

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 48/00

C12N 15/00 C12N 15/63

C12N 15/74



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02819665.1

[43] 公开日 2005 年 1 月 12 日

[11] 公开号 CN 1564696A

[22] 申请日 2002. 10. 7 [21] 申请号 02819665. 1

[30] 优先权

[32] 2001. 10. 5 [33] US [31] 60/327,270

[86] 国际申请 PCT/US2002/032084 2002. 10. 7

[87] 国际公布 WO2003/030827 英 2003. 4. 17

[85] 进入国家阶段日期 2004. 4. 5

[71] 申请人 宾西法尼亚大学托管人

地址 美国宾西法尼亚州

[72] 发明人 大卫·B·维尼尔

穆舒玛尼·卡鲁皮亚

[74] 专利代理机构 北京天平专利商标代理有限公司

代理人 宋子良 赵海生

权利要求书 5 页 说明书 23 页

[54] 发明名称 治疗和预防全身炎症反应综合症/败血症的药物组成和方法

[57] 摘要

本发明涉及抑制引起败血症的免疫反应的方法，涉及预防败血症的方法，涉及治疗败血症的方法以及这些方法中使用的药物组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种对已诊断患有全身炎症反应综合症或败血症的个体的治疗方法，包括给上述个体施用一个治疗有效剂量的免疫调节药物组合物的步骤，该药物组合物包括从下列小组中选择一个或多个成分，该小组包括：

- i) Vpr 蛋白；
- ii) Vpr 蛋白的一个功能性片段；
- iii) 一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的核酸；
- iv) 一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的一个功能性片段的核酸。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征为个体被施用的是一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征为核酸的给药剂量是 1-500 μg 核酸。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其特征为核酸的给药剂量是 20-250 μg 核酸。

5. 如权利要求 2 所述的方法，其特征为核酸的给药剂量大约是 100 μg 核酸。

6. 如权利要求 2 所述的方法，其特征为可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸包含在一个质粒中。

7. 如权利要求 2 所述的方法，其特征为可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸包含在一个病毒载体中。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征为病毒载体是从包含一个反转录病毒载体和一个腺病毒载体的小组中选择的。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征为免疫调节药物组合物的给药步骤至少重复一次。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征为免疫调节药物组合物的给药步骤每天进行 1-6 次。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其特征为额外包括至少一个给上述个

体施用一个治疗有效剂量的抗感染药剂的步骤。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征为抗感染药剂是从包括阿米卡星、妥布霉素、奈替米星、庆大霉素、头孢菌素、头孢他啶、拉氧头孢、碳青霉烯、亚胺培南、噻肟单酰胺菌素、氨苄青霉素、青霉素、酰脲青霉素、奥格门汀、两性霉素、法昔洛韦、阿昔洛韦的小组中选择的。

13. 如权利要求 11 所述的方法,其特征为抗感染药剂的给药步骤是与免疫调节药物制备物的给药步骤同时进行的。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其特征为包含有额外的步骤:监控个体血浆中前炎性细胞因子和败血症标志蛋白/状况的浓度,决定是否有对免疫调节药物组合物额外剂量的需要和是否施用额外剂量的免疫调节药物组合物。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其特征为监控 $\text{TNF}\alpha$ 的血浆水平并根据 $\text{TNF}\alpha$ 的血浆水平高于 25 pg/ml 来决定免疫调节药物组合物额外剂量的需要。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其特征为免疫调节药物组合物的给药步骤包括持续给药。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其特征为个体被施用 Vpr 蛋白或其功能性片段。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其特征为 Vpr 蛋白或其功能性片段按每天 0.1-100 mg/kg 体重给药。

19. 如权利要求 17 所述的方法,其特征为 Vpr 蛋白或其功能性片段按每天 0.5-50 mg/kg 体重给药。

20. 如权利要求 17 所述的方法,其特征为 Vpr 蛋白或其功能性片段按每天 1.0-10 mg/kg 体重给药。

21. 一种对经鉴定有很高风险患败血症的个体预防患败血症的方法,包括给上述个体施用一个预防有效剂量的免疫调节药物组合物的步骤,该药物组合物包括从下列小组中选择一个或多个成分,该小组包括:

i) Vpr 蛋白;

- ii) Vpr 蛋白的一个功能性片段;
- iii) 可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的一个核酸;
- iv) 可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的一个功能性片段的一个核酸。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其特征为个体被施用的是一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其特征为核酸的给药剂量是 1-500 μg 核酸。

24. 如权利要求 22 所述的方法,其特征为核酸的给药剂量是 25-250 μg 核酸。

25. 如权利要求 22 所述的方法,其特征为核酸的给药剂量大约是 100 μg 核酸。

26. 如权利要求 22 所述的方法,其特征为可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸包含在一个质粒中。

27. 如权利要求 22 所述的方法,其特征为可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸包含在一个病毒载体中。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其特征为病毒载体是从包含一个反转录病毒载体和一个腺病毒载体的小组中选择的。

29. 如权利要求 21 所述的方法,其特征为免疫调节药物组合物的给药步骤至少重复一次。

30. 如权利要求 29 所述的方法,其特征为免疫调节药物组合物的给药步骤每天进行 1-6 次。

31. 如权利要求 21 所述的方法,其特征为额外包括至少一个给上述个体施用一个治疗有效剂量的抗感染药剂的步骤。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其特征为抗感染药剂是从包括阿米卡星、妥布霉素、奈替米星、庆大霉素、头孢菌素、头孢他啶、拉氧头孢、碳青霉烯、亚胺培南、噻肟单酰胺菌素、氨苄青霉素、青霉素、酰脲青霉素、奥格门汀、两性霉素、法昔洛韦、阿昔洛韦的小组中选择的。

33. 如权利要求 31 所述的方法,其特征为抗感染药剂的给药步骤是与免疫调节药物制备物的给药步骤同时进行的。

34. 如权利要求 21 所述的方法,其特征为包含有额外的步骤:监控个体血浆中前炎性细胞因子和败血症标志蛋白/状况的浓度,决定是否有对免疫调节药物组合物额外剂量的需要和是否施用额外剂量的免疫调节药物组合物。

35. 如权利要求 34 所述的方法,其特征为监控 $\text{TNF}\alpha$ 的血浆水平并根据 $\text{TNF}\alpha$ 的血浆水平高于 25 pg/ml 来决定免疫调节药物组合物额外剂量的需要。

36. 如权利要求 21 所述的方法,其特征为免疫调节药物组合物的给药步骤包括持续给药。

37. 如权利要求 21 所述的方法,其特征为个体被施用 Vpr 蛋白或其功能性片段。

38. 如权利要求 37 所述的方法,其特征为 Vpr 蛋白或其功能性片段按每天 0.1-100 mg/kg 体重给药。

39. 如权利要求 37 所述的方法,其特征为 Vpr 蛋白或其功能性片段按每天 0.5-50 mg/kg 体重给药。

40. 如权利要求 37 所述的方法,其特征为 Vpr 蛋白或其功能性片段按每天 1.0-10 mg/kg 体重给药。

41. 一种用于预防和治疗败血症的药物组合物,包含一个抗感染药剂和一个或多个从下列小组中选择的成分,该小组包括:

- v) Vpr 蛋白;
- vi) Vpr 蛋白的一个功能性片段;
- vii) 可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的一个核酸;
- viii) 可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的一个功能性片段的一个核酸。

42. 如权利要求 41 所述的药物组合物,其特征为抗感染药剂是从包含阿米卡星、妥布霉素、奈替米星、庆大霉素、头孢菌素、头孢他啶、拉氧头

孢、碳青霉烯、亚胺培南、噻肟单酰胺菌素、氨苄青霉素、青霉素、酰脲青霉素、奥格门汀、两性霉素、法昔洛韦、阿昔洛韦的小组中选择的。

43. 如权利要求 41 所述的药物组合物，其特征为在治疗全身炎症反应综合症或败血症中额外包括至少一种佐剂。

治疗和预防全身炎症反应综合症/败血症的药物组成和方法

技术领域

本发明涉及抑制引起全身炎症反应综合症/败血症的免疫反应的方法，涉及预防全身炎症反应综合症/败血症的方法，涉及治疗全身炎症反应综合症/败血症的方法以及这些方法使用的药物组合物。

背景技术

细菌感染和其它可能的刺激因素引起的免疫反应能导致全身炎症反应，或全身炎症反应综合症（SIRS）【Burnell R, 1994, 循环休克 43: 137 (Burnell R., 1994, Circ. Shock 43: 137) ; Bahrani S 等, 1995, 临床生物研究进展 392: 197 (Bahrani S, *et al.*, 1995, Prog. Clin. Biol. Res. 392: 197); 收录在此作为参考文献】。严重的全身炎症反应综合症会导致“多脏器功能损伤综合征”(MODS)，包括不同程度的发热，低血毒症，呼吸急促，心动过速，内皮发炎，心肌功能不全，高灌注，精神状态改变，血管衰竭和最终的器官损伤如急性呼吸困难综合症，凝血病，心脏衰竭，肾衰竭，休克，和/或昏迷【美国胸科医师大学/危重病学会共同会议，危重病，1992, 20: 864 (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, Crit. Care Med., 1992, 20: 864); 和 Bone, 1995, 美国医学会杂志, 273: 155 (Bone, 1995, JAMA 273: 155), 收录在此作为参考文献】。

当全身炎症反应综合症是由感染引起时，它被称为败血症。败血症能发展成严重败血症临床阶段和最终的败血症休克临床阶段。临床败血症被广泛定义为与感染的临床表现相关的微生物原侵入的状况。全身炎症反应综合症和败血症的临床症状包括但不限于（1）体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$ ；（2）心跳速率 >90 跳每分钟；（3）呼吸速度 >20 次吸气每分钟或 $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mm Hg}$ ；（4）白细胞计数 $>12000/\text{cu mm}$ ， $<4000/\text{cu mm}$ ，或 $>10\%$ 不成熟（带状）

形式；（5）器官功能障碍，高灌注或高血压【Bone 等，1992，胸 101: 1644（Bone *et al.*, 1992, Chest 101: 1644），收录在此作为参考文献】。败血症休克具有不充分的组织灌注的特性，导致组织供氧不足，低血压。

但感染发生时，感染部位的巨噬细胞活化分泌 TNF- α 和 IL-1，导致增加的血浆蛋白释放到组织中，增加的吞噬细胞和淋巴细胞移动进入组织，增加的血小板贴附到血管壁上。这样，局部的血管堵塞并且病原体被局限在感染位点。然而，在败血症中，感染变为全身性的并且 TNF- α 引起的血管堵塞变为灾难性的。TNF- α 的全身性释放造成血管舒张和由于血管渗透性增加而引起的血浆体积减少，导致休克。在败血症休克中，TNF- α 进一步引发散布性的血管内凝集（血液凝结）导致在小血管中血块的产生和凝集蛋白的巨大消耗。由于病人凝血能力的丧失，重要的器官如肾、肝、心脏和肺都会由于正常灌注的无法进行而受到损伤。败血症性休克的致死率高达 81%。

大肠杆菌是许多例败血症中的感染病原体，而其它革兰氏阴性菌，如克雷伯菌属—肠杆菌属—沙雷菌属的细菌和假单胞杆菌也能引起败血症。在一些少量的病例中，革兰氏阳性菌如金黄葡萄球菌和全身性病毒和真菌感染也能引起败血症。泌尿生殖器系统，肠胃系统和呼吸系统是最普通的感染导致败血症的位点。其它败血症相关的感染位点包括创伤，烧伤和骨盆感染，和感染的静脉血管。

在患对血流扩张敏感的疾病或状况的住院病人或烧伤、创伤或外科手术病人中发生败血症是很平常的。使病人对血流扩张敏感的因素包括一个通常衰弱的免疫系统，比如新生儿和老年人中可见的，和导致对感染增加的局部敏感性的状况或疾病，比如循环损伤，糖尿病，尿毒症和艾滋病。最后，具有过大的免疫反应倾向的个体，比如可能由于某种 IL-1 基因的等位基因的存在而发生的个体，也有很高的风险发生败血症（美国专利 No.6,251,598，收录在此作为参考文献）。

既然败血症病人的病症诊断不根据感染的严重程度，而是根据病人的全身炎性反应综合症/败血症反应的严重程度【pilz 等，1991，Krankenpflege 杂志，29: 483（pilz *et al.*, 1991, Krankenpflege-journal 29: 483），收录在此作为参

考文献】，许多诊断测定都集中在免疫反应方面。Centocor 公司的 TNF- α 免疫测定法（WO 90/06314，收录在此作为参考文献）使用了两个抗体检测病人血液中这个炎性调节子的水平。美国国家航空和宇宙航行局（NASA）建立的通过提取的天青蛋白检测病人血液中假单胞杆菌测定法，并用一个单克隆抗体对它进行检测（美国专利 No.5,210,019，收录在此作为参考文献）。BioWhittaker 的败血症测定法和 Seikagaku Kyoto 公司（东京，日本）的美洲鲎试剂测定法？检测病人血液中 *E. Coli* 内毒素的水平。其它败血症诊断测定法检测败血症反应期间白细胞产生的氧化剂的存在（美国专利 No. 5,804,370，收录在此作为参考文献），败血症标志肽降钙素原（美国专利 No. 5,639,617，收录在此作为参考文献），白细胞高亲和性 Fc 受体（CD64）表达【Davis 等，1995，血液学试验 1: 3（Davis *et al.*, Laboratory Hematology 1: 3），收录在此作为参考文献】；血清 C-活化蛋白（CRP）【Drews 等，1995，纽约学术科学年鉴 762: 398（Drews *et al.*, 1995, Ann. NY Acad. Sci. 762: 398）；Kawamura 和 Nishida, 1995，儿科学 84: 10（Kawamura and Nishida, 1995, Acta Paediatr. 84: 10），均收录在此作为参考文献】；中性粒细胞表面 CD11b 水平（美国专利 No. 6,077,665，收录在此作为参考文献）和选择的未饱和自由脂肪酸与饱和自由脂肪酸的比例（美国专利 No. 5,780,237，收录在此作为参考文献）。

HIV 附属基因 *vpr* 编码病毒蛋白 R（Vpr）参与了许多（宿主）细胞事件包括扩增，分化，凋亡，细胞因子产生和 NF-B 调节的转录调节【Levy 等，1993，细胞 72: 541-550（Levy *et al.*, 1993, cell 72: 541-550）；Ayyavoo 等，1997，自然药物 3: 1117-1123（Ayyavoo *et al.*, 1997, Nature Medicine 3: 1117-1123）；Stewart 等，1997，病毒学杂志 71: 5579-5592（Stewart *et al.*, J. Virol. 71: 5579-5592）】。NF-B 的活化对特异扩大抗原特异免疫反应的一些细胞因子和趋化因子的诱导作用是很重要的。NF-B 的活化在通过 CD28 共刺激途径引发的前炎性细胞因子，特别是 TNF α 的诱导中也扮演重要角色，【Moriuchi 等，1997，免疫学杂志 158: 3483-3491（Moriuchi *et al.*, 1997, J. Immunol. 158: 3483-3491）；Fraser 等，1992，分子细胞生物学 12: 4357-4363（Fraser *et al.*, 1992,

Mol. Cell Biol. 12: 4357-4363)】。细胞因子表达的形式影响炎症反应的本性和持久性。比如, IFN 和 TNF 的产生对增强细胞免疫的诱导是很适合的, 而 IL-4 和 IL-10 与帮助 B 细胞发展为抗体产生细胞有关【Paul 等, 1994, 细胞 76: 241-251 (Paul *et al.*, 1994, cell 76: 241-251)】。用突变的 NF-B 结合位点和 I κ B 竞争物进行的研究表明包括 NF-B 和 SP-1 的转录因子对 RANTES (活化调节, 正常 T 表达和分泌的) 基因表达是重要的【Moriuchi 等, 1997, 免疫学杂志 158: 3483-3491 (Moriuchi *et al.*, 1997, J Immunol. 158: 3483-3491)】。

CD8⁺T 细胞被认为在控制 HIV 通过 CTL 诱导的感染中扮演重要的角色。此外, CD8⁺T 细胞也参与包括 β -趋化因子 RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β 和 MDC 一些因子的分泌【Brinchman 等, 1990, 免疫学杂志 114: 2961-2966 (Brinchman *et al.*, 1990, J Immunol. 114: 2961-2966); Cocchi 等, 1996, 科学 270: 1811-1815 (Cocchi *et al.*, 1996, Science 270: 1811-1815); Pal 等, 1997, 科学 278: 695-698 (Pal *et al.*, 1997, Science 278: 695-698)】。CD8⁺CTL 是对病毒感染的一种重要的免疫防御。

趋化因子对感染和免疫活化中淋巴细胞补充的调节是很重要的【Schall 等, 1994, 免疫学新观点 6: 865-873 (Schall *et al.*, 1994, Curr. Opin. Immunol. 6: 865-873)】。T 细胞的活化导致对抗原特异 T 帮助细胞和细胞毒性效应细胞的扩张是必须的某种趋化因子/化学因子的合成【Weiss 等, 1994, 细胞 76: 263-274 (Weiss *et al.*, 1994, Cell 76: 263-274)】。除了在 T 细胞交换和免疫活化中扮演角色外, β -趋化因子能在确定的巨噬细胞系也包括原代淋巴细胞中通过干扰病毒进入所需的病毒共受体来抑制 HIV-1 感染【Feng 等, 1996, 科学 272: 872-877 (Feng *et al.*, 1996, Science 272: 872-877); Dornaz 等, 1996, 细胞 85: 1149-1158 (Dornaz *et al.*, 1996, cell 85: 1149-1158)】。例如, 在 T 细胞受体 (TCR) 和 CD28/CTLA-4 共连接反应之后, 趋化因子可由 T 细胞的一些亚群产生【Taub 等, 1996, 免疫学杂志 156: 2095-2103 (Taub *et al.*, 1996, J. Immunol. 156: 2095-2103); Herold 等, 1997, 免疫学杂志 159: 4150-4153 (Herold *et al.*, 1997, J. Immunol. 159: 4150-4153)】。

T 细胞扩增的诱导, CTL 诱导和细胞因子分泌, 每个都需要 TCR 复合物

的衔接和 CD28/CTLA-4 共刺激分子与它们在抗原呈递细胞 (APCs) 上的配基 CD80 或 CD86 的相互作用, 或通过 CD40/CD40 配基提供需要的二级信号以诱导 T 细胞活化【Fraser 等, 1994, 今日免疫学 14: 357-362 (Fraser *et al.*, 1994, Immunol. Today 14: 357-362); Crabtree 等, 1989, 科学 243: 355-361 (Crabtree *et al.*, 1989, Science 243: 355-361); Linsley 等, 1993, 免疫学综述年鉴 11: 191-212 (Linsley *et al.*, 1993, Annu. Rev. Immunol. 11: 191-212); June 等, 今日免疫学 15: 321-331 (June *et al.*, Immunol. Today 15: 321-331)】。研究表明通过 CD28 的 T 细胞活化增强 β -趋化因子的产生, 获得抗病毒效应【Carroll 等, 1997, 科学 276: 273-276 (Carroll *et al.*, 1997, Science 276: 273-276); Levine 等, 1996, 科学 272: 1939-1943 (Levine *et al.*, 1996, Science 272: 1939-1943); Bisset 等, 1997, AIDS 11: 485-491 (Bisset *et al.*, 1997, AIDS 11: 485-491)】。感染部位的 CD8⁺细胞的补充和活化增加了特异 CTL 前体细胞的频率【Stevenson 等, 1997, 欧洲免疫学杂志 27: 3259-3268 (Stevenson *et al.*, 1997, Eur. J. Immunol. 27: 3259-3268); Doherty 等, 1997, 免疫学综述 159: 105-117 (Doherty *et al.*, 1997, Immunol. Reviews 159: 105-117)】。封闭趋化因子的合成可缓解依赖趋化因子来补充免疫反应所负责的细胞的炎症的症状。

细胞免疫, 特别是 MHC 限制性 CTL 反应被认为在大量病毒感染的保护和清除方面扮演实质性的角色。在 HIV-1 感染个体中 CD8⁺T 细胞数量的减少与免疫系统恶化并行的抗病毒水平的降低和病情发展是相关联的【Mackewicz 等, 1991, 临床调查杂志 87: 1462-1466 (Mackewicz *et al.*, 1991, J. Clin. Invest. 87: 1462-1466); Pantaleo 等, 1997, 美国科学院院报 94: 9848-9853 (Pantaleo *et al.* 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9848-9853)】。从对 HIV-1 感染长期未恶化者, HIV-1 感染母亲所生的未感染的婴儿和反复接触但未感染的血清反应阴性的个体的研究的信息支持了 CTL 反应在控制病毒进入和可能甚至限制疾病发展中扮演角色【Borrow 等, 1994, 病毒杂志 68: 6103-6110 (Borrow *et al.*, 1994, J. Virol. 68: 6103-6110); Rowland-Jones 等, 1995, 自然药物 1: 59-94 (Rowland-Jones *et al.*, 1995, Nature Medicine 1: 59-94)】。

对治疗全身性炎症，如全身炎症反应综合症，和更特异的败血症和败血症休克的方法和药物组成的需要是仍然存在的。特别需要能预防有风险发展的病人患全身炎症反应综合症/败血症和有效治疗诊断为全身炎症反应综合症/败血症的病人的方法。

发明内容

本发明涉及治疗已诊断患全身炎症反应综合症或败血症的病人的方法，该方法包括的步骤为给上述病人施用一治疗有效剂量的免疫调节药物组合物，该药物组合物包括一个或几种下列成分：Vpr 蛋白；Vpr 蛋白的一个功能性片段；一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的核酸；一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白功能性片段的核酸。优选的，施用免疫调节药物组合物的步骤重复至少一次，更优选的为每天 1-6 次。在其它的优选实例中，施用免疫调节药物组合物的步骤包含持续施用。

在一些治疗被诊断患全身炎症反应综合症或败血症个体的方法的具体实例中，个体被施用可操作的与调节成分连接的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸。核酸优选按 1-500 μg 核酸，25-250 μg 核酸，或约 100 μg 核酸每剂量给药。可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 或其功能性片段的核酸优选包含在一个质粒或病毒载体中。病毒载体优选反转录病毒载体和腺病毒载体。

在一些治疗被诊断患全身炎症反应综合症或败血症个体的方法的具体实例中，个体被施用 Vpr 蛋白或其功能性片段。优选的 Vpr 蛋白或其功能性片段的给药量为 0.1-100 mg/kg 体重每天，0.5-50 mg/kg 体重每天或 1.0-10 mg/kg 体重每天。

在其它具体实例中，前面所述的治疗已被诊断患全身炎症反应综合症或败血症的病人的方法另外还包括至少一步给上述个体施用治疗有效剂量的一个抗感染药剂的步骤。这个抗感染药剂优选阿米卡星、妥布霉素、奈替霉素、庆大霉素、头孢菌素、头孢他啶、拉氧头孢、碳青霉烯、亚胺培南、噻肟单酰胺菌素、氨苄青霉素、青霉素、酰脲青霉素、奥格门汀、两性霉素、法昔洛韦或阿昔洛韦。抗感染药剂的给药步骤优选与免疫调节药物制备物的给药

步骤同时进行。

在其它具体实例中，前面所述的治疗已被诊断患全身炎症反应综合症或败血症的病人的方法另外还包括的步骤有：监控个体血浆中前炎症细胞因子和败血症标志蛋白/状况的浓度，决定是否需要施加额外剂量的免疫调节药物组合物，和施用额外剂量的免疫调节药物组合物的步骤。优选的，监控 $\text{TNF}\alpha$ 的血浆水平并根据 $\text{TNF}\alpha$ 的血浆水平高于 25 pg/ml 来决定是否需要施加额外剂量的免疫调节药物组合物。

本发明的另一方面是一个预防已认定高风险患全身炎症反应综合症/败血症的个体患该病的方法，该方法包括的步骤为给上述病人施用治疗有效剂量的一个免疫调节药物组合物，该药物组合物包括一个或多个以下成分：Vpr 蛋白；Vpr 蛋白的一个功能性片段；一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的核酸；和一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 功能性片段的核酸。优选的，施用免疫调节药物组合物的步骤重复至少一次，更优选的为每天 1-6 次。优选的，施用免疫调节药物组合物的步骤包含持续施用。

在一些预防已认定有很高的风险患全身炎症反应综合症/败血症的个体患病的方法的具体实例中，个体被施用可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸。核酸优选按 1-500 μg 核酸，25-250 μg 核酸，或约 100 μg 核酸每剂量施用。可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸优选包含在一个质粒或病毒载体中。病毒载体优选反转录病毒载体和腺病毒载体。

在一些预防已认定有很高的风险患全身炎症反应综合症/败血症的个体患病的方法的具体实例中，个体被施用 Vpr 蛋白或其功能性片段。优选的 Vpr 蛋白或其功能性片段的给药量为 0.1-100 mg/kg 体重每天，0.5-50 mg/kg 体重每天或 1.0-10 mg/kg 体重每天。

在其它具体实例中，前面所述的预防已认定有很高的风险患全身炎症反应综合症/败血症的个体患病的方法另外还包括至少一步给上述个体施用治疗有效剂量的一个抗感染药剂的步骤。这个抗感染药剂优选阿米卡星、妥布霉素、奈替霉素、庆大霉素、头孢菌素、头孢他啶、拉氧头孢、碳青霉烯、亚

胺培南、噻肟单酰胺菌素、氨苄青霉素、青霉素、酰脲青霉素、奥格门汀、两性霉素、法昔洛韦或阿昔洛韦。抗感染药剂的给药步骤优选与免疫调节药物制备物的给药步骤同时进行。

在其它具体实例中，前面所述的预防已认定有很高的风险患全身炎症反应综合症/败血症的个体患病的方法另外包括的步骤有，监控个体血浆中前炎症细胞因子和败血症标志蛋白/状况的浓度，决定是否需要额外剂量的免疫调节药物组合物，和施用额外剂量的免疫调节药物组合物的步骤。优选的，监控 $\text{TNF}\alpha$ 的血浆水平并根据 $\text{TNF}\alpha$ 的血浆水平高于约 25 pg/ml 来决定是否需要施加额外剂量的免疫调节药物组合物。

本发明的另一个方面是用于预防和治疗败血症的药物组合物，它包括一个抗感染药剂和一个或多个从下列小组中选择的成分，该小组包括：Vpr 蛋白，Vpr 蛋白的一个功能性片段；一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的核酸；和一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白功能性片段的核酸。优选的抗感染药剂从包含阿米卡星、妥布霉素、奈替霉素、庆大霉素、头孢菌素、头孢他啶、拉氧头孢、碳青霉烯、亚胺培南、噻肟单酰胺菌素、氨苄青霉素、青霉素、酰脲青霉素、奥格门汀、两性霉素、法昔洛韦和阿昔洛韦的小组中选择。在全身炎症反应综合症/败血症的治疗中，优选的药物组合物另外包括至少一个佐剂。

本发明的另一个方面是用于预防或治疗败血症的药物组合物，它包括一预防或治疗有效剂量的一个或多个从下列小组中选择的成分，该小组包括：Vpr 蛋白，Vpr 蛋白的一个功能性片段；一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白的核酸；和一个可操作的连接于调节成分的编码 Vpr 蛋白功能性片段的核酸。在一些具体实例中，药物组合物按持续注入的方式制成制剂。在一些具体实例中，药物组合物按单次注射的方式制成制剂。

具体实施方式

I. 定义

本文中，术语“蛋白”和“多肽”可交换使用，都是指包括蛋白，多肽和肽的蛋白质成分。

本文中，术语“个体”是指定向于本发明使用的脊椎动物。本发明所计划的可举例的“个体”包括但不限于人、高等灵长类，犬，猫，牛，马，羊，猪，鸟和其它哺乳动物。

本文中，术语“给药”是指向个体中递送多肽。“给药”也指递送编码多肽的核酸。该术语包括但不限于的递送方式包括口服、肌内的、静脉内的、鼻下的、腹膜内的、真皮内的、胸内的、心室内的、皮下的、透皮的、局部的、或通过灌洗。本发明所计划的施用模式包括但不限于使用一个注射器，静脉内管、透皮贴片或无针式注射器。

本文中，Vpr 功能性片段是指具削弱个体或细胞培养物免疫反应能力的 Vpr 的片段。Vpr 的一个功能性片段能由检测 Vpr 片段对人巨噬细胞和原代淋巴细胞中 β -趋化因子比如 MIP-1 α 、MIP-1 β 和 RANETS 产生的影响的分析试验来鉴定【Muthumani K 等，2000，白细胞生物学杂志 68: 366-372 (Muthumani K *et al.*, 2000, J. Leukoc. Biol. 68: 366-372)，收录在此作为参考文献】。能减少人巨噬细胞或原代淋巴细胞中 β -趋化因子产生的 Vpr 片段被认为是与本发明相关的 Vpr 功能性片段。或者，功能性片段可根据对 Vpr 核定位和细胞周期停滞必须的功能区域的存在来决定【Mahalingam S 等，1997，病毒学杂志，71: 6339-6347 (Mahalingam S *et al.*, 1997, J. Virol. 71: 6339-6347); Macreadie, I.G.等，1995，美国科学院院报，92: 2770-2774 (Macreadie I. G. *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 2770-2774); 均收录在此作为参考文献】。一般来说，功能性片段包含 Vpr 中的一部分长度的氨基酸序列，该长度超过 5 个氨基酸，优选的长度超过 10 个氨基酸，最优选的长度超过 20 个氨基酸。在一些具体实例中，功能性片段包含 Vpr 氨基端 30 个最氨基端残基的一个 5-30 个残基的片段。在一些具体实例中，功能性片段包含 Vpr 羧基端 30 个最羧基端残基的一个 5-30 个残基的片段。

本文中，全身炎症反应综合症/败血症的治疗是指减少、缓解或消除与全身炎症反应综合症和败血症的相关临床症状，和与 MODS 相关的那些状况，

比如不同程度发热、低血毒症，呼吸急促，心动过速，内皮发炎，心肌功能不全，高灌注，精神状态改变，血管衰竭，和最终的器官损伤如急性呼吸困难综合症，凝血病，心脏衰竭，肾衰竭，休克，和/或昏迷。

II. 本发明优选实例描述

本发明提供预防有病情发展风险的个体患全身炎症反应综合症（SIRS）的改进方法，和治疗已患全身炎症反应综合症个体的方法。全身炎症反应综合症预防和治疗使用方法使用 HIV 病毒用来躲避和破坏被感染个体的免疫系统的武器之一：Vpr 蛋白和/或编码它的核酸分子。在 HIV 衍化的武器的武装下，通过减少个体免疫反应的过度刺激这个全身炎症反应综合症发生的直接原因，败血症预防和治疗更加有效。此外，本发明使用 HIV Vpr 蛋白和/或编码它的核酸分子来治疗患败血症或有风险发展为败血症的个体。

本发明来源于 Vpr 多肽的递送可抑制包括与全身炎症反应综合症和败血症相关的那些细胞免疫反应这个惊人的发现。尽管没有限制本发明到任何一个机制，Vpr 抑制包括 $\text{TNF}\alpha$ 的原型 Th1 型细胞因子的合成，并转换抗体反应偏向 Th2 型。此外，Vpr 抑制 CC 趋化因子和和解 CD8^+ 细胞效应功能。数据支持 Vpr 干扰参与免疫活化的共刺激分子结论。因此，当递送给患全身炎症反应综合症/败血症或有风险发展为全身炎症反应综合症/败血症的个体时，Vpr 减少导致全身性 $\text{TNF}\alpha$ 释放的免疫反应。当给患败血症的个体递送时，Vpr 减少导致最终败血症休克的全身性免疫反应。特别令人惊奇的发现是一旦败血症得到有效治疗，本发明的方法可预防和保护全身炎症反应综合症/败血症的复发或继发。

Vpr 的氨基酸序列和编码它的 DNA 序列在 1999 年 2 月 23 日的美国专利 No.5,874,225 中有描述，收录在此作为参考文献，包括专利和与其中相关的出版物。Vpr 片段在下列专利中有描述，1994 年 2 月 22 日申请的 PCT/US94/02191 专利，1995 年 9 月 21 日申请的 PCT/US95/12344 专利和 1998 年 8 月 14 日申请的 PCT/US98/16890 专利（每个和各自向对应的美国国家阶段申请要求的优先权都收录在此作为参考文献），和 1998 年 6 月 9 日出版

的美国专利 No.5,763,190, 收录在此作为参考文献。收录在此作为参考文献的 1993 年 12 月 15 日申请的美国专利 08/167,608 和 1994 年 1 月 26 日申请的 PCT/US94/00899 描述了包括 Vpr 功能性片段作为病毒颗粒部分的重组病毒颗粒。Vpr 蛋白的突变分析已鉴定了 Vpr 核定位和细胞周期停滞活性所需要的独特功能区域【Mahalingam, S.等, 1997, 病毒学杂志 71: 6339-6347 (Mahalingam, S. *et al.*, 1997, J. Virol. 71: 6339-6347); Macreadie, I. G.等, 1995, 美国科学院院报 92: 2770-2774 (Macreadie I.G. *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 2770-2774); 两者均收录在此作为参考文献】。

A. 预防全身炎症反应综合症/败血症的方法

本发明提供了一个预防被认为有高风险患全身炎症反应综合症的个体患病的方法。在一个优选具体实例中, 个体被认为有很高的风险发展成败血症。根据本发明, 治疗有风险发展为过度的全身性免疫反应的方法包括给个体施用一个预防有效剂量的 Vpr 蛋白, 可以 Vpr 蛋白或其一个功能性片段的形式, 或以一个编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸的形式, 或两种或多种的组合形式。当一个编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸被递送到个体时, 编码序列可操作的与调节成分相连接。一旦传递到个体, 编码 Vpr 蛋白的核酸在个体中表达并合成 Vpr 蛋白。在一些具体实例中, Vpr 是以含 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的编码序列的核酸分子的形式递送的。在一些具体实例中, Vpr 和/或其功能性片段是以蛋白形式递送的。无论 Vpr 蛋白是以蛋白形式递送的, 或是以编码它的核酸表达的, 一旦被递送到个体, 它的存在会抑制不希望的免疫反应。

在另一个具体实例中, 预防全身炎症反应综合症/败血症的方法的附加步骤包括监控个体血浆中前炎症细胞因子和败血症标志蛋白/状况的浓度, 决定是否监控的细胞因子/标记指示病人患全身炎症反应综合症/败血症, 注射额外剂量的 Vpr 蛋白或其功能性片段, 和/或编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸。适用于监控的前炎症细胞因子和败血症标志蛋白/状况包括但不限于细胞因子如 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12; 趋化因子比如 IL-8、PBP、 β -

TG、NAP-2、GRO α 、GRO β 、GRO、IP-10、SDF-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES、嗜酸细胞活化趋化因子、淋巴细胞激活素、神经趋化素；和标志蛋白/情况比如天青蛋白、*E.coli* 和其它革兰氏阴性细菌内毒素、白细胞产生的氧化剂、降血钙素原、白细胞高亲和性 Fc 受体 (CD64)；血清 C 活化蛋白 (CRP)；神经表面 CD11b 水平和选择的未饱和自由脂肪酸与饱和自由脂肪酸的比例。在优选的具体实例中，血浆中 TNF α 的浓度是被监控的。在优选的具体实例中，当血浆中 TNF α 浓度高于 100 pg/ml 时个体被鉴定患全身炎症反应综合症/败血症，更优选的高于 50 pg/ml，最优选的是高于 25 pg/ml。

有很高风险患全身炎症反应综合症/败血症的个体包括但不限于有夸大免疫反应倾向的人，比如因存在 IL-1 基因等位基因而发生的这种夸大免疫反应倾向（美国专利 No. 6,251,598，收录在此作为参考文献）。有很高风险患败血症的个体包括但不限于有使他们对血流侵袭敏感的潜在的疾病或情况，特别是那些住院的个体，或烧伤、外伤、负伤或外科手术病人。使病人对血流侵袭敏感的因素包括但不限于一个通常衰弱的免疫系统，比如在新生儿或老人中可见的，或导致感染增加的局部敏感的情况或疾病，比如损伤循环、糖尿病和尿毒症。

本文中所用的短语“预防有效剂量”是指预防有风险发展成全身炎症反应综合症/败血症的个体发生全身炎症反应综合症/败血症相关的病症的有效剂量。预防有效剂量优选减少至少 30%，更优选的至少 50%，最优选的至少 90%，TNF α 血浆水平临床意义增加。TNF α 血浆水平临床意义增加是指高于 25 pg/ml 血浆的增加，优选的高于 50 pg/ml 血浆，最优选的高于 100 pg/ml 血浆。测定血浆 TNF α 水平的方法是专业领域已知的【美国专利 No. 6,168,790；美国专利 No. 6,063,764；Creasey 等，1991，休克循环 33: 84-9 (Creasy *et al.*, 1991 *Circ. Shock* 33: 84-9)；收录在此作为参考文献】。

应该注意的是在正常的健康人或试验动物中 TNF α 水平估计不高于 10 pg/ml 【Michie 等，1988，药物新工程杂志 318: 1481-1486 (Michie *et al.*, 1988, *New Eng J. Med.* 318: 1481-1486)；Mathison 等，1988，临床研究杂志 81: 1925 (Mathison *et al.*, 1988, *J. Clin. Invest.*, 81: 1925)；和 Waage 等，1987，手术

刀 1: 355-357 (Waage *et al.*, 1987, Lancet 1: 355-357); 收录在此作为参考文献】。在造成败血症的感染中, 暴露于革兰氏阴性菌脂多糖内毒素 (LPS) 后, $\text{TNF}\alpha$ 水平显示 10-20 倍的提高以至达到 400 pg/ml 血浆。血清 $\text{TNF}\alpha$ 水平与革兰氏阴性菌、含 LPS 的脑膜炎球菌感染的致死结果显示有很好的相关性【Waage 等, 同上, 1987 (Waage *et al.*, *supra*, 1987)】。进一步在近人类的灵长类动物的败血症动物模型中注意到增长的 $\text{TNF}\alpha$, 并且这些变化与致死率直接相关【Tracey 等, 自然 330: 662-664, 1987 (Tracey *et al.*, Nature 330: 662-664, 1987), 收录在此作为参考文献】。

Vpr 蛋白和/或其功能性片段的预防有效的每日剂量是 0.1-100 mg 每公斤体重。通常 0.5-50, 优选 1-10 mg 每公斤体重每天。编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸能与上述药剂共同施用。编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸的预防有效剂量是每剂量 1 ng-10 mg 核酸; 在一些具体实例中, 是约 0.1-2000 μg DNA。在一些优选的具体实例中, 治疗活性剂量是约 1-1000 μg DNA。在一些优选的具体实例中, 治疗活性剂量是约 1-500 μg DNA。在一些优选的具体实例中, 治疗活性剂量是约 25-250 μg DNA。最优选的, 治疗活性剂量是约 100 μg DNA。

预防个体患全身炎症反应综合症/败血症的剂量控制可包括在一次或多次剂量中施用一种或多种编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸和 Vpr 蛋白和/或其功能性片段。按每天 1-6 次分开的剂量或按持续释放的形式的 Vpr 的每天配药可有效的获得希望的结果。Vpr 蛋白和/或其功能性片段, 和/或编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸的施用可每天重复 1-6 次, 1 至几天或数周, 或直到导致有风险发展成全身炎症反应综合症/败血症的因素减少。在优选的具体实例中, Vpr 蛋白和/或其功能性片段, 和/或编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸按 Vpr 蛋白持续注入的方式施用。在另一个优选的具体实例中, 随持续注入 Vpr 蛋白和/或其功能性片段, 和/或编码它们的核酸后, Vpr 蛋白和/或其功能性片段, 和/或编码它们的核酸按丸剂形式施用。

在其它具体实例中, 预防全身炎症反应综合症/败血症方法包括的附加步骤为施用一治疗有效剂量的抗感染药剂, 典型的有对绿脓杆菌、肠杆菌属、

吡啶阳性变形杆菌属和沙雷菌属有抗性的氨基酸糖苷如阿米卡星、妥布霉素、奈替米星和庆大霉素、头孢菌素如头孢他啶、相关的 β -内酰胺试剂如拉氧头孢；碳青霉烯类如亚胺培南；单环菌素药剂如噻肟单酰胺菌素；氨基青霉素和广谱青霉素（如青霉素酶抗性青霉素、酰脲青霉素或抗假单胞菌青霉素或奥格门汀）。同抗病毒药剂如法昔洛韦和阿昔洛韦一样，抗真菌药剂，两性霉素和类似物也包括在抗感染药剂定义中。

本文中所用的术语“抗感染药剂的治疗剂量”是指足够达到细菌或真菌杀死的血浆浓度的量，或足够减慢接受治疗的个体中病毒复制的量。一般认为对人施用安全的抗感染药剂的治疗剂量是专业人士已知的并是可变的，用抗生素、杀真菌剂或抗病毒试剂和感染个体的治疗类型也是已知的。用于实施本发明的抗生素包括那些按《医师的试验台参考书》，Huff, B.B 编辑，医药经济公司，欧雷德尔，新泽西州（1989）【Physicians' Desk Reference, Huff, B. B. ed., Medical Economics Company, Inc., Oradell, N. J.(1989)】中描述的方法制成制剂的抗生素，抗细菌和杀菌药剂，该书收录在此作为参考文献。

此外，治疗全身炎性反应综合症/败血症的各种药剂与本发明成分的联用也是有用的。它们包括类交感神经胺（血管加压素）如去甲肾上腺素、肾上腺素、异丙基肾上腺素、多巴胺和多巴酚丁胺；抗感染药剂如甲基强的松龙、消炎痛和苯基丁氮酮；和皮质类固醇如倍他米松、氢化可的松、甲基强的松龙或地塞米松；抗凝血剂如肝素，抗凝血酶 III 或针对特定情况或安排的香豆素型药物；利尿素如利尿磺胺或利尿酸；和鸦片剂对抗剂和 β 内啡肽如纳洛酮；额外的肿瘤坏死因子或白介素-1 的对抗剂；酚噻嗪；抗组胺剂；高血糖素； α -肾上腺素封闭药剂、血管舒张剂；血浆扩张剂；红细胞；血小板；低温沉淀剂；新鲜冻存的血浆；细菌渗透蛋白；克林霉素；和（脂 A）的抗体，*E.coli* 的 J5 突变体或内毒素核糖脂。制备这些佐剂的方法在许多文献中有描述。

抗感染药剂能与 Vpr 组合物同时或分开施用。在一个优选的具体实例中，抗感染药剂与 Vpr 或其片段一起施用。治疗全身炎性反应综合症/败血症药剂所用的一个或多个佐剂也能与 Vpr 蛋白或其功能性片段，和/或编码 Vpr 蛋白

或其功能性片段的核酸一起施用。佐剂能分别给药，或与 Vpr 蛋白和/或 Vpr 编码核酸制成相同的制剂给药。在一个优选的具体实例中，佐剂与 Vpr 蛋白或其功能性片段和/或编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸一起施用。

B. 治疗全身炎症反应综合症/败血症的方法

本发明的另一方面提供一个治疗已被诊断患全身炎症反应综合症个体的方法。在一个优选的具体实例中，个体已被诊断患败血症。根据本发明，治疗有过度的全身性免疫反应的个体的方法包括给个体施用 Vpr 蛋白，以 Vpr 蛋白或其功能性片段的形式，或以编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸的形式，或以两种或多种的组合形式。当编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸被递送到个体时，编码序列可操作的连接于调节成分。一旦递送到个体，编码 Vpr 蛋白的核酸序列在体内表达并合成 Vpr 蛋白。在一些具体实例中，Vpr 是以有 Vpr 蛋白和/或其功能性片段编码序列的核酸分子形式递送。在一些具体实例中，Vpr 和/或其功能性片段以蛋白形式递送。无论是以蛋白形式递送的或是编码它的核酸表达的，一旦递送到个体，Vpr 蛋白的存在能抑制或下调不希望的免疫反应。

在另一个具体实例中，治疗全身炎症反应综合症/败血症的方法包含额外的步骤，监控个体前炎症因子和败血症标志蛋白/状况血浆中的浓度，决定是否监控的细胞因子/标志指示个体患全身炎症反应综合症/败血症和施用额外剂量的 Vpr 蛋白和/或其功能性片段。适用于监控的前炎症细胞因子和败血症标志蛋白/状况包括但不限于细胞因子如 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12；趋化因子比如 IL-8、PBP、 β -TG、NAP-2、 $\text{GRO}\alpha$ 、 $\text{GRO}\beta$ 、GRO、IP-10、SDF-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES、嗜酸细胞活化趋化因子、淋巴细胞激活素、神经趋化素；和标志蛋白/状况比如天青蛋白、*E.coli* 和其它革兰氏阴性细菌内毒素、白细胞产生的氧化剂、降血钙素原、白细胞高亲和性 Fc 受体 (CD64)；血清 C 活化蛋白 (CRP)；神经表面 CD11b 水平和选择的未饱和和自由脂肪酸与饱和自由脂肪酸的比例。在优选的具体实例中，血浆中 $\text{TNF}\alpha$ 的浓度是被监控的。在优选的具体实例中，当血浆中 $\text{TNF}\alpha$ 浓度高于 100 pg/ml

时个体被鉴定患全身炎性反应综合症/败血症，更优选的高于 50 pg/ml，最优选的是高于 25 pg/ml。

个体可通过一个或多个临床症状诊断患全身炎性反应综合症/败血症，如：（1）体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$ ；（2）心跳速率 >90 跳每分钟；（3）呼吸速度 >20 次吸气每分钟或 $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mm Hg}$ ；（4）白细胞计数 $>12000/\text{cu mm}$ ， $<4000/\text{cu mm}$ ，或 $>10\%$ 不成熟（带状）形式；（5）器官功能障碍，高灌注或高血压【Bone 等，1992，胸 101: 1644 (Bone *et al.*, 1992, Chest 101: 1644) 收录在此作为参考文献】，也包括专业领域已知的其它方法。可通过使用许多专业领域已知的诊断检测法来诊断个体是否患败血症，这些方法包括但不限于 Centocor 公司的 TNF- α 免疫测定法（WO 90/06314，收录在此作为参考文献），该法使用了两个抗体检测病人血液中这个感染调节子的水平。美国国家航空和宇宙航行局（NASA）建立的通过提取的天青蛋白检测病人血液中假单胞杆菌测定法，并用一个单克隆抗体对它进行检测（美国专利 No.5,210,019，收录在此作为参考文献）。BioWhittaker 的败血症测定法和 Seikagaku Kyoto 公司（东京，日本）的美洲鲎试剂测定法？检测病人血液中 *E. Coli* 内毒素的水平。其它败血症诊断测定法检测败血症反应期间白细胞产生的氧化剂的存在（美国专利 No. 5,804,370，收录在此作为参考文献），败血症标志肽降钙素原（美国专利 No. 5,639,617，收录在此作为参考文献），白细胞高亲和性 Fc 受体（CD64）表达【Davis 等，1995，血液学试验 1: 3 (Davis *et al.*, Laboratory Hematology 1: 3)，收录在此作为参考文献】；血清 C-活化蛋白（CRP）【Drews 等，1995，纽约学术科学年鉴 762: 398 (Drews *et al.*, 1995, Ann. NY Acad. Sci. 762: 398)；Kawamura 和 Nishida，1995，儿科学 84: 10 (Kawamura and Nishida, 1995, Acta Paediatr. 84: 10)，均收录在此作为参考文献】；中性粒细胞表面 CD11b 水平（美国专利 No. 6,077,665，收录在此作为参考文献），和选择性未饱和自由脂肪酸与饱和自由脂肪酸的比例（美国专利 No. 5,780,237，收录在此作为参考文献）。

本文中短语“治疗有效剂量”是指足够缓解或减少败血症或全身炎性反应综合症相关的症状严重程度的剂量。一般来说，治疗有效剂量优选减少至

少 30%，更优选的至少 50%，最优选的至少 90%，TNF α 血浆水平临床意义增加。TNF α 血浆水平临床意义增加是指高于 25 pg/ml 血浆的增加，优选的高于 50 pg/ml 血浆，最优选的高于 100 pg/ml 血浆。测定血浆 TNF α 水平的方法是专业领域已知的【美国专利 No. 6,168,790；美国专利 No. 6,063,764；Creasey 等，1991，休克循环 33: 84-9 (Creasy *et al.*, 1991 Circ. Shock 33: 84-9)；收录在此作为参考文献】。

应该注意的是在正常的健康人或试验动物中 TNF α 水平估计不高于 10 pg/ml【Michie 等，1988，药物新工程杂志 318: 1481-1486 (Michie *et al.*, 1988, New Eng J. Med. 318: 1481-1486)；Mathison 等，1988，临床研究杂志 81: 1925 (Mathison *et al.*, 1988, J. Clin. Invest., 81: 1925)；和 Waage 等，1987，手术刀 1: 355-357 (Waage *et al.*, 1987, Lancet 1: 355-357)；收录在此作为参考文献】。在造成败血症的感染中，暴露于革兰氏阴性菌脂多糖内毒素 (LPS) 后，TNF α 水平显示 10-20 倍的提高以至达到 400 pg/ml 血浆。血清 TNF α 水平与革兰氏阴性菌、含 LPS 的脑膜炎球菌感染的致死结果显示有很好的相关性【Waage 等，同上，1987 (Waage *et al.*, *supra*, 1987)】。进一步在近人类的灵长类动物的败血症动物模型中注意到增长的 TNF α ，并且这些变化与致死率直接相关【Tracey 等，自然 330: 662-664, 1987 (Tracey *et al.*, Nature 330: 662-664, 1987)，收录在此作为参考文献】。

Vpr 蛋白和/或其功能性片段的每日治疗有效剂量能是 0.1-100 mg 每公斤体重。通常 0.5-50，优选 1-10 mg 每公斤体重每天。编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸能与上述药剂共同施用。编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸的治疗有效剂量是每剂量 1 ng-10 mg 核酸；在一些具体实例中，是约 0.1-2000 μ g DNA。在一些优选的具体实例中，治疗活性剂量是约 1-1000 μ g DNA。在一些优选的具体实例中，治疗活性剂量是约 1-500 μ g DNA。在一些优选的具体实例中，治疗活性剂量是约 25-250 μ g DNA。最优选的，治疗活性剂量是约 100 μ g DNA。

预防个体全身炎症反应综合症/败血症的剂量控制可包括在一次或多次剂量中施用一种或多种编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸和 Vpr 蛋白和/

或其功能性片段。按每天 1-6 次分开的剂量或按持续释放的形式进行的 Vpr 的每天配药可有效的获得希望的结果。Vpr 蛋白和/或其功能性片段, 和/或编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸的施用可每天重复 1-6 次, 施用 1 至几天或数周, 或直到导致有风险发展成全身炎症反应综合症/败血症的因素减少。在优选的具体实例中, Vpr 蛋白和/或其功能性片段, 和/或编码 Vpr 蛋白和/或其功能性片段的核酸按 Vpr 蛋白持续注入的方式施用。在另一个优选的具体实例中, 随持续注入 Vpr 蛋白和/或其功能性片段, 和/或编码它们的核酸后, Vpr 蛋白和/或其功能性片段, 和/或编码它们的核酸按丸剂形式施用。

在其它具体实例中, 治疗全身炎症反应综合症/败血症方法包括的附加步骤为施用一治疗有效剂量的抗感染药剂, 典型的有对绿脓杆菌、肠杆菌属、吲哚阳性变形杆菌属和沙雷菌属有抗性的氨基酸糖苷如阿米卡星、妥布霉素、奈替米星和庆大霉素、头孢菌素如头孢他啶、相关的 β -内酰胺试剂如拉氧头孢; 碳青霉烯类如亚胺培南; 单环菌素药剂如噻吩单酰胺菌素; 氨基青霉素和广谱青霉素(如青霉素酶抗性青霉素、酰脲青霉素或抗假单胞菌青霉素或奥格门汀)。同抗病毒药剂如法昔洛韦和阿昔洛韦一样, 抗真菌药剂, 两性霉素和类似物也包括在抗感染药剂定义中。

本文中所用的术语“抗感染药剂的治疗剂量”是指足够达到细菌或真菌杀死的血浆浓度的量, 或足够减慢接受治疗的个体中病毒繁殖的量。一般认为对人施用安全的抗感染药剂的治疗剂量是专业人士已知的并是可变的, 用抗生素、杀真菌剂或抗病毒试剂和治疗感染个体的类型也是已知的。用于实施本发明的抗生素包括那些按《医师的试验台参考书》, Huff, B.B 编辑, 医药经济公司, 欧雷德尔, 新泽西州(1989)【Physicians' Desk Reference, Huff, B. B. ed., Medical Economics Company, Inc., Oradell, N. J.(1989)】中描述的制剂方法制成的抗生素, 抗细菌和杀菌药剂, 该书收录在此作为参考文献。

此外, 治疗全身炎症反应综合症/败血症的各种佐剂与本发明成分的联用也是有用的。它们包括类交感神经胺(血管加压素)如去甲肾上腺素、肾上腺素、异丙基肾上腺素、多巴胺和多巴酚丁胺; 抗感染药剂如甲基强的松龙、消炎痛和苯基丁氮酮; 和皮质类固醇如倍他米松、氢化可的松、甲基强的松

龙或地塞米松；抗凝血剂如肝素，抗凝血酶 III 或针对特定情况或安排的香豆素型药物；利尿素如利尿磺胺或]利尿酸；和鸦片剂对抗剂和 β 内啡肽如纳洛酮；附加的肿瘤坏死因子或白介素-1 的对抗剂；酚噻嗪；抗组胺剂；高血糖素； α -肾上腺素封闭药剂、血管舒张剂；血浆扩张剂；红细胞；血小板；低温沉淀剂；新鲜冻存的血浆；细菌渗透蛋白；克林霉素；和（脂 A）的抗体，*E.coli* 的 J5 突变体或内毒素核糖脂。制备这些佐剂的方法在许多文献中有描述。

抗生素能与 Vpr 蛋白同时或分开施用。在一个优选的具体实例中，抗生素与 Vpr 一起施用。治疗全身炎症反应综合症/败血症药剂所用的一个或多个佐剂也能与 Vpr 蛋白或其功能性片段，和/或编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸一起施用。佐剂能分开给药，或与 Vpr 蛋白和/或 Vpr 编码核酸制成相同的制剂给药。在一个优选的具体实例中，佐剂与 Vpr 蛋白或其功能性片段和/或编码 Vpr 蛋白或其功能性片段的核酸一起施用。

在一些本发明的预防和治疗方法的具体实例中，一个或多个 Vpr、其一个功能性片段、编码 Vpr 的一个核酸或编码 Vpr 功能性片段的一个核酸的联合向病人施用。在一些具体实例中，Vpr 或其功能性片段按与编码 Vpr 的核酸相同的制剂形式对个体施用。在其它具体实例中，Vpr 或其功能性片段按与编码 Vpr 的核酸不同的制剂形式对个体施用。

C. 预防和治疗全身炎症反应综合症/败血症方法的方案

通过直接 DNA 给药向细胞递送蛋白如 Vpr，这样的组合物和方法已有多种方案报道。这些方法的例子在美国专利 No. 5,593,972，美国专利 No.5,739,118，美国专利 No.5,580,859，美国专利 No.5,589,466，美国专利 No.5,703,055，美国专利 No.5,622,712，美国专利 No.5,459,127，美国专利 No.5,676,954，美国专利 No.5,614,503，和 PCT 申请专利 PCT/US95/12502 中都有描述，每个都收录在此作为参考文献。通过直接 DNA 给药向细胞递送的组合物和方法在 PCT/US90/01515，PCT/US93/02338，PCT/US93/048131 和 PCT/US94/00899 中有描述，每个都收录在此作为参考文献。除在这些申

请专利中描述的递送方案外，可供选择的递送 DNA 的方法在美国专利 No.4,945,050 和 5,036,006 中有描述，两者都收录在此作为参考文献。核酸分子也能用脂介导的 DNA 转染法传递，如在美国专利 No.4,235,871，美国专利 No.4,241,046 和美国专利 No.4,394,448 中有描述，每个都收录在此作为参考文献。

包含有编码 Vpr 序列的核酸的制剂根据施用的方式和位点制成。这种制剂在专业领域是已知的。除了核酸和可选的多肽外，制剂也可包括缓冲液、赋形剂、稳定剂、载体和稀释剂。

D. 预防和治疗全身炎症反应综合征/败血症的药物组合物

包含 Vpr 蛋白或其一个片段和药用载体和稀释剂的药物组合物可与根据选择的施用方式选择的组合物由普通专业人员制成制剂。合适的药物载体在最新版的《Remington 的药物科学》(*Remington's Pharmaceutical Sciences*) 上有描述，该书为专业领域的标准参考书，收录在此作为参考文献。

对肠胃外的给药，Vpr 蛋白或其片段能与药用肠胃外媒介物相联系，制成比如按溶液、悬浮物、乳剂或冻干粉形式的制剂。可举例的这种媒介物如水、盐水、Ringer 式溶液、葡萄糖溶液和 5% 人血清白蛋白。脂和无水媒介物如固体油也是可以使用的。媒介物或冻干粉可含有保持等渗透性（例如氯化钠、甘露醇）和化学稳定性（例如缓冲液和防腐剂）的添加物。制剂按通用方法除菌。例如，适用于注射方式给药的肠胃外组合物可按 1.5% 的活性成分重量溶于 0.9% 氯化钠溶液中。

包含 Vpr 蛋白或其片段的药物组合物可按任何使活性药剂到达哺乳动物体内药剂作用位点的方式给药。因为当以口服的形式给药时蛋白被降解，所以通常使用肠胃外给药，例如静脉内、皮下、肌内给药来优化吸收。

给药的剂量根据以下因素而改变，如：药效性质；它的给药模式和路径；受药者的年龄、健康和体重；症状的性质和程度；并行治疗的类型；和治疗频率。通常，Vpr 蛋白的每天剂量能为 0.1-100 mg 每公斤体重。一般为 0.5-50，优选 1-10 mg 每公斤每天，按分开的剂量每天 1-6 次或持续释放的形式或持

续给药能有效获得希望的结果。

本发明的另一个方面描述了包含有编码 Vpr 的核酸分子和药用载体或稀释剂的药物组合物。根据本发明，编码 Vpr 蛋白的遗传材料以可表达形式向个体递送。遗传材料，DNA 或 RNA，被个体的细胞吸收并表达。因而产生的 Vpr 能抑制免疫反应，无论是载体免疫原直接引起的免疫反应或是不希望的免疫反应如与自体免疫和感染疾病和状况和移植过程相关联的免疫反应。因此，包含编码 Vpr 遗传材料的药物组合物与包含 Vpr 蛋白的药物组合物一样有用。

可操作的与个体细胞内表达必须的调节成分连接的编码 Vpr 蛋白的核酸序列可以用一系列策略的药物组合物的形式来传递，该策略包括但不限于病毒载体如腺病毒或反转录病毒载体或直接核酸转化。使用病毒载体递送编码目的蛋白的核酸的方法已广泛报道。重组病毒载体如反转录病毒载体或腺病毒载体用常规方法和初始材料制备。重组病毒载体包括编码 Vpr 的核酸序列。这个载体与药用载体或稀释剂结合。获得的药用制备物可给个体施用。一旦个体感染病毒载体，Vpr 在感染细胞中产生。

或者，包含编码 Vpr 核酸的分子可按不使用感染性载体的药物组合物的方式施用。核酸分子可是 DNA 或 RNA，优选 DNA。DNA 分子可为线形或环形，优选质粒。核酸分子与药用载体或稀释剂结合。

根据本发明，包含编码 Vpr 蛋白的核酸序列的药物组合物可直接施用到人体，或在体外传递到与个体分离、给药后重新移入的细胞。通过任一途径，遗传材料被引入存在于个体体内的细胞。优选的给药途径包括肌内的、腹膜内的、真皮内的和皮下注射。或者，药物组合物可通过不同的方式引入到从个体分离的细胞中。这些方式包括，例如，转染、电转化和基因枪法。核酸分子被细胞吸收后，它们被重新植入个体。

根据本发明的这方面的药物组合物包含约 1 ng 到 10 mg 核酸在制剂中；在一些具体实例中，约 0.1-2000 μg DNA。在一些优选的具体实例中，药物组合物包含约 1-1000 μg DNA。在一些优选具体实例中，药物组合物约含 1-500 μg DNA。在一些优选具体实例中，药物组合物约含 25-250 μg DNA。最

优选的，药物组合物约含 100 μg DNA。

根据本发明的这方面的药物组合物是根据使用的给药模式来制成制剂的。普通专业人士能容易的将编码 Vpr 的核酸制成制剂。在以注射为选择的给药模式的例子中，使用无菌、等渗、无热源的制剂。一般来说，等渗的添加物包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、三梨醇和乳糖。等渗溶液如磷酸盐缓冲液是优选的。稳定剂包括明胶和白蛋白。

核酸表达的调节成分包括启动子、起始密码子、终止密码子和多聚腺苷酸信号。这些调节成分必须可操作的与编码目的多肽和可选的 Vpr 多肽的序列连接，并且调节成分必须是按核酸形式给药的个体能使用的。例如，起始和终止密码子必须与编码序列同一框架。使用的启动子和多聚腺苷酸信号也必须在个体的细胞内是有功能的。

可举例的用于实施本发明的启动子包括但不限于猿病毒 40 (SV40) 的启动子、鼠乳腺致癌因子 (MMTV)、人免疫缺陷型病毒 (HIV) 例如 HIV 长末端重复 (LTR) 启动子、莫洛尼病毒、ALV、巨细胞病毒 (CMV) 如 CMV 介导早期启动子、EB 病毒 (EBV)、劳斯肉瘤病毒 (RSV)，也包括人类基因如人肌动蛋白、人肌凝蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌醇蛋白和人金属硫蛋白中的启动子。

可举例的用于实施本发明的多聚腺苷酸信号包括但不限于 SV40 多聚腺苷酸信号和 LTR 多聚腺苷酸信号。特别使用的是在 pCEP4 质粒 (Invitrogen, 圣地亚哥, 加利福尼亚州) 中的 SV40 多聚腺苷酸信号，被称为 SV40 多聚腺苷酸信号。

在其它具体实例中，药物组合物包括一个治疗有效剂量的抗感染药剂，典型的有对绿脓杆菌、肠杆菌属、吲哚阳性变形杆菌属和沙雷菌属有抗性的氨基酸糖苷如阿米卡星、妥布霉素、奈替米星和庆大霉素、头孢菌素如头孢他啶、相关的 β -内酰胺试剂如拉氧头孢、碳青霉烯类如亚胺培南、单环菌素药剂如噻肟单酰胺菌素、氨基青霉素和广谱青霉素 (如青霉素酶抗性青霉素、酰脲青霉素或抗假单胞菌青霉素或奥格门汀)。同抗病毒药剂如法昔洛韦和阿昔洛韦一样，抗真菌药剂，两性霉素和类似物也包括在抗感染药剂定义中。

本文中所用的术语“抗感染药剂的治疗剂量”是指足够达到细菌或真菌杀死的血浆浓度的量，或足够减慢接受治疗的个体中病毒复制的量。一般认为对人施用安全的抗感染药剂的治疗剂量是专业人士已知的并是可变的，用抗生素、杀真菌剂或抗病毒试剂和感染个体治疗的类型也是已知的。用于实施本发明的抗生素包括那些按《医师的试验台参考书》，Huff, B.B 编辑，医药经济公司，欧雷德尔，新泽西州（1989）【Physicians' Desk Reference, Huff, B. B. ed., Medical Economics Company, Inc., Oradell., N. J.(1989)】中描述的制剂方法制成的抗生素，抗细菌和杀菌药剂。

此外，治疗全身炎性反应综合症/败血症中的各种佐剂在本发明药物组合物中也是有用的。它们包括类交感神经胺（血管加压素）如去甲肾上腺素、肾上腺素、异丙基肾上腺素、多巴胺和多巴酚丁胺；抗感染药剂如甲基强的松龙、消炎痛和苯基丁氮酮；和皮质类固醇如倍他米松、氢化可的松、甲基强的松龙或地塞米松；抗凝血剂如肝素，抗凝血酶 III 或针对特定状况或安排的香豆素型药物；利尿剂如利尿磺胺或利尿酸；和鸦片剂对抗剂和 β -内啡肽如纳洛酮；附加的肿瘤坏死因子或白介素-1 的对抗剂；酚噻嗪；抗组胺剂；高血糖素； α -肾上腺素封闭药剂、血管舒张剂；血浆扩张剂；红细胞；血小板；低温沉淀剂；新鲜冻存的血浆；细菌渗透蛋白；克林霉素；和（脂 A）的抗体，*E.coli* 的 J5 突变体或内毒素核糖脂。制备这些佐剂的方法在许多文献中有描述。

前述的具体实例是对本发明的举例说明，并不是以任何形式写来限制本发明。那些专业人士能识别在本发明本质和范围内的修改。所有此处引用的参考文献都以其完整形式作为参考文献引用于此。