



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102239179 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 09

(21) 申请号 200980128192. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 07. 14

*C07K 16/28*(2006. 01)

(30) 优先权数据

*C07K 14/705*(2006. 01)

61/080558 2008. 07. 14 US

*A61K 38/17*(2006. 01)

*A61P 31/00*(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 01. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2009/000791 2009. 07. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02010/006508 EN 2010. 01. 21

(71) 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

(72) 发明人 陆满晴 黄广辉 潘冬平 范上达

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 李进 郭文洁

权利要求书 1 页 说明书 14 页

序列表 4 页 附图 12 页

(54) 发明名称

用于治疗内毒素介导的促炎反应的整联蛋白肽、抗-CD18 β A 抗体及用途

(57) 摘要

细菌脂多糖(LPS)在全身循环中引发有害的超炎症反应,这在很多病症如革兰氏阴性脓毒病和坏死性小肠结肠炎中为关键的发病机理。目前没有有效的治疗性介入可用于保护患者免于死亡。本发明内容为以下方法和治疗剂:其消滅LPS在循环中的生物毒性(整联蛋白肽),以及终止白细胞浸润至肺和肝中并阻抑粘附分子表达(整联蛋白肽和抗-CD18 β A scFv)。这些治疗剂可单独或联合用于治疗内毒素介导的促炎反应,尤其在急性脓毒病和坏死性小肠结肠炎的病例中。

1. 一种抗 CD18 B A 抗体,所述抗体包含具有与静息构象和活性构象的哺乳动物 CD18 整联蛋白的结合亲和力的单个多肽链。

2. 权利要求 1 的抗体,其中:

所述单个多肽具有 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 变体的氨基酸残基序列;SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 变体的氨基酸残基序列;以及具有至少约 60%或更多甘氨酸的接头序列,

其中 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 变体位于 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 变体的 N 端,并且接头序列介于 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 变体与 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 变体之间。

3. 权利要求 1 的抗体,其中所述多肽具有以下序列中的一种或多种序列:SYDID、SEQ ID NO. 7 或具有 70%同一性的 SEQ ID NO. 7 变体以及 SEQ ID NO. 8 或具有 70%同一性的 SEQ ID NO. 8 变体。

4. 权利要求 1 的抗体,其中所述多肽具有以下序列中的一种或多种的氨基酸残基序列:SEQ ID NO. 9 或具有 70%同一性的 SEQ ID NO. 9 变体、SEQ ID NO. 10 或具有 70%同一性的 SEQ ID NO. 10 变体、SEQ ID NO. 11 或具有 70%同一性的 SEQ ID NO. 11 变体。

5. 权利要求 1 的抗体,其中所述多肽具有 SEQ ID NO. 3 或 SEQ ID NO. 3 变体的序列。

6. 一种包含 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 1 变体的氨基酸序列的整联蛋白肽。

7. 权利要求 6 的整联蛋白肽,所述整联蛋白肽的氨基酸序列具有与 SEQ ID NO. 1 的 70%或更多的同一性或保守取代。

8. 权利要求 6 或 7 的整联蛋白肽,其中所述整联蛋白肽能够结合细菌脂多糖。

9. 以下组合物在制备用于治疗患有内毒素介导的炎性反应的哺乳动物的药物中的用途,其中所述组合物包含以下中的一种或多种:

A. 单链多肽,其包含 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 变体的氨基酸残基序列;SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 变体的氨基酸残基序列;以及具有至少约 60%或更多甘氨酸的接头序列,其中 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 变体位于 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 变体的 N 端,并且接头序列位于 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 变体与 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 变体之间;以及

B. 整联蛋白肽,其包含具有 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 1 变体的氨基酸残基序列的氨基酸序列。

10. 权利要求 9 的用途,其中所述单链多肽具有 SEQ ID NO. 3 或 SEQ ID NO. 3 变体的序列。

## 用于治疗内毒素介导的促炎反应的整联蛋白肽、 抗-CD18 $\beta$ A 抗体及用途

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护于 2008 年 7 月 14 日提交的临时申请序号 61/080,558 的优先权权益,所述临时申请通过引用而结合于本文中。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及用于治疗内毒素介导的促炎反应的方法和组合物,更具体地涉及急性腹膜炎和脓毒病病状的治疗。公开了人工单链抗-CD18 $\beta$ A 抗体(抗-CD18 $\beta$ A)和新型整联蛋白肽在治疗内毒素介导的促炎反应中的用途。

### 背景技术

[0004] 患有急性脓毒病的病危患者有死亡的直接风险。对这些患者的当前处理方法依赖于使用皮质类固醇、抗生素、流体复苏(fluidresuscitation)和对衰竭器官的支持性护理。然而,这些介入对于实现 100%保护患者免于器官衰竭和死亡不够有效。重度脓毒病患者的死亡率为约 50%,并且如果发生脓毒性休克则可达到 90%。

[0005] 细菌脂多糖(LPS)为细菌细胞壁细胞外膜的结构组分。一旦被释放到循环中,游离且具有生物活性的 LPS 分子刺激单核细胞释放促炎细胞因子。这些细胞因子的控释和局部释放有助于宿主免疫系统引发促炎反应以清除入侵的病原菌。然而,在对难以抵御的严重细菌感染的应答中,不受限制地广泛释放促炎细胞因子可导致凝血系统和白细胞介导的反应的有害活化,这最终导致多器官衰竭,甚至死亡。凝血的过度活化导致血栓形成、组织缺氧和坏死。同时,还刺激炎性白细胞的外渗和组织浸润。浸润的白细胞通过许多不同细胞机理如产生损伤质膜的活性氧物质引起组织损伤。

[0006] 根据当前对脓毒病发病机理的认识,能通过阻断初始 LPS 对宿主免疫系统的刺激和/或白细胞浸润至组织中而减少促炎细胞因子的释放的治疗剂,可能有利于急性脓毒病患者的存活。

[0007] 因此,在急救室中存在对用于治疗患有急性腹膜炎和脓毒病的病危患者的其它疗法的需求。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及治疗内毒素介导的促炎反应的方法,以及新型治疗剂和这些药剂在例如治疗炎症的不利作用中的用途,所述炎症不利作用包括可在脓毒病患者中出现的严重组织损伤。白细胞 $\beta_2$ 整联蛋白被认为充当介导促炎反应的 LPS 的受体。白细胞 $\beta_2$ 整联蛋白为异二聚体,其中 $\beta$ 亚基(CD18)与至少四个不同 $\alpha$ 亚基(CD11a、CD11b、CD11c 和 CD11d)配对。

[0010] 本文公开了新型整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 抗体,其可用作对抗与由内毒素包括 LPS 引起的炎症有关的不利作用包括死亡的治疗剂。

[0011] 在具体实施方案中,本发明涉及整联蛋白肽和/或抗-CD18 $\beta$ AscFv 在针对急性脓

毒病保护动物包括人中的用途。

[0012] 因此,在一个实施方案中,本发明提供靶向 CD18 $\beta$  A 域的单链抗体(抗- $\beta$  A 域 ScFv)。与常规治疗性抗体相比,本发明的 ScFv 分子为包含用柔性接头连接在一起的轻链和重链的可变区但没有恒定区(Fc)的抗体。不存在恒定区允许较好的组织渗透性、较小的免疫原性和较高的特异性。

[0013] 在另一个实施方案中,整联蛋白肽能消减内毒素在循环中的生物活性。此外,单独给予或以联合方案给予整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$  A scFv,可用于阻抑促炎细胞因子释放、粘附分子表达和白细胞浸润至组织中。

[0014] 本发明的另一个实施方案为用于筛选可抑制或改善内毒素介导的促炎反应的化合物的方法,其包括评估候选化合物结合 CD18 $\beta$  A 域的亲合力。在相关方法中,通过使用竞争性结合测定法并评估候选化合物对结合至 CD18 $\beta$  A 域的抗-CD18 $\beta$  A scFv 或其保守变体或片段的置换作用进行评估。

[0015] 在其它相关方法中,CD18 $\beta$  A 域为  $\beta$  A<sub>266-318</sub>。优选的候选物将被观察到具有与本发明的抗-CD18 $\beta$  A scFv 相等或更优的对 CD18 $\beta$  A 域的结合特异性。

[0016] 本发明的又一个方面为在体外或体内抑制 LPS 结合至 CD18 $\beta$  A 域。在相关方法中,通过给予整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$  A 或两者的组合实现抑制。

[0017] 本发明的其它实施方案包括编码整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$  A 和其片段的分离多核苷酸,所述片段足以保持具有 SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 3 序列的肽抑制 LPS 结合至 CD18 $\beta$  A 的特性。这种片段容易并常规地通过例如使用用于从起始多核苷酸的末端进行控时限制性消化的 Ba131 核酸外切酶产生。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1A 显示本发明实施方案的整联蛋白肽的氨基酸序列(SEQ ID NO. 1)。

[0020] 图 1B 为多肽序列(SEQ ID NO. 1)和整联蛋白肽的计算机模拟(in silico)模型的图示。整联蛋白肽的螺旋排列通过所示的螺旋轮图描述。该螺旋表明两亲性螺旋的特征。

[0021] 图 2 为选自 scFv cDNA 文库的抗-CD18 $\beta$  A scFv 多肽序列(SEQ ID NO. 3)的图示,所述文库通过本发明实施方案的噬菌体展示。加下划线的为根据 Kabat 氏算法预测的抗体的互补决定区(CDR)。免疫球蛋白的重链和轻链的可变结构域,分别命名为 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub>,其通过接头连接成抗-CD18 $\beta$  A scFv。接头由三个 (Gly)<sub>4</sub>Ser 重复单元组成。在抗-CD18 $\beta$  A scFv(SEQ ID NO. 3)的 C 末端,连接着 13 个氨基酸-肽 E 标记。

[0022] 图 3 为用 (A) 整联蛋白肽、(B) 抗-CD18 $\beta$  A scFv 和 (C) 联合方案治疗的施以 CLP 小鼠的存活分析结果的图示。

[0023] 图 4 为在循环中整联蛋白肽对内毒素生物活性的影响的血清学分析结果的图示,该分析使用鲎变形细胞溶解物(LAL)显色测定进行。

[0024] 图 5 为整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$  A scFv 和联合方案对施以 CLP 小鼠的 (A) TNF- $\alpha$  和 (B) IL-6 血清水平的影响的血清学分析结果的图示。

[0025] 图 6 为整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$  A scFv 和联合方案对白细胞浸润至施以 CLP 小鼠的 (A) 肺和 (B) 肝中的影响的 CD3mRNA 实时 PCR 结果的图示。

[0026] 图 7 为整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$  A scFv 和联合方案对细胞间粘附分子(ICAM)-1 在施以 CLP 小鼠的肝中表达的影响的表达分析结果的图示。

[0027] 图 8 为整联蛋白肽对 VCAM 和 E- 选择蛋白在施以 CLP 小鼠的肺中表达的影响的免疫组织化学分析结果的图示。

[0028] 图 9 为整联蛋白肽对坏死性小肠结肠炎模型大鼠的 (A) TNF- $\alpha$  和 (B) IL-6 血清水平的影响的血清学分析的图示。

[0029] 图 10 为整联蛋白肽对坏死性小肠结肠炎大鼠的 CD14、TLR4 和 MD-2 的 mRNA 表达的影响的实时 PCR 分析的图示。

[0030] 序列简述

[0031] SEQ ID NO. 1 为整联蛋白肽的多肽序列。

[0032] SEQ ID NO. 2 为编码整联蛋白肽的多核苷酸序列。

[0033] SEQ ID NO. 3 为抗 -CD18  $\beta$  A scFv 的多肽序列。

[0034] SEQ ID NO. 4 为抗 -CD18  $\beta$  A scFv 的核苷酸序列。

[0035] SEQ ID NO. 5 为抗 -CD18  $\beta$  A scFv 的 V<sub>H</sub>- 衍生区的多肽序列。

[0036] SEQ ID NO. 6 为抗 -CD18  $\beta$  A scFv 的 V<sub>L</sub>- 衍生区的多肽序列。

[0037] SEQ ID NO. 7 为抗 CD18  $\beta$  A scFv 的 CDR 的多肽序列。

[0038] SEQ ID NO. 8 为抗 CD18  $\beta$  A scFv 的 CDR 的多肽序列。

[0039] SEQ ID NO. 9 为抗 CD18  $\beta$  A scFv 的 CDR 的多肽序列。

[0040] SEQ ID NO. 10 为抗 CD18  $\beta$  A scFv 的 CDR 的多肽序列。

[0041] SEQ ID NO. 11 为抗 CD18  $\beta$  A scFv 的 CDR 的多肽序列。

[0042] SEQ ID NO. 12 为抗 CD18  $\beta$  A scFv 的 CDR 的多肽序列。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明涉及新型治疗剂以及这些药剂在例如治疗炎症的不利作用包括可在脓毒病患者中出现的严重组织损伤中的用途。

[0045] 术语“处理”和“治疗”在本文中可交换地使用，并且如本文中所用的包括预防性和响应性治疗两方面，可为急性短期或慢性长期，并且表示抑制或改善患者中的炎性反应或免疫应答。“患者”包括动物，包括哺乳动物和人类。“改善”或“改进”表示减轻接受治疗的患者中的炎性反应或免疫应答病症的有害作用。术语“治疗有效的”意指所使用的治疗剂（整联蛋白肽、抗 -CD18  $\beta$  A scFv 或其组合）的量为足以抑制或改善炎性反应或免疫应答的症状的量。

[0046] 本发明的某些实施方案涉及具有对 CD18  $\beta$  A 域抗原的亲力的单链抗体（抗 - $\beta$  A 域 ScFv）。与常规治疗性抗体相比，ScFv 抗体的实施方案包含在单条多肽序列中而不是在两条独立多肽序列的组成部分中用柔性接头连接在一起的轻链和重链的可变区，没有恒定区 (Fc)。不存在恒定区允许较好的组织渗透性、较低的免疫原性和较高的特异性。

[0047] 在一个实施方案中，整联蛋白肽能消减内毒素在血液和其它体液循环中的生物活性。另外，如下文所论述的，单独给予或与整联蛋白肽联合给予抗 -CD18  $\beta$  A scFv，可用于抑制促炎细胞因子释放、粘附分子表达和白细胞浸润至组织中。

[0048] 本发明的另一个实施方案为用于筛选可抑制或改善内毒素介导的促炎反应的化合物的方法，其包括评估候选化合物结合 CD18  $\beta$  A 域的亲合力。在相关方法中，通过使用竞争性结合测定法并评估候选化合物对结合至 CD18  $\beta$  A 域的抗 -CD18  $\beta$  A scFv 或其保守变体或片段的置换作用进行评估。

[0049] 在其它相关方法中,CD18 $\beta$ A 域至少由人 CD18 $\beta$ A 域的残基 266-318( $\beta$ A266-318)(SEQ ID NO. 7) 组成。优选的候选物将被观察到具有与本发明的抗 -CD18 $\beta$ A scFv 相等或更优的对 CD18 $\beta$ A 域的结合特异性。

[0050] 本发明的又一个方面为在体外或体内抑制 LPS 结合至 CD18 $\beta$ A 域。在相关方法中,通过给予整联蛋白肽、抗 -CD18 $\beta$ A scFv 或两者的组合实现抑制。

[0051] 本发明的其它实施方案包括编码整联蛋白肽、抗 -CD18 $\beta$ A 和其片段的分离多核苷酸,所述片段足以保持具有 SEQ ID NO. 1 和 SEQ IDNO. 2 序列的肽抑制 LPS 结合至 CD18 $\beta$ A 的特性。这种片段容易且常规地通过例如使用用于从起始多核苷酸的末端进行控时限制性消化的 Ba131 核酸外切酶产生。

[0052] 本发明的某些实施方案涉及整联蛋白肽,其可重组制备,其氨基酸序列来源于 CD18 $\beta$ A 域上的 LPS 结合位点中的一个。换言之,整联蛋白肽来源于 CD18 $\beta$ A 受体蛋白区,该受体蛋白已鉴定为具有对 LPS 的亲合力。整联蛋白肽容易结合 LPS,并且在体外拮抗 LPS 作用。

[0053] 抗 -CD18 $\beta$ A scFv 为可变片段,其可重组制备,其表位位于 CD18 $\beta$ A 域中。抗 -CD18 $\beta$ A scFv 识别呈静息构象和活性构象的哺乳动物整联蛋白。

[0054] 本发明治疗剂的给药剂量范围足够大以至于产生所需效果,其中内毒素介导病症的症状得以治愈。剂量不应太大以至于引起不利的副作用,例如不合乎需要的交叉反应、过敏性反应等。一般而言,剂量随着年龄、状况、性别和患者中症状的程度而变化,并可由本领域技术人员确定。剂量可由个别医师在发生任何禁忌症(counter indication) 的情况下作调整。剂量取决于被治疗的特定内毒素介导的病症,并可由具有治疗这些病症的普通技术的医师使用已知剂量调整技术容易地确定。剂量通常在对治疗性化合物已建立的治疗窗之内,这在使另外的发病率和死亡率最小化的同时提供疗效。通常,治疗性化合物以每剂 0.001mg/kg- 约 100mg/kg, 优选 0.1-20mg/kg 的剂量范围给予。约 0.5-5mg/kg 的优选剂量尤其可用于含本文公开的治疗剂的化合物,以每天给予一剂或多剂,持续一天或数天。

[0055] 本文所述的任何组合物可配制用于药理学上或治疗性给予哺乳动物或更优选给予人。因此,组合物可包含在药学上可接受的载体中。肽活性剂的优选给药模式为通过静脉内、动脉内、肌肉或皮下注射。给药的其它途径也是可能的,也包括在本公开内容的范围之内。

[0056] 组合物可经胃肠外给予或腹膜内给予。作为游离碱或药理可接受盐的活性化合物的溶液剂可在水中与表面活性剂例如羟基丙基纤维素适当混合而制备。分散剂(dispersion) 也可在甘油、液态聚乙二醇和其混合物中以及油类中制备。在普通条件下储存和使用时,这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

[0057] 定义

[0058] 术语“变体”多肽或多核苷酸在本文中是指由于在亲本序列中的一个或多个氨基酸残基的插入、缺失和 / 或置换而与“亲本”多肽或多核苷酸序列在氨基酸或核苷酸序列上不同的分子。变体多肽或多核苷酸具有与亲本多肽或多核苷酸类似或相同的功能。变体多肽具有与亲本多肽类似的氨基酸序列,并符合以下中的至少一种:具有同一性为至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95% 和至少约 98% 中的一种或多种和 / 或被保守取代的氨基酸序列的多肽。变体多核苷酸具有与亲

本多核苷酸类似的氨基酸序列,并符合以下中的至少一种:(i) 变体核苷酸序列编码的多肽与亲本多肽具有至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95% 和至少约 98% 中的一种或多种的同一性;或(ii) 变体多核苷酸序列在如本文中定义的严格条件下与亲本多核苷酸序列杂交。

[0059] “分离的”核酸分子为与所述核酸分子的天然来源中存在的其它核酸分子分离的核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,例如 cDNA 分子,可基本不含其它胞内物质或培养基(当通过重组技术制备时),或者基本不含化学前体或其它化学物质(当化学合成时),但不包括存在于重组 DNA 文库中的核酸分子。在本发明的优选实施方案中,编码本发明的多肽/蛋白的核酸分子为分离的或纯化的。

[0060] 术语“在严格条件下”是指杂交和洗涤条件,在该条件下相互具有同源性的核酸序列保持相互杂交。这种杂交条件描述于例如但不限于 Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学中的现有方案), John Wiley 和 Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6; Basic Methods in Molecular Biology(分子生物学中的基本方法), Elsevier Science Publishing Co., Inc., N. Y. (1986), 第 75-78 页和 84-87 页;以及 Molecular Cloning(分子克隆), Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1982), 第 387-389 页,并且为本领域技术人员所熟知。严格杂交条件的非限制性优选实例为在约 68°C 下于 6× 氯化钠/柠檬酸钠(SSC), 0.5% SDS 中杂交,接着在室温下于 2× SSC, 0.5% SDS 中洗涤一次或多次。严格杂交条件的另一个非限制性优选实例为在约 45°C 下于 6× SSC 中杂交,接着在约 50-65°C 下于 0.2× SSC, 0.1% SDS 中洗涤一次或多次。氨基酸残基的“保守性取代”或“保守取代”是指用具有类似化学性质和/或物理性质的氨基酸残基取代亲本多肽中的氨基酸残基以形成变体多肽。氨基酸残基可属于以下 10 个化学组别中的任一个,其中用来自同一个化学组别的另一种氨基酸残基取代任何氨基酸残基为保守取代:(1) 酸性(带负电荷的)氨基酸例如天冬氨酸和谷氨酸;(2) 碱性(带正电荷的)氨基酸例如精氨酸、组氨酸和赖氨酸;(3) 中性极性氨基酸例如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;(4) 中性非极性(疏水)氨基酸例如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸;(5) 具有脂族侧链的氨基酸例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(6) 具有脂族羟基侧链的氨基酸例如丝氨酸和苏氨酸;(7) 具有含酰胺侧链的氨基酸例如天冬酰胺和谷氨酰胺;(8) 具有芳族侧链的氨基酸例如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(9) 具有碱性侧链的氨基酸例如赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(10) 具有含硫侧链的氨基酸例如半胱氨酸和甲硫氨酸。

[0061] 本文所用“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和延缓吸收剂等。这种介质和制剂在药物活性物质中的应用为本领域所熟知。除非任何常规介质或制剂与活性成分不相容,否则预期了其在治疗性组合中的用途。附加的活性成分也可加入到组合中。

[0062] 本发明的实施方案

[0063] 本文公开的抗-CD18βA scFv 抗体和整联蛋白肽都是以下多肽:其可作为本文中公开的特定序列或本文公开序列的变体的形式。多肽可以中性或盐的形式配制成组合。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与游离氨基形成的盐),其用无机酸例如盐酸或磷酸形成,或用有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、苦杏仁酸等形成。与游离羧基形成的盐还可衍生自

无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱,例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0064] 用于胃肠外给药的制剂包括无菌水性或非水性溶液剂、混悬剂和乳剂。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油以及注射用有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液剂、乳剂或混悬剂,包括盐水和缓冲介质。胃肠外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的补充剂)等。还可存在防腐剂和其 它添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0065] 本发明还涉及用于制备包含本发明的治疗剂的药物或药物组合物的方法,所述药物组合物用于治疗内毒素介导的促炎反应和所产生的病症。

[0066] 这两种新型药剂抗-CD18 $\beta$ A scFv 和整联蛋白肽的治疗效果已在熟知的鼠盲肠结扎穿孔 (CLP) 模型中评估。发现整联蛋白肽能消减内毒素在循环中的生物活性。研究表明整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$ A scFv 以及整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 的联合方案能阻抑腹膜炎诱导的促炎细胞因子释放和 ICAM-1 在肝中的表达。整联蛋白肽还能阻抑 VCAM 和 E-选择蛋白在施以 CLP 小鼠的肺中的表达。还发现用这些新型治疗法的治疗减少了白细胞在肺和肝中的浸润。

[0067] 整联蛋白肽的治疗效果除在 CLP 模型中之外,还已在良好建立的坏死性小肠结肠炎 (NEC) 的大鼠模型中检验。在大鼠 NEC 模型中,由灌输至大鼠空肠的细菌 LPS 诱导超炎症反应 (super-inflammatory response)。整联蛋白肽能阻抑 NEC 诱导的促炎细胞因子释放和先天免疫组分(包括 TLR4、CDH 和 MD-2) 的表达。

[0068] 在某些实施方案中,本发明涉及新型治疗剂,其具有提高有急性脓毒病风险或患有急性脓毒病的人患者的存活率的能力。

#### [0069] A. 整联蛋白肽

[0070] LPS 结合至其细胞受体引发促炎信号级联放大。病原体相关性分子图式 (PAMP), 包括 LPS, 由称为 toll 样受体 (TLR) 的受体家族识别。TLR4 识别 LPS, 而 LPS 结合至 TLR4 导致由各种转录调控因子介导的信号传导途径的活化。核因子- $\kappa$ B 为众多重要的调控因子之一, 其从细胞质易位至细胞核中可导致许多促炎细胞因子包括 TNF- $\alpha$  的转录。

[0071] 为了减少或中断促炎细胞因子的产生, 已制备出企图阻断 LPS 结合到 TLR4 上的实验药剂。已通过对实验动物和脓毒病患者的许多研究来评估其保护效能。然而, 很少实验药剂产生令人满意的保护作用。成功例子有限的潜在原因尚未明确认识。尽管如此, 非人类来源的这些抗体和拮抗剂的免疫原性可能引起免疫反应, 这可能导致不良的临床表现如过敏反应。

[0072] 从实践的角度来看, 使用来源于人蛋白的制品为有利的, 因为其防止副作用, 例如由免疫应答引起的过敏反应。因此, 本发明提出整联蛋白肽, 其具有来源于人白细胞整联蛋白的 CD18 $\beta$ A 域上的 LPS 结合位点的序列。白细胞整联蛋白 (CD11/CD18), 称为  $\beta_2$  整联蛋白, 为细菌 LPS 的受体。我们最近在 CD18 抗原上的表位分析揭示了两个 LPS 结合位点, 其位于残基 216-248 和 266-318。因而, 将这两个结合位点称为  $\beta A_{216-248}$  和  $\beta A_{266-318}$ 。参见 Wong 等 (2007), FASEB J., 第 21 卷, 3231-3239, 其通过引用结合于本文中。随后制备了这两个结合位点的多肽序列的两种重组肽, 而且发现来源于  $\beta A_{266-318}$  的重组肽 (整联蛋白肽)



在体外有效抑制 LPS 对人淋巴母细胞细胞系 (Jurkat 细胞) 的作用。

[0073] 在一个实施方案中, 整联蛋白肽包含 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 1 的变体。在一个实施方案中, SEQ ID NO. 1 的变体具有与 SEQ ID NO. 1 的约 70% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在另一个实施方案中, SEQ ID NO. 1 的变体具有与 SEQ ID NO. 1 的约 80% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在又一个实施方案中, SEQ ID NO. 1 的变体具有与 SEQ ID NO. 1 的约 90% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在再一个实施方案中, SEQ ID NO. 1 的变体具有与 SEQ ID NO. 1 的约 95% 或更多的同一性和 / 或保守取代。

#### [0074] B. 抗-CD18 $\beta$ A scFv

[0075] 白细胞整联蛋白, 其中共同的 CD18 抗原与至少 4 个不同的 CD11 抗原配对, 促进炎性白细胞的渗出和迁移至组织中。为促进移动, 整联蛋白与不同的细胞粘附分子相互作用。白细胞整联蛋白的主要结合配体为细胞间粘附分子 (ICAM)。据此, 破坏整联蛋白与 ICAM 之间的相互作用的任何拮抗剂很可能减少浸润过程, 从而导致在脓毒病期间组织损伤较少。

[0076] 在本文之中, 通过常规杂交瘤技术产生特异性靶向白细胞整联蛋白的 CD11 或 CD18 抗原的单克隆抗体, 并初次尝试阻断整联蛋白与 ICAM 相互作用。尽管据报道在实验动物和患者中降低脓毒病的严重程度, 但这些单克隆抗体的药代动力学确实受到恒定区 (Fc) 的存在所限制。存在 Fc 使得抗体具有约 150kDa 的分子量, 该高分子量足以阻碍抗体的有效组织渗透。此外, Fc 与其全身分布的相应受体之间的相互作用可导致治疗性抗体不理想的生物分布 (biodistribution)。更为重要的是, Fc 对患者可为免疫原性的, 引起不良临床后果。

[0077] 为了减少炎性白细胞浸润至组织中以及防止出现使用常规治疗性抗体时遇到的普遍问题, 本发明开发了靶向 CD18 $\beta$ A 域的单链抗体 (scFv) 的应用。所述 scFv 包含由接头连接的重链和轻链的抗原结合位点 ( $V_H$  和  $V_L$ ), 并且不存在 Fc 部分。scFv 相对低的分子量使得其有效渗透至组织中。免疫原性和不理想的生物分布的问题也解决了。

[0078] 本发明制备的 scFv 靶向白细胞 CD18 $\beta$ A 域。许多功能性研究和位点定向诱变研究已表明, CD18 $\beta$ A 域在配体识别方面对整联蛋白与粘附分子之间的相互作用为重要的。据此, 已产生以高亲和力结合至 CD18 $\beta$ A 域的 scFv。构建了由编码 scFv 的 cDNA 片段群体组成的噬菌体展示文库。在三轮淘选 (panning) 之后, 最终选出高亲和力的克隆。抗-CD18 $\beta$ A scFv 的结合特性通过免疫沉淀反应证实, 而且对抗-CD18 $\beta$ A scFv 与不同的人淋巴母细胞系结合的 FACS 分析表明, 抗-CD18 $\beta$ A scFv 能结合呈静息构象和活性构象的整联蛋白。

[0079] 抗-CD18 $\beta$ A scFv 抗体的结构作为单条多肽链示于图 2 中。抗-CD18 $\beta$ A scFv 抗体包含存在至少以下三种氨基酸序列的多肽链: i) 来源于  $V_H$  结构域的序列 (SEQ ID NO. 5); ii) 柔性接头序列; 以及 iii) 来源于  $V_L$  结构域的序列 (SEQ ID NO. 6)。来源于  $V_H$  结构域的序列相对于来源于  $V_L$  结构域的序列位于抗-CD18 $\beta$ A scFv 抗体的 N 端, 其中柔性接头序列介于  $V_H$  结构域序列与  $V_L$  结构域序列之间。认为柔性接头序列的确切身份 (identity) 不是关键的。在一个实施方案中, 接头序列具有约 60% 或更多的甘氨酸残基。在另一个实施方案中, 接头序列具有约 75% 或更多的甘氨酸残基。在一个实施方案中, 接头序列为两个或更多个 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 重复单元。在一个实施方案中, 接头序列长度为约 8- 约 25 个残基。

[0080] 抗-CD18 $\beta$ A scFv 抗体包含 SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 的变体, 其中术语“变

体”如上文所定义。在一个实施方案中,SEQ ID NO. 5 的变体具有与 SEQ ID NO. 5 的约 70% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在另一个实施方案,SEQ ID NO. 5 的变体具有与 SEQ ID NO. 5 的约 80% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在又一个实施方案中,SEQ ID NO. 5 的变体具有与 SEQ ID NO. 5 的约 90% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在再一个实施方案中,SEQ ID NO. 5 的变体具有与 SEQ ID NO. 5 的约 95% 或更多的同一性和 / 或保守取代。

[0081] 此外,抗 -CD18 $\beta$  A scFv 抗体包含 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 的变体,其中术语“变体”如上文所定义。在一个实施方案中,SEQ ID NO. 6 的变体具有与 SEQ ID NO. 6 的约 70% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在另一个实施方案中,SEQ ID NO. 6 的变体具有与 SEQ ID NO. 6 的约 80% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在又一个实施方案中,SEQ ID NO. 6 的变体具有与 SEQ ID NO. 6 的约 90% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在再一个实施方案中,SEQ ID NO. 6 的变体具有与 SEQ ID NO. 6 的约 95% 或更多的同一性和 / 或保守取代。

[0082] 在一个实施方案中,抗 -CD18 $\beta$  A scFv 抗体包含 SEQ ID NO. 3 或 SEQ ID NO. 3 的变体。在一个实施方案中,SEQ ID NO. 3 的变体具有与 SEQ ID NO. 3 的约 70% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在另一个实施方案中,SEQ ID NO. 3 的变体具有与 SEQ ID NO. 3 的约 80% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在又一个实施方案中,SEQ ID NO. 3 的变体具有与 SEQ ID NO. 3 的约 90% 或更多的同一性和 / 或保守取代。在再一个实施方案中,SEQ ID NO. 3 的变体具有与 SEQ ID NO. 3 的约 95% 或更多的同一性和 / 或保守取代。

[0083] SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6 包含互补决定区 (CDR),其被认为涉及对 CD18 $\beta$  A 表位的识别。CDR 在图 2 中加下划线显示。在一个实施方案中,SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 的变体包含序列 SYDID (SEQ ID NO. 12)。在另一个实施方案中,SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 的变体包含 SEQ ID NO. 7 或具有 70% 或更多同一性的 SEQ ID NO. 7 变体。在又一个实施方案中,SEQ ID NO. 5 或 SEQ ID NO. 5 的变体包含 SEQ ID NO. 7 或具有 70% 或更多同一性的 SEQ ID NO. 8 变体。

[0084] 在一个实施方案中,SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 的变体包含 SEQ ID NO. 9 或具有 70% 或更多同一性的 SEQ ID NO. 9 变体。在另一个实施方案中,SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 的变体包含 SEQ ID NO. 10 或具有 70% 或更多同一性的 SEQ ID NO. 10 变体。在又一个实施方案中,SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 6 的变体包含 SEQ ID NO. 11 或具有 70% 或更多同一性的 SEQ ID NO. 11 变体。

[0085] 在急性腹膜炎的动物模型中的效能研究

[0086] 整联蛋白肽和抗 -CD18 $\beta$  A scFv 在保护动物免受急性腹膜炎中的效能已在使用称为盲肠结扎穿孔 (CLP) 的熟知鼠模型的实验中评估。CLP 为人脓毒病的严格模型。在该模型中,将小鼠的盲肠非阻塞地结扎并用 19 规针穿孔两次。肠内菌群随后传染腹腔,并引发免疫反应,这类似于人脓毒病的脓毒性反应。结果表明单独地或在联合方案中用整联蛋白肽和抗 -CD18 $\beta$  A scFv 治疗施以 CLP 的小鼠,导致如较低的促炎细胞因子释放和白细胞浸润至组织中所显示的促炎反应减少。还在用新型疗法治疗的小鼠中发现 48 小时的存活率显著增加。

[0087] 整联蛋白肽在保护动物免受内毒素介导的超炎性反应方面的治疗效能也已在坏死性小肠结肠炎大鼠模型中评估。在该模型中,用细菌 LPS 使大鼠空肠肿胀,而该肿胀诱导

超炎症反应,如循环促炎细胞因子增加所反映。先天免疫组分的表达随之上升。结果表明用整联蛋白肽治疗 NEC 大鼠减少了针对细菌 LPS 的炎症反应。

[0088] 总起来说,本说明书公开了抑制内毒素介导的促炎反应的方法,本文通过改善脓毒病和坏死性小肠结肠炎的超炎症反应来例示。还公开了制备整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 的方法。特别地,本文还教导了使用这两种治疗法治疗动物包括人的方法。我们的结果表明整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 为前沿分子(lead molecule),其在治疗急性脓毒病以及其它内毒素介导的促炎反应中可用作新型介入剂(intervention)。

[0089] 本发明的整联蛋白肽可为重组制备的肽,其包含来源于新发现的沿着白细胞 CD18 $\beta$ A 域抗原的 LPS 结合位点(即残基 266-318)的以下氨基酸序列:GRCHLEDNLYXRSN EFDYPSVGLAHKLAENNIQPIFAVTSRMVKTYEKLTEIIPKSAVPKSAVGELSEDSSNVVHLIKNAYNKL (SEQ IDNO. 1) (Wong KF 等,2007)。

[0090] 在本文中,抗-CD18 $\beta$ A scFv 为以下抗体(优选重组制备的):其靶向 CD18 $\beta$ A 域,并且最初选自噬菌体展示的 cDNA 文库。

## 实施例

[0091] 本发明的实施方面在以下实施例中阐述。实施例 1 阐述使用原核细菌表达系统重组地制备整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 的方法。实施例 2 使用称为盲肠结扎穿孔模型的熟知的鼠模型,阐述由整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 提供的保护小鼠免受内毒素介导的组织损伤和致死的体内研究。实施例 3 使用鲎变形细胞(LAL)测定法,表示整联蛋白肽对内毒素在循环中的生物活性的影响的血清学分析。实施例 4 表示整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 对施以 CLP 小鼠的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 血清水平的影响的血清学分析。实施例 5 表示关于白细胞浸润至肺和肝的 CD3 表达分析。实施例 6 表示整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 对施以 CLP 小鼠的肝中的 ICAM-1 转录水平的影响的分析。该实施例还表示整联蛋白肽对 VCAM 和 E-选择蛋白在肺中表达的影响的免疫组织化学分析。实施例 7 表示整联蛋白肽对 NEC 大鼠模型的促炎细胞因子释放和先天免疫的影响。实施例 8 表示筛选结合 CD18 $\beta$ A 的候选化合物的测定法。实施例 9 表示设计衍生物结构(derivative structure)的标准技术,所述衍生物结构可用于制备经测试抑制能力增强的候选物。

[0092] 以下为阐述实施本发明的方法的实施例。这些实施例不应理解为限制性的。除非另外指出,否则所有百分比为重量百分比,而所有溶剂混合比例为体积比。根据本公开内容,本领域的技术人员应认识到可对所公开的具体实施方案作出很多改变,但依然获得同样或类似的结果,而不会背离本发明的精神和范围。

[0093] 实施例 1

### A. 整联蛋白肽的制备

[0095] 整联蛋白肽为重组地制备并纯化自原核表达系统的多肽。整联蛋白肽的制备方法按照(Wong KF 等,2007)描述的方法进行。简言之,将编码肽的 cDNA,5'-ACCCCAACGACGG CCGCTGTCACCTGGAGGACAACCTTGTACAAGAGGAGCAACGAATTCGACTACCCATCGGTGGGCCAGCTGGCGACA AGCTGGCTGAAAACAACATCCAGCCCATCTCGCGGTGACCAGTAGGATGGTGAAGACCTACGAGAACTCACCGAG ATCATCCCAAGTCAGCCGTGGGGGAGCTGTCTGAGGACTCCAGCAATGTGGTCCATCTCATTAAGAATGCTTACAA TAAACTC-3' (SEQID NO. 2) 使用 AmpliTaq Gold DNA 聚合酶通过聚合酶链式反应(PCR)扩

增。用于 PCR 的 DNA 模板为人 CD18 cDNA 构建体,其由 Lloyd B. Klickstein 博士 (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) 惠赠。PCR 条件按照制造商的说明书:在 94°C 变性 1 分钟,在 55°C 退火 30 秒,然后在 72°C 延伸 1 分钟,25 个循环。将所得 DNA 片段纯化并通过两个限制性位点: SacI 和 HindIII 克隆至称为 pET43.1-B 的表达载体中。然后将经验证序列的质粒转入大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)。通过加入异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷至终浓度 0.5mM 诱导蛋白产生。过夜温育后,通过在 3,000g 离心 10 分钟收获细菌细胞,然后使之在裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.3mM NaCl, 20mM 咪唑) 中超声处理。重组整联蛋白肽在其 C 端包含聚组氨酸标签,并使用 Ni-NTA 柱的固定化亲和层析法从细菌提取物中将其纯化。用 200mM 咪唑将结合的重组蛋白从柱中洗脱。

#### [0096] B. 抗-CD18βA scFv 的制备

[0097] 抗-CD18βA scFv 为重组制备并且靶向白细胞整联蛋白的 CD18βA 域的抗体。对于其制备,将 BALB/c 小鼠用纯化的重组 CD18βA 域初免,其中如 (Wong KF 等,2007) 所述制备和纯化重组 CD18βA 域。如上所述进行 PCR 扩增、克隆、蛋白制备和纯化。免疫接种后,经手术将脾摘除用于提取总 RNA。在反转录之后,将免疫球蛋白的重链和轻链的可变基因通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增。将简并寡核苷酸用于 PCR 中,因为未完全认识基因靶标的序列。将所得 PCR 产物纯化并连接以产生单链抗体 cDNA 片段。这些 scFv cDNA 片段编码一系列亲合力的抗体。构建了这些 cDNA 克隆的文库。为选出显示对 CD18βA 域有显著亲合力的克隆,用噬菌体感染文库,并使之经过数轮淘选。在实行 3 轮筛选之后,选出其 scFv 产物在 40 个克隆中显示最高亲合力的 cDNA 克隆。随后对该 scFv 克隆的 DNA 序列进行测序。通过原核表达系统制备足量的抗-CD18βA scFv。重组抗-CD18βA scFv 的表达和纯化随后按照制备整联蛋白肽的方法进行。

[0098] 图 2 显示了多肽序列 (SEQ ID NO. 3),其中下划线区域的那些序列为抗体的互补决定区 (CDR)。还预测了抗-CD18βA scFv 的分子结构,其中 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 结构域通过接头连接。代表性克隆的核苷酸序列为 SEQ ID NO. 4。

#### [0099] 实施例 2

##### [0100] 盲肠结扎穿孔 (CLP) 脓毒症模型

[0101] 使用盲肠结扎穿孔 (CLP) 模型评估本疗法提供的保护患者对抗急性腹膜炎的治疗作用。CLP 模型为许多模拟人类患者中的脓毒性反应的严格模型之一。为了使可由手术产生的潜在变化最小化,所有手术方法如 Echtenacher B 等所述由一名有公认资格 (board-qualified) 的外科兽医进行。

[0102] 在手术前,腹膜内注射 60mg/kg 在 0.3ml 无菌无热原盐水中的戊巴比妥钠 (Nembutal, Rhone Merieux, Pinkenba, QLD, Australia) 麻醉 ICR 小鼠。将盲肠通过 15mm 的腹前中线切口暴露,并将其远端无阻塞地结扎。随后将结扎的盲肠用 19 规针穿孔两次。将经穿孔的盲肠放回腹腔,并用小夹使切口闭合。假手术对照组的小鼠仅接受剖腹术而没有任何盲肠结扎和穿孔。

[0103] 手术 2 小时后,通过腹膜内注射给予小鼠治疗。用 (i) 无菌盐水、(ii) 整联蛋白肽 (0.8mg/kg)、(iii) 抗-CD18βA scFv (0.8mg/kg) 和 (iv) 整联蛋白肽和抗-CD18βA scFv 的联合方案 (每种制剂 0.8mg/kg) 注射小鼠。术后 12 和 24 小时,通过颈脱位法处死接受不同治疗的小鼠。然后立即从内腔静脉抽出血液,并储存在 -20°C 直至其分别用于测定内毒

素活性和促炎细胞因子水平的 LAL 测定和 ELISA。还采集冷冻并石蜡固定的肝样品,分别用于实时 PCR 和免疫组织化学。

#### [0104] 施以 CLP 小鼠的存活公析

[0105] 还研究了用整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$  A scFv 的疗法所提供的 CLP 小鼠免于致死的保护作用。在手术后对盐水、整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$  AscFv 和联合方案治疗的小鼠连续监测 48 小时。存活超过 48 小时的小鼠确定为存活者。进行了两组独立的实验,并用 GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) 分析了数据。

[0106] 存活分析的结果示于图 3A-C 中。在本研究中,用盐水治疗的施予 CLP 的小鼠在手术后无一存活超过 36 小时。用整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$  A scFv 治疗的施以 CLP 小鼠的 48 小时存活率分别为 37.5%和 37.5%。联合方案进一步使施以 CLP 小鼠的存活率增加至 50%。从整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$  A scFv 的治疗性给药中所得到的存活益处与用无菌盐水处理的那些相比都是统计学显著的。

#### [0107] 实施例 3

[0108] 整联蛋白肽对内毒素在循环中的生物活性的影响通过使用 LALpyrochrome 试剂盒 (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA) 的 LAL 测定法如先前所述 (Ho DW 等, Asian J. Surg. (2002), 第 25 卷, 73-39) 进行测定。用于 LAL 测定法的所有缓冲液按照制造商的说明书用无内毒素的水制备。使用微量滴定板读数器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 在 540nm 的光密度下监测信号发展。将样品分析三次,然后根据以 0-0.623 内毒素单位 (EU)/ml 的动态范围建立的标准曲线计算内毒素水平。

[0109] 肠内细菌感染腹腔导致循环中内毒素水平 ( $0.266 \pm 0.106$  EU/ml) 在手术后 12 小时迅速增加,这反映了感染的全身散布 (图 4)。用盐水处理的小鼠中的血清内毒素水平在手术后 24 小时期间持续升高 ( $0.143 \pm 0.006$  EU/ml)。在腹膜内注射整联蛋白肽治疗的那些小鼠中,血清内毒素水平显著低于在盐水处理的小鼠中测到的水平:在手术后 12 小时  $0.143 \pm 0.03$  EU/ml 对比  $0.266 \pm 0.106$  EU/ml ( $P < 0.05$ ); 在手术后 24 小时  $0.076 \pm 0.001$  EU/ml 对比  $0.143 \pm 0.006$  EU/ml ( $P < 0.001$ )。这些结果为以下提供明确的证据:如施以 CLP 的小鼠所例示的,用整联蛋白肽的治疗可降低患者中的循环内毒素水平

#### [0110] 实施例 4

[0111] 在用整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$  A scFv 和联合治疗之后,施以 CLP 小鼠中的血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的变化通过 ELISA 测定,结果阐述于图 5 中。

[0112] 在手术后 12 小时,盐水处理的施以 CLP 小鼠的血清 TNF- $\alpha$  水平为约  $1081 \pm 132$  pg/ml,接近于假手术对照小鼠 ( $289 \pm 90$  pg/ml) 的 5 倍的值。单独或者联合使用治疗剂治疗施以 CLP 的小鼠导致血清 TNF- $\alpha$  水平几乎减少 50% (PSP12 :  $529 \pm 43$  pg/ml ; 整联蛋白肽 :  $627 \pm 98$  pg/ml ; 抗-CD18 $\beta$  A scFv :  $624 \pm 50$  pg/ml ; 以及联合方案 :  $462 \pm 43$  pg/ml)。施以 CLP 小鼠的血清 IL-6 水平在单独或联合使用治疗剂治疗后于手术后 12 小时也降低 (假手术对照 :  $95 \pm 19$  pg/ml ; 盐水 :  $550 \pm 83$  pg/ml ; PSP12 :  $256 \pm 60$  pg/ml ; 整联蛋白肽 :  $212 \pm 49$  pg/ml ; 抗-CD18 $\beta$  A scFv :  $182 \pm 24$  pg/ml ; 以及联合方案 :  $242 \pm 38$  pg/ml)。

[0113] 在盐水处理的 CLP 小鼠中的两种细胞因子的血清水平在手术后 24 小时保持升高,并接近假手术对照小鼠的 6 倍。CLP 小鼠在手术后 24 小时对各种治疗的反应类似于在手术后 12 小时的 CLP 小鼠中观察到的反应:TNF- $\alpha$  和 IL-6 血清水平与用盐水治疗的小鼠相比

降低 50%。

[0114] 实施例 5

[0115] 整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 对白细胞浸润至施以 CLP 小鼠的肺和肝中的调节作用通过测量在两种组织中的 CD3mRNA 含量来进行研究。CD3 为炎性淋巴细胞的标志。为此,在处死小鼠后,立即将肺和肝在液氮中速冻。首先从肺和肝中提取和纯化总 RNA,随后用于合成第一条 cDNA 链。随后在 ABI PRISM 7700 序列检测器系统 (Applied Biosystems Inc., Forest Hill, CA, USA) 中进行从第一条 cDNA 链扩增 CD3,以及对扩增的 CD3 的实时测量。

[0116] 施以 CLP 小鼠的肺和肝中的 CD3 水平阐述于图 6 中。结果表明在 CLP 后 12 小时和 24 小时, CD3mRNA 在肺和肝两者中的含量升高,这表明炎性白细胞严重浸润至这些器官中。用整联蛋白肽、抗-CD18 $\beta$ A scFv 和联合方案治疗施以 CLP 的小鼠降低了 CD3 mRNA 在肺和肝中的含量。这些结果表明整联蛋白肽和抗-CD18 $\beta$ A scFv 两者都能终止炎性白细胞浸润至患者的主要器官中。

[0117] 实施例 6

[0118] 实时 PCR 测量给予不同治疗的小鼠肝中的 ICAM-1 转录水平。ICAM-1 转录物在 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 中使用 ABI PRISM 7700 序列检测器系统 (Applied Biosystems) 扩增。计算并比较结果,然后表示为图 7 中的倍数变化。

[0119] 急性腹膜炎导致 ICAM-1 转录的显著增量调节,如盐水处理的施以 CLP 的小鼠所反映的,所述小鼠中 ICAM-1 转录物为假手术对照小鼠的 14-16 倍。接受不同治疗的施以 CLP 的小鼠总体显示较低的 ICAM-1 转录。具体而言,与盐水处理的小鼠的 ICAM-1 转录水平相比,用整联蛋白肽的治疗导致 ICAM-1 转录水平在手术后的两个时间点上都显著降低 ( $P < 0.05$ )。单独或联合的抗-CD18 $\beta$ A scFv 也阻抑 CLP 诱导的 ICAM-1 转录。然而,发现抗-CD18 $\beta$ A scFv 的调节作用小于整联蛋白肽。因此,这就表明本发明的治疗剂单独或在联合方案中对下调腹膜炎诱导的 ICAM-1 在患者肝中表达有效。

[0120] 整联蛋白肽对 VCAM 和 E-选择蛋白在肺中的表达的调节作用通过免疫组织化学来研究 (图 8)。VCAM 和 E-选择蛋白为在内皮上的除 ICAM-1 外的两种粘附分子,其促进白细胞浸润至组织中。结果表明 CLP 手术诱导 VCAM 和 E-选择蛋白在肺中表达。将整联蛋白肽给予施以 CLP 的小鼠阻抑这些粘附分子在肺中表达,如在肺部分中对 VCAM 和 E-选择蛋白的反应性减低所显示的。

[0121] 实施例 7

[0122] 除盲肠结扎穿孔 (CLP) 模型之外,整联蛋白肽的疗效还在坏死性小肠结肠炎大鼠模型中得以证实。在该模型中,用细菌 LPS 使大鼠空肠肿胀诱导致死的全身性炎症反应,这由循环 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的急剧上升以及 TLR4 免疫组分 mRNA 的增量调节表达所揭示。这些组分包括 TLR4、MD-2 和 CD14。

[0123] TNF- $\alpha$  和 IL-6 的循环水平通过细胞因子 ELISA 来研究 (图 9)。根据显示,用细菌内毒素使大鼠空肠肿胀以极为显著的方式使 TNF- $\alpha$  和 IL-6 两者的循环水平升高 (红柱)。为了检测整联蛋白肽是否可降低循环中的这种细胞因子水平,将 0.8mg/kg 整联蛋白肽直接注入大鼠空肠中。对采集的血液样品的测定表明所给予的整联蛋白肽 (蓝柱) 可降低 TNF- $\alpha$  ( $P = 0.0259$ ) 和 IL-6 ( $P = 0.0477$ ) 两者的循环水平,这意味着整联蛋白肽能改

善细菌 LPS 诱导的炎性反应。

[0124] 内毒素介导的炎性反应还增加先天免疫组分 (TLR4、MD-2 和 CD14) 的 mRNA, 其通过如上所论述的实时 PCR 测定 (图 10)。如所显示的 (红柱), 用细菌内毒素使空肠肿胀激发 TLR4、MD-2 和 CD14mRNA 的表达。输注整联蛋白肽以显著的方式阻抑这些内毒素介导的表达 (蓝柱): TLR4 ( $P = 0.00127$ ); MD-2 ( $P = 0.0187$ ); 以及 CD14 ( $P = 0.00498$ )。

[0125] 在开发新型疗法中的基本问题之一是确定药物靶标和制备针对这些靶标的药剂。本公开内容教导了用于在治疗脓毒症中使用的分子靶标。

[0126] 本发明的治疗剂的保守变体包括将氨基酸换成例如具有类似电荷、大小或亲水性的另一种氨基酸。本发明的保守变体可为特定序列的变更使得功能上等价的氨基酸取代肽序列中的一个或多个氨基酸, 从而产生沉默变化 (silent change)。例如, 序列内的一个或多个氨基酸残基可用在功能上起等价作用的具有类似极性的另一种氨基酸取代。用于序列内的氨基酸的取代物可选自所述氨基酸所属分类中的其它成员。例如, 非极性 (疏水) 氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷 (碱性) 氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电 (酸性) 氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

[0127] “变体”多肽或抗体在本文中是指由于在亲本序列中的一个或多个氨基酸残基的插入、缺失和 / 或取代而与“亲本”多肽或抗体氨基酸序列在氨基酸序列上不同的分子。在优选实施方案中, 变体抗体包含在亲本抗体的一个或多个超变区中的一个或多个氨基酸的取代。例如, 变体可包含在亲本抗体的一个或多个超变区的至少 1 个取代物, 例如约 1 个至约 10 个取代物, 优选约 2 个至约 5 个取代物。通常, 变体的氨基酸序列与亲本抗体重链或轻链可变结构域序列具有至少 75% 的氨基酸序列同一性, 更优选至少 80%, 更优选至少 85%, 更优选至少 90% 以及最优选至少 95% 同一性。关于该序列的同一性或同源性在本文中定义为在比对序列和引入空位 (如果需要的话) 以获得最大百分比序列同一性之后, 候选序列中与亲本抗体残基相同的氨基酸残基的百分比。在 N 端、C 端或内部的抗体序列中的延伸、缺失或插入都不应理解为影响序列的同一性或同源性。变体保留结合受体的能力, 并优选具有优于亲本抗体的结合能力的性质。

[0128] 有可能通过测定被测试的抗体是否能防止抗 -CD18 $\beta$ A scFv 结合至特定抗原 (例如抗 -CD18 $\beta$ A scFv 通常与之反应的 CD18 $\beta$ A 受体) 而无需过度的实验就能评估抗体, 以确定其是否具有与本发明的抗 -CD18 $\beta$ A scFv 相同的特异性。如果被测试的抗体与抗 -CD18 $\beta$ A scFv 竞争, 如抗 -CD18 $\beta$ A scFv 的结合减少所示, 那么很可能这两种抗体结合相同的表位。

[0129] 确定抗体是否具有抗 -CD18 $\beta$ A scFv 的特异性的另一种方法为将抗 -CD18 $\beta$ A scFv 与其通常与之反应的抗原 (例如 CD18 $\beta$ A 受体) 预保温, 并测定被测试的抗体在其结合抗原的能力方面是否受抑制。如果被测试的抗体受抑制, 那么很可能其具有与本发明的抗 -CD18 $\beta$ A scFv 相同的表位特异性。

[0130] 实施例 8

[0131] 筛选测定

[0132] 候选化合物与 CD18 $\beta$ A 结合的能力通过竞争性结合测定法评估。候选化合物可为

肽类化合物或非肽类化合物。与 CD18 $\beta$ A 的结合通过从 CD18 $\beta$ A 置换抗 -CD18 $\beta$ A 或其保守变体的能力来定量。被置换的抗 -CD18 $\beta$ A 或其保守变体可通过许多技术测定。例如,放射性标记的肽可使用市售放射性标记的氨基酸前体合成。用  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$  或  $^{35}\text{S}$  放射性标记的肽可通过常规液体闪烁技术定量。或者,可合成荧光标记的肽。例如,可将赖氨酸插入非关键性位置并用异硫氰酸荧光素 (“FITC”) 标记。除 FITC 之外,还可用任何合适的荧光团 (fluorophore) 标记肽。从未结合的肽中分离结合的肽并定量被置换的肽可通过本领域技术人员已知的常规技术进行。本发明的这个实施方案不受用于定量被置换的肽的方法所限制,并且任何合适的分析技术都可使用并包含在本发明的范围内。

[0133] 实施例 9

[0134] 为了获得更有效的抑制性肽,可将设计衍生物结构的标准技术用于制备经测试抑制能力增强的候选物。

[0135] 例如,一种衍生肽策略为使共有序列肽经过如 Cunningham 和 Wells, 1989 所述的丙氨酸筛选法。可将丙氨酸分别引入各个位置以确定肽中调节与 CD18 $\beta$ A 结合的特异性侧链。一旦确定以后,用保守氨基酸取代物替换这类氨基酸。这类取代物为具有类似电荷的氨基酸,例如如 Dayoff 等, Atlas of Protein Sequence and Structure (蛋白序列和结构图谱); 第 5 卷, 增刊 3, 第 3, 45-362 页 (M. O. Dayoff 编辑, Nat'l BioMedResearch Fdn., Washington, D. C. 1979) 中所述。对氨基酸侧链取代基的大小、形状和类型的分析显示精氨酸、赖氨酸和组氨酸都是带正电荷的残基; 丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸的大小都类似; 以及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸都具有基本类似的形状。因此,基于这些考虑,精氨酸、赖氨酸和组氨酸; 丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸; 以及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸; 在本文中定义为保守变体。该类型的衍生策略已在鉴定较高亲和力的肽上取得成功 (Ohman 等, 1995; Adgey, 1998)。除了与 CD18 $\beta$ A 结合 (通过例如上文实施例 7 的筛选测定) 之外,还可根据其它所需性质筛选保守变体,例如较长的血清半寿期或所需的其它药代动力学性质或药效学 (pharmacodynamic) 性质。

[0136] 应该理解的是,本文所述的实施例和实施方案仅为说明性目的,并且根据其作出的各种修改或改变都由本领域的技术人员提出并包含在本申请的精神和范围之内。

[0137] 本文所提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物都通过引用以其整体 (包括所有图和表) 结合到本文中,其结合程度直到其内容与说明书的明确教导不一致为止。



[0001]

序 列 表

[0002]

- <110> 香港大学
- <120> 用于治疗内毒素介导的促炎反应的整联蛋白肽、  
抗-CD18 βA 抗体及用途
- <130> VERSP104US
- <160> SEQ ID NOS 12
- <170> PatentIn version 3.5

- <210> SEQ ID NO 1
- <211> 53
- <212> PRT
- <213> 人
- <400> 1

```

Leu Glu Asp Asn Leu Tyr Arg Ser Asn Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val
1           5           10           15
Gly Gln Leu Ala His Lys Leu Ala Glu Asn Asn Ile Gln Pro Ile Phe
           20           25           30
Ala Val Thr Ser Arg Met Val Lys Thr Tyr Glu Lys Leu Thr Glu Ile
           35           40           45
Ile Pro Lys Ser Ala
           50

```

- <210> SEQ ID NO 2
- <211> 252
- <212> DNA
- <213> 人
- <400> 2

```

accccaacg acggcgcgtg tcacctggag gacaacttgt acaagaggag caacgaattc 60
gactacctat cggtgggcca gctggcgcac aagctggctg aaaacaacat ccagcccatc 120
ttcgcggtga ccagtaggat ggtgaagacc tacgagaaac tcaccgagat catccccaag 180
tcagccgtgg gggagctgtc tgaggactcc agcaatgtgg tccatctcat taagaatgct 240
tacaataaac tc 252

```

- <210> SEQ ID NO 3
- <211> 234
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 抗 CD18 scFv 抗体
- <400> 3

```

Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser
1           5           10           15
Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Asp
           20           25           30
Ile Asp Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
           35           40           45
Trp Ile Phe Pro Gly Glu Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

```

[0003]

```

      50              55              60
Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65              70              75              80
Glu Leu Thr Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
      85              90              95
Arg Gly Asp Tyr Thr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
      100             105             110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
      115             120             125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala
      130             135             140
Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala
      145             150             155             160
Ser Ser Ser Ile Arg Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser
      165             170             175
Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Val Ala Pro Gly Val
      180             185             190
Pro Phe Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
      195             200             205
Ile Asn Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu
      210             215             220
Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
      225             230
    
```

<210> SEQ ID NO 4

<211> 738

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 CD18 scFv 抗体 cDNA

<400> 4

```

gtgaagctgc agcagtcagg aactgaagtg gtaaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc 60
tgcaaggctt ctggctacat cttcacaagt tatgatatag actgggtgag gcagacgcct 120
gaacagggac ttgagtggat tggatggatt tttcctggag aggggagtac tgaatacaat 180
gagaagttca agggcagggc cacaotgagt gtagacaagt cctccagcac agcctatatg 240
gagctcacta ggetgacatc tgaggactct gctgtctatt tetgtgctag aggggactac 300
tataggecgt accttgactt gtggggccaa gggaccaagg tcaccgtctc ctcagtggga 360
ggcggttcag gcggagggtg ctctggcggg ggcggatctg acattgagct caccagctct 420
ccagcaatca tgtctgcate tccaggggag agggtcacca tgacctgcag tgccagctca 480
agtatacgtt acatatattg gtaccaacag aagcctggat cctccccag actcctgatt 540
tatgacacat ccaacgtggc tcctggagtc ccttttgcct tcagtggcag tgggtctggg 600
acctcttatt ctctcacaat caaccgaatg gaggctgagg atgctgccac ttattactgc 660
caggagtgga gtggttatcc gtacacgttc ggagggggtg cgcoggtgcc gtatccggat 720
ccgctggaac cgagtgcc 738
    
```

<210> SEQ ID NO 5

<211> 120

<212> PRT

<213> 人

[0004]

<400> 5  
 Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser  
 1                            5    10    15  
 Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Asp  
                           20    25    30  
 Ile Asp Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
                           35    40    45  
 Trp Ile Phe Pro Gly Glu Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
                           50    55    60  
 Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met  
 65    70    75    80  
 Glu Leu Thr Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
     85    90    95  
 Arg Gly Asp Tyr Thr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
     100    105    110  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Cys  
     115    120

<210> SEQ ID NO 6

<211> 100

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

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

<210> SEQ ID NO 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Trp Ile Phe Pro Gly Glu Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1                            5    10    15  
 Gly

<210> SEQ ID NO 8

<211> 11

<212> PRT

[0005]

<213> 人  
 <400> 8  
 Gly Asp Tyr Thr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Leu  
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 9  
 Ser Ala Ser Ser Ser Ile Arg Tyr Ile Tyr  
 1 5 10

<210> SEQ ID NO 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 10  
 Asp Thr Ser Asn Val Ala Pro  
 1 5

<210> SEQ ID NO 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 11  
 Gln Glu Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> SEQ ID NO 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 12  
 Ser Tyr Asp Ile Asp  
 1 5

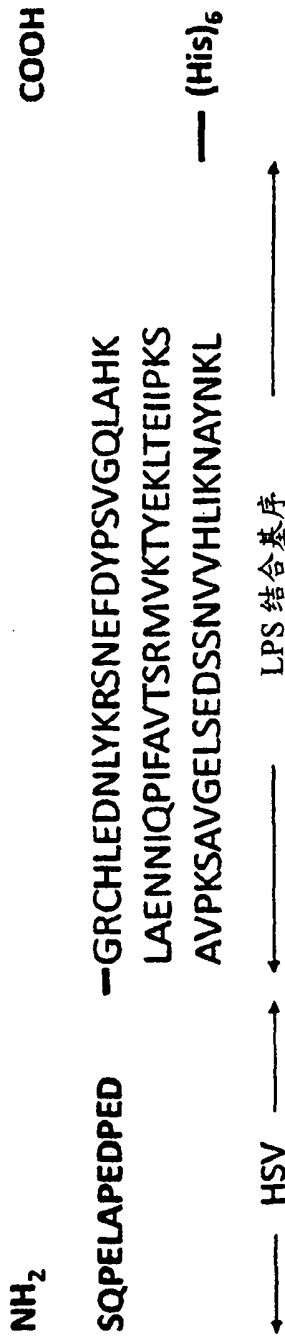


图 1A

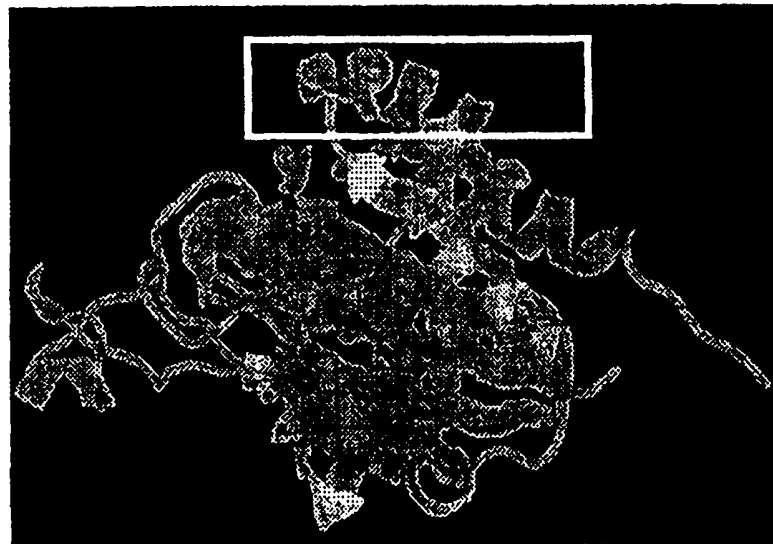
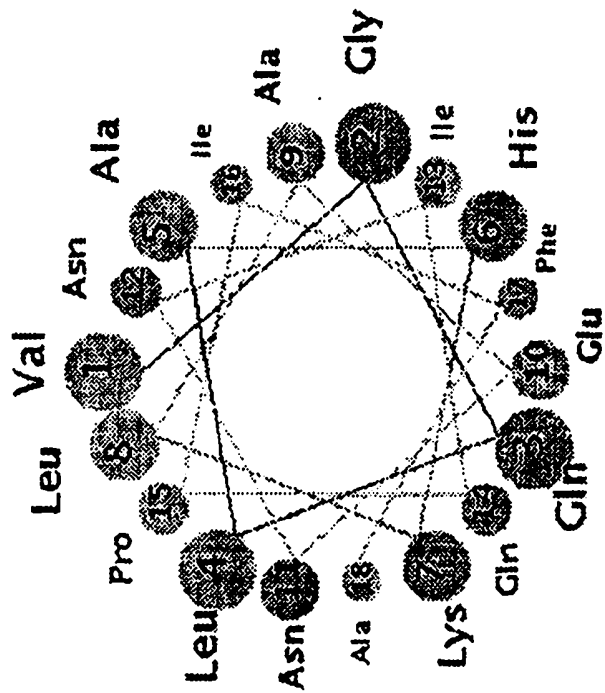


图 1B



抗-CD18 βA scFv 的多肽序列(SEQ ID NO. 3)

V<sub>H</sub>结构域

V K L A S G L K E L F P R  
C K A S G L K E L F P R  
E Q K E L K E L F P R  
E L Y P P R

Q G G L K E L F P R  
L S G L K E L F P R  
S Y W E L K E L F P R  
G I I A T S E L L  
E T W L D W G  
V S I S V K Q  
V Y E E I D P G A G V K L S  
V E I D P G A G V K L S  
V E T T S S R T V G S S C

接头

GGGGSGGGSGGGG

V<sub>L</sub>结构域

S D M S F D  
T N S F D  
G S S S A  
E C P G A  
L S R S T  
T A S L E G Y  
F Q S L I G C  
S S I G C  
P S Y T Q  
A I K T S Y Q E W S G Y  
M S I Y V A I N Y  
S A S W A E Y  
P Y G R E  
G Q G R E  
E Q V R F  
R K P E G  
V P R A C

GAPVYPDPLEPR

13个氨基酸的肽E标签

图 2

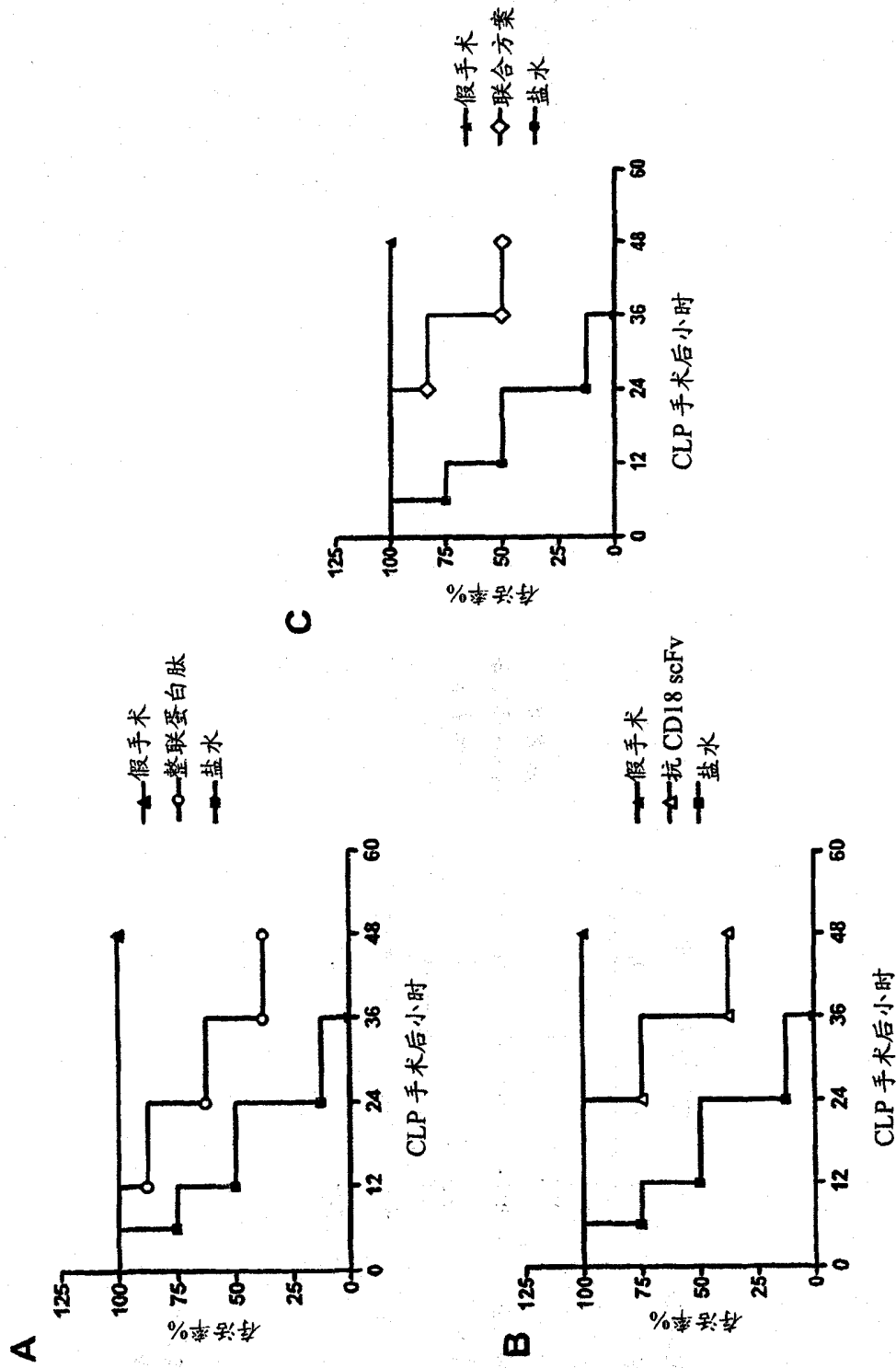


图 3

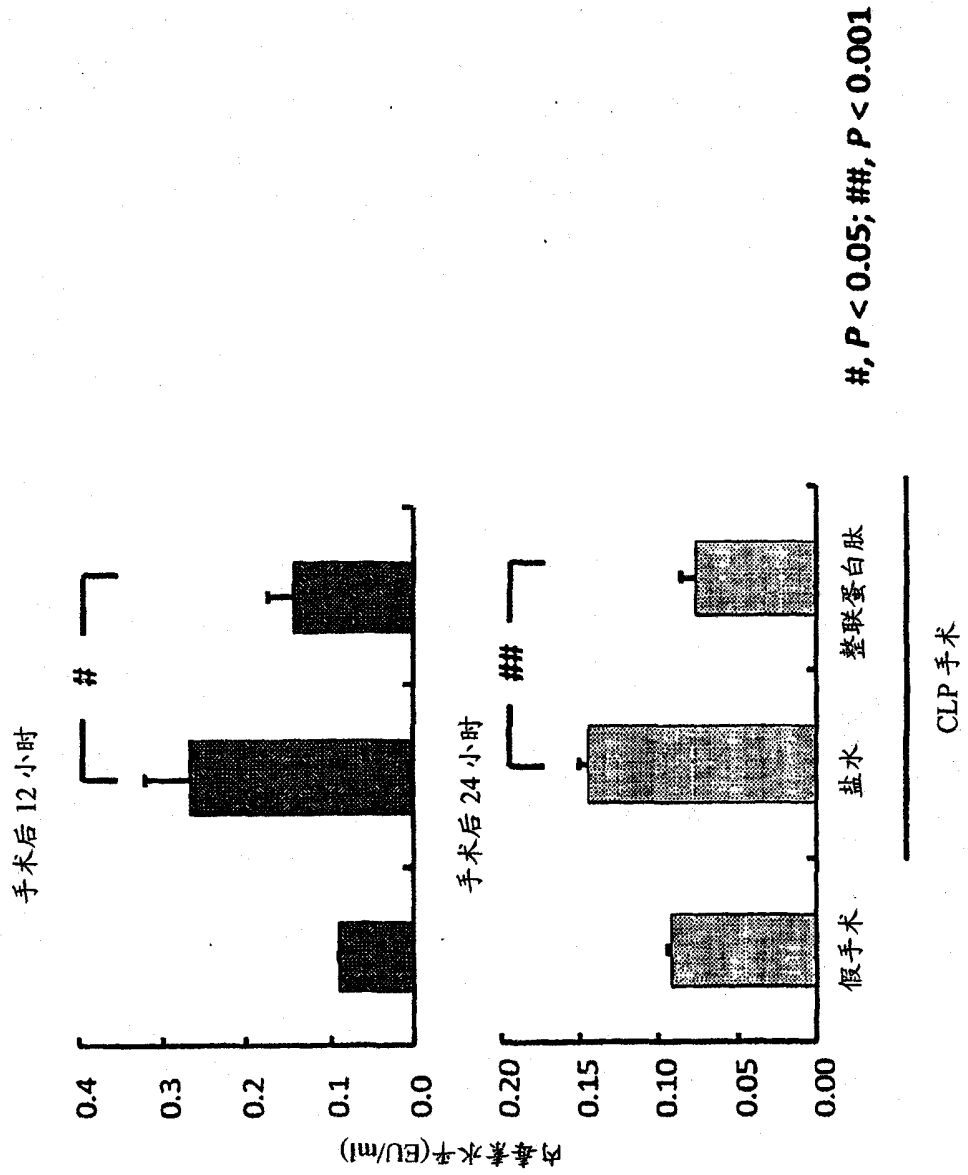


图 4



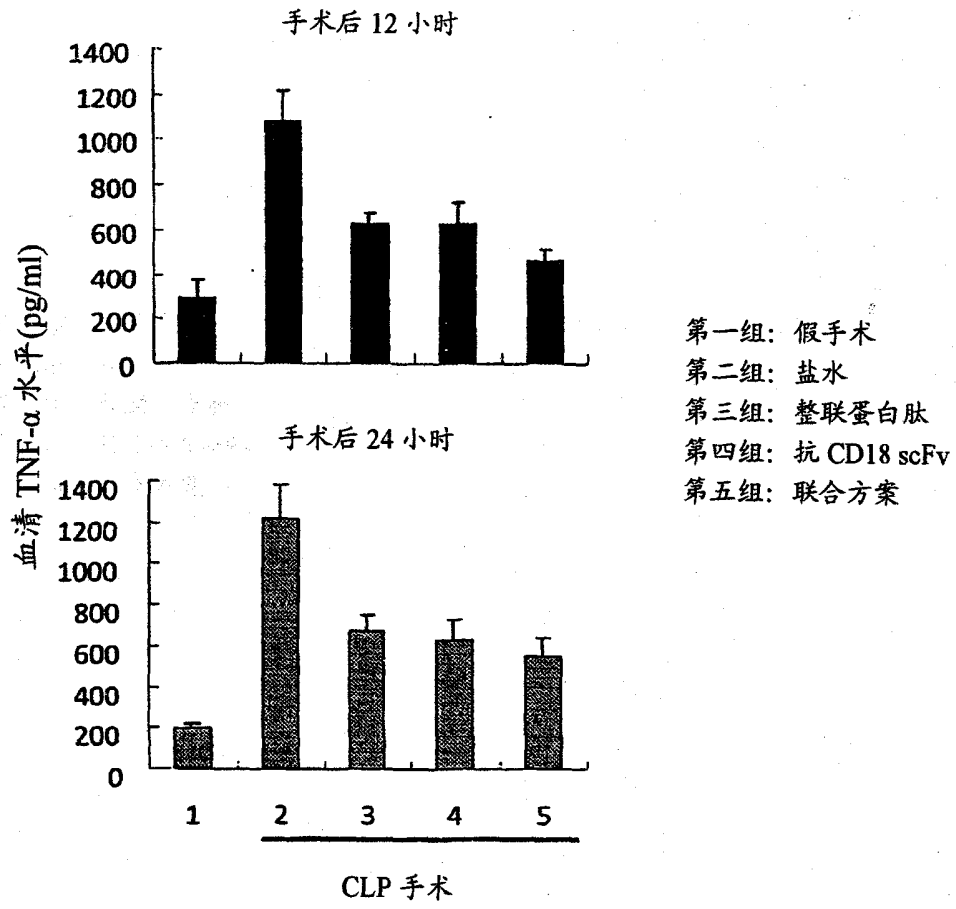


图 5A

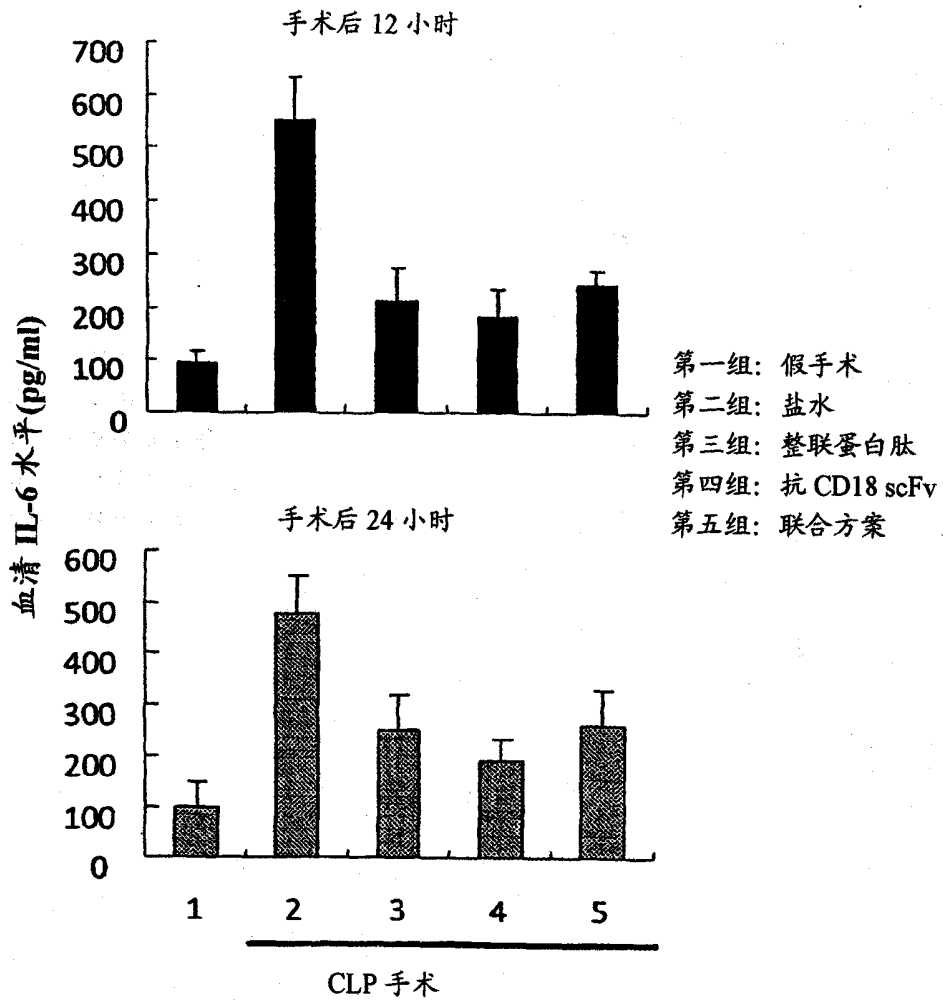
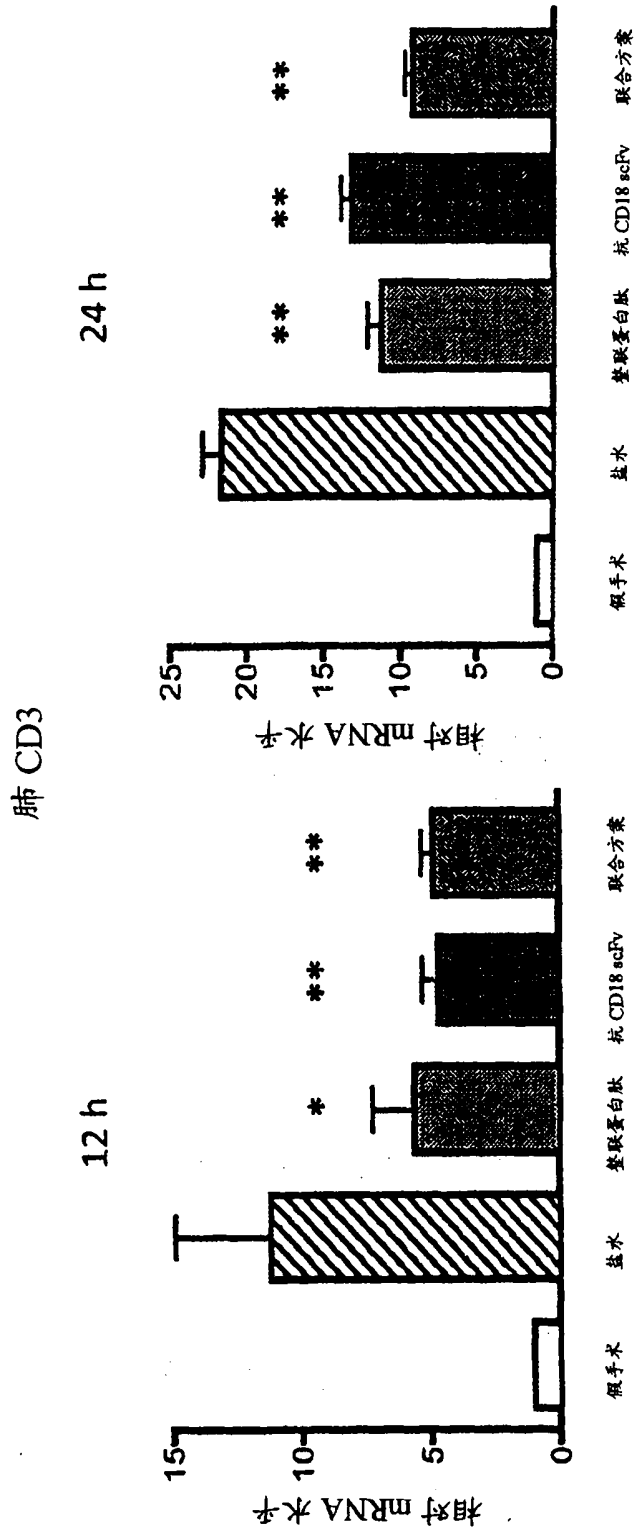


图 5B

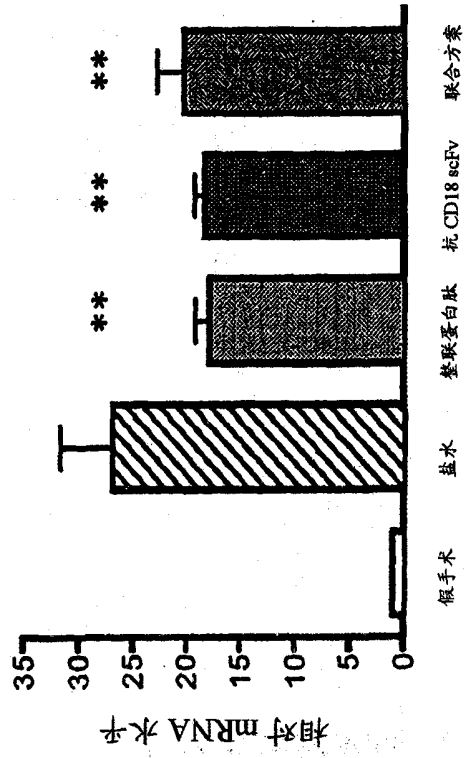


\*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$  与盐水相比

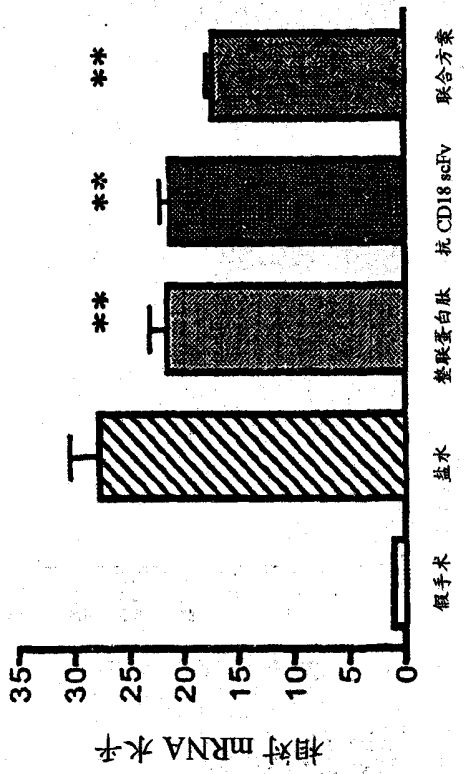
图 6A

肝 CD3

24 h



12 h



**\***,  $P < 0.01$ ; **\*\***,  $P < 0.001$ 与盐水相比

图 6B

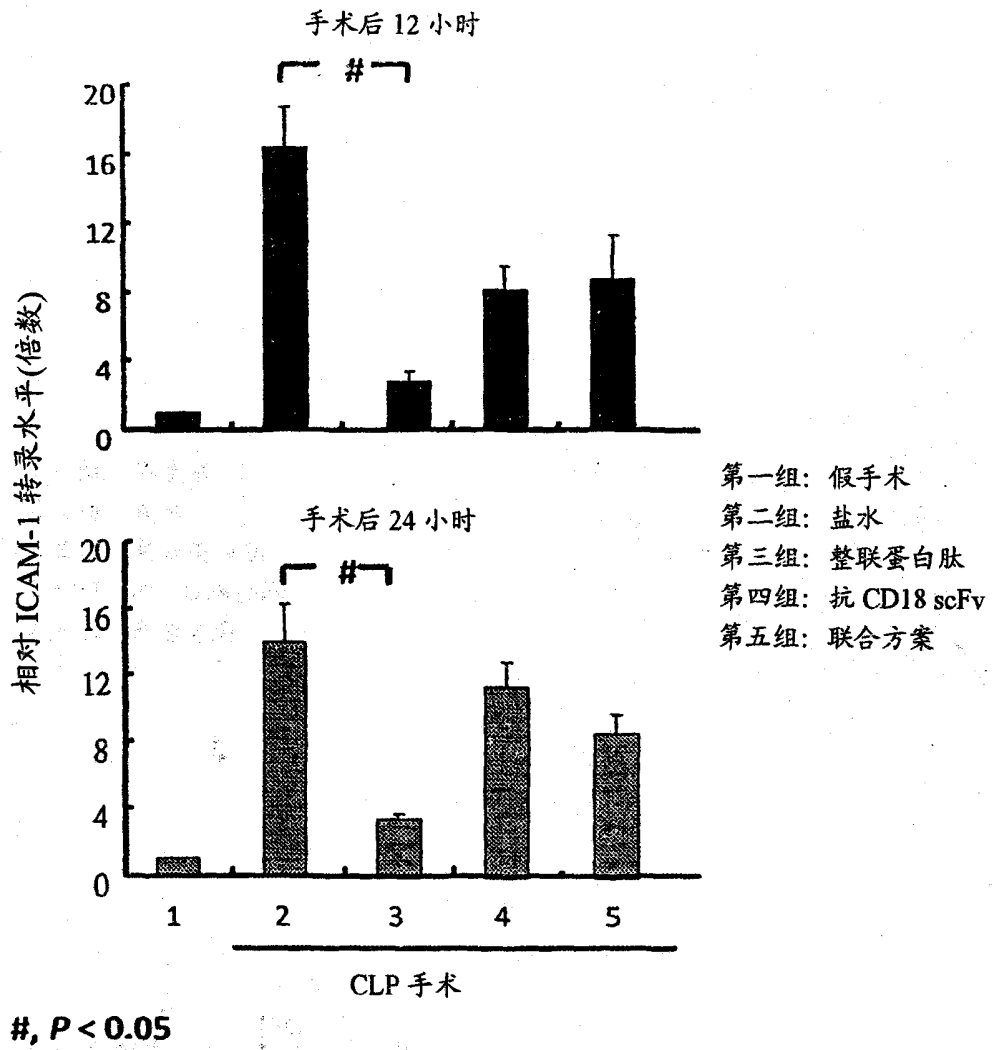


图 7

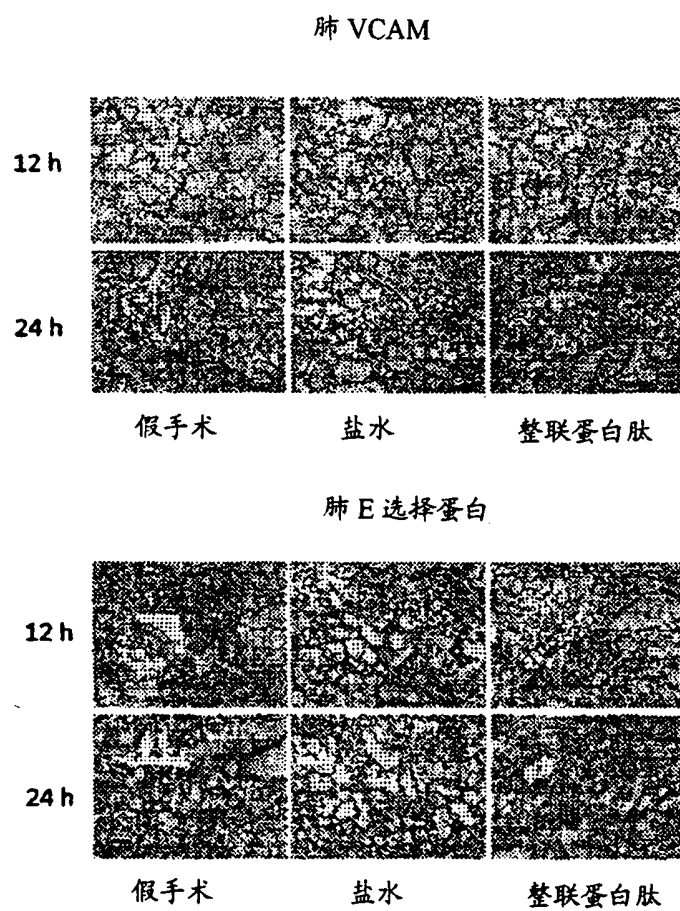


图 8

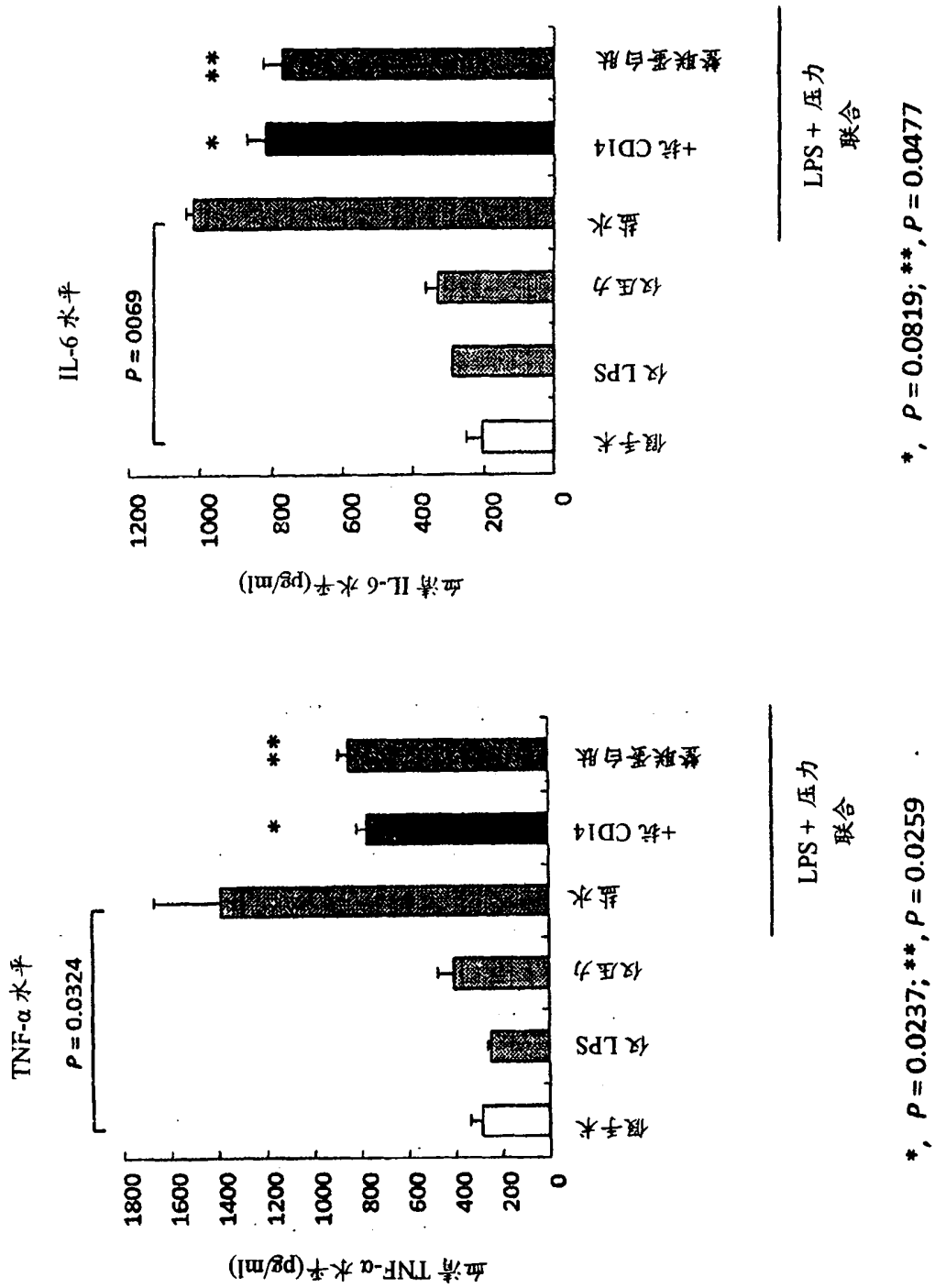


图 9

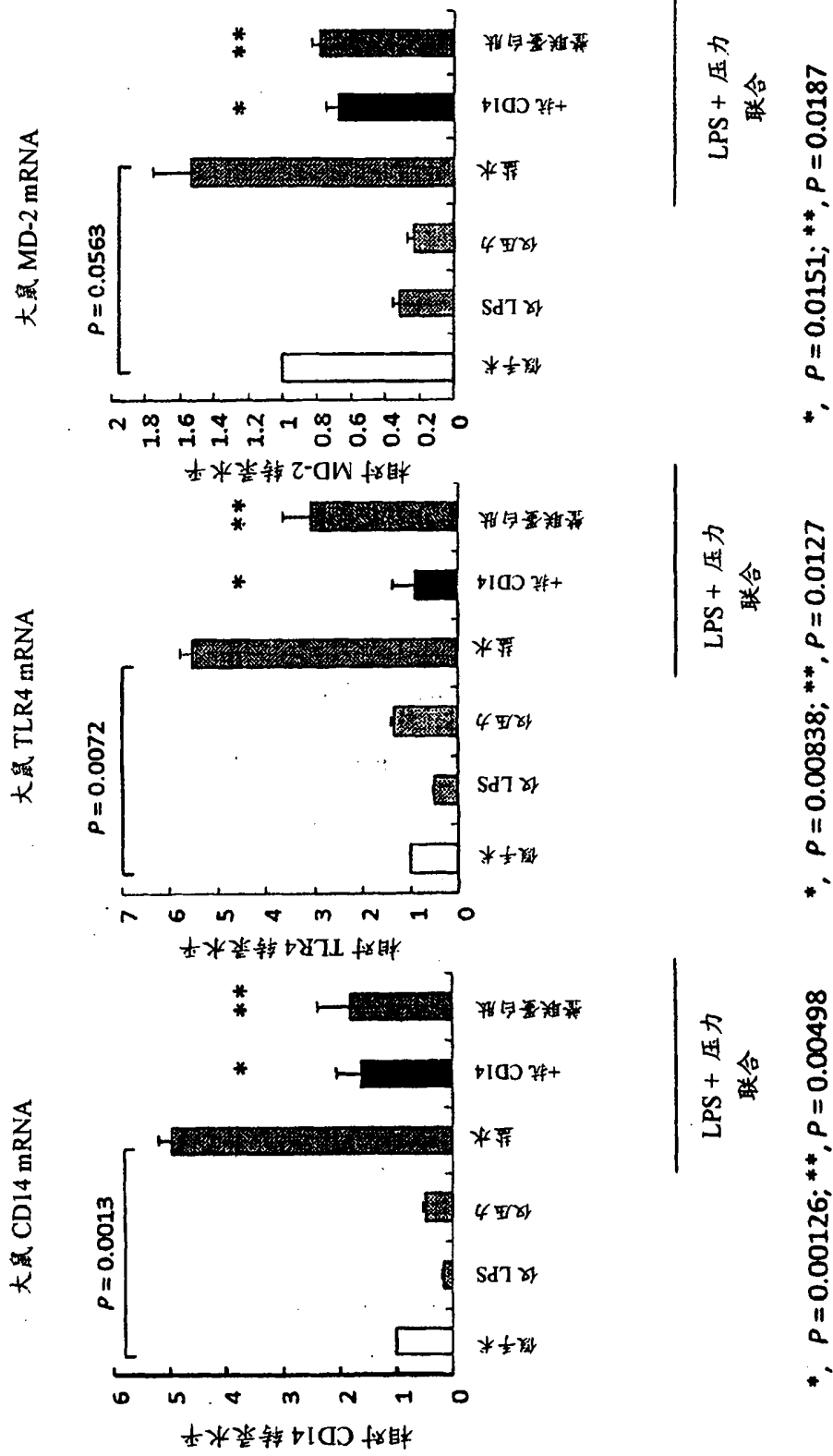


图 10