

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/00
C07K 14/435 C12N 5/10
C12N 15/00 C12N 15/12
A61K 38/16 A61K 38/17

[21] 申请号 96196124.4

[43]公开日 1998年9月9日

[11] 公开号 CN 1192751A

[22]申请日 96.6.7

[30]优先权

[32]95.6.7 [33]US[31]08/479,126

[86]国际申请 PCT/US96/10087 96.6.7

[87]国际公布 WO96/40762 英 96.12.19

[85]进入国家阶段日期 98.2.6

[71]申请人 人类基因组科学公司

地址 美国马里兰

[72]发明人 李浩东 S·M·鲁宾

G·G·萨顿三世

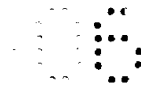
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所
代理人 陈文平

权利要求书 3 页 说明书 40 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 单核细胞趋化蛋白-4

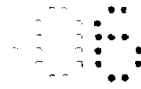
[57]摘要

本发明公开了人单核细胞趋化蛋白-4 和编码该多肽的 DNA (RNA) 以及用重组技术生产这种多肽的方法。还公开了利用这种多肽预防和/或治疗进行干细胞活化、骨髓和神经元保护的方法, 以及治疗肿瘤、促进伤口愈合、抵抗寄生虫感染和调节血细胞生成的方法。还公开了这种多肽的拮抗剂, 它们可用于治疗类风湿关节炎、肺炎、变态反应、感染性疾病并用于预防炎症和动脉粥样硬化。还公开了检测编码本发明多肽的核酸序列中突变以及检测本发明多肽水平的变化用于疾病检查的诊断检测方法。



权 利 要 求 书

1. 一种分离的多核苷酸,包含从下组选择的一个成员:
 - (a) 编码含有 SEQ ID NO:2 所示的 - 26 到 93 位氨基酸的多肽的多核苷酸;
 - (b) 编码含有 SEQ ID NO:2 所示的 1-93 位氨基酸的多肽的多核苷酸;
 - (c) 编码一成熟多肽的多核苷酸,该成熟多肽具有在 ATCC 保藏号 75703 中含有的 DNA 表达的氨基酸序列;
 - (d) 能与(a)(b)或(c)的多核苷酸杂交并与其有至少 70% 同一性的多核苷酸;和
 - (e) (a)(b)(c)或(d)的多核苷酸的多核苷酸片段。
2. 权利要求 1 的多核苷酸,其中该多核苷酸是 DNA。
3. 权利要求 2 的多核苷酸,其编码含 SEQ ID NO:2 的 1-93 位氨基酸的多肽。
4. 含有权利要求 2 的 DNA 的载体。
5. 用权利要求 4 的载体遗传工程化的宿主细胞。
6. 产生多肽的方法,包括:
 - 用权利要求 5 的宿主细胞表达所述的 DNA 编码的多肽。
7. 产生能表达多肽的细胞的方法,包括:用权利要求 4 的载体遗传工程化细胞。
8. 包含从下组选择的一个成员的多肽:(i)具有 SEQ ID NO:2 的推定氨基酸序列的多肽及其片段、类似物和衍生物;和(ii)由 ATCC 保藏号 75703 的 cDNA 编码的多肽和所述多肽的片段,类似物和衍生物。
9. 权利要求 8 的多肽,其中该多肽含有 SEQ ID NO:2 的 1-93 位的氨基酸。
10. 抑制权利要求 8 的多肽的活性的化合物。
11. 治疗需要 MCP-4 的病人的方法,包括:给予病人治疗有效量的权利要求 8 的多肽。



12. 权利要求 11 的方法,其中所述治疗有效量的多肽是通过提供给病人编码所述多肽的 DNA 并在体内表达该多肽而给药。

13. 治疗需要抑制 MCP-4 多肽的病人的方法,包含:

给予病人治疗有效量的权利要求 10 的化合物。

14. 诊断与 MCP-4 表达不足有关的疾病或疾病易感性的方法,包括:

测定编码 MCP-4 的核酸序列中的突变。

15. 一种诊断方法,包括:

在来自宿主的样品中分析权利要求 8 的多肽的存在。

16. 鉴定与权利要求 8 的多肽结合并抑制其活性的化合物的方法,包括:

在允许化合物与受体结合的条件下,将化合物与表面表达该多肽受体的细胞接触,所述受体与第二组分相联,该组分能对化合物与所述受体结合作出反应而提供可检测的信号;和

检测由化合物与受体的相互作用而产生的信号的缺失。

17. 鉴定与权利要求 8 的多肽结合并使其活化的化合物的方法,包括:

在允许化合物与受体结合的条件下,将化合物与表面表达该多肽受体的细胞接触,所述受体与第二组分相联,该组分能对化合物与所述受体结合作出反应而提供可检测的信号;和

检测由化合物与受体的相互作用而产生的信号的出现。

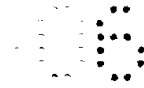
18. 增加宿主外周血中的造血始祖细胞的数量方法,包括:

将对增加宿主外周血中的造血始祖细胞的数量有效量的权利要求 8 的多肽给予宿主。

19. 抑制由对宿主的化学治疗导致的造血始祖细胞的破坏的方法,包括:

将对抑制由化学治疗导致的造血始祖细胞的破坏有效量的权利要求 8 的多肽给予宿主。

20. 抑制宿主中神经元细胞的退化的方法,包括:



将对抑制宿主中神经元细胞的退化有效量的权利要求 8 的多肽给予有此需要的宿主。

单核细胞趋化蛋白-4

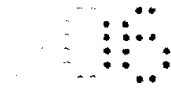
本发明涉及最近鉴定的多核苷酸,这些多核苷酸编码的多肽,这些多核苷酸和多肽的用途以及这些多核苷酸和多肽的制备。更具体地讲,本发明的多肽是单核细胞趋化蛋白-4 (MCP-4)。本发明还涉及对这些多肽作用的抑制。

单核细胞趋化蛋白有三种形式,即,MCP-1, MCP-2, MCP-3。所有这些蛋白质已得到结构和功能鉴定并已被克隆和表达。MCP-1和MCP-2能吸引白细胞(单核细胞,和白细胞),而MCP-3还能吸引嗜酸性粒细胞和T淋巴细胞(Dahinderi, E.等 实验医学杂志(J. Exp. Med.) 179:751-756(1994))。

人单核细胞特异性吸引因子开始是从一神经胶质瘤细胞系和一单核细胞系中纯化的。Matsushima, K.等 实验医学杂志 169:1485-1490(1989)。该因子开始被Matsushima等定义为神经胶质瘤衍生趋化因子(GDCF)和单核细胞趋化活化因子(MCAF)。现在该因子被称为MCP-1。随后MCP-1 cDNA的克隆显示它与鼠的JE基因高度相似。可用血小板衍生生长因子在鼠成纤维细胞中大量诱导JE基因。Cochran, B.H.等 细胞(Cell) 33:939-947(1983)。鼠JE与MCP-1高度相似。在N-末端残基部分68个氨基酸区域内MCP-1蛋白与鼠JE有62%的同一性。JE与MCP-1是种间同源物,这被广泛接受。

在脊椎动物中施用JE/MCP-1抑制肿瘤形成的方法已被公开在PCT申请WO-92/20372中,同时施用JE/MCP-1治疗恶性肿瘤局部并发症的方法和施用JE/MCP-1抵抗寄生虫感染的方法也被公开。发现在恶性肿瘤细胞中JE/MCP-1蛋白质的表达能抑制有体内肿瘤形成能力的细胞。

人MCP-1是一76氨基酸的碱性多肽,预测的分子量为8,700 Da。MCP-1主要在单核细胞、内皮细胞和成纤维细胞中诱导表达。



Leonard,E.J.和 Yoshimura,T.,当代免疫(Immunol. Today) 11:97-101(1990)。诱导这种表达的因子是 IL-1、TNF 或脂多糖处理。

MCP-1 的其它特性包括以百日咳毒素敏感方式强烈活化成熟人嗜碱性粒细胞的能力。MCP-1 是一种具有直接诱导嗜碱性粒细胞释放组胺能力的细胞因子(Bischoff,S.C.等 实验医学杂志 175:1271-1275(1992))。进一步地,MCP-1 促进用白细胞介素 3、白细胞介素 5 或粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子预处理的嗜碱性粒细胞形成白三烯 C4。MCP-1 诱导的嗜碱性粒细胞介质的释放在变态反应性炎症和表达 MCP-1 的其它疾病中起重要作用。

含编码人单核细胞趋化和活化因子(MCAF)的核苷酸序列的克隆揭示了 MCAF 多肽的初始结构,它是由 23 氨基酸残基的推定信号肽序列和 76 氨基酸残基的成熟 MCAF 序列组成。Furutani,Y.H.,等 生物化学和生物物理研究通讯(Biochem. Biophys. Res. Commu.)159:249-55(1989)。人神经胶质瘤衍生的单核细胞趋化因子(GDCF-2)的完整的氨基酸序列也已被测定。这种多肽吸引人单核细胞,但不吸引中性粒细胞。GDCF-2 被证实包含 76 个氨基酸残基。多肽链在 11、12、36、52 位含有 4 个半胱氨酸,它们产生一对环,群集在二硫桥处。进一步地,该 MCP-1 已被定位于人 17 号染色体。Mehraban,M.R.等 基因组(Genomics)9:200-3(1991)。

一些数据显示 MCP-1 的一种潜在功能是介导动脉血管壁的单核细胞浸润。单核细胞对动脉粥样形成似有重要作用,包括作为泡沫细胞的祖细胞和介导内皮增生的生长因子的潜在来源。Nelken,N.A.等,临床研究杂志(J. Clin. Invest.) 88:1121-7(1991)。也已发现 MCP-1 的滑液生成可能与类风湿关节炎相关的炎症中单核巨噬细胞的反射增进有重要作用并且滑液组织巨噬细胞是该细胞因子的主要来源。已发现类风湿关节炎病人的滑液中 MCP-1 水平显著高于骨关节炎病人或其它关节炎病人的滑液中 MCP-1 水平。Koch,A.E.等,临床研究杂志 90:772-9(1992)。

MCP-2 和 MCP-3 被分类为一个促炎蛋白质的亚家族并且与 MCP-1 功能相关,因为它们吸引单核细胞而不吸引中性粒细胞。Van



Damme,J.等, 实验医学杂志 176:59-65(1992)。MCP-3 与 MCP-1 和 MCP-2 分别显示 71%和 58%的同源性。MCP-3 是调节巨噬细胞功能的炎症细胞因子。

血淋巴干细胞的移植已被提议用于癌症和血液病的治疗中。研究表明来自外周血血淋巴干细胞的移植优于骨髓来源的干细胞的移植。由于循环干细胞的数量少,就需要诱导多潜能骨髓干细胞迁移到外周血中。减少要加工的血量以获得足够的干细胞数将增加自体移植方法的用途和消除与异体移植有关的移植物-宿主反应的危险。现在,骨髓 CD34⁺干细胞的血液活化可通过注射组合剂来实现,包括抗凋萎素 (antiblastic) 药和 G-CSF 或 GM-CSF。能够使干细胞活化的药物包括 IL-1、IL-7、IL-8 和 NIP-1 α 。IL-1 和 IL-8 表明促炎活性可能会危及良好的移植。IL-7 必须长期高剂量使用, NIP-1 α 作为单一试剂活性不高而与 G-CSF 结合时显示最好的活性。

依据本发明的一方面,它提供了一种新的成熟多肽,及其生物学活性和诊断或治疗有用的片段、类似物和衍生物。本发明的多肽是人源的。

依据本发明的另一方面,它提供了编码本发明多肽的分离的核酸分子,包括 mRNA、DNA、cDNA、基因组 DNA 及其类似物和生物学活性和诊断或治疗有用的片段。

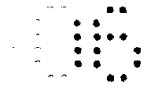
依据本发明的又一方面,它提供了用重组技术产生这些多肽的方法,包括在促进所述蛋白质表达的条件下培养含有编码本发明多肽之核酸序列的重组原核细胞和/或真核宿主细胞,并随后回收所述蛋白质。

依据本发明的另一方面,它提供了利用这些多肽、或编码这些多肽的多核苷酸用于治疗目的的方法,例如,用于干细胞活化、骨髓和神经元保护、治疗肿瘤、促进伤口愈合、抵抗寄生虫感染和调节血细胞生成的方法。

依据本发明的另一方面,它提供了这些多肽的抗体。

依据本发明的另一方面,它提供了模仿本发明多肽并与受体结合诱导产生第二信使反应的激动剂。

依据本发明的另一方面,它提供了这些多肽的拮抗剂,它可用于抑制该多肽的作用,例如,用于治疗类风湿关节炎、肺炎、变态反应、感染性



疾病和用于预防炎症和动脉粥样硬化。

依据本发明的另一方面,它提供了核酸探针,它包含足够长度的核酸分子以与本发明的核酸序列进行特异性的杂交。

依据本发明的另一方面,它提供了一种检查与编码本发明多肽的核酸序列突变相关的疾病或疾病易感性的诊断方法。

依据本发明的另一方面,它提供了利用这些多肽或编码这些多肽的多核苷酸进行体外的科学研究,例如,DNA的合成和DNA载体的构建。

对于那些本领域的技术人员来说,本发明的这些和其它方面从本文的描述中是清楚的。

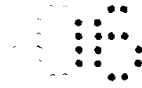
下面的附图是对本发明具体实施方案的说明,并不意味着限制如权利要求中概括的本发明的范围。

图 1.描绘了 MCP-4 的 cDNA 序列和相应推定的氨基酸序列。显示的 119 氨基酸序列是全长蛋白质,有约前 26 氨基酸代表了先导序列(下划线),因此蛋白质的成熟形式是 93 氨基酸长度。这里所用的是氨基酸标准的单字母缩写。

图 2.说明了本发明多肽、MCP-1 和 MIP-1 α 间氨基酸序列同源性的比较。MCP-4 与 MIP-1 α 显示 39% 的同源性,与 MCP-1 显示 34% 的同源性。

图 3.说明了本发明多肽在嗜中性粒细胞(PMN)和外周血单核细胞(PBMC)中的趋化活性。嗜中性粒细胞(PMN)和外周血单核细胞(PBMC)分离自外周血,用 calcein-AM 加样并在 96 孔单用途神经探针趋化室中测定趋化性。与 MCP-4 共同孵育 90 分钟后,取下该室,真空干燥滤膜,并在细胞荧光测定仪 II 上计数迁移过膜的细胞数量。

图 4.说明了 MCP-4 抑制高度增殖潜能的集落形成细胞(HPP-CFC)的生长和分化(A)而对低度增殖潜能的集落形成细胞(LPP-CFC)无影响(B)。在这些实验中,来自低密度不贴壁骨髓细胞的 1,500 个细胞涂布于



补充了 5ng/ml 鼠 IL-3、100ng/ml 鼠 SCF、10ng/ml 鼠 IL-1 α 、5ng/ml 人 M-CSF 和加入或不加入说明浓度的 MCP-4 的琼脂培养基平板上。培养 14 天后对集落计数。共进行三次实验。结果显示为集落平均数 \pm SD。无关蛋白质无影响。

图 5.显示了 MCP-4 对通过除去定型祖细胞而富集原始 Lin-细胞的骨髓细胞的作用(抗-CD11b、CD4、CD8、CD45R 和 Gr-1 抗体)。A 部分显示了在骨髓细胞(柱 1)或 Lin-细胞(柱 2)中 LPP-CFC/HPP-CFC 的比例 \pm SD 值,其中细胞涂布于补充了 5ng/mlIL-3、100ng/mlSCF、10ng/mlIL-1 α 、5ng/ml 人 M-CSF 的琼脂培养基平板上。柱 3、4 和 5 显示了在 Lin-细胞中 LPP-CFC/HPP-CFC 的比例,其中细胞与 5ng/mlIL-3 和 100ng/mlSCF(柱 3)、IL-3、SCF 和 50ng/ml MCP-4(柱 4) 或 IL-3、SCF 和 50ng/ml 无关蛋白质(柱 5)一起培养。6 天后,培养物用于 HPP-CFC 和 LPP-CFC 实验。B 部分显示了培养 6 天后的细胞构成。

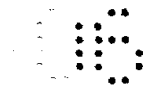
图 6.说明 MCP-4 体外对抗阿糖胞苷(Ara-C)的细胞毒作用保护 HPP-CFC 但不保护 LPP-CFC。

图 7.说明 MCP-4 体外对抗 5-溴尿嘧啶(5-FU)细胞毒作用保护 HPP-CFC 但不保护 LPP-CFC。

图 8.说明在皮层神经元存活中 MCP-4 和 FGF 的作用。

依据本发明的另一方面,它提供了一种分离的核酸(多核苷酸),它编码具有图 1 的推定氨基酸序列的成熟多肽(SEQ ID NO:2)或在 1994 年 3 月 10 日以 ATCC 保藏号 75703 保藏的 cDNA 克隆编码的成熟多肽。

本发明的多核苷酸是在一活化的单核细胞 cDNA 文库中发现的。它包含编码一长度约为 119 氨基酸的蛋白质的开放读码框架,其中前 26 氨基酸残基包含一推定的先导序列。因此,可预测成熟蛋白质长度为 93



个氨基酸。它与鼠单核趋化蛋白(MCP-1 或 JE)结构相关,显示 27%的同一性,并与全长的人 MCP-1 蛋白序列有 56%的相似性。该多肽含有在所有趋化因子特征基元中存在的所有四个半胱氨酸残基。与鼠 MCP-1/JE 相比这些半胱氨酸间的距离是保守性的,这个特征强烈提示了该新基因是一趋化因子。

本发明的多核苷酸可以是 RNA 形式或 DNA 形式,其中 DNA 包括 cDNA、基因组 DNA 和合成的 DNA。DNA 可是双链或单链,如果是单链可是编码链或非编码(反义)链。编码成熟多肽的编码序列可以与图 1 所示的编码序列(SEQ ID NO:1)相同或与保藏克隆的编码序列相同,或可能是一不同的编码序列,由于遗传密码的丰余性或简并性,该编码序列与图 1 所示的 DNA(SEQ ID NO:1)或保藏的 cDNA 编码相同的成熟多肽。

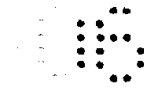
编码图 1(SEQ ID NO:2)的成熟多肽或保藏的 cDNA 编码的成熟多肽的多核苷酸,可包括但不限于:仅仅成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列加另外的编码序列如先导或分泌序列或蛋白原序列;成熟多肽的编码序列(和可选择的另外的序列)和非编码序列如内含子或成熟多肽编码序列的 5'和/或 3'非编码序列。

因此,术语“编码一多肽的多核苷酸”包括仅含多肽编码序列的多核苷酸以及包含另外的编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明进一步涉及上述的多核苷酸的变体,其编码具有图 1(SEQ ID NO:2)的推定氨基酸序列多肽的片段、类似物和衍生物或保藏克隆的 cDNA 编码的多肽的片段、类似物和衍生物。这些多核苷酸的变体可以是自然发生的多核苷酸的等位变体或非自然发生的多核苷酸的变体。

因此,本发明包括编码图 1 所示的(SEQ ID NO:2)成熟多肽本身或保藏克隆的 cDNA 编码的成熟多肽本身的多核苷酸以及这些多核苷酸的变体,这些变体编码如图 1(SEQ ID NO:2)的多肽或保藏克隆的 cDNA 编码的多肽的片段、衍生物和类似物。这些核苷酸变体包括缺失变体、替代变体和添加或插入变体。

如上文所示,该多核苷酸可含有图 1(SEQ ID NO:1)所示编码序列



的或保藏克隆编码序列的自然发生的等位突变体。如本领域所知,等位突变体是多核苷酸序列的一种改变形式,它可以有一个或多个核苷酸的替代、缺失或添加,而基本不改变所编码多肽的功能。

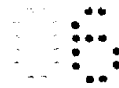
本发明也包括这样的多核苷酸,其中的成熟多肽的编码序列可在同一读码框中与在宿主细胞中帮助多肽表达和分泌的多核苷酸序列融合,例如,作为控制细胞中多肽运输的分泌序列的前导序列。带有前导序列的多肽是前蛋白,并可由宿主细胞切除前导序列而形成多肽的成熟形式。这些多核苷酸也可编码成熟蛋白加另外的 5'氨基酸残基的蛋白原。具有原序列的成熟多肽是蛋白原并是蛋白质的无活性形式。一旦该原序列被切除,就形成活性的成熟蛋白质。因此,例如,本发明的多核苷酸可编码成熟蛋白质或带有原序列的蛋白质或带有原序列和前序列(前导序列)的蛋白质。

本发明的多核苷酸也可含有与允许本发明多肽纯化的标记序列同框融合的编码序列。

标记序列可以是一 pQE-9 载体提供的六组氨酸尾,在细菌宿主的例子中提供融合于标记物的成熟多肽的纯化,或,例如,当利用一哺乳动物宿主如 COS-7 细胞时,标记序列可以是一血凝素(HA)尾。该 HA 尾对应于由流感血凝素蛋白质得到的表位(Wilson,I,等 细胞 37: 767(1984))。

术语“基因”指的是包括产生一多肽链的 DNA 片段;它包括编码区域前面的和后面的区域(前导区和非转录尾区)以及个体编码序列(外显子)之间的插入序列(内含子)。

本发明的全长基因的片段可被用作 DNA 文库的杂交探针来分离全长的 cDNA 和分离其它的与该基因有高度序列相似性的或生物学活性相似的 cDNA。这种类型的探针优选有至少 30 个碱基,例如可含有 50 或更多个碱基。这种探针也可用于鉴定对应于全长转录物的 cDNA 克隆和含有包括调节子和启动子区域、外显子和内含子的完整基因的基因组克隆。筛选的一个实例包括利用已知的 DNA 序列来合成一寡核苷酸探针分离基因的编码区域。与本发明基因序列互补的标记的寡核苷酸被用于筛选人 cDNA 文库、基因组文库或 mRNA 文库来检测与该探针杂交的文库成员。



本发明进一步涉及与上述的序列杂交的多核苷酸,条件是两序列间有至少 70% 的同一性,优选至少 90% 的同一性,更优选至少 95% 的同一性。本发明特别涉及严紧条件下与上述的多核苷酸杂交的多核苷酸。本文中术语“严紧条件”指仅在两序列间有至少 95% 的同一性和优选至少 97% 的同一性时才能杂交。与上述的多核苷酸杂交的多核苷酸在一优选的具体实施方案中,编码保持图 1(SEQ ID NO:1)的 cDNA 或保藏的 cDNA 编码的成熟多肽的基本相同的生物学功能或活性的多肽。

可供选择地,多核苷酸可有至少 20 个碱基,优选 30 个碱基,更优选 50 个碱基,其与本发明的多核苷酸杂交且与其具有如上所述的同一性,可保持或不保持活性。例如,这些多核苷酸可被用于 SEQ ID NO:1 的多核苷酸的探针,例如,用于多核苷酸的回收或作为诊断探针或作为 PCR 引物。

因此,本发明涉及与编码 SEQ ID NO:2 的多肽的多核苷酸有至少 70% 的同一性,优选至少 90% 的同一性,更优选至少 95% 的同一性的多核苷酸,及其片段,这些片段有至少 30 个碱基,更优选 50 个碱基,还涉及这些多核苷酸编码的多肽。

在此所提及的保藏保持在国际承认的用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约的条件下。这些保藏仅仅为方便提供给那些本领域技术人员的,并不是承认根据 35U.S.C. § 112 条款需要保藏。在保藏材料中含有的多核苷酸的序列以及由其编码的氨基酸序列引入本文以供参考,当对本文序列描述有任何争议时用于核实。为了制备、应用或出售该保藏材料可以请求许可,但这里并没有授权这种许可。

本发明进一步涉及具有图 1 (SEQ ID NO:2)所示推定氨基酸序列或由保藏的 cDNA 编码的氨基酸序列的多肽及其片段、类似物和衍生物。

图 1(SEQ ID NO:2)所示或由保藏的 cDNA 编码的多肽的“片段”、“衍生物”和“类似物”指基本保留该多肽相同的生物学功能或活性的多肽。因此,类似物包括了被切除蛋白原部分后被激活产生一活性成熟多肽的蛋白原。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽,优选重组多



肽。

图 1(SEQ ID NO:2)所示或由保藏的 cDNA 编码的多肽的片段、衍生物或类似物可以是:(i)一个或多个氨基酸残基被保守或非保守的氨基酸残基所替代(优选保守的氨基酸残基),替代的氨基酸残基是或不是由遗传密码编码的氨基酸;或(ii)一个或多个氨基酸残基包含取代基团;或(iii)成熟多肽与另一化合物融合在一起,如提高多肽半衰期的化合物(如聚乙二醇);或(iv)另外的氨基酸与成熟多肽融合,例如前导序列、分泌序列、用于纯化成熟蛋白的序列或蛋白原序列。基于本文的描述,这样的片段、衍生物和类似物相信在本领域技术人员知识范围内。

本发明的多肽和多核苷酸优选的是以分离的形式提供,并优选被纯化到均一的程度。

术语“分离的”指将材料从它初始环境(如,如果是天然产生的,即自然环境)中移出。例如,一天然产生的多核苷酸或多肽在活动物中就是没有被分离的,但同样的多核苷酸或多肽同一些或全部在自然系统中与之共存的物质分开就是分离的。这样的多核苷酸可能是一载体的一部分,和/或这些多核苷酸或多肽是一组合物的一部分,既然载体或组合物不是其自然环境的一部分它们仍是分离的。

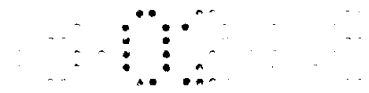
本发明的多肽包括 SEQ ID NO:2 所示的多肽(特别指成熟多肽),也包括与 SEQ ID NO:2 多肽至少有 70%相似性(优选是 70%同一性)的多肽,优选至少有 90%相似性(优选是 90%同一性)的多肽,更优选至少有 95%相似性(优选是 95%同一性)的多肽,也包括这些多肽的一些部分,通常这些多肽部分至少含有 30 个氨基酸,更优选 50 个氨基酸。

如本领域所知,两个多肽的“相似性”是通过比较一个多肽与另一个多肽的氨基酸序列及其保守性氨基酸替代来决定的。

本发明的多肽的片段或部分可以用于经肽合成产生相关的全长多肽。因此,这些片段可作为产生全长多肽的中间体。本发明多核苷酸的片段或部分可以用来合成本发明全长多核苷酸。

本发明也涉及包含本发明多核苷酸的载体、带有本发明载体的遗传工程宿主细胞和依靠重组技术产生本发明多肽的方法。

宿主细胞是用本发明的载体进行遗传工程化(转导、转化或转染)的,



载体可以是一个克隆载体或表达载体。载体可以是一种质粒、病毒粒子、噬菌体等等。工程化的宿主细胞能在为适于活化启动子、筛选转化子或扩增本发明基因而改变的传统营养培养基上培养。培养条件如温度、pH 等与被选择的细胞原来所用的表达条件一致,并且对于本发明普通技术人员来说是明显的。

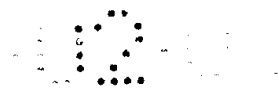
本发明的多核苷酸可以用来经重组技术产生多肽。例如,该多核苷酸可以存在于一系列的用于表达多肽的表达载体中的任何一个载体上。这些载体包括染色体的、非染色体的和合成的 DNA 序列,例如,SV40 的衍生物、细菌质粒、噬菌体 DNA、杆状病毒、酵母质粒及衍生于质粒和噬菌体 DNA 结合的载体、病毒 DNA 如痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒及伪狂犬病毒。不过,只要能在宿主中复制和存活,其他载体也可以使用。

合适的 DNA 序列可以通过许多方法插入到载体中。通常,DNA 序列用本领域已知的方法插入到合适的限制性内切酶位点上。这些方法相信在本领域技术人员的知识范围内。

表达载体中的 DNA 序列被有效地与一个合适的表达控制序列(启动子)连在一起,从而指导 mRNA 的合成。下面提到的是这种启动子的代表:LTR 或 SV40 启动子、大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子、 λ 噬菌体的 P_L 启动子、以及已知控制原核或真核细胞或其病毒中基因表达的其他启动子。表达载体也包含翻译起始所需的核糖体结合位点和转录终止子。载体还可以包括增强表达的合适序列。

此外,表达载体优选包含提供表型特征的一个或多个选择标记基因,以便于转化宿主细胞的筛选,例如,真核细胞的培养可用二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,大肠杆菌则可用四环素或氨基青霉素抗性。

含有上述合适 DNA 序列以及启动子或调控序列的载体可用于转化适当的宿主,以使宿主表达所述蛋白。下面列举的是合适宿主的代表:细菌细胞,如大肠杆菌、链霉菌、鼠伤寒沙门氏菌;真菌细胞,如酵母;昆虫细胞,如果蝇 S2 和草地夜蛾 Sf9;动物细胞,如 CHO、COS 或 Bowes 黑色素瘤;腺病毒;植物细胞等。基于本文的描述,合适宿主的选择应在本领域技术人员的知识范围内。



特别值得提及的是,本发明也包括含有上面概括性描述的一个或多个序列的重组构建体。该构建体包括载体,如质粒或病毒载体,其中正向或反向插入了本发明的一个序列。在此实施方案的一个优选方面,该构建体还包含调节序列,例如启动子,它被有效地连接到该序列上。对于本领域技术人员来说,许多载体和启动子都是已知的,并可通过商业途径获得。下面列举几种载体;细菌的:pQE70、pQE6、pQE-9(Qiagen)、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A(Stratagene)、ptrc99a、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia);真核的:pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(Pharmacia)。不过,只要是能在宿主中复制和存活,其他质粒或载体也可使用。

启动子区域可以利用CAT(氯霉素转移酶)载体或其他具有选择标记的载体从想要的基因中选择出。pKK232-8和pCM7是两个合适的载体。特称的细菌启动子包括lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λP_L 、 P_R 和trp。真核启动子包括CMV的立即早期启动子、HSV胸腺激酶、早期和晚期SV40、逆转录病毒的LTR和小鼠金属硫蛋白I。合适载体和启动子的选择应在本领域普通技术人员的技术水平之内。

在另一实施方案中,本发明涉及包含上述构建体的宿主细胞。宿主细胞可以是高等真核细胞,如哺乳动物类细胞,或低等真核细胞,如酵母细胞,还可以是原核细胞,如细菌细胞。将构建体导入细胞的方法有:磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或电穿孔(Davis,L.,Dibner,M.,Battay,I.,分子生物学基本方法(Basic Methods in Molecular Biology)(1986))。

宿主细胞中的构建体能够通过传统的方式产生重组序列编码的基因产物。可供选择的,可用传统的肽合成仪合成本发明的多肽。

在合适的启动子控制下,可以在哺乳动物细胞、酵母、细菌或其他细胞中表达成熟蛋白。利用由本发明的DNA构建体衍生的RNA,也可以用无细胞翻译体系产生这种蛋白质。适合于原核和真核宿主的克隆和表达载体,Sambrook等已在《分子克隆实验室手册》(第二版,冷泉

港,纽约(1989))中进行了描述,其内容引入本文以供参考。

在高等真核生物中,编码本发明多肽的 DNA 转录可以通过在载体中插入一增强子序列而被提高。增强子是 DNA 的顺式作用因子,通常约 10-300bp,作用于启动子,提高它的转录效率。例如,SV40 的位于复制起点下游 100-270bp 处的增强子,巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点下游的多形瘤增强子及腺病毒增强子。

通常,重组表达载体包含复制起点和用于转化宿主细胞的选择标记,例如大肠杆菌的氯霉素抗性基因和啤酒酵母 TRP1 基因,还包含从高效表达基因而来的启动子,从而介导下游结构序列的转录。这些启动子可以从编码糖酵解酶的操纵子中得来,如 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)、 α 因子、酸性磷酸酶或热休克蛋白。异源的结构序列以适当的方位与翻译起始和终止序列及优选的先导序列装配在一起,先导序列能使翻译的蛋白质进入周质空间或胞外介质中。可供选择的,异源的序列可以编码一个融合蛋白,该蛋白含有一个 N-末端确认肽,表现出所需的特征,例如所表达的重组产物的稳定化和提纯简化。

细菌适用的有效表达载体这样来构建:将编码目的蛋白的结构 DNA 序列随同适当的翻译起始和终止信号插入到有一功能启动子的可操作的读码框中。载体应包含一个或多个表型选择标记和复制起点,复制起点保证了载体在宿主中被保留,更理想的是能使载体得到扩增。适于转化的原核宿主有大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌及假单胞菌属、链霉菌属、和葡萄球菌属的各种细菌,其他的宿主也可以被选择。

作为一个代表性但非限制性的例子,细菌适用的有效表达载体可包括一选择标记和细菌复制起点,它衍生于从商业途径获得的、具有众所周知的克隆载体 pBR322(ATCC37017)遗传元件的质粒。这些商业化的载体包括,如 pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)和 pGEM1(Promega Biotec, Madison, WI,USA)。这些 pBR322 “骨架”部分与合适的启动子和被表达的结构序列组合在一起。

在转化合适的宿主菌株和宿主菌株生长到适当的细胞密度后,用适当的方法(例如温度转变或化学药物诱导)诱导所选择的启动子,并将细

胞再培养一段时间。

通常用离心的方法收获细胞,用物理的或化学的方法破碎细胞,将粗提物保留以进一步纯化。

用于表达蛋白的微生物细胞可以用任何便捷的方法破碎,包括冻融循环、超声波、机械破碎,或者用细胞溶解剂,这些方法都是本领域的技术人员所熟知的。

各种哺乳动物细胞的培养系统也能用于表达重组蛋白。哺乳动物表达系统的例子有 Gluzman 在《细胞》 23:175(1981)中所描述的猴肾成纤维细胞的 COS-7 细胞系,及其它的能表达相容载体的细胞系,如 C127、3T3、CHO、HeLa 和 BHK 细胞系。哺乳动物表达载体含有复制起点、适当的启动子、增强子及任何必须的核糖体结合位点、聚腺苷化位点、供体和受体拼接位点、转录终止序列、和 5'侧翼非转录序列。衍生于 SV40 拼接序列的 DNA 序列和聚腺苷化位点可用于提供所需的非转录遗传元件。

多肽可以从重组细胞培养物中回收和纯化,回收和纯化的方法有硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和植物凝集素层析。形成成熟蛋白质的完整构象需要蛋白质的再折叠步骤。最后,高效液相层析(HPLC)应被用于最后的纯化步骤。

本发明的多肽可以是纯化的天然产物,也可以是化学合成方法的产物,或从原核或真核宿主(如培养的细菌、酵母、高等植物、昆虫或哺乳动物细胞)利用重组技术产生。根据重组生产方法所用的宿主不同,本发明的多肽可能被糖基化或不被糖基化。该多肽也可能有起始的甲硫氨酸残基。

本发明多肽可用于促进伤口愈合。因为 MCP-4 是一趋化因子,它是白细胞的化学吸引剂(如单核细胞、T 淋巴细胞、嗜碱性粒细胞、PMN、PBL 等);因此,引起靶免疫细胞到损伤部位的浸润。

MCP-4 多肽还可用于抗肿瘤治疗和治疗恶性肿瘤的局限的并发症,如腹膜渗出液或腹水。滴注 MCP-4 进入解剖学部位可导致该部位单核细胞的累积和活化。

在体内 MCP-4 存在伴随着该部位嗜酸性粒细胞的增加,这有杀死寄生虫幼虫的显著功能,其中包括血吸虫病、旋毛虫病和蛔虫病。因此 MCP-4 可用于抵御寄生虫感染。

本发明多肽可用于人类或非人类宿主优选人类宿主活化造血始祖细胞进入外周血循环,随后回收并用于移植中。施用有效量的本发明多肽以活化和增加造血始祖细胞进入外周血循环中的量,特别是在外周血循环中增加造血干细胞。这些细胞通常指 CD34+ 细胞。例如,以下文所述的量施用该多肽。本发明多肽可单独或结合其他试剂给药,例如,已知 GM-CSF 和 G-CSF 有效增加外周血中的这些细胞。活化造血始祖细胞进入外周血循环对自体 and 异体的骨髓移植是重要的,被用于如癌症和血液疾病的治疗。

本发明多肽还可用于抑制人类或非人类宿主中由化学治疗试剂治疗而导致的造血始祖细胞的破坏,优选人类宿主。本发明多肽可先于化疗、化疗期间或化疗后给药,并允许高剂量的化疗药物用于癌症治疗。施用有效量的本发明多肽来抑制造血始祖细胞的破坏;例如,本发明多肽按如下所述的剂量给药。本发明多肽可单独或结合其他试剂给药。本发明多肽还可用于保护造血始祖细胞从而预防或抑制造血始祖细胞的破坏而导致的疾病;例如,白细胞减少、骨髓发育不良综合症和中性白细胞减少症。

本发明多肽还可以有效剂量用于抑制人类或非人类宿主中由神经退化性疾病(如 Alzheimer's 病、 Parkinson's 病、 AIDS-相关复合症)而导致的神经细胞的退化,优选人类宿主。例如,本发明多肽可按如下所述的剂量使用。



表 1

MCP-4 施用于小鼠两天后对外周血、脾、和骨髓中原始造血始祖细胞分布的影响

处理	始祖细胞数/							
	10 ⁴ PB 细胞			10 ⁴ 脾细胞			10 ⁴ BM 细胞	
	HPP	LPP	IM	HPP	LPP	IM	HPP	LPP
盐水	0.5±0.7	38±9.5	6.5±1.9	0.7±1.5	5.5±2.5	1.5±2.3	53±11	484±59
MCP-4 (1mg/kg /天)	3.5±0.5	95±16.9	25±13.5	2.75±0.9	4.2±3.5	3.5±2.4	27±3.5	610±28

PB=外周血,单核细胞

Spl.=脾细胞的低密度级分

BM=原始细胞 6 倍富集的骨髓级分

HPP=高度增殖潜能的集落形成细胞

LPP=低度增殖潜能的集落形成细胞

IM=未成熟细胞,骨髓中发现的稀少细胞类型,在多种细胞因子的存在下,能产生高折射性的小(<50 个细胞/集落)集落;集落内的细胞堆积在一水平面并显示母细胞的核着色特征。

三只小鼠用 MCP-4 或盐水每日腹腔内注射。第一次注射 48 小时后,每只动物通过心包穿刺取血且将小鼠处死得到骨髓和脾。每组织中指定数目的细胞双份涂布在含有 rmIL-3(5ng/ml)、rmSCF(50ng/ml)、rhM-CSF(5ng/ml)和 rmIL-1a(10ng/ml)的含琼脂培养基的平板上,培养 14 天。每组动物中收集三只动物的数据并以平均值±S.D 表示。

表 2

MCP-4 施用于小鼠四天后对外周血、脾、和骨髓中原始造血始祖细胞分布的影响

处理	始祖细胞数/							
	10 ⁴ PB 细胞			10 ⁴ 脾细胞			10 ⁴ BM 细胞	
	HPP	LPP	IM	HPP	LPP	IM	HPP	LPP
盐水	0	29	1	1	10	0.8	60	505
		±5.6	±1.5	±0.6	±4.6	±0.7	±8	±45
MCP-4 (1mg/kg/天)	3.8	84.5	28.6	2.6	10.3	7	26.5	330
	±1.5	±14.5	±8.6	±0.5	±2.1	±1.5	±8	±46

PB=外周血,单核细胞

Spl.=脾细胞的低密度级分

BM=原始细胞 6 倍富集的骨髓级分

HPP=高度增殖潜能的集落形成细胞

LPP=低度增殖潜能的集落形成细胞

IM=未成熟细胞,骨髓中发现的稀少细胞类型,在多种细胞因子的存在下,能产生高折射性的小(<50 个细胞/集落)集落;集落内的细胞堆积在一水平面并显示母细胞的核着色特征。

三只小鼠用 MCP-4 或盐水每日腹膜内注射。第一次注射 96 小时后,每只动物通过心包穿刺取血且小鼠处死得到骨髓和脾。每组织中指定数目的细胞双份涂布在含有 rmIL-3(5ng/ml)、rmSCF(50ng/ml)、rhM-CSF(5ng/ml)和 rmIL-1a(10ng/ml)的含琼脂培养基的平板上,培养 14 天。每组动物中收集三只动物的数据并以平均值±S.D 表示。

表 3

MCP-4 施用于小鼠两天后通过 FACS 对外周血白细胞组成的分析

在所示细胞群中的阳性百分率

	CD45+ B-细胞	GR.1+ PMN	Mac.1+ 单核细胞	CD8+ T-细胞	CD4+ T-细胞
盐水	40.5±9.2	62.5±10.6	19.5±2.1	29±5.6	39±12
MCP-4 (mg/Kg/天)	37±5.6	56±11.3	18±4.2	27±4.3	33±7

三只 C57 Black 6 小鼠(20g 重)每日腹膜内注射 MCP-4 或盐水。第一次注射 48 小时后,每只动物通过心包穿刺取血且将小鼠处死得到骨髓和脾。从每只动物的 0.1ml 血先用 Gen Trak 裂解液裂解红细胞后进行免疫染色。沉淀具核细胞,用 PBS 冲洗,与 PE 偶联的抗 CD45R、Gr.1、Mac.1、CD4 和 CD8 的单克隆抗体一起孵育并用流式细胞仪测定。至少分析 10,000 个细胞。数据以各类细胞群中阳性细胞平均百分率±SD 表示。

本发明的多核苷酸和多肽可用做研究试剂和材料用于人类疾病的治疗和诊断方法的发现。

本发明提供了一种确定 MCP-4 的受体的方法。编码该受体的基因可用本领域技术人员所知的许多方法确定,例如,配体淘选和 FACS 分选(Coligan,等,免疫学现代方法(Current Protocols in Immun.)1(2),第 5 章,(1991))。优选应用表达克隆技术,从对 MCP-4 敏感的细胞中制备聚腺苷酸化的 RNA,从该 RNA 构建一个 cDNA 文库,并分成许多亚库用于转染 COS 细胞或其他的对 MCP-4 不敏感的细胞。生长在玻片上的转染细胞暴露于标记的 MCP-4。MCP-4 可用许多方法标记,包括碘化作用或含有一位点特异性蛋白激酶的识别位点。固定和温育后,将玻片放射自显影分析。鉴定出阳性库后制备亚库,重复分亚库、再筛选过程进行再转染,最终得到编码推定的受体的单一克隆。受体鉴定的另一个方法为,标记的配体光亲和性地与细胞膜或表达受体分子的提取制剂相连

接。交联材料经 PAGE 分离并暴露于 X 光胶片。含有配体受体的标记复合物被切断,分离肽片段,并用于蛋白质微量测序。微量测序得到的氨基酸序列被用于设计一套简并的寡核苷酸探针,用来筛选一 cDNA 文库,从而鉴定编码推定的受体的基因。

本发明还提供了一种筛选化合物以鉴定本发明多肽的激动剂和拮抗剂的方法。例如,表达 MCP-4 受体的哺乳动物细胞或膜样品与所述的化合物接触。接着测定该化合物与 MCP-4 受体作用后产生一种已知的第二级信使系统反应的能力。这种第二信使系统包括但并不局限于 cAMP 鸟苷酸环化酶、离子通道、或磷酸肌醇水解。化合物结合 MCP-4 受体和诱导第二信使反应的能力确定了该化合物是一激动剂。化合物结合 MCP-4 受体但不诱导第二信使反应确定了该化合物是一拮抗剂。

一种竞争结合实验,其中化合物例如通过放射活性被标记,也可用于鉴定拮抗剂。该方法被本领域所熟知。

这些拮抗剂包括 MCP-4 的显性阴性突变体。MCP-4 是一四聚体多肽,其一个突变亚基将导致整个多肽失去功能。一种 MCP-4 显性阴性突变体与 MCP-4 受体结合但不能激活其结合的细胞(白细胞和单核细胞)。检测 MCP-4 显性阴性突变体的实验是一种体外的趋化实验,其中用无聚乙烯吡咯烷酮的聚碳酸酯膜装备的多孔趋化室来测定潜在的拮抗剂或激动剂分子存在或缺乏时 MCP-4 对白细胞的趋化吸引能力。

潜在的拮抗剂还包括抗体,或有时为寡肽,它可与多肽结合并阻止该多肽与它的受体结合。

利用反义技术制备的反义构建体是另一类潜在的拮抗剂。反义技术能通过三股螺旋形成或反义 DNA 或 RNA 控制基因的表达,这两种方法都基于多核苷酸与 DNA 或 RNA 的结合。例如,编码本发明成熟多肽的多核苷酸序列的 5'端编码部分可用于设计一反义 RNA 寡核苷酸,长约 10-40 个碱基对。可设计一 DNA 寡核苷酸与该基因的转录区域互补(三股螺旋,见 Lee 等《核酸研究》(Nucl. Acids. Res.)6: 3073(1979);Cooney 等,《科学》241:456(1988);和 Dervan 等《科学》251:1360(1991)),从而阻止转录和 MCP-4 的产生。反义 RNA 寡核苷酸在体内与 mRNA 杂交,阻止 mRNA 分子翻译成 MCP-4 多肽(反义-Okano,神经化学杂志

(J. Neurochem.)56:560(1991);作为基因表达反义抑制剂的寡脱氧核苷酸,CRC Press , Boca Raton,FL(1988))。上述寡核苷酸也可以输入到细胞中,以使反义 RNA 或 DNA 在体内表达,抑制 MCP-4 的产生。

潜在的拮抗剂包括一种小分子,它结合并占据该多肽的活性位点,从而使催化位点无法接近底物而使得正常的生物学活性被阻止。小分子的实例包括但不局限于小肽或类肽分子。

拮抗剂可用于治疗炎症,通过阻止单核细胞吸引到伤口或创伤部位,并调节正常的肺吞噬细胞群,因为急性的或慢性的肺炎疾病与单核巨嗜细胞在肺部的会集有关。它们还可以用于治疗类风湿关节炎,因为在类风湿关节炎病人的滑液中发现 MCP 水平显著升高,这暗示 MCP 在滑液中的产生吸引单核细胞,其流入量和激活在关节变性的和发炎的病理学中有重要意义。

拮抗剂还可用于治疗粥样动脉硬化,因为 MCP 介导单核细胞在动脉壁上的浸润,这种浸润导致了粥样动脉硬化,还可用于防止变态反应,因为已显示 MCP 直接诱导了嗜碱性粒细胞组胺的释放。

拮抗剂还可用于治疗感染性疾病如结核,因为结核靶细胞(通常为单核细胞)引起单核细胞释放 MCP,这吸引更多的单核细胞到肺部而引起严重的炎症。拮抗剂可用在与药理学适用的载体组合的组合物中,例如,如上文所述。

本发明的多肽、激动剂和拮抗剂可以与合适的药用载体结合使用。这样的组合物包括有效剂量的多肽或激动剂或拮抗剂,和药理学适用的载体或赋形剂。这样的载体包含但并不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。制剂应适于给药方式。

本发明也提供了一种药物包装或试剂盒,包括一个或多个装有一种或多种本发明药物组合物成分的容器。随容器可以有一个管理药物或生物制剂的生产、使用或销售的政府机构规定形式的通知,这一通知说明已获得该生产、使用或销售的管理机构的批准可用于人体。另外,本发明这些多肽或激动剂或拮抗剂可以与其他的治疗化合物组合使用。

这些药物组合物可用一种方便的方式给药,如口服、表皮、胃肠外、静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、鼻内或真皮内途径。这些药物组合

物以治疗和/或预防特定适应症的有效剂量给药。通常,它们的使用剂量是至少约 10 μ g/kg 体重,多数情况下不超过每天约 8mg/kg 体重。多数情况下,考虑到给药途径和症状等,剂量从每天约 10 μ g/kg 到约 1mg/kg 体重不等。

根据本发明,这些多肽和激动剂和拮抗剂可经体内表达而被使用,通常称之为“基因治疗”。

因此,例如,病人的细胞可以在离体的条件下用编码一多肽的多核苷酸(DNA 或 RNA)工程化,工程化的细胞然后供给待用该多肽治疗的病人。从本文的讲述看,这样的方法是本领域所熟知的和明显的。例如,可以用含有编码本发明多肽的 RNA 的逆转录病毒质粒载体来工程化细胞。

类似地,可以在体内工程化细胞来体内表达多肽,如本领域已知的方法。例如,可以用含有编码本发明多肽的 RNA 的逆转录病毒质粒载体转化包装细胞,而使包装细胞产生含有所述基因的感染性病毒颗粒。这些生产细胞可以注射病人而工程化体内细胞,并在体内表达多肽。从本发明的讲述看,这些及其他的本发明多肽的给药方式对于本领域技术人员是清楚的。

可以衍生出上述逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒包括,但并不局限于,Moloney 鼠白血病病毒、脾坏死病毒、逆转录病毒如劳斯氏肉瘤病毒、Harvey 肉瘤病毒、禽白血病病毒、长臂猿白血病病毒、人免疫缺损病毒、腺病毒、骨髓增生性肉瘤病毒、和哺乳动物肿瘤病毒。在一实施方案中,逆转录病毒质粒载体可衍生于 Moloney 鼠白血病病毒。

载体包含一个或多个启动子。可使用的合适的启动子包括,但并不局限于,逆转录病毒 LTR;SV40 启动子;和人巨细胞病毒(CMV)启动子(Miller 等,生物技术(Biotechniques),7(9):980-990(1989))或其他任何启动子(如,细胞的启动子如真核细胞的启动子包括但并不局限于组蛋白、pol III、和 β -肌动蛋白的启动子)。其他可用的病毒启动子包括但并不局限于腺病毒启动子、胸腺嘧啶激酶(TK)启动子、和 B19 细小病毒启动子。从本文的讲述看,合适启动子的选择将对本领域技术人员是

显而易见的。

编码本发明多肽的核酸序列在合适的启动子控制之下。应用的合适的启动子包括但并不局限于腺病毒启动子,如腺病毒主要晚期启动子;或异源启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子;呼吸道合胞病毒(RSV)启动子;可诱导的启动子,如 MMT 启动子、金属硫蛋白启动子;热休克启动子;白蛋白启动子;ApoAI 启动子;人珠蛋白启动子;病毒胸腺嘧啶激酶(TK)启动子,如单纯疱疹胸腺嘧啶激酶(TK)启动子;逆转录病毒 LTR(包括上文所述的修饰的逆转录病毒 LTR); β -肌动蛋白的启动子;及人生长激素启动子。也可以是控制编码该多肽基因自身的启动子。

用逆转录病毒质粒载体转导包装细胞系而形成生产细胞系。可用于转染的包装细胞系的例子包括但并不局限于 PE501、PA317、 Ψ -2、 Ψ -AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、 Ψ CRE、 Ψ CRIP、GP+E-86、GP+envAM12、和 DAN 细胞系,如 Miller 在人类基因治疗(Human Gene Therapy),第 1 卷, 5-14 页(1990)所述,此处引用其全文供参考。可用本领域已知的任何方法利用载体转导包装细胞系。这些方法包括但并不局限于电穿孔、使用脂质体和磷酸钙沉淀。在一可选择的方法中,逆转录病毒质粒载体包裹进脂质体或与脂类偶联,然后注射给宿主。

生产细胞系产生具感染性的逆转录病毒载体颗粒,此病毒载体颗粒中包含编码这些多肽的核酸序列。这样的逆转录病毒载体颗粒然后可用于体外或体内转导真核细胞。转导的真核细胞将表达编码多肽的核酸序列。可用于转导的真核细胞包括但并不局限于,胚胎干细胞、胚胎癌细胞、及造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、成肌细胞、角质细胞、内皮细胞、和支气管上皮细胞。

本发明还涉及本发明基因作为诊断剂的用途。该基因突变形式的检测将使得诊断出由 MCP-4 的表达不足引起的疾病或疾病易感性。

可以用多种技术在 DNA 水平上检测出带有本发明基因突变的个体。用于诊断的核酸可从病人的细胞中得到,包括但不局限于血液、尿液、唾液、活组织检测和尸解材料。基因组 DNA 可以直接用于检测,或在检测分析前用 PCR(Saiki,等 自然 324:163-166(1986))进行酶扩

增。RNA 或 cDNA 也可同样用于此目的。例如,与编码 MCP-4 的核酸互补的 PCR 引物可用来鉴定和分析突变。例如,从扩增产物的大小与正常基因型相比可以检测出缺失或插入突变。将扩增的 DNA 与放射性标记的 RNA 或另外的放射性标记的反义 DNA 序列杂交可检测出点突变。用 RNA 酶 A 消化或通过溶解温度的不同可以区分完全配对的序列与错配的双螺旋。

参考基因与有突变的基因序列的差异可通过直接的 DNA 测序方法来揭示。另外,克隆的 DNA 片段可用做探针检测特异的 DNA 片段。当与 PCR 结合使用可大大增强这种方法的敏感性。例如,用双链 PCR 产物或一由修饰 PCR 产生的单链模板分子作测序引物。序列测定通过用放射性标记的核苷酸常规方法或用荧光素尾的自动测序方法来进行。

通过检测 DNA 片段在含有或不含有变性剂的凝胶中的电泳迁移率的变化,可以进行基于 DNA 序列差异的遗传学测试。小片段的缺失和插入可以从高分辨率的凝胶电泳中观察到。不同序列的 DNA 片段可以在变性的甲酰胺梯度凝胶中区别出来,在这种凝胶中,根据不同 DNA 片段特异的溶解温度或部分溶解温度,它们的迁移被阻滞在不同的位置(见,例如,Myers 等, 科学 230:1242(1985))。

核酸酶保护实验可以揭示特定位置的序列变化,如用 RNA 酶和 S1 酶保护或化学裂解法(如,Cotton 等, PNAS USA ,85:4397-4401(1985))。

因此,特异 DNA 序列的检测可通过以下方法得到,如杂交、RNA 酶保护、化学裂解、直接的 DNA 测序或使用限制性内切酶(如,限制片段长度的多态性(RFLP))和基因组 DNA 的 DNA 印迹技术。

除了较传统的凝胶电泳和 DNA 测序方法以外,突变还可用原位分析检测出来。

本发明还涉及用于检测各种组织中本发明多肽的水平改变的诊断方法,因为与正常对照组织相比,蛋白质的过量表达可检测 MCP-4 的存在。测定宿主样品中本发明多肽的水平的方法是本领域技术人员所熟知的,包括放射免疫测定、竞争结合测定、蛋白质印迹分析、和优选的 ELISA 实验。ELISA 实验首先包括制备 MCP-4 抗原特异性的抗



体,优选单克隆抗体。另外要准备抗单克隆抗体的报告抗体。报告抗体连接一种可检测试剂如放射性、荧光或在此实例中的辣根过氧化物酶。从宿主得到样品并在一固相载体上温育,如聚苯乙烯反应板,能结合样品中的蛋白质。然后用一种非特异性的蛋白质如牛血清白蛋白(BSA)封闭,以封闭板上任何游离的蛋白质结合位点。接着,加入单克隆抗体在板中孵育,这时,单克隆抗体与附着在聚苯乙烯板上的本发明任何多肽结合。所有未结合的单克隆抗体用缓冲液洗去。与辣根过氧化物酶偶联的报告抗体加入板中,使得报告抗体与结合在本发明多肽上的任何单克隆抗体相结合。未结合的报告抗体也被洗掉。然后加入辣根过氧化物酶的底物,在一定的时间内形成颜色的深浅与标准曲线比较,就可测出一定体积的病人样品中本发明多肽的含量。

竞争实验也可用于这项检测,本发明多肽特异的抗体连到一固相支持物上,并将标记的 MCP-4 和从宿主中得到的样品一起通过固相支持物,样品中本发明多肽的数量与检测到的连接于支持物上的标记含量相关。

本发明序列还可用于染色体鉴定。该序列被特异地靶向于人染色体上的特异位置并可与之杂交。但是,在染色体上特异位置的鉴定是当前所需。现在很少有基于实际的序列数据(重复多态性)的染色体标记试剂以供标记染色体位置。本发明的染色体 DNA 作图是将序列与疾病相关的基因关联的重要的第一步。

简单地说,通过从 cDNA 制备 PCR 引物(优选 15-25bp)将序列绘制在染色体中。计算机分析基因的 3'端非翻译区,用于快速选择出基因组 DNA 中不跨出一个外显子的引物,因跨出一个外显子以上会使扩增过程复杂化。然后这些引物被用于含有个人染色体的体细胞杂种的 PCR 筛选。只有那些包含与引物相关的人基因的杂种会产生扩增片段。

体细胞杂种的 PCR 作图是一种将特定的 DNA 定位于一特定染色体的快速方法。利用本发明的方法,通过同样的寡核苷酸引物,经类似的方法可用一系列来自特异染色体的片段或巨大基因组克隆的集合体进行亚定位。另一种能类似地绘制染色体的作图策略包括原位杂交、用流式分选的染色体预筛选并通过杂交进行预选择而构建染色体特异的

cDNA 文库。

cDNA 克隆的中期染色体扩展的荧光原位杂交(FISH)可一步提供精确的染色体定位。这一技术所用的 cDNA 至少为 50-60 碱基。为了解此技术可参看 Verma 等, 人类染色体:基础技术手册(Human Chromosomes:A Manual of Basic Techniques),Pergamon Press,New York(1988)。

一旦一序列被绘制在精确的染色体位置上,该序列在染色体上的物理位置就能与遗传图谱的数据关联起来。这些数据可获自如 V. McKusick 《人的孟德尔遗传》(可在网上从 Johns Hopkins 大学的 Welch 医学图书馆获得)。通过连锁分析(物理位置邻近的基因的共遗传)已鉴定了基因和定位于同一染色体上的疾病之间的关系。

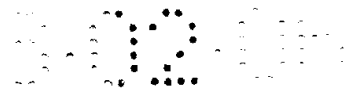
下一步,需要确定 cDNA 或基因组 DNA 序列在患病和不患病个体之间的差异。如果在一些或全部患病个体中观察到一个突变,而正常个体中无此突变,这个突变很可能是该病的促发因素。

利用当前物理图谱和遗传图谱技术的分辨率,被精确定位在与某疾病相关连的染色体区域上的 cDNA 可能具有 50-500 个可能的致病基因(假定图谱分辨率为一百万碱基和每 20 kb 一个基因)。

多肽及其片段或衍生物或类似物或表达多肽的细胞可用作免疫原以产生其抗体。这些抗体可为,例如,多克隆抗体或单克隆抗体。本发明也包含嵌和的、单链的和人源化的抗体以及 Fab 段、或 Fab 段表达文库的产物。本领域已知的各种方法可用于这样的抗体和片段的产生。

抗本发明序列相应多肽的抗体可通过直接将多肽注射给动物或多肽施用给动物(优选非人类)而获得。所得的抗体可与多肽本身结合。用这种方法,甚至用编码一个多肽片段的序列也能用于产生结合整个天然多肽的抗体。然后,该抗体可用于将多肽从表达的组织中分离出来。

为制备单克隆抗体,可以使用提供产生抗体的连续细胞系的任何技术。实例包括杂交瘤技术(Kohler 和 Milstein,自然(Nature)256:495-497(1975))、trioma 技术、人 B-细胞杂交瘤技术(Kozbor 等,当代免疫学 4:72(1983))和 EBV-杂交瘤技术以产生人单克隆抗体(Cole 等《单克隆抗体和癌症治疗》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)



Alan R. Liss, Inc., pp77-96(1985))。

所述的单链抗体产生技术(美国专利 4,946,778)可适用于产生本发明免疫原性多肽产物的单链抗体。同样,转基因小鼠可用来表达本发明免疫原性多肽产物的人源化抗体。

本发明将参照下述实施例被进一步描述。但是,应理解本发明并不局限于这些实施例。所有的份和量,除非另有说明都按重量计。

为便于理解下面的实施例,先描述一些经常出现的方法和/或术语。

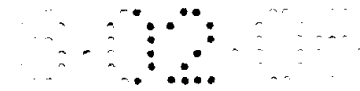
“质粒”的命名用一小写的 p,在其前和/或后接大写的字母和/或数字。其中的出发质粒可从商业获得,或能不受限制地为公众所得,或可按已公开的方法从可得质粒构建。另外,那些所描述质粒的等价质粒在本领域是已知的,对于普通的技术人员来说是清楚的。

DNA 的“消化”指用限制酶对 DNA 进行催化裂解,限制酶只作用于 DNA 序列的特定位点。这里所用的各种限制酶可以从商业途径获得,它们的反应条件、辅助因子和其他的要求按照普通技术人员所知的应用。为了分析目的,典型地在 20 μ l 缓冲溶液中加入 1 μ g 质粒或 DNA 片段和约 2 个单位的酶。为了分离 DNA 片段用于质粒构建,典型地在一较大的体积中用 20-250 单位的酶消化 5-50 μ g 的 DNA。生产厂家会标明特异的限制酶合适的缓冲液和底物量。通常温育时间为约 37 $^{\circ}$ C 1 小时,但根据供应商的介绍可有所变化。消化反应后直接在聚丙烯酰胺凝胶上电泳,以分离所要的片段。

用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶对裂解片段进行大小分离(Goeddel,D. 等,核酸研究,8:4057(1980))。

“寡核苷酸”指可化学合成的单链多脱氧核糖核苷酸或两条互补的多脱氧核糖核苷酸链。这些合成的寡核苷酸不含有 5' 端磷酸,所以如果没有在激酶作用下用 ATP 加上一个磷酸,就不能与另一个寡核苷酸连接。合成的寡核苷酸与没有被去磷酸化的片段连接。

“连接”指在两个双链核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程(Maniatis,T., 等 Id., p. 146)。除非提供其他方法,连接应在已知的缓冲液和条件下进行,即每约 0.5 μ g 约等摩尔量的待连接的 DNA 片段需 10 个



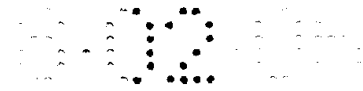
单位的 T4 DNA 连接酶(“连接酶”)。

除非另有声明,转化都用 Graham,F.和 Van der Eb,A.病毒学(Virology)52:456-457(1973)中所描述的方法进行。

实施例 1

MCP-4 的细菌表达和纯化

编码 MCP-4 的 DNA 序列(ATCC#75703)首先用 PCR 扩增,所用寡核苷酸引物与加工过的 MCP-4 蛋白(去掉信号肽序列)的 5'和 3'末端及 MCP-4 基因 3'端的载体序列相对应。另外的与 MCP-4 对应的核苷酸也分别加入到 5'和 3'末端序列。5'端寡核苷酸引物序列 5' TCAGGATCCCCTACGGGCTCGTGGTC3' (SEQ ID NO:3)含有一 BamHI 限制酶位点,接着是 MCP-4 的编码序列的 18 个核苷酸,从已加工蛋白密码子的假定的最末氨基酸开始。3'末端序列 3'CGCTCTAGAGTAAAACGACGGCCAGT5'(SEQ ID NO:4)含有一 XbaI 位点的互补序列和一 pBluescript SK-载体序列位于 MCP-4 DNA 插入片段的 3'末端的互补序列。这些限制酶切位点与细菌表达载体 pQE-9(Qiagen, Inc, 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)上的限制酶切位点一致。pQE-9 编码抗生素抗性(Amp^r)、一细菌复制起点(ori)、一 IPTG 调节的启动子操纵子(P/O)、一核糖体结合位点(RBS)、一 6His 尾和限制酶位点。用 BamHI 和 XbaI 消化 pQE-9。将扩增的序列连接到 pQE-9 中,插入到编码组氨酸尾和 RBS 的读码框中。用连接混合物转化 Qiagen 的商标名为 M15/rep4 的大肠杆菌株 m15/rep4,所用方法如 Sambrook,J.等,分子克隆实验室手册,冷泉港实验室出版社,1989 中所述。M15/rep4 含有多拷贝的 pREP4 质粒,该质粒表达 LacI 抑制因子并表现卡那霉素抗性(Kan^r)。转化子通过含有氨苄青霉素/卡那霉素的 LB 平板上的生长能力来鉴定,选择抗性菌落。分离出质粒 DNA 并用限制性分析来确证。含有所需构建体的克隆在加有 Amp(100µg/ml)和 Kan(25µg/ml)的 LB 液体培养基中过夜生长(O/N)。再将 O/N 培养物以 1:100 到 1:250 的比例接种大的培养液中。细菌生长到光密度 600(O.D.⁶⁰⁰)在 0.4-0.6 之间。然后加入终浓度 1mM 的



IPTG(异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷)。IPTG 通过使 LacI 抑制因子失活而进行诱导,清除 P/O 导致基因表达增加。再让细菌生长 3-4 小时。细胞沉淀溶解在离液剂 6M 的盐酸胍中。澄清之后,在使含有六组氨酸尾的蛋白紧密结合的条件下,用镍螯合柱层析从该溶液中纯化出溶解的 MCP-4。Hochuli,E.等,色谱学杂志 411:177-184(1984)。用 6M 的盐酸胍 pH5.0 将 MCP-4(95%纯度)从柱上洗脱,为了复性,加入 3M 的盐酸胍、100mM 的磷酸钠、10mM 谷胱甘肽(还原的)和 2mM 谷胱甘肽(氧化的)。在该溶液中孵育 12 小时后,蛋白质在 10mM 的磷酸钠中透析。

实施例 2

MCP-4 在人源细胞中的表达模式

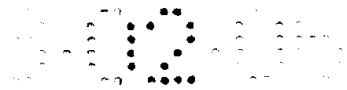
为检查 MCP-4 在人源细胞中的表达水平进行蛋白质印迹实验。用 RNazol™ 系统 (Biotecx Laboratories, Inc. 6023 South Loop East, Houston TX77033) 分离总细胞 RNA 样品。从每种所示人组织分离的约 10 μ g 的总细胞 RNA 在 1% 的琼脂糖凝胶中分离,并印迹到尼龙膜上 (Sambrook, J. 等, 分子克隆实验室手册, 冷泉港实验室出版社, (1989))。根据 Sratagene Prime-It 试剂盒用 50ngDNA 片段进行标记反应。用一 Select-G-50 柱纯化标记的 DNA。(5Prime-3Prime, Inc. 5603 Arapahoe Road, Boulder, CO 80303)。然后膜用放射性标记的 1,000,000cpm/ml 的全长的 MCP-4 基因在 0.5 M NaPO₄、pH7.4 和 7%SDS 中 65 °C 杂交过夜。用 0.5 \times SSC、0.1%SDS 室温和 60 °C 洗涤两次后,该膜用增感屏于 -70 °C 曝光过夜。MCP-4 的信使 RNA 在活化和非活化的 T 细胞、单核细胞、和 T 细胞系中是丰富的。

实施例 3

用杆状病毒表达系统克隆和表达 MCP-4

编码全长 MCP-4 蛋白的 DNA 序列(ATCC#75703)用 PCR 扩增,寡核苷酸引物与基因的 5'和 3'序列对应:

扩增的序列用一商业获得的试剂盒(“Geneclean,” BIO 101



Inc., La Jolla, Ca) 在 1% 的琼脂糖凝胶中分离。然后用对应于扩增产物的限制性内切酶消化该片段,并在 1% 的琼脂糖凝胶上再次纯化。该片段被命名为 F2。

载体 pRG1(pVL941 载体的修饰,讨论见下)被用于使用杆状病毒表达系统的 MCP-4 蛋白的表达。(参见:Summers,M.D.和 Smith,G.E.1987,杆状病毒载体和昆虫细胞培养方法手册,Texas 农业实验基地公报(Dexas Agricultural Experimental Station Bulletin)1555 号)。该表达载体含有苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)的强多角体蛋白启动子及其后的限制性内切酶用于消化扩增产物的识别位点。猴病毒(SV40)的聚腺苷酸化位点用于有效的聚腺苷酸化。为了便于选择重组病毒,在多角体蛋白启动子的同向插入了大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因,后面接着多角体蛋白基因的聚腺苷酸化信号。多角体蛋白序列两侧是病毒序列,用于与野生型病毒 DNA 共转染进行细胞介导的同源重组。许多其他的杆状病毒载体可代替 pRG1,如 pAc373、pVL941 和 pAcIM1(Luckow,V.A.和 Summers ,M.D.病毒学,170:31-39)。

用限制酶消化质粒,并用小牛小肠磷酸酶经本领域已知的方法进行去磷酸化。用商业获得的试剂盒(“GeneClean,” BIO 101 Inc.,La Jolla, Ca)在 1% 的琼脂糖凝胶中分离出 DNA。该载体 DNA 被命名为 V2。

F2 片段和去磷酸化的质粒 V2 用 T4 DNA 连接酶进行连接。然后转化大肠杆菌 HB101 细胞,用酶鉴定出含有 MCP-4 基因的质粒(pBacMCP-4)的细菌。克隆片段的序列通过 DNA 测序确证。

5 μ g 的质粒 pBacMCP-4 与 1 μ g 的可商业获得的线性化杆状病毒(“BaculoGold™杆状病毒 DNA” Pharmingen ,San diego,CA.)用脂转染方法(Felgner,等,美国科学院院报 84:7413-7417)进行共转染。

1 μ g BaculoGold™病毒 DNA 和 5 μ g 的质粒 pBacMCP-4 在无菌微量滴定板的加样孔中混合,其中含有 50 μ l 无血清的 Grace's 培养基(Life Technologies Inc.,Gaithersburg,MD)。加入 10 μ l 脂转染剂和 90 μ l 的 Grace's 培养基,混匀,室温温育 15 分钟。然后将转染混合物滴加入接种在含 1ml 无血清 Grace's 培养基的 35mm 组织培养板上的 Sf9 昆虫细胞(ATCC CRL 1711)中。前后晃动培养板以混匀新加入的溶液。培养

板在 27 °C 孵育 5 小时。5 小时后从培养板上移去转染混合液,并加入 1ml 添加 10%胎牛血清的 Grace's 昆虫培养基。将培养板放回培养箱中,27 °C 持续培养 4 天。

4 天后,收集上清,用类似于 Summers 和 Smith(同上)所描述的方法进行空斑实验。改变之处是使用了“Blue Gal”(Life Technologies Inc.,Gaithersburg)的琼脂糖凝胶,使得兰色噬斑较易分离。(“空斑实验”的详细描述可参见 Life Technologies Inc.,Gaithersburg 分发的昆虫细胞培养和杆状病毒学用户指南的 9-10 页)。

系列稀释后 4 天,病毒加入到细胞中,用 Eppendorf 吸管头挑取兰色噬斑。在 200 μ l 的 Grace's 培养基的 Eppendorf 管中重悬含有重组病毒的琼脂。短暂离心去除琼脂,并将含有重组杆状病毒的上清液感染接种 35mm 平皿中的 Sf9 细胞。4 天后收获这些培养平皿中的上清液,储存在 4 °C。

Sf9 细胞生长在补加 10%热灭活 FCS 的 Grace's 培养基中。用感染复数(MOI)2 的重组杆状病毒 V-MCP-4 感染细胞。6 小时后去掉原培养基,用不含甲硫氨酸和半胱氨酸的 SF900II 培养基(Life Technologies Inc.,Gaithersburg)替换。42 小时后加入 5 μ Ci 的 ³⁵S-甲硫氨酸和 5 μ Ci 的 ³⁵S-半胱氨酸(Amersham)。细胞再培养 16 小时后离心收获,通过 SDS-PAGE 和放射自显影可观察到标记的蛋白。

实施例 4

基因治疗表达

从一受试者皮肤活检中获得成纤维细胞。所得组织置于组织培养基中并分成小块。小而厚的组织放在组织培养瓶的潮湿面,约每瓶 10 块。将培养瓶倒置、盖紧,室温中放置过夜。室温中 24 小时后,倒转瓶子,组织块仍固定在瓶底,加入新鲜的含有 10%的 FBS、青霉素和链霉素的培养基(如,Ham'sF12 培养基)。然后在 37 °C 培养约一周。这时,加入新鲜培养基,并在此后隔几天换一次。再培养二周后,出现了一单层成纤维细胞。将其用胰蛋白酶消化并置入大培养瓶中。

PMV-7(Kirschmeier,P.T. 等 ,DNA 7:219-25(1988)) 两侧为



Moloney 鼠肉瘤病毒的长末端重复序列,用 EcoRI 和 HindIII 消化并用小牛小肠磷酸酶处理。线性载体在琼脂糖凝胶中分开并用玻璃珠纯化出来。

编码本发明多肽的 cDNA 用 PCR 扩增,引物分别与 5'和 3'末端序列对应。5'端引物含有一 EcoRI 位点, 3'端引物含有一 HindIII 位点。将等量的 Moloney 鼠肉瘤病毒的线性骨架和扩增的 EcoRI 和 HindIII 片段加在一起,再加入 T4 DNA 连接酶。该混合物保持在适于两片段连接的条件。连接混合物转化细菌 HB101,然后转化产物涂布于含有卡那霉素的琼脂平板上,以确定载体上有所述的正确插入片段。

兼嗜性的 pA317 或 GP+am12 包装细胞在含有 10%小牛血清 (CS)、青霉素和链霉素的 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基(DMEM)中组织培养成片。将含有该基因的 MSV 载体加入到培养基中,用它转导包装细胞。包装细胞产生含有该基因的具感染性的病毒颗粒(包装细胞在此称为生产细胞)。

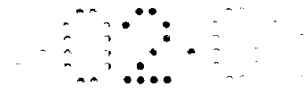
转导的生产细胞中加入新鲜的培养基,随后从 10cm 平板上的成片生产细胞中收获培养液。消耗的培养液中含有具感染性的病毒颗粒,用微孔滤膜除去解离的生产细胞,培养液又用于感染成纤维细胞。从亚成片的成纤维细胞平板中除去培养基,快速用来自生产细胞的培养液取代。该培养基也被除去又被新鲜的培养基取代。如果病毒的滴度高,则基本上所有的成纤维细胞都被感染,并不需要进行选择。如果病毒的滴度非常低,,就需要使用含选择标记如 neo 或 his 的逆转录病毒载体。

工程化的成纤维细胞可以单独注射给宿主,或在 cytodex 3 微载体珠上生长成片是再注射给宿主。这时成纤维细胞产生该蛋白质产物。

实施例 5

MCP-4 作为髓干细胞活化剂(骨髓拯救)的原始指征

在 16 周龄 C57B1/6 小鼠(约 20g) 中研究了 MCP-4 对外周血、脾、和骨髓中原始的造血始祖细胞分布的影响。在第一次实验中,三只小鼠在两天内每日腹膜内注射 1mg/kg 的 MCP-4 或盐水并在最后一次注射后 24 小时进行分析。在第二次实验中,另外的三只小鼠在四天内每日腹



膜内注射 1mg/kg 的 MCP-4 或盐水并在最后一次注射后 24 小时进行分析。在着两次实验中, 每只动物通过心包穿刺取血且处死小鼠得到骨髓和脾。每组织中所示数量的细胞双份涂布在含有 IL-3(5ng/ml)、SCF(50ng/ml), M-CSF(5ng/ml)和 IL-1 α (10ng/ml)的含琼脂培养基的平板上, 培养 14 天。在两个实验中, 收集不同动物中的数据并表达为平均值 \pm S.D.。两个实验的结果显示 MCP-4 活化干细胞从骨髓移到外周血中(表 1 和 2)。在第一个实验中, 用 MCP-4 治疗后 2 天, 外周血中的 HPP-CFC、LPP-CFC、和未成熟细胞的频率显著地比对照增加。在脾中未观察到变化并且在骨髓中观察到 HPP-CFC 的显著减少(表 1)。在第二个实验中, 用 MCP-4 治疗后 4 天, 观察到外周血中的 HPP-CFC、LPP-CFC、和未成熟细胞的频率同样显著的增加。在脾中观察到未成熟细胞的频率显著增加并且在骨髓中观察到 HPP-CFC 和 LPP-CFC 的显著减少(表 2)。特别地指出注射 MCP-4 后在外周血中未成熟造血干细胞的存在是重要的。用 MCP-4 治疗后在动物中观察到的影响并非起因于毒性, 因为在对照和 MCP-4 治疗的小鼠中白细胞组分的 FACScan 的分布是一致的(表 3)。

实施例 6

MCP-4 作为骨髓保护剂抗阿糖胞苷

在这个实验中, Lin-细胞 (1×10^5 细胞/毫升) 涂布于补充了小鼠 IL-3(5ng/ml)、小鼠 SCF(50ng/ml)(柱 1); IL-3、SCF 和 100mg/ml MCP-4(柱 2); 或 IL-3、SCF 和 100mg/ml 无关蛋白质 HG200-3-B(柱 3)的生长培养基上。培养 48 小时后, 上述一组培养物接受 50 μ g/ml Ara-C 并继续培养 24 小时。然后收获细胞, 用 HBSS 洗涤三次以除去药物和细胞因子, 并如图 4 的说明中所述对 HPP-CFC 和 LPP-CFC 的存在进行检测。结果表示为保护的平均值%(\pm SD)。保护的百分率按如下计算: 保护的百分率表示为在 Ara-C 存在下培养的培养物中发现的集落数除以无 Ara-C 存在下培养的培养物中发现的集落数 $\times 100$ 。三个实验之一的数据显示在图 6 中。所有样品均以两份检测。

实施例 7

MCP-4 作为骨髓保护剂抗 5-氟尿嘧啶

小鼠骨髓细胞的单核细胞群通过利用一系列抗细胞表面抗原的单克隆抗体的负选择谱系-定型细胞被排除。得到的细胞群(Lin-细胞)重悬于生长培养基中,该培养基含有 IL-3(5ng/ml)、SCF(50ng/ml)、GM-CSF(5ng/ml)、M-CSF(5ng/ml)和 IL-1 α (10ng/ml),并将 1ml 的该细胞悬液加入到培养管中。(1) 一组双份培养物未接受趋化因子;(2) 一组双份培养物中加入 100ng/ml 的 MCP-4;和(3) 一组双份培养物中加入 100ng/ml 的无关蛋白质。所有的培养物在组织培养箱中培养 48 小时,此时每组的一份培养物接受 100 μ g/ml 的 5-氟尿嘧啶,并继续培养 24 小时。然后收获所有的培养物,用 HBSS 洗涤三次,并如图 5 的说明中所述对 HPP-CFC 和 LPP-CFC 的存在进行检测。保护的百分率表示为在 5-氟尿嘧啶存在下培养的培养物中检测的集落数除以无 5-氟尿嘧啶存在下培养的培养物中发现的集落数 $\times 100$ 。数据表示为保护的平均值 \pm SD。进行两次实验并每次进行双份。见图 7。

实施例 8

MCP-4 对皮层神经细胞生存力的影响

怀孕 17 天的 Sprague-Dawley 大鼠被处死,取出皮层并小心地从皮层组织片中剥离脑膜。制备单细胞悬液并以 20,000 个细胞/孔将细胞置于含有 5% 马血清的培养基中。24 小时后,去除含有血清的培养基并加入无血清培养基到培养物中。无血清培养物中的 MCP-4 的浓度如图 8 中所示。应用的 MCP-4 是如在该申请的 SEQ ID NO:1 中所示的多核苷酸序列编码的 MCP-4 多肽。每两天换一次培养基并重新加入 MCP-4。进行生存力检测前神经细胞在培养物中维持 6 天。

利用来自 Molecular Probe 的活/死检测试剂盒来估计细胞生存力。该实验是基于活和死细胞的同时测定的一种两色荧光细胞生存力检测法。活细胞通过胞内普遍存在的酯酶活性的存在来区别,由近似无荧光细胞透过 calcein AM 到强荧光 calcein 的酶促转变来测定。聚阳离子的 calcein 被活细胞很好地保持,并因此在活细胞中产生强一致性



绿色荧光。因此发射读数(约 530nm)是培养物的总细胞数的测量值。如图 8 所示,当 MCP-4 的浓度增加时,活细胞数随之增加。

从以上的讲述来看,在所附的权利要求的范围内可能对本发明进行大量的修饰和变动,本发明可以不同于具体描述的方式实施。



序列表

(1)一般信息::

(i) 申请人:

(A)名称:Human Genome Science ,Inc.

(B)街道:9401 Key West Avenue

(C)城市:Rockville

(D)州:Maryland

(E)国家:美国

(F)邮政编码(ZIP):20850-3338

(G)电话:301-309-8504

(H)传真:301-309-8512

(ii)发明题目:单核趋化蛋白-4

(iii)序列数目:6

(iv)计算机可读形式:

(A)媒体类型:软盘

(B)计算机:IBM PC 兼容

(C)操作系统:PC-DOS/MS-DOS

(D)软件:PatentIn Release #1.0 ,#1.30 版本(EPO)

(V)本申请资料:

(A)申请号:(待定)

(B)申请日期:1996年6月7日

(vi)在先申请资料:

(A)申请号:US 08/479,126

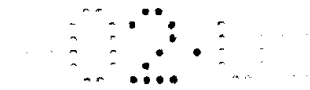
(B)申请日期:1995年6月7日

(2)SEQ ID NO:1 的信息:

(I)序列特征:

(A)长度:360 碱基对

(B)类型:核酸



(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

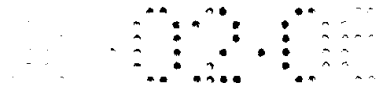
(ii)分子类型:DNA(基因组)

(ix)特征:

(A)名称/关键词:CDS

(B)位置:1..357

(xi)序列描述: SEQ ID NO:1:



ATG GCA GGC CTG ATG ACC ATA GTA ACC AGC CTT CTG TTC CTT GGT GTC
48
Met Ala Gly Leu Met Thr Ile Val Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gly Val
1 5 10 15

TGT GCC CAC CAC ATC ATC CCT ACG GGC TCT GTG GTC ATA CCC TCT CCC
96
Cys Ala His His Ile Ile Pro Thr Gly Ser Val Val Ile Pro Ser Pro
20 25 30

TGC TGC ATG TTC TTT GTT TCC AAG AGA ATT CCT GAG AAC CGA GTG GTC
144
Cys Cys Met Phe Phe Val Ser Lys Arg Ile Pro Glu Asn Arg Val Val
35 40 45

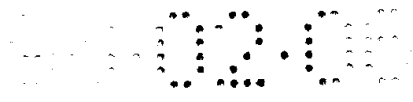
AGC TAC CAG CTG TCC AGC AGG AGC ACA TGC CTC AAG GGA GGA GTG ATC
192
Ser Tyr Gln Leu Ser Ser Arg Ser Thr Cys Leu Lys Gly Gly Val Ile
50 55 60

TTC ACC ACC AAG AAG GGC CAG CAG TTC TGT GGC GAC CCC AAG CAG GAG
240
Phe Thr Thr Lys Lys Gly Gln Gln Phe Cys Gly Asp Pro Lys Gln Glu
65 70 75 80

TGG GTC CAG AGG TAC ATG AAG AAC CTG GAC GCC AAG CAG AAG AAG GCT
288
Trp Val Gln Arg Tyr Met Lys Asn Leu Asp Ala Lys Gln Lys Lys Ala
85 90 95

TCC CCT AGG GCC AGG GCA GTG GCT GTC AAG GGC CCT GTC CAG AGA TAT
336
Ser Pro Arg Ala Arg Ala Val Ala Val Lys Gly Pro Val Gln Arg Tyr
100 105 110

CCT GGC AAC CAA ACC ACC TGC TAA
360
Pro Gly Asn Gln Thr Thr Cys
115



(2)SEQ ID NO:2 的信息:

(I)序列特征:

(A)长度:119 氨基酸

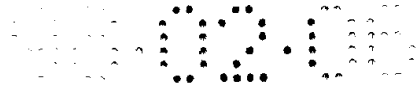
(B)类型:氨基酸

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO:2:

```
Met Ala Gly Leu Met Thr Ile Val Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gly Val
  1           5           10           15
Cys Ala His His Ile Ile Pro Thr Gly Ser Val Val Ile Pro Ser Pro
          20           25           30
Cys Cys Met Phe Phe Val Ser Lys Arg Ile Pro Glu Asn Arg Val Val
          35           40           45
Ser Tyr Gln Leu Ser Ser Arg Ser Thr Cys Leu Lys Gly Gly Val Ile
  50           55           60
Phe Thr Thr Lys Lys Gly Gln Gln Phe Cys Gly Asp Pro Lys Gln Glu
  65           70           75           80
Trp Val Gln Arg Tyr Met Lys Asn Leu Asp Ala Lys Gln Lys Lys Ala
          85           90           95
Ser Pro Arg Ala Arg Ala Val Ala Val Lys Gly Pro Val Gln Arg Tyr
          100          105          110
Pro Gly Asn Gln Thr Thr Cys
          115
```



(2)SEQ ID NO:3 的信息:

(I)序列特征:

(A)长度:28 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:3:

TCAGGATCCC CTACGGGCTC GTGTGGTC
28

(2)SEQ ID NO:4 的信息:

(I)序列特征:

(A)长度:26 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(xi)序列描述: SEQ ID NO:4:

TGACCGGCAG CAAAATGAGA TCTCGC
26

(2)SEQ ID NO:5 的信息:

(I)序列特征:

(A)长度:99 氨基酸

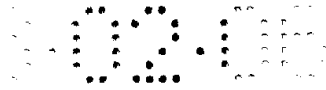
(B)类型:氨基酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:蛋白质

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5:



Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Ala Thr
1 5 10 15
Phe Ile Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val
20 25 30
Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu
35 40 45
Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val
50 55 60
Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln
65 70 75 80
Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr
85 90 95
Pro Lys Thr

(2)SEQ ID NO:6 的信息:

(I)序列特征:

(A)长度:93 氨基酸

(B)类型:氨基酸

(C)链型:单链

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:蛋白质

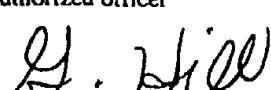
(xi)序列描述: SEQ ID NO:6:

Met Gln Val Ser Thr Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu Cys Thr Met Ala
1 5 10 15
Leu Cys Asn Gln Val Leu Ser Ala Pro Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr
20 25 30
Ala Cys Cys Pro Ser Tyr Thr Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile
35 40 45
Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Gln Cys Ser Lys Pro Ser Val Ile
50 55 60
Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu
65 70 75 80
Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser Asp Leu Glu Leu Ser Ala
85 90

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>8</u> , line <u>6</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Date of deposit March 10, 1994	Accession Number ATCC 75703
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
DNA Plasmid, 179500	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
(This section is currently blank)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
(This section is currently blank)	

For receiving Office use only	
<input checked="" type="checkbox"/>	This sheet was received with the international application
Authorized officer	
	

For International Bureau use only	
<input type="checkbox"/>	This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	



说明书附图

1 ATGGCAGGCCTGATGACCATAGTAACCAGCCTTCTGTTCCTTGGTGTCTGTGCCACCAC 60
M A G L M T I V T S L L F L G V C A H H

61 ATCATCCCTACGGGCTCTGTGGTCATACCCTCTCCCTGCTGCATGTTCTTTGTTTCCAAG 120
I I P T G S V V I P S P C C M F F V S K

121 AGAATTCCTGAGAACCGAGTGGTCAGCTACCAGCTGTCCAGCAGGAGCACATGCCTCAAG 180
R I P E N R V V S Y Q L S S R S T C L K

181 GGAGGAGTGATCTTCACCACCAAGAAGGGCCAGCAGTTCTGTGGCGACCCCAAGCAGGAG 240
G G V I F T T K K G Q Q F C G D P K Q E

241 TGGGTCCAGAGGTACATGAAGAACCTGGACGCCAAGCAGAAGAAGGCTTCCCCTAGGGCC 300
W V Q R Y M K N L D A K Q K K A S P R A

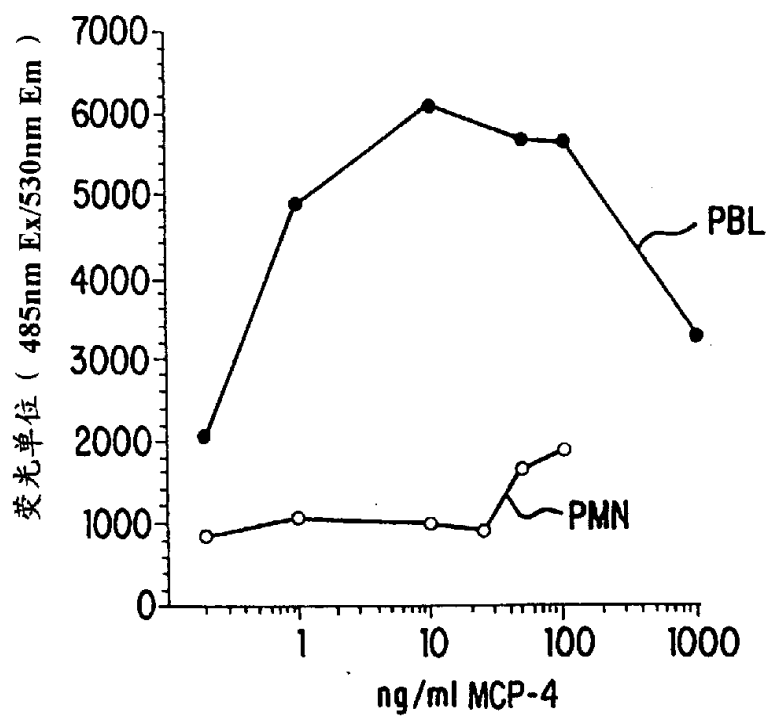
301 AGGGCAGTGGCTGTCAAGGGCCCTGTCCAGAGATATCCTGGCAACCAAACCACCTGCTAA 360
R A V A V K G P V Q R Y P G N Q T T C *

图 1

1	M	A	G	L	M	T	I	V	T	S	L	L	F	-	L	G	V	C	A	H	H	I	I	P	T	G	S	V	V	I	MCP-4
1	M	K	V	S	A	A	L	L	C	L	L	L	I	A	A	T	F	I	P	Q	G	L	A	Q	P	D	A	I	N	A	MCP1
1	M	Q	V	S	T	A	A	L	A	V	L	L	C	T	M	A	L	C	N	Q	V	L	S	A	P	L	A	A	D	T	MIP1-A
30	P	S	P	C	C	M	F	F	V	S	K	R	I	P	E	N	R	V	V	S	Y	Q	L	S	S	R	S	T	C	L	MCP-4
31	P	V	T	C	C	Y	N	F	T	N	R	K	I	S	V	Q	R	L	A	S	Y	R	R	I	T	S	S	K	C	P	MCP1
31	P	T	A	C	C	F	S	Y	T	S	R	Q	I	P	Q	N	F	I	A	D	Y	F	E	-	T	S	S	Q	C	S	MIP1-A
60	K	G	G	V	I	F	T	T	K	K	G	Q	Q	F	C	G	D	P	K	Q	E	W	V	Q	R	Y	M	K	N	L	MCP-4
61	K	E	A	V	I	F	K	T	I	V	A	K	E	I	C	A	D	P	K	Q	K	W	V	Q	D	S	M	D	H	L	MCP1
60	K	P	S	V	I	F	L	T	K	R	G	R	Q	V	C	A	D	P	S	E	E	W	V	Q	K	Y	V	S	D	L	MIP1-A
90	D	A	K	Q	K	K	A	S	P	R	A	R	A	V	A	V	K	G	P	V	Q	R	Y	P	G	N	Q	T	T	C	MCP-4
91	D	K	Q	T	Q	T	P	K	T	MCP1																					
90	E	L	-	-	-	-	S	A	MIP1-A																						

图 2

图 3



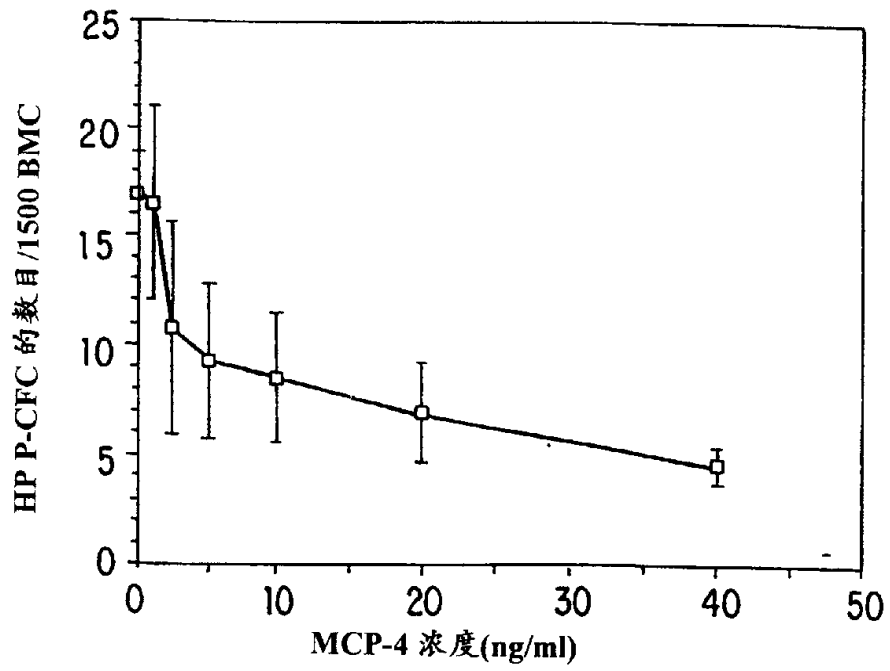


图 4A

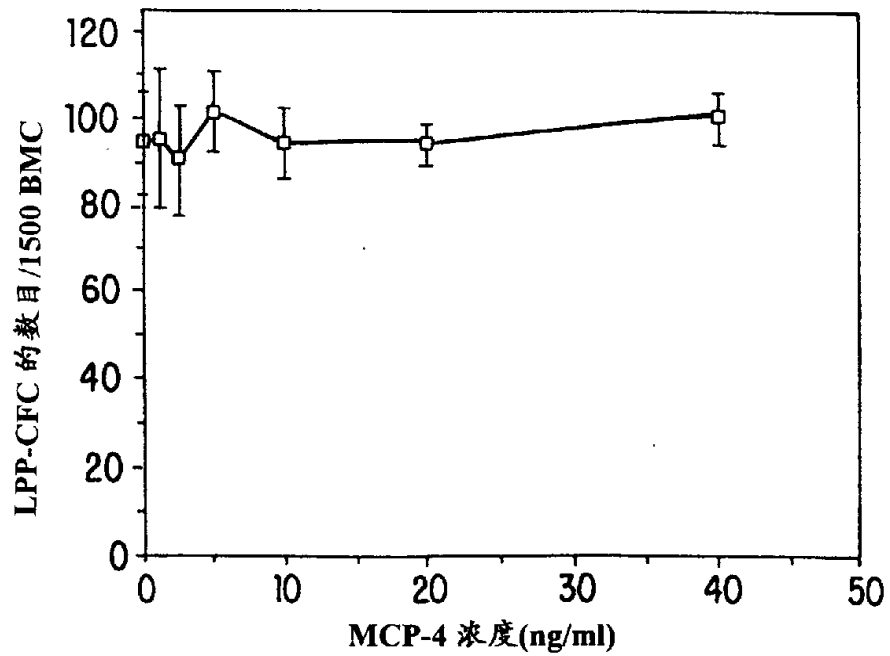


图 4B

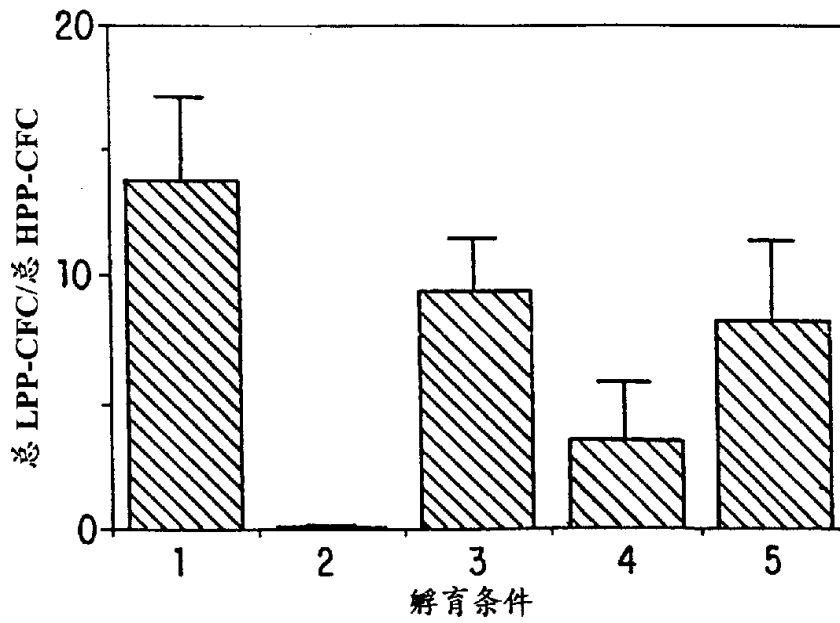


图 5A

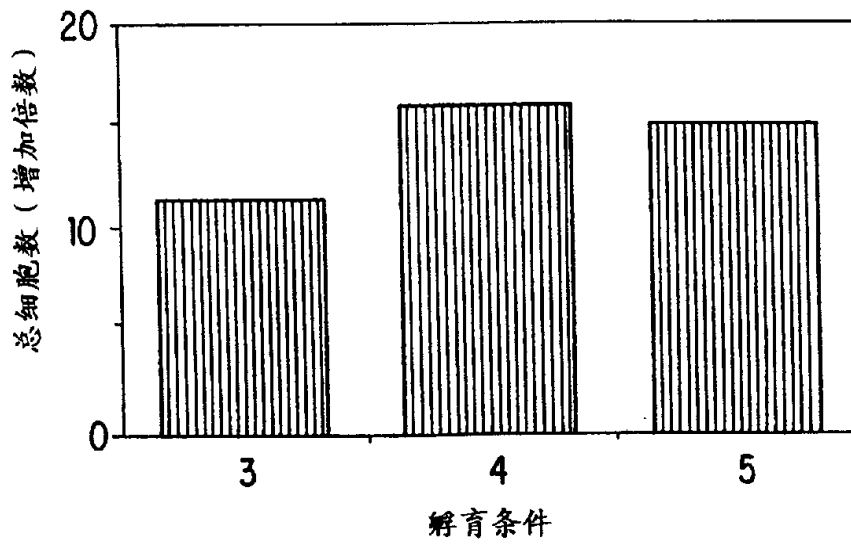


图 5B

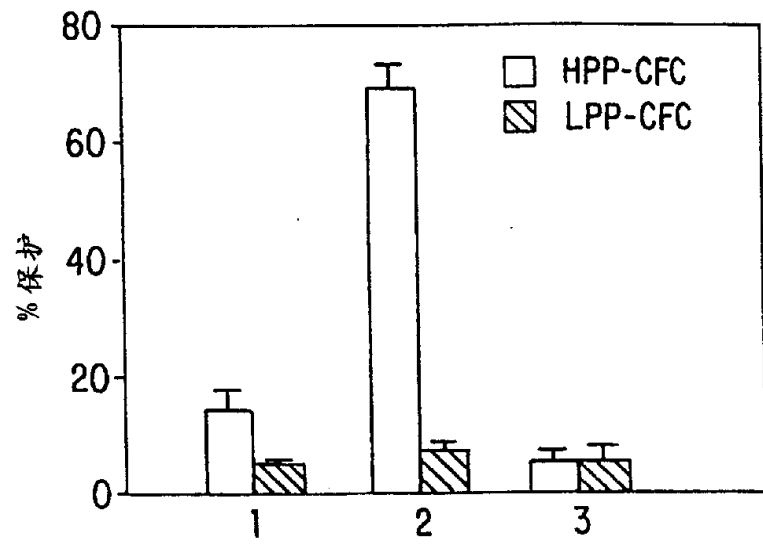


图 6

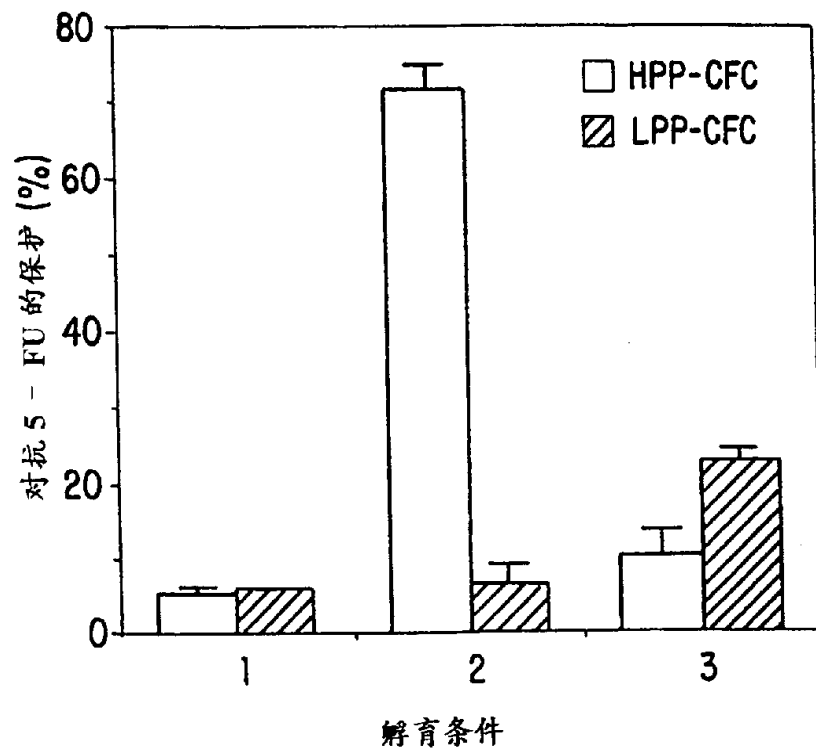


图 7

