



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1913915 B

(45) 授权公告日 2010.12.01

(21) 申请号 200480041259.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2004.12.02

A61K 38/16(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

(30) 优先权数据

60/526,496 2003.12.02 US

60/526,461 2003.12.02 US

60/526,666 2003.12.02 US

60/526,460 2003.12.02 US

审查员 赵彦豪

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.08.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/040753 2004.12.02

(87) PCT申请的公布数据

W02005/056042 EN 2005.06.23

(73) 专利权人 克里夫兰临床基金会

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 A·V·古德克夫

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限

公司 11314

代理人 程伟

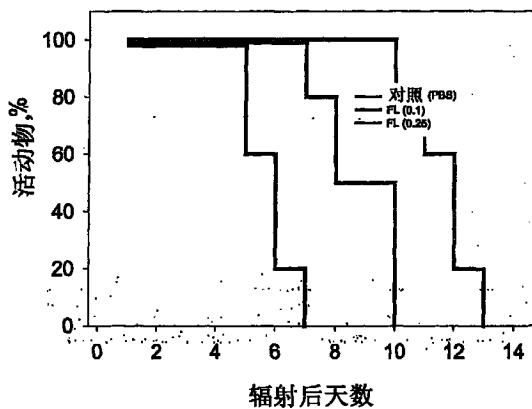
权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 18 页

(54) 发明名称

使用鞭毛蛋白防止辐射的方法

(57) 摘要

本发明描述了鞭毛蛋白在防止哺乳动物凋亡效果中的应用。



1. 一种包含鞭毛蛋白的组合物在制备用于从放射影响中保护哺乳动物体的药物中的用途。
2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该组合物进一步包含辐射防护剂。
3. 根据权利要求 2 所述的用途,其中该辐射防护剂是抗氧化剂。
4. 根据权利要求 3 所述的用途,其中该抗氧化剂选自 amifostine 或维生素 E。
5. 根据权利要求 2 所述的用途,其中该辐射防护剂是细胞因子。
6. 根据权利要求 5 所述的用途,其中该细胞因子是干细胞因子。
7. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该组合物进一步包含生长因子。
8. 根据权利要求 7 所述的用途,其中该生长因子是角化细胞生长因子。
9. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该组合物进一步包含 5-雄甾烯二酮。
10. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该组合物进一步包含三氯代铵(二氧乙烯-0,0'-) 碲酸盐。
11. 根据权利要求 1-10 任一项所述的用途,其中该哺乳动物是人类。
12. 根据权利要求 1 所述的用途,其中该影响是肠道和造血系统的症状。

使用鞭毛蛋白防止辐射的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本发明要求 2003 年 12 月 2 日提交的美国临时申请 No. 60/526, 460、2003 年 12 月 2 日提交的美国临时申请 No. 60/526, 461、2003 年 12 月 2 日提交的美国临时申请 No. 60/526, 496、和 2003 年 12 月 2 日提交的美国临时申请 No. 60/526, 666 的权利, 这些申请在此通过参考而并入本申请。

技术领域

[0003] 本发明涉及鞭毛蛋白在防止哺乳动物凋亡效果中的应用。更特别地, 本发明涉及鞭毛蛋白在防止哺乳动物暴露于压力, 如放射和癌症治疗中的应用。

[0004] 发明背景

[0005] 从正常细胞进展到肿瘤细胞涉及生长调节的副性机制缺失, 包括对生长抑制刺激物的对抗和缺失了对生长因子和激素的依赖。基于放射和细胞毒性药物的传统的肿瘤治疗方法依靠正常细胞和恶性细胞的生长调控的不同。传统的肿瘤治疗使细胞面对严重的基因毒性压力。在这些情况下, 大部分正常细胞被捕获, 因而保存下来, 而肿瘤细胞持续分裂和死亡。

[0006] 可是, 常规肿瘤治疗方法的本质是使正常快速分裂或有凋亡倾向的组织具有风险。对这些正常快速分裂的细胞的损伤产生了肿瘤治疗中常见的副作用, (敏感组织: 造血组织, 小肠, 毛囊)。这些组织的天然敏感性使问题复杂化了: 通常肿瘤细胞获得在自杀(凋亡)机制中的缺陷, 引起正常敏感组织死亡的那些治疗步骤也许不会损伤癌症细胞。常规的减少癌症治疗副作用的方法基于 (a) 使肿瘤细胞对治疗更敏感, (b) 使癌症治疗对肿瘤细胞更特异, 或 (c) 治疗后促进正常组织再生(如, 促红细胞生成素, GM-CSF, 和 KGF)。

[0007] 仍需要一种能够减轻与癌症治疗中的化疗和放疗相关的副作用的治疗剂。本发明完成了这种需要, 并提供了其他相关的优点。

发明内容

[0008] 本发明涉及从一种或多种诱发凋亡的治疗中保护患者的方法, 其包括向患者给药含有药学上可接受剂量的诱导 NF- κ B 的药剂的组合物。该药剂可以是鞭毛蛋白或 TGF β , 其可是潜伏的 (latent) TGF β 。治疗可以是癌症治疗, 其可以是化疗或放疗。

[0009] 本发明还涉及治疗患组成活性 NF- κ B 癌症的哺乳动物的方法, 其包括向哺乳动物投药含有药学上可接受剂量的诱导 NF- κ B 的药剂的组合物。该药剂可以是鞭毛蛋白或 TGF β , 其可是潜伏的 TGF β 。该药剂可以在癌症治疗前、同癌症治疗一起、或在癌症治疗后给药。治疗可以是化疗或放疗。

[0010] 本发明还涉及由于治疗癌症引发的正常组织损伤的哺乳动物的方法, 其包括向哺乳动物投药含有药学上可接受剂量的诱导 NF- κ B 的药剂的组合物。该药剂可以是鞭毛蛋白或 TGF β , 其可是潜伏的 TGF β 。该药剂可以在癌症治疗前、同癌症治疗一起、或在癌症治疗后给药。治疗可以是化疗或放疗。

[0011] 本发明还涉及治疗由于压力引起的正常组织损伤的哺乳动物的方法,其包括向哺乳动物投药含有药理学上可接受剂量的诱导 NF- κ B 的药剂的组合物。该药剂可以是鞭毛蛋白或 TGF β ,其可是潜伏的 TGF β 。该药剂可以在治疗患病动物前、同治疗患病动物一起、或在治疗患病动物后给药。

[0012] 本发明还涉及在哺乳动物中调节细胞年龄的方法,其包括向哺乳动物投药含有药理学上可接受剂量的诱导 NF- κ B 的药剂的组合物。该药剂可以是鞭毛蛋白或 TGF β ,其可是潜伏的 TGF β 。该药剂可以在治疗患病动物前、同治疗患病动物一起、或在治疗患病动物后给药。

[0013] 本发明还涉及药物组合物,其含有诱导 NF- κ B 活性的药剂、化疗药物、以及任选地药理学上可接受的佐剂、稀释剂或载体。该药剂可以是鞭毛蛋白或 TGF β ,其可是潜伏的 TGF β 。

[0014] 本发明还涉及筛选 NF- κ B 诱导剂的方法,其包括向 NF- κ B 激活的表达系统中加入猜想的诱导剂,并单独向 NF- κ B 激活的表达系统中加入对照,由此通过增加 NF- κ B 激活的表达水平的能力来鉴别 NF- κ B 的诱导剂。

[0015] 本发明还涉及从放射影响中保护哺乳动物的方法,其包括向所述哺乳动物投药含有药理学上可接受剂量的诱导 NF- κ B 的药剂的组合物。该药剂可以是鞭毛蛋白,其可以衍生自沙门氏菌种。组合物可以与射线防护剂一同给药。射线防护剂可以是抗氧化剂,其可以是氨磷汀或维生素 E。射线防护剂还可以是细胞因子,其可以是干细胞因子。

[0016] 本发明还涉及从诱发凋亡的一种或多种治疗或状态中保护患者的方法,其包括向所述患者投药含有药理学上可接受剂量的诱导 NF- κ B 鞭毛蛋白的药剂的组合物。该药剂可以是鞭毛蛋白,其可以衍生自沙门氏菌种。治疗可以是癌症治疗,其可以是化疗或放疗。状态可以是压力,其可以是放射、受伤、中毒、感染和发烧应激。

[0017] 本发明还涉及筛选凋亡调节剂的方法,其包括向以细胞为基础的凋亡系统中添加猜想的调节剂,并单独向以细胞为基础的凋亡系统中添加对照物,由此通过改变凋亡速率的能力来鉴别凋亡调节剂,其中猜想的调节剂来自哺乳动物寄生虫。

[0018] 本发明还涉及筛选 NF- κ B 调节剂的方法,其包括向 NF- κ B 激活的表达系统中加入猜想的调节剂,并分别向 NF- κ B 激活的表达系统中添加对照物,由此通过改变 NF- κ B 激活的表达能力来鉴别 NF- κ B 调节剂,其中猜想的调节剂来自哺乳动物寄生虫。寄生虫的种可以是,但不局限于沙门氏菌、支原体和衣原体。

[0019] 本发明还涉及筛选 TGF β 调节剂的方法,其包括向 TGF β 激活的表达系统中加入猜想的调节剂,并单独向 TGF β 激活的表达系统中添加对照物,由此通过改变 TGF β 激活的表达能力来鉴别 TGF β 调节剂,其中猜想的调节剂来自哺乳动物寄生虫。TGF β 可以是潜伏的 TGF β 。寄生虫的种可以是,但不局限于沙门氏菌、支原体和衣原体。

[0020] 本发明还涉及筛选 p53 调节剂的方法,其包括向 p53 激活的表达系统中加入猜想的调节剂,并单独向 p53 激活的表达系统中添加对照物,由此通过改变 p53 激活的表达能力来鉴别 p53 调节剂,其中猜想的调节剂来自哺乳动物寄生虫。寄生虫的种可以是,但不局限于沙门氏菌、支原体和衣原体。

[0021] 本发明还涉及通过本文描述的任何一种方法鉴别的调节剂。本发明还涉及含有本文描述的调节剂的组合物。该组合物可以是含有药理学上可接受剂量的本文所述调节剂的药

学组合物。

[0022] 本发明还涉及治疗癌症的方法,其包括向需要治疗的患者投药含有增强凋亡的调节剂的药学组合物。

[0023] 本发明还涉及从一种或多种诱导凋亡的治疗中保护患者的方法,其包括向所述患者投药含有抑制凋亡的调节剂的药物组合物。一种或多种治疗可以是肿瘤治疗。肿瘤治疗可以是化疗或放疗。

附图说明

[0024] 图 1 表明在未感染细胞中沙门氏菌感染导致 NF- κ B 核定位的发生。HT29 细胞在玻璃盖片上生长,或者模拟感染,未处理的,用鼠伤寒沙门氏菌感染的,或用 TNF α (10ng/ml) 处理的。组 A :HT29 细胞模拟感染或用从 *ssaH* 启动子表达 GFP 的鼠伤寒沙门氏菌株 Sjw1103G 以 100MOI 感染,该启动子仅在感染的宿主细胞内有活性。使用明视场显微镜 (BF) 给细胞照相,如所述用免疫荧光检测 GFP 或 DAPI。图像结合 (叠加) 揭示细胞被感染。组 B :HT29 细胞未处理、用鼠伤寒沙门氏菌株 1103 处理、或用 TNF α 处理。通过间接免疫荧光如所述监测在各种状态下 NF- κ B p65 (RelA) 的定位。使用明视场显微镜 (BF) 观察细胞,用 DAPI 染色细胞核,用 FITC 观察 p65 (RelA)。DAPI 染色被误染成红色使得结合 (叠加) 显影更易被区别。

[0025] 图 2 表示沙门氏菌培养液中的蛋白因子导致 NF- κ B 激活。组 A :如所示处理浓缩 100 倍的沙门氏柏林菌培养液,如所示用感染细菌激发 HT29 细胞。通过 EMSA 从处理 45 分钟后制备的全部细胞提取液中分析 NF- κ B DNA 结合活性。用 p65 (RelA) - 特异的和 p50 特异的抗体超迁移 (supershifts) 确定 NF- κ B DNA :蛋白质复合物的确实性 (Authenticity)。组 B :在 Superose12 柱上通过凝胶渗入色谱分析浓缩的沙门氏柏林菌培养液 (IN)。在 10% SDS-PAGE 上通过分级法分析洗脱的蛋白部分,并用考马斯兰观察染色。显示出色谱分析和在凝胶上的分子量标记。如所示每级分的试样用于刺激 HT29 细胞,用于 NF- κ B DNA 结合活性的 EMSA 分析得到的 WCEs。组 C :在 POROS HQ 基质上通过阴离子交换色谱分析浓缩的沙门氏柏林菌培养液 (IN)。如所示用增加浓度梯度的 NaCl 洗脱蛋白质,在 10% SDS-PAGE 上分析,并用考马斯兰 (CB) 染色观察。如所示每部分的输入和试样用于刺激 HT29 细胞,用于 NF- κ B DNA 结合活性的 EMSA 分析得到的 WCEs。从复制的 10% SDS-PAGE 凝胶分离的蛋白带 B1-B6 和凝胶空白的相应洗脱物,与从最初和最终 NaCl 缓冲梯度液来源的缓冲液样品一起用于刺激 HT29 细胞,用于 NF- κ B DNA 结合活性的 EMSA 分析得到的 WCEs。

[0026] 图 3 表示如质谱测定法所鉴别的,沙门氏菌培养液中的 NF- κ B 激活因子是鞭毛蛋白。用胰蛋白酶消化带 2 的微毛细管 HPLC 前后质谱测定。计数沙门氏菌肽相应的峰值,相应数字的肽序列在右侧被鉴定。

[0027] 图 4 表示鞭毛蛋白突变不能激活 NF- κ B。组 A :在未感染细胞 (UN)、如所示用野生型大肠杆菌 DH5 α 、野生型沙门氏柏林菌或 *SopE*⁻ 突变、*SopB*⁻ 突变、*SopE*⁻/*SopB*⁻ 双突变、野生型鼠伤寒沙门氏菌 1103、*fliC*⁻ 突变 (*fliC* : :Tn10)、*fliC*⁻/*fliJ*⁻ 双突变在 MOI 50 直接感染 HT29 细胞 45 分钟制备的 WCEs 中用 EMSAs 分析 NF- κ B DNA 结合活性。组 B :

[0028] 从未感染细胞 (UN) 或用如所示的从野生型和突变细菌的无菌过滤的浓缩培养液激发 HT29 细胞后 45 分钟制备的 WCEs 中用 EMSA 法分析 NF- κ B DNA 结合活性。

[0029] 图 5 表示在沙门氏菌感染过程中需要鞭毛蛋白激活多种信号途径,从而导致 NF- κ B 核定位。组 A:未处理的 HT29 细胞,用 TNF α (10ng/ml) 或茴香霉素 [An] (20 μ g/ml)/PMA (12.5ng/ml) 鸡尾酒刺激 15 分钟的 HT29 细胞,或如所述用野生型鼠伤寒沙门氏菌株 1103 或鼠伤寒沙门氏菌 fliC⁻/fliB⁻ 双突变株 134 感染 HT29 细胞。在指定时间或 TNF 处理细胞 10 分钟或茴香霉素/PMA 处理细胞 15 分钟时制备 WCE,并用于 EMSAs 以分析 NF- κ B DNA 结合活性,或用于使用抗 IKK 或抗 IKK 抗体的免疫激酶分析 (KA) 以测定在他们各自底物 GST-I κ B α 1-54 和 GST-cJun1-79 中 IKK 和 IKK 激酶活性 (如所示)。每种提取物中相当量的蛋白质 (40 μ g) 的免疫印迹分析 (IB) 在 SDS-PAGE 凝胶上分级,并转膜到 PVDF 膜上,用所示抗体杂交以检测大多数 IKK, JNK, ERK, 和 p38, 如所示。使用 ERK 和 p38 的含磷的特异性抗体检测激活的 ERK 和 p38 的免疫印迹分析被显示。组 B:免疫荧光分析,通过间接免疫荧光分析显示出鞭毛蛋白突变的沙门氏菌不能感染 HT29 细胞, HT29 细胞的纯化的鞭毛蛋白刺激导致了 NF- κ B 核 p65 (RelA) 定位。处理的图像表明在盖玻片上生长的 HT29 细胞基本上与图 1A 和 B 相同。DAPI 染色的假着色被用于增强 DAPI 染色的核和 p65 核定位的影响观察。

[0030] 图 6 表明纯化的鞭毛蛋白激活信号途径以及模拟野生型沙门氏菌感染,在肠上皮细胞感染前基因表达。未处理的或用 TNF α (10ng/ml) 或用茴香霉素 [An] (20 μ g/ml)/PMA (12.5ng/ml) 鸡尾酒 10 分钟处理的、或用鞭毛蛋白 (1 μ g/ml) 处理指定时间的 HT29 细胞。制备 WCE,用 EMSA 分析其 NF- κ B DNA 结合活性,用使用 ERK 或 p38 的含磷的特异性抗体的免疫激酶分析 (KA) 或免疫印迹分析检测活性,并用如图 5A 所示的激酶特异性抗体检测所示的大多数激酶含量。组 A:检测 NF- κ B DNA 结合活性的 EMSA。组 B:如图 5A 的检测 IKK, JNK, ERK 和 p38 激酶活性和蛋白含量的免疫印迹和激酶分析。组 C:未处理的、野生型和鞭毛蛋白双突变鼠伤寒沙门氏菌感染的, TNF α (10ng/ml) 或鞭毛蛋白 (1mg/ml) 刺激的细胞的感染前基因表达的半定量 RT-PCR。在指定处理后的指定时间收集 HT29 细胞,用分离的 RNA 合成初始链 cDNA,随后该 cDNA 用 IL1 α 、IL1 β 、IL-8、TNF α 、MCP1 和 β 肌动蛋白的基因特异性引物的 R T-P C R 中。 β 肌动蛋白作为标准以标准化表达模式。得到的 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上分离,并用溴化二氨乙苯啡啶染色以便观察。

[0031] 图 7 表示鞭毛蛋白介导的 NF- κ B 的激活是 MyD88 依赖的。感染野生型沙门氏柏林菌 (100MOI), IL-1 (20ng/ml), 纯化的鞭毛蛋白 (1 μ g/ml) (如所示), 从野生型沙门氏柏林菌和 SopE⁻/SopB⁻ 双突变沙门氏柏林菌株 SE1SB2 (S2, 如所示) 的无菌过滤的和浓缩的 100kDa 的过滤滞留物上清 (spt) 被用于激发野生型、MyD88^{-/-} 缺失或 TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-} 双缺失 MEF, 如所示。处理 45 分钟后制备 WCEs, 用 EMSA 检查以分析 NF- κ B DNA 结合活性。用 IL-2 (20ng/ml) 作为阳性对照以监控 MyD88 的功能。

[0032] 图 8 表示 TLR5 抑制鞭毛蛋白介导的 NF- κ B 受体基因活性。在 6 孔平板中转染 HT29 细胞,用指定的 DN-TLR 哺乳动物表达载体或反义 TLR5 (AS TLR5) (2 μ g/孔)、2XNF- κ B Luc 受体基因 (100ng/孔)、pRL-TKRenilla 荧光素酶用于标准化 (50ng/孔), 与空的载体 pCDNA3.1DNA 调整至每孔 DNA 总量为 4 μ g, 重复三次。组 A:在未刺激细胞 (浅色阴影) 和 TNF α (10ng/ml) 处理的细胞 (深色阴影) 中的 2XNF- κ B Luc 受体基因的折叠诱导。刺激后 12 小时制备裂解液。图示出各自的试验结果。组 B:用鞭毛蛋白 (1 μ g/ml) 处理如图 8A 转染的 HT29 细胞,制备裂解液,如图 8A 所示分析。图示出各自的试验结果。

[0033] 图 9 表示小肠上皮细胞的鞭毛蛋白刺激导致了一系列的 TLR 基因激活。用鞭毛蛋白 (1mg/ml) 刺激 HT29 细胞, 3 小时后用 Trizol 分离 RNA, 并用该 RNA 合成第一链 cDNA。图 10 表示出如所述用每种 TLR 基因特异性引物产生的 RT-PCR 产物。用 β 肌动蛋白作标准标准化表达模式。

[0034] 图 10 表示在多种细胞类型中表达 TLR5, 其对鞭毛蛋白具有不同的反应。组 A: 从未刺激的 T84、HT29、A549、HeLa、293T、T98G 细胞制备全细胞提取液, 在 8% 的 SDS-PAGE 凝胶上分离, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 用抗 TLR5 抗体杂交作免疫印迹分析 (IB)。通过用抗肌动蛋白抗体杂交检测加入的蛋白量。组 B: HT29、A549、HeLa、293T 和 T98G 细胞未处理 (——)、用鞭毛蛋白 (F) 处理或用 TNF α (T) 处理, 45 分钟后制备 WCEs, 并用于 EMSA 以监控 NF- κ B DNA 的结合活性。用 p65 (RelA) 特异抗体复合物的超迁移检测 NF- κ B 带移位的确实性。

[0035] 图 11 表示 p53 缺陷加速了小鼠中 GI 症状的发展。组 A: 腹腔注射 PFT α (10mg/kg) 从一次 9Gy 量的 γ 射线以及部分累积射线量 12.5Gy (5X2.5Gy) 中保护 C57B1/6J 小鼠 (如果没有指明, 此处和以下使用 6-8 周雄性小鼠)。对于一次受 12.5 和 25Gy IR 的小鼠, PFT α 在小鼠的生存上没有作用: (表示出各自的实验结果; 以每分钟 4Gy 的剂量速率使用 Shepherd4000Ci 铯 137 辐射源)。组 B: 在对低剂量 (10Gy) 和高剂量 (15Gy) 的 γ 射线的相对敏感性上野生型和 p53 缺陷的 C57B1/6J 小鼠不同: 与 p53 缺陷小鼠相比, 野生型对 10Gy 更敏感, 而对 15Gy 更有抗性。组 C: 用 11Gy 的全身 γ 射线处理小鼠, 12 小时后从野生型或 p53 缺陷的同源的 C57B1/6J 小鼠注射 1.5×10^7 骨髓细胞 (此剂量在未重建 (nonreconstituted) 的对照组小鼠中引起 100% 的死亡率)。两个月后, 造血功能完全恢复后, 用全身 γ 射线量 15Gy 处理动物, 表现骨髓 p53 状态不同的两组间的死亡率没有差别。组 D: 15Gy γ 射线辐射后在指定的时间上野生型和 p53 缺陷小鼠的小肠损伤动力学的比较表明在 p53 缺陷小鼠中损伤加速 (苏木素-曙红染色, 石蜡切片; 放大 X125)。如果是阴窝切片, 24h 组包括 TUNEL 染色图片: 厚重的凋亡在野生型很明显, 而在 p53 缺陷上皮不明显。

[0036] 图 12 表明在野生型和 p53 缺陷小鼠的小肠中细胞增殖和生存的动力学。组 A: 用 IR 处理后野生型和 p53 缺陷小鼠的小肠中增值率的比较。(左) 用 14 C 胸腺嘧啶脱氧核苷 (每只动物 10 μ Ci) 腹腔注射处理或未处理的 4 周龄野生型和 p53 缺陷小鼠用 15Gy γ 射线照射的放射自显影的全身切片 (放大 X1.7) (Westphal et al 1997)。箭头指小肠。(右) 15Gy γ 射线照射后在不同时间的野生型和 p53 缺陷小鼠小肠中 BrdU 结合的比较。在杀死小鼠前 2 小时注射 BrdU (50mg/kg), 如前所述进行免疫染色 (Watson & Pritchard 2000)。在更大倍数下 (X400) 表示 96h 组的片断。组 B: 15Gy γ 射线照射后不同时间上在野生型和 p53 缺陷小鼠小肠中 BrdU 阳性细胞 / 阴窝数的比较。在每个时间点上分析 3 只动物, 从每个动物中制备 5 个回肠横切片, 用显微镜分析, 以评估阴窝和绒毛数。在 X200 放大倍数下 (100-30 阴窝) 在 5 个随机的视野下计数阴窝中的 BrdU 阳性细胞数, 用 BrdU 阳性细胞平均值作图。组 C: 15Gy γ 射线照射后不同时间上在野生型和 p53 缺陷小鼠小肠中追踪 BrdU 标记细胞的数量和位置。照射前 30 注射 BrdU, 在指定时间处死小鼠。在 p53-缺陷小鼠中观察到从阴窝向绒毛的加速迁移, 及随后的标记细胞的快速消失。

[0037] 图 13 表明重组鞭毛蛋白能激活 NF- κ B。

[0038] 图 14 显示了检测鞭毛蛋白从辐射中保护小鼠的各种试验。向 C56BL6 小鼠 (6 周

龄,雄性),每组 10 只静脉注射 2.0 μ g(0.1mg/kg) 或 5.0 μ g(0.25mg/kg) 溶于 PBS 的鞭毛蛋白。四小时后,用 15Gy 照射小鼠,每天检测小鼠的生存。

[0039] 图 15 显示静脉注射或未注射 0.25mg/kg 的鞭毛蛋白的小鼠用 15Gy γ 射线处理后的小肠上皮组织切片(HE 染色)。与鞭毛蛋白处理的小鼠的接近正常的组织形态学相比,对照组小鼠的隐窝和绒毛有完全的损伤。

[0040] 图 16 显示鞭毛蛋白在小鼠对全身 γ 射线量 10Gy 的敏感性中的作用。

[0041] 图 17 显示在小鼠对全部体重 γ 射线量 13Gy(左)和 10Gy(右)的敏感性中照射前在指定时间静脉注射鞭毛蛋白的作用。

[0042] 图 18 显示鞭毛蛋白在小鼠对全部体重 γ 射线量 10,13 和 15Gy 的敏感性中的作用。

[0043] 图 19 显示细菌鞭毛蛋白的结构域结构。F41 和 Ca 骨架痕迹、疏水核心分布的结构信息。四个不同的疏水核心是 D1、D2a、D2b、和 D3。所有的疏水侧链原子用 Ca 骨架显示。侧链原子用颜色的标记:Ala,黄色;Leu, Ile, 或 Val,橙色;Phe 和 Tyr,紫色(碳链)和红色(氧原子)。C,鞭毛蛋白氨基酸序列中的不同结构特性的位置和结构域。如图所示,从上到下:F41 片段用蓝色表示;三个 β -薄层折叠为褐色;有螺旋的二级结构分布为黄色; β -结构为绿色, β -折转为紫色;每 50 个残基的 tic 标记为蓝色;D0, D1, D2, D3 结构域;在第一元素中的轴向亚单位接触区为青色;高度保守的氨基酸序列为红色,变异区为紫罗兰色;F41 区的点突变产生不同的超盘绕元素。底下的字母表示突变元素的形态学:L(D107E, R124A, R124S, G426A), L-型直链;R(A449V), R-型直链;C(D313Y, A414V, A427V, N433D),弯曲的 33。(Samatey 等 Nature, 2001)。

具体实施方式

[0044] 本发明是基于从由压力引起的凋亡中保护正常的细胞和组织的,该压力包括,但不局限于,化疗、放疗和辐射。在细胞中有两个主要的调控凋亡的机制:p53 路径(前凋亡)和 NF- κ B 途径(抗凋亡)。两种途径在肿瘤中通常都不受控制:p53 通常缺失,而 NF- κ B 变得组成型激活。因此,在正常细胞中抑制 p53 和激活 NF- κ B 可以防止其被压力引起的死亡,如肿瘤治疗,但并不会使肿瘤细胞对抗治疗,因为这些控制机制不受控制了。这与传统的 p53 和 NF- κ B 的观念相反,传统认为 p53 和 NF- κ B 应分别被激活和抑制。

[0045] 本发明涉及诱导 NF- κ B 的活性,以从凋亡中保护正常细胞。通过在哺乳动物中诱导 NF- κ B 的活性,可以从细胞压力和细胞老化造成的凋亡中保护正常细胞,该压力发生在肿瘤治疗和极高热中;暴露于有害剂量的射线,如核能厂、国防工业或放射药物生产的工人,士兵。在许多肿瘤细胞中,由于 NF- κ B 是组成型被激活的,诱导 NF- κ B 活性可以从凋亡中保护细胞,而对肿瘤细胞没有益处。一旦正常细胞被修复,NF- κ B 活性可恢复到正常水平。NF- κ B 活性可被诱导以保护此种放疗和化疗敏感组织,如造血系统(包括免疫系统),内脏上皮和毛囊。

[0046] NF- κ B 活性诱导子还可用于各种其他的应用。哺乳动物暴露于各种严重状态引起的病理后果和死亡可来源于对压力反应的正常生理机制的激活,这些状态包括但不局限于,射线、创伤、中毒、感染、老化、和高温应激,该生理机制的激活如诱导渐进的细胞死亡(凋亡)或释放生物活性蛋白,细胞因子。

[0047] 凋亡通常具有从创伤或遗传上损伤的细胞中“清理”组织的功能，而细胞因子可动员生物体的防御系统对抗病源。可是在严重损伤的状态下，两种压力反应自身可引起死亡。例如，射线导致的死亡可来源于发生在造血、免疫和消化系统的大量 p53 介导的凋亡。合理的药物调节 NF- κ B 可在严重的压力下增强生存。控制这些因子可允许对损伤器官中的细胞炎症反应和生死抉择进行控制。

[0048] NF- κ B 的保护作用可通过多种基因的转录激活调节，这些基因编码：a) 阻断两种主要凋亡途径的抗凋亡蛋白，b) 诱导 HP 和其他干细胞增殖和生存的细胞因子和生长因子，和 c) 潜伏的 ROS- 清扫抗过氧化蛋白，如 MnSOD (SOD-2)。因此，通过 NF- κ B 短暂激活的辐射防护，不仅仅可以实现肿瘤患者的凋亡抑制，由于同时发生的免疫刺激作用，还可以降低二级癌症发生率的可能性，如果通过激活 Toll 类似受体而实现 NF- κ B 被激活。

[0049] 作为靶，NF- κ B 途径的另一个吸引特性是其被认为是辐射防护剂的多种天然因子激活。其中，有多种病源相关的分子类型 (PAMPs)。PAMPs 是宿主生物体中不存在的分子，其特征是病源的大组，不容易突变。他们被 Toll 类似受体 (TLRs) 识别，Toll 类似受体是内在免疫的主要感受器成分。TLRs 直接地或通过细胞因子的释放诱导免疫细胞的迁移或激活，可作为免疫系统的初级警告机制。TLRs 是 I 型膜蛋白，作为同或异二聚物发挥作用。与配体结合后，TLRs 募集 MyD88 蛋白，对于多数 TLRs，MyD88 蛋白是不可缺少的信号转接器。随后的信号系列产生的作用包括 (i) 激活 NF- κ B 途径，(ii) 激活 MAPKs，包括 Jun N- 末端激酶 (JNK)。Toll- 类受体配体激活的 NF- κ B 途径产生了作为潜伏辐射防护剂的配体吸引物。不像细胞因子，许多 PAMPs 除激活 TLRs 外没什么作用，因此不产生副作用。而且，许多 PAMPs 存在于人类。

[0050] 与其免疫细胞的激活功能一致，所有的 TLRs 在脾和外周血白细胞中表达，在其他的淋巴器官和白细胞系中具有更多的 TLR 特异模式表达。可是，TLRs 也表达在身体的其他组织和器官，如 TLR1 广范表达，TLR5 也表达在 GI 上皮和内皮，TLRs2、6、7、8 已知在肺表达。

[0051] 1. 定义

[0052] 应当理解此处使用的术语仅仅是为了描述特定的实施例而不是限制本发明。必须注意，如说明书和权利要求中所使用的，单数“a”“an”和“the”除非特别指明，包括多重指代的含义。

[0053] 在本文使用的术语“给药”，当用于描述诱导 NF- κ B 活性的制剂的剂量时，指该制剂的一次或多次给药剂量。

[0054] 在本文使用的术语“类似物”，当用于肽或多肽的上下文时，指包含一种或多种非标准氨基酸或传统氨基酸的其他结构变异的肽或多肽。

[0055] 在本文使用的术语“抗体”指 IgG、IgM、IgA、IgD、或 IgE 类抗体，或其片段或衍生物，包括 Fab、F(ab')₂、Fd 和单链抗体、微型双功能抗体、双特异抗体、双功能抗体、及其衍生物。抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、亲和力纯化的抗体、或其混合物，其呈现出对相关抗原决定簇或其衍生的序列的足够的特异性结合。抗体还可以是嵌合的抗体。可以通过一种或多种本领域已知的化学的、肽或多肽半族的连接衍生出抗体。抗体还可以与化学半族连接。

[0056] 本文中使用的“凋亡”指细胞死亡的形式，包括胞内细胞器完整性保存而细胞体积的渐进收缩；如光镜或电镜观察到的染色体浓缩（即核浓缩）；和 / 或 DNA 断裂成核小体大

小的片段,如离心沉淀分析所确定的。细胞死亡发生在细胞膜完整性缺失时(如膜泡),完整的细胞片段(凋亡小体)被巨噬细胞吞噬(engulfment)。

[0057] 本文中使用的术语“癌症”指任何一种特征为对抗凋亡刺激的状态。

[0058] 本文使用的术语“癌症治疗”指任何本领域中已知的治疗癌症的方法,包括但不限于化疗和放疗。

[0059] 本文的术语“与结合”用于描述投药诱导 NF- κ B 活性的制剂和额外的治疗时,在额外的治疗前、与其一同或在其后或与其结合给药。

[0060] 本文的术语“衍生物”,当用于肽或多肽的上下文时,指不同于初级结构(氨基酸或氨基酸类似物)的肽或多肽。通过描述,衍生物可以通过糖基化、转录后修饰的一种方式而不同。例如肽或多肽由于在异种系统表达可以展现糖基化模式。如果保留至少一种生物学活性,那么这些肽或多肽是根据本发明的衍生物。其他衍生物包括但不限于具有共价修饰的 N- 或 C- 末端的融合肽或融合多肽,PEG 化的(PEGylated)肽和多肽,与脂质半族相关的肽或多肽、烷基化的肽或多肽、通过氨基侧链功能组与其它肽、多肽或化学物连接的肽或多肽,本领域中应该理解的额外的修饰。

[0061] 本文中的术语“鞭毛蛋白”指的是任何来源的鞭毛蛋白,包括但不限于任何细菌种。鞭毛蛋白可以是沙门氏菌种。还可以特异地是所述鞭毛蛋白的片段、变异、类似物、同源物、或衍生物及其结合。此处所述的各种片段、变异、类似物、同源物、或衍生物可以与野生型鞭毛蛋白具有 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99% 的同一性。

[0062] 本文的术语“片段”,当用于肽或多肽的上下文时,指 8-50 个氨基酸长度的肽。片段的长度可以是 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或 50 个氨基酸。

[0063] 本文中的术语“同源物”,当用于肽或多肽的上下文时,指享有共同进化祖先的肽或多肽。

[0064] 本文的术语“潜伏的 TGF β ”指不具活性的 TGF β 前体。潜伏的 TGF β 可以是含有活性 TGF β 和潜伏相关肽(LAP)的 TGF β 前体。潜伏的 TGF β 还可以含有连接到潜伏的 TGF β 结合蛋白的 LAP。潜伏的 TGF β 还可以是大的潜伏的复合物。进一步,潜伏的 TGF β 可以被修饰的潜伏的 TGF β ,从而转染成活性 TGF β 的速率或转染成 TGF β 的能力降低。被修饰的潜伏的 TGF β 可以是,例如,防止或降低转染为活性 TGF β 的 TGF β 变异。

[0065] 本文的术语“TGF β ”指任何活性或潜伏的 TGF β 的异构体,包括但不限于 TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、TGF β 4、或 TGF β 5 及其组合。还可以特异地指所述 TGF β 异构体的片段、变异、类似物、同源物、或衍生物,及其组合。此处所述的各种片段、变异、类似物、同源物、或衍生物可以与 TGF β 异构体具有 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99% 的同一性。

[0066] 此处所述的术语“治疗”或“治疗”,当指从状态中保护哺乳动物时,意味着保护、抑制、压制或清除状态。保护状态包括在状态发生前向哺乳动物投药本发明的组合物。抑制状态涉及在状态诱导后但在临床症状前向哺乳动物投药本发明的组合物。压制状态涉及临床症状出现后向哺乳动物投药本发明的组合物使此状态降低或维持。消除状态涉及临床症状出现后向哺乳动物投药本发明的组合物使哺乳动物不再遭受此种状态。

[0067] 如此处所述,术语“肿瘤细胞”指对抗凋亡刺激的任何细胞。

[0068] 如此处所述,术语“变异”当在肽或多肽的上下文时,指通过氨基酸的插入、缺失或保守性替代使肽或多肽的氨基酸序列不同,但保留了至少一种生物功能。为了本发明的目的,“生物活性”包括,但不局限于通过特异抗体的结合能力。氨基酸的保守替代,即,用具有相似特性的不同氨基酸取代(如,亲水性、带电区的程度和分布)的氨基酸可被本领域中作所识别典型地涉及较小变化。这些小变化可部分地通过考虑氨基酸的疏水指数鉴别,如本领域中已知的。Kyte 等 J. Mol. Biol. 157 :105-132(1982)。氨基酸的疏水指数是以考虑它的疏水性和电荷为基础的。本领域中已知相似疏水指数的氨基酸可被取代,仍保留蛋白功能。在一方面,疏水指数 2 的氨基酸被取代。氨基酸的疏水性还可被用于揭示可导致蛋白质保持功能的取代基。在肽中大部分氨基酸的疏水性可允许计算该肽的最大局部平均疏水性,其是一个有用的指数,被报道与抗原性和免疫原性有关。美国专利 No. 4554101 在此引入作参考。具有相似疏水性值的氨基酸取代可使肽保留生物活性,例如免疫原性,如本领域中知道的。在一方面,用亲水性相差 ± 2 的氨基酸中进行取代。氨基酸的疏水性和亲水性指数都受该氨基酸特定的侧链的影响。与此观察相一致的,与生物功能一致的氨基酸取代被认为是依赖氨基酸的相对相似性,特别是这些氨基酸的侧链,如通过疏水性、亲水性、电荷、大小、和其他特性所揭示的。

[0069] 2. 治疗方法

[0070] a. 组成型地激活的 NF- κ B 肿瘤

[0071] 本发明涉及治疗遭受组成型地激活 NF- κ B 癌症的哺乳动物的治疗,包括向哺乳动物投药含有治疗潜伏剂量的诱导 NF- κ B 活性的制剂。诱导 NF- κ B 活性的制剂可以与肿瘤治疗物联合给药。

[0072] 该制剂可以与其它抗肿瘤治疗如化疗或放疗同时或分次 (metronomically) 给药。此处的术语“同时”或“同时地”指其它抗肿瘤治疗和本发明的化合物在 48 小时、优选 24 小时、更优选 12 小时、更优选 6 小时、最优选 3 小时或更少时间的间隔。此处的术语“分次”指与化疗在不同的时间内,以某种相对重复给药和 / 或化疗方案的频率给药。

[0073] 可以在任何暴露于肿瘤治疗前的时间点上给药,包括但不限于暴露前 48、46、44、42、40、38、36、34、32、30、28、26、24、22、20、18、16、14、12、10、8、6、4、3、2、或 1 小时。可以在任何肿瘤治疗后的时间点上给药,包括但不限于暴露后 1、2、3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48 小时。

[0074] 肿瘤治疗可以包括给药细胞毒性制剂或抑制细胞的制剂,或其结合。细胞毒性制剂防止癌症细胞增殖,其通过:(1) 干扰细胞复制 DNA 的能力 (2) 诱导癌症细胞中的细胞死亡或凋亡。抑制细胞的制剂通过调节、干扰或抑制细胞信号传导的过程发挥作用,其调节细胞增殖有时在低的持续水平。

[0075] 可作为细胞毒性剂的化合物种类包括:烷化剂(包括但不限于氮芥子气、次乙亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲、和三氮烯);尿嘧啶芥子气、氮芥、环磷酰胺 (Cytosan[®])、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、三乙烯基-三聚氰胺、三乙烯基硫磷酰胺、白消安、卡氯芥、环己亚硝脲、链脲霉素、达卡巴嗪、和蒂清;抗代谢物(包括但不限于叶酸抗体、嘧啶类似物、嘌呤类似物、和腺苷脱氨酶抑制剂):甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、氟达拉滨磷酸盐、pentostatine、

和 gemcitabine ;天然产品及其衍生物 (例如,长春蔓生物碱、抗肿瘤抗生素、酶、淋巴因子和鬼臼毒素):长春碱、长春新碱、长春地辛、博来霉素、放线菌素 D、正定霉素、阿霉素、epirubicin、柔红霉素、阿糖胞苷、泰素 (泰素在商售上为 Taxol[®]),光神霉素、去氧间型霉素、丝裂霉素 -C、1-天冬酰胺酶、干扰素 (优选 IFN- α)、足叶乙甙和替尼泊苷。

[0076] 其他的增生的细胞毒制剂是 navelbene、CPT-11、阿那曲唑、来曲唑、吉西他滨、reloxafine、环磷酰胺、异环磷酰胺和 droloxafine。

[0077] 影响微管的制剂干扰细胞有细分裂,于是产生了本领域熟知的细胞毒性。用于本发明的影响微管的制剂包括,但不局限于 allocolchicine (NSC406042)、halichondrinB (NSC609395)、秋水仙碱 (NSC757)、秋水仙碱衍生物 (如 NSC33410)、dolastatin10 (NSC376128)、美登素 (NSC153858)、rhizoxin (NSC332598)、paclitaxel (Taxol[®], NSC125973)、Taxol[®] 衍生物 (如,衍生物 (如 NSC608832), thiocolchicine NSC361792)、三苯甲半胱氨酸 (NSC83265)、长春碱硫酸盐 (NSC49842)、长春新碱硫酸盐 (NSC67574)、天然和合成的埃坡霉素,包括但不限于埃坡霉素 A、埃坡霉素 B 和 discodermolide (见 Service, (1996) Science, 274 :2009) 磷雌氮芥、nocodazole、MAP4 等等。这些制剂的例子也描述在 Bulinski (1997) J Cell Sci 110 :3055-3346 ;Panda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 :10560-10564 ;Muhlradt (1997) Cancer Res. 57 :3344-3346 ; Nicolaou (1997) Nature 387 :268-272 ;Vasquez (1997) Mol Biol Cell 8 :973-985 ; 和 Panda (1996) J Biol Chem 271 :29807-29812。

[0078] 另外适合的细胞毒制剂还有 epidophyllotoxin ;抗新生物酶 ;topoisomerase 抑制剂 ;甲基苄肼 ;米托蒽醌 ;铂联合复合物如顺式铂和炭铂 ;生物反应调节剂 ;生长抑制剂 ;抗激素治疗剂 ;亚叶酸 ;恩世康 ;和造血生长因子。

[0079] 细胞生长抑制剂可以包括但不局限于激素和类固醇 (包括合成的类似物):17 α 炔雌醇、己烯雌酚、睾丸激素、强的松、氟羚甲基睾丸素、屈他雄酮丙酸盐、睾丸激素、甲地孕酮、甲基脱氢皮质甾醇、甲基睾丸激素、脱氢皮质甾醇、去炎松、hlorotrianisene、羟孕酮、氨基导眠能、磷雌氮芥、安宫黄体酮醋酸盐、醋酸亮丙瑞林、氟化酰胺、托瑞米芬、诺雷德。

[0080] 其他的细胞生长抑制剂是抗血管生成剂,如矩阵金属蛋白酶抑制剂、和其他的 VEGF 抑制剂,如抗 VEGF 抗体和小分子如 ZD6474 和 SU6668 页包括在内。Genetech 的抗 Her2 抗体也可以被使用。一种合适的 EGFR 抑制剂是 EKB-569 (不可逆的抑制剂)。还包括对 EGFR 具免疫特异性的 Imclone 抗体 C225 和 src 抑制剂。

[0081] 作为细胞生长抑制剂的合适的制剂还包括 Casodex[®] (bicalutamide, Astra Zeneca),其提供了男性激素依赖的癌症非增殖。依然另外一种细胞生长抑制剂的例子是男性激素 Tamoxifen[®],其抑制雌激素依赖的乳腺癌症的增殖或生长。细胞增殖信号传导的抑制剂是细胞生长抑制剂。代表的例子包括表皮生长因子抑制剂、Her-2 抑制剂、MEK-1 激酶抑制剂、MAPK 激酶抑制剂、PI3 抑制剂、Src 激酶抑制剂、和 PDGF 抑制剂。

[0082] 可以根据本发明治疗各种肿瘤,包括但不局限于膀胱 (包括加速的和转移的膀胱癌症),乳腺、结肠 (包括结肠直肠癌),肾,肝脏,肺 (包括小和非小细胞肺癌和肺腺癌),卵巢,前列腺,睾丸,泌尿生殖道,淋巴系统,直肠,喉,胰腺 (包括外分泌胰腺癌症),

食管,胃,胆囊,子宫,甲状腺,和皮肤(包括鳞状细胞癌症);淋巴血系的造血系统癌症,包括白血病,急性淋巴细胞白血病,急性淋巴母细胞白血病,B-细胞淋巴瘤,T-细胞淋巴瘤,赫杰森氏病,非赫杰森氏淋巴瘤,毛细细胞淋巴瘤,组织细胞淋巴瘤,和Burkett's淋巴瘤;骨髓血系的造血肿瘤,包括急、慢性髓性白血病,再生障碍性疾病,骨髓白血病和原髓细胞白血病;中枢和周围神经系统肿瘤包括星细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、和雪旺氏细胞瘤;间叶细胞来源的肿瘤包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤;其他的肿瘤包括黑素瘤、xenodermapigmentosum、keratoactanthoma、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌症、畸胎癌症。在一个优选的实施例中,本发明用于治疗胃肠道肿瘤。

[0083] B 肿瘤治疗副作用的治疗

[0084] 本发明还涉及哺乳动物的治疗方法,该哺乳动物遭受组成型活性NF- κ B癌症治疗所引起的正常组织损伤,该方法包括向哺乳动物投药含有治疗潜伏量的诱导NF- κ B活性的制剂的组合物。诱导NF- κ B活性的制剂可以与上述肿瘤治疗联合给药。

[0085] C 细胞老化的调节

[0086] 本发明还涉及在哺乳动物中调节细胞老化的方法,其包括向哺乳动物投药含有治疗潜伏量的诱导NF- κ B活性的制剂的组合物。诱导NF- κ B活性的制剂可以其他治疗联合给药。

[0087] 该制剂可以在其它治疗前任何时间给药,包括但不限于48、46、44、42、40、38、36、34、32、30、28、26、24、22、20、18、16、14、12、10、8、6、4、3、2、或1小时。该制剂可以在其它治疗后任何时间给药,包括但不限于给药后1、2、3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48小时。

[0088] D 治疗压力

[0089] 本发明还涉及治疗压力引起的正常组织损伤的哺乳动物的方法,其包括向哺乳动物投药含有治疗潜伏量的诱导NF- κ B活性的制剂的组合物。诱导NF- κ B活性的制剂可以其他治疗联合给药。压力可以来源于任何原因,包括但不限于射线、创伤、中毒、感染、和高热应激。

[0090] 含有NF- κ B诱导剂的组合物可以在暴露于压力前的任何时间给药,包括但不限于48、46、44、42、40、38、36、34、32、30、28、26、24、22、20、18、16、14、12、10、8、6、4、3、2、或1小时。含有NF- κ B诱导剂的组合物可以在暴露于压力后的任何时间给药,包括但不限于压力后1、2、3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48小时。

[0091] E 放射

[0092] 本发明还涉及从射线暴露中保护细胞的方法。离子辐射造成的正常细胞的损伤和死亡是对受射细胞的直接放射诱导的损伤和对射线诱导压力的活性遗传性渐进的细胞反应共同导致的死亡或凋亡。在许多放射敏感的器官中凋亡在细胞缺失中起重要作用(即,造血和免疫系统,消化道上皮等),其衰竭确定了生物体一般的放射敏感性。

[0093] 对离子射线的暴露(IR)可以是短期的或长期的,可以是一次或多次剂量,可以是全身或局部。因此,核事故或军事攻击可涉及全身暴露于一次的高剂量射线(有时随后有长期的放射性同位素中毒)。对于骨髓移植患者的预处理也是同样(其严格控制使用的量),当有必要为供体骨髓准备造血器官时,从受体血前体中“清除”他们。肿瘤治疗可涉及

多次剂量的局部放射,如果全身放射,则其大大超过了致死量。放射性同位素的中毒和治疗导致了靶器官长期局部暴露于射线(如,125I吸入的情况的甲状腺)。最后,有许多离子射线的物理形式在其生物作用的严重性中显著不同。

[0094] 在分子和细胞水平,放射粒子能产生DNA、蛋白质、细胞膜和其他大分子结构的断裂和交联。离子射线还可以通过增加自由基和活性氧种(ROS)诱导细胞成分的二级损伤。多种修复系统对抗此损伤,如恢复DNA完整性和保真度的许多DNA修复途径,清除自由基和ROS及减少被氧化的蛋白和脂质的抗氧化化学物和酶。细胞检测系统检测DNA损伤和延长细胞周期性进展,直至损伤恢复或决定细胞生长停滞或渐进性细胞死亡(凋亡)。

[0095] 射线可以引起哺乳动物器官损伤,从野生型突变和低剂量的致癌作用到几乎导致死亡的高剂量。生物体的整个放射敏感性通过许多敏感组织发生的病理改变决定,其包括造血系统、生殖系统和具有高速率细胞反转的分化的上皮细胞。

[0096] 导致死亡的 γ 射线的急性病理作用随剂量不同而不同,通过某些器官的衰竭而确定,其定义了生物体对每种特定剂量的敏感性的阈值。因此,低剂量致死发生于骨髓发育不全,而通过诱导肠道症状的中剂量加快了杀伤。非常高的射线引起神经坏死而导致立即死亡。

[0097] 射线急性毒性期存活的生物体可遭受长的远期的结果,包括受辐射几个月或几年后,射线诱导的癌症和暴露器官的纤维化(如肾脏,肝脏或肺)。

[0098] 细胞DNA是IR的主要靶子,其通过直接或间接的机制(自由基为基础的)引起多种类型的DNA损伤(基因毒的压力)。所有的有机体保留了DNA修复系统,其可地恢复放射损伤的DNA;DNA修复过程中的错误可导致突变。

[0099] 肿瘤通常对 γ 射线更敏感,可用多种对正常组织产生相对低的损伤局部剂量治疗。但是,在一些情况下,正常组织的损伤是肿瘤治疗中 γ 射线应用的一个限制性因子。在传统的肿瘤治疗中使用 γ 射线、三维适形、或更聚焦点的BeamCath传送也具有剂量限制的毒性,其是由累积的射线产生,并诱导快速再生的正常组织的干细胞损伤,如骨髓和胃肠(GI)道。

[0100] 在高剂量下,射线诱导的致死与所述的造血和胃肠射线症状相关。造血症状的特征是造血细胞和其祖先细胞的缺失,导致了不能生成血和淋巴系统。死亡通常是感染(免疫抑制的结果)、出血和/或贫血的结果。GI症状由肠道上皮中多数细胞死亡引起,主要是小肠,随后是肠壁的不完整,并死于菌血症和败血症。造血症状通常在低剂量射线比较多,导致比GI症状延迟的死亡。

[0101] 在过去,射线防护剂典型的是抗氧化剂-包括合成的和天然的。最近,细胞因子和生长因子被加入到射线防护剂中;这些射线防护剂的机制被认为是有助于敏感组织的再生。在两组射线防护剂中没有明确的功能区别,可是,一些细胞因子诱导细胞抗氧化蛋白的表达,如过氧化镁歧化酶(MnSOD)和金属硫蛋白。

[0102] 特定制剂的防护检测可用剂量调节因子(DMF或DRF)表示。用一定范围的射线剂量照射辐射防护剂处理的目标物和未处理的对照物,然后比较其生存或其他终结点,从而确定DMF。DMF通常被计算30天的生存率(用对照组的LD50/30除以药物处理组的LD50/30),并定量造血系统的保护。为了分析胃肠道系统的保护,LD50和DMF被计算6或7天的生存。除非特别指明,此处的DMF值是30天的。

[0103] NF- κ B 诱导剂在细胞水平以及在整个有机体水平具有强的促生存活性。为了对超致死剂量的射线反应, NF- κ B 诱导剂抑制肠道和造血系统症状, 其是主要的急性射线暴露的致死原因。作为这些特性的结果, NF- κ B 诱导剂可用于治疗天然放射事件和核事故的作用。而且, 由于 NF- κ B 诱导剂通过不同于以前所知的所有射线防护剂的机制发挥作用, 他们可与其他射线防护剂联合使用, 从而, 大大地增加了对离子射线的防护范围。

[0104] 与传统射线防护剂 (如自由基清除剂) 相反, 抗凋亡制剂也许不能降低一级放射介导的损伤, 但是可以对抗二级事件, 包括对一级损伤的活性细胞反应, 因而补足了存在的防护线。皮斐松- α , p53 的药物抑制剂 (哺乳动物细胞中一种主要的放射反应调节剂), 是此种新的射线防护剂的例子。可是, p53 抑制剂的活性限于保护造血系统, 在消化系统没有保护作用 (胃肠道症状), 因此, 降低了这类化合物的治疗价值。具有很宽活性范围的抗凋亡药物绝对是需要的。

[0105] NF- κ B 诱导剂可被用作射线防护剂, 通过超出目前方法 (存在的生物防护剂的防护和应用) 可达到的水平地增加人机体对射线的抵抗力来扩大可容忍的放射剂量, 并大大地增加了核事故或大规模日光粒子事件中人员的生存机会。NF- κ B 诱导剂鞭毛蛋白的大概 DMF (30 天生存) 大于 1.5, 其比目前报道任何天然化合物都有效。

[0106] NF- κ B 诱导剂还可用于治疗低剂量辐射引起的不可替代的细胞缺失, 例如, 在中枢神经系统和生殖器官中。NF- κ B 诱导剂还可被用于癌症化疗中, 以治疗化疗产生的副作用, 包括秃头症。

[0107] 再一个实施例中, 治疗受辐射的哺乳动物, 包括向哺乳动物投药含有治疗有效量的 NF- κ B 诱导剂的组合物。含有 NF- κ B 诱导剂的组合物可以与一种或多种辐射防护剂联合给药。一种或多种辐射防护剂可以是任何治疗受辐射的制剂, 包括但不局限于抗氧化剂、自由基清除剂和细胞因子。

[0108] NF- κ B 诱导剂还可以抑制放射诱导的 DNA 和其他细胞结构损伤的渐进性细胞死亡; 可是, NF- κ B 诱导剂不能处理细胞的损伤, 也不能防止突变。自由基和反应氧族 (ROS) 是引起突变和其他细胞内损伤的主要原因。抗氧化剂和自由基清除剂可有效地防护自由基产生的损伤。NF- κ B 诱导剂和抗氧化剂或自由基清除剂联合使用可导致受射哺乳动物更小范围的损伤、高的生存和改善的健康状态。实际上可用于本发明的抗氧化剂和自由基清除剂包括但不局限于硫醇、如半胱氨酸、巯基乙胺、谷胱甘肽和胆红素; amifostine (WR-2721); 维生素 A; 维生素 C; 维生素 E; 和类黄酮, 如印度荷力罗勒 (*Ocimum sanctum*), orientin, 和 vicenin。

[0109] NF- κ B 诱导剂还可以与多种通过补充和 / 或保护射线敏感干细胞群而提供放射防御的细胞因子和生长因子联合给药。可通过使用干细胞因子 (SCF, c- 试剂盒配体)、flt-3 配体和白细胞介素 1 片段 IL-1 b-rd 而实现具有最少副作用的放射防护。可以通过诱导干细胞增殖 (所有提到的细胞因子) 及防止其凋亡 (SCF) 实现防护。治疗允许辐射前白细胞及其前体集聚, 从而使辐射后免疫系统可以得到快速重建。SCF 可有效地防止受辐射小鼠的死亡, DMF 在 1.3-1.35, 其也可以有效地对抗肠道症状。Flt-3 配体也可以提供对小鼠 (在 LD100/30 时, 30 天生存率 70-80%, 相当于 DMF) 1.2) 和兔子 (15, 16) 的强保护。

[0110] 一些因子, 本质上不是细胞因子, 刺激免疫细胞增殖, 可以与 NF- κ B 诱导剂联合使用。5-AED (5-雄甾烯二酮) 是类固醇, 可刺激细胞因子的表达并增加对细菌和病毒感染

的抗性。辐射前 24 小时向小鼠皮下注射 5-AED 可改善生存, DMF = 1.26。合成的化合物, 如三氯代铵(二氧乙烯 -0, 0' -) 硝酸盐 (AS-101) 可被用于诱导多种细胞因子的分泌, 可与 NF- κ B 诱导剂联合使用。

[0111] 生长因子和细胞因子可被用于提供肠道症状的保护。角化细胞生长因子 (KGF) 促进肠粘膜的增殖和分化, 在肠阴窝增加辐射后的细胞生存。造血细胞因子和放射防护 SCF 可以增加肠干细胞的生存及相关的短期有机体生存。

[0112] NF- κ B 诱导剂可保护肠道 (GI) 和造血系统的症状。由于暴露于全身致死辐射 15Gy 的小鼠多数死于肠道症状, 含有 NF- κ B 诱导剂和一种或多种 GI 症状抑制剂的组合物可更有效。用于本发明的 GI 症状抑制剂包括但不限于细胞因子, 如 SCF 和 KGF。

[0113] 含有 NF- κ B 诱导剂的组合物可在辐射暴露于辐射前的任何时间给药, 包括但不限于包括但不局限于暴露前 48、46、44、42、40、38、36、34、32、30、28、26、24、22、20、18、16、14、12、10、8、6、4、3、2、或 1 小时。含有 NF- κ B 诱导剂的组合物可以在暴露于辐射后的任何时间给药, 包括但不限于包括但不局限于暴露后 1、2、3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48 小时。

[0114] 3. 制剂

[0115] 本发明还涉及诱导 NF- κ B 活性的制剂。制剂可以是人工合成的化合物或天然存在的化合物。制剂可以是低分子量的化合物、多肽或肽、或片段、类似物、同源物、其变异或衍生物。

[0116] 制剂还可以是诱导 NF- κ B 细胞因子的, 包括但不限于 IL2、IL6、TNF 和 TGF β 。制剂还可以是前列腺素。制剂还可以是生长因子, 包括但不限于 KGF 和 PDGF。制剂还可以是诱导 NF- κ B 活性的抗体。

[0117] A. 鞭毛蛋白

[0118] 在一个实施例中, 制剂是鞭毛蛋白, 其可来自细菌包括但不限于沙门氏菌属, 如鼠伤寒沙门氏菌。如以下的实施例中所示的, 在细胞水平和作为一个整体的有机体, 鞭毛蛋白具有强的促生存活性 (pro-survival)。

[0119] 具有有益特性的 NF- κ B 诱导剂的片段、变异、类似物、同源物或衍生物, 如鞭毛蛋白可通过以鞭毛蛋白结构域结构为基础的合理设计得到。沙门氏菌鞭毛蛋白的结构域结构在文献中报道了 (图 19)。鞭毛蛋白在 N 末端和 C 末端具有保守结构域 (D1 和 D2), 以及一个中间的高变异区 (D3) (Samatey, 等 2001, Eaves-Pyles T. 等 2001a)。通过大肠杆菌埃希氏菌属铰链区分离的含有氨基酸 D1 和 D2 及羰基 D1 和 D2 (ND1-2/ECH/CD2) 的重组蛋白的结果表明当连接到 ECH 元件时 D1 和 D2 具有生物活性。这种嵌合体, 并不仅仅是铰链区, 在两个小肠上皮细胞系诱导 I κ B α 降解、NF- κ B 激活和 NO 及 IL8 生成。非保守的 D3 区在鞭毛蛋白细丝表面上, 含有主要的抗原决定簇。鞭毛蛋白的有效的促炎性活性可能位于高保守的 N 和 CD1 和 D2 区。

[0120] B. 寄生虫的 NF- κ B 诱导剂

[0121] 鞭毛蛋白的特性表明额外的 NF- κ B 调节剂可存在于寄生虫。有许多寄生虫依赖于凋亡抑制, 因为没有宿主细胞, 他们不能存活。这些生物体经过适应通过分泌抗凋亡因子而在宿主有机体中有效地存活。像发展的肿瘤, 这些生物体分泌的因子能增强其自身的存活, 而解决与宿主压力反应防御机制的冲突。

[0122] 来自寄生或共生的生物体的抗凋亡因子通过数百万年的适应而最小化了可影响宿主生存的伤害。结果,这些因子很少需要,如果有额外的修饰,可被直接应用或小量修饰后应用。这些因子可用于治疗压力介导的凋亡,如与化疗或放疗相关的副作用。

[0123] 本发明还涉及筛选用于鉴别 NF- κ B 调节剂的寄生虫的方法。该候选的调节剂可来自人或非人源寄生虫。寄生虫优选宿主细胞外寄生虫。寄生虫还可以是共生体。本发明的调节剂可分离自的寄生虫包括但不限于支原体、衣原体和沙门氏菌。可通过此处所述的筛选方法以及生物化学和基因选择方法、体外试验、细胞死亡保护剂和体内来鉴别这些调节剂。

[0124] 4. 组合物

[0125] 本发明还涉及含有治疗有效剂量的 NF- κ B 诱导剂的组合物。该组合物可以是药物组合物,可以使用本领域熟知的方法制备。如上所述,含有 NF- κ B 诱导剂的组合物可以给药于哺乳动物用于治疗凋亡相关的状态,包括但不限于暴露于辐射、癌症治疗的副作用、压力和细胞老化。组合物可以包括另外的制剂,包括但不限于辐射防护剂或化疗药物。

[0126] A. 给药

[0127] 本发明的组合物可以以任何方式给药,包括但不限于口服、肠道外、舌下、经皮的、直肠、经粘膜、局部、经吸入、经颊给药或其组合。肠道外给药包括但不限于静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、鞘内、和关节内给药。在兽医中的应用,可以根据常规兽医操作以适当的配方形式给药组合物。兽医可以确定最适合特定动物的药方剂量和给药途径。

[0128] B. 配方

[0129] 本发明的组合物可以以传统的方式以片剂或锭剂配方。例如,用于口服给药的片剂或胶囊配方可以包含常规的赋形剂包括但不限于结合制剂、填充剂、滑润剂、分解质和湿润剂。结合制剂包括但不限于糖浆、accacia、凝胶、山梨醇、黄芪胶、淀粉的黏液和聚乙烯吡咯烷酮。填充剂包括但不限于乳糖、糖、微晶体纤维素、玉米淀粉、磷酸钙、和山梨醇。滑润剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、聚乙烯乙二醇、和硅石。分解质包括但不限于土豆淀粉、乙醇酸钠淀粉。湿润剂包括但不限于月桂醇硫酸钠。根据本领域熟知的方法将片剂包被。

[0130] 本发明的组合物还可以是液体配方,包括但不限于水或油性悬浊液、溶液、乳状液、糖浆和西也剂。组合物也可被配方成干燥的产物,使用前用水或适合的媒介物构建。这种液体制剂何以含有添加剂包括但不限于悬浮剂、乳化剂、非水性媒介或防腐剂。悬浮剂包括但不限于山梨醇糖浆、甲基纤维素、葡萄糖 / 蔗糖糖浆、凝胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝和氢化可食的脂肪。乳化剂包括但不限于卵磷脂、山梨醇单油酸盐和阿拉伯树胶。非水性媒介包括但不限于食用油、杏仁油、分级的椰子油、油脂、丙烯乙二醇和乙烯乙醇。防腐剂包括但不限于甲基或丙基 p- 羟基安息香酸盐和山梨酸。

[0131] 本发明的组合物还可以被配方成栓剂、气可以含有栓剂的基础成分,包括但不限于可可黄油或甘油酯。本发明的组合物还可被配方成吸入剂包括但不限于溶液、悬液、或乳剂,可以粉末形式或使用推动剂如二氯二氟甲烷或三氯二氟甲烷以气雾剂形式给药。本发明的组合物还可以被配方成经皮的配方,其包括水或非水媒介,包括但不限于乳霜、药膏、洗剂、糊、药用糊、块或膜。

[0132] 本发明的组合物还可被配方成肠外投药,包括但不限于注射或持续浸剂。用于

注射的配方可以是油或水性介质中的悬浮液、溶液、或乳剂的形式，可以含有配方制剂包括但不局限于悬浮的、稳定的、和分散的制剂。组合物还可以以粉末的形式被提供，使用恰当的媒介重建，包括但不局限于消过毒的，无热原质的水。

[0133] 本发明的组合物还可以被配方成贮存制剂，其可通过植入或肌肉内注射给药。组合物还可被配方成合适的聚合体或疏水物质（例如以可接受的油形式的乳化剂）、离子交换树脂、或保守的溶液衍生物（例如保守的溶液衍生盐）。

[0134] C. 剂量

[0135] 用于治疗制剂的治疗有效剂量随被治疗状态、需要诱导 NF- κ B 活性的时间长短、病人的年龄和状态的不同而不同，最终由参加的医师决定。可是，一般而言，用于成年病人治疗的剂量通常在每天约 0.001mg/kg-200mg/kg。剂量可以是大约每天 1 μ g/kg-100 μ g/kg。通常可一次地给药所需剂量，或在恰当的时间间隔内多次给药，如，一天给药 2, 3, 4 或更多次。通常想要或需要多次剂量，因为一旦不再给药制剂，在正常的细胞内 NF- κ B 活性会降低。

[0136] NF- κ B 诱导剂的剂量可以是任何剂量，包括但不局限于 1 μ g/kg、25 μ g/kg、50 μ g/kg、75 μ g/kg、100 μ g/kg、125 μ g/kg、150 μ g/kg、175 μ g/kg、200 μ g/kg、225 μ g/kg、250 μ g/kg、275 μ g/kg、300 μ g/kg、325 μ g/kg、350 μ g/kg、375 μ g/kg、400 μ g/kg、425 μ g/kg、450 μ g/kg、475 μ g/kg、500 μ g/kg、525 μ g/kg、575 μ g/kg、600 μ g/kg、625 μ g/kg、675 μ g/kg、700 μ g/kg、725 μ g/kg、775 μ g/kg、800 μ g/kg、825 μ g/kg、852 μ g/kg、875 μ g/kg、900 μ g/kg、925 μ g/kg、950 μ g/kg、975 μ g/kg 或 1mg/kg。

[0137] 5. 筛选方法

[0138] 本发明还涉及鉴别诱导 NF- κ B 活性的制剂的方法。可以通过一种方法鉴别诱导 NF- κ B 活性的制剂，该方法包括将猜想的 NF- κ B 活性诱导剂加到 NF- κ B 激活的表达系统，与对照比较 NF- κ B 激活表达的水平，藉由增加 NF- κ B 激活表达系统的水平的能力鉴别 NF- κ B 活性的诱导剂。

[0139] 候选制剂可存在于数据库中（即，许多化合物）。例如，此种制剂可以被表达数据库中的 DNA 分子编码。候选制剂可存在于条件的介质或细胞提取物。其他此类制剂包括本领域熟知的“小分子”化合物，分子量小于 10^5 道尔顿，优选小于 10^4 道尔顿，跟优选小于 10^3 道尔顿。此种候选制剂可以作为组合的数据库的成员被提供，其包括根据多种预定的化学合成制备的合成制剂（如肽）。本领域普通技术人员应当能够理解根据确定的步骤可以制备此数据库的多种类别，并可根据此处的方法同时或相继地筛选候选制剂的数据库成员。

[0140] 可以以各种形式进行筛选方法，包括体外、细胞基础和的体内分析。任何细胞可用于细胞基础的分析中。优选地，用于本发明的细胞包括哺乳动物细胞、更优选地包括人或非人类灵长类细胞。细胞基础的筛选可以使用表达 NF- κ B 激活的代用品标记的基因修饰的肿瘤细胞来进行。此种标记包括但不局限于细菌 β 半乳糖苷酶、荧光素酶和增强的绿色荧光蛋白 (EGFP)。可应用本领域的标准技术测量代用品标记的表达量包括但不局限于比色、发光和荧光。

[0141] 将猜想调节剂加入细胞，如通过混合，的条件是如果基本上没有干扰凋亡或信号的其他调节化合物存在，细胞能够进行凋亡或信号的条件。有效的条件包括但不局限于允许细胞生长的恰当的介质、温度、pH 和氧状态。恰当的介质典型地是固体或液体介质，其含

有生长因子和可吸收的碳、氮、和磷酸源,以及恰当的盐、矿物质、金属和其他营养物,如维生素,并包括细胞可在其中生长并表现出凋亡和信号的介质。例如,对于哺乳动物细胞,介质可以含有 10%胎牛血清的 Dulbecco 修饰的 Eagle 介质。

[0142] 可以在各种容器中培养细胞,包括但不限于组织培养瓶、试管、微量滴定皿、和培养板。培养在适合细胞的温度、pH 和二氧化碳含量的条件下进行。此培养条件也在本领域的范围。

[0143] 将猜想调节剂加入细胞的方法包括电穿孔、微注射、细胞表达(即使用包括裸核酸分子、重组病毒、逆转录酶病毒表达载体和腺病毒表达的表达式),使用有助于细胞通透的离子配对试剂和去垢剂。

[0144] 本发明具有多个方面,通过下述非限制性实施例描述。

[0145] 实施例 1

[0146] P53 缺陷加速小鼠肠道症状的发展

[0147] 哺乳动物离子辐射的初期致死原因依赖于射线剂量。达到 9-10Gy 的剂量,小鼠 12-20 天后死亡,主要是由于致命的骨髓缺失造血综合征 (HP)。在此剂量下,受辐射小鼠可通过骨髓移植得到挽救。受到大于 15Gy 的动物在处理 7-12 天死亡(在造血综合征杀死之前),死于小肠-胃肠道综合征 (GI) 的并发症 (Gudkov&Komarova 2003)。在 HP 和 GI 综合征两种情况下,组织的致死性损伤来自于大多数 p53 依赖的凋亡 (Potten1992, Merritt 1994, Cui 等 1995, Potten 等 1994),此观察使得我们可以较早地建议 p53 可以确定放射诱导的死亡。同样的,p53 缺陷小鼠对抗通过 HP 症状进行杀伤的射线剂量 (Westphal 等 1997, Komarov 等 1999),通过小分子的 p53 抑制剂皮斐松 α (PFT) (pifithrin- α) 暂时药物地抑制 p53 可以降低 6-11Gy γ 射线在野生型动物中引起的死亡 (Komarov 等 1999)。通过证实作为实验性化疗和放疗结果的毛发缺失(秃头症)的 p53 依赖,进一步强化了 p53 对基因毒性压力的敏感组织因子的定义 (Botchkarev 等 2000)。因此,基于上述观察,大家可以期待 p53 在高剂量的 IR 后的致死性 GI 综合征的发展中持续起重要的作用。令人吃惊的是,p53 缺陷使小鼠对高剂量导致致死的胃肠道综合征的 IR 敏感(图 11)。IR 后在 p53 缺陷上皮的隐窝中持续的细胞增殖于加速的隐窝受损细胞的死亡和快速的绒毛破坏相关。P53 通过诱导小肠隐窝的生长停滞延长生存,因而保持肠道完整性(图 12)。所以,p53 的促凋亡功能加速了造血症状,而其生长停滞功能延缓了胃肠道症状。

[0148] 小肠细胞的动力学已被详细的分析了。肠道上皮的细胞增殖局限于隐窝,其中有干细胞和早期增殖的祖细胞。一系列细胞分裂后,已近分化的隐窝干细胞的后代移到绒毛,在绒毛顶脱落。在小鼠的小肠中,细胞的整个“旅途”(增生部分到绒毛顶)一般需要 3-5 天 (Potten1992, Potten 等 1997, Booth 等 2002, Somosy 等 2002)。虽然小肠对 γ 射线的反应在病理形态学水平上已被详细研究了,仍不明白的是到底是什么引起的 GI 致死,包括初级事件。死亡可以上皮隐窝细胞损伤及随后的绒毛剥脱,而导致的液体和电解质失衡、菌血症和毒血症的直接后果。除了炎性和间质反应,内皮的功能丧失是导致死亡的重要因素 (Potten 等 1997, Somosy 等 2002)。总言之,对防止 IR 诱导的 HP 症状的有效方法,p53 的药物抑制并不能对抗 GI 症状(如果不是有害的)。因此,有必要发展一种其他的方法,在其他机制上对小肠上皮进行放射性保护,例如,NF- κ B 的激活和随后的细胞死亡的抑制。

[0149] 实施例 2

[0150] 沙门氏菌感染激活 NF- κ B

[0151] 沙门氏菌感染导致有效的 IKK 和 NF- κ B 激活以及促炎性基因的激活 (Elewaut 等 1999)。先前的研究表明在培养的肠上皮细胞中大约 30-40% 的肠上皮细胞在典型的沙门氏菌感染中被感染 (Valdivia 等 1996)。我们希望解决这个问题, 宿主细胞大约 30% 的细菌感染是怎样使 NF- κ B DNA 的结合活性增加到作为 TNF α 治疗剂量的几乎所有的宿主细胞中的 NF- κ B 活性的。

[0152] 为了详细检测这个现象, 假感染或在 MOI50 时用野生型鼠伤寒沙门氏菌感染 HT29 细胞 1 小时, 该鼠伤寒沙门氏菌用编码沙门氏菌 *ssaH* 启动子控制的绿色荧光蛋白 (GFP) 的质粒 pFM10.1 转染, 仅当细菌侵入宿主细胞是才具功能 (Valdivia 等 1997)。用沙门氏菌侵入的细胞通过直接的荧光显微镜检测 GFP 的表达来检测。P65 (RelA) 定位通过使用间接的免疫荧光检测, 用 FITC 连接的驴抗兔抗体检测兔抗 p65 抗体。DAPI 用于染色核。

[0153] 如图 1A 所示, GFP 的表达发生在大约 30-40% 的细胞。下一步我们检测在未处理的 (假感染)、沙门氏菌感染或 TNF α (10ng/ml) 刺激的细胞中 NF- κ B 亚单位 p65 的定位。P65 (RelA) 定位于未处理细胞的细胞质中, 而 p65 (RelA) 定位于沙门氏菌感染或 TNF α 处理细胞的细胞核上 (图 1B)。这些结果表明沙门氏菌感染几乎在所有的细胞激活 NF- κ B, 尽管只有一少部分被感染。

[0154] 实施例 3

[0155] 鞭毛蛋白激活 NF- κ B

[0156] 因为培养的小肠上皮细胞感染沙门氏菌仅导致大概 30% 的感染, 而几乎全部的细胞中 NF- κ B 都被激活, 我们期望 NF- κ B 的激活是对宿主细胞识别细菌结构成分或细菌产物的反应, 而不是通过侵入过程。侵入自身被证明在激活上述认为的促炎症基因过程中不是必要的 (16)。为了研究此种可行性, 使用未处理的或煮沸 20 分钟的消毒过滤的柏林沙门氏菌培养液激发 HT29 小肠上皮细胞, 通过暴露 45 分钟后制备的全细胞提取物 (WCEs) 的电迁移分析 (EMSA) 分析 NF- κ B DNA 的结合活性 (3, 40)。在两种条件下观察到对培养液反应的潜伏激活, 表明激活因子是热稳定的。

[0157] 随后用 DNase、RNase、蛋白激酶 K 或在 100kDa 的 centricon 过滤器上粗略地分离处理天然消毒过滤浓缩的培养液。然后用各种处理的培养液激发 HT29 肠上皮细胞 45 分钟后制备 WCEs, 用 EMSA 分析 NF- κ B DNA 的结合活性 (图 2A)。通过鼠伤寒沙门氏菌 1103 的 HT29 细胞的直接感染或暴露于如所述培养液 (supt), 诱导 NF- κ B DNA 结合活性, 而发现活性诱导剂对蛋白激酶消化敏感, 并通过 100kDa 过滤器保留 (图 2A)。为了进一步确定 NF- κ B 诱导活性的身份, 用 Superose12 凝胶通透色谱 (图 2B) 和阴离子交换色谱 (图 2C) 分离消毒过滤浓缩的培养液培养基。分析色谱分离的水性部分对激活 HT29 细胞中 NF- κ B 的能力, 并用 EMSA 分析。如在考马斯兰染色凝胶中所见 (图 2B, 上), 对应增加的大约 55kDa 的蛋白质, NF- κ B DNA 结合活性增强 (图 2B, 下组 4-6 泳道)。如所示的在 POROS HQ 基质上的阴离子交换色谱和如所示的具有增加的盐梯度的结合蛋白洗提液 (图 2C) 证明了 NF- κ B DNA 结合诱导活性对应了含有增加的含量的 55kDa 的蛋白质的色谱部分 (图 2C, 上, 数据未显示)。图 2C 中的洗提液被浓缩, 并在预备的 12% SDS-PAGE 凝胶上分离, 从胶上切除 B1-B6 的带, 洗提蛋白质, 沉淀, 复性, 并用于刺激 HT29 细胞。通过 EMSA 分析这些细胞中的全部细胞提取液的 NF- κ B DNA 结合诱导活性, 仅有对应 55kDa 蛋白的带 2 (B2) 能过引起 NF- κ B DNA

结合活性,而从开始或最后的盐剃度缓冲液不能激活 NF- κ B DNA 结合活性(图 2C, F)。

[0158] 进一步对 B1-B6 蛋白带的蛋白和凝胶的空白区进行蛋白测序。B2 蛋白质的胰蛋白酶消化和电分散离子捕获 LC/MS 分析鉴别出一个 21 个肽的氨基酸序列。鞭毛蛋白(21 个肽的覆盖率为 75%)毫无疑问地被鉴定为诱导 NF- κ B DNA 结合活性的蛋白质(图 3)。

[0159] 实施例 4

[0160] 在肠上皮中需要鞭毛蛋白激活 NF- κ B

[0161] 为了确认鞭毛蛋白到底是不是在肠上皮暴露于直接的细菌感染或治病沙门氏菌的过滤的培养液后 NF- κ B 活性触发的因子,我们从非鞭毛蛋白的大肠杆菌 DH5 α 、致病的柏林沙门氏菌 2229、异源柏林沙门氏菌 2229 SopE⁻突变、异源柏林沙门氏菌 2229 SopB⁻突变、异源柏林沙门氏菌 2229 SopE⁻/B⁻双突变(SE1SB2 株)、鼠伤寒沙门氏菌 1103、异源鼠伤寒沙门氏菌 fliC⁻Tn10 插入突变(株 86)和鼠伤寒沙门氏菌 1103 异源双突变 fliC⁻/fliJ⁻中制备了感染细菌,煮沸,过滤培养液。SopE 是病原性沙门氏菌噬菌体编码的蛋白被注入宿主细胞,并作为小 RhoGTPases Rac1 和 Cdc42 启动的细胞骨架重排的交流因子发挥作用,最终激活 MAPK、SAPK 和 NF- κ B 途径(7, 15),而 SopB 是作为磷酸肌糖磷酸酶发挥作用的沙门氏蛋白,参加细胞骨架重排和刺激宿主细胞分泌氯(44)。用细菌和培养液激发 HT29 小肠上皮细胞,45 分钟后制备 WCEs 提取液,通过 EMSA 分析 NF- κ B DNA 结合活性。沙门氏菌株能够激活 NF- κ B,而不能产生鞭毛蛋白的沙门氏菌株(如所述的 fliC 和 fliC⁻/fliJ⁻突变)也不能激活 NF- κ B(图 4A&B)。大肠杆菌 DH5 α 是非鞭毛蛋白,不产生鞭毛蛋白,不能激活 NF- κ B。通过多种试验我们还注意到柏林沙门氏菌的直接感染比如图 4A 的鼠伤寒沙门氏菌通常激活更多的 NF- κ B,而两种菌种的培养液几乎同样地激活 NF- κ B(图 4B)。我们相信这种区别也许是由于在感染期间柏林沙门氏菌比鼠伤寒沙门氏菌向细胞培养介质中释放更多的鞭毛蛋白,因为从两种柏林沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的培养液中纯化并加入相同剂量的色谱纯化的鞭毛蛋白而产生相似的 NF- κ B 激活。还注意到的是双鞭毛蛋白基因突变与在单相 I 鞭毛蛋白 fliC::Tn10 插入突变(图 4A&4B 中接近最后一泳道)中观察到的很小的激活相比不能激活 NF- κ B,原因可能是相 II 鞭毛蛋白的有限的表达(从 fliJ),尽管此处使用的沙门氏菌株遗传上不能或很少迁移鞭毛蛋白产物的相。由于在小肠上皮细胞的直接感染中需要鞭毛蛋白激活 NF- κ B 途径,很可能鞭毛蛋白也是其他小肠上皮细胞的致病性沙门氏菌感染激活的主要的促有丝分裂和压力激活的信号途径的主要决定因子。小肠上皮细胞直接的沙门氏菌感染导致 JNK 激活(8),也通过 IKK 激活 NF- κ B(3)。

[0162] 实施例 5

[0163] 鞭毛蛋白触发有丝分裂激活的蛋白激酶、压力激活的蛋白激酶和 IKK 信号途径的活性。

[0164] 对于向肠腔表面的侵入,小肠上皮细胞作为哨兵发挥作用,其可通过产生细胞因子基因如 IL-8 和巨噬细胞化学吸引蛋白 1(MCP1)促炎症的细胞因子基因如 TNF α 、IL-1 和 IL-6(1, 4-6)吸引免疫细胞到局部。这些基因的表达主要依赖转录因子的活性,这些转录因子通过对 MAPK、SAPK 和 IKK 信号途径的信号传导的反应被激活。由于 NF- κ B 被认为是促炎症基因的中枢调节/激活剂,我们决定检测不产生鞭毛蛋白的沙门氏菌突变株在激活 MAPK、SAPK 和 IKK 信号途径的作用,并与野生型沙门氏菌感染的肠上皮或暴露于纯化的鞭毛蛋白的肠上皮比较。野生型鼠伤寒沙门氏菌感染 HT29 细胞导致了 MAPK、ERK1&2、

SAPKsp38 和 JNK 和 IKK 的激活 (图 5), 如通过免疫印迹 (IB) 分析中的活性指示磷酸特异性抗体分析或分别使用底物 GST-cJun1-79 和 GST-I κ B α 1-54 的 JNK 和 IKK 的抗体特异性免疫激酶分析 (KA) 所确定的那样。有趣的是, MAPK 刺激在本质上是短暂的, 在 45 分钟开始激活降低, 而 p38、JNK 和 IKK 随时间超过一小时增加。如图 4 所见, fliC⁻/fliJ⁻ 双突变沙门氏菌也不能诱导 IKK 和 NF- κ B 的活性 (如图 5 所示)。令人吃惊的是, fliC⁻/fliJ⁻ 双突变沙门氏菌不能诱导 SAPKs p38 和 JNK, 仅能暂时地 (15 分钟) 激活 MAPK。此结果是令人疑惑的, 原因是其他沙门氏菌蛋白如 SopE 和 SopE2 能够激活小的 GTPaseRac 和 Cdc42, 这些 Rho 家族的 GTPases 与 JNK 和 p38 的激活相联系 (7, 8, 14, 15) 可是在鞭毛蛋白负株中没有功能。

[0165] 与野生型沙门氏菌相比, fliC⁻/fliJ⁻ 双突变沙门氏菌不能侵入 HT29 细胞, 如基因刺激防护 / 侵入分析 (gentamycinprotection/invasion assay) 中所确定的。鞭毛蛋白 fliC⁻/fliJ⁻ 双突变沙门氏菌在其侵入 HT29 细胞的能力中显示出 4 级不同的幅度。为了进一步说明这一点, 我们用野生型沙门氏菌和 fliC⁻/fliJ⁻ 双突变沙门氏菌 (株 134) 感染 HT29 细胞, 用在沙门氏菌 ssaH 启动子控制下编码表达 GFP 的质粒 pFM10.1 转染两种菌株, 仅当细菌侵入宿主细胞是才发挥功能 (10, 36)。很明显野生型沙门氏菌能够感染 HT29 细胞 (GFP, 图 5B) 而鞭毛蛋白突变细菌不能侵入 HT29 细胞, 如没有 GFP 表达所验证的 (图 5B)。为了确定为了侵入, 鞭毛蛋白是否足够或需要其他细菌产生的蛋白, 我们将纯化的鞭毛蛋白或消毒过滤的培养液或其混合加入 HT29 细胞, 用沙门氏菌 fliC⁻/fliJ⁻ 双突变激发 HT29 细胞, 并分析侵入。使用纯化的鞭毛蛋白和 / 或 fliC⁻/fliJ⁻ 双突变株² 培养液的所有试验组合不能侵入肠上皮细胞都。不相信鞭毛蛋白基因和 III 型分泌系统有直接的关联以传递细菌产物蛋白如, SopE、SopE2 和 SipA 或其他在抑制细菌整合中起重要作用的 Sip 蛋白 (7, 14, 15, 45, 46) 的有效性。而且, 为了评估鞭毛蛋白刺激 p65 (RelA) 在肠上皮细胞中核定位的有效性, 我们用纯化的鞭毛蛋白激发 HT29 细胞, 并使用间接免疫荧光检测 p65 (RelA) 的定位, 发现 p65 (RelA) 几乎定位于每一个细胞核 (如图 5B 所示)。

[0166] 在 HT29 细胞中纯化的鞭毛蛋白 (0.5 μ g/ml) 有效地激活 NF- κ B, 这与 TNF (10ng/ml) 处理的 HT29 细胞中观察得到的时间依赖的方式相似 (图 6A), 其中 WCEs 在暴露后的指定的各个时间上制备, 用 EMSAs 分析 NF- κ B DNA 结合活性。在这些相同的提取液中分析 MAPK、SAPK 和 IKK 信号途径 (图 6B), 使用激活特异的磷酸抗体检测 MAPK 和 p38 激酶活性或抗体特异性免疫沉淀激酶分析检测 JNK 和 IKK 活性, 证明 JNK 和 IKK 活性在一小时内增加而 p38 和 MAPK (ERK1&2) 活性在 30 分钟达到最大, 在一小时时下降到可注意的低水平 (如图 6B 所示)。MAPK、SAPK 和 IKK 信号分子 ERK1&2, p38, JNK, 和 IKK 在小肠上皮细胞中对暴露于纯化的鞭毛蛋白的反应曲线与野生型沙门氏菌感染的小肠上皮细胞惊人的相似 (图 5A)。从这些观察中我们得出结论, 此处检测到的信号系统暂时的激活 (MAPK, SAPK 和 IKK) 反映了沙门氏菌感染的早期状况, 几乎可专有地通过小肠上皮细胞对鞭毛蛋白的识别和反应确定。

[0167] 我们希望进一步检测纯化鞭毛蛋白沙门氏菌中的和鞭毛蛋白在肠上皮细胞中暂时的促炎症细胞因子基因表达的作用, 以便区分鞭毛蛋白单独、鞭毛蛋白化的沙门氏菌或非鞭毛蛋白化的沙门氏菌感染。HT29 细胞未处理、用 TNF α (10ng/ml) 刺激、或用鞭毛蛋白 (0.5 μ g/ml) 刺激、或用野生型鼠伤寒沙门氏菌或沙门氏菌 fliC⁻/fliJ⁻ 双突变 (MOI50) 感

染。在处理或感染指定的时间后,在冰冷的 PBS 中回收 HT29 细胞,在 Trizol 中裂解细胞沉淀,纯化 RNA,并用其制备第一链 cDNA 链(见实验步骤)。cDNA 水溶液用于半定量 RT-PCR 反应中,使用 IL1 α 、IL1 β 、IL-8、TNF α 、MCP1 和 β 肌动蛋白基因特异性引物(根据要求提供序列),在含溴化二氢乙苯啡啶的 1.2% 的琼脂糖凝胶的上分离产物。已知的 NF- κ B 靶基因 IL1 β 、IL-8、TNF α 、MCP1 的表达在对 TNF α 或纯化的鞭毛蛋白暴露的反应中增加(图 6C)。野生型沙门氏菌感染也能导致这些基因的激活,尽管相比之下 TNF α 、MCP1 的表达是短暂的,发生在感染之后。沙门氏菌 fliC⁻/fliJ⁻ 双突变不能诱导 IL-1 β 、IL-8 和 TNF α 的表达,但是可诱导 MCP1 的表达,尽管水平比野生型沙门氏菌低,而且, MCP1 的表达不是暂时的而是持续整个时间(9h)(图 6C)。作为内部标准的 β 肌动蛋白的表达水平用于比较。有趣的是,在所有的处理激发的 HT29 细胞在反应中都刺激了非 NF- κ B 靶基因, IL-1 α 。很明显,沙门氏菌 fliC⁻/fliJ⁻ 双突变能激活其他不知道的信号途径,导致 IL-1 α 的表达。

[0168] 实施例 6

[0169] 鞭毛蛋白以 MyD88- 依赖的方式激活 NF- κ B DNA 结合

[0170] 由于鞭毛蛋白能够激活与促炎症基因激活一致的需要的信号途径,这种活性与细胞因子激活相关,如 TNF α 激活所有存在其细胞表面受体的细胞(见图 1 和图 5C 中的 p65[RelA] 核定位),我们决定检测 Toll 类受体其是已知的病原识别受体在暴露于鞭毛蛋白是激活 NF- κ B 途径的潜力。为了检测这种假说,我们检测了表达腺病毒的显性负性 MyD88(aa152-296)(47) 在 HT29 细胞中鞭毛蛋白诱导的 NF- κ B 激活中的作用。MyD88 是 IL-1 受体和所有已知 TLR 利用的转接蛋白,TLR 通过他们的细胞质信号区与 IL-1 同源,在 NF- κ B 途径的立即激活中是必须的(48,49)。DN-MyD88 在 HT29 细胞中的表达阻滞了 EMSA 检测到的在 IL-1 或暴露于鞭毛蛋白的反应中的 NF- κ B DNA 结合活性的激活,与 TLR 介导的 NF- κ B 的激活作用一致。为了进一步检测这种可能性,我们开始使用野生型、MyD88^{-/-} 和 TLR2^{-/-}/TLR4^{-/-}-MEF(从日本大阪大学 S. Akira 得到的礼物)证实 MyD88 的作用,并检测两种 TLR 对鞭毛蛋白反应或对直接的野生型沙门氏菌感染导致 NF- κ B 激活的有效作用(图 7)。在野生型和 TLR 缺陷 MEFs 中,野生型沙门氏菌感染有效地激活 NF- κ B(泳道 2 和 5),但这种激活在 MyD88 缺陷的 MEFs 中缺失(泳道 10)。用浓缩的灭菌过滤的野生型柏林沙门氏菌或双 SopE⁻/SopB⁻ 同源突变柏林沙门氏菌 SE15B2 株培养液激发的所有三种细胞,在野生型 MEF 和 TLR2/4 双缺陷细胞中激活 NF- κ B,而在 MyD88 缺陷细胞中不能激活 NF- κ B(比较泳道 11、12 与泳道 3,4,6,7,16 和 17)。在野生型 MEF 中暴露与纯化的鞭毛蛋白(0.5 μ g/ml)有力地激活 NF- κ B,因而消除了 LPS 在这些实验中在 NF- κ B 的激活中起作用的可能性。也可通过 TLR2/4 双缺陷 MEF 的有力激活排除 LPS 作为 NF- κ B 激活剂的可能性(泳道 16 和 17)。TLR2 和 4 分别对细菌脂肽、肽聚糖、某些 LPSs 和 γ 阴性 LPS 发生反应(50-52)。IL-1 刺激证实了在 IL-1 传递和鞭毛蛋白介导的信号中需要 MyD88 的功能。

[0171] 为了进一步确定 TLRs 在鞭毛蛋白识别中的作用,我们分析了 TLRs 过度表达在通常对鞭毛蛋白反应弱的细胞中激活 NF- κ B 的能力。选择对纯化鞭毛蛋白轻度反应的细胞可以保证鞭毛蛋白使用的信号成分和转接器的存在和功能,限制性因子看起来仅仅是对鞭毛蛋白反应的受体。我们发现 HeLa 细胞和 HEK293 细胞对 IL-1 反应激活 NF- κ B DNA 结合活性,而对暴露于鞭毛蛋白反应弱,我们选择 HEK293 细胞进一步使用,是因为他们有更强的转染效率。氨基末端 FLAG 决定簇标记的 TLR1-9(Yale Univ. 和 R. Ulevitch, TSRI

的 R. Medzhitov 来的礼物) (42, 43) 在 HEK293 细胞瞬时转染后与 2x-NF- κ B- 依赖的启动子启动的荧光素酶受体基因一起过度表达, 确定了在未处理、鞭毛蛋白 (0.5 μ g/ml) 或 TNF α (10ng/ml) 的反应中的荧光素酶的表达。TLR5 是唯一的一种其表达导致可见的鞭毛蛋白激发细胞反应的 TLR (见表 1)。

[0172] 为了进一步确定 TLR5 作为 TLR 通过其鞭毛蛋白激活 NF- κ B 的可能性, 我们通过去除每个 TLR 的羧基部分使其成为 TIR 结构域的保守的色氨酸来构建显性负性信号突变。IL-1 受体中相似的突变取消了其导致 NF- κ B 活性的能力 (54, 55)。每一个 DN-TLR 和反义 TLR5 克隆 (AS-TLR5) 被克隆到哺乳动物表达载体 pCDNA3.1 (Invitrogen)。所有的突变蛋白很好的表达。每一个 DN-TLR 哺乳动物表达载体和具有 2xNF- κ B Luc 的空载体如上所述被转染到对鞭毛蛋白反应好的 HT29 细胞中。不转染的细胞未处理、用 TNF α (10ng/ml) 或纯化的鞭毛蛋白 (0.5 μ g/ml) 刺激。观察到受体基因表达不被对转染细胞 TNF α 刺激反应的 DN-TLR 表达影响 (图 8A); 可是, 仅表达 DN-TLR5 或反义 TLR5 构建分别导致了接近 50% 和 25% 的鞭毛蛋白介导的受体基因活性的抑制 (图 8B), 而 DN-TLR2 也被发现可中度抑制鞭毛蛋白介导的受体表达。这些结果意味着 TLR5 是细胞表面识别鞭毛蛋白并启动导致 NF- κ B 活性的信号途径的一部分。DN-TLR2 在 NF- κ B 依赖的受体基因激活中的作用可以是非特异的, 因为与其它 DN-TLRs 相比, 它的表达也抑制了 TNF α 介导的受体激活。DN-TLR2 还可以竞争 TLR2 和 TLR5 享有的未知的转接器蛋白。在任何情况下, TLR2 和 TLR4 如图 7 的结果所示在鞭毛蛋白介导的 NF- κ B 的激活中不是必要的。

[0173] 实施例 7

[0174] 鞭毛蛋白介导的 NF- κ B 激活导致增加的 TLRs 系列的表达

[0175] 用鼠伤寒沙门氏菌或纯化的鞭毛蛋白刺激小肠上皮细胞导致促炎症基因的激活 (图 6C)。我们希望检测在鞭毛蛋白刺激的细胞中 TLR 基因表达是否也被改变。用纯化的鞭毛蛋白 (0.5 μ g/ml) 处理 HT29 细胞, 从未处理的和刺激三小时后的处理细胞分离总 RNA, 用于合成第一链 cDNA。使用每种 TLR 的特定的基因特异性引物进行半定量 RT-PCR, 用从未刺激的和鞭毛蛋白刺激的细胞中制备第一链 cDNA, 用于合成 DNA 产物, 在含有溴化二氢乙苯啡啶的 1.2% 琼脂糖凝胶上分离该 DNA 产物。在鞭毛蛋白刺激后 TLRs 2、3、7 的表达增加 (图 9)。其它 TLRs 的表达模式不变, β 肌动蛋白用于内部对照。

[0176] TLR5 在对鞭毛蛋白反应不好的细胞中表达。此研究和其他 (22, 33) 鉴别出 TLR5 可能与 TLR 一样通过鞭毛蛋白激活 NF- κ B。先前的报道并没有确定细胞中 TLR5 的存在或量, 以用于确定他的功能 (22, 23)。我们希望确定在不能对鞭毛蛋白的激发产生反应或反应弱的细胞中 TLR5 蛋白是不存在还是大大降低。在许多细胞系中用免疫印迹分析检测 TLR5 充分度, 使用 TLR5 特异性抗体并与纯化鞭毛蛋白诱导的从其制备的 WCEs 的 NF- κ B DNA 结合活性相比较。小肠上皮细胞系 T84 和 HT29 被用作肺腺癌细胞系 A549, 人宫颈腺癌细胞系 HeLa, 表达大 T 抗原的人胚胎肾细胞系 HEK293, 和胶质细胞瘤细胞系 T98G。用 TLR5 特异的抗体通过免疫印迹在所有的细胞中检测 TLR5 蛋白 (图 10A)。T84 细胞系表现出最丰富, 而其他细胞系的表达水平相似, 区别不超过 2 倍 (图 10A)。从每种细胞系制备的 WCEs 中通过 EMSA 分析在未刺激细胞、TNF α 和鞭毛蛋白刺激的细胞中的 NF- κ B DNA 结合活性 (图 10B)。HT29 和 A549 细胞对鞭毛蛋白和 TNF α 刺激反应强烈, 而 HeLa、293T 和 T98G 细胞对鞭毛蛋白刺激反应弱 (HeLa, 293T) 或没反应 (T98G)。NF- κ B DNA 结合复合物的确实

性用 p65 特异的抗体对超迁移 NF- κ B DNA :蛋白质复合物检测。令人感兴趣的是表达 TLR5 的一些细胞完全不反应或反应非常弱。这可能是由于缺乏胞膜或胞内受体、这些细胞系中的 TLR5 基因的失活或有害的突变或所需的联合受体或转接器蛋白的缺乏或量少（如在一些细胞中的 TLR4 和它的联合受体 / 转接器 MD2 (30, 56, 57)）。在所有检测的细胞系中 IL-1 能激活 NF- κ B DNA 结合活性, MyD88 下游至 NF- κ B 的信号器好像是完整的。

[0177] 实施例 8

[0178] 重组鞭毛蛋白的分离

[0179] 为了确定重组鞭毛蛋白能诱导 NF- κ B, 用携带 NF- κ B 反应荧光素酶 (luc) 的报告细胞检测其活性。报告构建含有 3 个来自结合 Hsp70 最小启动子的 E- 选择子启动子的 NF- κ B 结合位点, 通常被用于检测 NF- κ B。向介质中加入鞭毛蛋白 6 小时后在细胞裂解液中检测荧光素酶活性。用 TNF α 作阳性对照。结果分别在图 13 中显示, 表明重组鞭毛蛋白能够激活 NF- κ B。

[0180] 实施例 9

[0181] 鞭毛蛋白延迟 IR 诱导的 GI 症状引起的小鼠死亡

[0182] 如上所述, 鞭毛蛋白是 NF- κ B 潜伏的激活剂, 推断其能作为凋亡死亡抑制剂发挥作用。由于能诱导 NF- κ B 的细胞因子可作为辐射防护剂发挥作用, 我们检测了鞭毛蛋白能否作辐射防护剂。

[0183] 小鼠全身受辐射 15Gy γ 射线辐射可导致 8 天内死于肠道症状 (见上), 提供一个常规的辐射诱导肠道损伤的模型中。为了检测鞭毛蛋白能否防护 IR 的 GI 症状, 我们检测了受辐射 15Gy 后小鼠死亡的动力学中静脉注射鞭毛蛋白的作用。我们用了各种计量的鞭毛蛋白, 其明显低于文献报道的最大耐受量 (300 μ g / 小鼠, Eaves-Pyles, T. 等, 2001b)。处理 4 小时后照射。结果分别在图 14 中表示。如所预期的, 对照受辐射小鼠 (静脉注射 PBS) 处理后 5-8 天死亡, 而接受鞭毛蛋白的动物存活明显延长; 存活的延长与鞭毛蛋白的剂量有关。照射 7 天后小肠的病理形态学分析表明鞭毛蛋白处理组与对照组的显著差异 (图 15)。静脉、腹腔、和皮下注射 0.2mg/kg 的鞭毛蛋白后受 13Gy 辐射提供了相似的防护作用, 导致小鼠 30 天的生存率为 85-90% (数据未显示)。如上所示用 13Gy 的射线和各种给药途径进行实验确定最优计量。

[0184] 实施例 10

[0185] 鞭毛蛋白拯救了 IR 诱导的造血症状致死的小鼠

[0186] 下一步我们检测了鞭毛蛋白对由于 HP 症状导致的 IR 诱导的死亡是否有效, 辐射通过较低实验性辐射剂量引起的 (通常最多 11Gy), 其不能引起致死的 GI 毒性。实验与上述的相似 (图 14 和 15), 只是没用 15Gy, 小鼠接受了 10Gy 的照射, 此剂量在对照组中第 13 天 100% 杀死小鼠 (图 16)。鞭毛蛋白处理组 (5 μ g / 小鼠) 显示出对此剂量 IR 的完全的防护, 表明鞭毛蛋白介导的射线防护不仅抗 GI, 也抗 IR 诱导的 HP 症状。

[0187] 实施例 11

[0188] 鞭毛蛋白防护作用的时间依赖

[0189] 为了评估鞭毛蛋白射线防护活性在治疗时间上的依赖性, 在 13Gy γ 射线照射前不同时间注射小鼠。其中的一个结果在图 17 中表示。得到的结果表明照射前 1-4 小时注射对 13Gy 的射线防护有效, 如果照射前 24 小时注射则无效。

[0190] 为了评估鞭毛蛋白射线防护活性在治疗时间上的依赖性,在相对 γ 射线的不同时间点上注射。如上所述进行实验,每只小鼠腹腔注射 $5 \mu\text{g}/\text{小鼠}$ ($0.2\text{mg}/\text{kg}$) 的 CBLB501 或对照小鼠,注射 $5 \mu\text{g}/\text{小鼠}$ ($0.2\text{mg}/\text{ml}$) 的细菌 RNA 多聚酶。在 NIH 瑞士株小鼠上进行实验。结果表明如果在处理前 1-2 小时注射,鞭毛蛋白 501 可在 13Gy 照射后提供大约 90% 的生存 (图 17)。为了清楚仅做了 -1 小时的曲线,可是,两个时间点 (-1 和 -2 小时) 提供相似的生存率和动力学。4 小时的时间点显示一些防护的下降。放射 24 小时前注射鞭毛蛋白对 13Gy 诱导的死亡没有防护作用。

[0191] 有趣的是,10Gy γ 射线照射前 24 小时投药鞭毛蛋白提供 100% 的防护。而 13Gy 照射在小鼠中主要由 GI 症状诱导死亡,10Gy 诱导的死亡多数是由造血症状介导的。从而,这种对 10Gy 照射的长期的保护可能是通过鞭毛蛋白和 / 或长期二级细胞因子诱导的增强的造血干细胞的增殖或生存介导的。

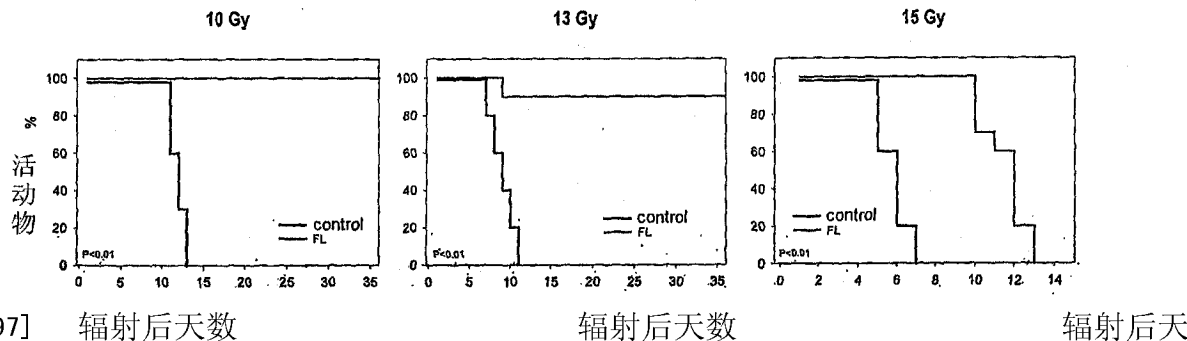
[0192] 实施例 12

[0193] 确定鞭毛蛋白的 $\text{LD}_{50/30}$ 、 $\text{LD}_{50/7}$ 和 DMF

[0194] 我们得到了鞭毛蛋白的放射剂量依赖防护评估。如上所示 (图 17),用鞭毛蛋白处理的能够 100% 防护 10Gy γ 射线 (此剂量引起造血症状的死亡),对 13Gy 30 天的生存为 90% (造血和 GI 综合症)。如上所述进行实验,放射 1 小时前用鞭毛蛋白 $5 \mu\text{g}/\text{小鼠}$ ($0.2\text{mg}/\text{kg}$) 腹腔注射。

[0195] 可是,在 15Gy,7 天生存率为 100%,死亡延迟到 13 天之后,(30 天的生存率为 0%),而对照组第 7 天全部死于 GI 综合症。

[0196]



[0197] 辐射后天数

辐射后天数

辐射后天数

数

[0198] 图 8, CBLB501 在小鼠对全身 γ 射线量 10、13、15Gy 的敏感性上的效果 (详见本文)。

[0199] (图 18) 15Gy 照射后 CBLB-501 处理组的死亡的动力学治疗组死亡率为使人想起对照组在 10Gy 的死亡率,暗示死亡由造血综合症引起。此结果提供了鞭毛蛋白 $\text{LD}_{50/30}$ 在大约 13.5-14Gy 和大约 1.75-1.8 的 DMF_{30} 的评估。此放射防护水平显著高于报道的任何天然化合物。

[0200] 表 1

[0201] TLR5 对鞭毛蛋白反应并激活 NF- κ B

[0202] 用空载体 (pCDNA3.1) 或独自列出的野生型 TLR 等位基因在 6 孔平板中转染 293T 细胞,重复三次。细胞未处理 (未刺激)、TNF α ($10\text{ng}/\text{ml}$) 或鞭毛蛋白 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 处理。通过将相对于到对照 Renilla 荧光素酶活性表达标准化调整 NF- κ B 报告活性,通过处理细胞

的报告基因活性 / 未刺激细胞的报告基因活性计算诱导倍数。ND 为未测定。

[0203]

	未刺激	TNF	FliC
载体	1	13.5	4.9
TLR1	1.7	ND	5.1
TLR2	1.6	ND	5.3

[0204]

TLR3	1.5	ND	5.0
TLR4	1.8	ND	5.4
TLR5	1.6	ND	9.2*
TLR7	1.5	ND	5.2
TLR8	1.4	ND	5.0
TLR9	1.5	ND	5.1

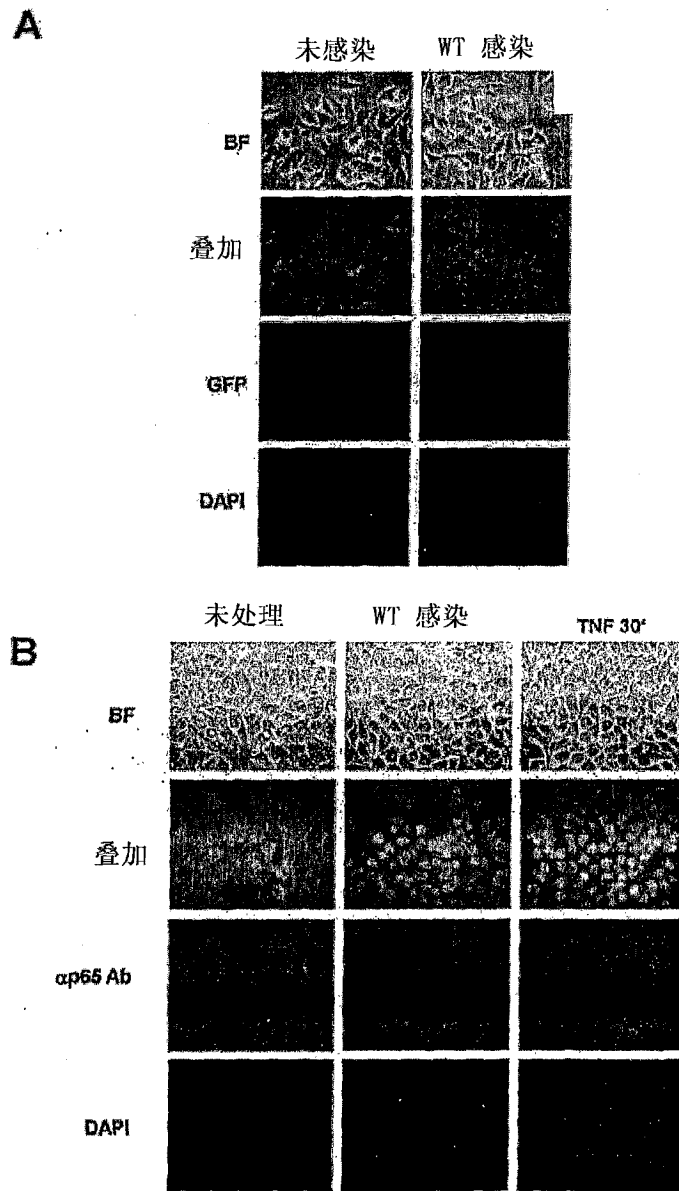


图 1

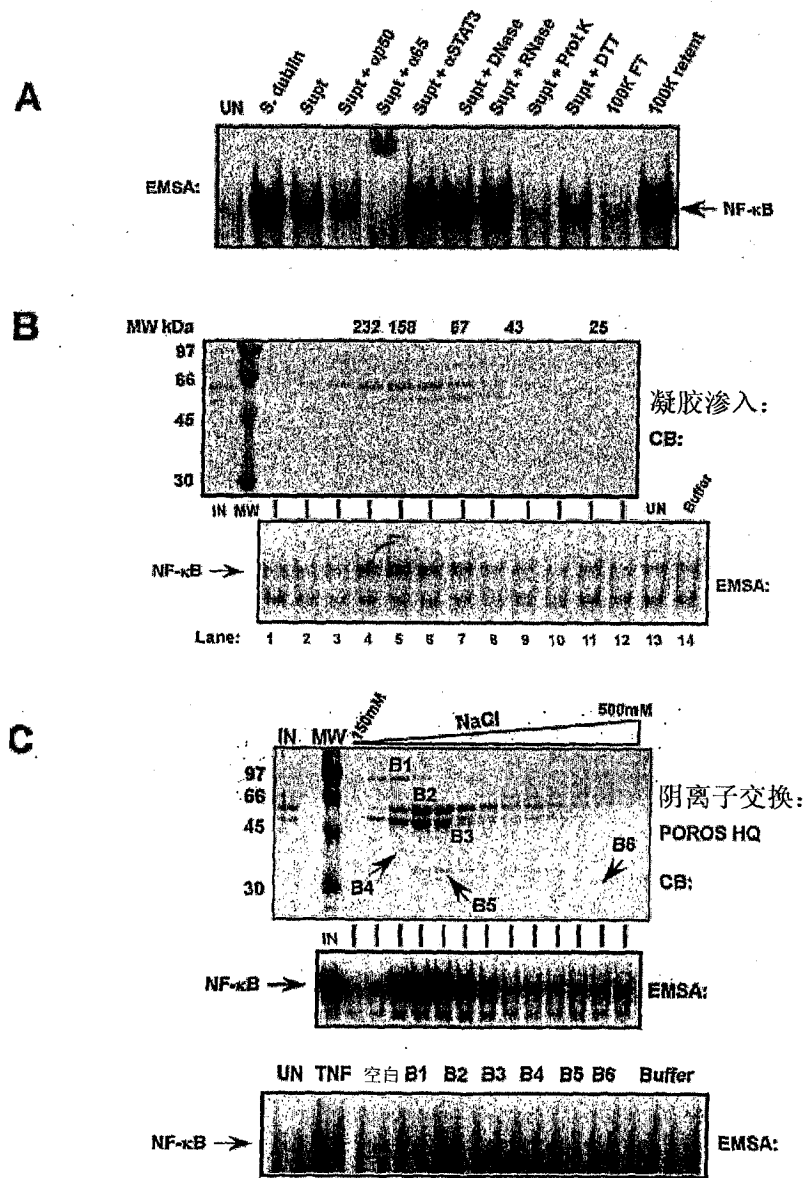


图 2

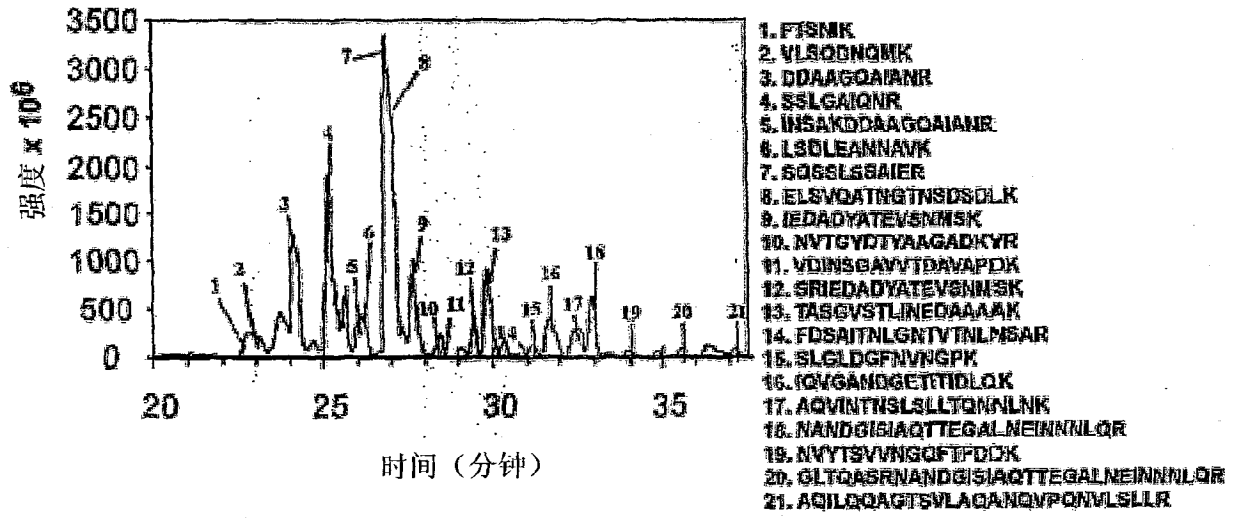


图 3

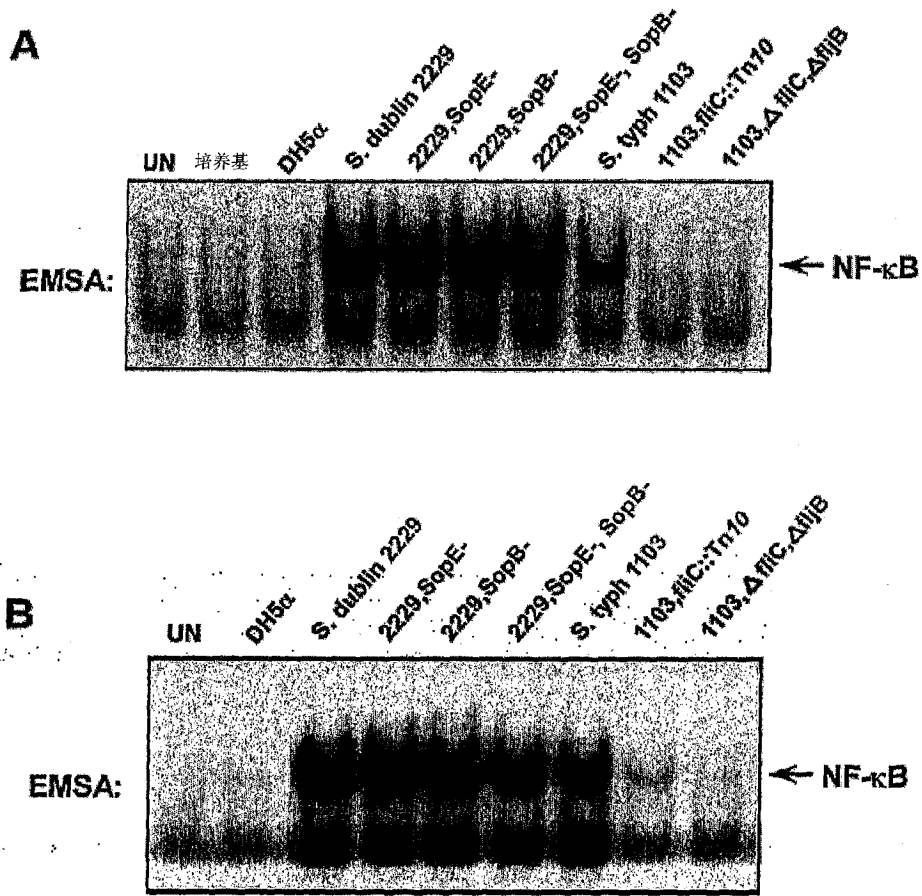


图 4

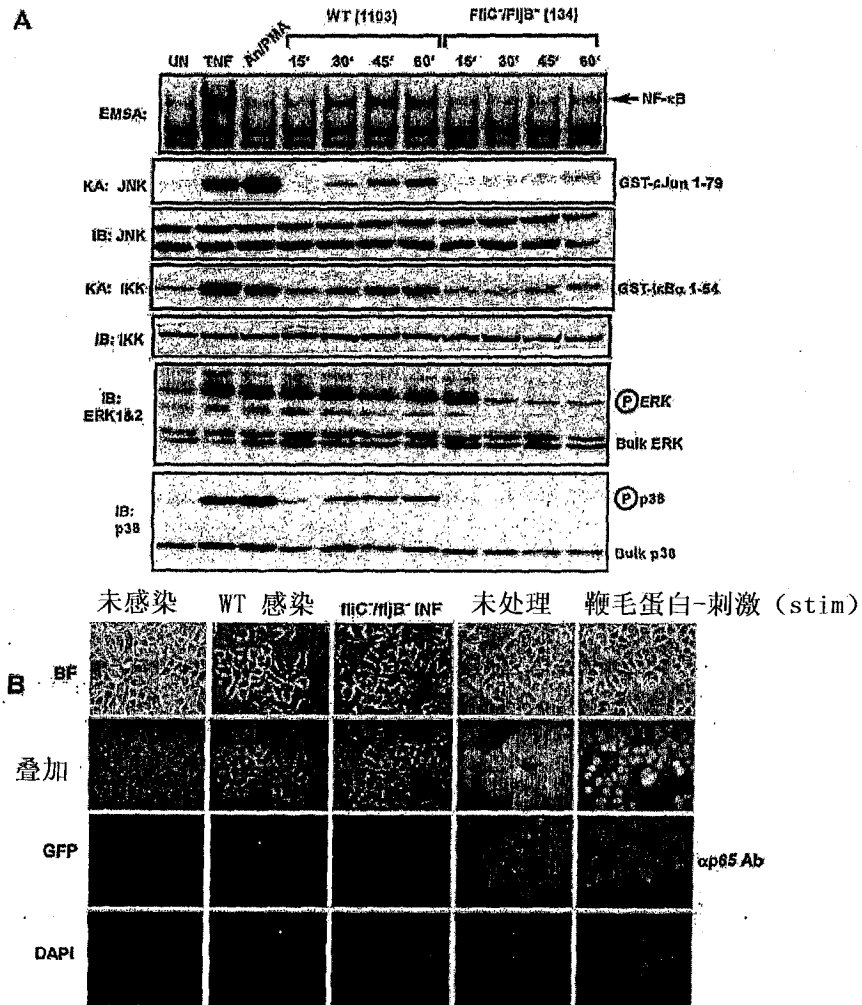


图 5

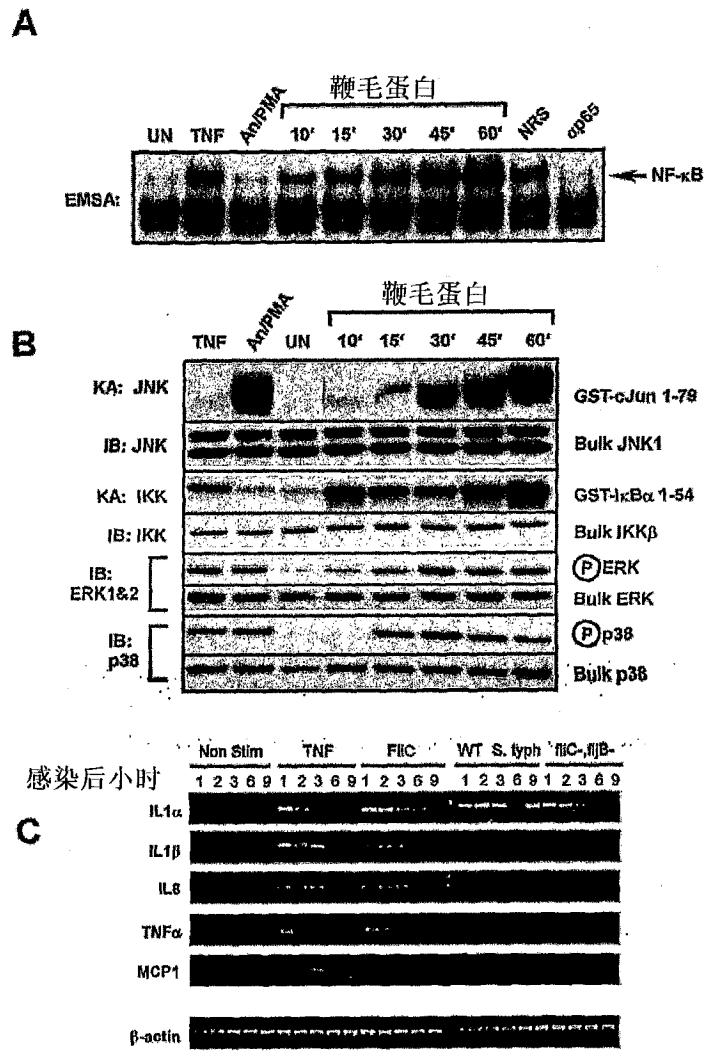


图 6

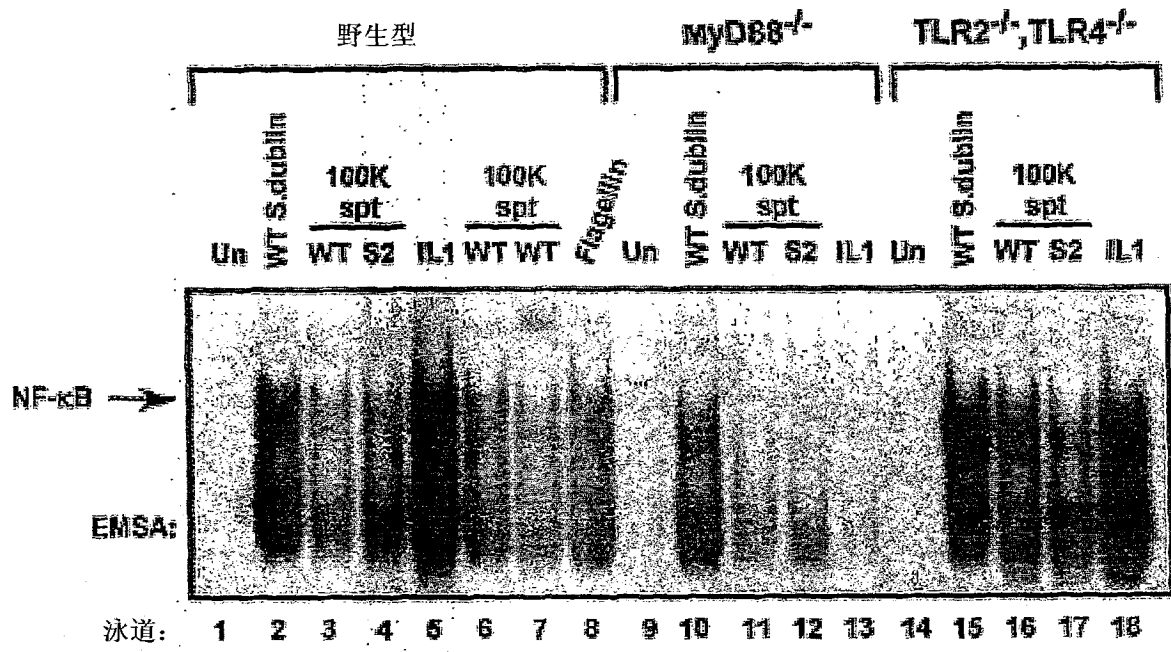


图 7

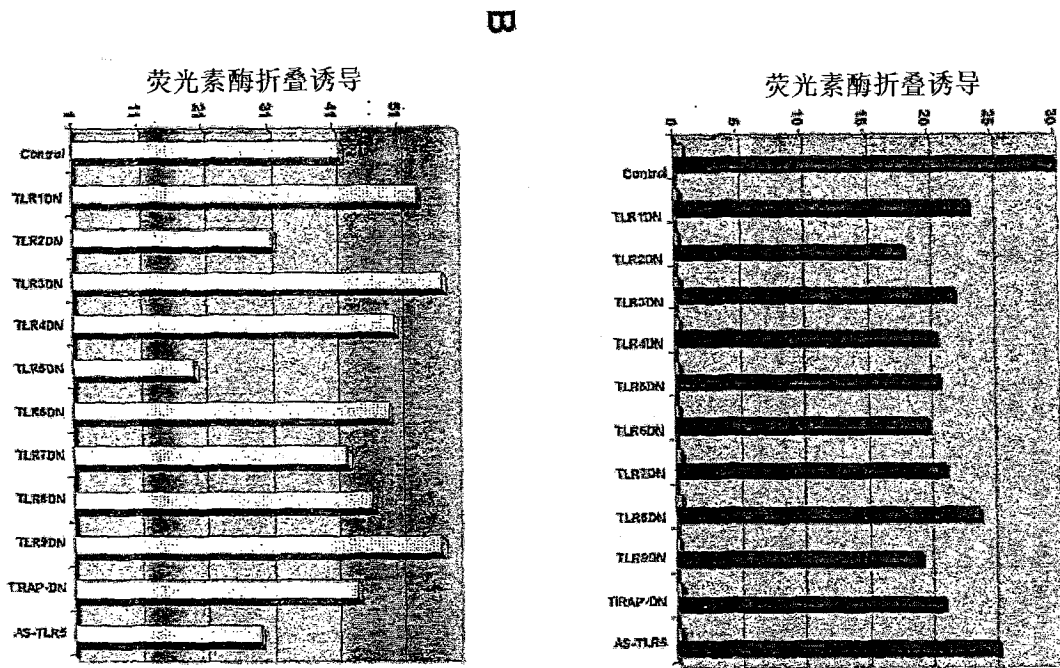


图 8

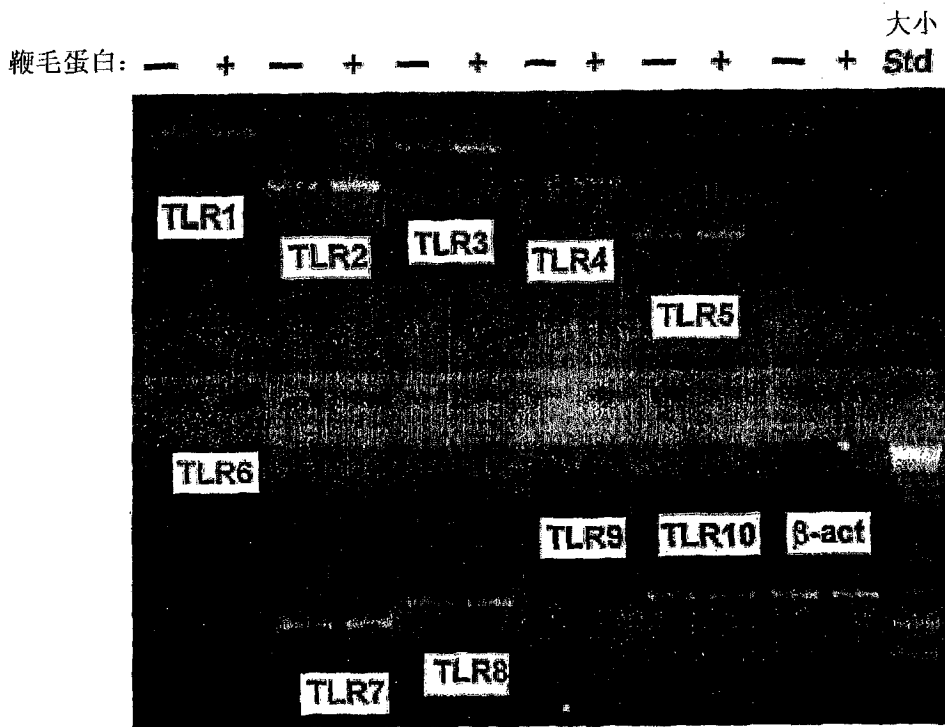


图 9

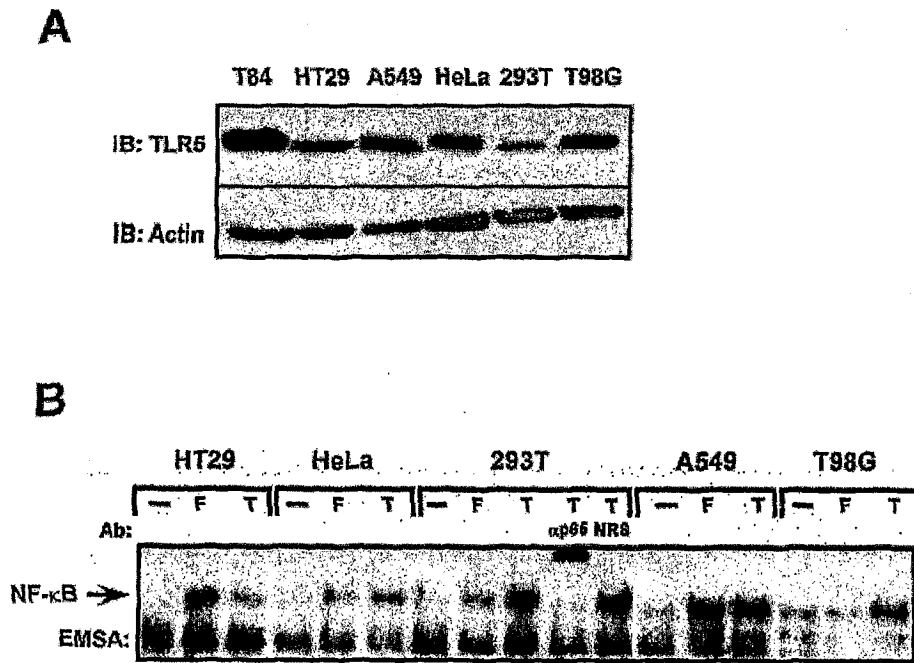


图 10

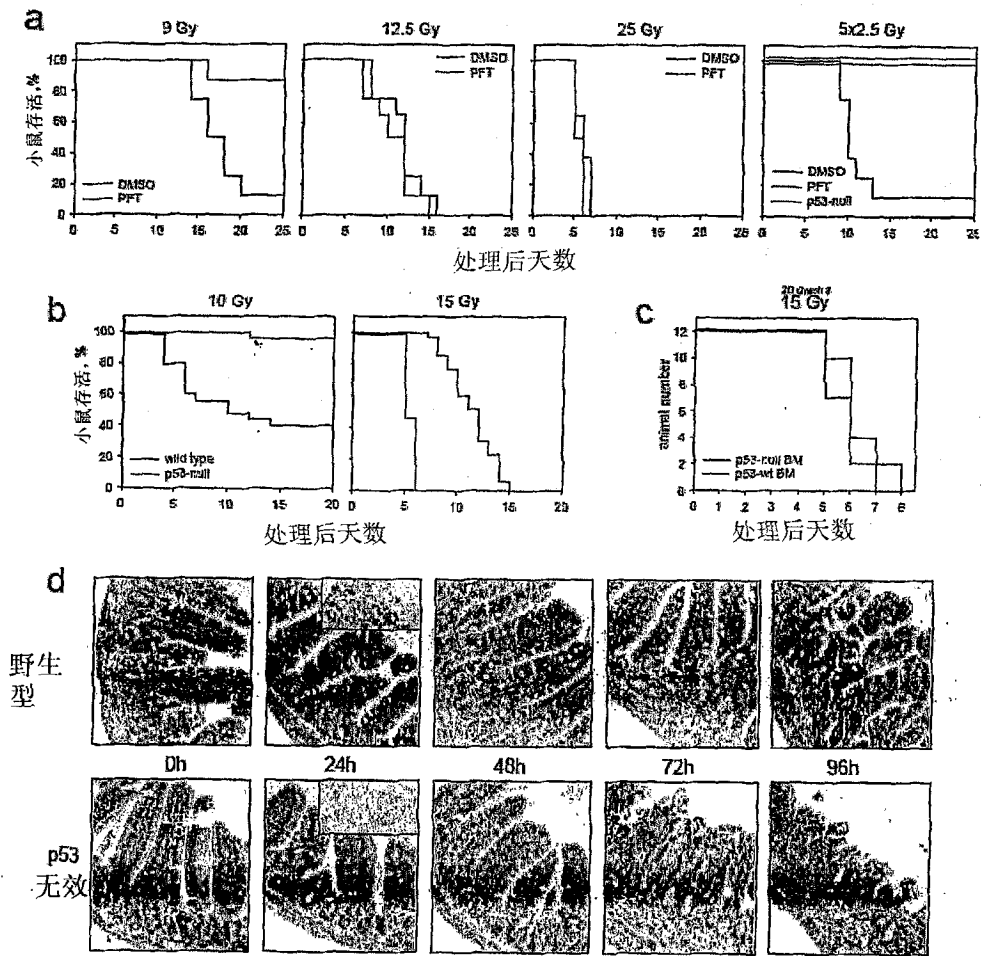


图 11

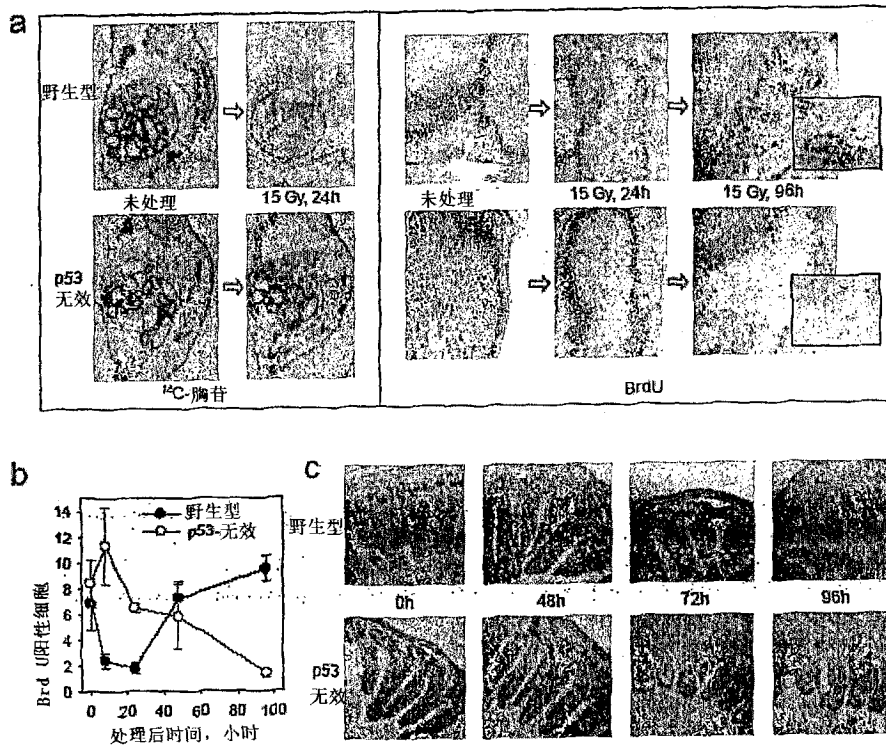


图 12

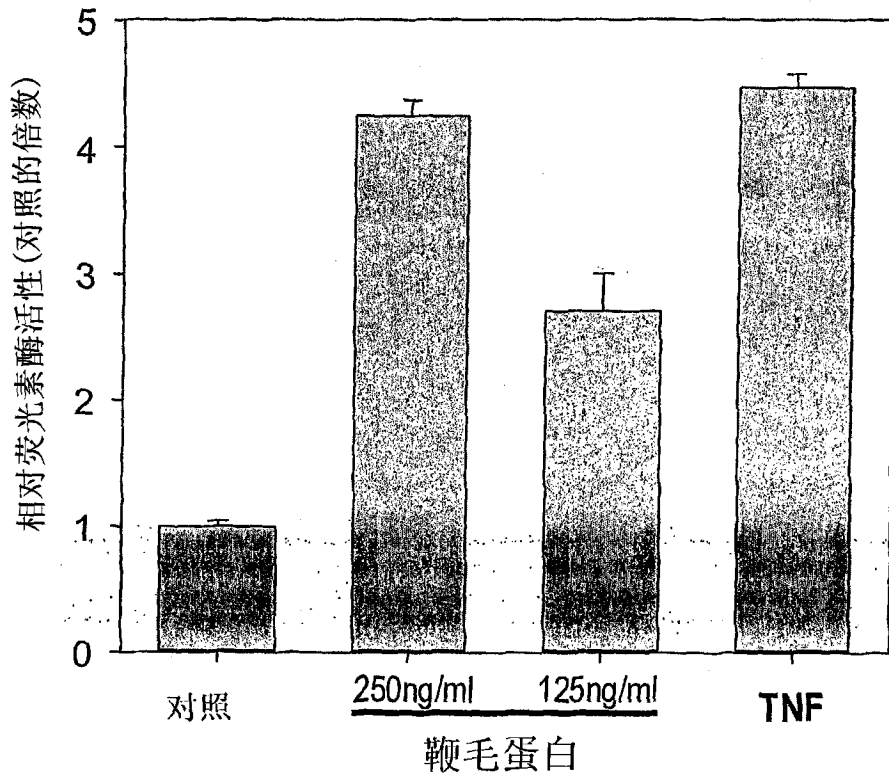


图 13

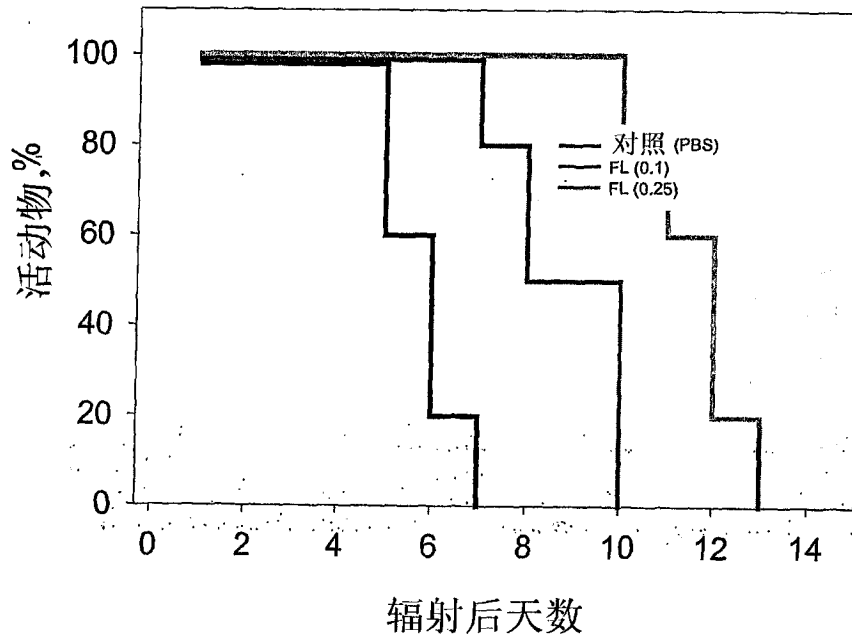


图 14

小肠, 第7天

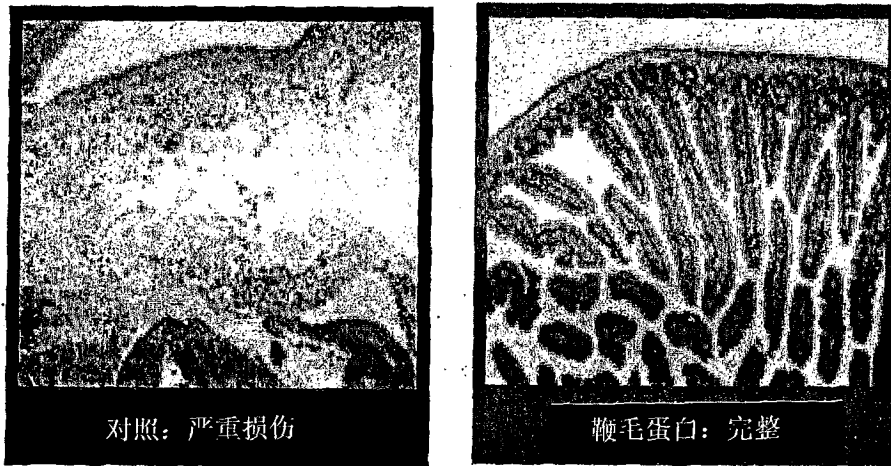


图 15

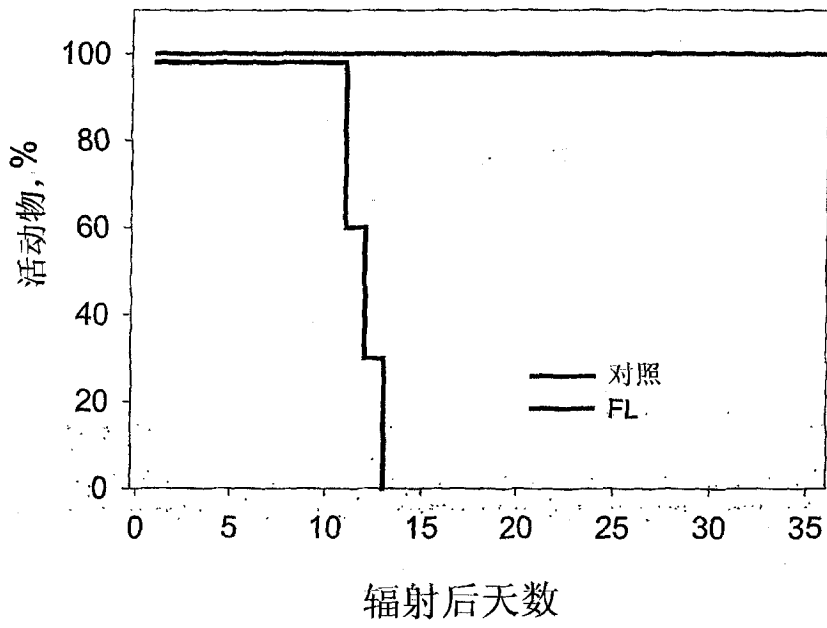


图 16

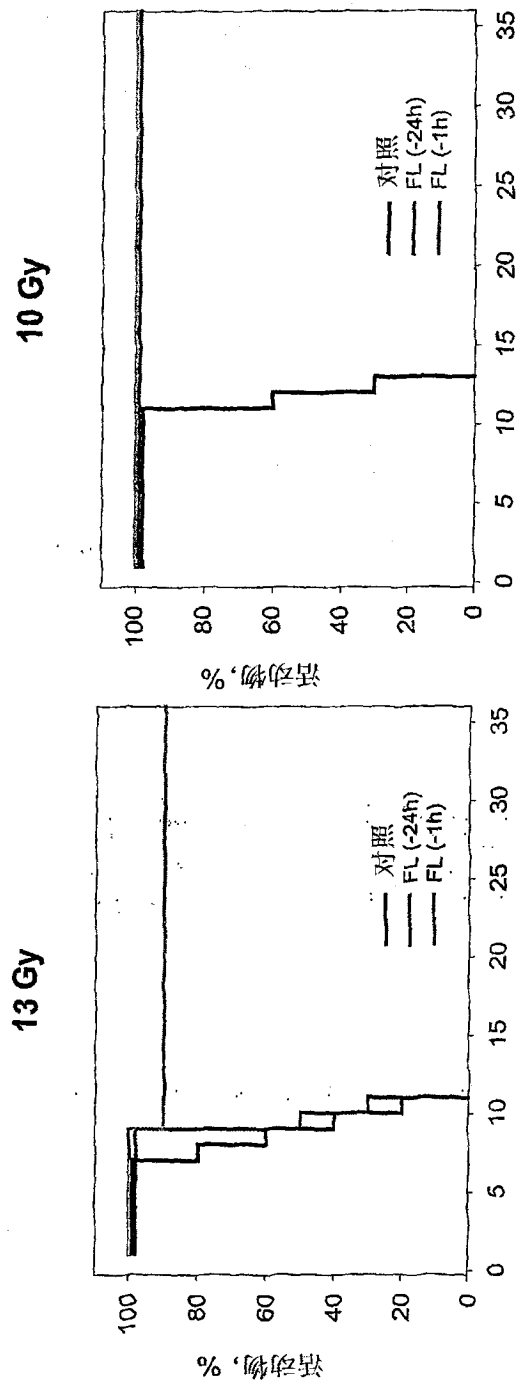


图 17

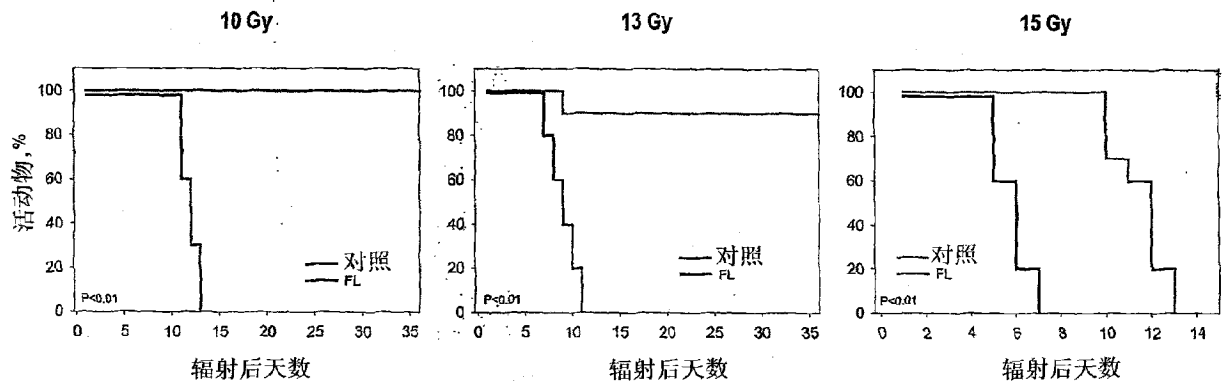


图 18

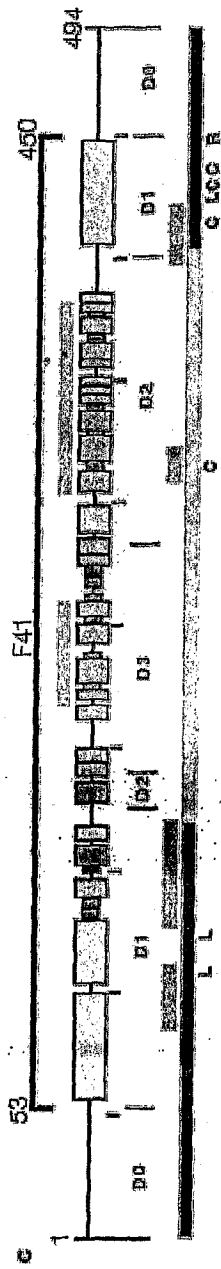


图 19