

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 19/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/09 A61K 39/395

A61P 37/02 A61P 37/06

A61P 35/00 A61P 29/00

A61P 31/12 A61P 31/18

[21] 申请号 02129301.5

[43] 公开日 2003 年 8 月 13 日

[11] 公开号 CN 1435433A

[22] 申请日 2002.8.30 [21] 申请号 02129301.5

[71] 申请人 龚小迪

地址 300270 天津市大港区胜利街前光里 46  
栋 1 单元 301 号

[72] 发明人 龚疆红

[74] 专利代理机构 天津三元专利事务所

代理人 胡婉明

权利要求书 4 页 说明书 31 页 附图 7 页

[54] 发明名称 长效广谱的趋化因子受体抑制物

[57] 摘要

本发明提供设计了数种长效且可高效抑制多种不同趋化因子受体的嵌合蛋白质化合物及其核酸序列, 并提供了制备和测试这些产品的方法; 本发明嵌合蛋白质化合物的特点是, 1. 它们能够同时高效抑制多种不同对疾病起着关键作用的趋化因子受体; 2. 可选择性地针对不同的疾病而作相适应的抑制组合; 3. 长效, 既在体内半寿期为未经改造的受体拮抗蛋白质的百倍以上; 由于嵌合蛋白质化合物的这些特征使其具有很高的临床应用价值; 本发明嵌合蛋白质化合物可分别用于如艾滋病毒感染、肿瘤转移、组织移植排斥、自身免疫疾病的有效预防或治疗, 也可用于与其它方法和药物的联合治疗及诊断, 用于治疗除了上述嵌合蛋白质化合物, 还包括含有这些嵌合蛋白质核酸序列的 DNA, RNA。

ISSN 1008-4274

1、一种长效广谱的趋化因子受体抑制物，其特征在于，能够拮抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质，其包含有如下的蛋白质片段：

5 a、人体免疫球蛋白恒定区；

b、两种不同的对细胞趋化因子受体有拮抗作用的蛋白质片段；

c、其中每个受体拮抗剂通过其分子的 C-末端与人体免疫球蛋白恒定区的 N-末端相连，形成融合蛋白单体；

d、这些含有不同受体的拮抗剂的融合蛋白单体彼此之间再以共价相连，  
10 可以双倍体，四倍体，或多聚体的形式产出。

2、根据权利要求 1 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物，其特征在于，所述的融合蛋白单体的人体免疫球蛋白恒定区部分是指人体免疫球蛋白的重链的恒定区和/或轻链的恒定区片段；所述融合蛋白单体的受体拮抗剂部分包括下述任意两个针对不同受体的蛋白质：XR4 拮抗剂 1；XR4 拮抗剂 2；  
15 氨基末端头两个氨基酸经化学修饰而产生的，具有抑制受体 CXCR4 作用的 SDF-1 衍生物；R5 拮抗剂 1；R5 拮抗剂 2；XR3 拮抗剂 1；XR3 拮抗剂 2；氨基末端头 3 个氨基酸经过化学修饰而得到的，具有抑制受体 CXCR3 作用的 ITAC 衍生物；R7 拮抗剂 1；氨基末端头两 7 氨基酸经过化学修饰而得到的，具有抑制受体 CCR7 作用的 MIP-3 $\beta$ 衍生物；R7 拮抗剂 2；氨基末端头 7 个氨基酸经  
20 过化学修饰而得到的，具有抑制受体 CCR7 作用的 6CKine (1-79) 片断的衍生物；XR1 拮抗剂 1；R2 拮抗剂 1；R2 拮抗剂 2；氨基末端头 9 氨基酸经过化学修饰而得到的，具有抑制受体 CCR2 作用的 MCP-3 衍生物；R2 拮抗剂 3；R2 拮抗剂 4；氨基末端头 9 个氨基酸经过化学修饰而得到的，具有抑制受体 CCR2 作用的 MCP-1 的衍生物；XR2 拮抗剂 1；氨基末端头 7 个氨基酸经过化学修  
25 饰而得到的，具有抑制受体 CXCR2 作用的 GR0 $\alpha$ 的衍生物；所述两种不同的融合蛋白单体彼此之间相连接的方式最好是通过二硫桥，也可通过多肽链，或多糖分子等共价键；所述的相连的两种不同融合蛋白单体包括两种不同的含有重链的融合蛋白单体之间，或含有重链和含有轻链的融合蛋白单体之间。

3、根据权利要求 1 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物，其特征在于，所述的人体免疫球蛋白的重链恒定区包含有绞链区以及 CH3 片段；所述的人体免疫球蛋白的重链恒定区包含有绞链区和 CH1，CH2 及 CH3 片段；人体免疫球蛋白的重链恒定区包含 IgGy1 和 IgGy4 的重链恒定区；所述的轻链的恒定区片段包含人体免疫球蛋白轻链的 $\kappa$ 和 $\lambda$ 的恒定区。  
30

4、一种如权利要求 1 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其特征 在于，所述的拮抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质可用于治疗自身免疫病和非特异性炎症疾病、治疗肿瘤相关疾病、治疗/预防器官移植导致的排斥以及移植物抗宿主病、治疗 HIV-1 病毒感染和艾滋病；所述的拮 5 抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质与其它方法或药物做联合治疗。

5、根据权利要求 4 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其特征 在于，所述的治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重范围；肌肉注射剂量应为该剂量的数倍。

6、一种如权利要求 1 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方 10 法，其特征 在于，所述能够拮抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质的方法，包括：利用基因重组技术构建包含有拮抗不同种趋化因子受体的嵌合蛋白质单体的载体；利用上述不同的载体，组建表达和分泌能够拮抗两种或多 种趋化因子受体的嵌合蛋白质的细胞株或菌株；培养上述细胞或菌株，收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

7、一种如权利要求 1 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方 15 法，其特征 在于，所述能够拮抗趋化因子受体 CCR5, CCR1, CCR2, CCR3, CXCR4 的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1，其方法包括：利用基因重组技术按照款 1 所指构建包含有核酸序列 ND. 1, ND. 2, ND. 3, ND. 4 或表达蛋白相当于序列 (1), (2), (3), (4) 的嵌合蛋白质单体的载体；利用上述不同的载体，组建表 20 达和分泌能够拮抗趋化因子受体 CCR5, CCR1, CCR2, CCR3, CXCR4 的嵌合蛋白质的细胞株；培养上述细胞，收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

8、一种如权利要求 7 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其特征 在于，所述的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 用于治疗/预防 HIV 病毒感染、艾滋病以及涉及到上述受体的自身免疫病；所述的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 用 25 于与其它方法或药物做联合治疗；所述的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 及其核酸编 码用于疫苗治疗方法。

9、根据权利要求 7 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其特征 在于，所述的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 用于治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重；肌肉注射剂量为上述剂量的数倍；使用剂型包括注射剂型 30 和粘膜局部用药剂型；所述嵌合蛋白 XR4/R5/R1 的核酸编码的基因治疗方法和剂量为 0.4-4 毫克/公斤体重。

10、一种如权利要求 1 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方

法，其特征在于，所述的能够拮抗趋化因子受体 CCR1，CCR5，CXCR3 的嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 的方法包括：利用基因重组技术构建包含有核酸序列 ND. 3，ND. 4 ND. 5，ND. 6，或它们相应的蛋白序列 (3)，(4)，(5)，(6) 的嵌合蛋白质单体的载体；利用上述不同的载体，组建表达和分泌能够拮抗趋化因子受体 CCR5，CCR1，CXCR3 的嵌合蛋白质的细胞株；培养上述细胞，收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

11、一种如权利要求 10 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其特征在于，所述的嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 用于治疗/预防器官移植导致的排斥，移植物抗宿主病以及涉及到上述受体的自身免疫病；所述嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 用于与其它方法或药物做联合治疗；嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 及其核酸编码的疫苗治疗方法。

12、根据权利要求 11 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其特征在于，所述的嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 用于治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重范围，肌肉注射，剂量应为该剂量的数倍；所述嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 用于治疗/预防时的使用剂型，包括注射剂型；所述的各种嵌合蛋白质的核酸编码的基因治疗方法和剂量为 0.4-4 毫克/公斤体重。

13、一种如权利要求 1 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方法，其特征在于，所述的能够拮抗趋化因子受体 CCR7，CXCR4 的嵌合蛋白质 R7/XR4 的方法包括：利用基因重组技术构建包含有核酸序列 ND. 1，ND. 2，ND. 7，ND. 8，或它们相应的蛋白序列 (1)，(2)，(7)，(8) 的嵌合蛋白质单体的载体；利用上述不同的载体，组建表达和分泌能够拮抗趋化因子受体 CCR7，CXCR4 的嵌合蛋白质的细胞株；培养上述细胞，收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

14、一种如权利要求 13 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其特征在于，所述的嵌合蛋白质 R7/XR4 用于治疗肿瘤及治疗和预防肿瘤转移，以及涉及到上述受体的自身免疫病；所述的嵌合蛋白质 R7/XR4 用于与其它方法或药物做联合治疗；所述的嵌合蛋白质 R7/XR4 及其核酸编码的疫苗治疗方法。

15、根据权利要求 14 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其特征在于，所述的嵌合蛋白质 R7/XR4 用于治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重；肌肉注射剂量为该剂量的数倍；所述的嵌合蛋白质 R7/XR4 用于治疗/预防时的使用剂型包括注射剂型；所述的各种嵌合蛋白质的核酸

编码的基因治疗方法和剂量为 0.4-4 毫克/公斤体重。

16、一种如权利要求 1 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方法，其特征在于，所述的能够拮抗趋化因子受体 CCR2, CXCR1, CXCR2 的嵌合蛋白质 XR1/R2 的方法包括：利用基因重组技术构建包含有核酸序列 ND. 9, 5 ND. 10, ND. 11, ND. 12, ND. 13, No. 14 或它们相应的蛋白序列 (9), (10), (11), (12) (13) (14) 的嵌合蛋白质单体的载体；利用上述不同的载体，组建表达和分泌能够拮抗趋化因子受体 CCR2, CXCR1/CXCR2 的嵌合蛋白质的细胞株或菌株；培养上述细胞或菌株，收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

17、一种如权利要求 16 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，10 其特征在于，所述的嵌合蛋白质 XR1/R2 用于治疗自身免疫性疾病和非特异炎症；所述的嵌合蛋白质 XR1/R2 用于与其它方法或药物做联合治疗；所述的嵌合蛋白质 R2/XR1 及其核酸编码的疫苗治疗方法。

18、根据权利要求 16 所述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，15 其特征在于，所述的嵌合蛋白质 XR1/R2 用于治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重范围；肌肉注射剂量为该剂量的数倍；所述的嵌合蛋白质 XR1/R2 用于治疗/预防时的使用剂型，包括肠道吸收剂型、注射剂型；所述的各种嵌合蛋白质的核酸编码的基因治疗方法和剂量为 0.4-4 毫克/公斤体重。

## 长效广谱的趋化因子受体抑制物

### 一、技术领域

本发明涉及嵌合蛋白质化合物，尤其涉及一种长效广谱的趋化因子受体抑制物。

### 二、背景技术

研究发现，细胞趋化因子的蛋白质 (Chemokine) 及其受体对许多疾病的病理过程起着重要作用：爱滋病毒是利用趋化因子的受体感染人体的，所以，如能封闭这些受体，便可阻止爱滋病毒的感染；另外某些肿瘤细胞向一些特定的器官的转移也是通过肿瘤细胞表面带有的趋化因子受体完成的；各种非特异炎症疾病发生时，都有趋化因子介导的白细胞向病灶渗入的现象。因而，有效地抑制趋化因子的受体便能抑制细胞移动，达到治疗和预防非特异性炎症疾病和肿瘤转移的效果。

研究还发现，许多疾病都涉及到多种不同的趋化因子受体。如艾滋病主要的 HIV-1 病毒利用 CCR5 和 CXCR4 趋化因子受体感染人类，但还有许多 HIV-1 病毒可利用 CCR1, CCR2, CCR3 等受体感染；乳腺癌细胞表面带有 CXCR4 和 CCR7 两种受体，从而决定了这些癌细胞转移到骨髓，淋巴结和肺部；溃疡性结肠炎造成病理损害的主要因素是单核细胞（通过 CCR2 受体）和中性粒细胞（通过 CXCR1, CXCR2 受体）等。目前药物筛选原则都是一种药物只针对一种受体。这些药物可以抑制这一种受体，却不能抑制疾病。举例来讲，多肽化合物 SDF-1P2G 被证明高效特异抑制 CXCR4 受体，可以抑制晚期艾滋病人的病毒，然而却不能抑制早期病人和许多其它亚型的 HIV-1 病毒，因为这些病毒利用上面所提到的其它受体。而艾滋病问题解决的最大难题就是 HIV-1 病毒本身会随着病程不断产生突变，因而感染所用的受体也在不断改变。不能抑制所有的受体就不可能做到真正抑制病毒感染，也就没有广泛的临床价值。正是由于这个原因，到目前为止，世界上还没有办法来预防 HIV-1 的感染。又比如乳腺癌细胞，如果只抑制它两种受体中的一种，癌细胞依然可以通过另外一种受体而转移（参考例证 7），类似的情况还有许多其它疾病。因而，为了防治这类疾病，需要研发能够同时抑制多种不同趋化因子受体的多靶性药物。此外，多靶性的药物的另一优势就是开发时节约大量资金和时间。因为开发一个由几种不同的化合物组

成的复合药物，其临床试验要求必须对每个药物先分别作临床试验，再作综合临床试验，无论时间和费用都耗费巨大，不可行，而一个多靶性的药物的开发只需一次临床试验。

另一方面，趋化因子受体的有效抑制依赖于药品有效浓度的维持，因为趋化因子受体是依赖 G 蛋白受体，其特点是在受到抑制后可通过再循环及生物合成再生，需要重新抑制（文献 8），只有维持抑制剂在体内的有效浓度才可做到对受体彻底的抑制，从而有效地阻止 HIV-1 病毒的感染和肿瘤的转移，所以体内的长药效也是此类药物的另一重要因素。

### 三、发明内容

本发明的主要目的在于鉴于目前所研制的抑制趋化因子受体的化合物要么太专一不广谱、要么在体内太不稳定的问题，而已发现的几个来源于病毒的多靶性蛋白抑制剂由于是一个结构固定的分子，既无法选择抑制的范围，又可引起过敏反应（因为它是病毒蛋白），不适合临床反复使用的现状，而提供一种长效广谱的趋化因子受体抑制物，其在体内长效、广谱、高效，没有副作用（同时具有特异性和多样性），是一种可以长期反复使用的新药。

本发明的目的是由以下技术方案实现的。

本发明长效广谱的趋化因子受体抑制物，其特征在於，能够拮抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质，其包含有如下的蛋白质片段：

a、人体免疫球蛋白恒定区；

b、两种不同的对细胞趋化因子受体有拮抗作用的蛋白质片段；

e、其中每个受体拮抗剂通过其分子的 C-末端与人体免疫球蛋白恒定区的 N-末端相连，形成融合蛋白单体；

d、这些含有不同受体的拮抗剂的融合蛋白单体彼此之间再以共价相连，可以双倍体，四倍体，或多聚体的形式产出。

前述的述的长效广谱的趋化因子受体抑制物，其特征在於，所述的融合蛋白单体的人体免疫球蛋白恒定区部分是指人体免疫球蛋白的重链的恒定区和/或轻链的恒定区片段；所述融合蛋白单体的受体拮抗剂部分包括下述任意两个针对不同受体的蛋白质：

a. XR4 拮抗剂 1，即 SDF-1P2G（见附件 1，蛋白质序列 1.1；1.2；以及基因编码 ND. 1）；

b. XR4 拮抗剂 2，即 SDF-1(2-67)（见附件 1，蛋白质序列 2.1；2.2，以及基因编码 ND. 2）；

- c. 氨基末端头两个氨基酸经化学修饰而产生的, 具有抑制受体 CXCR4 作用的 SDF-1 衍生物;
- d. R5 拮抗剂 1, 即 RANTES (9-68) (见蛋白质序列 3.1, 3.2, 4.1, 4.2 以及基因编码 ND. 4);
- e. R5 拮抗剂 2, 即 RANTES (8-68) (见蛋白质序列 4.1, 4.2 以及基因编码 ND. 3);
- f. XR3 拮抗剂 1, 即 ITAC (4-73) (见蛋白质序列 5.1, 5.2 以及基因编码 ND. 5);
- g. XR3 拮抗剂 2, 即 ITAC (3-73) (见蛋白质序列 6.1, 6.2 以及基因编码 ND. 6);
- h. 氨基末端头 3 个氨基酸经过化学修饰而得到的, 具有抑制受体 CXCR3 作用的 ITAC 衍生物;
- i. R7 拮抗剂 1, 即 MIP-3 $\beta$  (8-77) (见蛋白质序列 7.1, 7.2 以及基因编码 ND. 7);
- j. 氨基末端头两 7 氨基酸经过化学修饰而得到的, 具有抑制受体 CCR7 作用的 MIP-3 $\beta$  衍生物;
- k. R7 拮抗剂 2, 即 6CKine (8-79) (见蛋白质序列 8.1, 8.2 以及基因编码 ND. 8);
- l. 氨基末端头 7 个氨基酸经过化学修饰而得到的, 具有抑制受体 CCR7 作用的 6CKine (1-79) 片断的衍生物;
- m. XR1 拮抗剂 1, 即 IL-8 (6-72) (见蛋白质序列 9.1, 9.2 以及基因编码 ND. 9);
- n. R2 拮抗剂 1, 即 MCP-3 (9-76) (见蛋白质序列 10.1, 10.2 以及基因编码 ND. 11);
- o. R2 拮抗剂 2, 即 MCP-3 (8-76) (见蛋白质序列 11.1, 11.2 以及基因编码 ND. 10);
- p. 氨基末端头 9 氨基酸经过化学修饰而得到的, 具有抑制受体 CCR2 作用的 MCP-3 衍生物;
- q. R2 拮抗剂 3, 即 MCP-1 (9-76) (见蛋白质序列 12.1, 12.2 以及基因编码 ND. 13);
- r. R2 拮抗剂 4, 即 MCP-1 (8-76) (见蛋白质序列 13.1, 13.2 以及基因编码 ND. 12);



s. 氨基末端头 9 个氨基酸经过化学修饰而得到的, 具有抑制受体 CCR2 作用的 MCP-1 的衍生物;

t. XR2 拮抗剂 1, 即 GRO $\alpha$  (8-73) (见蛋白质序列 14.1, 14.2 以及基因编码 ND. 14);

u. 氨基末端头 7 个氨基酸经过化学修饰而得到的, 具有抑制受体 CXCR2 作用的 GRO $\alpha$ 的衍生物; 所述两种不同的融合蛋白单体彼此之间相连接的方式最好是通过二硫桥, 也可通过多肽链, 或多糖分子等共价键; 所述的相连的两种不同融合蛋白单体包括两种不同的含有重链的融合蛋白单体之间, 或含有重链和含有轻链的融合蛋白单体之间。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物, 其中人体免疫球蛋白的重链恒定区包含有绞链区以及 CH3 片段; 所述的人体免疫球蛋白的重链恒定区包含有绞链区和 CH1, CH2 及 CH3 片段; 人体免疫球蛋白的重链恒定区包含 IgGy1 和 IgGy4 的重链恒定区; 所述的轻链的恒定区片段包含人体免疫球蛋白轻链的 $\kappa$ 和 $\lambda$ 的恒定区。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途, 其中拮抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质可用于治疗自身免疫病和非特异性炎症疾病、治疗肿瘤相关疾病、治疗/预防器官移植导致的排斥以及移植物抗宿主病、治疗 HIV-1 病毒感染和艾滋病; 所述的拮抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质与其它方法或药物做联合治疗。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途, 其中治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重范围; 肌肉注射剂量应为该剂量的数倍。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方法, 其中能够拮抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质的方法, 包括: 利用基因重组技术构建包含有拮抗不同种趋化因子受体的嵌合蛋白质单体的载体; 利用上述不同的载体, 组建表达和分泌能够拮抗两种或多种趋化因子受体的嵌合蛋白质的细胞株或菌株; 培养上述细胞或菌株, 收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方法, 其中能够拮抗趋化因子受体 CCR5, CCR1, CCR2, CCR3, CXCR4 的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1, 其方法包括: 利用基因重组技术按照款 1 所指构建包含有核酸序列 ND. 1, ND. 2, ND. 3, ND. 4 或表达蛋白相当于序列 (1), (2), (3), (4) 的嵌合蛋白质单体的载体; 利用上述不同的载体, 组建表达和分泌能够拮抗趋化因子受体 CCR5, CCR1, CCR2, CCR3, CXCR4 的嵌合蛋白质的细胞株; 培养上述细胞,

收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其中嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 用于治疗/预防 HIV 病毒感染、艾滋病以及涉及到上述受体的自身免疫病；所述的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 用于与其它方法或药物做联合治疗；所述的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 及其核酸编码用于疫苗治疗方法。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其中的嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 用于治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重；肌肉注射剂量为上述剂量的数倍；使用剂型包括注射剂型和粘膜局部用药剂型；所述嵌合蛋白 XR4/R5/R1 核酸编码的基因治疗方法和剂量为 0.4-4 毫克/公斤体重。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方法，其中能够拮抗趋化因子受体 CCR1, CCR5, CXCR3 的嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 的方法包括：利用基因重组技术构建包含有核酸序列 ND. 3, ND. 4 ND. 5, ND. 6, 或它们相应的蛋白序列 (3), (4), (5), (6) 的嵌合蛋白质单体的载体；利用上述不同的载体，组建表达和分泌能够拮抗趋化因子受体 CCR5, CCR1, CXCR3 的嵌合蛋白质的细胞株；培养上述细胞，收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其中嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 用于治疗/预防器官移植导致的排斥，移植物抗宿主病以及涉及到上述受体的自身免疫病；所述嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 用于与其它方法或药物做联合治疗；嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 及其核酸编码的疫苗治疗方法。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其中嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 用于治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重范围，肌肉注射，剂量应为该剂量的数倍；所述嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 用于治疗/预防时的使用剂型，包括注射剂型；所述的各种嵌合蛋白质的核酸编码的基因治疗方法和剂量为 0.4-4 毫克/公斤体重。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方法，其中能够拮抗趋化因子受体 CCR7, CXCR4 的嵌合蛋白质 R7/XR4 的方法包括：利用基因重组技术构建包含有核酸序列 ND. 1, ND. 2, ND. 7, ND. 8, 或它们相应的蛋白序列 (1), (2), (7), (8) 的嵌合蛋白质单体的载体；. 利用上述不同的载体，组建表达和分泌能够拮抗趋化因子受体 CCR7, CXCR4 的嵌合蛋白质的细胞株；. 培养上述细胞，收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其中嵌合蛋白质 R7/XR4

用于治疗肿瘤及治疗和预防肿瘤转移，以及涉及到上述受体的自身免疫病；所述的嵌合蛋白质 R7/XR4 用于与其它方法或药物做联合治疗；所述的嵌合蛋白质 R7/XR4 及其核酸编码的疫苗治疗方法。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其中嵌合蛋白质 R7/XR4 用于治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重；肌肉注射剂量为该剂量的数倍；所述的嵌合蛋白质 R7/XR4 用于治疗/预防时的使用剂型包括注射剂型；所述的各种嵌合蛋白质的核酸编码的基因治疗方法和剂量为 0.4-4 毫克/公斤体重。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的生产方法，其中能够拮抗趋化因子受体 CCR2, CXCR1, CXCR2 的嵌合蛋白质 XR1/R2 的方法包括：利用基因重组技术构建包含有核酸序列 ND. 9, ND. 10, ND. 11, ND. 12, ND. 13, No. 14 或它们相应的蛋白序列 (9), (10), (11), (12) (13) (14) 的嵌合蛋白质单体的载体；利用上述不同的载体，组建表达和分泌能够拮抗趋化因子受体 CCR2, CXCR1/CXCR2 的嵌合蛋白质的细胞株或菌株；培养上述细胞或菌株，收集并纯化分泌出的嵌合蛋白质。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其中嵌合蛋白质 XR1/R2 用于治疗自身免疫性疾病和非特异炎症；所述的嵌合蛋白质 XR1/R2 用于与其它方法或药物做联合治疗；所述的嵌合蛋白质 R2/XR1 及其核酸编码的疫苗治疗方法。

前述的长效广谱的趋化因子受体抑制物的用途，其中嵌合蛋白质 XR1/R2 用于治疗/预防时的使用剂量为 3-300 毫克/公斤体重范围；肌肉注射剂量为该剂量的数倍；所述的嵌合蛋白质 XR1/R2 用于治疗/预防时的使用剂型，包括肠道吸收剂型、注射剂型；所述的各种嵌合蛋白质的核酸编码的基因治疗方法和剂量为 0.4-4 毫克/公斤体重。

#### 四、附图说明

图 1A 至图 1E 是本发明嵌合蛋白质化合物的组成方式示意图。

图 2 是本发明分泌与抗人源免疫球蛋白抗体结合滴定曲线示图。

图 3A 是本发明与受体结合的趋化因子数量百分比示图。

图 3B 是本发明与受体结合的趋化因子百分比示图。

图 4 是本发明诱导细胞移动数量的百分比示图。

图 5 是本发明与受体结合的趋化因子数量百分比示图。

图 6A 是本发明趋化因子诱导移动的细胞数量的百分比示图。

图 6B 是本发明诱导肿瘤细胞移动的百分比示图。

图 7 是本发明与受体结合的趋化因子数量百分比示图。

图 8 是本发明趋化因子诱导移动的细胞数量的百分比示图。

图 9 是本发明与受体结合的趋化因子数量百分比示图。

图 10 是本发明趋化因子诱导移动的细胞数量的百分比示图。

## 五、具体实施方式

本发明设计并制备的是一些含有针对多种不同的趋化因子受体高效拮抗物的嵌合蛋白质化合物。这些含有针对不同的趋化因子受体拮抗物的融合蛋白质单体彼此之间共价相连，可以双倍体，四倍体，或多聚体的形式产出。图 1A—E 说明了这些嵌合蛋白质化合物的组成方式。

具体地说，上述趋化因子受体拮抗物部分包括（但不限于）氨基末端修饰的 ITAC，氨基末端修饰的 SDF-1，氨基末端修饰的 RANTES，氨基末端修饰的 MCP-1，氨基末端修饰的 MCP-3，氨基末端修饰的 MIP-3 $\beta$ ，氨基末端修饰的 GRO，和 6Ckine 的一个片段，等突变的无趋化因子功能的多肽化合物，以及它们的衍生物或片段。有关的序列见附件 1。比方，嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 的拮抗物部分包括蛋白序列 1（或序列 2）和序列 3（或 4）；嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 拮抗物部分包含蛋白序列 3（或 4）与蛋白序列 5（或 6）；嵌合蛋白质 R7/XR4 拮抗物部分包含有蛋白序列 1（或 2）和序列 7（或 8）；嵌合蛋白质 XR1/R2 包括蛋白序列 9（或序列 14）和序列 10（或 11 或 12 或 13）

上述与受体拮抗物相融合部分是人源免疫球蛋白的重链及轻链的恒定区域。根据需要，融合可是不同的受体拮抗物与重链恒定区，主要是 IgG1, IgG4, IgG2 的恒定区（其序列见附件 1），或轻链恒定区中的任何一个。此外，还可利用其它的免疫球蛋白的恒定区序列（见世界基因库和 EMBL 数据库）。由于与 IgG1 嵌合的化合物可以结合补体，引起 ADCC 反应，因而可以杀伤与其结合的靶细胞。相反，与 IgG4 嵌合的化合物不结合补体，不会引起 ADCC 反应。融合是在基因水平上进行的，含有针对不同受体拮抗物的融合蛋白单体之间以共价相连。连接方式包括二硫桥，多肽，有机化合物等结构。这里可以是两个重链之间相连，也可是重链与轻链之间相连。产物可以是双倍体，四倍体，或多聚体的形式。

本发明的功能特征是嵌合蛋白全部采用人源的蛋白质的片段，不会在体内引起明显的过敏反应。每种嵌合蛋白质都对两种或以上不同的趋化因子受体都有显著的抑制作用。这里的受体包括（但不限于）趋化因子受体 CCR1, CCR2,

CCR3, CCR5, CCR7, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4。显著的抑制作用指的是这些嵌合蛋白质本身不具有活性,但可与各自相应的受体紧密结合(具有高亲和力),通过占有受体而抑制趋化因子的活性。此处趋化因子的活性指的是它们可诱导人体的血液白细胞,主要包括 T-淋巴细胞, B-淋巴细胞,单核细胞,嗜酸性粒细胞,中性粒细胞等,或某些肿瘤细胞,比如乳腺癌细胞的移动。另外,趋化因子的刺激还具有使细胞内钙离子浓度增加,和/或一些胞内酶的释放等功能。不同的趋化因子通过与特定的受体结合和刺激来诱导携带受体的靶细胞产生移动,比如 IP-10 通过 T-淋巴细胞表面的 CXCR3 受体来诱导 T-细胞的移动。例如,嵌合蛋白 XR4/R5/R1 抑制 CCR5, CCR1, CCR3, CCR2 和 CXCR4 受体;嵌合蛋白 XR3/R5/R1 抑制 CXCR3, CCR1 和 CCR5 受体;嵌合蛋白 XR4/R7 抑制 CCR7 和 CXCR4 受体,嵌合蛋白 XR1/R2 抑制 CCR2 和 CXCR1, CXCR2 受体。如果用纯化好的嵌合蛋白质与同等克分子量的受体拮抗物来比较与受体的结合能力,则嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 比未嵌合的拮抗物的结合能力都高约 1.5-3 倍。

上述嵌合蛋白质的另一特征是在动物体内的半寿期都比受体拮抗物本身明显提高,提高的倍数可达百倍以上。本文中例证 12 显示嵌合蛋白 XR4/R5/R1 经静脉注射,在兔子血浆中的半寿期约为 45 小时,比未嵌合的受体拮抗物在体内半寿期(0.25 小时)长近 180 倍。已知人的 IgG1 抗体在兔子血浆中的半寿期约为 100 小时,但在人体内的半寿期长达 21 天(由于人体血液循环比兔慢得多)。因而,本发明的嵌合蛋白在人体内的半寿期应当接近人抗体 IgG1 的半寿期(人抗体 IgG1 在人体内的半寿期为 21 天)。

本发明长效广谱的趋化因子受体抑制物的制备方法是,上述多靶性趋化因子抑制剂嵌合蛋白质可利用基因重组方法构建。由于上述受体拮抗物都是基因突变的无功能的趋化因子衍生物,可根据已发表的论文由人体的核酸库利用 RT-PCR 方法先克隆各种趋化因子的基因片段,再利用克隆技术和基因突变技术将这些趋化因子的基因序列加以改造。

关于其中与上述受体拮抗物相融合的人源免疫球蛋白的重链及轻链的恒定区域部分,其基因序列可根据已发表的学术论文从人体的核酸库中通过 RT-PCR 方法获得。将此重链或轻链的基因片段 5' 端与上述受体拮抗物基因片段 3' 端分连接形成融合蛋白质。

此外,本发明提供了为表达上述嵌合蛋白质所必要的表达载体。表达载体可利用质粒载体,如实施例 1 所示,也可是病毒载体,或其它通用的载体。载体中带有启动子(如 CMV 启动子),和增强子(如 EU 增强子)等等重要基因调

控片段。当然也可装入作为基因治疗用的载体，为了筛选方便，载体还可装进针对不同抗菌素的阻抗基因，如此处利用的抗 Neomycin 和抗 Puromycin 的基因。

本发明还提供了为表达上述嵌合蛋白基因所必需的宿主。上述构建好的两个或三个含有不同融合蛋白基因的表达载体通过电击或其它方法同时被导入同一个合适的宿主中进行表达。这里的宿主最好是用真核细胞，比方此处选择使用的 CHO 细胞。它的长处是 1. 利用 CHO 表达生产蛋白制剂是目前世界上最成熟和受欢迎的办法。大工业化生产工艺已成熟；2. CHO 细胞可在无血清培养液中生长传代。这使得整个生产过程无需使用任何动物制剂，从而避免了病毒污染；3. 用 CHO 细胞生产蛋白质工艺已得到美国 FDA 认可。若干种用此方法生产出的蛋白制剂已完全达到临床合格标准。此外，常用的还有 HEK293 细胞，COS 细胞，NS/O 或 HELA 细胞，还可是昆虫细胞，如 Rf9 细胞，或者是酵母细胞等等；原核细胞如大肠杆菌 E.Coli 等也可作为宿主表达这些基因。所不同的是后者生产出的嵌合蛋白质不能被糖化。稳定表达的细胞株通过筛选载体的抗菌素阻抗基因而得到。

本发明还提供了如何提高产品产量的办法。比如此处使用的利用提高 MTX 的办法筛选出高表达细胞株，以供生产使用。另外，可将 GK 酶基因接到嵌合蛋白基因的另一载体中，通过提高酶底物将产量提高。

本发明提供了如何将上述多靶性趋化因子受体抑制剂嵌合蛋白以分泌蛋白形式生产表达的方法，既在蛋白基因的氨基末端加上先导序列，使表达的产物分泌到培养细胞的上清液中。先导序列在蛋白质分泌过程中被截掉。附件 1 给出了一些先导序列的例子。此法好处是下游蛋白质产物纯化相对容易。除此之外，也可以内源性蛋白形式表达。

本发明列举的实施例显示生产分泌出的嵌合蛋白产量可达 15 毫克/升上清/10<sup>9</sup> 细胞每天。通过筛选细胞克隆还可进一步提高产量。本发明进一步提供了如何将生产分泌的产物蛋白质分离纯化的方法。此处采用的是亲和层析的分离法。亲和层析可使用蛋白质 A，将其偶连到载体支撑物上，它与嵌合蛋白的免疫球蛋白片段特异结合；或者使用抗嵌合蛋白受体拮抗物部分的抗体，都可达到理想的分离纯化结果。

对本发明长效广谱的趋化因子受体抑制物的改变和修饰，如下的各种对专利物的改变和修饰应当包括在本发明之内。

基本上说，如果对上述专利物的改变和修饰是为了达到增强治疗或预防效

应；或是为了提高产品在体外的稳定性（对体内蛋白酶的抵御能力）；或对专利蛋白质在翻录合成后所做的修饰，如改变糖化或磷酸化成分，由这些变化衍生出的产物只要保留有本专利物的主要特征，既应当包括在本发明之内。

这种修饰包括对专利物的氨基酸或它们的核酸序列通过取代，增加或截短来加以改变，但改变的产物仍旧保留专利物的主要特征。比如亮氨酸可被异亮氨酸或缬氨酸取代，酸性氨基酸之间（或碱性氨基酸之间，中性氨基酸之间，极性氨基酸之间或非极性氨基酸之间，芳香性氨基酸之间）等等可相互取代。一般认为，只要改变后的产物与本发明的各种蛋白的序列，尤其是趋化因子受体拮抗剂片段的氨基末端的头 40 个氨基酸，有 70%以上相同，就应属于本发明范围之内。

另外，专利物蛋白质或它们的核酸序列亦可在其侧链化学基团上加上其它化合物而保留专利物的主要特征，如盐基，从而增加其可溶性；或同位素，如钴 60，碘 125，硫 35 等等，或荧光物，以达到杀伤靶细胞的作用（生物导弹）或体内对靶细胞（如肿瘤细胞）的跟踪作用，从而增强疗效或应用于体内诊断。另外，专利物蛋白质或它们的核酸序列亦可与其它功能的蛋白质或它们的核酸序列嵌合杂交，如毒素片段，以达到杀伤靶细胞的作用。这些都是普遍运用的保留专利物主要特征的方法。

最后，根据需要，融合可以是不同的受体拮抗物分别与下面任意一个：人体免疫球蛋白重链恒定区，主要是（但不限于）IgG1, IgG4, IgG2 的恒定区，或轻链的恒定区中。比方 CCR2 受体拮抗物可与 IgG1 恒定区嵌合，或与 IgG4 恒定区嵌合，或与轻链的恒定区融合。这里重链恒定区所指的是包含有绞链区（hinge region）可以加上 CH1, CH2 及 CH3 片段，或绞链区加 CH1 及 CH2 的片段，或绞链区加 CH2 及 CH3 的片段。轻链的恒定区片段所指的包含人体免疫球蛋白轻链的 $\kappa$ 或 $\lambda$ 的恒定区。

本发明长效广谱的趋化因子受体抑制物的测试方法。

本发明的多靶性趋化因子受体抑制嵌合蛋白可通过如下的实验方法加以鉴定：测定其与两种或多种不同的趋化因子受体结合能力选出带有待测受体的靶细胞（例如人的单核细胞株带有 CCR1 受体，可作为 CCR1 的靶细胞；还带有 CCR2 受体，因而也可作为 CCR2 的靶细胞）。将所要测定受体的配体趋化因子（比方针对 CCR1 受体的配体趋化因子是 MIP-1 $\alpha$ ，CCR2 的受体的配体趋化因子是 MCP-1，详情见表 1）用同位素（比如碘<sup>125</sup>）加以标记。另一方面将固定量的标记配体趋化因子与不同量的待测嵌合蛋白一起与受体靶细胞保温。如果嵌合蛋白与这个

受体结合，则同位素标记的配体趋化因子受到嵌合蛋白的竞争，与受体结合量必定减少。所以通过测定与不同靶细胞结合的量来鉴定待测嵌合蛋白是否与它们的配体趋化因子竞争结合受体，以及竞争的能力（亲合力）。

测定嵌合蛋白对两种或多种不同的趋化因子受体的抑制作用可用下述任意一种办法：配体趋化因子可以诱导其受体靶细胞朝着趋化因子方向移动。通过测定对细胞移动的作用可检测嵌合蛋白的功能。方法是取一个透膜测试板，将趋化因子和待测嵌合蛋白加在测试板下面的孔里，上面孔里则只加受体靶细胞。保温一定时间后，受趋化因子诱导受体靶细胞移动穿过两孔之间的膜进入下面孔里。如果待测嵌合蛋白抑制受体的功能，则配体趋化因子诱导作用减低，导致移动的靶细胞数量减少。

另外，配体趋化因子还可以诱导其受体靶细胞内钙离子浓度提高。方法是先将受体靶细胞与特定荧光试剂一起保温，使其进入细胞。配体趋化因子的刺激可引起受体的激活，从而导致胞内钙离子浓度提高，表现为荧光吸收度的瞬间升高。受体抑制剂本身由于不能激活受体，所以没有上述效应，但可以抑制配体趋化因子的这种作用。

测定体内半寿期。测定待测嵌合蛋白注射到动物体内（或其它方法给药）后，在血液中的量减到注射量的一半所需要的时间。详情见实施例 12。

本发明长效广谱的趋化因子受体抑制物的应用：

本发明包括了这些嵌合蛋白质或它们的基因片段（DNA，RNA）的应用。

a). 作为药物应用于临床治疗，已发表的大量研究成果证明趋化因子的蛋白质及其受体对许多疾病的病理过程都起到重要的作用。研究还发现，不少疾病都涉及到多种不同的趋化因子受体。比方爱滋病毒感染，异体器官移植排斥反应，某些肿瘤细胞的转移，各种自身免疫疾病，非特异性炎症疾病（见上）。还有其它许多疾病在此不一一列举。这里发明的嵌合蛋白，由于能够高效地抑制多种不同的趋化因子受体，克服了疾病病理的多样性复杂性。同时，由于嵌合蛋白在体内的半寿期很长，能够维持药品有效浓度，所以从根本上克服了趋化因子受体不断再生而造成的抑制不彻底的困扰。以上两个优点显然大大地提高了嵌合蛋白的临床应用价值，适用于这类疾病的治疗和预防。具体举例（但不限于）如下：艾滋病的 HIV-1 病毒主要利用 CCR5 和 CXCR4 趋化因子受体感染人类，此外，许多 HIV-1 病毒还可利用 CCR1，CCR2、CCR3 等受体感染。因而本发明的嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 因其可高效抑制上述所有受体（实施例 4、实施例 5），因而可抑制各种不同类型的 HIV-1 病毒感染。此外，嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 在体内稳



定长寿的性能保证体内的有效浓度的长久维持(实施例 10), 真正有效地阻止 HIV-1 病毒的感染。正是嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 的这些特点, 使它必定成为目前世界上最有效的预防 HIV-1 病毒感染的药物之一。可用于艾滋病的治疗和预防, 尤其应该适用于预防艾滋病对胎儿的感染, 或是与 HIV 病毒携带者性交后防止感染的急速补救。

又如, 乳腺癌细胞表面几乎全都带有 CXCR4 和 CCR7 两种受体, 从而决定了这些癌细胞转移到骨髓, 淋巴结和肺部, 并在那里得以固定下来, 迅速增长。本发明的嵌合蛋白 XR4/R7 可长效地抑制上述两种受体(实施例 6、实施例 7), 故可有效地抑制乳腺癌细胞向这些器官的转移。此应用还适用于其它一些肿瘤细胞的转移(实施例 6)。

又如, 异体组织器官移植的排斥现象, 象具有代表性的心脏移植的排斥, 动物试验显示是由于带有 CXCR3, CCR5, CCR1 受体的白细胞在起作用。本发明的嵌合蛋白 XR3/R5/R1 (实施例 8 和实施例 9) 可高效, 长效地抑制上述三种受体(实施例 10), 故可用于防止组织器官的被排斥, 以及移植物抗宿主病。

又如自身免疫性疾病, 还有非特异性炎症, 研究发现造成病理损害的主要因素是单核细胞和中性粒细胞(分别通过 CCR2, CXCR1 和 CXCR2 受体)。本发明的嵌合蛋白 XR2/R2 可高效抑制上述三种受体(例证 10 和 11), 而且体内药效长, 故可有效地抑制这两种细胞, 减轻症状。

#### b). 作为药物组成部分

本发明包括上述专利物被制备成不同的剂型用于治疗。单独或与其它成分一起, 作为药品的剂型可以是注射药品, 口服药品或局部用药(包括直肠给药, 或喷雾给药的剂型如鼻部喷雾或口吸喷雾等)的各种剂型。例证 12 是作为溶液静脉给药的例子。

本发明还包括上述专利物用于治疗的有效剂量。比如嵌合蛋白静脉给药, 根据疾病的情况, 剂量在 3-300 毫克/公斤体重范围; 如肌肉注射, 剂量应为上述的数倍; 如是作基因治疗, 质粒载体的剂量在 0.4-4 毫克/公斤体重; 等等。

#### c). 应用于基因治疗

本发明中的核酸序列可以用做基因治疗。这些序列可被装在不同的用于基因治疗的载体中, 比如已知的 naked DNA 载体或病毒载体(比如腺病毒载体或逆转录病毒载体)。基因被导入体内, 通过在体内自行表达而达到治疗效果。治疗的疾病包括(但不限于)艾滋病, 肿瘤和异体组织器官排斥, 各种自身免疫性疾病。

d). 应用于与其它方法或药物一起的联合治疗

这里发明的嵌合蛋白还可用于与其它方法或药物一起的联合治疗。比方(但不限于)嵌合蛋白 XR4/R7 可与化疗和放射治疗一起使用,达到不仅抑制肿瘤转移,还杀死肿瘤细胞的效果;嵌合蛋白 XR4/R5/R1 可与鸡尾酒疗法联合使用,通过多种不同的作用渠道抑制 HIV-1 病毒的增长率,以达到更好的治疗效果;嵌合蛋白 XR3/R5/R1 可与少量类固醇激素合用,对移植异体组织器官的排斥起到更好的治疗效果;嵌合蛋白 XR1/R2 可与少量类固醇激素或其它免疫抑制剂合用,共同对付顽固且严重的自身免疫性疾病等。

e). 应用于体内诊断

这里发明的嵌合蛋白还可用于诊断。比方(但不限于)将嵌合蛋白经同位素标记后用于乳腺癌细胞在病人体内转移的追踪。

为了便于对本项发明的了解,以下列举出一些有关本发明的具体实施例。

实施例 1 嵌合蛋白 XR4/R5/R1 的基因重组

趋化因子 SDF-1 和 RANTES 的 cDNA (包括先导序列)通过 RT-PCR 方法从人组织的 RNA 中获得。将 cDNA 克隆到 PCR2.1 载体中。利用基因突变法将趋化因子的基因改造,组成另外的核酸序列。另一方面,将人源免疫球蛋白 IgG4 的重链恒定区的 cDNA 利用已经发表的序列从人脾脏的 cDNA 库中获得,并将这一片段接到表达的载体中(这里用的是改造的 pCR3.1 载体 pHC,利用 CMV 为启动子,EU 为增强子,neomycin 不敏感基因为筛选标志)。将上述基因工程改造的 RANTES 序列片段和改造的 SDF-1 的序列片段的 3'端通过限制性酶切点分别与 IgG4 的重链恒定区(IgG<sub>4</sub>)的 CH1 段的 5'端连接。另一方面,将利用已经发表的序列从人脾脏的 cDNA 库中获得的人源免疫球蛋白轻链 $\kappa$ 恒定区的 cDNA 片段接到表达载体中(这里用的是改造的 pCR3.1 载体 pLC, Puromycin 不敏感基因为筛选标志)。

融合的方向是拮抗物的基因片段的 3'末端与免疫球蛋白恒定区的 5'末端连接(相应地,其表达的蛋白质产物必须是通过受体拮抗物分子的羧基末端与免疫球蛋白的重链及轻链的恒定区域的氨基末端肽键连接)(图 3B)。

实施例 2 嵌合蛋白 XR4/R7 的基因重组

趋化因子 MIP-3 $\beta$ 的基因通过 PCR 方法从人组织的 cDNA 库中获得,并克隆到 PCR2.1 载体中。利用基因突变法将其改造成新的核酸序列。另一方面,将人源免疫球蛋白 IgG1 的重链恒定区的 cDNA (利用已经发表的序列从人脾脏的 cDNA 库中获得)片段接到表达的载体中(这里用的是载体 pHC,利用 CMV 为启动子,EU 为增强子,neomycin 不敏感基因为筛选标志)。将基因工程改造的 MIP-3 $\beta$ 的

序列片段和 SDF-1 的序列片段 3'端分别与 IgG $\gamma$ 1 的 5'端通过酶切点连接。另外，制作人源免疫球蛋白轻链 $\kappa$ 恒定区片段表达载体，同实施例 1。

### 实施例 3 嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 基因在真核细胞 CHO 里的表达

将带有上述 CCR5 拮抗物- IgG $\gamma$ 4 序列和带有 CXCR4 拮抗物- IgG $\gamma$ 4 序列，以及轻链恒定区 $\kappa$ 的三种不同的基因表达载体的 DNA，线性化后同时导入 CHO 细胞中加以表达。经过用 G418 (1 毫克/毫升)，和 Purimycin (3 微克/毫升) 3 周的筛选，得到稳定表达细胞株。为了获得高产细胞株，利用提高 MTX 的办法筛选出高表达细胞株。将筛选的细胞株培养一天后收集细胞的培养上清。

通过 ELISA 方法鉴定转基因的细胞是否合成并分泌嵌合蛋白。具体说来，将收集的培养上清液与制备好的鼠抗人 IgG 抗体作结合试验。图 2 显示克隆的基因已插入 CHO 细胞基因并成功表达，合成的嵌合蛋白已分泌到培养液中，因而可以与抗人体 IgG 抗体呈剂量依赖的结合竞争。

通过对不同趋化因子受体的结合试验（见实施例 4）证明，其中大约 20% 的克隆分泌嵌合蛋白分别与 CXCR4 和 CCR5 等多种受体结合，说明这些嵌合蛋白含有两种不同单体。扩大并冷冻保存几个克隆。

分泌上清经分离纯化测定，产量为每  $10^6$  细胞每天分泌 15-25 微克/毫升嵌合蛋白质。其主要分子约 75kDa 大小，加上表达细胞对 Puromycin 和 Neomycin 都不敏感，说明嵌合蛋白是由重链和轻链嵌合蛋白组成的四倍体。

上述实验结果显示，无论是两个重链嵌合蛋白之间形成的双倍体，还是由重链和轻链嵌合蛋白组成的四倍体，既如图 1A 所描述的结构，都可成功表达。

为了鉴定嵌合蛋白 XR4/R5 是否有受体抑制剂的功能，共做了如下两个实验：

实施例 4 对生产表达的嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 特征的鉴定-对不同趋化因子受体的结合。

首先测定上述基因工程制作和分泌的嵌合蛋白 R5/XR4 是否能与 CCR5, CCR1, CCR2, CCR3, 和 CXCR4 受体高亲和力地结合。为此做了受体结合竞争实验。人的单核细胞表面带有 CCR1, CCR2, CCR5 受体，人的嗜酸性粒细胞表面带有 CCR3 受体，人的 T-淋巴细胞株带有 CXCR4 受体。这三个细胞株作为这些受体的靶细胞。将含有嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 的培养上清液与固定剂量的同位素  $I^{125}$  标记的配体趋化因子混合，并与这些受体竞争结合：其中，MIP-1 $\alpha$  是 CCR1 的配体趋化因子，MCP-1 是 CCR2 的配体，Eotaxin 是 CCR3 的配体，RANTES 是 CCR5 的配体，SDF-1 $\alpha$  则是 CXCR4 受体的配体。图 3 显示嵌合蛋白 XR4/ R5/R1 与上述受体表现

很强的结合的能力（50%细胞上清可抑制绝大部分趋化因子的结合）。利用蛋白质 A 做亲和层析，将上清中的分泌蛋白分离纯化。之后，以相同克分子浓度比较，嵌合蛋白 XR4/R4 比未融合的拮抗剂的亲合力为高。

实施例 5 对生产表达的嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 特征的鉴定-对不同趋化因子受体功能的抑制。

利用细胞移动抑制试验来检测基因工程制作的嵌合蛋白 XR4/ R5/R1 对受体的抑制作用。配体趋化因子可诱导带有它们受体的靶细胞定向移动。将人的单核细胞，人的嗜酸性粒细胞和 T-淋巴细胞株这三个细胞株作为这些受体的靶细胞。如图 4 所示，各种配体趋化因子分别诱导各自的靶细胞移动（定为移动的 100%）。含有不同浓度的嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 培养上清液的加入呈剂量依赖状地抑制细胞的移动：通过抑制 CCR1， CCR2 和 CCR5 受体而抑制由 MIP-1 $\alpha$ ， MCP-1 和 RANTES 诱导的 THP-1 细胞的移动；通过抑制 CCR3 受体抑制 Eotaxin 诱导的嗜酸性粒细胞的移动；通过对 CXCR4 受体的抑制而抑制 SDF-1 $\alpha$ 诱导的 CEM-M3 细胞的移动。抑制程度与嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 对受体的结合能力相吻合。

实施例 6 对生产表达的嵌合蛋白 XR4/R7 特征的鉴定-对不同趋化因子受体的结合。测定基因工程制作和分泌的嵌合蛋白 XR4/R7 是否能与 CCR7， CXCR4 受体高亲合力结合。为此做了受体结合竞争实验。人的 T-淋巴细胞株（CXCR4 受体）和人的带有 CCR7 受体的 T 细胞株作为受体的靶细胞。将含有嵌合蛋白 XR4/R7 的培养上清液分别与同位素 I<sup>125</sup> 标记的配体趋化因子 SDF-1 $\alpha$ 和 6CKine 或 MIP-3 $\beta$  混合，并与这些受体作竞争结合。图 5 显示嵌合蛋白 XR4/R7 与上述受体紧密结合的能力（50%细胞上清可抑制绝大部分趋化因子的结合）。若以相同克分子浓度比较，嵌合蛋白 XR4/R7 比未融合的拮抗剂的亲合力都明显高。

实施例 7 嵌合蛋白 XR4/R7 抑制乳腺癌细胞株的移动

利用两个人的乳腺癌细胞株 T-47D 和 MDA-7 作为靶细胞，测试了嵌合蛋白 XR4/R7 对乳腺癌细胞移动的抑制作用。如图 6 所示，CCR7 受体的配体趋化因子 6CKine 或 MIP-3 $\beta$ ，以及 CXCR4 的配体 SDF-1 都诱导这两个乳腺癌细胞株的移动（此处只示出 T-47D 的结果）。含有不同浓度的嵌合蛋白 XR4/R7 的培养上清液的加入呈剂量依赖状地抑制 SDF-1 $\alpha$ 和 6CKine（或 MIP-3 $\beta$ ）诱导的乳腺癌细胞的移动。抑制程度与嵌合蛋白 XR4/R7 对受体的结合能力相吻合。

实施例 8 对生产表达的嵌合蛋白 XR3/ R5/R1 特征的鉴定-对不同趋化因子受体的结合。测定基因工程制作和分泌的嵌合蛋白 XR3/ R5/R1 是否能与 CCR1， CCR5 和 CXCR3 受体高亲合力结合。用激活的人外周血的 T 细胞作为 CXCR3 和 CCR5 的

靶细胞, 单核细胞做为 CCR1 受体的靶细胞。将分离得到的 T 细胞与细胞因子白介素-2 一起保温, 使 T 细胞得到激活。激活的 T 细胞和单核细胞与嵌合蛋白 XR3/R5/R1 的培养上清液, 以及分别与同位素  $I^{125}$  标记的配体趋化因子 IP-10 或 RANTES, 或 MIP-1 $\alpha$  混合一起, 与这些受体作竞争结合。图 7 显示嵌合蛋白 XR3/R5/R1 与上述受体紧密结合的能力 (50% 细胞上清可抑制绝大部分趋化因子的结合)。

实施例 9 对生产表达的嵌合蛋白 XR3/R5/R1 特征的鉴定-通过对不同趋化因子受体的抑制来抑制靶细胞移动。

利用激活的人外周血的 T 细胞作为 CXCR3 和 CCR5 的靶细胞, 单核细胞做为 CCR1 受体的靶细胞。细胞的制备如例证 8。如图 8 所示, CCR1 受体的配体趋化因子 MIP-1 $\alpha$ , 以及 CXCR3 的配体 IP-10 和 CCR5 的配体 RANTES 都诱导上述靶细胞的移动。含有不同浓度的嵌合蛋白 XR3/R5/R1 的培养上清液的加入呈剂量依赖状地抑制 IP-10, MIP-1 $\alpha$  或 RANTES 诱导的靶细胞的移动。抑制程度与嵌合蛋白 XR3/R5/R1 对受体的结合能力相吻合。

实施例 10 对生产表达的嵌合蛋白 XR1/R2 特征的鉴定-对不同趋化因子受体的结合。

测定基因工程制作和分泌的嵌合蛋白 XR2/R2 是否能与 CCR2, CXCR1 和 CXCR2 受体高亲和力结合。用人外周血的中性粒细胞作为 CXCR1 和 CXCR2 的靶细胞, 单核细胞做为 CCR2 受体的靶细胞。将分离得到的中性粒细胞和单核细胞立即与嵌合蛋白 XR2/R2 的培养上清液, 以及分别与同位素  $I^{125}$  标记的配体趋化因子 IL-8 或 GRO- $\alpha$ , 或 MCP-1 混合一起, 与这些受体作竞争结合。图 9 显示嵌合蛋白 XR2/R2 与上述受体紧密结合的能力 (50% 细胞上清可抑制绝大部分趋化因子的结合)。

实施例 11 对生产表达的嵌合蛋白 XR1/R2 特征的鉴定-通过对不同趋化因子受体的抑制来抑制靶细胞移动。利用人体外周血的中性粒细胞作为 CXCR1 和 CXCR2 受体的靶细胞, 单核细胞做为 CCR2 受体的靶细胞测试了嵌合蛋白 XR1/R2 对 CCR2 和 CXCR1, CXCR2 受体介导的细胞移动的抑制作用。如图 10 所示, CCR2 受体的配体趋化因子 MCP-1, 以及 CXCR1 的配体 IL-8 和 CXCR2 的配体 GRO $\alpha$  都诱导上述靶细胞的移动。含有不同浓度的嵌合蛋白 XR1/R2 的培养上清液的加入呈剂量依赖状地抑制 IL-8, GRO $\alpha$  或 MCP-1 诱导的靶细胞的移动。抑制程度与嵌合蛋白 XR1/R2 对受体的结合能力相吻合。

实施例 12 嵌合蛋白 R5/XR4 在动物体内的药代动力实验

50 微克纯化并用  $I^{125}$  标记的嵌合蛋白 XR4/R5/R1 (二倍体), 嵌合蛋白 XR4/R5/R1 (四倍体) 或未融合的拮抗蛋白质由左耳静脉分别打入体重 2 公斤的兔

子体内。每隔 10 分钟从兔子的右耳静脉取 5-10 毫升血。通过测定同位素检测血液中人的免疫球蛋白重链的含量。由于未融合的拮抗蛋白质消失非常快，而嵌合蛋白在血中浓度稳定，从第而天开始，改为每隔 1-2 天抽从后者取一次样。如下面表 2 所示， $I^{125}$  标记的非融合拮抗蛋白在兔外周血中的半寿期仅有大约 15 分钟，而  $I^{125}$  标记的嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 (二倍体) 的半寿期大约为 45 小时， $I^{125}$  标记的嵌合蛋白 XR4 /R5/R1 (四倍体) 的半寿期大约为 110 小时，是未融合的拮抗蛋白质的大约 180-400 倍。

#### 本发明中涉及的定义

1. 趋化因子: 体内自然存在的一大家族蛋白质，它们特异地诱导各种白细胞定向移动。其中一些参与炎症反应，另一些负责白细胞在体内定位。每个趋化因子都有自己相应的受体。具体情况见表 1。
2. 趋化因子受体拮抗物 (简称受体拮抗物): 可与趋化因子受体结合，本身没有功能，却可抑制趋化因子功能的化合物。这里，受体拮抗物指的都是一些突变的无功能的趋化因子衍生物。
3. 人源免疫球蛋白: 共分为 IgG, IgA, IgM, IgD, IgE 5 大类。其中 IgG 又分为 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 亚类, (由重链和轻链组成), 它们的重链被相应地命名为 IgG $\gamma$ 1, IgG $\gamma$ 2, IgG $\gamma$ 3, IgG $\gamma$ 4, 轻链则有  $\kappa$  或  $\lambda$  两种。
4. 多靶性趋化因子抑制剂: 可以抑制至少两个不同的趋化因子受体的化合物。
5. 融合蛋白: 将两个不同蛋白质的基因片断相连接, 其表达产物是一条由两个不同蛋白质彼此之间以肽键相连接的单链蛋白质。
6. 嵌合蛋白质化合物 (简称嵌合蛋白): 两个不同的蛋白质的基因片段在同一宿主内表达, 生产出的是两个不同的蛋白质单体, 彼此之间再共价连接的产物。
7. 配体趋化因子: 与某种受体特异结合并产生生物效应的趋化因子被称为这种受体的配体趋化因子 (表 1)

表 1 与本文相关的配体趋化因子及相应的受体

趋化因子惯用名	趋化因子国际新命名	受体名称
MCP-1	CCL2	CCR2
MCP-3	CCL7	CCR2
MIP-1 $\alpha$	CCL3	CCR1
RANTES	CCL5	CCR5
IP-10	CXCL10	CXCR3

I-TAC	CXCL11	CXCR3
Eotaxin	CCL11	CCR3
MIP-3 $\beta$	CCL19	CCR7
6CKine	CCL21	CCR7
SDF-1	CXCL12	CXCR4
IL-8	CXCL8	CXCR1/CXCR2
GRO $\alpha$	CXCL1	CXCR2

表 2

嵌合蛋白质的某些特征

名称	单位的结构	在兔血浆中的半寿期(小时)	与补体结合	与蛋白质A结合
趋化因子蛋白质	非嵌合蛋白质	0.25	不结合	不结合
嵌合蛋白质 双倍体	重链 <sub>2</sub>	45	不结合	结合
嵌合蛋白质 四倍体	重链 <sub>2</sub> 轻链 <sub>2</sub>	110	结合	结合

本发明长效广谱的趋化因子受体抑制物的特征

化学结构特征

本发明设计并制备的是一些含有针对多种不同的趋化因子受体高效拮抗物的嵌合蛋白质化合物。这些含有针对不同的趋化因子受体拮抗物的融合蛋白质单体彼此之间共价相连，可以双倍体，四倍体，或多聚体的形式产出。图 1A—E 说明了这些嵌合蛋白质化合物的组成方式。

具体地说，上述趋化因子受体拮抗物部分包括（但不限于）氨基末端修饰的 ITAC，氨基末端修饰的 SDF-1，氨基末端修饰的 RANTES，氨基末端修饰的 MCP-1，氨基末端修饰的 MCP-3，氨基末端修饰的 MIP-3 $\beta$ ，氨基末端修饰的 GRO，和 6CKine 的一个片段，等突变的无趋化因子功能的多肽化合物，以及它们的衍生物或片段。有关的序列见附件 1。比方，嵌合蛋白质 XR4/R5/R1 的拮抗物部分包括蛋白序列 1（或序列 2）和序列 3（或 4）；嵌合蛋白质 XR3/R5/R1 拮抗物部分包含蛋白序列 3（或 4）与蛋白序列 5（或 6）；嵌合蛋白质 R7/XR4 拮抗物部分包含有蛋白序列 1（或 2）和序列 7（或 8）；嵌合蛋白质 XR1/R2 包括蛋白序列 9（或序列 14）和序列 10（或 11 或 12 或 13）

上述与受体拮抗物相融合的部分是人源免疫球蛋白的重链及轻链的恒定区域。根据需要，融合可以是不同的受体拮抗物与重链恒定区，主要是 IgG1, IgG4, IgG2 的恒定区（其序列见附件 1），或轻链的恒定区中的任何一个。此外，还可利用其它的免疫球蛋白的恒定区序列（见世界基因库和 EMBL 数据库）。由于与 IgG1 嵌合的化合物可以结合补体，引起 ADCC 反应，因而可以杀伤与其结合的靶细胞。相反，与 IgG4 嵌合的化合物则不结合补体，不会引起 ADCC 反应。融合是在基因水平上进行的。含有针对不同受体拮抗物的融合蛋白单体之间以共价相连。连接方式包括二硫桥，多肽，有机化合物等结构。这里可以是两个重链之间相连，也可是重链与轻链之间相连。产物可以是双倍体，四倍体，或多聚体的形式。

#### 功能特征

由于嵌合蛋白全部采用人源蛋白质片段，不会在体内引起明显的过敏反应。

每种嵌合蛋白质都对两种或以上不同的趋化因子受体都有显著的抑制作用。这里的受体包括(但不限于)趋化因子受体 CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4。显著的抑制作用指的是这些嵌合蛋白质本身不具有活性，但可与各自相应的受体紧密结合（具有高亲和力），通过占有受体而抑制趋化因子的活性。此处趋化因子的活性指的是它们可诱导人体的血液白细胞，主要包括 T-淋巴细胞，B-淋巴细胞，单核细胞，嗜酸性粒细胞，中性粒细胞等，或某些肿瘤细胞，比如乳腺癌细胞的移动。另外，趋化因子的刺激还具有使细胞内钙离子浓度增加，和/或一些胞内酶的释放等功能。不同的趋化因子通过与特定的受体结合和刺激来诱导携带受体的靶细胞产生移动，比如 IP-10 通过 T-淋巴细胞表面的 CXCR3 受体来诱导 T-细胞的移动。例如，嵌合蛋白 XR4/ R5/R1 抑制 CCR5, CCR1, CCR3, CCR2 和 CXCR4 受体；嵌合蛋白 XR3/R5/R1 抑制 CXCR3, CCR1 和 CCR5 受体；嵌合蛋白 XR4/R7 抑制 CCR7 和 CXCR4 受体，嵌合蛋白 XR1/R2 抑制 CCR2 和 CXCR1, CXCR2 受体。

如果用纯化好的嵌合蛋白质与同等克分子量的受体拮抗物来比较与受体的结合能力，则嵌合蛋白质 XR4 R5/R1 比未嵌合的拮抗物的结合能力都高约 1.5-3 倍。

上述嵌合蛋白质的另一特征是在动物体内的半寿期都比受体拮抗物本身明显提高，提高的倍数可达百倍以上。本文中例证 12 显示嵌合蛋白 XR4/ R5/R1 经静脉注射，在兔子血浆中的半寿期约为 45 小时，比未嵌合的受体拮抗物在体内半寿期（0.25 小时）长近 180 倍。已知人的 IgG1 抗体在兔子血浆中的半寿期



约为 100 小时,但在人体内的半寿期长达 21 天(由于人体血液循环比兔慢得多)。因而,本发明的嵌合蛋白在人体内的半寿期应当接近人抗体 IgG1 的半寿期(人抗体 IgG1 在人体内的半寿期为 21 天)。

本发明长效广谱的趋化因子受体抑制物的序列(附件 1,例证,不仅限于此)包括表达蛋白的核酸序列,表达蛋白的氨基酸序列及带有先导序列的氨基酸序列。

趋化因子受体拮抗物蛋白质序列:

(1) XR4 拮抗物 1 (SDF-1P2G)

1.1 带先导序列

MNAKVVVVLVLTALCLSDGKGVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLK  
NNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRFBM

1.2 分泌蛋白质序列

KGVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK  
RFBM

(2) XR4 拮抗物 2

2.1 带先导序列

MNAKVVVVLVLTALCLSDGKGVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKN  
NNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRFBM

2.2 分泌蛋白质序列 (SDF-1 (2-72))

PVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKR  
FBM

(3) R5 拮抗物 1 (RANTES (9-68))

3.1 带先导序列

MKVSAAALAVILIATALCAPASAPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGKCSNPVVFVTRKNRQVC  
ANPEKKWVREYINSLEMS

3.2 分泌蛋白质序列

PCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGKCSNPVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS

(4) R5 拮抗物 2 (RANTES (8-68))

4.1 带先导序列

MKVSAAALAVILIATALCAPASATPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGKCSNPVVFVTRKNRQVC  
CANPEKKWVREYINSLEMS

4.2 分泌蛋白质序列

TPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAVVVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS

(5) XR3 拮抗物 1 (ITAC (4-73))

5.1 带先导序列

MSVKGMAIALAVILCATVVQGFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKE  
NKGQRCLNPKSK QARLIKKVE RKNF

5.2 分泌蛋白质序列

FKRGRCLCIGPGVKAV

KVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKGQRCLNPKSKQARLIKKVERKNF

(6) XR3 拮抗物 2 (ITAC (3-73))

6.1 带先导序列

MSVKGMAIALAVILCATVVQGMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLK  
ENKGQRCLNPKSK QARLIKKVE RKNF

6.2 分泌蛋白质序列

MFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKGQRCLNPKSKQARLIKK  
VERKNF

(7). R7 拮抗物 1 (MIP-3 $\beta$ (8-77))

7.1 带先导序列

MALLLALSLLVLWTSPAPTLSCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCAPPD  
QPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSS

7.2 分泌蛋白质序列

CCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLIKDGCRVPAVVFTTLRGRQLCAPPDQPWVERIIQRLQRTSAKM  
KRRSS

(8) R7 拮抗物 (6CKine (8-79))

8.1 带先导序列

MAQSLALSLLILVLAFGIPRTQGCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELC  
ADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQG

8.2 分泌蛋白质序列

CCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPS  
PQKPAQG

(9) XR1 拮抗物 1 (IL-8 (6-72))

9.1 带先导序列

MTSKLAVALLAAFLISAALCEGAVLPR---

RCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS"

## 9.2 分泌蛋白质序列

RCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS"

(10) R2 拮抗物 1 (MCP-3 (9-76))

### 10.1 带先导序列

MKASAALLCLLLTAAAFSPQGLA---

TTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWWQDFMKHLDKKTQTPKL

### 10.2 分泌蛋白质序列

TTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWWQDFMKHLDKKTQTPKL

(11) R2 拮抗物 2 (MCP-3 (8-76))

### 11.1 带先导序列

MKASAALLCLLLTAAAFSPQGLA---

STTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWWQDFMKHLDKKTQTPKL

### 11.2 分泌蛋白质序列

STTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWWQDFMKHL

(12) R2 拮抗物 (MCP-1 (9-76))

### 12.1 带先导序列

MKVSAALLCLLLIAATFIPQGLA---

VTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWWQDSMDHLDKQTQTPKT

### 12.2 分泌蛋白质序列

VTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWWQDSMDHLDKQTQTPKT

(13) R2 拮抗物 4 (MCP-1 (8-76))

### 13.1 带先导序列

MKVSAALLCLLLIAATFIPQGLA---

PVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWWQDSMDHLDKQTQTPKT

### 13.2 分泌蛋白质序列

PVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWWQDSMDHLDKQTQTPKT

(14) XR2 拮抗物 1 (GRO $\alpha$  (8-73) )

## 14.1 带先导序列

MARAALSAAPSNPRLLRVALLLLLLVAAGRRAAG  
 ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNG  
 RKACLNPASPIVKKIIEKMLN . SDKSN

## 14.2 分泌蛋白质序列

ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNG  
 RKACLNPASPIVKKIIEKMLN SDKSN

嵌合的蛋白序列(例子, 但不局限于):

## 15. 人源 免疫球蛋白 IgG1 的 定区:

ASFKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT  
 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
 PENNYKT  
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## 16. 人源免疫球蛋白 IgG2 的定区:

ASFKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS  
 RTPEVTWVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFCVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK  
 VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
 YKTTTPM  
 LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## 17. 人源免疫球蛋白 IgG4 的定区:

ASFKGPSVFPLVPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSCALTSVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSSLGT  
 KTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
 SQEDPEVQF  
 NWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV  
 YT

LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTTPP  
 VLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS  
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK"

18. 人源免疫球蛋白轻链κ的定区:

TAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY  
 SLSSTLTL  
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

趋化因子受体拮抗物的核酸序列(例子,但不局限于):

(ND.1) XR4 拮抗物 1 (SDF-1P2G)

atgaacgcca aggtcgtggt cgtgctggtc ctctgtgctga ccgcgctctg cctcagcgac  
 gggaaGGcg tcagcctgag ctacagatgc ccatgccgat tcttcgaaag ccatgttgcc  
 agagccaacg tcaagcatct caaaattctc aacctccaa actgtgcctt tcagattgta  
 gcccggtga agaacaaca cagacaagtg tgcattgacc cgaagctaaa gtggattcag  
 gactacctgg agaaagcttt aaacaagagg ttcaagatgtga

(ND.2) XR4 拮抗物 2 (SDF-1(2-73))

atgaacgcca aggtcgtggt cgtgctggtc ctctgtgctga ccgcgctctg cctcagcgac  
 gggcccg tcagcctgag ctacagatgc ccatgccgat tcttcgaaag ccatgttgcc  
 agagccaacg tcaagcatct caaaattctc aacctccaa actgtgcctt tcagattgta  
 gcccggtga agaacaaca cagacaagtg tgcattgacc cgaagctaaa gtggattcag  
 gactacctgg agaaagcttt aaacaagagg ttcaagatgtga

(ND.3) R5 拮抗物 1 RANTES (8-68)

atgaaggtc tccgcggcag ccctcgtgt catcctcatt gctactgccc tctgcgctcc  
 tgcattctgcc acacctgc tgccttgccct acattgcccc cccactgccc cgtgcccaca  
 tcaaggagta tttctacacc agtggcaagt  
 gctccaaccc agcagtcgtc tttgtcacc gaaagaaccg ccaagtgtgt gccaacccag  
 agaagaaatg ggttcgggag tacatcaact ctttgagat gagctag

(ND.4) R5 拮抗物 2 (RANTES (9-68))

atgaaggtc tccgcggcag ccctcgtgt catcctcatt gctactgccc tctgcgccc ccc  
 tgcattctgcc tctgc tgccttgccct acattgcccc cccactgccc cgtgcccaca  
 tcaaggagta tttctacacc agtggcaagt gctccaaccc agcagtcgtc tttgtcacc  
 gaaagaaccg ccaagtgtgt gccaacccag agaagaaatg ggttcgggag tacatcaact  
 ctttgagat gagctag

## (ND. 5) XR3 拮抗物 1 (ITAC (4-73))

atgag tgtgaagggc atggctatag ccttggctgt gatattgtgt gctacagttg  
 ttcaaggc---ttc aaaagaggac  
 gctgtctttg cataggccct ggggtaaaag cagtgaaggt ggcagatatt gagaaagcct  
 ccataatgta cccaagtaac aactgtgaca aaatagaagt gattattacc ctgaaagaaa  
 ataaaggaca acgatgccta aatcccaa<sup>at</sup> cgaagcaagc  
 aaggcttata atcaaaaaag ttgaaagaaa gaatttttaa

## (ND. 6) XR3 拮抗物 2 (ITAC (3-73))

atgag tgtgaagggc atggctatag ccttggctgt gatattgtgt gctacagttg ttcaaggc  
 --- atgttc aaaagaggac  
 gctgtctttg cataggccct ggggtaaaag cagtgaaggt ggcagatatt gagaaagcct  
 ccataatgta cccaagtaac  
 aactgtgaca aaatagaagt gattattacc ctgaaagaaa ataaaggaca acgatgccta  
 aatcccaa<sup>at</sup> cgaagcaagc  
 aaggcttata atcaaaaaag ttgaaagaaa gaatttttaa

(ND. 7) R7 拮抗物 1 (MIP-3 $\beta$  (8-77))

at ggccctgcta ctggccctca gcctgctggt tctctggact tccccagccc caactctgag  
 t--tgctgcct gtctgtgacc cagaaacca tccctgggta catcgtgagg aacttccact  
 accttctcat caaggatggc tgcaggggic ctgctgtagt gttcaccaca ctgaggggccc  
 gccagctctg tgcaccccca gaccagccct gggtagaacg catcatccag agactgcaga  
 ggacctcagc caagatgaag cgccgcagca gttaa

## (ND. 8) R7 拮抗物 2 (6CKine (8-79))

atggctcagtca ctggctctga gcctccttat cctggttctg gcctttggca tccccaggac  
 ccaaggctg ttgcctcaag tacagccaaa ggaagattcc cgccaaggtt gtccgcagct  
 accggaagca ggaaccaagc ttaggctgct ccatcccagc tatcctgttc ttgccccgca  
 agcgctctca ggcagagcta tgtgcagacc caaaggagct ctgggtgcag cagctgatgc  
 agcatctgga caagacacca tccccacaga aaccagccca gggc

## (ND. 9) XR1 拮抗物 1 (IL-8 (6-72))

atgacttcca agctggccgt ggctctcttg gcagccttcc tgatttctgc agctctgtgt  
 gaaggtgcag ttttgccaag  
 g ---agat gtcagtgc<sup>at</sup> aaagacatac tccaaacctt tccaccccaa atttatcaaa  
 gaactgagag tgattgagag

tggaccacac tgcgccaaca cagaaattat tgtaaagctt tctgatggaa gagagctctg  
tctggacccc aaggaaaact

gggtgcagag ggttgtggag aagtttttga agagggctga gaattcataa

(ND.10) R2 拮抗物 1 (MCP-3(8-76))

atgaaagcct ctgcagcact tctgtgtctg ctgctcacag cagctgcttt cagccccag  
gggcttgcct ---tcaactacct gctgctacag atttatcaat aagaaaatcc ctaagcagag  
gctggagagc tacagaagga ccaccagtag ccaactgtccc

cgggaagctg taatcttcaa gaccaaactg gacaaggaga tctgtgctga cccacacag  
aagtgggtcc aggactttat

gaagcacctg gacaagaaaa cccaaactcc aaagctttga

(ND.11) R2 拮抗物 2 (MCP-3(9-76))

atgaaagcct ctgcagcact tctgtgtctg ctgctcacag cagctgcttt cagccccag  
gggcttgcct ---actacct gctgctacag atttatcaat aagaaaatcc ctaagcagag  
gctggagagc tacagaagga ccaccagtag ccaactgtccc

cgggaagctg taatcttcaa gaccaaactg gacaaggaga tctgtgctga cccacacag  
aagtgggtcc aggactttat

gaagcacctg gacaagaaaa cccaaactcc aaagctttga

(ND.12) R2 拮抗物 3 (Mcp-1(8-76))

atgaaag tctctgccgc ccttctgtgc ctgctgctca tagcagccac cttcattccc  
caagggtctg

ct ----ccagtca cctgctgtta taacttcacc aataggaaga tctcagtgca gaggctcgcg  
agctatagaa

gaatcaccag cagcaagtgt cccaaagaag ctgtgatctt caagaccatt gtggccaagg  
agatctgtgc

tgacccaag cagaagtggg ttcaggattc catggaccac ctggacaagc aaacccaac  
tccgaagact tgaa

(ND.13) R2 拮抗物 4 (Mcp-1(9-76))

atgaaag tctctgccgc ccttctgtgc ctgctgctca tagcagccac cttcattccc  
caagggtctg

ct ----gtca cctgctgtta taacttcacc aataggaaga tctcagtgca gaggctcgcg  
agctatagaa

gaatcaccag cagcaagtgt cccaaagaag ctgtgatctt caagaccatt gtggccaagg  
agatctgtgc

tgaccccaag cagaagtggg ttcaggattc catggaccac ctggacaagc aaacccaaac  
tccgaagact tgaa

(ND.14)XR2 拮抗物 1 GRO $\alpha$ (8-73)

a tggcccgcgc tgctctctcc gccgccccca gcaatccccg gctcctgcga gtggcactgc  
tgctcctgct

cctggtagcc gctggccggc gcgcagcagg a-cgctgcca gtgcttgacg accctgcagg  
gaattcacc

caagaacatc caaagtgtga acgtgaagtc ccccgacc cactgcgccc aaaccgaagt  
catagccaca

ctcaagaatg ggcggaaagc ttgcctcaat cctgcatccc ccatagttaa gaaaatcatc  
gaaaagatgc

tgaacagtga caaatccaac tga

嵌合的核酸序列(例子,但不局限于):

ND15. 人源免疫球蛋白 IgG1 的定区:

1 gcaagcttca agggcccac cgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg  
61 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg  
121 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca  
181 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc  
241 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc  
301 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga  
361 ccgtcagtct tcccttcccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatcic ccggaccctt  
421 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg  
481 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac  
541 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag  
601 gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc  
661 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag  
721 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc  
781 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg  
841 ctggactccg acggtcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg  
901 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg



961 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa

ND16. 人源 免疫球蛋白 IgG2 的 定区:

1 gcaagcttca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag  
 61 agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg  
 121 tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca  
 181 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc  
 241 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc  
 301 aaatgtttgtg tcgagtgtccc accgtgccc gaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc  
 361 ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgg  
 421 gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc  
 481 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttctgt  
 541 gtggtcagcg tcctaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc  
 601 aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaggg  
 661 cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac  
 721 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagge ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg  
 781 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac  
 841 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaaac  
 901 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc  
 961 tcctgtctc cgggtaaa

ND 17. 人源免疫球蛋白 IgG4 的定区:

1 gcaagcttca agggcccatc ggtcttcccc ctgggtgccct gctccaggag cacctccgag  
 61 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg  
 121 tggaactcat gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca  
 181 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc  
 241 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc  
 301 aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gacctgagt tcctgggggg accatcagtc  
 361 ttctgttcc cccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcagc  
 421 tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat  
 481 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgaggagg agcagttcaa cagcacgtac  
 541 cgtgtggtea gggctctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggtaa ggagtacaag  
 601 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacatctc caaagccaaa  
 661 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag

721 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag  
 781 tgggagagca atgggcagcc ggaggacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc  
 841 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg  
 901 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc  
 961 ctctccctgt ctccgggtaa actctccctgtctctgggtaa

ND 18. 人源 免疫球蛋白轻链κ的 定区:

1 actgcggccg caccatctgt cttcatcttc ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga  
 61 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg  
 121 aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc  
 181 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa  
 241 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc  
 301 ttcaacaggg gagagtgttga

有关主要发明的图表说明

图 1A—C 是本发明设计并制造的某些嵌合蛋白质的示意图。这里的拮抗物 1, 2, 3 可分别代表本发明所包括的任意四种不同的拮抗物。同样地, 这里的重链可以是人源免疫球蛋白包括 IgG1, IgG4, IgG2 的任意一种重链; 这里的轻链可以是κ或λ中的任何一种。这里的 CH1, CH2, CH3 是指重链的恒定区的三个片段; CL 代表的是轻链的恒定区; 这里嵌合蛋白单体之间的连接或二硫桥所代表的是包括二硫桥键在内的不同种共价连接物。详情见发明的详细说明。

图 2 用 ELISA 方法做抗人体 IgG 抗体的结合竞争试验。

结果显示克隆的嵌合蛋白 XR4/ R5/R1 基因已被插入 CHO 细胞基因并成功表达, 合成的嵌合蛋白已分泌到培养液中, 因而可以与抗人体 IgG 抗体呈剂量依赖的结合竞争。

图 3A 不同趋化因子与其受体的结合竞争试验。

人的单核细胞表面带有 CCR1, CCR2, CCR5 受体, 人的嗜酸性粒细胞表面带有 CCR3 受体, 人的 T-淋巴细胞带有 CXCR4 受体。这三个细胞株作为这些受体的靶细胞。将含有嵌合蛋白 XR4/R5/R1 的培养上清液与固定剂量的同位素  $I^{125}$  标记的配体趋化因子混合, 并与这些受体竞争结合: 其中, MIP-1 $\alpha$ 是 CCR1 的配体趋化因子, MCP-1 是 CCR2 的配体, Eotaxin 是 CCR3 的配体, RANTES 是 CCR5 的配体, SDF-1 $\alpha$ 则是 CXCR4 受体的配体。结果显示嵌合蛋白 XR4/ R5/R1 与上述受体表现很强的结合的能力 (50%细胞上清可抑制绝大部分趋化因子的结合)。

图 3B 不同融合的蛋白与受体的结合试验

将含有核酸序列 ND. 1 的 3'末端（相当于 SDF-1P2G 蛋白的羧基末端）与核酸序列 ND. 14 的 5'末端连接融合的蛋白质（C-N 融合，环形标志）和核酸序列 ND. 1 的 5'末端与核酸序列 ND. 14 的末端连接融合的蛋白质（三角形标志）的转基因细胞所分泌上清与固定量的碘 125 标记的趋化因子 SDF-1 做受体结合竞争试验。结果显示 C-N 融合蛋白具有受体结合能力。

图 4 细胞移动抑制试验。

将人的单核细胞，人的嗜酸性粒细胞和 T-淋巴细胞株这三个细胞株作为这些受体的靶细胞。如图所示，各种配体趋化因子分别诱导各自的靶细胞移动（定为移动的 100%）。含有不同浓度的嵌合蛋白 XR4/R5/R1 培养上清液的加入呈剂量依赖状地抑制细胞的移动：通过抑制 CCR1, CCR2 和 CCR5 受体而抑制由 MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 和 RANTES 诱导的 THP-1 细胞的移动；通过抑制 CCR3 受体抑制 Eotaxin 诱导的嗜酸性粒细胞的移动；通过对 CXCR4 受体的抑制而抑制 SDF-1 $\alpha$ 诱导的 CEM-M3 细胞的移动。

图 5 受体结合竞争实验。

人的带有 CXCR4 受体的 T-淋巴细胞株和人的带有 CCR7 受体的细胞株（）作为受体的靶细胞。将含有嵌合蛋白 XR4/R7 的培养上清液分别与同位素 I<sup>125</sup> 标记的配体趋化因子 SDF-1 $\alpha$ 和 6CKine 或 MIP-3 $\beta$ 混合，并与这些受体作竞争结合。如显示嵌合蛋白 XR4/R7 与上述受体紧密结合的能力（50%细胞上清可抑制绝大部分趋化因子的结合）。

图 6 嵌合蛋白 XR4/R7 抑制乳腺癌细胞株的移动

利用两个人的乳腺癌细胞株 T-47D 作为靶细胞，测试了嵌合蛋白 XR4/R7 对乳腺癌细胞移动的抑制作用。如图所示，CCR7 受体的配体趋化因子 6CKine 或 MIP-3 $\beta$ ，以及 CXCR4 的配体 SDF-1 都诱导这两个乳腺癌细胞株的移动。图 6A: 含有不同浓度的嵌合蛋白 XR4/R7 的培养上清液的加入呈剂量依赖状地抑制 SDF-1 $\alpha$ 和 6CKine（或 MIP-3 $\beta$ ）诱导的乳腺癌细胞的移动。图 6B: CXCR4 受体拮抗剂 SDF-1P2G 只能通过抑制 CXCR4 受体来抑制 SDF-1 诱导的 T47 乳腺癌细胞移动，却不能抑制 6CKine（通过 CCR7 受体）诱导的乳腺癌细胞移动。说明只有当乳腺癌细胞 T47D 的两个受体都受到抑制，才能阻止癌细胞的移动。

图 7 测定基因工程制作和分泌的嵌合蛋白 XR3/ R5/R1 是否能与 CCR5, CCR1, 和 CXCR3 受体高亲和力结合。

用人外周血的 T-淋巴细胞和单核细胞株作为受体的靶细胞。先将分离得到的 T-细胞用细胞因子白介素-2 激活。后将含有嵌合蛋白 XR3/R5/R1 的培养上清

液分别与同位素  $I^{125}$  标记的配体趋化因子 IP-10 或 RANTES, 或 MIP-1 $\alpha$  混合一起, 与这些受体作竞争结合。图示嵌合蛋白 XR3/R5/R1 与上述受体紧密结合的能力 (50% 细胞上清可抑制绝大部分趋化因子的结合)。

#### 图 8 T-淋巴细胞和单核细胞移动抑制试验

利用激活的人体 T-淋巴细胞和单核细胞株作为靶细胞, 测试了嵌合蛋白 XR3/R5/R1 对 CCR1, CCR5 和 CXCR3 受体介导的细胞移动的抑制作用。如图所示, CCR5 受体的配体趋化因子 RANTES, 以及 CXCR3 的配体 IP-10 都诱导激活的 T-淋巴细胞的移动, CCR1 受体的配体趋化因子 MIP-1 $\alpha$  诱导单核细胞移动, 含有不同浓度的嵌合蛋白 XR3/R5/R1 的培养上清液的加入呈剂量依赖状地抑制 IP-10, MIP-1 $\alpha$  或 RANTES 诱导的靶细胞的移动。

图 9 测定基因工程制作和分泌的嵌合蛋白 XR1/R2 与 CCR2, CXCR1 和 CXCR2 受体的结合。

用人外周血的中性粒细胞作为 CXCR1 和 CXCR2 的靶细胞, 单核细胞株做为 CCR2 受体的靶细胞。将分离得到的中性粒细胞和单核细胞立即与嵌合蛋白 XR1/R2 的培养上清液, 以及分别与同位素  $I^{125}$  标记的配体趋化因子 IL-8 或 GRO- $\alpha$ , 或 MCP-1 混合一起, 与这些受体作竞争结合。结果显示嵌合蛋白 XR1/R2 与上述受体紧密结合的能力 (50% 细胞上清可抑制绝大部分趋化因子的结合)。

#### 图 10 人的中性粒细胞细胞和单核细胞移动抑制试验

利用人体外周血的中性粒细胞作为 CXCR1 和 CXCR1 受体的靶细胞, 单核细胞株做为 CCR2 受体的靶细胞测试了嵌合蛋白 XR1/R2 对 CCR2 和 CXCR1, CXCR2 受体介导的细胞移动的抑制作用。如图所示, CCR2 受体的配体趋化因子 MCP-1, 以及 CXCR1 的配体 IL-8 和 CXCR2 的配体 GRO $\alpha$  都诱导上述靶细胞的移动。含有不同浓度的嵌合蛋白 XR2/R2 的培养上清液的加入呈剂量依赖状地抑制 IL-8, GRO $\alpha$  或 MCP-1 诱导的靶细胞的移动。

#### 表 2 嵌合蛋白质的一些特征

以上所述, 仅是本发明的较佳实施例而已, 并非对本发明作任何形式上的限制, 凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰, 均仍属于本发明技术方案的范围。

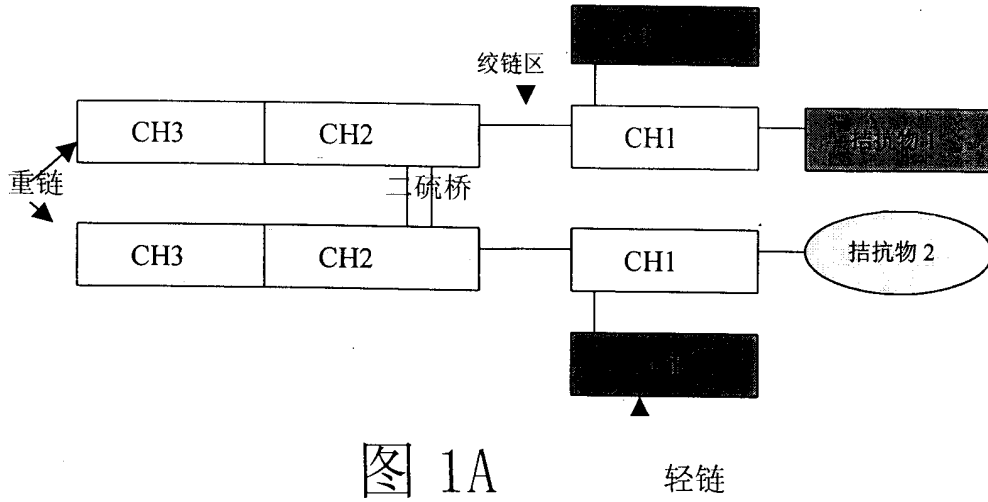


图 1A

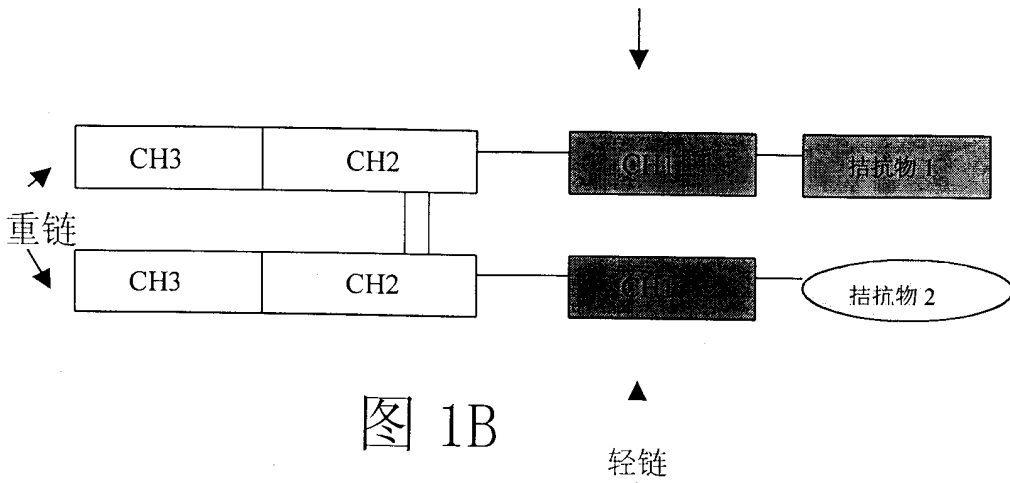


图 1B

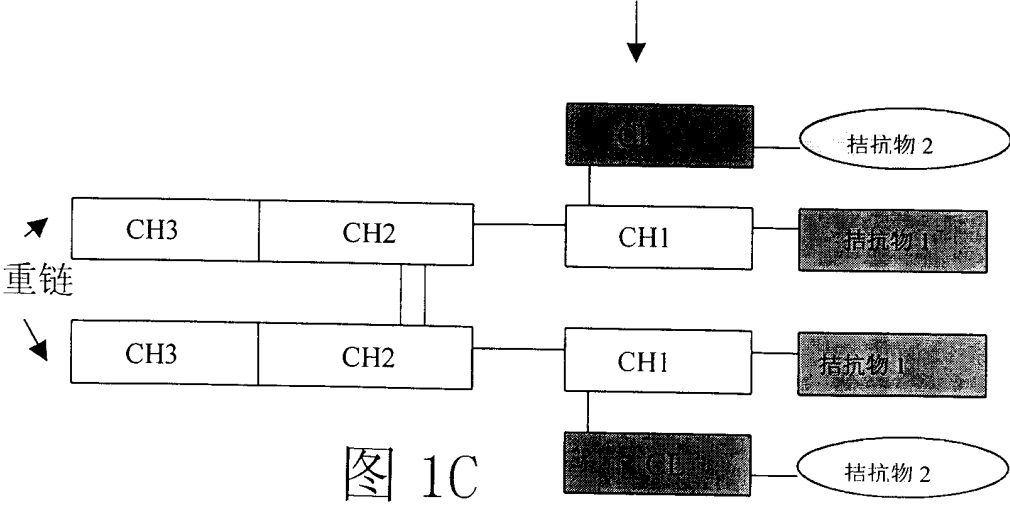


图 1C

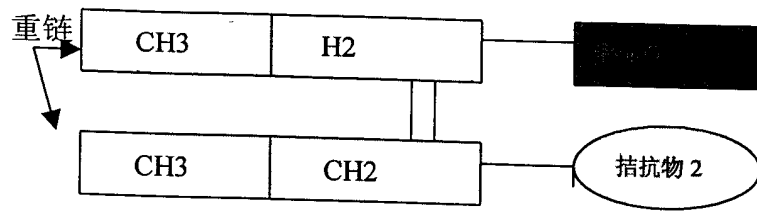


图 1D

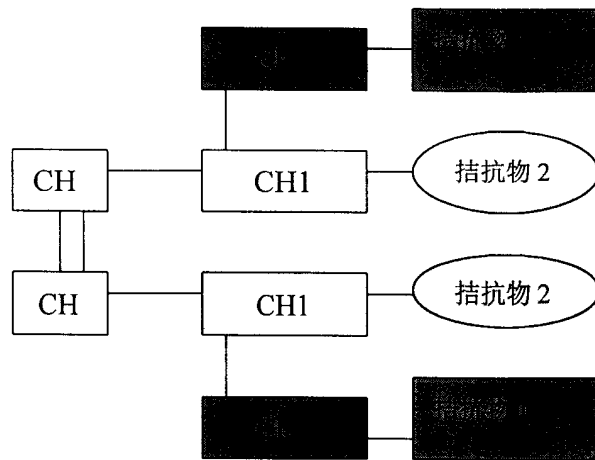


图 1E

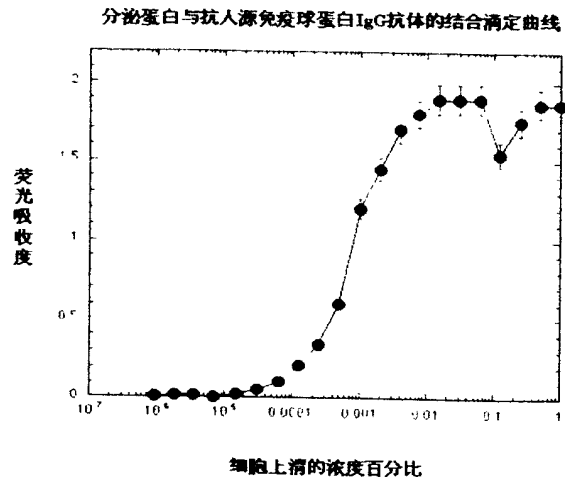
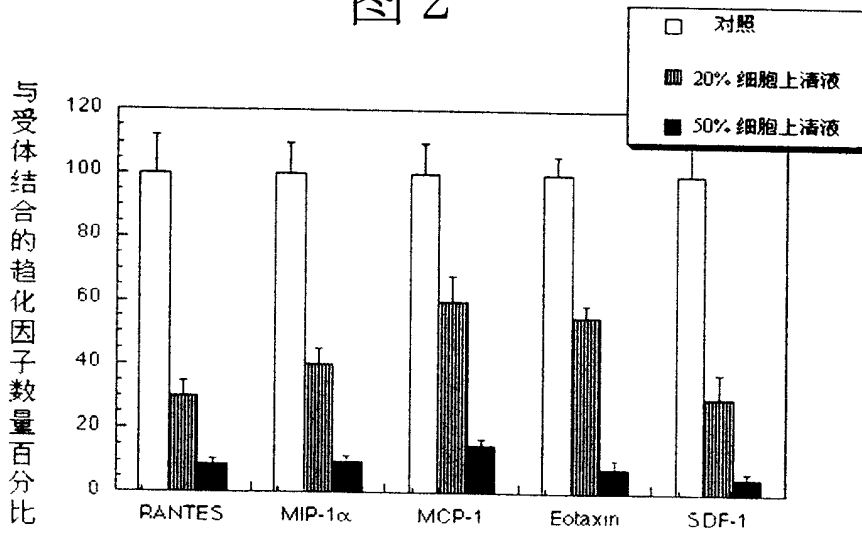
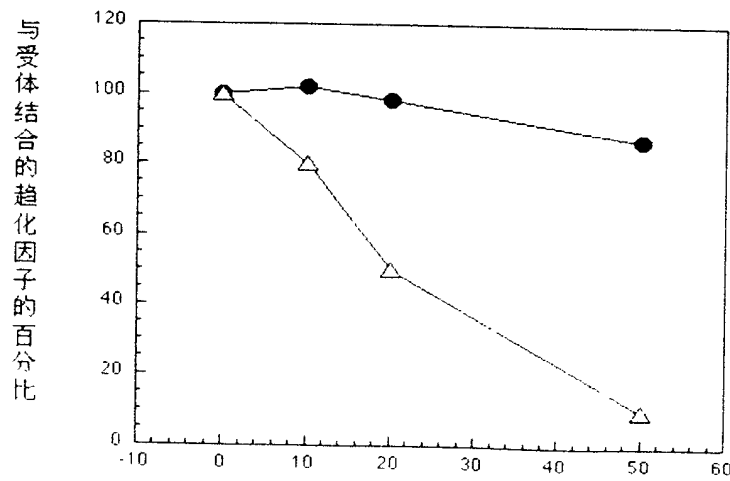


图 2



配体趋化因子

图 3A



融合蛋白分泌上清的浓度 (%)

图 3B

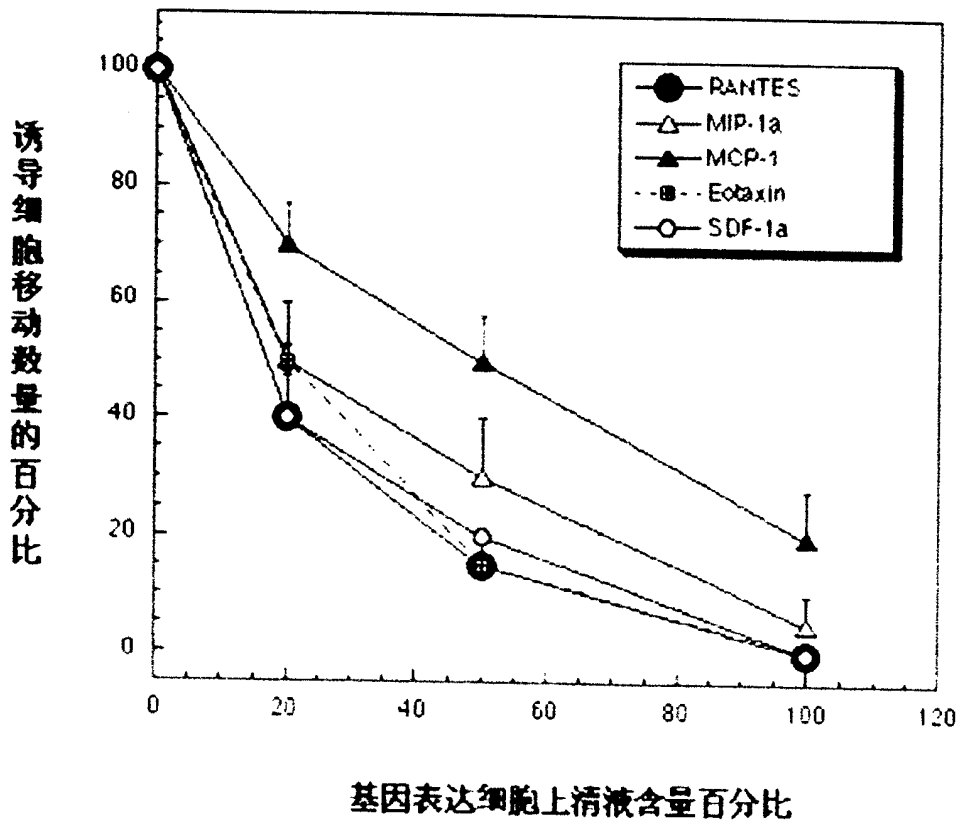


图 4

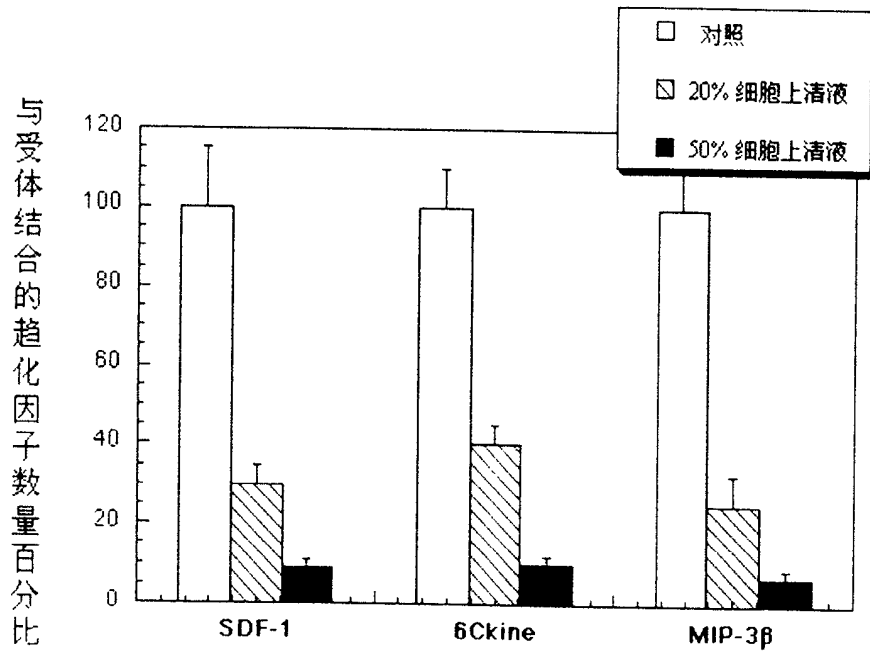


图 5 配体趋化因子



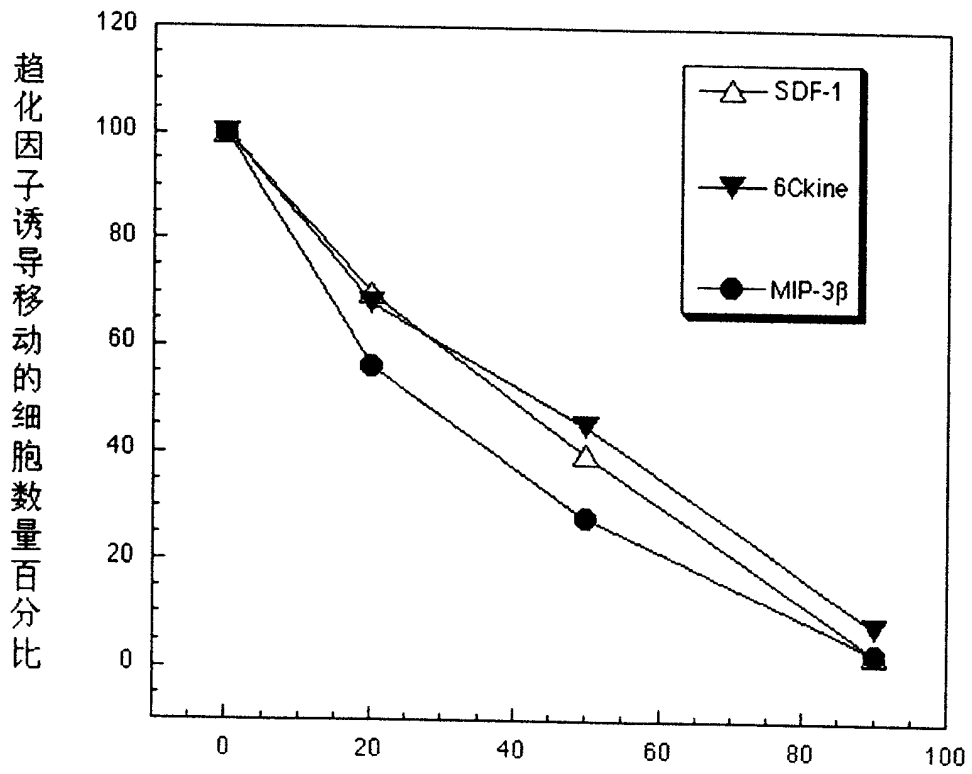


图 6A 基因表达细胞上清液含量百分比

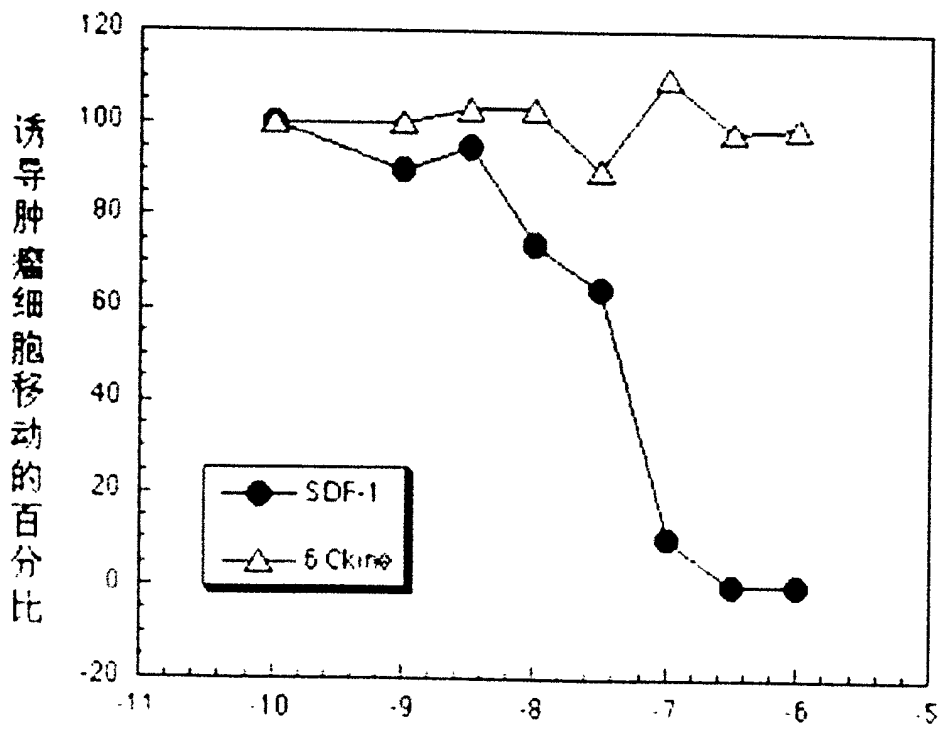


图 6B CXCR4受体拮抗剂的浓度 (Log M)

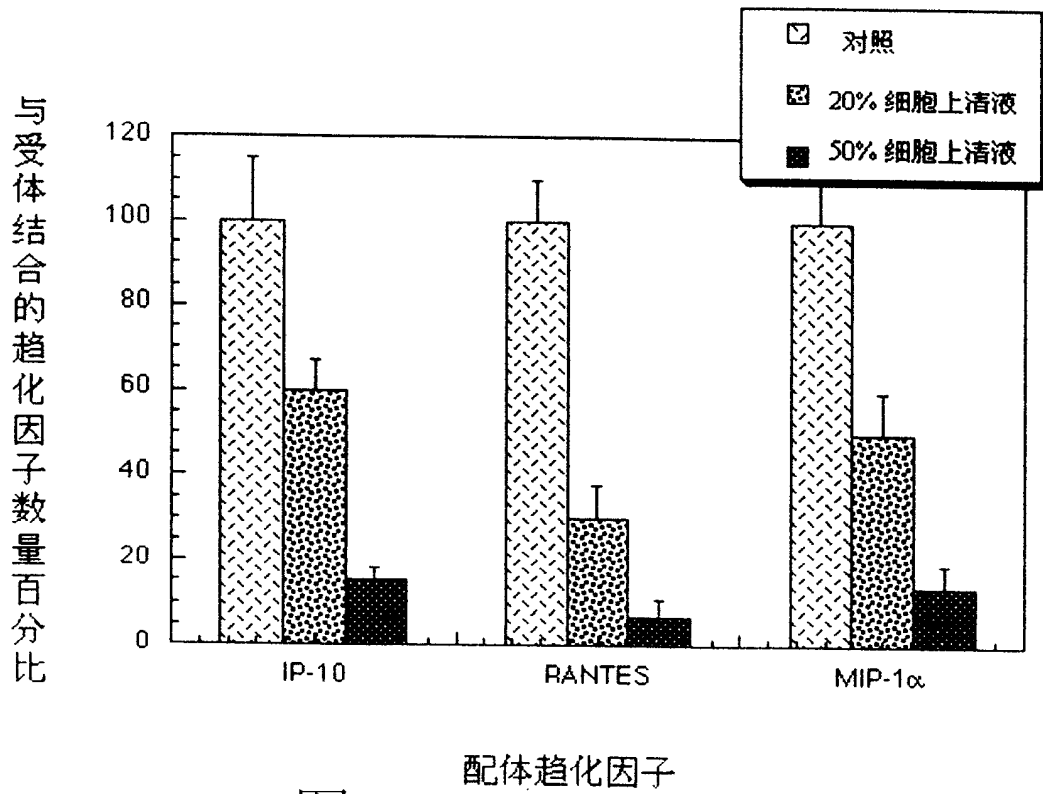


图 7

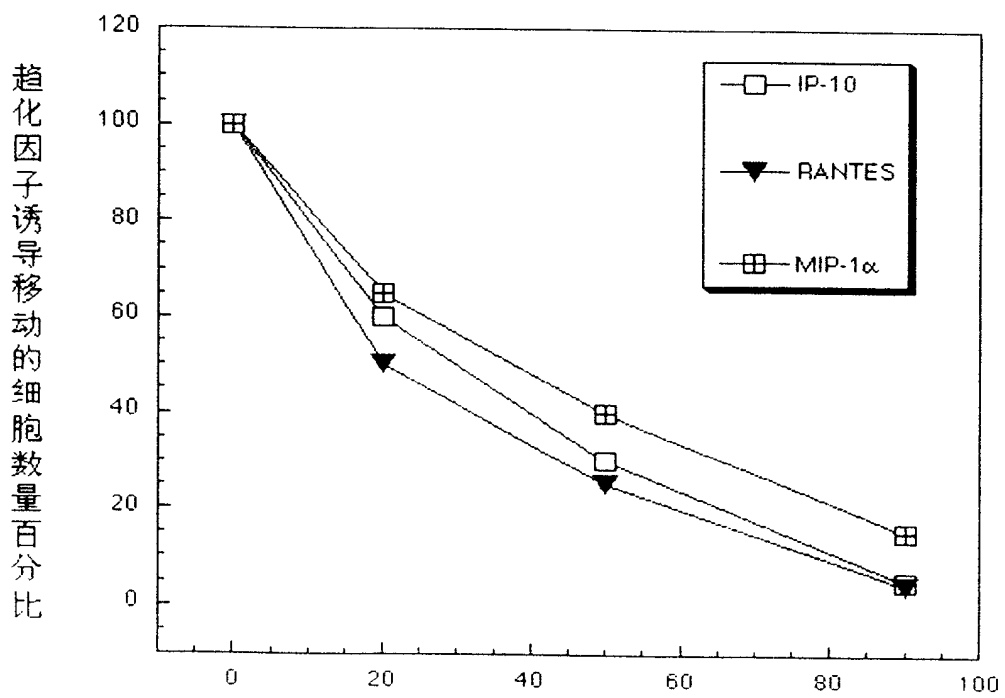


图 8 基因表达细胞上清液含量百分比

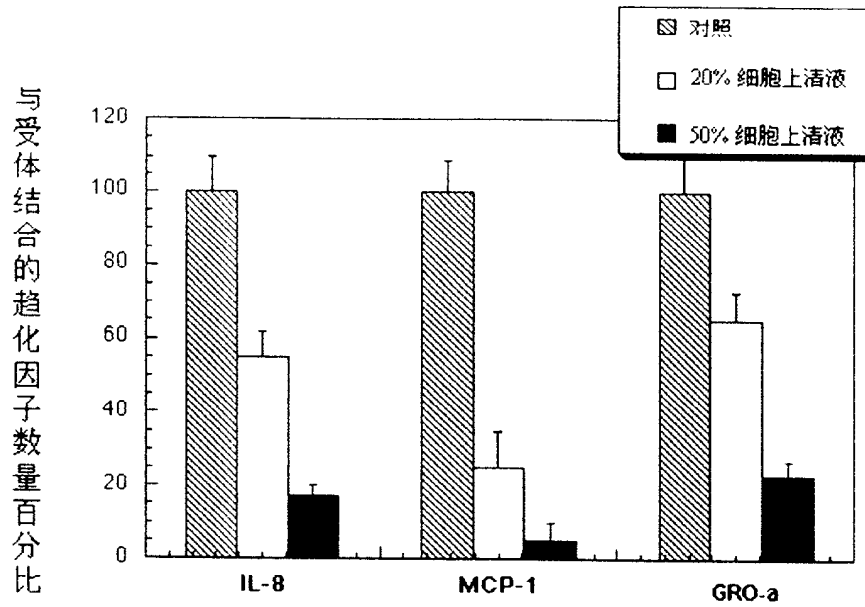


图 9 配体趋化因子

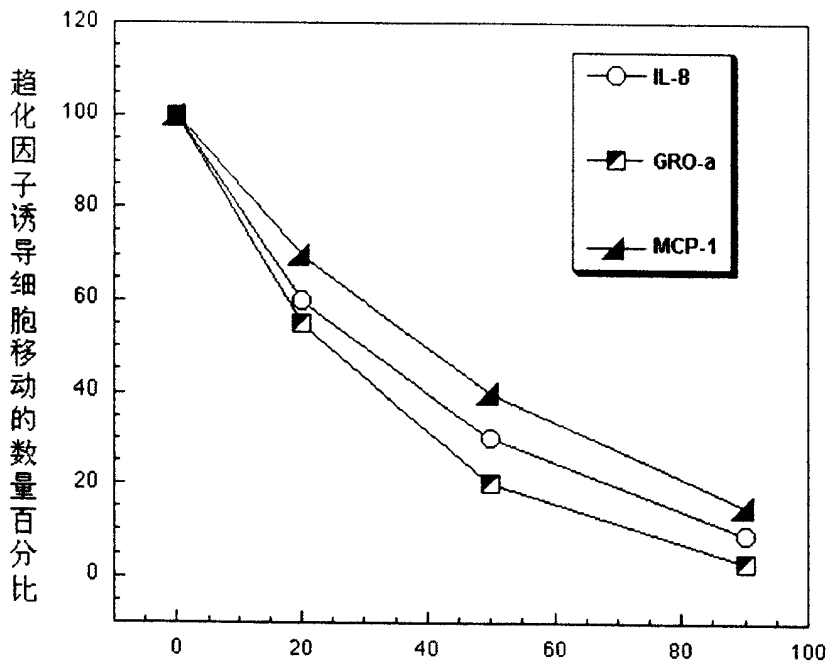


图 10 基因表达细胞上清液的含量百分比