



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102458465 B

(45) 授权公告日 2015.09.02

(21) 申请号 201080026421.1

WO 0109387 A1, 2001.02.08,

(22) 申请日 2010.04.13

Ana Artero-Castro et

(30) 优先权数据

al.,. "Cold-Inducible RNA-Binding

61/212,584 2009.04.13 US

Protein Bypasses Replicative Senescence

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

in Primary Cells through Extracellular

2011.12.13

Signal-Regulated Kinase 1 and 2

(86) PCT国际申请的申请数据

Activation". 《Molecular and Cellular

PCT/US2010/030824 2010.04.13

Biology》. 2009, 第29卷(第7期), 第1855-1868

页.

(87) PCT国际申请的公布数据

Jun Fujita. "Cold Shock Response in

W02010/120726 EN 2010.10.21

Mammalian Cells". 《J. Mol. Microbiol.

Biotechnol.》. 1999, 第1卷(第2期), 第

(73) 专利权人 范因斯坦医学研究院

243-255页.

地址 美国纽约

审查员 杜玉娟

(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

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1589279 A, 2005.03.02,

CN 1980649 A, 2007.06.13,

权利要求书1页 说明书15页

序列表3页 附图8页

(54) 发明名称

通过抑制冷诱导 RNA 结合蛋白 (CIRP) 治疗炎性疾

(57) 摘要

公开了含有 CIRP 抑制剂的药物组合物。还描述了治疗患有炎性症状的受试者的方法,该方法包括对所述受试者施用 CIRP 抑制剂。

1. 特异性结合冷诱导 RNA 结合蛋白 (CIRP) 的抗体或其抗原结合片段在制备治疗受试者的炎性症状的药物中的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段抑制 CIRP 的一种或多种生物活性, 其中所述炎性症状是外伤出血或出血性休克。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述抗体是多克隆抗体。

3. 权利要求 1 的用途, 其中所述抗体是单克隆抗体。

4. 权利要求 1 的用途, 其中所述抗体是嵌合抗体、人抗体、或人源化抗体。

5. 权利要求 1 的用途, 其中所述抗体是单链抗体。

6. 权利要求 1 的用途, 其中所述受试者是人。

7. 权利要求 1 的用途, 其中所述抗体或其抗原结合片段是特异性地与针对 CIRP 的兔多克隆抗血清竞争与 CIRP 的结合的抗体或其抗原结合片段, 所述兔多克隆抗血清是用纯化的 SEQ ID NO :1 的重组 CIRP 注射兔产生的。

## 通过抑制冷诱导 RNA 结合蛋白 (CIRP) 治疗炎性疾病

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 4 月 13 日提交的美国临时申请号 61/212,584 的优先权。上述申请的全部教导在此引入作为参考。

[0003] 政府资助

[0004] 本发明在国立卫生研究院 (the National Institutes of Health) 授予的第 R01 HL 076179 号项目款的政府支持下完成。政府拥有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 炎症是血管组织对有害刺激 (例如病原体、受损细胞或刺激物) 的复杂生物响应。它是有机体为了去除有害刺激并启动组织康复过程的保护性努力。在不存在炎症的情况下, 创伤和感染至多只能更慢地愈合, 而组织的进行性破坏会损害有机体的存活。然而, 不加抑制的炎症也能够导致许多疾病。

[0007] 炎症可分为急性或慢性。急性炎症是身体对有害刺激的最初响应, 其通过来自血液的血浆和白细胞向受伤组织的移动增加来发生。一系列生物化学事件促发了涉及局部血管系统、免疫系统和受伤组织中的多种细胞的炎性响应并使其成熟。延长的炎症, 即慢性炎症, 会导致发生炎症处的细胞类型进行性变化, 其特征为在炎性过程中组织的破坏和愈合同时发生。

[0008] 虽然近期对于急性炎症患者的治疗已有进步 (例如, 脓毒症、外伤出血以及内脏缺血再灌注损伤), 但是仍有大量病人死于并发的循环性休克和多器官衰竭。休克和多器官衰竭持续作为医疗和外科重症室中的死亡主因, 具有难以接受的高致死率。虽然已经对多种疗法和药物进行了研究来预防循环性衰竭并降低死亡率, 但还没有一种是完全成功的。

[0009] 今天现代医学开始承认慢性炎症是导致慢性变性疾病的主要因素。促炎性细胞因子是我们免疫系统的一部分, 其可以攻击并杀死具有氧化性化学物质的细胞。如果不进行治疗, 炎症可能伤害组织和器官。例如, 炎症导致关节炎患者软骨退化并对糖尿病患者的胰腺造成伤害; 且其现在被认为在心血管疾病和癌症中发挥作用。

[0010] 目前为止, 对于治疗人类的急性和慢性炎性症状只有非常有限的特定治疗方法。从而, 对于具有最小副作用的有效治疗炎性症状的新方法存在很大的未满足的医疗需求。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明基于以下发现: 对于冷诱导 RNA 结合蛋白 (Cold-Inducible RNA-Binding Protein, CIRP) 进行抑制可以减弱炎性响应。更具体的, 申请人发现对 CIRP 的抑制与不进行治疗的对照相比能降低出血性休克动物模型中的天冬氨酸转氨酶 (AST)、肝髓过氧化物酶 (MPO)、乳酸盐、TNF、血清 TNF 和血清、肺和肝 IL-6 的水平 (图 7-8)。另外, 对 CIRP 的抑制降低了出血导致的死亡率 (图 6)。基于该发现, 公开了治疗炎性症状的药物组合物和方法。

[0013] 在一个实施方式中, 本发明为药物组合物, 其包含药学上可接受的载体或稀释剂和 CIRP 抑制剂。

[0014] 在另一个实施方式中, 本发明为治疗患有炎性症状的受试者的方法, 该方法包括对受试者施用有效量的 CIRP 抑制剂。

[0015] 在另一个实施方式中,本发明为分离的抗体,其特异性结合 CIRP(“ CIRP 抗体” )或其抗原性片段,其中所述抗体或抗原性片段抑制 CIRP 的一种或多种生物活性。

[0016] 在另一个实施方式中,本发明为抑制 CIRP 活性的方法,该方法包括对有需求的受试者施用有效量的 CIRP 抑制剂。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1 是人的 CIRP 氨基酸序列 (SEQ ID NO 1)。

[0019] 图 2 显示了 CIRP 基因在出血动物模型中的肝、心脏和血液中的过表达与假手术 (sham) (不出血) 对照进行对比。

[0020] 图 3 是描述施用重组 CIRP (rCIRP) 后 AST 和 ALT 提高的两幅图。

[0021] 图 4 显示了施用 rCIRP 后血液、肝和肠中 TNF 和 HMGB1 的增加。

[0022] 图 5 显示了 rCIRP 促进和增加释放自巨噬细胞培养物中的细胞因子 (TNF、IL-6、HMGB1) 的时间进程和效果。

[0023] 图 6 描述了在出血动物模型中加入抗 -CIRP 抗体后与未治疗的对照对比存活率增加。

[0024] 图 7 是一系列描述在出血动物模型中施用抗 -CIRP 抗体组合物后与未治疗的对照对比血清 AST、ALT 和乳酸盐降低的图。

[0025] 图 8 包括了描述在出血动物模型中施用抗 -CIRP 抗体后与未治疗的对照进行对比抗 -CIRP 抗体降低血清、肺和肝 IL-6 的图。

[0026] 发明详述

[0027] 申请人惊讶地发现在炎症响应期间, CIRP 表达被上调,并被释放至循环系统。申请人还发现一旦 CIRP 进入血液,其就会作为强效的促炎性介导体或细胞因子并导致组织损伤甚至死亡。

[0028] 本发明基于以下发现,即,与未治疗的对照相比,对 CIRP 的抑制会导致在脓毒症动物模型中的炎症介导体和标志物的水平降低,该炎症介导体和标志物包括但不限于:天冬氨酸转氨酶 (AST)、肝髓过氧化物酶 (MPO)、乳酸盐、TNF、血清 TNF 和血清 IL-6、肺 IL-6 和肝 IL-6。这些降低反映并在某些情况下解释了在炎症疾病和病症的治疗中靶向 CIRP 的有益效果。此外,这些降低显示了 CIRP 抑制剂和拮抗剂在治疗这些疾病和病症中的治疗益处。

[0029] CIRP 是一种因温和冷应激 (32°C) 在培养的细胞中诱导出的哺乳动物蛋白质,优选为人蛋白质。CIRP 包括一个 N 末端 RNA 结合域和一个 C 末端甘氨酸富集域。人 CIRP 氨基酸序列见图 1, SEQ ID NO :1 (参见 Nishiyama 等人, The Journal of Cell Biology, Volume 137, 1997)。“哺乳动物 CIRP”包括具有与天然存在或内源性的相应哺乳动物 CIRP 相同的氨基酸序列的蛋白 (如重组蛋白、合成蛋白 (即用合成有机化学产生的蛋白))。该术语还涵盖了 CIRP 的多态性变异体或等位变异体和其他同种型 (如选择性剪接或其他细胞学方法所产生的) 以及前述的修饰或未修饰形式 (如脂化、糖基化和非糖基化)。这类蛋白可从例如天然产生的哺乳动物 CIRP 的来源进行回收和分离。CIRP 在冷诱导细胞增殖抑制方面发挥不可或缺的作用。

[0030] 在此定义的“CIRP 抑制剂”是一种结合 CIRP 并抑制 (例如,减少、阻止、降低、中和) CIRP 一种或多种生物活性的试剂 (例如,分子、天然或合成核酸或核酸类似物、反义分子、小干扰 RNA (siRNA)、蛋白质、肽、抗体、抗原性片段、化合物等等);或一种抑制 CIRP 基因

和 / 或蛋白质表达或 CIRP 生物活性释放的试剂。术语“CIRP 的生物活性”表示 CIRP 受体结合、CIRP 信号传导、CIRP 介导的促炎性细胞因子的释放、CIRP 介导的炎症和 / 或 CIRP 介导的其它活性。术语“拮抗剂”可以与术语“抑制剂”可互换使用。

[0031] CIRP 抑制剂可以是抗体,其结合并抑制(例如,减少、阻止或中和)CIRP 的一种或多种生物活性或功能。

[0032] 抗体可为多克隆或单克隆的,术语“抗体”意在涵盖多克隆和单克隆抗体。术语多克隆和单克隆指抗体制剂的同质程度,不限于特定的生产方法。本文中用到的术语“抗体”也涵盖抗体的功能性片段,包括嵌合抗体、人源化抗体、灵长类化(primatized)抗体、杂合(veneered)抗体或单链抗体的片段。功能性片段包括与哺乳动物 CIRP 结合的抗原结合片段。这样的片段可通过酶裂解或通过重组技术产生。例如,木瓜蛋白酶、胃蛋白酶或其他具有所需底物特异性的蛋白酶也可用来产生片段。也可用其中在天然终止位点上游已引入一个或多个终止密码子的抗体基因生产为多种截短形式的抗体。

[0033] 包括源自不同物种的片段的单链抗体、和嵌合、人源化或灵长类化(CDR-移植)或杂合抗体以及嵌合、CDR-移植或杂合单链抗体等也涵盖在本发明和术语“抗体”的范围内。这些抗体的各种片段可通过常规技术化学结合于一起,或可采用基因工程技术制备作为相邻的蛋白。例如,编码嵌合或人源化链的核酸可被表达来产生相邻的蛋白。参见例如 Cabilly 等人的美国专利 4,816,567;Cabilly 等人的欧洲专利 0,125,023B1;Boss 等人的美国专利 4,816,397;Boss 等人的欧洲专利 0,120,694B1;Neuberger, M. S 等人的 WO 86/01533;Neuberger, M. S. 等人的欧洲专利 0,194,276B1;Winter 的美国专利 5,225,539;Winter 的欧洲专利 0,239,400B1;Queen 等人的欧洲专利 0 451 216 B1;和 Padlan, E. A. 等人的 EP 0 519 596 A1。也参见关于灵长类化抗体的文献 Newman, R. 等人的 BioTechnology, 10 :1455-1460(1992),以及关于单链抗体的文献 Ladner 等人的美国专利 4,946,778 和 Bird, R. E. 等的 Science, 242 :423-426(1988)。

[0034] 人源化抗体可用合成或重组 DNA 技术使用标准方法或其他适宜技术生产。也可用 PCR 诱变方法构建编码人源化可变区的核酸(如 cDNA)序列以改变编码人或人源化链的 DNA 序列,如来自先前人源化可变区的 DNA 模板(参见例如 Kamman, M. 等人, Nucl. Acids Res., 17 :5404(1989);Santo, K. 等人, Cancer Research, 53 :851-856(1993);Daugherty, B. L. 等人, Nucleic Acids Res., 19(9) :2471-2476(1991)和 Lewis, A. P. 和 J. S. Crowe, Gene, 101 :297-302(1991))。使用这些或其他适宜方法,也可容易地产生变体。在一个实施方案中,可以对克隆的可变区进行突变,并可筛选具有所需特异性的编码变体的序列(例如从噬菌体库;参见例如 Krebber 等人的美国专利 5,514,548;1993 年 4 月 1 日公开的 Hoogenboom 等的 WO 93/06213)。

[0035] 对哺乳动物(如人)CIRP 具有特异性的抗体可用适宜的免疫原得到,例如 SEQ ID NO :1 的分离的和 / 或重组的人蛋白或其片段(包括合成分子如合成肽)。抗体也可通过免疫具有表达 CIRP 的细胞的适宜宿主(如小鼠)得到。此外,表达 CIRP 的细胞可用作免疫原或用于筛选结合 CIRP 的抗体。

[0036] 免疫抗原的制备及多克隆和单克隆抗体的生产可用任何适宜技术进行。文献中已描述了多种方法(参见例如 Kohler 等人, Nature, 256 :495-497(1975)和 Eur. J. Immunol. 6 :511-519(1976);Milstein 等人, Nature 266 :550-552(1977);Koprowski

等人的美国专利 4,172,124 ;Harlow, E. 和 D. Lane,1988, *Antibodies :A Laboratory Manual*(抗体:实验手册), (Cold Spring Harbor Laboratory :Cold Spring Harbor, N. Y.) ;*Current Protocols In Molecular Biology*(分子生物学实验手册), 第 2 卷(增刊 27,1994 年夏), Ausubel, F. M. 等人编辑, (John Wiley&Sons ;New York, N. Y.), 第 11 章, (1991))。一般来说,通过将适宜的无限增殖细胞系(例如骨髓瘤细胞系如 SP2/0、P3X63Ag8.653 或杂合骨髓瘤)与产生抗体的细胞进行融合来产生杂交瘤。产生抗体的细胞可从用目的抗原免疫的人或其他适宜动物的周围血或优选脾或淋巴结获得。融合细胞(杂交瘤)可用筛选性培养条件分离,并采用有限稀释法克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可通过适宜的检测法(如 ELISA)筛选。

[0037] 可以使用产生或分离具有所需特异性的抗体(如人抗体或抗原结合片段)的其他适宜方法,包括例如从文库(如噬菌体展示文库)中筛选重组抗体的方法,或基于对能产生人抗体谱的转基因动物(如小鼠)进行免疫的方法(参见例如 Jakobovits 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :2551-2555(1993) ;Jakobovits 等人, *Nature*, 362 :255-258(1993) ;Lonberg 等的美国专利 5,545,806 ;Surani 等的美国专利 5,545,807 ;Lonberg 等的 W097/13852)。这些免疫和分离方法是本领域一般技术人员公知的。

[0038] 抗原性片段是一种当进入体内时会刺激产生抗体的物质。抗原可以包括毒素、细菌、外源血细胞和 / 或移植器官的细胞。

[0039] CIRP 抑制剂可以是特异性结合和抑制(减少、阻止、降低、中和)CIRP 的活性的肽(例如,合成、重组、融合或衍生的肽)。肽可以是线性、分支或环化的,例如,包含一些酰胺键的含有杂环原子结构的肽。在一个具体的实施方式中,所述肽是环肽。肽表示含有约 2 至约 100 氨基酸残基的化合物,其中一个氨基酸的氨基通过肽键连接到另一个氨基酸的羧基。这些肽的长度一般少于约 100 个氨基酸残基,优选约 10、约 20、约 30、约 40 或约 50 个残基。

[0040] 可以产生选择性结合 CIRP 特定结构域(例如,独特域)的肽。例如,可以通过酶促或化学裂解从天然蛋白质中衍生或分离肽,或可以通过合适的方法合成肽,该方法例如,固相肽合成(例如, Merrifield 型合成)(参见,例如, Bodanszky 等人。" *Peptide Synthesis*", John Wiley & Sons, Second Edition, 1976)。作为 CIRP 抑制剂的肽还可以通过使用例如重组 DNA 方法或其它合适方法产生(参见,例如, Sambrook J. 和 Russell D. W., *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001)。

[0041] CIRP 抑制剂还可以是融合到例如载体蛋白(例如, myc、his、谷胱甘肽巯基转移酶)上的和 / 或被标记(例如,放射性标记、荧光标记)的融合肽。

[0042] 肽可以含有任何合适的 L- 和 / 或 D- 氨基酸,例如,常规  $\alpha$  氨基酸(例如丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸)、非  $\alpha$  氨基酸(例如,  $\beta$ - 丙氨酸、4- 氨基丁酸、6- 氨基己酸、肌氨酸、抑胃酶氨酸 (statine))、以及非常规氨基酸(例如,瓜氨酸、高瓜氨酸、高丝氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸)。肽的氨基、羧基和 / 或其它官能团可以是游离的(例如,未修饰的)或使用合适的保护基团进行保护。合适的氨基和羧基的保护基团、以及添加或移除保护基团的方法是本领域公知的,并公开于,例如, Green 和 Wuts, " *Protecting Groups in Organic Synthesis*", John Wiley & Sons, 1991。肽的官能团也可以通过公知的方法进行衍生(例

如,烷基化)。

[0043] 可以对肽进行合成并组装至包含有一些到很多离散分子种属的文库中。这些文库可以使用组合化学方法进行制备,并使用任何合适的方法进行筛选以判断该文库是否包含具有目标生物活性的肽。然后可以将这些肽抑制剂通过合适的方法进行分离。

[0044] 如果需要的话,多肽可以包括修饰(例如,氨基酸接头、酰化、乙酰化、酰胺化、甲基化、末端修饰(例如,环化修饰))。多肽还可以包括化学修饰(例如,N-甲基- $\alpha$ -氨基取代)。另外,肽抑制剂可以是已知肽和/或天然产生肽的类似物,例如,具有保守氨基酸残基取代的肽类似物。这些修饰可以改进肽的不同性质(例如,溶解性、结合),包括其 CIRP 抑制活性。

[0045] 拟肽是指并非多肽、但是模拟其结构方面的分子。拟肽拮抗剂可通过常规化学方法制备(参见例如,Damewood J.R, " Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry", Reviews in Computational Biology, 2007, Vol. 9, pp. 1-80, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1996; Kazmierski W.K., " Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols", Humana Press, New Jersey, 1999)。例如,可以制备具有相同官能团的多糖作为肽。可以通过例如确立肽试剂在其被结合或将被结合至目标分子的环境下的三维结构来设计拟肽。拟肽包括至少两个部分:结合部分和骨架或支撑结构。

[0046] 结合部分是能与例如在配体结合位点处或附近具有氨基酸的目标分子反应或形成复合物(例如,通过疏水或离子相互作用)的化学原子或基团。例如,拟肽的结合部分可以与肽或蛋白抑制剂的结合部分相同。结合部分可以是通过与肽抑制剂的结合部分相同或相似的方式与受体反应的原子或化学基团。例如,可以使用计算化学来设计与 CIRP 结合的拟肽来抑制 CIRP 的活性。适合用于肽的碱性氨基酸的拟肽设计的结合部分的例子包括含氮的基团,例如胺、铵、胍、和酰胺或磷鎓。适合用于肽的酸性氨基酸的拟肽设计的结合部分的例子包括例如羧基、低烷基羧酸酯、磺酸、低烷基磺酸酯或磷酸或其酯。

[0047] 支撑结构是当结合至结合部分的时候能够提供拟肽的三维构型的化学实体。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、聚合物或有机合成聚合物低聚物(如聚乙烯醇或聚交酯)。优选的,支撑结构基本上具有与肽骨架或肽支撑结构相同的大小和规格。这可以通过计算或测量肽和拟肽的原子和键的尺寸来进行确定。在一个实施方式中,肽键的氮可以用氧或硫来取代,例如,形成聚酯骨架。在另一个实施方式中,羰基可以用磺酰基或亚磺酰基取代,从而形成聚酰胺(例如,聚磺酰胺)。可以制备肽的反式酰胺(例如,将一个或多个 -CONH 基团取代为 -NHCO 基团)。在另一个实施方式中,肽骨架可以被聚硅烷骨架取代。

[0048] 这些化合物可通过已知方法生产。例如,聚酯拟肽可通过将氨基酸上对应的  $\alpha$  氨基取代为羟基,从而制备羧酸并进而酯化羧酸,可选地封闭碱基和酸基侧链以使得副反应最小化。一般可以通过确定化学结构来容易地确定合适的化学合成路径。

[0049] 可以对拟肽进行合成并组装至包含有一些到很多离散分子种属的文库中。这些文库可以使用已知组合化学方法进行制备,并进行筛选以判断该文库是否包含一种或多种具有目标活性的拟肽。然后可以将这些拟肽抑制剂通过合适的方法进行分离。

[0050] 其它 CIRP 抑制剂,例如,非肽化合物或小分子,可以在自然界中发现(例如,

鉴定、分离、纯化)和/或生产(例如,合成)。可以对化合物和/或文库(例如,化合物、肽、核酸文库)进行筛选,例如高通量筛选,以检测试剂的 CIRP 结合特异性。可以从无数可获得的化合物文库中鉴定化合物或小分子,该文库例如,来自于 Chemical Repository of the National Cancer Institute、Molecular Libraries Small Molecules Repository(PubChem)和其它商业可获得的文库。这些文库或分子集合也可以使用公知的化学方法进行制备,例如公知的组合化学方法。可以筛选文库以鉴定结合和抑制 CIRP 的化合物。鉴定的化合物可以作为先导化合物通过公知的药物化学方法来进一步多样化。例如,可以制备先导化合物结构变体的化合物集合并用于筛选 CIRP 结合和/或抑制活性。这可能导致结构活性关系的发展,其将化合物结构与生物活性相联系。具有合适的结合和抑制活性的化合物可以进一步研发用于体内。在一个例子中,小分子  $\text{NaN}_3$  抑制 CIRP 转录,参见"Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by HIF-1-independent mechanism", S. Wellmann 等人, *Journal of Cell Science*, 117, 1785-1794, 2004。

[0051] 在本发明的一些实施方式中, CIRP 抑制剂具有低于 1000 道尔顿的分子量。

[0052] CIRP 抑制剂也可以是抑制(减少、降低、中和、阻止) CIRP 表达的试剂。抑制 CIRP 基因表达(例如,转录、mRNA 加工、翻译)的试剂(分子、化合物、核酸、寡核苷酸)是有效的 CIRP 抑制剂。反义寡核苷酸(例如, DNA, 核糖核酸探针(ribozymes))也可以用作 CIRP 抑制剂来抑制 CIRP 亚基表达。反义寡核苷酸一般是短(13 至 25 核苷酸)的单链核酸,其特异性与目标核酸序列(例如, mRNA)杂交并诱导目标核酸的降解(例如,通过 RNase H 依赖机理进行的 RNA 的降解)或空间上阻碍剪接或翻译机构的进行(参见例如, Dias N. 和 Stein C. A., *Mol. Cell Biol.* 1:347~355, 2002)。有很多不同类型的反义寡核苷酸可用作 CIRP 抑制剂,包括甲基膦酸酯寡核苷酸、硫代膦酸酯寡核苷酸、在核糖 2' 位处的氢被 O-烷基(例如甲基)取代的寡核苷酸、聚酰胺核酸(PNA)、磷二酰胺吗啉低聚物(脱氧核糖部分被吗啉环取代)、PN(在核糖 3' 位处的氧被氨基进行  $\text{N}^3\text{'}\text{-}\text{P}^5\text{'}$  置换)和嵌合寡核苷酸(例如, 2' -O-甲基/硫代磷酸酯)。

[0053] 可以使用预测性算法将反义寡核苷酸设计为 CIRP 特异性的。(参见例如, Ding, Y. 和 Lawrence, C. E., *Nucleic Acids Res.*, 29:1034-1046, 2001; Sczakiel, G., *Front. Biosci.*, 5:D 194-D201, 2000; Scherr, M. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 28:2455-2461, 2000; Patzel, V. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 27:4328-4334, 1999; Chiang, M. Y. 等人, *J. Biol. Chem.*, 266:18162-18171, 1991; Stuil, R. A. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 20:3501-3508, 1992; Ding, Y. 和 Lawrence, C. E., *Comput. Chem.*, 25:387-400, 1999; Lloyd, B. H. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 29:3664-3673, 2001; Mir, K. U. 和 Southern, E. M., *Nat. Biotechnol.*, 17:788-792, 1999; Sohail, M. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 29:2041-2051, 2001; Altman, R. K. 等人, *J. Comb. Chem.*, 7:493-508, 1999)。反义寡核苷酸可以通过合适的方法产生;例如,使用自动核酸合成仪(来自,例如, Applied Biosystems)合成核酸(例如, DNA, RNA, PNA)(还参见 Martin, P., *Helv. Chim. Acta* 78:486-504, 1995)。反义寡核苷酸也可以在含有合适表达载体的细胞中稳定表达。

[0054] 反义寡核苷酸可以通过吸附性内吞作用被目标细胞吸收。从而,在对受试者(例如,哺乳动物)进行治疗中,反义 CIRP 可以通过例如注射或输液被递送至目标细胞。例如,

纯化的寡核苷酸或 siRNA/shRNA,可单独给药或在具有合适的给药载体(例如,脂质体、阳离子聚合物(例如,聚-L-赖氨酸、PAMAM 树枝状聚合物(dendrimer),聚氰基丙烯酸烷基酯纳米颗粒和聚乙烯亚胺))的制剂中进行给药,或偶联至合适的载体肽(例如,同源转录因子、触角足(antennapedia)肽、HIV-1 的 Tat 蛋白、E5CA 肽)。

[0055] 鉴定 CIRP 拮抗剂(例如,抗体)的方法将在下文描述。

[0056] 包含 CIRP 的组合物可被用于结合分析以检测和/或鉴定能够结合 CIRP 的试剂,包括本发明的抗体。

[0057] 适于结合分析的组合物包括,例如,天然表达哺乳动物 CIRP 或其功能性变体的细胞以及表达哺乳动物 CIRP 或其功能性变体的重组细胞。适于结合分析的组合物还包括,包含哺乳动物 CIRP 或其功能性变体的膜制剂。这些膜制剂可包含天然的(例如,质膜)或合成的膜。优选的,膜制剂是含有哺乳动物 CIRP 或其功能性变体的细胞的膜部分。

[0058] 在一个实施方式中,检测和/或鉴定能够结合哺乳动物 CIRP 的试剂(例如抗体)的方法是竞争性结合分析,其中评价待测试剂(例如,抗体)抑制参比试剂(例如,配体或另一种已知特异性的抗体)的结合的能力。例如,可以使用如下所述的合适的标记物对参比试剂进行标记,从而可以确定要饱和测试中存在的 CIRP 所需要的带标记的参比试剂的量。可以将饱和量的带标记的参比试剂和不同量的待测试剂与包含哺乳动物 CIRP 或其功能性变体的组合物在适宜结合和复合物形成被确定的条件下进行接触。可以使用合适的对照(例如,未标记的试剂、单独的标记物)来确定 CIRP 和待测试剂之间形成复合物的特异性。

[0059] 参比或待测试剂与 CIRP 或其片段(包括如上所述免疫原性肽)间复合物的形成可直接或间接地用适宜的方法检测或测定。例如,可将试剂用适宜的标记物标记,从而复合物的形成可通过标记物的检测测定。复合物的特异性可采用适宜的对照(如未标记的试剂或单独的标记物)来测定。适用于试剂与哺乳动物 CIRP 或其功能性变体间形成的复合物的检测中的标记物包括例如放射性同位素、表位、亲和标记物(如生物素、抗生物素蛋白)、自旋标记物、酶、荧光基团或化学发光基团。

[0060] 就用来测定待测试剂如抗体与 CIRP 结合的能力的竞争性结合测定法而论,这种能力可以 50%抑制(IC<sub>50</sub> 值)标记参比试剂的特异性结合所需的待测试剂浓度给出。特异性结合优选定义为总结合(如复合物中的总标记物)减去非特异性结合。非特异性结合优选定义为在过量未标记参比试剂的存在下形成的复合物中仍检测到的标记物的量。适用于该方法中的参比试剂包括特异性地与哺乳动物 CIRP 或其功能性变体结合的分子和化合物,例如 CIRP 的配体或抗体。优选的参比试剂为已知对人 CIRP(SEQ ID NO:1) 片段具有特异性的抗体。

[0061] CIRP 结合试剂可被进一步研究评价其抑制(例如,降低、阻止、中和)一种或多种“CIRP 的生物活性”的能力。如前定义的术语“CIRP 的生物活性”是指 CIRP 受体结合、CIRP 信号传导、CIRP 介导的促炎性细胞因子的释放、CIRP 介导的炎症和/或 CIRP 介导的其它活性。从而,检测这些 CIRP 介导的功能的分析可用于评价待测试剂的活性抑制(例如,待测试剂抑制 CIRP 的一种或多种功能的能力)。

[0062] 对一种试剂(例如,抗体)抑制 CIRP 生物活性的评价可以通过,例如,检测抗体是否抑制哺乳动物细胞促炎性细胞因子的释放来确定。合适的细胞因子的例子包括 TNF、IL-6

或 HMGB1。

[0063] 对于这些方法,细胞可以是能够诱导产生促炎性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、或中性粒细胞。

[0064] 对细胞因子产生的抑制进行评价可以采用任何已知的方法,包括细胞因子定量(例如,通过 ELISA)、或生物分析(例如,确定促炎性细胞因子活性是否被降低)、或检测促炎性细胞因子 mRNA。本领域技术人员可以利用这些分析手段的任何一种而不必进行过度的实验。关于 CIRP 抑制试剂抑制促炎性细胞因子释放的非限制性的实施例参见图 4 和 8。图 8A 显示了在出血动物模型中用抗 -CIRP 抗体处理的血清 TNF 的减少与未治疗的对照进行对比。图 8B-C 显示了在出血动物模型中用抗 -CIRP 抗体处理的组织 TNF 的减少与未治疗的对照进行对比。图 8D-F 显示了在出血动物模型中用抗 -CIRP 抗体处理的 IL-6(例如,血清、肺和肝 IL-6)的减少与未治疗的对照进行对比。

[0065] 另一种检测促炎性细胞因子释放的方法包括用抗体与刺激促炎细胞因子级联反应的试剂一道处理哺乳动物细胞。优选的试剂为细菌脂多糖(LPS)。所述化合物可在所述试剂之前、与所述试剂同时或在所述试剂之后给予哺乳动物细胞。优选所述化合物在所述试剂之前给予。参见例如美国专利 6,610,713,其相关公开在此引入作为参考。

[0066] 可以用于评价 CIRP 抑制的 CIRP 的其它可检测的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盐水平。这些标志物的水平通常在炎性响应期间上升。相对于未处理的对照而言,CIRP 生物活性的抑制剂可以降低在炎性响应动物模型中的一种或多种这些标志物的水平。实施例部分的图 7A-C 给出了评价 CIRP 抑制剂抑制这些标志物释放的方法。图 7A 显示了在出血动物模型中抗 -CIRP 抗体对于 AST 水平的抑制效果与未治疗的对照进行对比。图 8G 显示了在出血动物模型中用抗 -CIRP 抗体处理的肝 MPO 水平的降低与未治疗的对照进行对比。图 7B-C 给出了抗 -CIRP 抗体导致的血清 ALT 和乳酸盐的减少。

[0067] 这些方法可在体内进行,其中,动物如大鼠用所述化合物与刺激促炎细胞因子级联反应的试剂一道处理,并通过例如测定血清 TNF 水平来测定所述试剂对促炎细胞因子级联反应的诱导的影响。但由于用细胞培养物相较用全动物进行这些类型的检测的相对容易性,所述方法优选在体外进行,例如用巨噬细胞培养物。

#### [0068] 治疗方法

[0069] 如在此使用的,“炎性疾病或病症”表示导致个体炎症增加的疾病或病症。炎性疾病或病症也表示感染性疾病或病症,其导致个体炎症增加。所述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、几个月或更久的时间内无法解决的炎性症状。慢性炎性症状可以继发于急性炎性症状,或对于一些疾病或病症而言可以在不存在急性炎性疾病或病症的情况下发生。可选地,炎性症状可以是急性炎症发作的结果。在此使用的“急性炎症发作”是指增加的免疫响应。急性炎症的症状包括发红、发热、肿胀、疼痛、以及功能损失,例如关节移动的损失。例如,慢性炎性疾病或病症的急性炎症发作在以下方面不同于典型的慢性炎性疾病或病症的症状。通常,在急性炎性响应期间,肝合成急性期蛋白质或急性期反应物,其可在血液中检测到。急性期反应物包括 C- 反应蛋白(CRP);  $\alpha$  1- 抗胰蛋白酶;  $\alpha$  1- 抗凝乳蛋白酶;  $\alpha$  2- 巨球蛋白;凝血因子例如纤维蛋白原、纤维蛋白、凝血素、凝血酶、因子 VIII 和纤溶酶原;补充蛋白,以及血清淀粉体蛋白。另外,在急性

炎症发作期间,局部炎性细胞例如中性粒细胞和巨噬细胞向血液中分泌若干细胞因子,最主要的有 IL-1、IL-6、IL-11、HMGB1 和 TNF- $\alpha$  (“细胞因子级联”)。可以施用 CIRP 抑制剂以抑制、降低或另外减轻一些或全部的这些炎性症状的试剂和标志物。

[0070] 可以通过本发明有效治疗的炎性症状的非限制性的例子选自阑尾炎、消化性溃疡、胃溃疡和十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肠梗阻、会厌炎、弛缓不能、胆管炎、胆囊炎、肝炎、惠普耳氏病 (Whipple' s 疾病)、哮喘、变态反应、过敏性休克、免疫复合疾病、器官缺血-再灌注损伤、器官坏死、花粉热、脓毒症、败血病-感染性休克、败血病、内毒素性休克、恶病质、高热、嗜曙红细胞肉芽肿、肉芽肿病、结节病、脓毒性流产、附睾炎、阴道炎、前列腺炎、尿道炎、支气管炎、气肿、鼻炎、肺炎、矽肺病 (pneumoultramicroscopic silicovolcanoconiosis)、肺泡炎 (alveolitis)、细支气管炎、咽炎、胸膜炎、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、弥漫性菌血症、登革热、念珠菌病、疟疾、丝虫病、阿米巴病、包虫囊肿 (hydatid cysts)、血管炎 (vasculitis)、脉管炎、心内膜炎、动脉炎、动脉硬化症、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、乳糜泄、成人呼吸窘迫综合征、慢性阻塞性肺病、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 (thyroiditis)、系统性红斑狼疮、同种异体移植物排异反应、移植物抗宿主疾病、古德帕斯彻氏综合征、白塞氏综合征、强直性脊柱炎、贝格尔氏病、Retier 氏综合征、何杰金氏病、牛皮癣、心肌梗塞、中风、炎性肠病、坏死性肠炎和外伤出血。

[0071] 在另一个实施方式中,炎性症状选自阑尾炎、消化性溃疡、胃溃疡或十二指肠溃疡、腹膜炎、胰腺炎、肝炎、哮喘、变态反应、过敏性休克、器官坏死、花粉热、脓毒症、败血病-感染性休克、败血病、内毒素性休克、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肠梗阻、恶病质、脓毒性流产、弥漫性菌血症、乳糜泄、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、同种异体移植物排异反应、移植物抗宿主疾病、脊髓损伤、瘫痪、牛皮癣、肠缺血-再灌注、肝缺血-再灌注、肾缺血-再灌注、心脏缺血-再灌注、脑缺血-再灌注和四肢缺血-再灌注、心肌梗塞、中风、炎性肠病、坏死性肠炎和外伤出血。

[0072] 在另一个实施方式中,炎性症状选自腹膜炎、胰腺炎、脓毒症、败血病-感染性休克、败血病、内毒素性休克、克罗恩氏病,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、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肠缺血-再灌注、肝缺血-再灌注、肾缺血-再灌注、心脏缺血-再灌注、脑缺血-再灌注和四肢缺血-再灌注、心肌梗塞、中风、炎性肠病、坏死性肠炎、哮喘和外伤出血。

[0073] 可选地,炎性症状选自外伤出血、败血病-感染性休克、肠缺血-再灌注、肝缺血-再灌注、肾缺血-再灌注、心脏缺血-再灌注、脑缺血-再灌注和四肢缺血-再灌注、心肌梗塞、中风、炎性肠病和坏死性肠炎。

#### [0074] 给药方式

[0075] CIRP 抑制剂的给药途径取决于待治疗的疾病。例如,静脉注射对于全身性疾病如脓毒性休克的治疗可能是优选的,而口服对于胃肠道疾病如胃溃疡的治疗可能是优选的。

[0076] 按照所述方法,本发明的一种或多种 CIRP 抗体可通过适宜的途径或单独或与另一种药物联合地给予患者。应给予有效量的试剂(即 CIRP 抑制剂)。“有效量”为给药条件

下足以获得所需治疗或预防效果的量,如足以抑制炎性响应和减轻或治愈炎性症状的量。所述试剂可以单剂量或多剂量给药。剂量可通过本领域内熟知的方法确定并取决于例如所选择的特定试剂、受试者的年龄、药敏性和耐药性、以及整体的健康状态。抗体的适宜剂量可为每次治疗约 0.01mg/kg 到约 100mg/kg 体重。

[0077] 有多种可能的给药途径,包括例如口服、饮食给药、局部给药、经皮给药、直肠给药、肠胃外给药(如静脉、动脉、肌肉、皮下注射、皮内注射)和吸入(如支气管内、鼻内或口腔吸入、鼻内滴入)给药途径,具体取决于试剂和待治疗的病患或疾病。可按指示局部或全身给药。优选的给药方式可随所选择的特定试剂(CIRP 抑制剂)以及待治疗的特定疾病(如病患)而异。静脉内给药、口服或肠胃外给药是优选的。

[0078] 所述试剂可以中性化合物或以药学可接受的盐给药。可通过例如与适宜的有机或无机酸如氯化氢、溴化氢、乙酸、高氯酸等反应获得含胺或其他碱性基团的化合物的盐。具有季铵基团的化合物也含有抗衡阴离子如氯离子、溴离子、碘离子、乙酸根、高氯酸根等。含羧酸或其他酸性官能团的化合物的盐可通过与适宜的碱如氢氧化物碱反应制备。酸性官能团的盐含有抗衡阳离子如钠离子、钾离子等。

[0079] 本文中用到的所公开化合物的“药学可接受的盐”为使本发明的化合物与适合给予受试者的酸或碱反应所得到的含离子键的产物。例如,含胺或其他碱性基团的化合物的酸性盐可通过使化合物与适宜的有机或无机酸如氯化氢、溴化氢、乙酸、高氯酸等反应获得。这类盐的其他实例包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、甲基磺酸盐、硝酸盐、马来酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、酒石酸盐(如(+)-酒石酸盐、(-)-酒石酸盐或其混合物,包括外消旋混合物)、琥珀酸盐、苯甲酸盐以及与氨基酸如谷氨酸的盐。当所述化合物包含酸官能团如-COOH或-SO<sub>3</sub>H时,盐也可与适宜的有机碱形成。适于与本发明的化合物形成药学可接受的碱加成盐的这类碱包括无毒且强度足以与酸官能团反应的有机碱。这类有机碱是本领域内众所周知的,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-甲基葡糖胺、N-甲基哌嗪、吗啉、乙二胺、三(羟甲基)氨基甲烷等。

[0080] 所述试剂可作为包括 CIRP 抑制剂和药学可接受载体的药物组合物的一部分给予个体。

[0081] 本文中用到的“药物组合物”为以适于向受试者给药的形式包含所公开的 CIRP 拮抗剂(例如抗-CIRP 抗体)和药学可接受的稀释剂或载体的制剂。适宜的药学可接受的载体包括惰性固体填充物或稀释剂和无菌水或有机溶液。制剂将随所选择的给药途径而异(如溶液、乳剂、胶囊剂)。适宜的药物载体可含不与 CIRP 促进剂(激动剂)或抑制剂(拮抗剂)相互作用的惰性成分。可采用标准的药物制剂技术,如 Remington's Pharmaceutical Sciences(雷氏药学大全),Mack Publishing Company, Easton, Pa. 中所描述的那些。对于肠胃外给药而言适宜的药物载体包括例如无菌水、生理盐水、抑菌盐水(含约 0.9% mg/ml 苯甲醇的盐水)、磷酸盐缓冲盐水、Hank 溶液、乳酸林格氏(Ringer's)液等。包封组合物(如硬明胶或环状糊精的包衣)的方法是本领域内熟知的(Baker 等人,“Controlled Release of Biological Active Agents”, John Wiley and Sons, 1986)。对于吸入,所述试剂可溶液化并装载于适宜的分药器中(例如雾化器、喷雾器或加压气雾器)。

[0082] 所述药物组合物可呈散剂或单位剂量形式。单位剂量形式可呈任何形式,包括例

如胶囊剂、静脉注射袋、片剂、一次泵送气雾剂或小瓶剂。单位剂量组合物中活性成分（即所公开的化合物或其盐的制剂）的量为有效的量，可随所涉及的特定治疗而异。可以理解，可能有必要根据病人的年龄和状况改变剂量。剂量也将取决于给药的途径。

[0083] 本文中用到的“受试者”包括哺乳动物（如人）、伴侣动物（如狗、猫、鸟等）、家畜（如母牛、羊、猪、马、家禽等）和实验动物（如大鼠、小鼠、豚鼠等）。在所公开方法的优选实施方案中，所述受试者为人。

[0084] 除非另有指出，本发明的实施将采取细胞培养、分子生物学、微生物学、细胞生物学和免疫学的常规技术，其在本领域内是众所周知的。这类技术在文献中有详尽的描述。参见例如 Sambrook 等人, 1989, “Molecular Cloning :A Laboratory Manual (分子克隆 :实验手册)”, Cold Spring Harbor Laboratory Press ;Ausubel 等人 (1995), “Short Protocols in Molecular Biology(精编分子生物学实验指南)”, John Wiley and Sons ;Methods in Enzymology(酶学方法)(若干卷) ;Methods in Cell Biology(细胞生物学方法)(若干卷) 和 Methods in Molecular Biology(分子生物学方法)(若干卷)。

[0085] 本发明的优选实施方案在下面的实施例中描述。根据本文中所公开的本发明的说明书或实施方式，本文权利要求范围内的其他实施方案对于本领域技术人员来说将是显而易见的。该说明书和实施例仅应视为示例性的，本发明的范围和精神由实施例后的权利要求书指定。

## 实施例

[0086] 材料和方法

[0087] 实验动物 :雄性 Sprague-Dawley 大鼠（体重为 275-325g）购自 Charles River Laboratories(Wilmington, MA), 并置于 12 小时光 / 暗循环的控温房间内用标准 Purina 大鼠饲料喂养。在出血休克诱导前，将大鼠禁食过夜，但是允许随意饮水。本实验按照美国国立卫生研究院 (Bethesda, MD) 的实验动物使用指南来进行。本项目已获得 Feinstein Institute for Medical Research(Manhasset, NY) 的 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC) 的批准。

[0088] 出血性休克动物模型 :本实验所用出血性休克模型按之前的详述而略有修改 (Wang P, Hauptman JG, Chaudry IH :Hemorrhage produces depression in microvascular blood flow which persists despite fluid resuscitation. Circ Shock 32 :307-318, 1990. ;Wu R, Dong W, Zhou M, Cui X, Simms H H, Wang P :A novel approach to maintaining cardiovascular stability after hemorrhagic shock :beneficial effects of adrenomedullin and its binding protein. Surgery 137 :2005)。简而言之，使大鼠吸入异氟烷进行麻醉。在小心分离股神经和血管后将导管 (PE-50 管) 置于股静脉和动脉内。在另一侧的股动脉中也插入导管。用一根动脉内置管通过血压分析仪 (Digi-Med, Louisville, KY) 来监控平均动脉压 (MAP) 和心率 (HR), 其它内置管用于抽取血液，静脉管用于体液复苏。在 10min 内使大鼠出血至 MAP 为 40mmHg。通过进一步抽取小体积的血液或提供小体积的乳酸林格氏液维持该压力 90min。在该低血压阶段的最后，用乳酸林格氏液（相当于最大出血体积的 4 倍，大约 60% 的血液体积计算值）复苏大鼠 60 分钟。流出的血液不用于复苏，且实验动物在出血前、出血过程中或出血后不进行肝素化。4h 后，收集血样并置于冰上

进行凝血。然后将样品在 4℃ 下 1200g 离心 10min, 血清样品储存于 -80℃ 直到分析。还收集组织样品并马上存于液氮中, 然后储存于 -80℃ 直到分析。实施假手术的动物进行同样的手术过程但是既不出血也不进行复苏。

[0089] 重组蛋白 (rCIRP): 我们使用了一系列方法用于从细菌表达系统中表达和纯化具有六组氨酸标签 (His-tag) 的重组蛋白。cDNA 如下制备: 通过使用修饰的寡聚 d(T<sub>16</sub>) 引物用 50U 的 MuLV 逆转录酶对 4 μg 的大鼠心脏总组织 RNA 进行逆转录, 如之前所述 (Dwivedi AJ, Wu R, Nguyen E, Higuchi S, Wang H, Krishnasastri K, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P: Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 prevent acute lung injury after gut ischemia-reperfusion. *J Am Coll Surg* 205:284-293, 2007)。为了得到 CIRP 蛋白, 通过 PCR 从 CIRP 的 cDNA 扩增了编码 CIRP 的序列, 其中使用引物: 正义 5' -CACCAT GGC ATC AGA TGA AGG-3' (SEQ ID No. 2) 和反义 5' -CTCGTT GTG TGT AGC ATA GC-3' (SEQ ID No. 3), 对该引物进行合成 (根据 GenBank: NM\_031147, NCBI 进行设计) 并用于分离大鼠 CIRP 克隆。然后用 EcoRV 和 NotI 消化 PCR 产物并克隆至 pENTR 载体, 即, C 末端六组氨酸标签 (His-tag) 系统 (描述于 Invitrogen), 然后作为得到的表达质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3)。CIRP 的诱导表达在数升 BL21 (DE3) 细胞培养物中进行, 然后按照生产商 (Novagen, Madison, WI) 的说明进行 CIRP 的分离和纯化。为了避免不慎发生脂多糖 (LPS) 污染, 我们应用 Triton X-114 萃取以除去可能的内毒素污染, 并使用鲎阿米巴样细胞溶解物 (LAL) 分析 (BioWhittaker Inc, Walkersville, MD) 测定 LPS 的终浓度, 如前所述 (Ertel W, Morrison MH, Wang P, Ba ZF, Ayala A, Chaudry IH: The complex pattern of cytokines in sepsis. Association between prostaglandins, cachectin, and interleukins. *Ann Surg* 214:141-148, 1991)。

[0090] rCIRP 的给药: 对额外的健康正常动物组施用了 rCIRP (1mg/kgBW) 或缓冲液 (等体积, 1ml)。治疗完成 4 小时后, 收集血样并置于冰上进行凝血, 然后在 4℃ 下 1200g 离心 10min, 血清样品储存于 -80℃ 直到分析。还收集组织样品并马上存于液氮中, 然后储存于 -80℃ 直到分析。在另一组出血动物中, 出血动物复苏开始后 15min 通过股静脉管施用 CIRP 抗体 (3mg/kg BW) 或缓冲液 (等体积, 1ml) 45min。治疗完成 1.5 小时后, 如上述收集组织或血液样品。

[0091] 抗 -CIRP 抗体的生产: 通过用纯化的重组 CIRP 以三周或更久的间隔对兔进行注射来根据标准流程生产多克隆抗 CIRP 血清 (Covance Research Products, Denver, PA)。使用固定化的免疫纯化蛋白 -A/G 柱根据供应商的说明 (Pierce, Rockford, IL) 从血清中对抗 -CIRP 抗体的 IgG 进行亲和纯化。抗体滴度通过 96 孔板直接 ELISA 进行测定 (参见 Covance Research Products, Denver, PA 的描述)。纯化的抗体制剂中用鲎阿米巴样细胞溶解物分析 (BioWhittaker) 检测不到 LPS 的存在。

[0092] CIRP 基因表达的检测: 为了确定在出血中 CIRP 基因的表达是否发生变化, 检测了出血组织并通过实时反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 进行定量。对使用鼠白血病毒反转录酶 (Applied Biosystems) 反转录来自 4 μg RNA 的 cDNA 样品进行 Q-PCR。使用 QuantiTect SYBR Green PCR 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA), 反应在 24 μl 的终体积中进行, 其中含有 2pmol 的正义和反义引物, 12 μl 的 QuantiTect Master Mix, 以及 1 μl 的 cDNA。根据 Qiagen 的推荐使用 Applied Biosystems 7300 实时 PCR 仪进行扩增。根据大鼠 G3PDH mRNA 的表达

量对各样品进行归一化,各特定 mRNA 的分析进行两个平行。mRNA 的相对表达使用  $\Delta\Delta Ct$  方法进行计算,其结果以相对于对应的实验对照的倍数变化的形式给出。使用下述大鼠引物: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)。通过 RT-PCR 评价了 TNF- $\alpha$  的基因表达。TNF- $\alpha$  和看家基因的引物如下:大鼠 TNF- $\alpha$ ,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);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),如前所述(Wu R, Zhou M, Wang P:Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 downregulate TNF-alpha in macrophage cell line and rat Kupffer cells. Regul Pept 112:19-26,2003)。

[0093] **蛋白质印迹分析:**使用兔 CIRP 多克隆抗体 (Protein Tech Group, Chicago, IL) 用蛋白质印迹分析检测了 CIRP 蛋白在血清和组织中的表达。简而言之,在 4-12% NuPAGE Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 上将等量的血清 (体积) 和组织匀浆物 (蛋白质 mg/道) 进行分离并转移至硝酸纤维素膜,然后在含有 5% 的脱脂奶粉的 TBST 缓冲液 (10mM Tris-HCl [pH 7.5], 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) 中室温培养 1h 进行封闭。将膜与兔多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 培养过夜。在用 TBST 缓冲液洗涤数次并与辣根过氧化物酶偶联的抗-兔 IgG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) 培养后,根据生产商的说明加入化学发光过氧化物酶底物 (ECL; GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) 并将膜露置于 X-射线胶片。对蛋白质印迹结果进行扫描,使用 GS800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad Image Analysis Systems (Hercules, CA) 对相对谱带强度进行定量。使用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体 (用于胞浆蛋白, Santa Cruz Biotechnology) 确保等量上样。使用兔 HMGB1 多克隆抗体检测大鼠血清 HMGB1 水平,如前所述 (Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science 285:248-251, 1999)。

[0094] **细胞培养:**鼠巨噬细胞样 RAW 264.7 细胞来自 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA), 其培养于含有 10% (v/v) 的 FBS (56 $^{\circ}$ C 热失活 30min)、100U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素和 2mM 谷氨酸的 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基 (DMEM, Life Technologies, Grand Island, NY) 中。在培养基中重悬细胞并在潮湿培养箱中的 6 或 48 孔板上培养过夜 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)。在本实验中,单层细胞在不同指定浓度和指定时间使用或不使用重组 CIRP 进行刺激。无细胞上清液用 ELISA 分析 TNF- $\alpha$  或用蛋白质印迹分析 HMGB1。

[0095] **炎性细胞因子分析:**作为炎性细胞因子级联和急性炎性反应的指标,对于用重组 CIRP 培养的细胞上清液使用商业可获得的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (BioSource International, Camarillo, CA) 根据生产商的说明进行了 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的测定。为了定量血清和组织中的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 蛋白质水平,我们通过心脏穿刺在大鼠死亡时收集

了出血后 4h、或重组 CIRP 治疗 4h 后的动物血清样品,并收集了组织样品,然后通过上述相同的方法继续进行。

[0096] 转氨酶和乳酸盐的血清水平测定:天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、和乳酸盐的血清浓度使用分析试剂盒按照生产商的说明 (Pointe Scientific, Lincoln Park, MI) 进行测定。

[0097] 粒细胞髓过氧化物酶的评价:使用髓过氧化物酶 (MPO) 活性分析对肺部和肝脏组织中积累的嗜中性粒细胞进行了评价,如之前所报道 (Dwivedi AJ, Wu R, Nguyen E, Higuchi S, Wang H, Krishnasastriy K, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P: Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 prevent acute lung injury after gut ischemia-reperfusion. J Am Coll Surg 205:284-293, 2007)。

[0098] 统计分析:全部数据以平均值  $\pm$  SE 的形式表示,并通过单向方差分析 (ANOVA) 和 Student-Newman-Keuls 方法进行比较。存活率使用 Kaplan-Meier 方法进行估测并比较了对数秩检验 (log-rank test)。如果  $P < 0.05$  则认为数值差异显著。

[0099] 结果

[0100] 出血后循环和组织 CIRP 水平的变化:经过实验血液损失 (出血) 的大鼠表现出在不同组织中显著升高的 CIRP 表达。与假手术的对照相比在肝脏中 CIRP 表达增加了  $\sim 5$  倍 (图 2A), 在心脏  $\sim 3$  倍 (图 2B)。蛋白质印迹分析检测发现了出血大鼠的 CIRP 蛋白的高循环水平。出血组表现出明显的免疫活性 CIRP 条带,其在假手术组中没有发现 (图 2C)。与假手术的大鼠相比,出血动物心脏中的 CIRP 蛋白的表达也有所增加 (FIG. 2D), ( $\beta$ -肌动蛋白用于保证相等的上载)。

[0101] 重组 CIRP (rCIRP) 导致健康大鼠的组织损伤:为了考察 rCIRP 在正常动物中的作用,我们对正常健康大鼠施用 rCIRP (1mg/kgBW), 一种从细菌表达系统中纯化的重组蛋白,并检测了 AST 和 ALT (肝损伤指示剂) 的血清水平。用 rCIRP 处理的大鼠表现出 AST (图 3A) 和 ALT (图 3B) 水平的显著提升。这些结果显示 rCIRP 直接导致炎性组织损伤。

[0102] 重组 CIRP (rCIRP) 增加健康大鼠的促炎性细胞因子水平:在注射 rCIRP (1mg/kg BW) 或作为对照的缓冲溶液 (等体积) 后,  $\text{TNF-}\alpha$  的血清水平在 rCIRP 组显著增加,比缓冲液 (空白对照) 组高  $\sim 5$  倍 (图 4A)。rCIRP 给药后在肝 (图 4C 和 D) 和肠 (图 4E 和 F) 中的  $\text{TNF-}\alpha$  基因和蛋白的表达都有增加。图 4B 显示了在施用 rCIRP (1mg/kg BW) 后促炎性细胞因子 HMGB1 的循环水平增加。与空白对照组的弱条带 (两次平行) 相比, rCIRP 处理的大鼠表现出明显强的免疫反应的 HMGB1 条带 (三次平行)。

[0103] rCIRP 刺激巨噬细胞后炎性细胞因子的增加释放:在平行实验中,我们检测了与 rCIRP 一起培养的 RAW 细胞培养物上清液的细胞因子。与重组 CIRP 一起培养的 RAW 细胞培养物上清液中  $\text{TNF-}\alpha$  和 IL-6 水平的增加是剂量和时间依赖性的。如图 5A 所示,剂量为 100ng/ml 的 rCIRP (培养 4h) 显著增加  $\text{TNF-}\alpha$  释放。对于时间进程,剂量为 100ng/ml 的 rCIRP 分别早在培养后 4h 和 2h 即显著增加  $\text{TNF-}\alpha$  和 IL-6 的生产 (图 5C-D)。上清液 HMGB1 水平随着 rCIRP 的刺激以剂量依赖型的方式增加。蛋白质印迹定量显示 RAW 细胞培养释放的 HMGB1 在与剂量为 500ng/ml 的 rCIRP 培养 20h 后增加了  $\sim 6$  倍 (图 5B)。

[0104] 抗-CIRP 抗体提供了出血后的显著存活优势:为了进一步确认 CIRP 是针对各种挑战例如出血等的炎性响应的新型介导体,我们对出血大鼠施用了 CIRP 的特异性抗体 (3mg/

kg BW)。结果显示 CIRP 阻断作用提供了急性血液损失中的显著存活优势。如图 6 所示，抗 -CIRP 抗体处理增加了实验性出血动物的存活率，从 43% 到 85% ( $P < 0.05$ )。

[0105] 抗 -CIRP 抗体减弱了出血后的组织损伤：为了继续考察 rCIRP 在出血响应中的病理生理学结果，我们对出血大鼠施用了 CIRP 的特异性抗体 (3mg/kg BW)。我们的结果显示出血后 AST、ALT 和乳酸盐水平的增加被抗 -CIRP 抗体显著减轻 (降低了 30-40%， $P < 0.05$ ) (图 7A-C)。

[0106] 抗 -CIRP 抗体减弱了出血导致的促炎性细胞因子增加：用 CIRP 特异性抗体 (3mg/kg BW) 的处理显著降低了出血导致的 TNF- $\alpha$  (图 8A) 和 IL-6 (图 8D) 在血清中的上调。在实验性血液缺失 (出血) 的动物的肺和肝中分别观察到了非常相似的 TNF- $\alpha$  (图 8B 和 C) 和 IL-6 (图 8E 和 F) 组织水平的结果。

[0107] 抗 -CIRP 抗体降低了出血后 MPO 的活性增加：MPO (髓过氧化物酶) 被认为是炎症的一般指示物，增加的组织 MPO 活性反映了嗜中性粒细胞的溢出。实验性出血导致了肝部 MPO 的活性增加。我们已经观察到施用抗 -CIRP 抗体后增加的 MPO 被显著降低 (图 8G)。

[0108] 本说明书中引用的全部参考文献在此引入作为参考。

[0001]

序列表

<110> The Feinstein Institute For Medical Research  
Wang, Ping

<120> 通过抑制冷诱导RNA结合蛋白 (CIRP) 治疗炎性疾病

<130> 3268.1019001

<140> PCT/US2010/030824  
<141> 2010-04-13

<150> US 61/212,584  
<151> 2009-04-13

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
<211> 172  
<212> PRT  
<213> 人类

<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 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> 大鼠CIRP编码序列的正义引物

<400> 2  
caccatggca tcagatgaag g 21

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> 大鼠CIRP编码序列的反义引物

<400> 3  
ctcgttgtgt gtagcatagc 20

<210> 4  
<211> 23

[0002]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 测量大鼠CIRP表达水平的正向引物	
<400> 4	
gggtcctaca gagacagcta cga	23
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 测量大鼠CIRP表达水平的反向引物	
<400> 5	
ctggacgcag agggctttta	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 测量大鼠G3PDH表达水平的正向引物	
<400> 6	
atgactctac ccacggcaag	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 测量大鼠G3PDH表达水平的反向引物	
<400> 7	
ctggaagatg gtgatgggtt	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 测量大鼠TNF-alpha表达水平的正向引物	
<400> 8	
cccagaccct cacactcaga	20
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 测量大鼠TNF-alpha表达水平的反向引物	
<400> 9	
gccactactt cagcatctcg	20
<210> 10	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 测量大鼠G3PDH表达水平的正向引物	
<400> 10	
tgaaggtcgg tgtcaacgga tttggc	26

[0003]

<210> 11  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 测量大鼠G3PDH表达水平的反向引物

<400> 11  
catgtaggcc atgaggtcca ccac

24

10            20            30            40            50            60  
MASDEGKLFV GGLSFDTNEQ SLEQVFSKYG QISEVVVKD RETQSRGFG FVTFENIDDA  
70            80            90            100            110            120  
KDAMMAMNGK SVDGRQIRVD QAGKSSDNRS RGYRGGGAGG RGFFRGGRGR GRGFSRGGGD  
130            140            150            160            170  
RGYGGNRFES RSGGYGGSRD YYSSRSQSGG YSDRSSGGSY RDSYDSYATH NE

图 1

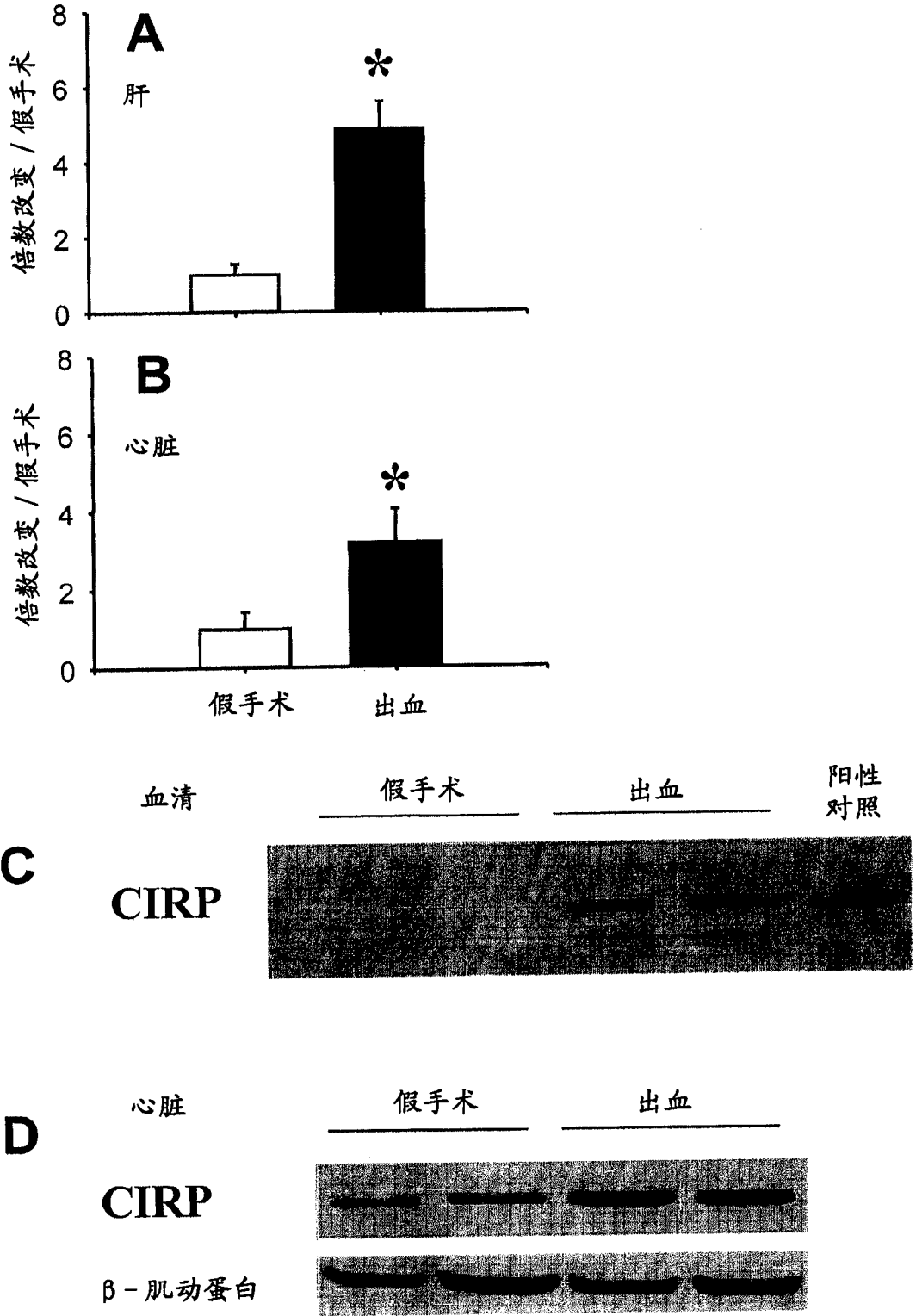


图 2

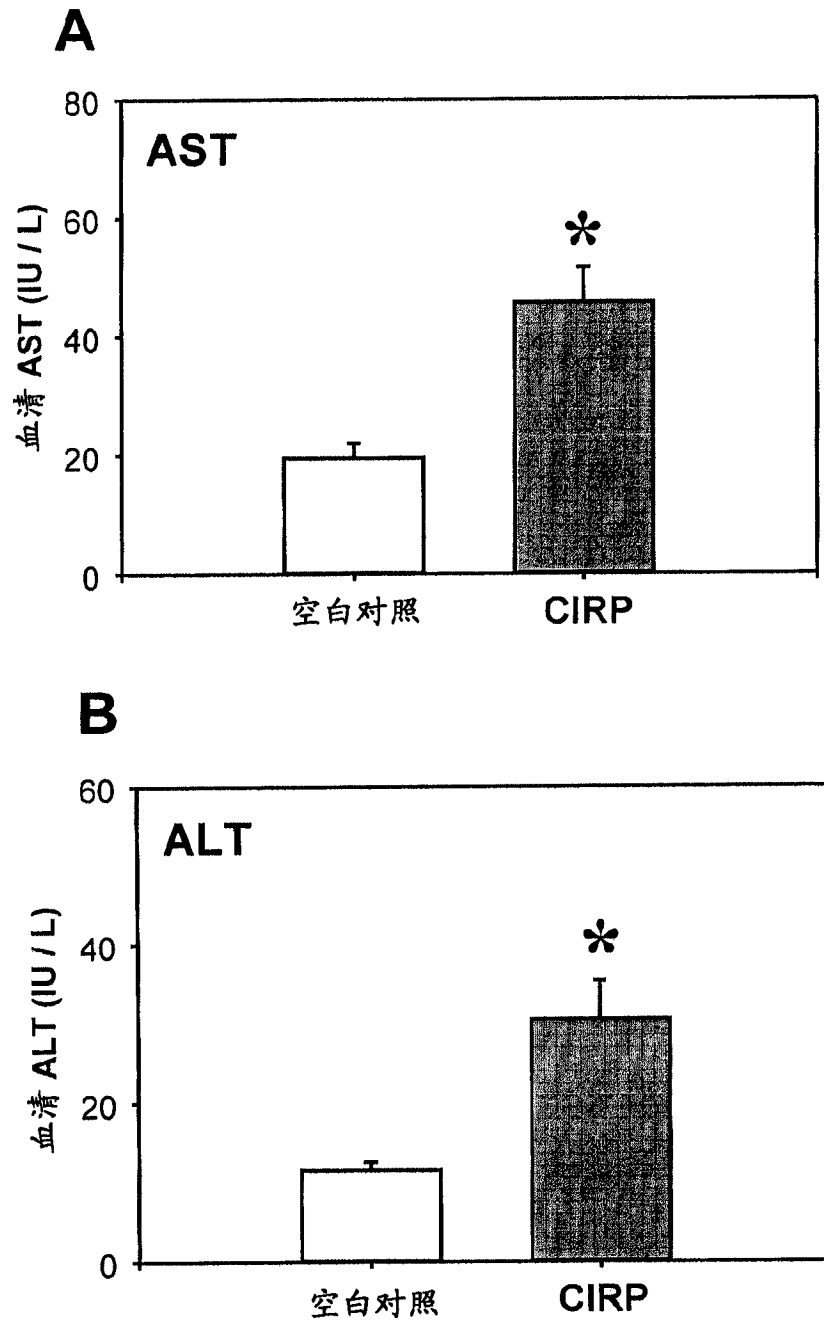


图 3

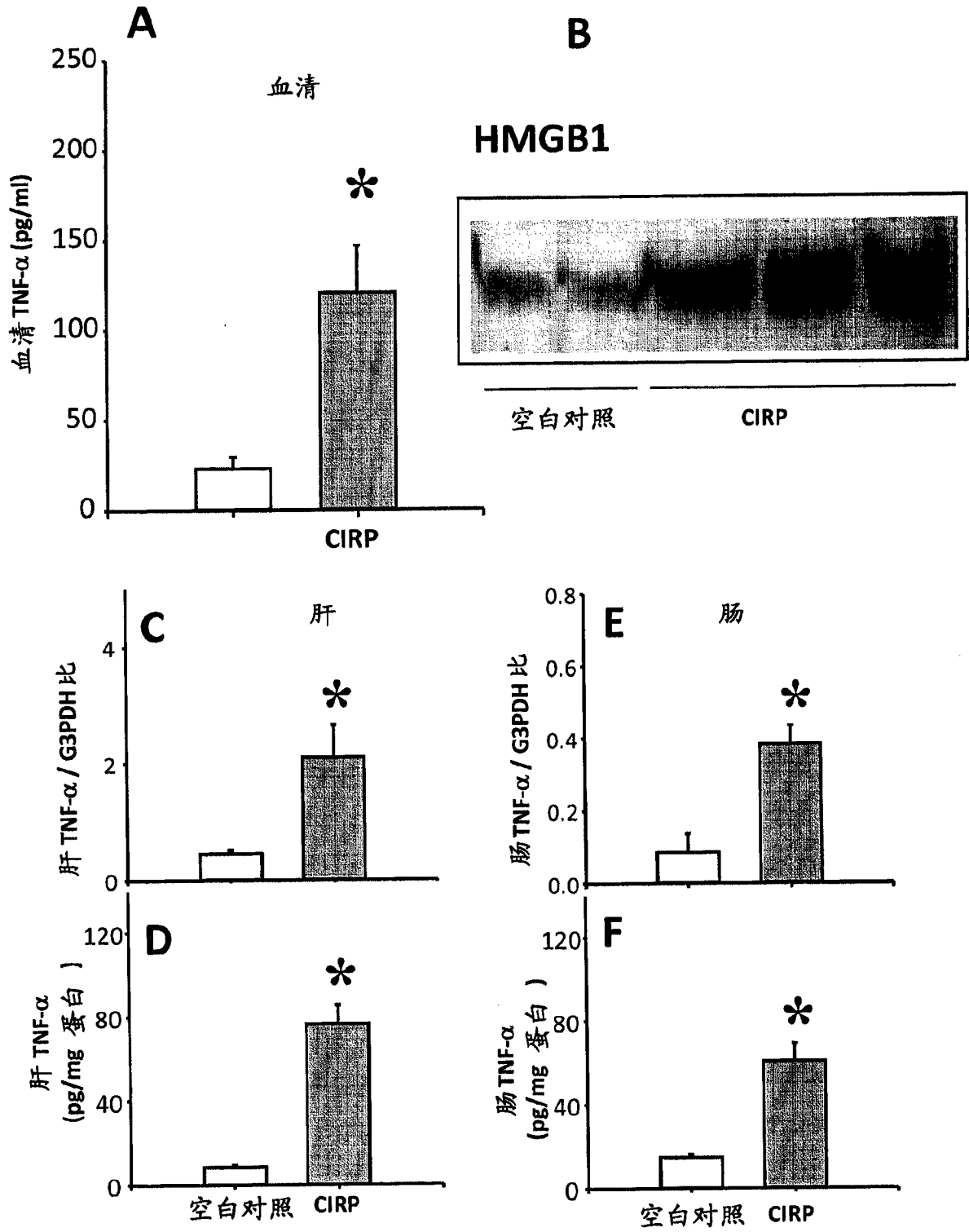


图 4

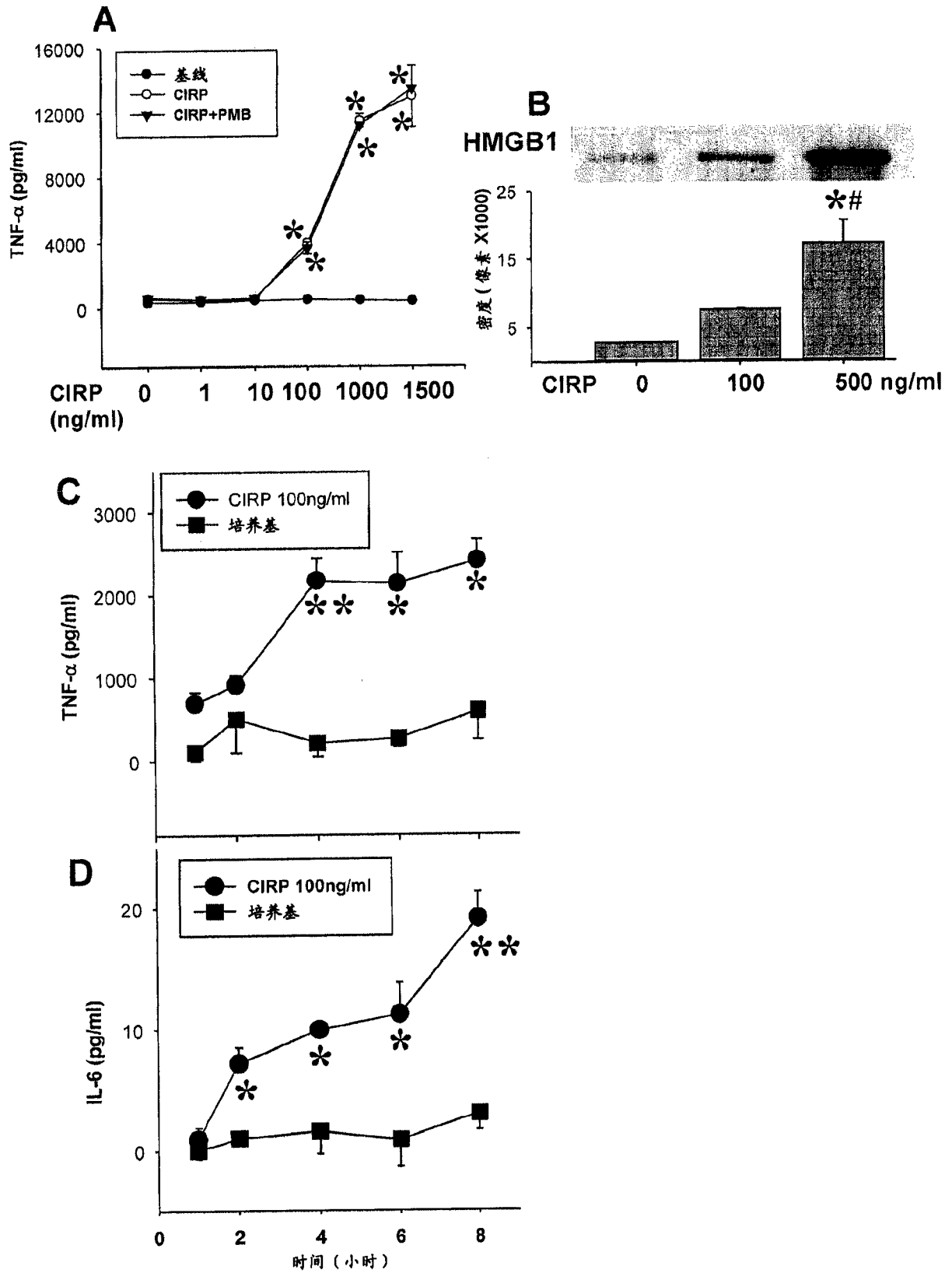


图 5

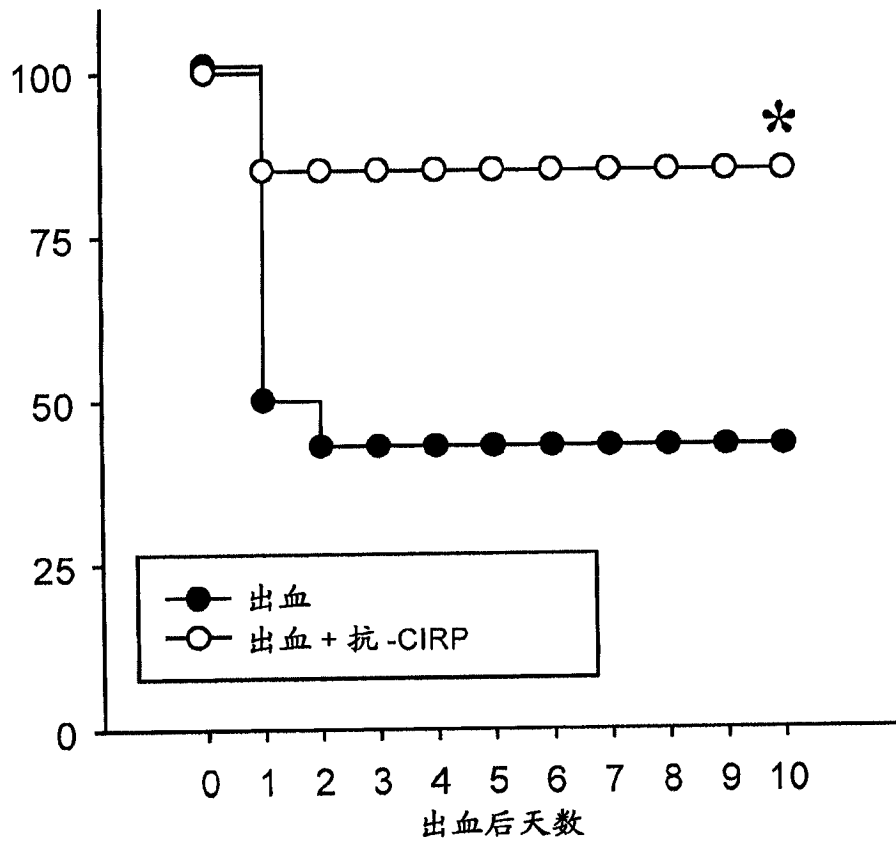


图 6

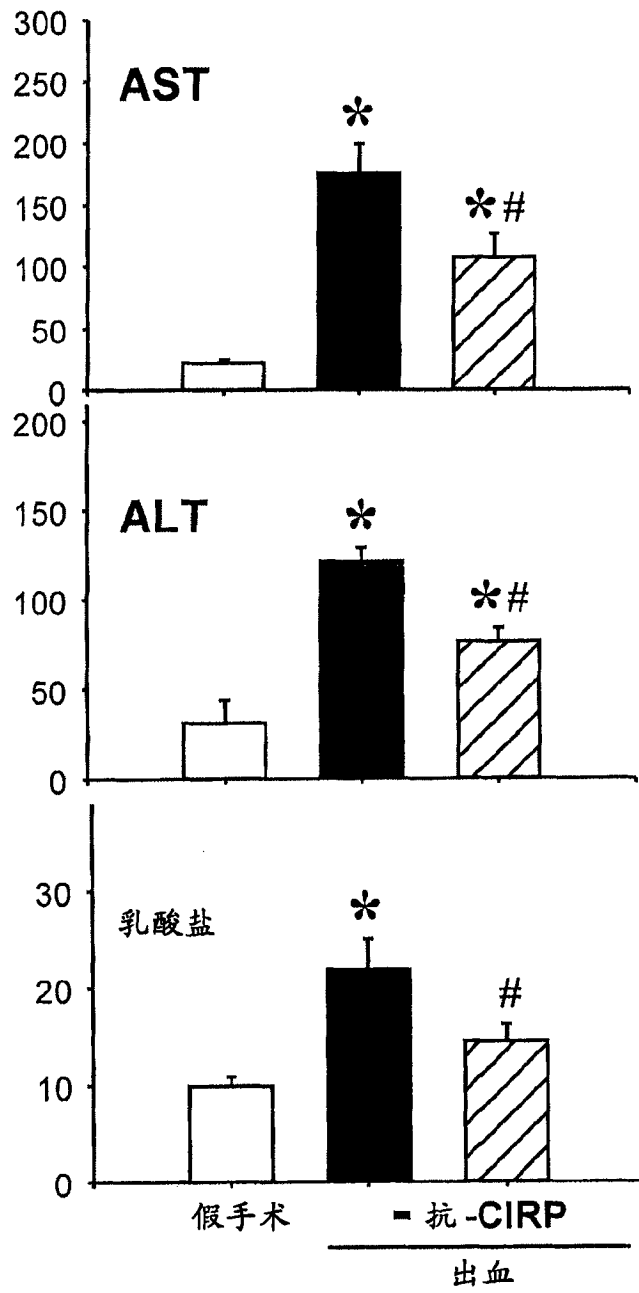


图 7

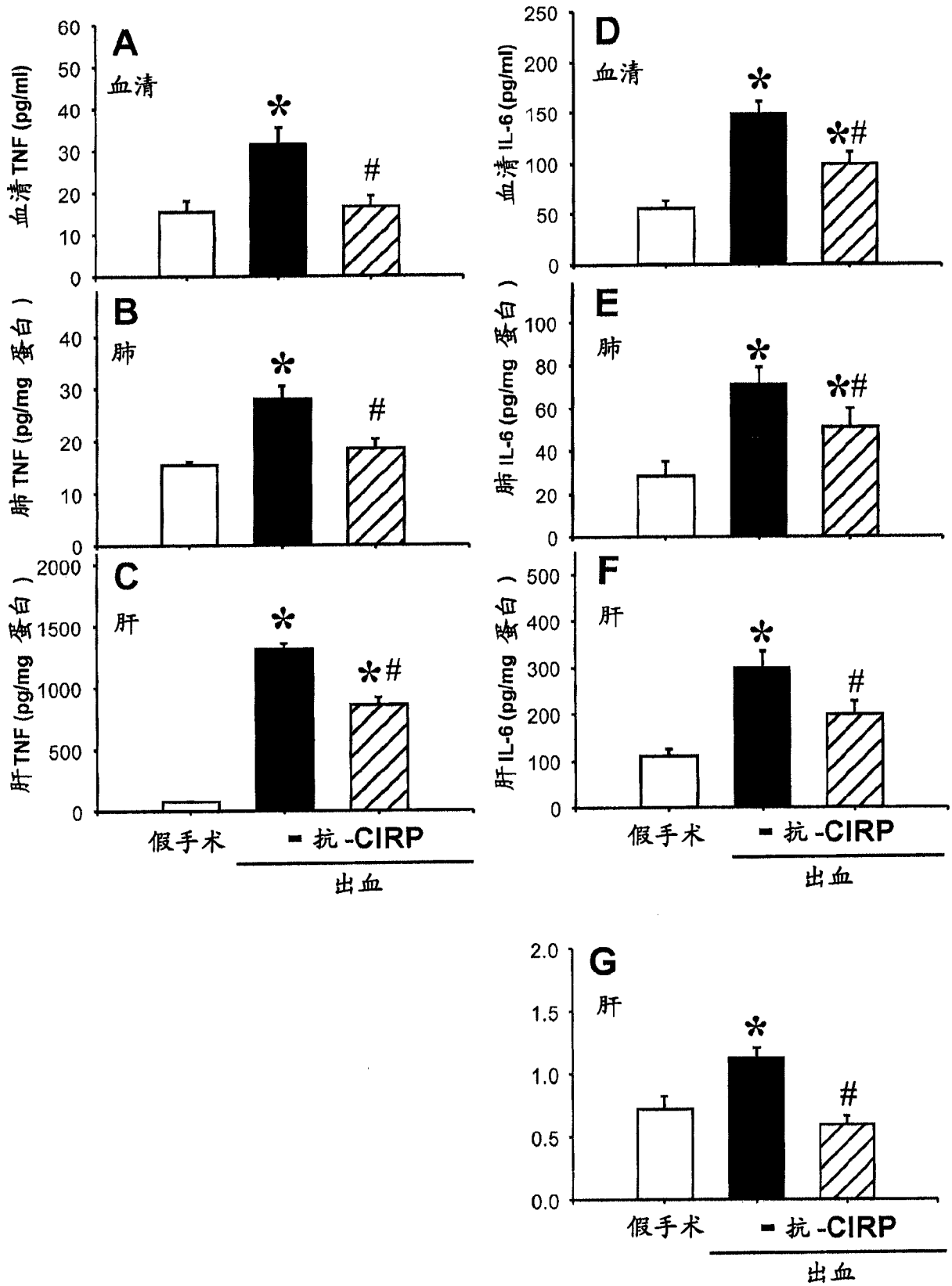


图 8