

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/19



[12] 发明专利说明书

C07K 14/52 A61K 38/19

A61K 38/48 G01N 33/68

[21] ZL 专利号 98809569.6

[45] 授权公告日 2004 年 4 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1145693C

[22] 申请日 1998.9.28 [21] 申请号 98809569.6

[30] 优先权

[32] 1997. 9. 29 [33] EP [31] 97116863. 8

[32] 1997. 12. 19 [33] EP [31] 97122471. 2

[32] 1998. 3. 10 [33] EP [31] 98104216. 1

[86] 国际申请 PCT/EP1998/006142 1998. 9. 28

[87] 国际公布 WO99/16876 英 1999. 4. 8

[85] 进入国家阶段日期 2000. 3. 27

[71] 专利权人 应用研究系统 ARS 股份公司

地址 荷属安的列斯群岛库拉索市

[72] 发明人 P·皮奥斯特 S·斯特勒伊夫

J·范达默

审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 4 页

[54] 发明名称 作为趋化因子拮抗剂的氨基端截短的 MCP-2

[57] 摘要

本发明涉及以氨基端截短的 MCP-2，它缺少对应于天然存在的 MCP-2 的氨基酸残基 1、1-2、1-3、1-4 或 1-5 的 NH₂ 端氨基酸并具有趋化因子拮抗活性，本发明还涉及编码这些 MCP-2 的 cDNA 序列，以及它们在需要有趋化因子作用拮抗活性的疾病治疗和/或诊断中的应用，以及包含它们的药物组合物。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1. 一种氨基端截短的 MCP-2, 它缺少对应于天然存在的 MCP-2 的氨基酸残基 1-5 的氨基端氨基酸, 并具有趋化因子拮抗活性。
- 5 2. 根据权利要求 1 所述的氨基端截短的 MCP-2, 它具有 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。
3. 根据前述任一权利要求所述的氨基端截短的 MCP-2, 它是糖基化的形式。
4. 一种 DNA 分子, 它包含编码权利要求 1 所述的氨基端截短 MCP-2 的 DNA 序列。
- 10 5. 一种表达载体, 它包含权利要求 4 所述的 DNA 分子。
6. 一种宿主细胞, 它包含权利要求 5 所述的表达载体。
7. 一种制备权利要求 1 所述的氨基端截短的 MCP-2 的重组方法, 该方法包括将权利要求 6 所述的宿主细胞培养在培养基中。
8. 权利要求 1 所述的氨基端截短的 MCP-2 在生产用于治疗或诊断疾病的药物中
15 的应用, 其中该疾病的治疗或诊断需要有拮抗趋化因子作用的活性。
9. 根据权利要求 8 所述的应用, 该应用用于生产用来治疗炎性疾病、HIV 感染、血管生成和血细胞生成相关疾病或肿瘤的药物。
10. 一种药物组合物, 它包含权利要求 1 所述的氨基端截短的 MCP-2 以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

作为趋化因子拮抗剂的氨基端截短的 MCP-2

5

发明领域

本发明涉及氨基端截短的 MCP-2, 它缺少对应于天然存在的 MCP-2 的氨基酸残基 1、1-2、1-3、1-4 或 1-5 的 NH₂ 端氨基酸, 并具有趋化因子拮抗活性, 本发明还涉及编码这些 MCP-2 的 cDNA 序列, 以及它们在需要有趋化因子作用拮抗活性的疾病治疗和/或诊断中的应用, 以及包含它们的药物组合物。

发明背景

趋化因子构成了具有白细胞趋化和活化性能的一个促炎性细胞因子小家族。根据第一个半胱氨酸的位置, 趋化因子家族可以分为 C-C、C-X-C 和 C-X₃-C 趋化因子 (Baggiolini M.等人, 1994; Baggiolini M.等人, 1997 和 Taub D.等人, 1996)。

许多 C-X-C 趋化因子, 如白细胞介素-8(IL-8), 对于嗜中性粒细胞有趋化作用, 而 C-C 趋化因子, 如单核细胞趋化蛋白-3(MCP-3), 则对包括单核细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、NK 细胞和树突细胞在内的各种白细胞有活性。

趋化因子的氨基端区域参与受体结合, 氨基端的加工可以激活趋化因子或使趋化因子完全没有活性。

C-X-C 趋化因子血小板碱性蛋白只有在除去氨基端的 24 个残基后才变成一种嗜中性粒细胞趋化肽(NAP-2)(Walz A.等人, 1989 和 Van Damme J.等人, 1990)。

IL-8 缺失 8 个氨基端残基导致趋化活性增强, 但是位于所有嗜中性粒细胞趋化性 C-X-C 趋化因子中第一个 Cys 前的 Glu-Leu-Arg 基序进一步断裂却导致其完全失去活性(Clark-Lewis I.等人, 1991)。

另一个 C-X-C 趋化因子粒细胞趋化蛋白-2(GCP-2)发生相似的氨基端蛋白水解(解离下 8 个氨基酸)却对嗜中性粒细胞趋化活性没有影响(Proost P.等人, 1993a)。

缺少 8 到 9 个氨基端氨基酸的合成的 C-C 趋化因子 MCP-1、MCP-3 和 RANTES 对单核细胞没有活性, 并被用作受体拮抗剂(Gong J.等人, 1996; 和 Gong J.等人, 1995)。

RANTES 延伸一个甲硫氨酸将导致该分子完全失去活性, Met-RANTES 表现为真正的 RANTES 拮抗剂(Proudfoot A. E.等人, 1996)。

已经用 cDNA 探针(从刺激的针对休眠的外周血淋巴细胞(PBL)衍生获得)通过差

示实验室筛选分离出人 MCP-2(单核细胞引诱蛋白-2)的克隆(它最初称为“HC14”, Chang H.C.等人, 1989)。cDNA 衍生的蛋白序列与纯化的天然 MCP-2 相同; 然而, 还分离出推定的等位基因变体(其中 Gln46 代替 Lys46)(Van Coillie 等人, 1997)。

还用固相化学方法合成了 MCP-2(Proost P.等人, 1995)。

5

发明描述

本发明的主要目的是氨基端截短的 MCP-2, 它缺少对应于天然存在的 MCP-2 的氨基酸残基 1、1-2、1-3、1-4 或 1-5 的氨基端氨基酸, 并具有趋化因子拮抗剂活性。

10 更具体地说, 本发明的一个目的是 MCP-2(6-76), 它是缺少氨基端氨基酸 1-5 的 MCP-2, 如图 1 和 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 所示。

本发明的这种氨基端截短的 MCP-2 可以是糖基化形式或非糖基化形式。

术语“趋化因子拮抗剂”指“成熟的、天然存在的全长趋化因子的拮抗剂”。

15 本发明的另一个目的是包含编码本发明氨基端截短的 MCP-2 的 DNA 序列的 DNA 分子, 其中所述 DNA 序列包括基本上相同的核苷酸序列。

“基本上相同的核苷酸序列”包括凭借遗传密码的简并性也能编码出给定氨基酸序列的所有其它核酸序列。

20 本发明还包括含有上述 DNA 的表达载体, 转化了该载体的宿主细胞, 以及通过将所述转化细胞培养在合适培养基中来制备本发明这些氨基端截短的 MCP-2 的方法。

编码本发明蛋白的 DNA 序列可以插入合适的质粒并与其连接。一旦形成表达载体, 就将其导入合适的宿主细胞, 该宿主细胞进而表达载体, 产生所需蛋白。

本文提到的任何本发明重组蛋白的表达均可用合适的表达载体在真核细胞(如酵母、昆虫或哺乳动物细胞)或原核细胞中进行。本领域中已知的任何方法均可采用。

25 例如, 用本领域熟知的技术(参见 Sambrook 等人, 1989)将上述任一方法获得的编码蛋白的 DNA 分子插入适当构建的表达载体中。利用同聚物加尾、采用合成的 DNA 接头的限制性连接或平头连接技术, 将双链 cDNA 连接到质粒载体中。用 DNA 连接酶连接 DNA 分子, 通过碱性磷酸酶处理避免不希望发生的连接。

30 为了能表达所需的蛋白, 表达载体还应包含特异的含有转录和翻译调控信息的核苷酸序列, 该核苷酸序列与编码所需蛋白的 DNA 连接, 从而允许该基因表达和产生蛋白。首先, 为了使基因被转录, 它的前面必须有能被 RNA 聚合酶识别的启动子, 该启动子与聚合酶结合, 从而启动转录过程。可以采用具有不同工作效率的各种启

动子(强的和弱的启动子)。

对于真核宿主,可以采用不同的转录和翻译调控序列,这取决于宿主的性质。它们可以来自病毒,如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猿猴病毒等,其中调控信号与具有高表达水平的特定基因相关联。例子是疱疹病毒的 TK 启动子、SV40 早期启动子、
5 酵母 gal4 基因启动子等。可以选择转录起始调控信号,使其具有阻遏和激活作用,从而能够调节基因的表达。

将包含编码本发明蛋白的核苷酸序列的 DNA 分子插入载体中与转录和翻译调控信号操作性相连,该载体能将所需基因序列整合入宿主细胞中。

还可以通过导入一个或多个允许选择含有表达载体的宿主细胞的标记物,来选择被导入的 DNA 稳定转化的细胞。标记物还可为营养缺陷型宿主提供光营养、杀微生物的抗性,例如抗生素,或重金属如铜等。可选择的标记基因可以和待表达的 DNA 基因序列直接连接,或通过共转染导入同一细胞中。为了使本发明蛋白的合成最优,可能还需要额外的元件。

选择特定质粒或病毒载体的重要因素包括:从不含载体的受体细胞中识别和选
15 出含有载体的受体细胞的容易程度;特定宿主中所希望的载体拷贝数;以及是否希望载体能在不同种宿主细胞之间“穿梭”。

一旦制得了用于表达的载体或含 DNA 序列的构建物,就可用以下多种合适的方法将该 DNA 构建物导入合适的宿主细胞中:转化、转染、偶联、原生质体融合、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等。

20 宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。较佳的是真核宿主,例如哺乳动物细胞,如人、猴、小鼠和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,因为它们为蛋白质分子提供了翻译后的修饰,包括正确折叠或在正确位点的糖基化。酵母细胞也可进行包括糖基化的翻译后肽修饰。有许多重组 DNA 策略采用了强启动子序列和高拷贝数的质粒,它们可用来在酵母中产生所需的蛋白质。酵母识别克隆的哺乳动物基因产物上的前导序列,
25 并分泌携带前导序列的肽(即前肽(pre-peptide))。

在导入载体后,使宿主细胞在选择性培养基中生长,该培养基使含有载体的细胞选择性地生长。克隆的基因序列的表达导致产生所需的蛋白质。

本发明的氨基端截短的 MCP-2 可用本领域中其它熟知的方法来制备,尤其是已建立的化学合成方法:用自动化固相肽合成仪,然后进行层析纯化。

30 例如,本发明的趋化因子可用 Fmoc(9-芴甲氧基羰基)、tBoc(叔丁氧羰基)或其它任何类似的化学合成在不同氨基酸上有或没有合适的侧链保护基团的条件下合成。有或没有合适的侧链保护基团的氨基酸被预先激活(例如用 HBTU/HOBt[2-(1H-

苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基-脲六氟磷酸/1-羟基苯并三唑), 并偶联到生长的肽链上。在加入下一个残基之前, 从 α 氨基上除去保护基团(例如 Fmoc)。合成后除去所有保护基团, 纯化完整的全长肽并用化学方法或酶法将肽折叠(包括在半胱氨酸之间形成二硫键)成本发明的对应的趋化因子。

5 天然的、合成的或重组的蛋白可用已知用于纯化的任一种方法(即任何常规方法, 包括抽提、沉淀、层析、电泳等(例如参见 Proost P.等人, 1996))来进行纯化。用于纯化本发明蛋白的另一优选的纯化方法是亲和层析, 该方法利用的是结合靶蛋白并产生和固定在柱中所含凝胶基质上的单克隆抗体或肝素的亲和力。使含有蛋白质的不纯制备物通过该柱。蛋白质将会通过肝素或特异性抗体结合在柱上, 而杂质
10 则将通过柱。洗柱后, 通过改变 pH 或离子强度将蛋白质从凝胶上洗脱下来。

本发明的氨基端截短的 MCP-2 可用于治疗和/或诊断需要有趋化因子拮抗作用的疾病。这些疾病的例子包括: 炎性疾病、血管生成和血细胞生成相关疾病、肿瘤、传染病(包括 HIV)、自身免疫疾病、动脉粥样硬化、肺疾病和皮肤病。

因此, 本发明另一方面提供了本发明的蛋白在生产用于治疗上述疾病的药物中
15 的应用。

药物宜为包含本发明蛋白以及一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物形式。这些药物组合物形成了本发明的另一个方面。

本发明还有一个方面是一种治疗上述疾病的方法, 该方法包括给予处于发生这些疾病危险的对象或已经表现出这些病理学现象的对象药学上活性量的本发明氨基
20 端截短的 MCP-2。

现在将通过下列实施例来描述本发明, 这些实施例不应被理解成以任何方式限定了本发明。实施例将参考下文所述的附图。

附图简述

25 图 1: 它显示了 MCP-2 以及其已知变体的氨基酸序列。信号序列用斜体字表示, 而 C 端残基用粗体表示。箭头表示本发明的氨基端截短的 MCP-2(6-76)的第一个氨基酸。下划线是与 MCP-2 变体中不同的氨基酸。

图 2: 氨基端截短的 MCP-2(6-76)的 SDS-PAGE:

泳道 1: 天然 MCP-2(1-76, 100ng/泳道);

30 泳道 2: 天然 MCP-2(1-76, 30 ng/泳道);

泳道 3: 天然 MCP-2(6-76, 30 ng/泳道); 和

泳道 4: 合成的 MCP-2(1-76, 60 ng/泳道)。

凝胶在还原性条件下进行电泳, 蛋白质用银染色。

图 3: 它显示了修饰型 MCP-2 的趋化效力的比较。

测试完整的天然(nat)和合成(syn)MCP-2(1-76)、氨基端截短的天然 MCP-2(6-76)以及羧基端截短的合成的 MCP-2(1-74)在 THP-1 细胞上的趋化活性。结果表示成四次或四次以上单独实验的 CI 平均值 \pm SEM。

图 4: 与 MCP-1 相比, 天然的 MCP-2 是使单核细胞中钙流动的较弱的激动剂。完整的 MCP-2 随剂量的增加(15、50 和 150ng/ml)而增加 THP-1 细胞中的 $[Ca^{2+}]_i$ 。图中显示了两个实验中一个典型实验的结果。

10 实施例

实施例 1: 氨基端截短的 MCP-2

材料和方法

趋化因子和免疫试验

如前所述的那样(Proost P.等人, 1995)合成和纯化 MCP-2。

15 从小鼠获得特异性抗人 MCP-2 抗体, 并在 Sepharose 柱(CNBr 活化的 Sepharose 4B, Pharmacia, Uppsala, Sweden)上亲和纯化, 用生产商提供的条件使合成的 MCP-2 与柱偶联。

用亲和纯化的抗人 MCP-2 包被 ELISA 板, 并用生物素化的抗-MCP-2 作为捕获性抗体。用过氧化物酶标记的链霉亲和素和 TMB 进行检测。MCP-2 ELISA 的检测
20 极限约为 0.1ng/ml。

MCP-2 的生产和纯化

从 Antwerp 和 Leuven 输血中心所得 132 份献血员的外周血单核细胞衍生的条件培养基中纯化获得单核细胞趋化蛋白(Proost P.等人, 1996)。

25 通过在羟乙基淀粉(Fresenius AG, Bad Homburg, Germany)中沉淀和在 3-乙酰氨基-5-乙酰甲氨基-2,4,6-三碘苯甲酸钠溶液(sodium metrizoate, Lymphoprep; Nyegaard, Oslo Norway)梯度离心, 除去红细胞和粒细胞。

用 10 微克/毫升 Con A 和 2 微克/毫升 LPS 培育单核细胞(60×10^9 细胞)。48 至 120 小时后, 收集条件培养基并置于 -20°C 直至纯化。

30 如以前所描述的那样(Proost P.等人, 1996), 用四步纯化程序纯化天然的 MCP-2。

简言之, 在控制孔径的玻璃或硅酸上浓缩条件培养基, 并在肝素-Sepharose 柱 (Pharmacia)上亲和层析部分纯化。

含有 MCP-2 免疫反应性的级分用 Mono S(Pharmacia)阳离子交换层析进一步纯化,并用 pH4.0 的 NaCl 梯度洗脱。

在用 0.1%三氟乙酸(TFA)平衡的 C-8 Aquapore RP-300 柱(Perkin Elmer, Norwalk CT)上通过 RP-HPLC 将天然的 MCP-2 纯化至均一。蛋白质用乙腈梯度洗脱。

5

用 SDS-PAGE、氨基酸序列分析和质谱法对 MCP-形式进行生物化学特性分析

在还原性条件下、Tris/麦黄酮(tricine)凝胶上用 SDS-PAGE 检测柱级分的纯度(Proost P.等人, 1996)。银染蛋白质,并用下列相对分子量(*Mr*)标记: OVA(*Mr* 45000), 碳酸酐酶(*Mr* 31000)、大豆胰蛋白酶抑制剂(*Mr* 21500)、 β -乳球蛋白(*Mr* 18400)、溶菌酶(*Mr* 14400)以及抑蛋白酶肽(*Mr* 6500)。

10

在脉冲液体 477A/120A 蛋白质测序仪(Perkin Elmer)上,用 N-甲基哌啶作为偶联碱,用 Edman 降解法测定纯化的趋化因子的氨基端序列。将封闭的蛋白置于 75%甲酸中 50 小时,使其在 Asp 和 Pro 之间断裂。不作进一步纯化就对甲酸消化物测序。

15

用基质辅助性激光解吸电离/飞行时间质谱法(MALDI/TOF-MS)(Micromass TofSpec, Manchester, UK)测定 MCP-2 的 *Mr*。分别用 α -氰基-4-羟基肉桂酸和细胞色素 C 作为基质和内部标准。

趋化活性的检测

在 Boyden 微室中用孔径 5 微米的聚乙烯吡咯烷酮处理的聚碳酸膜测试 MCP-2 在新鲜纯化的单核细胞(2×10^6 细胞/毫升)或单核细胞性 THP-1 细胞(0.5×10^6 细胞/毫升; 转种后 2 天)上的趋化活性。

20

将样品和细胞稀释在添加了 1 毫克/毫升人血清白蛋白(Red Cross Belgium)的 HBSS(Life technologies/Gibco BRL, Paisley, Scotland)中。37°C 培育 2 小时后,固定细胞,用 Diff-Quick 染色液(Harleco, Gibbstown, NJ)染色,然后用显微镜在 10 个放大 500 倍的油浸视野中计数迁移通过膜的细胞。

25

根据迁移到样品中的细胞数与迁移至对照培养基中的细胞数之比(Van Damme J. 等人, 1992), 计算样品(每个室中一式三份)的趋化指数(CI)。

对于脱敏实验,在加入 Boyden 微室的上排孔之前,用无生物活性的趋化因子变体 37°C 培育细胞 10 分钟。用 HBSS 处理的细胞的 CI 对样品的 CI 作为参照值, 计算 CI 的抑制%。

30

胞内 Ca^{2+} 浓度的检测

如以前所述的那样(Wuyts A.等人, 1997), 测定胞内钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)。在含荧光指示剂 fura-2(fura-2/AM 2.5 μ M; Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands)和 0.01% Pluronic F-127(Sigma, St Louis MO)的 Eagle 极限必需培养基(EMEM, Gibco)+ 0.05%FCS 中, 培育纯化的单核细胞或 THP-1 细胞(10^7 细胞/毫升)。

5 37 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟后, 洗涤细胞两次, 并以 10^6 细胞/毫升的浓度重悬于含 1mM Ca^{2+} 和 0.1%FCS 的 HBSS(用 pH 7.4 的 10mM HEPES/NaOH 作为缓冲液)中。37 $^{\circ}$ C 平衡细胞 10 分钟, 然后在 LS50B 发光分光光度计(Perkin Elmer)中测定 fura-2 荧光。

在 340 和 380nm 处激发后, 在 510nm 检测荧光。用 Grynkiewicz 方程式(Grynkiewicz 等人, 1985)计算 $[Ca^{2+}]_i$ 。为了测定 R_{max} , 用 50 μ M 毛地黄皂苷裂解细胞。
10 随后, 用 20mM Tris 调节 pH 至 8.5, 在裂解的细胞中加入 10mM EGTA, 获得 R_{min} 。所用 K_d 为 224nM。

对于脱敏实验, 首先用缓冲液、不同浓度的趋化因子或趋化因子拮抗剂刺激单核细胞或 THP-1 细胞。作为第二刺激, MCP-2 所用浓度为缓冲液预先刺激后诱导 $[Ca^{2+}]_i$ 显著增加的浓度。第二刺激在加入第一刺激后 2 分钟施加。比较用趋化因子或趋化
15 因子拮抗剂预先刺激后的信号与加入缓冲液后的信号, 计算对第二刺激反应中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的抑制百分数。

结果

翻译后修饰型 MCP-2 的分离

20 用特异的、灵敏的 ELISA 追踪检测促分裂素和内毒素刺激的外周血单核细胞所产生的不同形式的 MCP-2。

根据标准的分离方法(Proost P.等人, 1996)纯化条件培养基, 这些方法包括吸附到孔径控制的玻璃上和肝素 Sepharose 层析。

25 随后, 进行 FPLC mono S 阳离子交换层析纯化, 然后采用 C-8 RP HPLC 作进一步纯化。用 SDS-PAGE 和 MALDI/TOF-MS 测定分子量。

分离获得不同形式的 MCP-2: 除了真实的 7.5kDa 的 MCP-2(1-76)外, 用 RP-HPLC 将缺少 5 个残基的 7kDa 氨基端截短型 MCP-2[MCP-2(6-76)]纯化至均一, 并用氨基酸序列分析鉴定(图 2)。MALDI/TOF-MS(表 I)测得完整 MCP-2 的分子量为 8881Da(理论上的相对分子量为 8893Da), 而测得 MCP-2(6-76)的分子量为 8365Da, 这确认了
30 有 5 个氨基端氨基酸缺失(理论上的相对分子量为 8384Da)。这些天然形式的 MCP-2 在 THP-1 趋化试验中的功能比较表明, 完整的 MCP 2 在 5ng/ml 下仍有活性, 而截短的 MCP-2(6-76)在 0.6-60ng/ml 的浓度范围内测试时仍没有趋化活性(图 3)。还比较

了完整的天然 MCP-2 与合成的 MCP-2(1-76)以及缺少 2 个残基的羧基端截短的合成型 MCP-2[MCP-2(1-74)](Proost P.等人, 1995)的效力。

5 还发现这些形式的最低有效趋化浓度为 5ng/ml(图 3)。尽管在趋化试验中, 天然的完整 MCP-1 和 MCP-2 的比活是相当的(Van Damme J, 等人, 1992), 但是 MCP-2 使钙迁移的性能仍有待争论。

然而, 在 Ca^{2+} 迁移实验中, 天然的或合成的 MCP-2(1-76)的最低有效剂量比天然的完整的 MCP-1(1-76)高 10 倍(图 4), 而 MCP-2(6-76)却仍没有活性。

尽管如此, 完整的 MCP-2(50ng/ml)却能使 MCP-2(15ng/ml)和 MCP-3(10ng/ml)脱敏, 使两者的趋化作用分别受到 52%和 45%的抑制。

10 由于 MCP-2 在 Ca^{2+} 试验中的比活较低, 因此在 Boyden 微室中进行了 MCP-2(6-76)对趋化作用的脱敏。据报道, 完整的 MCP-2 在单核细胞趋化试验中与活性 MCP-1、MCP2 和 MCP 3 交叉脱敏(Sozzani S.等人, 1994), 所以, 我们研究天然的无活性的 MCP-2(6-76)是否也能使 MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 RANTES 脱敏(表 II)。用 100ng/ml 无活性 MCP-2(6-76)预先培育 THP-1 细胞已经能明显抑制 10ng/ml MCP-1(63%)、
15 5ng/ml MCP-2(75%)、30ng/ml MCP-3(62%)和 100ng/ml RANTES(75%)诱导的趋化作用。另外, 浓度低 3 倍的各 MCP 所产生的趋化作用被 100ng/ml MCP-2(6-76)完全 (91-100%)抑制。而且, 在低达 10ng/ml 的浓度下, MCP-2(6-76)仍然能明显抑制 MCP-1(3ng/ml)、MCP-2(1.5ng/ml)或 MCP 3(10ng/ml)以及 RANTES(30ng/ml)诱导的趋化活性。总之, MCP-2(6-76)是天然产生的、无活性的化学引诱剂, 并拮抗几种 C-
20 C 趋化因子, 对 MCP-3 的效果最突出。

表 I

天然型 MCP-2 的生物化学特性分析。氨基端氨基酸分析以及 C-8 RP-HPLC 纯化的天然 MCP-同种型的实验(SDS-PAGE 和 MALDI/TOF-MS)和理论的相对分子量的比较

MCP 形式	氨基端序列	相对分子量(Da)		
		未糖基化的理论值	SDS-PAGE	MALDI/TOF-MS
MCP-2(1-76)	封闭	8893	7500	8881
MCP-2(2-76)	SIPITCC	8384	7500	8365

表 II

MCP-2(6-76)使微室中的 MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 RANTES 的单核细胞趋化反应脱敏。

趋化因子 ^a	浓度	趋化反应的拮抗作用 ^{b,c}		趋化作用的抑制%
		缓冲液	100ng/ml MCP-2(6-76)	
MCP-1	10	22.3±7.9	8.3±3.8	63±21
	3	15.0±8.0	1.3±0.3	99±1.0
MCP-2	5	36.0±15.6	10.8±6.1	75±8.0
	1.5	6.7±1.4	1.5±0.3	91±7.0
MCP-3	30	13.2±0.4	6.0±4.0	62±31
	10	3.0±1.5	<1	100±0.0
RANTES	100	6.3±0.8	2.6±1.3	75±19
	30	4.0±0.8	1.5±0.3	77±16
		缓冲液	100ng/ml MCP-2(6-76)	
MCP-1	10	12.7±2.3	10.5±3.8	24±1.8
	3	7.5±0.0	3.0±0.3	69±4.0
MCP-2	5	38.0±5.3	27.2±4.9	30±6.0
	1.5	18.3±4.6	9.2±1.4	45±23
MCP-3	30	13.2±1.9	8.0±1.0	37±19
	10	7.7±1.4	1.7±0.3	90±6.0
RANTES	100	5.5±0.6	5.8±0.9	17±7.0
	30	3.2±0.7	2.5±0.5	39±18

^a 将 MCP-1、MCP-2、MCP-3 或 RANTES 作为化学吸引剂加入下排孔中。

5 ^b 微室的上排孔中加入预先用 MCP-2(6-76)或缓冲液培育的 THP-1 细胞

^c 3 个独立实验的 CI 平均值±SEM

参考文献

- Baggiolini M. 等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 55, 97-179, 1994.
- Baggiolini M. 等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 15, 675-705, 1997.
- Chang H. C. 等人, *International Immunology*, 1(4), 388-397, 1989.
- Clark-Lewis I. 等人, *J. Biol. Chem.*, 266, 23128-23134, 1991.
- De Meester I. 等人, *J. Immunol. Methods* 189, 99-10526, 1996.
- Deng H. 等人, *Nature.*, 381, 661-666, 1996.
- Gong J. 等人, *J. Exp. Med.*, 181, 631-640, 1995.
- Gong J. 等人, *J. Biol. Chem.* 271, 10521-10527, 1996.
- Gryniewicz G. 等人, *J. Biol. Chem.*, 260, 3440, 1985.
- Proost P. 等人, *Biochemistry*, 32, 10170-10177, 1993a.
- Proost P. 等人, *J. Immunol.*, 150, 1000-1010, 1993.
- Proost P. 等人, *Cytokine*, 7, 97-104, 1995.
- Proost P. 等人, *Methods: A companion to Methods in Enzymol.*, 10, 82, 1996.
- Proudfoot A. E. 等人, *J. Biol. Chem.*, 271, 2599-2603, 1996.
- Sambrook 等人, 《分子克隆实验手册》, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- Schols D. 等人, *J. Exp. Med.*, 186, 1383-1388, 1997.
- Sozzani S. 等人, *J. Immunol.*, 152, 3615, 1994.
- Taub D. 等人, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7, 335-76, 1996.
- Van Coillie E. 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 231, 726-730, 1997.
- Van Damme J. 等人, *Eur. J. Biochem.*, 181, 337-344, 1989.
- Van Damme J. 等人, *Eur. J. Immunol.*, 20, 2113-8, 1990.
- Van Damme J. 等人, *J. Exp. Med.*, 176, 59, 1992.
- Walz A. 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 969-75, 1989.
- Wuyts A., 等人, *Biochemistry* 36, 2716-2723, 1997.

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

- (A) 姓名: APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.
- (B) 街道: 14 JOHN B. GORSIRAWEG
- (C) 城市: CURACAO
- (E) 国家: THE NETHERLANDS ANTILLES
- (F) 邮政编码: 没有
- (G) 电话: 639300
- (H) 电传: 614129
- (I) 电报:

5

(ii) 发明名称: 作为趋化因子拮抗剂的氨基端截短的 MCP-2

(iii) 序列数目: 4

10

(v) 计算机可读形式:

- (A) 记录介质类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容型
- (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

15

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 99 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑结构: 线性

20

(ii) 分子类型: 蛋白质

25

(iii) 假设: 没有

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键: 蛋白质
- (B) 位置: 1..76

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

```

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Met Ala Ala Thr
      -20                      -15                      -10

Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile
      -5                      1                      5

Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu
10                      15                      20                      25

Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val
                      30                      35                      40

Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu
                      45                      50                      55

Arg Trp Val Arg Asp Ser Met Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn
      60                      65                      70

Leu Lys Pro
      75

```

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

- 5 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 99 氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (C) 链型:
 - (D) 拓扑结构: 线性

10 (ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 没有

- 15 (ix) 特征:
- (A) 名称/关键: 蛋白质
 - (B) 位置: 1..76

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

```

Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Met Ala Ala Thr
  -20                               -15                       -10
Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile
  -5                               1                               5
Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu
10                               15                               20                       25
Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val
  30                               35                               40
Ile Phe Lys Thr Gln Arg Gly Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu
  45                               50                               55
Arg Trp Val Arg Asp Ser Met Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn
  60                               65                               70
Leu Lys Pro
  75

```

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 71 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型:
 (D) 拓扑结构: 线性

10 (ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 没有

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

```

Ser Ile Pro Ile Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile Asn Arg Lys Ile Pro
1                               5                               10                       15
Ile Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr Asn Ile Gln Cys Pro
  20                               25                               30
Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly Lys Glu Val Cys Ala
  35                               40                               45
Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met Lys His Leu Asp Gln
  50                               55                               60
Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro
  65                               70

```

15

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 71 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

5

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假设: 没有

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

```

Ser Ile Pro Ile Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile Asn Arg Lys Ile Pro
1           5           10           15
Ile Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr Asn Ile Gln Cys Pro
20           25           30
Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Gln Arg Gly Lys Glu Val Cys Ala
35           40           45
Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met Lys His Leu Asp Gln
50           55           60
Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro
65           70

```

MCP-2

-23

1 ↓

MKVSALLCL LLMAATFSPQ GLAQPDSVSI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIQCP
KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP

76

MCP-2 变体

-23

1 ↓

MKVSALLCL LLMAATFSPQ GLAQPDSVSI PITCCFNVIN RKIPIQRLES YTRITNIQCP
KEAVIFKTKR GKEVCADPKE RWVRDSMKHL DQIFQNLKP

76

图 1

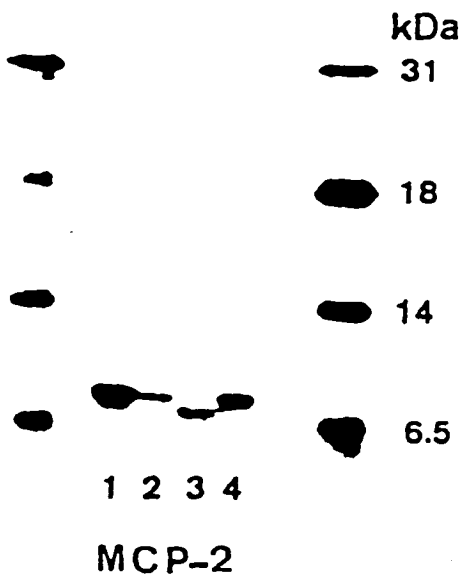
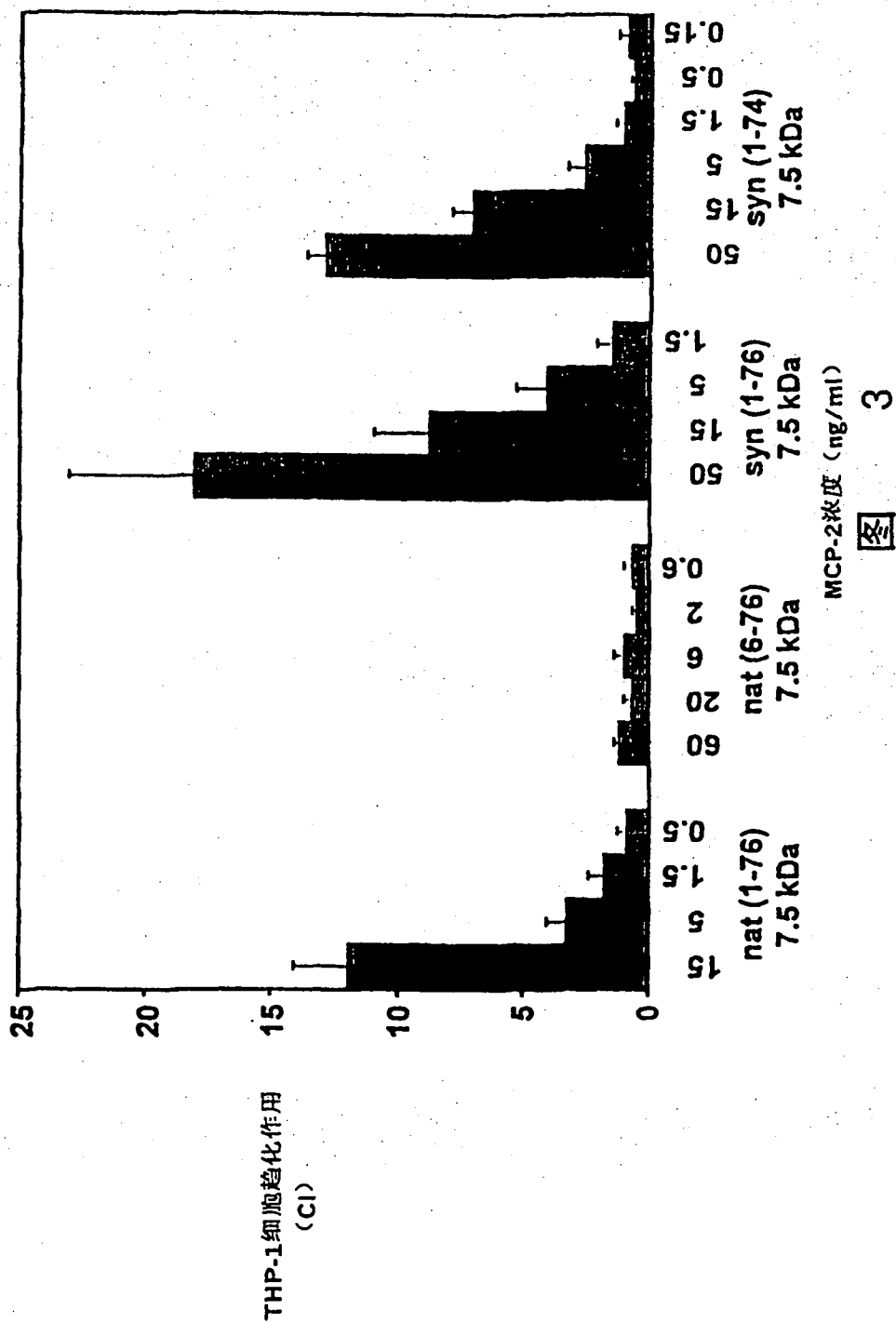


图 2



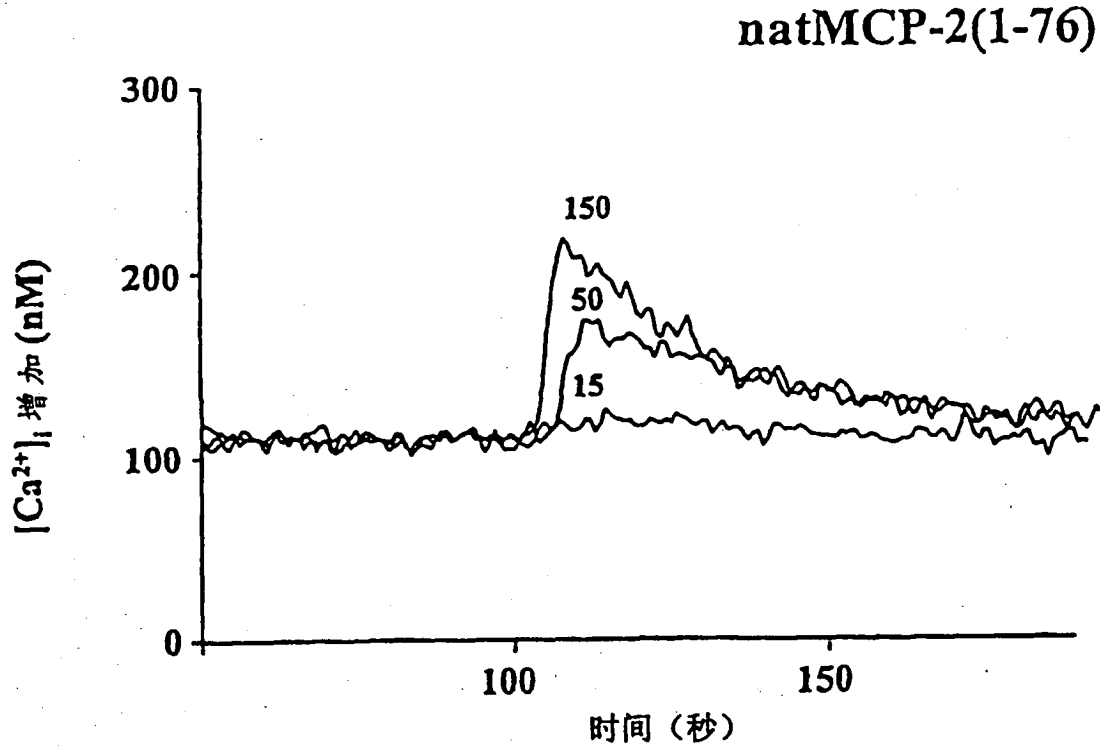
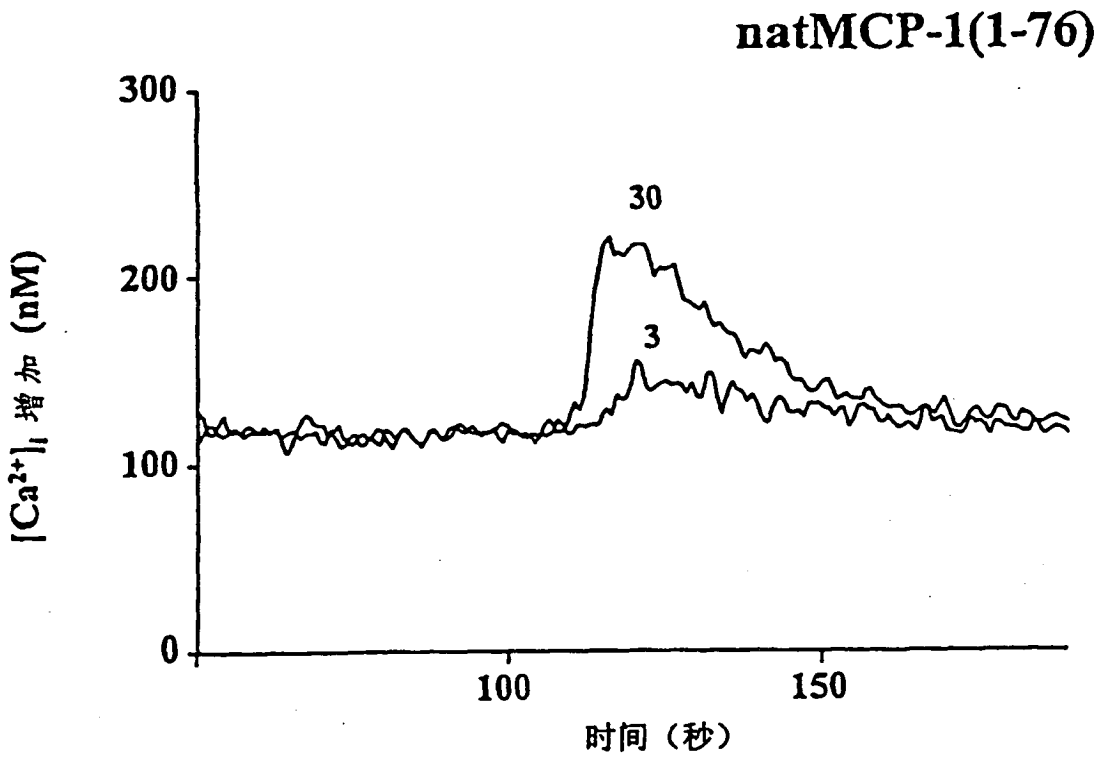


图 4