

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2011年4月7日 (07.04.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/038537 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/17 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2009/074302

(22) 国际申请日: 2009年9月29日 (29.09.2009)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 上海南方基因科技有限公司 (SHANGHAI SOUTH GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市张江高科技园区李冰路 151 号 6 号楼, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 王志勤 (WANG, Zhiqin) [CN/CN]; 中国上海市张江高科技园区李冰路 151 号 6 号楼, Shanghai 201203 (CN)。 江宏铨 (JIANG, Hongquan) [CN/CN]; 中国上海市张江高科技园区李冰路 151 号 6 号楼, Shanghai 201203 (CN)。 张新 (ZHANG, Xin) [CN/CN]; 中国上海市张江高科技园区李冰路 151 号 6 号楼, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE,

LLC); 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

WO 2011/038537 A1

(54) Title: METHODS AND KITS FOR THE PREDICTION, PREVENTION AND TREATMENT OF SEPTICEMIA AND SEPTIC SHOCK

(54) 发明名称: 败血症以及败血症休克的预测、预防和治疗方法及试剂盒

(57) Abstract: The present invention discloses the uses of CRISPLD2 protein and agonists thereof in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of septicemia and septic shock. The present invention also provides methods and pharmaceutical compositions for the prevention or treatment of septicemia and septic shock, and kits for the prediction of susceptibility to septicemia and septic shock.

(57) 摘要:

本发明公开了 CRISPLD2 蛋白及其促效剂在制备预防或治疗败血症以及败血症休克的药物中的应用。本发明还提供了预防或治疗败血症以及败血症休克的方法和药物组合物, 和预测败血症以及败血症休克的易感性的试剂盒。

败血症以及败血症休克的预测、预防和治疗方法及试剂盒

技术领域

5 本发明属于生物技术和医学领域，具体地说，本发明提供了一种败血症以及败血症休克相关蛋白-CRISPLD2蛋白，及其在败血症以及败血症休克的预测、预防和治理中的用途。通过提高血清中CRISPLD2蛋白的浓度，可以预防和治理败血症以及败血症休克。

10 背景技术

细菌感染引起的败血症至今仍然是危害人类健康的急性综合症，败血症目前是
美国排位第10的主要死亡原因，在中国败血症的发病率和死亡率也不容乐观。格兰氏阴性以及阳性细菌引起的败血症主要原因是由于细菌或细菌毒素侵入血流引起。健康者在病原菌入侵后，一般仅表现为短暂的菌血症，细菌可被人体的免疫
15 防御系统迅速消灭，并不引起明显症状；但各种免疫防御功能缺陷者(包括局部和全身屏障功能的丧失)，都易诱发败血症。放射治疗、广谱抗菌素、细胞毒类药物的应用，以及各种大手术至严重的开放性创伤等都是败血症的重要诱因。

细菌感染引起的败血症以及败血症并发休克的诊断、预防治疗工作仍然面临许多挑战，监测血流中的微量细菌和细菌毒素都是可行的诊断方法但存在严重缺
20 点，而且缺乏统一的标准。

近20多年，发现一些可以应用于诊断的分子靶点的人血清分子，例如B型尿肽(B-type natriuretic peptide)、降血钙素(Procalcitonin)、细菌聚脂多糖结合蛋白(LBP)、细菌渗透性增强蛋白(BPI)、可溶性CD14(sCD14)、Endocan等，但它们都不能准确、有效预测败血症及败血症休克。在格兰氏阴性细菌引起
25 败血症的病理过程中，该类细菌外壳的多聚脂多糖(LPS)起重要作用。但是根据对上述分子的分子免疫学功能以及生物学功能研究，很难作为预测格兰氏阴性细菌败血症以及个体对内毒素休克的有效靶点。

因此，本领域迫切需要开发的新的、有效地对败血症以及败血症休克进行预测、预防和治理的方法。

30

发明内容

本发明的目的是提供一种人败血症以及败血症休克相关蛋白-CRISPLD2蛋白及其应用。

在本发明的第一方面，提供了一种CRISPLD2蛋白或其促效剂的用途，它们被用于制备预防或治疗败血症以及败血症休克的药物。

在另一优选例中，所述的促效剂包括：刺激CRISPLD2分泌的TLRs激活剂，以及诱导CRISPLD2表达的诱导剂。

在另一优选例中，所述的TLRs激活剂包括：细菌的多聚脂多糖(LPS)、鞭毛蛋白(FLA)、细菌多聚糖(PGN)、和细菌DNA(CPG-DNA)；

而所述的诱导剂包括：组蛋白去乙酰化酶抑制剂（如制滴菌素A(Trichostatin A)）和维甲酸（尤其是全反式维甲酸）。

在另一优选例中，所述的药物含有CRISPLD2蛋白和/或其促效剂，以及药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述药物的剂型为口服剂型或注射剂。

在本发明的第二方面，提供了一种预防或治疗败血症以及败血症休克的方法，包括步骤：给需要的哺乳动物对象施用CRISPLD2蛋白或其促效剂，从而提高其血清中CRISPLD2蛋白的浓度。

在本发明的第三方面，提供了一种可用于制备预防或治疗败血症以及败血症休克的药物组合物，它含有药学上可接受的载体以及用于增加血清中CRISPLD2浓度的一种或多种选自下组的物质：

(a) 重组的CRISPLD2蛋白；

(b) 所述的TLRs激活剂包括：细菌的LPS、鞭毛蛋白(FLA)、细菌多聚糖(PGN)、和细菌DNA(CPG-DNA)和

(c) 组蛋白去乙酰化酶抑制剂(如制滴菌素A)和全反式维甲酸。

在本发明的第四方面，提供了一种CRISPLD2蛋白或基因的用途，它们被用于制备预测或检测败血症以及败血症休克的易感性的试剂盒或试剂。

在另一优选例中，所述的试剂盒包括：容器以及位于容器中的用于检测CRISPLD2血清浓度的试剂。

在另一优选例中，所述的试剂包括：抗CRISPLD2的抗体(尤其是单克隆抗体)。

在本发明的第五方面，提供了一种用于预测败血病及败血病及败血病休克

的易感性的试剂盒，它包括：容器以及位于容器中的用于检测CRISPLD2血清浓度的试剂。

在另一优选例中，所述的试剂包括：抗CRISPLD2的抗体。

在本发明的第六方面，提供了一种对败血病及败败血病及败血病休克的易感性进行预测的方法，它包括步骤：

检测待检个体的CRISPLD2血清浓度，并与正常人群的CRISPLD2血清浓度相比较，其中，高于正常人群就表明对该个体而言败血病及败败血病及败血病休克的易感性低于正常人群；低于正常人群就表明对该个体而言败血病及败败血病及败血病休克的易感性高于正常人群。

在本发明的第七方面，提供了与上述的CRISPLD2多肽特异性结合的抗体。

在本发明的第八方面，提供了模拟、促进、拮抗CRISPLD2多肽活性的化合物，以及促进CRISPLD2多肽表达的化合物。还提供了筛选这些化合物的方法。

在本发明的第九方面，提供了定性和定量检测样品中是否存在CRISPLD2蛋白的方法，它包括：将样品与CRISPLD2蛋白的特异性抗体接触，观察是否形成抗体复合物及其数量，其中形成了抗体复合物就表示样品中存在CRISPLD2蛋白。

本发明的其它方面由于本文的技术的公开，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图 1 显示了 ELISA 标准曲线。

图 2 显示了重组 CRISPLD2 的鉴定结果。其中，图 2A，10% SDS-PAGE 胶分离纯化重组 CRISPLD2 分子，考马斯蓝鉴定；图 2B 抗 CRISPLD2 抗体免疫印迹；图 2C 抗 c-myc-标记抗体免疫印迹。各泳道如下：1，3 和 5:培养基中的 CRISPLD2；M:分子量标准；2 和 4:对照培养基。

图 3 显示了应用 BIAcore 技术测定的分子相互作用。其中，(A) *E. coli* LPS 与 CRISPLD2 结合的传感图。(B) 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) LTA 与 CRISPLD2 结合的传感图。*E. coli* LPS 或 *S. aureus* LTA (0.3, 1.0, 3.0, 10 和 30 μ M) 流过固定在芯片表面的 CRISPLD2, k_{off} 和 k_{on} 是传感图计算取得的结合参数, LPS

的离解常数(K_D) = (k_{off} / k_{on})。 (C) 分子结合动力学曲线: RU 反映 *E. coli* LPS 与 CRISPLD2 的结合能力, *E. coli* LPS (1.0, 3.0, 10, 30 and 100 μ M) 流过固定在芯片表面的 CRISPLD2, . (D) Scatchard plot 分析 *E. coli* LPS 与 CRISPLD2 结合的离解常数(KD) (平均值 \pm s. d)。

5 图 4 显示了不同剂量 LPS 腹腔注射后血清 Crisp1d2 浓度的时间曲线。

图 5 显示了重组 CRISPLD2 阻断 LPS 与靶细胞受体结合, 抑制靶细胞炎症因子释放。其中, 图 A-B: 重组 CERISPLD2 蛋白阻断大肠杆菌 LPS 及沙门氏菌 LPS 与靶细胞受体结合。图 C-D. 重组 CERISPLD2 蛋白阻断大肠杆菌 LPS 诱导的炎症因子释放。

10 图 6 显示了重组人 CRISPLD2 保护小鼠免于内毒素休克致死, 血清 CRISPLD2 浓度与 *E. coli*-LPS 致死剂量相关性分析。其中, 图 A 显示了重组人类 CRISPLD2 保护小鼠免于内毒素休克致死。图 B 显示了小鼠血清 CRISPLD2 浓度与 *E. coli*-LPS 致死剂量存在相关性。

图 7 显示了抗菌素长时间治疗引起小鼠血清 CRISPLD2 浓度下降, 小鼠对内毒素休克的敏感性增加。其中, 图 7A 显示, 长时间服用万古霉素加新霉素导致小鼠血清 CRISPLD2 浓度下降。图 7B 显示, 长时间服用万古霉素加新霉素增加了小鼠对内毒素休克的敏感性。

图 8 显示了促效剂对 CRISPLD2 分泌或表达的促进作用。

20 图 9 显示了格兰氏阴性和阳性细菌的 LPS、脂蛋白、DNA 均可与 CRISPLD2 结合。

图 10 显示了 CRISPLD2 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2), 其中结合 LPS 的二个 LCCL 结构域位于第 286-370 位和第 387-460 位。第 333-337 位为 RXXXH 基序。

具体实施方式

25 本发明人经过深入而广泛的研究, 首次证明了一种与败血症以及败血症休克密切相关的人蛋白 CRISPLD2。一方面, 以 CRISPLD2 蛋白作为靶分子, 可检测个体血清 CRISPLD2 浓度, 预测诊断个体内对毒素的敏感性。另一方面, 通过提高血清中 CRISPLD2 蛋白的浓度, 可以预防和治疗败血症以及败血症休克。在此基础上完成了本发明。

30

CRISPLD2 (cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing

2, 含LCCD结构域的半胱氨酸富集分泌蛋白2)的cDNA序列可参见登录号NM_031476(长度4607 bp)或SEQ ID NO: 1, 其基因组序列可参见登录号NC_000016.8, 氨基酸序列可参见序列号AAH63012或SEQ ID NO: 2。

在本发明中, 术语“CRISPLD2蛋白”、“CRISPLD2多肽”或“人败血症以及败血症休克相关蛋白CRISPLD2”可互换使用, 都指具有人败血症以及败血症休克相关蛋白CRISPLD2氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的蛋白或多肽。它们包括含有或不含起始甲硫氨酸的CRISPLD2蛋白。

如本文所用, “分离的”是指物质从其原始环境中分离出来(如果是天然物质, 原始环境即是天然环境)。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的, 但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开, 则为分离纯化的。

如本文所用, “分离的CRISPLD2蛋白或多肽”是指CRISPLD2多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化CRISPLD2蛋白。基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上能产生单一的主带。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽, 优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物, 或是化学合成的产物, 或使用重组技术从原核或真核宿主(例如, 细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主, 本发明的多肽可以是糖基化的, 或可以是非糖基化的。

本发明还包括CRISPLD2蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用, 术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的天然CRISPLD2蛋白相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽, 而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的, 或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽, 或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物, 例如聚乙二醇)融合所形成的多肽, 或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列, 或与抗原IgG片段的形成的融合蛋白)。根据本文的教导, 这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

在本发明中, 术语“CRISPLD2多肽”指具有CRISPLD2蛋白活性的SEQ ID NO:

2序列的多肽。该术语还包括具有与CRISPLD2蛋白相同功能的、SEQ ID NO: 2序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为1-50个, 较佳地1-30个, 更佳地1-20个, 最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代, 以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内, 较佳地为10个以内, 更佳地5个以内)氨基酸。例如, 在本领域中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变蛋白质的功能。又比如, 在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括CRISPLD2蛋白的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨度条件下能与CRISPLD2 DNA 杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗CRISPLD2多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽, 如包含CRISPLD2多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外, 本发明还包括了CRISPLD2多肽的可溶性片段。

发明还提供CRISPLD2蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然CRISPLD2多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异, 也可以是不影响序列的修饰形式上的差异, 或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到, 如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变, 还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物, 以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解, 本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括: 体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化, 如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸, 磷酸丝氨酸, 磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

在本发明中, “CRISPLD2蛋白保守性变异多肽”指与SEQ ID NO: 2的氨基酸序列相比, 有至多10个, 较佳地至多8个, 更佳地至多5个, 最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与SEQ ID NO:1所示的编码区序列(第228-1718位)相同或者是简并的变异体。如本文所用,“简并的变异体”在本发明中是指编码具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的蛋白质,但与SEQ ID NO:1所示的编码区序列有差别的核酸序列。

本发明中的多肽和多核苷酸优选以分离的形式提供,更佳地被纯化至均质。

本发明的CRISPLD2核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的cDNA库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次PCR扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

应用PCR技术扩增DNA/RNA的方法被优选用于获得本发明的基因。用于PCR的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择，并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的DNA/RNA片段。

用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用CaCl₂法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl₂。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层

析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

另一方面,本发明还包括对CRISPLD2 DNA或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体,尤其是单克隆抗体。

5 本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体,而且还包括具有免疫活性的抗体片段,如Fab'或(Fab)₂片段;抗体重链;抗体轻链;遗传工程改造的单链Fv分子;或嵌合抗体,如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如,纯化的CRISPLD2基因产物或者其具有抗原性的片段,可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的,表达CRISPLD2蛋白或其具有抗原性的片段的细胞可
10 用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。

抗CRISPLD2蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中,检测活检标本(尤其是血清样本)中的CRISPLD2蛋白。此外,与CRISPLD2蛋白结合的单克隆抗体也可用放射性同位素标记,注入体内可跟踪其位置和分布。

15 多克隆抗体的生产可用CRISPLD2蛋白或多肽免疫动物,如家兔,小鼠,大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应,包括但不限于弗氏佐剂等。

利用本发明蛋白,通过各种常规筛选方法,可筛选出与CRISPLD2蛋白发生相互作用的物质,如受体、抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

20 本发明蛋白及其激动剂(也称为促效剂)等,当在治疗上进行施用(给药)时,可预防或治疗败血症以及败血症休克。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):口服、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

25 本发明的多肽可直接用于疾病治疗和预防,尤其是防治败血症以及败血症休克。在使用本发明CRISPLD2蛋白时,还可同时使用其他用于同一病症的治疗剂。

30 本发明还提供了一种组合物(包括药物组合物),它含有安全有效量(如0.001-99.9wt%)的本发明CRISPLD2多肽或其激动剂以及(药学上)可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行

制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物，可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

5 使用药物组合物时，是将安全有效量的CRISPLD2蛋白或其拮抗剂、激动剂施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约5毫克/千克体重，较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约1毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

10 本发明还涉及定量检测CRISPLD2蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的，包括ELISA、FISH测定和放射免疫测定。试验中所检测的CRISPLD2蛋白水平，可以用作解释CRISPLD2蛋白在各种疾病中的重要性和用于诊断败血症以及败血症休克的易感性。

 一种检测样品中是否存在CRISPLD2蛋白的方法是利用CRISPLD2蛋白的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与CRISPLD2蛋白特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在CRISPLD2蛋白。

本发明的主要应用包括：

1. 将CRISPLD2蛋白作为靶分子，检测个体血清CRISPLD2浓度，预测诊断个体体内对毒素的敏感性，清除细菌抗原分子的能力，为临床医生提供依据，对可能突发败血症并引起休克的病人采取必要的预防治疗措施。

2. 将重组CRISPLD2蛋白用于病人败血症时干预治疗。

3. 应用TLRs激活剂提高CRISPLD2的血清浓度，以预防败血症以及败血症休克。

25 4. 药物通过CRISPLD2启动子区RXR/RXR以及组蛋白去乙酰化酶与RXR/RXR结合激活CRISPLD2表达，提高血清CRISPLD2浓度。

5. 药物通过信号通路AP-1、STAT3、GATA3、IRF-3激活激活CRISPLD2表达，提高血清CRISPLD2浓度。

30 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，

通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

5 通用方法

一、质粒构建和细胞转染

1. 应用PCR从人类混合组织mRNA中获得全长CRISPLD2阅读框架(ORF)cDNA；引物：

F1 5' - GCTGTCGCCGCTGCTACCGC (SEQ ID NO: 3)；

10 R1 5' - GACGCCCTTCTCCCCTGGT (SEQ ID NO: 4)

2. PCR产物插入质粒pGEM-T (Promega)作为表达载体构建的模版。

3. 构建重组原核生物表达载体； CRISPLD2序列(部分；257-497aa)的cDNA插入质粒pGEX-4T-1 (GE Healthcare)产生GST-CRISPLD2融合蛋白。这一融合蛋白用来免疫兔子产生抗血清。应用Protein G Agarose从抗血清中纯化抗
15 CRISPLD2 IgG。

4. 哺乳动物细胞表达重组CRISPLD2；全长CRISPLD2阅读框架(ORF)cDNA插入pcDNA3.1A带有-myc-his标记序列(Invitrogen)质粒，形成pcDNA3.1A-CRISPLD2。然后，产生蛋白C端带有-myc-his标记的重组CRISPLD2蛋白。

5. 应用Lipofectamine(Invitrogen)，将质粒pcDNA3.1A-CRISPLD2转染
20 CHO细胞，然后应用抗菌素G418选择转染阳性细胞。稳定表达人类CRISPLD2的CHO细胞培养时保持G418，应用有限稀释法进一步分离、选择高表达的CHO细胞克隆。

二、纯化重组CRISPLD2蛋白

25 1. 无血清培养液培养表达重组CRISPLD2蛋白的CHO细胞。收集上清液内含高浓度重组CRISPLD2蛋白。

2. 应用Nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) (Qiagen)亲和层析，纯化培养液中的重组CRISPLD2蛋白；50 μ l 缓冲液(50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl; pH 7.5)洗柱，用含有250 mM 咪唑(imidazole)的缓冲液(pH 7.8)洗脱
30 纯化的重组CRISPLD2蛋白。

3. 收集部分磷酸缓冲液透析，用SDS-PAGE电泳分离，考马斯蓝(coomassie

blue)染色SDS-PAGE胶，鉴定纯度，并用BCA 测定试剂盒蛋白定量 (Pierce)。

三、免疫酶联反应测定法(ELISA) 测定CRISPLD2浓度

用碳酸钠缓冲液 (pH 9.5)适当稀释培养液或血清，包被96孔板(Nunc
5 MaxiSorp, Denmark.)，4℃过夜。磷酸缓冲液洗96孔板两遍，用含8%胎牛血清的
磷酸缓冲液孵育1小时，然后用含8%胎牛血清和抗CRISPLD2多克隆抗体(10 μg
/ml)的磷酸缓冲液孵育2小时，磷酸缓冲液洗4遍，加入辣根过氧化酶偶联的第二
抗体，再用磷酸缓冲液洗4遍，含有TMB 底物的醋酸/柠檬酸盐缓冲液(0.1 M, pH
6.0)加入96孔板显色反应，检测波长为450nm-570nm 。以重组CRISPLD2(0.03-
10 4.00微克/ml)为标准，可以定量样本中CRISPLD2/Crispld2的含量。应该指出8%
胎牛血清磷酸缓冲液中的牛Crispld2不影响检测本底。获得的ELISA标准曲线如
图1所示。

实施例1. 蛋白纯度的鉴定

15 蛋白标本稀释在上样缓冲液中，由 10% SDS-PAGE 电泳胶分离，直接考马斯
蓝染色鉴定蛋白纯度。免疫影迹法：SDS-PAGE 电泳胶上的蛋白质转移到硝酸纤维
膜(GE Healthcare)，硝酸纤维膜与含有第一抗体的缓冲液一起培养 2 小时
37° C，清洗，荧光素标记的第二抗体(ROCKLAND) 培养 1 小时 37° C。ODYSSEY 红
外线图像系统(Infrared Imaging System) 扫描硝酸纤维膜获得图像。

20 结果如图 2 所示。

实施例2. LPS可以与CRISLD2结合，但金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)LTA不能。

应用BIAcore 3000生物传感检测仪，通过Surface plasmon resonance
25 (SPR) 方法定量测定LPS与CRISPLD2的结合。

用仪器公司提供的试剂分别将重组CRISPLD2蛋白和IgG(0.18 mg/ml 溶解于
醋酸缓冲液，pH 4.5)偶联到传感芯片(GE Healthcare)的两个通道。不同浓度
E. coli LPS溶于磷酸缓冲液，并衡量注入，同时流过传感芯片(20 μl/min)的两个
通道。从重组CRISPLD2蛋白通道获得的LPS的结合反应单位(RU)减去IgG通道的信
30 号(RU)；磷酸缓冲液(PBS)洗去未结合的LPS；然后50 mM NaOH洗去结合的LPS，
对芯片进行再生。

LPS亲和力分析：LPS 解离常数(K_D) 可以用 Scatchard plot 分析(C—D)；
 公式为： $K_D = -1/\text{slope} = (R_{U_{\max}} - RU)/(RU/\text{Conc}_{LPS})$ 。同样(A) K_D 可以通过计算
 两个常数的比率($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$)得到。解离比率常数(dissociation rate constant,
 k_{off})可以用公式： $R_t = R_{t_0} e^{-k_{\text{off}}(t - t_0)}$ ， R_{t_0} 是开始反应时幅度(amplitude of
 5 the initiate response)。结合比率常数(association rate constant, k_{on})
 从 k_{off} 值推导，公式为： $R_t = R_{\max} [1 - e^{-(k_{\text{on}} C + k_{\text{off}})(t - t_0)}]$ ，这里 C 为LPS浓度，
 R_{\max} 是 LPS 与CRISPLD2结合最大结合反应单位(RU)， R_t 是时间 t 时LPS 与
 CRISPLD2结合的量。

结果如图3所示。

10

实施例3. 血清、血浆CRISPLD2的浓度(10例正常成人，5例新生儿)

对于10例正常成人的血清和血浆，5例新生儿的脐带血，用免疫印迹法分析
 其CRISPLD2浓度。参照重组CRISPLD2标准浓度，血清、血浆CRISPLD2浓度由
 ODYSSEY 红外线图像扫描分析系统计算定量。成人血清与新生儿脐带血CRISPLD2
 15 比较，并用T-test进行显著性分析。P = 0.025。

结果如下：

蛋白质	样品	数量 (n)	范围 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	平均值 \pm s. d ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
CRISPLD2*	血清	7	304 - 996	607 290
CRISPLD2*	血浆	3	384 - 790	619 210
CRISPLD2*	脐带血	5	149 - 426	290 110

实施例4 不同剂量LPS腹腔注射后血清Crispld2浓度的时间曲线

小鼠腹腔注射不同非毒性剂量E coli-LPS，阴性对照为Pam3CSK4人工合成
 20 细菌脂蛋白和磷脂壁酸LTA，不同时间点小鼠尾静脉抽血，血清Crispld2由ELISA
 检测。

结果如图4所示。

**实施例5. 重组CRISPLD2阻断LPS与靶细胞受体结合，抑制靶细胞炎症因子
 25 释放。**

5x10⁶/毫升人类外周单个核细胞悬浮在RPMI1640培养液中(0.1%FCS),加入重组CERISPLD2蛋白和Cy2标记的LPS,4°C,20分钟。流式细胞仪分析,单核细胞与淋巴细胞又点阵图分离(Dot-plot,SSC versus FSC),分别分析FITC-LPS在这两群细胞上的荧光强度。重组CRISP-3蛋白作为对照。

5 结果如图5A和5B所示,重组CERISPLD2蛋白可阻断大肠杆菌LPS及沙门氏菌LPS与靶细胞受体结合。

5x10⁶/毫升人类外周单个核细胞悬浮在RPMI1640培养液中(0.1%FCS),加入重组CERISPLD2蛋白和Cy2标记的LPS,37°C,18小时。重组CRISP-3蛋白作为对照。上清液中TNF、IL-6用商业ELISA试剂盒测定。

10 结果如图5C和5D所示,重组CERISPLD2蛋白可阻断大肠杆菌LPS诱导的炎症因子释放。

15 实施例6. 重组人CRISPLD2 保护小鼠免于内毒素休克致死,血清CRISPLD2浓度与E coli-LPS致死剂量相关性分析

(A)三组balb/c小鼠都腹腔注射400 微克Ecoli-LPS,同时,正常对照组腹腔注射PBS(21个小鼠),实验组腹腔注射1毫克重组CRISPLD2(17个小鼠),实验对照组腹腔注射1 毫克重组CRISP3(7个小鼠)(该蛋白同属CRISP家族,但缺失LPS结合区域)。存活率计数并制图。

20 结果如图6A所示,重组人CRISPLD2保护小鼠免于内毒素休克致死(45个小鼠)。

(B)小鼠(20个小鼠)腹腔注射非毒性剂量E coli-LPS(30微克/小鼠),第十天时与4只正常小鼠一起尾静脉抽血,血清1:10000 稀释,CRISPLD2进行ELISA检测,6小时后对全部小鼠进行不同致死剂量Ecoli-LPS随机腹腔注射。第三十二天时,存活的小鼠再次尾静脉抽血,血清1:10000 稀,CRISPLD2进行ELISA检测,6小时后再次随机腹腔注射不同致死剂量Ecoli-LPS。每一小鼠的致死剂量Ecoli-LPS与当时的血清CRISPLD2浓度数据相对应,组成数据矩阵,并应用Graphpad Prism 5软件进行统计学分析,P值=0.0009。Excel的logarithmic trendline是数据矩阵的最佳匹配。

30 结果如图6B所示,小鼠血清CRISPLD2浓度与E coli-LPS致死剂量正相关。

这提示本发明蛋白是一个预测格兰氏阴性细菌败血症以及个体对内毒素敏感性的靶分子。

5 实施例7. 广谱抗菌素长时间治疗引起小鼠血清CRISPLD2浓度下降，小鼠对内毒素休克的敏感性增加

(A) 万古霉素1毫克/毫升+新霉素0.5毫克/毫升溶解于饮用水中喂食小鼠(27个小鼠)杀灭体内共生菌，不同时间点小鼠尾静脉抽血，血清1:10000稀，CRISPLD2进行ELISA定量检测。

10 结果如图7A所示，长时间服用万古霉素加新霉素导致小鼠血清CRISPLD2浓度下降。

(B) 正常饮水的正常对照组，饮水中含广谱抗菌素的4天组以及15天组，三组小鼠都腹腔注射200微克Ecoli-LPS。正常小鼠腹腔注射400微克Ecoli-LPS才会有70-80%死亡率，连续15天服用广谱抗菌素的小鼠与正常对照相比，腹腔注射200微克Ecoli-LPS导致的死亡率显著增加，而连续4天服用广谱抗菌素的小鼠与
15 正常对照相比，腹腔注射200微克Ecoli-LPS导致的死亡率无显著变化。统计方法和统计数据已标在图上。

结果如图7B所示，表明长时间服用万古霉素加新霉素增加了小鼠对内毒素休克的敏感性(32个小鼠)。

20 实施例 8. 格兰氏阴性阳性细菌的LPS、鞭毛蛋白、DNA、细菌多聚糖均可刺激免疫细胞显著增加CRISPLD2分泌；用维甲酸或HDAC抑制剂来激活CRISPLD2基因启动子区域的EXE/EXE /HDAC复合物，可以上调CRISPLD2的表达。

PGN；高纯度细菌多聚糖，FLA；高纯度细菌鞭毛蛋白，OND ctr；人工合成细菌DNA富含GPC序列，OND；人工合成细菌DNA富含CPG序列。人外周血单个核细胞(PBMCs) 2×10^6 /ml 悬浮于RPMI 1640 培养液含0.1% 胎牛血清。*E. coli*
25 LPS、PGN、FLA、OND ctr、OND 用于刺激人外周血单个核细胞3小时或12小时37°C。这些试剂所用的浓度如图8中所示。CRISPLD2 在培养液中的浓度由ELISA鉴定。

30 结果如图8所示。TLRs激活剂包括细菌的LPS、鞭毛蛋白、CPG-DNA均可刺激免疫细胞显著增加CRISPLD2分泌。

格兰氏阳性细菌的磷脂壁酸(LTA)激活TLR2则不能增加CRISPLD2分泌。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂和全反式维甲酸可以抑制感染炎症反应导致的炎症因子释放，而且可以诱导免疫细胞大量释放CRISPLD2(实施例8D-E)。

5 实施例 9. 格兰氏阴性和阳性细菌的LPS、脂蛋白、DNA均可与CRISPLD2结合

Surface plasmon resonance (SPR) 测定方法同实施例2。Pam3CSK4;人工合成细菌脂蛋白。LTA; 格兰氏阳性菌磷脂壁酸。OND ctr; 人工合成细菌DNA富含GPC序列。OND; 人工合成细菌DNA富含CPG序列。Poly I:C; 人工合成病毒双链RNA。所有这些试剂浓度为(0, 0.3, 1.0, 3.0, 10 μM),

10 结果如图 9 所示。细菌 DNA, 细菌脂蛋白(Pam3CSK4)等可以与 CRISPLD2 相互作用, 这提示 CRISPLD2 不但可以作用于格兰氏阴性细菌的分子, 同样也作用于格兰氏阳性细菌的分子。

实施例10 败血症以及败血症休克易感性的检测试剂盒

15 制备一检测试剂盒, 其中含有兔抗 CRISPLD2 IgG、ELISA 的检测试剂, 和说明书。

实施例 11 含重组 CRISPLD2 蛋白质的药物组合物

按以下配方, 用常规方法制备药物组合物:

CRISPLD2蛋白	100 微克
右旋糖酐	1 毫克
100 毫摩尔磷酸缓冲液	1毫升

20 另外, 在上述药物组合物中, 可额外添加大肠杆菌 LPS、鞭毛蛋白(FLA)。另外, 也将 CRISPLD2 用大肠杆菌 LPS 或鞭毛蛋白(FLA)进行替换。

讨论

25 1. 分泌蛋白CRISPLD2是一个预测格兰氏阴性细菌败血症以及个体对内毒素敏感性的靶分子。

本发明的研究工作中发现, 非常保守的半胱氨酸富集的秘密蛋白 CRISPLD2(Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2)是

一个血清浓度较高的LPS结合蛋白(实施例3)，该蛋白拥有两个与LPS结合的结构区域(图10)，并具有较高的亲和力与LPS结合(实施例2)。不同于已知蛋白，小鼠腹腔注射非毒性剂量LPS的第一天(急性期)，血清Crispld2浓度快速下降，第二天以后开始反弹，第五天(恢复期)达到LPS注射前1-2倍以上，然后，维持较高的血清浓度超过1周(实施例4)。统计学分析发现该蛋白血清浓度与内毒素致死剂量正相关(实施例6, 7)，这提示本发明蛋白是一个预测格兰氏阴性细菌败血症以及个体对内毒素敏感性的靶分子。

2. CRISPLD2蛋白可以保护小鼠，增加内毒素休克的存活率，可以预防治疗内毒素休克。

人类、小鼠和大鼠的心脏、肺脏、小肠、胎盘以及粒细胞、单核细胞都高表达CRISPLD2。体外实验中本发明人还发现大部分白细胞(包括粒细胞、单核细胞)自然释放该LPS结合蛋白，TLR4的激活剂可以显著加强其释放。该蛋白在正常生理浓度范围内可以阻断LPS与受体结合，并抑制LPS诱导的炎症因子释放，包括肿瘤坏死因子(TNF- α)释放(实施例5)；该重组蛋白腹腔注射可以保护小鼠，大幅降低内毒素休克的死亡率(实施例6)。

60年前，科学家发现小鼠腹腔注射非毒性剂量E coli-LPS可以诱导个体产生免疫反应，降低腹腔注射致死剂量E coli-LPS导致的死亡率，这一现象称之为“耐受”(tolerance)，其分子机制至今尚未完全揭示。

本发明人发现小鼠腹腔注射非毒性剂量E coli-LPS可以提高血清CRISPLD2浓度1-2倍以上，并维持较高的血清浓度超过1周，该期间小鼠再次腹腔注射致死剂量E coli-LPS，它们的死亡率大大降低。实验数据统计学分析发现小鼠血清CRISPLD2浓度与E coli-LPS致死剂量呈正相关(实施例6B, 7)。应用广谱抗菌素喂食小鼠两个星期，小鼠血清CRISPLD2浓度降低50%，小鼠对内毒素休克易感性显著增加(实施例7)，揭示了LPS结合蛋白CRISPLD2在固有免疫防御中调控细菌LPS反应的重要作用。提示了临床干预提高血清CRISPLD2浓度，具有预防内毒素休克的重要临床意义。

3. 应用TLRs激活剂是提高体内CRISPLD2浓度的简单有效预防治疗方法。格兰氏阳性及阴性细菌抗原分子刺激增减细胞分泌CRISPLD2；反之，该蛋白还可以与这些细菌抗原结合，具有“清道夫”蛋白(Scavenge protein)的功能。

(1) 细菌的LPS、DNA、鞭毛蛋白(FLA)、细菌多聚糖(PGN)等激活剂可以增加细胞分泌CRISPLD2蛋白。血清CRISPLD2浓度不但是一个指标，直接反映个体的

对内毒素敏(LPS)感性,也间接反映内生细菌环境。细菌分子包括LPS、鞭毛蛋白(FLA)、DNA、细菌多聚糖(PGN)都是TLRs激活剂,分别激活TLR4、TLR5、TLR9等受体。本发明人发现TLRs激活剂包括细菌的LPS、鞭毛蛋白、CPG-DNA均可刺激免疫细胞显著增加CRISPLD2分泌,而格兰氏阳性细菌的磷脂壁酸(LTA)激活TLR2则不能增加CRISPLD2分泌(实施例8)。很久以来,大量的研究证明TLRs激活剂进入血液可引起炎症反应,过量可导致脓毒性休克,因而限制了TLRs激活剂应用于疾病治疗方面的努力。这一事实不能忽视,上消化道始终暴露于大量的TLRs激活剂环境。最近的研究表明消化道粘膜对TLRs激活剂反应温和,TLRs激活剂对粘膜上皮动态平衡起重要作用并加强了小肠内抗细菌的固有免疫反应。小鼠腹腔注射非毒性剂量的LPS可以提高血清CRISPLD2浓度,并降低小鼠对内毒素的敏感性,提高小鼠内毒素休克的存活率(实施例6)。虽然全身系统性应用TLRs激活剂不是一个合适以及可以接受的方法,但通过消化道TLRs激活剂进入粘膜表面,因而增强宿主的固有免疫功能肯定在临床上可行的并且是有益的。

(2) CRISPLD2蛋白与细菌脂蛋白(Pam3CSK4)和细菌DNA结合,清除诱导炎症反应的格兰氏阳性及阴性细菌分子。细菌DNA,细菌脂蛋白(Pam3CSK4)等可以与CRISPLD2相互作用(实施例9),可见CRISPLD2不但可以作用于格兰氏阴性细菌的分子,同样也作用于格兰氏阳性细菌的分子。该蛋白的第一个LCCL结构域中发现RXXXH结构,这一结构可以与DNA的结合;LCCL结构域又是亲脂性蛋白结构,可以与细菌脂蛋白Pam3CSK4结合(实施例9);该蛋白两个LCCL结构域中的还具有与血清脂蛋白结合的潜力,可能通过这一机制不但参与清除外源细菌抗原分子,而且还参与清除炎症反应导致的凋亡细胞释放DNA碎片。以上所述提示了CRISPLD2蛋白具有“清道夫”(Scavenge protein)的功能。正常情况下,体液中维持相对合理的CRISPLD2浓度,保持内生细菌菌群平衡。当外部细菌入侵,免疫细胞、上皮细胞通过TLRs受体发现过量的细菌分子释放,确认细菌入侵,因而加强CRISPLD2分泌(实施例8),拮抗细菌抗原分子并控制适度的固有免疫反应;一旦免疫系统杀死入侵细菌,细菌崩解导致大量细菌分子释放,CRISPLD2立即参与加速清除细菌分子以及炎症反应导致的凋亡细胞,加强控制免疫系统对这些细菌抗原分子的反应(包括固有以及获得性免疫),避免过度免疫反应引发生严重综合症导致休克。血清学研究可以观察到急性期血清CRISPLD2浓度快速下降,然后马上反弹,反映了该蛋白浓度在体液中动态平衡;细胞加强释放CRISPLD2,又有效地参与拮抗清除大量细菌抗原分子工作和死亡细胞碎片。一旦完成清除工作,

CRISPLD2维持较高血清浓度，个体进入恢复期，并获得较高的拮抗细菌抗原的能力，包括拮抗内毒素的能力(实施例4)。可见，CRISPLD2是控制细菌感染引起的过度免疫反应反馈机制中一个关键的分子。因此，应用内服 TLRs激活剂提高血清CRISPLD2浓度，降低个体对内毒素的敏感性，维持细菌平衡，加速清除体内残存内毒素以及其他免疫原性细菌分子，是一个预防败血症以及败血症休克的简易有效的办法。重组CRISPLD2蛋白也可以在重症病人输血时加入血浆，加速清除体内残存细菌内毒素以及其他免疫原性细菌分子，应用于治疗。

4. 通过激活CRISPLD2的启动子可以增加细胞分泌CRISPLD2。

例如已知组蛋白去乙酰化酶与未活化的RXR/RXR复合物控制CRISPLD2转录表达，组蛋白去乙酰化酶抑制剂和全反式维甲酸可以抑制感染炎症反应导致的炎症因子释放，而且可以诱导免疫细胞大量释放CRISPLD2(实施例8, 图8D-E)，但这些药物抑制免疫反应的机制是直接干预信号传导，而不依赖于CRISPLD2释放拮抗细菌抗原，另一方面，药物治疗引起的大量CRISPLD2释放有益于清除抗细菌抗原分子。这是药物作用相辅相成的两个方面----直接干预抑制炎症反应信号传导；同时细胞增加分泌CRISPLD2清除细菌抗原分子。本发明人已经发现了CRISPLD2启动子区含有维甲酸受体RXR/RXR结合区以及其他启动子的结合区，包括AP-1、STAT3、GATA3、IRF-3以及组蛋白去乙酰化酶的结合区。药物干预激活RXR/RXR、AP-1、STAT3、GATA3、IRF-3等核受体和因子是增加细胞CRISPLD2分泌是另一个具有前景的预防治疗措施。

20

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

25

权利要求

1. 一种CRISPLD2蛋白或其促效剂的用途，其特征在于，用于制备预防或治疗败血症以及败血症休克的药物。

2. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述的促效剂包括：刺激
5 CRISPLD2分泌的TLRs激活剂，以及诱导CRISPLD2表达的表达诱导剂。

3. 如权利要求2所述的用途，其特征在于，所述的TLRs激活剂包括：细菌的多聚脂多糖(LPS)、鞭毛蛋白(FLA)、细菌多聚糖(PGN)、和细菌DNA(CPG-DNA)；

所述的表达诱导剂包括：组蛋白去乙酰化酶抑制剂(如制滴菌素A)和全反式维甲酸。

10 4. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述的药物含有CRISPLD2蛋白和/或其促效剂，以及药学上可接受的载体。

5. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述药物的剂型为口服剂型或注射剂。

6. 一种预防或治疗败血症以及败血症休克的方法，其特征在于，包括步
15 骤：给需要的哺乳动物对象施用CRISPLD2蛋白或其促效剂，从而提高其血清中CRISPLD2蛋白的浓度。

7. 一种用于制备预防或治疗败血症以及败血症休克的药物组合物，其特征在于，它含有药学上可接受的载体以及用于增加血清中CRISPLD2浓度的一种或多种选自下组的物质：

20 (a) 重组的人CRISPLD2蛋白；

(b) 所述的TLRs激活剂包括：细菌的LPS、鞭毛蛋白(FLA)、细菌多聚糖(PGN)、和细菌DNA(CPG-DNA)和

(c) 组蛋白去乙酰化酶抑制剂(如制滴菌素A)和全反式维甲酸。

8. 一种CRISPLD2蛋白或基因的用途，其特征在于，用于制备预测或检测败
25 血症以及败血症休克的易感性的试剂盒或试剂。

9. 如权利要求8所述的用途，其特征在于，所述的试剂盒包括：容器以及位于容器中的用于检测CRISPLD2血清浓度的试剂。

10. 一种用于预测败血病及败血病及败血病休克的易感性的试剂盒，其特征在于，它包括：容器以及位于容器中的用于检测CRISPLD2血清浓度的试剂。

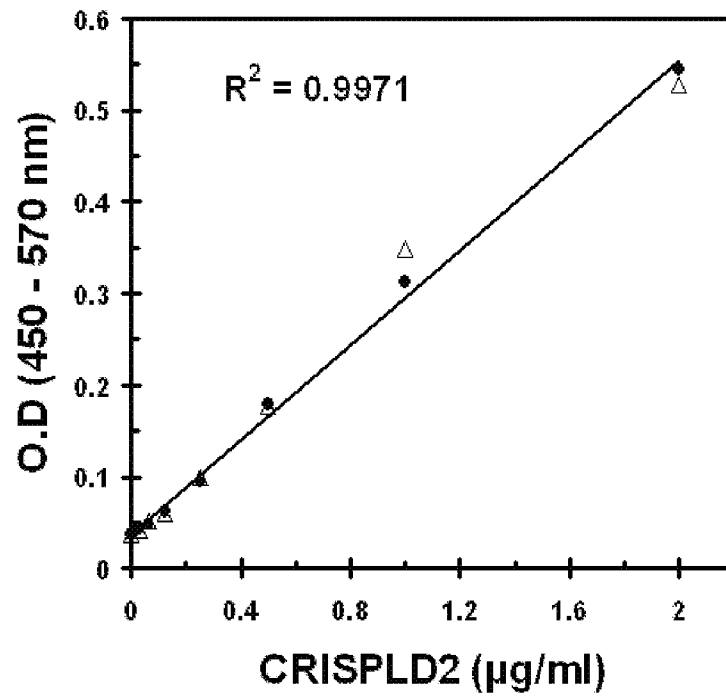


图 1

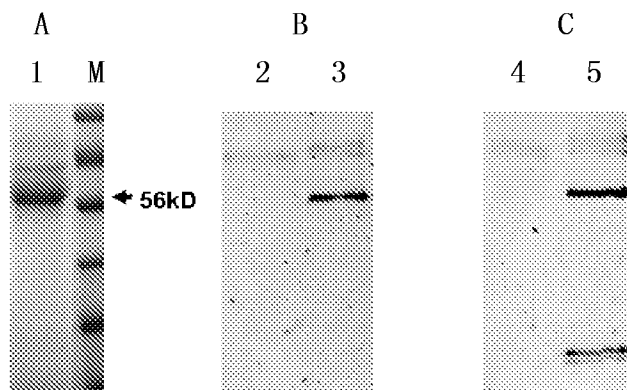


图 2

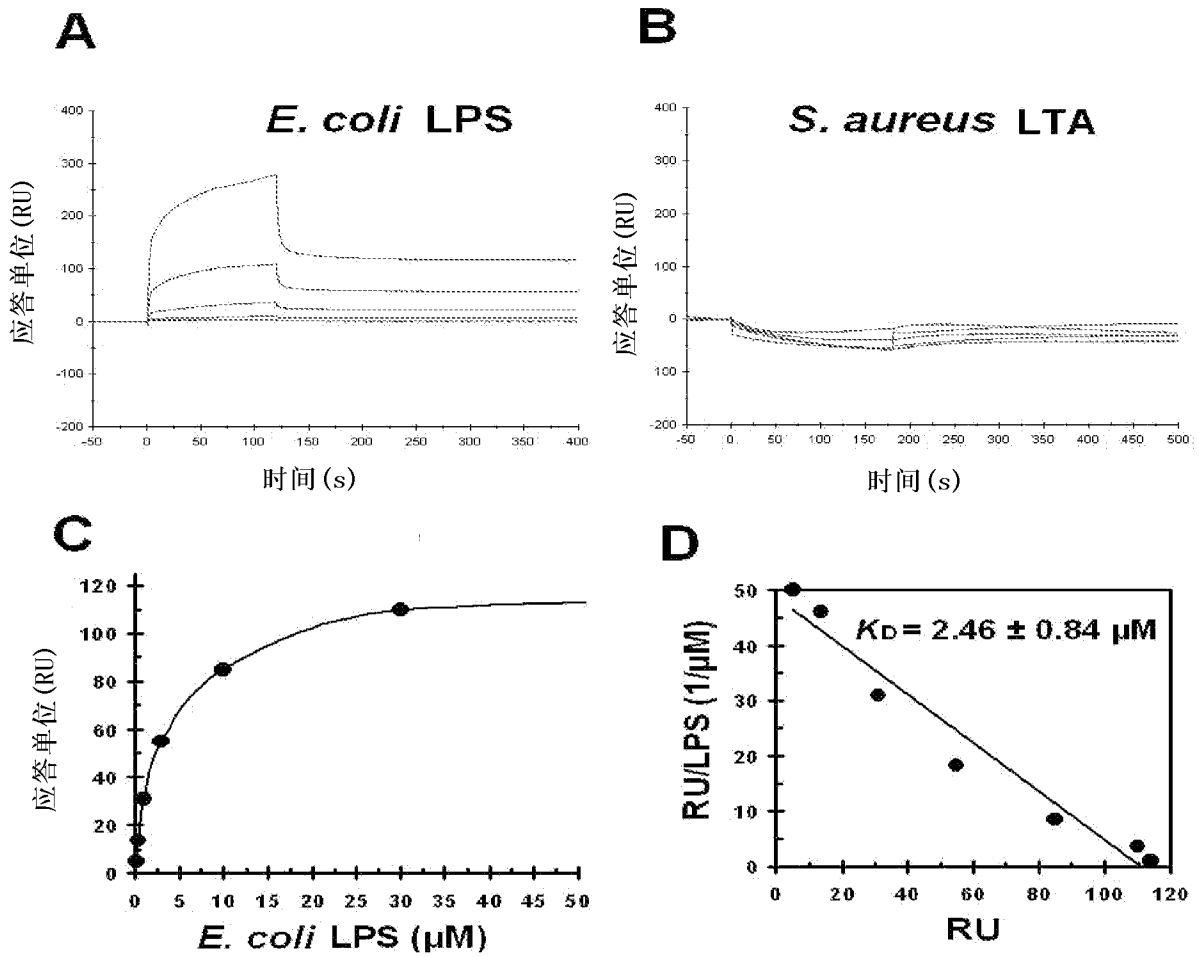


图 3

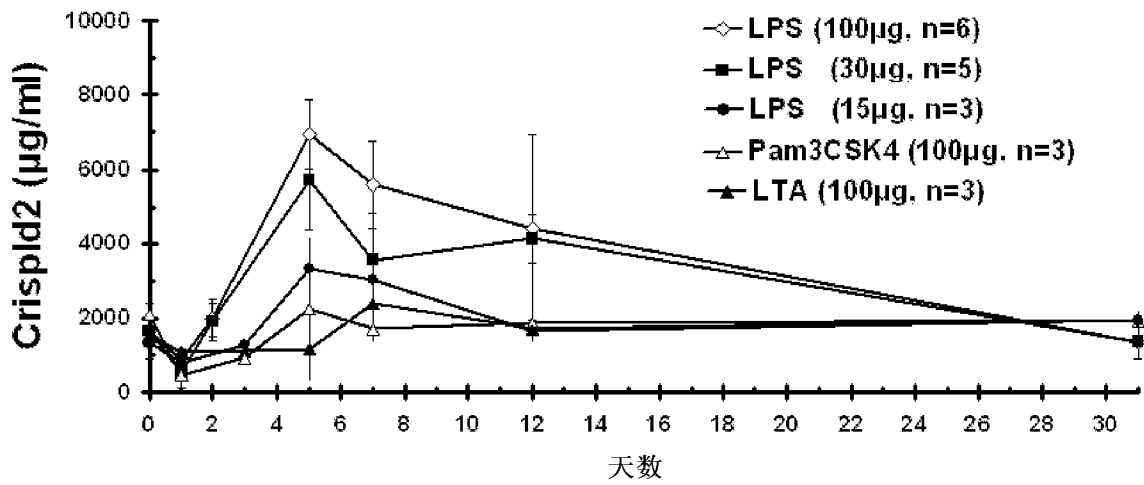


图 4

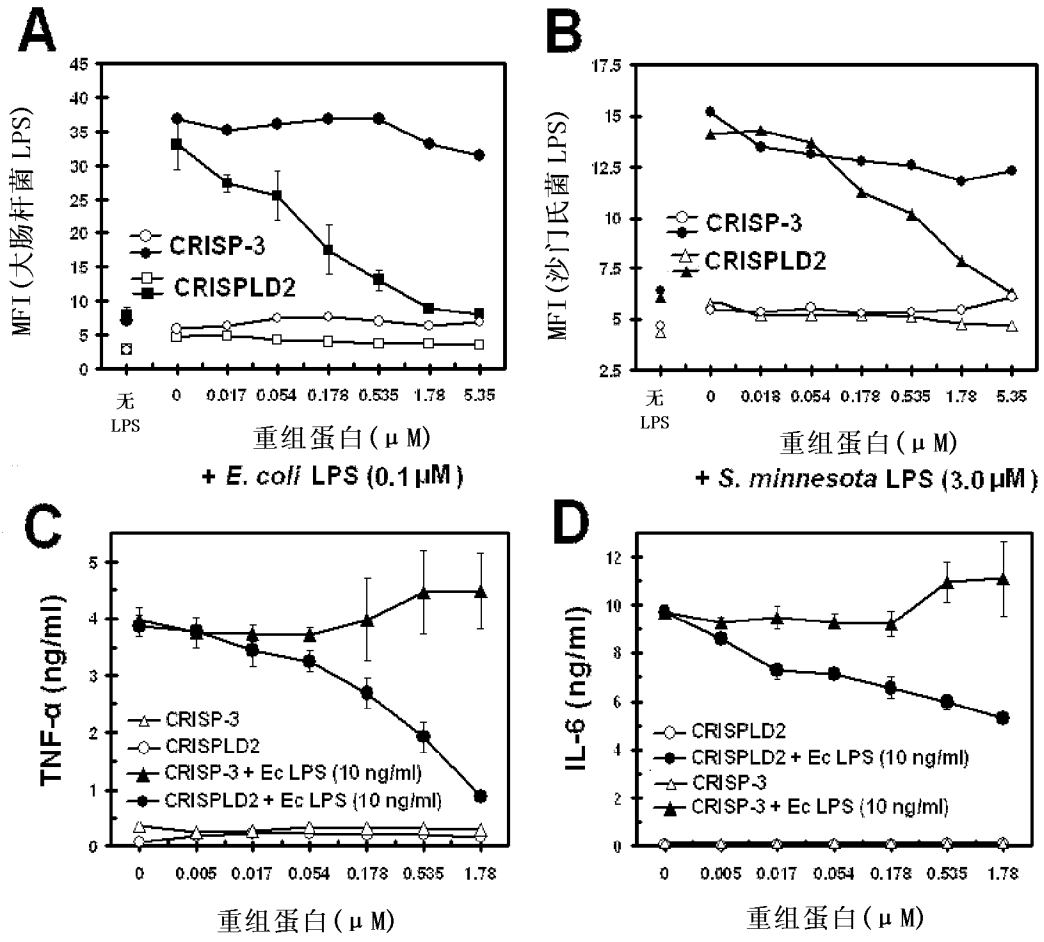


图 5

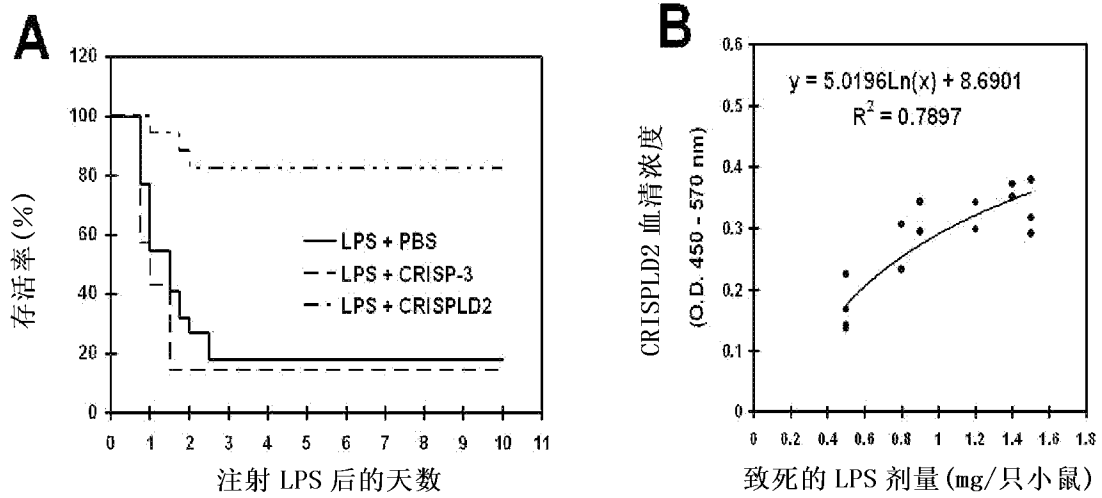


图 6

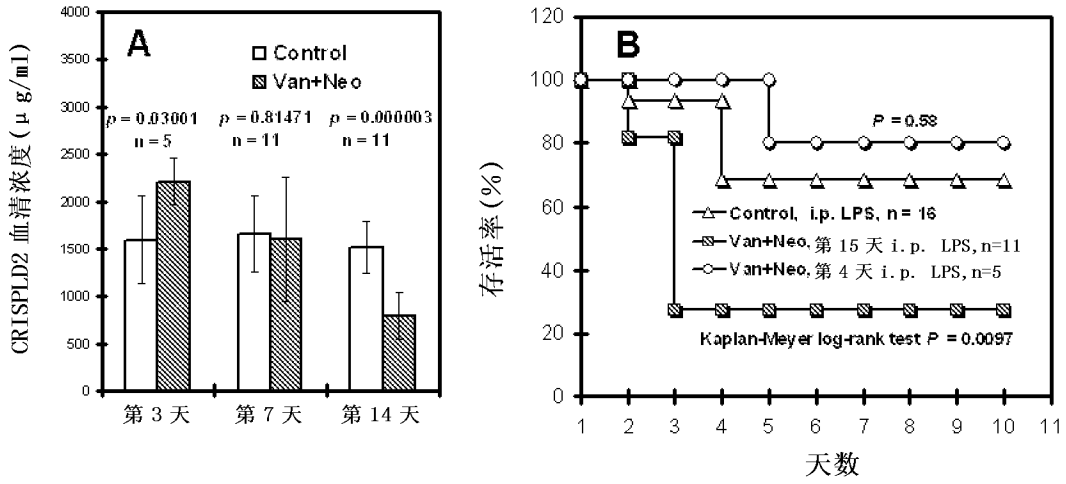


图 7

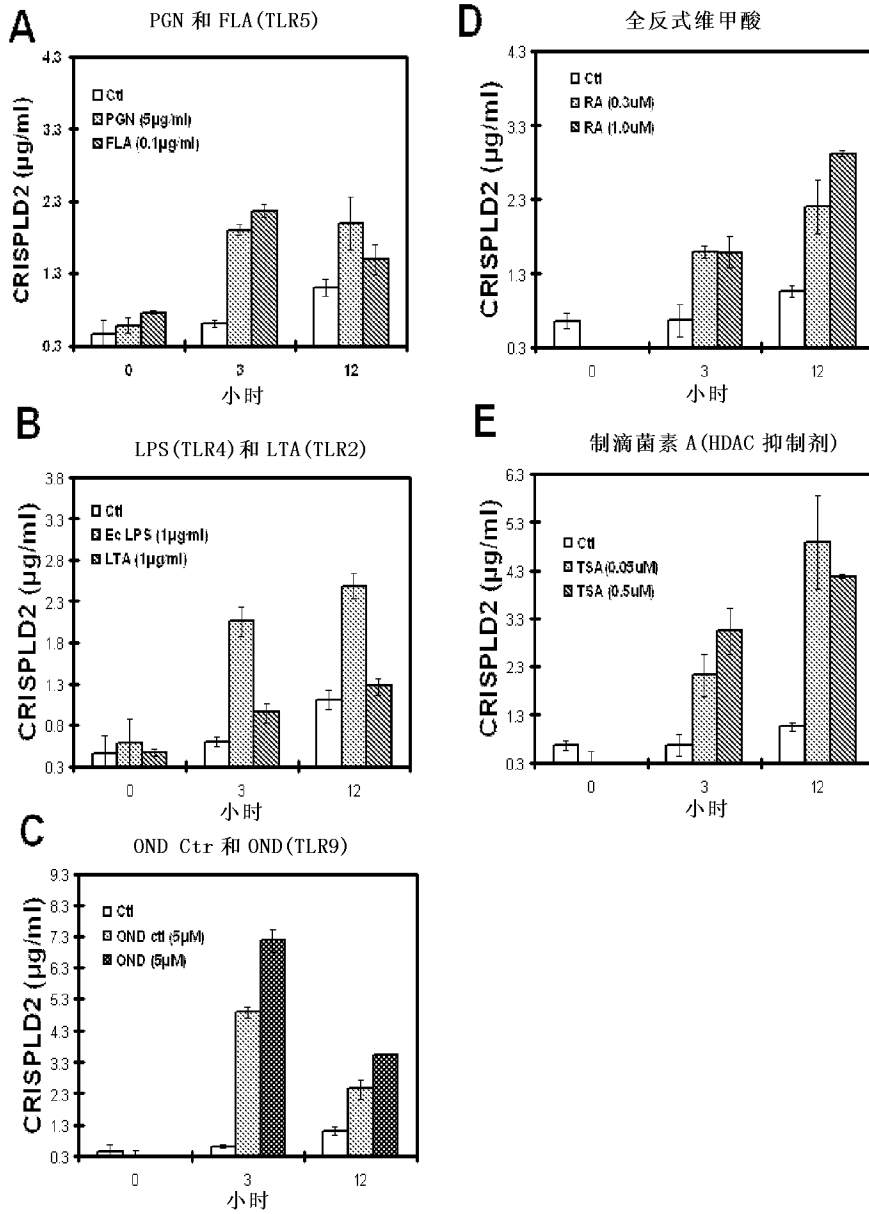


图 8

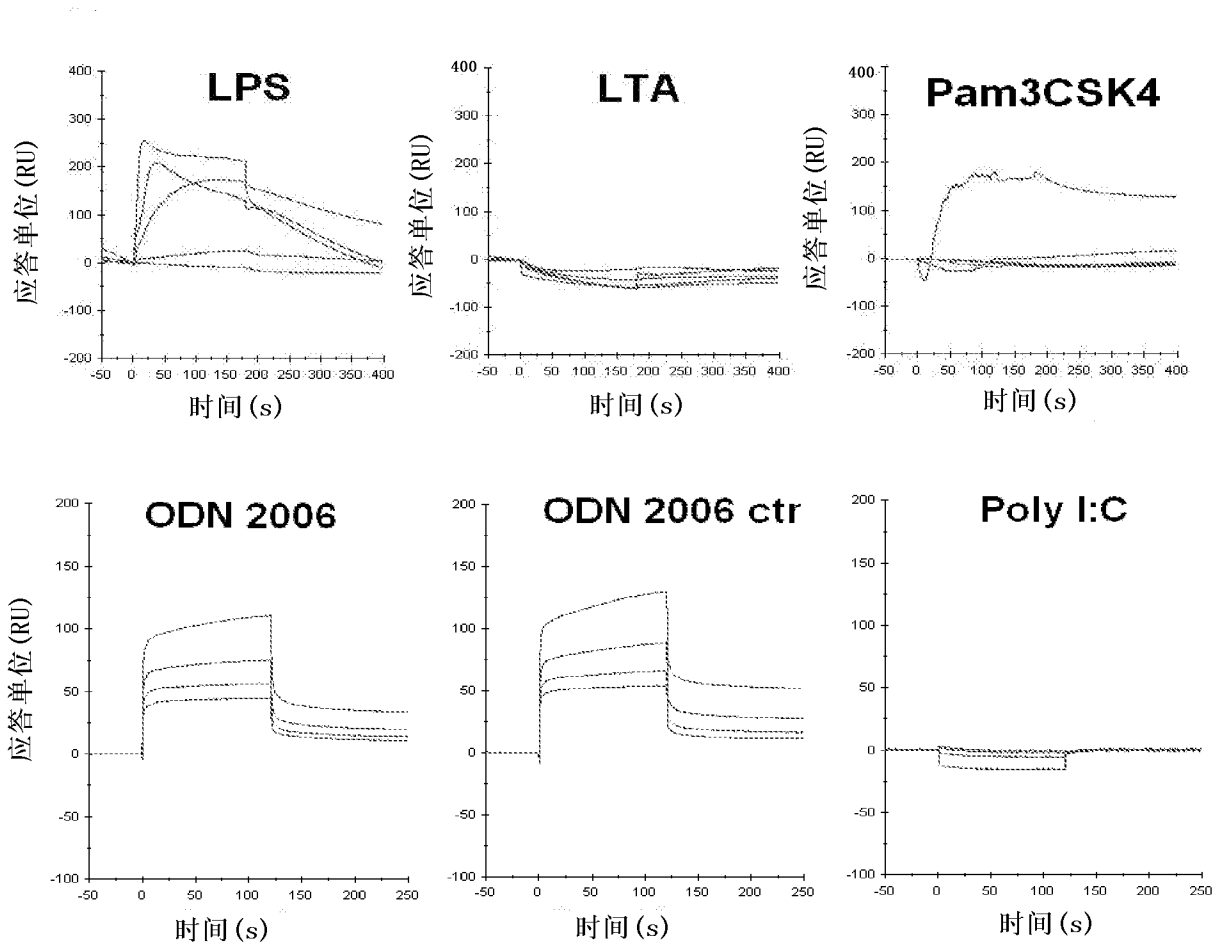


图 9

1 MSCVLGGVIP LGLLFLVCGS QGYLLPNVTL LEELLSKYQH NESH SRVRRR IPREDKEEIL
 61 MLHNKLRGQV QPQASNMEYM TWDELEKSA AAWASQCIWE HGPTSLLVSI GQNLGAHWGR
 121 YRSPGFHVQS WYDEVKDYTY PYPSECNPWC PERCSGPMCT HYTQIVWATT NKIGCAVNTC
 181 RKMTVWGEVW ENAVYFVCNY SPKGNWIGEA PYKNGRPCSE CPPSYGGSCR NNL CYREETY
 241 TPKPETDEM N EVETAPIPEE NHVWLQPRVM RPTKPKKTS A VNYMTQVVRC DTKMKDRCKG
 301 STCNRYQCPA GCLNHKAKIF GTLFYESSSS ICRAAIHYGI LDDKGGGLVDI TRNGKVPFFV
 361 KSERHGVQSL SKYKSSSFM VSKVKVQDLD CYTTVAQLCP FEKPATHCPR IHCPAHCKDE
 421 PSYWAPVFGT NIYADTSSIC KTA VHAGVIS NESGGD VDM PVDKKKTYVG SLRNGVQSES
 481 LGTPRDGKAF RIFAVRQ (SEQ ID NO: 2)

图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/074302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CPRS, CNKI, BIOSIS, GenBank

CRISPLD2, septicemia, septicaemia, sepsis, septic shock, TLRs, lipopolysaccharide, LPS, flagellin, FLA, peptidoglycan, PGN, CPG-DNA, HDAC, retinoic acid, tretinoin, trichostatin A, TSA, SEQ ID NO 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1192216A (Eisai Co Ltd) 2 Sep.1998 (02.09.1998) description pages 1-3 and 52-54	1-5, 7
X	WO2006069198A1 (Cleve-Land Clinic Foundation) 29 Jun.2006 (29.06.2006) description paragraphs 8, 13 and 137, claims 1 and 13	1-5, 7
X	WO0140280A2 (Inotek Corporation) 7 Jun.2001 (07.06.2001) description pages 27-28, claims 24-30	1-4, 7
X	WO2004074435A2 (Emory University) 2 Sep.2004 (02.09.2004) description pages 7 and 25, claims 1-4, 13, 22, 29 and 54-55	1-4, 7
X	WO2007071961A1 (Astrazeneca AB) 28 Jun.2007 (28.06.2007) description pages 1, 23 and 26	1-5, 7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&”document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 23 Jun 2010 (23.06.2010)	Date of mailing of the international search report 08 Jul. 2010 (08.07.2010)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer SU, Lin Telephone No. (86-10)62411030

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/074302

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP1243264A2 (Research Development Foundation) 25 Sep.2002 (25.09.2002) description paragraphs 29, 32 and 33, claims 1-3	1-5, 7
A	Chiquet BT, et al. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. Hum Mol Genet. 2007, 16(18):2241-2248.	1-5, 7-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/074302

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 6 relates to a method for treatment of the human or animal body by therapy.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2009/074302

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1192216 A	02.09.1998	WO 9639411 A1	12.12.1996
		AU 6380296 A	24.12.1996
		ZA 9604666 A	28.05.1997
		NO 975644 A	04.02.1998
		US 5750664 A	12.05.1998
		EP 0853627 A1	22.07.1998
		HU 9802662 A2	28.05.1999
		NZ 312299 A	28.08.1999
		AU 707779B B	22.07.1999
		MX 9709502 A1	01.10.1998
		KR 19990022104 A	25.03.1999
		TW 366345 A	11.08.1999
		RU 2170738 C2	20.07.2001
		IL 122251 A	30.06.2002
		HU 221342 B1	30.09.2002
		PH 1199653287 B1	07.06.2000
		MX 207012 B	07.03.2002
		EP 0853627 B1	21.01.2004
		DE 69631376E E	26.02.2004
		ES 2214543T T3	16.09.2004
		KR 100416335B B	27.07.2004
		JP 2007269812 A	18.10.2007
		CA 2223140 C	05.08.2008
IL 149971 A	29.04.2010		
WO 2006069198 A1	29.06.2006	EP 1838340 A1	03.10.2007
		JP 2008525472T T	17.07.2008
		US 2009011982 A1	08.01.2009
WO 0140280 A2	07.06.2001	AU 4709401 A	12.06.2001
WO 2004074435 A2	02.09.2004	US 2004259790 A1	23.12.2004
WO 2007071961 A1	28.06.2007	NONE	
EP 1243264 A2	25.09.2002	WO 9426277 A1	24.11.1994
		AU 6944194 A	12.12.1994
		US 5457129 A	10.10.1995
		TW 261529 A	01.11.1995
		ZA 9403320 A	27.12.1995
		EP 0708648 A1	01.05.1996
		JP 8510727T T	12.11.1996
		AU 697072B B	24.09.1998
		AU 9702598 A	04.02.1999
		AU 713504B B	02.12.1999
		NZ 267220 A	25.08.2000
		IL 109458 A	25.11.2001
		EP 0708648 B1	27.11.2002
		DE 69431801E E	09.01.2003
		KR 100345255B B	30.11.2002
		ES 2187522T T3	16.06.2003
		JP 2005263808 A	29.09.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/074302

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/17 (2006.01) i

A61K39/02 (2006.01) i

A61K31/19 (2006.01) i

A61P7/00 (2006.01) i

A61P31/04 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2009/074302

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61P A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CPRS, CNKI, BIOSIS, GenBank

败血症, 脂多糖, 鞭毛蛋白, 多聚糖, 肽聚糖, 细菌 DNA, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 制滴菌素 A, 维甲酸, CRISPLD2, septicemia, septicaemia, sepsis, septic shock, TLRs, lipopolysaccharide, LPS, flagellin, FLA, peptidoglycan, PGN, CPG-DNA, HDAC, retinoic acid, tretinoin, trichostatin A, TSA, SEQ ID NO 1-2

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN1192216A (卫材株式会社) 2.9 月 1998 (02.09.1998) 说明书第 1-3, 52-54 页	1-5, 7
X	WO2006069198A1 (Cleve-Land Clinic Foundation) 29.6 月 2006 (29.06.2006) 说明书第 8、13 和 137 段, 权利要求 1 和 13	1-5, 7
X	WO0140280A2 (Inotek Corporation) 7.6 月 2001 (07.06.2001) 说明书第 27-28 页, 权利要求 24-30	1-4, 7
X	WO2004074435A2 (Emory University) 2.9 月 2004 (02.09.2004) 说明书第 7 和 25 页, 权利要求 1-4、13、22、29 和 54-55	1-4, 7
X	WO2007071961A1 (Astrazeneca AB) 28.6 月 2007 (28.06.2007) 说明书第 1、23 和 26 页	1-5, 7

其余文件在 C 栏的续页中列出。

见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
23.6 月 2010 (23.06.2010)

国际检索报告邮寄日期
08.7 月 2010 (08.07.2010)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员
苏林
电话号码: (86-10) 62411030

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	EP1243264A2 (Research Development Foundation) 25.9 月 2002 (25.09.2002) 说明书第 29、32 和 33 段, 权利要求 1-3	1-5, 7
A	Chiquet BT, et al. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. Hum Mol Genet. 2007, 16(18):2241-2248.	1-5, 7-10

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：6
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求6涉及通过治疗对人体或动物体进行处置的方法。

2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2009/074302

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1192216 A	02.09.1998	WO 9639411 A1	12.12.1996
		AU 6380296 A	24.12.1996
		ZA 9604666 A	28.05.1997
		NO 975644 A	04.02.1998
		US 5750664 A	12.05.1998
		EP 0853627 A1	22.07.1998
		HU 9802662 A2	28.05.1999
		NZ 312299 A	28.08.1999
		AU 707779B B	22.07.1999
		MX 9709502 A1	01.10.1998
		KR 19990022104 A	25.03.1999
		TW 366345 A	11.08.1999
		RU 2170738 C2	20.07.2001
		IL 122251 A	30.06.2002
		HU 221342 B1	30.09.2002
		PH 1199653287 B1	07.06.2000
		MX 207012 B	07.03.2002
		EP 0853627 B1	21.01.2004
		DE 69631376E E	26.02.2004
		ES 2214543T T3	16.09.2004
		KR 100416335B B	27.07.2004
		JP 2007269812 A	18.10.2007
		CA 2223140 C	05.08.2008
		IL 149971 A	29.04.2010
WO 2006069198 A1	29.06.2006	EP 1838340 A1	03.10.2007
		JP 2008525472T T	17.07.2008
		US 2009011982 A1	08.01.2009
WO 0140280 A2	07.06.2001	AU 4709401 A	12.06.2001
WO 2004074435 A2	02.09.2004	US 2004259790 A1	23.12.2004
WO 2007071961	28.06.2007	无	
EP 1243264 A2	25.09.2002	WO 9426277 A1	24.11.1994
		AU 6944194 A	12.12.1994
		US 5457129 A	10.10.1995
		TW 261529 A	01.11.1995
		ZA 9403320 A	27.12.1995
		EP 0708648 A1	01.05.1996
		JP 8510727T T	12.11.1996
		AU 697072B B	24.09.1998
		AU 9702598 A	04.02.1999
		AU 713504B B	02.12.1999
		NZ 267220 A	25.08.2000
		IL 109458 A	25.11.2001
		EP 0708648 B1	27.11.2002
		DE 69431801E E	09.01.2003
		KR 100345255B B	30.11.2002
		ES 2187522T T3	16.06.2003
		JP 2005263808 A	29.09.2005

主题的分类:

A61K38/17 (2006.01) i

A61K39/02 (2006.01) i

A61K31/19 (2006.01) i

A61P7/00 (2006.01) i

A61P31/04 (2006.01) i