



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113614535 B

(45) 授权公告日 2024.08.16

(21) 申请号 201980087173.2

(22) 申请日 2019.10.31

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113614535 A

(43) 申请公布日 2021.11.05

(30) 优先权数据

62/753,802 2018.10.31 US

62/896,483 2019.09.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.06.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/059379 2019.10.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/089841 EN 2020.05.07

(73) 专利权人 亚利桑那大学评议会

地址 美国亚利桑那州

(72) 发明人 J·G·N·加西亚

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 刘盈盈

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 2018191751 A1, 2018.10.18

审查员 万青

权利要求书2页 说明书42页

序列表6页 附图23页

(54) 发明名称

用于辐射诱导的肺损伤的生物标志物和使用方法

(57) 摘要

本公开内容涉及使用烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (NAMPT) 作为辐射诱导的肺损伤 (RILI) 的生物标志物的方法 (例如, 体外方法)。本文提供了一种体外方法, 其用于通过提供来自受试者的组织或血浆样本并检测其中的NAMPT水平来诊断、预后和/或监测人类受试者中的RILI, 其中相比于健康对照或参考值, 来自所述受试者的所述组织或血浆样本中的更高NAMPT水平指示在所述受试者中存在RILI。本文还提供了一种方法, 所述方法通过以下方法检测人类受试者中的NAMPT: 从所述受试者中获得生物样本, 通过将所述样本与特异性结合NAMPT的捕获剂接触检测在所述样本中NAMPT的存在情况, 和检测NAMPT与所述捕获剂之间的结合。

1. 一种结合烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (NAMPT) 的捕获剂在制备用于进行在人类受试者中诊断、预后和/或监测辐射诱导的肺损伤 (RILI) 的体外方法的诊断剂中的用途, 所述方法包括以下步骤: (a) 提供来自所述人类受试者的组织或血浆样本, (b) 检测在所述组织或血浆样本中 NAMPT 的水平, 其中相比于健康对照或参考值, 如在步骤 (b) 中确定的来自所述人类受试者的所述组织或血浆样本中的更高 NAMPT 水平指示在所述人类受试者中存在 RILI。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中步骤 (b) 包括检测 NAMPT 蛋白的水平。

3. 根据权利要求2所述的用途, 其中通过放射自显影、western 印迹分析、免疫组织化学或 ELISA 检测所述 NAMPT 蛋白的水平。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中所述捕获剂是抗 NAMPT 抗体。

5. 根据权利要求4所述的用途, 其中所述抗 NAMPT 抗体是放射性标记的。

6. 根据权利要求1所述的用途, 其中步骤 (b) 包括检测 NAMPT mRNA 的水平。

7. 根据权利要求6所述的用途, 其中通过 RT-PCR 检测所述 NAMPT mRNA 的水平。

8. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述捕获剂是与 SEQ ID NO:1 的核酸序列的全部或部分互补的引物对。

9. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述人类受试者显示出 RILI 的症状。

10. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述人类受试者处于发展 RILI 的风险中。

11. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述人类受试者是正在接受放射疗法的癌症患者。

12. 根据权利要求11所述的用途, 其中所述人类受试者是正在接受胸部放射疗法的癌症患者。

13. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述人类受试者暴露于电离辐射 (IR) 中。

14. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述健康对照或参考值是在对照受试者中的 NAMPT 表达水平。

15. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述对照受试者是无 RILI 的受试者。

16. 根据权利要求15所述的用途, 其中所述对照受试者是无任何肺部疾病的受试者。

17. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述组织是肺组织、胸部组织或扁桃体组织。

18. 一种特异性结合烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (NAMPT) 的捕获剂在制备用于进行在人类受试者中检测 NAMPT 的方法的诊断剂中的用途, 所述方法包括: (a) 从所述人类受试者获得生物样本; (b) 通过将所述生物样本与所述捕获剂接触而检测在所述生物样本中是否存在 NAMPT; 和 (c) 检测 NAMPT 与所述捕获剂之间的结合, 其中所述人类受试者处于发展 RILI 的风险中。

19. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述捕获剂检测 NAMPT 蛋白, 和在步骤 (c) 中 NAMPT 与所述捕获剂之间的所述结合是通过放射自显影、western 印迹分析、IHC 或 ELISA 检测的。

20. 根据权利要求19所述的用途, 其中所述捕获剂是抗 NAMPT 抗体。

21. 根据权利要求20所述的用途, 其中所述抗 NAMPT 抗体是放射性标记的。

22. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述捕获剂检测 NAMPT mRNA, 和在步骤 (c) 中 NAMPT 与所述捕获剂之间的所述结合是通过 RT-PCR 检测的。

23. 根据权利要求22所述的用途, 其中所述捕获剂是与 SEQ IDNO:1 的核酸序列的全部

或一部分互补的引物对。

24. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述人类受试者显示出RILI的症状。

25. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述人类受试者是正在接受放射疗法的癌症患者。

26. 根据权利要求25所述的用途, 其中所述人类受试者是正在接受胸部放射疗法的癌症患者。

27. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述人类受试者暴露于电离辐射 (IR) 中。

28. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述方法还包括 (d) 将在所述人类受试者中的NAMPT水平与健康对照或参考值进行比较, 其中相比于所述健康对照或参考值, 来自所述人类受试者的所述生物样本中的更高NAMPT水平指示在所述人类受试者中存在RILI。

29. 根据权利要求28所述的用途, 其中所述健康对照或参考值是对照受试者的NAMPT表达水平。

30. 根据权利要求29所述的用途, 其中所述对照受试者是无RILI的受试者。

31. 根据权利要求30所述的用途, 其中所述对照受试者是无任何肺部疾病的受试者。

32. 根据权利要求18所述的用途, 其中所述生物样本是组织或血浆。

33. 根据权利要求32所述的用途, 其中所述组织是肺组织、胸部组织或扁桃体组织。

用于辐射诱导的肺损伤的生物标志物和使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2018年10月31日提交的美国临时申请号62/753,802和2019年9月5日提交的美国临时申请号62/896,483的优先权。这些优先权申请的内容在此通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含一个序列表,该序列表已以ASCII格式以电子方式提交,并且其全部内容通过引用并入本文。所述ASCII副本创建于2019年10月30日,名为A105818_1010W0_SL.txt,大小为10,316字节。

背景技术

[0005] 对于接受胸部放疗的个体(例如,癌症患者)或暴露于电离辐射(IR)(例如,来自核事故)的个体,辐射诱发的肺损伤(RILI)的发展是一种致残且可能致命的毒性。在RILI的两个主要组成部分中,最突出的是放射性肺炎,这是一种亚急性并发症,发生在IR暴露后4-20周,由对IR的严重炎症反应诱发。导致放射性肺炎发展的危险因素是多因素的,但包括总辐射剂量、剂量率分数大小(每日剂量增量)、肺受照体积、共病因素(例如,肺气肿)和未知的遗传因素。尽管估计值各不相同,但在接受IR肺部照射后,放射性肺炎通常发生在约10%的患者中,包括5-15%接受放疗的肺癌患者和约2-3%的乳腺癌患者在保乳手术后接受术后放疗时出现局灶性放射性肺炎。放射性肺炎的严重程度范围从轻微的、自限性非特异性呼吸道症状到需要机械通气的严重呼吸功能不全,具有严重残疾或死亡。而相比之下,第二个RILI组成部分,辐射诱导的肺纤维化(RILF),是在IR暴露后6-24个月出现的晚期延迟毒性,如果纤维化区域广泛,可导致严重的呼吸系统损害、残疾和死亡。不幸的是,肺功能减弱的RILF的发展限制了有效杀死肿瘤细胞所需的辐射剂量的使用。由于促血管生成和促纤维生成刺激,RILF的病理生理学包括持续炎症、细胞因子释放和微血管变化。RILF的管理的选择有限,主要包括支持性护理。迄今为止,还没有经过验证的疗法可用于限制RILF的发展或严重程度。

[0006] 最近的核事故,如2011年的福岛事件和潜在的恐怖主义行为,加剧了对灾难性IR辐射的担忧。毫不奇怪,急性、高剂量IR暴露会产生急性-亚急性-慢性炎症,最终可能导致致命的多器官衰竭,包括肺炎和RILF。超过50%的辐射事故受害者都患有RILI,单次8Gy照射会导致约30%的患者出现肺炎,有时甚至会导致死亡。不幸的是,目前国家战略储备中没有RILI对策,这是严重未满足的医疗和社会需求。

[0007] 由全胸肺照射(WTLI)、全身照射(TBI)或局部照射(PBI)引起的RILI的病理学是复杂的,包括不受控制的炎症(例如,活性氧物质、细胞因子、炎症细胞等)的恶化作用,其增加血管通透性,损害气体转移和促进纤维化。尽管Toll样受体(TLR)和细胞因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-4等)是RILI发展的贡献者,但是中和IR诱导的促炎细胞因子效应或阻断炎症细胞浸润的实验和临床策略令人失望。血管紧张素转换酶抑制剂(例如,赖诺普利和卡托普利)、己酮茶碱和抗氧化剂(例如,氨磷汀)等疗法虽然在临床前模型中显示出前景,但未能在人类

中显示出实质性的临床获益。此外,其中只有少数在大型动物模型中进行了实际测试。作为RILI护理标准的高剂量皮质类固醇的有用性仍然存在争议。尽管具有急性疗效,但使用类固醇会出现长期并发症,包括预后不良、需要持续的类固醇治疗和频繁的、可能致命的复发(“召回”肺炎)。多项研究发现预防性类固醇给药几乎没有益处。临床前研究发现,使用泼尼松龙(10mg/kg/天)时,暴露于IR的小鼠的死亡率降低,并且类固醇戒断导致最终死亡加速,与未经治疗的小鼠相比,肺炎持续时间延长。此外,过早停药会加剧肺炎的严重程度。因此,在RILI中使用类固醇缺乏共识、其有限的疗效和严重的副作用(可能致命的复发)要求寻找更安全、更有效的RILI治疗策略,这是一个严重未满足的需求。

发明内容

[0008] 本公开内容涉及使用烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAMPT)作为辐射诱导的肺损伤(RILI)的生物标志物的方法(例如,体外方法)。

[0009] 第一个方面提供了一种用于在人类受试者中诊断、预后(prognosis)和/或监测辐射诱导的肺损伤(RILI)的体外方法,其包括以下步骤:(a)提供来自所述人类受试者的组织或血浆样本,(b)检测在所述组织或血浆样本中烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAMPT)的水平,其中相比于健康对照或参考值,如在步骤(b)中确定的来自所述人类受试者的所述组织或血浆样本中的更高NAMPT水平指示在所述人类受试者中存在RILI。

[0010] 在上述方面的一些实施方式中,步骤(b)包括检测NAMPT蛋白的水平。在某些实施方式中,NAMPT蛋白的水平是通过放射自显影检测的。在某些实施方式中,NAMPT蛋白的水平是通过western印迹分析检测的。在某些实施方式中,NAMPT蛋白的水平是通过免疫组织化学检测的。在某些实施方式中,NAMPT蛋白的水平是通过ELISA检测的。

[0011] 在一些实施方式中,NAMPT蛋白的水平是通过抗NAMPT抗体检测的。在某些实施方式中,抗NAMPT抗体是放射性标记的。

[0012] 在上述方面的其他实施方式中,步骤(b)包括检测NAMPT mRNA的水平。在某些实施方式中,NAMPT mRNA的水平是通过RT-PCR检测的。在特定实施方式中,通过与SEQ ID NO:1的核酸序列的全部或部分互补的引物对检测NAMPT mRNA的水平。

[0013] 在一些实施方式中,人类受试者显示出RILI的症状。

[0014] 在一些实施方式中,人类受试者处于发展RILI的风险中。在某些实施方式中,人类受试者是正在接受放射疗法的癌症患者。在特定实施方式中,人类受试者是正在接受胸部(thoracic)放射疗法的癌症患者。在某些实施方式中,人类受试者暴露于电离辐射(IR)中。

[0015] 在上述方面的一些实施方式中,健康对照或参考值是在对照受试者中的NAMPT表达水平。在某些实施方式中,对照受试者是无RILI的受试者。在特定实施方式中,对照受试者是无任何肺部疾病的受试者。

[0016] 在前述方面的一些实施方式中,组织是肺组织。在一些实施方式中,组织是胸部组织。在一些实施方式中,组织是扁桃体组织。

[0017] 另一个方面提供了一种在人类受试者中检测NAMPT的方法:(a)从所述人类受试者中获得生物样本;(b)通过将所述生物样本与特异性结合NAMPT的捕获剂接触而检测在所述生物样本中是否存在NAMPT;和(c)检测NAMPT与所述捕获剂之间的结合。

[0018] 在前述方面的一些实施方式中,捕获剂检测NAMPT蛋白和在步骤(c)中NAMPT与所

述捕获剂之间的所述结合是通过放射自显影检测的。在前述方面的一些实施方式中,捕获剂检测NAMPT蛋白和在步骤(c)中NAMPT与所述捕获剂之间的所述结合是通过western印迹分析检测的。在前述方面的一些实施方式中,捕获剂检测NAMPT蛋白和在步骤(c)中NAMPT与所述捕获剂之间的所述结合是通过IHC检测的。在前述方面的一些实施方式中,捕获剂检测NAMPT蛋白和在步骤(c)中NAMPT与所述捕获剂之间的所述结合是通过ELISA检测的。

[0019] 在上述方面的一些实施方式中,捕获剂是抗NAMPT抗体。在某些实施方式中,抗NAMPT抗体是放射性标记的。

[0020] 在前述方面的一些实施方式中,捕获剂检测NAMPT mRNA和在步骤(c)中NAMPT与所述捕获剂之间的所述结合是通过RT-PCR检测的。在某些实施方式中,捕获剂是与SEQ ID NO:1的核酸序列的全部或一部分互补的引物对。

[0021] 在一些实施方式中,人类受试者显示出RILI的症状。

[0022] 在一些实施方式中,人类受试者处于发展RILI的风险中。在某些实施方式中,人类受试者是正在接受放射疗法的癌症患者。在特定实施方式中,人类受试者是正在接受胸部放射疗法的癌症患者。在某些实施方式中,人类受试者暴露于电离辐射(IR)中。

[0023] 在上述方面的一些实施方式中,所述方法还包括(d)将在所述人类受试者中的NAMPT水平与健康对照或参考值进行比较,其中相比于健康对照或参考值,来自所述人类受试者的所述生物样本中的更高NAMPT水平指示在所述人类受试者中存在RILI。

[0024] 在一些实施方式中,健康对照或参考值是对照受试者的NAMPT表达水平。在某些实施方式中,对照受试者是无RILI的受试者。在特定实施方式中,对照受试者是无任何肺部疾病的受试者。

[0025] 在上述方面的一些实施方式中,生物样本是组织或血浆。在某些实施方式中,组织是肺组织。在某些实施方式中,组织是胸部组织。在某些实施方式中,组织是扁桃体组织。

附图说明

[0026] 图1是描述在辐射暴露后第1、2、6、12和18周时辐射(20Gy)对小鼠肺组织中BAL蛋白量的影响的图。图中还显示了在未辐射对照小鼠和暴露于0.1mg/kg LPS的小鼠的肺组织中BAL蛋白的量。*表示 $p=0.007$

[0027] 图2是描述在辐射暴露后第1、2、6、12和18周时辐射(20Gy)对小鼠肺组织中表达BAL的细胞(BAL细胞)的计数的影响的图。图中还显示了在未辐射对照小鼠和暴露于0.1mg/kg LPS的小鼠的肺组织中BAL细胞的计数。*表示 $p=0.007$

[0028] 图3是表示在辐射暴露后第1、2、6、12和18周时辐射(20Gy)对小鼠肺组织中表达BAL的巨噬细胞(BAL巨噬细胞)和表达BAL的PMN(BAL PMN)的计数的影响的图。图3A是显示在所示时间在辐射小鼠的肺组织中BAL巨噬细胞计数的图。图中还显示了在未辐射对照小鼠和暴露于0.1mg/kg LPS的小鼠的肺组织中BAL巨噬细胞的计数。*表示 $p=0.01$

[0029] 图3B是显示在所示时间在辐射小鼠的肺组织中BAL PMN计数的图。图中还显示了在未辐射对照小鼠和暴露于0.1mg/kg LPS的小鼠的肺组织中BAL PMN的计数。*表示 $p=0.005$

[0030] 图4提供了来自未辐射小鼠的肺组织(左图)和在辐射(20Gy)暴露后1周的小鼠肺组织(右图)的H&E染色的显微照片。

[0031] 图5描述了暴露于20Gy辐射后在小鼠肺组织中NAMPT表达分析的结果。图5A提供了来自未辐射小鼠的肺组织(左图)和在辐射(20Gy)暴露后1周的小鼠肺组织(右图)的NAMPT染色的显微照片。图5B是显示在辐射暴露后1周的小鼠肺组织切片的肺细胞和巨噬细胞中的NAMPT染色的显微照片。

[0032] 图6是描述在辐射小鼠的肺组织中NAMPT mRNA表达(在辐射暴露后1周时)相对于未辐射对照小鼠的肺组织中NAMPT mRNA表达的倍数变化的图。图中还描述了来自LPS处理小鼠的肺组织中NAMPT mRNA表达相对于来自载剂处理对照小鼠的肺组织中的NAMPT mRNA表达的倍数变化。

[0033] 图7是描述在辐射暴露后8小时、24小时、48小时、1周、2周、6周、12周和18周时辐射(20Gy)对小鼠中NAMPT血浆水平的影响的图。图中还显示了在未辐射对照小鼠和暴露于0.1mg/kg LPS的小鼠中NAMPT的血浆水平。*表示 $p<0.05$

[0034] 图8是描述在辐射暴露后4周时辐射(20Gy)对野生型(WT)和NAMPT杂合小鼠的肺组织中BAL蛋白的量的影响的图。图中还显示了在未辐射WT小鼠和未辐射NAMPT杂合小鼠的肺组织中BAL蛋白的量。

[0035] 图9是描述在接受20Gy胸部照射并使用多克隆NAMPT中和抗体或载剂治疗的小鼠肺组织中BAL蛋白的量的图。图中显示了在辐射暴露后4周时在所示小鼠中BAL蛋白的量。*表示 $p<0.05$

[0036] 图10是描述在接受20Gy胸部照射并使用多克隆NAMPT中和抗体或载剂治疗的小鼠肺组织中BAL细胞的计数的图。图中显示了在辐射暴露后4周时在所示小鼠中BAL细胞的计数。*表示 $p<0.05$

[0037] 图11是在接受20Gy胸部照射并使用多克隆NAMPT中和抗体或载剂治疗的小鼠肺组织中BAL PMN和表达BAL的淋巴细胞(BAL淋巴细胞)计数的图示。左图显示了在辐射暴露后4周时在所示小鼠中的BAL PMN计数,右图显示了在辐射暴露后4周时在所示小鼠中的BAL淋巴细胞计数。*表示 $p<0.05$

[0038] 图12是描述在使用多克隆NAMPT中和抗体治疗的辐射小鼠的肺组织中的NAMPT mRNA表达相对于在使用载剂对照治疗的辐射小鼠的肺组织中NAMPT mRNA表达的倍数变化的图。

[0039] 图13是描述在使用多克隆NAMPT中和抗体或载剂对照治疗的辐射小鼠中NAMPT血浆水平的图。

[0040] 图14是辐射对人组织和血液中NAMPT表达的影响的分析结果的图示。图14A提供了显示在人扁桃体上皮组织中NAMPT的免疫组化(IHC)染色的显微照片,所述人扁桃体上皮组织是未辐射的(下图)或暴露于8Gy电离辐射(IR)24小时(上图)。图14B是描述在对照受试者中或者在经历针对乳腺癌($n=50$)或肺癌($n=34$)的放射疗法的受试者中的NAMPT血浆水平的图。*表示 $p<0.0001$

[0041] 图14C是描述在对照受试者($n=70$)或患有放射性肺炎的患者($n=19$)中的NAMPT血浆水平的图。*表示 $p<0.001$

[0042] 图14D是描述在对照受试者($n=245$)或在患有辐射诱导的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的患者中的NAMPT血浆水平的图。

[0043] 图15是描述在暴露于20Gy全胸肺照射(WTLI)的WT C57/B6小鼠的肺组织中NAMPT

表达的图。图15A是显示在WTLI暴露后4周时在WTLI暴露小鼠的肺组织中NAMPT表达的显微照片。在插图中还显示了描述在假暴露小鼠(未辐射小鼠)的肺组织中NAMPT表达的显微照片。图15B是显示在WTLI暴露后12周时在WTLI暴露小鼠的肺组织中NAMPT表达的显微照片。在插图中还显示了描述在假暴露小鼠(未辐射小鼠)的肺组织中NAMPT表达的显微照片。图15C是显示在WTLI暴露后18周时在WTLI暴露小鼠的肺组织中NAMPT表达的显微照片。在插图中还显示了描述在假暴露小鼠(未辐射小鼠)的肺组织中NAMPT表达的显微照片。图15D是在WTLI暴露后4、12和18周时在WTLI暴露小鼠的肺组织中NAMPT表达(面积%)的图示。在插图中还描述了作为阴性对照的在假暴露小鼠(未辐射小鼠)的肺组织中NAMPT表达的图。

[0044] 图16是未辐射(“未辐射的”)或暴露于20Gy WTLI(“RILI”)的WT小鼠(“对照”)或者NAMPT杂合小鼠(Nampt^{+/-})的肺组织中BAL蛋白的量和BAL细胞的计数的图示。图16A是描述在20Gy WTLI暴露后4周在WT或NAMPT杂合小鼠的肺组织中BAL蛋白的量的图。在图中还描述了在未辐射WT或NAMPT杂合小鼠的肺组织中BAL蛋白的量。图16B是描述在20Gy WTLI暴露后4周在WT或NAMPT杂合小鼠的肺组织中BAL细胞的计数的图。在图中还描述了在未辐射WT或NAMPT杂合小鼠的肺组织中BAL细胞的计数。*表示 $p < 0.05$

[0045] 图17是在暴露于20Gy WTLI的WT小鼠、暴露于20Gy WTLI并使用抗NAMPT pAb或载体对照治疗的WT小鼠,或者暴露于20Gy WTLI的NAMPT杂合小鼠(Nampt^{+/-})中,WTLI暴露4周后肺损伤和炎症、BAL蛋白水平、BAL细胞计数和血浆NAMPT水平的图示。图17A是显示在WTLI暴露WT小鼠的肺组织中H&E染色的显微照片。在插图中还显示了在假暴露小鼠(未辐射小鼠)的肺组织中H&E染色的显微照片。图17B是显示在WTLI暴露的NAMPT杂合小鼠的肺组织中H&E染色的显微照片。图17C是显示在WTLI暴露并使用抗NAMPT pAb治疗的WT小鼠的肺组织中H&E染色的显微照片。图17D是在暴露于WTLI并使用抗NAMPT pAb或载体治疗的WT小鼠的肺组织中BAL蛋白的量(图17D,左图)和BAL细胞的量(图17D,右图)的图示。图17E是在WTLI暴露(“RILI”)并使用抗NAMPT pAb或载体(“对照”)治疗的WT小鼠的血浆NAMPT水平的图示。在图中还描述了在假IR暴露(“未辐射”)小鼠中的血浆NAMPT水平。*表示 $p < 0.05$

[0046] 图18是在暴露于20Gy WTLI的WT小鼠、暴露于20Gy WTLI并使用抗NAMPT pAb治疗的WT小鼠,或者暴露于20Gy WTLI的NAMPT杂合小鼠(Nampt^{+/-})的肺组织中炎症、胶原沉积以及平滑肌肌动蛋白(SMA)和IL-6的表达的图示。图18A是显示在WTLI暴露的WT小鼠的肺组织中H&E染色的显微照片。图18B是显示在WTLI暴露并使用抗NAMPT pAb治疗的WT小鼠的肺组织中H&E染色的显微照片。图18C是显示在WTLI暴露的WT小鼠的肺组织中通过三色染色检测的胶原沉积的显微照片。图18D是显示在NAMPT杂合小鼠的肺组织中通过三色染色检测的胶原沉积的显微照片。图18E是在暴露于20Gy WTLI的WT或NAMPT杂合小鼠的肺组织中WTLI暴露12周后SMA和IL-6表达(图18E,左图),或者在暴露于20Gy WTLI并使用或不使用抗NAMPT pAb治疗的WT小鼠的肺组织中WTLI暴露18周后SMA表达(图18E,右图)的western印迹分析的图示。在图18E中还描述了作为上样对照的组蛋白表达的western印迹分析。

[0047] 图19描述了人源化抗NAMPT抗体(NN、SS、K、N、XX、P和UU)对小鼠肺损伤模型中的炎症和损伤的体内检测的结果。图19A是描述在对照小鼠中或在来自LPS诱导的“一次打击”肺损伤模型的小鼠中的肺损伤评分的图,后者使用抗NAMPT pAb或人源化抗NAMPT抗体(NN、SS、K、N、XX、P和UU)治疗。图19B是描述在对照小鼠或在来自LPS/VILI诱导的“二次打击”肺损伤模型的小鼠中的肺损伤评分的图,后者使用抗NAMPT pAb或人源化抗NAMPT抗体(NN、

SS、K、N、XX、P和UU) 治疗。图19C提供了显示来自LPS/VILI诱导的“二次打击”肺损伤模型并使用(图19C, 下图) 或不使用(图19C, 上图) 人源化抗NAMPT抗体P治疗小鼠的肺组织的H&E染色的显微照片。

[0048] 图20是NAMPT在响应多种有害刺激(包括辐射) 而激活全身炎症级联反应和多器官功能障碍中的作用的示意图, 以及抗nAMPT抗体在减轻NAMPT的此类有害作用中的潜力。

[0049] 图21是通过放射性标记的抗NAMPT单克隆抗体(mAb) 探针检测NAMPT表达的图示。图21A是描述在对照小鼠中(左图) 和在辐射暴露后2周时暴露于8Gy局部身体照射(PBI) 的小鼠中(右图) 通过^{99m}Tc标记的抗NAMPT mAb探针检测NAMPT表达的放射自显影照片。图21B提供了描述在对照小鼠的肺组织中通过^{99m}Tc标记的抗NAMPT mAb探针检测NAMPT表达的图21A(左图) 的放大图像。图21C提供了描述在辐射暴露后2周时暴露于8Gy PBI的小鼠肺组织中通过^{99m}Tc标记的抗NAMPT mAb探针检测NAMPT表达的图21A(右图) 的放大图像。图21D是描述在对照小鼠的肺组织中通过^{99m}Tc标记的抗NAMPT mAb探针检测NAMPT表达的放射自显影图像。图21E是描述在LPS气管内注射后24小时LPS攻击小鼠的肺组织中通过^{99m}Tc标记的抗NAMPT mAb探针检测NAMPT表达的放射自显影图像。图21F是描述20Gy WTLI暴露后5天在WTLI暴露小鼠的肺组织中通过^{99m}Tc标记的抗NAMPT mAb探针检测NAMPT表达的放射自显影图像。

[0050] 定义

[0051] 如本文所用, 术语“多核苷酸”指已从总基因组核酸中分离出来的核酸分子、RNA或DNA。

[0052] 如在本文中互换使用的, 术语“NAMPT多核苷酸”或“编码NAMPT的多核苷酸”是指已被分离的基本上(essentially) 或实质上(substantially) 不含总基因组核酸以允许杂交和扩增的NAMPT编码核酸分子, 但不限于此。因此, “编码NAMPT的多核苷酸”是指含有从总哺乳动物或人类基因组DNA分离或纯化的野生型NAMPT编码序列(SEQ ID NO:1) 的DNA区段。NAMPT寡核苷酸是指与NAMPT编码序列的至少5个连续核苷酸相同的核酸分子, 如与作为编码人NAMPT的cDNA序列的SEQ ID NO:1的至少5个连续核苷酸相同的核酸分子。在一些实施方式中, 与本文中提及的NAMPT多核苷酸或寡核苷酸互补的序列可用于检测来自受试者(例如, 待测受试者) 的样本(例如, 生物样本) 中人NAMPT的表达。

[0053] 如本文所用, “引物”指能够用在扩增方法(如聚合酶链式反应(PCR)) 中的寡核苷酸, 以基于对应于感兴趣基因(例如, 人NAMPT或其部分的cDNA或基因组序列) 的多核苷酸序列扩增核苷酸序列。通常, 用于多核苷酸序列扩增的至少一个PCR引物是针对多核苷酸序列为序列特异性的。引物的确切长度取决于许多因素, 包括温度、引物来源和使用的方法。例如, 对于诊断和预后应用, 根据靶序列的复杂性, 寡核苷酸引物通常包含至少10、或15、或20、或25个或更多个核苷酸, 尽管其可能包含更少的核苷酸或更多的核苷酸。确定引物的适当长度所涉及的因素是本领域普通技术人员容易知道的。在本公开内容中, 术语“引物对”是指与靶DNA分子的相反链或与待扩增的核苷酸序列侧翼的靶DNA区域杂交的一对引物。在本公开内容中, 术语“引物位点”是指与引物杂交的靶DNA或其他核酸的区域。在一些实施方式中, 将引物对设计为与核酸选择性杂交, 如在允许选择性杂交的条件下将对应于SEQ ID NO:1的核酸与模板核酸接触。根据所需的应用, 可以选择仅允许与引物完全互补的序列杂交的高严格杂交条件。在其他实施方式中, 杂交可以在降低的严格性下发生, 以允许扩增含

有一个或多个与引物序列错配的核酸。一旦杂交,使模板-引物复合物与一种或多种促进模板依赖性核酸合成的酶接触。进行多轮扩增,也称为“循环”,直到产生足够量的扩增产物。

[0054] 术语“cDNA”旨在指使用RNA作为模板制备的DNA。与基因组DNA或RNA转录物相比,使用cDNA的优点是稳定性和使用重组DNA技术操纵序列的能力。此外,cDNA可能是有利的,因为其代表多肽的编码区并消除内含子和其他调节区。在某些实施方式中,核酸与cDNA编码序列如NAMPT序列互补或相同。

[0055] 为简单起见,术语“基因”在本文中用于指功能性蛋白质、多肽或肽编码核酸单元。如本领域技术人员将理解的,该功能术语包括基因组序列、cDNA序列和较小的工程基因片段,其表达或可能适合表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和突变体。

[0056] 如本文所用,术语“NAMPT基因”或“NAMPT蛋白”是指人NAMPT基因或NAMPT蛋白的任何天然存在的变体或突变体、种间同源物或直系同源物、或人造变体。人野生型NAMPT mRNA的DNA序列如GenBank登录号NM_005746所示(本文以SEQ ID NO:1提供),其编码NAMPT蛋白(例如,本文以SEQ ID NO:2提供了NAMPT蛋白的亚型)。本申请含义内的NAMPT蛋白通常与人野生型NAMPT蛋白具有至少约80%、或90%、或95%或更高的序列同一性。

[0057] 在本公开内容中,术语“或”通常以包括“和/或”在内的含义使用,除非内容另有明确规定。

[0058] 如本文所用,术语“基因表达”用于指DNA转录以形成编码特定蛋白质(例如,人NAMPT蛋白质)的RNA分子或由多核苷酸序列编码的蛋白质的翻译。换言之,由感兴趣基因(例如,人NAMPT基因)编码的mRNA水平和蛋白质水平都包含在本公开内容中的术语“基因表达水平”中。

[0059] 在本公开内容中,术语“生物样本”或“样本”包括组织切片(例如,肺组织、胸部组织、扁桃体组织等),如活检和尸检样本,以及为组织学目的而取的冷冻切片,或任何此类样本的加工形式。生物样本包括血液和血液成分或产品(例如,血清、血浆、血小板、红细胞等)、痰或唾液、淋巴和舌组织、培养细胞,例如,原代培养物、外植体和转化细胞、肺活检组织等。生物样本通常获自真核生物,其可以是哺乳动物、可以是灵长类动物并且可以是人类受试者。

[0060] 在本公开内容中,术语“组织活检”是指为了诊断或预后评估而移出组织(例如,肺组织、胸部组织、扁桃体组织等)样本以及组织标本本身的过程。可以将本领域公知的任何组织活检技术应用于本发明的诊断和预后方法中。所应用的组织活检技术将取决于要评估的组织类型(例如,肺组织、胸部组织、扁桃体组织等)以及其他因素。代表性的组织活检技术包括但不限于切除组织活检、切口组织活检、针刺组织活检、手术组织活检和骨髓组织活检。广泛的组织活检技术对于本领域技术人员来说是众所周知的,其将在它们之间进行选择并以最少的实验实施它们。

[0061] 在本公开内容中,术语“分离的”核酸分子是指与通常与分离的核酸分子相关的其他核酸分子分离的核酸分子。因此,“分离的”核酸分子包括但不限于不含核苷酸序列的核酸分子,所述核苷酸序列天然位于分离核酸所源自的生物体的基因组中核酸的一端或两端(例如,通过PCR或限制性内切酶消化产生的cDNA或基因组DNA片段)。此类分离的核酸分子通常被引入载体(例如,克隆载体或表达载体)以方便操作或产生融合核酸分子。此外,分离的核酸分子可以包括工程化的核酸分子,例如重组的或合成的核酸分子。存在于例如含有

限制性消化的基因组DNA的核酸文库(例如,cDNA或基因组文库)或凝胶(例如,琼脂糖或聚丙烯胺)内的数百至数百万个其他核酸分子中的核酸分子不是“分离的”核酸。

[0062] 在本申请中,术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。如本文所用,该术语包括任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质(即,抗原),其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0063] 如本文所用,术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及那些后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。就本申请的目的而言,氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构的化合物,即碳结合至氢、羧基、氨基和R基团,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。就本申请的目的而言,氨基酸模拟物是指具有不同于氨基酸的一般化学结构的结构但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化合物。氨基酸可以包括具有非天然存在的D-手性的那些,如WO 01/12654中公开的,其可以改善包含一种或多种此类D-手性的多肽的稳定性(例如,半衰期)、生物利用度和其他特征。在一些情况下,治疗性多肽的一个或多个,并且可能所有氨基酸具有D-手性。氨基酸在本文中可以通过公知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指代。同样,核苷酸可以用其普遍接受的单字母代码来指代。

[0064] 如本文所用,在描述两个或多个多核苷酸或氨基酸序列的上下文中,术语“相同”或“同一性”百分比指当使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查在比较窗口或指定区域上进行比较和比对以获得最大对应时,两个或多个相同或具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸的序列或子序列(例如,在本发明的方法中使用的变体NAMPT蛋白与参照序列(例如,野生型人NAMPT蛋白)具有至少约80%序列同一性,优选地约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性)。然后,将此类序列称为“基本上相同”。关于多核苷酸序列,该定义也指测试序列的互补序列。优选地,同一性存在于长度至少约50个氨基酸或核苷酸的区域,或更优选长度为75-100个氨基酸或核苷酸的区域。对于序列比较,通常一个序列充当参照序列,与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参照序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法根据程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分比。对于核酸和蛋白质的序列比较,使用BLAST和BLAST 2.0算法以及下面讨论的默认参数。

[0065] 如本文所用,“比较窗口”包括对选自20至600,通常约50至约200,更通常约100至约150的多个连续位置中的任何一个的区段的引用,其中序列可以在两个序列最佳比对后,与具有相同数量连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。可以通过以下进行用于比较的序列最佳比对,例如,通过Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981)的局部同源性算法,通过Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970)的同源性比对算法,通过Pearson&Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444

(1988)的相似性搜索方法,通过这些算法(在威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,Wis.)的计算机化实施,或者通过人工比对和目测检查(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等编著,1995supplement))。

[0066] 适于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的实例是BLAST和BLAST 2.0算法,在Altschul等,(1990)J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul等,(1977)Nucleic Acids Res.25:3389-3402中分别对其进行了描述。用于执行BLAST分析的软件可在美国国家生物技术信息中心网站ncbi.nlm.nih.gov上公开获得。该算法首先通过识别查询序列中长度为W的短词来识别高评分序列对(HSP),当与数据库序列中相同长度的词比对时,这些词匹配或满足某个正值阈值分数T。T被称为邻域词得分阈值(Altschul等,同上)。这些最初的邻域词命中充当种子,用于启动搜索以找到包含它们的更长的HSP。然后沿着每个序列在两个方向上扩展词命中,直到累积比对分数可以增加。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励分数;总是>0)和N(错配残基的惩罚分数;总是<0)计算累积分数。对于氨基酸,将评分矩阵用于计算累积分数。在以下情况下,词命中在每个方向的扩展将停止:累积比对分数从其最大实现值下降了数量X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积分数变为零或更低;或到达任一序列的末尾。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用默认的字长(W)为28,期望值(E)为10,M=1,N=-2,以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用字长(W)3、期望值(E)10和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915(1989))。

[0067] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见,例如,Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877(1993))。BLAST算法提供的一种相似性度量是最小总概率(P(N)),其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与参照核酸的比较中的最小总概率小于约0.2,更优选小于约0.01,最优选小于约0.001,则认为核酸与参照序列相似。

[0068] 两个核酸序列或多肽基本上相同的指示是由第一个核酸编码的多肽与针对由第二个核酸编码的多肽产生的抗体发生免疫交叉反应,如下所述。这样,多肽通常与第二多肽是基本上相同的,例如,其中两个肽仅是保守性置换不同。两个核酸序列基本相同的另一个指示是两个分子或其互补物在严格条件下彼此杂交,如下所述。两个核酸序列基本相同的另一个指示是相同的引物可用于扩增序列。

[0069] 在本公开内容中,术语“严格杂交条件”和“高严格性”是指探针与其目标子序列杂交的条件,通常在核酸的复杂混合物中,但不与其他序列杂交。严格条件是序列依赖性的并且在不同情况下将是不同的。更长序列在更高温度下特异性杂交。核酸杂交的广泛指南参见Tijssen,Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes,“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays”(1993),并且本领域技术人员将容易理解。通常,在定义的离子强度pH下,选择的严格条件比特定序列的热熔点(T_m)低约5-10°C。 T_m 是某个温度(在规定的离子强度、pH和核酸浓度下),在该温度下,50%与目标互补的探针在平衡时与目标序列杂交(因为目标序列存在过量,在 T_m 下,50%的探针在平衡时被占据)。还可以通过添加去稳定剂(例如甲酰胺)来实现严格条件。对于选择性或特异性杂交,阳性信号至少是背景的两倍,

优选是背景杂交的10倍。示例性的严格杂交条件可以是如下所示:50%甲酰胺、5×SSC和1%SDS,在42℃下孵育,或者5×SSC、1%SDS,在65℃下孵育,使用0.2×SSC和0.1%SDS在65℃下洗涤。

[0070] 如果它们编码的多肽基本相同,则在严格条件下不彼此杂交的核酸仍然基本相同。例如,当使用遗传密码允许的最大密码子简并性建立核酸的副本时,就会发生这种情况。在这种情况下,核酸通常在中等严格的杂交条件下杂交。示例性的“中等严格杂交条件”包括在40%甲酰胺、1M NaCl、1%SDS的缓冲液中在37℃下杂交,以及在45℃下在1×SSC中洗涤。阳性杂交至少是背景的两倍。普通技术人员将容易地认识到,可以利用替代的杂交和洗涤条件来提供类似严格性的条件。许多参考文献中提供了用于确定杂交参数的其他指南,例如,Current Protocols in Molecular Biology.Ausubel等,

[0071] “表达盒”是重组或合成产生的核酸构建体,具有一系列允许特定多核苷酸序列在宿主细胞中转录的特定核酸元件。表达盒可以是质粒、病毒基因组或核酸片段的一部分。通常,表达盒包括与启动子可操作地连接的待转录的多核苷酸。“可操作地连接”在本文中是指两个或多个遗传元件,例如多核苷酸编码序列和启动子,放置在允许元件的适当生物学功能的相对位置,如指导编码序列转录的启动子。可能存在于表达盒中的其他元件包括增强转录的元件(例如,增强子)和终止转录的元件(例如,终止子),以及赋予表达盒产生的重组蛋白一定的结合亲和性或抗原性的元件。

[0072] 术语“免疫球蛋白”或“抗体”(本文可互换使用)是指具有由两条重链和两条轻链组成的基本四多肽链结构的抗原结合蛋白,所述链被稳定化,例如,通过链间二硫键,其具有特异性结合抗原的能力。重链和轻链都折叠成结构域。术语“抗体”还指抗体的抗原和表位结合片段,例如Fab片段,其可用于免疫亲和性测定。有很多充分表征的抗体片段。因此,例如,胃蛋白酶消化铰链区二硫键的C末端抗体以产生F(ab)'₂,其是Fab的二聚体,其本身是轻链通过二硫键连接到V_H-C_H。F(ab)'₂可以在温和条件下被还原以破坏铰链区中的二硫键,从而将(Fab')₂二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体本质上是一个带有部分铰链区的Fab(参见,例如,Fundamental Immunology,Paul编著,Raven Press,N.Y.(1993),对于其他抗体片段更详细的描述)。虽然根据完整抗体的消化定义了各种抗体片段,但技术人员会理解,片段可以通过化学方法或利用重组DNA方法从头合成。因此,术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生的或使用重组DNA方法合成的抗体片段。如本文所用,术语“抗体”是指表现出所需生物活性的任何形式的抗体或其片段。因此,其以最广泛的意义使用,具体涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要其表现出所需的生物活性即可。

[0073] 在一些实施方式中,本文描述的是结合至NAMPT的抗体(如抗NAMPT抗体)或其抗原结合片段。在某些实施方式中,将抗NAMPT抗体(例如,单克隆抗体或多克隆抗体)用作检测剂,如结合至NAMPT并检测NAMPT(例如,来自生物样本的)的检测抗体,,如在检测测定(例如,在western印迹分析、免疫组织化学分析、ELISA和/或放射自显影分析中)中检测NAMPT。在某些实施方式中,将NAMPT抗体(例如,单克隆抗体或多克隆抗体)用作结合至NAMPT并检测NAMPT(例如,来自生物样本的)的捕获剂,,如在检测测定(例如,在western印迹分析、免疫组织化学分析、ELISA和/或放射自显影分析中)中检测NAMPT。在一些实施方式中,与NAMPT结合的抗体,例如抗NAMPT抗体或其抗原结合片段被标记以便于检测。在一些实施方

式中,结合至NAMPT的抗体(如抗NAMPT抗体)或其抗原结合片段是放射性标记的(例如,用放射性同位素标记,例如用 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等标记)、酶促标记的(例如,使用酶标记,如使用辣根过氧化物酶(HRP))、荧光标记的(例如,使用荧光团标记)、使用化学发光剂标记的和/或使用化合物(例如,使用生物素和地高辛)标记的。

[0074] 在一些实施方式中,抗-NAMPT抗体用作抗体抑制剂。在一些实施方式中,抗体抑制剂(例如,抗NAMPT抗体抑制剂)可被视为中和抗体。包含在结合NAMPT的抗体定义内的是NAMPT抗体结合片段。如本文所用,术语“NAMPT结合片段”或“其结合片段”涵盖仍基本上保留其抑制NAMPT活性的生物学活性的抗体的片段或衍生物。因此,术语“抗体片段”或NAMPT结合片段是指全长抗体的一部分,通常是其抗原结合或其可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双体;线性抗体;单链抗体分子,例如,sc-FV;和由抗体片段形成的多特异性抗体。通常,结合片段或衍生物保留至少50%的NAMPT抑制活性。优选地,结合片段或衍生物保留其NAMPT抑制活性的约或至少约60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。还旨在NAMPT结合片段可以包括基本上不改变其生物活性的保守氨基酸置换。

[0075] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即,除了可能以少量存在的天然发生的突变之外,构成群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高特异性的,其针对单一抗原表位。相比之下,常规(多克隆)抗体制剂通常包括大量针对(或特异性针对)不同表位的抗体。修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体中获得,不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明的单克隆抗体可以由Kohler等,(1975)首次描述的杂交瘤方法制备或可以由重组DNA方法制备(参见,例如,美国专利号4,816,567)。例如,还可以使用在Clackson等,(1991)和Marks等,(1991)中描述的方法从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0076] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指包含来自非人(例如,小鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体是嵌合抗体,其包含源自非人免疫球蛋白的最少序列。在通常情况下,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,通常为两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白序列。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。

[0077] 可以使用用于产生单克隆抗体的任何适宜方法。例如,可以使用NAMPT或其片段免疫受体。可以使用免疫接种的任何适宜方法。此类方法可包括佐剂、其他免疫刺激剂、重复强化免疫和使用一种或多种免疫接种途径。

[0078] 当在描述特定分子与蛋白质或肽的结合关系的上下文中使用时,短语“特异性结合”是指确定蛋白质在异质蛋白质和其他生物制剂群体中的存在的结合反应。因此,在指定的结合测定条件下,指定的结合剂(例如,抗体)与特定蛋白质的结合至少是背景的两倍,并且基本上不与样本中存在的其他蛋白质大量结合。例如,抗NAMPT抗体(例如,放射性标记(例如,用放射性同位素标记,例如用 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等标记)的抗NAMPT抗体、酶促标记的(例如,使用酶标记,如使用辣根过氧化物酶(HRP))抗NAMPT抗体、荧光标记的(例如,使用荧光团标记)抗NAMPT抗体、使用化学发光剂标记的抗NAMPT抗体和/或使用化合物标记的抗NAMPT抗体)可以以至少是背景的两倍结合至NAMPT,并且基本上不与生物样本中存在的其他蛋白质大量结合,并且可以用作生物样本(例如,在来自检测受试者或对照受试

者的生物样本中)中NAMPT检测的检测剂和/或捕获剂。在这样的条件下抗体的特异性结合可能需要根据其特定蛋白质或蛋白质而非其类似“姐妹”蛋白质的特异性而选择的抗体。多种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白质或以特定形式具有特异性免疫反应性的抗体。例如,固相ELISA免疫分析通常用于选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体(参见,例如,Harlow&Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity)。通常,特异性或选择性结合反应将是背景信号或噪音的至少两倍,更通常是背景的10到100倍以上。另一方面,术语“特异性结合”当在指与另一多核苷酸序列形成双链复合物的多核苷酸序列的上下文中使用时,描述了基于沃森-克里克碱基配对的“多核苷酸杂交”,如在术语“多核苷酸杂交方法”的定义中所提供的。

[0079] 如在本申请中所使用的,“增加”或“减少”是指从比较对照例如建立的正常水平或建立的标准对照可检测到的量的正变化或负变化。增加是正变化,其通常是至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多,并且可以高达正常值或对照值的至少约2倍或至少约5倍或者甚至约10倍。类似地,减少是负变化,其通常是正常值或对照值的至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更低。以与上述相同的方式在本申请中使用指示相对于比较基础的数量变化或差异的其他术语,如“更多”、“更少”、“更高”和“更低”。例如,在检测受试者中NAMPT表达更高表示在检测受试者的生物样本中NAMPT表达的水平比NAMPT表达的正常水平、对照水平、健康对照水平或参照水平(例如,RILI出现前受试者的相同类型生物样本中的NAMPT表达水平,或来自对照受试者的相同类型生物样本中的NAMPT表达水平,如健康对照受试者(例如,无RILI的受试者和/或无任何肺部疾病的受试者))高至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多。相比之下,术语“基本上相同”或“基本上没有变化”表示与标准对照值相比数量几乎没有变化,通常在标准对照的+10%内,或在±5%、2%内或与标准对照的差异更小。

[0080] 如本文所用,术语“抑制(inhibiting)”或“抑制(inhibition)”是指对感兴趣生物过程(如细胞信号转导、细胞增殖、炎症、表达和疾病/病况的严重程度)的任何可检测的负向影响。通常,抑制反映了当与未应用抑制剂的对照比较时,在应用抑制剂(例如,抗NAMPT抗体)后,在感兴趣过程中(例如,在mRNA水平或蛋白水平NAMPT的表达)减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多。

[0081] 如本文所用,“多核苷酸杂交方法”是指用于检测预定多核苷酸序列的存在和/或数量的方法,基于其在适当的杂交条件下与已知序列的多核苷酸探针形成沃森-克里克碱基配对的能力。此类杂交方法的实例包括Southern印迹、Northern印迹和原位杂交。

[0082] “标记”、“可检测标记”或“可检测部分”是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理方式检测的组分。例如,有用的标记包括放射性同位素或放射性标记(例如, ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等标记)、荧光染料、荧光团、化学发光剂、电子致密剂、酶(例如,通常用于ELISA中,如HRP)、生物素、地高辛或者半抗原和蛋白,可以例如通过将放射

性成分掺入肽或用于检测与肽特异性反应的抗体而使其可检测。通常,将可检测标记连接到具有确定结合特征的探针或分子(例如,连接到抗体,如连接到抗NAMPT抗体)(例如,具有已知结合特异性的多肽或多核苷酸),以便允许探针或分子的存在及其结合靶点(例如,NAMPT作为标记的抗NAMPT抗体的结合靶点)易于检测。

[0083] “正常水平”或“标准对照”或“对照水平”或“健康对照水平”或“参照水平”在本文中可以互换使用,指“预定量或浓度的多核苷酸序列或多肽,例如,NAMPT基因组DNA、mRNA或蛋白质,其存在于已建立的正常无病生物样本中,例如,在RILI出现之前的受试者的生物样本中或来自对照受试者的生物样本中,如健康对照受试者(例如,没有RILI的受试者和/或没有任何肺部疾病的受试者)。正常水平值、标准对照值、对照水平值、健康对照水平值或参考水平值适用于本发明的方法,作为比较在待测样本(例如,在待测受试者的生物样本中)中存在的NAMPT基因组DNA、mRNA或蛋白的量的依据。正常水平值、标准控制值、控制水平值、健康控制水平值或参考水平值可能会根据样本的性质以及其他因素(例如,建立这种控制值的受试者的性别、年龄、民族)而有所不同。

[0084] 如在用于描述健康的、没有任何常规定义的肺部疾病(尤其是RILI)的人的上下文中所使用的,术语“平均”指代表随机选择的健康人的组(这些人没有任何肺部疾病(尤其是RILI)并且没有已知的患该疾病的风险)的某些特征,尤其是在人的生物样本(例如,细胞、组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中发现的NAMPT基因组序列的拷贝或NAMPT mRNA或蛋白质的数量)。该选定组应包括足够数量的人,使得这些个体的生物样本中NAMPT mRNA或蛋白质的平均拷贝数和平均量以合理的准确度反映正常人群中NAMPT基因的相应拷贝数和NAMPT mRNA/蛋白质的数量。此外,所选择的人的组通常具有与其生物样本被测试用于RILI指示的受试者(例如,待测受试者)的年龄相似的年龄。此外,还考虑其他因素,如性别、民族、病史,并且优选地在待测受试者的概况和确定“平均”值的选定个体组之间紧密匹配。

[0085] 如在本申请中所使用的,术语“量”指样本中存在的感兴趣多核苷酸或感兴趣多肽,例如人NAMPT基因组DNA、NAMPT mRNA或NAMPT蛋白的数量。这种量可以以绝对形式表示,即样本中多核苷酸或多肽的总量,或以相对形式表示,即样本中多核苷酸或多肽的浓度。

[0086] 如在本申请中所使用的,术语“治疗(treat)”或“治疗(treating)”描述导致相关病症的任何症状的消除、减少、缓解、逆转或预防或延迟发作或复发的行为。换言之,“治疗”病症包括针对该病症的治疗性和预防性干预。

[0087] 如本文所用,术语“有效量”是指在量上足以产生所需效果的给定物质的量。例如,NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体)的有效量是实现NAMPT mRNA或蛋白质表达或生物活性水平降低的所述抑制剂的量,从而减轻、逆转、消除、预防或延迟因治疗目的给予NAMPT抑制剂的患者的RILI症状、严重程度和/或发作。足以实现这一点的量被定义为“治疗有效剂量”。剂量范围随给药的治疗剂的性质和其他因素如给药途径和患者病情的严重程度而变化。

[0088] 如本文所用,术语“受试者”或“需要治疗的受试者”包括因RILI的风险或实际患有RILI而寻求医疗护理的个人。受试者还包括目前正在接受寻求治疗方案操作的治疗的个体。需要治疗的受试者或个体包括那些表现出RILI症状或处于发生RILI风险中的受试者或个体(例如,接受胸部放疗的癌症患者和/或暴露于电离辐射(IR)的受试者,例如,来自核事故)。例如,需要治疗的受试者包括过去曾患有RILI相关症状的个体、患有RILI的个体以及

已暴露于触发物质或事件的个体(例如,接受胸部放疗的癌症患者和/或暴露于IR的受试者,例如,来自核事故)。“需要治疗的受试者”可以是生命的任何年龄。

[0089] 如本文所用,“待测受试者”是指要通过本文描述的方法测试RILI的诊断、预后和/或监测的受试者(例如,人)。待测受试者可以包括表现出RILI症状的受试者和处于发生RILI风险的受试者(例如,接受胸部放疗的癌症患者和/或暴露于IR的受试者,例如,来自核事故)。在一些实施方式中,待测受试者可以是过去患有RILI相关症状的个体、患有RILI的受试者和/或已暴露于触发物质或事件的受试者(例如,接受胸部放疗和/或暴露于IR的受试者,例如,来自核事故)。

[0090] 如本文所用,“对照受试者”或“健康对照受试者”是指没有RILI的受试者(例如,人)和/或没有任何肺部疾病的受试者(例如,人)。来自对照受试者或健康对照受试者的生物样本显示NAMPT表达的正常水平、健康对照水平或参考水平。

[0091] NAMPT蛋白的“抑制剂”、“激活剂”和“调节剂”分别用于指抑制性、激活性或调节性分子,其使用体外和体内NAMPT蛋白结合或信号传导测定法鉴定,例如配体、激动剂、拮抗剂及其同源物和模拟物。术语“调节剂”包括抑制剂和激活剂。抑制剂是例如部分或完全阻断NAMPT蛋白的结合、减少、阻止、延迟激活、灭活、脱敏或下调NAMPT蛋白活性的试剂。在一些情况下,抑制剂直接或间接结合NAMPT蛋白,如中和抗体(例如,人源化抗NAMPT单克隆抗体)。如本文所用,抑制剂与灭活剂和拮抗剂同义。激活剂是例如刺激、增加、促进、增强激活、敏化或上调NAMPT蛋白活性的试剂。调节剂包括NAMPT蛋白配体或结合配偶体,包括对天然存在的配体和合成设计的配体、抗体和抗体片段、拮抗剂、激动剂、包括含碳水化合物分子在内的小分子、siRNA、RNA适体等的修饰。

[0092] 如此处所用,术语“启动子”指一组转录控制模块,其聚集在RNA聚合酶II的起始位点周围。关于启动子如何组织的大部分思考源自对几种病毒启动子的分析,包括那些针对HSV胸苷激酶(tk)和SV40早期转录单位的启动子。这些研究,加上最近的工作,表明启动子由离散的功能模块组成,每个模块由大约7-20bp的DNA组成,并包含一个或多个转录激活蛋白的识别位点。

[0093] 每个启动子中至少有一个模块用于定位RNA合成的起始位点。最著名的实例是TATA盒,但在一些缺少TATA盒的启动子中,如哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和SV40晚期基因的启动子,覆盖起始位点本身的离散元件有助于确定起始位置。

[0094] 本发明上下文中的“诊断”或术语“诊断性”是指鉴定RILI的存在或性质,如通过本文所述的方法使用NAMPT作为生物标志物鉴定检测受试者中RILI的存在或性质。诊断方法的敏感性和特异性不同。诊断测定的灵敏度是检测呈阳性的患病个体的百分比(真阳性的百分比)。通过该测定未检测的患病个体是假阴性的。将未患病并在测定中检测为阴性的受试者称为真阴性。诊断检测的特异性是1减去假阳性率,其中假阳性率定义为检测呈阳性的无疾病患者的比例。虽然特定的诊断方法可能无法提供对病症的明确诊断,但如果该方法提供有助于诊断的阳性指示就足够了。

[0095] 如本文所用,术语“预后”是指对RILI的可能结局以及如病例的性质和症状所指示的从RILI恢复的前景的预测。例如,本文公开的是使用NAMPT作为生物标志物在待测受试者中预测RILI的可能结局以及从RILI恢复的前景的方法。将阴性或不良预后定义为较低的治疗后存活期或存活率。相反,将阳性或良好的预后定义为治疗后存活期或存活率升高。通常

以为无进展生存期或总生存期的时间提供预后。

[0096] 出于本发明的目的,术语“监测进展”是指在待测受试者中观察RILI的进展。在一些实施方式中,在治疗期间定期监测正在接受治疗(例如,使用NAMPT抑制剂,如抗NAMPT抗体)的待测受试者(例如,患有RILI的受试者)所应用的治疗的效果(例如,对RILI的严重程度和/或对NAMPT表达的作用),这允许医生在治疗的早期阶段估计处方治疗是否有效,从而相应地调整治疗方案。

具体实施方式

[0097] 放射性肺损伤(RILI)、放射性肺炎和放射性纤维化是胸部放疗可能危及生命的后果,对可靠的RILI生物标志物和新型治疗策略的需求尚未得到满足。炎症对RILI发展的贡献支持了一种减少IR暴露个体的损伤信号和随后的炎症负担的方法。

[0098] 烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)

[0099] 烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)也称为前B细胞集落增强因子(PBEF)或内脂素(visfatin)。人NAMPT基因(NAMPT)位于7号染色体上(区段7q22.3;碱基对106,248,285至106,286,326)。NAMPT的人cDNA序列在GenBank登录号NM_005746中提供,其通过引用并入本文。该序列还对应于SEQ ID NO:1。NAMPT基因编码以两种形式存在的蛋白质,细胞内NAMPT(iNAMPT)和细胞外NAMPT(eNAMPT),其中iNAMPT催化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的合成。由NAMPT基因编码的蛋白序列是如SEQ ID NO:2所提供的。

[0100] NAMPT因其对B细胞成熟的影响而被定性为促炎细胞因子(Samal等,Mol Cell Biol 14:1431-1437(1994)),并且据报道,其作为全身性NAD生物合成酶调节 β 细胞中的胰岛素分泌(Revollo等,Cell Metab 6:363-375(2007))。NAMPT已被证明可增加CD14⁺单核细胞、巨噬细胞和树突细胞中IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的产生,增强T细胞的有效性,并参与B和T淋巴细胞的发育(Sun等,Cytokine&Growth Factor Reviews 24:433-442(2013))。Kim等(J Mol Biol 362:66-77(2006))详细描述了NAMPT酶的晶体结构。NAMPT是NAD补救途径中的限速酶,可在哺乳动物中将烟酰胺转化为烟酰胺单核苷酸,以实现NAD生物合成。细胞外NAMPT蛋白的成熟形式是一个约120kDa的同源二聚体(Takahashi等,J Biochem 147:95-107(2010))。已经确定,降低或抑制NAMPT酶功能的突变可以减少引起诸如白血病和肺动脉高压(PAH)等疾病的病理生理过程。

[0101] NAMPT已被鉴定为Toll样受体4(TLR4)的配体,TLR4是一种在人类中由TLR4基因编码的蛋白质。TLR4是一种跨膜蛋白,是Toll样受体家族的一员,属于模式识别受体(PRR)家族。TLR4的激活导致细胞内NF- κ B信号通路和炎症细胞因子的产生,其负责激活先天免疫系统。TLR4最著名的是识别脂多糖(LPS),脂多糖是许多革兰氏阴性菌(例如,奈瑟菌属)和某些革兰氏阳性菌中存在的一种组分。其配体还包括几种病毒蛋白、多糖和多种内源性蛋白,如低密度脂蛋白、 β -防御素和热休克蛋白。人TLR4基因位于9号染色体(区段9q32-q33)(Georgel等,PLoS ONE 4(11):e7803(2009))。人TLR4基因产物的核酸序列是本领域公知的。参见,例如,NCBI参照序列:AAY82268.1,智人Toll样受体4(TLR4),mRNA。人TLR4的氨基酸序列是本领域公知的。参见,例如,GenBank登录号AAY82268。

[0102] NAMPT已被确定为一种有效的促炎细胞因子,在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和呼吸机诱导的肺损伤的病理生理学中发挥作用。iNAMPT和eNAMPT都与代谢、应激反应、细胞凋

亡、衰老和纤维化的调节有关。eNAMPT可显著放大失调的炎症反应,导致器官功能障碍、细胞因子风暴和严重危重疾病的死亡。iNAMPT是一种高度可成药的癌症治疗靶点;然而,由于不可接受的毒性,iNAMPT酶抑制剂在II期和III期临床癌症试验中均失败了。

[0103] 本公开内容涉及NAMPT作为RILI中的生物标志物的用途。还公开了使用NAMPT作为RILI中的治疗靶点的方法和组合物。在RILI中使用NAMPT作为生物标志物

[0104] 本文公开了使用NAMPT作为RILI中的生物标志物的方法(例如,在体外方法中)和组合物。在一些实施方式中,与RILI出现前的受试者中NAMPT的表达相比,或者与在对照受试者(如健康对照受试者(例如,无RILI和/或任何肺部疾病的受试者))中NAMPT的表达相比,在具有RILI的受试者中,NAMPT的表达(例如,NAMPT的DNA、RNA和/或蛋白表达)更高(例如,5%或更多,如5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多)。例如,与RILI出现前的受试者组织或血浆中NAMPT的表达相比,或者与在对照受试者(如健康对照受试者(例如,无RILI和/或任何肺部疾病的受试者))的组织或血浆中NAMPT的表达相比,在具有RILI的受试者的组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中,NAMPT的表达(例如,NAMPT的DNA、RNA和/或蛋白表达)更高(例如,5%或更多,如5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多)。

[0105] 在一些实施方式中,在受试者(例如,处于发展RILI风险中的受试者)的组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中NAMPT的表达增加可能提示在受试者中发生了RILI。或者,在受试者(例如,处于发展RILI风险中的受试者)的组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中NAMPT的表达增加可能提示在受试者中RILI发作。另外地或或者,在受试者的组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中NAMPT的表达增加可能提示受试者发展RILI的风险增加。处于发展RILI风险中的受试者(例如,人)可以是经历胸部放射疗法的癌症患者。另外地或或者,处于发展RILI风险中的受试者(例如,人)可以是暴露于电离辐射(IR)的受试者,例如,来自核事故。

[0106] 在一些实施方式中,在组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中NAMPT表达高于正常水平(或标准对照水平、对照水平、健康对照水平或参照水平)的受试者(例如,人)表明受试者患有RILI。另外地或或者,在组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中NAMPT表达高于正常水平(或标准对照水平、对照水平、健康对照水平或参照水平)的受试者(例如,人)表明受试者发展RILI的风险增加。在一些实施方式中,NAMPT表达的正常水平(或标准对照水平、对照水平、健康对照水平或参照水平)是RILI发作之前在受试者的组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中NAMPT的表达水平。在一些实施方式中,NAMPT表达的正常水平(或标准对照水平、对照水平、健康对照水平或参照水平)是在对照受试者(如健康对照受试者(例如,无RILI和/或任何肺部疾病的受试者))的组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆中NAMPT的表达水平。

[0107] 为了当前公开的方法的目的,预期将待测受试者(例如,疑似具有RILI的受试者和/或处于发展RILI风险中的受试者)生物样本中的NAMPT表达与在相同类型生物样本中NAMPT表达的正常水平(或标准对照水平、对照水平、健康对照水平或参照水平)(例如,RILI发作前受试者同类型生物样本中NAMPT表达水平和/或对照受试者同类型生物样本中NAMPT表达水平)进行比较。例如,为了当前公开的方法的目的:将待测受试者肺组织中NAMPT的表

达与在肺组织中NAMPT表达的正常水平进行比较;将待测受试者扁桃体组织中NAMPT表达与扁桃体组织中的NAMPT表达的正常水平进行比较;将待测受试者胸部组织中NAMPT的表达与胸部组织中NAMPT表达的正常水平进行比较;和/或将待测受试者血浆中NAMPT的表达与血浆中NAMPT表达的正常水平进行比较。

[0108] 预期可以产生一种或多种标准,其中定义或鉴定了正常水平的NAMPT表达。然后,该标准可以被称为确定给定受试者(例如,待测受试者,例如疑似患有RILI的受试者和/或有发生RILI风险的受试者)中的表达是正常还是高于正常的一种方式。生成的标准类型将取决于用于评估NAMPT表达的测定或测试。在一些实施方式中,根据某些标准为样本分配分数,在某个数字或范围内或以上的数字被视为“高于正常水平”。在一些实施方式中,如果测定表明NAMPT表达的特定测量结果、量或水平为在具有正常水平的NAMPT表达的组织或血浆中过程到的测量结果、量或水平的约或至多约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多(例如,高于在RILI发作之前在受试者的组织或血浆中观察到的测量结果、量或水平或者高于在对照受试者(例如,没有RILI的受试者和/或没有任何肺部疾病的受试者)的组织或血浆中观察到的测量结果、量或水平),则认为NAMPT的表达高于正常。在优选实施方式中,如果测定表明NAMPT表达的特定测量结果、量或水平为在具有正常水平的NAMPT表达的组织或血浆中过程到的测量结果、量或水平的约或至多约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多(例如,高于在RILI发作之前在受试者的组织或血浆中观察到的测量结果、量或水平或者高于在对照受试者(例如,没有RILI的受试者)的组织或血浆中观察到的测量结果、量或水平),则认为NAMPT的表达高于正常。或者,在一些实施方式中,如果测定表明NAMPT表达的特定测量结果、量或水平比在具有正常水平NAMPT表达的细胞、组织或血浆中观察到的NAMPT的测量结果、量或水平高约或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个标准偏差,则认为NAMPT表达高于正常。在其他情况下,如果NAMPT的测量结果、量或水平是或约是在具有正常水平NAMPT表达的细胞、组织或血浆中观察到的测量结果、量或水平的2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或更多倍,则认为NAMPT表达高于正常。

[0109] 评估NAMPT的表达

[0110] 预期可以来自受试者例如待测受试者(例如,怀疑患有RILI的受试者和/或患有RILI的风险增加的受试者)的样本中测定NAMPT水平。在一些实施方式中,来自受试者的样本指生物样本。在一些实施方式中,生物样本包括但不限于组织活检或切片(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等的组织活检或切片)、血液样本、灌洗液、拭子、刮片、乳头抽吸物或者可以从身体中提取并含有细胞的其他组分。在其他实施方式中,生物样本包括血浆。在特定实施方式中,来自受试者(例如,待测受试者)的样本可以包含组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)活检的全部或部分。在进一步的实施方式中,来自受试者(例如,待测受试者)的样本可以含有肺组织活检的全部或部分,其可以来自双侧活检或单侧活检。

[0111] 本文提供了用于评估NAMPT在细胞、组织或血浆中,如在受试者(例如,待测受试者)的细胞、组织或血浆中的表达的方法。NAMPT在细胞、组织或血浆中的表达可以通过多种直接或间接提供有关其表达的信息的方式进行评估。因此,评估NAMPT表达的方法包括但不限于评估或测量相应的蛋白质、评估或测量相应的转录物、对相应的转录物或基因组序列

进行测序以及测定NAMPT活性。可以使用类似于在美国专利号9,409,983中描述的那些方法在生物样本(例如,细胞、组织、血浆)中检测NAMPT,其全部内容通过引用并入本文。

[0112] I.一般方法学

[0113] 实施本文公开的方法利用分子生物学领域的常规技术。公开在本公开中使用的一般方法的基本文本包括Sambrook和Russell,Molecular Cloning,A Laboratory Manual (3rd ed.2001);Kriegler,Gene Transfer and Expression:A Laboratory Manual (1990);和Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等编著,1994)。

[0114] 对于核酸,大小以千碱基(kb)或碱基对(bp)给出。这些估计值来自琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳、测序的核酸或已发表的DNA序列。对于蛋白质,大小以千道尔顿(kDa)或氨基酸残基数给出。蛋白质大小通过凝胶电泳、测序的蛋白质、衍生的氨基酸序列或公开的蛋白质序列估计。

[0115] 不可商购的寡核苷酸可以化学合成,例如,根据Beaucage和Caruthers,Tetrahedron Lett 22:1859-1862(1981)首次描述的固相亚磷酰胺三酯方法,使用自动合成仪,如在Van Devanter等,Nucleic Acids Res 12:6159-6168(1984)中描述的。寡核苷酸的纯化使用任何本领域公认的策略进行,例如,如Pearson和Reanier,J Chrom 255:137-149(1983)中所述的天然聚丙烯酰胺凝胶电泳或阴离子交换高效液相色谱(HPLC)。

[0116] 本发明中使用的目的序列,例如人NAMPT基因的多核苷酸序列可以使用例如Wallace等,Gene 16:21-26(1981)的双链模板的链终止方法来验证。

[0117] II.采集组织样本并分析NAMPT mRNA或DNA

[0118] 本公开内容涉及测量在细胞、组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆样本中发现的NAMPT mRNA或NAMPT基因组DNA的量的方法(例如,体外方法)作为检测RILI的存在、评估发展的风险、诊断、预后和/或监测RILI的进展或治疗功效的手段。因此,实施本公开的方法(例如,使用NAMPT作为诊断、预后和/或RILI监测的生物标志物的体外方法)的第一步是从待测受试者获得细胞、组织或血浆样本并提取来自样本的mRNA或DNA。

[0119] A.样本的采集和制备

[0120] 使用本公开内容的方法从要测试或监测RILI的人中获得生物样本(例如,细胞、组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆)。应从待测受试者(例如,疑似患有RILI和/或处于发展RILI风险中的受试者)和对照受试者(例如,未患有RILI和/或任何肺部病症的受试者)采集相同类型的生物样本。根据医院或诊所通常遵循的标准方案从受试者例如待测受试者收集生物样本。收集适量的生物样本(例如,细胞、组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆),并在进一步制备之前根据标准程序进行储存。

[0121] 根据本文公开的方法,可以使用例如细胞、组织或血浆进行在受试者(例如,待测受试者)的生物样本中发现的NAMPT mRNA或DNA的分析。制备用于核酸提取的生物样本的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,应首先处理受试者(例如,待测受试者)的组织以破坏细胞膜以释放细胞内包含的核酸。

[0122] B.DNA和RNA的提取和定量

[0123] 从生物样本中提取DNA的方法在分子生物学领域是众所周知的和常规实践的(例如,如Sambrook和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 3d ed.,2001中所描述的)。应消除RNA污染以避免干扰DNA分析。

[0124] 同样,有许多方法可以从生物样本中提取mRNA。mRNA制备的一般方法可以参见例如,Sambrook和Russell,同上;还可以使用各种市售试剂或试剂盒,如Trizol试剂(Invitrogen,Carlsbad,Calif.)、Oligotex Direct mRNA试剂盒(Qiagen,Valencia,Calif.)、RNeasy Mini试剂盒(Qiagen,Hilden,Germany)和PolyATtract.RTM.Series 9600.TM.(Promega,Madison,Wis.)从来自待测受试者的生物样本中获得mRNA。还可以使用一种以上这些方法的组合。必须从RNA制剂中去除所有污染DNA。因此,小心处理样本,用DNase彻底处理,并在扩增和定量步骤中使用适当的阴性对照。

[0125] 1.DNA或mRNA水平的基于PCR的定量测定

[0126] 一旦从样本中提取DNA或mRNA,就可以量化人类NAMPT基因组DNA或mRNA的量。确定DNA或mRNA水平的优选方法是基于扩增的方法,例如通过聚合酶链反应(PCR),尤其是用于mRNA定量分析的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。

[0127] 虽然NAMPT基因组DNA直接进行扩增,但mRNA必须首先进行逆转录。在扩增步骤之前,必须合成人类NAMPT mRNA的DNA拷贝(cDNA)。这是通过逆转录实现的,逆转录可以作为单独的步骤进行,也可以在均相逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)中进行,聚合酶链反应是用于扩增RNA的修饰。Romero and Rotbart in Diagnostic Molecular Biology:Principles and Applications pp.401-406,Persing等编著,Mayo Foundation,Rochester,Minn (1993);Egger等,J Clin Microbiol 33:1442-1447,(1995);和美国专利号5,075,212.中描述了用于核糖核酸PCR扩增的适宜方法。

[0128] PCR的一般方法是本领域众所周知的,因此不在本文中进行详细描述。关于PCR方法、方案和设计引物的原则的综述,参见,例如,Innis等,PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Academic Press,Inc.N.Y.,1990。PCR试剂和实验方案也可从商业供应商处获得,例如Roche Molecular Systems。

[0129] PCR最通常作为使用热稳定酶的自动化过程进行。在此过程中,反应混合物的温度在变性区、引物退火区和延伸反应区之间自动循环。专门适用于此目的的机器可在市场上买到。

[0130] 尽管在实践本公开时通常使用靶基因组DNA或mRNA的PCR扩增,但本领域技术人员将认识到,然而,样本中这些DNA或mRNA种类的扩增可以通过任何已知方法完成,如连接酶链反应(LCR)、转录介导的扩增和自我维持的序列复制或基于核酸序列的扩增(NASBA),每一种都能提供足够的扩增。最近开发的分支DNA技术也可用于定量测定样本中DNA或mRNA的数量。用于对临床样本中核酸序列进行直接定量的分支DNA信号放大的综述参见Nolte,Adv Clin Chem 33:201-235(1998)。

[0131] 一种等温扩增方法,其中使用限制性内切核酸酶和连接酶来实现在限制性位点的一条链中包含核苷酸5'-[α -硫代]-三磷酸的靶分子的扩增,也可用于在本发明中扩增核酸。在美国专利号5,916,779中公开的链置换扩增(SDA)是另一种进行核酸等温扩增的方法,涉及多轮链置换和合成,即切口平移。

[0132] 其他核酸扩增程序包括基于转录的扩增系统(TAS),包括基于核酸序列的扩增(NASBA)和3SR(PCT申请WO 88/10315,其全部内容通过引用并入本文)。欧洲申请号329 822公开了一种核酸扩增方法,该方法涉及循环合成单链RNA("ssRNA")、ssDNA和双链DNA(dsDNA),其可根据本公开内容使用。PCT申请WO 89/06700(其全部内容通过引用并入本文)

公开了一种核酸序列扩增方案,该方案基于启动子区域/引物序列与靶单链DNA(“ssDNA”)的杂交,随后是该序列的许多RNA拷贝的转录。这个方案不是循环的,即新的模板不是从产生的RNA转录物中产生的。其他扩增方法包括“RACE”和“一侧PCR”(Frohman,1990;Ohara等,1989)。

[0133] 在任何扩增或步骤如引物延伸之后,可能需要将扩增或引物延伸产物与模板和/或过量引物分离。在一个实施方式中,使用标准方法通过琼脂糖、琼脂糖-丙烯酰胺或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物(Sambrook等,2001)。分离的扩增产物可以从凝胶上切下和洗脱用于进一步操作。使用低熔点琼脂糖凝胶,可以通过加热凝胶去除分离的条带,然后提取核酸。

[0134] 核酸的分离也可以通过本领域已知的色谱技术进行。有多种色谱法可用于实施本发明,包括吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、羟基磷灰石色谱、分子筛色谱、反相色谱、柱色谱、纸色谱、薄层色谱和气相色谱以及高效液相色谱法。

[0135] 在某些实施方式中,扩增产物是可视化的。典型的可视化方法包括用溴化乙锭染色凝胶和在紫外光下观察条带。或者,如果扩增产物用放射或荧光标记的核苷酸整体标记,则分离的扩增产物可暴露于X射线胶片或在适当的激发光谱下观察。

[0136] 在一个实施方式中,在扩增产物分离后,使标记的核酸探针与扩增的标志物序列接触。探针优选与生色团缀合,但可以是放射性标记的。在另一个实施方式中,探针与结合配偶体缀合,例如抗体或生物素,或另一个携带可检测部分的结合配偶体。

[0137] 在特定实施方式中,检测是通过Southern印迹和与标记探针杂交。涉及Southern印迹的技术是本领域技术人员熟知的(参见Sambrook等,2001)。在美国专利号5,279,721中描述了前述的一个实例,其通过引用并入本文,其公开了一种用于核酸自动电泳和转移的装置和方法。该装置允许在无需外部操作凝胶的情况下进行电泳和印迹,并且非常适合实施根据本发明的方法。

[0138] 在美国专利号5,840,873、5,843,640、5,843,651、5,846,708、5,846,717、5,846,726、5,846,729、5,849,487、5,853,990、5,853,992、5,853,993、5,856,092、5,861,244、5,863,732、5,863,753、5,866,331、5,905,024、5,910,407、5,912,124、5,912,145、5,919,630、5,925,517、5,928,862、5,928,869、5,929,227、5,932,413和5,935,791中描述了可以用于本公开内容的实施的核酸检测的其他方法,其各自通过引用并入本文。

[0139] 将RNA逆转录(RT)为cDNA,然后进行相对定量PCR(RT-PCR),可用于确定从细胞中分离的特定mRNA种类的相对浓度,例如NAMPT编码转录物。通过确定特定mRNA种类的浓度变化,表明编码特定mRNA种类的基因差异表达。

[0140] 特别考虑的是基于芯片的DNA技术,如Hacia等,(1996)和Shoemaker等,(1996)描述的那些。简言之,这些技术涉及快速准确地分析大量基因的定量方法。通过用寡核苷酸标记基因或使用固定探针阵列,可以利用芯片技术将目标分子分离为高密度阵列,并在杂交的基础上筛选这些分子(亦参见,Pease等,1994;和Fodor等,1991)。预期该技术可以与关于本公开内容的诊断方法评估NAMPT的表达水平结合使用。

[0141] 2.其他定量方法

[0142] NAMPT DNA或mRNA也可以使用本领域技术人员公知的其他标准技术来检测。尽管检测步骤通常在扩增步骤之前,但在本发明的方法中不需要扩增。例如,可以通过尺寸分级

(例如,凝胶电泳)来鉴定DNA或mRNA,无论是否进行了扩增步骤。在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶中运行样本并根据众所周知的技术用溴化乙锭标记后(参见,例如,Sambrook和Russell,同上),存在与标准比较相同大小的条带表明存在目标DNA或mRNA,然后可以根据条带的强度将其量与对照进行比较。或者,对NAMPT DNA或mRNA特异的寡核苷酸探针可用于检测此类DNA或mRNA种类的存在,并根据探针传递的信号强度指示与标准比较相比的DNA或mRNA的量。

[0143] 序列特异性探针杂交是检测包含其他种类核酸的特定核酸的公知方法。在足够严格的杂交条件下,探针仅与基本互补的序列特异性杂交。杂交条件的严格性可以放宽以容忍不同数量的序列错配。

[0144] 本领域熟知的多种杂交形式,包括但不限于溶液相、固相或混合相杂交测定。以下文章概述了各种杂交测定形式:Singer等,Biotechniques 4:230,1986;Haase等,Methods in Virology,pp.189-226,1984;Wilkinson,In situ Hybridization,Wilkinson编著,IRL Press,Oxford University Press,Oxford;以及Hames和Higgins编著,Nucleic Acid Hybridization:A Practical Approach,IRL Press,1987。

[0145] 根据众所周知的技术检测杂交复合物。能够与靶核酸(即mRNA或扩增的DNA)特异性杂交的核酸探针可以通过通常用于检测杂交核酸存在的几种方法中的任何一种来标记。一种常见的检测方法是使用放射自显影,使用标记有³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C或³²P、^{99m}Tc等的探针。由于所选同位素合成容易、稳定性和半衰期,放射性同位素的选择取决于研究偏好。其他标记包括化合物(例如,生物素和地高辛),其与用荧光团、化学发光剂和酶标记的抗配体或抗体结合。或者,探针可以直接与标记物缀合,如荧光团、化学发光剂或酶。标记的选择取决于所需的灵敏度、与探针缀合的难易程度、稳定性要求和可用的仪器。

[0146] 可以使用众所周知的技术合成和标记实施本发明所必需的探针和引物。用作探针和引物的多核苷酸和寡核苷酸(例如,与NAMPT多核苷酸或寡核苷酸互补的寡核苷酸)可以根据Beaucage和Caruthers,Tetrahedron Letts,22:1859-1862,1981首次描述的固相亚磷酸三酯方法化学合成,使用自动合成器,如在Needham-VanDevanter等,Nucleic Acids Res 12:6159-6168,1984中所描述的。如Pearson和Regnier,J Chrom,255:137-149,1983中所描述的,寡核苷酸的纯化通过天然丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换HPLC进行。

[0147] 在本发明的一些实施方式中,NAMPT表达通过评估NAMPT转录来评估。NAMPT转录可以通过多种方法进行评估,包括那些涉及扩增NAMPT转录物或对NAMPT转录物进行Northern印迹的方法。NAMPT转录物的扩增可用于定量聚合酶链反应,这是本领域普通技术人员众所周知的。或者,可以实施核酸酶保护测定来量化NAMPT转录物。还考虑了利用探针和靶标之间杂交的其他方法来评估NAMPT转录,例如荧光原位杂交(FISH)或RNA原位杂交(RISH)。在另一个实施方式中,使用微阵列测量NAMPT的RNA表达,该微阵列可以制造成含有全局基因组序列含量或疾病特异性生物标志物。

[0148] C. 用于NAMPT检测的多核苷酸和寡核苷酸

[0149] 本文描述的是能够检测NAMPT表达的多核苷酸和寡核苷酸。本文所述的多核苷酸或寡核苷酸可以是与编码NAMPT的核酸序列(例如,SEQ ID NO:1)的全部或一部分互补的。这些核酸可直接或间接用于评估、评价、量化或确定NAMPT表达。

[0150] 与全部或部分NAMPT序列互补的核酸序列被考虑用于本文所述的方法。在某些实

施方式中,核酸是与5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、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、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10000个或更多个连续的核苷酸、核苷或碱基对(或其中可推导出的任何范围)互补的,包括来自SEQ ID NO:1的此类序列。

[0151] 围绕本文所述的核苷酸序列设计的各种探针和引物可以是任何长度,例如上文所述。通过给序列赋值,例如,第一个残基是1,第二个残基是2,等等,可以提出定义所有引物的算法: n 到 $n+y$,其中 n 是从1到序列的最后一个数字的整数, y 是引物的长度减一,其中 $n+y$ 不超过序列的最后一个数字。因此,对于10-mer,探针对应于碱基1至10、2至11、3至12……等等。对于15-mer,探针对应于碱基1至15、2至16、3至17……等等。对于20-mer,探针对应于碱基1至20、2至21、3至22……等等。

[0152] 使用长度为13至100个核苷酸,优选长度为17至100个核苷酸,或在某些方面,长度高达1-2千碱基或更长的探针或引物,允许形成既稳定又具有选择性的双链体分子。此类探针或引物可以与如上文所述SEQ ID NO:1的长度互补。在长度大于20个碱基的连续段上具有互补序列的分子通常是优选的,以增加获得的杂合分子的稳定性和/或选择性。人们通常更喜欢设计用于杂交的核酸分子,该核酸分子具有一个或多个20至30个核苷酸,或在需要时甚至更长的互补序列。这样的片段可以容易地制备,例如,通过化学方法直接合成片段或通过将选择的序列引入重组载体用于重组生产。

[0153] 探针可以与本文公开的序列的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、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、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000个连续的碱基或其中可推导出的任何范围互补(也称为“互补性”)。在一些实施方式中,序列是SEQ ID NO:1。

[0154] 或者,探针可以与本文公开的序列的至多5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、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、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000个连续的碱基或其中可推导出的任何范围互补(也称为“互补性”)。在一些实施方式中,序列是SEQ ID NO:1。

[0155] 因此,本文所述的核苷酸序列可用于其选择性地形成具有互补DNA和/或RNA片段的双链体分子或提供用于从样本扩增DNA或RNA的引物的能力。根据预想的应用,人们可能希望采用不同的杂交条件来实现探针或引物对靶序列的不同程度的选择性。

[0156] 对于需要高选择性的应用,人们通常希望采用相对高严格的条件来形成杂交体。例如,相对低盐和/或高温条件,例如,在约50°C至约70°C的温度下由约0.02M至约0.10M NaCl提供。这种高度严格的条件几乎不能容忍探针或引物与模板或靶链之间的错配(如果有的话),并且特别适用于分离特定基因(例如,NAMPT基因)或检测特定mRNA(例如,NAMPT mRNA)转录物。一般认为,通过添加增加量的甲酰胺可以使条件更加严格。

[0157] 对于某些应用,例如,定点诱变,应理解较低严格条件是优选的。在这些条件下,即使杂交链的序列不是完全互补的,而是在一个或多个位置错配,也可能发生杂交。通过增加盐浓度和/或降低温度,可以使条件变得不那么严格。例如,在约37°C至约55°C的温度下,约0.1至0.25M NaCl可提供中等严格条件,而在约20°C至约55°C的温度范围内,约0.15M至约0.9M盐的可提供低严格条件。杂交条件可以很容易地根据所需的结果进行操作。

[0158] 在其他实施方式中,例如,杂交可在50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂、1.0mM二硫苏糖醇的条件下,在约20°C至约37°C之间的温度下实现。使用的其他杂交条件可以包括约10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂,温度范围从约40°C到约72°C。

[0159] 在某些实施方式中,将本文所述的确定序列的核酸与合适的手段例如标记结合使用来确定杂交将是有利的。多种合适的指示剂是本领域已知的,包括能够被检测到的荧光、放射性、酶促或其他配体,例如亲和素/生物素。在优选实施方式中,人们可能希望使用荧光标记或酶标签,例如脲酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶,而不是放射性或其他环境不希望的试剂。在酶标签的情况下,比色指示剂底物是已知的,其可用于提供可见或分光光度法可检测的检测手段,以鉴定与含有互补核酸的样本的特异性杂交。

[0160] 在通常情况下,预期本文所述的探针或引物将用作溶液杂交中的试剂,如在PCR中,用于检测NAMPT的表达,以及在采用固相的实施方式中。在涉及固相的实施方式中,测试DNA(或RNA)被吸附或以其他方式固定在选定的基质或表面上。该固定的单链核酸然后在所需条件下与选定的探针杂交。选择的条件将取决于特定环境(例如,取决于G+C含量、靶核酸类型、核酸来源、杂交探针大小等)。用于感兴趣的特定应用的杂交条件的优化是本领域技术人员众所周知的。在洗涤杂交分子以去除非特异性结合的探针分子后,通过确定结合标记的量来检测和/或量化杂交。在美国专利号5,843,663、5,900,481和5,919,626中公开了代表性的固相杂交方法。自美国专利号5,849,481、5,849,486和5,851,772中公开了可以用

于实施本公开内容的其他杂交方法。在本说明书的这一部分中标识的这些和其他参考文献的相关部分通过引用并入本文。

[0161] 可根据标准方法从细胞、组织、血浆或其他样本中分离用作扩增模板的核酸(例如,用作扩增NAMPT模板的核酸)(Sambrook等,2001)。在某些实施方式中,对全细胞或组织匀浆或生物流体样本进行分析,无需对模板核酸进行大量纯化。核酸可以是基因组DNA或分级分离的或全细胞RNA。在使用RNA时,可能需要先将RNA转化为互补DNA。

[0162] III. 多肽的定量

[0163] A. 获得样本

[0164] 本公开内容涉及测量在受试者的细胞、组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆样本中发现的NAMPT蛋白的量的方法(例如,体外方法),如检测RILI的存在、评估发展风险、诊断、预后和/或监测RILI进展或治疗效果的方法。因此,实施本公开内容的方法(例如,使用NAMPT作为诊断、预后和/或RILI监测的生物标志物的体外方法)的第一步是从测试对象获得细胞、组织或血浆样本并从样本中提取蛋白质。

[0165] A. 样本的获取和制备

[0166] 使用本公开的方法从待测试或监测RILI的人获得生物样本(例如,细胞、组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆)。应从待测受试者(例如,怀疑患有RILI的受试者和/或有发展为RILI的风险的受试者)和对照受试者(例如,未患有RILI和/或任何肺部病症的受试者)获得相同类型的生物样本。根据医院或诊所通常遵循的标准方案从受试者例如测试受试者收集生物样本。收集适量的生物样本(例如细胞、组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)或血浆),并在进一步制备之前根据标准程序进行储存。

[0167] 根据本文公开的方法,可以使用例如细胞、组织或血浆来分析在受试者(例如,待测受试者)的生物样本中发现的NAMPT蛋白。制备用于蛋白质提取的生物样本的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,应首先处理受试者(例如,待测受试者)的组织以破坏细胞膜以释放细胞内所含的蛋白质。

[0168] 为检测受试者是否存在RILI或评估受试者发生RILI的风险,可从受试者采集生物样本,并测量人NAMPT蛋白的水平,然后与NAMPT蛋白的正常水平进行比较(例如,与RILI发作前受试者的相同类型生物样本中的NAMPT蛋白水平相比和/或与来自对照受试者的相同类型生物样本中的NAMPT蛋白水平相比)。如果与NAMPT的正常水平相比,观察到人类NAMPT蛋白水平的增加,则测试对象被认为患有RILI或发生RILI的风险升高。为了在RILI患者中监测疾病进展或评估治疗效果,可以在不同时间点采集个体患者的生物样本,以便可以测量人类NAMPT蛋白的水平以提供指示疾病状态的信息。例如,当患者的NAMPT蛋白水平显示出随时间下降的总体趋势时,患者被认为RILI的严重程度有所改善,或者患者接受的治疗被认为是有效的。另一方面,患者的NAMPT蛋白水平没有变化或持续增加的趋势表明病情恶化和给予患者的治疗无效。通常,在患者中观察到的更高的NAMPT蛋白水平表示该患者患有更严重的RILI并且该疾病的预后更差。

[0169] B. 制备用于NAMPT蛋白检测的样本

[0170] 来自受试者的组织或血浆样本适用于本发明并且可以通过众所周知的方法获得并且如前一节所述。在本发明的某些应用中,肺组织可能是优选的样本类型。

[0171] C. 确定人NAMPT蛋白的水平

[0172] 任何特定身份的蛋白质,例如NAMPT蛋白质,都可以使用多种免疫学分析来检测。在一些实施方式中,可以通过用对多肽具有特异性结合亲和性的抗体从测试样本中捕获多肽来进行夹心测定。然后可以用对其具有特异性结合亲和性的标记抗体检测该多肽。一种常见的检测方法是使用放射性标记的检测剂(例如,放射性标记的抗NAMPT抗体)的放射自显影,所述放射性标记的检测剂是使用放射性同位素(例如, ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等)标记的。由于所选同位素的合成容易、稳定性和半衰期,放射性同位素的选择取决于研究偏好。可用于标记检测剂(例如,用于标记抗NAMPT抗体)的其他标记包括化合物(例如,生物素和地高辛),其结合至使用荧光团、化学发光剂、荧光团和酶(例如,HRP)标记的抗配体或抗体。可以使用微流体装置例如微阵列蛋白质芯片进行此类免疫学测定。也可以通过凝胶电泳(例如,二维凝胶电泳)和使用特异性抗体的蛋白质印迹分析检测感兴趣蛋白质(例如人NAMPT蛋白)。在一些实施方式中,使用适当的抗体,标准ELISA技术可用于检测给定的蛋白质(例如,人NAMPT蛋白质)。在其他实施方式中,使用适当的抗体,标准western印迹分析技术可用于检测给定蛋白质(例如,人NAMPT蛋白质)。或者,使用适当的抗体,标准免疫组织化学(IHC)技术可用于检测给定的蛋白质(例如,人类NAMPT蛋白质)。单克隆抗体和多克隆抗体(包括具有所需结合特异性的抗体片段)均可用于多肽的特异性检测。此类抗体及其对特定蛋白质(例如人NAMPT蛋白质)具有特异性结合亲和性的结合片段可以通过已知技术产生。

[0173] 在一些实施方式中,NAMPT蛋白(例如,生物样本中的NAMPT蛋白)可以用结合NAMPT的抗体(例如,抗NAMPT抗体或其抗原结合片段)来检测(例如,可以在检测试验中检测到)。在某些实施方式中,抗-NAMPT抗体用作检测剂,例如与NAMPT结合并检测NAMPT(例如,来自生物样本)的检测抗体,例如在检测测定中检测NAMPT(例如,在western印迹分析、免疫组织化学分析、放射自显影分析和/或ELISA中)。在某些实施方式中,抗NAMPT抗体用作结合NAMPT并检测NAMPT(例如,来自生物样本)的捕获剂,例如在检测分析中检测NAMPT(例如,在western印迹分析、免疫组织化学分析、放射自显影分析和/或ELISA中)。在一些实施方式中,与NAMPT结合的抗体,例如抗NAMPT抗体或其抗原结合片段被标记以便于检测。在一些实施方式中,结合NAMPT的抗体,例如抗NAMPT抗体,或其抗原结合片段是放射性标记的(例如,用放射性同位素标记,例如用 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等)、酶标记(例如,用酶标记,例如用辣根过氧化物酶(HRP)标记)、荧光标记(例如,用荧光团标记)、用化学发光剂标记和/或用化合物标记(例如,用生物素和地高辛)。

[0174] 在实施本发明时也可以采用其他方法来测量NAMPT蛋白的水平。例如,基于质谱技术开发了多种方法,即使在大量样本中也能快速准确地定量感兴趣蛋白。这些方法涉及高度复杂的设备,例如使用多反应监测(MRM)技术的三重四极杆(triple Q)仪器、基质辅助激光解吸/电离飞行时间串联质谱仪(MALDI TOF/TOF)、使用选择性离子监测(SIM)模式的离子阱仪器,以及基于电喷雾电离(ESI)的QTOF质谱仪。参见,例如,Pan等,J Proteome Res 2009年2月;8(2):787-797。

[0175] 在特定方面中,通过评估NAMPT蛋白水平评价NAMPT表达。在一些实施方式中,抗NAMPT抗体可用于评估NAMPT蛋白。此类方法可能涉及使用IHC、蛋白质印迹分析、ELISA、免疫沉淀、放射自显影或抗体阵列。在特定实施方式中,使用IHC评估NAMPT蛋白。使用IHC可以对NAMPT蛋白进行定量和表征。IHC还可允许对要确定NAMPT蛋白表达的样本进行免疫反应

评分。术语“免疫反应评分”(IRS)是指根据反映阳性细胞百分比的量表计算的数字(在1-4的量表上,其中0=0%,1=<10%,2=10%-50%、3=50%-80%和4=>80%)乘以染色强度(1-3级,其中1=弱,2=中等,3=强)。IRS的范围可以是0-12。

[0176] IV. 建立标准对照

[0177] 为了建立用于实施本发明方法的标准对照,首先选择没有任何常规定义的任何肺病(尤其是任何形式的肺损伤,例如RILI)的健康人组。为了使用本发明的方法筛选和/或监测RILI,这些个体在适当的参数范围内,如果适用的话。可选地,个体具有相同的性别、相似的年龄或相似的种族背景。

[0178] 所选个体(例如,对照受试者)的健康状况通过完善的、常规采用的方法来确认,包括但不限于个体的一般体格检查 and 对其病史的一般回顾。

[0179] 此外,所选择的健康个体组必须具有合理的规模,使得从该组获得的组织样本中人类NAMPT基因组DNA、NAMPT mRNA或NAMPT蛋白的平均数量/浓度可以合理地被视为代表NAMPT的正常水平或健康人群一般NAMPT的平均水平。优选地,所选的组包含至少10个人类受试者。

[0180] 一旦基于在所选健康或对照组的每个受试者中发现的个体值建立了NAMPT基因组DNA、mRNA或蛋白质的平均值,则该平均值或中值或代表性值或概况被视为标准对照或被视为NAMPT表达的正常水平。在同一过程中也确定了标准偏差。在一些情况下,可以为具有不同特征(例如年龄、性别或民族背景)的单独定义的群体建立单独的标准控制。

[0181] 在进一步的实施方式中,通过评估NAMPT活性的水平评价NAMPT表达。

[0182] 在RILI中使用NAMPT作为治疗靶点

[0183] 本文公开了使用NAMPT作为RILI治疗靶点的方法和组合物。在一些实施方式中,本公开内容描述了使用NAMPT抑制剂用于治疗RILI。在一些实施方式中,一种或多种NAMPT抑制剂用于治疗暴露于辐射例如全胸肺照射(WTLI)、全身照射(TBI)或局部照射(PBI)的受试者的RILI。在一些实施方式中,一种或多种NAMPT抑制剂用于治疗接受放射治疗(例如,胸部放射治疗)的受试者,例如接受放射治疗(例如,胸部放射治疗)的癌症患者中的RILI。在一些实施方式中,一种或多种NAMPT抑制剂用于治疗接受放疗(例如,胸部放疗)的受试者,例如接受过放疗(例如,胸部放疗)的癌症患者的RILI。在一些实施方式中,一种或多种NAMPT抑制剂用于治疗暴露于辐射(例如,WTLI、TBI或PBI)(例如,来自核事故)的受试者的RILI。在一些实施方式中,一种或多种NAMPT抑制剂用于治疗使用上文描述的诊断方法被诊断患有RILI的受试者的RILI。例如,通过上文描述的方法,可以在暴露于辐射的受试者和/或处于发展为RILI的风险中的受试者中评估NAMPT的表达,并且一旦受试者被诊断患有RILI,该受试者可以用一种或多种NAMPT抑制剂。如本文所述,NAMPT抑制剂可包括但不限于NAMPT siRNA、NAMPT核酶、NAMPT抗体和其他NAMPT结合蛋白或抑制NAMPT转录物表达的蛋白。特别地,抗-NAMPT抗体可用于(例如,作为NAMPT抑制剂)治疗受试者(例如,接受胸部放疗的受试者(例如,癌症患者),或暴露于IR的受试者,例如来自核事故)。

[0184] 在一些实施方式中,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如,人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以降低一种或多种组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)和/或受试者的血浆中NAMPT的表达。在一些实施方式中,可以用于在受试者中治疗RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,如人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以在受

试者的一个或多个组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)中降低炎症(例如,可以降低一种或多种促炎细胞因子的表达,例如IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、TNF、IFN- γ 等)。在一些实施方式中,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以在受试者的一个或多个组织(例如,肺组织、扁桃体组织、胸部组织等)中降低NF κ B的激活(例如,可以降低NF κ B的磷酸化)。在一些实施方式中,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如,人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以减少受试者的肺损伤。在一些实施方式中,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以在受试者中减轻肺纤维化(如辐射诱导的肺纤维化(RILF))。在一些实施方式中,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以在受试者的肺组织中减少胶原沉积。在一些实施方式中,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以在受试者中减少肺组织平滑肌肌动蛋白(SMA)的表达。在一些实施方式中,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以在受试者中减少肌成纤维细胞转化和/或肺组织纤维化。

[0185] 在一些实施方式中,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以胃肠外或口服向受试者施用。特别地,可用于治疗受试者的RILI的NAMPT抑制剂(例如,抗NAMPT抗体,例如人源化抗NAMPT单克隆抗体)可以静脉内向受试者施用。

[0186] 核酸

[0187] 本文公开了与NAMPT序列相关的多核苷酸或核酸分子,用于RILI的诊断、治疗和预防应用。在某些实施方式中,本公开内容涉及可用于基于在严格或高度严格杂交条件下检测NAMPT序列的过度表达来诊断RILI的核酸。在其他实施方式中,本公开特别涉及用作预防或治疗RILI的NAMPT抑制剂的核酸。本文公开的核酸或多核苷酸可以是DNA或RNA,并且在某些实施方式中其可以是寡核苷酸(100个残基或更少)。此外,其可以重组生产或合成生产。这些多核苷酸或核酸分子可以从细胞中分离和纯化,或者其可以合成产生。在一些实施方式中,NAMPT编码核酸是核酸NAMPT抑制剂的靶点,例如降低NAMPT表达水平的核酶或siRNA。

[0188] 与NAMPT杂交的核酸分子可以包含与下述长度或至少下述长度互补的连续的核酸序列:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、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、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、

760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、5500、5600、5700、5800、5900、6000、6100、6200、6300、6400、6500、6600、6700、6800、6900、7000、7100、7200、7300、7400、7500、7600、7700、7800、7900、8000、8100、8200、8300、8400、8500、8600、8700、8800、8900、9000、9100、9200、9300、9400、9500、9600、9700、9800、9900、10000、10100、10200、10300、10400、10500、10600、10700、10800、10900、11000、11100、11200、11300、11400、11500、11600、11700、11800、11900、12000个或更多个(或其中可推导的任何范围)NAMPT序列的核苷酸、核酸或碱基对。此类序列可以与SEQID NO:1相同或互补。

[0189] 因此,具有或者至少或至多具有核酸的约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%以及其中可推导的任何范围的序列与SEQ ID NO:1的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、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、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900或5000个连续碱基(或其中可推导的任何范围)的核酸序列是互补的,其作为本公开内容的一部分。其可用作NAMPT抑制剂或用作本文所述方法中使用的检测探针或引物。

[0190] 反义序列,包括siRNA

[0191] 在一些实施方式中,本文所述的核酸可编码反义构建体。反义方法利用核酸倾向于与互补序列配对的事实。互补是指多核苷酸是能够根据标准沃森-克里克互补规则进行碱基配对的那些。在杂交序列中包含不太常见的碱基,例如肌苷、5-甲基胞嘧啶、6-甲基腺嘌呤、次黄嘌呤和其他碱基,不会干扰配对。

[0192] 反义多核苷酸当被引入靶细胞时,会与其靶多核苷酸特异性结合并干扰转录、RNA

加工、转运、翻译和/或稳定性。反义RNA构建体或编码此类反义RNA的DNA可用于在体外或体内抑制宿主细胞内的基因转录或翻译或两者,例如在宿主动物(包括人类受试者)内。

[0193] 反义构建体可以设计为与基因的启动子和其他控制区、外显子、内含子或甚至外显子-内含子边界结合。预期最有效的反义构建体将包括与内含子-外显子剪接点互补的区域。因此,建议优选实施方式包括与内含子-外显子剪接点的50-200个碱基内的区域互补的反义构建体。已经观察到一些外显子序列可以包含在构建体中而不会严重影响其靶标选择性。包含的外显子材料的量将根据所使用的特定外显子和内含子序列而变化。人们可以简单地通过在体外测试构建体以确定正常细胞功能是否受到影响或具有互补序列的相关基因的表达是否受到影响,就可以很容易地测试是否包含过多的外显子DNA。

[0194] 互补或反义多核苷酸序列在其整个长度上基本上是互补的,并且具有很少的碱基错配。例如,当长度为15个碱基的序列在13或14个位置具有互补核苷酸时,它们可以被称为互补序列。自然地,完全互补的序列将是在其整个长度上完全互补并且没有碱基错配的序列。还考虑了具有较低同源性的其他序列。例如,可以设计具有有限高同源性区域但也包含非同源区域(例如,核酶;见下文)的反义构建体。这些分子虽然具有小于50%的同源性,但会在适当条件下与靶序列结合。将基因组DNA的部分与cDNA或合成序列组合以产生特定的构建体可能是有利的。例如,如果最终构建体需要内含子,则需要使用基因组克隆。cDNA或合成的多核苷酸可以为构建体的剩余部分提供更方便的限制性位点,因此,将用于序列的其余部分。

[0195] 在某些实施方式中,核酸编码干扰RNA或siRNA。RNA干扰(也称为RNA介导的干扰或RNAi)是一种可以减少或消除基因表达的机制。已观察到双链RNA(dsRNA)介导还原,这是一个多步骤过程。dsRNA激活转录后基因表达监视机制,该机制似乎具有保护细胞免受病毒感染和转座子活性的作用(Fire等,1998;Grishok等,2000;Ketting等,1999;Lin和Avery,1999;Montgomery等,1998;Sharp和Zamore,2000;Tabara等,1999)。这些机制的激活靶向成熟的dsRNA互补mRNA进行破坏。RNAi的优点包括非常高的特异性、易于跨细胞膜移动以及对感兴趣基因的长期下调。此外,dsRNA已被证明可以使多种系统中的基因沉默,包括植物、原生动物、真菌、秀丽隐杆线虫、锥虫、果蝇和哺乳动物。人们普遍认为,RNAi在转录后起作用,靶向RNA转录物进行降解。似乎核和细胞质RNA都可以靶向(Bosher和Labouesse,2000)。

[0196] siRNA的设计使其在抑制感兴趣基因表达方面具有特异性和有效性。选择靶序列的方法,即,siRNA将引导降解机制到感兴趣基因中存在的那些序列,旨在避免可能干扰siRNA引导功能的序列,同时包括对一个或多个基因特异的序列。通常,长度约为21至23个核苷酸的siRNA靶序列最有效。该长度反映了如上所述处理更长的RNA所产生的消化产物的长度(Montgomery等,1998)。siRNA的制备主要是通过直接化学合成;或通过源自S2细胞的体外系统。化学合成通过制备两个单链RNA寡聚体,然后将两个单链寡聚体退火成双链RNA来进行。化学合成方法多种多样。非限制性实例提供在美国专利号5,889,136、4,415,723和4,458,066,其通过引用明确并入本文,以及在Wincott等,(1995)中。

[0197] 已建议对siRNA序列进行一些进一步的修改,以改变其稳定性或提高其有效性。建议具有二核苷酸突出端的合成互补21-mer RNA(即,19个互补核苷酸+3'非互补二聚体)可提供最大水平的抑制。这些方案主要使用两个(2'-脱氧)胸苷核苷酸序列作为二核苷酸突出端(overhang)。这些二核苷酸突出端通常写为dTdT,以将它们与掺入RNA的典型核苷酸区

分开来。文献表明,dT突出端的使用主要是出于降低化学合成RNA成本的需要。也有人认为dTdT突出端可能比UU突出端更稳定,尽管可用数据显示与具有UU突出端的siRNA相比,dTdT突出端仅略有(<20%)改善。

[0198] 在一些实施方式中,本公开提供了一种能够触发RNA干扰的siRNA, RNA干扰是一种破坏特定RNA序列的过程。siRNA是长度不超过100个碱基的dsRNA分子(或在其互补区域有100个碱基对或更少)。在一些情况下,它有一个2核苷酸的3'突出端和一个5'磷酸酯。作为dsRNA和特定RNA序列之间互补性的结果,特定RNA序列被靶向。应当理解的是,本公开内容的dsRNA或siRNA能够影响细胞中靶RNA的表达,使其降低至少约15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。由于触发RNAi的能力,本文描述的dsRNA(术语“dsRNA”将被理解为包括“siRNA”)与反义和核酶分子不同且可区分。在结构上,用于RNAi的dsRNA分子不同于反义和核酶分子,因为dsRNA在RNA分子内具有至少一个互补区域。与本文公开的序列(或其补体)的互补(也称为“互补性”)区域包含至少或至多5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、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、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000个连续的碱基,或其中可推导的任何范围。在一些实施方式中,序列是SEQ ID NO:1。在一些实施方式中,使用长dsRNA,其中“长”是指1000个碱基或更长(或在互补区为1000个碱基对或更长)的dsRNA。除非另有说明,术语“dsRNA”包括“长dsRNA”和“中间dsRNA”。在一些实施方式中,dsRNA可以排除使用siRNA、长dsRNA和/或“中间”dsRNA(长度为100到1000个碱基或互补区域中的碱基对)。特别考虑dsRNA可以是具有两条分开的RNA链的分子,其中一条链具有与另一条链上的区域互补的至少一个区域。或者,dsRNA包括单链分子,但具有至少一个如上所述的互补区(参见,Sui等,2002和Brummelkamp等,2002),其中带有发夹环的单链用作RNAi的dsRNA。为方便起见,dsRNA的长度可以用碱基来表示,它只是指单链的长度,也可以用碱基对来表示,它指的是互补区的长度。特别考虑本文关于由两条链组成的dsRNA所讨论的实施方式考虑用于包括单链的dsRNA,反之亦然。在双链dsRNA分子中,具有与目标mRNA互补序列的链称为反义链,具有与目标mRNA相同序列的链称为有义链。类似地,对于仅包含单链的dsRNA,预期反义区具有与靶mRNA互补的序列,而有义区具有与靶mRNA相同的序列。此外,将理解有义和反义区,如有义和反义链,彼此互补(即,可以特异性杂交)。

[0199] 单链RNA或dsRNA分子的两条互补的双链可以至少或至多是下述长度:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、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、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、5500、5600、5700、5800、5900、6000、6100、6200、6300、6400、6500、6600、6700、6800、6900、7000、7100、7200、7300、7400、7500、7600、7700、7800、7900、8000、8100、8200、8300、8400、8500、8600、8700、8800、8900、9000、9100、9200、9300、9400、9500、9600、9700、9800、9900、10000个或更多个(包括一个特定基因的mRNA的全长,没有poly-A尾)碱基或碱基对。如果dsRNA由两条独立的链组成,则两条链的长度可能相同,也可能不同。如果dsRNA是单链,除了互补区以外,该链在一个或两个末端(5'和/或3')还可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、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、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100个或更多个碱基,或者在互补区域之间形成发夹环。

[0200] 在一些实施方式中,dsRNA的一条或多条链为100个碱基(或碱基对)或更少,在这种情况下,它们也可称为siRNA。在具体实施方式中,dsRNA的一条或多条链的长度小于70个碱基。对于那些实施方式,dsRNA链的长度可以是5-70、10-65、20-60、30-55、40-50个碱基或碱基对。具有等于或小于30个碱基对的互补区的dsRNA(例如,茎或互补部分小于或等于30个碱基对的单链发夹RNA)或其中链为30个或更少碱基对的dsRNA长度是特别考虑的,因为这样的分子逃避哺乳动物细胞的抗病毒反应。因此,发夹dsRNA(单链)的长度可能为70个或更少碱基,而互补区域的长度为30个碱基对或更少。在一些情况下,dsRNA可以在细胞中加工成siRNA。

[0201] 发现化学合成的siRNA在细胞培养中以25-100nM的浓度发挥最佳作用,但约100nM的浓度已实现对哺乳动物细胞中表达的有效抑制。siRNA在哺乳动物细胞培养中最有效,浓度约为100nM。在若干实例中,然而,已使用较低浓度的化学合成siRNA(Caplen等,2000;

Elbashir等,2001)。PCT公开号WO 99/32619和WO 01/68836表明用于siRNA的RNA可以化学或酶促合成。这些文本的全部内容各自通过引用并入本文。所考虑的构建体提供产生含有与靶基因的一部分相同的核苷酸序列的RNA的模板。通常,提供的相同序列的长度至少为25个碱基,长度可能多达400个或更多。较长的dsRNA可被内源性核酸酶复合物消化至21-25聚体长度,该复合物可在体内将长dsRNA转化为siRNA。化学或酶法合成的dsRNA在RNA干扰中的用途之间没有区别。类似地,通过引用并入本文的WO 00/44914表明单链RNA可以通过酶促或通过部分/全部有机合成产生。美国专利号5,795,715报道了在单一反应混合物中同时转录两条互补的DNA序列链,其中两个转录物立即杂交。

[0202] 载体

[0203] 本文还描述了主要设计成用于治疗性或预防性NAMPT抑制剂转化细胞的载体,从而编码在真核启动子(即,组成型、诱导型、抑制型、组织特异性)控制下的NAMPT抑制剂核酸序列。此外,如果没有其他原因,载体可以包含选择标记以促进它们的体外操作。然而,选择标记可能在生产重组细胞中发挥重要作用。

[0204] 在真核细胞中控制蛋白质编码基因转录的启动子和增强子由多个遗传元件组成。细胞机制能够收集和整合每个元素传达的调控信息,允许不同的基因进化出不同的、通常是复杂的转录调控模式。

[0205] 在一些实施方式中,用于本文所述方法的启动子是巨细胞病毒(CMV)立即早期(IE)启动子。该启动子可在载体pcDNAIII中从INVITROGEN商购获得,其可用于本文所述的方法中。其他病毒启动子、细胞启动子/增强子和诱导型启动子/增强子可用于本文所述的方法中。此外,任何启动子/增强子组合(根据真核启动子数据库EPDB)也可用于驱动目标核酸的表达。

[0206] 另一个可能证明有用的信号是聚腺苷酸化信号。此类信号可从人生长激素(hGH)基因、牛生长激素(BGH)基因或SV40获得。

[0207] 内部核糖体结合位点(IRES)元件可用于创建多基因或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5-甲基化帽依赖性翻译的核糖体扫描模型并在内部位点开始翻译(Pelletier和Sonenberg,1988)。已描述了来自小核糖核酸病毒家族(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的两个成员的IRES元件(Pelletier和Sonenberg,1988),以及来自哺乳动物信息的IRES(Macejak和Sarnow,1991)。IRES元件可以连接到异源的开放阅读框。多个开放阅读框可以一起转录,每个阅读框由一个IRES分隔,创建多顺反子信息。凭借IRES元件,核糖体可以访问每个开放阅读框以进行有效翻译。使用单个启动子/增强子转录单个信息可以有效地表达多个基因。

[0208] 无论如何,应该理解启动子是DNA元件,当其在功能上位于基因的上游时导致该基因的表达。本文所述的大多数转基因构建体在功能上位于启动子元件的下游。

[0209] 还提供了将本文公开的组合物(例如,包含一种或多种NAMPT抑制剂的组合物)施用于受试者(例如,患有RILI的受试者)的方法。本文所述的任何核酸分子可包含在载体中。本领域技术人员将具备通过标准重组技术构建载体的能力,其描述在Sambrook等,2001和Ausubel等,1996中,这两者通过引用并入本文。除了编码修饰的多肽,例如修饰的白树毒素,载体可以编码未修饰的多肽序列,例如标签或靶向分子。编码此类融合蛋白的有用载体包括pIN载体(Inouye等,1985),编码一段组氨酸的载体和pGEX载体(用于产生谷胱甘肽S-转移酶(GST)可溶性融合蛋白以供后期纯化和分离或切割)。靶向分子是将修饰的多肽引导

至受试者身体中的特定器官、组织、细胞或其他位置的分子。

[0210] 载体是一种载体核酸分子,可将核酸序列插入其中以导入可复制的细胞。核酸序列可以是外源的,这意味着它对于导入载体的细胞是外源的,或者该序列与细胞中的序列同源但位于宿主细胞核酸内的位置一般是找不到的。载体包括质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如,YAC)。表达载体是包含编码至少部分能够转录的基因产物的核酸序列的载体。在一些情况下,然后将RNA分子翻译成蛋白质、多肽或肽。表达载体可包含多种控制序列,其指特定宿主生物中可操作连接的编码序列的转录和可能翻译所必需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列之外,载体和表达载体还可以包含具有其他功能的核酸序列,如下所述。

[0211] 一种递送重组DNA的方法涉及使用腺病毒表达载体。腺病毒表达载体包括含有足以(a)支持构建体的包装和(b)最终表达已克隆到其中的重组基因构建体的腺病毒序列的那些构建体。腺病毒载体可能是复制缺陷的,或至少是条件缺陷的,认为腺病毒载体的性质对于本公开的成功实践不是关键的。腺病毒可以是42种不同的已知血清型或亚群A-F中的任何一种。亚群C的5型腺病毒是获得用于本公开方法的条件复制缺陷型腺病毒载体的一些起始材料。如上所述,根据本公开的典型载体是复制缺陷的并且不会具有腺病毒E1区。因此,在已去除E1编码序列的位置引入转化构建体将是最方便的。然而,构建体在腺病毒序列内的插入位置对于本公开内容的成功实践并不重要。编码感兴趣基因的多核苷酸也可以插入代替缺失的E3区,如Karlsson等,(1986)所述,或插入辅助细胞系或辅助病毒补充E4缺陷的E4区。

[0212] 逆转录病毒是一组单链RNA病毒,其特征在于能够通过逆转录过程将其RNA在感染细胞中转化为双链DNA(Coffin,1990)。为了构建逆转录病毒载体,将编码感兴趣基因的核酸插入病毒基因组中代替某些病毒序列,以产生复制缺陷型病毒。为了生产病毒粒子,构建了包含gag、pol和env基因但不含LTR和包装组分的包装细胞系(Mann等,1983)。当含有cDNA的重组质粒连同逆转录病毒LTR和包装序列被引入该细胞系时(例如,通过磷酸钙沉淀),包装序列允许重组质粒的RNA转录物被包装成病毒颗粒,然后被分泌到培养基中(Nicolas和Rubenstein,1988;Temin,1986;Mann等,1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任选浓缩,并用于基因转移。逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型。然而,整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂(Paskind等,1975)。

[0213] 其他病毒载体包括腺相关病毒(AAV)(在美国专利号5,139,941和美国专利号4,797,368中描述的,各自通过引用并入本文)、痘病毒、其他痘病毒、慢病毒、爱泼斯坦巴尔病毒和小核糖核酸病毒。

[0214] 核酸的鱼精蛋白递送

[0215] 鱼精蛋白也可用于与表达构建体形成复合物。然后可以将此类复合物与上述脂质组合物一起配制用于施用于细胞。鱼精蛋白是与DNA相关的小型强碱性核蛋白。在美国专利号5,187,260中描述了其在核酸递送中的用途,其通过引用并入本文。

[0216] 用于核酸递送的脂质制剂

[0217] 在一个进一步的实施方式中,核酸可以被包裹在脂质体或脂质制剂中。脂质体是一种以磷脂双层膜和内部水性介质为特征的囊泡结构。多层脂质体具有多个被水性介质隔开的脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们会自发形成。脂质成分在形成封闭结构

之前进行自我重排,并在脂质双层之间截留水和溶解的溶质(Ghosh和Bachhawat,1991)。还考虑了与LIPOFECTAMINE(GIBCO BRL)复合的基因构建体。

[0218] 脂质制剂的改进提高了体内基因转移的效率(Smyth-Templeton等,1997;WO 98/07408)。一种由等摩尔比的1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基氨)丙烷(DOTAP)和胆固醇组成的新型脂质制剂显著增强了全身性体内基因转移,约150倍。据说DOTAP:胆固醇脂质制剂形成一种独特的结构,称为“夹心脂质体”。据报道,这种配方将DNA“夹在”内陷的双层或花瓶结构之间。这些脂质结构的有益特征包括胆固醇的正胶体稳定性、二维DNA堆积和增加的血清稳定性。

[0219] 在进一步的实施方式中,脂质体进一步定义为纳米颗粒。纳米粒子是指亚微米粒子。亚微米颗粒可以是任何尺寸。例如,纳米颗粒可具有约0.1、1、10、100、300、500、700、1000纳米或更大的直径。施用于受试者的纳米颗粒可以具有不止一种尺寸。可以使用本领域普通技术人员已知的任何方法来生产纳米颗粒。在一些实施方式中,纳米颗粒在生产过程中被挤出。有关纳米粒子生产的信息可以参见美国专利申请公开号20050143336、美国专利申请公开号20030223938、美国专利申请公开号2003.0147966,其每一个都在此通过引用特别并入本节。

[0220] 在某些实施方式中,抗炎剂与脂质一起施用以预防或减少继发于脂质:核酸复合物的施用的炎症。例如,抗炎剂可以是非甾体抗炎剂、水杨酸盐、抗风湿剂、类固醇或免疫抑制剂。

[0221] DOTAP:Chol纳米颗粒可以通过本领域普通技术人员已知的任何方法合成。例如,方法可以是根据Chada等,2003,或Templeton等,1997中所示的,其两者通过引用特别地并入。

[0222] 本领域普通技术人员熟悉使用脂质体或脂质制剂包埋核酸序列。脂质体是一种以磷脂双层膜和内部水性介质为特征的囊泡结构。多层脂质体具有多个被水性介质隔开的脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们会自发形成。脂质成分在形成封闭结构之前进行自我重排,并在脂质双层之间截留水和溶解的溶质(Ghosh和Bachhawat,1991)。还考虑了与LIPOFECTAMINE(GIBCO BRL)复合的基因构建体。

[0223] 脂质介导的核酸递送和体外外源DNA的表达非常成功(Nicolau和Sene,1982;Fraleay等,1979;Nicolau等,1987)。Wong等,(1980)证明了脂质介导的外源DNA在培养的鸡胚胎、HeLa和肝癌细胞中的传递和表达的可行性。基于脂质的非病毒制剂提供了腺病毒基因疗法的替代方案。尽管许多细胞培养研究记录了基于脂质的非病毒基因转移,但通过基于脂质的制剂进行全身基因传递受到限制。基于非病毒脂质的基因递送的主要限制是构成非病毒递送载体的阳离子脂质的毒性。脂质体的体内毒性部分解释了体外和体内基因转移结果之间的差异。造成这种矛盾数据的另一个因素是存在和不存在血清蛋白时脂质体稳定性的差异。脂质体与血清蛋白的相互作用对脂质体的稳定性特性有显著影响(Yang和Huang,1997)。阳离子脂质体吸引并结合带负电荷的血清蛋白。被血清蛋白包被的脂质体被巨噬细胞溶解或吸收,导致它们从循环中去除。当前的体内脂质体递送方法使用皮下、皮内、肿瘤内或颅内注射来避免与循环中的阳离子脂质相关的毒性和稳定性问题。脂质体和血浆蛋白的相互作用是造成体外和体内基因转移效率差异的原因。

[0224] 脂质制剂的生产通常通过在(I)反相蒸发、(II)脱水-再水化、(III)洗涤剂透析和

(IV) 薄膜水化之后对脂质体混合物进行超声处理或连续挤出来完成。一旦制造出来,脂质结构可用于封装在循环中有毒(化学治疗剂)或不稳定(核酸)的化合物。脂质体封装导致此类化合物的毒性较低,血清半衰期较长(Gabizon等,1990)。许多疾病治疗正在使用基于脂质的基因转移策略来增强传统疗法或建立新疗法,特别是用于治疗过度增殖性疾病的疗法。脂质体可以与血凝病毒(HVJ)复合。这已被证明有助于与细胞膜融合并促进脂质体包裹的DNA进入细胞。在其他实施方式中,脂质体可以与核非组蛋白染色体蛋白(HMG-1)复合或结合使用。在更进一步的实施方式中,脂质体可以与HVJ和HMG-1复合或结合使用。

[0225] 用于非病毒递送的核酸可以在聚丙烯酰胺凝胶、氯化铯离心梯度、柱层析或通过本领域普通技术人员已知的任何其他方式纯化。在某些方面,本发明涉及作为分离核酸的核酸。如本文所用,术语“分离的核酸”是指已经分离出不含或另外不含大量细胞成分或体外反应成分和/或大量细胞成分或体外反应成分的核酸分子(例如,RNA或DNA分子)一种或多种细胞的总基因组和转录的核酸分离核酸的方法(例如,平衡密度离心、电泳分离、柱层析)是本领域技术人员熟知的。

[0226] 蛋白和多肽

[0227] 本文还公开了为多肽的NAMPT抑制剂。在某些实施方式中,NAMPT多肽抑制剂用于治疗或预防RILI。术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用,并且其都涵盖被理解为“肽”(具有100个或更少氨基酸残基的多肽分子)的内容。在某些实施方式中,NAMPT抑制剂是蛋白、多肽或肽;在特定实施方式中,NAMPT抑制剂是作为抗体的蛋白质或多肽。

[0228] 如本领域技术人员将理解的,可以在多肽或肽NAMPT抑制剂的结构中进行修饰和改变,并且仍然产生具有相似或其他所需特征的分子。例如,某些氨基酸可以替换其他氨基酸或包括蛋白质序列中的缺失、添加或截短,而不会明显丧失与结构的相互作用结合能力。由于蛋白质的相互作用能力和性质决定了该蛋白质的生物功能活性,因此可以在蛋白质序列(或其潜在的DNA编码序列)中进行某些氨基酸序列替换,但仍可获得具有相似抑制特性的蛋白质。因此预期可在NAMPT抑制剂多肽或肽(或潜在DNA)的序列中进行各种改变而不会明显损失它们的生物学效用或活性。也很好理解,当某些残基被证明对蛋白质或肽的生物学或结构特性特别重要时,例如抗体结合位点中的残基,这些残基通常不会被交换。

[0229] 氨基酸置换通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷、大小等。对氨基酸侧链取代基的大小、形状和类型的分析表明,精氨酸、赖氨酸和组氨酸都是带正电荷的残基;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸的大小都相似;并且苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸都具有大致相似的形状。因此,基于这些考虑,以下子集在本文中被定义为生物学功能等价物:精氨酸、赖氨酸和组氨酸;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸;和苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。

[0230] 为了实现更多的数量变化,可以考虑氨基酸的亲水指数。根据疏水性和电荷特性,每种氨基酸都被赋予了亲水指数,其是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0231] 亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用的生物学功能方面的重要性是本领域普

遍理解的 (Kyte&Doolittle,1982,其通过引用并入本文)。已知某些氨基酸可以替代具有相似亲水指数或分数的其他氨基酸,并且仍保留相似的生物活性。在基于亲水性指数进行改变时,优选亲水性指数在 ± 2 内的氨基酸的置换,特别优选在 ± 1 内的氨基酸,一些和在 ± 0.5 内的那些甚至更特别优选。本领域还理解,可以在亲水性的基础上有效地进行类似氨基酸的置换,特别是当由此产生的生物功能等效蛋白或肽旨在用于免疫学实施方式时,如在本案中那样。美国专利号4,554,101,其通过引用并入本文,指出蛋白质的最大局部平均亲水性,由其相邻氨基酸的亲水性控制,与其免疫原性和抗原性相关,即与蛋白质的生物学特性相关。

[0232] 如美国专利号4,554,101中所描述的,氨基酸残基具有以下亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 ± 1);谷氨酸(+3.0 ± 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 ± 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。

[0233] 在基于相似亲水性值进行改变时,考虑替换亲水性值在+2、 ± 1 或 ± 0.5 内的氨基酸。虽然讨论集中在由氨基酸变化引起的功能等效的多肽上,但应理解这些变化可能受到编码DNA的改变的影响,还考虑到遗传密码是简并的,并且两个或多个密码子可以编码相同的氨基酸。

[0234] 体外蛋白生产

[0235] 除了实施例中提供的纯化方法外,还讨论了体外蛋白质生产的一般程序。在用根据本公开的一些实施方式的病毒载体转导之后,可以以各种方式制备原代哺乳动物细胞培养物。为了使细胞在体外和与表达构建体接触时保持活力,必须确保细胞与正确比例的氧气、二氧化碳和营养物质保持接触,但要防止微生物污染。细胞培养技术有据可查,在此通过参考(Freshney,1992)公开。

[0236] 前述的一个实施方式涉及使用基因转移使细胞永生化以产生和/或呈递蛋白质。可以如上所述将目的蛋白质的基因转移到合适的宿主细胞中,然后在合适的条件下培养细胞。实际上任何多肽的基因都可以以这种方式使用。上文讨论了重组表达载体的产生以及其中包含的元件。或者,要产生的蛋白质可以是通常由所讨论的细胞合成的内源蛋白质。

[0237] 本公开的另一个实施方式使用自体B淋巴细胞细胞系,其被病毒载体转染,所述病毒载体表达免疫基因产物,更具体地,表达具有免疫原活性的蛋白质。哺乳动物宿主细胞系的其他实例包括Vero和HeLa细胞,其他B和T细胞系,如CEM、721.221、H9、Jurkat、Raji等,以及中国仓鼠卵巢、W138、BHK的细胞系、COS-7、293、HepG2、3T3、RIN和MDCK细胞。此外,可选择调节插入序列表达或以所需方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)对于蛋白质的功能可能是重要的。不同的宿主细胞对于蛋白质的翻译后加工和修饰具有特征性和特异性的机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保表达的外源蛋白质的正确修饰和加工。

[0238] 可以使用多种选择系统,包括但不限于分别在tha-、hgprt-或aprt-细胞中的HSV胸苷激酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因。此外,抗代谢物抗性可以用作选择的基础:对于dhfr,赋予对乙胺嘧啶的抗性;gpt,赋予对霉酚酸的抗性;neo,赋予对氨基糖苷G418的抗性;以及hygro,赋予对潮霉素的抗性。

[0239] 动物细胞可以在体外以两种方式繁殖:作为在整个培养物中悬浮生长的非贴壁依赖性细胞或作为需要附着在固体基质上进行繁殖的贴壁依赖性细胞(即单层类型的细胞生长)。来自连续建立的细胞系的非锚定依赖性或悬浮培养是大规模生产细胞和细胞产品的最广泛使用的手段。然而,悬浮培养的细胞有其局限性,例如致癌潜力和比贴壁细胞低的蛋白质产量。

[0240] 抗体生产

[0241] 本公开的一些实施方式涉及涉及NAMPT抑制剂的方法和组合物,其中所述抑制剂是结合NAMPT的抗体。

[0242] 可以使用用于产生单克隆抗体的任何适宜方法。例如,可以用NAMPT或其片段免疫受体。可以使用任何合适的免疫方法。此类方法可包括佐剂、其他免疫刺激剂、重复加强免疫和使用一种或多种免疫途径。

[0243] 任何合适的NAMPT来源均可用作产生本文公开的组合物和方法的非人抗体的免疫原。此类形式包括但不限于通过本领域已知的重组、合成、化学或酶促降解方式产生的完整蛋白质、肽和表位。可以使用任何形式的抗原来产生足以产生生物活性抗体的抗体。因此,引发抗原可以是单个表位、多个表位或整个蛋白质,单独或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂组合。引发抗原可以是分离的全长蛋白质、细胞表面蛋白质(例如,用转染了至少一部分抗原的细胞进行免疫)或可溶性蛋白质(例如,仅用蛋白质的细胞外结构域部分进行免疫)。抗原可以在遗传修饰的细胞中产生。编码抗原的DNA可以是基因组的或非基因组的(例如,cDNA)并且编码胞外域的至少一部分。如本文所用,术语“部分”是指构成目标抗原的免疫原性表位的最少数量的氨基酸或核酸,视情况而定。可以使用适合于转化目标细胞的任何遗传载体,包括但不限于腺病毒载体、质粒和非病毒载体,例如阳离子脂质。

[0244] 实施例

[0245] 本文描述了体外和体内研究,以评价NAMPT作为RILI中的生物标志物和治疗靶点。包括以下实施例仅用于说明目的,而不是限制性的。

[0246] 实施例1:探索NAMPT在RILI中的作用

[0247] 鉴于炎症级联反应在RILI中的重要作用,研究了辐射对NAMPT表达的影响,NAMPT是TLR4配体和损伤相关分子模式蛋白。将三组C57/B6小鼠用于评估NAMPT在RILI中的作用。

[0248] 第一组由接受单剂量胸部辐射(20Gy)的野生型(WT)小鼠组成。将使用0.1mg/kg LPS处理的小鼠作为阳性对照,将未辐射小鼠作为阴性对照(“对照”)。在18周时间段的特定时间点从小鼠中收集肺组织。测量支气管肺泡灌洗(BAL)蛋白的量,获得细胞计数/差异,并通过RT-PCR评估肺组织中的NAMPT表达。还对肺组织进行苏木素和伊红(H&E)以及NAMPT染色。此外,从小鼠中收集血液,以测量血浆中NAMPT的表达。在图1-7中提供了相应分析的结果。

[0249] 如图1中所描述的,与对照小鼠相比,暴露于辐射的小鼠在暴露于辐射后第1周开始显示出显著增加的BAL蛋白水平($p=0.007$),并且持续整个18周的期间,在第18周观察到最大增加(6倍)。类似地,如在图2中所描述的,在暴露于辐射的小鼠中,表达BAL的细胞(BAL细胞)的数量显著增加($p=0.007$),在第12周观察到最大增加(9倍)。如在图3中所描述的,在辐射暴露后第1、12和18周,BAL细胞的增加主要反映在表达BAL的巨噬细胞的计数增加(BAL巨噬细胞; $p=0.01$)(图3A)和表达BAL的PMN的计数增加(BAL PMN; $p=0.005$)(图3B)。

通过对肺组织进行H&E染色证实了在辐射暴露后1周小鼠中RILI的发展,与来自非辐射对照的肺组织相比,该肺组织表现出急性弥漫性肺泡损伤(图4)。如在图5中所描述的,与来自非辐射对照的肺组织相比(图5A,左图),在辐射暴露后1周,在辐射小鼠的肺组织中观察到NAMPT表达增加(图5A,右图;图5B)。通过RT-PCR分析进一步证实了在辐射肺组织中NAMPT的表达增加。如在图6中所描述的,在辐射暴露后1周的肺组织中NAMPT mRNA表达增加(1.4倍)。受辐射肺组织中NAMPT mRNA表达的增加持续到第12周,然后下降(数据未显示)。此外,如图7中所示,早在辐射暴露后8小时,20Gy辐射就增加了血浆NAMPT水平;在辐射暴露后1周时,血浆NAMPT水平显著增加($p<0.05$) (1.5倍),在第2周观察到最大增加(2.4倍)。

[0250] 第二组由接受20Gy胸部辐射的NAMPT杂合(Nampt^{+/-};“Nampt het”)小鼠组成,并观察4周。将未辐射WT和NAMPT杂合小鼠,以及经辐射的WT小鼠作为对照。4周后从小鼠中收集肺组织,并测量肺组织中BAL蛋白的量。在图8中提供了来自相应分析的结果。

[0251] 如在图8中所描述的,在辐射暴露后4周时,与未经辐射的对照相比,在WT小鼠中BAL蛋白显著增加。然而,NAMPT(+/-)小鼠在4周时表现出RILI减轻(BAL指数,H&E染色),与辐射的WT对照相比,BAL蛋白水平显著降低(降低~20%),但是未观察到总BAL细胞计数的改变。

[0252] 第三组由接受20Gy胸部辐射并腹腔内注射多克隆NAMPT中和抗体(pAb) (3x/周)或PBS(“载体”)的辐射小鼠组成。4周后从小鼠中收集肺组织。测量BAL蛋白的量,获得细胞计数/差异,并通过RT-PCR对肺组织中NAMPT的表达进行评估。此外,从小鼠中收集血液以测量血浆NAMPT的表达。在图9-13中提供了相应分析的结果。

[0253] 如在图9和图10中所描述的,与给予载体的辐射小鼠相比,在4周时,使用NAMPT中和pAb治疗的小鼠RILI减轻,其BAL蛋白水平(图9)和总BAL细胞(图10)减少40%-60%。使用NAMPT中和pAb治疗后BAL细胞减少主要反映在在辐射暴露后4周BAL PMN计数减少(图11,左图)和表达BAL的淋巴细胞的计数减少(BAL-淋巴细胞;图11,右图)。此外,如在图12中所描述的,与载体处理的对照相比,在用NAMPT中和pAb治疗的辐射小鼠的肺组织中观察到NAMPT mRNA表达水平降低11%。此外,如图13中所描述的,与载体处理的对照相比,用NAMPT中和pAb治疗的辐射小鼠的血浆中NAMPT水平降低了约36%。

[0254] 因此,图1-13中概括的结果清楚地证明了RILI中NAMPT表达和分泌的失调。这些发现表明,NAMPT是RILI中的一种新型生物标志物和治疗靶点,有助于肺组织辐射诱导损伤的病理生物学。

[0255] 实施例2:辐射对人体组织和血液中NAMPT表达的影响

[0256] 为了进一步探索NAMPT在RILI中的作用,研究了辐射对人体组织和血液中NAMPT表达的影响。在图14中描述了结果。

[0257] 为评估辐射对NAMPT表达的影响,将人扁桃体上皮组织暴露于8Gy电离辐射(IR)24小时。如在图14A中所描述的,8Gy IR暴露后,在人扁桃体组织中NAMPT的表达迅速且显著的上调。通过研究接受放射治疗的癌症患者的NAMPT表达,进一步评估了辐射对NAMPT表达的影响。如在图14B中所描述的,与对照受试者($n=268$)相比,接受乳腺癌($n=50$)或肺癌($n=34$)放射治疗的受试者的血浆NAMPT水平显著增加($p<0.0001$)。还通过研究放射性肺炎患者的NAMPT表达来评估辐射对NAMPT表达的影响。这些受试者接受针对肺癌或食道癌的放射治疗,在放射治疗后平均6周出现RILI。如在图14C中所描述的,放射性肺炎患者($n=19$)表现

出的NAMPT血浆水平比对照受试者(n=70)高4-5倍($p<0.001$)。通过研究急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者的NAMPT表达,进一步评估了辐射对NAMPT表达的影响。如在图14D中所描述的,ARDS患者(n=338)表现出的NAMPT血浆水平比对照受试者(n=245)高4-5倍。

[0258] 因此,图14中概述的结果清楚地表明人RILI中NAMPT表达和分泌的失调。

[0259] 实施例3:使用放射性肺炎的体内模型评估NAMPT在RILI中的作用

[0260] 为了进一步评价NAMPT在RILI中的作用,WT C57/B6小鼠和NAMPT杂合小鼠(Nampt^{+/-})暴露于20Gy全胸肺辐射(WTLI),并在18周时间段的特定时间点进行评估。在图15和图16中描述了结果。

[0261] 如在图15A-15C中所描述的,与假暴露小鼠相比(未辐射小鼠,如插图所示),在20Gy WTLI后4周(图15A)、12周(图15B)和18周(图15C),WTLI暴露WT小鼠显示出增加的NAMPT表达,特别是在肺泡巨噬细胞和上皮细胞中,以及炎症、血管渗漏和炎性肺损伤增加。图15D总结了IR暴露后4周、12周和18周的肺组织中的NAMPT染色;以假暴露小鼠(未辐射小鼠)作为阴性对照。另一方面,与WT小鼠相比,NAMPT杂合小鼠(Nampt^{+/-})显示出炎性肺损伤减轻,这反映在20Gy WTLI暴露4周后NAMPT杂合小鼠中BAL蛋白水平降低(图16A)和BAL细胞计数减少(图16B)。

[0262] 因此,在图15和图16中所描述的结果强调了NAMPT在RILI发病机制中的关键作用,并表明使用NAMPT作为RILI生物标志物的潜力。

[0263] 实施例4:使用放射性肺炎的体内模型验证NAMPT作为RILI的治疗靶点

[0264] 为验证NAMPT作为RILI的治疗靶点,如在实施例3中所描述的,将WT C57/B6小鼠和NAMPT杂合小鼠(Nampt^{+/-})暴露于20Gy WTLI(RILI小鼠)或假-IR(未辐射小鼠)。使用50μg抗NAMPT pAb或载体对照腹腔注射WT小鼠3x/周。在IR暴露4周后,评价小鼠的肺损伤和炎症、BAL蛋白水平、BAL细胞计数和血浆NAMPT水平。在图17中描述了结果。

[0265] 与假-IR暴露小鼠相比(如插图所示),WTLI暴露的WT小鼠肺组织的H&E染色显示肺损伤和炎症显著增加(图17A)。而相比之下,暴露于20Gy IR的NAMPT杂合小鼠显示出显著减少的损伤(图17B)。在使用抗NAMPT pAb注射的小鼠中也观察到显著减轻的肺损伤(图17C)。使用抗NAMPT抗体治疗后,IR诱导的肺损伤减轻还反映在注射抗NAMPT pAb抗体的小鼠BAL蛋白水平降低(图17D,左图)和BAL细胞计数减少(图17D,右图)。抗NAMPT抗体还降低IR暴露4周后IR暴露小鼠血液中的NAMPT水平(图17E)。

[0266] 因此,图17中描述的结果强调了抗NAMPT抗体在改善WTLI诱导的放射性肺炎和肺损伤中的作用,并验证了NAMPT作为RILI的治疗靶点。

[0267] 实施例5:使用辐射诱导的肺纤维化的体内模型验证NAMPT作为RILI的治疗靶点

[0268] 为验证NAMPT作为RILI的治疗靶点,如在实施例3中所描述的,将WT C57/B6小鼠和NAMPT杂合小鼠(Nampt^{+/-})暴露于20Gy WTLI。如在实施例4中所描述的,使用50μg抗NAMPT pAb或载体对照腹腔注射WT小鼠3x/周。通过评估炎症、胶原蛋白沉积和肺组织平滑肌肌动蛋白(SMA)的表达来评估小鼠的辐射诱导的肺纤维化(RILF),这是肌成纤维细胞转变和纤维化的反映。在图18中描述了结果。

[0269] 如在图18中描述的,在12和18周时,20Gy IR诱导了RILF,其反映在炎症增加(肺组织的H&E染色,如图18A中所示;和在western印迹分析中IL-6表达增加,如图18E中所示),胶原沉积增加(通过肺组织的三色染色检测,如图18C中所示),和肺组织SMA表达增加(通过

western印迹分析检测,如图18E中所示)。抗NAMPT pAb在12和18周时显著降低了IR诱导的损伤,其反映在炎症减少(肺组织的H&E染色,如图18B中所示),和肺组织SMA表达减少(western印迹分析,如图18E中所示)。类似地,观察到Nampt^{+/-}基因型的保护作用,其为三色染色减少(18周)(图18D)和在IR暴露后12周的肺组织中SMA和IL-6水平降低(western印迹分析,如图18E中所示)。

[0270] 因此,在图18中描述的结果强调了抗NAMPT Ab和杂合Nampt^{+/-}基因型在减弱RILI中的作用,并进一步验证了NAMPT作为RILI中的治疗靶点。

[0271] 实施例6:用于减轻全身性炎症损伤的人源化抗NAMPT抗体平台的开发

[0272] 为了抑制进化保守的炎症通路的激活,我们开发了人源化抗NAMPT抗体。经过几轮亚克隆后,产生了一组抗NAMPT小鼠单克隆抗体(mAb),其在显著减少NAMPT诱导的NFκB磷酸化和减轻小鼠炎性肺损伤方面非常有效。选择这些中Kd为6和9nM的两个高亲和性小鼠抗NAMPT mAb(AL303、AL310)进行人源化。利用人内皮细胞以及小鼠和大鼠炎症损伤的临床前模型对50种人源化mAb(每种小鼠mAb衍生25种)进行全面的体外和体内筛选,最终选择了我们的主要人源化抗NAMPT抗体。使用两种小鼠肺损伤模型在体内测试了人源化抗NAMPT抗体治疗肺损伤的能力:通过器官内将LPS递送到小鼠体内开发的肺损伤的“一次打击”模型,和通过将小鼠暴露于LPS和机械VILI开发的肺损伤“二次打击”模型。向这些小鼠施用任一人源化抗NAMPT抗体,以评估抗体减轻急性炎症和损伤的能力。在图19中提供了检测结果。

[0273] 如在图19A中所描述的,综合肺损伤评分分析表明,所有检测的人源化抗NAMPT抗体均能有效减轻LPS诱导的“一次打击”模型中的肺损伤。然而,使用抗NAMPT抗体P观察到最显著的效果(减轻45%)。如在图19B中所描述的,综合肺损伤评分分析表明,所有检测的人源化抗NAMPT抗体均能够有效减轻LPS/VILI诱导的“二次打击”模型中的肺损伤。然而,使用抗NAMPT抗体P观察到最显著的效果(减轻42%)。如在图19C中所描述的,在LPS/VILI诱导的急性炎症损伤的“二次打击”模型中,抗NAMPT抗体P也能有效降低组织学损伤指数。因此,将人源化抗NAMPT抗体“P”选为可行的RILI治疗策略。

[0274] 对人源化抗NAMPT mAb“P”进行序列优化,以影响VH和VL序列内的相关氨基酸置换,以改善研发、增强在稳定哺乳动物细胞系中mAb的表达和降低免疫原性。序列改变基于结构和序列数据,如聚集或翻译后修饰(氧化、脱酰胺、异构化)、T细胞表位和N连接糖基化基序。在U.S.S.N.62/883,952中提供了人源化抗NAMPT单克隆抗体研发和选择的细节,其全部内容通过引用并入本文。

[0275] 在图19中描述的结果强调了抗NAMPT抗体是一种新型的、基于免疫的抗炎平台。如图20中提供的示意图所概括的,NAMPT是一种由多种有害刺激(包括辐射)释放的免疫效应分子,其功能是与损伤相关的分子模式蛋白或DAMP。通过连接TLR4,NAMPT有助于激活全身炎症级联反应、增加血管通透性和多器官衰竭。抗NAMPT抗体抑制NAMPT,从而抑制辐射诱导的炎症级联反应、肺毒性和全身炎症,以减轻RILI的症状。

[0276] 实施例7:放射性标记的抗NAMPT抗体可鉴定发炎的肺组织中NAMPT表达的增加

[0277] 放射性标记的抗NAMPT抗体开发的目的是无创检测体内不同组织中的NAMPT信号转导通路和NAMPT表达。使用放射性标记的抗NAMPT mAb对具有RILI的小鼠模型成像将使我们能够在全身辐射(TBI)或局部辐射(PBI)之后(如在核事故中)确定部署抗NAMPT mAb作为治疗干预的最佳时间,以及使用其他特定放射性标记来调查炎症和细胞凋亡的主要器官。

此前针对使用^{99m}Tc的特异性放射性标记抗体优化了方案。使用类似方法,我们通过将mAb与异双功能性接头缀合,使用间接标记方案对抗NAMPT mAb进行放射性标记,以检测肺和其他器官中的NAMPT组织表达。为了测试通过放射性标记的抗NAMPT抗体检测NAMPT表达,将^{99m}Tc-标记的抗NAMPT mAb探针注射至对照小鼠和暴露于8Gy PBI的小鼠,并进行生物分布测量和快速放射自显影成像。如在图21A-21C中所描述的,在PBI暴露后2周,与对照小鼠相比,在PBI暴露小鼠的肺中观察到更高的放射性摄取(高1.8倍)。为了进一步确证通过放射性标记的抗NAMPT抗体检测NAMPT,将^{99m}Tc-标记的抗NAMPT mAb探针注射至使用LPS或20Gy WTLI攻击的小鼠,并进行生物分布测量和快速放射自显影成像。如在图21D-21F中所描述的,放射自显影成像显示,在C57/B6小鼠中注射LPS(气管内)后24小时和胸部辐射(20Gy)后5天,^{99m}Tc标记的抗NAMPT mAb探针在肺组织中强烈检测到NAMPT表达。

[0278] 因此,如在图21中所描述的,放射性标记的抗NAMPT抗体可有效检测发炎的肺组织中NAMPT表达的增加。这强调了利用放射性标记的抗NAMPT抗体作为检测NAMPT的工具的潜力,这对于通过本文所述的方法使用NAMPT作为RILI中的生物标志物可能是关键的。

[0279] 表1:序列表

序列标识	序列
SEQ ID NO: 1	AGTGACTTAAGCAACGGAGCGCGGTGAAGCTCATTTTTCTCCTTCCTCGCAGCCGCGCCA GGGAGCTCGCGGCGCGCGGCCCTGTCTCCGGCCCGAGATGAATCCTGCGGCAGAAAGCC GAGTTCAACATCCTCCTGGCCACCGACTCCTACAAGTTACTACTATAAACAAATATCCA CCCAACACAAGCAAAGTTTATCTCTACTTTGAATGCCGTGAAAAGAAGACAGAAAACCTCC AAATTAAGGAAGGTGAAATATGAGGAAACAGTATTTTATGGGTTGCGAGTACATCTCTAAT AAGTACTTAAAAGGTAAAGTAGTAACCAAAGAGAAAATCCAGGAAGCCAAAGATGTCTAC AAAGAACATTTCCAAGATGATGTCTTTAATGAAAAGGGATGGAACACTAGATGGTCTGGAA TATGATGGGCATCTTCCAATAGAAATAAAAGCTGTTCTGAGGGCTTTGTCTATCCAGAG GGAAATGTTCTCTTCACGGTGGAAAACACAGATCCAGAGTGTACTGGCTTACAAATTTGG ATTGAGACTATTTCTGTTTCAGTCTGTATCCAATCACAGTGGCCACAAATTTAGAGAG CAGAAGAAAATATTGGCCAAATATTTGTTAGAAACTTCTGGTAACTTAGATGGTCTGGAA TACAAGTTACATGATTTTGGCTACAGAGGAGTCTCTTCCCAAGAGACTGCTGGCATAGGA GCATCTGCTCACTTGGTTAACTTCAAAGGAACAGATACAGTAGCAGGACTTGTCTTAATT AAAAATATTATGGAACGAAAGATCCTGTTCCAGGCTATTCTGTTCCAGCAGCAGAACAC AGTACCATAACAGCTTGGGGGAAAGACCATGAAAAGATGCTTTGAACATATTGTGAACA CAGTTTTTCATCAGTGCCTGTATCTGTGGTCAGCGATAGCTATGACATTTATAATGCGTGT GAGAAAATATGGGGTGAAGATCTAAGACATTTAATAGTATCAAGAAGTACACAGGCACCA CTAATAATCAGACCTGATTCTGGAAACCCCTCTTGACACTGTGTTAAAGGTTTTGGAGATT TTAGGTAAGAAGTTTCTGTACTGAGAACTCAAAGGGTTACAAGTTGCTGCCACCTTAT CTTAGAGTTATTCAAGGGGATGGAGTAGATATTAATACCTTACAAGAGATTTGTAGAAGGC ATGAAACAAAAATGTGGAGTATTGAAAATATTGCCTTCGGTTCTGGTGGAGGTTTGCTA CAGAAGTTGACAAGAGATCTCTTGAATTGTTCTTCAAGTGTAGCTATGTTGTAACATAAT GGCCTTGGGATTAACGTCTTCAAGGACCCAGTTGCTGATCCCAACAAAAGGTCCAAAAAG GGCCGATTATCTTTACATAGGACGCCAGCAGGGAATTTGTTACACTGGAGGAAGGAAAA GGAGACCTTGAGGAATATGGTCAGGATCTTCTCCATACTGTCTTCAAGAATGGCAAGGTG ACAAAAAGCTATTCATTTGATGAAATAAGAAAAAATGCACAGCTGAATATTGAACTGGAA GCAGCACATCATTAGGCTTTATGACTGGGTGTGTGTGTGTGTATGTAATACATAATGTT TATTGTACAGATGTGTGGGTTTGTGTTTTATGATACATTACAGCCAAATATTGTTGTTGG TTTTATGGACATACTGCCCTTTCATTTTTTTTCTTTTCCAGTGTTTAGGTGATCTCAAATT AGGAAATGCATTTAACCATGTAAAAGATGAGTGCTAAAGTAAGCTTTTTAGGGCCCTTTG CCAATAGGTAGTCATTCAATCTGGTATTGATCTTTTCAAAATAACAGAAGTGAAGAACT TTTATATATAACTGATGATCATAAAAACAGATTTGCATAAAATTACCATGATTGCTTTA TGTTTATATTTAACTTGTATTTTTGTACAAACAAGATTGTGTAAGATATATTGAAGTTT CAGTGATTTAACAGTCTTTCCAACCTTTTCATGATTTTTATGAGCACAGACTTTCAAGAAA ATACTTGAAAAATAAATTACATTGCCTTTTGTCCATTAATCAGCAATAAAACATGGCCCTT AACAAAGTTGTTGTGTTATTGTACAATTGAAAATTATGTCGGGACATACCCATAGAAA TTACTAACCTTACTGCCCCCTGTAGAATATGTATTAATCATCTACATTAAAGAAAATAA TGGTCTTACTGGAATGTCTAGGCACTGTACAGTTATTATATATCTTGGTGTGTGATTG TACCAGTGAAATGCCAAATTTGAAAGGCTGTACTGCAATTTTATATGTACAGAGATTGCC

[0280]

[0281]

序列标识	序列
	TGTGGCTCTAATATGCACCTCAAGATTTTAAGGAGATAATGTTTTTAGAGAGAATTTCTG CTTCCACTATAGAAATATATACATAAATGTAAAATACCTACAAAAGTGGAAAGTAGTGATT TTAAAGTAATTACACTTCTGAATTTATTTTTCATATTCTATAGTTGGTATGACTTAAATG AATTACTGGAGTGGGTAGTGAGTGACTTAAATGTTTCAATTCTGTTATATTTTTTTATTA AGTTTTTAAAAAATTAAATTGGATATTAAATTGTATGGACATCATTTATTAATTTTAAAC TGAATGCCCTCAATAAGTAATACTGAAGCACATTCTTAAATGAAGATAAATTATCTCCAA TGAAAAGCATGACATGTGTTTCAATAGAAGAATCTTAAGTTGGCTAAATTCAAAGTGCTT GACATCAAAATGTTCTAGAGTGATTAGCTACTAGATTCTGAATCATACATCACATCTGAC TAGAGACCAGTTTCTTTTCAATGATTCTTTTATGTATGTAGATCTGTTCTTCTGAGGCAG CGGTTGGCCAACTATAGCCCAAGGCCAAATTTGGACTTCTTTTTATAAATGCAGATTGT CTATGGCTGCTTTCCCACTACTCCAGCCTAAGGTAAACAGCTGCAATAGAAGCCAAATGA GAATCGCAAAGCCCAAATGTTTATTAACCTGCCCTTACACAAAATTACACAAAAGTT TCCTGATCTCTGTTCTAAGAAAAGGAGTGTGCCTTGCAATTTAAAGGAAATGTTGGTTTC TAGGGAAGGGAGGAGGCTAAATAATTGATACGGAATTTTCTCTTTTGTCTCTTTTTTC TCACTTAAGAATCCGATACTGGAAGACTGATTTAGAAAAGTTTTTAACATGACATTAAAT GTGAAATTTTAAAAATTGAAAAGCCATAAATCATCTGTTTTAAATAGTTACATGAGAAAA TGATCACTAGAATAACCTAATTAGAAGTGTATCTTCATTAAATGTTTTTGAATAGTGGT ATTAGAAAGAATATGTTTTTTCAGATGGTTCTTTAAACATGTAGTGAGAACAATAAGCATT ATTCACTTTTAGTAAGTCTTCTGTAATCCATGATATAAAATAATTTTAAATGATTTTTT AATGTATTTGAGTAAAGATGAGTAGTATTAAGAAAAACACACATTTCTTCACAAAATGTG CTAAGGGGCGTGTAAAGAATCAAAAAGAACTATTACCAATAATAGTTTTTGAATAGTGGT ATAATTTTGTGTTTAAACATTGAAATTATAGTACAGACAGTATTCTCTGTGTTCTGTGAA TTTCAGCAGCTTCAGAATAGAGTTTAATTTAGAAAATTTGCAGTGAAAAAAGCTATCTCTT TGTTCAACAACCATAAATCAGGAGATGGAGATTAATCTATTGGCTCTTAGTCACTTGGAA CTGATTAATTCTGACTTTTCTGTCACTAAGCACTTGGTATTTGGCCATCTCCATTCTGAGC ACCAAACGGTTAACACGAATGTCCACTAGAACTCTGCTGTGTGTACCCTTAAATCAGTC TAAATCTTCCAGACAAAAGCAAATGGCATTATGGATTAAAGTCATTAGATTTTCAACTG ACATTAATTAATCCCTCTTGATTGATTATATCATCAAGTATTTATATCTTAAATAGGAGG TAGGATTTCTGTGTTAAGACTCTTATTTGTACCCTATAAATAAGTAAAAATGTTTTTTAT GAGTATCCCTTGTTTTCCCTTCTTAAATTGTTATCAACAATTTTATAATGAAATCTAT CTTGGAAAATTAGAAAGAAAAATGGCAAGGTATTTATGTTCTGTTTGCCATAATTTAGA ACTCACACTTAAGTATTTTGTAGTTTTACATTCCTTTTTAACCATTTCAGTGGAGAATGT CAGCTTTTCTCCCAAGTTGTATGTTAAGTCTATTCTAATATAGTACTCAACATCAAGTTAT AAACATGTAATAAACATGGAAATAAAGTTTAGCTCTATTA
SEQ ID NO: 2	MNPAAEAEFNILLATDSYKVTHYKQYPPNTSKVYSYFECREKKTENSKLRKVKEETVIFY GLQYILNKYLKGVVTKKEIQEAKDVYKEHFQDDVFNEKGWNYILEKYDGHLPBIEIKAVP EGFVIPRGNVLTVENTDPECYWLTNWIETILVQSWYPITVATNSREQKKILAKYLLETS GNLDGLEKHLHDFGYRGVSSQETAGIGASAHLVNFKGTDTVAGLALIKKYYGTDKDPVPGY SVPAAEHSTITAWGKDHEKDAFEHIVTQFSSVPVSVSDSYDIYNACEKIWGEDLRHLIV SRSTQAPLIIRPDGSGNPLDTVLKVLEILGKKFPVTENSKGYKLLPPYLRVIQGDGVDINT LQEIVEGMKQKMWSIENIAFGSGGGLLQKLTRDLLNCSFKCSYVVTNGLGINVFKDPVAD PNKRSKKGRLSLHRTFAGNFVTL EEGKGDLEEYQDLLHTVFKNKGVTKSYSFDEIRKNA QLNIELEAAHH

序列表

<110> 亚利桑那大学评议会

<120> 用于辐射诱导的肺损伤的生物标志物和使用方法

<130> A105818-1010W0

<140>

<141>

<150> 62/896, 483

<151> 2019-09-05

<150> 62/753, 802

<151> 2018-10-31

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4360

<212> DNA

<213> 智人

[0001]

<400> 1

agtgacttaa gcaacggagc gcggtgaagc tcatttttct ccttcctcgc agccgcgcca	60
gggagctcgc ggcgcgcggc cctgtcctc cgccccgaga tgaatcctgc ggcagaagcc	120
gagttcaaca tcctcctggc caccgactcc tacaaggta ctactataa acaatatcca	180
cccaacacaa gcaaagtta ttctacttt gaatgccgtg aaaagaagac agaaaactcc	240
aaattaagga aggtgaaata tgaggaaaca gtattttatg ggttgagta cattcttaat	300
aagtacttaa aaggtaaagt agtaaccaa gagaaaatcc aggaagcaa agatgtctac	360
aaagaacatt tccaagatga tgtctttaat gaaaaggat ggaactacat tcttgagaag	420
tatgatgggc atcttccaat agaaataaaa gctgttcctg agggctttgt cattcccaga	480
ggaaatgttc tcttcacggt ggaaaacaca gatccagagt gttactggct tacaaattgg	540
attgagacta ttcttggtca gtcttggtat ccaatcacag tgccacaaa ttctagagag	600
cagaagaaaa tattggccaa atatttgta gaaactctg gtaacttaga tggctctgaa	660
tacaagttac atgattttgg ctacagagga gtctcttccc aagagactgc tggcatagga	720

[0002]	gcacctgctc acttggttaa cttcaaagga acagatacag tagcaggact tgctctaatt	780
	aaaaaatatt atggaacgaa agatcctgtt ccaggctatt ctgttccagc agcagaacac	840
	agtaccataa cagcttgggg gaaagaccat gaaaaagatg cttttgaaca tattgtaaca	900
	cagttttcat cagtgcctgt atctgtggtc agcgatagct atgacattta taatgcgtgt	960
	gagaaaatat ggggtgaaga tctaagacat ttaatagtat caagaagtac acaggcacca	1020
	ctaataatca gacctgattc tggaaaccct cttgacactg tgttaaaggt tttggagatt	1080
	ttaggtaaga agtttctgt tactgagaac tcaaaggggt acaagttgct gccacettat	1140
	cttagagtta ttcaagggga tggagtagat attaatacct tacaagagat tgtagaaggc	1200
	atgaaacaaa aaatgtggag tattgaaaat attgccttcg gttctggtgg aggtttgcta	1260
	cagaagttga caagagatct cttgaattgt tccttcaagt gtagctatgt tgtaactaat	1320
	ggccttggga ttaacgtctt caaggaccca gttgctgac ccaacaaaag gtccaaaaag	1380
	ggccgattat ctttaccatag gacgccagca gggaattttg ttacactgga ggaaggaaaa	1440
	ggagaccttg aggaatatgg tcaggatctt ctccatactg tcttcaagaa tggcaagggtg	1500
	acaaaaagct attcatttga tgaaataaga aaaaatgcac agctgaatat tgaactggaa	1560
	gcagcacatc attaggcttt atgactgggt gtgtgttgtg tgtatgtaat acataatgtt	1620
	tattgtacag atgtgtgggg tttgtgtttt atgatacatt acagccaaat tattgtttgg	1680
	tttatggaca tactgccctt tcattttttt tcttttccag tgtttaggtg atctcaaatt	1740
	aggaaatgca tttaaccatg taaaagatga gtgctaaagt aagcttttta gggccctttg	1800
	ccaataggta gtcattcaat ctggtattga tcttttcaca aataacagaa ctgagaaact	1860
	tttatatata actgatgac acataaaaca gatttgcata aaattacat gattgcttta	1920
	tgtttatatt taacttgtat tttgtacaa acaagattgt gtaagatata tttgaagttt	1980
	cagtgattta acagtctttc caacttttca tgatttttat gagcacagac tttcaagaaa	2040
	atacttgaaa ataaattaca ttgccttttg tccattaatc agcaaataaa acatggcctt	2100
	aacaaagttg tttgtgttat tgtacaattt gaaaattatg tcgggacata ccctatagaa	2160
	ttactaacct tactgcccct tgtagaatat gtattaatca ttctacatta aagaaaataa	2220
	tggttcttac tggaatgtct aggcactgta cagttattat atatcttggt tgttgtattg	2280

	taccagtga atgccaaatt tgaaaggcct gtactgcaat tttatatgtc agagattgcc	2340
	tgtggctcta atatgcacct caagatttta aggagataat gtttttagag agaatttctg	2400
	cttcactat agaatatata cataaatgta aaatacttac aaaagtggaa gtagtgtatt	2460
	ttaaagtaat tacacttctg aatttatatt tcataattcta tagttggtat gacttaaatg	2520
	aattactgga gtgggtagt agtgtactta aatgtttcaa ttctgttata tttttatta	2580
	agtttttaaa aaattaaatt ggatattaaa ttgtatggac atcatttatt aattttaaac	2640
	tgaatgcct caataagtaa tactgaagca cattcttaaa tgaagataaa ttatctccaa	2700
	tgaaaagcat gacatgtgt tcaatagaag aatcttaagt tggctaaatt caaagtgctt	2760
	gacatcaaaa tgttctagag tgattagcta ctgattctg aatcatacat cacatctgac	2820
	tagagaccag tttctttcga atgattcttt tatgtatgta gatctgttct tctgaggcag	2880
	cggttggcca actatagccc aaaggccaaa ttggacttc tttttataaa tgcagattgt	2940
	ctatggctgc tttccacta ctccagccta aggtaaacag ctgcaataga agccaaatga	3000
[0003]	gaatcgcaaa gcccaaatg tttattaacc tgccctttac acaaaattac acaaaaagtt	3060
	tcctgatctc tgttctaaga aaaggagtgt gccttgcat taaaaggaaa tgttggtttc	3120
	tagggaaggg aggaggctaa ataattgata cggaattttc ctcttttgtc ttctttttc	3180
	tcacttaaga atccgatact ggaagactga ttagaaaaag tttttaacat gacattaaat	3240
	gtgaaatttt aaaaattgaa aagccataaa tcactgttt taaatagtta catgagaaaa	3300
	tgatcactag aataacctaa ttagaagtgt tatcttcatt aaatgttttt tgtaagtgg	3360
	attagaaaga atatgttttt cagatggttc tttaaacatg tagtgagaac aataagcatt	3420
	attcactttt agtaagtctt ctgtaatcca tgatataaaa taattttaaa atgatttttt	3480
	aatgtatttg agtaaagatg agtagtatta agaaaaacac acatttcttc acaaaatgtg	3540
	ctaaggggcg tgtaaagaat caaaagaaac tattaccaat aatagttttg ataatacccc	3600
	ataattttgt gtttaaacat tgaaattata gtacagacag tattctctgt gttctgtgaa	3660
	tttcagcagc ttcagaatag agtttaattt agaaatttgc agtgaaaaaa gctatctctt	3720
	tgttcacaac cataaatcag gagatggaga ttaattctat tggctcttag tcacttggaa	3780

```

ctgattaatt ctgactttct gtcactaagc acttggtatt tggccatctc cattctgagc      3840
accaaacggt taacacgaat gtccactaga actctgctgt gtgtcacctt taaatcagtc      3900
taaattcttc agacaaaagc aaatggcatt tatggattta agtcattaga ttttcaactg      3960
acattaatta atccctcttg attgattata tcatcaagta tttatatctt aaataggagg      4020
taggatttct gtgttaagac tcttatttgt accctataat taaagtaaaa tgttttttat      4080
gagtatccct tgttttccct tcttaaattg ttatcaaaca atttttataa tgaaatctat      4140
cttggaaaat tagaaagaaa aatggcaagg tatttattgt tctgtttgcc ataatttaga      4200
actcacactt aagtattttg tagttttaca ttccttttta acccattcag tggagaatgt      4260
cagcttttct cccaagttgt atgttaagtc tattctaata tgtactcaac atcaagttat      4320
aaacatgtaa taaacatgga aataaagttt agctctatta      4360

```

<210> 2

<211> 491

<212> PRT

<213> 智人

[0004]

<400> 2

```

Met Asn Pro Ala Ala Glu Ala Glu Phe Asn Ile Leu Leu Ala Thr Asp
1           5           10          15

Ser Tyr Lys Val Thr His Tyr Lys Gln Tyr Pro Pro Asn Thr Ser Lys
          20          25          30

Val Tyr Ser Tyr Phe Glu Cys Arg Glu Lys Lys Thr Glu Asn Ser Lys
          35          40          45

Leu Arg Lys Val Lys Tyr Glu Glu Thr Val Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr
          50          55          60

Ile Leu Asn Lys Tyr Leu Lys Gly Lys Val Val Thr Lys Glu Lys Ile
65          70          75          80

Gln Glu Ala Lys Asp Val Tyr Lys Glu His Phe Gln Asp Asp Val Phe
          85          90          95

Asn Glu Lys Gly Trp Asn Tyr Ile Leu Glu Lys Tyr Asp Gly His Leu
          100         105         110

Pro Ile Glu Ile Lys Ala Val Pro Glu Gly Phe Val Ile Pro Arg Gly
          115         120         125

Asn Val Leu Phe Thr Val Glu Asn Thr Asp Pro Glu Cys Tyr Trp Leu

```

[0005]

130	135	140	
Thr Asn Trp Ile Glu Thr	Ile Leu Val Gln Ser Trp Tyr Pro Ile Thr		
145	150	155	160
Val Ala Thr Asn Ser Arg Glu Gln Lys Lys	Ile Leu Ala Lys Tyr Leu		
	165	170	175
Leu Glu Thr Ser Gly Asn Leu Asp Gly Leu Glu Tyr Lys Leu His Asp			
	180	185	190
Phe Gly Tyr Arg Gly Val Ser Ser Gln Glu Thr Ala Gly Ile Gly Ala			
	195	200	205
Ser Ala His Leu Val Asn Phe Lys Gly Thr Asp Thr Val Ala Gly Leu			
	210	215	220
Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Tyr Gly Thr Lys Asp Pro Val Pro Gly Tyr			
	225	230	235
Ser Val Pro Ala Ala Glu His Ser Thr Ile Thr Ala Trp Gly Lys Asp			
	245	250	255
His Glu Lys Asp Ala Phe Glu His Ile Val Thr Gln Phe Ser Ser Val			
	260	265	270
Pro Val Ser Val Val Ser Asp Ser Tyr Asp Ile Tyr Asn Ala Cys Glu			
	275	280	285
Lys Ile Trp Gly Glu Asp Leu Arg His Leu Ile Val Ser Arg Ser Thr			
	290	295	300
Gln Ala Pro Leu Ile Ile Arg Pro Asp Ser Gly Asn Pro Leu Asp Thr			
	305	310	315
Val Leu Lys Val Leu Glu Ile Leu Gly Lys Lys Phe Pro Val Thr Glu			
	325	330	335
Asn Ser Lys Gly Tyr Lys Leu Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Val Ile Gln			
	340	345	350
Gly Asp Gly Val Asp Ile Asn Thr Leu Gln Glu Ile Val Glu Gly Met			
	355	360	365
Lys Gln Lys Met Trp Ser Ile Glu Asn Ile Ala Phe Gly Ser Gly Gly			
	370	375	380
Gly Leu Leu Gln Lys Leu Thr Arg Asp Leu Leu Asn Cys Ser Phe Lys			
	385	390	395
Cys Ser Tyr Val Val Thr Asn Gly Leu Gly Ile Asn Val Phe Lys Asp			

```

      405                               410                               415
Pro Val Ala Asp Pro Asn Lys Arg Ser Lys Lys Gly Arg Leu Ser Leu
      420                               425                               430

His Arg Thr Pro Ala Gly Asn Phe Val Thr Leu Glu Glu Gly Lys Gly
      435                               440                               445

[0006] Asp Leu Glu Glu Tyr Gly Gln Asp Leu Leu His Thr Val Phe Lys Asn
      450                               455                               460

Gly Lys Val Thr Lys Ser Tyr Ser Phe Asp Glu Ile Arg Lys Asn Ala
      465                               470                               475                               480

Gln Leu Asn Ile Glu Leu Glu Ala Ala His His
      485                               490
```

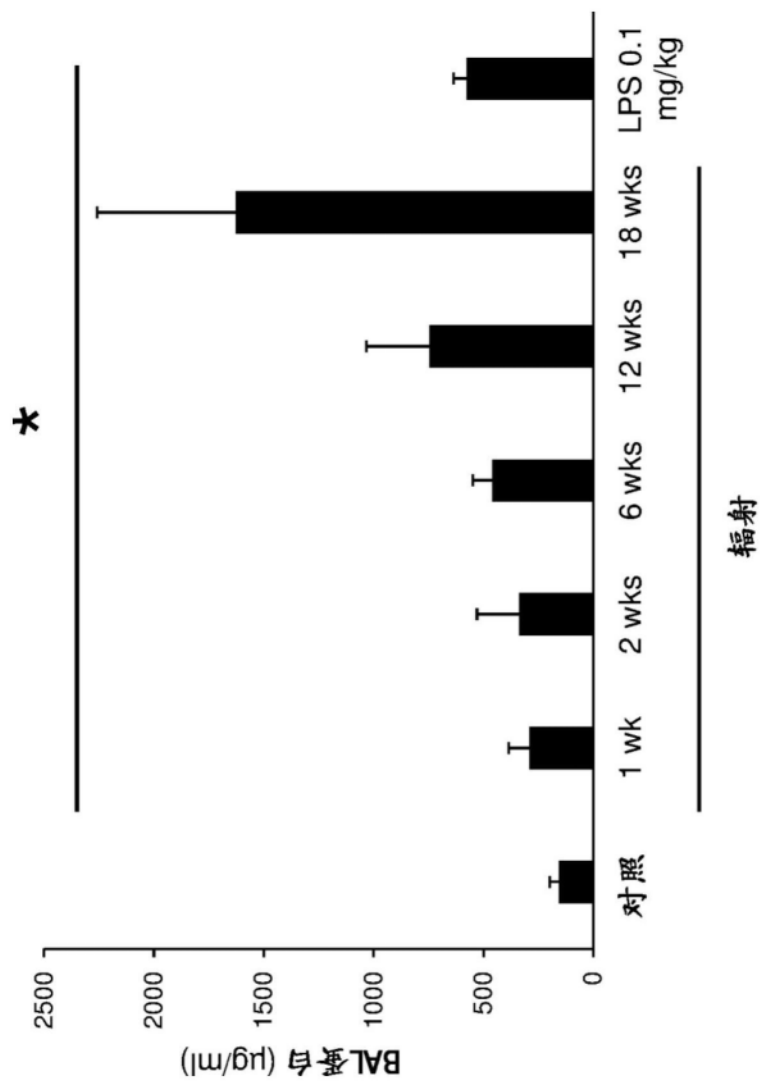


图1

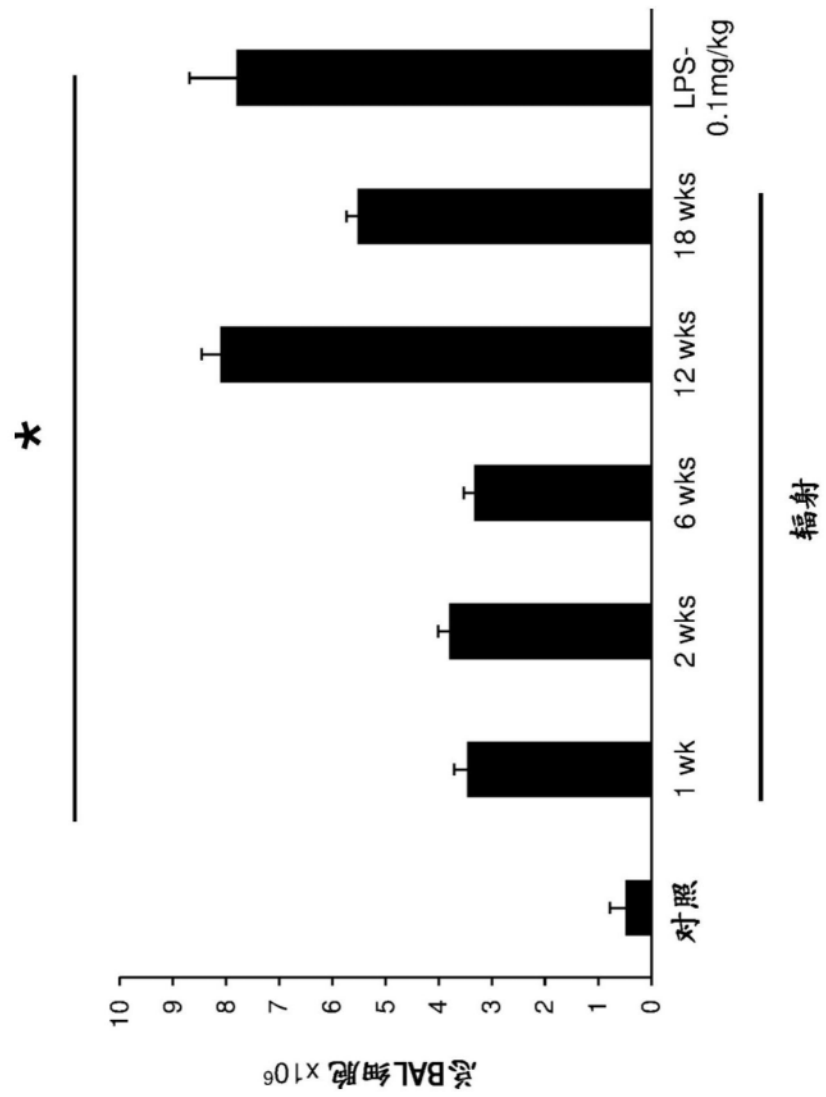


图2

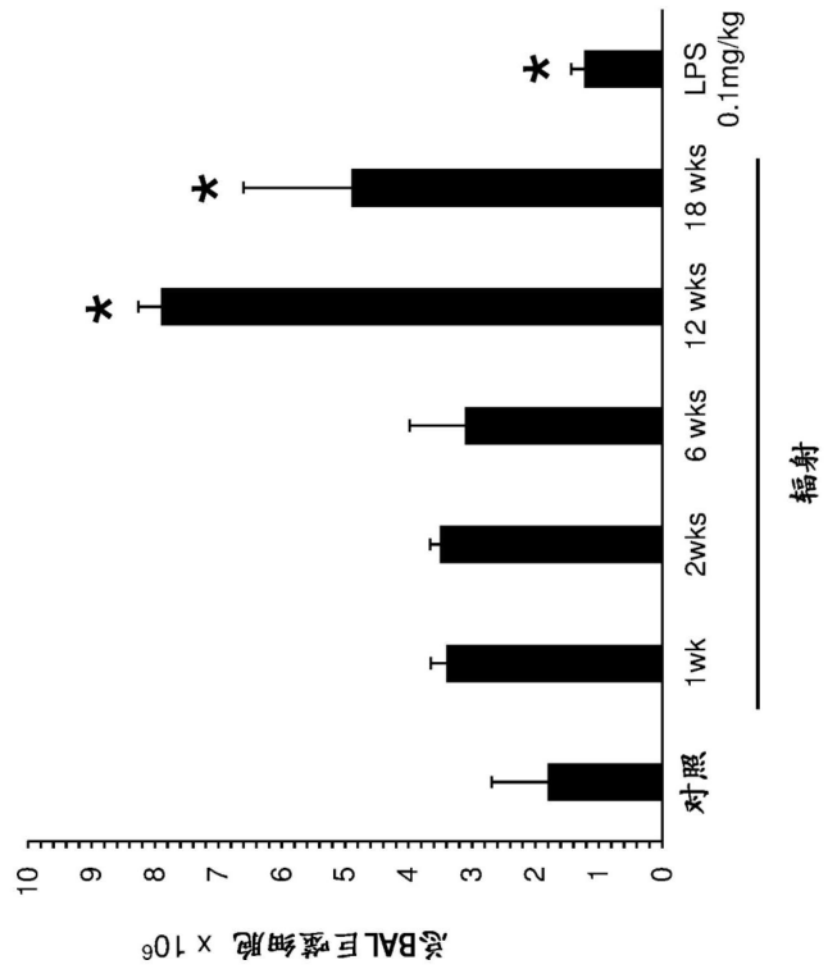


图3A

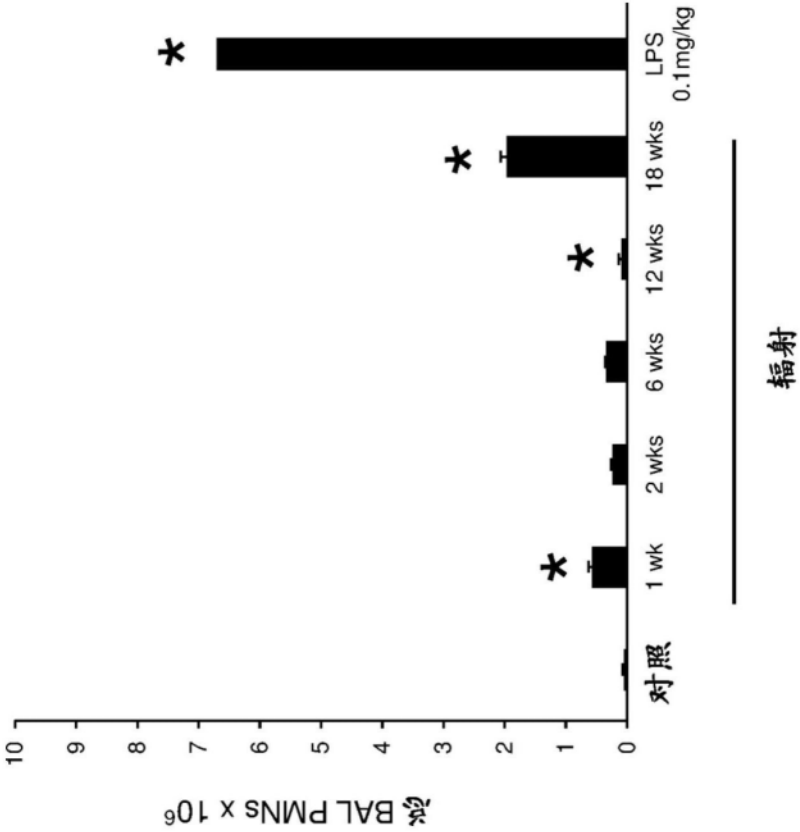
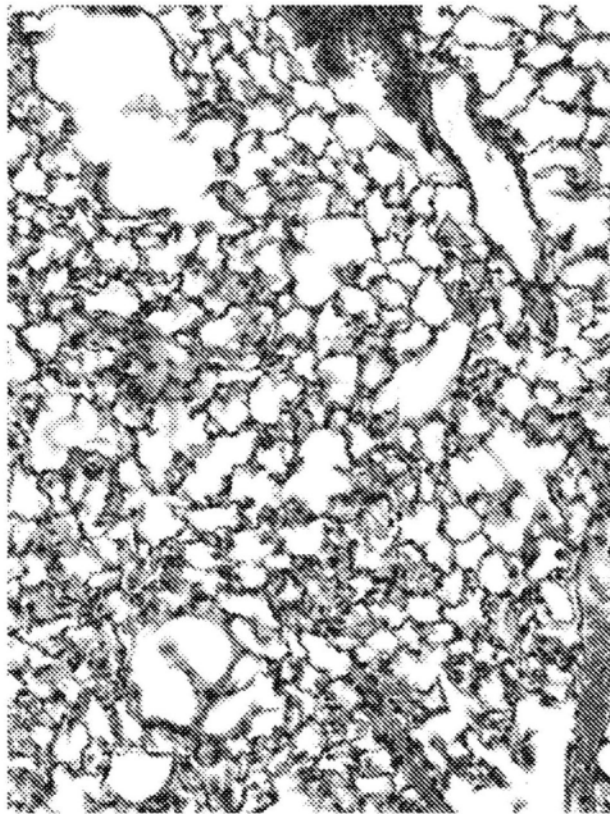


图3B

H&E染色：来自
辐射后1周小鼠的肺组织



H&E染色：来自
未辐射小鼠的肺组织

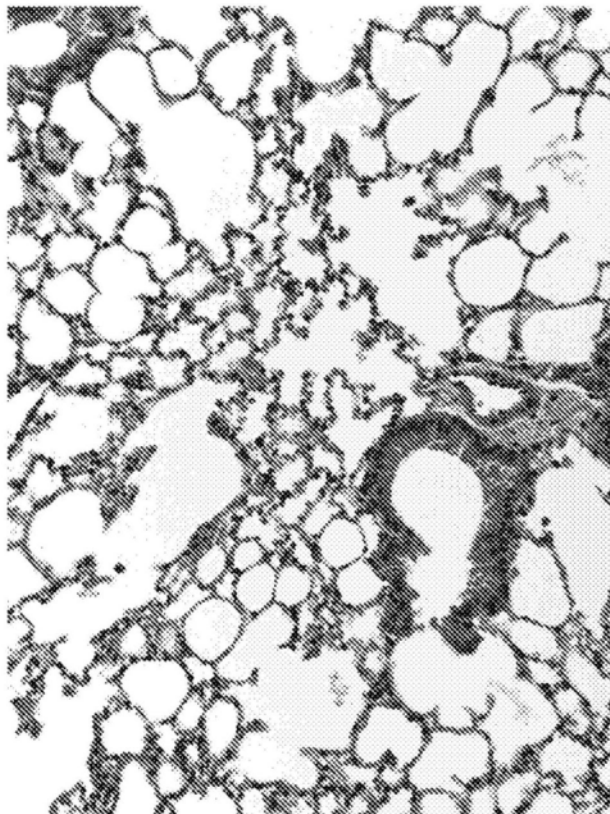
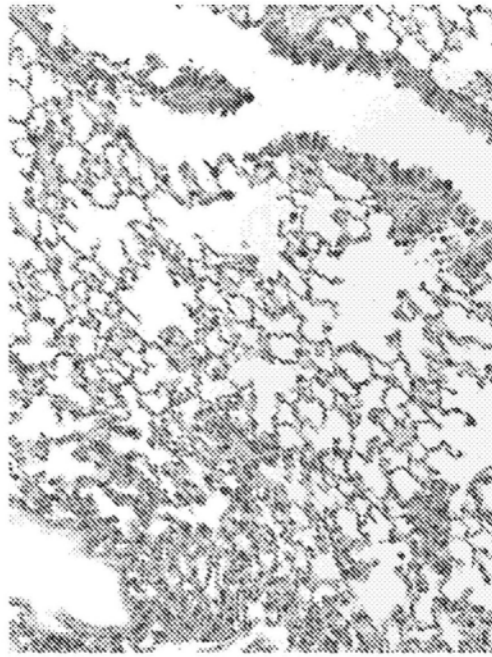


图4

NAMPT染色：来自
辐射后1周小鼠的肺组织



NAMPT染色：来自
未辐射小鼠的肺组织

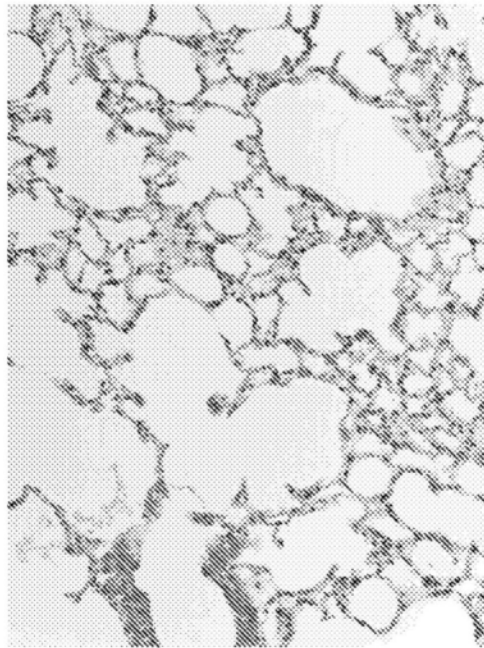


图5A

NAMPT染色: 来自
辐射后1周小鼠的肺组织

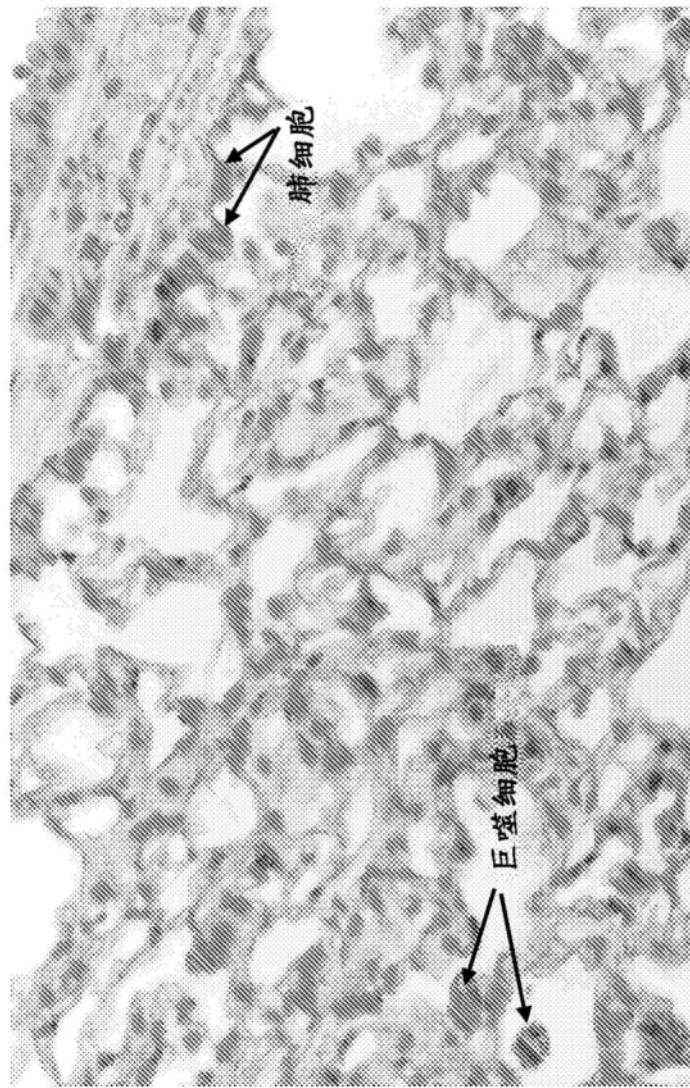


图5B

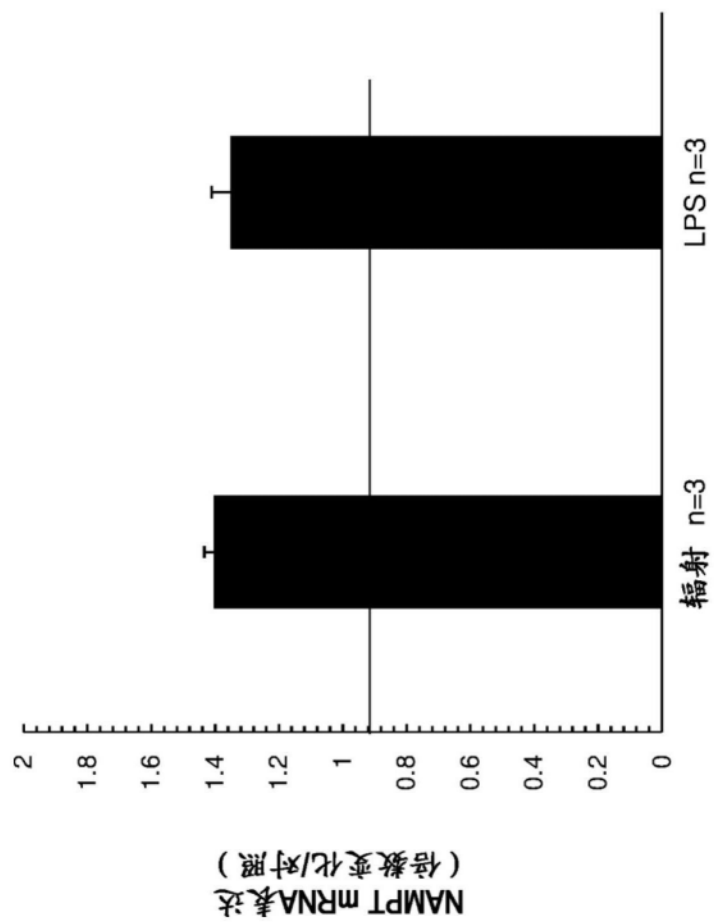


图6

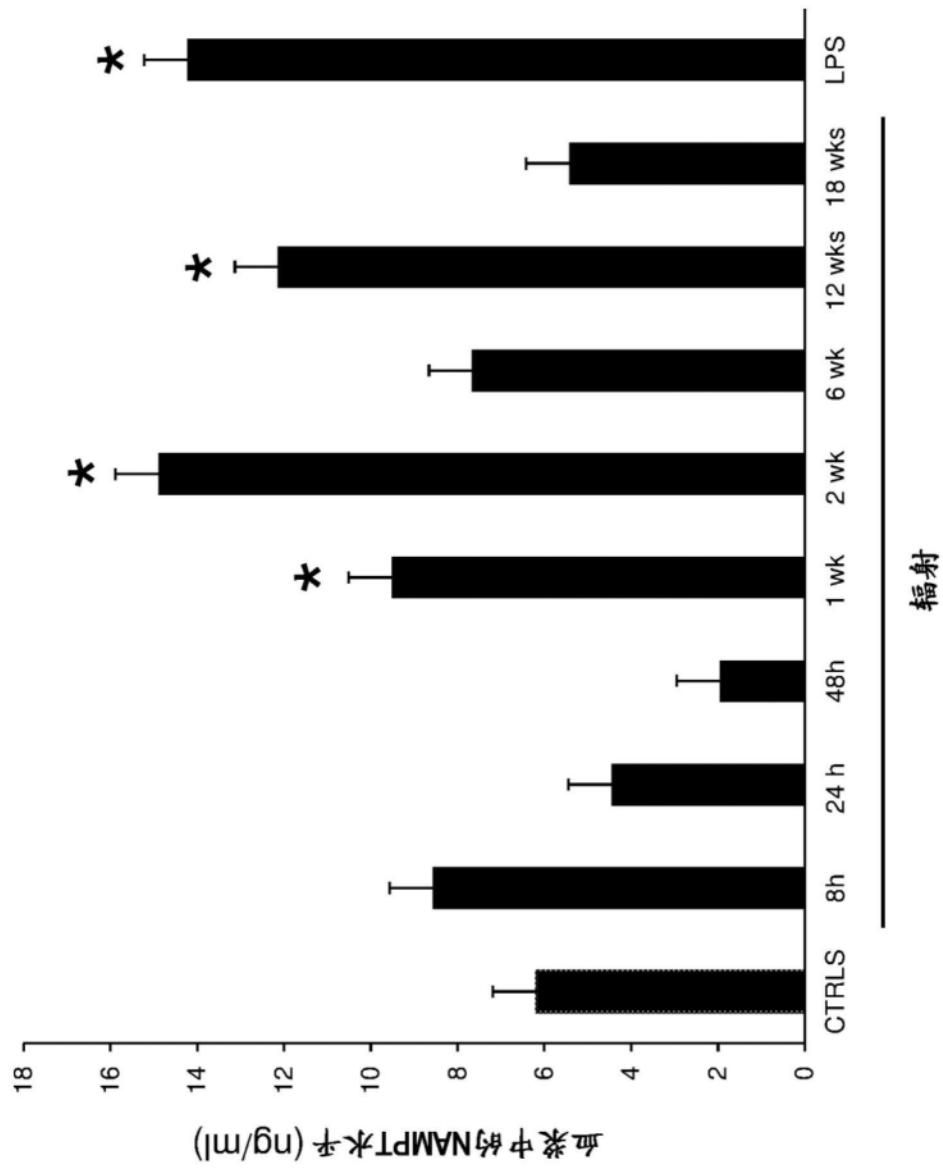


图7

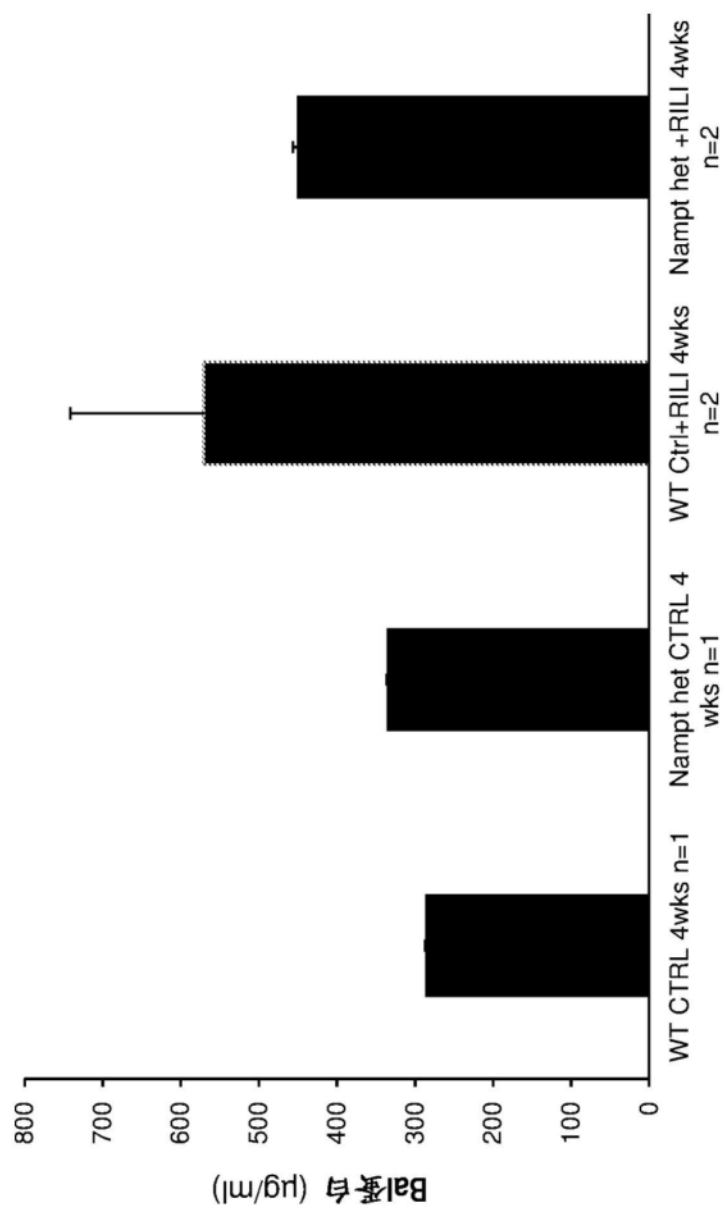


图8

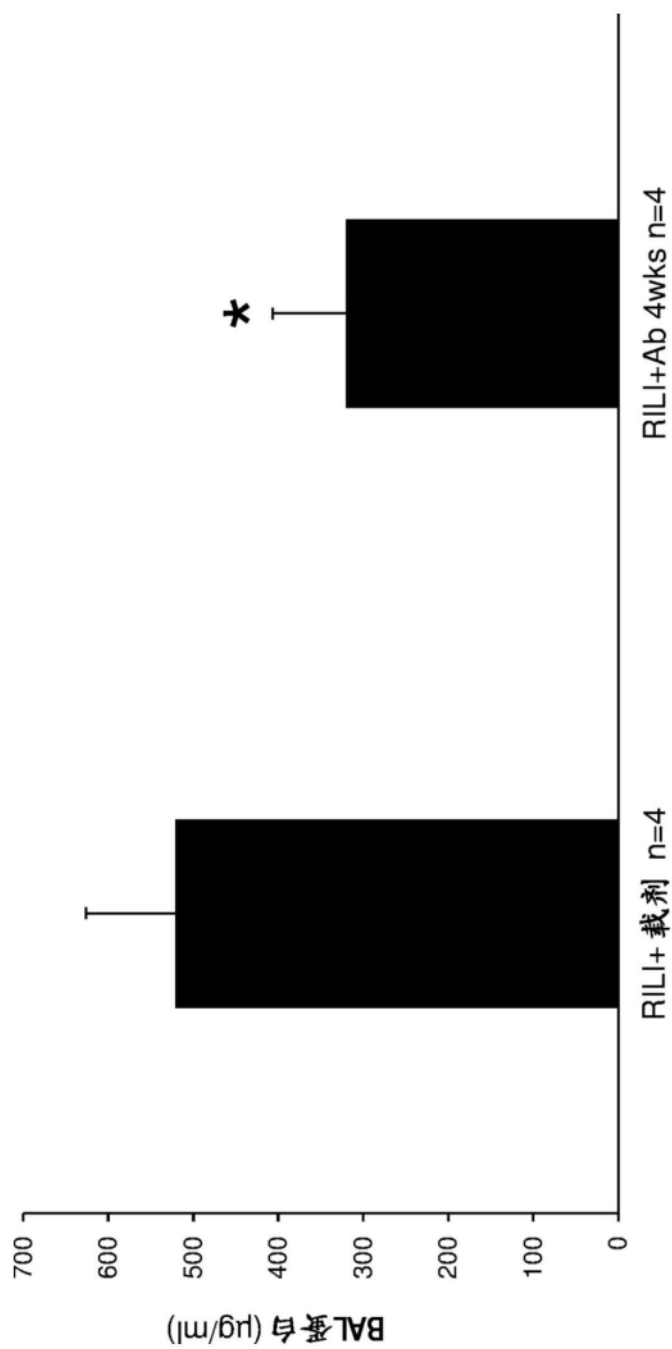


图9

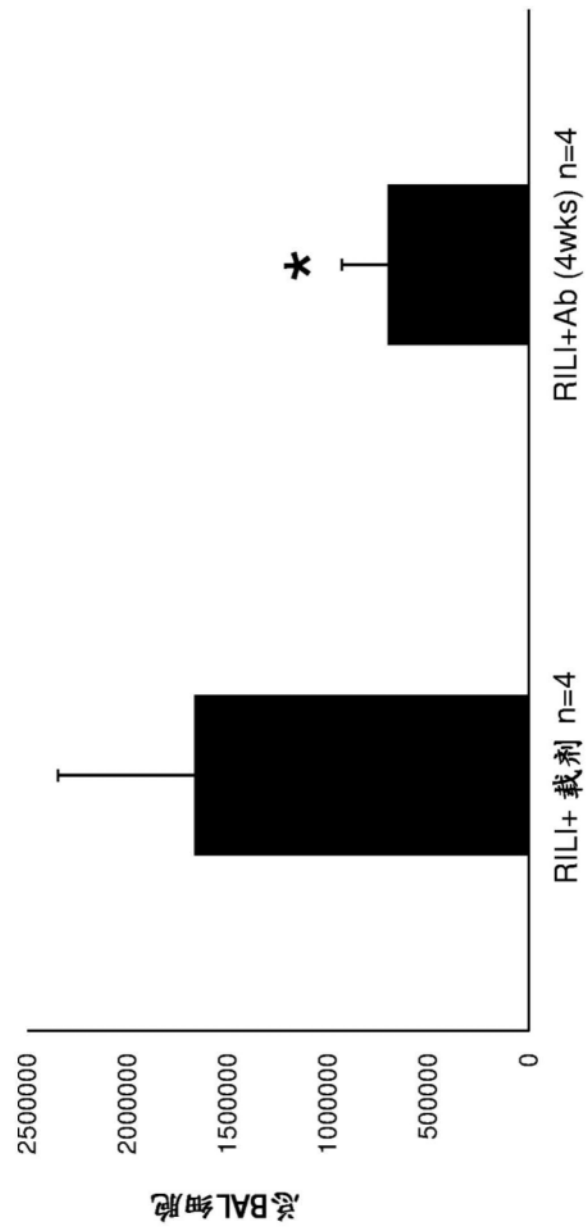


图10

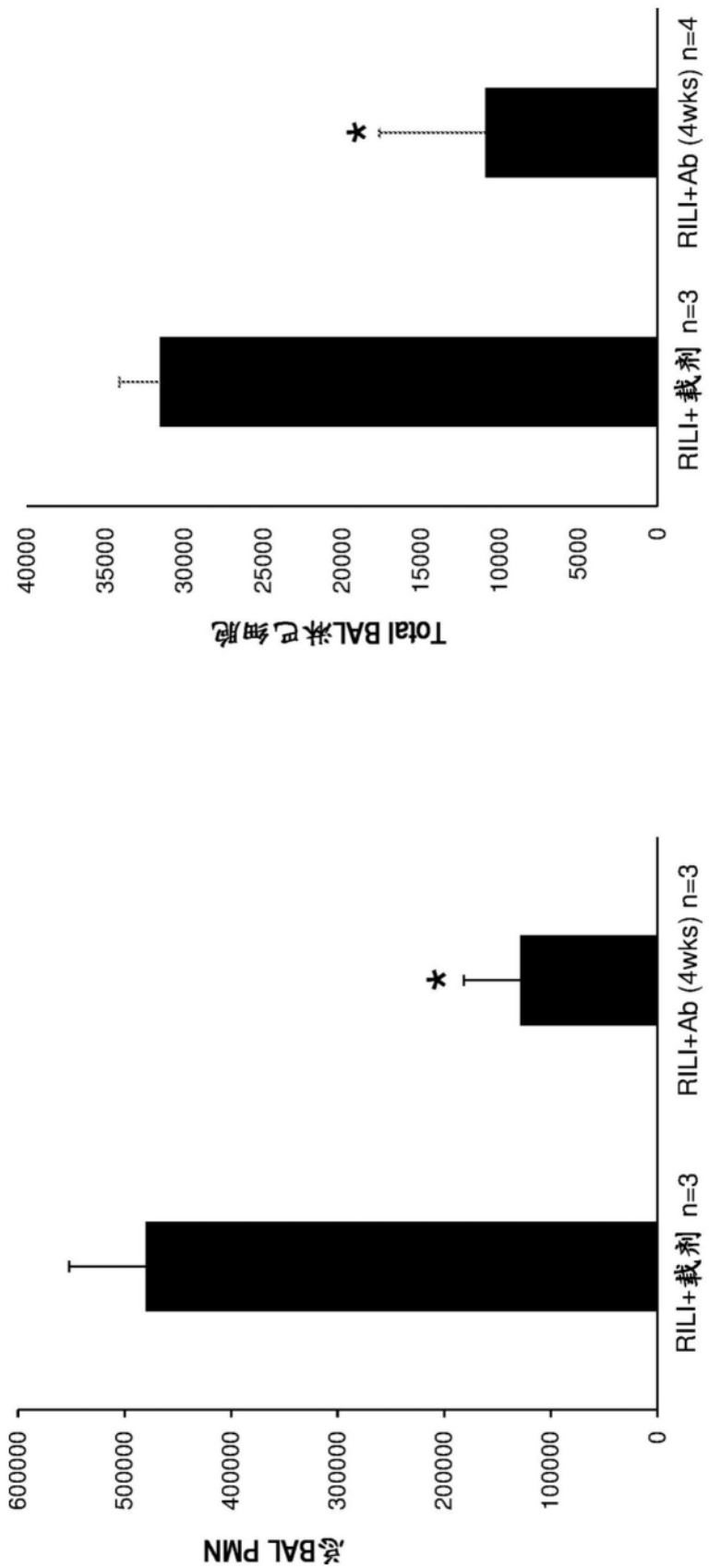


图11

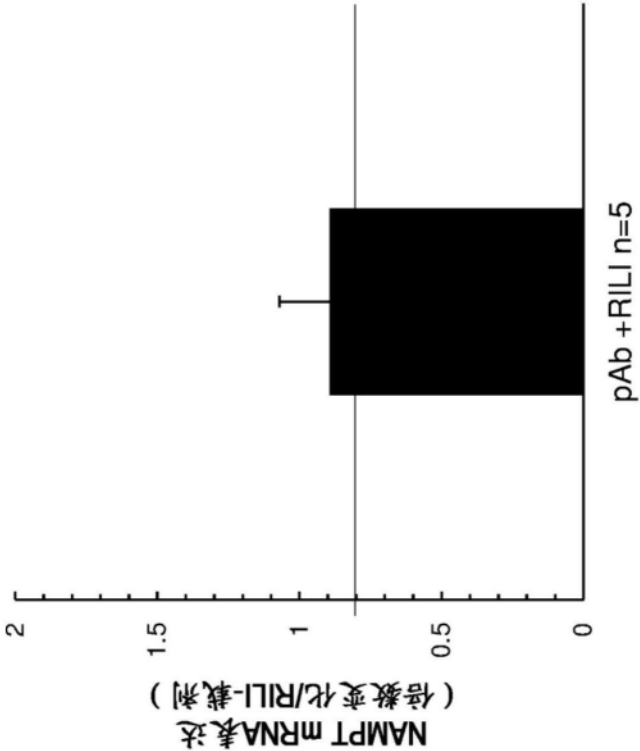


图12

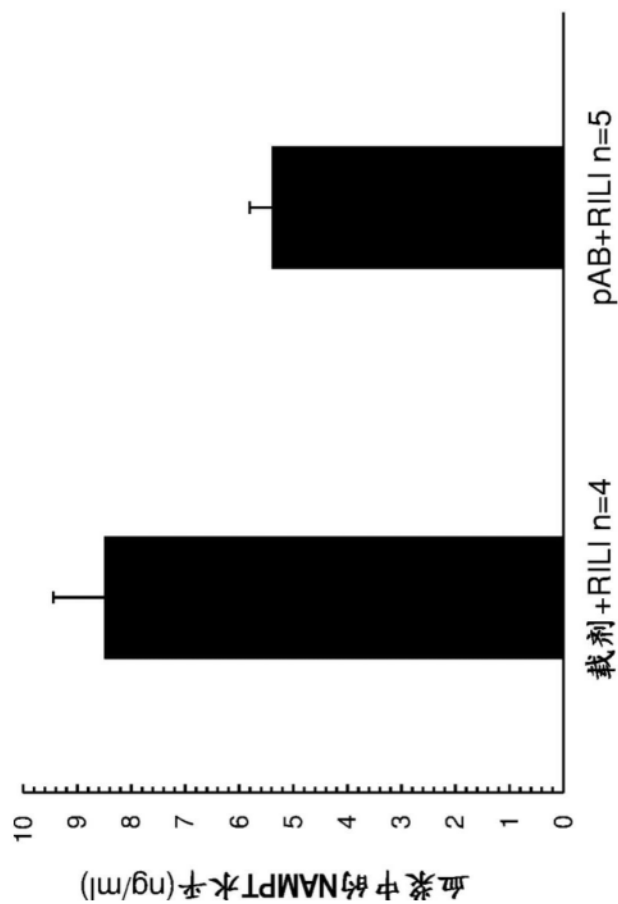


图13

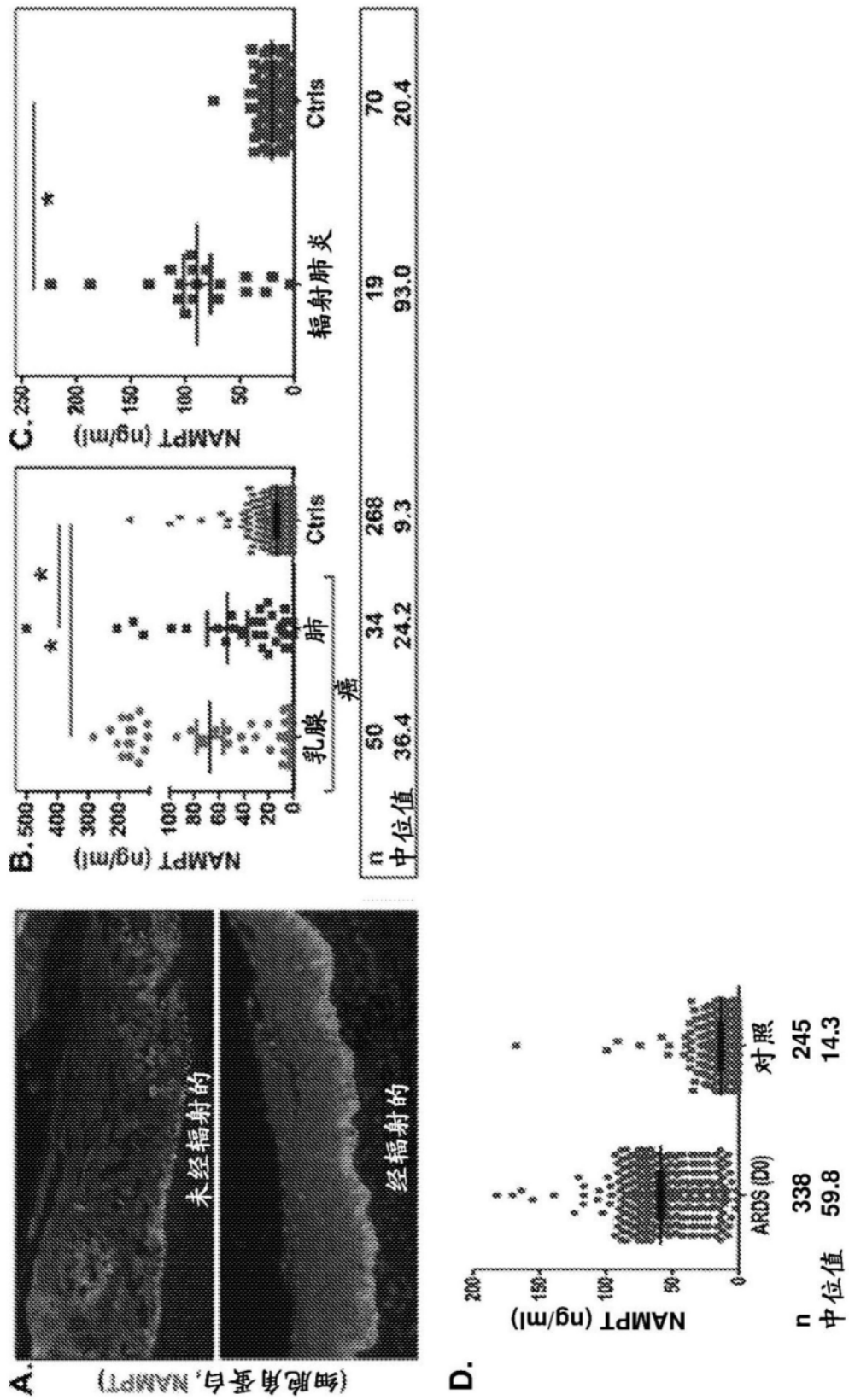


图14

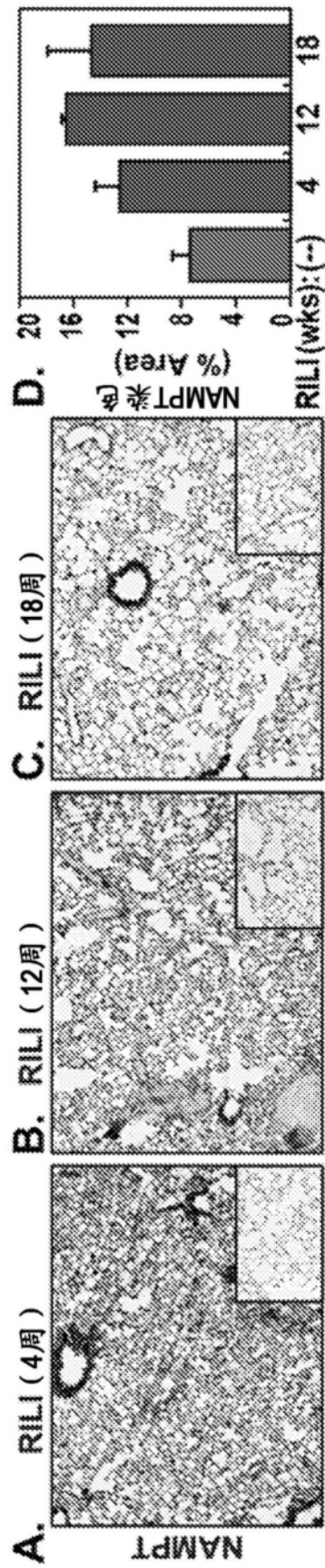


图15

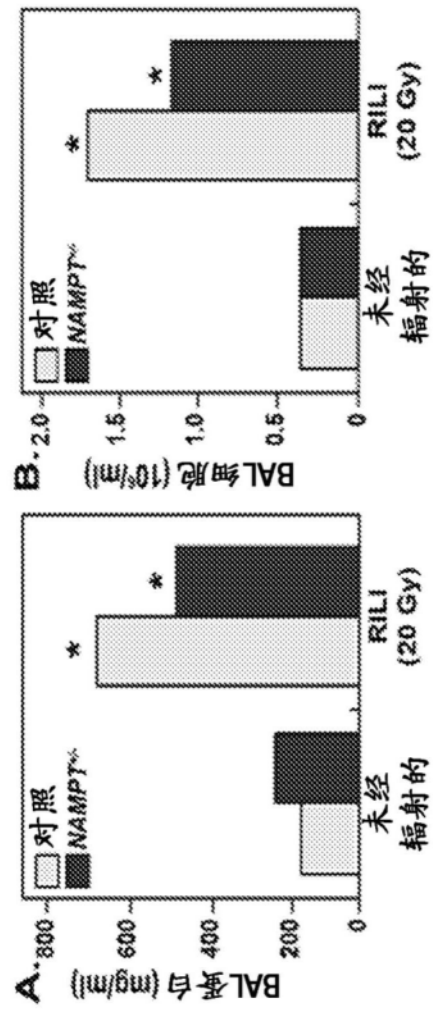


图16

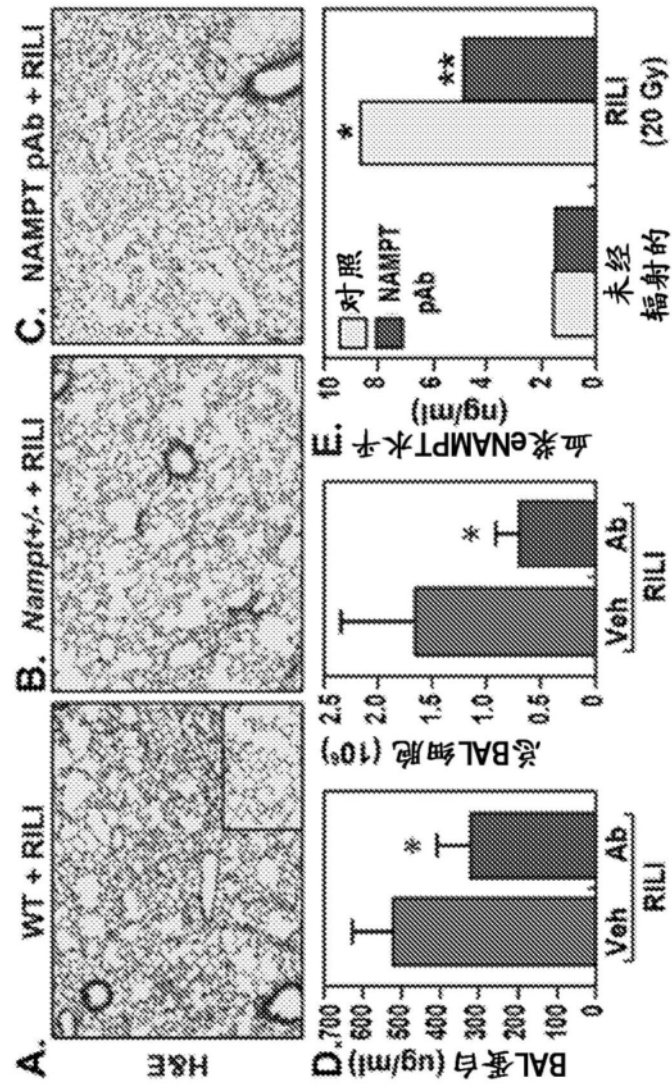


图17

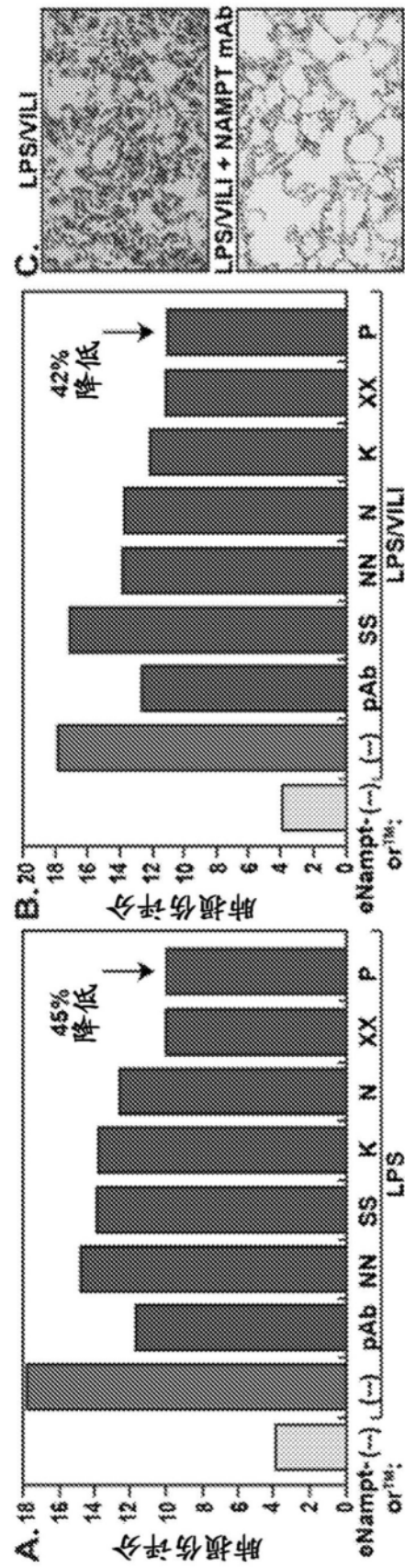


图19

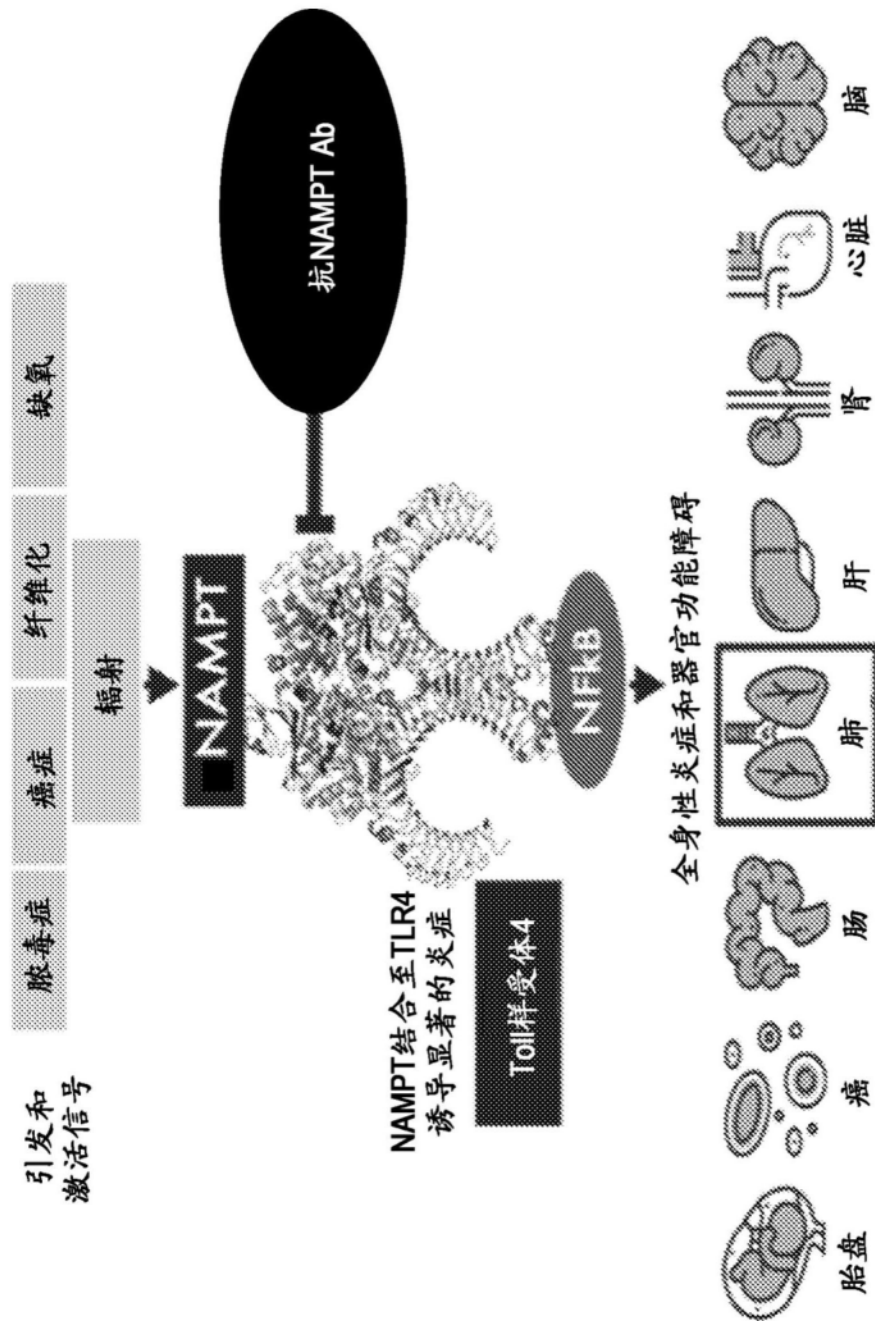


图20

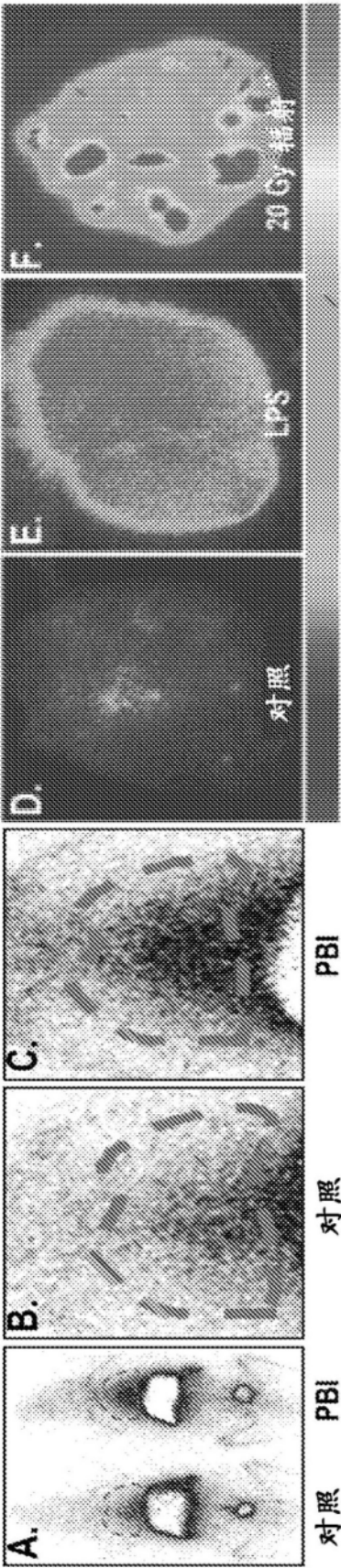


图21