



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110381985 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201780077416.5

(22)申请日 2017.12.20

(30)优先权数据

1621728.3 2016.12.20 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/083949 2017.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/115199 EN 2018.06.28

(71)申请人 UCB生物制药私人有限公司

地址 比利时布鲁塞尔

申请人 戊瑞治疗有限公司

(72)发明人 T·S·约翰逊 B·图玫

J·鲍尔斯

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51)Int.Cl.

A61K 38/21(2006.01)

权利要求书2页 说明书27页 附图51页

(54)发明名称

干扰素- λ 治疗纤维化的医学用途

(57)摘要

本发明涉及治疗纤维化的方法。本发明公开了新的研究,该研究表明干扰素- λ 在体外和体内都具有直接作用的抗纤维化作用,并且可用于提供治疗多种类型纤维化的有效新疗法。

1. 干扰素- λ , 其用于治疗纤维化。
2. 权利要求1的干扰素- λ , 其中所述干扰素- λ 是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4, 或其功能性模拟物。
3. 权利要求2的干扰素- λ , 其中所述功能性模拟物是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4的片段、变体或衍生物。
4. 权利要求3的干扰素- λ , 其中所述功能性模拟物是聚乙二醇化的。
5. 权利要求4的干扰素- λ , 其中所述功能性模拟物是Peg-干扰素 λ -1a。
6. 权利要求2的干扰素- λ , 其中所述功能性模拟物是抗体。
7. 权利要求2的干扰素- λ , 其中所述功能性模拟物是小化学实体。
8. 前述权利要求之任一项的干扰素- λ , 其中所述干扰素- λ 或功能性模拟物激活干扰素- λ 受体。
9. 前述权利要求之任一项的干扰素- λ , 其中所述纤维化是肾纤维化。
10. 权利要求1~8之任一项的干扰素- λ , 其中所述纤维化是肺纤维化。
11. 权利要求1~8之任一项的干扰素- λ , 其中所述纤维化是小肠纤维化。
12. 权利要求1~8之任一项的干扰素- λ , 其中所述纤维化是皮肤纤维化。
13. 权利要求1~8之任一项的干扰素- λ , 其中所述纤维化是肝纤维化。
14. 干扰素- λ 用于制备用于治疗纤维化的药物的用途。
15. 权利要求14的干扰素- λ 的用途, 其中所述干扰素- λ 是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4, 或其功能性模拟物。
16. 权利要求15的干扰素- λ 的用途, 其中所述功能性模拟物是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4的片段、变体或衍生物。
17. 权利要求16的干扰素- λ 的用途, 其中所述功能性模拟物是聚乙二醇化的。
18. 权利要求17的干扰素- λ 的用途, 其中所述功能性模拟物是Peg-干扰素 λ -1a。
19. 权利要求15的干扰素- λ 的用途, 其中所述功能性模拟物是抗体。
20. 权利要求15的干扰素- λ 的用途, 其中所述功能性模拟物是小化学实体。
21. 权利要求14~20之任一项的干扰素- λ 的用途, 其中所述干扰素- λ 或功能性模拟物激活干扰素- λ 受体。
22. 权利要求14~21之任一项的干扰素- λ 的用途, 其中所述纤维化是肾纤维化。
23. 权利要求14~21之任一项的干扰素- λ 的用途, 其中所述纤维化是肺纤维化。
24. 权利要求14~21之任一项的干扰素- λ 的用途, 其中所述纤维化是小肠纤维化。
25. 权利要求14~21之任一项的干扰素- λ 的用途, 其中所述纤维化是皮肤纤维化。
26. 权利要求14~21之任一项的干扰素- λ 的用途, 其中所述纤维化是肝纤维化。
27. 治疗纤维化的方法, 包括给予治疗有效量的干扰素- λ 。
28. 权利要求27的方法, 其中所述干扰素- λ 是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4, 或其功能性模拟物。
29. 权利要求28的方法, 其中所述功能性模拟物是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4的片段、变体或衍生物。
30. 权利要求29的方法, 其中所述功能性模拟物是聚乙二醇化的。
31. 权利要求30的方法, 其中所述功能性模拟物是Peg-干扰素 λ -1a。

32. 权利要求28的方法,其中所述功能性模拟物是抗体。
33. 权利要求28的方法,其中所述功能性模拟物是小化学实体。
34. 权利要求27~33之任一项的方法,其中所述干扰素- λ 或功能性模拟物激活干扰素- λ 受体。
35. 权利要求27~34之任一项的方法,其中所述纤维化是肾纤维化。
36. 权利要求27~34之任一项的方法,其中所述纤维化是肺纤维化。
37. 权利要求27~34之任一项的方法,其中所述纤维化是小肠纤维化。
38. 权利要求27~34之任一项的方法,其中所述纤维化是皮肤纤维化。
39. 权利要求27~34之任一项的方法,其中所述纤维化是肝纤维化。
40. 权利要求27~39之任一项的方法,其中所述干扰素- λ 或功能性模拟物与其他治疗活性化合物联合给药。
41. 权利要求40的方法,其中所述其他治疗活性化合物是另一种抗纤维化治疗剂。

干扰素- λ 治疗纤维化的医学用途

【技术领域】

[0001] 本发明涉及治疗纤维化的方法。本发明公开了新的研究,该研究表明干扰素- λ 在体外和体内都具有直接作用的抗纤维化作用,并且可用于提供治疗多种类型纤维化的有效新疗法。

【背景技术】

[0002] 纤维化疾病是以异常伤口愈合反应为特征性疾病,其中在器官或组织中形成过量的纤维结缔组织。过量的细胞外基质(ECM)组分如胶原蛋白和纤连蛋白的沉积和积累导致组织硬化和瘢痕形成,引起器官的病理性重塑,并最终导致器官衰竭。

[0003] 实体器官中的伤口通常始于内皮损伤,血小板聚集和活化,引发炎症反应,中性粒细胞,巨噬细胞,嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润到伤口部位。浸润性炎症细胞和受影响的上皮细胞分泌多种生长因子和细胞因子,用于进一步扩增炎症反应。诸如TGF- β , PDGF和IL-13的分子激活巨噬细胞并导致伤口部位的成纤维细胞的募集,增殖和活化。活化的成纤维细胞或肌成纤维细胞的特征在于 α -平滑肌肌动蛋白的表达并分泌胶原和其他ECM组分以稳定细胞基质。这允许上皮细胞和内皮细胞在临时基质上的增殖和迁移,以再生受损组织。一旦完成,炎症过程就会关闭,而成纤维细胞会经历细胞凋亡,从而导致伤口反应的消退。

[0004] 在纤维化重塑中,持续的组织损伤或损伤,或修复途径的失调,导致不适当的伤口反应。发生胶原和ECM的过度沉积和超交联,导致ECM的过度积聚超过正常要求,这与持续的肌成纤维细胞活化,上皮细胞损伤和正常组织结构的丧失有关。

[0005] 纤维化疾病可以影响任何器官或组织,例如肾,肺,肠,皮肤或肝脏。纤维化疾病的原因可能取决于所涉及的器官或组织,并且在某些疾病例如特发性肺纤维化中仍然是未知的。在其他类型的间质性肺病中,其原因被认识到,例如暴露于引起过敏性肺炎的环境过敏原。肝纤维化和最终的肝硬化是由于暴露于多种因素(包括环境和饮食因素或感染因子)而导致的慢性肝损伤。持续过量饮酒或高脂肪/糖饮食也可导致肝硬化。类似地,糖尿病,高血压,暴露于毒性剂和各种类型的自身免疫疾病可以损害肾,导致纤维化重塑和功能丧失。许多类型的炎性肠病如克罗恩病或腹腔注射口炎可导致纤维化重塑,从而导致狭窄和/或吸收不良。

[0006] 进行性纤维化的治疗主要是通过治疗潜在的疾病。例如,控制血压,改善糖尿病中的葡萄糖管理,或去除有害的过敏原或环境原因。然而,在许多患者中,一旦纤维化重塑已经确立,该疾病就会变得自我延续,并且对起始疾病的简单改善治疗不能阻止该过程。一些纤维化疾病可以用抗炎和免疫抑制剂治疗,但这些仅在患者亚组中有效且缓慢,而不是阻止疾病。

[0007] 迄今为止,只有2种经过验证的纤维化重塑疗法,这两种疗法都被授权用于特发性肺纤维化(IPF)。吡非尼酮是一种小分子药物,2008年被批准用于治疗日本的IPF,2011年被批准用于治疗IPF,这可能通过多种作用机制起作用,这些作用机制尚未完全理解,但可能部分通过下调TGF- β 而起作用。尼达尼布是一种三血管激酶抑制剂,可阻断VEGF,FGF和PDGF

受体中的酪氨酸激酶活性。这两种化合物均可减缓IPF的发展,但根据目前的研究,可能只能延长寿命2年。此外,两者都具有显著的副作用,使得超过30%的患者不能长期耐受它们的使用。迄今为止,尚未批准用于纤维化适应症的靶向疗法。

[0008] 因此,目前对于改善所有器官中纤维化疾病的治疗存在未满足的医学需求。因此,本发明的一个目的是提供一种治疗纤维化的新方法。

[0009] 2003年初干扰素- λ (IFN- λ) 家族的发现和初步描述揭示了干扰素研究领域令人兴奋的新篇章。有4种不同但高度相关的蛋白质表示为IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3和IFN- λ 4。这些蛋白质也分别称为白细胞介素-29 (IL-29), IL-28A, IL-28B和IFNL4。总共地,这4种细胞因子包含IFN的III型亚组。由于多种原因,它们不同于I型和II型IFN,包括它们通过异二聚体受体复合物发出信号的事实,所述异二聚体受体复合物不同于I型或II型IFN所使用的受体。虽然I型IFNs (IFN- α /b) 和III型IFNs (IFN- λ) 通过不同的受体复合物发出信号,但它们激活相同的细胞内信号传导途径和许多相同的生物活性,包括抗病毒活性,在各种各样的靶细胞。与它们的抗病毒活性一致,IFN- λ 基因及其相应蛋白质的表达可通过感染多种类型的病毒而诱导。因此,III型IFN (IFN- λ s) 的表达及其主要生物学活性与I型IFN非常相似。然而,与在大多数细胞类型(包括白细胞)上广泛表达的IFN- α 受体不同,IFN- λ 受体主要限于上皮来源的细胞。IFN- λ 作为新型抗病毒治疗剂的潜在临床重要性已经很明显。此外,若干组的临床前研究表明,IFN- λ 也可用作某些类型癌症的潜在治疗剂。

[0010] 在本发明中,我们公开了新的研究,该研究首次证明干扰素- λ 家族的细胞因子在体外和体内都具有直接作用的抗纤维化作用,并且这些蛋白质可用于设计对于治疗多种类型的纤维化有效的新方法。

[0011] **【发明描述】**

[0012] 除非另外定义,否则本文使用的所有科学和技术术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。本文提及的所有出版物和专利均通过引用并入本文。

[0013] 应当理解,可以组合本文描述的任何实施例。

[0014] 本发明提供干扰素- λ 用于治疗纤维化。本发明还提供干扰素- λ 用于制备治疗纤维化的药物的用途。本发明进一步提供治疗纤维化的方法,包括给予治疗有效量的干扰素- λ 。

[0015] 干扰素 (IFN) 是一类重要的细胞因子,在宿主保护免受病毒感染和免疫应答调节方面具有不同的作用。基于其结构特征,受体使用和生物活性,识别出三种不同类型的干扰素 (I型,II型和III型),并且它们在宿主防御中的作用在不同类型之间变化。

[0016] I型IFN (人体中的IFN- α / β / ω / ϵ / κ) 具有强的抗病毒活性,并且能够在多种细胞类型中诱导有效的抗病毒应答 (Huang等,1993)。IFN- α / β 结合称为IFN α R (由IFNAR1和IFNAR2亚基组成) 的异二聚体跨膜受体,其在与配体结合后触发激酶JAK1和TYK2的激活,然后磷酸化受体的细胞内结构域中的特定酪氨酸。这产生了STAT1和STAT2信号分子的停靠位点,导致它们的募集和随后的磷酸化。磷酸化的STAT募集IFN调节因子9 (IRF9),它们一起形成IFN刺激的基因因子3 (ISGF3),其穿过细胞核并驱动IFN刺激的基因 (ISG) 的转录。

[0017] II型类仅包括IFN- γ ,其被分类为Th1型细胞因子,其刺激细胞介导的免疫应答,其对宿主保护免受病原微生物如结核分枝杆菌 (Bach等1997),在肿瘤免疫中具有重要作用,并扩增I型IFN的抗病毒活性。因此,I型和II型IFN共同作用以激活先天性和适应性免疫应答,目的是保护宿主免受感染和肿瘤侵袭 (Biron等2001)。

[0018] IFNs是较大的II类细胞因子家族的一部分,其包括六种IL-10相关细胞因子:IL-10,IL-19,IL-20,IL-22,IL-24和IL-26 (Kotenko 2002),并且是归类于一起,因为它们通过在细胞外结构域中具有共同基序的受体发出信号。这些受体包括II类细胞因子受体家族(CRF2),并且通常是由2个不同的受体链, α 和 β 受体亚基组成的异二聚体(Stahl等,1993)。通常, α 亚基是主要的细胞因子结合蛋白,并且 β 亚基是形成高亲和力结合位点和用于信号转导所必需的。

[0019] III型IFN或IFN- λ s是CRF2家族的最新添加物。它们证明了IL-10相关细胞因子的结构特征,并且在比I型IFN,即上皮细胞和某些免疫细胞更受限制的细胞群中诱导抗病毒活性(Kotenko等,2003;Sheppard等,2003)。。在人中,III型IFN家族由4种密切相关的蛋白质组成,IFN- λ 1,- λ 2,- λ 3和- λ 4(分别称为IL-29,IL-28A,IL-28B和IFNL4),而小鼠仅具有IFN- λ 2和- λ 3(分别为IL-28A和IL-28B)。它们是高度同源的;IFN- λ 2和IFN- λ 3之间的氨基酸同一性为~96%,IFN- λ 1和IFN- λ 2/ λ 3之间的同一性为~81%。IFN- λ 4最类似于IFN- λ 3,但这些蛋白质仅具有约30%的同一性,并且IFN- λ 4主要在细胞内并且在人中非常差地分泌(Hong等2016)。

[0020] IFN- λ 受体复合物由特异性IFN- λ 受体链1(IFN- λ R1或IL-28RA)和共有的IL-10受体链2(IL-10R2或IL-10R β)组成。通过四种配体中的任何一种接合IFN- λ 受体复合物导致JAK1和TYK2的活化,转录因子STAT1,STAT2和IRF9的活化以形成IFN刺激的基因因子3(ISGF3)。ISGF3通过与数百种IFN刺激基因(ISG)的启动子中的IFN刺激元件(ISRE)结合来调节基因转录,所述基因包括与抗病毒表型相关的许多基因,包括OAS1,MX1,EIF2AK2(双链RNA激活蛋白激酶)和IRF7。比较cDNA微阵列分析显示,由III型IFN(IFN- λ)诱导的基因库与由I型IFN(IFN- α / β)诱导的基因库基本相同(Doyle等,2006)。总之,尽管使用不同的受体,I型和III型IFN均激活ISGF3(Zhou等,2007),因此诱导相似的转录反应。

[0021] 尽管由I型或III型IFN诱导的基因表达模式非常相似,但IFN- α 诱导的基因表达的相对大小通常大于IFN- λ 。这可以反映通过I型与III型受体的信号传导的相对强度的差异,或者可以简单地反映这些配体的各个受体的表达水平的差异。

[0022] IFN- λ 的晶体结构揭示了典型的II类细胞因子的四螺旋束结构,最接近的IFN- λ 结构同源物是IL-22(Gad等,2009),并且可能表明IFN- λ 和IL-22具有平行功能,分别保护上皮组织免受病毒和细菌感染。IFN- λ R1受体链上的结合位点在所有四种IFN- λ 中都很保守,而IL-10R2上的结合位点定义不明确(Miknis等,2010)。IFN- λ R1由两个不同的纤连蛋白III型结构域组成,每个结构域约100个氨基酸。配体-受体界面包括IFN位点上的螺旋A,环AB和螺旋F,以及主要来自IFN- λ R1的N-末端结构域和结构域间铰链区的环。配体和受体之间的结合模式支持通过氢键介导的初始长程离子相互作用,然后进行疏水相互作用以完成拟合。

[0023] IFN- λ s由多种造血细胞和上皮细胞表达以响应病毒感染。检测粘膜上皮表面上的入侵病毒的模式识别受体通过转录因子NF- κ B,IRF3,IRF7和Med23启动转录反应(Osterlund等,2007,Griffiths等,2013)。根据病毒和进入点,I型和III型IFN在介导粘膜界面的抗病毒防御中的作用已被证明是多余的和独特的。肠上皮细胞专门响应III型IFN,其以非冗余的方式介导对上皮病毒如轮状病毒的控制(Pott等2011)。呼肠孤病毒在肠上皮细胞中引发感染,但可穿透肠上皮层,引起小鼠全身性感染;III型IFN限制肠上皮中的初始复制,但I型IFN对于预防全身性感染是必不可少的(Mahlakoiv等,2015)。I型和III型IFN的

区室化在呼吸道中不太清楚,其中在两种IFN系统之间存在一定程度的冗余(Mordstein等2008)。因此,气道上皮细胞表达两种IFN类型的受体,而肠上皮细胞仅表达IFN- λ 受体。

[0024] 在某些情况下,IFN- λ R1受体表达主要限于上皮细胞和某些免疫细胞亚群,例如单核细胞衍生的巨噬细胞,浆细胞样树突细胞和NK细胞。NK细胞中IFN- λ R1的激活与IFN- γ 和抗肿瘤活性的最大产生有关,这可能是与其他刺激或与其他细胞类型组合协同介导的效应(Souza-Fonseca-Guimaraes等2015)。由于对免疫细胞和上皮细胞的IFN- λ R1表达受到限制,III型IFN的免疫调节作用是有限的,但当局部粘膜反应足以控制病毒时,它们是非常有效的抗病毒。这与I型IFN在感染反应期间普遍存在的活性形成对比,因此更适合控制需要广泛免疫激活的严重或全身性感染。

[0025] 以下参考文献描述了I型和III型干扰素之间信号传导和生物学效应的差异:Wack等2015,Chow&Gale 2015,Hemann等2017,Broggi等2017,Blumer等2017,Chiriac等2017,Bhushal等,2017年,Andreakos等2017年和Bhushal等2017年。

[0026] IFN- λ s对抗病毒治疗的贡献已经很好地建立在小鼠和黑猩猩的临床前模型中,以及在体外,在感染丙型肝炎病毒(HCV)的原代人肝细胞中可获得的数据(Thomas等,2012,Park等,2012)和人体临床试验(PhII BMS数据)。可以用IFN- λ 靶向的病毒范围包括但不限于以下:流感A/B,严重急性呼吸综合征(SARS),冠状病毒,H1N1,人免疫缺陷病毒(HIV),单纯疱疹病毒2型(HSV2),巨细胞病毒(CMV),中东呼吸综合征(MERS),诺罗病毒,轮状病毒和埃博拉(Eslam和George 2015;Gresser 2015)。所有这些病毒都靶向上皮入侵点并且治疗上可以用IFN- λ 靶向,其可以在该接入点激活IFN- λ R1受体复合物。

[0027] 许多临床前研究表明,IFN- λ s在多种肿瘤类型中具有抗肿瘤活性,如肝癌,黑色素瘤,食管癌,神经内分泌肿瘤,结肠直肠癌,肺腺癌和伯基特淋巴瘤(Sato等2006,Zitzmann等2006,Steen等2010)。IFN- λ s的抗肿瘤机制是肿瘤细胞诱导细胞凋亡和直接影响免疫细胞以增强先天和适应性免疫刺激活性。IFN- λ s在肿瘤微环境中被诱导,并且已经显示通过IFN- λ R1受体的信号传导在IFN- λ R1敲除小鼠中发挥抗肿瘤作用,所述小鼠在移植的肿瘤模型中更容易形成肉瘤和死亡。IFN- λ 治疗延迟了致死率并减少了肉瘤的发展(Numasaki等,2007)。在癌症治疗的背景下,可以设想IFN- λ s补充目前的IFN- α 疗法,免疫检查点抑制剂或作为传统抗癌剂如硼替佐米,替莫唑胺,顺铂或5-FU的辅助剂(Guenterberg等2010年,Li等2010)。

[0028] 遗传和功能证据表明IFN- λ 在炎症性疾病如哮喘,牛皮癣和类风湿性关节炎中具有保护作用。在哮喘的小鼠模型中,IFN- λ 使疾病严重程度最小化,嗜酸性粒细胞浸润减少并且证明远离Th2和Th17细胞因子的Th1免疫偏斜效应(Koltsida等2011)。在小鼠胶原诱导的关节炎模型中,IFN- λ 2治疗通过抑制IL-1和IL-17反应以及中性粒细胞募集而导致疾病的消除(Blazek等2015)。在牛皮癣病变中,已显示Th17细胞是IFN- λ 的来源,其中它可以抑制Th2细胞因子IL-13(Wolk等2013)。IFN- λ 在炎症和自身免疫疾病中的作用仍然模糊不清。

[0029] 关于HCV的三项具有里程碑意义的全基因组关联研究(GWAS)已证明IFN- λ 区域的单核苷酸多态性(SNPs)是响应于聚乙二醇化IFN- λ 1/利巴韦林(PEG-IFN/RBV)治疗和自发性清除慢性HCV感染的最强单一预测因子。这些SNP定位于IFNL3/IFNL4基因座,并且已显示对所有HCV基因型和所有地理位置都有效(Ge等2009,Suppiah等2009,Tanaka等2009)。IFNL3/IFNL4基因型在预测所有抗病毒治疗(包括第一代和第二代直接作用抗病毒药物)的

治疗结果中的作用也扩展到包括CMV,HSV和Epstein-Barr病毒在内的其他病毒感染的广泛列表(EBV),以及HCV/HIV和HCV/HBV的共感染(Rallon等,2010,Guo等,2013)。数据与IFN- λ 在控制不同器官,特别是上皮来源的病毒感染中的主要作用一致。

[0030] 有证据表明两种SNP在肝纤维化中的作用,即rs12979860和rs8099917'应答者'基因型,以及丙型肝炎和乙型肝炎病毒感染和非酒精性脂肪性肝病中肝脏炎症和纤维化的加速(Bochud等,2012,Eslam等,2015)。

[0031] 已经描述了IFNL3/IFNL4区域中的两种功能变体,其与原始GWAS发现相关联,但可能存在许多其他尚未鉴定的贡献因子。第一个SNP是 $\Delta G/TT$ (rs368234815),其控制IFN- $\lambda 4$ 的产生并且还预测HCV清除(Prokunina-Olsson等,2013)。祖先的' ΔG '等位基因编码功能性IFN- $\lambda 4$,其损害HCV清除并因此增加病毒载量,而最近(在进化方面)rs368234815的' TT '等位基因破坏IFNL4的开放阅读框架(破坏蛋白质表达)并与病毒清除率提高有关。这种明显的悖论可能与IFNL4的主要细胞内定位和分泌不良有关,并且暗示IFNL4可能抑制其他IFN- λ 家族成员的分泌和功能。IFNL3的3'UTR区域中的第二个SNP(rs4803217)影响IFNL3的信使RNA稳定性(McFarland等,2014)。尽管这些变异在预测肝纤维化中的作用尚不清楚,特别是在非HCV队列中,但它们与rs12979860处于连锁不平衡状态,因此需要做更多的工作来证明是否存在任何关联。

[0032] 总之,迄今已描述IFN- λ 具有抗病毒和抗肿瘤活性,免疫-炎性功能和稳态作用。在本发明中,我们公开了IFN- λ s出乎意料地在体外和体内都具有直接作用的抗纤维化作用。实施例证明干扰素- λ 蛋白在体内小鼠慢性肾病模型和具有来自肝,小肠,皮肤,肾和肺器官系统的相关原代细胞的体外人纤维化模型中具有抗纤维化作用。因此,这些蛋白质在多种类型的纤维化中具有作为抗纤维化剂的意想不到的潜力,并且可以用于设计用于治疗纤维化疾病的有效新疗法。

[0033] 术语干扰素- λ (IFN- λ)和干扰素- λ (IFN- λ)在本文中可互换使用,指干扰素- λ 家族的细胞因子。干扰素- λ 蛋白和干扰素- λ 受体也通过许多其他同义词已知,如表1所示。

[0034] **【表1】**

[0035]

蛋白	同义词
干扰素 λ -1	IFN- λ 1 IFNL1 白细胞介素-29 IL-29
干扰素 λ -2	IFN- λ 2 IFNL2 白细胞介素-28A IL-28A 细胞因子 Zcyto20 ZCYTO20
干扰素 λ -3	IFN- λ 3 IFNL3 白细胞介素-28B IL-28B ZCYTO22.
干扰素 λ -4	IFN- λ 4 IFNL4
干扰素- λ 受体	IFN-LR1 IL-28R1 IL-28RA IFN- λ R1

[0036] 在一个实施方案中,干扰素- λ 是IFN- λ 1。

[0037] 在一个实施方案中,干扰素- λ 是IFN- λ 2。

[0038] 在一个实施方案中,干扰素- λ 是IFN- λ 3。

[0039] 在一个实施方案中,干扰素- λ 是IFN- λ 4。

[0040] IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3和IFN- λ 4的氨基酸和DNA序列示于图18中。

[0041] IFN- λ 可以以融合蛋白的形式使用,例如Fc融合体。Fc融合蛋白由与IFN- λ 融合的抗体(例如IgG)的Fc结构域组成。由于Fc结构域的结合,Fc融合蛋白形成二聚体。因此IFN- λ 可以是二聚体形式,也可以是单体形式。

[0042] **【功能性模拟物】**

[0043] 在一个实施方案中,干扰素- λ 是IFN- λ 1的功能性模拟物。

[0044] 在一个实施方案中,干扰素- λ 是IFN- λ 2的功能性模拟物。

[0045] 在一个实施方案中,干扰素- λ 是IFN- λ 3的功能性模拟物。

[0046] 在一个实施方案中,干扰素- λ 是IFN- λ 4的功能性模拟物。

[0047] 术语“功能性模拟物”是指与野生型蛋白质具有相同或相似生物学效应的分子。例如,干扰素- λ 功能性模拟物可以激活干扰素- λ 受体并驱动IFN-刺激的基因的转录。

[0048] 在一个实施方案中,功能性模拟物可以如实施例1中所述在体内纤维化模型中降低羟脯氨酸水平。在一个实施方案中,功能性模拟物可以在体外纤维化模型中抑制纤连蛋白和/或胶原沉积,如实施例2中所述。

[0049] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 1的片段。

[0050] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 2的片段。

[0051] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 3的片段。

[0052] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 4的片段。

[0053] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 1的变体。

[0054] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 2的变体。

[0055] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 3的变体。

[0056] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 4的变体。

[0057] 变体干扰素- λ 可以是或可以包含图18中所示的特定序列之一的变体。例如,变体可以是图18中任何氨基酸序列的取代,缺失或添加变体。片段例如,IFN- λ 的大小可以具有大于50个氨基酸,大于100个氨基酸或大于150个氨基酸的大小。

[0058] 与图18中的特定氨基酸序列相比,变体干扰素- λ 可包含1、2、3、4、5,最多10,最多20或更多(通常最多50个)氨基酸取代,缺失和/或添加。“缺失”变体可包括缺失单个氨基酸,缺失小的氨基酸组,例如2、3、4或5个氨基酸,或删除较大的氨基酸区域,例如缺失特定氨基酸结构域或其他特征。“取代”变体通常涉及用相同数量的氨基酸取代一个或多个氨基酸并进行保守氨基酸取代。例如,氨基酸可以被具有相似性质的替代氨基酸取代,例如,另一种碱性氨基酸,另一种酸性氨基酸,另一种中性氨基酸,另一种带电荷的氨基酸,另一种亲水性氨基酸,另一种疏水性氨基酸,另一种极性氨基酸,另一种芳香族氨基酸或另一种脂肪族氨基酸。表2中显示了可用于选择合适取代基的20种主要氨基酸的一些性质。

[0059] 【表2】

[0060]

Ala	脂肪族,疏水,中性	Met	疏水,中性
Cys	极性,疏水,中性	Asn	极性,亲水,中性
Asp	极性,亲水,带电(-)	Pro	疏水,中性
Glu	极性,亲水,带电(-)	Gln	极性,亲水,中性
Phe	芳族,疏水,中性	Arg	极性,亲水,带电(+)
Gly	脂肪族,中性	Ser	极性,亲水,中性
His	芳族,极性,亲水,带电(+)	Thr	极性,亲水,中性
Ile	脂肪族,疏水,中性	Val	脂肪族,疏水,中性
Lys	极性,亲水,带电(+)	Trp	芳族,疏水,中性
Leu	脂肪族,疏水,中性	Tyr	芳族,极性,疏水

[0061] 变体干扰素- λ 可与图18中的氨基酸序列具有大于约60%,或大于约70%,例如75%或80%,通常大于约85%,例如超过约90或95%的氨基酸同一性。变体可与图18中的序列保留至少约90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的同一性。变体通常保留约60%-约99%的同一性,约80%-约99%的同一性,约90%-约99%的同一性或约95%-约99%的同一性。可以在相关的SEQ ID NO序列的整个长度上或在序列的一部分上观

察到该水平的氨基酸同一性,例如跨越约20、30、50、75、100、150、200或更多个氨基酸。

[0062] 如本文所用的术语“同一性”表示在比对序列中的任何特定位置,氨基酸残基在序列之间是相同的。如本文所用的术语“相似性”表示,在比对序列中的任何特定位置,氨基酸残基在序列之间具有相似类型。例如,亮氨酸可以取代异亮氨酸或缬氨酸。通常可以彼此取代的其他氨基酸包括但不限于:

[0063] • 苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸(具有芳香侧链的氨基酸)

[0064] • 赖氨酸,精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);

[0065] • 天冬氨酸和谷氨酸(具有酰胺侧链的氨基酸);和

[0066] • 半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。

[0067] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 1的衍生物。

[0068] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 2的衍生物。

[0069] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 3的衍生物。

[0070] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是IFN- λ 4的衍生物。

[0071] 在一个实施方案中,干扰素- λ 可以是或可以包含图18中所示的特定序列之一的衍生物。在一个实例中,衍生物可以包括天然存在的氨基酸的结构类似物。或者,可以修饰氨基酸,例如标记。

[0072] 在一个实施方案中,本发明的干扰素- λ 是聚乙二醇化的,即干扰素- λ 与聚(乙二醇)(PEG)共价连接。产生聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域熟知的,参见例如Chapman A等,2002,Advanced Drug Delivery Reviews 54:531-545。

[0073] 在一个实施方案中,聚乙二醇化干扰素- λ 是PEG干扰素 λ -1a“ λ ”(Andersen等,2013)。“ λ ”是最初在ZymoGenetics(现为Bristol-Myers Squibb的全资子公司)开发的研究型III型干扰素治疗剂。它于2016年获得了Eiger Biopharmaceuticals的许可,目前正在进行临床开发,用于治疗慢性丁型肝炎病毒(HDV)感染。

[0074] 在一个实施方案中,干扰素- λ 功能性模拟物是抗体。

[0075] 本发明的抗体分子可包含具有全长重链和轻链的完整抗体分子或其片段或抗原结合部分。术语抗体的“抗原结合部分”是指抗体的一个或多个片段,其保留选择性结合抗原的能力。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。抗体和其片段及其抗原结合部分可以是但不限于Fab,修饰的Fab,Fab',修饰的Fab',F(ab')₂,Fv,单结构域抗体(例如VH或VL或VHH),scFv,bi,tri或四价抗体,Bis-scFv,双抗体,三抗体,四抗体和任何上述的表位结合片段(参见例如Holliger和Hudson,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。用于产生和制造这些抗体片段的方法是本领域熟知的(参见例如Verma等,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。用于本发明的其他抗体片段包括国际专利申请W0 2005/003169,W0 2005/003170和W0 2005/003171中描述的Fab和Fab'片段以及国际专利申请W02009/040562中描述的Fab-dAb片段。多价抗体可以包含多种特异性或可以是单特异性的(参见例如W0 92/22853和W0 05/113605)。可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且可以以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

[0076] 本发明的抗体是干扰素- λ 功能性模拟物,并且引发与野生型蛋白质相同或相似的生物学效应。例如,抗体可以结合干扰素- λ 受体上的表位,激活受体信号传导并驱动IFN刺

激的基因的转录。

[0077] 在一个实施方案中,干扰素- λ 衍生物是小分子化学实体(例如分子量小于900道尔顿的化学实体)。

[0078] 筛选化学文库以鉴定可能是潜在候选药物的小分子化学实体的方法是本领域已知的。例如,如实施例2中所述,可以在配体-受体结合测定中或在器官纤维化的细胞培养模型中测试化学文库。

[0079] **【纤维化疾病】**

[0080] 可以使用本发明的干扰素- λ 治疗的纤维化疾病的实例包括但不限于间质性肺病,肺纤维化,例如特发性肺纤维化,矽肺病,过敏性肺炎,非特异性间质性肺炎,类风湿性肺,硬皮病,慢性阻塞性肺病和囊性纤维化;肾纤维化(包括慢性肾小球肾炎,肾小管间质性肾病和肾遗传性疾病),如糖尿病肾病,高血压性肾硬化,局灶性节段性肾小球硬化,IgA肾病,系膜增生性肾小球肾炎,膜性肾病,肾血管疾病,多囊肾病,慢性移植肾肾病和Goodpastures疾病;肝纤维化和肝硬化包括原发性硬化性胆管炎,原发性胆汁性肝硬化,酒精性肝病和非酒精性脂肪性肝炎(包括其他脂肪酸性肝病);以及心内膜心肌纤维化,纵隔纤维化,骨髓纤维化,腹膜后纤维化,包裹性腹膜纤维化,进行性大块纤维化,肾源性系统性纤维化,克罗恩病(加上其他肠道狭窄引起的疾病),瘢痕疙瘩,心肌梗塞,硬皮病,系统性硬化和关节纤维化。

[0081] 在一个实施方案中,纤维化是肾纤维化(在这种情况下,IFN- λ 可以是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4)。

[0082] 在一个实施方案中,纤维化是肺纤维化(在这种情况下,IFN- λ 可以是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4)。

[0083] 在一个实施方案中,纤维化是小肠纤维化(在这种情况下,IFN- λ 可以是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4)。

[0084] 在一个实施方案中,纤维化是皮肤纤维化(在这种情况下,IFN- λ 可以是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4)。

[0085] 在一个实施方案中,纤维化是肝纤维化(在这种情况下,IFN- λ 可以是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4)。

[0086] 在一个实施方案中,纤维化是腹膜纤维化(在这种情况下,IFN- λ 可以是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4)。

[0087] 在一个实施方案中,纤维化是胰腺纤维化(在这种情况下,IFN- λ 可以是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4)。

[0088] 在一个实施方案中,纤维化是动脉粥样硬化(在这种情况下,IFN- λ 可以是IFN- λ 1、IFN- λ 2、IFN- λ 3或IFN- λ 4)。

[0089] 在一个实施方案中,纤维化选自肾纤维化,肺纤维化,小肠纤维化,皮肤纤维化,肝纤维化,腹膜纤维化,胰腺纤维化和动脉粥样硬化。

[0090] 在一个实施方案中,纤维化选自肾纤维化,肺纤维化,小肠纤维化,皮肤纤维化,腹膜纤维化,胰腺纤维化和动脉粥样硬化。

[0091] 在一个实施方案中,纤维化与微生物感染无关,例如病毒感染。因此,本发明中治疗的受试者可以是没有感染的受试者,例如病毒感染。例如,受试者可以是没有已知可被

IFN- λ 治疗的病毒感染的受试者。受试者可以是未感染肝炎病毒的受试者,例如甲型肝炎,乙型或丙型肝炎;流感病毒;严重急性呼吸综合征(SARS)病毒;冠状病毒;人免疫缺陷病毒(HIV);单纯疱疹病毒2型(HSV2);巨细胞病毒(CMV);中东呼吸综合征(MERS)病毒;诺如病毒;轮状病毒;或埃博拉病毒。

[0092] **【药物组合物,剂量和剂量方案】**

[0093] 本发明的干扰素- λ 或其功能活性片段或衍生物可以以药物组合物的形式提供。药物组合物通常是无菌的,可另外包含药学上可接受的佐剂和/或载体。

[0094] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂,分散介质,包衣,抗菌剂和抗真菌剂,等渗剂和吸收延迟剂等。载体可适用于肠胃外,例如静脉内,肌肉内,皮内,眼内,腹膜内,皮下,脊柱或其他胃肠外给药途径,例如通过注射或输注。或者,载体可适用于非肠胃外给药,例如局部,表皮或粘膜给药途径。载体可适用于口服给药。取决于给药途径,干扰素- λ 或其功能活性片段或衍生物可以包被在材料中以保护其免受酸和其它可能使其失活的天然条件的作用。

[0095] 本发明的药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的所需生物活性并且不赋予任何不期望的毒理学作用的盐。这些盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。

[0096] 药学上可接受的载体包括含水载体或稀释剂。可用于本发明药物组合物的合适含水载体的实例包括水,缓冲水和盐水。其他载体的实例包括乙醇,多元醇(例如甘油,丙二醇,聚乙二醇等),及其合适的混合物,植物油(例如橄榄油)和可注射的有机酯(例如油酸乙酯)。在许多情况下,希望在组合物中包含等渗剂,例如糖,多元醇如甘露醇,山梨糖醇或氯化钠。

[0097] 治疗组合物通常必须在制造和储存条件下是无菌和稳定的。该组合物可以配制成溶液,微乳液,脂质体或适于高药物浓度的其他有序结构。

[0098] 本发明的药物组合物可包含另外的活性成分。

[0099] 包含本发明的干扰素- λ 和使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒可以进一步含有一种或多种另外的试剂,例如上面讨论的另外的治疗剂或预防剂。

[0100] 可以施用本发明的干扰素- λ 或其制剂或组合物用于纤维化疾病的预防性和/或治疗性治疗。

[0101] 在一个实施方案中,纤维化疾病的治疗是治疗性治疗。在治疗应用中,化合物以足以治愈,缓解或部分阻止病症或其一种或多种症状的量给予已经患有如上所述的病症或病症的受试者。这种治疗性治疗可导致疾病症状的严重性降低,或无症状期的频率或持续时间的增加。足以实现此目的的量被定义为“治疗有效量”。

[0102] 在一个实施方案中,纤维化疾病的治疗是预防性治疗。在预防性应用中,将制剂施用于具有如上所述的病症或病症风险的受试者,其量足以预防或减少病症或其一种或多种症状的后续影响。足以实现此目的的量被定义为“预防有效量”。

[0103] 每种目的的有效量将取决于疾病或损伤的严重程度以及受试者的体重和一般状态。

[0104] 给药对象可以是人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物,绵羊,狗,猫,马,牛,鸡,两栖动物,爬行动物等,对

人施用是典型的。

[0105] 本发明的抗体/调节剂或药物组合物可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种通过一种或多种给药途径给药。如本领域技术人员所理解的, 给药途径和/或方式将根据所需结果而变化。本发明药物组合物的给药途径的实例包括静脉内, 肌肉内, 皮内, 眼内, 腹膜内, 皮下, 脊柱或其它肠胃外给药途径, 例如通过注射或输注。本文所用的短语“肠胃外给药”是指除肠内和局部给药以外的给药方式, 通常通过注射给药。或者, 本发明的药物组合物可以通过非肠胃外途径给药, 例如局部, 表皮或粘膜给药途径。本发明的药物组合物可以用于口服给药。

[0106] 合适剂量的本发明药物组合物可由熟练的医师确定。可改变本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平, 以获得有效实现特定患者, 组合物和给药方式的所需治疗反应的活性成分的量, 对病人有毒。选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素, 包括所用本发明特定组合物的活性, 给药途径, 给药时间, 所用特定化合物的排泄速率, 治疗持续时间, 与所用特定组合物组合使用的其他药物, 化合物和/或材料, 所治疗患者的年龄, 性别, 体重, 状况, 一般健康状况和既往病史, 以及医学领域中众所周知的相似因素。

[0107] 合适的剂量可以是, 例如, 待治疗患者的约0.01 μ g/kg至约1000mg/kg体重, 通常约0.1 μ g/kg至约100mg/kg体重。例如, 合适的剂量可以是每天约1 μ g/kg至约10mg/kg体重或每天约10 μ g/kg至约5mg/kg体重。

[0108] 可以调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如, 治疗反应)。例如, 可以施用单剂量, 可以随时间施用几个分开的剂量, 或者可以按照治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位; 每个单元含有预定量的活性化合物, 经计算可与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果。

[0109] 给药可以是单剂量或多剂量。多剂量可以通过相同或不同的途径给予相同或不同的位置。或者, 剂量可以通过持续释放制剂, 在这种情况下需要较低频率的给药。剂量和频率可以根据患者中拮抗剂的半衰期和所需治疗的持续时间而变化。

[0110] 如上所述, 本发明的调节剂/抗体或药物组合物可与一种或多种其他治疗剂共同施用。

[0111] 可以以多种不同方式实现两种或更多种药剂的组合施用。两者可以在单一组合物中一起施用, 或者它们可以作为组合疗法的一部分在单独的组合物中施用。例如, 可以在另一个之前, 之后或同时施用。

[0112] 在一个实施方案中, 本发明的干扰素- λ 与另一种治疗活性化合物联合给药。在一个实施方案中, 其他治疗活性化合物是另一种抗纤维化治疗剂。

[0113] 或者, 干扰素- λ 可以不与另一种治疗活性化合物组合施用。例如, 用干扰素- λ 治疗的患者可以是未用抗病毒剂治疗的患者, 例如另一种干扰素(例如I型干扰素或II型干扰素, 例如干扰素- γ)。

[0114] **【附图】**

[0115] 图1: 在肾病的阿霉素模型中鉴定IL-28A作为抗纤维化的命中

[0116] 在筛选条件下, 在通过静脉注射施用阿霉素而诱导慢性肾病之前, 通过水动力学转染将小鼠IL-28A(ILFNL2)作为cDNA对(即具有另一种未公开的cDNA的IL-28A cDNA)(所

有处理组的n=15组大小)引入小鼠中。在注射阿霉素之前,用盐水转染对照小鼠。监测小鼠至多49天并且终止肾羟脯氨酸水平(图1(a)和(b))和血清肌酸酐水平(图1(c)) (对于初筛没有条件存活数据)。

[0117] 羟脯氨酸($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肾)和血清肌酸酐($\mu\text{g}/\text{mL}$)的数字是盒状和须状图。中心水平线显示数据的中位数,盒子从第25百分位数延伸到第75百分位数。'胡须'涵盖了典型的数据范围。标准化的羟脯氨酸(肾胶原)显示平均值,误差条为+SEM,**** $p < 0.0001$,*** $p < 0.001$,* $p < 0.05$ 。

[0118] 图2:在肾病的阿霉素模型中确认IL-28A作为抗纤维化的命中

[0119] 在通过IV注射施用阿霉素以诱导慢性肾病之前,通过水动力学转染将小鼠IL-28A(IFNL2)作为单个cDNA(所有治疗组的n=22组大小)引入小鼠。在注射阿霉素之前,用盐水转染对照小鼠。对小鼠进行随访49天。终止时,测量肾羟脯氨酸水平(图2(a)和(b))和血清肌酸酐水平(图2(c)),并在整个研究期间记录条件存活数据(图2(d))。

[0120] 羟脯氨酸($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肾)和血清肌酸酐($\mu\text{g}/\text{mL}$)的数字是盒状和须状图。中心水平线显示数据的中位数,盒子从第25百分位数延伸到第75百分位数。'胡须'涵盖了典型的数据范围。标准化的羟脯氨酸(肾胶原)显示平均值,误差条为+SEM,**** $p < 0.0001$,*** $p < 0.001$,* $p < 0.05$ 。

[0121] 图3:在肾病的阿霉素模型中鉴定IL-28B作为抗纤维化的命中

[0122] 在初步筛选中,在阿霉素之前,通过水动力学转染将小鼠IL-28B(ILFNL3)作为cDNA对(所有治疗组的n=15组大小)引入小鼠组,并且监测小鼠长达49天,测量终止肾羟脯氨酸水平(图3(a)和(b))和血清肌酸酐水平(图3(c)) (初级筛选没有条件存活数据)。在注射阿霉素之前,用盐水转染对照小鼠。

[0123] 羟脯氨酸($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肾)和血清肌酸酐($\mu\text{g}/\text{mL}$)的数字是盒状和须状图。中心水平线显示数据的中位数,盒子从第25百分位数延伸到第75百分位数。'胡须'涵盖了典型的数据范围。标准化的羟脯氨酸(肾胶原)显示平均值,误差条为+SEM,**** $p < 0.0001$,*** $p < 0.001$,* $p < 0.05$ 。

[0124] 图4:在肾病的阿霉素模型中确认IL-28B作为抗纤维化的命中

[0125] 在阿霉素之前,通过水动力学转染将小鼠IL-28B(IFNL3)作为单个克隆(在每个处理组中n=22组大小)引入小鼠组,并且将小鼠随访至49天。在注射阿霉素之前,用盐水转染对照小鼠。终止时,测量肾羟脯氨酸水平(图4(a)和(b))和血清肌酸酐水平(图4(c)),并在整个研究期间记录条件存活数据(图4(d))。

[0126] 羟脯氨酸($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肾)和血清肌酸酐($\mu\text{g}/\text{mL}$)的数字是盒状和须状图。中心水平线显示数据的中位数,盒子从第25百分位数延伸到第75百分位数。'须'涵盖了典型的数据范围。标准化的羟脯氨酸(肾胶原)显示平均值,误差条为+SEM,**** $p < 0.0001$,*** $p < 0.001$,* $p < 0.05$ 。

[0127] 图5:肾病阿霉素模型中IL-28B和IL-28A作为抗纤维化的组织学确认

[0128] 在终止时,将来自图2和图4中描述的研究的肾固定在NBF中,石蜡包埋,切片,并用苏木精和曙红(H&E),天狼猩红(PSR)或masons trichrome(MT)染色。然后用Hamamatsu载玻片扫描仪对载玻片成像。PSR染色的肾切片的代表性图像显示了图5(a)中的IL-28B,用于1只幼稚小鼠,3只盐水阿霉素处理的小鼠和3只阿霉素处理的小鼠(其也接受IL-28B和IL-

28A);图5(f)为1只幼稚小鼠,3只盐水阿霉素处理的小鼠和3只阿霉素处理的小鼠(其也接受IL-28A)。对IL-28B组(10只幼稚,18只盐水和22只IL-28B处理的小鼠)和IL-28A组(8只幼稚,20只盐水和19只IL-28A处理的小鼠)的所有终末小鼠肾切片进行成像,并且使用Definiens图像分析平台估计PSR染色所覆盖的总面积分别如图5(b)和图5(g)所示。此外,所有载玻片均由纤维化领域的独立专家(2名科学家和1名临床病理学家)手动评分纤维化,并根据H&E染色计算IL-28B的病理学评分(图5(c))和PSR染色(图5(d)和(e))和来自PSR染色的IL-28A(图(h)) and MT染色(图(i))。放大倍数= $\times 100$ 。

[0129] 图6:IL-28A在肝脏体外ECM纤维化模型中的作用

[0130] 人原代星状细胞(图6(a)) (以1000个细胞/孔接种) 或人原代星状细胞与人原代肝细胞共培养(图6(b)) (以1000个细胞/孔,1:1比例接种) 用IL-28A培养5天。除去细胞,通过在Cellomics Arrayscan上成像和定量的免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原IV。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值 \pm SD。

[0131] 图7:IL-28A和IL-28B在肝脏体外ECM纤维化模型加TGF β 中的作用

[0132] 将人原代星状细胞(1000个细胞/孔)(图7(a)) 或与人原代肝细胞共培养的人原代星状细胞(1000个细胞/孔,1:1比例)(图7(b)) 用IL-28A或IL-28B处理,在250pg/ml的TGF β 存在下培养5天。除去细胞,通过在Cellomics Arrayscan上成像和定量的免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原IV。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值 \pm SD。

[0133] 图8:高含量图像显示IL-28A和IL-28B在TGF β 1刺激的星状细胞-肝细胞共培养ECM中的作用

[0134] 将与用TGF β 1(250pg/ml)刺激的原代肝细胞共培养的人原代星状细胞(比例为1:1,最终细胞浓度为1000个细胞/孔)单独培养(TGF β 1共培养) 或用IL-28A或IL-28B在10000、1000、100或10ng/ml下处理持续5天。显示的图像来自每个条件的16个字段中的1个代表性字段。用 $\times 10$ 物镜进行放大。

[0135] 图9:IL-28A,IL-28B和IL-29在TGF β 1刺激的小肠成纤维细胞ECM体外模型中的作用

[0136] 在TGF β (10ng/ml)存在下,用IL-28A,IL-28B或IL-29(均为10ng/ml)培养人原代小肠成纤维细胞(2000细胞/孔)7天。除去细胞,通过在Cellomics Arrayscan上成像和定量的免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原IV。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值 \pm SD。

[0137] 图10:皮肤角质形成细胞-成纤维细胞共培养ECM体外模型中IL-28A和IL-28B的抑制%

[0138] 将来自3个单独批次的人原代真皮成纤维细胞置于与原代人角质形成细胞共培养(比例为9:1,最终细胞浓度为1500个细胞/孔),并用增加量的IL-28A或IL-28B处理7天。除去细胞,通过在Cellomics Arrayscan上成像和定量的免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原IV。来自3批的标准化数据计算为%抑制并绘制为平均值 \pm SD。用Presto蓝测量细胞活力,将3个成纤维细胞批次与角质形成细胞共培养以归一化以控制共培养,并将数据平均以得到倍数变化。

[0139] 图11:IL-28A,IL-28B和IL-29在皮肤角质形成细胞-成纤维细胞共培养ECM体外模

型中的作用

[0140] 与原代人角质形成细胞共培养的人原代真皮成纤维细胞(比例为9:1,最终细胞浓度为1500个细胞/孔)用IL-29,IL-28A或IL-28B以1250-10000ng/ml细胞因子的浓度范围处理7天。除去细胞并通过免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原IV,在Cellomics Arrayscan上进行成像和定量。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值+/-SD。

[0141] 用Presto蓝测量细胞活力。

[0142] 图12:显示IL-28A,IL-28B和IL-29在皮肤角质形成细胞-成纤维细胞共培养ECM体外模型中的作用的高含量图像

[0143] 来自代表性供体的人原代真皮成纤维细胞与原代角质形成细胞共培养(比例为9:1,最终细胞浓度为1500个细胞/孔)单独培养(对照)或用IL-29,IL-28A或IL-28B在10000或1250ng/ml下持续7天。图像代表来自纤连蛋白,Col I和III和Col IV ECM基质蛋白的组合信号,并且显示来自每种条件的总共16个视野的1个代表性视野。用×10物镜进行放大。

[0144] 图13:IL-28A和IL-28B在IL-1 α 刺激的皮肤成纤维细胞ECM体外模型中的作用

[0145] 用IL-1 α (10ng/ml)刺激的人原代真皮成纤维细胞(1500个细胞/孔)用增加量的培养物中的IL-28A或IL-28B处理7天。除去细胞,通过在Cellomics Arrayscan上成像和定量的免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原IV。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值+/-SD。

[0146] 用Presto蓝测量细胞活力。数据代表两种不同成纤维细胞批次中的一种。

[0147] 图14:IL-28A,IL-28B和IL-29在肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM体外模型中的作用

[0148] 将人原代肾小管上皮细胞(RPTEC)置于与原代人肾成纤维细胞共培养(比例为1:1,最终接种细胞浓度为2000个细胞/孔)并用IL-29,IL-28A或IL-28B处理7天。除去细胞,通过在Cellomics Arrayscan上成像和定量的免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白和胶原蛋白I和III。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值+/-SD。用Presto蓝测量细胞活力。在第0天将IL-29,IL-28A或IL-28B加入到RPTEC和成纤维细胞的共培养物中(图14(a)),或者在与成纤维细胞组合之前加入到RPTEC中24小时(图14(b))或在与RPTEC组合之前将其加入成纤维细胞中24小时(图14(c))。

[0149] 图15:IL-28A,IL-28B和IL-29在肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM体外模型中作用的添加形式的比较

[0150] 重新绘制图14中呈现的数据,显示IL-28A,IL-28B和IL-29在肾共培养细胞系统中的作用,使用一个图中的3种不同的添加方案,其中将IL-28A,IL-28B或IL-29一起加入到RPTEC和HRF的共培养物(称为共培养物)中,首先加入到RPTEC中,24小时后引入HRF(称为首先添加RPTEC),及首先加入HRFs和24小时后引入RPTEC(称为首先添加HRF),共培养7天,纤连蛋白和胶原I和III数据分别重新绘制在图15(a)和(b)中。对于每种细胞因子,分析ECM标记物,使用方差分析,考虑添加顺序(共培养,RPTEC优先和HRF优先)和剂量(0至10000ng/ml)之间的差异。进行分析后比较,并使用Bonferroni校正来调整报告的p值。所有分析均使用SAS v9.4(SAS Institute)进行。细胞因子达到显著的剂量在图上标出,其中****p<0.0001,***p<0.001,**p<0.01和*p<0.05。

[0151] 图16:显示IL-28A,IL-28B和IL-29在肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM中的作用的高含量图像

[0152] 将人原代肾近端小管细胞 (RPTEC) 与原代人肾成纤维细胞共培养 (比例为1:1,最终细胞浓度为2000细胞/孔,接种时) 单独培养 (对照) 或用IL-29处理,IL-28A或IL-28B,1000、100或10ng/ml,持续7天。如图14 (b) 所示,在将成纤维细胞包含在培养物中之前24小时,将细胞因子加入到RPTEC中。显示的图像来自每个条件的总共16个场中的1个代表性场。用 $\times 10$ 物镜进行放大。

[0153] 图17:IL-28A和IL-28B在肺SAEepithelial-fibroblast共培养ECM体外模型中的作用

[0154] 与人IPF原代肺成纤维细胞共培养的原代人小气道肺上皮细胞 (SAEepithelial) (在接种时最终细胞浓度为2000细胞/孔时1:1比例) 用IL-28A或IL-28B处理7天。除去细胞并通过免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原蛋白IV,同时通过Flamingo粉红染色鉴定总ECM蛋白。在Cellomics Arrayscan上进行成像和定量。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值 \pm SD。用Presto蓝测量细胞活力,读出荧光。

[0155] 图18:IFNL1,IFNL2,IFNL3和IFNL4的蛋白质和DNA序列

[0156] IFNL1,IFNL2,IFNL3和IFNL4的蛋白质序列来自Uniprot数据库,IFNL1,IFNL2,IFNL3和IFNL4的DNA序列来自GenBank。

[0157] 图19:IL-28A和IL-29在体外人肝星状细胞和肝纤维化上皮细胞共培养模型中的作用

[0158] 将人原代星状细胞和原发性肝内胆管上皮细胞置于1000个细胞/孔 (1:1比例) 的共培养物中,并用IL-28A或IL-29处理5天。除去细胞,通过在Cellomics Arrayscan上成像和定量的免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原IV。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值 \pm SD。

[0159] 图20:体外3D肾小球球体肾小球硬化模型中IL-28A对足细胞存活的影响

[0160] (a) 由GFP标记的人足细胞包围的人肾小球内皮细胞的内核构建3D肾小球球状体。(b) 球状体在培养基中生长或用局灶性节段性肾小球硬化 (FSGS) 患者血浆处理,终浓度为15%加上或减去人IL-28A蛋白的存在。在每个实验中并且对于每种条件,成像至少5个球状体。(c) 然后使用Definiens图像分析来分析这些球状体的2D最大强度投影 (MIP),以在不同培养条件下定义绿色通道中阈值强度以上的标记区域,将其绘制为细胞标记区域作为总球状区域的比例。7%的足细胞是GFP标记的

[0161] 图21:小鼠IL-28B的水动力转染可防止小鼠单侧输尿管梗阻 (UUO) 肾纤维化模型中的纤维化

[0162] 小鼠是UUO操作 (UUO操作对照HDT,n=10),非操作 (非操作,n=5),UUO操作但在第-1天用IL-28B治疗而预防性给药 (IL-28BHDT,第-1天,n=10) 或在第7天用IL-28B治疗给药 (IL-28B HDT,第7天,n=10) 并且在第21天终止所有动物,取出肾,在NBF中固定,石蜡包埋切片,并用天狼猩红 (PSR) 染色。然后用Hamamatsu载玻片扫描仪对载玻片成像。PSR染色的肾切片的代表性图像显示在图21 (a) 中,1只正常小鼠,2只UUO操作的对照小鼠,2只UUO操作的,并通过水动力学转染在第-1天用IL-28B处理小鼠或2只UUO操作的,并在第7天用IL-28B处理小鼠。对所有终末小鼠肾切片 (5 \times 非手术,10 \times UUO对照,第1天10 \times UUO IL-28B和

第7天 $10\times$ UUOIL-28B处理小鼠)进行成像,并且PSR染色覆盖的总面积为估计使用Definiens图像分析平台读出总染色区域(图21(b))或高强度染色区域(图21(c))。与使用Dunnet多重比较试验的SEAP对照相比,使用治疗组将%胶原区域显示为平均值 \pm SEM; **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$, ****= $P<0.0001$ 。

[0163] SEAP=分泌的碱性磷酸酶控制蛋白

[0164] 图22:IL-29在肾纤维化的体外人肾近端小管上皮细胞单培养模型中的作用

[0165] 将人原代肾近端小管上皮细胞置于2000细胞/孔的共培养物中,并用IL-29处理5天。除去细胞,通过在Cellomics Arrayscan上成像和定量的免疫荧光标记测量ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原IV。数据表示平均总强度,绘制为4个独立孔的平均值 \pm SD。

[0166] 图23:通过水动力转染用人IL-29治疗在小鼠单侧输尿管梗阻肾纤维化模型中防止肾小管间质纤维化

[0167] 用含有SEAP ($n=10$)的对照载体或含有人IL-29构建体 ($n=9$)的载体对C57B1/6小鼠进行水动力学转染。转染后24小时,对小鼠进行左肾的单侧输尿管梗阻(UUO)或未操作的小鼠 ($n=4$)。7天后,重复进行水动力学转染,并在UUO后19天宰杀动物。图23(a);在第0天(转染后24小时)和第19天再次从小鼠中取血清样品并分析人IL-29蛋白。绘制人IL-29水平,比较第0天UUO IL-29组,末端D19UUO SEAP组和末端UUO IL-29组中的IL-29水平。

[0168] 回收肾,固定在NBF中,石蜡包埋,切片并用天狼猩红(PSR)染色,然后用Hamamatsu载玻片扫描仪对载玻片成像。图23(b)显示来自正常肾,用含有对照SEAP的载体或含有人IL-29的载体转染的UUO肾的代表性图像,如 $100\times$ (顶行)和 $200\times$ (底线)放大所示。对所有终末小鼠肾切片($4\times$ 非手术, $10\times$ UUO SEAP对照,第1天 $9\times$ UUO IL-29)进行成像,并使用Definiens图像分析平台估计PSR染色覆盖的总染色区域(图23(c))。使用未校正的Fisher's LSD比较试验,使用IL-29治疗组与UUO+SEAP对照组相比,%胶原区域显示为平均值 \pm SEM; **= $p<0.01$ 。

[0169] SEAP=分泌的碱性磷酸酶控制蛋白

[0170] 【参考文献】

[0171] Adair J.R.和Lawson A.D.G.,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3):209-217。

[0172] Andersen H.等,2013,Journal of Clinical and Translational Hepatology 1:1 16-124。

[0173] Andreakos等,2017,Frontiers in Immunology,8,article1232。

[0174] Bach等,1997,Annu Rev.Immunol.15:563-591。

[0175] Bhushal等,2017,Frontiers in Immunology,8,article 671。

[0176] Biron等,2001,Immunity 14(6):661-664

[0177] Blazek等,2015,J Exp Med 212(6):845-853。

[0178] Blumer等,2017,J.Biol.Chem.292(43)17928-17938。

[0179] Bochud等,2012,Hepatology 5(2):384-394

[0180] Broggi等,2017,Nature Immunology,18(10),1084-1093

[0181] Chow&Gale 2015,Cell 163(7),1808-1808.e1

- [0182] Chapman A.等,2002,Advanced Drug Delivery Reviews 54:531-545。
- [0183] Chiriac等,2017,Gastroenterology,153,123-138
- [0184] Doyle等,2006,Hepatology 44(4):896-906。
- [0185] Eslam和George,2015,Semin Liver Dis.35:402-420。
- [0186] Eslam等,2015,Nature Communications 6:6422-6432。
- [0187] Gad等,2009,Journal Biological Chemistry 284(31):20869-20875。
- [0188] Ge等,2009,Nature 461(7262):399-401。
- [0189] Gresser,2015,Biomed Pharmacother.71:29。
- [0190] Griffiths S.J.等,2013,PLoS Pathog.9:e1003514。
- [0191] Guenterberg等,2010,Molecular Cancer Therapeutics 9(2):510-520。
- [0192] Guo等,2013,PLoS One 8(10):e77911。
- [0193] Hemann等,2017,Nature Immunology,18(10),1061-1062
- [0194] Holliger P.和Hudson P.J.,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136。
- [0195] Hong等,2016,Journal of Experimental Medicine 10:1084-1098。
- [0196] Huang等,1993,Science 259(5102):1742-1745。
- [0197] Kanefuji等,2014,Molecular Therapy-Methods&Clinical Development(2014) 1,14029。
- [0198] Kotenko,2002,Cytokine Growth Factor Rev 13(3):223-240。
- [0199] Kotenko等,2003,Nature Immunology 4(1):69-77
- [0200] Koltsida等,2011,EMBO Molecular Medicine 3(6):348-361。
- [0201] Li等,2010,European Journal of Cancer 46(1):180-190。
- [0202] Liu等,1999,Gene Therapy 6,1258-1266。
- [0203] Mahlakoiv T.等,2015,PLoS Pathog.11:e1004782。
- [0204] McFarland等,2014,Nature Immunology 15:72-79。
- [0205] Miknis等,2010,Journal of Molecular Biology 404:650-664。
- [0206] Mordstein M.等,2008,PLoS Pathog.4:e1000151
- [0207] Numasaki等,2007,Journal Immunology 178(8):5086-5098。
- [0208] Osterlund等,2007,Journal Immunology 179:3434-3442。
- [0209] Park等,2012,Hepatology 56(6):2060-2070。
- [0210] Pott J.等,2011,Proc.Natl.Acad.Sci.108:7944-7949。
- [0211] Prokunina-Olsson等,2013,Nature Genetics 45(2):164-171。
- [0212] Rallon等,2010,Aids 24(8):F23-29。
- [0213] Stahl等,1993,Cell 74:587-590。
- [0214] Sato等,2006,Journal Immunology 176(12):7686-7694。
- [0215] Steen等,2010,Journal Interferon Cytokine Research 30(8):597-602。
- [0216] Sheppard等,2003,Nature Immunology 4(1):63-68。
- [0217] Souza-Fonseca-Guimaraes等,2015,Proc.Natl.Acad.Sci.112:E2376-E2384。
- [0218] Suppiah等,2009,Nature Genetics 41(10):1100-1104。
- [0219] Tanaka等,2009,Nature Genetics 41(10):1105-1109。

- [0220] Thomas等,2012,Gastroenterology 142(4):978-988。
- [0221] Verma R.等,1998,Journal of Immunological Methods,216:165-181。
- [0222] Wack等,2015,Nature Immunology,16(8),802-809
- [0223] Wolk等,2013,Science Translational Medicine 5(204):204ra129。
- [0224] Zhou等,2007,Journal of Virology,81:7749-7758。
- [0225] Zitzmann等,2006,Biochem.Biophys.Res.Commun.344(4):1334-1341。
- [0226] W01992/022853。
- [0227] W02005/003169。
- [0228] W02005/003170。
- [0229] W02005/003171。
- [0230] W02005/113605。
- [0231] W02009/040562。

【实施例】

[0232] 【摘要】

[0233] 干扰素- λ (IFN- λ) 家族的细胞因子,称为IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A) 和IFN- λ 3 (IL-28B), 通过由IFN- λ R1 (IL-28R1) 和白细胞介素-10R2 (IL-10R2) 受体链组成的独特的受体复合物发出信号。

[0234] 在小鼠阿霉素诱导的慢性肾病 (CKD) 模型中使用水动力学转染体内筛选, 报道IFN- λ 2和IFN- λ 3为命中。根据肾纤维化水平调用命中, 如通过肾羟脯氨酸水平降低40% (肾胶原) 来确定。通过血清肌酐测量, IFN- λ 2和IFN- λ 3也显示出相应的肾功能保持。这导致条件存活率 (即未达到终末期肾衰竭) 从盐水转染小鼠中阿霉素后49天的50%增加到用IFN- λ 2转染时的85%及用IFN- λ 3转染时的100%。为了用不同刺激验证这替代CKD模型中的抗纤维化作用, 在单侧输尿管阻塞 (UUO) 诱导的慢性肾病肾纤维化模型中, 通过水动力学转染应用IFN- λ 1和IFN- λ 3, 二者给予保护免于肾小管间质纤维化。

[0235] IL-28R1配体的抗纤维化作用已在几种人体原代细胞体外纤维化模型中得到证实, 该模型读出成熟的细胞外基质 (ECM) 蛋白。重组人IFN- λ 1, IFN- λ 2和IFN- λ 3各自抑制纤维化相关ECM蛋白 (纤连蛋白和胶原蛋白I, III和IV) 在肝, 肺, 肠, 皮肤和肾纤维化的原代人细胞体外模型中的积累。这可见于几种模型, 包括肝星状细胞, 肝星状肝细胞共培养物 (基底基质和TGF β 诱导的), 肝星状细胞-上皮细胞共培养物, TGF β 诱导的小肠成纤维细胞, IL-1 α 诱导的皮肤成纤维细胞, 角质形成细胞-真皮成纤维细胞共培养物, 肾近端小管上皮细胞-肾成纤维细胞共培养物和单培养物和肺小气道上皮-IPF肺成纤维细胞共培养物。在更复杂的肾小球硬化症肾小球类器官模型中, 应用复发性肾病综合征患者的血浆导致足细胞数量减少和过程 and 花梗缩回, 其方式与许多导致肾小球硬化和肾纤维化的肾小球疾病中足细胞消失和丢失一致。重组IFN- λ 2在该模型中的应用完全防止了由该患者血浆引起的足细胞的变化。

[0236] 已显示IL-28R1配体在体外和体内纤维化筛选中具有有效的抗纤维化作用。已经在肾纤维化的体内小鼠模型和许多体外人纤维化模型中描述了有效作用, 所述模型具有来自肝, 小肠, 皮肤, 肾和肺器官系统的相关原代细胞。因此, 这些蛋白质在多种类型的纤维化

中具有作为抗纤维化剂的意想不到的潜力。

[0237] 【方法】

[0238] 【小鼠体内】

[0239] 【IL-28A和IL-28B在阿霉素肾病慢性肾病 (CKD) 肾纤维化模型中的作用】

[0240] 将雌性Ba1b/c小鼠(至少6周龄,体重大于24g)在适当的水动力学转染表达载体中通过cDNA的尾静脉(或用于配对研究的cDNA对)进行IV注射。7天后,给予小鼠11mg/kg IP的阿霉素(多柔比星)并监测49天。每天监测小鼠的体重和健康状况;那些已经失去超过40%的起始体重或显示终末期肾衰竭的体征的小鼠被终止并收集数据。在49天研究期结束时,终止所有小鼠并收集肾和血清用于分析。使用QuickZyme测定法(QuickZyme Biosciences)测量肾羟脯氨酸,并使用三种酶方法测量血清肌酸酐,并以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 血清肌酸酐读出。盐水加阿霉素组中的肾纤维化(羟脯氨酸),在图上标记为“盐水”,被认为是最大的疾病反应。将其设定为100%,并用于整个治疗组的标准化。幼稚动物未接受阿霉素,每个筛选实验含有“HGF”组,其接受阿霉素和HGF的cDNA。HGF用作抗纤维化阳性对照,用于质量控制的羟脯氨酸减少 $>40\%$ 。

[0241] 【IL-28和IL-29在小鼠单侧输尿管梗阻肾病纤维化模型中的作用】

[0242] 【用于小鼠IL28B和人IL29的水动力学转染的DNA构建】

[0243] 通过使用NheI-XhoI限制性消化,然后DNA连接同源末端来将编码人IL29前体蛋白(NP_742152.1)的DNA序列(NM_172140.1)插入pLive载体(Mir5420,Mirus Bio LLC,545 Science Dr.,Madison,WI 53711USA)产生用于水动力学转染的DNA构建体。使用载体和插入物的BamHI-XhoI限制性消化策略将编码小鼠IFNL3(NP_796370)的基因(mRNA Ref Seq NM_177396)构建体克隆到pLive(Mirus)中,然后连接。通过DNA测序验证基因插入pLive。该基因之前是编码信号序列的起始甲硫氨酸的ATG直接上游的CCACC序列。该载体含有卡那霉素抗性基因和pUC来源,其允许在大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)中进行DNA扩增。此外,该载体含有小鼠最小白蛋白启动子,以转录两侧内含二侧的人IFNL-1基因[pLive载体允许肝脏中的长期蛋白质表达]。

[0244] 使用限制溶液中内毒素量的质粒分离试剂盒(HiSpeed Plasmid Giga EF,Qiagen)从含有该构建体的大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)培养物中分离用于水动力学转染的DNA构建体。对质粒DNA进行Sanger测序以验证插入物。

[0245] Kanefuji等和Liu等描述了用于水动力学转染的典型载体。

[0246] 【通过水动力转染(HDT)表达蛋白质】

[0247] 用Transit-EE载体中的50 μg pLIVE-人IL-29,pLIVE-小鼠IL-28B或pLIVE SEAP载体(Mirus Bio,Cat#MIR 5320)对小鼠进行水动力学转染。含有载体的溶液以2ml的体积静脉注射(少于2.5秒)。在水动力学注射之前诱导使用异氟烷的全身麻醉,并在注射后保持至少1分钟。

[0248] 【从小鼠血清中定量小鼠IL-28B和人IL-29】

[0249] 使用商业抗体对(RnD系统,cat#DY1598B)使用中等规模发现(MSD)定量测定法定量小鼠IL-28B,并将小鼠血清稀释100倍,置于线性标准曲线上。使用MSD U-plex人IL-29抗体组(目录号B21WD)定量人IL-29,并将小鼠血清稀释100倍,置于线性范围内。

[0250] 【单侧输尿管梗阻(UUO)诱发慢性肾病的肾纤维化模型】

[0251] 将体重至少19g的雄性C57BL/6小鼠 (Charles River) 进行单侧输尿管阻塞 (UUO) 诱导的慢性肾病肾纤维化模型。

[0252] 使用异氟醚诱导的全身麻醉并在适合于手术技术的无菌条件下进行手术。对小鼠进行剖腹手术,然后用3.0Mersilk结扎线将左输尿管绑起来。使用5-0Vicryl以连续模式密封肌肉壁,使用5-0Vicryl通过皮下缝合闭合皮肤。在手术前和手术后施用适当的镇痛。

[0253] 在结果中详述的适当时间采集血样。使用识别的小鼠限制器约束小鼠,并通过尾刺方法从尾静脉采集30 μ l血液,使用移液管准确测量血液样品。将该样品置于0.2ml PCR管 (Thermo) 中并离心 (20,000g, 5分钟) 以尽可能多地取出血清,将其置于新的PCR管中并在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0254] 在第19天或第21天,使用异氟烷麻醉小鼠,通过心脏穿刺将血液移除到血清管 (Sarstedt) 中,并通过颈椎脱位将小鼠杀死。取出左肾并将两个季度在液氮中快速冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C。将剩余的一半置于10%中性缓冲福尔马林中,在组织处理器中脱水,并且石蜡包埋用于组织学分析。将石蜡块在切片机上以4 μ m切片并安装在载玻片上。然后将载玻片脱蜡并水合,用天狼猩红 (PSR) 染色,然后用酸化水洗涤。然后将载玻片脱水,清除并盖上盖玻片。使载玻片干燥,然后使用Hamamatsu载玻片扫描仪扫描。

[0255] 将整个载玻片图像导入Definiens Developer XD 64并使用亮场模块进行分析。简言之,手动注释皮质区域以从分析中去除髓质。在不少于四个图像的训练数据集上确定各个标记的标记阈值水平 (例如PSR染色)。然后在专用服务器上运行分析算法以确定每个单独标记的阈值强度以上的标记区域,并且将阈值强度以上的每个标记的面积确定为皮质区域的比例。

[0256] 纤维化水平的组织学评估由具有肾纤维化领域专业知识的盲法研究人员进行,使用天狼猩红,Masson's Trichrome和苏木精和曙红染色切片的组合作为优选。使用10分量表,其中10例是非常严重的纤维化,相当于终末期肾衰竭和1例正常。评分中评估的参数为管状基底膜扩张,上皮细胞扁平化,刷状缘完整性,管状萎缩和塌陷,管状腔尺寸,间质细胞浸润,肾小球簇状结构,系膜扩张,肾小球浸润,肾小球尿空间,肾小球基底膜和系膜基质扩张。

[0257] Definiens图像分析和图像的组织学评估也适用于阿霉素治疗的肾切片。

[0258] **【人体外细胞外基质纤维化测定】**

[0259] (a) 细胞培养

[0260] 所有细胞外基质 (ECM) 积累测定均在384孔黑色透明平板 (Greiner cat#781090) 中进行,其中培养基,细胞数/孔,孵育时间和刺激随所用的原代细胞类型而变化。

[0261] 将人肝星状细胞 (HHStEC) (ScienCell, Cat. #sc-5300) (第4代) 和人肝内胆管上皮细胞 (ScienCell, 目录号sc-5100) (第3代) 共培养物以1000个细胞/孔 (1:1比例) 接种于25 μ L不含酚红 (EpiCM-prf) 和补充物 (ScienCell, 目录号sc-sc-4101-prf) 的上皮细胞培养基中。将单个培养物中的人星状细胞 (ScienCell) 以1000个细胞/孔接种于星状细胞培养基 (ScienCell) 中,并且在混合培养基 (ScienCell) 中以1000个细胞/孔 (1:1比例) 共培养人星状细胞和肝细胞 (ScienCell)。

[0262] 将人小肠成纤维细胞 (ScienCell) 以2000个细胞/孔接种在肾上皮细胞基础培养基+0.5%FCS和补充物 (ATCC) 中。

[0263] 人皮肤成纤维细胞在成纤维细胞生长培养基中生长,人角质形成细胞在角质形成细胞培养基中生长,并以1500个细胞/孔接种。将成纤维细胞-角质形成细胞共培养物(9:1比例)在1:1培养基混合物中生长,并以1500个细胞/孔接种。

[0264] 使用肾上皮细胞基础培养基(ATCC)+0.5%FCS和补充物(ATCC),在共培养物中以每孔2000个细胞(比例1:1)接种人肾近端小管上皮细胞(RPTEC,Innoprot)和人肾成纤维细胞(HRF,InnoProt)。

[0265] 人小气道上皮细胞(ATCC)在基础生长培养基和支气管上皮生长试剂盒补充物(ATCC)中生长,并且IPF134肺成纤维细胞(ATCC)在成纤维细胞生长培养基(Lonza)中生长。共培养物以2000个细胞/孔(1:1比例)接种。

[0266] (b) 细胞生长的测量

[0267] 在37°C,5%CO₂温育7天后,使用Presto 蓝®细胞活力试剂(Thermo Fischer Scientific)按照制造商的说明评估细胞生长。

[0268] (c) ECM积累的测量

[0269] 【单个ECM成分的测量:免疫荧光】

[0270] 在37°C,5%CO₂中孵育7天后,将细胞在PBS中洗涤,并用20μl/孔的0.25M NH₄OH/25mM Tris(Sigma-Aldrich)在37°C下裂解15分钟。然后将基质在PBS中洗涤3次,在-20°C下在40μl 100%甲醇中固定30分钟并在PBS中洗涤3次,然后使用抗纤连蛋白(eBiosciences),抗胶原蛋白I(Millipore),抗-Collagen III(Millipore),抗胶原蛋白IV(eBiosciences)和抗胶原蛋白V(Abcam)抗体染色。在Arrayscan HC读数器(Cellomics)上使用3通道流程在“Cellomics CellHealth”分析生物应用和10×物镜(新×1相机)下以2×2合并(1.10⁴×1.10⁴像素/场)扫描平板。

[0271] 【总ECM组分的测量:Flamingo™染色】

[0272] 免疫荧光板在Flowfusor水中洗涤3次,然后按照制造商的说明使用Flamingo™荧光凝胶染色试剂(BioRad)染色。使用在“Cellomics CellHealth”分析生物应用下的2通道流程和具有2×2合并(1.10⁴×1.10⁴像素/场)的10×物镜(新×1相机)在Arrayscan HC读数器(Cellomics)上扫描平板。

[0273] 【产生3D人肾小球球体的方法】

[0274] 【球体的产生和治疗】

[0275] 将Nano-穿梭-PL(Cat#657841)加入到稳定转染的GFP标记肌动蛋白的T75烧瓶中,条件永生化SV40感染的足细胞和人肾小球内皮细胞(HRGEC)由布里斯托大学提供,分别在含来自Lonza(Cat#CC4147)的补充试剂盒的RPMI 1640(10%FCS,5ML L-谷氨酰胺和1×ITS,Gibco)和EBM-2培养基中生长。通过FACS确认GFP转染的足细胞。使用TrypLE Express(Gibco)收获所有细胞,并将磁化的HRGEC以5000个细胞/孔接种在96孔低粘附Greiner平板(Cat#655976)中。将Greiner Spheroid驱动器(Cat#655830)置于96孔板下6小时,并在37°C/5%CO₂/100%湿度下在EBM-2培养基中生长球状体。移除驱动器,并以5000个细胞/孔接种磁化的GFP-足细胞。驱动器在一夜之间返回,并且使用Holding Drive每隔3天将球状体分化10天。然后用15%终浓度的人FSGS血浆,加或减IL-28A(10,000ng/mL)或培养基仅7天处理球状体。

[0276] 【固定和染色】

[0277] 将球状体固定并在4℃下在10%福尔马林/1%Triton X-100/PBS中透化3小时。在3×10分钟后,PBS洗涤球体在4℃下在PBS中的上升系列甲醇(25%,50%,75%,95%)中脱水各30分钟,并在100%甲醇中过夜。将球状体以相同的递减系列再水合并如前在PBS中洗涤,然后在4℃下在含有3%BSA的PBST(含0.1%Triton X-100的PBS)中封闭过夜。在4×30分钟PBST洗涤后,加入第二抗体(1:500/PBST:Alexa GAR-AF647和GAM-AF555)。为了增强GFP信号,以1:200加入抗GFP-AF488 24小时。在图像捕获之前使用以×20放大率下的YokoGawa共聚焦定量1(CQ1)洗涤球体(4×30分钟/PBST)。

[0278] 【足细胞细胞标记区域定量】

[0279] 将最大强度投影导入Definiens Developer XD 64并使用免疫荧光模块进行分析。手动注释球状区域并确定各个标记的标记阈值水平,并运行分析算法以确定每个标记的阈值强度以上的标记区域。高于阈值强度的每个标记的面积被确定为球状体的面积的比例。

[0280] 【结果】

[0281] (1) 小鼠阿霉素诱导的慢性肾病(CKD)模型

[0282] 小鼠IL-28A(IFNL2)在小鼠阿霉素CKD模型中筛选纤维化修饰蛋白质,最初作为水动力学转染的cDNA对的一个成员(n=15只小鼠)。转染对减少了肾纤维化,相对于盐水转染对照组,总肾羟脯氨酸减少了51%(p=0.02)(图1(a)和(b)),并根据血清肌酐水平标准化肾功能(p<0.05)(图1(c))。在重复研究中证实IL-28A的抗纤维化作用,在相同模型中独立转染IL-28A cDNA(每组n=22只小鼠)。相对于生理盐水对照组,IL-28A通过总肾羟脯氨酸测定的肾纤维化减少了48%(p=0.0004)(图2(a)和(b)),而肾功能的丧失恢复到正常范围,如用血清肌酐测定(IL-28A组平均血清肌酐=1μg/ml,未治疗阿霉素生理盐水对照组平均血清肌酐为4.8μg/ml(p<0.0001);平均初始组血清肌酐=0.8μg/ml)(图2(c))。通过终末期肾衰竭症状测量的条件存活率从盐水处理的阿霉素组中的50%增加至用小鼠IL-28A转染的那些中的85%(图2(d))。在第49天,将来自存活小鼠(天然(n=8),未处理的阿霉素动物(n=20)和IL-28A水动力学转染的动物(n=19))的所有肾固定,石蜡包埋,切片并染色使用Masson's trichrome(MT)或天狼猩红(PSR)并在Hamamatsu载玻片扫描仪上成像。一个幼稚,三个未经处理的阿霉素和三个IL-28B处理的阿霉素动物的PSR染色肾的示例和代表性图像显示在图5(f)。阿霉素治疗导致约50%的肾小球表现出明显的肾小球硬化,并且肾小球基底膜中的PSR染色增强,而且在系膜基质中也是如此。在肾小管上,以超过70%的皮质有大量的管表现出扁平的上皮细胞,导致管状结构的显著损失,导致管的巨大膨胀导致大的管腔没有刷状缘有一致的管状基底膜扩张。这些区域有轻度至中度的细胞浸润。

[0283] IL-28A的应用几乎完全预防了肾小球硬化的迹象,几乎没有肾小球基底膜增厚的迹象。22只动物中只有2只显示出明显的上皮变平迹象和未经治疗的动物的腔扩张特征。剩下的动物有一个肾小管间质,在大于80%的皮质中出现接近正常,对管状基底膜几乎没有影响。

[0284] 使用Definiens软件对用PSR染色的47个小鼠肾样品进行高含量图像分析,并将三组中测量的PSR染色面积绘制为PSR染色面积百分比(图5(g))。对具有肾病理学专业知识的两个个体对相同的47只小鼠肾载玻片进行纤维化程度的盲法病理评估。肾科学专家使用0-

10分范围的评分范围(0显示无纤维化,10显示最高纤维化)对PSR染色的载玻片进行评分。与未治疗组相比,IL-28A治疗显示病理学评分显著降低47% ($p < 0.0001$) (图5(h))。第二位肾科学专家使用1-10级(1表示无纤维化,10表示最高)手动评分47MT染色的载玻片。IL-28A治疗组再次显示相对于未治疗组的纤维化重塑水平 ($p < 0.0001$) 明显改善(图5(i))。

[0285] 小鼠IL-28B(IFNL3)也在小鼠阿霉素CKD模型中的纤维化修饰蛋白的筛选中被鉴定为最初作为水动力学转染的cDNA对的一个成员(每组 $n = 15$ 只小鼠)。相对于盐水转染对照组,转染对减少了肾纤维化(通过总肾羟脯氨酸测量了59%) ($p = 0.00086$) (图3(a)和(b))并且基于血清肌酸酐水平标准化肾功能(非重要的) (图3(c))。在重复研究中证实IL-28B的抗纤维化作用,在相同模型中独立转染IL-28B cDNA(每组 $n = 22$ 只小鼠)。通过总肾羟脯氨酸测量的肾纤维化相对于生理盐水对照组降低了65% ($p = 0.0000018$) (图4(a)和(b)),相比在未经处理的盐水对照组中显著增加(IL-28B组中的平均血清肌酸酐 $= 1.2\mu\text{g}/\text{ml}$,与此相比,未治疗阿霉素生理盐水对照组平均血清肌酸酐为 $3.2\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$);平均初始组血清肌酸酐 $= 0.8\mu\text{g}/\text{ml}$),肾功能恢复正常(图4(c))。条件存活从未处理的阿霉素动物中的 $< 50\%$ 增加至接受IL-28B的那些中的100% (图4(d))。在第49天,将来自存活小鼠(天然($n = 10$),未处理的阿霉素动物($n = 18$)和IL-28B水动力学转染的动物($n = 22$))的所有肾固定,石蜡包埋,切片并染色用苏木精和曙红(H&E)或天狼猩红(PSR)并在Hamamatsu载玻片上成像。显示了一个幼稚,三个未经处理的阿霉素和三个IL-28B处理的阿霉素动物的PSR染色肾的示例和代表性图像在图5(a)中。未经治疗的小鼠肾有广泛的肾小球硬化和肾小管间质纤维化,伴有明显的管状基底膜扩张,管状上皮扁平,大量管状扩张伴有刷状缘丧失和肾小管萎缩。相比之下,IL28B治疗的小鼠主要防止两种类型的纤维化重塑。使用Definiens软件对PSR染色的50个小鼠肾样本进行高含量图像分析,并对将三组中测量的PSR染色区域绘制为PSR染色面积百分比(图5(b))。相对于未处理的肾的3倍增加,IL-28B处理的组PSR染色区域被标准化 ($p < 0.0001$)。相同的50个小鼠肾载玻片经由肾病理学专业知识的三个个体对纤维化程度进行盲法病理评估。临床病理学家使用0-4分量表(0表示无纤维化,4表示最高纤维化)的评分范围对H&E染色的载玻片进行评分。与未治疗组相比,IL-28B治疗显示病理学评分显著降低45% ($p < 0.01$) (图5(c))。两名专家肾科学家使用1-10级手动对50PSR染色的载玻片进行手动评分(1表示无纤维化,10表示最高)。IL-28B治疗组再次显示相对于未治疗组的纤维化重塑水平 ($p < 0.0001$) 明显改善(图5(d)和(e))。

[0286] (2) 原代人细胞器官纤维化体外模型

[0287] (2.1) 肝纤维化

[0288] 通过ECM蛋白质纤连蛋白,胶原蛋白IV和胶原蛋白I和III的水平测量,在塑料上生长的人原代星状细胞是自激活的并且积累基本水平的细胞外基质。通过用剂量依赖性方式用重组IL-28A处理培养物可以抑制这种ECM积累(图6(a))。人原代星状细胞与原代人肝细胞(1:1比例)的共培养导致基底细胞外基质,其也可通过用重组人IL-28A以剂量依赖性方式处理来抑制,而纤连蛋白、胶原蛋白IV和胶原蛋白I&III减少了(图6(b))。

[0289] 星状细胞单一培养和星状肝细胞共培养的TGF β 1刺激诱导ECM蛋白,纤连蛋白,胶原蛋白IV和胶原蛋白I和III的进一步增加。用IL-28A或IL-28B处理TGF β 1刺激的星状细胞单培养物或星状肝细胞共培养物,证明在 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IL-28A或B的最高浓度下,任何ECM蛋白的任何增加几乎完全抑制,二者均以剂量依赖性方式抑制。IL-28A在TGF β 1刺激的肝细胞中

的所有ECM蛋白中比IL-28B更有效(图7(a)和(b))。在IL-28A或IL-28B处理的共培养物存在下TGFβ1刺激的共培养ECM的图像显示与单独的TGFβ1处理相比ECM数量明显减少,与图像分析定量一致(图8)。

[0290] (2.2) 小肠纤维化

[0291] 用TGFβ1 (10ng/ml) 刺激的人小肠成纤维细胞诱导细胞外基质蛋白,纤连蛋白和胶原蛋白I和III。IL-28A, IL-28B和IL-29 (10ng/ml) 显著抑制纤连蛋白水平,相对于对照TGFβ1刺激分别抑制76%, 73%和83%。IL-28A, IL-28B和IL-29 (10ng/ml) 抑制胶原蛋白I和III分别为48%, 33%和35%。相对于对照TGFβ1刺激,胶原IV仅被IL-28A显著抑制(在10μg/ml时抑制37%) (图9)。

[0292] (2.3) 皮肤纤维化

[0293] 与原代角质形成细胞(9:1比例)共培养的人原代真皮成纤维细胞仅通过共培养积累了大量的纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原蛋白IV。使用3个单独批次的成纤维细胞与单个供体的角质形成细胞组合,用IL-28A或IL-28B处理培养物。用所有3个成纤维细胞批次测量ECM蛋白质相对于未处理培养物的抑制百分比,并绘制平均抑制(图10)。IL-28A和IL-28B均以10μg/ml的最高浓度完全抑制所有4种基质蛋白,具有相似的功效。IL-28A和IL-28B均显示Col IV ECM标记物的剂量依赖性抑制在10和10000ng/ml之间。使用Presto蓝测定法测试细胞活力,表明在任何测试浓度下IL-28A和IL-28B都不是有毒的(图10)。

[0294] 用IL-29, IL-28A和IL-28B在1250-10000ng/ml的较窄浓度范围内处理真皮成纤维细胞-角质形成细胞共培养物。这表明相对于对照共培养物,纤连蛋白,胶原蛋白I和III以及胶原蛋白IV的剂量依赖性抑制(图11)。在所有测试浓度下,胶原蛋白IV被IFNL抑制最多(图11)。通过Presto蓝细胞活力测定法测定的IL-29, IL-28A或IL-28B处理不影响细胞活力(图11)。

[0295] 未处理的真皮共培养物与1250ng/ml和10000ng/ml的IL-29, IL-28A和IL-28B处理的共培养物相比的图像证实,在10μg/ml IFNL存在下通过图像分析确定的ECM积累的完全预防(图12)。

[0296] 最后,用IL-1α (10ng/ml) 在单培养物中刺激人真皮成纤维细胞,以诱导ECM蛋白纤连蛋白,胶原蛋白I和III和胶原蛋白IV。用IL-28A或IL-28B处理IL-1α刺激的成纤维细胞单培养物证明了对所有ECM蛋白质的pro基质反应的有效抑制,在10μg/ml的最高浓度下完全抑制基质。在所有批次的成纤维细胞中IL-28A比IL-28B更有效,描绘了一个代表性实例(图13)。通过Presto蓝测量,IL-28A或IL-28B对细胞活力没有影响(图13)。

[0297] (2.4) 肾纤维化

[0298] 将人原代肾小管上皮细胞(RPTEC)置于与人原代肾成纤维细胞共培养(以1:1的比例以2000细胞/孔接种),产生强大的ECM,纤连蛋白和胶原蛋白I和III高。使用3种不同的方案用IL-29, IL-28A或IL-28B处理该共培养物以添加细胞因子。

[0299] 首先在第0天将IL-29, IL-28A和IL-28B加入到肾共培养物中,并将培养物温育7天。所有3种细胞因子以剂量依赖性方式有效地抑制纤连蛋白和胶原蛋白I和III的积累(图14(a))。IL-29显示出最有效的作用,IL-28A和IL-28B之间几乎没有差异。细胞因子处理不损害细胞活力(图14(a))。

[0300] 其次,在第0天将IL-29, IL-28A和IL-28B加入到RPTEC细胞中,24小时后加入成纤

维细胞,然后使培养物继续共7天,之后测量ECM。此处,IL-29,IL-28A和IL-28B均以剂量依赖性方式再次抑制纤连蛋白和胶原蛋白I和III的积累(图14(b))。当在通过添加成纤维细胞而不是同时添加两种细胞来启动ECM的共培养诱导前24小时将细胞因子加入到RPTEC中时,在IFNL存在下ECM蛋白的抑制幅度更大(比较图14(a)和图14(b))。

[0301] 最后,在第0天将IL-29,IL-28和IL-28B加入成纤维细胞中。24小时后,加入RPTEC,当测量纤连蛋白和胶原蛋白I和III时,共培养共7天。首先将IFNL添加到成纤维细胞中也显示出对ECM蛋白的显著抑制(图14(c)),但与在第0天向共培养添加细胞因子并在成纤维细胞前24小时将细胞因子添加到RPTEC中相比,降低了IL-29,IL-28A和IL-29B的功效。该观察指向RPTEC中IL-28R1介导的信号传导反应,其介导抗纤维化表型,其导致上皮细胞和成纤维细胞类型的共培养物中ECM信号的抑制。为了清楚地证明IFNL添加顺序对不同细胞类型与同时添加的不同影响,重新绘制了纤连蛋白的IL-28A,IL-28B和IL-29数据(图15(a))和Col I和III(图15(b))显示了不同添加方案对每种单独IL-28R1配体的抑制水平的相对影响。在某些较低浓度的IL-28A,IL-28B或IL-29中,与首先(成纤维细胞之前)添加到RPTEC相比,细胞和细胞因子的同时添加之间的差异达到统计学显著性,并且这些值在图上标出。

[0302] 在通过Presto蓝读出的共培养物的交替细胞之前,首先将细胞因子添加到RPTEC或成纤维细胞中不损害细胞活力(图14(a),(b)和(c))。

[0303] 与IL-28A,IL-28B和IL-29处理的共培养物相比,未处理的共培养物的代表性图像(每次处理总共16个视野中的一个)显示IL-29,IL-28A和IL-28B的剂量依赖性作用,以及在1000ng/ml IL-29存在下观察到的几乎完全抑制(图16)证实了图像分析数据。

[0304] 单细胞培养的肾近端小管上皮细胞(RPTEC)通过在塑料上生长而产生基础ECM蛋白,尽管水平较低。如图22中的纤维蛋白,胶原蛋白IV和胶原蛋白I和III所示,在非常低浓度的IL-29存在下仍然可以抑制低水平的ECM。

[0305] (2.5) 肺纤维化

[0306] 与从特发性肺纤维化(IPF)患者分离的肺成纤维细胞共培养的人原代小气道肺上皮细胞(2000细胞/孔,比例为1:1)在培养7天后产生稳健的总ECM(通过Flamingo染色测量),并且对ECM标记物,纤连蛋白,I型胶原蛋白和III型胶原蛋白以及IV型胶原蛋白呈阳性。IL-28A或IL-28B对纤连蛋白水平没有显著影响。然而,IL-28B在最高浓度为10 μ g/ml时显示出对胶原蛋白I和III,胶原蛋白IV和Flamingo染色的显著抑制(图17)。然而,IL-28A的作用不太明显。IL-28A或IL-28B在第7天细胞存活率没有变化(图17)。

[0307] (3) 器官纤维化的原代人细胞模型

[0308] (3.1) 肝纤维化

[0309] 人原代星状细胞与原代人肝内胆管上皮细胞(1:1比例)的共培养导致基底细胞外基质,其也可以通过以剂量依赖性方式用重组人IL-28A和IL-29处理来抑制,而纤连蛋白,胶原蛋白IV和胶原蛋白I和III减少了(图19)。

[0310] (3.2) 3D肾小球球体模型

[0311] 肾小球球状体由磁化的人原代肾小球内皮细胞的内核构建,其具有温度条件性人足细胞的外核,其可在稳定培养物中维持长达3周。用局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)患者用15%复发血浆治疗肾小球球体诱导了外核中GFP标记的足细胞的丢失,这可以在IL-28A存在下得到保护。来自健康志愿者的血浆对足细胞没有影响。绿色荧光足细胞标记物区域

的定量表明FSGS复发血浆的存在显著减少,其在IL-28A处理上显著增加(图20(a),(b)和(c))。FSGS的临床进展的特征在于消失和足细胞的丢失。该模型再现了FSGS血浆中来自循环因子的足细胞的作用,并提示IL-28疗法的临床可译性以预防相关的肾病综合征和肾小球硬化。

[0312] (4) 小鼠单侧输尿管梗阻(UUO)肾纤维化模型

[0313] (4.1) 通过水动力学转染(HDT)递送的小鼠IL28B

[0314] 通过HDT接受对照SEAP载体的动物中的UUO肾在手术后第21天显示该模型典型的皮质中的肾小管间质纤维化,管状基底膜广泛扩张,强烈的胶原染色,基底膜在髓质射线内特别强烈染色,上皮细胞体积广泛流失,肾小管萎缩,近端管状刷状缘缺失和广泛的肾小管间质浸润。不到15%的肾小管接近正常的结构。髓质被有效地破坏和丢失,而肾小球的变化很小(图21(a))。

[0315] 在UUO前1天和UUO后7天用小鼠IL-28B进行HDT的动物中的UUO肾在手术后21天均显示出对皮质肾小管间质纤维化的保护作用(图21(a))。通过HDT接受小鼠IL-28B的两组中的管状基底扩张和胶原染色比接受对照载体的UUO小鼠低至少30%至40%。两个IL28B组都具有管状结构的保留,具有较少的上皮扁平化和萎缩发生。从HDT前第1天开始,30%至40%的肾小管显示接近正常结构,而稍后治疗的患者中肾小管显示略低(20%至30%)。与对照载体组相比,IL-28组的间质浸润约为40%。IL28组均未对髓质结构进行任何显著保护。总体而言,HDT对IL28B的早期和晚期递送均具有对UUO诱导的肾皮质纤维化重塑的显著保护。

[0316] 使用definiens图像分析算法对天狼猩红(PSR)染色的胶原切片进行定量,显示在第1天或第7天递送的小鼠IL-28B的统计学显著保护作用,当绘制为总胶原区域时(图21(b))或相对于对照质粒处理的小鼠的高强度胶原区域(图21(c))。这与如上所述的染色切片的视觉组织学评估一致。

[0317] 通过ELISA测量在小鼠UUO模型中在HDT后第21天达到的小鼠IL28B蛋白的血清水平,并且在所有组中在43和485ng/ml之间。在对照SEAP HDT小鼠中不能测量小鼠IL28B蛋白,因此水平低于4ng/ml,这是所用测定的定量下限(LLQ)。

[0318] (4.2) 通过水动力学转染(HDT)递送的人IL-29

[0319] 与SEAP对照质粒处理组相比,HDT递送的人IL-29在第0天(转染后24小时)和第19天在所有小鼠中显示显著的蛋白质表达,此时模型终止(图23(a))。在未转染或SEAP对照小鼠血清中未检测到人IL-29。

[0320] 未经处理的19天UUO显示该模型的典型组织学变化。所有肾都有广泛的破坏和肾髓质的损失。皮质显示管状基底膜的广泛扩张,具有显著的间质胶原积聚,如增加的天狼猩红(PSR)染色所示。在整个皮质中还存在明显的细胞浸润到间质中。管状上皮结构显著受损。大多数上皮细胞已经失去体积并且通常看起来扁平,包括具有扩张腔的少量肾小管。值得注意的是,超过80%的肾小管经历了广泛的萎缩,并且在许多情况下完全塌陷。在大多数情况下,由于失去通畅,小管的腔很难区分,上皮细胞明显地从肾单位管状基底膜上脱落并且驻留在本来就是管腔中。

[0321] 第19天使用IL-29治疗UUO时的UUO肾与仅接受SEAP载体的患者有明显不同的外观,结构清晰。髓质受损,但仍然存在,并且在75%的动物中具有比未经处理的UUO更可识别的结构。在皮质中,较低放大水平的主要观察是与SEAP UUO相比具有扩张的管腔的大量小

管。然而,这通常与非常扁平的上皮细胞和未经处理的UUO中的管状基底膜的扩张有关,通过IL-29处理,上皮细胞保持体积,管状基底膜的最小扩张和结构肾小管显著保留,几乎没有萎缩和肾小管塌陷的证据。显然有较低水平的间质胶原蛋白和管状基底膜的膨胀减少。总体而言,IL-29的应用显著减少了由UUO引起的肾小管间质纤维化,具有较少的间质胶原和管状结构的显著保留,如图23 (b) 中的代表性图像所示。

[0322] 使用definiens图像分析算法对所有天狼猩红 (PSR) 染色的胶原切片进行定量,显示当作为相对于对照SEAP质粒处理的小鼠而总染色胶原区域作图时,在第-1天递送的人IL-29的统计学显著保护作用(图23 (c))。这与如上所述的染色切片的视觉组织学评估一致。

肾病阿霉素模型中IL-28A的鉴定

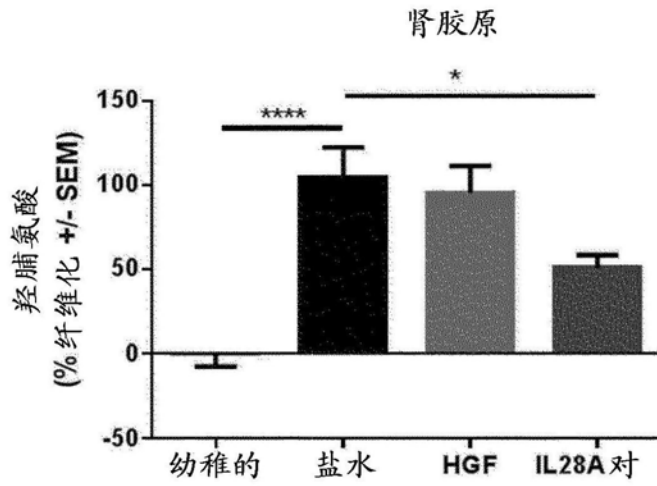


图1 (a)

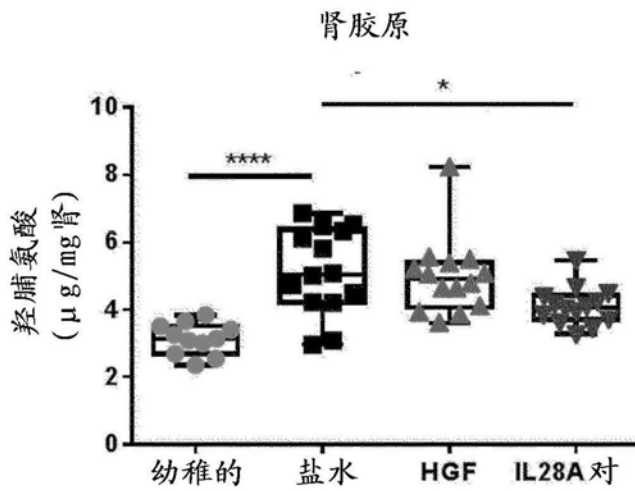


图1 (b)

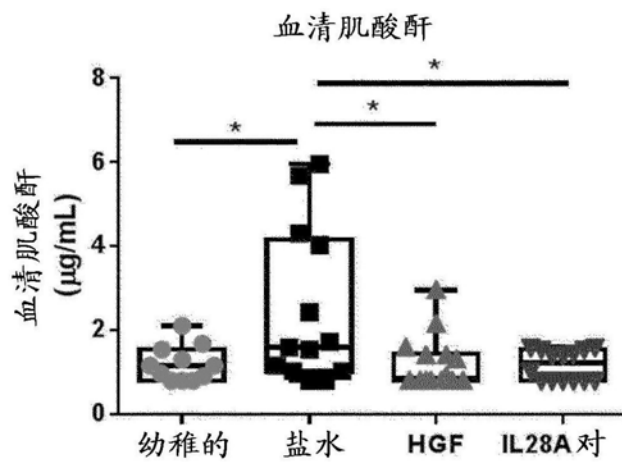


图1 (c)

图1

肾病阿霉素模型中IL-28A的确认

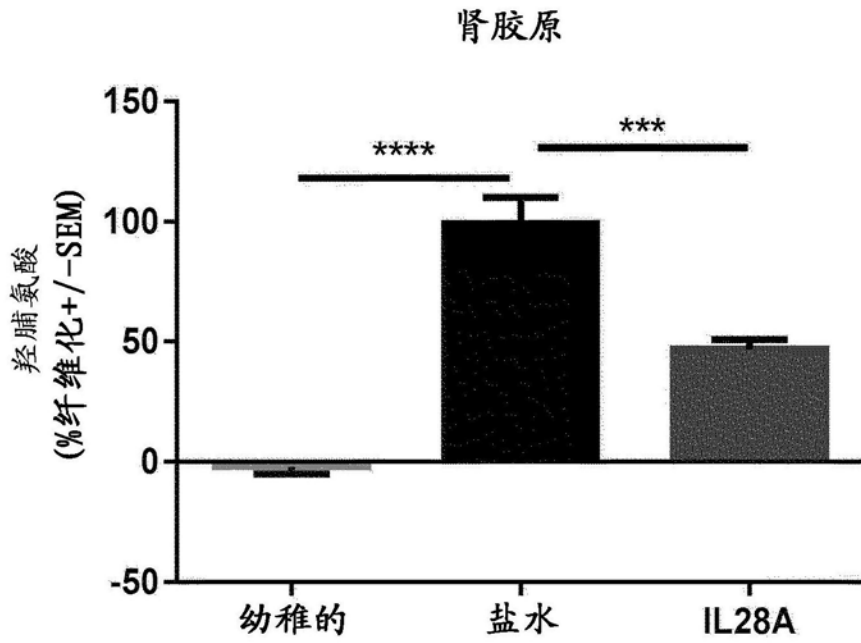


图2 (a)

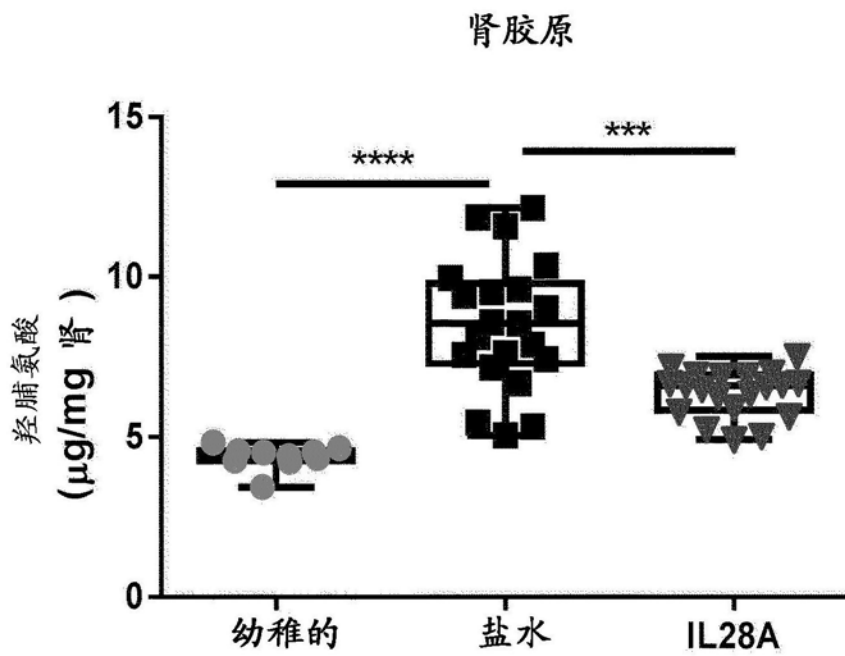


图2 (b)

图2

肾病阿霉素模型中IL-28A的确认

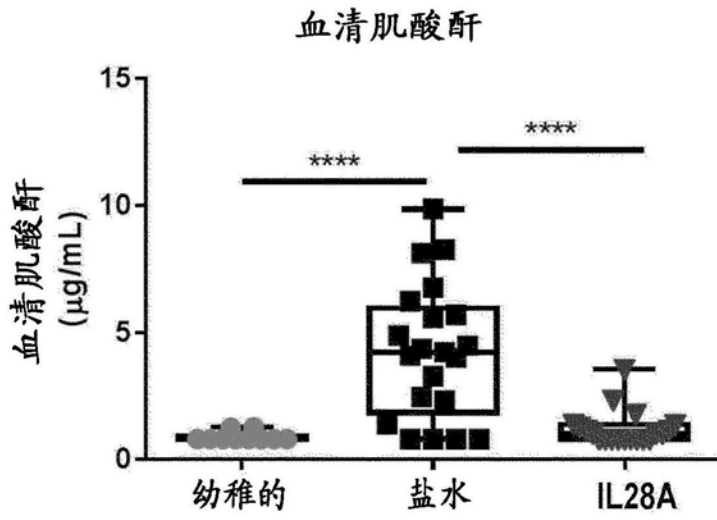


图2(c)

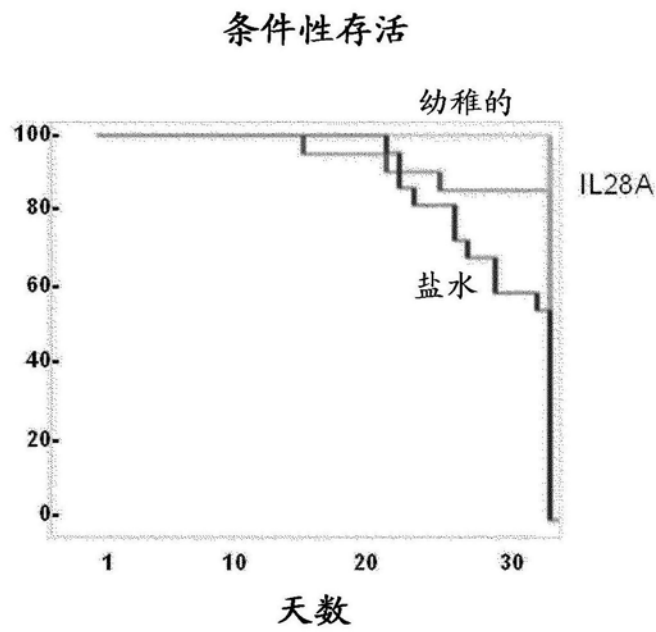


图2(d)

图2(续)

肾病阿霉素模型中IL-28B的鉴定

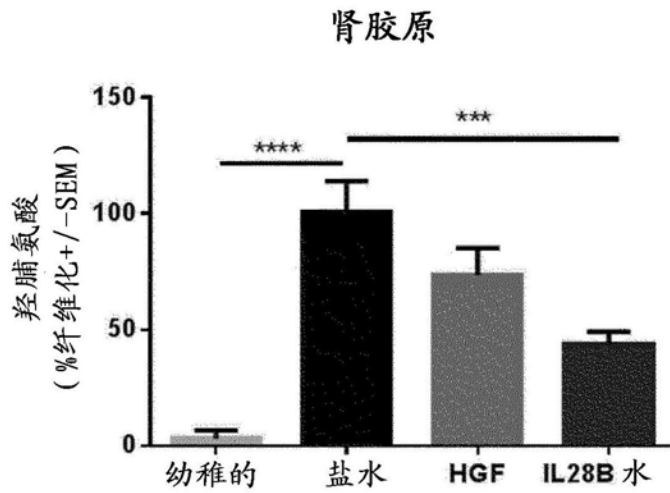


图3 (a)

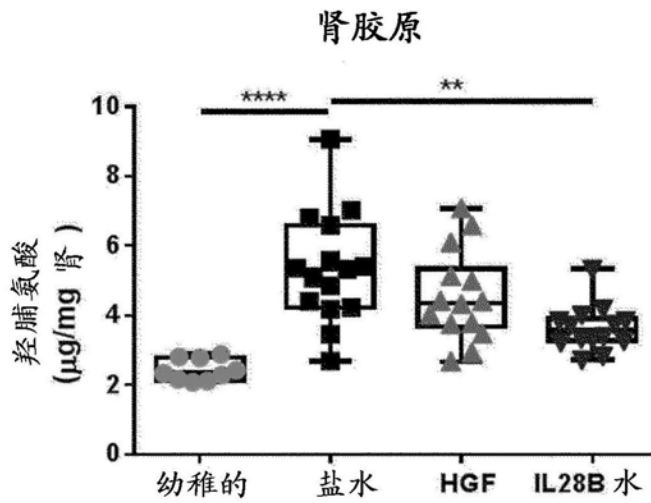


图3 (b)

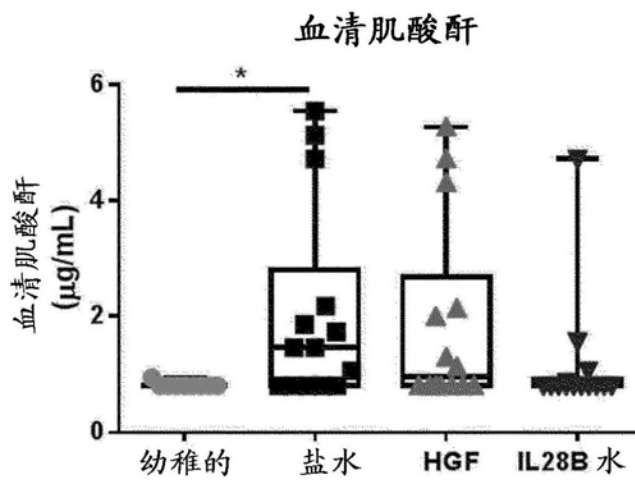


图3 (c)

图3

肾病阿霉素模型中IL-28B的确认

肾胶原

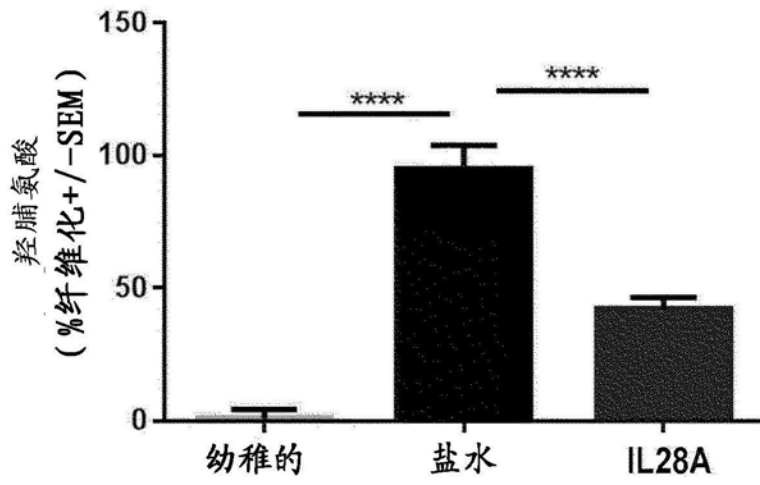


图4 (a)

肾胶原

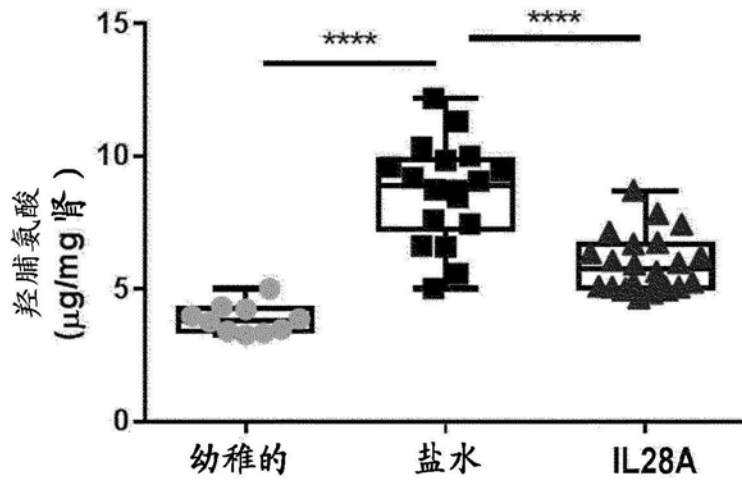


图4 (b)

图4

肾病阿霉素模型中IL-28B的确认

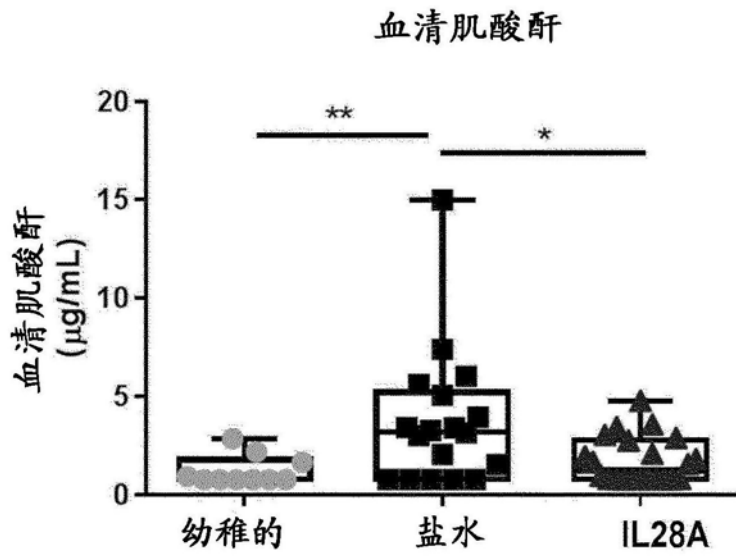


图4(c)

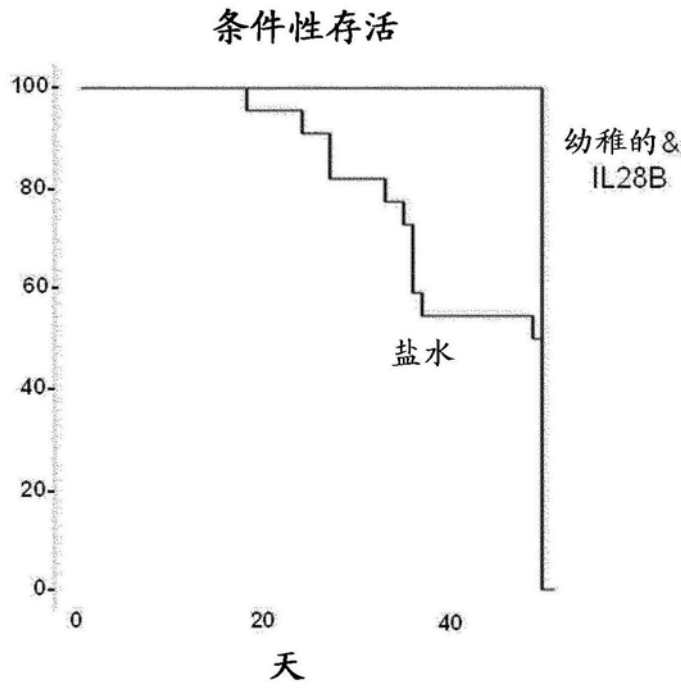


图4(d)

图4(续)

肾病阿霉素模型中IL-28B和IL-28A作为抗纤维化剂的组织学确认

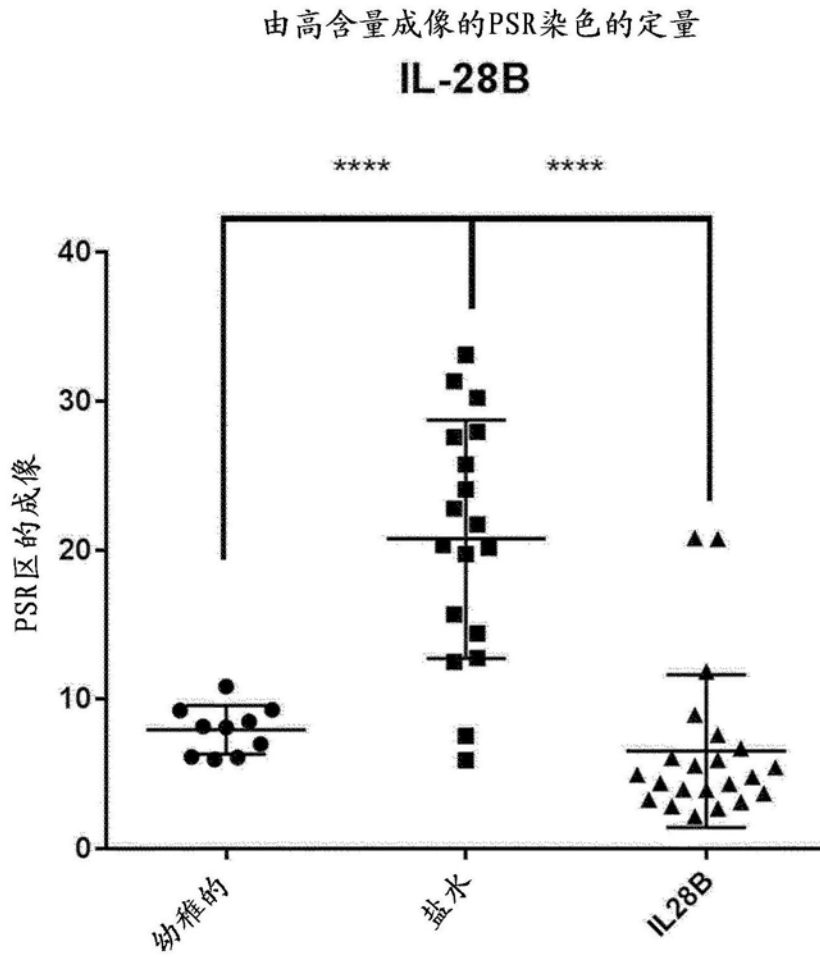


图5b

图5(续)

肾病阿霉素模型中IL-28B和IL-28A作为抗纤维化剂的组织学确认

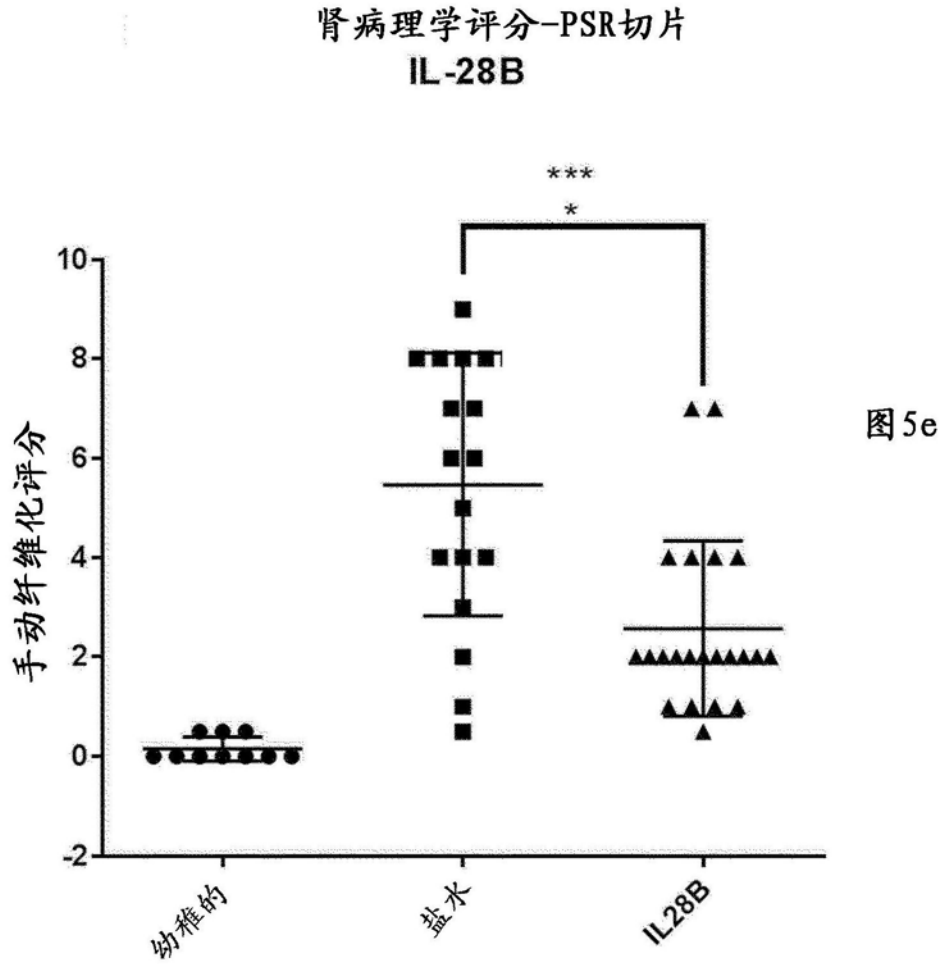


图5(续)

肾病阿霉素模型中IL-28B和IL-28A作为抗纤维化剂的组织学确认

图5f: IL-28A肾的PSR染色-肾病阿霉素模型

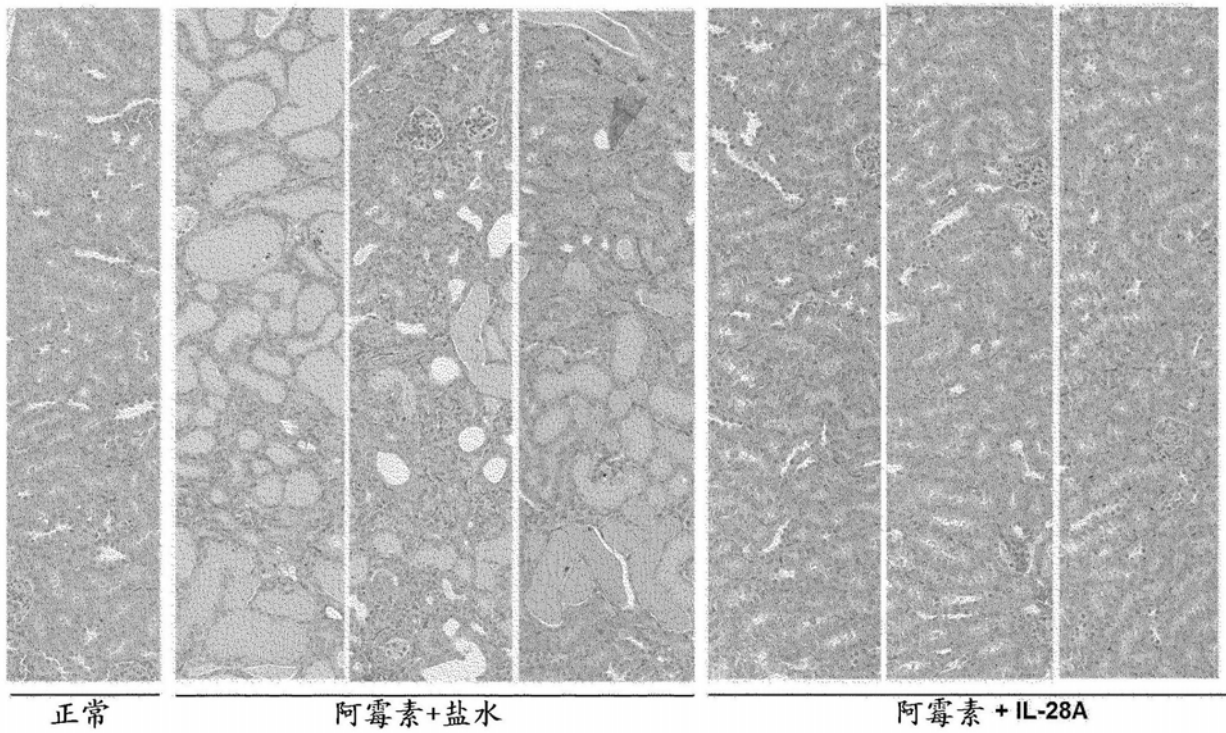


图5(续)

肾病阿霉素模型中IL-28B和IL-28A作为抗纤维化剂的组织学确认

由高含量成像的PSR染色的定量

IL-28A

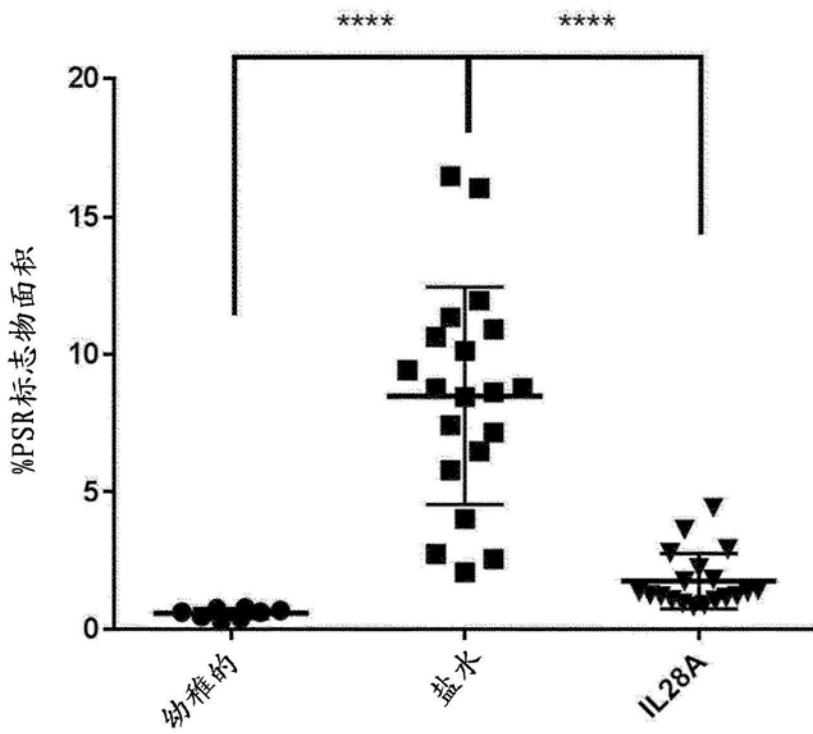


图5g

图5(续)

肾病阿霉素模型中IL-28B和IL-28A作为抗纤维化剂的组织学确认

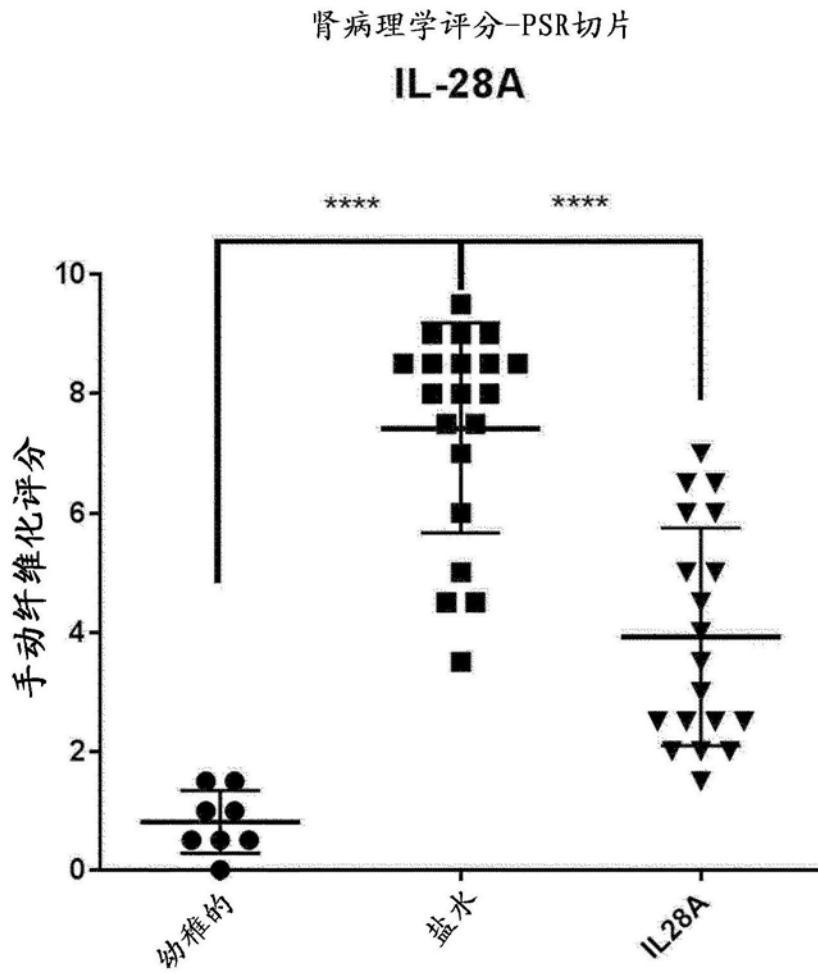


图5h

图5(续)

肝星状细胞体外ECM纤维化模型中IL-28A的效应

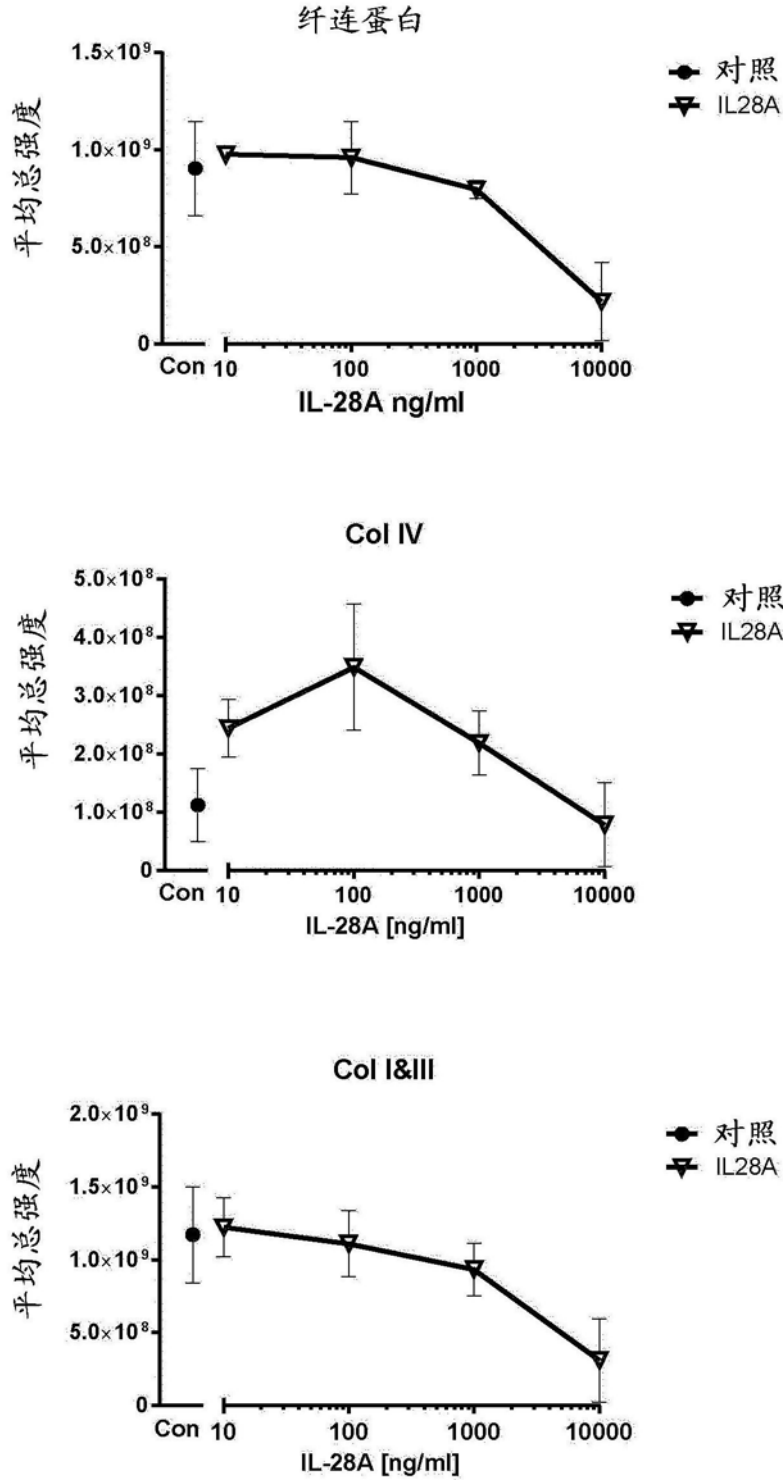


图6 (a)

肝星状细胞-肝细胞体外ECM纤维化模型中IL-28A的效应

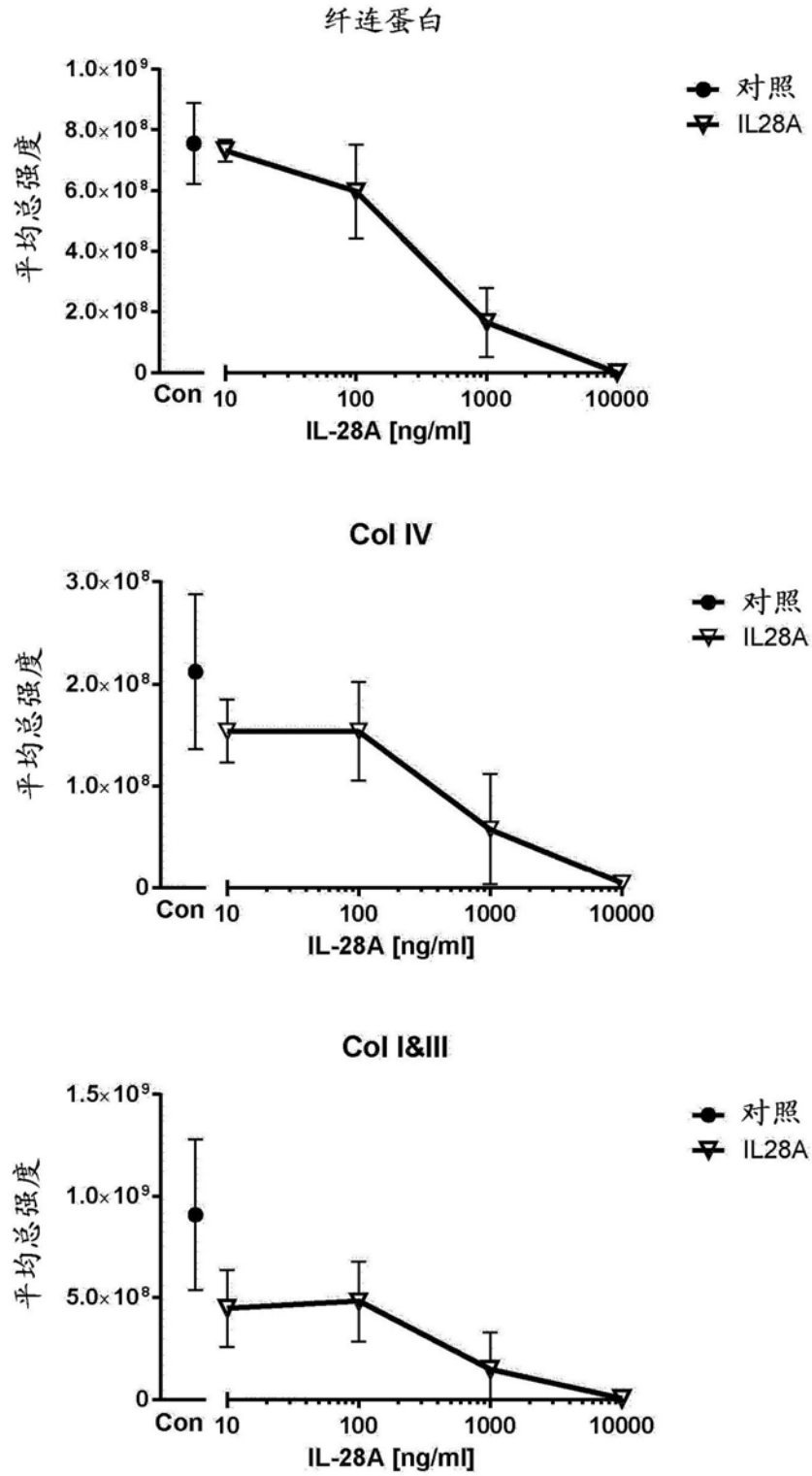


图6 (b)

肝星状细胞体外ECM纤维化模型+TGF β 中 IL-28A和IL-28B的效应

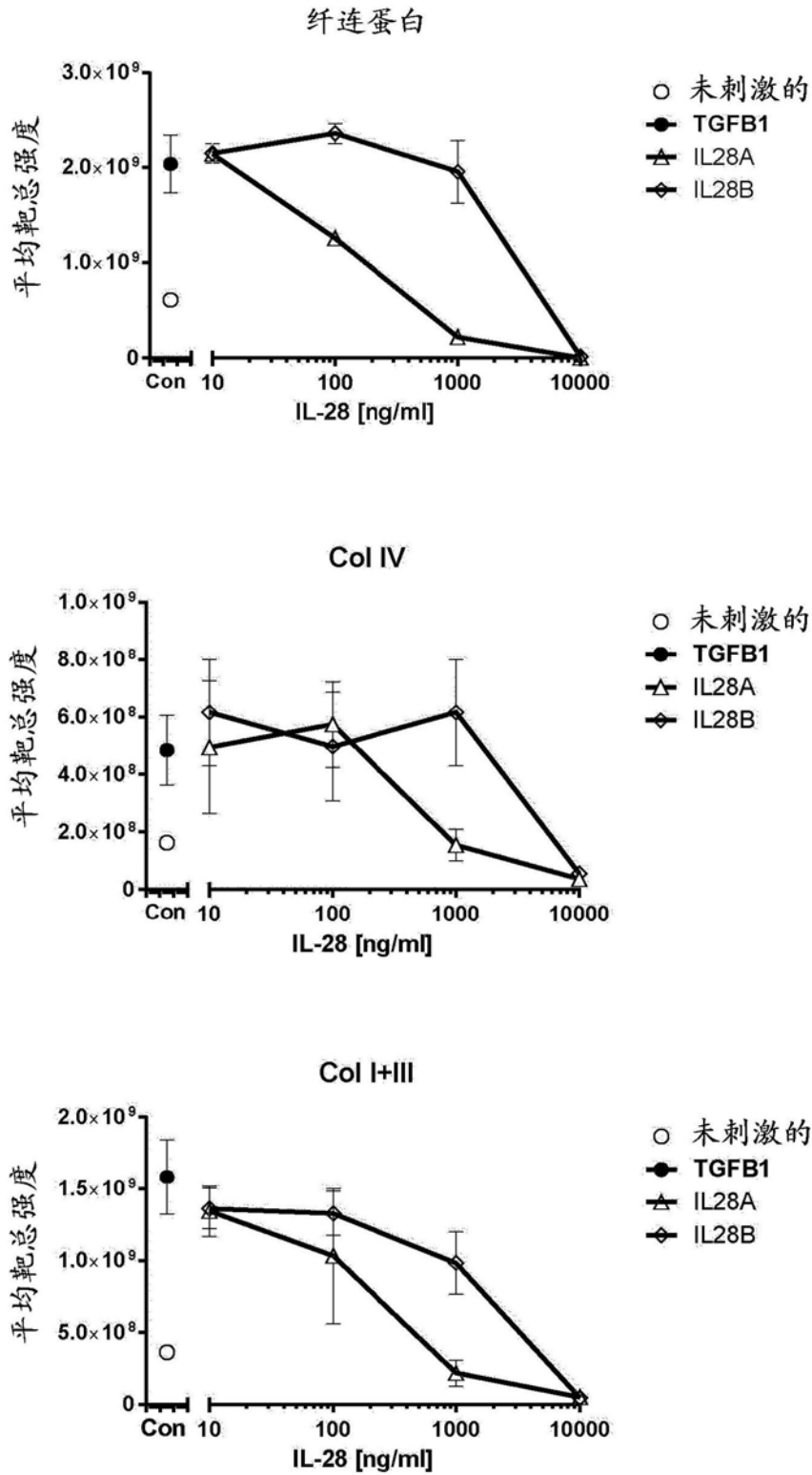


图7 (a)

肝星状细胞-肝细胞共培养+TGFβ 中 IL-28A和 IL-28B的效应

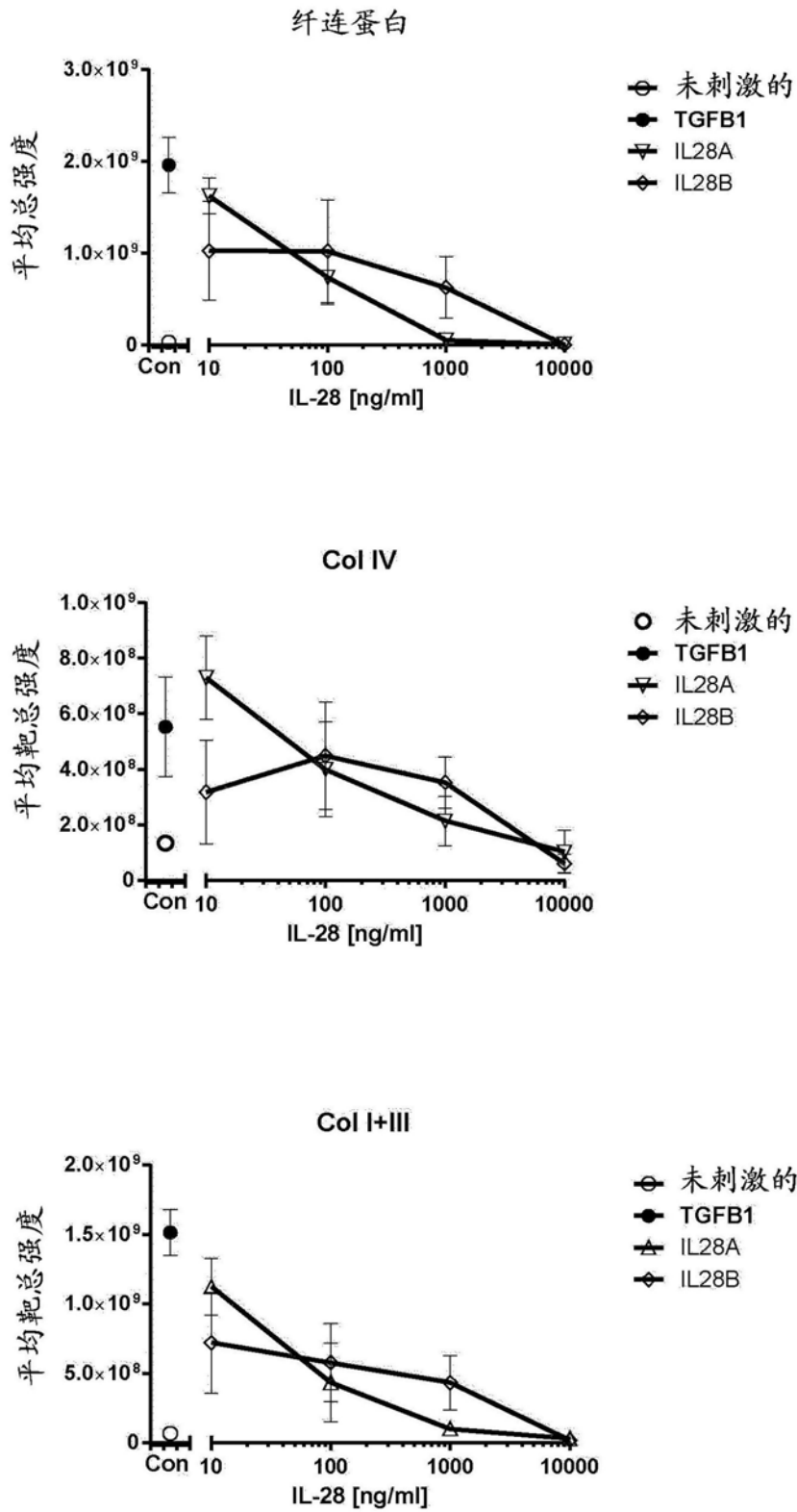


图7 (b)

显示TGFβ1-刺激的星状细胞-肝细胞共培养ECM中IL-28A和IL-28B的效应的高含量图像

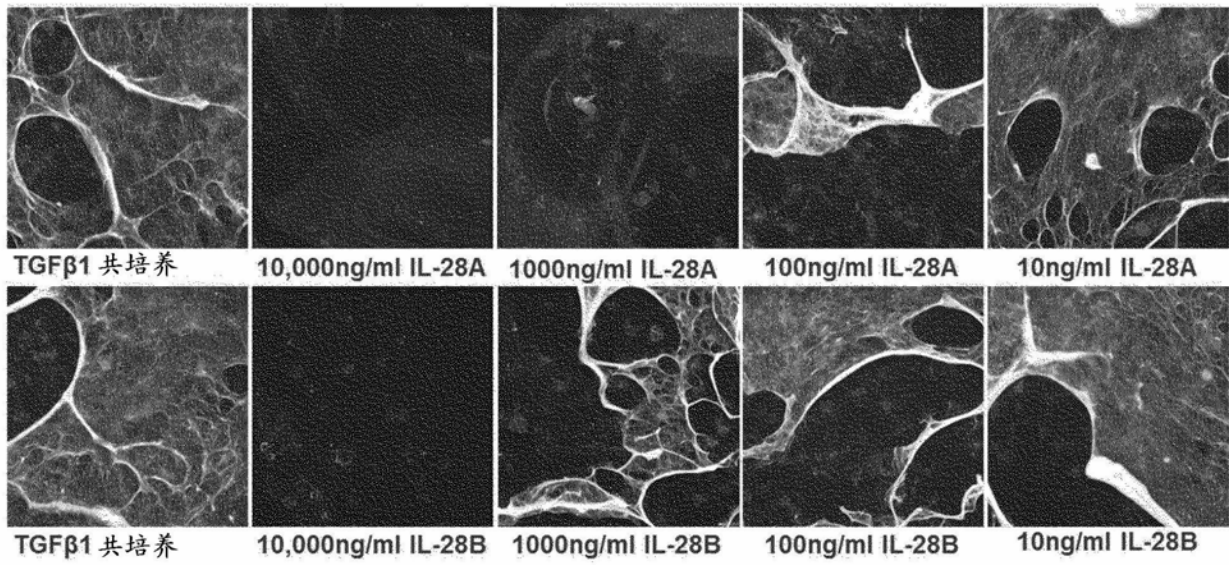


图8

IL-28A、IL-28B和IL-29对TGFβ1-刺激的小肠成纤维细胞ECM的效应

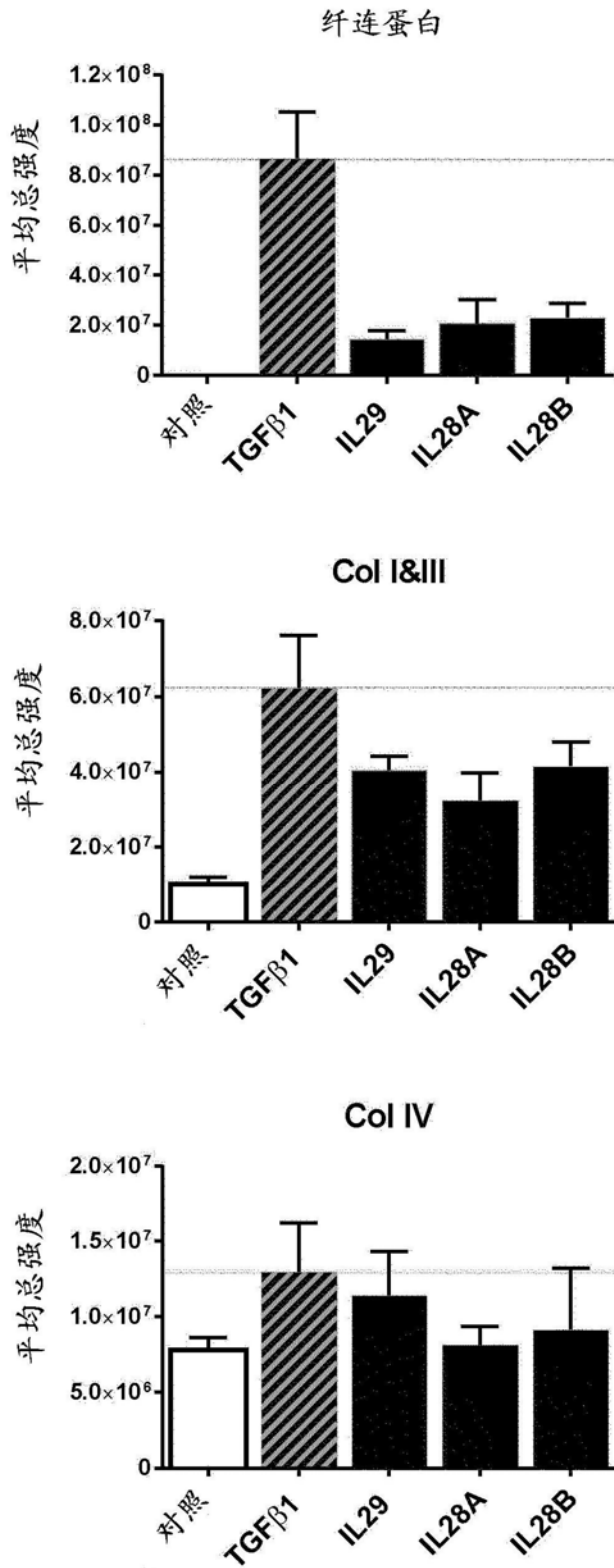


图9

皮肤角质形成细胞-成纤维细胞共培养ECM中IL-28A和IL-28B的%抑制

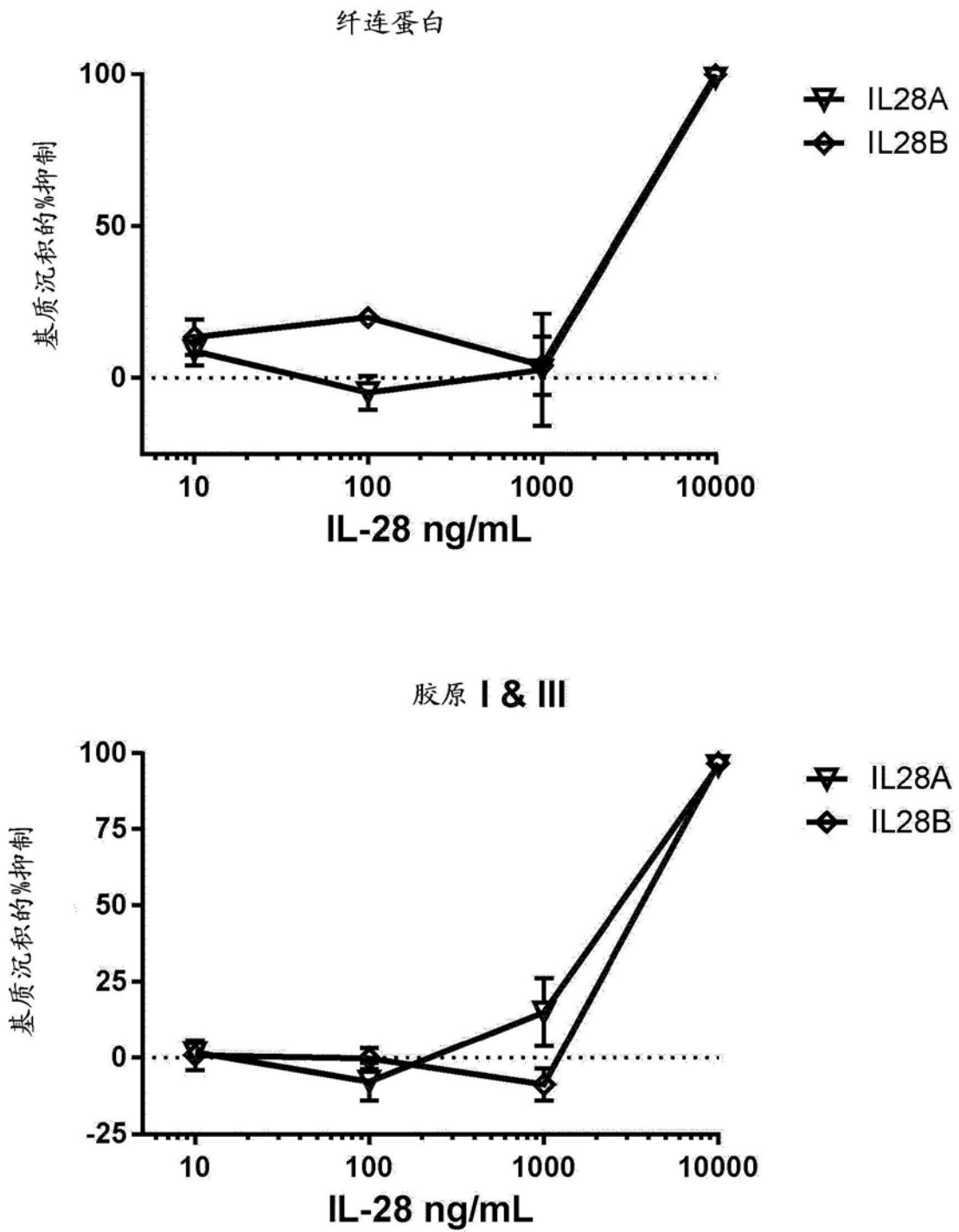


图10

皮肤角质形成细胞-成纤维细胞共培养ECM中
IL-28A和IL-28B的%抑制及细胞活力

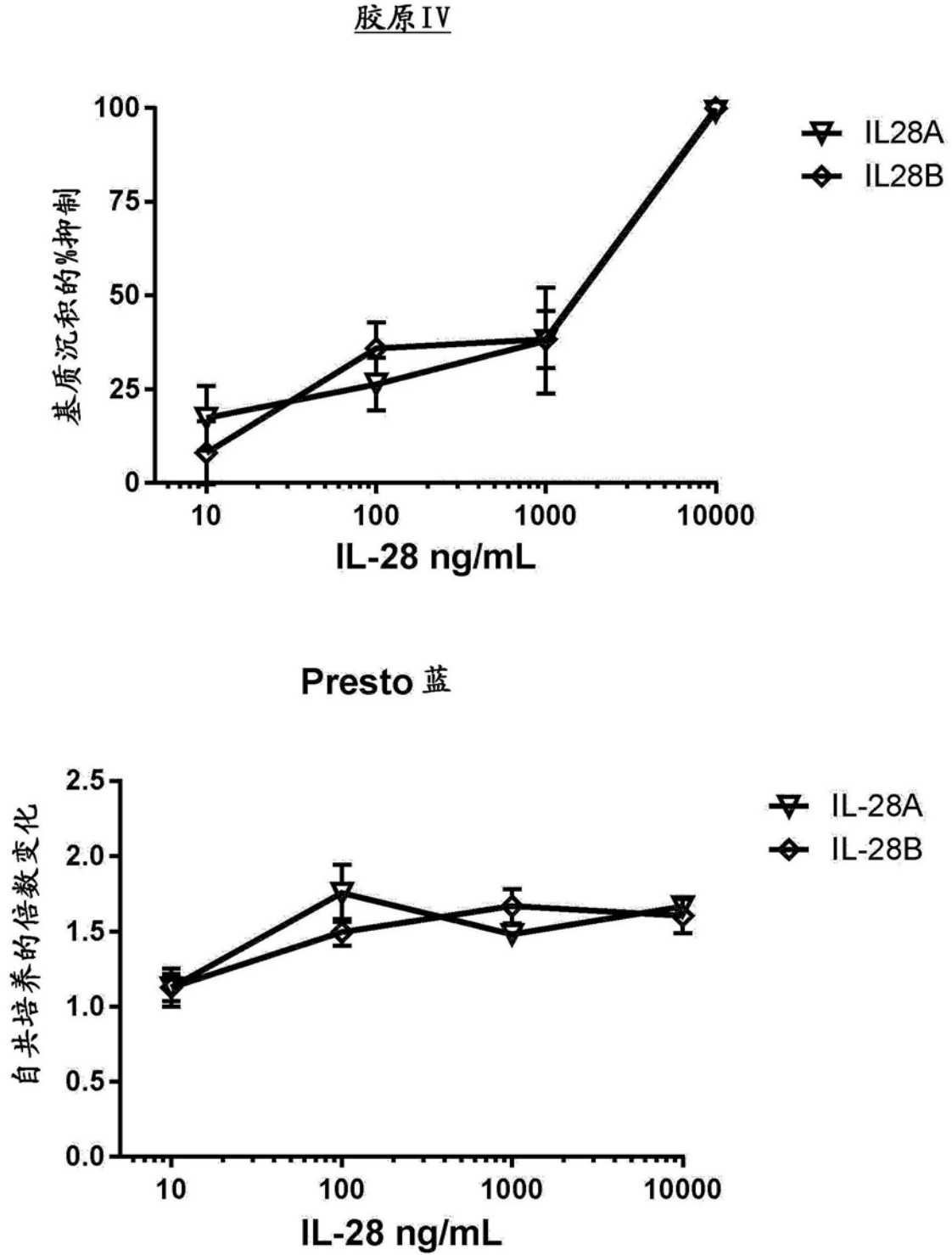
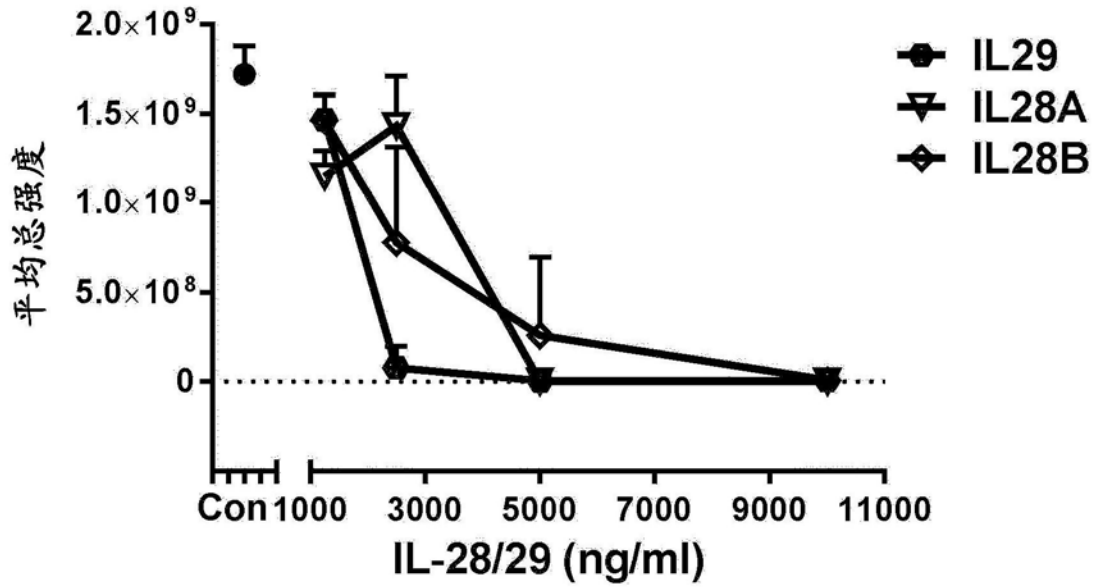


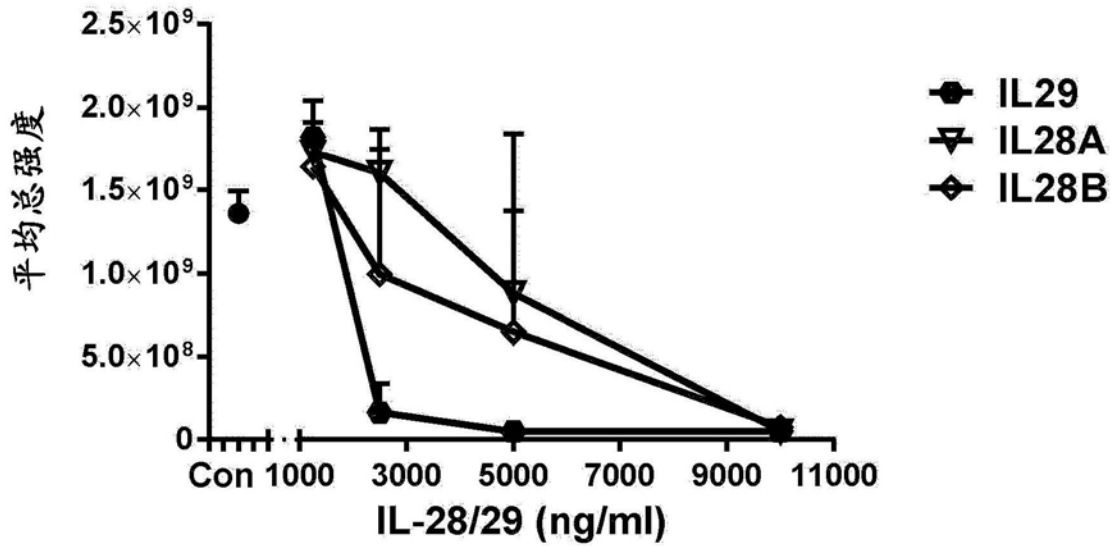
图10(续)

皮肤角质形成细胞-成纤维细胞共培养ECM中
IL-28A、IL-28B和IL-29的效应

纤连蛋白



胶原 I/III



皮肤角质形成细胞-成纤维细胞共培养ECM中
IL-28A、IL-28B和IL-29的效应及细胞活力

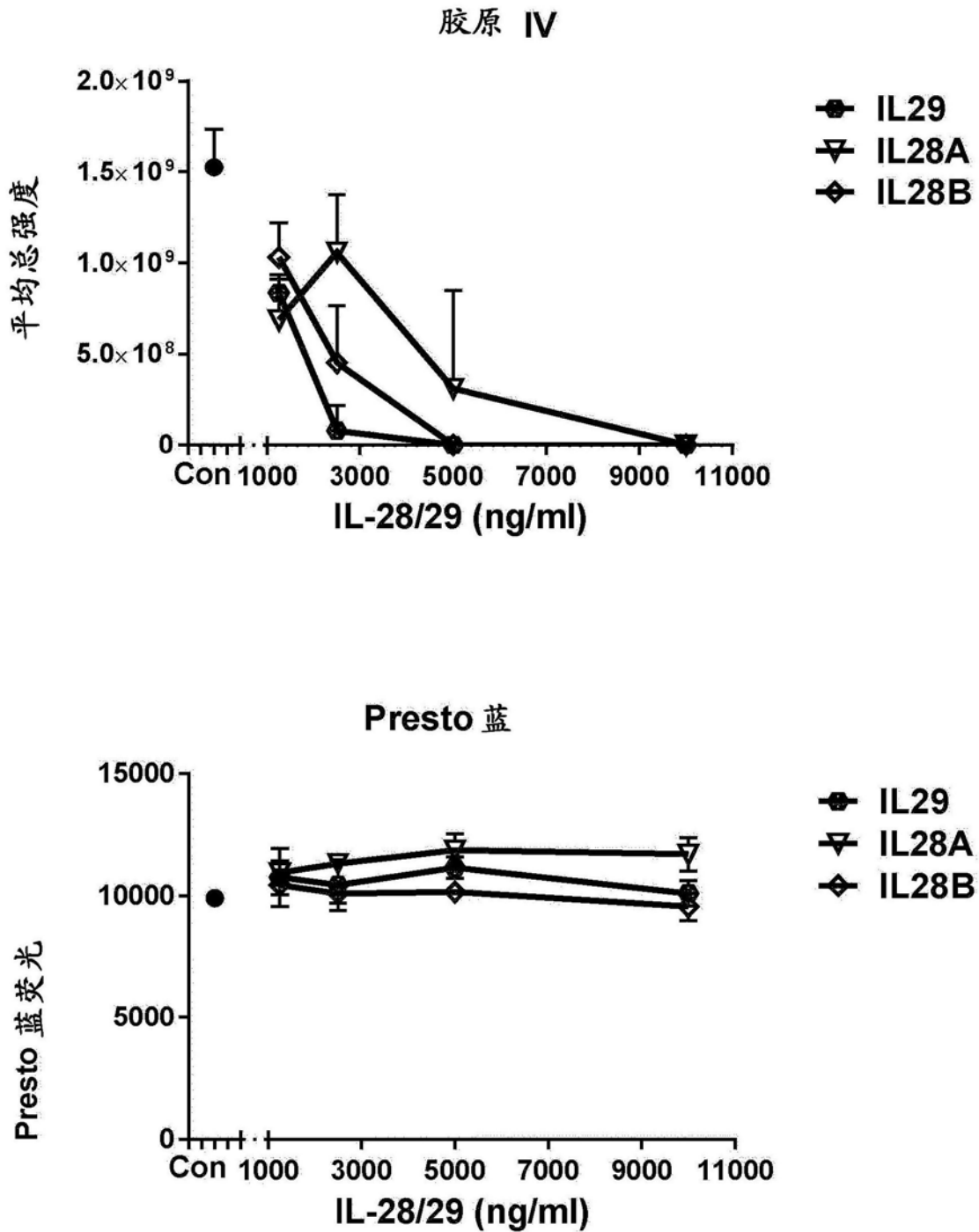


图11

显示皮肤角质形成细胞-成纤维细胞共培养ECM中
IL-28A、IL-28B和IL-29的效应的高含量图像

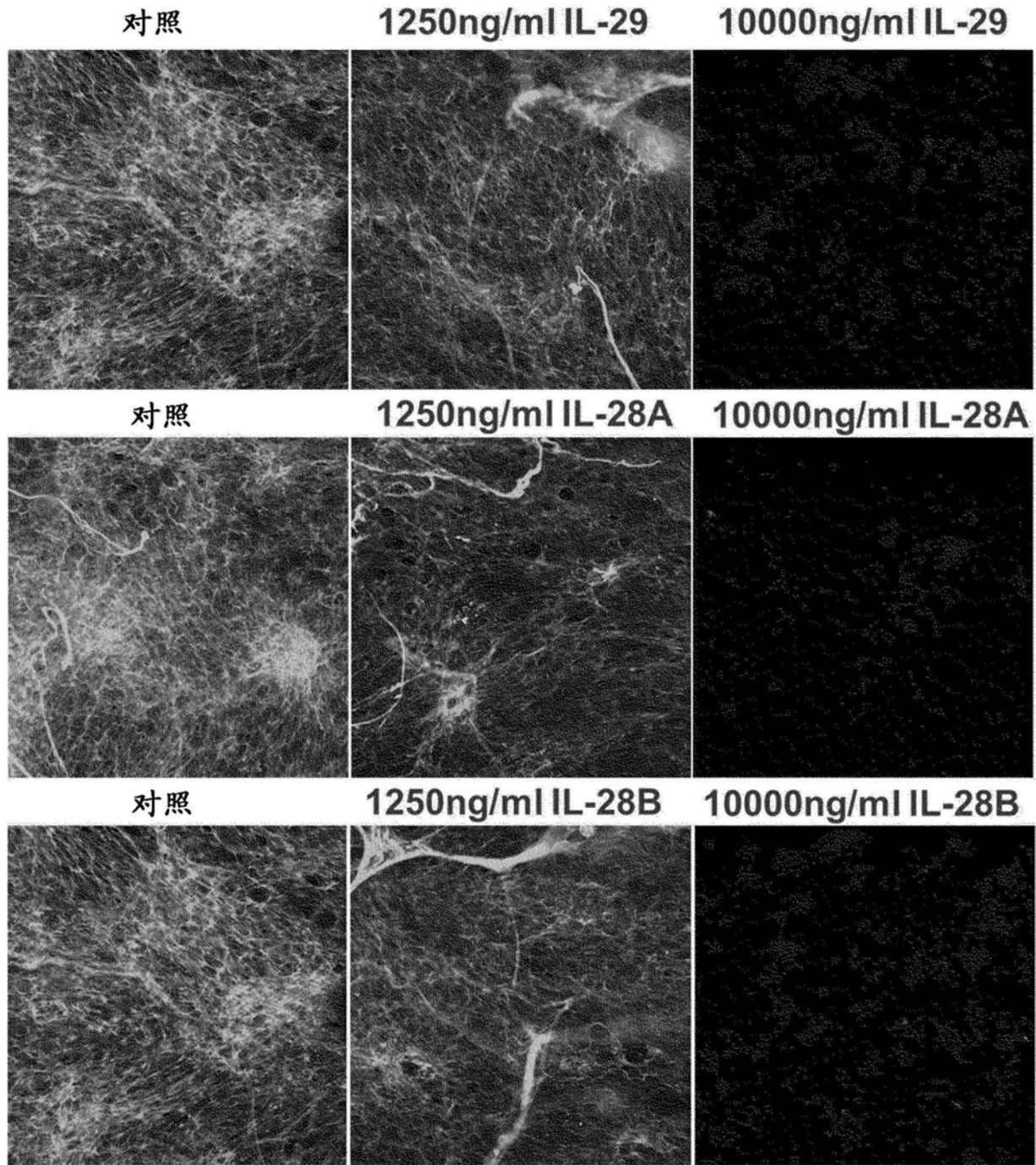


图12

IL-1 α -刺激的皮肤成纤维细胞中IL-28A和IL28B的效应

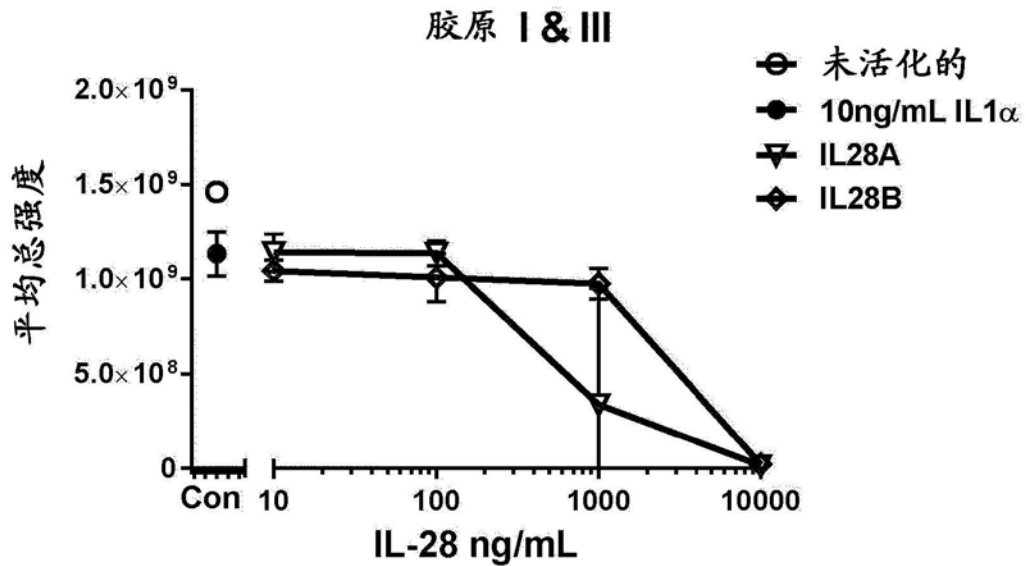
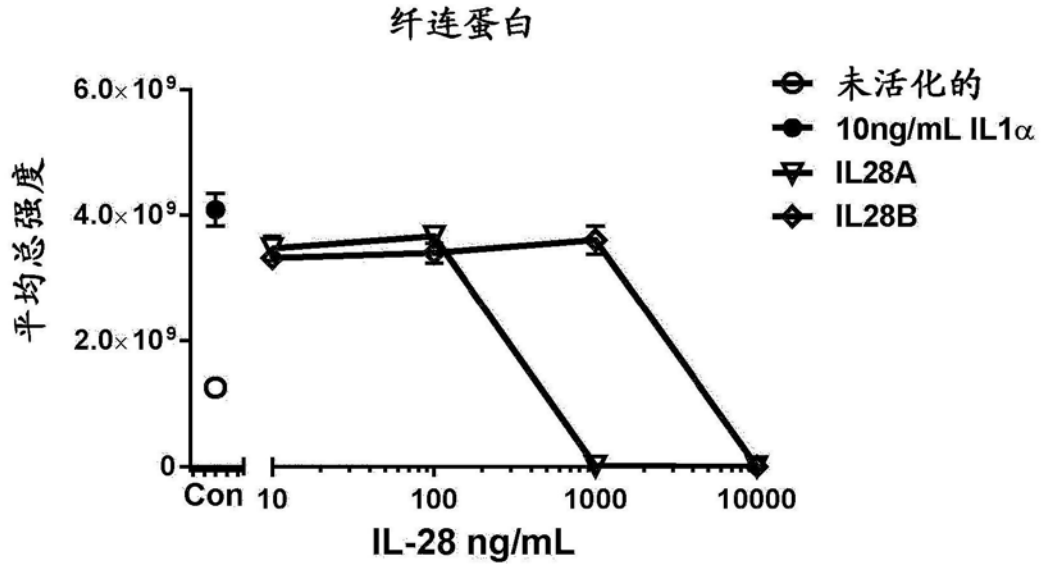


图13

IL-1 α -刺激的皮肤成纤维细胞中IL-28A和IL-28B的效应及细胞活力

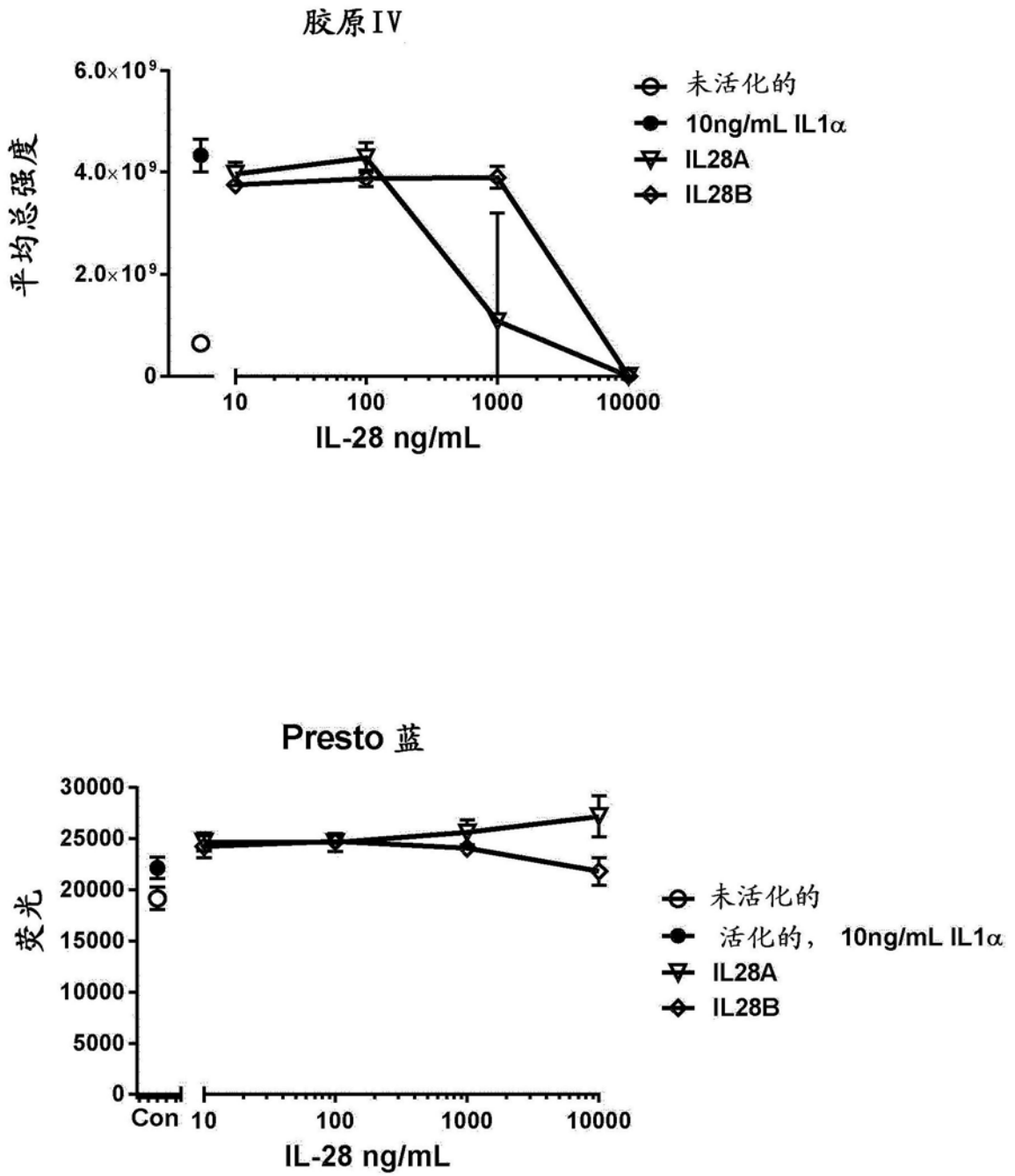


图13(续)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM中IL-28A、IL-28B和IL-29的效应及细胞活力-共培养添加

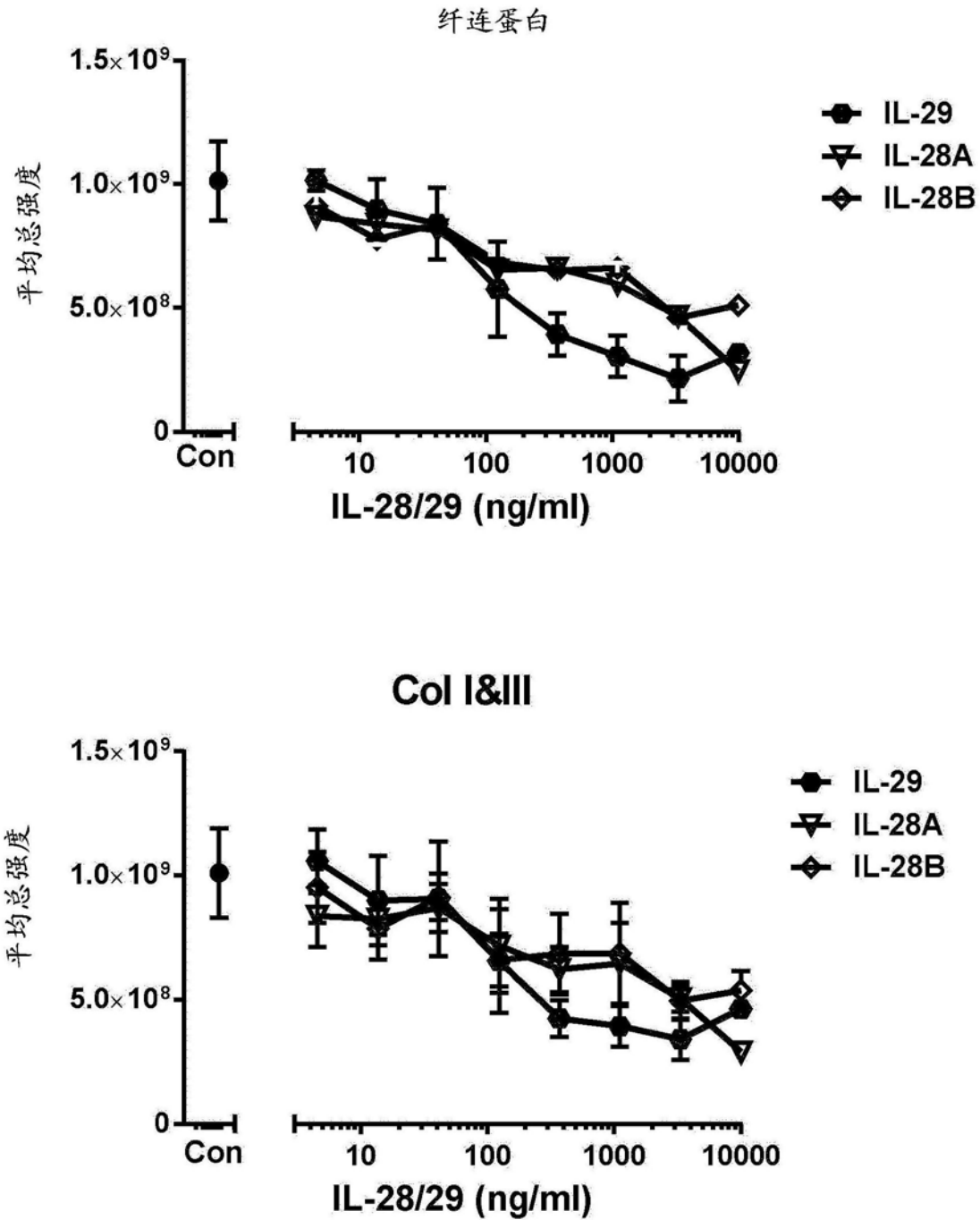


图14 (a)

肾RPTEC-成纤维细胞共ECM中IL-28A、IL-28B和IL-29的效应及细胞活力-共培养添加

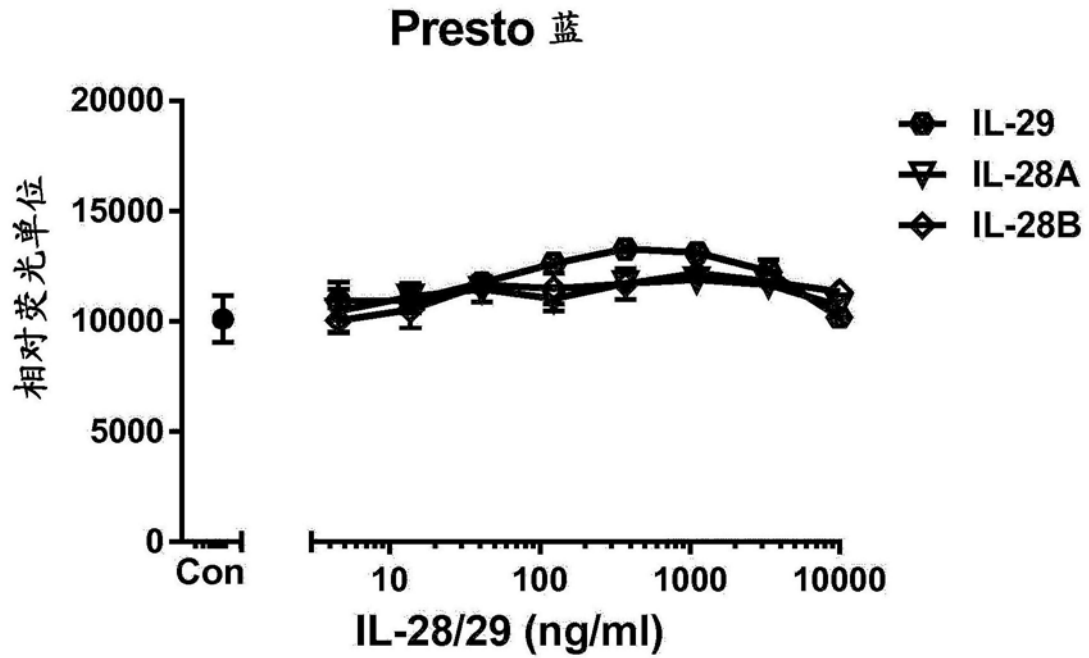


图14(a) (续)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM中IL-28A、IL-28B和IL-29的效应及细胞活力-首先添加RPTEC

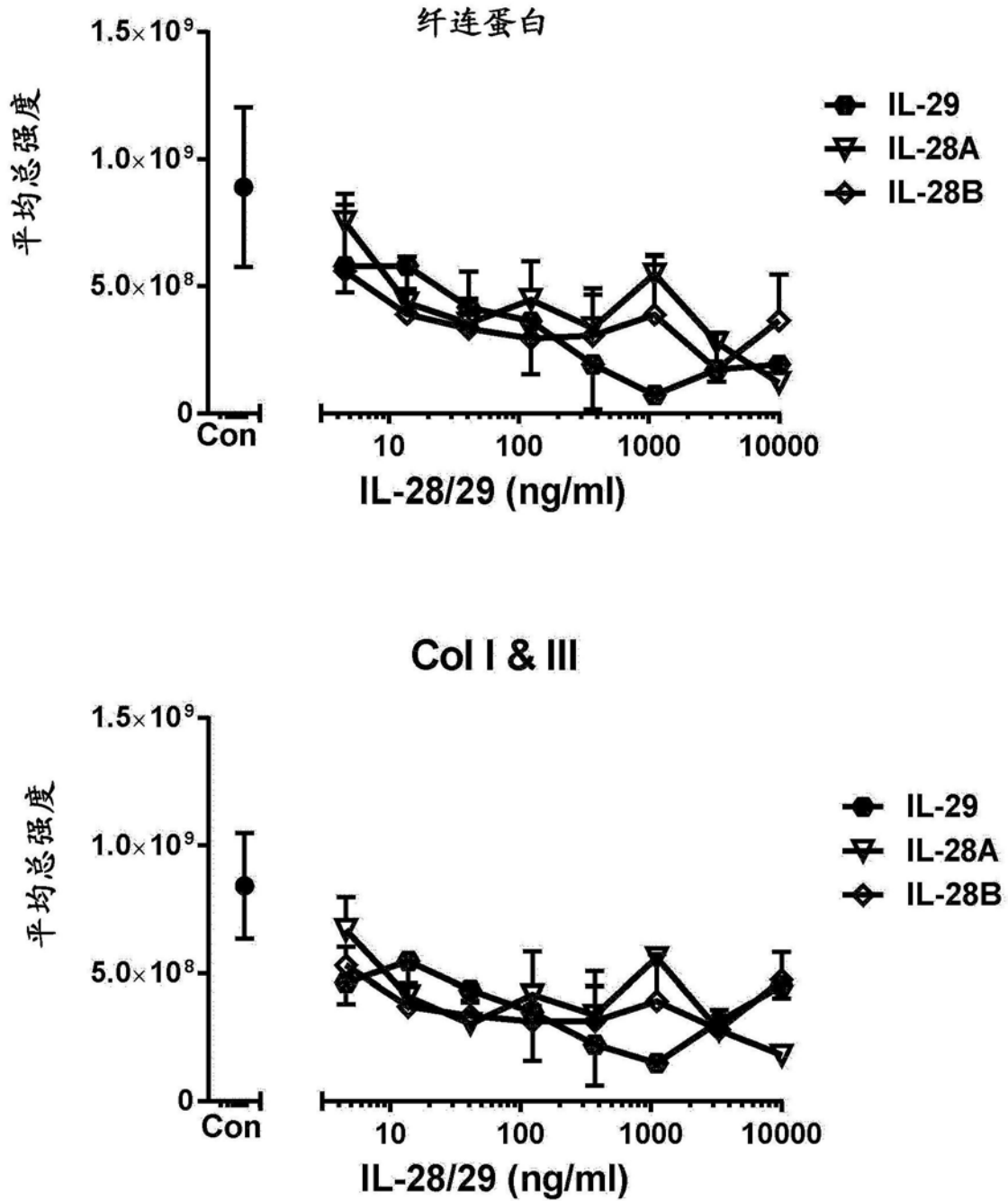


图14 (b)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM中IL-28A、IL-28B和IL-29的效应及细胞活力-首先添加RPTEC

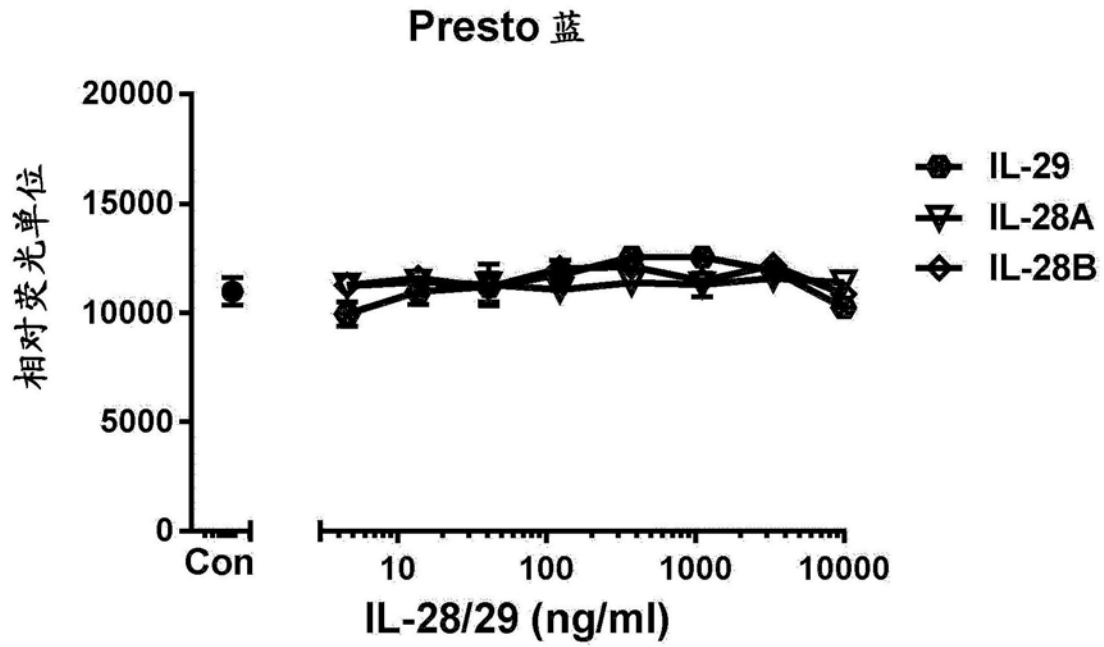


图14 (b) (续)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM中IL-28A、IL-28B和IL-29的效应及细胞活力-首先添加HRF

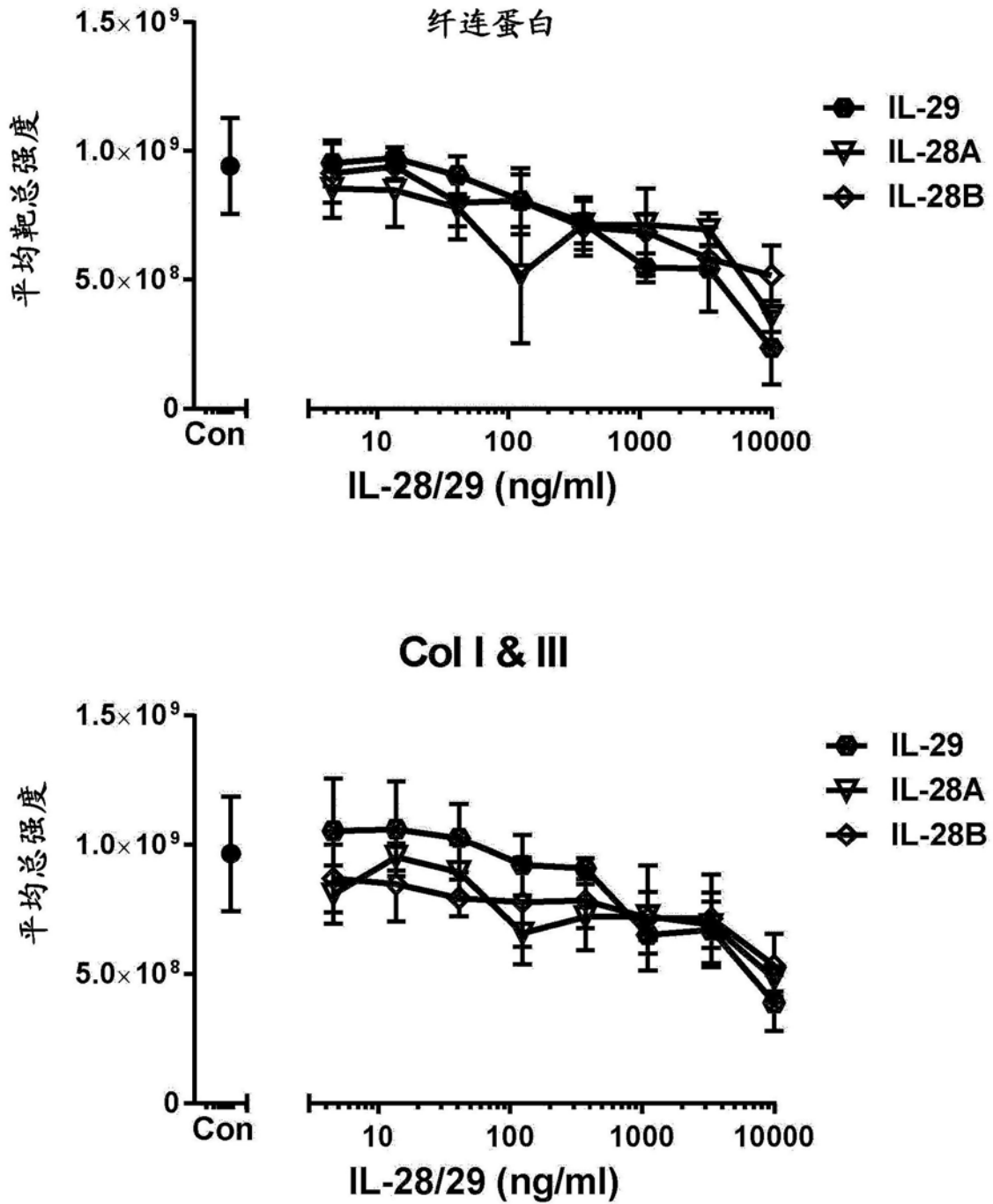


图14(c)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM中IL-28A、IL-28B和IL-29的效应及细胞活力-首先添加HRF

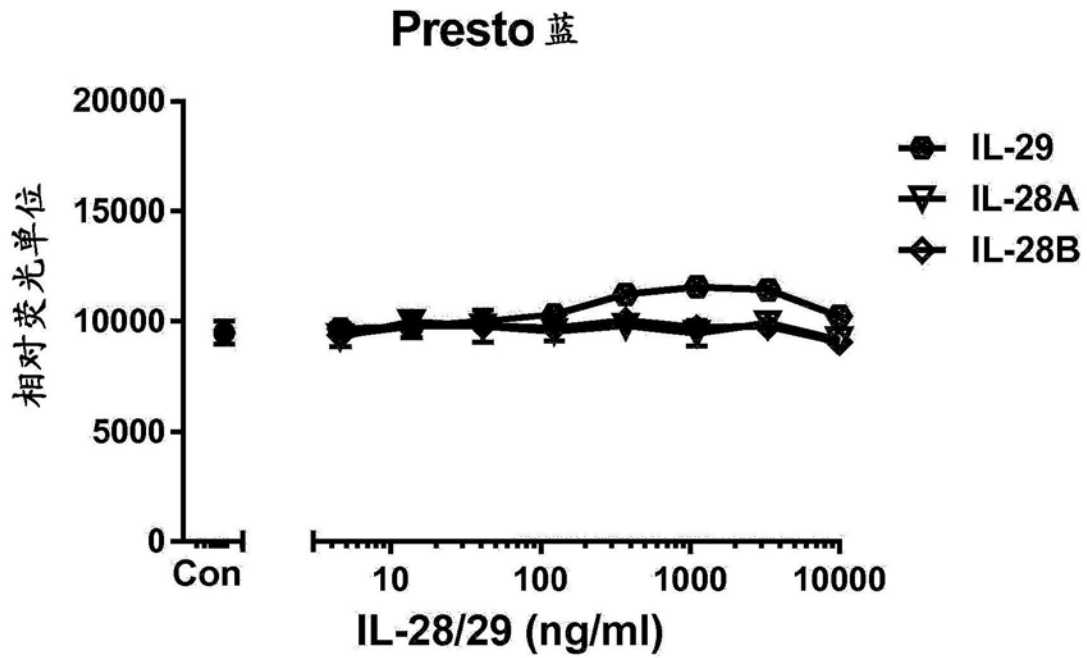


图14(c) (续)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养纤连蛋白中
IL-28A和IL-28B的效应上添加形式的比较

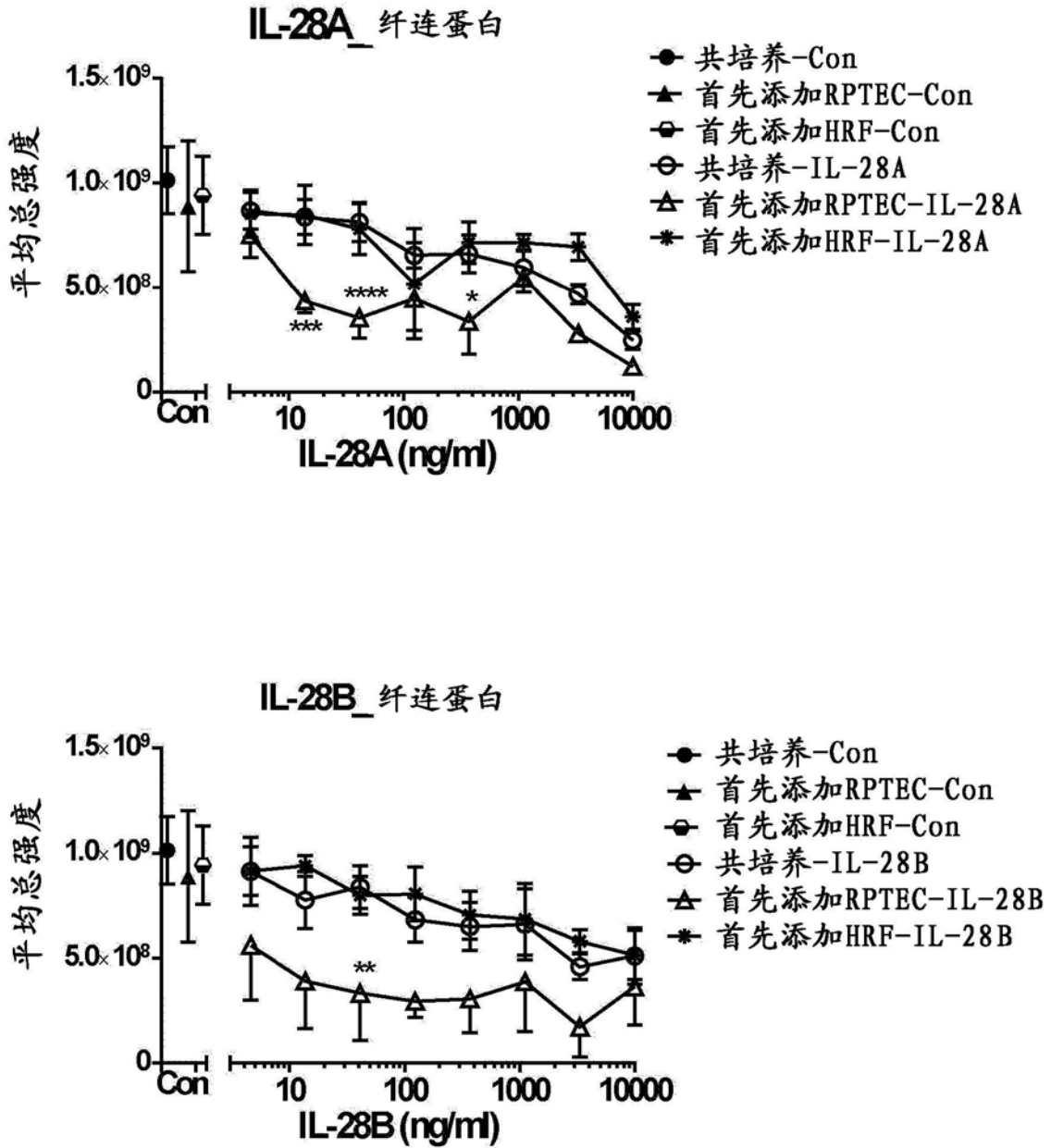


图15 (a)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养纤连蛋白中IL-29的效应上添加形式的比较

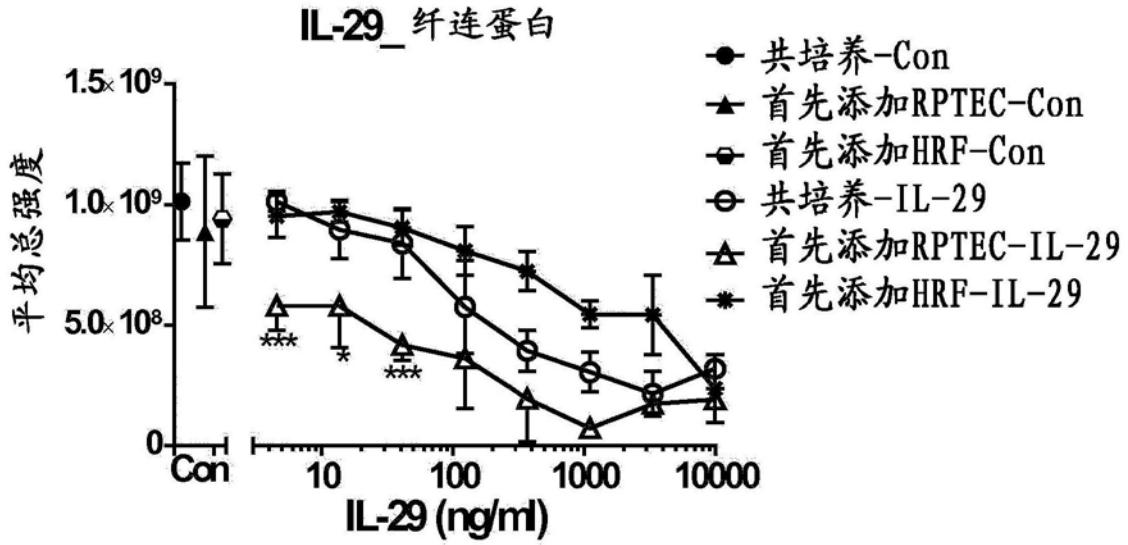


图15(a) (续)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养Co1 I&III中
IL-28A和IL-28B的效应上添加形式的比较

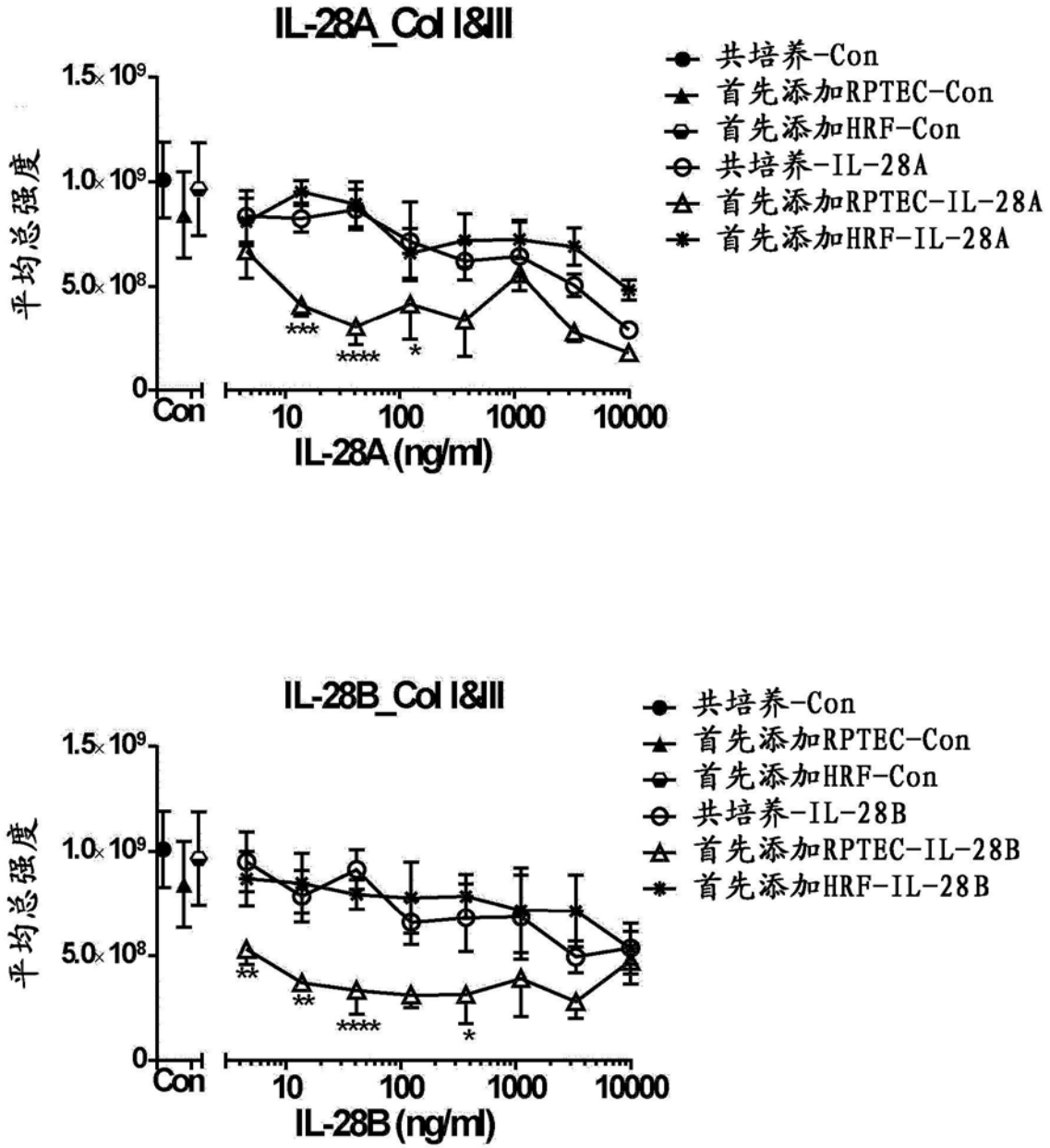


图15 (b)

肾RPTEC-成纤维细胞共培养Co1 I&III中
IL-29的效应上添加形式1的比较

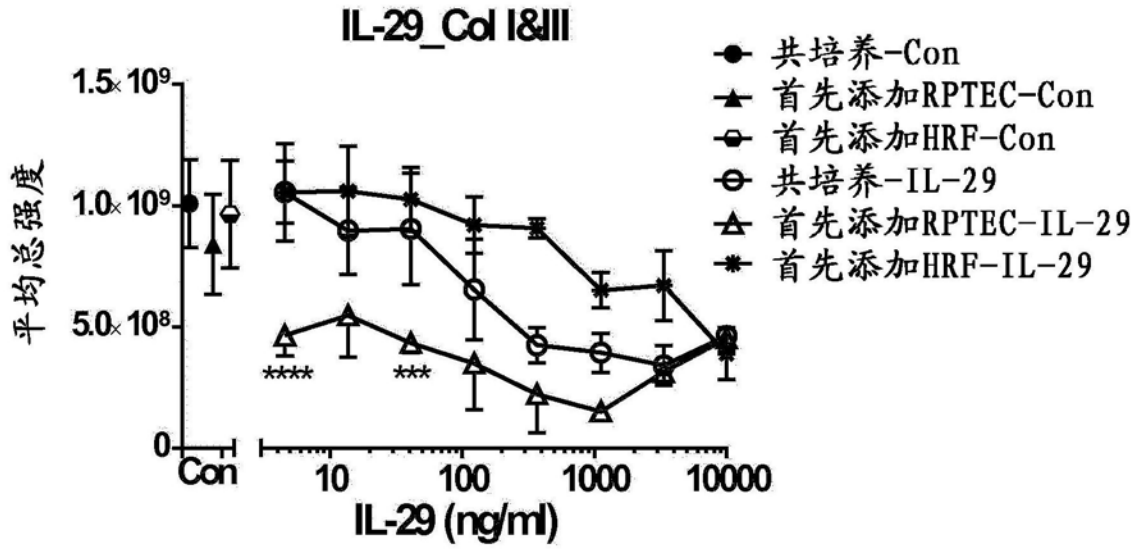


图15 (b) (续)

显示肾RPTEC-成纤维细胞共培养ECM中IL-28A、IL-28B和IL-29的效应的高含量图像

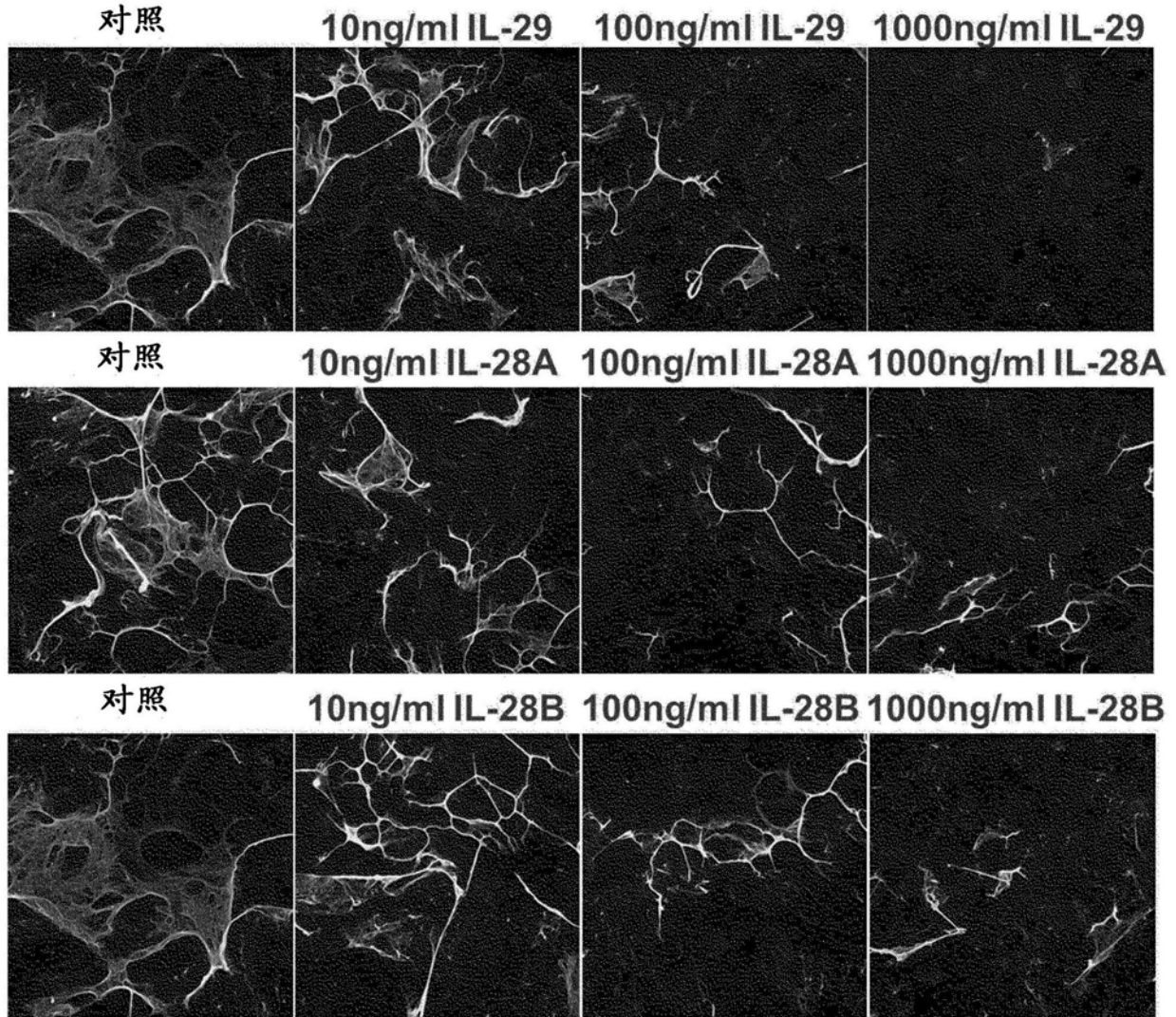


图16

肺SA上皮成纤维细胞共培养ECM中IL-28A和IL-28B的效应

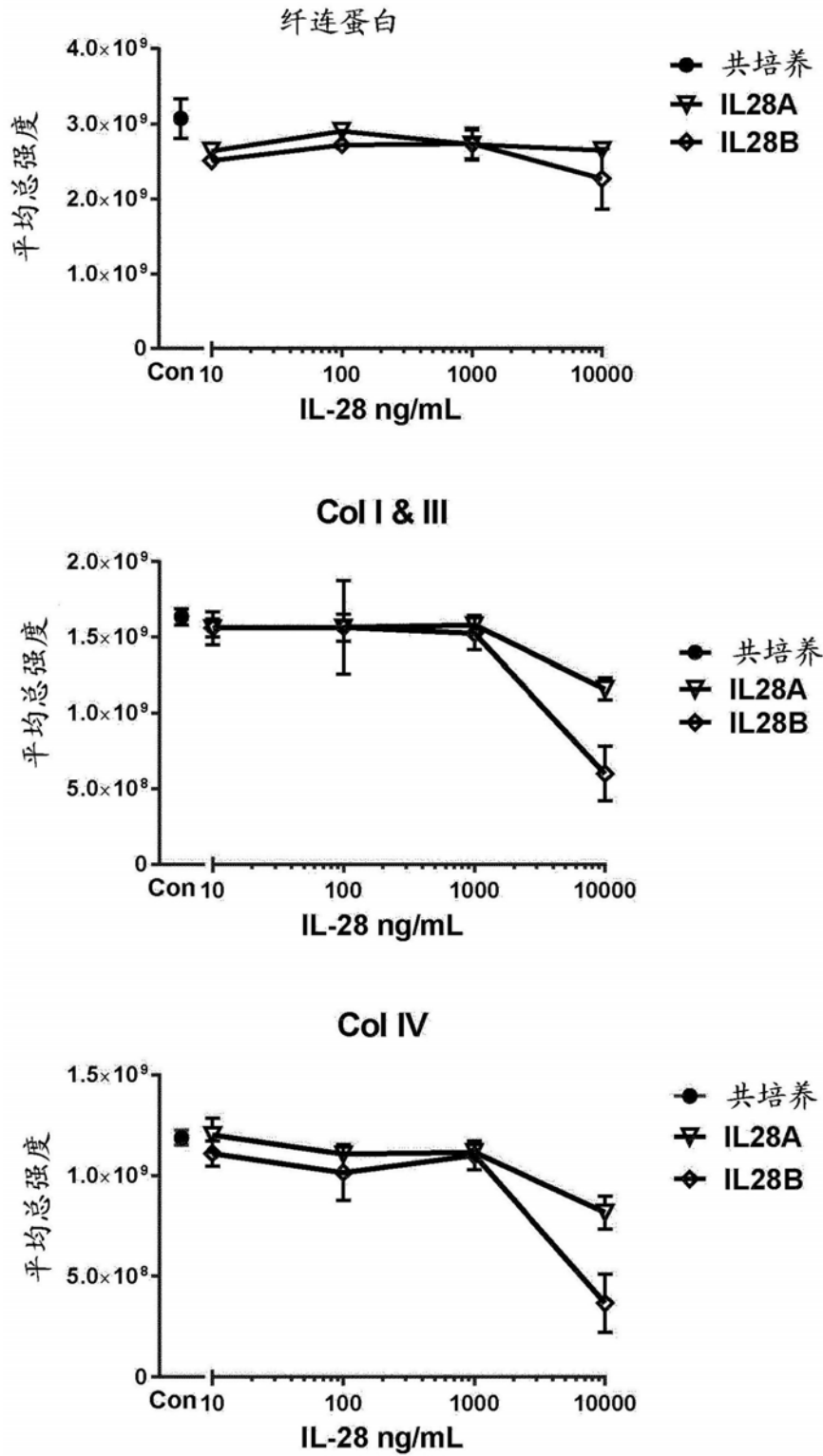


图17

肺SA上皮-成纤维细胞共培养ECM中
IL-28A和IL-28B的效应及细胞活力

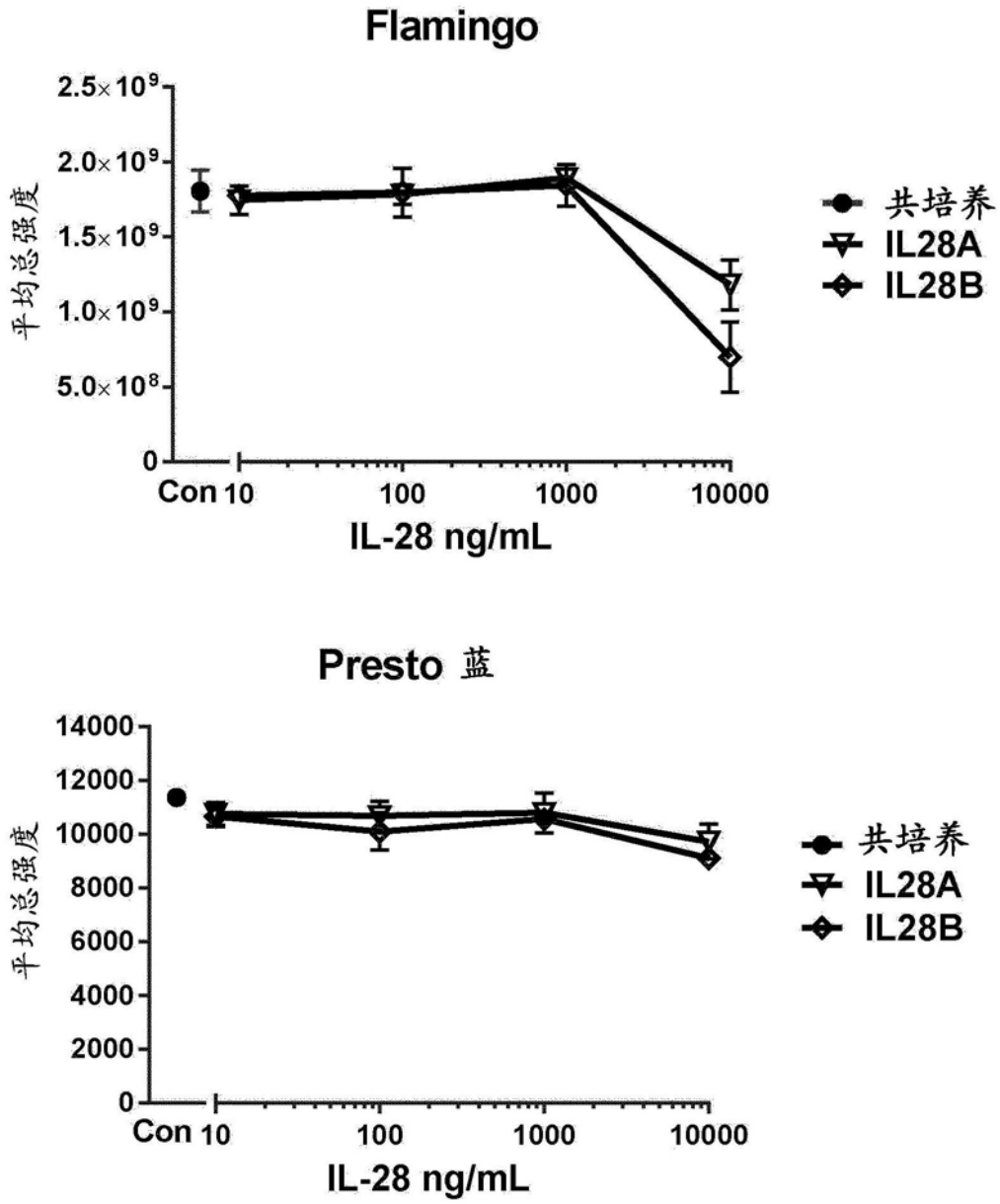


图17(续)

IFNL1, IFNL2, IFNL3和IFNL4的蛋白质和DNA序列**IFNL1****人蛋白质序列 (Uniprot IDQ8IU54)**

GPVPTSKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDLRLLQVRERPVALEAELALTLKYLE
AAAGPALEDVLDQPLHLHLHLSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLLHHLHRLQEAPKESAGCLEASVTFNLFRLLRDLKLVAD
GNLCRLTSTHPEST

IFNL1**人DNA序列 (NM_172140 DNA 含内含子)**

ORIGIN

```

1 aattaccttt tcaactttaca cacatcatct tggattgccc attttgcggtg gctaaaaagc
61 agagccatgc cgctggggaa gcagttgcca tttagccatg gctgcagctt ggaccgtggt
121 gctggtgact ttggtgctag gcttggccgt ggcaggccct gtccccactt ccaagcccac
181 cacaactggg aagggtgcc acattggcag gttcaaactc ctgtcaccac aggagctagc
241 gagcttcaag aaggccaggg acgccttgga agagtcactc aagctgaaaa actggagttg
301 cagctctcct gtcttccccg ggaattggga cctgaggctt ctccagggtga gggagcgcgc
361 tgtggccttg gaggctgagc tggccctgac gctgaaggtc ctggaggccg ctgctggccc
421 agccctggag gacgtcctag accagcccct tcacaccctg caccacatcc tctcccagct
481 ccaggcctgt atccagcctc agcccacagc agggcccagg ccccggggcc gcctccacca
541 ctggctgcac cggtccagg aggcccccaa aaaggagtcc gctggctgcc tggaggcatc
601 tgtaaccttc aacctcttcc gcctcctcac gogagacctc aaatatgtgg ccgatgggaa
661 cctgtgtctg agaacgtcaa cccaccctga gtccacctga cccccacac cttattttatg
721 cgtgagccc tactccttcc ttaattttatt tcctctcacc ctttattttat gaagctgocag
781 ccctgactga gacatagggc tgagttttatt gttttacttt tatacattat gcacaaataa
841 acaacaagga attgga

```

IFNL2**人蛋白质序列 (Uniprot ID Q8IZJ0)**

VPVARLHGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLKDCRCHSRFPRTWDLRQLQVRERPMALEAELALTLKVL
LEATADTDPALVDVLDQPLHLHLHLSQFRACIQPQPTAGPRTRGRLLHHLWLYRLQEAPKESPGCLEASVTFNLFRLLRDLNLC
VASGDLCV

IFNL2**人DNA序列 (NM_172138 DNA 含内含子)**

ORIGIN

```

1 tgggtgacag cctcagagtg tttcttctgc tgacaaagac cagagatcag gaatgaaact
61 agacatgact ggggactgca cgccagtgct ggtgctgatg gccgcagtgc tgaccgtgac
121 tggagcagtt cctgtcgcca ggctccacgg ggtctctccg gatgcaaggg gctgccacat
181 agcccagttc aagtccctgt ctccacagga gctgcaggcc tttagaggg ccaagatgc
241 cttagaagag tcgcttctgc tgaaggactg caggtgccac tcccgcctc tcccaggac
301 ctgggacctg aggcagctgc aggtgaggga gcgcccctat gctttggagg ctgagctggc
361 cctgacgctg aaggttctgg aggccaccgc tgacactgac ccagccctgg tggacgtctt
421 ggaccagccc cttcacacc tgcaccatat cctctcccag ttccgggct gtatccagcc
481 tcagcccacg gcagggccca ggaccgggg ccgcctcac cattggctgt accggctcca
541 ggaggcccca aaaaaggagt cccctggctg cctogaggcc tctgtcacct tcaacctctt
601 ccgcctctc acgcgagacc tgaattgtgt tgccagtggg gacctgtgtg tctgaccctc
661 ccaccagtca tgcaacctga gattttattt ataaattagc cacttgtctt aattttattg
721 caccagtgc ctat

```

图18

IFNL1, IFNL2, IFNL3和IFNL4的蛋白质和DNA序列**IFNL3 人蛋白质序列 (Uniprot ID Q8IZ19)**

VPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDCKCRSRLFPRTWDLRQLQ
 VRERPVALEAELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLH
 HWLHRLQEAPKKESPGCLEASVTFNLFRLLRDLNLCVASGDLCV

IFNL3 人DNA序列 (NM_172139 DNA 含内含子)

ORIGIN

```

1 ctgcattccc tcagctccct ttctctctgt gacacagaca tgaccgggga ctgcatgcca
61 gtgctggtgc tgatggccgc agtgetgacc gtgactggag cagttcctgt cgccaggctc
121 cgcgggggctc tcccggatgc aaggggctgc cacatagccc agttcaagtc cctgtctcca
181 caggagctgc aggcctttaa gagggccaaa gatgccttag aagagtcgct tctgctgaag
241 gactgcaagt gccgctcccc cctcttcccc aggacctggg acctgaggca gctgcaggtg
301 agggagcgcc ccgtggcttt ggaggetgag ctggccctga cgctgaaggt tctggaggcc
361 accgctgaca ctgaccacgc cctgggggat gtettggacc agcccctca caccctgcac
421 catatcctct cccagctccg ggcctgtatc cagcctcagc ccacggcagg gcccaggacc
481 cggggccgcc tccaccattg gctgcaccgg ctccaggagg ccccaaaaaa ggagtcccct
541 ggctgcctcg aggcctctgt caccttcaac ctcttccgcc tctcacgcg agacctgaat
601 tgtgttgcca gcggggacct gtgtgtctga ccttccgcc agtcatgcaa cctgag

```

IFNL4 人蛋白质序列 (Uniprot ID K9M1U5)

AAPRRCLLSHYRSLEPRTLAAAKALRDYEEEEALSWGQRNCSFRPRRDPPRPSSCARLRHVARG
 IADAQAVLSGLHRSELLPGAGPILELLAAAGRDVAACLELARPGSSRKVPGAQKRRHKPRRADSP
 RCRKASVFNLLRLLTWELRLAAHSGPCL

IFNL4人mRNA序列 (AFQ38559)

```

ATGCGGCCGAGTGTCTGGGCCGAGTGGCCGCGGGGCTGTGGGCCTGTGCACGGTGATC
GCAGCGGCCCCCGGCGCTGCCTGCTCTCGCACTACCGCTCGCTGGAGCCCCGGACGCTG
GCGGCTGCCAAGGCCTGAGGGACCGCTACGAGGAAGAGGCCTGAGCTGGGGGCAGCGC
AACTGCTCCTCCGCCCCAGGAGGGATCCTCCGCGGCCATCGTCCTGCGCTCGGCTCCGC
CACGTGCCCCGGGCATCGCGGACGCCAGGCAGTGCTCAGCGGCCTGCACCGCTCGGAG
CTGCTCCCCGGCGCCGGCCCCGATCCTGGAGTGCTGGCGGCCGCGGGGAGGGATGTGGCG
GCCTGCCTTGAAGTGGACGGCCAGGCTCCTCCAGGAAGGTCCCCGGGGCCAGAAGAGG
CGTCACAAACCCCGGAGAGCGGACTCGCTCGGTGCCGCAAAGCCAGCGTGGTCTTCAAC
CTCCTGCGCCTGCTCACGTGGGAGCTCCGGCTGGCTGCACACTCTGGGCCTTGCCTCTGA

```

图18 (续)

体外人肝星状和上皮细胞共培养肝纤维化模型中
IL-28A和IL-29的效应

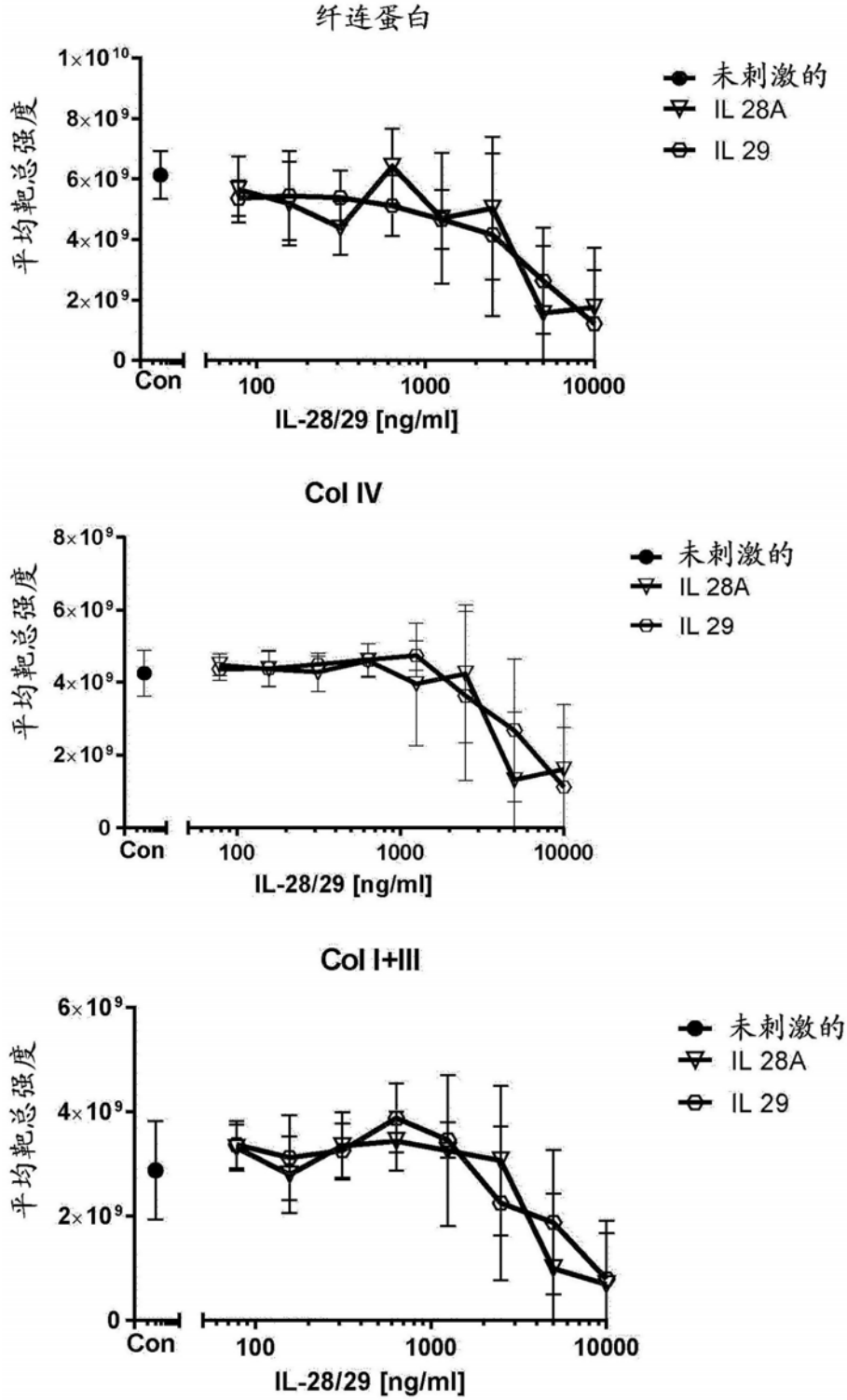


图19

体外3D肾小球球体肾小球硬化模型中
IL-28A对足细胞存活的影响

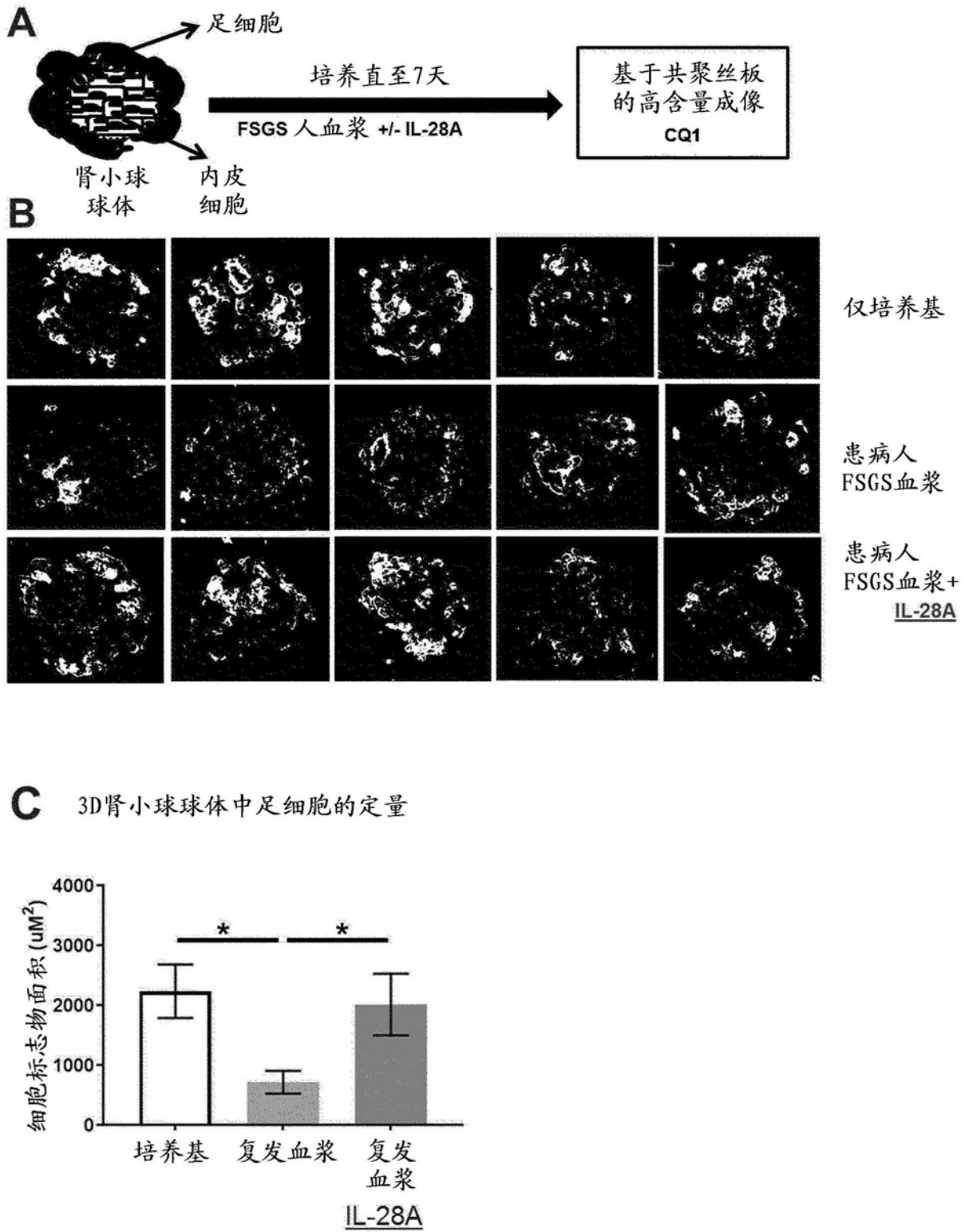


图20

小鼠IL-28B的水动力转染防止小鼠单侧
输尿管梗阻(UUO)肾纤维化模型中的纤维化

A 来自IL-28B处理的小鼠的小鼠纤维化肾的PSR染色

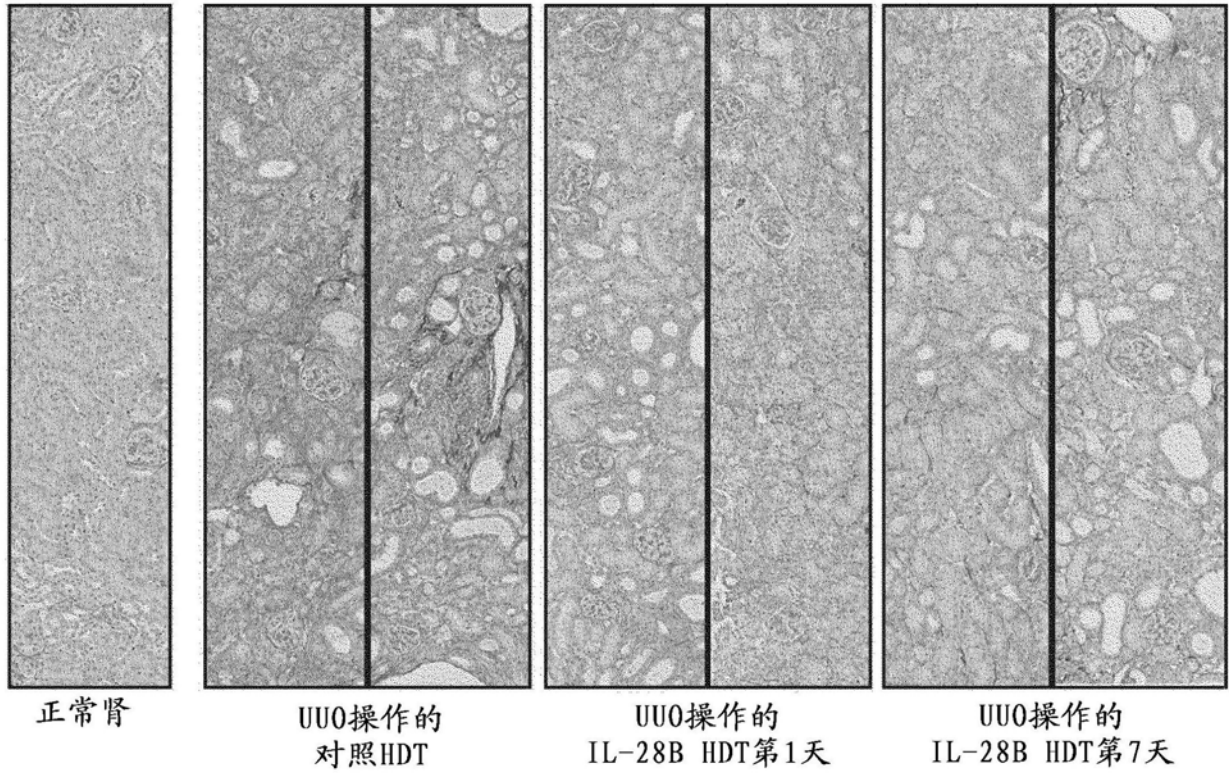


图21

小鼠IL-28B的水动力转染防止小鼠单侧
输尿管梗阻肾纤维化模型中的纤维化

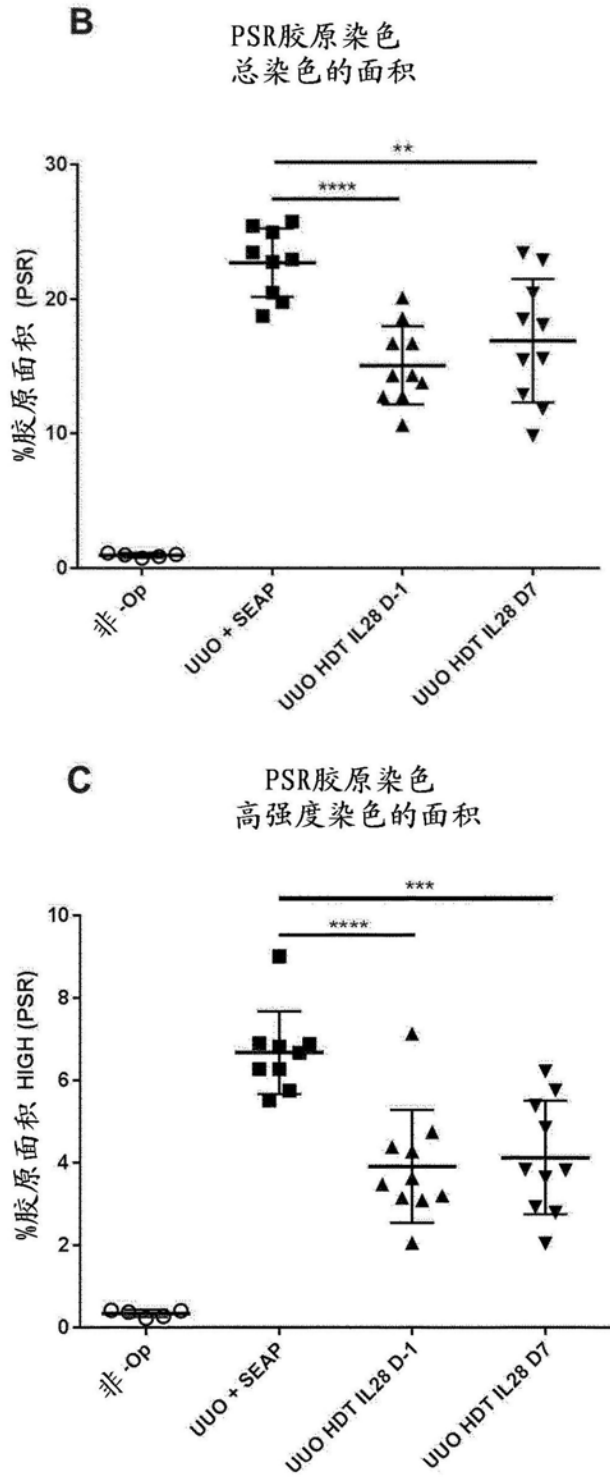


图21

IL-29在肾纤维化的体外人肾近端小管上皮细胞单培养模型中的作用

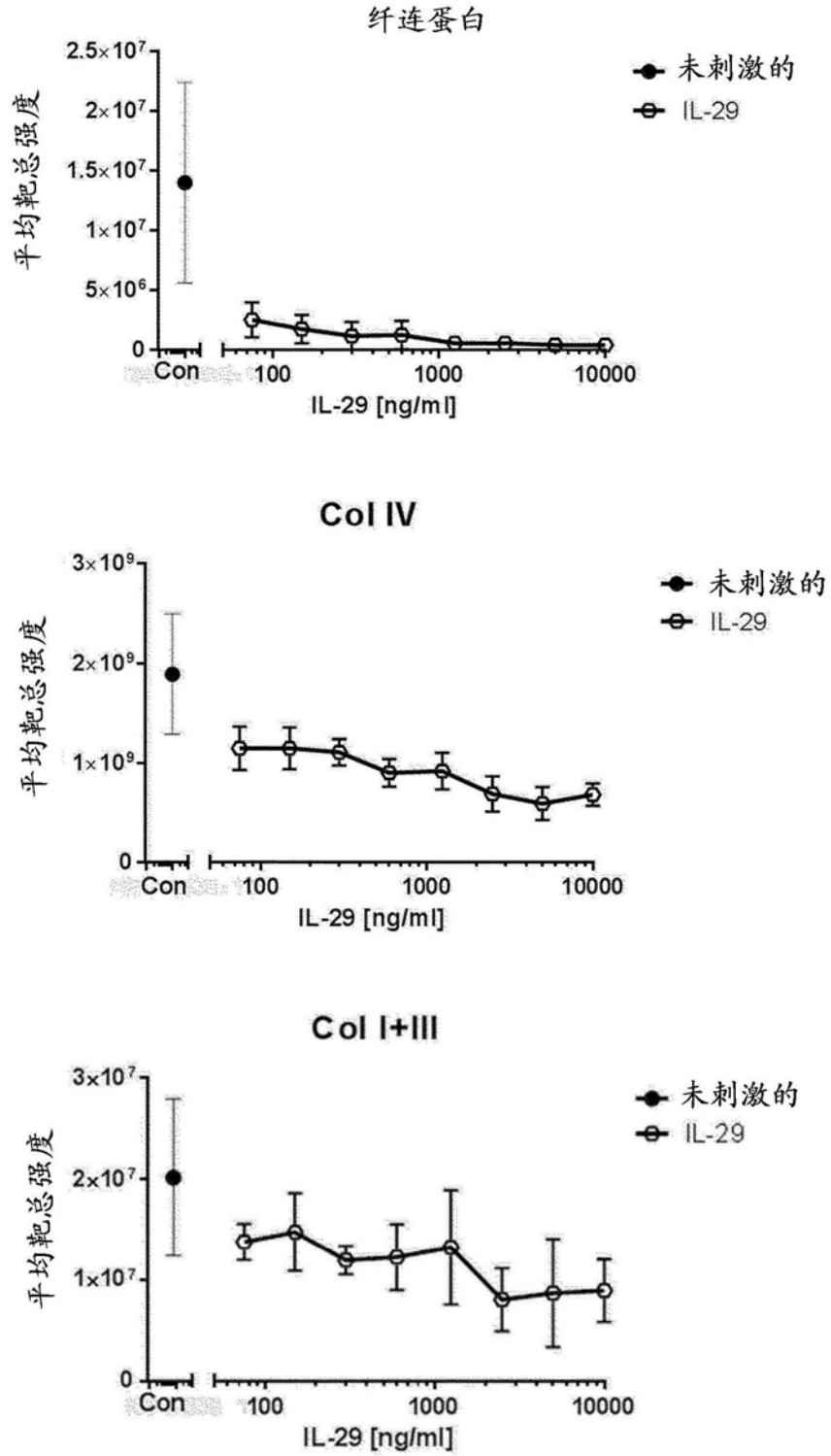


图22

水动力转染人IL-29在小鼠单侧输尿管梗阻(UUO)肾纤维化模型中防止纤维化

来自IL-29处理小鼠的小鼠纤维化肾的PSR染色

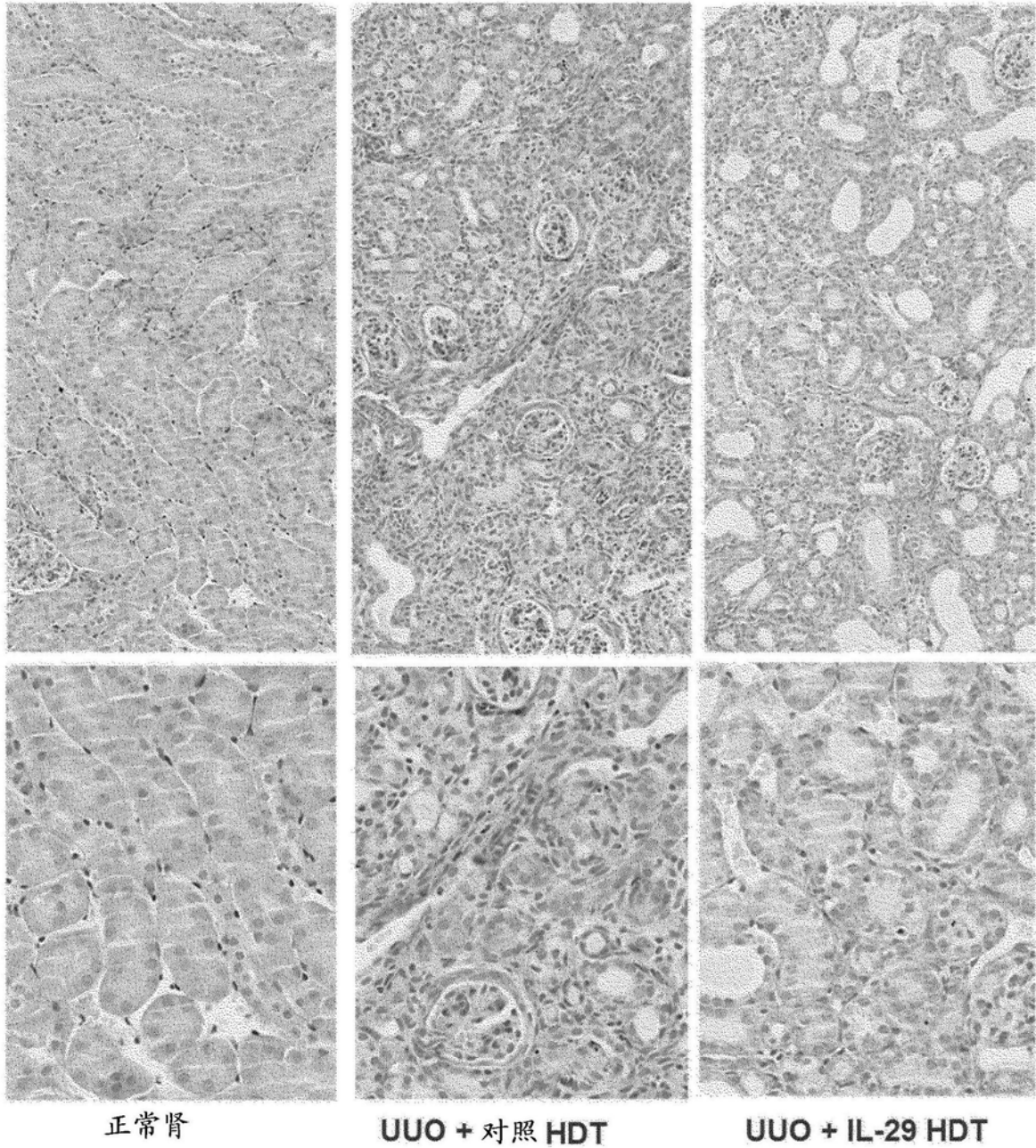


图23 (b)

水动力转染人IL-29在小鼠单侧输尿管梗阻(UUO)肾纤维化模型中防止纤维化

PSR染色的胶原

总染色的面积

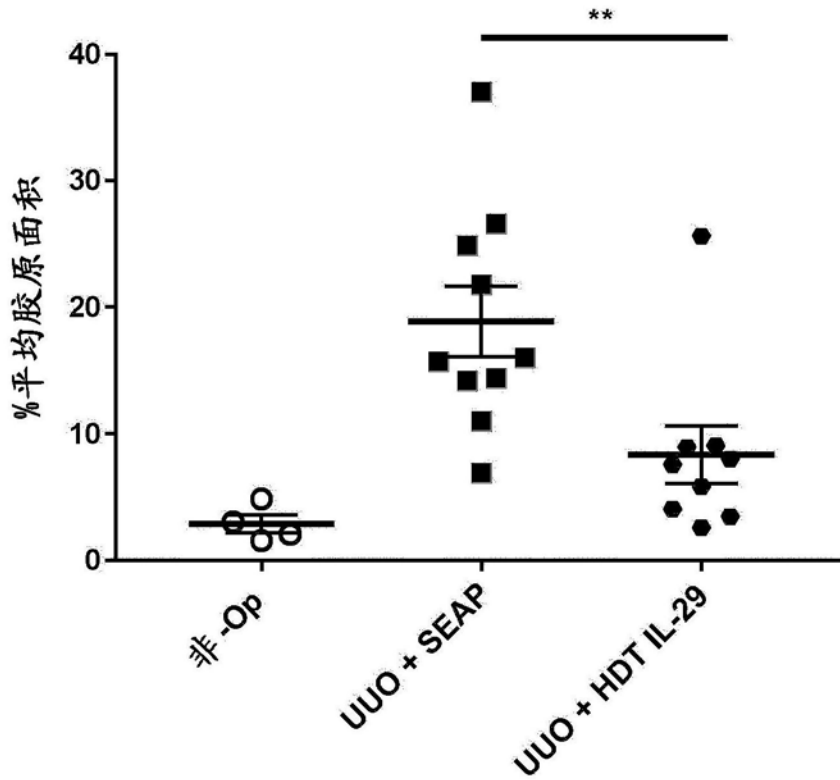


图23 (c)