



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104411325 B

(45)授权公告日 2017.06.06

(21)申请号 201380022472.0

(22)申请日 2013.03.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104411325 A

(43)申请公布日 2015.03.11

(30)优先权数据

2012900999 2012.03.13 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.10.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2013/000247 2013.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/134822 EN 2013.09.19

(73)专利权人 詹姆斯库克大学

地址 澳大利亚,昆士兰

(72)发明人 A·劳卡斯 S·纳瓦罗

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51)Int.Cl.

A61K 38/57(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

审查员 吴希哲

权利要求书2页 说明书16页

序列表4页 附图10页

(54)发明名称

用于治疗炎症的方法

(57)摘要

一种用于降低或减轻受试者中炎症的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a)Ac-TMP-1或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体;(b)Ac-TMP-2或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体;或者(c)(a)和(b)的组合,从而降低或减轻受试者中的炎症。一种用于预防或治疗受试者中哮喘或炎症性肠病的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a)Ac-TMP-1或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体;(b)Ac-TMP-2或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体;或者(c)(a)和(b)的组合,从而预防或治疗受试者中的哮喘或炎症性肠病。受试者可以是包括人类在内的哺乳动物。

1. SEQ ID NO:2所示的Ac-TMP-2在制备用于降低或减轻受试者中炎症的药物中的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述炎症与受试者中的疾病病症或病况有关,或者所述炎症是受试者中的疾病病症或病况所继发的。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述疾病、病症和/或病况是基线疗法难以治疗的。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述基线疗法包括施用至少一种选自如下的基线药剂:非甾体类抗炎药、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受体剂、抗生素、及其组合。

5. 根据权利要求3所述的用途,其中至少首先将Ac-TMP-2与基线疗法联合施用。

6. 根据权利要求3所述的用途,其中至少首先将Ac-TMP-2与至少一种基线药剂联合施用,其中以全剂量以下的剂量施用所述基线药剂。

7. SEQ ID NO:2所示的Ac-TMP-2在制备用于预防受试者中炎症的药物中的用途。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述炎症与受试者中的疾病、病症或病况有关,或者所述炎症是受试者中的疾病、病症或病况所继发的。

9. 根据权利要求2-6或权利要求8中任一项所述的用途,其中所述疾病、病症和/或病况是免疫疾病、病症和/或病况。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述免疫疾病、病症和/或病况选自:阿狄森氏病、强直性脊柱炎、乳糜泻、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性复发性多灶性骨髓炎、克罗恩氏病、脱髓鞘性神经病、肾小球性肾炎、肺出血肾炎综合征、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏脑炎、桥本氏甲状腺炎、低丙球蛋白血症、特发性血小板减少性紫癜、胰岛素依赖型糖尿病、幼年型关节炎、川崎综合征、多发性硬化、重症肌无力、心肌梗塞后综合征、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、特发性肺纤维化、瑞特综合征、类风湿关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征、系统性红斑狼疮、血小板减少性紫癜、溃疡性结肠炎、脉管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿。

11. 根据权利要求2-6或权利要求8中任一项所述的用途,其中所述疾病是消化道疾病。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述疾病是慢性胃炎或炎症性肠病。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述炎症性肠病是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

14. 根据权利要求2-6或权利要求8中任一项所述的用途,其中所述疾病是呼吸系统疾病。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述疾病选自哮喘、肺气肿、慢性支气管炎和慢性阻塞性肺病。

16. SEQ ID NO:2所示的Ac-TMP-2在制备用于预防和/或治疗受试者中哮喘的药物中的用途。

17. 根据权利要求1所述的用途,还包括向受试者施用至少一种其它药剂的步骤。

18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述至少一种其它药剂选自:非甾体类抗炎药、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受体剂、抗生素、及其组合。

19. 根据权利要求1所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述哺乳动物是人类。

21. 根据权利要求7所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述哺乳动物是人类。
23. 根据权利要求16所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。
24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述哺乳动物是人类。
25. 根据权利要求7所述的用途,还包括向受试者施用至少一种其它药剂的步骤。
26. 根据权利要求16所述的用途,还包括向受试者施用至少一种其它药剂的步骤。

用于治疗炎症的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗炎症的方法。更具体而言,本发明涉及钩虫排泄/分泌的蛋白用于降低、减轻和/或预防炎症的用途。

背景技术

[0002] 炎症是免疫系统响应所感知到的损伤或威胁而发动的非特异性反应。与免疫系统更加精确定制的适应性反应不同,炎症是固有的防御反应。炎症可与免疫系统的适应性反应协同工作,适应性反应进展得更缓慢但更精确地靶向至有害物(harmful agent),例如可引起局部损伤的病原体。

[0003] 当与感染有关时,因响应许多类型的损伤而发生炎症,损伤包括物理创伤、烧伤(例如,由于辐射、热或腐蚀性物质)、化学或颗粒刺激物、细菌或病毒病原体、以及局部缺氧(局部缺血)。炎症也与自身免疫疾病和过敏性反应有关。炎症包括发红、发热、肿胀和疼痛的典型症状,并且可能伴有发炎的器官或组织的功能降低。

[0004] 尽管已知许多用于治疗炎症的方法,它们都具有局限性,特别是对于广泛的(broad based)功效。因此,需要用于降低、减轻和/或预防与多种原因有关的炎症的新方法。

发明内容

[0005] 本发明涉及用于治疗 and/或预防炎症和/或炎症相关疾病或病况的方法和组合物。

[0006] 以广泛的形式,本发明涉及可源自或可获自钩虫的一种或多种组织金属蛋白酶抑制蛋白用于降低、减轻和/或预防炎症和/或炎症相关疾病或病况(比如哮喘和/或炎症性肠病)的用途,其中所述钩虫包括但不限于犬钩口线虫(*Ancylostoma caninum*)。

[0007] 一方面,本发明提供一种用于降低或减轻受试者中炎症的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合的步骤。

[0008] 在一个实施方式中,此方面还包括向受试者施用至少一种其它药剂的步骤。

[0009] 适当地,根据上述实施方式,至少一种其它药剂选自非甾体类抗炎药(NSAID)、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受体剂(如抗TNF α 剂、抗IL-5剂、抗IL-13剂、抗IL-17剂和抗IL-6R剂)、抗生素、及其组合。

[0010] 在一些实施方式中,炎症与受试者中的疾病、病症和/或病况有关,或者炎症是受试者中的疾病、病症和/或病况所继发的,尤其是免疫疾病、病症和/或病况。

[0011] 在某些实施方式中,疾病是消化道或呼吸系统疾病。

[0012] 在另一实施方式中,疾病、病症和/或病况是基线疗法难以治疗的。

[0013] 适当地,根据上述实施方式,基线疗法包括施用至少一种选自如下的基线药剂:非甾体类抗炎药(NSAID)、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受

体剂(如抗TNF α 剂、抗IL-5剂、抗IL-13剂、抗IL-17剂和抗IL-6R剂)、抗生素、及其组合。

[0014] 在另一方面,本发明提供一种预防受试者中炎症的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合的步骤。

[0015] 在一个实施方式中,此方面还包括向受试者施用至少一种其它药剂的步骤。

[0016] 在另一方面,本发明提供一种治疗和/或预防受试者中炎症性肠病的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合的步骤。

[0017] 在一个实施方式中,此方面还包括向受试者施用至少一种其它药剂的步骤。

[0018] 适当地,根据上述实施方式,至少一种其它药剂选自非甾体类抗炎药(NSAID)、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受体剂(如抗TNF α 剂、抗IL-5剂、抗IL-13剂、抗IL-17剂和抗IL-6R剂)、抗生素、及其组合。

[0019] 在另一方面,本发明提供一种治疗和/或预防受试者中哮喘的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合的步骤。

[0020] 在一个实施方式中,此方面还包括向受试者施用至少一种其它药剂的步骤。

[0021] 适当地,根据上述实施方式,至少一种其它药剂选自非甾体类抗炎药(NSAID)、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受体剂(如抗TNF α 剂、抗IL-5剂、抗IL-13剂、抗IL-17剂和抗IL-6R剂)、抗生素、及其组合。

[0022] 优选地,受试者是哺乳动物。

[0023] 更优选地,受试者是人类。

[0024] 本发明的另一方面提供一种药物组合物,其包含治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合,以及药学上可接受的载体赋形剂的稀释剂。

[0025] 在一些实施方式中,药物组合物可还包含至少一种其它药剂。

[0026] 至少一种其它药剂可选自非甾体类抗炎药(NSAID)、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受体剂(如抗TNF α 剂、抗IL-5剂、抗IL-13剂、抗IL-17剂和抗IL-6R剂)、抗生素、及其组合。

[0027] 适当地,药物组合物用于预防或治疗炎症和/或用于预防或治疗炎症相关的疾病或病况。

附图说明

[0028] 图1.Ac-TMP-1的核苷酸序列和氨基酸序列(SEQ ID NO:1) (Zhan等人, Am.J.Trop.Med.Hyg.66:238-44,2002)。

[0029] 图2.Ac-TMP-2的核苷酸序列和氨基酸序列(SEQ ID NO:2) (Zhan等人, Mol.Biochem.Parasitology 162:142-48,2008)。

[0030] 图3.纯化的重组Ac-TMP-1保护免受TNBS诱导的体重减轻。简单而言,小鼠在第0天

接受单次腹膜内注射20 μ g Ac-TMP-1 (TIMP) 或模拟PBS注射 (TNBS)。五小时后,在轻度麻醉下,它们接受直肠内注射45%乙醇中2.5mg的2,4,6-三硝基苯磺酸(通常被称为TNBS)。从第0天至第3天,每日监测小鼠的体重减轻。对照组(对照)没有接受任何注射也没有施用TNBS。与接受模拟注射的TNBS组相比时,如各组小鼠平均值所示,Ac-TMP-1显著保护小鼠免受体重减轻。

[0031] 图4.Ac-TMP-2保护小鼠免受TNBS诱导的结肠炎模型。在第0天用Ac-TMP-2或载体(vehicle) (PBS) 治疗小鼠。五小时后,它们被麻醉,并直肠内注射45%乙醇中2.5mg剂量的TNBS。每日监测体重、总体外观、大便和活动性。与载体对照组相比,用Ac-TMP-2治疗的小鼠显著损失更少的体重。与对照相比,Ac-TMP-2治疗的小鼠的临床分数(结合其它监测的参数)也显著更少受到影响(***P<0.001)。

[0032] 图5.纯化的重组Ac-TMP-2保护免受TNBS诱导的肠道病理。简单而言,小鼠在第0天接受单次腹膜内注射20 μ g Ac-TMP-2 (TIMP-2) 或模拟PBS注射 (TNBS)。五小时后,在轻度麻醉下,它们接受直肠内注射45%乙醇中2.5mg的TNBS。在第3天,处死小鼠并测量临床分数、宏观分数和结肠长度(对于方法,参见Ruyssers等人,Inflamm.Bowel Dis.15:491-500, 2009)。对照组(对照)没有接受任何注射也没有施用TNBS。

[0033] 图6.用热和蛋白酶处理使Ac-TMP-2变性,消除其在TNBS结肠炎小鼠模型中的保护特性。如此处使用宏观分数所示(结合结肠粘连(adhesion)、溃疡、水肿和壁增厚),通过胰蛋白酶处理和煮沸使Ac-TMP-2变性,这在TNBS诱导的结肠炎小鼠模型中消除Ac-TMP-2诱导的保护。

[0034] 图7.Ac-TMP-1在过敏性哮喘小鼠模型中保护免受炎症。支气管肺泡灌洗(BAL)浸润在AcES(犬钩口线虫排泄/分泌的蛋白)和重组Ac-TMP-1治疗的小鼠中下降。在第0天和第7天,采用两次腹膜内(i.p.)注射2mg氢氧化铝(明矾)中的20 μ g BSA使小鼠致敏。在第14天至第21天,小鼠i.p.注射20 μ g BSA、AcES或Ac-TMP-1 (TIMP)。从第18至21天,在轻度麻醉下小鼠鼻内(i.n.)注射50 μ gBSA。第24天,处死小鼠并收集BAL和肺。简言之,给小鼠放血,并将套管插入气管。肺用1ml的PBS洗涤三次。对于差异BAL细胞计数,用抗CCR3、抗Gr1、抗CD3和抗CD19单克隆抗体对细胞进行染色,并且通过荧光激活细胞分选(FACS)用FACS canto II流式细胞仪和FACS Diva软件进行分析。嗜酸性粒细胞被定义为CCR3⁺CD3⁻CD19⁻,嗜中性粒细胞为Gr-1^高CCR3⁻CD3⁻CD19⁻,淋巴细胞为CD3⁺CD19⁺。

[0035] 图8. IL-5和IL-13Th2细胞因子在AcES和重组Ac-TMP-1治疗的小鼠中降低。肺样本在含5%胎牛血清的钙和无镁Hanks平衡的盐溶液中匀浆。用1mg/ml AcES或Ac-TMP-1在体外再刺激细胞、或在37℃未刺激三天。采用细胞计数珠阵列使用FACS阵列进行复合的IL-5和IL-13分析。

[0036] 图9.重复实验显示Ac-TMP-1在过敏性哮喘小鼠模型中介导的保护的稳健性。在Ac-TMP-1治疗的小鼠中支气管肺泡灌洗(BAL)浸润减少。收集BAL细胞并通过(FACS)分析。嗜酸性粒细胞被定义为CCR3⁺CD3⁻CD19⁻,嗜中性粒细胞为Gr-1^高CCR3⁻CD3⁻CD19⁻,淋巴细胞为CD3⁺CD19⁺。用Ac-TMP-1进行治疗显著降低Th2细胞(如嗜酸性粒细胞和淋巴细胞)进入气道的浸润。

[0037] 图10.促炎细胞因子IL-6、TNF α 和IFN γ 在重组Ac-TMP-1治疗的小鼠中降低。肺样本在含5%胎牛血清的钙和无镁Hanks平衡的盐溶液中匀浆。用1mg/ml的AcES或Ac-TMP-1在

体外再刺激细胞、或在37℃未刺激三天。采用细胞计数珠阵列使用FACS阵列进行复合的IL-6、IL-12、TNF α 和IFN γ 分析。

[0038] 图11. IL-17A在重组Ac-TMP-1治疗的小鼠中降低。肺样本在含5%胎牛血清的钙和无镁Hanks平衡的盐溶液中匀浆。用1mg/ml的AcES或Ac-TMP-1在体外再刺激细胞、或在37℃未刺激三天。采用细胞计数珠阵列进行复合的IL-17A和MCP-1分析。

[0039] 图12. Ac-TMP-1在哮喘小鼠模型中预防OVA诱导的肺细胞浸润。与未经免疫的(naïve) (PBS) 小鼠相比, 来自未经治疗的OVA攻击的小鼠的支气管肺泡灌洗样本显示细胞数目的显著升高。然而, 用Ac-TMP-1治疗显著降低来自OVA攻击的小鼠的支气管肺泡灌洗样本的总细胞浸润。与升高的总细胞计数相符, 来自未经治疗的OVA攻击的小鼠的BAL样本的差异细胞计数显示出嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的显著升高。然而, 用Ac-TMP-1治疗防止这种嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润到OVA攻击的小鼠的肺中。来自OVA攻击的小鼠的腹膜灌洗的总细胞数目、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞或嗜中性粒细胞没有增加。不像在肺中, Ac-TMP-1不改变总腹膜细胞计数。然而, 它的确导致腹膜嗜酸性粒细胞的显著减少。针对BAL和腹膜灌洗总细胞计数, 提供来自重复实验的数据。

[0040] 图13. Th2细胞因子在Ac-TMP-1治疗的小鼠的肺中降低。从个体小鼠的肺中制备全蛋白提取物, 并通过细胞计数珠阵列(CBA) 分析IL-5、IL-10和IL-13含量。当用Ac-TMP-1治疗时, IL-5、IL-10和IL-13水平显著降低。如图12所示, 用Ac-TMP-1治疗降低了这些细胞因子的水平, 证实了炎症的降低。

[0041] 图14. 促炎细胞因子在Ac-TMP-1治疗的小鼠的肺中降低。从个体小鼠的肺中制备全蛋白提取物, 并通过细胞计数珠阵列(CBA) 分析MCP-1和IL-17A含量。Ac-TMP-1存在时两种细胞因子均降低。

[0042] 图15. Ac-TMP-2在哮喘小鼠模型中预防OVA诱导的肺细胞浸润。与未经免疫的(PBS) 小鼠相比, 来自未经治疗的OVA攻击的小鼠的支气管肺泡灌洗样本显示嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和嗜中性粒细胞的显著升高。相反地, 在来自这些小鼠的腹膜灌洗样本中没有观察到这种升高。用Ac-TMP-2治疗显著防止这种嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和嗜中性粒细胞浸润到OVA攻击的小鼠的肺中。然而, Ac-TMP-2对来自腹膜灌洗样本的差异细胞计数没有显著影响。

[0043] 图16. Ac-TMP-2保护小鼠免受OVA诱导的肺细胞浸润。(A) 和 (B) 在获得的支气管肺泡(A) 和腹膜(B) 灌洗液中的差异细胞计数。在将套管插入气管并用3×1mL PBS洗涤之后获得BALF。通过将3×5mL补充有5%FCS的RPMI注射入腹膜获得腹膜灌洗。用抗体对细胞进行染色, 并通过流式细胞术(FACSCanto II) 进行分析。在OVA气雾攻击之前用Ac-TMP-2治疗的小鼠中, 支气管肺泡灌洗液(BALF) 中嗜酸性粒细胞(E) 和淋巴细胞(L) 的数目高度显著降低(P<0.001)。(B) 在Ac-TMP-2注射的部位(腹膜), 没有检测到细胞数目上的这种差异, 这突显出这样的事实, 即保护免受细胞浸润被限制在炎症部位。针对BAL和腹膜灌洗总细胞计数, 提供来自重复实验的数据。

[0044] 图17. Th2细胞因子在Ac-TMP-2治疗的小鼠的肺中降低。从个体小鼠的肺中制备全蛋白提取物, 并通过细胞计数珠阵列(CBA) 分析IL-5和IL-13含量。当用Ac-TMP-2治疗时, IL-5和IL-13水平都显著降低。

[0045] 图18. 促炎细胞因子IL-6和IL-17A在重组Ac-TMP-2治疗的小鼠中降低。从个体小

鼠的肺中制备全蛋白提取物,并通过细胞计数珠阵列(CBA)分析IFN- γ 、IL-6和IL-17A含量。没有观察到在IFN- γ 水平中的变化,在我们的哮喘模型中这是预料之中的,然而经Ac-TMP-2治疗,IL-6和IL-17A水平都显著降低。

[0046] 图19.Ac-TMP-2在慢性哮喘小鼠模型中降低气道浸润。为了研究Ac-TMP-2对慢性气道炎症的长期保护和功效,使小鼠对OVA致敏,并用5日每日OVA气雾攻击两次,两次攻击之间3周的休息期。(A)如前面所述获得总细胞气道浸润。(B)差异细胞计数。无论是在第一次攻击期间施用Ac-TMP-2 (+/-) 还是在两次攻击期间施用Ac-TMP-2 (+/+),都显著保护小鼠免受嗜酸性粒细胞的气道浸润($p < 0.001$)。

[0047] 图20.在OVA诱导的哮喘中预防性和治疗性Ac-TMP-2治疗。为了评价当以预防性(OVA攻击前)或在治疗性(OVA攻击后)模式施用,Ac-TMP-2是否能够局部施用(通过鼻内注射)以及是否其能够预防炎症的发展,使小鼠对OVA致敏,并且在用OVA气雾攻击小鼠一周之前用4次i.n.Ac-TMP-2注射进行治疗(预防性),或者在攻击开始后两天用4次i.n.Ac-TMP-2注射进行治疗(治疗性)。(A)如前面所述获得总细胞气道浸润。(B)差异细胞计数。无论是预防性还是治疗性方式用Ac-TMP-2治疗小鼠,两组均显著保护免受嗜酸性粒细胞的气道浸润($p < 0.001$)。

[0048] 图21.Th2细胞因子在预防性和治疗性Ac-TMP-2治疗中在BALF中降低。从个体小鼠的肺中制备全蛋白提取物,并通过细胞计数珠阵列(CBA)分析白细胞介素-5和IL-13含量。经Ac-TMP-2预防性和治疗性治疗时,IL-5和IL-13水平都显著降低($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$)。

[0049] 图22.Ac-TMP-2诱导积累在黏膜上的调节性T细胞的产生。未经免疫的小鼠采用Ac-TMP-2或PBS(vcl) i.p.注射治疗6天,并且分析肠系膜淋巴结(MLN)、脾脏和小肠固有层(lamina propria)的Treg存在。(A)从Ac-TMP-2治疗或未治疗的小鼠的肠系膜淋巴结、脾脏和小肠固有层中制备细胞。(B)来自MLN、脾脏、幽门淋巴结(PLN)和小肠黏膜固有层(LP)的细胞用CCR9抗体(一种在MLN中产生的细胞上表达的特有标记物)染色,并用流式细胞术分析。数据显示Ac-TMP-2诱导小肠粘膜中显著的Treg积累,以及固有层中发现的Treg上的CCR9表达说明它们源自肠系膜淋巴结($P < 0.05$)。

[0050] 图23.Ac-TMP-2介导的免受炎症的保护,依赖于调节性T细胞(Treg细胞)。为了研究Treg在我们的实验性哮喘模型中由Ac-TMP-2诱导的保护中的重要性,我们用白喉毒素(DT)在经工程改造而在Foxp3启动子下表达DT受体的转基因小鼠(DEREG小鼠)中选择性地耗尽Treg,其中DT受体是Treg的转录因子。使野生型对照(C57B1/6)和DEREG小鼠致敏,并用OVA攻击。相较于用OVA攻击且暴露至DT的未治疗小鼠,用Ac-TMP-2治疗的小鼠具有相当的气道炎症和BAL浸润水平,其中用Ac-TMP-2治疗的小鼠接受DT注射以耗尽Treg(DEREG小鼠)。这些结果表明,在我们的小鼠哮喘模型中Treg通过Ac-TMP-2在炎症抑制中发挥必不可少的作用。

[0051] 图24.在Ac-TMP-2治疗的小鼠中Treg对于Th2细胞因子的抑制是重要的。从个体小鼠的肺中制备全蛋白提取物,并通过细胞计数珠阵列(CBA)分析IL-5、IL-10和IL-13含量。当在野生型小鼠中用Ac-TMP-2治疗时,IL-5、IL-10和IL-13水平显著降低,然而在Treg被耗尽的DEREG小鼠中用Ac-TMP-2治疗没有显著差异($**P < 0.01$ 和 $***P < 0.001$)。

[0052] 图25.Ac-TMP-2诱导的Treg对于促炎细胞因子的抑制是重要的。从个体小鼠的肺中制备全蛋白提取物,并通过细胞计数珠阵列(CBA)分析IFN- γ 、白细胞介素-6、IL-9和IL-

IL-17A、IL-23和MCP-1含量。在野生型小鼠中在Ac-TMP-2存在时,IFN- γ 的水平低于检测水平(数据未示出),并且仅IL-6下调。正如预期的,在我们的小鼠哮喘模型中Th-1和Th-17细胞因子水平保持在低水平或不变的水平。

具体实施方式

[0053] 本发明涉及用于降低、减轻和/或预防炎症和/或炎症性疾病或病况(比如哮喘和/或炎症性肠病)的方法。

[0054] 本发明至少部分地基于这样一种出乎意料的发现,即可源自或可获自钩虫的一种或多种组织金属蛋白酶抑制蛋白可用于降低、减轻和/或预防受试者中炎症和/或炎症性疾病或病况(比如哮喘和/或炎症性肠病),其中所述钩虫包括但不限于犬钩口线虫。

[0055] 在具体的方面中,本发明涉及(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合用于降低、减轻和/或预防炎症和/或炎症性疾病或病况(比如哮喘和/或炎症性肠病)的用途。

[0056] 贯穿本说明书,除非上下文另有要求,字眼“包括”、“包含”和“含有”将被理解为暗示包括所述整体(integer)或整体的组,但不排除任何其它整体或整体的组。

[0057] 如本说明书中所用,不定冠词“一”和“一个”可以指一个实体或多个实体(例如蛋白),并且不应被阅读为或理解为仅限于单个实体。

[0058] 一方面,本发明提供一种降低或减轻受试者中炎症的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合的步骤。

[0059] 另一方面,本发明提供一种预防受试者中炎症的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合的步骤。

[0060] “降低”,正如在受试者中降低炎症,意思是指与炎症相关症状、方面或特性(如发红、发热、肿胀、和/或疼痛)的减轻或缩短,或者受试者经历炎症相关症状、方面或特性的时间长度的减轻或缩短。这种降低不需要绝对是对受试者有益的。“减轻”,正如在受试者中减轻炎症,意思是指与炎症相关症状、方面或特性(如发红、发热、肿胀、和/或疼痛)的严重程度或严重性的降低。这种减轻不需要绝对是对受试者有益的。可使用普通技术人员已知的任何方法或标准(包括定性和定量的方法和标准)来确定受试者中炎症的降低和/或减轻。

[0061] 应当理解的是,降低或减轻受试者中炎症是一种在受试者中治疗炎症的方法。如此处所用,“治疗”(或“治”或“处理”)是指在炎症的迹象或症状已开始发展之后,改善炎症的迹象或症状的治疗性干预。当提及炎症时,术语“改善”是指任何可观察到的治疗有益效果。可使用普通技术人员已知的任何方法或标准来确定有益效果。

[0062] 如此处所用,“预防”(或“防止”或“预防”)是指在炎症的症状、方面或特性发作之前起始的行为过程(如施用治疗有效量的Ac-TMP-1/Ac-TMP-2或其生物活性片段或变体),从而预防或降低症状、方面(aspect)或特性。应当理解的是这样的预防不需要绝对是对受试者有益的。“预防性”治疗是指目的在于降低发展成炎症症状、方面或特性的风险,而向没有表现出炎症迹象或仅表现出早期迹象的受试者所施用的治疗。

[0063] 如此处所用,“炎症”是指针对各种类型损伤或感染的公知的局部反应,其特征在于发红、发热、肿胀和疼痛,并且常常还包括功能障碍或活动性降低。炎症代表了一种早期的防御性机制,以控制(contain)感染并防止感染从初始的病灶发生扩散。炎症中的主要事件包括毛细血管扩张以增加血流、改变微脉管系统的结构、导致血浆和蛋白以及白细胞从循环中逃逸、以及白细胞从毛细管迁移并积累在损伤或感染部位。

[0064] 炎症通常与受试者中的疾病、病症和/或病况有关,或者炎症是受试者中的疾病、病症和/或病况所继发的,包括免疫疾病、病症和/或病况(如自身免疫性疾病、病症和/或病况)和过敏性反应。示例性免疫疾病、病症和/或病况包括但不限于阿狄森氏病、强直性脊柱炎、乳糜泻、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、慢性复发性多灶性骨髓炎(CRMO)、克罗恩氏病、脱髓鞘性神经病、肾小球性肾炎、肺出血肾炎综合征、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏脑炎、桥本氏甲状腺炎、低丙球蛋白血症、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、胰岛素依赖型糖尿病(1型)、幼年型关节炎、川崎综合征、多发性硬化、重症肌无力、心肌梗塞后综合征、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、特发性肺纤维化、瑞特综合征、类风湿关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征、系统性红斑狼疮(SLE)、血小板减少性紫癜(TTP)、溃疡性结肠炎、脉管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿。

[0065] 本领域普通技术人员之一将理解,消化道疾病(如慢性胃炎或炎症性肠病,如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)和呼吸系统疾病(如哮喘、肺气肿、慢性支气管炎和慢性阻塞性肺病(COPD))具有炎症性组成,且因此尤其适用于采用公开的方法进行治疗。

[0066] 因此,在另一方面,本发明提供一种治疗和/或预防受试者中炎症性肠病的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合的步骤。

[0067] 在一个实施方式中,炎症性肠病是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

[0068] 在另一方面,本发明提供一种治疗和/或预防受试者中哮喘的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的:(a) Ac-TMP-1 (SEQ ID NO:1) 或Ac-TMP-1的生物活性片段或变体、(b) Ac-TMP-2 (SEQ ID NO:2) 或Ac-TMP-2的生物活性片段或变体、或(c) (a) 和(b) 的组合的步骤。

[0069] 正如本领域普通技术人员之一还将理解,炎症与受试者中的疾病、病症和/或病况有关,或者炎症是受试者中的疾病、病症和/或病况所继发的,当基线疗法难以治疗所述疾病、病症和/或病况时通常发生所述炎症,例如基线疗法包括非甾体类抗炎药(NSAID)、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受体剂(如抗TNF α 剂、抗IL-5剂、抗IL-13剂、抗IL-17剂和抗IL-6R剂)、抗生素、及其组合。“难以治疗”意指对治疗尤其是对一线治疗耐受。

[0070] 术语“受试者”包括人类和兽受试者。例如,向受试者的施用可以包括向人类受试者或兽受试者施用。优选地,受试者是人类。然而,根据本发明的治疗性用途还可以应用于哺乳动物,比如家养和伴侣动物、性能动物(performance animal)如马、牲畜、以及实验动物。

[0071] “施用”意指通过所选的途径向受试者引入组合物(如包含Ac-TMP-1/Ac-TMP-2或其生物活性片段或变体的药物组合物)。

[0072] 术语“治疗有效量”描述足以在受试者中实现所需效果的特定药剂的量,其中受试者待采用所述药剂进行治疗。例如,这可以是包含Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)的组合物的量,其是降低、减轻和/或预防炎症所必须的。在一些实施方式中,“治疗有效量”足以降低或缓解炎症的症状。在其它实施方式中,“治疗有效量”是足以实现所需生物效果的量,例如有效减少炎症相关的发红、发热、肿胀和/或疼痛的量。

[0073] 理想情况下,药剂的治疗有效量是足以在受试者中诱导所需结果而不引起实质性细胞毒性效果的量。用于降低、减轻和/或预防炎症的药剂,例如Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)的有效量,将依赖于待治疗的受试者、任何相关疾病、病症和/或病况的类型和严重程度、以及治疗性组合物的施用方式。

[0074] 治疗过程期间,可以以单一剂量或以多剂量,例如每日,来施用包含Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)的组合物的治疗有效量。然而,施用频率依赖于所采用的制剂、待治疗的受试者、炎症的严重程度以及疗法或组合物的施用方式。

[0075] “Ac-TMP-1”意指组织金属蛋白酶抑制剂-1,一种来自犬钩口线虫(犬钩虫)的金属蛋白酶的抑制剂。Ac-TMP-1(UniProtKB/Swiss-Prot:#Q963I8)是一种140个氨基酸的多肽。

[0076] “Ac-TMP-2”意指组织金属蛋白酶抑制剂-2,一种来自犬钩口线虫的金属蛋白酶的抑制剂。Ac-TMP-2(UniProtKB/Swiss-Prot:#B1Q143)是一种244个氨基酸的多肽。

[0077] 如此处所用,“生物活性片段”描述Ac-TMP-1或Ac-TMP-2的部分或子序列,该部分或子序列包含Ac-TMP-1或Ac-TMP-2的结构域,所述生物活性片段具有不少于10%,优选不少于25%,更优选不少于50%,以及甚至更优选不少于75%、80%、85%、90%或95%的Ac-TMP-1或Ac-TMP-2的生物活性。可采用本领域技术人员认可的通常用于鉴定这种活性的标准测试方法和生物分析来评价这种活性。

[0078] Ac-TMP-1的片段可包含成熟Ac-TMP-1序列的小于120、小于110、小于100、小于75、或小于50个连续氨基酸。Ac-TMP-2的片段可包含成熟Ac-TMP-2序列的小于220、小于200、小于150、小于120、小于110、小于100、小于75、或小于50个连续氨基酸。也考虑Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2的多个片段。

[0079] (蛋白的)“结构域”是指蛋白的部分,其共享共同的结构、理化和功能特征(例如疏水性、极性、球状、螺旋、或神经生长因子样(netrin-like)(NTR)结构域)或特性(例如蛋白结合结构、受体结合结构域、辅因子结合结构域等)。

[0080] 还考虑的是Ac-TMP-1和Ac-TMP-2的变体,相较于野生型Ac-TMP-1/Ac-TMP-2,所述变体包含Ac-TMP-1(或其片段)或Ac-TMP-2(或其片段)中的一个或多个氨基酸取代、插入和/或删除。

[0081] 通常情况下,相对于蛋白,“变体”蛋白具有已被不同氨基酸所替换的一个或多个氨基酸。本领域中很好理解的是,一些氨基酸可以改变为具有大体相似的特性而不改变蛋白活性性质的其它氨基酸(即,保守取代)。

[0082] 还应当理解的是,参考序列(如Ac-TMP-1/Ac-TMP-2(或其片段))的一个或多个氨基酸残基,可进行修饰或删除、或添加额外序列,而基本上不改变Ac-TMP-1/Ac-TMP-2(或其片段)的生物活性。可采用本领域技术人员认可通常用于鉴定这种活性的标准测试方法和生物分析来评价这种活性。

[0083] 术语“变体”包括Ac-TMP-1和Ac-TMP-2的模拟肽和直系同源物。“模拟肽”是指含有能够模仿或拮抗天然母体肽的生物作用的非肽结构元件的分子。模拟肽的实例包括肽化合物以及“逆反”(retro-inverso)肽(参见,例如美国专利号4,522,752),其中肽化合物中肽主链上取代有一个或多个苯二氮卓分子(见,例如James等人,Science 260:1937-42, 1993)。该术语也指除了天然存在的氨基酸以外的半体(moiety),其在构象上和功能上作为蛋白中特定氨基酸的取代而没有以显著的程度负面干扰蛋白的功能。氨基酸模拟物的实例包括D-氨基酸。可使用公知的肽合成方法制备取代有一个或多个D-氨基酸的蛋白。其它取代包括具有带有官能团的变体侧链的氨基酸类似物,如,例如b-氰丙氨酸、刀豆氨酸、甲烯胱氨酸(djenkolic acid)、正亮氨酸、3-磷酸丝氨酸、高丝氨酸、二羟苯丙氨酸、5-羟色氨酸、1-甲基组氨酸和3-甲基组氨酸。

[0084] Ac-TMP-1和Ac-TMP-2的“直系同源物”是指来自其它肠蠕虫(即,钩虫、鞭虫和蛔虫)的TMP直系同源物,其中肠蠕虫包括人类钩虫,如例如美洲钩虫(*Necator americanus*)、十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)和锡兰钩口线虫(*Ancylostoma ceylanicum*),以及猪鞭虫,如例如猪毛尾线虫(*Trichuris suis*)和毛首鞭形线虫(*Trichuris trichiura*)。

[0085] 在一个实施方式中,蛋白变体或直系同源物与参考氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2共享至少70%、优选至少75%、80%或85%,更优选至少90%、95%、98%、或99%的序列同一性。

[0086] 优选地,序列同一性被测量超过至少60%,更优选超过至少75%,更优选超过至少90%或更优选超过至少95%、98%的参考序列的全长,或基本上是参考序列的全长。

[0087] 为了确定百分比序列同一性,通过算法的计算机执行算法(Intelligenetics的Geneworks程序;Wisconsin Genetics Software Package版本7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA以及TFASTA,遗传学计算机小组,WI,USA)或者通过检查和任何各种入选方法产生的最优比对(即,覆盖比对窗产生最高的同源性百分比),可进行氨基酸和/或核苷酸序列的最佳比对。还可以参考BLAST程序家族,例如Altschul等人,Nucl.Acids Res.25:3389-402,1997所公开的。

[0088] 序列分析的详细讨论可见于CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel等人主编(John Wiley&Sons Inc NY,1995-1999)的19.3单元。

[0089] 可以通过本领域技术人员之一已知的各种标准、诱变方法来制备变体蛋白。突变可涉及单基因、基因块或整个染色体的核苷酸序列的修饰、以及一个或多个突变蛋白的随后生产。单基因中的改变可以是点突变的结果,点突变涉及DNA序列中单个核苷酸碱基的删除、添加或取代,或者它们可以是涉及插入或删除大量核苷酸的改变的结果。

[0090] 暴露于化学或物理诱变剂之后发生突变。这种突变诱导剂包括电离辐射、紫外线和多种(diverse array of)化学剂,如烷基化剂和多环芳族烃,所有这些都能够直接或间接地与核酸相互作用(通常在一些代谢生物转化之后)。当复制或修复受到影响的DNA时,这种环境剂引起的DNA损伤可导致碱基序列的修饰,并因此导致突变,其随后可以在蛋白水平上得以体现。通过使用特定的靶向方法,突变还可以是定点的。

[0091] 用于生产包含一个或多个突变的Ac-TMP-1和Ac-TMP-2的诱变方法,包括但不限于随机诱变(例如,基于通过插入已知DNA片段使基因失活的插入诱变、化学诱变、辐射诱变、易错PCR(Cadwell和Joyce,PCR Methods Appl.2:28-33,1992))以及定点诱变(例如,使用

编码所需突变的DNA序列的特异寡核苷酸引物序列)。定点诱变的其它方法公开于美国专利号5,220,007;5,284,760;5,354,670;5,366,878;5,389,514;5,635,377;以及5,789,166。

[0092] 可以通过本领域技术人员已知的任何合适方法来制备分离的Ac-TMP-1和Ac-TMP-2(包括片段和变体)。

[0093] 在一个实施方式中,通过化学合成生产Ac-TMP-1和Ac-TMP-2(包括片段和变体)。化学合成技术是本领域公知的,尽管如此技术人员可以参考,例如CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE.Coligan等人编,John Wiley&Sons NY(1995-2001)第18章的合适方法。

[0094] 在另一个实施方式中,Ac-TMP-1和Ac-TMP-2(包括片段和变体)制备成重组蛋白。

[0095] 然而,重组蛋白的生产是本领域中公知的,技术人员可参考,例如Sambrook等人,MOLECULAR CLONING.A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press,1989),尤其是16和17节;CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY.Ausubel等人编(John Wiley&Sons, Inc.1995-1999)尤其是10和16章;以及CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE.Coligan等人编(John Wiley&Sons, Inc.1995-1999)尤其是1、5和6章中表述的标准规程。

[0096] 除了治疗有效量的Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)以外,可以向有需求的受试者施用本领域技术人员之一已知用于降低、减轻和/或预防炎症(和/或用于治疗或预防炎症相关的疾病、病症和/或病况)的一种或多种其它药剂的各种组合。即,除了治疗有效量的Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)以外,可以向受试者施用常规用于治疗 and/或预防炎症的一种或多种其它药剂。

[0097] 例如,在用于降低、减轻和/或预防炎症的某些实施方案中,非甾体类抗炎药(NSAID)、氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫抑制剂、抗细胞因子/细胞因子受体剂(如抗TNF α 剂、抗IL-5剂、抗IL-13剂、抗IL-17剂和抗IL-6R剂)尤其是抗细胞因子/细胞因子受体抗体、抗生素及其组合可以与Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)一同施用。

[0098] 在某些实施方式中,一种或多种其它药剂提供对Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)的节约效果。在进一步的实施方式中,Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)提供对一种或多种其它药剂的节约效果。在更进一步的实施方式中,一种或多种其它药剂提供对Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)作用的互补效果,优选消除或减少(和/或预防)一种或多种炎症相关症状的频率或严重程度。

[0099] 如本领域技术人员之一众所周知的,非甾体类抗炎药(NSAID)也被称为非甾体抗炎药剂(NSAIA),是具有镇痛、解热和抗炎作用的药物,并且包括水杨酸盐(例如,阿司匹林)和丙酸衍生物(例如布洛芬和萘普生)。

[0100] 本领域熟知氨基水杨酸盐用于治疗炎症性肠病(特别是溃疡性结肠炎),氨基水杨酸盐包括,例如巴柳氮、美沙拉嗪、奥沙拉嗪和柳氮磺吡啶(sulfasalazine)。

[0101] 如本领域技术人员之一众所周知的,皮质类固醇是极为类似皮质醇(由肾上腺分泌的激素)的药物。示例性的皮质类固醇包括但不限于可的松、泼尼松、泼尼松龙和甲泼尼龙。

[0102] 本领域熟知免疫抑制剂用于治疗某些疾病或病况相关的炎症,免疫抑制剂包括例如药物环孢素、硫唑嘌呤和麦考酚酸盐/酯。

[0103] 如本领域技术人员之一众所周知的,抗细胞因子/细胞因子受体剂(如抗TNF α 剂、抗IL-5剂、抗IL-13剂、抗IL-17剂和抗IL-6R剂)包括但不限于小分子抑制剂和抗体。

[0104] 在一些实施方式中,Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)与一种或多种其它药剂的组合在治疗和/或预防炎症当中产生协同作用。因此,本发明还包括一种在治疗任何使用药剂的病况(如炎症和任何相关疾病、病症和/或病况)中增强这种药剂治疗有效性的方法。

[0105] 在一个实施方式中,在施用一种或多种其它药剂之前,施用Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)。在另一实施方式中,在施用一种或多种其它药剂之后,施用Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)。在又一实施方式中,在施用一种或多种其它药剂的同时,施用Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)。在另一实施方式中,施用Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)并且施用一种或多种其它药剂(无论是相继地还是同时地)导致炎症的降低或减轻,而这种降低或减轻高于在不施用另一种的情况下施用Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)或者施用一种或多种其它药剂时所产生的这种降低或减轻。

[0106] 如本领域技术人员之一所公知的,可通过可用于联合治疗性组合物的任何常规方法/途径,来施用Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)以及一种或多种其它药剂。这种方法包括但不限于,通过微针注射入特定组织部位的施用,如美国专利6,090,790中描述的;应用到炎症部位的局部霜剂、洗剂或密封剂敷料(sealant dressing),如美国专利6,054,122中描述的;或者释放Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)的植入物,如国际公开WO 99/47070中描述的。

[0107] 在此方面中,包含Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)以及可选地一种或多种其它药剂的组合物,可以与如下联合施用、或作为如下的组成而施用:生物材料、生物聚合物、无机材料如羟基磷灰石或其衍生物、外科植入物、假体、伤口敷料、压布(compress)、绷带等经过适当浸渍、涂布或以其它方式而包含所述组合物的。

[0108] 合适地,所述组合物包含合适的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0109] 优选地,所述药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂适于施用哺乳动物,并且更优选人类。

[0110] “药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”指的是可以被安全地用于全身施用的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。取决于具体的施用途径,可以使用在本领域中公知的各种载体。这些载体可选自糖、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、藻酸、磷酸盐缓冲溶液、乳化剂、等渗盐水和盐(例如,包括盐酸盐、溴化物和硫酸盐的无机酸盐,如醋酸盐、丙酸盐和丙二酸盐的有机酸)、和无致热原的水。

[0111] 描述药学上可接受的载体、稀释剂和赋形剂的一个有用参考是Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.NJ USA,1991)。

[0112] 可以采用任何安全的施用途径用于向受试者提供包含Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)以及可选地一种或多种其它药剂的组合物。例如,可采用口服、直肠、肠胃外、舌下、口腔、静脉内、关节内、肌肉内、真皮内、皮下、吸入、眼内、腹膜内、脑室内、经皮等。

[0113] 剂型包括片剂、分散剂、混悬剂、注射剂、溶液、糖浆剂、锭剂、胶囊剂、栓剂、气雾剂、经皮贴剂等。这些剂型也可包括专门为此目的而设计的注射或植入控制释放装置,或经改造而用于以这种方式发挥额外作用的植入物的其它形式。Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其

生物活性片段或变体)以及可选地一种或多种其它药剂的控制释放,可以通过例如将Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)以及可选地一种或多种其它药剂同疏水性聚合物进行涂布而起作用,疏水性聚合物包括丙烯酸树脂、蜡、高级脂肪醇、聚乳酸和聚乙醇酸、以及某些纤维素衍生物如羟丙基甲基纤维素。此外,控制释放可通过使用其它聚合物基质、脂质体和/或微球而进行。

[0114] 可以按照与剂量制剂兼容的方式,并且以药学/治疗有效的量施用上述组合物。在本发明的上下文中,施用至受试者的剂量,应足以在受试者中在一段适当的时间内实现有益反应(例如,炎症的降低)。待施用的Ac-TMP-1和/或Ac-TMP-2(或其生物活性片段或变体)的量可依赖于待治疗的受试者,包括年龄、性别、体重和其总体健康状况、取决于本领域普通技术操作者的判断的因素。

[0115] 此处所述组合物还可包括表达载体(vector),如病毒载体(如,痘病毒、腺病毒和腺病毒相关病毒(AAV)、逆转录病毒和慢病毒载体、以及源自单纯疱疹病毒和巨细胞病毒的载体)。基因疗法也适用于这方面,例如根据美国专利5,929,040和美国专利5,962,427所述的方法。

[0116] 因此,可以容易地理解本发明并付诸实际效果,提供以下非限制性实施例。

[0117] 实施例

[0118] 实施例1

[0119] 重组Ac-TMP-1和Ac-TMP-2抑制IBD(TNBS模型)

[0120] 动物和TNBS诱导的结肠炎

[0121] 在它们用于实验之前,允许六周龄的雄性瑞士C57B1/6小鼠(体重20-25g,西澳大利亚州,珀斯,动物资源中心)适应七天。根据澳洲动物权利和规定标准饲养它们。所有涉及小鼠的程序得到詹姆斯库克大学动物伦理委员会的批准。

[0122] 通过Neurath等人(J Exp Med.182:1281-90,1995)描述的TNBS腔内注射来诱导结肠炎。简单地说,小鼠禁食24小时同时自由饮水。通过i.p.注射氯胺酮(50μg/kg)和甲苯噻嗪(5μg/kg)的混合物将它们麻醉。接下来,通过3.2cm长的柔性导管直肠内注射100μL 45%乙醇溶液中的2.5mg TNBS。TNBS注射后,小鼠在45°位置倒置保持一分钟以防止TNBS溶液的泄漏,然后将小鼠放置在其笼中自由获得食物和水。

[0123] 实验规程

[0124] 在第0天,小鼠接受20μg的AcES、Ac-TMP-1、Ac-TMP-2、变性Ac-TMP-2或模拟PBS注射的单次腹膜注射。五个小时后,在轻度麻醉下,它们接受直肠内注射在45%乙醇中的2至2.5mg的TNBS。从第0天至第3天,每日监测小鼠的体重减轻、活动性、总体外观和腹泻的出现。在第3天,将小鼠处死并收集结肠用于评价炎症(结肠长度、壁增厚、水肿和溃疡)。

[0125] 结果

[0126] 在两个独立的TNBS结肠炎实验中,重组Ac-TMP-1和Ac-TMP-2提供对体重减轻的优异保护(图3至图6)。进一步评价Ac-TMP-2的临床和宏观分数以及结肠长度,Ac-TMP-2在这方面在肠道病理中提供显著的降低(图4至图6)。有趣的是,如宏观分数评价所示,通过胰蛋白酶和加热使Ac-TMP-2变性,在我们的炎症性结肠炎小鼠模型中消除了Ac-TMP-2的保护活性(图6)。

[0127] 实施例2

[0128] 用重组Ac-TMP-1调节实验性哮喘

[0129] 动物和BSA诱导的哮喘

[0130] 在第0天和第7天,采用两次腹膜内(i.p.)注射2mg氢氧化铝(明矾)中的20 μ g BSA使小鼠致敏。在第14天至第21天,小鼠i.p.注射20 μ g AcES或Ac-TMP-1。从第18至第21天,在轻度麻醉下小鼠鼻内(i.n.)注射50 μ g BSA。第24天,处死小鼠并收集组织样本。

[0131] 结果

[0132] 为了研究AcES或Ac-TMP-1是否能够在小鼠中防止过敏性气道炎症,在攻击之前连续4天,以及在攻击的同时再持续4天,每日用AcES或Ac-TMP-1(20 μ g i.p.)治疗BALB/c小鼠。相较于PBS模拟注射组,AcES和Ac-TMP-1治疗的小鼠显示显著降低的嗜酸性粒细胞、肺的血管周和支气管周的细胞浸润(图7和9)。与未经免疫的组相比,PBS处理的BSA攻击的小鼠显示增高的Th2细胞因子,如白介素(IL)-5和IL-13,以及炎症标记物如IL-6的水平(图8和10)。我们发现AcES和Ac-TMP-1治疗(分别)导致肺中一倍至五倍以下的IL-5、以及两倍以下的IL-13(图8)。在AcES或Ac-TMP-1治疗的小鼠中,炎症细胞因子IL-6也降低两至三倍(图10)。有趣的是,虽然促炎细胞因子TNF α 或IFN γ 不直接与哮喘诱导的炎症有关,但在AcES治疗的小鼠中,其水平(分别)增加三和五倍(图10)。然而,水平保持不受Ac-TMP-1治疗的影响,这表明Ac-TMP-1被很好地耐受并不诱导炎症反应。IL-12和MCP-1水平保持不受AcES或Ac-TMP-1治疗的影响,这意味着防止BSA诱导的炎症不需要诱导Th1反应,并且不影响单核细胞趋化作用(图10和11)。出人意料的是,AcES或Ac-TMP-1治疗诱导肺中IL-17A水平2至3倍的降低,其中高水平已被报道与严重哮喘诱导的炎症和气道高反应性相关(图11)。总之,这些结果表明AcES和Ac-TMP-1显著降低BSA诱导的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的气道浸润,以及Th2和Th17反应,以及促炎细胞因子比如IL-6。

[0133] 实施例3

[0134] 用重组Ac-TMP-1/2调节实验性哮喘

[0135] 动物和OVA诱导的哮喘

[0136] 在第0天和第7天,采用两次腹膜内(i.p.)注射2mg氢氧化铝(明矾)(Pierce)中的20 μ g OVA进行致敏。在第14天至第21天,小鼠i.p.注射20 μ g Ac-TMP-1或Ac-TMP-2。从第18至22天,使用超声雾化器将小鼠暴露于OVA(0.25%)气雾20min。第24天,分析小鼠。

[0137] 第24天,处死小鼠并收集支气管肺泡灌洗。计数细胞,并用抗Siglec F或抗CCR3、抗Gr1、抗CD3和抗CD19单克隆抗体对细胞进行染色,并且通过荧光激活细胞分选(FACS)用FACS canto II流式细胞仪和FACS Diva软件进行分析。嗜酸性粒细胞被定义为CCR3⁺或SiglecF⁺CD3⁻CD19⁻,嗜中性粒细胞为Gr-1^高SiglecF⁻CD3⁻CD19⁻,淋巴细胞为CD3⁺CD19⁺。

[0138] 第24天,处死小鼠并收集腹膜灌洗。简言之,用5ml补充有5%FCS的冰冷HBSS洗两次腹膜。针对差异PL细胞计数,用抗CCR3、抗Gr1、抗CD3和抗CD19单克隆抗体对细胞进行染色,并且通过荧光激活细胞分选(FACS)用FACS canto II流式细胞仪和FACS Diva软件进行分析。

[0139] 取得来自每个个体小鼠的肺样本,并在含5%胎牛血清的钙和无镁Hanks平衡盐溶液中匀浆。用1mg/ml Ac-TMP-1在体外再次刺激细胞、或在37 $^{\circ}$ C未刺激保持三天。收集来自这些培养物的上清,并通过细胞计数珠阵列和FACS分析评价IL-5、IL-10、IL-13、MCP-1和IL-17A水平。或者,在含蛋白酶混合物抑制剂的钙和无镁Hanks平衡盐溶液中,从个体小鼠

的速冻肺中制备全蛋白提取物。通过CBA分析提取物含量。

[0140] 结果

[0141] 在我们实验室之前产生的结果表明,AcES的复合组合物诱导多种T细胞反应,包括与嗜酸性粒细胞的腹膜浸润相关的强Th2反应。为了验证Ac-TMP-1或Ac-TMP-2在腹膜中没有比气道诱导更强的趋化信号,与支气管肺泡灌洗并行的是,收集未经免疫的小鼠、PBS模拟注射、Ac-TMP-1或Ac-TMP-2治疗的小鼠的腹腔灌洗,并通过FACS分析(图12,图15和图16)。然而相较于模拟注射组,用Ac-TMP-1和Ac-TMP-2治疗的小鼠气道中显示显著减低的嗜酸性粒细胞,在腹膜中没有嗜酸性粒细胞浸润(图12、图15和图16),这表示Ac-TMP-1和Ac-TMP-2防止仅在过敏或炎症反应部分诱导嗜酸性粒细胞。

[0142] 用OVA体外刺激,来自OVA攻击的小鼠的肺细胞表现出提高水平的IL-5、IL-10和IL-13分泌(图13)。另一方面,当用OVA刺激时,MCP-1和IL-17A的上清水平在PBS模拟和OVA攻击的小鼠肺细胞中均相似地提高(图14)。与支气管肺泡灌洗中的发现一致,在Ac-TMP-1治疗的小鼠OVA刺激的肺细胞中Th2细胞因子IL-5、IL-10和IL-13、以及促炎细胞因子MCP-1和IL-17A的水平降低(图13和14)。类似地,在Ac-TMP-2治疗的小鼠中,肺细胞因子含量显著降低(图17和18)表明Ac-TMP-2有效地抑制Th2和促炎细胞因子如IL-6和IL-17A。

[0143] 实施例4

[0144] 用重组Ac-TMP-2调节实验性慢性哮喘

[0145] 动物和OVA诱导的慢性哮喘

[0146] 在第0天和第7天,采用两次腹膜内(i.p.)注射2mg氢氧化铝(明矾)(Pierce)中的20μg OVA进行致敏。在第14天至第18天,小鼠i.p.注射20μg Ac-TMP-2或PBS对照溶液。从第17至20天以及36至40天,使用超声雾化器将小鼠暴露于OVA(0.25%)气雾中保持20min。第36至40天,一组之前用Ac-TMP-2治疗的小鼠再次i.p.注射20μg Ac-TMP-2。剩下的小鼠,无论之前用Ac-TMP-2治疗与否,都i.p.注射PBS对照溶液。第42天分析小鼠的气道炎症。

[0147] 结果

[0148] 无论是仅在第一次OVA攻击期间施用Ac-TMP-2(+/-)或是在两组OVA攻击期间施用Ac-TMP-2(+/+),为了评价Ac-TMP-2在慢性哮喘的小鼠模型中是否降低气道炎症,收集未经免疫的小鼠、PBS模拟注射治疗的小鼠、或Ac-TMP-2治疗的小鼠(+/-和+/+)的支气管肺泡灌洗,并通过FACS分析(图19)。在这种OVA诱导的慢性哮喘模型中,无论是在第一次攻击期间(+/-)还是两次攻击(+/+)期间施用Ac-TMP-2,相较于PBS模拟注射治疗的小鼠,经治疗的小鼠显示总细胞和嗜酸性粒细胞的气道浸润的显著降低(图19)。

[0149] 实施例5

[0150] 用重组Ac-TMP-2调节实验性哮喘

[0151] 动物和OVA诱导的哮喘

[0152] 在第0天和第7天,采用两次腹膜内(i.p.)注射2mg氢氧化铝(明矾)(Pierce)中的20μg OVA进行致敏。在第14天至第18天,一组OVA致敏的小鼠鼻内(i.n.)注射20μg Ac-TMP-2(预防性治疗)。从第22至26天,使用超声雾化器将OVA致敏的小鼠暴露于OVA(0.25%)气雾中保持20min。第24至28天,第二组OVA致敏的小鼠鼻内(i.n.)注射20μg Ac-TMP-2(治疗性治疗)。第30天分析小鼠的气道炎症。

[0153] 结果

[0154] 当以预防性 (Tp, OVA攻击之前) 或治疗性 (Tc, OVA攻击之后) 方式给予时, 为了确定通过鼻内注射局部施用的Ac-TMP-2是否能够减弱气道炎症, 收集未经免疫的小鼠、PBS模拟注射治疗的OVA攻击的小鼠、或Ac-TMP-2治疗的OVA攻击的小鼠 (Tc和Tp) 的支气管肺泡灌洗, 并通过FACS进行分析, 从中获得总的和差异细胞计数 (图20)。无论小鼠是否按照预防性或治疗性方式进行治疗, 鼻内Ac-TMP-2显著减弱总的和嗜酸性粒细胞的气道细胞浸润 (图20)。重要的是, 这些数据突显出Ac-TMP-2不仅是经肠胃外途径还可以经局部施用来预防这种小鼠哮喘模型中的气道炎症。

[0155] 从未经免疫的小鼠、PBS模拟注射治疗的OVA攻击的小鼠、或Ac-TMP-2治疗的OVA攻击的小鼠 (Tc和Tp) 的肺制备全蛋白提取物, 并通过细胞计数珠阵列 (CBA) 分析Th2细胞因子IL-5和IL-13。相较于未经免疫的组, PBS治疗的OVA攻击的小鼠显示显著提高的IL-5和IL-13水平 (图21)。我们发现用Ac-TMP-2进行治疗, 无论是预防性还是治疗性方式, 均显著降低IL-5和IL-13水平 (图21)。总之, 这些发现说明当鼻内施用Ac-TMP-2时显著降低OVA诱导的嗜酸性粒细胞的气道浸润以及相关的Th2炎症反应。

[0156] 实施例6

[0157] 用重组Ac-TMP-2调节调节性T细胞 (Treg)

[0158] 动物和调节性T细胞

[0159] 小鼠采用Ac-TMP-2 (20 μ g) 或PBS腹膜内注射6天, 并且收集和分析肠系膜淋巴结 (MLN)、脾脏和小肠固有层 (LP) 的Treg存在。分离来自各组织的个体细胞, 并染色Treg标记物CD4、CD25和Foxp3, 随后通过流式细胞术进行分析。来自MLN、脾脏和幽门淋巴结 (PLN) 以及LP的Treg进一步用CCR9抗体染色, 并通过流式细胞术进行分析来确定其组织来源。

[0160] 结果

[0161] 向未经免疫的小鼠施用Ac-TMP-2显著诱导Treg募集至小肠的固有层 (图22)。相反地, 用Ac-TMP-2进行治疗观察到来自肠系膜淋巴结 (MLN) 的Treg的频率显著减少 (图22)。这些数据表明了Treg从MLN到肠黏膜的迁移模式。为了支持这一点, 60%的固有层Treg表达趋化因子受体CCR9, 这表明它们已经印刻在 (imprinted in) 内脏相关引流淋巴结中 (即MLN) (图22)。这种观察与数据相符, 表明MLN所产生的Treg积聚在粘膜上以便维持对普遍存在的抗原的耐受 (Navarro等人, *Mucosal Immunol.* 4:53-65 2011)。

[0162] 实施例7

[0163] 用重组Ac-TMP-2调节实验性哮喘中的调节性T细胞 (Treg)

[0164] 动物和OVA诱导的哮喘

[0165] 为了研究在我们的OVA诱导的实验性哮喘模型中Treg对Ac-TMP-2诱导的保护的贡献, 我们在OVA致敏和暴露之前在选择性地耗尽小鼠中Treg。通过在经工程改造而表达DT受体的转基因小鼠中使用白喉毒素 (DT) 实现这种耗尽, 其中DT受体在Treg特异性Foxp3启动子的控制下 (DEREG小鼠; Lahl和Sparwasser *Methods Mol Biol.* 707:157-72 2011)。然后在第0天和第7天, 通过两次i.p. 注射2mg氢氧化铝 (明矾) (Pierce) 中的20 μ g OVA使野生型和DEREG小鼠致敏。在第14天至第21天, 致敏的野生型和DEREG小鼠i.p. 注射20 μ g Ac-TMP-2或PBS对照溶液。从第18至22天, 使用超声雾化器将OVA致敏的小鼠暴露于OVA (0.25%) 气雾中保持20min。第24天, 分析小鼠的气道炎症。从采用PBS模拟注射或Ac-TMP-2治疗的未经免疫的野生型小鼠和致敏的野生型以及DEREG小鼠中收集支气管肺泡灌洗, 并通过FACS分析, 从

中获得差异细胞计数(图23)。从各治疗组小鼠的肺制备全蛋白提取物,并分析Th2相关细胞因子(图24)和促炎细胞因子(图25)的蛋白表达。

[0166] 结果

[0167] 与上述实施例3相似,用Ac-TMP-2治疗显著降低OVA攻击的野生型小鼠的气道炎症(图23)。相反地,相较于用OVA攻击的未治疗的DEREG小鼠,用Ac-TMP-2治疗的OVA攻击的DEREG小鼠显示出相当的支气管肺泡浸润水平(图23)。与这些发现相符,Ac-TMP-2治疗时,Th2细胞因子IL-5、IL-10和IL-13以及促炎细胞因子IL-6的水平在OVA攻击的野生型小鼠中但不在OVA攻击的DEREG小鼠中显著降低(图24和25)。总之,这些结果表明,在我们的小鼠哮喘模型中Treg在Ac-TMP-2抗炎作用中发挥整体作用。

[0168] 在整个说明书中,目的是要描述本发明的优选实施方式,而非将本发明限制于任何一个实施方式或特定的特征集合。因此,本领域技术人员将理解,根据本公开,在所示例的具体实施方式中,在不脱离本发明的范围内可进行各种修改和变化。

[0169] 此处提及的所有计算机程序、算法、专利和科学文献在此引入作为参考。

序列表

<110> 詹姆斯库克大学

<120> 用于治疗炎症的方法

<130> 25345CN2

<150> AU2012900999

<151> 2012-03-13

<150> PCT/AU2013/000247

<151> 2013-03-13

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> 犬钩口线虫

<400> 1

Met Arg Val Ala Ile Val Phe Ile Ala Cys Phe Ala Val Ala His Ala
1 5 10 15

[0001] Cys Lys Cys Glu Lys Lys Pro Arg Pro Pro Leu Glu Lys Leu Leu Cys
20 25 30

Gln Ser Gln Phe Val Thr His Ala Lys Val Thr Lys Lys Arg Ile Asp
35 40 45

Gly Tyr Phe Ile Tyr Tyr Asp Leu Glu His Lys Glu Val Tyr Lys Pro
50 55 60

Lys Asp Arg Ser Ile Pro Ile Glu Leu Phe Ser Trp Arg Glu Lys Glu
65 70 75 80

Asn Cys Gly Val Pro Asp Leu Glu Glu Gly Lys Glu Tyr Leu Ile Gly
85 90 95

Gly Lys Val Thr Asp Tyr Gly Asp Gly Asp Leu Val Ile Ser Val Ser
100 105 110

Arg Cys Asp Leu Leu Arg Asn Trp Thr Asp Val Ser Gly Glu Glu Lys
115 120 125

Lys Leu Leu Gly Thr Phe Lys Cys Glu Asn Gln Ser
130 135 140

<210> 2

<211> 244

<212> PRT

<213> 犬钩口线虫

<400> 2

Met Ile Ser Leu Ile Val Phe Ile Ala Cys Leu Thr Thr Thr Gln Ala

1 5 10 15

Ala Cys Ser Cys Lys Pro Phe Gly Thr Leu Lys Glu Ala Phe Cys Gln

20 25 30

Ser Asp Tyr Val Leu Leu Ala Lys Val Leu Ser Val Asn Ser Lys Tyr

35 40 45

Gly Glu Ser Ser Arg Asn Glu Ala Asn Asp Met Ser Thr Thr Ala Asn

50 55 60

Gly Thr Trp Ser Tyr His Val Trp His Met Arg Thr Trp Lys Gly Pro

65 70 75 80

[0002]

Val Val Asp Thr Ser Val Leu Thr Thr Ser Tyr Ser Glu Cys Gly Val

85 90 95

Thr Gly Leu Leu Lys Asn Trp Asp Tyr Phe Leu Thr Gly Lys Gln Gly

100 105 110

Lys Asp Gly Glu Ile Thr Ile Thr Ser Cys Asp Phe Val Met Pro Ser

115 120 125

Thr Asp Val Thr Pro Glu Glu His Asp Leu Leu Met Asp Leu Met Gly

130 135 140

Asp Pro Lys Lys Cys Glu Glu Lys Asp Asp Glu Arg Asp Val Lys Glu

145 150 155 160

Asn Glu Asn Ser Val Glu Glu Asn Asp Glu Lys Asp Glu Glu Glu Asn

165 170 175

Gly Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn Asp Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn

180 185 190

Asp Glu Lys Val Glu Glu Glu Asn Gly Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn

195 200 205

Asp Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn Asp Glu Lys Asp Glu Glu Glu Asn
210 215 220

Gly Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn Asp Glu Lys Thr Val Glu Glu Asn
225 230 235 240

Asp Glu Gln Glu

<210> 3
<211> 519
<212> DNA
<213> 犬钩口线虫

<400> 3
agcatatcag catgagagtc gctattgttt tcattgcatg cttegcagta gcacacgcat 60
gcaagtgcga aaagaaacct cgtcctccat tggagaaact gctttgcaa tcacaatttg 120
ttactcacgc gaaagtgacg aagaagagaa ttgatggta cttcatctat tacgacttgg 180
agcataagga agtttataag cccaagata ggagtatccc aatcgaactc ttctcatgga 240
gggaaaagga aaattgtggt gttccggatc tcgaagaagg caaagaatac ctgataggag 300
[0003] gtaaagtgc ggattatggc gacggtgatt tggtaatttc tggttcacgg tgcgaccttc 360
tcgaaaactg gacagacgtc tctggagagg agaagaaatt gctcggaaacg tcaaatgtg 420
aaaatcagtc ataaacgccg attatatata attgaaagaa gagaaatgaa catttttcac 480
gcgaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 519

<210> 4
<211> 870
<212> DNA
<213> 犬钩口线虫

<400> 4
cctcgtgccg aatggcacga gggtttgagg tacagaaggc cgcgaagtt atactaaacc 60
catgattct ccatagttt tcattgcatg cctcacaacg acgcaggcag catgctcttg 120
caaaccgttc ggaacactga aggaagcttt ctgccaatca gattacgtgc ttctggcaaa 180
agtgttgta gtaaatagta aatfatgtga atcgtcgaga aatgaagcaa atgatatgag 240
cacgaccgct aacggaacat ggagttacca tglatggcac atgcggactt ggaagggtcc 300
tgtcgttgat actagtgttc tcaccacgtc atatagcgag tgtggtgtaa ctggtctctt 360
gaaaaattgg gattattttc taacaggcaa gcaaggaaaa gatggcgaaa tcaccatcac 420

[0004]	aagctgcgac ttgtaatgc catcaactga tgtcacacca gaagagcatg atcttttgat	480
	ggacctcatg ggggacccga aaaaatgtga agaaaaagat gatgagaggg acgttaaaga	540
	aaacgagaat agcgtagaag agaatgatga gaaagatgaa gaagaaaatg gtgagaaaac	600
	agtagaagag aatgacgaga aaactgtgga agaaaacgat gagaaagttg aagaagaaaa	660
	tggtgagaaa acagtagaag agaatgacga gaaaactgtg gaagaaaacg atgagaaaga	720
	tgaagaagaa aatggtgaga aaacagtaga ggagaatgac gagaaaactg tggaagaaaa	780
	cgatgaacag gagtgatctg aacactgcaa ttctcgtaa ccaagtggga ataaaattct	840
	gacgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	870

```

1      M R V A I V F I A C F A V A H A C
1 AGCATATCAGCATGAGAGTCGCTATTGTTTTTCATTGCATGCTTTCGCAGTAGCACACGCAT
18  K C E R K P R P P L E K L L C Q S Q F V
61 GCAAGTGGGAAAAGAAACCTCGTCTCCATTGGAGAAACTGCTTTGCCAATCACAATTTG
38  T H A K V T K K R I D G Y F I Y Y D L E
121 TTACTCAGCGGAAAGTACGAGGAAGAGAATTGATGGTTACTTCATCTATTACGACTTGG
58  H K E V Y K P K D R S I F I E L F S W R
181 AGCATAAGGAAGTTTATAAGCCCAAGATAGGAGTATCCCAATCGAACTCTTCTCATGGA
48  E K E N C G V P D L E E G K R Y L I G G
241 GGGAAAAGGAAAATTGTGGTGTTCGGATCTCGAAGAGGCAAGAAATACCTGATAGGAG
98  K V T D Y G D G D L V I S V S R C D L L
301 GTAAAGTGACGGATTATGGCGACGGTGTATTGGTAATTTCTGTTTCACGGTGCACCTTC
118 R N W T D V S G E E K K L L G T F K C E
361 TCCGAAACTGGACAGACGTCTCTGGAGAGGAGAAGAAATGCTCGGAACGTTCAATGTG
138 N Q S * (SEQ ID NO:1)
421 AAAATCAGTCATAACGCCGATTATATATAATTGAAAGAAGAGAAATGAACATTTTTTCAC
481 GCGAAAAA

```

图1

```

1 CCTCGTGCCGAATGCGACGAGGCTTTGAGGTACAGAGGGCGCCGAGTTATACTAAACC
1 M I S L I V F I A C L T T T Q A A C S C
61 CATGATTTCTCTCATAGTTTTCATTGCATGCCTCACAACGACGCGAGGCAGCATGCTCTTG
21 K P F G T L K E A F C Q S D Y V L L A K
121 CAAACCGTTCGGAACACTGAAGGAAGCTTTCTGCCAATCAGATTACGTGCTTCTGGCAAA
41 V L S V N S K Y G E S S R N E A N D M S
181 AGTGTGTGTCAGTAATAGTAAATATGGTGAATCGTCGAGAAATGAAGCAAATGATATGAG
61 T T A N G T W S Y H V W H M R T W K G F
241 CACGACCGCTAACGGAAACATGGAGTTACCATGTATGGCAGATGCCGACTTGGAAAGGGTCC
81 V V D T S V L T T S Y S E C G V T G L L
301 TGTGTTGATACGTGTGTTCTCACCACGTATATAGCGAGTGTGGTGTAACTGGTCTCTT
101 K N W D Y F L T G K Q G K D G E I T I T
361 GAAAAATTGGGATTATTTCTAACAGGCAAGCAAGGAAAAGATGGCGAAATCACCATCAC
121 S C D F V M P S T D V T P E E H D L L M
421 AAGCTGCGACTTTGTAAATGCCATCAACTGATGTACACCAGAAGAGCATGATCTTTTGAT
141 D L M G D P K K C E E K D D E R D V K E
481 GGACCTCATGGGGACCCGAAAAAATGTGAAGAAAAAGATGATGAGAGGGACGTTAAAGA
161 N E N S V E E N D E K D E E E N G E K T
541 AAACGAGAATAGCGTAGAGGAGAAATGATGAGAAAGATGAGAAAGAAATGGTGAGAAAAC
181 V E E N D E K T V E E N D E K V E E N
601 AGTAGAAGAGAATGACGAGAAAACGTGGAAGAAAACCATGAGAAAGTTGAAGAAGAAAA
201 G E K T V E E N D E K T V E E N D E K D
661 TGGTGAGAAAACAGTAGAAGAGAATGACGAGAAAACGTGGAAGAAAACCATGAGAAAGGA
221 E E E N G E K T V E E N D E K T V E E N
721 TGAAGAAGAAAATGGTGAGAAAACAGTAGAGGAGAATGACGAGAAAACGTGGAAGAAAA
241 D E Q E * (SEQ ID NO:2)
781 CGATGAACAGGAGTGATCTGAACACTGCAATTTCTCGTAACCAAGTGGGAATAAAATTC
841 GACGAAAA

```

图2

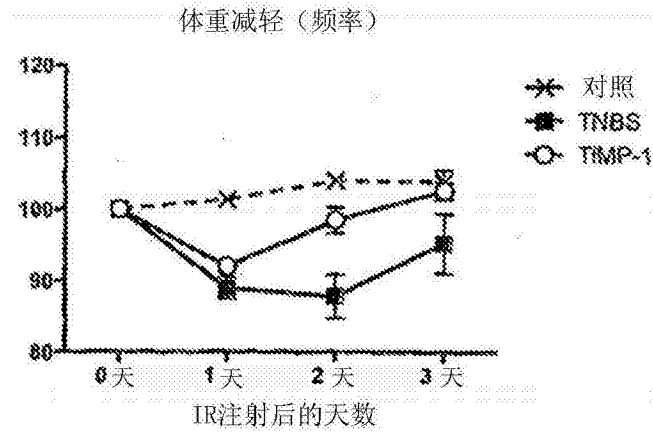


图3

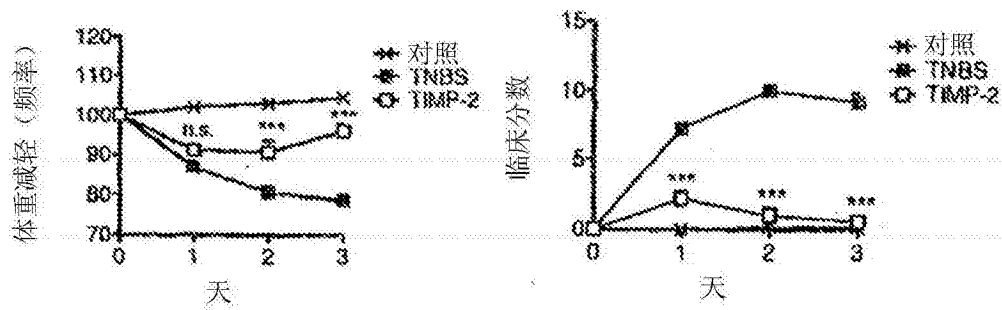


图4

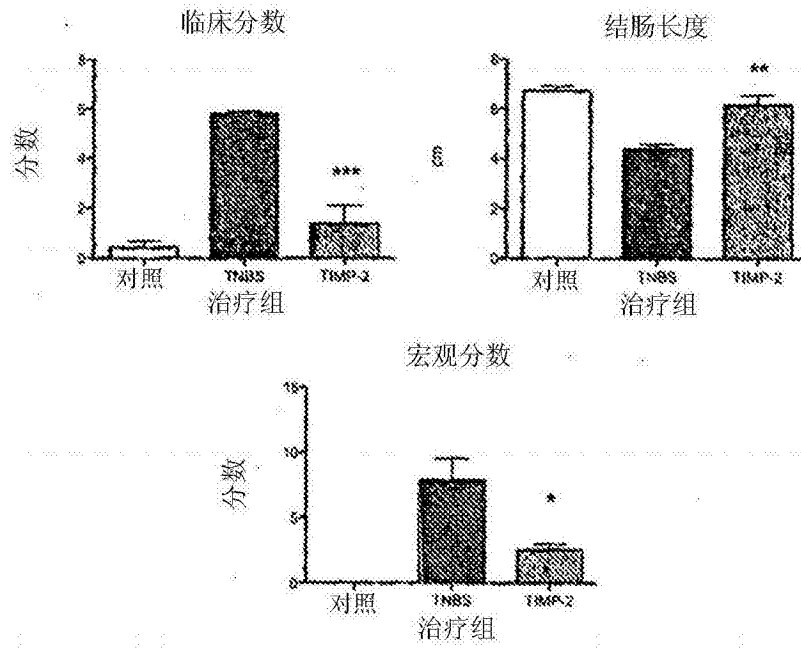


图5

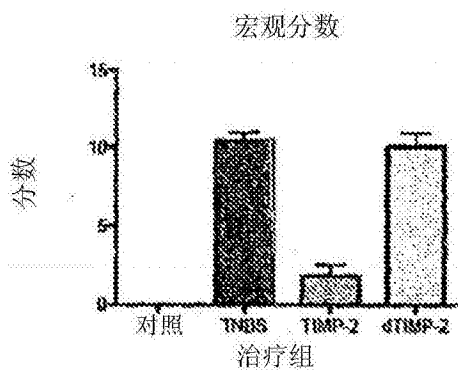


图6

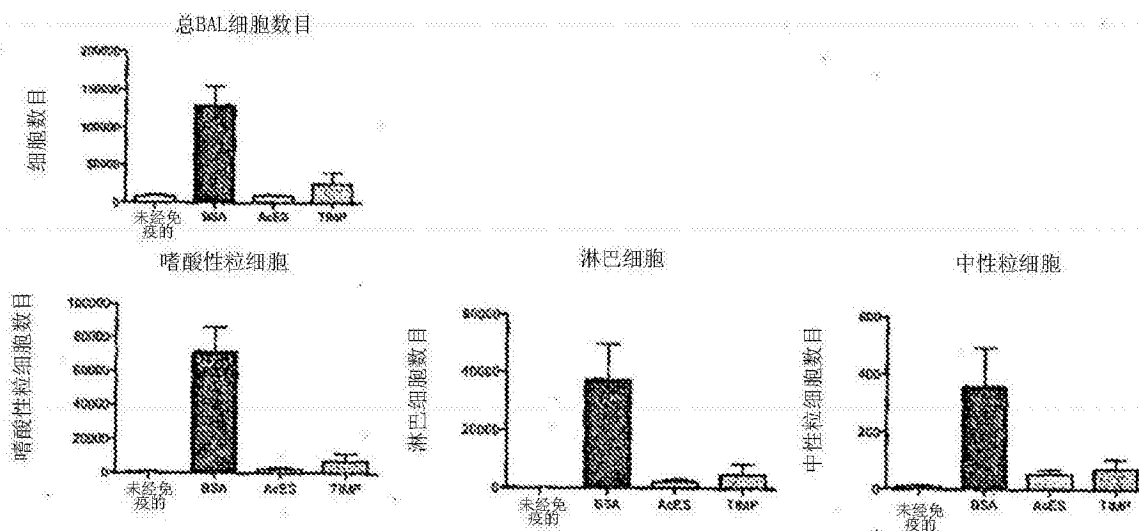


图7

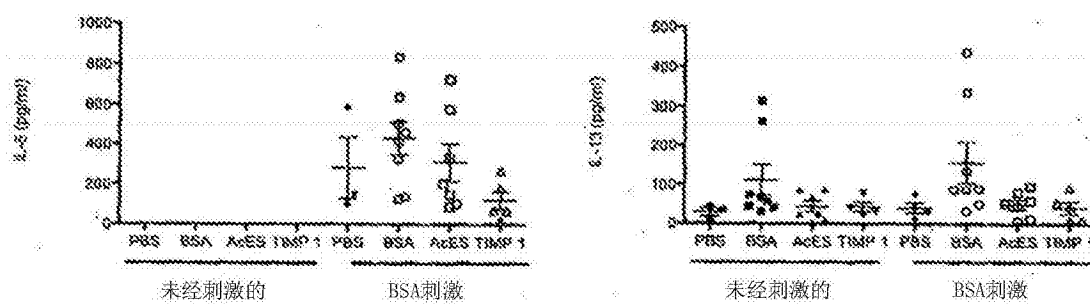


图8

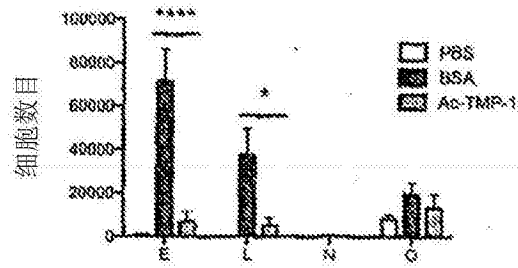


图9

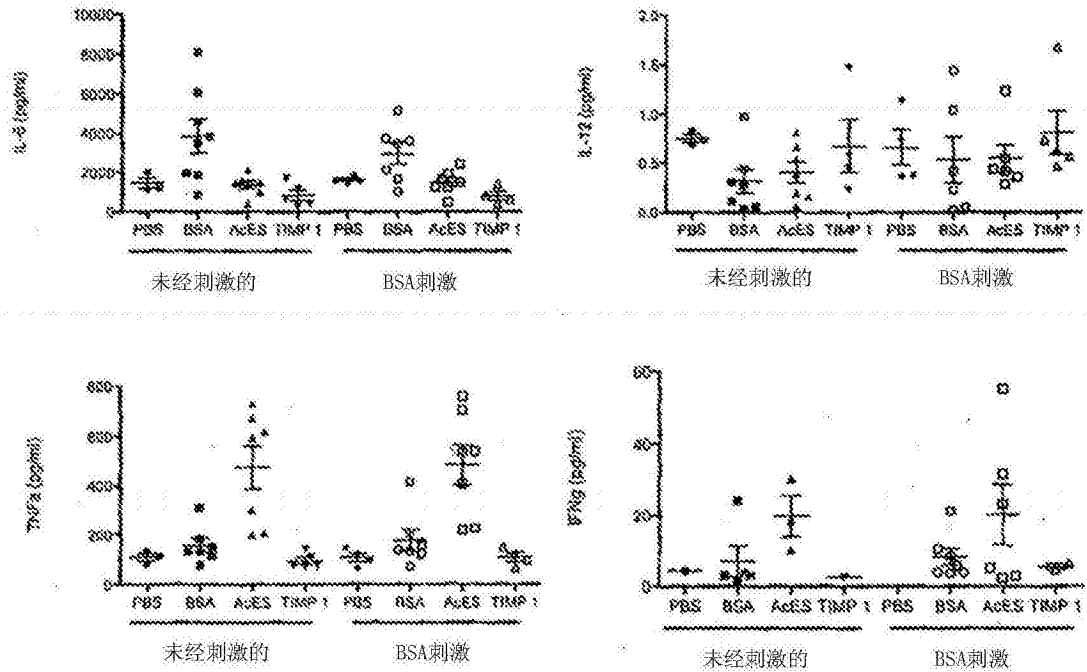


图10

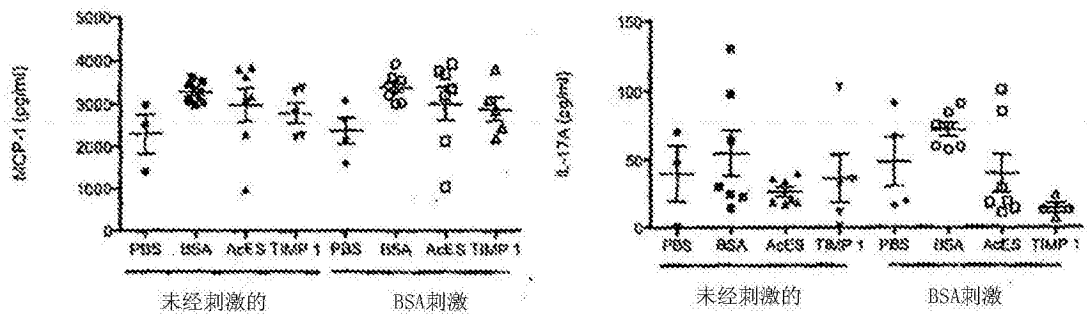


图11

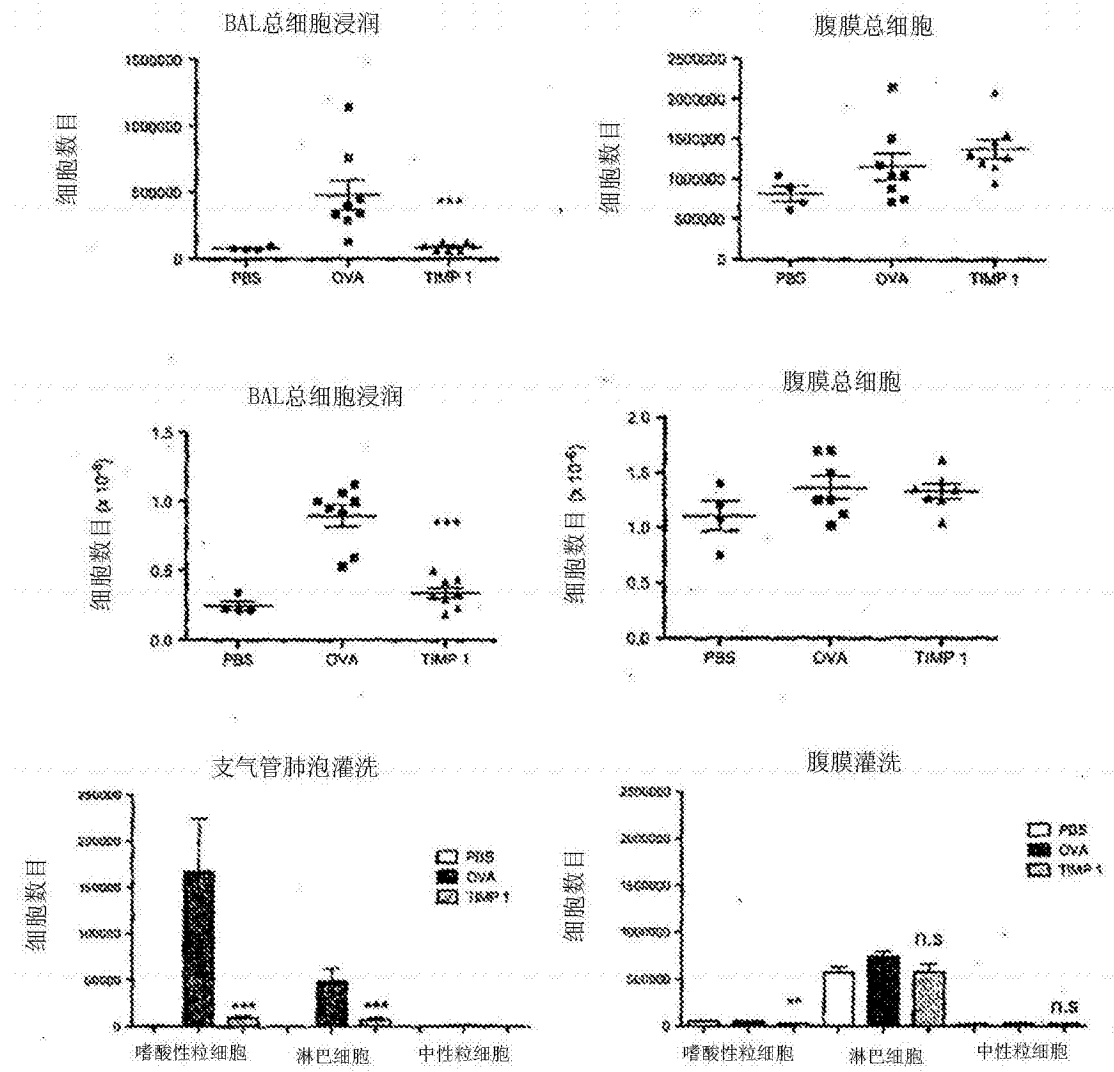


图12

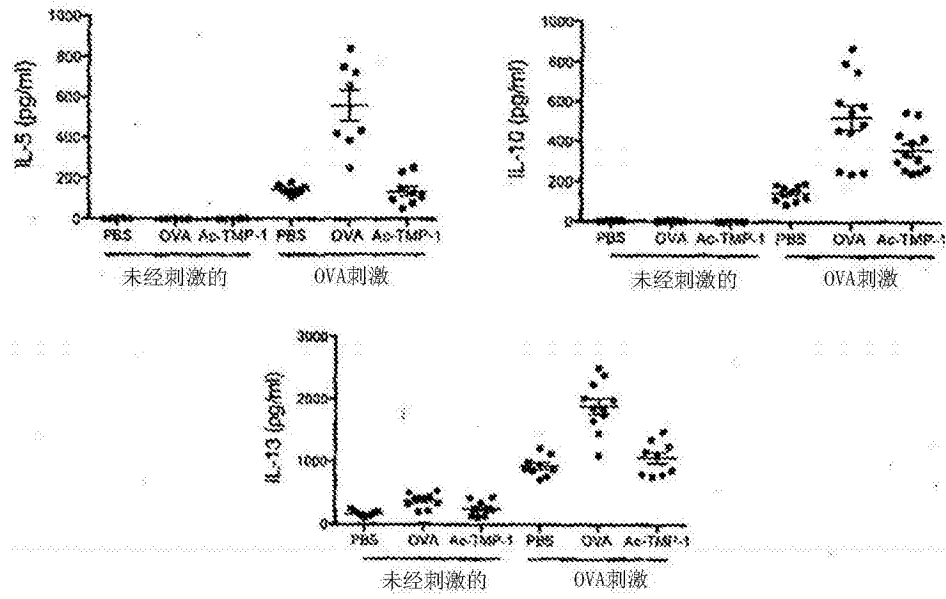


图13

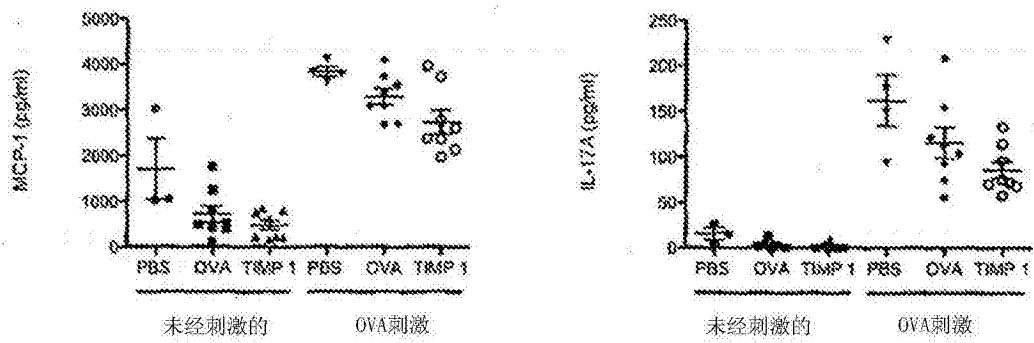


图14

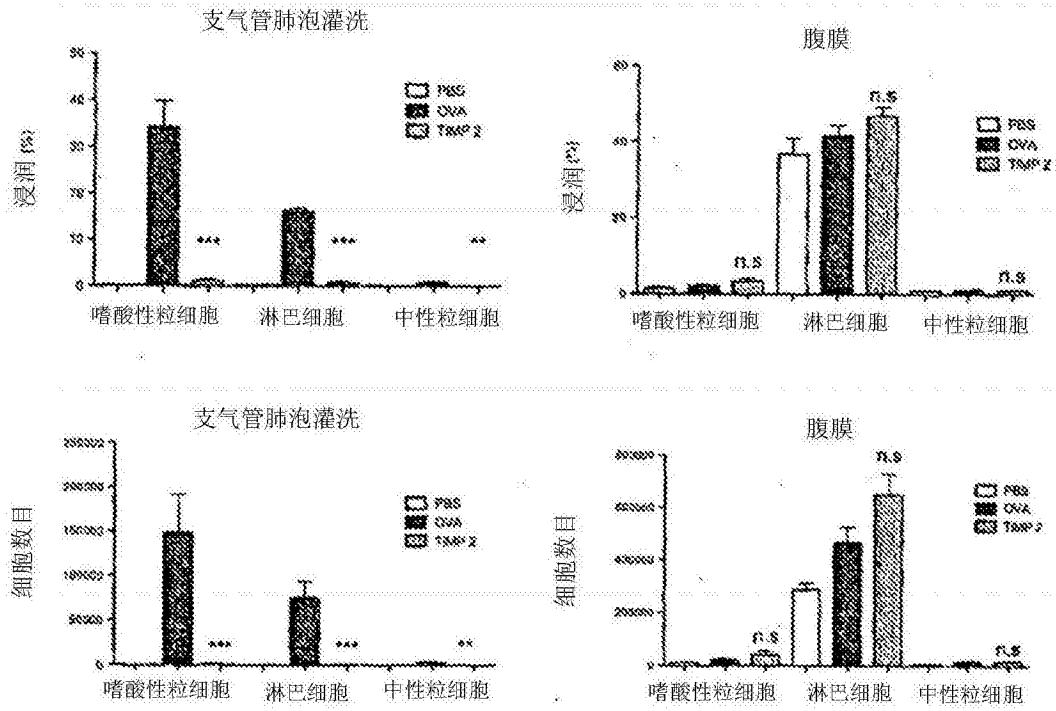


图15

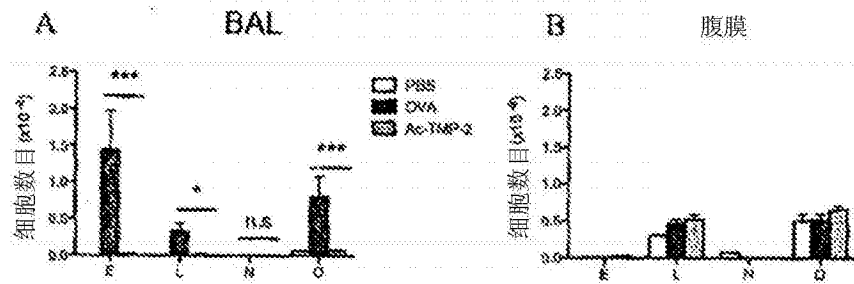


图16

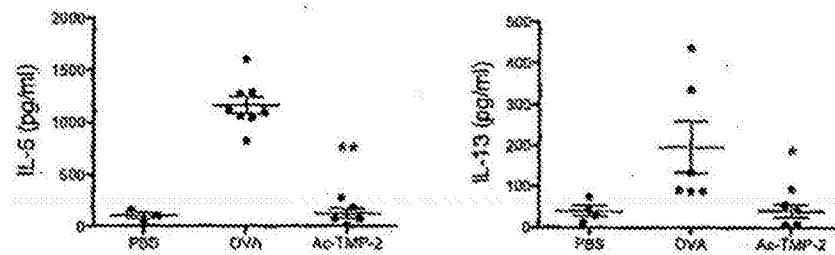


图17

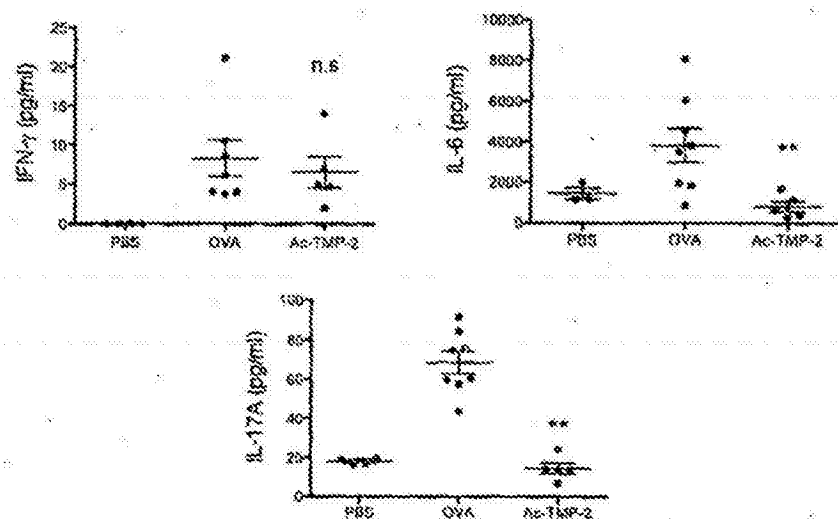


图18

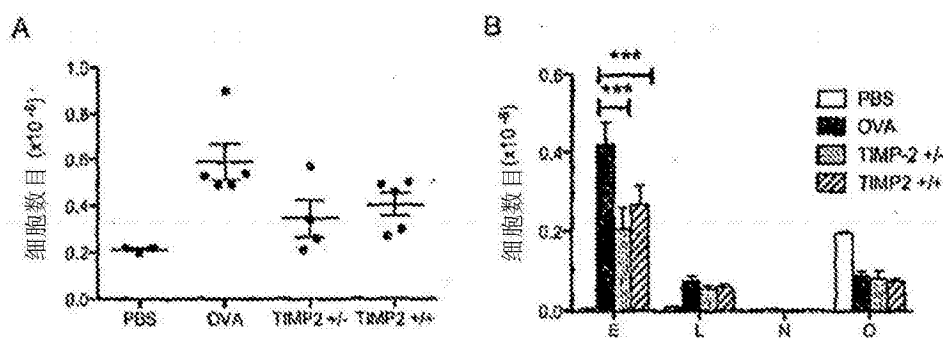


图19

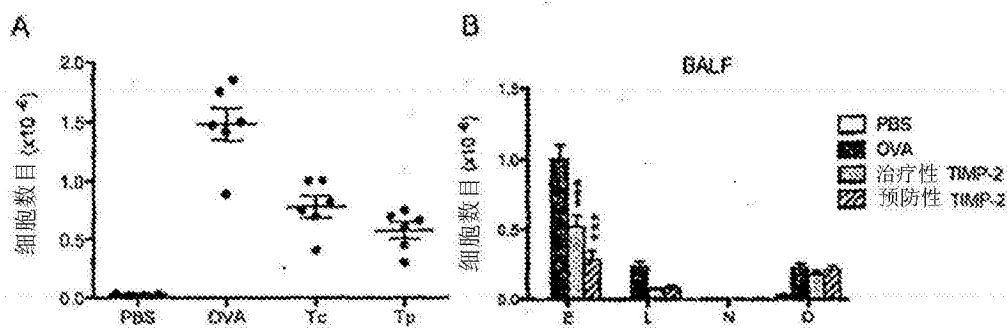


图20

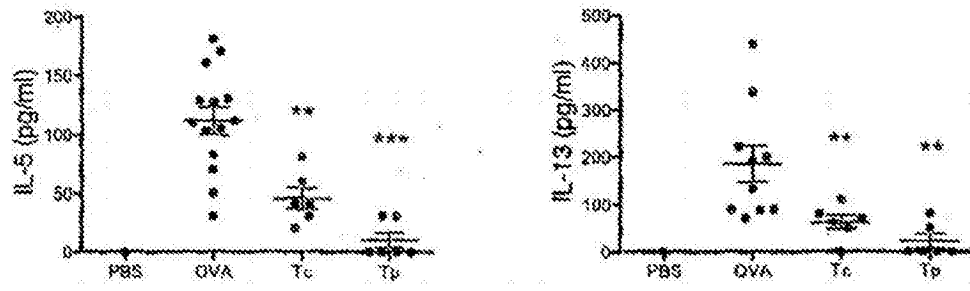


图21

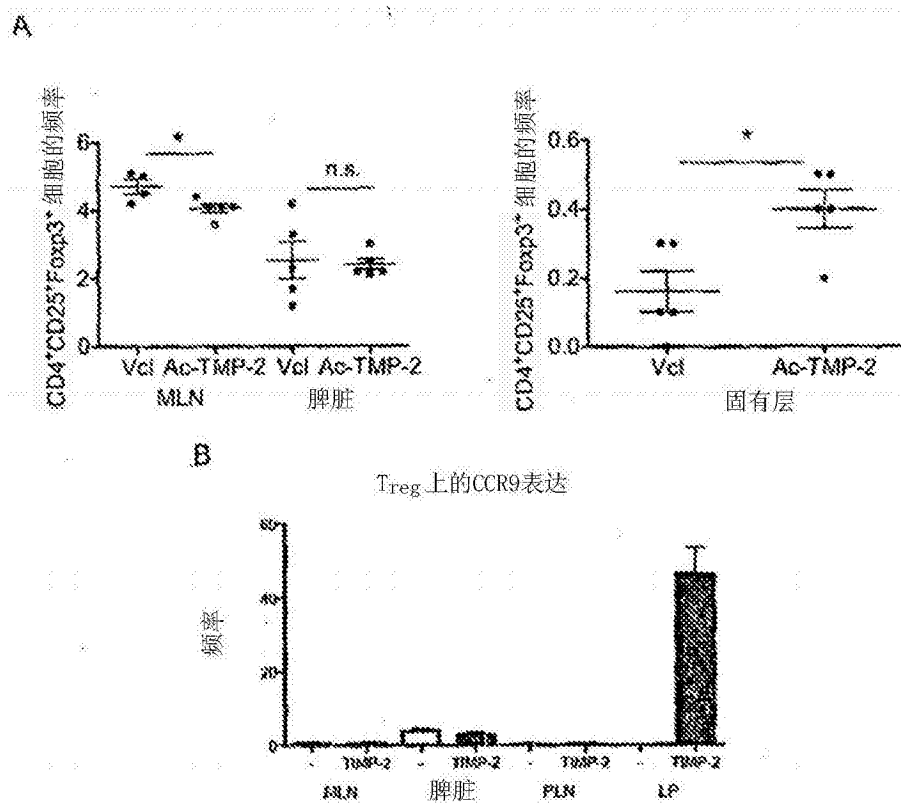


图22

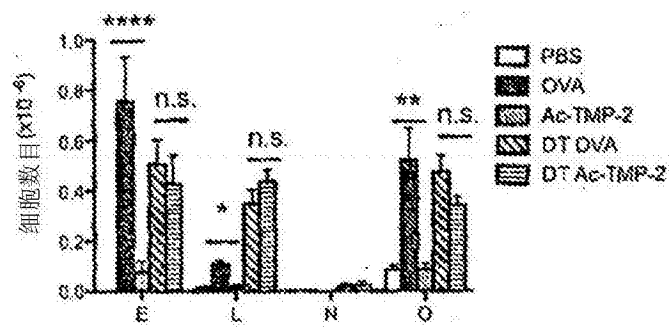


图23

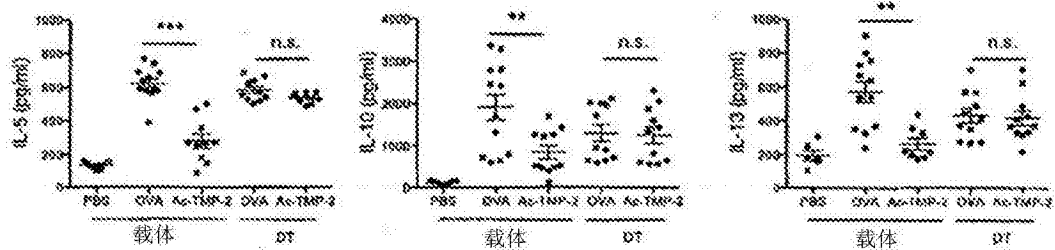


图24

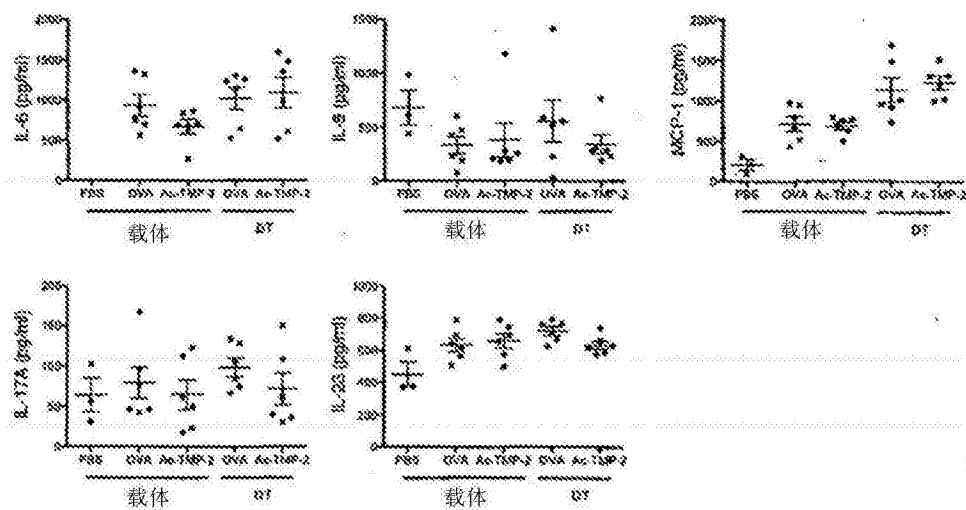


图25