



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106102761 A

(43)申请公布日 2016. 11. 09

(21)申请号 201580015029.X

(22)申请日 2015.02.06

(30)优先权数据

2014-022041 2014.02.07 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.09.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/053415 2015.02.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/119253 JA 2015.08.13

(71)申请人 宫崎彻

地址 日本东京都

(72)发明人 宫崎彻

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 杨思捷

(51)Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/15(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书3页 说明书40页

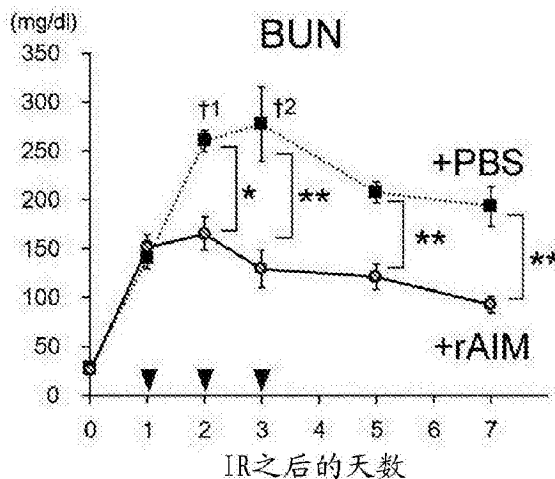
序列表8页 附图25页

(54)发明名称

用于肾疾病的预防或治疗剂

(57)摘要

本发明提供了:肾疾病的预防或治疗剂,其含有AIM或其部分肽、或含有编码它们的碱基序列的核酸;或用于筛选肾疾病的预防或治疗剂的方法,其包括使用如下得到的动物:对AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻或短暂肾缺血/再灌注。



1. 肾疾病的预防或治疗剂,其包含AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸。

2. 肾疾病的预防或治疗剂,其包含诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物。

3. 根据权利要求1或2所述的药剂,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

4. 根据权利要求1-3中的任一项所述的药剂,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭。

5. 根据权利要求1-4中的任一项所述的药剂,其中所述预防或治疗的受试者是人。

6. 根据权利要求1-4中的任一项所述的药剂,其中所述预防或治疗的受试者是猫。

7. 根据权利要求6所述的药剂,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM。

8. 根据权利要求7所述的药剂,其中所述结合猫IgM的AIM或其部分肽含有小鼠衍生的AIM的SRCR3结构域。

9. 肾疾病的预防或治疗剂的筛选方法,所述方法包括使用如下得到的动物:对AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注。

10. 根据权利要求9所述的方法,所述方法包括下述步骤:

(1) 在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下,将测试物施用给AIM表达缺陷型非人哺乳动物的步骤,

(2) 观察给其施用测试物的AIM表达缺陷型非人哺乳动物的下述性能的任意一项或多项的步骤:

(i) 坏死肾小管细胞和肾实质纤维化的积累,

(ii) 肾小球结构的崩解和纤维化,

(iii) 肾中炎症性细胞因子的表达水平,

(iv) 肾中巨噬细胞的比率,

(v) BUN值,

(vi) 存活率,

(3) 选择与不施用测试物情况下的那些相比改善上述特性中的任意一项或多项的测试物的步骤。

11. 根据权利要求9或10所述的筛选方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

12. 肾疾病的预防或治疗剂的预防或治疗效果的评价方法,其包括使用如下得到的动物:对AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注。

13. 根据权利要求12所述的评价方法,所述方法包括下述步骤:

(1) 在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下,将肾疾病的预防或治疗剂施用给AIM表达缺陷型非人哺乳动物的步骤,

(2)观察给其施用肾疾病的预防或治疗剂的AIM表达缺陷型非人哺乳动物的下述性能的任意一项或多项的步骤:

- (i)坏死肾小管细胞和肾实质纤维化的积累,
- (ii)肾小球结构的崩解和纤维化,
- (iii)肾中炎症性细胞因子的表达水平,
- (iv)肾中巨噬细胞的比率,
- (v) BUN值,
- (vi)存活率,

(3)通过将上述特性中的任意一项或多项与不施用肾疾病的预防或治疗剂的情况下的那些进行对比来评价肾疾病的预防或治疗剂的作用的步骤。

14. 根据权利要求12或13所述的评价方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

15. 预测具有肾疾病的患者的预后的方法,所述方法包括测量受试者的样品中AIM的浓度。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述样品是血液或血清。

17. 根据权利要求15或16所述的方法,其中所述AIM浓度的测量方法是使用抗-AIM抗体的免疫学方法。

18. 根据权利要求15-17中的任一项所述的方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

19. 急性肾衰竭的测试方法,所述方法包括测量受试者的样品中AIM的浓度。

20. 根据权利要求19所述的测试方法,其中所述样品是尿。

21. 根据权利要求19或20所述的测试方法,其中所述AIM浓度的测量方法是使用抗-AIM抗体的免疫学方法。

22. 用于肾疾病的诊断或预后预测的试剂盒,其包含下述(a)或(b):

- (a)可与AIM基因的转录产物杂交的核酸探针或核酸引物,和/或
- (b)针对AIM的抗体。

23. 根据权利要求22所述的试剂盒,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

24. 一种用于预防或治疗肾疾病的方法,所述方法包括给受试者施用有效量的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸。

25. 一种用于预防或治疗肾疾病的方法,所述方法包括给受试者施用有效量的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物。

26. 根据权利要求24或25所述的方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

27. 根据权利要求24-26中的任一项所述的方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性

肾衰竭。

28. 根据权利要求24-27中的任一项所述的方法,其中所述预防或治疗的受试者是人。

29. 根据权利要求24-27中的任一项所述的方法,其中所述预防或治疗的受试者是猫。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM。

31. 用于预防或治疗肾疾病的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸。

32. 根据权利要求31所述的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

33. 根据权利要求31或32所述的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭。

34. 根据权利要求31-33中的任一项所述的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述预防或治疗的受试者是人。

35. 根据权利要求31-33中的任一项所述的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述预防或治疗的受试者是猫。

36. 根据权利要求35所述的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM。

37. 用于预防或治疗肾疾病的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物。

38. 根据权利要求37所述的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

39. 根据权利要求37或38所述的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭。

40. 根据权利要求37-39中的任一项所述的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述预防或治疗的受试者是人。

41. 根据权利要求37-39中的任一项所述的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述预防或治疗的受试者是猫。

42. 根据权利要求41所述的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM。

43. AIM或其部分肽或包含编码它们的碱基序列的核酸或诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物用于生产肾疾病的预防或治疗剂的用途。

44. 根据权利要求43所述的用途,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病。

45. 根据权利要求43或44所述的用途,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭。

46. 根据权利要求43-45中的任一项所述的用途,其中所述预防或治疗的受试者是人。

47. 根据权利要求43-45中的任一项所述的用途,其中所述预防或治疗的受试者是猫。

48. 根据权利要求47所述的用途,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM。

## 用于肾疾病的预防或治疗剂

### [0001] [技术领域]

本发明涉及用于肾疾病等的预防或治疗剂。

### [0002] [背景技术]

由于近年来生活环境的变化,具有肾疾病的患者的数目正在与越来越多的生活方式相关的疾病(诸如高血压、糖尿病、脂质异常等和代谢综合征)一起增加,且在日本约1/8的成年人被认为是具有慢性肾疾病的患者。作为肾疾病进展的结果,当肾功能下降至发展肾衰竭时,肾透析和肾移植变得必要,这形成对于患者的QOL和医学经济而言严重的问题。此外,急性肾衰竭(或急性肾病)是由不同病因(诸如肾缺血、肾毒性毒素、脓毒症等)造成的疾病,具有高长期住院治疗率和高死亡率,并且其发病率在近年来反而增加。已知的是,在非常罕见的病例中,急性肾衰竭不会充分治愈,变成慢性的,且转变成慢性肾衰竭。

[0003] 作为慢性肾疾病的治疗方法,执行药物治疗法、饮食疗法和休息疗法。例如,使用抑制剂、利尿剂、活性维生素D制剂、口服碳质吸附剂制剂、钾吸附剂、磷吸附剂等执行药物治疗法,目的在于延迟疾病的进展和改善与降低的肾功能有关的症状。但是,任何治疗方法不能充分停止疾病的进展,并且已经期望新的治疗方法。另外,不存在急性肾衰竭的可靠治疗方法,且需要治疗方法的快速开发。

[0004] 并且,肾疾病在猫中造成严重问题。慢性肾衰竭最常见地发生在老龄猫中,且据说肾衰竭是老龄猫的死亡的主要原因。几乎所有猫在6-7岁时发生泌尿道结石或泌尿道感染,这会触发肾功能的下降,遭受急性肾衰竭(或急性肾病),且它们中的许多发生慢性肾衰竭并在约15岁之前死亡。也不存在猫的肾疾病的令人满意的治疗方法,且已经需要新治疗方法。

[0005] AIM(巨噬细胞的细胞凋亡抑制剂)是由本发明人鉴别出的巨噬细胞特别地产生的一种因子(非专利文献1),已经提示其与有些疾病相关。例如,由于肥胖,AIM的血液浓度增加,AIM经由CD36通过胞吞作用掺入脂肪细胞中,并诱导积累的中性脂肪的降解(脂解作用),且因此,已经提示与抗肥胖的关联(非专利文献2)。AIM通过中性脂肪的分解从脂肪细胞释放游离脂肪酸,并且释放的脂肪酸经由toII-样受体的刺激在脂肪组织中诱导和维持慢性炎症。尽管代谢综合征是基于胰岛素抗性在肥胖中的获得,由于脂肪组织中的慢性炎症是重要的,认为AIM与代谢综合征有关(非专利文献3)。此外,本发明人澄清,用高热量饮食饲喂的肥胖AIM KO小鼠显示出与肥胖、脂肪肝、肝实质纤维化和致癌作用的人NASH病理学类似的病理学,并且报道了将AIM应用于肝疾病的可能性(专利文献1)。但是,迄今为止尚不知道AIM和肾疾病之间的关联。

### [0006] [文件列表]

#### [专利文献]

专利文献1: WO 2013/162021

#### [非专利文献]

非专利文献1: Miyazaki, J Exp Med 189:413-422, 1999

非专利文献2: Kurokawa, CeII Metab 11:479-492, 2010

非专利文献3: Kurokawa, PNAS 108:12072-12077, 2011。

[0007] [发明内容]

[本发明要解决的问题]

本发明目的在于提供肾疾病的预防或治疗药物。另外,本发明目的在于提供用于评价或筛选肾疾病的预防或治疗药物的新方法等,其使用肾疾病的模型小鼠。此外,本发明的另一个目的是,提供肾疾病的预后的预测方法。

[0008] [解决问题的方式]

本发明人监测了经历单侧输尿管梗阻(UUO)或单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注(IR;缺血/再灌注)的AIM敲除的小鼠的肾的进展,并得到了非常有趣的发现:急性肾衰竭首先发生,并且,随着天数的流逝,在慢性肾疾病中观察到的症状(诸如坏死肾小管细胞和肾实质纤维化的积累,以及肾小球结构的崩解和纤维化)出现。并且,在经历两侧短暂肾缺血/再灌注(IR;缺血/再灌注)的AIM敲除的小鼠中,急性肾衰竭发生,并且证实了坏死肾小管细胞的积累和与其有关的肾病的快速进展、以及总体状况的恶化和高死亡率。另外,当将AIM施用给AIM敲除的小鼠时,BUN值改善,肾功能快速改善,并且与其一起,与其有关的全身症状和死亡率改善。由此认为,AIM的补充会提供急性肾衰竭的治疗以及慢性肾疾病的预防或治疗。

[0009] 本发明的发明人基于这些发现已经进行了进一步研究,并完成了本发明。

[0010] 因此,本发明提供了

[1]肾疾病的预防或治疗剂,其包含AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸;

[2]肾疾病的预防或治疗剂,其包含诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物;

[3]前述[1]或[2]的药剂,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[4]前述[1] - [3]中的任一项的药剂,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭;

[5]前述[1] - [4]中的任一项的药剂,其中所述预防或治疗的受试者是人;

[6]前述[1] - [4]中的任一项的药剂,其中所述预防或治疗的受试者是猫;

[7]前述[6]的药剂,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM;

[8]前述[7]的药剂,其中所述结合猫IgM的AIM或其部分肽含有小鼠衍生的AIM的SRCR3结构域;

[9]肾疾病的预防或治疗剂的筛选方法,所述方法包括使用如下得到的动物:对AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注;

[10]前述[9]的方法,所述方法包括下述步骤:

(1)在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下,将测试物施用给AIM表达缺陷型非人哺乳动物的步骤,

(2)观察给其施用测试物的AIM表达缺陷型非人哺乳动物的下述性能的任意一项或多项的步骤:

(i)坏死肾小管细胞和肾实质纤维化的积累,

(ii)肾小球结构的崩解和纤维化,

- (iii)肾中炎症性细胞因子的表达水平,
- (iv)肾中巨噬细胞的比率,
- (v) BUN值,
- (vi)存活率,

(3)选择与不施用测试物的情况下的那些相比改善上述特性中的任意一项或多项的测试物的步骤;

[11]前述[9]或[10]的筛选方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[12]肾疾病的预防或治疗剂的预防或治疗效果的评价方法,所述方法包括使用如下得到的动物:对AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注;

[13]前述[12]的评价方法,所述方法包括下述步骤:

(1)在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下,将肾疾病的预防或治疗剂施用给AIM表达缺陷型非人哺乳动物的步骤,

(2)观察给其施用肾疾病的预防或治疗剂的AIM表达缺陷型非人哺乳动物的下述性能的任意一项或多项的步骤:

- (i)坏死肾小管细胞和肾实质纤维化的积累,
- (ii)肾小球结构的崩解和纤维化,
- (iii)肾中炎症性细胞因子的表达水平,
- (iv)肾中巨噬细胞的比率,
- (v) BUN值,
- (vi)存活率,

(3)通过将上述特性中的任意一项或多项与不施用肾疾病的预防或治疗剂的情况下的那些进行对比来评价肾疾病的预防或治疗剂的作用的步骤;

[14]前述[12]或[13]的评价方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[15]预测具有肾疾病的患者的预后的方法,所述方法包括测量受试者的样品中AIM的浓度;

[16]前述[15]的方法,其中所述样品是血液或血清;

[17]前述[15]或[16]的方法,其中所述AIM浓度的测量方法是使用抗-AIM抗体的免疫学方法;

[18]前述[15] - [17]中的任一项的方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[19]急性肾衰竭的测试方法,所述方法包括测量受试者的样品中AIM的浓度;

[20] [19]的测试方法,其中所述样品是尿;

[21] [19]或[20]的测试方法,其中所述AIM浓度的测量方法是使用抗-AIM抗体的免疫学方法;

[22]用于肾疾病的诊断或预后预测的试剂盒,其包括下述(a)或(b):

(a)可与AIM基因的转录产物杂交的核酸探针或核酸引物,和/或

(b)针对AIM的抗体;

[23] [22]的试剂盒,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[24]一种用于预防或治疗肾疾病的方法,所述方法包括给受试者施用有效量的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸;

[25]一种用于预防或治疗肾疾病的方法,所述方法包括给受试者施用有效量的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物;

[26]前述[24]或[25]的方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[27]前述[24] - [26]中的任一项的方法,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭;

[28]前述[24] - [27]中的任一项的方法,其中所述预防或治疗的受试者是人;

[29]前述[24] - [27]中的任一项的方法,其中所述预防或治疗的受试者是猫;

[30]前述[29]的方法,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM;

[31]用于预防或治疗肾疾病的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸;

[32]前述[31]的AIM或其部分肽或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[33]前述[31]或[32]的AIM或其部分肽或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭;

[34]前述[31] - [33]中的任一项的AIM或其部分肽或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述预防或治疗的受试者是人;

[35]前述[31] - [33]中的任一项的AIM或其部分肽或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述预防或治疗的受试者是猫;

[36]前述[35]的AIM或其部分肽或包含编码它们的碱基序列的核酸,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM;

[37]用于预防或治疗肾疾病的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物;

[38]前述[37]的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[39]前述[37]或[38]的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭;

[40]前述[37] - [39]中的任一项的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述预防或治疗的受试者是人;

[41]前述[37] - [39]中的任一项的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述预防或治疗的受试者是猫;

[42]前述[41]的诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM;

[43] AIM或其部分肽或包含编码它们的碱基序列的核酸或诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物用于生产肾疾病的预防或治疗剂的用途;

[44]前述[43]的用途,其中所述肾疾病是急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病;

[45]前述[43]或[44]的用途,其中所述肾疾病是急性肾衰竭或慢性肾衰竭;

[46]前述[43] - [45]中的任一项的用途,其中所述预防或治疗的受试者是人;

[47]前述[43] - [45]中的任一项的用途,其中所述预防或治疗的受试者是猫;

[48]前述[47]的用途,其中所述AIM或其部分肽结合猫IgM。

[0011] [本发明的效果]

本发明可以提供肾疾病的预防或治疗剂,其包含AIM等作为活性成分。另外,根据本发明的使用肾疾病模型小鼠的筛选方法,可以探究对于肾疾病的预防或治疗而言有效的物质。另外,使用本发明的肾疾病模型小鼠,可以评价肾疾病的已知预防或治疗剂的效果。此外,本发明可以提供肾疾病的预后预测方法和测试方法,其包括测量测试受试者的样品中的AIM浓度。

[0012] [附图说明]

图1显示了A:正常肾组织切片和经历单侧输尿管梗阻的AIM KO小鼠和WT小鼠的UUO以后的肾组织切片的Azan和苏木精同时染色图像,B:正常肾组织切片和经历单侧输尿管梗阻的AIM KO小鼠和WT小鼠的UUO以后的肾组织切片的同时Azan、PAS和苏木精染色图像。

[0013] 图2显示了经历单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的肾组织切片的苏木精-伊红染色图像。

[0014] 图3显示了A:经历单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的肾组织切片的F4/80免疫染色图像,B:显示经历单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的肾组织切片MCP-1表达水平的图。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ 。

[0015] 图4显示了A:经历单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注和rAIM或PBS的施用的AIM KO小鼠的肾组织切片的苏木精-伊红染色图像,B:经历单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注和rAIM或PBS的施用的AIM KO小鼠和WT小鼠的BUN值。

[0016] 图5显示了经历单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注和rAIM的施用的AIM KO小鼠的肾组织切片的AIM的相位差图像和免疫染色图像。N:坏死病灶。箭头:AIM。

[0017] 图6的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注的WT小鼠的尿AIM水平。\*:  $p < 0.05$ 。

[0018] 图7的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的存活率。

[0019] 图8的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的临床评分。\*\*:  $p < 0.01$ 。

[0020] 图9的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的BUN值。每天死亡的小鼠的数目用+指示。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ 。

[0021] 图10显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的肾组织切片的

PAS染色图像。

[0022] 图11的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的肾组织切片中在近侧肾小管中的死细胞团的面积相对于每个切片的总面积的比率。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ 。

[0023] 图12的图显示了通过定量RT-PCR确定的、经历两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠中的IL-1b和IL-6的mRNA表达比率。\*:  $p < 0.05$ 。

[0024] 图13显示了在IR以后第7天从经历两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的肾衍生出的细胞的流式细胞计分析结果。

[0025] 图14显示了用抗-AIM抗体得到的经历两侧短暂肾缺血/再灌注的WT小鼠的肾组织切片的PAS染色图像和免疫染色图像。

[0026] 图15显示了用死于肾梗塞引起的急性肾衰竭的人的肾组织切片的抗-AIM抗体得到的PAS染色图像和免疫染色图像。

[0027] 图16的图显示了通过ELISA测得的、3个由于人急性肾衰竭(AKI)运输至医院的患者、3个健康个体和5个进行两侧IR的WT小鼠在IR之前、IR以后1天和7天后的尿的AIM浓度。N.D.: 未检测。

[0028] 图17显示了用抗-AIM抗体得到的经历两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠的肾组织切片的随时间的PAS染色图像和免疫染色图像。

[0029] 图18的图显示了通过FACS分选仪从在AIM-KO小鼠的两侧IR以后第3天用胶原酶处理过的肾分离出的F4/80阳性的巨噬细胞的吞噬活性。

[0030] 图19的图显示了通过用M-CSF区分AIM-KO衍生的骨髓细胞和通过FACS分选仪分离而得到的巨噬细胞的吞噬活性。

[0031] 图20的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注并在从第1天至第3天施用rAIM或PBS的AIM KO小鼠的存活率。

[0032] 图21的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注并在从第1天至第3天施用rAIM或PBS的AIM KO小鼠的临床评分。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ 。

[0033] 图22的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注并在从第1天至第3天施用rAIM或PBS的AIM KO小鼠的BUN值。每天死亡的小鼠的数目用+指示。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ 。

[0034] 图23显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注并在从第1天至第3天施用rAIM或PBS的AIM KO小鼠的肾组织切片的PAS染色图像。

[0035] 图24的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注并在从第1天至第3天施用rAIM或PBS的AIM KO小鼠的肾(在IR以后第7天)组织切片中在近侧肾小管中的死细胞团的面积相对于每个切片的总面积的比率。\*:  $p < 0.05$ 。

[0036] 图25的图显示了通过定量RT-PCR确定的、经历两侧短暂肾缺血/再灌注并在从第1天至第3天施用rAIM或PBS的AIM KO小鼠中的IL-1b和IL-6的mRNA表达比率。\*:  $p < 0.05$ 。

[0037] 图26的图显示了经历非致命的两侧短暂肾缺血/再灌注并在从第1天至第3天施用rAIM或PBS的AIM KO小鼠的BUN值。\*:  $p < 0.05$ 。

[0038] 图27的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注并在从第1天至第3天施用rAIM或PBS的WT小鼠的BUN值。

[0039] 图28显示了经历非致命的两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠的肾组

织切片的PAS染色图像和Azan染色图像。

[0040] 图29的图显示了通过定量RT-PCR确定的、经历非致命的两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM KO小鼠和WT小鼠中的4类纤维化标记物的mRNA表达比率。

[0041] 图30的图显示了健康人、没有肾病的糖尿病患者和具有糖尿病慢性肾衰竭的患者的性别区分的血液AIM浓度。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ 。

[0042] 图31显示了A:该图显示了慢性肾衰竭患者( $n=55$ )中eGFR (肾小球滤过率;  $\text{mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$ )或血液肌酐水平( $\text{mg}/\text{dL}$ )和血液AIM浓度之间的关联,B:该图显示了在慢性肾衰竭患者中从测量血液AIM浓度起2 - 3年时血液AIM浓度和肾功能变化之间的关联。

[0043] 图32显示了A:存在于狗( $n=3$ )、猫( $n=3$ )和小鼠的血清中的AIM的蛋白质印迹图像,B:猫和小鼠中的rAIM的蛋白质印迹图像。

[0044] 图33显示了A:在从静脉内地注射重组猫AIM (1 mg)的猫衍生出的血清的每个大小级分上AIM和IgM的蛋白质印迹图像,B:在从小鼠衍生出的血清的每个大小级分上AIM和IgM的蛋白质印迹图像。

[0045] 图34显示了在从静脉内地注射重组小鼠AIM (1 mg)的猫衍生出的血清的每个大小级分上AIM和IgM的蛋白质印迹图像。

[0046] 图35显示了猫AIM cDNA序列(SEQ ID NO: 5),其中翻译起始位点(atg)和翻译终止位点(tga)以粗体显示,非编码序列以倾斜字体显示,编码前导肽的碱基序列用实线显示,且进一步,编码SRCR1和SRCR2之间的铰链区、SRCR2和SRCR3之间的铰链区、以及SRCR3和翻译终止位点之间的肽序列的碱基序列用虚线标记下划线。

[0047] 图36显示了猫AIM蛋白的前导肽序列的疏水性。

[0048] 图37显示了人AIM蛋白的前导肽序列的疏水性。

[0049] 图38显示了小鼠AIM蛋白的前导肽序列的疏水性。

[0050] 图39显示了狗AIM蛋白的前导肽序列的疏水性。

[0051] 图40显示了人(SEQ ID NO: 2)、猫(SEQ ID NO: 4)和小鼠(SEQ ID NO: 6)的每个SRCR和铰链区的前导肽(LS)和氨基酸序列的对比。

[0052] 图41显示了使用抗-猫AIM单克隆抗体得到的猫的血清中的AIM的还原蛋白质印迹法图像,其中个体1 - 4是用AIM检测的个体,且通过与对照的rcAIM的信号强度进行对比来计算AIM值,且个体5 - 7是未用AIM信号检测的个体(N.D.: 不可检测)。

[0053] 图42的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注的猫的血清中的BUN值和Cre值。●: Cre, ○: BUN。

[0054] 图43显示了使用抗-猫AIM单克隆抗体得到的、在IR之前和之后猫的血清或尿AIM的还原蛋白质印迹法图像。

[0055] 图44显示了使用抗-AIM抗体得到的、经历两侧短暂肾缺血/再灌注的猫的肾组织切片的免疫染色图像。

[0056] 图45的图显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注并施用rAIM或PBS的猫的血清中的eGFR (肾小球滤过率;  $\text{mL}/\text{min}/\text{m}^2$ )。各自 $n=1$ 。

[0057] 图46显示了经历两侧短暂肾缺血/再灌注并施用rAIM或PBS的猫的肾组织切片的PAS染色图像。

[0058] [实施方案的描述]

本发明提供了肾疾病的预防或治疗剂,其包含AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸。

[0059] 本发明中的AIM是这样的蛋白:其含有与SEQ ID NO: 2 (人衍生的AIM蛋白的氨基酸序列)或SEQ ID NO: 4 (猫衍生的AIM蛋白的氨基酸序列)所示的氨基酸序列相同或基本上相同的氨基酸序列。

[0060] AIM可以是,例如,从巨噬细胞分离和纯化的蛋白,所述巨噬细胞是温血动物(例如,人、小鼠、大鼠、兔、绵羊、猪、牛、马、猫、狗、猴、黑猩猩、鸡等)的免疫细胞。它也可以是化学合成的或在无细胞翻译系统中生物化学合成的蛋白。可选地,所述蛋白可以是掺入核酸的转化体产生的重组蛋白,所述核酸包含编码上述氨基酸序列的碱基序列。

[0061] 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列是指与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列等具有约60%或更多、优选约70%或更多、进一步优选约80%或更多、特别优选约90%或更多、最优选约95%或更多的同源性的氨基酸序列。在这里,“同源性”是指在使用本技术领域已知的数学算法比对两个氨基酸序列时在最佳比对中相同的氨基酸残基和类似的氨基酸残基与所有重叠的氨基酸残基的比率(%)(优选地,所述算法考虑为了最佳比对在序列的一侧或两侧引入缺口)。“类似氨基酸”意指具有类似生理化学特性的氨基酸;其例子包括在相同组下分类的氨基酸,诸如芳香族氨基酸(Phe、Trp、Tyr),脂肪族氨基酸(Ala、Leu、Ile、Val),极性氨基酸(Gln、Asn),碱性氨基酸(Lys、Arg、His),酸性氨基酸(Glu、Asp),具有羟基的氨基酸(Ser、Thr),和具有小侧链的氨基酸(Gly、Ala、Ser、Thr、Met)。预期这样的类似氨基酸的置换不会改变蛋白的表型(即,保守氨基酸置换)。保守氨基酸置换的具体例子是技术领域已知的,并且描述于不同的文件中(参见,例如,Bowie等人, *Science*, 247:1306-1310 (1990))。

[0062] 本说明书中的氨基酸序列同源性可以在以下条件(期望值= 10;允许缺口;矩阵=BLOSUM62;过滤=OFF)下使用同源性计算算法NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)来计算。作为用于确定氨基酸序列同源性的其它算法的例子,可以提到Karlin等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5877 (1993)中描述的算法[所述算法被并入NBLAST和XBLAST程序(版本2.0) (Altschul等人, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997))],Needleman等人, *J. Mol. Biol.*, 48:444-453 (1970)中描述的算法[所述算法被并入GCG软件包中的GAP程序],Myers和Miller, *CABIOS*, 4:11-17 (1988)中描述的算法[所述算法被并入ALIGN程序(版本2.0),这是CGC序列比对软件包的部分],Pearson等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448 (1988)中描述的算法[所述算法被并入GCG软件包中的FASTA程序]等,它们同样可以优选使用。

[0063] 更优选地,与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列是与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列具有约60%或更多、优选约70%或更多、进一步优选约80%或更多、特别优选约90%或更多、且最优选约95%或更多的同一性的氨基酸序列。

[0064] 作为包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列的蛋白,例如,包含与上述SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列且具有与包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4等所示的氨基酸序列的蛋白的活

性实质上相同质量的活性的蛋白是优选的。在这里，“活性”是指，例如，抑制动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞的凋亡的活性，维持或促进动脉硬化的活性，脂肪细胞分化抑制活性，熔化脂肪细胞的脂滴的活性，脂肪细胞降低活性，CD36结合活性，胞吞至脂肪细胞的活性，FAS结合活性，FAS功能抑制活性，抗肥胖活性等。“实质上相同的质量”意指其活性是定性地(例如，生理学上或药理学上)相同的。因此，优选的是，上述活性是相互等效的，但这些活性的定量系数，诸如活性的程度(例如，约0.1至约10倍，优选约0.5至约2倍)和蛋白的分子量，可以是不同的。

[0065] 上述活性可以通过本身已知的方法进行测量。

[0066] 本发明中AIM的例子还包括包含以下序列的蛋白：(1)从SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列缺失1或2个或更多个(优选约1至100，优选约1至50，进一步优选约1至10，特别优选1至几个(2、3、4或5))氨基酸的氨基酸序列，(2)向SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列添加1或2个或更多个(优选约1至100，优选约1至50，进一步优选约1至10，特别优选1至几个(2、3、4或5))氨基酸的氨基酸序列，(3)在SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列中插入1或2个或更多个(优选约1至50，优选约1至10，进一步优选1至几个(2、3、4或5))氨基酸的氨基酸序列，(4)在SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列中被其它氨基酸置换1或2个或更多个(优选约1至50，优选约1至10，进一步优选1至几个(2、3、4或5))氨基酸的氨基酸序列，或(5)包含其组合的氨基酸序列。

[0067] 当已经如上所述插入、缺失或置换氨基酸序列时，插入、缺失或置换的位置没有特别限制，只要维持所述蛋白的活性。

[0068] 本发明的AIM优选为具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列(GenBank登录号：AAD01446)的人AIM蛋白，或具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的猫AIM蛋白或其其它哺乳动物中的同系物[例如，在GenBank中登记为登录号：AAD01445等的小鼠同系物]，更优选地，由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的人AIM蛋白或由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的猫AIM蛋白。

[0069] 在本说明书中，根据肽命名的惯例描述蛋白和肽，其中左端表示N端(氨基端)，右端表示C端(羧基端)。在包括包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的蛋白的本发明的AIM中，C端可以是羧基(-COOH)、羧酸盐(-COO<sup>-</sup>)、酰胺(-CONH<sub>2</sub>)和酯(-COOR)中的任一种。

[0070] 在这里，作为酯中的R，可以使用C<sub>1-6</sub>烷基，例如，甲基、乙基、正丙基、异丙基和正丁基，C<sub>3-8</sub>环烷基，例如，环戊基和环己基，C<sub>6-12</sub>芳基，例如苯基和 $\alpha$ -萘基，苯基-C<sub>1-2</sub>烷基，例如苄基和苯乙基，C<sub>7-14</sub>芳烷基，例如， $\alpha$ -萘基-C<sub>1-2</sub>烷基，例如， $\alpha$ -萘基甲基、新戊酰氧基甲基；等。

[0071] 当本发明的AIM在除了C端以外的位置具有羧基(或羧酸酯)时，其中羧基被酰胺化或酯化的蛋白也包括在本发明的蛋白中。在此情况下，作为酯，使用例如上述在C端的酯等。

[0072] 此外，本发明的AIM还包括：其中N端氨基酸残基的氨基被保护基(例如，C<sub>1-6</sub>酰基，诸如C<sub>1-6</sub>烷酰基(alkanoyl)诸如甲酰基和乙酰基等)保护的蛋白；其中可以在体内在N端裂解后产生的谷氨酰胺残基已经被转化为焦谷氨酸的蛋白，其中分子中氨基酸的侧链上的取代基(例如，-OH、-SH、氨基、咪唑基、吡啶基、胍基等)被适当的保护基(例如，C<sub>1-6</sub>酰基，诸如C<sub>1-6</sub>烷酰基诸如甲酰基和乙酰基等)保护的蛋白，缀合的肽，诸如所谓具有与之键合的糖链

的糖肽等。

[0073] AIM的部分肽(下文有时简称为“本发明的部分肽”)可以是任意的,只要它是具有上述AIM的部分氨基酸序列且具有与AIM实质上相同质量的活性的肽。在这里,“实质上相同质量的活性”如上文所定义。此外,可以以与AIM的情况下相同的方式测量“实质上相同质量的活性”。

[0074] 由于AIM包含3个包含大量半胱氨酸的SRCR(富含半胱氨酸的清道夫受体)结构域,所以各SRCR结构域都可以被用作本发明的部分肽。具体地,例如,在SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列中,可以使用分别包含SRCR1结构域(SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸编号24 - 125)、SRCR2结构域(SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸编号138 - 239)和SRCR3结构域(SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的氨基酸编号244 - 346)的部分氨基酸序列,包含SRCR结构域的任何组合的部分氨基酸序列等。另外,在SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列中,还可以使用分别包含SRCR1结构域(SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的氨基酸编号24 - 125)、SRCR2结构域(SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的氨基酸编号139-239)和SRCR3结构域(SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的氨基酸编号244-346)的部分氨基酸序列,包含SRCR结构域的任何组合的部分氨基酸序列等。本发明的部分肽的大小没有特别限制,只要它包含上述功能结构域。部分肽优选包含不小于50的部分氨基酸序列,更优选不小于100的部分氨基酸序列,进一步优选不小于200的部分氨基酸序列。部分氨基酸序列可以是单个连续的部分氨基酸序列,或者彼此连接的不连续的多个部分氨基酸序列。

[0075] 此外,本发明的部分肽的C端可以是羧基(-COOH)、羧酸盐(-COO<sup>-</sup>)、酰胺(-CONH<sub>2</sub>)和酯(-COOR)中的任一种。在这里,酯中的R的例子包括类似于AIM的上述例子的那些。当本发明的部分肽在除了C端以外的位置具有羧基(或羧酸酯)时,羧基被酰胺化或酯化,其也包括在本发明的部分肽中。作为这种情况下的酯,例如,使用与在C端的酯类似的那些等。

[0076] 此外,本发明的部分肽包括,以与上述AIM相同的方式,N端氨基酸残基的氨基可以用保护基保护,N端的谷氨酰胺残基可以被转化为焦谷氨酸,分子中氨基酸的侧链上的取代基可以用合适的保护基保护,或者部分肽可以是其中糖链被键合的合成肽(所谓的糖肽等),等。

[0077] 本发明中待使用的AIM或其部分肽可以是盐的形式。例如,使用与生理学上可接受的酸(例如,无机酸、有机酸)、碱(例如,碱金属盐)的盐等,并且生理学上可接受的酸加成盐是优选的。有用的盐包括,例如,与无机酸(例如,盐酸、磷酸、氢溴酸、硫酸)的盐或与有机酸(例如,乙酸、甲酸、丙酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、苯甲酸、甲磺酸、苯磺酸)的盐等。

[0078] 可以通过本身已知的蛋白纯化方法从上述哺乳动物的巨噬细胞产生AIM。具体地,AIM或其盐可以通过均质化哺乳动物巨噬细胞,通过低速离心除去细胞碎片,以高速离心上清液以沉淀包含细胞膜的级分,并且使上清液进行色谱法诸如反相色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等等来制备。

[0079] AIM或其部分肽也可以根据公众已知的肽合成方法来制备(以下在其化学合成的说明中,全长AIM和其部分肽被综合简称为AIM,除非另外指出)。

[0080] 肽合成的方法可以是,例如,固相合成方法和液相合成方法中的任一种。期望的蛋白可以通过将能够构成AIM的部分肽或氨基酸与剩余部分缩合,并且除去所得产物可具有

的任何保护基来产生。

[0081] 在这里,根据本身已知的方法,例如,下面(1)和(2)中所示的方法,进行缩合和保护基除去:

(1) M. Bodanszky和M.A. Ondetti: *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York (1966)

(2) Schroeder和Luebke: *The Peptide*, Academic Press, New York (1965)。

[0082] 如此获得的AIM可以通过已知的纯化方法进行纯化或分离。在这里,作为纯化方法的例子,可以提到溶剂提取、蒸馏、柱色谱法、液相色谱法、重结晶、其组合等。

[0083] 当如此获得的AIM是游离形式时,可以将所述游离形式通过已知方法或其类似方法转化为合适的盐形式,并且在另一方面,当获得盐形式的AIM时,它可以通过已知方法或基于此的方法转化为游离形式或者不同的盐的形式。

[0084] 此外,AIM也可以通过培养包含编码其的核酸的转化体,以及从获得的培养物中分离和纯化AIM而产生。编码AIM或其部分肽的核酸可以是DNA或RNA,或DNA/RNA嵌合体,优选DNA。此外,核酸可以是双链或单链的。在双链核酸的情况下,它可以是双链DNA、双链RNA、或DNA:RNA杂合体。在单链的情况下,它可以是有义链(即编码链)或反义链(即非编码链)。

[0085] 编码AIM或其部分肽的DNA的例子包括基因组DNA,源自温血动物(例如人、牛、猴、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫、豚鼠、大鼠、小鼠、兔、仓鼠、鸡等)的巨噬细胞的cDNA,合成的DNA等。编码AIM或其部分肽的基因组DNA可以通过聚合酶链式反应(在下文中简称为“PCR方法”)直接扩增,其使用从以下物质制备的基因组DNA级分作为模板:前述动物的任何细胞[例如,肝细胞、脾细胞、神经细胞、神经胶质细胞、胰脏B细胞、中幼粒细胞、肾小球系膜细胞、朗格汉斯细胞、表皮细胞、上皮细胞、杯状细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、纤维细胞、肌细胞、脂肪细胞、免疫细胞(例如,巨噬细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞)、巨核细胞、滑膜细胞、软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、乳腺细胞、肝细胞或间质细胞、或其对应的祖细胞、干细胞或癌细胞等],或其中存在此类细胞的任何组织[例如,脑或脑的任何部分(例如,嗅球、杏仁核、基底神经节、海马、丘脑、下丘脑、底丘脑核、大脑皮质、延髓、小脑)、脊髓、脑垂体、胃、胰腺、肾、肝、生殖腺、甲状腺、胆囊、骨髓、肾上腺、皮肤、肺、胃肠道(例如大肠、小肠)、血管、心脏、胸腺、脾脏、下颌腺、外周血、前列腺、睾丸、卵巢、胎盘、子宫、骨、关节、脂肪组织(例如,棕色脂肪组织、白色脂肪组织)、骨骼肌等],且编码AIM或其部分肽的cDNA也可以通过PCR方法和逆转录酶-PCR(在下文简称为“RT-PCR方法”)通过分别使用从巨噬细胞制备的总RNA或mRNA级分作为模板直接扩增。可选地,编码AIM或其部分肽的基因组DNA和cDNA也可以通过菌落或噬菌斑杂交方法或PCR方法等从通过将上述基因组DNA和总RNA或mRNA的片段插入合适的载体中而制备的基因组DNA文库和cDNA文库中克隆。用于文库的载体可以是细菌噬菌体、质粒、粘粒、噬粒等中的任一种。

[0086] 编码AIM的DNA的例子包括包含与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3等中所示的碱基序列相同或实质上相同的碱基序列的DNA等。

[0087] 作为包含与SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3所示的碱基序列相同或实质上相同的碱基序列的DNA,例如,使用这样的DNA:其包含与SEQ ID NO: 1所示的碱基序列具有不小于约60%、优选地不小于约70%、更优选地不小于约80%、特别优选地不小于约90%的同源性的碱

基序列,且编码具有与上述AIM等的实质上相同质量的活性的蛋白。

[0088] 本说明书中的碱基序列同源性可以在以下条件(期望值= 10;允许缺口;过滤= ON;匹配得分=1;错配得分=-3)下使用同源性计算算法NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)来计算。作为用于确定碱基序列同源性的其它算法的优选例子,还可以提到上述氨基酸序列同源性计算算法。

[0089] 编码AIM的DNA优选是包含SEQ ID NO: 1所示的碱基序列所示的编码人AIM蛋白的碱基序列的DNA(GenBank登录号:AF011429),或含有SEQ ID NO: 3所示的碱基序列所示的编码猫AIM蛋白的碱基序列的DNA,或其其它哺乳动物中的同系物[例如,在GenBank中登记为登录号: AF011428等的小鼠同系物等]。

[0090] 编码本发明的部分肽的DNA可以是任意的,只要它包含这样的碱基序列:其编码包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的部分相同或实质上相同的氨基酸序列的肽。具体地,作为编码本发明的部分肽的DNA,使用(1)包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3所示的碱基序列的部分碱基序列的DNA,或(2)这样的DNA:其包含与含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3所示的碱基序列的部分碱基序列的DNA具有不小于约60%、优选地不小于约70%、更优选地不小于约80%、特别优选地不小于约90%的同源性的碱基序列,且编码具有与上述AIM等的实质上相同质量的活性的蛋白。

[0091] 可以如下克隆编码AIM或其部分肽的DNA:通过PCR方法使用具有编码AIM或其部分肽的碱基序列的部分的合成DNA引物扩增它们,或将掺入合适的表达载体中的DNA与编码AIM的部分或完整区域的标记的DNA片段或合成进行杂交。根据本身已知的方法或基于此的方法,例如,描述于Molecular Cloning, 第2版(J. Sambrook等人, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)等中的方法,可以进行杂交。当使用商购文库时,杂交可以根据所附指导手册中描述的方法来进行。杂交可以优选在高严谨条件下进行。

[0092] 作为高严谨条件的例子,可以提到在45°C在6×SSC(氯化钠/柠檬酸钠)中杂交反应、随后在65°C在0.2×SSC/0.1%SDS中洗涤一次或多次的条件等。本领域技术人员能够通过适当地改变杂交溶液的盐浓度、杂交反应温度、探针浓度、探针长度、错配数、杂交反应时间、洗涤溶液的盐浓度、洗涤温度等而容易地获得期望的严谨性。当使用商购文库时,杂交可以根据随附所述文库的指导手册中描述的方法来进行。

[0093] 包含编码AIM或其部分肽的DNA的表达载体可以通过以下产生,例如,从编码AIM的DNA切出期望的DNA片段,并且将所述DNA片段接合在适当的表达载体中启动子下游。

[0094] 作为表达载体,使用源自大肠杆菌的质粒(例如,pBR322、pBR325、pUC12、pUC13);动物细胞表达质粒(例如,pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo);动物病毒载体,诸如逆转录病毒、牛痘病毒、腺病毒等等。

[0095] 所述启动子可以是任何启动子,只要它适用于用于表达所述基因的宿主。

[0096] 例如,当宿主是动物细胞时,使用SR $\alpha$ 启动子、SV40启动子、LTR启动子、CMV(巨细胞病毒)启动子、RSV(劳斯肉瘤病毒)启动子、MoMuLV(莫洛尼鼠白血病病毒)LTR、HSV-TK(单纯疱疹病毒胸苷激酶)启动子等。在这些中,CMV启动子、SR $\alpha$ 启动子等是优选的。

[0097] 当宿主是属埃希氏菌属(*Escherichia*)的细菌时,trp启动子、lac启动子、recA启动子、 $\lambda$ PL启动子、Ipp启动子、T7启动子等是优选的。

[0098] 除了上述以外,有用的表达载体包括,任选携带增强子、剪接信号、聚腺苷酸添加

信号、选择标记、SV40复制原点(以下也简称为SV40ori)等的那些。作为选择标记的例子,可以提到二氢叶酸还原酶(以下也简称为dhfr)基因[甲氨蝶呤(MTX)抗性]、氨苄青霉素抗性基因(以下也简称为Amp<sup>r</sup>)、新霉素抗性基因(以下也简称为Neo<sup>r</sup>,G418抗性)等。具体地,当使用缺乏dhfr基因的中国仓鼠细胞以及作为选择标记的dhfr基因时,也可使用不含胸苷的培养基来选择目标基因。

[0099] 必要时,可以将编码适合用于宿主的信号序列的碱基序列(信号密码子)添加(或用天然信号密码子置换)至编码AIM或其部分肽的DNA的5'-末端侧。例如,当宿主是属埃希氏菌属,使用PhoA信号序列、OmpA信号序列等;当宿主是动物细胞时,使用胰岛素信号序列、 $\alpha$ -干扰素信号序列、抗体分子信号序列等。

[0100] AIM或其部分肽可以通过用包含上述编码AIM或其部分肽的DNA的表达载体转化宿主并培养获得的转化体来产生。

[0101] 作为宿主,例如,使用属埃希氏菌属、动物细胞等。

[0102] 作为属埃希氏菌属,例如,使用大肠杆菌K12·DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第60卷, 160(1968)], 大肠杆菌JM103 [Nucleic Acids Research, 第9卷, 309(1981)], 大肠杆菌JA221 [Journal of Molecular Biology, 第120卷, 517(1978)], 大肠杆菌HB101 [Journal of Molecular Biology, 第41卷, 459(1969)], 大肠杆菌C600 [Genetics, 第39卷, 440(1954)等]。

[0103] 作为动物细胞,例如,使用猴COS-7细胞、猴Vero细胞、中国仓鼠卵巢细胞(以下简称为CHO细胞)、dhfr基因缺陷的CHO细胞(以下简称为CHO(dhfr<sup>-</sup>)细胞)、小鼠L细胞、小鼠AtT-20细胞、小鼠骨髓瘤细胞、大鼠GH3细胞、人FL细胞等。

[0104] 转化可基于公众已知的方法根据宿主种类进行。

[0105] 属埃希氏菌属可以,例如,根据描述于Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第69卷, 2110 (1972), Gene, 第17卷, 107 (1982)中的方法进行转化。

[0106] 动物细胞可以,例如,根据描述于Saibo Kogaku (Cell Engineering), extra issue 8, Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol (New Cell Engineering Experimental Protocol), 263-267 (1995), Shujunsha出版,或Virology, 第52卷, 456 (1973)的方法进行转化。

[0107] 转化体的培养可基于公众已知的方法根据宿主种类进行。

[0108] 作为用于培养转化体(其宿主是属埃希氏菌属的细菌)的培养基的例子,补充有葡萄糖和酪蛋白水解物的M9培养基[Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972]是优选的。根据需要,为了增强启动子效率,可以将化学剂诸如3 $\beta$ -吡啶基丙烯酸添加至培养基中。

[0109] 转化体(其宿主是属埃希氏菌属的细菌)的培养通常在约15°C至约43°C进行约3至约24小时。如果必要,培养物可以进行通气或搅拌。

[0110] 用于培养转化体(其宿主是动物细胞)的有用的培养基包括,例如,包含约5-约20%胎牛血清的最低基础培养基(MEM) [Science, 第122卷, 501 (1952)], DuBecco改良的Eagle培养基(DMEM) [Virology, 第8卷, 396(1959)], RPMI1640培养基 [The Journal of the American Medical Association, 第199卷, 519(1967)], 199培养基 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 第73卷, 1(1950)]等。培养基的pH优选

为约6至约8。培养通常在约30℃至约40℃进行约15至约60小时。如果必要,培养物可以进行通气或搅拌。

[0111] 如上所述,AIM可以在转化体细胞的内部或外部产生。

[0112] AIM或其部分肽可以根据本身已知的方法从通过培养上述转化体获得的培养物中分离和纯化。

[0113] 例如,当从培养的细菌或细胞的细胞质中提取AIM或其部分肽时,适当地使用这样的方法:其中通过已知方式从培养物收集细菌或细胞,将其悬浮在适当的缓冲溶液中,并借助于超声处理、溶菌酶和/或冻融等破碎,此后,通过离心或过滤获得可溶性蛋白的粗提取物。缓冲溶液可包含蛋白变性剂诸如脲或盐酸胍,和表面活性剂诸如Triton X-100™。此外,当AIM或其部分肽被分泌在细菌(细胞)外时,使用通过离心、过滤等从培养物等中分离培养上清液的方法。

[0114] 如此获得的可溶性级分和培养上清液中含有的AIM或其部分肽的分离和纯化可以根据本身已知的方法来进行。有用的方法包括基于溶解度的方法,诸如盐析和溶剂沉淀;主要基于分子量差异的方法,诸如透析、超滤、凝胶过滤和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;基于电荷差异的方法,诸如离子交换色谱法;基于特异性亲和力的方法,诸如亲和色谱法;基于疏水性差异的方法,诸如反相高效液相色谱法;和基于等电点差异的方法,诸如等电聚焦。这些方法可以适当地组合。

[0115] 如此获得的AIM或其部分肽的存在可以通过酶免疫测定法、蛋白质印迹法等使用针对AIM的抗体来证实。

[0116] 如上所述获得的AIM或其部分肽或其盐或包含编码AIM或其部分肽(有时在这里表示为AIM)的碱基序列的核酸可以作为用于预防肾疾病的发作或肾疾病的治疗的药剂提供。

[0117] 在本发明中,诱导AIM表达的药物和稳定AIM的药物也可用于替代AIM。

[0118] 诱导AIM表达的药物例子包括具有AIM转录活性等的化合物,并且所述化合物的例子包括能够结合AIM基因的启动子区域等的转录因子。本发明人还发现,AIM在巨噬细胞中表达。因此,作为诱导AIM表达的药物,可以提到巨噬细胞分化诱导剂。巨噬细胞分化诱导剂没有特别限制,只要其可以从祖细胞诸如粒细胞-巨噬细胞集落形成细胞(CFU-GM)、巨噬细胞集落形成细胞(CFU-M)等诱导巨噬细胞的分化,并且可以使用例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)等。转录因子、GM-CSF、M-CSF可以通过上述已知方式从哺乳动物组织和细胞中分离和纯化的蛋白,或者可以是化学合成的或在无细胞翻译系统中生物化学合成的蛋白。可选地,它们可以是从小于包含编码上述蛋白的碱基序列的核酸导入的转化体产生的重组蛋白。

[0119] 稳定AIM的药物的例子包括抑制AIM的降解的化合物,抑制排泄到尿中的化合物等。抑制降解的化合物的例子包括蛋白酶抑制剂,蛋白酶体抑制剂等。蛋白酶抑制剂的例子包括丝氨酸蛋白酶抑制剂(4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸化物(AEBSGF)、抑肽酶、胰蛋白酶抑制剂等),半胱氨酸蛋白酶抑制剂(E-64,亮抑酶肽等)等。蛋白酶体抑制剂的例子包括乳胞素、MG-115、MG-132、蛋白酶体抑制剂I等。抑制排泄到尿中的化合物的例子包括给AIM赋予防止通过肾小球基膜的分子量的化合物。由于IgM会结合AIM(WO 2013/162021; Arai等人, CeII Reports 3: 1187-1198, 2013),所以IgM可作为抑制AIM排泄到尿中的化合物提及。但是,由于担心施用IgM本身引起免疫系统中的副作用,优选使用通过融合IgM的Fc片段

(这是与AIM的结合位点)和具有防止肾小管的过滤和排泄到尿中的水平的分子量的蛋白而获得的融合蛋白。尽管待融合的蛋白没有特别限制,但具有较少副作用担心的蛋白是优选的,并且,例如,可以使用白蛋白。结合可以是直接结合或经由铰链区。铰链区的例子包括串联FLAG标签。这样的分子可以通过常规方法将编码各自的基因连接而产生为单个重组蛋白。尽管结合IgM的AIM可以源自任何温血动物,但是可以排除源自猫的AIM。

[0120] 在下面提及的本发明的例子中,AIM敲除的小鼠在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下显示出肾疾病的症状。从上面内容,提示AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物、或能够替换AIM的功能的化合物(其可以通过下面提及的筛选方法来搜索)会阻止肾疾病的发作和进展以及治疗肾疾病。

[0121] 本发明的含有AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物的药物组合物的施用对象包括,例如,人和其它温血动物(例如,小鼠、大鼠、兔、绵羊、猪、牛、猫、狗、猴、禽类,优选猫等)。

[0122] 要成为本发明的包含AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物的药物组合物的应用目标的肾疾病是,例如,急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病,优选地可以提及急性肾衰竭或慢性肾衰竭。与胶原疾病有关的代表性肾病是,例如,狼疮肾炎。

[0123] 本发明的包含AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物的药物组合物是低毒性的,并且可以作为液体原样、或作为药物组合物的合适剂型口服或胃肠外(例如,血管内施用,皮下施用等)施用给人或其它温血哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔、绵羊、猪、牛、猫、狗、猴、禽类,优选猫等)。

[0124] 作为用于胃肠外施用的组合物的例子,使用注射剂、栓剂等;所述注射剂可包括剂型,诸如静脉内注射剂、皮下注射剂、真皮内注射剂、肌肉注射剂和滴注注射剂。此类注射剂可以根据公众已知的方法来制备。注射剂可以通过以下制备,例如,将上述本发明的AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物溶解、悬浮或乳化在通常用于注射剂的无菌水溶液或油性溶液中。作为用于注射的水溶液的例子,可以使用生理盐水、包含葡萄糖或另一种辅助药物的等渗溶液等,其可以与适当的增溶剂组合使用,所述增溶剂,例如,醇(例如乙醇),多元醇(例如,丙二醇,聚乙二醇),非离子表面活性剂[例如,聚山梨酯80, HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50 moI)加合物)]等。作为油性溶液的例子,可以使用芝麻油、大豆油等,其可以与作为增溶剂的苯甲酸苄酯、苄醇等组合使用。将制备的注射溶液优选填充在适当安瓿中。用于直肠施用的栓剂可以通过将上述本发明的AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物与普通栓剂基质混合来制备。

[0125] 作为用于口服施用的组合物,可以提到固体或液体剂型,特别是片剂(包括糖包衣片剂和薄膜包衣片剂)、丸剂、颗粒剂、粉剂、胶囊(包括软胶囊)、糖浆剂、乳剂、悬浮剂等。此类组合物通过公众已知的方法产生,并且可以包含在药物制备领域中常用的载体、稀释剂或赋形剂。作为用于片剂的载体或赋形剂的例子,可以使用乳糖、淀粉、蔗糖、硬脂酸镁等。

[0126] 用于胃肠外或口服施用的上述药物组合物被便利地制备在适用于活性成分的剂量的药物单位剂型中。作为此类药物单位剂型的例子,可以提到片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿)和栓剂。优选的是,可以以例如,每个药物单位剂型通常5至500 mg,特别是5至100 mg用于注射剂,或10至250 mg用于其它剂型,来含有上述本发明的AIM、诱导AIM表达的药物

或稳定AIM的药物。

[0127] 尽管本发明的包含AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物的上述预防或治疗剂的剂量根据施用对象、目标疾病、症状、施用途径等而变化；例如，当所述药剂用于治疗/预防成年人中的肾疾病时，通过静脉内注射，每天约1至5次，优选每天约1至3次，持续约1至21天，优选约1至14天，基于单次剂量，通常以约0.01至20 mg/kg体重、优选约0.1至10 mg/kg体重、且更优选约0.1至5 mg/kg体重方便地施用本发明的AIM。在胃肠外施用和口服施用的其它模式的情况下，可以施用类似的剂量。在症状特别严重的情况下，可以根据症状增加剂量。

[0128] 每种上述组合物都可以包含当与上述AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物配制时不产生不希望的相互作用的任何其它活性成分。

[0129] 此外，本发明的AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物可以与可用于治疗肾疾病的其它药物组合使用，所述其它药物是诸如抑制剂（例如，血管紧张素-转化酶抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、钙拮抗剂、凝乳酶抑制剂、 $\alpha$ 阻滞剂、 $\beta$ 阻滞剂等）；利尿剂（例如，碳酸酐酶抑制剂、袢利尿剂、噻嗪利尿剂、抗醛固酮药物、保钾利尿剂等）；活性维生素D3制剂（例如，骨化三醇、阿法骨化醇、马沙骨化醇、氟骨三醇等）；口服碳质吸附剂制剂（例如，活性炭等）；校正钾的药物（例如，聚苯乙烯磺酸钠等）；磷吸附剂（例如，碳酸钙、醋酸钙、盐酸司维拉姆、碳酸镧等）；红血细胞生成刺激因子制剂（红细胞生成刺激剂；ESA）（例如，促红细胞生成素制剂）、氨基酸输注制剂等。本发明的AIM、诱导AIM表达的药物或稳定AIM的药物和上述药物可以同时或不同时施用给患者。

[0130] 如在下面提及的实施例中证实的，当在猫的血液中没有检测到AIM时，提示猫AIM不可结合血液中的猫IgM且通过肾小球的基底膜容易地排泄进尿中。所以，猫AIM不可稳定地存在于血液中，且被认为间接地造成肾疾病。此外，已经澄清，小鼠AIM可以结合猫的血液中的猫IgM，且特别地提示小鼠AIM的SRCR3结构域对于与猫IgM的结合而言是重要的。因此，本发明也提供了用于施用给猫的肾疾病的预防或治疗剂，其含有结合猫IgM的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸。

[0131] 在本发明中结合猫IgM的AIM是这样的蛋白：其含有与SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列相同或实质上相同的氨基酸序列，其可以结合猫IgM。

[0132] 这样的蛋白也可以是，例如，化学合成的或在无细胞翻译系统中生化合成的蛋白。可选地，所述蛋白可以是掺入核酸的转化体产生的重组蛋白，所述核酸包含编码上述氨基酸序列的碱基序列。

[0133] 与SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列表示与SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列等具有约60%或更多、优选约70%或更多、进一步优选约80%或更多、特别优选约90%或更多、最优选约95%或更多的同源性的氨基酸序列。“同源性”可以是如上所述。更优选地，与SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列是与SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列具有约60%或更多、优选约70%或更多、进一步优选约80%或更多、特别优选约90%或更多和最优选约95%或更多的同一性的氨基酸序列。作为包含与SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列的蛋白，例如，包含与SEQ ID NO: 4所示的前述氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列且具有与包含SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列的蛋白等的活性实质上相同质量的活性的蛋白是优选的。在这里，“实质上相同质量的活性”

如上面所定义。

[0134] 尽管可以结合猫IgM的AIM蛋白可以是任意AIM蛋白,只要它结合猫血液中的猫IgM,例如,它优选地是含有小鼠衍生的AIM的SRCR3结构域的蛋白。具体地,例如,可以提及含有SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列的氨基酸编号246-348的AIM蛋白。含有小鼠衍生的AIM的SRCR3结构域的蛋白可以是这样的蛋白:其中AIM天然地具有的SRCR3结构域被小鼠衍生的AIM的SRCR3结构域置换。

[0135] 结合猫IgM的AIM的部分肽可以是任意的,只要它是这样的肽:其具有结合猫IgM的AIM的上述部分氨基酸序列,且其具有与AIM实质上相同质量的活性。在这里,“实质上相同质量的活性”如上面所定义。

[0136] 具体而言,例如,在SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列中,还可以使用分别包含SRCR1结构域(SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的氨基酸编号24 - 125)、SRCR2结构域(SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的氨基酸编号139 - 239)和SRCR3结构域(SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的氨基酸编号244 - 346)的部分氨基酸序列、包含SRCR结构域的任何组合的部分氨基酸序列等。上述部分肽的大小没有特别限制,只要它包含上述功能结构域。

[0137] 包含编码结合猫IgM的AIM或其部分肽的碱基序列的DNA的例子包括包含与SEQ ID NO: 3所示的碱基序列相同或实质上相同的碱基序列的DNA等。

[0138] 作为包含与SEQ ID NO: 3所示的碱基序列相同或实质上相同的碱基序列的DNA,例如,使用包含与SEQ ID NO: 3所示的碱基序列具有不小于约60%、优选地不小于约70%、更优选地不小于约80%、特别优选地不小于约90%的同源性的碱基序列且编码与前述AIM具有实质上相同质量的活性的蛋白的DNA等。在这里,“同源性”如上所述。所述DNA如在上述方法中类似地制备。

[0139] 作为药物组合物(其含有本发明的结合猫IgM的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸)的施用对象,可以提及猫。

[0140] 作为要成为药物组合物(其含有本发明的结合猫IgM的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸)的应用目标的肾疾病,可以提及例如急性肾衰竭、慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病,且可以优选地提及急性肾衰竭或慢性肾衰竭。作为与胶原疾病有关的代表性肾病,可以提及狼疮肾炎。

[0141] 含有本发明的结合猫IgM的AIM或其部分肽、或包含编码它们的碱基序列的核酸的药物组合物是低毒的,且可以类似与上面口服地或胃肠外地施用给目标。剂型、剂量等如上所述。

[0142] 如上所述,AIM敲除的小鼠在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下显示出肾疾病的症状。这提示,在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下的AIM敲除的小鼠可以作为肾疾病的新模型小鼠提供。因此,本发明提供了用于肾疾病的预防或治疗剂的筛选方法,其使用通过对AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注得到的动物。

[0143] AIM表达缺陷型非人哺乳动物意指其中内源AIM的表达灭活的非人哺乳动物,包括从其中AIM敲除(KO)的ES细胞制备的AIM KO动物,以及其中AIM表达被反义或RNAi技术灭活

的敲低(KD)动物等。在这里,“敲除(KO)”意指通过破坏或除去内源基因而防止完整mRNA的产生,而“敲低(KD)”意指抑制从mRNA翻译为蛋白以灭活内源基因的表达。在下文中,本发明的AIM KO/KD动物有时简称为“本发明的KO/KD动物”。本发明的AIM KO动物公开于Miyazaki T. 等人(J. Exp. Med., 189, 413-422, 1999或WO 2013/162021)。

[0144] 可以是本发明的受试者的“非人哺乳动物”没有特别限制,只要它是已经对其建立转基因系统的非人哺乳动物;例子包括小鼠、大鼠、牛、猴、猪、绵羊、山羊、兔、狗、猫、豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠等。兔、狗、猫、豚鼠、仓鼠等是优选的;具体地,从疾病模型动物制备的观点来看,具有相对短的个体发育时期和生命周期且易于繁殖的啮齿类动物是更优选的;具体地,小鼠(例如,作为纯系的C57BL/6品系、BALB/c品系、DBA2品系等,作为杂交系的B6C3F<sub>1</sub>品系、BDF<sub>1</sub>品系、B6D2F<sub>1</sub>品系、ICR品系)和大鼠(例如,Wistar、SD等)是优选的。

[0145] 除了哺乳动物以外,鸟类诸如鸡可用于与作为本发明的受试者的“非人哺乳动物”的目的相同的目的。

[0146] 用于敲除AIM的具体方法公开于前述Miyazaki T. 等人(J. Exp. Med., 189, 413-422, 1999或WO 2013/162021)。作为其它已知的一般方法,可以优选使用包括以下步骤的方法:通过常规方法分离源自受试者非人哺乳动物的AIM(基因组DNA),并通过例如(1)通过将另一DNA片段(例如,药物抗性基因,报道基因等)插入外显子部分或启动子区域而破坏外显子或启动子的功能,或(2)使用Cre-IoxP系统或Flp-frt系统切出AIM的整体或部分以缺失所述基因,或(3)将终止密码子插入蛋白编码区以防止翻译为完整蛋白,或(4)将终止基因转录的DNA序列(例如,聚腺苷酸添加信号等)插入转录区以防止合成完整的mRNA,通过同源重组等在受试者非人哺乳动物的AIM基因座处整合具有构建成随后灭活所述基因的DNA序列的DNA链(以下简称为靶向载体)。

[0147] 同源重组可以通过,例如,将上述靶向载体引入胚胎干细胞(ES细胞)来获得。

[0148] ES细胞是指在胚泡期源自受精卵的内细胞团(ICM)的细胞,并且可以培养和维持,同时在体外保持未分化状态。ICM细胞注定形成胚体,是所有组织包括生殖细胞都基于其的干细胞。所使用的ES细胞可以是建立的细胞系,或根据Evans和Kaufman (Nature, 第292卷, 第154页, 1981)的方法新建立的细胞系。例如,在小鼠ES细胞的情况下,目前通常使用源自129小鼠品系的ES细胞,但其免疫学背景不清楚;出于获得具有免疫学清楚的遗传背景的纯系的ES细胞等来替代它的目的,也可以合适地使用从C57BL/6小鼠或从BDF<sub>1</sub>小鼠(C57BL/6和DBA/2的F<sub>1</sub>)建立的ES细胞等,其中可从C57BL/6收集的少数卵子已经通过与DBA/2杂交而进行改良。除了可收集的卵子数目高且卵子强健的优点以外,BDF<sub>1</sub>小鼠具有C57BL/6小鼠作为其背景;因此,可以有利地使用由其衍生的ES细胞,因为当制备疾病模型小鼠时,遗传背景可以通过与C57BL/6小鼠回交而用C57BL/6小鼠的遗传背景来替代。ES细胞可以在适当条件下通过单层培养(直至达到高密度),或悬浮培养(直至形成细胞聚集体)被分化为许多种类型的细胞,包括体壁肌(parietal muscle)、内脏肌和心肌[M. J. Evans和M. H. Kaufman, Nature第292卷, 第154页, 1981; G. R. Martin, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 第78卷, 第7634页, 1981; T. C. Doetschman等人, Journal of Embryology and Experimental Morphology, 第87卷, 第27页, 1985];通过分化整合了本发明的靶向载体的ES细胞获得的AIM表达缺陷型非人哺乳动物的细胞可用于AIM的体外细胞生物学研究中。

[0149] 例如,如果靶向载体被设计成通过将另一DNA片段插入AIM的外显子部分或启动子区域以破坏外显子或启动子的功能,则所述载体可以假定,例如,下面所示的构造。

[0150] 首先,为了确保另一DNA片段通过同源重组插入AIM的外显子或启动子部分,靶向载体需要包含与其它DNA片段中5'的上游和3'的下游的各目标位点(5'臂和3'臂)同源的序列。

[0151] 尽管插入的其它DNA片段没有特别限制,但可通过使用药物抗性基因或报道基因选择在其染色体中整合具有药物抗性或报道基因活性作为指标的靶向载体的ES细胞。在这里,药物抗性基因的例子和报道基因的例子包括,但不限于,分别新霉素磷酸转移酶II(nptII)基因、潮霉素磷酸转移酶(HPT)基因等,和 $\beta$ -半乳糖苷酶(IacZ)基因、氯霉素乙酰转移酶(cat)基因等。

[0152] 药物抗性或报道基因优选在任意选择的能够在哺乳动物细胞中发挥功能的启动子的控制下。例如,可以提到病毒启动子,诸如SV40早期启动子、巨细胞病毒(CMV)长末端重复(LTR)、劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR、小鼠白血病病毒(MoMuLV) LTR、和腺病毒(AdV)衍生的早期启动子、和用于哺乳动物组成型蛋白基因的启动子,诸如 $\beta$ -肌动蛋白基因启动子、PGK基因启动子和转铁蛋白基因启动子等。但是,如果将药物抗性或报道基因插入AIM中,从而使得其被置于AIM的内源启动子的控制之下,则控制所述基因的转录的启动子不需要存在于靶向载体中。

[0153] 靶向载体优选具有终止从药物抗性或报道基因下游的基因(多腺苷酸化(poIyA)信号,也称为终止子)转录mRNA的序列;例如,可以使用源自病毒基因或源自各种哺乳动物或鸟类基因的终止子序列。优选地,使用SV40终止子等。

[0154] 通常,哺乳动物中的基因重组主要非同源地发生;引入的DNA被随机地插入染色体上任意选择的位置。因此,不可能通过基于检测药物抗性或报道基因等的表达的选择(阳性选择)有效地只选择靶向至由同源重组靶向的内源AIM的那些克隆;有必要对于所有选择的克隆通过DNA杂交或PCR证实整合位点。因此,如果,例如,赋予丙氧鸟苷敏感性的单纯疱疹病毒衍生的胸苷激酶(HSV-tk)基因接合在与靶向载体的目标序列同源的区域之外,则具有随机插入其中的载体的细胞不能在包含丙氧鸟苷的培养基上生长,因为它们具有HSV-tk基因,而通过同源重组靶向至内源AIM基因座的细胞变得对丙氧鸟苷耐受,并得到选择,因为它们不具有HSV-tk基因(阴性选择)。可选地,如果将白喉毒素基因,例如,接合以替代HSV-tk基因,则具有随机插入其中的载体的细胞由于本身产生的毒素而死亡,从而使得也可以在药物不存在的情况下选择同源重组体。

[0155] 尽管磷酸钙共沉淀法、电穿孔法、脂质体转染法、逆转录病毒感染法、凝集法、显微注射法、基因枪(粒子枪)法、DEAE-葡聚糖法等中的任一种都可用于靶向载体引入ES细胞,但因为易于处理大量细胞等而通常选择电穿孔法,因为哺乳动物中的基因重组主要非同源地发生,从而使得如上所述获得同源重组体的频率低。对于电穿孔,可以原样使用用于转染到动物细胞中的普通条件;例如,电穿孔可以这样进行:通过对数生长期胰蛋白酶消化ES细胞以便将它们分散为单细胞,将细胞悬浮在培养基中以获得 $10^6$ 至 $10^8$ 个细胞/mI的密度,将细胞转移至小杯中,添加10至100  $\mu$ g的靶向载体,并施加200至600 V/cm的电脉冲。

[0156] 其中整合靶向载体的ES细胞可以通过由DNA杂交或PCR筛选从通过在饲养细胞上培养单细胞获得的集落分离和提取的染色体DNA进行确定;如果药物抗性基因或报道基因

被用作其它DNA片段,则可能在细胞阶段用其表达作为指标来选择转化体。例如,如果使用包含nptII基因作为用于阳性选择的标记基因的载体,将转染处理后的ES细胞在包含新霉素型抗生素诸如G418的培养基中培养,并且选择所得抗性集落作为转化体的候选者。如果使用包含HSV-tk基因作为用于阴性选择的标记基因的载体,将ES细胞在包含丙氧鸟苷的培养基中培养,并且选择所得抗性集落作为同源重组体的候选者。将获得的集落转移至各自培养板,并重复胰蛋白酶消化和培养基交换,此后保留部分用于培养,并且使剩余部分进行PCR或DNA杂交来证实引入的DNA的存在。

[0157] 当将证实其中整合了引入的DNA的ES细胞返回至源自相同物种的非人哺乳动物来源的胚胎时,ES细胞整合到宿主胚胎的ICM中,以形成嵌合胚胎。将其移植至受体母体(雌性胚胎受体)中,并允许继续发育,从而获得嵌合的KO动物。如果ES细胞有助于在嵌合动物中形成将分化为卵子或精子的原生殖细胞,则将获得种系嵌合体;通过将其交配,可以制备其中遗传维持AIM的表达缺陷的KO动物。

[0158] 为了制备嵌合胚胎,存在其中将最多至桑椹胚期的早期胚胎粘附并聚集在一起的方法(聚集嵌合体方法),和其中将细胞显微注射至胚泡的胚泡腔的方法(注射嵌合体方法)。尽管在使用ES细胞制备嵌合胚胎中已传统上广泛实施后者,但作为不需要显微操作器且可以容易操作的方法,近来已实施其中通过将ES细胞注射至8细胞期胚胎的透明带中而生成聚集嵌合体的方法,和其中通过将ES细胞团和除去透明带的8细胞期胚胎共培养并聚集而生成聚集嵌合体的方法。

[0159] 在所有情况下,宿主胚胎可以收集自如下以相同方式提到的可以用作转染至受精卵中的用于卵收集的雌性的非人哺乳动物;例如,在小鼠的情况下,为了使得可能通过毛色确定ES细胞对形成嵌合体小鼠的百分比贡献,优选的是,宿主胚胎收集自显示与ES细胞来源的品系的毛色不同的毛色的品系的小鼠。例如,在源自129小鼠品系(毛色:深浅环纹(agouti))的ES细胞的情况下,C57BL/6小鼠(毛色:黑色)或ICR小鼠(毛色:白化)用作用于收集卵的雌性;在源自C57BL/6或DBF1小鼠(毛色:黑色)或源自TT2细胞(源自C57BL/6和CBA的F1(毛色:深浅环纹))的ES细胞的情况下,ICR小鼠或BALB/c小鼠(毛色:白化)可用作用于收集卵的雌性。

[0160] 因为种系嵌合体形成能力主要取决于ES细胞和宿主胚胎的组合,所以更优选选择显示高种系嵌合体形成能力的组合。例如,在鼠的情况下,优选使用源自C57BL/6品系的宿主胚胎等用于源自129品系的ES细胞,并使用源自BALB/c品系的宿主胚胎等用于源自C57BL/6品系的ES细胞。

[0161] 优选的是,用于卵收集的雌性小鼠为约4至约6周龄,并且用于交配的雄性小鼠是约2至约8个月龄的相同品系。尽管交配可以通过自然交配,但其优选在施用促性腺激素(促卵泡激素,然后促黄体激素)以诱导过度排卵后进行。

[0162] 在胚泡注射方法的情况下,胚泡胚胎(例如,在鼠的情况下,在交配后约3.5天)收集自用于卵收集的雌性的子宫(或桑椹胚期中或收集自输卵管之前、之后的早期胚胎,可以在用于胚胎培养的培养基(下述)中培养,直至胚泡期),且将具有引入其中的靶向载体的ES细胞(约10至约15个细胞)用显微操作器注射入胚泡的胚泡腔,此后将胚胎移植到假孕胚胎受体雌性非人哺乳动物的子宫中。作为胚胎受体雌性非人哺乳动物,可以以相同的方式使用可用作转染到受精卵中的胚胎受体雌性的非人哺乳动物。

[0163] 在共培养方法的情况下,8-细胞期胚胎和桑椹胚(例如,在小鼠的情况下,在交配后约2.5天)收集自用于卵收集的雌性的输卵管和子宫(或8细胞期中或收集自输卵管之前、之后的早期胚胎,可以在用于胚胎培养的培养基(下述)中培养,直至8-细胞期或桑椹胚期),且将透明带溶解在酸性台氏溶液中,此后,将整合了靶向载体的ES细胞团(细胞数:约10至约15个细胞)置于用矿物油覆盖的用于胚胎培养的介质的微滴中,将上述8-细胞期胚胎或桑椹胚(优选2个胚胎)进一步放置,并且将它们共同培养过夜。将获得的桑椹胚或胚泡移植到如上所述的胚胎受体雌性非人哺乳动物的子宫。

[0164] 如果移植的胚胎成功植入且胚胎受体雌性受孕,则嵌合非人哺乳动物将通过自然分娩或剖腹产获得。允许已经自然分娩的胚胎受体雌性继续哺乳;如果幼崽通过剖腹产分娩,则幼崽可以由分别提供的用于哺乳的雌性(通常交配和分娩的雌性非人哺乳动物)进行哺乳。

[0165] 对于种系嵌合体的选择,如果已经确定ES细胞的性别,则首先选择与ES细胞性别相同的嵌合体小鼠(通常,选择雄性嵌合体小鼠,因为使用雄性ES细胞),然后基于表型诸如毛色选择显示高ES细胞贡献率(例如,50%或更多)的嵌合体小鼠被。例如,从D3细胞(其是源自129小鼠品系的雄性ES细胞)和源自C57BL/6小鼠的宿主胚胎之间的嵌合体胚胎获得嵌合体小鼠的情况下,优选的是,选择显示高百分比的深浅环纹毛色的雄性小鼠。选择的嵌合体非人哺乳动物是否是种系嵌合体可以基于通过与相同动物物种的适当品系杂交获得的F<sub>1</sub>动物的表型来确定。例如,在上述嵌合体小鼠的情况下,深浅环纹相对于黑色是显性的;因此,当雄性小鼠与雌性C57BL/6小鼠杂交时,如果选择的雄性小鼠是种系嵌合体,则获得的F<sub>1</sub>的毛色是深浅环纹的。

[0166] 通常获得如此获得的整合了靶向载体的种系嵌合体非人哺乳动物(创建者)作为AIM仅在同源染色体中任一者中敲除的杂合子。为了获得AIM在两条同源染色体中都敲除的纯合子,在如上所述获得的F<sub>1</sub>动物中,可以杂交杂合子的同胞动物。杂合子的选择可以通过,例如,通过DNA杂交或PCR筛选从F<sub>1</sub>动物的尾部分离和提取的染色体DNA来确定。获得的F<sub>2</sub>动物的1/4将是纯合子。

[0167] 在使用病毒作为靶向载体的另一个优选实施方案中,可以提到以下方法,所述方法包括用含有包含在5'和3'臂之间插入的用于阳性选择的标记基因和所述臂外的用于阴性选择的标记基因的DNA的病毒感染非人哺乳动物的ES细胞(参见,例如,Proceedings of the National Academy of Sciences, USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 第99卷,第4期,第2140-2145页,2002)。例如,当使用逆转录病毒或慢病毒时,将细胞接种到适当的培养容器诸如培养皿中,将病毒载体添加至培养液(如果需要,聚凝胺可以共存在),将细胞培养1至2天,此后,如上所述在加入选择药物的情况下继续培养,并选择其中整合了载体的细胞。

[0168] 关于用于敲低AIM的具体方法,可以提到以下方法,所述方法包括使用本身已知的制备转基因动物的技术引入编码AIM的反义RNA或siRNA(包括shRNA)的DNA,并允许其在受试者非人哺乳动物细胞等中表达。

[0169] 包含与期望多核苷酸的目标区域互补的碱基序列的DNA,即与期望多核苷酸可杂交的DNA可以被称为针对期望多核苷酸是“反义”的。

[0170] 具有与编码AIM或其部分的多核苷酸的碱基序列互补或实质上互补的碱基序列的

反义DNA可以是任何反义DNA,只要它包含与编码AIM或其部分的多核苷酸的碱基序列互补或实质上互补且具有抑制多核苷酸表达的作用的碱基序列。

[0171] 与编码AIM的多核苷酸实质上互补的碱基序列是,例如,与重叠区域的多核苷酸的互补链的碱基序列具有约70%或更多、优选约80%或更多、更优选约90%或更多、最优选约95%或更多的同源性的碱基序列。本文中的碱基序列同源性可以,例如,在以下条件(期望值= 10;允许缺口;过滤= 0N;匹配得分=1;错配得分=-3)下使用同源性计算算法NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)来计算。

[0172] 具体地,在编码AIM的多核苷酸的互补链的完整碱基序列中,(a)在意在抑制翻译的反义DNA的情况下,与编码AIM的N端部分的部分的碱基序列(例如,在起始密码子附近的碱基序列等)的互补链具有约70%或更多、优选约80%或更多、更优选约90%或更多、最优选约95%或更多的同源性的反义DNA是合适的,和(b)在意在用RNA酶H降解RNA的反义DNA的情况下,与编码AIM的包括内含子的多核苷酸的完整碱基序列的互补链具有约70%或更多、优选约80%或更多、更优选约90%或更多、最优选约95%或更多的同源性的反义DNA是合适的。

[0173] 具体地,当受试者非人哺乳动物是小鼠时,可以提到包含与在GenBank登录号AF011428下登记的碱基序列或其部分互补或实质上互补的碱基序列的反义DNA,优选地,包含与所述碱基序列或其部分互补的碱基序列的反义DNA等。

[0174] 可以基于编码克隆的或测定的AIM的DNA的碱基序列信息设计并合成具有与编码AIM或其部分的多核苷酸的碱基序列互补或实质上互补的碱基序列的反义DNA(下文也称为“本发明的反义DNA”)。此类反义DNA能够抑制AIM的复制和表达。具体地,本发明的反义DNA能够与从AIM转录的RNA(mRNA或初始转录产物)杂交,并且能够抑制mRNA的合成(加工)或功能(翻译成蛋白)。

[0175] 本发明的反义DNA的目标区域关于其长度没有特别限制,只要翻译成AIM由于反义DNA的杂交而受到抑制;目标区域可以是编码蛋白的mRNA的整个序列或部分序列,且长度最短为约10个碱基,并且最长为mRNA或初始转录产物的整个序列。具体地,可以选择AIM的5'末端发夹环、5'末端6碱基对重复、5'末端非翻译区、翻译起始密码子、蛋白编码区、ORF翻译终止密码子、3'末端非翻译区、3'末端回文区、或3'末端发夹环等作为反义DNA的优选目标区域,但也可以选择AIM基因的任何其它区域作为目标。例如,所述基因的内含子部分也可以是目标区域。

[0176] 此外,本发明的反义DNA可以是以下反义DNA,所述反义DNA不仅与AIM的mRNA或初始转录产物杂交以抑制翻译成蛋白,而且能够结合至作为双链DNA的AIM以形成三重链(三链体(triplex)),从而抑制转录为RNA。可选地,本发明的反义DNA可以是形成的DNA:RNA杂合体以诱导被RNA酶H降解的反义DNA。

[0177] 在编码区域内编码能够特异性切割编码AIM的mRNA或初始转录产物(在初始转录产物的情况下,包括内含子部分)的核酶的DNA也可以涵盖在本发明的反义DNA中。最通用核酶之一是感染性RNA诸如类病毒和拟病毒中发现的自我剪接RNA,并且锤头型、发夹型等是已知的。锤头型表现出酶活性,具有长度约40个碱基,并且可能通过使侧接锤头结构部分的两端的几个碱基(总共约10个碱基)变为与mRNA的期望切割位点互补的序列而特异性切割

目标mRNA。因为这种类型的核酶仅以RNA作为底物,所以它提供了不攻击基因组DNA的额外优点。如果AIM mRNA本身假定双链结构,则可以通过使用通过接合可以特异性结合RNA解旋酶的源自病毒核酸的RNA基序而制备的杂合核酶而使得目标序列成为单链的[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。此外,核酶可以通过进一步接合从促进转录产物易位到细胞质的tRNA修饰的序列而制备的杂合核酶[Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

[0178] 在本文中,由与AIM的mRNA或初始转录产物的编码区中的部分序列(在初始转录产物的情况下,包括内含子部分)同源的寡-RNA (oIigo-RNA)和与之互补的链(即所谓的单链干扰RNA(siRNA))组成的双链RNA也可用于制备本发明的KD动物。已知所谓的RNA干扰(RNAi)(这是当siRNA被引入细胞中,与所述RNA同源的mRNA被降解的现象)发生在线虫、昆虫、植物等中;因为这种现象也被证实广泛发生在动物细胞中[Nature, 411(6836): 494-498 (2001)],所以siRNA已经被用作核酶的替代技术。siRNA可以使用商购软件(例如RNAi Designer; Invitrogen)基于作为目标的mRNA的碱基序列信息来适当地设计。

[0179] 本发明的反义寡-DNA和核酶可以通过基于AIM的cDNA序列或基因组DNA序列来确定mRNA或初始转录产物的目标序列,并使用商购的DNA/RNA合成仪(Applied Biosystems, Beckman等)合成与其互补的序列来制备。通过经由根据需要使用的适当接头(衔接分子)序列将合成的反义寡-DNA或核酶插入在表达载体中启动子的下游,可以制备编码反义寡-RNA或核酶的DNA表达载体。在这里可以优选使用的表达载体的例子包括来自大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或酵母、噬菌体诸如 $\lambda$ 噬菌体、逆转录病毒诸如莫洛尼白血病病毒、动物或昆虫病毒诸如慢病毒、腺伴随病毒、牛痘病毒和杆状病毒等的质粒。尤其而言,质粒(优选来自大肠杆菌、枯草芽孢杆菌或酵母的质粒,特别是来自大肠杆菌的质粒)和动物病毒(优选逆转录病毒、慢病毒)是优选的。启动子的例子包括病毒启动子,诸如SV40早期启动子、巨细胞病毒(CMV)长末端重复(LTR)、劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR、小鼠白血病病毒(MoMuLV) LTR、和腺病毒(AdV)衍生的早期启动子、和用于哺乳动物组成型蛋白基因的启动子,诸如 $\beta$ -肌动蛋白基因启动子、PGK基因启动子和转铁蛋白基因启动子等。

[0180] 编码较长反义RNA(例如,AIM mRNA的全长互补链等)的DNA表达载体可以通过经由根据需要使用的适当接头(衔接分子)序列以相反方向将通过常规方法克隆的AIM cDNA插入在表达载体中启动子的下游来制备。

[0181] 同时,编码siRNA的DNA可以通过分别合成编码有义链的DNA和编码反义链的DNA,并将它们插入适当的表达载体中来制备。作为siRNA表达载体,可以使用具有PoI III系统启动子诸如U6或H1的siRNA表达载体。在这种情况下,在整合了载体的动物细胞中,将有义链和反义链转录并退火以形成siRNA。shRNA可以通过将包含通过长度碱基(所述长度碱基允许形成适当的环结构(例如,约15至25个碱基))分隔的有义链和反义链的单元插入适当表达载体中来制备。作为shRNA表达载体,可以使用具有PoI III系统启动子诸如U6或H1的shRNA表达载体。在这种情况下,在整合了表达载体的动物细胞中转录的shRNA本身形成环,然后由内源酶Dicer酶等处理,以形成成熟的siRNA。可选地,也可能通过使用PoI II启动子表达包含作为目标的siRNA序列的微小RNA(miRNA)而实现通过RNAi的敲低。在这种情况下,通过显示组织特异性表达的启动子,组织特异性敲低也是可能的。

[0182] 为了将包含编码AIM的反义RNA、siRNA、shRNA或miRNA的DNA的表达载体引入细胞,

根据目标细胞适当地使用本身已知的方法。例如,为了引入早期胚胎诸如受精卵,使用显微注射法。为了引入ES细胞,可以使用磷酸钙共沉淀法、电穿孔法、脂质体转染法、逆转录病毒感染法、凝集法、显微注射法、粒子枪方法、DEAE-葡聚糖法等。可选地,当逆转录病毒、慢病毒等被用作载体时,有时可能通过将病毒添加至早期胚胎或ES细胞,并培养胚胎或细胞1至2天以使用病毒感染细胞而便利地实现转染。从ES细胞(建立创建者)再生个体、传代(制备纯合子)等可以如上关于本发明的KO动物所述来进行。

[0183] 在一个优选的实施方案中,通过显微注射将包含编码AIM的反义RNA、siRNA、shRNA、或miRNA的DNA的表达载体引入作为受试者的非人哺乳动物的早期胚胎(受精卵)。

[0184] DNA显微注射至受精卵中可以通过常规方法使用通常已知的装置诸如显微操作器来进行。简而言之,使用固定移液器将置于用于胚胎培养的培养基的微滴中的受精卵抽吸并固定,并且使用注射移液器将DNA溶液直接注射至雄性或雌性原核,优选为雄性原核。用于引入的DNA优选在使用CsCl密度梯度超速离心或者阴离子交换树脂柱等高度纯化后使用。还优选的是,将用于引入的DNA通过使用限制性酶切割载体部分预先进行线性化。

[0185] 引入DNA后,将受精卵通过微滴培养法等5%气态二氧化碳/95%大气中在用于胚胎培养的培养基中培养,直至1细胞期至胚泡期,此后将其移植到使得假孕的用于接受胚胎的雌性非人哺乳动物的输卵管或子宫。用于接受胚胎的雌性非人哺乳动物可以是任一种与待移植的早期胚胎来源的动物相同的物种;例如,当移植小鼠早期胚胎时,优选使用雌性ICR小鼠(优选约8至约10周龄)等。使得用于接受胚胎的雌性非人哺乳动物假孕的已知方法是,例如,包括将雌性与切除输精管(结扎输精管)的相同物种的雄性非人哺乳动物(例如,在小鼠的情况下,用雄性ICR小鼠(优选约2个月或更大龄))交配,并选择证实具有阴道塞的雌性的方法。

[0186] 使用的用于胚胎培养的雌性可以是已经自发排卵的雌性,或者在与切除输精管(结扎输精管)的雄性交配之前接受施用的促黄体激素释放激素(通常简称为LHRH)或其类似物以诱导生育力的雌性。LHRH类似物的例子包括[3,5-DiI-Tyr<sup>5</sup>]-LH-RH、[GIn<sup>8</sup>]-LH-RH、[D-AIa<sup>6</sup>]-LH-RH、[des-GIy<sup>10</sup>]-LH-RH、[D-His(BzI)<sup>6</sup>]-LH-RH和其乙基酰胺类(Ethylamides)等。施用的LHRH或其类似物的量和施用后与雄性非人哺乳动物的交配的时间根据非人哺乳动物的种类而变化。例如,当非人哺乳动物是小鼠(优选ICR小鼠等)时,通常优选的是,在施用LHRH或其类似物之后约4天将雌性小鼠与雄性小鼠交配;施用的LHRH或其类似物的量通常为约10至60 μg/个体,优选约40 μg/个体。

[0187] 通常,如果待移植的早期胚胎是在桑椹胚期或之后,则将胚胎移植到用于接受胚胎的雌性的子宫;如果早期胚胎是在桑椹胚期之前的阶段(例如,1-细胞期至8细胞期胚胎),则将胚胎移植到输卵管。根据待移植的胚胎的发育阶段,在变得假孕之后给定天数过去之后,适当地使用用于接受胚胎的雌性。例如,在小鼠的情况下,变得假孕之后约0.5天的雌性小鼠优选用于移植2-细胞期胚胎,并且变得假孕之后约2.5天的雌性小鼠优选用于移植胚泡胚胎。将用于接受胚胎的雌性麻醉(优选地,使用阿佛丁、耐波他等)后,进行切开,拉出卵巢,并且使用用于胚胎移植的移液器将在用于胚胎培养的培养基中悬浮的早期胚胎(约5至约10个胚胎)注射入输卵管的腹腔口(abdominal ostium)的附近或子宫角的输卵管接合部。

[0188] 当移植的胚胎成功植入且胚胎受体雌性受孕时,非人哺乳动物幼崽将通过自然分

娩或剖腹产获得。允许已经自然分娩的胚胎受体雌性继续哺乳；当幼崽通过剖腹产分娩时，幼崽可以由分别提供的用于哺乳的雌性进行哺乳（例如，在小鼠的情况下，具有通常交配和分娩的雌性小鼠（优选为雌性ICR小鼠等））。

[0189] 确保在受精卵细胞阶段转移编码AIM的反义RNA、siRNA、shRNA或miRNA的DNA，从而使引入的DNA将存在于受试者非人哺乳动物的所有种系细胞和体细胞中。引入的DNA是否被整合在染色体DNA中可以通过，例如，通过DNA杂交或PCR筛选从幼崽的尾部分离和提取的染色体DNA进行确定。如上所述获得的后代非人哺乳动物(F<sub>0</sub>)的种系细胞中表达载体的存在意指所述表达载体存在于随后世代(F<sub>1</sub>)中所有动物的所有生殖系细胞和体细胞中。

[0190] 通常，F<sub>0</sub>动物作为在任一同源染色体中具有引入的DNA的杂合子获得。不同F<sub>0</sub>个体具有在不同的染色体上随机插入的引入的DNA，除非插入是通过同源重组。为了获得在两条同源染色体中都具有表达载体的纯合子，将F<sub>0</sub>动物与非转基因动物杂交以制备F<sub>1</sub>动物，并且可以杂交在任一同源染色体中具有引入的DNA的其杂合的同胞动物。如果引入的DNA只在一个基因座上整合，则1/4获得的F<sub>2</sub>动物将是纯合子。

[0191] 在使用病毒作为载体的另一个优选的实施方案中，与KO动物的上述情况的一样，可以提到包括用包含编码AIM的反义RNA、siRNA、shRNA或miRNA的DNA的病毒感染非人哺乳动物的早期胚胎或ES细胞的方法。当受精卵被用作细胞时，优选的是，在感染前除去透明带。病毒载体感染后培养1至2天后，在早期胚胎的情况下，将受精卵移植到如上所述使得假孕的用于接受胚胎的雌性非人哺乳动物的输卵管或子宫，或者在ES细胞的情况下，受精卵继续在添加如上所述的选择药物的情况下进行培养，并且选择整合了载体的细胞。

[0192] 此外，如Proceedings of the National Academy of Sciences, USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)，第98卷，第13090-13095页，2001中所述，从雄性非人哺乳动物收集的精原细胞在与STO饲养细胞共培养的过程中用病毒载体感染，此后将精原细胞注入雄性不育的非人哺乳动物的输精管，并且将雄性不育的非人哺乳动物与雌性非人哺乳动物交配，由此可以有效获得对于编码AIM的反义RNA、siRNA、shRNA或miRNA的DNA是杂合-Tg (+/-)的幼崽。

[0193] 描述于Miyazaki T. 等人(J. Exp. Med., 189, 413-422, 1999或WO 2013/162021)中或通过上述方法获得的本发明的AIM基因表达缺陷的非人哺乳动物在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下具有以下特征：

(1)与对照肾相比，在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中，坏死肾小管细胞积累，且肾实质变得纤维化，

(2)与对照肾相比，在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中，肾小球结构崩解，且肾小球变得纤维化，

(3)与对照肾相比，在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中，促进了炎症性细胞因子的表达，

(4)与对照肾相比，在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中，促进了巨噬细胞的渗入，

(5)与对照非人哺乳动物相比，AIM表达缺陷型非人哺乳动物的血液BUN值较高，

(6)与对照非人哺乳动物相比，AIM表达缺陷型非人哺乳动物的存活率较低，

(7) AIM施用改善了前述(1) - (6)。至少在常规公开已知的AIM KO小鼠中尚未报道这些表型。具体地,它们类似于以下疾病的病理学:与输尿管结石、上升泌尿道感染、肿瘤等引起的输尿管挤压·阻塞所触发的急性肾病(急性肾衰竭)有关的慢性肾病,和与糖尿病、高血压等引起的肿瘤块、血栓或肾血管狭窄或阻塞所造成的缺血性肾病有关的慢性肾病,这是一个新发现。

[0194] (1)与对照肾(正常肾,或没有输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾,在下文中含义相同)相比,在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中,坏死肾小管细胞积累且肾实质变得纤维化,这意味着:通过对本发明的AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注,与对照肾相比,在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中观察到坏死肾小管细胞的积累和肾实质的广泛纤维化。通过例如肾组织切片的苏木精-伊红染色可以证实坏死肾小管细胞的积累,且通过Azan染色和苏木精染色的同时染色可以证实肾实质纤维化。在下面提及的实施例中,从输尿管阻塞以后第14天,与对照肾相比,在AIM敲除的小鼠中观察到显著差异。另外,从短暂肾缺血/再灌注以后第7天,与对照肾相比,在AIM敲除的小鼠中观察到显著差异。

[0195] (2)与对照肾相比,在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中,肾小球结构崩解且肾小球变得纤维化,这意味着:通过对本发明的AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注,与对照肾相比,在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中观察到肾小球结构的崩解和肾小球的纤维化。通过例如肾组织切片的苏木精-伊红染色可以证实肾小球结构的崩解,且通过Azan染色和苏木精染色的同时染色可以证实肾小球的纤维化。在下面提及的实施例中,从输尿管阻塞以后第14天,与正常肾相比,在AIM敲除的小鼠中观察到显著差异。另外,从短暂肾缺血/再灌注以后第7天,与正常肾相比,在AIM敲除的小鼠中观察到显著差异。

[0196] (3)与对照肾相比,在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中,促进了炎症性细胞因子的表达,这意味着:通过对本发明的AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注,与对照肾相比,在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中促进了MCP-1、IL-1 $\beta$ 和IL-6的表达。通过例如定量RT-PCR、RNA印迹方法等,可以证实表达的促进。在下面提及的实施例中,与正常肾相比在AIM敲除的小鼠中观察到MCP-1和IL-6的显著差异,并且也观察到IL-1 $\beta$ 的高表达的趋势。

[0197] (4)与对照肾相比,在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中,促进了巨噬细胞的渗入,这意味着:通过对本发明的AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注,与对照肾相比,在经历输尿管阻塞或短暂肾缺血/再灌注的肾中,巨噬细胞(Mac-1阳性细胞)的数目较高。通过例如用流式细胞计等鉴别Mac-1阳性细胞,可以证实细胞数目的计数。在下面提及的实施例中,证实了与正常肾相比在AIM敲除的小鼠中巨噬细胞的比率较高。

[0198] (5)与对照非人哺乳动物相比,AIM表达缺陷型非人哺乳动物的血液BUN值较高,这意味着:通过对本发明的AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注,与对照非人哺乳动物相比,AIM表达缺陷型非人哺乳动物的血液BUN值较高。

[0199] (6)与对照非人哺乳动物相比,AIM表达缺陷型非人哺乳动物的存活率较低,这意味着:通过对本发明的AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注,与对照非人哺乳动物相比,存活率较低。

[0200] (7) AIM施用会改善前述(1) - (6),这意味着:通过对本发明的AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注,随后进行AIM施用,在坏死肾小管细胞的积累和肾小球结构的崩解中观察到BUN值的显著下降,并且与其有关的肾实质和肾小球的纤维化明显改善,炎症性细胞因子的表达下降,存活率改善,并且巨噬细胞的渗入被抑制。

[0201] 这些发现指示,进行了单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的AIM表达缺陷型非人哺乳动物可用作肾疾病的动物模型,且可以进一步用于筛选肾疾病的预防或治疗药物。具体地,本发明的筛选方法包括下述步骤:

(1)在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下,将测试物施用给AIM表达缺陷型非人哺乳动物的步骤,

(2)观察给其施用测试物的AIM表达缺陷型非人哺乳动物的下述性能的任意一项或多项的步骤:

- (i)坏死肾小管细胞和肾实质纤维化的积累,
- (ii)肾小球结构的崩解和纤维化,
- (iii)肾中炎症性细胞因子的表达水平,
- (iv)肾中巨噬细胞的比率,
- (v) BUN值,
- (vi)存活率,

(3)通过与在不施用测试物情况下的那些进行对比来选择改善上述特性中的任意一项或多项的测试物的步骤。

[0202] 在本发明的筛选方法中,单侧输尿管梗阻是指一个肾的输尿管的阻塞。输尿管阻塞能够在特定肾的肾实质中诱导肾小管和肾小球的坏死,所述特定肾发生阻塞,并随后发生炎症和纤维化,最后发生肾的功能病症。另外,单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注表示预先分离一个肾,在2周以后在剩余肾的肾动脉中发生阻塞以诱导缺血,和30 min以后阻塞的缓解允许血流的再灌注。该短暂缺血造成肾小管坏死的进展以及轻度纤维化约3天,由此导致肾功能下降。两侧短暂肾缺血/再灌注表示在不分离一个肾的情况下两个肾的肾动脉的阻塞以诱导缺血,并且30 min以后阻塞的缓解允许血流的再灌注。

[0203] 作为要施用给AIM表达缺陷型非人哺乳动物的测试物,可以使用蛋白、肽、抗体、非肽化合物、合成化合物、发酵产物、细胞提取物、植物提取物、动物组织提取物、血浆等。测试物的施用时机可以是在单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注之前或同时,或者在AIM表达缺陷型非人哺乳动物的单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注以后观察上述特性之后。施用方法可以是口服或胃肠外的。对于口服施用,其也可以通过与饲料或饮用水混合来施用。作为胃肠外施用,可以提到腹膜内施用、静脉内注射、皮下注射、真皮内注射、肌肉注射、通过滴注等来施用、栓剂的直肠施用等。施用可以包括单次施用或多次施用。

[0204] 在施用测试物以后,通常3或4天或更晚,优选地7天或更晚,更优选地14天或更晚,

观察施用测试物的AIM表达缺陷型非人哺乳动物的特性。可以如下观察与其有关的坏死肾小管细胞和肾实质纤维化的积累：用苏木精-曙红或Azan和苏木精将分离自前述哺乳动物的肾的肾组织切片染色，并将其染色水平转化成数值。与上面类似，可以如下观察肾小球结构的崩解和肾小球纤维化的水平：用苏木精-曙红或Azan和苏木精将前述分离的肾的肾组织切片染色，并将其染色水平转化成数值。通过定量RT-PCR等可以测量肾中炎症性细胞因子的表达水平。这里要测量的炎症性细胞因子的例子包括MCP-1、IL-1 $\beta$ 和IL-6。通过用流式细胞计等鉴别Mac-1阳性细胞，可以证实肾中巨噬细胞的比率。通过测量血液尿素氮浓度，可以观察BUN值。

[0205] 将如上所述获得的上述特性的观察结果与在不施用测试物情况下的结果进行对比。可选地，预先绘制肾疾病的存在与否和上述特性的关联图，并且可以将获得的上述特性的观察结果与关联图进行对比。优选基于显著差异的存在与否进行对比。

[0206] 当获得的上述特性的观察结果与不施用测试物情况下的那些相比得到改善时，可以选择所谓测试物作为肾疾病的预防或治疗剂。在这里，得到改善意指(i)坏死肾小管细胞的积累的水平(苏木精-伊红染色、或Azan染色和苏木精染色的水平)显著低于在不施用测试物情况下的水平，(ii)肾小球结构的崩解的水平(苏木精-伊红染色、或Azan染色和苏木精染色的水平)显著低于在不施用测试物情况下的水平，(iii)肾中炎症性细胞因子的表达水平显著低于在不施用测试物情况下的水平，(iv)肾中巨噬细胞的比率显著低于在不施用测试物情况下的水平，(v) BUN值显著低于在不施用测试物情况下的水平，和(vi)存活率显著高于在不施用测试物情况下的水平。

[0207] 当在上面选择的测试物被用作肾疾病的预防或治疗剂时，它可以以与本发明的AIM相同的方式配制，并且通过类似的施用途径并以类似的剂量施用。要作为预防或治疗剂的目标的肾疾病可以类似于上述那些。

[0208] 另外，由于AIM表达缺陷型非人哺乳动物可用作在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下的肾疾病的动物模型，所以所述哺乳动物可以用于肾疾病的预防或治疗药物的评价方法中。因此，本发明还提供了评价肾疾病的预防或治疗剂的预防或治疗效果的方法，其包括使用如下得到的动物：对AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注。具体地，本发明的评价方法包括以下步骤：

(1)在执行单侧输尿管梗阻、单肾切除术以后的短暂肾缺血/再灌注或两侧短暂肾缺血/再灌注的条件下，将肾疾病的预防或治疗剂施用给AIM表达缺陷型非人哺乳动物的步骤，

(2)观察给其施用肾疾病的预防或治疗剂的AIM表达缺陷型非人哺乳动物的下述性能的任意一项或多项的步骤：

- (i)坏死肾小管细胞和肾实质纤维化的积累，
- (ii)肾小球结构的崩解和纤维化，
- (iii)肾中炎症性细胞因子的表达水平，
- (iv)肾中巨噬细胞的比率，
- (v) BUN值，
- (vi)存活率，

(3)通过将上述特性中的任意一项或多项与不施用肾疾病的预防或治疗剂的情况下的那些进行对比来评价肾疾病的预防或治疗剂的作用的步骤。

[0209] 在本发明的评价方法中要施用给AIM表达缺陷型非人哺乳动物的肾疾病的预防或治疗剂可以是已知的肾疾病的预防或治疗剂。其例子包括、但不限于抑制剂(例如,血管紧张素-转换酶-抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、钙拮抗剂、凝乳酶抑制剂、 $\alpha$ 阻滞剂、 $\beta$ 阻滞剂等);利尿剂(例如,碳酸酐酶抑制剂、祥利尿剂、噻嗪利尿剂、抗醛固酮药物、保钾利尿剂等);活性型维生素D3制剂(例如,骨化三醇、阿法骨化醇、马沙骨化醇、氟骨三醇等);口服碳质吸附剂制剂(例如,活性炭等);校正钾的药物(例如,聚苯乙烯磺酸钠等);磷吸附剂(例如,碳酸钙、醋酸钙、盐酸司维拉姆、碳酸镧等)、红血细胞生成刺激因子制剂(红细胞生成刺激剂、ESA)(例如,促红细胞生成素制剂)、氨基酸输注制剂等。肾疾病的预防或治疗剂的施用时期、施用方法、施用频率等可以与上述筛选方法中的那些相同。

[0210] 待通过本发明的评价方法观察的特性的观察方法可以根据上述筛选方法的描述来进行。当通过评价方法获得的上述特性的观察结果与不施用肾疾病的预防或治疗剂相比改善更大程度时,可以将测试物评价为作为肾疾病的预防或治疗剂具有较高的预防或治疗效果。如本文中所示,得到改善意指与上述相同。

[0211] 在下面提及的本发明的实施例中,证实了具有慢性肾疾病的患者的血液AIM浓度与肾功能(eGFR:肾小球滤过率)相关。具体地,证实了具有低于给定水平的血液AIM浓度的慢性肾疾病患者的肾功能在2-3年以后下降。以上内容提示,通过测量测试受试者的血液AIM浓度,可以预测慢性肾疾病患者的预后。因此,本发明提供了预测具有肾疾病的患者的预后的方法,其包括测量受试者的样品中AIM的浓度。

[0212] 尽管本发明的预测方法可适用的测试受试者没有特别限制,但是可以提到例如具有发生急性肾衰竭或慢性肾疾病的风险或被怀疑已经发生急性肾衰竭或慢性肾疾病的测试受试者。尽管慢性肾疾病没有限制,但是它包括,例如,慢性肾炎、慢性肾衰竭、肾病综合征、糖尿病肾病、肾硬化、IgA肾病、高血压肾病、与胶原疾病有关的肾病或IgM肾病等。

[0213] 待用于本发明的预测方法的样品没有特别限制,只要它收集自上述测试受试者,并且包含要作为测量目标的AIM基因产物(例如,RNA、蛋白、其裂解产物等)。其例子包括体液诸如血液、血浆、血清、淋巴液、尿液、汗液、唾液、滑液等或其级分,和其中含有的细胞,特别是巨噬细胞等,优选地,可以提及血液、血浆、血清。

[0214] 通过从前述样品制备RNA(例如,总RNA,mRNA)级分,并测量级分中含有的AIM基因的转录产物,可以测量从测试受试者收集的样品的AIM浓度。尽管RNA级分可以通过使用已知方法(诸如胍-CsCl超速离心法、AGPC法等)来制备,但可以通过使用商购的RNA提取试剂盒(例如RNeasy Mini试剂盒;由QIAGEN等制造)从痕量巨噬细胞迅速且方便地制备高纯总RNA。用于检测RNA级分中AIM基因的转录产物的方法的例子包括使用杂交的方法(RNA印迹、斑点印迹、DNA芯片分析等),使用PCR的方法(RT-PCR、竞争性PCR、实时PCR等)等。定量PCR方法,诸如竞争性PCR、实时PCR等是优选的,因为AIM基因表达的变化可以从痕量的巨噬细胞迅速、方便且高定量地检测。

[0215] 当采用RNA印迹或斑点印迹杂交时,AIM基因的转录产物可以通过使用能够与基因的转录产物杂交的核酸(探针)来测量。此类核酸的例子包括能够在高严谨条件下与包含AIM基因的转录产物所示的碱基序列(例如,SEQ ID NO:1所示的碱基序列)的核酸杂交的核

酸。高严谨条件是上述条件等。更优选地,可以提及包含与AIM基因的转录产物所示的碱基序列(例如,SEQ ID NO: 1所示的碱基序列)互补的碱基序列的核酸。

[0216] 待用作探针的核酸可以是双链或单链的。在双链核酸的情况下,它可以是双链DNA、双链RNA、或DNA:RNA杂合体。在单链的情况下,可以使用反义链。尽管核酸的长度没有特别限制,只要它可以与目标核酸特异性杂交,但例如,它不小于约15个碱基,优选不小于约30个碱基。核酸优选能够检测且定量目标核酸的标记试剂来标记。作为标记试剂,例如,使用放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质等。作为放射性同位素,例如,使用 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 等。作为上述酶,优选具有高比活性的稳定酶;例如,使用 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶、苹果酸脱氢酶等。作为荧光物质,例如,使用荧光胺、异硫氰酸荧光素等。作为发光物质,例如,使用鲁米诺、鲁米诺衍生物、萤光素、光泽精等。此外,还可以使用生物素-(链霉)抗生物素蛋白用于结合探针和标记。

[0217] 当采用RNA杂交时,将上述制备的RNA级分通过凝胶电泳分离,转移至硝酸纤维素、尼龙、聚偏二氟乙烯等的膜上,使其在上述高严谨条件下在包含如上述制备的标记探针的杂交缓冲液中杂交,且通过合适的方法对于各条带测量与膜结合的标记的量,由此可以测量AIM基因的表达水平。此外,在斑点印迹的情况下,AIM基因的表达水平可以通过使点有RNA级分的膜以相同方式进行杂交反应并测量斑点的标记的量来测量。

[0218] 在另一个优选的实施方案中,定量PCR方法用作用于测量AIM浓度的方法。定量PCR的例子包括竞争性PCR、实时PCR等。

[0219] 用作PCR中的引物的寡核苷酸组没有特别限制,只要它们可以各自与AIM基因的转录产物的有义链(编码链)和反义链(非编码链)特异性杂交,并且可以扩增它们夹心的DNA片段。例如,可以提到各自具有约15-约100个碱基、优选约15-约50个碱基的长度且设计以扩增约100 bp - 1 kbp DNA片段的寡DNA组。更具体地,作为用作引物的寡核苷酸组,可以提到能够在高严谨条件下与包含与上述碱基序列互补的碱基序列的核酸(反义链)杂交的核酸。如本文中所使用,高严谨条件如上定义。更优选地,可以提及包含与SEQ ID NO: 1所示的碱基序列互补的碱基序列的核酸,和包含与上述核酸的碱基序列互补的碱基序列的核酸。

[0220] 在竞争性RT-PCR中,期望的DNA的量通过以下测定:允许已知量的可以由能够扩增期望的DNA的引物组扩增的另一种模板核酸作为竞争物在反应液中共存,以引起竞争性扩增反应,并比较扩增产物的量。因此,当使用竞争性RT-PCR时,除了上述引物组以外,使用已知量的可以用引物组扩增且在扩增后可以与目标核酸的扩增产物(即AIM基因的转录产物)区分(例如,不同的扩增大小、限制性酶处理后的片段的不同迁移模式等)的竞争物核酸。因为当目标核酸和竞争物核酸竞争引物时扩增竞争性地发生,所以扩增产物的定量比例反映初始模板的定量比例。竞争物核酸可以是DNA或RNA。在DNA的情况下,cDNA通过逆转录反应从如上所述制备的RNA级分合成,并且PCR可以在上述引物组和竞争物共同存在的情况下进行。在RNA的情况下,将竞争物添加至RNA级分并进行逆转录反应,且添加上述引物组并进行PCR。在后者的情况下,可以估计初始mRNA的绝对量,因为还考虑逆转录反应效率。

[0221] 另一方面,在实时PCR中,使用荧光试剂实时监测扩增量,并且整体地包含热循环仪和荧光分光光度计的装置是必要的。此类装置是商购的。根据待使用的荧光试剂,存在几种方法,并且,例如,可以提到嵌入剂法、TaqMan<sup>TM</sup>探针法、分子信标法等。在任何情况下,

cDNA通过逆转录反应从如上所述制备的RNA级分合成,并将上述引物组和荧光试剂(探针)(通过结合双链DNA而发射荧光的试剂(嵌入剂),诸如SYBR Green I、溴化乙锭等)、可用作上述探针的核酸(所述核酸在扩增区域内与目标核酸的杂交)(其中两个末端分别用荧光物质(例如,FAM、HEX、TET、FITC等)和猝灭物质(例如TAMRA、DABCYL等)等修饰)(TaqMan™探针或分子信标探针)各自添加至PCR反应系统。由于嵌入剂结合合成的双链DNA且在照射激发光之后发射荧光,所以可以通过测量荧光的强度监测扩增产物的量,基于其可以推定初始模板cDNA的量。TaqMan™探针是能够杂交至目标核酸的扩增区域的寡核苷酸,其两个末端分别被荧光物质和猝灭物质修饰。它在退火过程中杂交至目标核酸,但由猝灭物质的存在禁止其发射荧光,并且当在延伸过程中被DNA聚合酶的外切酶活性分解时(其释放荧光物质)发射荧光。因此,通过测量荧光强度,可以监测扩增产物的量,基于其可以推定初始模板cDNA的量。分子信标探针是能够杂交至目标核酸的扩增区域且具有发夹型二级结构的寡核苷酸,其两个末端分别被荧光物质和猝灭物质修饰。当它具有发夹结构时,它由于猝灭物质的存在而不发射荧光,并且当荧光物质和猝灭物质之间的距离在退火过程中杂交至目标核酸之后增加而发射荧光。因此,可以通过测量荧光强度监测扩增产物的量,基于其可以推定初始模板cDNA的量。由于实时RT-PCR允许实时监测PCR的扩增量,所以它不需要电泳且可以更快速地分析AIM基因的表达。

[0222] 在另一个实施方案中,从测试受试者收集的样品的AIM浓度可以通过从样品制备蛋白级分并检测级分中含有的AIM来测量。AIM的检测可以使用针对AIM的抗体通过免疫测量方法(例如,ELISA、FIA、RIA、蛋白质印迹等)来进行。可选地,AIM的检测也可以通过质谱法诸如MALDI-TOFMS等来进行。

[0223] 针对AIM的抗体可以根据通常用于产生多克隆抗体或单克隆抗体的技术且使用包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列相同或实质上相同的氨基酸序列或其部分氨基酸序列的蛋白作为免疫抗原来获得。

[0224] 在将这些个别免疫测量方法应用于本发明的诊断方法时,不必设置具体条件、程序等。使本领域技术人员普通技术考虑各方法中的常规条件和程序,可以构建AIM的测量系统。对于这些一般技术手段的详情,可以参考汇编、书本等。例如,Hiroshi Irie, 编,“Radioimmunoassay”(Kodansha Ltd., 1974年出版), Hiroshi Irie, 编,“Sequel to the Radioimmunoassay”(Kodansha Ltd., 1979年出版), Eiji Ishikawa等人, 编,“Enzyme Immunoassay”(Igakushoin, 1978年出版), Eiji Ishikawa等人, 编,“Enzyme Immunoassay”(第2版)(Igakushoin, 1982年出版), Eiji Ishikawa等人, 编,“Enzyme Immunoassay”(第3版)(Igakushoin, 1987年出版), Methods in ENZYMOLOGY, 第70卷(Immunochemical Techniques (部分A)), 出处同上, 第73卷(Immunochemical Techniques (部分B)), 出处同上, 第74卷(Immunochemical Techniques (部分C)), 出处同上, 第84卷(Immunochemical Techniques (部分D: Selected Immunoassays)), 出处同上, 第92卷(Immunochemical Techniques (部分E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), 出处同上, 第121卷(Immunochemical Techniques (部分I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(都由Academic Press Publishing出版)等。

[0225] 本发明的预测方法可以具体地是包括下述步骤的方法。

[0226] (1)测量健康人和测试受试者的样品的AIM浓度的步骤,

(2)将在健康人中测量的AIM浓度和在测试受试者中测量的AIM浓度进行对比的步骤。

[0227] 如上所述,在具有慢性肾疾病的患者中,具有慢性肾疾病且表现出比给定水平更低的本发明的AIM的血液浓度的患者的肾功能在2 - 3年以后下降。因此,如上所述,当测量的AIM浓度低于健康人的AIM浓度或给定水平时,可以判断测试受试者的慢性肾疾病在将来非常可能下降。可选地,预先绘制慢性肾疾病的下降和AIM浓度的关联图,并且可以将获得的观察结果与关联图进行对比。优选基于显著差异的存在与否进行对比。

[0228] 除了上述步骤(1)和(2)以外,本发明的预测方法可以包括(3)当测试受试者的AIM浓度显著高于健康人的AIM浓度时,判断测试受试者的慢性肾疾病在将来非常可能下降的步骤。

[0229] 此外,在下面提及的本发明的实施例中,在具有急性肾衰竭的患者和经历两侧短暂肾缺血/再灌注的小鼠的尿中发现了与健康个体相比显著更高的AIM浓度。以上内容提示,通过测量测试受试者的尿的AIM浓度,可以检查急性肾衰竭。因此,本发明提供了急性肾衰竭的测试方法,其包括测量受试者的样品中AIM的浓度。

[0230] 尽管本发明的测试方法可适用的测试受试者没有特别限制,但是可以提及例如具有发生急性肾衰竭的风险或被怀疑已经发生急性肾衰竭的测试受试者。可用于本发明的测试方法的样品如关于本发明的预测具有肾疾病的患者的预后的方法所述,且优选地,可以提及尿。另外,从测试受试者收集的样品的AIM浓度的测量如关于本发明的预测具有肾疾病的患者的预后的方法所述。

[0231] 本发明的测试方法可以具体地是包括下述步骤的方法。

[0232] (1)测量健康人和测试受试者的样品的AIM浓度的步骤,

(2)将在健康人中测量的AIM浓度和在测试受试者中测量的AIM浓度进行对比的步骤。

[0233] 如上所述,本发明的AIM的尿浓度在具有急性肾衰竭的患者中显著高于在健康人中。因此,当如上所述测量AIM浓度并且结果显示与健康人相比显著更高的浓度时,可以判断测试受试者已经发生急性肾衰竭。可选地,预先绘制急性肾衰竭的存在与否和AIM浓度的关联图,并且可以将获得的观察结果与关联图进行对比。优选基于显著差异的存在与否进行对比。

[0234] 除了上述步骤(1)和(2)以外,本发明的测试方法可以包括(3)当测试受试者的AIM浓度显著高于健康人的AIM浓度时,判断测试受试者受急性肾衰竭影响的步骤。

[0235] 此外,本发明也涵盖用于肾疾病的诊断或预后预测的试剂盒。所述试剂盒没有特别限制,只要它是用于方便地实现前述本发明的测试方法或预测方法的试剂盒。所述试剂盒含有

(a)可与AIM基因的转录产物杂交的核酸探针或核酸引物,和/或

(b)针对AIM的抗体。

[0236] 当所述试剂盒含有上述核酸和/或抗体中的两种或更多种时,每种核酸或抗体可以特异性地识别AIM基因的碱基序列上的相互不同的区域,或可以特异性地识别AIM基因的翻译产物的不同表位。

[0237] 当本发明的试剂盒含有在构造中包含前述(a)的核酸的试剂时,用于本发明的测试方法或预测方法的上述引物的探针或寡核苷酸的核酸可以作为核酸提及。

[0238] 能够检测AIM基因的表达的核酸可以作为处于干燥状态的固体或醇沉淀物提供,或在水或合适缓冲液(例如:TE缓冲液等)中的溶解状态提供。当将它用作标记探针时,所述核酸可以以预先用上述标记物质中的任一种标记的状态提供,或也可以独立于标记物质而提供并在使用时进行标记。

[0239] 可选地,所述核酸还可以以固定化在合适固相上的状态提供。固相的例子包括、但不限于玻璃、硅、塑料、硝酸纤维素、尼龙、聚偏二氟乙烯等。固定化方式的例子包括、但不限于包括以下步骤的方法:先向核酸中引入官能团诸如氨基、醛基、SH基团、生物素等,也在固相上引入能够与所述核酸反应的官能团(例如:醛基、氨基、SH基团、抗生蛋白链菌素等),和通过两种官能团之间的共价键交联所述固相和所述核酸,或者引入与聚阴离子核酸有关的聚阳离子包被固相,并通过静电结合等固定化所述核酸。

[0240] 在试剂盒中包含的核酸特别优选地构造成能够通过相同方法(例如:RNA印迹、斑点印迹、DNA阵列技术、定量RT-PCR等)检测AIM基因的表达。

[0241] 当本发明的试剂盒含有在构造中包含前述(b)的抗体的试剂时,上述用于本发明的测试方法或预测方法的抗体可以作为抗体提及。

[0242] 除了能够检测AIM基因的表达的核酸和抗体以外,构成本发明的试剂盒的试剂还可以含有用于检测所述基因的表达的反应所必需的其它物质,其在共存保存时不会不利地影响反应。可选地,所述试剂也可以与含有用于检测AIM基因的表达的反应所必需的其它物质的单独试剂一起提供。例如,当用于检测AIM基因的表达的反应是PCR时,这样的其它物质的例子包括反应缓冲液、dNTP、耐热的DNA聚合酶等。当使用竞争性PCR和实时PCR时,还可以含有竞争核酸、荧光试剂(上述嵌入剂、荧光探针等)等。当用于检测AIM基因的表达的反应是抗原抗体反应时,这样的其它物质的例子包括反应缓冲液、竞争抗体、标记的第二抗体(例如,当第一抗体是兔抗-人AIM抗体时,用过氧化物酶、碱性磷酸酶等标记的小鼠抗-兔IgG等)、封闭溶液等。

[0243] 本文序列表中的序列标识号显示以下序列。

[0244] [SEQ ID NO: 1]

显示人AIM的碱基序列。

[0245] [SEQ ID NO: 2]

显示人AIM的氨基酸序列。

[0246] [SEQ ID NO: 3]

显示猫AIM的碱基序列。

[0247] [SEQ ID NO: 4]

显示猫AIM的氨基酸序列。

[0248] [SEQ ID NO: 5]

显示猫AIM的转录产物的互补序列。

[0249] [SEQ ID NO: 6]

显示小鼠AIM的氨基酸序列。

[0250] [实施例]

下面借助以下实施例和参考实施例更具体地描述本发明,本发明并不限于以下实施例和参考实施例。

**[0251] 实施例1:AIM对慢性肾衰竭或肾纤维化的进展的抑制**

经常使用的使用动物的肾疾病模型之一是单侧输尿管梗阻(UUO)模型。在该情况下,单侧输尿管阻塞诱发发生阻塞的肾实质中的肾小管和肾小球的逐渐坏死,随后发生炎症和纤维化,且最后发生该肾的功能病症。对AIM敲除的小鼠(AIM-KO)和野生型小鼠(WT)各自进行UUO并观察进展(各自n=6)(图1A)。正常肾的结构在WT和AIM-KO之间没有不同。但是,当在第14天对UUO肾进行Azan染色和苏木精染色的同时纤维染色时,WT表现出扩散的纤维化,但是相当数目的肾小球和肾小管仍然维持正常结构,且许多肾小管是没有坏死的。相反,AIM-KO表现出在宽范围内的坏死肾小管细胞的积累、被破坏的肾小球结构和已经分解的肾实质结构。在所有观察的小鼠中得到了类似的结果。

**[0252]** 类似地,对AIM-KO和WT小鼠各自进行UUO,并在第14天通过HE、PAS、Azan染色来观察肾(各自n=6)(图1B)。WT表现出扩散的纤维化,但是相当数量的肾小球和肾小管仍然维持正常结构(HE、Azan染色)。另一方面,AIM-KO表现出纤维化的进展、被破坏的肾小球结构和已经分解的肾实质结构。PAS染色揭示在AIM-KO小鼠的肾小管内部和外部在宽范围内积累的坏死细胞团(PAS阳性的)。在所有观察的小鼠中得到了类似的结果。

**[0253] 实施例2:AIM对急性肾衰竭(直到第7天)向慢性肾病(变成慢性肾衰竭)(第14天)的进展的抑制**

另一个肾疾病模型是短暂肾缺血/再灌注(IR)模型。短暂肾缺血/再灌注包括预先分离一个肾,阻塞剩余肾中的肾动脉以诱导缺血,和在阻塞30 min以后释放以允许血流的再灌注。该短暂缺血会造成肾小管的坏死的进展以及轻度纤维化约3天,由此导致肾功能下降。对AIM敲除的小鼠(AIM-KO)和野生型小鼠(WT)各自进行IR并观察进展(图2)。在WT中,在肾功能下降以后,将坏死细胞取出,未坏死的肾小管快速分裂,且在14天以后恢复几乎正常的肾小管结构。随即肾功能变得正常。在AIM-KO中,尽管肾小管的初始损伤水平没有不同于WT,坏死细胞的除去没有进展,且坏死细胞发生积累。由于坏死细胞的除去没有进展,新肾小管细胞的分裂被抑制,且继发的炎症和纤维化发生进展。用N=6执行实验,并在所有小鼠中得到了类似的结果。即从实施例1和实施例2的结果表明,AIM的缺失会导致坏死肾小管细胞的积累和显著受损的肾结构和功能的修复。

**[0254] 实施例3:AIM对急性肾衰竭以后的长期炎症(肾病变成慢性病)的抑制**

将在实施例2中执行的短暂肾缺血/再灌注(IR)应用于野生型小鼠(WT)和AIM敲除的小鼠(AIM-KO),并通过巨噬细胞标记物F4/80的免疫染色来观察炎症性巨噬细胞的手术后渗入(图3A)。在手术后第3天,AIM KO小鼠表现出与WT相比明显促进的F4/80阳性的巨噬细胞渗入。在手术后第14天,WT表现出减少的巨噬细胞渗入,但是AIM KO小鼠表现出进一步恶化。定量RT-PCR实验证实,与巨噬细胞渗入的进展一起,MCP-1(炎症性细胞因子之一)的表达在AIM KO小鼠的肾中类似地显著增加(图3B)。用N=6执行实验,并在所有小鼠中得到了类似的结果。

**[0255] 实施例4:AIM对急性肾衰竭的恢复**

将在实施例2中执行的IR应用于AIM-KO小鼠,在第3天、第4天和第7天当肾功能短暂地最下降时腹膜内地施用各100  $\mu$ g的重组AIM(rAIM)或PBS(各自n=6),并观察进展(图4)。在PBS施用组中,得到与在实施例2中类似的结果,并且坏死细胞的积累、肾小球的破坏等此后进展,并且肾功能(BUN值)从第3天开始稍微改善,但是没有恢复至正常值,并在以后逐渐

下降。但是,在rAIM施用组中,在第3天的rAIM施用以后,BUN值显著改善,并且在第7天已经恢复至正常范围,随后进一步下降。组织学上,坏死肾小管细胞在第7天之前除去,并且肾实质的结构也变得正常。即表明AIM施用可以促进坏死细胞的除去,加速肾小管的再生,和恢复肾功能。

[0256] 实施例5:由于急性肾衰竭和坏死病灶的除去将AIM附着于坏死肾小管上皮细胞团对AIM-KO小鼠应用在实施例2中执行的IR,手术后静脉内地施用rAIM (100  $\mu$ g),并在3、6、12小时以后将肾切片用抗-AIM抗体染色。在AIM施用以后3小时,证实AIM向坏死肾小管的强附着(图5,上图:在相位差显微照片中,坏死病灶用N指示。图5,下图:观察到与坏死病灶重叠的AIM信号(箭头))。随着时间的发展,坏死病灶区域减小,并且在12小时以后几乎可以证实痕迹。即在IR以后用AIM恢复肾功能时(实施例4),认为AIM向坏死病灶的附着会加速其除去,与其伴随着炎症被抑制和组织再生进展。

[0257] 实施例6:急性肾衰竭以后尿AIM的出现

在应用了两侧短暂肾缺血/再灌注(IR)的野生型小鼠(WT)(其中阻塞两个肾的肾动脉以诱发缺血,而不分离所述肾中的一个)的尿上,通过ELISA方法在IR以后第1天和第7天执行检测(图6)。在正常状态的小鼠尿中几乎没有检测到AIM(在IR之前),但是在IR以后第1天当肾病最剧烈时在尿中检测到大量AIM。与肾病的恢复一起,尿AIM下降(在IR以后第7天)。由于在IR引起的肾病过程中排泄的尿变成稀尿,将尿AIM值用尿肌酸酐值归一化。

[0258] 实施例7:由AIM的缺乏引起的急性肾衰竭的恶化(存活率)

对WT和AIM-KO小鼠进行两侧IR,并检查存活率(各自n=8)(图7)。在IR以后第7天,在不小于80%的WT存活的情况下,AIM-KO的存活率为30%或更低,并且大多数死小鼠在IR以后第3天之前死亡。

[0259] 实施例8:临床评分

对WT和AIM-KO小鼠进行两侧IR,并且随时间分析临床评分(图8)。通过累加获得关于敏捷运动的缺乏、眼不透明度、对尾巴上的疼痛刺激的反应性的下降、较差的毛皮层的临床评分(0:没有异常,1:轻度症状,2:中等症状,3:严重症状),并将它们的总和用图形显示。在WT中,评分在IR以后第1天达到最大值并逐渐减轻;但是,在AIM-KO中,评分保持较高。

[0260] 实施例9:与急性肾衰竭有关的肾功能病症(BUN值)

对WT和AIM-KO小鼠进行两侧IR,并随时间测量BUN,其为肾功能的标记物(n=8)(图9)。类似于实施例8中的临床评分,BUN在WT中在第1天达到峰值并在此后下降;但是,在AIM-KO中,在增加直到第2天,并在此后没有观察到显著的下降。

[0261] 实施例10:与急性肾衰竭有关的肾功能病症(肾组织:PAS染色)

对WT和AIM-KO小鼠进行两侧IR,并随时间通过PAS染色分析肾组织(图10)。类似于实施例8中的临床评分和实施例9中的BUN值,肾功能病症在WT中在第1天达到峰值并在此后恢复,并且具有正常肾小管结构和刷状缘(刷状缘;箭头)的近侧肾小管上皮在第7天再生。但是,在AIM-KO中,所述病症继续,并且PAS-阳性的死细胞团积累在近侧肾小管中,并且甚至在第7天没有除去。

[0262] 实施例11:由于急性肾衰竭变得坏死的肾小管上皮细胞团的定量

通过计算为相对于一个切片(n=3 - 5)的总面积的比率,定量在图10中观察到的近侧肾小管中的上皮细胞的死细胞团的面积(图11)。显示了类似于在实施例8-10中得到的发现

的图,并且死细胞团的积累和残余在AIM-KO中是明显的。

[0263] 实施例12:用AIM治疗急性肾衰竭的长期炎症(炎症性细胞因子)

对WT和AIM-KO小鼠进行两侧IR,在IR之前和在IR之后第7天从肾提取RNA,并通过定量RT-PCR分析炎症性细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-6(各自n=3)(图12)。两种标记物在AIM-KO中表现出与WT相比更高的值,并且提示与IR引起的肾组织破坏有关的长期炎症。

[0264] 实施例13:用AIM治疗急性肾衰竭的长期炎症(浸润性巨噬细胞)

对WT和AIM-KO小鼠进行两侧IR,在IR之后第7天对肾进行胶原酶处理,并通过流式细胞计进行分析以检查巨噬细胞(Mac-1阳性细胞)的比率(图13)。类似于实施例12的结果,肾中巨噬细胞的比率在AIM-KO中比WT更高。分析每3只小鼠,并得到类似的结果。图13显示了代表性的结果。

[0265] 实施例14:AIM在由于急性肾衰竭变得坏死的小鼠肾小管中的上皮细胞团中的积累

对经历两侧IR的WT小鼠的系列肾切片进行PAS染色(左)和使用抗-AIM抗体的免疫染色(右)(图14)。观察到AIM在许多死细胞团上的积累(白色)。

[0266] 实施例15:AIM在具有急性肾衰竭的患者的小鼠肾小管中的坏死上皮细胞团中的积累

对死于肾梗塞引起的急性肾衰竭的人患者的系列肾切片进行PAS染色(左)和使用抗-AIM抗体的免疫染色(右)(图15)。类似于实施例14中的IR小鼠,观察到AIM在许多死细胞团上的积累(白色)。

[0267] 实施例16:具有急性肾衰竭的患者和具有急性肾衰竭的小鼠中尿AIM的检测

通过ELISA分析3个由于人急性肾衰竭(AKI)运输至医院的患者、3个健康个体、和5个发生两侧IR的WT小鼠在IR之前、IR以后1天和7天后的尿的AIM浓度(图16)。AIM在健康个体的尿中几乎没有观察到,但是在AKI患者的尿中观察到。也在小鼠中,它在IR之前没有观察到,但是在IR以后1天当肾病显著时在尿中观察到显著量的AIM,并且在第7天当肾病改善时AIM量下降。

[0268] 实施例17:AIM积累使肾小管中的上皮细胞团收缩

对AIM-KO小鼠进行两侧IR,在IR以后第3天施用200  $\mu$ g rAIM,并对随时间得到的肾切片进行PAS染色和使用抗-AIM抗体的免疫染色(图17)。与AIM一起积累的死细胞团迅速地收缩。

[0269] 实施例18:体外吞噬作用测定(使用肾衍生的巨噬细胞的实验)

对AIM-KO小鼠进行两侧IR,在IR以后第3天对肾进行胶原酶处理,使用FACS分选仪分离F4/80阳性的巨噬细胞,并分析其吞噬活性(图18)。作为吞噬作用的靶标,将人肾小管细胞系HK2细胞热处理以发生坏死,用FITC标记,用重组AIM(rAIM)或牛血清白蛋白(BSA)包被,并使用得到的死HK2细胞。作为空白,使用未用rAIM或BSA包被的死HK2细胞。将巨噬细胞和上述3类死HK2细胞温育,通过流式细胞计(FACS)随时间分析被巨噬细胞摄取的FITC阳性的死HK2细胞。证实了与用BSA包被的死HK2细胞或未用其包被的死HK2细胞相比,用rAIM包被的死HK2细胞更非常有效地被巨噬细胞吞噬。

[0270] 实施例19:体外吞噬作用测定(使用源自骨髓的巨噬细胞的实验)

使用通过用M-CSF分化AIM-KO衍生的骨髓细胞得到的巨噬细胞作为吞噬细胞,执行类

似于实施例18的实验(图19)。由于用BSA包被的死HK2细胞和没有用其包被的死HK2细胞没有表现出实施例18中的吞噬作用方式的差异,在该实施例中并没有使用未包被的死HK2细胞。类似于实施例18的结果,用rAIM包被的死HK2细胞的吞噬作用增加。

[0271] 实施例20:通过AIM施用来治疗AIM-KO小鼠的急性肾衰竭

对AIM-KO小鼠进行两侧IR,并从第1天至第3天静脉内地注射rAIM (200  $\mu\text{g}$ /小鼠)或等量的PBS(n=5-6)。注射PBS的小鼠的存活率在第7天不超过40%,但是在施用rAIM的小鼠中恢复至100%(图20)。

[0272] 实施例21:通过AIM施用来恢复临床评分

与在实施例8中类似地研究了实施例20的小鼠的临床评分(图21)。在rAIM施用以后观察到临床评分的显著恢复。

[0273] 实施例22:通过AIM施用来恢复肾功能

与在实施例9中类似地随时间测量实施例20的小鼠的BUN(图22)。通过rAIM施用观察到BUN值的显著下降。

[0274] 实施例23:通过AIM施用来除去肾小管中的坏死上皮细胞团

对AIM-KO小鼠进行两侧IR,并从第1天至第3天静脉内地注射rAIM (200  $\mu\text{g}$ /小鼠)或等量的PBS,并在第3天和在第7天通过PAS染色分析肾的状态(图23)。在PBS施用中,近侧肾小管中的死细胞积累,在施用rAIM的小鼠中观察到显著除去,并且具有刷状缘的肾小管细胞在第7天恢复。

[0275] 实施例24:AIM施用以后肾小管中的坏死上皮细胞团的定量

在IR以后第7天的肾中,通过计算为相对于一个切片的总面积的比率,定量在图23中观察到的近侧肾小管中的死细胞团的面积(各自n=3)(图24)。在rAIM施用组中观察到死细胞团的显著下降。

[0276] 实施例25:AIM施用使炎症反应下降(炎症性细胞因子)

在实施例20的小鼠中,在IR以后第7天从肾提取RNA,并通过定量RT-PCR分析炎症性细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-6(图25)。在rAIM施用组中,IL-1 $\beta$ 和IL-6与PBS施用组相比下降,并且还提示与急性肾衰竭有关的炎症反应已经被rAIM施用抑制。

[0277] 实施例26:AIM对非致命的(温和的)IR引起的急性肾衰竭的影响

在实施例6-25所进行的两侧IR中,执行缺血30 min,并在AIM-KO中诱导具有高致死率的急性肾衰竭。在该实施例中,缺血时间缩短(30 min $\rightarrow$ 25 min),在AIM-KO小鼠中诱导了甚至在AIM-KO中在第7天表现出100%存活率的水平的肾衰竭,并且类似于实施例20通过从第1天至第3天注射进颈静脉中来施用rAIM或PBS。甚至在IR中在这样的温和条件下,rAIM施用可以更多地加速BUN的改善(各自n=5)(图26)。

[0278] 实施例27:AIM对WT小鼠的治疗作用

对最初具有内源性AIM的WT小鼠进行两侧IR(缺血30 min),并与实施例20类似地施用rAIM或PBS(n=5-6)。在WT中,原始的内源性AIM使肾病恢复,且rAIM可以进一步加速其改善(图27)。发现直到第2天通过rAIM施用增加的BUN值已经下降。

[0279] 实施例28:通过AIM的缺乏变成慢性的肾衰竭

对WT和AIM-KO小鼠进行与实施例26类似的温和IR,并通过PAS染色(以观察死细胞团)和Azan染色(以观察纤维化)分析IR以后第28天肾的状态(图28)。甚至在第28天,与WT相比,

PAS阳性的死细胞团在AIM-KO中稍微保持。在AIM-KO中,观察到显著的纤维化(Azan阳性的),并且肾小管的结构与WT相比变形。

#### [0280] 实施例29:AIM的缺乏促进肾纤维化

在IR以后第28天从实施例28的小鼠的肾提取RNA,并通过定量RT-PCR分析4类纤维化标记物(各自n=4)(图29)。在AIM-KO中,所有纤维化标记物与WT相比增加。

#### [0281] 实施例30:具有糖尿病慢性肾衰竭的人患者中的血液AIM值

在以下人中测量性别区分的血液AIM浓度:(1)健康人(男性:142,女性:54),(2)没有肾病的糖尿病患者(Cre<1.0 mg/dl)(男性:70,女性:57),和(3)具有糖尿病慢性肾衰竭的患者(男性:146,女性:54),他们处于几乎相同的年龄(图30)。在(1)和(2)中的男性和女性没有表现出AIM值的显著差异,但是所述值在(3)中显著更低。

#### [0282] 实施例31:具有慢性肾疾病的人患者中肾功能和血液AIM之间的关联

分析了具有慢性肾疾病(CKD)的患者的血液AIM值,并检查了各个肾功能标记物eGFR(肾小球滤过率)和血液肌酐值之间的关联(n=55)。作为CKD的原因疾病,可以提及糖尿病肾病、肾小球肾炎、高血压肾病、IgA肾病等。患者(男性和女性)的年龄不超过60。如在图31A中所示,发现了血液AIM值和肾功能之间的显著关联。此外,在该分析的时间点具有比较高AIM值的患者在2-3年以后的跟踪研究中表现出改善的肾功能,并且具有低AIM值的患者相反表现出下降的肾功能(图31B)。即AIM可以是用于在CKD患者中不仅预测现在的肾功能、而且预测预后的有用标记物。

#### [0283] 实施例32:猫中血液AIM的缺少(或显著下降)

使用抗-AIM抗体(Rab2:通过用mouser AIM免疫兔而产生的多克隆抗体,其已经被净化以检测小鼠和人AIM)在还原条件下对来自狗(3)、猫(3)和小鼠的每份血清进行免疫印迹(图32A)。所以,尽管可以在狗血清中证实信号,在3只猫中几乎不能检测到信号。这不是抗体的问题,并且通过克隆猫AIM cDNA(将其与附着于C端的HA标签一起整合进pCAGGS表达载体中,将其在HEK293T细胞中表达,并将其使用抗-HA抗体柱从培养物上清液纯化)(参见实施例36)得到的猫rAIM蛋白可以在使用该抗体的还原条件下通过免疫印迹在与小鼠rAIM相同的水平检测到(图32B)。从这些结果发现,在该实施例中研究的猫表达功能性AIM mRNA,但是在血液中几乎不含有AIM蛋白。

#### [0284] 实施例33:猫血液中的猫AIM和IgM的结合性

将质粒(其中将图35中所示的猫AIM cDNA插入表达载体中)转染至HEK293T细胞,从其培养物上清液纯化的重组猫AIM(1 mg)静脉内地注射给猫(杂种,雄性,2岁3个月),在1小时以后收集血液样品,并将血清分离。将血清应用于使用凝胶的尺寸分级分离,并通过蛋白质印迹方法针对AIM和IgM分析每个级分。如在图33A中所示,含有AIM的级分和含有IgM的级分是明显不同的。结果不同于通过给AIM KO小鼠静脉内注射小鼠AIM得到的血清的类似分级分离分析的结果(图33B,对比实施例)(IgM和AIM级分完全匹配)。即AIM最初结合血液中的IgM并维持其稳定性(现有技术参考文献:Arai等人,Cell Reports 3: 1187-1198, 2013),作为其结果,AIM的血液浓度得到维持。但是,在猫中,由于AIM不可结合IgM,AIM在血液中的稳定性不可维持,所以,AIM的血液浓度不可维持。

#### [0285] 实施例34:猫血液中小鼠AIM和IgM的结合性

使用小鼠AIM,进行了与实施例33类似的测试。将重组小鼠AIM(1 mg)静脉内地注射给

猫(杂种,雄性2岁3个月),在1小时以后收集血液样品,并将血清分离。将血清应用于使用凝胶的尺寸分级分离,并通过蛋白质印迹方法针对AIM和IgM分析每个级分。如在图34A中所示,含有小鼠AIM的级分与含有猫IgM的级分完全匹配。因此,不同于猫AIM,认为小鼠AIM会结合IgM并在血液中稳定。

#### [0286] 实施例35:小鼠AIM与IgM的结合位点

生产了多种C端缺陷型重组修饰的小鼠AIM。在体外证实了修饰的小鼠AIM和IgM的结合。所以,具有部分缺陷的SRCR3结构域的修饰的小鼠AIM表现出显著降低的与IgM的结合。因此,发现小鼠AIM的SRCR3结构域对于与IgM的结合而言是重要的。

#### [0287] 实施例36:猫AIM cDNA序列

从在NCBI Resources中公开的猫CD5L (=AIM)的预测序列(GenBank登录号:XM\_003999688.1)设计了多个引物,并从猫脾的cDNA库分离全长猫AIM cDNA (SEQ ID NO: 5)(图35)。在所述序列中,具体地,编码前导肽的序列非常不同于公开的序列。

#### [0288] 实施例37:前导肽的疏水性

显示了猫、人、小鼠、狗各自的AIM蛋白的前导肽序列的疏水性(图36 - 39)。都表现出足够的疏水性,且满足分泌的蛋白的先决条件。从我们分离的cDNA分析猫的前导肽,且从在NCBI Resources中公开的预测序列(GenBank登录号:XM\_846487.2)分析狗AIM。

#### [0289] 实施例38:人、猫、小鼠的AIM氨基酸序列的对比

关于前导肽(LS)、每个SRCR和铰链区,在三者之间对比了氨基酸序列(图40)。在图中,三者共有的氨基酸用“\*”显示,仅人和猫共有的氨基酸用“.”显示,且仅人和小鼠共有的氨基酸用“:”显示。

#### [0290] 实施例39:猫中血液AIM的分析

在实施例32中,使用抗-小鼠AIM抗体来检测猫AIM。在该实施例中,将DNA(其中HA标签连接至猫AIM的cDNA)掺入表达载体中,并转染至HEK293T细胞,由此生产重组猫AIM蛋白(其中C端添加了HA肽(rcAIM-HA)),将其用于免疫小鼠以建立抗-猫AIM单克隆抗体。使用所述抗体,通过还原蛋白质印迹方法分析不同品系的猫(48个体)的血液AIM浓度(图41)。作为对照浓度,使用rcAIM-HA。所以,不论品系,发现了检测到AIM的个体和没有检测到AIM的个体。在检测到AIM的个体中,4个代表性个体的平均血液AIM浓度是16.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,其显著高于小鼠和人的约5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### [0291] 实施例40:用于猫的IR方法的建立

在具有高血液AIM浓度的猫中建立通过IR实现的急性肾衰竭诱导方法。在全身麻醉下,在腹腔镜下用夹子使两侧肾动脉阻塞1小时,然后释放。此后,随时间收集血液和尿,并研究肾功能。图42显示了血液BUN值和Cre值的概况。在IR以后的12小时中,BUN值和Cre值都达到峰值,且在第7天之前没有改善。象AIM-KO小鼠一样,提示从急性肾衰竭的恢复是非常可能混乱的。

#### [0292] 实施例41:IR以后猫的血液和尿AIM的分析

在小鼠中,在IR以后在尿中检测到AIM,且认为积累在阻塞于肾小管中的死细胞团上。使用抗-猫AIM抗体通过还原蛋白质印迹方法分析IR以后猫的血清和尿,并且在IR以后在猫尿中没有检测到AIM(图43)。血液中AIM的量没有显示明显的变化。

#### [0293] 实施例42:在诱导了急性肾衰竭的猫的近侧肾小管的死细胞团中的AIM积累的存

在与否

对猫进行两侧IR,并通过免疫染色分析在第3天AIM是否积累在肾中的肾小管的坏死细胞团上(图44)。在近侧肾小管中检测到坏死细胞团(白色箭头部分);但是,在相同部分中没有观察到AIM的积累。在实施例41中,在IR以后在尿中没有检测到AIM,且所以,提示AIM没有到达肾小管中的死细胞团。

[0294] 实施例43:AIM施用对诱导了急性肾衰竭的猫的影响

类似于在实施例40中描述的方法,对猫(雌性5岁)进行两侧IR,24小时以后在麻醉下从腹股沟区动脉插入动脉导管,使导管尖部前进至肾动脉,并将各25 mL (rAIM: 25 mg)的rAIM (50 mg)溶解在PBS (50 mL)中的溶液注射进单侧肾动脉中。对另一只猫(也是雌性5岁)类似地进行IR和导管插入,并将各25 mL单独的PBS注射进单侧肾动脉中。显示了在IR之前以及在rAIM或PBS注射之后24小时(IR之后48小时)用体表面积归一化的GFR(肾小球滤过率)(图45)。在用单独PBS注射的猫中,GFR下降且肾功能下降;但是,用rAIM注射的猫没有表现出GFR的下降,且肾功能没有下降。

[0295] 实施例44:AIM施用对诱导了急性肾衰竭的猫的影响

类似于在实施例43中描述的方法,对猫进行两侧IR,并在rAIM或PBS注射之后24小时(IR之后48小时)通过PAS染色来分析肾组织(图46)。在用PBS注射的猫中,观察到肾小管上皮细胞的坏死和脱落、肾小管结构的破坏和间质的生长。在用rAIM注射的猫中,肾小管上皮细胞已经恢复,刷状缘也恢复,并且结构也恢复。另外,间质比在用PBS注射的猫中更稀,并且没有观察到生长。在组织学上,rAIM对肾衰竭的治愈是明显的。

[0296] 实施例45:AIM施用对猫的影响

每天将AIM或媒介物连贯地施用给6-8岁猫。施用以后2-4周测量肾功能(BUN值)。在AIM施用组中,在媒介物施用组中观察到的肾功能的下降被抑制。因此,显然,AIM可用于猫中肾功能的下降以及肾衰竭的预防。使用能够激动地控制AIM(其含有具有AIM活性的AIM的部分肽)的功能的药物或诱导AIM表达的药物替代AIM,得到了类似的结果。

[0297] 实施例46:修饰的AIM的施用对猫的影响

将猫AIM的SRCR3结构域改变成小鼠AIM的SRCR3结构域以产生结合IgM的修饰的猫AIM。将修饰的AIM或媒介物每天连贯地施用给6-8岁猫。施用以后2-4周测量肾功能(BUN值)。在修饰的AIM施用组中,在媒介物施用组中观察到的肾功能的下降被抑制。因此,显然,AIM可用于猫中肾功能的下降以及肾衰竭的预防。另外,由于修饰的猫AIM会结合血液中的IgM且被稳定化,通过施用低剂量的修饰的猫AIM而不是施用猫AIM得到有效性。修饰的猫AIM仅需要结合至猫IgM且没有限制。

[0298] [工业适用性]

本发明可以提供肾疾病的预防或治疗剂,其包含AIM作为活性成分。另外,本发明的肾疾病模型小鼠有助于阐明肾疾病的发作机制,并且根据使用所述肾疾病模型小鼠的筛选方法,可以搜索对于肾疾病的预防或治疗有效的物质。另外,使用本发明的肾疾病模型小鼠,可以评价已知的肾疾病的预防或治疗剂的效果。此外,本发明可以提供用于诊断肾疾病的方法。

[0299] 本申请基于在日本提交的专利申请号2014-022041(提交日期:2014年2月7日),其内容完整地并入本文中。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; MIYAZAKI, Toru

&lt;120&gt; 用于肾疾病的预防或治疗剂

&lt;130&gt; 092272

&lt;150&gt; JP 2014-022041

&lt;151&gt; 2014-02-07

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn 3.5版

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1044

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

atggctctgc tattctcctt gatccttgcc atttgcacca gacctggatt cctagcgtct	60
ccatctggag tgcgctggt ggggggctc caccctgtg aaggcgggt ggaggtggaa	120
cagaaaggcc agtggggcac cgtgtgat gacgctggg acattaagga cgtggctgtg	180
ttgtgceggg agctgggctg tggagctgcc agcggaaacce ctagtggat tttgtatgag	240
ccaccagcag aaaaagagca aaagtcctc atccaatcag tcagttgcac aggaacagaa	300
gatacattgg ctcaagtga gcaagaagaa gtttatgatt gttcacatga tgaagatgct	360
ggggcatcgt gtgagaacc agagagctct ttctccccag tcccagaggg tgtcaggctg	420
gctgacggcc ctgggcattg caagggaacc gtggaagtga agcaccagaa ccagtggat	480
accgtgtgcc agacagctg gagcctcagg gccgcaaagg tgggtgtccg gcagctggga	540
tgtgggaggg ctgtactgac tcaaaaacc tgcaacaagc atgcctatgg ccgaaaacc	600
atctggctga gccagatgtc atgtcagga cgagaagcaa cccttcagga ttgccctct	660
gggccttggg ggaagaacac ctgcaaccat gatgaagaca cgtgggtcga atgtgaagat	720
ccctttgact tgagaactag aggaggagac aacctctgct ctgggcgact ggaggtgctg	780
cacaaggcg tatgggctc tgtctgtgat gacaactggg gagaaaagga ggaccaggtg	840
gtatgcaagc aactgggctg tgggaagtcc ctctctcct ccttcagaga ccgaaatgc	900
tatggccctg ggttggecg catctgctg gataatgttc gttgctcagg ggaggagcag	960
tccttgagc agtgcagca cagattttgg gggtttcacg actgcacca ccaggaagat	1020
gtgctgtca tctgctcagg atag	1044

<210> 2  
 <211> 347  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 2

Met Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ile Leu Ala Ile Cys Thr Arg Pro Gly  
 1 5 10 15

Phe Leu Ala Ser Pro Ser Gly Val Arg Leu Val Gly Gly Leu His Arg  
 20 25 30

Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Glu Gln Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val  
 35 40 45

Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ile Lys Asp Val Ala Val Leu Cys Arg Glu  
 50 55 60

Leu Gly Cys Gly Ala Ala Ser Gly Thr Pro Ser Gly Ile Leu Tyr Glu  
 65 70 75 80

[0002]

Pro Pro Ala Glu Lys Glu Gln Lys Val Leu Ile Gln Ser Val Ser Cys  
 85 90 95

Thr Gly Thr Glu Asp Thr Leu Ala Gln Cys Glu Gln Glu Glu Val Tyr  
 100 105 110

Asp Cys Ser His Asp Glu Asp Ala Gly Ala Ser Cys Glu Asn Pro Glu  
 115 120 125

Ser Ser Phe Ser Pro Val Pro Glu Gly Val Arg Leu Ala Asp Gly Pro  
 130 135 140

Gly His Cys Lys Gly Arg Val Glu Val Lys His Gln Asn Gln Trp Tyr  
 145 150 155 160

Thr Val Cys Gln Thr Gly Trp Ser Leu Arg Ala Ala Lys Val Val Cys  
 165 170 175

Arg Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Arg Cys Asn  
 180 185 190

[0003]

Lys His Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Ile Trp Leu Ser Gln Met Ser Cys  
 195 200 205

Ser Gly Arg Glu Ala Thr Leu Gln Asp Cys Pro Ser Gly Pro Trp Gly  
 210 215 220

Lys Asn Thr Cys Asn His Asp Glu Asp Thr Trp Val Glu Cys Glu Asp  
 225 230 235 240

Pro Phe Asp Leu Arg Leu Val Gly Gly Asp Asn Leu Cys Ser Gly Arg  
 245 250 255

Leu Glu Val Leu His Lys Gly Val Trp Gly Ser Val Cys Asp Asp Asn  
 260 265 270

Trp Gly Glu Lys Glu Asp Gln Val Val Cys Lys Gln Leu Gly Cys Gly  
 275 280 285

Lys Ser Leu Ser Pro Ser Phe Arg Asp Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Gly  
 290 295 300

Val Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asn Val Arg Cys Ser Gly Glu Glu Gln  
 305 310 315 320

Ser Leu Glu Gln Cys Gln His Arg Phe Trp Gly Phe His Asp Cys Thr  
 325 330 335

His Gln Glu Asp Val Ala Val Ile Cys Ser Gly  
 340 345

<210> 3

<211> 1068

<212> DNA

<213> 家猫

<400> 3

atggegetac ttttctccct aatectcgcc atttacactg gacctggcat tttagggctc 60

ttttccagag tgcggctagt gggaggcgac caccgetgtg aaggctcgtg ggagttgcag 120

caggatgacg agtgggctac cgtgtgtgat gactaetgga acatggactc tgtggccgtg 180

ctgtgccggg agetgggetg tggggcggcc aggaagacca tgagtggcac cgtgtatgga 240

ccagtgacac caaaggacca aaaagtcttc atccacctgt tcagatgcaa tgggatcgaa 300

[0004]

gaaagcctgt ctcagtgcga gagggaagat gcaatcggat gcteccatgt tgaggatgcg 360  
 ggagccgtgt gcgagcccat ttacactgga cctggcattt tagggccgga gagtgtgagg 420  
 ctggccgatg gcccceggcg ctgccagggc cgagtggagg tgaagttecg aggggagtgg 480  
 agctctgtgt gccaaagcagg ctggagcttt gcagccgcca aggtggtgtg ccggcagctg 540  
 ggggtgtggac gggccaccct gaccocggaga ggctgcaaca aagegaccca gggccaaggg 600  
 gccatctggc agagaaaggc gtcattgetca ggacaagaag tgagcettca agattgcett 660  
 tctgaagttt gggaaacacaa ctgtaccac acatgaggacg tgtgggtcga atgtgaagat 720  
 cccittgect tgaagctggt aggaggacgc agccactgtg aggggaggct ggaggtgctg 780  
 cacaagggcg agtggggctc tgtctgcgac gacggctggg gacaagacgc agaccgggtg 840  
 gtgtgcaggc agctgggctg cgggcagccc ctgtctcegc ctgtcaaagt ccggagaagg 900  
 ttcggccccg gggctggccc catctggctg gacgacgtca agtgcctcggg gaaggagccg 960  
 tcctggagc agtgccctgca caggctctgg ggctaccaca actgtaacca cagagaggat 1020  
 gtggctgtgg tctgtgaaga acagcagtct ggctacctg atgcttga 1068

<210> 4  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> 家猫

<400> 4

Met Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ile Leu Ala Ile Tyr Thr Gly Pro Gly  
1 5 10 15

Ile Leu Gly Ser Phe Ser Arg Val Arg Leu Val Gly Gly Asp His Arg  
20 25 30

Cys Glu Gly Arg Val Glu Leu Gln Gln Asp Asp Glu Trp Val Thr Val  
35 40 45

Cys Asp Asp Tyr Trp Asn Met Asp Ser Val Ala Val Leu Cys Arg Glu  
50 55 60

Leu Gly Cys Gly Ala Ala Arg Lys Thr Met Ser Gly Thr Val Tyr Gly  
65 70 75 80

Pro Val Thr Pro Lys Asp Gln Lys Val Phe Ile His Leu Phe Arg Cys

	85	90	95
	Asn Gly Ile Glu Glu Ser Leu Ser Gln Cys Glu Arg Glu Asp Ala Ile 100	105	110
	Gly Cys Ser His Val Glu Asp Ala Gly Ala Val Cys Glu Pro Ile Tyr 115	120	125
	Thr Gly Pro Gly Ile Leu Gly Pro Glu Ser Val Arg Leu Ala Asp Gly 130	135	140
	Pro Gly Arg Cys Gln Gly Arg Val Glu Val Lys Phe Arg Gly Glu Trp 145	150	155
	Ser Ser Val Cys Gln Ala Gly Trp Ser Phe Ala Ala Ala Lys Val Val 165	170	175
	Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Arg Arg Gly Cys 180	185	190
[0005]	Asn Lys Ala Thr Gln Gly Gln Gly Ala Ile Trp Gln Arg Lys Ala Ser 195	200	205
	Cys Ser Gly Gln Glu Val Ser Leu Gln Asp Cys Leu Ser Glu Val Trp 210	215	220
	Glu His Asn Cys Thr His Asn Glu Asp Val Trp Val Glu Cys Glu Asp 225	230	235
	Pro Phe Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly Arg Ser His Cys Glu Gly Arg 245	250	255
	Leu Glu Val Leu His Lys Gly Glu Trp Gly Ser Val Cys Asp Asp Gly 260	265	270
	Trp Gly Gln Asp Ala Asp Arg Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly 275	280	285
	Gln Pro Leu Ser Pro Pro Val Lys Val Arg Arg Arg Phe Gly Pro Gly 290	295	300
	Val Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asp Val Lys Cys Ser Gly Lys Glu Pro		

[0006]

305		310		315		320									
Ser	Leu	Glu	Gln	Cys	Leu	His	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	His	Asn	Cys	Asn
				325					330					335	
His	Arg	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Val	Cys	Glu	Glu	Gln	Gln	Ser	Gly	Leu
			340					345					350		
Pro	Asp	Ala													
			355												

<210> 5  
 <211> 1196  
 <212> DNA  
 <213> 家猫

<400> 5  
 agaactctcc gttgetgecc tgggectec tegegectc ggattccagc teagcctete 60  
 cegtcgcttg gctcatggcg ctaetcttct ceetaatcct cgccatttac actggacctg 120  
 geattttagg gtctttttcc agagtgcgge tagtgggagg cgaccacegc tgtgaaggtc 180  
 gtgtggagtt gcagcaggat gacgagtggg teaccgtgtg tgatgactac tggaacatgg 240  
 actctgtggc cgtgctgtgc cgggagctgg gctgtggggc ggccaggaag accatgagtg 300  
 gcaccgtgta tggaccagtg acaccaaagg accaaaaagt ctteatecac ctgttcagat 360  
 gcaatgggat cgaagaaagc ctgtctcagt gcgagaggga agatgcaatc ggatgctccc 420  
 atgttgagga tgcgggagcc gtgtgcgagc ceatttacac tggacctggc attttagggc 480  
 cggagagtgt gaggetggcc gatggccccg ggcgctgcca gggccgagtg gaggtgaagt 540  
 tccgagggga gtggagctct gtgtgccaag caggctggag ctttgcagcc gccaaggtgg 600  
 tgtgcccgca gctggggtgt ggacgggcca cctgacctg gagaggetgc aacaaagcga 660  
 cccagggcca aggggccatc tgccagagaa aggcgtcatg ctcaggacaa gaagtgagcc 720  
 tteaagattg cttttetgaa gtttgggaac acaactgtac ccacaatgag gacgtgtggg 780  
 togaatgtga agatcccctt gccttgaagc tggtaggagg acgcagccac tgtgagggga 840  
 ggctggaggt gctgcacaag ggcgagtggg gctctgtctg cgacgacggc tggggacaag 900  
 acgcagaccg ggtggtgtgc aggeagctgg gctgcgggca gcccctgtct cegectgtea 960  
 aagtccggag aaggttcggc cccggggtcg gccgcactcg gctggacgac gteaagtget 1020  
 cggggaagga gccgtccctg gageagtgcc tgcacaggtc ctggggctac cacaactgta 1080

[0007]

accacagaga ggatgtggct gtggtctgtg aagaacagca gtctggccta cctgatgett 1140

gacccacagg ccccaagegc tcttaacttct cctgggacct gatcggeceg gcctga 1196

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 352

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;400&gt; 6

Met Ala Pro Leu Phe Asn Leu Met Leu Ala Ile Leu Ser Ile Phe Val  
1 5 10 15Gly Ser Cys Phe Ser Glu Ser Pro Thr Lys Val Gln Leu Val Gly Gly  
20 25 30Ala His Arg Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Glu His Asn Gly Gln Trp  
35 40 45Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Asp Arg Arg Asp Val Ala Val Val  
50 55 60Cys Arg Glu Leu Asn Cys Gly Ala Val Ile Gln Thr Pro Arg Gly Ala  
65 70 75 80Ser Tyr Gln Pro Pro Ala Ser Glu Gln Arg Val Leu Ile Gln Gly Val  
85 90 95Asp Cys Asn Gly Thr Glu Asp Thr Leu Ala Gln Cys Glu Leu Asn Tyr  
100 105 110Tyr Val Phe Asp Cys Ser His Glu Glu Asp Ala Gly Ala Gln Cys Glu  
115 120 125Asn Pro Asp Ser Asp Leu Leu Phe Ile Pro Glu Asp Val Arg Leu Val  
130 135 140Asp Gly Pro Gly His Cys Gln Gly Arg Val Glu Val Leu His Gln Ser  
145 150 155 160Gln Trp Ser Thr Val Cys Lys Ala Gly Trp Asn Leu Gln Val Ser Lys  
165 170 175

Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Leu Leu Thr Tyr Gly  
 180 185 190

Ser Cys Asn Lys Asn Thr Gln Gly Lys Gly Pro Ile Trp Met Gly Lys  
 195 200 205

Met Ser Cys Ser Gly Gln Glu Ala Asn Leu Arg Ser Cys Leu Leu Ser  
 210 215 220

Arg Leu Glu Asn Asn Cys Thr His Gly Glu Asp Thr Trp Met Glu Cys  
 225 230 235 240

Glu Asp Pro Phe Glu Leu Lys Leu Val Gly Gly Asp Thr Pro Cys Ser  
 245 250 255

[0008] Gly Arg Leu Glu Val Leu His Lys Gly Ser Trp Gly Ser Val Cys Asp  
 260 265 270

Asp Asn Trp Gly Glu Lys Glu Asp Gln Val Val Cys Lys Gln Leu Gly  
 275 280 285

Cys Gly Lys Ser Leu His Pro Ser Pro Lys Thr Arg Lys Ile Tyr Gly  
 290 295 300

Pro Gly Ala Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asp Val Asn Cys Ser Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Gln Ser Leu Glu Phe Cys Arg His Arg Leu Trp Gly Tyr His Asp  
 325 330 335

Cys Thr His Lys Glu Asp Val Glu Val Ile Cys Thr Asp Phe Asp Val  
 340 345 350

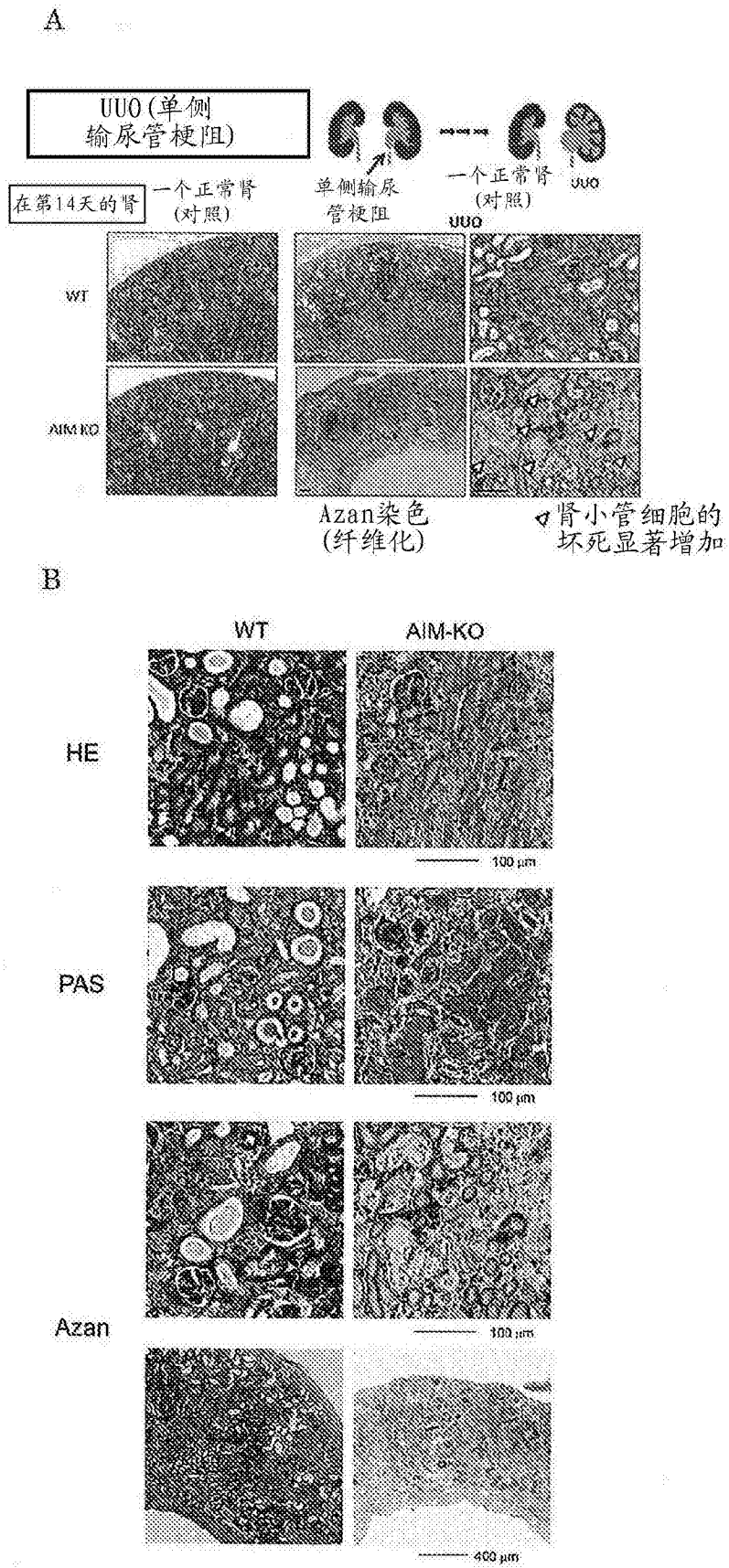


图 1

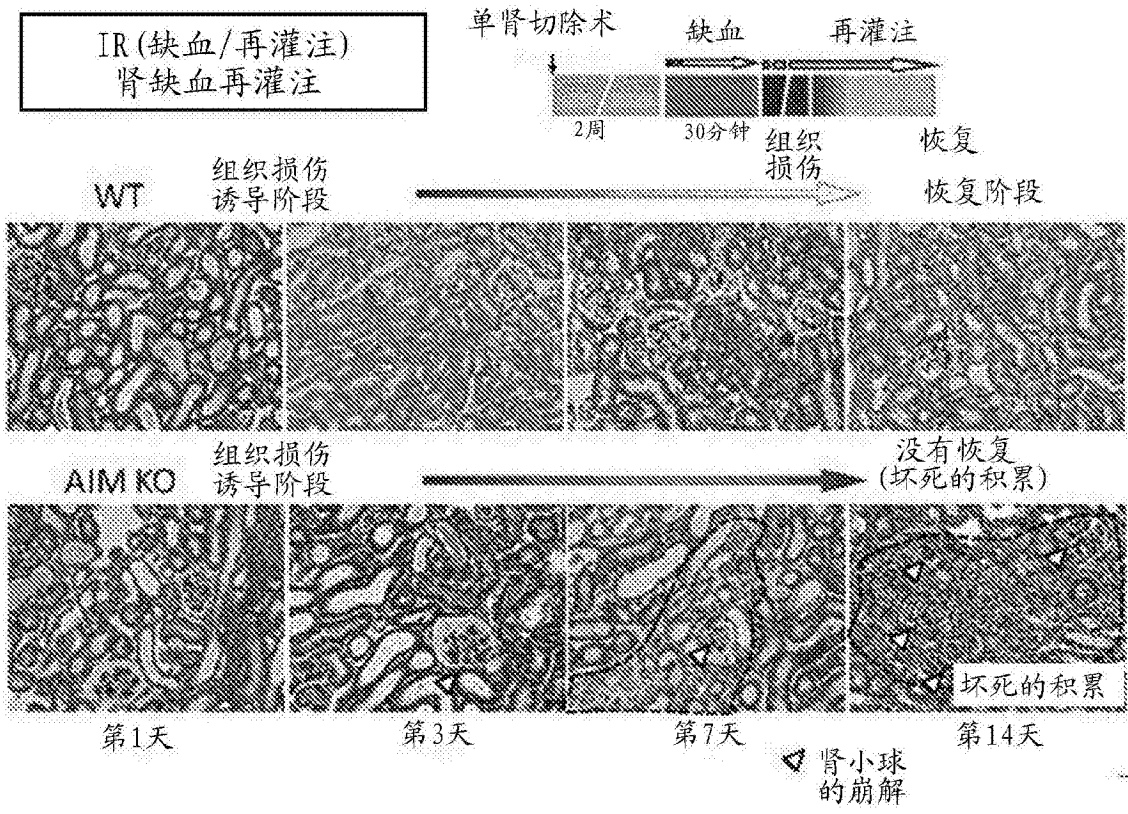


图 2



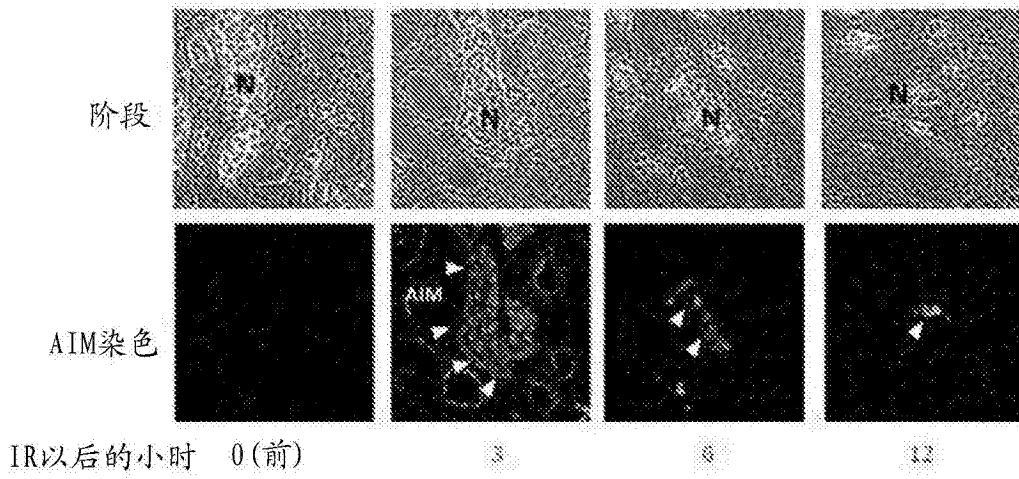


图 5

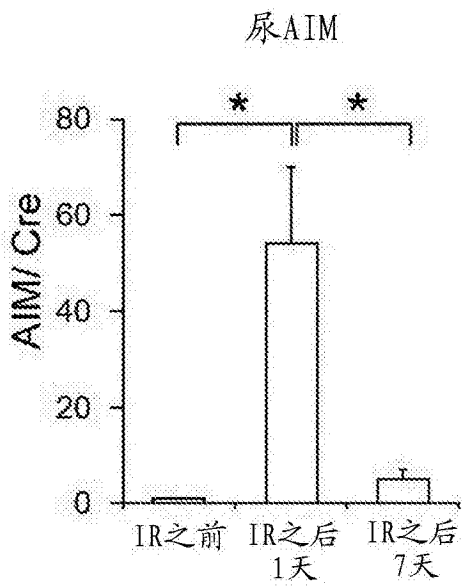


图 6

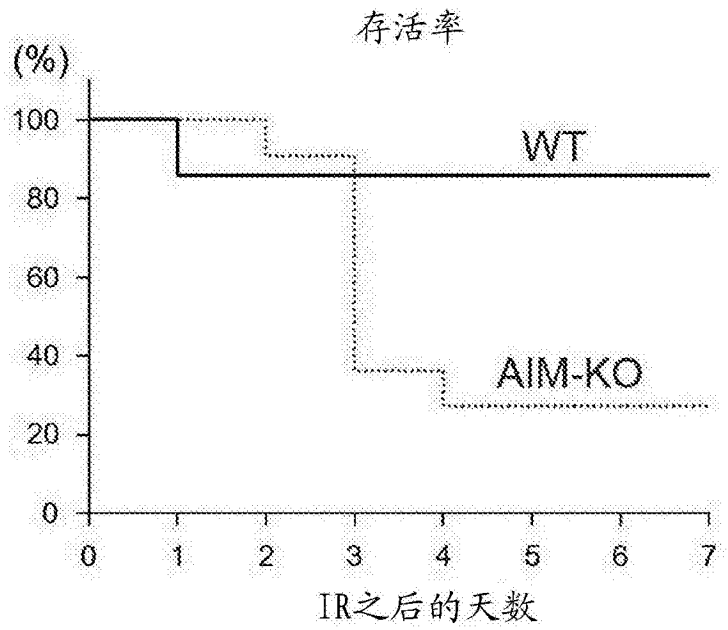


图 7

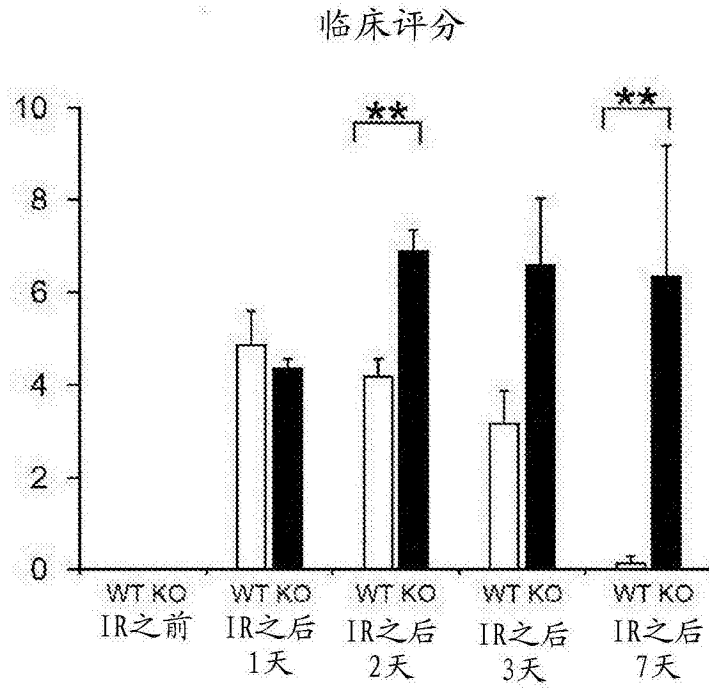


图 8

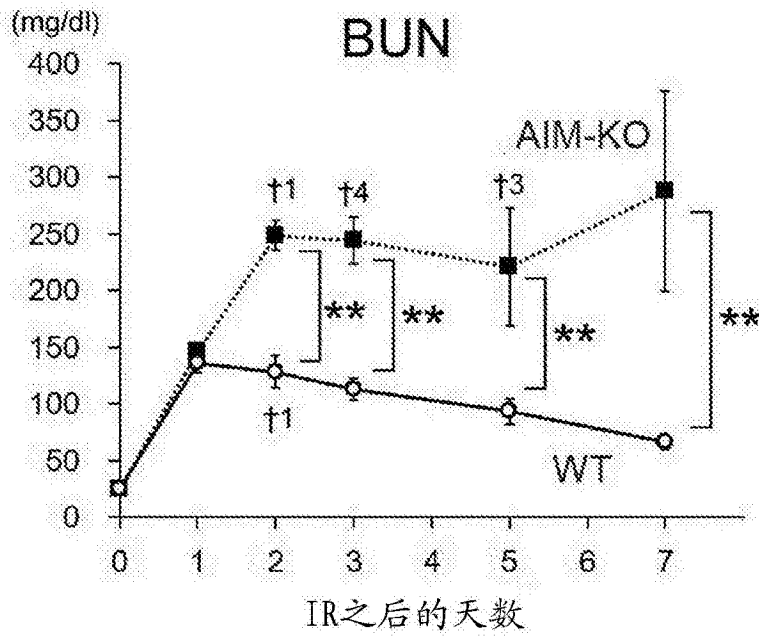


图 9

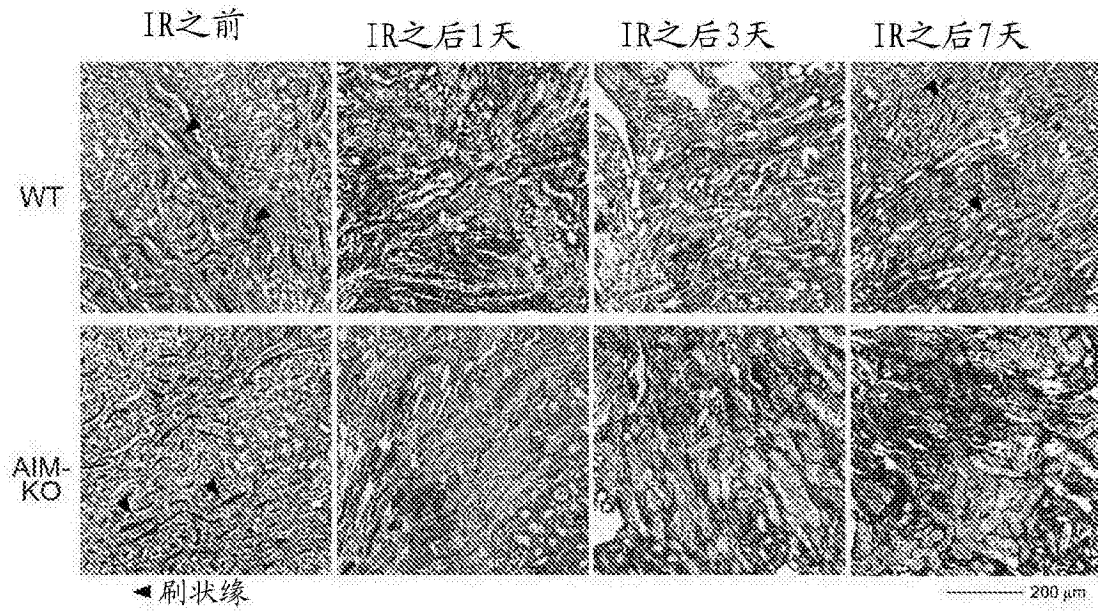


图 10

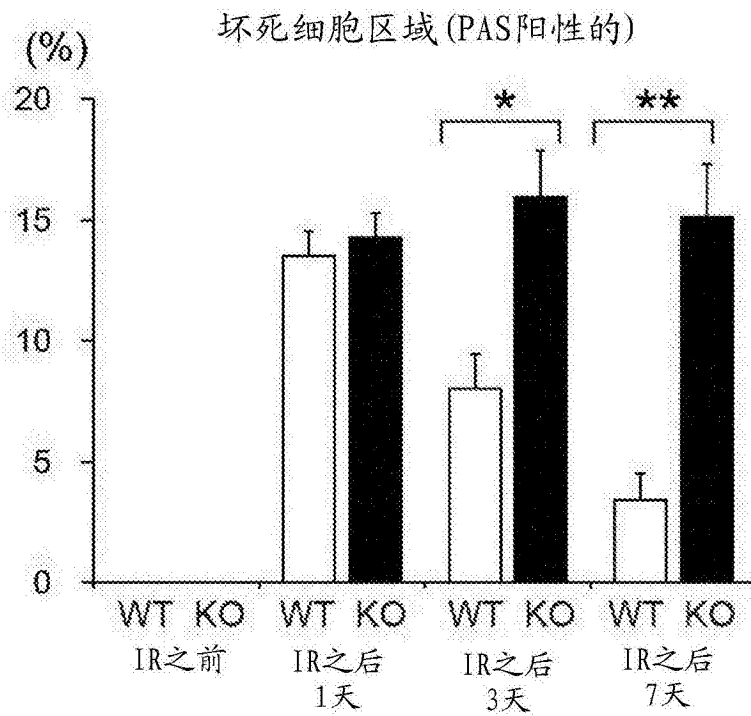


图 11

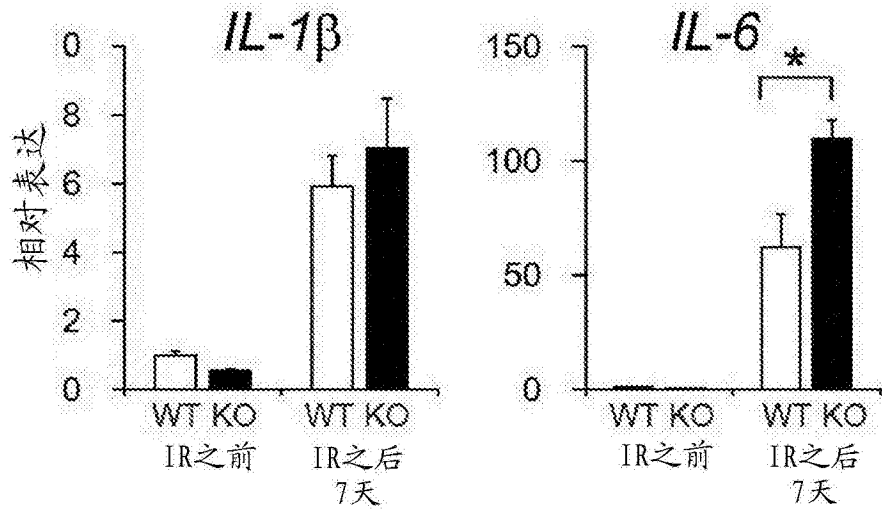


图 12

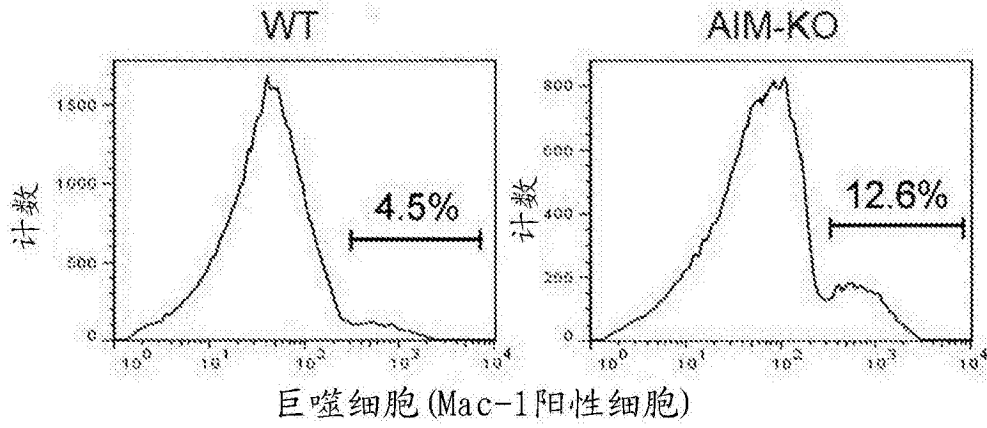
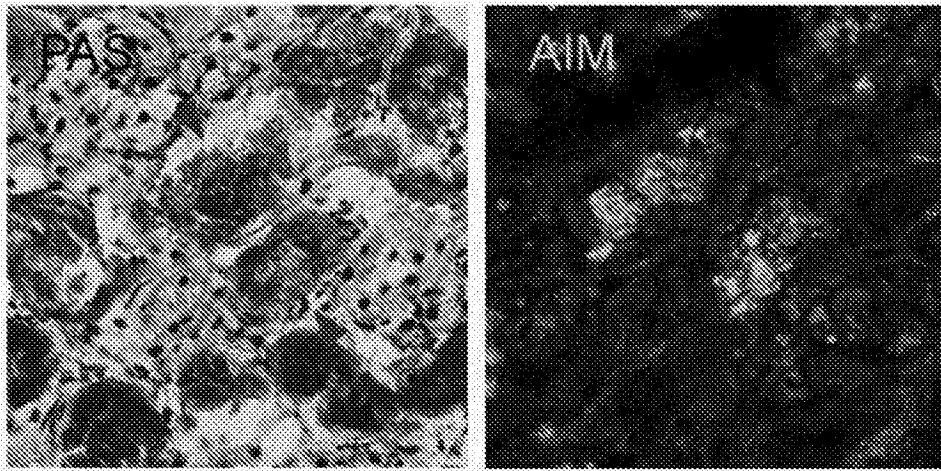


图 13



▲ 阻塞在近侧肾小管中的死细胞团  
(管腔内碎片)

图 14

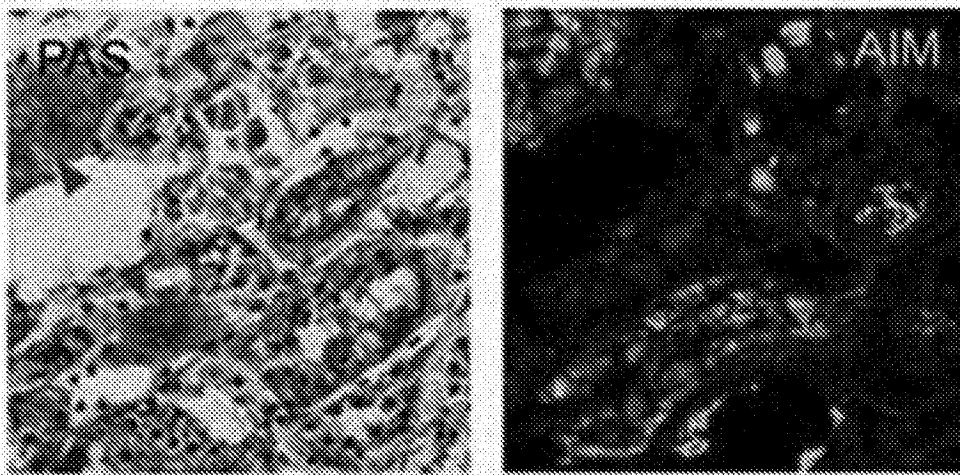


图 15

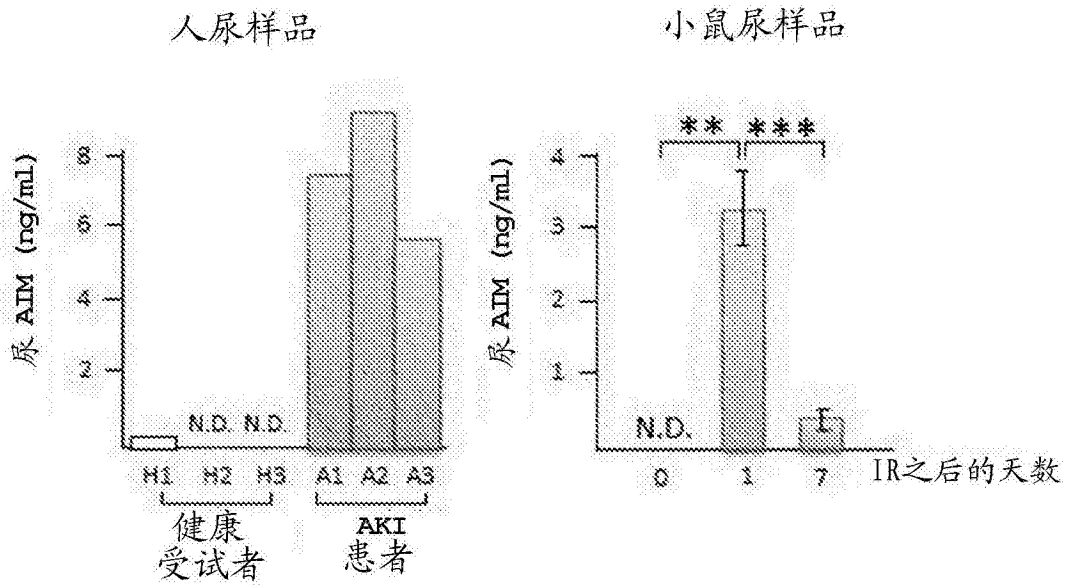


图 16

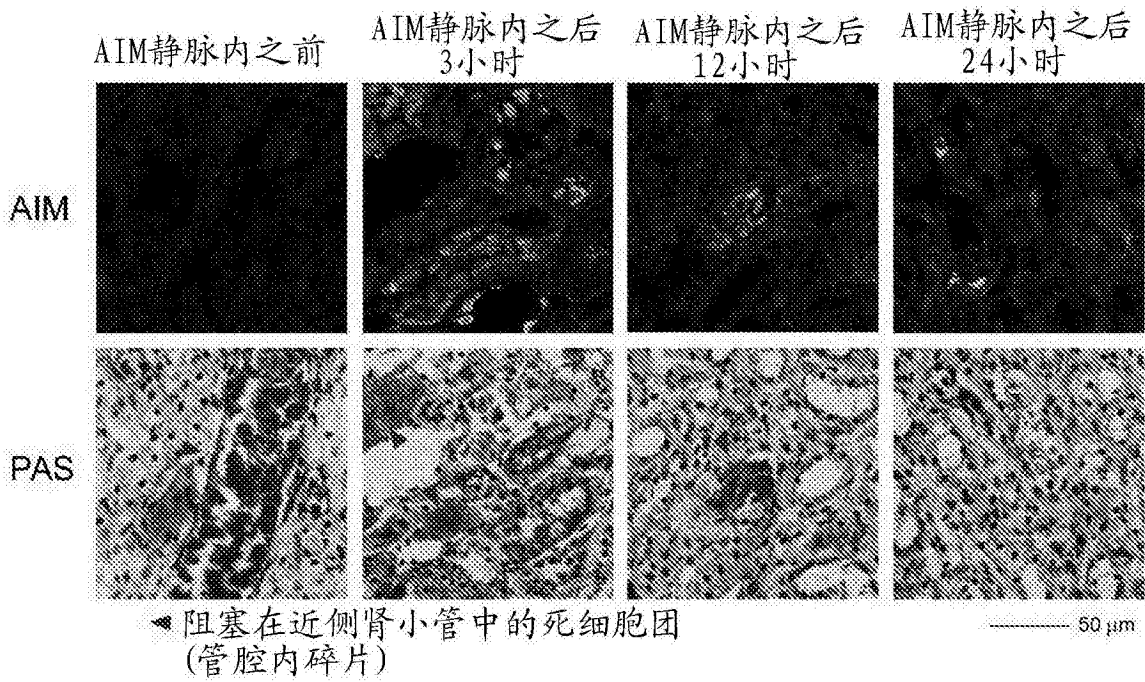


图 17

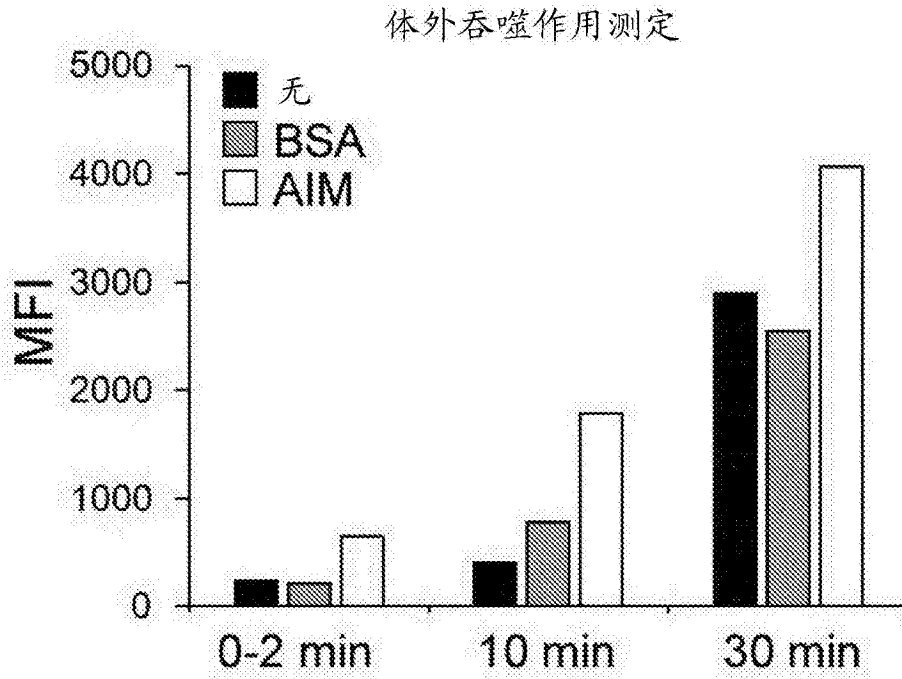


图 18

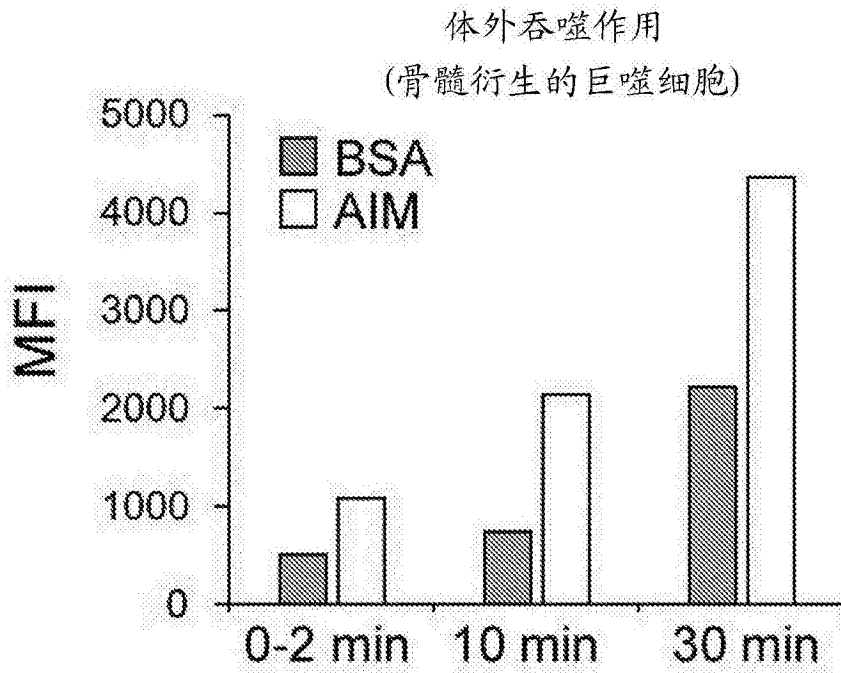


图 19

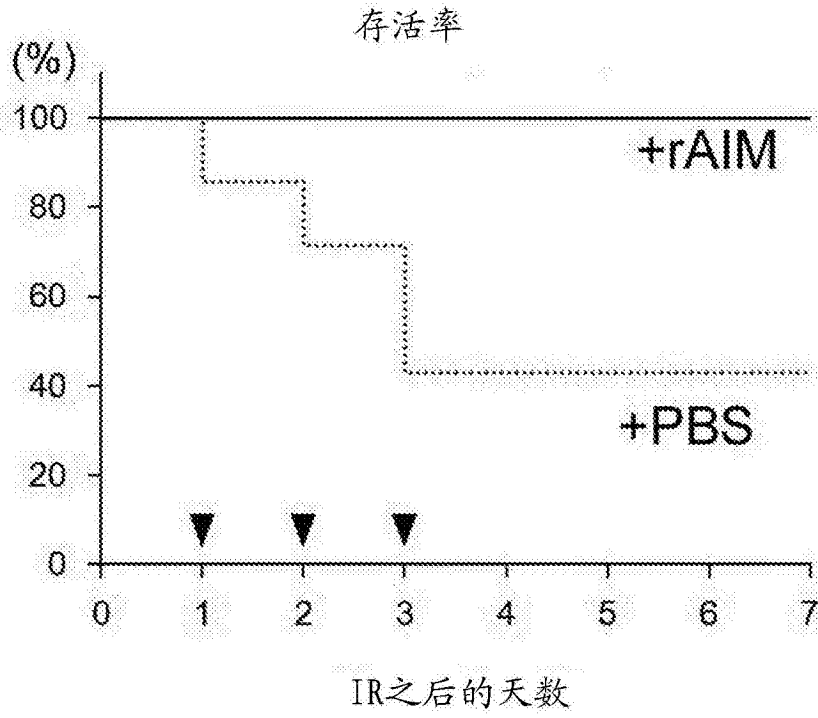


图 20

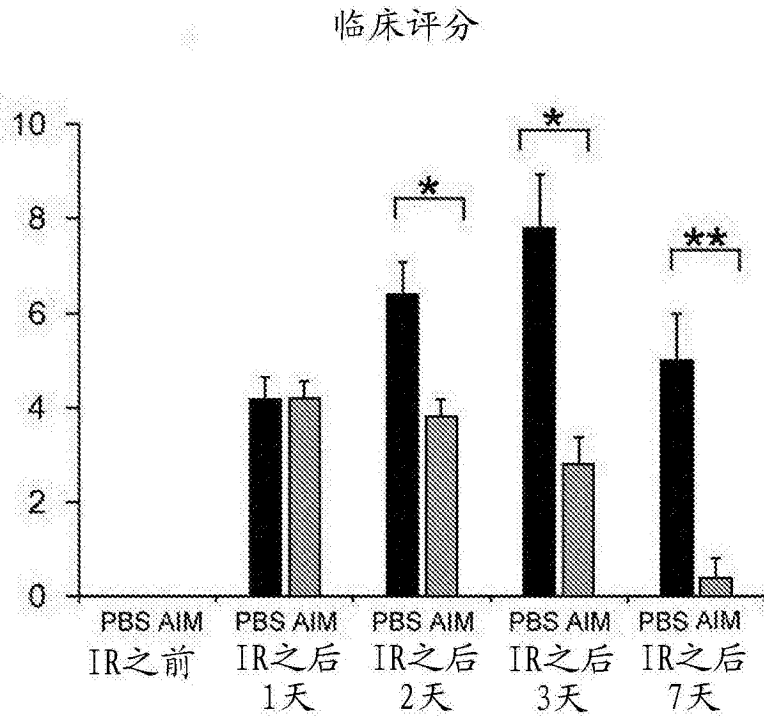


图 21

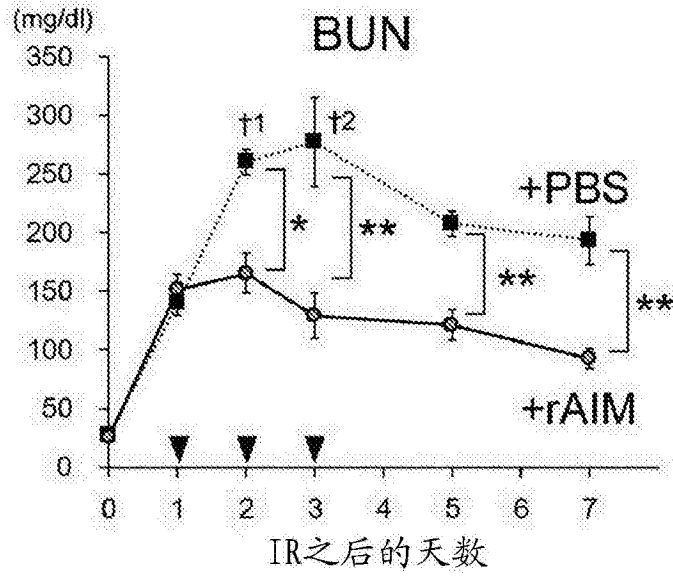


图 22

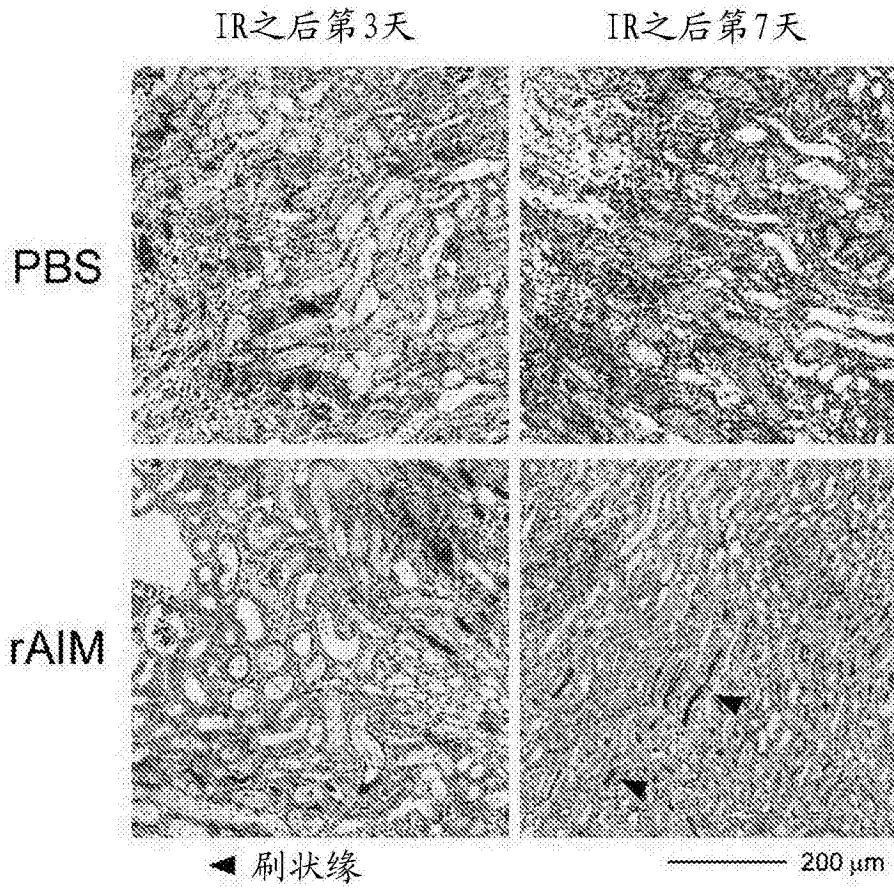


图 23

坏死细胞区域 (PAS阳性)  
IR之后第7天

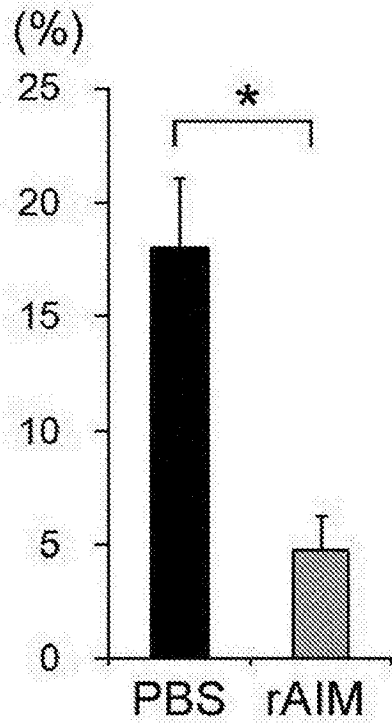


图 24

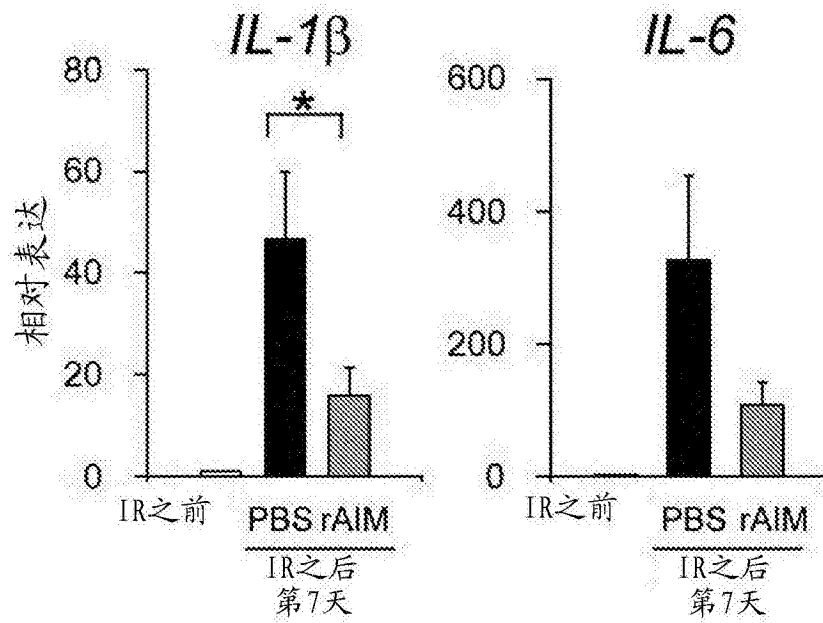


图 25

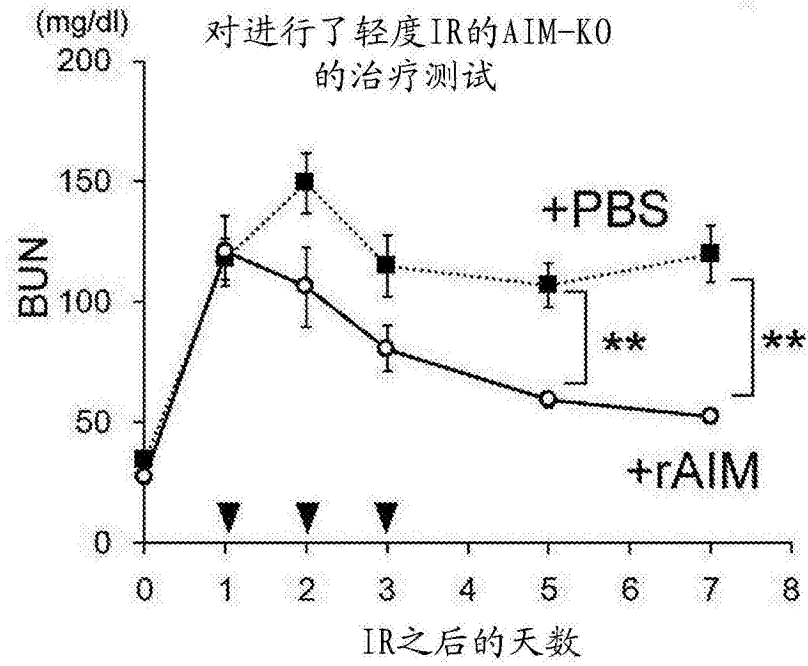


图 26

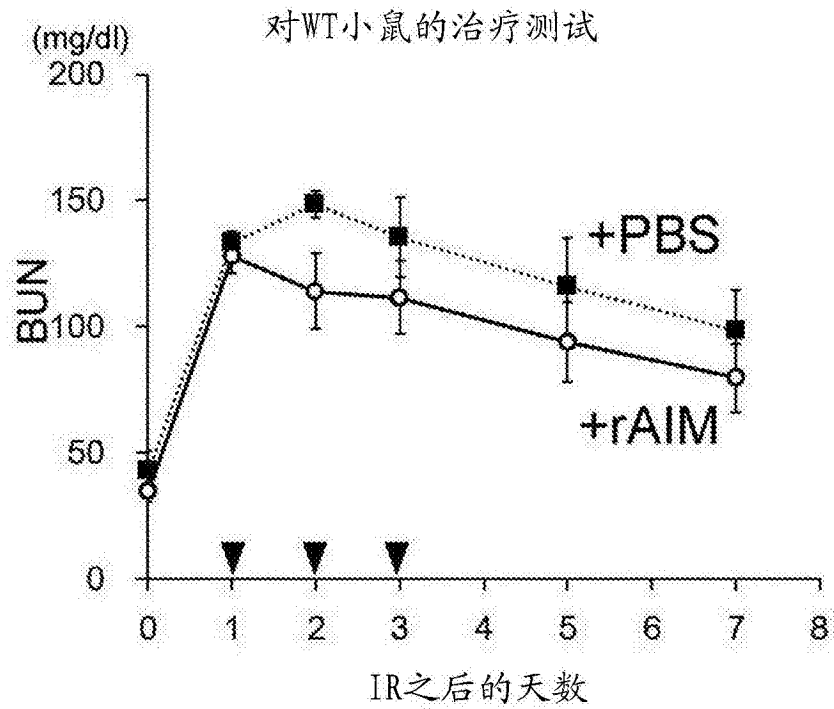


图 27

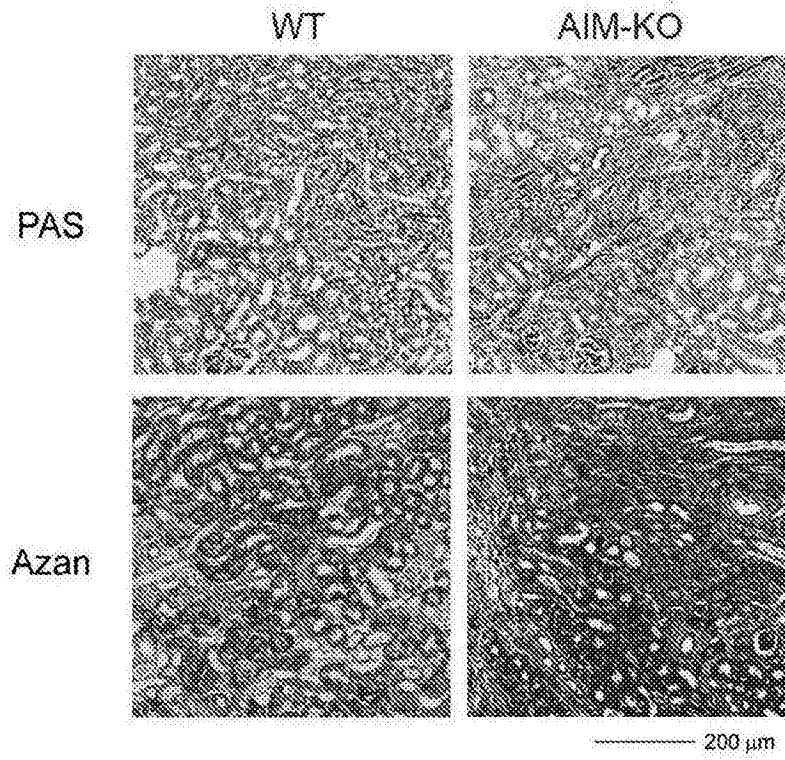


图 28

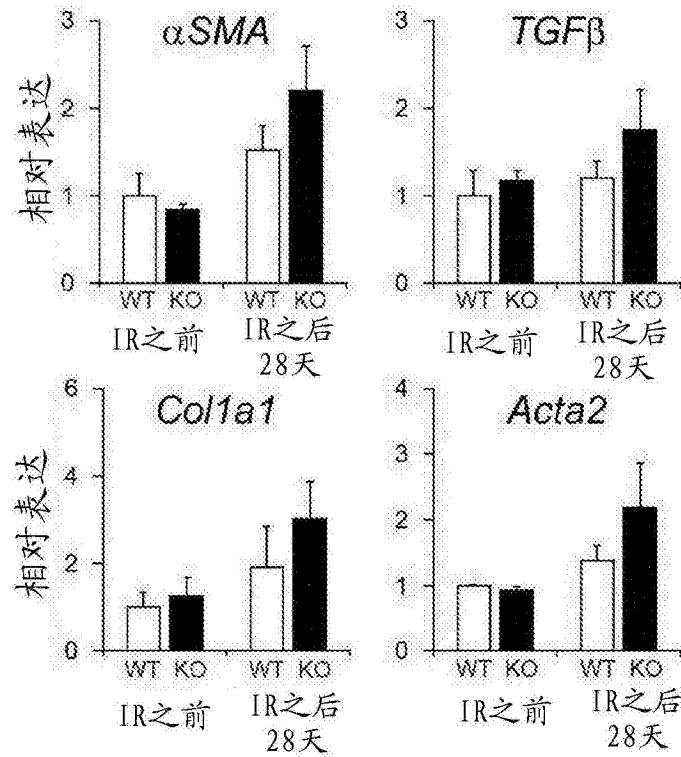


图 29

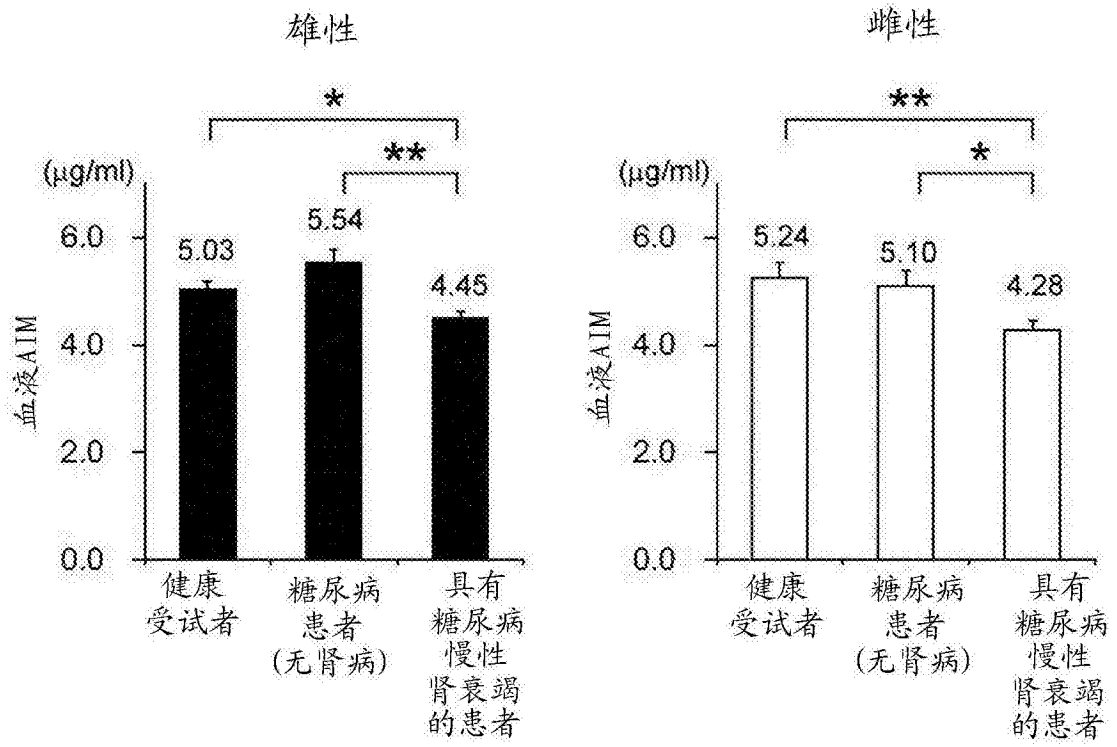


图 30

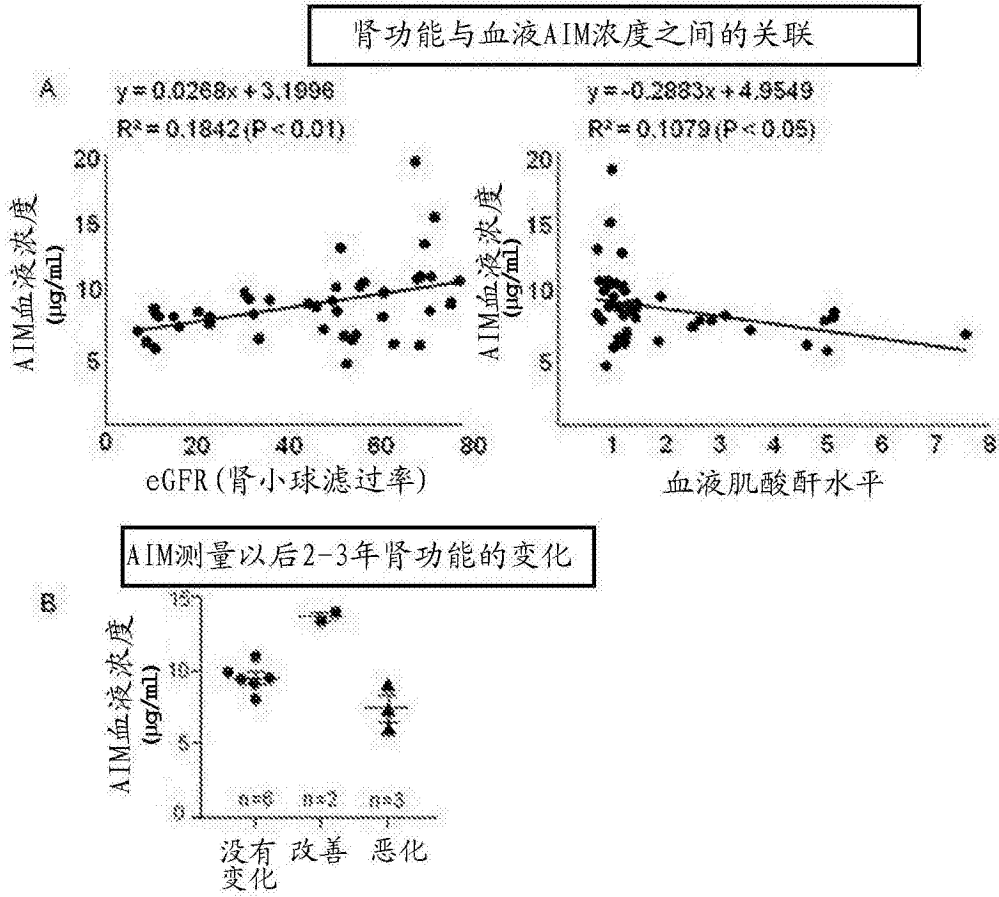


图 31

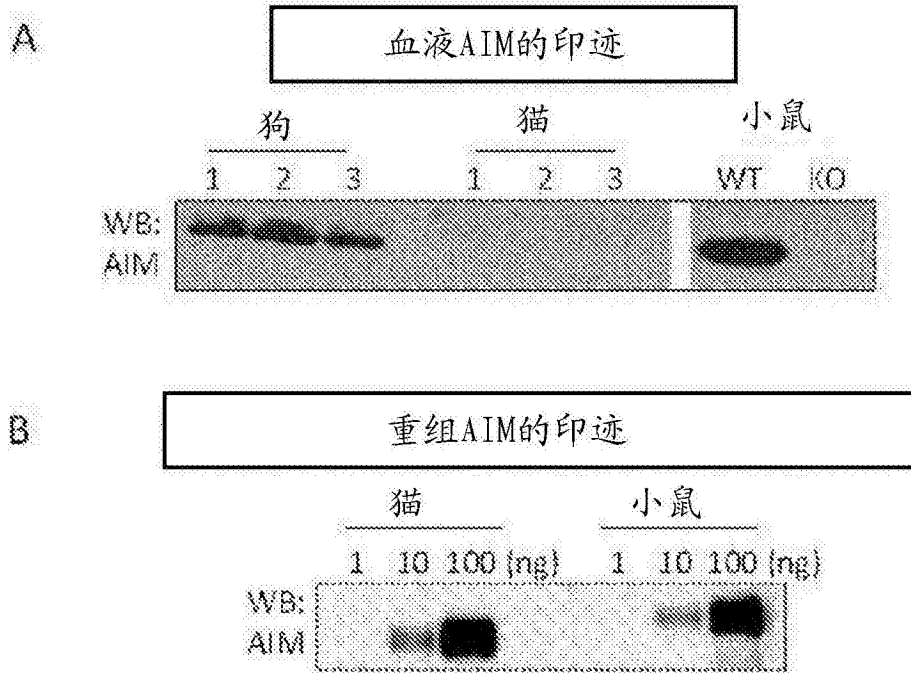
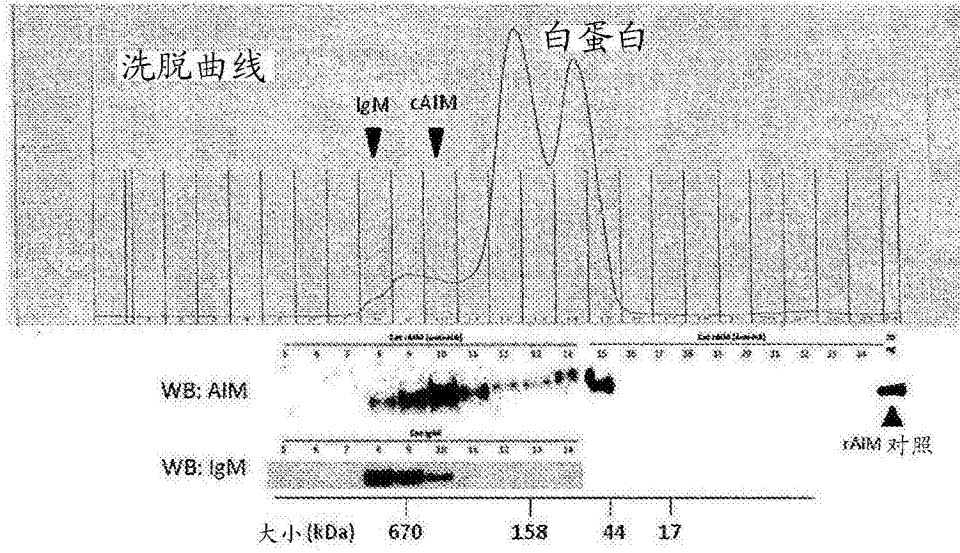


图 32

A



B

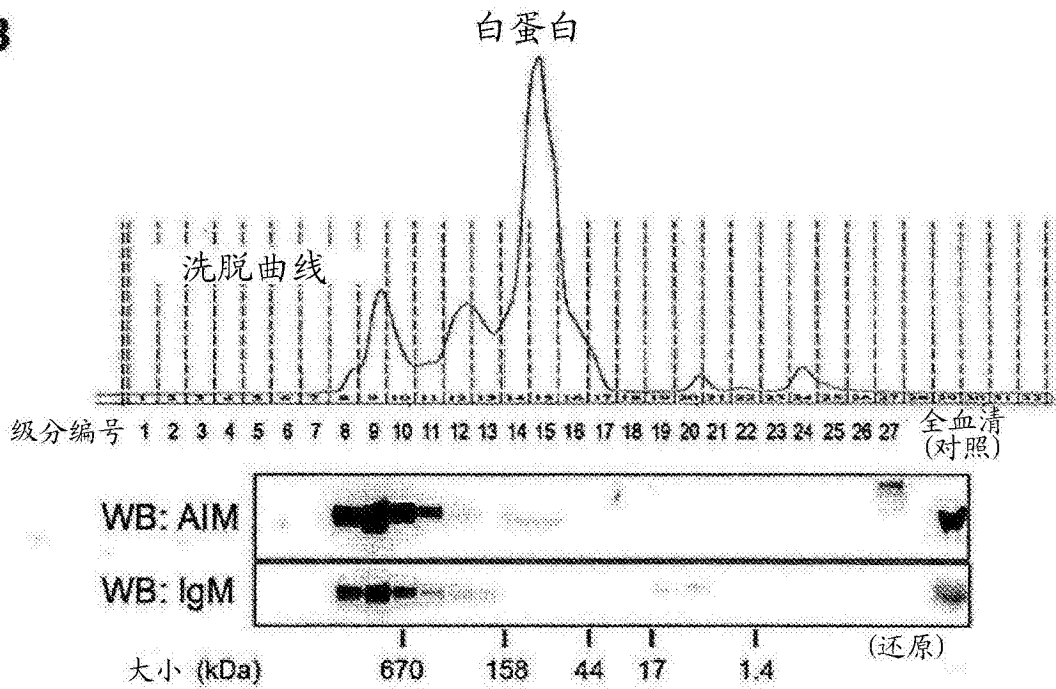


图 33

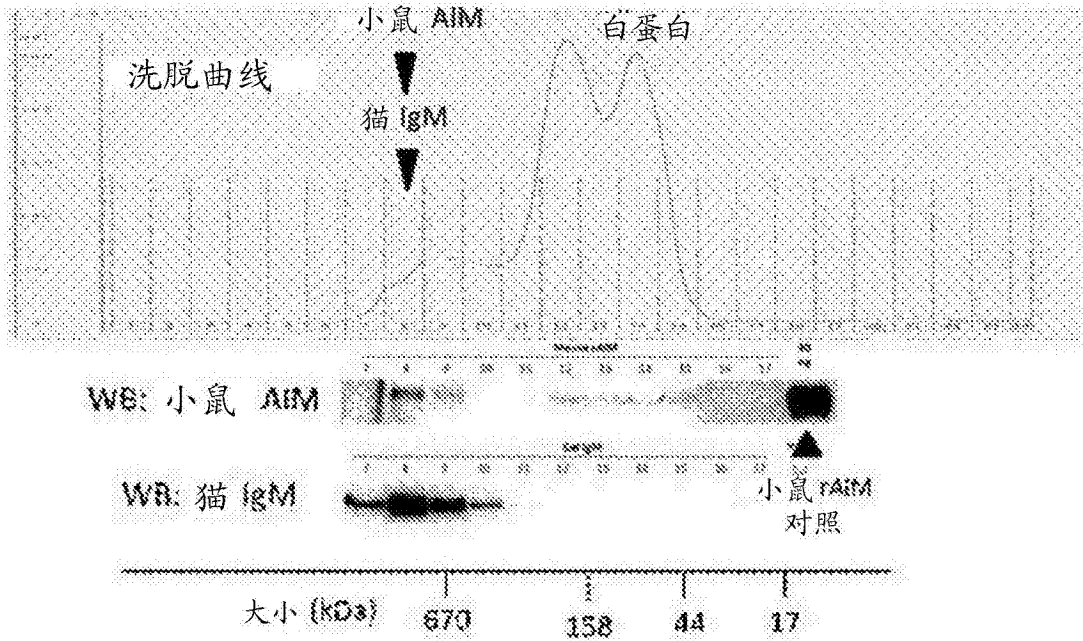


图 34

猫AIM cDNA序列

```

agaactctcc gttgetgccc tggggcctcc tcygggctc ggattocage
tcagcctctc ccgtcgccctg gctcctggcg ctactctctt ccctaactct
cggcatttac actggacctg gcatttttagg gtctttttcc agagtgcggc
tagtgggagg cgaccaccgc tgtgaaggtc gtgtggagtt gcagcaggat
gacgagtggg tcaccgtgtg tgatgactac tggaaacatgg actctgtggc
cgtgctgtgc cgggagctgg gctgtggggc ggocaggaag accatgagtg
gcaccgtgta tggaccagtg acaccaaaagg accaaaaagt ettcatecac
ctgttcagat gcaatgggat cgaagaaagc ctgtctcagt gcgagagggg
agatgcaate ggatgetccc atgttgagga tgcgggagcc gtgtgcgagc
ccatttacac tggacstggc atttttagggc cggagaggtg gagctggcc
gatggccccg ggcgctgcca gggccgagtg gaggtgaagt fccgagggga
gtggagctct gtgtgccaag caggctggag ctttgcagcc gccaaagtg
tftgccccga gctggggtgt ggaccgggcca ccctgaccog gagaggctgc
aacaagcgca ccagggcca aggggccatc tggcagagaa agcgcctcatg
ctcaggacaa gaagtgagcc ttcaagattg ctttctgaa gtttgggaac
acaactgtac ccacaatgag gacgtgtggg tccaatgfga agatcctttt
gccttgaagc tggtaggagg acgcagccac tgtgagggga ggctggaggt
gctgcacaag ggcgagtggt gctctgtctg cgacgacggc tggggacaag
acgcagaccg ggtgggtgtc aggcagctgg gctgcgggca gccctgtct
ccgcctgtca aagtccggag aaggttcggc cccggggtcg gccgcctctg
gctggacgac gtcaagtgtc cggggaagga gccgtccctg gagcagtgcc
tgcacaggtc ctggggctac cacaactgta accacagaga ggatgtggt
gtggtctgtg aagaacagca gtctgggcta cctgatgctt gacccaagg
ccccagcgc tcttaettct cctgggcccet gatcggcccc gcctga

```

图 35

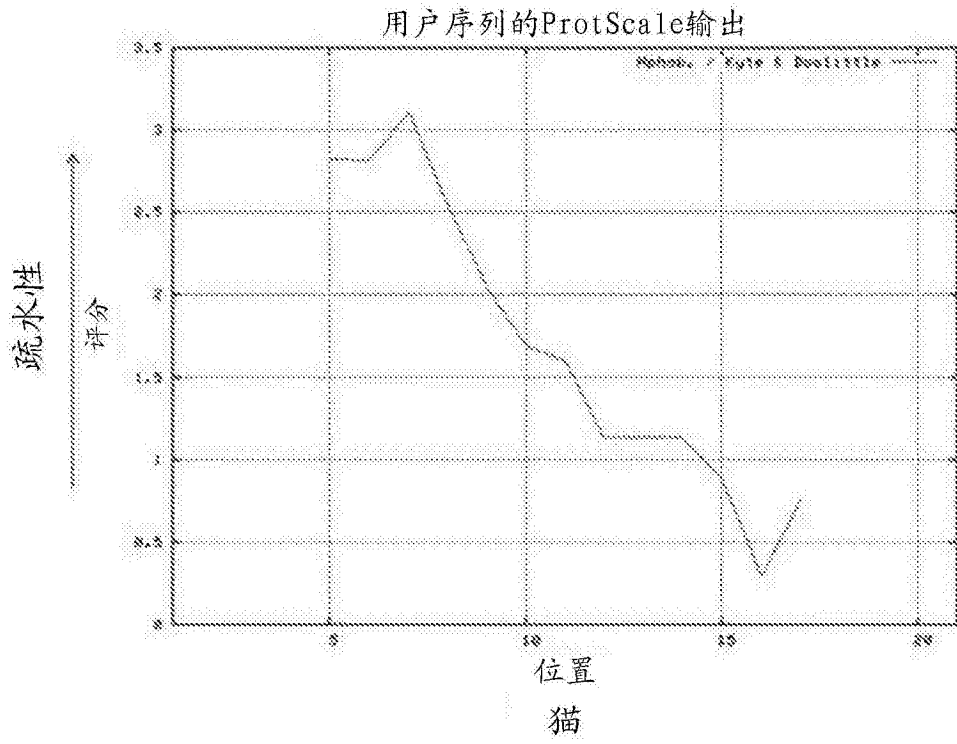


图 36

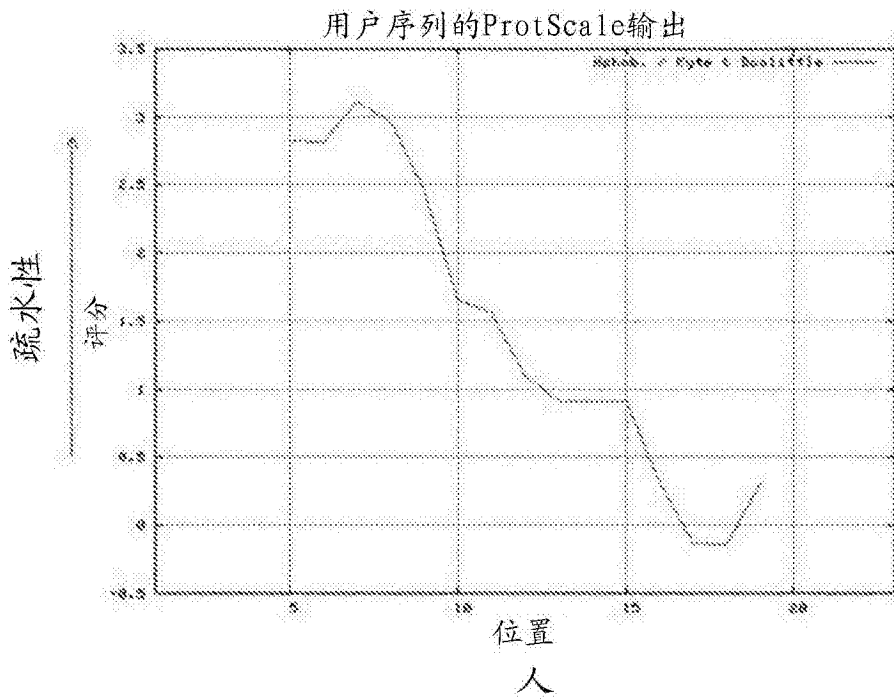


图 37

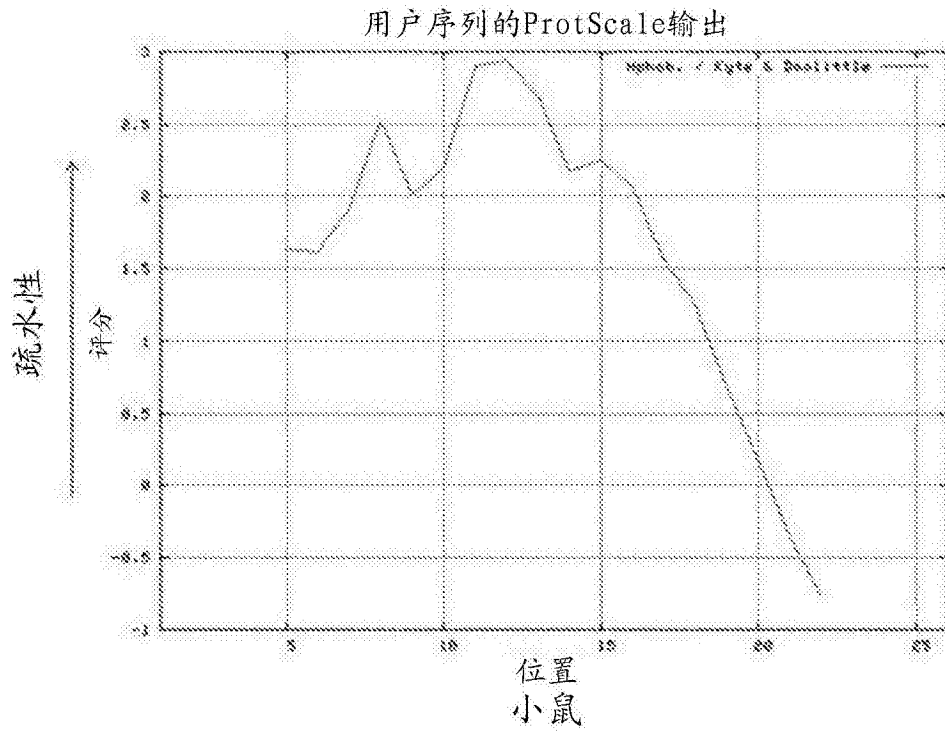


图 38

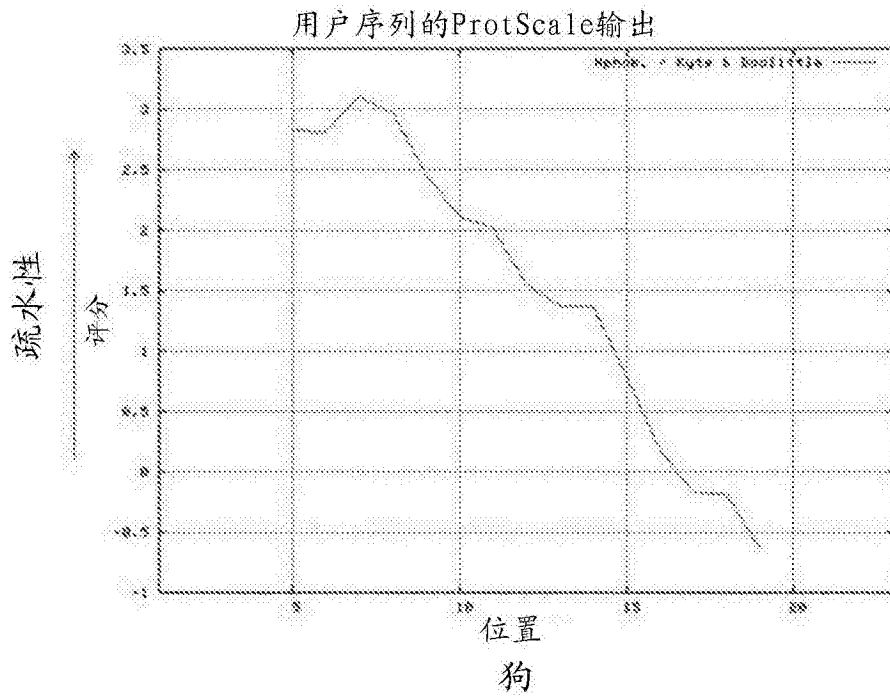


图 39

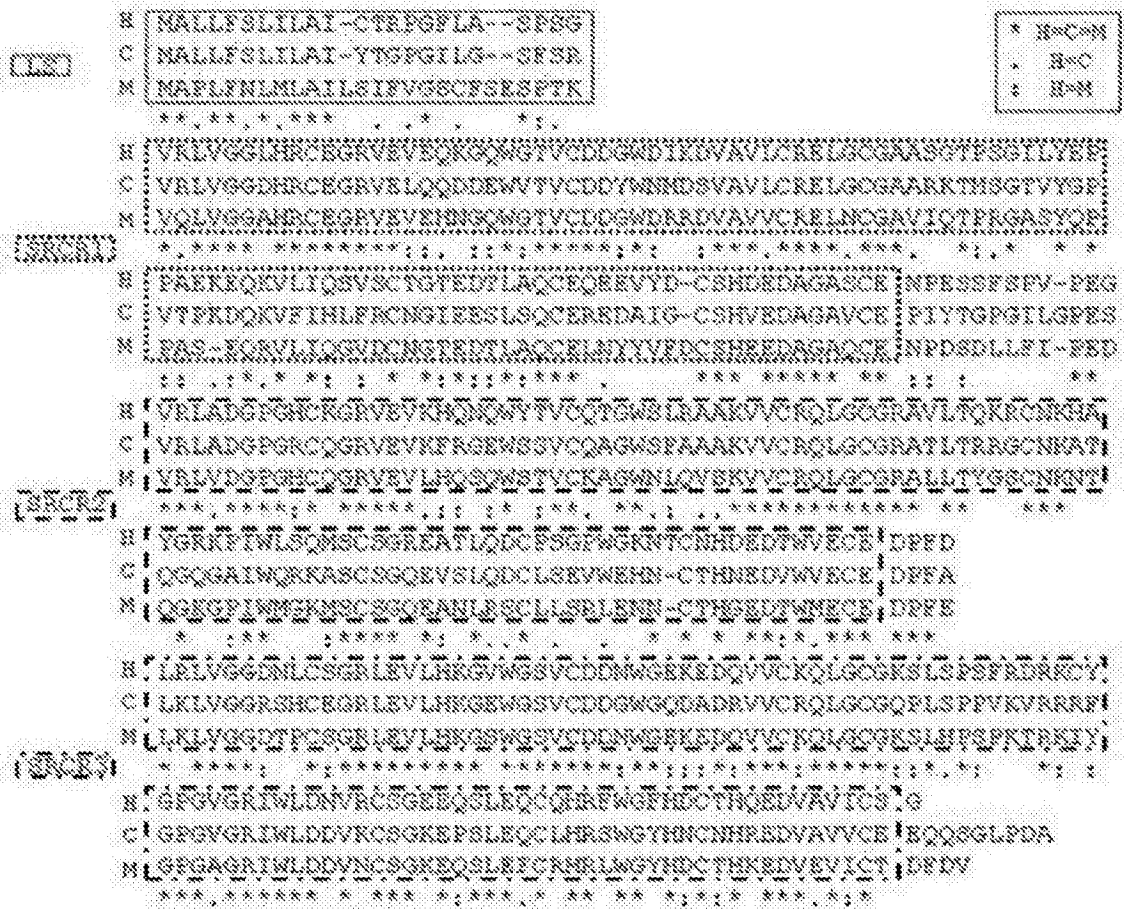
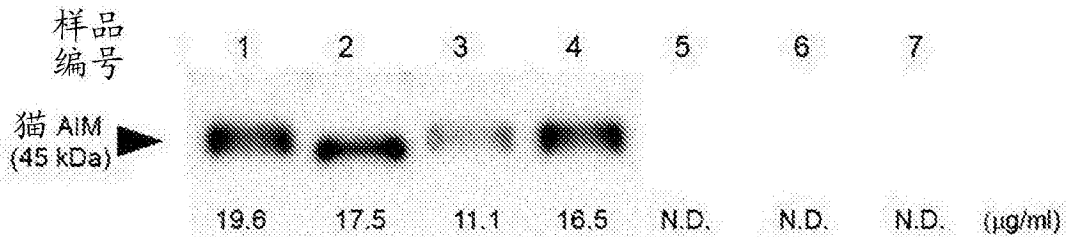


图 40



在AIM+ (总计48个样品) 中的平均血清AIM浓度: 16.8 μg/m  
 (小鼠·人AIM的平均值: 5 μg/m)

图 41

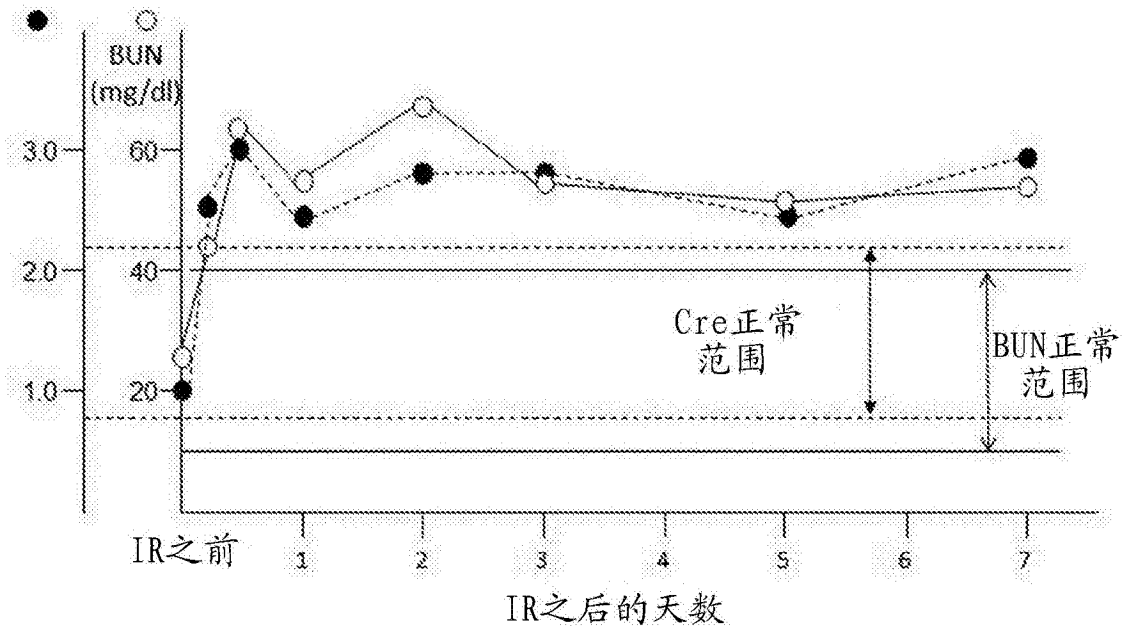


图 42

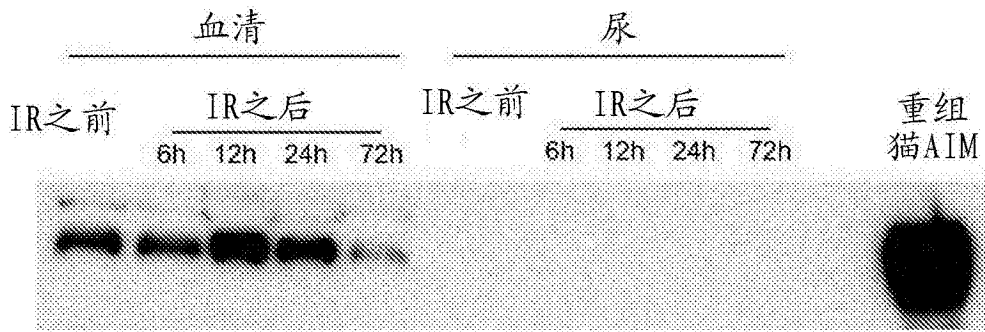


图 43

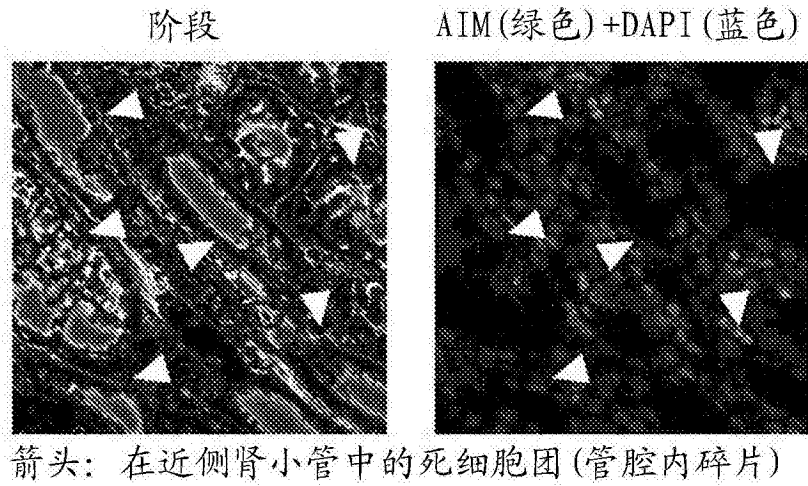


图 44

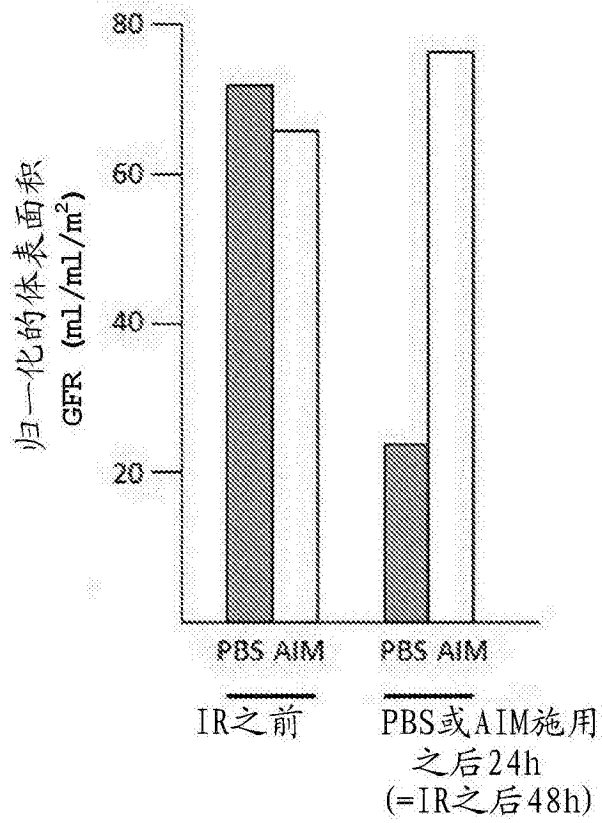
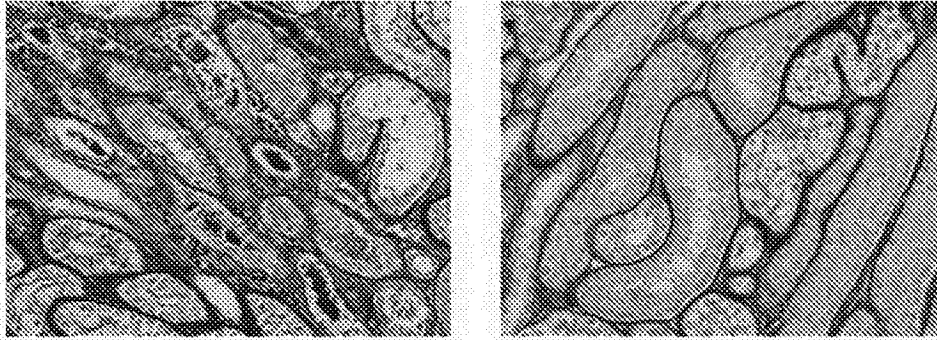


图 45



施用PBS的猫肾

施用rAIM的猫肾

图 46

专利名称(译)	用于肾疾病的预防或治疗剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN106102761A</a>	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201580015029.X	申请日	2015-02-06
申请(专利权)人(译)	宫崎彻		
当前申请(专利权)人(译)	宫崎彻		
[标]发明人	宫崎彻		
发明人	宫崎彻		
IPC分类号	A61K38/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61P13/12 C07K14/435 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/035 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/1761 A61P13/12 C07K14/435 A61K35/15 A61K48/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 A01K2267/03 A61K45/06 G01N33/6893 G01N2333/775 G01N2800/347 G01N2800/52		
代理人(译)	梁谋 杨思捷		
优先权	2014022041 2014-02-07 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了：肾疾病的预防或治疗剂，其含有AIM或其部分肽、或含有编码它们的碱基序列的核酸；或用于筛选肾疾病的预防或治疗剂的方法，其包括使用如下得到的动物：对AIM表达缺陷型非人哺乳动物进行单侧输尿管梗阻或短暂肾缺血/再灌注。

