

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 38/16

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97196663.X

[43]公开日 1999 年 8 月 18 日

[11]公开号 CN 1226171A

[22]申请日 97.5.21 [21]申请号 97196663.X

[30]优先权

[32]96.5.22 [33]US[31]60/018,137

[86]国际申请 PCT/US97/08590 97.5.21

[87]国际公布 WO97/44054 英 97.11.27

[85]进入国家阶段日期 99.1.22

[71]申请人 艾伯塔大学

地址 加拿大艾伯塔省

[72]发明人 G·麦法登

A·卢卡斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 齐曾度

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 2-型趋化因子结合蛋白及其使用方法

[57]摘要

本发明提供了新的趋化因子结合蛋白(2型 CBP)的使用方法,该蛋白质是由痘病毒编码的,并且具有与 Shope 纤维瘤病毒 T1 蛋白质家族同源的氨基酸序列,该蛋白质能抵抗一些疾病综合症,这些疾病综合症与急性或慢性调节异常的炎症应答相关。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 治疗受治疗者与趋化因子相关的免疫病理紊乱的方法，该方法包括对受治疗者给药治疗有效量的具有 SEQ ID NO: 2 中阐述的氨基酸序列的趋化因子结合蛋白。

5 2. 权利要求 1 的方法，其中趋化因子是 α 类或 β 类趋化因子。

3. 权利要求 2 的方法，其中趋化因子选自 CTAP - III, gro/MGSA, ENA-78, MCP-1, 白细胞介素 - 8, RANTES, MIP - 1 α , MIP - 1 β , PF - 4, IP - 10, 和 NAP - 2。

10 4. 权利要求 1 的方法，其中免疫病理紊乱选自微生物感染，恶性肿瘤和转移，哮喘，冠状动脉再狭窄，自身免疫疾病，肝硬化，内毒素血症，粥样动脉硬化，和再灌注损伤。

5. 权利要求 1 的方法，进一步包括对受治疗者给药抗生素或抗病毒药。

15 6. 权利要求 1 的方法，其中给药的抗炎症蛋白的剂量为每次给药约 10 皮克到 100 微克。

7. 权利要求 1 的方法，其中抗炎症蛋白的给药途径选自皮下，静脉内，动脉内，肌肉内，直肠内和经皮。

20 8. 药物组合物，药学可接受载体中含有至少一个剂量的免疫治疗有效量的抗炎症蛋白质，该蛋白质具有 SEQ ID NO: 2 中阐述的氨基酸序列。

9. 权利要求 8 的组合物，其中抗炎症蛋白是 2 型趋化因子结合蛋白。

10. 权利要求 9 的组合物，其中趋化因子是 α 类或 β 类趋化因子。

25 11. 权利要求 10 的组合物，其中趋化因子选自 CTAP - III, gro/MGSA, ENA-78, MCP-1, 白细胞介素 - 8, RANTES, MIP - 1 α , 和 MIP - 1 β , PF - 4, IP - 10, 和 NAP - 2。

30 12. 鉴定趋化因子的方法，该方法包括将具有约 30 - 40 千道尔顿分子量和与 SFV - T1 蛋白质家族有氨基酸同源性的趋化因子结合蛋白与怀疑是趋化因子的组合物接触，并检测趋化因子组合物与趋化因子结合蛋白的结合。

说明书

2-型趋化因子结合蛋白及其使用方法

发明背景

5 1. 发明领域

总的来说, 本发明涉及免疫学领域, 特别是各种痘病毒编码的趋化因子结合蛋白和它们的使用方法。

2. 相关技术的说明

10 人们逐渐明了, 在较高等级的脊椎动物的细胞中生存的病毒必定已经进化到能特异地回避寄主的免疫系统 (Gooding, L., 细胞, 91: 5-7, 1992; Marrack, P. 和 Kappler, J., 细胞, 76: 323-332, 1994; Smith, G., 微生物学趋势, 82: 80-88, 1994)。事实上, 病毒的生存依赖于回避, 抑制, 抵销, 或混淆寄主对外源入侵的无数应答的策略。免疫系统的效应装备授予的选择压力显然是进化压力的强有力的因素, 今天现存
15 的所有真核病毒都含有与免疫系统战斗的印迹或残迹, 如编码的蛋白或它们特殊的生物学生存策略所证实的。

更大的 DNA 病毒(即, 腺病毒, 疱疹病毒, 虹彩病毒和痘病毒)特异地编码起保护病毒不受感染寄主的免疫识别和/或清除功能的蛋白质。这样的“subversive”病毒蛋白质现在正提供出有关免疫系统功能
20 操作的信息, 并且很可能在将来将鉴定这一正在增长的家族的更多新成员地发现。

在二十世纪八十年代, 术语“病毒因子”是用来描述从感染细胞分泌的病毒编码的蛋白质, 病毒因子通过模仿细胞外信号分子如对寄主免疫的组成成分很重要的细胞因子或其它分泌的调节物而起作用
25 (Kotwal, G. 和 Moss, B., 自然, 335: 176-178, 1988)。后来, 在二十世纪九十年代, 引入了术语“病毒编码受体”来解释观察到的现象, 就是一些病毒编码蛋白模仿重要的细胞受体, 并通过将寄主细胞因子从它们正常的受体中转移, 从而在最早时期干扰免疫路线而起作用 (Upton, 等人, 病毒学, 184: 370, 1991; Schreiber 和 McFadden, 病毒学,
30 204: 692-705, 1994)。

最近对特殊的痘病毒, 粘液瘤病毒的研究表明该病毒通过各种策略破坏免疫系统 (McFadden 和 Graham, 病毒学讨论会, 5: 421-429,

1994)。粘液瘤病毒是称为粘液瘤病的家养兔的有毒性的系统疾病的感染试剂。根据上一世纪的最早叙述，粘液瘤病毒是实验室动物中发现的第一个病毒致病原，并且是明确地为了根除害虫的目的故意引入环境中的第一个病毒试剂。因为它是在 40 多年以前释放进澳大利亚和欧洲野兔群体中的，兔和病毒的野生品系已经经过了相互进化和选择压力，在接种区已经导致了稳定状态的地方性动物病 (Fenner, F. 和 Ratcliffe, F.N., “粘液瘤病”，剑桥大学出版社，伦敦，1965)。

10 粘液瘤具有许多与其它痘病毒相关的生物学特征，也就是复制的细胞质定位和大的双链 DNA 基因组(160kb)。许多证据表明，粘液瘤，象所有的痘病毒，编码多重基因产物，这些基因产物的功能是允许该病毒在各种寄主组织中传播和繁殖。这些病毒蛋白质中的一些蛋白质特异地抵抗或破坏寄主炎症应答的发展和获得性细胞免疫，通常痘病毒是这样的免疫调节蛋白的丰富来源 (Turner, P.C., 和 Moyer, R.W., Cur. Top. Microbiol. Imm., 163:125-152, 1990; Buller, R.M.L. 和 15 Palumbo, G.J., Micro. Dev., 55:80-122, 1991; Smith, G.L., J. Gen. Virol., 94:1725-1740, 1993; McFadden, G., (Ed), “病毒受体，病毒因子和相关的 DNA 病毒编码的免疫调节物” R.G. Landes 公司 Austin Texas, 1995)。

20 这样的免疫调节基因产物的例子包括粘液瘤生长因子(MGF)，该因子以类似旁分泌的方式通过细胞表皮生长因子受体刺激邻近细胞 (Upton, 等人, 病毒学杂志, 61: 1271 - 1275, 1987; Opgenorth, 等人, 病毒学, 186: 185 - 191, 1992; Opgenorth, 等人, 病毒学, 192: 701 - 708, 1992; Opgenorth, 等人, 病毒学杂志, 66: 4720 - 4731, 1992); Serp1, 具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性的分泌糖蛋白，它防止了早期炎症应答的发展 (Upton, 等人, 病毒学, 179: 628 - 631, 1990; Lomas, 25 等人, JBC, 268: 516 - 521, 1993; Macen, 等人, 病毒学, 195: 348 - 363, 1993); T2, 分泌的细胞肿瘤坏死因子(TNF)受体超家庭的病毒同系物，它结合和抑制兔 TNF (Smith, 等人, BBRC, 176: 335 - 342, 1991; Schreiber, M. 和 McFadden, G., 出处同上, 1994; Upton, 等人, 出处同上, 1991); T7, 分泌的细胞干扰素 γ 受体的病毒同系物，它结合和抑制兔干扰素 γ (Upton, 等人, 科学, 258: 1369, 1992; Upton 和 McFadden, 30 分子遗传学方法, 4: 383, 1994; Mossman, 等人, “病毒受体，病毒

因子和相关的免疫调节物”， p. 41 - 54Ed. McFadden, R. G. Landers 公司, 1995); 和 M11L, 类似表面受体蛋白, 它通过未知的机制干扰炎症应答 (Opgeorth, 等人, 出处同上; Graham, 等人, 病毒学, 191: 112 - 124, 1992)。

5 免疫调节蛋白也包括趋化细胞因子, 称为“趋化因子”。趋化因子是小分子量的免疫配体, 它们是白细胞, 如特别是嗜中性粒细胞, 嗜碱性粒细胞, 单核细胞和 T 细胞的化学引诱物。存在两类主要的趋化因子, 都含有四个保守的半胱氨酸残基, 在蛋白质的三级结构中形成二硫键。 α 类命名为 C-X-C (其中 X 是任何氨基酸), 它包括 IL-8, CTAP-III, gro/MGSA 和 ENA-78; 和 β 类, 命名为 C-C, 包括 MCP-1, MIP-1 α 和 β , 和调节激活, 正常的 T 表达和分泌蛋白质 (RANTES)。类别的命名的根据是干扰残基是否隔开了基序中开始两个半胱氨酸。通常, 大多数 C-X-C 趋化因子是嗜中性粒细胞而不是单核细胞的化学引诱物, 而 C-C 趋化因子似乎吸引单核细胞而不是嗜中性粒细胞。最近, 15 发现了称为 lymphotactin 的新蛋白质, 命名为第三类趋化因子 “C” 组 (Kelner, 等人, 科学, 266: 1395 - 1933, 1994)。我们确信趋化因子家族在淋巴细胞和单核细胞渗入炎症位点中是非常重要的。

很可能更多的免疫调节病毒基因仍然有待发现。这些基因和相关基因产物不仅提供仔细分析不同的寄主抗病毒防御机制装备的有用工具, 而且它们也可以提供鉴定细胞免疫组成的新元素和抑制炎症和免疫系统的调节失常的新药物类别的新探针。

本发明的概要

本发明叙述了可溶的特异于病毒的细胞因子类的抑制剂的新家族, 这些细胞因子参与白细胞的趋化性, 总称为“趋化因子”。这些蛋白质命名为 2 型趋化因子结合蛋白 (2 型 CBP) 并且属于痘病毒蛋白质家族, 这一蛋白质家族与 Shope 纤维瘤病毒和粘液瘤病毒编码的 T1 蛋白质 (SFV-T1) 相关。2 型 CBP 和相关的功能同系物可用于治疗各种炎症紊乱失调, 在这些病症中, 病理过程与白细胞的过量流入相关。

附图的简要说明

30 图 1 显示了与趋化性细胞因子 (趋化因子) 结合的痘病毒蛋白质 2 型 CBP 家族的已知成员的序列排列。RPV35 千道尔顿的序列是不完全的。

图 2 显示了粘液瘤的 T1 基因的核苷酸序列，它表达了 2 型 CBP。盒状核苷酸三联体是邻接的 T2 基因(TNF-受体同系物)的终止密码，箭头指出了推测的信号肽切割位点，和下面划线的氨基酸是 T1 蛋白质(SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO: 2)的两个推测的 N-糖基化位点。

5 图 3 显示了免疫病毒(RPV)的 35 千道尔顿蛋白质，2 型 CBP 家族的一个成员，它与趋化因子的 C-C 家族(MIP-1 β , 上面的组)和 C-X-C 家族(11-8, 中间的组)的成员结合。在上面两组中，这些放射性标记的配体与对照感染 BGMK 细胞(MOCK)，或者用粘液瘤(MYX)，粘液瘤的缺失 T7 的突变体(MYX-T7-)，免疫病毒(RPV)，和 RPV 的缺失 35 千道尔顿的突变体(RPV-35K-)感染的细胞分泌的病毒蛋白质交叉连接。箭头
10 表示了配体和病毒蛋白之间的交联复合物。虽然粘液瘤 1 型 CBP 蛋白质(T7)也与趋化因子结合，2 型 CBP 蛋白质(T1)的大小(约 35 千道尔顿)实际上与底部的组中显示的一样。所以 T1(2 型)和 T7(1 型)粘液瘤的蛋白质都与趋化因子结合，但只有 PRV 的 35 千道尔顿蛋白质(2 型)
15 具有这一活性。

图 4 显示了从牛痘(Lister 毒株)分泌的 35 千道尔顿蛋白质，这种蛋白正从 WR 毒株中消失，这种蛋白与 35 千道尔顿的 RPV 分泌蛋白质一样与趋化因子 MIP-1 β 结合。箭头表示了 MIP-1 β 和用 Lister 牛痘毒株，而不是 WR 毒株感染的 BGMK 细胞分泌的 35 千道尔顿蛋白质之间的
20 的复合物。

本发明的详细说明

本发明的发现提供了重要的抗免疫蛋白的新来源，它具有治疗广泛范围的免疫病理病症的潜力，这些病症与炎症和对损坏，感染和各种疾病状态的免疫应答过程中淋巴细胞和单核细胞从循环系统运输到组织
25 位点相关。

已经克隆和测序的 2 型 CBP 基因不是已知趋化因子受体的分泌同系物，如最近的综述中所述，这些受体都具有七个跨膜区(称为“蛇根碱”)(Kelvin, D. J., 等人，白细胞生物学杂志，54: 604-612, 1993; Murphy, P. M., 免疫学年评，12: 593-633, 1994; Horuk, R., 今日免疫
30 学，15: 169-174, 1994; 和 Horuk, R., 药科学趋势，15: 159-165, 1994)。虽然一些 DNA 病毒编码这样的蛇根碱受体的同系物(Ahuja, S. K., 等人，今日免疫学，15: 281-287, 1994)，这些受体至少包括一个痘

病毒中的基因候选物 (Massung, R. F., 等人, 病毒学, 197: 511 - 528, 1994), 但本发明的 2 型 CBP 不是这一特殊受体家族的成员。

作为例证的本发明的 2 型趋化因子结合蛋白 (2 型 CBP) 是从 Shope 纤维瘤病毒感染的细胞中分泌的一种蛋白质, 是 T1 开放读码框架编码的 (Upton, 等人; 病毒学, 160: 20 - 30, 1987; 和基因库登记号: P25946)。这一蛋白质与牛痘 (Copenhagen 和 Liser 毒株) 和兔痘病毒分泌的 35 千道尔顿蛋白质具有明显的序列相似性。另外, 2 型 CBP 蛋白质与粘液瘤 M-T7 蛋白质是有区别的, M-T7 蛋白质与兔 IFN- γ 而不是鼠或人 IFN- γ 结合 (Mossman, 等人, 生物化学杂志, 270: 3031 - 3038, 1995), 但 M-T7 蛋白质也与趋化因子结合, 命名为 1 型趋化因子结合蛋白 (前面称为趋化因子结合蛋白 - 1 (CBP-1))。

术语“趋化因子结合蛋白”指结合和抑制一个或更多趋化因子的蛋白质。“趋化因子”是一类细胞因子, 它负责白细胞的趋化性。将 α 类趋化因子命名为 C-X-C (其中 X 是任何氨基酸), 包括白细胞介素-8 (IL-8), 结缔组织活化蛋白质 III (CTAP-III), 黑素细胞生长刺激活性 (MGSA) gro/MGSA, IFN- γ 可诱导蛋白质 (IP-10), 嗜中性粒细胞活化肽 2 (NAP2), β -血栓球蛋白和上皮起源的嗜中性粒细胞引诱物 78 (ENA-78); 和 β 类, 命名为 C-C, 包括 T-细胞活化基因-3 (TCA-3), 单核细胞趋化蛋白 (MCP-1, 2 和 3), 巨嗜细胞炎症蛋白 (MIP-1 α 和 β), 和当活化进行调节的, 正常的 T 表达和分泌蛋白质 (RANTES)。

其它趋化因子可以通过本领域通常使用的方法检测。例如, 利用 Boyden 室可以检测分子, Boyden 室是优选的用于体外研究化学引诱物质的微趋化测试系统。在有机玻璃块中形成一系列孔, 每个孔由两个室组成, 上层和下层, 两层之间是由几种类型的多孔过滤器中的任一种, 如硝酸纤维和聚碳酸酯分开的。在每个孔的顶部的室中加入所感兴趣的细胞如外周血液单核细胞 (PBMC), 并在底部的室中加入测试物质, 如化学引诱物。如果将顶部室中的细胞吸引到底部室中的物质上, 它们将沿着存在于溶液中的理论浓度梯度迁移并通过过滤器的孔, 吸附于过滤器的底部一侧。

现在, 利用本发明的 CBP 可以筛选怀疑是趋化因子家族成员的多肽。因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了筛选和鉴定新趋化因子的方法, 该方法包括将本发明的游离的或结合基质的 CBP 与怀疑含有

一个或更多趋化因子的组合物接触，并检测 CBP 与该组合物的结合。

如果需要，可以使用各种标记作为检测 CBP 与趋化因子的结合的手段。可以将趋化因子或 CBP 直接或间接地可检测地标记，例如用放射性同位素，荧光化合物，生物荧光化合物，化学荧光化合物，金属螯合物或酶。本领域的这些普通技术人员将知道其它适当的标记物或能够利用常规实验确定这些物质。

在一个实施方案中，本发明提供了治疗受治疗者的免疫病理紊乱的方法，该方法包括对受治疗者给药治疗有效量的抗炎症蛋白质，该蛋白质的特征是如还原型 SDS-PAGE 确定的，根据糖基化程度，分子量约为 30-40 千道尔顿，具有与 SFV T1 或 RPV 35 千道尔顿同系物的氨基酸序列同源性，并具有从感染细胞中分泌出来的特征。术语“抗炎症”指减弱或抑制炎症应答。

如在 SDS-PAGE 中的还原条件下确定的，本发明的糖基化和分泌形式的 2 型 CBP 具有约为 35-40 千道尔顿的表观分子量。另外，该蛋白质与 SFV T1 和 RPV 35 千道尔顿分泌蛋白质具有同源性。术语“同源性”指在 2 型 CBP 和其它家族成员之间氨基酸水平上的同一性程度。优选地，2 型 CBP 与 SFV T1 蛋白质之间的氨基酸序列同源性为 50-95%。这一同源性的要求不是严格的，但是，2 型 CBP 必须保留与人趋化因子相互反应的生物学功能。用另一句话说，只要 2 型 CBP 结合和抑制趋化因子，同源性就足够了。

本发明包括功能性多肽，2 型 CBP，和其功能片断。如本文所用，术语“功能性多肽”指具有生物学功能或活性的多肽，这种生物学功能或活性是通过确定的功能性测试鉴定的，与特殊的生物学，形态学，或表现型应答相关。2 型 CBP 多肽的功能性片断包括 2 型 CBP 的片断，只要该片断保留 2 型 CBP 活性(如结合趋化因子)。本发明包括含有 2 型 CBP 的生物学活性的更小的肽。通过本领域技术人员通常所知的方法可以测试这些肽与趋化因子的结合，这些方法包括本文的实施例中所述的方法。这一生物学功能可以从抗体分子结合的多肽片断以及表位变化到在细胞中能够参与表现型变化的特征性诱导或编制的大多肽。“功能性多核苷酸”指编码本文所述的功能性多肽的多核苷酸。

对 2 型 CBP 一级氨基酸序列的小的修饰可以产生与本文所述的 2 型 CBP 多肽比较，具有基本上相当的活性的蛋白质。这样的修饰可以

是故意的，如位点特异诱变，或自发的。这些修饰产生的所有多肽都包括在本文中，只要这些多肽保留了 2 型 CBP 活性。另外，缺失一个或更多氨基酸也可以导致得到的分子的结构修饰而不明显改变它的活性。这可以导致开发较小的活性分子，从而具有更广的用途。例如，

5 可以除去氨基或羧基末端的氨基酸，这些氨基酸可能不是 2 型 CBP 活性所必需的。

本发明的 2 型 CBP 多肽也包括多肽序列的保守变化。如本文所用，术语“保守变化”指用另一个生物学相似的残基替代一个氨基酸残基。

保守变化的实施例包括用一个疏水残基如异亮氨酸，缬氨酸，亮氨酸或甲硫氨酸替代另一个，或用一个极性氨基酸残基替代另一个，如用精氨酸替代赖氨酸，谷氨酸替代天冬氨酸，或谷氨酰胺替代天冬酰胺，和诸如此类。术语“保守变化”也包括在未替代的亲本氨基酸位置使用替代氨基酸，前提是对抗替代多肽的抗体也与未替代多肽发生免疫反应。

10

在本发明的方法中使用的 2 型 CBP 的病毒来源的例子包括粘液瘤病毒，牛痘(Lister 和 Copenhagen 毒株)，Shope 纤维瘤病毒，兔痘和其它哺乳动物痘病毒，只要 2 型 CBP 具有抗炎症蛋白质的生物学功能，该蛋白的特征是分子量约为 30-40 千道尔顿，取决于具有与 SFV T1 蛋白质同系物的同源性的糖基化程度，并具有这一蛋白质家族的生物学功能。

15

20

通过本发明的方法治疗的免疫病理紊乱可能与趋化因子的产生和在患病组织中导致的反应性的白细胞的积累有关。治疗方法包括对受治疗者给药治疗有效量的 2 型 CBP。术语“免疫病理紊乱”通指涉及免疫应答或免疫的任何疾病。本文所用的“治疗有效”是指足以改良免疫病理紊乱状况的 2 型 CBP 的量。“改良”是指减轻这种紊乱对接受治疗的病人的有害效果。本发明的受治疗者优选地是人，但是，可以预想利用本发明的方法可以治疗任何患有免疫病理紊乱的动物，例如，用人骨髓移植的 SCID 鼠(人化 SCID)。通过本发明的方法可以治疗的免疫病理紊乱的例子包括获得性免疫缺陷紊乱(AIDS)，毒性休克综合症，

25

30

异源移植排斥，动脉粥样硬化斑点增长，紫外线和放射反应，和与免疫应答和急性时期应答过程中 T 细胞，B 细胞，巨嗜细胞，和其它炎症白细胞的活化相关的紊乱，和与晚期癌症如肿瘤坏死因子传导的恶病

质相关的紊乱。

本发明提供了治疗或改良免疫病理紊乱包括内毒素血症或败血休克(脓毒)，或一种或多种脓毒症状的方法，该方法包括对表现出脓毒症状或有发展脓毒危险的受治疗者给药治疗有效量的 2 型 CBP。术语“改良”指减少或减轻治疗的紊乱症状。

除了用 2 型 CBP 治疗外，还可以用抗生素或抗病毒药治疗表现出免疫病理紊乱症状的病人。典型的抗生素包括氨基糖苷，如庆大霉素或 β -内酰胺如青霉素，或头孢菌素。所以，本发明的治疗方法包括基本上同时给药治疗有效量的 2 型 CBP 和杀菌量的抗生素或足够量的抗病毒化合物。

本文所用的术语“杀菌量”指在接受治疗的病人的血液中足以达到杀死细菌的浓度的量。通常确认为对人能安全给药的抗生素杀菌量是本领域已知的，正如本领域已知的，该量随着具体的抗生素和治疗的细菌感染的类型而变化。优选地，在大约 48 小时内给药 2 型 CBP，更优选地在大约 2-8 小时内，最优选地，基本上与抗生素的给药同时进行。

在本发明的方法中给药 2 型 CBP 也可以用于改良再灌注后的损伤。当治疗动脉血栓形成时，凝块溶解试剂如组织纤溶酶原激活剂(t-PA)诱导的再灌注经常与组织损伤相关。我们认为白细胞包括但不限于多形核白细胞(PMN)至少部分地介导了这样的组织损伤。所以，给药 2 型 CBP 将阻止白细胞或 PMN 一内皮的相互作用，从而减轻或防止再灌注后的损伤。给药 2 型 CBP 也可以用于在动脉损伤后防止动脉粥样硬化斑点增长的新发生和重新出现。我们确信对动脉壁的内层的局部炎症应答加剧了再狭窄和斑点的新生长。

本发明的方法也用于治疗由于过敏或自我免疫紊乱导致的炎症。过敏反应紊乱的例子包括过敏性鼻炎，哮喘，特异性皮炎，和食物过敏。自我免疫紊乱的例子，其中免疫系统攻击寄主自我的组织，包括但不限于，1 型依赖胰岛素的糖尿病，炎症性肠道疾病，皮炎，脑膜炎，血栓形成中血小板减少形成的紫斑，Sjogern 综合症，脑炎，眼色素层炎，白细胞粘连缺陷，类风湿病和其它形式的免疫关节炎，风湿性发烧，Reiter 综合症，关节病型牛皮癣，急进的系统性硬化症，初期的胆硬化，天疱疮，类天疱疮，坏死性脉管炎，重症肌无力，多重硬化，红斑

狼疮, 多肌炎, 结节病, 肉芽肿病, 脉管炎, 恶性贫血, CNS 炎症紊乱, 抗原-抗体复合物介导的疾病, 自身免疫溶血贫血, Hashimoto 甲状腺炎, Graves 病, 习惯性自发流产, Reynard 综合症, 肾小球性肾炎, 5 性皮炎, 慢性活动性肝炎, 腹腔疾病, AIDS 的自身免疫并发症, 萎缩性胃炎, 关节粘连性脊椎炎, 和 Addison 病。

本方法也用于治疗非恶性的或与免疫相关的细胞增殖疾病如, 牛皮癣, 天疱疮 vulgaris, Behcet 综合症, 急性呼吸窘迫综合症(ARDS), 局部贫血心脏病, 动脉粥样硬化, 透析后综合症, 白血病, 获得性免疫缺陷综合症, 败血病休克和其它类型的急性炎症, 和脂质组织细胞 10 增多症。任何由于趋化因子的产生(如诱导 IL-8, MIP-1 α 或 β 的表达)导致的紊乱基本上被认为对治疗是敏感的, 这些紊乱与炎症前过程和细胞渗透有病原学联系。

本发明的方法也用于治疗微生物感染。许多微生物如细菌, 立克次氏体, 各种寄生虫, 和病毒与血管内皮和白细胞结合, 并诱导炎症反 15 应, 导致例如白细胞介素的产生。所以, 可以将用于本发明的方法的 2 型 CBP 对病人给药以防止与这样的感染相关的炎症。

本发明的 2 型 CBP 的给药剂量范围足够大以致能产生期望的效果, 即免疫应答的症状显示了一些程度的抑制。该剂量不应该大到引起不利的副作用, 如不需要的交叉反应, 过敏反应, 和诸如此类。通常, 20 剂量将随着病人的年龄, 症状, 性别和疾病的程度而变化, 并且可以由本领域技术人员确定。在任何有相反迹象的事件中各医生可以判断剂量。剂量可以从约 10 皮克变化到 100 微克/剂量, 每天给药一次或多次剂量, 给药一天或几天。

可以通过任何适当的手段给药 2 型 CBP, 包括肠胃外的, 皮下的, 25 肺内的, 动脉内的, 直肠内的, 肌肉内的, 和鼻内的给药。肠胃外的注入包括肌肉内, 静脉内, 动脉内, 或腹膜内的给药。2 型 CBP 也可以以慢慢释放的皮下植入的形式经皮给药, 或以胶囊, 粉末或颗粒形式口服。2 型 CBP 也可以吸入给药。例如, 当治疗性地用于治疗肺的炎症疾病, 优选的给药途径是通过入肺的气雾剂。

30 肠胃外给药的药学可接受载体制剂包括无菌的或含水的或不含水的溶液, 悬浮液和乳液。不含水的溶剂的例子是丙二醇, 聚乙二醇, 植物油如橄榄油, 和可注射的有机酯如油酸乙酯。含水的载体包括水,

醇/水溶液，乳液或悬浮液，包括盐溶液和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液，Ringer 葡萄糖，葡萄糖和氯化钠，乳酸钠林格氏溶液，或固定油。活性治疗成分经常与赋形剂混合，这些赋形剂是药学上可接受的并且与活性成分相容。适当的赋形剂包括水，盐溶液，葡萄糖，甘油和乙醇，或它们的混合物。静脉内载体包括液体和营养补充剂，电解质补充剂，如基于 Ringer 葡萄糖，和诸如此类的那些。也可以存在防腐剂和其它添加剂如抗微生物剂，抗氧化剂，螯合剂和惰性气体和诸如此类。

10 本发明也涉及制备含有本发明的 2 型 CBP 的药剂或药物组合物的方法，该药剂用于治疗不期望的免疫应答/炎症反应，其中免疫应答导致产生趋化因子，这些趋化因子与本发明的 2 型 CBP 结合。

15 本发明提供于药学载体中的药物组合物，其含有至少一个剂量的免疫治疗有效量的抗炎症蛋白，该蛋白质根据糖基化程度，具有分子量约为 30-40 千道尔顿，具有与粘液瘤 T1 干扰素 γ 受体同系物同源的氨基酸序列，和具有粘液瘤 T1 干扰素 γ 受体同系物的生物学功能。

本发明提供本发明的方法中所使用的，含有本发明的 2 型 CBP 的药物制剂和组合物。它的形式将根据给药途径而不同。例如，可以提供注射用的组合物，形式是针剂，每针剂含有单位剂量，或容器形式，含有多个剂量。

20 可以将 2 型 CBP 配制成中性的药学可接受盐形式的治疗组合物。这些包括加入酸加成盐，它们是用无机酸如，盐酸或磷酸，或有机酸如乙酸，草酸，酒石酸和诸如此类形成的。盐也包括由无机碱，如氢氧化钠，钾，铵，钙或铁，和有机碱如异丙胺，三甲胺，组氨酸，普鲁卡因和诸如此类形成的那些。

25 通过选择适当的大分子可以实现控制释放，大分子例如聚酯，聚氨基酸，聚乙烯吡咯烷酮，乙烯乙酸乙烯酯，甲基纤维素，羧甲基纤维素，鱼精蛋白硫酸盐，或丙交酯/乙交酯共聚物。通过改变大分子的浓度可以控制 2 型 CBP 的释放速度。

30 控制持久作用的另一个方法包括在聚合物物质如聚酯，聚氨基酸，水凝胶，丙交酯/乙交酯共聚物，或乙烯乙酸乙烯酯共聚物的颗粒中掺入 2 型 CBP。可选择地，例如通过凝聚技术，或通过界面聚合，例如通过分别使用羟甲基纤维素或胶状微胶囊或聚 methymethacrolate 微胶

囊，可以将 2 型 CBP 包裹进制备的微胶囊中，或包裹进胶态药物递送系统。胶态分散系统包括大分子复合物，纳米胶囊，微球体，小珠，和基于脂质的系统包括水包油乳剂，胶粒，混合胶粒，和脂质体。

下面的实施例用于叙述但不限制本发明。它们是可以使用的那些典型的例子，本领域技术人员已知的其它过程也可以替代使用。

实施例 1

材料和方法

损伤诱导动脉粥样硬化的鼠模型

诱导 Sprague Dawley 鼠使其右左髂股动脉具有气囊血管成形术介导的损伤。在通常的戊巴比妥麻醉(每 100 克重通过 i.m. 注射 6.5 毫克, Somnotrol, MTC 药公司, 剑桥, Ontario)下剖开和切开动脉使 1.5 毫米 USCI 血管成形术气囊逆向进入动脉。通过动脉内注射将 CBP 或对照溶液注射进入后气囊介导的损伤的位点上游的血管成形术气囊导管的远侧的腔中，给予 500 皮克 CBP (6 只鼠)或盐水 (6 只鼠)。然后将气囊中的压力膨胀到 8 巴，维持 1 分钟。在血管成形术后，抽掉气囊中的气并排出，局部应用氨基丙烯酸正丁酯单体 (Nexaband, 兽医学产品实验室, Phoenix, Arizona) 封闭动脉切开位点。每只鼠维持正常的鼠饮食方式，并且在手术后随污 4 星期。随访时，每公斤用 2.0 毫升 euthanyl 使鼠死亡，收集主动脉进行组织检查。

损伤诱导动脉粥样硬化的兔模型

通过在远侧的腹部主动脉进行气囊血管成形术处理 8 只喂食胆固醇的新西兰白兔。在气囊伤害之前 2 星期开始用 10% 的花生油食物中的 2% 的胆固醇每星期 4 天喂养所有兔子 (新西兰白兔品系)。在麻醉(肌肉内注射 40 毫克/公斤 ketalean, 8 毫克/公斤塞拉嗪, 和 0.5 毫克/公斤乙酰丙嗪)后，通过切下的股动脉中导入 3-3.5 毫米血管成形术气囊导管(气囊与主动脉直径比例 $\geq 1:1$)。在远侧腹部主动脉中，使气囊的压力膨胀到 8 巴，逆向前进到远处胸部主动脉。在每只兔中，在荧光屏检查控制下使气囊前进和后退 3 次以便保证除光内皮。在气囊血管成形术介导损伤之前和之后，和接着的 4 星期随访中记录差别悬殊的血管造影片。在获得股入口后立即给予肝素 (400 单位) 以便降低与导管相关的血栓形成。

在 4 只兔的腹部主动脉远侧中进行气囊介导损伤后，对每个样品立

即注入 500 皮克纯化的 2 型 CBP。在 4 只兔的腹部主动脉的末梢局部地平行注入盐水。在进行气囊传导的损伤后通过 Wolinsky 导管每次注入在无菌 0.9% 盐水中即时稀释的 10 毫升总体积的注入液。所有的注入过程都是通过在靠近髂分叉的腹部主动脉中的 3.25mm Wolinsky 气囊(膨胀到最后压力为 6 ± 1 巴, 维持 2 分钟)进行的。在荧光屏检查控制下, 将 Wolinsky 气囊定位于紧挨髂分叉的上面, 使灌注的气囊通常定位于分叉上面 0.5 - 2.5 厘米, 记为第一注入位点。在靠近髂分叉 2.5 厘米以上的区域中确定上游的第二个位点。在所有实验中, 注入液是在气囊介导损伤后通过 Wolinsky 导管, 以在无菌 0.9% 盐水中即时稀释的 10 毫升总体积给予的。所有注入过程是通过在靠近髂分叉的腹部主动脉中的 3.25 毫米 Wolinsky 气囊(膨胀到最后压力 6 ± 1 巴, 维持 2 分钟)进行的。

组织学和形态计量分析:

在远侧腹部主动脉(兔)或上部髂股动脉分支(鼠)中 Wolinsky 注入的第一位点进行组织学分析, 这代表了灌注气囊的原始定位确定的第一注入位点。在兔中, 从下游, 靠近髂分叉的非注入位点(在分叉的上面 0.5 厘米到分叉的下面 0.5 厘米)和上游, 非注入位点(腹部主动脉上部, 髂分叉上面 2.5 厘米 - 3.5 厘米)取内部对照切片。髂分叉上面 1.5-2.5 厘米的区域被认为是放置气囊造成的注入剂量潜在地可变的宽区域, 所以不包括在这一分析中。在鼠中, 将 T1 处理和注入盐水的鼠的第一气囊位点用于组织学评价。如前面所述, 对福尔马林固定的样品进行苏木精和曙红染色。简要地说, 将每个样品在 10% (v/v) 磷酸钠缓冲的福尔马林中固定, 加工, 浸渍, 包埋在石蜡中, 用切片机切成 5 微米的切片。然后用苏木精和曙红将每个样品(每个位点最少 2 个切片)的切片染色, 用光学显微镜检查。

实施例 2

细胞因子与新的病毒蛋白的结合

简要地说, 将用 ^{125}I 放射性标记各种人细胞因子, 与从对照或痘病毒感染 BGMK 细胞收集的分泌蛋白接触, 交联, 然后通过 SDS - PAGE 分析新的细胞因子/蛋白质复合物。

交联测试发现, 新的特异于病毒的蛋白质明显地与各个测试的人趋化因子: IL - 8 和 MIP - 1β 结合(图 2)。图 2(上面两组)显示了使用碘

化配体和组织培养上清液的凝胶迁移率变动分析。如下制备了组织培养上清液(Sups): 让 BGMK(新生的 Green 猴子肾细胞)保持未处理(模拟实验)或用粘液瘤(MYX), 粘液瘤的 T7 缺失突变体(myx-T7⁻), 兔痘(RPV)或缺失 35 千道尔顿的 RPV 重复感染(MOI)3 次。在感染后 4 小时, 通过用 PBS 洗涤单层细胞 3 次, 并用无血清培养基补充, 制备分泌的蛋白质; 然后在感染后 18 小时, 收集这些上清液(升)。以同样方法, 在没有病毒存在下, 制备模拟实验的上清液。利用 Amicon 浓缩器将上清液浓缩约 15 倍。根据制造商的说明利用碘化珠(Pierce)上的 ¹²⁵I 标记人趋化因子 IL-8 和 MIP-1 β 。

如下进行凝胶迁移率变动分析: 将 5 微升碘化配体与 10 微升 SUP 混合, 允许在室温下停留 2 小时。然后加入 2 微升化学交联试剂 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)(200 毫摩尔/升, 于 100 毫摩尔/升磷酸钾中, pH7.5), 维持 15 分钟。接着加入另外 2 微升, 维持 15 分钟。然后加入 2 微升 Tris-HCl(1.0 摩尔/升, pH7.5)淬灭反应。利用 SDS-PAGE 和放射自显影分析得到的混合物。箭头指出了迁移的复合物。底部的组指出了考马斯染色的凝胶, 显示了在 myx-T7⁻ 感染中没有 T7 蛋白和在 RPV-35k⁻ 感染中没有 35 千道尔顿蛋白。

实施例 3

在鼠股动脉中血管成形术气球介导的损伤中

显示的 2 型 CBP(T1)作为抗再狭窄蛋白质的效力的分析

炎症与加速动脉壁中动脉粥样硬化的斑点的发展相关。在应用了为了打开堵塞的动脉设计的气囊血管成形术和其它相关的血管成形术装置后, 发生了斑点高速地再出现或再狭窄。也已经有报道在导致动脉损伤, 病毒感染, 脉管炎, 高胱氨酸尿症颊炎, 糖尿病, 高血压, hyperlipideuria, 吸烟和免疫复合物产生的紊乱的条件下, 动脉粥样硬化斑点加速增长。较大的 DNA 病毒具有进化的机制, 如抗炎症蛋白, 允许病毒在寄主中增殖, 而寄主免疫和炎症防御机制对病毒的抑制下降。测试了 2 型 CBP(T-1)作为潜在的治疗试剂用于防止血管成形术后斑点的增长。我们确信 2 型 CBP 作为干扰素 γ 的受体同系物和趋化因子的抑制剂起作用。在损伤诱导动脉粥样硬化的动物模型中测试 2 型 CBP, 结果显示在注入后 4 星期, 斑点的形成明显减少。在单独进行静脉内注射后(表 1), 在气囊血管成形术损伤后, 从牛痘病毒分离的 35 千道

尔顿蛋白质 2 型 CBP 明显降低内膜增生(动脉粥样硬化斑点生长)。这表明 2 型 CBP 可以用作抗炎症试剂治疗或防止基于免疫的紊乱。

在通常的麻醉下, 在 10 只 Sprague Dawley 鼠的右髂股动脉中诱导气囊损伤。通过切开的股动脉导入 1.5 毫米的血管成形术气囊, 将气囊的远侧点前进到髂分叉。在气囊膨胀之前立即向动脉中注入 1.0 毫升盐水(5 只鼠)或增加浓度的 50 皮克纯化牛痘 35 千道尔顿蛋白质(5 只鼠)。然后将血管成形术气囊膨胀到 6-8atm, 维持 2 分钟, 抽掉气体, 除去。在除去导管后, 用 nexaband 在穿刺位点封闭股动脉。使鼠苏醒, 监测 4 星期。在 4 星期后, 杀死鼠, 收集动脉用于组织学评价。通过形态计量分析检测内膜区。与对照注入盐水($p < 0.0089$)的比较, 在注入 35 千道尔顿的蛋白质后检测到内膜增生(斑点面积)的明显减少(表 1)。

表 1

35 千道尔顿剂量	平均斑点面积平方毫米	S. E.	P 值(t 测试)
0	0.055	0.012	NS
50 皮克	0.014	0.011	0.0089

15

实施例 4

CBP - II 抑制趋化因子与人单核细胞的细胞受体结合

根据下面方案, 证明分别来自牛痘(Lister 毒株)(表 2)的 35 千道尔顿蛋白质和 M-T1(表 3)抑制人 MIP-1 α 与原代人单核细胞和 THP-1 细胞中的表面受体的结合。(注意: 表 1 和 2 中的实验 3 利用了 THP-1 细胞, 所有其它结果是从原代单核细胞得到的)

获得放射性标记的 ^{125}I MIP-1 α (25 微居里/毫升), 在试管中加入适当体积的放射性标记(热)MIP-1 α 使每管中含有 50,000cpm。作为对照, 将未标记(冷)的 MIP-1 α (400 纳克)与热 MIP-1 α 一起加入证明存在背景结合。为了测定 35 千道尔顿的 M-T1(CBP-2)和 M-T7(CBP-1)的抑制特性, 将不同剂量的抑制剂与放射性标记的配体一起加入, 将样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ (5%CO₂)温育 30 分钟。在含有 1% BSA 的 RPMI 1640 中将从人血液分离和 Percoll 梯度上分开的原代单核细胞稀释到 1×10^7 个细胞/毫升的浓度, 向每个反应中加入 200 微升这些细胞。同样的浓度

用于 THP-1 细胞(单核细胞系)。在室温下,将样品管离心 1 小时,其中在 13,000rpm 下离心细胞 5 分钟。除去上清液,用 800 微升 10% 蔗糖溶液洗涤细胞。细胞又一次在 13,000rpm 离心 10 分钟。除去上清液。然后利用 γ 计数器测量沉淀中的放射性。作为第二套对照,在存在抑制剂时,也测试 H^3 -fMLP 与它的细胞受体的结合特性(表 4)。遵照上面的方案,除了在每个试管中同样分配 1 微升体积使每管的计数约为 180,000cpm。注意到 35 千道尔顿和 M-T1 两者都定量地阻止趋化因子与 MIP-1 α 的细胞受体的结合。

表 2

表面结合 MIP-1 α										
E X P.	过量摩尔的 35 千道尔顿的蛋白质								过量未 标记 MIP- 1 α	标记 MIP- 1 α
	1600	800	400	200	50	40	4	2	6500X	
1	80		107	144	1280	-	-	-	470	4705
2	-	-	-	88	-	2342	10688	9113	410	7708
3	55	-	-	-	-	-	-	-	1038	9944

10 注意: 实验 3 使用 THP-1 细胞; 实验 1 和 2 使用原初单细胞。

表 3

表面结合 MIP-1 α				
实验	200X 摩尔过量 M-T1	200X 摩尔过 量 M-T7	6500X 摩尔 过量未标记 的 MIP-1 α	标记的 MIP-1 α
1	978	10171	444	12206

表 4

表面结合 fMIP			
实验	标记的 fMLP	1×10^6 M 未标记的 fMLP	35 千道尔顿 (400 纳克)
1	374	132	507

虽然参考给出的优选实施方案已经叙述了本发明，应该理解的是，不脱离本发明的精神可以进行各种修饰。因此，本发明仅受下面的权利要求书的限制。

说明书附图

	1					50
RPV35kd		MPAS	LQSS			
VV1is35kd	MKQYIVLACM	CLAAAAMPAS	LQSSSSSSSS	CTEEENKHHM	GIDVLIKVT	
VVcop35kd		MHVPAS	LQSSSSSSSS	CTEEENKHHM	GIDVLIKVT	
VAR35kd	MKQYIVLACM	CLAAAAMPAS	LQ...SSSS	CTEEENKHHM	GIDVLIKVT	
CPV35k	.MKQIVLACI	CLAAVAIPT	LQSFSSSSS	CTEEENKHHM	GIDVLIKVT	
SFV-T1	M	RRLCIILLVY	VYATFATKGI	CKQDEDVRYM	GIDVVVKVT	
MYX-T1	M	KRLC.VLFAC	LAATLATKGI	CRQGEDVRYM	GIDAVAKIT	
	51					100
VV1is35kd	QDQTPTNDKI	CQSVTEITES	ESDPDPEVE.		SED	
VVcop35kd	QDQTPTNDKI	CQSVTEITES	ESDPDPEVE.		SED	
VAR35kd	QDQTPTNDKI	CQSVTEITES	ES..DPEVE.		SED	
CPV35k	QDQTPTNDKI	CQSVTEITES	EDESEEVVK.		GD	
SFV-T1	..KTSGSDTV	CQALRTTFFA	AHKGDGAND.	.SLSTEYVDD	YSZEEY.EY	
MYX-T1	..RTTGSDTP	CQGLRTTIES	AYTEDENEDD	GATGTEQPD	LSZEYEDEN	
	101					150
VV1is35kd	DSTSVEDVDP	PTTYYSIIGG	GLRMNFGFTK	CPQIKSISES	ADGNTVNARL	
VVcop35kd	DSTSVEDVDP	PTTYYSIIGG	GLRMNFGFTK	CPQIKSISES	ADGNTVNARL	
VAR35kd	DSTSVEDVDP	PTTYYSIIGG	GLRMNFGFTK	CPQIKSISES	ANGNAVNRAL	
CPV35k		PTTYTIVVGG	GLTMDFGFTK	CPKISSISEY	SDGNTVNARL	
SFV-T1	DESFLGFEVI	GSTYITIVGG	GLSVTFGFTG	CP TVKSVSEY	AKGRIVEIRL	
MYX-T1	DESFLTGEVI	GSTYETIVGG	GLSVTFGFTG	CP TVKALSEH	VKGRHVYVPL	
	151					200
VV1is35kd	SSVSPGQGKD	SPAITREEAL	AMIKDCEVSI	DIRCSEEEKD	SDIKTHPVLG	
VVcop35kd	SSVSPGQGKD	SPAITREEAL	AMIKDCEVSI	DIRCSEEEKD	SDIKTHPVLG	
VAR35kd	SSVPLGQGKD	SPAITRAEAL	AMIKDCELSI	DIRCSEEEKD	SDIQTHPVLG	
CPV35k	SSVSPGQGKD	SPAITREEAL	SMIKDCEMSI	NIKCSEEEKD	SDIKTHPVLG	
SFV-T1	SSDAPWRDTN	PMSINRTEAL	ALLEKCESTI	DIKCSNETVS	ETTYGLASLA	
MYX-T1	SSDAPWRDTN	PVSMNRTEAL	ALLDTCEVSV	DIKCSRVNVT	ETTYGTAALV	
	201					250
VV1is35kd	SNISHKKVSY	EDIIGSTIVD	TKCVKNLEFS	VRIGDMCKES	SELEVKGDFK	
VVcop35kd	SNISHKKVSY	EDIIGSTIVD	TKCVKNLEFS	VRIGDMCKES	SELEVKGDFK	
VAR35kd	SNISHKKVSY	EDIIGSTIVD	TKCVKNLEFS	VRIGDMCKES	SDLEVKGDFK	
CPV35k	SNISHKKVSY	EDIIGSTIVD	TKCVKNLEIS	VRIGDMCKES	SELEVKGDFK	
SFV-T1	PRITQATER.	GNIIGSTLVD	TDCVENLDVT	VHLGEMCKRT	SDLSKRDSLK	
MYX-T1	PRITQATRR.	SHIIGSTLVD	TECVKSLDIT	VQVGEMCKRT	SDLSARDSLK	
	251		276			
VV1is35kd	YVDGSASEGA	TDDTSLIDST	KLKACV			
VVcop35kd	YVDGSASEGA	TDDTSLIDST	KLKACV			
VAR35kd	YVDGSVSEGV	TDDTSLIDST	KLKSCV			
CPV35k	YVDGSASEDA	ADDTSLINSA	KLIACV			
SFV-T1	VKNGELLD..	.DDTFSIHTP	KLKACN			
MYX-T1	VKNGKLL..	.DDILVLRTP	TLKACN			

图 1

1 TACAGCGACAGTAATCATCCCCGAGGAGGTGACGACTTCGTGGAATACCATTTGGGGTACA
 61 CGCCTCCGTCTCTTTCCCTCACCCAAACGATGTAGACTCGTTTCATAGATTACGGATTTT
 121 CTTCTAGTTAAATTCTTAAAAAAAGTCGAATTATAATAAAACGTGGGCGTATAGAAGAA
 181 CTCTATCATGAAACGCCTGTGTGTATTATTTCGCGTGCCTGGCCGCGACCCTCGCGACGAA
 M K R L C V L F A C L A A T L A T K
 241 GGGCATCTGCAGACAAGGCGAAGATGTCCGATACATGGGAATAGACGCCGTGGCCAAAAT
 G I C R Q G E D V R Y M G I D A V A K I
 301 TACAAAGAGGACTACCGGAAGCGACACGCCGTGTCAGGGTCTGCGTACGACTATTGAATC
 T K R T T G S D T P C Q G L R T T I E S
 361 CGCGTATACAGAAGACGAAAACGAAGACGATGGCGCGACGGGTACGGAGCAGCCCGACGA
 A Y T E D E N E D D G A T G T E Q P D D
 421 TCTTAGCGAGGAATACGAGTACGACGAAAACGACGAATCGTTTCTAACCGGTTTCGTGAT
 L S E E Y E Y D E N D E S F L T G F V I
 481 CGGAAGTACTTACCACACGATCGTCGGAGGAGGACTCTCCGTCACGTTCCGGATTTACGGG
 G S T Y H T I V G G G L S V T F G F T G
 541 ATGTCCTACCGTTAAGGCGATATCCGAACACGTCAAAGGACGCCACGTCTACGTCCGACT
 C P T V K A I S E H V K G R H V Y V R L
 601 GTCCAGCGACGCTCCTTGGAGAGATACGAATCCCGTGTCTATGAACCGTACAGAGGCGCT
 S S D A P W R D T N P V S M N R T E A L
 661 CGCCCTACTCGACACGTGTGAAGTGTCCGTAGATATCAAATGCAGTCGCGTCAACGTAAC
 A L L D T C E V S V D I K C S R V N V T
 721 CGAAACGACGTACGGAACCGCGCGCTTGTCCCGGTATAACTCAAGCGACGAGACGCAG
 E T T Y G T A A L V P R I T Q A T R R S
 781 TCATATTATCGGATCTACCCTGGTCGACACGGAATGTGTGAAGAGTCTAGACATAACCGT
 H I I G S T L V D T E C V K S L D I T V
 841 CCAAGTGGGTGAAATGTGTAAGAGAACGTCTGATCTCTCGGCGAGAGACAGTCTTAAGGT
 Q V G E M C K R T S D L S A R D S L K V
 901 AAAGAACGGCAAACCTACTCGAGGACGATATCCTTGTCTTCGTACGCCTACCCTCAAGGC
 K N G K L L E D D I L V L R T P T L K A
 961 GTGTAACCTAATCCTATCTACGATCGATGTCGTATTTTTCTGACCGTTACGCGTCACGTTT
 C N
 1021 TTATACCTATATAAATAGTTAAAACCCATATAGGGAATACCGCTCGCTTTTTTTTTCCTTC
 1081 GTAGTTGTTTACCCGCTCGATAGATCGCGTCGAGGAAGTACCAACCGTGACCACTCCTCC
 1141 GGCGGGGATCC

图 2

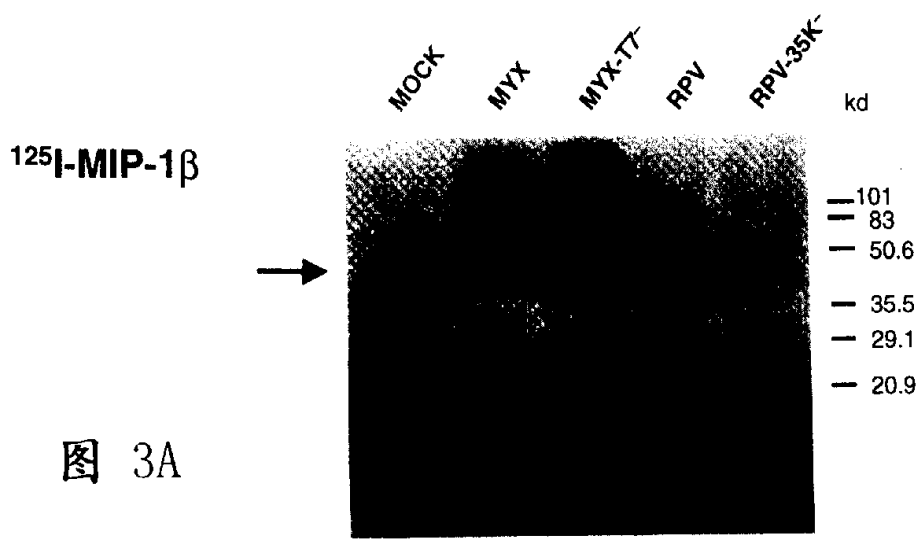


图 3A

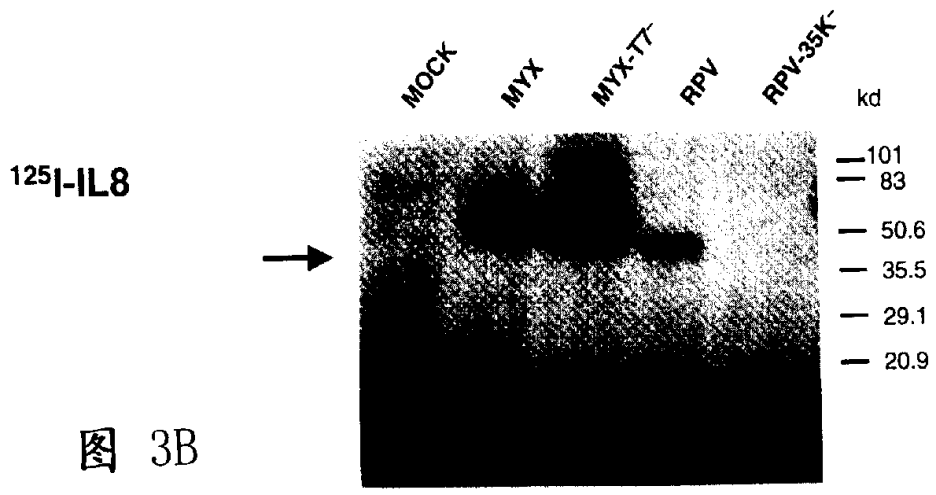


图 3B

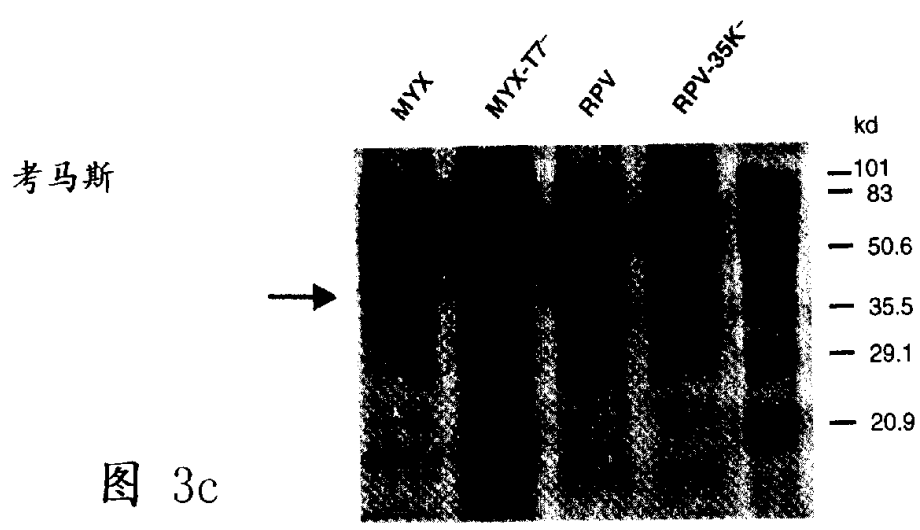


图 3c

^{125}I MIP-1 β

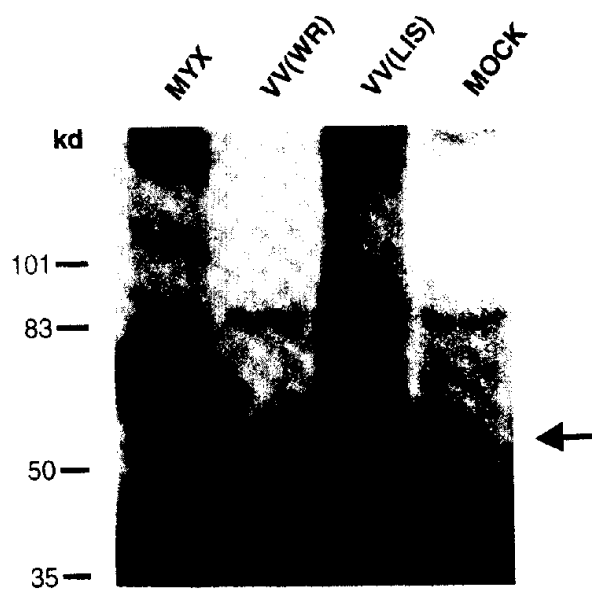


图 4