



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102256617 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 200980150927. 0

(22) 申请日 2009. 10. 16

(30) 优先权数据

61/106, 390 2008. 10. 17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 06. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2009/001469 2009. 10. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/043045 EN 2010. 04. 22

(73) 专利权人 伦敦健康科学中心研究公司

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 冯清平 陆湘如 保罗·阿诺德

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250

代理人 张韬

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

A61K 38/57(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

(56) 对比文件

Cederholm 等. Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis

in SLE and in the general polulation.

《Ann. N. Y. acad. Sci. 》. 2007, 第 1108 卷 (第 1 期), 96-103.

Cederholm 等. Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general polulation.

《Ann. N. Y. acad. Sci. 》. 2007, 第 1108 卷 (第 1 期), 96-103.

Palmi 等. Inhibition of the interleukin-1 β -induced pyresis in the rabbit by peptide 204-212 of lipocortin 5. 《European journal of pharmacology》. 1995, 第 281 卷 (第 1 期), 97-99.

李欣 等. 膜联蛋白 A5 与宫颈粘膜上皮细胞癌变的关系. 《解剖学杂志》. 2006, (第 4 期),

Westerweel 等. premature atherosclerotic cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. 《arthritis & rheumatism》. 2007, 第 56 卷 (第 5 期), 1384-1396.

审查员 高雅

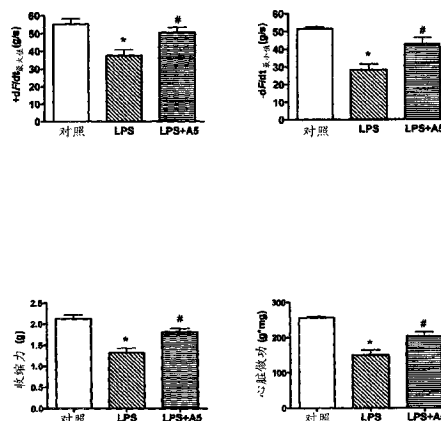
权利要求书1页 说明书23页 附图6页

(54) 发明名称

膜联蛋白及其治疗炎症病症的用途

(57) 摘要

提供了用于治疗炎症病症的包含有效量的膜联蛋白 A5 的组合物。提供了用于改善器官功能的包含有效量的膜联蛋白 A5 的组合物。还提供了给予这些组合物用于治疗动物的方法。



1. 人全长膜联蛋白 A5 在制备用于治疗脓毒症的药物中的用途。
2. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述膜联蛋白 A5 的量能有效抑制选自 TNF- α 和 IL-1 β 的促炎细胞因子。
3. 人全长膜联蛋白 A5 在制备用于治疗脓毒症中心脏功能障碍的药物中的用途。
4. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述膜联蛋白 A5 的量能有效治疗选自小鼠、猪、狗、大鼠和人的哺乳动物。
5. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述膜联蛋白 A5 的用量为 0.1 μ g-10,000mg 每剂量。
6. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述膜联蛋白 A5 的用量为 10 μ g-5mg 每剂量。
7. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述膜联蛋白 A5 的用量为 0.1 μ g/kg/天-20mg/kg/天。
8. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述膜联蛋白 A5 的用量少于或等于 1 μ g/kg/天。
9. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述膜联蛋白 A5 为全长天然存在的多肽。
10. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述膜联蛋白 A5 为重组体。
11. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述治疗脓毒症是指治疗脓毒症的炎症病症。
12. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中,在高度怀疑有感染或已证实有感染并满足以下特征中的至少两个特征,则认为存在脓毒症:心动过速;低体温;发烧;呼吸急促;低碳酸血症;白细胞减少症;白细胞增多症;以及杆状核粒细胞增多症。

膜联蛋白及其治疗炎症病症的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及炎症病症的治疗。更具体而言,本发明涉及膜联蛋白 A5 在治疗炎症病症、特别是治疗脓毒症中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 在本申请的各处,在括号中引用了不同的参考文献,用于更全面地描述了本发明所属领域的状况。在本说明书的末尾、权利要求书之前提供了每篇引文的完整目录信息。通过引用将这些参考文献的公开内容整体并入本公开。

[0004] 炎症相关的异常包括一大类病症,这些病症是各种人类疾病的基础。免疫系统通常与炎症病症相关,在过敏反应和一些肌病中都有表现,多种免疫系统病症导致异常炎症。具有炎症过程中的病因学起源的非免疫性疾病被认为包括脓毒症、癌、动脉粥样硬化和缺血性心脏病。

[0005] 多种蛋白参与炎症,并且这些蛋白中的一种或多种的改变的表达和 / 或活性可以损害正常的免疫功能或使正常的免疫功能失调。

[0006] 脊椎动物通过平衡促炎和抗炎途径的活性来实现感染或损伤期间的内部稳态。然而,在多种疾病状态下,该内部稳态失衡。例如,由所有革兰氏阴性细菌产生的内毒素(脂多糖, LPS) 活化巨噬细胞,使其释放可能致死的细胞因子(Tracey, K. J. et al., Science, 234 :470-74(1986) ;Dinarello, C. A., FASEB J., 8 :1314-25(1994) ;Wang, H., et al., Science, 285 :248-51(1999) ;Nathan, C. F., J. Clin. Invest., 79 :319-26(1987))。

[0007] 炎症病症(例如由内毒素暴露引起的脓毒性休克)通常由促炎细胞因子所诱导,例如肿瘤坏死因子(TNF,也被称为 TNF- α 或恶病质素)、白细胞介素(IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-18、干扰素 γ 、血小板激活因子(PAF)、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF) 以及其它化合物。促炎细胞因子通过在炎症细胞因子级联中的释放而促进各种病症。

[0008] 因此,存在炎症病症的治疗需求。

[0009] 发明概述

[0010] 一方面,提供了用于治疗炎症病症的包含有效量的膜联蛋白 A5 的组合物。

[0011] 按照本发明的一方面,提供了用于治疗炎症病症的包含有效量的膜联蛋白 A5 的治疗药物组合物。

[0012] 另一方面,提供了用于治疗器官功能障碍的包含有效量的膜联蛋白 A5 的组合物。

[0013] 另一方面,提供了用于治疗脓毒症的包含有效量的膜联蛋白 A5 的治疗药物组合物。

[0014] 另一方面,提供了用于在内毒素血症期间改善心脏功能的包含有效量的膜联蛋白 A5 的组合物。

[0015] 在本发明组合物或药物的任一方面中,组合物还可以包含一种或多种药剂。

[0016] 另一方面,提供了膜联蛋白 A5 在制备药物中的用途。

[0017] 另一方面,提供了膜联蛋白 A5 在制备用于治疗炎症病症的药物中的用途。

[0018] 另一方面,提供了膜联蛋白 A5 在制备用于治疗器官功能障碍、特别是治疗心脏功

能障碍的药物中的用途。

[0019] 另一方面,提供了膜联蛋白 A5 在制备用于治疗个体中的脓毒症的药物中的用途。

[0020] 另一方面,提供了治疗个体中炎症病症的方法,所述方法包括给予所述个体有效量的膜联蛋白 A5。

[0021] 另一方面,提供了治疗个体中器官功能障碍的方法,所述方法包括给予所述个体有效量的膜联蛋白 A5。

[0022] 按照本发明的另一方面,提供了治疗个体中脓毒症的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物有效量的膜联蛋白。在一些方面中,所述膜联蛋白是膜联蛋白 A5。

[0023] 另一方面,提供了膜联蛋白 A5 在制备用于改善个体中器官功能的药物中的用途。

[0024] 另一方面,提供了用于改善器官功能的包含有效量的膜联蛋白 A5 的组合物。

[0025] 另一方面,提供了改善个体中器官功能的方法,所述方法包括给予所述个体有效量的膜联蛋白 A5。

[0026] 另一方面,提供了试剂盒,所述试剂盒包括膜联蛋白 A5 和药学上可接受的载体以及制备包含膜联蛋白 A5 的药物的说明和 / 或给予膜联蛋白 A5 用于治疗炎症病症的说明。

[0027] 另一方面,提供了试剂盒,所述试剂盒包括膜联蛋白 A5 和药学上可接受的载体以及制备包含膜联蛋白 A5 的药物的说明和 / 或给予膜联蛋白 A5 用于治疗个体中器官功能障碍的说明。

[0028] 附图简要说明

[0029] 现在仅以举例的方式,参照附图来描述实施方案,其中

[0030] 图 1 显示膜联蛋白 A5 给药对内毒素血症小鼠的心脏功能的作用;

[0031] 图 2 显示膜联蛋白 A5 给药对内毒素血症小鼠的心肌 TNF- α mRNA 表达的作用;以及

[0032] 图 3 显示膜联蛋白 A5 给药对内毒素血症小鼠的心肌 TNF- α 蛋白表达的作用。

[0033] 图 4 证实了图 1 的实验,因为膜联蛋白 A5 (A5) 改善了内毒素血症小鼠的体内心脏功能。用盐水 (对照, 100 μ L, i. p.)、A5 (5 μ g/kg i. v.)、LPS (4mg/kg i. p.) 或 LPS 加 A5 处理小鼠 4 小时。A5 治疗显著增加了内毒素血症小鼠的 LV+dP/dt 和 -dP/dt。数据为平均值 $\pm$ 标准误,并通过双因素 ANOVA,随后通过用 Bonferroni 校正的非配对 Student's t- 检验进行分析。与对照相比 *P < 0.01;与 LPS 相比†P < 0.05;每组 n = 9-11。

[0034] 图 5 显示膜联蛋白 A5 (A5) 改善内毒素血症小鼠的离体心脏功能。用盐水 (对照, 100 μ L, i. p.)、A5 (5 μ g/kg i. v.)、LPS (4mg/kg i. p.) 或 LPS 加 A5 处理小鼠 4 小时。A5 治疗显著增加了内毒素血症小鼠的 +dF/dt, -dF/dt 和心脏做功。数据为平均值 $\pm$ 标准误,并通过双因素 ANOVA 随后通过用 Bonferroni 校正的非配对 Student's t- 检验进行分析。与对照相比 *P < 0.01;与 LPS 相比†P < 0.05;每组 n = 4-7。

[0035] 图 6A-D 显示了膜联蛋白 A5 (A5) 对内毒素血症小鼠中的 TNF- α 和 IL-1 β 产生的作用。用盐水 (对照, 100 μ L, i. p.)、A5 (5 μ g/kg i. v.)、LPS (4mg/kg i. p.) 或 LPS 加 A5 处理小鼠 4 小时。A 和 B :A5 治疗 (5 μ g/kg, i. v.) 显著降低了内毒素血症期的心肌 TNF- α mRNA 和蛋白表达。C 和 D :A5 治疗显著降低了内毒素血症期 TNF- α 和 IL-1 β 的血浆水平。数据为平均值 $\pm$ 标准误,并通过双因素 ANOVA 随后通过用 Bonferroni 校正的非配对 Student's t- 检验进行分析。与对照相比 *P < 0.01;与 LPS 相比†P < 0.05;每组 n = 8-12。

[0036] 图 7A 和 B 显示膜联蛋白 A5 (A5) 降低了内毒素血症期的心肌 p38 和 ERK1/2 MAPK 的磷酸化。用盐水 (对照, 100 μ L, i. p.)、A5 (5 μ g/kg i. v.)、LPS (4mg/kg i. p.) 或 LPS 加 A5 处理小鼠 30 分钟。A.: 心肌 p38 磷酸化。B.: ERK1/2 磷酸化。通过 western 印迹分析来确定 p38 和 ERK1/2 的磷酸化。数据为平均值 $\pm$ 标准误, 并通过双因素 ANOVA 随后通过用 Bonferroni 校正的非配对 Student's t- 检验进行分析。与对照相比 *P < 0.05; 与 LPS 相比 †P < 0.05; 每组 n = 4-6。

[0037] 图 8A 和 B 显示膜联蛋白 A5 (A5) 抑制成熟心肌细胞中的 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达。成熟心肌细胞培养于 35mm 皿中。在存在或不存在 A5 (1 μ g/ml) 的情况下, 用 LPS (2.5 μ g/ml) 处理细胞 6 小时。通过实时 RT-PCR 分析来测定 TNF- α (A) 和 IL-1 β (B) mRNA 水平, 用 28S 作为上样对照。数据为平均值 $\pm$ 标准误, 并通过双因素 ANOVA 随后通过用 Bonferroni 校正的非配对 Student's t- 检验进行分析。与对照相比 *P < 0.01, 与 LPS 相比 †P < 0.05; 每组 n = 3-4 个独立的实验。

[0038] 图 9 显示通过免疫共沉淀分析确定的膜联蛋白 A5 与心肌组织中的 TLR4 的相互作用。将心肌组织匀浆, 并与 0.5 μ g 膜联蛋白 A5 孵育。使用用抗 TLR4 抗体包被的磁珠拉下 (pull down) TLR4 蛋白。随后通过 Western 印迹分析膜联蛋白 A5。泳道 1: 来自盐水治疗小鼠的对照心肌样品。泳道 2: 来自 LPS 处理小鼠 (4mg/kg, i. p., 4 小时) 的心肌样品。泳道 3: 重组膜联蛋白 A5 阳性对照。显示的印迹是来自 3 次实验的代表。

[0039] 发明的详细描述

[0040] 本文描述了治疗炎症病症的方法和组合物。更具体而言, 本文描述了包含用膜联蛋白 A5 来治疗炎症病症的方法和组合物。在某些方面中, 所述病症是脓毒症。

[0041] 本文所用的“治疗”包括预防性和治疗性治疗。“预防性治疗”是指在炎症疾病状态开始之前治疗个体, 从而预防、抑制或降低它的发生。治疗性治疗是治疗已罹患炎症病症的个体。

[0042] “个体”可以是任何脊椎动物, 但通常涉及哺乳动物, 例如人类患者、驯养的动物 (例如狗或猫)、家畜 (例如马、牛和羊) 或实验室动物 (例如大鼠、小鼠、非人灵长类动物或豚鼠)。在某些实例中, 所述个体是人。

[0043] “炎症病症”通常由炎症细胞因子级联介导, 在本文中炎症细胞因子级联被定义为个体中至少一种促炎细胞因子从细胞的体内释放, 其中细胞因子释放影响个体的生理状况。产生促炎细胞因子的细胞的非限制性实例是单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、上皮细胞、成骨细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和神经元。

[0044] “细胞因子”是哺乳动物细胞天然产生的可溶性蛋白或肽, 并且在微摩尔至皮摩尔浓度下在体内作为体液调节物。无论在正常条件或病理条件下, 细胞因子可以调节个体细胞和组织的功能活性。促炎细胞因子是能引起任何下述炎症相关生理反应的细胞因子: 血管舒张、充血、血管增加的透过性伴有相关水肿、粒细胞和单核吞噬细胞的积累或纤维蛋白的沉积。促炎细胞因子的非限制性实例是肿瘤坏死因子 α (TNF)、白细胞介素 (IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-18、干扰素- γ 、HMG-1、血小板活化因子 (PAF) 和巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)。促炎细胞因子可以介导多种炎症病症的不利状况, 例如内毒素性休克、哮喘、风湿性关节炎、炎症胆汁病、心力衰竭和同种移植物排斥。

[0045] 促炎细胞因子应当与不是炎症调节物的诸如 IL-4、IL-10 和 IL-13 的抗炎细胞因

子区分开。在某些实例中,本文所述的膜联蛋白 A5 治疗不抑制抗炎细胞因子的释放。

[0046] 在某些实例中,本文所述的膜联蛋白 A5 治疗抑制 TNF 的促炎性效应。TNF 作为各种炎症病症中的调节物。几种这类实例包括:脓毒性休克、癌、AIDS、移植排斥、多发性硬化、糖尿病、风湿性关节炎、外伤、疟疾、脑膜炎、缺血再灌注损伤和成人呼吸窘迫综合征。

[0047] TNF 在数种炎症病症中发挥作用,并且因此进行了关于 TNF 疗法和抗 TNF 疗法的研究。研究集中于在炎症病症以及预防同种异体反应性和移植排斥中抑制 TNF 活性,所述炎症病症例如风湿性关节炎、克罗恩氏病、AIDS、细菌脓毒性休克(由某些革兰氏阴性菌引起)和细菌中毒性休克(由超抗原引起)。缺少 TNF 的突变小鼠对革兰氏阴性菌诱导的脓毒症具有抗性(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Capra, J. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York, N.Y.: Garland Publishers. 1999), 并且抗 TNF 单克隆抗体已用于抑制 TNF 活性和治疗内毒素血症(Beutler, B., Milsark, L., Cerami, A. 1985. Passive Immunization Against Cachectin/Tumor Necrosis Factor Protects Mice from Lethal Effects of Endotoxin(针对恶病质素/肿瘤坏死因子的被动免疫保护小鼠免于内毒素的致死效应). Science 229:867-871)。控制 TNF 活性的治疗的一个优势来自它在多种炎症类型中的作用。例如,通常难于确定烧伤和外伤患者中的炎症是否为感染性病因学的以及抗生素治疗是否合理;因此抑制 TNF 活性的治疗可能是有利的。抑制 TNF 活性的策略包括通过抗 TNF 抗体、可溶性受体或受体融合蛋白来中和细胞因子;通过诸如环孢霉素 A、糖皮质激素或细胞因子 IL-10 的药物来抑制 TNF- α 合成;通过重复的低剂量刺激来降低对 TNF 的反应性;或抑制诸如 IL-1、IL-6 或一氧化氮的次级调节物。本文所述的膜联蛋白 A5 治疗可用来抑制 TNF 活性。

[0048] 当涉及膜联蛋白 A5 对炎症病症的作用时,使用的术语“治疗”、“抑制”、“减小”或“减弱”包括由于膜联蛋白 A5 给药而使得被治疗的病症相关的症状具有至少小的但可检测到的减少。

[0049] 炎症病症可以是这样的:炎症细胞因子级联引起全身性反应,例如全身炎症反应综合征(SIRS)或脓毒性休克。可选择地,病症可以由局部炎症细胞因子级联介导,正如在风湿性关节炎中。可用本文所述的膜联蛋白 A5 治疗有效治疗的疾病状态的非限制性实例包括阑尾炎、消化性溃疡、胃溃疡、十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、溃疡性结肠炎、假膜性结肠炎、急性结肠炎、缺血性结肠炎、憩室炎、会厌炎、失弛缓症、胆管炎、胆囊炎、肝炎、克罗恩氏病、小肠炎、惠普尔氏病、过敏症、过敏性休克、免疫复合物病、多器官功能障碍综合征(MODS)、器官缺血、再灌注损伤、器官坏死、枯草热、全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症、败血症、内毒素性休克、恶病质、高热、嗜酸粒细胞肉芽肿、肉芽肿病、结节病、脓毒性流产、附睾炎、阴道炎、前列腺炎、尿道炎、支气管炎、肺气肿、鼻炎、肺炎、肺泡炎、细支气管炎、咽炎、胸膜炎、鼻窦炎、流感、呼吸道合胞体病毒感染、HIV 感染、AIDS、乙型肝炎病毒感染、丙型肝炎病毒感染、疱疹病毒感染、弥散性菌血症、登革热、念珠菌病、疟疾、丝虫病、阿米巴病、棘球囊肿病、烧伤、皮炎、皮肤炎、晒伤、风疹、疣、风团、血管炎、脉管炎、心内膜炎、动脉炎、动脉粥样硬化、心包炎、心肌炎、心肌缺血、结节性动脉周围炎、风湿热、阿尔察默病、乳糜泄、充血性心力衰竭、成人呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、多发性硬化、脑梗死、脑栓塞、格林-巴利综合征、神经炎、神经痛、脊髓损伤、麻痹、葡萄膜炎、关节炎性疹、关节痛、骨髓炎、筋膜炎、帕哲病、痛风、牙周病、风湿性关节炎、滑膜炎、重症肌无力、甲状腺炎、系统性红斑

狼疮、古德帕斯丘综合征、贝赫切特综合征、同种异体移植排斥、移植物抗宿主病、I 型糖尿病、肥胖症、强直性脊柱炎、伯格氏病、瑞特氏综合征和何杰金氏病。

[0050] 在某些非限制性实例中,所述炎性病症选自哮喘、过敏症、过敏性休克、多器官功能障碍综合征 (MODS)、器官缺血、缺血-再灌注损伤、器官坏死、SIRS、脓毒症、败血症、内毒素性休克、恶病质、脓毒性流产、弥散性菌血症、烧伤、乳糜泄、充血性心力衰竭、心肌炎、心肌缺血、成人呼吸窘迫综合征、脑梗死、脑栓塞、脊髓损伤、麻痹、同种异体移植排斥或移植物抗宿主病。

[0051] 在一个实例中,所述炎性病症是内毒素性休克。在另一个实例中,所述炎性病症是 SIRS。另一个实例中,所述炎性病症是脓毒症。另一个实例中,所述炎性病症是多器官功能障碍综合征 (MODS)。

[0052] 可以使用膜联蛋白 A5 来改善脓毒症期的器官功能(例如,心脏、肝脏、肺、肾脏或脑)。膜联蛋白 A5 还可以用来治疗全身炎症反应综合征 (SIRS) 期的全身器官损伤、外伤、或涉及缺血和再灌注的损伤。

[0053] 脓毒症是对感染的全身炎性反应,并且是重症监护病房中最常见的死因。脓毒症的死亡率为 20-30%,脓毒性休克的死亡率为 40-80% [1]。心肌功能障碍是脓毒性休克的常见并发症 [2]。该全身炎性病症是对感染的失调的宿主反应的结果,并且特征为过量的促炎细胞因子产生。宿主固有免疫反应的起始是通过在识别病原相关分子模式 (PAMP) 中细胞膜 toll 样受体-4 (TLR4) 的活化所介导。脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性菌外膜中最主要的 PAMP,并且以 CD-14 和 LPS 结合蛋白 (LBP) 依赖的方式与 TLR4 结合。通过 LPS 结合的 TLR4 活化起始导致丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的激活和 TNF 产生的信号通路, TNF 是重要的细胞因子并且是脓毒症中器官功能障碍(例如,心脏功能障碍)中起主要作用的因子 [3,4]。

[0054] 如果高度怀疑有感染或已证实有感染并满足下述全身炎症反应综合征 (SIRS) 标准中的两条或更多条,则认为存在脓毒症 (Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al (June 1992). " Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis (脓毒症和器官衰竭的定义和在脓毒症中使用创新疗法的准则). The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine". Chest 101(6):1644-55.) :

[0055] ● 心率 > 每分钟 90 次跳动 (心动过速) ;

[0056] ● 体温 < 36°C (96.8 °F) 或 > 38°C (100.4 °F) (低体温或发烧) ;

[0057] ● 呼吸速率 > 每分钟 20 次呼吸, 或血气 PaCO₂ 小于 32mm Hg (4.3kPa) (由于过度换气的呼吸急促或低碳酸血症) ;

[0058] ● 白细胞计数 < 4000 细胞/mm³ 或 > 12000 细胞/mm³ (< 4×10⁹ 或 > 12×10⁹ 细胞/L), 或大于 10% 带形 (未成熟白细胞) ; (白细胞减少症、白细胞增多症或杆状核粒细胞增多症)。

[0059] 发烧和白细胞增多症是急性期反应的特征, 而心动过速通常是血液动力不足的初始指征。呼吸急促可与由于感染和炎症的增加的代谢应激有关, 但是也可以是灌注不足的指征, 灌注不足导致厌氧菌细胞代谢的开始。

[0060] 对于儿童, 按照以下方式修改了 SIRS 标准 (Goldstein B, Giroir B, Randolph A (2005). " International pediatric sepsis consensus conference : definitions for

sepsis and organ dysfunction in pediatrics(国际儿科脓毒症会议:儿科中脓毒症和器官功能障碍的定义)".Pediatr Crit Care Med 6(1):2-8):

[0061] ●心率>不存在诸如疼痛和药物给予的刺激的情况下的年龄正常值+2倍标准差、或者不明原因持续升高30分钟至4小时。婴儿中还包括心率低于不存在迷走神经刺激物、 β -受体阻滞剂或先天性心脏病的情况下的年龄正常值的10个百分点,或不明原因的持续降低超过30分钟;

[0062] ●经口或经直肠、从Foley导管探头或从中央静脉导管探头获得的体温 $> 38.5^{\circ}\text{C}$ 或 $< 36^{\circ}\text{C}$ 。在儿科患者中,温度必须异常才能确定为SIRS;

[0063] ●呼吸速率>年龄正常值+2倍标准差,或需要人工呼吸,但与神经肌肉病或给予麻醉无关;

[0064] ●与化学疗法无关的白细胞计数相对于年龄升高或降低,或大于10%杆状白细胞+其它未成熟形式。

[0065] 本领域技术人员应当意识到,在临床环境中必须谨慎解释SIRS标准。存在这些标准的主要目的是更客观地对危重患者进行分类,以便将来的临床研究可以更严谨且更容易重复。

[0066] 随着反映临床经验的脓毒症指征和症状的最新列表,一致性定义也在不断演变。

[0067] 为了确定为脓毒症,必须有怀疑的或被证实(通过培养、染色或聚合酶链式反应(PCR))的感染,或具有感染特定的临床综合征。感染的特定证据包括正常情况下无菌液体(例如尿液或脑脊髓液(CSF))中的WBC、内脏穿孔的证据(腹部x-射线或CT扫描上的游离空气、急性腹膜炎指征)、符合肺炎的异常的胸部x-射线(CXR)(病灶处混浊)或瘀点、紫癜或爆发性紫癜。

[0068] 脓毒症更危重的亚类是重度脓毒症(伴有急性器官功能障碍的脓毒症)和脓毒性休克(伴有难治性低动脉压的脓毒症)。可选择地,当满足两条或更多条全身炎症反应综合征标准而没有感染证据时,可将患者简单地诊断为“SIRS”。SIRS和急性器官功能障碍患者可以称为“重度SIRS”。

[0069] 如果患者患脓毒症并伴有全身灌注不足(器官功能障碍或血清乳酸盐大于 4mmol/dL)的指征,则将他们确定为“重度脓毒症”。其它指征包括少尿和改变的精神状态。如果患者患脓毒症并伴有积极液体复苏(通常多至6升或 40ml/kg 的晶体)之后的血压过低,则也将他们确定为患有脓毒性休克。

[0070] 终末器官功能障碍的实例包括以下(Abraham E, Singer M(2007). "Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction(脓毒症诱导的器官功能障碍的机制)".Crit. Care Med. 35(10):2408-16):

[0071] ●肺--急性肺损伤(ALI)($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$);

[0072] ●脑--脑病(症状:焦虑、混乱、昏迷);(病因:缺血、出血、微血栓、微脓疡、多病灶坏死脑白质病);

[0073] ●肝脏--蛋白合成功能被破坏:由于不能合成凝血因子而表现为急性进行性凝血病;代谢功能被破坏:表现为胆红素代谢停止,导致非结合血清胆红素水平(间接胆红素)上升;

[0074] ●肾脏——少尿和无尿；电解质异常；容量过度负荷；

[0075] ●心脏——收缩性和舒张性心力衰竭，至少部分原因是降低肌细胞功能的细胞因子；细胞损伤，表现为肌钙蛋白泄露（但实际上未必缺血）。

[0076] 本文所述的膜联蛋白 A5 治疗并非意图用于治疗诸如弥散性血管内凝血（DIC）的血液凝固病症。在某些实例中，膜联蛋白 A5 用来治疗处于早期阶段的诸如脓毒症的炎症病症，从而预防诸如弥散性血管内凝血（DIC）的血液凝固病症的发生。

[0077] 本文所述的组合物和方法包含膜联蛋白分子，更通常为膜联蛋白多肽。

[0078] 在一个实例中，提供了包含膜联蛋白 A5 分子的组合物。

[0079] 膜联蛋白 A5 是 35kDa 的磷脂结合蛋白，是 13 个成员蛋白家族的一部分（表 1，Gerke et al., *Physiol Review* 2002 ;82 :331-371）。膜联蛋白 A5 以钙依赖的方式与质膜上的阳离子磷脂（例如磷脂酰丝氨酸）结合，并且通过在磷脂酰丝氨酸暴露的细胞表面上形成保护性 2D 结晶化的防护罩而表现出抗凋亡和抗凝血特征 [Reutelingsperger et al., *Cell Mol Life Sci* 1997 ;53 :527-532]。该保护性防护罩隔离细胞外因子复合的磷脂位点，并降低了它们起始吞噬作用或血栓形成的能力。

[0080] 膜联蛋白 A5 用于某些诊断方法和产品中，以下公司提供一些实例：

[0081] ● Affinity Research, UK；膜联蛋白 A5- 鉴定将要死亡的细胞；

[0082] ● Bender MedSystems GmbH, D；Bender MedSystems GmbH 通过 Boehringer Ingelheim 持有制备膜联蛋白 A5 的权利，并提供了膜联蛋白 A5 产品的多种不同的形式和缀合物；

[0083] ● Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA, 人重组膜联蛋白 A5；

[0084] ● Clontech, Palo Alto, CA；ApoAlert 膜联蛋白 A5 方案；

[0085] ● IQ Products, Groningen, NL；用于检测磷脂酰丝氨酸的膜联蛋白 A5；

[0086] ● Oncogene Research Products；AnxA5- 生物素、AnxA5-FITC 细胞凋亡检测试剂盒；

[0087] ● R&D Systems；AnxA5- 荧光素、AnxA5- 藻红蛋白；

[0088] ● Tau Technologies BV, NL；抗膜联蛋白 A5 抗体；

[0089] ● Trevigen, MD, USA；膜联蛋白 A5 细胞凋亡产品：TACS AnxA5-FITC、TACS AnxA5- 生物素。

[0090] 膜联蛋白 A5 基因序列的早期公布是 1987 年时关于内联蛋白 II 的公开中 (Schaeffer et al. 1987. Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium- and phospholipid-binding protein (内联蛋白 II 的结构和功能表征 - 钙结合和磷脂结合蛋白) *PNAS USA* 84 :6078-6082)。该蛋白的早期公布是在 1979 年的公开内容中 (Bohn, H and Kraus W. 1979. Isolation and characterization of a new placental specific protein (PP10) (新的胎盘特异性蛋白 (PP10) 的分离和表征). *Arch Gynecol* 227 :125-134)。

[0091] 膜联蛋白 A5 也被称为：胎盘抗凝血蛋白 I (Tait et al. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family (人胎盘抗凝血蛋白 -I 的磷脂结合特性 - 脂皮质蛋白家族成员) *J Biol Chem*. 1989 May 15 ;264(14) :7944-9 ;Grundmann et al. Characterization of

cDNA encoding human placental anticoagulant protein (PP4):homology with the lipocortin family(编码人胎盘抗凝血蛋白(PP4)的cDNA的表征:与脂皮质蛋白家族的同源性)Proc Natl Acad Sci U S A.1988 Jun;85(11):3708-12;血管抗凝血剂- α (Andree et al.1990.Binding of vascular anticoagulant alpha(VAC alpha) to planar phospholipid bilayers(血管抗凝血剂- α (VAC α)与平面磷脂双层的结合).J Biol Chem.1990 Mar 25;265(9):4923-8;内联蛋白II(Schaepfeet al.1987.Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium-and phospholipid-binding protein(内联蛋白II的结构和功能表征-钙结合和磷脂结合蛋白).PNAS USA 84:6078-6082);脂皮质蛋白V(Rothhut et al.A 32 kDa lipocortin from human mononuclear cells appears to be identical with the placentalinhibitor of blood coagulation(来自人单核细胞的32kDa脂皮质蛋白似乎与血液凝结的胎盘抑制剂相同).Biochem J.1989Nov 1;263(3):929-35);胎盘蛋白4(Inaba et al.Clinical significance of a new membrane associated placental protein 4 (PP4) in gynecologic malignancies(新的膜相关胎盘蛋白4(PP4)在妇科恶疾中的临床意义).Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.1986 Feb;38(2):265-6);以及锚定蛋白CII(Mollenhauer et al.Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen(摩尔分子量为31,000的膜蛋白锚定蛋白CII在与具有II型胶原蛋白的软骨细胞相互作用中的作用).J Cell Biol.1984 Apr;98(4):1572-9;von der Mark et al.Anchorin CII, a type II collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes(锚定蛋白CII-一种来自软骨细胞膜的II型胶原蛋白结合糖蛋白).Ann N Y Acad Sci.1985;460:214-23;Mauch et al.A defective cell surface collagen-binding protein in dermatosparactic sheep fibroblasts(位于dermatosparactic绵羊成纤维细胞中的缺陷细胞表面胶原蛋白结合蛋白).J Cell Biol.1988 Jan;106(1):205-11;Pilar et al.The structure of anchorin CII, a collagen binding protein分离的from chondrocyte membrane(从软骨细胞膜分离的胶原蛋白结合蛋白锚定蛋白CII的结构).J Biol Chem.1988Apr 25;263(12):5921-5)。

[0092] 不希望受到理论的束缚,本文所述的膜联蛋白A5治疗被证实通过抑制诸如TNF- α 的促炎细胞因子来治疗炎症病症。本文所述的膜联蛋白A5治疗并非意图作为抗凝血剂。因此,在某些实例中,膜联蛋白A5用来治疗炎症病症中的器官功能障碍,而不依赖抗凝血作用。

[0093] 包含膜联蛋白A5分子的组合物可用于治疗炎症病症。包含膜联蛋白A5分子的组合物可用于改善患炎症病症的个体的器官功能(例如,心脏、肝脏、肺、肾脏或脑)。包含膜联蛋白A5分子的组合物还可用于治疗与细胞因子(例如,TNF- α)产生相关的炎症病症。包含膜联蛋白A5分子的组合物还可用于治疗SIRS或脓毒症期的器官(例如,心脏、肝脏、肺、肾脏或脑)功能障碍或损伤。包含膜联蛋白A5分子的组合物还可用于治疗缺血或再灌注期的器官(例如,心脏、肝脏、肺、肾脏或脑)功能障碍或损伤。包含膜联蛋白A5分子的组合物还可用于治疗脓毒症以预防DIC的发生。

[0094] 包含膜联蛋白A5分子的组合物可用于治疗促炎细胞因子的抑制能提供预防性和

/或治疗性益处的任何病症。因此,治疗个体中炎性病症的方法包括给予能有效抑制促炎细胞因子(例如,TNF- α)活性的量的膜联蛋白 A5 分子。

[0095] 膜联蛋白 A5 分子可以是,但并非限制,全长天然存在的多肽或其变体,或编码膜联蛋白 A5 多肽或其变体的核酸分子。而且,提供了产生膜联蛋白 A5 分子的重组细胞。

[0096] 可以通过任何来源或方法提供膜联蛋白 A5 多肽,例如,天然分离物或重组或合成来源或以上的适当组合。将膜联蛋白 A5 多肽给予个体可用于治疗炎性病症,且更具体而言,可用于治疗炎性病症中的器官功能障碍。给予的膜联蛋白 A5 多肽的量应能有效抑制诸如 TNF- α 的促炎细胞因子。膜联蛋白 A5 多肽可以为任何长度,只要保留它的抗炎活性。膜联蛋白 A5 多肽的序列可以基于完整的或部分的天然存在的氨基酸序列。在制备治疗炎性病症或治疗炎性病症中的器官功能障碍的组合物中,可以单独使用膜联蛋白 A5 多肽或将其与其它抗炎多肽或其它类型的多肽联合使用。多肽是指具有生物学功能的氨基酸链,例如肽、寡肽或蛋白,但不是指具体长度的链。

[0097] 分离的膜联蛋白 A5 多肽是从它的天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的多肽。通常通过至少一个纯化步骤来纯化分离的多肽,并且在一些实施方案中,纯化可以达到(1)足以通过使用测序仪获得 N-端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度,或(2)通过非还原或还原条件下使用考马斯亮蓝或优选银染的 SDS-PAGE 的同质性。分离的多肽包括重组细胞中的原位多肽,因为膜联蛋白 A5 多肽天然环境的至少一种组分不会存在。可以通过合成或重组技术来产生分离的多肽,例如 J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验手册), 第二版, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 中所述。由重组技术产生的分离的多肽可以被称为重组多肽。

[0098] 编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸可以是任何核酸分子,例如, cDNA、基因组 DNA、合成的 DNA 或 RNA 来源或以上的适当组合。将编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸给予个体可用于治疗炎性病症,且更具体而言,可用于治疗炎性病症中的器官功能障碍。给予的膜联蛋白 A5 核酸的量应能有效抑制诸如 TNF 的促炎细胞因子。所述核酸可以为任何长度,只要所编码的膜联蛋白 A5 多肽保留了抗炎活性。编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸的序列可以基于完整的或部分的天然存在的核酸序列。在制备治疗炎性病症或治疗炎性病症中的器官功能障碍的组合物中,可以单独使用编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列或将其与编码抗炎多肽或编码任何其它所需多肽的其它核酸序列联合使用。

[0099] 编码膜联蛋白 A5 多肽的分离的核酸分子是从至少一种污染性核酸分子中鉴定和分离出的核酸分子,所述分离的核酸分子在其天然来源中通常与所述污染性核酸核酸相关联。这类分离的核酸分子不是它在自然中的形式或环境。因此,分离的核酸分子不同于它在天然细胞中存在时的核酸分子。编码膜联蛋白 A5 多肽的分离的核酸分子包括通常表达膜联蛋白 A5 多肽的细胞中含有的编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸分子,例如,所述核酸分子位于与天然细胞不同的染色体或染色体外的位置。所述分离的核酸分子可以被称为重组的核酸分子,其中用重组技术操控分离的核酸分子,例如, J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验手册), 第二版, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 中所述。

[0100] 变体包括而不限于,类似物、衍生物、片段、截短、剪接变体、突变体、缺失、取代、插

入、融合等。

[0101] 可以以任何所需的方式(例如,任何数量的缺失、插入或取代或其组合)来突变或改变或衍生膜联蛋白 A5 多肽或编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸,以产生相应的变体。考虑到了这类变体在治疗炎症病症或治疗炎症病症中的器官功能障碍中的用途,并且可以以任何方式分别相对于天然存在的核酸或多肽序列来突变或改变或衍生这类变体核酸或变体多肽,只要保留抗炎活性。同样,可以容许与对应的天然存在的核酸或多肽序列具有不同程度的序列同一性而没有失去抗炎活性的核酸或多肽。例如,组合物可以包含具有下述序列的膜联蛋白 A5 多肽:所述序列与膜联蛋白 A5 多肽的天然存在形式或其变体相同,所述变体具有的序列与膜联蛋白 A5 多肽的天然存在形式至少 80% 相同。作为另一个实例,组合物可以包含具有下述编码序列的核酸分子:所述编码序列与膜联蛋白 A5 多肽编码序列的天然存在形式或其变体相同,所述变体具有的序列与膜联蛋白 A5 多肽编码序列的天然存在形式至少 70% 相同。通过基于计算机的方法测定蛋白和核酸序列同一性以及用高严紧性条件来确定或鉴定共享高(例如,至少 70%)序列同一性的核酸序列的核酸杂交技术是本领域技术人员所公知的。

[0102] 本领域技术人员可容易确定杂交反应的严紧性,并且杂交反应的严紧性通常是根根据探针长度、洗涤温度和盐浓度而凭经验推算。通常,为了合适的退火,较长的探针需要较高的温度,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于当互补链存在于低于它们的熔解温度的环境时变性的 DNA 再退火能力。探针和可杂交序列之间的序列同一性程度越高,可以使用的相对温度越高。如下所述的可鉴定为高严紧性条件:(1) 使用低离子强度和高温来洗涤,例如 50°C 下 0.015M 氯化钠 / 0.0015M 柠檬酸钠 / 0.1% 十二烷基硫酸钠;(2) 杂交期间使用诸如甲酰胺的变性剂,例如,42°C 下具有 0.1% 牛血清白蛋白的 50% (v/v) 甲酰胺 / 0.1% 聚蔗糖 (Ficoll) / 0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 / 具有 750mM 氯化钠、75mM 柠檬酸钠的 pH 6.5 的 50mM 磷酸钠缓冲液;或 (3) 使用 42°C 的 50% 甲酰胺、5×SSC (0.75M NaCl、0.075M 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠 (pH 6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5×Denhardt's 溶液、超声处理的鲑鱼精 DNA (50 μg/ml)、0.1% SDS 和 10% 硫酸葡聚糖,并且在 42°C 下 0.2×SSC (氯化钠 / 柠檬酸钠) 和在 55°C 下 50% 甲酰胺中洗涤,随后为 55°C 下含有 EDTA 的 0.1×SSC 组成的高严紧性洗涤。杂交和洗涤时间应足够达到平衡。

[0103] 氨基酸或核酸序列相对于膜联蛋白 A5 多肽和编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列的序列同一性百分比(%)是候选序列中与膜联蛋白 A5 多肽氨基酸序列或编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列相同的残基的百分比,视情况,这可以是在比对序列和如果需要引入空位以达到最大序列同一性百分比之后。可以用不同方法实现为了测定氨基酸序列同一性百分比或核酸序列同一性百分比的比对,这些方法是本领域现有技术,例如,使用公众可获得的计算机软件,例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适的参数,包括实现在所需序列长度上的最大比对所需要的算法,例如,比较序列的至少 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 或 200 个残基或者甚至是全长。

[0104] 对于膜联蛋白 A5 多肽或其变体,变体膜联蛋白 A5 多肽具有的氨基酸序列通常与对应的膜联蛋白 A5 多肽是至少 80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96% 或 98% 同一的。

[0105] 对于编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列或其变体,变体核酸序列通常与对应的编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸是至少 70%、72%、74%、76%、78%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、96%或 98%同一的。

[0106] 产生变体的技术和策略在本领域内是公知的。在一个实例中,就多肽而言,可以通过糖基化、酰胺化、磷酸化、羧化、截短化、片段化、取代等但不消除抗炎活性而在体内或体外修饰膜联蛋白 A5 多肽。在另一个实例中,就核酸而言,可以在编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸中进行取代突变,使得特定密码子变成编码不同氨基酸的密码子。可以以非保守型方式(即,通过将密码子从属于具有特定大小和特征的氨基酸分类的氨基酸变成属于另一分类的氨基酸)或保守型方式(即,通过将密码子从属于具有特定大小和特征的氨基酸分类的氨基酸变成属于同一分类的氨基酸)进行这类取代突变,从而改变产生的蛋白中的氨基酸。这类保守型改变通常导致产生的蛋白的结构和功能的较小的变化。非保守型改变更可能改变产生的蛋白的结构、活性或功能。氨基酸分类是本领域技术人员已知的。例如,非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。含有芳香环结构的氨基酸是苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。可以容许任何数量的这些取代或任何其它类型的改变(例如,缺失或插入)或修饰,只要没有消除抗炎效应。

[0107] 包含膜联蛋白 A5 多肽或编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列的重组细胞可用于治疗炎症病症或治疗炎症病症中的器官功能障碍。重组细胞类型可以包括与意图选择治疗的个体的生理学相容的任何细胞类型。

[0108] 可以改变或修饰细胞,以使其包含非天然存在于细胞中的核酸序列,并且因此认为细胞是重组的。在其它的实例中,可以改变或修饰细胞,以使其包含天然存在于细胞中的核酸序列的其它拷贝,并且这样的细胞也被认为是重组的。本领域技术人员应当理解,可以用任何已知技术将编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸引入细胞,例如,显微注射、电穿孔、病毒转染、lipofectamine 转染、磷酸钙沉淀等。在某些非限制性实例中,可以通过引入编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸分子来修饰干细胞,然后将修饰过的细胞给予个体。在某些其它实例中,可以将编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸分子并入诸如病毒构建体的适当的构建体或媒介中,并给予个体,使得个体的至少一部分细胞中引入并表达编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸分子。

[0109] 通常在适当载体的情况下,可以将编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸可操作地连接于控制序列。有用的控制序列可以是核酸序列的编码序列的表达所必需的或对表达有利的任何核酸元件。每个控制序列对于编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列来说,可以是内源的或外源的。这类控制序列包括但不限于,前导子、多腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号序列或转录终止子。本领域技术人员容易获得并入控制序列的备选方案。例如,编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸可以在内源上游启动子的控制下,或者可以将它置于异源上游启动子的控制下。指导膜联蛋白 A5 核苷酸序列在细菌宿主中转录的合适的启动子的实例包括大肠杆菌 lac 操纵子的启动子、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂酶基因 dagA 启动子、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) α -淀粉酶基因 (amyL) 的启动子、嗜热脂

肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 麦芽糖淀粉酶基因 (amyM) 的启动子、节淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) α -淀粉酶基因 (amyQ) 的启动子、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) xylA 和 xylB 基因的启动子、枯草芽孢杆菌 aprE 基因的启动子以及来自乳球菌 (*Lactococcus* sp.) 来源的启动子的启动子, 包括 P170 启动子。当编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸在诸如大肠杆菌的细菌物种中表达时, 适当的启动子可以选自例如噬菌体启动子中, 所述噬菌体启动子包括 T7 启动子和噬菌体 λ 启动子。

[0110] 对于真菌物种中的转录, 有用的启动子的实例是来自编码下述蛋白的基因的那些启动子: 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) TAKA 淀粉酶、米赫根毛菌 (*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 中性 α -淀粉酶、黑曲霉耐酸性 α -淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、米赫根毛菌脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶或构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 乙酰胺酶。

[0111] 用于酵母物种中表达的适当启动子的实例包括但不限于酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Gal 1 和 Gal 10 启动子和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) AOX1 或 AOX2 启动子。

[0112] 本领域技术人员还可获得其它启动子, 例如, 巨细胞病毒、劳氏肉瘤病毒、合成的 pox 病毒启动子、pox 合成的晚期启动子 1、pox 合成的晚期启动子 2、早期启动子 2、pox 01L 启动子、pox 14L 启动子、pox 13L 启动子; pox 12L 启动子、pox 11L 启动子、pox D10R 启动子、PRV gX、HSV-1 α 4、鸡 β -肌动蛋白启动子、HCMV 即早期、MDV gA、MDV gB、MDV gD、ILT gB、BHV-1. 1VP8 和 ILT gD 以及内部核糖体进入位点启动子。

[0113] 适当的载体可以是能合并编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列和任何所需的控制序列中, 并能引起所述核酸序列表达的任何载体 (例如, 质粒或病毒)。载体的选择通常取决于载体与所述载体被引入的宿主细胞之间的相容性。在某些实例中, 载体可以作为染色体外的实体存在, 其复制不依赖于染色体复制, 例如, 质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。在其它实例中, 载体可以是这样的: 当所述载体被引入宿主细胞中时被整合进基因组并与其被整合进的染色体共同复制。载体和操纵载体的技术的其它实例是已知的且对本领域技术人员是显而易见的。

[0114] 重组细胞可以单独包含膜联蛋白 A5 多肽或编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列, 或包含膜联蛋白 A5 多肽或编码膜联蛋白 A5 多肽的核酸序列分别与其它所需的多肽或核酸分子的组合, 例如为了优化或提高效率。而且, 在引入细胞之前, 可以视情况将核酸序列突变或改变, 例如为了特定细胞类型中表达的密码子优化。此外, 在应用中可以视情况改变核酸序列, 使其编码膜联蛋白 A5 多肽与一种或多种其它多肽的融合, 例如与靶向多肽或载体多肽的融合。

[0115] 本领域技术人员应当意识到, 本文所述的关于膜联蛋白 A5 分子和包含膜联蛋白 A5 分子的细胞的变体可以同等地应用于与膜联蛋白 A5 分子和包含膜联蛋白 A5 分子的细胞联合使用的其它多肽、核酸分子和细胞。在某些实例中, 抗炎多肽、编码抗炎多肽的核酸分子或产生抗炎多肽的细胞可以与膜联蛋白 A5 分子或产生膜联蛋白 A5 分子的细胞联合使用。在某些实例中, 膜联蛋白 A5 分子与膜联蛋白 1 分子联合使用。

[0116] 本领域技术人员应当理解, 可以以各种方式给予多肽、核酸分子或细胞。例如, 可以肌肉内给药、皮下给药、静脉内给药、鼻内给药、皮内给药、囊内给药、胚蛋给药、眼部给

药、口服给药、气管内给药或支气管内给药,以及这些形式的组合。剂量可以随着目标个体的体型而变化。给药的方法是本领域技术人员已知的,例如,参见美国专利第 5,693,622 号、第 5,589,466 号、第 5,580,859 号和第 5,566,064 号。制备组合物所需的多肽、核酸序列或重组细胞的量是本领域技术人员公知的。

[0117] 还可以在动物研究中确定治疗有效量。可以根据相对的生物利用度和给予的化合物的药效(包括所用的佐剂)来调整施用的膜联蛋白 A5 的剂量。根据上述方法和其它方法调整剂量以达到最大效力是本领域技术人员公知的。本文所述的膜联蛋白 A5 的个体剂量的可以通常为约 0.1 μ g-10,000mg,更通常为约 1 μ g/天-8000mg,更通常为约 10 μ g-5mg 并且最通常为约 10 μ g-100pg。如果以个体体重换算的话,通常剂量为约 0.1 μ g-20mg/kg/天,更通常为约 1-10mg/kg/天,且最通常为约 1-5mg/kg/天,但是每天的剂量可以大于 20mg/kg/天或小于 0.1 μ g/kg/天。例如,在一些实施方案中,给予的膜联蛋白 A5 的量可以少于或等于 1.0mg/kg/天。这包括等于或少于 0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1mg/kg/天的量。给予的膜联蛋白 A5 的量还可以少于或等于 0.1mg/kg/天(例如,少于或等于 0.09、0.08、0.07、0.06、0.5、0.04、0.03、0.02 或 0.01mg/kg/天)。在一些实施方案中,给予的试剂为约 0.005mg/kg/天至小于 1.0mg/kg/天(或约 0.005mg/kg/天至等于或小于 0.1mg/kg/天)。在一些实施方案中,大于 20mg/kg/天。在一些实施方案中(例如,在特别针对有发展为炎症病症的风险的个体的方法中),包含膜联蛋白 A5 和/或功能等同物的试剂的给药安排可能是重要的。例如,可以按固定安排对个体进行给药。本文所用的“固定安排”是指预先指定的时间段。所述固定安排可以包括长度相同或不同的时间段,只要所述安排是预定的。例如,固定安排可以包括以下给药方式:每天、每两天、每三天、每四天、每五天、每六天、每周、每月或其之间的任何天数或周数、每两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、十二个月等。可选择地,预定的固定安排可以包括第一周每天给药,之后的数月每月给药,之后每三个月给药。固定安排包括任何具体组合,只要其是预先确定的,合适的安排包括在某天进行给药。

[0118] 本文所述的多肽、核酸或重组细胞可以与药学上可接受的载体组合使用,以用于制备治疗炎症病症或治疗炎症病症中的器官功能障碍的组合物。药学上可接受的载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于蛋白、糖类等。这类适当的载体的一个实例是含有一种或多种稳定剂的生理学平衡的培养基,所述稳定剂例如水解的蛋白、乳糖等。可接受的载体的另一个实例是 0.01-0.1M、优选为 0.05M 的磷酸盐缓冲液或 0.8% 的盐水。可接受的载体可以是水性或非水性溶液、悬液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、诸如橄榄油的植物油以及诸如油酸乙酯的可注射的有机酯。水性载体的实例是水、酒精/水溶液、乳液或悬液,包括盐水和缓冲介质。防腐剂和药物组合物的其它添加剂也是本领域技术人员公知的,例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体、有机酸等。这类合适载体的另一个实例是包含天然的或合成的细胞外基质材料的生物材料。

[0119] 包含膜联蛋白 A5 的本发明的组合物还可以包含治疗炎症病症所需的其它药剂。例如,但并非限制,在治疗脓毒症中,膜联蛋白 A5 组合物还可以包含如用于治疗脓毒症的一种或多种抗生素或血管加压剂和/或皮质类固醇。因此,基于待治疗的根本疾病状况来选择其它的药物。

[0120] 考虑到包含与药学上可接受的载体组合的本文所述的多肽、核酸或重组细胞的试

剂盒。试剂盒通常包含制备包含膜联蛋白 A5 的药物的说明和 / 或给予膜联蛋白 A5 用于改善患炎症病症的个体的器官功能的说明。

[0121] 当介绍本文所公开的元件时,冠词“a”“an”“the”和“所述(said)”意图表示存在一个或多个所述元件,除非文中有其它指示。例如,术语“化合物”和“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括其混合物。术语“包含(comprising)”、“具有(having)”“包括(including)”意图表示开放式的,并且表示在所列出元件之外可以具有其它元件。短语“本质上由...组成”意图限于指定的元件和不会明显影响指定元件的组合的基本特征和新特征的其它元件。例如,用短语“本质上由...组成”限定的组合物包含任何已知的药学上可接受的添加剂、赋形剂、稀释剂、载体等。

[0122] 上面详细的说明仅是为了示例目的,并非意图限制权利要求的范围。通过参考下面具体的实施例可以获得更完整的理解。描述的实施例仅为示例目的,并非意图限制权利要求的范围。当情况可能提示或使之更合适时,考虑到形式上的变化和等同物的替换。尽管本文使用了具体的术语,但这类术语意图是说明性意义而非限制性目的。

实施例

[0123] 实施例 1 :实施例 2 和 3 中所用的方法

[0124] 动物 :本研究符合美国国立卫生研究院 (US National Institutes of Health) (NIH 公开号第 85-23 号,1996 年修订) 公布的实验室防护和使用指导 (Guide for the Care and Use of Laboratory)。动物的使用获得加拿大西安大略大学 (University of Western Ontario) 动物使用委员会批准。从 Jackson 实验室购得 C57BL/6 小鼠。在 Lawson 健康研究所动物管理中心进行繁育程序至产崽。研究使用体重 21-26g 的成年 (3-4 月龄) 雄性小鼠。

[0125] 实验方案 :将小鼠随机分配至以下组中 :盐水 (对照, $n = 5$)、脂多糖 (LPS, $n = 7$) 和 LPS 加重组人膜联蛋白 A5 处理组 ($n = 6$)。利用 LPS (4mg/kg, i. p.) 来模拟脓毒症。在给予 LPS 后立即和 2 小时后,注射两次重组人膜联蛋白 A5 (5 μ g/kg, i. v.) 来治疗小鼠。给予 LPS 后 4 小时,处死小鼠并分离心脏。用兰根道尔夫 (Langendorff) 心脏制备来测量心脏功能。在心脏功能测量结束时,将心脏贮存于 -80°C 冷藏室用于心肌 TNF 表达分析。

[0126] 通过实时 RT-PCR 检测 TNF mRNA :如之前的描述 [7,8], 用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Burlington, Ontario) 从 LV 心肌分离总 RNA。用 M-MLV 逆转录酶和随机引物 (Invitrogen) 来合成 cDNA。使用 SYBR Green PCR Master Mix 按照生产商的说明书 (Abm, Vecouver, BC) 进行实时 PCR。TNF 的寡核苷酸引物 :有义为 5' CCG ATG GGT TGT ACC TTG TC 3' 和反义为 5' GGG CTG GGT AGA GAA TGG AT 3'。用 28S rRNA 作为上样对照,使用有义为 5' TTG AAA ATC CGG GGG AGA G 3' 和反义为 5' ACA TTG TTC CAA CAT GCC AG 3' 的寡核苷酸引物。用 MJ Research Opticon 实时 PCR 仪器将样品扩增 35 个循环。获得的 TNF mRNA 相对于 28S rRNA 的水平与之前的报道相似 [9]。

[0127] TNF 蛋白水平的检测 :用小鼠 TNF ELISA 试剂盒 (Cedarlane Laboratory, Mississauga, Ontario) 按照之前报道中所描述的 [7,10] 来检测左心室 (LV) 心肌 TNF 蛋白水平。将 LV 心肌组织在 PBS 中匀浆。离心后,收集上清用于蛋白浓度和 TNF ELISA。用每个样品的蛋白浓度将 TNF 检测结果标准化,并表示为 pg/mg 蛋白。

[0128] 分离的小鼠心脏制备:在盐水、LPS 或 LPS 加膜联蛋白 A5 处理 4 小时后,处死小鼠。分离小鼠心脏并在兰根道尔夫系统中灌流,按之前的描述 [10] 测定心脏功能。简单而言,用 Krebs-Henseleit 缓冲液以 2mL/ 分钟恒流对心脏进行灌流。灌流缓冲液保持在 37℃,并用 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合物使缓冲液持续冒泡。将 6-0 丝线穿过左心室的心尖放置并将其穿过轻重量刚性连接杆,所述轻重量刚性连接杆与张力-变位换能器 (FT03, Grass Instrument Co.) 连接。通过 PowerLab Chart 程序 (ADInstruments, Mountain View, CA) 测量收缩力和心率。通过张力 (g) 乘以心率 (搏动数 / 分钟) 并用心脏重量标准化来计算心脏做功。

[0129] 统计学分析:将所有结果表示为平均值 ± 标准误。用单因素方差 (ANOVA) 分析,随后用 Newman-Keul's 事后检验来检查处理组之间的差异。当 P 值小于 0.05 时,认为有统计学显著性。

[0130] 实施例 2:膜联蛋白 A5 对脓毒症模型中心脏功能的作用

[0131] 脓毒症是常见的临床问题,占有医院或重症监护室入院的 2-11% [11,12]。尽管在过去的 20 年进行了大量研究工作,但是脓毒症仍是重症监护室中的主要死亡原因。心肌功能障碍常见于重度脓毒症患者,并且使脓毒症患者有发展为与高死亡率相关的多器官衰竭的风险 [13]。内毒素或 LPS 是脓毒症期引起心肌衰弱的主要病原 [3,4]。LPS 对心脏功能的抑制效应是通过促炎细胞因子的产生而诱导的 [14]。在这些细胞因子中, TNF-α 被认为是脓毒症期心脏功能障碍的主要因子之一 [4,15]。LPS 激发之后,心肌细胞合成 TNF-α [15-17],且心肌中产生的高水平的 TNF-α 有助于心脏功能障碍的发展 [17]。

[0132] 为了模拟人的重度脓毒症,由 LPS 诱导的内毒素血症的啮齿动物模型被广泛作为研究脓毒症的工具 [8,10]。LPS 处理与脓毒症样症状相关,并伴随类似于脓毒症患者的血液学改变 [18]。而且,在内毒素血症中包括 TNF-α 在内的细胞因子表达显著增加 [8,10]。此外,之前的研究已经表明 LPS 诱导显著的的心脏功能障碍,正如小鼠收缩性和舒张性功能减弱以及平均动脉压降低所表明的 [Xiang et al., Circulation;2009;120:1065-1074]。总之,这些研究提示内毒素血症是人脓毒症的良好模型。

[0133] 图 1 表明膜联蛋白 A5 改善患内毒素血症小鼠的心脏功能。用 LPS 处理小鼠 4 小时 (4mg/kg i. p., n = 7) 来诱导造成心脏功能障碍的内毒素血症。相比于单独的 LPS,膜联蛋白 A5 的治疗 (5 μg/kg i. v., n = 6) 显著改善了心脏功能。盐水治疗 (100 μL, i. p) 充当对照 (n = 4)。数据是平均值 ± 标准误,并通过单因素 ANOVA 随后通过 Newman-Keul's 检验进行分析。与对照相比 *P < 0.01,与 LPS 相比 #P < 0.05。

[0134] 盐水、LPS 或 LPS 加膜联蛋白 A5 处理后 4 小时,处死动物并用兰根道尔夫心脏制备来测定心脏功能。记录心率和收缩力。分析心脏做功和收缩率 (+dF/dt_{最大值}) 与舒张率 (-dF/dt_{最小值})。结果表明与对照组比较,LPS 处理组中的收缩率与舒张率、收缩力和心脏做功都显著降低 (图 1, *P < 0.001)。与 LPS 组比较,重组人膜联蛋白 A5 的治疗显著改善了所有 4 项心脏参数 (图 1, #P < 0.01)。

[0135] 实施例 3:膜联蛋白 A5 对心肌 TNF 表达的影响

[0136] 图 2 显示膜联蛋白 A5 对内毒素血症小鼠中心肌 TNF mRNA 表达的影响。用 LPS 处理小鼠 4 小时 (4mg/kg i. p., n = 7) 来诱导内毒素血症和相比于对照的显著心肌 TNF mRNA 表达。与单独的 LPS 相比,膜联蛋白 A5 治疗 (5 μg/kg i. v., n = 6) 显著降低了心肌 TNF

mRNA 表达。盐水治疗 (100 μ L, i. p) 充当对照 (n = 5)。通过实时 RT-PCR 测定 TNF mRNA 水平。数据是平均值 $\pm$ 标准误,并用单因素方差 (ANOVA),随后进行 Newman-Keul's 检验进行分析。与对照相比 *P < 0.01,与 LPS 相比 #P < 0.05。

[0137] 图 3 显示膜联蛋白 A5 对内毒素血症小鼠中心肌 TNF 蛋白表达的影响。用 LPS 处理小鼠 4 小时 (4mg/kg i. p., n = 5) 来诱导内毒素血症和相比于对照的显著心肌 TNF 蛋白表达。与单独的 LPS 相比,膜联蛋白 A5 治疗 (5 μ g/kg i. v., n = 6) 显著降低了心肌 TNF 蛋白表达。盐水治疗 (100 μ L, i. p) 充当对照 (n = 4)。通过 ELISA 测定 TNF 蛋白水平。数据是平均值 $\pm$ 标准误,并用单因素方差 (ANOVA),随后进行 Newman-Keul's 检验进行分析。与对照相比 *P < 0.01,与 LPS 相比 #P < 0.05。

[0138] 盐水、LPS 或 LPS 加膜联蛋白 A5 处理后 4 小时,分别通过实时 RT-PCR 和 ELISA 来测定心肌 TNF mRNA 和蛋白表达。与盐水治疗的对照相比,LPS 处理的小鼠的 LV 心肌中 TNF mRNA 和蛋白水平都显著增加 (P < 0.01)。膜联蛋白 A5 治疗显著降低了由 LPS 诱导的 TNF 表达 (P < 0.05)。

[0139] 在本研究中,使用脓毒症的小鼠模型小鼠内毒素血症来检查 LPS 激发期间重组人膜联蛋白 A5 对心脏功能的作用。为了避免心脏的心血管反射和负荷状态可能对心脏功能测量结果的影响,使用了分离的兰根道尔夫心脏制备。LPS 诱导心脏功能障碍,膜联蛋白 A5 治疗部分地恢复该心脏功能障碍。本结果首次表明:膜联蛋白 A5 改善小鼠内毒素血症期的心脏功能。尽管膜联蛋白 A5 与膜联蛋白 A1 属于同一膜联蛋白超家族,但是它们是由不同基因编码的分别的蛋白 [5]。为了确定膜联蛋白 A5 是否具有抗炎效应,测定了心肌 TNF- α 表达。图 2 和 3 提供的结果表明:膜联蛋白 A5 治疗显著降低了内毒素血症期 LV 心肌中的 TNF- α 的 mRNA 和蛋白水平,提示具有抗炎效应。由于 TNF- α 产生是脓毒症期心脏功能障碍的主要促成因素,所以心肌 TNF- α 表达的降低代表膜联蛋白 A5 改善内毒素血症模型中的心脏功能的重要机制。

[0140] 实施例 4- 实施例 5-10 的实验方案

[0141] 将小鼠随机分配至下组中:盐水 (对照, n = 15)、重组人膜联蛋白 A5 (n = 11)、脂多糖 (LPS, n = 16) 和 LPS 加重重组人膜联蛋白 A5 处理组 (n = 17)。给予 LPS (4mg/kg, i. p.) 来模拟脓毒症。在给予 LPS 后立即和 2 小时,注射两次重组人膜联蛋白 A5 (5 μ g/kg, i. v.) 来治疗小鼠。给予 LPS 后 4 小时,用开他敏 (50mg/kg) 和甲苯噻嗪 (12.5mg/kg) 混合物的 IP 注射来麻醉小鼠,并用 Millar 压力电导导管来测定体内心脏功能。处死一些小鼠,抽血并分离心脏。用兰根道尔夫心脏制备来测定离体心脏功能。在心脏功能检测结束时,将血浆和心脏贮存于 -80°C 冷藏室用于进一步的分析。

[0142] 血液动力学检测

[0143] 在 LPS 和 / 或膜联蛋白 A5 处理 4 小时后,用开他敏和甲苯噻嗪麻醉小鼠。将 Millar 压力电导导管 (型号 SPR-839, 尺寸 1.4F) 插入右颈动脉并深入至 LV。稳定 10 分钟后,用 PowerLab Chart 程序 (ADInstruments, Mountain View, CA) 连续记录信号。通过心脏压力容积分析程序 (PVAN 3.2; Millar Instruments, TX) 如之前的描述 (Xiang et al. Circulation. 2009, 120 :1065-1074) 来分析血液动力学参数。

[0144] 分离的小鼠心脏制备

[0145] 在 LPS 和 / 或膜联蛋白 A5 处理 4 小时后,处死小鼠。分离小鼠心脏并在兰根道尔

夫系统中灌流,按之前的描述 [Peng et al., Circulation. 2005 ;111 :1637-1644] 测定心脏功能。简单而言,用 Krebs-Henseleit 缓冲液以 2mL/ 分钟恒流对心脏进行灌流。灌流缓冲液保持在 37℃,并用 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合物使缓冲液持续冒泡。将 6-0 丝线穿过左心室的心尖放置并将其穿过轻重量刚性连接杆,所述轻重量刚性连接杆与张力-变位换能器 (FT03, Grass Instrument Co.) 连接。通过 PowerLab Chart 程序 (ADInstruments, Mountain View, CA) 测量收缩力和心率。通过张力 (g) 乘以心率 (搏动数 / 分钟) 并用心脏重量标准化来计算心脏做功。

[0146] 通过实时 RT-PCR 测定 TNF- α 和白细胞介素 (IL)-1 β mRNA

[0147] 如之前的描述 (Peng et al., Cardiovasc Res. 2003 ;59 :893-900 ; Geoghegan-Morphet et al., Cardiovasc Res. 2007 ;75 :408-416) 用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Burlington, Ontario) 从 LV 心肌和心肌细胞分离总 RNA。用 M-MLV 逆转录酶和随机引物 (Invitrogen, Burlington, Ontario) 来合成 cDNA。使用 SYBR Green PCR Master Mix 按照生产商的说明 (Abm, Vecouver, BC) 进行实时 PCR。TNF- α 的寡核苷酸引物:有义为 5' CCG ATG GGT TGT ACC TTG TC 3' 和反义为 5' GGG CTG GGT AGA GAA TGGAT 3'。IL-1 β 的引物:有义为 5' ACAAGGAGAACCAAGCAACGAC 3' 和反义为 5' GCTGATGTACCAGTTGGGAAC 3'。将 28S rRNA 用作上样对照,使用有义为 5' TTG AAAATC CGG GGG AGA G 3' 和反义为 5' ACA TTG TTC CAA CAT GCC AG 3' 的寡核苷酸引物。用 MJ Research Opticon 实时 PCR 仪器将样品扩增 35 个循环。

[0148] TNF- α 和 IL-1 β 蛋白水平的检测

[0149] 用小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (Cedarlane Laboratory, Mississauga, Ontario) 如申请人之前报道 8,9 中的描述来测定心肌和血浆 TNF- α 蛋白水平。将左心室 (LV) 心肌组织在 PBS 中匀浆。离心后,收集上清用于蛋白浓度和 TNF- α ELISA。用每个样品的蛋白浓度将心肌 TNF- α 检测结果标准化。用来自 eBioscience Inc, CA 的 ELISA 试剂盒测定血浆 IL-1 β 蛋白水平。

[0150] p38 和 ERK1/2 MAPK 的磷酸化

[0151] 通过 western 印迹分析来检测心脏组织中的磷酸化的 / 总的 p38 和 ERK1/2 蛋白水平。简单而言,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳将 40 μ g 的蛋白分离。然后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜,并用抗 p38 抗体 (1 : 800, Cell Signaling, Danvers, MA)、抗磷酸化 p38 的抗体 (Thr 180/Tyr182, 1 : 800, Cell Signaling)、抗 ERK1/2 抗体 (1 : 800, Cell Signaling) 或抗磷酸化 ERK 1/2 抗体 (Thr 202/Tyr 204, 1 : 800, Cell Signaling) 来探测印迹。用辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1 : 2000 ; BioRad, Hercules, CA) 来探测印迹,并用 ECL 化学发光方法进行检测。

[0152] 成熟心肌细胞培养

[0153] 从成年 WT 和 nNOS^{-/-} 小鼠的心脏分离心肌细胞。将心脏置于兰根道尔夫装置上,并用含有 45 μ g/mL liberase blendzyme IV (Roche) 的消化缓冲液灌流。消化之后,将细胞重悬,并在含有渐增 Ca²⁺ 浓度 (12.5 μ M-1.0mM) 的缓冲液中进行一系列沉降和重悬步骤。然后将杆状肌细胞以 50 细胞 /mm² 的密度铺于层粘连蛋白包被的 35-mm 平皿上,并于 37℃ 下 2% CO₂ 孵育箱中培养 6 小时。随后用有或没有膜联蛋白 A5 (1.0 μ g/ml) 的 LPS (2.5 μ g/ml) 处理 4 小时。

[0154] 免疫共沉淀

[0155] 用 Dynabead 蛋白 G 免疫沉淀试剂盒 (Invitrogen, CA) 进行 TLR4 和膜联蛋白 A5 的免疫共沉淀。简单而言,将磁性 dynabead 悬浮于含有 20 μ g TLR4 抗体 (Santa Cruz, CA) 的抗体结合缓冲液中,持续 1 小时。将心肌组织在 NP40 细胞裂解缓冲液中匀浆并超声。用 Lowry 蛋白测定 (Bio-Rad, Mississauga, ON) 测量蛋白浓度。测定浓度后就允许每管等量上样 1mg 蛋白。将 500ng 人重组膜联蛋白 A5 (Biovision, CA) 添加至组织样品,并与 TLR4 包被的珠孵育 2 小时。从 dynabead 洗脱样品,并等量上样至 12% 聚丙烯酰胺凝胶上。用抗膜联蛋白 A5 抗体 (1 : 2000, Biovision, CA) 进行膜联蛋白 A5 检测的 Western 印迹。将膜再生并用抗 TLR4 抗体 (1 : 2000, SantaCruz, CA) 再次探测 TLR4。

[0156] 统计学分析

[0157] 将所有结果表示为平均值 $\pm$ 标准误。进行双因素方差分析 (ANOVA),随后进行用 Bonferroni 校正的非配对 Student's t-检验,以检测处理组之间的差异。当 P 值小于 0.05 时,认为具有统计学显著性。

[0158] 实施例 5- 膜联蛋白 A5 对心脏功能的体内作用

[0159] 盐水、膜联蛋白 A5、LPS 或 LPS 加膜联蛋白 A5 处理后 4 小时,麻醉小鼠,并用 Millar 压力电导管来测量心脏功能。获得的血液动力学参数包括平均动脉压 (MAP)、心率、左心室射血分数 (LVEF)、心输出量、左心室压的导数 (LV $dP/dt_{\text{最大值}}$ 和 $dP/dt_{\text{最小值}}$)、最大 dP/dt 时的压力 ($P@dP/dt_{\text{最大值}}$)、LV 收缩期末压 (LVESP)、LV 舒张期末压 (LVEDP)、LV 舒张期末容积 (LVEDV)、等容舒张时间常数 (Tau) 和最大功率 (表 2, 图 4)。LPS 处理之后,MAP、LVEF、LV $dP/dt_{\text{最大值}}$ 和 $-dP/dt_{\text{最小值}}$ 、 $P@dP/dt_{\text{最大值}}$ 、LVESP、LVEDP 和最大功率都显著下降 ($P < 0.01$),而 LVEDV 显著增加 ($P < 0.01$)。膜联蛋白 A5 治疗显著增加内毒素血症小鼠中的 LVESP 和 $P@dP/dt_{\text{最大值}}$ ($P < 0.05$, 表 2)。重要的是,相对于 LPS 组,膜联蛋白 A5 治疗的 LPS 中 LV dP/dt_{max} 和 $-dP/dt_{\text{最小值}}$ 都显著增加 ($P < 0.05$, 图 4)。

[0160] 实施例 6- 膜联蛋白 A5 对心脏功能的离体作用

[0161] 盐水、膜联蛋白 A5、LPS 或 LPS 加膜联蛋白 A5 处理后 4 小时,处死动物,并用兰根道尔夫心脏制备来检测心脏功能。记录心率和收缩力。分析心脏做功和收缩率 ($+dF/dt_{\text{最大值}}$) 与舒张率 ($-dF/dt_{\text{最小值}}$)。结果表明:与对照组比较,LPS 处理组中的收缩率与舒张率、收缩力和心脏做功都显著降低 (图 5, $P < 0.001$)。与 LPS 组比较,重组人膜联蛋白 A5 治疗显著改善了所有 4 项心参数 (图 6, $P < 0.01$)。

[0162] 实施例 7- 膜联蛋白 A5 对心肌和血浆 TNF- α 水平的影响

[0163] 盐水、LPS 或 LPS 加膜联蛋白 A5 处理 4 小时后,分别通过实时 RT-PCR 和 ELISA 来测定心肌 TNF mRNA 和蛋白表达。与盐水治疗的对照相比,LPS 处理小鼠的 LV 心肌中 TNF- α mRNA 和蛋白水平都显著增加 ($P < 0.01$, 图 6A 和 6B)。膜联蛋白 A5 治疗显著降低了由 LPS 诱导的 TNF- α 表达 ($P < 0.05$, 图 6A 和 6B)。同样地,在 LPS 处理的小鼠中,TNF- α 和 IL-1 β 的血浆水平都显著增加 ($P < 0.01$),膜联蛋白 A5 治疗使其显著降低 ($P < 0.05$, 图 6C 和 6D)。

[0164] 实施例 8- 膜联蛋白 A5 对心肌 p38 和 ERK1/2 磷酸化的影响

[0165] 我们已经表明,LPS 造成的 p38 和 ERK1/2MAPK 激活导致心肌 TNF- α 表达。由于 p38 和 ERK1/2 在 LPS 诱导的 TNF- α 表达中起重要作用,所以用 western 印迹分析来研究

膜联蛋白 A5 对心肌 p38 和 ERK1/2 磷酸化的影响。LPS (4mg/kg, IP) 处理后 30 分钟, 心肌 p38 和 ERK1/2 磷酸化显著增加 ($P < 0.05$, 图 4)。膜联蛋白 A5 与 LPS 的共同处理将 p38 和 ERK1/2 磷酸化恢复至对照水平 ($P < 0.05$, 图 7)。

[0166] 实施例 9- 膜联蛋白 A5 对心肌细胞中 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响

[0167] 为了确定膜联蛋白 A5 对心肌细胞中 TNF- α 和 IL-1 β 表达的直接影响, 分离和培养成熟心肌细胞。与上文报道的体内数据一致, LPS 显著增加培养的成熟心肌细胞中通过实时 RT-PCR 测定的 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 水平, 并且膜联蛋白 A5 治疗消除该反应 ($P < 0.05$, 图 8A 和 8B)。

[0168] 实施例 10- 膜联蛋白 A5 和 TLR4 受体之间的相互作用

[0169] 为了进一步确定膜联蛋白 A5 抑制 LPS 诱导的 TLR4 信号转导的机制, 用免疫共沉淀研究膜联蛋白 A5 和 TLR4 受体之间的相互作用。将来自盐水和 LPS 处理小鼠的心肌组织匀浆, 并与膜联蛋白 A5 孵育。用抗 TLR4 抗体包被磁性 dynabead, 从而拉下 TLR4 受体并用于膜联蛋白 A5 印迹。重组人膜联蛋白 A5 用作阳性对照。数据显示来自盐水和 LPS 处理的小鼠的心肌样品中存在膜联蛋白 A5 特异性条带, 这指示膜联蛋白 A5 和 TLR4 受体之间的相互作用 (图 9)。

[0170] 内毒素血症的小鼠模型表明: 人膜联蛋白 A5 影响 LPS 激发期的心脏功能。用 Millar 压力电导管来测定体内心脏功能。数据表明: 膜联蛋白 A5 治疗之后, LPS 诱导的心脏功能障碍显著改善。为了避免心脏的心血管反射和负荷状态可能对心脏功能测量结果的影响, 使用了分离的兰根道尔夫心脏制备。与体内数据一致, 膜联蛋白 A5 治疗部分地恢复 LPS 诱导的心脏功能障碍。因此, 本文的这些结果首次表明: 膜联蛋白 A5 改善小鼠内毒素血症期的心脏功能。

[0171] 结果还表明: 膜联蛋白 A5 治疗显著降低内毒素血症期 LV 心肌中的 TNF- α 的 mRNA 和蛋白水平。除了降低心肌 TNF- α 表达之外, 膜联蛋白 A5 治疗还降低了内毒素血症小鼠中 TNF- α 和 IL-1 β 的血浆水平。而且, 膜联蛋白 A5 治疗抑制培养的成熟心肌细胞中的 TNF- α 和 IL-1 β 表达。这些数据表明膜联蛋白 A5 具有抗炎效应。还表明: LPS 处理之后, 心肌 p38 和 ERK1/2 磷酸化增加。膜联蛋白 A5 治疗完全消除增加的 p38 和 ERK1/2 磷酸化, 这表明膜联蛋白 A5 干扰 TLR4/MAPK 信号通路。膜联蛋白 A5 可以与 TLR4 受体的富亮氨酸重复相互作用, 并抑制 LPS 诱导的信号转导。进行了免疫共沉淀来鉴定膜联蛋白 A5 和 TLR4 之间可能相互作用, 并且数据表明: 膜联蛋白 A5 与 TLR4 发生免疫共沉淀, 这提示膜联蛋白 A5 和 TLR4 受体之间的相互作用。由于膜联蛋白 A5 与富亮氨酸重复的结合已经被证实能抑制受体功能, 所以可能是膜联蛋白 A5 通过它与 TLR4 受体的相互作用来抑制 LPS 诱导的 TLR4/MAPK 信号转导。

[0172] 综上所述, 本文给出的数据显示出内毒素血症小鼠模型中膜联蛋白 A5 的新的效应。膜联蛋白 A5 治疗降低心肌 TNF- α 表达且改善内毒素血症期的心脏功能。膜联蛋白 A5 的这些有益效应是通过抑制 TLR4/MAPK 信号转导实现的, 该抑制是通过膜联蛋白 A5 与 TLR4 受体的相互作用。因此, 膜联蛋白 A5 在治疗脓毒症中具有重要的治疗用途。

[0173] 表 1 显示人膜联蛋白 A5 的 mRNA 和氨基酸序列。

[0174] 以粗体显示 mRNA 编码序列

[0175]

人膜联蛋白 A5 的 mRNA 序列

```

1 gttgcttgga tcagtctagg tgcagctgcc ggatccttca gcgtctgcat ctcggcgctcg
61 ccccgcgctac cgtcgcccgg ctctccgccc ctctcccggg gtttcggggc acttggggtcc
121 cacagtctgg tcctgcttca ccttcccctg acctgagtag tcgccatggc acagggttctc
181 agaggcactg tgactgactt ccctggattt gatgagcggg ctgatgcaga aactcttcgg
241 aaggctatga aaggcttggg cacagatgag gagagcatcc tgactctgtt gacatcccga
301 agtaatgctc agcgccagga aatctctgca gcttttaaga ctctgtttgg cagggatctt
361 ctggatgacc tgaaatcaga actaactgga aaatttgaaa aattaattgt ggctctgatg
421 aaaccctctc ggctttatga tgcttatgaa ctgaaacatg ccttgaaggg agctggaaca
481 aatgaaaaag tactgacaga aattattgct tcaaggacac ctgaagaact gagagccatc
541 aaacaagttt atgaagaaga atatggctca agcctggaag atgacgtggt ggggggacact
601 tcagggtact accagcggat gttggtggtt ctccttcagg ctaacagaga ccctgatgct
661 ggaattgatg aagctcaagt tgaacaagat gctcaggctt tatttcaggc tggagaactt
721 aaatggggga cagatgaaga aaagtttatc accatctttg gaacacgaag tgtgtctcat
781 ttgagaaagg tgtttgacaa gtacatgact atatcaggat ttcaaattga ggaaaccatt
841 gaccgcgaga cttctggcaa tttagagcaa ctactccttg ctgttgtgaa atctattcga
901 agtatacctg cctaccttgc agagaccctc tattatgcta tgaagggagc tgggacagat
961 gatcatacc tcatacagat catgggttcc aggagtgaga ttgatctggt taacatcagg
1021 aaggacttta ggaagaattt tgccacctct ctttattcca tgattaaggg agatacatct
1081 ggggactata agaaagctct tctgctgctc tgtggagaag atgactaacg tgtcacgggg
1141 aagagctccc tgctgtgtgc ctgcaccacc ccactgcctt ccttcagcac ctttagctgc
1201 atttgtatgc cagtgtttaa cacattgcct tattcatact agcatgctca tgaccaacac
1261 atacacgtca tagaagaaaa tagtggtgct tctttctgat ctctagtggg gatctctttg
1321 actgctgtag tactaaagtg tacttaatgt tactaagttt aatgcctggc cattttccat
1381 ttatatatat tttttaagag gctagagtgc ttttagcctt ttttaaaaac tccatttata
1441 ttacatttgt aaccatgata ctttaatcag aagcttagcc ttgaaattgt gaactcttgg
1501 aaatgttatt agtgaagttc gcaactaaac taaacctgta aaattatgat gattgtattc
1561 aaaagattaa tgaaaaataa acatttctgt cccctgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1621 aaaa

```

人膜联蛋白 A5 的氨基酸序列

```

1 maqvlrgtvt dfpgfderad aetlrkamkg lgtdeesilt lltsrsnaqr qeisaafktl
61 fgrdllddlk seltgkfecl ivalmkpsrl ydayelkhal kgagtnekvl teiasrtpe
121 elraikqvye eeygssledd vvgdtsgyyq rmlvvllqan rdpdagidea qveqdaqalf
181 qagelkwgtd eekfitifgt rsvshlrkvf dkymtisgfg ieetidrets gnleqlllav
241 vksirsipay laetlyyamk gagtdhtli rvmvsrseid lfnirkefrk nfatslysmi
301 kgdtsgdykk allllcgedd

```

[0176] 表 2:内毒素血症小鼠中体内血液动力学检测结果

[0177]

参数	盐水	A5	LPS	LPS+A5
n	10	11	9	11
心率, 搏动数/分钟	412±23	395±9	473±17	489±17
MAP, mmHg	86±3	83±5	44±3 **	52±4 **
LVEF, %	63±6	67±7	13±3 **	17±2 **
心输出量, μ L/分钟	5188±834	3698±558	3511±835	4664±810
P@dP/dt _{最大值} , mmHg	64±2	64±4	31±2 **	40±3 ** †
LVESP, mmHg	102±5	95±8	66±2 **	77±4 ** †
LVEDP, mmHg	6.9±0.9	6.5±0.7	3.6±0.2 **	4.9±0.5 **
LVEDV, μ L	20±4	14±3	50±4 **	61±7 **
Tau, ms	7.9±0.3	8.1±0.5	9.9±0.5	8.5±0.5
最大功率, mWatts	6.1±1.1	4.4±0.8	2.0±0.6 **	3.8±0.8

[0178] 数据为平均值 $\pm$ 标准误, 并通过双因素 ANOVA, 随后用 Bonferroni 校正的非配对 Student's t- 检验进行分析。与盐水相比 **P < 0.01, 与 LPS 相比 †P < 0.05。MAP, 平均动脉压; SW, 搏出功; P@dP/dt_{最大值}, 最大 dP/dt 时的 LV 压力; LVESP, LV 收缩期末压; LVEDP, LV 舒张期末压; LVEDV, LV 舒张期末容积; Tau, 等容舒张时间常数。

[0179] 参考文献

[0180] 1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care (美国重度脓毒症的流行病学: 发生率、结果和相关医疗费用的分析). Crit Care Med 2001;29:1303-1310.

[0181] 2. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy (人类脓毒性休克 - 发病机理、心血管功能障碍和治疗中理解的进展). Ann Intern Med 1990;113:227-242.

[0182] 3. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin (正常人对内毒素给药的心血管反应). N Engl J Med 1989;321:280-287.

[0183] 4. Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, Banks SM et al. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock (狗中内毒素和肿瘤坏死因子激发模拟人脓毒性休克的心血管特征). J Exp Med 1989;169:823-832.

[0184] 5. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function (膜联蛋白: 从结构至功能). Physiol Rev 2002;82:331-371.

[0185] 6. Reutelingsperger CP, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis (膜

联蛋白 V, 细胞凋亡期磷脂酰丝氨酸催化的炎症和凝集的调节剂). *Cell Mol Life Sci* 1997 ;53 :527-532.

[0186] 7. Peng T, Lu X, Lei M, Moe GW, Feng Q. Inhibition of p38 MAPK decreases myocardial TNF- α expression and improves myocardial function and survival during acute endotoxemia in mice(抑制 p38MAPK 降低小鼠急性内毒素血症期的心肌 TNF- α 表达并改善心肌功能和存活率). *Cardiovasc Res* 2003 ;59 :893-900.

[0187] 8. Geoghegan-Morphet N, Burger D, Lu X, Sathish V, Peng T, Sims SM, Feng Q. Role of neuronal nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression in neonatal mouse cardiomyocytes(神经元一氧化氮合酶在新生小鼠心肌细胞中脂多糖诱导的肿瘤坏死因子- α 表达中的作用). *Cardiovasc Res* 2007 ;75 :408-416.

[0188] 9. Hammoud L, Xiang F, Lu X, Brunner F, Leco K, Feng Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes neonatal cardiomyocyte proliferation by inhibiting tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression(内皮一氧化氮合酶通过抑制金属蛋白酶-3 表达的组织抑制剂来促进新生心肌细胞增殖). *Cardiovasc Res* 2007 ;75 :359-368.

[0189] 10. Peng T, Lu X, Feng Q. Pivotal role of gp91 phox-containing NADH oxidase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression and myocardial depression(含有 gp91phox 的 NADH 氧化酶在脂多糖诱导的肿瘤坏死因子- α 表达和心肌抑制中的重要作用). *Circulation* 2005 ;111 :1637-1644.

[0190] 11. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update(脓毒症流行病学: 更新). *Crit Care Med* 2001 ;29 :S109-116.

[0191] 12. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000(美国 1979 至 2000 年的脓毒症流行病学). *N Engl J Med* 2003 ;348 :1546-1554.

[0192] 13. Court O, Kumar A, Parrillo JE. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock(临床综述: 脓毒症和脓毒性休克中的心肌衰弱). *Crit Care* 2002 ;6 :500-508.

[0193] 14. Parrillo JE, Burch C, Shelhammer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock(患脓毒性休克的人中循环心肌抑制物). *J Clin Invest* 1985 ;76 :1539-1553.

[0194] 15. Peng T, Lu X, Lei M, Feng Q. Endothelial nitric-oxide synthase enhances lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- α expression via cAMP-mediated p38 MAPK pathway in cardiomyocytes(内皮一氧化氮合酶经由 cAMP- 介导的 p38MAPK 途径增加心肌细胞中脂多糖刺激的肿瘤坏死因子- α 表达). *J Biol Chem* 2003 ;278 :8099-8105.

[0195] 16. Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration(内毒素给药后成熟猫科动物心肌中的肿瘤坏死因

子- α 基因和蛋白表达). J Clin Invest 1995 ;96 :1042-1052.

[0196] 17. Grandel U, Fink L, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K et al. Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor- α synthesis depresses contractility of isolated rat hearts:evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production(内毒素诱导的心肌肿瘤坏死因子- α 合成抑制分离的大鼠心脏的收缩性:神经鞘氨醇的作用和环氧化酶-2-来源的凝血恶烷产生的证据). Circulation 2002 ;102 :2758-2764.

[0197] 18. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis:lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture(两种脓毒症模型死亡率和炎症反应的比较:脂多糖对盲肠结扎和穿刺). Shock 2000 ;13 :110-116.

[0198] 19. Damazo AS, Yona S, D'Acquisto F, Flower RJ, Oliani SM, Perretti M. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation(膜联蛋白 1 基因表达在内毒素血症鼠科动物微循环中的重要保护性作用). Am J Pathol 2005 ;166 :1607-1617.

[0199] 21. Peng T, Lu X, Zhang T, Feng Q. JNK1/c-fos inhibits cardiomyocyte TNF- α expression via a negative crosstalk with ERK and p38 MAPK in endotoxemia(JNK1/c-fos 经由与内毒素血症中的 ERK 和 p38MAPK 的阴性串扰抑制心肌细胞 TNF- α 表达). Cardiovasc Res. 2009 ;81 :733-741.

[0200] 22. Markoff A, Bogdanova N, Knop M, Ruffer C, Kenis H, Lux P, Reutelingsperger C, Todorov V, Dworniczak B, Horst J, Gerke V. Annexin A5 interacts with polycystin-1 and interferes with the polycystin-1 stimulated recruitment of E-cadherin into adherens junctions(膜联蛋白 A5 与多囊蛋白-1 相互作用并干扰多囊蛋白-1 刺激的 E-钙粘蛋白补入粘着连接). J Mol Biol. 2007 ;369 :954-966.

[0201] 以上所述的实施方案意图进行举例说明,且本领域技术人员在不背离由附加的权利要求书所限定的本发明的范围下,可以对其进行改变和修改。

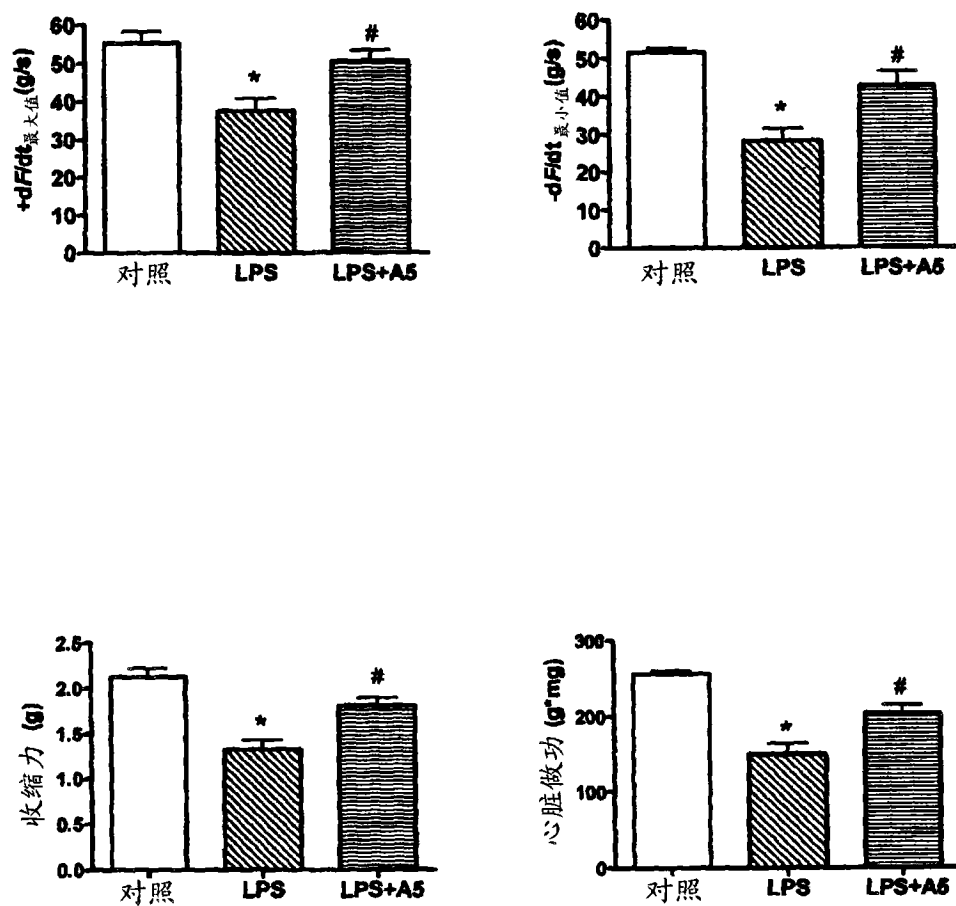


图 1

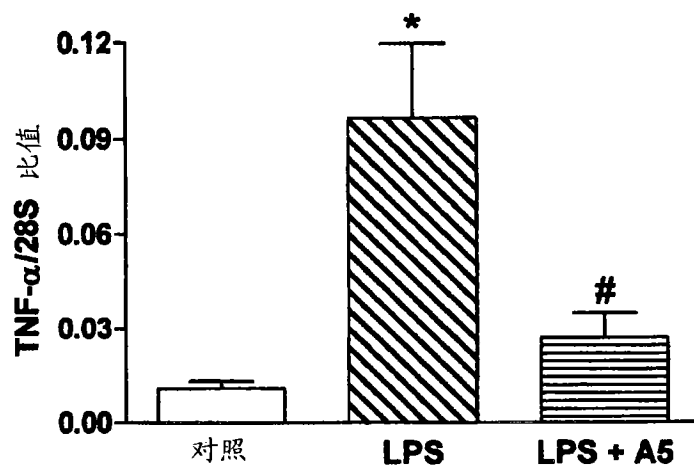


图 2

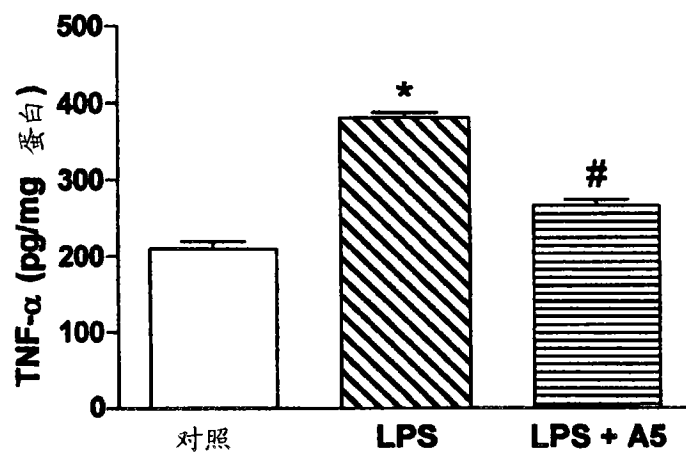


图 3

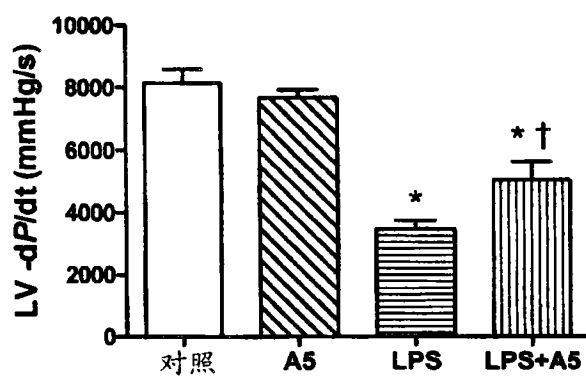
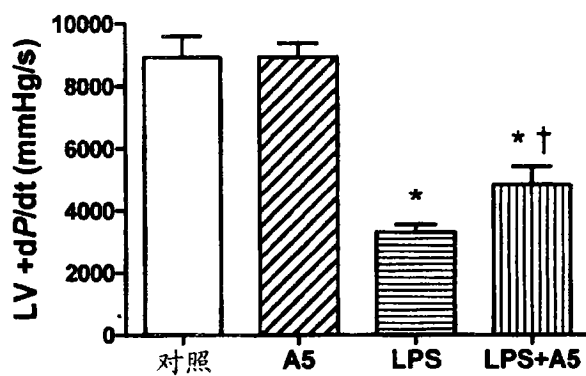


图 4

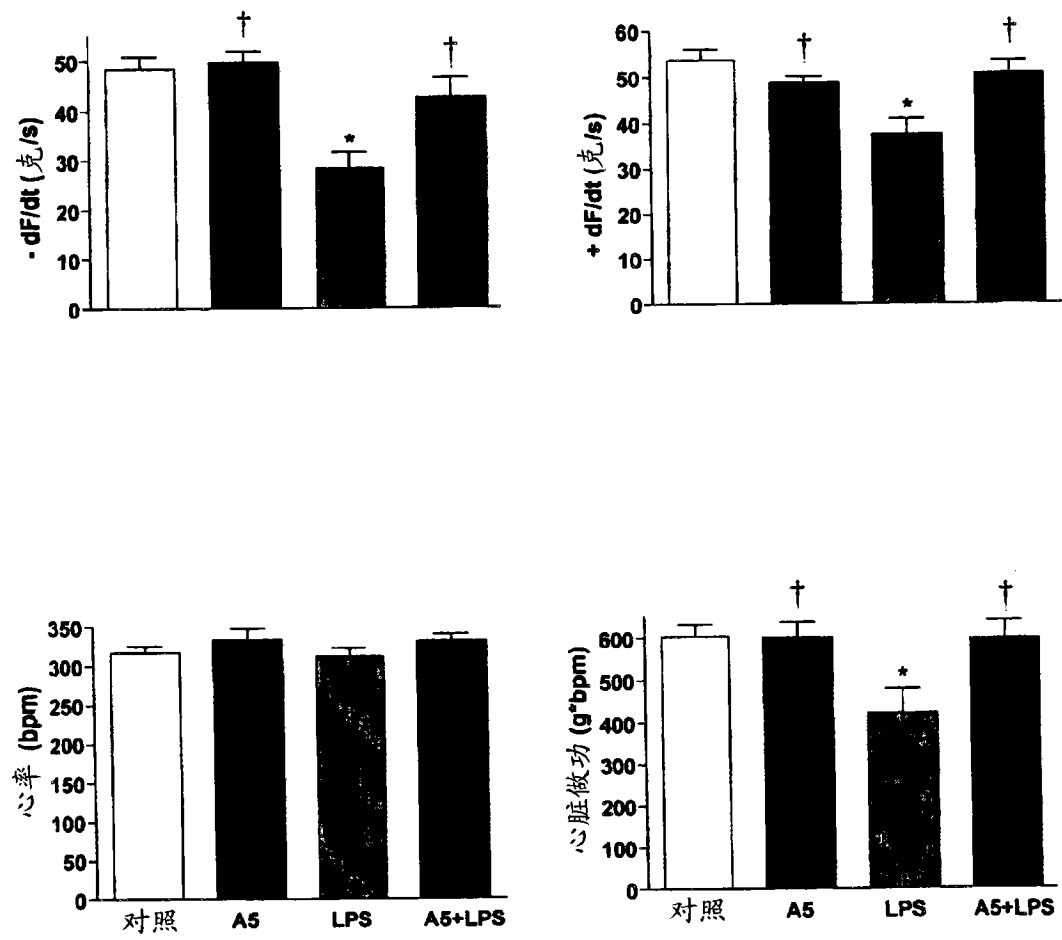


图 5

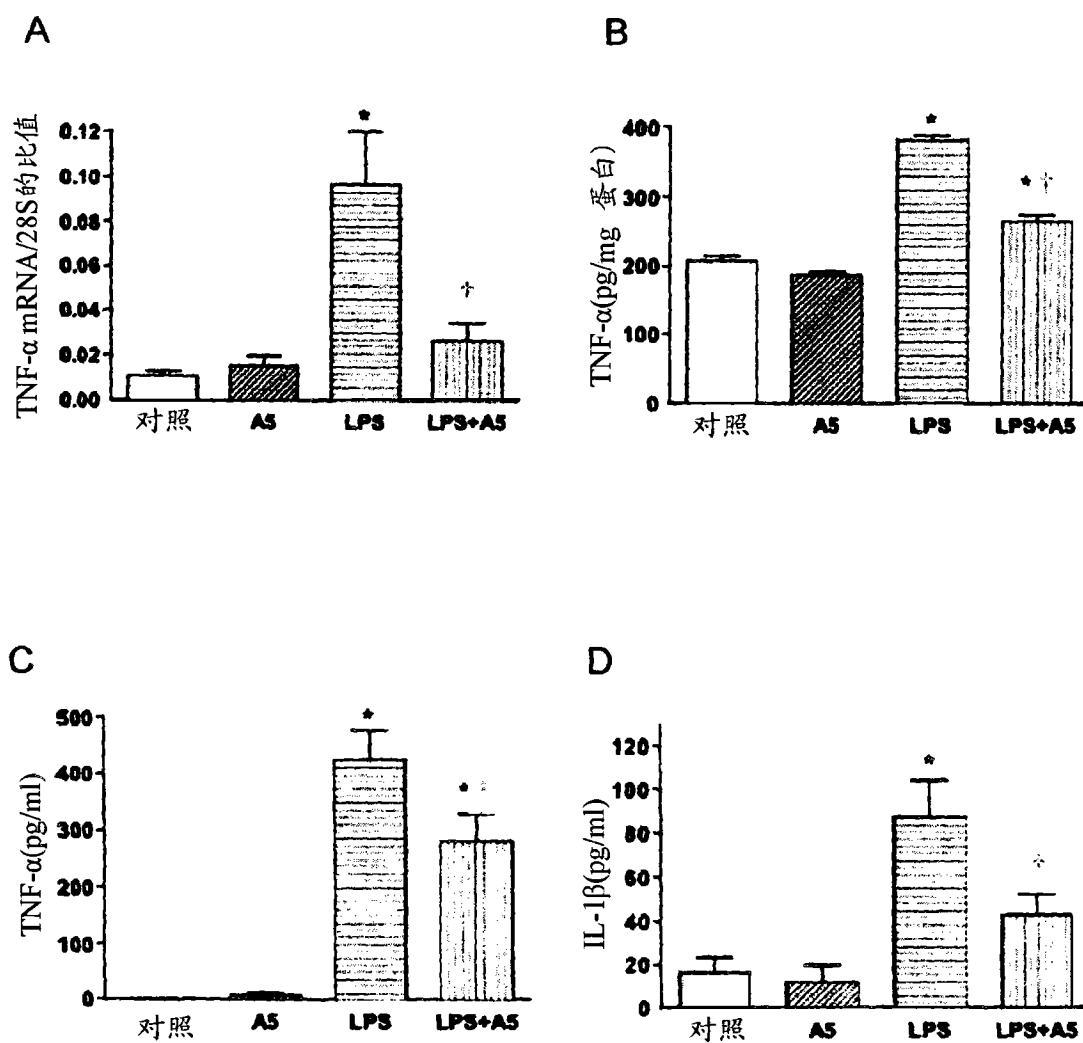


图 6

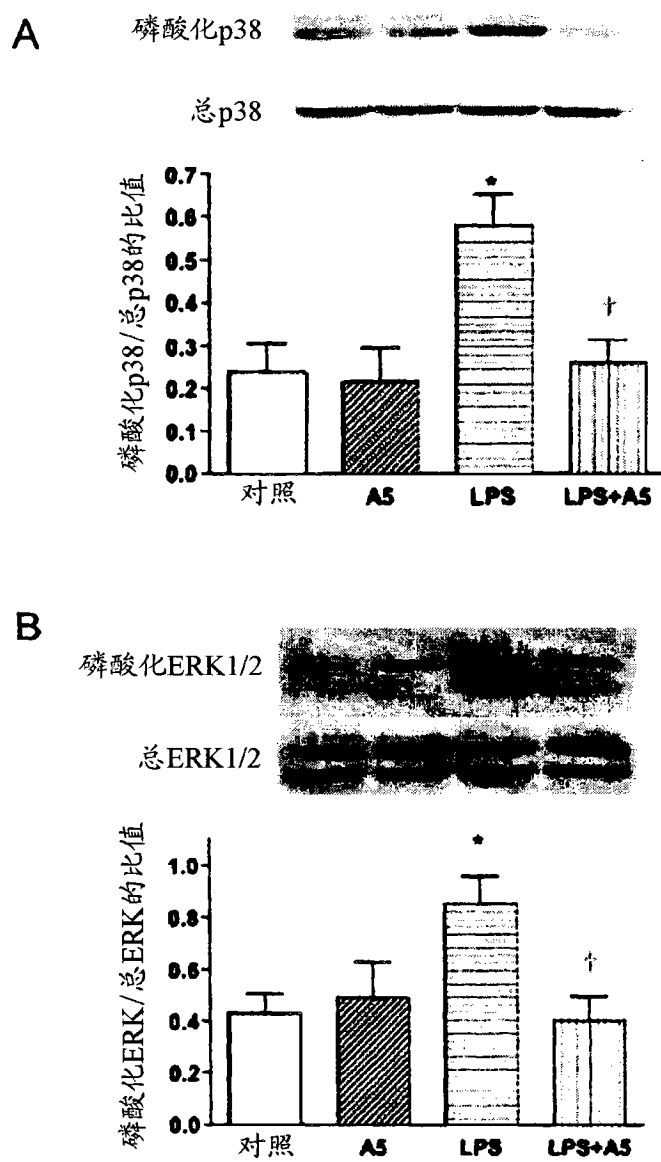


图 7

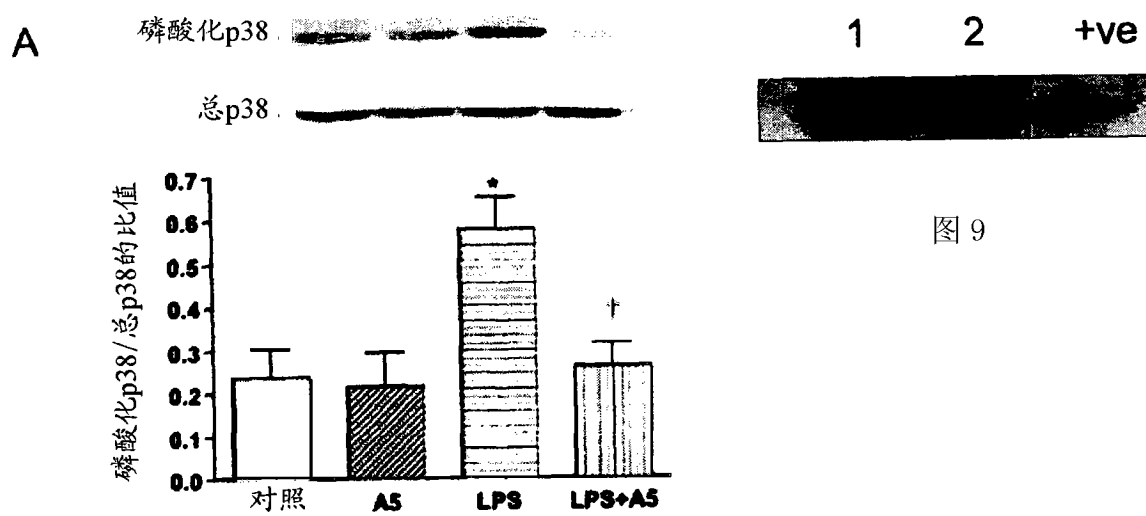


图 9

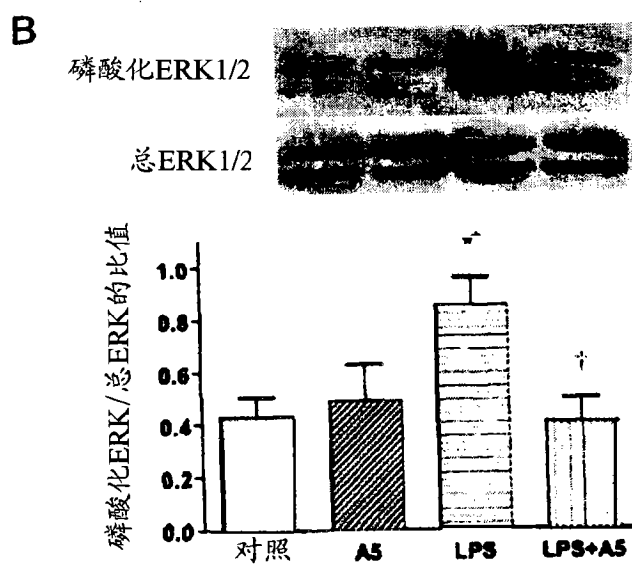


图 8