



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779461 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201780016917.2

(22)申请日 2017.01.31

(30)优先权数据

62/291,271 2016.02.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/015775 2017.01.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/136322 EN 2017.08.10

(71)申请人 朱正仑

地址 美国马萨诸塞州

申请人 高红

(72)发明人 朱正仑 高红

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理
有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨

(51)Int.Cl.

G12N 15/11(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

G12Q 1/68(2018.01)

G01N 33/566(2006.01)

C07H 21/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页
序列表6页

(54)发明名称

炎性疾病的诊断和治疗

(57)摘要

一种治疗受试者的炎性病征的方法,包括向有此需要的受试者施用用于抑制Hom-1表达的核酸分子。具体地,核酸分子是RNAi剂或反义吗啉代寡核苷酸。进一步公开了为受试者的炎性病征选择治疗剂的方法,或监测受试者中治疗剂对炎性病征的功效的方法,包括检测从受试者获得的发炎组织样品中Hom-1的表达水平。

1. 一种治疗受试者的炎性病征的方法,包括向需治疗的受试者施用用于抑制Hom-1表达的核酸分子。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述的核酸分子是RNAi剂或反义寡核苷酸。

3. 权利要求2所述的方法,其中所述的核酸分子是吗啉代寡核苷酸。

4. 权利要求3所述的方法,其中所述的吗啉代寡核苷酸具有SEQ ID NO.3、4、5或6所示的序列。

5. 权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述的核酸分子通过局部,口服,直肠内,鼻腔内,静脉内,关节内,结膜内,颅内,腹膜内,胸膜内,肌肉内,鞘内或皮下方式给药。

6. 权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述的核酸分子以未加载体的方式给药。

7. 权利要求1-6中任一项所述的方法,其中与对照水平相比,从受试者获得的发炎组织样品表达更高水平的Hom-1。

8. 权利要求1-6中任一项所述的方法,还包括在施用步骤之前,与对照水平相比,检测出从受试者获得的发炎组织样品中更高的Hom-1表达水平。

9. 权利要求8所述的方法,还包括在给药步骤后,检测从受试者获得的发炎组织样品中Hom-1或炎性细胞因子的表达水平。

10. 权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述对照水平对应于未发炎组织样品中Hom-1的表达水平。

11. 一种用于治疗炎性病征的组合物,所述的组合物包含用于抑制Hom-1表达的核酸分子和药学上可接受的载体。

12. 权利要求11所述的组合物,其中所述的核酸分子是具有SEQ ID NO.3、4、5或6所示序列的吗啉代寡核苷酸。

13. 权利要求11或12所述的组合物,其中所述组合物配制成用于局部,口服,直肠,鼻腔,静脉内,关节内,结膜,颅内,腹膜内,胸膜内,肌肉内,鞘内或皮下给药途径的制剂。

14. 一种确定炎性病征的治疗剂的方法,包括:

使发炎的组织样品与测试治疗剂接触;以及

检测组织样品中Hom-1的表达水平;

如果表达水平低于或等于对照水平,则测试治疗剂是炎性病征的候选治疗剂。

15. 一种在需要治疗的受试者中选择炎性病征的治疗剂的方法,包括:

使来自受试者的发炎组织样品与治疗剂接触;

与对照水平相比,检测组织样品中Hom-1的较低或相同表达水平;以及

将治疗剂给予受试者。

16. 一种在需要治疗的受试者中监测治疗剂对炎性病征功效的方法,包括:

检测受试者在给予治疗剂后从受试者获得的发炎组织样品中Hom-1的表达水平;

将检测到的水平与对照水平进行比较;以及

基于比较做出治疗决定,其中,如果检测到的水平高于对照水平,则继续向受试者施用治疗剂或不同的治疗剂。

17. 权利要求15-16中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是类固醇,非甾体抗炎药,免疫抑制剂。

18. 权利要求15-17中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是Hom-1抑制剂。

19. 权利要求15-18中任一项所述的方法,其中所述治疗剂是蛋白质,肽,肽模拟物,拟肽,细胞,抗体或其片段,小分子化合物,核酸分子或植物提取物。

20. 权利要求15-19中任一项所述的方法,其中所述对照水平对应于未发炎的组织样品或发炎的组织样品中Hom-1在与治疗剂接触之前的表达水平。

21. 一种治疗有此需要的受试者的炎性病症的方法,包括:

提供经过Hom-1抑制剂处理或含有表达Hom-1抑制剂的表达载体修饰的巨噬细胞,单核细胞或树突细胞,其中与对照水平相比,修饰的巨噬细胞,单核细胞或树突细胞表达较低水平的Hom-1;以及

向受试者施用有效量的经修饰的巨噬细胞,单核细胞或树突细胞。

22. 权利要求21所述的方法,其中所述的Hom-1抑制剂抑制Hom-1的表达。

23. 权利要求22所述的方法,其所述的中Hom-1抑制剂是RNAi剂或反义寡核苷酸。

24. 如权利要求21-23中任一项所述的方法,还包括,在提供步骤之前,从受试者获得的发炎组织样品中检测的Hom-1表达水平高于对照水平。

炎性疾病的诊断和治疗

背景技术

[0001] 组织巨噬细胞在宿主防御病原体入侵和免疫稳态中起着主要的作用。可塑性是巨噬细胞的特点。驻留在充满来自宿主细胞和微生物的信号的环境中，巨噬细胞可被激活以显示促炎(M1)表型或抗炎(M2)表型。巨噬细胞的异常分化和活化在炎症的发病机理中起主要作用。例如，在IBD患者中，显示M1促炎表型的粘膜CD14+巨噬细胞增加。由于其先天性和适应性免疫的中心执行者作用，巨噬细胞被视为控制自身免疫和炎症性疾病的理想靶标。然而，巨噬细胞可塑性是如何调节的仍然未被完全理解，并且可被操纵以调节巨噬细胞功能的细胞内在因子仍然在很大程度上未知。

发明内容

[0002] 在一方面，下面描述了治疗受试者炎性病症的方法，包括向要治疗的受试者施用用于抑制Hom-1表达的核酸分子。

[0003] 在一个实施方案中，所述核酸分子是RNAi剂或反义寡核苷酸。核酸分子可以通过局部，口服，直肠，鼻腔，静脉内，关节内，结膜，颅内，腹膜内，胸膜内，肌肉内，鞘内或皮下的方式给药。在一个实施方案中，对受试者给以未加载体的核酸分子。

[0004] 另一方面，本文描述了用于治疗炎性病症的组合物，该组合物包含用于抑制Hom-1表达的核酸分子和药学上可接受的载体。在一个实施方案中，核酸分子是具有SEQ ID NO: 3、4、5或6所示序列的吗啉代寡核苷酸。该组合物可以配制成用于局部，口服，直肠，鼻，静脉内，关节内，结膜，颅内，腹膜内，胸膜内，肌肉内，鞘内或皮下等给药途径的剂型来给药。在一个实施方案中，核酸分子(例如具有SEQ ID NO: 3、4、5或6所示序列的吗啉代寡核苷酸)是裸核酸分子。

[0005] 在另一方面，本文描述了炎性病症治疗剂的鉴定方法。它包括使发炎的组织样品与测试治疗剂接触；并检测组织样品中Hom-1的表达水平。如果表达水平低于或等于对照水平，则测试治疗剂是炎性病症的候选治疗剂。

[0006] 在一个方面，下面描述了在有此需要的受试者中选择炎性病症的治疗剂的方法，包括使来自受试者的发炎组织样品与治疗剂接触；检测组织样本中的Hom-1表达水平较低或与对照具有相同的表达水平；并将治疗剂给予受试者。

[0007] 另一方面，本文考虑了监测治疗剂对需治疗受试者中的炎性病症的功效的方法，包括检测受试者在给药后获得的发炎组织样品中Hom-1的表达水平。将检测到的水平与对照水平进行比较；基于这个比较制定下一步治疗方案，如果检测到的水平高于对照水平，则继续向受试者施用治疗剂或施用不同的治疗剂。

[0008] 另一个方面，本文描述了处理需治疗受试者的炎性病症的方法。包括提供已用Hom-1抑制剂处理，或含有用于表达Hom-1抑制剂的表达载体的巨噬细胞，单核细胞或树突细胞，其中经修饰的巨噬细胞，单核细胞或树突细胞表达与对照水平相比具有较低水平的Hom-1；向受试者施用有效量的经修饰的巨噬细胞，单核细胞或树突细胞。在一个实施方案中，该方法包括在提供步骤之前，从受试者获得的发炎组织样品中检测的Hom-1表达水平高

于对照水平。

[0009] 在下面的描述中阐述了一个或多个实施例的细节。实施例的其他特征,目的和优点将从说明书以及权利要求书中显而易见。

具体实施方式

[0010] 意外地发现,敲除组织巨噬细胞中的Hom-1表达可以使组织发炎并保护粘膜上皮细胞的活力。

[0011] Hom-1是人类同源框转录因子,是经典Wnt信号传导的拮抗剂。Hom-1的核酸序列(SEQ ID NO.1)及其编码的氨基酸序列(SEQ ID NO.2)如下所示:

[0012]

acctggccgccatgcgctctctctctccccacctgtggcccgcagcagctctccagcttggctccgtggactggctctccc
agagcagctgtctcagggccgacccacacccccaggectgcccgaacttctccctggggagcctccctggcccaggccagacatccgg
cgccccgggagccccctcaggccgtcagcatcaaggaggccgcccgggtctcaaatctgcctgcgccggagaggaccatggccgg
ggtgagtaaggagccaaataccttggggccccctgttcgcacagccttaccatggagcaggtccgcaccttggaggcgtcttc
cagcaccaccagtacctgagccctctggagcgggaagaggtggccaggagatgcagctctcagaggtccagataaaaacctggtt
tcagaatgcccgcatgaaacacaaacggcaaatgcaggacccccagctgcacagcccccttctcgggtctctccatgcgccccagc
tttctactcaacgtcttctggccttgccaatggcctgcagctgctgtgcccttgggcaaccctgtccgggccccaggctctgatctgccc
ectggctccttctgggtctctgccaagtggcacaagaggccctggcatctcgggagcttctgctcgggcagcctctggcgctcc
acccccctaccccaggccggccttctgtgggaccagccctgtccacggggccccggggcctgtgtgctatgccacagacggggga

短发夹RNA (shRNA)。反义寡核苷酸通常是具有可与靶核酸分子结合的序列的单链DNA, RNA或其类似物。

[0020] 抗Hom-1核酸分子可以通过任何给药途径给予受试者, 例如局部, 口服, 直肠, 鼻, 静脉内, 关节内, 结膜, 颅内, 腹膜内, 胸膜内, 肌肉内, 鞘内或皮下等给药途径。可以基于炎症部位选择途径。含有抗-Hom-1核酸分子的药物组合物可以配制成用于任何给药途径的剂型, 例如, 可注射溶液, 丸剂, 胶囊, 滴眼剂, 喷雾剂, 吸入剂, 局部乳膏或凝胶剂或气雾剂等。

[0021] 在一个实施方案中, 抗-Hom-1核酸分子是未加载体的。换句话说, 没有递送载体如脂质体或病毒载体与核酸分子一起使用。

[0022] 在向受试者施用任何Hom-1抑制剂之前, 可以测试受试者以确定与对照相比他或她是否具有升高的Hom-1表达水平和/或升高的炎性细胞因子的表达水平。在一个实施方案中, 在从受试者获得的发炎组织样品中检测表达水平。可以用Hom-1抑制剂治疗具有增加的Hom-1表达水平的受试者。对照水平可以是未发炎组织中典型的Hom-1表达水平, 或没有炎性病症的受试者, 或在待治疗的受试者中未发炎的组织中的表达水平。

[0023] “受试者”是指人和非人动物。“治疗”或“治疗”是指向患有疾病的受试者施用化合物或药剂, 目的是治愈, 缓解, 缓解, 补救, 延缓疾病的发作, 或减轻疾病、疾病的症状, 疾病继发的疾病状态, 或疾病的倾向。“有效量”是指能够在治疗的受试者中产生医学上期望的结果的化合物的量。治疗方法可以单独进行或与其他药物或疗法联合进行。

[0024] 本文还描述了鉴定炎性病症治疗剂的筛选方法。该方法包括使发炎的组织样品与测试治疗剂接触并检测组织样品中Hom-1的表达水平。如果表达水平低于或等于对照水平, 则测试治疗剂是炎性病症的候选治疗剂。

[0025] 还描述了在需治疗受试者中选择炎性病症治疗剂的方法。该方法包括使得自受试者的发炎组织样品与治疗剂接触, 检测组织样品中具有与对照水平相比较低或相同的Hom-1表达水平, 并将治疗剂给予受试者。

[0026] 进一步描述了在有此需要的受试者中监测治疗剂对炎性病症的功效的方法。该方法包括在将治疗剂施用于受试者后, 检测从受试者获得的发炎组织样品中的Hom-1的表达水平, 将检测的水平与对照水平进行比较, 并基于该比较做出治疗决定。如果检测到的水平低于对照水平, 则表明治疗剂对于治疗受试者的炎症是有效的。如果检测到的水平与对照水平相同或高于对照水平, 则可以决定继续给予相同的治疗或尝试不同的治疗。

[0027] 治疗或测试治疗剂可以是蛋白质, 肽, 肽模拟物, 拟肽, 细胞, 抗体或其片段, 小分子化合物, 核酸分子或植物提取物。在一个实施方案中, 治疗或测试治疗剂可以是类固醇, 甾体抗炎药或免疫抑制剂。

[0028] 在上述筛选, 选择或监测方法中, 对照水平可以是代表非发炎组织中Hom-1表达水平的水平。它也可以是发炎组织样品中Hom-1在与治疗或测试治疗剂接触之前的表达水平。有经验的人员将能够确定合适的对照水平。

[0029] 本文在一方面描述了使用修饰的巨噬细胞, 单核细胞或树突细胞治疗炎性病症的方法。该方法包括提供已经用Hom-1抑制剂处理, 或其中含有用于表达Hom-1抑制剂的表达载体修饰的巨噬细胞, 单核细胞或树突细胞。与对照水平相比, 修饰的巨噬细胞, 单核细胞或树突细胞表达较低水平的Hom-1。将有效量的经修饰的巨噬细胞, 单核细胞或树突细胞施用于患有炎性疾病的受试者。

[0030] Hom-1抑制剂可以是蛋白质,肽,肽模拟物,拟肽,细胞,抗体或其片段,小分子化合物,核酸分子或植物提取物。在一个实施方案中,抑制剂是RNAi剂或反义寡核苷酸(例如吗啉代寡核苷酸)。

[0031] 在将修饰的细胞施用于受试者之前,可以确定从受试者获得的样品(例如,发炎的组织样品)中Hom-1的表达水平。如果表达水平高于对照水平,则认为受试者适合于治疗。对照水平可以是代表未发炎组织中的水平或在从待治疗的受试者获得的非发炎组织样品中检测到的水平。同样,熟练的从业者将能够确定合适的控制水平。

[0032] 可以在mRNA水平或蛋白质水平确定Hom-1表达水平。测量mRNA水平和蛋白质水平的方法是本领域熟知的。

[0033] 在本文所述的任何方法中,除了检测Hom-1的表达水平作为炎症的指示(例如,炎症的存在或程度)之外,或作为另外一种选择,检测促炎性细胞因子的表达与/或分泌,抗炎细胞因子的表达与/或分泌,M1或M2巨噬细胞标记物的表达,DC分化和活化标志物的表达也可用于测量炎症。

[0034] 炎症病症可表征为局部或全身,急性或慢性的。炎症性疾病包括但不限于炎性皮肤病(例如,皮炎,牛皮癣,湿疹,特应性皮炎,过敏性接触性皮炎,荨麻疹,坏死性血管炎,皮肤血管炎,过敏性血管炎,嗜酸性粒细胞性肌炎,多发性肌炎,皮肌炎或嗜酸性筋膜炎),炎症性肠病(如克罗恩病和溃疡性结肠炎),急性呼吸窘迫综合征,暴发性肝炎,胰腺炎,过敏性肺病(如过敏性肺炎,嗜酸性粒细胞性肺炎,迟发型超敏反应,间质性肺病或ILD,特发性肺纤维化和类风湿性关节炎相关的ILD),哮喘,COPD,过敏性鼻炎,类风湿性关节炎,银屑病关节炎,系统性红斑狼疮,重症肌无力,青少年糖尿病,肾小球肾炎,自身免疫性甲状腺炎,强直性脊柱炎,系统性硬化症,多发性硬化症,原发性侧索硬化,肌萎缩侧索硬化症,过敏性疾病,全身性过敏症,过敏反应,全身炎症,药物过敏,昆虫叮咬过敏,同种异体移植排斥反应,移植物抗宿主病,干燥综合征,人类免疫缺陷,病毒感染,动脉粥样硬化,高血压,糖尿病,慢性肾脏疾病,眼部炎症性疾病,葡萄膜炎和结膜炎,神经炎。

[0035] 熟练的从业者将能够确定一个人是否患有炎症性疾病。从怀疑患有炎症性疾病的受试者获得的样品(例如组织,细胞或体液样品)中Hom-1的表达水平也可用作诊断工具。

[0036] 以下具体示例应被解释为仅是说明性的,并且不以任何方式限制本公开的其余部分。无需进一步详细说明,相信本领域技术人员基于本文的描述可以最充分地利用本发明。

[0037] 实施例

[0038] 巨噬细胞是先天性和适应性免疫的关键调节因子。巨噬细胞可塑性如何受细胞内在因素调节尚不完全清楚。下面描述的数据表明人类同源框异形框转录因子Hom-1在将巨噬细胞极化指向M1表型中起关键作用。在从IBD患者的发炎粘膜分离的组织巨噬细胞中, Hom-1表达异常升高。使用整块培养模型,我们显示通过吗啉寡核苷酸敲低组织巨噬细胞中的Hom-1表达可以减轻组织炎症并保护粘膜上皮细胞的活力。总之,我们的数据表明Hom-1可以作为治疗炎症性疾病的新靶点。

[0039] 在从发炎的胃肠粘膜分离的巨噬细胞中Hom-1表达上调

[0040] 使用体外单核细胞衍生的巨噬细胞模型,我们显示Hom-1控制单核细胞向巨噬细胞分化和促炎激活。为了探索Hom-1在组织巨噬细胞分化和活化中的潜在作用,我们检测了从IBD患者的粘膜分离的粘膜巨噬细胞中的Hom-1表达。我们发现,与从相同患者的正常粘

膜分离的对照巨噬细胞相比,从炎症粘膜分离的巨噬细胞中Hom-1表达显著升高。使用FACAS和ELISA分析,我们发现,与Hom-1的升高表达平行,从发炎的粘膜中分离出来的巨噬细胞中,M1表面标志物如CD40,CD80和CD86的表达以及M1促炎细胞因子的表达和分泌也有升高。此外,我们发现活性氧(ROS)和一氧化氮(NO)的表达在从炎症粘膜分离的巨噬细胞中也升高。

[0041] Hom-1调节粘膜巨噬细胞可塑性并使粘膜巨噬细胞向M1表型极化

[0042] 可塑性是巨噬细胞的标志。出于对环境诱因的响应,巨噬细胞显示出从经典的促炎M1表型到具有显著特征的各种M2表型的谱系分布。皮质类固醇已广泛用于治疗炎症性疾病,并已显示其诱导巨噬细胞的M2表型。为了确定Hom-1是否在调节粘膜巨噬细胞可塑性中发挥作用,我们检测了皮质类固醇对Hom-1表达的影响。用prednisolone孵育粘膜CD14巨噬细胞导致Hom-1表达水平显著降低和M1细胞因子IL12的特征性减少分泌,但M2细胞因子IL10的分泌增加。与Hom-1在调节巨噬细胞可塑性中的潜在作用一致,我们发现转染GFP而不是转染GFP-Hom-1的粘膜巨噬细胞的形态可以通过PD诱导以显示特征性的整合表型。对表达GFP或GFP-Hom-1的巨噬细胞的CD80细胞表面表达进行FACS分析,以及对培养基中的IL12分泌情况进行ELISA分析显示, Hom-1使巨噬细胞对PD诱导的CD80减少和IL12分泌具有抗性。为了进一步探索Hom-1是否调节巨噬细胞极化,我们使用如前所述的体外巨噬细胞分化模型检测诱导的M2至M1开关期间的Hom-1表达。我们发现在诱导M2到M1极化期间Hom-1表达升高。为了确定Hom-1在巨噬细胞极化中的关键调节作用,我们检测了敲低Hom-1在LPS诱导的M2中对M1表型转换的影响。我们发现Hom-1的下调使得巨噬细胞对LPS诱导的M1极化具有抗性,这表明Hom-1在该过程中具有关键的调节作用。为了进一步确定Hom-1在巨噬细胞极化中的功能,我们研究了Hom-1在M2巨噬细胞中的异位表达的影响,并发现Hom-1的过表达导致M1标记物CD 80表面表达的显著增加;以及M1细胞因子,IL1b, IL12和TNF α 的分泌增加。总之,数据表明Hom-1在调节巨噬细胞可塑性和使巨噬细胞向M1表型极化方面起关键作用。

[0043] Hom-1差异调节M1和M2基因的表达

[0044] 为了探讨Hom-1调节巨噬细胞极化的潜在机制,我们研究了Hom-1的异位表达对表达特征M1和M2基因的影响。我们发现Hom-1表达促进M1基因(如IL1, IL12和TNF α)的表达,但抑制M2基因(如IL10和TGFb)的表达。结合我们先前的发现, Hom-1表达是M1基因表达所必需的,而不是测试的M2基因的表达,我们的数据表明Hom-1通过极化M1和M2基因的表达来调节巨噬细胞的可塑性。

[0045] 在组织炎症的发病机制中靶向Hom-1调节的巨噬细胞的可塑性

[0046] 为了进一步确定Hom-1调节的巨噬细胞是否可以靶向减轻组织炎症,我们使用从溃疡性结肠炎(UC)患者的发炎或正常粘膜获得的组织的整块培养物。我们发现,与临床发现一致,炎症细胞因子如TNF α , IL1和硝酸盐的分泌在发炎组织的培养物中显著升高。然后我们将抗-Hom-1吗啉代寡核苷酸(MO)添加到组织培养物中并检查它是否可以下调粘膜巨噬细胞中Hom-1的表达。我们发现Hom-1MO有效抑制整块组织培养物中巨噬细胞中的Hom-1表达。为了进一步探索Hom-1MO对组织炎症的影响,我们使用ELISA测定检查了在用Hom-1孵育整块组织期间TNF α 的浓度。我们发现Hom-1MO以剂量依赖性方式减少培养物中TNF α 的量。为了进一步探讨Hom-1MO对其他促炎细胞因子分泌的影响,我们检测了Hom-1MO对IL1和硝

酸盐分泌的影响,发现与TNF α 类似,Hom-1MO在整块培养物中发挥对这些促炎细胞因子的强烈抑制作用。由于离体整块培养物可以反映体内组织微环境,我们的数据表明Hom-1MO可以靶向组织巨噬细胞以减轻组织炎症。

[0047] Hom-1MO拯救发炎组织炎症中上皮细胞的活力

[0048] 导致粘膜溃疡的上皮细胞的凋亡是IBD的标志。组织炎症被认为是粘膜上皮细胞凋亡的主要触发因素。使用整块组织培养,我们发现与正常对照组织中上皮细胞的凋亡率相比,从发炎粘膜分离的组织中粘膜上皮细胞的凋亡率更高。当将Hom-1MO添加到整块组织培养物中时,我们发现Hom-1MO而不是对照MO对组织培养中上皮细胞的凋亡发挥强烈的抑制作用。结合我们的研究结果,Hom-1MO可以减轻组织炎症,数据表明Hom-1MO可以作为治疗炎症的药剂。

[0049] 单核细胞分离和培养

[0050] 采用Ficoll密度梯度离心分离来自波士顿儿童医院的健康成人供体的外周血单核细胞(PBMC)。人体材料的实验按照布莱根妇女医院机构审查委员会批准的指导方针进行。使用抗CD14包被的微珠(MiltenyiBiotec)从PBMC中纯化CD14⁺单核细胞。通过流式细胞术分析,新鲜分离的CD14⁺单核细胞的纯度大于95%。用含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基以 1×10^6 个细胞/ml在12孔板中培养单核细胞。M-CSF,GM-CSF和IL3购自PeproTech并以100ng/ml的终浓度使用。每2或3天将细胞因子加入培养物中。

[0051] RNA干扰

[0052] 根据制造商的说明,使用人单核细胞核转染试剂盒(Lonza)转染人原代单核细胞。简而言之,将 5×10^6 个单核细胞重悬浮于100 μ l含有0.5nmolHom-1siRNA的核融合物溶液中

[0053] 正向:5'-UUCAGAAUCGCCGCAUGAAACACAAACGG-3'(SEQ ID NO.7);

[0054] 反向:5'-CCGUUUGUGUUUCAUGCGGCGAUUCUGAA-3'(SEQ ID NO.8);

[0055] 或非有效GFP siRNA,正向:5'-UGACCACCCUGACCUACGGCGUGCAGUGC-3'(SEQ ID NO.9);

[0056] 反向:5'-GCACUGCACGCCGUAGGUCAGGGUGGUCA-3'(SEQ ID NO.10))

[0057] 电穿孔前使用nucleofector II Device(Lonza)。然后立即从装置中取出细胞,并与含有2mM谷氨酰胺和10%FBS的1ml预热的人单核细胞核转染培养基一起温育过夜。然后将细胞重悬浮于完全RPMI培养基中并用合适的细胞因子处理以诱导分化成巨噬细胞。类似地,按照制造商的说明,用人巨噬细胞核转染试剂盒(Lonza)转染源自单核细胞的巨噬细胞。

[0058] FACS分析

[0059] 在用荧光染料缀合的抗体免疫标记细胞后,使用流式细胞术进行单核细胞/巨噬细胞的表型分析。使用以下抗体:PE缀合的抗CD71,CD11b,CD11c,CD16,CD64,CD80,CD86,HLA-DR,CD14,TLR4,IL1- β 和TNF- α ,以及FITC缀合的抗CD40,CD36(eBioscience公司);FITC缀合的抗甘露糖受体(MR)和未缀合的小鼠抗MCSFR(R&D Systems)。同位素对照标记平行进行。按供应商的建议稀释抗体。将针对小鼠IgG抗体的PE缀合的兔用于二次M-CSFR染色。使用CellQuest软件,用FACScan流式细胞仪(BD Bioscience)分析标记的细胞。结果表示为阳性细胞的百分比与/或减去用同种型对照抗体获得的MFI后平均荧光强度(MFI)值。

[0060] RT-PCR

[0061] 通过TRIzol试剂分离总RNA,并使用等量的RNA根据制造商的方案用SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) 进行第一链cDNA合成。为了用常规PCR扩增Hom-1cDNA,按照制造商的说明使用AccuPrimeTMTaq DNA聚合酶系统 (Invitrogen)。在2%琼脂糖凝胶上分离PCR产物,并用溴化乙锭染色。GAPDH用作内部对照。我们用SYBR Green在一个LightCycler® (480Real-Time PCR System; Roche) 上进行Hom-1和细胞因子cDNA的定量测量。

[0062] 细胞因子测量

[0063] 使用从eBiosciences获得的ELISA试剂盒定量大肠杆菌LPS (Sigma) 和IFN- γ (PeproTech) 处理的巨噬细胞,或LPS处理的U937细胞的上清液中IL-1 β 和TNF- α 和IL12p70的水平。根据制造商的说明进行分析。

[0064] 检测活性氧 (ROS) 和一氧化氮 (NO)

[0065] 使用Image-iT®LIVE绿色活性氧物质检测试剂盒 (Invitrogen) 基本上按照制造商的说明检测活化的巨噬细胞中的ROS水平,不同的是通过荧光显微镜和流式细胞术分析结果。根据制造商提供的方案,由Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (Invitrogen) 测定NO水平。

[0066] 细胞染色

[0067] Wright-Giemsa染色,是根据制造商的说明采用来自Sigma的染色试剂盒。

[0068] 统计分析

[0069] 使用配对Student's t检验 (双尾) 和Wilcoxon秩和检验分析数据。 $P < 0.05$ 的差异被认为具有统计学意义。

[0070] 其他实施例

[0071] 本说明书中公开的所有特征可以以任何特征进行组合。本说明书中公开的每个特征可以由用于相同,等同或类似目的的替代特征代替。因此,除非另有明确说明,否则所公开的每个特征仅是一系列等效或类似特征的示例。

[0072] 根据以上描述,本领域技术人员可以容易地确定所描述的实施例的基本特征,并且在不脱离其精神和范围的情况下,可以对实施例进行各种改变和修改以使其适应各种用途和条件。因此,其他实施例也在权利要求内。

序列表

<110> 朱正仑

高红

<120> 炎症疾病的诊断和治疗

<130> 218008-0006PCT

<150> US 62/291,271

<151> 2016-02-04

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2428

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (12) .. (788)

<223> Hom-1

<400> 1

```

acctggccgc c atg cgc ctc tcc tcc tcc cca cct cgt ggc ccg cag cag 50
      Met Arg Leu Ser Ser Ser Pro Pro Arg Gly Pro Gln Gln
          1             5             10
ctc tcc agc ttt ggc tcc gtg gac tgg ctc tcc cag agc agc tgc tca 98
Leu Ser Ser Phe Gly Ser Val Asp Trp Leu Ser Gln Ser Ser Cys Ser
    15             20             25
ggg ccg acc cac acc ccc agg cct gcc gac ttc tcc ctg ggg agc ctc 146
Gly Pro Thr His Thr Pro Arg Pro Ala Asp Phe Ser Leu Gly Ser Leu
    30             35             40             45
cct ggc cca ggc cag aca tcc ggc gcc cgg gag ccc cct cag gcc gtc 194
Pro Gly Pro Gly Gln Thr Ser Gly Ala Arg Glu Pro Pro Gln Ala Val
          50             55             60
agc atc aag gag gcc gcc ggg tcc tca aat ctg cct gcg ccg gag agg 242
Ser Ile Lys Glu Ala Ala Gly Ser Ser Asn Leu Pro Ala Pro Glu Arg
          65             70             75
acc atg gcc ggg ttg agt aag gag cca aat acc ttg cgg gcc ccc cgt 290
Thr Met Ala Gly Leu Ser Lys Glu Pro Asn Thr Leu Arg Ala Pro Arg
          80             85             90
gtc cgc aca gcc ttc acc atg gag cag gtc cgc acc ttg gag ggc gtc 338
Val Arg Thr Ala Phe Thr Met Glu Gln Val Arg Thr Leu Glu Gly Val

```

95	100	105	
ttc cag cac cac cag tac ctg agc cct ctg gag cgg aag agg ctg gcc			386
Phe Gln His His Gln Tyr Leu Ser Pro Leu Glu Arg Lys Arg Leu Ala			
110	115	120	125
agg gag atg cag ctc tca gag gtc cag ata aaa acc tgg ttt cag aat			434
Arg Glu Met Gln Leu Ser Glu Val Gln Ile Lys Thr Trp Phe Gln Asn			
	130	135	140
cgc cgc atg aaa cac aaa cgg caa atg cag gac ccc cag ctg cac agc			482
Arg Arg Met Lys His Lys Arg Gln Met Gln Asp Pro Gln Leu His Ser			
	145	150	155
ccc ttc tcg ggg tet ctc cat gcg ccc cca get ttc tac tea acg tet			530
Pro Phe Ser Gly Ser Leu His Ala Pro Pro Ala Phe Tyr Ser Thr Ser			
	160	165	170
tct ggc ctt gcc aat ggc ctg cag ctg ctg tgc cct tgg gca ccc ctg			578
Ser Gly Leu Ala Asn Gly Leu Gln Leu Leu Cys Pro Trp Ala Pro Leu			
	175	180	185
tcc ggg ccc cag get ctg atg ctg ccc cct ggc tcc ttc tgg ggt ctc			626
Ser Gly Pro Gln Ala Leu Met Leu Pro Pro Gly Ser Phe Trp Gly Leu			
190	195	200	205
tgc caa gtg gca caa gag gcc ctg gca tet gcg gga get tcc tgc tgc			674
Cys Gln Val Ala Gln Glu Ala Leu Ala Ser Ala Gly Ala Ser Cys Cys			
	210	215	220
ggg cag cct ctg gcg tcc cac ccc cct acc cca ggc cgg cct tcg ctg			722
Gly Gln Pro Leu Ala Ser His Pro Pro Thr Pro Gly Arg Pro Ser Leu			
	225	230	235
gga cca gcc ctg tcc acg ggg ccc cgg ggc ctg tgt gct atg cca cag			770
Gly Pro Ala Leu Ser Thr Gly Pro Arg Gly Leu Cys Ala Met Pro Gln			
	240	245	250
acg ggg gat gca ttt tga ggaggeacct ctgactcecca cactcgcggt			818
Thr Gly Asp Ala Phe			
255			
cttgctgata gcacctgget cctacctgga ggaactcagtt gttctgttta cactctggtg			878
gcacctctca ccctgacceca cacaaagggt ctggagatta ctggagaata tatataaata			938
tatatatgta cgtatatatg taaatacaca tatacgtata tataaatata tatatacata			998
tgtgtgtgta tatatatata tatttttttt ttttttttt tttttgagac ggagtgttgc			1058
tctgtcacc aggetggagt gcaatgacgc aatctcgget cactgcaacc tccgectct			1118
gggttcaagc gattctccag cctcagcctc ccgagtagct gggattacag acaccgcca			1178
ccacgcccgg ctaatttttt ctatttttag tagaaatggg gtttcacat gttagccagg			1238
ctggtctcaa actcctgacc ctgtgatccg cccgectcgg cctcccaaag tgctgggatt			1298

acaggcatga gccactgcac ccggccctga gaatatattt attaaagcca cctcttcaact 1358
 gaaagttacc gaaagagtcg gtttaggaag gaaacgaagg gtcagtgaac agagtcaaat 1418
 gcagaagtgg gcttgtcatg ggtagggcctt tcggcgtacg ataaaaggat catttgtttt 1478
 ttaaaagggg ttggaaaaac tggttttcca gttggaaaca gtaaaggttg taagctttgt 1538
 gtgtacaaaa gaaaacaggg aatgcaggtg tgtttatagc gttgtggttc aagtccctct 1598
 taacaagaac tccaaagctg gaaagcagga gggaacaaag gtgaacatga aggcgaggat 1658
 gctggggccc tgcagtgcgc tctaggtgtg gcgtgagccg ggactgtacc cacagcttgc 1718
 tgagggctgc tcttcttggg ccagggaaag cagggcagcc gggacctgcg gctgtgcctg 1778
 gactgaagct gtcccgcagg tccccacct ccaacacgtg ctcacctgc cccctcctcg 1838
 cagcagcctc gggacaaaaac aatgactcaa ggacagcact tctcgcagaa ggtctggaag 1898
 tgcccagaat gggaggcacg gaagcccctc ccggggagga ctcccgcgtt gatggacctg 1958
 tcttgggtgca gactcctgac tgcgtgcatg aaacctgaga caagtgcaat tcttccatg 2018
 tcgccccaga gtgcccagga ggcaggcagt gcgggggtgcc caggcagacg ggttcagcct 2078
 gcagaactgg aggcgacctg tgaaaccac ccgggcaccc caacaggaac agaagcgtgg 2138
 tctgcggct gcgtccccag cgagtttcc tttccccttg ctggtttctc cttgttgta 2198
 agtgtttaca actggcatgt gcttttaaac gtcaggtgaa aggggaacag ctgctgtaca 2258
 tcgtcctggc gaggtagaat gtgacagaag cctgggcgag gccctcggag ggcagcagct 2318
 ggacaggggc tactgggttt ggccctggaca gcaactgattt gtggatgtgg atgggggcac 2378
 gttgtccgtg ataaaagtac aagtgccct cacaacaaaa aaaaaaaaaa 2428

<210> 2

<211> 258

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

115	120	125
Gln Leu Ser Glu Val Gln Ile Lys Thr Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met		
130	135	140
Lys His Lys Arg Gln Met Gln Asp Pro Gln Leu His Ser Pro Phe Ser		
145	150	155
Gly Ser Leu His Ala Pro Pro Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Gly Leu		
165	170	175
Ala Asn Gly Leu Gln Leu Leu Cys Pro Trp Ala Pro Leu Ser Gly Pro		
180	185	190
Gln Ala Leu Met Leu Pro Pro Gly Ser Phe Trp Gly Leu Cys Gln Val		
195	200	205
Ala Gln Glu Ala Leu Ala Ser Ala Gly Ala Ser Cys Cys Gly Gln Pro		
210	215	220
Leu Ala Ser His Pro Pro Thr Pro Gly Arg Pro Ser Leu Gly Pro Ala		
225	230	235
Leu Ser Thr Gly Pro Arg Gly Leu Cys Ala Met Pro Gln Thr Gly Asp		
245	250	255

Ala Phe

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3

tactcaaccc tgacatagag ggtaa 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 4

gagcccggtt tgcatacacg gctaa 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 5
gcccagataa gcagcgccta attgc 25
<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 6
ctgtaggaaa agcaagatca gaaca 25
<210> 7
<211> 29
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 7
uucagaaucg ccgcaugaaa cacaaacgg 29
<210> 8
<211> 29
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 8
ccguuugugu uucaugcggc gauucugaa 29
<210> 9
<211> 29
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic oligonucleotide
<400> 9
ugaccacccu gaccuacggc gugcagugc 29
<210> 10
<211> 29
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 10

gcacugcacg ccguaggua gggugguca 29