



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104540945 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201380029115. 7

(22) 申请日 2013. 04. 30

(30) 优先权数据

13/460, 408 2012. 04. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/038840 2013. 04. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/166000 EN 2013. 11. 07

(71) 申请人 格伦·N·巴伯

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 格伦·N·巴伯

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王思琪 高瑜

(51) Int. Cl.

C12N 15/11(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

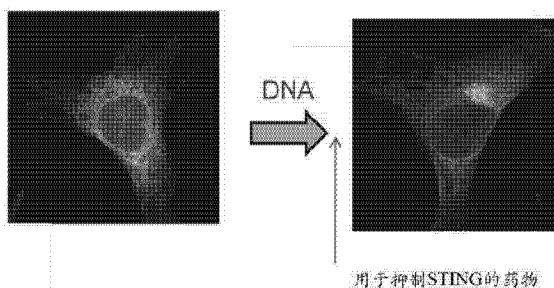
权利要求书1页 说明书19页 附图25页

(54) 发明名称

调节免疫应答

(57) 摘要

STING的调节物能够上调或下调免疫应答。给予此类调节物可以用于直接或与其他药剂组合治疗受试者的疾病或其他不希望的病症。



1. 一种用于调节罹患一种与异常 STING 功能相关的疾病或失调的受试者的免疫应答的方法,该方法包括向该受试者给予一定量的药物组合物的步骤,该药物组合物包括一种调节 STING 功能的药剂和一种药学上可接受的载体,其中该药物组合物的量有效改善该受试者的该异常 STING 功能。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中该药剂是一种增加 STING 功能的小分子。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中该药剂是一种降低 STING 功能的小分子。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中该药剂是一种在细胞内条件下结合至 STING 的核酸分子。

5. 如权利要求 5 所述的方法,其中该核酸分子是一种长度在 40 与 150 个碱基对之间的单链 DNA。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其中该核酸分子是一种长度在 40 与 150 个碱基对之间的双链 DNA。

7. 如权利要求 5 所述的方法,其中该核酸分子是一种长度在 60 与 120 个碱基对之间的双链 DNA。

8. 如权利要求 5 所述的方法,其中该核酸分子是一种长度在 80 与 100 个碱基对之间的双链 DNA。

9. 如权利要求 5 所述的方法,其中该核酸分子是一种长度在 85 与 95 个碱基对之间的双链 DNA。

10. 如权利要求 4 所述的方法,其中该核酸分子包括耐受核酸酶的核苷酸。

11. 如权利要求 4 所述的方法,其中该核酸分子与一种协助该核酸分子的跨膜转运的分子关联。

12. 如权利要求 1 所述的方法,其中该疾病或失调是一种 DNA- 依赖性炎性疾病。

13. 一种治疗罹患被炎性免疫细胞浸润的癌性肿瘤的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者给予一定量的药物组合物的步骤,该药物组合物包括一种下调 STING 功能或表达的药剂和一种药学上可接受的载体,其中该药物组合物的量可有效地将浸润该癌性肿瘤的炎性免疫细胞的数目减少至少 50%。

调节免疫应答

政府权利

[0001] 在此描述的本发明是在由国立卫生研究院授予的授权号 R01A1079336 下在美国政府支持下完成的。美国政府在本发明中享有某些权利。

发明领域

[0002] 本发明的实施例涉及用于调节受试者的先天性和获得性免疫和 / 或用于免疫相关失调、癌症、自身免疫的治疗, 治疗并预防感染的组合物和方法。

背景

[0003] 对病原体入侵的细胞宿主防御应答主要涉及导致抗病原体基因的诱导的病原体相关分子模式 (PAMP) 的检测, 例如病毒核酸或细菌细胞壁组分 (包括脂多糖或鞭毛蛋白)。例如, 病毒 RNA 可以通过存在于内质网 (ER) 和 / 或内涵体 (例如 TLR 3 和 7/8) 中的膜结合 Toll-样受体 (TLR) 或通过 TLR- 依赖性细胞内 DExD/H 盒 RNA 解旋酶 (称为视黄酸诱导基因 1 (RIG-I)) 或黑色素瘤分化相关抗原 5 (MDA5, 也称为 IFIH1 和 helicard) 检测。这些事件在下游信号传导事件的激活中达到高潮, 其中大部分仍是未知的, 从而导致 NF- κ B 和 IRF3/7- 依赖性基因 (包括 I 型 IFN) 的转录。

概述

[0004] 作为一种在先天性免疫应答中发挥关键作用的分子的 STING (干扰素基因的刺激物) 包括 5 个主要位于内质网 (ER) 中的假定跨膜 (TM) 区, 并且能够激活 NF- κ B 和 IRF3 转录途径两者从而诱导 I 型 IFN 并且在表达后发挥有效的抗病毒状态。参见美国专利申请序列号 13/057,662 和 PCT/US 2009/052767。STING 的缺失减少聚 IC 激活 I 型 IFN 的能力并且使得通过靶向同源重组产生的缺乏 STING ($^{-}$ MEF) 的鼠类胚胎成纤维细胞易受水疱性口炎病毒 (VSV) 感染。不存在 STING 的情况下, DNA 介导的 I 型 IFN 应答被抑制, 表明 STING 可能在识别来自病毒、细菌及其他可以感染细胞的病原体的 DNA 中发挥重要作用。酵母双杂交和免疫共沉淀研究表明 STING 与 RIG-I 相互作用并且与 Ssr2/TRAP β 相互作用, Ssr2/TRAP β 是翻译后蛋白质跨越 ER 膜易位所需的易位子相关蛋白 (TRAP) 复合体的一个成员。TRAP β 的 RNAi 消融抑制了 STING 功能并且阻碍对聚 IC 应答的 I 型 IFN 的产生。

[0005] 另外的实验显示, STING 自身结合例如来自病原体的核酸 (包括单链和双链 DNA) 及凋亡 DNA, 并且在调节炎症病症 (例如 DNA 介导的关节炎和癌症) 中的促炎基因表达中发挥核心作用。在此描述了上调 STING 表达或功能的各种新方法和组合物, 连同与 STING 相互作用的其他细胞分子的另外的表征。这些发现允许用于调节免疫系统和其他系统的新辅助剂、疫苗和疗法的设计。

[0006] 在此描述了用于调节罹患一种与异常 STING 功能相关的疾病或失调的受试者的免疫应答的方法。这些方法可以包括向该受试者给予一定量的药物组合物的步骤, 该药物组合物包括一种调节 STING 功能的药剂和一种药学上可接受的载体, 其中该药物组合物的量有效地改善该受试者的异常 STING 功能。该药剂可以是一种增加或减小 STING 功能的小分子, 或一种在细胞内条件下结合至 STING 的核酸分子。该结合 STING 的核酸分子可以是一

种长度在 40 与 150 个碱基对之间的单链 DNA 或一种长度在 40 与 150、60 与 120、80 与 100、或 85 与 95 个碱基对之间或更长的双链 DNA。该结合的 STING 核酸分子可以是耐受核酸酶的,例如由耐受核酸酶的核苷酸构成。它还可以与一种协助跨膜转运的分子关联。在这些方法中,该疾病或失调可以是一种 DNA- 依赖性炎症性疾病。

[0007] 在此还描述了治疗罹患被炎症免疫细胞浸润的癌性肿瘤的受试者的癌症的方法。这些方法可以包括向该受试者给予一定量的药物组合物的步骤,该药物组合物包括一种下调 STING 功能或表达的药剂和一种药学上可接受的载体,其中该药物组合物的量可有效地将浸润癌性肿瘤的炎症免疫细胞的数目减少至少 50% (例如,至少 50%、60%、70%、80% 或 90%,或直到炎症细胞浸润的减少是通过组织学或扫描可检测地减少的)。

附图说明

[0008] 图 1A-G 示出了 STING 依赖性先天性免疫信号传导。图 1A:将人类端粒酶成纤维细胞(hTERT-BJ1)用不同核苷酸($3\mu\text{g/ml}$)转染 16h。测量内源性 IFN β 水平。将 hTERT-BJ1 细胞用 FITC 标记的 dsDNA90 转染,通过荧光显微镜进行检查,以确保有效转染。图 1B:将 hTERT-BJ1 细胞用模拟的、随机的或两个独立的人类 STING siRNA(siRNA 3 或 4)转染 3 天,随后 dsDNA90 转染($3\mu\text{g/ml}$)16 小时。测量内源性 IFN β 水平。通过免疫印迹展示 hSTING 蛋白的沉默,用 β -肌动蛋白作为对照物。图 1C:将初级 STING $^{+/+}$ 、STING $^{-/-}$ 、STAT1 $^{+/+}$ 或 STAT1 $^{-/-}$ MEF 用或不用 dsDNA90($3\mu\text{g/ml}$)转染 3 小时。纯化总 RNA 并且通过 Illumina Sentrix 珠粒芯片阵列(小鼠 WG6 版本 2)检查基因表达。图 1D:将 hTERT-BJ1 细胞用 NS 或 STING siRNA 处理。3 天后,将细胞用 dsDNA90、ssDNA90 或 ssDNA45($3\mu\text{g/ml}$)处理。16 小时后,通过实时 RT-PCR 测量 IFN β mRNA 水平。图 1E:将 hTERT-BJ1 细胞用 NS 或 STING siRNA 处理。在第 3 天,将细胞用 dsDNA90、ssDNA90 或 ssDNA45($3\mu\text{g/ml}$)处理。16 小时后,测量内源性 IFN β 水平。图 1F:将初级 STING $^{+/+}$ 或 STING $^{-/-}$ MEF 用或不用 dsDNA90($3\mu\text{g/ml}$)转染。3h 后,与图 1C 相同。图 1G:将 hTERT-BJ1 细胞用或不用 dsDNA90($3\mu\text{g/ml}$)处理 3 小时并且用抗-HA 抗体和作为 ER 标记物的钙网蛋白染色。

[0009] 图 2A-J 显示 STING 结合至 DNA。图 2A:将 293T 细胞用指定的质粒转染。将细胞裂解物用生物素-dsDNA90 琼脂糖沉淀并且使用抗-HA 抗体通过免疫印迹进行分析。图 2B:STING 突变体的示意图。图 2C:与图 2A 相同。图 2D:与图 2A 相同。不能结合 DNA 的 STING 变体标记为红色。图 2E:将 hTERT-BJ1 细胞用生物素标记的 dsDNA90(B-dsDNA90; $3\mu\text{g/ml}$)转染 6h 并用 DSS 处理。将裂解物使用链霉亲和素琼脂糖沉淀并且使用抗-HA 抗体通过免疫印迹进行分析。图 2F:在 293T 细胞中表达 STING 并且 36 小时后,在竞争者 dsDNA90、聚(I:C)、B-DNA 或 ssDNA90 的存在下,用 dsDNA90 琼脂糖沉淀裂解物并且使用抗-HA 抗体通过免疫印迹进行分析。图 2G:将 293T 细胞用 HA- 标记的 STING、GFP 或 TREX1 转染。将细胞裂解并且添加生物素标记的 ssDNA 或 dsDNA 与链霉亲和素琼脂糖珠粒。使用抗-HA 抗体通过免疫印迹对沉淀物进行分析。图 2H:将 293T 细胞用 IFN β -荧光素酶和 STING 变体转染并且测量荧光素酶活性。图 2I:将 hTERT-BJ1 细胞用 dsDNA90 转染并且与甲醛交联。沉淀 STING 并且使用 dsDNA90 特异性引物通过 PCR 检测结合的 DNA。NC:阴性对照。PC:阳性对照,dsDNA90。图 2J:将 STING $^{+/+}$ 或 STING $^{-/-}$ MEF 用 dsDNA90 转染并且然后与图 2I 相同。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0010] 图 3A-3H 显示 TREX1 是 STING 信号传导的负调节物。图 3A:免疫印迹确认在 siRNA 处理的 hTERT-BJ1 细胞中 STING 和 / 或 TREX1 的敲低 (knockdown)。图 3B:将 siRNA 处理的 hTERT-BJ1 细胞用 dsDNA90 (3 μ g/ml) 转染。16 小时后,测量内源性 IFN β 水平。 $*P<0.05$ 。图 3C:将 siRNA 处理的 hTERT-BJ1 细胞用 HSV-1 (m. o. i = 1) 感染并且测量病毒滴度。 $*P<0.05$ 。图 3D:将 siRNA 处理的 hTERT-BJ1 细胞用 γ 34.5 缺失的 HSV 感染并且测量病毒滴度。 $*P<0.05$ 。图 3E:NS 或 STING siRNA 处理的 TREX1^{+/+}或 TREX1^{-/-}MEF 的免疫印迹确认 STING 敲低。图 3F:将 siRNA 处理的 TREX1^{+/+}或 TREX1^{-/-}MEF 用 dsDNA90 处理并且 16 小时后,测量 IFN β 水平。 $*P<0.05$ 。图 3G:将 siRNA 处理的 TREX1^{+/+}或 TREX1^{-/-}MEF 用 HSV-1 (m. o. i = 1) 感染并且测量病毒滴度。 $*P<0.05$ 。图 3H:使用或未用 dsDNA90 转染的 hTERT-BJ1 细胞的抗 -TREX1 或抗 -STING 抗体的免疫荧光分析。 $*P<0.05$, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0011] 图 4A-J:显示 TREX1 与寡糖基转移酶复合体关联。图 4A 示出了 TREX1 的示意图。红色表示 RPN1 结合位点。图 4B 示出了 STING 的示意图。红色表示 DAD1 结合位点。图 4C:在酵母双杂交分析 (1. pGBKT7, 2. pGBKT7-NFAR M9, 3. pGBKT7-TREX1, 4. pGBKT7-STING 全长, 5. pGBKT7-STING C-末端) 中, RPN1 与 TREX1 相互作用。图 4D:将 293T 细胞用 TREX1-tGFP 和 RPN1-Myc 共转染。将裂解物使用抗 -Myc 抗体免疫沉淀并且通过免疫印迹进行分析。图 4H:将 hTERT-BJ1 细胞用或不用 dsDNA90 (3 μ g/ml) 处理。转染后第 6h, 使用抗 -STING 或抗 -DAD1 抗体通过免疫荧光检查细胞。图 4I:在蔗糖梯度离心后, 使用指定的抗体对微粒体部分进行免疫印迹分析。I:输入。图 4J:将 hTERT-BJ1 细胞用 TREX1、Sec61A1、TRAP β 、NS 或 STING siRNA 处理。72h 后, 将细胞用 dsDNA90 (3 μ g/ml) 处理 16h 并且然后测量内源性 IFN β 水平。 $*P<0.05$, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0012] 图 5A-G 显示细胞质 DNA 在 hTERT-BJ1 细胞中诱导 STING- 依赖性基因。图 5A:将 hTERT-BJ1 细胞用 STING siRNA 处理。3 天后, 将细胞用或不用 dsDNA90 处理 3h。纯化总 RNA 并且使用人类 HT-12_V4_ 珠粒芯片检查基因表达。图 5B-G:将 hTERT-BJ1 细胞如在图 5A 中的进行处理。通过实时 PCR 检查 IFN β (图 5B)、PMAIP1 (图 5C)、IFIT1 (图 5D)、IFIT2 (图 5E)、IFIT3 (图 5F) 以及 PTGER4 (图 5G) 的总 RNA。使用 TaqMan 基因表达测定 (应用生物系统公司 (Applied Biosystem)) 进行实时 PCR。 $*P<0.05$, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0013] 图 6A-H 显示在 MEF 中, STING- 依赖性基因由细胞质 DNA 诱导。将初级 STAT1^{+/+}或 STAT1^{-/-}MEF 用 dsDNA90、IFN α 或与 IFN α 一起的 dsDNA90 处理。纯化总 RNA 并且通过实时 PCR 检查 IFN β (图 6A)、IFIT1 (图 6B)、IFIT2 (图 6C)、IFIT3 (图 6D)、CXCL 10 (图 6E)、GBP1 (图 6F)、RSAD2 (图 6G) 以及 CCL5 (图 6H)。 $*P<0.05$, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0014] 图 7A-H 显示, 细胞质 DNA 在 MEF 中诱导 STING- 依赖性基因。在图 7A-H 中, 将 STING^{+/+}或 STING^{-/-}MEF 用或不用 dsDNA45、dsDNA90、ssDNA45 或 ssDNA90 处理 3h。纯化总 RNA 并且通过实时 PCR 检查 IFN β (图 7A)、IFIT1 (图 7B)、IFIT2 (图 7C)、IFIT3 (图 7D)、CCL5 (图 7E)、CXCL 10 (图 7F)、RSAD2 (图 7G) 或 GBP1 (图 7H)。 $*P<0.05$, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0015] 图 8A-D 示出了 STING 定位和二聚化。图 8A:将稳定表达 STING-HA 的 MEF 用

ssDNA45、dsDNA45、ssDNA90 或 dsDNA90 处理。3h 后,使用抗-HA 或抗-钙网蛋白抗体将细胞染色。图 8B:将 293T 细胞用 STING-HA 和 Myc-STING 转染。将裂解物通过抗-Myc 抗体沉淀并且使用抗-HA 抗体通过免疫印迹进行分析。图 8C. 将 hTERT-BJ 1 细胞用或不用交联剂 DSS 处理。使用抗-STING 抗体使细胞裂解物经免疫印迹。图 8D:将 293T 细胞用指定的质粒转染并且用 DSS 处理。使用抗-HA 抗体通过免疫印迹对细胞裂解物进行分析。

[0016] 图 9A-I 显示,DNA 病毒在 MEF 中诱导 STING- 依赖性基因。图 9A:将 MEF 用 γ 34.5 缺失的 HSV(m. o. i. = 1) 感染 3h。纯化总 RNA 并且使用 Illumina Sentric 珠粒芯片阵列(小鼠 WGS 版本 2) 检查基因表达。图 9B-I:将 STING^{+/+}、STING^{-/-}或 STAT^{-/-}/STING^{+/+}MEF 用或不用 dsDNA90、HSV 或 γ 34.5 缺失的 HSV 处理 3h。纯化总 RNA 并且通过实时 PCR 检查 IFN β (图 9B)、IFIT1 (图 9C)、IFIT2 (图 9D)、IFIT3 (图 9E)、CCL5 (图 9F)、CXCL 10 (图 9G)、RSAD2 (图 9H) 或 GBP1 (图 9I)。误差条表示标准差。

[0017] 图 10A-F 显示 STING 与 IRF3/7 和 NF κ -B 相互作用。图 10A:STING 依赖性 dsDNA90 刺激基因的启动子区中的 IRF7 结合位点。图 10B-D:遵循制造商的指示,从模拟品处理的或 dsDNA90 处理的 STING^{+/+}或 STING^{-/-}MEF 中分离细胞核提取物并且检查 IRF3 (图 10B)、IRF7 (图 10C) 和 NF- κ B (图 10D) 激活。细胞核提取试剂盒、TransAM IRF3、TransAM IRF7 及 TransAMNF κ B 家族 Elisa 试剂盒来自伯昂兴业公司 (Active Motif)。*P<0.05,斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。图 10E:将 STING^{+/+}或 STING^{-/-}MEF 用聚(I:C)、dsDNA90 或 HSV1 处理并且通过抗-IRF3 抗体将细胞染色。图 10F. 将 STING^{+/+}或 STING^{-/-}MEF 用 dsDNA90 或 HSV1 处理并且通过抗-p65 抗体将细胞染色。STING 的缺失不影响聚(I:C) 介导的先天性免疫信号传导。

[0018] 图 11A-F 显示 STING 在体外结合 DNA。图 11A:将体外翻译产物用生物素标记的 dsDNA90 沉淀并且通过抗-HA 抗体进行免疫印迹。图 11B:STING 变体的示意图。图 11C, 11D:与图 11A 相同。缺乏 aa242-341 的 STING 变体(红色)不能结合 DNA。图 11E-F:将体外翻译产物用生物素标记的 ssDNA90 沉淀并且通过抗-HA 抗体进行免疫印迹。

[0019] 图 12A-G 显示 STING 在体内并且在体外结合 DNA。将 hTERT BJ1 细胞用生物素-dsDNA90 转染并且通过 UV 进行交联。将细胞裂解并且通过链霉亲和素琼脂糖沉淀并且通过免疫印迹进行分析。图 12B-C 将 hTERT-BJ1 细胞用 IFI16 (图 12B) 或 STING (图 12C) siRNA 处理并且然后与图 12A 中相同。图 12D:将 STING^{+/+}或 STING^{-/-}MEF 如在图 12A 中进行处理。图 12E:将表达 STING-Flag 的 293T 细胞用或不用生物素-dsDNA90 处理并且通过 DSS 进行交联。将裂解物沉淀并且通过免疫印迹进行分析。图 12F:将 293T 细胞用或不用 dsDNA90 或 ssDNA90 转染并且通过 UV 或 DSS 交联并且然后沉淀并且通过免疫印迹进行分析。图 12G:将表达 STING-Flag 的 293T 细胞裂解并且用 dsDNA90 或聚(I:C) 和生物素-dsDNA90 琼脂糖孵育并且然后与图 12E 相同。

[0020] 图 13A-C 显示 STING 结合病毒 DNA。图 13A:HSV、巨细胞病毒(CMV) 或腺病毒(ADV) 的寡核苷酸序列。图 13B-C:将 293T 细胞用指定的质粒转染。将细胞裂解物用生物素-dsDNA90、生物素-HSV DNA120mer、生物素-ADV DNA 120mer 或生物素-CMV DNA 120mer 琼脂糖沉淀并且使用抗-HA 抗体通过免疫印迹进行分析。

[0021] 图 14A-C 显示 STING 结合 DNA。图 14A:STING ELISA 的示意图。图 14B:STING ELISA 的一个实施例的过程。图 14C:通过 ELISA 测量 dsDNA90 的结合能力。*P<0.05,斯氏

t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0022] 图 15A-D 显示 TREX1 是一种 STING 信号传导的负调节物。图 15A :将 hTERT-BJ1 细胞用 TREX1、STING 或 STING 和 TREX1siRNA 处理。3 天后,将细胞用 HSV-Luc(m. o. i = 1) 感染 48h。测量裂解物荧光素酶活性。图 15B :将初级 TREX1^{+/+}或 TREX1^{-/-}MEF 用 NS 或 STING siRNA 转染。3 天后,将细胞用 HSV-Luc(m. o. i = 1) 感染 48h。测量裂解物。图 15C :将初级 TREX1^{+/+}或 TREX1^{-/-}MEF 用 NS 或 STING siRNA 转染。48h 后,将细胞用 HSV 感染并且测量 HSV 复制。通过免疫印迹检查 TREX1 表达。*P<0.05, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。图 15D :将 STING^{+/+}或 STING^{-/-}MEF 用或不用 dsDNA90 处理 3h。纯化总 RNA 并且通过 Illumina Sentrix 珠粒芯片阵列 (小鼠 WG6 版本 2) 检查基因表达。

[0023] 图 16 显示 STING 在 TREX1^{-/-}MEF 中调节 ssDNA90 介导的 IFN β 产生。将 siRNA 处理的 TREX1^{+/+}或 TREX1^{-/-}MEF 用 ssDNA45 或 ssDNA90 处理并且 16 小时后,测量 IFN β 水平。*P<0.05, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0024] 图 17A-H 显示 TREX1 不是一种 STING- 依赖性基因的负调节物。图 17A :将 TREX1^{+/+}或 TREX1^{-/-}MEF 用 HSV1、IFN α 、dsDNA90、三磷酸 RNA (TPRNA) 以及 VSV 处理。TPRNA 和 VSV 微弱地激活 IFN 诱导的基因。纯化总 RNA 并且通过 Illumina Sentrix 珠粒芯片阵列 (小鼠 WG6 版本 2) 检查基因表达。图 17B-H :通过 RT-PCR 检查 IFN β (图 17B)、IFIT1 (图 17C)、IFIT2 (图 17D)、IFIT3 (图 17E)、CCL5 (图 17F)、CXCL 10 (图 17G)、RSAD2 (图 17H) 的总 RNA。在缺乏 TREX1 的细胞中未观察到 IFN 诱导的基因上的显著差异。*P<0.05, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0025] 图 18A-D 显示 TREX1 与寡糖基转移酶复合体关联。使用 IFN 处理的 hTERT cDNA 文库产生一个酵母双杂交文库 (AH109)。将全长 TREX1 用作诱饵来筛选该文库。筛选到大约 500 万个表达 cDNA 的酵母 (Clontech 公司)。从 3 个独立的酵母杂合程序中分离 44 个克隆。总共将 RPN1 分离 8 次 (在筛选 1 中三次,在筛选 2 中两次以及在筛选 3 中三次)。大多数克隆 (RPN1 除外) 在重新测试后不能与 IREX1 相互作用。在这八个 RPN1 分离的克隆中,四个克隆编码 aa 258-397,两个克隆编码 aa 220-390 以及两个克隆编码 aa 240-367。产生 TREX1 变体并且标绘在 TREX1 (aa. 241-369) 与 RPN1 (aa 256-397) 之间的相互作用。为了分离 DAD1,将 STING 的 C-末端区 (aa 173-379) 用来筛选同一文库。发现两次 24 个分离的克隆,全长 DAD1。大多数克隆 (DAD1 除外) 在重新确认研究后不能与 STING 相互作用。看到全长 DAD1 与 STING 的区域 242-310 关联。图 18A :TREX1 突变体的示意图。图 18B :在酵母双杂合体筛选中,融合至 TREX1 或 TREX1-4 的 GAL4 结合域与融合至 GAL4 激活域的 RPN1 相互作用。图 18C :STING 突变体的示意图。图 18D. 在酵母双杂合体筛选中,融合至 STING-C-末端或 STING-C2 的 GAL4 结合域与融合至 GAL4 激活域的 DAD1 相互作用。

[0026] 图 19A-C 显示 TREX1 和 STING 与寡糖基转移酶复合体关联。图 19A :将 293T 细胞用 TREX1-tGFP 和 RPN1-Myc 共转染。将裂解物用抗 -tGFP 抗体或 IgG 对照物免疫沉淀并且使用指定的抗体通过免疫印迹进行分析。图 19B :将 293T 细胞与 Myc-STING 或 GFP-DAD1 共转染并且将细胞裂解。将裂解物用抗 -Myc 抗体或 IgG 对照物免疫沉淀并且使用抗 -GFP 抗体进行免疫印迹。图 19C :将 293T 细胞用 TREX1-tGFP 和 RPN1-Myc、GFP-DAD1 或 STING-HA 共转染。将裂解物通过抗 -tGFP 抗体或 IgG 对照免疫沉淀并且使用抗 -tGFP、抗 -Myc、抗 -GFP 或抗 -HA 抗体通过免疫印迹进行分析。

[0027] 图 20 显示 TREX1 定位于内质网中。将 hTERT-BJ1 细胞用 RPN1-Myc 转染。48h 后, 使用抗-TREX1 抗体(红色)、抗-Myc 抗体(绿色)或作为内质网标记物的抗-钙网蛋白抗体(蓝色)通过免疫荧光检查细胞。

[0028] 图 21A-H 显示在 293T 细胞中外源表达的 STING 重建 dsDNA90 应答。图 21A: 将 293T 细胞用对照物慢病毒或 hSTING 慢病毒感染。感染 1 天后, 将细胞用 dsDNA90 处理。6h 后, 使用抗-STING 或抗-钙网蛋白抗体将细胞染色。图 21B: 使用抗-STING 抗体使细胞裂解物(来自图 56A)经受免疫印迹。图 21C-D: 将慢病毒感染的 293T 细胞用 dsDNA90 刺激 6h。纯化总 RNA 并且通过实时 PCR 检查 IFN β (图 21C) 或 IFIT2(图 21D)。图 21E: 使用对照物或 hSTING 慢病毒稳定转导的 293T 细胞经受布雷菲德菌素 A(BFA) 实验, 如流程图所示。图 21F: 使用抗-STING 抗体使细胞裂解物(来自图 21E)经受免疫印迹。图 21G: 测量细胞裂解物(来自图 21E)的 IFN β -荧光素酶活性。图 21H: 将初级 STING^{-/-}•MEF 用对照物或 mSTING 稳定地转导。将细胞用 dsDNA90 处理并且通过 ELISA 测量内源性 IFN β 水平。 $*P<0.05$, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0029] 图 22 显示易位子成员调节 HSV1 复制。将 hTERT-BJ1 细胞用 TREX1、Sec61A1、TRAP β 、NS 或 STING siRNA 处理。

[0030] 图 23A-C 显示在 hTERT-BJ1 细胞中通过 dsDNA90 的 IFN β 产生不需要 IFI16。图 23A: 将 hTERT-BJ1 细胞用 NS、IFI16、STING 或 TREX1 siRNA 处理。3 天后, 将细胞裂解并且通过免疫印迹检查表达水平。图 23B: 将 siRNA 处理的 hTERT-BJ1 细胞用 dsDNA90 处理并且通过 ELISA 测量 IFN β 产生。图 23C: 将 siRNA 处理的 hTERT-BJ1 细胞用 HSV- 荧光素酶(m. o. i = 0.1) 感染。感染后第 2 天, 将细胞裂解并且测量荧光素酶活性。 $*P<0.05$, 斯氏 t 检验。误差条表示标准差。数据表示至少两个独立实验。

[0031] 图 24 示出了基于 STING 细胞的测定的一个实施例。

[0032] 图 25 显示药物“A”诱导 STING 运输。

[0033] 图 26 显示药物“X”抑制 IFN β mRNA 产生。

[0034] 图 27 是一个示意图, 显示 STING 在对细胞质 DNA 的应答中磷酸化。将 hTERT-BJ1 细胞用 4 μ g/ml 的 ISD 转染 6h。在 TNE 缓冲液中制备细胞裂解物并且然后使其经受用抗-STING 抗体的免疫沉淀, 随后经受 SDS-PAGE。将凝胶用 CBB 染色并且然后在哈佛质谱和蛋白质组学资源实验室(Harvard Mass Spectrometry and Proteomics Resource Laboratory) 通过 mL/MS/MS 分析包括 STING 的条带。比对来自不同物种的 STING 氨基酸序列并且通过质谱法鉴定磷酸化位点。通过质谱法鉴定丝氨酸 345、358、366 以及 379。丝氨酸 358 和 S366 对于 STING 功能而言是重要的。

[0035] 图 28 显示在细胞质 DNA 途径中, STING 的丝氨酸 366(S366) 对于 IFN β 产生而言是重要的。将 293T 细胞用编码突变体 STING 的质粒和报告质粒转染。36hr 后, 测量荧光素酶活性。将 STING^{-/-}MEF 细胞用突变体 STING 重构并且然后通过 ELISA 测量培养基中的 IFN β 的量。S366 对于通过 STING 的 IFN 产生而言是重要的并且 S358 也似乎发挥重要作用。

[0036] 图 29A-D 显示 STING 缺陷小鼠耐受 DMBA 诱导的炎症和皮肤癌发生: 将 STING^{+/+} 和 STING^{-/-}小鼠在剃毛的背侧上每周用丙酮模拟处理或用 10 μ g 的 DMBA 处理, 持续 20 周。图 29A: STING 缺陷动物耐受导致皮肤癌的 DNA 损伤剂。无皮肤肿瘤的小鼠的百分比在卡

普兰-迈耶 (Kaplan-Meier) 曲线中示出。图 29B :示出了每个处理组的代表性小鼠的图片。图 29C :在模拟品或 DMBA 处理的皮肤 / 皮肤肿瘤活检上通过 H&E 染色进行组织病理学检查。在 20X 放大下拍摄图像。图 29D :在暴露于致癌物的表达 STING 的小鼠中细胞因子上调。通过 Illumina Sentrix 珠粒芯片阵列 (小鼠 WG6 版本 2) 一式两份地分析提取自模拟品或 DMBA 处理的皮肤 / 皮肤肿瘤活检的 RNA。分析总基因表达。选择最可变基因。行表示单独的基因 ;列表示单独的样品。伪颜色表明转录物水平低于、等于或高于平均值 (分别为绿色、黑色和红色)。基因表达 ;倍数变化 $\log_{10}$ 标度范围在 -5 至 5 之间。在 STING 缺陷动物的皮肤中未观察到细胞因子。

详细说明

[0037] 在此描述了用于调节罹患一种与异常 STING 功能相关的疾病或失调的受试者的免疫应答的方法和组合物。以下描述的优选实施例说明了这些组合物和方法的调适。虽然如此,根据这些实施例的说明,基于以下提供的说明可以完成和 / 或实践本发明的其他方面。

[0038] 用于调节罹患一种与异常 STING 功能相关的疾病或失调的受试者 (例如,人、狗、猫、马、牛、羊、猪等) 的免疫应答的方法和组合物涉及一种药物组合物,该药物组合物包括一种调节 STING 功能的药剂和一种药学上可接受的载体,其中该药物组合物的量有效改善该受试者的异常 STING 功能。

[0039] 与异常 STING 功能相关的疾病或失调可以是其中具有缺陷的 STING 功能或表达的细胞导致或恶化疾病或失调的物理症状的任何疾病或失调。常见地,此类疾病或失调由免疫系统细胞介导,例如,炎性病症、自身免疫性病症、癌症 (例如,乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、卵巢癌、白血病、肺癌、子宫内膜癌或肝癌)、动脉硬化、关节炎 (例如,骨关节炎或类风湿性关节炎)、炎性肠病 (例如,溃疡性结肠炎或克罗恩氏病)、周边血管疾病、脑血管意外 (中风)、存在慢性炎症的疾病、由具有炎性细胞浸润的损害表征的疾病、脑中存在淀粉样蛋白斑的疾病 (例如,阿尔茨海默病)、艾卡迪-古铁雷斯综合征 (Aicardi-Goutieres syndrome)、幼年型关节炎、骨质疏松、肌萎缩侧索硬化或多发性硬化。

[0040] 该药剂可以是一种增加或减少 STING 功能或表达的小分子 (即,一种具有小于 500、1000 或 2000 道尔顿的分子量的有机或无机分子) 或一种在细胞内条件下 (即,在 STING 正常地位于其中的细胞内的条件下) 结合至 STING 的核酸分子。该药剂还可以是一种结合 STING 的核酸分子,该核酸分子可以是一种单链 (ss) 或双链 (ds) RNA 或 DNA。优选地,该核酸的长度在 40 与 150、60 与 120、80 与 100 或 85 与 95 个碱基对之间或更长。这种结合 STING 的核酸分子可以是耐受核酸酶的,例如由耐受核酸酶的核苷酸构成或处于环状二核苷酸形式。它还可以与一种协助跨膜转运的分子关联。

[0041] 用于治疗罹患被炎性免疫细胞浸润的癌性肿瘤的受试者的癌症的方法和组合物涉及一种药物组合物,该药物组合物包括一种下调 STING 功能或表达的药剂和一种药学上可接受的载体,其中该药物组合物的量可有效地将浸润癌性肿瘤的炎性免疫细胞的数目减少至少 50% (例如,至少 50%、60%、70%、80% 或 90%,或直到炎性细胞浸润的减少是通过组织学或扫描可检测地减少的)。

[0042] 在此描述的这些组合物可以连同一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂一起被包括,这些载体或赋形剂用于使得可以通过多种路径来给予药物组合物,这些路径

包括口服、直肠、阴道、局部、经皮、皮下、静脉内、肌内、吸入、鞘内以及鼻内给药。用于在本发明中使用的适合的配制品发现于雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 马克出版公司 (Mack Publishing Company), 费城, 宾夕法尼亚州, 第 17 版 (1985) 中。

[0043] 这种或这些活性成分可以与一种赋形剂混合, 被一种赋形剂稀释, 和 / 或被封闭在一种载体内, 该载体可以处于胶囊、小袋、纸或其他容器的形式。当该赋形剂作为一种稀释剂时, 它可以是一种固体、半固体或液体材料, 该材料可以作为活性成分的运载体、载体或介质而起作用。这些组合物可以处于片剂、丸剂、散剂、锭剂、小袋、扁囊剂、酏剂、悬浮剂、乳剂、溶液、糖浆、气雾剂 (作为固体或处于液体介质中)、软膏、软明胶胶囊和硬明胶胶囊、栓剂、无菌可注射溶液、用于鼻内给药的无菌液体 (例如, 一种喷雾装置) 或无菌包装的散剂的形式。这些配制品可以另外包括: 润滑剂, 例如滑石、硬脂酸镁和矿物油; 润湿剂; 乳化剂和悬浮剂; 防腐剂, 例如甲基苯甲酸酯和丙基羟基苯甲酸酯; 甜味剂; 以及调味剂。可以对本发明的组合物进行配制, 以便通过利用本领域中已知的程序给予至患者后, 提供活性成分的快速、持续或延迟释放。

[0044] 用于制备固体配制品 (例如片剂), 可以将该组合物与一种药用赋形剂混合, 以形成一种包含化合物的均匀混合物的固体预配制组合物。可以将片剂或丸剂包衣或以另外的方式化合, 以提供给与延长作用的优势的剂型。例如, 片剂或丸剂可以包括一种内剂量组分和一种外剂量组分, 后者处于前者上的包膜的形式。这两种组分可以被一个肠溶层分开, 该肠溶层用来抵抗胃中的崩解并且允许内组分完整地传递进入十二指肠中或延迟释放。多种材料可以用于此类肠溶层或包衣, 此类材料包括许多聚合酸和聚合酸与例如虫胶、十六烷醇和乙酸纤维素的材料的混合物。

[0045] 配制品的液体形式包括悬浮剂和乳剂。为了增强血清半衰期, 可以将这些配制品胶囊化, 引入进脂质体的管腔中, 制备为胶体, 或掺入进脂质体层中。多种方法可用于制备脂质体, 如在例如 Szoka (索卡) 等人的美国专利号 4, 235, 871、4, 501, 728 和 4, 837, 028 中所述的, 将各自通过引用结合在此。

[0046] 优选地, 将这些组合物配制为这种或这些活性成分的单位剂型。给予至患者的量将取决于给予的药物、给予的目的 (例如预防或治疗)、患者的状态、给予的方式等而变化, 全部位于合格的医师和药师的技术内。在治疗应用中, 以足够治愈或至少部分地抑制疾病的症状及其并发症的量将组合物给予至已经罹患该疾病的患者。有效用于这一用途的量将取决于正在治疗的疾病病症并且通过主治临床医师的判断取决于以下因素, 例如症状的严重程度、患者的年龄、体重和一般状况等。

[0047] 在此提到的所有文件通过引用结合在此。出于所有目的, 所有在本申请中引用的公开物和专利文件通过引用结合在此, 并且其结合程度如同每个单独公开物或专利文件单独地指出。通过在本文件中不同参考文献的引用, 诸位申请人不承认, 任何具体参考文件是相对于本发明的“现有技术”。在以下实例中说明本发明的组合物和方法的实施例。

实例

实例 1: 用于调节先天性免疫的易位子相关 STING 与细胞质 DNA 复合体

[0048] 先前, 描述了一种内质网 (ER) 新跨膜组分的分离, 该组分称为 STING (干扰素基因的刺激物), STING 被证明为响应于细胞质 dsDNA 以及 DNA 病毒和细胞内细菌应答而在成

纤维细胞、巨噬细胞和树突细胞 (DC) 中产生 I 型 IFN 所必需的 (参见美国专利申请序列号 13/057,662 和 PCT/US 2009/052767)。注意的是,在鼠类细胞中激活 STING- 依赖性 I 型 IFN 信号传导所需的 dsDNA 的最小尺寸在鼠类细胞中是大约 45 个碱基对。然而,在正常人类细胞 (hTERT) 中,观察到完全激活 I 型 IFN 需要具有大约 90 个碱基对的 dsDNA (在此称为干扰素刺激 dsDNA90)。使用 RNAi 敲低程序,另外确认在 hTERT 中,STING 的确为 I 型 IFN 的产生所必需 (图 1B)。使用微阵列程序测量 mRNA 表达的进一步分析表明除 I 型 IFN 之外,细胞质 dsDNA 在 hTERT 细胞中还可以诱导一系列广泛的先天性免疫基因 (图 5A-G)。这些固有分子 (包括 IFIT 家族的成员) 的诱导似乎是 STING- 依赖性的,因为 hTERT 中的 STING 的 RNAi 敲低在很大程度上消除了细胞质 dsDNA 对它们的刺激 (图 5A-G)。使用 STING^{+/+} 或 ^{-/-} 鼠类胚胎成纤维细胞 (MEF) 确认了那种细胞质 dsDNA,该细胞质 dsDNA 以一种 STING- 依赖性方式诱导多种先天性免疫基因 (图 1C)。为了确认这些 mRNA 的诱导是 STING- 依赖性基因 (SDG) 并且不通过 I 型 IFN 依赖性自分泌或旁分泌信号传导而被刺激,将 I 型 IFN- 信号传导缺陷的 STAT1^{-/-} MEF 用 dsDNA 类似地处理并且证实 SDG 的产生不受影响 (图 1C)。逆转录酶 (RT) PCR 分析确认了阵列结果 (图 6A-H 和 7A-H)。注意到,具有 45 个核苷酸的 ssDNA (ssDNA45) 在 hTERT 中微弱地诱导先天性免疫基因产生并且在 MEF 中更微弱。然而,观察到包括 90 个核苷酸的转染的 ssDNA (ssDNA90) 在 hTERT 细胞中更有力地激活一系列基因 (包括 I 型 IFN) (图 1D, 1E)。使用 STING^{+/+} 或 ^{-/-} 鼠类胚胎成纤维细胞 (MEF) 类似地确认了那种细胞质 ssDNA90 以一种 STING- 依赖性方式诱导先天性免疫基因的产生 (图 1F 和 7A-H)。观察到,STING 可能作为同源二聚体位于人类和鼠类细胞两者的 ER 中,并且在细胞质 ssDNA 或 dsDNA 配体的存在下从 ER 迁移到核周区,以激活 I 型 IFN- 依赖性转录因子 (图 1G 和 8A-E)。类似地观察到 HSV1 以一种 STING 依赖性方式激活先天性免疫基因产生 (图 9A-I)。确认到,许多 SDG 在其启动子区中包含 IRF7 结合位点 (图 10A-F)。因此,包括转染的质粒 DNA 的细胞质 ssDNA 或 dsDNA 可以有力地诱导依赖 STING 的一系列广泛的先天性免疫相关基因的转录。

[0049] 为了进一步评估 STING 自身可以与 DNA 种类关联的可能性,将 293T 细胞用 STING 转染并且在细胞裂解后观察到 STING 的 C- 末端区 (aa181-349) 可以使用生物素标记的 dsDNA90 而沉淀 (图 2A)。STING 的 N- 末端区 (aa 1-195) 以及三种类似 HA 标记的对照物 (GFP、NFAR1 和 IPS1) 不与 dsDNA90 关联。将结合 DNA 的核酸外切酶 TREX1 作为阳性对照。另外一系列广泛的研究表明,STING 的氨基酸区域 242-341 可能负责结合 dsDNA,因为缺乏这一区域的 STING 变体不能与核酸关联 (图 2B-D)。体外表达的 STING 在高盐和高洗涤剂条件下也结合至 dsDNA (类似地缺乏区域 242-341 的那些变体除外) (图 11A-F)。通过将生物素标记的 dsDNA90 转染进 hTERT 中并且将此类细胞用一种可逆交联试剂 (DSS) 或 UV 光处理而取得另外的关于 STING 可以与 dsDNA 复合 (可能呈一种二聚体) 的证据。在两种处理情况下,都观察到在细胞裂解后 STING 保留其与 DNA 的关联 (图 2E 和图 12A-G)。STING 在 hTERT 细胞中的 RNAi 敲低消除了观察到的结合,并且还仅在野生型 MEF (^{+/+}) 中观察到 STING-DNA 复合体,但是在缺乏 STING 的 MEF (^{-/-}) 中未观察到 (图 12A-G)。类似地确认了 HSV1、巨细胞病毒 (CMV) 以及腺病毒 (ADV) 相关 dsDNA。竞争实验说明,STING 还可以结合至 ssDNA (ssDNA90) 以及 dsDNA,但是不结合至 dsRNA (图 2F)。这通过在体外表达 STING 并且观察到与 ssDNA90 的关联而得以确认 (图 2G)。分析的所有 STING 变体缺乏在 293T 细

胞中激活 IFN 型启动子的能力 (图 2H)。还将 dsDNA 转染进 hTERT 或 MEF 细胞中并且用甲醛处理,以将细胞蛋白交联至核酸。STING 捕获 (pull down) 后随后的 CHIP 分析进一步确认,转染的 DNA 可以直接与 STING 关联,如使用 dsDNA90 特异性引物所确定 (图 2I 和 2J)。在 ELISA 测定中观察到,STING 可以结合至生物素标记的 DNA (图 14A-C)。数据表明 ssDNA 和 dsDNA- 介导的先天性信号传导事件依赖于 STING 并且证明 STING 自身能够复合至这些核酸结构,以帮助触发这些事件。

[0050] 作为 3'→5' DNA 核酸外切酶的 TREX1 还是一种 ER 关联分子并且对于降解检查点激活的 ssDNA 种类而言是重要的,这些 ssDNA 种类能以另外的方式激活免疫系统。用于在 hTERT 细胞中沉默 TREX1 的 RNAi 显著增加了 I 型 IFN 的由 dsDNA90 进行的 STING 依赖性产生 (图 3A 和 3B)。伴随地,dsDNA 病毒 HSV1 的复制在缺乏 TREX1 的 hTERT 细胞中在很大程度上被减少,可能由于 I 型 IFN 和抗病毒 IFN 刺激的基因 (ISG) 的升高的产生 (图 3C 和 D)。在用沉默 TREX1 的 RNAi 处理的 hTERT 感染细胞中,来自表达荧光素酶基因的重组体 HSV 的荧光素酶表达也是显著更低的 (图 15A-D)。通过使用 TREX1 缺陷 MEF 延伸这些观察结果,类似地表明细胞质 dsDNA- 依赖性基因诱导在不存在 TREX1 的情况下在很大程度上得以升高并且 HSV1 复制显著减少 (图 3E-G)。为了确定 STING 是否负责在不存在 TREX1 的情况下观察到的 I 型 IFN 的升高的产生,将缺乏 TREX1 的 hTERT 或 TREX1^{-/-}MEF 中的 STING 沉默并且用细胞质 dsDNA 或 HSV1 处理这些细胞。这些结果表明在缺乏 STING 的 TREX1 缺陷细胞 (hTERT 和 MEF 两者) 中 I 型 IFN 产生在很大程度上减少,表明在不存在 TREX1 的情况下观察到的 I 型 IFN 的升高的水平是 STING- 依赖性的 (图 3A-F)。类似地,注意到 STING 在 TREX1^{-/-}MEF 中的 RNAi 敲低也消除了 ssDNA90- 介导的 I 型 IFN 产生和先天性基因刺激 (图 16)。共聚焦分析确认 TREX1 和 STING 共定位于 ER 中 (图 3H)。然而,细胞质 dsDNA 不有效地诱导类似于 STING 的 TREX1 从 ER 运输至核周区 (图 3H)。因此,未观察到 STING 和 TREX1 有力地相互作用,如通过免疫共沉淀分析所确定。在非刺激条件下,在 TREX1^{+/+}或 TREX1^{-/-}MEF 中,在 STING- 依赖性基因的表达上未注意到显著差异 (图 17A-H)。然而, TREX1 是一种 dsDNA- 诱导基因,确认并且能以一种 STING- 依赖性方式被上调 (图 17A-H)。因此, dsDNA 种类与 STING 和辅助分子复合以介导运输和下游信号传导事件是似乎合理的,这些事件激活负责初级先天性免疫基因 (包括 TREX1) 的诱导的转录因子 IRF3/7 和 NF-κB。该证据表明, STING- 激活的 TREX1 位于 ER 区中以降解激活剂 dsDNA 并且以一种负反馈方式抑制细胞质 dsDNA 信号传导。因此, TREX1 是一种 STING 负调节物。

[0051] 在此的数据证明, STING 作为易位子复合体的一部分位于 ER 中,与易位子相关蛋白 β (TRAP β) 关联。易位子复合体包括与可以附接至核糖体的 TRAP α β、γ 和 δ 偶联的 Sec61 α β 和 γ。分泌蛋白和膜蛋白易位进入 ER 中用于正确折叠并且在被输出之前进行糖基化。为了鉴定 TREX1 结合配偶体,在双杂交酵母筛选中将全长 TREX1 用作诱饵。结果表明, TREX1 循环地与一种称作核糖体结合蛋白 I (RPN1) 的蛋白相互作用,该蛋白是一种 68kDa I 型跨膜蛋白并且是寡糖基转移酶 (OST) 复合体的成员 (图 4A-E; 图 18A-D)。在新生多肽通过易位子进入 ER 时,该 OST 复合体催化甘露糖低聚糖转移至这些新生多肽的天冬酰胺残基上。至少七种蛋白质包括 OST 复合体,包括 RPN1、RPN2、OST48、OST4、STT3A/B、TUSC3 以及 DAD1。显著地,将 STING 用作诱饵的类似筛选确定, STING 还可以与 DAD1 (对抗凋亡性细胞死亡的防御者) 关联, DAD1 是一种 16kDa 跨膜蛋白 (图 14F-H)。使用酵母双杂

交途径进一步分析这些关联,表明包括其跨膜区的 TREX1 的 C-末端区(氨基酸 241-369)负责结合至 RPN1 的氨基酸 258-397(图 18A-D)。另外,STING 的氨基酸 242-310 负责与全长 DAD1 关联(图 18A-D)。免疫共沉淀研究确认了这些分子的相互作用(图 4D 和 4G 及图 29A-C)。另外的免疫共沉淀实验表明了 TREX1 与 DAD1 的关联(图 19A-C)。共聚焦分析确认 TREX1 和 RPN1 共定位于细胞中但不响应于细胞质 dsDNA 而运输(图 4E 和图 20)。类似地,STING 和 DAD1 共定位于细胞的 ER 中,但后者分子在细胞质 dsDNA 的存在下不伴随 STING 至内涵体区室(图 4H)。通过分级分离包括 ER 的细胞微粒体区室并且通过蔗糖梯度分析进行检查。这一研究表明 TREX1 和 STING 与 ER 标记物 RPN1 和 RPN2、DAD1 及钙网蛋白被共同级分,但是不与核组蛋白 H3 共同级分,确认了它们的亚细胞定位在易位子/OST 复合体的组分之间是不可识别的(图 4I)。因此,TREX1 靶向 ER 的包括 STING 的 OST/易位子复合体,并且这一关联通过与 RPN1 关联而发生,尽管发现 TREX1 的 TM 区涉及 TREX1 至 ER 的定位中。为了鉴定 OST、TRAP 或 SRP(信号识别肽)复合体的成员是否影响 dsDNA-依赖性信号传导,进行 RNAi 筛选以沉默这些组分的表达。然而,除了抑制在很大程度上升高 I 型 IFN 产生的 STING(为 DNA 介导的 I 型 IFN 产生所必需;图 21A-H)和 TREX1 之外,仅仅 Sec61 α 和 TRAP β 沉默显著地影响信号传导和 HSV1 复制,证明这些转位子成员在控制这一途径中发挥一定作用(图 4J 和图 22)。观察到 IFI16 的沉默(也牵连到细胞质 DNA 感测中)没有有力地抑制 dsDNA-依赖性信号传导,至少在 hTERT 细胞中如此(图 23A-C)。类似于 STING 的缺失,IFI16 的缺失在不存在 TREX1 的情况下也不能挽救由 dsDNA 造成的增加的 IFN 产生(图 23A-C)。然而,减少的 IFI16 使得能够进行更熟练的 HSV1 基因表达,确认了这一分子在影响病毒复制中的重要作用。RPN1 或 2 的沉默也导致 HSV1 基因表达的增加,但是也未显著影响 I 型 IFN 产生,证明 OST 的这些组分可能主要涉及 N-糖基化。

[0052] 数据证明,STING 可以与细胞质细胞内 ssDNA 和 dsDNA(可以包括基于质粒的 DNA 和基因治疗载体)复合,可以调节一系列广泛的先天性免疫基因的诱导,这些基因是例如 I 型 IFN、IFIT 家族以及多种对于抗病毒活性和对于引发获得性免疫应答而言重要的趋化因子。STING 激活似真地协助将 TBK1 护送至网格蛋白覆盖的内涵体区室,以通过仍未完全阐明的机制而激活 IRF3/7。TREX1 显现以低水平存在于细胞中并且自身通过 STING 是可诱导的。翻译后,TREX1 靠近未激活的 STING(还位于 OST/易位子复合体中)定位至 OST 复合体,其中可推测地它降解能以另外的方式引起 STING 作用的 DNA 种类。易位子/OST 复合体的组分(现在包括 STING 和 TREX1)调节细胞质 ssDNA 和 dsDNA-介导的先天性免疫信号传导。因为 TREX1 的缺失通过升高的 I 型 IFN 产生而显示自身免疫性失调,所以通过 STING 活性诱导这些疾病是可能的。

实例 2:STING 调节物

[0053] 筛选药物文库,以鉴定调节 STING 表达、功能、活性等的药剂。图 24 示出了基于 STING 细胞的测定的步骤。

[0054] 这些文库包括 BioMol ICCB 已知的生物活性文库,500 个靶标;药物活性化合物的 LOPAC1280™文库;恩佐生命科学(Enzo Life Sciences),Screen-Well™磷酸酶抑制剂文库,33 种已知的磷酸酶抑制剂;

[0055] 显微资源谱收藏中心(MicroSource Spectrum Collection)2000 种组分,50%药物组分,30%天然产物,20%其他生物活性组分;EMD:InhibitorSelect™96 孔蛋白激酶抑

制剂文库 I, InhibitorSelect™96 孔蛋白激酶抑制剂文库 II, InhibitorSelect™96 孔蛋白激酶抑制剂文库 IIIa ; 激酶文库 B 激酶真克隆 (TrueClone) 收藏中心 ; 激酶缺陷真克隆收藏中心。

[0056] 结果显示一种药物 (叫做 ‘ 药物 A ’) 诱导 STING 运输 (图 60) 。 另一种药物 (叫做 “ 药物 X ”) 抑制 IFN β mRNA 产生 (图 61) 。

[0057] 表 2 : 以下被鉴定为 STING 抑制剂 :

名称	化学名称	描述
双氯芬酸钠	2-[(2,6-二氯苯基)氨基]苯乙酸钠	环氧合酶抑制剂; 抗炎性的
R(-)-2,10,11-三羟基阿朴啡氢溴化物	R(-)-2-羟基阿朴啡氢溴化物	D2 多巴胺受体激动剂
二丙多巴胺氢溴化物		多巴胺受体激动剂
2,2'-联吡啶	α,α' -联吡啶	金属蛋白酶抑制剂

(±) 反式-U-50488 甲磺酸酯	反式-(±)-3,4-二氯-N-甲基-N-[2-(1-吡咯烷基)-环己基]-苯乙酰胺甲磺酸酯	选择性 κ 阿片样物质受体激动剂。
SP600125	蒽吡唑啉酮; 1,9-吡唑蒽酮 (Pyrazoloanthrone)	选择性 c-Jun N-末端激酶(c-JNK) 抑制剂。
甲磺酸多沙唑嗪	1-(4-氨基-6,7-二甲氧基-2-喹唑啉基)-4-[4-(1,4-苯并二噁烷-2-基)羰基哌嗪 (carpiperezin) -1-基]-6,7-二甲氧基喹唑啉甲磺酸酯	α1 肾上腺素受体阻断剂
米托蒽醌	1,4-二羟基-5,8-双([2-([2-羟乙基]氨基)乙基]氨基)-9,10-蒽二酮	DNA 合成抑制剂
MRS 2159		P2X1 受体拮抗剂
尼莫地平(Nemadipine) -A	1,4-二氢-2,6-二甲基-4-(五氟苯基)-3,5-吡啶二羧酸二乙酯	一种 L 型钙通道 α1-亚基拮抗剂。
(±)-PPHT 盐酸化物	(±)-2-(N-苯乙基)-N-丙基氨基-5-羟基萘满盐酸化物	有效的 D2 多巴胺受体激动剂
SMER28	6-溴代-N-2-丙烯基-4-喹唑啉胺	哺乳动物的自噬的小分子调节物。
硫酸奎宁		K ⁺ 通道阻断剂; 抗疟疾剂、抗胆碱剂、抗高血压剂和降血糖剂; 分离自南美树的金鸡纳家族的树皮的生物碱
(+)-使君子酸	L(+)-α-氨基-3,5-二氧代-1,2,4-噁二唑烷-2-丙酸	使君子酸的活性对映异构体; 谷氨酸受体处的兴奋氨基酸; 驱虫剂

[0058] STING 的激活剂诱导二氢鸟苷和 BNTX 马来酸盐水合盐。

实例 3:STING 显示自我 DNA- 依赖性炎症性疾病

[0059] 骨髓衍生的巨噬细胞 (BMDM) 获得自 $\text{Sting}^{+/+}$ 和 $\text{Sting}^{-/-}$ 小鼠并且将其用 90 个碱基对 dsDNA (dsDNA90) 转染以激活 STING 途径, 或用来源于地塞米松 (Dex) 处理的胸腺细胞的凋亡 DNA (aDNA) 转染。观察到, 两种类型的 DNA 都以一种 STING 依赖性方式在 BMDM 和常规树突细胞 (BMDC) 中有力地诱导 $\text{IFN}\beta$ 的产生。DNA 微阵列实验确认, aDNA 在 BMDM 中触发一系列广泛的先天性免疫和炎症相关细胞因子 (例如 $\text{IFN}\beta$ 以及 $\text{TNF}\alpha$) 的 STING- 依赖性产生 (表 3)。通过测量用 aDNA 处理的 $\text{Sting}^{+/+}$ 或 $\text{Sting}^{-/-}$ BMDM 中的细胞因子产生确认这些数据。因此, STING 可以协助 BMDM 以及 BMDC 中的凋亡 DNA- 介导的促炎基因产生。

[0060] 表 3 示出了较高表达的基因在用凋亡 DNA (aDNA) 处理的 BMDM 中的基因表达。

符号	BMDM (STING +/+)			BMDM (STING -/-)		
	信号		倍数增加	信号		增加倍数
	模拟品	aDNA		模拟品	aDNA	
Cxcl9	6.338	1.281	33.303	-1.102	-1.524	1.339
Ifnb1	5.594	0.728	29.162	-0.846	-0.916	1.049
Ifna11	4.548	0.085	22.051	-0.032	-0.064	1.022
Ifna6	4.403	-0.038	21.718	-0.068	-0.027	-1.029
Ccl5	4.851	0.463	20.947	-1.654	-3.732	2.461
Fam26f	4.493	0.597	14.888	-2.052	-4.000	-1.008
Ifna6	3.831	0.020	14.044	-1.819	-3.705	-1.019
AA467197	2.486	-1.303	13.822	0.000	-0.342	1.268
Ifna2	3.665	-0.055	13.179	0.000	-0.129	1.094
Ifna5	3.609	-0.051	12.637	-0.068	-0.027	-1.029
Rgs16	2.242	-1.183	10.738	-1.408	-2.737	2.116
Hopx	3.416	0.037	10.400	-0.929	-2.230	1.016
Hdc	3.181	0.120	8.346	-0.094	-0.214	1.086
Oasl1	3.747	0.688	8.330	-0.715	-0.766	1.036
Gm14446	4.130	1.078	8.294	-1.742	-3.029	1.109
Ifi205	3.805	0.788	8.093	-1.931	-3.199	1.051
Oasl1	4.202	1.198	8.021	-0.565	-1.865	1.036
Ifi205	4.597	1.595	8.011	-1.931	-3.199	1.013
LOC100044702	2.907	0.041	7.291	0.478	-1.334	3.511
Gbp5	3.852	1.063	6.913	-2.076	-3.180	1.125
Gja4	2.989	0.203	6.895	0.241	-0.840	-1.000
Oasl1	4.312	1.547	6.795	-0.565	-1.865	1.602
Il33	2.754	-0.010	6.792	-2.038	-3.039	1.001
Plekha4	3.399	0.672	6.623	0.750	-0.248	-1.011
Calb2	3.454	0.753	6.501	-1.814	-2.804	1.062
Hap1	2.844	0.181	6.330	0.684	-0.302	1.045
Gm12597	2.570	-0.072	6.243	-0.659	-1.629	1.013
Serpina3f	2.607	0.022	6.000	0.644	-0.261	1.203
Cxcl1	2.210	-0.373	5.994	-0.783	-1.661	4.791
LOC100044873	2.532	0.020	5.706	-0.495	-1.372	-1.084
Ifna4	2.468	-0.032	5.656	0.541	-0.334	-1.014
Upp1	2.168	-0.275	5.515	0.460	-0.414	1.395
Ccl8	2.579	0.122	5.490	-0.141	-0.234	1.066
Atm	2.549	0.101	5.455	-0.136	-0.127	-1.006
Phf11	3.545	1.113	5.397	0.606	-0.244	1.303
Gas7	1.364	-1.043	5.305	1.452	0.627	-1.083
Nos2	2.282	-0.099	5.209	0.061	-0.718	1.063
Phf11	3.572	1.233	5.060	1.484	0.706	1.008
Lif	2.209	-0.127	5.049	0.292	-0.485	-1.033
Lcn2	2.408	0.080	5.020	0.440	-0.322	1.287

[0061] 为了确定 STING 是否在 DNase II 相关炎症疾病中发挥一定作用,使用 RNAi 将 THP1 细胞或 BMDM 中的 STING 和 / 或 DNase II 敲低并且注意到 DNase II 的缺失以一种 STING- 依赖性方式响应于 aDNA 而协助细胞因子 (包括 I 型 IFN) 的上调。因为 DNase II^{-/-}小鼠通常在出生前死亡,所以分析 DNase II^{-/-}、Sting^{-/-}或 Sting^{-/-}DNase II^{-/-}DKO 17 天胚胎 (E17 天)。基因分型分析 (包括 RT-PCR 和免疫印迹) 确认这些胚胎缺乏 Sting、DNase II 或两种功能基因。观察到如上所述的 DNase II^{-/-}胚胎展现出贫血,这与显著地缺乏这一表

型的 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}DKO$ 胚胎或对照物形成显著对比。已经报道致死的贫血是由于在发育过程中 I 型 IFN 抑制红细胞生成。随后通过苏木精和伊红染色观察到, $DNase\ II^{-/-}$ 胚胎的肝脏中包含许多充满负责生产高水平的细胞因子的吞噬的凋亡细胞的浸润巨噬细胞。与对照小鼠相比之下, $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 胚胎的肝脏展现出类似的表型。通过 TUNEL (末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 生物素缺口末端标记) 分析胎肝确认, $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 胚胎和 $DNase\ II^{-/-}$ 缺陷但非野生型的胎肝包含许多大的不适当消化的濒死细胞。体外分析已经表明, 来自野生型或 $DNase\ II^{-/-}$ 小鼠的胚胎的巨噬细胞充分地吞噬凋亡细胞。然而, 虽然吞噬的凋亡细胞的 DNA 在野生型巨噬细胞的溶酶体中被有效降解, 但是 $DNase\ II^{-/-}$ 巨噬细胞积聚吞噬的细胞核并且不能消化 DNA。这一事件导致先天性免疫信号传导途径的刺激和自身免疫相关细胞因子的产生。鉴于此, 将胎肝衍生的缺乏 $DNase\ II$ 和 $STING$ 两者的巨噬细胞的能力评估为它们是否吞噬凋亡细胞并消化 DNA。注意到类似于 $DNase\ II^{-/-}$ 巨噬细胞, 与取自野生型或 $Sting^{-/-}$ 小鼠的对照巨噬细胞相比, $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 巨噬细胞不能消化来自地塞米松处理的凋亡胸腺细胞的吞噬的细胞核。因此, 类似于 $DNase\ II^{-/-}$ 巨噬细胞, 收获自 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 胚胎小鼠的肝脏的巨噬细胞类似地展现出不能消化吞噬的凋亡细胞。

[0062] 通过分析胚胎小鼠的肝脏中的 mRNA 表达水平补充以上分析。这一研究表明, 非常少的炎症基因产生在野生型或 $Sting^{-/-}$ 胚胎的肝脏中。然而, 观察到 $DNase\ II^{-/-}$ 胚胎的肝脏中包含异常高水平的细胞因子相关 mRNA。显著地, 与 $DNase\ II^{-/-}$ 小鼠相比, $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 小鼠的肝脏具有显著降低水平的先天性免疫基因表达活性。通过 RT-PCR 分析在胎肝中的所选先天性免疫基因的 mRNA 表达水平确认这些结果。例如, 与 $DNase\ II^{-/-}$ 小鼠相比, IFN β 的产生在 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 小鼠中减少若干倍。关键干扰素刺激基因 (ISG) 的产生也是显著减少的, 这些关键干扰素刺激基因是例如 2'-5' 寡腺苷酸合成酶 (OAS)、具有三角形四肽 (tetratricopeptide) 重复的干扰素诱导蛋白 (IFIT)、干扰素诱导蛋白 27 (IFI27) 以及泛素样改性剂 (ISG15)。与 $DNase\ II^{-/-}$ 小鼠相比, 促炎细胞因子 (例如 TNF α 和 IL1 β) 在 $Sting^{-/-}$ 和 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 的胎肝中也是降低的。虽然在不存在 $STING$ 的情况下先天性基因的产生被显著抑制, 但是在 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 小鼠中仍存在一些基因轻微升高, 尽管处于低水平, 如通过阵列分析所确定, 这可能是由于分析的动物之间的 mRNA 表达的变化, 或也许由于其他途径的刺激。这些基因中的许多通过 NF- κ B 和干扰素调节因子 (IRF) 途径被调节。因此, 在发育自 14 天胚胎 (E14 天) 的 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ 或对照鼠类胚胎成纤维细胞 (MEF) 中评估这些转录因子的功能。主要地, 当暴露于细胞质 DNA 时, 在 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ MEF 中观察到 NF- κ B 活性 (p65 磷酸化) 的缺陷。当暴露于凋亡 DNA 以及细胞质 DNA 时, 在 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ BMDM 中获得相同缺陷。这通过在暴露于 dsDNA 后, 注意到 NF- κ B 以及 IRF3 也不能在 $Sting^{-/-}DNase\ II^{-/-}$ MEF 中易位但是在对照 MEF 中可以易位加以确认。因此, $STING$ 可能负责控制自我 DNA- 诱导的炎症细胞因子产生, 该炎症细胞因子产生负责导致致死的胚胎红细胞生成。

[0063] 为了延伸 $STING$ 在调节自我 DNA- 协助的致死红细胞生成中的重要性, 评估 $DNase\ II^{-/-}$ 小鼠是否可以在不存在 $STING$ 的情况下出生。显著地, 当在 $Sting^{-/-}$ 背景上杂交时, $DNase\ II^{-/-}$ 小鼠出生, 伴随明显的孟德尔频率。PCR 基因分型、RNA 印迹、RT-PCR 及免疫印迹分析确认了后代小鼠中的 $DNase\ II$ 和 $STING$ 缺陷。与对照小鼠相比, $Sting^{-/-}DNase$

II^{-/-}双敲除小鼠 (DKO) 显现为正常生长并且展现出类似大小,但注意到 Sting^{-/-}小鼠由于仍不清楚的原因而稍微更大。初步免疫学评估也表明, Sting^{-/-}DNase II^{-/-}DKO 动物享有类似于 Sting^{-/-}和野生型小鼠的类似的 CD4⁺/CD8⁺谱,但注意到 DKO 的随着年龄的增长发展为脾肿大。在缺乏 I 型 IFN 信号传导的存活 DNase II 缺陷小鼠 (DNase II^{-/-}Ifnar1^{-/-}小鼠) 中也观察到脾肿大并且已经报道是由于红髓的放大。然而,在 8 周龄时,与对照小鼠相比,来自 Sting^{-/-}DNase II^{-/-}小鼠的血清分析表明没有可检测的异常细胞因子产生,由于产生的细胞因子的水平一般是较低的不可测量的。通过这些研究,注意到在体外,类似于 DNase II^{-/-}巨噬细胞,与取自野生型或 Sting^{-/-}小鼠的对照巨噬细胞相比, Sting^{-/-}DNase II^{-/-}巨噬细胞不能消化来自凋亡胸腺细胞 (Dex⁺) 的吞噬的细胞核。当将 WT 胸腺细胞用作靶标 (Dex⁻) 时,未消化的 DNA 在 DNase II^{-/-}Sting^{-/-}巨噬细胞中的积聚是不太明显的。因此,来源于 Sting^{-/-}DNase II^{-/-}小鼠的 BMDM 也不能消化来自凋亡细胞的 DNA,尽管与 DNase II^{-/-}BMDM 相比不产生炎性细胞因子应答。

[0064] 虽然 DNase II 介导的胚胎致死性可以通过将 DNase II^{+/+}小鼠与 I 型 IFN 缺陷 Ifnar1^{-/-}小鼠杂交而避免,但是所得的出生后大约 8 周的后代遭受严重的多关节炎 (关节炎得分为 2),因为未消化的 DNA 激活先天性免疫信号传导途径并触发炎性细胞因子 (例如 TNF α) 的产生。显著地,注意到 Sting^{-/-}DNase II^{-/-}小鼠出生后不显示任何多关节炎病征。直到 12 个月,在 Sting^{-/-}DNase II^{-/-}小鼠中的关节炎得分仍大约处于零 (无得分),与在类似时间后展现出高达 7 的关节炎得分的报到的 DNase II^{-/-}Ifnar1^{-/-}小鼠形成相比。虽然 DNase II^{-/-}Sting^{-/-}小鼠的脾脏和胸腺组织的 H&E 和 TUNEL 染色说明了还包含凋亡 DNA 的浸润巨噬细胞的存在,但是来自 6 月龄 Sting^{-/-}DNase II^{-/-}小鼠的关节的组织学展现出正常的骨 (B) 滑膜关节 (S) 和软骨 (C) 结构,在关节结构中没有血管翳浸润的迹象。来自 Sting^{-/-}DNase II^{-/-}小鼠的血清的 TNF α 、IL1 β 和 IL6 的水平仍处于较低水平,如从我们对缺乏 STING 的 BMDM 的阵列分析中所预测 (表 3)。在 Sting^{-/-}DNase II^{-/-}小鼠的关节内没有 CD4、CD68 或 TRAP 阳性细胞浸润的迹象。Sting^{-/-}DNase II^{-/-}小鼠的血清分析还表明类风湿因子 (RF)、抗 -dsDNA 抗体或 MMP3 的水平未升高。因此,STING 的缺失消除了负责自我 DNA 介导的多关节炎的促炎细胞因子产生。

[0065] STING 负责炎症性疾病,例如像艾卡迪 - 古铁雷斯综合征 (AGS)。AGS 从遗传学角度被确定为脑病并且表征为基底节和白质的钙化、脱髓鞘。脑脊液中的高水平的淋巴细胞和 I 型 IFN。这些特征模拟了慢性感染。I 型 IFN 的血清水平在自身免疫综合征系统性红斑狼疮 (SLE) 中也是升高的。AGS 由 3' -5' DNA 核酸外切酶 TREX1 的突变导致。TREX1 功能缺失的 DNA 种类在细胞的 ER 中积聚并且激活细胞质 DNA 传感器 (STING)。TREX1 消化这一 DNA 源 (看家功能 (housekeeping function)) 以阻止先天性免疫基因激活。

[0066] 鉴于 STING 似乎在细胞凋亡缺陷小鼠中负责炎症性疾病,接下来评估其他类型的自我 -DNA 触发的疾病是否通过 STING 途径的激活而发生。例如,3' 修复核酸外切酶 1 (Trex1) 缺陷的患者遭受艾卡迪 - 古铁雷斯综合征 (AGS),该综合征促进以脑脊液中存在高水平的 I 型 IFN 产生为表征的致死性脑炎。Trex1 缺陷小鼠展现出大约 10 周的中值寿命,因为可推测为正常被 Trex1 消化的至今仍未被表征的自我 -DNA 激活了细胞内 DNA 传感器,这触发细胞因子产生并且导致致死的炎性加重的心肌炎。最近的数据表明 STING 的缺失可以延长 Trex1^{-/-}小鼠的寿命,但原因是未知的。这些研究被延伸并且注意到,在暴露于 dsDNA90

的 Trex1 缺陷 BMDC (Trex1^{-/-}BMDC) 中 I 型 IFN 产生水平轻微升高。显著地, STING 的缺失 (Sting^{-/-}Trex1^{-/-}BMDC) 消除了 DNA 在 Trex1 缺陷型 BMDM 中增强 I 型 IFN 产生的能力。有趣地, 当与 Trex1^{-/-}小鼠相比时, 观察到 Sting^{-/-}Trex1^{-/-}、Sting^{-/+}Trex1^{-/-}的心脏的尺寸减小。与单独的 Trex1^{-/-}相比, 在 Sting^{-/-}Trex1^{-/-}中也注意到心肌炎显著减少的迹象。另外, 在 Trex1^{-/-}小鼠的血清中观察到非常普遍的抗核自身抗体 (ANA), 在 Sting^{-/-}Trex1^{-/-}小鼠的血清中几乎完全不存在抗核自身抗体。微阵列分析展示出与 Trex1^{-/-}小鼠相比, 在 Sting^{-/-}Trex1^{-/-}、Sting^{-/+}Trex1^{-/-}的心脏中显著减少水平的促炎基因。综上所述, 这些数据表明 STING 在 Trex1 缺陷小鼠中负责促炎基因诱导并且似真地负责 AGS。实例 4 : 针对 STING 的 S366 的激酶筛选

[0067] 针对作为底物的 2 种肽 (A366 和 S366), 评估 217 种蛋白激酶靶标的活性。将蛋白激酶与每种肽和 ³³P-ATP 混合并且然后测量活性 (CPM)。在 STING 中, 将以下激酶鉴定为使 S366 磷酸化。靶向这一丝氨酸的激酶的鉴定开辟了通向药物发现的途径。靶向这一关联的药物可以抑制 STING 活性并且可以用于抑制 STING 活性的治疗目的。STING 过活性可以导致可以恶化癌症的炎性疾病。

[0068] 表 4 : 针对 STING 的 S366 的激酶筛选

蛋白激酶	活性 (cpm)		诱导倍数
	A366	S366	
CK1δ	15569	25185	1.62
GRK7	7263	13124	1.81
IKKα	2432	6889	2.83
IRAK4	7435	50353	6.77
MEKK1	11316	24866	2.20
NEK2	8702	162331	18.65
NEK6	5512	35556	6.45
NEK7	3619	19112	5.28
NEK9	6977	26284	3.77
PIM2	1414	3715	2.63
PKCι	6812	12820	1.88
RIPK5	1327	15966	12.03
TBK1	6603	16651	2.52
ULK1	12221	209014	17.10
ULK2	7377	155880	21.13

实例 5 : STING 负责炎症相关癌症

[0069] 将 STING WT 和 STING^{-/-}动物用 DNA 损伤剂处理并且缺乏 STING 的小鼠耐受肿瘤形成。这是因为浸润性免疫细胞 (例如树突细胞、巨噬细胞等) 吞噬已经经历坏死或细胞凋亡的损伤细胞, 并且来自此类损伤细胞的 DNA 和其他配体激活 STING 并且激活促进肿瘤形成的细胞因子的产生。STING 可以涉及协助多种多样的其他癌症的肿瘤进展中。

[0070] 图 29A-D 显示 STING 缺陷小鼠耐受 DMBA 诱导的炎症和皮肤癌发生 : 将 STING^{+/+}和 STING^{-/-}小鼠在剃毛的背侧上每周用丙酮模拟处理或用 10 μg 的 DMBA 处理, 持续 20 周。图

29A :STING 缺陷动物耐受导致皮肤癌的 DNA 损伤剂。无皮肤肿瘤的小鼠的百分比在卡普兰 - 迈耶曲线中示出。图 29B :示出了每个处理组的代表性小鼠的图片。图 29C :在模拟品或 DMBA 处理的皮肤 / 皮肤肿瘤活检上通过 H&E 染色进行组织病理学检查。在 20X 放大下拍摄图像。图 29D :在暴露于致癌物的表达 STING 的小鼠中细胞因子上调。通过 Illumina Sentrix 珠粒芯片阵列 (小鼠 WG6 版本 2) 一式两份地分析提取自模拟品或 DMBA 处理的皮肤 / 皮肤肿瘤活检的 RNA。分析总基因表达。选择最可变基因。行表示单独的基因 ;列表示单独的样品。伪颜色表明转录物水平低于、等于或高于平均值。基因表达 ;倍数变化 $\log_{10}$ 标度范围在 -5 至 5 之间。在 STING 缺陷动物的皮肤中未观察到细胞因子。

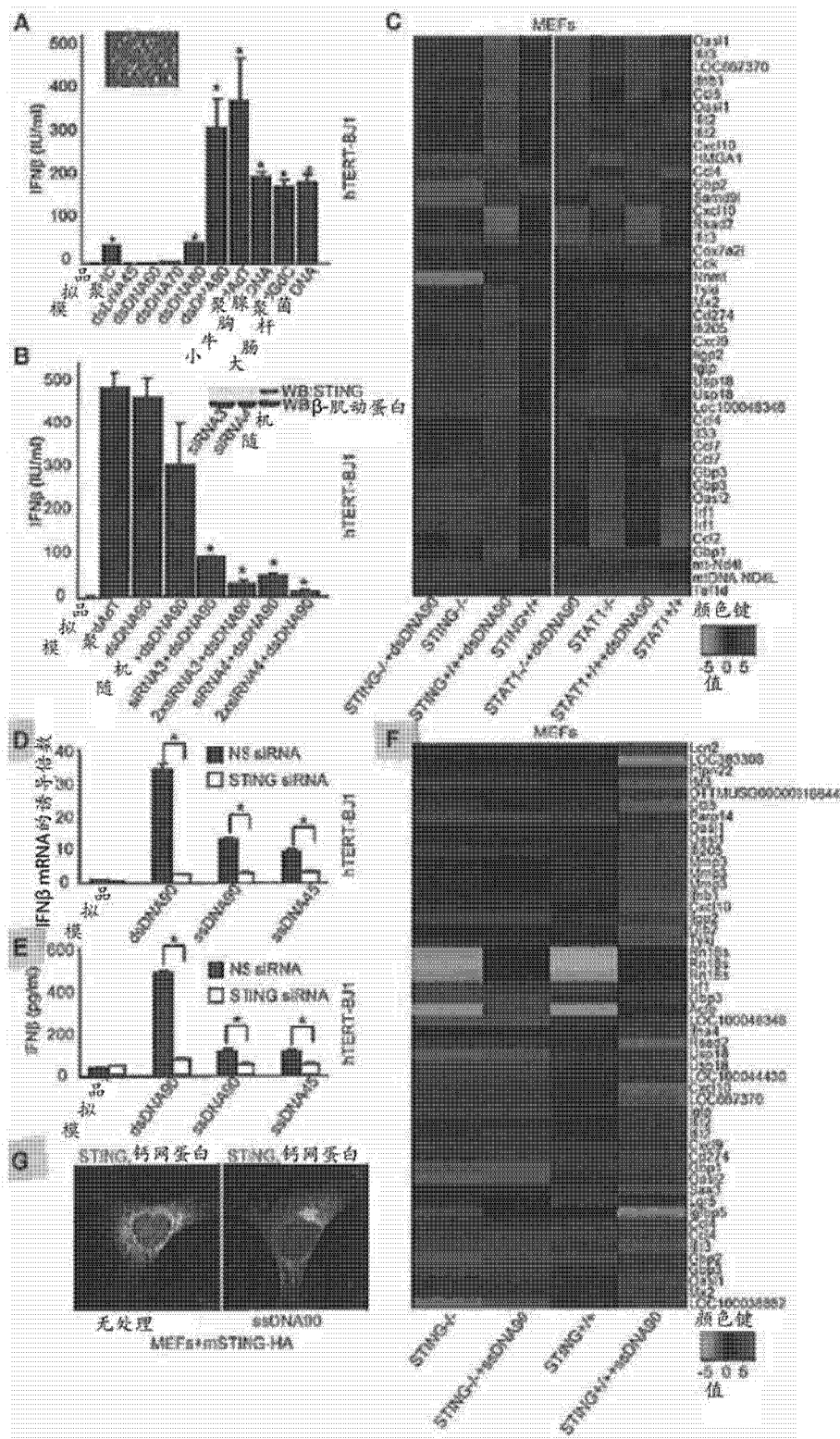


图 1A-1G

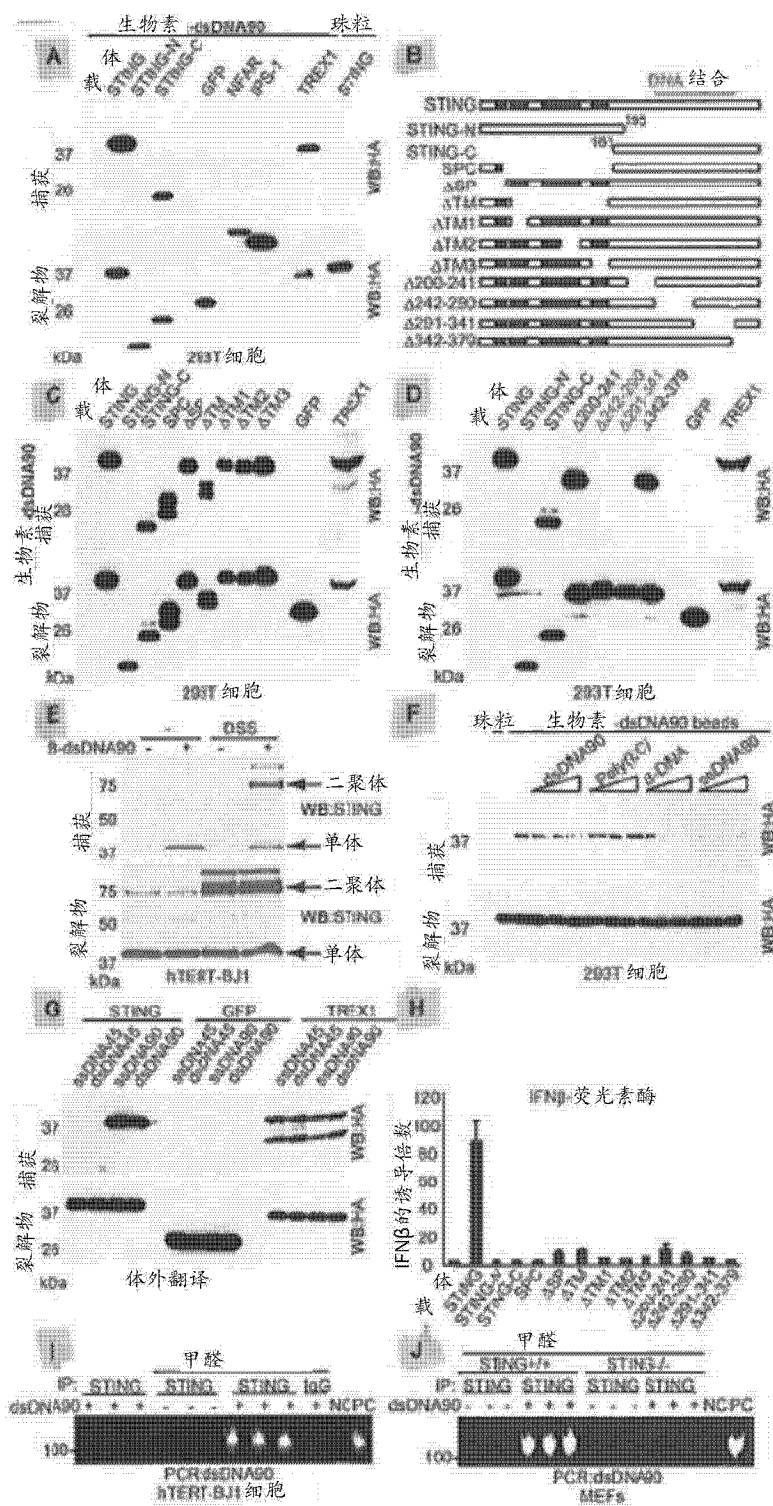


图 2A-2J

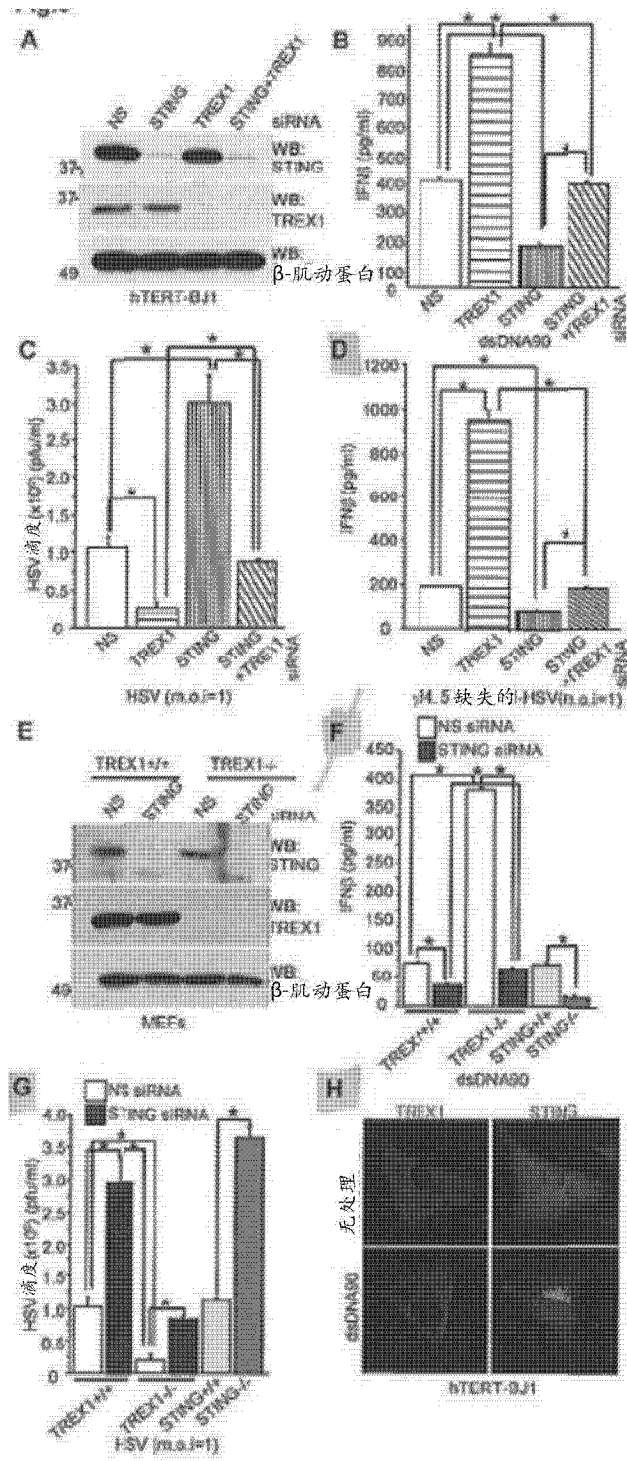


图 3A-3H

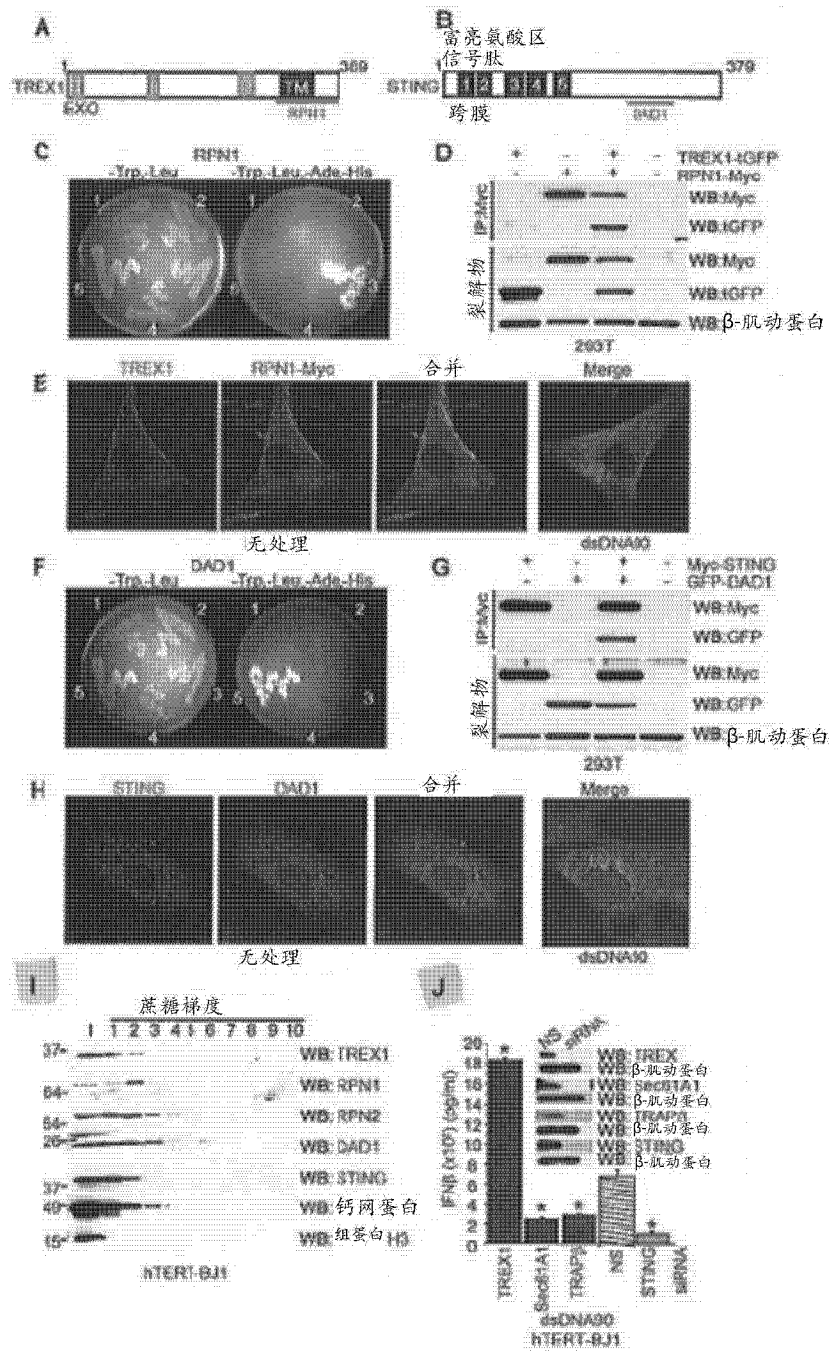


图 4A-4J

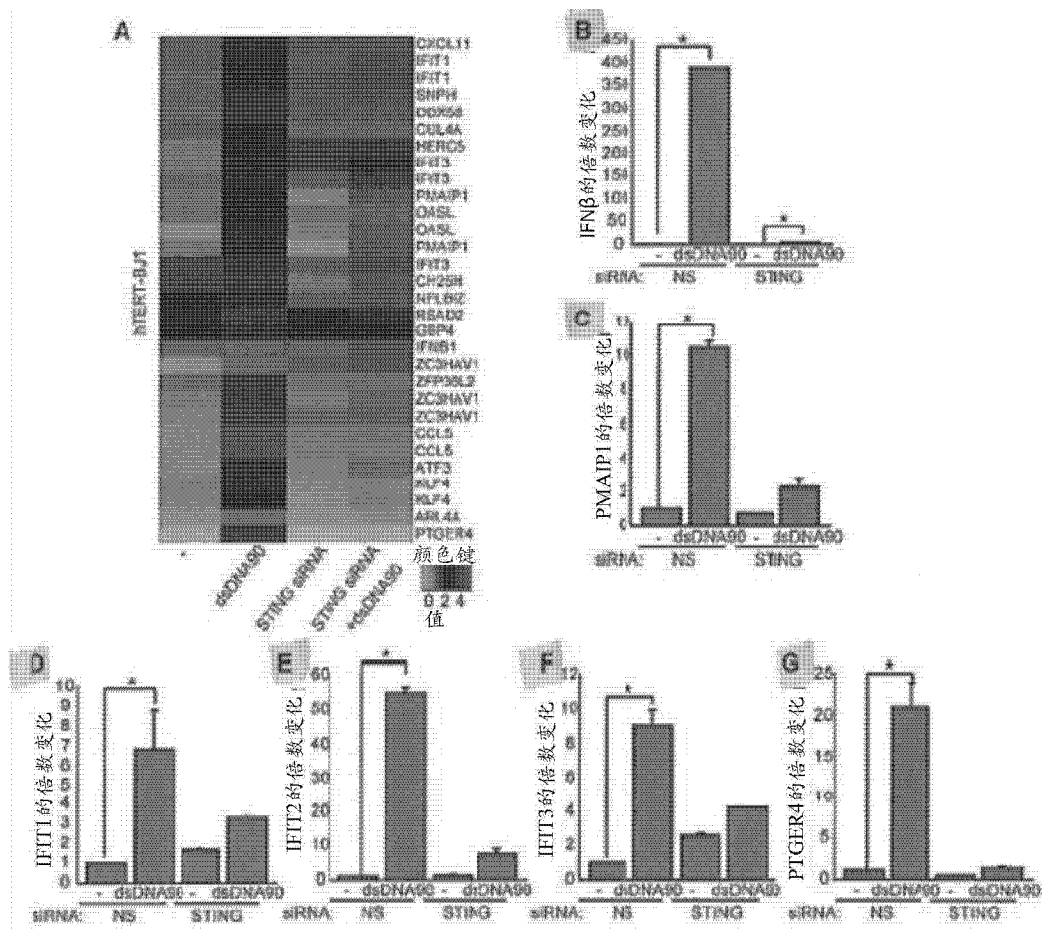


图 5A-5G

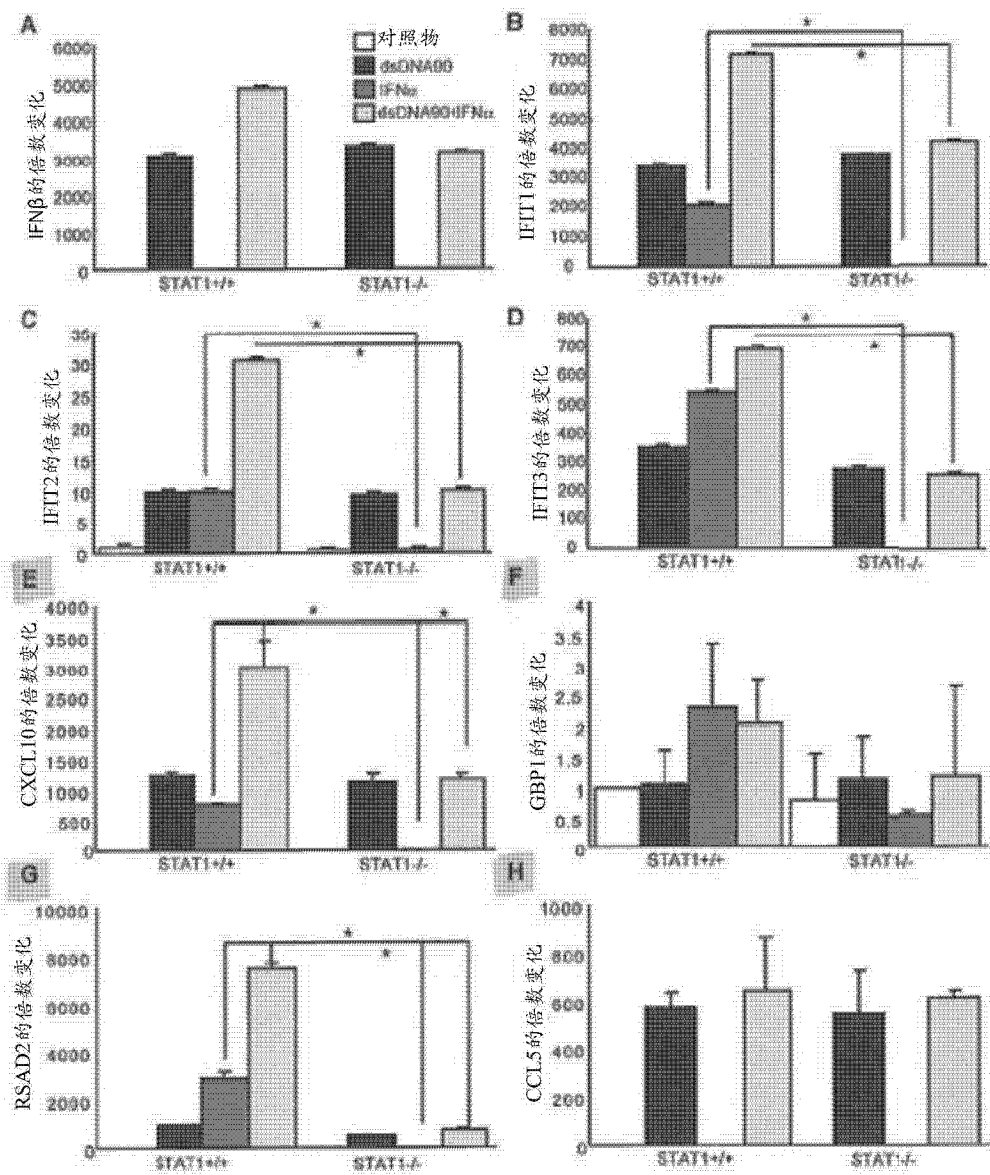


图 6A-6H

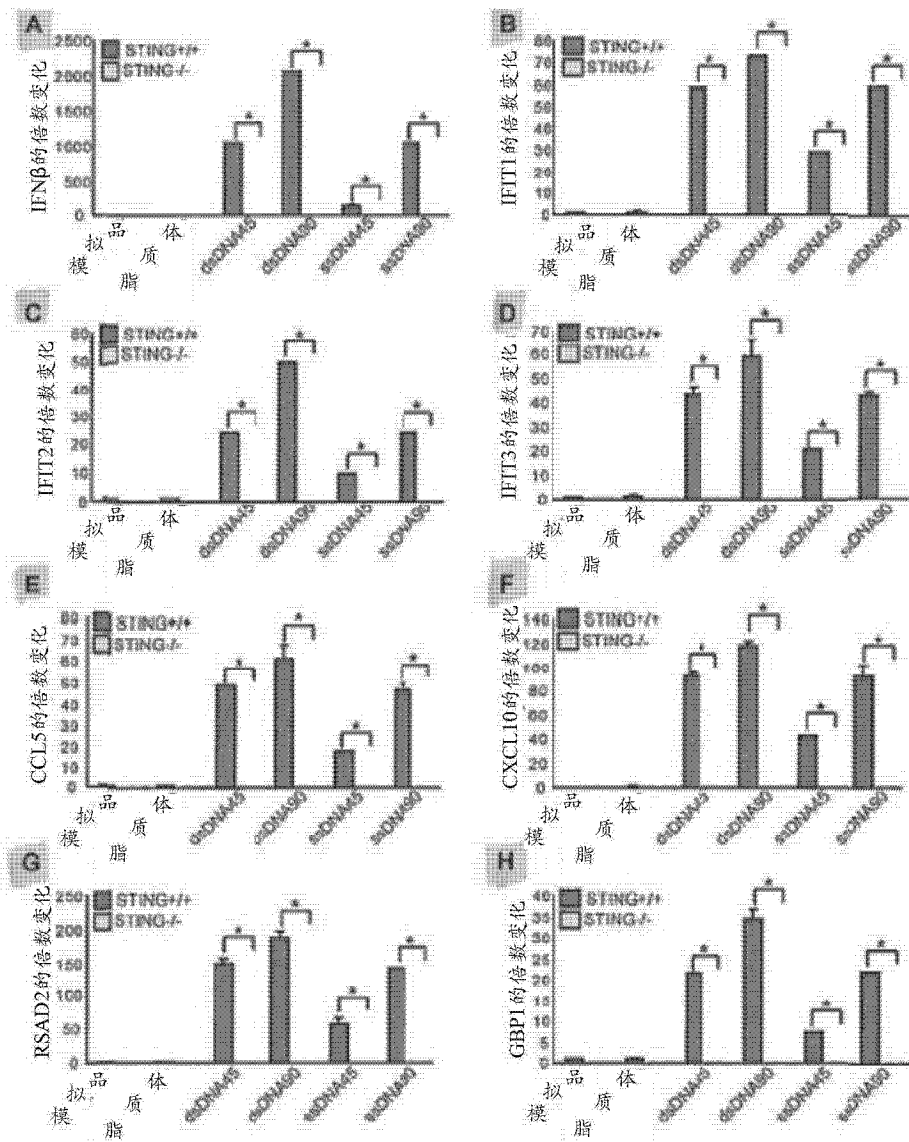


图 7A-7H

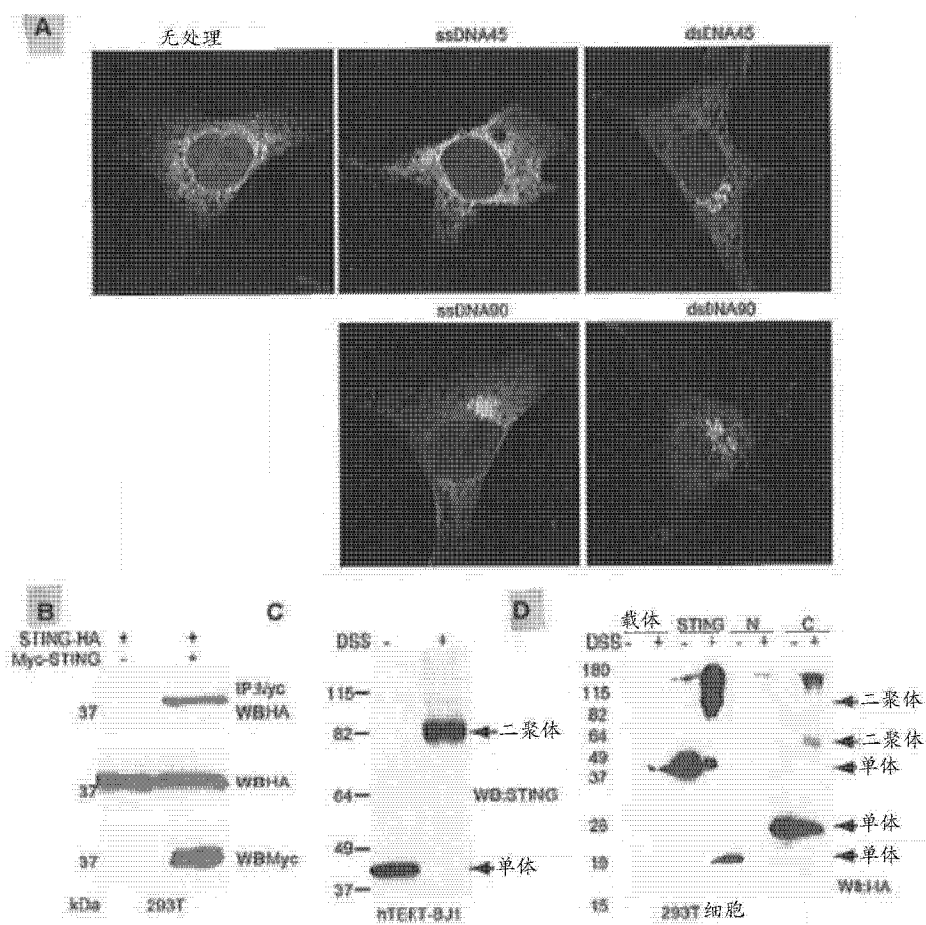


图 8A-8D

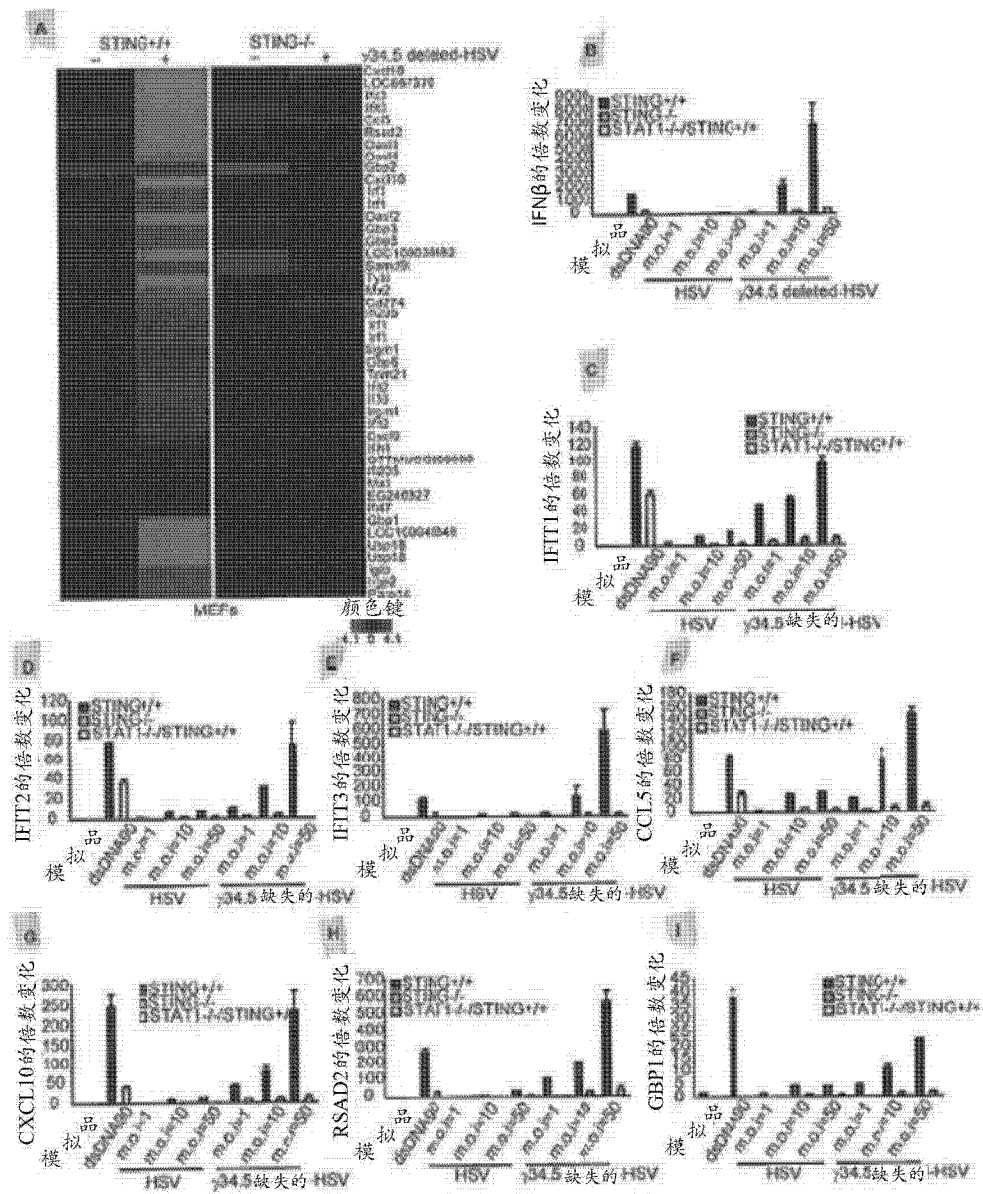


图 9A-9I

A STING依赖性dsDNA90刺激基因的启动子区中的IRF7结合位点

IFIT1

91147339-AGAGGAAAAGGAAACGGACAG-91147339

91151898-TATAGAAAGTGAAAATAGAGC-91152018

91152824-ACAAGAAATGTAAAGCCTCAG-91152914

IFIT3

34657877-AAAGGAAAGTGAAACTTACC-34657857

34657911-AAGTAGAAAGTGAAACAGACT-34657891

GCL6

83348301-CAAGAAACCGAAACCCGATT-83348321

RSAD2

27133518-ATGAAAGAAATTGAAACATTCT-27133498

FAM46A

82482902-TTCGAGAATCGAAACCAGTT-82482972

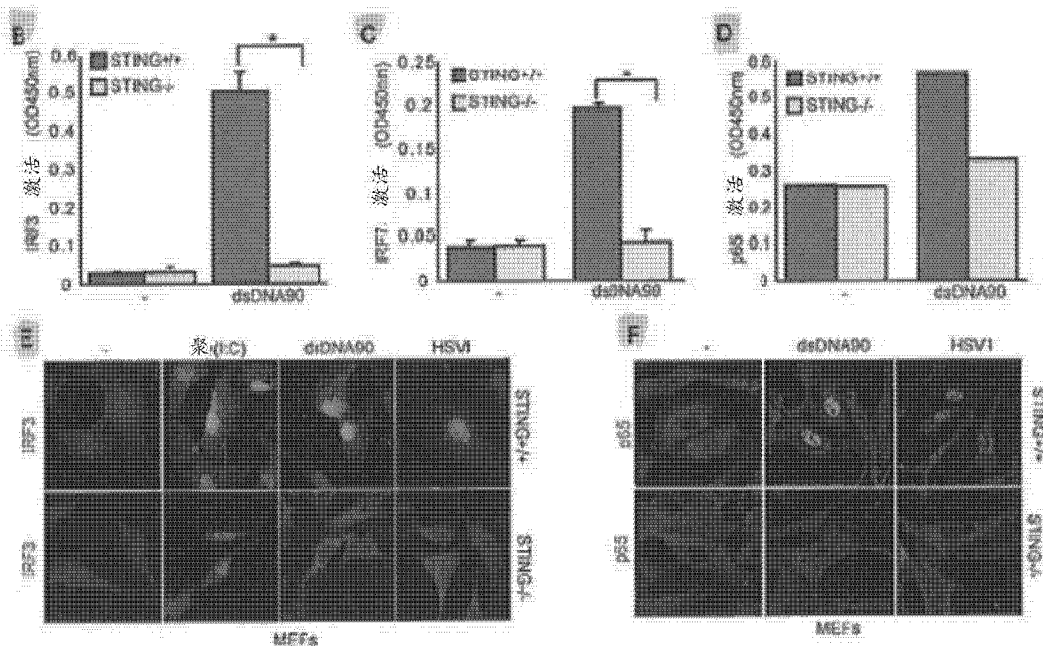


图 10A-10F

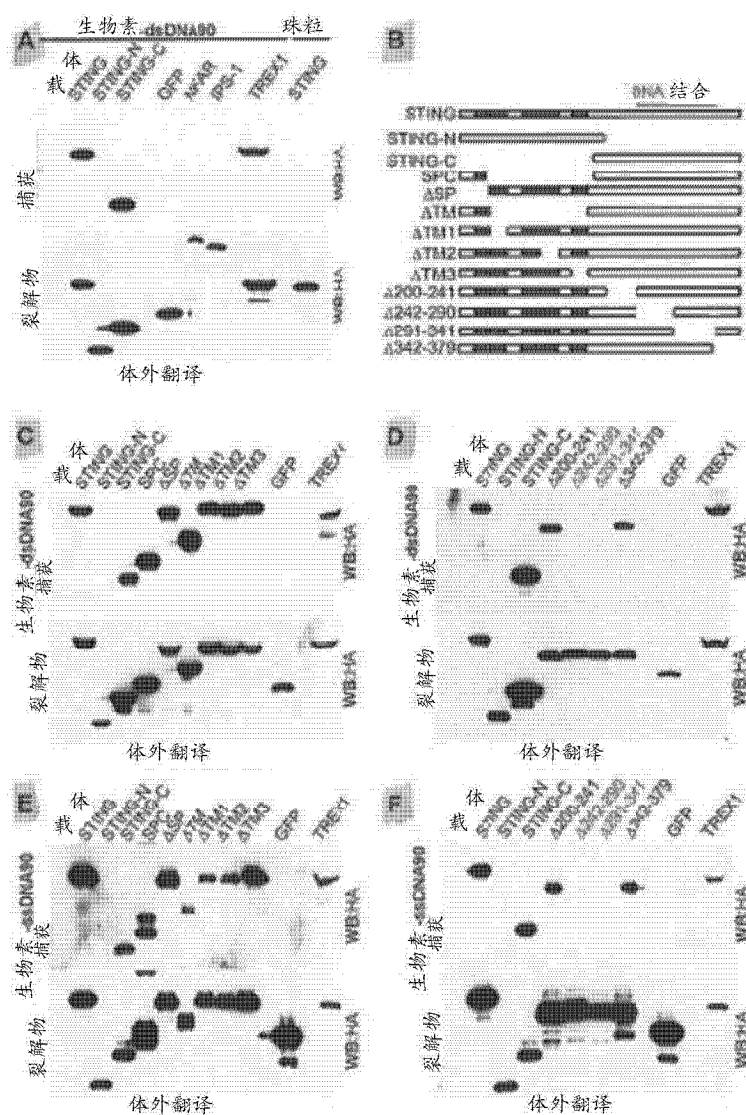


图 11A-11F

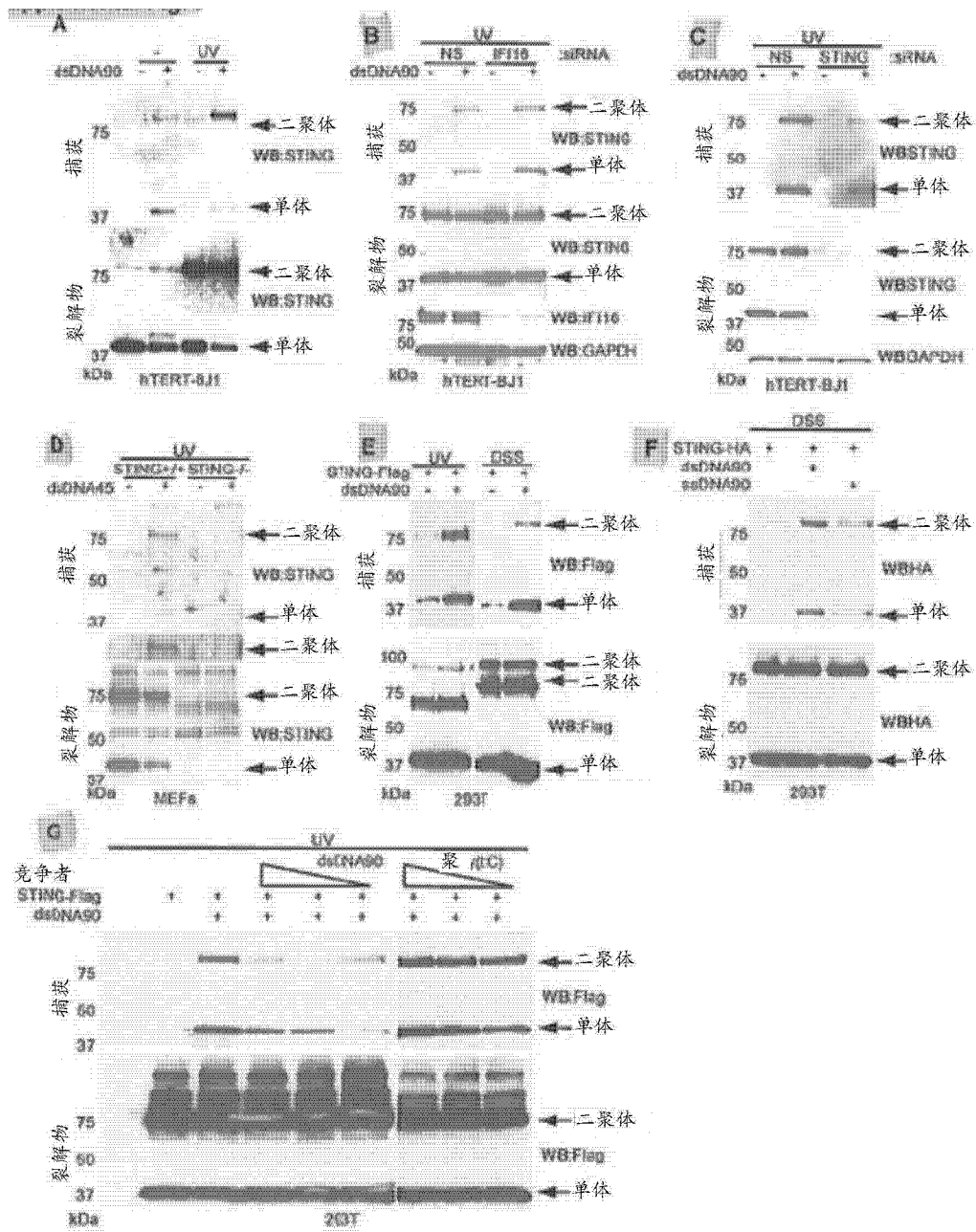


图 12A-12G

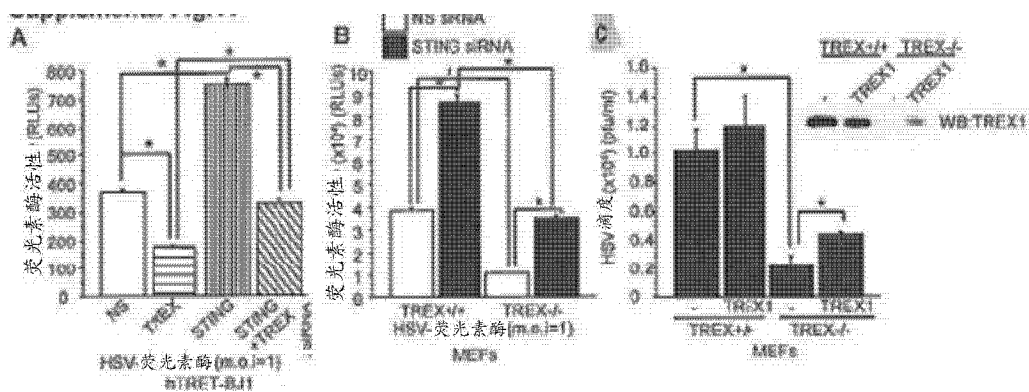


图 15A-15C

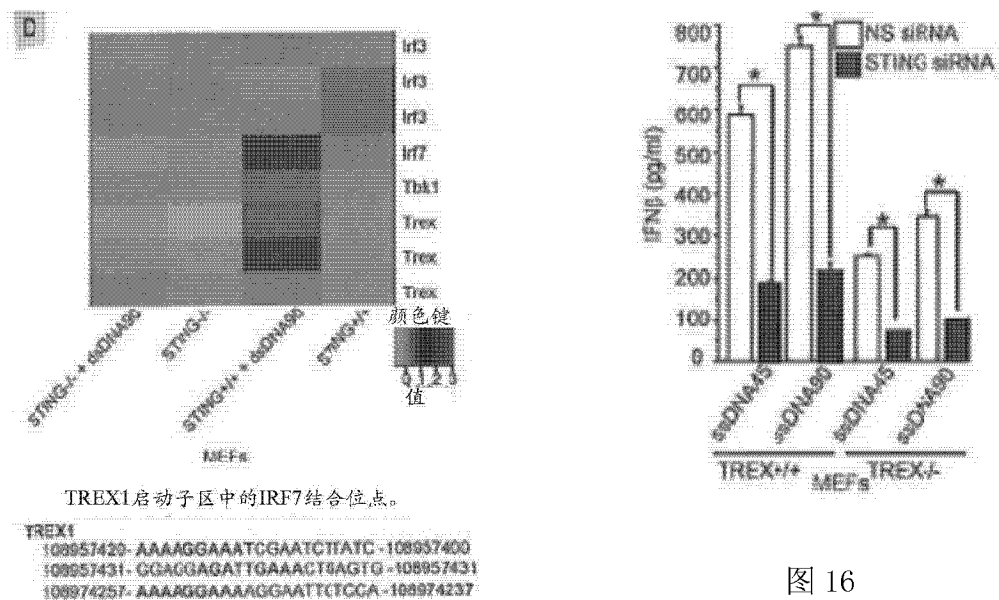


图 16

图 15D

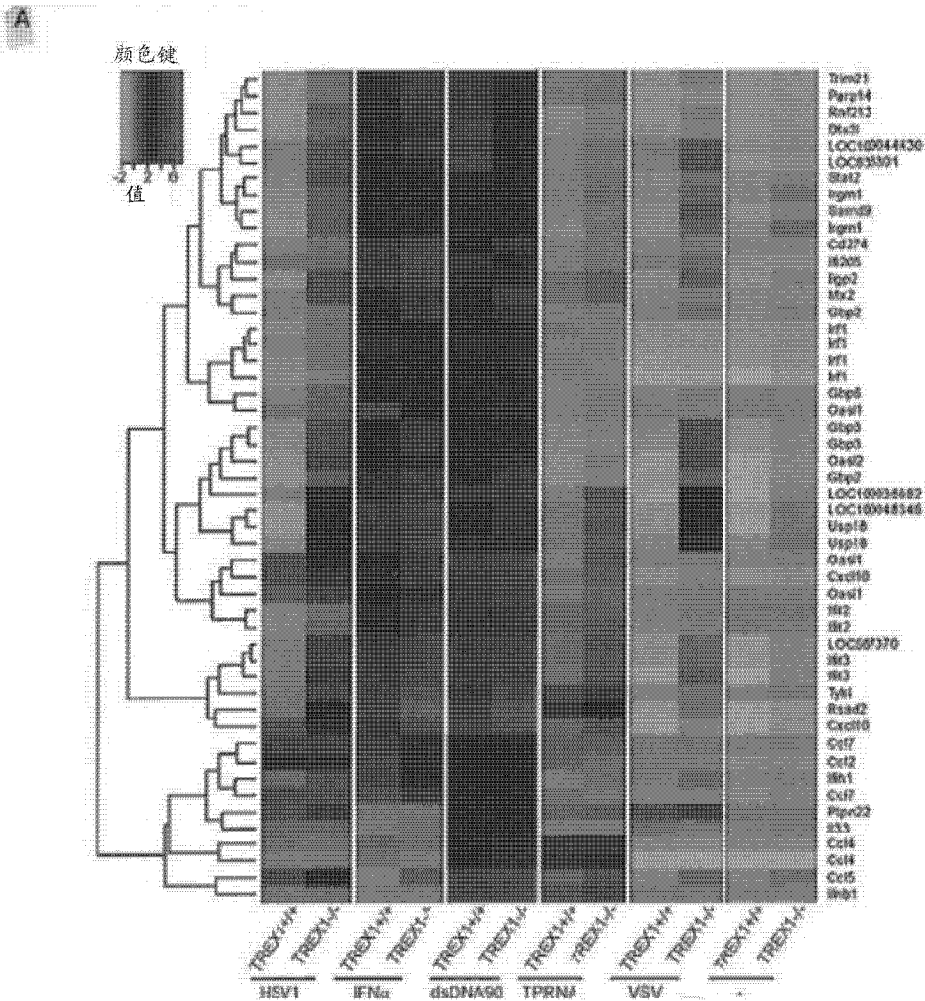


图 17A

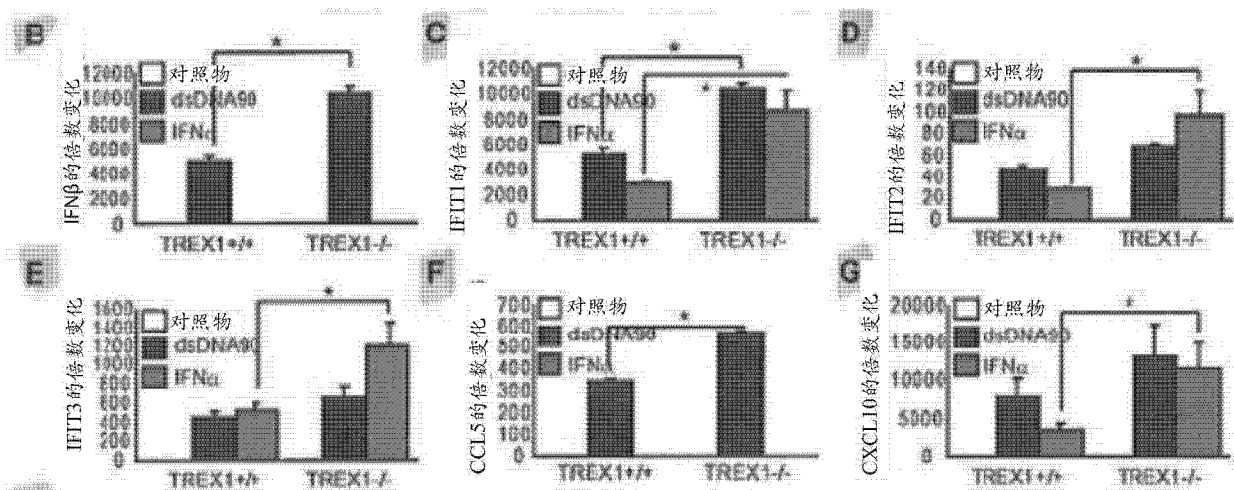


图 17B-17G

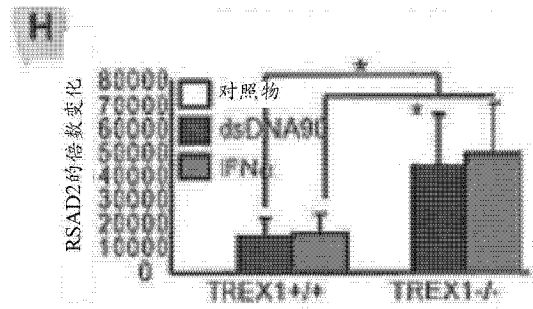


图 17H

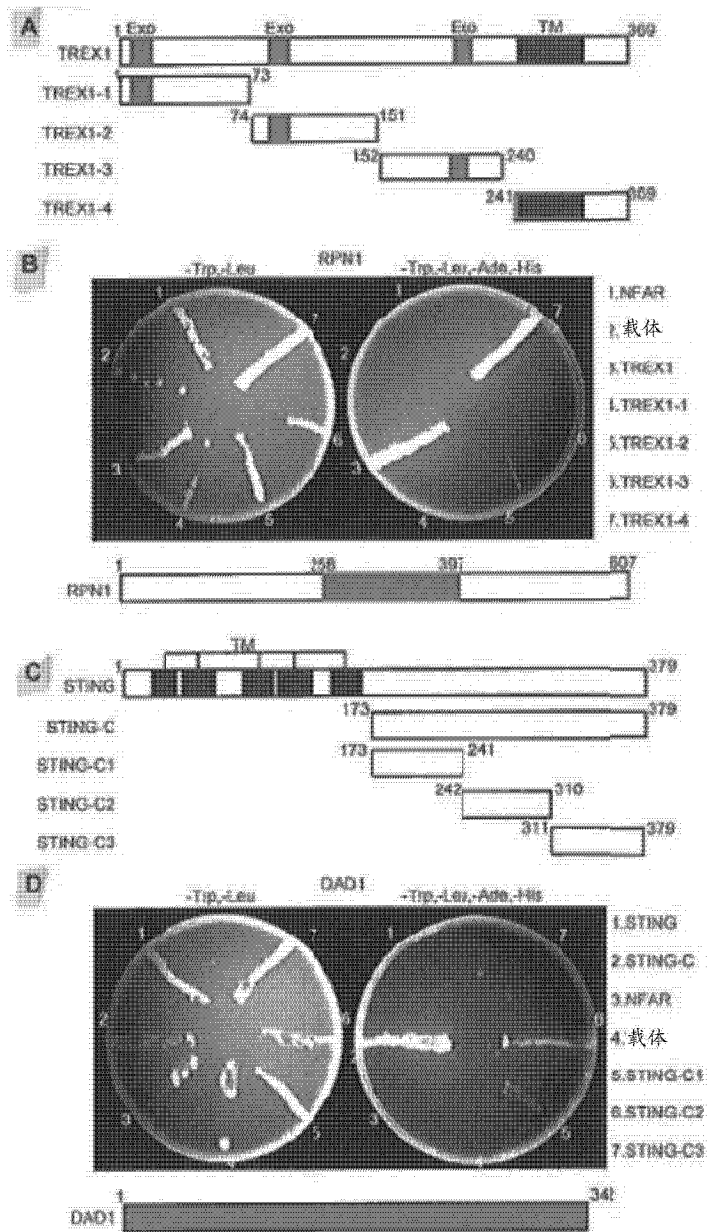


图 18A-18D

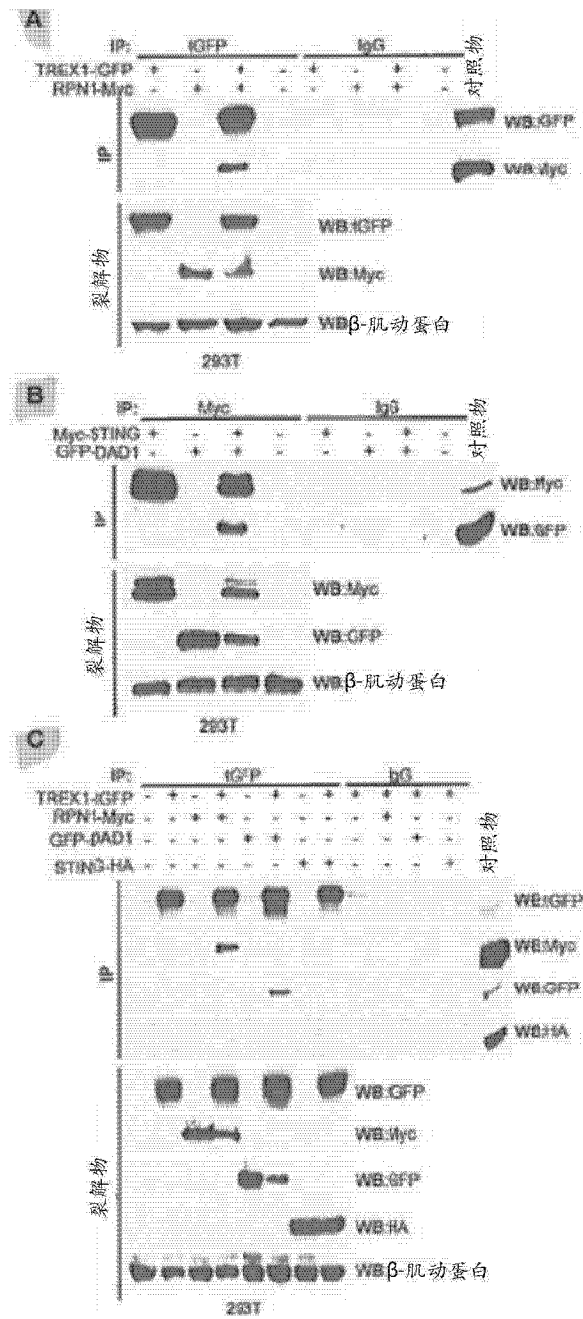


图 19A-19C

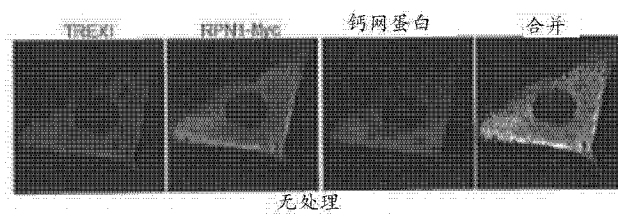


图 20

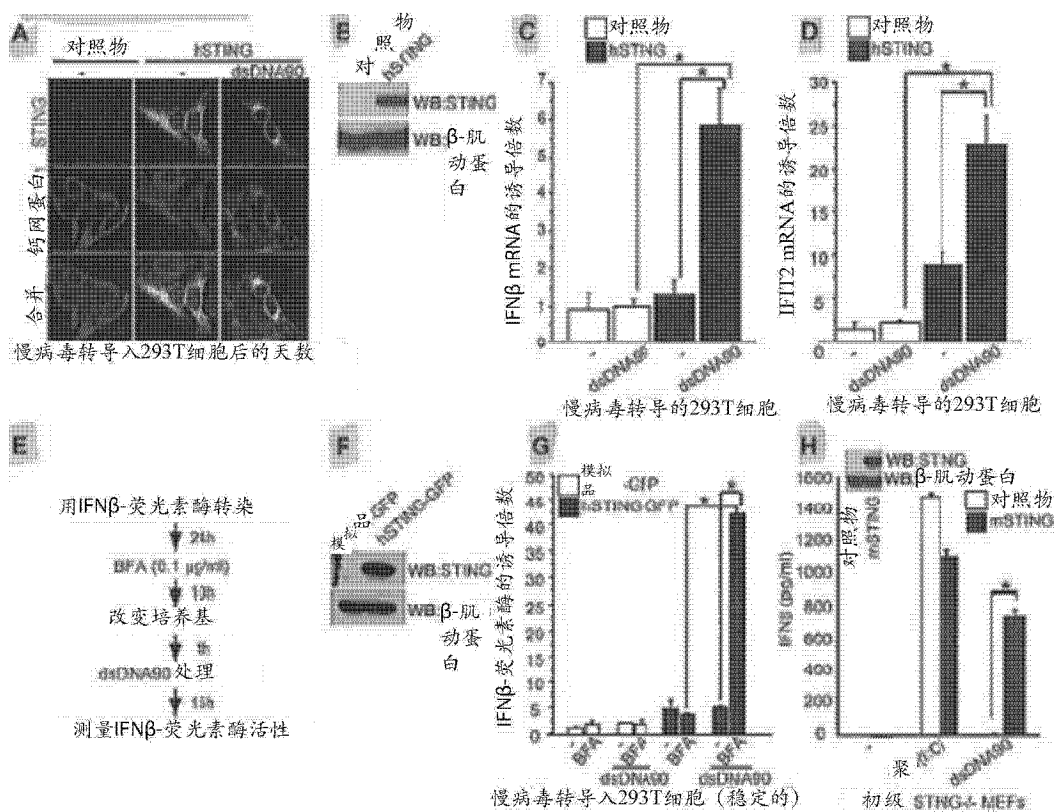


图 21A-21H

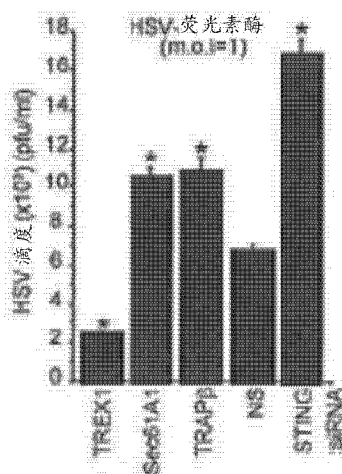


图 22

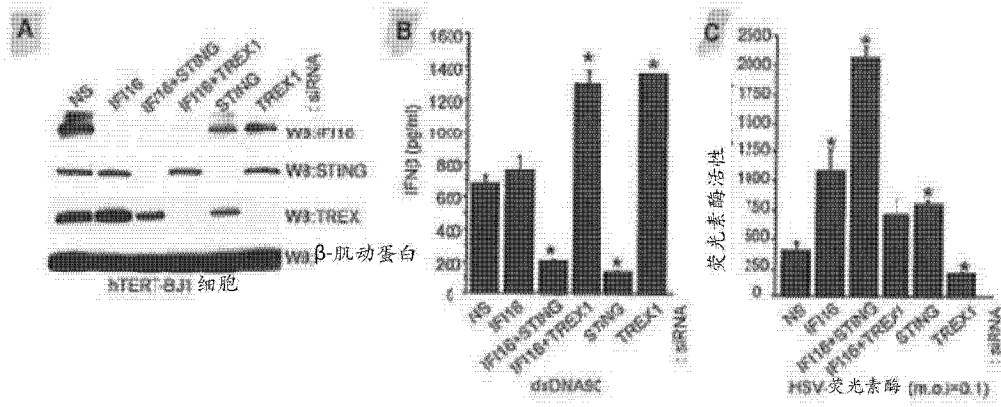


图 23A-23C

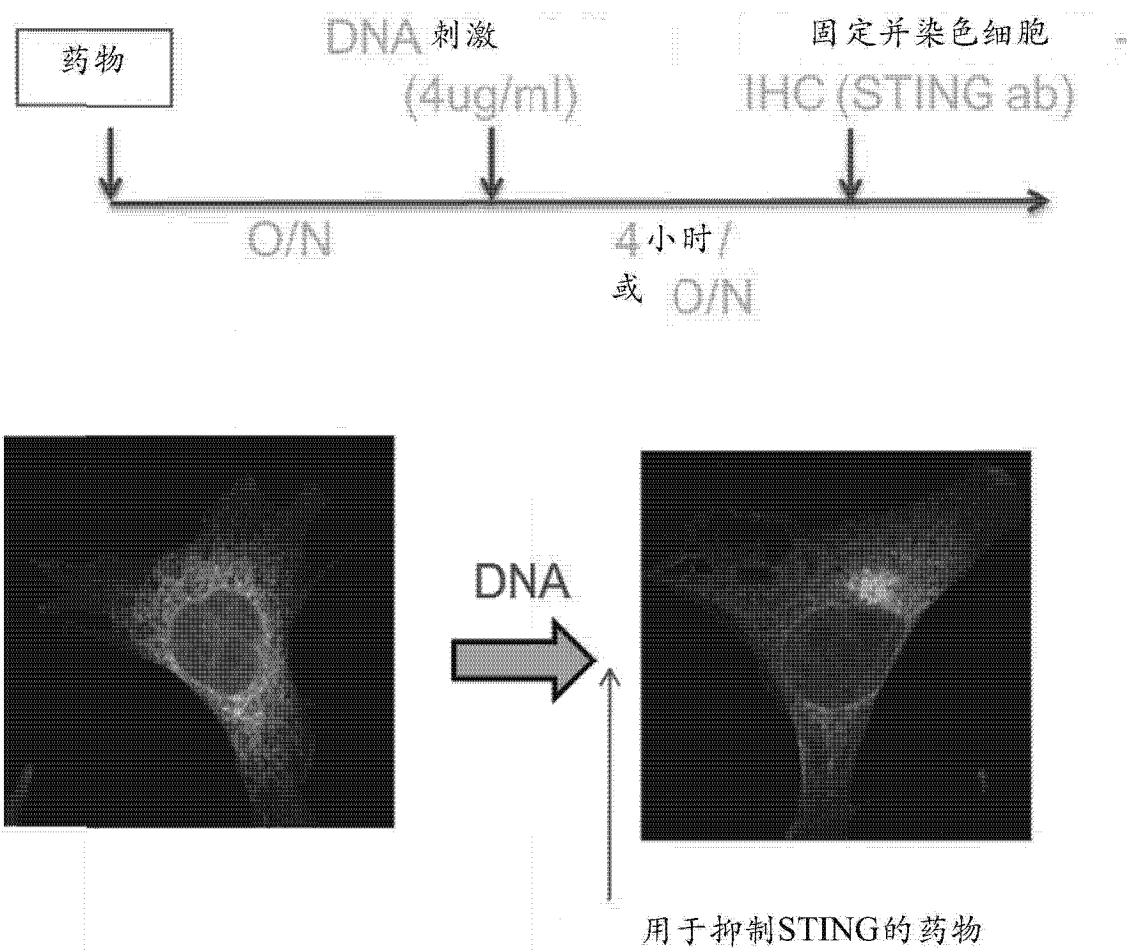


图 24

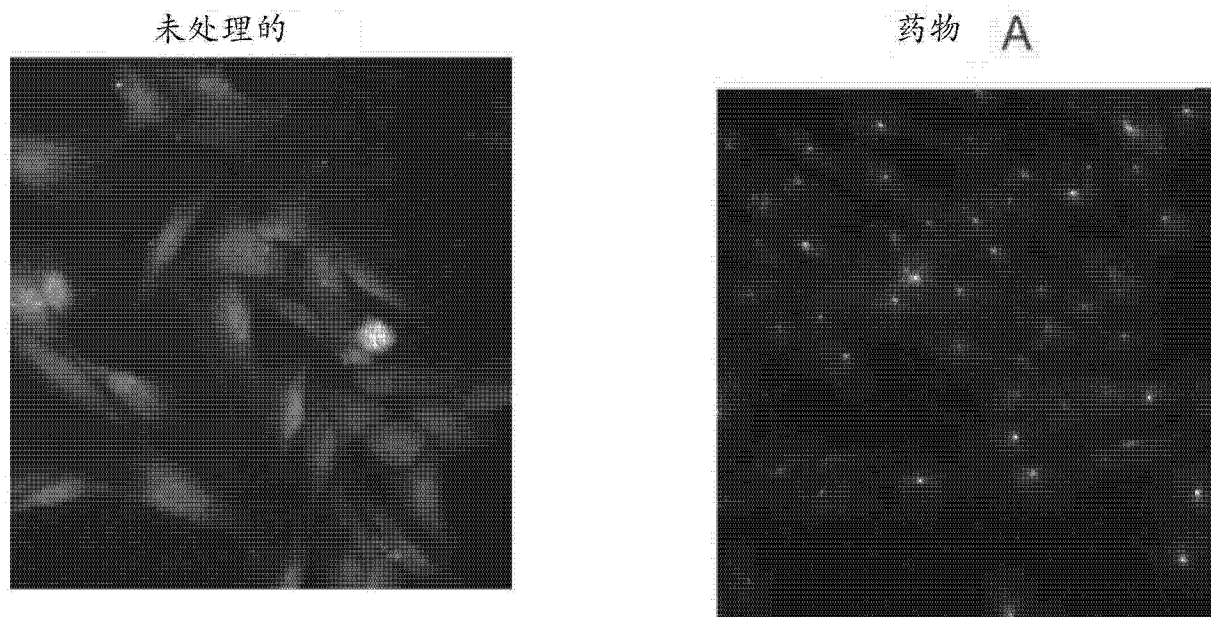


图 25

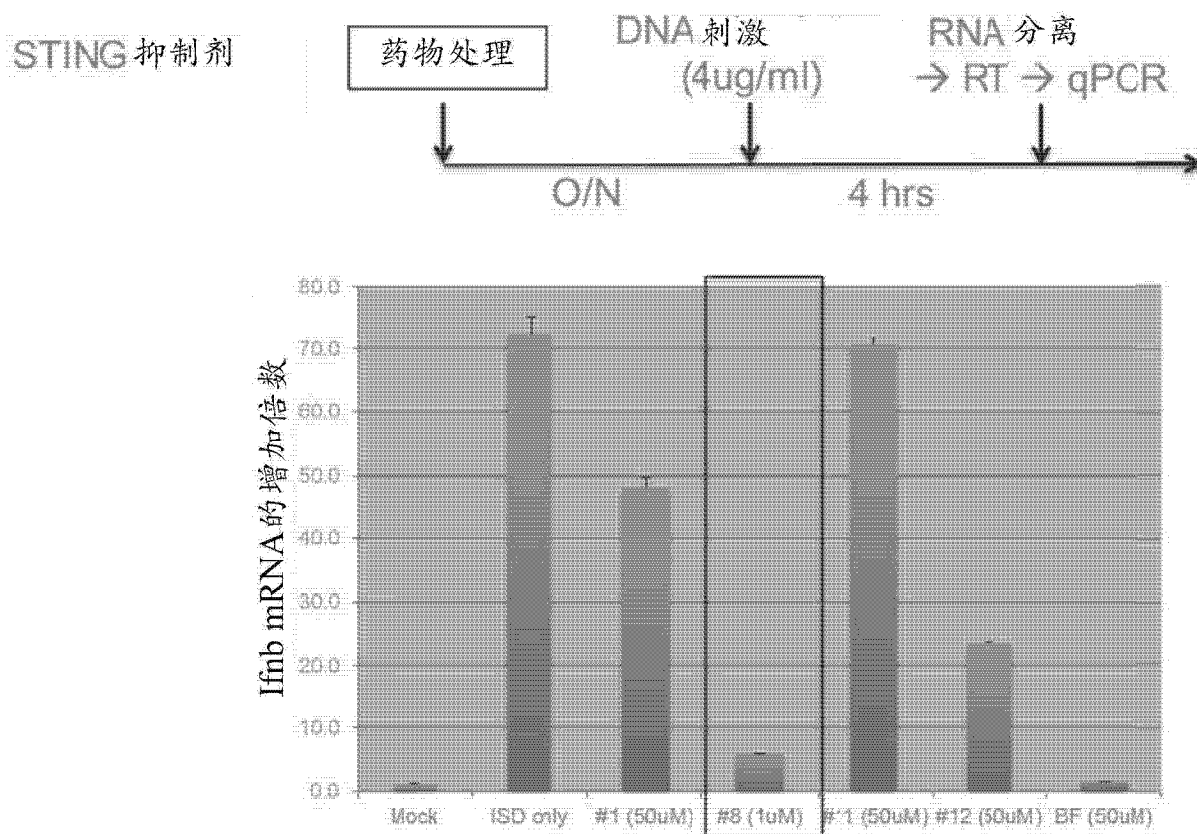


图 26



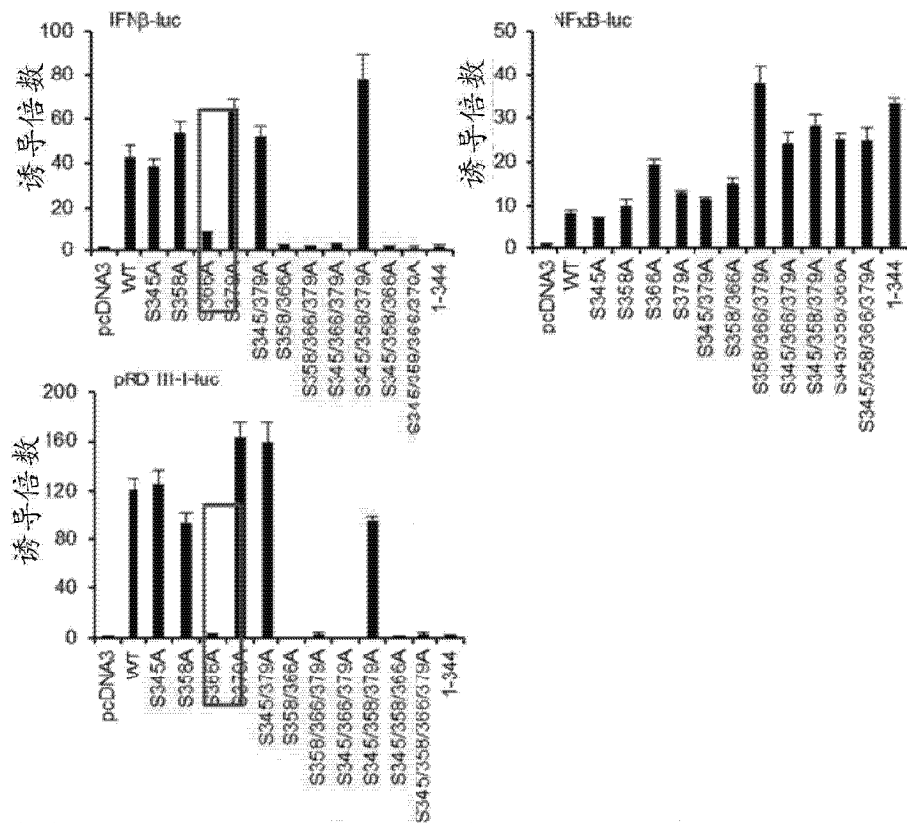
图例

蛋白质覆盖 肽谱
M*:+15.99490 Met 亚砷 (b pH 假象) C*:+14.01570 丙酰胺 (凝胶假象) STY@:+79.96630
磷酸化 (经鉴定的) K*:+114.04293 泛素化 (未观察到) 342, 353-356: 替代位置
366: 微弱的

	S345	S366	S379	
小鼠	HIRQEEKEEVTMNAPMTSVAPPP-SVLSQEPRLLISGMQPLPLRTDLI			378
大鼠	HIRQEEKEEVTMSPPTSVAPRP-SLLSQEPRLLISGMQPLPLRTDLI			379
黑猩猩	HLRQEKEEVTVGLKTSVAPST-STMSEPEPELLISGMKPLPLRTDPS			379
猴	HLRQEKEEVTVGLKTSVAPST-STMSEPEPELLISGMKPLPLRTDPS			379
牛	HLRQEKEEVTVGLKTSVAPST-STMSEPEPELLISGMKPLPLRTDPS			379
野猪	HLRQEERE-VTMGSTETSVMPGS-SVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVF			378
狗	HLRQEERE-VTMGSTETSVMPGS-SVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVF			378
兔	HLRQEERE-VTMGSTETSVMPGS-SVLSQEPELLISGLEKPLPLRSDVF			422
鸡	HLRQEEEREVTMGMDSIVPTS-STLSQEPEPELLISGMQPLPLRSDIF			380
鸭	HLRQEEEREVTMGMDSIVPTS-STLSQEPEPELLISGMQPLPLRSDIF			395
蟾	HLRQEEEREVTMGMDSIVPTS-STLSQEPEPELLISGMQPLPLRSDIF			329
马	HLRQEEEREVTMGMDSIVPTS-STLSQEPEPELLISGMQPLPLRSDIF			398
斑	HLRQEEEREVTMGMDSIVPTS-STLSQEPEPELLISGMQPLPLRSDIF			377
海	HLRQEEEREVTMGMDSIVPTS-STLSQEPEPELLISGMQPLPLRSDIF			348
果	HLRQEEEREVTMGMDSIVPTS-STLSQEPEPELLISGMQPLPLRSDIF			

图 27

293T luc



具有突变体hSTING的STING^{-/-} MEF中的mIFNβ ELISA

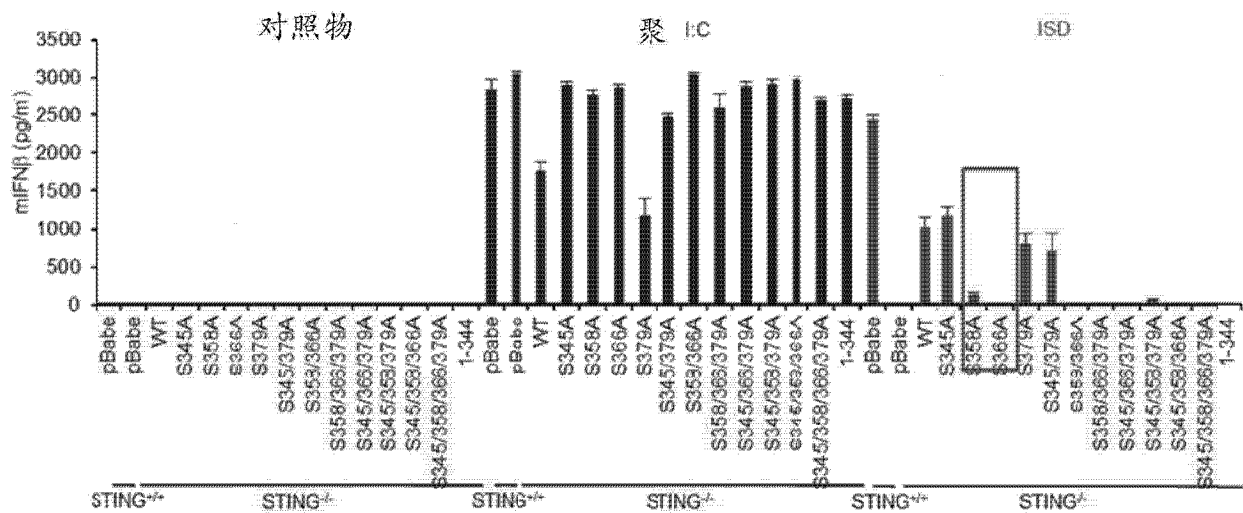


图 28

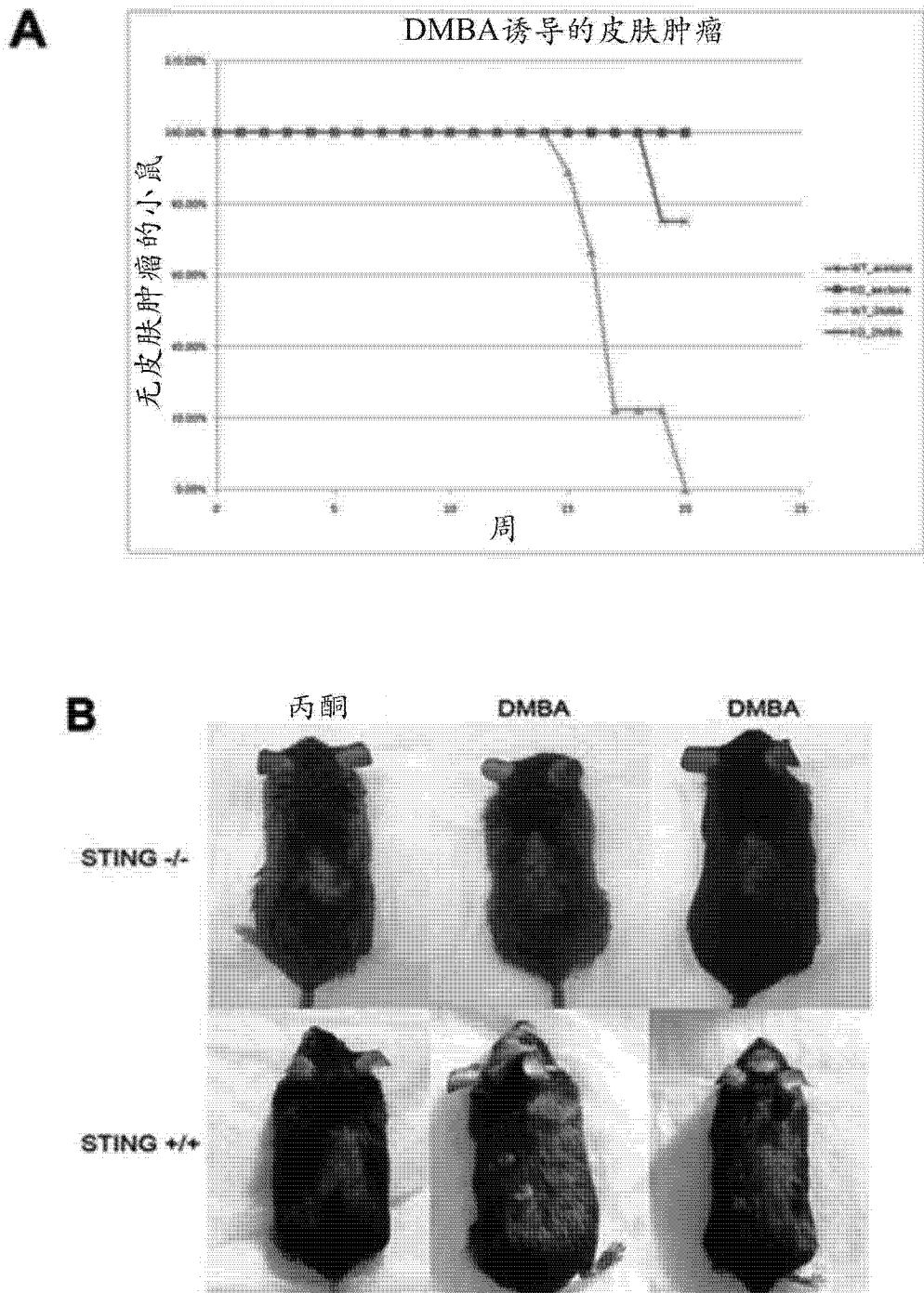


图 29A-29B

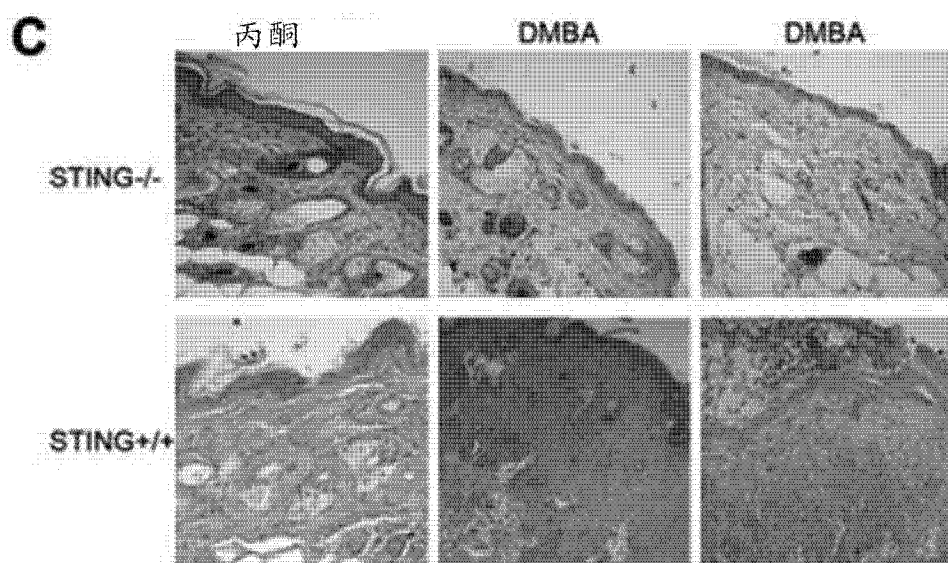


图 29C



图 29D