

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610008506.2

[51] Int. Cl.

*A61K 36/17 (2006.01)*

*A61K 45/06 (2006.01)*

*A61K 8/64 (2006.01)*

*A61P 29/00 (2006.01)*

*A61P 11/00 (2006.01)*

*A61P 13/12 (2006.01)*

[43] 公开日 2006 年 10 月 18 日

[11] 公开号 CN 1846718A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 13/10 (2006.01)*

*A61P 15/02 (2006.01)*

*A61P 31/10 (2006.01)*

*A61P 31/12 (2006.01)*

*A61P 27/02 (2006.01)*

*A61P 33/12 (2006.01)*

*A61P 43/00 (2006.01)*

*A61Q 19/00 (2006.01)*

*G01N 33/68 (2006.01)*

*G01N 33/577 (2006.01)*

[22] 申请日 1998.5.28

[21] 申请号 200610008506.2

分案原申请号 98807702.7

[30] 优先权

[32] 1997. 5.28 [33] US [31] 08/864357

[71] 申请人 克拉拉根有限公司

地址 美国马里兰州

共同申请人 国家卫生协会

[72] 发明人 A·L·皮隆 A·B·姆克赫耶

Z·张

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 8 页 说明书 29 页 附图 7 页

[54] 发明名称

重组人子宫珠蛋白在治疗炎症和纤维变性疾病中的应用

[57] 摘要

公开了使用 UG 体内治疗炎症和纤维变性疾病的方法。还公开了治疗或预防特征在于内源功能性 UG 缺乏的炎症或纤维变性疾病的方法。还提供了包含 UG, 任选包含肺表面活性剂的组合物以及检测 UG - 纤连蛋白复合物的分析法。

1. 一种药物组合物，包含  $\text{PLA}_2$  抑制有效量的重组人子宫珠蛋白 (rhUG) 或其片段或衍生物和药物可接受的载体或稀释剂。
2. 权利要求 1 的药物组合物，进一步包含肺表面活性剂。
3. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 rhUG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。
4. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 rhUG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。
5. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述 rhUG 具有至少 95% 的纯度。
6. 一种药物组合物，包含纤连蛋白结合有效量的重组人子宫珠蛋白 (rhUG) 或其片段或衍生物和药物可接受的载体或稀释剂。
7. 权利要求 6 的药物组合物，进一步包含肺表面活性剂。
8. 权利要求 6 的药物组合物，其中所述 rhUG 具有约 75% 或至 100% 的纯度。
9. 权利要求 6 的药物组合物，其中所述 rhUG 具有约 90% 或至 100% 的纯度。
10. 权利要求 6 的药物组合物，其中所述 rhUG 具有至少 95% 的纯度。
11. 一种药物组合物，包含与治疗靶适应证的活性剂混合的  $\text{PLA}_2$  抑制或纤连蛋白结合有效量的 UG。
12. 权利要求 11 的药物组合物，其中所述  $\text{PLA}_2$  抑制或纤连蛋白结合有效量的 rhUG 减少炎症，从而确保有效量的所述活性剂到达治疗位点。
13. 一种用于在需要该治疗的哺乳动物体内抑制  $\text{PLA}_2$  酶的方法，所述方法包括对所述哺乳动物给药  $\text{PLA}_2$  抑制有效量的天然或重组人子宫珠蛋白 (UG) 或其片段或衍生物。
14. 权利要求 13 的方法，其中所述 UG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。
15. 权利要求 13 的方法，其中所述 UG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。

16. 权利要求 13 的方法，其中所述 UG 具有至少 95 % 的纯度。

17. 权利要求 13 的方法，其中所述 UG 为具有基本上与天然人子宫珠蛋白相同序列的重组(rhUG)。

18. 权利要求 13 的方法，其中所述  $PLA_2$  抑制有效量的 UG 为 20ng/kg 至 500mg/kg。

19. 权利要求 13 的方法，其中所述 UG 与肺表面活性剂一起给药。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述肺表面活性剂以约 20 % 至约 80 % (重量计) 的量存在。

21. 权利要求 13 的方法，其中所述 UG 通过气管内、眼、静脉内、全身、腹膜内、肌肉内或口服途径给药。

22. 权利要求 13 的方法，其中所述 UG 借助于气管内管以液体或半气雾剂给药。

23. 权利要求 13 的方法，其中所述方法用于治疗选自下面的疾病：全身性炎症、哮喘、囊性纤维化、眼炎症、早产分娩、不育症、类风湿性关节炎、I 型糖尿病、肾病、炎性肠病、节段性回肠炎、溃疡性结肠炎、胰腺炎、腹膜炎、变态反应、多器官功能衰竭、ARDS、急性肾衰竭、感染或术后炎症以及移植器官的排斥。

24. 权利要求 23 的方法，其中眼炎症由自身免疫性眼色素层炎和角膜移植手术产生。

25. 权利要求 13 的方法，其中所述方法用于治疗炎症和免疫调节。

26. 一种用于在需要该治疗的病人中治疗或预防炎症疾病的方法，所述方法包括对所述病人给药抗炎有效量的天然或重组 UG 或其片段或衍生物。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述 UG 具有约 75 % 至约 100 % 的纯度。

28. 权利要求 26 的方法，其中所述 UG 具有约 90 % 至约 100 % 的纯度。

29. 权利要求 26 的方法，其中所述 UG 具有至少 95 % 的纯度。

30. 权利要求 26 的方法，其中所述 UG 为具有基本上与天然人子宫珠蛋白相同序列的重组(rhUG)。

31. 权利要求 26 的方法，其中所述  $PLA_2$  抑制有效量的 UG 为

20ng/kg 至 500mg/kg。

32. 权利要求 26 的方法，其中所述 UG 与肺表面活性剂一起给药。

33. 权利要求 32 的方法，其中所述肺表面活性剂以约 20% 至约 80% (重量计) 的量存在。

34. 权利要求 26 的方法，其中所述 UG 通过气管内、眼、静脉内、全身、腹膜内、肌肉内或口服途径给药。

35. 权利要求 26 的方法，其中所述 UG 借助于气管内管以液体或半气雾剂给药。

36. 权利要求 26 的方法，其中所述炎症疾病为新生儿 RDS。

37. 权利要求 26 的方法，其中所述炎症疾病为成人 RDS。

38. 权利要求 26 的方法，其中所述炎症疾病由病毒性感染、细菌感染、寄生虫感染或真菌感染导致。

39. 权利要求 26 的方法，其中所述方法用于治疗选自下面的炎症疾病：全身性炎症、哮喘、囊性纤维化、眼炎症、早产分娩、远器官功能衰竭、类风湿性关节炎、胰腺炎、败血性休克、胶原蛋白血管疾病、过敏性休克、创伤诱导性休克、急性肾衰竭、膀胱炎、尿道炎、输尿管炎症、膀胱炎症、间质膀胱炎、阴道炎、子宫颈炎、盆腔炎、输卵管炎、输尿管炎症、阴茎炎、前列腺炎、曲细精管和曲细小管炎症、睾丸炎症、输精管腺管炎症、副睾炎和前列腺炎、视网膜炎、由于火或化学灼烧导致的损伤、支气管哮喘、ARDS、新生儿 RDS、直肠炎、新生儿坏死性小肠结肠炎、胃溃疡、胃肠回流疾病、扁桃腺炎、中耳炎、牛皮癣、荨麻疹、变态反应性皮炎、接触性皮炎、化学性皮炎、心内膜炎和不育症。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述炎症为由自身免疫眼色素层炎、CMV 视网膜炎、细菌性感染、病毒性感染、寄生虫性感染、感染剂的存在、成视网膜细胞瘤、辐射暴露、变态反应和角膜移植手术导致的眼炎症。

41. 一种治疗或预防需要该治疗的病人纤维变性疾病的方法，所述方法包括向病人给药纤连蛋白结合有效量的天然或重组 UG 或其片段或衍生物。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述 UG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。

43. 权利要求 41 的方法, 其中所述 UG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。

44. 权利要求 41 的方法, 其中所述 UG 具有至少 95% 的纯度。

45. 权利要求 41 的方法, 其中所述 UG 为具有基本上与天然人子宫珠蛋白相同序列的重组(rhUG)。

46. 权利要求 41 的方法, 其中所述纤连蛋白结合有效量的 UG 为 20ng/kg 至 500mg/kg。

47. 权利要求 41 的方法, 其中所述 UG 与肺表面活性剂一起给药。

48. 权利要求 47 的方法, 其中所述肺表面活性剂以约 20% 至约 80% (重量计) 的量存在。

49. 权利要求 41 的方法, 其中所述 UG 通过气管内、眼、静脉内、全身、腹膜内、肌肉内或口服途径给药。

50. 权利要求 41 的方法, 其中所述 UG 借助于气管内管以液体或半气雾剂给药。

51. 权利要求 41 的方法, 其中所述纤维变性疾病为肺纤维变性。

52. 权利要求 41 的方法, 其中所述纤维变性疾病为肾纤维变性。

53. 权利要求 41 的方法, 其中所述纤维变性为血管纤维变性。

54. 一种治疗或预防特征性在于内源性 UG 缺乏的炎症或纤维变性疾病的方法, 所述方法包括对需要该治疗的病人给药补偿量的天然或重组 UG 或其片段或衍生物。

55. 权利要求 54 的方法, 其中所述 UG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。

56. 权利要求 54 的方法, 其中所述 UG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。

57. 权利要求 54 的方法, 其中所述 UG 具有至少 95% 的纯度。

58. 权利要求 54 的方法, 其中所述 UG 为具有基本上与天然人子宫珠蛋白相同序列的重组(rhUG)。

59. 权利要求 54 的方法, 其中所述补偿量的 UG 为 20ng/kg 至 500mg/kg。

60. 权利要求 54 的方法, 其中所述 UG 与肺表面活性剂一起给药。

61. 权利要求 60 的方法, 其中所述肺表面活性剂以约 20% 至约 80% (重量计) 的量存在。

62. 权利要求 54 的方法, 其中所述 UG 通过气管内、眼、静脉内、全身、腹膜内、肌肉内或口服途径给药。

63. 权利要求 54 的方法, 其中所述 UG 借助于气管内管以液体或半气雾剂给药。

64. 权利要求 54 的方法, 其中所述方法用于治疗特征在于内源性 UG 缺乏的炎症或纤维变性疾病, 其中所述疾病选自新生儿支气管肺发育不良、血液透析并发症、博来霉素肺慢性阻塞性肺病和遗传性肾小球肾病。

65. 权利要求 26 的方法, 其中 UG 与选自下面的活性剂混合给药: 类固醇、非类固醇抗炎剂、化疗剂、镇痛药、抗体、抗寄生虫剂、抗病毒剂、抗生素、抗真菌剂、疫苗、肿瘤疫苗、免疫抑制剂、造血生长因子、抗凝剂、心血管药物、一种或多种维生素和矿物质补充物和生育药物。

66. 权利要求 44 的方法, 其中 UG 与选自下面的活性剂混合给药: 类固醇、非类固醇抗炎剂、化疗剂、镇痛药、抗体、抗寄生虫剂、抗病毒剂、抗生素、抗真菌剂、疫苗、肿瘤疫苗、免疫抑制剂、生长因子、抗凝剂、心血管药物、一种或多种维生素和矿物质补充物和生育药物。

67. 权利要求 54 的方法, 其中 UG 与选自下面的活性剂混合给药: 类固醇、非类固醇抗炎剂、化疗剂、镇痛药、抗体、抗寄生虫剂、抗病毒剂、抗生素、抗真菌剂、疫苗、肿瘤疫苗、免疫抑制剂、生长因子、抗凝剂、心血管药物、一种或多种维生素和矿物质补充物和生育性药物。

68. 一种化妆品组合物, 包含 PLA<sub>2</sub> 抑制有效量的天然或重组人子宫珠蛋白 (UG) 或其片段或衍生物和药物可接受载体或稀释剂。

69. 权利要求 68 的化妆品组合物, 进一步包含肺表面活性剂。

70. 权利要求 68 的化妆品组合物, 其中所述 UG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。

71. 权利要求 68 的化妆品组合物, 其中所述 UG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。

72. 权利要求 68 的化妆品组合物, 其中所述 UG 具有至少 95% 的纯度。

73. 一种化妆品组合物, 包含纤连蛋白结合有效量的天然或重组人子宫珠蛋白 (UG) 或其片段或衍生物和可接受载体或稀释剂。

74. 权利要求 73 的化妆品组合物, 进一步包含肺表面活性剂。

75. 权利要求 73 的化妆品组合物, 其中所述 UG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。

76. 权利要求 73 的化妆品组合物, 其中所述 UG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。

77. 权利要求 73 的化妆品组合物, 其中所述 UG 具有至少 95% 的纯度。

78. 一种血液补充物, 包含  $\text{PLA}_2$  抑制有效量的天然或重组人子宫珠蛋白 (UG) 或其片段或衍生物和药物可接受载体或稀释剂。

79. 权利要求 78 的血液补充物, 进一步包含肺表面活性剂。

80. 权利要求 78 的血液补充物, 其中所述 UG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。

81. 权利要求 78 的血液补充物, 其中所述 UG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。

82. 权利要求 78 的血液补充物, 其中所述 UG 具有至少 95% 的纯度。

83. 一种血液补充物, 包含纤连蛋白结合有效量的天然或重组人子宫珠蛋白 (UG) 或其片段或衍生物和药物可接受载体或稀释剂。

84. 权利要求 83 的血液补充物, 进一步包含肺表面活性剂。

85. 权利要求 83 的血液补充物, 其中所述 UG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。

86. 权利要求 83 的血液补充物, 其中所述 UG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。

87. 权利要求 83 的血液补充物, 其中所述 UG 具有至少 95% 的纯度。

88. 一种用于定量临床样品中子宫珠蛋白-纤连蛋白复合物的分析法, 其中将推测包含一种或多种子宫珠蛋白-纤连蛋白复合物的临床样品

(a) 与抗原捕获剂接触,

(b) 将抗原检测剂加入至所述样品中, 和

(c)使用次生抗体检测与所述捕获剂结合的任何复合物的存在,其中次生抗体与能通过加入与所述化学部分反应的化合物而得以检测的部分缀合。

89. 权利要求 88 的分析法, 其中所述抗原捕获剂为固定在不溶性载体中的单特异性的兔多克隆抗体。

90. 权利要求 88 的分析法, 其中次生抗体为与酶结合的抗 IgG 抗体, 其中与化学部分反应的化合物为在与酶反应时被转化为发色或荧光化合物的酶底物。

91. 权利要求 90 的分析法, 其中酶为辣根过氧化物酶。

92. 权利要求 88 的分析法, 其中抗原检测剂为纤连蛋白特异性抗体。

93. 一种治疗或预防需要这种治疗的病人原纤维形成的方法, 所述方法包括对病人给药纤连蛋白结合有效量的天然或重组 UG 或其片段或衍生物的步骤。

94. 权利要求 93 的方法, 其中所述 UG 具有约 75% 至约 100% 的纯度。

95. 权利要求 93 的方法, 其中所述 UG 具有约 90% 至约 100% 的纯度。

96. 权利要求 93 的方法, 其中所述 UG 具有至少 95% 的纯度。

97. 权利要求 93 的方法, 其中所述 UG 为具有基本上与天然人子宫球蛋白相同序列的重组(rhUG)。

98. 权利要求 97 的方法, 其中所述纤连蛋白结合有效量的 UG 为 20ng/kg 至 500mg/kg。

99. 权利要求 97 的方法, 其中所述 UG 与肺表面活性剂一起给药。

100. 权利要求 99 的方法, 其中所述肺表面活性剂以约 20% 至约 80% (重量计) 的量存在。

101. 权利要求 93 的方法, 其中所述 UG 通过气管内、眼、静脉内、全身、腹膜内、肌肉内或口服途径给药。

102. 权利要求 93 的方法, 其中所述 UG 借助于气管内管以液体或半气雾剂给药。

103. 权利要求 93 的方法, 其中所述纤维变性疾病为肺纤维变性。

104. 权利要求 93 的方法, 其中所述纤维变性疾病为肾纤维变性。

105. 权利要求 93 的方法，其中所述纤维变性疾病为血管纤维变性。

106. 权利要求 38 的方法，其中所述病毒感染为 CMV 视网膜炎。

107. 权利要求 38 的方法，其中所述细菌感染为肺炎或膀胱炎。

108. 权利要求 38 的方法，其中所述寄生虫性感染为血吸虫病。

109. 权利要求 38 的方法，其中所述真菌感染为阴道念珠菌病。

## 重组人子宫珠蛋白在治疗炎症和纤维变性疾病中的应用

本申请是申请日为1998年5月28日的中国专利申请98807702.7“重组人子宫珠蛋白在治疗炎症和纤维变性疾病中的应用”的分案申请。

本发明为美国申请系列号 08/864,357 的部分系列申请,其公开被本文引作参考。

### 技术领域

本发明通常涉及使用天然人子宫珠蛋白(hUG)或重组人子宫珠蛋白(rhUG)对炎症和纤维变性疾病的治疗。已证实了UG(hUG或rhUG)的新的生理作用和疗法。具体地说,本发明涉及通过给药hUG或rhUG抑制PLA<sub>2</sub>和/或预防纤连蛋白沉积来治疗炎症和纤维变性疾病。本发明进一步提供一种治疗为严重的肺临床疾病的新生儿呼吸窘迫综合征(RDS)和支气管肺发育不良(BPD)以及为一种肾病的肾小球肾病,这两种疾病的特征均在于炎症和纤维变性疾病。

本申请所引用的参考文献涉及本发明所涉及的现有技术的状况,其均被本文引作参考。

### 背景技术

#### 炎症和纤维变性疾病

近些年来,对改进的用于治疗炎症和纤维变性疾病的治疗剂的研究已受到广泛的注意。为肺表面活性剂缺乏疾病的新生儿RDS为尤其令人感兴趣的一种疾病,因为它是早期新生儿死亡的一个主要原因。虽然引入表面活性剂的治疗显著地增加了RDS病人的存活率,但这类病人人群中有很高比例的人出现慢性炎症和纤维变性疾病是一个主要问题。同样,当病人肾被阻塞并不再过滤血液时,遗传性纤连蛋白沉积肾小球肾病导致晚期肾衰竭。肾病的特征在于纤连蛋白沉积和肾的纤维化,这使得器官丧失功能并最终不能维持生命。

PLA<sub>2</sub>(磷脂酶A<sub>2</sub>),一类水解甘油磷脂Sn2位置酯键的内源性酶,是涉及炎症和纤维变性疾病的许多蛋白中的一种。它还负责肺内表面活性剂磷脂的水解。子宫珠蛋白(还称作CC10、CC16、CC17、尿蛋白-1、P-1、孕酮结合蛋白、PCB-结合蛋白、克拉拉细胞分泌蛋白(CCSP)、

胎动素、视黄醛结合蛋白、磷脂结合蛋白和 $\alpha 2$  微珠蛋白)在体外抑制 PLA<sub>2</sub> 的活性。

子宫珠蛋白为小的球状同型二聚体蛋白。它具有 15.8kDa 的分子量，但它在凝胶电泳中以相当于 10kDa 的大小迁移。人子宫珠蛋白在成人肺中为大量的，包含高达全部可溶性蛋白的约 7%。然而，它的表达在发育的人胎儿中并未完全活化直至妊娠后期。结果，早产婴儿的细胞外肺液包含比成人肺液少得多的 UG。UG 还由胰腺表达。

由于它们从细胞磷脂库中释放花生四烯酸(AA)，因此 PLA<sub>2</sub> 在炎症反应中起着关键的作用。AA 在称为花生四烯酸级联的过程中被代谢为大量可能的炎症介体。

通过升高的血清或局部 PLA<sub>2</sub> 活性已确定一些急性和慢性临床疾病(参见下面表 1)。

表 1. 与 PLA<sub>2</sub> 活性相关的临床疾病

| 疾病        | 部位        |
|-----------|-----------|
| 类风湿性关节炎   | 血清，滑液，WBC |
| 胶原血管疾病    | 血清        |
| 胰腺炎       | 血清        |
| 腹膜炎       | 腹膜液和细胞    |
| 败血性休克     | 血清        |
| ARDS*     | 血清和肺泡液    |
| 急性肾衰竭     | 血清        |
| 自身免疫眼色素层炎 | 血清，房水     |
| 支气管哮喘     | 支气管液      |

\*成人呼吸窘迫综合征

目前没有有效的可用于临床应用的 PLA<sub>2</sub> 抑制剂。至今，仅一些 PLA<sub>2</sub> 抑制剂已进入临床试验，但均未获准用于商业销售。

纤连蛋白(Fn)为以一些不同形式存在并由不同组织分泌的 200kDa 糖蛋白。Fn 为一种必需的蛋白，并且在小鼠中 Fn 基因的靶定破坏表明它在胚胎发生中具有关键作用。Fn 还在炎症、细胞粘附、组织修复和纤维变性中起着关键的作用，并在损伤部位沉积。血浆纤连蛋白(pFn)由肝脏分泌并在血浆中循环。在肺中，细胞 Fn(cFn)在炎症

和损伤时分泌。两种类型的 Fn 是炎症细胞和成纤维细胞的趋化因子。炎症发生期间,大量的炎症细胞和成纤维细胞渗入肺,这可导致肺纤维变性和最终死亡。在人临床疾病,如新生儿 RDS 和 BPD 等肺部疾病以及肾小球肾炎等肾脏疾病中已检测到升高水平的 Fn。

#### UG 的作用

纯化的人 UG 的氨基酸分析表明它与其它“UG 样”蛋白,如兔 UG 的结构类似但不相同。人与兔 UG 之间 70 个氨基酸中 39 个相同(参见图 1)。“UG 样”蛋白,包括人 UG/CC10、大鼠 CC10、小鼠 CC10 和兔 UG 显示种特异性和组织特异性抗原差异以及它们的组织分布和体外生化活性的不同。根据组织和来源种类,在许多不同的文章中描述了 UG 样蛋白,包括大鼠肺、人尿、痰、血液成分、兔子宫、大鼠和人前列腺和人肺。目前,仍未知这些蛋白的生理作用。

尽管多年的研究,这些蛋白在体内的生物学作用仍然不清楚。UG 样蛋白之间缺乏结构的相同性使得不可能根据某蛋白在体外或其它由结构相关蛋白显示的活性来预测其是否在人体内将具有治疗功效。例如,兔 UG 与 5% 的孕酮结合,而在相同试验中,人子宫珠蛋白结合的孕酮的量小于 5%。人 UG 具有比兔 UG (5.4) 低的等电点 (4.6)。

Stripp 等 (1996) 报道了关于被制备用来消除子宫珠蛋白的表达的子宫珠蛋白剔除小鼠的研究。该小鼠具有克拉拉细胞,其中该细胞显示不定的细胞内结构来代替子宫珠蛋白分泌颗粒,但没有其它表型。这种观察结果极其重要,因为预测了伴随有肺炎症和纤维变性的肺功能。而且,这种剔除小鼠没有显示肾、胰腺或生殖异常,这表明子宫珠蛋白在体内控制炎症或纤维变性中不具有显著的作用。

#### 发明内容

因此,本发明的一个目的是提供包含 PLA<sub>2</sub> 抑制有效量的重组人子宫珠蛋白 (rhUG) 或其片段或衍生物以及药物可接受载体或稀释剂的药物组合物。

本发明的另一个目的是提供包含纤连蛋白结合有效量的重组人子宫珠蛋白或其片段或衍生物以及药物可接受载体或稀释剂的药物组合物。

本发明的另一个目的是提供包含 PLA<sub>2</sub> 抑制或纤连蛋白结合有效量的用于治疗靶适应证的活性剂的药物组合物。

而且,本发明的一个目的是提供一种在需要这种治疗的哺乳动物体内抑制 PLA<sub>2</sub> 酶的方法,其中该方法包括对哺乳动物给药 PLA<sub>2</sub> 抑制有效量的天然或重组人子宫珠蛋白或其片段或衍生物。

进一步,本发明的一个目的是提供一种在需要这种治疗的病人中治疗或预防炎症疾病的方法,其中该方法包括给药抗炎有效量的天然或重组人子宫珠蛋白或其片段或衍生物。

本发明的一个目的是提供一种在需要这种治疗的病人中治疗或预防纤维变性疾病的方法,其中该方法包括给药纤连蛋白结合有效量的天然或重组人子宫珠蛋白或其片段或衍生物。

本发明的另一个目的是提供一种治疗或预防特征在于内源 UG 缺乏的炎症或纤维变性疾病的方法,其中该方法包括给药补偿量的天然或重组人子宫珠蛋白或其片段或衍生物。

本发明的另一个目的是提供一种包含 PLA<sub>2</sub> 抑制或纤连蛋白结合有效量的天然或重组人子宫珠蛋白或其片段或衍生物的化妆品组合物。

另外,本发明的一个目的是提供一种包含 PLA<sub>2</sub> 抑制或纤连蛋白结合有效量的天然或重组人子宫珠蛋白或其片段或衍生物的血液补充物。

最后,本发明的一个目的是提供临床样品中子宫珠蛋白纤连蛋白复合物的定量分析法。

## 发明概述

现已发现子宫珠蛋白在体内抑制 PLA<sub>2</sub> 和预防纤连蛋白沉积和纤维变性中起关键的生理作用。在新品系的转基因子宫珠蛋白“剔除”小鼠和涉及肺炎症和纤维变性的新生儿呼吸窘迫综合征(RDS)的猴模型中进行的结合实验中证实了这些作用。本发明的子宫珠蛋白剔除小鼠(下文称“UG KO 小鼠/小鼠”)在早期和晚期发作疾病时分别显示致死的肾小球肾病和肾实质纤维变性。对正常的小鼠给药外源 Fn 导致 Fn 在肾中的沉积,但给药等摩尔量的 Fn 和 rhUG 未导致沉积。

已证实在存在 rhUG 时 PLA<sub>2</sub> 在体内活性降低。在第一个实验中,UG KO 小鼠的表型表明与具有功能性 UG 基因的同窝幼畜中的 PLA<sub>2</sub> 活性相比,在不存在 UG 时,血清 PLA<sub>2</sub> 活性显著升高。在第二个实验中,对患有 RDS 的早产猴给药 rhUG 显示在肺的细胞外液中抑制 PLA<sub>2</sub> 活性。

其它实验证实在体外 PLA<sub>2</sub> 可降解用于治疗 RDS 的人工表面活性剂

(通常为 Survanta), 并且 UG 可抑制这种降解。这些实验证实在气管内或静脉内给药后, 在体内 UG 介导 PLA<sub>2</sub> 抑制和 Fn 沉积。

使用子宫珠蛋白剔除小鼠的实验证实 rhUG 可用来治疗其中子宫珠蛋白被发现缺乏或蛋白本身具有导致功能丧失的突变的疾病。现已发现 rhUG 可用来治疗或预防其中在循环中或炎症或纤维变性位点功能性内源子宫珠蛋白缺乏的炎症或纤维变性疾病。在一些肺炎症或纤维变性疾病中发现血清和/或支气管-肺泡渗出液中的 hUG 水平降低, 包括处于发展成新生儿 BPD 的危险中的早产婴儿。发现 UG 可用来补充缺乏或缺陷性内源子宫珠蛋白以预防或治疗这些炎症和纤维变性疾病。

根据一个方面, 本发明提供一种体内治疗炎症疾病的方法, 包括对需要这种治疗的病人给药抗炎有效量的 UG。

根据另一个方面, 本发明提供一种体内抑制可溶性 PLA<sub>2</sub> 酶的方法, 包括对需要这种治疗的病人给药 PLA<sub>2</sub> 抑制有效量的 UG。

根据另一个方面, 本发明提供一种治疗或预防纤维变性疾病的方法, 它包括对需要这种治疗的病人给药纤连蛋白结合有效量的 UG。

本发明的另一个方面提供一种通过加入纤连蛋白结合量的 UG 治疗或预防原纤维形成的方法。

根据另一个方面, 本发明提供一种治疗或预防特征在于内源功能性 UG 缺乏的炎症或纤维变性疾病的方法, 它包括对需要这种治疗的病人给药补偿量的 UG。

本发明还提供包含有效量的 rhUG 与药物可接受载体或稀释剂的药物组合物。该组合物可为可注射溶液剂的形式和用于气管内给药的液体或半气雾剂的形式。

根据另一个方面, 本发明提供包含 UG 和肺表面活性剂(例如 Survanta(来自 Abbott 实验室的牛肺提取物)和 Exosurf(来自 Glaxo-Wellcome 的化学合成肺表面活性剂))以及药物可接受的载体或稀释剂的药物组合物。

本发明还包括包含 PLA<sub>2</sub> 抑制或纤连蛋白结合有效量的 rhUG、治疗靶适应证的活性剂和载体的药物组合物。PLA<sub>2</sub> 抑制或纤连蛋白结合有效量的 rhUG 减少炎症, 并从而确保有效量的活性剂到达治疗部位。

另一个方面, 本发明提供定量临床样品中子宫珠蛋白纤连蛋白复合物的分析法, 其中将怀疑包含子宫珠蛋白-纤连蛋白复合物的临床样

品与抗原捕获剂接触，例如固定在不溶载体上的单特异性的兔多克隆抗体；向样品中加入抗原检测剂，例如纤连蛋白特异性抗体；使用例如次生抗体检测与载体结合的任何复合物的存在，其中次生抗体为例如使用标准酶反应与诸如辣根过氧化物酶缀合的抗-IgG 抗体，其中酶底物被转化为可使用标准分光光度或荧光设备定量的产色或荧光化合物。

本发明还提供包含 PLA<sub>2</sub> 抑制和/或纤连蛋白结合有效量的人子宫珠蛋白和药物可接受的载体或稀释剂的化妆品组合物或血液补充物。

#### 附图说明

参考附图将更详细地描述本发明，其中：

图 1 示 UG 样蛋白的顺序；

图 2A 示转基因 UG 剔除小鼠的预期的靶定构建物；限制位点为 B-BamIII, E = EcoRI, H = HindIII；

图 2B-2D 示通过 PCR 和蛋白质印迹分析证实转基因胚胎的后代中的基因构建物；(B)靶定的 ES R1 细胞克隆的蛋白质印迹分析，其中 Wt = 野生型；(C)来自后代的尾生物样品的基因组 DNA 的代表性的 PCR 分析；基因型和其对应的 PCR 产物如下：UG<sup>+/+</sup>, 304bp；UG<sup>+/-</sup>, 304 和 667bp；UG<sup>-/-</sup>, 667bp；(D)小鼠尾基因组 DNA 的蛋白质印迹分析；图 2E 示通过 RT-PCR 分析证实 UG<sup>-/-</sup>小鼠的肺组织中不存在 UG-mRNA；从具有 UG<sup>+/+</sup>, UG<sup>+/-</sup>和 UG<sup>-/-</sup>基因型的同窝幼畜的肺组织中提取的全部 RNA 的 RT-PCR 分析；在基因型为 UG<sup>+/+</sup>和 UG<sup>+/-</sup>的肺中可检测 273bp RT-PCR 产物，但在 UG<sup>-/-</sup>小鼠的肺中缺乏；图 2F 显示通过蛋白质印迹分析证实 UG<sup>-/-</sup>小鼠的肺中不存在 UG 蛋白；来自肺裂解物的蛋白(各 30mg)通过非还原条件下使用 4-20%梯度的 SDS-PAGE 电泳解析并使用兔抗-小鼠 UG 进行免疫印迹；图 2G 显示使用免疫组织化学法证实 UG<sup>-/-</sup>小鼠的肺组织切片中的支气管上皮细胞中不存在 UG；UG<sup>+/+</sup>小鼠支气管上皮细胞(上面的列)上的黑色染色表明 UG 的免疫反应性；注意在 UG<sup>-/-</sup>小鼠肺(下面的列)不存在免疫反应性。

图 3A-3J 比较来自正常和 UG<sup>-/-</sup>小鼠的肾切片的组织病理学分析，显示仅在剔除小鼠中有异常实质纤维变性和肾小球 Fn 沉积；来自 UG<sup>+/+</sup>(A)和其 UG<sup>-/-</sup>(B)同窝幼畜的肾切片的 H&E 染色；(C)患有严重实质纤维变性的 10 月龄小鼠的肾切片；(D)显示肾小管增生的(C)中的相同

的小鼠肾的一个区(放大倍数 40X, g = 肾小球; f = 纤维变性; t = 肾小管); (E) 患有严重肾病的  $UG^{-/-}$  小鼠的肾小球沉积的透射电镜(放大倍数 6000X); (F) (E) 中的插图放大 60,000X 倍, 显示表明为胶原(col)的长的具细纹的纤维性结构和与 Fn 原纤维一致的短的弥散结构; (G) 使用小鼠 Fn-抗体的对来自  $UG^{+/+}$  小鼠的肾切片进行的 Fn 免疫荧光; (H) 来自患有严重肾病的  $UG^{-/-}$  小鼠的肾切片的 Fn-免疫荧光;  $UG^{+/+}$  (I) 和  $UG^{-/-}$  (J) 小鼠的肾切片的 Mason's 三色染色;  $UG^{-/-}$  小鼠肾切片的肾小球上的蓝色染色为胶原(放大倍数约 40X)。

图 4A 显示仅在  $UG^{-/-}$  小鼠的肾中存在 Fn 聚集物; 来自  $UG^{+/+}$  和  $UG^{-/-}$  小鼠的血浆、肾和肝脏的 Fn 的免疫沉淀和蛋白质印迹; 仅在  $UG^{-/-}$  小鼠肾的裂解物中检测到了多亚基 Fn 带(粗箭头)。

图 4B 和 4C 显示体外 UG-Fn 复合物的形成; (B) 将等摩尔浓度的 UG 和 Fn 一起培养, 免疫沉淀, 并使用 Fn 或 UG 抗体通过蛋白质印迹进行检测; 免疫沉淀物包含 Fn(泳道 2, 上面的列)和 UG(泳道 2, 下面的列); 两列的泳道 1 代表 Fn 和 UG 标准; (C) 4℃ 下, 将等摩尔浓度的  $^{125}I$ -UG 与 Fn 一起培养 1 小时, 产生的复合物通过 6% 非还原, 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳解析; 泳道 1, 考马氏兰染色的 Fn-UG 异聚体; 泳道 2, 其放射自显影图。

图 4D 显示在正常但不在  $UG^{-/-}$  小鼠中存在 UG-Fn 复合物; 使用 Fn 抗体对来自  $UG^{+/+}$  和  $UG^{-/-}$  小鼠血浆进行免疫沉淀并使用 Fn 和 UG 抗体进行蛋白质印迹; Fn(上面的列); UG(下面的列); std = UG 和 Fn 标准。

图 4E 显示体外 UG 对 Fn 自身聚集的剂量依赖性抑制; 在不存在(泳道 2)和存在改变量的 UG(泳道 3-5)时,  $^{125}I$ -UG 与未标记的 Fn 的亲合和交联; 极高分子量的强度, 在不存在 UG 下形成的放射活性 Fn 带(泳道 2)以剂量依赖性方式降低; 泳道 1, 在不存在 UG 和 DSS 下,  $^{125}I$ -Fn 与未标记 Fn 的交联; 空心箭头-多聚体 Fn; 较细的箭头=220kDa Fn。

图 4F 显示 UG 对 Fn-胶原复合物形成的抑制; 在不存在(泳道 3)和存在(泳道 4)UG 时,  $^{125}I$ -胶原 I 与未标记的 Fn 的亲合和交联; 泳道 1, 考马氏兰染色的胶原 I; 胶原 I 的  $\alpha 1$ - $\alpha 1$  链和胶原 I 的  $\alpha 2$ - $\alpha 2$  链; 泳道 2, 在不存在 UG 和 DSS 时,  $^{125}I$ -胶原 I 与未标记 Fn 的交联。

图 5A-5F 显示仅在不存在 UG 时, 正常和  $UG^{-/-}$  小鼠的肾中的 Fn 沉积的免疫组织化学分析; (A) 经静脉获得等摩尔浓度的 Fn 和 UG 混合物

的野生型小鼠的肾切片；(B)获得与(A)等剂量的Fn但未获得UG的UG<sup>+/+</sup>小鼠；(C)表面健康的获得Fn和UG混合物的UG<sup>-/-</sup>小鼠；(D)仅获得Fn(与(C)相同的剂量)，但未获得UG的UG<sup>-/-</sup>小鼠；(E)在仅补充有可溶性hFn的培养基中生长的培育细胞的Fn原纤维形成；(F)与(E)相同的饲以含有等摩尔浓度可溶性hFn和UG的混合物的培养基的细胞培养物(放大倍数40X，g = 肾小球)。

图6A-6B示用于检测临床样品中UG-Fn复合物的诊断分析公式。

图7显示UG二聚体通过8.0kDa MWCO透析膜，但不通过3.5 kDa MWCO透析膜。

#### 具体实施方式

##### rhUG

本发明的rhUG基本上具有与天然人UG蛋白相同的氨基酸序列。具有与天然人蛋白“基本上相同的”氨基酸序列的氨基酸序列包括至少75%与天然人蛋白相同的rhUG。在一个优选的具体实施方案中，rhUG具有至少85%的同一性，在一个最优选的具体实施方案中，rhUG与天然UG具有至少98%的同一性。

还包括在本发明方法中的是UG片段或衍生物的使用。UG的“片段”指具有天然蛋白序列的六个或更多个连续氨基酸的天然hUG氨基酸序列的一部分。术语“衍生物”指UG的肽类似物，包括一个或多个氨基酸取代和/或一个或多个化学部分的加入，例如酰化剂或磺化剂，前提是衍生物保留母体分子的生物学活性。

而且，用于本发明方法中的UG基本上为纯的。术语“基本上为纯的”指具有约75%至约100%纯度的UG。在一个优选的具体实施方案中，UG具有约90%至约100%的纯度，在一个最优选的具体实施方案中，UG具有至少95%的纯度。

##### UG的临床用途

另一方面，本发明提供一种用于治疗或预防炎症或纤维变性疾病的方法，包括对可能为动物或人的哺乳动物给药有效量的UG。

下面非限制性的疾病的实例为与UG缺乏、过度PLA<sub>2</sub>活性和纤连蛋白沉积相关的那些的实例。

表 2. 重组子宫球蛋白的临床用途  
(根据 UG 特性分组)

| UG 特性                            | 疾病                                                                                                   |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| UG 缺乏                            | (1) 新生儿支气管肺发育不良<br>(2) 血液透析并发症<br>(3) 争光霉素肺<br>(4) 慢性阻塞性肺疾病<br>(5) 肺气肿                               |
| 过度 PLA <sub>2</sub> 活性<br>(炎症)   | (1) 全身性炎症<br>(2) 哮喘<br>(3) 胆囊纤维变性<br>(4) 眼炎症, 包括自身免疫眼色素层炎和角膜移植手术;<br>(5) 与产科和妇科相关的疾病, 包括早产和生育力(出自体内) |
| 过度 PLA <sub>2</sub> 活性<br>(免疫调节) | (1) 自身免疫疾病, 包括类风湿性关节炎、I 型糖尿病、炎性肠疾病和节段性回肠炎<br>(2) 移植器官排斥                                              |
| 纤连蛋白沉积                           | (1) 肾纤维组织形成<br>(2) 肺纤维组织形成, 包括自发性肺纤维变性;<br>(3) 血管纤维变性                                                |

在人炎症/纤维变性疾病中 UG 缺乏、PLA<sub>2</sub> 活性和纤连蛋白聚集与沉积之间的典型的相互关系总结在下面。

#### 新生儿支气管-肺发育异常(新生儿 BPD)

新生儿 BPD 特征在于新生婴儿中肺组织的严重炎症和不可逆的纤维变性, 这通常是呼吸窘迫综合征(RDS)的结果。然而, 该疾病还可能由胎粪吸入综合征或感染导致。

由于肺 hUG 的合成可与表面活性剂共调节, 并在妊娠后期开始,

故该疾病与 hUG 缺乏相关。因此，严重早产的新生儿可能缺乏 UG 以及表面活性剂。hUG 的缺乏可能导致与在新生儿 BPD 中见到的炎症和纤维变性相关的增加的 PLA<sub>2</sub> 活性和 Fn 相关的纤维变性。一些婴儿对合成的表面活性剂不反应，这可能是由于过量的 PLA<sub>2</sub> 活性。因此，UG 可用来治疗新生儿 BPD。

优选的给药途径为借助于气管内或全身性途径直接滴注。

### 多器官功能衰竭(MOF)

过量的 PLA<sub>2</sub> 活性与由于细菌脓毒症或外伤的 MOF 有关。该疾病的特征在于全身性的炎症反应，包括迅速大量的组织损伤以及肺、肾、胰腺、肠和脉管系统器官功能的丧失。最近的证据指出 MOF 的启动为升高的全身性可溶的磷脂酶 A2 活性、其对组织细胞膜的直接裂解以及对如肺表面活性剂的必需磷脂的水解。在临床实验中直接抑制 PLA<sub>2</sub> 的努力已经成功。

在 MOF 中，内源 UG 的量不足以对抗 PLA<sub>2</sub> 的超活化。外源施加的 UG 可用来治疗 MOF。

远器官功能衰竭(ROF)包括对不是首先被外伤或感染影响的器官的器官的损伤。通常远器官功能衰竭涉及多于一种的远器官，导致多器官功能衰竭。例如胰腺炎是对醇摄取、感染或外伤反应的胰腺炎症，它可能导致成人呼吸窘迫综合征(ARDS)，急性肾衰竭(ARF)和全身性休克。炎性肠疾病或腹膜炎的发作可导致 ROF/MOF。ROF/MOF 与高水平的循环活化的 PLA<sub>2</sub> 相关。全身性给药 hUG 可防止 ROF/MOF。在患有 ROF/MOF 的病人中立即注射 UG 可降低严重性或消除 PLA<sub>2</sub> 介导的器官衰竭和休克。

### 胰腺炎

所有形式的胰腺炎都涉及全身性和局部升高的 I 型可溶性 PLA<sub>2</sub> 活性。胰腺炎通常导致特征在于肺中升高的可溶性 PLA<sub>2</sub> 活性的肺机能不全或 ARDS。因此，作为体内可溶性 I 型 PLA<sub>2</sub> 抑制剂，UG 为治疗两种形式的急性胰腺炎的极好的代表，并且作为所有急性形式的胰腺炎中肺机能不全的预防性措施。

优选的给药途径为静脉内途径。

### 炎性肠疾病

炎性肠疾病(IBD)，包括溃疡性结肠炎、直肠炎和节段性回肠炎，

特征在于 II 型可溶性 PLA<sub>2</sub> 的增加的局部产生和活性。在 IBD 中循环的可溶性 PLA<sub>2</sub> 活性也可能升高。作为增加的 PLA<sub>2</sub> 活性的后果, IBD 在严重的情况下导致肺机能不全或 ARDS (这类似于胰腺炎)。

在 IBD 中给药外源 UG 的合理性与胰腺炎相同: 通过抑制 PLA<sub>2</sub>、Fn 聚集和/或沉积下调炎症反应和防止牵连远器官(肺和肾)。

优选的给药途径为在住院病人中通过静脉内途径。

### 细菌性肺炎

患有活细菌肺炎的病人的 BAL 液体显示具有比死亡者高 2-3X 水平的 UG。肺的细菌性感染可能过度活化内源可溶性 PLA<sub>2</sub>。可给药 UG 以抑制或控制这种作用。

如果病人插管, 优选的给药途径为借助于气管内途径, 如果不是, 则通过静脉内注射。

### 透析并发症

透析主要的并发症为血栓形成, 即自发形成血块。在病人中, 这通常阻塞血管经过部分, 破坏治疗以及导致局部缺血, 有时危及生命。血液透析的第二个问题是邻近静脉的炎症和/或纤维变性, 它将透析的血液返回至病人主循环中。邻近静脉的纤维变性通常以对透析血液的返回的耐受性和压力的增加来检测。第三个问题是血管经过部位的纤维变性以及关闭或瘘管。第四个问题是加快的动脉硬化, 第五个问题是剩余肾功能的丧失, 这主要是由于 Fn 的沉积。

在此过程中内源性 UG 被透析掉的可能性提供了对这些问题的一個解释。选择性地除去内源 UG 使得循环的 Fn 不聚集形成激发它们通过相互粘附或粘附于血管腔中形成血块反应的血块形成病灶或沉积在红细胞中。转谷氨酰胺酶(TGs)为负责建造在基膜、皮肤和血块中发现的大分子网格的酶。在不存在竞争作为活化的 TGs 的底物的游离 UG 时, Fn 和其它血块成分发生交联。

邻近静脉和血管到达部位的炎症和纤维变性以及加速的动脉粥样硬化可通过 Fn 在血管腔的沉积来解释。纤连蛋白在血管内皮的沉积促进血小板和白细胞的粘附, 在不存在 PLA<sub>2</sub> 抑制时它们可被加速。Fn 的血管沉积还可促进在动脉粥样硬化斑块中发现的脂肪、胆固醇和蛋白的局部沉积。纤连蛋白已知为动脉粥样硬化斑块以及与肾病和初级和剩余肾功能丧失相关的肾小球沉积的主要成分。因此, 通过减少炎症

和纤连蛋白的沉积，UG 的给药可减少或消除这些问题。

给药 UG 的优选途径为在透析前、期间和之后静脉灌注。

另一种方法，内源性 UG 的丧失可通过向透析缓冲液中加入 UG 或用 UG 预覆盖透析膜或这两种方法来预防。

### 器官移植

术语“器官”指例如实体器官，如肾、肝脏和心脏以及骨髓、角膜和皮肤。

有两种类型的器官移植排斥：急性的和慢性的。急性排斥为涉及 PLA<sub>2</sub> 活性和被通常损伤移植物的炎症细胞浸润的炎症过程。

慢性排斥涉及 Fn 介导的移植物的纤维变性，包括局限于移植物的动脉粥样硬化。因此，给药 UG 可用来治疗或预防急性和慢性移植排斥。

优选的给药途径为通过注射。

器官移植的另一个方面为在从供体移出之前、移植期间和在受体中时的器官的缺血，这导致急性排斥。已知缺血导致升高的 PLA<sub>2</sub> 活性和组织坏死。因此，UG 可用来预防此缺血。UG 的优选形式为灌注液体或储存缓冲液，其中来自体内的器官保存在此。

### I 型糖尿病的预防

I 型糖尿病来自通过自身免疫反应对胰腺组织的损伤。胰腺通常分泌可溶性的 PLA<sub>2</sub> 和 hUG 至血液循环中。在本发明的子宫珠蛋白剔除 (KO) 小鼠 (本文称为“UG KO 小鼠”) 的胰腺中报道了坏死性损伤。

在不存在子宫珠蛋白时，UG KO 小鼠显示可引发自身免疫反应的类似的胰腺组织损伤。因此，UG 可用来预防或终止 I 型糖尿病的缓慢进程。优选的给药途径为通过注射。

### 肾病的预防和治疗

UG KO 小鼠中的肾 Fn 沉积和纤维变性类似于人肾病中 Fn 的沉积和纤维变性。因此，UG 的给药可预防或减缓处于如 II 型糖尿病危险中的病人的肾病发展进程。

### 预防和治疗眼炎症

眼炎症，包括眼色素层炎、视网膜炎和术后炎症的特征在于增加的 PLA<sub>2</sub> 活性。因此，UG 可被局部、眼内或全身性给药以减少眼的炎症。

### 动脉硬化

动脉硬化为全身性血管纤维化增厚。它通过 Fn 在脉管系统壁的沉

积来启动和/或介导。动脉粥样硬化是除开 Fn 沉积外还涉及胆固醇沉积的动脉硬化的一种形式。因此,UG 可被给药以预防或减少动脉硬化。

### 急性肾衰竭

急性肾衰竭 (ARF) 通常是远器官炎症、感染或直接损伤的结果,它导致可溶性 PLA<sub>2</sub> 在血液循环中的释放和活化。ARF 期间对肾的损伤可相当严重,具有由炎症促进的急性组织损伤并可溶至肾的纤维变性中,从长期来看导致降低的肾功能。如 UG KO 小鼠所示,UG 的抗炎症和抗纤维化的特性在肾中尤其相关。

优选的给药途径为通过注射或全身性给药。

总之,下面非限制性的疾病表与 PLA<sub>2</sub> 和/或纤连蛋白沉积的抑制相关,每一种为通过本发明方法治疗或预防的疾病的代表:

|          |                                                                 |
|----------|-----------------------------------------------------------------|
| 关节/骨:    | 类风湿性关节炎;                                                        |
| 自身免疫:    | 类风湿性关节炎、多发性硬化、I 型糖尿病、眼色素层炎、牛皮癣、全身性红斑狼疮 (SLE) 和节段性回肠炎;           |
| 胰腺;      | 胰腺炎;                                                            |
| 腹膜;      | 腹膜炎、阑尾炎;                                                        |
| 血管/全身性:  | 败血性休克、胶原血管病、动脉硬化、动脉粥样硬化、过敏性休克、血吸虫病和损伤性休克;                       |
| 肾:       | 急性肾衰竭、肾细菌感染、由于肾肿瘤、预防化疗剂或抗体治疗导致的纤维变性、预防糖尿病性肾病、预防和/或治疗特发性肾病导致的炎症; |
| 肝脏:      | 肝炎、病毒性肝炎和肝硬化;                                                   |
| 膀胱:      | 膀胱炎、尿道炎症、输尿管炎症和膀胱炎症,如间质膀胱炎;                                     |
| 生殖系统/雌性: | 阴道炎、宫颈炎、骨盆炎症、卵巢炎症(输卵管炎)、子宫内膜异位、阴道念珠菌病和输卵管炎症或纤维变性;               |
| 生殖系统/雄性: | 阴茎炎症、前列腺炎症、曲细精管和精囊炎症、睾丸炎症和输精管腺管、副睾和前列腺炎症;                       |

|     |                                                                                                                                            |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 眼:  | 眼色素层炎、视网膜炎、创伤、由于化学物质或抽烟的损伤、由于 CMV 视网膜炎的眼炎症、结膜炎(细菌感染)、病毒感染、由于感染剂的眼炎症、眼手术后的眼炎症、包括白内障除去、激光手术、角膜移植、肿瘤切除、由于视网膜色素瘤(肿瘤)的眼炎症、由于辐射暴露的眼炎症、由于变态反应的炎症; |
| 心脏: | 心内膜炎;                                                                                                                                      |
| 肺:  | 支气管哮喘、ARDS、肺炎、自发性肺纤维变性、化疗(博来霉素、氮甲喋呤)导致的肺纤维变性、暴露于环境化学物质(石棉、清洁剂、污染物,例如二恶因和尾气中的 PCB)导致的肺纤维变性、吸烟、从淹溺恢复期间的肺炎症和新生儿 RDS;                          |
| 肠:  | 炎性肠疾病、结肠炎、节段性回肠炎、直肠炎、新生儿坏死性小肠结肠炎、由于感染剂、轮状病毒、脊髓灰质炎病毒的炎症、HIV、胃溃疡、胃食道回流疾病和扁桃体炎;                                                               |
| 痔;  |                                                                                                                                            |
| 移植: | 任何器官或组织的移植手术后给药以控制炎症或纤维变性和排斥;                                                                                                              |
| 耳:  | 中耳炎; 和                                                                                                                                     |
| 皮肤: | 牛皮癣、荨麻疹、变态反应性皮炎、硬皮病、接触性皮炎、化学性皮炎(由于毒性常青藤和橡树,及暴露于化学物质,如 PCB、氯、氨、清洁剂、毒性剂)。                                                                    |

而且,UG 可单独给药或与常用于治疗或预防上述疾病的其它活性剂或组合物混合给药。这些活性剂或组合物包括,但不局限于类固醇、非类固醇抗炎剂(NSAIDs)、化疗剂、止痛剂、免疫治疗剂、抗病毒剂、抗真菌剂、疫苗、免疫抑制剂、造血生长因子、激素、细胞因子、抗体、抗血栓形成剂、心血管药物或生育药物。而且还包括口服耐受性

药物、维生素和矿物质。

而且，UG 可作为用于在注射部位抑制炎症或给药其它治疗剂或预防剂以抑制炎症或由这些物质导致的免疫反应的载体来给药。在此方面，UG 使得能对靶适应证给药有效量的活性剂。

UG 还可以化妆品组合物的形式给药用于限制由伤口愈合或在皮肤炎症反应期间导致的纤维变性、疤痕、瘢痕形成。

而且，UG 可用作血液补充物，即作为合成或捐献的人血的添加物。

最后，UG 可用来通过加入至精子、体外受精卵和在转移至人和其它哺乳动物的母体子宫之前的胚胎中来提高人工受精的比率。

本发明涉及 UG 在预防或治疗 PLA<sub>2</sub> 和纤连蛋白相关的疾病中的用途。在预防疾病方面，“预防”指在易感或可能易感人群中预防疾病发生，或限制其严重性或发展，而术语“治疗”指改善疾病或病理学状况。

UG 可静脉内给药，或在治疗新生儿 RDS/BPD 和成人 RDS 的情况下，借助于气管内管以液体或半气雾剂形式给药。其它可行的给药途径包括局部、眼、经皮肤、透皮、肛门、全身性、肌肉内、缓释、口服、阴道、十二指肠内、腹膜内和结肠内给药。这些组合物可以药理学、营养和兽医学领域技术人员熟知的剂量和方法对需要这种给药的个体或病人给药，给药时考虑这些因素，如年龄、性别、体重和特定个体或病人的情况以及给药途径。本发明的组合物还可以控制释放的剂型给药。再次考虑到如年龄、性别、体重以及特定个体或病人的情况以及给药途径，组合物可与其它活性剂同时给药或顺序给药。

本发明的组合物的实例包括用于口服给药的可食用的组合物，如固体或液体制剂，例如胶囊剂、片剂、丸剂以及类似的给药于管口的液体制剂，例如口、鼻、肛门、阴道等，制剂如悬浮剂、糖浆或酏剂；和用于胃肠外、皮下、皮内、肌肉内或静脉内（如注射给药）给药的制剂，如无菌悬浮剂或乳剂。然而，由于组合物中的活性成分可与蛋白混合，使得当其给药至血流中时，由于血液蛋白的沉淀，可能形成血块；本领域技术人员应考虑这种情况。

在这些组合物中，UG 可与适宜载体、稀释剂或赋形剂混合，如无菌水、生理盐水、葡萄糖、DMSO、乙醇等。UG 可以用于再配制在等渗水溶液、盐水、葡萄糖或 DMSO 缓冲液中的冷冻干燥的形式提供。在一

些盐溶液中，观察到一些 rhUG 沉淀；这种现象可用作一种分离本发明化合物的方法，例如通过“盐析”法。

进一步，本发明还设想提供 UG 的试剂盒。该试剂盒还包括一个包含适宜载体、稀释剂或赋形剂的单独的容器。试剂盒可包括用于同时或顺序给药的降低或减轻上述疾病的致病作用的其它试剂。其它试剂可以单独的容器或与 UG 混合的形式提供。另外，试剂盒可包括关于混合或混合成分和/或给药的说明书。

本发明还设想一种治疗或预防特征在于内源功能性 UG 缺乏的炎症或纤维变性疾病的方法，它包括对需要这种治疗的病人给药补偿量的 UG。术语“补偿量”指使总 UG (内源功能性 UG 和外源 UG) 的局部肺或全身性浓度至其正常的范围内所需的 UG 的量。更具体地说，内源 UG 的局部肺浓度的正常范围为约 >50 毫克 UG/微克血清白蛋白或 >50 毫克/升。血清 UG 浓度的正常范围为 >50 毫克/升。

本发明的组合物包含获得预期目的有效量的天然和/或重组 hUG，即提高的 UG 血浆或组织水平以产生选择性抑制 PLA<sub>2</sub> 和降低的炎症和/或纤连蛋白的结合以减轻其在纤维变性疾病中聚集和/或沉积的所需效果。组合物包含与药物可接受的载体或稀释剂混合的有效量的基本上纯化的天然和/或重组人 UG。

在另一个方面，本发明的组合物包含与药物可接受的载体或稀释剂混合的有效量的天然和/或重组 hUG 和肺表面活性剂。对肺局部气管内给药足以抑制 PLA<sub>2</sub> 活性和/或纤连蛋白沉积的 UG 需要在单剂或复剂中范围为 0.2 μg/kg 至 500mg/kg 基本纯化量的 UG 蛋白。UG 通常以单剂为 20ng/kg 至 500mg/kg 的量一次或多次给药，或连续灌注高达 10g。

天然和/或重组 hUG 还可借助于气管内途径与人工肺表面活性剂，如 Survanta 结合给药。UG 与 Survanta (5mls/kg) 共同给药，UG 不结合表面活性剂，阻止它发挥治疗功效。肺表面活性剂通常在组合物中以约 10-90% (重量计) 存在，较通常为约 20-80% (重量计)。由于其极低的表面张力，表面活性剂携带有 UG 扩展在肺的内表面。借助于静脉内注射全身性给药足以抑制 PLA<sub>2</sub> 活性和/或纤连蛋白沉积的 UG 在延长的时间内 (天) 需要范围为 0.5 μg 至连续灌注数克蛋白的基本上纯的天然和/或重组 hUG 的量。

用于注射和半气雾剂气管内送递的适宜的制剂包括任选具有粘度调节剂和稳定剂的天然和/或重组 hUG 的水溶液。

如本文所采用的术语“PLA<sub>2</sub>抑制有效量”指抑制 PLA<sub>2</sub>活性和降低或减轻病人组织或身体炎症的 UG 的量。术语“纤连蛋白结合有效量”指结合纤连蛋白以降低其聚集和/或沉积,并防止或降低原纤维形成或纤维变性的 UG 的量。如本文所使用的术语“抗炎量”指降低或减轻组织或身体炎症的量。通常,给药至成人用于治疗炎症和纤维变性疾病的 UG 的量为单剂 0.2μg/kg 至 500mg/kg 或在延长的时间内给药的高达数克。对于新生儿,在治疗新生儿 RDS 中,范围通常为单剂为 50ng/kg 至 100mg/kg 或在延长的时间内连续给药高达 10g。连续灌注的有效安全速率为 50ng/kg/小时至 500mg/kg/小时。

#### 实施例

现将进一步参考下面非限制性的实施例来说明本发明。除非另有说明,份和百分数以重量计。

#### 实施例 1: 体内实验

通过 Mantle 等的方法(1993)获得重组人 UG。

在妊娠 142 天通过剖腹产产下体重各为约 400g 的一只雄性和雌性 P. cyanocephalus 品种。这是建立的 RDS 模型(Coalson, J. J. 等, BPD 的狒狒模型 II: 病理学特性。实验分子病理学 37: 355-350(1982))。

分娩后,将幼仔用酮胺(10mg/kg)麻醉并用 2.5mm 直径的气管内管插管。借助于通过经皮肤注射入桡动脉放置的动脉线监测血气和压力。将一深的静脉线经皮肤放置入隐静脉内,通过它给药液体、抗生素和药物。将动物放在饲服控制的红外温室中并用带有加湿器的标准循环时间、压力调节的通风器进行通风,保持在 36-37℃。最初设置为适宜胸运动所需的 FiO<sub>2</sub> 1.0,速率为 40/分钟, I/E 比例 1:1.5, 4cm H<sub>2</sub>O 正向末端呼气压力(PHEP)和峰吸气压力(PIP)。FiO<sub>2</sub> 保持在 1.0,调节 PIP 以保持 PaCO<sub>2</sub> 为 40±10 托。每小时监测血气、血细胞比容、电解质、凝血酶原时间、部分促凝血酶原激酶时间和血糖试条。抽取用于研究的血液容量性地被加入肝素的成年狒狒血液代替。通过电解质以 10cc/kg/小时给药静脉内液体,并当心率超过 180 次/分钟时如所需地增加。当碱不足超过 -10 时加入碳酸氢钠(2meq/kg)。实验期间连续给药氨苄青霉素(50mg/kg/天,以两次分开的剂量)和庆大霉素

(5mg/kg/天，以两次分开的剂量)。

一只动物接受表面活性剂加上 PBS (处理号 1)，第二只动物 (处理号 2) 接受表面活性剂加上两倍剂量的 1mg/kg rhUG。经气管内管直接将表面活性剂和 rhUG 对肺给药。使用的表面活性剂为 Survanta (Ross Labs)，表面活性剂制剂来自牛肺组织，除开磷脂还包含表面活性剂脱辅基蛋白 B 和 C。第一次剂量的 rhUG 与表面活性剂一起给药，第二次在第一次之后 4 小时给药。监测动物的动脉血气、电解质和 EKG。在开始表面活性剂治疗后 50 小时杀死它们。在 24 和 48 小时的时候，用包含蛋白酶抑制剂 (PMSF, 10 $\mu$ g/ml 亮抑蛋白酶肽, 10 $\mu$ g/ml 胃蛋白酶抑制剂和杆菌肽) 的 PBS 灌洗肺。将其冷冻于 -80 $^{\circ}$ C 下直至分析 PLA<sub>2</sub> 活性。通过 Bradford 方法 (Biorad) 测定总蛋白。根据 Levin 等的方法 (1986; 见上文) 测定肺洗出物中的 PLA<sub>2</sub> 活性并示于下表。

表 3: 体内 UG 的检测结果

| 处理 # | 时间    | 肺洗出物 PLA <sub>2</sub> 活性<br>(ccpm/10 $\mu$ g 蛋白) |
|------|-------|--------------------------------------------------|
| 1    | 24 小时 | 3030                                             |
|      | 48 小时 | 2607                                             |
| 2    | 24 小时 | 1739                                             |
|      | 48 小时 | 996                                              |

上面给出的数据为两次测定的平均值。结果表明气管内给药 rhUG 在体内抑制 PLA<sub>2</sub>。接受了表面活性剂和 rhUG 的动物与接受了表面活性剂而没有 rhUG 的动物相比在其肺洗出物液体中具有显著较低的 PLA<sub>2</sub> 活性。数据证实与表面活性剂结合给药 rhUG 在保护表面活性剂磷脂中有益。

#### 实施例 2: 在体外可溶性 PLA<sub>2</sub> 对人工表面活性剂水解的抑制

在体外 rhUG 抑制可溶性 PLA<sub>2</sub> 对人工表面活性剂的水解。Survanta 为来自牛肺的人工表面活性剂并被用来治疗患有 RDS 的早产新生儿和患有 RDS 的成人 (ARDS)。组 I 可溶性 PLA<sub>2</sub>，即猪胰腺 PLA<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim) 对 Survanta 的水解特征在于其作为底物与荧光磷脂酰胆碱底物 (Cayman Chemicals) 竞争，产生花生四烯酸产物的能力。

Survanta 是组 I 可溶性 PLA<sub>2</sub> 体外降解的底物。在体外 Survanta 迅速地被在人肺的细胞外液体中发现的 PLA<sub>2</sub> 降解。在体外 RhUG 抑制 Survanta 的降解。

### 实施例 3: UG 剔除小鼠的构建

制备转基因 UG KO 小鼠, 目的在于用于确定子宫球蛋白在哺乳动物生理学中的作用以及产生在严重炎性临床疾病中 UG 作为治疗剂的模型。第一步是构建适宜的 DNA 载体, 通过它来靶定和打断内源小鼠子宫球蛋白基因。将包含来自 129/SVJ 小鼠品系的外显子 3 和子宫球蛋白基因的旁侧序列(Ray, 1993)的 3.2kb BamHI-EcoRI DNA 片段亚克隆至如 Lei 等(1996)描述的 pPNW 载体的相应位置。通过 PCR(引物 Primer-L(来自内显子 1): 5'-TTCCAAGGCAGAACATTTGAGAC-3'; Primer-R(来自外显子 2): 5'-TCTGAGCCAGGGTTGAAAGGC-3')扩增包含部分外显子 2 和其上游序列的 0.9kb 片段, NotI 和 XhoI 限制性位点被遗传改造至末端用于定向亚克隆至基因靶定载体。在该构建物中, 编码 27 个氨基酸的 79bp 的外显子 2 缺失。将 PCR 片段放置于 pPNW 中编码新霉素抗性基因的上游, 产生基因靶定载体 pPNWUG。载体示于图 2A 中, 其中 PGK-neo 盒打断子宫球蛋白基因, 破坏蛋白质编码序列。

根据 Nagy, A. 等, PNAS 90: 8424(1993)用 NotI 线性化 pPNWUG 基因靶定载体并电穿孔至 ES R<sub>1</sub> 细胞中。电穿孔细胞的 9-(1, 3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤和 G-418 选择产生 156 个克隆, DNA 印迹分析证实野生型子宫球蛋白等位基因的 5.1kb HindIII 片段和来自 156 个克隆中的 3 个的同源重组的另外 8.2kb HindIII 片段, 其示于图 2B 中。根据 Capecchi, 科学 244: 1288(1989), 将这些 ES R<sub>1</sub> 克隆注射至 C57BL/6 胚胎中。生成两种不同的传于不同嵌合起始物的小鼠品系。让携带靶定子宫球蛋白基因座的杂合后代(UG<sup>+/-</sup>)交配, 通过图 2C 所示的 PCR 以及图 2D 所示的 DNA 印迹分析后代的基因型。

### 实施例 4: UG 基因剔除和小鼠 UG (mUG) 蛋白不存在的证实

为了证实纯合剔除小鼠(UG<sup>-/-</sup>)不具有任何可检测的 mUG, 检测子宫球蛋白基因靶定小鼠在一些器官, 包括肺中的 UG-mRNA 和 mUG 蛋白的表达。实验方法通过规定的动物保护和使用委员会的批准。从 UG<sup>+/+</sup>、UG<sup>+/-</sup>和 UG<sup>-/-</sup>小鼠的不同器官分离全部 RNA。使用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 mUG-mRNA。使用 mUG 特异性引物, mPr(5'-

ATCTTGCTTACACAGAGGACTTG-3') 逆转录靶分子, 使用 PCR 引物 mPr 和 mP1 (5'-ATCGCCATCACAATCACTGT-3') 扩增产生的 cDNA。将 PCR 产物与来自 UG 基因序列外显子-2 的 mPp (5'-ATCAGAGTCTGGTTATGTGGCATCC-3') 寡核苷酸探针杂交。用于小鼠 GAPDH RT-PCR 的引物和探针如下; mGAPDH-r (5'-GGCATCGAAGGTGGAAGAGT-3'); mGAPDH-1 (5'-ATGGCCTTCCGTGTTCTTAC-3'); mGAPDH-p (5'-GAAGGTGGTGAAGCAGGCATCTGAGG-3')。图 2E 显示在  $UG^{+/+}$ 、 $UG^{+/-}$ , 但不在  $UG^{-/-}$  小鼠肺中检测到了 mUG-mRNA。类似的数据(未显示)表明 mUG-mRNA 不存在于  $UG^{-/-}$  小鼠的前列腺或子宫中, 但存在于具有完整子宫珠蛋白基因的小鼠中。

肺中的 mUG 蛋白的免疫沉淀和蛋白质印迹分析产生示于图 2F 的类似确证的结果。来自  $UG^{+/+}$  和  $UG^{-/-}$  小鼠的肾、肝脏和肺的组织裂解物通过在包含 2mM 苯基甲基磺酰氯和各 20 $\mu$ g/mL 抑蛋白酶肽、亮抑蛋白酶肽和胃蛋白酶抑制剂 A 的缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.2% 脱氧胆酸盐, 150mM NaCl, 5mM EDTA) 中匀浆制备。将匀浆在 4 $^{\circ}$ C 下以 17,500  $\times$  g 离心 30 分钟, 并如所描述的 (E. Harlow 和 D. Lane, 抗体; 实验室手册, 第一版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, NY, 1988) 通过将组织裂解物或血浆蛋白 (1mg/mL) 与兔抗小鼠 Fn 抗体 (1:100 稀释) 一起保温进行免疫沉淀。通过在 10% 甘油, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 250mM NaCl, 4.3mM 磷酸钠存在下, 将等摩尔浓度的 mFn 与 rhUG 4 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 接着加入抗-mFn 抗体 (1:100 稀释), 使纯小鼠 Fn (mFn) 与 uhUG 一起共免疫沉淀 (Mantile, G 等, 生物化学杂志 267: 20343 (1993) )。还原条件下, 在 4-20% 或 6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分辨等量的提取组织蛋白 (30 $\mu$ g) 或免疫沉淀物, 接着用抗小鼠 Fn (1:2000 稀释) 或 UG (1:2000 稀释) 的兔抗体进行蛋白质印迹。在来自  $UG^{-/-}$  小鼠的组织或体液中未检测到 mUG, 而来自  $UG^{+/+}$  和  $UG^{+/-}$  小鼠的组织的确包含 mUG 蛋白。

最后, 对  $UG^{-/-}$  小鼠肺的组织病理学分析, 仅在支气管上皮细胞中缺乏 mUG 特异性免疫染色。将来自  $UG^{+/+}$ 、 $UG^{+/-}$  和  $UG^{-/-}$  小鼠的肺组织固定在 Bouin 氏液或 10% 中性缓冲的福尔马林固定液中, 包埋在石蜡中, 切成 4-6 微米。将它们用苏木精和伊红 (H&E) 染色。通过 Masson 氏三色法检测胶原, PTAH 检测纤维蛋白或 Congo 红检测淀粉状蛋白将选择的组织染色。对于 mUG 和 mFn 的免疫组织化学检测, 使用

Vectastain 兔 Elite ABC 试剂盒 (Vector 实验室)。通过使用对应于 mUG 氨基酸序列 (Lys28-Thr49, 具体为 KPFNPGSDLQNAGTQLKRLVDT) 的合成肽 (Peptide Technologies, Inc.) 产生 mUG 的兔抗体 (CytImmune)。以 1:1000 的稀释度使用 mFn 的兔抗体 (GIBCO BRL), mUG 的抗体以 1:500 使用。

这三组结果证实纯合子宫珠蛋白剔除小鼠  $UG^{-/-}$  缺乏 mUG 蛋白或任何可检测的蛋白成分。

#### 实施例 5: 子宫珠蛋白剔除小鼠的表型

在 179 只源于  $UG^{+/-}$  小鼠杂交的小鼠中, 46 只 (26%) 为  $+/+$ , 90 (50%) 为  $+/-$  和 43 只 (24%) 为  $UG^{-/-}$  表型, 表明打破的 mUG 基因座以孟德尔方式遗传,  $UG^{+/+}$ 、 $UG^{+/-}$  和  $UG^{-/-}$  小鼠在出生时存活率相同。然而,  $UG^{-/-}$  小鼠显示新的表型, 其中它们发展成特征在于恶质病、严重蛋白尿和与体重大大降低相关的低血钙的进行性疾病。蛋白尿为在尿中排泄异常高水平的白蛋白和其它血清蛋白的疾病。它表明肾小球功能异常和肾衰竭。对受影响动物 (如上所述对于肺) 的肾的组织病理学研究揭示了示于图 3 的爆发性肾肾小球疾病。与  $UG^{+/+}$  小鼠的肾小球比较,  $UG^{-/-}$  小鼠的那些为细胞过少并具有大量的嗜曙红的蛋白沉积。 $UG^{-/-}$  小鼠中的致命肾病的时间进程为早期发生 (4-5 周时间) 或后期发生 (10 月时间)。在开始 4 周龄表现稍微健康的那些  $UG^{-/-}$  小鼠在两月龄时具有病灶性的肾小球沉积。在约 10 个月时, 这些小鼠具有类似于死于早期发生疾病的小鼠的严重的恶质病。杂合子具有在  $UG^{-/-}$  小鼠中观察到的较轻度形式的肾病。患有晚期发生疾病的小鼠的肾的组织病理学不仅显示如早期发生疾病中的严重的肾小球病, 而且具有显著的肾实质纤维变性和肾小管增生 (参见图 3)。虽然在肾中发现了  $UG^{-/-}$  小鼠的显著的病理学, 但组织病理学研究还发现看来为血管来源的胰腺的偶然的坏死病灶区。而且, 还发现了表明为编程性细胞死亡实体的胸腺和脾结构中的病灶区。令人感兴趣的是, 胰腺表达 mUG 基因, 并且该器官还为 I 组细胞外  $PLA_2$  的丰富来源; 由于这为主要的消化酶, 因此它的活化可能导致组织损伤。

由于子宫珠蛋白已被报道具有免疫调节和抗炎特性, 并且由于已知反应性淀粉样变性应答于炎症而发生, mUG-裸鼠中肾小球的沉积可能是淀粉样蛋白。反应性淀粉样变性特征在于淀粉状蛋白和免疫复合

物的沉积。UG<sup>-/-</sup>小鼠中肾沉积物的同一性通过肾切片的免疫组织化学来确定。来自UG<sup>-/-</sup>和UG<sup>+/+</sup>小鼠的肾切片用刚果红染色,并在偏振光下观察。在该实验中淀粉状蛋白产生阳性双折射;然而,UG<sup>-/-</sup>小鼠的肾小球清楚的为阴性。对UG<sup>-/-</sup>小鼠的肾小球中的IgA, IgG或IgM-免疫复合物存在的免疫荧光研究以及对主要淀粉状蛋白的存在的免疫组织化学分析也为阴性。因此,UG<sup>-/-</sup>小鼠的肾小球沉积物不包含淀粉状蛋白和免疫复合物,因此看来不是炎症应答的结果。

#### 实施例 6: UG<sup>-/-</sup>肾中的 Fn 和胶原蛋白的检测

UG<sup>-/-</sup>小鼠的肾沉积物通过透射电子显微镜观察以说明它们的结构和形态学。将来自患有肾小球损伤的UG<sup>-/-</sup>小鼠的肾固定在福尔马林中并包埋在环氧树脂中。将薄的切片用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色以用于电子显微镜下观察。以6000X或60,000X进行显微照相。沉积物主要包含两种类型的纤维性结构;一种类型为相对不常见的长的具条纹的纤维,另一种更大量的短分散纤维(图3E和3F)。由于ECM蛋白,如胶原蛋白和纤连蛋白产生类似的纤维性结构,因此UG<sup>-/-</sup>小鼠肾小球沉积物可能包含这些蛋白。

接着通过使用抗mFn抗体的免疫荧光分析肾小球沉积物。福尔马林固定的组织切片被用于使用兔抗-mFn和FITC-缀合山羊抗兔IgG的免疫荧光。类似地,还进行使用特异于mFn、胶原蛋白I和III、玻连蛋白、层粘连蛋白和骨桥蛋白的抗体的免疫荧光研究。使用Zeiss Axiophot显微镜对落射荧光进行照相。野生型小鼠的肾小球中的Fn特异性免疫荧光实质上不可检测(图3G),在UG<sup>-/-</sup>同窝幼畜的肾小球中密集(图3H)。当使用Masson氏三色染色,UG<sup>+/+</sup>小鼠的肾小球为阴性(图3I),UG<sup>-/-</sup>小鼠(图3J)的那些为阳性,表明在肾小球沉积物中胶原蛋白的存在。使用胶原蛋白I和胶原蛋白III特异性抗体的免疫荧光证实了这些结果。由于已知Fn与其它细胞外基质(ECM)蛋白相互反应,我们还通过免疫组织化学检测了UG<sup>+/+</sup>和UG<sup>-/-</sup>小鼠的肾小球中的层粘连蛋白、玻连蛋白和骨桥蛋白的存在,其结果为阴性。

#### 实施例 7: UG<sup>-/-</sup>小鼠的肾不超量产生 Fn

为了确定是否Fn过量的产生可能导致其在肾小球中的沉积,我们通过RT-PCR和光密度法评价了UG<sup>-/-</sup>和UG<sup>+/+</sup>小鼠的肾、肺和肝脏中的Fn-mRNA的相对量。结果表明Fn-mRNA的相对量在UG<sup>+/+</sup>和UG<sup>-/-</sup>动物中

本质上相同。因此, Fn-mRNA 的超量产生可能不是  $UG^{-/-}$  小鼠肾小球中 Fn 沉积的原因。接着我们通过还原条件下的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹比较了  $UG^{-/-}$  和  $UG^{+/+}$  小鼠的血浆, 肾和肝脏中的 Fn-蛋白。在野生型小鼠的血浆、肾和肝脏中仅可检测到 220kD Fn 种类; 然而,  $UG^{-/-}$  小鼠的血浆和肝脏裂解物中具有 220kD Fn 带, 肾裂解物包含另一种独特的共价交联的多聚 Fn 带(图 4A)。

#### 实施例 8: $UG^{-/-}$ 小鼠中的提高的血清 $PLA_2$ 活性

基于目前的概念, 至少在细胞表面的 Fn 基质装配和原纤维形成中关键的起始步骤被认为包括整联蛋白活化和 Fn 自身聚集。由于 UG 是炎症途径中的关键酶—可溶性磷脂酶 A2 ( $sPLA_2$ ) 的强抑制剂,  $UG^{-/-}$  小鼠中 mUG 的缺乏可能导致发生为炎性肾病的肾小球性肾炎。因此, 我们检测了年龄、性别和体重匹配的  $UG^{+/+}$  ( $n=3$ ) 和  $UG^{-/-}$  小鼠 ( $n=3$ ) 的血清中的  $PLA_2$  活性。杀死动物并根据制造商的说明, 使用  $PLA_2$ -分析试剂盒 (Caymen Chemical) 三次重复测定各样品的血清  $PLA_2$  活性。通过 Bradford 分析 (Bio Rad) 确定血清中的蛋白浓度并计算  $PLA_2$  的比活。 $UG^{-/-}$  小鼠的血清  $PLA_2$  的比活 ( $\mu\text{mol}/\text{分钟}/\text{mg}$  蛋白) [ $36 \pm 3.3$  (SEM)] 明显高于 ( $p < 0.05$ )  $UG^{+/+}$  小鼠 [ $18 \pm 2.8$  (SEM)]。这些结果提出这种可能性, 即在  $UG^{-/-}$  小鼠中, 较高的  $PLA_2$  活性可能导致增加的溶血磷脂酸 (LPA) 的产生, 结果促进整联蛋白的活化和 Fn 自身聚集。

#### 实施例 9: 体外子宫珠蛋白与纤连蛋白的相互作用

为了进一步理解子宫珠蛋白可能如何防止 Fn 自身聚集, 在体外测定 rhUG 破坏 mFn-Fn 相互作用的能力。将等摩尔浓度的 rhUG 和 mFn 一起保温以使得所有蛋白结合或其它相互作用, 接着用抗 Fn 抗体免疫沉淀, 并通过在还原条件下的 SDS-PAGE 分辨免疫沉淀。如前所述, 通过使用 mFn 或 mUG 抗体的蛋白质印迹分别检测各种蛋白。结果表明纤连蛋白与 rhUG 共免疫沉淀(图 4B)。为了证实这些结果, 将  $^{125}\text{I}$ -rhUG 与 mFn 一起保温, 并在非变性和非还原条件下, 使用 6% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳来分辨复合物(图 4C)。放射自显影中对 Fn-UG 异聚体的检测(泳道 2)表明在体外可溶性 Fn 与 UG 相互作用。为了确定在体内是否发生 Fn-UG 异聚作用, 将  $UG^{+/+}$  和  $UG^{-/-}$  小鼠的血浆与不与 rhUG 交叉反应的抗 mFn 抗体进行免疫沉淀(图 4D)。抗 mFn 抗体与来自  $UG^{+/+}$ , 但不与来自  $UG^{-/-}$  小鼠的血浆的 mFn 和 rhUG 共沉淀, 这表明 Fn-UG 异聚体存

在于  $UG^{+/+}$  小鼠的血浆中。因此, Fn-UG 复合物并不单纯是在体外形成的假象, 且天然产生于血清中。

为了确定 UG 对 Fn 结合的特异性和亲和性, 我们在存在和不存在 UG 下将  $^{125}I$ -Fn 与未标记的 Fn 一起保温。所有复合物与二琥珀酰亚胺基底物 (DSS) 亲和交联。使用覆盖有人 Fn (hFn) (Collaborative Biomedical Products) 的 24 孔平板, 在不存在和存在 UG 或 Fn ( $10^{-12}$ - $10^{-6}M$ ) 下, 将  $3\mu l$   $^{125}I$ -Fn (Sp. Act. 6mCi/mg: ICN Biomedicals) 在  $500\mu l$  HBSS 中室温下保温 2 小时。SDS-PAGE 以及使用 UG 抗体对所有 Fn 的蛋白质印迹未检测到任何 UG 污染。将放射标记的复合物用 PBS 洗涤两次, 溶解在 1N NaOH 中, 用 1N HCl 中和, 通过  $\gamma$  计数器测定放射活性。在一个单独的实验中, 在不存在或存在增加浓度的还原 rhUG (5-500 $\mu g$ ) 下, 将  $^{125}I$ -hFn ( $3\mu l$ ) 与  $20\mu l$  (1mg/ml) 小鼠 Fn 的  $40\mu l$  HBSS, pH7.6 一起室温下保温 2 小时。室温下将样品与 0.20mM DSS 交联 20 分钟, 在 SDS-样品缓冲液中煮沸 5 分钟, 4-20% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并放射自显影。在不存在 UG 下,  $^{125}I$ -Fn 与未标记的 Fn 形成高分子量的放射活性复合物, 但在存在 UG 时, Fn-Fn 聚集物的形成被以依赖于 UG 浓度的方式抑制 (图 4E)。

为了确定在 Fn 对 UG 的结合亲和性与 Fn 对其本身的结合亲和性之间是否存在任何差异, 进行结合实验, 其中将  $^{125}I$ -Fn 与未标记 Fn 一起保温, 并与变化浓度的 UG 一起固定 in 多孔平板中。在独立实验中, 还使用各种浓度的未标记的可溶性 Fn 进行了对  $^{125}I$ -Fn 与未标记固定的 Fn 的结合研究。来自两种类型的结合实验的数据的 Scatchard 分析产生具有 UG 对 Fn 的结合的解离常数 (kds) 为 13nM, Fn 对其本身的结合的解离常数为 176nM 的直线。这些结果表明由于 UG 对 Fn 的相对较高的结合活性, UG 有效地对抗 Fn 自身聚集。如上面对 Fn 所描述的, 还在不存在或存在 UG 下, 进行了将放射碘标记 ( $^{125}I$ )-胶原蛋白 I 与未标记的 Fn 一起保温的亲和交联实验。在存在或不存在还原 UG (250 $\mu g$ ) 下, 将  $15\mu l$  变性或未变性  $^{125}I$ -胶原蛋白 I (Sp. Act. 65.4mCi/mg) 与 Fn 一起保温, 亲和交联, 电泳并放射自显影。结果表明 UG 对抗高分子量  $^{125}I$ -胶原蛋白-Fn 聚集物的形成 (图 4F)。

#### 实施例 10: rhUG 对肾小球 hFn 沉积的体内抑制

为了检测 rhUG 是否保护肾小球免于 Fn 聚集, 对  $UG^{+/+}$  和外表健康

的  $UG^{-/-}$  同窝仔静脉内单独给药可溶性人 Fn (nFn) 或与等摩尔浓度的 rhUG 混合的 hFn。

将人 Fn (500 $\mu$ g/150 $\mu$ l PBS) 给药至两月龄, 大约 22g 的  $UG^{+/+}$  和外表健康的  $UG^{-/-}$  小鼠的尾静脉中。类似地, 对照鼠被注射 500 $\mu$ g 与等摩尔浓度的 rhUG 或白蛋白的 150 $\mu$ l PBS 混合物。末次注射 24 小时后, 将小鼠杀死, 并将各器官固定在缓冲的福尔马林中。通过使用单特异性的抗-hFn 抗体 (GIBCO BRL; 克隆 1) 和 FITC 缀合兔抗小鼠 IgG (Cappel) 的免疫荧光观察肾和其它器官的组织切片。在一个单独的实验中, 将  $UG^{+/+}$  小鼠每天注射仅 1mg hFn 的 150 $\mu$ l PBS 达连续 3 天。

注射人 Fn 的合理性能分辨内源小鼠 Fn 与给药的 hFn。已描述了静脉内给药的方法和各组织中的 hFn 的免疫组织化学检测。

注射了 hFn 和 rhFn (1:1 摩尔比例) 的混合物或仅 hFn 的野生型  $UG^{+/+}$  小鼠的肾小球中的人 Fn 的免疫荧光类似 (图 5A 和 5B)。然而, 注射了 hFn 和 UG 混合物的  $UG^{-/-}$  小鼠在肾小球中显示极少的 hFn 特异性免疫荧光 (图 5C), 而仅注射了 Fn 的那些显示较高强度的免疫荧光 (图 5D)。作为对照, 给药 hFn 和 BSA 的混合物不产生保护作用。

为了确定这种 UG 保护作用是否可通过在  $UG^{+/+}$  小鼠中注射较大量的 Fn 来克服, 我们每只动物每天注射 1mg hFn 达连续 3 天。虽然以较低的剂量 (500 $\mu$ g/动物) 对  $UG^{+/+}$  小鼠静脉内给药在导致任何明显的肾小球沉积中不起作用 (图 5A), 但给药较高剂量 (3mg/动物) 导致显著的积累。因此, UG 防止肾小球 Fn 沉积, 与  $UG^{-/-}$  小鼠相反, 由于内源 UG 的存在,  $UG^{+/+}$  对于可溶性 Fn 的积累具有较高的阈值。

#### 实施例 11: 组织培养细胞中 rhUG 对纤维形成和 Fn 基质聚集的抑制

为了确定在通常的体外组织培养物分析中 UG 是否阻止 Fn 纤维形成和基质聚集, 在仅包含可溶性 hFn 或等摩尔浓度的 hFn 和 rhUG 的混合物的培养基中培养小鼠胚胎成纤维细胞。如上测定培养细胞 (CRL6336, ATCC) 中的 Fn 基质的聚集和纤维形成。与接受 hFn 和 rhUG 的混合物的那些比较 (图 5F), 在仅用 hFn 处理的培养物的细胞中观察到的纤维形成水平更高 (图 5E)。

#### 实施例 12: 临床样品中的 UG-Fn 复合物的检测

对体液的临床样品, 如血清、BAL 体液和痰中的 UG-Fn 复合物的检测在确定该复合物在人疾病中的作用非常重要。开发了用于检测

UG-Fn 复合物的液相诊断分析法，该分析方式示于图 6。与固体载体共价连接的捕获抗体为针对人蛋白产生的单特异性的兔多克隆抗体。固体载体可为珠，如磁性珠，管和 ELISA 平板。固体载体在各结合反应后提供进行洗涤步骤的灵活性以获得对于各种样品类型的更一致的结果。检测抗体为 Fn 特异性的，并可从许多商业来源获得。与酶，如辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的抗-IgG 抗体接着被用来检测在标准酶反应中分子链末端的抗-Fn IgG，其中酶底物被转化为用分光光度计和荧光光度计 (Amersham) 定量的显色或荧光化合物。该分析法的检测限制值为 500 $\mu$ gUG-Fn 复合物/ml 样品液体。

#### 实施例 13: 子宫珠蛋白缺陷

暂时但为急性 hUG 缺乏是由已知为临床透析，包括血液透析、腹膜透析和连续透析 (CRRT) 的血液清洗技术产生的。所有形式的临床透析包括使用半透膜从血液中过滤有毒的身体废产物，包括化学代谢物，如尿和小的蛋白，如 $\beta$ 2-微球蛋白。

从其在 SDS-PAGE 中的特殊的迁移已知 UG 是一种极紧密的蛋白，其中特殊的迁移对应于约 10-13kDa 的分子量，尽管其真正的分子量为 15.7kDa。因此，UG 二聚体被预期在透析实验中以 10-13kDa 起作用。令人惊奇的是，发现二聚体是如此致密以致通过 8.0kDa MWCO 透析膜。UG 还通过 14.0 kDa MWCO 透析膜。

如果不相同，用于这些实例中的透析膜的组成与生产和用于临床透析的大多数膜的组成类似。它们由再生纤维素或乙酸纤维素组成。

对于本实验，将不含缓冲添加物的两份部分纯化(一个纯度大于 90%，一个约 70% 纯度)的 rhUG 细胞裂解物的 1.0ml 等份试样对 1000ml 未缓冲的 50mM 乙酸铵透析，使用三种大小的透析管：3.5kDa，8.0kDa 和 14.0kDa (Spectra/Pro; Thomas Scientific)。在 48 小时期间对各样品四次更换缓冲液，均在室温下(约 25-27 $^{\circ}$ C)进行。各透析样品的外观从清亮的黄色变为清亮的无色液体。在过程的开始和结束，通过简短地对管道(挤压系统)加压并观察任何渗漏来检查其中不存在渗漏的透析管道系统。管道系统在各末端是双固定的以进一步确保渗漏。

图 7 显示这些 SDS-PAGE 分析结果。90% 纯度的预透析的样品示于泳道 7 和 8，紧接泳道 1，2 和 3 中的三个透析后样品。UG 二聚体不再

存在于代表用 8.0kDa MWC0 膜透析的样品的泳道中。这些结果后来用不同批次的部分纯化的 UG 制备物得以证实。

虽然本发明结合目前被认为是最可行和优选的具体实施方案进行了描述，但应理解本发明不局限于所公开的具体实施方案，相反，覆盖各种包括在所附权利要求的实质和范围内的各种修改和等同的方法。

## 参考文献

1. Levin, S.W. *et al.*, 生命科学. 38: 1813-1819 (1986);
2. Singh G. *et al.*, 生物化学与生物物理进展 1039: 348-355(1990);
3. Mantile, G. *et al.*, 生物化学杂志 268: 20343-20351 (1993);
4. Singh, G. *et al.*, J. 组织化学与细胞化学杂志. 36: 73-80 (1987);
5. Bernard, A. *et al.*, 临床化学. 38: 434-435 (1992);
6. Dhanireddy, R. *et al.*, 儿科研究. 23: 463A (1988);
7. Dhanireddy, R. *et al.*, 儿科研究. 33: 323A (1993);
8. Piomelli, D., Op. 细胞生物学. 5: 274-280(1993);
9. Krishnan, R.S. *et al.*, 科学 158: 490-492 (1967);
10. Beier, H. Verhandl Deut. Zool. Ges. Heidelberg (1968);
11. Umland, T.C. *et al.*, 天然结构与生物学. 1: 538-545 (1994);
12. Hard, T. *et al.*, 天然结构与生物学. 2: 938-989 (1995);
13. Umland, T.C. *et al.*, 天然结构与生物学. 2: 919-922(1995);
14. Stripp, B. R. *et al.*, Am. T. Physio. 271 ( 肺细胞分子生理学. 15): L656-L664 (1996);
15. Lesur, O. *et al.*, Am. T. Respir. 急救医学. 152: 290-297 (1995);
16. Glaser, K.B., 药理学. 32: 31-66 (1995);
17. Tykka, H.T. *et al.*, Scand. J. 斯堪的纳维亚肠胃病学杂志. 20: 5-12 (1985);
18. Sheuer, W., Klin. Wochenschr. 67: 153-159 (1989);
19. Barnes, H.J. *et al.*, 分子生物杂志., 2月. 23, 1996;
20. Aoki, A. *et al.*, Mol. Hum. 生殖. 2: 419-497 (1996);
21. Anderson 和 Kurkland, 微生物学综述 54: 198-210 (1990);

22. Miele, L. *et al.*, 生物化学杂志. 265: 6427-6435 (1990);
23. Coalson, J.J. *et al.*, 实验分子病理学. 37: 355-360 (1982);
24. Nagy, A. *et al.*, 美国科学院院报. 90: 8424 (1993);
25. Capecchi, M.R., 科学, 244: 1288 (1989);
26. Harlow, E. 和 Lane D. 抗体: 实验室手册, 第一版.冷泉港实验室出版, 冷泉港, NY, 1988;
27. Mantile, G. *et al.*, 生物化学杂志. 267: 20343 (1993);
28. Ruoslahti, E. 生物化学年鉴. 57: 375 (1988);
29. R.O. Hynes, Fibronectins, New York: Springer-Verlag (1990);
30. Chernousor, M.A. *et al.*, 生物化学杂志. 266: 10857 (1991);
31. Zhang, Q. *et al.*, 细胞生物学杂志. 127: 1447 (1994);
32. Wu, C. *et al.* 细胞 83: 715 (1995);
33. Zhang, Q. *et al.*, 生物化学杂志. 271: 33284 (1996);
34. Border, W.A. *et al.*, 临床研究杂志. 90: 1 (1992);
35. Peri, A., *et al.*, 临床研究杂志. 92: 2099 (1995);
36. Peri, A. *et al.*, 临床研究杂志. 96: 343 (1995);
37. Oh, E. *et al.*, 美国国家科学院院报. (USA) 78: 3218 (1981);
38. Mosher, D.F. *et al.*, 现代生物学. 4: 810 (1992).

人 CC10 kDa: 1 EICPSFQRVETLLMDTPSSYEAAAMELFSPDQDMREAGAKKKLVDTLPQKPREIIKLMKIAQSSLCN 70  
ICP F VIE LL TPSSYE F PC M AG Q KK D LPQ RE I KL EKI S LC  
兔 Utg: GICPRFAHVIEENLLGTPSSYEISLKEFEFDDIMKDGAMQNKVLDLSPQTIRENIMKLTKEIKVKSPLC  
大鼠 CC10: ICP F V E LL S YEAA F P D AG QLK LVDTLPO R I KL EKI S LC  
DICPGFLQVLEALLGSESNYEAAKPFNPASDLQNAGTQLKRLVDTLPQETRINIVKLTKEILTSPLCEQDLRV  
小鼠 CC10: ICP F V E LLM S Y A F P D AG QLK LVDTLPO R I KL EKI S LC  
DICPGFLQVLEALLMESESGYVASLKPFNPGSDLQNAGTQLKRLVDTLPQETRINIMKLTKEILTSPLCKQDLRF

为了比较，氨基酸残基显示在一级序列下面，对应于人蛋白相同位置发现的残基。这些序列通过翻译保存在Genebank中的核苷酸序列来推测。这些蛋白为分泌蛋白和N-末端信号序列，并且被翻译和加工，经编辑用于比较

图 1

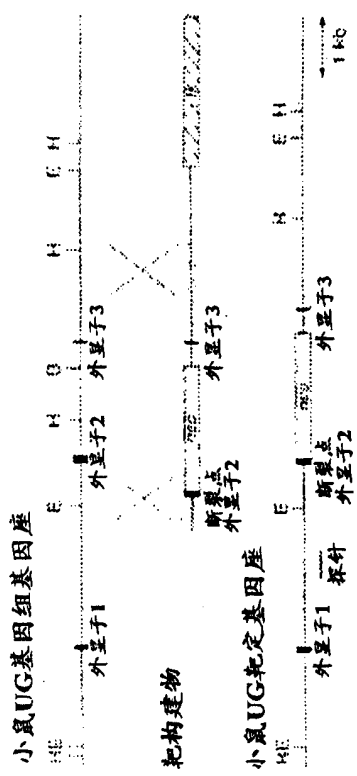


图 2A

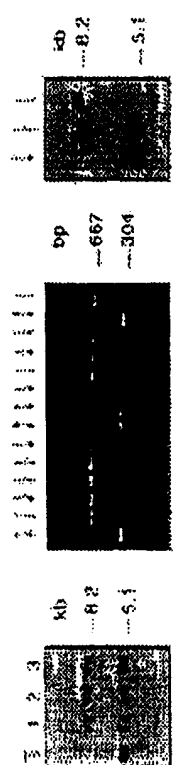


图 2D

图 2C

图 2B

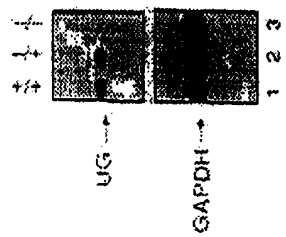


图 2E

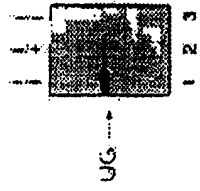


图 2F



图 2G



图 3D

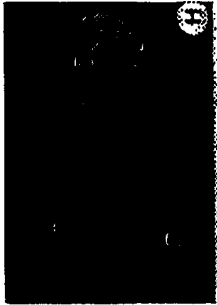


图 3H



图 3C

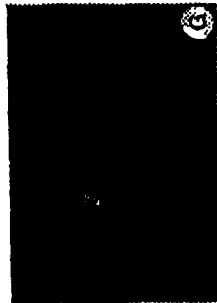


图 3G



图 3J



图 3B



图 3F



图 3I



图 3A



图 3E

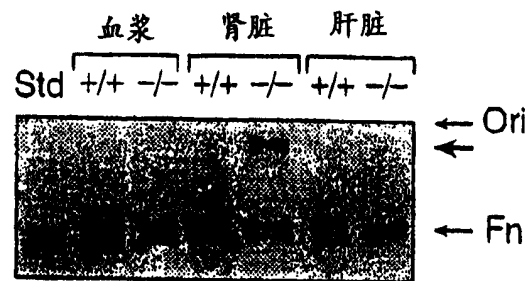


图 4A

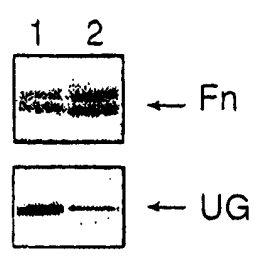


图 4B

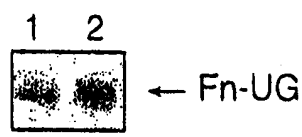


图 4C

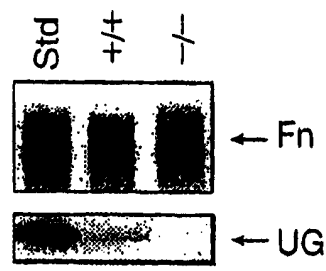


图 4D

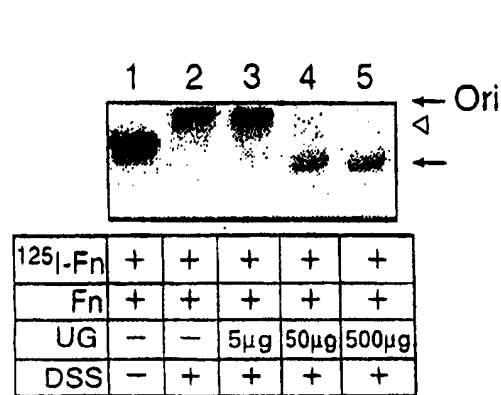


图 4E

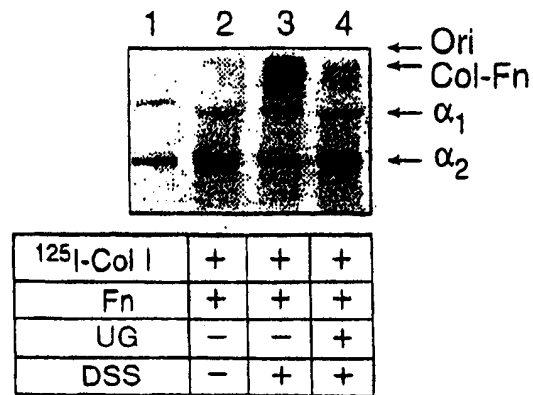


图 4F

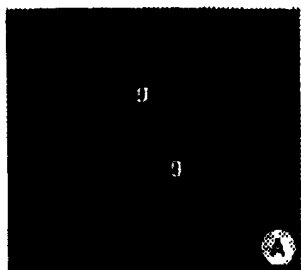


图 5A

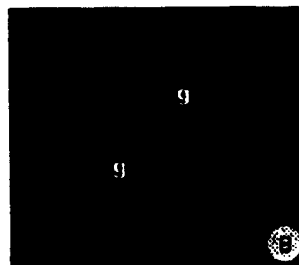


图 5B



图 5C



图 5D

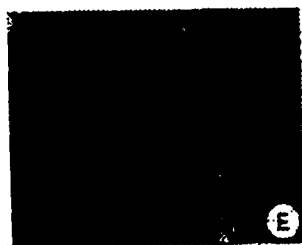


图 5E



图 5F

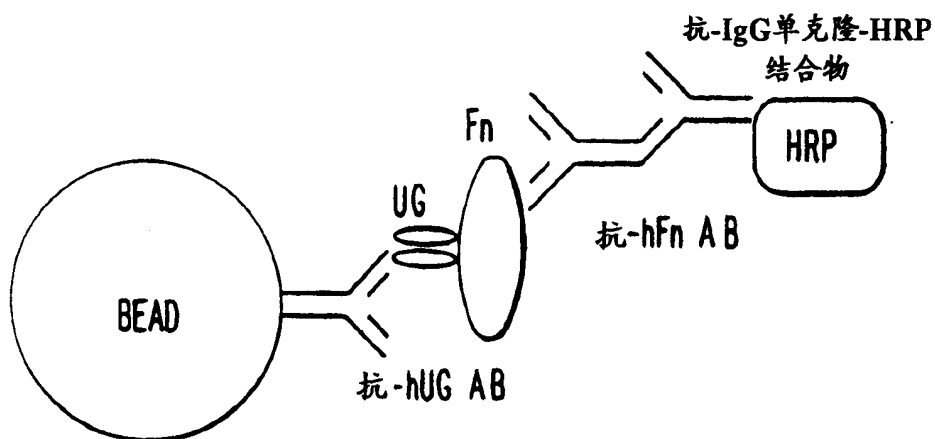


图 6A

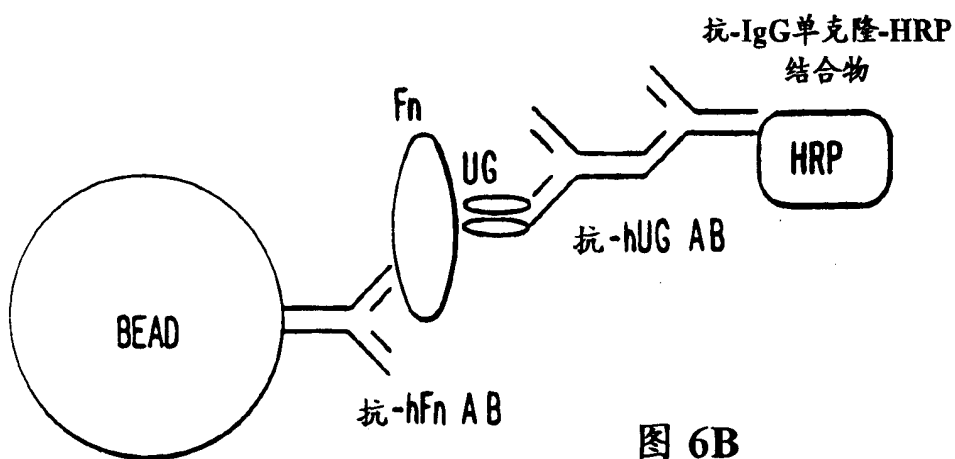


图 6B



图 7