(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113164552 B
(45)授权公告日 2025.06.06

(21)申请号 201980080467.2
(22)申请日 2019.10.03
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113164552 A
(43)申请公布日 2021.07.23
(30)优先权数据
62/741,188 2018.10.04 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/054546 2019.10.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/072805 EN 2020.04.09
(73)专利权人 新泽西州立罗格斯大学
地址 美国新泽西州
(72)发明人 M·C·西拉库萨 J·Y·罗贝热
(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼
(51)Int.Cl.
A61K 38/10(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 38/18(2006.01)
A61K 38/22(2006.01)
(56)对比文件
US 5736517 A,1998.04.07
WO 2009040084 A2,2009.04.02
审查员 韩福平

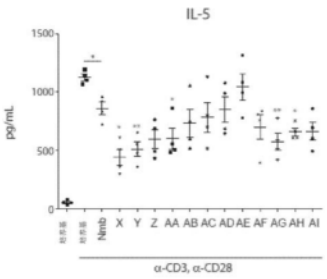
权利要求书1页 说明书57页
序列表19页 附图30页

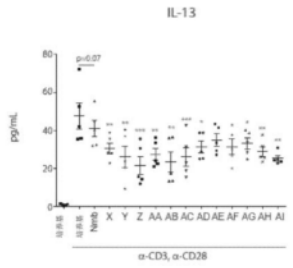
(54)发明名称

使用神经介素肽减少2型细胞因子介导的炎症的方法

(57)摘要

提供了减少2型细胞因子介导的炎症的方法,例如通过使用天然和变体神经介素B(Nmb)肽或编码序列降低IL-5和II-13活性。此类方法可用于治疗炎性病症,例如哮喘、COPD或过敏反应。还提供了修饰的Nmb肽。





CN 113164552 B

1.神经介素B(Nmb)蛋白或编码Nmb蛋白的核酸分子在制备用于治疗哺乳动物受试者中过敏性气道炎症的药物中的用途,

其中所述Nmb蛋白包含SEQ ID NO: 1。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述Nmb蛋白由SEQ ID NO: 1组成。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述核酸分子包含SEQ ID NO: 2。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述核酸分子由SEQ ID NO: 2组成。

5.根据权利要求3或4中任一项所述的用途,其中所述核酸分子为质粒或病毒载体的一部分。

6.根据权利要求5所述的用途,其中所述病毒载体是慢病毒载体或腺相关病毒载体。

7.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述核酸分子与启动子可操作地连接。

8.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物用于注射、口服施用、吸入施用或局部施用。

9.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述哺乳动物受试者是人受试者。

10.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物用于至少两次单独施用治疗有效量的所述Nmb蛋白或所述核酸分子。

11.根据权利要求10所述的用途,其中所述至少两次单独施用间隔至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少一年。

12.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物用于在所述过敏性气道炎症发作的5分钟内、10分钟内、30分钟内、1小时内、2小时内、3小时内、4小时内、5小时内、6小时内、12小时内、24小时内、48小时内、72小时内、96小时内、1周内、2周内、3周内、4周内、1个月内、2个月内或3个月内进行施用。

13.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物用于与治疗有效量的另一种治疗剂联合施用。

14.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物减少炎症、降低IL-5活性、降低IL-13活性、减少ILC2应答、降低嗜酸性粒细胞增多或其组合。

15.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述Nmb蛋白是包含所述Nmb蛋白与细胞穿透肽或免疫球蛋白Fc结构域的融合蛋白。

16.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物上调包含*Sprr2a2*、*Serpinb2*、*Il1b*、*Xist*和*Tsix*的第一组基因中的一个或更多个的表达。

17.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物下调包含*Hgs2*、*Nkg7*、*Klra7*、*P2rx7*、*Ly6c2*和*Mcpt2*的第二组基因中的一个或更多个的表达。

18.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物降低所述受试者的肺中的细胞浸润水平。

19.根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述药物用于与治疗有效量的前列腺素E2(PGE2)联合施用。

使用神经介素肽减少2型细胞因子介导的炎症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年10月4日提交的美国申请号62/741,188的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本申请提供了减少2型细胞因子介导的炎症的方法,例如通过使用天然和变体神经介素肽降低白介素(IL)-5和IL-13活性。在一些实例中,此类方法用于治疗炎性疾病,例如哮喘或过敏反应。

[0004] 致谢政府支持

[0005] 本发明是在美国国立卫生研究院(NIH)授予的R01 AI131634-01的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0006] 以白介素(IL)-4、5、9和13的产生为特征的2型细胞因子应答促进对蠕虫寄生虫的免疫力,启动组织修复并调节代谢健康,但也导致与过敏和哮喘相关的炎症(1-4)。特化的先天免疫细胞群之间的交互作用(cross-talk)可能指导2型细胞因子应答的强度(5)。例如,嗜碱性粒细胞向2型先天淋巴样细胞(ILC2)提供信号,从而促进其产生IL-5和IL-13(6,7)。另外,神经元衍生的肽神经介素U(NMU)直接激活ILC2,从而促进对巴西日圆线虫(Nippostrongylus brasiliensis(Nb))的免疫力(8,9)。然而,免疫系统和神经系统是否通讯以限制2型炎症并促进组织完整性仍没有完全确定。

发明内容

[0007] 本文显示在缺乏嗜碱性粒细胞的情况下,Nb诱导的ILC2应答被夸大,导致炎症增加和肺功能降低。此外,显示出来自嗜碱性粒细胞缺失小鼠的ILC2表达与其增强的激活有关的降低水平的神经介素B(Nmb)受体。Nmb肽的体内施用减少感染诱导的ILC2应答、肺嗜酸性粒细胞和寄生虫清除。此外,用Nmb处理足以降低来自对照小鼠而非嗜碱性粒细胞缺失小鼠的经分类纯化的肺ILC2的IL-5和IL-13表达。此外,Nmb也足以通过激活的2型辅助细胞(T_H2)T细胞减少IL-5和IL-13表达。共同地,这些数据表明嗜碱性粒细胞介导ILC2限制炎症和维持组织完整性所必需的神经元衍生信号产生应答的能力。此外,这些数据还表明,Nmb处理足以减少促进2型炎症的IL-5和IL-13的先天和适应性来源。

[0008] 基于这些观察,本文提供了治疗哺乳动物受试者中的病症(例如炎性病症,例如与不期望的白介素5(IL-5)和/或IL-13产生/活性相关的病症)的方法。在一些实例中,此类方法降低IL-5活性、降低IL-13活性、减少ILC2应答、减少T_H2应答、降低嗜酸性粒细胞增多或其组合,从而治疗病症。可以治疗的示例性病症包括气道病症(例如哮喘、鼻窦炎、特发性肺纤维化、鼻炎、嗜酸性肉芽肿伴多血管炎、嗜酸细胞性食管炎或COPD)和皮肤病症(例如湿疹、特应性皮炎或荨麻疹)。表1提供了其他示例性病症。

[0009] 该方法包括向哺乳动物受试者(例如人或兽医受试者)施用治疗有效量的至少一种神经介素B(Nmb)蛋白,或编码至少一种Nmb蛋白的至少一种核酸分子,从而治疗病症。在一些实例中,至少一种Nmb蛋白与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性。在一些实例中,替代使用Nmb蛋白,使用神经介素C(Nmc)蛋白或编码Nmc蛋白的核酸分子,例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的蛋白。在一些实例中,至少一种核酸分子编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的Nmb蛋白。在其他实例中,核酸分子编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的Nmc蛋白。在一些实例中,使用至少两种不同的Nmb蛋白,例如(1)与SEQ ID NO:3、4、5、6、11、12、13、14、20、22、26、27、28、29、30、31、32、35、36或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的至少一种Nmb蛋白,其不是SEQ ID NO:1和(2)包含与SEQ ID NO:26、27、29、35或36具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的至少一种Nmb蛋白,其不是SEQ ID NO:1。在一些实例中,使用至少两种不同的Nmb蛋白,例如(1)SEQ ID NO:1,和(2)与SEQ ID NO:3、4、5、6、11、12、13、14、20、22、26、27、28、29、30、31、32、35、36或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的至少一种Nmb蛋白,其不是SEQ ID NO:1。在进一步的实例中,使用至少一种Nmb蛋白和至少一种Nmc蛋白。在一些实例中,至少一种核酸分子与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性,并且可以是质粒或病毒载体(例如慢病毒载体或腺相关病毒载体)的一部分。在其中施用核酸分子的实例中,这样的核酸分子可以与启动子(例如组成型启动子)可操作地连接。在一些实例中,施用包括注射(例如,iv、im、ip或皮内)、口服施用、吸入施用或局部施用。

[0010] 在一些实施方案中,该方法上调包含Sprr2a2、Serpinb2、Il1b、Xist和Tsix的第一组基因中的一个或更多个的表达。在其他实施方案中,该方法下调包含Hgs2、Nkg7、Klra7、P2rx7、Ly6c2和Mcpt2的第二组基因中的一个或更多个的表达。在进一步的实施方案中,该方法上调包含Sprr2a2、Serpinb2、Il1b、Xist和Tsix的第一组基因中的一个或更多个的表达,并下调包含Hgs2、Nkg7、Klra7、P2rx7、Ly6c2和Mcpt2的第二组基因中的一个或更多个的表达。在其他实施方案中,该方法降低受试者(例如患有炎性或气道病症的受试者)的肺中的细胞浸润水平。

[0011] 至少一种Nmb或Nmc蛋白或编码至少一种Nmb或Nmc蛋白的至少一种核酸分子可以存在于药物组合物中,例如包含药学上可接受的载体例如水或盐水的药物组合物中。这样的组合物可以包括其他治疗性分子。在一些实例中,向受试者提供治疗有效量的至少一种Nmb或Nmc蛋白或编码至少一种Nmb或Nmc蛋白的至少一种核酸分子的至少两次单独施用,例如间隔至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少一年的至少两次单独施用。在一些实例中,施用在病症发作的5分钟内、10分钟内、30分钟内、1小时内、2小时内、3小时内、4小时内、5小时内、6小时内、12小时

内、24小时内、48小时内、72小时内、96小时内、1周内、2周内、3周内、4周内、1个月内、2个月内或3个月内进行。该方法可以包括向受试者施用治疗有效量的另一种治疗剂(例如,参见表1)。在一些实例中,另外的治疗剂是前列腺素E2(PGE2)。

[0012] 还提供了组合物,该组合物包括分离的Nmb蛋白和脂质体,所述分离的Nmb蛋白包含与SEQ ID NO:1具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性,其中Nmb蛋白被包封在脂质体中。还提供了组合物,该组合物包括分离的Nmb蛋白和和药学上可接受的载体,所述分离的Nmb蛋白包含与SEQ ID NO:1具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。还提供了组合物,该组合物包括分离的蛋白和药学上可接受的载体,所述分离的蛋白包含与SEQ ID NO: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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性,其不是SEQ ID NO:1或38。在一些实例中,这样的组合物包括脂质体,其中非天然Nmb蛋白被包封在脂质体中。还提供了组合物,其包括:(1)与SEQ ID NO:3、4、5、6、11、12、13、14、20、22、26、27、28、29、30、31、32、35、36或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的至少蛋白质,其不是SEQ ID NO:1和/或(2)包含与SEQ ID NO:26、27、29、35或36具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的至少一种蛋白质,其不是SEQ ID NO:1或38。

[0013] 公开的方法和组合物还可以利用融合蛋白或嵌合蛋白(或编码该蛋白的核酸分子),其中Nmb蛋白或Nmc蛋白或非天然Nmb蛋白是包括Nmb蛋白或Nmc蛋白或非天然Nmb蛋白和细胞穿透肽的融合蛋白。Nmb蛋白或Nmc蛋白或非天然Nmb蛋白可以在细胞穿透肽的N或C末端。另外,Nmb蛋白或Nmc蛋白或非天然Nmb蛋白和细胞穿透肽可以通过接头分开。

[0014] 从下面参照附图进行的详细描述,本公开的前述和其他目的和特征和优点将变得更加明显。

附图说明

[0015] 图1A-1F.嗜碱性粒细胞调节蠕虫诱导的炎症。(A),在Nb感染后第7天定量对照组或嗜碱性粒细胞缺失小鼠(baso-dep)中的肠道蠕虫负荷。(B),在Nb感染后第7天,通过实时PCR确定对照和baso-dep小鼠的肺中的2型细胞因子表达。(C),通过用CD200R体内染色确定肺驻留嗜碱性粒细胞。(D),Nb感染后定量肺驻留嗜碱性粒细胞的百分比。(E),在Nb感染后第7天通过苏木精和伊红染色评估肺病理学。(F),通过脉搏血氧仪测定Nb感染后对照和baso-dep小鼠的氧水平。P值由双尾Student t检验确定。

[0016] 图2A-2B.Nb感染后第7天,通过(A)过碘酸希夫染色和(B)苏木精和伊红染色评估肺病理学。(A),将单个图像数字化拼接在一起以提供更大的概览。

[0017] 图3A-3H.嗜碱性粒细胞负调节ILC2应答。在Nb感染后第7天定量对照或baso-dep小鼠的支气管肺泡灌洗(BAL)中的(A)中性粒细胞、(B)嗜酸性粒细胞和(C)中的ILC2。在Nb感染后第7天,对BAL中的谱系阴性、CD90+、CD127+ILC2进行(D)IL-5和(E)IL-13细胞内细胞因子染色,并对细胞因子阳性细胞进行定量。Nb感染后将嗜碱性粒细胞过继转移(i.t.)到baso-dep小鼠中,并定量BAL中的(F)ILC2、(G)IL-5+ILC2和IL-13+ILC2以及(H)嗜酸性粒细

胞的数量。P值由双尾Student t检验确定。

[0018] 图4A-4G.在Nb感染后第7天定量对照或baso-dep小鼠的肺中的(A)中性粒细胞、(B)嗜酸性粒细胞和(C)ILC2。在Nb感染后第7天,对肺中的谱系阴性、CD90+、CD127+ILC2进行(D)IL-5和IL-13细胞内细胞因子染色,并对细胞因子阳性细胞进行定量。Nb感染后将嗜碱性粒细胞过继转移(i.t.)到baso-dep小鼠中,并定量肺中的(E)ILC2、(F)IL-5+ILC2和IL-13+ILC2以及(G)嗜酸性粒细胞的数量。P值由双尾Student t检验确定。

[0019] 图5A-5H.嗜碱性粒细胞促进ILC2上Nmb受体(Nmbr)的表达。Rag2缺陷小鼠用嗜碱性粒细胞缺失抗体Ba103处理,并在Nb感染后第7天定量BAL中的(A)IL-5+ILC2、IL-13+ILC2和(B)嗜酸性粒细胞的数量。在Nb后第7天,对来自对照或嗜碱性粒细胞缺失小鼠的肺的分选纯化ILC2进行核糖核酸(RNA)测序分析。(C),维恩图示出了在对照或baso-dep ILC2之间以2.0倍或更高差异表达的基因。对对照ILC2中富含的899个基因进行DAVID通路分析。(D),对照ILC2中富含的基因,其定义类视紫红质通路。在Nb后第7天,通过实时PCR确定对照或baso-dep小鼠的肺中的(E)Mcpt8、(F)Nmb和(G)Nmbr表达。(H)在Nb后第7天,通过对照或从肺中分选纯化的baso-dep ILC2的Nmbr的表达。P值由双尾Student t检验确定。

[0020] 图6A-6E.Nmb抑制2型细胞因子应答。(A),用PBS或Nmb处理(i.t.)Nb感染的小鼠,并定量BAL中的ILC2。(B)在Nb后第7天通过实时PCR测定在PBS或Nmb处理的小鼠的肺中的IL-5和IL-13的表达。(C)定量BAL中的嗜酸性粒细胞,并(D)在Nb感染后第7天确定蠕虫负荷。在Nb后第7天从对照或baso-dep小鼠的肺中分选纯化ILC2,并在存在或不存在Nmb的情况下与IL-2和IL-7培养(O/N),并(E)通过ELISA测定培养上清液中的IL-5和IL-13水平。P值由双尾Student t检验确定。

[0021] 图7A-7I.Nmb处理足以抑制过敏性气道炎症。用PBS或Nmb(i.t.)处理木瓜蛋白酶激发的小鼠,并评价(A)肺ILC2、(B)IL-5+和IL-13+ILC和(C)嗜酸性粒细胞。(B)在Nb后第7天分离肠系膜淋巴结(MLN),在存在或不存在Nmb的情况下,用抗CD3和抗CD28处理单细胞悬液48小时,和通过ELISA在无细胞上清液中定量(E)IL-5和(F)IL-13。(F-I),检测Nmb的修饰形式(参见表2)改变从Nb后第7天分离的抗CD3和抗CD28 MLN细胞产生IL-5和IL-13的能力。P值由双尾Student t检验确定。蓝色星号表示培养基处理的对照和天然Nmb之间的比较。红色星号表示培养基处理的对照和Nmb的修饰形式之间的比较,如表2所示。(*,$p<0.05$),(**,$p<0.01$),(***,$p<0.001$)或(F-I)。

[0022] 图8A-8B.在Nb后第7天分离肠系膜淋巴结(MLN),在存在或不存在天然Nmb或肽的修饰形式的情况下,用抗CD3和抗CD28处理单细胞悬液48小时,和通过ELISA定量无细胞上清液中的(A)IL-5和(B)IL-13。P值由双尾Student t检验确定。蓝色星号表示培养基处理的对照和天然Nmb之间的比较。红色星号表示培养基处理的对照和Nmb的修饰形式之间的比较,如表2所示。(*,$p<0.05$),(**,$p<0.01$),(***,$p<0.001$)。

[0023] 图9.嗜碱性粒细胞调节NMBR表达。从Nb感染小鼠的肺中分选纯化ILC2(第7天),并用存活细胞因子(IL-7和IL-2)以及激活的嗜碱性粒细胞、IL-4或IL-33刺激过夜。培养后通过流式细胞术分析监测NMBR表达。数据表示为几何平均荧光强度(GMFI)。使用Student t检验进行统计比较。

[0024] 图10A-10B.NMB抑制从IL-33激活的ILC2的2型细胞因子产生。从Nb感染小鼠的肺中分选纯化ILC2(第7天),并在存在或不存在Nmb和/或IL-33的情况下与存活细胞因子(IL-

2、IL-7)培养。在过夜培养后,通过标准ELISA检测上清液的IL-5(图10A)和IL-13(图10B)的存在。使用Student t检验进行统计比较。

[0025] 图11A-11B.需要造血细胞上的NMBR介导的信号传导以调节2型细胞因子产生。对从天然或Nb感染的(第7天)Vav1-Cre、NMBR-floxed或Vav1-Cre-NMBR-floxed小鼠的BAL中分离的ILC2进行IL-5(图11A)和IL-13(图11B)细胞内染色。使用Student t检验进行统计比较。

[0026] 图12.需要造血细胞上的NMBR介导的信号传导来调节肺中的细胞浸润。评价天然或Nb感染的(第7天)、Vav1-Cre、NMBR-floxed或Vav1-Cre-NMBR-floxed小鼠的肺病理学(H&E染色)。

[0027] 图13.NMBR由几种免疫细胞群表达。对天然(实心符号)和Nb感染的小鼠(第7天)(空心符号)中各种免疫细胞群上NMBR的表达进行评价。淋巴细胞(lymphs)、肺泡巨噬细胞(Alv Macs)、非肺泡巨噬细胞(NAM)、嗜酸性粒细胞(Eos)和中性粒细胞(Neuts)。

[0028] 图14.前列腺素E2上调淋巴细胞上的NMBR的表达。在Nb后第7天从小鼠肺中分选纯化肺ILC2,并与存活细胞因子(IL-2和IL-7)和/或激活细胞因子(IL-25和IL-33)联合培养。另外,用NMB或前列腺素E2(PGE2)处理培养物,并在培养后第4天通过流式细胞术分析测量NMBR的表达。使用Student t检验进行统计分析。还显示了由同种型对照抗体确定的阴性NMBR染色(Isot)。

[0029] 序列表

[0030] 如37C.F.R.1.822所定义,随附序列表中列出的核酸和氨基酸序列使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码显示。每个核酸序列仅显示一条链,但是互补链应理解为包括对显示链的任何提及。

[0031] SEQ ID NO:1是示例性天然人Nmb蛋白序列。

[0032] SEQ ID NO:2是天然人Nmb的示例性编码序列。

[0033] SEQ ID NO:3-37是示例性的非天然Nmb蛋白序列。

[0034] SEQ ID NO:38是示例性的天然人神经介素C蛋白序列。

[0035] SEQ ID NO:39-58是示例性的细胞穿透肽。

具体实施方式

[0036] 除非另有说明,否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义可以在Benjamin Lewin,Genes VII,由Oxford University Press出版,1999;Kendrew等人(编辑),The Encyclopedia of Molecular Biology,由Blackwell Science Ltd.出版,1994;和Robert A.Meyers(编辑),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc.出版,1995;和其他类似的参考文献中找到。

[0037] 如本文所用,单数形式“a”、“an”和“the”既指单数也指复数,除非上下文另外明确指出。如本文所用,术语“包含”是指“包括”。因此,“包含Nmb肽”是指“包括Nmb肽”而不排除其他要素。应当进一步理解,否则针对核酸给出的任何和所有碱基大小都是近似的,并且出于描述目的而提供,除非另外指出。虽然可以使用与本文所述的那些相似或等同的许多方法和材料,但下面描述特别合适的方法和材料。在发生冲突的情况下,以本说明书(包括术

语解释)为准。另外,材料、方法和实施例仅是说明性的而不旨在是限制性的。所有参考文献,包括专利申请和专利以及与所列GenBank®登录号相关的序列(截至2018年10月4日)的全部内容通过引用并入本文。

[0038] 为了促进审阅本公开的各种实施方案,提供了以下对特定术语的解释:

[0039] I.术语

[0040] 施用:通过任何有效途径向受试者提供或给予试剂,例如Nmb核酸分子或蛋白质。示例性的施用途径包括但不限于注射(例如静脉内、肌内、皮内、腹膜内或注射到CNS,例如注射到脊柱或脑内)、口服、经鼻、经皮、阴道、直肠、或吸入。

[0041] 气雾剂:细固体或液体颗粒的任何气态悬浮液。因此,术语"雾化的"是指呈分散或悬浮在空气或气体中的微观固体或液体颗粒的形式。在一个实例中,微观固体具有1μm至20μm的质量中值空气动力学直径。术语"喷雾"是指将(液体)转化为细雾或雾化的行为。因此,术语"干粉气雾剂"是指悬浮在气体(通常是空气)中的任何微观固体。也有可能将所公开的组合物(例如包括Nmb核酸分子或蛋白质的那些)配制成缓释制剂。气雾剂递送是指配制为气雾剂的试剂(例如Nmb核酸分子或蛋白质)的施用(例如至气道)。

[0042] 气道病症或疾病:通常,气道病症/疾病包括与肺气道有关的任何病症/疾病。在特定的非限制性实例中,肺部病症/疾病是哮喘或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。

[0043] 过敏原:引起过敏应答或反应的任何物质。常见的过敏原包括灰尘、花粉、植物、宠物(例如,猫或狗皮屑)、药物、某些食物(例如,蛋类、牛奶、花生、贝类)、昆虫毒液、病毒或细菌。(有害的)反应可能是通过食入、吸入、注射或与皮肤接触使受试者暴露后引起的。可以使用所公开的方法来治疗任何过敏原。

[0044] 过敏反应(allergic reaction):一种超敏反应(例如,对通常无害的实体)的形式,其特征在于IgE过度激活肥大细胞和嗜碱性粒细胞,导致极端的炎症应答。常见的过敏反应包括湿疹、荨麻疹、枯草热、哮喘、食物过敏以及对带刺昆虫(诸如黄蜂和蜜蜂)的毒液的反应。

[0045] 酰胺化或酰胺衍生物:翻译后修饰以形成酰胺,例如Nmb肽(例如SEQ ID NO:1和3-37中的任一个)或Nmc肽(例如SEQ ID NO:38)。因此,在一些实例中,本文提供的Nmb或Nmc肽是酰胺化的,并且可以在公开的方法中使用。在酰胺化中,C末端氨基酸(肽-COOH)经修饰以形成酰胺(肽-$CONH_2$)。酰胺可以通过翻译后的C末端酰胺化而形成。待修饰的氨基酸可以后接甘氨酸,其提供酰胺基。在一些实例中,酰胺增加了Nmb或Nmc肽的生物活性。

[0046] 严重过敏反应(anaphylaxis):代表最严重的全身过敏反应的临床综合征。它是由于在先前致敏的个体中暴露于特定抗原后肥大细胞和/或嗜碱性粒细胞介体(包括2型细胞因子)的免疫诱导的释放所致。尽管任何物质都有可能引起严重过敏反应,但IgE介导的严重过敏反应的最常见原因是虫叮、药物、乳胶、花生和树坚果(例如,核桃、榛子、杏仁、腰果、山核桃和开心果)、贝类和鱼类、奶类、蛋类和小麦。当通过激活的ILC2和T_H2细胞产生2型细胞因子时,产生IgE,从而启动嗜碱性粒细胞和肥大细胞对随后暴露于过敏原的应答。还发生运动诱导的严重过敏反应和特发性过敏反应,由不同的机制介导。在一些实例中,公开的方法(例如,施用Nmb肽)用于治疗或预防严重过敏反应。

[0047] 哮喘:哮喘是涵盖性术语,描述了呼吸系统的许多综合征或表型。在这些病症中,气道收缩、发炎及伴有过量粘液,通常响应于一种或更多种"触发因素",例如暴露于环境刺

激物(或过敏原)、化学品、冷空气、运动、或病毒、或由于完全未知的原因。这种气道狭窄引起症状,诸如喘息、呼吸短促、胸闷和咳嗽。该病症是一种慢性或复发性炎症病况,其中气道对各种刺激的反应性增强,其特征在于支气管高反应性、炎症、粘液产生增加和间歇性气道阻塞。在更严重受影响的患者中,阻塞可能变得固定而不是间歇性的。在典型的过敏性哮喘反应中,由Th2炎症过程形成的IgE抗体主要附着在位于与细支气管和小支气管紧密相关的肺间质中的肥大细胞。触发细胞导致多种物质释放,包括但不限于细胞因子、趋化因子和花生四烯酸衍生的介体,导致支气管收缩、气道高反应性、粘液分泌过多和气道炎症。然而,并非所有哮喘都是过敏性的,并且有充分的证据表明患有更严重哮喘形式的患者不仅出现Th2炎症,而且还出现Th1炎症。

[0048] 国际指南定义轻度哮喘为间歇性症状、相对正常的肺功能和很少加重。所公开的Nmb核酸分子和肽可以用于治疗轻度哮喘,例如与低剂量的吸入型皮质类固醇(CS)或支气管扩张剂联合使用。中度哮喘定义为更持久和更严重的症状,偶发加重和/或肺功能恶化。所公开的Nmb核酸分子和肽可以用于治疗中度哮喘,例如与更高剂量的吸入型CS和长效β激动剂(LABA)或白三烯素拮抗剂联合使用。在ATS-ERS重度哮喘指南中重度哮喘定义为:需要接受高剂量吸入型CS联合控制剂(LABA或白三烯素拮抗剂)进行治疗,或使用全身性CS以保持疾病控制(加重较低、症状少、肺功能更好),或者即使进行这些治疗也无法获得控制的哮喘。所公开的Nmb核酸分子和肽可以用于治疗重度哮喘,例如与此类试剂联合使用。

[0049] 支气管扩张剂:扩张支气管或细支气管的解痉剂或其他试剂。支气管扩张剂使气道平滑肌松弛,使得气道扩张。支气管扩张药通常不能抵抗炎症。实例包括短效(例如,沙丁胺醇)和长效(例如,福莫特罗)β-2肾上腺素能激动剂,以及抗胆碱能药(例如,噻托溴铵和异丙托溴铵)。

[0050] 细胞渗透性:分子穿过细胞膜(例如哺乳动物细胞)的能力。在一些实例中,细胞渗透性包括通过各种运输方式的渗透性,例如被动扩散和转运蛋白介导的渗透。某些试剂可增强细胞渗透性(即,细胞渗透性增强剂),包括肽,例如细胞穿透肽,例如标签中所包括的;基于蛋白质的试剂,例如孔或通道形成蛋白质;基于病毒的试剂;基于脂质或聚合物的试剂;或无机试剂。在一个实例中,Nmb肽(诸如SEQ ID NO:1和3-37中的任一个)包括增加其细胞渗透性的标签,例如肽标签(也称为细胞穿透肽(CPP))(例如转录反式激活因子TAT,例如TAT_{48-57}、TAT_{47-57}或TAT_{49-57};穿膜肽(penetratin);Pep-1;P物质,SP;聚精氨酸,例如R5-R12;pVEC;转运素(transportan);MAP;diatos肽载体1047、DPV1047、VECTOCELL®;MPG;ADP核糖基化因子,ARF,例如ARF_{1-22};BPrPr(例如$BPrPr_{1-28}$);p28;VT5;Bac 7,例如Bac_{1-24};C105Y;PFVYLI(SEQ ID NO:58);Pep-7、SynB1[RGGRLSYSRRRFSTSTGR;SEQ ID NO:39]、SynB3[RRLSYSRRRF;SEQ ID NO:40]、PTD-4[PIRRRKKLRRLK;SEQ ID NO:41]、PTD-5[RRQRRTSKLMKR;SEQ ID NO:42]、FHV Coat-(35-49)[RRRRNRTRRNRRRVR;SEQ ID NO:43]、BMV Gag-(7-25)[KMTRAQRRAAARRNRWTAR;SEQ ID NO:44]、HTLV-II Rex-(4-16)[TRRQRTRRARRNR;SEQ ID NO:45]、D-Tat[GRKKRRQRRRPPQ;SEQ ID NO:46]、R9-Tat GRRRRRRRRRPPQ[SEQ ID NO:47]和穿膜肽[RQIKWFQNRRMKWKK;SEQ ID NO:48])、两亲性多肽(例如,MAP[KLALKLALKLALALKLA;SEQ ID NO:49]、SBP[MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV;SEQ ID NO:50]、FBP[GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV;SEQ ID NO:51]、MPG ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:52]、MPG(ΔNLS)[ac-

GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-cya;SEQ ID NO:53]、Pep-2[ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:54]和转运素[GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL;SEQ ID NO:55])、周期序列(例如pVec、聚精氨酸RxN(4<N<17)嵌合体、聚赖氨酸KxN(4<N<17)嵌合体、(RAca)6R、(RAbu)6R、(RG)6R、(RM)6R、(RT)6R、(RS)6R、R10、(RA)6R、R7和pep-1[ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:56])和Cr10(环状pol-精氨酸CPP),或编码此类肽标签的核酸。

[0051] 嵌合或融合蛋白:包括第一肽(例如,Nmb)和第二肽(例如,细胞穿透肽)的蛋白质,其中第一和第二蛋白质不同。嵌合多肽还包括包含两个或更多个衍生自相同多肽的不连续部分的多肽。在一些实例中,嵌合蛋白包括Nmb/细胞穿透肽融合蛋白,其中细胞穿透肽位于Nmb的N或C末端。两种或更多种不同的肽可以直接或间接地连接,例如使用接头(例如1-30个氨基酸)。

[0052] 慢性阻塞性肺病:一种类型的阻塞性肺病,其特征在于长期呼吸问题和通气不畅。通气受限通常是进行性的,并与肺部对有害颗粒或气体的异常炎症反应有关。主要症状包括呼吸短促和咳嗽伴痰液产生。吸烟是COPD的最常见原因。所公开的Nmb核酸分子和肽可以用于治疗COPD,例如与支气管扩张药、皮质类固醇、抗生素、补氧或其组合联合使用。

[0053] cDNA(互补DNA):缺少内部、非编码片段(内含子)和决定转录的调控序列的DNA片段。cDNA可以从信使RNA逆转录合成。

[0054] 接触:以直接物理结合放置,包括固体或液体形式。接触可以在体外或离体发生,例如,通过将试剂添加至样品(例如含有ILC2细胞的一种),或通过向受试者施用而在体内发生。

[0055] 对照:参考标准。在一些实施方案中,对照是健康受试者。在其他实施方案中,对照是患有表1所列病症的受试者。在其他实施方案中,对照是历史对照或标准参考值或值的范围(例如,具有已知预后或结局的先前测试的对照受试者或代表基线或正常值的受试者组)。测试受试者和对照之间的差异可以增加或减少。该差异可以是定性差异或定量差异,例如统计学上显著的差异。在一些实例中,差异是相对于对照增加或减少至少约5%,例如至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%、至少约300%、至少约350%、至少约400%、至少约500%或大于500%。

[0056] 简并变体:编码肽的核苷酸,例如Nmb,其包含因遗传密码而简并的序列。有20种天然氨基酸,其中大多数由多于一种密码子指定。因此,所有简并的核苷酸序列都包括在本公开内容中,只要由核苷酸序列编码的肽的氨基酸序列不变。

[0057] 有效量或治疗有效量:足以在例如待治疗的受试者中产生有益或期望结果的试剂(例如,Nmb蛋白或编码Nmb的核酸分子)的量。例如,这可以是减轻或抑制炎症(例如,2型细胞因子介导的炎症)、哮喘发作、过敏反应、改善症状和肺功能或其组合所必需的Nmb蛋白或编码Nmb的核酸分子的量。当施用于受试者时,通常将使用达到靶组织浓度(例如,在气道中)的剂量,其已被证实实现期望的体内作用。

[0058] 治疗有效量可以根据以下一项或更多项而变化:受试者和待治疗的疾病状况、受试者的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式等,其可以由本领域普通技术人员来确定。有益治疗作用可以包括疾病、症状、病症或病理状况的改善;减少或预防疾病、症状、病症或病况的发作;并且通常抵抗疾病、症状、病症或病理状况。在一个实施方案中,“有效量”

是足以实现以下的量:(1)减少炎症(例如在肺部或过敏反应部位),例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(2)减少IL-5(例如在ILC2和/或T细胞中),例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(3)减少IL-13(例如在ILC2和/或T细胞中),例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(4)减少ILC2和/或T细胞应答,例如存在、增殖和/或激活的ILC2和/或T细胞数量,例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,和/或(5)减少嗜酸性粒细胞增多(例如在肺或外周血中),例如,相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%。

[0059] 嗜酸性粒细胞增多:外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过约450-500细胞/μL(例如,通过全血细胞计数(CBC)确定的)或组织病理学检查中观察到的非血液组织嗜酸性粒细胞计数增加的病况。嗜酸性粒细胞通常占少于5-7%的循环白细胞。示例性原因包括过敏反应和寄生虫感染。

[0060] 祛痰药:诱导从肺和气道中排出粘液、痰和其他液体(例如通过咳嗽)的药物或化学物质。此类试剂的一个实例是愈创甘油醚。

[0061] 增加或减少:相对于对照值(例如,用Nmb蛋白或核酸分子治疗前的值,或未经Nmb蛋白或核酸分子治疗的患有类似病症的受试者中的值)的数量分别在统计学上显著的正或负变化。增加是正变化,例如与对照值相比增加至少50%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。减少是负变化,例如与对照值相比减少至少20%、至少25%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或至少100%。在一些实例中,减少小于100%,例如减少不大于90%、不大于95%或不大于99%。

[0062] 2型先天性淋巴样细胞(ILC2):一种类型的先天性淋巴细胞,衍生自常见的淋巴样祖细胞。这些细胞由于缺乏重组激活基因而缺乏抗原特异性B或T细胞受体。ILC2产生2型细胞因子(例如IL-4、IL-5、IL-9、IL-13)。

[0063] 白介素5(IL-5):(例如,OMIM 147850):由2型辅助细胞(Th2细胞)、ILC2细胞和肥大细胞产生的白介素。IL-5刺激B细胞生长并增加免疫球蛋白分泌,主要是IgA。它还介导嗜酸性粒细胞激活。I1-5与多种过敏性疾病的病因有关,包括过敏性鼻炎和哮喘。靶向IL-5的示例性药物包括美泊利单抗、贝那利珠单抗和瑞利珠单抗,其可以与本文公开的Nmb蛋白或核酸分子联合使用,例如,以治疗哮喘(例如,嗜酸性粒细胞性哮喘)或嗜酸性肉芽肿伴多血管炎(EGPA)。

[0064] IL-5序列可公开获得,例如可从GenBank®序列数据库(例如,登录号NP_000870.1(成熟肽aa 20-134)、CAA29607.1和NP_001006951.1提供示例性IL-5蛋白序列,而登录号NM_000879.2,X06271.1和NM_001006950.1提供示例性IL-5核酸序列)公开获得。涵盖IL-5变体,例如与这些登录号具有至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的那些。

[0065] 白介素13(IL-13)(例如,OMIM 147683):由Th2细胞、CD4细胞、自然杀伤性T细胞、

肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和ILC2细胞分泌的细胞因子。IL-13是IgE合成、杯状细胞增生、粘液分泌过多、气道高反应性、纤维化和几丁质酶上调的主要调节物。它是过敏性炎症和各种疾病(包括哮喘)的介体。靶向IL-13的示例性药物包括曲罗芦单抗(tralokinumab)和来瑞组单抗(lebrikizumab),其可以与本文公开的Nmb蛋白或核酸分子联合使用,例如以治疗哮喘、特应性皮炎或霍奇金淋巴瘤。

[0066] IL-13序列可公开获得,例如,可从GenBank®序列数据库(例如,登录号NP_002179.2(成熟肽aa 21-132)、NP_032381.1(成熟肽aa 22-131)和NP_446280.1(成熟肽aa 21-131)提供了示例性的IL-13蛋白序列,而登录号NM_002188.2、NM_008355.3和NM_001003384.1提供了示例性的IL-13核酸序列)公开获得。涵盖IL-13变体,例如与这些登录号具有至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的那些。

[0067] 吸入器:通过吸入施用蒸气或挥发药物的设备。吸入器通常用于在气道内局部施用药物,例如以治疗哮喘。在一些实例中,吸入器是干粉吸入器。在其他实例中,吸入器是计量剂量吸入器。在一些实例中,吸入器包括本文公开的Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1、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或37中的任一个)或编码此类的核酸分子(例如SEQ ID NO:2)(或含有诸如核酸分子的载体)。

[0068] 抑制:为了减少、限制或阻断分子的作用或功能。在实例中,IL-5和/或IL-13活性(例如蛋白表达)被本文公开的Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1、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或37中的任一个)或编码此类的核酸分子(例如SEQ ID NO:2)(或含有诸如核酸分子的载体)降低或抑制。例如,本文公开的Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1、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或37中的任一个)或编码此类的核酸分子(例如SEQ ID NO:2)(或包含诸如核酸分子的载体)将IL-5和/或IL-13活性例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子降低或抑制至少10%、至少20%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%。

[0069] 分离的:“分离的”生物组分(例如,蛋白质或核酸或细胞)已与其中存在该组分的生物体的细胞或组织中的其他生物组分(例如其他细胞、染色体和染色体外DNA和RNA以及蛋白质)基本分离、分开生产或从其中纯化。已被“分离”的核酸分子和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸分子和蛋白质。该术语还涵盖通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质(例如,Nmb蛋白和核酸分子)以及化学合成的核酸和蛋白质。在一些实例中,分离的Nmb蛋白、Nmb核酸或细胞(例如ILC2细胞)的纯度为至少50%,例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少100%的纯度。

[0070] 接头或间隔子:将两个或更多个部分(例如,其中一个部分是Nmb肽)连接(例如,共价连接)在一起但不具有特定生物学活性并且未对该部分的活性或功能造成不利影响的分子。接头优选具有生物相容性。可以选择接头以提供或影响连接的部分的性质,例如部分的折叠、构象、疏水性和/或空间形成。在一些实例中,接头在每个末端包括反应性位点,每个末端各自可与本文所述的化合物中包括的部分之一形成共价键。在一些实例中,接头包括肽、直链或支链碳接头或杂环碳接头。

[0071] 雾化器:将药物的液体形式转变为可吸入的细雾(气雾剂)的装置,例如,用于将药物(例如包含Nmb蛋白或核酸的药物)递送到呼吸道深部。

[0072] 神经介素B(Nmb):(例如,OMIM 162340):包括神经介素A、B、C、K、L、N、S和U的肽的神经介素家族的一部分。Nmb是在哺乳动物的中枢神经系统、肺、胃肠道和脂肪组织中表达的蛙皮素相关的肽。Nmb通过与其高亲和力细胞表面受体神经介素B受体(NMBR)结合而起作用。据报道,在与其受体结合后,Nmb调节细胞生长、体温、血压和葡萄糖水平。本文证实Nmb也可以减少二型细胞因子介导的炎症,例如通过减少IL-5和IL-13的表达。

[0073] Nmb十肽的序列在哺乳动物物种中高度保守:GNLWATGHFM(SEQ ID NO:1),并且可以由序列ggcaacctctgggccaccggtcacttcatg(SEQ ID NO:2)编码。这种十肽有时被称为神经介素B或神经介素B 23-32。

[0074] 可以鉴定的来自十肽的全长Nmb序列可公开获得,例如从GenBank®序列数据库(例如,登录号AAA59934.1、AAH28490.1和A37178提供了示例性的蛋白质序列,而登录号BC007407.2、BC028490.1和EU375564.1提供了示例性的核酸序列)。使用本文提供的方法可以生成Nmb变体,例如与SEQ ID NO:1,例如SEQ ID NO: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和37中的任一个具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的那些,并用于生成治疗性重组核酸分子和蛋白质,例如以治疗炎性疾病,如表1所列的那些。

[0075] 非天然存在或工程化的:本文中可互换使用的术语,并且表示人为介入。当提及核酸分子或多肽(例如Nmb分子)时,该术语表示核酸分子或多肽至少基本上不含至少一种在自然界中与它们天然缔合的和如在自然界中发现的其他组分。另外,这些术语可以指示核酸分子或多肽,例如变体Nmb分子,是具有自然界中未发现的序列的核酸分子或多肽。

[0076] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列(例如Nmb十肽编码序列)的转录或表达,则该启动子与编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,在同一阅读框中。

[0077] 药学上可接受的载体:使用的药学上可接受的载体是常规的。Remington'sPharmaceutical Sciences,by E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,22nd Edition,2013描述了适用于本文公开的Nmb蛋白的药物递送的组合物和制剂。

[0078] 通常,载体(carrier)的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射的流体,其包括药学和生理学上可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为溶媒。对于固体组合物(例如散剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规的无毒固体载体可以包括例如,药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物中性载体外,待施用的药物组合物还可包含少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0079] 多肽、肽和蛋白质:这些术语在本文中可互换使用,是指任何长度的氨基酸的聚合物,例如通过酰胺键(CONH)化学结合在一起的氨基酸。该聚合物可以是直链或支链的,它可以包含修饰的氨基酸,并且可以被非氨基酸中断。该术语还涵盖已经修饰的(例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、或任何其他操作,例如与标记组分缀合)氨基酸聚合物。

如本文所用,术语“氨基酸”包括天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸和D或L光学异构体,以及氨基酸类似物和拟肽。在一些实例中,肽是Nmb肽,例如Nmb十肽。

[0080] 纯化的:术语“纯化的”不需要绝对的纯度;相反,它旨在作为相对术语。因此,例如,纯化的核酸是其中在细胞内核酸比其天然环境中的核酸更富集的一种。类似地,纯化的肽制剂是其中蛋白质比例如细胞中的蛋白质更富集的肽制剂。基本上纯化表示从其他蛋白质或细胞组分纯化。在一个实施方案中,纯化(或分离)制剂使得本文公开的Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1、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和37中的任一个)表示至少50%(例如但不限于70%、80%、90%、95%、98%或99%)的制剂的总蛋白质含量。本文公开的Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1、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和37中的任一个)可以通过任何方法进行纯化(和/或合成)(参见例如,Guide to Protein Purification,ed.Deutscher,Meth.Enzymol.185,Academic Press,San Diego,2nd Edition,2009;和Scopes,Protein Purification:Principles and Practice,Springer Verlag,New York,3rd Edition,1994)。

[0081] 序列同一性/相似性:氨基酸(或核苷酸)序列之间的相似性以序列之间的相似性表示,另外称为序列同一性。序列同一性经常用百分比同一性(或相似性或同源性)来衡量;百分比越高,两个序列相似性越大。

[0082] 用于比较和比对算法的序列比对方法描述在:Smith and Waterman,Adv.Appl.Math.2:482,1981;Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.48:443,1970;Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444,1988;Higgins and Sharp,Gene 73:237,1988;Higgins and Sharp,CABIOS 5:151,1989;Corpet et al.,Nucleic Acids Research 16:10881,1988;and Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444,1988.Altschul et al.,Nature Genet.6:119,1994中,提出了序列比对方法和同源性计算的详细考虑。

[0083] NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST)(Altschul et al.,J.Mol.Biol.215:403,1990)可从多个来源(包括美国国家生物技术信息中心(NCBI,Bethesda,MD)和互联网上)获得,用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。互联网的NCBI网站上提供了有关如何使用此程序确定序列同一性的说明。

[0084] 蛋白质和核酸序列(包括本文提供的Nmb序列)的变体通常特征在于拥有使用NCBI Blast 2.0将有缺口的blastp设置为默认参数,在与氨基酸序列进行的全长比对中计数的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少有96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。为了比较大于约30个氨基酸的氨基酸序列,使用默认BLOSUM62矩阵设置为默认参数,采用Blast 2序列函数(缺口存在成本为11,且每个残基缺口成本为1)。比对短肽(少于约30个氨基酸)时,可使用Blast 2序列函数进行比对,采用PAM30矩阵设置为默认参数(开放缺口9,延伸缺口1罚分)。在这样的短窗口上确定序列同一性的方法可在互联网上的NCBI网站上获得。这些序列同一性范围仅用于指导;完全有可能获得超出所提供范围的非常重要的同源物。

[0085] 受试者:哺乳动物,例如人或兽医受试者。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿、人类、农场动物、运动动物和宠物。在一个实施方案中,受试者是非人类哺乳动物受试者,例如猴

或其他非人灵长类动物、小鼠、大鼠、兔、猪、山羊、绵羊、狗、猫、野猪、公牛、马或母牛。在一些实例中,受试者是实验室动物/生物体,例如小鼠、兔或大鼠。在一些实例中,受试者患有炎性病症,例如表1中所列的炎性病症(例如,哮喘、COPD或过敏反应)。

[0086] 治疗(treating或treatment):是指改善与疾病或病理相关的疾病或病理状况(例如表1中所列的那些,例如气道病症,例如哮喘或慢性阻塞性肺病或过敏反应)的体征或症状的治疗性干预。治疗还可以诱导缓解或治愈这种病况。在特定的实例中,治疗包括减轻炎症。

[0087] 减轻或抑制与疾病(例如表1中列出的气道疾病或其他病症)有关的体征或症状可以例如,通过易感受试者中疾病的临床症状的延迟发作、疾病的某些或所有临床症状的严重性的减轻、疾病进展较慢(例如,通过延长患有疾病的受试者的寿命)、疾病复发次数的减少、受试者的总体健康状况或幸福感的改善,或通过本领域公知的特异于特定疾病的其他参数来证实。

[0088] 可以通过客观或主观参数评估治疗;包括体格检查的结果和其他临床检测等。在一个实例中,使用公开的方法进行治疗(1)减少炎症(例如在肺中或过敏反应部位),例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(2)减少IL-5(例如在ILC2和/或T细胞中),例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(3)减少IL-13(例如在ILC2和/或细胞中),例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(4)减少ILC2和/或T细胞应答,例如存在、增殖和/或激活的ILC2和/或T细胞数量,例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,和/或(5)减少嗜酸性粒细胞增多(例如在肺或外周血中),例如,相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%。

[0089] 在足以进行以下的条件下:用于描述允许期望的活性的任何环境的短语。在一个实例中,这包括施用足以允许期望的活性(例如,减轻与IL-5和/或IL-13相关的炎症)的有效量的组合物,该组合物包含本文公开的一种或更多种Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1、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和37中的一种或更多种)或编码此类的核酸分子(例如SEQ ID NO:2)(或含有诸如核酸分子的载体)。

[0090] 单位剂量:物理上离散的单元,其包含预定量的活性物质,该活性物质计算可单独或共同产生期望的效果,例如治疗效果。可以使用单个单位剂量或多个单位剂量来提供期望的效果,例如病症的治疗,例如表1中所列的病症,例如哮喘、COPD或过敏反应。

[0091] 载体(vector):引入到细胞中的核酸分子,从而产生转化的细胞。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可包含一个或更多个治疗基因(例如编码本文提供的Nmb肽的一种)和/或选择标记基因和其他遗传元件。载体可以转导、转化或感染细胞,从而使细胞表达不同于细胞固有的那些的核酸和/或蛋白质。载体任选地

包括有助于实现核酸进入细胞内的材料,例如病毒颗粒、脂质体、蛋白质涂层等。在一个实例中,载体是病毒载体,例如AAV或慢病毒载体。

[0092] II.概述

[0093] 嗜碱性粒细胞能够通过产生IL-4以放大2型细胞因子应答,并具有促进其他细胞类型(包括ILC2和TH2细胞)激活的能力(2,5,10)。此外,嗜碱性粒细胞是蠕虫感染或诱发过敏性炎症后的2型细胞因子介导的炎症的共同特征(2,10)。尽管嗜碱性粒细胞应答是2型炎症的标志,但这些神秘细胞在调节2型应答中所起的一种或更多种作用仍存在争议。例如,尽管嗜碱性粒细胞群在Nb感染后迅速扩大,但这些细胞的缺失对抗蠕虫免疫力和寄生虫清除几乎没有影响(2,11)。因此,Nb诱导的嗜碱性粒细胞无助于寄生虫清除,但可能执行其他未识别的功能。

[0094] 本文提供的数据确定了能够负调节ILC2和T_H2细胞应答的神经系统和免疫系统之间交互作用的先前未曾认识到的方面。先前的研究表明胆碱能神经元表达神经介素U可以促进ILC2的激活并增强对蠕虫寄生虫的免疫力(8,9),这表明神经系统和免疫系统可以允许最佳感测和清除病原体的方式协作。此处提出的研究表明,随着神经系统和免疫系统的共同进化,他们还开发了通过神经介素B信号传导负调节炎症应答的机制,以助于维持组织完整性。此外,本文的数据确定了额外的复杂性水平,并表明嗜碱性粒细胞通过免疫细胞促进Nmbr的表达,从而使它们能够接收神经元衍生的信号。因此,其他特异性固有免疫细胞有助于介导神经元与产生2型细胞因子的免疫细胞之间的交流。数据进一步表明,前列腺素E2(PGE2)促进淋巴细胞表达Nmbr。由于嗜碱性粒细胞是PGE2的有效来源,因此这些数据表明嗜碱性粒细胞调节Nmb通过PGE2抑制炎症的能力。这些数据揭示了允许启动而仔细调控暴露于感染原或过敏原后粘膜部位炎症的持续所需的高度协调的细胞事件。此外,本文提供的数据确定了可治疗性地用于治疗多种形式的过敏性疾病和慢性炎症以及其他疾病的Nmb作为2型细胞因子应答的负调节剂的先前未认识到的作用。

[0095] III.治疗方法

[0096] 此处提供了用于治疗哺乳动物受试者中的病症的方法,例如炎性病症,例如由2型细胞因子引起的炎性病症。在一些实例中,病症与不期望的白介素5(IL-5)和/或IL-13活性有关。此类病症的实例在表1中提供,并且包括过敏、气道病症(例如,哮喘、鼻窦炎、特发性肺纤维化、鼻炎、嗜酸性肉芽肿伴多血管炎、嗜酸性食管炎和COPD)、皮肤病症(例如,湿疹、特应性皮炎和荨麻疹)和嗜酸性病症(例如,嗜酸性食管炎、嗜酸性胃炎、嗜酸性胃肠炎、嗜酸性肠炎、嗜酸性结肠炎、嗜酸性哮喘、嗜酸性胃肠病症(EGID)、嗜酸性筋膜炎、EGPA、嗜酸性肺病、高嗜酸性粒细胞综合征(HES)、或嗜酸性粒细胞白血病)。在一个实例中,所治疗的病症是霍奇金淋巴瘤。因此,可以用所公开的方法治疗患有此类病症的哺乳动物受试者,例如人或兽医受试者。

[0097] 施用治疗有效量的一种或更多种Nmb或Nmc蛋白、或编码一种或更多种Nmb或Nmc蛋白的一种或更多种核酸分子可以(1)减少炎症(例如在肺中或过敏反应部位),例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(2)减少IL-5活性(例如,核酸或蛋白表达),例如在ILC2和/或细胞中,例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或

至少90％,(3)减少IL-13活性(例如,核酸或蛋白质表达),例如在ILC2和/或细胞中,例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少75％或至少90％,(4)减少ILC2和/或T细胞应答,例如存在、增殖和/或激活的ILC2和/或T细胞数量,例如相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少75％或至少90％,和/或(5)减少嗜酸性粒细胞增多(例如在肺或外周血中),例如,相对于不施用Nmb蛋白或核酸分子,例如减少至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少75％或至少90％,从而治疗病症。

[0098] 所公开的治疗方法包括向受试者施用治疗有效量的至少一种神经介素B(Nmb)蛋白或神经调节蛋白C(Nmc)蛋白,或编码至少一种Nmb蛋白或Nmc蛋白的至少一种核酸分子,从而治疗病症。Nmb或Nmc蛋白(一种或更多种)或核酸分子(一种或更多种)可以存在于药物组合物中,例如包括盐水或水的一种药物组合物中。

[0099] 因此,在一些实例中,施用至少两种不同的Nmb蛋白,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同的Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1、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和37中的2、3、4、5、6、7、8、9或10种)。在一些实例中,所施用的Nmb蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:3、4、5、6、11、12、13、14、20、22、26、27、28、29、30、31、32、35、36或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性。在一些实例中,所施用的Nmb蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:26、27、29、35或36具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性。在一些实例中,施用至少两种Nmb蛋白,其中(1)与SEQ ID NO:3、4、5、6、11、12、13、14、20、22、26、27、28、29、30、31、32、35、36或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性,并且(2)与SEQ ID NO:26、27、29、35或36具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性。在一些实例中,施用至少两种Nmb蛋白,其中(1)与SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、11、12、14、15、19、21、22、26、27、28、29、30、32、34、35、36或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性,并且(2)与SEQ ID NO:3、4、5、6、9、11、12、13、14、18、19、20、21、22、23(其中两种Nmb蛋白不同)具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性。在一些实例中,施用至少两种Nmb蛋白,其中(1)包含SEQ ID NO:1或由其组成和(2)包含SEQ ID NO: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或37或由其组成。

[0100] 在一些实例中,编码至少一种Nmb蛋白的核酸分子编码多于一种Nmb蛋白,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同的Nmb蛋白。在一些实例中,方法包括施用多种不同的核酸分子,每种编码至少一种Nmb蛋白。所施用的一种或更多种核酸分子可以是质粒或病毒载体,例如慢病毒或腺相关病毒载体的一部分。另外,所施用的一种或更多种核酸分子可以与启动子可操作地连接,例如组成型启动子或其他增强子元件。

[0101] 施用的示例性方式包括注射(例如,iv、im、ip或皮内)、口服施用、鼻施用、吸入施用或局部施用。可以施用一剂或更多剂,例如至少两剂、至少3剂、至少4剂或至少5剂的治疗有效量的至少一种Nmb蛋白或Nmc蛋白或编码至少一种Nmb蛋白或Nmc蛋白的至少一种核酸分子。例如,方法可以包括至少两次单独施用,间隔至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至

少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少一年。在一些实例中,施用在病症发作的5分钟内、10分钟内、30分钟内、1小时内、2小时内、3小时内、4小时内、5小时内、6小时内、12小时内、24小时内、48小时内、72小时内、96小时内、1周内、2周内、3周内、4周内、1个月内、2个月内或3个月内进行。

[0102] 在一些实例中,所施用的至少一种Nmb蛋白与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性。在一些实例中,所施用的至少一种核酸分子编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的至少一种Nmb蛋白。在一些实例中,所施用的至少一种Nmb核酸分子编码序列与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性,其中编码序列可被插入或为载体的一部分。在一些实例中,神经介素C(Nmc)蛋白与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性。在一些实例中,核酸分子编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性。

[0103] 在一些实例中,方法包括向受试者施用治疗有效量的另一种治疗剂,例如表1中提供的一种或更多种。在一个实例中,方法包括向受试者施用治疗有效量的PGE2。

[0104] 表1:示例性病症和另外的治疗剂

[0105]

病症	示例性另外的治疗方法
过敏 • 季节性（例如花粉） • 灰尘/霉菌 • 食物（例如贝类、蛋类、牛奶、坚果、小麦） • 宠物（例如皮屑） • 植物 • 药物（例如，抗生素，例如磺胺或青霉素、阿司匹林、NSAID、抗惊厥药、化疗药物） • 昆虫（例如，蟑螂，以及蜜蜂、大黄蜂、胡蜂、小黄蜂、火蚁的毒液） • 病原体（例如，病毒、细菌、真菌、寄生虫） • 乳胶	解充血药 抗组胺药 皮质类固醇 免疫疗法 肾上腺素
鼻窦炎	抗生素（例如，阿莫西林） 皮质类固醇
哮喘（轻度、中度或重度，包括嗜酸细胞性哮喘和类固醇抵抗型哮喘）	皮质类固醇 糖皮质激素 支气管扩张药（例如短效（例如，沙丁胺醇）或长效（例如，福莫特罗）β-2 肾上腺素能激动剂、抗胆碱能药（例如，噻托溴铵和异丙托溴铵） 长效β激动剂（LABA）白三烯素拮抗剂 美泊利单抗 贝那利珠单抗 瑞利珠单抗 曲罗芦单抗 来瑞组单抗 度普利尤单抗

[0106]

病症	示例性另外的治疗方法
COPD	皮质类固醇 支气管扩张药（例如短效（例如，沙丁胺醇）或长效（例如，福莫特罗）β-2 肾上腺素能激动剂、抗胆碱能药（例如，噻托溴铵和异丙托溴铵） 抗生素（例如，红霉素） 补氧
特发性肺纤维化（IPF）	吡非尼酮 血管激酶抑制剂（例如，尼达尼布）
鼻炎	抗组胺鼻喷雾剂 皮质类固醇鼻喷雾剂 抗胆碱能药鼻喷雾剂（例如，异丙托溴铵） 解充血药（例如，伪麻黄碱或去氧肾上腺素）
嗜酸性肉芽肿伴多血管炎（EGPA）	美泊利单抗 糖皮质激素（例如，泼尼松龙） 免疫抑制剂（例如，硫唑嘌呤和环磷酰胺） 甲氨蝶呤
嗜酸细胞性食管炎	局部用皮质类固醇（例如，布地奈德、氟替卡松） 质子泵抑制剂（例如，奥美拉唑、兰索拉唑、右兰索拉唑、艾司奥美拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑、艾普拉唑）
湿疹	皮质类固醇（例如，氢化可的松、丙酸氯倍他索） 免疫抑制剂（例如，吡美莫司、他克莫司）

[0107]

病症	示例性另外的治疗方法
荨麻疹（Urticaria、hives）	抗组胺药（例如，苯海拉明、羟嗪、氯雷他定、西替利嗪、地氯雷他定） 白三烯拮抗药（例如，孟鲁司特和扎鲁司特） 口服糖皮质激素 消炎药 奥马珠单抗 免疫抑制剂
慢性瘙痒	皮质类固醇（例如，可的松和泼尼松） 钙神经素抑制剂（例如，吡美莫司和他克莫司） 抗抑郁药（例如，百忧解和左洛复）
血管性水肿	抗组胺药（例如，西替利嗪） 雄激素
结膜炎	抗组胺药（例如，苯海拉明） 肥大细胞稳定剂（例如，色甘酸） 抗生素
特应性皮炎	曲罗芦单抗 局部用皮质类固醇（例如，氢化可的松） 局部用钙神经素抑制剂（例如，他克莫司或吡美莫司） 全身免疫抑制剂（例如，ciclospoin、甲氨蝶呤、干扰素γ-1b）

[0108]

病症	示例性另外的治疗方法
嗜酸性病症 • 嗜酸性食管炎 • 嗜酸性胃炎 • 嗜酸性肠胃炎 • 嗜酸性肠炎 • 嗜酸性结肠炎 • 嗜酸性哮喘（见上文） • 嗜酸性胃肠道病症（EGID） • 嗜酸性筋膜炎 • 嗜酸性肉芽肿伴多血管炎，先前为 Churg-Strauss 综合征（EGPA）（见上文） • 嗜酸性肺病 • 高嗜酸性粒细胞综合征（HES） • 白血病–嗜酸性（慢性、急性或克隆性）	局部用或全身性类固醇（例如，皮质类固醇、糖皮质激素，例如泼尼松） 基于氨基酸的饮食 免疫抑制剂（例如，硫唑嘌呤和环磷酰胺） 对于白血病：化学疗法（例如，阿糖胞苷、蒽环类、组胺二盐酸盐、白细胞介素2）、格列卫、酪氨酸激酶抑制剂（例如，索拉非尼、midostaruin、帕纳替尼）、造血干细胞移植
寄生或真菌感染	抗真菌剂（例如，多烯（例如，两性霉素B、制霉菌素、那他霉素）、唑类（例如，氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑）、烯丙胺（例如，特比萘芬）和棘白菌素（例如，卡泊芬净） 他伐硼罗（tavaborole） 抗寄生虫剂（例如，驱虫剂、抗原生动物剂、抗阿米巴药）

[0109]

病症	示例性另外的治疗方法
霍奇金淋巴瘤	来瑞组单抗 MOPP 放射疗法 ABVD（阿霉素、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪） Stanford V （阿霉素、博来霉素、长春碱、长春新碱、氮芥、依托泊苷、泼尼松） BEACOPP（多柔比星、博来霉素、长春新碱、环磷酰胺、丙卡巴肼、依托泊苷、泼尼松）

[0110] A.神经介素蛋白

[0111] 示例性的Nmb十肽示于SEQ ID NO:1(人),及其SEQ ID NO:3-37中的变体。在一些实例中,Nmb蛋白包括SEQ ID NO:1、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或37的蛋白序列或由其组成。示例性的Nmb编码序列示于SEQ ID NO:2。在一些实例中,Nmb核酸序列包括SEQ ID No:2的序列或由其组成,其在一些实例中是质粒或载体的一部分,并且在一些实例中与启动子(例如,组成型启动子)可操作地连接。

[0112] 在一个实例中,所公开的方法利用Nmb蛋白(例如,哺乳动物Nmb蛋白),即,向受试者施用Nmb蛋白。此类蛋白质的实例示于SEQ ID NO:1(天然Nmb蛋白)。可以使用天然或变体Nmb蛋白。在一个实例中,通过操纵Nmb核苷酸序列来产生变体Nmb肽。在一些实例中,使用变体Nmb序列,例如包括一个或更多个氨基酸替换、添加、缺失或其组合的Nmb序列,只要该蛋白质保留降低IL-5活性、降低IL-13活性、减少嗜酸性粒细胞增多、减少炎症、减少ILC2应答或其组合的能力。本文描述了测量IL-5活性(例如,测量DNA或蛋白质表达)、IL-13活性(例如,测量DNA或蛋白质表达)、嗜酸性粒细胞增多、炎症和ILC2应答的示例性方法。可以通过比对序列来确定更可能耐受替换的Nmb区域,其中物种之间保守的氨基酸不太可能耐受替换,而在特定位置变化的氨基酸更可能耐受替换。另外,可以利用丙氨酸扫描和截短扫描(参见实施例7)。

[0113] 变体Nmb蛋白,例如SEQ ID NO:1的变体,可以包含一个或更多个突变,例如单个插入、单个缺失或单个氨基酸替换。在一些实例中,突变的Nmb蛋白包括1至5个插入、1至5个缺失、1至5个替换或其任何组合(例如,单个插入连同1至5个替换)。在一些实例中,变体Nmb蛋白(例如,SEQ ID NO:1)具有1、2、3、4或5个氨基酸变化,例如1、2、3、4或5个氨基酸替换(例如,保守氨基酸替换),1、2、3、4或5个氨基酸插入,或1、2或3个氨基酸缺失,或其组合。在一些实例中,SEQ ID NO:1、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或37具有1、2、3、4或5个氨基酸变化,例如1、2、3、4或5个氨基酸插入,1、2或3个氨基酸缺失,1、2、3、4或5个氨基酸替换或其任意组合(例如1或2个氨基酸缺失连同1、2、3、4或5个氨基酸替换)。在一个实例中,SEQ ID NO:1包括在氨基酸1、2、3、4、10的氨基酸替换,例如丙氨酸或保守氨基酸替换。在一个实例中,SEQ ID NO:

1在氨基酸1、2、3、4和/或10处包括2、3、4或5个氨基酸替换,例如丙氨酸或保守氨基酸替换。在一个实例中,SEQ ID NO:1包括1、2、3或4个氨基酸缺失,例如在氨基酸1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处,例如aa 5和/或aa 7。在一个实例中,SEQ ID NO:1包括2、3或4个连续的氨基酸缺失,例如在氨基酸1和2、1-3、1-4、2-3、2-4、2-5处等。在一个实例中,SEQ ID NO:1在氨基酸1、2、3、4、10处包括氨基酸替换,例如丙氨酸或保守氨基酸替换,和在氨基酸5和/或7处包括1或2个氨基酸缺失。在一个实例中,SEQ ID NO:1在N或C末端包括帽,例如甲磺酰基帽、NHMe、帽或OH帽。

[0114] 一种类型的修饰或突变包括用具有相似的生化特性的氨基酸残基替换氨基酸,即保守替换(例如1、2、3、4或5个保守替换)。通常,保守替换对所得Nmb肽的活性几乎没有影响。例如,保守替换是SEQ ID NO:1、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或37中的氨基酸替换,其基本上不影响Nmb肽在哺乳动物中降低IL-5活性、降低IL-13活性、减少嗜酸性粒细胞增多、减少炎症、减少ILC2应答或其组合的能力。丙氨酸扫描可用于鉴定Nmb蛋白中的哪些氨基酸残基,例如SEQ ID NO:1,可以耐受氨基酸替换(参见实施例7)。在一个实例中,当用丙氨酸或其他保守氨基酸替换1、2、3、4或5种天然氨基酸时,Nmb的这些活性(例如,SEQ ID NO:1)被改变不大于25%,例如不大于20%,例如不大于10%。可以替换蛋白质中的原始氨基酸(例如Nmb)并且被视为保守替换的氨基酸的实例包括:Ser替换Ala;Lys替换Arg;Gln或His替换Asn;Glu替换Asp;Ser替换Cys;Asn替换Gln;Asp替换Glu;Pro替换Gly;Asn或Gln替换His;Leu或Val替换Ile;Ile或Val替换Leu;Arg或Gln替换Lys;Leu或Ile替换Met;Met、Leu或Tyr替换Phe;Thr替换Ser;Ser替换Thr;Tyr替换Trp;Trp或Phe替换Tyr;和Ile或Leu替换Val。

[0115] 可以通过使用保守性较低的替换来进行更实质性的改变,例如选择残基在其维持以下的效果上差异更显著的残基:(a)替换区域中多肽主链的结构,例如片状或螺旋状构型;(b)靶位点处多肽的电荷或疏水性;或(c)侧链的大部分。通常预期在多肽功能上产生最大改变的替换是那些,其中:(a)亲水残基,例如丝氨酸或苏氨酸,替换(或被替换为)疏水残基,例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸;(b)半胱氨酸或脯氨酸替换(或被替换为)任何其他残基;(c)具有带正电的侧链的残基,例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸,替换(或被替换为)带负电的残基,例如谷氨酸或天冬氨酸;或(d)具有大体积侧链的残基,例如苯丙氨酸,替换(或被替换为)没有侧链的残基,例如甘氨酸。可以通过分析Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1)的功能,通过分析变体Nmb蛋白在哺乳动物中降低IL-5活性、降低IL-13活性、降低嗜酸性粒细胞增多、减少炎症、减少ILC2应答或其组合的能力来评估这些氨基酸替换(或其他缺失或添加)的影响。

[0116] 在一些实例中,在所公开的方法或组合物中使用的Nmb蛋白(例如,SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc蛋白(例如SEQ ID NO:38)在一个或多个位置被PEG化。在一些实例中,在所公开的方法或组合物中使用的Nmb蛋白或Nmc蛋白包括免疫球蛋白FC结构域。抗体的保守FC片段可以掺入Nmb蛋白或Nmc蛋白的n末端或c末端,并且可以增强蛋白质的稳定性并因此增强血清半衰期。FC结构域也可以用作纯化蛋白A或蛋白G琼脂糖珠上的蛋白的手段。

[0117] Nmb蛋白(例如,SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc蛋白(例如SEQ ID NO:38)可以用细胞穿透肽(CPP)标记以促进细胞摄取。因此,在一些实例中,所使用的Nmb蛋白或Nmc蛋白是融合蛋白,其包括(1)Nmb蛋白或Nmc蛋白,和(2)细胞穿透肽。细胞穿透肽可以在Nmb或Nmc蛋白的N或C末端。细胞穿透肽通常是高度阳离子化且通常富含精氨酸和赖氨酸的短肽(40个氨基酸或更少),其可促进细胞摄取/蛋白质摄取。可以使用的示例性细胞穿透肽包括亲水性肽(例如,TAT[YGRKKRRQRRR;SEQ ID NO:57]、SynB1[RGGRLSYSRRRFSTSTGR;SEQ ID NO:39]、SynB3[RRLSYSRRRF;SEQ ID NO:40]、PTD-4[PIRRRKKLRRLK;SEQ ID NO:41]、PTD-5[RRQRRTSKLMKR;SEQ ID NO:42]、FHV Coat-(35-49)[RRRRNRTRRNRRRVR;SEQ ID NO:43]、BMV Gag-(7-25)[KMTRAQRRAAARRNRWTAR;SEQ ID NO:44]、HTLV-II Rex-(4-16)[TRRQRTRRARRNR;SEQ ID NO:45]、D-Tat[GRKKRRQRRRPPQ;SEQ ID NO:46]、R9-Tat GRRRRRRRRRPPQ[SEQ ID NO:47]和穿膜肽[RQIKWFQNRRMKWKK;SEQ ID NO:48])、两亲性多肽(例如,MAP[KLALKLALKLALALKLA;SEQ ID NO:49]、SBP[MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV;SEQ ID NO:50]、FBP[GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV;SEQ ID NO:51]、MPG ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:52]、MPG(ΔNLS)[ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-cya;SEQ ID NO:53]、Pep-2[ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:54]和转运素[GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL;SEQ ID NO:55])、周期序列(例如pVec、聚精氨酸RxN(4<N<17)嵌合体、聚赖氨酸KxN(4<N<17)嵌合体、(RAca)6R、(RAbu)6R、(RG)6R、(RM)6R、(RT)6R、(RS)6R、R10、(RA)6R、R7和pep-1[ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:56)、Cr10(环状pol-精氨酸CPP)、TAT_{48-57}、TAT_{47-57}或TAT_{49-57};穿膜肽;Pep-1;P物质,SP;聚精氨酸,例如R5-R12;pVEC;转运素;MAP;diatos肽载体1047、DPV1047、VECTOCELL®;MPG;ADP核糖基化因子,ARF,例如ARF_{1-22};BPrPr(例如$BPrPr_{1-28}$);p28;VT5;Bac 7,例如Bac_{1-24};C105Y;PFVYLI(SEQ ID NO:58);和Pep-7。

[0118] Nmb蛋白(例如,SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc蛋白(例如SEQ ID NO:38)可包括N末端帽,例如甲酰基、乙酰基、2-18个碳的酰基、芳基酰基(如苯甲酰基)、杂芳基酰基(如2-乙酰基吡啶)、氨基甲酸酯(如叔丁基氨基甲酸酯)、琥珀酰基、烷基或芳基磺酰胺和/或C末端基,例如酰胺、酸、醛和酯(芳基、烷基、杂芳基、杂烷基,如2至20个重复单元的聚乙二醇)。

[0119] B.蛋白质生成

[0120] 重组表达的Nmb或Nmc蛋白的分离和纯化可以通过常规方法进行,例如制备色谱和免疫分离。一旦表达,Nmb或Nmc蛋白可以按照标准程序进行纯化,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析等(通常参见R.Scopes,Protein Purification,Springer-Verlag,N.Y.,1982)。本文公开了具有至少约90至95%均匀性的基本上纯的组合物,并且98至99%或更高均匀性可用于药物目的。

[0121] 除了重组方法之外,还可以使用标准肽合成来全部或部分构建Nmb或Nmc蛋白(或其如上所述的变体)。在一个实例中,Nmb或Nmc蛋白是通过较短片段的氨基和羧基末端的缩合而合成的。可以通过活化羧基末端来形成肽键(例如通过使用偶联剂N,N'-二基己基碳二亚胺)。

[0122] C.蛋白质的修饰

[0123] 可用于公开的方法和组合物中的Nmb肽包括本文描述的Nmb肽的合成实施方案。另外,这些肽的类似物(非肽有机分子)、衍生物(从所公开的肽序列开始获得的化学官能化的肽分子)和变体(同源物)可用于本文所述的方法中。本公开的每种Nmb肽Nmc肽都包含天然存在和以其他方式存在的氨基酸序列,其可以是L-和/或D-氨基酸。

[0124] 可以通过多种化学技术修饰Nmb和Nmc肽以产生具有与未修饰的Nmb和Nmc肽基本相同的活性并且任选地具有其他期望的性质的衍生物。例如,肽的羧酸基团,无论是羧基末端还是侧链,都可以药学上可接受的阳离子的盐的形式提供或被酯化以形成C_1-C_{16}酯,或转化为式NR_1R_2的酰胺,其中R_1和R_2各自独立地为H或C_1-C_{16}烷基,或组合以形成杂环,例如5元或6元环。肽的氨基,无论是氨基末端还是侧链,都可以是药学上可接受的酸加成盐的形式,例如HCl、HBr、乙酸、苯甲酸、甲苯磺酸、马来酸、酒石酸和其他有机盐,或者可以被修饰为C_1-C_{16}烷基或二烷基氨基,或者可以进一步转化为酰胺以结合配体分子的某些键合功能。

[0125] 肽侧链的羟基可被转化为C_1-C_{16}烷氧基或C_1-C_{16}酯以将疏水特性引入肽。或者,羟基可被硫酸化或磷酸化以引入负电荷并增加水溶性。或者,侧链羟基或/和天冬酰胺和/或天冬氨酸侧链可以被糖基化,如丝氨酸/苏氨酸糖肽或N-乙酰基糖肽,其可以调节肽的性质。肽侧链的苯基和酚环可以被一个或更多个卤素原子取代,例如氟、氯、溴或碘,或被C_1-C_{16}烷基、C_1-C_{16}烷氧基、其羧酸和酯、或此类羧酸的酰胺取代。肽侧链的亚甲基可延伸至同源的C_2-C_4亚烷基。可以用许多公认的保护基团中的任何一个来保护硫醇,例如乙酰胺基团。硫醇可与马来酰亚胺或二硫化物反应。

[0126] 设想了拟肽和拟有机物的实施方案,由此此类拟肽和拟有机物的化学成分的三维排列模拟了肽主链和组分氨基酸侧链的三维排列,导致Nmb或Nmc肽的此类拟肽和拟有机物具有可测量的或增强的减少2型细胞因子产生和所致炎症的能力。对于计算机建模应用,药效团是对生物活性的结构要求的理想的三维定义。可以使用计算机建模软件(使用计算机辅助药物设计或CADD)来设计拟肽和拟有机物以拟合每个药效团。有关CADD中使用的技术的说明,参见Walters,"Computer-Assisted Modeling of Drugs,"in Klegerman&Groves,eds.,1993,Pharmaceutical Biotechnology,Interpharm Press:Buffalo Grove,IL,pp.165174and Principles of Pharmacology,Munson(ed.)1995,Ch.102。还包括使用此类技术制备的模拟物。

[0127] 在一些实例中,在公开的方法或组合物中使用的Nmb蛋白(例如,SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc蛋白(例如SEQ ID NO:38)包括一种或更多种修饰的氨基酸(例如1、2、3、4或5种修饰的氨基酸)。示例性的Nmb或Nmc肽是衍生肽,其可以是通过糖基化、聚乙二醇化、磷酸化或保留其所衍生自的肽的至少一种生物学功能(例如,降低IL-5活性、降低IL-13活性、减少嗜酸性粒细胞增多、减少炎症、减少ILC2应答或其组合)的任何类似过程进行修饰的一种。Nmb或Nmc肽还可包括一种或更多种非天然存在的氨基酸。例如,可以将非经典氨基酸或化学氨基酸类似物作为替换或添加引入到Nmb肽(例如SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc肽(例如SEQ ID NO:38)中。非经典氨基酸包括但不限于常见氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、α-氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、γ-Abu、ε-Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、

肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、磺基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、β-丙氨酸、氟氨基酸、设计氨基酸例如β-甲基氨基酸、Cα-甲基氨基酸、Nα-甲基氨基酸和通常的氨基酸类似物。此外,氨基酸可以是D(右旋的)或L(左旋的)。在其他具体实例中,提供了本文列出的Nmb肽和Nmc肽的分支形式,例如通过用具有能够使用一个或更多个氨基酸形成肽键(因此能够形成“分支”)的自由侧链的氨基酸或氨基酸类似物替换序列中的一个或更多个氨基酸。还考虑了环状肽。

[0128] 还包括在合成过程中或之后被差异修饰的肽衍生物,例如通过苄基化、糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、聚乙二醇化、通过保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割、与抗体分子或其他细胞配体的连接等。在特定的实施方案中,Nmb肽(例如,SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc肽(例如SEQ ID NO:38)在N末端被乙酰化和/或在C末端被酰胺化。在一个实例中,Nmb肽(例如,SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc肽(例如SEQ ID NO:38)包括羧基末端酰胺。

[0129] 拟肽是基于或衍生自肽和蛋白质的化合物。拟肽可通过使用非天然氨基酸、构象限制、电子等排取代等通过对已知肽序列进行结构修饰而获得。本发明的拟肽构成了肽与非肽合成结构之间的结构空间的连续体;因此,拟肽可用于描述药效团并有助于将肽转化为具有母体肽活性的非肽化合物。

[0130] Nmb肽(例如SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc肽(例如SEQ ID NO:38)的其他拟位被包括在本公开中。此类拟肽可以具有诸如不可水解的属性(例如,对蛋白酶或降解该肽的其他生理条件的增加的稳定性)。为了说明的目的,可以生成肽类似物,使用例如苯并二氮卓类(例如,参见Freidinger et al.in Peptides:Chemistry and Biology,G.R.Marshall ed.,ESCOM Publisher:Leiden,Netherlands,1988)、替换的内酰胺环(Garvey et al.in Peptides:Chemistry and Biology,G.R.Marshall ed.,ESCOM Publisher:Leiden,Netherlands,1988,p123)、C-7模拟物(Huffman et al.in Peptides:Chemistry and Biology,G.R.Marshall ed.,ESCOM Publisher:Leiden,Netherlands,1988,p.105)、酮亚甲基假肽(Ewenson et al.(1986)J Med Chem29:295;和Ewenson et al.in Peptides:Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium)Pierce Chemical Co.Rockland,Ill.,1985)、β-转角二肽核(Nagai et al.(1985)Tetrahedron Lett 26:647;和Sato et al.(1986)J Chem Soc Perkin Trans 1:1231)、β-氨基醇(Gordon et al.(1985)Biochem Biophys Res Commun126:419;和Dann et al.(1986)Biochem Biophys Res Commun 134:71)、二氨基酮(Natarajan et al.(1984)Biochem Biophys Res Commun 124:141)和亚甲基氨基修饰(Roark et al.in Peptides:Chemistry and Biology,G.R.Marshall ed.,ESCOM Publisher:Leiden,Netherlands,1988,p134)。通常还参见Session III:Analytic and synthetic methods,in Peptides:Chemistry and Biology,G.R.Marshall ed.,ESCOM Publisher:Leiden,Netherlands,1988)。

[0131] 除了可以进行以生成拟肽的各种侧链取代之外,本公开还考虑使用肽二级结构的

构象受限的模拟物。已经开发出用于肽的酰胺键的替代物。酰胺键的常用替代物包括以下基团(i)反式烯烃,(ii)氟烯烃,(iii)亚甲基氨基,(iv)磷酰胺和(v)磺酰胺。另外,可以使用基于肽主链的更大量修饰的拟肽。属于此类的拟肽包括(i)逆反类似物,和(ii)N-烷基甘氨酸类似物(所谓的类肽)。此外,组合化学方法可用于生产拟肽。例如,所谓的"肽变形"策略的一个实施方案侧重于随机产生包含大量肽键替代物的肽类似物的文库。在示例性的实施方案中,Nmb肽(例如,SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc肽(例如SEQ ID NO:38)的拟肽可以衍生为该肽的逆反类似物。此类逆反类似物可以根据已知方法制备,例如Sisto等人美国专利号4,522,752中描述的方法。逆反类似物可以如例如PCT公开号WO 00/01720中所述产生。可以产生混合肽,例如包含一些正常肽键的混合肽。作为一般指南,通常改变对蛋白质水解最敏感的位点,而对于模拟转换而言,较低敏感性的酰胺键是可选的。最终产物或其中间体可以被纯化。

[0132] Nmb肽(例如SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc肽(例如SEQ ID NO:38)可以包括为D立体异构体的至少一个氨基酸或每个氨基酸。Nmb肽或Nmc肽可包括至少一个被逆转的氨基酸。被逆转的氨基酸可以是D立体异构体。肽的每个氨基酸可以被逆转和/或每个氨基酸可以是D立体异构体。在另一个示例性的实施方案中,拟肽可以衍生为肽的逆对映体类似物。可以使用可商购的D-氨基酸(或其类似物)和标准的固相或溶液相肽合成技术来合成这样的逆对映体类似物,例如在PCT公开号WO 00/01720中所述。可以通过HPLC纯化最终产物以产生纯的逆对映体类似物。在又一个说明性的实施方案中,可以制备主题肽的反式烯烃衍生物。可以根据Y.K.Shue et al.(1987)Tetrahedron Letters 28:3225和在PCT公开WO 00/01720中描述的方法合成反式烯烃类似物。还可以将通过上述方法合成的假二肽与其他假二肽偶联,以制备具有数个烯烃官能团替代酰胺官能团的肽类似物。另一类别的拟肽衍生物包括膦酸酯衍生物。此类膦酸酯衍生物的合成可以根据已知的合成方案进行修改(参见例如,Loots et al.in Peptides:Chemistry and Biology,(Escom Science Publishers,Leiden,1988,p.118));Petrillo et al.in Peptides:Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium,Pierce Chemical Co.Rockland,Ill.,1985)。

[0133] 其他拟肽结构是已知的,并且可以容易地适用于主题拟肽。例如,拟肽可以掺入1-氮杂双环[4.3.0]壬烷替代物(参见Kim et al.(1997)J.Org.Chem.62:2847)、或N-酰基哌嗪酸(参见Xi et al.(1998)J.Am.Chem.Soc.120:80)或2-替换的哌嗪部分作为受约束的氨基酸类似物(参见Williams et al.(1996)J.Med.Chem.39:1345-1348)。在其他实施方案中,Nmb肽(例如,SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc肽(例如SEQ ID NO:38)的某些氨基酸残基可以被芳基和双芳基部分,例如单环或双环芳族或杂芳族核,或双芳族、芳族-杂芳族或双杂芳族核取代。可以例如通过组合合成技术结合高通量筛选来优化主题拟肽。此外,拟位的其他实例包括但不限于,基于蛋白质的化合物、基于碳水化合物的化合物、基于脂质的化合物、基于核酸的化合物、天然有机化合物、合成衍生的有机化合物、抗独特型抗体和/或催化抗体或其片段。例如,可以通过筛选天然和合成化合物的文库中能够抑制

纤维化的化合物来获得拟位。还可以例如,从天然和合成化合物的文库,特别是化学或组合文库(例如,序列或大小不同但具有相同结构单元的化合物的文库)获得拟位。也可以通过例如合理的药物设计来获得拟位。在合理的药物设计程序中,可以通过例如核磁共振(NMR)或X射线晶体学分析本发明化合物的三维结构。然后,可以通过例如计算机建模将三维结构用于预测潜在拟位的结构。然后可以通过例如化学合成、重组DNA技术或通过从天然来源(例如,植物、动物、细菌和真菌)中分离出拟位来产生预测的拟位结构。

[0134] D.神经介素核酸分子和载体

[0135] 示例性的Nmb编码序列示于SEQ ID NO:2。在一些实例中,编码Nmb的Nmb核酸分子包括SEQ ID NO:2的序列或由其组成。在一些实例中,Nmb核酸分子编码SEQ ID NO:1的蛋白质、或其变体(例如上述的那些)。在一些实例中,Nmb核酸序列包括SEQ ID NO:2或由其组成,其在一些实例中是质粒或载体的一部分,并且在一些实例中与启动子(例如,组成型启动子)可操作地连接。

[0136] 在一个实例中,所公开的方法利用Nmb核酸序列或Nmc核酸序列(例如cDNA、基因组或RNA序列),即,向受试者施用Nmb或Nmc核酸分子,并且编码的Nmb或Nmc蛋白在导入核酸分子的细胞中表达。如上所述,Nmb或Nmc核酸分子可编码天然或变体Nmb或Nmc蛋白。

[0137] 基于遗传密码,可以生成编码任何Nmb蛋白(例如SEQ ID NO:1、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或37)或Nmc蛋白(例如SEQ ID NO:38)的核酸序列。在一些实例中,优化此类序列以在宿主细胞(例如用于表达Nmb或Nmc蛋白的宿主细胞)中表达。此类核酸可直接使用(例如,施用于受试者),或用于产生施用于受试者的Nmb或Nmc蛋白。

[0138] 在一个实例中,编码Nmb蛋白的核酸分子包含SEQ ID NO:2的序列或由其组成。还提供了包括此类核酸的细胞、质粒和病毒载体,其也可以包括与Nmb或Nmc编码序列可操作地连接的启动子。

[0139] 在一个实例中,编码Nmb蛋白的核酸序列与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少99%或至少99%的序列同一性。使用本文提供的氨基酸序列和遗传密码,可以容易地产生此类序列。另外,技术人员可以容易地构建包含功能上等同的核酸的各种克隆,例如序列不同但其编码相同的Nmb蛋白序列的核酸。

[0140] 核酸分子包括编码Nmb或Nmc蛋白的DNA、cDNA、mRNA和RNA序列。编码序列中的沉默突变是由遗传密码的简并性(即,冗余)产生的,由此多于一个密码子可以编码相同的氨基酸残基。因此,例如,亮氨酸可以由CTT、CTC、CTA、CTG、TTA或TTG编码;丝氨酸可以由TCT、TCC、TCA、TCG、AGT或AGC编码;天冬酰胺可以由AAT或AAC编码;天冬氨酸可以由GAT或GAC编码;半胱氨酸可以由TGT或TGC编码;丙氨酸可以由GCT、GCC、GCA或GCG编码;谷氨酰胺可以由CAA或CAG编码;酪氨酸可以由TAT或TAC编码;以及异亮氨酸可以由ATT、ATC或ATA编码。显示标准遗传密码的表可在各种来源中找到(参见,例如,Stryer,1988,Biochemistry,3rd Edition,W.H.5Freeman and Co.,NY)。

[0141] 特定物种的密码子偏好和密码子使用表可用于利用该特定物种的密码子使用偏好工程化编码Nmb蛋白(例如,编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少

50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性的蛋白的一种)或Nmc蛋白(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性的蛋白质的一种)的分离的核酸分子。例如,在所公开的方法中使用的Nmb蛋白可以被设计为具有特定目标生物(例如人或小鼠)优先使用的密码子。

[0142] 编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的一种)的核酸可以通过体外方法克隆或扩增,例如聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、基于转录的扩增系统(TAS)、自我维持序列复制系统(3SR)和Qβ复制酶扩增系统(QB)。另外,编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的一种)的核酸可以通过克隆技术(例如在Sambrook et al.(ed.),Molecular Cloning:ALaboratory Manual 2nd ed.,vol.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring,Harbor,N.Y.,1989,和Ausubel et al.,(1987)in"Current Protocols in Molecular Biology,"John Wiley and Sons,New York,N.Y.中发现的那些)制备。

[0143] 编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少75％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的一种)的核酸序列可以通过任何合适的方法制备,包括例如克隆合适的序列,或通过诸如Narang et al.,Meth.Enzymol.68:90-99,1979的磷酸三酯法;Brown et al.,Meth.Enzymol.68:109-151,1979的磷酸二酯法;Beaucage et al.,Tetra.Lett.22:1859-1862,1981的二乙基亚磷酰胺法;由Beaucage&Caruthers,Tetra.Lett.22(20):1859-1862,1981描述的固相亚磷酰胺三酯法的方法直接化学合成,例如,使用如例如在Needham-VanDevanter et al.,Nucl.Acids

Res.12:6159-6168,1984中描述的自动化合成器;和美国专利号4,458,066的固体载体法。化学合成产生单链寡核苷酸。可以通过与互补序列杂交,或通过使用单链作为模板使用DNA聚合酶聚合,将其转化为双链DNA。

[0144] 在一个实例中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的一种)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性)通过将编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子)或Nmc蛋白的cDNA插入载体中而制备。可以进行插入,以便在框架中读取Nmb或Nmc蛋白,从而产生Nmb或Nmc蛋白。

[0145] Nmb核酸编码序列(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc核酸编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的一种)可以插入表达载体中,所述表达载体包括但不限于质粒、病毒或其他溶媒,其可被操纵以允许插入或掺入序列,并且可以在原核生物或真核生物中表达。宿主可以包括微生物、酵母、昆虫、植物和哺乳动物生物体。载体可以编码选择标记,例如胸苷激酶基因、抗生素抗性基因或荧光蛋白。

[0146] 编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的一种)的核酸序列可以与表达控制序列可操作地连接。连接与Nmb或Nmc蛋白编码序列可操作连接的表达控制序列,使得在与表达控制序列相容的条件下实现Nmb或Nmc编码序列的表达。示例性表达控制序列包括但不限于,启动子、增强子、转录终止子、Nmb或Nmc蛋白质编码基因前的起始密码子(即,ATG)、内含子的剪接信号、维持该基因正确的阅读框以允许正确翻译mRNA以及终止密码子。

[0147] 在一个实施方案中,使用载体在酵母中表达,例如酿酒酵母(S.cerevisiae)、毕赤酵母(P.pastoris)或乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)。用于酵母表达系统的示例性启动子包括组成型启动子、质膜H^+-ATPase(PMA1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPD)、磷酸甘油酸激酶-1(PGK1)、醇脱氢酶-1(ADH1)和多效性耐药泵(PDR5)。此外,还可以使用诱导型启

动子,例如GAL1-10(由半乳糖诱导的)、PHO5(由低细胞外无机磷酸盐诱导的)和串联热休克HSE元件(由温度升高至37℃诱导的)。响应可滴定的诱导物指导可变表达的启动子包括蛋氨酸响应的MET3和MET25启动子以及铜依赖性CUP1启动子。这些启动子中的任何一个都可以克隆到多拷贝(2μ)或单拷贝(CEN)质粒中,以提供额外水平的表达水平控制。质粒可包括用于在酵母中选择的营养标记(例如URA3、ADE3、HIS1等),以及用于在细菌中繁殖的抗生素抗性(AMP)。用于在乳酸克鲁维酵母(K.lactis)上表达的质粒是已知的,例如pKLAC1。因此,在一个实例中,在细菌中扩增后,可通过类似于细菌转化的方法将质粒引入相应的酵母营养缺陷型中。编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的一种,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的一种)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的一种)的核酸序列也可以设计成在昆虫细胞中表达。

[0148] Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的一种)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的一种)可以在酵母菌株中表达。例如,在酵母宿主细胞中同时缺失七个多效性耐药转运蛋白YOR1、SNQ2、PDR5、YCF1、PDR10、PDR11和PDR15以及它们的激活转录因子PDR1和PDR3,从而使所得菌株对药物敏感。也可以使用具有质膜的脂质组成改变的酵母菌株,例如麦角甾醇生物合成有缺陷的erg6突变体。对蛋白水解高度敏感的蛋白质可以在缺少主液泡内肽酶Pep4的酵母细胞中表达,其控制其他液泡水解酶的激活。如果相应的无效突变体无法存活,则可采用在携带基因的温度敏感(ts)等位基因的菌株中的异源表达。

[0149] 也可以制备病毒载体,该病毒载体编码Nmb蛋白(例如包括以下核酸分子的那些:与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的一种)。示例性的病毒载体包括多瘤、SV40、腺病毒、牛痘病毒、腺伴随病毒(AAV)、疱疹病毒(包括HSV和EBV)、辛德毕斯病毒、甲病毒属以及禽类、鼠类和人源的逆转录病毒。也可以使用杆状病毒(苜蓿银纹夜蛾多核多角体病毒;AcMNPV)载体。其他合适

的载体包括逆转录病毒载体、正痘载体、禽痘载体、鸡痘载体、羊痘载体、猪痘载体、腺病毒载体、疱疹病毒载体、α病毒载体、杆状病毒载体、辛德毕斯病毒载体、痘苗病毒载体和脊髓灰质炎病毒载体。具体的示例性载体是痘病毒载体,例如牛痘病毒、鸡痘病毒和高度减毒的牛痘病毒(MVA)、腺病毒、杆状病毒等。使用的痘病毒包括正痘病毒、猪痘病毒、禽痘病毒和羊痘病毒。正痘包括牛痘、鼠痘和浣熊痘。使用正痘的一个实例是牛痘。禽痘包括鸡痘、金丝雀痘和鸽痘。羊痘包括山羊痘和绵羊痘。在一个实例中,猪痘(suipox)是猪痘(swinepox)。可以使用的其他病毒载体包括其他DNA病毒,例如疱疹病毒和腺病毒,以及RNA病毒,例如逆转录病毒和脊髓灰质炎。

[0150] 编码Nmb蛋白(例如包括以下核酸分子的那些:与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的病毒载体可包括至少一种与编码Nmb蛋白或Nmc蛋白的核酸序列可操作地连接的表达控制元件。将表达控制元件插入载体中以控制和调节核酸序列的表达。在这些载体中使用的表达控制元件的实例包括但不限于lac系统、噬菌体λ的操纵子和启动子区、酵母启动子和衍生自多瘤病毒、腺病毒、逆转录病毒或SV40的启动子。另外的操作元件包括但不限于,前导序列、终止密码子、聚腺苷酸化信号和宿主系统中编码Nmb蛋白的核酸序列的适当转录和随后翻译所必需的任何其他序列。表达载体可以包含在宿主系统中转移和随后复制包含核酸序列的表达载体所必需的其他元件。此类元件的实例包括但不限于复制起点和可选标记。可以使用常规方法(Ausubel et al.,(1987)in“Current Protocols in Molecular Biology,”John Wiley and Sons,New York,N.Y.)构建此类载体,并且可以商购获得。

[0151] 在一个实例中,编码Nmb蛋白(例如包括以下核酸分子的那些:与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的病毒载体是慢病毒或AAV载体,并且包括与Nmb编码序列可操作地连接的启动子。在一些实例中,启动子是组成型启动子,例如CMV、β肌动蛋白或T7,或组织特异性启动子,例如肺特异性启动子(例如,肺特异性表面活性剂蛋白B基因启动子、SP-B启动子、或CC10启动子)或皮肤特异性启动子(例如,kerain 14启动子、丝聚蛋白启动子或转谷氨酰胺酶3启动子)。

[0152] 制备包含编码Nmb蛋白(例如包括以下核酸分子的那些:与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、

至少99％或100％的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的异源DNA序列的重组病毒的方法是已知的。此类技术涉及例如,供体质粒中Nmb或Nmc编码序列侧翼的病毒序列与亲本病毒中存在的同源序列之间的同源重组。可以例如通过使用天然存在或人工插入亲本病毒载体中的独特限制性核酸内切酶位点来构建载体以插入异源DNA。

[0153] 当导入Nmb或Nmc编码序列的细胞是真核细胞时,转染方法包括磷酸钙共沉淀、机械程序(例如,显微注射、电穿孔、插入包入脂质体中的质粒)或病毒载体。真核细胞也可以与编码Nmb蛋白(例如包括以下核酸分子的那些:与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的多核苷酸序列,以及编码可选表型的第二外源DNA分子,例如单纯疱疹胸苷激酶基因共转化。另一种方法是使用真核病毒载体,例如猿猴病毒40(SV40)或牛乳头瘤病毒,以瞬时感染或转化真核细胞并表达蛋白质(参见例如,Eukaryotic Viral Vectors,Cold Spring Harbor Laboratory,Gluzman ed.,1982)。表达系统(诸如质粒和载体)可用于在在细胞(包括高等真核细胞,例如COS、CHO、HeLa和骨髓瘤细胞系)中产生Nmb蛋白。

[0154] E.施用与给药

[0155] 根据所选择的特定施用方式,包含Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)或编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的核酸的药物组合物可以与合适的

药学上可接受的载体(例如水或盐水)一起配制。可以使用公开的方法向患有神经病症的受试者施用此类组合物。在一个实例中,药物组合物适合于注射,例如注射到皮肤、静脉或肌肉中。

[0156] 在一些实施方案中,药物组合物基本上由Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质),或编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的核酸,以及药学上可接受的载体组成。在这些实施方案中,组合物中不包括另外的治疗有效剂。

[0157] 在其他实施方案中,药物组合物包含Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质),或编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID No:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)、或Nmc蛋白(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的核酸,以及药学上可接受的载体。可以包括另外的治疗剂,例如用于治疗由2型细胞因子引起的炎性病症的试剂(例如表1中所示的病症)。因此,药物组合物可以包含治疗有效量的另一种试剂。此类试剂的实例包括但不限于PGE2,在下面的“F”部分和表1中列出的那些或其组合。

[0158] 可用于本公开的药学上可接受的载体和赋形剂是常规的。参见例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy,The University of the Sciences in Philadelphia,Editor,Lippincott,Williams,&Wilkins,Philadelphia,PA,22st Edition (2013)。例如,肠胃外制剂通常包含可注射的流体,其是药学和生理学上可接受的流体载

体,例如水、生理盐水、其他平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等。对于固体组合物(例如散剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规的无毒固体载体可以包括例如,药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物中性载体外,待施用的药物组合物还可包含少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂、pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。可以包括的赋形剂是例如其他蛋白质,例如人血清白蛋白或血浆制品。

[0159] 在一些实施方案中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的核酸包括在控释制剂中,例如微囊化制剂中。可以使用各种类型的生物可降解和生物相容性聚合物、方法,以及可以使用封装各种合成化合物、蛋白质和核酸的方法(参见,例如,美国专利公开号2007/0148074;2007/0092575;和2006/0246139;美国专利号4,522,811;5,753,234;和7,081,489;PCT公开号WO/2006/052285;Benita,Microencapsulation:Methods and Industrial Applications,2nd ed.,CRC Press,2006)。

[0160] 在一些实施方案中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质),或编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc蛋白(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的核酸包括在纳米分散体系中。参见例如美国专利号6,780,324;美国专利公开号2009/0175953。例如,纳米分散体系包括生物活性剂和分散剂(例如,聚合物、共聚物或低分子量表面活性剂)。可以使用的示例性聚合物或共聚物包括聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚(D,L-乳

酸)(PLA)、聚(D,L-乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)、聚(乙二醇)。示例性的低分子量表面活性剂包括十二烷基硫酸钠、氯化十六烷基吡啶鎓、聚山梨醇酯、脱水山梨糖醇、聚(氧乙烯)烷基醚、聚(氧乙烯)烷基酯及其组合。在一个实例中,纳米分散体系包括PVP和ODP或其变体(例如80/20w/w)。在一些实例中,使用溶剂蒸发法制备纳米分散体,参见例如,Kanaze et al.,Drug Dev.Indus.Pharm.36:292-301,2010;Kanaze et al.,J.Appl.Polymer Sci.102:460-471,2006。关于核酸的施用,一种核酸施用方法是用病毒载体例如慢病毒或AAV载体直接治疗。如上所述,编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)的核苷酸序列,例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或编码Nmc蛋白(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的核酸分子可以置于启动子的控制下以增加Nmb或Nmc蛋白的表达。

[0161] Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或Nmb核酸编码序列(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子)、或Nmc编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)可以单独施用,或以各种组合施用,并与其他治疗组合物联合使用。另外,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或Nmb核酸编码序列(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子)、或Nmc编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)可以全身或局部施用。

[0162] 可以使用多种类型的释放递送系统。实例包括基于聚合物的体系,例如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己内酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酸酐。前述含药物的聚合物的微胶囊描述于例如,美国专利号5,075,109中。递送系统还包括非聚合物系统,例如脂质,包括甾醇,例如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸,或中性脂肪,例如甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡涂层;使用常规粘合剂和赋形剂的压缩片;部分融合的植入物等。具体实例包括但不限于:(a)侵蚀系统,其中Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或编码Nmb蛋白的核酸(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc编码序列(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子),以在基质中的形式包含,例如美国专利号4,452,775;4,667,014;4,748,034;5,239,660;和6,218,371中描述的那些;和(b)扩散系统,其中活性成分以受控的速率从聚合物中渗透,例如美国专利号3,832,253和3,854,480中所述的。另外,可以使用基于泵的硬件递送系统,其中一些适于植入。

[0163] 长期持续释放植入物可适合于治疗慢性病症,例如炎性病症(例如,参见表1)。如本文所用,长期释放是指植入物被配置和布置成在至少30天或至少60天内递送治疗水平的活性成分。长期持续释放植入物包括上述释放系统。已经描述了这些系统与核酸一起使用(参见美国专利号6,218,371)。为了在体内使用,核酸和肽对降解(例如,通过核酸内切酶和核酸外切酶)相对耐受。因此,可以使用Nmb或Nmc蛋白的修饰,例如包含C末端酰胺。

[0164] 在一些实例中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或编码Nmb蛋白的核酸(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或

Nmc编码序列(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)通过使用推进剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体),以气雾喷雾器(其可包括固体或液体颗粒)的形式,例如从加压包装或雾化器中局部施用于气道。在加压气雾剂的情况下,可以通过提供阀门来确定计量单位以递送计量的量。可以配制用于吸入器或吹入器的胶囊和药筒,其中含有化合物和合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0165] 在一些实施方案中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或编码Nmb蛋白的核酸(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc编码序列(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)通过吸入施用。例如,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或编码Nmb蛋白的核酸(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc编码序列(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)以雾化形式施用,例如使用雾化器,定量吸入器(MDI)或干粉吸入器(DPI)。使用的技术包括微型泵雾化器(例如AEROGEN*GO*®系统),旨在产生较大细颗粒级分的喷射雾化器(例如PARI LC*STAR*®)、在雾化过程中产生较小剪切力的喷射雾化器(例如HUDSON *MICROMIST*®)以及超声波雾化器(例如DeVilbiss*ULTRA-NEB*®)。

[0166] 适合与喷射或超声波喷雾器一起使用的制剂可包括以每mL溶液约0.1至25mg的浓度溶解在水中的Nmb蛋白或核酸分子。该制剂还可以包含缓冲剂和单糖(例如,用于蛋白质

稳定化和调节渗透压)。喷雾器制剂还可以包含表面活性剂,以减少或防止在形成气雾剂中因溶液的雾化导致的Nmb或Nmc蛋白或核酸分子的表面诱导的聚集(美国专利申请公开号2007/0065367)。

[0167] 与MDI装置一起使用的制剂通常包括细分的粉末,其包含借助表面活性剂悬浮在推进剂中的Nmb或Nmc蛋白或核酸分子。推进剂可以是用于该目的的任何常规材料,例如氢氯氟烃、氢氟烃或烃,包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和1,1,1,2-四氟乙烷,或其组合。合适的表面活性剂包括脱水山梨糖醇三油酸酯和大豆卵磷脂。油酸也可用作表面活性剂(美国专利申请公开号2007/0065367)。吸入系统的装置可以递送单剂量(例如通过泡罩包装),或者它可以设计成多剂量。为了确保给药的准确度,可以通过微处理器对制剂的递送进行编程,以使其发生在吸入周期的某个点。在某些情况下,MDI是便携手持式。

[0168] 干粉吸入器(DPI)也可用作气雾剂递送装置。DPI的基本设计包括计量系统、粉状组合物和分散组合物的方法。诸如旋转和振动的力可用于分散组合物。计量和分散系统可以是机械的或电驱动的,并且可以是微处理器可编程的。装置可以是便携手持式。吸入器可以设计成多剂量或单剂量,并可以使用诸如硬明胶胶囊或泡罩包装的选项来获得精确的单位剂量。Nmb或Nmc蛋白或核酸分子可以通过被动吸入(例如患者自己的吸气努力)从装置中分散,或者可以采用主动分散系统。治疗性组合物的干粉可通过诸如喷射研磨、喷雾染色和超临界流体制造的方法调整大小。可接受的赋形剂,例如糖、甘露糖醇和麦芽糖,可用于制备粉状制剂。

[0169] Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或编码Nmb蛋白的核酸(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子,或编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)或Nmc编码序列(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)可以溶解在载体中(诸如盐水),并使用上述装置雾化。可以使用NEXT GENERATION *IMPACTOR*® (NGI)(MSP Corp.,Shoreview,Mn)收集相关气雾剂,其使用一系列气动力学阶段以基于液滴大小将气雾剂分离并收集为单独的馏分,例如将沉积在小气道和肺泡中的那些。

[0170] 气雾剂粒度通常用质量中值气体动力学直径(MMAD)表示,该参数基于粒度、形状和密度。对于球形颗粒,MMAD等于MMD($p^{1/2}$),其中MMD为质量中值直径,r为体积密度。对于非球形粒子,MMAD等于MMD$(p/x)^{1/2}$,其中X是形状因子。因此,具有大于单位密度的颗粒的实际直径将小于其MMAD。

[0171] 根据粒度划分呼吸道内颗粒沉积的位置。在一个实例中,利用约1至约500微米的颗粒,例如利用约25至约250微米或约10至约25微米的颗粒。在其他实施方案中,使用约1至50微米的颗粒。为了在定量吸入器中使用,可以将小于约10微米的颗粒,例如约2至约8微米的颗粒,例如约1至约5微米的颗粒,例如2至3微米的颗粒施用于肺部。

[0172] 药物组合物的剂型可以通过选择的施用方式来确定。例如,除了注射液外,还可以使用局部、吸入、口服和栓剂制剂。局部制剂可包括滴眼剂、软膏剂、喷雾剂、贴剂等。吸入制剂可以是液体(例如,溶液剂或混悬剂),并且包括雾、喷雾剂等。口服制剂可以是液体(例如,糖浆剂、溶液剂或混悬剂),或固体(例如,散剂、丸剂、片剂或胶囊剂)。栓剂制剂也可以是固体、凝胶或混悬剂形式。对于固体组合物,常规的无毒固体载体可以包括药用级的甘露醇、乳糖、纤维素、淀粉或硬脂酸镁。

[0173] 在一些实例中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)、或Nmb核酸编码序列(例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的核酸分子)、或Nmc编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的治疗有效量是(1)减少炎症(例如在肺中或过敏反应部位),例如相对于不施用Nmb或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(2)减少IL-5(例如在ILC2和/或T细胞中),例如相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(3)减少IL-13(例如在ILC2和/或T细胞中),例如,相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,(4)减少ILC2和/或T应答,例如存在、增殖和/或激活的ILC2和/或T细胞数量,例如相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%,和/或(5)减少嗜酸性粒细胞增多(例如在肺或外周血中),例如,相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少75%或至少90%所必需的Nmb或Nmc蛋白或编码Nmb或Nmc的核酸分子的量。

[0174] 包含Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)的药物组合物可以配制成单位剂型,适用于精确剂量的个

体施用。在一个非限制性实例中,单位剂量包含约1μg至约1g的Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质),例如约1mg至100mg、10mg至约100mg、约50mg至约500mg、约50mg至约100mg、约100mg至约900mg、约250mg至约750mg、或约400mg至约600mg。在其他实例中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)的治疗有效量为约0.01mg/kg至约50mg/kg,例如,约0.1mg/kg至约10mg/kg,约0.1mg/kg至约1mg/kg或约1mg/kg至约10mg/kg。在其他实例中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)的治疗有效量为约0.1ug/kg至约10ug/kg、约0.1ug/kg至约1ug/kg,例如约0.8ug/kg。在特定的实例中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质)的治疗有效量为约1mg/kg至约10mg/kg,例如约2mg/kg。

[0175] 其他合适的范围包括从约100μg/kg体重到10mg/kg体重或更高的Nmb或Nmc蛋白剂量(例如,约0.1-10mg/kg、约1-20mg/kg、约5-50mg/kg、或约10-100mg/kg)。在某些实施方案中,将在例如5-40mg/kg、10-35mg/kg或20-25mg/kg的较窄范围内选择有效剂量。在其他实例中,剂量为约1-100mg,例如约1-10mg、约5-25mg、约10-50mg、约25-60mg或约50-100mg(例如,约1mg、5、mg、10mg、15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、55mg、60mg、70mg、80mg、90mg或100mg)。在特定实例中,剂量为约20-60mg,并且在一个非限制性实例中为约25mg。

[0176] 包含Nmb编码序列(例如编码与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的蛋白质的一种,例如与SEQ ID NO:2具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%

或100％的序列同一性的核酸分子)或Nmc编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的药物组合物可以配制成单位剂型,适用于精确剂量的个体施用。通常,携带待施用的Nmb蛋白的核酸编码序列的重组病毒载体的量基于病毒颗粒的滴度。在一个非限制性实例中,例如当病毒载体用于施用编码Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)的核酸或Nmc编码序列(例如,编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)时,例如含有与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的核酸分子的载体,单位剂量(例如0.5-1.5μl)包含每只哺乳动物约10^5至约10^{10}个噬菌斑形成单位(pfu)/ml。因此,在一些实例中,向受体受试者施用每只哺乳动物约10^5至约10^{10}pfu/ml的剂量的组合物中的重组病毒。在一些实例中,向受体受试者施用至少10^5pfu/ml/哺乳动物,至少10^6pfu/ml/哺乳动物,至少10^7pfu/ml/哺乳动物,至少10^8pfu/ml/哺乳动物,至少10^9pfu/ml/哺乳动物,或至少10^{10}pfu/ml/哺乳动物的剂量。将组合物施用于哺乳动物的方法的实例包括但不限于,将组合物注射至患病组织(例如,皮肤或肺)或静脉内、皮下、皮内或肌内施用。

[0177] 包含Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)、或Nmb编码序列(例如与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的核酸分子)、或Nmc编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的本公开的组合物可以通过任何方式(包括口服、静脉内、肌内、腹膜内、鼻内、皮内、实质内、脑室内、鞘内(例如脑池和腰椎)、皮下、通过吸入或通过栓剂)施用于人或其他动物。在一个非限制性实例中,组合物通过注射施用。在一些实例中,可以使用组合物的位点特异性施用,例如通过将Nmb或Nmc蛋白或编码序列施用于皮肤组织或肺(例如,通过吸入)。

[0178] 治疗可以涉及单次施用或多次施用(例如至少两次单独施用),例如在几天至几个月甚至几年时间内给药。例如,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少

98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)、或Nmb编码序列(例如与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的一种)或Nmc编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)的治疗有效量可以在治疗过程中以单次给药或多次给药施用,例如每天、每周、每月或每年。在特定的非限制性实例中,治疗涉及每月施用一次,每年施用一次或每隔一个月施用一次。在一些实例中,在多次给药施用的情况下,至少两次单独施用可以间隔至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少一年。

[0179] 在一些实例中,所施用的第一剂量(在一些实例中是唯一的剂量)发生在病症(例如2型细胞因子炎症)发作的1分钟内、10分钟内、15分钟内、30分钟内、1小时内、2小时内、3小时内、4小时内、5小时内、6小时内、12小时内、24小时内、48小时内、72小时内、96小时内、1周内、2周内、3周内、4周内、1个月内、2个月内或3个月内,例如在病症发作的1至24小时内、2至24小时内、4至24小时内或1至96小时内。

[0180] 在一些实施方案中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)、或Nmb编码序列(例如与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的核酸分子)、或Nmc编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)在暴露于过敏性触发因素之前被预防性施用。例如,哮喘患者可以在运动前或暴露于环境触发因素(如污染或过敏原)之前用Nmb或Nmc蛋白或核酸分子治疗。预防性治疗也可用于治疗有化学暴露风险的受试者,例如化学事故的第一响应者。Nmb或Nmc蛋白或核酸分子也可以预防性地施用于无症状个体,所述无症状个体反复暴露于已知触发受试者哮喘发作的试剂。在一个实例中,可以向健康个体施用有效量的Nmb或Nmc蛋白或核酸分子,所述健康个体反复暴露于已知可诱发哮喘发作的过敏原。在其他实施方案中,可以向需要皮质类固醇(CS)治疗或既往接受过CS治疗的受试者施用Nmb或Nmc蛋白或核酸分子。Nmb或Nmc蛋白或核酸分子可以在参与触发哮喘发作的活动之前施用给患有哮喘的患者以减轻哮喘发作的严重性或完全避免哮喘发作。因此,在一些实施方案中,Nmb或Nmc蛋白或核酸分子的施用预防哮喘发作。在一些实施方案中,施用Nmb或Nmc蛋白或核酸分子以长期改善出现每日症状的患者的症状。

[0181] 在一些实例中,通过检测或测量(1)减少炎症(例如在肺中或过敏反应部位),例如相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少75％或至少90％,(2)减少IL-5(例如在ILC2和/或T细胞中),例如相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少75％或

至少90％,(3)减少IL-13(例如在ILC2和/或T细胞中),例如相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少75％或至少90％,(4)减少ILC2和/或T应答,例如存在、增殖和/或激活的ILC2和/或T细胞数量,例如相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少75％或至少90％,和/或(5)降低嗜酸性粒细胞增多(例如在肺或外周血中),例如相对于不施用Nmb蛋白或Nmc蛋白或核酸分子,例如减少至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少75％或至少90％来测量有效性。

[0182] 在一些实例中,通过监测肺功能来测量治疗的有效性。例如,可以在治疗之前、期间或之后研究肺功能的各种可测量参数。肺功能可以通过测试肺部几种可物理测量的操作中的任一种来监测,包括但不限于吸气流速、呼气流速和肺容积。这些参数中的一个或更多个的统计上显著增加表明该治疗具有有效性。症状减轻、哮喘加重、使用急救吸入器或炎症措施也是疗效的证据。

[0183] 临床实践中最常采用的测量肺功能的方法包括定时测量吸气和呼气动作以测量特定参数。例如,FVC测量从患者最初深吸气用力呼出的总体积(以升计)。与FEV1一起评估时,该参数允许对支气管收缩进行定量评估。由FVC或FEV1中的数学公式确定的统计上显著的增加反映了支气管收缩的减少,并表明该疗法是有效的。

[0184] 除了测量呼出的空气的体积作为肺功能的指标外,在呼气周期的不同部分测量的以升/分钟计的流量也可以用于确定患者的肺功能状态。特别地,最大呼气流量(在强制最大呼气期间以升/分钟计的最高气流速率)与哮喘和其他呼吸系统疾病患者的整体肺功能密切相关。因此,在施用TPO抑制剂后,最大呼气流量的统计上显著增加表明该疗法是有效的。

[0185] F.另外的治疗的施用

[0186] 在一些实例中,Nmb蛋白(例如与SEQ ID NO:1、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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)或Nmc蛋白(例如与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质)Nmb编码序列(例如与SEQ ID NO:2具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的一种)或Nmc编码序列(例如编码与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的蛋白质的核酸分子)与一种或更多种其他试剂(例如可用于治疗表1所列的炎性病症或其他病症的那些)联合(例如序贯、同时或同期)施用。术语“联合施用”或“共同施用”是指活性剂的并行和序贯施用。

[0187] 在一些实例中,向受试者施用Nmb或Nmc蛋白或Nmb或Nmc编码序列联合有效剂量的皮质类固醇(例如甲泼尼龙或泼尼松)、抗组胺药或两者。在一些实例中,向受试者施用Nmb蛋白或Nmb编码序列联合有效剂量的IL-4抑制剂(例如,度普利尤单抗)、IL-5抑制剂(例如,美泊利单抗、贝那利珠单抗和瑞利珠单抗)和I1-13抑制剂(例如,曲罗芦单抗和来瑞组单

抗)或其组合。在另一实例中,向受试者施用Nmb或Nmc蛋白或Nmb或Nmc编码序列联合有效剂量的PGE2。

[0188] 在一些实例中,向受试者施用Nmb或Nmc蛋白或Nmb或Nmc编码序列联合有效剂量的用于预防或治疗与气道病症(例如哮喘或COPD)有关的一种或更多种体征或症状的试剂。例如,也可以施用一种或更多种β-激动剂,包括β-2激动剂(如沙丁胺醇)、一种或更多种白三烯拮抗剂/形成抑制剂(例如齐留通,ZYFLO®,Abbott Laboratories,monteleukast,SINGULAIR®、Merck and Company,和其他)、阻断IgE的抗体、祛痰剂或其组合。

[0189] 在一些实例中,向患有炎性疾病(例如过敏或过敏反应、鼻窦炎、哮喘(轻度、中度或重度,包括嗜酸细胞性哮喘)、COPD、特发性肺纤维化(IPF)、鼻炎、EGPA、嗜酸细胞性食管炎、湿疹、荨麻疹、慢性瘙痒、血管性水肿、结膜炎或特应性皮炎)的受试者施用Nmb或Nmc蛋白或Nmb或Nmc编码序列,联合有效剂量的一种或更多种其他治疗剂。例如,如果受试者有过敏反应(例如季节性过敏,或对粉尘/霉菌、食物(例如贝类、蛋类、牛奶、坚果、小麦)、动物(例如皮屑)、植物、药物(例如抗生素,如磺胺类或青霉素、阿司匹林、NSAID、抗惊厥药、化疗药物)、昆虫(例如蟑螂以及蜜蜂、大黄蜂、胡蜂、小黄蜂、火蚁的毒液)、病原体(例如,病毒、细菌、真菌、寄生虫)或化学品(例如,乳胶)有过敏反应),则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种解充血药、抗组胺药、皮质类固醇,免疫疗法和肾上腺素。例如,如果受试者患有鼻窦炎,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的抗生素(例如阿莫西林)和/或皮质类固醇。例如,如果受试者患有哮喘(轻度、中度或重度,包括嗜酸细胞性哮喘),则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种皮质类固醇、糖皮质激素、支气管扩张药(例如短效(例如,沙丁胺醇)或长效(例如,福莫特罗)β-2肾上腺素能激动剂、抗胆碱能药(例如,噻托溴铵和异丙托溴铵)、长效β激动剂(LABA)白三烯素拮抗剂、IL-4抑制剂(例如度普利尤单抗)、美泊利单抗、贝那利珠单抗、瑞利珠单抗、曲罗芦单抗和来瑞组单抗。例如,如果受试者患有COPD,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种皮质类固醇、支气管扩张药(例如短效(例如,沙丁胺醇)或长效(例如,福莫特罗)β-2肾上腺素能激动剂、抗胆碱能药(例如,噻托溴铵和异丙托溴铵)、抗生素(例如,红霉素)和补氧。例如,如果受试者患有特发性肺纤维化(IPF),则方法可以进一步包括施用治疗有效量的吡非尼酮和/或血管激酶抑制剂(例如,尼达尼布)。例如,如果受试者患有鼻炎,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种抗组胺鼻喷雾剂、皮质类固醇鼻喷雾剂、抗胆碱能药鼻喷雾剂(例如,异丙托溴铵)、解充血药(例如,伪麻黄碱或去氧肾上腺素)。例如,如果受试者患有EGPA,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种美泊利单抗、糖皮质激素(例如,泼尼松龙)、免疫抑制剂(例如,硫唑嘌呤和环磷酰胺)和甲氨蝶呤。例如,如果受试者患有嗜酸细胞性食管炎,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的局部用皮质类固醇(例如,布地奈德、氟替卡松)和/或质子泵抑制剂(例如,奥美拉唑、兰索拉唑、右兰索拉唑、艾司奥美拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑、艾普拉唑)。例如,如果受试者患有湿疹,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的皮质类固醇(例如,氢化可的松、丙酸氯倍他索)和/或免疫抑制剂(例如,吡美莫司、他克莫司)。例如,如果受试者患有荨麻疹,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种抗组胺药(例如,苯海拉明、羟嗪、氯雷他定、西替利嗪、地氯雷他定)、白三烯拮抗药(例如,孟鲁司特和扎鲁司特)、口服糖皮质激素、消炎药、奥马珠单抗、免疫抑制剂。例如,如果受试者患有慢性瘙痒,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种

或更多种皮质类固醇(例如,可的松和泼尼松)、钙神经素抑制剂(例如,吡美莫司和他克莫司)和抗抑郁药(例如,百忧解和左洛复)。例如,如果受试者患有血管性水肿,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的抗组胺药(例如西替利嗪)和/或雄激素。例如,如果受试者患有结膜炎,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种抗组胺药(例如,苯海拉明)、肥大细胞稳定剂(例如,色甘酸)或抗生素。例如,如果受试者患有特应性皮炎,则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种曲罗芦单抗、局部用皮质类固醇(例如,氢化可的松)、局部用钙神经素抑制剂(例如,他克莫司或吡美莫司)、全身免疫抑制剂(例如,ciclospoin、甲氨蝶呤、干扰素γ-1b)。例如,如果受试者患有嗜酸性病症(例如,嗜酸性食管炎、嗜酸性胃炎、嗜酸性肠胃炎、嗜酸性肠炎、嗜酸性结肠炎、嗜酸性哮喘、嗜酸性胃肠道病症(EGID)、嗜酸性筋膜炎、EGPA、嗜酸性肺病、高嗜酸性粒细胞综合征(HES)),则方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种局部用或全身性类固醇(例如,皮质类固醇、糖皮质激素,例如泼尼松)、基于氨基酸的饮食、和免疫抑制剂(例如,硫唑嘌呤和环磷酰胺)。在一些实例中,向患有寄生虫或真菌感染的受试者施用Nmb或Nmc蛋白或Nmb或Nmc编码序列,并且方法可以进一步包括施用治疗有效量的抗真菌剂(例如,多烯(例如,两性霉素B、制霉菌素、那他霉素)、唑类(例如,氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑)、烯丙胺(例如,特比萘芬)和棘白菌素(例如,卡泊芬净)和/或抗寄生虫剂(例如,驱虫剂、抗原生动物剂、抗阿米巴药)。

[0190] 在一些实例中,向患有嗜酸性粒细胞白血病(慢性、急性或克隆性)的受试者施用Nmb或Nmc蛋白或Nmb或Nmc编码序列,并且方法可以进一步包括施用治疗有效量的一种或更多种化学疗法(例如,阿糖胞苷、蒽环类、组胺二盐酸盐、白细胞介素2)、格列卫、酪氨酸激酶抑制剂(例如,索拉非尼、midostaruin、帕纳替尼)和造血干细胞移植。

[0191] 在一些实例中,向患有霍奇金淋巴瘤的受试者施用Nmb或Nmc蛋白或Nmb或Nmc编码序列,并且方法可以进一步包括施用治疗有效量的以下的一种或更多种:来瑞组单抗、MOPP、放射疗法、ABVD(阿霉素、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪)、Stanford V(阿霉素、博来霉素、长春碱、长春新碱、氮芥、依托泊苷、泼尼松)和BEACOPP(多柔比星、博来霉素、长春新碱、环磷酰胺、丙卡巴肼、依托泊苷、泼尼松)。

[0192] IV.组合物

[0193] 还提供了可以与所公开的方法一起使用的组合物。在一个实例中,组合物包括与SEQ ID NO:1具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的分离的Nmb蛋白,或与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的分离的Nmc蛋白和脂质体,其中Nmb或Nmc蛋白被包封在脂质体中。在一个实例中,组合物包含Nmb融合蛋白,其由以下组成:(1)与SEQ ID NO:1具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的Nmb蛋白,或与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的Nmc蛋白,和(2)细胞穿透肽(或编码这种融合蛋白的核酸分子)。在一个实例中,组合物包括包含与SEQ ID NO: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或37(其不是SEQ ID NO:1)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同

一性的分离的非天然Nmb蛋白,药学上可接受的载体和任选的脂质体。在一个实例中,组合物包含至少一种非天然Nmb蛋白,例如与SEQ ID NO:3、4、5、6、11、12、13、14、20、22、26、27、28、29、30、31、32、35、36或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性的一种(其不是SEQ ID NO:1);和/或与SEQ ID NO:26、27、29、35或36具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％或100％的序列同一性的一种(其不是SEQ ID NO:1)。在一个实例中,组合物包括(1)天然Nmb蛋白(例如,SEQ ID NO:1)和(2)非天然Nmb蛋白,例如包含与SEQ ID NO: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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的一种(其不是SEQ ID NO:1)。在一个实例中,组合物包括(1)SEQ ID NO:3、4、6、7、9、10、11、12、14、15和19中的一种或更多种以及(2)SEQ ID NO:3、4、5、6、9、11、12、13、14、18、19、20、21、22和23中的一种或更多种(其中组合物可以进一步包含天然Nmb蛋白,例如SEQ ID NO:1)。

[0194] 在一个实例中,组合物包括与SEQ ID NO: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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的分离的非天然Nmb蛋白(其不是SEQ ID NO:1)和药学上可接受的载体(例如水或盐水)。在一些实例中,非天然Nmb蛋白被包封在脂质体中。在一些实例中,非天然Nmb蛋白是融合蛋白的一部分,其由(1)与SEQ ID NO: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或37具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的非天然Nmb蛋白,以及(2)细胞穿透肽(或编码这种融合蛋白的核酸分子)组成。在一些实例中,组合物包含非天然Nmb编码序列替代非天然Nmb蛋白。在其他实例中,Nmc蛋白是融合蛋白的一部分,其由(1)与SEQ ID NO:38具有至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性的Nmb蛋白和(2)细胞穿透肽(或编码这种融合蛋白的核酸分子)组成。这样的组合物可以进一步包括其他材料,例如药学上可接受的载体,例如水或盐水。在一些实例中,组合物包括Nmb或Nmc编码序列替代Nmb或Nmc蛋白。

[0195] 可以使用的示例性细胞穿透肽包括亲水性肽(例如,TAT[YGRKKRRQRRR;SEQ ID NO:57]、SynB1[RGGRLSYSRRRFSTSTGR;SEQ ID NO:39]、SynB3[RRLSYSRRRF;SEQ ID NO:40]、PTD-4[PIRRRKKLRRLK;SEQ ID NO:41]、PTD-5[RRQRRTSKLMKR;SEQ ID NO:42]、FHV Coat-(35-49)[RRRRNRTRRNRRRVR;SEQ ID NO:43]、BMV Gag-(7-25)[KMTRAQRRAAARRNRWTAR;SEQ ID NO:44]、HTLV-II Rex-(4-16)[TRRQRTRRARRNR;SEQ ID NO:45]、D-Tat[GRKKRRQRRRPPQ;SEQ ID NO:46]、R9-Tat GRRRRRRRRRPPQ[SEQ ID NO:47]和穿膜肽[RQIKWFQNRRMKWKK;SEQ ID NO:48])、两亲性多肽(例如,MAP[KLALKLALKLALALKLA;SEQ ID NO:49]、SBP[MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV;SEQ ID NO:50]、FBP[GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV;SEQ ID NO:51]、MPG ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:52]、MPG(ΔNLS)[ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-cya;SEQ ID NI:53]、Pep-2[ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:54]和转运素[GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL;

SEQ ID NI:55])、周期序列(例如pVec、聚精氨酸RxN(4<N<17)嵌合体、聚赖氨酸KxN(4<N<17)嵌合体、(RAca)6R、(RAbu)6R、(RG)6R、(RM)6R、(RT)6R、(RS)6R、R10、(RA)6R、R7和pep-1[ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cya;SEQ ID NO:56])、Cr10(环状pol-精氨酸CPP)、TAT_{48-57}、TAT_{47-57}或TAT_{49-57};穿膜肽;Pep-1;P物质,SP;聚精氨酸,例如R5-R12;pVEC;转运素;MAP;diatos肽载体1047、DPV1047、VECTOCELL®;MPG;ADP核糖基化因子,ARF,例如ARF_{1-22};BPrPr(例如$BPrPr_{1-28}$);p28;VT5;Bac 7,例如Bac_{1-24};C105Y;PFVYLI(SEQ ID NO:58);和Pep-7。

[0196] 在一些实例中,组合物是液体。在一些实例中,将组合物冷冻干燥或冻干。

[0197] 根据施用方式和剂型,此类药物组合物可进一步包含一种或更多种稀释剂、填充剂、粘合剂和其他赋形剂。治疗惰性的无机或有机载体的实例包括但不限于,乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石、植物油、蜡、脂肪、多元醇如聚乙二醇、水、蔗糖、醇、甘油等。也可以添加各种防腐剂、乳化剂、分散剂、调味剂、湿润剂、抗氧化剂、甜味剂、着色剂、稳定剂、盐、缓冲剂等。

[0198] 在一些实例中,组合物还包含一种或更多种载体、辅助物质或稳定剂,例如缓冲剂(例如磷酸盐、柠檬酸盐、tris或乙酸钠和其他有机酸);抗氧化剂例如抗坏血酸;低分子量多肽(少于约10个残基),蛋白质例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、亮氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,例如葡萄糖、蔗糖、甘露糖、乳糖、柠檬酸盐、海藻糖、麦芽糊精或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖醇,例如甘露醇或山梨糖醇);成盐的抗衡离子,例如钠和/或非离子表面活性物质,例如吐温、Pluronics或聚乙二醇(PEG)。

[0199] 在一些实例中,组合物包含在喷雾器、定量吸入器(MDI)或干粉吸入器(DPI)中。用于从粉末吸入器装置分配的制剂可以包括含有Nmb肽的细碎的干粉,或核酸分子也可以包括膨胀剂,例如乳糖、山梨糖醇、糖或甘露糖醇,其量有助于粉末从装置中的分散,例如制剂的50至90重量%。可以将化合物制备成平均粒度小于10μM(例如0.5至5μM)的颗粒形式,以递送至远端肺部(美国专利申请公开号2007/0065367)。

[0200] 通过以下非限制性实施例说明本公开。

[0201] 实施例

[0202] 实施例1

[0203] 材料和方法

[0204] 本实施例提供了以下实施例中使用的材料和方法。

[0205] 小鼠

[0206] 从Jackson Laboratory购买8-10周龄C57BL(6)野生型(WT)、$Mcpt8^{tm1(cre)Lksy}$、ROSA26iDTR和Rag2KO小鼠。如先前(Sullivan et al.,Nat Immunol.2011Jun;12(6):527-35,2011)所述,通过将$Mcpt8^{tm1(cre)Lksy}$小鼠与ROSA26iDTR小鼠杂交,获得嗜碱性粒细胞缺失小鼠。将所有小鼠维持在无特定病原体的设施中。

[0207] 巴西奴卡菌感染和物质施用

[0208] 如先前(Camberis et al.,2003,Animal model of Nippostrongylus brasiliensis and Heligmosomoides polygyrus.Current protocols in immunology/edited by John E.Coligan...[et al.]Chapter 19:Unit 19.12.)所述,进行维持、恢复、

感染和分离巴西奴卡菌(N.brasiliensis)幼虫的方法。通过皮下注射使小鼠感染约500巴西奴卡菌幼虫。为了嗜碱性粒细胞缺失,每隔一天用0.375μg的白喉毒素i.p.处理WT和嗜碱性粒细胞缺失小鼠;在巴西奴卡菌幼虫感染后3-7天后处死小鼠。对于神经介素B处理,将小鼠麻醉并用通过气管内滴注施用的溶解于50μL的PBS中的10μg的神经介素B(MP Biomedicals)处理。对于抗体介导的嗜碱性粒细胞缺失,在巴西奴卡菌感染后第1、3和5天用20μg的抗FceR1α抗体(克隆MAR-1,eBioscience)或抗CD200R3抗体(克隆Ba103,hycult biotech)i.p.处理Rag2缺陷小鼠。

[0209] 过继转移

[0210] 每3天向WT小鼠注射(i.p.)200μL的PBS中的重组IL-3(1μg)和α-IL-3抗体(0.5μg)(BioLegend:克隆MP2-8F8)的组合,共8天。尸检时,制备脾脏的单细胞悬液,并对嗜碱性粒细胞群进行分选纯化。将15,000个嗜碱性粒细胞重悬于50μL的PBS中,并在感染后第3、4、5和6天通过气管滴注转移到每只小鼠中。

[0211] 血管内体内染色

[0212] 如先前(Laidlaw et al.Immunity 41:633-645,2014)所述进行血管内体内染色方案。简言之,在安乐死前5分钟,向小鼠注射在300μL的PBS中稀释的3μg的靶向CD200R的荧光标记抗体(克隆OX110,eBioscience)。

[0213] 肺和支气管肺泡灌洗(BAL)细胞悬液的制备

[0214] 对于尸检后的BAL收集,注射5mL的PBS并从每只小鼠的气管吸出,收集后记录收集的BAL的体积。BAL收集后,尸检时收集肺,并如前所述制备用于流式细胞术分析的单细胞悬液(Jungblut et al.,J Vis Exp 29:1266,2009)。简言之,将肺组织切碎并在含有2.5%的FBS、胶原酶D(2mg/mL,Roche)和DNAse I(80U/mL,Roche)的HBSS中在37℃下孵育30分钟。细胞悬液通过100μM的过滤器过滤,并通过流式细胞术分析。另外,收集肺组织切片用于实时PCR和组织学分析。

[0215] 流式细胞术和细胞分选

[0216] 细胞用单克隆抗小鼠荧光偶联抗体染色:来自eBioscience或BD Biosciences的B220(RA3-6B2)、c-Kit(ACK2)、CD3(145-2C11)、CD4(GK1.5)、CD5(53-73)、CD19(1D3)、NK1.1(PK136)、CD11b(MI/70)、CD11c(N418)、IgE(23G3)、FcεRI(MAR-1)、CD49b(DX5)、CD45(30-F11)、CD90(5E10)、CD127(A7R34)、F4/80(BM8)、γδTCR(eBioGL3)、Siglec-F(E50-2440)、Ly6G(1A8)、Ly6C(AL-21)、IL-5(TRFK5)、IL-13(eBio13A)、Ter-119(TER-119)。对于细胞内染色,按照生产商的说明,将细胞与白细胞激活混合物和BD GolgiPlug™(BD Biosciences)在37℃下孵育5小时。嗜碱性粒细胞经分析为$CD45^+CD3^-CD19^-FceR1^+CD49b^+$。嗜酸性粒细胞经分析为$CD45^+CD11b^+Siglec\text{-}F^+CD11c^-$。中性粒细胞经分析为活$CD45^+CD11b^+Ly6G^+$。ILC2经分析为$CD45^+CD3^-CD19^-CD11b^-CD11c^-NK1.1^-B220^-CD5^-Ter\text{-}119^-\gamma\delta TCR^-CD90^+CD127^+IL\text{-}5^+IL\text{-}13^+$。在BD Fortessa流式细胞仪(BD Biosciences)上采集样品,并使用FlowJo软件(v10.0.5,Tree Star)分析。使用FACSAriaII(BD Bioscience)进行细胞分选。

[0217] ILC2体外培养

[0218] 巴西奴卡菌感染后第7天从WT或嗜碱性粒细胞缺失小鼠的肺中分离肺细胞。将ILC群体($CD45^+Lin^-CD90^+CD127^+$)分选纯化,并在100ng/mL的IL-2、IL-7和溶媒(PBS)或10μg/mL的细胞介素B存在下将10,000个细胞培养24小时。通过ELISA在无细胞上清液中定量IL-5和

IL-13。

[0219] RNA分离和定量实时PCR分析

[0220] 通过在TRIzol(Invitrogen)中均质化分离肺组织切片的RNA,然后进行苯酚-氯仿提取和异丙醇沉淀。cDNA根据标准方案使用Superscript逆转录酶(Invitrogen)生成,并用作实时PCR的输入。使用ΔΔCT方法,使用SYBR绿色化学方法(Applied Biosystems)以β-肌动蛋白作为内源管家基因来分析实时数据。所有反应均在ABI 7500快速实时PCR系统(Applied Biosystems)上运行。将样品归一化为天然对照。使用以下来自Qiagen的QuantiTech引物测定法:Mcpt1(QT00157864)、IL-4(QT00160678)、IL-5(QT00099715)、IL-13(QT00099554)、Mcpt8(QT00131565)、Nmb(QT00105945)、Nmbr1(QT00312494)、Muc5ac(QT01161104)。

[0221] 脉搏血氧仪。

[0222] 按照生产商的说明,使用MouseOx Plus® (Starr Lifesciences Corp)评估氧饱和度。简言之,在巴西奴卡菌感染前1天,除去大腿周围的毛发,用5%异氟烷麻醉小鼠,并使用大腿传感器监测氧饱和度约5分钟的时间间隔。

[0223] 统计学

[0224] 结果显示为平均值±平均值的标准误。使用GraphPad Prism版本6中的Student t检验进行统计分析。

[0225] 实施例2

[0226] 嗜碱性粒细胞调节蠕虫诱导的炎症

[0227] 检查在有和没有嗜碱性粒细胞的情况下由Nb诱导的2型细胞因子介导的炎症的参数。

[0228] 嗜碱性粒细胞的谱系特异性缺失(11)未改变胃肠道炎症或蠕虫排出(图1A),而嗜碱性粒细胞缺失导致肺中2型细胞因子应答显著增加(图1B)。用于区分血液相比组织驻留细胞的体内染色方案(12)显示,在感染后第3天开始并在感染后第5天达到峰值时,在肺中可以发现组织驻留的嗜碱性粒细胞群(图1C、1D)。

[0229] 虽然据报道在2型细胞因子应答中激活的效应细胞可促进寄生虫清除,但它们也可促进受寄生虫影响的组织的完整性(2)。由于Nb幼虫在大多数嗜碱性粒细胞到达之前在感染后的第3天离开肺组织,因此嗜碱性粒细胞可以调节炎症以尝试恢复肺功能,而不是限制寄生虫负荷。支持该假说的是,Nb感染的嗜碱性粒细胞缺失的小鼠表现出改变的肺病理学,其特征是粘液产生增加(图2A)和炎性细胞浸润(图1E、2B),与对照小鼠相比,氧水平显著降低(图1F)。总之,这些数据表明嗜碱性粒细胞群负调控感染诱导的2型细胞因子应答,并有助于维持感染后的肺功能。

[0230] 实施例3

[0231] 嗜碱性粒细胞负调节ILC2应答

[0232] 在实施例2中观察到的肺病理学的显微镜分析表明,嗜碱性粒细胞缺失小鼠具有升高的感染诱导的嗜酸性粒细胞应答。

[0233] 支气管肺泡灌洗(BAL)液和肺浸润的流式细胞术分析证实,虽然感染诱导的中性粒细胞没有显著改变(图3A、4A),但嗜碱性粒细胞缺失小鼠表现出显著增加的BAL和肺嗜酸性粒细胞应答(图3B、4B)。Nb诱导的嗜酸性粒细胞应答和粘液产生取决于2型固有淋巴样细

胞(ILCS2)和/或CD4+T细胞(1-3)产生的IL-5和IL-13。当ILC2应答很重要时,固有窗口期间感染后的最初几天(第3-5天)发生肺嗜碱性粒细胞应答(13,14)。此外,已经证明嗜碱性粒细胞与ILC2通信并改变其激活状态的能力(2)。

[0234] 因此,确定嗜碱性粒细胞缺失动物是否表现出升高的感染诱导的ILC2应答,其与增多的粘液产生和嗜酸性粒细胞相关(14)。有趣的是,与对照相比,嗜碱性粒细胞缺失小鼠的BAL和肺组织中的ILC2群都增加(图3C、4C)。此外,感染后嗜碱性粒细胞缺失小鼠的BAL和肺组织中还检测到产生IL-5和IL-13的ILC2增加(图3D、3E、4D)。为了排除脱靶缺失效应的可能性,使用了功能获得方法。白喉毒素受体(DTR)阴性嗜碱性粒细胞被引入到嗜碱性粒细胞缺失小鼠中。DTR阴性嗜碱性粒细胞的气管内转移到嗜碱性粒细胞缺失小鼠中足以抑制BAL和肺两者中的ILC2应答和嗜酸性粒细胞回到WT水平(图3F-3H、4E-4G)。总之,这些功能丧失和功能获得方法表明,嗜碱性粒细胞负调控Nb感染后的肺ILC2应答。

[0235] 实施例4

[0236] 嗜碱性粒细胞促进Nmb在ILC2上的表达

[0237] 为了确认嗜碱性粒细胞缺失的影响独立于适应性淋巴细胞而发生,用嗜碱性粒细胞缺失抗体Ba103处理重组激活基因(Rag2)缺陷的小鼠。与对照小鼠相比,用Ba103处理的Rag2-/-小鼠表现出显著升高的Nb诱导的ILC2应答(图5A)和升高的嗜酸性粒细胞增多(图5B)。总之,功能丧失和功能获得方法均表明,嗜碱性粒细胞负调控Nb感染后的肺ILC2应答。

[0238] 为了鉴定嗜碱性粒细胞调节ILC2的机制,在Nb后对肺ILC2进行全基因组转录谱分析。与从嗜碱性粒细胞缺失小鼠中分选纯化的ILC2相比,来自对照动物的ILC2富集用于与感觉转导、七次跨膜结构域受体(7TM)、G蛋白偶联受体信号传导和视紫红质样信号传导相关的途径(图5C)。

[0239] 值得注意的是,与这些途径相关的驱动基因之一是神经介素B受体(Nmbr)(图5D)。神经介素B(Nmb)是神经介素肽家族的一部分,包括神经介素A、B、C、K、L、N、S和U(15,16)。神经介素B是蛙皮素样肽,其在哺乳动物的中枢神经系统、肺、胃肠道和脂肪组织中表达(15,17)。先前的研究表明,Nmb及其受体定位于粘膜下层中发现的神经元(18)。在与其受体结合后,据报道Nmb调节细胞生长、体温、血压和葡萄糖水平,然而,其调节免疫力和炎症的能力仍有待确定(15)。

[0240] 为了研究嗜碱性粒细胞是否在Nb感染后调节肺中Nmb信号传导通路,检验了在存在或不存在嗜碱性粒细胞的情况下Nmb及其受体的表达(如通过减少的Mcpt8表达证实的)(图5E)。Nb感染后未检测到Nmb表达的变化(图5F);然而,在感染的动物中Nmbr以显著更高的水平表达。此外,嗜碱性粒细胞缺失导致肺中Nmbr表达的显著降低(图5G)。与RNAseq分析一致,与对照相比,从嗜碱性粒细胞缺失小鼠中分选纯化的ILC2中,Nmbr表达也显著降低(图5H)。

[0241] 实施例5

[0242] Nmb抑制2型细胞因子应答

[0243] 为了确定Nmb是否充当2型细胞因子应答的负调节剂,使小鼠感染钩虫属,并用重组天然Nmb(SEQ ID NO:1)处理。在感染后第7天,评估2型细胞因子依赖性炎症的参数。

[0244] 令人惊讶的是,虽然Nmb处理对感染诱导的中性粒细胞无影响,但Nmb处理的小鼠表现出降低的ILC2应答(图6A、IL-5和IL-13表达(图6B)、嗜酸性粒细胞增多(图6C)并且清

除蠕虫失败,与对照小鼠一样有效(图6D)。这些数据表明Nmb充当2型细胞因子介导的免疫的负调节剂。

[0245] 为了确定Nmb是否可以直接抑制肺中Nb激活的ILC2,以及嗜碱性粒细胞是否调节这一过程,对来自Nb感染的对照和嗜碱性粒细胞缺失小鼠的肺ILC2进行分选纯化,并在存在或不存在Nmb的情况下培养过夜。值得注意的是,用Nmb处理显著降低了从嗜碱性粒细胞充足的小鼠(而非嗜碱性粒细胞不足的小鼠)分离的ILC2产生的IL-5和IL-13(图6E)。

[0246] 实施例6

[0247] Nmb处理足以抑制过敏性气道炎症

[0248] ILC2应答是2型细胞因子产生、嗜酸性粒细胞增多和与过敏性炎症相关的粘液产生的主要因素(14)。此外,激活的ILC2在激活TH2细胞中起重要作用,TH2细胞是过敏性炎症的关键调节剂(13,14)。因此,ILC2代表具有显著治疗潜力的细胞群,其可以被靶向以治疗多种形式的过敏性疾病。上面提供的数据表明,Nmb在寄生性蠕虫感染的情况下可以抑制ILC2应答。为了证明Nmb可用于治疗过敏性炎症,进行以下实验。

[0249] 利用已知依赖于ILC2的木瓜蛋白酶诱导的过敏性气道炎症的已确认模型(19,20)。用木瓜蛋白酶处理的小鼠表现出升高的百分比的ILC2(图7A),通过ILC2的升高表达的IL-5和IL-13(图7B)和肺嗜酸性粒细胞增多(图7C)。至关重要的是,Nmb的体内施用足以减少木瓜蛋白酶诱导的ILC2应答和嗜酸性粒细胞增多(图7A-7C),表明Nmb可用于治疗过敏性炎症。因此,Nmb在体内和体外均负调节ILC2应答。

[0250] ILC2与它们的适应性TH2对应物具有许多共同的特征,因此,Nmb也可能具有抑制TH2细胞的能力(13,14)。在Nb后评估的时间点,大多数2型细胞因子是ILC2衍生的(14),并且Nmb对TH2细胞应答的任何影响可能都难以检测到。为了解决这个问题,在Nb后第7天分离肺引流的LN,并在有或没有重组Nmb的情况下用抗CD3和抗CD28刺激以激活T细胞。用抗CD3和抗CD28处理的LN细胞产生增加量的IL-5和IL-13(图7D、7E)。用Nmb处理的培养物显示显著降低水平的IL-5和13(图7D、7E)。这些数据表明,Nmb也抑制从激活的T_H2细胞产生细胞因子。

[0251] 实施例7

[0252] Nmb蛋白变体

[0253] 上面的结果证明,Nmb在ILC2和TH2细胞应答中均充当负调节,并且足以减少2型细胞因子介导的炎症,例如在患有寄生虫感染和/或过敏性气道炎症的受试者中。因此,Nmb可用于减少2型细胞因子介导的炎症。天然Nmb是10-mer肽(SEQ ID NO:1),其通过其结合Nmb受体(15)的能力操作。本实施例描述了用丙氨酸系统地取代Nmb的各种残基的丙氨酸扫描的结果(表2),以及变体Nmb肽抑制由TH2细胞产生2型细胞因子的所得能力。此外,将帽添加到Nmb的天然形式(SEQ ID NO:1)并对其生物活性进行监控(图5A)。

[0254] 表2:变体Nmb肽

[0255]

代码	化合物名称	结构(SEQ ID NO:)
NMB	WT 神经介素 B	H2N-GNLWATGHFM-酰胺(1)

[0256]

化合物 A	丙氨酸扫描肽 1	H2N-**A**NLWATGHFM-酰胺（3）
化合物 B	丙氨酸扫描肽 2	H2N-G**A**LWATGHFM-酰胺（4）
化合物 C	丙氨酸扫描肽 3	H2N-GN**A**WATGHFM-酰胺（5）
化合物 D	丙氨酸扫描肽 4	H2N-GNL**A**ATGHFM-酰胺（6）
化合物 E	丙氨酸扫描肽 5	H2N-GNLWA**A**GHFM-酰胺（7）
化合物 F	丙氨酸扫描肽 6	H2N-GNLWAT**A**HFM-酰胺（8）
化合物 G	丙氨酸扫描肽 7	H2N-GNLWATG**A**FM-酰胺（9）
化合物 H	丙氨酸扫描肽 8	H2N-GNLWATGH**A**M-酰胺（10）
化合物 I	丙氨酸扫描肽 9	H2N-GNLWATGHF**A**-酰胺（11）
化合物 J	不同的帽肽 1	**Ac**-G**L**LWATGHFM-酰胺（12）
化合物 K	不同的帽肽 2	**甲磺酰基**-GNLWATGHFM-酰胺（13）
化合物 L	不同的帽肽 3	H2N-GNLWATGHFM-**NHMe**（14）
化合物 M	游离酸	H2N-GNLWATGHFM-**OH**（15）
化合物 N	截短肽 1	H2N-NLWATGHFM-酰胺（16）
化合物 O	截短肽 2	H2N-GLWATGHFM-酰胺（17）
化合物 P	截短肽 3	H2N-GNWATGHFM-酰胺（18）
化合物 Q	截短肽 4	H2N-GNLATGHFM-酰胺（19）
化合物 R	截短肽 5	H2N-GNLWTGHFM-酰胺（20）
化合物 S	截短肽 6	H2N-GNLWAGHFM-酰胺（21）
化合物 T	截短肽 7	H2N-GNLWATHFM-酰胺（22）
化合物 U	截短肽 8	H2N-GNLWATGFM-酰胺（23）
化合物 V	截短肽 9	H2N-GNLWATGHM-酰胺（24）
化合物 W	截短肽 10	H2N-GNLWATGHF-酰胺（25）
化合物 X	长度 8 补偿 1 肽 1	H2N-GNLWATGH-酰胺（26）
化合物 Y	长度 8 补偿 1 肽 2	H2N-NLWATGHF-酰胺（27）
化合物 Z	长度 8 补偿 1 肽 3	H2N-LWATGHFM-酰胺（28）
化合物 AA	长度 7 补偿 1 肽 1	H2N-GNLWATG-酰胺（29）
化合物 AB	长度 7 补偿 1 肽 2	H2N-NLWATGH-酰胺（30）
化合物 AC	长度 7 补偿 1 肽 3	H2N-LWATGHF-酰胺（31）
化合物 AD	长度 7 补偿 1 肽 4	H2N-WATGHFM-酰胺（32）
化合物 AE	长度 6 补偿 1 肽 1	H2N-GNLWAT-酰胺（33）
化合物 AF	长度 6 补偿 1 肽 2	H2N-NLWATG-酰胺（34）
化合物 AG	长度 6 补偿 1 肽 3	H2N-LWATGH-酰胺（35）
化合物 AH	长度 6 补偿 1 肽 4	H2N-WATGHF-酰胺（36）
化合物 AI	长度 6 补偿 1 肽 5	H2N-ATGHFM-酰胺（37）

[0257] 虽然肽C、F和K(分别为SEQ ID NO:5、8和13)与天然形式的Nmb(SEQ ID NO:1)相比表现出显著降低的抑制IL-5产生的能力,但没有一种Nmb变体肽显示出显著增强的抑制IL-5产生的能力(图7F)。相反,肽F和H(分别为SEQ ID NO:8和10)具有抑制IL-13产生的能力,并且肽A、B、C、D、I、J、K和L(分别为SEQ ID NO:3、4、5、6、11、12、13和14)与天然Nmb相比具有显著更大的抑制IL-13的能力(图7G)。

[0258] 检查了Nmb的截短版本的能力(表2,SEQ ID NO:16-25)以调节从T_H2细胞产生2型细胞因子。天然Nmb足以显著减少从T_H2细胞产生IL-5,然而,截短的肽N、O、P、R、U、V和W(分

别为SEQ ID NO:16、17、18、20、23、24和25)显示出降低的抑制IL-5产生的能力(图7H)。有趣的是,截短的肽V(SEQ ID NO:24)显示出降低的抑制IL-13的能力,肽R和T(分别为SEQ ID NO:20和22)显示出增强的抑制T_H2细胞中的IL-13的能力(图7I)。

[0259] 检验了补偿长度(表2,SEQ ID NO:26-36)对调节从T_H2细胞产生2型细胞因子的改变的能力的影响。如上所述,天然Nmb足以减少从T_H2细胞产生IL-5和IL-13。补偿肽X(SEQ ID NO:26)、Y(SEQ ID NO:27)、AA(SEQ ID NO:29)、AG(SEQ ID NO:35)和AH(SEQ ID NO:36)具有显著增强的抑制从激活的细胞产生IL-5的能力(图8A)。另外,肽X(SEQ ID NO:26)、Y(SEQ ID NO:27)、Z(SEQ ID NO:28)、AA(SEQ ID NO:29)、AB(SEQ ID NO:30)、AC(SEQ ID NO:31)、AD(SEQ ID NO:32)、AG(SEQ ID NO:35)、AH(SEQ ID NO:36)和AI(SEQ ID NO:37)显示出增强的减少从T_H2细胞产生IL-13的能力(图8B)。

[0260] 总之,这些数据表明可以修饰Nmb以抑制2型细胞因子产生,并且与Nmb的天然版本(SEQ ID NO:1)相比,这些改变的肽可能具有更大的修饰2型炎症的治疗潜力。

[0261] 另外,这些数据表明Nmb变体肽的组合可用于公开的方法,例如至少一种减少IL-5的变体肽和至少一种减少IL-13的变体肽的组合,例如表3中显示的肽的组合。此外,另外,这些数据还表示天然Nmb(SEQ ID NO:1)可以与一种或更多种Nmb变体肽肽使用,例如(1)天然Nmb与至少一种降低IL-5的变体肽的组合,(2)天然Nmb与至少一种降低IL-13的变体肽的组合,或(3)天然Nmb与至少一种降低IL-5的变体肽和至少一种降低IL-13的变体肽的组合(例如表3所示的肽)。在一个实例中,方法使用至少一种具有增强的降低IL-5的能力的Nmb变体肽,例如肽X(SEQ ID NO:26)、Y(SEQ ID NO:27)、AA(SEQ ID NO:29)、AG(SEQ ID NO:35)和AH(SEQ ID NO:36)中的一种或更多种。在一个实例中,方法使用至少一种具有增强的降低IL-13的能力的Nmb变体肽,例如肽A、B、C、D、I、J、K、L、R、T、X、Y、Z、AA、AB、AC、AD、AG、AH和AI(分别为SEQ ID NO:3、4、5、6、11、12、13、14、20、22、26、27、28、29、30、31、32、35、36和37)中的一种或更多种。

[0262] 表3:减少IL-5或IL-13的变体Nmb肽

[0263]

减少 IL-5 的肽	减少 IL-13 的肽
肽 A、B、D、E、G、H、I、J、L、M、Q、S、T、X、Y、Z、AA、AB、AD、AF、AG、AH 和 AI（SEQ ID NO: 3、4、6、7、9、10、11、12、14、15、19、21、22、26、27、28、29、30、32、34、35、36、37）	肽 A、B、C、D、G、I、J、K、L、P、Q、R、S、T、U（SEQ ID NO: 3、4、5、6、9、11、12、13、14、18、19、20、21、22、23）

[0264] 实施例8

[0265] 神经介素C蛋白

[0266] 在一些实例中,替代(或除了)在所公开的方法和组合物中使用Nmb蛋白(或其变体),使用神经介素C蛋白(或其变体)。示例性的天然神经介素C蛋白是GNHWAVGHLM(SEQ ID NO:38)。或者,使用编码神经介素C的核酸分子。因此,与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一性的蛋白质,或编码至少一种与SEQ ID NO:38具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的序列同一

性的神经介素C蛋白的一种核酸分子可用于所公开的方法中。在哺乳动物中的先前研究表明Nmb和Nmc能够与共同的受体(PMID 1720612)相互作用。因此,Nmc和Nmb可能启动能够抑制2型炎症的常见信号传导通路。

[0267] 实施例9

[0268] 嗜碱性粒细胞调节Nmbr表达

[0269] 当Nb感染后嗜碱性粒细胞缺失时,肺ILC2的NMBR表达降低。为了确定嗜碱性粒细胞是否直接介导NMBR的表达或它们是否通过中间通路操作,从Nb感染小鼠的肺中分选纯化ILC2(第7天),并与存活细胞因子IL-2和IL-7一起培养。另外,将ILC2与激活的嗜碱性粒细胞、IL-4或IL-33一起培养过夜。随后,培养后通过流式细胞术分析监测NMBR表达。所得数据表明,虽然用IL-4或IL-33(已知促进ILC2激活的细胞因子)(21,23,24)处理的ILC2未显示NMBR表达水平的变化,但用激活的嗜碱性粒细胞培养的ILC2显示出显著增加的NMBR表达(图9)。总之,这些结果表明,激活的嗜碱性粒细胞足以直接通过ILC2调节NMBR表达。

[0270] 这些研究表明,在没有嗜碱性粒细胞的情况下,Nb诱导的ILC2应答扩大。此外,数据表明,在没有嗜碱性粒细胞的情况下,减少的NMB-NMBR信号传导可能导致ILC2激活的增强状态。然而,在Nb攻击后,还已知ILC2应答受到几个其他因素调节。具体地,据报道IL-33是Nb感染后肺ILC2应答的关键调节剂(24)。为了解决在没有嗜碱性粒细胞的情况下改变的ILC2活性是否是IL-33降低的可用性的结果,而不是NMB-NMBR信号传导通路的改变,从Nb感染的小鼠的肺中分选纯化ILC2(第7天),并用存活细胞因子(IL-2、IL-7)和/或IL-33和NMB培养。在过夜培养后,通过标准ELISA检测上清液中IL-5和IL-13的存在。使用Student t检验进行统计比较。数据表明,NMB抑制激活的ILC2产生的2型细胞因子。具体地,NMB足以显著减少稳态下从ILC2产生的IL-5和IL-13(图10A-10B)。此外,这些数据表明,尽管IL-33处理导致IL-5和IL-13水平升高,但NMB处理仍然导致2型细胞因子显著减少。综上所述,这些研究表明,即使存在大量的IL-33,NMB仍可作为ILC2的负调节剂。

[0271] 公开的研究表明,造血细胞上的NMB-NMBR信号传导是正确调节2型细胞因子应答所必需的。为了进一步评估这种可能性,生成新型NMBR-floxed小鼠并将其与表达Vav1-Cre的小鼠杂交。Vav1由所有造血细胞表达(22),并将其与新型floxed小鼠模型杂交,导致所有免疫细胞上的NMBR的选择性缺失。接下来,将这些小鼠感染Nb并评估2型细胞因子应答和肺病理学。IL-5(图11A)和IL-13(图11B)的细胞内染色在从天然或Nb感染的(第7天)Vav1-Cre、NMBRfloxed或Vav1-Cre-NMBRfloxed小鼠的BAL中分离的ILC2上进行。使用Student t检验进行统计比较。数据表明需要造血细胞上的NMBR介导的信号传导来调节2型细胞因子产生。与先前的数据一致,免疫细胞上NMBR的基因缺失导致用于被感染动物的BAL分离的ILC2导致的显著升高的IL-5和IL-13产生(图11A-11B)。评价天然或Nb感染的(第7天)、Vav1-Cre、NMBR-floxed或Vav1-Cre-NMBR-floxed小鼠的肺病理学(H&E染色)。NMBR-floxed-Vav1-Cre小鼠显示肺部细胞浸润增加,和肺病理学明显恶化(图12)。这表明需要造血细胞上的NMBR介导的信号传导来调节(例如,减少)肺中的细胞浸润。这些遗传方法进一步证实了NMB-NMBR信号传导对免疫细胞在正确调节2型细胞因子介导的炎症中的重要性。

[0272] 上面提供的数据表明,NMB是淋巴细胞对2型细胞因子应答的重要负调节剂。为了进一步了解NMB如何改变淋巴细胞激活,从Nb感染小鼠的肺分选纯化ILC2,并在有或没有Nmb的情况下与存活细胞因子(IL-2、IL-7)一起培养过夜。然后,通过RNA测序分析评估基因

表达。具体地,在培养后,将细胞进行RNA测序,并鉴定出通过NMB处理显著上调或下调(>1.5倍)的基因(表4)。这允许鉴定NMB信号传导通路。结果表明,NMB处理导致几个基因上调,包括Sprr2a2、Serpinb2、Il1b、Xist和Tsix等。此外,NMB处理导致Hgs2、Nkg7、Klra7、P2rx7、Ly6c2和Mcpt2等的下调。总之,这些数据表明NMB可以通过影响表4中列出的基因操作,并且这些基因可能具有巨大的治疗潜力。

[0273] 表4:NMB信号传导通路

[0274]

名称	染色体	区域	倍数变化	FDR-P值	ENSEMBL
Igkv17-127	6	67861153..67861659	800.9031394	1.39349E-09	ENSMUSG00000076508
Ighg2b	12	补体(113302965..113307933)	276.0317888	1.29827E-08	ENSMUSG00000076613
Ighg1	12	补体(113325240..113330523)	253.5888585	7.33518E-10	ENSMUSG00000076614
Igkv1-135	6	67609713..67610508	47.49234298	0.049956905	ENSMUSG00000096336
Igkv8-28	6	补体(70143593..70144166)	43.80053615	0.038814357	ENSMUSG00000094356
Sprr2a2	3	92215920..92256724	37.85216327	0.000515772	ENSMUSG00000068893
Serpinb2	1	107511423..107535478	5.695871502	0.002291872	ENSMUSG00000062345
Il1b	2	补体(129364570..129371139)	3.263058363	0.005266113	ENSMUSG00000027398
Xist	X	补体(103460375..103483217)	3.076866923	1.37162E-10	ENSMUSG00000086503
Tsix	X	103431517..103484957	2.833195718	1.45251E-05	ENSMUSG00000085715
Hgs_2	11	120467635..120483984	-1.89340553	0.043638034	ENSMUSG00000116045
Nkg7	7	43437073..43438249	-1.894603182	0.000515772	ENSMUSG00000004612
Klra7	6	补体(130218605..130233322)	-1.984286795	0.038814357	ENSMUSG00000067599
P2rx7	5	122643911..122691432	-2.148918914	0.002437103	ENSMUSG00000029468
Ly6c2	15	补体(75108158..75111970)	-2.368890009	0.001898784	ENSMUSG00000022584
Gm10031	1	156524012..156526664	-6.202778267	0.000138883	ENSMUSG00000101523
Mcpt2	14	56042041..56044642	-11.85721712	0.005266113	ENSMUSG00000022226
Gm14288	2	补体(175789357..175801093)	-25.4323313	0.009218816	ENSMUSG00000078889

[0275] 上面讨论的小鼠模型表明,CD45+细胞上的NMBR表达是正确调节2型细胞因子介导的炎症所必需的(图11A-B、12)。为了更好地确定可能需要该信号传导通路以被正确调节的细胞类型,在稳态和Nb后第7天评估肺中的免疫细胞上的NMBR的表达。数据表明NMBR由几种免疫细胞群表达。发现ILC2、CD4+和CD4-淋巴细胞、肺泡巨噬细胞、非肺泡巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞表达不同水平的NMBR(图13)。这些数据表明,NMB可以通过多种细胞靶标调节炎症。

[0276] 实施例10

[0277] 前列腺素E2上调淋巴细胞上的NMBR的表达

[0278] 为了更好地确定嗜碱性粒细胞调节淋巴细胞上NMBR表达的机制,在存在或不存在NMB或前列腺素E2(PGE2)的情况下,用存活和激活细胞因子的组合培养ILC2。虽然IL-25、IL-33和NMB的组合未能通过ILC2上调NMBR表达,但用PGE2处理导致NMBR上显著上调的水平(图14)。这些数据表明,嗜碱性粒细胞(已充分描述的前列腺素来源)可能通过其释放的PGE2来调节NMBR表达。

[0279] 鉴于表明PGE2促进淋巴细胞表达Nmbr的数据,治疗病症(例如炎性病症)的方法的实施方案可以包括向受试者施用有效量的本文公开的Nmb肽或核酸和有效量的PGE2。

[0280] 参考文献

[0281] 1.Pulendran B,Artis D.New paradigms in type 2immunity.Science.[Research Support,N.I.H.,Extramural Research Support,Non-U.S.Gov't Review].2012Jul 27;337(6093):431-5.

[0282] 2.Henry EK,Inclan-Rico JM,Siracusa MC.Type 2cytokine responses:regulating immunity to helminth parasites and allergic inflammation.Curr Pharmacol Rep.2017Dec;3(6):346-59.

[0283] 3.Wynn TA.Type 2cytokines:mechanisms and therapeutic strategies.Nat Rev Immunol.[Research Support,N.I.H.,Intramural Review].2015May;15(5):271-82.

[0284] 4.Lloyd CM,Snelgrove RJ.Type 2immunity:Expanding our view.Sci Immunol.[Review].2018Jul 6;3(25).

[0285] 5.Rivera A,Siracusa MC,Yap GS,Gause WC.Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity.Nat Immunol.[Research Support,N.I.H., Extramural Research Support,Non-U.S.Gov't Review].2016Apr;17(4):356-63.

[0286] 6.Motomura Y,Morita H,Moro K,Nakae S,Artis D,Endo TA,et al.Basophil-derived interleukin-4controls the function of natural helper cells,a member of ILC2s,in lung inflammation.Immunity.[Research Support,Non-U.S.Gov't] .2014May 15;40(5):758-71.

[0287] 7.Kim BS,Wang K,Siracusa MC,Saenz SA,Brestoff JR,Monticelli LA,et al.Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin.J Immunol.[Clinical Trial Research Support,N.I.H.,Extramural].2014Oct 1;193(7): 3717-25.

[0288] 8.Klose CSN,Mahlakoiv T,Moeller JB,Rankin LC,Flamar AL,Kabata H,et al.The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation.Nature.[Research Support,N.I.H.,Extramural Research Support,Non-U.S.Gov't Research Support,U.S.Gov't,Non-P.H.S.].2017 Sep 14;549(7671):282-6.

[0289] 9.Cardoso V,Chesne J,Ribeiro H,Garcia-Cassani B,Carvalho T,Bouchery T,et al.Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U.Nature.[Research Support,Non-U.S.Gov't].2017 Sep 14;549(7671):277-81.

[0290] 10.Kubo M.Mast cells and basophils in allergic inflammation.Curr Opin Immunol.[Review].2018 Jun 28;54:74-9.

[0291] 11.Sullivan BM,Liang HE,Bando JK,Wu D,Cheng LE,McKerrow JK,et al.Genetic analysis of basophil function in vivo.Nat Immunol.2011 Jun;12(6): 527-35.

[0292] 12.Anderson KG,Mayer-Barber K,Sung H,Beura L,James BR,Taylor JJ,et al.Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes.Nature protocols.[Research Support,N.I.H.,Extramural

[0293] Research Support,N.I.H.,Intramural

[0294] Research Support,Non-U.S.Gov't].2014 Jan;9(1):209-22.

[0295] 13.Colonna M.Innate Lymphoid Cells:Diversity,Plasticity,and Unique Functions in Immunity.Immunity.[Review].2018 Jun 19;48(6):1104-17.

[0296] 14.Tait Wojno ED,Artis D.Emerging concepts and future challenges in innate lymphoid cell biology.J Exp Med.[Review Research Support,Non-U.S.Gov't Research Support,N.I.H.,Extramural].2016 Oct 17;213(11):2229-48.

[0297] 15.Ohki-Hamazaki H.Neuromedin B.Prog Neurobiol.[Review].2000Oct;62 (3):297-312.

[0298] 16.Gajjar S,Patel BM.Neuromedin:An insight into its types,receptors and therapeutic opportunities.Pharmacol Rep.[Review].2017 Jun;69(3):438-47.

[0299] 17.Ohki-Hamazaki H,Iwabuchi M,Maekawa F.Development and function of bombesin-like peptides and their receptors.Int J Dev Biol.[Review].2005;49(2-3):293-300.

[0300] 18.Ma Z,Su J,Guo T,Jin M,Li X,Lei Z,et al.Neuromedin B and Its Receptor:Gene Cloning,Tissue Distribution and Expression Levels of the Reproductive Axis in Pigs.PLoS One.[Research Support,Non-U.S.Gov't].2016;11(3):e0151871.

[0301] 19.Halim TY,Steer CA,Matha L,Gold MJ,Martinez-Gonzalez I,McNagny KM,et al.Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation.Immunity.[Research Support,Non-U.S.Gov't].2014Mar 20;40(3):425-35.

[0302] 20.Martinez-Gonzalez I,Matha L,Steer CA,Ghaedi M,Poon GF,Takei F.Allergen-Experienced Group 2 Innate Lymphoid Cells Acquire Memory-like Properties and Enhance Allergic Lung Inflammation.Immunity.[Research Support,Non-U.S.Gov't].2016 Jul 19;45(1):198-208.

[0303] 21.Barlow,J.L.,Bellosi,A.,Hardman,C.S.,Drynan,L.F.,Wong,S.H.,Cruickshank,J.P.,and McKenzie,A.N.(2012).Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity.J Allergy Clin Immunol 129,191-198.e191-194.

[0304] 22.Joseph,C.,Quach,J.M.,Walkley,C.R.,Lane,S.W.,Lo Celso,C.,and Purton,L.E.(2013).Deciphering hematopoietic stem cells in their niches:a critical appraisal of genetic models,lineage tracing,and imaging strategies.Cell stem cell 13,520-533.

[0305] 23.Motomura,Y.,Morita,H.,Moro,K.,Nakae,S.,Artis,D.,Endo,T.A.,Kuroki,Y.,Ohara,O.,Koyasu,S.,and Kubo,M.(2014).Basophil-derived interleukin-4controls the function of natural helper cells,a member of ILC2s,in lung inflammation.Immunity 40,758-771.

[0306] 24.Neill,D.R.,Wong,S.H.,Bellosi,A.,Flynn,R.J.,Daly,M.,Langford,T.K.,Bucks,C.,Kane,C.M.,Fallon,P.G.,Pannell,R.,et al.(2010).Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2immunity.Nature 464,1367-1370.

[0307] 鉴于可以应用公开的原理的许多可能的实施方案,应当认识到,示出的实施方案仅是本发明的实例,而不应被视为对本发明范围的限制。相反,本发明的范围由以下权利要求限定。因此,我们要求所有落入这些权利要求的范围和精神内的发明均作为我们的发明。

[0001] 序列表

[0002] <110> 新泽西州立罗格斯大学

[0003] <120> 使用神经介素肽减少2型细胞因子介导的炎症的方法

[0004] <130> 7213-101257-02

[0005] <150> US 62/741,188

[0006] <151> 2018-10-04

[0007] <160> 58

[0008] <170> PatentIn 3.5版

[0009] <210> 1

[0010] <211> 10

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 具有C末端酰胺化的神经介素B

[0015] <220>

[0016] <221> MOD_RES

[0017] <222> (10)..(10)

[0018] <223> 酰胺化

[0019] <400> 1

[0020] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0021] 1 5 10

[0022] <210> 2

[0023] <211> 30

[0024] <212> DNA

[0025] <213> 智人

[0026] <400> 2

[0027] ggcaacctct gggccaccgg tcacttcatg 30

[0028] <210> 3

[0029] <211> 10

[0030] <212> PRT

[0031] <213> 人工序列

[0032] <220>

[0033] <223> 变体神经介素B肽

[0034] <220>

[0035] <221> MOD_RES

[0036] <222> (10)..(10)

[0037] <223> 酰胺化

[0038] <400> 3

[0039] Ala Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0040] 1 5 10

[0041] <210> 4

[0042] <211> 10

[0043] <212> PRT

[0044] <213> 人工序列

[0045] <220>

[0046] <223> 变体神经介素B肽

[0047] <220>

[0048] <221> MOD_RES

[0049] <222> (10)..(10)

[0050] <223> 酰胺化

[0051] <400> 4

[0052] Gly Ala Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0053] 1 5 10

[0054] <210> 5

[0055] <211> 10

[0056] <212> PRT

[0057] <213> 人工序列

[0058] <220>

[0059] <223> 变体神经介素B肽

[0060] <220>

[0061] <221> MOD_RES

[0062] <222> (10)..(10)

[0063] <223> 酰胺化

[0064] <400> 5

[0065] Gly Asn Ala Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0066] 1 5 10

[0067] <210> 6

[0068] <211> 10

[0069] <212> PRT

[0070] <213> 人工序列

[0071] <220>

[0072] <223> 变体神经介素B肽

[0073] <220>

[0074] <221> MOD_RES

[0075] <222> (10)..(10)

[0076] <223> 酰胺化

[0077] <400> 6

[0078] Gly Asn Leu Ala Ala Thr Gly His Phe Met

[0079] 1 5 10

[0080] <210> 7

[0081] <211> 10

[0082] <212> PRT

[0083] <213> 人工序列

[0084] <220>

[0085] <223> 变体神经介素B肽

[0086] <220>

[0087] <221> MOD_RES

[0088] <222> (10)..(10)

[0089] <223> 酰胺化

[0090] <400> 7

[0091] Gly Asn Leu Trp Ala Ala Gly His Phe Met

[0092] 1 5 10

[0093] <210> 8

[0094] <211> 10

[0095] <212> PRT

[0096] <213> 人工序列

[0097] <220>

[0098] <223> 变体神经介素B肽

[0099] <220>

[0100] <221> MOD_RES

[0101] <222> (10)..(10)

[0102] <223> 酰胺化

[0103] <400> 8

[0104] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Ala His Phe Met

[0105] 1 5 10

[0106] <210> 9

[0107] <211> 10

[0108] <212> PRT

[0109] <213> 人工序列

[0110] <220>

[0111] <223> 变体神经介素B肽

[0112] <220>

[0113] <221> MOD_RES

[0114] <222> (10)..(10)

[0115] <223> 酰胺化

[0116] <400> 9

[0117] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly Ala Phe Met

[0118] 1 5 10

[0119] <210> 10

[0120] <211> 10

[0121] <212> PRT

[0122] <213> 人工序列

[0123] <220>

[0124] <223> 变体神经介素B肽

[0125] <220>

[0126] <221> MOD_RES

[0127] <222> (10)..(10)

[0128] <223> 酰胺化

[0129] <400> 10

[0130] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Ala Met

[0131] 1 5 10

[0132] <210> 11

[0133] <211> 10

[0134] <212> PRT

[0135] <213> 人工序列

[0136] <220>

[0137] <223> 变体神经介素B肽

[0138] <220>

[0139] <221> MOD_RES

[0140] <222> (10)..(10)

[0141] <223> 酰胺化

[0142] <400> 11

[0143] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Ala

[0144] 1 5 10

[0145] <210> 12

[0146] <211> 10

[0147] <212> PRT

[0148] <213> 人工序列

[0149] <220>

[0150] <223> 变体神经介素B肽

[0151] <220>

[0152] <221> 乙酰化

[0153] <222> (1)..(1)

[0154] <220>

[0155] <221> MOD_RES

[0156] <222> (10)..(10)

[0157] <223> 酰胺化

[0158] <400> 12

[0159] Gly Leu Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0160] 1 5 10

[0161] <210> 13

[0162] <211> 10

[0163] <212> PRT

[0164] <213> 人工序列

[0165] <220>

[0166] <223> 变体神经介素B肽

[0167] <220>

[0168] <221> MISC_FEATURE

[0169] <222> (1)..(1)

[0170] <223> 甲磺酰基

[0171] <220>

[0172] <221> MOD_RES

[0173] <222> (10)..(10)

[0174] <223> 酰胺化

[0175] <400> 13

[0176] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0177] 1 5 10

[0178] <210> 14

[0179] <211> 10

[0180] <212> PRT

[0181] <213> 人工序列

[0182] <220>

[0183] <223> 变体神经介素B肽

[0184] <220>

[0185] <221> MISC_FEATURE

[0186] <222> (10)..(10)

[0187] <223> N-甲基化

[0188] <400> 14

[0189] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0190] 1 5 10

[0191] <210> 15

[0192] <211> 10

[0193] <212> PRT

[0194] <213> 人工序列

[0195] <220>

[0196] <223> 变体神经介素B肽

[0197] <220>

[0198] <221> MOD_RES

[0199] <222> (10)..(10)

[0200] <223> 游离酸

[0201] <220>

[0202] <221> MOD_RES

[0203] <222> (10)..(10)

[0204] <400> 15

[0205] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0206] 1 5 10

[0207] <210> 16

[0208] <211> 9

[0209] <212> PRT

[0210] <213> 人工序列

[0211] <220>

[0212] <223> 变体神经介素B肽

[0213] <220>

[0214] <221> MOD_RES

[0215] <222> (9)..(9)

[0216] <223> 酰胺化

[0217] <400> 16

[0218] Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0219] 1 5

[0220] <210> 17

[0221] <211> 9

[0222] <212> PRT

[0223] <213> 人工序列

[0224] <220>

[0225] <223> 变体神经介素B肽

[0226] <220>

[0227] <221> MOD_RES

[0228] <222> (9)..(9)

[0229] <223> 酰胺化

[0230] <400> 17

[0231] Gly Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0232] 1 5

[0233] <210> 18

[0234] <211> 9

[0235] <212> PRT

[0236] <213> 人工序列

[0237] <220>

[0238] <223> 变体神经介素B肽

[0239] <220>

[0240] <221> MOD_RES

[0241] <222> (9)..(9)

[0242] <223> 酰胺化

[0243] <400> 18

[0244] Gly Asn Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0245] 1 5

[0246] <210> 19

[0247] <211> 9

[0248] <212> PRT

[0249] <213> 人工序列

[0250] <220>

[0251] <223> 变体神经介素B肽

[0252] <220>

[0253] <221> MOD_RES

[0254] <222> (9)..(9)

[0255] <223> 酰胺化

[0256] <400> 19

[0257] Gly Asn Leu Ala Thr Gly His Phe Met

[0258] 1 5

[0259] <210> 20

[0260] <211> 9

[0261] <212> PRT

[0262] <213> 人工序列

[0263] <220>

[0264] <223> 变体神经介素B肽

[0265] <220>

[0266] <221> MOD_RES

[0267] <222> (9)..(9)

[0268] <223> 酰胺化

[0269] <400> 20

[0270] Gly Asn Leu Trp Thr Gly His Phe Met

[0271] 1 5

[0272] <210> 21

[0273] <211> 9

[0274] <212> PRT

[0275] <213> 人工序列

[0276] <220>

[0277] <223> 变体神经介素B肽

[0278] <220>

[0279] <221> MOD_RES

[0280] <222> (9)..(9)

[0281] <223> 酰胺化

[0282] <400> 21

[0283] Gly Asn Leu Trp Ala Gly His Phe Met

[0284] 1 5

[0285] <210> 22

[0286] <211> 9

[0287] <212> PRT

[0288] <213> 人工序列

[0289] <220>

[0290] <223> 变体神经介素B肽

[0291] <220>

[0292] <221> MOD_RES

[0293] <222> (9)..(9)

[0294] <223> 酰胺化

[0295] <400> 22

[0296] Gly Asn Leu Trp Ala Thr His Phe Met

[0297] 1 5

[0298] <210> 23

[0299] <211> 9

[0300] <212> PRT

[0301] <213> 人工序列

[0302] <220>

[0303] <223> 变体神经介素B肽

[0304] <220>

[0305] <221> MOD_RES

[0306] <222> (9)..(9)

[0307] <223> 酰胺化

[0308] <400> 23

[0309] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly Phe Met

[0310] 1 5

[0311] <210> 24

[0312] <211> 9

[0313] <212> PRT

[0314] <213> 人工序列

[0315] <220>

[0316] <223> 变体神经介素B肽

[0317] <220>

[0318] <221> MOD_RES

[0319] <222> (9)..(9)

[0320] <223> 酰胺化

[0321] <400> 24

[0322] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Met

[0323] 1 5

[0324] <210> 25

[0325] <211> 9

[0326] <212> PRT

[0327] <213> 人工序列

[0328] <220>

[0329] <223> 变体神经介素B肽

[0330] <220>

[0331] <221> MOD_RES

[0332] <222> (9)..(9)

[0333] <223> 酰胺化

[0334] <400> 25

[0335] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe

[0336] 1 5

[0337] <210> 26

[0338] <211> 8

[0339] <212> PRT

[0340] <213> 人工序列

[0341] <220>

[0342] <223> 变体神经介素B肽

[0343] <220>

[0344] <221> MOD_RES

[0345] <222> (8)..(8)

[0346] <223> 酰胺化

[0347] <400> 26

[0348] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His

[0349] 1 5

[0350] <210> 27

[0351] <211> 8

[0352] <212> PRT

[0353] <213> 人工序列

[0354] <220>

[0355] <223> 变体神经介素B肽

[0356] <220>

[0357] <221> MOD_RES

[0358] <222> (8)..(8)

[0359] <223> 酰胺化

[0360] <400> 27

[0361] Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe

[0362] 1 5

[0363] <210> 28

[0364] <211> 8

[0365] <212> PRT

[0366] <213> 人工序列

[0367] <220>

[0368] <223> 变体神经介素B肽

[0369] <220>

[0370] <221> MOD_RES

[0371] <222> (8)..(8)

[0372] <223> 酰胺化

[0373] <400> 28

[0374] Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0375] 1 5

[0376] <210> 29

[0377] <211> 7

[0378] <212> PRT

[0379] <213> 人工序列

[0380] <220>

[0381] <223> 变体神经介素B肽

[0382] <220>

[0383] <221> MOD_RES

[0384] <222> (7)..(7)

[0385] <223> 酰胺化

[0386] <400> 29

[0387] Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly

[0388] 1 5

[0389] <210> 30

[0390] <211> 7

[0391] <212> PRT

[0392] <213> 人工序列

[0393] <220>

[0394] <223> 变体神经介素B肽

[0395] <220>

[0396] <221> MOD_RES

[0397] <222> (7)..(7)

[0398] <223> 酰胺化

[0399] <400> 30

[0400] Asn Leu Trp Ala Thr Gly His

[0401] 1 5

[0402] <210> 31

[0403] <211> 7

[0404] <212> PRT

[0405] <213> 人工序列

[0406] <220>

[0407] <223> 变体神经介素B肽

[0408] <220>

[0409] <221> MOD_RES

[0410] <222> (7)..(7)

[0411] <223> 酰胺化

[0412] <400> 31

[0413] Leu Trp Ala Thr Gly His Phe

[0414] 1 5

[0415] <210> 32

[0416] <211> 7

[0417] <212> PRT

[0418] <213> 人工序列

[0419] <220>

[0420] <223> 变体神经介素B肽

[0421] <220>

[0422] <221> MOD_RES

[0423] <222> (7)..(7)

[0424] <223> 酰胺化

[0425] <400> 32

[0426] Trp Ala Thr Gly His Phe Met

[0427] 1 5

[0428] <210> 33

[0429] <211> 6

[0430] <212> PRT

[0431] <213> 人工序列

[0432] <220>

[0433] <223> 变体神经介素B肽

[0434] <220>

[0435] <221> MOD_RES

[0436] <222> (6)..(6)

[0437] <223> 酰胺化

[0438] <400> 33

[0439] Gly Asn Leu Trp Ala Thr

[0440] 1 5

[0441] <210> 34

[0442] <211> 6

[0443] <212> PRT

[0444] <213> 人工序列

[0445] <220>

[0446] <223> 变体神经介素B肽

[0447] <220>

[0448] <221> MOD_RES

[0449] <222> (6)..(6)

[0450] <223> 酰胺化

[0451] <400> 34

[0452] Asn Leu Trp Ala Thr Gly

[0453] 1 5

[0454] <210> 35

[0455] <211> 6

[0456] <212> PRT

[0457] <213> 人工序列

[0458] <220>

[0459] <223> 变体神经介素B肽

[0460] <220>

[0461] <221> MOD_RES

[0462] <222> (6)..(6)

[0463] <223> 酰胺化

[0464] <400> 35

[0465] Leu Trp Ala Thr Gly His

[0466] 1 5

[0467] <210> 36

[0468] <211> 6

[0469] <212> PRT

[0470] <213> 人工序列

[0471] <220>

[0472] <223> 变体神经介素B肽

[0473] <220>

[0474] <221> MOD_RES

[0475] <222> (6)..(6)

[0476] <223> 酰胺化

[0477] <400> 36

[0478] Trp Ala Thr Gly His Phe

[0479] 1 5

[0480] <210> 37

[0481] <211> 6

[0482] <212> PRT

[0483] <213> 人工序列

[0484] <220>

[0485] <223> 变体神经介素B肽

[0486] <220>

[0487] <221> MOD_RES

[0488] <222> (6)..(6)

[0489] <223> 酰胺化

[0490] <400> 37

[0491] Ala Thr Gly His Phe Met

[0492] 1 5

[0493] <210> 38

[0494] <211> 10

[0495] <212> PRT

[0496] <213> 智人

[0497] <400> 38

[0498] Gly Asn His Trp Ala Val Gly His Leu Met

[0499] 1 5 10

[0500] <210> 39

[0501] <211> 18

[0502] <212> PRT

[0503] <213> 人工序列

[0504] <220>

[0505] <223> 细胞穿透肽

[0506] <400> 39

[0507] Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr

[0508] 1 5 10 15

[0509] Gly Arg

[0510] <210> 40

[0511] <211> 10

[0512] <212> PRT

[0513] <213> 人工序列

[0514] <220>

[0515] <223> 细胞穿透肽

[0516] <400> 40

[0517] Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe

[0518] 1 5 10

[0519] <210> 41

[0520] <211> 12

[0521] <212> PRT

[0522] <213> 人工序列

[0523] <220>

[0524] <223> 细胞穿透肽

[0525] <400> 41

[0526] Pro Ile Arg Arg Arg Lys Lys Leu Arg Arg Leu Lys

[0527] 1 5 10

[0528] <210> 42

[0529] <211> 12

[0530] <212> PRT

[0531] <213> 人工序列

[0532] <220>

[0533] <223> 细胞穿透肽

[0534] <400> 42

[0535] Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg

[0536] 1 5 10

[0537] <210> 43

[0538] <211> 15

[0539] <212> PRT

[0540] <213> 人工序列

[0541] <220>

[0542] <223> 细胞穿透肽

[0543] <400> 43

[0544] Arg Arg Arg Arg Asn Arg Thr Arg Arg Asn Arg Arg Arg Val Arg

[0545] 1 5 10 15

[0546] <210> 44

[0547] <211> 19

[0548] <212> PRT

[0549] <213> 人工序列

[0550] <220>

[0551] <223> 细胞穿透肽

[0552] <400> 44

[0553] Lys Met Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Arg Asn Arg Trp

[0554] 1 5 10 15

[0555] Thr Ala Arg

[0556] <210> 45

[0557] <211> 13

[0558] <212> PRT

[0559] <213> 人工序列

[0560] <220>

[0561] <223> 细胞穿透肽

[0562] <400> 45

[0563] Thr Arg Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ala Arg Arg Asn Arg

[0564] 1 5 10

[0565] <210> 46

[0566] <211> 13

[0567] <212> PRT

[0568] <213> 人工序列

[0569] <220>

[0570] <223> 细胞穿透肽

[0571] <400> 46

[0572] Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln

[0573] 1 5 10

[0574] <210> 47

[0575] <211> 13

[0576] <212> PRT

[0577] <213> 人工序列

[0578] <220>

[0579] <223> 细胞穿透肽

[0580] <400> 47

[0581] Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Pro Gln

[0582] 1 5 10

[0583] <210> 48

[0584] <211> 15

[0585] <212> PRT

[0586] <213> 人工序列

[0587] <220>

[0588] <223> 细胞穿透肽

[0589] <400> 48

[0590] Arg Gln Ile Lys Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

[0591] 1 5 10 15

[0592] <210> 49

[0593] <211> 17

[0594] <212> PRT

[0595] <213> 人工序列

[0596] <220>

[0597] <223> 细胞穿透肽

[0598] <400> 49

[0599] Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Ala Leu Lys Leu

[0600] 1 5 10 15

[0601] Ala

[0602] <210> 50

[0603] <211> 27

[0604] <212> PRT

[0605] <213> 人工序列

[0606] <220>

[0607] <223> 细胞穿透肽

[0608] <400> 50

[0609] Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly

[0610] 1 5 10 15

[0611] Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

[0612] 20 25

[0613] <210> 51

[0614] <211> 27

[0615] <212> PRT

[0616] <213> 人工序列

[0617] <220>

[0618] <223> 细胞穿透肽

[0619] <400> 51

[0620] Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly

[0621] 1 5 10 15

[0622] Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

[0623] 20 25

[0624] <210> 52

[0625] <211> 27

[0626] <212> PRT

[0627] <213> 人工序列

[0628] <220>

[0629] <223> 细胞穿透肽

[0630] <220>

[0631] <221> MISC_FEATURE

[0632] <222> (1)..(1)

[0633] <223> 乙酰化

[0634] <220>

[0635] <221> MISC_FEATURE

[0636] <222> (27)..(27)

[0637] <223> 巯基乙胺化

[0638] <400> 52

[0639] Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly

[0640] 1 5 10 15

[0641] Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

[0642] 20 25

[0643] <210> 53

[0644] <211> 27

[0645] <212> PRT

[0646] <213> 人工序列

[0647] <220>

[0648] <223> 细胞穿透肽

[0649] <220>

[0650] <221> MISC_FEATURE

[0651] <222> (1)..(1)

[0652] <223> 乙酰化

[0653] <220>

[0654] <221> MISC_FEATURE

[0655] <222> (27)..(27)

[0656] <223> 巯基乙胺化

[0657] <400> 53

[0658] Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly

[0659] 1 5 10 15

[0660] Ala Trp Ser Gln Pro Lys Ser Lys Arg Lys Val

[0661] 20 25

[0662] <210> 54

[0663] <211> 21
[0664] <212> PRT
[0665] <213> 人工序列
[0666] <220>
[0667] <223> 细胞穿透肽
[0668] <220>
[0669] <221> MISC_FEATURE
[0670] <222> (1)..(1)
[0671] <223> 乙酰化
[0672] <220>
[0673] <221> MISC_FEATURE
[0674] <222> (21)..(21)
[0675] <223> 巯基乙胺化
[0676] <400> 54
[0677] Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
[0678] 1 5 10 15
[0679] Lys Lys Arg Lys Val
[0680] 20
[0681] <210> 55
[0682] <211> 27
[0683] <212> PRT
[0684] <213> 人工序列
[0685] <220>
[0686] <223> 细胞穿透肽
[0687] <400> 55
[0688] Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
[0689] 1 5 10 15
[0690] Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
[0691] 20 25
[0692] <210> 56
[0693] <211> 21
[0694] <212> PRT
[0695] <213> 人工序列
[0696] <220>
[0697] <223> 细胞穿透肽
[0698] <220>
[0699] <221> MISC_FEATURE
[0700] <222> (1)..(1)
[0701] <223> 乙酰化

[0702] <220>

[0703] <221> MISC_FEATURE

[0704] <222> (21)..(21)

[0705] <223> 巯基乙胺化

[0706] <400> 56

[0707] Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys

[0708] 1 5 10 15

[0709] Lys Lys Arg Lys Val

[0710] 20

[0711] <210> 57

[0712] <211> 11

[0713] <212> PRT

[0714] <213> 人工序列

[0715] <220>

[0716] <223> 细胞穿透肽

[0717] <400> 57

[0718] Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

[0719] 1 5 10

[0720] <210> 58

[0721] <211> 6

[0722] <212> PRT

[0723] <213> 人工序列

[0724] <220>

[0725] <223> 细胞穿透肽

[0726] <400> 58

[0727] Pro Phe Val Tyr Leu Ile

[0728] 1 5

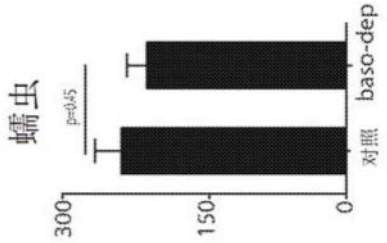

蠕虫
p=0.45
300
150
0
对照
baso-dep

图1A

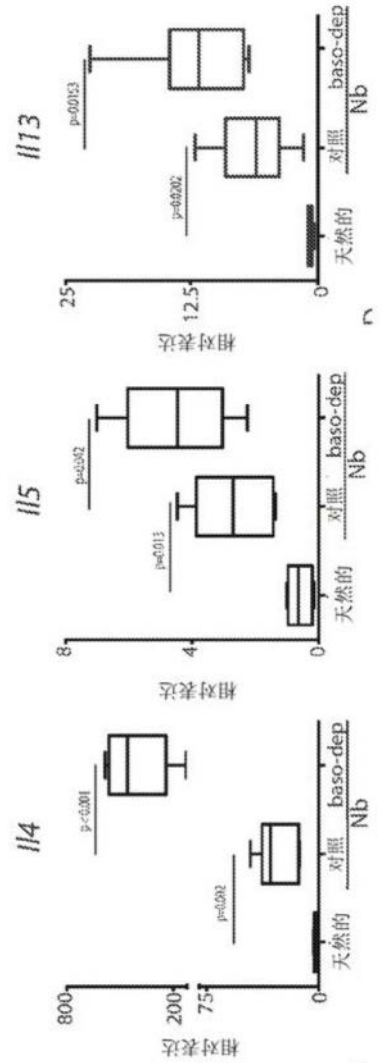
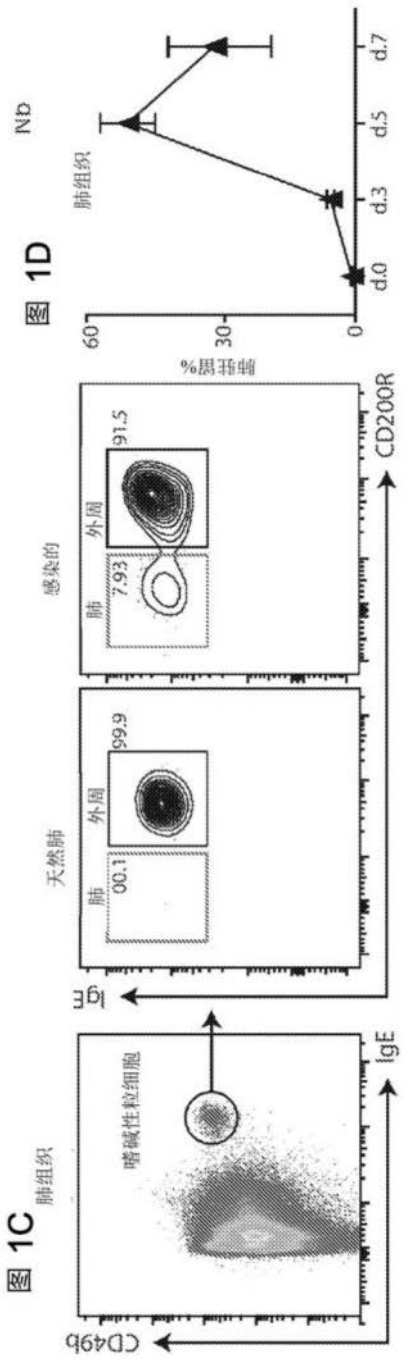

Il13
p=0.0153
p=0.0202
25
12.5
0
天然的
对照
baso-dep
Nb
相对表达
Il5
p=0.0342
p=0.0113
8
4
0
天然的
对照
baso-dep
Nb
相对表达
Il4
p<0.0001
p=0.0282
800
200
75
0
天然的
对照
baso-dep
Nb
相对表达

图1B


图 1C
肺组织
嗜碱性粒细胞
CD49b
IgE
天然肺
肺
00.1
外周
99.9
感染的
肺
7.93
外周
91.5
IgE
CD200R
图 1D
肺组织
肺驻留%
60
30
0
d.0
d.3
d.5
d.7

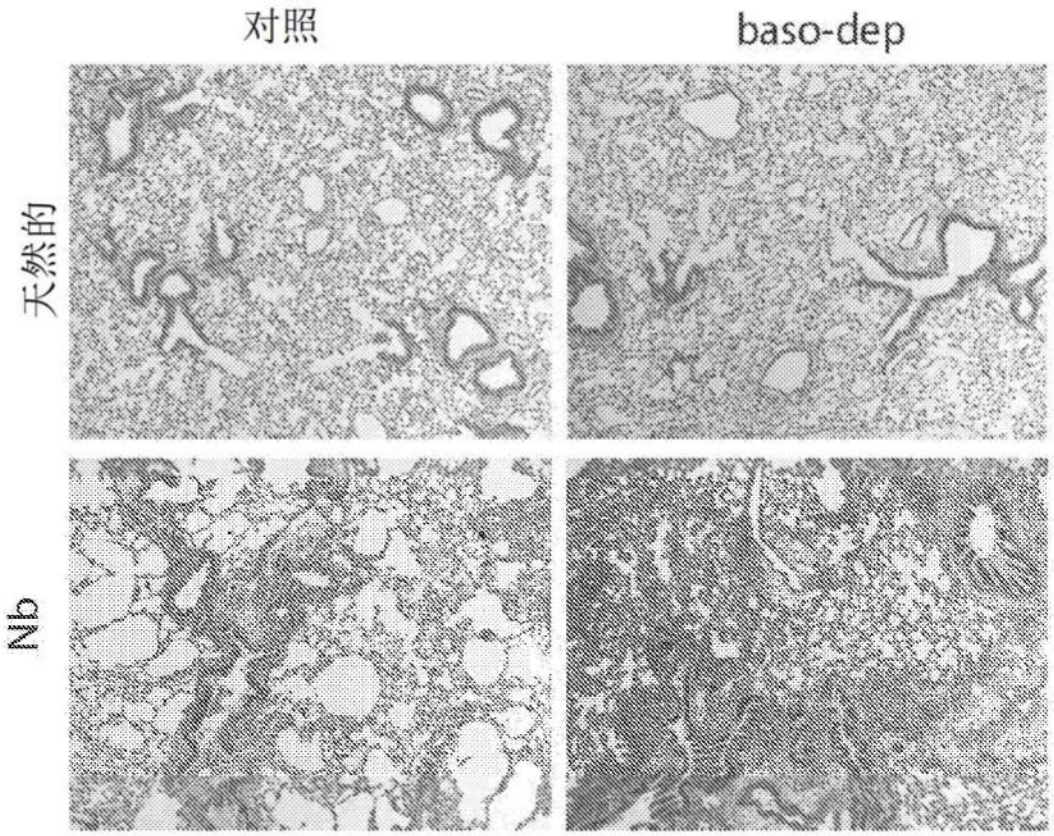

对照
baso-dep
天然的
Nb

图1E

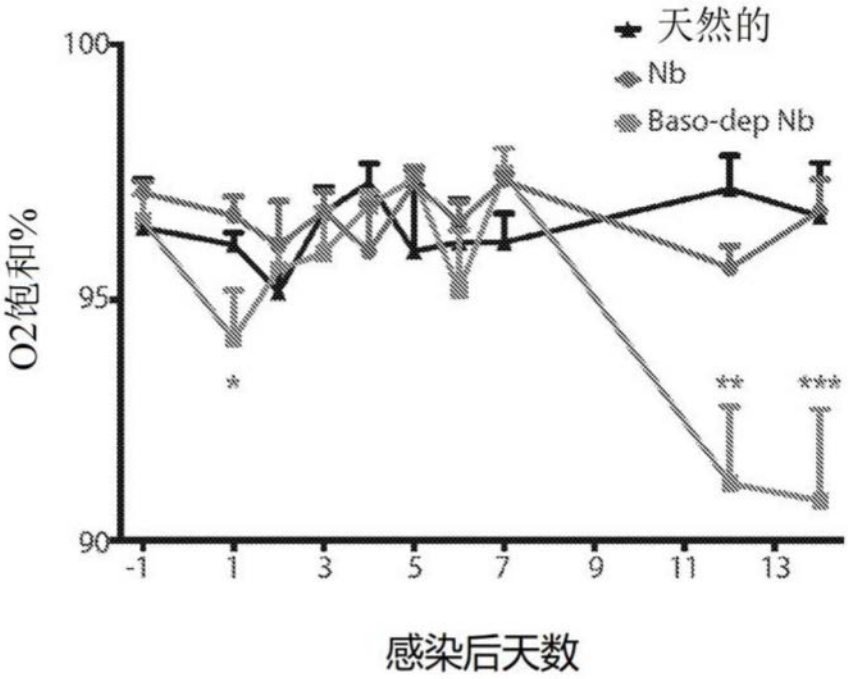

天然的
Nb
Baso-dep Nb
100
95
90
O2饱和%
-1
1
3
5
7
9
11
13
*
**
***
感染后天数

图1F

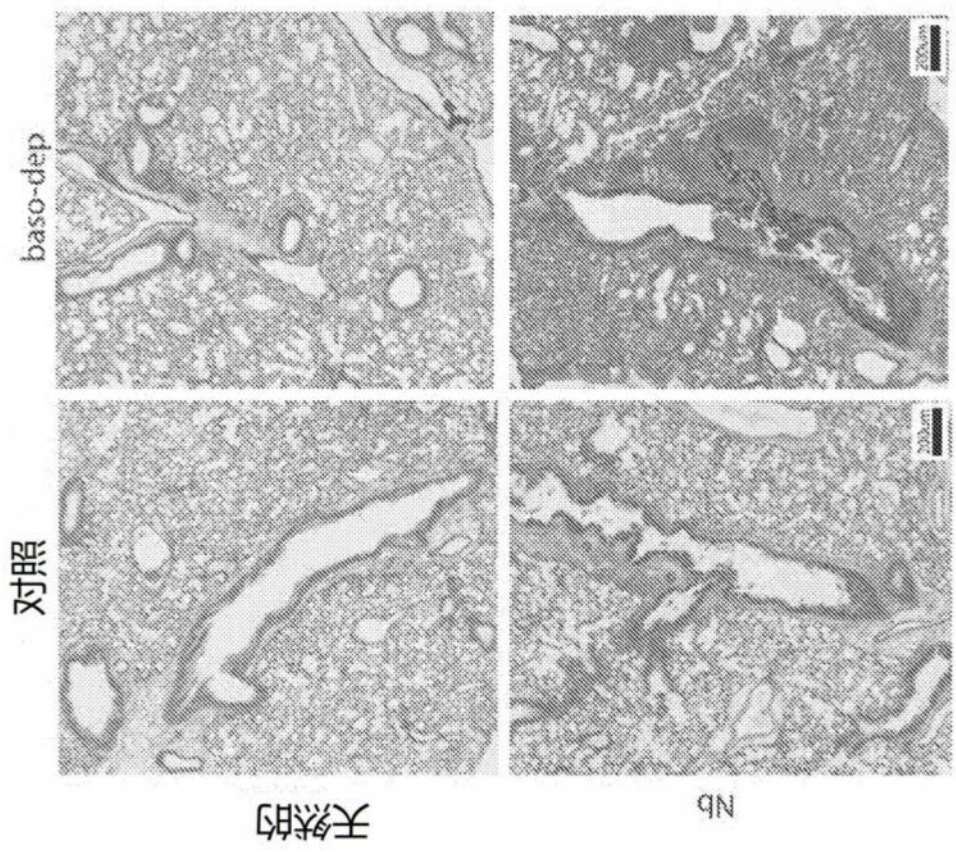


图2A

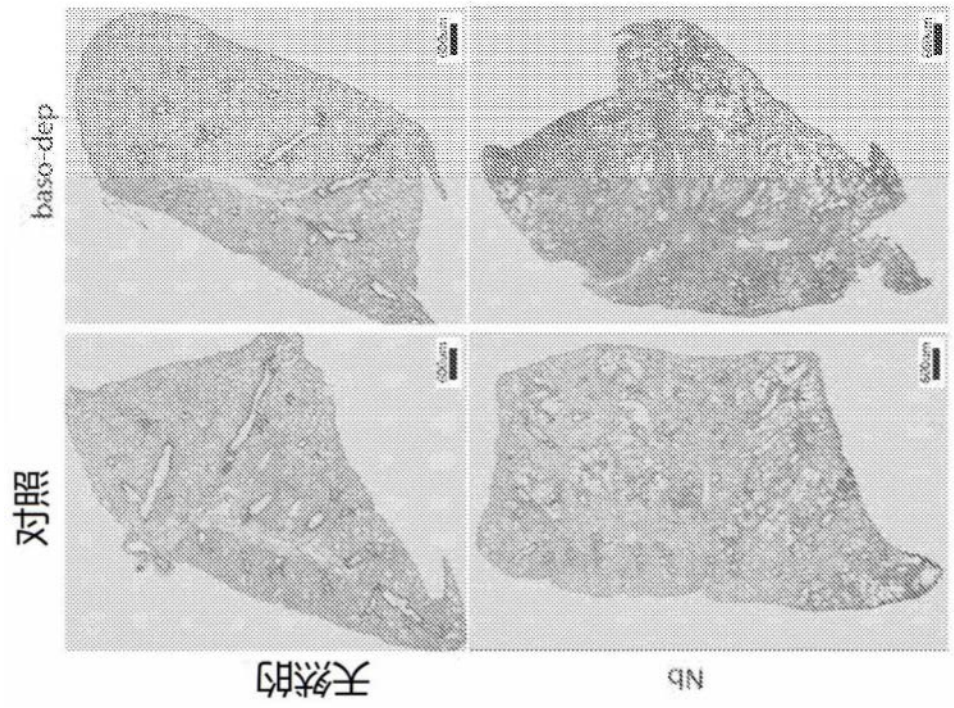


图2B

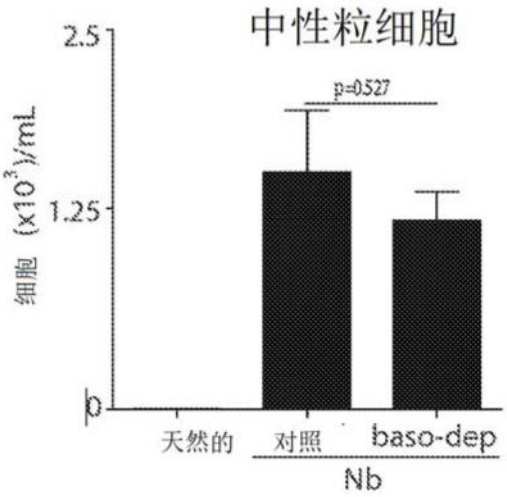

中性粒细胞
2.5
1.25
0
细胞 (x10³)/mL
p=0.527
天然的
对照
baso-dep
Nb

图3A

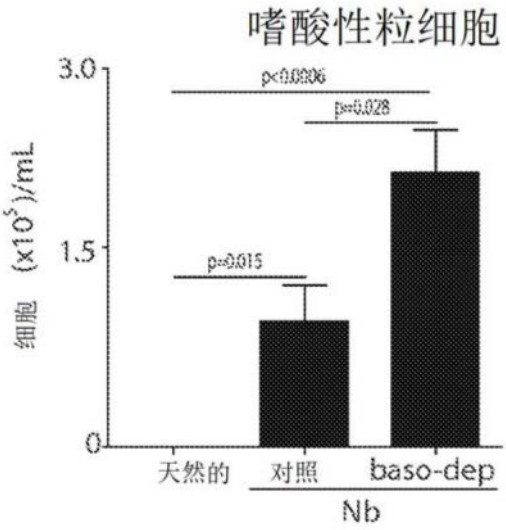

嗜酸性粒细胞
3.0
1.5
0
细胞 (x10⁵)/mL
p<0.0006
p=0.028
p=0.015
天然的
对照
baso-dep
Nb

图3B

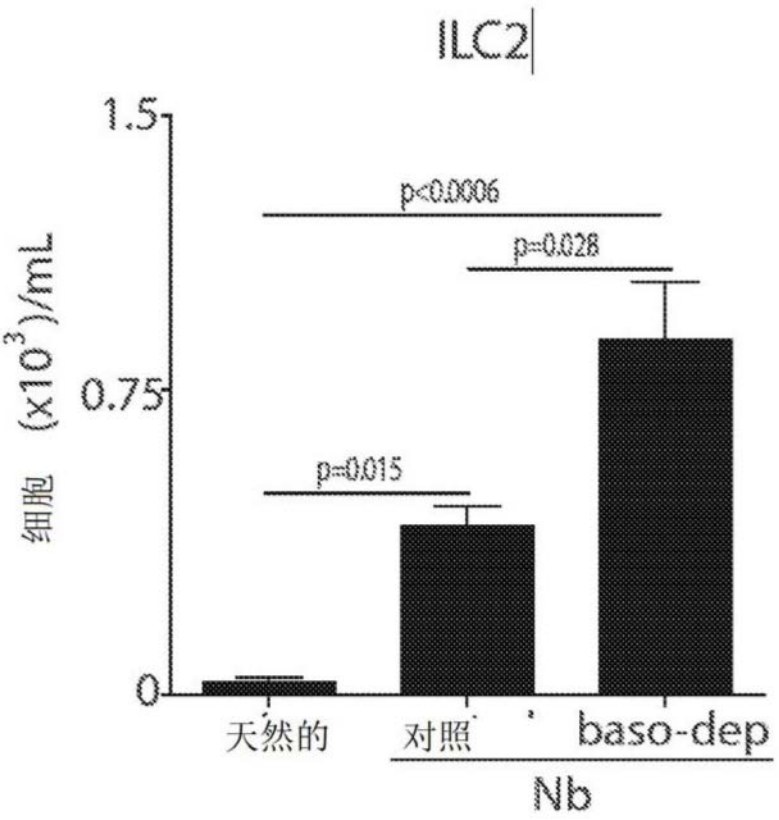


图3C

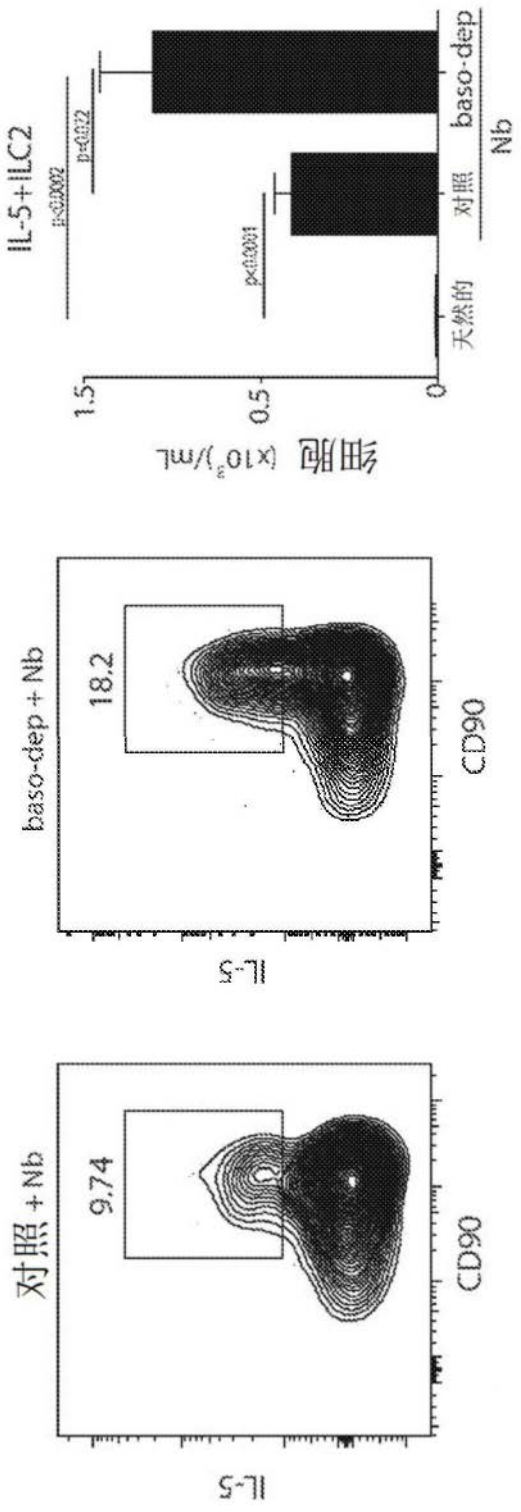

IL-5+ILC2
p<0.0002
p=0.022
p<0.0001
细胞 (x10³)/mL
1.5
0.5
0
天然的
对照
baso-dep Nb
baso-dep + Nb
18.2
IL-5
CD90
对照 + Nb
9.74
IL-5
CD90

图3D

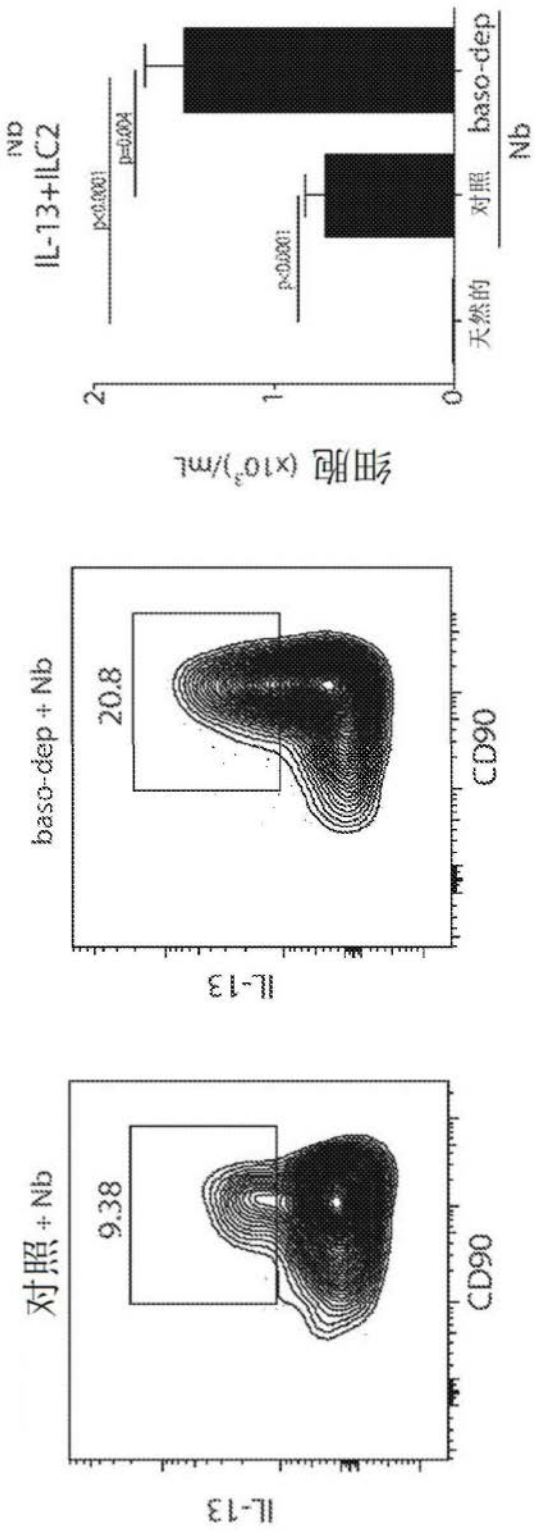

IL-13+ILC2
细胞 (x10³)/mL
天然的
对照
baso-dep
Nb
p<0.0001
p=0.004
p<0.0001
baso-dep + Nb
20.8
IL-13
CD90
对照 + Nb
9.38
IL-13
CD90

图3E

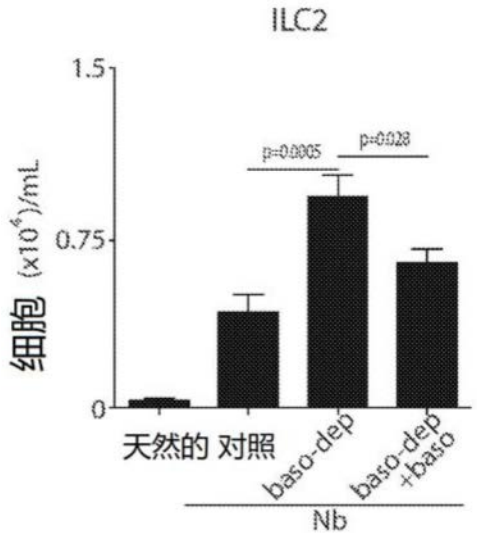

ILC2
1.5
0.75
0
细胞 (x10⁶)/mL
p=0.0005
p=0.028
天然的 对照
baso-dep
baso-dep +baso
Nb

图3F

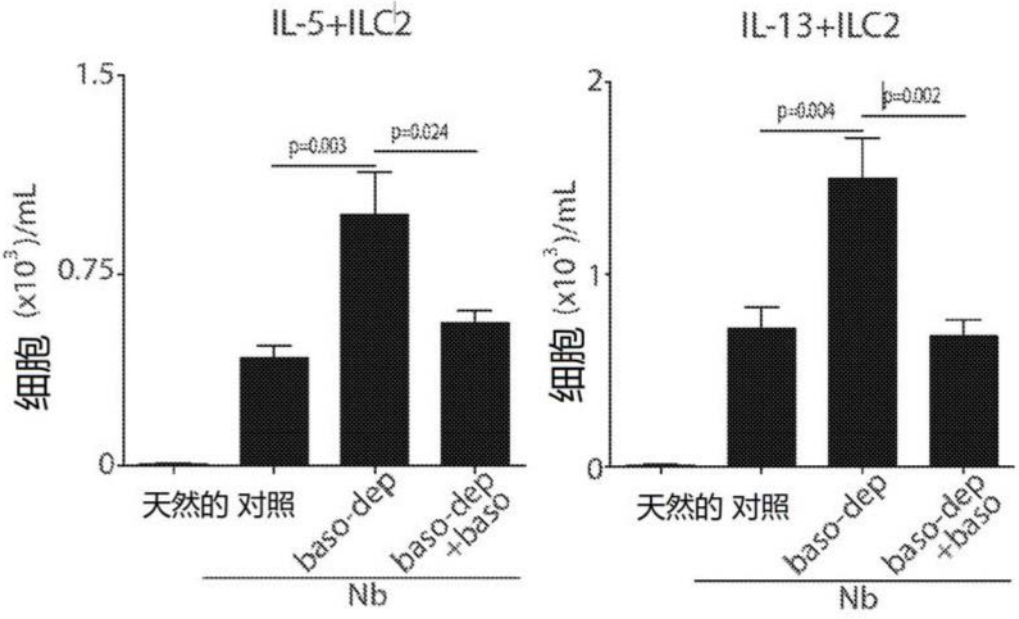

IL-5+ILC2
1.5
0.75
0
细胞 (x10³)/mL
p=0.003
p=0.024
天然的 对照
baso-dep
baso-dep +baso
Nb
IL-13+ILC2
2
1
0
细胞 (x10³)/mL
p=0.004
p=0.002
天然的 对照
baso-dep
baso-dep +baso
Nb

图3G

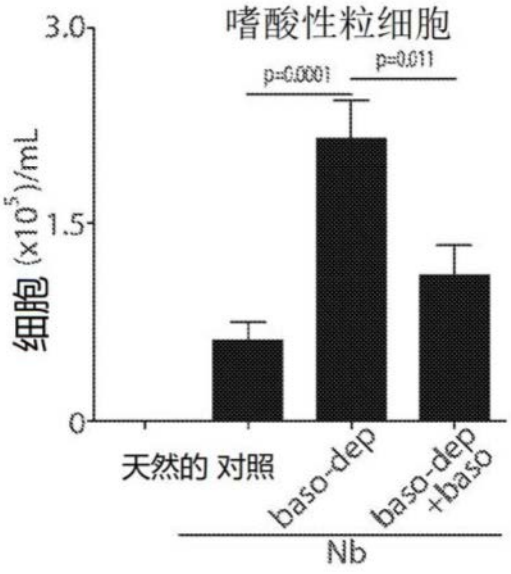

嗜酸性粒细胞
p=0.0001
p=0.011
3.0
1.5
0
细胞 (x10^5)/mL
天然的
对照
baso-dep
baso-dep +baso
Nb

图3H

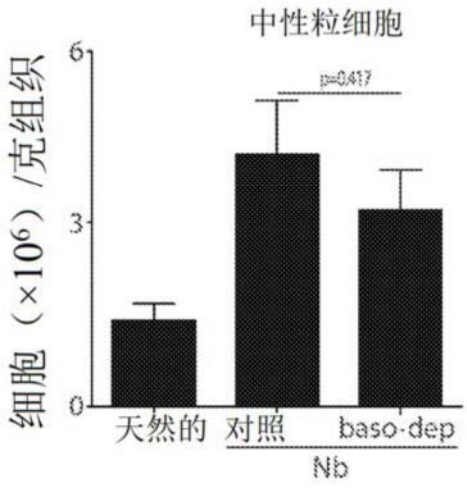

中性粒细胞
p=0.417
6
3
0
细胞（×10^6）/克组织
天然的
对照
baso-dep
Nb

图4A

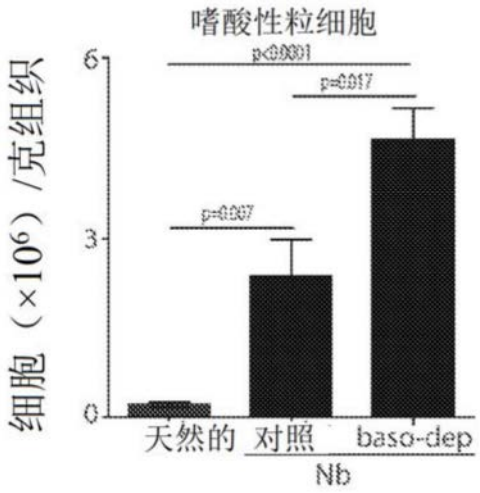

嗜酸性粒细胞
p<0.0001
p=0.017
p=0.007
6
3
0
细胞（×10⁶）/克组织
天然的
对照
baso-dep
Nb

图4B

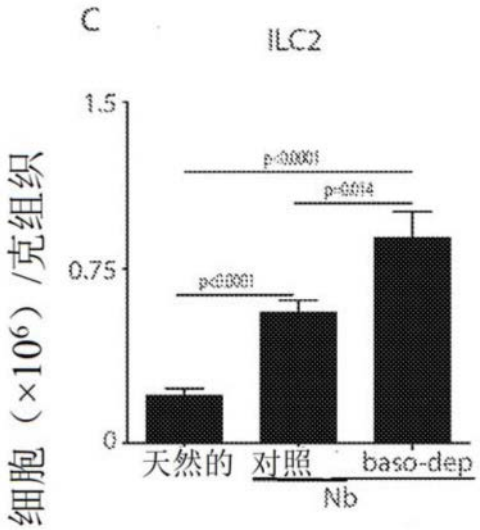

C
ILC2
1.5
0.75
0
细胞（×10⁶）/克组织
p<0.0001
p=0.014
p<0.0001
天然的
对照
baso-dep
Nb

图4C

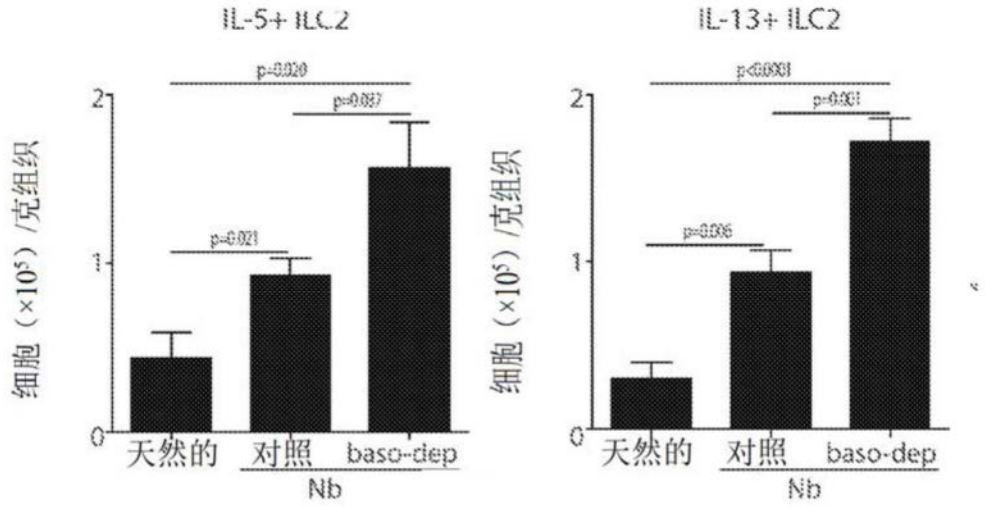

IL-5+ ILC2
IL-13+ ILC2
细胞（×10⁵）/克组织
p=0.020
p=0.007
p=0.021
p<0.0001
p=0.001
p=0.006
2
1
0
天然的
对照
baso-dep
Nb

图4D

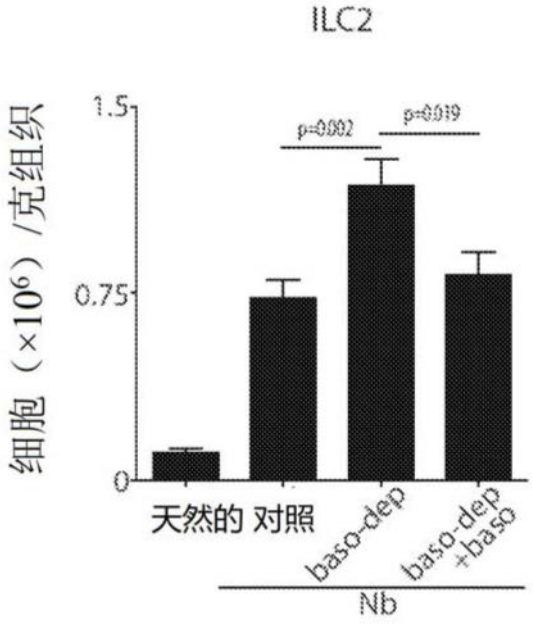

ILC2
细胞（×10⁶）/克组织
1.5
0.75
0
p=0.002
p=0.019
天然的
对照
baso-dep
baso-dep +baso
Nb

图4E

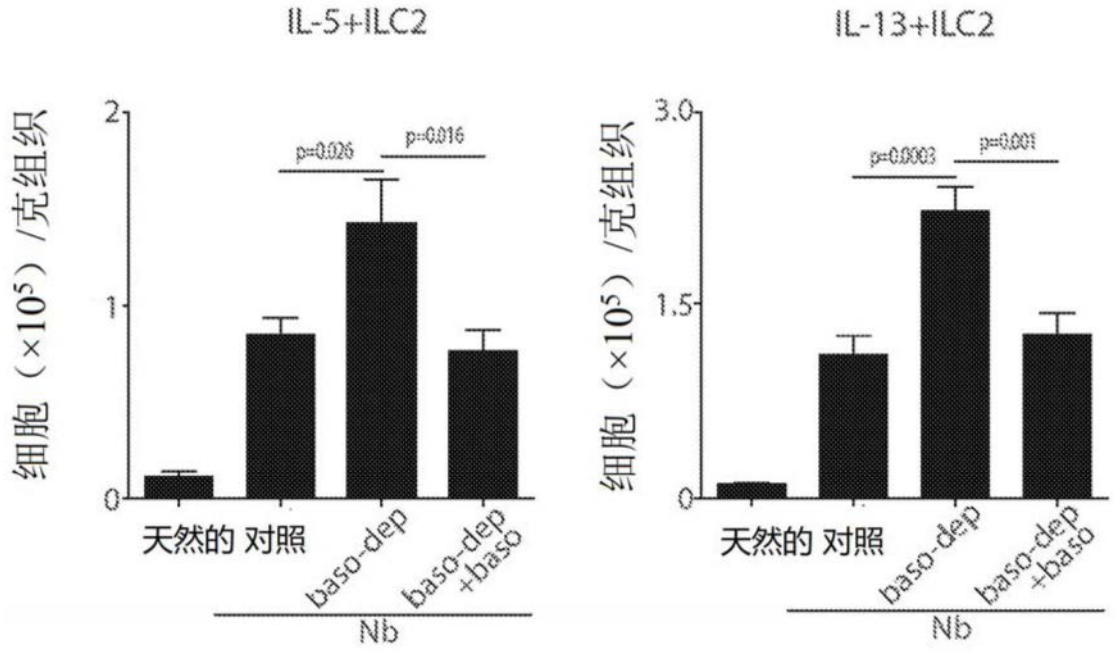

IL-5+ILC2
IL-13+ILC2
细胞（×10⁵）/克组织
p=0.026
p=0.016
p=0.0003
p=0.001
天然的
对照
baso-dep
baso-dep +baso
Nb

图4F

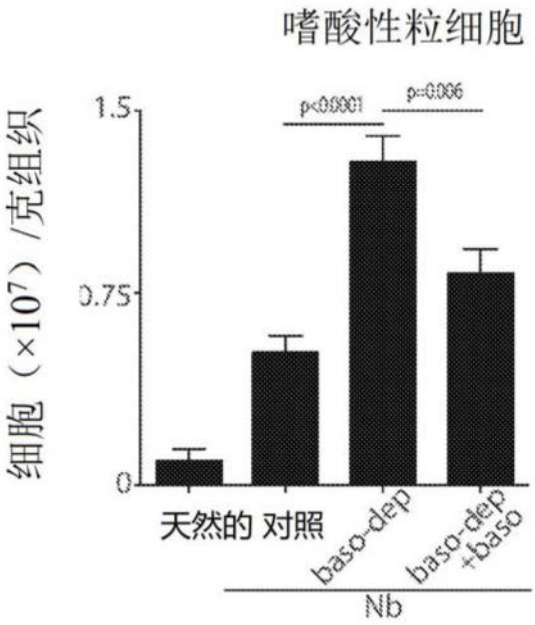

嗜酸性粒细胞
细胞（×10⁷）/克组织
p<0.0001
p=0.006
天然的
对照
baso-dep
baso-dep +baso
Nb

图4G

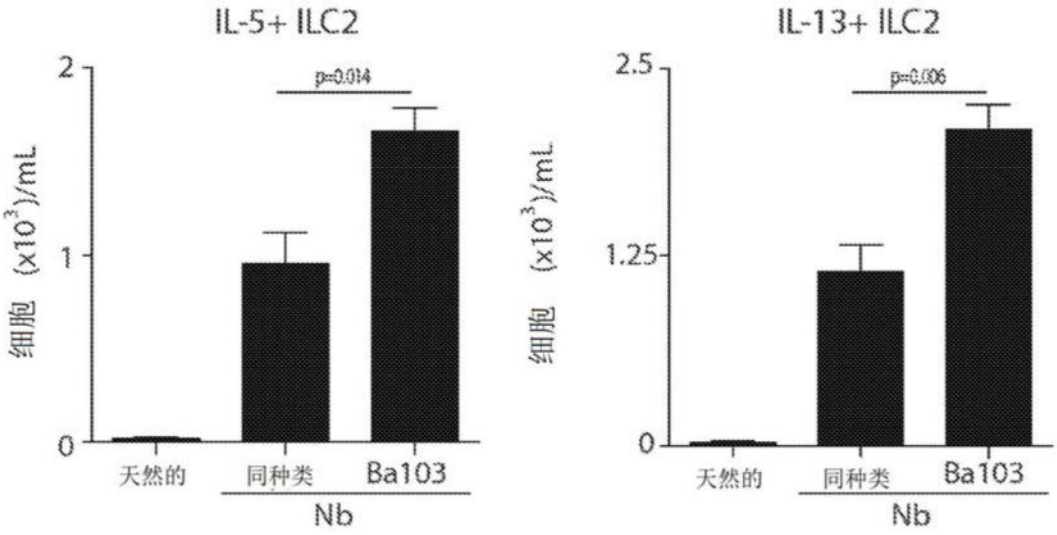

IL-5+ ILC2
p=0.014
细胞 (x10³)/mL
2
1
0
天然的
同种类
Ba103
Nb
IL-13+ ILC2
p=0.006
细胞 (x10³)/mL
2.5
1.25
0
天然的
同种类
Ba103
Nb

图5A

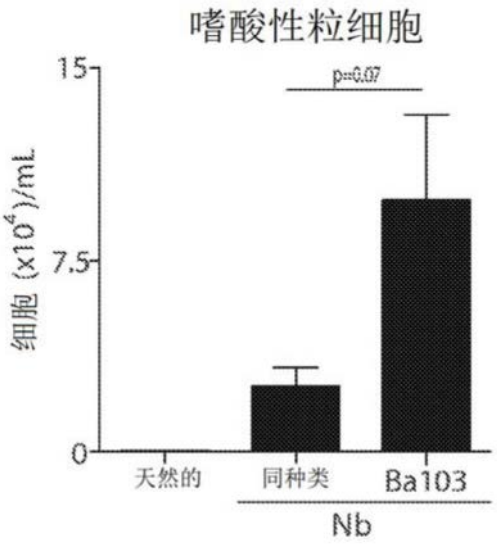

嗜酸性粒细胞
p=0.07
细胞 (x10⁴)/mL
15
7.5
0
天然的
同种类
Ba103
Nb

图5B

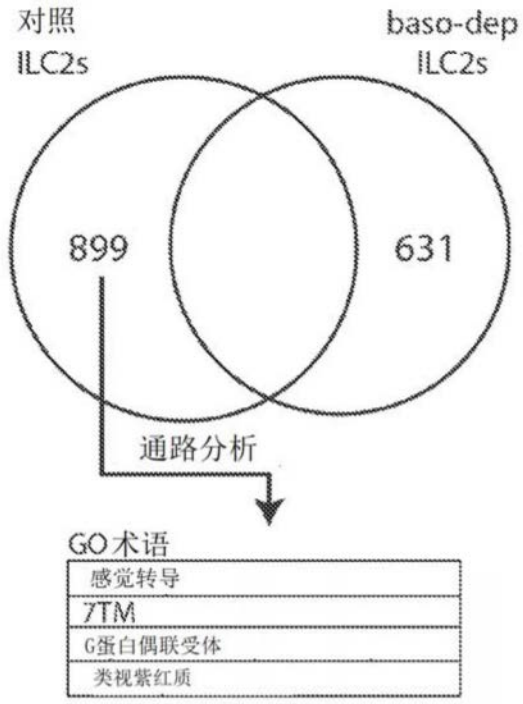


图5C

类视紫红质
嗅觉受体1253 (Olfr 1253)
痕量胺相关的受体 7E (Taar 7e)
G蛋白偶联受体 21 (Gpr21)
G蛋白偶联受体 142 (Gpr142)
嗅觉受体 331 (Olfr 331)
嗅觉受体 1329 (Olfr 1329)
神经介素B受体 (Nmbr)

图5D

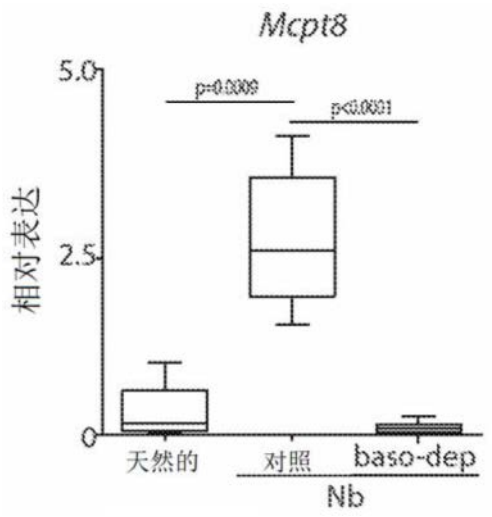

Mcpt8
5.0
2.5
0
相对表达
p=0.0009
p<0.0001
天然的
对照
baso-dep
Nb

图5E

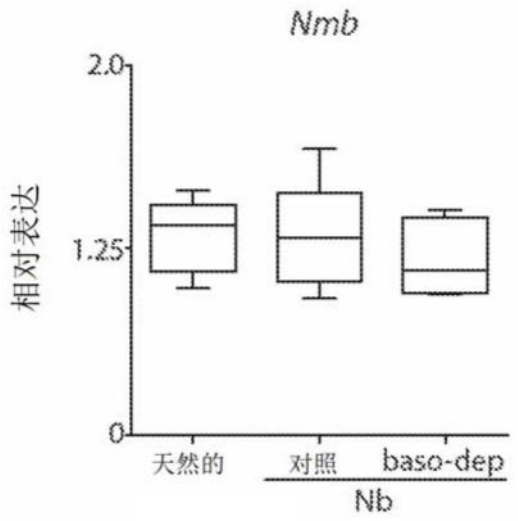

Nmb
2.0
1.25
0
相对表达
天然的
对照
baso-dep
Nb

图5F

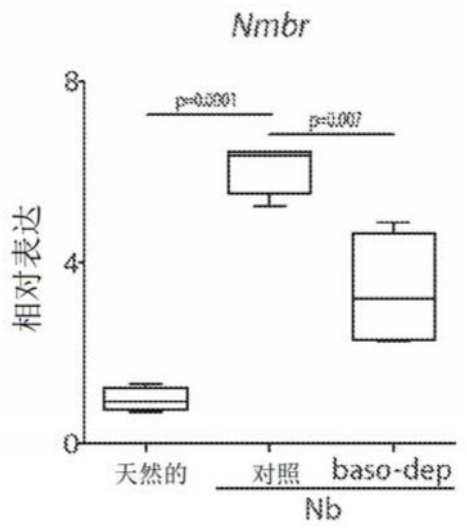

Nmbr
p=0.0001
p=0.007
相对表达
8
4
0
天然的
对照
baso-dep
Nb

图5G

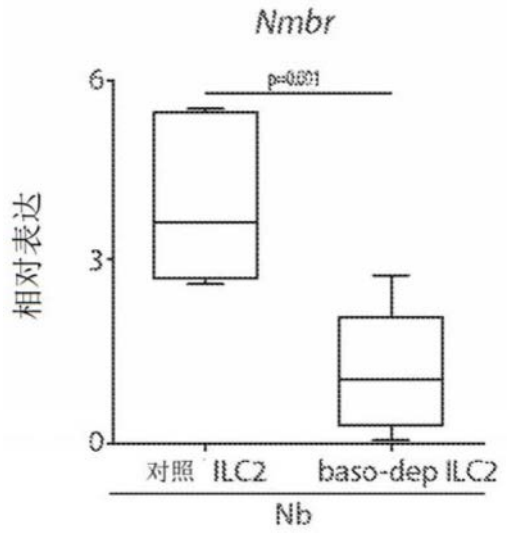

Nmbr
p=0.001
相对表达
6
3
0
对照 ILC2
baso-dep ILC2
Nb

图5H

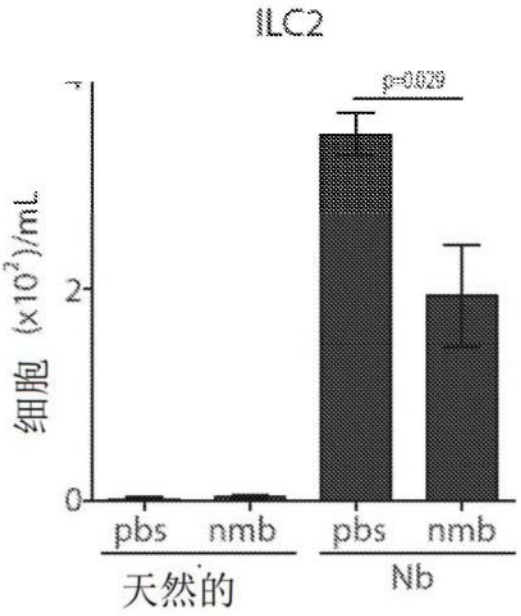

ILC2
p=0.029
细胞 (x10²)/mL
2
0
pbs
nmb
pbs
nmb
天然的
Nb

图6A

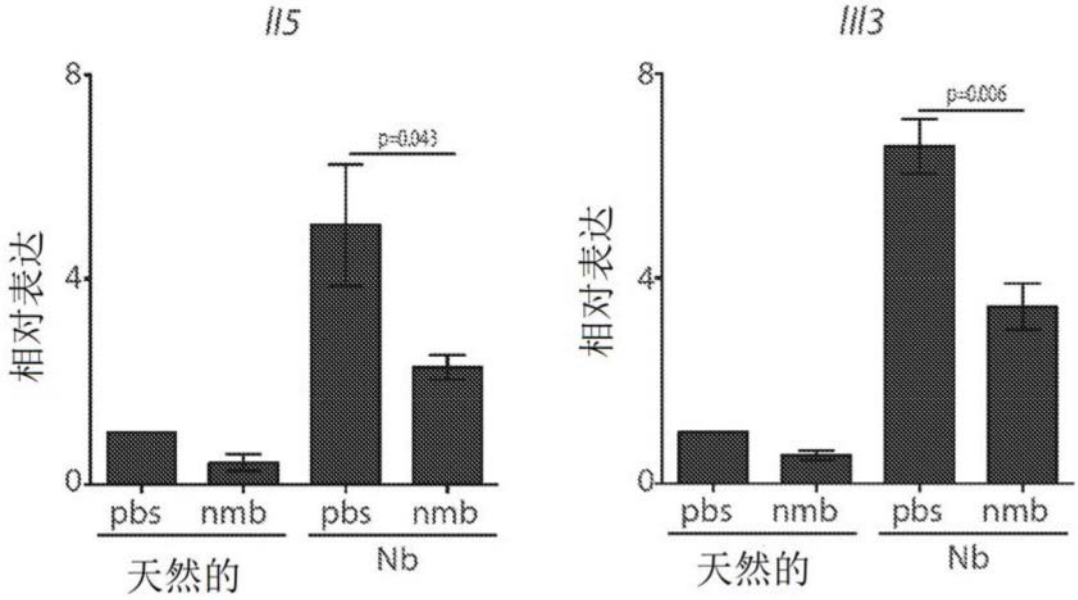

Il5
p=0.043
相对表达
8
4
0
pbs
nmb
pbs
nmb
天然的
Nb
Il13
p=0.006
相对表达
8
4
0
pbs
nmb
pbs
nmb
天然的
Nb

图6B

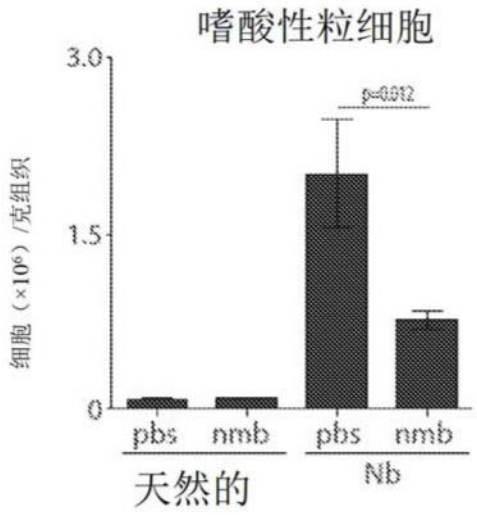

嗜酸性粒细胞
3.0
1.5
0
细胞（×10⁶）/克组织
p=0.012
pbs
nmb
pbs
nmb
天然的
Nb

图6C

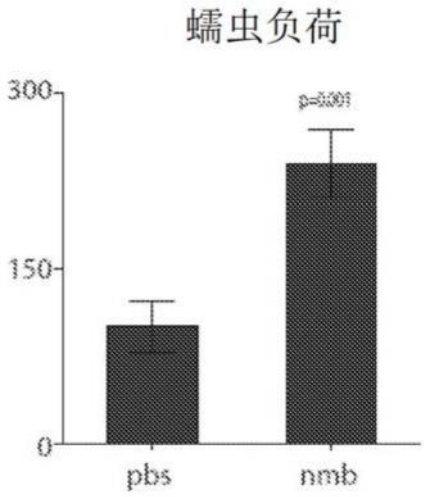

蠕虫负荷
300
150
0
p=0.001
pbs
nmb

图6D

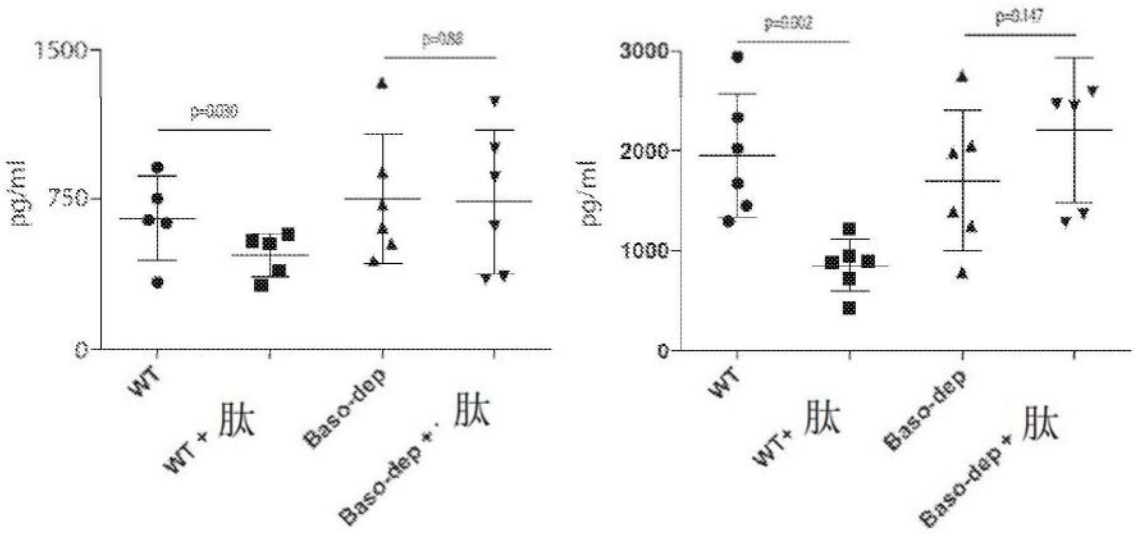

1500
750
0
pg/ml
p=0.030
p=0.082
WT
WT + 肽
Baso-dep
Baso-dep + 肽
3000
2000
1000
0
pg/ml
p=0.002
p=0.147
WT
WT+ 肽
Baso-dep
Baso-dep + 肽

图6E

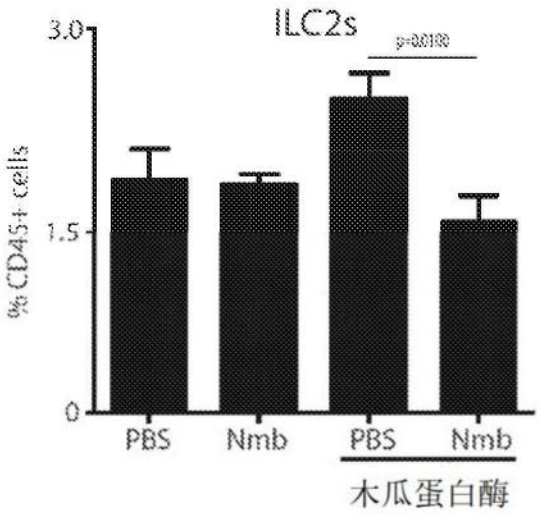

ILC2s
p=0.0100
3.0
1.5
0
% CD45+ cells
PBS
Nmb
PBS
Nmb
木瓜蛋白酶

图7A

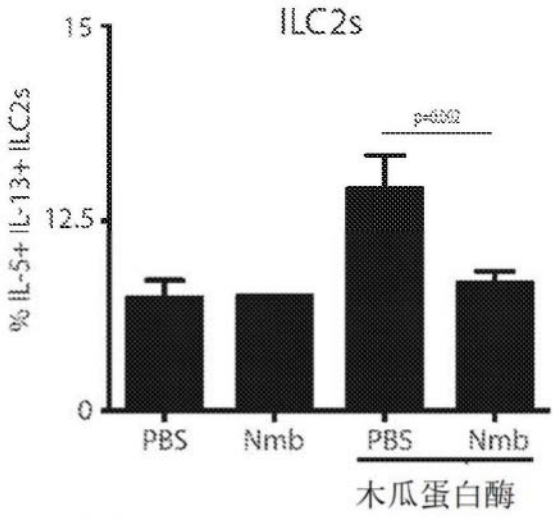

ILC2s
% IL-5+ IL-13+ ILC2s
15
12.5
0
PBS
Nmb
PBS
Nmb
木瓜蛋白酶

图7B

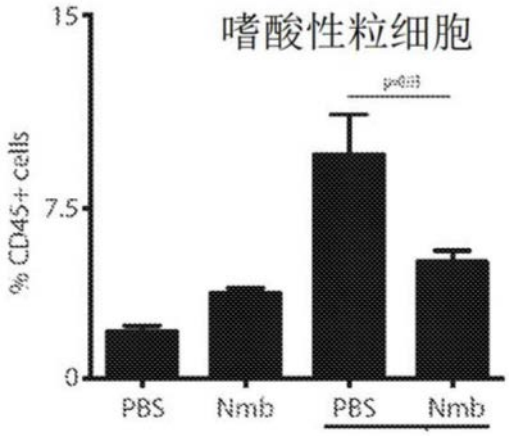

嗜酸性粒细胞
% CD45+ cells
15
7.5
0
PBS
Nmb
PBS
Nmb

图7C

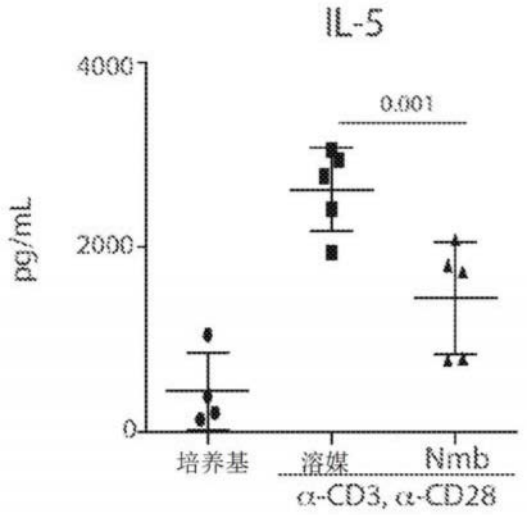

IL-5
4000
2000
0
pg/mL
0.001
培养基
溶媒
Nmb
α-CD3, α-CD28

图7D

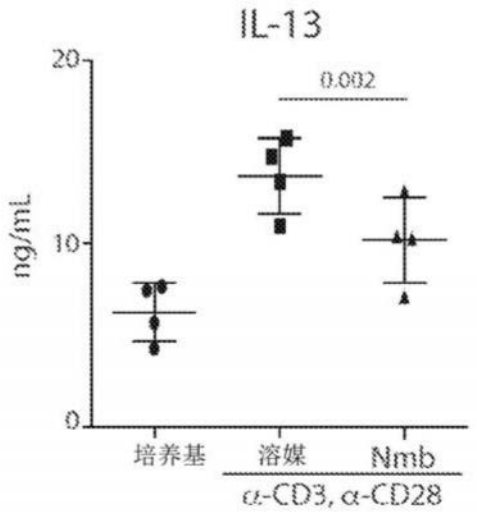

IL-13
20
10
0
ng/mL
0.002
培养基
溶媒
Nmb
α-CD3, α-CD28

图7E

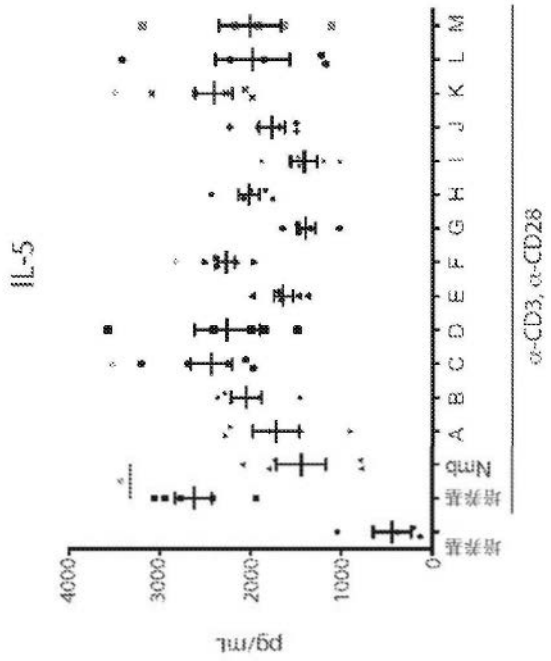

IL-5
pg/mL
4000
3000
2000
1000
0
培养基
Nmb
A B C D E F G H I J K L M
α-CD3, α-CD28

图7F

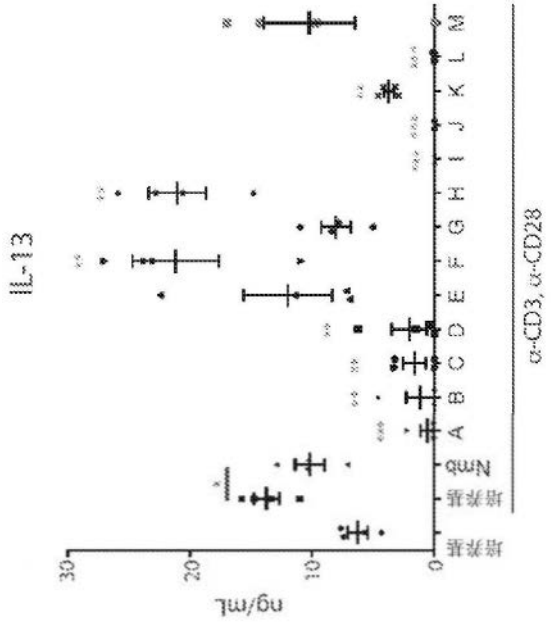

IL-13
ng/mL
30
20
10
0
培养基
Nmb
A B C D E F G H I J K L M
α-CD3, α-CD28

图7G

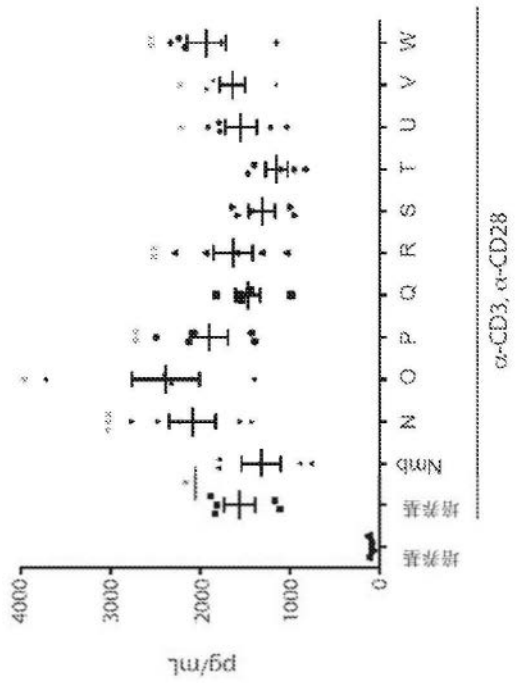

pg/mL
4000
3000
2000
1000
0
培养基
培养基
Nmb
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
α-CD3, α-CD28

图7H

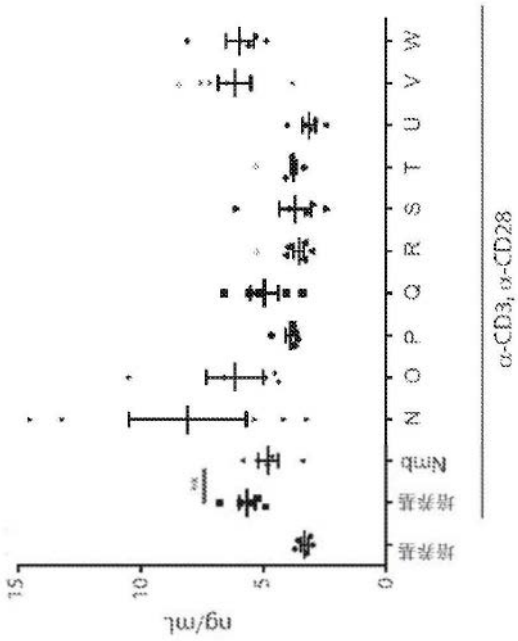

ng/mL
15
10
5
0
培养基
培养基
Nmb
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
α-CD3, α-CD28

图7I

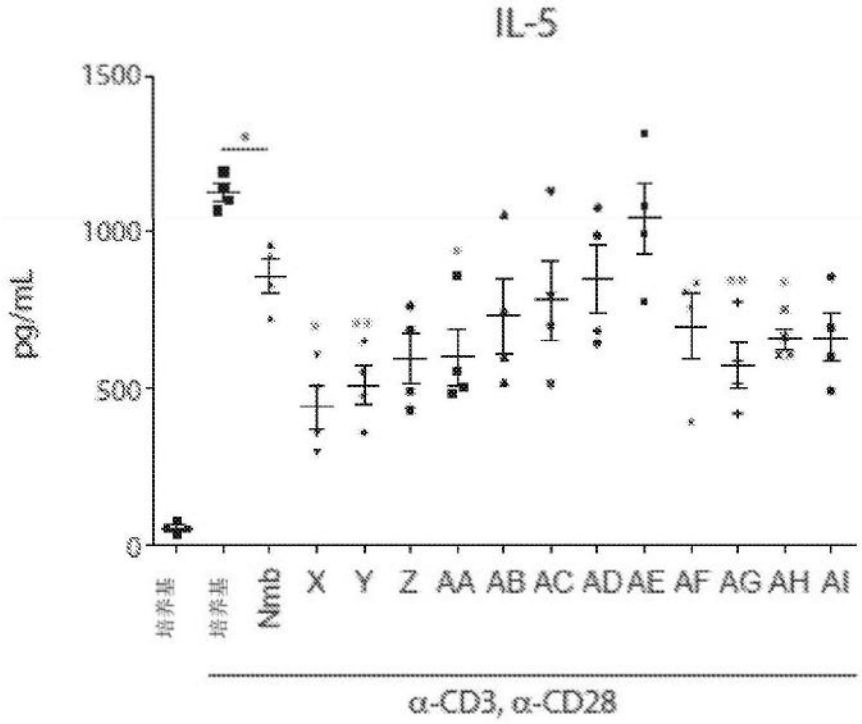

IL-5
1500
1000
500
0
pg/mL
培养基
培养基
Nmb
X
Y
Z
AA
AB
AC
AD
AE
AF
AG
AH
AI
α-CD3, α-CD28

图8A

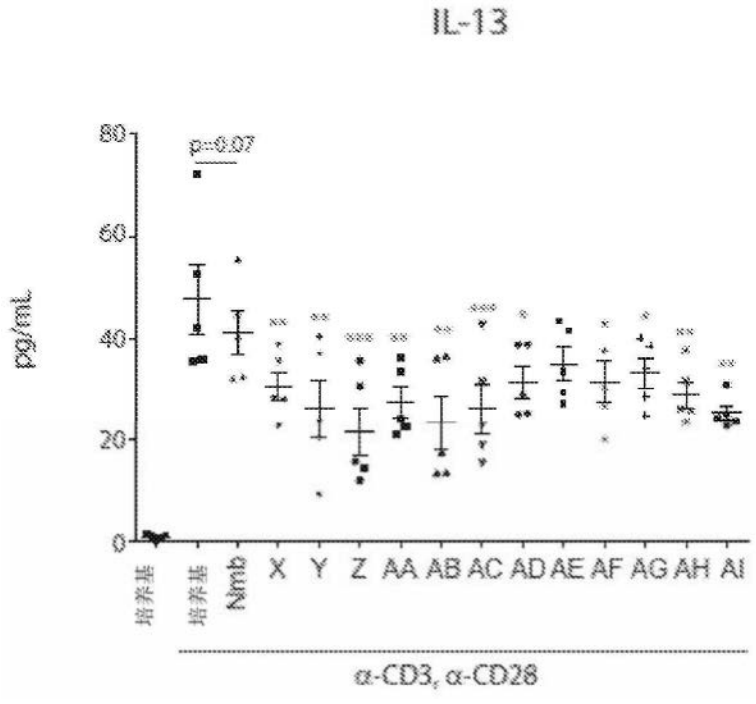

IL-13
80
60
40
20
0
pg/mL
培养基
培养基
Nmb
X
Y
Z
AA
AB
AC
AD
AE
AF
AG
AH
AI
α-CD3, α-CD28

图8B

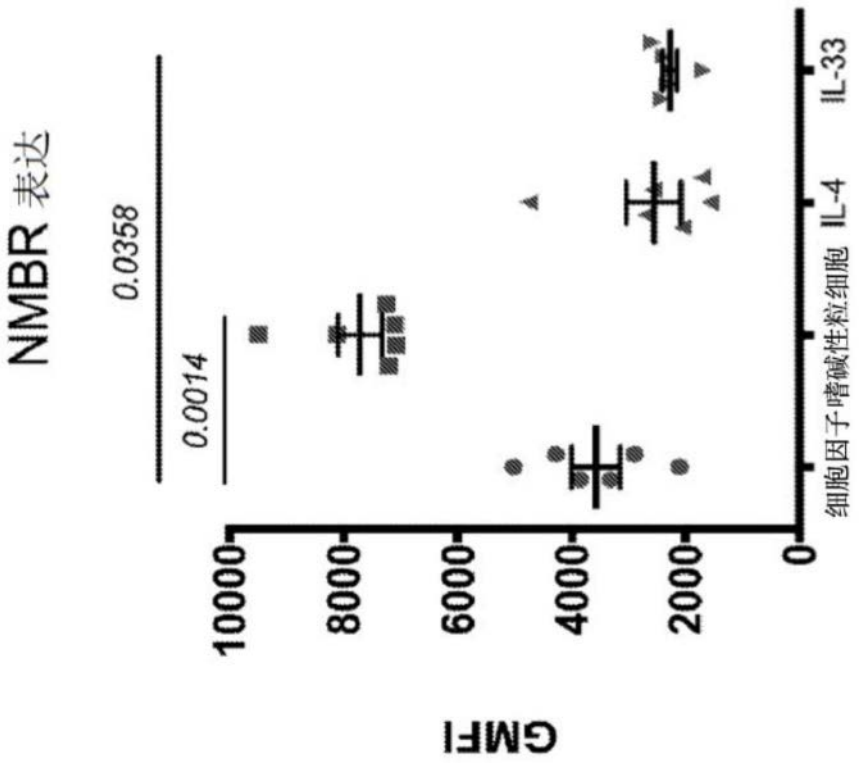

NMBR 表达
0.0358
0.0014
GMFI
10000
8000
6000
4000
2000
0
细胞因子-嗜碱性粒细胞 IL-4 IL-33

图9

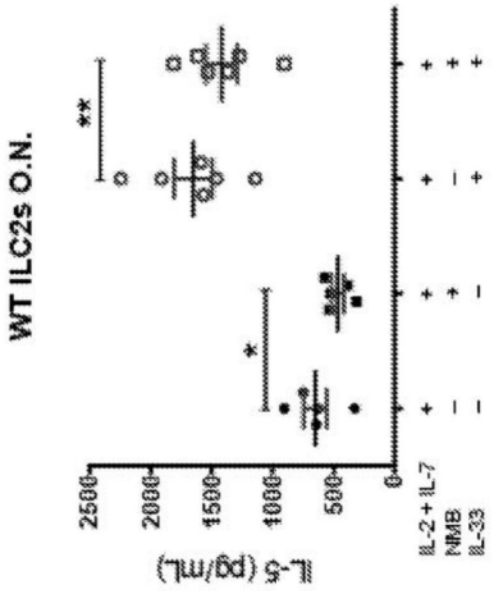

WT ILC2s O.N.
**
*
IL-5 (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
IL-2 + IL-7
NMB
IL-33

图10A

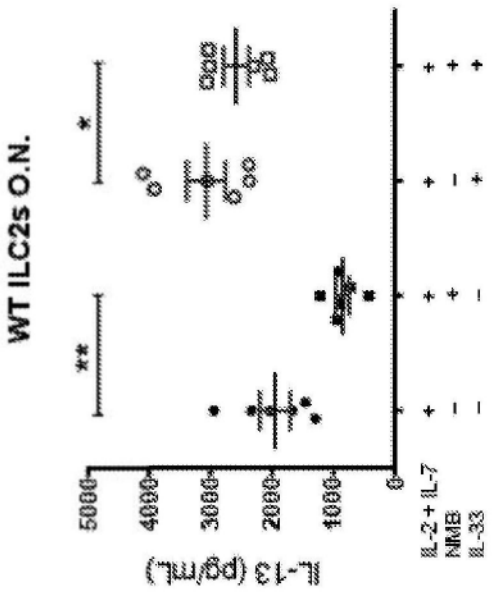

WT ILC2s O.N.
IL-13 (pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
IL-2 + IL-7
NMB
IL-33

图10B

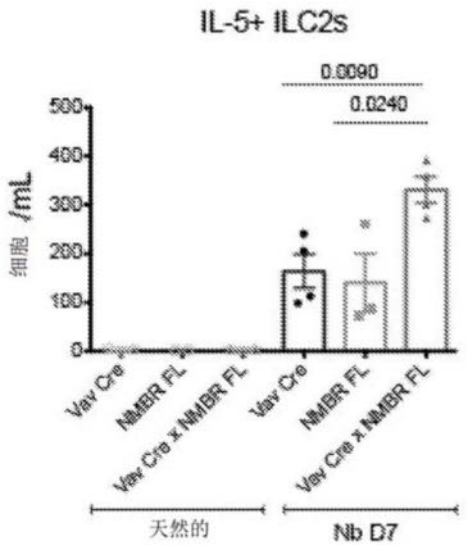

IL-5+ ILC2s
0.0090
0.0240
细胞 /mL
500
400
300
200
100
0
Vav Cre
NMBR FL
Vav Cre x NMBR FL
Vav Cre
NMBR FL
Vav Cre x NMBR FL
天然的
Nb D7

图11A

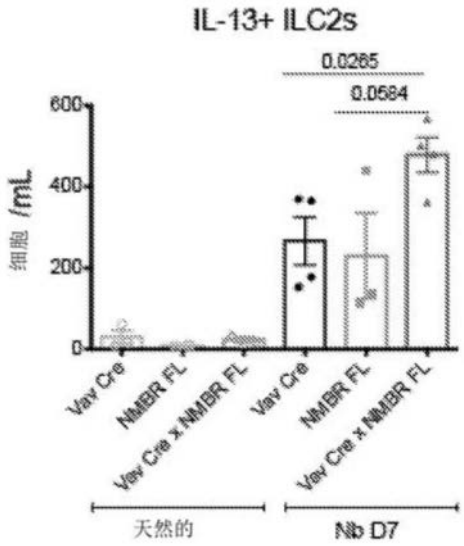

IL-13+ ILC2s
0.0285
0.0584
600
400
200
0
细胞 /mL
Vav Cre
NMBR FL
Vav Cre x NMBR FL
Vav Cre
NMBR FL
Vav Cre x NMBR FL
天然的
Nb D7

图11B

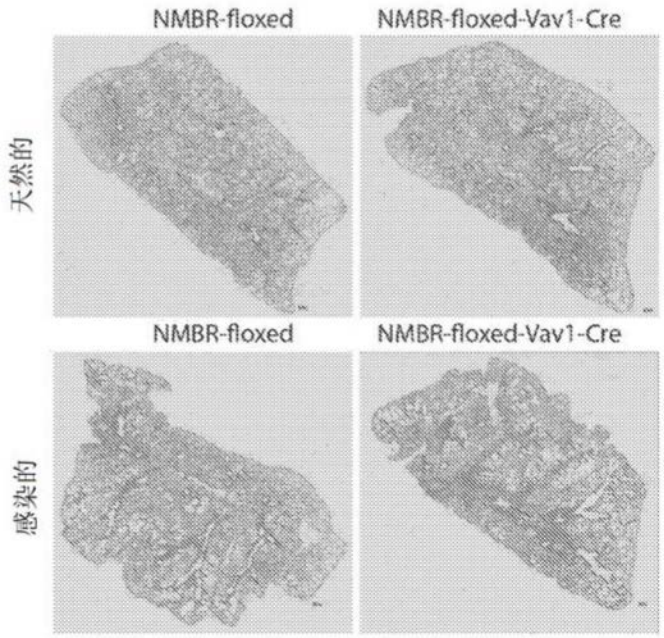

NMBR-floxed
NMBR-floxed-Vav1-Cre
天然的
NMBR-floxed
NMBR-floxed-Vav1-Cre
感染的

图12

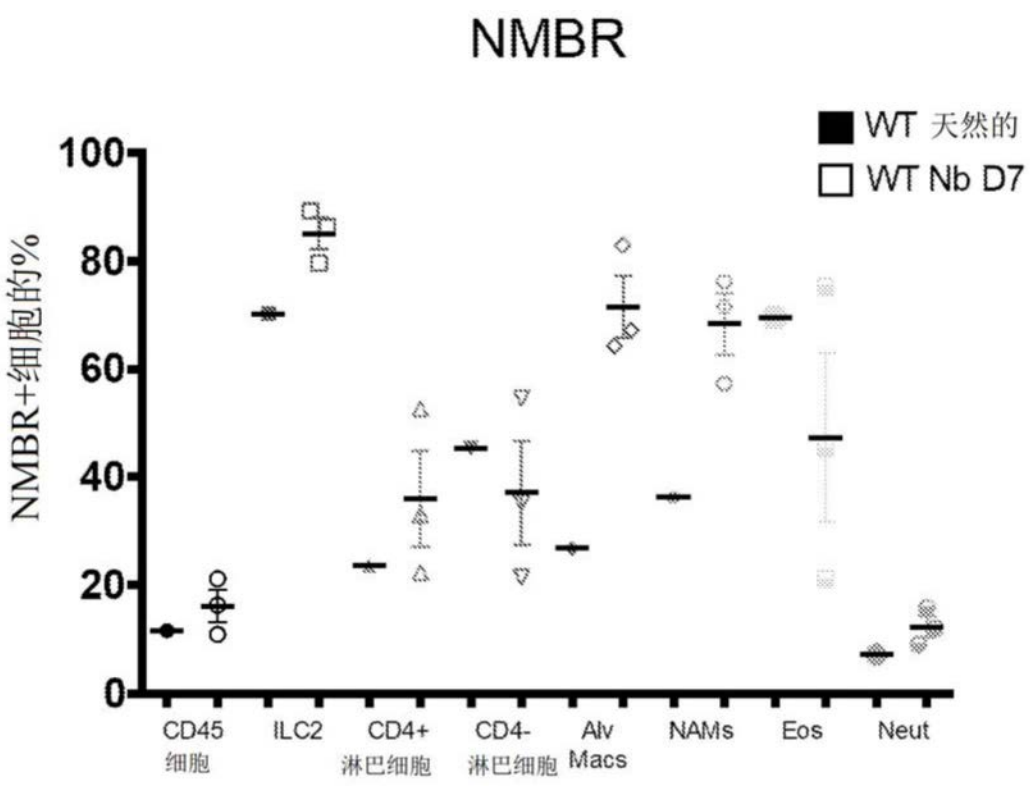

NMBR
WT 天然的
WT Nb D7
NMBR+细胞的%
100
80
60
40
20
0
CD45 细胞
ILC2
CD4+ 淋巴细胞
CD4- 淋巴细胞
Alv Macs
NAMs
Eos
Neut

图13

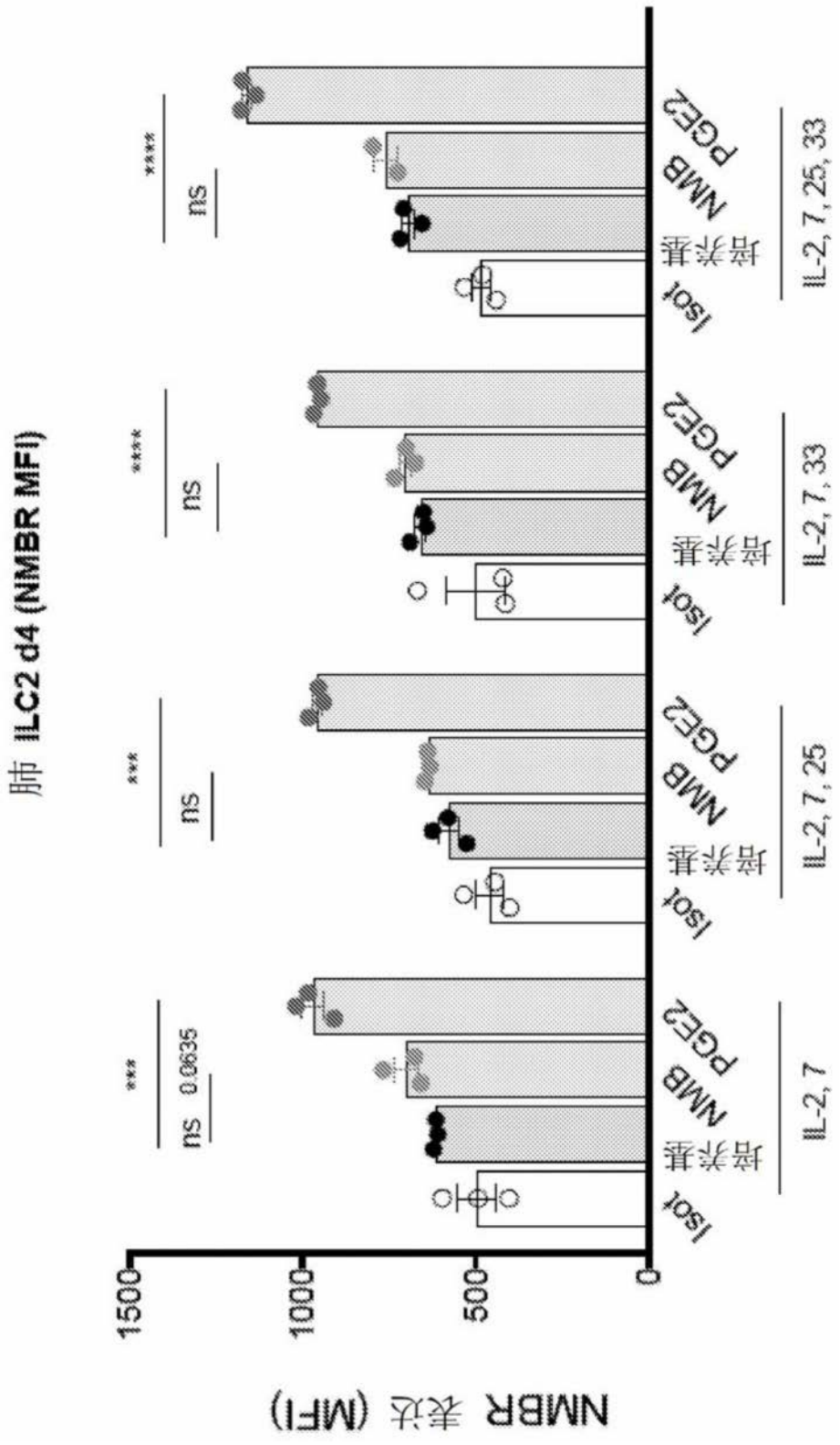

肺 ILC2 d4 (NMBR MFI)
NMBR 表达 (MFI)
1500
1000
500
0
Isot
培养基
NMB
PGE2
IL-2, 7
IL-2, 7, 25
IL-2, 7, 33
IL-2, 7, 25, 33
***
ns
0.0635
****

图14