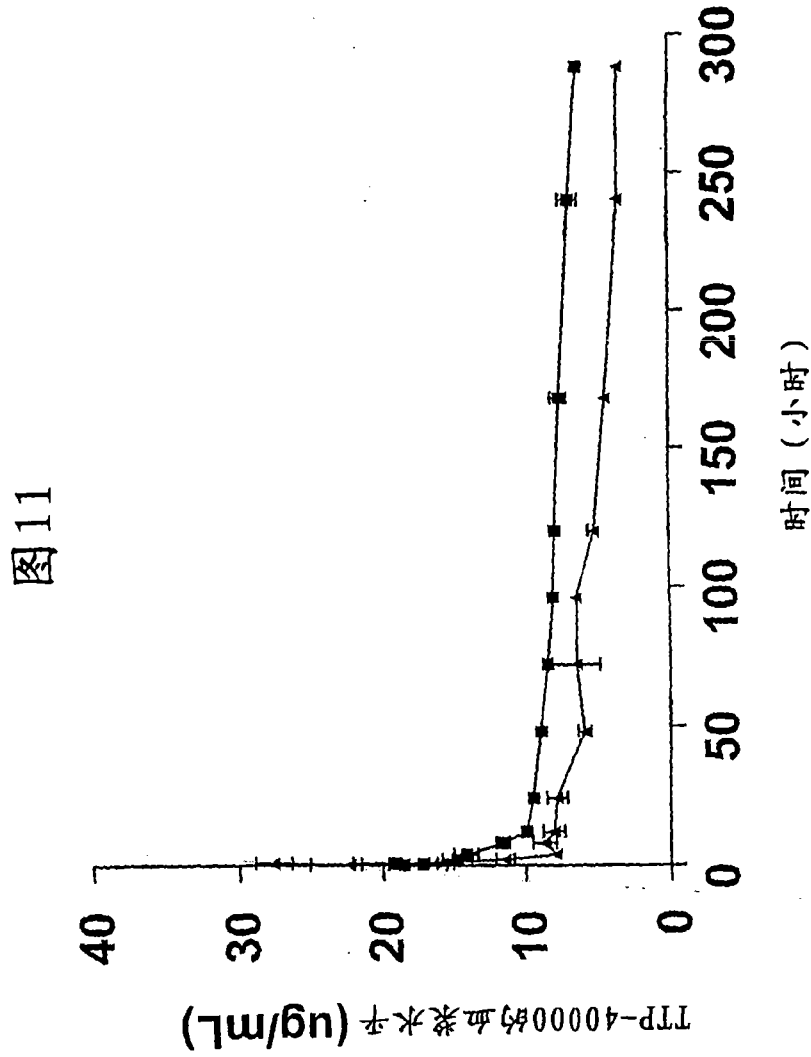


图12

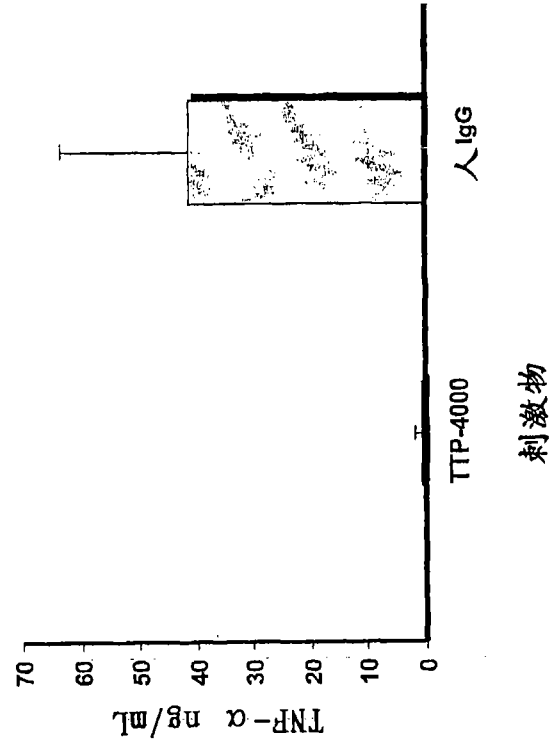


图13A

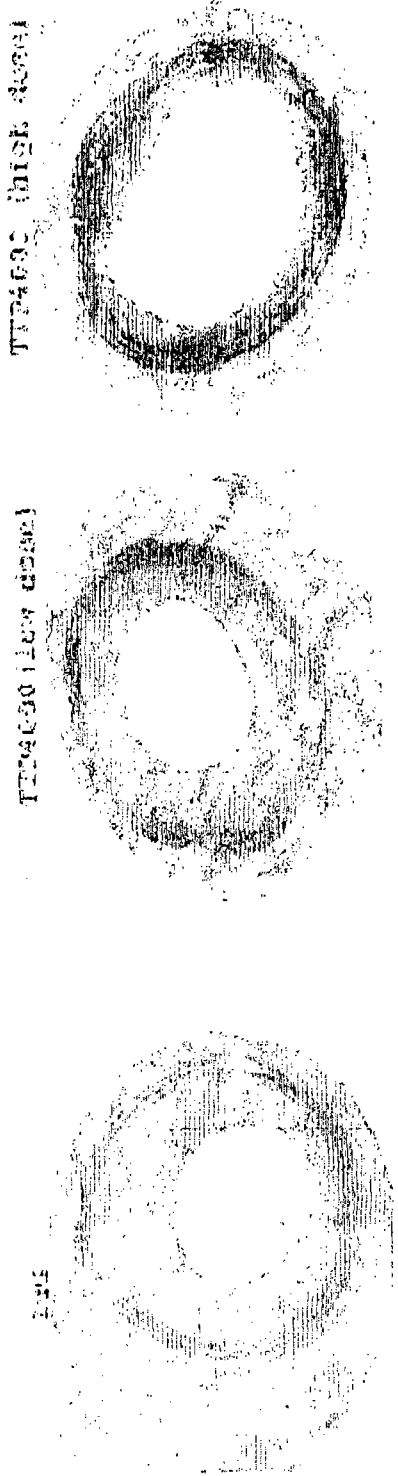


图 13B

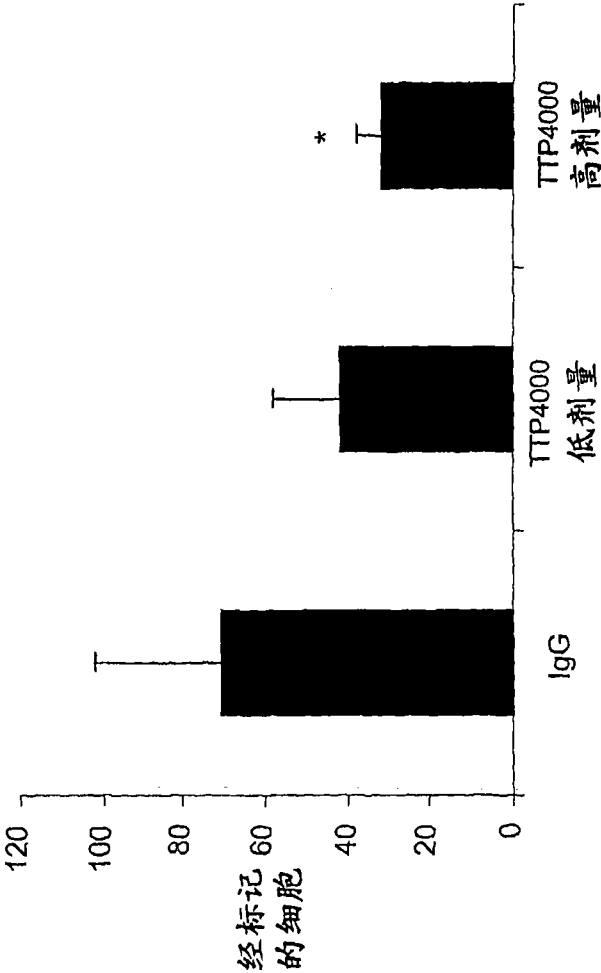
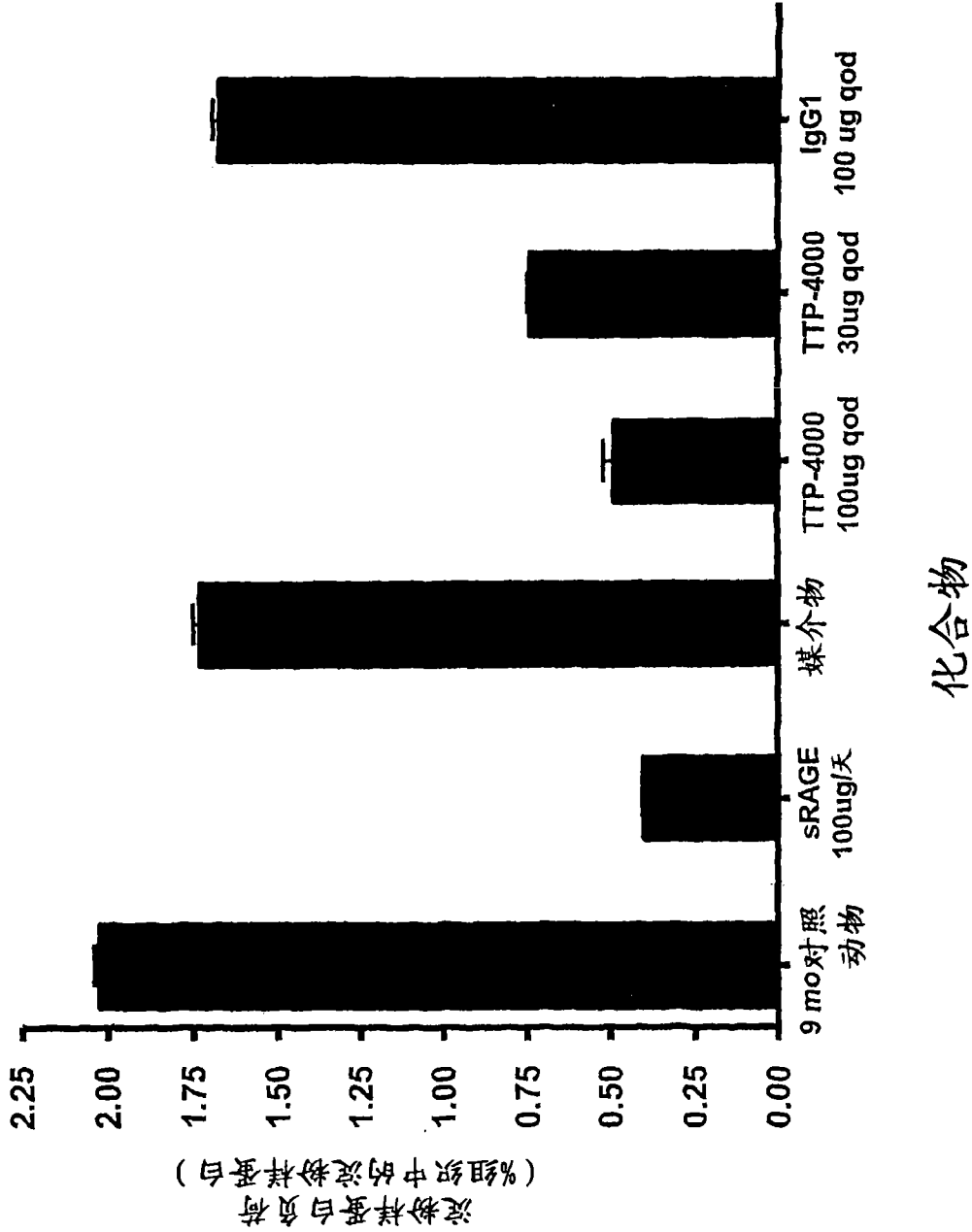


图14A



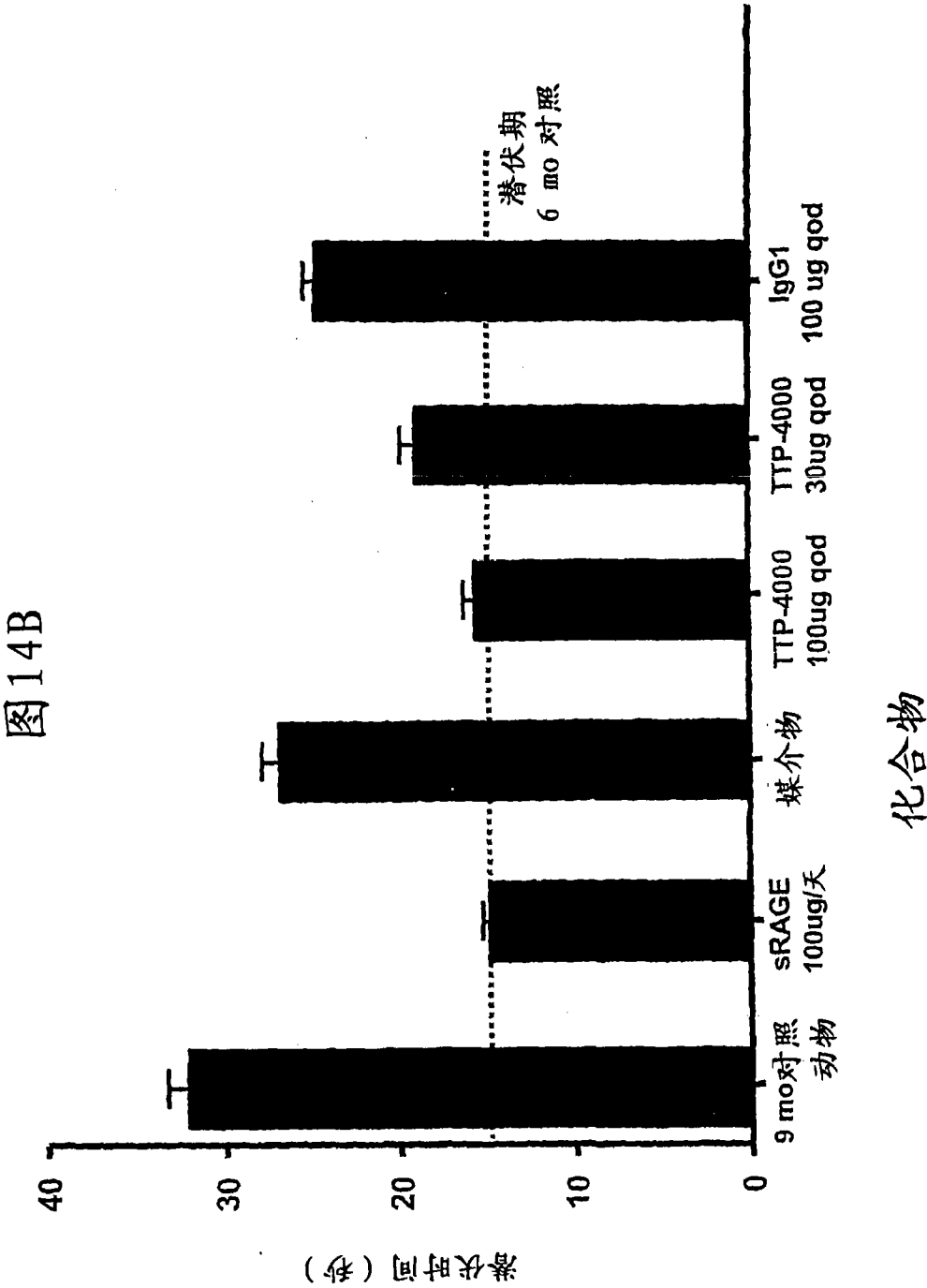


图15

