



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111825743 A

(43) 申请公布日 2020.10.27

(21) 申请号 202010358115.3 *A61K 38/08* (2019.01)

(22) 申请日 2014.09.24 *A61K 38/10* (2006.01)

(30) 优先权数据 *A61P 29/00* (2006.01)

61/881,798 2013.09.24 US *A61P 17/02* (2006.01)

(62) 分案原申请数据
201480064038.3 2014.09.24

(71) 申请人 范因斯坦医学研究院
地址 美国纽约州

(72) 发明人 王平

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

代理人 陈文平 黄海波

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

权利要求书2页 说明书38页
序列表14页 附图25页

(54) 发明名称

对可冷诱导的RNA结合蛋白活性进行抑制的肽

(57) 摘要

本申请涉及对可冷诱导的RNA结合蛋白活性进行抑制的肽,披露了包含CIRP抑制剂的药物组合物。在此还描述了治疗患有炎症病症的受试者的方法,这些方法包括向所述受试者给予CIRP抑制剂。

1. 一种分离的肽或其药学上可接受的盐,其由以下组成:

Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp (SEQ ID NO:12) 的十个氨基酸残基序列,其中所述肽任选地由肽键合的羧基末端延伸组成,所述羧基末端延伸依次由以下连续氨基酸中的前一个、前两个、前三个、前四个或前五个组成,所述连续氨基酸为:Arg₁-Gly₂-Tyr₃-Gly₄-Gly₅ (SEQ ID NO:45),或者其中所述肽任选地由肽键合的氨基末端延伸组成,所述氨基末端延伸依次由以下连续氨基酸中的前一个、前两个、前三个、前四个或前五个组成,所述连续氨基酸为:Gly₅-Gly₄-Arg₃-Gly₂-Arg₁ (SEQ ID NO:46),或者其中所述肽任选地由所述一至五个氨基酸羧基末端和氨基末端延伸二者组成;和

其中该肽的长度是10个至20个氨基酸残基;其中该肽是直链的肽;以及其中该肽抑制冷诱导的RNA结合蛋白(CIRP)的一种或多种生物活性。

2. 如权利要求1所述的肽或其药学上可接受的盐,其中该肽或其药学上可接受的盐抑制CIRP结合至MD2细胞表面受体。

3. 如权利要求1所述的肽或其药学上可接受的盐,其中该肽或其药学上可接受的盐抑制CIRP结合至TLR4/MD2复合物。

4. 如权利要求1所述的肽或其药学上可接受的盐,其中该肽由如下各项组成:氨基酸残基序列:

Gly-Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp (SEQ ID NO:13)。

5. 如权利要求1所述的肽或其药学上可接受的盐,其中该肽由如下各项组成:氨基酸残基序列:

Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp-Arg-Gly-Tyr-Gly-Gly (SEQ ID NO:14)。

6. 一种药物组合物,包括:

至少一种如权利要求1-5中任一项所述的肽或其药学上可接受的盐;以及药学上可接受的载体或稀释剂。

7. 至少一种如权利要求1至5中任一项所述的肽或其药学上可接受的盐在制备用于治疗患有由CIRP介导的炎症病症的受试者的药剂中的用途。

8. 如权利要求7所述的用途,其中该炎症病症选自下组,该组由以下各项组成:出血性休克、脓毒性休克、脓毒症、脓毒症-脓毒性休克、败血症、内毒素休克和创伤性出血。

9. 如权利要求7所述的用途,其中该受试者是人类。

10. 如权利要求7所述的用途,其中该至少一种肽或其药学上可接受的盐抑制促炎细胞因子的释放。

11. 如权利要求7所述的用途,其中该至少一种肽或其药学上可接受的盐抑制TNF- α 的释放。

12. 至少一种如权利要求1-5中任一项所述的肽或其药学上可接受的盐在制备用于抑制CIRP的一种或多种生物活性的药剂中的用途。

13. 如权利要求12所述的用途,其中CIRP的该生物活性是CIRP介导的信号转导。

14. 如权利要求12所述的用途,其中CIRP的该生物活性是CIRP介导的炎症。

15. 如权利要求12所述的用途,其中CIRP的该生物活性是CIRP介导的促炎细胞因子的

释放。

16. 如权利要求12所述的用途,其中CIRP的该生物活性是CIRP介导的TNF- α 的释放。

17. 至少一种如权利要求1至5中任一项所述的肽或其药学上可接受的盐在制备用于治疗患有皮肤创伤的患者的药剂中的用途。

18. 如权利要求17所述的用途,其中该皮肤创伤是慢性皮肤创伤。

19. 如权利要求17所述的用途,其中该皮肤创伤是糖尿病性溃疡。

20. 如权利要求17所述的用途,其中该皮肤创伤是褥疮。

21. 权利要求1-5中任一项所述的肽或其药学上可接受的盐用于制备治疗由CIRP介导的炎性病症的药剂中的用途。

对可冷诱导的RNA结合蛋白活性进行抑制的肽

[0001] 本申请是申请号为201480064038.3、申请日为2014年9月24日、名称为“对可冷诱导的RNA结合蛋白活性进行抑制的肽”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 这一申请要求于2013年9月24日提交的美国临时申请号61/881,798的权益。上述申请的全部说明通过引用结合在此。

[0004] 通过引用ASCII文本文件中的内容结合

[0005] 本申请通过引用结合了包含于与其同时提交的以下ASCII文本文件中的序列表：

[0006] 文件名称：32681023001SEQLIST.txt；创建于2014年9月23日，大小 11KB。

[0007] 政府支持

[0008] 本发明是由美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 资助的在资助金R01 HL 076179和GM053008下由政府支持进行的。在本发明中政府具有一定的权利。

[0009] 发明背景

[0010] 炎症是血管组织对有害刺激(如,病原体、受损细胞、或刺激物)的复杂的生物反应。它是生物的一种保护性尝试,以去除有害刺激,并且发起组织的愈合过程。在不存在炎症的情况下,创伤和感染最好情况是更缓慢的愈合,并且组织的渐进性破坏将有碍生物体的存活。然而,未检查出的炎症还可以导致许多疾病。

[0011] 可以将炎症分类为急性或慢性。急性炎症是身体对有害刺激的始初反应,并且通过增加从血液至受损组织的血浆和白细胞的移动来实现。生化事件的级联使炎症应答传播并成熟,其涉及局部的血管系统、免疫系统、和损伤组织内的各种细胞。长期炎症(被称为慢性炎)导致存在于炎症位点的细胞类型的渐进性转变,并且表征为由于炎症过程造成的组织的同时破坏和治愈。

[0012] 由失血量造成的出血性休克和多器官衰竭仍是在医疗和外科重症监护室中具有无法接受的高死亡率的主要死亡原因之一。即使已经研究多种医疗器械和物质来防止循环衰竭并且来减少死亡率,但是仍没有完全成功。

[0013] 类似地,创伤愈合是涉及止血、炎症、修复、和重构的动态的和复杂的过程。在愈合过程中需要多种细胞类型、酶、蛋白和信号分子以协调的方式工作。针对创伤护理存在许多治疗意见,这些治疗意见包括银治疗、负压创伤设备、高压氧、皮肤替代品、先进敷料、和生长因子以及生物创伤产品。尽管有众多现有临床工具,但是仍不能有效治疗和管理慢性创伤。非治愈性创伤仍然是一个显著的临床问题,并且往往导致截肢。具体而言,尽管创伤护理管理存在进步,但是皮肤创伤仍然造成显著的发病率和死亡率。如果患者还患有障碍(如糖尿病或心血管疾病),那么由外伤造成的急性皮肤创伤可能变成慢性(非治愈性)创伤。患者可能因慢性创伤的并发症(如,创伤感染、脓毒症和脓毒性休克),连同由长期不活动造成的栓塞事件致死。

[0014] 发明概述

[0015] 在一方面,本发明是基于如下发现:抑制冷诱导的RNA结合蛋白(CIRP)减弱炎症

应答。更确切地,申请已经发现,与未治疗的对照相比,在出血性休克的动物模型中,抑制CIRP减少天冬氨酸转氨酶(AST)、肝脏髓过氧化物酶(MPO)、乳酸、TNF、血清TNF和血清、肺和肝IL-6的水平(图7-8)。此外,抑制CIRP减少出血诱导的死亡率(图6)。基于该发现,披露了用于治疗炎症病症的药物组合物和方法。

[0016] 在一个实施例中,本发明是分离的肽,该分离的肽包括 Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp (SEQ ID NO:12) 的氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐;或与 SEQ ID NO:12 具有至少80%同源性的氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐,其中该肽的长度是10至30个氨基酸残基。

[0017] 在另一个实施例中,本发明是包括药学上可接受的载体或稀释剂和分离的肽的药物组合物,该分离的肽包括:SEQ ID NO:12的氨基酸残基序列,或与SEQ ID NO:12具有至少80%同源性的氨基酸残基序列。

[0018] 在另一个实施例中,本发明是治疗患有炎症病症的受试者的方法,该方法包括向受试者给予有效量的分离的肽,该分离的肽包括SEQ ID NO:12的氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐,或与SEQ ID NO:12具有至少80%同源性的氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐。

[0019] 在另一个实施例中,本发明涉及抑制一种或多种CIRP生物活性的方法,该方法包括将CIRP与分离的肽接触,该分离的肽包括SEQ ID NO:12氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐,或与分离的肽接触,该分离的肽包括与SEQ ID NO:12具有至少80%同源性的氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐。具体地而言,本申请已经发现了,本发明的肽,尤其是分离的肽(包括SEQ ID NO:12的序列或与SEQ ID NO:12具有至少80%同源性的残基序列),有效抑制了CIRP介导的促炎细胞因子释放,然而其他肽对CIRP的生物活性没有这种抑制作用。

[0020] 在另一方面,本发明是基于如下发现,CIRP的表达妨碍了愈合过程。调节CIRP表达和/或生物活性提供了创伤治法的新颖的靶标。

[0021] 因此,在一个实施例中,本发明是治疗有皮肤创伤的受试者的方法,该方法包括向受试者给予有效量的分离的肽,该分离的肽包括SEQ ID NO:12的氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐,或包括与SEQ ID NO:12具有至少80%同源性的氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐。

[0022] 附图简要说明

[0023] 图1是人类CIRP的氨基酸序列的绘图(SEQ ID NO:1)。

[0024] 图2A至2D说明,与假性手术(未流血)对照相比,在出血的动物模型中肝、心脏和血液中的CIRP基因的过度表达。图2A和2B是条形图,该条形图示出在动物出血模型中,在肝脏和心脏组织中CIRP表达分别成倍增加。图2C和2D是通过蛋白质印迹法检测的色谱分离的CIRP的照片。

[0025] 图3A和3B是条形图,该条形图解释了,在向受伤的动物给予重组CIRP (rCIRP) 后天冬氨酸转氨酶(AST,图3A)和丙氨酸氨基转移酶(ALT,图3B)的血中浓度的升高。

[0026] 图4A至4F解释了,在向健康大鼠给予rCIRP后,血液、肝脏和肠道组织中炎性细胞因子TNF和HMGB1的增加。

[0027] 图5A至5D解释了,rCIRP对来自培养的巨噬细胞的刺激细胞因子释放(TNF,IL-6,

HMGB1)的时程和作用。

[0028] 图6是一幅图,该图解释了,与未治疗的对照相比,通过在出血的动物模型中添加抗CIRP抗体,存活率增加。

[0029] 图7A至7C是图,这些图解释了,与未治疗的对照相比,在出血动物模型中,给予抗CIRP抗体组合后血清AST、ALT、乳酸的减少。

[0030] 图8A至8G是图,这些图解释了,与未治疗的对照相比,在出血动物模型中,在给予抗CIRP抗体后,由抗CIRP抗体造成的血清的、肺的和肝的IL-6的减少。在图8G中,通过实验性出血增加了骨髓过氧化物酶(MPO)活性,并且该增加通过给予抗CIRP抗体被逆转,而不是通过对照抗体。

[0031] 图9A是蛋白质印迹法的照片,其检测了取自健康志愿者或患有休克的 外科重症监护室(SICU)患者的血清样品中的CIRP的水平。

[0032] 图9B是蛋白质印迹法的照片,其检测了取自大鼠出血后的血清和组织样品中的CIRP水平。

[0033] 图9C示出条形图,这些条形图指示在出血后240min处出血动物的组织中CIRP转录的上调。

[0034] 图9D至9H说明了缺氧对细胞系的作用。图9D示出来自含氧量正常的和缺氧的RAW 264.7细胞的细胞抽提物的细胞核和细胞质成分的蛋白印迹法的照片。图9E示出用GFP-CIRP表达质粒转染的RAW 264.7细胞的荧光显微照片。图9F是检测条件培养基中CIRP的蛋白质印迹法的照片,在条件培养基中在缺氧休克后RAW 264.7细胞生长0、7、和24小时。图9G是对来自缺氧休克后0、7、和24小时的RAW 264.7细胞的细胞裂解物中的CIRP进行检测的蛋白质印迹。图9H示出来自在含氧量正常或缺氧条件下培养的 RAW 264.7细胞的细胞提取物的蛋白质印迹。将裂解物分馏成细胞核(N)和溶酶体(L)成分。在图9A、9B和9F中,“PS红”是针对蛋白质印迹膜的丽春红S红染色,以显示蛋白负载量。

[0035] 图10A、10B、和10D至10F是图,这些图说明了在各种细胞系中rCIRP对细胞因子释放的作用。图10A、10B、和10D-RAW 264.7细胞;图10E-人类THP-1细胞;图10F-人类PBMC系。

[0036] 图10C是条形图,该条形图说明了在向大鼠给予rmCIRP后, HMGB1的血清水平的诱导。

[0037] 图10G是条形图,该条形证实了在暴露于CIRP之前用抗CIRP抗体预孵育人类THP-1细胞对TNF α 的作用。

[0038] 图11A至11F说明了,在动物出血模型中,利用抗CIRP抗体使得细胞因子产生和肝损伤减弱和用抗CIRP抗体防止致死性。

[0039] 图12A至12G说明了,在脓毒症动物模型过程中CIRP的表达和释放,连同抗CIRP抗体的作用(图12G)。

[0040] 图13A至13D证实了,TLR4/MD2复合物介导细胞外CIRP活性。

[0041] 图14说明了人类CIRP与rhMD2的结合区域。

[0042] 图15示出RAW 264.7细胞的荧光显微照片,该照片证实缺氧/复氧诱导 CIRP易位从细胞核到细胞质。

[0043] 图16A至16D证实CIRP和HMGB1对TNF- α 释放的刺激累加效应。

[0044] 图17A至17C证实在健康大鼠中,重组CIRP(rCIRP)诱导炎性应答。

[0045] 图18说明了通过表面等离子体共振 (SPR) 分析测量的rhCIRP与模式识别受体的结合动力学。

[0046] 图19通过表面等离子体共振 (SPR) 分析说明了衍生自人类CIRP的 15-mer寡肽与rhMD2的结合动力学。

[0047] 图20A至20C说明了寡肽C22和C23 (而不是C21) 对人类THP-1细胞的TNF- α 的产生的抑制作用。

[0048] 图21是一幅图,该图示出在CIRP裸鼠与野生型小鼠中,作为愈合天数的函数的皮肤创伤的较小相对面积。

[0049] 图22是条形图,该条形图证实在CIRP刺激后,多种CIRP衍生肽对 THP-1细胞的TNA- α 分泌的作用。

[0050] 图23A是蛋白质印迹的照片,其证实在CIRP刺激后,寡肽C23对MLVEC 中ICAM-1的表达水平的作用。

[0051] 图23B是条形图,该条形图说明,在CIRP刺激后,寡肽C23对来自 MLVEC的IL-1 β 的分泌水平的作用。

[0052] 图24A是条形图,该条形图说明,在脓毒症小鼠的肺中,寡肽C23对 E-选择素 (顶部) 和ICAM-1 (底部) 的表达水平的作用。

[0053] 图24B是条形图,该条形图说明,在脓毒症小鼠的肺中,寡肽C23对 TNF- α (顶部) 和IL-1 β (底部) 的表达水平的作用。

[0054] 图24C是条形图,该条形图说明,在脓毒症小鼠的血清中,寡肽C23对TNF- α (顶部) 和IL-1 β (底部) 的表达水平的作用。

[0055] 图25A是在CLP程序后作为时间函数的脓毒症小鼠的存活率的图,该图证实寡肽C23的作用。

[0056] 图25B是散点图,该散点图证实了寡肽C23对脓毒症小鼠的存活率的作用。

[0057] 发明的详细说明

[0058] 本申请出人意料地发现,在炎性应答过程中,CIRP表达上调,并且被释放到循环中。本申请还发现了,一旦CIRP进入血流,它将作为有效的促炎介质或细胞因子,并且引起组织损伤以及甚至死亡。

[0059] 因此,本发明是基于CIRP作为炎性介质的发现。这一发现能够阐明诱导炎症的可替代机制,并且进一步使得本发明形成用于治疗炎症的靶向CIRP 的治疗策略。

[0060] CIRP是一种在培养细胞中通过轻度冷应激诱导的哺乳动物蛋白 (32 °C)。鼠和人类CIRP是一种172-aa (95%一致性) 核内蛋白,该核内蛋白包括N-末端RNA结合域和C-末端富含甘氨酸的结构域,并且起到RNA伴侣蛋白的作用以协助翻译。在图1中提供了人类CIRP的氨基酸序列,SEQ ID NO: 1 (参见 (Nishiyama) 等人,细胞生物学杂志 (The Journal of Cell Biology), 卷137,1997)。“哺乳动物CIRP”包括一种具有如下氨基酸序列的蛋白,该氨基酸序列与天然发生的或内源性对应的哺乳动物CIRP的氨基酸序列 (例如,重组蛋白、合成蛋白 (即,使用合成有机化学的方法产生的)) 相同。该术语还包括多态或等位基因变体,和其他CIRP亚型 (例如,通过可变剪接或其他细胞过程产生),以及前述各项的修饰的或未修饰形式 (例如,脂 质化、糖基化、和未糖基化)。此类蛋白可以从天然产生哺乳动物CIRP的 来源中回收或分离。CIRP在冷诱导的细胞增殖抑制中起到重要的作用。本发明是

基于以下意外发现:细胞外CIRP是在出血性和脓毒性休克过程中引起 有害作用的一种内源性促炎介质。因此,本发明是针对CIRP拮抗作用作为 以前不受重视治疗靶标。

[0061] 当细胞在严格条件下时,细胞内CIRP具有稳定特异性mRNA并促进生 存优势的翻译的已知的生物学功能(杨(Yang),C.和卡里尔(Carrier), F.,可UV诱导的RNA结合蛋白A18(A18 hnRNP)在基因毒性应激反应中 起到保护作用(The Uv-inducible RNA-binding protein A18(A18 hnRNP) plays a protective role in the genotoxic stress response),生物化学杂志(J.Biol.Chem.) 276,47277-47284(2001);卡马斯(Cammas),A.,路易斯(Lewis),S.M.,瓦格纳(Vagner),S.和霍希克(Holcik),M.,通过mRNA结合蛋白的亚细胞重新定位的基因表达的转录后控制(Post-transcriptional control of gene expression through subcellular relocalization of mRNA binding proteins),生化药理学(Biochem.Pharmacol.) 76,1395-1403(2008))。本申请发现细胞外 CIRP是一种新的损害相关分子模式(DAMP)分子,并且用实验证据证实该 发现(实例1)。首先,本申请在外科ICU患者连同出血和脓毒症动物的血 清中检测CIRP。第二,在缺氧应激或暴露于脂多糖(LPS)的情况下,巨噬 细胞中的CIRP从细胞核易位至细胞质,并且主动释放到细胞外基质。第三,重组CIRP蛋白从体外巨噬细胞诱导TNF- α 和HMGB1释放,刺激炎性应答 并且引起健康动物中的组织损伤。第四,通过中和性抗CIRP抗体抑制细胞 外CIRP活性明显改善了出血和脓毒症动物的存活,这是通过减弱休克诱导 的炎症、组织损伤、和致死性。最终,CIRP与TLR4相互作用,该TLR4是 模式识别受体(PRR)之一,其通常被DAMP利用来引发炎性应答。因此,细胞外CIRP是一种真实的促炎介质。

[0062] 在暴露于缺氧后,在RAW 264.7细胞中,CIRP从细胞核易位至细胞质。当在UV照射、渗透休克、热休克和内质网应激的情况下时,还在其他细胞类 型中观察到这种CIRP易位,这些其他细胞类型包括成纤维细胞和上皮细胞 (德莱乌(De Leeuw),F.等人,通过甲基化依赖性机制冷诱导RNA结合蛋 白从细胞核移动至细胞质应激颗粒并且充当转译抑制因子(The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor),实验 细胞研究(Exp.Cell Res.),313,4130-4144(2007);杨(Yang),R.等人, 共济失调性毛细血管扩张突变以及Rad3相关(ATR)的转录物的3' -非翻译区 中异源核糖核蛋白A18特征RNA基序的功能意义(Functional significance for a heterogenous ribonucleoprotein A18 signature RNA motif in the 3' -untranslated region of ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related(ATR) transcript),生物 化学杂志(J.Biol.Chem.),285,8887-8893(2010))。在环境应激下, RGG 结构域中的精氨酸残基的甲基化(德莱乌(De Leeuw),F.,等人,实验细 胞研究(Exp.Cell Res.) 313,4130-4144(2007))和响应于UV照射的C-末端区 处的磷酸化(phosphorylation at the C-terminal region in response to UV radiation)(杨(Yang),R.,等人,生物化学杂志 (J.Biol.Chem.) 285,8887-8893 (2010))假设是为了调节CIRP从细胞核中离开。响应于缺氧或LPS,CIRP被 释放到CM中。已经针对“无前导”蛋白的释放提出多种非典型途径,这些途径 包括微泡脱落、分泌溶酶体的胞吐、和主动转运(曲(Qu),Y.和杜布亚克 (Dubyak),G.R.P2X7受体调节多种类型的膜运输响应和非经典的分泌途径 (P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical

secretion pathways), 嘌呤信号 (Purinergic Signal.) 5, 163-173 (2009))。此外, 无前导 IL-1 β 分泌的可替代模型可以通过包含具有诱捕的 IL-1 β 的外排体的多泡体的形成并且随后具有质膜的这些多泡体的融合来释放外排体 (参见曲 (Qu), Y., 弗兰希 (Franchi), L., 努涅斯 (Nunez), G. 和 杜布亚克 (Dubyak), G.R., 通过 P2X7 受体刺激的非典型 IL-1 β 分泌取决于炎性体活化并且与在小鼠巨噬细胞中的外排体释放相关 (Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages), 免疫学杂志 (J. Immunol.) 179, 1913-1925 (2007))。不局限于理论, CIRP 释放的一种方法是通过溶酶体分泌。

[0063] 通过 TLR4/MD2 复合物调节细胞外 CIRP 活性 (实例 9)。表面等离子共振分析指出, CIRP 结合至 TLR4/MD2 复合物连同结合至单独的 TLR4 和 MD2。通过该发现, 本申请已经形成新的 CIRP 活性抑制剂, 如在此描述的, 这些抑制剂包括人类 CIRP 衍生肽, 典型地长度 10-30 个氨基酸残基, 具有与位于氨基酸残基 106-125 之间的 hCIRP 蛋白的部分至少 80% 同源性的序列。该肽以高亲和力结合至 MD2。

[0064] CIRP 的 TLR4 介导的促炎活性的鉴别与之前研究的一致, 显示出在出血动物 (本哈默 (Benhamou), Y. 等人, Toll 样受体 4 促进小鼠中出血性休克中的内皮损伤和炎症 (Toll-like receptors 4 contribute to endothelial injury and inflammation in hemorrhagic shock in mice), 危重症医学 (Crit. Care Med.) 37, 1724-1728 (2009)) 连同脓毒症动物 (维特博尔 (Wittebole), X., 卡斯 塔内尔斯-萨帕特罗 (Castanares-Zapatero), D. 和拉特 (Laterre), P.F., Toll 样受体 4 调节作为一种治疗脓毒症的策略 (Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis), 炎症介质 (Mediators Inflamm.) 2010, 568396 (2010)) 中 TLR4 在介导炎症和器官损伤中发挥重要作用。当内源分子从应激的、受损的或死亡的细胞中, 或从胞外基质的降解中释放出来时, TLR4 还可以识别若干内源分子, 这些内源分子包括 HMGB1、热休克蛋白、透明质酸、和纤连蛋白 (参见 (a) 帕克 (Park), J.S. 等人, toll 样受体 2 和 4 参与通过高迁移率族蛋白 B1 的细胞活化 (Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein), 生化化学杂志, 279, 7370-7377 (2004); (b) 大桥 (Ohashi), K., 伯卡特 (Burkart), V., 弗洛 (Flohe), S. 和科尔布 (Kolb), H. 切缘: 热休克蛋白 60 是 toll 样受体-4 复合物的假定内源性配体 (Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex), 免疫学杂志 (J. Immunol.) 164, 558-561 (2000); (c) 特米尔 (Termeer), C. 等人, 透明质酸的低聚糖经 toll 样受体 4 活化树突细胞 (Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4), 实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 195, 99-111 (2002); (d) 冈村 (Okamura), Y. 等人, 纤连蛋白的超域 A 活化 Toll 样受体 4 (The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4), 生物化学杂志 276, 10229-10233 (2001))。尽管许多 DAMP 用作 TLR4/MD2 复合物的配体, 但是一些分子可以结合至 TLR4/MD2 复合物的不同位点, 并且在巨噬细胞中在刺激促炎细胞因子生产中起加成作用, 如在此通过 CIRP 和 HMGB1 之间关系所证实的。如通过 SPR 分析所指示的, HMGB1 以 1.5×10^{-6} M 的 K_D 结合至 TLR4/MD2 复合物 (杨 (Yang), H. 等人, 针对 HMGB1 结合至 Toll 样受体 4 和巨噬细胞因子释

放的活化所需的关键半胱氨酸 (A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release), 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 107, 11942-11947 (2010)), 该TLR4/MD2复合物可与CIRP比较 ($K_D = 2.39 \times 10^{-7} M$)。进一步的分析指示出, HMGB1以 $8 \times 10^{-9} M$ 的 K_D 结合至MD2, 但是并没有结合至TLR4 (杨 (Yang), H., 安托万 (Antoine), D. J., 安德松 (Andersson), U. 和特蕾西 (Tracey), K. J., HMGB1的多面: 在炎症、细胞凋亡、和趋化中的分子结构-功能活性 (The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis), 白血球生物学杂志 (J. Leukoc. Biol.) 93, 865-873 (2013)), 然而CIRP可以结合至单独的MD2和TLR4。研究了与TLR4、MD2和TLR4/MD2复合物互相作用的CIRP子域的作图, 以获得关于CIRP的总体分子结构的更多信息, 因为它涉及结合至这些受体。值得注意, LPS对于TLR4和MD2的 K_D 分别是 1.41×10^{-5} 和 $2.33 \times 10^{-6} M$ (真宗 (Shin), H. J. 等人, LPS结合至重组CD14、TLR4、和MD-2蛋白的动力学 (Kinetics of binding of LPS to recombinant CD14, TLR4, and MD-2 proteins), 分子细胞 (Mol. Cell) 24, 119-124 (2007))。

[0065] 尽管事实上“无前导”蛋白可以通过被动方式 (如坏死=) 漏出, 但是可以主动释放CIRP (斯卡菲迪 (Scaffidi), P., 米斯特利 (Misteli), T. 和比安奇 (Bianchi), M. E. 由坏死细胞释放染色质蛋白HMGB1引发炎症 (Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation), 自然 (Nature) 418, 191-195 (2002))。最近研究报道CIRP参与活化NF- κ B途径用于调节在培养的成纤维细胞中的IL-1 β 表达, 其中利用中和性抗CIRP抗体作为治疗改进行出血和脓毒症动物的存活率 (参见 (Brochu), C. 等人, 针对冷诱导的RNA结合蛋白在调节白介素1 β 中的NF- κ B-依赖性作用 (NF- κ B-Dependent Role for Cold-Inducible RNA Binding Protein in Regulating Interleukin 1beta), 公共科学图书馆-综合 (PLoS One) 8, e57426 (2013))。因此, 靶向CIRP可以针对出血和脓毒症的受害者提供改善发病率和死亡率的治疗潜力。

[0066] 在脓毒症的动物模型中, 与未治疗的对照相比, 抑制CIRP导致炎性介质和标志物水平的减少, 这些炎性介质和标志物包括但不限于: 天冬氨酸转氨酶 (AST)、肝脏髓过氧化物酶 (MPO)、乳酸、TNF、血清TNF和血清、肺和肝IL-6 (实例7和8)。这些减少反映了并在在一些病例中解释了靶向CIRP在治疗炎性疾病和病症中的有益作用。此外, 这些减少说明了CIRP抑制剂和拮抗剂在治疗此类疾病和病症中的治疗益处。

[0067] 如在此定义的, “CIRP抑制剂”是一种药剂 (例如, 分子, 天然的或合成的核酸或核酸类似物, 反义分子, 小干扰RNA (siRNA), 蛋白, 肽, 抗体, 抗原片段, 化合物等等), 其结合CIRP并且抑制 (例如, 减少, 防止, 降低, 中和) CIRP的一种或多种生物活性; 或一种对CIRP基因和/或蛋白表达或生物活性CIRP释放进行抑制的药剂。术语“CIRP的生物活性”是指CIRP受体结合, CIRP信号转导, CIRP介导的促炎细胞因子释放, CIRP介导的炎症和/或其他CIRP介导的活性。术语“拮抗剂”可与术语“抑制剂”互换使用。

[0068] CIRP抑制剂可以是一种抗体, 其结合并抑制 (例如, 减少, 防止或中和) CIRP的一种或多种生物活性或功能。

[0069] 该抗体可以是多克隆的或单克隆的, 并且术语“抗体”意指涵盖多克隆和单克隆抗体。术语多克隆和单克隆是指一种抗体制剂的同质性的程度, 并且不旨在限于特定的产

生方法。如在此使用的术语“抗体”还涵盖抗体的功能片段,这些功能片段包括嵌合的、人源化的、灵长化、镶饰的或单链抗体。功能片段包括结合至哺乳动物CIRP的抗原结合片段。这种片段可以通过酶促切割或通过重组技术而产生的。例如,还可以使用具有必要的底物特异性的木瓜蛋白酶、胃蛋白酶或其他蛋白酶来产生片段。还可以使用抗体基因来产生不同的平截形式的抗体,在这些基因中一种或多种终止密码子已经被引入该自然的终止位点的上游。

[0070] 单链抗体,以及嵌合的、人源化的、或灵长源化的(CDR移植的)、或镶饰的抗体,连同嵌合的、CDR移植的、或镶饰的单链抗体(包括由不同物种衍生的片段),以及类似物也由本发明以及术语“抗体”所涵盖。这些抗体的不同片段可以由常规技术通过化学方式连接在一起,或可以使用遗传工程技术制备为一种连续蛋白。例如,可以对编码了一种嵌合的或人源化的链的核酸进行表达以产生一种连续蛋白。参见,例如,卡比利(Cabilly)等人,美国专利号4,816,567;卡比利等人,欧洲专利号0,125,023 B1;博斯(Boss)等人,美国专利号4,816,397;博斯等人,欧洲专利号0,120,694 B1;纽伯格(Neuberger),M.S.等人,WO 86/01533;纽伯格,M.S.等人,欧洲专利号0,194,276 B1;温特(Winter),美国专利号5,225,539;温特,欧洲专利号0,239,400 B1;奎因(Queen)等人,欧洲专利号0 451 216 B1;以及帕德兰(Padlan),E.A.等人,EP 0 519 596 A1。还参见纽曼(Newman),R.等人,生物技术(BioTechnology),10:1455-1460(1992),关于灵长源化的抗体,以及拉德纳(Ladner)等人,美国专利号4,946,778和伯德(Bird),R.E.等人,科学(Science),242:423-426(1988)(关于单链抗体)。

[0071] 人源化的抗体可以使用标准方法或其他适当的技术、使用合成或重组DNA技术来进行生产。对人源化的可变区进行编码的核酸(例如,cDNA)序列还可以使用PCR诱变方法进行构建,来改变对人类或人源化的链进行编码的DNA序列,例如来自之前被人源化的可变区的DNA模板(参见,例如,卡曼(Kamman),M.等人,核酸研究(Nucl.Acids Res.),17:5404(1989);萨托(Sato),K.等人,癌症研究(Cancer Research),53:851-856(1993);多尔蒂(Daugherty),B.L.等人,核酸研究,19(9):2471-2476(1991);和路易斯(Lewis),A.P.和J.S.克罗(Crowe),基因(Gene),101:297-302(1991))。使用这些或其他适当的方法,还可以容易地产生多种变体。在一个实施例中,可以对经克隆的可变区进行突变,并且可以选择对具有令人希望的特异性的变体进行编码的序列(例如,来自一种噬菌体文库;参见,例如Krebber等人,美国专利号5,514,548;Hoogenboom等人,WO 93/06213,于1993年4月1日公布)。

[0072] 针对哺乳动物(例如,人类)CIRP具有特异性的抗体可以针对适当的免疫原,如SEQ ID NO:1的分离的和/或重组人类蛋白或其片段(包括合成的分子,如合成肽)而产生。抗体还可以通过用表达CIRP的细胞使适合宿主(例如,小鼠)免疫来产生。此外,表达CIRP的细胞可以用作免疫原或用于筛选结合CIRP的抗体。

[0073] 可以使用任何适合的技术进行免疫抗原的制备,和多克隆和单克隆抗体产生。已经描述了各种方法(参见,例如,(Kohler)等人,自然(Nature),256:495-497(1975)和欧洲免疫学杂志(Eur.J.Immunol.)6:511-519(1976);米尔斯坦(Milstein)等人,自然266:550-552(1977),科普罗夫斯基(Koprowski)等人,美国专利号4,172,124;哈洛(Harlow),E.和D.莱恩(Lane),1988,抗体:实验手册(Antibodies:A Laboratory Manual),(冷泉港

实验室:冷泉港,纽约);分子生物学实验指南(Current Protocols In Molecular Biology),卷2(增刊27,Summer'94),奥苏贝尔(Ausubel), F.M.等人,编辑(威利父子出版公司:纽约,纽约),第11章,(1991))。通常,通过将一种适当的无限增殖性细胞系(例如,一种骨髓瘤细胞系,如 SP2/0、P3X63Ag8.653或杂合骨髓瘤)与产生抗体的细胞的抗体进行融合而产生一种杂交瘤。这些产生抗体的细胞可以是来自所感兴趣的抗原进行免疫的人或其他适当的动物的外周血、脾或淋巴结而获得的。这些融合的细胞(杂交瘤)可以是使用选择性培养条件来分离的,并且通过有限稀释而被克隆。具有所希望的特异性的、产生抗体的细胞可以通过一种适当的测定来进行选择(例如,ELISA)。

[0074] 可以使用生产或分离必要特异性抗体(例如,人类抗体或抗原结合片段)的其他适合方法,这些方法包括,例如,从文库(例如,噬菌体展示文库)中选择重组抗体的方法,或依靠能够产生人类抗体表达谱的转基因动物(例如,小鼠)的免疫的方法(参见,例如,雅克博维次(Jakobovits)等人,美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),90:2551-2555(1993);雅克博维次等人,自然(Nature),362:255-258(1993);隆伯格(Lonberg)等人,美国专利号5,545,806;苏拉尼(Surani)等人,美国专利号5,545,807;隆伯格等人,WO 97/13852)。这种免疫和分离程序是本领域的普通技术人员熟知的。

[0075] 抗原片段是当引入体内时刺激产生抗体的物质。抗体可以包括毒素、细菌、外源血细胞和/或移植器官的细胞。

[0076] CIRP抑制剂可以是一种特异性结合至CIRP并抑制(减少,防止,降低,中和)其活性的肽(例如,合成的、重组、融合或衍生的)。该肽可以是直链的、支链或环状的,例如具有一种杂原子环状结构(包括若干酰胺键)的肽。在一个具体的实施方案中,该肽是一种环肽。该肽是指一种化合物,该化合物由从大约2个至大约100个氨基酸残基组成,其中一个氨基酸的氨基基团是通过一种肽键而连接至另一种氨基酸的羧基基团上的。此类肽在长度上典型地是小于约100个氨基酸残基,并且在一些实施例中为约10、约20、约30、约40、或约50个残基。

[0077] 可以产生选择用于结合至CIRP的具体结构域(例如,唯一结构域)的肽。肽可以是,例如,通过酶促或化学切割从天然蛋白衍生或去除的,或可以通过适合的方法,例如,固相肽合成法(例如,梅里菲尔德型合成)合成的(参见,例如,博丹斯基(Bodanszky)等人“肽合成(Peptide Synthesis)”,威利父子出版公司,第二版,1976)。例如,使用重组DNA方法学或其他适合方法,也可以产生作为CIRP抑制剂的肽(参见,例如,萨姆布鲁克(Sambrook) J.和拉塞尔(Russell) D.W.,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第三版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,2001)。

[0078] CIRP抑制剂还可以是融合至,例如,载体蛋白(例如,myc、his、谷胱甘肽硫氢转移酶)和/或标记的(例如,放射性标记的荧光标记的)载体蛋白的融合肽。

[0079] 肽可以包括任何适当的L-和/或D-氨基酸,例如,常见的 α -氨基酸(例如,丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸)、非 α -氨基酸(例如, β -丙氨酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、肌氨酸、抑胃酶氨酸(statine))、以及不常见的氨基酸(例如,瓜氨酸、高瓜氨酸(homocitruline)、同型丝氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸)。在一种肽上的氨基、羧基和/或其他官能团可以是游离的(例如,未被修饰)或用一种适当的保护基团进行保护的。氨基和羧基的适合的保护基团,以及添加或去除保护基团的方法是本领域中已知的并且披露于,例如,格林(Green)和

伍兹 (Wuts), “在有机合成中的 保护基团 (Protecting Groups in Organic Synthesis)”, 约翰威利父子出版公司, 1991 中。一种肽的官能团还可以使用领域已知的多种方法进行衍生 (例如, 烷基化)。

[0080] 这些肽可以被合成并且装配到文库种, 这些文库包括少许 至许多离散的分子种类。此类文库可以使用组合化学的方法户必须报告制备, 并且可以使用任何适当的方法进行筛选以确定该文库是否包括具有一种令人 希望的生物活性的肽。然后, 可以使用适当的方法将此类肽抑制剂分离。

[0081] 若希望, 这种多肽可以包括修饰 (例如, 氨基酸接头、酰化作用、乙酰 化作用、酰胺化作用、甲基化作用、末端修饰剂 (例如, 环化修饰作用))。这种多肽还可以含有化学修饰作用 (例如, N-甲基- α -氨基取代)。此外, 这种肽抑制剂可以是一种已知的和/或自然发生的肽的类似物, 例如具有一种 或多种保守的氨基酸残基取代的肽类似物。这些修饰可以改进这种肽的不同 的特性 (例如, 溶解度、结合性), 包括它的 CIRP 抑制活性。在此描述的 肽抑制剂还包括其药学上可接受的盐, 如以下在给予模式部分中所描述的。

[0082] 在本发明的某些方面中, 该 CIRP 抑制剂是一种分离的肽, 该肽包括 Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp (SEQ ID NO: 12) 的氨基酸残基序 列并且具有约 10 至约 30 个氨基酸残基。在本发明的某些其他方面中, 该 CIRP 抑制剂是一种分离的肽, 该肽包括 Gly-Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp (SEQ ID NO: 13) 或 Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp-Arg-Gly-Tyr-Gly-Gly (SEQ ID NO: 14) 的氨基酸残基序列。在本发明的其他方面, 该 CIRP 抑制剂是一 种分离的肽, 该分离的肽包括与 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、或 SEQ ID NO: 14 中任一项具有至少 80%, 或可替代地 85%、90%、95%、98% 或 99% 同源性的氨基酸残基序列。

[0083] 使用序列分析软件 (例如, 威斯康星大学生物技术中心 (麦迪逊大学道 1710, 威斯康星州 53705 (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)) 遗传计算组的序列分析软件包, BLAST、BESTFIT、GAP、PILEUP/PRETTYBOX、ALIGN、ADVANCE、ADAM 或 FASTA 程序) 典型地测量序列一致性。这种软件通过将同源性程度分配给不同的取代、缺失、和/或其他修饰进行相同或相似序列的匹配。保守取代典型地包括以下组内的 取代: 甘氨酸、丙氨酸; 缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸; 天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺; 丝氨酸、苏氨酸; 赖氨酸、精氨酸; 以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定一致性程度的示例性方法中, 可以使用 BLAST 程序。概率 评分指示密切相关的序列的同源性仅归因于随机因素的概率。在某些实施例 中, 低概率评分在 1×10^{-3} 和 1×10^{-100} 之间。

[0084] 出于最佳比较的目的 (例如可以将缺口引入一个第一序列 的序列中) 通过比对这些序列可以测定两种氨基酸序列的百分比同源性。然 后对在相应位置上的氨基酸序列进行比较, 并且这两个序列间的百分比一致 性是这些序列所共享的一致性位置的数目的一个函数 (例如, % 一致性 = # 一致性位置的数目 / 位置的 # 总数目 $\times 100$)。还可使用 GCG 软件包中的 GAP 程序 (Accelrys, San Diego, California), 使用 Blossom 63 矩阵或 PAM250 矩阵, 和缺口权 12, 10, 8, 6 或 4, 以及长度权 2, 3, 或 4, 得到两个氨基 酸序列之间的一致性百分数。出于比较目的, 可以将蛋白编码的长度进行比 对, 该蛋白编码的长度是参照序列的长度的至少 80%, 或可替代地 85%、90%、95%、98%、99% 或 100%, 例如, CIRP 抑制剂包括 SEQ ID NO: 12、13 或 14 中任一项的氨基酸残基序列。

[0085] 模拟肽是指多种分子,这些分子不是多肽,但是它们摹模拟拟了这些肽 或蛋白的结构 的多个方面。可以通过常规化学方法来制备模拟肽拮抗剂(参见,例如,达姆伍德(Damewood) J.R.“用计算化学的援助的模拟肽设计 (Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry)”于计算生物学评论(Reviews in Computational Biology),2007,卷9,第1-80页,约翰威利父子出版公司,纽约,1996;凯兹米尔斯基(Kazmierski) W.K.,“分子医学方法:模拟肽方案(Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols)”,胡马纳出版社,新泽西州,1999)。例如,可以制备具有与 肽类具有相同官能团的多糖。可以对多种模拟肽进行设计,这是(例如)通 过在该环境中建立一种肽试剂的三维结构来进行的,其中该试剂结合到或将 要结合到一种靶分子上。该模拟肽包括至少两种组分:这种或这些结合部分 以及主链或支撑结构。

[0086] 这些结合部分是以下化学原子或基团,它们将与一种靶分 子(例如,与配体结合位点处或附近的氨基酸)进行反应或与其形成一种复 合物(例如,通过疏水性或离子相互作用)。例如,在一种模拟肽中这些结合 部分可以与在一种肽或蛋白抑制剂中的那些相同。这些结合部分可以是一种 原子或化学基团,它与该受体以按照与该肽抑制剂中的结合部分相同或相似 的方式进行反应。例如,可以使用计算化学来设计CIRP结合的模拟肽,来 抑制CIRP的活性。适合用于针对一种肽中的碱性氨基酸进行设计的一种模 拟肽的多种结合部分的例子包括含氮基团,如胺类、铵类、胍类、以及酰胺 类或磷鎓类。适合用于针对一种酸性氨基酸进行设计的一种模拟肽的多种结 合部分的例子包括:例如羧基、低级烷基羧酸酯、磺酸、一种低级烷基磺酸 酯、或一种亚磷酸或它的酯。

[0087] 该支撑结构是以下化学实体,该化学实体当这种或这些结 合部分结合时提供了该模拟肽的三维构型。该支撑结构可以是有机或无机 的。有机支撑结构的例子包括:多糖、聚合物、或有机合成的聚合物的寡聚 体(如聚乙烯醇或聚丙烯交酯)。优选的是该支撑结构基本上具有与该肽主链 或支撑结构相同的大小和尺寸。这可以通过计算或测量这种肽和模拟肽的原 子和键的大小而确定。在一个实施方案中,这种肽键的氮可以用氧或硫取代, 例如形成一种种聚酯主链。在另一个实施方案中,该羰基可以用一种磺酰基 基团或亚磺酰基基团取代,从而形成一种聚酰胺(例如,一种聚磺酰胺)。可以制备这种肽的反向酰胺(例如,将一种或多种-CONH-基团置换为一种 -NHCO-基团)。在又一个实施方案中,这种肽主链可以用一条种聚硅烷主 链取代。

[0088] 可以通过已知的方法来制造这些化合物。例如,一种聚酯 模拟肽可以通过将一种羟基基团取代为在多种氨基酸上的对应的-氨基基团 来进行制备,由此制备了一种羟酸,并且将这些羟酸顺序地酯化、可任选地 将这种碱性和酸性侧链阻挡以使副反应最小化。确定一种适当的化学合成路 线大体上很容易在确定该化学结构时进行鉴定。

[0089] 可以合成多种模拟肽并且将其装配到文库中,这些文库包 括少许至许多离散 的分子种类。可以使用熟知的组合化学方法来制备此类文 库,并且可以对其进行筛选以确定该文库是否包括一种或多种模具有所希望 的活性的拟肽。然后,可以通过适当的方法将此 类模拟肽抑制剂分离。

[0090] 其他CIRP抑制剂像,例如,非肽化合物或小分子,可以在自然中(例 如,鉴别的、分 离的、纯化的)发现和/或进行生产(例如,合成的)。针对 CIRP结合特异性,药剂可以在一种 筛选中进行测试,例如化学化合物和/或 文库(例如,化学的、肽、核酸文库)的高通量筛选。

化合物或小分子可以从化合物的许多的可获得的文库中鉴定,这些文库来自,例如,国家癌症研究所的化学库、分子文库小分子库(PubChem)以及可商购的其他文库。此类文库或多种分子的集合还可以使用熟知的化学方法(例如,熟知的组合化学方法)进行制备。可以对这些文库进行筛选以鉴定结合并抑制CIRP的多种化合物。经鉴定的多种化合物可以充当当前先导化合物用于使用药物化学的多种熟知的方法来进行进一步多样化。例如,可以制备和筛选用于CIRP结合和/或抑制活性的多种化合物的集合(这些化合物是该先导物的结构变体)。这可以导致将这些化合物的结构与生物活性联系起来的一种结构活性关系的开发。具有适当的结合和抑制活性的化合物可以被进一步开发用于体内用途。在一个实例中,小分子 NaN_3 抑制CIRP转录,如在“通过HIF-1-依赖性机制RNA结合蛋白RBM3和CIRP的氧调节表达(Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by HIF-1-independent mechanism)”中所披露的,其由S.威尔曼(Wellmann)等人编辑,细胞科学杂志(*Journal of Cell Science*),117,1785-1794,2004。

[0091] 在本发明的一些实施例中,该CIRP抑制剂具有少于1000道尔顿的分子量。

[0092] CIRP抑制剂也是抑制(减少、降低、中和、防止)CIRP表达的药剂。抑制CIRP基因表达(例如,转录、mRNA加工、翻译)的药剂(分子、化合物、核酸、寡核苷酸)是有效的CIRP抑制剂。还可以将反义寡核苷酸(例如,DNA、核糖核酸探针)用作CIRP抑制剂以预防CIRP亚单位表达。反义寡核苷酸普遍是短(约13至约25个核苷酸)单链核酸,这些单链核酸特异性杂交以靶向核酸序列(例如,mRNA)并诱导靶标核酸的降解(例如,通过RNA酶H-依赖性机制降解RNA)或空间位阻剪接或翻译的进展。(参见,例如,迪亚斯(Dias)N.和斯坦(Stein)C.A.,*分子癌症治疗学(Mol.Can.Ther.)* 1:347-355,2002)。存在可以用作CIRP抑制剂的多种不同类型的反义寡核苷酸,这些反义寡核苷酸包括甲基磷酸酯寡核苷酸、硫代磷酸寡核苷酸、在核糖的位置处2'具有氢被O-烷基基团(例如,甲基)替代的寡核苷酸、聚酰胺核酸(PNA)、吗啉反义寡核苷酸(被吗啉环替代的脱氧核糖部分)、PN(在核糖的3'位置处的氧被胺基基团N3'→P5'替代)和嵌合寡核苷酸(例如,2'-O-甲基/硫代磷酸)。

[0093] 可以使用预测算法,将反义寡核苷酸设计为针对CIRP特异性的。(参见,例如,丁(Ding),Y.,和劳伦斯(Lawrence),C.E.,*核酸研究(Nucleic Acids Res.)*,29:1034-1046,2001;斯卡基尔(Sczakiel),G.,*生命科学前沿(Front.Biosci.)*,5:D194-D201,2000;谢尔(Scherr),M.等人,*(Nucleic Acids Res.)*,28:2455-2461,2000;帕泽尔(Patzel),V.等人,*核酸研究*,27:4328-4334,1999;蒋(Chiang),M.Y.等人,*生物化学杂志(J.Biol.Chem.)*,266:18162-18171,1991;斯塔尔(Stull),R.A.等人,*核酸研究*,20:3501-3508,1992;丁(Ding),Y.,和劳伦斯,C.E.,*计算化学(Comput.Chem.)*,23:387-400,1999;劳埃德(Lloyd),B.H.等人,*核酸研究*,29:3664-3673,2001;米尔(Mir),K.U.,和萨瑟恩(Southern),E.M.,*自然生物技术(Nat.Biotechnol.)*,17:788-792,1999;苏海尔(Sohail),M.等人,*核酸研究*,29:2041-2051,2001;奥特曼(Altman),R.K.等人,*组合化学杂志(J.Comb.Chem.)*,1:493-508,1999)。该反义寡核苷酸可以通过适合的方法进行生产;例如,使用自动化的核酸合成仪(来自,例如,应用生物系统公司)的核酸(例如,DNA、RNA、PNA)合成(还参见马丁(Martin),P.,*瑞士化学学报(Helv.Chim.Acta)* 78:486-504,1995)。反义寡核苷酸还可以在包含适当表达型载体的细胞中稳定表达。

[0094] 反义寡核苷酸可以通过吸附性内吞的过程由靶细胞摄入。因此,在治疗受试者

(例如,哺乳动物)中,反义CIRP可以通过,例如,注射或输注,递送至靶细胞。例如,经过纯化的寡核苷酸或siRNA/shRNA,可以单独或与适合的药物递送运载体(例如,脂质体、阳离子型聚合物(例如,聚左旋赖氨酸PAMAM树状聚合物、聚氰基丙烯酸酯纳米粒子))在一个配制品中或偶联到适合的载体肽(例如,同源异型转录因子、黑腹果蝇触足肽、HIV-1的Tat蛋白、E5CA肽)上来给予。

[0095] 将在以下描述鉴定针对CIRP的拮抗剂(例如,抗体)的方法。

[0096] 可以将包括CIRP的组合物用于结合测定中,以检测和/或鉴定可以结合至CIRP的药剂,这些药剂包括本发明的抗体。

[0097] 适用于在结合测定中使用的组合物包括,例如,天然表达哺乳动物CIRP或其功能变体的细胞和表达哺乳动物CIRP或其功能变体的重组细胞。适用于结合测定中使用的组合物还包括,包括哺乳动物CIRP或其功能变体的膜制品。这种膜制品可以包含天然(例如,质膜)或合成膜。在一些实施例中,该膜制品是包含哺乳动物CIRP或其功能变体的细胞的膜部分。

[0098] 在一个实施例中,检测或识别结合至哺乳动物CIRP的药剂(例如,抗体)的方法是一种竞争性结合测定,其中评估测试剂(例如,抗体)抑制参考剂(例如,已知特异性的配体或另一个抗体)结合的能力。例如,可以将参考剂用如下描述的适合的标签进行标记,并且可以确定饱和测定中存在的CIRP所需的经标记的参考剂的量。在适用于结合和所确定的复合物形成的条件下,可以将经标记的参考剂的饱和量和测试剂的各种量与包括哺乳动物CIRP或其功能变体的组合物联系。在该CIRP与该测试剂之间的复合物的形成的特异性可以使用一种适当的对照物(例如,未标记的试剂、单独的标签)进行确定。

[0099] 在参考或测试剂和CIRP或其片段(包括如以上所描述的免疫原性肽)之间的复合物的形成可以直接或间接使用适合的方法进行检测或测量。例如,可以将药剂用适合的标签进行标记,并且可以通过检测标签来确定复合物的形成。可以使用适合的对照如未标记的药剂或标记的药剂来确定复合物的特异性。适用于在检测药剂和哺乳动物CIRP或其功能变体之间的复合物中使用的标签包括,例如,放射性同位素、表位、亲和标签(例如,生物素、阿维丁)、自旋标签、酶、荧光基团或化学发光基团。

[0100] 关于用于确定测试剂(如抗体)结合CIRP能力的竞争性结合测定,这种能力可以报告为50%抑制经标记的参考剂的特异性结合所需的测试剂的浓度(IC₅₀值)。特异性结合被优选地定义为总结合(例如,在复合物中总标签)减去该非特异性结合。非特异性结合被优选地定义为在过量的未标记参比试剂存在下所形成的仍可在复合物中检出的标签的量值。适用于方法中使用的参考剂包括特异性结合至哺乳动物CIRP或其功能变体的分子和化合物,例如,CIRP或抗体的配体。优选的参考剂是针对人类CIRP部分(SEQ ID NO: 1)具有抑制特异性的抗体。

[0101] 在其他方面,本发明还涉及用于抑制CIRP的一种或多种生物活性的方法。在一些实施例中,CIRP抑制剂抑制CIRP介导的信号转导。如在此使用的“CIRP介导的信号转导”意指通过细胞外信号分子CIRP的细胞表面受体的活化。细胞表面受体的活化从细胞产生生理学应答。活化通过,例如,CIRP结合至细胞表面受体发生。在本发明的一些实施例中,CIRP抑制剂抑制CIRP结合至细胞表面受体,例如,MD2。在本发明的其他实施例中,CIRP抑制剂抑制CIRP结合至细胞表面受体复合物,例如,MD2/TLR4。在本发明的其他实施例中,

CIRP抑制剂抑制CIRP介导的炎症。在本发明的另外方面,CIRP 抑制剂抑制促炎细胞因子(例如,TNF- α)的CIRP介导的释放。

[0102] 可以检查结合CIRP的药剂抑制(例如,减少、防止、中和)“CIRP的一种或多种生物活性”的能力。如上述所定义的,术语“CIRP的生物活性”是指CIRP受体结合,CIRP信号转导,CIRP介导的促炎细胞因子释放,CIRP 介导的炎症和/或其他CIRP介导的活性。因此,可以将检测这些CIRP介导 的功能的测定用来评估测试剂的抑制活性(例如,测试剂抑制CIRP的一种 或多种功能的能力)。

[0103] 可以对药剂(例如,抗体)是否抑制CIRP的生物活性进行评估,例如,通过确定抗体是否抑制促炎细胞因子从哺乳动物细胞的释放。适合的细胞因 子的实例包括TNF、IL-6或HMGB1。

[0104] 针对这些方法,该细胞可以是可以被诱导来产生促炎细胞因子的任何细 胞。该细胞是免疫细胞,例如巨噬细胞、单核细胞、或嗜中性粒细胞。

[0105] 可以通过已知的任何手段评估细胞因子产生的抑制,这些手段包括量化 细胞因子(例如,用ELISA),或通过生物测定(例如,确定促炎细胞因子 活性是否减少),或通过促炎细胞因子mRNA的测量。技术人员可以在无过 度实验的情况下利用任何这些测定。针对关于CIRP抑制剂抑制促炎细胞因 子释放的非限制实例,参见图4和8。图8A示出,与未治疗的对照相比,在 出血动物模型中,通过用抗CIRP抗体治疗,血清TNF减少。图8B-C中示 出,与未治疗的对照相比,在出血动物模型中,通过用抗CIRP抗体治疗, 组织TNF减少。图8D-F示出,与未治疗的对照相比,在出血动物模型中, 通过用抗CIRP抗体的治疗,IL-6(例如,血清的、肺的和肝的IL-6)减少。

[0106] 测量促炎细胞因子释放的另一个方法涉及用抗体和刺激促炎细胞因子 级联的药剂一起处理哺乳动物细胞。在一些实施例中,一种药剂是细菌脂多 糖(LPS)。可以在该药剂前,与该药剂同时,或该药剂后向哺乳动物细胞 给予该化合物。在某些实施例中,在该药剂前给予该化合物。参见,例如, 美国专利号6,610,713,其相关教授通过引用结合在此。

[0107] 可以被测量以评估CIRP抑制的CIRP的其他生物活性包括动物模型中的 AST水平、动物模型中的肝MPO水平和动物模型中的乳酸水平。在炎性应 答过程中,这些标志物的水平通常是升高的。相对于未治疗的对照,CIRP生 物活性抑制剂可以在经受炎性应答的动物模型中减少这些标志物中的一种或 多种的水平。在举例说明部分中在图7A-C中给出了用于评估CIRP抑制剂对 这些标志物的释放的抑制的方法。图7A中描述了,与未治疗对照相比,在 出血动物模型中,抗CIRP抗体对AST水平的抑制作用。图8G描绘,与未 治疗的对照相比,在出血动物模型中,通过用抗CIRP抗体的治疗,肝MPO 水平减少。在图7B-C中,给出了通过抗CIRP抗体的血清ALT和乳酸的减 少。

[0108] 这些方法可以在体内进行,其中用化合物与刺激促炎细胞因子级联的药 剂一起治疗动物(例如,大鼠),并且测量该药剂对促炎细胞因子级联的诱 导的作用,例如,通过测量血清TNF水平。然而,由于用细胞培养物而不是 用整体动物做这些类型测定相对容易,在某些方面,这些方法可以在体外进 行,例如使用巨噬细胞培养物。

[0109] 本发明还涉及治疗患有皮肤创伤的受试者的方法,这些方法包括向受试 者给予CIRP抑制剂。在本发明的某些方面,该CIRP抑制剂是一种分离的肽, 该分离的肽包括SEQ ID NO:12的氨基酸残基序列或其药学上可接受的盐, 或与SEQ ID NO:12具有至少80%,或

可替代地85%、90%、95%、98%、99% 或100%同源性的氨基酸残基序列。在本发明的某些方面中,该CIRP抑制剂 是一种包括SEQ ID NO.13或14的氨基酸残基序列的肽。

[0110] 治疗的方法

[0111] 如在此使用的,“炎性疾病或病症”是指在个体中典型是增加的炎症的 疾病或病症。“炎性疾病或病症”是指在个体中典型是增加的炎症的传染性 疾病或病症。该炎性疾病或病症可以是“慢性炎性疾病或病症”。慢性炎性 疾病或病症是在几周,几个月或更久后仍没有解决的炎性病症。慢性炎性病 症可以随急性炎性病症后出现,或针对一些疾病或病症可以在不存在急性炎 性疾病或病症的情况下发生。可替代地,炎性病症可能是急性炎症发作的结 果。“急性炎症发作”,如在此使用的,是指一种增加的先天免疫应答。急 性炎症的症状包括发红、发热、肿胀、疼痛、和功能损失,例如,关节运动 的丧失。例如,慢性炎性疾病或病症的急性炎症发作不同于以下方式中的慢 性炎性疾病或病症的典型症状。经常地,在急性炎性应答过程中,肝合成在 血流中可检测的急性期蛋白或急性期反应物。急性期反应物包括C-反应蛋白 (CRP); α 1-抗胰蛋白酶; α 1-抗凝乳蛋白酶; α 2-巨球蛋白;凝结因 子(如纤维蛋白质、纤维素、凝血素、凝血酶、因子VIII、和纤溶酶原); 补体蛋白;和血清淀粉样蛋白。此外,在急性炎症发作过程中,局部炎症细 胞,例如,嗜中性粒细胞和巨噬细胞,分泌大量细胞因子进入血流中,最显 着地IL-1、IL-6、IL-11、HMGB1和TNF- α (“细胞因子级联”)。可以 给予CIRP抑制剂来抑制、减少或以其他方式改善炎性病症的这些因子和标志 物中的一些或所有。

[0112] 使用本发明可以有效治疗的炎性病症的非限制性实例选自下组,该组由 以下各项组成:阑尾炎、消化性溃疡、胃溃疡和十二指肠溃疡、腹膜炎、胰 腺炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠梗阻、会厌炎、失弛症、胆管炎、胆囊 炎、肝炎、惠普耳氏病、哮喘、过敏症、过敏性休克、免疫复合物病、器官 缺血再灌注损伤、器官坏死、枯草热、脓毒症、脓毒症-脓毒性休 克、败血症、内毒素休克、恶病质、高热、嗜酸细胞肉芽肿、肉芽肿病、结节病、流产感 染、附睾炎、阴道炎、前列腺炎、尿道炎、支气管炎、肺气肿、鼻炎、肺炎、 火山肺矽病 (neumoultramicroscopic silicovolcanoconiosis)、肺泡炎(alveolitis)、细支气管炎、 咽炎、胸膜炎、鼻窦炎、流行性感 冒、呼吸道合胞体病毒感染、疱疹感染、HIV感染、乙型肝炎 病毒感染、丙型肝炎病毒感染、播散性菌血 症、登革热、念珠菌病、疟疾、丝虫病、阿米巴病、 包虫囊肿、血管炎、脉 管炎、心内膜炎、动脉炎、动脉粥样硬化、血栓性静脉炎、心包炎、心肌 炎、局部缺血、结节性动脉周围炎、风湿热、乳糜泻、成人呼吸窘迫综合征、慢 性阻塞性肺 疾病、脑膜炎、脑炎、神经炎、神经痛、脊髓损伤、瘫痪、葡萄 膜炎、关节炎性皮疹、关节痛、骨 髓炎、筋膜炎、佩吉特氏病、痛风、牙周 病、关节炎、滑膜炎、重症肌无力、甲状腺炎、系统性 红斑狼疮、同种异体 移植排斥、移植物抗宿主疾病、古德帕斯丘综合征、贝赫切特综合征 (Behcets's syndrome)、强直性脊柱炎、贝格尔病(Berger's disease)、赖特氏综合征 (Retier's syndrome)、霍奇金病、银屑病、心肌梗塞、中风、炎性肠病、坏死性小肠 结肠炎 和创伤性出血。

[0113] 在另一个实施例中,该炎性病症选自下组,该组由以下各项组成:阑尾 炎,消化性 溃疡,胃溃疡和十二指肠溃疡,腹膜炎,胰腺炎,肝炎,哮喘, 过敏症,过敏性休克,器官坏 死,枯草热,脓毒症,脓毒症-脓毒性休克,败 血症,内毒素休克,克罗恩病,溃疡性结肠炎, 肠梗阻,恶病质,流产感染, 播散性菌血症,乳糜泻,成人呼吸窘迫综合征,慢性阻塞性肺

病,关节炎, 系统性红斑狼疮,同种异体移植排斥,移植物抗宿主疾病,脊髓损伤,瘫痪, 银屑病,肠道、肝、肾、心脏、脑和四肢的缺血再灌注,心肌梗塞,中风, 炎性肠病,坏死性小肠结肠炎和创伤性出血。

[0114] 在另一个实施例中,该炎性病症选自下组,该组由以下各项组成:腹膜炎,胰腺炎,脓毒症,脓毒症-脓毒性休克,内毒素休克,克罗恩病,溃疡性结肠炎,肠梗阻,成人呼吸窘迫综合征,慢性阻塞性肺病,类风湿性关节炎, 系统性红斑狼疮,肠道、肝、肾、心脏、脑和四肢的缺血再灌注,心肌梗塞, 中风,炎性肠病,坏死性小肠结肠炎,哮喘和创伤性出血。

[0115] 可替代地,该炎性病症选自下组,该组由以下各项组成:创伤性出血, 脓毒症脓毒性休克,肠道、肝、肾、心脏、脑和四肢的缺血再灌注,心肌梗塞,中风,炎性肠病和坏死性小肠结肠炎。

[0116] 在另一个实施例中,本发明涉及治疗患有皮肤创伤的受试者的方法,这些方法包括向受试者给予有效量的CIRP抑制剂。如在此使用的,“皮肤创伤”是至少对真皮的损伤,其中部分皮肤是被撕裂,割伤,穿刺,或通过任何药剂以其他方式被破坏,其包括钝力、化学试剂、或细菌感染。皮肤创伤的实例包括慢性皮肤创伤(皮肤溃疡),这些皮肤创伤包括与糖尿病、褥疮、和细菌或病毒感染相关的慢性(非治愈性)创伤。

[0117] 给药模式

[0118] CIRP抑制剂的给药途径取决于待治疗的病症。例如,针对治疗系统性障碍(如脓毒性休克),静脉注射可以是优选的,并且对于治疗胃肠失调(如胃溃疡),口服给药可以是优选的。

[0119] 根据本方法,可以将本发明的一种或多种CIRP抑制剂通过适当的途径,单独地或与另一种药物结合地,向受试者给予。给予有效量的药剂(即,CIRP抑制剂)。“有效量”是在给予的条件下足以实现所希望治疗或预防效果的量,如足以抑制炎症应答并缓解或治愈炎症病症的量。这些药剂可以单一剂量或多个剂量给予。剂量可以通过本领域中已知的方法确定,并且取决于,例如,所选的具体药剂、受试者年龄、对药物的敏感性和耐受性、和整体健康。抗体的适合的剂量可以从约0.01mg/kg至约100mg/kg体重/治疗。

[0120] 多种给药途径是可能的,这些给药途径包括,例如,口腔、饮食、局部、经皮肤、经直肠、胃肠外(例如,静脉内、动脉内、肌内、皮下注射、皮内注射)、和吸入(例如,支气管内、鼻内或口腔吸入、鼻腔内滴)给予途径,其取决于药剂和待治疗的疾病或病症。给药可以是如表明的局部的或全身的。给药的优选模式可以取决于所选的具体药剂(CIRP抑制剂),和待治疗的具 体病症而变化。静脉内、口腔或胃肠外给药是优选的。

[0121] 该药剂可以作为一种中性化合物或作为一种药学上可接受的盐来进行给予。可以获得含有一种胺或其他碱性基团的化合物的盐类,这是例如通过与一种适当的有机酸或无机酸(如,氯化氢、溴化氢、乙酸、高氯酸以及类似物)反应来进行的。具有季铵基团的化合物还包括抗衡阴离子,例如氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、高氯酸盐、等。包含一种羧酸或其他酸性官能团的化合物的盐类可以通过与一种适当的碱(例如,一种氢氧化物碱)反应来制备。酸性官能团的盐包含反阳离子,如钠、钾等等。

[0122] 如在此使用的,所披露化合物的“药学上可接受的盐”是将本发明化合物与酸或碱反应的含离子键的产物,该酸或碱适用于向受试者给予。例如,可以获得包含胺或其他碱性基团的化合物的酸性盐,这是通过将该化合物与适当的有机酸或无机酸(如,氯化氢、

溴化氢、乙酸、高氯酸以及类似物) 反应来进行的。这类盐的其他实例包括盐酸盐、氢溴化物、硫酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、马来酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、酒石酸盐(例如, (+)-酒石酸盐、(-)-酒石酸盐或它们的混合物包括外消旋混合物)、琥珀酸盐、苯甲酸盐以及与氨基酸(例如谷氨酸)形成的盐。当化合物包括酸官能团(如 $-COOH$ 或 $-SO_3H$) 时, 盐也可以是用适合的有机碱形成。这种适用于与本发明的化合物形成药学上可接受的碱加成盐的碱包括无毒性的并足够强与酸官能团反应的有机碱。这种有机碱在本领域中是众所周知的, 并且包括氨基酸(如, 精氨酸和赖氨酸), 单-、二-、和三乙醇胺, 胆碱, 单-、二-、和三烷基胺(如甲胺、二甲胺、和三甲胺), 胍, N-苄基苯乙胺, N-甲基葡萄糖胺, N-甲基哌嗪, 吗啉, 乙二胺, 三(羟甲基)氨基甲烷等等。

[0123] 可以将该药剂作为包括CIRP的抑制剂和药学上可接受的载体的药物组合物的一部分向个体给予。

[0124] 如在此使用的, “药物组合物” 是以适用于向受试者给予的方式包括所披露的CIRP拮抗剂(如抗-CIRP抗体) 和药学上可接受的稀释剂或载体的配制品。适合的药学上可接受的载体包括惰性固体填料或稀释剂和无菌水性或有机溶液。配制品将根据所选择的给药途径(例如, 溶液、乳剂、胶囊剂) 而变化。适当的药用载体可以含有惰性成份, 这些成分并不与CIRP的促进剂(激动剂) 或抑制剂(拮抗剂) 相互作用。可以采用多种标准药物配制技术, 如那些在雷明顿药学大全 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 麦克出版公司, 伊斯顿, 宾夕法尼亚州中描述的技术。用于肠胃外给药的适当的药用载体包括, 例如无菌水、生理盐水、抑菌盐水(含大约0.9%mg/ml 苯甲醇的盐水)、磷酸盐缓冲盐水、汉克斯氏溶液、林格氏乳酸盐以及类似物。用于包封组合物的多种方法(如处于硬胶囊或环葡聚糖的包被中) 在本领域内是已知的(贝克(Baker) 等人, “控制释放生物活性药剂 (Controlled Release of Biological Active Agents)”, 约翰威利父子出版公司, 1986)。为了吸入, 可以将该试剂溶解并且载入到一种适当的用于给药的分配器中(例如, 雾化器、喷雾器或加压气溶胶分配器)。

[0125] 药物组合物可以是散装的或单位剂型的。单位剂型可以是任何多种形式, 这些形式包括, 例如, 胶囊剂、IV包、片剂、气雾剂吸入器上的单泵、或小瓶。在单位剂量组合物中的活性成分(即, 所披露的化合物或其盐的配制品) 的数量是有效量, 并且可以根据涉及的具体治疗而变化。可以理解, 有必要根据患者的年龄和病症作出剂量常规改变。剂量还将取决于给药途径。

[0126] 如在此使用的, “受试者” 包括哺乳动物, 例如, 人类、伴侣动物(例如, 狗、猫、鸟等等)、农畜(例如, 奶牛、绵羊、猪、马、家禽等等) 和实验动物(例如, 大鼠、小鼠、豚鼠等等)。在所披露的方法的某些实施例中, 该受试者是人类。

[0127] 在本发明的一些实施例中, 在受试者的液体复苏过程中给予该CIRP抑制剂。如在此使用的, “液体复苏” 或“补液” 意指补充通过流血、出汗、液体转移、或病理过程所损失的体液。液体复苏通过静脉给予, 可替代地口腔或直肠给予, 或进一步可替代地通过注射液体进入皮下组织进行。

[0128] 本发明的实践将采用(除非另外指明) 细胞培养、分子生物学、微生物学、细胞生物学、以及免疫学的常规技术, 这些都是在本领域技术之内。文献中充分解释了这些技术。参见, 例如, 萨姆布鲁克等人, 1989, “分子克隆: 实验室手册”, 冷泉港实验室出版社; 奥苏

贝尔等人, (1995), “分子生物学的短方案 (Short Protocols in Molecular Biology)”, 约翰威利父子出版公司; 酶学方法 (Methods in Enzymology) (若干卷); 细胞生物学方法 (Methods in Cell Biology) (若干卷), 和分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology) (若干卷)。

[0129] 本发明的具体实施例描述于以下实例中。考虑到本文披露的对本发明的说明书和实践, 本文权利要求范围内的其他实施例对本领域技术人员而言是明显的。说明书与实例一起旨在仅视为示例性, 本发明的范围和精神由实例后的权利要求书指明。

[0130] 举例说明

[0131] 实例1: 在动物模型中, 天然CIRP介导由出血性休克诱导的炎性应答

[0132] 在出血性休克模型中的动物的组织和血清中检测到CIRP的升高的水平。

[0133] 材料和方法

[0134] 试验动物: 雄性斯普拉-道来大鼠 (体重275-325g) 获得自查尔斯河实验室 (威明顿市, 马萨诸塞州), 并且关在处于12-h光/暗循环的温控室内, 并且以标准啮齿大鼠食物饮食进行喂养。在诱导出出血性休克之前, 将大鼠空腹过夜但是允许随意饮水。所有试验均根据国立卫生研究院 (贝塞斯达, 马里兰州) 的使用实验动物指南进行, 并且由范斯坦研究所的研究机构动物护理和使用委员会 (IACUC) 针对医学研究批准。

[0135] 出血性休克的动物模型: 之前详细描述了在本试验中所使用的出血性休克的模型, 略作修改 (王 (Wang) P, 豪普特曼 (Hauptman) JG, 乔杜里 (Chaudry) IH: 尽管有液体复苏, 但仍存在出血产生微血管血流的下降 (Hemorrhage produces depression in microvascular blood flow which persists despite fluid resuscitation), 循环休克 (Circ Shock) 32:307-318, 1990.; 吴 (Wu) R, 董 (Dong) W, 周 (Zhou) M, 崔 (Cui) X, 西姆斯 (Simms) H H, 王 (Wang) P: 在出血性休克后维护心血管稳定性的新颖的方法: 肾上腺髓质素及其结合蛋白的有益效果 (A novel approach to maintaining cardiovascular stability after hemorrhagic shock: beneficial effects of adrenomedullin and its binding protein), 外科手术 (Surgery) 137:2005)。简言之, 用异氟烷吸入剂麻醉大鼠。在分离股神经和血管后, 将导管 (PE-50管) 置于股静脉和动脉中。也对在相反侧的股动脉进行插管。通过血压分析器 (Digi-Med, 路易斯维尔, 肯塔基州), 一个动脉导管用于检测平均动脉压 (MAP) 和心率 (HR), 另一个用于放血, 并且静脉导管用于液体复苏。在10min内, 将大鼠放血至25-30mm Hg的MAP。通过进一步抽取小体积的血液或提供小体积的乳酸化林格式溶液, 将该压力维持90min。在低血压期结束时, 然后在60min期间内, 将大鼠用乳酸化林格式溶液 (相当于2倍最大出血体积, 该体积约为计算血量的60%) 进行复苏。该流的血并不用于复苏, 并且在出血之前、期间、或之后并没有将这些动物肝素化。在4h后, 收集血液样品, 并且置于冰上以允许凝固。然后在4°C下将样品以1200g离心10min, 并且然后将血清样品存储在-80°C下直至测定。还收集组织样品, 并且立即保存到液氮中, 然后存储在-80°C下直至测定。假手术的动物经受过相同外科手术, 但是并没有流血也没有复苏。

[0136] CIRP基因表达的确定: 为了检测CIRP基因的表达在出血中是否改变, 通过实时逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 确定并量化出血组织。使用鼠白血病病毒逆转录酶 (应用生物系统公司 (Applied Biosystems)), 在从4μg RNA 逆转录的cDNA样品上进行在Q-PCR。使用QuantiTect SYBR Green PCR试剂盒 (Qiagen公司), 在包含2pmol的正向和反向引物、12

μl QuantiTect预混合液、和 $1\mu\text{l}$ cDNA的 $24\mu\text{l}$ 最终体积中进行反应。根据Qiagen的建议,用应用生物系统公司7300实时PCR进行扩增。大鼠G3PDH mRNA的表达量用于各样品的归一化,并且一式两份进行各特异性mRNA的分析。通过 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 方法计算mRNA的相对表达,并且结果表达为关于相应的实验对照的倍数变化。使用以下大鼠引物:CIRP(NM_031147):5'-GGG TCC TAC AGA GAC AGC TAC GA-3'(正向),(SEQ ID NO:4),5'-CTG GAC GCA GAG GGC TTT TA-3'(反向),(SEQ ID NO:5);G3PDH(XM_579386):5'-ATG ACT CTA CCC ACG GCA AG-3'(正向),(SEQ ID NO:6),5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG TT-3'(反向),(SEQ ID NO:7)。使用RT-PCR评估TNF- α 的基因表达。TNF- α 和持家基因的引物如下:如之前描述的大鼠TNF- α ,5'-CCC AGA CCC TCA CAC TCA GA-3',(SEQ ID NO:8),5'-GCC ACT ACT TCA GCA TCT CG-3'(SEQ ID NO:9)和G3PDH,5'-TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC-3'(SEQ ID NO:10),5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'(SEQ ID NO:11)(吴(Wu)R,周(Zhou)M,王(Wang)P:在巨噬细胞细胞系和大鼠枯氏细胞中肾上腺髓质素和肾上腺髓质素结合蛋白-1下调TNF- α (Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 downregulate TNF-alpha in macrophage cell line and rat Kupffer cells),调节肽(Regul Pept)112:19-26,2003)。

[0137] RT-PCR 测定:全部RNA通过Trizol(英杰公司)进行提取。使用MLV逆转录酶(应用生物系统公司,格兰德岛,纽约)合成cDNA。在QuantiTect SYBR Green PCR混合物(Qiagen,巴伦西亚,加利福尼亚州)中进行PCR反应,并且通过应用生物系统公司7300PCR系统进行分析。将GAPDH用作用于归一化的内部对照,并且通过 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 方法计算所分析基因的相对表达水平。一式两份测量各样品。用于RT-PCR的引物合成自操纵子(亨茨维尔,阿拉巴马州)。这些引物如下列出:大鼠CIRP(NM_031147),5'-GGG TCC TAC AGA GAC AGC TAC GA-3'(正向),(SEQ ID NO:4)和5'-CTG GAC GCA GAG GGC TTT TA-3'(反向),(SEQ ID NO:5);TNF- α (NM_012675),5'-CCC AGA CCC TCA CAC TCA GA-3'(正向),(SEQ ID NO:8),5'-GCC ACT ACT TCA GCA TCT CG-3'(反向),(SEQ ID NO:9);和GAPDH(NM_017008),5'-ATG ACT CTA CCC ACG GCA AG-3'(正向),(SEQ ID NO:6),5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGC TT-3'(反向),(SEQ ID NO:7)。

[0138] 蛋白质印迹分析:使用针对CIRP的兔子多克隆抗体(ProteinTech基因,芝加哥,伊利诺伊州)通过蛋白印迹分析确定血清和组织中CIRP蛋白的表达。简言之,将等量的血清(体积)和组织匀浆(蛋白mg/泳道)在4%-12%NuPAGE Bis-Tris凝胶(英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)上进行分级,并且转移至硝酸纤维素滤膜,然后通过室温下的包含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液(10mM Tris-HCl[pH 7.5],150mM NaCl,0.1%Tween 20)中孵育1h进行阻断。将膜用兔多克隆抗体在4°C下孵育过夜。在TBST缓冲液中洗涤若干次并且用辣根过氧化物酶连接的抗兔IgG(细胞信号转导技术公司,丹弗斯,马萨诸塞州)孵育后,根据制造商的说明书应用化学发光过氧化物酶底物(ECL;通用电气医疗生物科学公司,皮斯卡塔韦,新泽西州),并且将膜暴露于X线胶片。扫描蛋白质印迹结果,并且通过使用GS800标刻度的光密度计,伯乐图像分析系统(赫拉克勒斯,加利福尼亚州)来量化相对谱带强度。使用抗- β -肌动蛋白抗体(针对胞浆蛋白,圣克鲁兹生物科技公司)来确定相等的负载量。使用如之前所述的兔多克隆抗-HMGB1抗体,测量大鼠血清中HMGB1的水平(王(Wang)H,布卢姆(Bloom)O,张(Zhang)M,毗瑟 拏巴克特(Vishnubhakat)JM,奥姆伯利诺

(Ombrellino) M, 车 (Che) J, 弗雷泽 (Frazier) A, 杨 (Yang) H, 伊万诺瓦 (Ivanova) S, 博罗维客瓦 (Borovikova) L, 马诺盖 (Manogue) KR, 费斯特 (Faist) E, 亚伯拉罕 (Abraham) E, 安德森 (Andersson) J, 安德森 (Andersson) U, 莫利纳 (Molina) PE, 阿布姆拉德 (Abumrad) NN, 萨马 (Sama) A, 特蕾西 (Tracey) KJ: 在 小 鼠 中, HMG-1 作为内毒素致死率的晚期介质 (HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice), 科学 (Science) 285:248-251, 1999)。

[0139] 可替代地, 将组织样品在包含蛋白酶抑制剂混合物 (罗氏公司, 印第安纳波利斯, 印第安纳州) 的 RIPA 缓冲液 (10mM Tris-HCl pH 7.5, 120mM NaCl, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸钠, 和 0.1% SDS) 中进行匀浆。通过 DC 蛋白测定 (伯乐公司, 赫拉克勒斯, 加利福尼亚州) 确定蛋白浓度。将等量的血清和组织匀浆在 SDS-PAGE 上分级, 并且转移至硝酸纤维素滤膜。将膜用 CIRP 的抗体 (#10209-2-AP; ProteinTech, 芝加哥, 伊利诺伊州)、GAPDH 的抗体 (#sc-25778; 圣克鲁兹公司, 圣克鲁兹, 加利福尼亚州)、组蛋白的抗体 (#9715; 细胞信号转导公司, 丹弗斯, 马萨诸塞州)、Bax 的抗体 (#sc-526; 圣克鲁兹公司)、肌动蛋白的抗体 (#A5441; 西格玛-奥德里奇公司, 圣路易斯, 密苏里州)、组织蛋白酶 D 的抗体 (#sc-10725; 圣克鲁兹公司)、HMGB1 的抗体 (#ab18256; 艾碧康公司, 坎布里奇, 马萨诸塞州) 进行孵育, 随后第二抗体辣根过氧化物酶共轭物 (SouthernBiotech, 伯明翰, 亚拉巴马州) 进行孵育并且用化学发光检测器试剂盒 (GE 医疗保健公司) 进行显影。

[0140] 统计分析: 将所有数据表达为平均值 \pm s.e.m., 并且通过单向方差分析 (ANOVA) 和 Student-Newman-Keuls 方法进行比较。将学生 t 检验用于两组分析。数据组的多数通过了正态性检验。一些数据组在组之间的变化方面具有统计差异。通过卡普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 方法估算存活率, 并且比较时序检验。如果 $p < 0.05$, 那么认为值的差异是显著的。

[0141] 结果

[0142] 在出血动物中的组织中和循环中的 CIRP 的上调和释放: 经受过实验失血 (出血) 的大鼠示出不同组织中 CIRP mRNA 表达的显著增加。与假手术对照相比, CIRP 表达在肝中增加约 5 倍 (图 2A), 并且在心脏中增加约 3 倍 (图 2B)。在出血大鼠中, 通过蛋白印迹分析检测到 CIRP 蛋白的高循环水平。出血组示出清晰的免疫反应性 CIRP 带, 这在假手术组中未发现 (图 2G)。与假手术大鼠相比 (确保 β -肌动蛋白相等的负载量), CIRP 蛋白的表达还在出血动物的心脏中增加 (图 2D)。通过将动物出血至 25-30mmHg 的平均动脉压 (MAP) 使用出血性休克的大鼠模型, 并且维持该 MAP 持续 90min, 随后液体复苏。在 240min 处, 血清 CIRP 是可检测的, 并且发现在出血大鼠中在休克后 330min 处显著提升。CIRP 蛋白水平在 150 和 240min 处的肝和心脏中分别开始增加。使用连续稀释的经过纯化的 CIRP 作为标准, 估算血清 CIRP 浓度。数据是平均值 \pm s.e.m., $n = 4-6$ /时间点, $*P < 0.05$ 对时间 0。 (图 9B 和图 2C)。相应地, CIRP mRNA 水平在休克后 240min 处在肝和心脏中分别以 4.1 和 2.8 倍显著诱导。通过实时 RT-PCR 分析这些水平。数据是平均值 \pm s.e.m., $n = 6$ /组, $*P < 0.05$ 对假手术 (图 9C 和图 2A 和 2B)。

[0143] 实例 2: 在人类中, 天然 CIRP 介导由出血性休克诱导的炎性应答

[0144] 在患有出血性休克的人类中, 检测到 CIRP 的提高了的血清水平。

[0145] 材料和方法

[0146] 人类血液标本:血样获得自外科重症监护室(ICU)的患有出血性休克的患者。分离血清,并在-80℃下以等份储存。知情同意书和人类受试者方案 由北岸-长岛犹太医疗系统的机构审查委员会(IRB)批准。

[0147] 结果

[0148] 检测患有休克的外科手术ICU患者中的血清CIRP:为了探索CIRP在临床病症中的作用,检查来自10外科ICU患者的血清CIRP水平(表1)。有五名女性和五名男性,并且平均年龄71岁。急性生理学和慢性健康评估II(APACHE II)范围从13至25,并且平均19。平均血液样品收集时间为休克发作后43h,其在活动性出血过程中或在创伤性损伤后由临床记录的收缩压<90mmHg 所限定。不论临床参数差异,在所有10名患者中良好检测了血清CIRP,然而很难在健康志愿者中观察到(图9A)。

[0149] 表1. 住进外科重症监护室的患者的临床参数

凝胶泳道	年龄	性别	APACHE II	小时*	起始的临床事件
1	81	女性	18	52	在血管搭桥手术过程中的术中出血
2	76	男性	23	64	破裂的肝血管瘤
[0150] 3	88	女性	21	24	大量下消化道出血
4	75	女性	19	61	在经腹全子宫切除术和两侧输卵管卵巢切除术后的术后出血
5	57	男性	15	41	在由车造成的行人碰撞后的骨盆骨折、脾裂伤和头皮裂

					伤	
	6	89	男性	25	60	来自膀胱肿瘤的肉眼血尿
	7	27	男性	17	23	由摩托车事故造成的骨盆骨折和脾裂伤
[0151]	8	67	男性	23	66	破裂的腹主动脉瘤
	9	85	女性	13	27	在诊断血管造影后的腹膜后出血
	10	65	女性	16	12	来自气管切开部位的出血
	平均值	71.0	5F/5 M	19.0	43.0	

[0152] *休克发作后的小时

[0153] 实例3:CIRP分泌自暴露于缺氧的细胞系。

[0154] CIRP分泌自经受过缺氧条件的细胞。在复氧后,CIRP从细胞核易位至细胞质,然后从细胞质至细胞外基质。

[0155] 材料和方法

[0156] 细胞培养:鼠巨噬细胞样RAW 264.7细胞获得自ATCC(美国种质保存中心,马纳萨斯,维吉尼亚州),并且生长在包含10%(vol/vol)FBS(在56°C热灭活30min)、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素和2mM谷氨酰胺的杜氏改良培养基(DMEM,生命科技公司,格兰德艾兰,纽约州)。将细胞在悬浮于介质中,并且在潮湿的培养箱(37°C,5%CO₂)中的6或48孔组织培养板中孵育过夜。在试验中,在不同的指示浓度和针对不同的指示时间用或不用重组CIRP刺激单细胞层。针对TNF-α通过ELISA或针对HMGB1通过蛋白印迹分析测定无细胞上清液。

[0157] 体外缺氧:在37°C下,使用在培养箱中放置的包含1%O₂、5%CO₂、和94%N₂的密闭箱产生缺氧。在经受缺氧之前,将培养介质变成Opti-MEM I介质(英杰公司)。在缺氧室中孵育20h后,针对不同时间段在正常培养条件下回收细胞,并且收集用于进一步分析。

[0158] 细胞分级:针对分离细胞质和细胞核级分,将RAW 264.7细胞沉淀再悬浮于包含10mM HEPES/KOH pH 7.9、1.5mM MgCl₂、10mM KCl、0.5mM 二硫苏糖醇、和蛋白酶抑制剂混合物的缓冲液中在冰上持续15min。在离心后,收集上清液为细胞质级分,并且将沉淀再悬浮于包含20mM HEPES/KOH pH 7.9、25%甘油、420mM NaCl、1.5mM MgCl₂、2mM EDTA、0.5mM 二硫苏糖醇、和蛋白酶抑制剂混合物的缓冲液中在冰上持续20min。在离心后,收集上清液作为细胞核级分。如赛默飞世尔科技公司(沃尔瑟姆,马萨诸塞州)说明的用试剂盒进行溶酶体的分离。

[0159] GFP-CIRP 融合蛋白的表达:GFP-CIRP表达质粒的构建描述于西山(Nishiyama)等人(西山,H.等人,富含甘氨酸RNA结合蛋白调节冷诱导抑制哺乳动物细胞生长(A

glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth.) 细胞生物学 (Cell Biol.) 137,899-908 (1997)) 中。使用脂转染胺 (LipofectAMINE) 试剂 (英杰公司) 用质粒转染 RAW 264.7 细胞。还只用 GFP 表达质粒转染细胞, 作为对照, 用于比较。研究培养的细胞中 CIRP 的释放。将来自含氧量正常的或缺氧/复氧的 RAW 264.7 细胞的培养条件培养基用 0.02% 脱氧胆酸和 10% 三氯乙酸在 4°C 下孵育过夜, 用于蛋白质沉淀, 并且然后使其经受蛋白质印迹。通过来自普安特科学公司 (Pointe Scientific) 的测定试剂盒确定 LDH 活性。

[0160] 结果

[0161] 来自暴露于缺氧的巨噬细胞的 CIRP 的易位和释放: 因为在休克后在人类和大鼠的血清中 CIRP 都是可检测的, 因此研究 CIRP 释放模式。巨噬细胞是造成各种炎性介质释放的主要细胞群体。将鼠巨噬细胞样 RAW 264.7 细胞在正常氧 (NM) 中培养或以类似方法经受缺氧 (1% O₂) 持续 20h, 其中它发生在出血性休克过程中, 并且检查 CIRP 的细胞位置。将暴露于缺氧的细胞复氧 0、2、4、7、或 24h (H/R0、H/R2、H/R4、H/R7、或 H/R24)。将细胞提取物分级为细胞核 (N) 和细胞质 (C) 组分, 并且然后经受蛋白质印迹。使用抗 GAPDH 和抗组蛋白抗体检验各级分的完整性。在含氧量正常的条件过程中, CIRP 主要位于细胞核中, 然而细胞质的 CIRP 在 7h 处进行检测, 并且从通过生物化学分级确定的 20 小时缺氧的复氧后 24 小时处显著增加 (图 9D)。遗传方法也被用来确认 CIRP 的易位。在对照实验中, 其中将 RAW 264.7 细胞用绿色荧光蛋白 (GFP) 表达质粒进行转染, 在含氧量正常的和缺氧条件下, 观察到绿色荧光遍布细胞 (图 15)。相比之下, 当将 RAW 264.7 细胞用 GFP-CIRP 表达质粒进行转染时, 仅在细胞中心观察到绿色荧光, 然而在正常氧条件下被来自 Hoechst 细胞核染色的蓝色荧光覆盖 (图 9E)。然而, 在从缺氧复氧后 4 小时处, 绿色荧光分布在整个细胞核和细胞质 (图 9E)。总之, 在巨噬细胞中, 缺氧/复氧诱导的 CIRP 从细胞核易位至细胞质中。

[0162] 为了检查细胞质 CIRP 是否能释放到细胞外间隙中, 在由三氯乙酸沉淀的 RAW 264.7 细胞的培养条件培养基 (CM) 中, CIRP 在缺氧后 24h 复氧处被良好地进行检测到, 然而它在正常氧中通过蛋白质印迹法是不可检测的 (图 9F)。此外, 细胞内 CIRP 蛋白水平在缺氧后立即增加 2.8 倍, 并且在复氧后的 7h 增加 4.3 倍, 然而在细胞裂解物中由于它释放到细胞外间隙中其水平在复氧的 24 h 处减少 (图 9F 和图 9G)。在图 9G 中, 图像中间的倍数变化指示了相对强度。CIRP 释放并不是归因于坏死, 因为乳酸脱氢酶活性不存在变化, 并且在缺氧后的 CM 中没有可检测的细胞内 Bax 蛋白。

[0163] CIRP 蛋白序列并不包含分泌前导信号; 因此, 它的分泌不应该是通过经典 (内质网-高尔基体-依赖性的) 途径 (Qu, Y. 和杜布亚克 (Dubyak), G. R., P2X7 受体调节多种类型的膜运输应答和非经典的分泌途径 (P2X7 receptors regulate multiple types of membrane trafficking responses and non-classical secretion pathways), 嘌呤能信号转导 (Purinergic Signal.) 5, 163-173 (2009))。将主动 CIRP 释放的潜在机制通过进行生物化学分级进行鉴定, 以分离经受了缺氧/复氧的 RAW 264.7 细胞的溶酶体分隔区。如来自 RAW 264.7 细胞的细胞提取物的蛋白质印迹中所示, 在正常氧 (NM) 中培养的细胞的溶酶体中没有检测到 CIRP 蛋白, 然而, 在从缺氧后的 24h 复氧 (H/R24) 处, 它与组织蛋白酶 D 共定位 (图 9H; N = 细胞核; L = 细胞提取物的溶酶体分级组分)。该结果指示出 CIRP 可以通过溶酶体分泌进行释放。在图 9D 至 9H 中, 图像表示了三个独立实验。

[0164] 实例4:用外源性重组CIRP治疗细胞系和动物诱导炎性应答

[0165] 如通过炎性细胞因子和器官损伤标志物的释放所测量的,在给予rCIRP 后,在鼠和人类细胞系中,连同在健康动物中,观察到增加的炎性应答。

[0166] 材料和方法

[0167] 重组蛋白 (rCIRP):使用表达和纯化具有来自细菌表达系统的六组氨基酸标签 (His-标签) 的重组蛋白的一系列方法。如之前所述的,通过使用修饰的寡核苷酸d (T₁₆) 引物与50U MuLV逆转录酶反向转录4 μ g的大鼠心脏总组织RNA,来制备cDNA (德维威迪 (Dwivedi) AJ, 吴 (Wu) R, 阮 (Nguyen) E, 希古契 (Higuchi) S, 王 (Wang) H, 克里希纳塞斯崔 (Krishnasastri) K, 马里尼 (Marini) CP, 拉维库马尔 (Ravikumar) TS, 王 (Wang) P:在肠缺血一再灌注后,肾上腺髓质素和肾上腺髓质素结合蛋白-1防止急性肺损伤 (Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 prevent acute lung injury after gut ischemia-reperfusion), 美国外科医师学会杂志 (J Am Coll Surg) 205:284-293, 2007)。为了获得CIRP蛋白,从CIRP cDNA, 用如下引物组,通过PCR扩增CIRP编码序列:合成正义5' -CAC CAT GGC ATC AGA TGA AGG-3' (SEQ ID NO:2) 和反义5' -CTC GTT GTG TGT AGC ATA GC-3' (SEQ ID NO:3) (设计根据GenBank:NM_031147, NCBI), 并且用来分离大鼠CIRP克隆。然后用EcoRV和NotI消化PCR产物,并且克隆到pENTR载体中, C末端六组氨基酸标签 (His-标签) 系统 (如由英杰公司所描述的), 并且然后转化至大肠杆菌 BL21 (DE3), 作为一种生成的表达质粒。在若干升BL21 (DE3) 细胞培养物中进行CIRP的诱导表达, 并且如由生产厂商 (Novagen公司, 麦迪逊, 威斯康星州) 所描述的然后将CIRP分离并纯化。为了避免任何无意的脂多糖 (LPS) 污染, 使用曲通X-114提取来去除可能的内毒素污染, 并且如之前所描述的使用鲎变形细胞溶解物 (LAL) 测定 (BioWhittaker公司, 沃克斯维尔, 马里兰州) 确定最终LPS含量 (厄特尔 (Ertel) W, 莫里森 (Morrison) MH, 王 (Wang) P, 巴 (Ba) ZF, 阿亚拉 (Ayala) A, 乔杜里 (Chaudry) IH: 脓毒症中细胞因子的复模式 (The complex pattern of cytokines in sepsis), 前列腺素、恶液质素、和白细胞介素之间的关联 (Association between prostaglandins, cachectin, and interleukins), 外科学年鉴 (Ann Surg) 214:141-148, 1991)。

[0168] CIRP 表达质粒的构建:从分离自大鼠心脏的总RNA, 通过使用MLV逆转录酶与寡核苷酸d (T₁₆) 引物合成大鼠CIRP cDNA (NM_031147)。用寡核苷酸引物、正义5' -CAC CAT GGC ATC AGA TGA AGG-3' 和反义5' -CTC GTT GTG TGT AGC ATA GC-3' 扩增cDNA。将得到的PCR产物用EcoRV和 NotI进行消化, 并且在六组氨基酸标签 (His-标签) 的C-末端处克隆到 pENTR 载体 (英杰公司) 中, 并且然后转化至大肠杆菌BL21 (DE3)。通过对卡那霉素的耐药性选择单个克隆。

[0169] 纯化rmCIRP:将携带大鼠His-CIRP表达质粒的转化的大肠杆菌在包含卡那霉素卢里亚-贝尔塔尼 (Luria-Bertani) 介质中孵育过夜, 并且用1.0mM IPTG 诱导另外6h。通过离心获得细菌, 并且用20mM Tris-HCl pH 7.9洗涤沉淀一次。将细菌沉淀重新悬浮于包含20mM Tris-HCl pH 7.9、500mM NaCl、和5 mM咪唑的缓冲液中, 并且在4°C下通过超声处理进行裂解。在4°C下, 将可溶性提取物通过以20,000g离心1h进行澄清。透明的裂解产物加载到Ni²⁺-NTA 柱 (Novagen公司, 麦迪逊, 威斯康星州) 上。将结合蛋白用20mM Tris-HCl pH 7.9、500mM NaCl、和100mM咪唑进行洗涤, 并且洗脱到补充以1.0M咪唑的相同缓冲液中。将

所有蛋白用PBS进行透析,并且存储在-80℃下用于进一步分析。

[0170] 从纯化的rmCIRP制品中去除LPS:将曲通X-114(西格玛-奥德里奇公司,圣路易斯,密苏里州)添加至纯化的蛋白溶液中,至5%的终浓度。将混合物在室温下旋转15min,以确保均相溶液。然后,将该混合物以14,000g离心12 min。小心去除包含rmCIRP(无LPS)的上层水相。通过鲎变形细胞裂解物(LAL)测定(Cambrex公司,东卢瑟福,新泽西州)在所去除溶液中的LPS水平。

[0171] 纯化的rmCIRP的验证:在表达和纯化后,将1μg的蛋白制品经受SDS-PAGE,并且将凝胶用考马斯蓝进行染色。泳道1,蛋白标志物;泳道2,批次A;泳道3,批次B。通过SDS-PAGE检验rmCIRP制品的纯度,显示出24kDa处的主要带,并且在其他位置处的非常小的带(图16A)。针对来自两个不同来源(一个产生自实验室并且另一个来自蛋白技术公司(ProteinTech))的抗CIRP抗体,通过蛋白质印迹法进一步确认rmCIRP的一致性(图16B)。在纽约的洛克菲勒大学的蛋白质组学资源中心,使用LC-MS/MS,通过氨基酸序列分析进一步验证纯化的rmCIRP。使用MASCOT数据库搜索算法,以>95%的把握,将重组蛋白鉴定为CIRP。

[0172] 细胞培养物:如实例3中所描述的,培养RAW 264.7细胞。

[0173] 炎性细胞因子测定:作为炎性细胞因子级联和急性炎性应答的指数,根据制造商的说明书,针对血清、组织匀浆、和生长以巨噬细胞的培养介质中的TNF-α和IL-6水平,使用可商购的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(BioSource International,卡马里奥,加利福尼亚州)测量来自用重组CIRP孵育的细胞的上清液。为了量化在血清和组织中TNF-α和IL-6蛋白水平,在出血后4h或在用重组CIRP治疗后4h获得血清样品,该血清样来自在大鼠处死时通过心脏穿刺的动物,并且收集组织样品,并且通过如上相同方法进行。通过蛋白质印迹确定HMGB1水平。

[0174] 确定转氨酶和乳酸的血清水平:根据制造商的说明书(普安特科学公司,林肯公园,密歇根州),通过使用测定试剂盒,确定天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、和乳酸的血清浓度。

[0175] 人类PBMC的分离:根据标准方案,通过离心,经Ficoll-Paque Plus(通用医疗公司,华盛顿港,纽约)密度梯度,将人类PBMC从来自纽约血库的健康供体获得的血液中分离。将分离的细胞用RPMI1640完全培养基进行洗涤并且在板上进行培养。在2h后,去除非贴壁细胞,并且在使用前将附着细胞培养过夜。

[0176] 结果

[0177] 在鼠细胞系中重组CIRP(rCIRP)诱导的炎性应答:为了解决细胞外CIRP是否能起炎性介质的作用,使用细菌表达系统来表达并纯化重组鼠CIRP(rmCIRP)(超过97%的纯度)并且通过蛋白质印迹法确认(图16A和B)。从具有残余的约10pg LPS/μg CIRP(通过鲎变形细胞裂解物测定所测量的)的纯化的rmCIRP中,应用曲通X-114提取程序来去除脂多糖(LPS)(参见,阿伊达(Aida),Y.和帕布斯特(Pabst),M.J.,使用曲通X-114通过相位分离从蛋白质溶液中去除内毒素(Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114),免疫法杂志(J.Immunol.Methods)132,191-195(1990)),可以将其与在其他鉴定的内源性DAMP中所描述的进行比较(参见王(Wang),Y.等人,在调节树突细胞的细胞因子产生和成熟的热休克蛋白70分子中刺激和抑制剂表

位的鉴定(Identification of stimulating and inhibitory epitopes within the heat shock protein 70 molecule that modulate cytokine production and maturation of dendritic cells),免疫学杂志(J.Immunol.) 174,3306-3316(2005);亨德森(Henderson),B.等人,分子伴侣的细胞外信号转导动作并不是由于微生物污染物(The extracellular signaling actions of molecular chaperones are not due to microbial contaminants),细胞应激分子伴侣(Cell Stress Chaperones)15,123-141(2010)。向RAW 264.7细胞添加 rmCIRP以剂量和时间依赖性方式增加TNF- α 释放(参见图10A和10B)。将 RAW 264.7细胞用所指示的rmCIRP浓度孵育4h(图10A)或用100ng/ml rmCIRP孵育持续所指示的时间(图10B),其中* $P < 0.05$ 对无rmCIRP或时间0。

[0178] 在健康大鼠中,重组CIRP(rCIRP)诱导的炎性应答

[0179] 将健康大鼠静脉内给予rmCIRP(1mg/kg BW)或生理盐水(运载体)。在注射rCIRP(1mg/kg BW)或缓冲溶液(相同体积)(作为对照)后,TNF- α 的血清水平显著在rCIRP组中增加,比缓冲(假手术)组高出约5倍(图4A)。在rCIRP给予后,TNF- α 基因和蛋白质表达在肝(图4C和D)和肠(图4E和F)中增加。rmCIRP还剂量依赖性地诱导另一个促炎细胞因子(HMGB1)的释放(图10C)。将RAW 264.7细胞用所指示的浓度的rmCIRP孵育20h。通过蛋白质印迹确定条件培养基(CM)中的HMGB1水平。用密度测定法量化谱带强度。图4B示出,在给予rCIRP(1mg/kg BW)后,HMGB1(一种促炎细胞因子)的循环水平的增加。与假手术组中的弱带(一式两份)相比,rCIRP治疗的大鼠示出强免疫反应性的HMGB1带(一式三份)。除了体外作用之外,与给予生理盐水的那些相比,向健康大鼠静脉给予rmCIRP(1mg/kg BW)显著增加了血清TNF- α 、IL-6、和HMGB1水平连同器官损伤标志物AST和ALT(图17A-C)。在4小时后,收集血液和组织用于分析。图17A示出通过ELISA测量的血清TNF- α 水平,和通过蛋白质印迹法所测量的HMGB1水平。图17B示出分别通过实时RT-PCR和ELISA所测量的TNF- α mRNA和蛋白水平。在rmCIRP给予后4小时测量血清AST和ALT,并且水平示于图17C中。数据是平均值 \pm s.e.m., $n=6-9$ /组,* $P < 0.05$ 对运载体。

[0180] 多粘菌素B(一种结合LPS的抗生素)并不干扰rmCIRP诱导的TNF- α 生产,证实在rmCIRP中的LPS残余物并没有造成细胞因子释放,然而热处理灭活了rmCIRP的活性。相比之下,多粘菌素B抑制将LPS诱导的TNF- α 释放抑制了84%,然而热处理仅小幅降低LPS活化(图10D)。为了进行该实验,在添加至RAW 264.7细胞持续8小时之前,将rmCIRP(1.5 μ g/ml)或LPS(10ng/ml)用多粘菌素B(PMB,120U/ml)进行处理,或在80 $^{\circ}$ C下加热30min。* $P < 0.05$ 对rmCIRP;# $P < 0.05$ 对LPS。

[0181] 在人类细胞系中,重组CIRP(rCIRP)诱导的炎性应答:如同鼠模型一样,研究在人类模型中利用rCIRP刺激TNF- α 释放。为了避免在制备重组蛋白中的LPS污染,利用重组人类CIRP(rhCIRP),其从人类HEK293细胞中表达并纯化。rhCIRP在以剂量依赖性方式刺激TNF- α 从分化的人类THP-1细胞(图10E)连同原代人类外周血单核细胞(PBMC)(图10F)中释放方面具有可与rmCIRP比较的活性。通过用所指示浓度的rhCIRP或rmCIRP孵育分化的人类THP-1细胞4h,进行这些实验。* $P < 0.05$ 对无CIRP。类似地,将人类PBMC用所指示浓度的rhCIRP孵育8h。* $P < 0.05$ 对无rhCIRP。因此,利用CIRP刺激细胞因子释放并不可归因于LPS污染。此外,在啮齿类和人类之间,CIRP诱导的细胞因子活化是保守的。

[0182] 在用rCIRP刺激巨噬细胞后炎性细胞因子释放的增加:在平行实验中,测量用

rCIRP孵育的培养的RAW细胞的上清液中的细胞因子。在用重组CIRP 孵育的培养的RAW细胞的上清液中提升的TNF- α 和IL-6水平是剂量和时间依赖性的。如图5A中所指示的,100ng/ml剂量的rCIRP(4-h孵育)显著增加了 TNF- α 释放。关于时程,分别早在孵育后4h和2h,100ng/ml剂量的rCIRP就显著增加了TNF- α 和IL-6产生。在以剂量依赖性方式rCIRP刺激后,上清液 HMGB1水平增加了。蛋白质印迹的量化示出,在用500ng/ml剂量的rCIRP孵育20h后,从培养的RAW细胞中的HMGB1释放增加了约6倍(图5B)。

[0183] 实例5:向CIRP缺陷小鼠给予外源性重组CIRP诱导炎性应答

[0184] 材料和方法

[0185] 实验动物:由日本熊本大学提供具有C57BL/6背景的Cirp^{-/-}小鼠(樱井(Sakurai),T.等人,通过活化细胞外信号调节激酶,Cirp保护防止肿瘤坏死因子- α 诱导的细胞凋亡(Cirp protects against tumor necrosis factor- α -induced apoptosis via activation of extracellular signal-regulated kinase),生物物理学报(Biochim.Biophys.Acta.)1763,290-295(2006))。Rage^{-/-}、Tlr2^{-/-}、和Tlr4^{-/-}小鼠获得自海伦娜埃兰德松-哈里斯(Helena Erlandsson-Harris)博士,并且在范斯坦研究所供养用于医学研究(杨(Yang),H.等人,需要关键的半胱氨酸用于HMGB1结合至Toll样受体4并且活化巨噬细胞因子释放(A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release),美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)107,11942-11947(2010))。从杰克逊实验室(巴尔港,缅因州)购买C57BL/6野生型小鼠。将雄性并年龄匹配(10至12周)的小鼠用于实验中。将动物随机分配到假手术、运载体对照、或治疗组中。各组中使用动物的数量基于关于出血和脓毒症的动物模型的之前的出版物。所有动物研究都不是以全盲方式进行的。如果动物在外科手术过程中死亡,那么它们将排除在分析之外。

[0186] 给予rCIRP:在另外组的正常健康动物中,给予rCIRP,例如,rmCIRP(1mg/kg BW)或缓冲液(相同体积,1ml)。在治疗完成后4h,收集血液样品,并置于冰上以允许凝固,并且然后在4°C下以1200g离心10min,并且将血清样品存储在-80°C下直至测定。并且还收集组织样品,并且立即保存到液氮中,然后存储在-80°C下直至测定。在出血动物的另一组中,开始液体复苏后15min,经由股静脉导管经45min时间向出血大鼠给予抗CIRP抗体(3 mg/kg BW)、兔IgG、或运载体或缓冲液(相同体积,1ml)。在完成治疗后1.5h,同上收集组织或血液样品。

[0187] 结果

[0188] 在健康大鼠中,重组CIRP(rCIRP)诱导组织损伤:为了研究rCIRP在正常动物中的作用,向正常健康大鼠给予rCIRP(1mg/kg BW)(从细菌表达系统纯化的重组蛋白),并且测量AST和ALT的血清水平(肝损伤的指标)。用rCIRP治疗的大鼠显示出AST(图3A)和ALT(图3B)的显著提高的水平。这些结果示出rCIRP直接引起炎性组织损伤。

[0189] 实例6:重组CIRP与促炎细胞因子HMGB1配合,刺激TNF- α 的释放

[0190] 材料和方法

[0191] 重组蛋白:如之前所述生产rmHMGB1((Yang),H.等人,用内源性高迁移率族1的拮抗剂逆转已经形成的脓毒症(Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1),美国国家科学院院刊

(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 101,296-301(2004))。重组大鼠TNF- α 获得自生物源公司(Biosource)。从人类HEK293细胞转染并表达具有C末端DDK 标记的重组人类(rh)CIRP(登录号NP_001271;全长),并且获得自傲锐 东源公司(罗克维尔市,马里兰州)。从小鼠骨髓瘤NS0细胞系转染并表达 rhTLR2(登录号NP_003255;Glu21-Leu590)和rhTLR4(登录号000206; Glu24-Lys631)。从大肠杆菌转化并表达rhMD2(登录号BAA78717; Glu17-Asn160)。将rhTLR4/MD2复合物从共表达rhTLR4(登录号000206; Glu24-Lys631)和rhMD2(登录号Q9Y6Y9;Glu17-Asn160)的NS0细胞中进行纯化,其中在各蛋白具有His标签。所有的rhTLR2、rhTLR4、和rhMD2与 10-His标签在其C-末端处进行融合,并且获得自R&D系统公司(明尼阿波里 斯市,明尼苏达州)。具有C-末端6-His标签的rhRAGE(登录号Q15109; Ala23-Ala344)从人类HEK293细胞转染并表达,并且获得自Biovision公司(苗 必达,加利福尼亚州)。

[0192] 结果

[0193] CIRP 和HMGB1对刺激TNF- α 释放的加成作用:在巨噬细胞中rmCIRP诱导的TNF- α 和HMGB1释放(图10a、b和c)。据报道,HMGB1还可以刺激TNF- α 释放(安德森(Andersson),U.等人,在人类单核细胞中高迁移率族蛋白1 (HMG-1)自己促炎细胞因子合成(High mobility group 1protein(HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes),实验医学 杂志(J.Exp.Med.) 192,565-570(2000))。通过应用相关的中和性抗体,分析关于刺激TNF- α 释放在CIRP和HMGB1之间的关系。产生在RAW 264.7细胞中以剂量依赖性方式通过rmCIRP有效抑制TNF- α 生产的抗CIRP多克隆抗体。如图16C中所示,在添加所指示浓度的rmCIRP之前,用20 μ g/ml的抗CIRP抗体或兔对照(非免疫的)IgG预孵育RAW 264.7细胞20min。在4h后,通过 ELISA测定条件培养基(CM)中的TNF- α 水平。数据是来自三个独立实验的平均值 \pm s.e.m.。 $*P<0.05$ 对rmCIRP+对照IgG。在图16D中,在添加1.0 μ g/ml rmCIRP之前,用1mg/ml所指示的稀释的兔对照IgG或抗CIRP抗体预孵育 RAW 264.7细胞20min。在4h后,通过ELISA测定CM中的TNF- α 水平。数据是来自三个独立实验的平均值 \pm s.e.m.。 $*P<0.05$ 对rmCIRP+对照IgG。在添加rmCIRP(0.3 μ g/ml)、rmHMGB1(0.3 μ g/ml)、或rmCIRP/rmHMGB1(0.3 μ g/ml、0.3 μ g/ml)持续8h之前用4 μ g/ml的抗-CIRP抗体、抗-HMGB1P 抗体、或非免疫对照IgG孵育THP-1细胞1h。 $*P<0.05$ 对rmCIRP; $^{\#}P<0.05$ 对rmHMGB1。用抗-HMGB1抗体预孵育(参见,杨(Yang),H.等人,用内 源性高迁移率族1的拮抗剂逆转已经形成的脓毒症(Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1),美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 101,296-301(2004))导致在THP-1细胞中由rmCIRP诱导的TNF- α 释放的31%的减少($P=0.292$),然而用抗-CIRP 抗体的预孵育具有显著的70%减少($P<0.05$,图10G)。反之亦然,用抗-CIRP 抗体的预孵育仅导致由rmHMGB1诱导的TNF- α 释放的17%减少($P=0.182$,图10G)。此外,rmCIRP、rmHMGB1、和rmCIRP加rmHMGB1分别诱导0.8 ng/ml、0.6ng/ml、和1.6ng/ml的TNF- α 水平。总之,这些结果指示了CIRP和 HMGB1在刺激从巨噬细胞中的TNF- α 释放方面起加成作用。通过ELISA测定 所有收集的CM中的TNF- α 水平。数据是来自三个或四个独立实验的平均值 \pm s.e.m.。

[0194] 实例7:在动物模型中,抗-CIRP抗体有效抑制CIRP的生物活性

[0195] 在动物模型中,给予抗-CIRP抗体减弱了炎性应答,改进了出血的存活 率。

[0196] 材料和方法

[0197] 抗-CIRP抗体产生:针对CIRP的多克隆抗血清在标准程序后,每隔三或更多周通过用纯化的重组CIRP注射兔子进行产生(科文斯研究产品公司,丹佛,宾夕法尼亚州)。根据供应商的说明书(皮尔斯公司(Pierce),罗克福德,伊利诺伊州),通过使用固定化免疫纯蛋白质-A/G柱,将抗-CIRP抗体的IgG从血清中进行亲和纯化。在96孔规格中,通过直接ELISA确定抗体滴度(如由科文斯研究产品公司所描述的,丹佛,宾夕法尼亚)。如通过鲎变形细胞裂解物测定(BioWhittaker)所测量的,在纯化的抗体制品中LPS是不可检测的。

[0198] 生产抗CIRP多克隆抗体:在科文斯公司(Covance)(普林斯顿,新泽西州),在新西兰白兔中,通过标准程序产生针对纯化的rmCIRP的抗体将IgG级分通过固定化免疫纯蛋白质-A/G层析(皮尔斯公司)从抗血清中分离。针对其纯化蛋白,通过蛋白质印迹检验抗-CIRP抗体的特异性。如通过LAL测定所测量的,在抗体制品中,LPS是不可检测的(Cambrex公司)。进行相同过程以纯化兔血清对照IgG。

[0199] 存活研究:将出血大鼠给予抗-CIRP抗体、兔对照IgG、或生理盐水(运载体)持续连续3天,并且监测其死亡率持续10天。使Cirr^{-/-}和野生型小鼠经受出血,并且记录存活持续72h。在CLP后5h,给予脓毒症大鼠抗-CIRP抗体或兔对照IgG。在CLP后20h去除坏死盲肠,并且监测其死亡率持续10天。

[0200] 粒细胞髓过氧化物酶评估:如之前所报道,使用髓过氧化物酶(MPO)活性测定,评估在肺和肝组织内嗜中性粒细胞累计(德维威迪(Dwivedi) AJ,吴(Wu) R,阮(Nguyen) E,希古契(Higuchi) S,王(Wang) H,克里希纳塞斯崔(Krishnasastri) K,马里尼(Marini) CP,,拉维库马尔(Ravikumar) TS,王(Wang) P:在肠缺血-再灌注后,肾上腺髓质素和肾上腺髓质素结合蛋白-1防止急性肺损伤(Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 prevent acute lung injury after gut ischemia-reperfusion),美国外科医师学会杂志(J Am Coll Surg) 205:284-293,2007)。为了确定MPO活性,将肝组织在包含0.5%十六烷基三甲基溴化铵的50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中进行匀浆。在离心后,将上清液添加至反应溶液中(0.2mg/ml O-联茴香胺克冠二胺和0.2mM H₂O₂,在磷酸盐缓冲液中),并且在460nm下记录OD的时间变化,以计算活性。

[0201] 结果

[0202] 抗-CIRP抗体提供了出血后显著的存活优势:为了进一步确认CIRP是在针对不同激发(如出血)的炎性应答方面的新颖的介质,向出血大鼠给予针对CIRP的特异性抗体(3mg/kg BW)。结果示出,CIRP阻断在急性失血中提供了显著存活优势。如图6中所示,抗-CIRP抗体治疗将实验性出血动物的存活率增加了从43%至85%(P<0.05)。

[0203] 抗-CIRP抗体减弱了出血后的组织损伤:为了继续研究rCIRP响应于出血的病理生理学结果,向出血大鼠给予针对CIRP的特异性抗体(3mg/kg BW)。结果指示出,出血后的AST、ALT、和乳酸水平的增加由于抗-CIRP抗体显著减弱(降低30%~40%,P<0.05)(图7A-C)。

[0204] 抗-CIRP抗体减弱出血诱导的促炎细胞因子的增加:研究细胞外CIRP在出血过程中调节炎性应答的作用。在液体复苏过程中,出血大鼠接受了兔对照(非免疫的)IgG或中性抗-CIRP抗体(10mg/kg BW)的静脉给予。在4h后,收集血清和肝样品用于通过ELISA测量TNF- α 和IL-6连同血清AST、ALT和肝MPO活性。数据是平均值 \pm s.e.m.,n=6/组,*P<0.05

对假手术; * $P < 0.05$ 对仅出血。中和性抗-CIRP抗体显著降低了TNF- α 和IL-6的血清和肝水平,其未被非免疫的对照IgG改变(图11A)。出血诱导的TNF- α (图8A)和IL-6(图8D)的上调在血清中显著减少。分别在实验性血亏(出血)后的动物的肺和肝中,观察到TNF- α (图8B和C)和IL-6(图8E和F)的组织水平的非常类似的结果。血清AST和ALT,连同肝髓过氧化物酶活性-嗜中性粒细胞累积的指标-在抗-CIRP抗体组中显著减少(图11B)。将出血大鼠静脉内给予抗-CIRP抗体(10mg/kg BW/天, $n = 13$)、对照IgG($n = 13$)、或生理盐水(运载体; $n = 14$)持续连续3天,并且监测死亡率持续10天。* $P < 0.05$ 对盐水。在出血后10天,抗-CIRP抗体组的存活率显著比对照IgG和运载体组的更高(85%对38%和43%;图11C)。使Cirp^{-/-}小鼠($n = 9$)和相同遗传背景的野生型(WT)小鼠($n = 9$)经受出血并且观察72h。* $P < 0.05$ 对WT。一致地,在出血的后72h, Cirp^{-/-}小鼠的存活率显著比野生型小鼠的更高(56%对11%;图11D)。使WT和Cirp^{-/-}小鼠经受出血。4h后,收集血清样品,用于通过ELISA测量TNF- α 水平,并且通过蛋白质印迹法测量HMGB1水平。数据是平均值 \pm s.e.m., $n = 6$ /组,* $P < 0.05$ 对WT假手术; * $P < 0.05$ 对WT出血。出血后4h,在野生型小鼠中观察血清TNF- α 的7.3倍增加;这种TNF- α 提升并没有发生在Cirp^{-/-}小鼠中(图11E)。在血清HMGB1水平中观察到了类似的现象(图11F),表明CIRP和HMGB1都在休克后促进动物死亡率方面起作用。

[0205] 抗-CIRP抗体减少出血后增加的MPO活性: MPO(髓过氧化物酶)被视为炎症的一般性指数,并且增加的组织MPO活性反映了嗜中性粒细胞外渗。实验性出血诱导了肝中MPO活性的增加。在给予抗-CIRP抗体后增加的MPO显著减少(图8G)。

[0206] 实例8: 抗-CIRP抗体有效增加脓毒症动物的存活率

[0207] 材料和方法

[0208] 多微生物脓毒症的动物模型: 将动物用异氟烷吸入法麻醉动物。通过中线剖腹手术进行盲肠结扎和穿刺(CLP)。简言之,进行2-cm中线剖腹术。暴露盲肠,仅在回盲瓣远端结扎,以避免肠梗阻,用18-计量注射针穿刺两次,轻轻挤压以允许少量的粪便物从这些孔中流出,并且然后回到腹腔。将腹部以多层缝合来闭合。假手术动物经历过相同程序,不同之处在于盲肠既没有结扎也没有穿刺。在外科手术后立即皮下地以3ml/100g BW生理盐水将这些动物进行复苏。

[0209] 腹腔巨噬细胞的细胞培养和分离: 鼠巨噬细胞样RAW 264.7细胞和人类单核细胞THP-1细胞获得自ATCC(马纳萨斯,弗吉尼亚州)。如之前所述,在腹腔注射以4%巯基乙醇后的第3天,将初代腹腔巨噬细胞从C57BL/6野生型、Rage^{-/-}、Tlr2^{-/-}、和Tlr4^{-/-}小鼠中分离(杨(Yang), H.等人,针对HMGB1结合至Toll样受体4和巨噬细胞因子释放的活化所需的关键半胱氨酸(A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release),美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 107, 11942-11947 (2010))。在没有预诱导的情况下,直接将大鼠初代腹腔巨噬细胞从雄性斯普拉-道来大鼠的腹腔分离。将RAW 264.7细胞和腹腔巨噬细胞分别培养在DMEM和RPMI1640(英杰公司,格兰德艾兰,纽约州)中。将THP-1细胞培养在具有0.05mM 2-巯基乙醇的RPMI1640中并且通过用佛波醇12-豆蔻酸13-乙酸(20ng/ml)孵育48h分化为巨噬细胞样细胞。将所有培养介质补充以10%热灭活的FBS、1%青霉素/链霉素和2 mM谷氨酰胺。将细胞维持在具有5%CO₂的37°C培养箱中。

[0210] 结果

[0211] 在脓毒症动物中CIRP的上调并释放:研究在脓毒症(由过度炎症引起的另一个临床病症)中CIRP的促炎因子活性。研究经受了盲肠结扎和穿孔(CLP)的大鼠(一种形成的多微生物脓毒症的动物模型)中的CIRP表达(参见杨(Yang), S., 周(Zhou), M., 乔杜里(Chaudry), I.H. 和王(Wang), P.防止从脓毒症的高动力相至低动力相的转变的新颖方法:肾上腺髓质素和肾上腺髓质素结合蛋白-1的作用(Novel approach to prevent the transition from the hyperdynamic phase to the hypodynamic phase of sepsis: role of adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1),外科学年鉴(Ann.Surg.) 236,625-633(2002))。在20h后,收集血液和肝组织用于分析。通过蛋白质印迹确定血清CIRP水平。通过密度测定法量化谱带强度。CLP后20h,与假手术的相比,CIRP血清水平增加了3.4-倍(图12A)。分别通过实时RT-PCR和蛋白质印迹法,评估肝中CIRP的mRNA和蛋白水平。数据是平均值 \pm s.e.m., $n=4-6$ /组,* $P<0.05$ 对假手术。肝中的CIRP的mRNA和蛋白水平分别增加了2.4-和4.0-倍(图12B和12C)。评估在巨噬细胞中LPS对调节CIRP表达和释放的作用。将分离自大鼠的腹腔巨噬细胞进行铺板并暴露于LPS(10 ng/ml)或非治疗(无)。6h后,通过实时RT-PCR分析巨噬细胞中的CIRP mRNA水平。将CIRP表达水平归一化为GAPDH。将未治疗的细胞中的值命名为1用于比较。数据是来自三个独立实验的平均值 \pm s.e.m.* $P<0.05$ 对无。在分别暴露于LPS持续6和24h后,在大鼠初代腹腔巨噬细胞中的CIRP的mRNA和蛋白水平显著增加(图12D)。在分别暴露于LPS后24h和6h收集总细胞裂解液和培养的介质并且经受蛋白质印迹法。数据代表了三个独立实验。还在6h暴露于LPS后的CM中检测CIRP蛋白,然而从未治疗的细胞中它是不可检测的(图12E)。研究诱导CIRP释放的其他炎性介质。用rmHMGB1(1 μ g/ml)或rmTNF- α (30ng/ml)诱导RAW 264.7细胞持续24h并没有造成CIRP释放到CM中,然而在暴露于LPS(100ng/ml)的细胞中,CIRP蛋白是可检测的。将该条件培养基经受蛋白质印迹,并且数据代表了三个独立的实验(图12F)。为了验证细胞外CIRP的有害活性,将中和性抗-CIRP抗体给予脓毒症动物。在CLP后5h,静脉内给予CLP大鼠抗-CIRP抗体(10mg/kg BW, $n=18$)或非免疫对照IgG(10mg/kg BW, $n=18$)。监测死亡率,持续10天。* $P<0.05$ 对对照IgG。PS红,丽春红S红染色。在用抗-CIRP抗体治疗后,脓毒症大鼠的10-天存活率从39%显著增加至78%(图12G)。因此,CIRP也是脓毒性休克中有害因子。

[0212] 实例9:CIRP结合至TLR4/MD2细胞表面受体复合物

[0213] 材料和方法

[0214] 表面等离子共振(SPR)分析:使用BIAcore T200仪器进行蛋白质-蛋白质相互作用和肽-蛋白质相互作用的分析(GE医疗保健公司)。在包含0.01% Tween-20(pH 7.4)的1 \times PBS缓冲液中进行结合反应。首先通过注射以89 μ l的0.1M N-乙基-N'-[3-二乙氨基-丙基]-碳化二亚胺和0.1M N-羟基琥珀酰亚胺活化CM5右旋糖酐芯片(流动细胞-2)。将在10mM乙酸钠(pH 4.5)中稀释的200 μ l的5 μ g/ml的配体的等分试样注射到CM5芯片的流动细胞-2中用于固定。接着,然后注射135 μ l的1M乙醇胺(pH 8.2),以阻断剩余活性位点。将没有被配体包被的流动细胞-1用作对照,以评估非特异性结合。在25 $^{\circ}$ C下,以30 μ l/min的流速进行结合分析。为了评估结合,将分析物(范围从62.5 nM至1.0 μ M,用于动力学分析,或0.5 μ M用于是/否结合分析)注射到流动细胞-1和-2中,并且通过表面等离子体共振分别记录分析物和配体的缔合。从用配体包被的通道(流动细胞2)中减去来自空白通道(流动细

胞-1)的信号。通过BIAcore T200评估软件分析数据。针对所有样品,从得到的反应表面数据减去仅用缓冲液的空白注射。将数据全面拟合为针对1:1结合的朗格缪尔模型。

[0215] 结果

[0216] 通过TLR4,CIRP诱导炎性应答:鉴定造成传递细胞外CIRP信号转导的细胞表面受体。检查已知调节炎症的三种主要PRR:RAGE、TLR2、和TLR4 (参见,(a)张(Zhang),X.和莫瑟(Mosser),D.M.,通过内源性危险信号的巨噬细胞活化(Macrophage activation by endogenous danger signals),病理学杂志(J.Pathol.)214,161-178(2008);(b)博伊特勒(Beutler),B.A.,TLR和先天免疫(TLRs and innate immunity),血液(Blood)113,1399-1407(2009);(c)瓦尔德(Ward),P.A.,脓毒症跷跷板:寻找心脏药膏(The sepsis seesaw:seeking a heart salve),自然医学(Nat.Med.)15,497-498(2009))。将分离自WT、Rage^{-/-}、Tlr2^{-/-}、或

[0217] Tlr4^{-/-}小鼠的腹膜巨噬细胞用1.5μg/ml rmCIRP孵育4h。通过ELISA测定条件培养基中的TNF-α水平。数据是来自三个独立实验的平均值±s.e.m.。*P<0.05对WT。比较野生型和响应于rmCIRP的靶向各受体的基因敲除小鼠中的差异,仅TLR4-缺陷型巨噬细胞失去了针对TNF-α诱导的应答,然而RAGE-和TLR2-缺陷型巨噬细胞仍维持与野生型巨噬细胞类似的应答(图13A)。为了确认CIRP活性的介导需要TLR4,用rmCIRP(1或5mg/kg BW)或生理盐水(运载体)注射野生型和TLR4基因敲除小鼠。在4h后,收集血清样品,并且通过ELISA针对TNF-α和IL-6并且通过蛋白质印迹法针对HMGB1,连同血清AST和ALT进行测定。数据是平均值±s.e.m.,n=6-9/组,*P<0.05对WT 无rmCIRP;#P<0.05对用5mg/kg rmCIRP的WT。与小鼠类似,野生型小鼠展现出针对rmCIRP注射的剂量依赖性方式的血清促炎细胞因子(TNF-α、IL-6、和HMGB1)和器官损伤标志物(AST和ALT)的增加(图13B和13C)。相比之下,在Tlr4^{-/-}小鼠中,减小了rmCIRP对野生型小鼠的这些有害作用。

[0218] CIRP 直接结合至TLR4/MD2复合物:利用表面等离子体共振(SPR)分析来确定在rhCIRP和模式识别受体和MD2之间的物理相互作用和结合亲和力。TLR4经常伴随MD2,作为一种辅助受体,以形成TLR4/MD2复合物((Nagai),Y.等人,MD-2在LPS应答和TLR4分布的重要作用(Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution),自然免疫学(Nat. Immunol.)3,667-672(2002))。所有重组蛋白衍生自人类编码序列用于SPR分析。用一系列浓度的分析物,通过动力学分析确定表观K_D。rhCIRP分别以 6.17×10^{-7} 、 3.02×10^{-7} 、和 2.39×10^{-7} M的表观K_D结合rhTLR4、rhMD2、和 rhTLR4/MD2复合物(图13d和图18)。来自二至三个独立实验的分析物分析的代表性传感图示于图18。这些传感图示出,以所指示浓度的分析物的缔合和解离传递到在传感器芯片上的固定的配体,指示为各图顶部的分析物/配体。将rhMD2至rhTLR4的结合作为阳性对照进行检验,并且获得 5.37×10^{-8} M的表观K_D,这非常接近之前报道的 6.29×10^{-8} M的K_D(屋久岛(Hyakushima),N.等人,可溶形式的重组细胞外TLR4结构域与MD-2的相互作用能够使脂多糖结合并且减弱TLR4-介导的信号转导(Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediated signaling),免疫学杂志(J.Immunol.)173,6949-6954(2004))。有趣地,rhCIRP与RAGE和TLR2具有以nM范围的KD(图13D和图18);然而,这些结合的生物意义仍有待确定。这些SPR结果清晰地指示出,CIRP能够与不同类型的蛋白相互作用,这符合其作为伴侣蛋白的特

性。通过合成覆盖了整个人类CIRP序列的32个寡肽(15-mer),确定结合至MD2的CIRP的区域。这些寡肽通过在BIAcore仪器上的固定的 rhMD2,随后进行后续一系列SPR分析。具有高结合亲和力的三个寡肽是所指示的。寡肽分析的代表性传感图(来自两个独立实验)示于图19中,证实以所指示的浓度的分析物的缔合和解离传递到在传感器芯片上的固定的 rhMD2,如在各图顶部上分析物/rhMD2所指示的。三种寡肽(aa 101-115、106-120 (C22)、和 111-125 (C23))以高亲和力结合至rhMD2(图14和图 19)。

[0219] 实例10:寡肽C22和C23抑制细胞系中rmCIRP-诱导产生TNF- α

[0220] 材料和方法

[0221] 合成寡肽:合成一组32个15-mer寡肽,并且在金斯瑞(Genscript)(皮斯卡特维,新泽西州)通过高效液相层析进行纯化。各15-mer寡肽序列(SEQ ID NO:13-44)衍生自hCIRP(图1)。

[0222] 细胞培养:将人类单核细胞THP-1细胞(美国种质保存中心,马纳萨斯,维吉尼亚州)以密度 1.5×10^6 细胞接种于T75组织培养烧瓶中的悬浮液中,并且用补充以10%热灭活胎牛血清、1%青霉素/链霉素、2mM谷氨酰胺和另外的0.05mM β -巯基乙醇的RPMI-1640介质,在37°C下,在具有5%CO₂的潮湿的培养箱中进行培养。

[0223] 细胞分化和处理:将细胞以 5×10^4 /孔的密度铺板于96-孔组织培养板,并且用佛波醇12-豆蔻酸13-乙酸(20ng/ml)孵育48h,以在实验前成为分化的巨噬细胞-样细胞。使用在第5和12传代之间的细胞。将细胞用所指示浓度的CIRP-衍生肽C22(SEQ ID NO:13)或C23(SEQ ID NO:12)预处理1h,并且然后在不存在或存在rmCIRP或LPS(来自大肠杆菌0111:B4,西格玛,圣路易斯,密苏里州)的情况下,用Opti-MEM-介质孵育6h。针对TNF- α 通过ELISA测定无细胞上清液。

[0224] 细胞因子测定:根据制造商的说明书,针对TNF- α 水平,使用可商购酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒-人类TNF- α 组(BioSource International,卡马里奥,加利福尼亚州)测量上清液。

[0225] 结果

[0226] 在分化的THP-1细胞中C22和C23对rmCIRP-诱导的TNF- α 生产的作用:如图20A所示,单独的CIRP-肽并不影响TNF- α 生产,可检测的量与介质类似。然而,以50ng/ml剂量的C22(SEQ ID NO:13)或C23(SEQ ID NO:14)的预处理减弱了rmCIRP 300ng/ml-诱导的TNF- α 生产。抑制水平范围在67%-72%。考虑两种分子之间的大小差异,如果转换为摩尔浓度,使用高于rmCIRP剂量2倍的肽。

[0227] 在分化的THP-1细胞中,C22和C23对LPS-诱导的TNF- α 生产的作用:还发现CIRP-衍生肽在分化的THP-1细胞中调节LPS-诱导的TNF- α 释放。如在图20B中所示,C22(SEQ ID NO:13)或C23(SEQ ID NO:14)将LPS-诱导的TNF释放抑制61%-63%。使用2ng/ml(相当于1.3pmol/ml)的C22或C23和10ng/ml(相当于0.67pmol/ml)的LPS(2:1的肽和LPS摩尔比)来处理细胞。

[0228] 实例11:在细胞系中,寡肽C1-C21和C24-C32示出对rCIRP-诱导的TNF- α 的生产的很少乃至没有抑制作用

[0229] 以下结果证实肽C22和C23对rCIRP-诱导的TNF- α 分泌的出人意料的抑制作用。

[0230] 材料和方法

[0231] 用于合成寡肽C1-C21和C24-C32的实验性方案,使用THP-1细胞的细胞培养,细胞的处理,和细胞因子测定描述于实例10中。将这些细胞用CIRP (1000ng/ml) 进行处理用于刺激。在刺激之前,将这些肽用10倍摩尔浓度的CIRP孵育1小时。在刺激后4小时,通过ELISA在培养介质中测定TNF- α 水平。

[0232] 在分化的THP-1细胞中,针对以下肽对rmCIRP-诱导的TNF- α 生产的抑制活性,对其进行测定:

[0233] C1:MASDEGKLFVGGLSF (SEQ ID NO:15);

[0234] C2:GKLFVGGLSFDTNEQ (SEQ ID NO:16);

[0235] C3:GGLSFDTNEQSLEQV (SEQ ID NO:17);

[0236] C4:DTNEQSLEQVFSKYG (SEQ ID NO:18);

[0237] C5:SLEQVFSKYGQISEV (SEQ ID NO:19);

[0238] C6:FSKYGQISEVVVVKD (SEQ ID NO:20);

[0239] C7:QISEVVVVKDRETQR (SEQ ID NO:21);

[0240] C8:VVVKDRETQRSRGFGF (SEQ ID NO:22);

[0241] C9:RETQRSRGFGVTFE (SEQ ID NO:23);

[0242] C10:SRGFGVTFENIDDA (SEQ ID NO:24);

[0243] C11:FVTFENIDDAKDAMM (SEQ ID NO:25);

[0244] C12:NIDDAKDAMMAMNGK (SEQ ID NO:26);

[0245] C13:KDAMMAMNGKSVDGR (SEQ ID NO:27);

[0246] C14:AMNGKSVDGRQIRVD (SEQ ID NO:28);

[0247] C15:SVDGRQIRVDQAGKS (SEQ ID NO:29);

[0248] C16:QIRVDQAGKSSDNRS (SEQ ID NO:30);

[0249] C17:QAGKSSDNRSRGYRG (SEQ ID NO:31);

[0250] C18:SDNRSRGYRGSAGG (SEQ ID NO:32);

[0251] C19:RGYRGSAGGRGFFR (SEQ ID NO:33);

[0252] C20:GSAGGRGFFRGGRGR (SEQ ID NO:34);

[0253] C21:RGFFRGGRGRGRGFS (SEQ ID NO:35);

[0254] C22:GGRGRGRGFSRGGGD (SEQ ID NO:13);

[0255] C23:GRGFSRGGGDRGYGG (SEQ ID NO:14);

[0256] C24:RGGGDRGYGGNRFES (SEQ ID NO:36);

[0257] C25:RGYGGNRFESRSGGY (SEQ ID NO:37);

[0258] C26:NRFESRSGGYGGSRD (SEQ ID NO:38);

[0259] C27:RSGGYGGSRDYSSR (SEQ ID NO:39);

[0260] C28:GGSRDYSSRSQSGG (SEQ ID NO:40);

[0261] C29:YSSRSQSGGYSDRS (SEQ ID NO:41);

[0262] C30:SQSGGYSDRSSGGSY (SEQ ID NO:42);

[0263] C31:YSDRSSGGSYRDSYD (SEQ ID NO:43);

[0264] C32:SGGSYRDSYDSYATH (SEQ ID NO:44)。

[0265] 在分化的THP-1细胞中,CIRP-衍生肽C1-C21和C24-C32对rmCIRP-诱导的TNF- α 生

产的作用:如图22中所示,CIRP-衍生肽C1-C21和C24-C32 并没有显著减弱rmCIRP-诱导的THP-1细胞的TNF- α 分泌。

[0266] 在分化的THP-1细胞中,C21对LPS-诱导的TNF- α 生产的作用:CIRP-衍生肽C22和C23抑制在分化的THP-1细胞中LPS-诱导的TNF- α 释放,如在实例10中所证实的,并如在图20B中所说明的。然而,如图20C中所示,在THP-1细胞中,肽C21并没有抑制LPS-诱导的TNF- α 释放。

[0267] 实例12:CIRP-裸鼠比野生型小鼠具有更快的创伤闭合速率

[0268] 为了鉴定CIRP在创伤愈合中的参与,使用皮肤创伤的动物模型比较野生型(WT)和CIRP-裸鼠之间的创伤闭合速率。详细过程和测量如下。在3月龄的雄性CIRP-裸鼠和WT小鼠的背上,手术产生全层2.0-cm直径环形切除创伤。直到受伤后第14天测量创伤大小,并通过NIH ImageJ软件量化。在第3和7天,将另两组动物安乐死,并且收集全层皮肤样品用于组织学评估并且通过实时RT-PCR测量不同基因的表达。

[0269] 如图21所示,在14天时程内,CIRP-裸鼠中的皮肤创伤的愈合速率明显比WT小鼠的更快。

[0270] 用H&E和Masson三色染色的组织学分析指示出,CIRP-裸创伤比WT创伤具有更好质量的创伤闭合和胶原沉积。在早期创伤愈合时,在CIRP-裸创伤中用细胞增殖标志物Ki67阳性染色的细胞多于WT中的那些。在第3天,在CIRP-裸创伤中的炎性介质TNF- α 和IL-6分别比WT创伤中的那些高2.6-和2.8-倍,然而在第7天,在CIRP-裸创伤中它们的水平分别比WT创伤中的那些低60%和68%。相应地,CIRP-裸创伤中针对髓过氧化物酶染色阳性的细胞数量(指示嗜中性粒细胞浸润)比WT创伤中的更高。在第3和7天,在CIRP-裸创伤和WT创伤之间的VEGF表达和PECAM-1/CD31染色不存在差异。在第3天,CIRP-裸创伤中的MMP-9mRNA水平比WT创伤高出2.2倍。

[0271] 这些结果指示出,CIRP-裸鼠展现出皮肤创伤更快的愈合。这种加速愈合与细胞增殖、炎症的早期活化和消退,以及基质重塑加速有关。这些结果显示出,CIRP表达可能妨碍愈合过程,并且在皮肤创伤的环境下,抑制CIRP将改进创伤闭合和愈合的速率和质量。

[0272] 实例13:寡肽C23废除了体内和体外内皮细胞的CIRP-诱导的活化

[0273] 寡肽C23被鉴定为针对TLR4辅助受体MD2具有最高亲和力的寡肽。(参见,图14,列出了所选片段的K_D的比较数据。)

[0274] 在以下所述实验中,C23显示出在用rmCIRP刺激的小鼠肺血管内皮细胞(MLVEC)中防止ICAM-1表达的诱导(细胞间黏附分子1),连同防止IL-1 β (促炎细胞因子)从MLVEC释放。

[0275] 图23A是SDS-PAGE/蛋白质印迹的照片,证实了ICAM-1的表达水平。在存在C23或非特异性寡肽P5(阴性对照)的情况下,将MLVEC用rmCIRP处理4小时。获得细胞,将其裂解,并且将细胞裂解物通过SDS-PAGE和蛋白质印迹法(免疫检测)进行分析。参考图23A,在存在200ng/ml的寡肽C23的情况下,废除了ICAM-1表达。

[0276] 类似地,当添加200ng/ml的寡肽C23至介质中时,阻断了通过rmCIRP刺激的MLVEC释放IL-1 β ,如图23B中所示。(针对图23A和23B:平均值 \pm SD, n=3,*P<0.05对没有C23的组。)

[0277] 在另一个实验中,证实了寡肽C23减少了肺中盲肠结扎和穿刺(CLP)-诱导的内皮

细胞活化标志物和促炎细胞因子的表达。在2小时后,将经受过 CLP的小鼠用寡肽C23 (8mg/kg) 或盐水进行处理。在CLP后24小时,观察到 了肺中内皮细胞活化标志物E-选择素和 ICAM-1的表达的显著减少,以及也是 在肺中的促炎细胞因子TNF- α 和IL-1 β 的表达的显著减少。这些结果显示在图 24A和图24B中。这些结果指示出C23能够阻断CIRP活性。

[0278] 最终,如图24C所示,用C23治疗的小鼠具有更低的TNF- α 和IL-6的血清 水平,这是脓毒症中的严重性和预后的指标。C23抑制CIRP的有害作用-不仅 是在肺中还是全身性的-表示C23有潜力形成通过减弱内皮细胞损害的针对脓 毒症的新颖治疗。

[0279] 在图24A至24C中:平均 \pm SD;n=4-8/组;*P<0.05对假手术,#P<0.05 对运载体,单向方差分析。通过qPCR测量mRNA量;通过ELISA测量蛋白水 平。

[0280] 实例14:用寡肽C23治疗延长脓毒症小鼠的存活

[0281] 以下试验提供了脓毒症小鼠的存活研究的结果,证实了寡肽C23的总体 有利的作用。

[0282] 在用抗生素亚胺培南 (0.5 μ g/kg BW) 和复苏液的手术后立即使小鼠经 受CLP并且进行治疗。在CLP后2小时,通过颈内静脉给予小鼠C23 (8mg/kg BW) 或等体积的生理盐水 (运载体)。然后每12小时评估存活。在该严重的 脓毒症的模型中,所有的小鼠在CLP后48小时内死亡,然而一些C23-治疗的 小鼠活得更久 (图25A,P<0.05,通过卡普兰-迈耶估算器使用时序检验分析 存活率)。在运载体组中平均存活时间为37.8小时,并且在C23-治疗的小鼠 中为44.2小时 (图25B,针对各组的个体存活时间和平均存活时间 (水平线))。这些结果指 示出,C23是有利的并且延长了严重脓毒症小鼠的存活时间。

[0283] 虽然本发明参考其示例性的实施例已经进行了具体显示和描述,本领域 的技术人员应当理解的是,在不偏离由所附权利要求书所包括的本发明的范 围下,可以在其中做出在形式和细节方面的多种改变。

[0284] 在说明书中提及的所有引用文件通过引用而结合于此。

[0285] 本申请还包括以下项目。

[0286] 1. 一种分离的肽,包括:

[0287] Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp (SEQ ID NO:12) 的氨基酸残基序 列或其药学上可接受的盐;或

[0288] 与SEQ ID NO:12具有至少80%同源性的氨基酸残基序列或其 药学上可接受的 盐,

[0289] 其中该肽的长度是10个至30个氨基酸残基。

[0290] 2. 如项目1所述的肽,其中该肽抑制CIRP的一种或多种生物活性。

[0291] 3. 如项目1或项目2所述的肽,其中该肽抑制CIRP结合至MD2细 胞表面受体。

[0292] 4. 如项目1-3中任一项所述的肽,其中该肽抑制CIRP结合至 TLR4/MD2复合物。

[0293] 5. 如项目1-4中任一项所述的肽,其中该肽的长度是10个至20个氨 基酸残基。

[0294] 6. 如项目1-5中任一项所述的肽,其中该肽包括如下氨基酸残基序 列:

[0295] Gly-Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp (SEQ ID NO:13) 或其药学上可接受的盐。

[0296] 7. 如项目1-6中任一项所述的肽,其中该肽由如下各项组成:氨基酸 残基序列:

[0297] Gly-Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp (SEQ ID

NO:13) 或其药学上可接受的盐。

[0298] 8. 如项目1-5中任一项所述的肽, 其中该肽包括如下氨基酸残基序列:

[0299] Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp-Arg-Gly-Tyr-Gly-Gly (SEQ ID NO:14) 或其药学上可接受的盐。

[0300] 9. 如项目1-5或8中任一项所述的肽, 其中该肽由如下各项组成: 氨基酸残基序列:

[0301] Gly-Arg-Gly-Phe-Ser-Arg-Gly-Gly-Gly-Asp-Arg-Gly-Tyr-Gly-Gly (SEQ ID NO:14) 或其药学上可接受的盐。

[0302] 10. 一种药物组合物, 包括:

[0303] 至少一种如项目1-9中任一项所述的肽; 以及

[0304] 药学上可接受的载体或稀释剂。

[0305] 11. 一种治疗患有炎性病症的受试者的方法, 该方法包括: 向有需要的受试者给予有效量的至少一种如项目1至9中任一项所述的肽。

[0306] 12. 如项目11所述的方法, 其中该炎性病症是急性炎性病症。

[0307] 13. 如项目11所述的方法, 其中该炎性病症选自下组, 该组由以下各项组成: 阑尾炎、消化性溃疡、胃溃疡和十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、肠梗阻、会厌炎、失弛症、胆管炎、胆囊炎、肝炎、惠普耳氏病、哮喘、过敏症、过敏性休克、免疫复合物病、器官缺血再灌注损伤、器官坏死、枯草热、脓毒症、脓毒症-脓毒性休克、败血症、内毒素休克、恶病质、高热、嗜酸细胞肉芽肿、肉芽肿病、结节病、流产感染、附睾炎、阴道炎、前列腺炎、尿道炎、支气管炎、肺气肿、鼻炎、肺炎、火山肺矽病、肺泡炎、细支气管炎、咽炎、胸膜炎、鼻窦炎、流行性感、呼吸道合胞体病毒感染、疱疹感染、HIV感染、乙型肝炎病毒感染、丙型肝炎病毒感染、播散性菌血症、登革热、念珠菌病、疟疾、丝虫病、阿米巴病、包虫囊肿、血管炎、脉管炎、心内膜炎、动脉炎、动脉粥样硬化、血栓性静脉炎、心包炎、心肌炎、局部缺血、结节性动脉周围炎、风湿热、乳糜泻、成人呼吸窘迫综合征、慢性阻塞性肺疾病、脑膜炎、脑炎、神经炎、神经痛、脊髓损伤、瘫痪、葡萄膜炎、关节炎性皮疹、关节痛、骨髓炎、筋膜炎、佩吉特氏病、痛风、牙周病、关节炎、滑膜炎、重症肌无力、甲状腺炎、系统性红斑狼疮、同种异体移植排斥、移植物抗宿主疾病、古德帕斯丘综合征、贝赫切特综合征、强直性脊柱炎、贝格尔病、赖特氏综合征、霍奇金病、银屑病、心肌梗塞、中风、炎性肠病、坏死性小肠结肠炎、出血性休克和创伤性出血。

[0308] 14. 如项目13所述的方法, 其中该炎性病症选自下组, 该组由以下各项组成: 阑尾炎, 消化性溃疡, 胃溃疡和十二指肠溃疡, 腹膜炎, 胰腺炎, 肝炎, 哮喘, 过敏症, 过敏性休克, 器官坏死, 枯草热, 脓毒症, 脓毒症-脓毒性休克, 败血症, 内毒素休克, 克罗恩病, 溃疡性结肠炎, 肠梗阻, 恶病质, 流产感染, 播散性菌血症, 乳糜泻, 成人呼吸窘迫综合征, 慢性阻塞性肺病, 关节炎, 系统性红斑狼疮, 同种异体移植排斥, 移植物抗宿主疾病, 脊髓损伤, 瘫痪, 银屑病, 肠道、肝、肾、心脏、脑和四肢的缺血再灌注, 心肌梗塞, 中风, 炎性肠病, 坏死性小肠结肠炎和创伤性出血。

[0309] 15. 如项目14所述的方法, 其中该炎性病症选自下组, 该组由以下各项组成: 腹膜炎, 胰腺炎, 脓毒症, 脓毒症-脓毒性休克, 内毒素休克, 克罗恩病, 溃疡性结肠炎, 肠梗阻, 成人呼吸窘迫综合征, 慢性阻塞性肺病, 类风湿性关节炎, 系统性红斑狼疮, 肠道、肝、肾、

心脏、脑和四肢的缺血再灌注,心肌梗塞,中风,炎性肠病,坏死性小肠结肠炎,哮喘和创伤性出血。

[0310] 16.如项目15所述的方法,其中该炎症病症选自下组,该组由以下各项组成:创伤性出血,脓毒症脓毒性休克,肠道、肝、肾、心脏、脑和四肢的缺血再灌注,心肌梗塞,中风,炎性肠病和坏死性小肠结肠炎。

[0311] 17.如项目11所述的方法,其中该炎症病症选自下组,该组由以下各项组成:出血性休克和脓毒性休克。

[0312] 18.如项目11-17中任一项所述的方法,其中该受试者是人类。

[0313] 19.如项目11-18中任一项所述的方法,其中该至少一种肽抑制促炎细胞因子的释放。

[0314] 20.如项目11-18中任一项所述的方法,其中该至少一种肽抑制 TNF- α 的释放。

[0315] 21.一种抑制CIRP的一种或多种生物活性的方法,该方法包括:

[0316] 使CIRP与至少一种如项目1-9中任一项所述的肽接触。

[0317] 22.如项目21所述的方法,其中CIRP的该生物活性是CIRP介导的信号转导。

[0318] 23.如项目21或项目22所述的方法,其中CIRP的该生物活性是CIRP介导的炎症。

[0319] 24.如项目21-23中任一项所述的方法,其中CIRP的该生物活性是CIRP介导的促炎细胞因子的释放。

[0320] 25.如项目21-23中任一项所述的方法,其中CIRP的该生物活性是CIRP介导的TNF- α 的释放。

[0321] 26.一种治疗患有皮肤创伤的患者方法,该方法包括:

[0322] 向有需要的受试者给予有效量的至少一种如项目1至9中任一项所述的肽。

[0323] 27.如项目26所述的方法,其中该皮肤创伤是慢性皮肤创伤。

[0324] 28.如项目26所述的方法,其中该皮肤创伤是糖尿病性溃疡。

[0325] 29.如项目26所述的方法,其中该皮肤创伤是褥疮。

序列表

<110> 范因斯坦医学研究院 (The Feinstein Institute for Medical Research)
王, 平 (Wang, Ping)

<120> 对可冷诱导的 RNA 结合蛋白活性进行抑制的肽

<130> 3268.1023-014

<150> 201480064038.3

<151> 2014-09-24

<150> PCT/US2014/057141

<151> 2014-09-24

<150> 61/881,798

<151> 2013-09-24

<160> 46

[0001] <170> Windows 4.0 版本的 FastSEQ

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

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

```

Gly Phe Ser Arg Gly Gly Gly Asp Arg Gly Tyr Gly Gly Asn Arg Phe
 115 120 125
 Glu Ser Arg Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Ser Arg Asp Tyr Tyr Ser Ser
 130 135 140
 Arg Ser Gln Ser Gly Gly Tyr Ser Asp Arg Ser Ser Gly Gly Ser Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asp Ser Tyr Asp Ser Tyr Ala Thr His Asn Glu
 165 170

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物正向

<400> 2
 caccatggca tcagatgaag g 21

[0002]

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物反向

<400> 3
 ctcgttggtg gtagcatagc 20

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物正向

<400> 4
 gggtcctaca gagacagcta cga 23

<210> 5

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物反向	
	<400> 5	
	ctggacgcag agggctttta	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物正向	
	<400> 6	
	atgactctac ccacggcaag	20
[0003]	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物反向	
	<400> 7	
	ctggaagatg gtgatgggtt	20
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物正向	
	<400> 8	
	cccagaccct cacactcaga	20
	<210> 9	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物反向	
	<400> 9	
	gccactactt cagcatctcg	20
	<210> 10	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 10	
	tgaaggtcgg tgtcaacgga tttggc	26
[0004]	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 引物	
	<400> 11	
	catgtaggcc atgaggtcca ccac	24
	<210> 12	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> CIRP 片段	
	<400> 12	
	Gly Arg Gly Phe Ser Arg Gly Gly Gly Asp	
	1 5 10	

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

<400> 13
 Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Phe Ser Arg Gly Gly Gly Asp
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

[0005] <400> 14
 Gly Arg Gly Phe Ser Arg Gly Gly Gly Asp Arg Gly Tyr Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

<400> 15
 Met Ala Ser Asp Glu Gly Lys Leu Phe Val Gly Gly Leu Ser Phe
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 16

Gly	Lys	Leu	Phe	Val	Gly	Gly	Leu	Ser	Phe	Asp	Thr	Asn	Glu	Gln
1				5					10					15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 17

Gly	Gly	Leu	Ser	Phe	Asp	Thr	Asn	Glu	Gln	Ser	Leu	Glu	Gln	Val
1				5					10					15

[0006]

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 18

Asp	Thr	Asn	Glu	Gln	Ser	Leu	Glu	Gln	Val	Phe	Ser	Lys	Tyr	Gly
1				5					10					15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 19

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

<400> 23
 Arg Glu Thr Gln Arg Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Glu
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

[0008] <400> 24
 Ser Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Glu Asn Ile Asp Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

<400> 25
 Phe Val Thr Phe Glu Asn Ile Asp Asp Ala Lys Asp Ala Met Met
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 26

Asn Ile Asp Asp Ala Lys Asp Ala Met Met Ala Met Asn Gly Lys
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 27

Lys Asp Ala Met Met Ala Met Asn Gly Lys Ser Val Asp Gly Arg
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 28

Ala Met Asn Gly Lys Ser Val Asp Gly Arg Gln Ile Arg Val Asp
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 29

Ser Val Asp Gly Arg Gln Ile Arg Val Asp Gln Ala Gly Lys Ser
1 5 10 15

[0009]

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

<400> 30
 Gln Ile Arg Val Asp Gln Ala Gly Lys Ser Ser Asp Asn Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

[0010]

<400> 31
 Gln Ala Gly Lys Ser Ser Asp Asn Arg Ser Arg Gly Tyr Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

<400> 32
 Ser Asp Asn Arg Ser Arg Gly Tyr Arg Gly Gly Ser Ala Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 33

Arg	Gly	Tyr	Arg	Gly	Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Gly	Phe	Phe	Arg
1				5					10					15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 34

Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg
1				5					10					15

[0011]

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 35

Arg	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Phe	Ser
1				5					10					15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 36

Arg Gly Gly Gly Asp Arg Gly Tyr Gly Gly Asn Arg Phe Glu Ser
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 37

Arg Gly Tyr Gly Gly Asn Arg Phe Glu Ser Arg Ser Gly Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

[0012]

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 38

Asn Arg Phe Glu Ser Arg Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Ser Arg Asp
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 39

Arg Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Ser Arg Asp Tyr Tyr Ser Ser Arg
1 5 10 15

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

<400> 40
 Gly Gly Ser Arg Asp Tyr Tyr Ser Ser Arg Ser Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

[0013] <400> 41
 Tyr Tyr Ser Ser Arg Ser Gln Ser Gly Gly Tyr Ser Asp Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CIRP 片段

<400> 42
 Ser Gln Ser Gly Gly Tyr Ser Asp Arg Ser Ser Gly Gly Ser Tyr
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 43

Tyr Ser Asp Arg Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Arg Asp Ser Tyr Asp
 1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 44

Ser Gly Gly Ser Tyr Arg Asp Ser Tyr Asp Ser Tyr Ala Thr His
 1 5 10 15

[0014]

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 45

Arg-Gly-Tyr-Gly-Gly
 1 5

<210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CIRP 片段

<400> 46

Gly-Gly-Arg-Gly-Arg
 1 5

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MASDEGKLFV	GGLSFDTNEQ	SLEQVFSKYG	QISEVVVKD	RETQRSRGFG	FVTFENIDDA
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
KDAMMAMNGK	SVDGRQIRVD	QAGKSSDNRS	RGYRGG SAGG	RGFFRGGRGR	GRGFSRGGGD
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	
RGYGGNRFES	RSGGYGGSRD	YYSSRSQSGG	YSDRSSGGSY	RDSYDSYATH	NE

(SEQ ID NO: 1)

图1

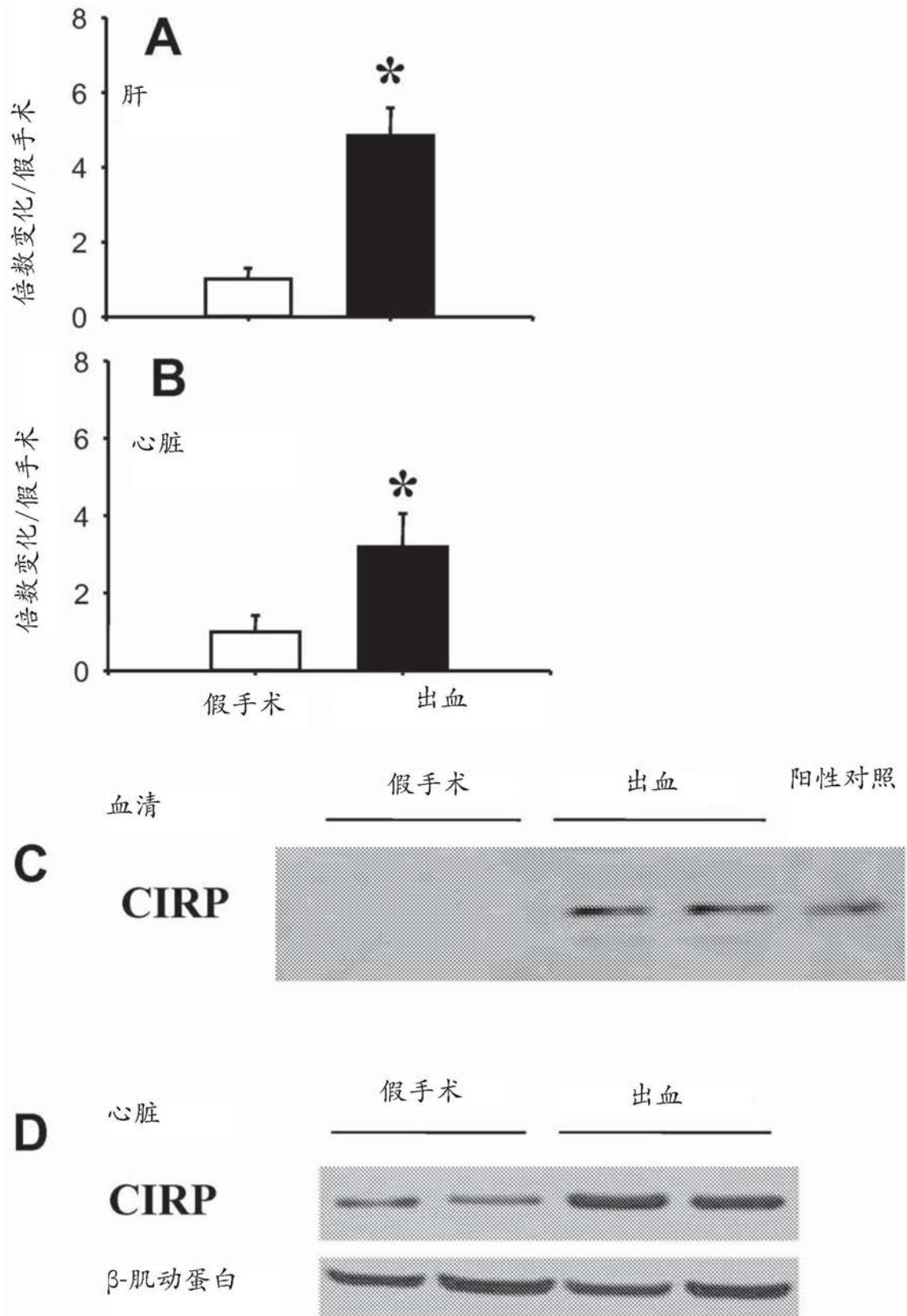


图2

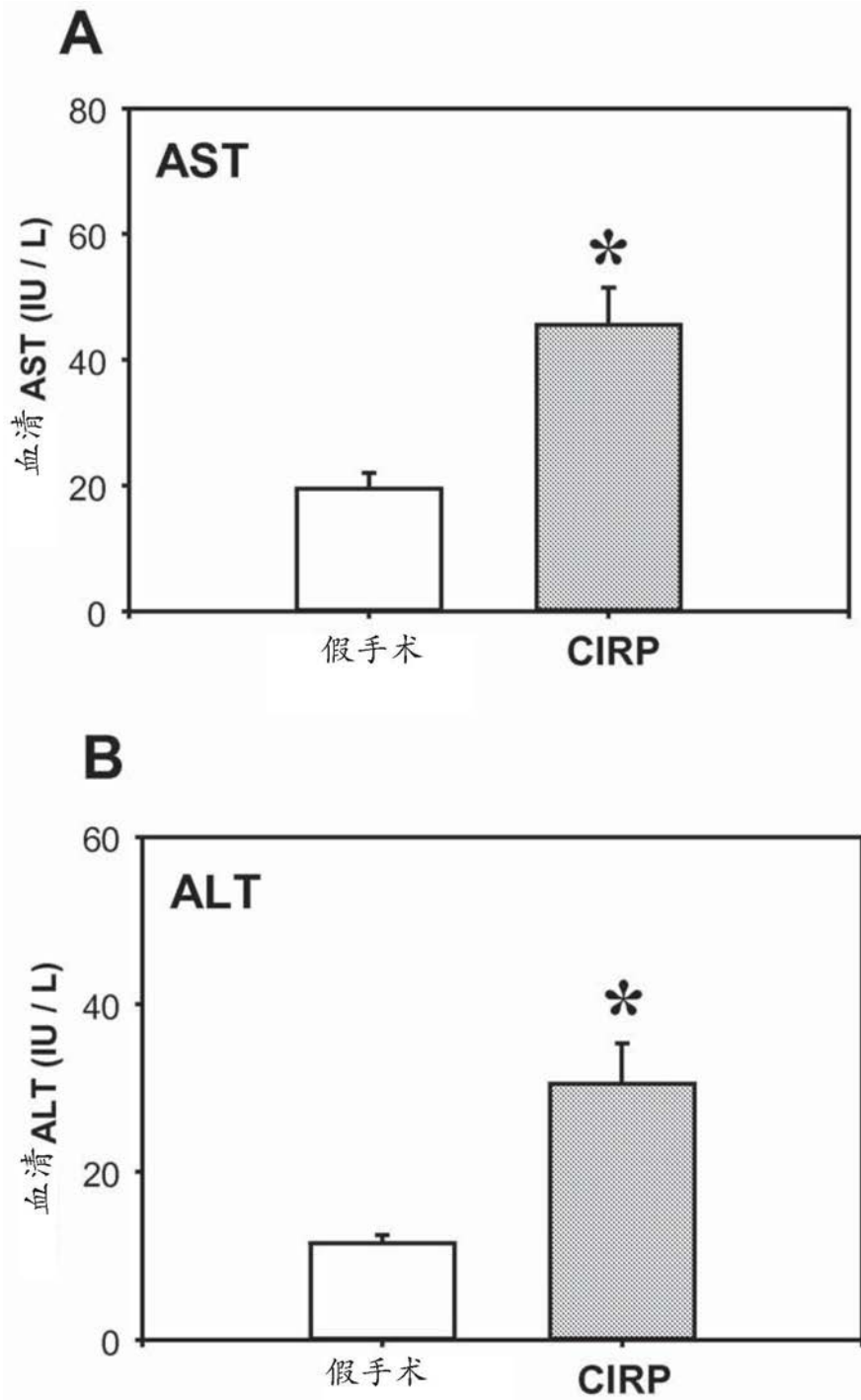


图3

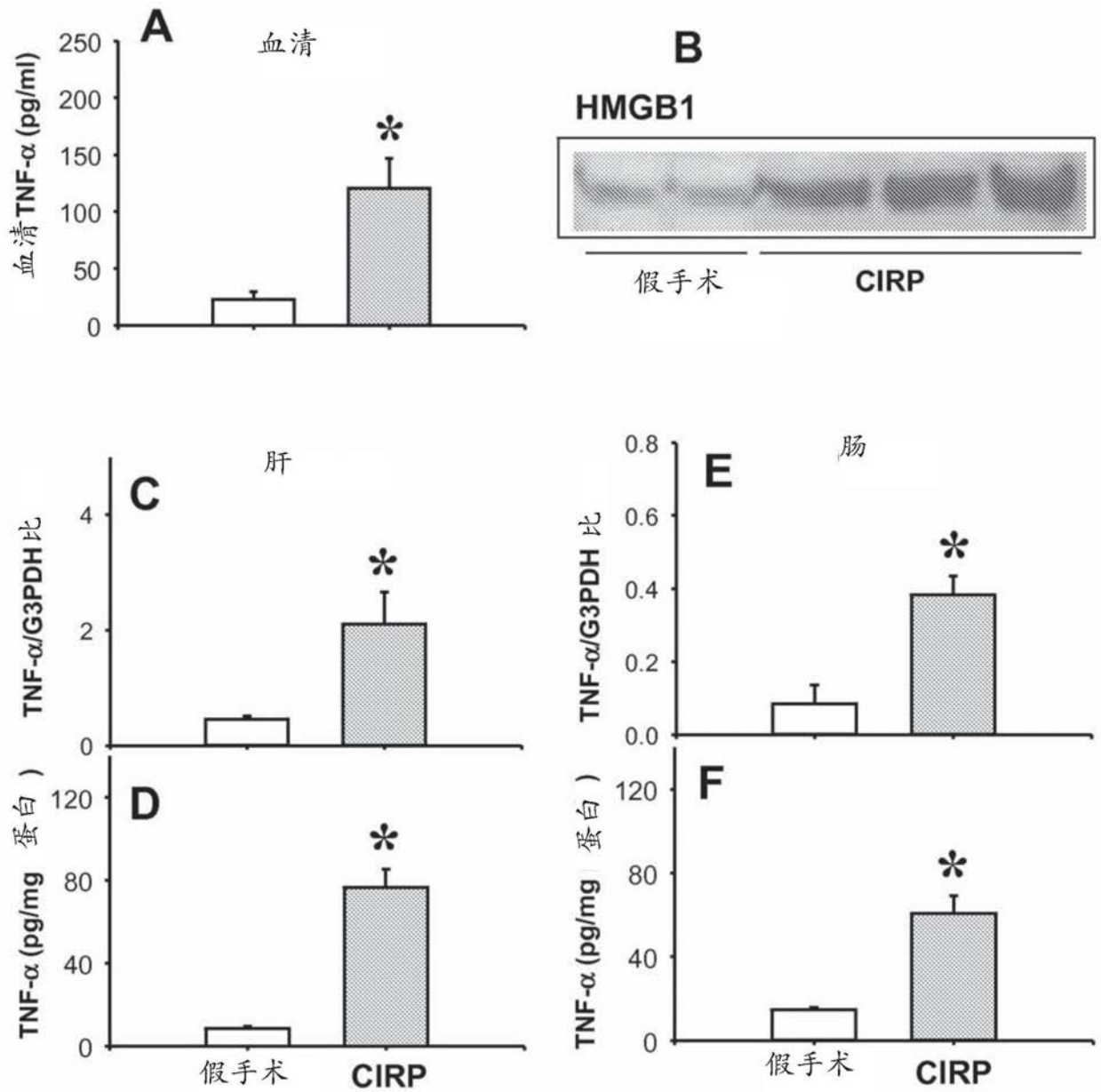


图4

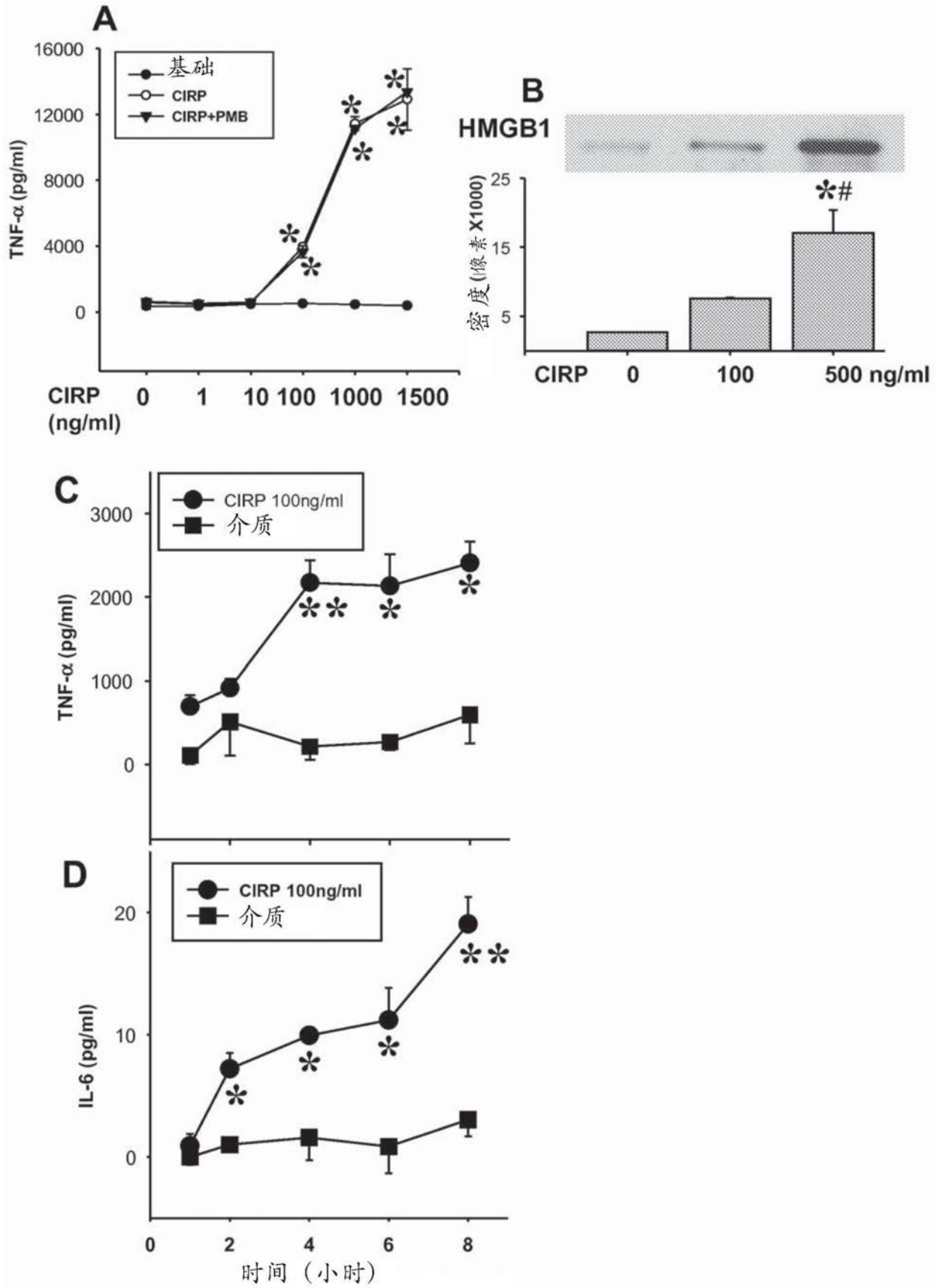


图5

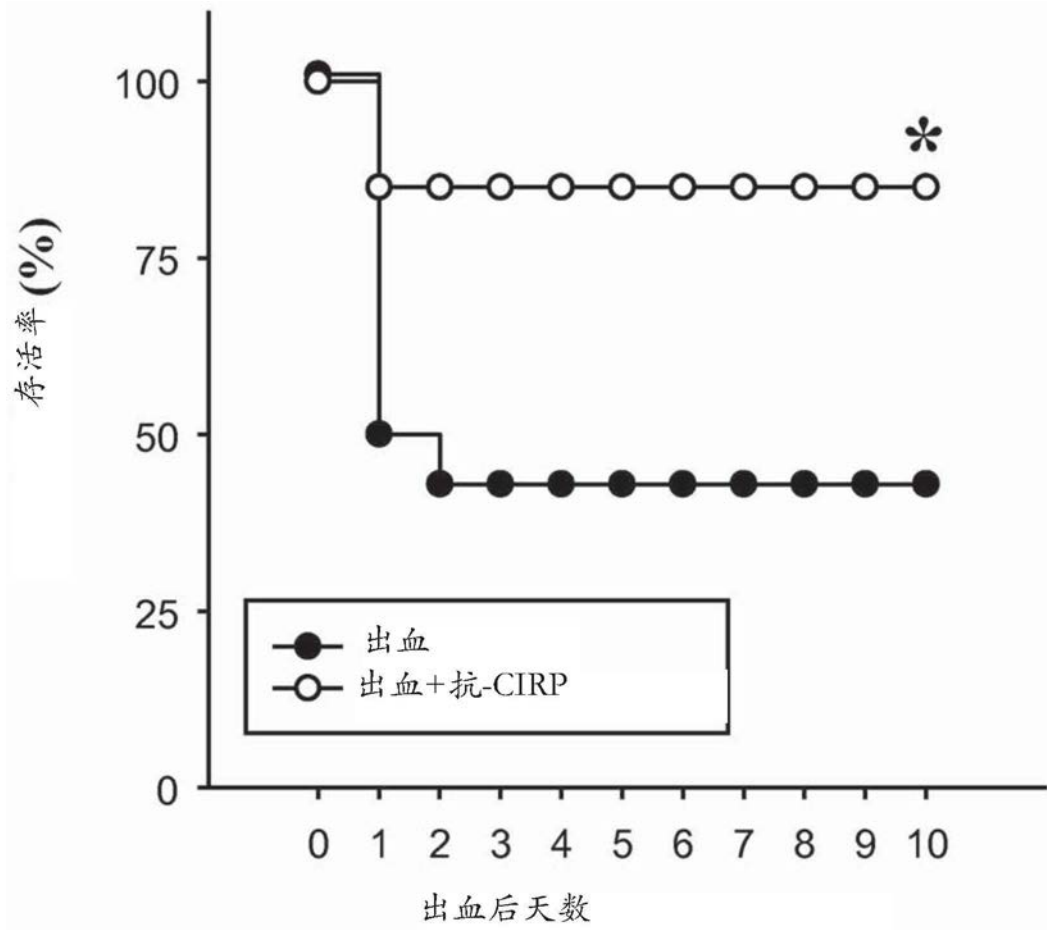


图6

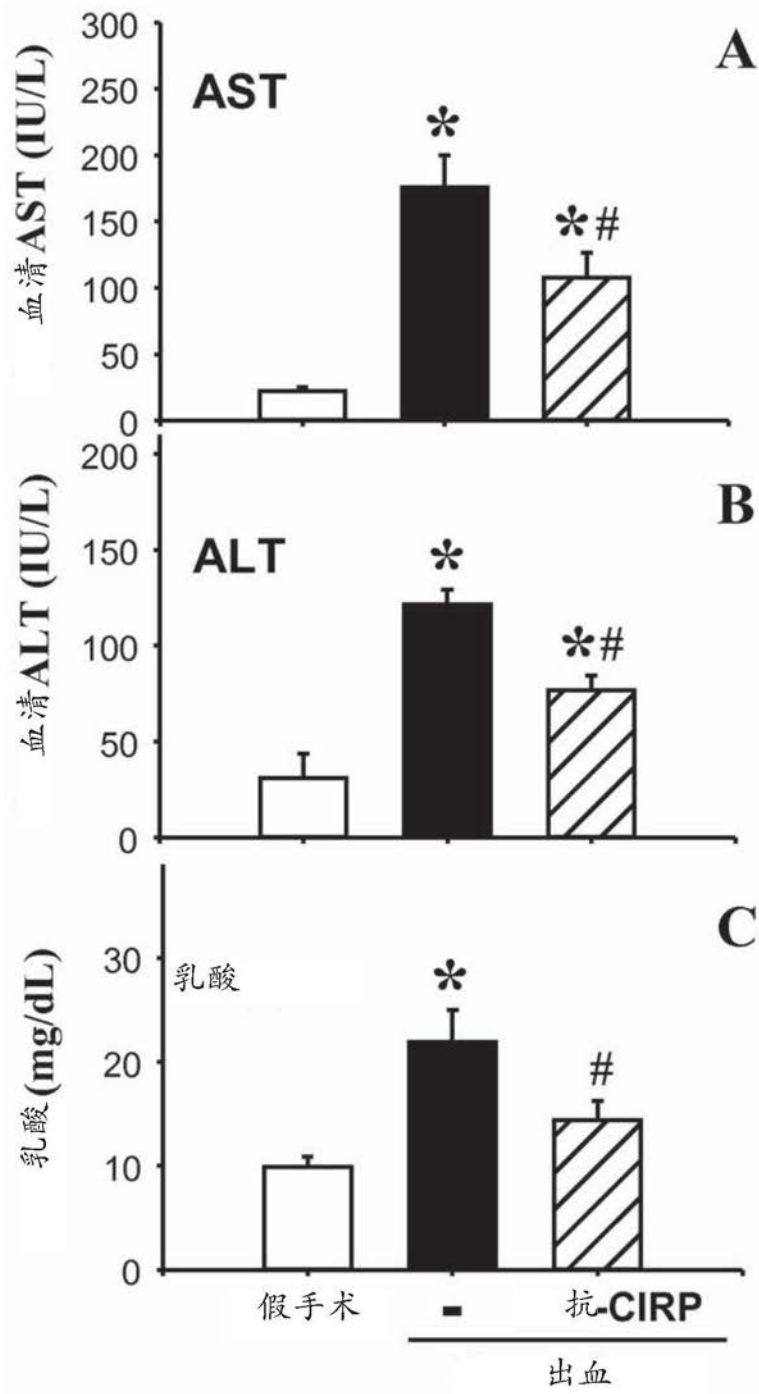


图7

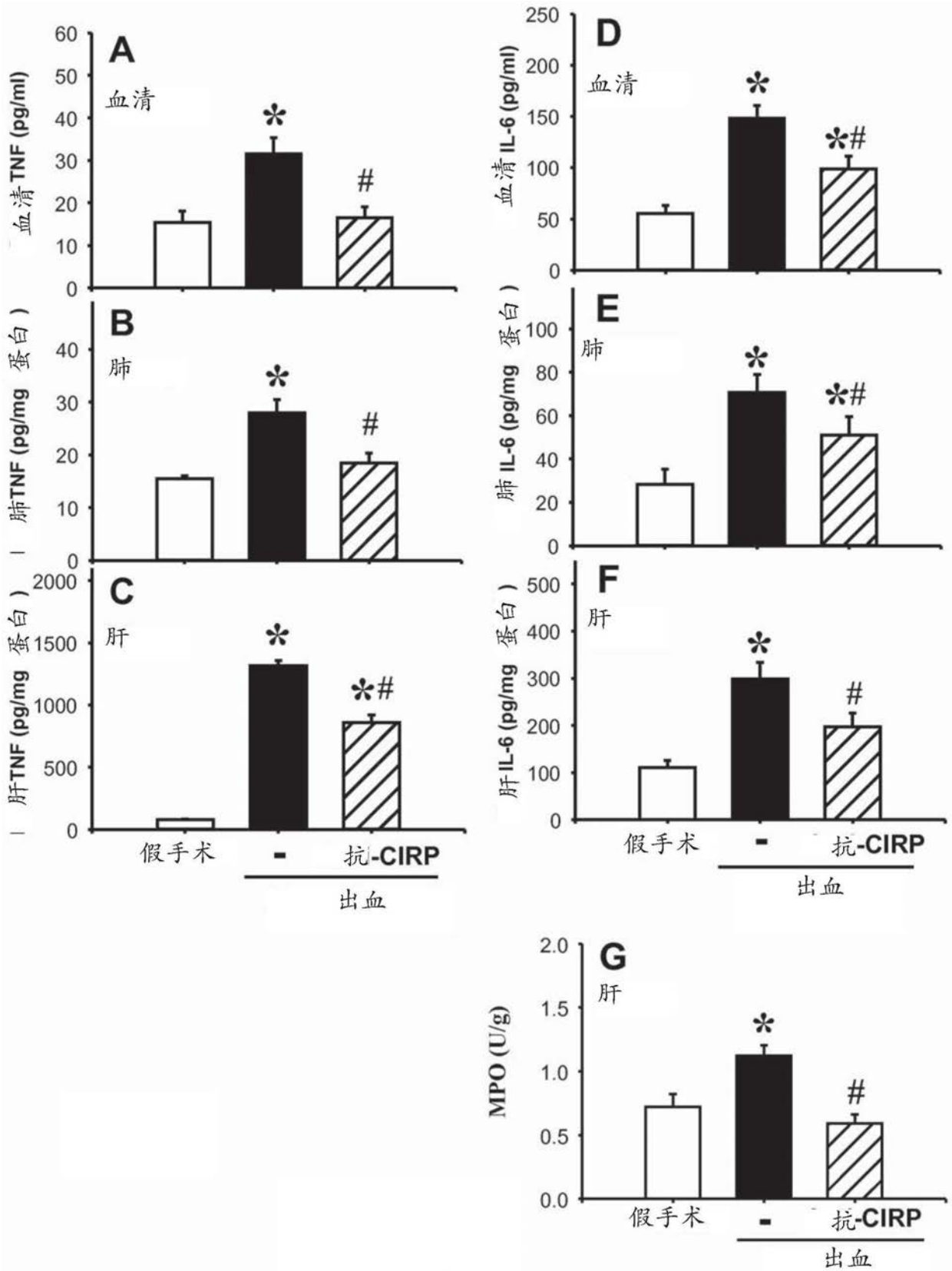


图8

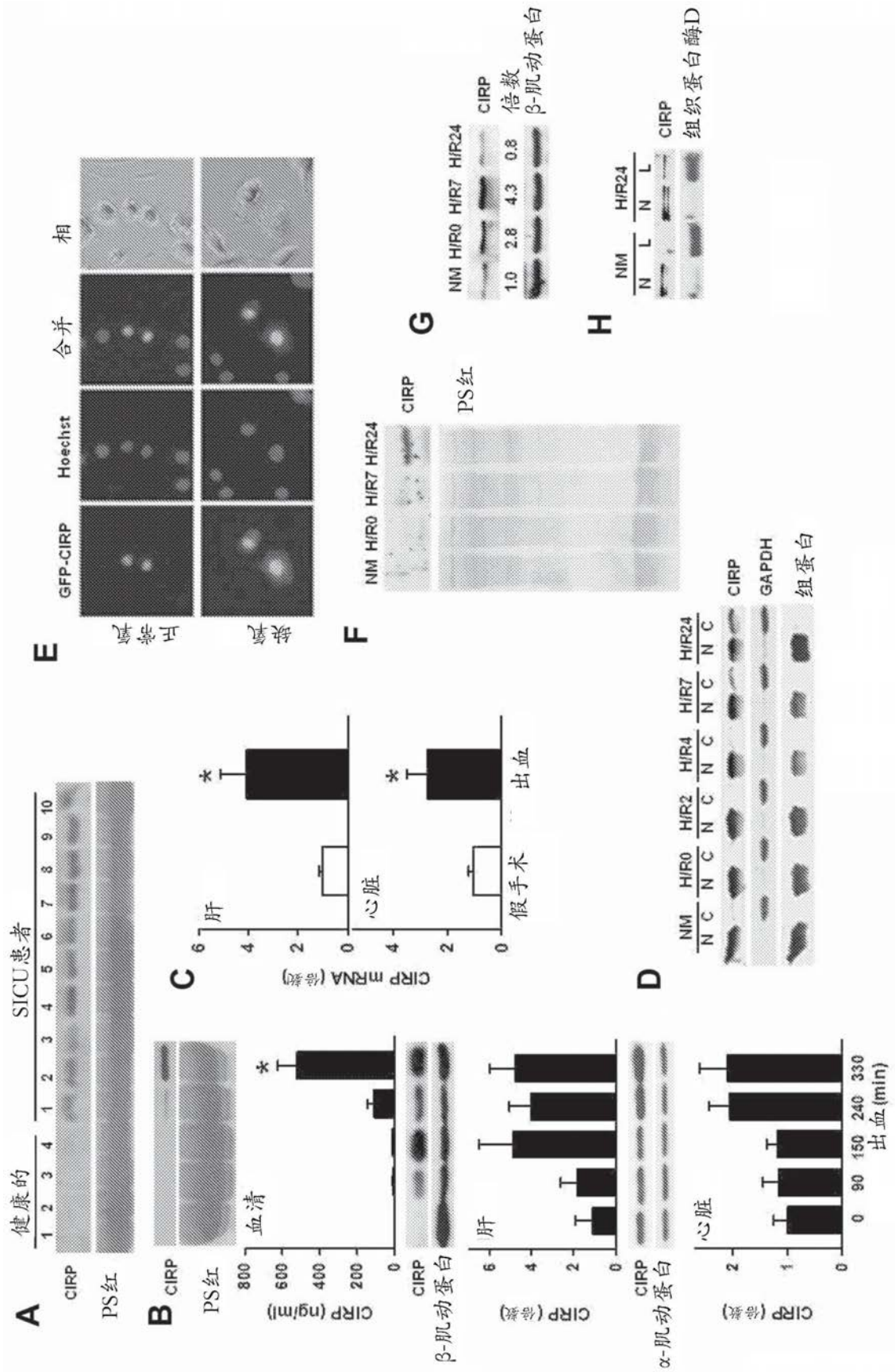


图9

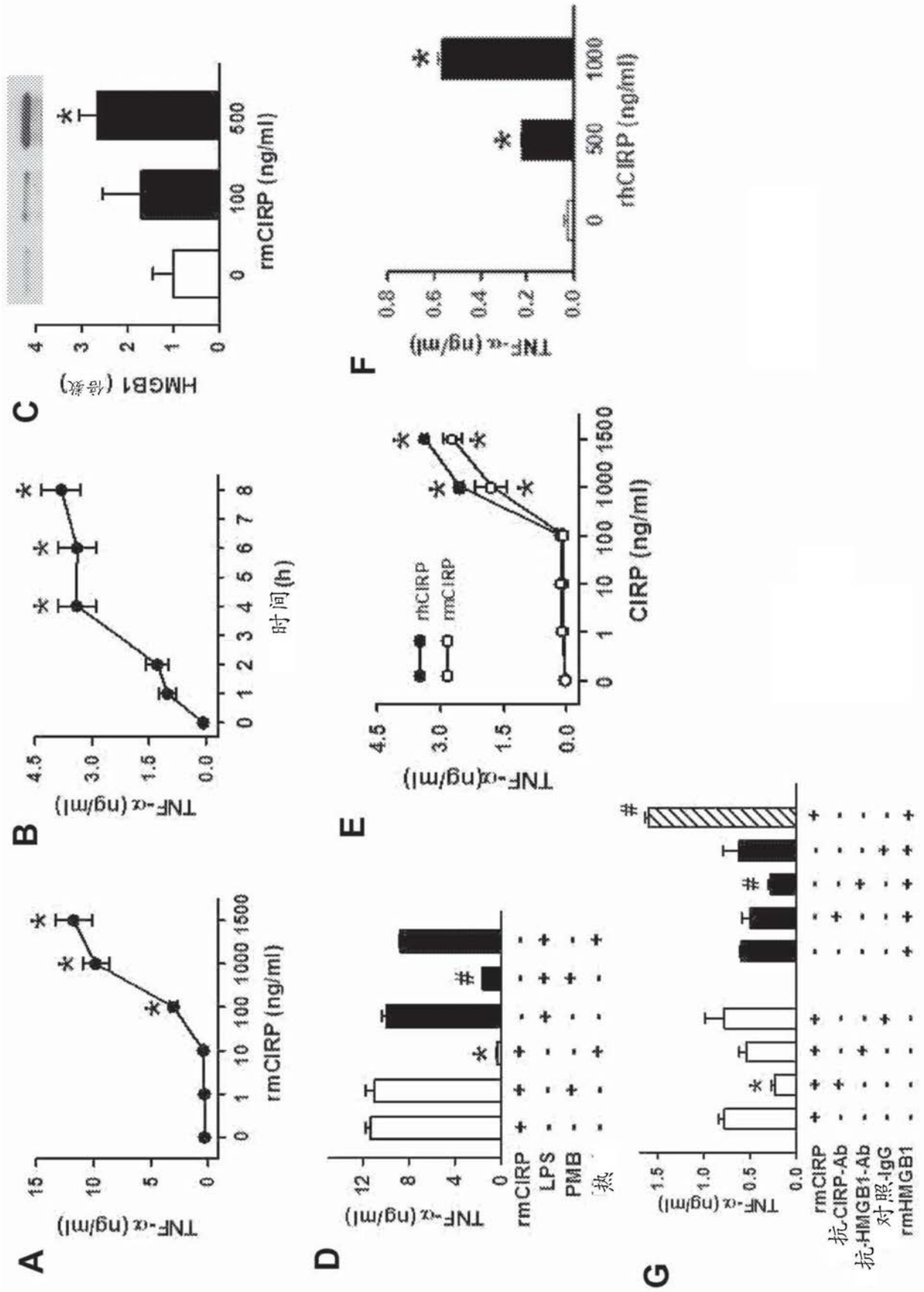


图10

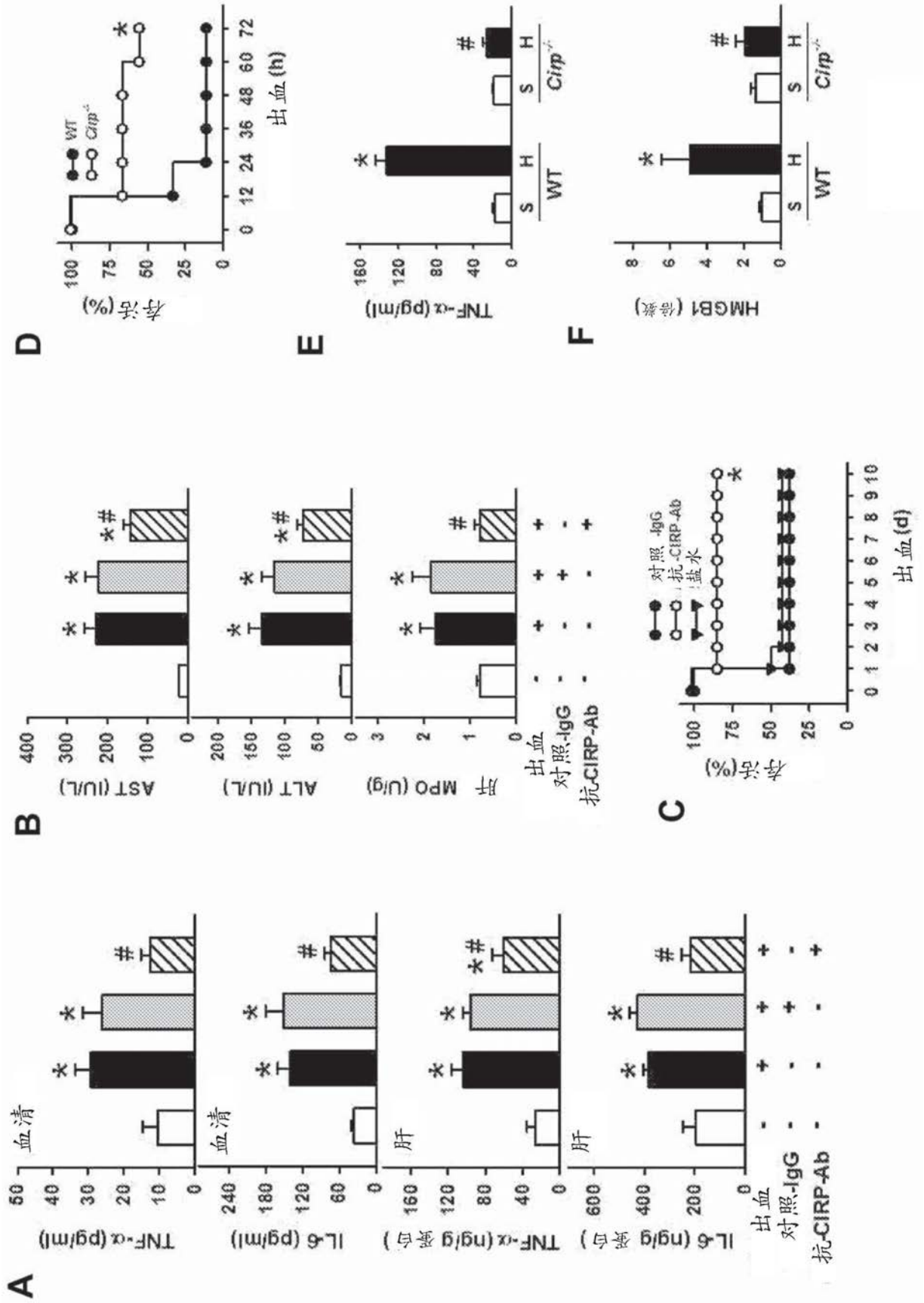


图11

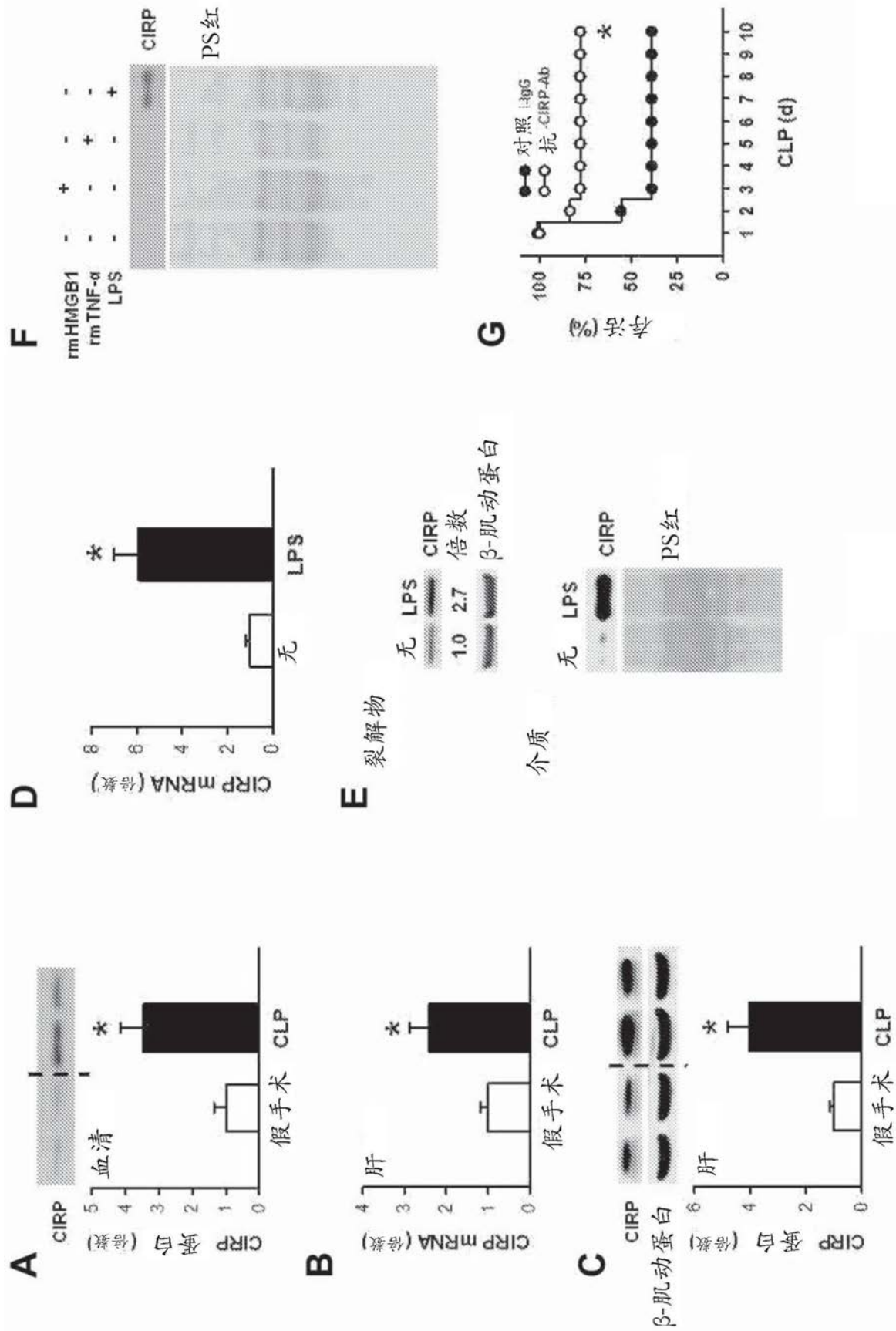


图12

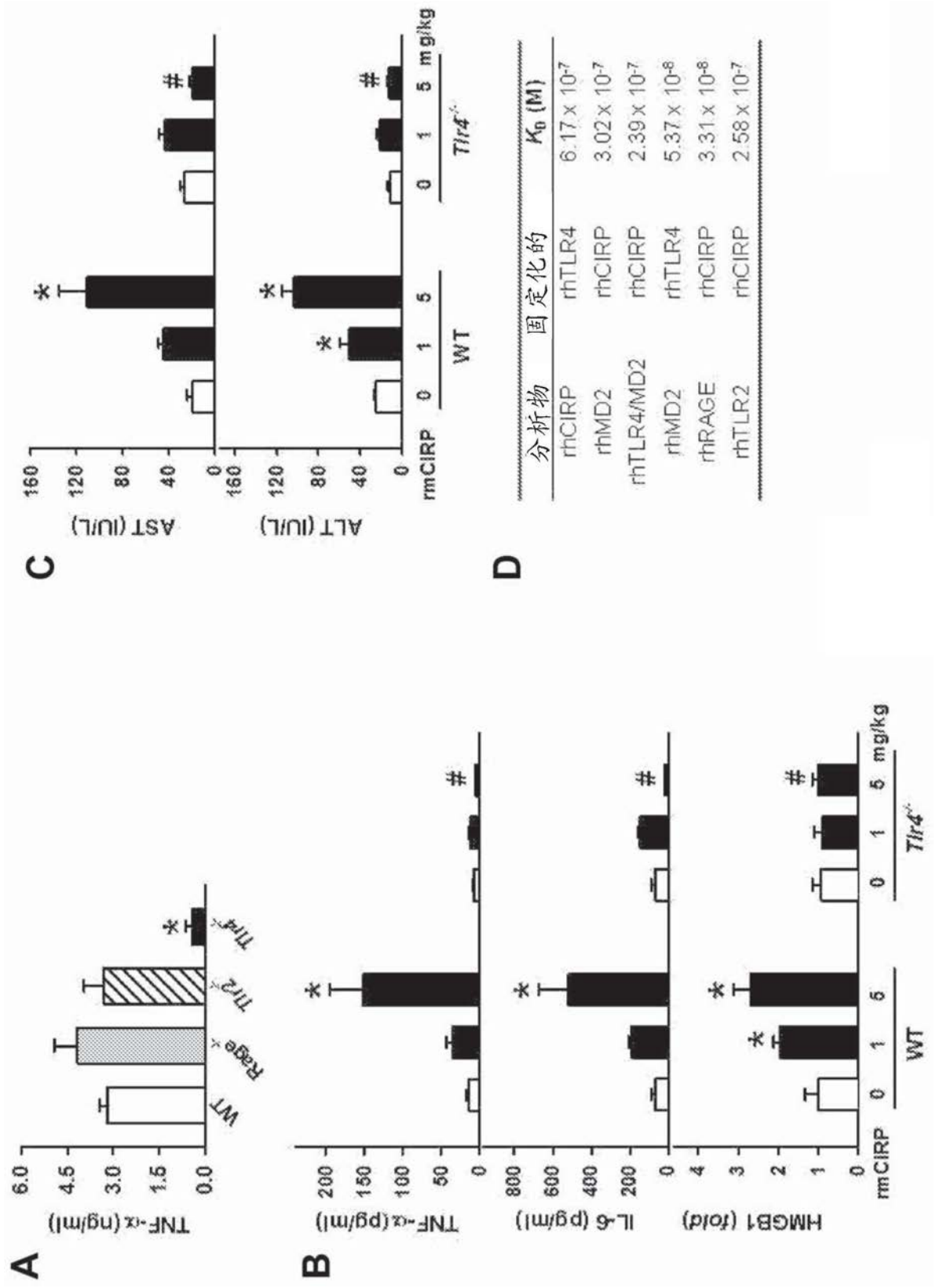


图13

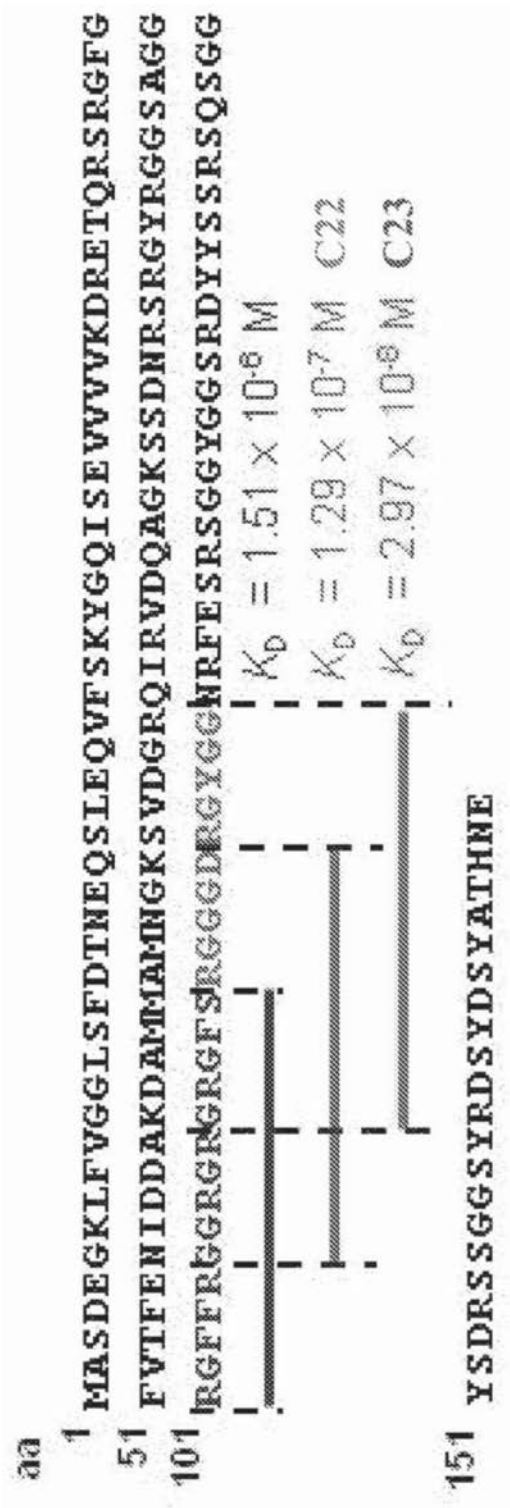


图14

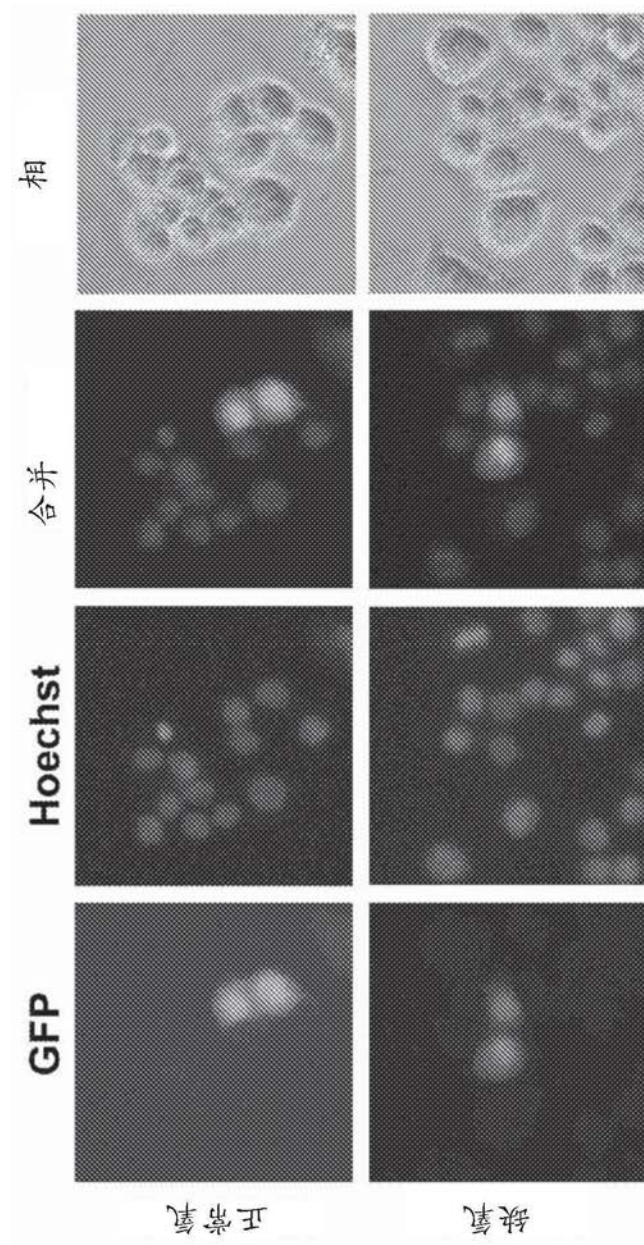


图15

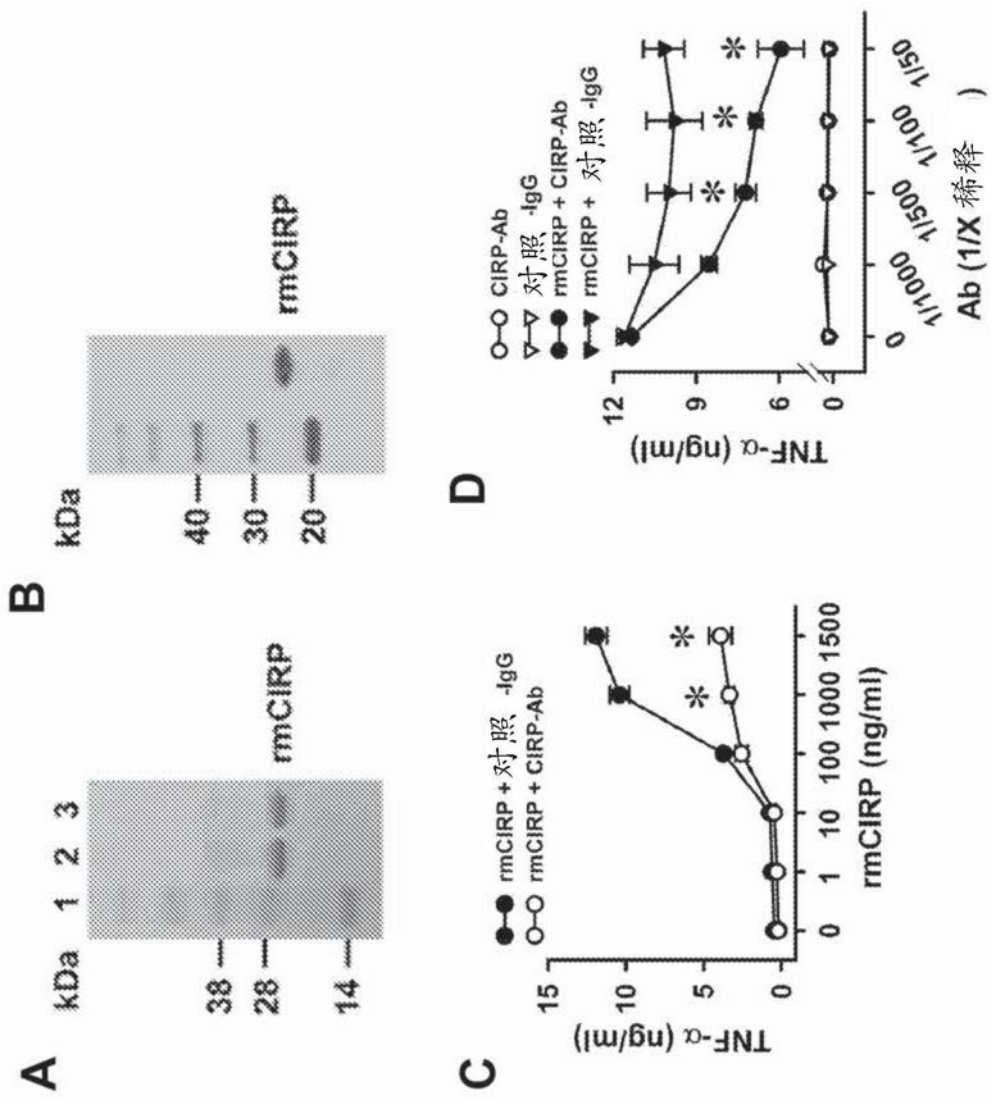


图16

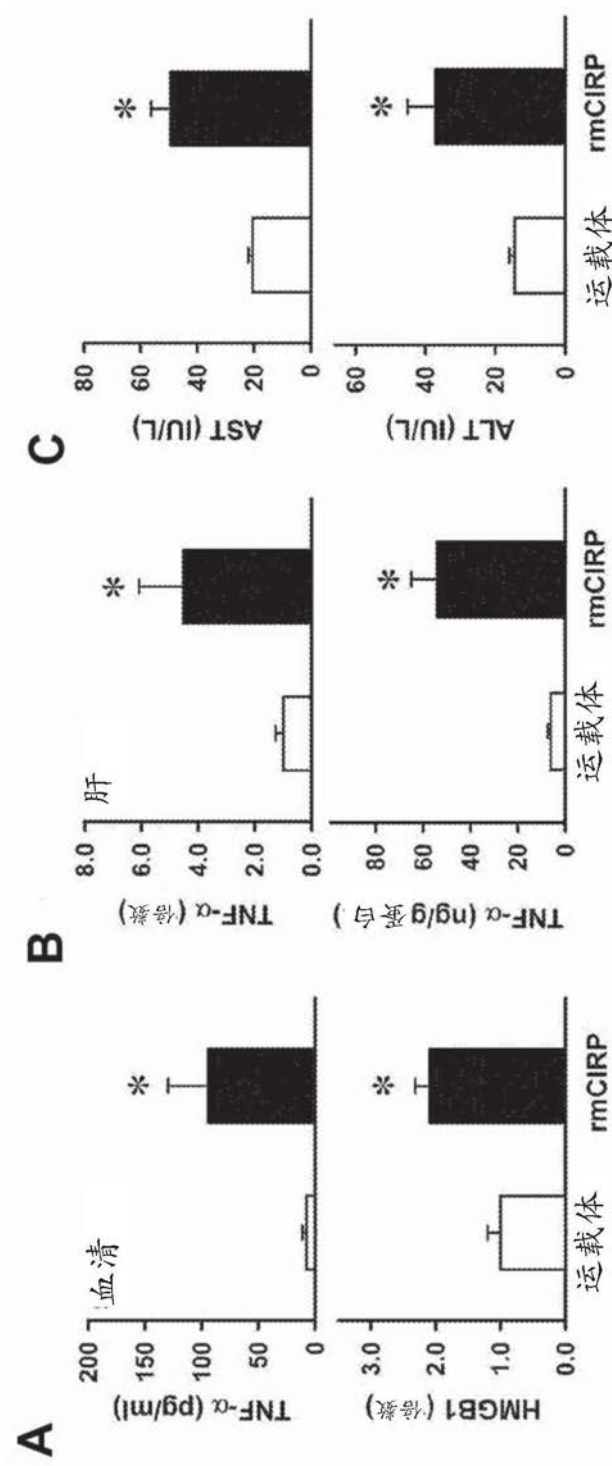


图17

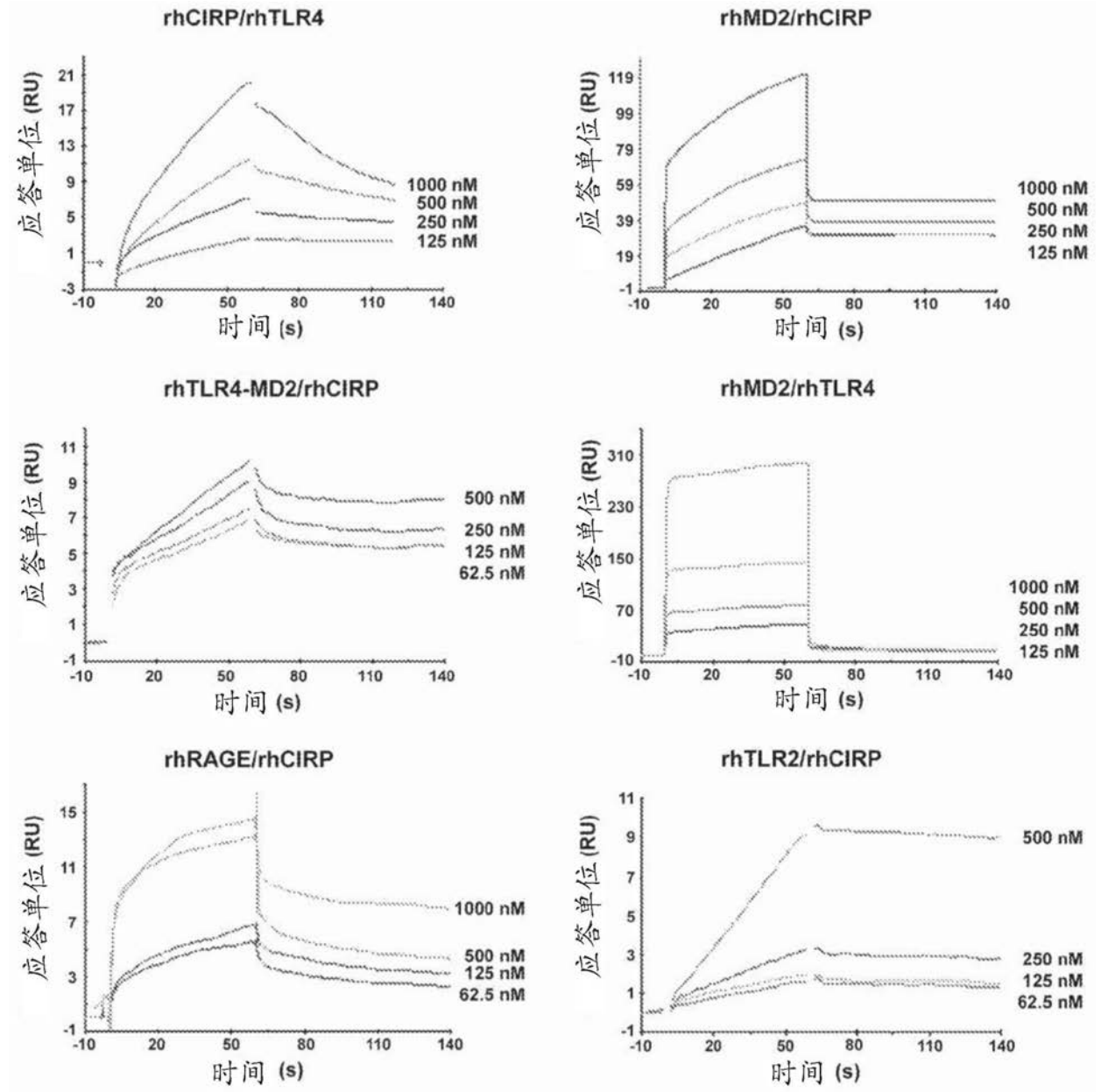


图18

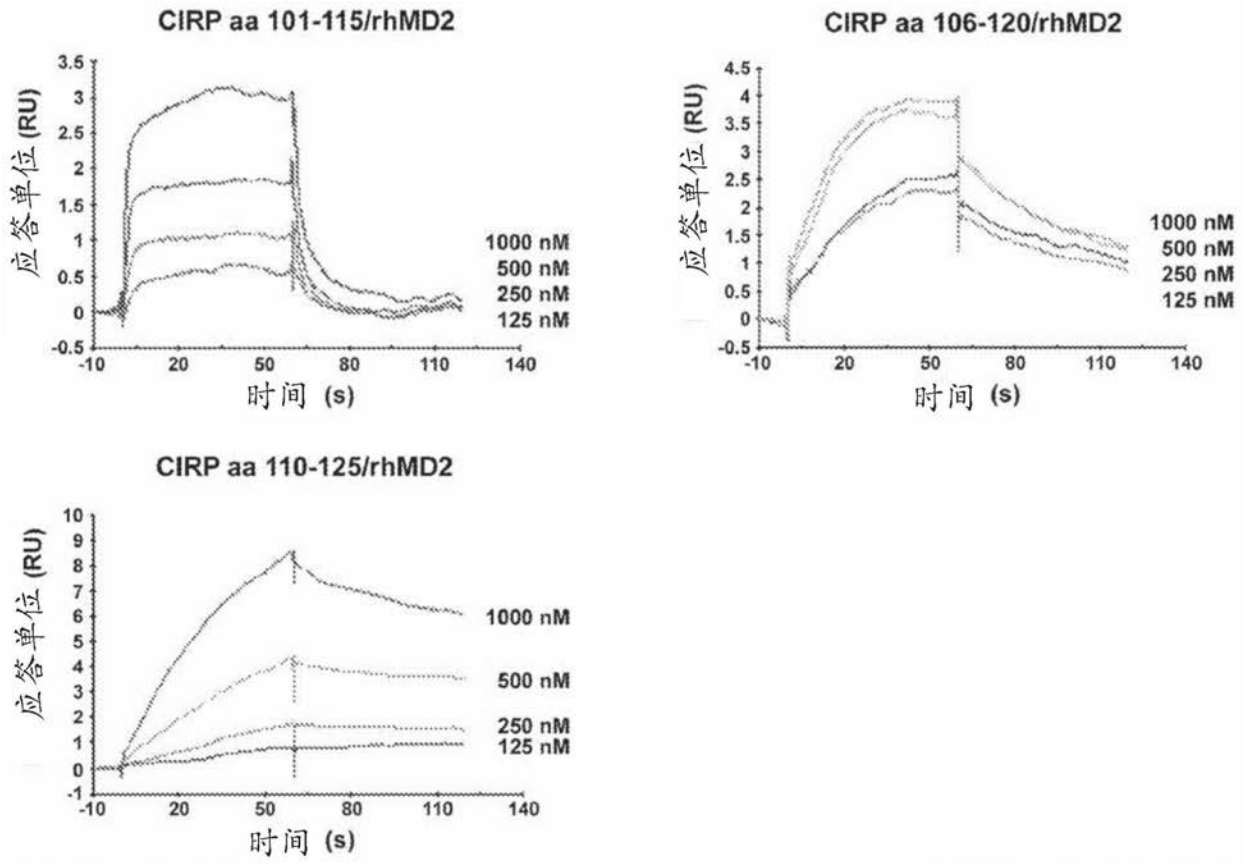


图19

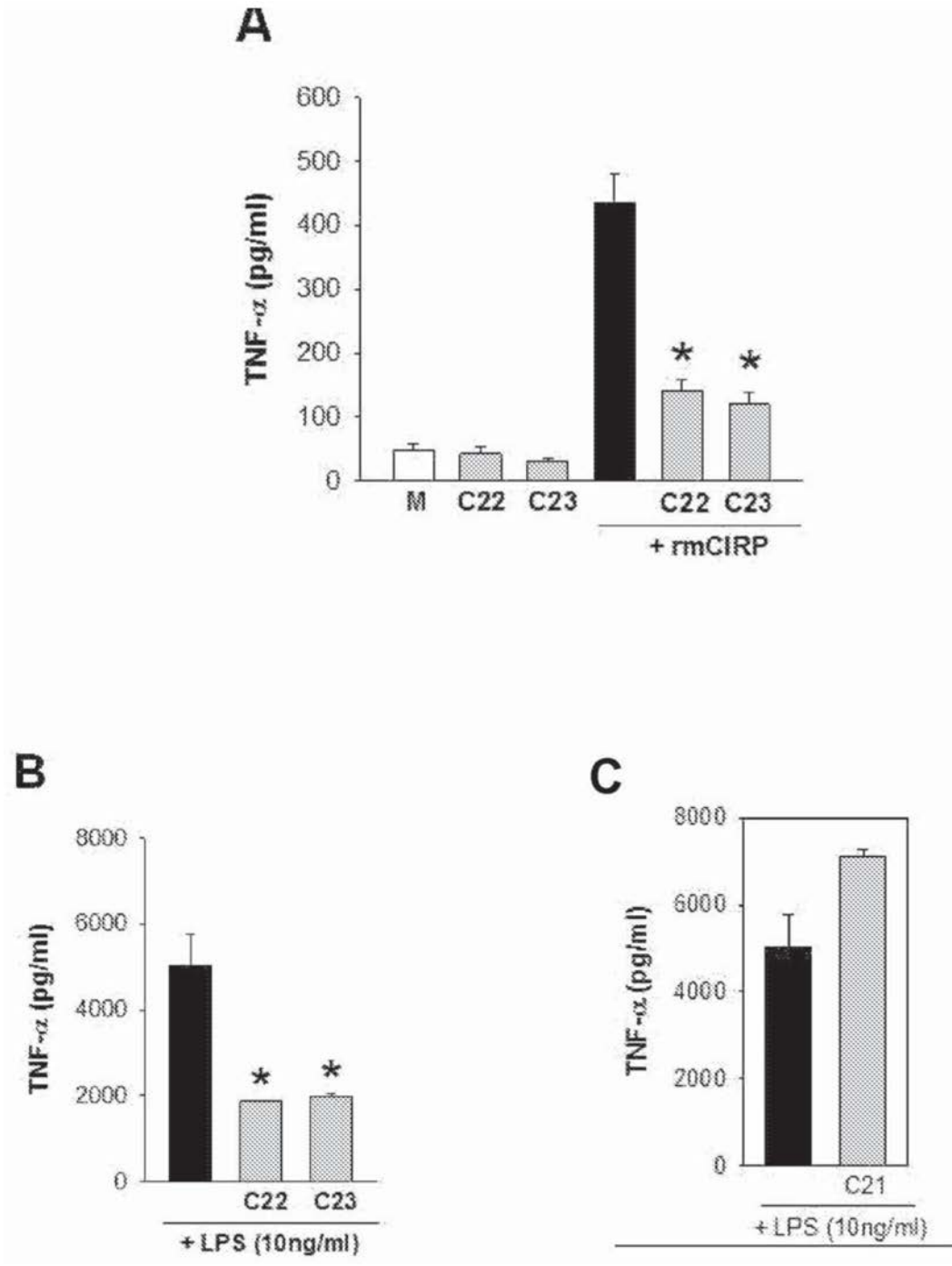


图20

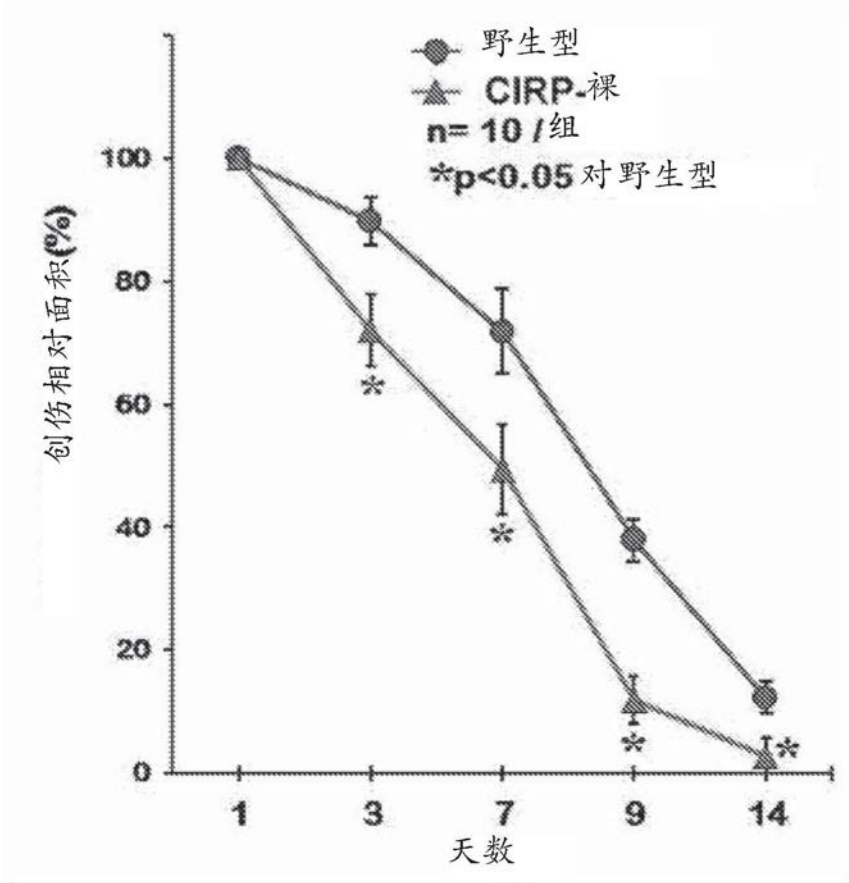


图21

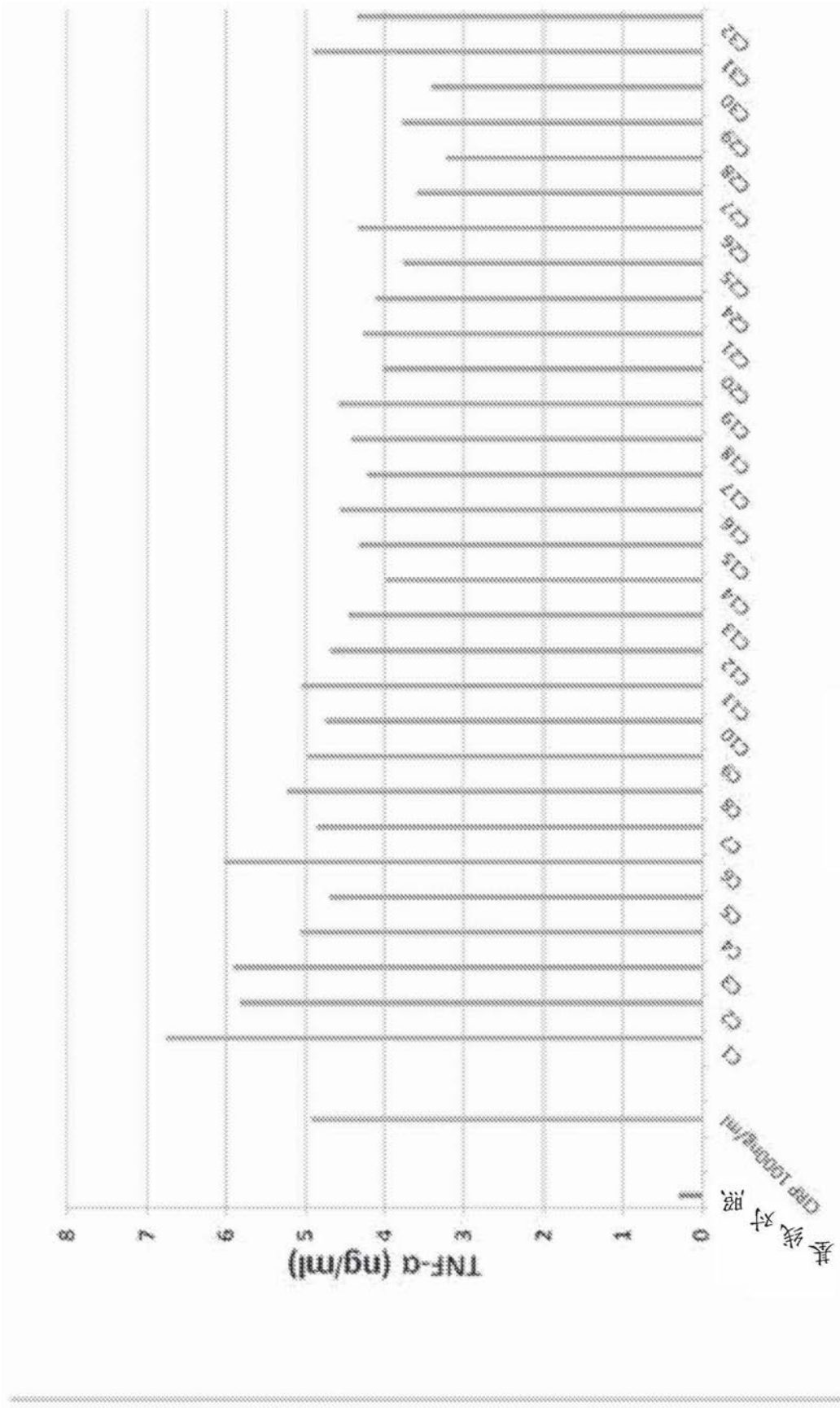


图22

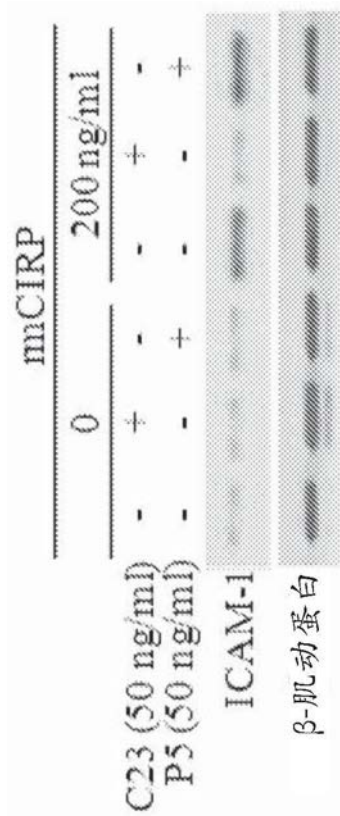


图23A

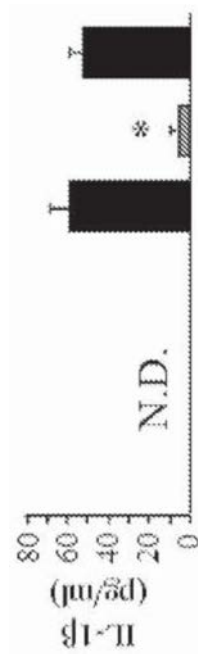


图23B

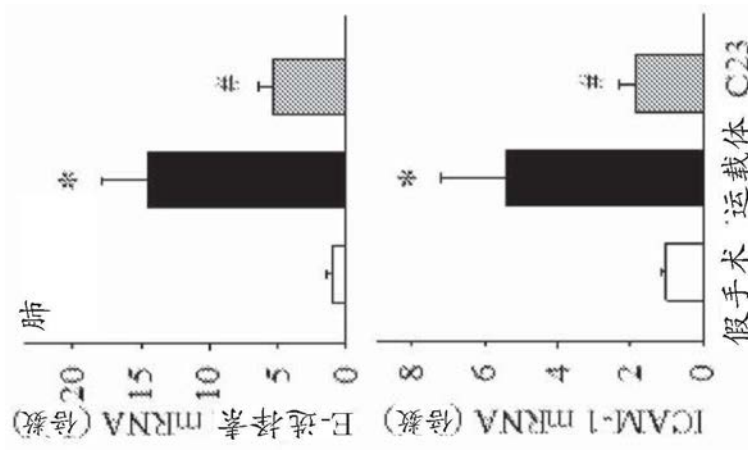


图24A

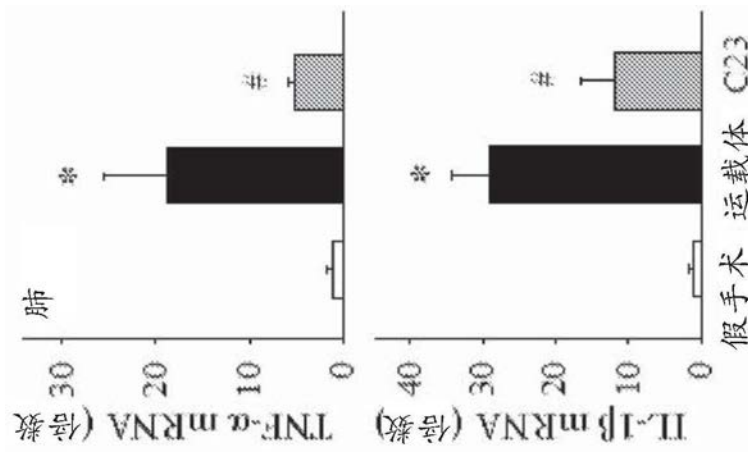


图24B

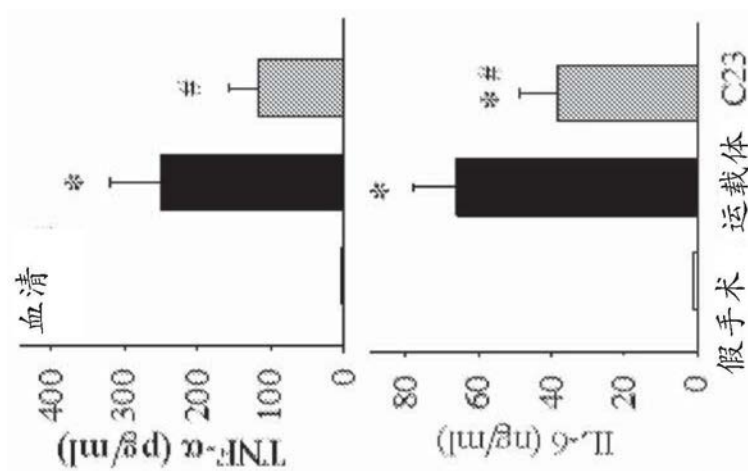


图24C

