

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01816946.5

[51] Int. Cl.

- C12N 15/11 (2006.01)*
- C07K 14/47 (2006.01)*
- A61K 31/713 (2006.01)*
- A61P 37/06 (2006.01)*
- A61P 37/00 (2006.01)*
- A61P 11/06 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2008 年 11 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100436578C

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 17/06 (2006.01)*

*A61P 19/02 (2006.01)*

[22] 申请日 2001.10.4 [21] 申请号 01816946.5

[30] 优先权

[32] 2000.10.6 [33] DE [31] 10049549.4

[32] 2000.11.29 [33] DE [31] 10059144.2

[86] 国际申请 PCT/DE2001/003835 2001.10.4

[87] 国际公布 WO2002/029044 德 2002.4.11

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.7

[73] 专利权人 亚文塔克有限公司

地址 德国马丁斯里德

[72] 发明人 马库斯·海克 安德烈·H·华格纳

[56] 参考文献

A NON - NUCLEOTIDE - BRIDGED DNA DECOY INHIBITS RENAL EPOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION. AMOAH. APRAKU BISMARCK ET AL. KIDNEY INTERNATIONAL, Vol. 57 No. 1. 2000

INHIBITION OF INTERFERON REGULATORY FACTOR - 1 EXPRESSION RESULTS IN PREDOMINANCE OF CELLGROWTH STIMULATORY EFFECTS OF INTERFERON - GAMMA DUE TO PHOSPHORYLATION OF STAT1 AND STAT3. SATO TADATSUGU ET AL. BLOOD, Vol. 90 No. 12. 1997

审查员 丁慧萍

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 1 页 说明书 31 页 附图 9 页

[54] 发明名称

促炎基因产物转录之调制

[57] 摘要

本发明涉及转录因子 IRF - 1 的抑制剂，它们作为治疗剂的用途以及它们对于预防和治疗下列之用途：心血管并发症如透皮血管造形术后的再狭窄或静脉旁通的狭窄，慢性（移植物动脉粥样硬化或血管病）或急性移植物排斥，移植物抗宿主疾病（GVHD），免疫性过敏性反应（变应性），特别者支气管型哮喘和异位性皮炎，慢性复发性炎性病，特别者溃疡性结肠炎和克隆氏症，牛皮癣和肉样瘤病，以及自体免疫疾病，特别者糖尿病，多发性硬化症，胶原性疾病（例如系统性红斑狼疮），风湿性关节炎和 vasculotids。

1. 一种作为治疗性物质的干扰素调节因子-1 表达及/或活性之抑制剂, 其中所述抑制剂为一种双链 DNA 分子, 所述双链 DNA 分子由选自 SEQ ID NO: 1 至 12、15 和 16 之核酸序列组成。

2. 根据权利要求 1 之抑制剂, 其中该双链 DNA 分子展现出经修饰的核苷酸间键联。

3. 一种干扰素调节因子-1 表达及/或活性之抑制剂在制造预防或治疗下列疾病所用医药制剂中之用途: 慢性移植物排斥或急性移植物排斥、移植物抗宿主疾病、免疫性过敏性反应、牛皮癣和肉样瘤病、或自体免疫疾病, 其中所述抑制剂为一种双链 DNA 分子, 所述双链 DNA 分子由选自 SEQ ID NO: 1 至 12、15 和 16 之核酸序列组成。

4. 权利要求 3 的用途, 其中该双链 DNA 分子展现出经修饰的核苷酸间键联。

5. 权利要求 3 或 4 的用途, 其中所述慢性移植物排斥是植体动脉粥样硬化或血管病。

6. 权利要求 3 或 4 的用途, 其中所述免疫性过敏性反应是支气管型哮喘或异位性皮炎。

7. 权利要求 3 或 4 的用途, 其中所述自体免疫疾病是类风湿性关节炎或 vasculotids。

## 促炎基因产物转录之调制

### 技术领域

本发明涉及转录因子 IRF-1 的抑制剂，它们作为治疗剂的用途以及它们对于预防和治疗下列之用途：心血管并发症如透皮血管造形术后的再狭窄或静脉旁通的狭窄，慢性(移植物动脉粥样硬化或血管病)或急性移植物排斥，移植物抗宿主疾病 (GVHD)，免疫性过敏反应 (变应性)，特别者支气管型哮喘和异位性皮炎，慢性复发性炎性病，特别者溃疡性结肠炎和克隆氏症，牛皮癣和肉样瘤病，以及自体免疫疾病，特别者糖尿病，多发性硬化症，胶原性疾病 (例如系统性红斑狼疮)，风湿性关节炎和 vasculotids。

血管内皮在炎性疾病扮有关键角色，系因为其代表循环发炎胜任细胞与组织之间的主要交互作用部位之故。于急性或慢性发炎中，有说明过在内皮细胞与单核细胞和多形核中性有粒白细胞 (polymorphonuclear neutrophil granulocytes)两者之间的种种交互作用。最近，有逐增地讨论到在自体免疫疾病(例如风湿性关节炎)，血管壁动脉粥样硬化性病变包括移植物和静脉旁通血管病 以及透皮血管造形术后的再狭窄与在慢性复发性炎性病 (例如克隆氏症，牛皮癣)等之中发生于内皮细胞与发炎前 T 辅助细胞(TH1)之间的。淋巴细胞和内皮细胞系以 CD40/CD154 受体/配体系统 (也称为 TNF 受体/配体-5-系统)沟通随而增加在内皮内的化学介素和粘着分子之表达。再者，内皮细胞与别的抗原呈现细胞例如单核细胞相异之处似乎在于 CD40 信号传送途径活化之后仅仅释放出生物活性白介素 12，其量类似于受到最大刺激的单核细胞 (此等通常被认为是白介素 12 的主要来源)。白介素 12 为天然 T 辅助细胞的主要刺激和分化因子，其会反应而在它们的表面上增加干扰素 $\gamma$ 的产生与CD154的表达(此等 T

辅助细胞即为称为 TH1 细胞者)。干扰素 $\gamma$ 转而增加内皮细胞内的 CD40 表达而导致一种恶性循环,其中内皮细胞, T-辅助细胞和新添的单核细胞彼此刺激并使炎性反应进展下去。

会触发发炎反应的 CD40/CD154 共-刺激性质业经在动物模型中针对疾病包括克隆氏症和急性或慢性移植物排斥(血管病)展示过。于其中不仅是透过 CD40/CD154 的内皮白血球交互作用发挥其作用,而且例如 CD40/CD154-介导的单核细胞/巨噬细胞或树突细胞(dendritic cells)分别与天然 T 辅助细胞和 TH1-细胞的交互作用也有作用。此外, CD40 可以为例如血管内衬中的平滑肌细胞所表达且也可为皮肤内的角质细胞或关节内的滑液纤维母细胞所表达。再者,在此等细胞内的 CD40 途径之活化不仅对炎性反应具有重要性,而且会导致在组织内的改造程序(rebuilding processes)例如在移植物血管病中血管的改作(remodelling), 牛皮癣中的皮肤变化或风湿性关节炎中关节软骨的糜烂。除了 CD154 被诱发, 白介素 12 依赖性和 TH1 媒介慢性炎性疾病与自体免疫反应, 包括糖尿病, 多发性硬化症, 肉样瘤病和 vasculotids 之外, CD40/CD154 的共刺激性质对于经由与 TH2-细胞接触所触发的在抗体产生性浆细胞内的 B-淋巴细胞之分化也聚又重要性。藉此, B-淋巴细胞会表达 CD40 而 TH2-细胞表达 CD154。没有此种共-刺激作用时, 浆细胞主要产生的是 IgM 型抗体而几乎没有 IgE 或 IgG 型抗体。一种扩张的 TH2 反应, 亦即 IgE 或 IgG 型抗体的过度产生, 主要在变应性引起的慢性复发性炎性病例如支气管哮喘, 异位性皮炎和溃疡性结肠炎等之中扮有重要角色, 不过也在胶原性疾病例如系统性红斑狼疮(SLE)也有其重要影响, 其中自体反应性自体抗体的产生为具有特别重要性者且其因而被称为全身化(generalized)自体免疫疾病。一般而言, 自体免疫疾病与慢性复发性炎性病之间的区分是有问题者, 因为一种常见的素因性因子(predisposing factor)似乎为在 TH1 和 TH2 分别媒介的细胞免疫反应

与体液免疫反应之间的不平衡。

目前对于和其它一起者, CD40/CD154 信号传送途径相关联的疾病之治疗为一有用的治疗措施-除了针对 CD 154 的组段性抗体之外-为在 CD154 目标细胞中对 CD40 表达的抑制。使用抗-CD154-抗体治疗的诸项缺点之一为过敏性反应(针对抗体)的危险性, 特别是在重复施用之下, 以及因为必须将抗体施加到血液之内, 导致至少以组织为基底的抗原决定部位(例如渗入的 T-淋巴细胞)之不良可达性(accessibility)。不过, 如同对许多其它的细胞介素受体一般, 对于 CD40 也同样没有小分子受体拮抗剂(antagonists)。由于在配体结合之后受体分子发生三聚体化(trimerization), 因此 CD40 抗体倾向于会活化 CD154 目标细胞。有别于一般所用炎性反应的衰减之其它策略包括使 TH1 细胞反应的刺激优于 TH2 细胞反应的刺激(例如经由给用 TH1 细胞介素例如干扰素 $\gamma$ )或反之使 TH2 细胞反应的刺激优于 TH1 细胞反应的刺激(例如经由给用 TH2 细胞介素例如白介素-10)。因为 T 辅助细胞反应系经利用细胞介素媒介而彼此抵消掉(亦即 TH1 细胞反应的优势导致 TH2 细胞反应的衰减, 反之亦然), 所以此等策略会有将 T 辅助细胞反应的各个其它途径予以解抑制(disinhibit)之危险。如此可能转而导致发生个别其它炎性反应之可能。

#### 发明内容

因此, 本发明的一项问题在于提出预防及/或治疗发炎疾病所用的药剂, 其, 与其它因素一起, 与 CD40/CD154 共刺激相关联。

此项问题由权利要求书所界定的主题内容予以解决。

#### 附图简要说明

本发明要用下面诸附图予以阐明。

图 1 以图解显示出在没有刺激的、经 TNF $\alpha$ (1000 单位/毫升)刺激、IFN $\gamma$ (1000 单位/毫升)刺激和 TNF $\alpha$ (100 单位/毫升)加 IFN $\gamma$ (1000

单位/毫升)刺激的培养人类内皮细胞于9小时后的CD40 mRNA 表达(RT-PCR 分析)之结果(%相对于在没有刺激的内皮细胞内之基底CD40 表达之%)(n=5-9, \* P < 0.05 相对于基底值, †P < 0.05 相对于TNF $\alpha$ 和IFN $\gamma$ )。

图2以图表形式显示出在人类内皮细胞中分别与TNF $\alpha$ (1000单位/毫升), IFN $\gamma$ (1000单位/毫升)和TNF $\alpha$ (100单位/毫升)加IFN $\gamma$ (1000单位/毫升)温育0.5小时(NF $\kappa$ B和STAT-1)与3小时(IRF-1)之后, NF $\kappa$ B(p65/p50异元二体物)或STAT-1和IRF-1的p91/p91同二聚体之核移位之时间相关性增加结果。使用环己酰亚胺(cycloheximide)(Cx, 1 $\mu$ M)预温育(1小时)展示出IRF-1会重新表达。代表性电泳迁移率变动分析, 于后续实验中得到可相比的结果。

图3以图表形式显示出针对STAT-1 NF $\kappa$ B和IRF-1的顺式元件假目标(Cis-element decoys)对于下列的特异性影响结果(10 $\mu$ M, 4小时预先温育): (a) CD40的mRNA水平(n=3-5, 统计摘要, 单位%, 相对于最大值, 相对于TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$ , \*P<0.05), (b) CD40和E-选择素的mRNA-水平(代表性RT-PCR-分析, 于其它实验中得到可相比的结果), (c) CD40蛋白质水平(代表性Western印迹, 于其它实验中得到可相比的结果, 于人类内皮细胞中, 分别与TNF $\alpha$ (100单位/毫升)/IFN $\gamma$ (1000单位/毫升)温育9小时(RT-PCR分析)和24小时(Western印迹)。于(b)和(c)下所显示得实验中, 以光密度分析法测定的(One-Dscan-Gel分析软件, Scanalytics, Billerica, MA, USA)相对强度(%)系相对于细胞介素刺激最大值显示出。

图4以图表形式显示出针对STAT-1, NF $\kappa$ B和IRF-1的不同顺式元件假目标(10 $\mu$ M, 预先温育4小时)对于CD40蛋白质水平之影响: (a) 经由荧光激活细胞分类术(Fluorescence Activated Cell Sorting)(FACS)在与TNF $\alpha$ (100单位/毫升)/IFN $\gamma$ (1000单位/毫升)一起温育24小时的人类内皮细胞内所测定出者; (b)对内皮细胞特有的

细胞表面蛋白质 PECAM-1 分析测定者。于(a)和(b)分别显示出得自 IgG 同种型对照细胞和经  $\text{TNF}\alpha$ / $\text{IFN}\gamma$ 处理过的细胞(CD40)与未经刺激的细胞(PECAM-1)之原始测量值的图表且在表中显示出个别平均荧光强度的对数值。代表性实验, 于其它实验中得到可相比的结果。

图 5 以图表形式显示出  $\text{TNF}\alpha$ (2000 单位/毫升,  $\text{IFN}\gamma$  (1000 单位/毫升)与  $\text{TNF}\alpha$  (100 单位/毫升)加  $\text{IFN}\gamma$ (1000 单位/毫升) 在人类内皮细胞中于 9 小时温育之后, 分别对于 CD40 和 IRF-1 mRNA 水平的影响之结果。代表性实验, 于其它实验中得到可相比的结果。

图 6 以图表形式显示出在与  $\text{IFN}\gamma$ (1000 单位/毫升)一起温育 0, 0.5, 1, 5, 3 和 9 小时之后, 人类内皮细胞内的 CD40 和 IRF-1 mRNA 表达之时间相关性增加结果。代表性实验, 于其它实验中得到可相比的结果。

图 7 以图表形式显示出顺式元件假目标对于人类内皮细胞中 CD40 mRNA 表达的影响之特异性。与顺式元件假目标 (IRF-1n, 浓度,  $10\mu\text{M}$ ) 的预温育(4 小时), 而非与个别突变对照样寡核苷酸 (IRF-1n mut,  $10\mu\text{M}$ )的预温育, 会在随后与  $\text{TNF}\alpha$ (100 单位/毫升)和  $\text{IFN}\gamma$ (1000 单位/毫升)温育 9 小时的细胞内抑制 CD40 mRNA 表达。代表性 RT-PCR 分析, 于其它实验中得到可相比的结果。

图 8 显示出在事先使用 IRF-1 反义寡核苷酸(AS; SEQ ID NO:23) (浓度  $0.2\mu\text{M}$ )处理 5 小时的人类内皮细胞内, 细胞介素诱导(100 单位/毫升)  $\text{TNF}\alpha$ , (1000 单位/毫升)  $\text{IFN}\gamma$ 的 IRF-1 蛋白质表达(3 小时之后)与 CD40 mRNA(9 小时之后)表达之抑制。(a) 和(b)的左边部份显示出使用不同的细胞装载量进行的三个实验之统计摘要; 个别的右边部份分别为代表性 Western 印迹分析和 RT-PCR 分析之结果, 且此外在(b)中更显示出以相对于经刺激的对照组及相对于内标准品  $\beta$ -肌动蛋白之%给出之光密度计分析之诠释 (\* $P < 0.05$ , 与经刺激的对照细胞相比较)。各个错义型(MS)和混杂型(SCR), 对照寡核苷酸都分别

不会影响 IRF-1 的表达也不会影响 CD40 的表达。

图 9 显示出对不同的 IRF-1 顺式元件假目标(SEQ ID NO:13, 17, 19 和 21)在培养的 THP-1 细胞内之摄取及随后的 IRF-1 之中和所进行的电泳迁移率变动分析。THP-1 细胞系与不同的顺式元件假目标预先温育 1 小时且随后使用  $\text{TNF}\alpha$ (100 单位/毫升)和  $\text{IFN}\gamma$ (1000 单位/毫升) 予以刺激 3 小时。在影像的左边部份中显示出下列样品处理和分析所得结果。影像的右边部份显示出对于在相同的实验条件下准备的刺激后对照细胞之核萃取物所进行的电泳迁移率变动分析。在电泳迁移率变动分析(超偏移分析)之前, 将该核萃取物补加地与抗 IRF-1 抗体按照 Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 中所述进行温育。

#### 实施方式

"假目标-ODN(decoy-ODN)"或"顺式元件假目标(顺式元件假目标)"或"双链 DNA 寡核苷酸"等术语如本文中所用者系指称一双链 DNA 分子, 其具有一对对应于或类似于天然发生于基因组内的 IRF-1 核结合序列之序列且在细胞内转录因子 IRF-1 会结合到该序列。顺式元件假目标因而具有用于 IRF-1 的竞争性抑制的分子之效应。

本案发明人可以将在人类内皮细胞内涉及发炎反应相关性, 细胞介素媒介的 CD40 受体表达的增加之转录因子予以解析出来。令人讶异地, 其转而显示出转录因子-核因子(Nuclear Factor)  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ )和信号转导体(Signal Transducer), 以及转录-1 (Transcription-1)活化剂(STAT-1)不是以如同在啮齿动物血管平滑肌细胞中一般的直接方式来控制肿瘤坏死因子 (TNF)  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )/干扰素- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-介导的 CD40 表达, 而是以间接方式经由活化其它转录因子, 亦即干扰素调节因子-1(IRF-1)来控制。IRF-1 (GenBank Accession No.: L05078, X14454, NM002198 an <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/qt/getEntry.pl?t00423>) 不同于许多其它转录因子之处在于其为一种不是潜含于细胞内的转录因

子，而事实上通常是需要在暴露于干扰素- $\gamma$ 且将转录因子 STAT-1 活化之后才重新(de novo)合成者。

此外 干扰素- $\gamma$ 可单独地或与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 组合地在人类内皮细胞内刺激 CD40 的表达。于此之中，NF $\kappa$ B 的 TNF- $\alpha$ 依赖性活化扮有微小角色。较重要者为 STAT-1 的 IFN- $\gamma$ 依赖性活化导致 IRF-1 的重新表达。IRF-1 随即诱发 CD40 的表达。两种细胞介素的协和作用基本上系基于 IRF-1 表达的扩增(amplification)。在细胞培养物中使用根据本发明针对 STAT-1 和 IRF-1 的假目标寡核苷酸而非在人类细胞中的个别控制寡核苷酸之时，细胞介素诱导的 CD40 表达(包括使用 IFN- $\gamma$ 的单刺激与 IFN- $\gamma$ 和 TNF $\alpha$ 的组合刺激两种情况)可获得抑制。由是，IRF-1 的诱导发生在 CD40 的诱导之前，反义寡核苷酸对 IRF-1 表达的阻断作用以与假目标寡核苷酸相同的量抑制细胞介素诱导的 CD40 表达。细胞内的 IRF-1 活性之抑活化导致在此等细胞内的 CD40 表达受到高度明显且选择性地抑制。由于在促炎条件下减低的 CD40 表达之结果，内皮白血球交互作用，特别者 TH1 与内皮细胞的交互作用会调低且呈现出治疗成功性的基础。相同的说法也以类似方式应用于下列交互作用的减低：CD40/CD154 介导天然 T 辅助细胞与抗原呈现细胞(例如单核细胞，树突细胞)的交互作用，TH2 细胞与 B 淋巴细胞以及其它 CD40 表达细胞(例如平滑肌细胞，角质细胞，纤维母细胞)与 CD154 表达细胞(TH1 细胞，活化凝血细胞)。

#### 发明内容

本发明的一方面为提出一种作为治疗物质的转录因子 IRF-1 活性抑制剂。蛋白质，也包括 IRF-1，系各以不同方式抑制它们的活性。例如可以使用抗-IRF-1 抗体，可减低 IRF-1 与 DNA 的交互作用，亦即转录活性，的天然或合成物质。IRF-1 的重新(de novo)合成可分别经由 STAT-1 和导致 STAT-1 活化的信号传导途径(Janus Kinases)之阻断而进一步受到抑制。

一种可以特异性地抑制 IRF-1 活性的较佳方法为使用具有对 IRF-1 的结合部位之双链 DNA 寡核苷酸, 也称为顺式元件假目标或假目标-ODN。对一细胞从外源给用大量的转录因子结合部位, 特别者以比在基因组内存在者远较为高的量给用, 会导致大部份特别转录因子特异地结合到个别顺式元件假目标而非结合到内源性标的结合部位之情势。这种抑制转录因子对它们的内源结合部位之结合的作法也称为"压制" (squelching)。使用顺式元件假目标对转录的压制(也称为中和 (neutralization))已经成功地用来细胞的生长。据此使用的 DNA 片段包括细胞转录因子 E2F 的特异性转录因子结合部位 (Morishita et al., PNAS, (1995) 92, 5855)。

阻止转录因子 IRF-1 的结合所用的核酸序列为例如 IRF-1 可在细胞内自然地结合之序列。IRF-1 可特异地结合到具有序列 5'-SAAAAGYGAAACC-3'基序(motive), 其中 S = C 或 G 且 Y = C 或 T。IRF-1 的结合有赖于重复性 G/CAAA 序列及此等基序之间的距离, 特别者三个核苷酸。所以, 本发明顺式元件假目标可具有下列 13-体一致性核结合序列: 5'-SAAAnnnSAAAYy-3' (SEQ ID NO:1), 其中 S = C 或 G, n = A, T, C 或 G 且 y = C 或 T。顺式元件假目标可以进一步比该 13-体核结合序列更为长且可以在 5'-端及/或 3-端伸长。核结合序列中得个别突变会导致 STAT-1 对假目标寡核苷酸的结合作用之丧失。

由于顺式元件假目标为一种双链核酸, 因此根据本发明的 DNA 寡核苷酸不仅包括有义或正向序列, 而且也包括互补反义或反向序列。根据本发明的较佳 DNA 寡核苷酸包括下列对 IRF-1 的 13-体核结合序列:

5'-CAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO:3),

5'-GAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO:5),

5'-CAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO:7),

5'-GAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO:9),

其中没有显示出个别的互补序列。不过, 顺式元件假目标可包括与上列诸序列不相同的序列且可以比 13-体更为长。

下列序列为更佳者:

(SEQ ID NO:11): 5'-CAGAAAAGTGAAACCCTG-3', 18-体 (非回文型, 1 结合部位),

(SEQ ID NO:13): 5'-CAGTTTCAAATTGAAACTG-3', 19-体 (几乎为回文型, 2 结合部位),

(SEQ ID NO:15): 5'-CAGGAAAAGTGAAACCGCTG-3', 20-体 (非回文型, 1 结合部位),

(SEQ ID NO:17): 5'-GCAGTTTCAAATTGAAACTGC-3', 21-体 (几乎为回文型, 2 结合部位),

(SEQ ID NO:19): 5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3', 22-体 (主要使用的一致性-序列),

(SEQ ID NO:21): 5'-GGCAGTTTCAAATTGAAACTGCC-3', 23-体 (几乎为回文型, 2 结合部位 s).

"2 结合部位"指的是有义链和反义链。该较佳序列的列举没有限制性。对于谙于此技者显而易见者可以使用多种序列作为 IRF-1 的抑制剂, 只要它们包括前面对于 13-体一致核心结合序列所列出的条件且对 IRF-1 具有亲和性即可。

一核酸序列对于 IRF-1 的结合亲和性可以使用电泳迁移率变动分析(the electrophoretic mobility shift assay) (EMSA) (Sambrook et al (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191)予以测定。此种分析系统适合用为对本发明方法所用核酸的品质管制或使合用来决定出结合部位的最佳长度。该分析系统也适合用于可被 IRF-1 结合的其它序列之鉴定。对于应该可用来离析出新的结合部位之 EMSA 最适合者为经纯化形式或

重组表达形式的 IRF-1, 它们可用于数个交互回合的 PCR 并以 EMSA 进行选择(Thiesen and Bach (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 3203)。

已知在它们的激活基因区或增强子等区内包括有 IRF-1 结合部位且因而可用本发明方法特异地压制的推定标的之基因为例如 CD40 基因与其它的促炎基因例如环氧酶-2 (cyclooxygenase-2), NADPH 氧化酶亚单位(p67phox 和 gp91phox), 一氧化氮合酶(nitrogen monoxide (NO)-synthase)的可诱导同功异形体, 白介素 6, 8 和 12 以及粘着分子 RANTES (分泌自 T 淋巴细胞, 可溶形式, 活化下受到调节, 经正常 T 细胞表达出者, 推测系经分泌出者)及 VCAM-1 (血管细胞粘着分子-1, 也称为 CD106)。

本发明方法可调制一或多种基因的转录, 其方式为使得该基因或该等基因, 例如 CD40, 根本不表达或以减低的方式表达。"减低或经抑制的表达"于本发明的意义中系意指其转录速率相较于没有使用本发明双链 DNA 寡核苷酸处理过的细胞而言系减低者。此种减低可以用例如 Northern 印迹 (Sambrook et al., 1989)或 RT-PCR 分析 (Sambrook et al., 1989) 予以测定。此种减低典型地为至少 2 倍, 较佳者至少 5 倍, 更佳者至少 10 倍的减低。活化的丧失可以经由例如下述而达到, 将 IRF-1 作为作用于某一基因的转录活化剂, 如此一来, 此种活化剂的压制会导致目标基因表达的丧失。

此外, 本发明方法也可促成一基因表达的解抑制, 但其限制条件为该表达系由具有组成活性的转录因子或由(在对应的细胞刺激之后)经活化的转录因子所阻断。一例子为针对转录因子 CCAAT/增强子结合性蛋白质的顺式元件假目标在天然兔子颈静脉内皮细胞中对于前内皮素原-1 基因(Prepro-endothelin-1 gene) 表达的解抑制(Lauth et al., *J. Mol. Med.*, (2000), 78, 441)。

其产物对于例如炎性疾病展现出保护效应的基因, 其表达可用此种方式解抑制。

本发明所用的顺式元件假目标于一较佳具体实例中包括一或多个，较佳者 1, 2, 3, 4 或 5, 更佳者 1 或 2 个 IRF-1 可特异地结合之结合部位。该核酸可以使用合成方式，以酵素方法或在细胞内产生。各种方法都是现有技术且为本领域技术人员熟知。

该双链 DNA 寡核苷酸的长度至少要与所使用的可特异地结合到 IRF-1 之序列一样长。通常，所用的双链 DNA 寡核苷酸之长度介于约 13-65 bp, 较佳介于约 13-26 bp 且最佳介于 18-23 bp。

通常寡核苷酸会被核酸内切酶和核酸外切酶，特别是 DNase 和 RNase 在细胞内所迅速降解。所以，可将 DNA 寡核苷酸修饰以将它们针对降解作用稳定化使得在细胞内可以更长时间地维持住高浓度的寡核苷酸。典型地，此等稳定化可以经由导入一或更多个经修饰的核苷酸间键联而达成。

经成功地稳定化之寡核苷酸不一定要在每一核苷酸间键联都有修饰。较佳者，核苷酸间键联系在顺式元件假目标所含两寡核苷酸得个别末端修饰。可以将最后六，五，四，三，二或最后一个或者在最后六个核苷酸间键联内的一或多个核苷酸间键联予以修饰。再者，可以在核酸内导入不同的核苷酸间键联修饰。以此种方式产生的双链 DNA 寡核苷酸可以使用例常性 EMSA 分析系统针对它们对 IRF-1 的序列特异性结合进行检验。此种分析系统可用来测定出顺式元件假目标的结合常数且因而测定出其亲和性是否因为修饰而有变化。可以选择出仍然具有足够结合作用的修饰顺式元件假目标，其中足够的结合作用代表为未修饰核酸结合作用的至少约 50%或至少约 75%且更佳者约 100%。

可以对具有经修饰的核苷酸间键联且仍然展现出足够结合作用之顺式元件假目标检验它们在细胞内是否比未修饰顺式元件假目标更为稳定。对经本发明顺式元件假目标转染过的细胞于不同时间检验仍然存在的顺式元件假目标之量。较佳者为使用以荧光染料 (例如 Texas

red)标记或经放射标记(例如  $^{32}\text{P}$ )的顺式元件假目标, 随后以数字荧光显微术 (digital fluorescent microscopy) 和放射自显影术 (autoradiography)或闪烁扫描法(scintigraphy) 分别予以分析。经成功修饰的顺式元件假目标在细胞内展现出彼未修饰顺式元件假目标所具半寿期较长之半寿期, 较佳者至少约 48 小时, 更佳者至少约 4 小时, 最佳者至少约 7 天。

适当的经修饰核苷酸间键联都摘列于 Uhlmann and Peyman ((1990) Chem. Rev. 90, 544)中。本发明方法中所用核酸内的修饰核苷酸间磷酸酯部份体及/或非磷桥联包含例如磷酸甲酯, 硫代磷酸酯, 二硫代磷酸酯, 磷酰胺酸酯, 磷酸酯, 而非磷核苷酸间类似物包含例如硅氧烷桥联, 碳酸酯桥联, 羧甲基酯桥联, 乙酰胺酸酯桥联及/或硫醚桥联。

本发明另一具体实例涉及核酸的稳定化, 其中经由在核酸中导入构造特点增加核酸的半寿期。此等含有肝素和钟状DNA(bell like DNA)的构造揭示于 US 5,683,985 之中。可以将修饰核苷酸间磷酸酯部份体及/或非磷桥联与上述构造一起同时导入。经如此产生的核酸可以使用上述分析系统针对结合性和稳定性予以检验。

核结合序列不仅可能存在于顺式元件假目标中, 而且也存在于载体中。于一较佳具体实例中, 该载体为一种质体载体且更佳者为能够以正染色体方式复制由是增加所导入的双链核酸所具稳定性之质体载体。

本发明的另一方面涉及能够以序列特异性方式结合到转录因子 IRF-1 且具有较佳者下列诸序列之一的双链 DNA 寡核苷酸, 其中于下面只有显示出该双链 DNA 寡核苷酸所含的一个链, 不过也要包括其互补链。

5'-SAAAnnnSAAyy-3' (SEQ ID NO:1),

5'-CAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO:3),

5'-GAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO:5),  
5'-CAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO:7),  
5'-GAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO:9),  
5'-CAGAAAAGTGAAACCCTG-3' (SEQ ID NO:11),  
5'-CAGTTTCAAATTGAAACTG-3'(SEQ ID NO:13),  
5'-CAGGAAAAGTGAAACCGCTG-3' (SEQ ID NO:15),  
5'-GCAGTTTCAAATTGAAACTGC-3' (SEQ ID NO:17),  
5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3'(SEQ ID NO:19),  
5'-GGCAGTTTCAAATTGAAACTGCC-3', (SEQ ID NO:21).

本发明双链 DNA 寡核苷酸展现出于上文中详细说出的长度、修饰与潜在地特异性结合部位重复(repeat)。该顺式元件假目标的最佳长度系经选择以将对 IRF-1 的结合与进入细胞的摄入最优化。通常短于 12 bp 的双链 DNA 寡核苷酸只能以微弱方式结合到其标的蛋白质，而长于 22 bp 的双链 DNA 寡核苷酸虽则能以较强的方式结合但只能被细胞以低效率摄入。结合强度可以用 EMSA 予以测定，而双链核酸的摄入可以利用以荧光染料(例如得克萨斯红(Texas red))标记的顺式元件假目标和经放射标记(例如  $^{32}\text{P}$ )的顺式元件假目标，随后分别以数字荧光显微术(digital fluorescent microscopy)和放射自显影术(autoradiography)或闪烁扫描法(scintigraphy)予以分析。本发明顺式元件假目标可按照上文所述予以稳定化。

本发明一较佳具体实例涉及含有回文型结合部位且因而在一短双链核酸中包括至少两个转录因子结合部位之顺式元件假目标。回文型序列不一定会促成较高的 IRF-1 结合作用，不过该顺式元件假目标会被目标细胞更快速(更有效率地)摄取。不过，特别者愈短的本发明顺式元件假目标会因为长(中央排列)的核结合序列与重复的 G/CAA 基序，而只有在末端才呈回文型。可以使用一较佳类似数目的单碱(A = C = G = T)来达到更有效率的摄取，不过，仍然会因为本发明

顺式元件假目标所含重复性 G/CAAA 基序而难以达到更有效率的摄取。所以较佳者要有一协调，其中至少 A = T 且 C = G。另外，较佳者，其核结合序列可呈颇为周围地排列如同在某些较佳顺式元件假目标序列中的情况者。

根据本发明的顺式元件假目标会迅速地掺加到细胞内。足够的摄取的特征在于一或多种可被 IRF-1 调制的基因之受到调制。根据本发明的顺式元件假目标较佳者系在与细胞接触 4 小时之后，更佳者约 2 小时之后，约 1 小时之后，约 30 分钟之后且最佳者约 10 分钟之后，调制一或多种基因的转录。常在此中实验中使用的一种混合物含有 10 微摩尔/升的顺式元件假目标。

本发明进一步有关一种在 CD40 表达细胞内调制至少一基因的转录之方法，特别是在内皮细胞，单核细胞，树突细胞，B 淋巴细胞，平滑肌细胞，角质细胞或纤维母细胞内，其中该方法包括下述一步骤：将该细胞与一含有一或多种能够以序列特异性方式结合到转录因子 IRF-1 的双链核酸之混合物接触。一种较佳方法系有关在作为一移植物的一部份之内皮细胞内的用途。该方法通常是在移植之前以活体内或活体外方式用在移植物上。

移植物于移植之前可以用本发明方法活体外 (ex vivo) 处理或在移植后使用该方法活体内 (in vivo) 处理。于较佳具体实例中该经处理的移植物为(小)肠，心，肝，肺，肾和胰脏及数种器官的组合。器官的处理，更正确而言，使用根据本发明的顺式元件假目标对它们的血管进行灌流/温育，可以经由紧接在移植之前使用溶液漂洗而在活体外进行。该器官可以同时贮存在一适当的保存溶液内(经冷藏者) (例如 University of Wisconsin Solution, Brettschneider HTK solution)。

含有本发明顺式元件假目标的混合物与目标细胞接触(例如内皮细胞，单核细胞，树突细胞，B 淋巴细胞，平滑肌细胞，角质细胞或纤维母细胞)。此接触的目的为将可结合 IRF-1 的顺式元件假目标

转移到目标细胞(亦即 CD40 表达细胞)之内。所以,可以根据本发明使用已知可以细胞膜穿透的核酸修饰及/或添加剂或佐剂 (Uhlmann and Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 544)。

于一较佳具体实例中,根据本发明的混合物指含有核酸和缓冲剂。顺式元件假目标的适当浓度系在至少 0,1 到 100 微摩尔/升 ((mol/L), 较佳者 10 微摩尔/升, 其中有加入一或更多种适当的缓冲液。此等缓冲液的一例子为 tyrode 溶液, 含有 144.3 毫摩尔/升 (mmol/L)  $\text{Na}^+$ , 4.0 毫摩尔/升  $\text{K}^+$ , 138.6 毫摩尔/升  $\text{Cl}^-$ , 1.7 毫摩尔/升  $\text{Ca}^{2+}$ , 1.0 毫摩尔/升  $\text{Mg}^{2+}$ , 0.4 毫摩尔/升  $\text{HPO}_4^{2-}$ , 19.9 毫摩尔/升  $\text{HCO}_3^-$ , 10.0 毫摩尔/升 D-葡萄糖。

于另一具体实例中本发明混合物加添地含有至少一种添加剂及/或佐剂。添加剂及/或佐剂例如脂质、阳离子脂质、聚合物、微脂粒、纳米粒子(nanoparticles)、核酸适合体(nucleic acid aptamers)、肽类和结合到 DNA 的蛋白质, 或合成肽 DNA 分子, 系用以增加, 例如, 核酸进入细胞内的掺加, 将混合物目标导向到仅仅一亚组细胞, 防止细胞内的核酸发生降解, 帮助在核酸混合物使用之前的贮存等。肽和蛋白质的粒子为合成肽 DNA 分子例如抗体, 抗体片段, 配体, 粘着分子, 它们都可经修饰或为未修饰者。

要将顺式元件假目标稳定化在细胞内所用的添加剂为例如核酸缩合物例如阳离子聚合物, 聚 L-赖氨酸或聚伸乙基亚胺。

用于本发明方法中的混合物较佳者系经由注射、插管、栓药、气雾剂(aerosols) (鼻和口腔喷药, 吸入剂), 套针剂(trocars), 投射体(projectiles), pluronic 凝胶, 聚合物, 它们可以永远释出药物, 或可促成局部达药的任何其它手段, 此外, 本发明方法中所使用的混合物之活体外使用可促成局部达药。

不过, IRF-1 活性的抑制不仅可在上述方法中于蛋白质层次上予以抑制, 而且可在转录因子蛋白质的转译之前予以完成。本发明另一

方面因而涉及作为治疗性物质的 IRF-1 表达抑制剂。该抑制剂较佳者作为一种单链型核酸分子，一种所谓的反义寡核苷酸。反义寡核苷酸可以在三种不同层次抑制目标基因的合成，于转录阶段(hnRNA 合成的防止)，hnRNA 变成 mRNA 的处理阶段 (剪接(splicing))以及 mRNA 在核糖体上的蛋白质转译。以反义寡核苷酸抑制基因表达的方法皆为现有技术且为本领域技术人员所熟知。本发明方法中所使用的针对 IRF-1 之反义寡核苷酸较佳者展现出序列 5'-CGAGTGATGGGCATGTTGGC-3' (SEQ ID NO:23)且桥联着起始密码子。其它较佳的反义寡核苷酸序列为 5'-GATTCGGCTGGTCGC-3' (SEQ ID NO:24)，5'-TAATCCAGATGAGCCC-3' (SEQ ID NO:25) 和 5'-GGAGCGATTCGGCTGGT-3' (SEQ ID NO:26)。反义寡核苷酸可为单链型 DNA 分子，RNA 分子或 DNA/RNA-杂合分子。另外，反义寡核苷酸可展现出一或多个经修饰的核苷酸间键联，例如上文所述顺式元件假目标序列。于反义寡核苷酸以硫代磷酸酯(phosphorothioate)修饰核苷酸间键联予以稳定化之下，较佳者要考虑的是，在胞嘧啶与鸟嘌呤之间没有导入硫代磷酸酯修饰核苷酸间键联，因为此举可能导致较佳者免疫活性细胞(例如内皮细胞)的似 IFN $\gamma$ 活化且，因此，至少会部份挫及合意的治疗效应。

本发明另一方面为一种反义寡核苷酸，其可特异地抑制 IRF-1 表达且较佳者具有下列诸序列中一者：

5'-CGAGTGATGGGCATGTTGGC-3' (SEQ ID NO:23),

5'-GATTCGGCTGGTCGC-3' (SEQ ID NO:24),

5'-TAATCCAGATGAGCCC-3' (SEQ ID NO:25),

5'-GGAGCGATTCGGCTGGT-3' (SEQ ID NO:26)。

本发明进一步有关本发明反义寡核苷酸及/或双链 DNA 分子对于制造预防及/或治疗下列疾病所用医药品之用途：心血管并发症如透皮血管造形术之后的再狭窄或静脉旁通的狭窄，慢性(移植物动脉粥

样硬化或血管病)或急性移植物排斥, 移植物抗宿主疾病 (GVAD), 免疫性过敏性反应 (变应性), 特别者支气管型哮喘和异位性皮炎, 慢性复发性炎性病, 特别者溃疡性结肠炎和克隆氏症, 牛皮癣和肉样瘤病, 以及自体免疫疾病, 特别者糖尿病, 多发性硬化症, 胶原性疾病(例如系统性红斑狼疮), 风湿性关节炎和 vasculotids。此种治疗措施的一项特别优点在于可将 CD40/CD154 信号传送途径以共-刺激方式影响到的 TH1- 和 TH2-细胞反应同时减低。由是使其不会在 TH2 细胞反应(例如异位性皮炎)得衰减之下导致 TH1 细胞反应(例如牛皮癣)的解抑制或反之亦然。

下面的实施例和附图用以解释本发明而非限制本发明的范围。

### 1. 细胞培养

人类内皮细胞系从脐静脉经由使用 1.6 单位/毫升 dispase/hepes 改变的 tyrode 溶液在 37° C 下处理 30 分钟而离析出。将该细胞在涂覆着明胶(2 毫克/毫升明胶, 在 0.1 M HCl 中于室温; RT 下 30 分钟)的 6-洞组织培养板上于 1.5 毫升含有下列的 M199 培养基中培养: 20% 胎牛血清, 50 单位/毫升 青霉素, 50 微克/毫升( $\mu\text{g/ml}$ )链霉素, 10 单位/毫升制霉菌素, 5 mM HEPES 和 5 mM TES, 1 微克/毫升肝素和 40 微克/毫升内皮生长因子(endothelial growth factor)。该等细胞系以它们的典型铺路石形态学(paving stone morphology), 对 von Willebrandt-Factor (vWF)的阳性免疫染色与 PECAM-1 (CD31)的荧光分析检测 (fluorimetric detection) (FACS)以及对平滑肌(-肌动蛋白)的阴性免疫染色等予以鉴定 (Krzysz at al. (1999) FEBS Lett. 453, 191)。

### 2. RT-PCR 分析

内皮总 RNA 使用 Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 分离, 随后用最大 3 微克 RNA 和 200 U Superscript TM II 反转录酶 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany)以 20 微升的总体积根据制造商的说明书进行 cDNA 合成。要调整 cDNA 荷量时, 在 50 微

升总体积中, 使用 5 微升 (约 75 毫微克 cDNA) 所得 cDNA 溶液与延伸因子(EF-1)PCR 所用的引物对(Gibco) 加上 1 单位的 Taq DNA 聚合酶(Gibco)。使用 EF-1 作为 PCR 的内标准品。将 PCR 产物在含有 0.1% 的溴化乙锭之 1.5% 琼脂糖凝胶上分离并使用 CCD 摄影机和得自 Scanalytics (Billerica, MA, USA) 的 One Dscan Gel 分析软件系统经由光密度分析法测定分离带的强度以调整在随后 PCR 分析中的 cDNA 用量。

所有 PCR 反应都配合每一对引物个别地在 Hybaid Omne Thermocycler (AWG, Heidelberg, Germany) 内实施。人类内皮脐静脉 cDNA 所用的个别 PCR 条件为下面所述者: CD40(扩增子大小 381 bp, 25 个循环, 配对温度 60 °C, (正向引物) 5' - CAGAGTTC ACTGAAACGGAATGCC-3' (SEQ ID NO:27), (反向引物) 5' -TGCCTGCCTGTTGCACAACC-3' (SEQ ID NO:28); E-选择素 (E-Selectin) (扩增子大小 304 bp, 33 个循环, 配对温度 60 °C, (正向引物) 5' -AGCAAGGCATGATGTTAACC-3' (SEQ ID NO:29), (反向引物) 5' -GCATTCCTCTCTCCAGAGC-3' (SEQ ID NO:30); IRF-1 (扩增子大小 310 bp, 29 个循环, 配对温度 55 °C, (正向引物) 5' -TTCCCTCTTCCACTCGGAGT-3' (SEQ ID NO:31), (反向引物) 5' -GATATCTGGCAGGGAGTTCA-3' (SEQ ID NO:32); EF-1 (扩增子大小 220 bp, 22 个循环, 配对温度 55 °C, (正向引物) 5' -TCTTAATCAGTGGTGGAAAG-3' (SEQ ID NO:33), (反向引物) 5' -TTTGGTCAAGTTGTTTCC-3' (SEQ ID NO:34)。

### 3. 电泳迁移率变动分析 (EMSA)

核萃取物和 [<sup>32</sup>P]- 标记双链一致性寡核苷酸 (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Germany) 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显和超偏移等分析都是按照 Krzesz 等 (1999) FEBS Lett.

453, 191 所述实施的。寡核苷酸与下列单链型序列使用(核结合序列为下面划线者): NF $\kappa$ B, 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' (SEQ ID NO:35); STAT-1, 5'-CATGTTATGCATATTCCTGTAAGT G-3' (SEQ ID NO:36); IRF-1, 5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3' (SEQ ID NO:19).

#### 4. 假目标寡核苷酸 (dODN)技术

按照 Krzesz 等(1999) FEBS Lett. 453, 191 中所述从互补单链型经硫代磷酸酯键联的寡核苷酸 (Eurogentec, Cologne, Germany)产生双链 dODNs。将经培养的人类内皮细胞与浓度 10<sup>-6</sup> M 的个别 dODN 预先温育 4 小时。这些都是先前由 EMSA 和 RT-PCR 分析予以最优化过的相同条件。含 dODN 的培养基通常于其后使用新鲜培养基予以置换。下面列出 dODNs 的单链型序列 (下面划线的字母表出经硫代磷酸酯键联的碱基, 所有序列都是以 5' - 3'方向写出):

NF $\kappa$ B, AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC (SEQ ID NO:35);

STAT-1, CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG (SEQ ID NO:36);

IRF-1, GGAAGCGAAAATGAAATTGACT (SEQ ID NO:19);

IRF-1n cons CAGAAAAGTGAAACCCTG (SEQ ID NO:11);

IRF-1n mut CAGATGAGTGTAACCCTG (SEQ ID NO:37).

#### 5. 反义寡核苷酸技术

对于反义实验, 在 1 毫升培养基内加入 3% Lipofectin (v/v) (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany)并在室温保温 30 分钟。随后添加个别的反义寡核苷酸 (Eurogentec, Cologne, Germany)到 0.2 $\mu$ M 的最后浓度并在室温下再保温 15 分钟。于实验开始时, 加入个别量的肝素和内皮生长因子并使用反义 Lipofectin 培养基更换常规的内皮细胞培养所用培养基。于 5 小时之后, 取出反义 Lipofectin 培养基并

改换成新鲜的细胞培养基。 IRF-1 反义寡核苷酸(IRF-1 AS)的序列为 5'-CGAGTGATGGGCATGTTGGC-3' (SEQ ID NO:23)。使用一错义 (missense) 寡核苷酸 (IRF-1 MS, 5'-CGAGTGGTAGACGTATTGGC-3' (SEQ ID NO: 38))和一混杂型(scrambled)寡核苷酸(IRF-1 SCR, 5'-GAGCTGCTGAGGTCGTTGAG-3' (SEQ ID NO:39))作为对照寡核苷酸(oligos)。

## 6. 荧光激活细胞分类术 (FACS)

将待分析的内皮细胞于初始使用 1 毫升 FACS 缓冲液(PBS, 2% 胎牛血清, 经无菌过滤过)洗涤三次, 每一次都于随后再悬浮于 2 毫升 FACS 缓冲液内。于离心(300 x g, 5 分钟, +4° C)之后, 根据制造商的指示加入荧光标记抗体 (Pharmingen, San Diego, USA) (20 微升/10<sup>6</sup> 细胞)并测定出总细胞数 (Neubauer Counting Chamber)且在 +4° C 黑暗中保温 30 分钟。随后使用 2 毫升 FACS 缓冲液洗涤样品并于+4°C下以 300 x g 离心 10 分钟。取出上澄液并将细胞沉淀再悬浮于 1 毫升 Cell Fix (PBS, 1% 甲醛)中且贮存在+4° C 黑暗中到要测量为止(EPICS(r)XL MCL, Coulter, Krefeld, Germany)。使用下列抗体: CD40, 经 R-藻蓝素(R-Phycoerythrin) (RPE)-和荧光素异硫氰酸酯 (FITC)-缀合; PECAM-1 (CD31), 经荧光素异硫氰酸酯(FITC)-缀合。使用各自的 RPE-和 FITC-缀合同种型对照样以测定非特异性细胞抗体结合。

## 7. Western 印迹分析

将内皮细胞以 5 次连接的在液氮中与 37° C (加热块组, Kleinfelden, Germany)下之冷冻-解冻循环予以浸软。按照 Hecker et al. (1994) Biochem J 299, 247 所述产生蛋白质萃取物。根据标准方案使用 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳在 SDS 存在中的变性条件下分离出 20-30

微克蛋白质并将其转移到 BioTrace™ Polyvinylidene Fluoride Transfermembran (Pall Corporation, Rodorf, Germany)上。使用针对 CD40 蛋白质的 C-端之多克隆原发抗体 (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA)来侦检 CD40 蛋白质。在添加过氧化酶缀合抗-兔子 IgG (1:3000, Sigma, Deisenhofen, Germany)之后, 利用化学发光法 (SuperSignal Chemiluminescent Substrat; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA)配合随后的放射自显影术(Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB)侦检蛋白质分离带。相同蛋白质质量的装载与转移系使用蓝色油墨点渍染色予以显示。

## 8. 统计学分析

除非有不同的显示, 否则附图中的所有数据都是以 n 个实验的平均值±SD 显示出。统计学分析系使用 Students t-Test 对未配对的数据以 p-值<0.05(以此视为具有统计意义者)实施的。

## 9. 对具有 CD40/CD154 相关移植物排斥的动物之实验证明

使用 STAT-1 假目标寡核苷酸对动物以实验方式检验大鼠体内的移植物排斥, 此系因为 STAT-1 为促成大鼠体内干扰素- $\gamma$ 诱导 CD40 表达, 不同于在人体内系由 IRF-1 促成者(Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191)。

### 株系组合

使用株系组合 Brown Norway 供给者对 Lewis 接受者的同种异基因移植。在没有免疫压制之下, 于 7 天之后即发生移植物排斥。实施从 Lewis 到 Lewis 的移植作为同基因对照。

### 外植

将动物的腹部于乙醚吸入麻醉之下, 沿中线打开。首先从所有动脉部份释出主动脉节段以制备 1 公分长具有预期的肠系膜动脉(Ateria

mesenterica)之主动脉节段。于下一步骤中取出完整的结肠。其后将门静脉的所有静脉血管在胰脏的纬部连接在一起使得胰脏无拘束地进入肝门(porta hepatis)。至此经如此准备的供给者小肠只接着到主动脉干和门静脉。于肠系膜动脉的近侧和远侧将主动脉夹住,将门静脉于肝门处切开,并使用冷的威斯康辛大学溶液(University of Wisconsin (UW) solution)清洗小肠的血管床直到血管床没有残留宏观血液残留物为止。于最后步骤中同样地使用冷得 UW 溶液清洗肠腔。取出有主动脉节段的肠并贮存在冷的 UW 溶液内到要移植为止(长达 120 分钟)。当移植物经使用 STAT-1 假目标寡核苷酸(序列: CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG; (SEQ ID NO:36))或个别的突变对照核苷酸(序列: CATGTTATGCAGACCGTAGTAAGTG (SEQ ID NO:40))处理之时,将移植物浸到林格式溶液(Ringer solution)(含有 145 毫摩尔/升  $\text{Na}^+$ , 5 毫摩尔/升  $\text{K}^+$ , 156 毫摩尔/升  $\text{Cl}^-$ , 2 毫摩尔/升  $\text{Ca}^{2+}$ , 1 毫摩尔/升  $\text{Mg}^{2+}$ , 10 毫摩尔/升 HEPES, 10 毫摩尔/升 D-葡萄糖, pH 7.4;体积 3 毫升,最后浓度 20 微摩尔/升)内的肠系膜动脉中并紧接在接通术(anastomorization)之前使用林格式溶液清洗。

### 植入

将动物的腹部于乙醚吸入麻醉之下,沿中线打开。准备腔动脉与腔静脉并同时夹住。血管连接是使用 8-0 耐纶缝线(nylonstitch)以连续缝合技术沿着末端到侧面(end-to-side)完成的。将载有主动脉节段的肠系膜动脉接通到静脉下主动脉(infravenal aorta)并将门静脉接通到静脉下腔静脉(infravenal vena cava)。于解放循环之后,将供给者肠的末端回肠也使用 6-0 耐纶缝线以末端到侧面方式连接到供给者肠的末端回肠。将供给者肠产生的粘液排到动物的正常排泄信道内。将供给者肠的口端结扎闭合并将腹部以两层方式连续地露出。为止痛理由让动物于受术后在其饮用水中接受 Temgesic。

活体内显微术分析(Intravital microscopie)

白细胞内皮交互作用对于发炎反应的重要性评估只有以活体内显微术分析进行才可能。这种方法可用来观察活体内白细胞在内皮上的"滚轧与粘着"以及微血管参数(组织的灌注(perfusion), 功能性毛细血管密度(functional capillary density)和血液流速)之定量分析。

活体内显微术细使用得自 Zeiss (Gottingen)装有 HBO 100 汞灯的 Axiotech Vario 100 显微镜实施以进行表面荧光测量。使用 10x, 20x 和 40x(浸水型)透镜以达到 243x, 476x 和 933x 的分辨率。使用 CCD 视讯摄影机 (CF 8/1, Kappa)采取显微镜影像并贮存在录像带上供分析所用。

在深度乙醚麻醉下移植 7 天之后, 使用活体内显微术检验大鼠(6 只动物/组)。为帮助呼吸, 于气管中插入导管。将聚胺基甲酸酯插管插置于颈动脉内以永久监测血压以使染料的施加获得简化。使用加热板将动物的体温保持固定。对动物经由中腹部切割予以打开, 将降结肠排空, 将一小切口以反肠系膜方式复合并将小肠以特用固定具固定以帮助显微术的进行。为了防止组织干涸, 使用林格式溶液将小肠永久湿润。经由注射 0.8 毫升的 0.5% FITC(荧光素异硫氰酸)缀合葡聚糖使肠的微循环显现。为了统计地涵盖测量值, 乃检验个别肠部份的至少 10 不同部位。各不同参数系按下述予以定量分析: 灌注指数系得自经灌注的粘膜面积(单位 %) + 0.5 x 所有经不规则灌注的粘膜面积(单位 %)。功能性毛细血管密度系经由计算机辅助影像分析(CAP-IMAGE software, Zeintl, Heidelberg, Germany)予以测定。要检验白细胞内皮交互作用时, 系经由注射 0.2 毫升的 0.1% 若单明-6 G(Sigma, Heidelberg, Germany)以标记白细胞并以显微镜检验粘膜下后毛细血管微静脉(the post capillary venules)。此等白细胞经定义为粘连白细胞("粘贴者"("sticker")), 它们会接着到内皮上一段 100 微米长度得血管节段至少 20 秒。计算出粘贴者数目/平方毫米内皮表面积的值。内皮表面积系得自对圆柱形的表面积计算。

### 小肠移植结果

作为灌流测量单位的粘膜功能性毛细血管密度，于没有排斥的对照组和用突变对照寡核苷酸处理组两者内都减低到同基因移植小肠所得值的。相异者，在使用 STAT-1 顺式元件假目标处理过的小肠内，功能性毛细血管密度则增加 4 倍。于此等动物体内的血液流速(红细胞流速)则为更高 10 倍且灌流指数为更高 3 倍。Staseindex 减低 60%且接着到内皮的白细胞数目减低 25%。只有后面的参数没有具统计学意义地变更。于使用顺式元件假目标处理的组中，该排斥会诱导肠灌流的减低且因而，使移植物的变质概括地明显减低。

## 序列表

<110> 亚文塔克有限公司  
 <120> 促炎基因产物转录之调制  
 <130> HEC-001 PCT  
 <140> unknown  
 <141> 2001-10-06  
 <150> DE 100 49 549.4  
 <151> 2000-10-06  
 <150> DE 100 59 144.2  
 <151> 2000-11-29  
 <160> 40  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5)..(7)  
 <223> g,a,c或t  
 <400> 1  
 saaannnsaa ayy 13  
 <210> 2  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(9)  
 <223> g.a.c或t(u)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(9)  
 <223> g.a.c或t  
 <400> 2  
 yytttsnnt tts 13  
 <210> 3  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <400> 3

---

caaaagcgaa acc 13

<210> 4  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 4  
ggtttcgctt ttg 13

<210> 5  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 5  
gaaaagcgaa acc 13

<210> 6  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 6  
ggtttcgctt ttc 13

<210> 7  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 7  
caaaagtgaa acc 13

<210> 8  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 8  
ggtttcactt ttg 13

<210> 9  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 9  
gaaaagtgaa acc 13

<210> 10  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 10

ggtttcactt ttc	13
<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 11	
cagaaaagtg aaaccctg	18
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 12	
cagggtttca cttttctg	18
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 13	
cagtttcaaa ttgaaactg	19
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 14	
cagtttcaat ttgaaactg	19
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 15	
caggaaaagt gaaaccgctg	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 16	
cagcggtttc acttttctg	20
<210> 17	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<400> 17	

gcagtttcaa attgaaactg c	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 18	
gcagtttcaa tttgaaactg c	21
<210> 19	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 19	
ggaagcgaaa atgaaattga ct	22
<210> 20	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 20	
agtcaatttc attttcgctt cc	22
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 21	
ggcagtttca aattgaaact gcc	23
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 22	
ggcagtttca atttgaaact gcc	23
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 23	
cgagtgatgg gcatggttggc	20
<210> 24	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 24	

gattcggctg gtcgc	15
<210> 25	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 25	
taatccagat gagcdc	16
<210> 26	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 26	
ggagcgattc ggctggt	17
<210> 27	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 27	
cagagttcac tgaaacggaa tgcc	24
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 28	
tgccctgctg ttgcacaacc	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 29	
agcaaggcat gatgtaacc	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 30	
gcattcctct cttccagagc	20
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 31	

tccctcttc cactcggagt	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 32	
gatatctggc agggagttca	20
<210> 33	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 33	
tcttaatcag tggtggaag	19
<210> 34	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 34	
tttggcgaag ttgtttcc	18
<210> 35	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 35	
agttgagggg actttcccag gc	22
<210> 36	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 36	
catggtatgc atattcctgt aagt	24
<210> 37	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 37	
cagatgagtg taacctg	18
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<400> 38	

---

cgagtggtag acgtattggc 20

<210> 39  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 39  
gagctgctga ggtcgttgag 20

<210> 40  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工

<400> 40  
catgttatgc agaccgtagt aagtg 25

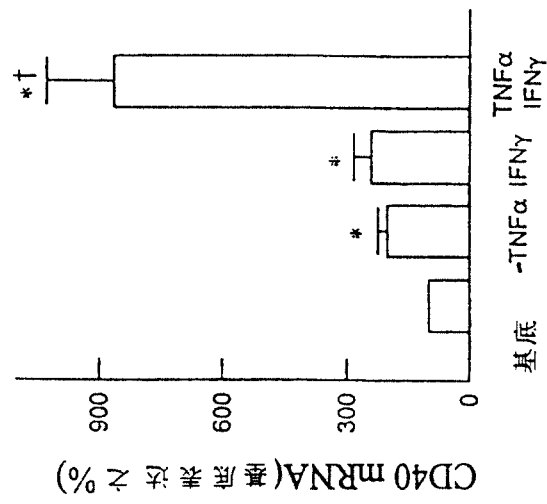


图1

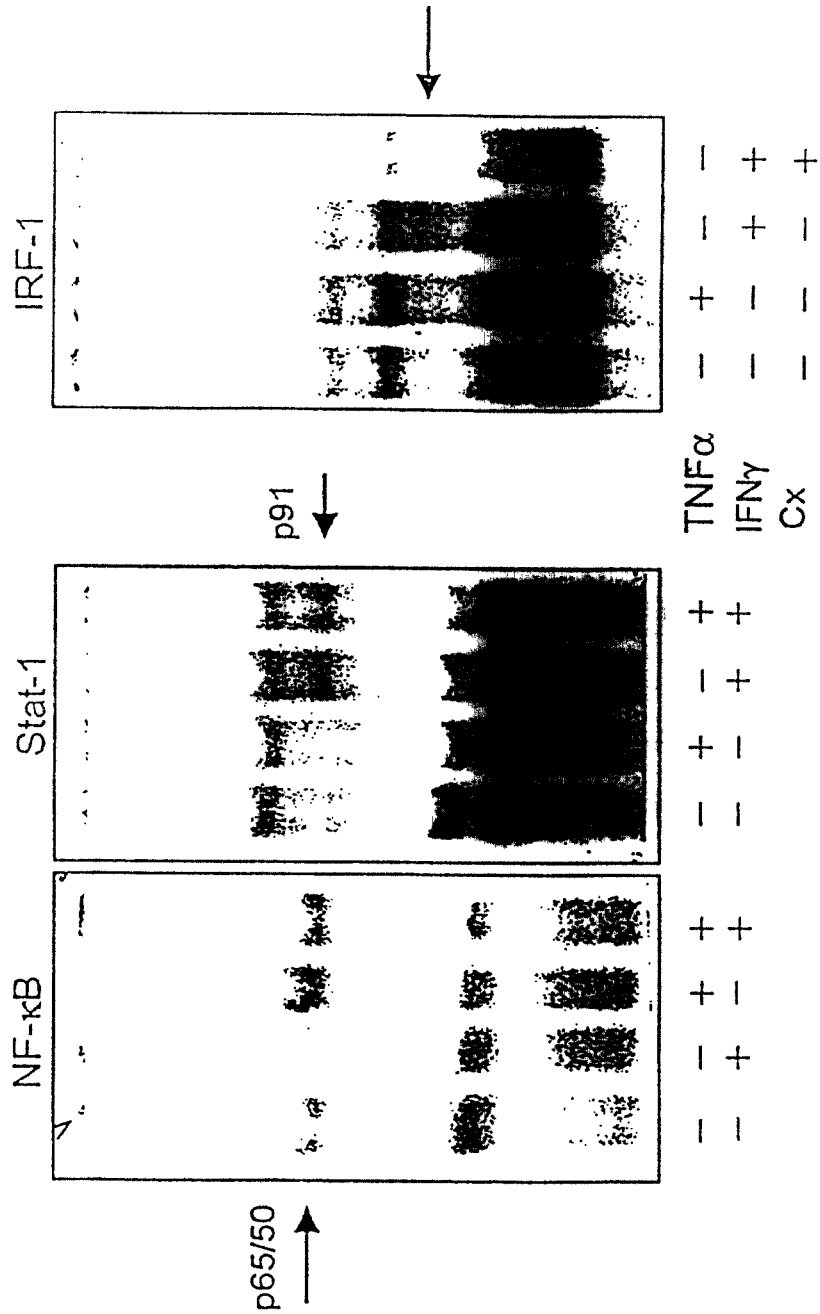


图2

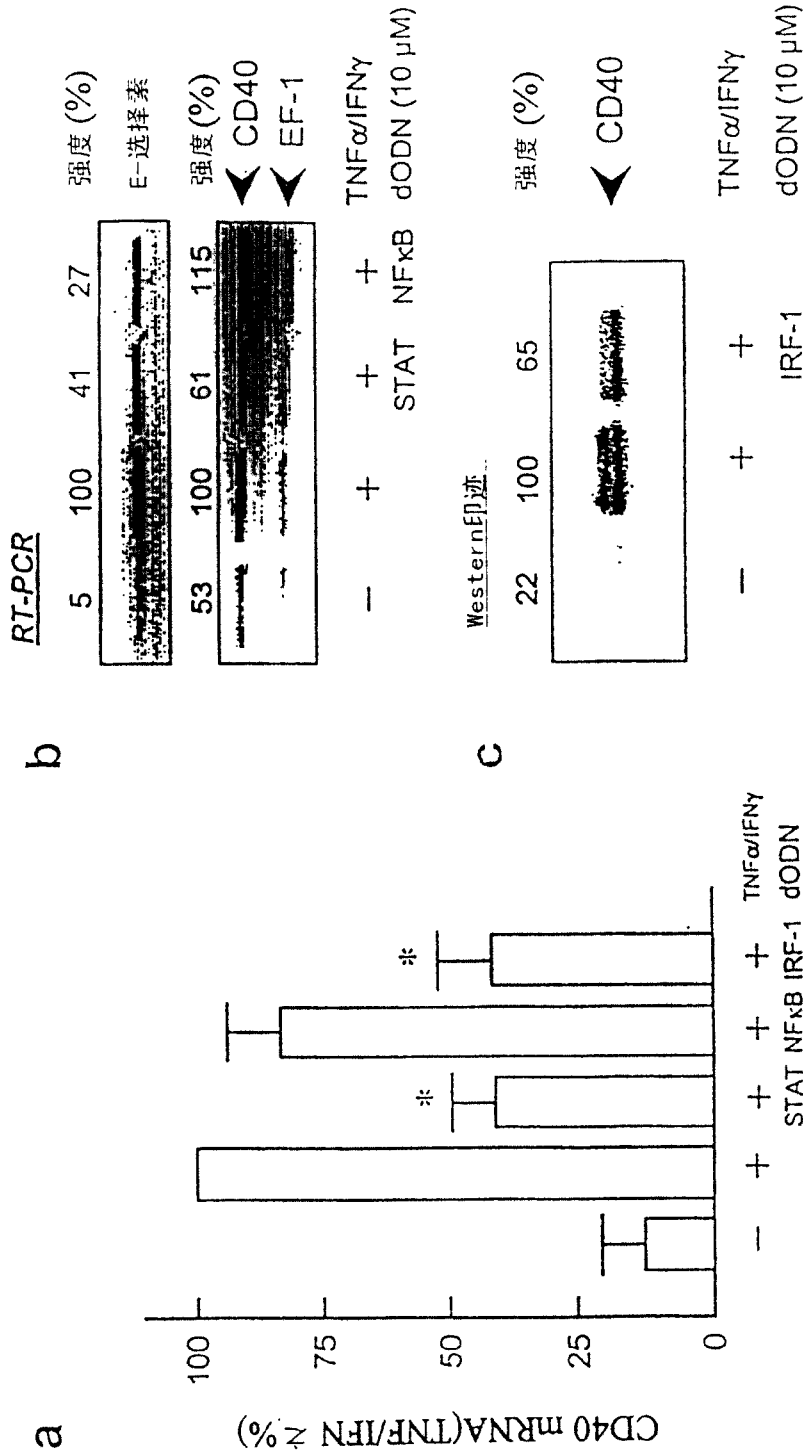


图 3

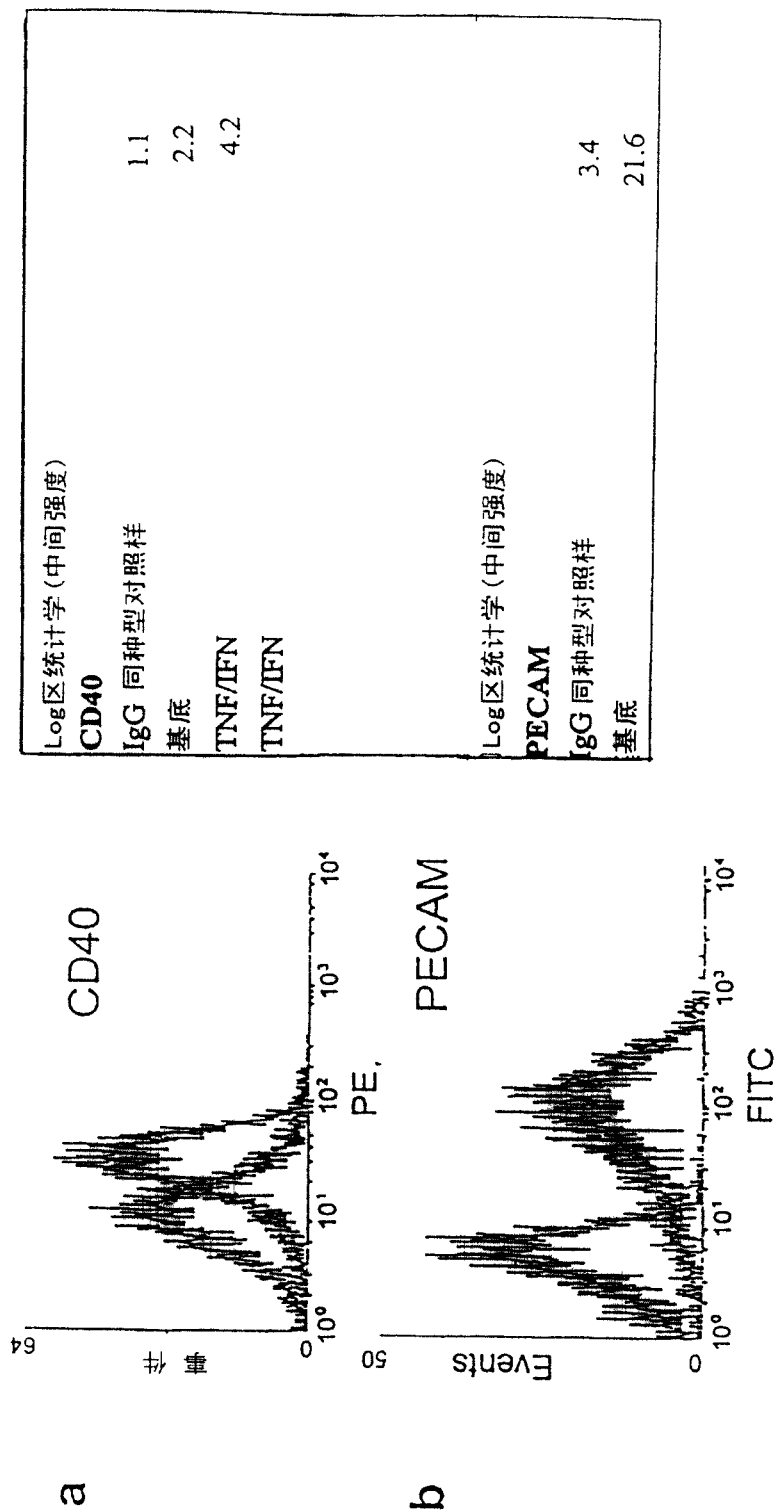


图4

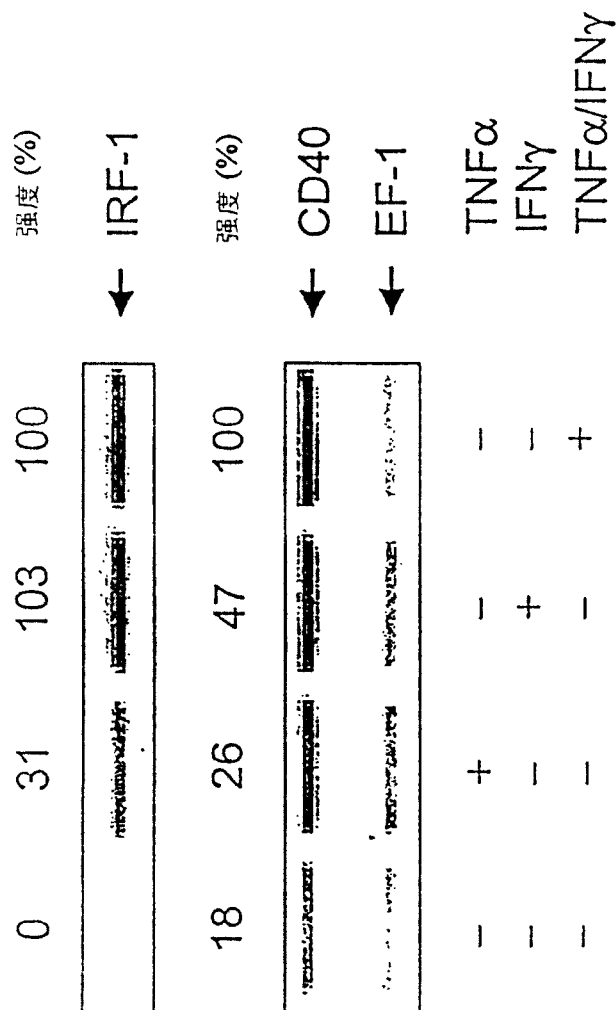


图5

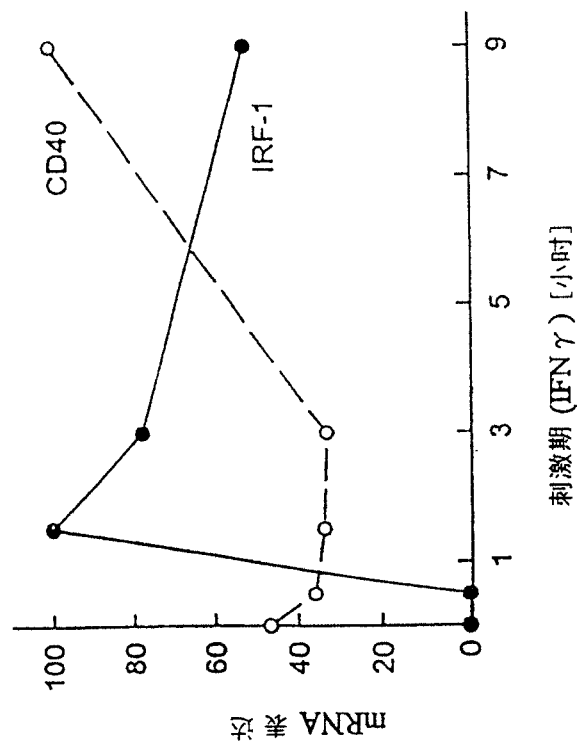


图6

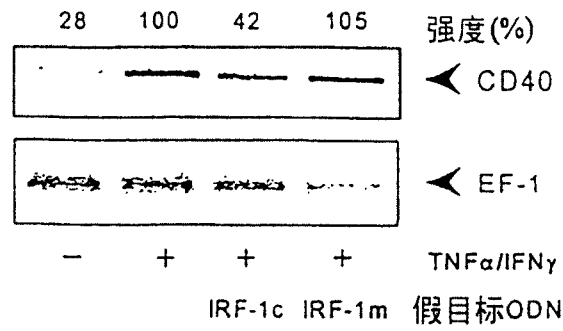


图7

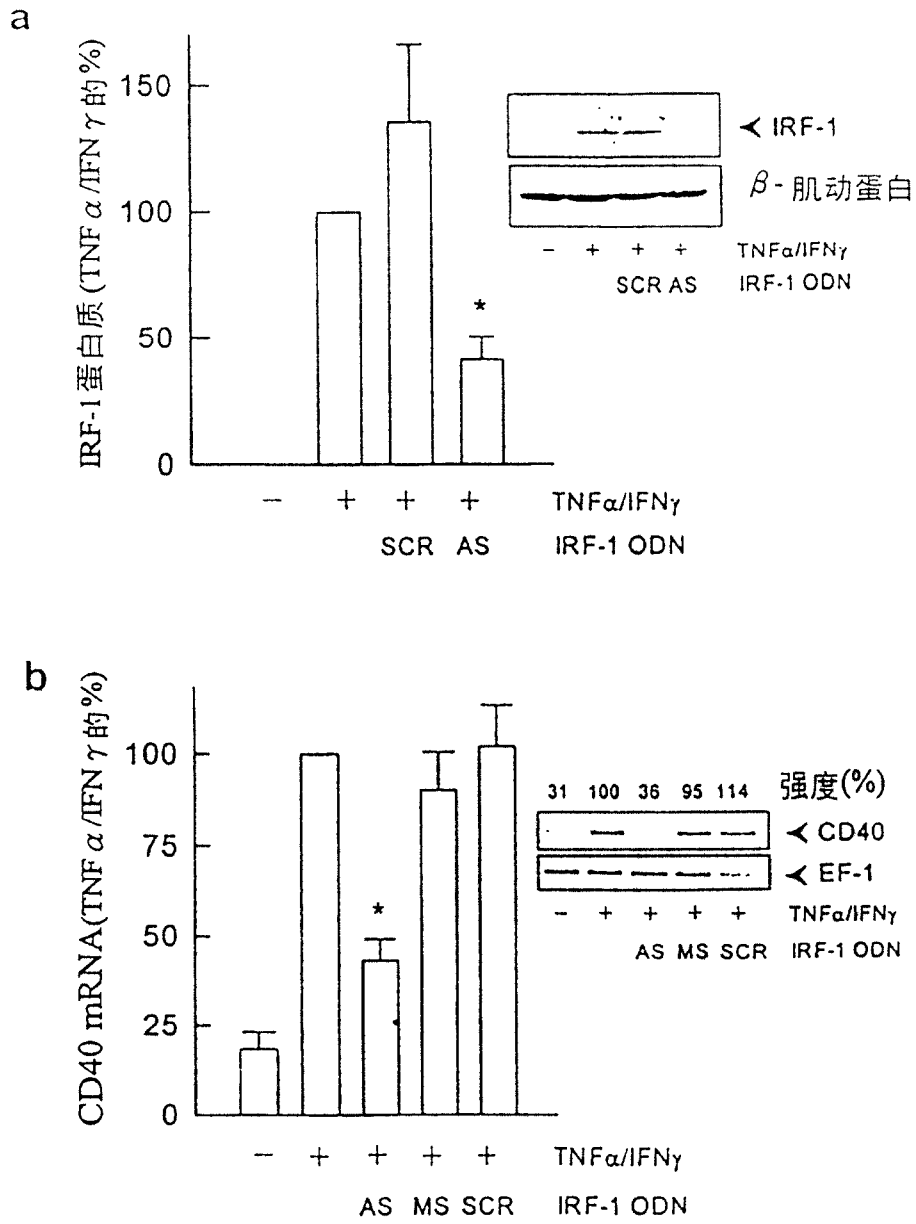


图8

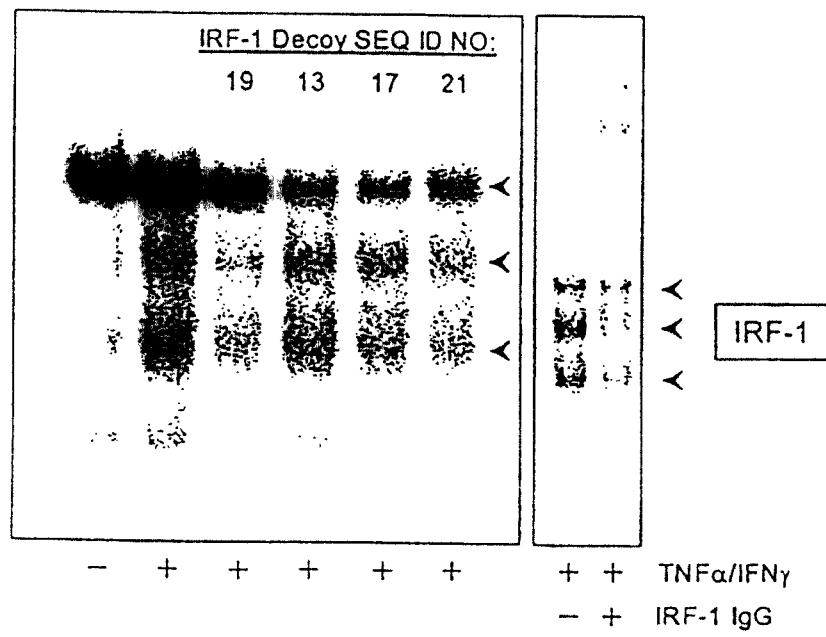


图9