



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108250290 A

(43)申请公布日 2018.07.06

(21)申请号 201810154860.9	<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
(22)申请日 2018.02.23	<i>A61P 17/00</i> (2006.01)
(71)申请人 中国科学院生物物理研究所	<i>A61P 17/06</i> (2006.01)
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号	<i>A61P 19/02</i> (2006.01)
(72)发明人 杨鹏远 高雅楠 游茂军	<i>A61P 19/08</i> (2006.01)
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任	<i>A61P 11/06</i> (2006.01)
公司 11021	<i>A61P 37/02</i> (2006.01)
代理人 单骁越	<i>A61P 3/10</i> (2006.01)
(51)Int.Cl.	<i>A61P 13/12</i> (2006.01)
<i>C07K 14/715</i> (2006.01)	<i>A61P 37/06</i> (2006.01)
<i>C07K 19/00</i> (2006.01)	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
<i>A61K 38/17</i> (2006.01)	<i>A61P 35/02</i> (2006.01)
<i>A61K 47/68</i> (2017.01)	
<i>A61P 37/08</i> (2006.01)	
<i>A61P 1/00</i> (2006.01)	

权利要求书1页 说明书7页
序列表9页 附图4页

(54)发明名称

CCR4的N端重组蛋白及其用途

(57)摘要

本发明提供重组蛋白或其衍生物,所述重组蛋白具有CC趋化因子受体4(CCR4)的N端部分的氨基酸序列。本发明还提供所述重组蛋白或其衍生物在治疗或预防与CCR4信号传导相关的疾病或状况中的用途。

1. 重组蛋白或其衍生物,所述重组蛋白具有CC趋化因子受体4 (CCR4) 的N端部分的氨基酸序列。
2. 权利要求1的重组蛋白或其衍生物,其中所述重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
3. 权利要求1的重组蛋白或其衍生物,其中所述衍生物是所述重组蛋白的多联体或所述重组蛋白与免疫球蛋白Fc片段的融合蛋白。
4. 权利要求1的重组蛋白或其衍生物,其中所述衍生物是所述重组蛋白的三联体,并且其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
5. 权利要求1的重组蛋白或其衍生物,其中所述衍生物是所述重组蛋白与免疫球蛋白Fc片段的融合蛋白,并且其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。
6. 药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-5中任一项的重组蛋白或其衍生物。
7. 权利要求1-5中任一项的重组蛋白或其衍生物或权利要求6的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于抑制CCR4与CCR4的配体的结合。
8. 权利要求1-5中任一项的重组蛋白或其衍生物或权利要求6的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防与CCR4信号传导相关的疾病或状况。
9. 权利要求8的用途,其中所述与CCR4信号传导相关的疾病或状况包括1) 变应性疾病,如全身过敏性或超敏性反应;2) 炎性肠炎,如克罗恩病、溃疡性结肠炎、回肠炎和肠炎;3) 银屑病和炎性皮肤病,如皮炎、湿疹、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、皮炎和荨麻疹;4) 脉管炎;5) 椎间盘病;6) 硬皮病;7) 哮喘和呼吸变应性疾病,如过敏性哮喘、运动诱导哮喘、过敏性鼻炎、超敏性肺病;8) 自身免疫性疾病,如关节炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、糖尿病、肾炎;9) 移植物排异,如同种异体移植物排异和移植物抗宿主病;10) 白血病、淋巴瘤和其它血源性癌症如皮肤T细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病;11) 需要抑制不良炎症的其他疾病,如动脉粥样硬化、肌炎、神经变性疾病、脑炎、脑膜炎、肝炎、肾炎;12) 癌症,包括实体瘤及转移瘤,如胃癌、肝癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、黑色素瘤、甲状腺癌、前列腺癌、神经系统肿瘤。
10. 权利要求8的用途,其中所述与CCR4信号传导相关的疾病或状况是癌症。

CCR4的N端重组蛋白及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及CCR4的N端重组蛋白及其衍生化合物、重组蛋白抗体等衍生物或组合物单独或联合具有相关用途的其他化合物或组合物用于治疗、预防、抑制或改善癌症和与CCR4信号传导相关的疾病或状况中的应用。

背景技术

[0002] CC趋化因子受体4(CC chemokine receptor 4,CCR4) 又称CKR4、CMKBR4、ChemR13、K5-5等,属于CC趋化因子受体家族,含360个氨基酸残基,定位于3号染色体p24-p21.3区域,为7次跨膜G蛋白偶联受体(GPCR),主要表达于各淋巴细胞和组织,CCR4的高表达与多种炎症性疾病、自身免疫性疾病、血液系统肿瘤以及恶性实体瘤的浸润、转移和预后相关。已知的CCR4高亲和力配体有两个,分别为胸腺活化调节趋化因子(Thymus and activation regulated chemokine,TARC/CCL17)和巨噬细胞衍生趋化因子(macrophage-derived chemokine,MDC/CCL22)。CCR4主要通过表达在Th2细胞、Th17细胞及调节性T细胞(Treg)表面的CCR4与其配体CCL22/CCL17的结合趋化不同类型T细胞发挥免疫效应,如Th2细胞在哮喘和呼吸变应性疾病等发挥重要促炎作用;Th17细胞诱发炎症性肠炎如克罗恩病、溃疡性结肠炎及自身免疫性疾病等;Treg细胞表面的CCR4通过与其配体CCL22/CCL17的结合趋化Treg细胞,引起免疫逃逸,从而导致不良临床后果。因此靶向CCR4的化合物有望成为相关疾病治疗的新策略。

[0003] 目前还没有CCR4和CCL22晶体结构的报道,且CCR4与其配体相互作用的分子机制未知。两步法模型是现在广为接受的GPCR与配体结合并激活的机制,其认为GPCR的N端在识别配体过程中发挥了非常重要的作用。因此通过明析CCR4的N端蛋白序列,解析CCR4的N端蛋白结构,可以有效合成CCR4N端重组蛋白,并通过对其重组蛋白功能研究及其衍生化合物或抗体开发,有望通过靶向CCR4竞争性抑制CCL22/CCL17-CCR4信号通路,单独或联合具有相关用途的其他化合物或组合物用于治疗、预防、抑制或改善癌症和与CCR4信号传导相关的疾病或状况,如炎症性疾病包括变态反应性疾病、炎症性肠炎、炎症性皮肤病、哮喘、自身免疫性疾病等、移植物排异、血液系统肿瘤如白血病、淋巴瘤和其它血源性癌症如皮肤T细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病等和癌症包括实体瘤及转移性疾病如胃癌、肝癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、黑色素瘤、甲状腺癌、前列腺癌、神经系统肿瘤等,成为相关疾病免疫靶向治疗的新策略,具有良好的临床应用前景。

[0004] 目前上市的治疗肿瘤的CCR4单克隆抗体为mogamulizumab,在皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、蕈样霉菌病、Sézary综合征、非霍奇金淋巴瘤等疾病治疗或研究中均有良好的治疗效果。而CCR4受体拮抗剂在哮喘、鼻炎、皮炎、血栓性疾病、自身免疫性疾病等疾病的研究中均有良好的治疗效果。

[0005] 但迄今为止,尚未见CCR4的N端重组蛋白及其衍生化合物、重组蛋白抗体等衍生物或组合物单独或联合具有相关用途的其他化合物或组合物用于治疗、预防、抑制或改善癌症和与CCR4信号传导相关的疾病或状况的报道。

发明内容

[0006] 本发明研究发现,通过两步法模型明析CCR4的N端蛋白序列,解析CCR4的N端蛋白结构,可以有效合成CCR4的N端重组蛋白及其衍生三联蛋白(N-CCR4)₃,实验证明CCR4的N端重组蛋白及衍生三联蛋白能够与趋化因子CCL22结合,并显著性抑制Treg的趋化作用。

[0007] 本发明提供的趋化因子受体CCR4的N端重组蛋白及其衍生化合物、重组蛋白抗体等衍生物或组合物单独或联合具有相关用途的其他化合物或组合物,在用于治疗、预防、抑制或改善癌症和与CCR4信号传导相关的疾病或状况中具有良好的临床应用前景。

[0008] 在一个方面,本发明提供CCR4的N端重组蛋白及其衍生化合物、重组蛋白抗体等衍生物或组合物单独或联合具有相关用途的其他化合物或组合物用于治疗、预防、抑制或改善癌症和与CCR4信号传导相关的疾病或状况的用途。

[0009] 在另一个方面,本发明提供CCR4的N端重组蛋白及其衍生化合物、重组蛋白抗体等衍生物或组合物,包括但不限于CCR4的N端重组蛋白(N-CCR4),其衍生化合物如二连、三联等多联N端重组蛋白等(N-CCR4)_n、其重组蛋白抗体(N-CCR4)_n-Fc或其他结构类似物等衍生化合物。

[0010] 其中所述的N-CCR4蛋白序列为:

[0011] MNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEG IKAFGELFLPPLYS (SEQ ID NO.1)

[0012] 其中所述的(N-CCR4)₃蛋白序列为:

[0013]

MNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEG IKAFGELFLPPLYSGGGGSGGGGSMNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEG IKAFGELFLPPLYSGGGGSGGGGSMNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEG IKAFGELFLPPLYSKLDPNSSVDKLAALAEHHHHHHH (SEQ ID NO.2)

[0014] 其中所述的(N-CCR4)₃-Fc蛋白序列为:

[0015]

MNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEG IKAFGELFLPPLYSGGGGSGGGGSMNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEG IKAFGELFLPPLYSKLDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFSFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.3)

[0016] 在另一个方面,本发明的CCR4的N端重组蛋白及其衍生化合物、重组蛋白抗体等衍生物或组合物可单独或联合具有相关用途的其他化合物或组合物使用。

[0017] 在另一个方面,本发明的CCR4的N端重组蛋白及其衍生化合物、重组蛋白抗体等衍生物或组合物可通过口服、胃肠外如肌肉内、静脉内、皮下注射或植入、吸入、或局部给药等途径施用,可以单独或一起配制成含有适合各给药途径的常规无毒药理学上可接受载体、佐剂和运载体的合适剂量单位制剂。

[0018] 在另一个方面,用于联合使用的其他化合物或组合物可通过其常用的途径和用量施用,与本发明的化合物或组合物同时或顺序或分开施用。可与本发明化合物或组合物连用同时或顺序或分开施用的治疗剂包括但不限于常规炎症性疾病治疗药物如抗炎类药物、

激素类药物、免疫抑制剂、抗组胺类药物等,常规癌症治疗药物如放疗类药物、常规一线药物(如顺铂、长春新碱、索拉菲尼等)、免疫检查点抑制剂(PD-1/PD-L1,CTLA-4,4-1BB,CD40/CD40L等)及其他肿瘤免疫靶向药物等(VEGF/VEGFR,EGF等)。

[0019] 在另一个方面,本发明的化合物可用于治疗、预防、抑制或改善癌症和与CCR4信号传导相关的疾病或状况。

[0020] 在另一个方面,所述治疗包括但不限于1) 变应性疾病,如全身过敏性或超敏性反应等;2) 炎性肠炎,如克罗恩病、溃疡性结肠炎、回肠炎和肠炎等;3) 银屑病和炎性皮肤病,如皮炎、湿疹、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、皮炎和荨麻疹等;5) 脉管炎;6) 脊椎关节病;7) 硬皮病;8) 哮喘和呼吸变应性疾病,如过敏性哮喘、运动诱导哮喘、过敏性鼻炎、超敏性肺病等;9) 自身免疫性疾病,如关节炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、糖尿病、肾炎等;10) 移植物排异,如同种异体移植物排异和移植物抗宿主病等;11) 白血病、淋巴瘤和其它血源性癌症如皮肤T细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病等;12) 需要抑制不良炎症的其他疾病,如动脉粥样硬化、肌炎、神经变性疾病、脑炎、脑膜炎、肝炎、肾炎等;13) 癌症,包括实体瘤及转移性疾病如胃癌、肝癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、黑色素瘤、甲状腺癌、前列腺癌、神经系统肿瘤等。

[0021] 在另一个方面,本发明的化合物与可联合使用的其他治疗剂可同时或顺序或分开施用,用于治疗、预防、抑制或改善癌症和与CCR4信号传导相关的疾病或状况。

[0022] 在另一个方面,本发明提供药物组合物,其可制成注射剂、片剂或胶囊剂。

[0023] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0024] 1. 重组蛋白或其衍生物,所述重组蛋白具有CC趋化因子受体4(CCR4)的N端部分的氨基酸序列。

[0025] 2. 根据1的重组蛋白或其衍生物,其中所述重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0026] 3. 根据1的重组蛋白或其衍生物,其中所述衍生物是所述重组蛋白的多联体或所述重组蛋白与免疫球蛋白Fc片段的融合蛋白。

[0027] 4. 根据1的重组蛋白或其衍生物,其中所述衍生物是所述重组蛋白的三联体,并且其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0028] 5. 根据1的重组蛋白或其衍生物,其中所述衍生物是所述重组蛋白与免疫球蛋白Fc片段的融合蛋白,并且其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0029] 6. 药物组合物,所述药物组合物包含根据1-5中任一项的重组蛋白或其衍生物。

[0030] 7. 根据1-5中任一项的重组蛋白或其衍生物或根据6的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于抑制CCR4与CCR4的配体的结合。

[0031] 8. 根据1-5中任一项的重组蛋白或其衍生物或根据6的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防与CCR4信号传导相关的疾病或状况。

[0032] 9. 根据8的用途,其中所述与CCR4信号传导相关的疾病或状况包括1) 变应性疾病,如全身过敏性或超敏性反应;2) 炎性肠炎,如克罗恩病、溃疡性结肠炎、回肠炎和肠炎;3) 银屑病和炎性皮肤病,如皮炎、湿疹、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、皮炎和荨麻疹;5) 脉管炎;6) 脊椎关节病;7) 硬皮病;8) 哮喘和呼吸变应性疾病,如过敏性哮喘、运动诱导哮喘、过敏性鼻炎、超敏性肺病;9) 自身免疫性疾病,如关节炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、

糖尿病、肾炎；10) 移植物排异，如同种异体移植物排异和移植物抗宿主病；11) 白血病、淋巴瘤和其它血源性癌症如皮肤T细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病；12) 需要抑制不良炎症的其他疾病，如动脉粥样硬化、肌炎、神经变性疾病、脑炎、脑膜炎、肝炎、肾炎；13) 癌症，包括实体瘤及转移瘤，如胃癌、肝癌、肾癌、肠癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、黑色素瘤、甲状腺癌、前列腺癌、神经系统肿瘤。

[0033] 10. 根据8的用途，其中所述与CCR4信号传导相关的疾病或状况是癌症。

[0034] 11. 根据1-5中任一项的重组蛋白或其衍生物或根据6的药物组合物用于抑制CCR4与CCR4的配体的结合的用途。

[0035] 12. 根据1-5中任一项的重组蛋白或其衍生物或根据6的药物组合物用于治疗或预防与CCR4信号传导相关的疾病或状况的用途。

附图说明

[0036] 图1. CCR4的N端蛋白N-CCR4预测及其衍生蛋白(N-CCR4)₃、(N-CCR4)₃-Fc纯化。

[0037] 图2. (N-CCR4)₃与CCL22相互作用实验。

[0038] 图3. (N-CCR4)₃抑制Treg细胞的趋化作用实验。

具体实施方式

[0039] 实施例1: 预测CCR4的N端蛋白N-CCR4

[0040] 1. CCR4的N端蛋白N-CCR4是通过CCR4与CXCR4蛋白序列疏水性比对(http://www.bioinfo.mpg.de/AlignMe/AlignMe_MSA.html)及计算CCR4蛋白序列的吉布斯自由能 ΔG (ΔG predictor sever v1.0, <http://dgpred.cbr.su.se>)预测的(图1A、B)。

[0041] N-CCR4蛋白序列为:

[0042] MNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEGIKAFGELFLPPLYS (SEQ ID NO.1)

[0043] 2. N-CCR4衍生蛋白(N-CCR4)₃纯化

[0044] 将(N-CCR4)₃DNA密码子优化后的序列通过NdeI和BamHI酶切位点克隆到pET22b(+)载体(Novagen, Cat.No.69744-3)上,转化Transetta感受态细胞(全式金,货号CD801-01)。按照1:100接种过夜摇菌菌液至新的LB培养基中,待菌液OD600为0.6时,加入终浓度1mM IPTG(amresco, cat:0487-1G), 25度, 220rpm/min诱导表达10小时。PBS重悬细胞后通过高压破菌仪(JN-02C低温超高压连续流细胞破碎仪)破菌,镍柱(BBI, 货号C600793)结合并用含有100mM咪唑Tris-HCl(pH8.0)缓冲液洗脱纯化, 2L PBS透析两次。取诱导前ctrl样, 诱导后lys样, 穿透液Ft样, 洗涤w样, 30mM咪唑洗脱样, 100mM咪唑洗脱样, 500mM咪唑洗脱样, 跑12% SDS-PAGE胶检测(图1C)。

[0045] (N-CCR4)₃蛋白DNA密码子优化后序列为:

[0046]

```
ATGAATCCGACCGATATTGCAGATACCACACTGGATGAAAGCATCTATAGCAACTATTATCTGTATGAGAGCATTCC
GAAACCGTGTACCAAAGAAGGTATTAAGCATTGGCGAACTGTTTCTGCCTCCGCTGTATAGCGGTGGTGGTGGTA
GTGGTGGCGGTGGTTCAATGAACCCGACAGATATCGCCGACACAACCCTGGATGAATCAATTTATTCCA ACTACTAC
CTGTACGAGTCAATCCC GAAACCTTGCACAAAAGAGGGCATCAAAGCCTTGGTGAGCTGTTTTTACCGCCTCTGTA
TTCAGGCGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGAAGCATGAATCCTACAGACATTGCGGATACGACCCTGGACGAGAGCA
```

TTTATTCAAATTA TACTATTTATACGAAAGCATCCCGAAGCCATGTACGAAAGAGGGAATTAAGGCGTTCGGTGAATTA
TTTCTGCCACCGTTATATAGCTTGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCA
CCACCACCAC (SEQ ID NO.4)

[0047] (N-CCR4)₃蛋白序列为:

[0048]

MNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEG IKA F G E L F L P P L Y S G G G S G G G S M N P T D I A D T T L D E S I Y S N Y Y
LYESIPKPCTKEG IKA F G E L F L P P L Y S G G G S G G G S M N P T D I A D T T L D E S I Y S N Y Y L Y E S I P K P C T K E G I K A F G E L
FLPPLYSLDPNSSVDKLA A A L E H H H H H H (SEQ ID NO.2)

[0049] 3.N-CCR4衍生抗体(N-CCR4)₃-Fc纯化

[0050] 将鼠的κIII信号肽-(N-CCR4)₃-Fc DNA序列通过KpnI和BamHI克隆到pCEP4载体,其中鼠的κIII信号肽为分泌信号肽,Fc为人源IgG1 Fc。并用PEI(上海起发生物试剂有限公司,货号24765-2)将构建的质粒转染293FT细胞,转染第三天收上清用protein A预装重力柱(BBI,货号C600951)纯化。取洗脱Elution样跑10%SDS-PAGE胶检测(图1D)。

[0051] (N-CCR4)₃-Fc DNA序列:

[0052]

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTACTCGATGAACCCAC
CGACATCGCCGACACCACCCTCGACGAGAGCATCTACAGCAACTACTACCTGTACGAAAGCATCCCCAACCCCTGCA
CCAAAGAAGGCATCAAAGCCTTCGGCGAGCTGTTCCCTCCCCCCCCTGTACAGCGGCGGCGGTGGATCTGGCGGCGGA
GGATCAATGAACCCACAGACATCGCCGATACCACCCTGGACGAAAGCATTACAGCAATTACTACCTGTATGAGTC
CATCCCCAACCTTGACCAAAGAGGGCATCAAGGCCTTCGGCGAAGTGTTCCTCCCACCCCTGTACAGTGGCGGGG
GCGGAAGCGGAGGCGGAGGAAGCATGAACCCCACTGACATCGCCGACACAACCCTCGACGAAAGCATATACAGCAAT
TATTACCTGTACGAGTCCATCCCTAAACCCTGCACAAAGGAAGGCATCAAGGCATTCGGAGAGCTGTTCTGCCCCC
CCTGTATAGCAAGCTTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT
TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGC
CTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGGTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
TAAATAATAA (SEQ ID NO.5)

[0053] (N-CCR4)₃-Fc蛋白序列:

[0054]

MNPTDIADTTLDESIYSNYLYESIPKPCTKEG IKA F G E L F L P P L Y S G G G S G G G S M N P T D I A D T T L D E S I Y S N Y Y
LYESIPKPCTKEG IKA F G E L F L P P L Y S G G G S G G G S M N P T D I A D T T L D E S I Y S N Y Y L Y E S I P K P C T K E G I K A F G E L
FLPPLYSKLDKTHTCPPELGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V M H E G L H N H Y T Q K S L S

LSPGK (SEQ ID NO.3)

[0055] 实施例2: (N-CCR4)₃与CCL22相互作用实验

[0056] GST-pulldown实验可以验证两个蛋白是否有相互作用,因此通过GST-pulldown实验验证(N-CCR4)₃与CCL22有相互作用。

[0057] 1.CCL22-GST蛋白表达

[0058] CCL22DNA序列进行密码子优化,并通过酶切位点NdeI, BamHI和HindIII将CCL22及GST克隆到pET22b载体上。转化Transetta感受态细胞。按照1:100接种过夜摇菌菌液至新的LB培养基中,待菌液OD600为0.6时,加入终浓度1mM IPTG (amresco, cat:0487-1G), 20℃, 210rpm/min诱导表达10小时。PBS重悬细胞后通过高压破菌仪破菌,GST琼脂糖(BBI, 货号C600031)结合过夜后,用150mM NaCl, 1mM DTT (amresco, 货号0281-5G) 10mM Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液洗涤10个柱体积,并用10mM还原型谷胱甘肽(BBI, 货号70-18-8) 150mM NaCl, 1mM DTT Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液洗脱纯化, 2L PBS透析两次。

[0059] CCL22-GST DNA序列:

[0060]

```
ATGGGTCCGTATGGTGCAAATATGGAAGATAGCGTTTGTGCGGTGATTATGTTTCGTTATCGTCTGCCGCTGCGTGT
TGTTAAACACTTTTATTGGACCAGCGATAGCTGTCCGCGTCCGGGTGTTGTTCTGCTGACCTTTCGTGATAAAGAAA
TTTGTGCAGATCCGCGTGTTCGTGGGTTAAAAATGATTCTGAATAAACTGAGCCAGGATCCGGGTGGCCCCGGGTATG
TCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAA
ATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTC
CCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACTTATATAGCTGACAAG
CACAACATGTTGGGTGGTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATA
CGGTGTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGC
TGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTG
TATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAA
ACGTATTGAAGCTATCCACAAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTCAGGGCTGGC
AAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATGA (SEQ ID NO.6)
```

[0061] CCL22-GST蛋白序列:

[0062]

```
MGPYGANMEDSVCCR DYVRYRLPLRVVKHFYWTSDSCPRPGVVLLTFRDKEICADPRVPWVKMILNKLSQDPGGPGM
SPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVCLTQSMATIRYIADK
HNMLGGCPKERA EISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFML
YDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPK (SEQ ID NO.7)
```

[0063] 2.GST蛋白表达

[0064] pGEX-6P-1质粒(GE, 货号27-4597-01)转化Transetta感受态细胞。按照1:100接种过夜摇菌菌液至新的LB培养基中,待菌液OD600为0.6时,加入终浓度1mM IPTG (amresco, cat:0487-1G), 25℃, 210rpm/min诱导表达10小时。PBS重悬细胞后通过高压破菌仪破菌,GST琼脂糖(BBI, 货号C600031)结合过夜后,用10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM DTT (amresco, 货号0281-5G) 缓冲液洗涤10个柱体积,并用10mM还原型谷胱甘肽(BBI, 货号70-18-8) 150mM NaCl, 1mM DTT Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液洗脱纯化, 2L PBS透析两次。

[0065] 3.GST pulldown

[0066] 分别将120ng CCL22-GST,GST蛋白与360ng (N-CCR4)₃混合,分别加入20ul GST琼脂糖,用PBS补足液体至600ul;4℃旋转结合,4h;PBS+0.1%Triton-100洗3次,PBS洗3次;30ul 1x loading buffer溶解beads上的蛋白,煮沸3分钟,高速离心,取1ul上清跑12%SDS PAGE胶,银染(碧云天,快速银染试剂盒,货号P0017S)检测,如图2所示,(N-CCR4)₃与CCL22有相互作用。

[0067] 实施例3: (N-CCR4)₃抑制Treg细胞的趋化作用实验

[0068] 趋化实验是常规观测细胞趋化迁移的模型,因此用其验证(N-CCR4)₃对Treg细胞趋化的抑制作用。

[0069] 分选 Naïve CD4⁺T淋巴细胞,加入anti-CD3 (2μg/mL)、anti-CD28 (1μg/mL)、TGFβ (1ng/mL) 和IL-2 (4ng/mL) 刺激2天,收取诱导好的Treg细胞,2*10⁵/孔置于趋化小室上室中,下室分别加入肿瘤细胞培养上清及0.05μM、0.1μM和1μM (N-CCR4)₃重组蛋白,4小时后,收取下室中的Treg细胞并计数统计分析,如图3所示,加入(N-CCR4)₃可显著抑制Treg细胞的趋化运动。

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> CCR4 的 N 端重组蛋白及其用途

<130> IB187234

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 1

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
1 5 10 15

[0001]

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
 20 25 30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser
 35 40 45

<210> 2

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 2

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
1 5 10 15

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
 20 25 30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala
 50 55 60

Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu
 65 70 75 80

Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu
 85 90 95

Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 100 105 110

[0002] Gly Ser Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser
 115 120 125

Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr
 130 135 140

Lys Glu Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr
 145 150 155 160

Ser Leu Asp Pro Asn Ser Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu
 165 170 175

Glu His His His His His His
 180

<210> 3

<211> 390

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 3

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
1 5 10 15

Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
20 25 30

Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Gly
35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala
50 55 60

Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu
65 70 75 80

[0003]

Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu
85 90 95

Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser
115 120 125

Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr
130 135 140

Lys Glu Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr
145 150 155 160

Ser Lys Leu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

	165	170	175
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
180	185	190	
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
195	200	205	
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
210	215	220	
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
225	230	235	240
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
245	250	255	
[0004]			
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
260	265	270	
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
275	280	285	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
290	295	300	
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
305	310	315	320
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
325	330	335	
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
340	345	350	

[0005]

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 355 360 365

Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 370 375 380

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390

<210> 4
 <211> 549
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 4
 atgaatecga cegatattgc agataccaca ctggatgaaa geatctatag caactattat 60
 ctgtatgaga gcattccgaa accgtgtacc aaagaaggta ttaaagcatt tggcgaactg 120
 tttctgcctc cgctgtatag cggtaggtgg gtagtggtg gegtggttc aatgaaccgg 180
 acagatatcg ccgacacaac cctggatgaa tcaatttatt ccaactacta cctgtaecgag 240
 tcaatcccga aaccttgcaac aaaagagggc atcaaagcct ttggtgagct gtttttaccg 300
 cctctgtatt caggcgggtg cggtagcgga ggtggcgga gcatgaatcc tacagacatt 360
 gcggatacga ccetggacga gagcatttat tcaaattact attatacga aagcatcccg 420
 aagccatgta cgaaagaggg aattaaggcg ttcggtgaat tatttctgcc accgttatat 480
 agcttggatc cgaattcgag ctccgtegac aagcttgcgg ccgcactcga gcaccaccac 540
 caccaccac 549

<210> 5
 <211> 1242
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

[0006]

<400> 5

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggg	60
gactegatga aceccaccga catcgccgac accaccctcg acgagagcat ctacageaac	120
tactacctgt acgaaagcat ccccaaacc tgcaccaaag aaggcatcaa agccttegge	180
gagctgttcc tccccccct gtacagcggc ggcgggtggat ctggcggcgg aggatcaatg	240
aaceccacag acatcgccga taccaccctg gacgaaagca ttacagcaa ttactacctg	300
tatgagtcca tccccaaacc ttgcaccaa gagggcatca aggccttcgg cgaactgttc	360
ctcccacccc tgtacagtgg cggcggcgga agcggaggcg gaggaagcat gaaccccact	420
gacatcgccg acacaaccct cgacgaaagc atatacagca attattacct gtaeagatcc	480
atccctaac cctgcacaaa ggaaggcatc aaggcattcg gagagctgtt cctgcccccc	540
ctgtatagca agettgacaa aactcacaca tgecccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	600
gggggaccgt cagtcttctt ctccccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg	660
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtcc	720
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	780
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccctcc tgcaccagga ctggtgaat	840
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	900
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	960
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggett ctatcccagc	1020
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgeet	1080
cccgtgctgg actccgacgg ctccctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagage	1140
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgagggtct gcacaaccac	1200
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataat aa	1242

	<210>	6	
	<211>	885	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial sequence	
	<400>	6	
	atgggtccgt	atggtgcaaa	tatggaagat agcgtttggt gccgtgatta tgttegttat 60
	cgtctgccgc	tgcgtgttgt	taaacaacttt tattggacca gegatagctg tccgcgtccg 120
	ggtgtttgtc	tgetgacctt	tcgtgataaa gaaatttgtg cagatccgcg tgttccgtgg 180
	gttaaaatga	ttctgaataa	actgagccag gatccgggtg gcccggtat gtccctata 240
	ctaggttatt	ggaaaattaa	ggccttgtg caaccacte gacttctttt ggaatatctt 300
	gaagaaaaat	atgaagagca	tttztatgag cgcatgaag gtgataaatg gcgaaacaaa 360
	aagtttgaat	tgggtttgga	gtttccaat cttccttatt atattgatgg tgatgttaaa 420
	ttaacacagt	ctatggccat	catacgttat atagetgaca agcacaacat gttgggtggt 480
[0007]	tgtccaaaag	agcgtgcaga	gatttcaatg cttgaaggag cggttttgga tattagatac 540
	ggtgtttcga	gaattgcata	tagtaaagac tttgaaactc tcaaagttga ttttcttagc 600
	aagctacctg	aatgctgaa	aatgttcgaa gatcgtttat gtcataaaac atatttaaat 660
	ggtgatcatg	taaccatcc	tgaactcatg ttgtatgacg ctcttgatgt tgtttatac 720
	atggacccaa	tgtgcctgga	tgcgttccca aaattagttt gttttaaaaa acgtattgaa 780
	gctateccac	aaattgataa	gtacttgaaa tccagcaagt atatagcatg gcctttgcag 840
	ggetggcaag	ccacgtttgg	tggtggegac catctccaa aatga 885
	<210>	7	
	<211>	294	
	<212>	PRT	
	<213>	Artificial sequence	
	<400>	7	
	Met Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Met Glu Asp Ser Val Cys Cys Arg Asp		

1	5	10	15
Tyr Val Arg Tyr Arg Leu Pro Leu Arg Val Val Lys His Phe Tyr Trp	20	25	30
Thr Ser Asp Ser Cys Pro Arg Pro Gly Val Val Leu Leu Thr Phe Arg	35	40	45
Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Arg Val Pro Trp Val Lys Met Ile	50	55	60
Leu Asn Lys Leu Ser Gln Asp Pro Gly Gly Pro Gly Met Ser Pro Ile	65	70	75
Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu	85	90	95
[0008]			
Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp	100	105	110
Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe	115	120	125
Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser	130	135	140
Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly	145	150	155
Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu	165	170	175
Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu	180	185	190

Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met
 195 200 205

Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val
 210 215 220

Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr
 225 230 235 240

[0009] Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys
 245 250 255

Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser
 260 265 270

Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly
 275 280 285

Gly Asp His Pro Pro Lys
 290

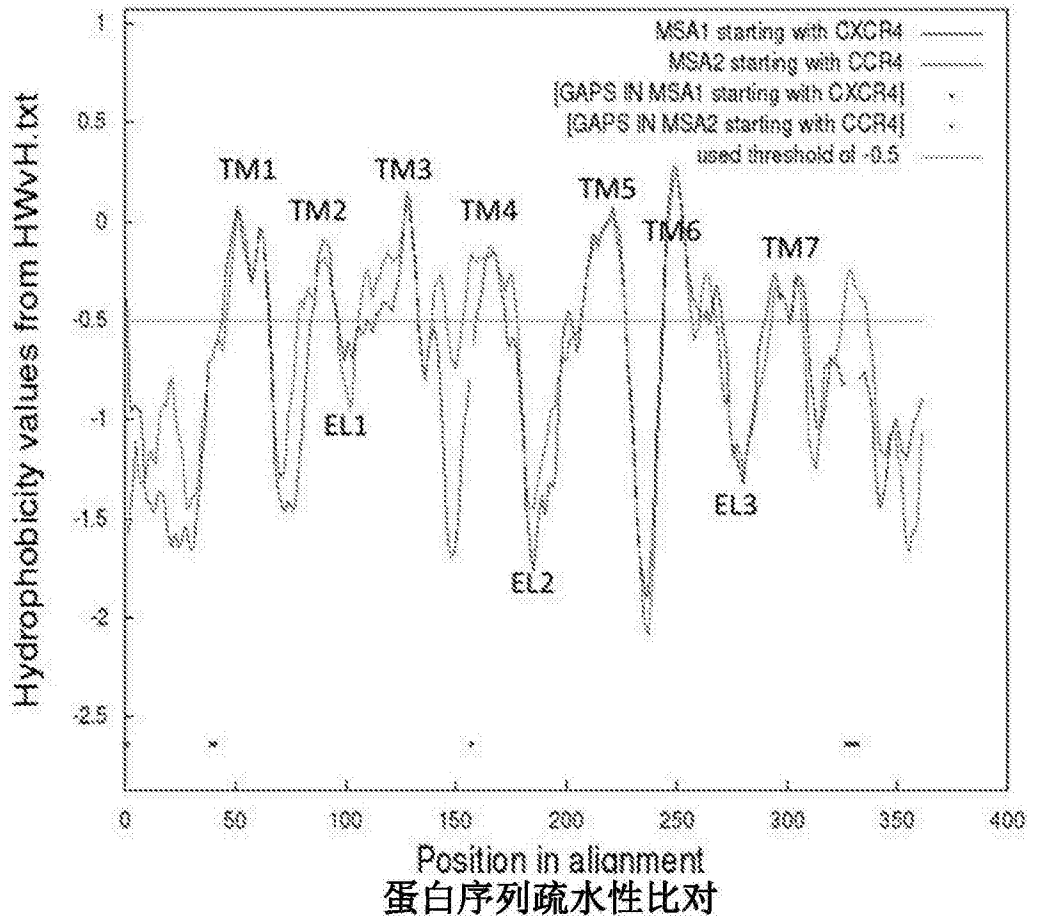
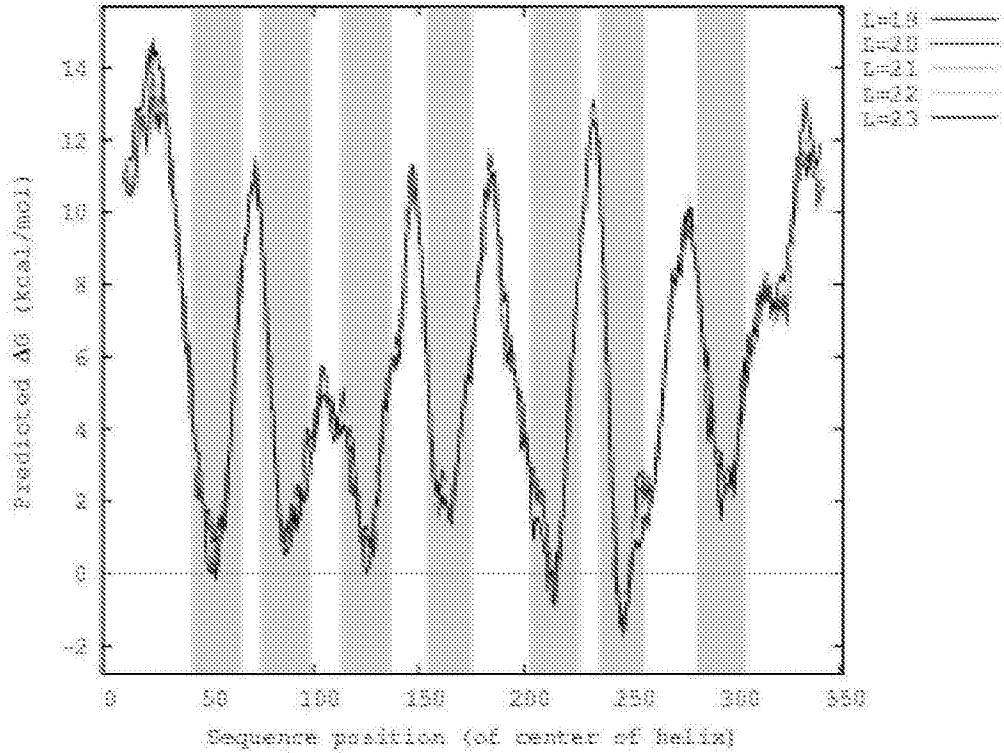


图1A

Predicted TM helices:

Position	Length	Predicted ΔG	Sequence	
43-65	23	-8.182	EYSKFLTGIVGNGVLENNGY	[analyze]
76-98	23	0.516	YRLHLSVADLLFWITLPPWAWDA	[analyze]
114-136	23	0.015	VIYTVNLYSSVLLAFISLDRYL	[analyze]
165-175	11	1.129	VVYVGVVWFALLTIPDFIFA	[analyze]
204-225	23	-0.947	IMVGLLPGIVILSCYCHNSKL	[analyze]
237-257	21	-1.776	AKTTVRLIAFFACWLPYYI	[analyze]
283-305	23	1.604	WISITEALAFFHCCLNPKLYAFL	[analyze]

Download plot in EPS format (new)



吉布斯自由能 ΔG 预测

图1B

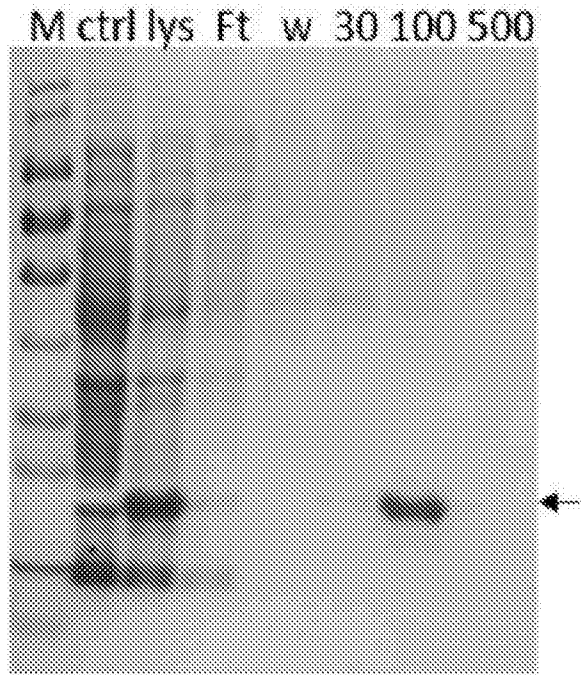


图1C

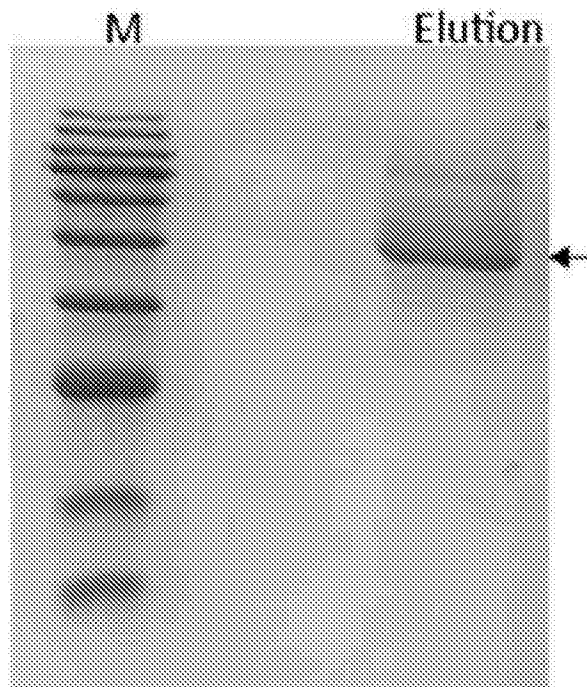


图1D

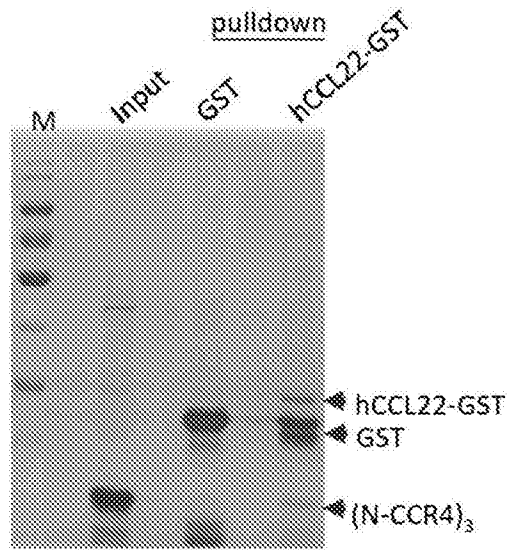


图2

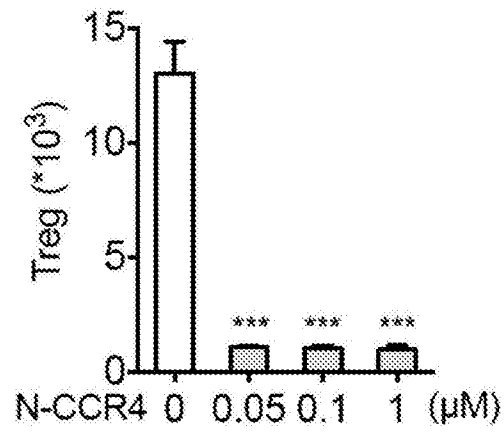


图3