[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/68
C12Q 1/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02824650.0

[43] 公开日 2005 年 3 月 30 日

[11] 公开号 CN 1602427A

[22] 申请日 2002.11.30 [21] 申请号 02824650.0
[30] 优先权
[32] 2001.12.12 [33] EP [31] 01129564.9
[86] 国际申请 PCT/EP2002/013545 2002.11.30
[87] 国际公布 WO2003/054541 英 2003.7.3
[85] 进入国家阶段日期 2004.6.10
[71] 申请人 默克专利股份公司
地址 德国达姆施塔特
[72] 发明人 F·-W·克卢克森 B·亨特施
T·厄林 M·布兰德勒
J·D·霍黑泽尔 M·弗罗姆
D·祖巴科夫

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李连涛 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 1 页

[54] 发明名称 三重四脯氨酸碱性蛋白用于保护心脏避免发生心脏损伤的抑制作用

[57] 摘要

本发明涉及一种适于治疗至少部分地通过提高 TNFα 产量而改善的疾病的化合物。本发明进一步涉及一种用于鉴别处于患病的高度危险中和/或正遭受这种疾病的个体的试验方法以及一种筛选能够提高 TNFα 生物合成的化合物的方法。

ISSN1008-4274

1．一种筛选具有能够通过抑制和/或反转 TTP 结合至 TNF-α mRNA 而提高 TNF-α 产量的能力的化合物的方法，包括：a）将该化合物与含有一种能够表达 TNF-α mRNA 的 3'未翻译区一部分的表达构建体的无细胞样品接触，其中该 TNF-α mRNA 包含 ARE 片段，已知该片断能在 TTP 的存在下在报道蛋白能够表达的条件下使得融合进报道基因中的 TNF-α mRNA 不稳定化，以及 b）确定报道蛋白的表达水平并与在该化合物不存在的条件下所获得的表达水平进行比较，以及 c）挑选与在该化合物不存在的条件下所获得的表达水平比较能够提高报道蛋白的表达水平的化合物。

2．如权利要求 1 所述的方法，其包括下列步骤：a）在 TTP 的存在下在 TNF-α 能够表达的条件下，将该化合物与含有 TNF-α mRNA 的无细胞样品接触，以及 b）确定 TNF-α 的表达水平并将生产 TNF-α 的水平与在该化合物不存在的条件下获得的 TNF-α 的水平进行比较，以及 c）挑选与在该化合物不存在的条件下所获得的表达水平比较能够提高报道蛋白的表达水平的化合物。

3．如权利要求 1 所述的方法，其包括下列步骤：a）使所述化合物与表达 TTP 以及 TNF-α 或者不是 TNF-α 而是 TNF-α mRNA 3'端未转译区域的一部分的细胞系接触，其中该部分包括已知可以使融入报道基因的 TNF-α mRNA 不稳定的 ARE 片段，以及 b）确定 TNF-α 或报道蛋白的表达水平且与在该化合物不存在的条件下获得的表达水平比较，以及 c）挑选与在该化合物不存在的条件下获得的表达水平比较可以增强 TNF-α 的表达或报道蛋白的表达的化合物。

4．检测个体中 TTP 浓度提高的体外方法，其包括使用免疫测定法检测所述 TTP 在所述个体的生物样品中的存在。

5．如权利要求 4 所述的方法，其包括下列步骤：a）在抗体与 TTP 能够结合的条件下，使从所述个体中获得的生物样品与抗 TTP 的抗体接触，以及 b）测定 TTP 的量。

6．一种检测个体中 TTP mRNA 水平提高的体外方法，其包括使用一些基于杂交的试验检测个体的生物样品中的 TTP mRNA。

7．如权利要求 6 所述的方法，其包括下列步骤：a）将从所述个体中获得的含有 RNA 的生物样品与可检测的 TTP 的 cDNA 或 cRNA 或其能

与 TTP 的 mRNA 结合的片段在 TTP 与 mRNA 的杂交能够发生的条件下接触；b）通过基于杂交的方法例如 RNA 印迹法，斑点印迹，RNA 酶保护或者类似的基于 TTP cDNA 或 cRNA 与获自所要分析样品的靶 RNA 杂交的方法测定 TTP-mRNA 的量。

8. 如权利要求 4 至 7 的任意一项所述的方法，其中所述个体正处于患疾病的危险中或正遭受疾病，所述疾病至少部分地通过提高 TNF-α 产量而得到改善。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中所述疾病是心脏疾病和/或心脏损伤。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于所述心脏疾病和/或心脏损伤是血液动力超载，心肌再灌注损伤，肥厚性心肌病，末期充血性心力衰竭和/或局部缺血的病症或其结果例如心肌梗塞或不稳定心绞痛。

11. 如权利要求 4 至 7 的任意一项所述的方法，其用于鉴别需要预防再灌注损伤的治疗的个体。

12. 作为药学活性物质的抗 TTP 的抗体或其片段或者与 TTP 的 mRNA 互补的 cDNA 或者 cRNA 或其片段。

13. 如权利要求 12 所述的化合物在制备用于通过抑制和/或反转 TTP 结合至 TNF-α mRNA 而诱导或提高 TNF-α 产量的药物中的用途。

14. 如权利要求 12 所述的化合物在制备用于治疗心脏疾病和/或心脏损伤的药物中的用途。

15. 如权利要求 14 所述的化合物在制备药物中的用途，其中所述的心脏疾病和/或心脏损伤是血液动力超载，心肌再灌注损伤，肥厚性心肌病，末期充血性心力衰竭和/或局部缺血性疾病或其结果例如心肌梗塞或不稳定心绞痛。

16. 如权利要求 12 所述的化合物在制备用于预防再灌注损伤的药物中的用途。

17. 含有至少一种权利要求 12 所述的化合物以及任选的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药物。

18. 适于进行如权利要求 4 或 5 所述方法的诊断试剂盒，它包含至少一种抗 TTP 的抗体。

19. 一种适于进行如权利要求 6 或 7 所述方法的诊断试剂盒，其

包含至少一种能够结合 TTP 的 mRNA 的 cDNA 或 cRNA 或其片段。

20. TTP cDNA 衍生的引物在进行基于 PCR 的 TTP mRNA 定量的方法中的用途。

21. TTP cDNA 衍生的引物作为一种诊断工具用来检测改变了的 TTP 的基因表达的用途。

三重四脯氨酸碱性蛋白
用于保护心脏避免发生心脏损伤的抑制作用

技术领域

本发明涉及适用于通过提高α-TNF(肿瘤坏死因子-α)产量而至少部分改善疾病的治疗疾病的化合物。本发明进一步涉及到一种鉴别患有该种疾病或具有极高风险患有该种疾病的个体的试验方法以及一种筛选具有能提高TNF-α生物合成能力的化合物的方法。

技术背景

TNF-α是一种可以由许多类型细胞释放的有效的细胞因子，其同样以与细胞膜结合的较高分子量的形态存在于细胞上，该种形态同样表现为可以介导各种各样的生物效应，TNF-α一般被认为在正常的发育以及生理过程中起很小的作用，然而，在许多疾病状态下其对许多组织起到了有害的及破坏的效果 (Tracey et al.,Ann. Rev. Med 1994; 45: 491)。已经显示出其中TNF-α起主要作用的疾病状态包括脓毒性休克综合病症，癌症，风湿性关节炎，等等。

与之相比较，来自不同实验室的实验研究显示，成年哺乳动物心脏在经过某些形式的应激之后合成TNF-αmRNA (Bader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91: 11831; Giroir et al., J. Clin. Invest. 1992; 90: 693; Giroir et al., Am. J. Physio. 1994; 267:H118.)。重复实验发现TNF-α事实上表达于无论大小的哺乳动物中的所有类型的心脏损伤，包括但并不限于心肌梗塞(Mauri etal., J. Intern. Med. 1989; 225: 333; Basaranet al., Angiology. 1993; 44: 332)，不稳定心绞痛(Matsumori etal., Br. Heart J. 1994; 72: 566)，血液动力超载(Kapadia etal., J. Clin. Invest. 1995; 96: 1042)，心肌梗塞再灌注损伤(Lefer etal., Science. 1990; 249: 61; Herskowitz etal., Am. J. Pathol. 1995 ; 146: 419)，心肌肥大病(Matsumori etal., Br. Heart. J. 1994 ; 72: 561)，以及末期充血性心力衰竭(Levine etal., N. Engl. J. Med. 1990; 223: 236; Torre-Amione etal., Circulation. 1996; 93: 704) ，表明TNF-

α在心脏中可以作为系统发育保守的先天性应激反应基因而发挥作用。

所发现的 TNF-α给予成体的心脏组织对于缺氧应激的抵抗力表明,受损的和/或应激状态下的心脏组织生产的TNF-α可以用作用于保护心脏中相邻细胞的局部自分泌/旁分泌/并分泌机理(Nakano et al., Circulation. 1998 ; 97: 1392),众所周知,再灌注之后短期的冠状动脉闭塞给予心脏免受后期的其他的致命性局部缺血伤害的保护,无论如何第一次保护期限在持续数小时后结束。第一次局部缺血后 24 小时,出现第二次保护窗口期 (SWOP),其可能持续数天,其主要依赖于所用的物种及所使用的实验条件。除了闭塞以及再灌注期间以外,一些物质例如腺苷以及脂多糖(LPS) 也已知可以诱导出一个第二次保护窗口期(SWOP)。

其他的方法中, iNOS(可诱导的 NO-合成酶)的表达被认为是 SWOP 的重要的调控因子。iNOS 本身可以为 TNF -α所诱导,其表达可以在通过 LPS 诱导的 SWOP 之后进行。TNF-α的表达被认为是 SWOP 发展所必需的。因此, TNF-α水平的提高对于至少部分通过提高 TNF -α产量而改善的疾病例如包括但并不限于心脏病和/或心脏损伤和/或再灌注损伤等疾病的预防具有治疗用途。

因此对于遭受上述疾患的个体来说,迫切需要相应的药物来提高体内的 TNF-α的水平,筛选有能力提高 TNF-α水平的化合物的方法以及鉴别和诊断可能遭受该种疾病的高危个体的方法。

本发明涉及一种新的途径以治疗可以至少部分地通过提高 TNF-α的产量而改善的疾病,该种途径涉及到蛋白质三重四脯氨酸碱性蛋白(TTP),以及 TTP 的 cDNA 以及 cRNA ,还有抗-TTP 的抗体及其片段。

TTP (Lai etal, J.Biol. Chem. 1990; 265: 16556),如同已知的 Nup475 (DuBois et al, J. Biol. Chem. 1990; 265: 19185)以及 TIS11 (Varnum et al, Oncogene 1989; 4: 119; Varnum et al, Mol. Cell. Biol. 1991; 11: 1754)是一个广泛分布的 33 kDa 的磷蛋白,其可以为直接的早期反应基因 Zfp-36 (Taylor et al, Nucl. Acids Res. 1991; 19: 3454)所编码,该基因已被绘制定位于小鼠的第 7 条染色体上以及相应的人类基因,ZFP36,被绘制定位于染色体 19q 13.1 上 (Taylor et al, Nucl. Acids Res. 1991; 19: 3454)。

TTP是一组含有两个或更多的高度保守的CCCH分类的推定锌指的蛋白质的原型(Varnum et al, Mol. Cell. Biol.1991; 11: 1754;Taylor et al, Nucleic Acids Res. 1991; 19: 3454;Gomperts et al, Oncogene. 1990; 5: 1081; Ma et al, Oncogene. 1994; 9: 3329)。此外，该蛋白已显示结合有 Zn^{2+} 且位于小鼠的成纤维细胞的细胞核中(DuBois et al, J. Biol. Chem. 1990; 265: 19185)，提示其可能是一个转录因子。血浆或其它的促有丝分裂剂对休眠的成纤维细胞刺激的可致快速的丝氨酸磷酸化以及 TTP 从核到细胞质的易位(Taylor et al., J. Biol. Chem. 1995; 270: 13341)，二者均可以调控其在细胞中的功能。

最近的研究已经显示 TTP 在巨噬细胞中起到调控 TNF-α 的作用(Carballo etal., Science 1998; 281: 2001)。TTP 的表达受到脂多糖以及 TNF-α 的诱导，TTP 可以与 TNF-α mRNA 分子的 3 引物末端中的一个富含 AU 的元件(ARE)结合，这样其可以使得 TNF-α mRNA 分子失稳化。

在 WO 97/42820 中已经描述了利用 TTP 的特点用于治疗与 TNF-α 过量相关的疾病例如败血性休克综合征，癌症痛病(cancer achexia)，类风湿性关节炎等，同时也描述了通过提高 TTP 水平来治疗这些疾病的方法以及筛选有能力抑制 TNF-α 生成的化合物的方法以及鉴别个体是否受到因 TNF-α 过量而带来的高度危险。

WO 01/12213 提供了调控含有富含 AU 的元件(ARE)的 mRNA 分子的破坏作用的方法，例如，刺激编码 TNF-α 的 mRNA 分子的降解的方法以及抑制一个编码粒细胞－巨噬细胞刺激因子(其可以治疗粒细胞减少症)的 mRNA 分子降解的方法。

在患有可以至少部分地通过增加 TNF-α 产量来改善的疾病或具有患该种疾病风险（例如包括但并不限于心脏疾病和/或心脏损伤）的个体中 TTP 的功能至今未知。

发明概述

本发明的目的是提供一种筛选试验方法，其可以挑选有能力增加 TNF-α 产量的化合物。

本发明的另一个目的是提供一种鉴别患有或具有很高风险患有至

少部分地通过增加 TNF-α 产量来改善的疾病（例如包括但并不限于心脏疾病和/或心脏损伤）的个体的试验方法和/或用于鉴别需要预防再灌注损伤治疗的个体的试验方法。

在本发明的另一个技术方案中，TTP cDNA 衍生的序列可被用于设计引物，其可用于 TTP mRNA 定量的任一基于 PCR 的方法中，生物样品中 TTP mRNA 水平的定量可被用于检测改变的基因表达的诊断工具。

本发明的进一步的目的是提供具有提高 TNF-α 产量的能力的活性化合物，其是通过抑制和/或反转 TTP 结合至 TNF-α 的 mRNA，如可以与 TTP mRNA 杂交的抗－TTP 抗体或其片段、TTP mRNA 的 cDNA 或 cRNA 或其片段而发挥作用的，或提供其它通过上述以及下述的试验方法选择的化合物以及含有这些化合物的药物。

在另一个技术方案中，本发明涉及到使用所述的能够抑制和/或反转 TTP 结合至 TNF-α 的 mRNA 以在个体中诱导或增加 TNF-α 产量的活性化合物的用途。

在本发明的另一个技术方案中，提供一个使用所述活性化合物来生产治疗患有或具有极高风险患有至少部分地通过增加 TNF-α 产量来改善的疾病（例如包括但并不限于心脏疾病和/或心脏损伤）的个体的方法和/或用于预防再灌注损伤个体的药物。

本发明进一步的目的以及优点可以通过下述说明书清楚地看出来。

附图的简要说明

图 1. 通过 RT-PCR 检测狗心脏中的 TTP mRNA。

1. 8h 再灌注对照 (假外科手术)

2. 4h 再灌注对照 (假外科手术)

3. 16h 再灌注 (外科手术)

4. 8h 再灌注 (外科手术)

5. 4h 再灌注 (外科手术)

指定来源的 RNAs 用于 RT-PCR 分析。使用标准方法对 RNAs 进行反转录，随后使用根据起始的狗 TTP 序列设计的短的寡聚脱氧核苷酸作为引物进行 PCR。

发明详述

本发明的目的是在无意中的发现的基础上达到的：蛋白三重四脯氨酸碱性蛋白(TTP)的表达在心脏组织中在冠状动脉闭塞以及再灌注之后以一时间依赖性的方式进行正调节 而取得的(图.1)。

正如上所述，由受伤和/或应激的心脏组织的 TNF-α 的生产可以作为用于保护邻近细胞的局部的自分泌/旁分泌/并泌机理。相应地，TTP 调控心脏中 TNF-α 生产的能力被认为具有相当大的制药重要性。

发现在冠状动脉闭塞后再灌注心脏中 TTP 的表达以及人类 TTP 氨基酸序列(Taylor etal, Nucl. Acids Res. 1991, 19 : 3454) 以及其编码序列(例如 Gnenbank 序列号 M63625)的可获得性允许发展试验方法以筛选可以被用于进行预防和/或治疗至少部分地通过提高 TNF-α 产量而改善的疾病（例如包括但并不限于心脏疾病，心脏损伤）和/或用于预防再灌注损伤目的的化合物以及鉴别和诊断患有该种疾病或处于高发危险中的个体的方法。

术语“心脏病和/或心脏损伤”指的是疾病和/或损伤或血液动力超载，心肌再灌注损伤，肥厚性心肌病，末期充血性心力衰竭和/或局部缺血的疾病或其结果例如心肌梗塞或不稳定心绞痛。

在按照本发明的一个筛选试验的实施例中，人类 TTP cDNA 的全长序列被插入到一个适宜的真核生物表达载体中(在一个很强的启动子例如 SV40，CMV，或一个诱导性启动子(例如在 tet 开关系统)的控制下)，该表达载体携带有一个选择性标记例如新霉素，zeozin，均霉素，或其它的用于选择重组细胞的物质。这些表达载体通过标准的方法被转染进入细胞系例如 H9C2，COS-1，COS-7，HEK293，HEK293 EBNA，CHO，BHK HeLA 或类似的细胞系以表达 cDNAs 且通过加入抗生素选择合适的细胞系。通过这种方法，可以选择到单克隆或者多克隆的细胞系。

使用启动子例如 SV40，CMV 或融合进一个 TNF-α 基因或一个报道基因的类似物例如荧光素酶，CAT，β-半乳糖苷酶以及 TNF-α mRNA 的 3'端未翻译区域的一部分来构建第二个质粒，该启动子包括已知可以使得 TNF-α(mRNAGenBank 登录号 X02611 的碱基 1197-1350)不稳的 ARE（富含 AU 的元件）。该载体另外携带一个选择性标记，其完全不同于第一个载体。可以使用本领域已知的技术进行转染。

在转染以及选择第二个质粒之后，细胞系可被用于检测可以干扰TTP活性的物质。

可供选择地，携带TTP的质粒以及携带TNF-α基因或报道基因的质粒可被混合，随后使用标准技术转染进入上述的一个细胞系中。

这样的一个细胞系可被用于筛选具有通过抑制和/或反转TTP结合至TNF-α的mRNA而提高TNF-α产量的能力的化合物，其包括例如下述步骤：a）使该化合物接触表达TTP以及TNF-α或者不是TNF-α而是TNF-α mRNA 3'端未翻译区域的一部分（其包括已知的可以使得融入报道基因的TNF-α mRNA不稳定的ARE片段）的细胞系，以及b）确定TNF-α或报道蛋白的表达水平且将该水平与在该化合物不存在的条件下获得的表达水平比较，以及c）挑选与在该化合物不存在的条件下获得的表达水平比较可以增强TNF-α的表达或报道蛋白的表达的化合物。

加入测试化合物且在24－72小时后使用酶活性阅读器或者一个荧光信号检测器或者在表达TNF-α的细胞系的情况下使用抗TNF-α抗体或其它本领域已知的技术测量报道基因的活性，所测得的值被用于进行TTP活性的确定。

能够提高TTP活性的物质可以通过用与未处理的对照细胞相比具有提高的活性的报道基因而检测出来。

能够抑制和/或反转TTP与位于TNF-α或报道mRNA的3'末端的ARE结合的物质将会稳定该mRNA，并导致与缺乏该化合物时相比较有更高的TNF-α或报道蛋白的产量。

本发明的另一个筛选试验的实施例包括下列步骤：a)将待筛选的化合物与含有能够表达出含有已知可以使得在TTP的存在下以及在报道蛋白能够表达的条件下融合至报道基因的TNF-α mRNA不稳定化的ARE片段的TNF-α mRNA的3'未端非翻译区的一部分的表达构建体的无细胞样品接触，以及b)确定报道蛋白的表达水平且将该水平与不含有该化合物时的表达水平比较，以及c)挑选与不含该化合物时的表达水平相比较能够提高报道蛋白的表达量的化合物。

本发明的另一个筛选试验的实施例包括下列步骤：a)在TNF-α能够表达的条件下以及在TTP存在下将所述化合物与含有TNF-α mRNA的无细胞样品接触，以及b）确定TNF-α的表达水平且将其TNF-α的生

产水平与不含该化合物时 TNF-α 的生产水平比较，以及 c) 挑选与不含该化合物时的表达水平相比较能够提高报道蛋白的表达水平的化合物。

可按照标准的试验设计对能够抑制和/或反转 TTP 的具有抑制活性的化合物的稳定性，毒性等等进行进一步分析。

在一个鉴别和/或诊断有较高患病危险性或正遭受可能至少部分地通过提高 TNF-α 产量而改善的疾病(例如包括但并不限于心脏病和/或心脏损伤)的个体或鉴别个体是否需要进行再灌注损伤预防治疗的方法中，可以测量从所述个体中所获得的生物样品以确定它是否含有增加量的 TTP 或 TTP-mRNA。

例如，TTP 的检测可以通过使用抗 TTP 的抗体与样品接触并测量 TTP 的值来完成。

上述实验可以通过一系列的方法来完成，这些方法中包括免疫分析方法，其包括但并不限于使用蛋白印迹技术，放射性免疫测定，ELSIA(酶联免疫吸附试验)，“三明治”免疫分析定法，免疫沉淀分析，沉淀素反应，凝胶扩散沉淀素反应，免疫扩散试验，凝剂反应试验，补体固定试验，免疫放射计测定，荧光免疫测定，(葡萄球菌)A 蛋白免疫测定，等等。

例如可以使用含有下列步骤的方法来完成该试验：a) 在能够发生抗体与 TTP 结合的条件下使从所述个体中获得的生物样品与抗-TTP 的抗体接触，b) 使用 ELSIA 或上述的一种方法测定 TTP 的数量。

使用第二种含有可检测标记的抗体可以检测到抗-TTP 的抗体，该可检测标记可以是一种放射性同位素，其可以通过放射自显影技术检测到。尤其用于本发明目的的同位素是 ^{3}H，^{125}I，^{131}I，^{35}S 以及 ^{14}C。该第二抗体也可以用荧光化合物来标记。荧光标记抗体是否存在可以通过将该免疫缀合物暴露于一合适波长的光线下并检测所得的荧光。荧光标记化合物包括氢化荧光素，异硫氰酸盐，玫瑰红，藻红蛋白，藻蓝蛋白，异藻蓝蛋白，邻苯二醛以及荧光胺。

可供选择地，第二种抗体可以通过将其结合至一个化学发光化合物上而被可检测地标记，化学发光标记的免疫缀合物的存在可以通过检测在化学反应过程当中所出现的冷光的存在而检测到。化学发光标记化合物的实例包括发光氨，异氨基苯二酰肼，一种芳香吖啶鎓酯，

咪唑，吖啶鎓盐及草酸酯。

相似地，生物发光化合物可被用于标记第二种抗体。生物发光是在生物系统中发现的一类化学发光，其中在该化学发光反应过程中催化蛋白提高了该反应的效率。生物发光蛋白的存在可以通过检测是否发光来确定。用于标记的生物发光化合物包括荧光素，荧光素酶以及水母皮光蛋白。

作为一种选择，可以通过连接第二抗体至一种酶上而使第二抗体被可检测地标记。在合适的酶作用底物存在下培养该抗体-酶缀合物时，该酶部分可以与底物反应以产生一种可被检测到的化学部分，例如，通过分光光度计，荧光计，或者视觉方式而检测到。可被用于检测标记的多特异性免疫缀合物包括β-半乳糖苷酶，葡萄糖氧化酶，过氧化物酶以及碱性磷酸酶。

本领域技术人员将知道其他合适的标记可被用于本发明的。使用本领域已知的标准技术就可以完成标记部分与抗体的结合。这方面典型方法已被 Kennedy 等所描述。Clin. Chim. Acta 1976, 70: 1; Schurs et al., Clin. Chim. Acta 1977, 81: 1; Shihet al., Intl J. Cancer 1990, 46 : 1101; Steinet al., Cancer Res. 1990, 50 : 1330。

可被用于产生抗体的 TTP 或其片段可以使用普通的表达系统（例如 E. coli，杆状病毒，Cos 细胞，Sf9 细胞或真核细胞，其已描述于标准文献(例如 Ausubel et al. (eds.): Current Protocols in Molecular Biology. JohnWiley & SonsInc., New York)）通过重组方式合成。使用一个标记物例如 His (6)，GST，FLAG 或者辅助蛋白质纯化的类似物也可修饰 cDNA。通过标准方法包括色谱(例如离子交换，亲合以及尺寸排阻色谱(法))，离心，不同的溶解性，电泳或者用于蛋白纯化的其他标准技术也可用于纯化该蛋白。

可供选择地，使用如上所述的本领域已知技术也可从自然资源中直接分离出 TTP。

使用本领域普通技术人员熟知的技术可以制备用于试验的针对重组的 TTP 或者直接分离自自然来源的 TTP 的多克隆抗体。(参见，例如，Green 等，在免疫化学试验操作方法当中的“多克隆抗血清的生产”，Manson, ed. , 第 1-5 页，Humana Press 1992; Williams 等，在 DNA 克隆 2: 表达系统，第二版，Glover 等(eds.)，第 15 页，牛津大学

出版社 1995)。

TTP 的免疫原性通过使用一种佐剂而提高，该佐剂例如是明矾(氢氧化铝)或者弗洛因德完全或不完全佐剂。用于免疫接种的多肽同样可以包括融合多肽例如 TTP 或其一部分与一种免疫球蛋白多肽或与麦芽糖结合蛋白的融合物。多肽免疫原可以是全长的分子或只是其中一部分。如果该多肽的一部分是“半抗原类似物”，其可以有利地结合或连接至一个大分子载体上(例如匙孔蟿血兰蛋白(KLH)，牛血清白蛋白(BSA)或破伤风毒素)用于免疫接种。

尽管多克隆抗体典型地在马，牛，狗，鸡，鼠，兔子，天竺鼠，山羊或绵羊等动物中出现，但是本发明所述的一种抗- Zsig62 的抗体也可以获自一个近似人类的灵长类动物的抗体。例如，在 WO 91/11465，以及在 Losman 等的 Int. J. Cancer. 1990，46:310 中可发现用于在狒狒中产生诊断和治疗用的抗体的普通技术。

可供选择地，可以生产抗-TTP 的单克隆抗体。对于特异性抗原的啮齿动物单抗可以通过本领域普通技术人员熟知的技术获得 (参见，例如，Kohler 等，Nature 1975，256 : 495; Coligan 等 (eds.)，现代免疫学方法，第 1 卷，第 2.5. 1- 2.6.7 页 (JohnWiley & Sons 1991)，Picksley 等，“抗在 E coli 中表达的蛋白的单克隆抗体的生产，”DNA 克隆 2: 表达系统，第二版，Glover 等(eds.)，第 93 页 (牛津大学出版社 1995))。

简而言之，单克隆抗体可通过使用一含有 TTP 的组合物注射入小鼠而获得，通过取出一血清样品而证实该抗体生产的存在，取出脾脏以获得 B-淋巴细胞，融合 B-淋巴细胞与骨髓瘤细胞而产生杂交瘤细胞，克隆该杂交瘤细胞，选择可以产生针对抗原的抗体的阳性克隆菌落，培养能产生针对抗原的抗体的克隆菌落并从杂交瘤培养物中分离出抗体。例如，本发明的一种抗 TTP 的抗体可获自人单克隆抗体。人单克隆抗体可获自一转基因鼠，其可以被设计以产生针对特定抗原或者刺激的人抗体。在这种技术中，人的轻链以及重链基因座的元件被导入至获自胚胎干细胞系(其含有内源重链以及轻链基因座的靶向破裂)的小鼠体内。转基因小鼠可以合成针对人抗原的特异性人抗体，该小鼠可被用于生产分泌人抗体的杂交瘤。

用于从转基因小鼠中获得人抗体的方法已被描述，在例如 Green

等，Nature Genet. 1994，7：13; Lonberg etal.，Nature 1994，368: 856; Taylor etal.，Int. Immun. 1994，6：579 中。

通过一系列已知技术可以从杂交瘤培养物中分离以及纯化单克隆抗体，这样的分离技术包括使用葡萄球菌 A 蛋白琼脂糖凝胶的亲和色谱，尺寸排阻色谱(法)，以及离子交换层析（参见，例如 Baines 等，“免疫球蛋白 G（IgG)的纯化，”分子生物学方法，第 10 卷，第 79-104 页(The Humana Press，Inc. 1992））。

用于鉴别以及诊断处于患病高危或正遭受可以至少部分地通过增加 TNF-α 而得到改善的疾病（其包括但并不限于心脏疾病和/或心脏损伤）的个体或者用于鉴别需要再灌注损伤的预防治疗的个体。一种替代的途径是，对从所述个体中获得的生物样品进行测定以核查是否存在较高数量的 TTP-mRNA。

例如，TTP mRNA 的检测可以按照下述步骤完成：a)将从所述个体中获得的含有 RNA 的生物样品与可检测的 TTP 的 cDNA 或 cRNA 或其片段(其可以在能与 TTP 的 mRNA 发生杂交的条件下与 TTP mRNA 连接)接触; b) 通过基于杂交的方法例如 RNA 印迹法，斑点印迹，RNA 酶保护或者类似的基于 TTP cDNA 或 cRNA 与获自所要分析样品的靶 RNA 杂交的方法测定 TTP-mRNA 的量。

在本发明的另外的方法中，TTP cDNA 衍生序列可被用于设计可用于基于 PCR 方法定量 TTP mRNA 的引物。生物样品中 TTP mRNA 水平的定量可被用于作为诊断工具以检测基因表达的变化。

按照本发明，词“cDNA”或“cRNA”指的是通过一个逆转录酶从一个 mRNA 模版形成的单链 DNA 或 RNA 分子。一般情况下，与 mRNA 的一部分互补的引物可用于启动逆转录作用。

上述的条件意旨作为一种指导，对这些条件进行调适以用于特定的试验就在本领域普通技术人员的能力范围之内。

在冠状动脉闭塞以及再灌注之后心脏组织中 TTP 表达的正调节的发现为治疗心脏疾病和/或心脏损伤和/或用于预防再灌注损伤的治疗提供了一个基础。例如，使用抗 TTP 的抗体优选是针对 TTP 的人源化抗体或抗体片段对个体进行治疗，以抑制 TTP 结合至 TNF-α mRNA 并因此提高 TNF-α 的产量。

本发明意义上的术语“抗体片段”意旨抗体的一部分例如 $F(ab')_2$，

$F(ab)_2$，Fab′，Fab，及其类似物。不论结构如何，抗体片断可与能被完整抗体识别的相同抗原结合。该术语同样包括可与特定抗原结合的合成的或基因工程多肽，例如由轻链可变区构成的多肽、由重链及轻链可变区构成的“Fv”片段、其中轻链以及重链可变区通过多肽连接子而连接的重组单链多肽分子（“scFv 蛋白”）、由模拟高可变区的氨基酸残基构成的最小识别单位。

术语“人源化抗体”指的是重组蛋白，其中鼠单克隆抗体的互补决定区已从鼠免疫球蛋白的重及轻链可变区转移至人类可变区。

这种抗体可以通过上述方法生产，对于特定的用途，最好是制备抗 TTP 抗体的片段。这种抗体片段可以获自例如抗体的蛋白水解作用。

使用传统方法用胃蛋白酶或者木瓜蛋白酶对整个抗体进行消化而获得抗体片段。作为一种例证，使用胃蛋白酶通过酶切割抗体来生产抗体片断以提供一种 5S 片段，标示为 $F(ab')_2$，使用一种硫醇还原剂可以将该片断进一步切割以形成 3.5S Fab′单价片段。可供选择地，该分解反应使用巯基(其产生于二硫键的断裂)的保护基而进行。作为一种选择，使用胃蛋白酶进行酶切割，其可直接产生两个单价的 Fab 片段以及一个 Fc 片段。这些方法已描述于，例如在美国专利 4,331,647，Nisonoff 等，Arch Biochem. Biophys. 1960，89：230；Porter，Biochem. J. 1959，73：119；Edelman etal.，in Methods in Enzymology Vol. 1，page 422 (Academic Press 1967)中。也可使用其他的抗体切割方法，例如将重链分开以形成单价轻－重链片段，进一步切割片段，或使用其它的酶、化学、遗传技术，只要该片段能够结合至可以被完整抗体所识别的抗原上。例如，含有 V_H 以及 V_L 结合的 Fv 片段，这种结合可以是非共价键结合的，其也已经描述于 Inbar etal.，Proc. Natl Acad. Sci. USA 1972，69:2659。可供选择地，可变链可以通过一个分子间二硫键连接或通过化学药剂例如戊二醛交联 (参见，例如，Sandhu，Crit. Rev. Biotech. 1992，12：437)。

Fv 片段可以包括 V_H 以及 V_L 链，其可以通过多肽连接子连接。这些单链抗原结合的蛋白 (scFv) 是通过构建一个含有编码相互间通过一个寡核苷酸连接的 V_H 以及 V_L 区的包含 DNA 序列的结构基因而制备的。将结构基因插入到一个表达载体中，随后引入一个宿主细胞例如

E. Coli 中去。重组的宿主细胞合成一个单个的多肽链，其中有一个连接子多肽将两个 V 区桥接起来。生产 scFvs 片段的方法已被描述在例如 Bird etal., Science 1988, 242 : 423; U. S.Patent No. 4,946,778; Pack etal., Biol. Technology 1993, 11 : 1271 中。

抗体片段的另一种形态是一种编码一个单一的互补决定区的多肽(CDR)。CDR 多肽(“最小的识别单位”) 可以通过构建编码相关抗体的 CDR 的基因而获得。这种基因例如可以通过使用聚合酶链式反应制备以便从生产抗体的细胞的 RNA 合成可变区 (参见，例如，Larrick 等，方法: 酶学方法伙伴 2: 106(1991)，Courtenay-Luck，“单克隆抗体基因操作，”在单克隆抗体中: 生产，加工以及临床应用，Ritter 等(eds.)，第 166 页，剑桥大学出版社 1995，以及 Ward 等，“抗体的遗传操作及表达，”在单克隆抗体中: 原理以及应用，Birch 等，(eds.)，第 137 页，Wiley-Liss，Inc. 1995)。

作为一种选择，一种抗 TTP 的抗体可以获自一个人源化的单克隆抗体。人源化的单克隆抗体可以通过将鼠互补决定区从鼠免疫球蛋白重链及轻链可变区转移至人可变区中而生产。然后典型的人抗体的残基取代了鼠相应元件的框架区。使用获自人源化单克隆抗体的抗体组份规避了潜在的与鼠恒定区免疫原性相关的问题。用于克隆鼠免疫球蛋白可变区的一般技术 例如已为 Orlandi 等描述。Proc. Natl Acad Sci. USA 1989, 86 : 3833。用于生产人源化单克隆抗体的技术已被描述，例如 Jones 等，Nature 1986, 321 : 522; Carter 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992,89 : 4285; Sandhu,Crit. Rev. Biotech. 1992, 12 : 437; Singer et al., J. Immun. 1993, 150 : 2844 and U. S. Patent No. 5,693,762。

一种选择性的治疗处方可以是使用 TTP 的 cDNA 或 cRNA 序列或其一部分。针对 DNA 或 RNA 部分的末端保护基团以及自然发生的修饰可提供进一步的稳定化作用其使得分子有效发挥作用几天以上。这种修饰的 DNA 或 RNA 部分一般都是商业上有售的，例如可购买自德国柏林的 ATUGEN。

这种修饰或非修饰的 cDNA 或 cRNA 可被用于与 TTP mRNA 杂交并因此抑制 TTP 的生产。

核酸可以通过多种机理被输入细胞。核酸可与任一辅助将 DNA 导

入细胞中去的试剂结合。使用不同的无菌溶液包括水、PBS 等输入该组合物，DNA 的浓度足以提供一个有效的治疗剂量。

如上所述制得的 cDNA、cRNA、抗体或其片段的实际输送，可以通过不同的技术来实现，其包括直接注射、直接输药到肺部及其他的上皮表面、静脉注射、以及其他的物理途径。

按照本发明，适宜的输送方法的例子是使用商业上可获得的脂质体制剂或脂质混合物例如单茶碱，Lipofectaminee (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD)，Superfecto (Qiagen, Inc. Hilden, Germany)和 Transfectarno (Promega Biotec, Inc., Madison, WI)，以及其他的本领域的标准技术开发的脂质体来运输 cDNA 或 cRNA 直接进入靶细胞。一旦进入细胞，与 TTP mRNA 互补的 cDNA 或 cRNA 结合至 TTP mRNA 并抑制 TTP 的翻译，其结果可以提高 TNF-α 的产量。这些脂质混合物也可商业上获自德国柏林的 ATUGEN。脂质体介导的 DNA 转移已被不同的研究人员所描述 (Liu 等,基因治疗 1994,1：7; Miller and Vile, FASEB J. 1995, 9 : 190)。

将核酸引入哺乳动物细胞的确切的方法当然并不局限于上述方法，其他的一些广泛用于此操作的技术包括使用例如受体介导的以及其它细胞内吞作用的机理，本发明可以与这些广泛使用的转移技术结合起来一起使用。

本发明所述的核酸以及核酸载体可以是用于给受试者体内给药的药理学上可接受的载体。这里所述的“药理学上可接受的”意指其不是生物学上或其它的不适性的材料，也就是说，可以把这种材料，与核酸或载体一起给受试者服用，并不导致任何不良的生物学反应或以有害的方式与该药物组合物中包含的其它组份相互作用。该载体应是自然选择的以减少有效成分的降解并减少对受试者的副作用，正如本领域任一技术人员所熟知的那样。

核酸或其载体可以被口服，非经胃肠地 (例如，静脉内)，通过肌肉内注射，通过腹腔内注射，经过皮肤的，体外的，局部的施用等等，需要的核酸或其载体的确切的量将根据受试者的种类，年龄，重量以及一般状况，待治疗的疾病的严重程度或其发生机制，所使用的特定的核酸或其载体，给药方式等等的不同而变化。

通过如上所述的试验方法所选择的的化合物，抗 TTP 的抗体或其

片段可被经口服，非经胃肠给药方式（例如，静脉方式），经过肌肉内注射，腹膜内注射，皮下注射，经皮肤摄取，体外摄取，局部给药，粘膜给药等途径摄取。

按照所要的给药方式，本发明所述的化合物可以是以固体，半固体或液体剂型的药物组合物，例如片剂，栓剂，丸剂，胶囊，粉末，液体，悬浮液，洗液，乳剂，凝胶剂，等等，最好以适宜单一个体给药的精确剂量的单位剂量的剂型形式存在的化合物。正如上所述，该组合物可以包括，有效量的所选组合物，可以与药学上可接受的载体结合在一起，此外其还可以包括其它医用试剂，药学试剂，载体，佐剂，稀释剂等等。本发明所述化合物的肠胃外给药法，如果使用的话可以是以注射的形式。将针剂制成常规剂型，其或者是液态的溶液，或者是悬浮液，固态形式，在注射之前适宜于在液体中悬浮的固体形态或者是一种乳剂。这里所使用的“非经胃肠给药”包括真皮内，皮下，肌肉内，腹膜内，静脉内以及器官内给药方式。对于肠胃外投药的最近的一种新的修订方法涉及使用一种缓释或持续释放系统以保持恒定的剂量，参见例如，美国专利号 3,610,795，其于这儿已被引入作为参考。这些化合物可以存在于药学上可接受的载体中，其同样包括一种佐剂。这里“药理学上可接受的”意指其不是生物学上或其它的不适性的材料，也就是说，可以与选定的化合物一起给个体服用这种材料，并不导致实质上不良的生物学反应或以有害的方式与该药物组合物中包含的其它组份进行相互作用。按照本发明所述的单位剂量可以包括本发明所述化合物的日需要剂量或补足理想剂量的多个小剂量。给定的患者（哺乳动物，包括人）最适的治疗学上可接受的剂量以及剂量率依赖于许多因素，例如所用的特定活性化合物的活性，年龄，体重，一般健康，性别，日常饮食，给药的时间以及途径，清除率，治疗的目标，也就是说，对于本领域技术人员所熟知的待治疗疾病的本性以及治疗或预防。

因此，在治疗患者（体内）的组合物或混合物中，本发明所述的活性化合物的药学有效的日服剂量为大约 0.01 至 100 mg/kg 体重，优选为 0.1 至 10 mg/kg 体重。按照所使用的剂型，单剂量可以包含大约 0.01 至 10 mg 的活性化合物。

实施例

对实验狗进行麻醉，开胸，研究缺血性预先调节保护的第二窗口期，使用仪器测量狗的左心室压以及主动脉压。灌注狗的前壁使其左前下行冠状动脉发生 5 分钟的冠状动脉闭塞，然后再灌注 4 小时、8 小时和 16 小时。第二组狗(对照组)并不进行冠状动脉闭塞。根据试验方法，来自前壁中心以及后面对照壁的心肌组织的透壁块被提取，然后立即进行冷冻。鉴别在发生了闭塞之后又经历了不同时间段的再灌注的狗心脏中上调的 mRNA，对狗心脏的 RNA 进行 RDA（表象差别分析）。该方法被设计以鉴别第一组织，通常是被处理的组织（指定为“试验器”）中存在的 mRNA 的数量是否比第二组织（指定为“驾驶员”）中的高。通过使用标准的硫氰酸胍提取来自休克冷冻的左心室肌的 RNA，随后在氯化铯中进行梯度离心 (Pharmacia，LKB，Freiburg，Germany)。按照制造商的说明书使用与磁珠（DYNABEADS，DYNAL，Norway）偶联的寡 d (T)分离 Poly (A)-RNA(DYNABEADS，Dynal，Norway)。为了克服基因表达的个体差异，对来自三个无问题的对照心脏(驾驶员)以及三个有问题的心脏(试验器)的 mRNA 如同混合样品一样进行比较。反转录之后(cDNA 合成系统，Gibco)，使用 Dpn11 消化双链 cDNAs，连接至连接子上，扩增并使用较小修饰象所述的 RDA 那样进行扣除 (Hubank，M. and Schatz，D. G. (1994)：Nucleic Acids Res.，22，5640-5648) (Frohme et al. (2000)：Ann N Y Acad Sci.，910，85-104)。进行三轮扣除杂交之后得到不同的产品 2 及 3，其被克隆进入 DH5α E. coli 中的 pBluescript II-SK+。通过标准 PCR 扩增克隆文库的插入片断用于凝胶分析。按照自动化测序仪的标准程序进行序列测定 (应用生物系统，USA)。使用 BLASTX 以及 BLASTN 分析来筛选所鉴别的序列的 DNA 和蛋白的同源性。

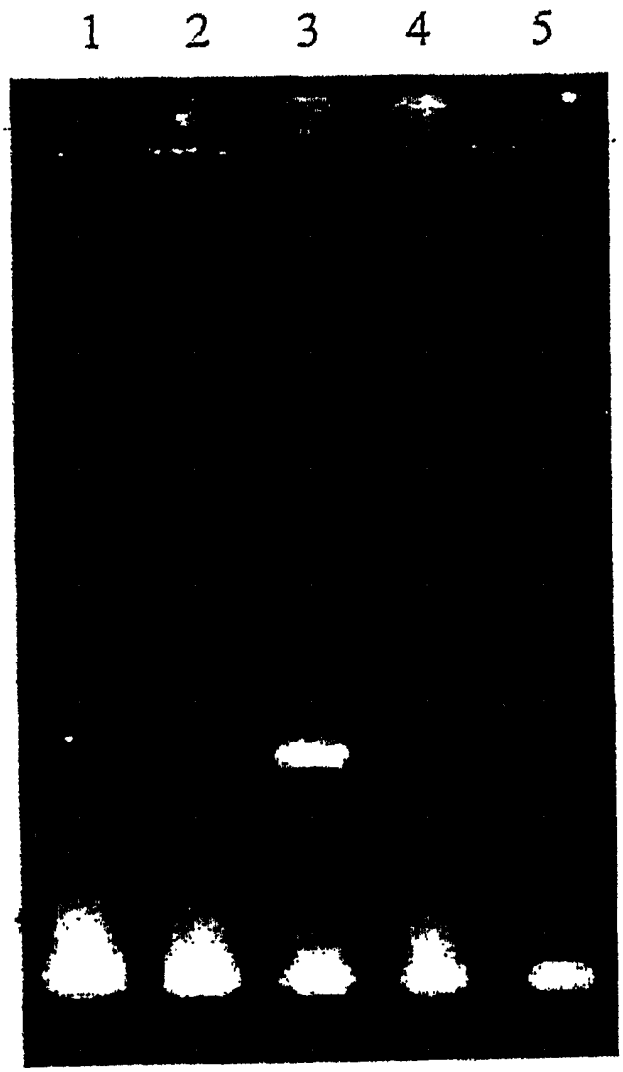


图 1