



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107427552 A

(43)申请公布日 2017. 12. 01

(21)申请号 201580045210.5

(22)申请日 2015.08.21

(66)本国优先权数据

201410418773.1 2014.08.22 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2015/000602 2015.08.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/026258 EN 2016.02.25

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 刘迎芳 梁欢欢 沈涓 夏侯志楷

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 陈晓庆

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

C07K 1/18(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

权利要求书6页 说明书56页 附图52页

(54)发明名称

治疗和/或预防与IFP35蛋白家族的异常水平和/或活性相关的疾病或不适的方法和组合物

(57)摘要

本发明涉及用于治疗 and/或预防与异常高水平的IFP35蛋白家族(包括IFP35和NMI)相关的疾病或不适的方法和组合物,用于诊断、预后或治疗监测与异常高水平的IFP35蛋白家族(包括IFP35和NMI)相关的方法和组合物,以及用于鉴定IFP35蛋白家族(包括IFP35和NMI)的调节剂的方法和组合物。

1. 一种治疗和/或预防受试者中与异常高水平和/或活性的IFP35(干扰素诱导的蛋白35kD)和/或NMI(N-Myc相互作用蛋白)相关的疾病或不适的方法,实施方法包括向需要这种治疗和/或预防的受试者施用有效量的预防或降低所述受试者中IFP35和/或NMI的产生和/或活性的试剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适与过度免疫应答相关。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适与细胞因子风暴相关。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适选自下述组成的组中:炎症、感染、败血症和自身免疫性疾病。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其用于治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其用于预防与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述试剂包括分抑制或减弱IFP35和/或NMI的表达和/或活性的子,比如小分子或小分子多肽。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述试剂包含抑制或降低IFP35和/或NMI的表达和/或活性的抗体或其抗原结合片段。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述试剂包含靶向编码IFP35和/或NMI的基因的多核苷酸(例如siRNA、shRNA或miRNA)。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述试剂包含靶向编码IFP35和/或NMI的基因的反义RNA。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述试剂包含抑制或降低IFP35和/或NMI的聚集的分子。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述试剂包含抑制或降低干扰素的表达和/或活性,从而抑制或降低IFP35和/或NMI的表达和/或活性的分子。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述试剂包含抑制或减少IFP35和/或NMI的分泌的分子。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述方法,其中所述试剂包含抑制或减弱IFP35和/或NMI与其胞内受体之间的相互作用的分子。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述方法,其中所述试剂包含抑制或减弱IFP35和/或NMI与其细胞表面受体之间的相互作用的分子。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述方法,其中所述预防或减少IFP35和/或NMI的产生和/或活性导致抑制或降低炎性因子的表达和/或活性和/或抑制或减少NF- κ B信号传导。

17. 根据权利要求16所述方法,其中所述炎性因子包括IL-1 β ,TNF- α ,iNOS和/或CD86,并且所述NF- κ B信号传导由TLR例如TLR4介导。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述方法,其中所述试剂包括特异性结合IFP35的抗体或抗原结合片段和/或特异性结合NMI的抗体或抗原结合片段。

19. 根据权利要求18所述方法,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合一个或多个NID (NMI/IFP35结构域)。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述方法,还包括施用药学上可接受的载体或赋形剂。

21. 根据权利要求1-19中任一项所述方法,其中所述试剂通过口服、鼻、吸入、肠胃外、静脉内、腹膜内、皮下、肌内、皮内、局部或直肠途径等施用。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述方法,其中所述试剂的施用量以将所述受试者中IFP35和/或NMI的生产和/或活性的水平降低至与没有与异常高水平IFP35和/或NMI活性相关的疾病或不适的对照受试者中IFP35和/或NMI的活性和/或水平相当。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述方法,其中所述受试者是哺乳动物。

24. 根据权利要求23所述方法,其中所述哺乳动物是人或非人哺乳动物。

25. 一种用于治疗和/或预防受试者中与IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的药物组合物,所述药物组合物包含有效量的可有效预防或减少IFP35和/或NMI的产生和/或活性的试剂及药学上可接受的载体或赋形剂。

26. 根据权利要求25中的药物组合物,还包含有效量的用于治疗 and/或预防受试者中IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的药物。

27. 有效量的在受试者中预防或降低IFP35和/或NMI的产生和/或活性的试剂在制备治疗和/或预防与异常高水平和/或活性IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的药物中的用途。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适指的是炎症、感染、败血症、器官损伤和自身免疫疾病。

29. 特异性结合IFP35和/或NMI的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8所示序列的表位。

30. 根据权利要求29所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:2的氨基酸81-170、177-268或136-216中的表位。

31. 根据权利要求29所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:4的氨基酸81-168、175-266或134-214中的表位。

32. 根据权利要求29所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:6的氨基酸104-193、202-293或151-250中的表位。

33. 根据权利要求29所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:8的氨基酸103-192、201-292或151-240中的表位。

34. 特异性结合IFP35和/或NMI的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或包含轻链可变区,所述重链可变区含有由SEQ ID NO:9所示的重链可变区序列的CDR的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR);所述轻链可变区含有SEQ ID NO:10所示的轻链可变区序列的CDR的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR)。

35. 根据权利要求34所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的重链可变区和SEQ ID NO:10所示的轻链可变区。

36. 根据权利要求29-35中任一项所述抗体或抗原结合片段,其中所述片段是Fab、F(ab')₂、Fv或scFv片段,并且其中所述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体或双特异性抗体。

37. 根据权利要求29-36中任一项所述抗体或抗原结合片段,还包含人重链恒定区和人

轻链恒定区。

38. 根据权利要求29-37中任一项所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是全人抗体或人源化抗体。

39. 根据权利要求29-38中任一项所述抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是重组产生的。

40. 一种治疗和/或预防受试者中与IFP35(干扰素诱导的蛋白35kD)和/或NMI(N-Myc相互作用蛋白)的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的方法,所述方法包括给予需要这种治疗和/或预防的受试者有效量的根据权利要求29-39中任一项所述抗体或其抗原结合片段。

41. 根据权利要求40所述方法,其中所述与异常高水平IFP35和/或NMI活性相关的疾病或不适与过度免疫应答相关。

42. 根据权利要求40或41所述方法,其中所述与IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适与细胞因子风暴相关。

43. 根据权利要求40-42中任一项所述方法,其中所述与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适选自下述组成的组中:炎症、感染、败血症和自身免疫疾病。

44. 根据权利要求40-43中任一项所述方法,其中所述预防或减少IFP35和/或NMI的产生和/或活性可导致抑制或降低炎性因子的表达和/或活性,和/或抑制或减少NF- κ B信号传导。

45. 根据权利要求44所述方法,其中所述炎性因子包括IL-1 β 、TNF- α 、iNOS和/或CD86,所述NF- κ B信号传导由TLR例如TLR4介导。

46. 一种分离的编码特异性结合IFP35和/或NMI的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有由在SEQ ID NO:9所示的重链可变区中的CDR的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR);所述轻链可变区含有由在SEQ ID NO:10所示的轻链可变区中的CDR的氨基酸序列组成的CDR。

47. 根据权利要求46所述的多核苷酸,其中所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的重链可变区和SEQ ID NO:10所示的轻链可变区。

48. 一种分离的载体,其包含根据权利要求46或47所述的多核苷酸。

49. 一种分离的宿主细胞,其包含根据权利要求48所述的载体。

50. 一种宿主细胞,其可选自由下述组成的组中:

(a) 用包含多核苷酸的表达载体转化的宿主细胞,所述多核苷酸是包含编码抗体或其抗原结合片段的重链可变区的序列和包含编码抗体或抗原结合片段的轻链可变区的序列的多核苷酸;

(b) 用表达载体转化的宿主细胞,所述表达载体是包含含有编码抗体或其抗原结合片段的重链可变区序列的多核苷酸和包含编码抗体或其抗原结合片段的轻链可变区序列的多核苷酸的表达载体;

其中所述抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含由SEQ ID NO:9所示的重链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR),所示的轻链可变区由SEQ ID NO:10所示的轻链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的CDR。

51. 根据权利要求49或根据权利要求50中所述宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核细

胞,例如CHO细胞。

52. 一种制备抗IFP35抗体或其抗原结合片段和/或抗NMI抗体或其抗原结合片段的方法,其中所述方法包括:

a) 在适于表达编码所述抗体或抗原结合片段的多核苷酸的条件下培养根据权利要求49-51中任一项所述宿主细胞;

b) 分离所述抗体或抗原结合片段。

53. 通过权利要求52所述的方法生产的抗体或抗原结合片段。

54. 一种分离的多肽,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:

- (1) SEQ ID NO:2所示的81-170、177-268或136-216氨基酸显示的序列;或者
- (2) SEQ ID NO:4所示的81-168、175-266或134-214氨基酸显示的序列;或者
- (3) SEQ ID NO:6所示的104-193、202-293或151-250氨基酸显示的序列;或者
- (4) SEQ ID NO:8所示的103-192、201-292或151-240氨基酸显示的序列。

55. 一种分离的多肽,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:2所示的81-170、177-268或136-216氨基酸显示的序列,其中一个或多个氨基酸残基位于SEQ ID NO:2的145、147、150、151、172、173、175、177、182、188、192、212、199、201、207、208、210、214和216 (Ser145、Arg147、Glu150、Glu151、Asp172、Val173、Glu175、Leu177、Met182、Asp188、Gln192、Arg212、Gln199、Thr201、Gln207、Gln208、Pro210、Ser214和Tyr216),它们被突变和/或修饰。

56. 声明55所述分离的多肽,其中所述突变基本上减少或消除所述多肽与IFP35受体或对IFP35特异性的抑制性抗体的结合。

57. 一种分离的多肽,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:2的81-168、175-266或134-214所示的氨基酸的序列,其中位于SEQ ID NO:4的143、145、148、149、170、172、173、175、180、186、190、210、197、199、204、205、206、208、212和214的一个或多个氨基酸残基 (Ser143、Arg145、Glu148、Glu149、Glu170、Arg172、Glu173、Leu175、Met180、Glu186、Gln190、Arg210、Gln197、Arg199、Arg204、Gln205、Gln206、Leu208、Ser212和Tyr214) 被突变和/或修饰。

58. 声明57所述分离的多肽,其中所述突变基本上减少或消除了多肽与IFP35受体或对IFP35特异性的抑制性抗体的结合。

59. 一种分离的多肽,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:6的104-193、202-293或151-250氨基酸显示的序列,其中位于SEQ ID NO:6的107、112、117、159、172、173、192、197、215、256、267和292的一个或多个氨基酸残基 (Leu107、Lys122、Gln117、Lys159、Glu172、Glu173、Glu192、Asp197、Asp215、Lys256、Asp267和Glu292) 被突变和/或修饰。

60. 根据权利要求59所述分离的多肽,其中所述突变可以明显减少或消除多肽与NMI受体或对NMI特异性的抑制性抗体的结合。

61. 一种分离的多肽,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:8的103-192、201-292或151-240的氨基酸显示的序列,其中位于SEQ ID NO:8的106、111、116、158、171、172、191、196、214、255、266和291 (Leu106、Lys111、Gln116、Lys158、Glu171、Asp172、Asp191、Asp196、Asp214、Arg255、Asp266和Asp291) 的一个或多个氨基酸残基被突

变和/或修饰。

62. 根据权利要求61所述分离的多肽,其中所述突变可以明显减少或消除所述多肽与NMI受体或特异性针对NMI的抑制性抗体的结合。

63. 一种药物组合物,其包含根据权利要求54-62中任一项所述多肽和任选的药学上可接受的载体或赋形剂。

64. 一种刺激受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向需要这种刺激的受试者施用有效量的根据权利要求54-62中任一项所述的多肽或根据权利要求63所述药物组合物。

65. 根据权利要求64所述方法,其中所述受试者患有增生性不适、赘生物、肿瘤或癌症。

66. 根据权利要求65所述方法,其中所述增生性疾病选自由下述组成的组中:肉瘤、表皮样癌、纤维肉瘤、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、白血病、淋巴瘤、肺癌、非小细胞肺癌、结肠癌、CNS癌、黑素瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、胰腺癌、膀胱癌和食管癌。

67. 根据权利要求64-66中任一项所述方法,其中所述免疫应答的刺激包括刺激炎性因子的表达和/或活性,免疫细胞例如嗜中性粒细胞和/或NF- κ B信号的招募。

68. 根据权利要求67所述方法,其中所述炎性因子包括IL-1 β 、TNF- α 、iNOS和/或CD86,并且所述NF- κ B信号传导由TLR例如TLR4介导。

69. 根据权利要求67或68所述方法,其中所述刺激NF- κ B的信号传导包括增加磷酸化的I κ B α 和/或减少总的I κ B α 。

70. 一种分离的多核苷酸,其编码根据权利要求54-62中任一项所述多肽。

71. 一种分离的载体包含根据权利要求70所述多核苷酸。

72. 一种分离的宿主细胞,其包含根据权利要求71所述载体,其中所述宿主细胞是真核细胞,例如CHO细胞。

73. 一种制备分离的多核苷酸的方法,其中所述方法包括:

a) 在适于表达编码包含根据权利要求54-62中任一项所述多肽的多核苷酸的条件培养根据权利要求72所述宿主细胞;和

b) 分离所述多肽。

74. 一种受试者中与IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适诊断、预后或治疗监测的方法,所述方法包括评估受试者中IFP35和/或NMI的水平和/或活性,受试者被怀疑患有或正接受治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适。

75. 根据权利要求74的方法,其中所述与IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适与过度免疫应答相关。

76. 根据权利要求74或75的方法,其中所述与异常高水平和/或活性IFP35和/或NMI相关的疾病或不适与细胞因子风暴相关。

77. 根据权利要求74-76中任一项所述方法,其中所述与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适选自由下述组成的组中:炎症、感染、败血症和自身免疫疾病。

78. 根据权利要求74-77中任一项所述方法,其用于诊断受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适,并且其中所述受试者中IFP35和/或NMI的水平和/或活性至少比不患有与异常高水平和/或IFP35活性相关的疾病或不适,例如炎症、感染、败血症和自身免疫疾病的对照受试者的IFP35和/或NMI的水平和/或活性高10%、20%、

30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%或500%，则表明受试者患有与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或病症。

79. 根据权利要求74-78中任一项所述方法，其包括评估被怀疑或接受治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的水平。

80. 根据权利要求74-78中任一项所述方法，其包括评估被怀疑或接受治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的活性。

81. 根据权利要求74-80中任一项所述方法，其中IFP35和/或NMI的水平和/或活性在DNA、RNA和/或蛋白质水平上评估。

82. 根据权利要求81所述方法，其中使用与IFP35和/或NMI的DNA或RNA中至少10个连续核苷酸互补的多核苷酸在DNA和/或RNA水平上评估IFP35和/或NMI的水平。

83. 根据权利要求81所述方法，其中使用特异性结合IFP35和/或NMI的抗体在蛋白质水平上评估IFP35和/或NMI的水平。

84. 一种诊断、预后或治疗监测受试者与IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的试剂盒，所述试剂盒包括用于评估被怀疑或正接受治疗与IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的水平和/或活性的手段。

85. 一种伴随诊断受试者与IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的方法，所述方法包括确定正在接受治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI基因的遗传状态。

86. 根据权利要求85所述方法，其中要使用与IFP35和/或NMI DNA或RNA中至少有10个连续核苷酸互补的多核苷酸确定受试者中IFP35和/或NMI基因的遗传状态。

87. 一种与受试者IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的伴随诊断试剂盒，所述试剂盒包括用于确定受试者IFP35和/或NMI基因遗传状态的手段，受试者正接受治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适。

88. 一种用于鉴定IFP35和/或NMI调节剂的方法，所述方法包括：

a) 使IFP35和/或NMI与测试物质接触，并评估已经与所述测试物质接触后IFP35和/或NMI的活性；

b) 评估未接触所述测试物质的IFP35和/或NMI的活性；和

c) 比较在步骤a) 和b) 中评估的IFP35和/或NMI的活性，当在步骤a) 和b) 中评估IFP35和/或NMI的活性不同时，则鉴定所述测试物质为IFP35和/或NMI的调节剂。

89. 根据权利要求88所述方法，其中所述测试物质是小分子、包含IFP35和/或NMI的突变体和/或片段的多肽文库及特异性结合IFP35和/或NMI的抗体、siRNA或反义RNA。

90. 根据权利要求88或89所述方法，用于鉴定IFP35和/或NMI的活性抑制剂。

91. 根据权利要求88-90中任一项所述方法，用于鉴定用于治疗 and/或预防受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的药物。

92. 根据权利要求91所述方法，其中与异常高水平和/或活性IFP35和/或NMI相关的疾病或不适是增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症。

93. 由权利要求88-92中任一项所述方法鉴定的药物候选物。

治疗和/或预防与IFP35蛋白家族的异常水平和/或活性相关的疾病或不适的方法和组合物

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2014年8月22日提交的中国专利号201410418773.1的优先权,其公开通过引用为了所有目的以整体并入本文。

技术领域

[0002] 在一些方面中,本公开涉及用于治疗 and/或预防与IFP35蛋白家族(包括IFP35和NMI)的异常水平和/或活性相关的疾病或不适的方法和组合物;用于诊断、预后或治疗监测与IFP35蛋白家族的异常水平和/或活性相关的疾病或不适的方法和组合物;以及用于鉴定IFP35蛋白家族的调节剂的方法和组合物。

背景技术

[0003] 内源性的危险信号是由坏死或者压力下的细胞分泌的、引起炎症反应的“病原体相关分子模式”(DAMP)。例如,在感染或损伤后,细胞产生用于免疫调节的内源性DAMP。见,Gallucci等,Current Opinion in Immunology 13,114-119(2001);Matzinger,Science 296,301-305(2002);和Hirsiger等,Mediators of Inflammation,315941(2012)。已知的DAMP不仅包括小分子,例如尿酸、胆固醇和ATP(见,Gombault等,Frontiers in Immunology 3,414(2012);Heil等,Frontiers in Plant Science 5,578(2014);和Shi,Journal of Clinical Investigation 120,1809-1811(2010)),也包括蛋白质,诸如高迁移率蛋白1(HMGB1)(见,Tsung等,Journal of Internal Medicine 276,425-443(2014);和Wang等,Science 285,248-251(1999))、热休克蛋白(HSP)(见,Tamura等,Immunotherapy 4,841-852(2012))、白细胞介素-1 α (IL-1 α)(见,Dinarello,Annual Review of Immunology 27,519-550(2009))、白细胞介素-33(IL-33)(见,Liew等,Nature Reviews Immunology 10,103-110(2010))、骨髓相关蛋白-8(Mrp8)和骨髓相关蛋白-14(Mrp14)(见,Vogl等,Nature Medicine 13,1042-1049(2007);和Austermann等,Cell Reports 9,2112-2123(2014))。DAMP可以在病原体清除和损伤修复中起重要作用。然而,通过DAMP的不受控制的炎症活化将导致有毒细胞因子的持续过表达,其是败血症休克和全身性炎症反应综合征的主要危险因素。见,Srikrishna等,Neoplasia 11,615-628(2009);和Piccinini等,Mediators of Inflammation,doi:10.1155/2010/672395(2010)。

[0004] 数千种细胞因子参与免疫应答。通过选择性激活或抑制,它们构成了复杂但精确控制的网络,以执行抗病毒或免疫调节功能。见,Dinarello,Chest 118,503-508(2000)。此外,它们被认为广泛参与其他细胞活性,例如,抑制肿瘤生长、促进衰老和诱导凋亡。见,Crusz等,Nature Reviews Clinical Oncology,doi:10.1038/nrclinonc.2015.105(2015);Chen等,Drug Design,Development and Therapy 9,2941-2946(2015);Villeda等,Nature 477,90-94(2011);和Eckhardt等,Cell Death Disease 5,e1562(2014)。然而,这些蛋白质的功能机制很大程度上还不清楚。

发明内容

[0005] 一方面,本文公开了用于治疗 and/或预防与 IFP35 (干扰素诱导的蛋白 35kD) 和/或 NMI (N-Myc 相互作用蛋白) 的异常高水平 and/或活性相关的疾病或不适的方法。在一些实施方案中,方法包括向需要这种治疗和/或预防的受试者施用有效量的预防或降低受试者中 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性的试剂。

[0006] 在任何前述实施方案中,与 IFP35 和/或 NMI 的异常高水平 and/或活性相关的疾病或不适可能与过度免疫应答相关。在任何前述实施方案中,疾病或不适可能与细胞因子风暴相关。在任何前述实施方案中,疾病或不适可选自由下述组成的组:炎症、感染、器官损伤、败血症和自身免疫疾病。在任何前述实施方案中,方法可用于治疗与 IFP35 和/或 NMI 的异常高水平 and/或活性相关的疾病或不适。在任何前述实施方案中,方法可用于预防与 IFP35 和/或 NMI 的异常高水平 and/或活性相关的疾病或不适。

[0007] 在任何前述实施方案中,试剂可以包含抑制或降低 IFP35 和/或 NMI 的表达和/或活性的分子,例如小分子或多肽。在任何前述实施方案中,试剂可以包含抑制或降低 IFP35 和/或 NMI 的表达和/或活性的抗体或其抗原结合片段。在任何前述实施方案中,试剂可以包含靶向编码 IFP35 和/或 NMI 的基因的多核苷酸,例如 siRNA、shRNA 或 miRNA。在任何前述实施方案中,试剂可以包含靶向编码 IFP35 和/或 NMI 的基因的反义多核苷酸,例如反义 RNA。在任何前述实施方案中,试剂可以包含抑制或减少 IFP35 和/或 NMI 的寡聚化的分子。在任何前述实施方案中,试剂可以包含抑制或降低干扰素的表达和/或活性,从而抑制或降低 IFP35 和/或 NMI 的表达和/或活性的分子。在任何前述实施方案中,试剂可以包含抑制或减少 IFP35 和/或 NMI 分泌的分子。在任何前述实施方案中,试剂可以包含抑制或减少 IFP35 和/或 NMI 与 IFP35 和/或 NMI 的细胞受体之间相互作用的分子。在任何前述实施方案中,试剂可以包含抑制或减少 IFP35 和/或 NMI 与 IFP35 和/或 NMI 细胞表面受体之间相互作用的分子。

[0008] 在任何前述实施方案中,预防或降低 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性可以导致抑制或降低炎症因子的表达和/或活性,和/或抑制或减少 NF- κ B 信号传导。在一个方面中,炎症因子包括 IL-1 β 、TNF- α 、iNOS 和/或 CD86,并且 NF- κ B 信号传导由 TLR 例如 TLR4 介导。

[0009] 在任何前述实施方案中,试剂可以包含特异性结合 IFP35 的抗体或抗原结合片段和/或特异性结合 NMI 的抗体或抗原结合片段。在一个方面中,抗体或抗原结合片段特异性结合一个或多个 NID (NMI/IFP35 结构域)。

[0010] 在任何前述实施方案中,方法可以进一步包括施用药学上可接受的载体或赋形剂。在任何前述实施方案中,可以通过口服、鼻、吸入、肠胃外、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、皮内、局部或直肠途径施用试剂。在任何前述实施方案中,可施用的药剂的量使得受试者的 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性降低至与不具有与 IFP35 和/或 NMI 的异常高水平 and/或活性相关的疾病或不适的对照受试者中的 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性基本上相同。

[0011] 在任何前述实施方案中,受试者可以是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人或非人哺乳动物。

[0012] 在另一方面中,本文公开了用于治疗 and/或预防受试者中与 IFP35 和/或 NMI 的异常高水平 and/或活性相关的疾病或不适的药物组合物。在一些方面中,药物组合物包含有效量的预防或降低受试者中 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性的试剂和药学上可接受的载体或

赋形剂。在任何前述实施方案中,药物组合物可进一步包含有效量的用于治疗 and/或预防受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的药物。

[0013] 在另一方面中,本文公开了有效量的在受试者中预防或降低IFP35和/或NMI的产生和/或活性的试剂在制备治疗和/或预防受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的用途。在一些方面中,与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性相关的疾病或不适是炎症、感染、败血症、器官损伤和自身免疫疾病。

[0014] 在另一方面中,本文公开了特异性结合IFP35和/或NMI的抗体或其抗原结合片段。在一些方面中,抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:8中的抗原表位。在一些方面中,抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:2的氨基酸81-170、177-268或136-216中的表位。在其它实施方案中,抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:4的氨基酸81-168、175-266或134-214中的表位。在其他实施方案中,抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:6的氨基酸104-193、202-293或151-250中的表位。在其它实施方案中,抗体或抗原结合片段特异性结合SEQ ID NO:8的氨基酸103-192、201-292或151-240中的表位。

[0015] 在另一方面中,本文公开了特异性结合IFP35和/或NMI的抗体或其抗原结合片段,并且所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有由SEQ ID NO:9所示的重链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR),所述轻链可变区包含由SEQ ID NO:10所示的轻链可变区中的CDR的氨基酸序列组成的CDR。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的重链可变区和SEQ ID NO:10所示的轻链可变区。

[0016] 在任何前述实施方案中,抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体或双特异性抗体。在任何前述实施方案中,抗原结合片段可以是Fab、F(ab')₂、Fv或scFv片段。在任何前述实施方案中,抗体或抗原结合片段可以进一步包含人重链恒定区和人轻链恒定区。

[0017] 在任何前述实施方案中,抗体或抗原结合片段可以是全人抗体或抗原结合片段或人源化抗体或抗原结合片段。在任何前述实施方案中,可以重组产生抗体或抗原结合片段。

[0018] 在一方面中,本文公开了用于治疗 and/或预防受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平和/或活性和/或活性相关的疾病或不适的方法。方法可包括向需要这种治疗和/或预防的受试者施用有效量的根据任何前述实施方案中的抗体或抗原结合片段。在任何前述实施方案中,疾病或不适可以与过度免疫应答相关。在任何前述实施方案中,所述疾病或不适可以与细胞因子风暴相关。在任何前述实施方案中,与异常高水平和/或IFP35和/或NMI活性相关的疾病或不适可选自由下述组成的组:炎症、感染、器官损伤、败血症和自身免疫疾病。在任何前述实施方案中,预防或降低IFP35和/或NMI的产生和/或活性可导致抑制或降低炎性因子的表达和/或活性,和/或抑制或减少的NF- κ B信号传导。在一个方面中,炎性因子包括IL-1 β 、TNF- α 、iNOS和/或CD86,并且NF- κ B信号传导由TLR例如TLR4介导。

[0019] 在一方面中,本文公开了编码特异性结合IFP35和/或NMI的抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含由SEQ ID NO:9所示的重链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR),所述轻链可变区包含由SEQ ID NO:10所示的轻链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的CDR。在一些方面中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID

NO:9所示的重链可变区和SEQ ID NO:10所示的轻链可变区。

[0020] 在一个方面中,本文还公开了包含根据前述实施方案中任一个的多核苷酸的分离的载体。在另一方面中,本文还公开了包含根据前述实施方案中任一个的载体的分离的宿主细胞。

[0021] 在另一方面中,本文公开了选自由以下组成的组中的宿主细胞:(a)用表达载体转化的宿主细胞,所述表达载体包含含有编码抗体或其抗原结合片段的重链可变区的序列的多核苷酸和包含编码抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的序列的多核苷酸;和(b)用表达载体转化的宿主细胞,所述表达载体包含含有编码抗体或其抗原结合片段的重链可变区的序列的多核苷酸和所述表达载体包含编码抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含由SEQ ID NO:9所示的重链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR),所述轻链可变区包含由SEQ ID NO:10所示的轻链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的CDR。在任何前述实施方案中,宿主细胞可以是真核细胞,例如CHO细胞。

[0022] 在另一方面中,本文公开了制备抗IFP35抗体或其抗原结合片段和/或抗NMI抗体或其抗原结合片段的方法。在一些方面中,方法包括:a)在适于表达编码抗体或抗原结合片段的多核苷酸的条件培养任何前述实施方案中的宿主细胞;和b)分离抗体或抗原结合片段。在一个方面中,本文还公开了通过根据任何前述实施方案中的方法产生的抗体或抗原结合片段。

[0023] 在一些实施方案中,本文公开了分离的多肽,所述多肽包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:(1)SEQ ID NO:2的氨基酸81-170、177-268或136-216中所示的序列;或(2)SEQ ID NO:4的氨基酸81-168、175-266或134-214中所示的序列;或(3)SEQ ID NO:6的氨基酸104-193、202-293或151-250中所示的序列;或(4)SEQ ID NO:8的氨基酸103-192、201-292或151-240中所示的序列。

[0024] 在一些实施方案中,本文公开了分离的多肽,所述多肽包含以下、主要由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:2的氨基酸的81-170、177-268或136-216中所示的序列,其中在SEQ ID NO:2中145、147、150、151、172、173、175、177、182、188、192、212、199、201、207、208、210、214和216位的一个或多个氨基酸残基(Ser145、Arg147、Glu150、Glu151、Asp172、Val173、Glu175、Leu177、Met182、Asp188、Gln192、Arg212、Gln199、Thr201、Gln207、Gln208、Pro210、Ser214和Tyr216)被突变和/或修饰。在一些方面中,根据基于结构的序列比对,所确定的IFP35NID-H结构域外部的左侧NID结构域具有与NID-H类似的结构。SEQ ID NO:2中的Ser234、Leu236、Arg110、Arg108、Arg233、Leu82、Glu268、Thr271、Val273、Glu92、Asp87、Asp245和Gly246残基是左侧的NID结构域中对应于IFP35确定的NID结构域中的表面残基。在任何前述实施方案中,突变可以基本上减少或消除多肽与IFP35受体或特异性针对IFP35的抑制性抗体的结合。

[0025] 在一些实施方案中,本文公开了分离的多肽,所述多肽包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:4的氨基酸81-168、175-266或134-214中所示的序列,其中在SEQ ID NO:4中143、145、148、149、170、172、173、175、180、186、190、210、197、199、204、205、206、208、212和214和216位的一个或多个氨基酸残基(Ser143、Arg145、Glu148、Glu149、Glu170、Arg172、Glu173、Leu175、Met180、Glu186、Gln190、Arg210、Gln197、Arg199、Arg204、

Gln205、Gln206、Leu208、Ser212和Tyr214)被突变和/或修饰。在任何前述实施方案中,突变可以基本上减少或消除多肽与IFP35受体或特异性针对IFP35的抑制性抗体的结合。

[0026] 在一些实施方案中,本文公开了分离的多肽,所述多肽包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:6的氨基酸104-193、202-293或151-250中所示的序列,其中在SEQ ID NO:6中107、112、117、159、172、173、192、197、215、256、267和292位的一个或多个氨基酸残基(Leu107、Lys112、Gln117、Lys159、Glu172、Glu173、Glu192、Asp197、Asp215、Lys256、Asp267和Glu292)被突变和/或修饰。在任何前述实施方案中,突变可以基本上减少或消除多肽与NMI受体或特异性针对NMI的抑制性抗体的结合。

[0027] 在一些实施方案中,本文公开了分离的多肽,所述多肽包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:8的氨基酸103-192、201-292或151-240中所示的序列,其中在SEQ ID NO:8中106、111、116、158、171、172、191、196、214、255、266和291位的一个或多个氨基酸残基(Leu106、Lys111、Gln116、Lys158、Glu171、Asp172、Asp191、Asp196、Asp214、Arg255、Asp266和Asp291)被突变和/或修饰。在任何前述实施方案中,突变可以基本上减少或消除多肽与NMI受体或特异性针对NMI的抑制性抗体的结合。

[0028] 在一个方面中,本文公开了包含任何前述实施方案中的多肽的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含药学上可接受的载体或赋形剂。

[0029] 在一个方面中,本文公开了用于刺激受试者中的免疫应答的方法,并且所述方法包括向需要这种刺激的受试者施用有效量的任何前述实施方案的多肽或药物组合物。在一个方面中,受试者患有增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症。在另一方面中,所述增生性疾病选自由下述组成的组:肉瘤、表皮样癌、纤维肉瘤、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、白血病、淋巴瘤、肺癌、非小细胞肺癌、结肠癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、胰腺癌、膀胱癌和食管癌。在任何前述实施方案中,免疫应答的刺激可以包括刺激炎症因子的表达和/或活性、免疫细胞例如嗜中性粒细胞的募集和/或NF- κ B信号传导。在一些方面中,炎症因子包括IL-1 β 、TNF- α 、iNOS和/或CD86,并且NF- κ B信号传导由TLR例如TLR4介导。在任何前述实施方案中,NF- κ B信号传导的刺激可包括增加磷酸化的I κ B α 和/或减少总的I κ B α 。

[0030] 在一些方面中,本文提供了用于激活、加强、增强和/或强化受试者中的免疫应答的组合物和方法。本发明的组合物和方法可用于治疗和/或预防受试者中与异常低水平的IFP35家族蛋白例如IFP35和/或NMI相关的任何合适的疾病或不适。例如,受试者中与异常低水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适可以是增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症。示例性增生性疾病包括肉瘤、表皮样癌、纤维肉瘤、宫颈癌、胃癌、皮肤癌、白血病、淋巴瘤、肺癌,例如非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、卵巢癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、胰腺癌、膀胱癌和食管癌。

[0031] 在另一方面中,本文公开了编码多肽的分离的多核苷酸,所述多肽包含任何前述实施方案中的多肽。在另一方面中,本文公开了包含任何前述实施方案中的多核苷酸的分离的载体。在仍另一方面中,本文公开了包含任何前述实施方案中的载体的分离的宿主细胞。在一些方面中,宿主细胞是真核细胞,例如CHO细胞。在一些方面中,本文公开了制备分离的多核苷酸的方法,并且所述方法包括:a)在适于表达编码包含任何前述实施方案中的多肽的多核苷酸的条件培养宿主细胞;和b)分离多肽。

[0032] 在一些方面中,本文公开了诊断、预后或治疗监测受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的方法。在一些方面中,方法包括评估怀疑患有或正在治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的活性水平和/或活性。在一个实施方案中,与异常高水平或/或IFP35和/或NMI活性相关的疾病或不适与过度的免疫应答相关。在另一个实施方案中,与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适与细胞因子风暴相关。在任何前述实施方案中,与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适可选自由下述组成的组:炎症、感染、器官损伤、败血症和自身免疫疾病。

[0033] 在任何前述实施方案中,方法可用于诊断受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适,并且其中所述受试者的IFP35和/或NMI水平和/或活性至少比没有与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适,例如炎症、感染、器官损伤、败血症和自身免疫疾病的对照受试者高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%或500%,表明受试者患有与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适。

[0034] 在任何前述实施方案中,所述方法可以进一步包括评估怀疑患有或正在被治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的水平。在任何前述实施方案中,方法可包括评估怀疑患有或正在被治疗与IFP35和/或NMI异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的活性。在任何前述实施方案中,可以在DNA、RNA和/或蛋白质水平评估IFP35和/或NMI的水平和/或活性。在一个方面中,使用与IFP35和/或NMI的DNA或RNA至少10个连续核苷酸互补的多核苷酸来评估IFP35和/或NMI的DNA和/或RNA的水平。在另一方面中,使用特异性结合IFP35和/或NMI的抗体在蛋白质水平评估IFP35和/或NMI的水平。

[0035] 在一个方面中,本文还公开了诊断、预后或治疗监测受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的试剂盒。在一些方面中,试剂盒包含用于评估怀疑患有或正在被治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的受试者中的IFP35和/或NMI的水平和/或活性。

[0036] 在一个方面中,本文还公开了伴随诊断受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的方法。在一些方面中,所述方法包括测定正在被治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI基因的遗传状态。在一个方面中,使用与IFP35和/或NMI的DNA或RNA中的至少10个连续核苷酸互补的多核苷酸测定受试者中IFP35和/或NMI的基因的遗传状态。

[0037] 在一个方面中,本文还公开了伴随诊断受试者中与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的试剂盒。在一个方面中,试剂盒包括用于测定正在被治疗与IFP35和/或NMI的异常高水平或/或活性相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI基因的遗传状态的手段。

[0038] 在一个方面中,本文公开了鉴定IFP35和/或NMI的调节剂的方法。在一些方面中,方法包括:a)使IFP35和/或NMI与测试物质接触,并评估已经与测试物质接触的IFP35和/或NMI的活性;b)评估没有与所述测试物质接触的IFP35和/或NMI的活性;和c)比较在步骤a)和b)中评估的IFP35和/或NMI的活性,并且当步骤a)和b)中评估的IFP35和/或NMI的活性不

同时,鉴定测试物质作为IFP35和/或NMI的调节剂。在一个方面中,测试物质是小分子、包含IFP35和/或NMI的突变体和/或片段的多肽文库、特异性结合IFP35和/或NMI的抗体、多核苷酸例如siRNA、shRNA、miRNA或反义RNA。在任何前述实施方案中,方法可用于鉴定IFP35和/或NMI的活性的抑制剂。在任何前述实施方案中,方法可用于鉴定用于治疗 and/或预防受试者中与IFP35和/或NMI的异常水平和/或活性相关的疾病或不适的药物。在一些方面中,与IFP35和/或NMI的异常水平和/或活性相关的疾病或不适是增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症。在一些实施方案中,疾病或不适,例如增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症与IFP35家族蛋白例如IFP35或NMI的异常低水平和/或活性相关。

[0039] 在一些方面中,本文还公开了通过任何前述实施方案中的方法鉴定的药物候选物。

附图说明

[0040] 图1显示NID-H(杂合NID)的晶体结构。a.显示了IFP35的截短和推定结构域,并且结构域之间的边界标注在序列中。b. IFP35二聚体(闭合构象二聚体,c-二聚体)的结构,标注了二级结构元件。c.标记了参与分子内相互作用的残基并以棒状显示。为了清楚起见,仅显示一半的相互作用。d.八聚体的环结构,其中示出了单体。e.强调了结构域交换构象的二聚体(开放构象二聚体,o-二聚体),二级结构元件标注在上图中。来自c-二聚体的NID-H分子叠加在o-二聚体上,如下图所示。

[0041] 图2显示了NID-H的两种稳定聚集态,二聚体和八聚体。a.使用Superdex-200 (16/60或10/30)柱(GE)对NID-H进行体积排阻色谱分析。280nm处的UV吸收以蓝色显示。两个峰的洗脱体积为75ml和90ml,表明形成了二聚体和八聚体。b.o-二聚体和c-二聚体叠加在八聚体上。四个o-二聚体通过 $\alpha 1$ - $\alpha 1$ 相互作用而彼此相互作用,并且形成环状八聚体结构。c.NID-H和RNA识别基序(RRM)之间的结构比较。它们之间的R.M.S.D.约为1.3Å。

[0042] 图3显示NID-H的开放构象二聚体(o-二聚体)负责免疫应答刺激。a.NID-H上调RAW 264.7细胞中TNF- α 和IL-1 β 的转录。通过RT-PCR检测细胞内TNF- α 和IL-1 β 的mRNA水平,使用GAPDH作为内部对照。b.二聚体显示的 $\alpha 1$ 上的K156E/K163E/R165E突变部分上调TNF- α 和IL-1 β 的转录。c.没有L-zip结构域(ΔN)的IFP35比NID-H八聚体更有效刺激免疫应答。d.与LPS类似, ΔN 可有效刺激RAW264.7细胞的TNF- α 释放。在孵育4小时后通过ELISA测定细胞培养物中的TNF- α 水平。

[0043] 图4显示人源NMI蛋白上调THP1细胞中TNF- α 和IL-1 β 的转录。PBS缓冲液用作阴性对照(NC)。结果来自三次独立重复的平均值。误差条表示它们之间的标准偏差。

[0044] 图5显示IFP35具有内源性DAMP的特征。a.LPS刺激由RAW264.7细胞释放的IFP35。用100ng/mL LPS预处理RAW 264.7巨噬细胞。通过IFP35、HMGB1和 β -肌动蛋白的蛋白质印迹来分析在0、1、2、3、5、9小时的细胞裂解物和上清液。b. IFP35在LPS诱导的败血症小鼠的血清中积累。注射LPS后3小时和6小时通过ELISA测定小鼠中IFP35的血清浓度。c. IFP35在脓毒症患者的血清中积累。该数据获自12位患者和8位正常个体的血清。d.提供了施用IgG和IFP35单克隆抗体(抗NID-H)的脓毒症小鼠的存活率。小鼠接受LPS注射(i.p.),然后用抗IFP35抗体或IgG处理。在n=15只小鼠/组中评估动物存活率。e.使用ELISA检测,抗NID-H中和减弱了早期炎症细胞因子如IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的释放。f.用LPS和D-gal处理的野生型

($n=12$) 和 IFP35^{-/-} 小鼠 ($n=12$) 的存活率。g. IFP35 敲除小鼠的血清中早期炎症细胞因子的释放减少。通过 ELISA 检测 IFP35^{-/-} 和野生型小鼠在注射 LPS 和 D-gal 后 1 小时和 3 小时血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的浓度。

[0045] 图6显示 IFP35 家族成员作为内源性 DAMP 释放。a. RAW 细胞在 10 ng/ml INF- γ 刺激下释放 IFP35。b. 由沙门氏菌 (SR) 刺激的 RAW 细胞释放的 NMI。c 和 d. 检测的 IFP35 (图 c) 和 NMI (图 d) 的聚集状态。在用 SR 刺激 RAW 细胞后, 收集细胞培养物, 并通过凝胶过滤 (Superdex-200 (16/60 或 10/30) 柱, GE) 和蛋白质印迹检测释放的 IFP35 家族成员。IFP35 的洗脱体积为约 90 ml, 如图 c 所示, 表明了 35 kD 单体。NMI 显示了通过凝胶过滤检测的多聚集状态。其主要构象的洗脱体积为约 76–82 ml, 表明释放的 NMI 作为二聚体存在于溶液中。e. NMI 在 LPS 诱导的败血症小鼠的血清中积累, 如通过 ELISA 在注射 LPS 后 3 小时和 6 小时测定。f. NMI 在脓毒症患者的血清中积累。从 8 名健康人和 12 名败血症患者获得血清。通过 ELISA 测定 NMI 的血清浓度。g. NMI 敲除小鼠对 LPS 攻击有抗性。显示了施用 LPS 的野生型 (WT) ($n=14$) 和 Nmi^{-/-} 小鼠 (KO) ($n=14$) 的存活率。h. Nmi^{-/-} 小鼠中血清炎症细胞因子如 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的释放降低。来自 WT 和 KO 小鼠的结果分别以灰色和黑色显示。所有结果通过多个独立分析的生物学重复确认。

[0046] 图7显示 IFP35 基于 TLR4/MD2/CD14 复合物刺激细胞因子风暴。a. 八聚体 NID-H 在用 TLR4、CD14、MD2 和 NF- κ B 启动子荧光素酶质粒转染的 HEK293 细胞系中诱导 NF- κ B 启动子活性。转染后 24 小时, 用 10 μ g/ml 八聚体 NID-H 或 100 ng/ml LPS 刺激细胞 4 小时 (在存在或没有 25 mg/ml 多粘菌素 B 的情况下), 并且测定荧光素酶活性。由 LPS 引发的荧光素酶活性可被多粘菌素 B 阻断, 多粘菌素 B 是革兰氏阴性菌感染的有效抗生素。b. 纯化的 IFP35 (Δ N), IFP35 和 LPS 的 N 末端截短诱导 NF- κ B 和 AP-1, 但不诱导 IRF3 启动子活性。将具有荧光素酶活性的 TLR4、MD2 和 CD14 以及 NF- κ B 启动子 (或 AP-1, IRF3) 的基因瞬时转染到 HEK293 细胞中。IFP35 的使用浓度为 1 μ g/ml, 而 100 ng/ml LPS 作为阳性对照施用。

[0047] 图8显示了 IFP35 中串联 NID 结构域的结构模型。a 和 b. A 和 A' 以及 B 和 B' 的二级结构元件和序列比对显示在图 a 中。相同的残基用 “*” 标记, 而具有相似特征的残基用 “:” 或 “.” 标记。NID-H 结构的疏水核心中的残基显示在图 b 中, 其在图 a 中以正方形突出显示。c. 串联 NID 的双筒结构。部分 B' 以绿色显示, 部分 A' 以青色显示。NID-H 结构以紫色显示。

[0048] 图9显示了 ClustalW 产生的 IFP35 和 NMI 的序列比对。相同的残基用 “*” 标记, 而具有相似特征的残基用 “:” 或 “.” 标记。NMI 的二级结构元件由 PsiPred 预测。 α -螺旋和 β -链分别以红色和黄色显示。与 IFP35 中的那些平行的两个 NID 结构域被标记并以方块突出显示。

[0049] 图10显示了 IFP35 蛋白纯化的过程。

[0050] 图11显示 IFP35 的不同寡聚物状态。

[0051] 图12显示了 IFP35-NID 晶体。

[0052] 图13显示了二聚体 IFP35-NID 的结构。

[0053] 图14显示了八聚体 IFP35-NID 的结构。

[0054] 图15显示了具有结构域交换构象的二聚体的结构。

[0055] 图16显示了一些区域的残基。

[0056] 图17显示了重组 NMI 的纯化。

[0057] 图18显示了当被沙门氏菌刺激时 IFP35 的表达水平。

- [0058] 图19显示了免疫荧光测定的IFP35的丰度随时间的变化。
- [0059] 图20显示了当细胞被病毒感染时在不同时期分泌到培养基中的IFP35的丰度。
- [0060] 图21显示了小鼠腹膜炎的模型。
- [0061] 图22显示了不同低聚物状态的IFP35在刺激炎症过程中的贡献。
- [0062] 图23显示了流式细胞术分析的结果,其说明八聚体IFP35-nid可募集大量的嗜中性粒细胞。
- [0063] 图24显示了外源八聚体IFP35-NID可刺激巨噬细胞中的NF- κ B途径。
- [0064] 图25说明了IFP35可通过myd88信号途径刺激炎症。
- [0065] 图26显示了IFP35诱导的WT、TLR9^{-/-}和TLR4^{-/-}小鼠中IL-1 β 和TNF的水平。
- [0066] 图27A显示了脓毒症小鼠血清中IFP35的量。图27B显示了当施用IFP35单克隆抗体时,脓毒症小鼠的存活率增加。
- [0067] 图28显示了IFP35的阻断减弱了小鼠中LPS诱导的IL-6的释放。
- [0068] 图29显示了沙门氏菌刺激的Thp1细胞的细胞裂解物和上清液中NMI的丰度。
- [0069] 图30显示了小鼠来源的NMI蛋白可上调Thp1细胞中TNF α 和IL-1 β 的转录。
- [0070] 图31显示了NMI的聚集状态的检测。
- [0071] 图32显示了人IFP35的二级结构预测。
- [0072] 图33显示了NID-H二聚体的晶体结构坐标。
- [0073] 图34显示了NID-H八聚体的晶体结构坐标。

发明详述

A. 一般技术

[0074] 除非另有说明,否则本发明的实践将使用本领域技术内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学、免疫学和药理学的常规技术。这样的技术在文献中已经被充分阐释,例如,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (Sambrook等,1989); Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait等,1984); Animal Cell Culture (R.I.Freshney编,1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等编,1987,以及定期更新); PCR: Polymerase Chain Reaction (Mullis等编,1994); 和Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第20版 (Lippincott, Williams & Wilkins, 2003)。

B. 定义

[0075] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文引用的所有专利、专利申请(公开的或未公开的)和其它出版物的通过引用以其整体并入本文。如果本部分中阐述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其它出版物中阐述的定义相反或不一致,则以本部分中阐述的定义为准。

[0076] 如本文所使用的“一个(a)”或“一个(an)”是指“至少一个”或“一个或多个”。

[0077] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指任何长度的氨基酸的聚合物,例如至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、1,000或更多个氨基酸。聚合物可以是直链或支链的,其可以包含修饰的氨基酸,并且其可以被非氨基酸中断。该术语还包括已经天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合

物,例如,通过二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作或修饰,例如与标记组分的缀合。定义还包括的例如含有一个或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等)以及本领域已知的其它修饰的多肽。

[0078] 如本文所用,术语“变体”用于指与亲本多肽序列具有一定程度的氨基酸序列同一性的多肽。变体与亲本序列相似,但在其氨基酸序列中具有至少一个替换、缺失或插入,使得它们在序列上不同于亲本多肽。另外,变体可以保留亲本多肽的功能特征,例如维持生物活性为该亲本多肽活性的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%。

[0079] “抗体”是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点特异性结合靶标,例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等的免疫球蛋白分子,并且可以是任何类别的免疫球蛋白,例如IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。IgY是禽类物种例如鸡中的主要抗体类型,也包括在定义内。如本文所用,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其突变体、天然存在的变体、包含具有必要特异性的抗原识别位点的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体和包含具有必要特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的构型。

[0080] 如本文所使用的,术语“抗原”是指可被抗体通过其抗原识别位点特异性识别的靶分子。抗原可以是单价或多价的,即它可以具有被一种或多种抗体识别的一个或多个表位。可被抗体识别的抗原种类的实例包括多肽、寡糖、糖蛋白、多核苷酸、脂质等。

[0081] 如本文所用,术语“表位”是指抗原的一部分,例如,至少约3至5个,优选约5至10或15个,并且不超过约1,000(或其间的任何整数)个氨基酸的肽序列,限定自身或作为较大序列的一部分的序列结合响应该序列产生的抗体。对于片段的长度没有严格的上限,其可以例如包含几乎全长的抗原序列,或甚至包含来自靶抗原的两个或更多个表位的融合蛋白。用于本发明的表位不限于具有其部分亲本蛋白的精确序列的肽,而是包括与天然序列相同的序列,以及对天然序列的修饰,例如缺失、添加和(本质上是保守的)替换。

[0082] 如本文所用,术语“特异性结合”是指特异性结合对的结合特异性。在其它潜在靶标的存在下,抗体识别特定靶标是这种结合的一个特征。特异性结合涉及两种不同的分子,其中一种分子通过化学或物理方式与第二种分子特异性结合。从两个分子彼此结合使得它们能够将它们的结合伴侣与具有类似特征的其他测定成分区分开的角度,两个分子是相关联的。结合组分对的成员被称为配体和受体(抗配体)、特异性结合对(SBP)成员和SBP伴侣等。分子还可以是用于分子聚集的SBP成员,例如针对第二抗体的免疫复合物产生的抗体并且相应的抗原可以被认为是免疫复合物的SBP成员。

[0083] 如本文所使用的,“标签”或“表位标签”是指通常添加到多肽的N-末端和/或C-末端的氨基酸序列。包含与多肽融合的标签可利于多肽纯化和/或检测。通常,标签或标签多肽是指具有足够的残基以提供由抗体识别的表位或可用于检测或纯化,并且足够短以使其不干扰其所连接的嵌合多肽的活性的多肽。标签多肽通常是足够独特的,因此与其特异性结合的抗体基本上不与其所连接的多肽中的表位交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少5或6个氨基酸残基,并且通常在约8-50个氨基酸残基之间,通常在9-30个残基之间。标签可以连接到多聚体的一个或多个嵌合多肽上,并且允许检测多聚体或从样品或混合物中将其回收。这样的标签是熟知的,并且可以容易合成和设计。示例性标签多肽包括用于亲和纯化的那些,并且包括His标签、流感血凝素(HA)标签多肽及其抗体12CA5;c-myc标签和其8F9、

3C7、6E10、G4、B7和9E10抗体；和单纯疱疹病毒糖蛋白D (gD) 标签及其抗体。见，例如，Field等 (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165；Evan等 (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3610-3616；Paborsky等 (1990) *Protein Engineering* 3:547-553。

[0084] 本文互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物，包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物，或可以通过DNA或RNA聚合酶掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸，例如甲基化的核苷酸及其类似物。如果存在，可以在聚合物组装之前或之后进行核苷酸结构的修饰。核苷酸序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合之后进一步修饰，例如通过与标记组分缀合。其他类型的修饰包括例如“加帽”，用类似物替换一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰，例如不带电荷的连接（例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、磷酸酰胺酯、氨基甲酸酯）和具有带电荷的那些（例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等）的那些、带侧链的物质，例如，蛋白质（例如，核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等）、嵌入剂的那些（例如吡啶、补骨脂素等）、包含螯合剂的那些（例如金属、放射性金属、硼、氧化金属等）、含有烷基化剂的那些、具有改性键的那些（例如， α -异头核酸等），以及多核苷酸的未修饰形式。此外，通常存在于糖中的任何羟基可以被例如磷酸酯基团、磷酸酯基团替代、被标准保护基团保护或被活化以为另外的核苷酸的准备另外的连接，或可以与固体载体缀合。5'和3'末端OH可以被磷酸化或被胺或具有1至20个碳原子的有机加帽基团部分替换。其它羟基也可以衍生为标准保护基团。多核苷酸还可以包含本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似形式，包括例如2'-O-甲基-2'-O-烯丙基，2'-氟-或2'-叠氮基-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和脱碱基核苷类似物如甲基核苷。一个或多个磷酸二酯键可以被可选的连接基团替代。这些可选的连接基团包括但不限于其中磷酸酯被P(O)S（“硫代酸酯”）、P(S)S（“二硫代酯”）、(O)NR₂（“酰胺化物”）、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂（“甲缩醛”）取代的实施方案，其中每个R或R'独立地为H或取代或未取代的任选地包含醚（--O--）键的烷基（1-20C）、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基。不是多核苷酸中的所有连接都需要是相同的。前述描述适用于本文提及的所有多核苷酸，包括RNA和DNA。

[0085] 本文所用的“寡核苷酸”通常是指短的，通常是单链的，通常是合成的多核苷酸，其通常但不一定长度小于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”不是相互排斥的。上文对多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。

[0086] 如本文所使用的，术语“同源物”用于指通过对天然存在的核酸（例如，“原型”或“野生型”核酸）进行微小修饰而不同于天然存在的核酸但保持天然存在形式的基本核苷酸结构。这种改变包括但不限于：一个或几个核苷酸的改变，包括缺失（例如，截短形式的核酸）插入和/或替换。与天然存在的核酸相比，同源物可以具有增强的、降低的或基本相似的性质。同源物可以与天然存在的核酸互补或匹配。同源物可以使用本领域已知的用于产生核酸的技术产生，包括但不限于重组DNA技术、化学合成等。

[0087] 如本文所用，“基本上互补或基本上匹配”是指两个核酸序列具有至少90%的序列同一性。优选地，两个核酸序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。或者，“基本上互补或基本上匹配”是指两个核酸序列可在高严格条件下杂交。

[0088] 通常，杂交物的稳定性是离子浓度和温度的函数。通常，杂交反应在较低严格性条

件下进行,随后是不同但更高严格性的洗涤。中等严格杂交是指允许核酸分子例如探针结合互补核酸分子的条件。杂交的核酸分子通常具有至少60%的同一性,包括例如70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性中的至少任一个。中等严格条件是等同于在42℃下在50%甲酰胺,5x Denhardt溶液,5x SSPE,0.2%SDS中杂交,随后在42℃下在0.2x SSPE,0.2%SDS中洗涤的条件。可以提供高严格条件,例如通过在42℃下在50%甲酰胺,5x Denhardt's溶液,5x SSPE,0.2%SDS中杂交,随后在65℃下在0.1x SSPE和0.1%SDS中洗涤。低严格杂交是指在22℃下在10%甲酰胺,5x Denhardt's溶液,6x SSPE,0.2%SDS中杂交的条件,随后在37℃下在1x SSPE,0.2%SDS中洗涤。Denhardt's溶液含有1%Ficoll、1%聚乙烯吡咯烷酮和1%牛血清白蛋白(BSA)。20x SSPE(氯化钠、磷酸钠、乙二醇四乙酸(EDTA))含有3M氯化钠、0.2M磷酸钠和0.025M(EDTA)。其它合适的中等严格性和高严格性杂交缓冲液和条件是本领域技术人员熟知的。

[0089] 如本文所用,术语“RNA干扰”或“RNAi”通常是指这样的过程,其中双链RNA分子或短发夹RNA分子减少或抑制核酸序列的表达,所述核酸序列与双链或短发夹RNA分子基本上或完全同源。术语“短干扰RNA”或“siRNA”或“RNAi试剂”是指引发RNA干扰,包含约10-50个核苷酸(或核苷酸类似物)的RNA(或RNA类似物)序列。见,Kreutzer等WO 00/44895、Zernicka-Goetz等WO 01/36646、Fire,WO 99/32619、Mello&Fire,WO 01/29058。如本文所用,siRNA分子包括包含化学修饰的核苷酸和非核苷酸的RNA分子。术语“ddRNAi试剂”是指从外源载体转录的DNA指导的RNAi试剂。术语“短发夹RNA”或“shRNA”是指具有双链区和环区的RNA结构。在某些实施方案中,ddRNAi试剂最初表达为shRNA。

[0090] 如本文所用,“载体(或质粒)”是指用于将异源DNA引入细胞中以用于表达或复制的单独的元件。这种载体的选择和使用在本领域技术人员的技术范围内是熟知的。表达载体包括能够表达与能够实现这种DNA片段的表达的调节序列,例如启动子区可操作地连接的DNA的载体。因此,表达载体是指重组DNA或RNA构建体,例如质粒、噬菌体、重组病毒或其它载体,其在导入合适的宿主细胞中时使得克隆DNA表达。合适的表达载体是本领域技术人员熟知的,包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的那些,以及保留附加型或那些整合到宿主细胞基因组中的那些。

[0091] 如本文所用,“启动子区或启动子元件”是指控制与其可操作连接的DNA或RNA的转录的DNA或RNA的片段。启动子区包括足以用于RNA聚合酶识别、结合和转录起始的特异性序列。该部分的启动子区称为启动子。此外,启动子区包括调节RNA聚合酶的这种识别、结合和转录起始活性的序列。这些序列可以对顺式作用或反式作用因子响应。根据调节的性质,启动子可以是组成型的或调节的。考虑用于原核生物中的示例性启动子包括噬菌体T7和T3启动子等。

[0092] 如本文所用,“可操作地连接或操作性地结合”是指具有核苷酸的调节和效应序列,例如启动子、增强子、转录和翻译终止位点的DNA和其他信号序列的功能关系。例如,DNA与启动子的可操作连接是指DNA和启动子之间的物理和功能关系,使得这种DNA的转录通过特异性识别、结合和转录DNA的RNA聚合酶从启动子启动。为了优化表达和/或体外转录,可能需要去除、添加或改变克隆的5'非翻译部分以消除额外的、潜在的不合适的可选翻译起始(即开始)密码子或其他在转录或翻译水平干扰或降低表达的序列。可选地,可以在起始密码子的5'端立即插入共有位点,并可以增强表达。见,例如,Kozak(1991)

J.Biol.Chem.266:19867-19870。这种修饰的期望(或需要)可以根据经验来确定。

[0093] “治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“减轻”是指治疗性治疗,其中如果不治愈目标病理状况或不适则该目的是减慢(减轻)或防止病状复发。如果在接受治疗量的治疗剂或治疗后,受试者显示出特定疾病的一种或多种迹象和症状的可观察和/或可测量的减少,则受试者被成功地“治疗”。患者还可以感觉到疾病的迹象或症状的减轻。如果患者经历稳定的疾病,也认为患者得到治疗。在一些实施方案中,用治疗剂的治疗有效地使得患者治疗后3个月,优选6个月,更优选1年,甚至更优选2或更多年无疾病。用于评估疾病的成功治疗和改善的这些参数可通过具有本领域适当技术的医生熟悉的常规程序容易测量。在一些实施方案中,“治疗”是指不适、不适或疾病的症状被改善或有益地改变的任何方式。治疗还包括本文组合物的任何制药用途。在一些实施方案中,通过施用特定药物组合物,特定不适的症状的“改善”是指可以归因于与组合物施用相关的任何不适的减轻,无论是永久的还是暂时的、持久的或瞬时的。

[0094] 本文使用的术语“预测”或“预后”是指患者将对药物或药物组有利地或不利地响应的可能性,或疾病的可能结果。在一个实施例中,预测涉及那些响应或结果的程度。在一个实施方案中,预测涉及在治疗(例如用特定治疗剂的治疗)后和在没有疾病复发的一段时间内,患者是否存活或改善的概率和/或概率。本发明的预测方法可以临床上用于通过为任何特定患者选择最适当的治疗方式来作出治疗决定。本发明的预测方法是预测患者是否可能有利地响应治疗方案,例如给定治疗方案,包括例如施用给定的治疗剂或组合、手术干预、类固醇治疗等。

[0095] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”指在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂等。这些介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。见,例如Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 第20版, (Lippincott, Williams & Wilkins 2003)。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则考虑在组合物中的这种用途。

[0096] “药学上可接受的盐”意指本文所示的化合物的游离酸或碱的盐,其无毒、生物学上可耐受或以其他方式生物学上适于施用于受试者。一般见, Berge, 等, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 1-19。优选的药学上可接受的盐是药理学上有效的并且适于与受试者的组织接触而没有过度的毒性、刺激或过敏反应的那些盐。本文所述的化合物可以具有足够酸性基团、足够碱性基团、两种类型的官能团或多于一种,因此与许多无机或有机碱以及无机和有机酸反应形成药学上可接受的盐。

[0097] 药学上可接受的盐的实例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、磺酸盐、甲基磺酸盐、丙基磺酸盐、苯磺酸盐、二甲苯磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、苯基乙酸盐、苯基丙酸盐、苯基丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 γ -羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐和扁桃酸盐。

[0098] 如本文所用,术语“治疗有效量”或“有效量”是指当单独或与其它治疗剂组合施用

于细胞、组织或受试者时有效的治疗剂的量预防或改善受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适。治疗有效剂量还指治疗剂的量足以导致症状的改善,例如治疗、治愈、预防或缓解相关医学不适,或提高治疗、治愈、预防或缓解这种病况的速度。当应用于单独施用的单个活性成分时,治疗有效剂量是指单个的该成分。当应用于组合时,治疗有效剂量是指导致治疗效果的活性成分的组合量,无论是组合、连续或同时施用。在一些实施方案中,“治疗特定疾病的化合物的有效量”是足以缓解或以某种方式减少与疾病相关的症状的量。这样的量可以作为单一剂量施用或可以根据方案施用,从而其是有效的。所述量可治愈疾病,但通常是为了改善疾病的症状而施用。可能需要重复给药以实现期望的症状缓解。

[0099] 术语“组合”是指一种剂量单位形式的固定组合或用于组合施用的部分试剂盒,其中化合物和组合伴侣(例如,如下所述的另一种药物,也称为“治疗剂“或”共同治疗剂”)可以同时或在时间间隔内分开施用,特别是其中这些时间间隔允许组合伴侣显示协作的效应,例如协同的。本文所用的术语“共同施用”或“组合施用”等意在包括向有需要的单个受试者(例如,患者)施用所选择的组合伴侣,并且旨在包括治疗方案其中所述药剂不必通过相同的给药途径或同时给药。本文所用的术语“药物组合”是指由多于一种活性成分的混合或组合产生的产物,包括活性成分的固定组合和非固定组合。术语“固定组合”是指活性成分,例如化合物和组合伴侣,以单一实体或剂量的形式同时施用于患者。术语“非固定组合”是指活性成分,例如化合物和组合伴侣,作为单独的实体,同时、共同或顺序地施用于患者,无特定时间限制,其中所述施用在患者体内提供两种化合物治疗有效的水平。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如,施用三种或更多种活性成分。

[0100] 如本文所使用的,“生物样品”是指从活的或病毒来源或其它大分子和生物分子来源获得的任何样品,并且包括能从中得到核酸或蛋白质或其它大分子的受试者中的任何细胞类型或组织。生物样品可以是直接从生物来源或加工的样品获得的样品。例如,扩增分离的核酸构成生物样品。生物样品包括但不限于来自动物和植物的体液,例如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液,组织和器官样品以及由其衍生的加工样品。

[0101] 术语“水平(level)”或“水平(levels)”用于指靶标,例如蛋白质或多核苷酸的存在和/或量,并且可以定性或定量测定。靶蛋白或多核苷酸水平的“定性”变化是指在从正常对照获得的样品中不可检测或存在的靶蛋白或多核苷酸的出现或消失。一种或多种靶蛋白或多核苷酸水平的“定量”变化是指当与健康对照相比时,可测量的靶蛋白或多核苷酸水平的增加或减少。

[0102] “健康对照”或“正常对照”是取自没有与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的个体的生物样品。“阴性对照”是没有试验设计用来检测的任何特异性分析物,并且因此为试验提供参考基线的样品。

[0103] 如本文所用,“哺乳动物”是指任何哺乳动物种类的物种。通常,本文所用的术语“哺乳动物”是指人、人类受试者或人类患者。“哺乳动物”还指任何非人哺乳动物种类的物种,例如实验、伴侣或经济性的非人哺乳动物。示例性非人哺乳动物包括小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪、牛、绵羊、山羊、马、猴、大猩猩和黑猩猩。

[0104] 如本文所用,“通过重组手段生产”是指使用重组核酸方法的生产方法,所述方法依赖于分子生物学的公认方法来表达由克隆核酸编码的蛋白质。

[0105] 如本文所使用的,术语“受试者”不限于特定物种或样品类型。例如,术语“受试者”

可以指患者,并且通常是人类患者。然而,该术语不限于人,因此包括多种非人动物或哺乳动物物种。

[0106] 如本文所用,“前药”是在体内施用时代谢或以其它方式转化为化合物的生物学,药学或治疗活性形式的化合物。为了制备前药,对药学活性化合物进行修饰,使得活性化合物通过代谢过程再生。前药可以设计成改变药物的代谢稳定性或转运特性,掩盖副作用或毒性,改善药物的风味或改变药物的其它特性或性质。根据药物动力学过程和体内药物代谢的知识,本领域技术人员一旦已知药学活性化合物,就可以设计该化合物的前药(参见例如Nogrody (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392)。

[0107] 本文所用的“测试物质(或候选化合物)”是指化学上确定的化合物(例如有机分子、无机分子、有机/无机分子、蛋白质、肽、核酸、寡核苷酸、脂质、多糖或这些分子中的杂合物如糖蛋白等)或化合物的混合物(例如,测试化合物文库、天然提取物或培养上清液等),其对IFP35和/或NMI的影响由所公开和/或要求保护的方法测定。

[0108] 如本文所用,高通量筛选(HTS)是指测试大量样品(例如针对疾病靶标的不同化学结构的样品)以鉴定“命中”的过程(参见例如Broach等, *High throughput screening for drug discovery*, *Nature*, 384:14-16 (1996); Janzen等, *High throughput screening as a discovery tool in the pharmaceutical industry*, *Lab Robotics Automation*: 8261-265 (1996); Fernandes, PB, *Letter from the society president*, *J. Biomol. Screening*, 2:1 (1997); Burbaum等, *New technologies for high-throughput screening*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1:72-78 (1997))。HTS操作是高度自动化和计算机化以处理样品制备,测定程序和大量数据的后续处理。

[0109] 应当理解,本文所述本发明的各个方面和实施方案包括“由各个方面和实施方案组成”和/或“基本上由各个方面和实施方案组成”。

[0110] 贯穿本公开,本发明的各个方面以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对本发明范围的不灵活限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,诸如1至6的范围的描述应当被认为已经具体公开了子范围,例如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数字,例如1、2、3、4、5和6。这适用于任何宽度的范围。

[0111] 从以下结合附图的说明中,本发明的其它目的、优点和特征将变得显而易见。

C. 治疗和/或预防与IFP35蛋白家族异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的方法

[0112] 在许多免疫细胞中,IFP35家族蛋白(包括IFP35和NMI)可以被I型或II型干扰素快速上调。Yang等, *PLoS One* 7, e50932 (2012); Das等, *Journal of Virology* 88, 3103-3113 (2014); Zhu等, *Cell* 96, 121-130 (1999); 和Lebrun等, *Journal of Interferon & Cytokine Research* 18, 767-771 (1998)。IFP35家庭成员的功能不清楚。IFP35家族成员预计由其N-末端的亮氨酸拉链(L-zip)结构域、随后两个串联的结构和功能未知的NMI/IFP35结构域(NID)组成。在早期报告中,人们使用免疫荧光显微镜发现了位于细胞质中的IFP35和NMI。Lebrun等, *Journal of Interferon & Cytokine Research* 18, 767-771 (1998)。它们可以组装成由它们的NID结构域介导的高分子量复合物(HMMC),并进一步聚集成功能未知的斑点样聚集物。Zhou等, *JBC* 275, 2134-21371 (2000); 和Chen等, *JBC* 275, 36278-84 (2000)。已知

IFP35可以识别来自牛泡沫病毒的特定病毒核酸,并抑制病毒转录。Tan等,Journal of Virology 82,4275-4283 (2008)。然而,最近的结果表明通过与RIG-1(视黄酸诱导基因I)特异性相互作用和负调节宿主先天免疫反应,它可以支持水疱性口炎病毒复制。Das等,Journal of Virology 88,3103-3113 (2014)。NMI的研究主要集中在通过调节多种信号传导途径对癌细胞的增生和转移的抑制作用。Li等,Mol Biol Cell 23,4635-4646 (2012); Fillmore等,International Journal of Cancer 125,556-64 (2009);和Li等,JBC 277,20965-73 (2002)。为了进一步探讨IFP35家族成员的潜在功能和机制,本发明人确定了IFP35中NID结构域的X射线晶体学结构。发现IFP35和NMI可以作为免疫调节的DAMP。据报道,一些DAMP蛋白在MD2和其它相关蛋白的帮助下被特异性细胞表面受体TLR4识别。参见Yang等,PNAS 107,11942-11947 (2010); Nagai等,Nature Immunology 3,667-672 (2002);和Zanoni等,Cell 147,868-880 (2011)。复杂的信号级联可以被触发以激活转录因子NF- κ B,导致细胞因子释放和增强的宿主炎症反应。参见Meylan等,Nature Immunology 5,503-507 (2004); Moynagh,Trends in Immunology 26,469-476 (2005);和Lu等,Cytokine 42,145-151 (2008)。

[0113] 在一些方面中,本文公开了截短的IFP35蛋白(例如,截短的蛋白的八聚体)或截短的NMI蛋白在制备用于调节炎症反应的药物中的用途。在一些方面中,本文公开了截短的IFP35蛋白(例如,截短的蛋白的八聚体)或截短的NMI蛋白在制备抗肿瘤产品中的用途。在一些方面中,通过使用IFP35抗体或NMI抗体来中和细胞或体液中的IFP35或NMI,其可有效调节IFP35或NMI蛋白过表达诱导的过度炎症反应、抑制炎症反应,避免身体和组织的产生由炎症引起的损伤并且明显改善受试者(例如具有细菌或病毒感染或自身免疫疾病的受试者)的存活率。在一些实施方案中,受试者患有病毒感染(例如流感病毒,SARS、MERS、HBV、HCV)、细菌感染(例如结核分枝杆菌)、真菌感染和/或由其他病原体引起的感染。在一些方面中,所述感染引起IFP35家族蛋白的表达,例如IFP35和/或NMI表达。在感染的患者中IFP35和/或NMI的过度表达可能导致其器官和身体的严重损伤。异常高水平的IFP35可能导致组织或器官损伤,因为引起细胞因子风暴。

[0114] 因此,本发明的组合物和/或方法可用于治疗、缓解和/或预防许多感染性疾病、感染状态、炎症、自身免疫疾病、移植物抗宿主疾病或与过度激活受试者的免疫系统相关的不适。病原性病毒包括但不限于逆转录病毒科(例如人免疫缺陷病毒,例如HIV-1(也称为HTLV-III、LAV或HTLV-III/LAV或HIV-III);以及其他分离株,例如HIV-LP、小核糖核酸病毒科(例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、回声病毒)、Caliciviridae(例如引起肠胃炎的菌株)、披膜病毒科(例如马脑炎病毒、风疹病毒)黄病毒科)、冠状病毒科(例如冠状病毒)、弹状病毒科(例如水泡性口炎病毒、狂犬病毒)、丝状病毒科(例如埃博拉病毒)、副粘病毒科(例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒)、正粘病毒科(例如,流感病毒)、双链RNA病毒科(例如汉坦病毒、bunga病毒、静脉炎病毒和Nairo病毒)、肾炎病毒科(出血热病毒)、呼肠孤病毒科轮状病毒)、双抗病毒科肝炎病毒科(乙型肝炎病毒)、细小病毒科(细小病毒)、乳头状病毒科(乳头瘤病毒、多瘤病毒)、腺病毒科(大多数腺病毒)、疱疹病毒科(单纯疱疹病毒(HSV) 1和2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒)、痘病毒(天花病毒、牛痘病毒、痘病毒)和虹彩病毒(例如,非洲猪瘟病毒)、丙型肝炎病毒和未分类的病毒(例如, δ 型肝炎(被认为是乙型肝炎病毒的有缺陷的卫

星)、诺瓦克和相关病毒,和星状病毒)。

[0115] 致病细菌包括但不限于幽门螺杆菌、布氏疏螺旋体、嗜肺军团杆菌、分枝杆菌(例如结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、戈登分枝杆菌)、金黄色葡萄球菌、奈瑟氏球菌淋球菌、脑膜炎奈瑟菌、单核细胞增生李斯特菌、酿脓链球菌(A组链球菌)、无乳链球菌(B组链球菌)、链球菌(viridans组)、粪链球菌、牛链球菌、链球菌(厌氧菌)、肺炎链球菌、致病性弯曲杆菌、肠杆菌属、流感嗜血杆菌、炭疽芽孢杆菌、白喉棒状杆菌、棒状杆菌、猪红斑丹毒丝菌、产气荚膜梭菌、破伤风杆菌、产气肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、多杀性多杀菌、拟杆菌属、核梭杆菌、大肠杆菌致病菌、链球菌念珠菌、苍白密螺旋体、密螺旋体、钩端螺旋体和放线菌。

[0116] 传染性真菌包括但不限于新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、粗球孢子菌、皮炎芽孢杆菌、沙眼衣原体、白色念珠菌。

[0117] 传染原生动物包括但不限于疟原虫属,例如恶性疟原虫,锥虫,例如锥虫(*Trypanosoma cruzi*)和弓形虫(*Toxoplasma gondii*)。

[0118] 过敏原包括但不限于花粉,昆虫毒液、动物毛屑、真菌孢子和药物(例如青霉素)。天然、动物和植物过敏原的实例包括下列具有特异性的蛋白质:犬(*Canis familiaris*)、*Dermatophagoides*(例如*Dermatophagoides farinae*)、猫属(*Felis domesticus*)、茼蒿(*Ambrosia artemisiifolia*; *Lolium*) (例如多年生黑麦草(*Lolium perenne*)或多花黑麦草(*Lolium multiflorum*))、褐鳕(*Cryptomeria japonica*)、链格孢(*Alternaria alternata*)、赤杨木、榆树(*Alnus gultinosa*)、桦树(*Betula verrucosa*)、白橡树(*Quercus alba*)、洋橄榄(*Olea europa*)、蒿(*Artemisia vulgaris*)、车前草(例如车前草)、山茱萸(例如*Parietaria officinalis*或*Parietaria judaica*)、*Blattella*(例如*Blattella germanica*)、*Apis*(例如*Apis multiflorum*)、柏木属(例如*Cupressus sempervirens*、*Cupressus arizonica* and *Cupressus macrocarpa*)、桧属(例如*Juniperus sabinoides*、*Juniperus virginiana*、*Juniperus communis* and *Juniperus ashei*)、金钟柏(例如*Thuja orientalis*)、偏柏(例如*Charaenocyparis obtusa*)、大蠊(例如美洲大蠊)、冰草属(例如小麦)、黑麦属(例如*Secale cereale*)、小麦属(例如*Triticum aestivum*)、鸭茅属(例如*Dactylis glomerata*)、羊茅属(例如*Festuca elatior*)、早熟禾属(例如*Poa pratensis* or *Poa compressa*)、燕麦属(例如*Avena sativa*)、绒毛草属(例如*Holcus lanatus*)、花椒(*Anthoxanthum*) (例如*Anthoxanthum odoratum*)、燕麦草属(例如*Arrhenatherum elatius*)、剪股颖属(例如*Agrostis alba*)、香蒲(例如:*Phleum pratense*)、藨草属(例如*Phalaris arundinacea*)、雀稗(例如*Paspalum notatum*)、高粱(例如*Sorghum halepensis*)和雀麦属(例如*Bromus inermis*)。还设想了在本方法中使用来自上述过敏原的表位进行抗体检测和分析的用途。

[0119] 在一些方面中,本发明的组合物和/或方法还可用于减轻受试者免疫系统的疾病诱导或相关抑制,例如受试者免疫系统的癌症诱导或相关抑制。例如,通过施用IFP35家族蛋白或其类似物或衍生物,可以激活和/或增强受试者的免疫应答,以克服引起疾病的载体逃避免疫反应的能力。该治疗方法适用于已经证明了免疫系统抑制的疾病状态,例如细菌感染,包括疟疾和typanosomiasis、寄生虫感染、病毒感染和由幽门螺杆菌感染引起的消化性溃疡和胃癌以及预防妊娠。

[0120] 在一些方面中,本文提供了参与结合IFP35受体或针对IFP35的拮抗剂抗体的氨基酸残基。在一个方面中,二聚体交换结构域形成弧状相交表面区域,并且二聚体提供一些残基诸如Ser145、Asp172、Val173、Leu177、Arg212、Gln199、Gln207、Gln208、Pro210、Ser214、Thr201和Tyr216,如图16所示的大的暴露表面。残基中,残基Glu150、Glu175、Leu177、Gln207和Gln208处于更明显的位置(图16A)。因此,它们更可能结合受体或抗体。

[0121] 在一些方面中,由IFP5-NID八聚体形成的环结构的内表面上的其它残基参与与其它蛋白质的相互作用。这些残基可以包括Ser145、Arg147、Glu150、Glu151、Val173、Gly206、Gln207和Gln208。在一些方面中,Arg147、Gln207、Gln208、Glu150和Glu151提供从八聚体环结构的内表面突出的延伸侧链(图16B)。

[0122] 基于二聚体或八聚体的结构,在单个单体或结构域交换单体的 β 折叠桶状结构的氨基末端和羧基末端附近存在一些相对大的氨基酸残基,这些相对大的氨基酸残基向外延伸。这些残基可以包括Arg187、Glu188、Gln192、Gln196、Arg212和Tyr216,它们在距离上接近。此外,一些氨基酸残基可参与结合其它蛋白质、抗体或小分子(图16C)。

[0123] 上述这些残基位于结构的表面上。在一些实施方案中,这些残基参与结合受体或抗体,并且是药物抑制的关键位置。

[0124] 在一些方面中,本发明人已经表达、纯化和结晶了IFP35和NMI,并且还确定了IFP35的一个片段的结构。IFP35的片段可以诱导炎症反应,并且可以从细胞分泌出更多的IFP35和NMI而刺激强烈的炎症反应。通过使用IFP35抗体或NMI抗体中和细胞溶液或体液中的IFP35或NMI,可以有效地控制由IFP35或NMI的过度分泌表达引起的过度炎症反应。在一些方面中,本文公开了如何避免了身体和组织的损伤并且提高了受试者的存活率。结果表明,与IFP35和NMI的过度表达相关的疾病或不适,例如细菌感染、病毒入侵、自身免疫疾病、肿瘤和其他感染,可以通过降低IFP35和/或NMI的浓度来控制。同时,通过添加蛋白质可以改善由IFP35和/或NMI的表达和/或过程(例如分泌)的缺陷或缺陷引起的疾病。

[0125] 以下是使用CLUSTAL 2.1的多重序列比对对的人IFP35(hIFP)、小鼠IFP35(mIFP)、人NMI(hNMI)和小鼠NMI(mNMI)的序列比对。

```

hnMI      MEADKDDTQQILKEHSPD-EFIKDEQNKGlideITKKNiQLKKEIQKLETELQeATKEFQ 59
mNMI      MDADKDNiKQACDERSAEMDDMRGEQSMGLVHEIMSENKELDEEiKKLEAELQSDAREFQ 60
hIFP      -----MSAPLDAALHALQEEQARLKMRLWDLQQLRKELGDSPK 38
mIFP      -----MSVTLQTVLYSLQEEQARLKMRLQELQQLKRERTGSPG 38

          *  :  :  :  *  :  :  *  :  :  :

hnMI      IKEDiPETKMKFLSVETPENDSQLSNiSCSFQVSSKVPYeiQKGQALITFEKEEVAQNvV 119
mNMI      IKENVPEKKLKLTSVESPKDGCHFSNssCSFQVSSQILYELQEGQALITFEKEEVAQNvi 120
hIFP      DKVPFSVEKiPLVFRGHTQQDPFVPKSLVS---NLRIHCPLLAGSALITFDdpKVAEQVL 95
mIFP      AKiPFsvPEVPLVFQGGTKQGRQVPKFVVS---NLKVCCeLPEGSALVTFEDPKVVDRLl 95

          *  :  :  :  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  :  :  :

hnMI      SMSKHhVQIKDVNLEVtAKPVPLNSGvRFQvY--VEVSKMKiNvTEiPD--TLREDQMRD 175
mNMI      SMGNhVVQMEGTPVKVSAHPVPLNTGvRFQvH--VDISKMKiNvTGiPD--ELSEEQTRD 176
hIFP      QQKEHTiNMEECRLRVQVQPLELPMVTTiQVMMSQLSGRRVLVTGFPASLRLSEEEELdD 155
mIFP      QQKEHRVnLEDcRLRVQVQPLELpVVTNiQV--SSQPDNHRVLvSGFFAGLRLSEEEELdD 153

          *  :  :  :  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :

hnMI      KLELSFSKSRNGGGEVDRVDYDRQSGSAViTFVEiGVADKiLKKKEYPLYiNQChRVtV 235
mNMI      KLELSFCKSRNGGGEVESVDYDRKSRSaViTFVETGVVDKiLKKKTYPLYMNQKChSVaV 236
hIFP      KLEiFFGKTRNGGdVdVR--ELLPgSVMLGFARDGVAQRlCQiGQFTVPLGGQvVPLRV 213
mIFP      KLEiFFGKAkNGGdVETR--EMlQGTVMlGFADeEVAQHlCQiGQFRVPLDRQqVLLRV 211

          ***: * *:*****:  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  :  :  :

hnMI      SPYTEiHLKKYQIFSGTSKRTVLLTGMEGiQMDEEiVEDLiNiHFQRAKNGGGEVDVVKC 295
mNMI      SPciERCLEKYQVFSAVSKKTVLLTGLEGiPVDEETGEDLLNiHFQRKNNGGGEVEVVKC 296
hIFP      SPYVNGeiQKAeIRSQPVPRSVLVlNiPDi-LDGPELHDVLEiHFQKPTRGGGEVEALtV 272
mIFP      SPYVSGeiQKAeIKFQQAPHSVLVtNiPDV-MDAQELHDiLEiHFQKPTRGGGEVEALtV 270

          **  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

hnMI      S-LGQPHiAYFEE----- 307
mNMI      S-LDQSFaAYFKEEARETi 314
hIFP      VPQGGQGLAVFTSESG--- 288
mIFP      VPSGQGLAiFTSESS--- 286

```

[0126] 在一些实施方案中,本文提供了IFP35家族蛋白激发免疫应答的方法中的用途。在另一个实施方案中,本文提供了抑制和/或减少IFP35家族蛋白例如IFP35和NMI的方法中的用途,以抑制例如通过细菌、病毒的感染或由通过食物或药物引起的异常高水平的IFP35/NMI的细胞因子风暴。器官可以包括肺、肾、肝或其他器官。

[0127] 在一些实施方案中,本文提供了用于IFP35家族蛋白的拮抗剂化合物,例如抗体或小分子化合物,其用于治疗或预防与异常水平的IFP35家族蛋白相关或由异常水平的IFP35家族蛋白引起的疾病或不适。

[0128] 在其它实施方案中,本文提供了应用晶体结构方法用于进一步设计和/或选择抗体或化合物的方法。在一个方面中,该结构用于观察药物或抗体如何与靶蛋白结合,然后可以进一步修饰抗体或化合物。从靶蛋白/抗体共晶体结构,也可以鉴定靶蛋白的表位。

[0129] 实施方案1:截短的IFP35蛋白在引起免疫应答和炎症的试剂/产物或制备抗肿瘤产物中的用途,其中所述截短的IFP35是人IFP35或小鼠IFP35,其中所述截短的人IFP35是以下的1)或2)。

[0130] 1) 具有如SEQ ID NO:2中136-216残基的蛋白质;

[0131] 2) 如1)中的所述蛋白质序列,其中1-10个额外的残基被添加到序列的氨基或/和羧基末端,并且序列同源性与1)的序列是至少约90%。

[0132] 其中所述截短的小鼠IFP35是以下3)或4):

[0133] 具有如SEQ ID NO:4中134-216残基的蛋白质;

[0134] 4) 如3)中的所述蛋白质序列,其中1-10个额外的残基添加到序列的氨基或/和羧基末端,并且序列同源性与3)的序列是至少约90%。

[0135] 实施方案2:实施方案1的方法,其中截短的人IFP35蛋白如SEQ ID NO:2中残基124-220所示。

[0136] 实施方案3:一种制备IFP35蛋白质引发的免疫应答/炎症产物或制备抗肿瘤/癌症产物的方法,其中所述IFP35蛋白质序列如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4所示。

[0137] 实施方案4:一种制备IFP35突变蛋白质引发免疫应答/炎症产物或制备抗肿瘤/癌症产物的方法,其中所述IFP35突变蛋白质具有至少一个残基的突变和/或修饰涉及IFP35受体或抑制性抗体的结合,所述突变和/或修饰导致IFP35与IFP35受体或抑制性抗体的结合减少或不结合,其中所述参与受体结合/抗体结合的残基是Ser145、Asp172、Val173、Leu177、Arg212、Gln199、Gln207、Gln208、Pro210、Ser214、Thr201、Tyr216、Glu150、Glu175、Gln208、Arg147、Glu151或Gly206或其任何组合。根据结构比较结果,来自IFP35和NMI的其他来源的序列中的对应位置残基也在本公开内。根据结构比较结果,IFP35和NMI都具有两个NID结构域,这两个NID结构域是彼此同源的,因此,在结构确定的IFP35NID结构域之外的IFP35和NMI相应NID结构域残基也在本公开内。

[0138] 实施方案5:根据实施方案1-4中任一项所述的方法,其中所述方法诱导免疫应答/炎症以增加炎症因子的表达、募集嗜中性粒细胞或刺激NF- κ B途径,其中所述炎症因子包括:IL-1 β 、TNF- α 、iNOS或CD86,并且其中所述激活NF- κ B途径是增加I κ B α 以减少总I κ B α 量。

[0139] 实施方案6:一种通过抑制过度免疫反应引起的IFP35不正常的高表达或通过抑制IFP35来抑制炎症因子的表达/反应来抑制疾病的方法。

[0140] 实施方案7:实施方案6的方法,其中所述抑制性产物或试剂是抑制IFP35蛋白活性

的IFP35抗体,和/或其中所述抗体是单克隆或多克隆的,和/或其中所述疾病是败血症,和/或其中所述炎症因子包括:IL-1 β 、TNF- α 、iNOS或CD86。

[0141] 实施方案8:截短的NMI蛋白在制备引发免疫应答的试剂/产物和制备炎症或抗肿瘤产物中的用途,其中所述截短的NMI是截短的人NMI或小鼠NMI,其中所述截短的人NMI蛋白具有SEQ ID NO:8中所示的155-240氨基酸残基序列,并且所述截短的小鼠NMI蛋白具有SEQ ID NO:6所示的151-250残基序列。

[0142] 实施方案9:一种制备通过NMI蛋白引发免疫应答/炎症的产物或制备抗肿瘤/癌症产物的方法,其中所述NMI蛋白是人或小鼠NMI蛋白,所述人NMI的序列在显示在SEQ ID NO:8中,或所述小鼠IFP35的序列显示在SEQ ID NO:6中。

[0143] 实施方案10:在一种制备由NMI突变蛋白引起免疫应答/炎症的产物或制备抗肿瘤/癌症的产物的方法,其中所述NMI突变蛋白是涉及的残基被突变的蛋白,导致NMI不结合NMI受体或抑制性抗体。

[0144] 实施方案11:根据实施方案8-11中任一项所述的方法,其中所述激发免疫应答/炎症刺激炎症因子表达和/或刺激NF- κ B途径信号传导,其中所述炎症因子包括:IL-1 β 、TNF- α 、iNOS或CD86,并且其中所述激活NF- κ B途径是增加I κ B α 以减少总I κ B α 量。

[0145] 实施方案12:一种通过抑制过度免疫反应引起的NMI不正常的高表达或通过抑制NMI来抑制炎症因子的过表达来治疗疾病的方法。

[0146] 实施方案13:根据实施方案12的方法,其中所述产物是NMI抗体,任选地其中所述抗体是单克隆或多克隆抗体,任选地其中所述疾病是败血症,任选地其中所述炎症因子包括:IL-1 β 、TNF- α 、iNOS或CD86。

[0147] 实施方案14:过表达和结晶截短的IFP35蛋白的方法,包括:

[0148] 1) 使用细菌细胞表达如实施例1中所述截短的蛋白质;

[0149] 2) 纯化所述截短的IFP35蛋白;

[0150] 3) 使纯化的截短的蛋白质结晶。

[0151] 实施方案15:根据实施方案14的方法,还包括:将截短的IFP35NID片段基因克隆至载体(例如,pGEX-6p-1载体),以便表达N末端GST标记的融合蛋白(GST-IFP35-NID),然后在IPTG诱导后将该质粒载体转化到大肠杆菌细胞,然后收集细菌用于纯化,其中所述纯化步骤包括:亲和层析(谷胱甘肽柱)步骤,通过酶去除GST融合标签,和/或离子交换柱步骤,和/或凝胶过滤柱步骤。

[0152] 实施方案16:过表达和结晶截短的NMI蛋白的方法,包括:

[0153] 1) 如实施例1中所述使用细菌细胞表达截短的蛋白质;

[0154] 2) 纯化所述截短的IFP35蛋白;

[0155] 3) 使纯化的截短的蛋白质结晶。

[0156] 实施方案17:根据实施方案14的方法,还包括:将截短的NMI NID片段基因克隆至载体(例如,pGEX-6p-1载体),以便表达N末端GST标记的融合蛋白(GST-NMI-NID),然后在IPTG诱导后将该质粒载体转化到大肠杆菌细胞,然后收集细菌用于纯化,其中所述纯化步骤包括:亲和层析(谷胱甘肽柱)步骤,通过酶去除GST融合标签,和/或离子交换柱步骤,和/或凝胶过滤柱步骤。

[0157] 实施方案18:设计或修饰IFP35家族蛋白例如IFP35和NMI的方法,以通过靶向

IFP35家族蛋白治疗疾病来治疗肿瘤、免疫缺陷疾病等。

[0158] 实施方案19:一种结构,其根据本文公开的IFP35-NID晶体结构的原子坐标,在其核心区域中具有小于距离本文公开的IFP35-NID结构约1.5埃的均方根偏差(RMSD)。

[0159] 实施方案20.一种原子水平结构,其具有小于IFP35-NID结构域的核心区域(包括残基136-216)的1.5埃的均方根偏差(RMSD)。

[0160] 实施方案21. IFP35抗体1D7,小鼠中产生的针对的人IFP35,并且以CGMCC 9573保藏在中国通用微生物培养物保藏中心(CGMCC)。

[0161] 实施方案22.人或小鼠来源的IFP35截短蛋白,其中所述人IFP35截短是:

[0162] 1) 具有SEQ ID NO:4中所示的134-216氨基酸残基序列的蛋白;或者

[0163] 2) 具有与1)相同但在其氨基或羧基末端具有另外1-10个残基序列的蛋白质,其中所述蛋白质与1)中的蛋白质的同源性为至少约90%。

[0164] 实施方案23.在参与IFP35家族蛋白与受体或中和抗体结合的位置处残基具有突变的IFP35家族蛋白,其中所述突变破坏或降低IFP35与受体或中和抗体的结合,其中所述残基是:SEQ ID NO:1中所示的人IFP的Ser145、Asp172、Val 173、Leu 177、Arg212、Gln199、Gln207、Gln 208、Pro210、Ser214、Thr201、Tyr216、Glu150、Glu175、Gln208、Arg147、Glu151或/和Gly206NO:2或IFP35家族蛋白中对应于SEQ ID NO:2中所列的残基。

[0165] 实施方案25.来自残基155-240(对应SEQ ID NO:8中所示的人NMI)和残基151-250(对应SEQ ID NO:6中所示的小鼠NMI)的NMI截短蛋白。

D. 用于治疗 and/或预防与IFP35和/或NMI异常高水平和/或活性相关的疾病或不适的药物组合物

[0166] 在另一方面中,本公开提供了用于治疗 and/或预防受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的药物组合物,所述药物组合物包含有效量的可以防止或降低受试者中IFP35和/或NMI的产生和/或活性的试剂和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0167] 本发明的药物组合物可用于治疗 and/或预防受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的任何合适的疾病或不适。

[0168] 在一些实施方案中,本药物组合物可用于治疗与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适。在其它实施方案中,本药物组合物可用于预防与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适。

[0169] 任何合适的试剂可以用于本药物组合物以治疗 and/或预防受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的任何合适的疾病或不适。例如,合适的试剂可用于减少IFP35和/或NMI基因的拷贝数,以阻断或减少IFP35和/或NMI基因的复制、阻断或减少IFP35和/或NMI基因的转录、阻断或减少IFP35和/或NMI mRNA的翻译,和/或抑制IFP35和/或NMI的一种、一些或所有活性。在一些实施方案中,所述试剂包含靶向编码IFP35和/或NMI的基因的多核苷酸(例如siRNA、shRNA或miRNA)。siRNA可靶向IFP35和/或NMI基因的任何合适的部分。例如,siRNA可以靶向IFP35和/或NMI基因中的编码一个或多个NID的部分。在其他实施方案中,所述试剂包含靶向编码IFP35和/或NMI的基因的反义RNA。反义RNA可靶向IFP35和/或NMI基因的任何合适部分。

[0170] 在仍其它实施方案中,试剂抑制或修饰控制IFP35和/或NMI转录的核因子。抑制或修饰控制IFP35和/或NMI转录的核因子的任何合适的试剂均可用于本方法中。

[0171] 在又一其它实施方案中,所述试剂包含特异性结合IFP35和/或NMI的抗体。抗体可以特异性结合IFP35和/或NMI的任何合适部分。例如,抗体可以特异性结合IFP35和/或NMI的一个或多个NID。在另一个实例中,抗体可以特异性结合与细胞IFP35和/或NMI受体相互作用的IFP35和/或NMI的部分。

[0172] 在一些方面中,本文公开了特异性结合IFP35和/或NMI的抗体或其抗原结合片段,并且所述抗体或其抗原结合片段包含具有互补决定区(CDR)的重链可变区和/或包含具有CDR的轻链可变区,所述重链可变区序列中的CDR由SEQ ID NO:9中的重链可变区序列组成,所述所述轻链可变区由SEQ ID NO:10中的轻链可变区序列组成。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的重链可变区和SEQ ID NO:10所示的轻链可变区。可以将保守替换引入本文公开的抗体的CDR和/或框架区(FR)中。

[0173]

VQLVESGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTFADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARYGYSWAMDYWGQGTSTVTVSSAST (SEQ ID NO:9)。

[0174]

DIVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHVYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:10)。

[0175] 一方面,本文公开了编码特异性结合IFP35和/或NMI的抗体或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区包含由SEQ ID NO:9所示的重链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的互补决定区(CDR),所述轻链可变区包含由SEQ ID NO:10所示的轻链可变区序列中的CDR的氨基酸序列组成的CDR。在一些方面中,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的重链可变区和SEQ ID NO:10所示的轻链可变区。在其它实施方案中,分离的多核苷酸包含SEQ ID NO:11和/或SEQ ID NO:12中所示的核酸序列。

[0176]

TGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCCCTGACCCCAGTAGTCCATAGCCCAAGAGTACCCGTATCTTGCA CAGAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTCTTGAGGTTGTTGATCTGCAAATAGGCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGA GAAGGCAAACCGTCCCTTGAAGTCATCAGCAAATGTTGGCTCTCCAGTGTAGGTGTTTATCCAGCCCATCCACTTTA AACCCCTTTCTGGAGCCTGCTTACCCAGTTCATTCCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTGCCAGGAGATC TTGACTGTCTCTCCTGACTCCTTAAGCTGCACCT (SEQ ID NO:11)。

[0177]

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAG CTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCA AACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATG GAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCATCACGTTGGTGTCTGGCACCAA GCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:12)。

[0178] 术语“互补决定区”和“CDR”在本领域中是指在抗体可变区内的氨基酸的非连续序列,其赋予抗原特异性和结合亲和力。一般而言,在每个轻链可变区中有三个(3)CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)并且每个重链可变区中有三个(3)CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)。

[0179] 给定CDR的精确氨基酸序列边界可以使用多种公知方案中的任一种容易地确定,

包括Kabat等描述的那些方案(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，5thEd.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等(1997) JMB 273,927-948 (“Chothia”编号方案),MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)，“Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,”J.Mol.Biol.262,732-745. (“Contact”编号方案),Lefranc MP等,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains”,Dev Comp Immunol,2003Jan;27 (1):55-77 (“IMGT”编号方案)和Honegger A和PlückthunA,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automated modeling and analysis tool,”J Mol Biol,2001Jun 8;309 (3):657-70, (AHo编号方案)。

[0180] 给定CDR的边界可以根据用于识别方案的不同而变化。例如,Kabat方案是基于结构比对,而Chothia方案是基于结构信息。Kabat和Chothia方案的编号是基于最常见的抗体区序列长度,插入片段伴随着插入字母,例如“30a”,并且在一些抗体中出现缺失。这两种方案在不同位置处放置某些插入和缺失(“indels”),导致不同的编号。接触方案基于复杂晶体结构的分析,并且在许多方面类似于Chothia编号方案。

[0181] 因此,除非另有说明,“CDR”和“互补决定区”是指给定抗体或其区域,例如可变区以及单独CDR(例如“CDR-H1、CDR-H2”),抗体或其区域应理解为涵盖如本文上述任何已知方案所定义的互补决定区。

[0182] 如本文所用,术语“保守替换”是指本领域技术人员已知的氨基酸和/或氨基酸序列的替换,并且通常可以在不改变所得分子的生物活性的情况下进行。本领域技术人员认识到,一般而言,多肽的非必需区域中的单个氨基酸替换基本上不改变生物活性(见,例如Watson等,MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,p.224 (4th Edition 1987))。例如,这样的改变包括用任何其它疏水氨基酸替换异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)和亮氨酸(L)中的任一种;天冬氨酸(D)替换谷氨酸(E),反之亦然;谷氨酰胺(Q)替换天冬酰胺(N),反之亦然;苏氨酸(T)替换丝氨酸(S),反之亦然。取决于特定氨基酸的环境及其在蛋白质的三维结构中的作用,其它替换也可被认为是保守的。例如,甘氨酸(G)和丙氨酸(A)通常可以互换,丙氨酸(A)和缬氨酸(V)也可以互换。相对疏水的甲硫氨酸(M)通常可以与亮氨酸和异亮氨酸互换,有时与缬氨酸互换。赖氨酸(K)和精氨酸(R)的氨基酸残基的明显特征是其电荷以及pK值的变化并不显著,因此经常是可互换的。其他变化在特定环境中可以被认为是“保守的”(见,13-15页“Biochemistry”2nd ED.Lubert Stryer ed (Stanford University);Henikoff等,PNAS1992Vol 89 10915-10919;Lei等,J Biol Chem 1995May 19;270 (20):11882-6)。其它替换也是允许的,并且可以根据经验或根据已知的保守替换来确定。

[0183] 在其他实施方案中,所述试剂可以包含IFP35和/或NMI的变体形式。IFP35和/或NMI的任何合适的变体形式可以用于本发明的方法中。例如,IFP35和/或NMI的变体形式可以是突变的IFP35和/或NMI和/或IFP35和/或NMI的片段。

[0184] 药物组合物可以通过任何合适的途径施用。例如,药物组合物可以通过口服、鼻、吸入、肠胃外、静脉内、腹膜内、皮下、肌内、皮内、局部或直肠途径给药。

[0185] 在一些实施方案中,本药物组合物可以进一步包含另一种合适的治疗或预防物质

或治疗。例如，药物组合物可进一步包含有效量的用于治疗 and/或预防受试者中的增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症的药物。

[0186] 本发明的药物组合物可以以任何合适的量或剂量使用。例如，本发明的药物组合物可以降低受试者中 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性的量至与 IFP35 和/或 NMI 的生产和/或活性水平基本相同的水平，其不具有与异常高水平的 IFP35 和/或 NMI 相关的疾病或不适应。

[0187] 本发明的药物组合物可用于治疗和/或预防任何合适受试者的疾病或不适应。例如，受试者可以是哺乳动物。在一些实施方案中，哺乳动物是人。在其它实施方案中，受试者是非人动物或非人哺乳动物，例如实验，伴侣或经济非人动物或非人哺乳动物。

E. 在药物制造中，预防或降低在受试者中 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或其活性的试剂的有效剂量的应用

[0188] 在仍另一方面中，本公开提供了可预防或降低在受试者中 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或其活性的有效剂量的试剂在制造用于治疗 and/或预防受试者中与异常高水平的 IFP35 和/或 NMI 相关的疾病或不适应的药物中的用途。

[0189] 预防或降低受试者中 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性的试剂用于制备用于治疗 and/或预防任何与异常高水平的 IFP35 和/或 NMI 相关的合适的疾病或不适应的药物中发用途。

[0190] 在一些实例中，预防或降低受试者中 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性的试剂可用于制备用于治疗任何与异常高水平的 IFP35 和/或 NMI 相关的合适的疾病或不适应的药物。在其它实例中，预防或降低受试者中 IFP35 和/或 NMI 的产生和/或活性的试剂可用于制备用于预防任何与异常高水平的 IFP35 和/或 NMI 相关的合适的疾病或不适应的药物。

[0191] 任何合适的试剂可用于制备用于治疗受试者中与异常高水平的 IFP35 和/或 NMI 相关的任何合适的疾病或不适应的药物。例如，合适的试剂可用于减少 IFP35 和/或 NMI 基因的拷贝数、来阻断或减少 IFP35 和/或 NMI 基因的复制、阻断或减少 IFP35 和/或 NMI 基因的转录、阻断或减少 IFP35 和/或 NMI mRNA 的翻译，和/或抑制 IFP35 和/或 NMI 的一种、部分或全部活性。在一些实例中，所述试剂包含一种靶向编码 IFP35 和/或 NMI 基因的 siRNA。siRNA 可靶向 IFP35 和/或 NMI 基因的任何合适的部分。例如，siRNA 可以靶向编码一个或多个 NID 结构域的 IFP35 和/或 NMI 基因的一部分。

[0192] 在其它实施方案中，所述试剂包含靶向编码 IFP35 和/或 NMI 的基因的反义 RNA。此反义 RNA 可靶向 IFP35 和/或 NMI 基因的任何合适部分。例如，反义 RNA 可以靶向编码一个或多个 NID 结构域的 IFP35 和/或 NMI 基因的一部分。

[0193] 在仍其它实施方案中，试剂抑制或修饰可以调控 IFP35 和/或 NMI 转录的核转录因子。任何合适的可抑制或修饰调控 IFP35 和/或 NMI 转录的核转录因子的试剂，可用于制备用于治疗 and/或预防受试者的与异常高水平的 IFP35 和/或 NMI 相关的疾病或不适应的药物。

[0194] 在又一其他实例中，试剂包括特异性结合 IFP35 和/或 NMI 的抗体。抗体可以特异性结合 IFP35 和/或 NMI 的任何合适部分。例如，此抗体可以特异性结合 IFP35 和/或 NMI 的一个或多个 NID 结构域。在另一个实例中，抗体可以特异性结合 IFP35 和/或 NMI 的 NID 结构域的一部分。

[0195] 在又一其它实施方案中，试剂可以包含 IFP35 和/或 NMI 的变异体。IFP35 和/或 NMI 的任何合适的变异体可以用于本方法。例如，IFP35 和/或 NMI 的变异体可以是 IFP35 和/或

NMI的突变体和/或IFP35和/或NMI的片段,例如包含IFP35和/或NMI的一个或多个NID结构域的片段,或包含IFP35和/或NMI的NID结构域的一部分的片段。此试剂还可以包含IFP35和/或NMI的变异体与外源蛋白(例如Fc部分)的融合蛋白。

[0196] 可以制造成通过任何合适的途径给药的药物。例如,药物可以通过口服、鼻、吸入、非肠道、静脉、腹膜、皮下、肌肉、真皮内、外用或直肠途径给药。

[0197] 在一些实施方案中,本药物可以进一步包含另一种合适的治疗性或预防物质或疗法。例如,此药物可进一步包含用于治疗 and/或预防受试者中的增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症的有效剂量。

[0198] 本发明的药物可以以任何合适的量或剂量使用。例如,本发明的药物可以降低受试者中IFP35和/或NMI的产生和/或活性的量至没有与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的对照受试者中IFP35和/或NMI的产生和/或活性的水平基本相同的水平剂量来施用。

[0199] 本药物可用于治疗和/或预防任何合适的受试者的疾病或不适。例如,受试者可以是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在其它实施方案中,受试者是非人类的动物或非人类的哺乳动物,例如实验的、伴侣的或经济的非人类动物或非人类哺乳动物。

[0200] 可以制备本文所述的任何合适的化合物的剂型。一般参见Remington's Pharmaceutical Sciences, (2000) Hoover, J.E. 编辑, 第20版, Lippincott Williams and Wilkins Publishing Company, Easton, Pa., 第780-857页。选择剂型以适合于恰当的给药途径。一些给药途径是口服、非肠道、通过吸入、外用、直肠、鼻、口腔、阴道、通过植入储液器或其它给药方法。如果在化合物具有足够碱性或酸性以形成稳定的无毒酸或碱盐的情况下,以盐的形式给予化合物可能是合适的。药学上可接受的盐的样品是加上盐的有机酸与能形成生理上可接受阴离子的酸类成形,例如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐和 α 甘油磷酸盐。也可以形成合适的无机盐,包括盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐。使用本领域熟知的标准程序获得药学上可接受的盐,例如通过足够碱性的化合物(像胺)与合适的酸,提供生理上可接受的阴离子。也可制备带羧酸的碱金属(例如钠、钾或锂)或碱土金属(例如钙)盐。

[0201] 当考虑的化合物以药学组合物施用时,化合物可以与药学上可接受的赋形剂和/或载体混合配制。例如,所考虑的化合物可以作为中性化合物或药学上可接受的盐口服施用,或在生理盐水溶液中静脉给药。常规的缓冲剂如磷酸盐、碳酸氢盐或柠檬酸盐也可使用。当然,本领域普通技术人员可以在说明书的教导下修改剂型,以提供多种制剂用于特殊的给药途径。尤其是,计划的化合物可以被修饰以使它们更易溶于水或其它载体中,例如可以通过本领域普通技术人员熟知的少量修饰(盐制剂,酯化等)的方法容易地实现。改变特殊化合物的给药途径和剂量方案以控制本发明化合物的药物动力学在患者中获得最大有益效果也是本领域普通技术人员所熟知的。

[0202] 本文所述的试剂可以是或可以通常可溶于有机溶剂如氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇、异丙醇、乙腈、甘油、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砜等。在一个实施方案中,本发明提供了通过将试剂与药学上可接受的载体制备混合的制剂。在一个方面中,可以使用包括以下步骤的方法制备制剂:a) 将所述试剂溶解在水溶性有机溶剂、非离子溶剂、水溶性脂质、环糊精、维生素例如生育酚、脂肪酸、脂肪酸酯、磷脂或其组合,以

提供溶液；和b) 加入盐水或含有1-10%碳水化合物溶液的缓冲液。在一个实例中，碳水化合物包括葡萄糖。使用本发明方法获得的药物组合物是稳定的并且可用于动物和临床应用。

[0203] 用于本方法和组合物的水溶性有机溶剂的说明性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、醇、乙腈、N-甲基-2-吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷或其组合。醇的实例包括但不限于甲醇、乙醇、异丙醇、甘油或丙二醇。

[0204] 用于本方法和组合物中的水溶性非离子表面活性剂的说明性实例包括但不限于EL、聚乙二醇改性的CREMOPHOR(聚氧乙烯甘油三蓖麻油酸酯35)、氢化CR40、氢化CR60、PEG-琥珀酸酯、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、HS(聚乙二醇660 12-羟基硬脂酸酯)、脱水山梨糖醇单油酸酯、泊洛沙姆、(乙氧基化的聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯)、(聚乙二醇-8-甘油酯)、GELUCIRE(甘油酯)、(PEG 6辛酸甘油酯)、甘油、乙二醇-聚山梨酯或其组合。

[0205] 用于本方法和组合物中的水溶性脂质的说明性实例包括但不限于植物油、甘油三酯、植物油或其组合。脂质油的实例包括但不限于蓖麻油、聚氧乙烯蓖麻油、玉米油、橄榄油、棉籽油、花生油、薄荷油、红花油、芝麻油、大豆油、氢化植物油、氢化大豆油、椰子油的甘油三酯、棕榈籽油及其氢化形式，或其组合。

[0206] 用于本方法和组合物中的脂肪酸和脂肪酸酯的说明性实例包括但不限于油酸、单甘油酯、甘油二酯、PEG的单-或二-脂肪酸酯、或其组合。

[0207] 用于本方法和组合物的环糊精的说明性实例包括但不限于 α -环糊精、 β -环糊精、羟丙基- β -环糊精或磺丁基醚- β -环糊精。

[0208] 用于本方法的磷脂的说明性实例环糊精包括但不限于大豆磷脂酰胆碱或二硬脂酰磷脂酰甘油及其氢化形式，或其组合。

[0209] 本领域普通技术人员可以在说明书的教导内修饰制剂，以提供用于特定给药途径的多种制剂。特别地，所述化合物可以被修饰以使它们更易溶于水或其它媒介物中。改变特定化合物的给药途径和剂量方案以控制本发明化合物的药物动力学在患者中获得最大有益效果也是本领域普通技术人员所熟知的。

F. 诊断、预后或治疗监测的方法

[0210] 在又另一方面中，本公开提供了诊断、预后或治疗监测受试者中异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的方法，所述方法包括评估那些被怀疑或被治疗患有异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的受试者的IFP35和/或NMI水平和活性。

[0211] 本方法可用于对受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的任何适合的疾病或不适的诊断、预后或治疗监测。

[0212] 在一些实施方案中，本方法用于诊断受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适，例如增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症，并且其中受试者IFP35和/或NMI的水平和/或活性比与没有与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的对照受试者中的IFP35和/或NMI的水平和/或活性至少高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%或500%，表明受试者患有与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适。

[0213] 在一些实施方案中，本方法用于治疗监测受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适，以调整受试者的进一步治疗，例如增加或降低剂量，或延长、缩短或停止治疗。

[0214] 在一些实施方案中,本方法包括评估被怀疑或被治疗与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的水平。在其它实施方案中,本发明方法包括评估被怀疑或被治疗与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的活性。此方法可以用来评估任何合适的IFP35和/或NMI的活性,例如与细胞内受体或抗体结合。在其它实施方案中,本发明方法包括评估被怀疑或被治疗与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的受试者中IFP35和/或NMI的活性。

[0215] IFP35和/或NMI的水平和/或活性可以在任何合适的水平上进行评估。例如,可以在DNA、RNA和/或蛋白质水平评估IFP35和/或NMI的水平 and/或活性。可以使用任何合适的手段或方法评估IFP35和/或NMI在DNA和/或RNA方面的水平。例如,IFP35和/或NMI的DNA和/或RNA的水平可以用与IFP35和/或NMI DNA或RNA中至少10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个连续核苷酸互补的多核苷酸评估。IFP35和/或NMI的蛋白水平可以使用任何合适的手段或方法评估。例如,IFP35和/或NMI蛋白的水平可以使用与IFP35和/或NMI特异性结合的抗体来评估。可以使用任何合适的抗体。例如,这种抗体可以特异性结合NID结构域的一部分或IFP35和/或NMI的一个或多个NID结构域。在另一个实例中,抗体是多克隆抗体。

[0216] 在仍另一方面中,本公开提供了一种针对受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的诊断、预后或治疗监测的试剂盒,试剂盒包括用于评估被怀疑或被治疗患有与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的受试者中的IFP35和/或NMI的水平和/或活性。

[0217] 在本发明的试剂盒中可以使用任何合适的工具。例如,所述方法可用于评估IFP35和/或NMI的活性。在另一个实例中,所述工具可以是与IFP35和/或NMI的DNA或RNA中至少10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个连续核苷酸互补的多核苷酸,用于评估IFP35和/或NMI DNA和/或RNA水平。在另一个实例中,所述工具可以是与IFP35和/或NMI特异性结合的抗体,用于评估IFP35和/或NMI的蛋白水平。合适的工具可以被放置在任何合适的单个或多个容器中,例如试管、微孔板等。合适的工具也可以被固定在任何合适的单个或多个表面上,例如珠子、芯片或微流体装置等。

[0218] 在另一方面中,本公开提供了受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的伴随式诊断的方法,所述方法包括测定被治疗的患有异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的受试者的IFP35和/或NMI基因的遗传状态。

[0219] 受试者中IFP35和/或NMI基因的遗传状态可以使用任何合适的方法或手段评估。例如,受试者中IFP35和/或NMI基因的遗传状态可以使用与IFP35和/或NMI DNA或RNA中至少10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000个连续核苷酸互补的多核苷酸来测定。

[0220] 在另一方面中,本专利提供了受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的伴随式诊断的试剂盒,所述试剂盒包括测定被治疗的患有与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的受试者的IFP35和/或NMI基因的遗传状态的方法。

[0221] 在本试剂盒使用任何合适的工具。例如,本试剂盒包含与IFP35和/或NMI DNA或RNA中至少10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000个连续核苷酸互补的多核苷酸,用于确定受试者中IFP35和/或NMI基因的遗传状态。这

种合适的工具可以储存在任何合适的单个或多个容器中,例如试管,微孔板等。合适的工具也可以被固定在任何合适的单个或多个表面上,例如珠子、芯片或微流体装置等。

[0222] 本方法可以以任何合适的方式进行。例如,本方法可以手动进行。在另一个示例中,本方法可以以半自动或自动方式进行。本方法可以在任何合适的地点进行。例如,本方法可以在医院、诊所、医生办公室、临床实验室、药房、办公室或家中进行。本方法可以由任何合适的人员进行。例如,本方法可以由医生、护士、实验室技术人员、护理人员或患者进行。

[0223] 本试剂盒可以包含另外附加的组件,例如,从受试者处获得样品的工具、检测标准、用于区别受试者的标识符和/或检测说明书等。本发明的试剂盒可以是独立试剂盒或可以是检测系统的一部分,例如自动化检测系统。

G. 鉴定IFP35和/或NMI的调节剂的方法

[0224] 在另一方面中,本公开提供了鉴定IFP35和/或NMI的调节剂的方法,所述方法包括:a)使IFP35和/或NMI与测试物质接触,并评估IFP35和/或NMI的活性;b)评估与所述测试物质未接触的IFP35和/或NMI的活性;和c)比较在步骤a)和b)中评估的IFP35和/或NMI的所述活性,并且当在步骤a)和b)中评估IFP35和/或NMI的所述活性不同时,鉴定所述测试物质作为调节剂在IFP35和/或NMI。

[0225] 任何合适的测试物质可以用于本发明的方法中。例如,测试物质可以是小分子、包含IFP35和/或NMI的突变体和/或片段的多肽文库、特异性结合IFP35和/或NMI的抗体、siRNA或反义RNA。

[0226] 在一些实施方案中,本发明的方法可用于鉴定IFP35和/或NMI的活性的抑制剂。

[0227] 在一些实施方案中,本发明的方法可用于鉴定用于治疗 and/或预防受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适的药物。本方法可用于鉴定用于治疗 and/或预防受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的任何合适的疾病或不适的药物。例如,受试者中与异常高水平的IFP35和/或NMI相关的疾病或不适可以是增生性疾病、赘生物、肿瘤或癌症。

[0228] 本方法可以使用任何合适的测定形式进行。优选地,本方法可以使用高通量测定形式进行。

[0229] 在一些实施方案中,本文公开提供了IFP35和/或NMI的调节剂或通过本发明方法鉴定的候选药物。

H 实施例

实施例1:作为早期内源性DAMP的IFP35家族蛋白

摘要

[0230] 在该实施例中,解析了IFP35杂合NID结构域(NID-H)的结构。NID-H可以形成“闭合”、“张开”两种构象。处于张开构象时,NID-H对小鼠具有高度毒性,可以引起巨噬细胞炎症因子级联反应,其特点是一些早期炎症因子的表达上调。此外,在LPS或IFN- γ 刺激单核细胞或巨噬细胞1h后,IFP35和NMI可以被释放到细胞培养基上清中。在LIP休克小鼠和脓毒患者中也检测到了IFP35和NMI的积聚。针对IFP35NID-H的中和性抗体减轻了LPS引起的炎症反应,并有效改善脓毒性小鼠的存活率。另外,IFP35或NMI敲除小鼠可以抵抗LPS感染。与众所周知的晚期DAMP HMGB1相比,IFP35家族成员可以作为TLR4的内源性配体,进而激活转

录因子NF-κB。因此,在某些方面中,具有一个或多个NID结构域的IFP35家族蛋白,包括IFP35与NMI,可以作为早期的内源性DAMP。在一些方面上,提供了IFP35和/或者NMI或其结合受体诊断和/或者治疗感染与损伤的用途。

结果

1.NID结构域的结构存在“闭合”与“张开”两种构象

[0231] 根据序列分析,IFP35的N端为包含前80个氨基酸的L-zip结构域,随后是两个串联的NID结构域,分别是81-270位氨基酸和177-268位氨基酸(图1a)。根据蛋白二级结构预测,对蛋白进行截短构建一些截短体。一个从124位到224位氨基酸的IFP35蛋白截短体可以很好地在大肠杆菌中表达。由于该截短体从第一个NID结构域跨越到第二个NID结构域,所以称之为NID-H(杂合NID)(图1a)。在纯化过程中,NID-H存在二聚体和八聚体两种稳定的聚合状态(图2a)。

[0232] 可以得到二聚体和八聚体两种状态下的衍射较好的NID-H晶体。含硒代甲硫氨酸的二聚体NID-H的衍射分辨率为2.2埃。通过单波长反常衍射法(SAD)解析了该结构(表1)。关于SAD法的报道来自Chayen&Saridakis,Nature methods 5,147-153(2008)。在NID-H的结构中,由五个β片和2个α螺旋以β1-α1-β2-β3-α2-β4-β5的顺序形成桶状结构(图1b)。α1螺旋上的几对氨基酸和连接α1与β2之间的无规则卷曲(L1)对二聚体的形成至关重要。从该结构中至少可以看到五对相互作用(图1c),包括:每个单体上159位异亮氨酸侧链间的疏水相互作用、163位赖氨酸与158位谷氨酸间及155位天冬氨酸与156位赖氨酸间的极性基团相互作用、170位天冬氨酸的侧链与164位苏氨酸主链上的氨基间的相互作用及165位精氨酸的侧链和171位缬氨酸主链上的羰基间的相互作用。

[0233] 表1数据收集与结构优化数据

	二聚体(Se-Met)	八聚体(天然的)
数据集合		
光束	BL17U1	BL17U1
波长(Å)	0.9798	0.9792
解析范围(Å)	40.0-2.3 (2.34-2.30) ^a	50.0-2.5 (2.54-2.50)
空间组	H3	P2 ₁
晶胞尺寸		
a, b, c (Å)	170.3, 170.3, 53.0	44.4, 125.3, 77.2
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.3, 90.0
总反射	25,256 (1,263)	29,326 (1,447)
特定反射	1,148	6,110

完整性 (%)	99.9 (100.0)	97.8 (99.9)
平均 I/ σ	74.2 (21.3)	21.1 (5.4)
多重性	22.0 (22.5)	4.8 (5.4)
R _{sys} (%)	12.5 (69.9)	10.8 (57.9)
优化		
解析范围 (Å)	32.38-2.30	36.71-2.50
R _{工作} /R _{游离} (%)	18.1/22.9	20.6/25.3
Rmsd 键长度(Å)	0.002	0.003
Rmsd 键角(°)	0.619	0.639
拉氏图		
最优的(%)	98.2	97.6
另外允许的(%)	1.8	2.4
未允许的(%)	0.0	0.0
平均 B 因子(Å ²)	29.0	55.0

括号里的值代表的是最高分辨率壳层。

[0234] 随后,使用分子置换(MR)的方法解析NID-H八聚体的结构,分辨率为2.8埃(图1d,表1)。在八聚体结构中,可观察到两个单体之间的结构域交换构象。具体方式由一个单体上的 $\beta 1-\alpha 1-\beta 2$ 与另一个单体上的 $\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 5$ 折叠成一个桶状结构(图1d)。两个单体以这种方式在二聚体中头尾堆叠并紧密相互作用。为了清楚起见,将这种结构域交换的二聚体命名为张开构象(o-二聚体),将不存在结构域交换的二聚体命名为闭合构象(c-二聚体)。四个o-二聚体进而通过前面c-二聚体中描述的 $\alpha 1-\alpha 1$ 间的相互作用进一步相互作用,并形成环状结构(图2b)。o-二聚体中的单体与c-二聚体中的单体非常相似(图1e),两者间的均方根偏差为0.7埃。最大的不同是c-二聚体中连接 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 的 β 转角(T1)在o-二聚体中被拉直,形成一个无规则卷曲(L2)进而连接两个桶状结构。二聚体和八聚体结构的晶体结构坐标分别显示在图33和图34中。

[0235] 使用强大的结构比对工具Dali server对NID-H的结构与PDB中已有结构进行比对。NID-H的结构与RNA识别基序(RRM)的结构非常相似(图2c)。RRMs被广泛用于识别不同序列和结构的RNAs。然而,NID-H表面电荷分布显示它的结构中并没有明显的RNA结合位点。EMSA实验使用了不同序列的RNA与NID-H相互作用,结果显示NID-H与所使用的RNA序列间没有相互作用。

2. IFP35NID-H张开构象激活免疫反应

[0236] NID-H结构域被用作抗原刺激小鼠以生产多克隆抗体。NID-H八聚体致使生产抗体的四只小鼠全部死亡。此外,所有死亡的小鼠都肚子肿胀,腹水明显增加。这种现象表明NID-H八聚体可能具有细胞毒性。因为IFP35通常是在免疫细胞中表达,譬如单核细胞、巨噬细

胞、树突状细胞和淋巴细胞等,所以NID-H八聚体可以刺激引起炎症反应。

[0237] NID-H八聚体刺激巨噬细胞样细胞RAW264.7后,会引起促炎性因子如TNF- α 和IL-1 β 的转录上调(图3a)。该结果与LPS引起的炎性因子表达类似。相比之下,NID-H二聚体(c-二聚体)不会引起这种效应。基于这些实验结果,处于八聚体状态的NID-H倾向于引起与TNF- α 和IL-1 β 相关的炎症风暴。

[0238] 由于c-二聚体构象本身不会引起炎症反应,NID-H八聚体中的o-二聚体构象可能就是活性构象。为了验证八聚体的骨架对细胞毒性是否是必要的,构建了如图1b所示的位于 α 1螺旋上含三个点突变的突变体K156E/K163E/R165E。这些突变被认为可以部分破坏导致八聚体解聚的c-二聚体构象,因而,这种突变应该会形成独立的o-二聚体。结果显示,突变或者改造过的二聚体可以部分上调TNF- α 和IL-1 β 的转录(图3b),这种变化可能归因于独立o-二聚体的形成。进而表明o-二聚体是NID-H的活性构象,可引起炎症风暴。

[0239] 鉴于NID-H可以引起固有免疫反应,因而对IFP35的全长蛋白进行了表达。然而,IFP35在真核细胞中表达含量低,而在大肠杆菌中形成包涵体。其原因可能是其N端为疏水的L-zip结构域。因而,N端缺失34个氨基酸(Δ N)的IFP35截短体得以构造并在原核表达系统中表达。可溶的 Δ N蛋白可以纯化得到,并刺激TNF- α 和IL-1 β 的转录,且比NID-H八聚体更为有效(图3c)。与NID-H的有效浓度(约10-50 μ g/ml)相比, Δ N的有效浓度为1 μ g/ml,并与HMGB-1或Mrps的有效浓度相当。此外, Δ N在低剂量时就能强烈地刺激炎性因子如TNF- α 的释放。ELISA的结果显示,1 μ g/ml的 Δ N或者LPS刺激RAW 264.7细胞就可以引起100-200pg/ml TNF- α 的释放(图3d)。当使用重组蛋白mNMI RAW 264.7时,也可以检测到类似的炎症反应(图4)。基于这些实验结果,IFP35家族蛋白可以作为内源性DAMP发挥作用。

[0240] 人IFP35的二级结构预测如图32所示。根据预测,在某种程度上,去除人IFP35前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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77和78位氨基酸可以得到与在本实施例中使用的 Δ N相似的实验结果。

3. IFP35家族蛋白具有内源性DAMP的典型特点

[0241] 包括HSPs、HMGB-1、Mrp8和Mrp14在内的DAMPs被细胞分泌并被细胞表面的模式识别受体(PRRs)识别。Kawai等,Immunity 34,637-650(2011);Wu&Chen,Annual Review of Immunology 32,461-488(2014);和Zhong等,Frontiers in Immunology 4,333(2013)。据报道,IFP35和NMI在IFN- γ 刺激后表达上调,并定位在细胞质中。然而,在该实施例中,用IFN- γ 刺激3h或者用LPS或沙门氏的菌刺激1h后,分泌IFP35和NMI并且在RAW 264.7细胞培养基上清中可检测到(图5a、图6a、图6b和图19-24)。在接下来的几小时内,IFP35和NMI随时间的推移在培养基上清中积累。相对照,早期内毒素症介质TNF- α 和晚期内毒素症介质HMGB-1分别在几分钟和6-8h内释放。Wang等,Science 285,248-251(1999)和Tracey等,Science 234,470-474(1986)。据报道,IFP35可以在胞内与NMI结合形成HMMC,并进一步形成颗粒状聚集体(Chen等,JBC 275,36278-84(2000)。)。使用聚丙烯酰胺凝胶和免疫印迹法检测SR-11刺激后RAW264.7细胞培养基上清中分泌的IFP35和NMI。结果显示,分泌的IFP35和NMI分别以单体和二聚体的形式存在(图6c和图6d)。与HMGB1和Mrps相似,IFP35家族蛋白不含有明显的跨膜信号肽。因此,IFP35家族蛋白可以用作早期DAMP。

[0242] 据报道DAMPs与感染和损伤密切相关(Hirsiger等, *Mediators of Inflammation*, 315941 (2012); 和Bianchi, *Journal of Leukocyte Biology* 81,1-5 (2007))。已知的DAMP, 如HMGB-1和Mrps, 它们的浓度在脓毒症患者的血清中显著提高(Wang等, *Science* 285,248-251 (1999); Austermann等, *Cell Reports* 9,2112-2123 (2014); and Sunden-Cullberg等, *Critical Care Medicine* 33,564-573 (2005))。为了确定IFP35和NMI在感染期间是否在血清中释放, 使用LPS刺激小鼠, 并在脓毒症小鼠的血清中检测它们。LPS刺激3小时后, 分泌IFP35和NMI。与对照组相比, 在LPS刺激下, 小鼠血清中的IFP35和NMI含量以剂量依赖性方式急剧增加, 在6小时内达到约3-8ng/ml (图5b和图6e)。另外, 对脓毒症患者的血清进行分析, 所有7个样品中IFP35和NMI的浓度都明显升高。尽管在这些病例中存在由不同病原体和患者身体条件引起的可能的较大偏差, 但是血清IFP35含量可以达到1-20ng/ml, 而IFP35在正常个体的血清中几乎检测不到 (图5c和图6f)。这些结果表明IFP35在感染期间被释放到血清中。

[0243] 与HMGB-1不同, IFP35家族蛋白可以在LPS刺激后的第一个小时内释放。在注射致死剂量(LD100)的LPS之前注射针对NID-H (抗NID-H) 的抗体可以为小鼠提供有效的保护。与对照组的存活率0%相比, 超过60%的使用抗NID-H抗体处理的小鼠在LPS刺激7天后依然存活 (图5d)。因为LPS的毒性作用由诸如TNF- α , IL-1 β 和IL-6的炎性因子介导, 在注射LPS和抗IFP35单克隆抗体后, 检测血清中这些炎性因子的浓度。与这种现象一致, 注射抗NID-H抗体可以减少脓毒症小鼠血清中一些毒性炎性因子 (例如TNF- α , IL-1 β 和IL-6) 的释放, 减少约20%-50% (图5e)。由CRISPR-Cas9技术产生IFP35和NMI敲除小鼠 (Ran等, *Nature Protocols* 8,2281-2308 (2013))。由细菌LPS与半乳糖胺(D-gal) 耦合引起的反应是由炎性因子介导的小鼠内毒性休克的一个良好模型 (Vogl等, *Nature Medicine* 13,1042-1049 (2007); 和Galanos等, *PNAS* 76,5939-5943 (1979))。腹腔注射LPS和D-gal后, 野生型小鼠表现出急性疾病的症状, 并在5-8小时内死亡。相比之下, IFP35^{-/-}小鼠没有受到严重影响, 存活时间更长 (图5f)。当小鼠注射大量不含D-gal的LPS时, 观察IFP35^{-/-}和NMI^{-/-}小鼠对LPS诱导的致死毒性的抗性。在注射致死剂量的LPS后, 正常小鼠的致死率几乎为100%, 相比之下, NMI敲除小鼠的致死率有所改观 (图6g)。在LPS刺激期间, 这些敲除小鼠的血清中已知的促炎性因子的浓度大大降低 (图5g和图6h)。因此, 所有这些结果表明IFP35可以作为DAMP并引起强烈的炎症反应。

4. IFP35通过TLR4通路引发炎性因子风暴

[0244] 基于先前的报道, HMGB-1和Mrps通过TLR4信号通路激活NF- κ B以引起免疫应答 (Vogl等, *Nature Medicine* 13,1042-1049 (2007); Yang等, *PNAS* 107,11942-11947 (2010); 和Yu等, *Shock* 26,174-179 (2006))。因此, 对该途径中的几个关键参与者进行检测, 并分析了它们对由IFP35家族蛋白诱导的免疫应答的影响。首先, 使用荧光素酶测定法检测NID-H对NF- κ B启动子的活化。用诸如TLR4、CD14、MD2和带有荧光素酶的NF- κ B启动子的质粒瞬时转染HEK293细胞。转染24小时后, 将细胞与纯化的八聚体蛋白NID-H (10 μ g/ml) 孵育。荧光素酶活性取决于由转录因子磷酸化NF- κ B调控的荧光素酶基因的转录水平, 因此它可以被用来表示NF- κ B的激活。由NID-H引起的荧光素酶活性不强却显著 (图7a)。LPS的活性可被多粘菌素B阻断, 多粘菌素B是有效对抗革兰氏阴性菌感染的抗生素。然而, NID-H的活性不受此影响。由于IFP35的N端截短体IFP35 (Δ N) 可以有效触发炎症反应, 进而检测了其激活转录

因子的活性。结果表明纯化的 ΔN 可以诱导较强的NF- κ B和AP-1启动子活性。相反,其对IRF3启动子没有影响(图7b)。这些结果表明,IFP35可以活化NF- κ B和AP-1而不是IRF-3,其通过的可能是Myd88依赖的通路,IFP35家族成员的机制应当与已知的DAMP平行。经干扰素刺激后,IFP35家族蛋白可作为危险信号释放,然后通过TLR4-MyD88-NF- κ B/AP-1信号通路引发细胞因子风暴。

讨论

[0245] 在该实施例中,确定了NID结构域的结构,即IFP35家族成员的特征结构域的结构。发现NID-H的开放构象可以激活先天免疫应答。结果表明,IFP35家族成员可以担当早期的DAMP并通过TLR4通路激活转录因子NF- κ B,并导致细胞因子风暴。然而,IFP35家族蛋白的结构和功能仍需要讨论和说明。

1. 串联的NID结构域的结构

[0246] 在IFP35和NMI中,都有两个串联的NID结构域。NID-H的结构横跨IFP35中两个预测的NID结构域。它可以分为两个片段, $\beta 1-\alpha 1-\beta 2$ (称为“A部分”)和 $\beta 3-\alpha 2-\beta 4-\beta 5$ (称为“B部分”),分别覆盖序列的131-179位和180-228位氨基酸。基于二级结构预测的结果,覆盖80-130的片段含有 $\beta-\alpha-\beta-\beta$ 二级结构元件,与B部分相区分,将其称为“B’部分”。类似地,覆盖229-276的“A’”部分包含 $\beta-\alpha-\beta$ 二级结构元件。通过序列比对,部分A’和B’与部分A和B相当(图8a)。图8b所示为NID-H结构的疏水核心所涉及的氨基酸残基。这些残基在这两组中,即A与A’和B与B’中几乎完全保守(图8a)。因此,同一组中的成员可以相互替换。根据先前的结构域预测,A和B’属于第一个NID结构域,而A’和B属于第二个NID结构域。根据NID-H的结构,IFP35中两个串联的NID结构域可以折叠成双桶结构(图8c)。

[0247] 在该模型中,由部分A和部分B组成的NID-H区域作为开放构象存在。串联NID模型和NID-H α -二聚体结构的骨架是相似的。然而,它们之间有许多区别。例如,A’和B’中的表面残基与A和B中的表面残基不完全相同。此外,这两个NID的相对位置应当是柔性的,这使得其在受体识别过程中可以适当调整。相反,NID-H的 α -二聚体构象是稳定的,因为它固定在八聚体的环结构中。基于这些,可以理解的是,与 ΔN 相比,NID-H八聚体仅具有约5-10%的活性。推测长环(LL)存在于预测的NID域中。它连接NID结构域的两个部分,这两部分折叠成 $\beta-\alpha-\beta-\beta-LL-\beta-\alpha-\beta$ 的结构。在IFP35中,这两个长环分别覆盖115-130和220-228位氨基酸。这些氨基酸的特征表明这两个环是柔性的。因此,这两个环可能参与细胞中的HMMC的形成或外膜上的受体识别。IFP35同源蛋白NMI的结构和功能机制也可以依据IFP35的结构推断(图9)。

2. TLR4和IFP35间的识别

[0248] 为了验证IFP35和TLR4之间的识别,进行了体外结合实验,通过TLR4、TLR4/MD2和TLR4/MD2/CD14复合物下拉IFP35。诱饵蛋白与6*His融合并固定在Ni-NTA珠上。结合蛋白的珠子用于下拉全长或截短的IFP35蛋白,包括纯化的NID-H八聚体, ΔN 和在RAW264.7细胞培养基中释放的IFP35。结果显示,只有在CD14存在的情况下,TLR4/MD2复合物才可以结合释放的IFP35(数据未显示)。因此,TLR4、MD2和CD14可以在IFP35识别期间协同工作。

3. IFP35家族成员和已知DAMPs间的不同

[0249] 虽然类似于已知的晚期DAMP,IFP35家族成员可以通过TLR4通路激活NF- κ B,事实上,预期它们间具有更多的差异。作为早期DAMP,与HMGB-1的6-8小时相比,IFP35和NMI在细

胞被病原体刺激后的第一小时就释放。由于在免疫应答的早期状态中起关键作用,IFP35家族成员可能与已知的其他早期炎症因子例如TNF- α , IL-1 β 交联。从本文的结果来看,NID-H的抗体可有效下调这些炎症细胞因子的表达,因此,它可以对LPS挑战的小鼠提供更有效的保护。此外,它们在患者血清中的浓度远远不同于HMGB-1,但与其他细胞因子相当,它们更可能作为信号分子而不是效应物。

[0250] 一方面,由于含有疏水性L-zip结构域,IFP35倾向于聚集;另一方面,由于两个NID结构域的柔性,IFP35易降解。因此,IFP35蛋白在许多表达系统中不能很好地折叠。免疫细胞释放的IFP35有限且发生糖基化修饰。折叠成活性八聚体构象的NID-H片段可在大肠杆菌中高量表达。由于活性构象稳定并且结合表面在八聚体结构中裸露,因此NID-H八聚体将非常利于单克隆抗体的筛选。NID-H的一个单克隆抗体可以中和IFP35,并保护脓毒症小鼠。此外,可溶性 ΔN 也可用于制备单克隆抗体。尽管仍需要进一步的证据,但可以预期它们在抵抗感染和损伤方面的应用前景。

[0251] 这些数据发现了一种早期的DAMP,IFP35家族成员。当免疫细胞被病原体或干扰素刺激时,它们会被释放,并通过TLR4信号通路进一步增强免疫应答。NID-H的结构阐明了这些新DAMP的功能机制。本文的结果提供了一种用于诊断和治疗感染及损伤相关疾病的方法。

方法

[0252] 质粒构建。从THP1和RAW264.7细胞的逆转录cDNA扩增人IFP35和鼠NMI(登录号:NP_005524.2和NP_001135421.1)的cDNA。使用引物设计,PCR扩增,消化和回收的标准方法,将分别对应于人IFP35蛋白(NID-H和 ΔN)序列124-240和35-289的DNA序列插入带N末端GST标签的pGEX-6p-1载体(Invitrogen)的BamHI和XhoI位点间。并且使用BamHI和Xho I位点将小鼠NMI蛋白的DNA序列插入到pRSFDuet-1载体(Novagen)中。所有的质粒都通过DNA测序验证。

[0253] IFP35(NID-H和 ΔN)纯化。将质粒转化到大肠杆菌BL21(DE3)表达菌株(用于天然蛋白质表达)和大肠杆菌B834(DE3)表达菌株(用于硒代甲硫氨酸衍生物(Se-Met)表达)中。细菌在加入0.1g/L氨苄青霉素的LB培养基或含硒代甲硫氨酸的培养基中(分子尺寸有限)37℃培养,直到OD₆₀₀达到0.8-1.0,然后用0.5mM异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)中在37℃下诱导5小时。

[0254] 收获含有过表达的天然IFP35或Se-Met IFP35(残基124-220)的细胞,用冷的1xPBS缓冲液(137mM NaCl,2.7mM KCl,10mM Na₂HPO₄,1.8mM KH₂PO₄,pH 7.4)重悬并使细胞悬浮液分别在5,000psi和15,000psi下通过EmulsiFlex-C5匀浆器(Avestin)两次而裂解。将细胞裂解物在30,700g/4℃/40分钟离心,并将上清液与谷胱甘肽琼脂糖4B树脂(GEHealthcare)以100ml上清每1ml柱胶的比率在4℃下孵育30-60分钟。孵育后,用1xPBS缓冲液洗涤GST树脂,并用150mM NaCl,20mM Tris-HCl,pH8.0的缓冲液平衡。用20mM GSH洗脱重组蛋白,并且通过PreScission蛋白酶(PPase)在4℃下将GST标签切掉。切掉后,通过HiTrap Q HP(GE Healthcare)柱进一步纯化重组蛋白,并用150到1,000mM NaCl的线性梯度洗脱。最后使用150mM NaCl,20mM Tris-HCl,pH 8.0平衡的HiLoad 16/60Superdex 200(GEHealthcare)柱(制备级)进行纯化。通过SDS-PAGE分析S200洗脱峰每个级分的蛋白质含量。分别将靶蛋白的两个峰浓缩,在液氮中快速冷冻,并储存在-80℃冰箱备用。

[0255] NMI、GFP-NID-H和GFP-NMI纯化。将质粒转化到大肠杆菌菌株BL21 (DE3) 中。在含100mg/L氨苄青霉素的LB培养基中于37℃培养。当OD₆₀₀达到0.8-1.0时,加入终浓度为0.5mM的异丙基硫代-D-半乳糖苷酶(IPTG) (Sigma),16℃诱导20小时。5000rpm离心10分钟收获细胞。用Tris缓冲液(20mM Tris pH8.0,150mM NaCl)重悬细菌,并用超声裂解。16,000rpm高速离心30分钟,分离细菌裂解物和上清,并将收集的上清液与Ni-NTA亲和柱(Qiagen)孵育,随后用缓冲液(20mM Tris,pH8.0,150mM NaCl,50mM咪唑)洗涤,使用洗脱缓冲液(pH8.0的20mM Tris,150mM NaCl,500mM咪唑)从Ni-NTA亲和柱洗脱重组蛋白,并使用上述Tris缓冲液平衡的Superdex200柱(GE Healthcare)在FPLC蛋白纯化系统上凝胶过滤进一步纯化。

[0256] 所有重组蛋白质的纯度和完整性通过SDS-PAGE考马斯蓝染色来验证,纯度高于90%。通过鲎试验测定,几乎检测不到所有蛋白质中的LPS或LPS含量低于10pg/mg蛋白质。

[0257] 结晶和数据收集。天然IFP35和Se-Met IFP35片段在Superdex 200柱上有两种聚集状态:八聚体和二聚体。两种形式的蛋白均用于结晶筛选。最终,天然IFP35(残基124-220)通过悬滴法以其八聚体形式结晶,悬滴含1μL 6mg/mL的蛋白质和1μL孔溶液(0.2M (NH₄)₂SO₄,0.1M二-Tris-HCl,20% [w/v]PEG3350,pH 5.4),在16℃下培养14天。Se-Met IFP35(残基124-220)晶体通过悬滴法从由1μL10mg/mL蛋白质和1μL孔溶液(0.2M (NH₄)₂SO₄,0.1MBis-Tris-HCl,22% [w/v]PEG3350,0.1M/V酒石酸钠,pH 5.5)组成的溶液中以其二聚体形式生长,在16℃下培养50天。

[0258] 数据收集前,将晶体在液氮中速冻并保存。对于Se-Met晶体,需要加入另外20% [v/v]甘油作为冷冻保护剂。天然和Se-Met蛋白的X射线衍射数据在上海同步辐射装置(SSRF)光源BL17U收集,波长分别为0.9798和0.9792。使用HKL-2000对收集的数据进行积分和缩放(0twinowski,Methods in Enzymology 276,307-326 (1997)),使用来自CCP4组的SHELXD确定Se-Met蛋白中的硒标记位置(Schneider等,Acta Crystallographica,Section D,Biological Crystallography 58,1772-1779 (2002);和Winn等,Acta Crystallographica,Section D,Biological Crystallography 67,235-242 (2011)),并发现了六个硒位点。

[0259] 结构解析和优化。使用Phenix软件包中的SAD解析了IFP35(残基124-220)二聚体的结构。(Adams等,Acta Crystallographica,Section D,Biological Crystallography 66,213-221 (2010)。)使用AutoSol获得了初始相位,模型中缺失的区域使用AutoBuild或Coot重建(Emsley等,Acta Crystallographica,Section D,Biological Crystallography 66,486-501 (2010)。)在迭代循环中,使用phenix.refine进一步优化模型,直到R值收敛。在一个不对称单位中有六个分子,其中马修斯系数值计算为2.39 Å³Da⁻¹,溶剂含量为48.6% (Matthews,J Mol Biol 33,491-497 (1968)。)。

[0260] 通过使用Phaser-MR以二聚体结构作为搜索模型进行分子置换来解析NID-H八聚体形式的结构(Adams等,Acta Crystallographica,Section D,Biological Crystallography 66,213-221 (2010))。用Coot重建模型(Emsley等,Acta Crystallographica,Section D,Biological Crystallography 66,486-501 (2010)),并用phenix.refine进行优化(Adams等,Acta Crystallographica,Section D,Biological Crystallography 66,213-221 (2010))。在最后一步,引入了TLS优化,TLS组由TLSMD服务器支持(Painter等,Acta Crystallographica,Section D,Biological Crystallography

62,439-450 (2006))。该结构在一个不对称单元中有八个分子。计算的马修斯系数和溶剂含量分别为2.61 Å³Da⁻¹和52.8% (Matthews, J Mol Biol 33,491-497 (1968))。通过PISA分析分子间相互作用 (Krissinel等, J Mol Biol 372,774-797 (2007))。所有与晶体结构相关的图用PyMOL制作 (www.pymol.org)。

[0261] 抗体和试剂。抗-IFP35抗体获得自Abnova (D01P)。抗-HMGB1抗体获得自Abcam (ab79823)。抗β-肌动蛋白抗体获得自Sigma-Aldrich (A5441)。抗CD11b (M1/70) 和Gr-1 (RB6-8C5) 的抗体获得自BD Biosciences。抗IκBa抗体和pIκBa抗体获得自Abcam。IFNγ、三氯乙酸 (TCA)、来自大肠杆菌055:5的脂多糖 (LPS) 和D-半乳糖胺 (D-gal) 购自Sigma-Aldrich。MCSF购自Peprotech。

[0262] 细胞和细胞培养。RAW 264.7巨噬细胞 (来自ATCC) 在补充10%胎牛血清的DMEM培养基中在37℃下培养。在补充10%胎牛血清和20ng/ml MCSF的DMEM培养基中在37℃下培养从B6/C57小鼠衍生的wt, Tlr3^{-/-}, Tlr4^{-/-}, Tlr7^{-/-}, Tlr9^{-/-}, Myd88^{-/-}小鼠中分离的BMDM。THP1细胞在补充10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中在37℃下培养。将RAW 264.7巨噬细胞、BMDM和THP1细胞以2×10⁶个细胞/孔的密度接种在6孔板中, 生长过夜。然后, 如图例所示, 用LPS (100ng/mL) 和不同浓度的沙门氏菌、IFN-γ及纯化的重组蛋白IFP35-NID或NMI以不同长短的时间刺激细胞。

[0263] RNA提取和q-PCR。根据制造商的说明书, 使用Trizol试剂 (Invitrogen) 从RAW264.7, THP1和BMDM细胞提取总RNA。使用随机引物和MMLV逆转录酶 (Invitrogen) 从1μg总RNA合成cDNA的第一链。使用SYBR Green PCR试剂盒 (Bio-Rad) 进行实时RT-PCR, 使用CFX96实时PCR系统 (Bio-Rad) 进行实时定量聚合酶链反应。每种测量一式两份, 并进行了三个独立实验。引物序列以下:

[0264] 小鼠 (m) GAPDH: 正向: CAGAACATCATCCCTGCATC; 反向: TACTTGGCAGGTTTCTCCAG;

[0265] mTNFα: 正向: CCAGTGTGGAAGCTGTCTT; 反向: AAGCAAAAGAGGAGGCAACA;

[0266] mIL-1β: 正向: AAGGAGAACCAAGCAACGACAAAA; 反向: TGGGGAAGTCTGCAGACTCAAAC。

[0267] 蛋白质印迹。用100ng/mL LPS或沙门氏菌SR-11对RAW 264.7巨噬细胞和THP1细胞预处理1小时、2小时、3小时、5小时和9小时。然后将细胞用冷的PBS洗涤两次, 刮下细胞并收集在裂解缓冲液 (20mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% NP-40, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂混合物 (Roche)) 中。将全细胞裂解物在4℃下孵育45分钟, 然后离心 (12000g×15分钟, 4℃)。通过三氯乙酸 (TCA) /丙酮沉淀法收集细胞培养物上清液中的分泌蛋白。向细胞培养上清液中加入0.11体积的冰冷的100% TCA, 置于冰上2小时, 然后以20,000g离心30分钟。然后小心地去除上清液, 加入500μL丙酮, 以20,000g离心10分钟, 小心地除去上清液, 并在真空蒸发器中干燥蛋白质沉淀。蛋白质样品通过SDS-PAGE分离, 转移到PVDF膜, 并用针对IFP35, HMGB1和NMI的特异性抗体探测。

[0268] 用纯化的重组蛋白IFP35-NID或NMI分别处理BMDM细胞5分钟、15分钟、30分钟和60分钟。然后将细胞用冷PBS洗涤两次, 刮下, 收集在裂解缓冲液中。将全细胞裂解物在4℃下孵育45分钟, 然后离心。制备的蛋白质样品用于免疫印迹, 分别检测IκBa、pIκBa、β-肌动蛋白。

[0269] LPS诱导的休克模型。来自大肠杆菌055:B5的LPS和D-gal在无致热原的盐水中稀释。将LPS (50μg/kg体重) 和D-gal (1.0g/kg体重) 的混合物注射到IFP35^{-/-}、NMI^{-/-}和野生型

小鼠的腹腔内。当在没有D-gal的情况下,向小鼠注射大量的LPS (50mg/kg体重) 后可观察到IFP35^{-/-}和NMI^{-/-}小鼠对LPS诱导的致命毒性的抗性。在1周内持续观察并记录小鼠的死亡率。

[0270] IFP35单克隆抗体保护LPS刺激的小鼠。在存活实验中,在注射LPS (50mg/kg体重) 4小时之前,将IFP35mAb和IgG1 (每只小鼠10ug) 注射到B6/C57小鼠腹腔中。在LPS注射之前2小时,施用另外的剂量 (每只小鼠10ug)。在1周内观察并记录小鼠的死亡率。

[0271] 细胞因子浓度的测定。通过ELISA试剂盒 (CUSABIO) 测量人和小鼠血清中IFP35和NMI的浓度。通过ELISA试剂盒 (Biolegend, Thermo Fisher) 检测细胞培养上清液或小鼠血清中的细胞因子 (IL-1 β 、IL-6和TNF α) 的浓度。

[0272] IFP35^{-/-}小鼠的产生。用之前描述的CRISPR/Cas9系统实现IFP35基因的敲除。

[0273] 流式细胞术。将重组蛋白IFP35NID-H、NMI或PBS分别注射到B6/C57小鼠腹腔中24小时。将小鼠腹水与抗CD11b和Gr-1的抗体孵育,然后与缀合FITC的二抗温育。在FACSCalibur机器 (BD Biosciences) 上分析细胞以检测腹腔中的中性粒细胞,并使用CellQuestPro软件分析数据。

[0274] 将由B6/C57小鼠衍生的wt或Tlr4^{-/-}细胞与GFP-NID-H和GFP-NMI在PBS缓冲液 (含有2%FBS) 中一起温育1小时。在FACS Calibur机器 (BD Biosciences) 上分析细胞,并使用CellQuestPro软件分析数据。

[0275] 本文中引用的出版物或文献并不意在承认任何前述内容是相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文献的内容或日期的任何承认。

例2:IFP35家族蛋白的用途

[0276] IFP35和NMI可以被干扰素 (IFN) 快速上调。在没有IFN诱导时,细胞中IFP35的蛋白水平较低。在许多免疫细胞中,IFP35和NMI被I型或II型干扰素 (IFN α /B/ γ) 诱导。IFP35的蛋白水平和mRNA水平在IFN γ 刺激6小时后明显提高,并在24小时达到最大水平,与未处理相比,提高了25倍。大多数细胞可以表达NMI,与IFP35相似,IFN处理后NMI的表达增加2-20倍。

[0277] 人IFP35基因位于17q21上,NCBI登录号为NP_005524.2。其cDNA序列编码含288个氨基酸、推导分子量为31.8KDa的蛋白质。存在第128位甲硫氨酸突变和/或修饰为缬氨酸 (M128V) 的天然突变体。人NMI位于2号染色体上,NCBI登录号为AAC12949.1,包括307个氨基酸。

[0278] IFP35和NMI是同源蛋白。根据结构预测,它们都包括两个串联N-Myc结合蛋白/IFP35结构域 (Nmi/IFP35结构域,NID)。根据序列分析,IFP35在其N-末端具有包含前80个氨基酸的L-zip结构域,随后是分别覆盖81-170和177-268位氨基酸的两个串联NID结构域。

[0279] 免疫荧光显微技术显示IFP35和NMI在不同细胞类型的细胞质中共定位。通过非变形凝胶电泳和凝胶过滤,并用蛋白酶体抑制IFP35的降解,发现NMI和IFP35蛋白可以通过NID结构域形成300-400kDa的高分子量复合物 (HMMC)。在IFN γ 刺激后,IFP35和NMI可以形成称为NMI/IFP35斑点 (NIS) 的斑点状聚集。在IFN γ 处理的凋亡细胞中,NIS解离,但是高分子量复合物不解离。

[0280] 据报道,IFP35可以作为抗病毒蛋白并抑制牛泡沫病毒的复制。IFP35的第二个NID结构域可以结合牛泡沫病毒的早期调节蛋白BTas (牛反式激活蛋白) 的长末端重复序列,从

而抑制病毒的转录活性进而抑制病毒感染细胞。此外,高通量筛选表明IFP35蛋白可以在Ras MAPK/PI3K通路中与CLEC4G (C型凝集素域家族成员4G) 相互作用。

[0281] NMI可以参与IFN诱导的JAK-STAT通路。NMI与Stat2以外的所有STAT蛋白相互作用,加强相互激活因子CBP/p300的结合,从而增强STAT介导的下游基因的转录。

[0282] 与正常乳腺细胞相比,恶性乳腺癌细胞系中NMI的mRNA水平降低了25-45倍,NMI的蛋白质水平也明显低于正常乳腺细胞。连续的端粒酶活性被认为是癌症的先决条件之一,NMI可以结合乳腺癌易感性蛋白BRCA1 (乳腺癌1型易感性蛋白) 及c-Myc形成三元复合物,下调人类端粒酶逆转录酶基因的启动子活性(人端粒酶逆转录酶基因,hTERT)。当将Flag-Nmi和HA-BRCA1共转染到细胞中时,hTERT启动子活性降低约75%。此外,当检测Wnt/ β -连环蛋白通路中的蛋白Dkk1 (Dickkopf-1) 时,数据表明过表达的NMI通过上调Dkk1抑制Wnt/ β -连环蛋白信号传导并延缓肿瘤生长。

[0283] NMI可上调TGF/ β 信号通路中的负反馈调节因子SMAD7以抑制TGF/ β 信号通路并降低乳腺癌细胞的侵袭和迁移。IFP35和NMI与炎症信号相关。

[0284] 图10为IFP35蛋白纯化的过程。(A) IFP35-NID蛋白的SDS-PAGE分析。左泳道:分子标记。泳道1:亲和层析纯化后的带GST标签的IFP35-NID。泳道2:PPase酶切后的蛋白质混合物。泳道3:从GST树脂柱洗脱下来的IFP35-NID。泳道4:体积排阻色谱之后纯化的IFP35-NID。(B) IFP35-NID的体积排阻色谱图(superdex-200 (16/60))。峰的洗脱体积表明蛋白质的聚集状态接近二聚体。

[0285] 图11显示IFP35的不同聚集状态。(A) 阴离子交换柱分析。(B) 体积排阻色谱分析。两个峰的洗脱体积表明不同的聚合状态。(C) 整个纯化过程的SDS-PAGE分析。泳道1:GST标记的IFP35。泳道2:从GST柱洗脱下来的IFP35。泳道3:用Ppase消化后的IFP35。泳道4:结合阴离子交换柱的样品。泳道5:不结合阴离子交换柱的样品。泳道6:从体积排阻色谱superdex-200洗脱下来的蛋白质(峰的洗脱体积为72-74ml)。泳道7:从体积排阻色谱superdex-200洗脱下来的蛋白质(峰的洗脱体积为90-92ml)。

[0286] 图12显示IFP35-NID晶体。(A) 天然八聚体晶体。蛋白质在含有0.2M硫酸铵,0.1M Bis-tris pH5.5,25% [w/v] PEG3350的溶液中结晶,其中悬滴液为1 μ l蛋白质和1 μ l贮液。晶体在289k的温度下生长14天。(B) 天然八聚体晶体。晶体通过悬滴法生长,悬滴中含有1 μ L蛋白质IFP35-NID (残基124-220) 和1 μ L加有添加剂30% [w/v] d-葡萄糖的贮液(0.2M (NH₄)₂SO₄,0.1M Bis-Tris-HCl pH 5.4,20% [w/v] PEG3350),在16℃下培养1-14天。(C) 通过悬滴法生长晶体,二聚体形式的Se-Met IFP35-NID (残基124-220) 晶体在1 μ L蛋白质和1 μ L贮液(0.2M (NH₄)₂SO₄,0.1M Bis-Tris-HCl pH 5.4,22% [w/v] PEG3350) 组成的溶液中生长,并在16℃下培养7天。比例尺=100 μ m。(D) Se-Me IFP35 (残基124-220) 的晶体以悬滴法在1 μ L蛋白质和1 μ L贮液(0.2M (NH₄)₂SO₄,0.1M Bis-Tris-HCl pH 5.5,22% [w/v] PEG3350) 中生长,并在16℃下培养30天。比例尺=200 μ m。晶体用箭头标识。

[0287] 图13显示二聚体IFP35-NID的结构。(A) 和(B) 是不同角度下的二聚体整体结构。(C) 和(D) 表示不同视角下参与分子内相互作用的氨基酸残基(显示为棒)。H1表示参与二聚体形成的关键 α -螺旋。红色或蓝色分别代表一个分子。

[0288] 图14显示八聚体IFP35-NID的结构。单体以不同的颜色显示。四个结构域交换的二聚体通过与形成二聚体的相互作用类似的方式形成八聚体。分子A的氨基末端和羧基末端

分别用A-N和A-C表示。

[0289] 图15显示有结构域交换构象的二聚体的结构。八聚体中结构域交换的模型。选自从八聚体中的A-二聚体和B-二聚体。红色和蓝色分别表示一个蛋白分子。两个分子可以彼此结合。通过一个二聚体侧面的H1 α -螺旋和其相邻二聚体的H1 α -螺旋之间的相互作用,二聚体最终形成环状八聚体的结构。

[0290] 图16显示一些区域的氨基酸残基。(A) 弧相交表面区域上的残基(侧链原子以短棒标记表示,主链上的原子未标记)。(B) 八聚体环结构的内表面上的残基(侧链原子以短棒标记表示,主链上的原子未标记)。(C) 二聚体内单体头部上的残基(来自两个分子,侧链原子以短棒标记表示,主链上的原子未被标记)。整个结构以带表示,不同的颜色表示不同的分子。

[0291] 图17显示重组NMI的纯化。(A) 小鼠NMI-NID片段的SDS-PAGE。(B) NMI-NID的体积排阻色谱。(C) 具有6*His标签的全长小鼠NMI的SDS-PAGE。(D) 在N末端具有6*His标签的全长小鼠NMI的体积排阻色谱图。

[0292] 图18揭示了当用沙门氏菌刺激时,IFP35和HMGB1(作为对照)的表达水平。

[0293] 图19显示了当用沙门氏菌刺激时,随着时间的推移,通过免疫荧光测量的IFP35的含量。

[0294] 图20为显示细胞被病毒感染时,在不同时期分泌到培养基中的IFP35的含量。(A) 当细胞被以不同MOI的A59和MHV68感染时,通过蛋白质印迹测量不同时间段分泌的IFP35。(B) 当细胞被以不同MOI的A59和MHV68感染时,通过蛋白质印迹测量不同时间段分泌的HMGB1的丰度。

[0295] 图21显示小鼠腹膜炎的模型。(A) 在小鼠沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)标准株SR-11诱导的腹膜炎模型中,当将活SR-11注射到模型时,IFP35释放到培养基中。(B) 在LPS和ATP刺激炎症小体的情况下,IFP35释放到培养基中。

[0296] 图22显示不同聚集状态的IFP35在刺激炎症过程中各自的贡献。如图所示为测量的一些炎性因子的表达水平。

[0297] 图23显示流式细胞术分析的结果,结果表明八聚体IFP35-NID可招募大量嗜中性粒细胞。

[0298] 图24显示外源八聚体IFP35-NID能够刺激巨噬细胞中的NF- κ B通路。

[0299] 图25显示IFP35可通过myd88信号通路激起炎症。

[0300] 图26显示由IFP35诱导的WT、Tlr9^{-/-}和Tlr4^{-/-}小鼠中IL-1 β 和TNF的水平。

[0301] 图27A显示脓毒症小鼠血清中IFP35的量。图27B显示注射IFP35单克隆抗体时,脓毒症小鼠的存活率增加。

[0302] 图28显示阻断IFP35减少了LPS诱导的小鼠中IL-6的释放。

[0303] 图29显示沙门氏菌刺激Thp1细胞后,其细胞裂解物和上清液中NMI的丰度。

[0304] 图30显示小鼠来源的NMI蛋白可上调Thp1细胞中TNF α 和IL-1 β 的转录。

[0305] 图31显示SDS-PAGE检测通过体积排阻色谱时NMI的聚集状态。每个蛋白质泳道上标记的数字表示洗脱体积。由于NMI洗脱曲线是持续的,结果表明NMI可能以不同聚集状态的低聚物存在于小鼠的血清中。

[0306] 图32显示IFP35的二级结构预测(由PSIPred(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>

psipred/) 进行)。

[0307] 除非另有说明,在以下方案中使用的实验方法都是常规方法。除非另有说明,以下方案中使用的所有材料和试剂可以商业获得。在以下方案中,IFP35-NID1和IFP35-NID2的结果没有明显差异。

[0308] IFP35和NMI的表达、纯化和结晶

[0309] 1. 质粒构建

[0310] 从THP1和RAW264.7细胞逆转录产生的cDNA扩增得到人IFP35和小鼠NMI的cDNA(登录号:NP_005524.2和NP_001135421.1)。通过DNA测序,验证IFP35的序列是M128V的野生变体。

[0311] SEQ ID NO:1是人IFP35的cDNA序列。SEQ ID NO:2是人IFP35的氨基酸序列。一方面,一个IFP35的NID由SEQ ID NO:1的372至660(从5'端)位核酸编码,其编码SEQ ID NO:2中124至220(从N末端)位氨基酸残基。另一个方面,另一个IFP35的NID由SEQ ID NO:1(从5'端)的408至648位核酸编码,其编码SEQ ID NO:2的136至216(从N末端)位氨基酸残基。

[0312] SEQ ID NO:3是小鼠IFP35的cDNA序列。SEQ ID NO:4是小鼠IFP35的氨基酸序列。

[0313] SEQ ID NO:5是小鼠NMI的cDNA序列。SEQ ID NO:6是小鼠NMI的氨基酸序列。NMI-NID由SEQ ID NO:5的453至750(从5'端)位核酸编码,其编码SEQ ID NO:6的151-250(从N末端)位氨基酸残基。

[0314] SEQ ID NO:7是人NMI的cDNA序列。SEQ ID NO:8是人NMI的氨基酸序列。NMI-NID由SEQ ID NO:7的465至720(从5'端)位核酸编码,其编码SEQ ID NO:8的155至240(从N末端)位氨基酸残基。

[0315] 本方案中使用的PCR引物由生工生物工程股份有限公司(上海)北京合成部合成。所使用的超级高保真DNA聚合酶购自康润生物科技有限公司。限制性核酸内切酶购自宝生物工程股份有限公司(大连)。琼脂糖购自Biowest(US)。快速凝胶提取试剂盒购自北京德兴生物科技有限公司。大肠杆菌表达载体pGEX-6p-1来自通用电气医疗集团公司。DH5 α , BL21(DE3)化学感受态细胞和B834缺陷感受态细胞购自英杰(Invitrogen)公司。DNA测序由北京六和基因科技有限公司进行。

[0316] 2. 蛋白表达和纯化

[0317] 用于培养大肠杆菌的胰蛋白胨和酵母提取物购自赛默飞世尔科技有限公司。用于细胞破碎的高压均质细胞裂解器EmulsiFlex-C5购自奥维斯丁(加拿大)。从大肠杆菌菌株中纯化制备蛋白酶(Ppase)。GST亲和柱(Glutathione Sepharose 4B),阴离子交换柱(HiTrap_Q_HP_5ml),体积排阻色谱(HiLoad_16/60_Superdex200_prep grad和Superdex 20010/300GL, 24ml),蛋白质纯化系统(ÄKTApurifier)均从通用电气医疗公司生命科学部购买。用于浓度检测的NanoDrop 2000分光光度计购自赛默飞世尔科技有限公司(美国)。

[0318] 所使用的其他生物化学试剂购自西格玛奥德里奇公司或北京化学试剂公司。

[0319] 3. 结晶和数据收集

[0320] 结晶筛选试剂盒和Se-Met购自汉普顿研究公司(Hampton Research Incorporation)。包括Tris碱,Bis-Tris和聚合物PEG3350在内的缓冲液购自西格玛奥德里奇公司。Home Source X射线衍射仪购自日本理学株式会社(Rigaku Incorporation(Japan))。

[0321] IFP35表达、纯化与结晶

[0322] 为了纯化方便,有许多蛋白标签可供选择,例如6×HIS、GST或MBP。以GST-标记的蛋白为例,将对应于人IPF35蛋白氨基酸序列1-288、128-216和136-216的DNA序列插入pGEX-6p-1载体(Invitrogen)的BamHI和XhoI位点间,表达的蛋白N末端带GST标签。所有质粒都通过DNA测序验证。以这种方式获得的重组蛋白可以通过PreScission蛋白酶(PPase)切割。以相似的方式构建全长IFP35和其它片段的重组质粒。

[0323] pGEX-6p-1载体在多克隆位点前具有GST标签和PPase切割位点。

[0324] (1). 质粒构建

[0325] 以IFP35的cDNA序列为模板,使用PCR扩增引物扩增得到全长IFP35蛋白的编码基因、IFP35NID1的编码基因及IFP35NID2的编码基因,分别用BamHI和EcoRI限制性内切酶酶切,然后连接到由相同的限制性内切酶切割的载体pGEX-6p-1上。连接反应后,使用热激法将连接的质粒DNA转化到感受态细胞例如大肠杆菌DH5α(Invitrogen)中。将细菌涂布在有对应抗生素抗性(100μg/ml氨苄青霉素)的板上,并将板在37℃孵育过夜。第二天,将几个菌落挑取到2ml LB培养基中,并在37℃下培养10小时以进行质粒提取,通过DNA测序验证重组质粒的存在。一旦已经确定插入物处于正确的方向并且连接正确,质粒即可用于蛋白质表达。

[0326] 通过DNA测序,质粒1是使用BamH I和Xho I位点插入pGEX-6p-1的含有SEQ ID NO:1的GST-IFP35重组质粒。质粒2是含有来自SEQ ID NO:1的5'端的DNA序列372-660的GST-IFP35-NID1重组质粒,其使用BamH I和Xho I位点插入pGEX-6p-1中,并加入终止密码子。质粒3是含有来自SEQ ID NO:1的5'端的DNA序列408-648的GST-IFP35-NID2重组质粒,其使用BamH I和Xho I位点插入pGEX-6p-1,并添加终止密码子。

[0327] 用于扩增全长IFP35的引物:

上游引物:5'GGTAGATCTATGTCAGCCCCACTGGATG3'

下游引物:5'GGT GAATTCCTAGCCTGACTCAGAGGTGAAGACT3'

用于扩增IFP35-NID1 (SEQ ID NO:2的氨基酸124-220)的引物:

上游引物:5'GGTGGATCCCCAGGTGATGATGTCCAGCCA3'

下游引物:5'GGTGAATTCTTACTCCCCGTTACATACGGAGAGAC3'

用于扩增IFP35-NID2 (SEQ ID NO:2的氨基酸136-216)的引物:

上游引物:5'GGTGAATTCAGGGTGTGGTCACTGGATTTCT3'

下游引物:5'GGTGAATTCTTACTCCCCGTTACATACGGAGAGAC3'

[0328] (2). 蛋白表达

[0329] 将重组质粒转化到大肠杆菌BL21 (DE3)感受态细胞中,并在含有100μg/ml氨苄青霉素的LB琼脂平板上生长。在37℃孵育过夜后,将单菌落转移到含有100μg/ml氨苄青霉素的100ml LB培养基中,并在37℃摇床(200转/分钟)生长过夜。将细菌以1/400的比例接种到含添加100μg/ml氨苄青霉素的1L LB培养基中,并在37℃连续振荡(200转/分钟)培养,直到OD600nm达到0.6。随后用1mM IPTG处理细胞以诱导重组蛋白的表达。在37℃连续振荡(200转/分钟-1)孵育5小时后,4℃,4000转/分钟离心30分钟,收集细胞。

[0330] 收获含有过表达的蛋白质的细胞,并在冷的1xPBS缓冲液(137mM NaCl,2.7mM KCl,10mM Na₂HPO₄,1.8mM KH₂PO₄,pH 7.4)中重悬,使细胞悬浮液分别在5,000psi和

15,000psi下通过EmulsiFlex-C5匀浆器(Avestin)。将细胞裂解物在4℃,30,700g,离心40分钟,并收集上清液。

[0331] (3).蛋白纯化

[0332] 1)亲和层析

[0333] 离心后,将上清液与谷胱甘肽琼脂糖4B树脂(GE Healthcare)以100ml上清液每1ml树脂的比例混合,在4℃下孵育30-60分钟。孵育后,将GST树脂加入到重力柱中以从溶液混合物中分离树脂,然后用1×PBS缓冲液洗涤约10个树脂体积,以结合树脂上的GST标记的蛋白质。

[0334] 接下来,用150mM NaCl,20mM Tris-HCl,pH 8.0的缓冲液平衡GST树脂。用含有15mM GSH,150mM NaCl,20mM Tris-HCl,pH8.0的2倍柱体积的缓冲液以1mL/min的速度洗脱30分钟,然后使用PreScission蛋白酶(PPase)酶切重组蛋白,4℃酶切过夜。切割和洗脱后,得到IFP35,IFP35NID1和IFP35NID2(所有洗脱体积为约50ml)。

[0335] 2)阴离子交换层析

[0336] 将由蛋白酶PPase酶切后的蛋白质注射到固定到FPLC纯化器(GE Healthcare)的阴离子交换柱(HiTrap_Q_HP_5ml,GE Healthcare公司)中,并用20mM Tris-HCl (PH8.0),50mM NaCl在注射前平衡该柱子。用洗脱缓冲液(20mM Tris HCl (PH8.0),1M NaCl)进行梯度洗脱,流速为1ml/min,洗脱体积为100ml,根据280nm和260nm紫外吸收收集相应蛋白质的样品。

[0337] 3)体积排阻色谱

[0338] 用含150mM NaCl,20mM Tris-HCl,5%gly,pH 8.0的缓冲液平衡HiLoad 16/60Superdex 200(GE Healthcare)柱(制备级),并将其作为阴离子交换层析后的下一纯化步骤。将该柱用同样的方式固定到FPLC纯化器(GE Healthcare)上,并以1ml/min的流速洗脱120分钟。人全长IFP35蛋白和IFP35-NID分别在约45ml和90-92ml的洗脱体积下收集。最后,获得纯化的IFP35(洗脱体积为45ml),IFP35NID1(洗脱体积为90-92ml)和IFP35NID2(洗脱体积为90-92ml)。

[0339] 图1表示的是IFP35-NID1和IFP35-NID2的体积排阻色谱。IFP35-NID1和IFP35-NID2样品的洗脱体积为90-92ml,对应于分子量17-43KD。离心分析和晶体结构的结果表明IFP35-NID1和IFP35-NID2是二聚体。

[0340] 在纯化IFP35-NID1和IFP35-NID2时,可以获得洗脱体积为72ml和90-92ml的两种不同聚集状态的蛋白质(图11)。当蛋白质在PPase酶切之前从树脂柱洗脱下来时,可以得到两个洗脱峰,一个洗脱体积为72ml,另一个体积为90-92ml。体积72ml的峰对应于70kd-100kd的分子量,而体积90-92ml的峰对应于二聚体。IFP35-NID1和IFP35-NID2的洗脱峰暗示存在二聚体和八聚体两种聚集状态。

[0341] IFP35-NID1和IFP35-NID2的SDS-PAGE分析没有明显差异。

[0342] 4) Se-Met IFP35-NID的纯化

[0343] Se-Met IFP35-NID的纯化类似于天然IFP35-NID。不同之处在于Se-Met IFP35-NID应用的是大肠杆菌B834(DE3)表达菌株(用于硒代甲硫氨酸衍生物(Se-Met)表达)和具有添加剂Se-Met的M9培养基。M9培养基培养的B934所表达的蛋白中的甲硫氨酸被替换为Se-Met。在该方法中获得的晶体可用于确定晶体相位并进一步用于结构测定。

[0344] (4). 蛋白结晶

[0345] 1) 结晶

[0346] 天然和Se-Met IFP35-nid1和IFP35-nid2片段在Superdex 200柱上表现出两种聚集状态:八聚体和二聚体。两种形式的蛋白均使用来自市售试剂盒 (Hampton Research) 的多种条件进行结晶筛选。纯化的蛋白质在4℃下14000rpm离心10min以除去沉淀和气泡。通过坐式蒸汽扩散法进行结晶试验,将1μl蛋白质样品与等体积的贮液在硅化载玻片上混合,并在含至少200μl贮液的晶体板中平衡。晶体在16℃生长。IFP35-NID1的晶体如图12所示。

[0347] 2) 结构解析与优化

[0348] 在IFP35-NID1或IFP35-NID2 (图13) 二聚体的晶体结构中,每个不对称单元内有六个分子,并且这六个IFP35-NID1或IFP35-NID2分子的结构是相同的。电子密度图可以清楚地显示IFP35中从136至216位的氨基酸残基,但是晶体结构不能完全且清楚地显示氨基末端的残基(124-135)和羧基末端的残基(216-220)。这种现象说明IFP35-NID结构域结构的核心主要由氨基酸136-216组成,羧基末端和氨基末端单个氨基酸残基的增加或减少对整个结构不重要。因此,这些氨基酸残基在晶体结构分析和结晶实验中是不必要的。在IFP35-NID结构中,五个反平行的β片(根据序列次序分别命名为B1-B5)构成桶状结构,其围绕α螺旋(H1)形成完整的桶结构(图13A和图13B)。

[0349] IFP35-NID2在以氢键、疏水相互作用和范德华力等定位的α螺旋(H1)界面上形成二聚体(图13C和图13D)。通过PISA(蛋白质界面,表面和组装)计算的相互作用表面的尺寸约为586.5平方埃。主要参与二聚体形成的残基包括α螺旋(H1)上的Glu150、Glu151、Asp155、Lys158、Ile159、Arg165和Asp172。

[0350] 八个NID-1或NID-2分子彼此相互作用并形成环状结构。八聚体中的单体与二聚体中的单体非常相似,单体由五个β-链和两个α-螺旋折叠成桶状结构。与二聚体结构相同,在八聚体结构中α1螺旋上的几对氨基酸残基对分子之间的相互作用和介导二聚体形成至关重要。至于两者间的差异,二聚体中的反平行β2和β3(177Lue-216Tyr)在八聚体中被拉直并插入到邻近分子中成为邻近NID结构域的一部分。以这种方式,两个单体堆积成二聚体并在两个单体之间形成结构域交换构象,这使得八聚体不同于二聚体。

[0351] 为了清楚起见,结构域交换的二聚体称为开放构象的二聚体(o-二聚体)。相对比,上面提到的没有结构域交换的二聚体称为闭合构象的二聚体(c-二聚体)。o-二聚体以与c-二聚体相同的方式折叠,因此交叉NID结构域的结构类似于c-二聚体中的单体结构(图15)。当相邻的o-二聚体使用与c-二聚体中使用的相同的H1α螺旋相互作用时,四个o-二聚体形成四角星结构(图14)。八个单体从N-末端开始以顺时针方向依次标记为A至G,整个结构可分别分为四对o-二聚体,即A/B、C/D、E/F和G/H,其中A/B和E/F或C/D和G/H的结构细节是相似的,而环的结构差异区分了来自C/D或G/H与A/B或E/F。对于四个结构域交换的二聚体(o-二聚体)形成的四角星结构,其内孔的直径为35埃,外径为80埃。八聚体通过c-二聚体中没有的两个交换分子的交换形成一个新的弧相互作用面。c-二聚体中没有八聚体环结构。结构上的差异可能是不同聚集状态蛋白之间的功能差异的基础。

[0352] 基于八聚体的结构,可以观察到一些残基参与结构形成,而另一些残基主要暴露于整个结构的表面,并且认为这些裸露的残基与其它蛋白质相互作用。这些外部的残基主要分布在以下的三个区域:

[0353] 弧相交表面区域上结构域交换二聚体提供的一些残基如Ser145、Asp172、Val173、Leu177、Arg212、Gln199、Gln207、Gln208、Pro210、Ser214、Thr201和Tyr216,这些残基形成一个大的暴露面(图16A)。其中,残基Glu150、Glu175,Leu177、Gln207和Gln208处于更明显的位置(图16A)。

[0354] 八聚体IFP5-NID形成的环结构的内表面上的一些残基也可以与其他蛋白质相互作用。这些残基包括Ser145、Arg147、Glu150、Glu151、Val173、Gly206、Gln207和Gln208。Arg147、Gln207、Gln208、Glu150和Glu151,他们在一定程度上提供了从八聚体环结构的内表面上向外突出的延伸侧链(图16B)。

[0355] 基于二聚体或八聚体的结构,在单个单体或结构域交换单体的 β 折叠桶状结构的氨基末端和羧基末端附近存在一些相对较大的氨基酸残基;这些相对较大的氨基酸残基向外延伸,这些残基包括Arg187、Glu188、Gln192、Gln196、Arg212和Tyr216,它们相距较近。此外,一些氨基酸残基可参与结合其它蛋白质、抗体或小分子(图16C)。

[0356] 3) 数据收集与结构解析

[0357] 在Rigaku-007X-射线衍射仪上测试制备的晶体,并在上海同步辐射装置(SSRF)的BL17U上收集衍射数据。使用现有的通用的结构测定或分析软件处理数据,这些软件包括数据分析软件如HKL2000和Mosflm,图像处理软件coot和pymol,重原子相位解析软件shelx和结构优化软件Phenix和CCP4。这里主要使用的方法是单波长反常衍射和分子置换。

[0358] 在波长为0.979的上海同步辐射装置(SSRF)的束线BL17U上收集Se-Met蛋白质的X射线衍射数据。以每个图像 1° 的旋转角度收集了720张图像,并使用HKL-2000进行积分和缩放。计算后,分辨率为2.3,空间群为H3。使用SHELXD中的SAD测定Se-Met蛋白中的硒原子标记位置,并发现了六个硒位点。使用AutoSol获得初始相位。用AutoBuild重建模型并用coot和phenix.refine进一步优化。

[0359] 在上海同步辐射装置以同样的方法获得天然八聚体晶体约 $2.5\text{\AA}$ 的X射线衍射数据。以二聚体结构作为搜索模型通过使用Phenix中的Phaser-MR做分子置换解析了八聚体形式的结构,并进一步用coot和phenix.refine进行优化。

[0360] 上述所有结果表明,预测的全长IFP35或NID片段不能表达或表达出来为高聚物,使得难以获得具有均一状态的蛋白质。然而,第一个NID结构域的第二半和第二个NID结构域的前半部分(残基124-220或134-216,分别命名为IFP35-NID1和IFP35-NID2,因类似的纯化结果统称为IFP35-NID)可以很好地表达和纯化。使用上述方法,特别是当IFP35-NID与GST融合时,可以获得大量的高纯度可溶性IFP35-NID,GST融合蛋白被称为GST-IFP35-NID。

[0361] 在纯化期间,获得了具有两种稳定聚集态的IFP35-NID蛋白和衍射较好的两种晶体。

[0362] NMI的表达和纯化

[0363] 以NMI的cDNA序列为模板,使用用于PCR扩增的引物可获得全长人NMI蛋白的编码基因(SEQ ID NO:7的5'端1-924),人NMI-NID(对应于氨基酸残基155-240)的编码基因(SEQ ID NO:7的5'端的465-720),小鼠全长NMI的编码基因(SEQ ID NO:5的5'端的1-945),小鼠NMI-NID(对应于氨基酸残基151-250)的编码基因(SEQ ID NO:5的5'端的453-750),用BamH1和XhoI限制性内切酶酶切,然后连接到由相同的限制酶切割的载体pGEX-6p-1中。以此方式,获得在3'末端添加终止密码子可表达GST-人-NMI,GST-人-NMI-NID,GST-小鼠-NMI

和GST-小鼠-NMI-NID的重组质粒。

[0364] 用于扩增全长人NMI的引物:

上游引物:5'GGT GGATCC ATGGAAGCTGATAAAGATGAC 3'

下游引物:5'GGT CTCGAG CTATTCTTCAAAGTATGCTATGTG3'

[0365] 用于扩增人NMI (155-240) 的引物:

上游引物:5'GGT GGATCC TCTAAAATGAAAATCAATGTTAC 3'

下游引物:5'GGT CTCGAG TTATTCTGTGTATGGAGAAACAG 3'

[0366] 用于扩增全长小鼠NMI的引物:

上游引物:5'CGCGGATCCATGGATGCTGATAAAGACAAC 3'

下游引物:5'CCGCTCGAGTCATATGGTTTCTCTGGCCTC3'

[0367] 用于扩增小鼠NMI (151-250) 的引物:

上游引物:5'CGCGGATCCGTTTCATGTGGACATTTCTAAAATG 3'

下游引物:5'CCGCTCGAGTCAAAACACCTGGTACTTTTCTAAG3'

[0368] 使用大肠杆菌原核表达系统表达小鼠和人的全长NMI或NMI片段蛋白。所用的试剂和表达方法基本上与IFP35蛋白表达相同。

[0369] NMI表达的方案与IFP35基本上相同。NMI纯化的方案基本上与IFP35相同。纯化分为4个步骤:GST重力柱亲和层析,用PPase切割GST,阴离子交换层析和凝胶过滤层析。

[0370] 1) GST亲和层析

[0371] 离心后,将上清液与谷胱甘肽琼脂糖4B树脂 (GE Healthcare) 以100ml上清液1ml树脂的比例混合,并在4℃下孵育1-2小时。孵育后,将GST树脂加入重力柱中,以从溶液混合物中分离树脂。然后用1×PBS缓冲液洗涤含树脂的柱子,直到树脂上没有杂蛋白。

[0372] 用含有10mM GSH的洗脱缓冲液洗脱带GST标签的NMI,然后在4℃下用PPase酶切8小时。酶切和洗脱后,获得小鼠NMI和小鼠NMI-NID(洗脱体积分别为约30ml)。蛋白质用含有10mM GSH,150mM NaCl,20mM Tris-HCl,pH 8.0的缓冲液以1ml/min的速度洗脱30分钟。

[0373] 2) 体积排阻色谱

[0374] 通过体积排阻色谱 (HiLoad_16/60_Superdex200_prep grad和Superdex 200 10/300GL,24ml) 进一步纯化由Ppase消化的蛋白质。用150mM NaCl,20mM Tris-HCl pH 8.0,5% gly平衡柱,流速为1ml/min,洗脱120分钟。以约30ml和120ml的洗脱体积分别收集全长小鼠NMI蛋白和NMI-NID。最后,得到纯化的NMI(洗脱体积为30ml),NMI NID(洗脱体积为120ml)。

[0375] 小鼠NMI的全长和片段蛋白可以在大肠杆菌中表达并纯化。但在NMI-NID中没有观察到与IFP35-NID类似的不同聚集状态的蛋白。全长NMI和NMI的片段呈聚合状态。

[0376] 以与小鼠NMI相关蛋白相同的方式纯化人NMI和NMI-NID。

[0377] 该实施例显示IFP35-NID存在两种聚集状态:二聚体和八聚体。IFP35中的两个NID结构域可能不是两个独立的结构域,而是两个交换相互作用的结构域。IFP35-NID的两种聚集态表明IFP35在细胞中可能具有两种不同的聚集状态,这最有可能与功能相符。NMI与IFP35具有相似的功能,其结构可能也相似。然而,与IFP35相比,NMI不含有不同的聚集状态。细胞分泌的NMI是均一的聚集状态。通过对分子量的估计,分泌的NMI可能是二聚体或四聚体。

[0378] 在随后的功能实验中,发现只有八聚体IFP35-NID可以诱导与NMI诱导的相同的炎症,表明八聚体IFP35-NID与全长IFP35具有相同的结构特征。因此,在八聚体表面上发现的参与IFP35与受体结合并阻断结合的氨基酸可能会阻断IFP35正常功能。类似地,可以开发针对IFP35和/或NMI的抑制性抗体,靶向参与IFP35与其细胞受体的相互作用的氨基酸残基。

实施例3 IFP35免疫功能的分析

[0379] IFP35引起过度免疫反应

[0380] 人IFP35-NID1, IFP35-NID2或IFP35-NID-H结构域(二聚体或八聚体)可用作抗原刺激小鼠免疫应答。每种蛋白使用四只小鼠,每只小鼠免疫四次,每只小鼠的腹膜内注射0.2mg的蛋白质。然后在小鼠第一次免疫后每14天增强免疫一次,共四次。

[0381] 在免疫过程中,使用人IFP35-NID二聚体免疫小鼠可以如期获得相应的抗体,然而,当免疫第三次时,NID-H八聚体引起小鼠腹部肿胀,并且几乎所有的小鼠在第四次免疫时均腹部肿胀且死亡。NID-H八聚体可以刺激炎症反应。RAW 264.7巨噬细胞(来自ATCC)在添加10%胎牛血清的DMEM培养基中37℃培养。

[0382] IFP35-NID1和IFP35-NID2没有明显差异。

[0383] IFP35在体内的免疫功能

[0384] BMDM细胞的培养:通过小鼠颈部脱颈法杀死小鼠,取小鼠的两条后腿,将腿浸泡在70%乙醇中1分钟,并清除腿骨上的肌肉,用PBS冲洗骨髓腔。然后400g离心100分钟,小心除去上清液。将红细胞收集在红细胞裂解缓冲液中,然后加入10ml PBS以中和细胞裂解缓冲液。BMDM细胞在加有10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素,1%L-谷氨酰胺和20ng/ml MCSF的DMEM培养基中37℃培养。

[0385] RAW 264.7巨噬细胞(来自ATCC)在加有10%胎牛血清的DMEM培养基中37℃培养。

[0386] 1. 沙门氏菌刺激巨噬细胞RAW264.7和BMDM释放IFP蛋白

[0387] 用预热的PBS将细胞洗涤三次。通过胰腺酶消化RAW264.7和BMDM细胞,并通过血细胞计数器计数,以确定每个孔中的细胞数目。向细胞培养皿中加入1ml预热的DMEM。沙门氏菌SR-11以12000RPM离心10分钟,并用PBS洗涤两次。重悬沙门氏菌并用血细胞计数器计数。以一定的感染指数(1:100或1:10)向Raw264.7细胞中加入沙门氏菌,而BMDM细胞则以感染指数(1:10或1:2)加入。将细胞培养皿在室温下以1500RPM离心10分钟,这有利于细菌吸附在细胞上。当用沙门氏菌感染Raw264.7细胞1小时,感染BMDM0.5小时,除去细胞培养基中的沙门氏菌,并加入含100mg/ml阿米卡星的DMEM培养基。当用沙门氏菌感染Raw 264.7细胞3小时,感染BMDM细胞1小时,加入含10mg/ml阿米卡星的DMEM培养基。在Raw 264.7和BMDM细胞分别用沙门氏菌感染1、3、5、9小时或0.5、1、2、4小时后,收集细胞培养基上清液中的分泌蛋白。

[0388] 沙门氏菌感染细胞后,浓缩细胞培养基上清液并提取全细胞裂解物。浓缩细胞培养基上清液:(1)将细胞培养基上清液加入0.1体积的冰冷的100%TCA并置于冰上2h。(2)在4℃下以12,000g离心30分钟。(3)小心地除去上清液,用冷丙酮洗涤沉淀物两次。(4)在4℃下以12,000g离心10分钟。(5)在沉淀物中加入30μl 1x SDS-PAGE上样缓冲液,并在95℃下加热5分钟。

[0389] 沙门氏菌感染细胞后,提取全细胞裂解物:(1)收集细胞:除去细胞培养基上清液,

用PBS洗涤细胞两次,向细胞培养皿中加入1ml PBS,用细胞刮擦器刮擦细胞,用移液枪将细胞悬液转移至1.5ml管中,以1500RPM离心5分钟,并除去上清液。细胞沉淀用于提取总蛋白。

(2) 细胞裂解:取适量的RIPA裂解缓冲液,在裂解缓冲液中加入终浓度为1mm的PMSF,并加入蛋白酶抑制剂混合液(Roche)。向细胞培养皿的每个孔中加入150ul RIPA裂解缓冲液,在冰上孵育15分钟。(3) 收集细胞裂解缓冲液:细胞完全分裂之后,在4℃下以12000RPM离心5分钟,将并将上清液转移到新管中。(4) 煮沸:在细胞裂解液中加入150μl 2×SDS-PAGE上样缓冲液,并在95℃加热5分钟。

[0390] 如图图18,在细胞培养上清液中没有或有很少量的IFP35。然而,在沙门氏菌刺激1小时内,可以在RAW 264.7细胞的培养上清液中检测到释放的IFP35。在接下来的几个小时,它们以依赖于时间的方式在培养基中累积。相比之下,IFP35的释放时间早于已知的危险信号HMGB-1。细胞内的IFP35蛋白水平降低(图18A)。使用BMDM和PBDM细胞可获得相同的结果(图18B and图18C)。

[0391] 为了更好地观察感染沙门氏菌后细胞内IFP35蛋白质含量的变化,使用免疫荧光方法检测IFP35蛋白。如图图19所示,IFP35用红色染色,DAPI用蓝色染色。使用两种不同的感染方案来观察从0至3小时IFP35蛋白质含量的变化,上述两种不同的感染方案是细胞数目与MOI的比例分别为1:2或1:10。结果发现,细胞内IFP35蛋白质含量随时间的延长而逐渐减少,并且在以较高MOI感染的细胞中,IFP35减少得更快。它进一步证明感染诱导不会引起IFP35在细胞内部积累,却使大部分IFP35分泌到细胞外部。这个结果与以前的研究一致,即细胞内IFP蛋白含量的变化。

[0392] 2. 病毒感染后IFP35的释放

[0393] 实验方法:根据感染的多重性,向Raw264.7细胞中加入病毒。随感染时间延长收集细胞培养上清液。在4℃以200g离心30分钟。通过三氯乙酸(TCA)收集上清液,并用蛋白质印迹进行检测。

[0394] 在感染指数(MOI)为0.2时,不管是用DNA病毒(MHV68)还是RNA病毒(A59)在体外感染Raw264.7后,IFP35早在感染后8小时就被释放。在相同条件下,HMGB1不释放。当提高感染指数至5时,HMGB1在感染24h后才明显释放。与细菌在体外感染细胞相似,IFP35早于HMGB1释放,说明IFP35是非常重要的危险信号分子。

[0395] 3. 小鼠腹膜炎模型

[0396] 图21A显示在沙门氏菌标准菌株SR-11引起的小鼠腹膜炎模型中,IFP35可被释放。注射活的沙门氏菌(活SR-11)可引起小鼠腹膜炎,IFP35可以被释放到小鼠腹水中。当注射共生的大肠杆菌(大肠杆菌Stable3)和热死亡的沙门氏菌(HK SR-11,热灭活的SR-11)时,不会引起炎症,也不会检测到IFP35的释放。这些结果表明IFP35与炎症反应相关。

[0397] 沙门氏菌标准菌株SR-11引起小鼠腹膜炎模型的建立。在注射细菌2h、4h、8h后,用8ml PBS洗涤小鼠腹水,并提取4ml腹水洗涤缓冲液。用三氯乙酸(TCA)沉淀蛋白并通过蛋白质印迹检测IFP35。(1) C57/B6小鼠,雄性,8~10周,体重约20g,禁水禁食4小时。(2) 每只小鼠注射 2×10^5 个细菌。(3) 注射细菌2h、4h、8h后,用8ml PBS洗涤小鼠腹水,提取4ml腹水洗涤缓冲液。(4) 在4℃下以200g离心10分钟,收集细胞培养基,三氯乙酸(TCA)沉淀。(5) 通过蛋白质印迹检测IFP35。

[0398] 如图图21B所示,当LPS,ATP激活炎症小体时,IFP35可被释放。实验方法:(1) 将

Raw264.7细胞用LPS (1mg/ml) 刺激4小时；(2) 继续用ATP (5mm) 刺激细胞10、30、60分钟；(3) 在4℃下以200g离心10分钟,收集细胞培养基,并用三氯乙酸(TCA) 沉淀；(4) 通过蛋白质印迹检测IFP35。

[0399] 炎症反应中的IFP35

[0400] 1. IFP35引起炎性因子的产生

[0401] 实验步骤:除去例1中IFP35二聚体和八聚体的内毒素,将其加入到BMDM细胞培养基(终浓度为5, 25, 50mg/ml) 中,刺激4小时,使用Q-PCR以GAPDH为内参检测已知的促炎性因子, TNF- α 和IL-1 β 。

[0402] Q-PCR的扩增引物以下:

[0403] IL-1 β :

正义:5' AAGGAGAACCAAGCAACGACAAAA 3'

反义:5' TGGGGAACTCTGCAGACTCAAAC 3'

[0404] TNF- α :

正义:5' CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT 3'

反义:5' AAGCAAAAGAGGAGGCAACA 3'

[0405] GAPDH:

正义:5' AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3'

反义:5' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA3'

[0406] 如图图22所示, NID-H八聚体可以引起已知的促炎性因子TNF- α , IL-1 β , iNOS和CD86在BMDM细胞中的表达上调,但是NID-H二聚体却没有这种效果。结果表明, IFP35-NID的不同聚集状态具有不同的效果。

[0407] 使用相同的方法检测IFP35NID1和IFP35NID2,结果没有明显差异。

[0408] 2. IFP35引起过度炎症反应

[0409] 将IFP35-NID二聚体和八聚体注射到小鼠腹腔内。注射8小时后, IFP35-NID八聚体可以引起急性炎症反应,表现为嗜中性粒细胞的积累。这应该是为什么小鼠在早期炎症反应中腹部膨胀和死亡的原因。结果表明, IFP35-NID八聚体不仅诱导巨噬细胞在体外产生炎性因子,而且还可以调节小鼠体内的炎症反应。

[0410] 3. IFP35可以激活巨噬细胞中的NF- κ B通路

[0411] 观察IFP35-NID八聚体引起的NF- κ B活化。NF- κ B通路是巨噬细胞活化的重要途径。检测方法:向Raw264.7细胞中加入无内毒素蛋白的IFP35-NID二聚体和八聚体,并孵育15、30和60分钟。细胞收集在RIPA(蛋白酶抑制剂混合物, Roche) 缓冲液中,并在冰上放置30分钟。在4℃以12,000rpm离心10分钟。收集上清液,加入SDS-PAGE上样缓冲液,在95℃加热10分钟。将样品保存在-70度。用蛋白质印迹法检测NF- κ B信号通路中抑制基因I κ B α 的磷酸化。Phospho-I κ B α 和I κ B α 的抗体来自CST。结果如图图24所示,添加原核表达的不同聚合态的无内毒素的蛋白后,重组蛋白IFP35-NID八聚体提高了I κ B α 的磷酸化水平,但降低总I κ B α 的蛋白水平。这表明重组蛋白IFP35-NID八聚体可以激活NF- κ B信号通路。总之,这些结果表明八聚体可以通过激活NF- κ B信号通路产生大量炎性细胞因子进而诱导巨噬细胞活化,而二聚体不能。

[0412] IFP35在细胞表面的受体

[0413] 由于IFP35通过分泌至细胞外或体液中诱导炎症反应,该实施例旨在鉴定介导IFP35活性的细胞表面受体,然后在该过程中检测TLR-Myd88途径的生物学功能。

[0414] BMDM细胞培养: BMDM细胞的培养: 通过小鼠颈部脱颈法杀死小鼠, 取小鼠的两条后腿, 将腿浸泡在70%乙醇中1分钟, 并清除腿骨上的肌肉, 用PBS冲洗骨髓腔。然后400g离心100分钟, 小心除去上清液。将红细胞收集在红细胞裂解缓冲液中, 然后加入10ml PBS以中和细胞裂解缓冲液。BMDM细胞在加有10%胎牛血清, 1%青霉素-链霉素, 1%L-谷氨酰胺和20ng/ml MCSF的DMEM培养基中37℃培养。

[0415] IFP35或NMI刺激: IFP35-NID二聚体、八聚体或NMI (5、25或50μg/mL) 刺激BMDM细胞4小时后, 通过Q-PCR检测IL-1β和TNFα。

[0416] 提取细胞总RNA: 使用来自康为世纪公司 (Cat.No.CW 0597) 的RNA提取试剂盒从BMDM细胞提取总RNA。使用Trizol试剂 (Invitrogen) 从RAW 264.7细胞提取总RNA。

[0417] 逆转录: 使用PrimeScript™ II第一链cDNA合成试剂盒 (Cat.No.6210A), 从1ug总RNA合成cDNA的第一链。使用SYBR®Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 和ROX plusQ-PCR试剂盒 (Cat.NO.RR42LR) 进行实时RT-PCR。如图25所示, 使用IFP35-NID蛋白处理Myd88敲除的BMDM细胞, NID-H的活性在这些细胞中急剧降低, IFP35-NID不会诱导IL-1β (图25A) 和TNFα (图25A)。IFP35可能通过Myd88依赖性通路结合细胞表面的TLR受体, 激活NF-κB, 并产生炎症因子。

[0418] TLR-4和TLR-9是细胞表面的可以诱导炎症反应的两种主要受体蛋白。如图26所示, TLR4通过IFP35-NID介导IL-1β (图26A) 和TNFα (图26B) 的上调。鉴于NID-H八聚体可以上调WT, TLR9^{-/-}和TLR4^{-/-}小鼠BMDM细胞中的TNF-α和IL-1β, IFP35家族蛋白也可以直接或间接通过TLR4引起反应。

[0419] IFP35单克隆抗体可以治疗由过度炎症反应引起的疾病如脓毒症

[0420] 由于IFP35-NID可以活化巨噬细胞并诱导炎症反应, 所以IFP35可能在败血症中发挥中作用, IFP35可以加重败血症中的炎症因子风暴并导致小鼠死亡。

[0421] 1. 脓毒症小鼠中IFP35的表达

[0422] LPS诱导的小鼠休克模型的建立: (1) 将B6/C57小鼠禁水禁食1夜; (2) 第二天早晨将LPS (5mg和10mg/kg体重) 注射到小鼠的腹腔内; (3) 注射后3小时用毛细管取血; (4) 注射后6小时取出小鼠眼睛并取血。

[0423] 使用ELISA检测LPS诱导的休克模型中IFP35的浓度。(1) 包被抗体: 将纯化的单克隆抗体IFP35 1D7用PBS稀释至2mg/ml, 在酶标板的每孔上加入100ul抗体, 4℃, 过夜; (2) 洗涤: 用PBST (0.05% Tween-20) 洗涤三次; (3) 封闭: 含有2% BSA的PBST (0.05% Tween-20) 放在摇动台上摇晃, 室温, 1小时; (4) 加入稀释标准品和样品, 每孔100ul, 4℃, 过夜; (5) 洗涤: 用PBST (0.05% Tween-20) 洗涤三次, 用ddH₂O洗涤两次。(6) 颜色: 每孔加入100ul TMB, 避光, 置于摇动台上摇晃10-20min。(7) 停止反应: 向每个孔中加入50ul 2M H₂SO₄; (8) 酶标板, 450nm扫描OD。

[0424] 定量检测败血症小鼠血液中的IFP35浓度, 结果显示LPS诱导的败血症小鼠的血液中IFP35的浓度处于较高水平, 其达到纳克水平 (约8ng)。但是根据前面的论文, HMGB1的水平是600-800pg。而且IFP35的水平取决于LPS注射的时间或剂量 (3小时和6小时, LPS剂量为5mg和10毫克/千克体重)。

[0425] 2. 注射IFP35单克隆抗体提高了脓毒症小鼠的存活率

[0426] 将IFP35单克隆抗体1D7注射到小鼠中。如图27所示, IFP35单克隆抗体可以提高脓毒症小鼠的存活率。结果表明IFP35单克隆抗体1D7可以有效地保护小鼠在细菌感染模型中免于死亡。接受1D7 (n=10) 治疗的小鼠的平均死亡时间为107小时, 而对照组为50小时。

[0427] 3. 为了在IFP35单克隆抗体注射后检测小鼠中炎性因子IL-6的表达, 采用了以下的方法: IL-6ELISA试剂盒购自BD Biosciences, 详细操作信息参见产品说明书。

[0428] 如图28所示, 对于具有严重败血症的小鼠, IL-6蛋白在注射IFP35抗体 (1D7) 的小鼠体液中高度表达, 却不会在非注射组中高度表达。

[0429] IFP35和抗肿瘤治疗

[0430] NMI的蛋白质水平在一些肿瘤中降低。由于IFP35和NMI在生物过程中有多种功能, 例如促进生物有机体的炎症反应, 活化免疫系统和促进炎性细胞因子的释放等, 将纯化的IFP35或NMI注射到血液中可以激活和/或增强抗肿瘤治疗。因此, IFP35或NMI蛋白可能是一种潜在的抗癌药物。

实施例4 NMI免疫功能分析

[0431] NMI引起过度免疫反应

[0432] 全长NMI和NMI-NID用作抗原刺激小鼠免疫应答。每种蛋白质分别注射四只小鼠, 每只小鼠免疫四次, 每只小鼠腹膜内注射0.2mg蛋白质。随后小鼠在第一次免疫后每14天增强免疫一次, 共四次。

[0433] 在免疫过程中, 当免疫第三次时, 使用NMI-NID蛋白免疫可以引起小鼠腹部肿胀, 并且当第四次免疫时几乎所有小鼠都腹部肿胀并死亡。从而, 很难在小鼠中获得抗体。因此, NID-H八聚体可以刺激炎症反应。

[0434] NMI在体内的免疫功能研究

[0435] 1. 当细胞被细菌感染时, NMI分泌到细胞外基质中

[0436] NMI和IFP35是同源蛋白。IFP35和NMI可以组装成高分子量复合物 (HMMC)。在实施例中, 检测的是NMI。

[0437] BMDM细胞培养: 通过小鼠颈部脱颈法杀死小鼠, 取小鼠的两条后腿, 将腿浸泡在70%乙醇中1分钟, 并清除腿骨上的肌肉, 用PBS冲洗骨髓腔。然后400g离心100分钟, 小心除去上清液。将红细胞收集在红细胞裂解缓冲液中, 然后加入10ml PBS以中和细胞裂解缓冲液。BMDM细胞在加有10%胎牛血清, 1%青霉素-链霉素, 1%L-谷氨酰胺和20ng/ml MCSF的DMEM培养基中37℃培养。

[0438] RAW 264.7巨噬细胞 (来自ATCC) 在加有10%胎牛血清的DMEM培养基中37℃培养。

[0439] 2. THP1细胞被沙门氏菌感染后, 检测细胞培养基上清与细胞裂解液中的NMI水平

[0440] 实验方法: 在15ml管中收集THP1细胞, 以500g离心5分钟, 除去上清液, 用预热的PBS洗涤细胞, 以500g离心5分钟, 除去上清液。用DMEM重悬细胞并用血细胞计数器计数。每孔加入 3×10^5 个细胞。向细胞培养皿中加入1ml预热的DMEM。沙门氏菌SR-11, 12000RPM离心10分钟, 并用PBS洗涤两次。重悬沙门氏菌并用血细胞计数器计数。沙门氏菌以感染指数 (1:100或1:10) 感染THP1细胞。将细胞培养皿在室温下1500RPM离心10分钟, 这有利于细菌吸附在细胞上。当用沙门氏菌感染THP1细胞1小时, 除去培养基中的沙门氏菌并在培养基中加入含100mg/ml阿米卡星的DMEM。当用沙门氏菌感染THP1细胞3小时, 在培养基中加入

含100mg/ml阿米卡星的DMEM。在用沙门氏菌感染THP1细胞1、3、5和9小时后,收集细胞培养基上清液中的分泌蛋白。

[0441] 沙门氏菌感染细胞后,浓缩细胞培养基上清液并提取全细胞裂解物。浓缩细胞培养基上清液:(1)将细胞培养基上清液加入0.1体积的冰冷的100%TCA并置于冰上 2h。(2)在4℃下以12,000g离心30分钟。(3)小心地除去上清液,用冷丙酮洗涤沉淀物两次。(4)在4℃下以12,000g离心10分钟。(5)在沉淀物中加入30μl 1x SDS-PAGE上样缓冲液,并在95℃下加热5分钟。

[0442] 在用沙门氏菌感染细胞后提取全细胞裂解物:(1)收集细胞:在15ml管中收集THP1细胞,以500g离心5分钟,除去上清液,用预热PBS洗涤细胞,500g离心5分钟,丢弃上清液。细胞沉淀用于提取总蛋白。(2)细胞裂解:取适量的RIPA裂解缓冲液,在裂解缓冲液中加入终浓度为1mm的PMSF,并加入蛋白酶抑制剂混合液(Roche)。向细胞培养皿的每个孔中加入150ul RIPA裂解缓冲液,在冰上孵育15分钟。(3)收集细胞裂解缓冲液:细胞完全分裂之后,在4℃下以12000RPM离心5分钟,将并将上清液转移到新管中。(4)煮沸样品:将在细胞裂解液中加入150μl 2x SDS-PAGE上样缓冲液,并在95℃加热5分钟。

[0443] THP1细胞培养基:THP1细胞在加有10%胎牛血清的DMEM培养基中在37℃培养。

[0444] 如图图29所示,在细胞培养上清液中没有或几乎检测不到NMI。然而,在沙门氏菌刺激1小时后,在THP1细胞的培养基上清液中可检测到释放的NMI。与此同时,细胞内的NMI变化不大。结果表明,当被细菌感染时,NMI可以分泌到细胞外。

[0445] 炎症反应中的NMI

[0446] 将小鼠全长NMI蛋白加入THP1细胞培养基(终浓度为5,25,50mg/ml)中,刺激4小时,并检测已知的促炎性因子TNF-α和IL-1β。

[0447] Raw264.7细胞培养:细胞在加有10%胎牛血清的DMEM培养基中在37℃培养。

[0448] 提取细胞总RNA:使用来自康为世纪公司(Cat No.CW 0597)的RNA提取试剂盒从BMDM细胞提取总RNA。使用Trizol试剂(Invitrogen)从RAW 264.7细胞提取总RNA。

[0449] 逆转录:使用PrimeScript™ II第一链cDNA合成试剂盒(Cat.No.6210A),从1ug总RNA合成cDNA的第一链。使用SYBR®Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)和ROX plus Q-PCR试剂盒(Cat.NO.RR42LR)进行实时RT-PCR。

[0450] 如图30,加入对照LPS和NMI蛋白(5μg/mL,25μg/mL或50μg/mL)后,已知的促炎因子TNF-α和IL-1β可以在THP1细胞中被NMI上调。结果表明,NMI也可以诱导与IFP35诱导的相似的炎性因子的表达。

[0451] 用相同的方法检测NMI-NID1和全长NMI,结果没有明显差异。

[0452] NMI蛋白的聚集状态

[0453] 检测细胞受到刺激后由细胞分泌的NMI的聚集状态。当用沙门氏菌感染THP1细胞时,NMI可以分泌到细胞培养基中。如图31所示,使用Millipore浓缩管将10ml含有分泌的NMI的细胞培养基浓缩至2ml。样品通过使用Superdex S-200体积排阻色谱来分离。然后,通过蛋白质测试洗脱的样品,并通过NMI抗体检测NMI的洗脱峰位置。图中的数字是洗脱缓冲液的体积。结果表明,NMI洗脱峰顶部为78ml,相应的分子量为70KDa至140KDa。

[0454] NMI在细胞表面的受体

[0455] 由于NMI可以分泌到细胞外并进入体液诱导炎症反应,因此本实施例旨在鉴定NMI

的细胞表面受体,然后在该过程中检测TLR-Myd88通路的生物学功能。

[0456] BMDM细胞培养:通过小鼠颈部脱颈法杀死小鼠,取小鼠的两条后腿,将腿浸泡在70%乙醇中1分钟,并清除腿骨上的肌肉,用PBS冲洗骨髓腔。然后400g离心100分钟,小心除去上清液。将红细胞收集在红细胞裂解缓冲液中,然后加入10ml PBS以中和细胞裂解缓冲液。BMDM细胞在加有10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素,1%L-谷氨酰胺和20ng/ml MCSF的DMEM培养基中37℃培养。

[0457] 提取细胞总RNA:使用来自康为世纪公司(Cat No.CW 0597)的RNA提取试剂盒从BMDM细胞提取总RNA。使用Trizol试剂(Invitrogen)从RAW 264.7细胞提取总RNA。

[0458] 逆转录:使用PrimeScript™ II第一链cDNA合成试剂盒(Cat.No.6210A),从1ug总RNA合成cDNA的第一链。使用SYBR®Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)和ROX plusQ-PCR试剂盒(Cat.NO.RR42LR)进行实时RT-PCR。

[0459] NMI单克隆抗体可以治疗由过度炎症反应引起的疾病如脓毒症

[0460] 由于NMI结构和功能与IFP35高度相似和这两种蛋白存在的协作,抑制NMI可能具有与抑制IFP35相同的效果,即抑制NMI诱导的过度免疫应答。因此,NMI抑制剂具有如IFP35抑制剂一样的治疗败血症、病毒感染诱导的NMI过表达和自身免疫性疾病等的潜质。

[0461] 脓毒症小鼠中NMI的表达

[0462] LPS诱导的小鼠休克模型的建立:(1)将B6/C57小鼠禁水禁食1夜;(2)第二天早晨将LPS(5mg和10mg/kg体重)注射到小鼠的腹腔内;(3)注射后3小时,用毛细管取血;(4)注射后6小时,取出小鼠眼睛并取血。

[0463] 使用ELISA检测LPS诱导的休克模型中NMI的浓度。定量检测败血症小鼠模型中血液里的NMI浓度,结果显示LPS诱导的败血症小鼠的血液中NMI的浓度处于较高水平,达到纳克水平。但是根据前面的论文报道,HMGB1的水平是600-800pg。而且NMI的水平取决于LPS注射的时间或剂量(3小时和6小时,LPS剂量为5mg和10毫克/千克体重)。NMI单克隆抗体可以提高脓毒症小鼠的存活率。

[0464] 过度的免疫反应

[0465] 将用原核系统表达纯化的不同长度的外源性蛋白质注入小鼠腹腔中,每只小鼠注射100毫克已除去内毒素的蛋白质。用流式细胞仪检测由IFP35和NMI招募到小鼠腹腔的免疫细胞,如中性粒细胞。

[0466] NMI在抗肿瘤治疗中的作用

[0467] 基于对IFP和NMI功能的发现,可以开发药物治疗与IFP35和/或NMI的高水平异常表达、分泌和/或活动相关的脓毒症、炎症风暴、自身免疫性疾病及其它疾病。一方面,本文提供了:(1)抑制IFP35和/或NMI释放的小化合物或肽;(2)抑制IFP35和/或NMI产生与功能的针对IFP35和/或NMI的抗体;(3)干扰IFP35或NMI在体内形成聚合物的小分子;(4)抑制干扰素分泌以减少IFP35产生的药剂;(5)通过抑制IFP35和NMI与其细胞表面受体之间的相互作用来抑制IFP35和/或NMI功能的药剂;(6)通过抑制IFP35和NMI与其受体相互作用以抑制其功能的药剂。同样,在低免疫力或免疫抑制的情况下,例如在肿瘤组织中,可以通过向生物体或生物体部分提供IFP35或NMI来增强免疫应答。

[0468] 实现该目的的技术包括:(1)将IFP35或NMI蛋白或其靶向衍生物直接注射到生物体中;(2)直接提供由IFP35或NMI或其靶向衍生物衍生的肽或小分子。此外,在诊断败血症

和炎症反应方面,可以开发ELISA试剂盒。因为只有IFP35的片段可以在体外表达和结晶,IFP35的全长蛋白可能不必形成聚合物以执行诱导炎症因子风暴的功能。在小鼠中,使用IFP35的中和性单克隆抗体可抑制炎症因子风暴。该结果表明,不管IFP35存在何种聚合物状态,都可以引起炎症因子风暴。因此,IFP35可能是导致细胞因子风暴的一个主要原因,这使其成为抑制细胞因子风暴的靶标。因此,IFP35单克隆抗体或IFP35的其他抑制分子的正确使用可有助于抑制细胞因子风暴。由于NMI结构和功能与IFP35高度相似,这两种分泌到细胞外的蛋白质间的协作以及如诱导细胞因子产生的功能,表明NMI可能具有与IFP35相同或相似的功能。因此,抑制NMI可能也可以抑制炎症,并且还能够保护动物免受过度炎症反应。因此,在一定程度上,可以避免由NMI或NMI介导的过度炎症反应产生的死亡或损伤。由于NMI在一些肿瘤中表达较低,添加NMI可能会产生抗肿瘤功能。NMI与IFP35的相似性显示了功能的两个方面,一是增强生物体抑制癌症或避免感染的免疫力;其次是它们可以成为肿瘤治疗的靶点,通过抑制它们的活性来抑制过度的免疫反应,预防和治疗由过度炎症反应引起的生物体损伤。总之,这些结果表明了IFP35和NMI诱导炎症反应的关键功能,并且进一步证明它们在医学科学中的重要价值。

例5 IFP35抗体的产生

[0469] 为了克隆抗体中可变区的序列,根据轻链的6个家族,为轻链可变区(VL)设计了7对PCR引物。引物P1-P7是从FWR1区开始的7个上游引物,并且P8是在FWR4区末端终止的下游引物。根据重链可变区的4个家族,设计了5对重链VH引物用于PCR扩增。引物P9-P12是从FWR1区开始的上游引物,引物13是在FWR4末端终止的下游引物。

[0470] 这些引物的序列以下:

P1GACATTGTGATGWCACAGTCTCC
P2GATRTTKTGATGACYCARRCTCC
P3GACATTGTGCTGACCCAATCTCC
P4GACATTGTGCTGACACAGTCTCC
P5SAAAWTGTKCTCACCCAGTCTCC
P6GAYATYAGATGACMCAGWC
P7GAYATTGTGATGACMCAGWCT
P8 (VL-R) TTTBAKYTCCAGCTTGGTSCC
P9AGGTGCAGCTKMAGGAGTCAGG
P10AGGTYCAGCTKCARSARTCT
P11AGGTCCARCTGCAGCAGYCT
P12AGGTGMAGCTKGWGGARTCTGG
(VH-R) TGGTCGACGCTGAGGAGACGGT

[0471] 培养和收集IFP35抗体杂交瘤细胞,使用Trizol试剂(Life Technologies Inc.)提取总RNA。然后使用提取的RNA作为模板,通过使用Life Technologies Inc.的cDNA合成试剂盒合成cDNA。轻链可变区和重链区的PCR片段产物用琼脂糖凝胶回收,然后克隆到T载体(GE Healthcare)中。将这些构建质粒转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,挑取单个克隆并测序。

[0472] 将上述重链和轻链的序列与NCBI BLAST中的序列比较显示,上述序列具有小鼠

IgG的相似特征。

[0473]

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAG
CTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCA
AACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATG
GAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCATCACGTTGGTGTCTGGCACCAA
GCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:12)

Mus musculus isolate AIDKO-gimm8-1 immunoglobulin kappa light chain variable region gene, partial sequence
Sequence ID: gb|EF542882.1| Length: 444 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 329 GenBank Graphics				Next Match >	Previous Match <
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
547 bits(296)	3e-152	298/299(99%)	0/299(0%)	Plus/Plus	
Query 18	CAGACTCAACCAATCATCTCTCATCTCCAGGAGAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGC			75	
Subject 31	CAGCTCCAGCAATCATCTCTCATCTCCAGGAGAAAGGTCACCATGACCTGCAGTGC			90	
Query 78	AGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGCACCTCCCCCA			135	
Subject 81	AGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAAGTCAGGCACCTCCCCCA			150	
Query 138	TGGATTTATGACACATCCAAGTTACTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGT			195	
Subject 151	TGGATTTATGACACATCCAAGTTACTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGT			210	
Query 198	TCTTGGACTCTTACTCTCTCAAACTGCTTCAAGCATGAGGCTGAAAGATGCTTCACT			255	
Subject 211	TCTTGGACTCTTACTCTCTCAAACTGCTTCAAGCATGAGGCTGAAAGATGCTTCACT			270	
Query 256	TACTGGCACTAGTGGATAGTAACTGCTTCACTGCTTGGTCTGGGACCTCTTACTCT			314	
Subject 271	TACTGGCACTAGTGGATAGTAACTGCTTCACTGCTTGGTCTGGGACCTCTTACTCT			329	

[0474] TGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCCCTTGACCCCAGTAGTCCATAGCCCAAGAGTACCCGT
ATCTTGACAGAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTCTTGAGGTTGTTGATCTGCAAATAGGCAGTGCTGGCAGAGGTT
TCCAAAGAGAAGGCAAACCGTCCCTTGAAGTCATCAGCAAATGTTGGCTCTCCAGTGTAGGTGTTTATCCAGCCCAT
CCACTTTAAACCCTTTCTGGAGCCTGCTTCACCCAGTTCATTCCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTGC
AGGAGATCTTGACTGTCTCTCCTGACTCCTTAAGCTGCACCT

(SEQ ID NO:11)

Mus musculus clone nat2BH immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds
Sequence ID: gb|U44855.1| Length: 331 Number of Matches: 1

Range 1: 8 to 331 GenBank Graphics				Next Match >	Previous Match <
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
518 bits(280)	3e-143	313/328(95%)	5/328(1%)	Plus/Minus	
Query 10	CTGAGAGAGGCTGACTGAGGTTCTTCACTCCATATGCTCATAGCCCAAGGATACCTG			68	
Subject 331	CTGAGAGAGGCTGACTGAGGTTCTTCACTCCATAGCTCATAGCCCAAGGATACCTG			278	
Query 68	TATCTTGACAGAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTCTTGAGGTTGTTGATCTGCAAAT			128	
Subject 275	TATCTTGACAGAAATATGTAGCCGTGTCCTCATTCTTGAGGTTGTTGATCTGCAAAT			218	
Query 123	GCACTGTGTCAGAGTTTCCAAAGGAGAGCAAGCTGCTTGAAGTCTTCAAGCAAT			188	
Subject 215	GCACTGTGTCAGAGTTTCCAAAGGAGAGCAAGCTGCTTGAAGTCTTCAAGCAAT			158	
Query 183	GTTTCACTCTCAAGTTTAAAGTTTATGCACTCATGCTTTTAAAGCTTCTCTTGAAG			248	
Subject 155	GTTTCACTCTCAAGTTTAAAGTTTATGCACTCATGCTTTTAAAGCTTCTCTTGAAG			98	
Query 243	TGCTTCATCACTTCAATCATAGTTTGGGAGTTATCTCAGAAAGCTTTCAGAGAGATC			308	
Subject 65	TGCTTCATCACTTCAATCATAGTTTGGGAGTTATCTCAGAAAGCTTTCAGAGAGATC			38	
Query 308	TTGACCTTTCTCTGACTCTTAAAGT			336	
Subject 35	TTGACCTTTCTCTGACTCTTAAAGT			8	

[0475] 基于DNA序列翻译的轻链蛋白质序列和重链蛋白质序列以下：

[0476] 轻链：DIVMTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGS
GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:10)；

[0477] 重链: VQLVESGP~~EL~~KKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTFADDFK
GRFAFSLETSASTAYLQINN~~LN~~KNEDTATYFCARYGYSWAMDYWGQGTSTVSSAST (SEQ ID NO:9) .

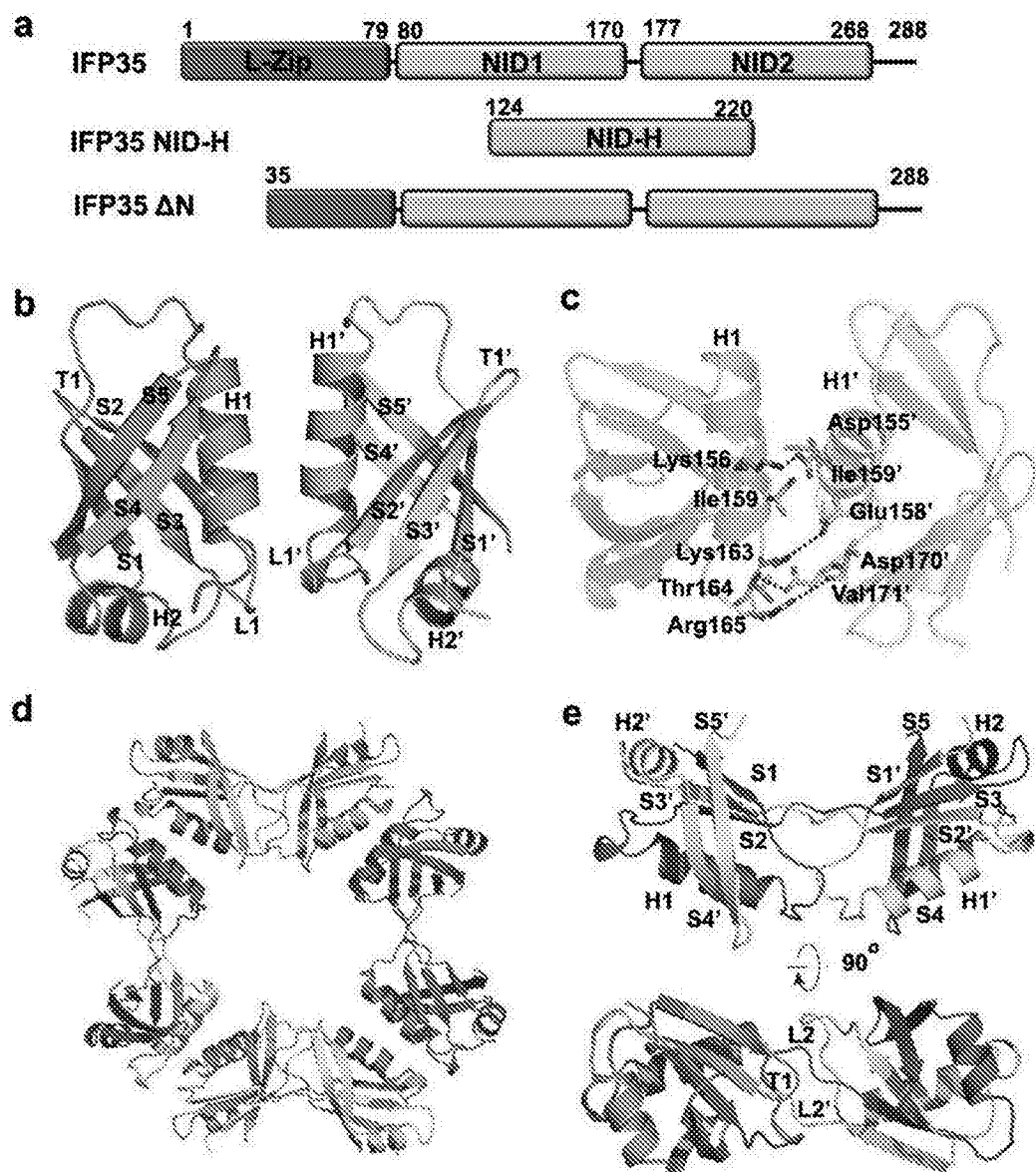


图1

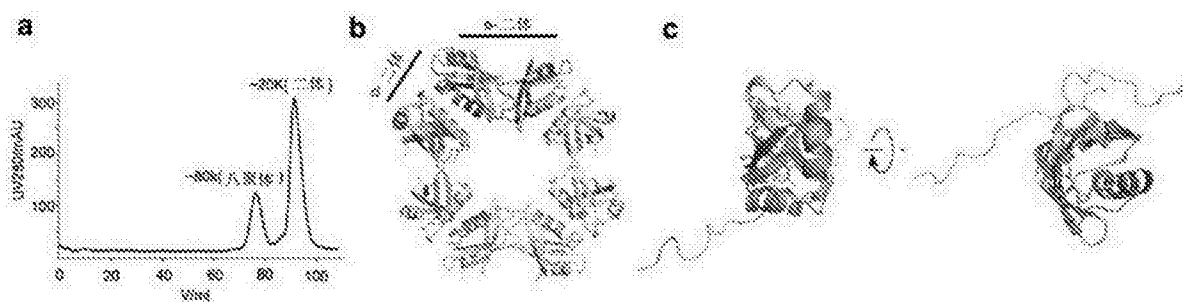


图2

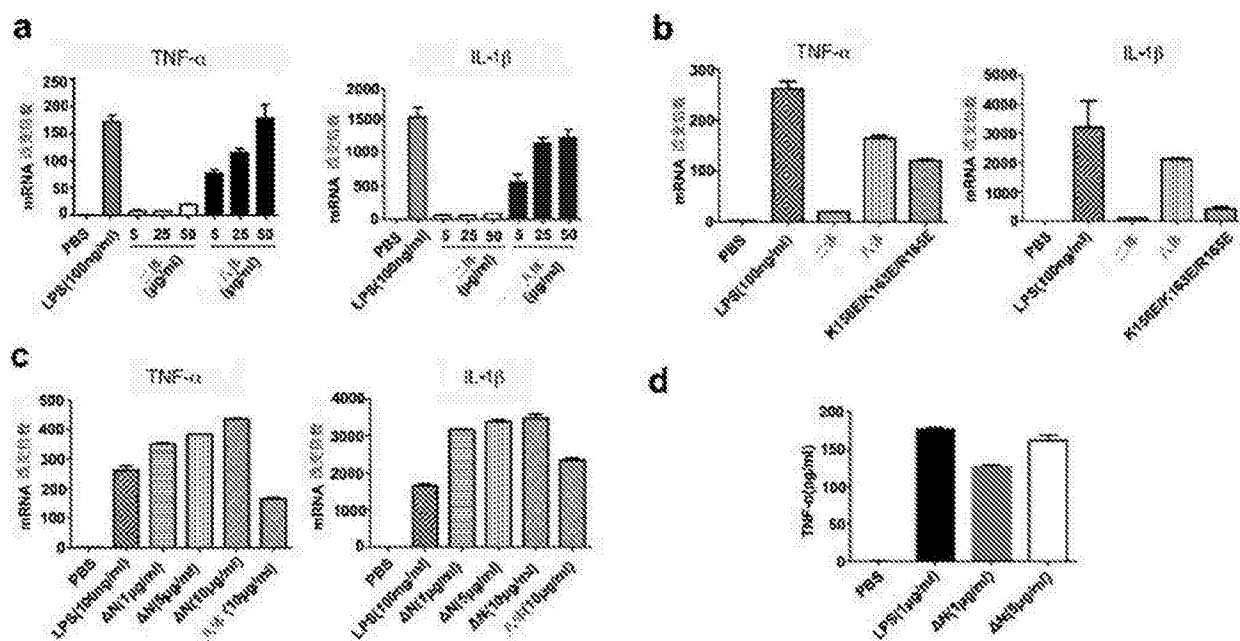


图3

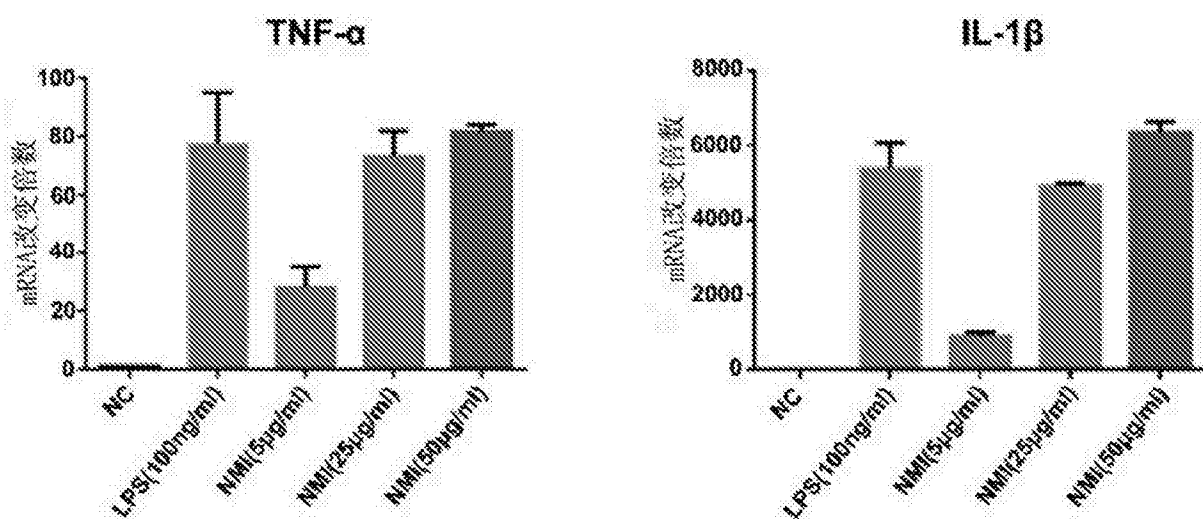


图4

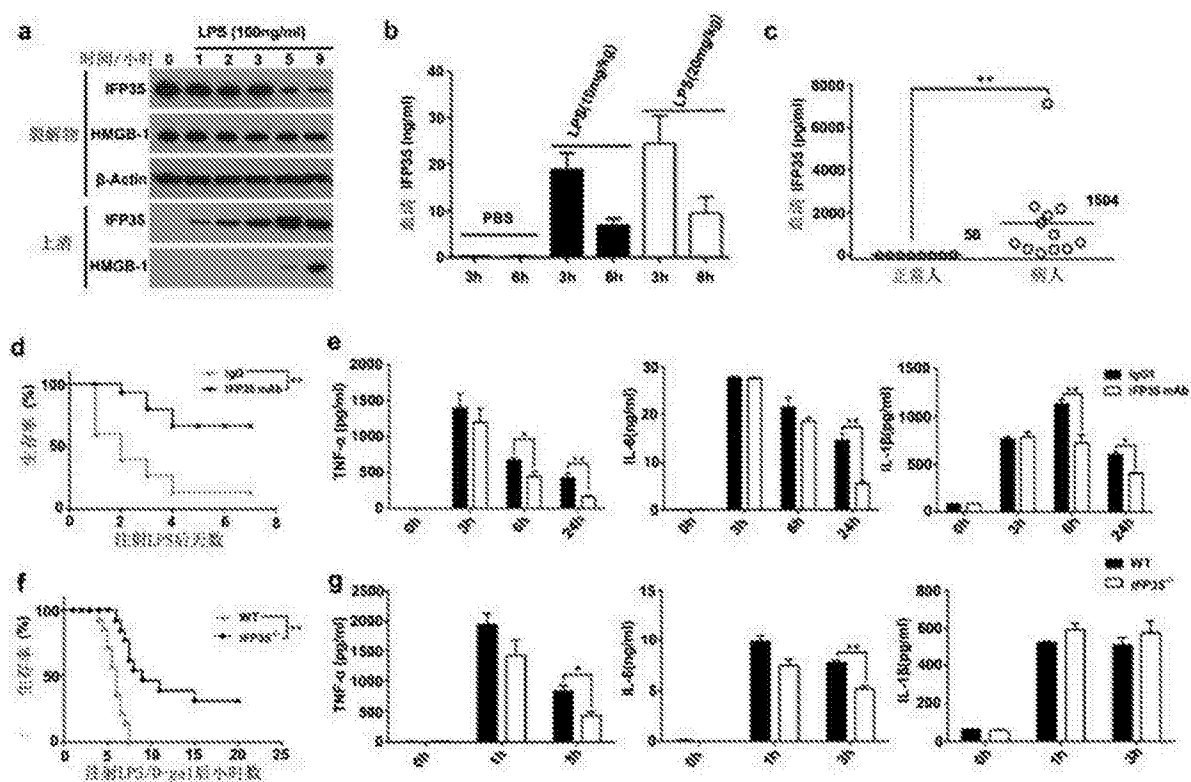


图5

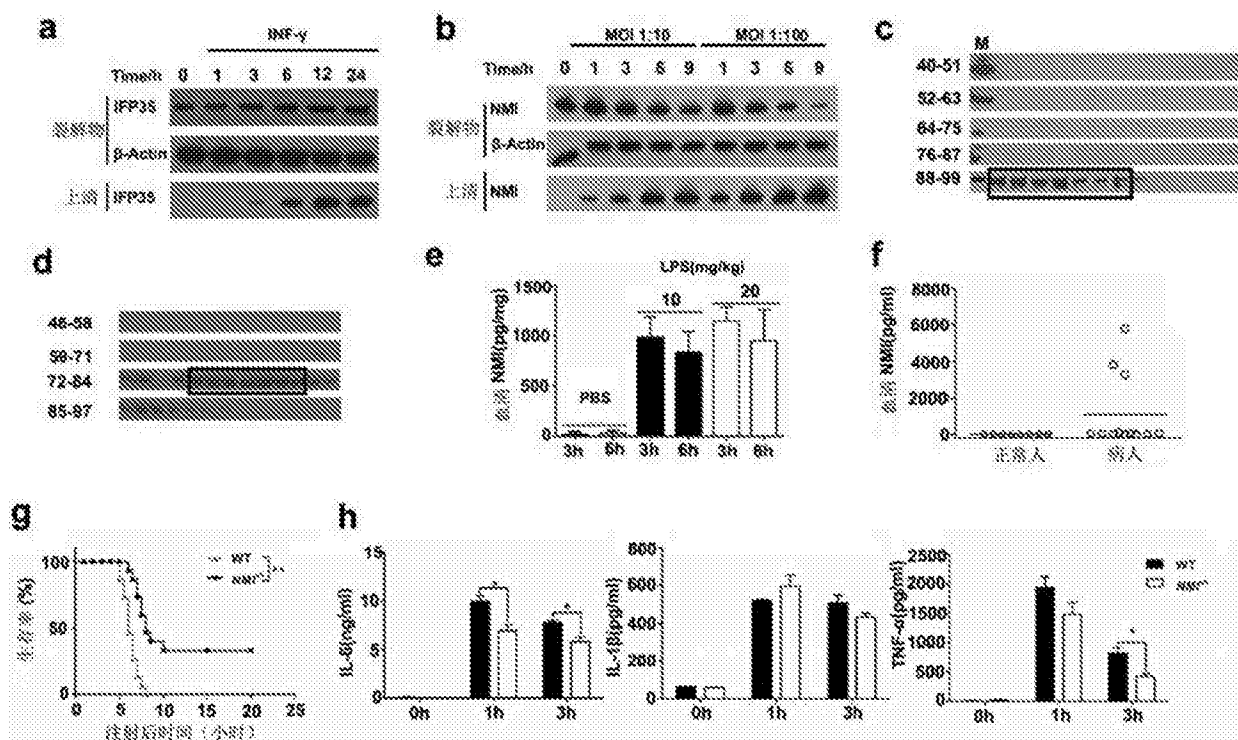


图6

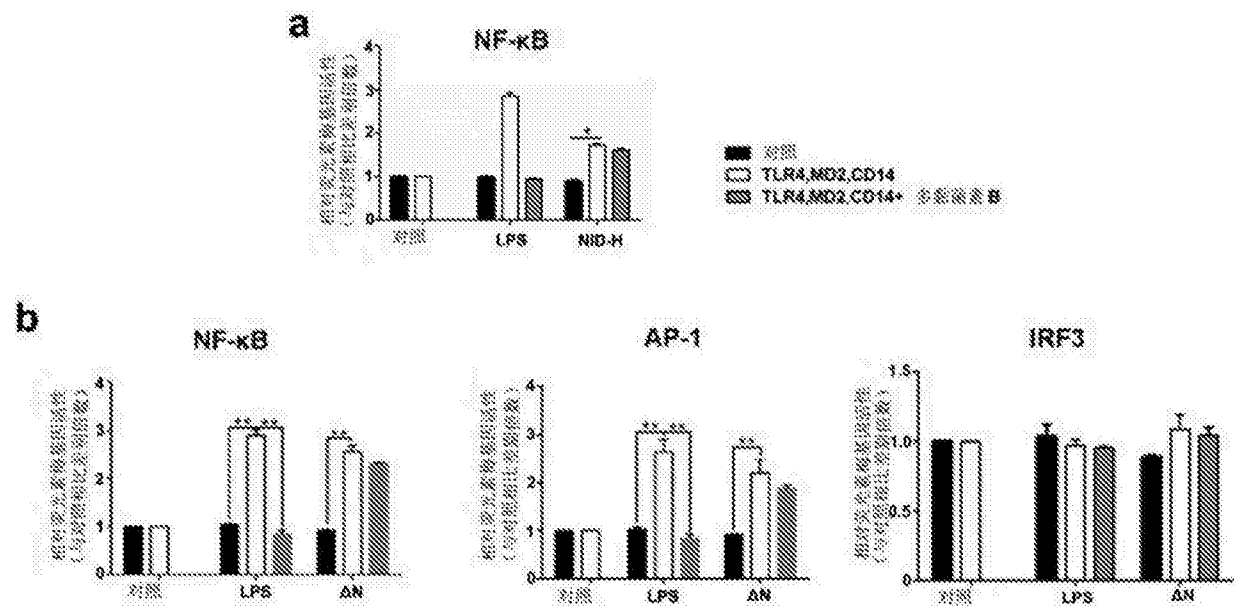


图7

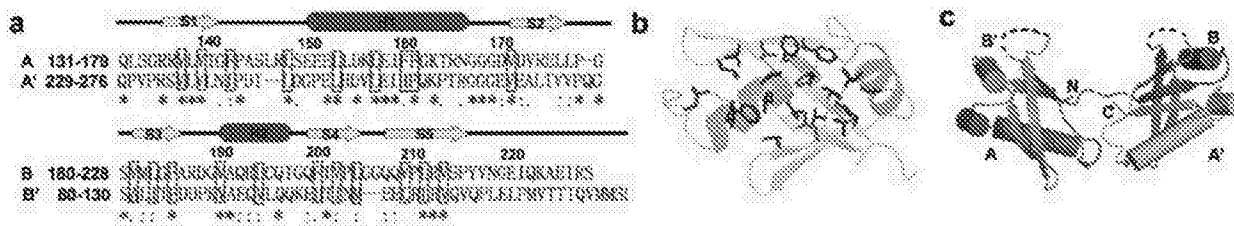


图8

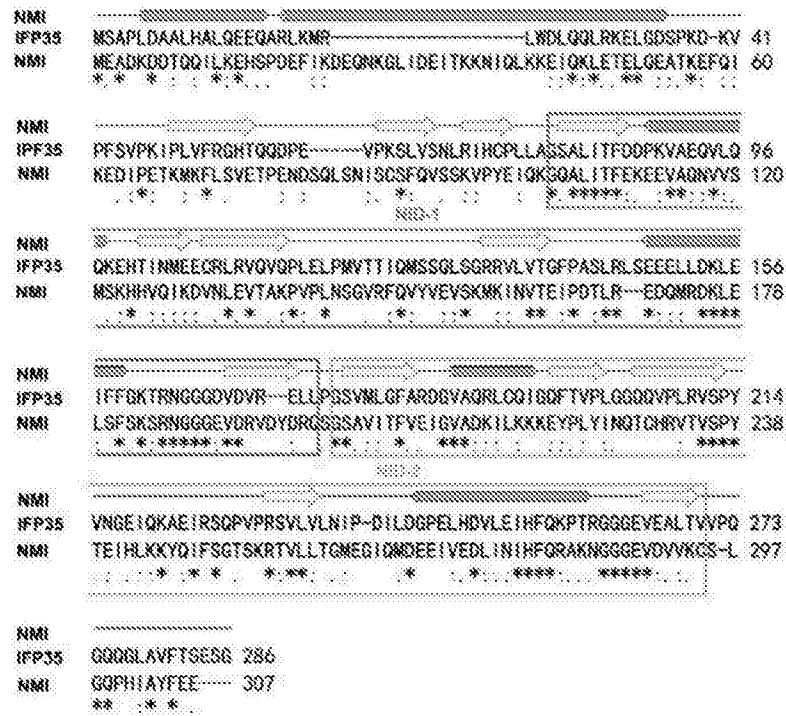


图9

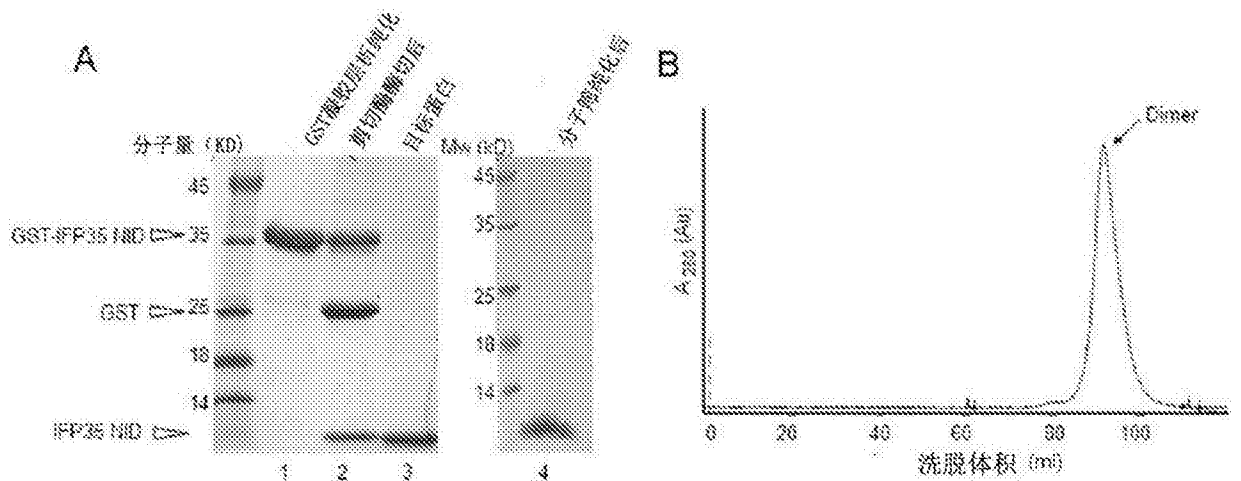


图10

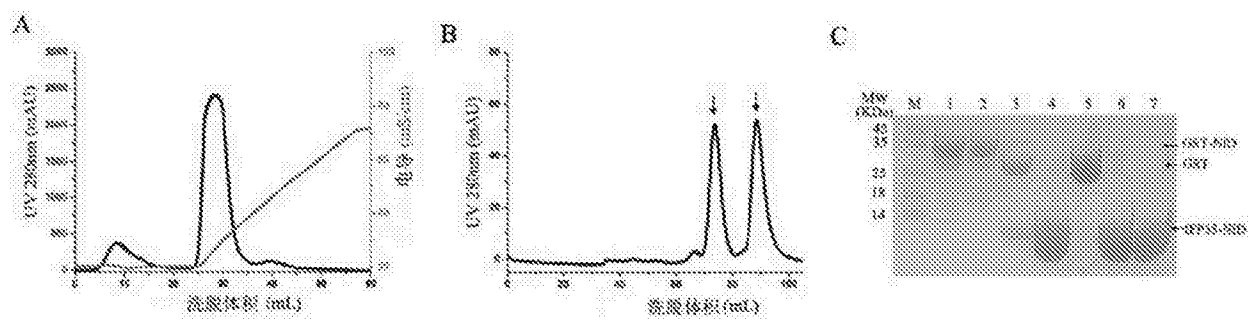


图11

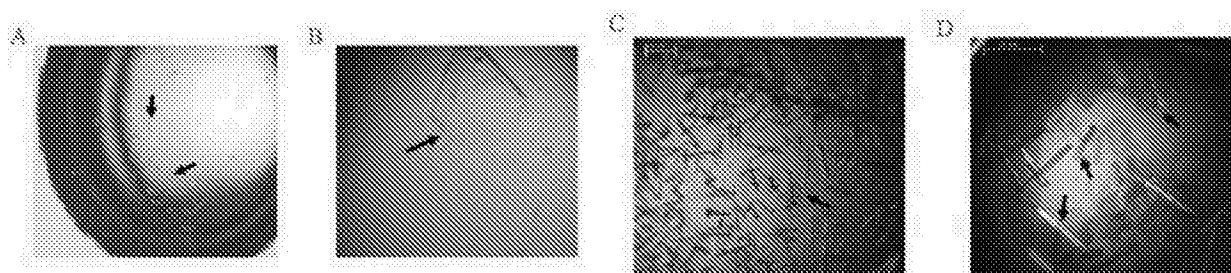


图12

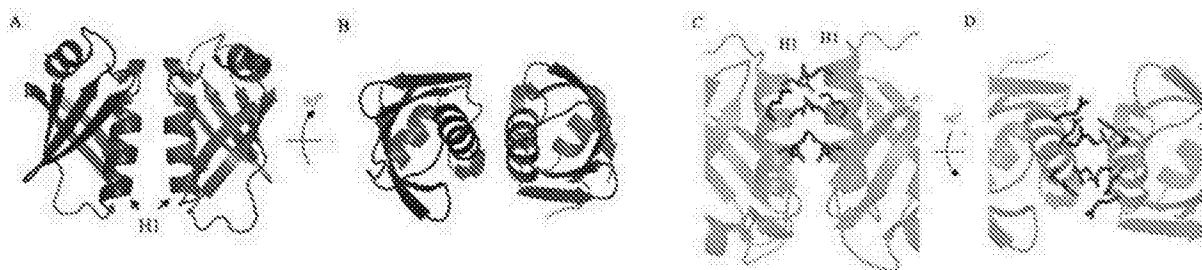


图13

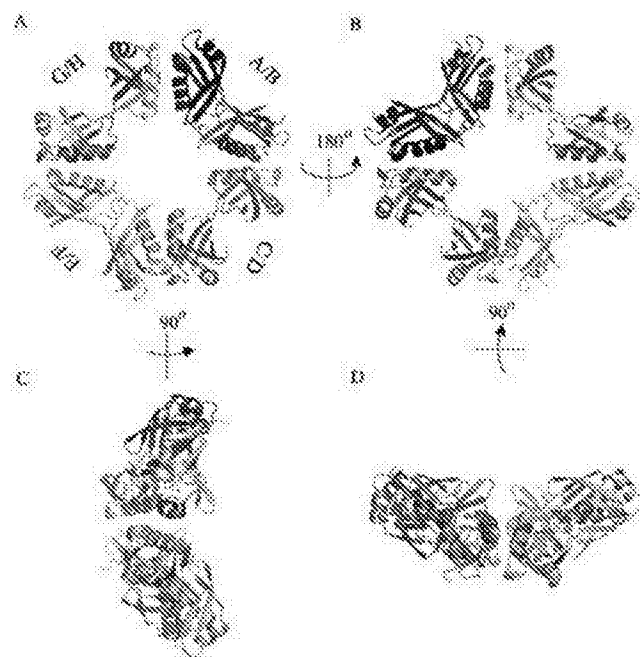


图14

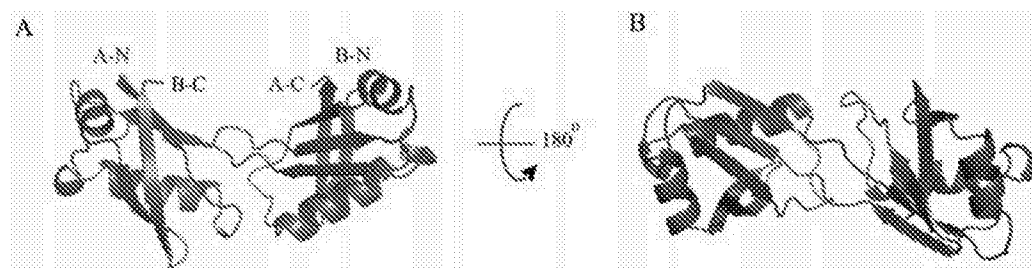


图15

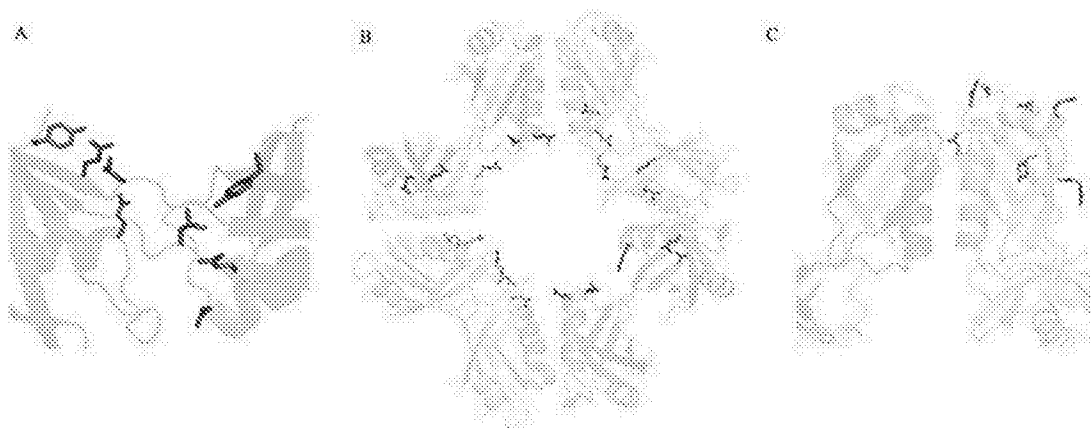


图16

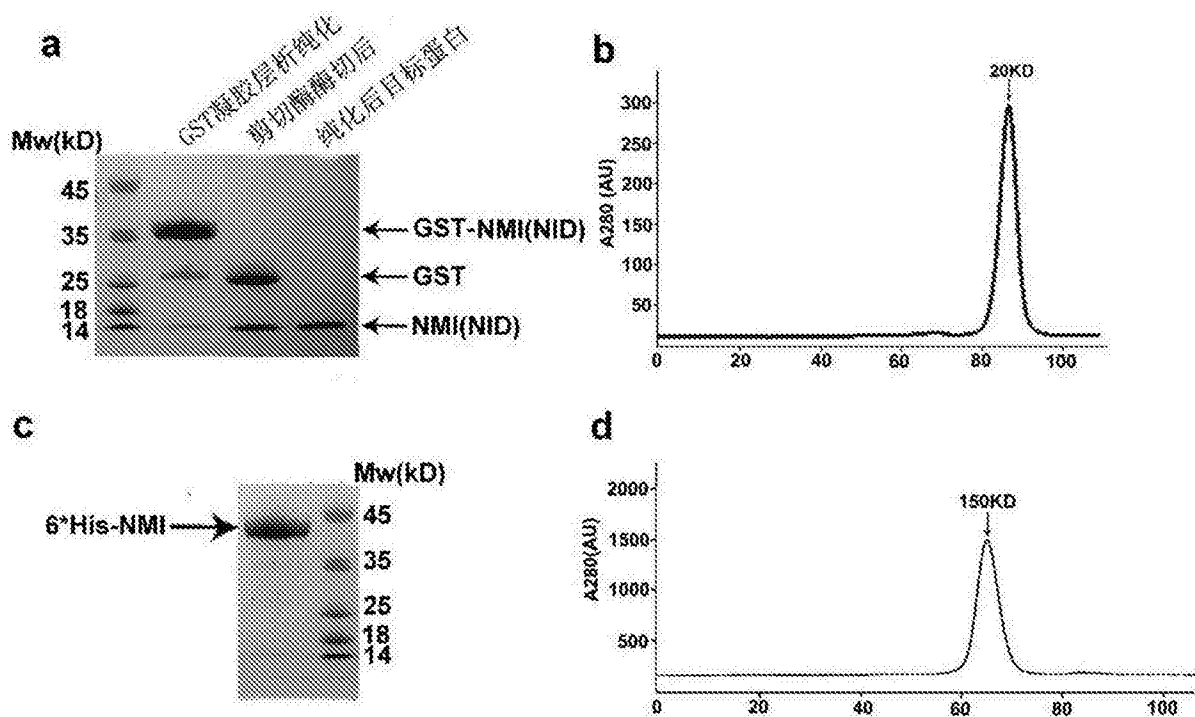


图17

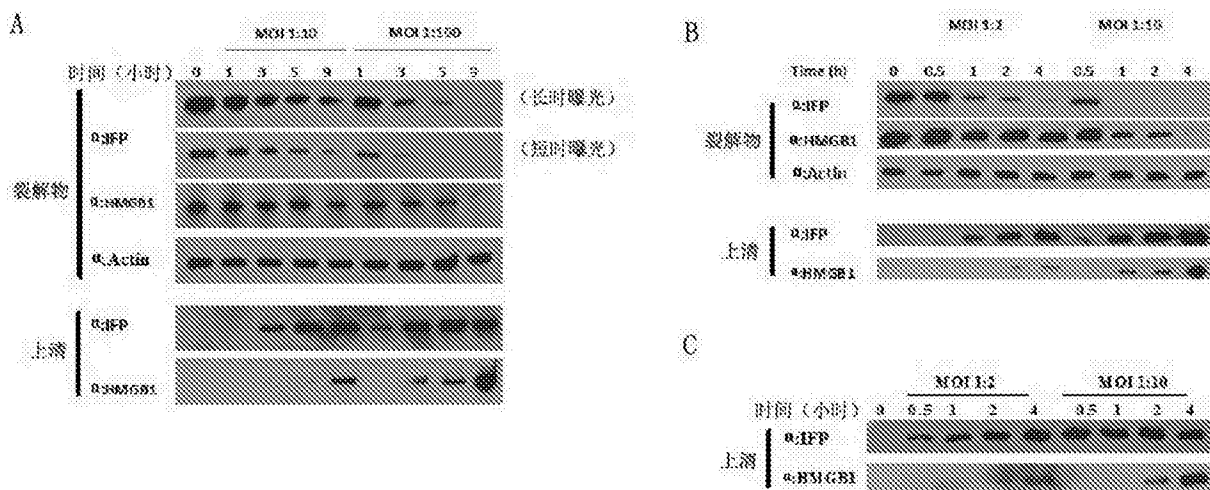


图18

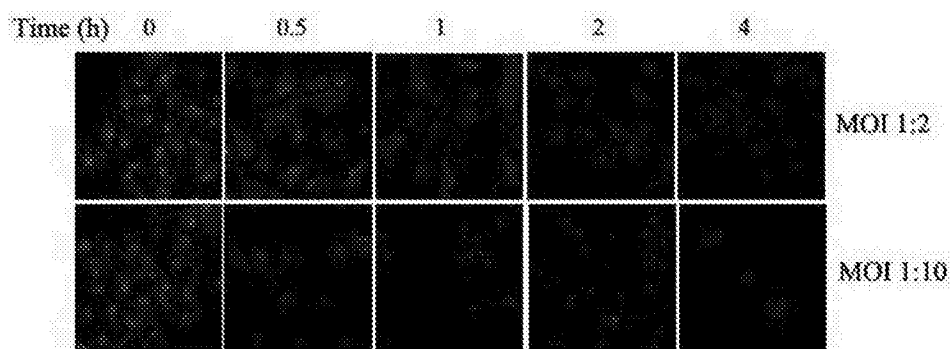


图19

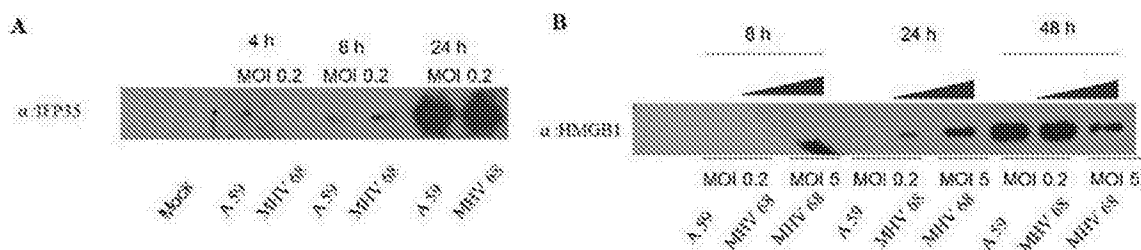


图20

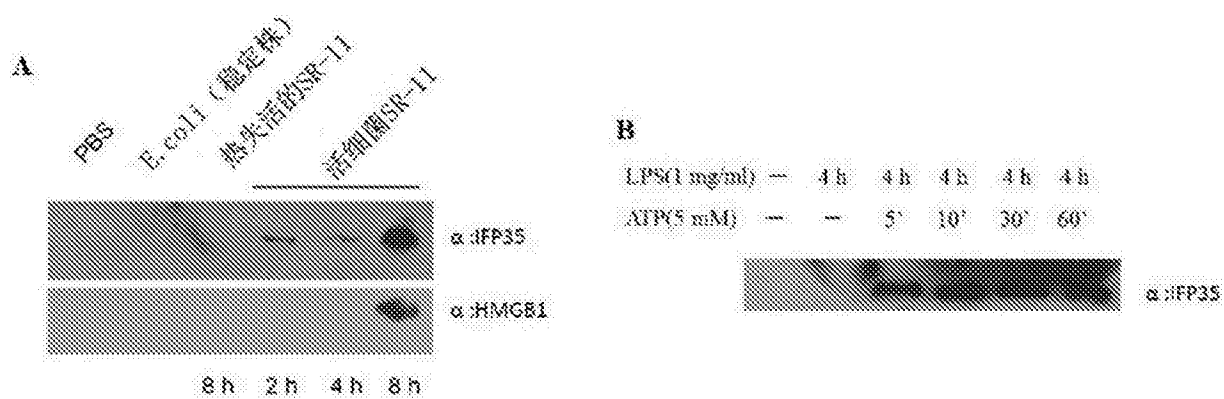


图21

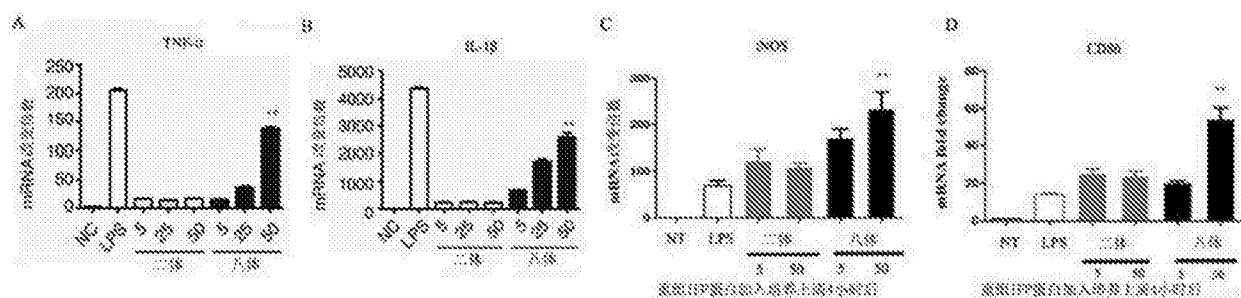


图22

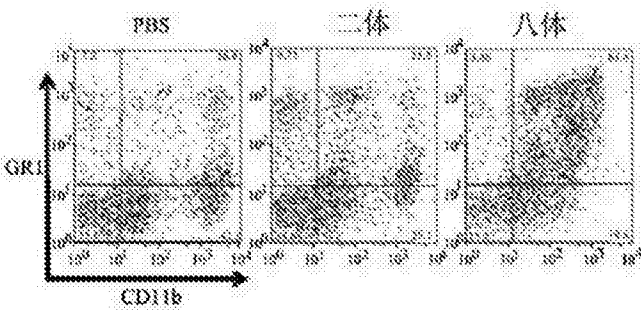


图23

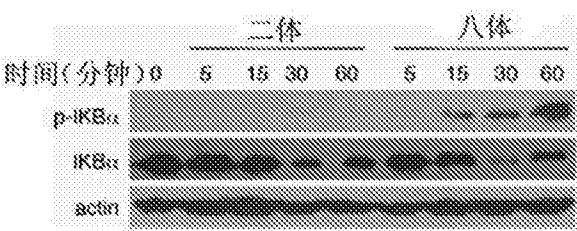


图24

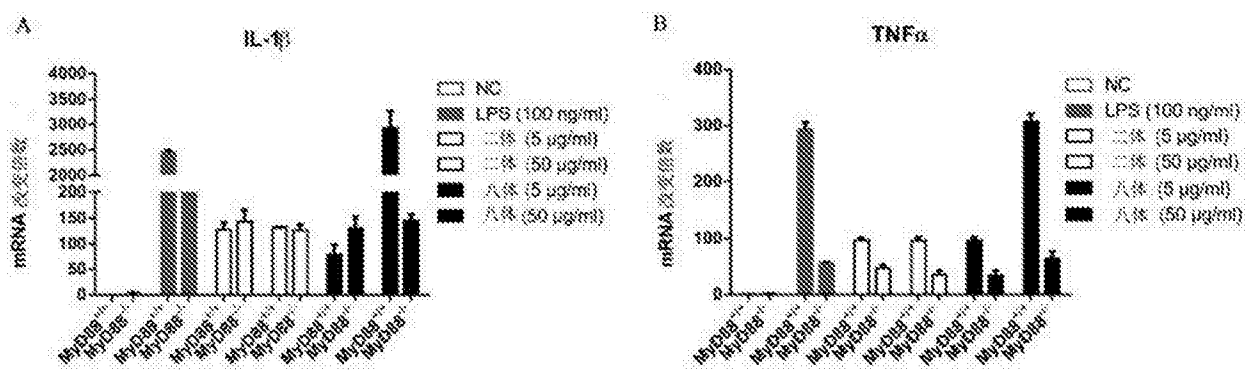


图25

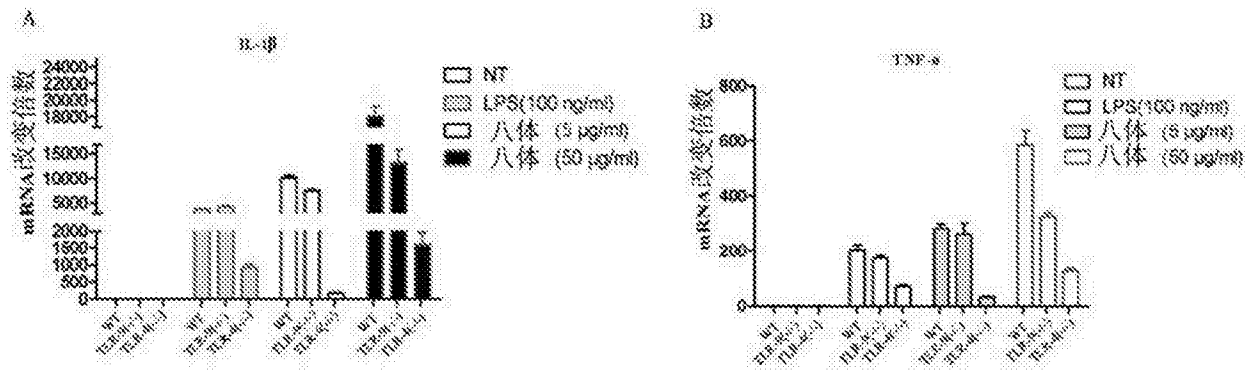


图26

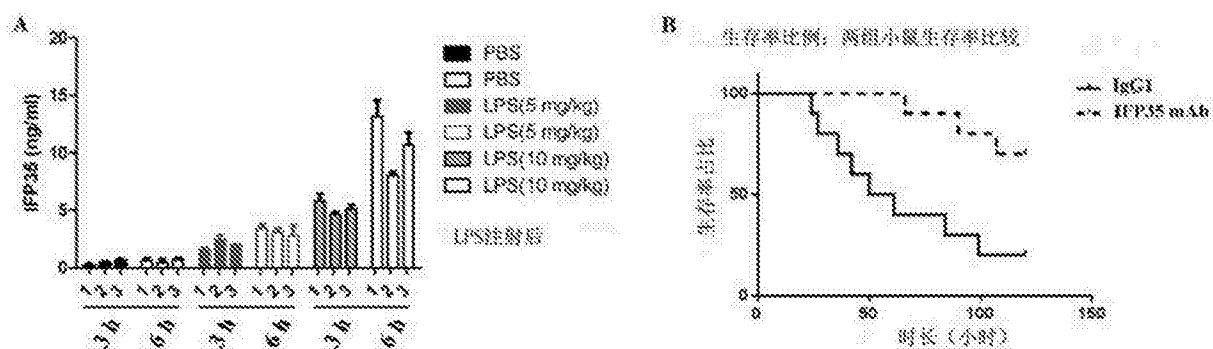


图27

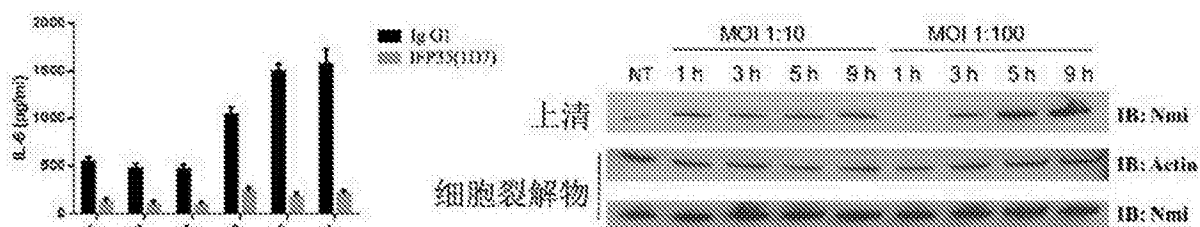


图 28

图 29

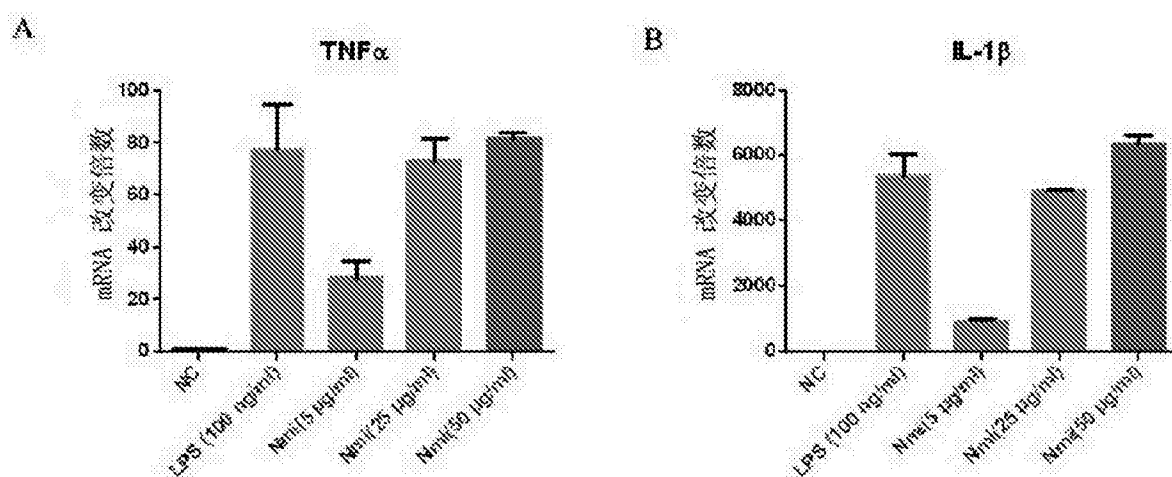


图30

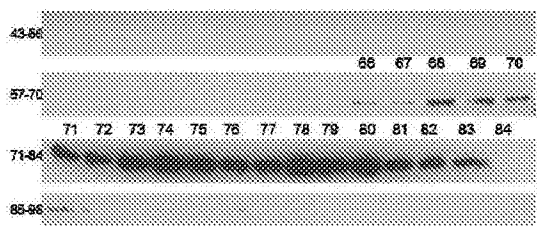


图31

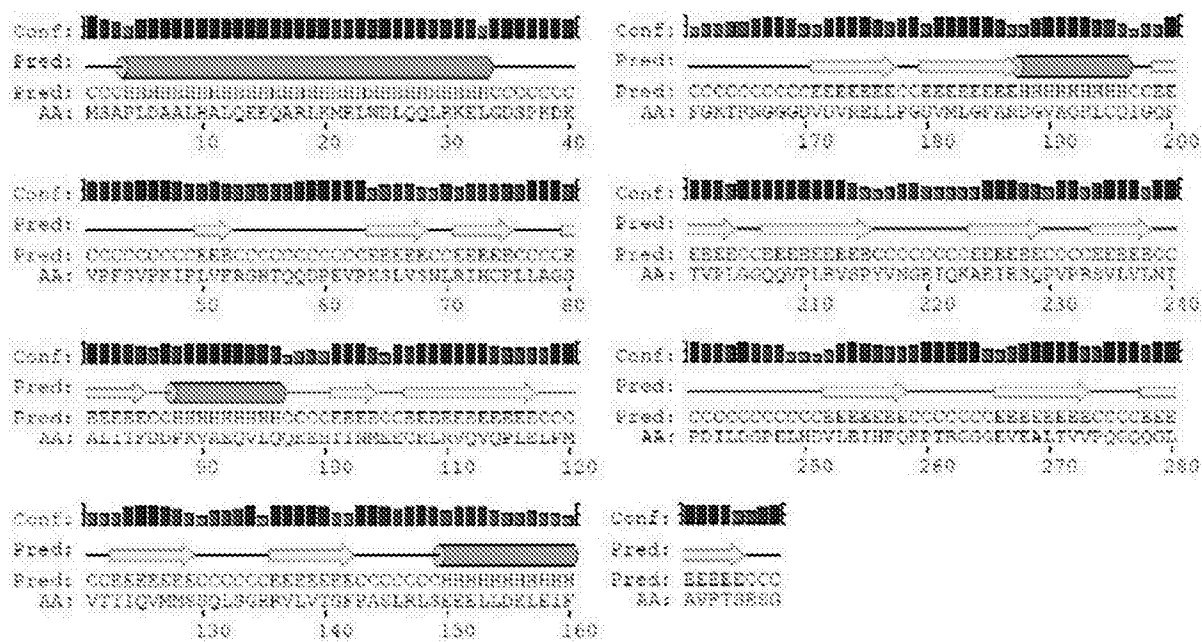


图32

77

82

83

85

TABLE 1 - continued									
Item	Code	Value	Unit	Item	Code	Value	Unit	Item	Code
AT001	001	1.00	1.00	AT001	001	1.00	1.00	AT001	001
AT002	002	1.00	1.00	AT002	002	1.00	1.00	AT002	002
AT003	003	1.00	1.00	AT003	003	1.00	1.00	AT003	003
AT004	004	1.00	1.00	AT004	004	1.00	1.00	AT004	004
AT005	005	1.00	1.00	AT005	005	1.00	1.00	AT005	005
AT006	006	1.00	1.00	AT006	006	1.00	1.00	AT006	006
AT007	007	1.00	1.00	AT007	007	1.00	1.00	AT007	007
AT008	008	1.00	1.00	AT008	008	1.00	1.00	AT008	008
AT009	009	1.00	1.00	AT009	009	1.00	1.00	AT009	009
AT010	010	1.00	1.00	AT010	010	1.00	1.00	AT010	010
AT011	011	1.00	1.00	AT011	011	1.00	1.00	AT011	011
AT012	012	1.00	1.00	AT012	012	1.00	1.00	AT012	012
AT013	013	1.00	1.00	AT013	013	1.00	1.00	AT013	013
AT014	014	1.00	1.00	AT014	014	1.00	1.00	AT014	014
AT015	015	1.00	1.00	AT015	015	1.00	1.00	AT015	015
AT016	016	1.00	1.00	AT016	016	1.00	1.00	AT016	016
AT017	017	1.00	1.00	AT017	017	1.00	1.00	AT017	017
AT018	018	1.00	1.00	AT018	018	1.00	1.00	AT018	018
AT019	019	1.00	1.00	AT019	019	1.00	1.00	AT019	019
AT020	020	1.00	1.00	AT020	020	1.00	1.00	AT020	020
AT021	021	1.00	1.00	AT021	021	1.00	1.00	AT021	021
AT022	022	1.00	1.00	AT022	022	1.00	1.00	AT022	022
AT023	023	1.00	1.00	AT023	023	1.00	1.00	AT023	023
AT024	024	1.00	1.00	AT024	024	1.00	1.00	AT024	024
AT025	025	1.00	1.00	AT025	025	1.00	1.00	AT025	025
AT026	026	1.00	1.00	AT026	026	1.00	1.00	AT026	026
AT027	027	1.00	1.00	AT027	027	1.00	1.00	AT027	027
AT028	028	1.00	1.00	AT028	028	1.00	1.00	AT028	028
AT029	029	1.00	1.00	AT029	029	1.00	1.00	AT029	029
AT030	030	1.00	1.00	AT030	030	1.00	1.00	AT030	030
AT031	031	1.00	1.00	AT031	031	1.00	1.00	AT031	031
AT032	032	1.00	1.00	AT032	032	1.00	1.00	AT032	032
AT033	033	1.00	1.00	AT033	033	1.00	1.00	AT033	033
AT034	034	1.00	1.00	AT034	034	1.00	1.00	AT034	034
AT035	035	1.00	1.00	AT035	035	1.00	1.00	AT035	035
AT036	036	1.00	1.00	AT036	036	1.00	1.00	AT036	036
AT037	037	1.00	1.00	AT037	037	1.00	1.00	AT037	037
AT038	038	1.00	1.00	AT038	038	1.00	1.00	AT038	038
AT039	039	1.00	1.00	AT039	039	1.00	1.00	AT039	039
AT040	040	1.00	1.00	AT040	040	1.00	1.00	AT040	040
AT041	041	1.00	1.00	AT041	041	1.00	1.00	AT041	041
AT042	042	1.00	1.00	AT042	042	1.00	1.00	AT042	042
AT043	043	1.00	1.00	AT043	043	1.00	1.00	AT043	043
AT044	044	1.00	1.00	AT044	044	1.00	1.00	AT044	044
AT045	045	1.00	1.00	AT045	045	1.00	1.00	AT045	045
AT046	046	1.00	1.00	AT046	046	1.00	1.00	AT046	046
AT047	047	1.00	1.00	AT047	047	1.00	1.00	AT047	047
AT048	048	1.00	1.00	AT048	048	1.00	1.00	AT048	048
AT049	049	1.00	1.00	AT049	049	1.00	1.00	AT049	049
AT050	050	1.00	1.00	AT050	050	1.00	1.00	AT050	050
AT051	051	1.00	1.00	AT051	051	1.00	1.00	AT051	051
AT052	052	1.00	1.00	AT052	052	1.00	1.00	AT052	052
AT053	053	1.00	1.00	AT053	053	1.00	1.00	AT053	053
AT054	054	1.00	1.00	AT054	054	1.00	1.00	AT054	054
AT055	055	1.00	1.00	AT055	055	1.00	1.00	AT055	055
AT056	056	1.00	1.00	AT056	056	1.00	1.00	AT056	056
AT057	057	1.00	1.00	AT057	057	1.00	1.00	AT057	057
AT058	058	1.00	1.00	AT058	058	1.00	1.00	AT058	058
AT059	059	1.00	1.00	AT059	059	1.00	1.00	AT059	059
AT060	060	1.00	1.00	AT060	060	1.00	1.00	AT060	060
AT061	061	1.00	1.00	AT061	061	1.00	1.00	AT061	061
AT062	062	1.00	1.00	AT062	062	1.00	1.00	AT062	062
AT063	063	1.00	1.00	AT063	063	1.00	1.00	AT063	063
AT064	064	1.00	1.00	AT064	064	1.00	1.00	AT064	064
AT065	065	1.00	1.00	AT065	065	1.00	1.00	AT065	065
AT066	066	1.00	1.00	AT066	066	1.00	1.00	AT066	066
AT067	067	1.00	1.00	AT067	067	1.00	1.00	AT067	067
AT068	068	1.00	1.00	AT068	068	1.00	1.00	AT068	068
AT069	069	1.00	1.00	AT069	069	1.00	1.00	AT069	069
AT070	070	1.00	1.00	AT070	070	1.00	1.00	AT070	070
AT071	071	1.00	1.00	AT071	071	1.00	1.00	AT071	071
AT072	072	1.00	1.00	AT072	072	1.00	1.00	AT072	072
AT073	073	1.00	1.00	AT073	073	1.00	1.00	AT073	073
AT074	074	1.00	1.00	AT074	074	1.00	1.00	AT074	074
AT075	075	1.00	1.00	AT075	075	1.00	1.00	AT075	075
AT076	076	1.00	1.00	AT076	076	1.00	1.00	AT076	076
AT077	077	1.00	1.00	AT077	077	1.00	1.00	AT077	077
AT078	078	1.00	1.00	AT078	078	1.00	1.00	AT078	078
AT079	079	1.00	1.00	AT079	079	1.00	1.00	AT079	079
AT080	080	1.00	1.00	AT080	080	1.00	1.00	AT080	080
AT081	081	1.00	1.00	AT081	081	1.00	1.00	AT081	081
AT082	082	1.00	1.00	AT082	082	1.00	1.00	AT082	082
AT083	083	1.00	1.00	AT083	083	1.00	1.00	AT083	083
AT084	084	1.00	1.00	AT084	084	1.00	1.00	AT084	084
AT085	085	1.00	1.00	AT085	085	1.00	1.00	AT085	085
AT086	086	1.00	1.00	AT086	086	1.00	1.00	AT086	086
AT087	087	1.00	1.00	AT087	087	1.00	1.00	AT087	087
AT088	088	1.00	1.00	AT088	088	1.00	1.00	AT088	088
AT089	089	1.00	1.00	AT089	089	1.00	1.00	AT089	089
AT090	090	1.00	1.00	AT090	090	1.00	1.00	AT090	090
AT091	091	1.00	1.00	AT091	091	1.00	1.00	AT091	091
AT092	092	1.00	1.00	AT092	092	1.00	1.00	AT092	092
AT093	093	1.00	1.00	AT093	093	1.00	1.00	AT093	093
AT094	094	1.00	1.00	AT094	094	1.00	1.00	AT094	094
AT095	095	1.00	1.00	AT095	095	1.00	1.00	AT095	095
AT096	096	1.00	1.00	AT096	096	1.00	1.00	AT096	096
AT097	097	1.00	1.00	AT097	097	1.00	1.00	AT097	097
AT098	098	1.00	1.00	AT098	098	1.00	1.00	AT098	098
AT099	099	1.00	1.00	AT099	099	1.00	1.00	AT099	099
AT100	100	1.00	1.00	AT100	100	1.00	1.00	AT100	100

108

