



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120305401 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 15

(21) 申请号 202411435476.8

(22) 申请日 2019.10.18

(30) 优先权数据

62/747,903 2018.10.19 US

(62) 分案原申请数据

201980083971.8 2019.10.18

(71) 申请人 总医院公司

地址 美国

(72) 发明人 M·Y·崔

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

专利代理师 李茂家 闫俊萍

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书73页

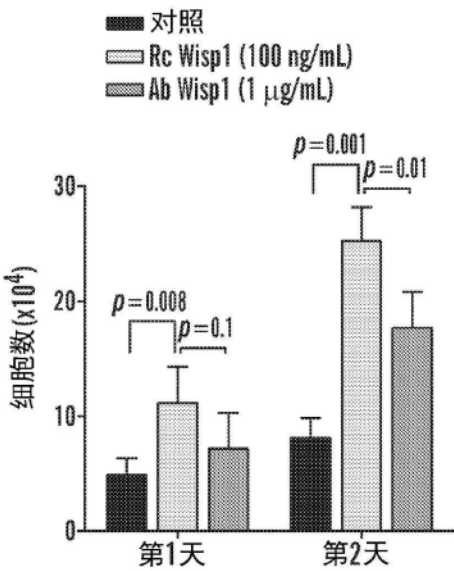
序列表(电子公布) 附图34页

(54) 发明名称

用于肝病的治疗的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于肝病的治疗的组合物和方法。本文描述了用于治疗肝病的方法和组合物。本发明的方面涉及向受试者施用抑制WISP1的试剂。本发明的另一方面涉及向受试者施用表达抑制WISP1的试剂的HSC。



1. 一种用于治疗或预防肝病的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述肝病选自由以下组成的组:阿拉吉欧综合征;酒精相关性肝病; α 1抗胰蛋白酶缺乏症;自身免疫性肝炎;良性肝肿瘤;胆道闭锁;肝硬化;克里格勒-纳贾尔综合征;半乳糖血症;吉尔伯特综合征;血色素沉着症;肝性脑病;甲型肝炎;乙型肝炎;丙型肝炎;肝肾综合征;妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP);溶酶体酸性脂肪酶缺乏症(LAL-D);肝囊肿;肝癌;新生儿黄疸;非酒精性脂肪肝病;非酒精性脂肪性肝炎;原发性胆汁性胆管炎(PBC);原发性硬化性胆管炎(PSC);进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC);瑞氏综合征;I型糖原贮积症;硬皮病;和威尔逊氏病。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述WISP1是选自由以下组成的组的剪接变体:WISP1v、WISP1vx、和WISP1 δ 外显子3-4。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO: 1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中WISP1在靶细胞中受到抑制。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶细胞为哺乳动物细胞。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶细胞为肝星状细胞、成纤维细胞、或肌成纤维细胞。

9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述肝星状细胞为静止的。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂通过直接注射、静脉内递送、皮下注射、肌肉注射、经皮、口服或经鼻给药来施用。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中抑制WISP1是抑制WISP1活性或降低WISP1蛋白水平。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中与合适的对照相比,WISP1的所述活性被抑制至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中与合适的对照相比,WISP1的所述水平被降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。

14. 一种组合物,其包括抑制WISP1的抗体或抗体药剂、和药学上可接受的载体。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。

16. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO: 1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。

17. 根据权利要求14所述的组合物,其中配制所述组合物用于治疗或预防肝病。

18. 一种治疗受试者的肝病的方法,所述方法包括:

a. 检测受试者的生物样品中的WISP1和/或Acta2、Colla1的水平;

b. 将(a)的测定结果与参考水平比较;

c. 将(a)中与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Acta2、Colla1的受试者鉴定为患有肝病;和

- d. 向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。
19. 根据权利要求18所述的方法, 其还包括在 (a) 之前从所述受试者获得生物样品。
20. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述肝病为原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝炎、或硬皮病。
21. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述生物样品为血液样品、组织、血沉棕黄层、血清、或组织。
22. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自以下组成的组: mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。
23. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO: 1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。
24. 一种用于治疗或预防肝病的方法, 所述方法包括: 向有需要的受试者施用抑制WISP1的试剂。
25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述肝病选自以下组成的组: 原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝炎、和硬皮病。
26. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述WISP1是选自以下组成的组的剪接变体: WISP1v、WISP1vx、和WISP1 δ 外显子3-4。
27. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述抑制WISP1的试剂选自以下组成的组: 小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。
28. 根据权利要求27所述的方法, 其中微小RNA是微小RNA15a或miRNA412。
29. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自以下组成的组: mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。
30. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO: 1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。
31. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述试剂通过直接注射、皮下注射、肌肉注射、或经鼻给药来施用。
32. 根据权利要求24所述的方法, 其中抑制WISP1是抑制WISP1活性或降低WISP1蛋白水平。
33. 根据权利要求32所述的方法, 其中与合适的对照相比, WISP1的所述活性被抑制至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。
34. 根据权利要求32所述的方法, 其中与合适的对照相比, WISP1的所述水平被降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。
35. 根据权利要求24所述的方法, 其中WISP1在靶细胞中受到抑制。
36. 一种组合物, 其包括抑制WISP1的试剂、和药学上可接受的载体。
37. 根据权利要求36所述的组合物, 其中所述抑制WISP1的试剂选自以下组成的组: 小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。
38. 根据权利要求37所述的组合物, 其中微小RNA是微小RNA15a或miRNA412。
39. 一种治疗受试者的肝病的方法, 所述方法包括:
- a. 检测受试者的生物样品中的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的水平;
- b. 将 (a) 的测定结果与参考水平比较;

c. 将(a)中与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Col1a1、Acta2的受试者鉴定为患有肝病;和

d. 向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的试剂。

40. 根据权利要求39所述的方法,其还包括在(a)之前从所述受试者获得生物样品。

41. 根据权利要求39所述的方法,其中所述肝病为原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝炎、或硬皮病。

42. 根据权利要求39所述的方法,其中所述生物样品为血液样品、组织、血沉棕黄层、血清、或组织。

43. 根据权利要求39所述的方法,其中所述抑制WISP1的试剂选自由以下组成的组:小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中微小RNA是微小RNA15a或miRNA412。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中所述抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。

46. 根据权利要求43所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。

47. 一种产生表达抑制WISP1的试剂的工程化肝星状细胞或其群体的方法,所述方法包括:使所述细胞与抑制WISP1的试剂相接触,并培养所述细胞足够时间来允许所述试剂的表达。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述细胞为静止的。

49. 根据权利要求47所述的方法,其中所述接触包括使所述细胞与试剂或编码所述试剂的载体相接触。

50. 根据权利要求47所述的方法,其中所述接触包括转导、核转染、电穿孔、直接注射、和/或转染。

51. 根据权利要求47所述的方法,其中所述抑制WISP1的试剂选自由以下组成的组:小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中微小RNA是微小RNA15a或miRNA412。

53. 根据权利要求51所述的方法,其中所述抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。

54. 根据权利要求51所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。

55. 一种细胞系,其包括通过根据权利要求47-54中任一项所述的方法产生的肝星状细胞。

56. 一种药物组合物,其包括通过根据权利要求47-54中任一项所述的方法产生的肝星状细胞或其群体、和药学上可接受的载体。

57. 一种治疗或预防肝病的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用通过根据权利要求47-54中任一项所述的方法产生的细胞、根据权利要求55所述的细胞、或根据权利要求56所述的药物组合物。

58. 一种降低受试者的纤维化的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用通过根据权利要求47-54中任一项所述的方法产生的细胞、根据权利要求55所述的细胞、或根据权利要求

要求56所述的药物组合物。

59.一种治疗受试者的肝病的方法,所述方法包括:

a.接受将与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Acta2、或Colla1的受试者鉴定为患有肝病的检验的结果;和

b.向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

60.一种治疗受试者的肝病的方法,所述方法包括:

a.接受将与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的受试者鉴定为患有肝病的检验的结果;和

b.向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的试剂药剂。

用于肝病的治疗的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日2019年10月18日、申请号为201980083971.8 (国际申请号PCT/US2019/056910)的专利申请“用于肝病的治疗的组合物和方法”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35U.S.C. §119 (e) 要求2018年10月19日提交的美国临时申请No. 62/747,903的权益,其内容通过引用以其整体结合在此。

技术领域

[0004] 本发明的领域涉及肝病的治疗。

背景技术

[0005] 肝脏是过滤代谢物、合成蛋白质的非常重要的器官,并且可产生消化所需的生化物质(biochemical)。具体地,肝脏产生胆汁以分解脂肪并乳化脂质。慢性进行性肝病可导致肝脏中的胆管的进行性破坏,其可导致胆汁积聚、严重的炎症、瘢痕化、和纤维化。当瘢痕组织替代健康肝脏组织时,肝脏功能变得愈发受损。对于一些肝病(例如,原发性胆汁性胆管炎(PBC)),仅有一种药物,熊去氧胆酸(UDCA),可改善存活率。不幸地,约40%的UDCA治疗的患者显示对治疗不充分的响应。因此,对于例如PBC等肝病的治疗需要更有效的疗法。

发明内容

[0006] 本文所描述的发明部分地涉及以下发现:由miRNA-15a、miRNA-412、和抗WISP1抗体对WISP1的抑制在激活的肝星状细胞(HSC)中诱导静止,所述肝星状细胞是在肝的纤维化进展中起到中心作用的细胞类型。本文还示出miR-15a和WISP1 IgG可直接靶向WISP1以抑制激活的HSC中的蛋白质的促纤维化功能。

[0007] 因此,本文所描述的一方面是一种用于治疗或预防肝病的方法,其包括向有需要的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

[0008] 在任何方面的一个实施方案中,所述肝病选自由以下组成的组:阿拉吉欧综合征;酒精相关性肝病; α 1抗胰蛋白酶缺乏症;自身免疫性肝炎;良性肝肿瘤;胆道闭锁;肝硬化;克里格勒-纳贾尔综合征;半乳糖血症;吉尔伯特综合征;血色素沉着症;肝性脑病;甲型肝炎;乙型肝炎;丙型肝炎;肝肾综合征;妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP);溶酶体酸性脂肪酶缺乏症(LAL-D);肝囊肿;肝癌;新生儿黄疸;非酒精性脂肪肝病;非酒精性脂肪性肝炎;原发性胆汁性胆管炎(PBC);原发性硬化性胆管炎(PSC);进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC);瑞氏综合征;I型糖原贮积症;硬皮病;和威尔逊氏病。

[0009] 在任何方面的一个实施方案中,WISP1是选自由以下组成的组的剪接变体:WISP1v、WISP1vx、和WISP1 δ 外显子3-4。

[0010] 在任何方面的一个实施方案中,抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。

[0011] 在任何方面的一个实施方案中,抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、

6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。

[0012] 在任何方面的一个实施方案中,受试者为哺乳动物。

[0013] 在任何方面的一个实施方案中,WISP1在靶细胞中受到抑制。在任何方面的一个实施方案中,靶细胞为哺乳动物细胞。在任何方面的一个实施方案中,靶细胞为肝星状细胞、成纤维细胞、或肌成纤维细胞。在任何方面的一个实施方案中,肝星状细胞为静止的(quiescent)。

[0014] 在任何方面的一个实施方案中,抗体或抗体药剂通过直接注射、皮下注射、肌肉注射、口服、经皮或经鼻给药来施用。

[0015] 在任何方面的一个实施方案中,抑制WISP1是抑制WISP1活性或降低WISP1蛋白水平。在任何方面的一个实施方案中,与合适的对照相比,WISP1的活性被抑制至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。在任何方面的一个实施方案中,与合适的对照相比,WISP1的水平被降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。

[0016] 本文所描述的另一方面提供一种组合物,其包括抑制WISP1的抗体或抗体药剂、和药学上可接受的载体。

[0017] 在任何方面的一个实施方案中,配制组合物用于治疗或预防肝病。

[0018] 本文所描述的另一方面提供一种治疗受试者的肝病的方法,所述方法包括:(a)检测受试者的生物样品中的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的水平;(b)将(a)的测定结果与参考水平比较;(c)将(a)中与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的受试者鉴定为患有肝病;和(d)向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

[0019] 在任何方面的一个实施方案中,所述方法还包括在(a)之前从所述受试者获得生物样品。

[0020] 在任何方面的一个实施方案中,生物样品为血液样品、组织、血沉棕黄层、血清、或组织。

[0021] 本文所描述的仍另一方面提供一种用于治疗或预防肝病的方法,其包括向有需要的受试者施用抑制WISP1的试剂。

[0022] 在任何方面的一个实施方案中,抑制WISP1的试剂选自由以下组成的组:小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、lncRNA、mRNA和siRNA。在任何方面的一个实施方案中,微小RNA是miRNA15a或miRNA412。

[0023] 在任何方面的一个实施方案中,试剂通过直接注射、皮下注射、肌肉注射、口服、经皮或经鼻给药来施用。

[0024] 本文所描述的另一方面提供一种组合物,其包括抑制WISP1的试剂、和药学上可接受的载体。

[0025] 本文所描述的另一方面提供一种治疗受试者的肝病的方法,包括(a)检测受试者的生物样品中的WISP1和/或Acta2的水平;(b)将(a)的测定结果与参考水平比较;(c)将(a)中与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Acta2的受试者鉴定为患有肝病;和(d)向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的试剂。

[0026] 本文所描述的仍另一方面提供一种产生表达抑制WISP1的试剂的工程化肝星状细胞或其群体的方法,包括使所述细胞与抑制WISP1的试剂相接触,和培养所述细胞足够时间以允许试剂的表达。

[0027] 在任何方面的一个实施方案中,其中所述细胞为静止的。

[0028] 在任何方面的一个实施方案中,所述接触包括使细胞与试剂或编码所述试剂的载体相接触。在任何方面的一个实施方案中,所述接触包括转导、核转染、电穿孔、直接注射、和/或转染。

[0029] 本文所描述的另一方面提供一种细胞系,其包括通过任何本文所描述的方法产生的肝星状细胞。

[0030] 本文所描述的另一方面提供一种药物组合物,其包括通过任何本文所描述的方法产生的肝星状细胞或其群体、和药学上可接受的载体。

[0031] 本文所描述的另一方面提供一种治疗或预防肝病的方法,其包括向有需要的受试者施用通过任何本文所描述的方法产生的细胞、任何本文所描述的产生的细胞、或任何包括本文所描述的产生的细胞的药物组合物。

[0032] 本文所描述的另一方面提供一种降低受试者的纤维化的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用通过任何本文所描述的方法产生的细胞、任何本文所描述的产生的细胞、或任何包括本文所描述的产生的细胞的药物组合物。

[0033] 本文提供的另一方面是一种治疗受试者的肝病的方法,其包括(a)接受将与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Acta2水平(例如,mRNA、miRNA、蛋白水平等)的受试者鉴定为患有肝病的检验的结果;和(b)向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

[0034] 本文提供的另一方面是一种治疗受试者的肝病的方法,包括(a)接受将与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Acta2水平的受试者鉴定为患有肝病的检验的结果;和(b)向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的试剂药剂。

[0035] 定义

[0036] 为了方便起见,以下提供用于说明书、实施例、和所附权利要求中的一些术语和短语的含义。除非另外指出、或从上下文中暗示,否则以下术语和短语包括以下提供的含义。提供定义以帮助描述具体实施方案,并且不旨在限制所要求保护的技术,因为技术范围仅受到权利要求的限制。除非另外指出,否则本文所用的全部技术和科学术语具有与本技术所属技术领域的普通技术人员通常所理解含义相同的含义。如果术语在本领域中的用法与其在本文中提供的定义之间明显矛盾,说明书中提供的定义将占主导。

[0037] 免疫学和分子生物学中的常规术语的定义可见于:The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第19版,由Merck Sharp&Dohme Corp.出版,2011(ISBN 978-0-911910-19-3);Robert S.Porter等人(编辑),The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,由Blackwell Science Ltd.出版,1999-2012(ISBN 9783527600908);和Robert A.Meyers(编辑),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Immunology by Werner Luttmann,由Elsevier出版,2006;Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver(编辑),Taylor&Francis Limited,2014(ISBN 0815345305,9780815345305);Lewin's Genes XI,由Jones&Bartlett Publishers出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green和Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(2012)(ISBN 1936113414);Davis等人,Basic Methods in

Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (编辑) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (编辑), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (编辑), John Wiley and Sons, Inc., 2005; 和 Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADAM Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (编辑) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737), 其内容通过引用以其整体结合在此。

[0038] 如本文所用, 术语“治疗”(“treat”、“treatment”、“treating”)或“改善”是指疗法治疗, 其中目的为逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止与例如肝纤维化等肝病相关的病况的进展或严重程度。术语“治疗”包括降低或减轻肝病的至少一种不利影响或症状, 例如黄疸、静脉曲张出血、纤维化减少、瘢痕化和腹水。如果一种或多种症状或临床标志物降低, 治疗通常为“有效的”。可选地, 如果疾病的进展降低或停止, 治疗为“有效的”。即, “治疗”不仅包括症状或标志物的改善, 还包括与缺乏治疗时所预期的相比, 症状的进展或恶化的中止、或至少减慢或逆转。有益的或期望的临床结果包括但不限于, 一种或多种症状的减轻、疾病程度的缩减、疾病的稳定(即, 不恶化)状态、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和、缓解(部分地或总体地)、和/或降低的死亡率, 无论是可检测的或不可检测的。术语疾病的“治疗”还包括提供疾病的症状或副作用的缓解(包括姑息疗法)。

[0039] 如本文所用, “预防”(“preventing”)或“防止”(“prevention”)是指由于方法学的作用(例如, 如本文所描述的组合物施用)而不发生疾病状态的任何方法学。在一方面, 理解的是预防还可意味着疾病未达到未治疗对照中发生的程度。因此, 疾病的预防包括相对于未治疗的受试者(例如, 未用本文所描述的方法或组合物治疗的受试者), 受试者可发展疾病的可能性的降低。

[0040] 如本文所用, 术语“施用”和“注射”可在通过导致引入的细胞或试剂至少部分地定位在例如肝或其区域等期望位置处使得产生期望的效果(一种或多种)(例如, 降低的WISP1水平或活性)的方法或途径、在将例如本文所描述的肝星状细胞或试剂等细胞放置于受试者的背景下交换使用。本文所描述的试剂或细胞可通过导致递送至受试者中期望的位置的任何合适的途径来施用, 在期望的位置处至少部分所递送的试剂、细胞、或细胞的组分维持存活。在施用至受试者后, 细胞的存活期可短至几小时, 例如24小时, 至几天, 长至几年, 即长期。在一些实施方案中, 术语“施用”是指施用包括一种或多种试剂或细胞的药物组合物。施用可通过直接注射(例如, 直接施用至靶细胞)、皮下注射、肌肉注射、口服、或经鼻递送至有需要的受试者来完成。施用可以是局部的或系统的。

[0041] 术语“患者”、“受试者”、和“个体”可在本文中交换使用, 并且是指向其提供包括预防性治疗的治疗的动物, 特别是人。本文所用的术语“受试者”是指人和非人动物。术语“非人动物”和“非人哺乳动物”可在本文中交换使用, 包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物, 诸如非人灵长类动物、(特别地高等灵长类动物)、绵羊、狗、啮齿类动物(例如小鼠或大鼠)、豚鼠、山羊、猪、猫、兔、牛, 和非哺乳动物, 诸如鸡、两栖动物、爬行动物等。在一个实施方案中, 受试者为人。在另一个实施方案中, 受试者为实验动物或作为疾病模型的动物替代者。在另

一个实施方案中,受试者为包括伴侣动物(例如,狗、猫、大鼠、豚鼠、仓鼠等)的家养动物。受试者可先前已接受针对肝病的治疗、或从未接受过针对肝病的治疗。受试者可先前已被诊断为患有肝病、或从未诊断为患有肝病。

[0042] 所有本文所用的术语“减少”、“降低的”、“降低”、或“抑制”是指性质、水平、或其它参数以统计学上显著的量的减少或减小。在一些实施方案中,“降低的”、“降低”或“减少”或“抑制”通常是指与参考水平(例如,缺少给定的治疗)相比减少至少10%,并且可包括,例如,减少至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或更多。如本文所用,“降低”或“抑制”不包括与参考水平相比完全抑制或降低。“完全抑制”是与参考水平相比100%抑制。减少可优选低至作为对于无给定病症的个体的正常范围内所接受的水平。例如,抑制WISP1是抑制WISP1活性或降低WISP1蛋白水平。

[0043] 所有本文所用的术语“增加的”、“增加”或“增强”或“激活”通常是指性质、水平、或其它参数以统计学上显著的量的增加;为了避免任何疑问,术语“增加的”、“增加”或“增强”或“激活”是指与参考水平相比增加至少10%,例如,与参考水平相比,增加至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或多达和包括100%增加或10-100%之间的任何增加,或与参考水平相比至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍增加、至少约20倍增加、至少约50倍增加、至少约100倍增加、至少约1000倍增加或更多。

[0044] 如本文所用,“参考水平”是指正常、其它方面未受影响的细胞群体或组织(例如,获自健康受试者的生物样品、或在先前时间点获自受试者的生物样品,例如,在被诊断为患有肝病前获自患者的生物样品、或不与本文所公开的试剂或组合物接触的生物样品)。

[0045] 如本文所用,“合适的对照”是指未处理的、其它方面相同的细胞或群体(例如,不与本文所描述的试剂或组合物接触的生物样品,或不以相同方式接触,例如与非对照细胞相比,持续不同的持续时间)。

[0046] 术语“药学上可接受的”可指可在无异常毒性的情况下施用至受试者(例如,哺乳动物或人)的化合物和组合物。

[0047] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”可包括当与活性成分组合时允许成分保持生物活性并且与受试者的免疫系统不反应的任何材料或物质。实例包括但不限于,例如磷酸盐缓冲盐水溶液等任何标准药物载体、例如油/水乳液等乳液、和各种湿润剂。术语“药学上可接受的载体”不包括组织培养基。药物载体的非限制性实例包括例如纳米颗粒、微粒、脂质体、聚合物微球、或聚合物-药物缀合物等颗粒或聚合物基运载体。

[0048] 如本文所用,术语“WNT1诱导信号通路蛋白1”或“WISP1”或“CCN4”是由WISP1基因编码的基质细胞蛋白,具有许多不同细胞功能,包括细胞粘附、迁移、增殖、分化、和存活。在肝中,WISP1由肝星状细胞(HSC)分泌,它们激活成为肌成纤维细胞。通过自分泌系统,WISP1还通过加速胶原的激活和分泌以促进纤维化来影响HSC。WISP1(也称为CCN4、WISP1c、WISP1i、WISP1tc、WISP1-OT1、和WISP1-UT1)的序列,对于许多物种是已知的,例如,人WISP1(NCBI基因ID:8840):多肽(例如,NCBI参考序列:NP_001191798.1)和mRNA(例如,NCBI参考序列:NM_001204869.1)。WISP1可指人WISP1,包括其天然存在的变体、分子、及等位基因。

WISP1是指例如小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、马、和猪等的哺乳动物WISP1。SEQ ID NO:5的核酸序列(nucleic sequence)包括编码WISP1的核酸序列。

[0049] 如本文所用,术语“WISP1活性”是指WISP1的细胞功能,例如,WISP1加速胶原的激活和分泌以促进HSC的纤维化,并且减弱p53介导的细胞凋亡,并且WISP1可抑制其它细胞类型中的TNF诱导的细胞死亡。例如,WISP1活性的增加可指细胞的胶原沉积的增加。WISP1活性可指 α 平滑肌肌动蛋白表达或例如IL-6等一些促炎细胞因子表达的诱导。

[0050] 如本文所用,术语“核酸(nucleic acid)”或“核酸序列(nucleic acid sequence)”是掺入核糖核酸、脱氧核糖核酸、或其类似物的单元的任何分子,优选聚合物分子。核酸可为单链或双链。单链核酸可以是变性的双链DNA的一条核酸链。可选地,其可以是不源自任何双链DNA的单链核酸。在一方面,核酸可以是DNA。在另一方面,核酸可以是RNA。合适的DNA可包括,例如,基因组DNA或cDNA。合适的RNA可包括,例如,mRNA。

[0051] 本文所用的术语“试剂”是指任何化合物或物质,例如,但不限于,小分子、核酸、多肽、肽、药物、离子等。“试剂”可以是任何化学物质,实体或部分,包括但不限于合成和天然存在的蛋白质的和非蛋白质的实体。在一些实施方案中,试剂是核酸、核酸类似物、蛋白质、抗体、肽、适体、核酸的低聚物、氨基酸、或碳水化合物,包括但不限于蛋白质、寡核苷酸、核糖酶、DNA酶、糖蛋白、siRNA、脂蛋白、适体、及其修饰和组合等。在某些实施方案中,试剂是具有化学部分的小分子。例如,化学部分包括未取代的或取代的烷基、芳香族、或杂环基部分,包括大环内酯类、莱普霉素及其相关天然产物或其类似物。化合物可已知具有期望的活性和/或性质,或可选自不同化合物的库。

[0052] 试剂可以是来自一个或多个化学类别的分子,例如有机分子,其可包括有机金属分子、无机分子、基因序列等。试剂还可为来自一个或多个蛋白的融合蛋白、嵌合蛋白(例如,相关或不同分子的功能显著区的结构域转换或同源重组)、合成蛋白或包括取代、缺失、插入和其它变体的其它蛋白变体。

[0053] 如本文所用,“抗体”是指IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子或其抗原特异性抗体片段(包括但不限于,Fab、F(ab')₂、Fv、二硫键(disulphide)连接的Fv、scFv、单结构域抗体、封闭构象多特异性抗体、二硫键连接的scfv、双抗体),是否来源于天然产生抗体的任何物质,或通过重组DNA技术产生;是否分离自血清、B细胞、杂交瘤、转染瘤、酵母或细菌。

[0054] 在另一实例中,抗体包括两个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。应注意的是,V_H区(例如,免疫球蛋白多肽的部分与V_H段不相同,这在本文其它部分描述)。V_H和V_L区可进一步细分为穿插有被称为“框架区”(“FR”)的更保守的区域的、被称为“互补决定区”(“CDR”)的高变的区域。框架区和CDR的范围已被准确限定(参见,Kabat,E.A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242,和Chothia,C.等人(1987) J.Mol.Biol.196:901-917;其以其整体引用结合在此)。各V_H和V_L通常由三个CDR和四个FR构成,从氨基末端至羧基末端以以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。如本文所用,术语“蛋白质”和“多肽”可在本文交换使用以指定一系列的氨基酸残基,通过相邻残基的 α 氨基和羧基之间的肽键彼此连接。

[0055] 如本文所用,术语“抗体药剂”是指包括至少一个免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列并且特异性结合给定的抗原的多肽。抗体药剂可包括抗体或包含抗体

的抗原结合结构域的多肽。在任何方面的一些实施方案中,抗体药剂可包括单克隆抗体或包含单克隆抗体的抗原结合结构域的多肽。例如,抗体可包括重(H)链可变区(本文缩写为VH)和轻(L)链可变区(本文缩写为VL)。在另一实例中,抗体包括两个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体药剂”包括抗体的抗原结合片段(例如,单链抗体,Fab和sFab片段、F(ab')₂、Fd片段、Fv片段、scFv、CDR、和结构域抗体(dAb)片段(参见,例如,Wildt等人,Eur J. Immunol. 1996;26(3):629-39;其以其整体引用结合在此))以及完全抗体。抗体可具有IgA、IgG、IgE、IgD、或IgM(以及其亚型和组合)的结构特征。抗体可来自任何来源,包括小鼠、兔、猪、大鼠、和灵长类动物(人和非人灵长类动物)和灵长类化(primatized)抗体。抗体还包括中间抗体(midbody)、纳米抗体(nanobody)、人源化抗体、嵌合抗体等。抗体药剂可以是抗体片段。

[0056] 术语“蛋白质”和“多肽”是指与其大小或功能无关的氨基酸,包括修饰的氨基酸(例如,磷酸化、糖化、糖基化等)和氨基酸类似物的聚合物。“蛋白质”和“多肽”通常用于指相对大的多肽,而术语“肽”通常用于指小的多肽,但本领域中这些术语重叠使用。当涉及基因产物及其片段时,术语“蛋白质”和“多肽”在本文可交换使用。因此,示例性多肽或蛋白质包括基因产物、天然存在的蛋白质、同源物、直向同源物、旁系同源物、片段和其它等同物、变体、片段、和前述的类似物。

[0057] 在本文所描述的各种实施方案中,其还预期包括任何描述的特定多肽的变体(天然存在或其它方式)、等位基因、同源物、保守修饰的变体、和/或保守取代变体。对于氨基酸序列,本领域技术人员将认识到,在编码序列中改变单个氨基酸或小百分比的氨基酸的、对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的单个取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中改变引起氨基酸被化学相似的氨基酸取代并保持期望的多肽活性。此类保守修饰的变体是除与本发明一致的多态性变体、种间同源物、和等位基因以外的,并且不排除这些。

[0058] 如本文所述,“抗原”是通过抗体上的结合位点结合的分子。典型地,抗原通过抗体配体结合并能够在体内提高抗体应答。抗原可以是多肽、蛋白质、核酸或其它分子或其部分。术语“抗原决定簇”是指由抗原结合分子、更具体地由所述分子的抗原结合位点识别的抗原上的表位。

[0059] 如本文所用,术语“亲和性”是指例如抗体结合抗原等相互作用的强度,并且可定量表示为解离常数(K_D)。亲和力是抗原结合分子(例如本文所描述的抗体药剂)和相关抗原之间的结合的强度的量度。亲和力与抗原决定簇和抗原结合分子上的其抗原结合位点之间的亲和性和存在于抗原结合分子上的相关结合位点的数量有关。典型地,抗原结合蛋白(例如本文所描述的抗体药剂)将以解离常数(10^{-5} 至 10^{-12} 摩尔/升以下、优选 10^{-7} 至 10^{-12} 摩尔/升以下和更优选 10^{-8} 至 10^{-12} 摩尔/升的 K_D (即,具有 10^5 至 10^{12} 升/摩尔以上、优选 10^7 至 10^{12} 升/摩尔以上和更优选 10^8 至 10^{12} 升/摩尔的结合常数(K_A))结合至它们的同源或特异性抗原。任何大于 10^{-4} 摩尔/升的 K_D 值(或任何小于 $10^4 M^{-1}$ 的 K_A 值)通常被认为表明非特异性结合。对于被认为有意义的(例如,特异性的)生物相互作用的 K_D 通常在 $10^{-10} M$ (0.1 nM)至 $10^{-5} M$ (10000 nM)的范围。相互作用越强,其 K_D 越低。优选地,本文所描述的抗体药剂上的结合位点将结合至期望的抗原,具有小于500 nM的亲和性、优选小于200 nM、更优选小于10 nM,例如小于500 pM。抗体药剂与抗原或抗原决定簇的特异性结合可在本身已知的任何合适的方法中确定,包括,例如,斯卡查德分析和/或竞争性结合试验,例如放射免疫分析(RIA)、酶免疫分

析(EIA)和夹心竞争试验(sandwich competition assay)、和本领域中其自身已知的其不同变体;以及本文所提及的其它技术。

[0060] 如本文所用,术语“特异性结合”或“特异性”是指两种分子、化合物、细胞和/或颗粒之间的化学相互作用,其中第一实体以比其结合至作为非靶实体的第三实体更高的特异性和亲和性结合至第二靶实体。在任何方面的一些实施方案中,特异性结合可以指第一实体对第二靶实体的亲和性较对第三非靶实体的亲和性为至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更多。因此,如本文所用,“选择性结合”或“特异性结合”是指本文所描述的试剂(例如,抗体药剂)结合至诸如包括例如给定抗原的氨基酸序列等肽等靶标的能力, K_D 为 $10^{-5}M$ (10000nM)以下,例如 $10^{-6}M$ 以下、 $10^{-7}M$ 以下、 $10^{-8}M$ 以下、 $10^{-9}M$ 以下、 $10^{-10}M$ 以下、 $10^{-11}M$ 以下、或 $10^{-12}M$ 以下。例如,如果本文所描述的试剂以 $10^{-5}M$ 以下的 K_D 结合至包括抗原的第一肽,但不结合至另一随机选择的肽,则所述试剂被称为特异性结合所述第一肽。特异性结合可受到例如试剂的亲和性和亲合力以及试剂的浓度等的影响。本领域技术人员可使用任何合适的方法例如在合适的细胞中的试剂的滴定和/或肽结合试验来确定试剂选择性结合靶标的合适的条件。

[0061] 术语“表达”是指包括可应用的但不限于例如转录、转录本加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和处理的涉及产生RNA和蛋白质并且适当时产生分泌蛋白的细胞过程。“表达产物”包括转录自基因的RNA,和通过翻译转录自基因的mRNA来获得的多肽。术语“基因”是指当可操作地连接至合适的调控序列时,其被体外或体内转录(DNA)为RNA的核酸序列。基因可在编码区之前和之后包括或不包括区域,例如,5'非翻译(5' UTR)或“前导”序列和3' UTR或“拖尾”序列,以及单个编码片段(外显子)之间的间隔序列(内含子)。

[0062] 如本文所用,术语“接触”在针对细胞或器官使用时,包括以允许细胞与试剂、表面、激素等的物理接触的方式将试剂、表面、激素等引入至细胞中,和引入例如基因构建体或载体等元件,其允许例如mRNA、多肽、或细胞中的其它表达产物等试剂的表达。应理解,基因修饰以表达试剂的细胞与试剂“接触”,表达试剂的细胞后代也是如此。

[0063] 术语“统计学上显著的”或“显著地”是指统计学上显著并且通常是指两个标准偏差(2SD)或更大的差异。

[0064] 如本文所用,术语“包括”是指除了存在限定的元件以外,也可存在其它元件。“包括”的使用表明包含而不是限制。

[0065] 术语“由……组成”是指本文所描述的组合物、方法、及其各自的组分,其不包括实施方案的描述中未叙述的任何元件。

[0066] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方案所需的那些元件。所述术语允许存在实际上不影响本发明的实施方案的基础的和新的或功能性特征(一个或多个)的其它元件。

[0067] 除非上下文中明确另外指出,否则单数术语“一”、“一个”、“该”包括复数个参照对象。类似地,除非上下文中明确另外指出,否则词语“或”旨在包括“和”。尽管与本文所描述的方法和材料类似的或等同的方法和材料可用于本公开的实践或试验,但以下描述合适的方法和材料。缩写“例如(e.g.)”源自拉丁语例如(exempli gratia),并且在本文中使用以表明非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。

[0068] 此外,除非上下文所需,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。

[0069] 还如本文所用,“和/或”是指且包括一个或多个相关列出的项的任何和全部可能组合,以及当以可选择的(“或”)解释时组合的缺乏。

[0070] 此外,当涉及例如本发明的组合物的量、剂量、时间、和温度等可测定值时,如本文所用的术语“约”意为包括特定量的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化。除了在操作实例中、或另外说明以外,本文所用的表示成分或反应条件的量的所有数字在所有情况下应被理解为以术语“约”修饰。当与百分比一起使用时,术语“约”可为平均值 $\pm 1\%$ 。

[0071] 除非另外说明,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本公开所述技术领域常规技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0072] 应理解,本公开不限于本文所描述的具体方法、方案、和药剂等,因此可改变。本文所用的术语是仅用于描述具体实施方案的目的,并且不旨在限制本公开的范围,本公开的范围由仅受权利要求的限定。

[0073] 鉴定的所有专利和其它出版物出于描述和公开例如可与本公开一起使用的在此类出版物中描述的方法的目的,通过引用明确地结合在此。提供这些出版物仅为了本申请的提交日期之前的它们的公开内容。就这一点而言,任何内容都不应被解释为承认本发明人由于先前的公开或出于任何其它原因无权先于此类公开。关于这些文献的日期或内容的陈述的所有表述是基于本申请人可获得的信息并且不构成对这些文献的日期或内容的正确性的任何承认。

附图说明

[0074] 图1显示研究计划的原理图:目的1探索miR-15a和miR-412的机制和功能,目的2试验它们的治疗潜力,和目的3说明miR-15a的已知靶向WISP1的功能。HSC是用于肝星状细胞的术语。

[0075] 图2显示实验的流程的原理图,所述实验筛选全基因组微小RNA模拟文库以鉴定将激活的肝星状细胞朝向静止恢复的候选物。

[0076] 图3显示当miR-15a或miR-412过表达时,通过尼罗红(Nile Red)染色-阳性脂滴的再形成来说明的激活的小鼠肝星状细胞(HSC)朝向静止恢复(顶行)。图3还显示当miR-15a或miR-412的人直系同源物过表达时,通过脂滴的再形成来说明的激活的人HSC朝向静止恢复(底行)。

[0077] 图4A和图4B显示miR-15a或miR-412递送至激活的肝星状细胞(HSC)导致形态朝向静止的形态改变。图4A显示HSC的大小减少10-100倍,以相同放大率取得全部照片(相同的比例尺用于所有图)。图4B显示,qPCR测定的初始激活的HSC中的miR-15a或miR-412的强制表达下调 α 平滑肌肌动蛋白(Acta2)和 α -1I型胶原(Coll1a1)。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0078] 图5显示miR-15a或miR-412转染的肝星状细胞(HSC)具有功能性表型。由miR-15a或miR-412处理的激活的HSC不在共培养的肝细胞中导致脂肪变性。由阴性对照微小RNA处理的激活的HSC在共培养肝细胞中诱导脂肪变性。qHSC,静止的肝星状细胞;Ac-HSC,激活的肝星状细胞;miR-Neg,微小RNA阴性对照。

[0079] 图6显示与接受miR-15a或miR-412的激活的人HSC共培养的HepG2细胞具有减少的促炎细胞因子的表达(左图)。与接受miR-15a或miR-412的激活的人HSC共培养的Huh7细胞

具有减少的相同促炎细胞因子的表达(右图)。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0080] 图7显示与静止的HSC相比,内源性miR-15a或miR-412在激活的原代HSC中具有减少的表达水平,尽管对于miR-15a不显著。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0081] 图8显示CCl₄激发和细胞疗法注射的时间表的原理图(图表)。顶行:由注射至脾的miR-15a或miR-412重编程的静止样HSC接枝在肝脏上,由肝脏产生组入驱动miRNA表达的载体的GFP信号来证明。中间行:接受静止样HSC的CCl₄激发的小鼠具有减少的肝细胞凋亡和炎症,由H&E染色来证明的。底行:接受静止样HSC的CCl₄激发的小鼠具有减少的由天狼星红(Sirius Red)染色的肝纤维化。定量纤维化的相对水平。CCl₄,CCl₄管饲而不注射HSC;HSC对照,CCl₄管饲并注射具有空GFP载体的HSC;HSC miR-15a,CCl₄管饲并注射具有miR-15a-GFP载体的HSC;HSC miR-412,CCl₄管饲并注射具有miR-412-GFP载体的HSC。

[0082] 图9显示具有重编程的静止样HSC的细胞疗法导致由CCl₄激发的小鼠在整个肝中具有减少的 α -1I型胶原(Coll1a1)的表达,由qPCR测定。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0083] 图10显示人原发性胆汁性胆管炎中的肝星状细胞表达其与 α 平滑肌肌动蛋白(Acta2)共定位的WISP1。

[0084] 图11显示与包含两条预测的WISP1靶序列的任一者的报告子共转染的miR-15a模拟物减少荧光素酶表达,同时其不影响包含突变序列的报告子,表明miR-15a结合至两条WISP1靶序列。数据表示为平均值 $\pm$ SD(**P<0.01;***P<0.001)。

[0085] 图12显示低和高放大率中的静止的HSC(左柱)。高放大率视图清晰地显示由BODIPY染色的发绿色荧光的几个脂滴(小图)。右柱:低和高放大率中的激活的HSC。激活的细胞非常大,缺少脂滴,并且不由BODIPY染色(小图)。HSC,肝星状细胞。

[0086] 图13显示由标准饮食(左柱)和由CDAHFD(右柱)饲养的小鼠的比较。由CDAHFD饲养的小鼠在三周发展早期NASH,显示增加的身体大小、肉眼和显微镜下的脂肪肝、和通过天狼星红染色追踪纤维化。CDAHFD,胆碱缺乏的L-氨基酸限定的高脂饮食。

[0087] 图14显示示出健康肝细胞(Hep)与来自未激发的小鼠的对照肝星状细胞(HSC)或来自CDAHFD激发的NASH小鼠的HSC的共培养的实验的原理图。顶行:与来自对照小鼠的HSC共培养的肝细胞显示非常少的由BODIPY染色的脂滴。底行:与来自NASH小鼠的HSC共培养的肝细胞显示显著更多的脂滴。CDAHFD,胆碱缺乏的L-氨基酸限定的高脂饮食。

[0088] 图15显示与来自NASH小鼠的肝星状细胞(HSC)共培养的肝细胞表达比当它们与对照HSC共培养时更高的水平的几种炎症细胞因子和化学引诱物(chemoattractant),由qPCR测定。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0089] 图16显示当将来自NASH-肝星状细胞(HSC)的条件培养基施加至正常肝细胞时,可实现肝细胞(Hep)中的脂肪累积的诱导。顶行:当将静止HSC(qHSC)培养基施加于健康肝细胞时,不诱导脂肪变性。底行:NASH-HSC培养基在初始健康肝细胞中诱导脂肪变性。由BODIPY染色脂滴。

[0090] 图17显示将miR-15a或miR-412递送至激活的肝星状细胞(AcHSC)诱导作为类维生素A(retinoid)阳性的脂滴的再形成,由在紫外线下荧光来证明,与静止的肝星状细胞(qHSC)中的那些相一致。

[0091] 图18显示由多维标度法分析的RNA测序数据表明,接受miR-15a或miR-412的静止样HSC具有比激活的细胞4D-50%更接近静止HSC的全局转录图谱。HSC,肝星状细胞。

[0092] 图19显示miR-15a或miR-412转染的肝星状细胞(HSC)具有功能性表型。顶行:由miR-15a或miR-412处理的激活的HSC在共培养肝细胞中不导致脂肪变性。由阴性对照微小RNA处理的激活的HSC在共培养肝细胞中诱导脂肪变性。qHSC,静止的肝星状细胞;Ac-HSC,激活的肝星状细胞;miR-Neg,微小RNA阴性对照。底行:收获自NASH的CDAHFD模型的HSC在共培养肝细胞中诱导脂肪变性。由表达miR-15a或miR-412的慢病毒感染的这些相同的HSC押注(bet)它们在相邻肝细胞中诱导脂肪变性的能力。

[0093] 图20显示在接受miR-15a或miR-412后,用基于预测算法的潜在直接靶的集合覆盖在肝星状细胞中具有减少的mRNA水平的基因的集合产生更可能包含真正miRNA靶的靶候选物集合。通过选择作为Tgf- β 或Pdgf信号通路的部分的那些进一步筛选靶候选物集合中的基因。

[0094] 图21显示CRISPR技术可用于原代肝星状细胞。通过递送长非编码RNA Digit缺失载体以验证在原代细胞上使用该技术的可行性。由新PCR条带的存在证明了纯合子敲入,一条等位基因具有嘌呤霉素构建体,另一条具有新霉素构建体。Ct1,对照构建体;KI,敲入构建体。

[0095] 图22显示>100个细胞因子、趋化因子、和细胞外基质蛋白的蛋白质印记,显示与来自健康小鼠的HSC相比,来自具有CDAHFD的小鼠的HSC诱导NASH上分泌的(up-secreted)WISP1.CM,条件培养基。

[0096] 图23显示激活的肝星状细胞(AcHSC)比静止的肝星状细胞(qHSC)表达约30倍更高的WISP1。肝细胞(Hep)也表达WISP1,但显著低于激活的肝星状细胞。Lv,整个肝。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0097] 图24显示来自过表达WISP1的肝星状细胞的条件培养基在收获自健康小鼠的肝细胞中诱导脂肪变性。CM,条件培养基。

[0098] 图25是显示参与人疾病的WISP1的原理图。

[0099] 图26是显示WISP1是分泌的基质细胞蛋白的CCN家族的成员的原理图。

[0100] 图27是显示肝星状细胞是肝纤维化的关键驱动子的原理图。

[0101] 图28是显示肝星状细胞(HSC)激活的原理图。

[0102] 图29A和29B显示WISP1在激活的HSC中高度上调并且是miR-15a的直接靶。(图29A)在NASH小鼠中通过激活的肝星状细胞分泌WISP1。(图29B)由报告包含预测的WISP1靶序列共转染的miR-15a模拟物减少荧光素酶表达。

[0103] 图30A-30C显示WISP1和Yap 1互相激活彼此。(图30A)在qHSC中通过rc-WISP1处理增加WISP1和YAP mRNA。(图30B)在qHSC中通过rc-WISP1处理诱导YAP1激活。(图30C)在由miRNA重编程的HSC中,通过YAP1过表达增加WISP1表达。

[0104] 图31A和31B显示支持WISP抑制在肝和肺纤维化中的作用的现有文献。(图31A)抗WISP1 mAb减弱CCl₄诱导的肝纤维化。(图31B)抗WISP1 mAb减弱博来霉素诱导的肺纤维化。

[0105] 图32A和32B显示WISP1中和抗体减弱胆纤维化。(图32A)由对WISP1的中和抗体的体内治疗减少胆管结扎(BDL)诱导的肺纤维化。(图32B)指定条件中的胶原表达。

[0106] 图33A和33B显示WISP1在普通和稀有人纤维化肝病中分泌。(图33A)WISP1在NASH的HSC中上调。(图33B)WISP1在几种稀有纤维化肝病的HSC中上调。

[0107] 图34A和34B显示WISP1是用于肝炎症和纤维化的新分泌的纤维化驱动子。(图34A)

来自NAFLD小鼠的激活的HSC分泌WISP1。(图34B)WISP1过表达HSC在健康共培养的原代肝细胞中诱导脂肪变性(BODIPY染色)。

[0108] 图35显示Rc WISP1处理加速HSC增殖,由ki67测定。

[0109] 图36显示人和小鼠miR-15a和miR-412的序列对齐。

[0110] 图37A和37B显示由HSC表达的WISP1具有自激活自分泌和促脂肪变性旁分泌作用。图37A显示小鼠中由重组WISP1处理来诱导的HSC增殖和激活。图37B显示对照和Rc Wisp1的免疫组织化学。

[0111] 图38A-38F显示Rc WISP1和Wisp IgG处理来自胆碱缺乏的L-氨基酸限定的高脂饮食模型诱导的脂肪变性(CDAHFD)的NASH-HSC并防止纤维化。在施用于HSC前,在37°C下用条件培养基培养1 μ g/ml WISP1抗体1小时。图38A显示处理和取样的时间轴。图38B显示对照、Rc WISP1处理的、和Ab WISP1处理的细胞的细胞数。图38C显示qHSC、对照、Rc WISP1处理的、和Ab WISP1处理的细胞的Acta2 mRNA表达。图38D显示qHSC、对照、Rc WISP1处理的、和Ab WISP1处理的细胞的Colla1 mRNA表达。图38E显示对照、Rc WISP1处理的、和Ab WISP1处理的细胞的免疫组织化学。图38F显示对照、Rc WISP1处理的、和Ab WISP1处理的细胞的BODIPY染色面积分数(stained area fraction)的定量。

[0112] 图39A和39B表明WISP1调控HSC迁移。图39A显示存在和不存在Rc-WISP1和WISP1 IgG的情况下的HSC迁移的图像。图39B显示与对照HSC相比,由Rc-WISP1和WISP1 IgG处理的HSC的相对划痕面积(wound area)。由WISP1 IgG处理的HSC在24小时内表现与对照HSC类似的相对划痕面积,证明WISP1 IgG可防止HSC激活和迁移。

具体实施方式

[0113] 肝病(例如,原发性胆汁性胆管炎(PBC))可导致肝内胆管的进行性破坏、胆汁淤积、门静脉周炎症、和最终胆纤维化,结束于硬化晚期肝病(cirrhotic end-stage liver disease)。例如PBC等肝病可表现为发病机制不明的自身免疫性疾病,尽管基因和环境因素二者可能导致肝病。

[0114] WISP1是由肝的肝星状细胞(HSC)分泌的蛋白质,它们激活成为肌成纤维细胞。通过自分泌系统,WISP1还通过加速胶原的激活和分泌以促进纤维化以影响HSC。在肝病(例如,原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、非人类疾病、非酒精性脂肪性肝炎、和硬皮病)中的成纤维细胞中高度表达WISP。因此,表明抑制WISP1是治疗肝病的策略。

[0115] 肝星状细胞是肝的脂肪储存周细胞,其被发现在窦周间隙(也被称为狄氏间隙(space of Disse))。通过细胞质内脂滴的存在来辨别静止的HSC。当肝受损时,星状细胞可成为激活的。激活的HSC增殖并在细胞质内具有降低的脂滴。激活的HSC成为促纤维化肌成纤维细胞,其分泌促进瘢痕形成的胶原和介体。

[0116] 本文所描述的方法显示WISP1在HSC中是上调的。当通过微小RNA、miR-15a和miR-412抑制WISP1时,该抑制独立地诱导激活的肝星状细胞(HSC)静止,所述肝星状细胞是在肝的纤维化进展中起重要作用的细胞类型。此外,miR-15a直接靶向WISP1以抑制激活的HSC中的蛋白质的促纤维化功能。通过使用微小RNA和它们的靶标来促进HSC静止,WISP1抑制剂是控制例如PBC等肝病的进行性肝纤维化的有用疗法。

[0117] 治疗和/或预防肝病

[0118] 本文所描述的方法和组合物用于治疗 and/或预防受试者的肝病。示例性肝病包括,但不限于,阿拉吉欧综合征;酒精相关性肝病; α -1抗胰蛋白酶缺乏症;自身免疫性肝炎;良性肝肿瘤;胆道闭锁;肝硬化;克里格勒-纳贾尔综合征;半乳糖血症;吉尔伯特综合征;血色素沉着症;肝性脑病;甲型肝炎;乙型肝炎;丙型肝炎;肝肾综合征;妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP);溶酶体酸性脂肪酶缺乏症(LAL-D);肝囊肿;肝癌;新生儿黄疸;非酒精性脂肪肝病;非酒精性脂肪性肝炎;原发性胆汁性胆管炎(PBC);原发性硬化性胆管炎(PSC);进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC);瑞氏综合征;I型糖原贮积症;硬皮病;和威尔逊氏病。在一些实施方案中,所述肝病为原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝炎、和硬皮病。

[0119] 在一个实施方案中,本文所描述的方法用于治疗患有例如肝合成和代谢功能的衰竭等肝衰竭的受试者。在一个实施方案中,本文所描述的方法用于治疗患有暴发性或重症急性肝衰竭(例如,在先前健康的个体中在<8周内发展具有脑病的肝衰竭);超急性肝衰竭(例如,在先前健康的个体中在<14天内发展具有脑病的肝衰竭);急性肝衰竭(在先前健康的个体中在<26周内发展具有脑病的肝衰竭);慢性肝衰竭(例如,无脑病的肝衰竭);或慢加急性肝衰竭(例如,具有脑病的发展的慢性肝衰竭)的受试者。熟练的技术人员可使用标准方法评价肝病(例如,肝衰竭)的严重程度,例如,Child-Pugh评分(其是总胆红素、白蛋白、INR、腹水、和肝性脑病的综合)、MELD评分(其使用血清胆红素、肌酐和INR)、或PELD评分(类似于MELD但针对儿科患者)、或METAVIR评分(其评价样品中纤维化的水平。METAVIR

[0120] 在一个实施方案中,本文所描述的方法用于治疗患有肝纤维化的受试者。肝纤维化可由熟练的临床医生使用例如METAVIR评分等来诊断。METAVIR评分提供两个评分,纤维化评分和活性评分。纤维化评分用于描述肝中炎症的量(组织的炎症/分解的强度),例如,F0:无纤维化;F1:部分纤维化,无隔膜;F2:部分纤维化,很少隔膜;F3:许多隔膜,无肝硬化;F4:肝硬化。活性评分是关于纤维化的程度迅速发展的预测,例如,A0:无活性;A1:轻度活性;A2:中度活性;和A3:严重活性。在一个实施方案中,用本文所描述的方法治疗的受试者具有F1、F2、F3、或F4和/或A1、A2、A3的METAVIR评分。

[0121] 在另一方面,本文描述了治疗或预防肝病的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

[0122] 在一方面,本文描述了用于治疗或预防肝病的方法,包括向有需要的受试者施用抑制WISP1的试剂。

[0123] 在各种实施方案中,WISP1在靶细胞中受到抑制。在一个实施方案中,靶细胞是高度表达WISP1的肝细胞并导致例如肝病等疾病状态。例如,与诸如健康的非患病的肝细胞等合适的对照相比,表达增加的WISP1水平的肝细胞。本领域技术人员可使用标准技术、分别使用基于PCR的试验或免疫印迹评价细胞中WISP1的mRNA或蛋白质水平。

[0124] 在另一个实施方案中,靶细胞是肝星状细胞(HSC)。HSC是被发现在肝的窦周间隙中的周细胞。本领域技术人员可使用例如氯化金的选择性染色或细胞质中脂滴的可视化确定细胞是否为HSC。在一个实施方案中,HSC是静止的。静止的HSC可由本领域技术人员通过非增殖细胞中细胞质中的脂滴的存在来鉴定。活HSC可由本领域技术人员通过评价细胞的增殖、细胞质内降低的脂滴、和/或促进瘢痕形成的胶原和介体的分泌来鉴定。

[0125] 在一个实施方案中,靶细胞是成纤维细胞,例如肝成纤维细胞。在一个实施方案中,靶细胞是肌成纤维细胞。肌成纤维细胞具有成纤维细胞和平滑肌细胞二者的特征。成纤维细胞和肌成纤维细胞可由本领域技术人员例如通过诸如通过显微术分别选择成纤维细胞或成纤维细胞和平滑肌细胞标志物来容易地鉴定。

[0126] 在一个实施方案中,靶细胞是哺乳动物细胞,优选人细胞。

[0127] 在另一方面,本文描述了治疗肝病的方法,其包括 (a) 测定受试者的生物样品中 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 的水平; (b) 将 (a) 的测定结果与参考水平比较; (c) 将 (a) 中与参考水平相比具有增加的 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 的受试者鉴定为患有肝病; 和 (d) 向患有肝病的受试者施用抑制 WISP1 的抗体或抗体药剂。

[0128] 在仍另一方面,本文描述了治疗肝病的方法,其包括 (a) 测定受试者的生物样品中 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 的水平; (b) 将 (a) 的测定结果与参考水平比较; (c) 将 (a) 中与参考水平相比具有增加的 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 的受试者鉴定为患有肝病; 和 (d) 向患有肝病的受试者施用抑制 WISP1 的试剂。

[0129] 用于测定 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 水平的试验包括但不限于,基于 PCR 的试验来评价 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 mRNA 水平,或免疫印迹来评价 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 蛋白水平。在一个实施方案中,与参考水平相比, WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 水平增加至少 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 以上,或至少一1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍或更多。在一个实施方案中, WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 水平为 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 mRNA 水平。在另一实施方案中, WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 水平为 WISP1 和/或 Yap、Colla1、Acta2 蛋白水平。

[0130] 如本文所用,“参考水平”是指例如不患有肝病的受试者等健康受试者的其它方面相同的生物样品。

[0131] 在一个实施方案中,本文描述的方法还包括在 (a) 之前从受试者获得生物样品。如本文所用,生物样品是指血液样品、组织样品、血沉棕黄层样品(例如,离心后含有高水平的白细胞和血小板的抗凝血的血液样品的部分、血清样品、或肝活检样品。生物样品可使用本领域已知的通用的合适的技术来获得。例如,组织样品可通过活检来获得,血液样品可获自扎手指或静脉内抽血。

[0132] 在各种实施方案中,生物样品取自先前已诊断患有肝病或未诊断患有肝病的受试者。在另一个实施方案中,生物样品取自被怀疑患有肝病的受试者,例如,受试者如何具有肝病的至少一个风险因素,例如,与正常摄入相比增加的酒精摄入。

[0133] 本文提供的另一方面是用于治疗受试者的肝病的方法,包括 (a) 接受将与参考水平相比具有增加的 WISP1 和/或 Acta2 水平的受试者鉴定为患有肝病的检验的结果; 和 (b) 向

患有肝病的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

[0134] 本文提供的另一方面是治疗受试者的肝病的方法,包括(a)接受将与参考水平相比具有增加的WISP1、Yap、Colla1和/或Acta2水平的受试者鉴定为患有肝病的检验的结果;和(b)向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的试剂药剂。

[0135] 用于测定WISP1、Yap (NCBI基因ID 10413)、Colla1 (NCBI基因ID 1277) 和/或Acta2 (NCBI基因ID 59) 水平的试验包括但不限于,基于PCR的试验来评价WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2 mRNA水平、或免疫印迹来评价WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2蛋白水平。试验(例如,基于PCR的试验来评价WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2 mRNA水平、或免疫印迹来评价WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2蛋白水平)可通过熟练的技术人员施用抑制WISP1的试剂(例如,抗体或抗体药剂)来进行。可选地,试验可由另一个体(即,不通过从业者施用抑制WISP1的试剂(例如,抗体或抗体药剂))来进行。试验的结果可通过任何方式接收,例如,通过邮政速递员、电话传输(例如,传真)、电子传输(例如,电子医疗记录、电子信函(电子邮件)等。在一个实施方案中,在接收试验结果后的任何时间(例如,至少1秒、1分钟、1小时、1天、1周、1个月、1年、或更长)向受试者施用治疗。

[0136] 在一个实施方案中,与参考水平相比,WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2水平增加至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上,或至少一1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍或更多。在一个实施方案中,WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2水平为WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2 mRNA水平。在另一个实施方案中,WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2水平为WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2蛋白水平。

[0137] 在另一方面,本文描述了治疗或预防肝病的方法,其包括向有需要的受试者施用使用本文所描述的方法产生的任何细胞、或包含使用本文所描述的方法产生的细胞的任何药物组合物。

[0138] 在本文提供的另一方面,使用本文所描述的方法产生的任何抗体或抗体药剂、试剂、细胞、本文所描述的药物组合物的组分可用于治疗或降低受试者的肝的纤维化。在本文所描述的一个方面,是降低例如肝纤维化等纤维化的方法,其包括向有需要的受试者施用使用本文所描述的方法产生的任何细胞、或包含使用本文所描述的方法产生的细胞的任何药物组合物。

[0139] 在一个实施方案中,受试者先前已诊断为患有肝病。在另一个实施方案中,在施用试剂之前,受试者被诊断为患有肝病。本领域技术人员例如使用本领域的标准技术可诊断患有肝病的受试者。例如,被称为肝功能检查的血液检查;例如CT扫描、超声、或MRI扫描等非侵入性成像;或组织活检。肝功能检查称为血液检查,评价例如丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、白蛋白、或胆红素等肝特异性酶的水平。甚至ALT、

AST、ALP、白蛋白、或胆红素水平的轻度的提高可表明肝病。本文描述用于评价肝病的其它的检查(例如,Child-Pugh评分、METAVIR评分、和PELD和MELD评分)。

[0140] 在另一个实施方案中,本文所描述的试剂WISP1在靶细胞中受到抑制剪接变体。示例性WISP1剪接变体包括但不限于WISP1v、WISP1vx、和WISP1δ外显子3-4。

[0141] 在另一个实施方案中,抑制WISP1是抑制WISP1活性。WISP1活性可为任何目前已知的,或WISP1基因或基因产物的仍待发现的功能的活性。例如,WISP1加速胶原的激活和分泌以促进HSC的纤维化,和减弱p53介导的细胞凋亡并在其它细胞类型中抑制TNF诱导的细胞死亡。在另一个实施方案中,与合适的对照相比,WISP1的活性被抑制至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。

[0142] 如本文所用,“合适的对照”是指不与本文所描述的试剂或组合物接触的其它方面相同的样品的WISP1活性的水平,或是施用试剂或组合物之前受试者中的WISP1活性的水平。此外,合适的对照可以是例如不患有肝病的个体等健康受试者中的WISP1活性的水平。本领域技术人员可使用WISP1活性的功能性解析(readout)来确定WISP1的活性,例如,通过测定/评价/定量HSC中胶原的活性和分泌。

[0143] 在另一个实施方案中,抑制WISP1是抑制细胞中WISP1水平,例如,基因表达水平或基因产物水平。在另一个实施方案中,与合适的对照相比,WISP1的水平被抑制至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。如本文所用,“合适的对照”是不与本文所描述的试剂或组合物接触的其它方面相同的样品的WISP1水平,或是施用试剂或组合物之前受试者中的WISP1水平。此外,合适的对照可以是例如不患有肝病的个体等健康受试者中的WISP1水平。本领域技术人员可使用WISP1活性的功能性解析(readout)来确定WISP1的活性,例如,通过测定/评价HSC中胶原的活性和分泌。本领域技术人员可评价/测定WISP1的蛋白和mRNA水平,例如,分别使用免疫印迹或基于PCR的试验。

[0144] 试剂

[0145] 在一方面,将抑制WISP1的试剂施用于患有肝病或处于患有肝病的风险的受试者。在一个实施方案中,试剂是小分子、抗体、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。

[0146] 如果例如在施用的情况中本文所描述的试剂抑制细胞中WISP1的存在、量、活性和/或水平,则本文所描述的试剂被认为对于抑制WISP1是有效的。

[0147] 试剂可抑制例如细胞中WISP1的转录、或翻译。试剂可抑制或改变细胞中WISP1的活性(例如,WISP的表达)(例如,使得不再发生活性、不再正确发生活性(例如,与野生型WISP1活性相比)、或以降低的速率发生)。

[0148] 在一个实施方案中,试剂不包括miRNA412和miRNA15a。在另一个实施方案中,试剂不包括任何miRNA412或miRNA 15a模拟物。

[0149] 试剂可以其被施用的形式直接起作用。可选地,试剂可被修饰或细胞内利用来产生抑制WISP1的某物,例如,将核酸序列引入细胞并且其转录引起细胞内WISP1的核酸和/或蛋白抑制剂的产生。在一些实施方案中,试剂是任何化学的实体或部分,包括但不限于合成和天然存在的非蛋白实体。在某些实施方案中,试剂是具有化学部分的小分子。例如,化学部分包括未取代或取代的烷基、芳香族、或包括大环内酯类、莱普霉素和其相关天然产物或

类似物的杂环部分。试剂可已知具有期望的活性和/或性质、或可鉴定自不同化合物的库。

[0150] 在各种实施方案中,试剂是抑制WISP1的小分子。如本文所用,术语“小分子”是指化学试剂,其可包括但不限于肽、肽模拟物、氨基酸、氨基酸类似物、多核苷酸、多核苷酸类似物、适体、核苷酸、核苷酸类似物、分子量小于约10,000克每摩尔的有机或无机化合物(例如,包括杂有机和有机金属化合物)、分子量小于约5,000克每摩尔的有机或无机化合物、分子量小于约1,000克每摩尔的有机或无机化合物、分子量小于约500克每摩尔的无机或有机化合物、和此类化合物的盐、酯、和其它药学上可接受的形式。

[0151] 给定期望的靶(例如,WISP1多肽),本领域已知筛选小分子的方法并且可用于鉴定在例如抑制WISP活性或水平方面有效的小分子。

[0152] 本文提供的一个方面是包含本文所描述的抑制WISP1的任何试剂的组合物。在一个实施方案中,组合物还包括药学上可接受的载体。在一个实施方案中,组合物是药物组合物。

[0153] 抑制WISP1的多肽

[0154] 在一个实施方案中,本文描述了治疗或预防肝病的方法,包括向此需要的受试者施用WISP1在靶细胞中受到抑制的多肽或编码此类多肽的核酸。

[0155] 术语“WISP1结合多肽”是指特异性结合感目标期望的抗原的多肽(例如,WISP1多肽),并且即包含一个或多个连接至接头或免疫球蛋白恒定结构域的本文所描述的抗原结合结构域的Ig样蛋白。在一些实施方案中,结合蛋白可以是双可变结构域(DVD-Ig)结合蛋白。“接头多肽”包括由肽键连接的一个或多个氨基酸残基并且用于连接一个或多个抗原结合部分。此类接头多肽是本领域已知的(参见,例如,Holliger等人(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak(1994) Structure 2:1121-1123)。免疫球蛋白恒定结构域是指重链或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列是本领域已知的(例如,参见美国申请2016/0200813的SEQ ID NO:197、198、199和200,其以其整体引用结合在此作为代表性实例)。

[0156] 在一些实施方案中,抑制WISP1的多肽是异源的。如本文所用,“异源”是指不是由例如表达异源多肽的细胞等宿主细胞通常产生的,而是来源于不同于宿主细胞的生物体的多肽。例如,本文所用的WISP1抑制剂来源于例如细菌细胞并且在例如哺乳动物细胞中表达。

[0157] 在一些实施方案中,抑制WISP1的多肽与SEQ ID NO 1-4或6为至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或100%同源。如本文所用,本文所用的术语“同源性”或“同源的”定义为在根据需要比对序列并引入空位以实现最大百分比序列同一性后,与靶染色体或多肽上相应序列中核苷酸或氨基酸残基相同的核苷酸或氨基酸残基的百分比。出于确定核苷酸或氨基酸序列同源性百分比的目的的比对可以本领域技术内的各种方式来实现,例如,使用公众可获得的电脑软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ClustalW2或Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对的合适的参数,包括在待比较的序列的全长中实现最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中,当序列与对应的WISP1的天然或未编辑的核酸序列(例如,基因组序列)或氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%以上的同一性时,例如WISP1结合片段或多肽等的核酸或氨

氨基酸序列(例如,DNA、RNA、或氨基酸序列)被认为是“同源的”。

[0158] 在本文所描述的各种实施方案中,其还预期包括任何描述的特定多肽的变体(天然存在或以其它方式)、等位基因、同源物、保守修饰的变体、和/或保守取代变体。关于氨基酸序列,本领域技术人员将认识到改变编码序列中单个氨基酸或小百分比的氨基酸的、对核酸、肽、多肽、或蛋白序列的单个取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中改变引起由化学相似氨基酸的氨基酸的取代并保持多肽的期望的活性。此类保守修饰的变体是除了与本公开一致的多态性变体、种间同源物、和等位基因以外并且不排除这些。

[0159] 给定的氨基酸可由具有相似生理化学特征的残基替换,例如,用一个脂肪族残基取代另一个(例如,Ile、Val、Leu、或Ala彼此)、或用一个极性残基取代另一个(例如,Lys和Arg;Glu和Asp;或Gln和Asn之间)。已知其它这样的保守取代,例如具有相似疏水性特征的实体区域的取代。可在本文所描述的试验的任一者中检查包含保守氨基酸取代的多肽以证明例如配体介导的受体活性和天然或参考多肽的特异性等期望的活性被保留。

[0160] 氨基酸可根据其侧链的性质中的相似性来分组(在A.L.Lehninger, in Biochemistry, 第二版, pp.73-75, Worth Publishers, New York (1975) 中): (1) 非极性的: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M); (2) 不带电极性的: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q); (3) 酸性的: Asp (D)、Glu (E); (4) 碱性的: Lys (K)、Arg (R)、His (H)。可选地,天然存在的残基可基于共同侧链性质来分组: (1) 疏水性的: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性亲水性的: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性的: Asp、Glu; (4) 碱性的: His、Lys、Arg; (5) 影响链定向的残基: Gly、Pro; (6) 芳香族的: Trp、Tyr、Phe。非保守取代将需要将这些类别之一的成员交换为另一类别。具体的保守取代包括,例如:Ala至Gly或至Ser;Arg至Lys;Asn至Gln或至His;Asp至Glu;Cys至Ser;Gln至Asn;Glu至Asp;Gly至Ala或至Pro;His至Asn或至Gln;Ile至Leu或至Val;Leu至Ile或至Val;Lys至Arg、至Gln或至Glu;Met至Leu、至Tyr或至Ile;Phe至Met、至Leu或至Tyr;Ser至Thr;Thr至Ser;Trp至Tyr;Tyr至Trp;和/或Phe至Val、至Ile或至Leu。

[0161] 在一些实施方案中,本文所描述的多肽(或编码此类多肽的核酸)可以是本文所描述的氨基酸序列之一的功能性片段。如本文所用,“功能性片段”是根据本领域已知或本文以下所描述的试验、保持至少50%的野生型参考多肽的活性的肽的片段或区段。功能性片段可包括本文所公开的序列的保守取代。

[0162] 在一些实施方案中,本文所描述的多肽可以是本文所描述的多肽或分子的变体。在一些实施方案中,变体是保守修饰的变体。例如,保守取代变体可通过天然核苷酸序列的突变来获得。本文所提及的“变体”是与天然或参考多肽基本上同源、但由于一个或多个缺失、插入或取代而具有与天然或参考多肽的氨基酸序列不同的氨基酸序列的多肽。在与天然或参考DNA序列相比时,编码变体多肽的DNA序列包括含有核苷酸的一个或多个添加、缺失、或取代的序列,但其编码保留非变体多肽的活性的变体蛋白或其片段。本领域已知各种基于PCR的位点特异性突变形成方法,并且可由本领域技术人员应用。

[0163] 变体氨基酸或DNA序列可与天然或参考序列具有至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的同一性。天然和突变序列之间的同源性的程度(同一性百分比)可以例如通过使用万维网上通常用于此目的的免费可获得的计算机程序来比较两条序列(例如,默认设置的BLASTp或

BLASTn) 来确定。

[0164] 天然氨基酸序列的改变可通过任何本领域已知的许多技术来完成。例如,通过合成含有突变序列的寡核苷酸在特定基因座上引入突变,侧翼为允许连接至天然序列的片段的限制性位点。在连接后,所得重构序列编码具有期望的氨基酸插入、取代、或缺失的类似物。可选地,可采用寡核苷酸定向的定点突变形成程序来提供具有根据所需取代、缺失、或插入改变的特定密码子的改变的核苷酸序列。已确立用于制造此类改变的技术,并且包括,例如,由以下所公开的那些:Walder等人(Gene 42:133,1986);Bauer等人(Gene 37:73,1985);Craik(BioTechniques,1985年1月,12-19);Smith等人(Genetic Engineering: Principles and Methods,Plenum Press,1981);和美国专利号4,518,584和4,737,462,其以其整体引用结合在此。任何不涉及维持多肽的适当构象的半胱氨酸残基可被取代,通常由丝氨酸取代,以改善分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反地,半胱氨酸键(一个或多个)可添加至多肽以改善其稳定性或促进低聚反应。

[0165] 抑制WISP1的抗体

[0166] 在任何实施方案的一方面,本文描述了治疗或预防肝病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用WISP1在靶细胞中受到抑制的抗体或抗体药剂。

[0167] 在各种实施方案中,本文所描述的试剂是抗体或其抗原结合片段,或对WISP1特异性的、抗体药剂。

[0168] 在另一个实施方案中,抑制WISP1的抗体或抗体药剂特异性结合至WISP1多肽。在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂特异性结合至氨基酸序列SEQ ID NO:1-4、或SEQ ID NO:6。

[0169] 如本文所用,术语“抗体药剂”是指包括至少一个免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列并且特异性结合给定抗原的多肽。抗体药剂可包括抗体或含有抗体的抗原结合结构域的多肽。在任何方面的一些实施方案中,抗体药剂可包括单克隆抗体或含有单克隆抗体的抗原结合结构域的多肽。例如,抗体可包括重(H)链可变区(本文缩写为V_H)和轻(L)链可变区(本文缩写为V_L)。在另一个实例中,抗体包括两个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体药剂”包括抗体的抗原结合片段(例如,单链抗体、Fab和sFab片段、F(ab')₂、Fd片段、Fv片段、scFv、CDR、和结构域抗体(dAb)片段(参见,例如,de Wildt等人,Eur J. Immunol.1996;26(3):629-39;其以其整体引用结合在此))以及完全抗体。

[0170] 抗体可具有IgA、IgG、IgE、IgD、或IgM的结构特征(以及其亚型和组合)。抗体可以来自任何来源,包括小鼠、兔、猪、绵羊、山羊、大鼠、和灵长类动物(人和非人灵长类动物)和灵长类抗体。抗体还包括中间体抗体、纳米抗体、胞内抗体(intrabodies)、人源化抗体、和嵌合抗体等。

[0171] 在任何方面的一个实施方案中,本文所描述的抗体是人源化的、单克隆抗体或其抗原结合片段、或抗体药剂。在另一个实施方案中,人源化抗体是人源化单克隆抗体。在另一个实施方案中,人源化抗体是人源化多克隆抗体。在仍另一个实施方案中,人源化抗体是用于治疗用途。

[0172] 本文所描述的抗WISP1抗体可以是单特异性抗体或单克隆抗体。术语“单特异性抗体”是指表现对例如表位等特定靶标的单结合特异性和亲和性的抗体。如本文所用的该术语包括“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”,其是指单分子组合物的抗体或其片段的制

剂,无论抗体是如何产生的。

[0173] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指包括来自非人物种(例如,小鼠、大鼠、绵羊、或山羊)的重链和轻链可变结构域序列,但其中至少部分的 V_H 和/或 V_L 序列已被改变为更“类人化”即更类似于人种系可变序列的抗体。因此,“人源化”抗体是嵌合抗体的形式,其被工程化或设计包括来源于非人免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(接受者(recipient)或受体(acceptor)抗体),其中来自接受者的高变区的残基可由来自具有期望的特异性、亲和性、和能力的例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物等非人物种(供体抗体)的高变区的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基由对应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包括不在接受者抗体或供体抗体中发现的残基。可进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体将基本上包括至少一个、通常两个可变结构域,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些、并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将任选地包括至少一部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区。对于进一步的详情,参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。如本文所用,“复合人抗体”或“去免疫化抗体(deimmunized antibody)”是设计成降低或消除来自可变结构域的T细胞表位的工程化或人源化抗体的具体类型。

[0174] 人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入其的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。人源化可基本上根据Winter和同事(Jones等人,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536(1988))的方法进行,通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的对应序列。因此,此类人源化抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中基本上少于完整人可变结构域被来自非人物种的对应序列取代。在实践中,人源化抗体通常为人抗体,其中一些CDR残基和可能地一些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点(analogous site)的残基取代。

[0175] 在某些实施方案中,抗WISP1抗体是胞内抗体。胞内抗体是在细胞内功能性结合靶标的细胞内抗体(通常,参见,Hood等人,Immunology,Benjamin,N.Y.,2ND ed.(1984)、Harlow和Lane,Antibodies.A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988);Hunkapiller和Hood,Nature,323,15-16(1986);和Rondon和Marasco,Annu Rev Microbiol,51:257-83(1997);U.S.Patent Number 6,004,940;和美国专利号5,581,829;其以其整体引用结合在此)。本领域技术人员已知生产胞内抗体的方法,例如,如WO 2002/086096中所述。抗体将通常以至少约1mM、更通常以至少约300 μ M、典型地以至少约10 μ M、更典型地以至少约30 μ M、优选以至少约10 μ M、和更优选以至少约3 μ M或更好的KD结合。

[0176] 在一个实施方案中,抗WISP1抗体是中和抗体。在一个实施方案中,抗WISP1抗体是非中和抗体。

[0177] 在一些实施方案中,抗WISP1抗体是嵌合的。如本文所用,术语“嵌合”,如在抗体、或编码抗体的序列的背景下所用,是指表征为来源于不同动物物种的两个或多个片段或部分的免疫球蛋白分子。例如,嵌合抗体的可变区来源于非人哺乳动物抗体,例如鼠单克隆抗体,并且免疫球蛋白恒定区来源于人免疫球蛋白分子。嵌合抗体的可变片段通常连接至至

少部分的免疫球蛋白恒定区 (Fc)、通常为人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区 (Fc)。人恒定区DNA序列可根据来自例如永生B细胞等各种人细胞的已知程序分离 (WO 87/02671; 其以其整体引用结合在此)。抗体可包含轻链和重链恒定区二者。重链恒定区可包括CH1、铰链区、CH2、CH3、和有时CH4区。出于治疗目的,可删除或省略CH2结构域。本领域已知被开发用于生产“嵌合抗体”的技术 (参见Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855 (1984); Neuberger等人, *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda等人, *Nature* 314:452-454 (1985); 其以其整体引用结合在此), 例如, 通过将来自小鼠、或其它物种、合适的抗原特异性的抗体分子的基因与来自合适的生物活性的人抗体分子的基因剪接在一起。

[0178] 在本文所描述的组合物和方法的一些实施方案中, WISP1结合结构域包括可变轻链序列、可变重链序列、或二者。

[0179] 如本领域技术人员所理解的, 在全长抗体中, 各重链由重链可变结构域 (本文缩写为HCVR或 V_H) 和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成: C_H1 、 C_H2 、和 C_H3 。各轻链由轻链可变结构域 (本文缩写为HCVR或 V_L) 和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 构成。 V_H 和 V_L 区可进一步被细分为穿插有被称为框架区 (FR) 的更保守的区域的、被称为互补决定区 (CDR) 的高变的区域。各 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成, 从氨基末端至羧基末端以下列次序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。该结构是本领域技术人员已知的。链通常通过二硫键彼此连接。

[0180] 如本文所用, 术语“互补决定区” (“CDR”), 即CDR1、CDR2、和CDR3) 是指重链或轻链可变结构域的氨基酸残基, 其存在是特异性抗原结合所必需的。各个可变结构域通常具有鉴定为CDR1、CDR2、和CDR3的三个CDR区。各个互补决定区可包括来自Kabat所限定的“互补决定区”的氨基酸残基 (即, 轻链可变结构域中的约残基24-34 (L1)、50-56 (L2) 和89-97 (L3) 和重链可变结构域中的31-35 (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3); Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和/或来自“高变环”的那些残基 (即, 轻链可变结构域中的约残基26-32 (L1)、50-52 (L2) 和91-96 (L3) 和重链可变结构域中的26-32 (H1)、53-55 (H2) 和96-101 (H3); Chothia和Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。在一些情况下, 互补决定区可包括来自根据Kabat所限定的CDR区和高变环二者的氨基酸。如本文所用的术语“CDR集”是指存在于能够结合抗原的单个重链或轻链可变区的三个CDR的组。这些CDR的确切边界已根据不同系统进行不同地限定。由Kabat (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991))) 所描述的系统不仅提供可应用于抗体的任何可变区的清楚的残基编号系统, 还提供限定三个CDR的精确残基边界。这些CDR可被称为Kabat CDR。Chothia和coworkers (Chothia&Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) 和Chothia等人, *Nature* 342:877-883 (1989)) 发现尽管在氨基酸序列水平存在极大差异, Kabat CDR中的某些亚部分采用几乎相同的肽主链构象。这些亚部分被指定为L1、L2和L3或H1、H2和H3, 其中“L”和“H”分别指定轻链和重链区。这些区域可被称为Chothia CDR, 其具有与Kabat CDR重叠的边界。已由Padlan (FASEB) 9:133-139 (1995)) 和MacCallum (*J. Mol. Biol.* 262(5):732-45 (1996)) 描述与Kabat CDR重叠的限定CDR的其它边界。其它CDR边界限定仍可能不严格遵循上述系统之一, 但仍将与Kabat CDR重叠, 尽管可根据特定的残基或残基的组或甚至整个CDR不显著

影响抗原结合的预测或实验结果缩短或延长它们。在一些实施方案中,CDR还可被描述成包括来自IMGT所限定的“互补决定区”的氨基酸残基。本文所用的组合物和方法可利用根据任何这些系统所限定的CDR,尽管优选实施方案使用IMGT或Abysis限定的CDR。然而,参考这些编号协定中的任何一个,CDR的边界是清楚的。

[0181] 免疫球蛋白恒定(C)结构域是指重(C_H)或轻(C_L)链恒定结构域。本领域已知鼠和人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列。关于重链,在本文所描述的方面的一些实施方案中,本文所描述的抗体的重链可以是阿尔法(α)、德尔塔(Δ)、艾普西隆(ϵ)、伽玛(γ)或谬(μ)重链。在本文所描述的方面的一些实施方案中,所描述的抗体的重链可以是人阿尔法(α)、德尔塔(Δ)、艾普西隆(ϵ)、伽玛(γ)或谬(μ)重链。本领域已描述人恒定区序列的非限制性实例,例如,参见如上所述的美国专利号5,693,780和Kabat E A等人,(1991)。

[0182] 因此,在本文所描述的组合物和方法的实施方案中,抗WISP1由非IgG框架构成。

[0183] 如本文所用,术语“供体”和“供体抗体”是指提供一个或多个CDR的抗体。在示例性实施方案中,供体抗体是来自与框架区获得自或来源自的抗体不同的种类的抗体。在一些实施方案中,供体抗体是与受体抗体不同的同种型。在人源化抗体的背景下,术语“供体抗体”是指提供一个或多个CDR的非人抗体。

[0184] 如本文所用,术语“受体”和“受体抗体”是指提供一个或多个框架区的氨基酸序列的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、或至少100%的抗体或编码其的核酸序列。在一些实施方案中,术语“受体”是指提供恒定区(一个或多个)的抗体氨基酸或编码其的核酸序列。在仍另一个实施方案,术语“受体”是指提供一个或多个框架区和恒定区(一个或多个)的抗体氨基酸或编码一个或多个框架区和恒定区(一个或多个)的核酸序列。在特定的实施方案中,术语“受体”是指提供或编码一个或多个框架区的氨基酸序列的至少80%、优选地、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、或100%的人抗体氨基酸或核酸序列。根据该实施方案,受体可包含不存在于人抗体的一个或多个特定位置的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、或至少10个氨基酸残基。受体框架区和/或受体恒定区(一个或多个)可以是,例如,来源于或获得自种系抗体基因、成熟抗体基因、功能性抗体(例如,本领域已知的抗体,开发中的抗体,或市售可得的抗体)。

[0185] 人重链和轻链受体序列是本领域已知的。在一些实施方案中,人重链和轻链受体序列选自在V-base(发现于万维网的vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/)或在IMGTTM the international ImMunoGeneTics Information SystemTM(发现于万维网的imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/)中列出的序列。在本文所公开的技术的另一个实施方案中,人重链和轻链受体序列选自在美国专利公开号2011/0280800的表3和表4中所描述的序列,其以其整体引用结合在此。

[0186] 在一些实施方案中,本文所描述的组合物和方法可包括抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”。术语抗体的“抗原结合片段”或“WISP1结合片段”是指保持特异性结合至抗原(例如,WISP1)的能力的抗体的一个或多个片段。

[0187] 抗体的抗原结合功能可由全长抗原的片段来进行。此类抗体片段实施方案可混入双特异性、双重特异性、或多特异性形式,例如双重可变结构域(DVD-Ig)形式;特异性地结合至两个或更多个抗原。术语抗体的“抗原结合部分”包含的抗原结合片段的非限制性实例包括(i)Fab片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段,包括在铰链

区由二硫键连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)Fd片段,由V_H和C_H1结构域组成；(iv)Fv片段,由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成；(v)dAb片段(Ward等人(1989)Nature,341:544-546;PCT公开号WO 90/05144),其包括单个可变结构域；和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H由各自的基因编码,但它们可使用重组方法、通过能够使它们被制成其中V_L和V_H区配对以形成单价分子的单蛋白链的合成接头(称为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人(1988)Science 242:423-426;和Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)来连接。此类单链抗体还旨在被包含在术语抗体的“抗原结合部分”中。还包括例如双抗体(diabody)等单链抗体的其它形式。

[0188] 在一些实施方案中,抗体药剂是双特异性单克隆抗体。

[0189] 双链抗体是二价的双特异性抗体,其中V_H和V_L结构域在单多肽链上表达,但使用的接头过短,无法在同一链上的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见,例如,Holliger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak(1994)Structure 2:1121-1123);Kontermann和Dubel编辑,Antibody Engineering,Springer-Verlag,N.Y.(2001),p.790(ISBN 3-540-41354-5)。此外,单链抗体还包括“线性抗体”,其包括串联Fv片段对(V_H-C_H1-V_H-C_H1),其与互补轻链多肽一起,形成抗原结合区对(Zapata等人(1995)Protein Eng.8(10):1057-1062;和美国专利号5,641,870)。

[0190] 术语“Fc区”用于限定免疫球蛋白重链的C末端区,其可由完整抗体的木瓜蛋白酶消化来产生。Fc区可以是天然序列Fc区或变体Fc区。免疫球蛋白的Fc区通常包括两个恒定结构域,C_H2结构域、和C_H3结构域,并且任选地包括C_H4结构域。本领域已知替换Fc部分中氨基酸残基以改变抗体效应子功能(美国专利号5,648,260和5,624,821)。抗体的Fc部分介导几种重要的效应子功能,例如,细胞因子诱导、抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、补体依赖的细胞毒性(CDC)、和抗体和抗原-抗体复合物的半衰期/清除率。在一些情况下,这些效应子功能对于治疗性抗体是期望的,但在其它情况中,取决于治疗目的,是不必要的或甚至是有利的。某些人IgG同种型,特别是IgG1和IgG3,通过分别结合Fc γ 受体和互补C1q来介导ADCC和CDC。新生的Fc受体(FcRn)是确定抗体的循环半衰期的关键组分。在仍另一个实施方案中,抗体的恒定区中至少一个氨基酸残基被替换,例如抗体的Fc区,使得抗体的效应子功能被改变。

[0191] 编码如本文所描述的特异性结合WISP1的抗体或抗原结合片段的DNA序列。核酸序列还可被修饰,例如通过取代人重链和轻链恒定结构域或框架区的编码序列替换同源哺乳动物(例如,鼠)序列(美国专利号4,816,567;Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851(1984))、或通过将全部或部分的非免疫球蛋白多肽的编码序列共价连接至免疫球蛋白编码序列,还如本文中其它地方所描述。

[0192] 此类非免疫球蛋白多肽可以取代抗体的恒定结构域,或它们可取代抗体的一个抗原结合位点的可变结构域以产生嵌合二价抗体,所述嵌合二价抗体包括具有对一个目标的抗原的特异性的一个抗原结合位点和具有对目标的不同的抗原的特异性的另一个抗原结合位点。

[0193] 在本文所描述的方面的一些实施方案中,抗体或其WISP1结合片段包括与来自其所来源的重链可变区序列的一个、两个、三个、或四个框架区具有至少75%、80%、85%、

90%、95%、或100%同一性的重链可变区序列的一个、两个、三个、或四个框架区。在本文所描述的方面的一些实施方案中,来源于所述氨基酸序列的重链可变框架区由所述氨基酸序列组成,但存在多至10个氨基酸取代、缺失、和/或插入,优选多至10个氨基酸取代。在本文所描述的方面的一些实施方案中,来源于所述氨基酸序列的重链可变框架区由具有被取代为在对应的非人、灵长类动物、或人重链可变框架区中类似位置处发现的氨基酸的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基的所述氨基酸序列组成。在本文所描述的方面的一些实施方案中,抗体或抗原结合片段还包括来源于人或灵长类动物抗体的 V_H 的一个、两个、三个、或全部四个 V_H 框架区。被选择供与本文所描述的重链CDR序列一起使用的抗体的灵长类动物或人重链框架区可具有例如与非人亲代抗体的重链框架区至少70%同一性。

[0194] 在本文所描述的方面的一些实施方案中,灵长类动物或人重链框架区氨基酸残基来自与任何本文所描述的抗体的重链框架区具有至少75%同一性、至少80%同一性、至少85%同一性(以上)的天然灵长类动物或人抗体重链框架区。在特定的实施方案中,抗体或抗原结合片段还包括来源于人重链可变亚家族(例如,亚家族1至7之一)的一个、两个、三个或全部四个 V_H 框架区。

[0195] 在本文所描述的方面的一些该实施方案中,抗体或其WISP1结合片段包括其与来自其所来源的轻链可变区序列的一个、两个、三个、或四个框架区具有至少75%、80%、85%、90%、95%、或100%同一性的轻链可变区序列的一个、两个、三个、或四个框架区。在本文所描述的方面的一些实施方案中,来源于所述氨基酸序列的轻链可变框架区由所述氨基酸序列组成,但存在多至10个氨基酸取代、缺失、和/或插入,优选多至10个氨基酸取代。在本文所描述的方面的一些实施方案中,来源于所述氨基酸序列的轻链可变框架区由具有被取代为在对应的非人、灵长类动物、或人轻链可变框架区中类似位置处发现的氨基酸的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基的所述氨基酸序列组成。在本文所描述的方面的一些实施方案中,抗体或抗原结合片段还包括来源于人或灵长类动物抗体的 V_L 的一个、两个、三个、或全部四个 V_L 框架区。被选择供与本文所描述的轻链CDR序列一起使用的抗体的灵长类动物或人轻链框架区可具有例如与非人亲代抗体的轻链框架区至少70%同一性。

[0196] 在本文所描述的方面的一些实施方案中,灵长类动物或人轻链框架区氨基酸残基是来自具有与任何本文所描述的抗体的轻链框架区至少75%同一性、至少80%同一性、至少85%同一性(或更多)的天然灵长类动物或人抗体轻链框架区。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段还包括源自人轻链可变 κ 亚家族的一个、两个、三个、或全部四个 V_L 框架区。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段还包括源自人轻链可变 λ 亚家族的一个、两个、三个、或全部四个 V_L 框架区。

[0197] 在本文所描述的方面的一些实施方案中,一个或多个CDR沿着本文所描述的抗体的 V_H (例如,CDR1、CDR2、或CDR3)和/或 V_L (例如,CDR1、CDR2、或CDR3)区的位置可改变,即更短或更长,以一个、两个、三个、四个、五个、或六个氨基酸位置,只要维持对感兴趣的抗原的免疫特异性结合即可(例如,基本上维持来自其所来源的原始抗体的结合的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)。例如,在一些实施方案中,限定CDR的位置可改变,即为更短或更长,通过相对于本文所描述的抗体的任一者的CDR位置以一个、两个、三个、四个、五个、或六个氨基酸移位CDR的N末端和/或C末端边界,只要维持对目标的抗原的免疫特异性结合即可(例如,基本上维持,例如,来自其所来源的原始抗体的结合的至少

50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)。在其它实施方案中,一个或多个CDR沿着本文所描述的抗体的 V_H (例如,CDR1、CDR2、或CDR3)和/或 V_L (例如,CDR1、CDR2、或CDR3)区的长度可改变(例如,更短或更长),以一个、两个、三个、四个、五个、或更多氨基酸,只要维持对目标的抗原的免疫特异性结合即可(例如,基本上维持,例如,来自其所来源的原始抗体的结合的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)。

[0198] 在本文所描述的方面的一些实施方案中,将一个、两个或更多突变(例如,氨基酸取代)引入至任何本文所描述的抗体的Fc区或其片段(例如,CH2结构域(人IgG1的残基231-340)和/或CH3结构域(人IgG1的残基341-447)和/或铰链区,根据Kabat编号系统编号(例如,Kabat中EU索引(EU index))),以改变抗体的一个或多个功能性质,例如,血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞细胞毒性。

[0199] 在本文所描述的方面的一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入至Fc区(C_H1 结构域)的铰链区,使得铰链区中的半胱氨酸残基的数量改变(例如,增加或减少),如例如美国专利号5,677,425中所述。 C_H1 结构域的铰链区中的半胱氨酸残基的数量可改变以例如促进轻链和重链的装配、或以改变(例如,增加或减少)抗体的稳定性。

[0200] 在本文所描述的方面的一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入至本文所描述的抗体的Fc区或其抗原结合片段(例如, C_H2 结构域(人IgG1的残基231-340)和/或 C_H3 结构域(人IgG1的残基341-447)和/或铰链区,根据Kabat编号系统(例如,Kabat中EU索引))编号,以增加或减少抗体对效应细胞表面上的Fc受体的亲和性。减少或增加抗体对Fc受体的亲和性的抗体的Fc区或其片段中的突变和用于将此类突变引入至Fc受体或其片段的技术是本领域技术人员已知的。可进行抗体的Fc受体的突变以改变抗体对于Fc受体的亲和性的实例描述于例如Smith P等人(2012)PNAS109:6181-6186、美国专利号6,737,056、和国际公开号WO 02/060919;WO 98/23289;和WO 97/34631,通过引用将其结合在此。

[0201] 术语“CDR接枝抗体”是指其包括来自一个物种的重链和轻链可变区序列,但其中 V_H 和/或 V_L 的一个或多个CDR区的序列被另一物种的CDR序列替换,例如具有其中一个或多个CDR(例如,CDR3)已被小鼠CDR序列替换的人重链和轻链可变区的抗体。本文所描述的CDR接枝抗体包括来自其中 V_H 和/或 V_L 的一个或多个CDR区被本文所描述的非人抗体的CDR序列替换的人抗体的重链和轻链可变区序列。

[0202] 本文所描述的抗WISP1抗体可被工程化以改善用于治疗用途的结合特异性或药代动力学性质。可例如通过使用抗原(例如,WISP1或其多肽片段)与和一个或多个不相关或不同抗原的竞争相比的竞争试验(competition assay)来试验结合的特异性。各种免疫测定形式适于选择特异性结合WISP1的抗原、抗体、或其它配体。特异性结合可受到例如本文所描述的试剂(例如,多肽或抗WISP1抗体)的亲和性和亲合力以及试剂的浓度的影响。本领域技术人员可使用例如合适的结合试验中试剂的滴定等任何合适的方法,确定本文所描述的试剂选择性结合WISP1的适当条件。

[0203] 如本文所用,术语“关键”残基是指可变结构域内的某些残基,其对抗体、特别是人源化抗体的结合特异性和/或亲和性的影响比其它残基更大。关键残基包括但不限于以下的一种或多种:邻近CDR的残基、潜在糖基化位点(可为N-或O-糖基化位点任一者)、稀有残

基(rare residue)、能够与抗原相互作用的残基、能够与CDR相互作用的残基、经典残基(canonical residue)、重链可变结构域和轻链可变结构域之间的接触残基、Vernier zone中的残基、和可变重链CDR的Chothia定义/和第一重链框架的Kabat定义之间重叠的区域中的残基。

[0204] 本文所描述的抗WISP1抗体可以是工程化抗体。如本文所用,术语“工程化”是指具有人工操作的方面。例如,当在基因座中天然不以该次序连接在一起的两个或更多个序列经人的手工操作以在工程化基因座中直接彼此连接时,基因座被认为是“工程化的”。例如,在本发明的一些实施方案中,工程化基因座包括具有非天然V片段的各种Ig序列,其全部在自然界中发现,但不在相同基因座中发现或不在自然界的基因座中以该次序被发现。如本领域技术人员通常实践并理解的那样,工程化多核苷酸(和/或包括此类多核苷酸的细胞或动物)的后代或拷贝通常仍称为“工程化”,即使实际操作是在先前实体上进行的。

[0205] WISP结合多肽、抗体、抗体药剂、或其抗原结合部分,可以是较大免疫粘附分子的部分或分子的组合物,通过抗体抗原结合部分与一个或多个其它蛋白或肽的共价或非共价结合来形成。此类免疫粘附分子的实例包括使用链霉亲和素核心区以制造四聚物scFv分子(Kipriyanov等人(1995)Human Antibod.Hybridomas 6:93-101)和使用半胱氨酸残基、标志物肽和C末端多组氨酸标签来制造二价和生物素化scFv分子(Kipriyanov等人(1994)Mol.Immunol.31:1047-1058)。抗体部分,例如Fab和F(ab')₂片段,可分别使用例如完整抗体的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化等常规技术从完整抗体中制备。此外,抗体、其抗原结合部分、和免疫粘附分子可使用标准重组DNA技术获得。靶结合蛋白,例如抗体的抗原结合部分还可以是双重可变结构域(DVD-Ig)的部分。

[0206] 对任何特定靶抗原(例如,WISP1)为治疗性和/或特异性的抗体和抗体药剂,本领域技术人员可从已知抗体或抗体药剂,例如从FDA批准的治疗性抗体药剂和/或根据它们的靶向特异性在目录中列出的市售可得的抗体药剂中容易地选择。

[0207] 在另一个实施方案中,抗WISP1抗体是本领域中任何已知抗WISP1抗体、或仍待发现的任何抗WISP1抗体。本领域已知的示例性抗WISP1抗体包括但不限于,由Abcam销售的抗WISP1抗体(例如,ab60114;ab65943)、RND Systems销售的抗WISP1抗体(例如,mab1680)、和Sigma-Aldrich销售的抗WISP1抗体(例如,SAB2501114)。

[0208] 在另一个实施方案中,抗WISP1抗体选自下表1(抗体的表格)。在另一个实施方案中,抗WISP1抗体包括SEQ ID NO:12-120的氨基酸序列的任一者。

[0209] 表1:抗体(抗WISP1)的表

[0210]

抗体名称	制造商(目录#)	来源	CDR 序列	参考文献
小鼠 WISP-1/CCN4 抗体 mab1680	R & D Systems (MAB1680)	单克隆大鼠 IgG2B 克隆# 214203	SEQ ID NO: 12-51	1. Pennica, D.等人(1998) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 95:14717. 2. Tanada, S.等人(2001) <i>Oncogene</i> 20:5525. 3. Brigstock, D.R.等人(2003) <i>J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.</i> 56:127. 4. Desnoyers, L. (2004) <i>Curr. Pharm. Des.</i> 10:3913. 5. Brigstock, D.R. (2003) <i>J. Endocrinol.</i> 178:169. 6. Hashimoto, Y.等人(1998) <i>J. Exp. Med.</i> 187:289. 7. SwissProt Accession # O54775. 8. SwissProt Accession # Q99PP0. 9. SwissProt Accession # O95388 10. French, D.M.等人(2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 165:855.

[0211]

抗体名称	制造商(目录#)	来源	CDR 序列	参考文献
				11. Parisi, M.S.等人(2006) <i>Bone</i> 38:671.
人 WISP-1/CCN4 抗体 mab1680	R & D Systems (MAB1627)	人小鼠 IgG2A 克隆# 213611		1. Pennica, D.等人(1998) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 95:14717. 2. Tanada, S.等人(2001) <i>Oncogene</i> 20:5525. 3. Brigstock, D.R.等人(2003) <i>J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.</i> 56:127. 4. Desnoyers, L. (2004) <i>Curr. Pharm. Des.</i> 10:3913. 5. Brigstock, D.R. (2003) <i>J. Endocrinol.</i> 178:169. 6. Li, Z. (2005) GenBank Accession # AAP43925. 7. Li, Z. (2005) GenBank Accession # AAP43926. 8. Li, Z. (2005) GenBank Accession # AAP43924. 9. Cervello, M.等人(2004) <i>Ann. N.Y. Acad. Sci.</i> 1028:432. 10. French, D.M.等人(2004) <i>Am. J. Pathol.</i> 165:855. 11. Parisi, M.S.等人(2006) <i>Bone</i> 38:671.
WISP-1/CCN4 抗体	Novus Biologicals (AF1680)	绵羊	SEQ ID NOs: 52-90	1. Quiros 等人 <i>J Clin Inv.</i> (2017)) 2. Colston 等人 <i>Am. J. Physiol. Heart Circ.</i> (2007).
抗 WISP1 抗体 在山羊中制造	Sigma Aldrich (SAB2501114)	山羊	SEQ ID NOs: 91-110	

	抗体名称	制造商(目录#)	来源	CDR 序列	参考文献
[0212]	抗 WISP1 抗体	Abcam (ab60114)	兔	SEQ ID NOs: 111-120	
	抗 WISP1 抗体	Abcam (ab65943)	山羊	SEQ ID NOs: 91-110	

[0213] *序列获得自万维网的可获得的<abysis.org>的AbYsis。

[0214] 在另一个实施方案中,抗WISP1抗体是来源于任何已知、或仍待发现的非人抗WISP1抗体的人源化抗WISP1抗体。

[0215] 在一个实施方案中,抗体或抗体药剂结合至对应于编码WISP1的氨基酸序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0216] 在另一个实施方案中,抗WISP1抗体或抗体药剂结合至包括SEQ ID NO:1的序列的氨基酸序列;或结合至包括与SEQ ID NO:1的序列具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%以上的序列同一性的序列的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗WISP1抗体或抗体药剂结合至包括SEQ ID NO:1的整个序列的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂结合包括SEQ ID NO:1的序列的片段的氨基酸序列,其中所述片段足以结合其靶标,例如WISP1,并引起WISP1水平和/或活性的抑制。

[0217] 在某些实施方案中,抗体或抗体药剂结合至对应于编码各种人WISP1同种型的氨基酸序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:2、3、或4)。

[0218] 在另一个实施方案中,抗WISP1抗体或抗体药剂结合至包括SEQ ID NO:2、3、或4的序列的氨基酸序列;或结合至包括与SEQ ID NO:2、3、或4的序列具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%以上的序列同一性的序列的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗WISP1抗体或抗体药剂结合包括SEQ ID NO:2、3、或4的整个序列的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂结合至包括SEQ ID NO:2、3、或4的序列的片段的氨基酸序列,其中所述片段足以结合其靶标,例如WISP1,并引起WISP1水平和/或活性的抑制。

[0219] 在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂结合至对应于编码小鼠WISP1的氨基酸序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。

[0220] 在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂结合至包括SEQ ID NO:6的序列的氨基酸序列;或结合至包括与SEQ ID NO:6的序列具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%以上的序列同一性的序列的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗WISP1抗体或抗体药剂结合至包括SEQ ID NO:6的整个序列的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂结合至包括SEQ ID NO:6的序列的片段的氨基酸序列,其中所述片段足以结合其靶标,例如WISP1,并引起WISP1水平和/或活性的抑制。

[0221] 因此,在一些实施方案中,本文描述了包括一个或多个可变结构域的人源化抗体,所述可变结构域包括一个或多个由SEQ ID NO:12-120的可变重链和轻链序列编码的CDR。

[0222] 在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂包括与SEQ ID NO:12-120的任一者具有至少70%同源性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂CDR包括与SEQ ID NO:12-120的任一者具有至少70%同源性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体或抗体药剂包括与SEQ ID NO:12-120的任一者具有至少90%同源性的氨基酸序列。

[0223] 以另一种方式说明,在一些实施方案中,抑制WISP1的抗体或抗体药剂与SEQ ID NO 1-4、6、或SEQ ID NO:12-120具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或100%的同源性。

[0224] 在其它实施方案中,当序列与特异性结合WISP1的抗体的天然或未编辑的核酸序列(例如,基因组序列)或氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%以上的同一性时,例如WISP1结合片段或抗WISP1抗体等的核酸或氨基酸序列(例如,DNA、RNA、或氨基酸序列)被认为是“同源的”。

[0225] 本文提供的一个方面是包括任何本文所描述的抗WISP1抗体或抗体药剂的组合物。在一个实施方案中,组合物还包括药学上可接受的载体。在一个实施方案中,组合物是药物组合物。

[0226] 抑制WISP1的核酸

[0227] 在一个实施方案中,抑制WISP1的试剂是反义寡核苷酸。如本文所用,“反义寡核苷酸”是指与DNA或mRNA序列、例如微小RNA序列的DNA和mRNA序列互补的合成的核酸序列。反义寡核苷酸通常被设计成通过结合至靶标并在转录、反义、或剪接水平下阻止表达以阻断DNA或RNA靶标的表达。本发明的反义寡核苷酸是设计成在细胞条件下与例如WISP1等基因杂交的互补核酸序列。因此,选择足以与靶标互补的寡核苷酸,即在细胞环境的背景下充分地杂交并具有足够的特异性,以提供期望的效果。例如,抑制WISP1的反义寡核苷酸可包括与人WISP1基因(例如,SEQ ID NO:5)或小鼠WISP1基因(例如,SEQ ID NO:7)的编码序列的部分互补的至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个以上碱基。

[0228] 在一个实施方案中,使用任何基因组编辑系统从细胞基因组中去除WISP1,所述基因组编辑系统包括但不限于锌指核酸酶、TALENs、大范围核酸酶(meganuclease)、和CRISPR/Cas系统。在一个实施方案中,用于将编码一个或多个指导RNA的核酸引入至细胞基因组的基因组编辑系统不是CRISPR/Cas系统;这可防止在保持少量Cas酶/蛋白的细胞中不期望的细胞死亡。本文还预期,Cas酶或sgRNA任一者各自在不同诱导型启动子的控制下表达,从而允许各自的暂时表达以防止此类干扰。

[0229] 当编码一种或多种sgRNA的核酸和编码RNA指导的核酸内切酶的核酸各自需要体内施用时,特别预期腺病毒相关载体(AAV)的使用。用于将核酸递送至基因组编辑/片段化系统的组分(例如,sgRNA、RNA指导的核酸内切酶)二者的其它载体包括慢病毒载体,例如,爱泼斯坦-巴尔、人免疫缺陷病毒(HIV)、和乙型肝炎病毒(HBV)。RNA指导的基因组编辑系统(例如,sgRNA和核酸内切酶)的各组分可在本领域已知或如本文所描述的各自的载体中递送。

[0230] 在一个实施方案中,试剂通过RNA抑制而抑制WISP1。给定基因的表达的抑制剂可以是抑制性核酸。在任何方面的一些实施方案中,抑制性核酸是抑制性RNA(iRNA)。RNAi可以是单链或双链。

[0231] iRNA可以是siRNA、shRNA、内源微小RNA(miRNA)、或人工miRNA。在一个实施方案中,本文所描述的iRNA影响例如WISP1等靶标的表达和/或活性的抑制。在任何方面的一些实施方案中,试剂是抑制WISP1的siRNA。在任何方面的一些实施方案中,试剂是抑制WISP1的shRNA。

[0232] 本领域技术人员将能够例如使用公开可得的设计工具等设计siRNA、shRNA、或miRNA以靶向WISP1。使用例如Dharmacon(Layfayette,CO)或Sigma Aldrich(St.Louis,MO)等公司通常制造siRNA、shRNA、或miRNA。

[0233] 在任何方面的一些实施方案中,iRNA可以是dsRNA。dsRNA包括充分互补以在使用dsRNA的条件下杂交来形成双链体结构的两条RNA链。dsRNA的一条链(反义链)包括与靶序列基本上互补、和通常完全互补的互补区域。靶序列可来源于在靶标的表达期间形成的mRNA的序列。其它链(正义链)包括与反义链互补的区域,使得当在合适条件下结合时,两条链杂交并形成双链体结构。

[0234] iRNA的RNA可被化学修饰以增强稳定性或其它有益特性。本发明中特定的核酸可通过本领域中完善确立的方法合成和/或修饰,例如在“Current protocols in nucleic acid chemistry,”Beaucage,S.L.等人(Edrs.),John Wiley&Sons,Inc.,New York,NY,USA中所述的那些,通过引用将其结合在此。

[0235] 在一个实施方案中,试剂是抑制WISP1的miRNA。微小RNA是具有22个核苷酸的平均长度的小非编码RNA。这些分子通过结合至mRNA分子中的互补序列,通常在3'非翻译(3'UTR)区中,从而促进靶向mRNA降解或抑制mRNA翻译来起作用。微小RNA和mRNA之间的相互作用由称为“种子序列(seed sequence)”介导,该种子序列为一种通过有缺陷的沃森-克里克碱基配对指导序列特异性结合至mRNA的微小RNA的6-8个核苷酸区域。超过900个微小RNA已知在哺乳动物中表达。这些的多数可基于它们的种子序列分组为家族,从而鉴定类似微小RNA的“簇(cluster)”。miRNA可在细胞中表达,例如裸DNA。miRNA可由例如裸DNA等在细胞中表达的核酸编码、或可由包含在载体内的核酸编码。

[0236] 在一个实施方案中,下调WISP1的试剂是miRNA-15a。miRNA-15a是在包括肝的许多器官中调控基因表达的非编码RNA。miRNA-15a序列对于许多物种是已知的,例如人miRNA-15a、例如miRBase登录号MI0000069,和小鼠miRNA-15a、例如miRBase登录号MI0000564。人miRNA-15a包括SEQ ID NO:8的序列。miRNA-15a可指人miRNA-15a,包括其天然存在的变体、分子、及等位基因。例如,miRNA-15a可为小鼠miRNA-15a,具有SEQ ID NO:10的序列。

[0237] 在一个实施方案中,例如miRNA-15A等试剂具有对应于SEQ ID NO:8的序列的序列;或包括SEQ ID NO:8的序列;或包括与SEQ ID NO:8的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或至少100%的序列同一性的序列。

[0238] 在一个实施方案中,例如miRNA-15a等试剂具有对应于SEQ ID NO:10的序列的序列;或包括SEQ ID NO:10的序列;或包括与SEQ ID NO:10的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或至少100%的序列同一性的序列。

[0239] 在一个实施方案中,下调WISP1的试剂是miRNA-412。miRNA-412对于许多物种是已知的,例如人miRNA-412、例如miRBase登录号MI0001464,和小鼠miRNA-412、例如miRBase登

录号MI0001164。人miRNA-412包括SEQ ID NO:9的序列。miRNA-412可指人miRNA-15a,包括其天然存在的变体、分子、及等位基因。例如,miRNA-15a可为小鼠miRNA-412,具有SEQ ID NO:11的序列。

[0240] 在一个实施方案中,例如miRNA-412等试剂具有对应于SEQ ID NO:9的序列的序列;或包括SEQ ID NO:9的序列;或包括与SEQ ID NO:9的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或至少100%的序列同一性的序列。

[0241] 在一个实施方案中,例如miRNA-412等试剂具有对应于SEQ ID NO:11的序列的序列;或包括SEQ ID NO:11的序列;或包括与SEQ ID NO:11的序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或至少100%的序列同一性的序列。

[0242] 试剂可引起靶基因(例如,WISP1)的基因沉默,例如由RNAi分子(例如,siRNA或miRNA)引起。这对于靶标需要细胞中的mRNA水平以不存在试剂的细胞中发现的mRNA水平的至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、或约100%的减少。在一个优选实施方案中,mRNA水平减少至少约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、或约100%。本领域技术人员能够容易地评价siRNA、shRNA、或miRNA是否有效靶向例如WISP1用于其下调,例如通过将siRNA、shRNA、或miRNA转染至细胞并通过免疫印迹或基于PCR的试验检测在细胞内发现的基因(例如,WISP1)的水平。

[0243] 试剂可被包含在载体中并因此进一步包括载体。可用于将外源基因转移至靶哺乳动物细胞的许多此类载体是可获得的。载体可以是附加体(episomal),例如质粒,例如巨细胞病毒、腺病毒等病毒来源的载体,或可通过同源重组或随机整合被整合至靶细胞基因组,例如,诸如MMLV、HIV-1、ALV等逆转录病毒来源的载体。在一些实施方案中,逆转录病毒和合适的包装细胞系的组合还可发现其中衣壳蛋白具有感染靶细胞的功能的用途。通常,在培养基中培养细胞和病毒至少约24小时。然后在一些应用中,在分析之前,允许细胞在培养基中以短时间间隔生长,例如24-73小时,或生长至少两周,并且可允许生长五周以上。通常使用的逆转录病毒载体是“缺陷的”,即不能够产生生产性感染所需的病毒蛋白。载体的复制需要包装细胞系中的生长。

[0244] 如本文所用,术语“载体”是指设计用于递送至宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所用,载体可以是病毒或非病毒的。术语“载体”包括在与合适的控制元件关联时能够复制并且可将基因序列转移至细胞的任何基因元件。载体可包括但不限于,克隆载体、表达载体、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、人工染色体、病毒、病毒粒子等。

[0245] 如本文所用,术语“表达载体”是指指导RNA或多肽(例如,WISP1抑制剂)从其中包含的核酸序列连接至载体上的转录调控序列的表达的载体。表达的序列将通常但不必须为对细胞异源的。表达载体可包含附加元件,例如,表达载体可具有两个复制系统,由此允许其被维持在两个生物体中,例如在人细胞中表达和在原核宿主中克隆和增殖。术语“表达”是指涉及产生RNA和蛋白质和根据需要的分泌蛋白的细胞过程,在适用情况下包括但不限于,例如,转录、转录物加工、翻译和蛋白折叠、修饰和加工。“表达产物”包括转录自基因的RNA,和通过转录自基因的mRNA的翻译来获得的多肽。术语“基因”是指当可操作地连接至合适的调控序列时,被体外或体内转录为RNA的核酸序列(DNA)。基因可或可不包括编码区之

前和之后的区域,例如,5' 非翻译(5' UTR)或“前导”序列和3' UTR或“拖尾”序列,以及单个编码片段(外显子)之间的间隔序列(内含子)。

[0246] 整合载体使它们递送的RNA/DNA永久并入宿主细胞染色体。非整合载体维持附加体,这意味着其中包含的核酸永不被整合至宿主细胞染色体。整合载体的实例包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、杂交腺病毒载体、和单纯疱疹病毒载体。

[0247] 非整合载体的一个实例是非整合病毒载体。非整合病毒载体消除由整合型逆转录病毒造成的风险,因为它们不将它们的基因组并入宿主DNA。一个实例是爱泼斯坦-巴尔oriP/核抗原-1(Epstein Barr oriP/Nuclear Antigen-1,“EBNA1”)载体,其能够限制自我复制并已知在哺乳动物细胞中起作用。作为包含来自爱泼斯坦-巴尔病毒的两个元件,oriP和EBNA1,EBNA1蛋白与病毒复制子区域oriP的结合在哺乳动物细胞中维持相对长期的质粒的附加体存在。oriP/EBNA1载体的该特定特征使其对于无整合-iPSC的产生是理想的。另一非整合病毒载体是腺病毒载体和腺相关病毒(AAV)载体。

[0248] 另一非整合病毒载体是RNA仙台病毒载体(Sendai viral vector),其可在不进入受感染细胞的细胞核的情况下产生蛋白。F缺陷型仙台病毒载体停留在受感染细胞的细胞质中很少代,但在很少代(例如,10代)后被快速稀释并完全丧失。

[0249] 非整合载体的另一实例为微环载体。微环载体是其中已释放质粒主链、仅留下待表达的真核启动子和cDNA(一个或多个)的环状载体。

[0250] 如本文所用,术语“病毒载体”是指包括至少一个病毒起始的元件并具有被包装成病毒载体颗粒的能力的核酸载体构建体。病毒载体可包含代替非必要病毒基因的编码本文所描述的多肽的核酸。载体和/或颗粒可用于将核酸体外或体内转移至细胞的目的。本领域已知许多形式的病毒载体。

[0251] 工程化肝星状细胞(HSC)

[0252] 在一方面,本文描述了生产表达抑制WISP1的试剂的肝星状细胞或其群体的方法,所述方法包括使细胞与任何本文所描述的抑制WISP1的试剂相接触,并培养细胞充足的时间以允许试剂的表达。

[0253] 在一个实施方案中,细胞是静止细胞。上文中描述了用于鉴定静止细胞的方法。

[0254] 在一个实施方案中,接触包括使细胞与试剂或编码试剂的载体相接触。例如,接触可包括但不限于,转导、核转染、电穿孔、直接注射(例如,至HSC)、和/或转染。本领域技术人员可使用本领域已知的技术使细胞与本文所描述的试剂相接触。

[0255] 在一个实施方案中,试剂是miRNA。在一个实施方案中,miRNA是miRNA-15a或miRNA412。

[0256] 在一个实施方案中,细胞在标准培养条件下、在补充有20% (重量/体积) 胎牛血清(FBS) 和1% (重量/体积) 青霉素/链霉素的杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM) 中培养。

[0257] 在一个实施方案中,培养细胞至少1小时以允许试剂的表达。在另一实施方案中,培养细胞至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、60、72、96、120、144以上小时以完全支持试剂的表达。本领域技术人员可使用本领域标准技术,例如基于PCR的试验来检测miRNA表达,来确定培养后试剂是否在细胞中表达。

[0258] 在一个实施方案中,细胞瞬时表达试剂。在另一个实施方案中,试剂的表达被整合

至细胞的基因组,例如使得细胞后代表达试剂。

[0259] 一方面提供包含使用本文所描述的方法产生的表达抑制WISP1的试剂的HSC的细胞系。表达抑制WISP1的试剂的HSC可以在药学上可接受的载体中,例如,用于施用至有此治疗需要的受试者,例如,用于肝病。

[0260] 另一方面提供包含使用本文所描述的方法产生的表达抑制WISP1的试剂的HSC的群和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0261] 组合物和药物组合物

[0262] 在一方面,本文描述了包含任何本文所描述的试剂的组合物。在一方面,本文描述了包含任何本文所描述的试剂的药物组合物。

[0263] 在另一方面,本文描述了包含抑制WISP1的抗体或抗体药剂的组合物。在另一方面,本文描述了包含抑制WISP1的抗体或抗体药剂的药物组合物。

[0264] 在一个实施方案中,本文所描述的组合物或药物组合物可包括至少2种、3种、4种、5种、或更多本文所描述的试剂。例如,组合物可包括抑制WISP1的siRNA和抗WISP1抗体药剂。可选地,组合物可包括两种抗WISP1抗体药剂。

[0265] 在任何方面的一个实施方案中,组合物被配制用于肝病的治疗或预防。对于本文所描述的方法的临床用途,本文所描述的抑制WISP1的试剂(例如,抗体、抗体药剂、或其WISP1结合片段)的施用可包括配制用于肠胃外施用的药物组合物或药物制剂,例如,静脉内;粘膜,例如,鼻内;眼部,或其它施用方式。在一些实施方案中,本文所描述的试剂可与引起受试者中有效治疗的任何药学上可接受的载体化合物、材料、或组合物一起施用。因此,用于本文所描述的方法的药物制剂可包含本文所描述的抗体或其抗原结合片段与一种或多种药学上可接受的成分与的组合。

[0266] 短语“药学上可接受的”是指其在以下的范围内的那些化合物、材料、组合物、和/或剂型:正确的医疗判断,适用于与人类和动物组织接触而无过度毒性、刺激、变态反应、或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。本文所用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或运载体,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂、介质、包封材料、制造助剂(例如,润滑剂、滑石镁(talc magnesium)、硬脂酸钙或硬脂酸锌、或硬脂酸)、或溶剂包封材料,涉及维持抗体或其抗原结合片段的稳定性、可溶性、或活性。从与制剂的其它成分相容且对患者无害的意义上来说,各载体必须是“可接受的”。术语“赋形剂”、“载体”、或“药学上可接受的载体”等在本文可交换使用。

[0267] 本文所描述的试剂的治疗制剂或WISP1的抑制剂可通过以冻干制剂或水溶液的形式、将具有期望的纯度的抗体或抗原结合片段与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))混合,为贮存做准备。可接受的载体、赋形剂、或稳定剂在采用的剂量和浓度下对接受者为无毒的,并且包括例如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸等缓冲剂;抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;尼泊金烷基酯(alkyl paraben)例如尼泊金甲酯或尼泊金丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;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、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖类、二糖类、和其它碳水化合物,包括葡萄

糖、甘露糖、或糊精；螯合剂例如EDTA；糖类例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；盐形成抗衡离子例如钠；金属络合物（例如，Zn-蛋白络合物）；和/或非离子型表面活性剂例如TWEEN、PLURONICS或聚乙二醇（PEG）。示例性冻干抗体制剂描述于WO 97/04801，通过引用将其清楚地结合在此。

[0268] 任选但优选地，包含本文所描述的组合物制剂包含药学上可接受的盐，通常地，例如氯化钠，并且优选以约生理学浓度。任选地，本发明的制剂可包含药学上可接受的防腐剂。在一些实施方案中，防腐剂浓度范围为0.1至2.0%，通常以v/v计。合适的防腐剂包括在药学领域已知的那些。苯醇、苯酚、间甲酚、尼泊金甲酯、和尼泊金丙酯是防腐剂的实例。任选地，本发明的制剂可包括0.005至0.02%的浓度的药学上可接受的表面活性剂。

[0269] 本文所描述的包含试剂（例如，抗体、抗体药剂、及其WISP结合片段）的组合物治疗制剂根据需要对于待治疗的特定指征（indication）还可包含多于一种的活性化合物，优选具有未不利地彼此影响的互补活性的那些。可选地，例如，组合物可包含细胞毒性剂、细胞因子、或生长抑制剂，例如。此类分子与对于预期目的为有效的量组合而合适的存在。

[0270] 包含本文所描述的试剂的组合物治疗制剂的活性成分包埋在微胶囊中，所述微胶囊例如通过例如在胶体药物递送系统（例如，脂质体、白蛋白微球、微乳液（microemulsions）、纳米颗粒和纳米胶囊）或在粗乳液（macroemulsion）中分别进行甲基纤维素或明胶微胶囊和聚（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊的凝聚技术或界面聚合法来制备。此类技术公开于雷明顿药物科学第16版（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition），Osol, A. Ed. (1980)。

[0271] 在一些实施方案中，药物组合物还包括液体运载体。示例性液体运载体包括但不限于，脂质体、胶束、外来体、脂肪乳液、和液体-药物复合物。

[0272] 在一些实施方案中，药物组合物还包括颗粒或基于聚合物的运载体。示例性颗粒或基于聚合物的运载体包括但不限于，纳米颗粒、微粒、聚合物微球、或聚合物-药物缀合物。

[0273] 在一些实施方案中，可使用缓释制剂。缓释制剂的合适的实例包括含有抗体或抗原结合片段的固体疏水性聚合物的半渗透基质，其中基质例如膜或微胶囊等成形品形式。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶（例如，聚（2-羟乙基-甲基丙烯酸酯）、或聚（乙烯醇））、聚乳酸（美国专利号3,773,919）、L-谷氨酸和γ-乙基L-谷氨酸盐、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸聚合物例如LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸聚合物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球）、和聚-D-(-)-3-羟丁酸。尽管例如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子超过100天，某些水凝胶在较短时间段内释放蛋白。当包封的抗体长时间残留在体内时，作为暴露于37°C下的湿度的结果，它们可变形或聚集，导致生物活性的丧失和免疫原性中可能的改变。合理的策略可被设计用于依赖于所涉及的机制的稳定化。例如，如果聚集机制被发现为通过硫代-二硫化物交换的分子间S-S键形成，稳定化可通过修饰巯基残基、自酸性溶液冻干、控制含水量、使用适当的添加剂、和开发特定聚合物基质组合物来实现。

[0274] 在本文所描述的方法中，可用于例如肠胃外施用等体内施用的治疗制剂可为无菌的，这由通过无菌过滤膜过滤、或本领域技术人员已知的其它方法来容易地实现。

[0275] 施用

[0276] 在一些实施方案中,本文所描述的方法涉及治疗患有或诊断为患有肝病的受试者,包括施用本文所描述的已知WISP1的试剂。患有肝病的受试者可由医师使用当前诊断病况的方法来鉴定。表征肝病并帮助诊断的肝病的症状和/或并发症是本领域已知的并且包括但不限于,疲劳、体重减轻、疼痛、皮肤和/或眼睛发黄、和深色尿(dark urine)。可帮助例如肝病等的诊断的试验包括但不限于实例验血、非侵入型成像和/或组织活检。肝病的家族史还将帮助确定受试者是否容易患有病况或帮助诊断肝病。

[0277] 本文所描述的试剂和组合物(例如,抑制WISP1的)可被施用至患有或诊断患有肝病的受试者。在一些实施方案中,本文所描述的方法包括向受试者施用有效量的试剂以减轻肝病的至少一个症状。如本文所用,“减轻肝病的至少一个症状”是改善与肝病相关的任何病况或症状(例如,疲劳、体重减轻、疼痛、皮肤和/或眼睛发黄、或深色尿)。与等同未处理对照相比,如由任何标准技术测定的,此类降低为至少5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%或更多。用于向受试者施用本文所描述的试剂和组合物的各种方法是本领域技术人员已知的。在一个实施方案中,试剂为全身或局部施用(例如,施用至肝脏)。在一个实施方案中,试剂为静脉内施用。在一个实施方案中,试剂为连续、间隔、或偶发施用。试剂的施用途径将对于待递送的试剂的种类(例如,miRNA、细胞、或RNAi)被优化,并且可由熟练的技术人员来确定。

[0278] 本文所描述的试剂和药物组合物可通过导致受试者中有效治疗的任何合适的途径施用至有需要的受试者。如本文所用,术语“施用”和“引入”可交换使用并且是指通过导致在例如感染或癌症的部位等期望部位处的此类试剂的至少部分的定位、使得产生期望的效果(一种或多种)的方法或途径将本文所描述的试剂或药物组合物(例如,抗体、抗体药剂、或其WISP1结合片段)置于受试者中。试剂或药物组合物可通过全身递送试剂或递送至期望表面或靶标的任何施用方式来施用至受试者,并且可包括但不限于,注射、输注、滴注、和吸入施用。就可保护各种试剂免于肠道中失活的程度而言,还预期口服施用形式。“注射”包括但不限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眼眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、脑脊髓内(intracerebro spinal)、和胸骨内注射和输注。

[0279] 试剂(例如,抗体、抗体药剂、及其WISP1结合片段)可以与良好的医疗实践相符的方式配置、给药(dosed)、和施用。在该情况下考虑的因素包括正在治疗的特定疾病、正在治疗的特定受试者、个体受试者的临床状况、病症的原因、试剂的递送部位、施用方法、施用时间表、和医师已知的其它因素。待施用的试剂的“治疗有效量”受到此类考虑的支配,并且是指改善、治疗、或稳定癌症;增加时间直至进展(无进展生存期间)或治疗或防止肝病的发生或复发所必须的最小量。在一些实施方案中,例如,试剂任选地与一种或多种目前用于预防或治疗感染的附加治疗剂配置。此类其它试剂的有效量取决于制剂中存在的试剂(例如,抗体及其WISP1结合片段)的量、病症或治疗的种类、和上文所讨论的其它因素。这些通常以相同剂量和如本文之前所用的施用方式使用或以约1至99%的迄今为止采用的剂量使用。

[0280] 剂量

[0281] 对于肝病的治疗,如本文所描述,试剂(例如,抗体、抗体药剂、或其WISP1结合片段)的合适的剂量将取决于待治疗的肝病,如上所限定的,疾病的严重程度和进程,是否出于预防或治疗目的施用试剂,先前的治疗适应症,受试者的临床史和对试剂的响应,和主治

医师的判定。试剂以一次或在一系列的治疗中适当地施用至受试者。在联合治疗方案中,试剂和一种或多种本文所描述的附加治疗剂以治疗有效或协同作用的量施用。

[0282] 如本文所用,“单位剂型”是指适合一次施用的剂量。举例来说,单位剂型可以是置于例如注射器或静脉内滴注包(drip bag)递送装置中的治疗剂的量。在一个实施方案中,单位剂型以单次施用施用。在另一个实施方案中,多于一个的单位剂型可同时施用。

[0283] 如本文所描述的试剂的剂量可由医师确定并根据需要调节以适合观察到的治疗的效果。关于治疗的持续时间和频率,熟练的临床医生通常监测受试者以确定何时治疗提供治疗利益、和确定是否施用其它细胞、中止治疗、重启治疗、或对治疗方案进行其它改变。剂量不应过大而导致不利的副作用,例如细胞因子释放综合征。通常,剂量将随着患者的年龄、病况、和性别而变化,并且可由本领域技术人员来确定。在发生任何并发症的情况下,剂量还可由个别医师进行调节。

[0284] 治疗剂的剂量范围取决于效力,并包含足够大的量以产生期望的效果。剂量不应过大而导致不可接受的不利的副作用。通常,剂量将随着患者的年龄、病况、和性别而变化,并且可由本领域技术人员来确定。在任何并发症的情况中,剂量还可由个别医师来调节。在一些实施方案中,剂量范围为0.001mg/kg体重至100mg/kg体重。在一些实施方案中,剂量范围为5 μ g/kg体重至100 μ g/kg体重。可选地,剂量范围可被滴定为将血清水平维持在1 μ g/mL和1000 μ g/mL之间。对于全身施用,受试者可被施用治疗量,诸如如,0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg以上。这些剂量可通过一个或多个分开的施用来施用、或通过连续输注来施用。对于在几天或更长时间内的重复施用,取决于病况,治疗可持续直至例如,肝病被治疗,如通过上文所描述的或本领域已知的方法来测定的。然而,其它剂量方案也可有有用的。

[0285] 联合疗法

[0286] 在一个实施方案中,本文所描述的试剂或组合物用作单药疗法。在一个实施方案中,本文所描述的试剂可与用于肝病的其它已知的试剂和疗法组合使用。如本文所用,“组合”施用是指在受试者遭受病症折磨期间,将两种(或多种)不同治疗递送至受试者,例如,在受试者已被诊断为患有病症(肝病)之后和病症已被治愈或消除或治疗已由于其它原因停止之间,递送两种或更多种治疗。在一些实施方案中,在第二治疗的递送开始时,仍发生一种治疗的递送,使得施用方面存在重叠。这在本文中有时被称为“同时”或“并行递送”。在其它实施方案中,一种治疗的递送在其它治疗的递送开始前停止。在任一情况的一些实施方案中,由于组合施用,治疗更有效。例如,第二治疗更有效,例如,与如果不存在第一治疗的情况下施用第二治疗时可看到的相比,较少第二治疗的情况下看到等效效果、或第二治疗较大程度地降低症状,或在第一治疗中看到类似情况。在一些实施方案中,递送使得症状降低,或与病症相关的其它参数比在缺少其它治疗的情况下递送第一治疗时观察到的参数更高。两种治疗的效果可以是部分累积的、完全累积的、或比累积的更高。递送可使得当递送第二治疗时,递送的第一治疗的效果仍为可检测的。本文所描述的试剂和至少一种附加疗法可在相同或在分开的组合物中同时施用、或顺序施用。对于顺序施用,可首先施用本文所描述的试剂,可第二个施用附加试剂,或施用的顺序可为相反的。试剂和/或其它治疗剂、过程、或形式可在活性病症(active disorder)的过程中施用,或可在缓解或较少活性

疾病中施用。试剂可在另一治疗之前施用,与治疗并行施用,治疗后施用,或在病症的缓解期间施用。

[0287] 目前用于治疗肝病的疗法包括但不限于:熊去氧胆酸(UDCA,也被称为乌索去氧胆酸(ursodiol)、INN、NAN、AAN、或USAN)、考来烯胺、康力龙、纳曲酮、利福平、匹格列酮、二甲双胍、罗格列酮、洛贝格列酮、视黄醇酯、维生素A、肝透析、或肝移植或本领域已知的用于肝病的任何其它治疗。在一个实施方案中,本文所描述的试剂或组合物不与另一疗法施用。具体地,本文所描述的试剂或组合物不与以下施用:熊去氧胆酸(UDCA,也被称为乌索去氧胆酸(ursodiol)、INN、NAN、AAN、或USAN)、考来烯胺、康力龙、纳曲酮、利福平、匹格列酮、二甲双胍、罗格列酮、洛贝格列酮、视黄醇酯、维生素A、肝透析、或肝移植或本领域已知的用于肝病的任何其它治疗。

[0288] 当组合施用时,试剂或组合物和附加试剂(例如,第二或第三试剂)、或全部,可以以高于、低于或与例如单药疗法等单独使用各个试剂的量或剂量相同的量或剂量施用。在某些实施方案中,试剂、附加试剂(例如,第二或第三试剂)、或全部的施用量或剂量低于(例如,至少20%、至少30%、至少40%、或至少50%)单独使用各个试剂的量或剂量。在其它实施方案中,导致期望效果(例如,肝病的治疗)的试剂、附加试剂(例如,第二或第三试剂)、或全部的施用量或剂量低于(例如,至少20%、至少30%、至少40%、或至少50%)实现相同治疗效果所需的单独各个试剂的量或剂量。

[0289] 肠胃外剂型

[0290] 本文所描述的试剂的肠胃外剂型可通过各种途径施用至受试者,包括但不限于,皮下、静脉内(包括团注(bolus injection))、肌内、和动脉内。由于肠胃外剂型的施用通常绕过患者针对污染物的天然防御,肠胃外剂型优选为无菌的或在施用至患者前可被无菌化的。肠胃外剂型的实例包括但不限于,准备用于注射的溶液、准备被溶解于或分散在药学上可接受的载体用于注射的干燥产物、准备用于注射的悬浮液、控释肠胃外剂型、和乳液。

[0291] 如本文所用的短语“肠胃外施用”或“肠胃外地施用”是指除了肠内和局部施用以外的其它施用形式,通常通过注射。如本文所用的短语“全身施用”、“全身地施用”、“外周施用”、和“外周地施用”是指除了直接施用至例如肿瘤部位等靶位点、组织、或器官以外的治疗治疗剂的施用,使得其进入受试者的循环系统并由此经历新陈代谢和其它类似过程。在其它实施方案中,当病症允许时,例如通过直接注射等局部地施用试剂,并且注射可周期性地重复。

[0292] 可用于提供本公开的肠胃外剂型的合适的运载体是本领域技术人员公知的。实例包括但不限于:无菌水;注射USP用水;盐水溶液;葡萄糖溶液;水性运载体,例如但不限于,氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液、和乳酸盐林格氏注射液;水溶性运载体,例如但不限于,乙醇、聚乙二醇、和丙醇;和非水性运载体,例如但不限于,玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、和苯甲酸苄酯。

[0293] 使用本文所描述的方法的疗法的持续时间将延续至和医学上所指示的一样长或直至实现期望的治疗效果(例如,本文所描述的那些)。在某些实施方案中,本文所描述的抗体或抗原结合片段的施用持续1个月、2个月、4个月、6个月、8个月、10个月、1年、2年、3年、4年、5年、10年、20年、或多至受试者的寿命的数年。

[0294] 控释和延迟释放剂型

[0295] 在本文所描述的方面的一些实施方案中,试剂或组合物通过控释或延迟释放方式来施用至受试者。理想地,药物治疗中优化设计的控释制剂的使用表征为采用最少的药物在最小时间量内治愈或控制病况。控释剂型的优势包括:1)扩大药物的活性;2)降低剂量频率;3)增加患者依从性;4)使用较少总药物;5)降低局部或全身副作用;6)最小化药物累积;7)降低血液水平波动;8)改善治疗的功效;9)降低药物活性的增强作用或丧失;和10)改善疾病或病况的控制的速度(Kim,Cherng-ju,Controlled Release Dosage Form Design,2 (Technomic Publishing,Lancaster,Pa.:2000))。控释制剂可用于控制式(I)的化合物的作用的开始、作用的持续时间、治疗窗口内的血浆水平、和峰值血药水平(peak blood level)。特别地,控释或缓释剂型或制剂可用于确保实现试剂的最大效力、同时最小化可由于药物给药不足(即,低于最小治疗水平)以及超过药物的毒性水平而发生的潜在不良反应和安全问题。

[0296] 各种已知控释或缓释剂型、制剂、和装置可被采用以用于任何本文所描述的试剂。实例包括但不限于在以下中所描述的那些:美国专利号:3,845,770;3,916,899;3,536,809;3,598,123;4,008,719;5674,533;5,059,595;5,591,767;5,120,548;5,073,543;5,639,476;5,354,556;5,733,566;和6,365,185,其各自以其整体引用结合在此。这些剂型可用于提供一种或多种活性成分的慢释放或控释,以各种比例使用例如羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶、渗透膜、渗透系统(例如**OROS®**(Alza Corporation,Mountain View,Calif.USA))、多层涂层、微粒、脂质体、或微球或其组合物,以提供期望的释放性能。此外,离子交换材料可用于制备公开的化合物的固定化的、吸附的盐形式,由此影响药物的控制递送。具体阴离子交换剂的实例包括但不限于**DUOLITE®**A568和**DUOLITE®**AP143(Rohm&Haas, Spring House, Pa. USA)。

[0297] 功效

[0298] 本文所描述的试剂的功效,例如对于肝病的治疗的功效,可通过熟练的医师来确定。然而,如本文所用的术语,如果肝病的一个或多个标志或症状被以有益方式改变,其它临床上接受的症状被改善、或甚至减轻,或期望的响应被诱导,例如在根据本文所描述的方法的治疗后以至少10%被诱导,则治疗被认为是“有效治疗”。功效可通过例如测定根据本文所描述的方法治疗的病况的标志、指标、症状、和/或发病率、或例如疲劳、疼痛、体重减轻、或深色尿等任何其它合适的可测定的参数来评价。功效还可通过由住院治疗评价的个体没有恶化、或需要医疗干预(即,症状的进展)来测定。测定这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或本文所描述的。

[0299] 可以在本文所描述的病况的动物模型中评价功效,例如,视情况可为肝病的小鼠模型或合适的动物模型。当使用实验动物模型时,在观察到例如黄疸、疲劳、恶心、呕吐、尿颜色、腹痛等标志中的统计学显著改变时,证实了治疗的功效。

[0300] 如本文所用术语“有效量”是指本文所述的试剂或组合物可被施用至患有或诊断患有肝病、需要减轻疾病的至少一个或多个症状的受试者的量。因此,术语“治疗有效量”是指当施用至典型受试者时,足以提供特定抗肝病效果的试剂或组合物的量。在各种情况下,如本文所用的有效量还可包括足以延迟疾病的症状的发展、改变疾病的症状的进程(例如,减慢肝病的进展)、或逆转疾病的症状(例如,修正或停止疾病的症状)的试剂的量。因此,通常不可指定准确的“有效量”。然而,对于任何给定情况,根据需要,“有效量”可由本领域常

规技术人员仅使用常规实验来确定。

[0301] 在一个实施方案中,试剂或组合物连续(例如,在时间段内以恒定水平)施用。试剂的连续施用可例如通过表皮贴(epidermal patch)、连续释放剂型、或体上注射器(on-body injector)。

[0302] 在一个实施方案中,试剂或组合物以间隔(例如,在给定时间段内以各种水平)施用。

[0303] 有效量、毒性、和治疗功效可通过细胞培养或实验动物中的标准药理学过程来评价。剂量可取决于所采用的剂型和所利用的施用方法而变化。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数并且可表达为比LD50/ED50。有限表现大治疗指数的组合物和方法。最初可从细胞培养试验估计治疗有效剂量。并且,剂量可在动物模型中配置以实现如在细胞培养中、或在合适的动物模型中所确定的IC50(即,实现症状的最高抑制的一半的试剂的浓度)的循环血浆浓度范围。血浆中的水平可例如通过高效液相色谱法来测定。任何特定剂量的效果可通过合适的生物检验来检测,其中,例如,测定肝功能、或血液工作。剂量可由医师确定并根据需要调节以适合观察到的治疗的效果。

[0304] 在以下数段中可进一步描述本文所提供的发明:

[0305] 1.一种治疗或预防肝病的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

[0306] 2.根据段1所述的方法,其中所述肝病选自自由以下组成的组:原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝炎、和硬皮病。

[0307] 3.根据任何前述段所述的方法,其中所述WISP1是选自自由以下组成的组的剪接变体:WISP1v、WISP1vx、和WISP1 δ 外显子3-4。

[0308] 4.根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。

[0309] 5.根据任何前述段所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。

[0310] 6.根据任何前述段所述的方法,其中WISP1在靶细胞中受到抑制。

[0311] 7.根据任何前述段所述的方法,其中所述靶细胞为哺乳动物细胞。

[0312] 8.根据任何前述段所述的方法,其中所述靶细胞为肝星状细胞、成纤维细胞、或肌成纤维细胞。

[0313] 9.根据任何前述段所述的方法,其中所述肝星状细胞为静止的。

[0314] 10.根据任何前述段所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂通过直接注射、皮下注射、肌肉注射、或经鼻给药来施用。

[0315] 11.根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1是抑制WISP1活性或降低WISP1蛋白水平。

[0316] 12.根据任何前述段所述的方法,其中与合适的对照相比,WISP1的活性被抑制至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。

[0317] 13.根据任何前述段所述的方法,其中与合适的对照相比,WISP1的水平被降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。

[0318] 14.一种组合物,其包括抑制WISP1的抗体或抗体药剂、和药学上可接受的载体。

- [0319] 15. 根据任何前述段所述的组合物,其中抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。
- [0320] 16. 根据任何前述段所述的组合物,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。
- [0321] 17. 根据任何前述段所述的组合物,其中所述组合物配置为治疗或预防肝病。
- [0322] 18. 一种治疗受试者的肝病的方法,所述方法包括:
- [0323] a. 检测受试者的生物样品中的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的水平;
- [0324] b. 将(a)的测定结果与参考水平比较;
- [0325] c. 将(a)中与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的受试者鉴定为患有肝病;和
- [0326] d. 向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。
- [0327] 19. 根据任何前述段所述的方法,其还包括在(a)之前从受试者获得生物样品。
- [0328] 20. 根据任何前述段所述的方法,其中所述肝病为原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝炎、或硬皮病。
- [0329] 21. 根据任何前述段所述的方法,其中所述生物样品为血液样品、组织、血沉棕黄层、血清、或组织。
- [0330] 22. 根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。
- [0331] 23. 根据任何前述段所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%同源性。
- [0332] 24. 一种用于治疗或预防肝病的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用抑制WISP1的试剂。
- [0333] 25. 根据任何前述段所述的方法,其中所述肝病选自自由以下组成的组:原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝炎、和硬皮病。
- [0334] 26. 根据任何前述段所述的方法,其中所述WISP1为选自自由以下组成的组的剪接变体:WISP1v、WISP1vx、和WISP1 δ 外显子3-4。
- [0335] 27. 根据任何前述段所述的方法,其中所述WISP1在靶细胞中受到抑制。
- [0336] 28. 根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1的所述试剂选自自由以下组成的组:小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。
- [0337] 29. 根据任何前述段所述的方法,其中微小RNA是微小RNA15a或miRNA412。
- [0338] 30. 根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。
- [0339] 31. 根据任何前述段所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%同源性。
- [0340] 32. 根据任何前述段所述的方法,其中所述试剂通过直接注射、皮下注射、肌肉注射、或经鼻给药来施用。
- [0341] 33. 根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1是抑制WISP1活性或降低WISP1蛋白水平。
- [0342] 34. 根据任何前述段所述的方法,其中与合适的对照相比,WISP1的活性被抑制至

少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。

[0343] 35. 根据任何前述段所述的方法,其中与合适的对照相比,WISP1的水平被降低至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或更多。

[0344] 36. 一种组合物,其包含抑制WISP1的试剂、和药学上可接受的载体。

[0345] 37. 根据任何前述段所述的组合物,其中抑制WISP1的所述试剂选自由以下组成的组:小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。

[0346] 38. 根据任何前述段所述的组合物,其中微小RNA是微小RNA15a或miRNA412。

[0347] 39. 一种治疗受试者的肝病的方法,所述方法包括:

[0348] a. 检测受试者的生物样品中的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的水平;

[0349] b. 将(a)的测定结果与参考水平比较;

[0350] c. 鉴定(a)中与作为患有肝病的对照水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的受试者;和

[0351] d. 向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的试剂。

[0352] 40. 根据任何前述段所述的方法,其还包括在(a)之前从受试者获得生物样品。

[0353] 41. 根据任何前述段所述的方法,其中所述肝病为原发性胆汁性胆管炎、自身免疫性肝炎、 α 1抗胰蛋白酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝炎、或硬皮病。

[0354] 42. 根据任何前述段所述的方法,其中所述生物样品为血液样品、组织、血沉棕黄层、血清、或组织。

[0355] 43. 根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1的试剂选自由以下组成的组:小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。

[0356] 44. 根据任何前述段所述的方法,其中微小RNA是微小RNA15a或miRNA412。

[0357] 45. 根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。

[0358] 46. 根据任何前述段所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。

[0359] 47. 一种产生表达抑制WISP1的试剂的工程化肝星状细胞或其群体的方法,所述方法包括:使细胞与抑制WISP1的试剂相接触,和培养细胞足够长的时间来允许试剂的表达。

[0360] 48. 根据任何前述段所述的方法,其中所述细胞为静止的。

[0361] 49. 根据任何前述段所述的方法,其中所述接触包括使细胞与试剂或编码试剂的载体相接触。

[0362] 50. 根据任何前述段所述的方法,其中所述接触包括转导、核转染、电穿孔、直接注射、和/或转染。

[0363] 51. 根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1的试剂选自由以下组成的组:小分子、抗体或抗体药剂、肽、基因组编辑系统、病毒载体、miRNA、和siRNA。

[0364] 52. 根据任何前述段所述的方法,其中微小RNA是微小RNA15a或miRNA412。

[0365] 53. 根据任何前述段所述的方法,其中抑制WISP1的抗体或抗体药剂选自由以下组成的组:mab1680、AF1680、SAB2501114、ab60114、和ab65943。

[0366] 54. 根据任何前述段所述的方法,其中所述抗体或抗体药剂的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-4、6、或12-120中的任一者具有至少70%的同源性。

[0367] 55.一种细胞系,其包括通过段46-53中的任一项所述的方法产生的肝星状细胞。

[0368] 56.一种药物组合物,其包括通过任何前述段所述的方法产生的肝星状细胞或其群体、和药学上可接受的载体。

[0369] 57.一种治疗或预防肝病的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用通过任何前述段所述的方法产生的细胞、任何前述段所述的细胞、或任何前述段所述的药物组合物。

[0370] 58.一种降低受试者的纤维化的方法,所述方法包括:向有需要的受试者施用通过任何前述段所述的方法产生的细胞、任何前述段所述的细胞、或任何前述段所述的药物组合物。

[0371] 59.一种治疗受试者的肝病的方法,所述方法包括:

[0372] a.接受将与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的受试者鉴定为患有肝病的试验的结果;和

[0373] b.向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的抗体或抗体药剂。

[0374] 60.一种治疗受试者的肝病的方法,所述方法包括:

[0375] a.接受将与参考水平相比具有增加的WISP1和/或Yap、Colla1、Acta2的受试者鉴定为患有肝病的试验的结果;和

[0376] b.向患有肝病的受试者施用抑制WISP1的试剂药剂。

[0377] 实施例

[0378] 实施例1:对进行性肝病的治疗

[0379] 响应于对于肝病疗法的未满足的需要,本文描述了在激活的肝星状细胞(HSC)中独立地诱导静止的微小RNA miR-15a和miR-412,所述肝星状细胞是在肝的纤维化进展中起到中心作用的细胞类型。此外,miR-15a直接靶向WISP1以抑制其在激活的HSC中的促纤维化功能。通过使用微小RNA和它们的靶标来促进HSC静止,微小RNA可以是控制PBC中进行性肝纤维化的有用的疗法(图1)。不希望受到特定理论的束缚,预期miR-15a和miR-412在HSC中诱导静止,这可其后说明miR-15a已知靶向WISP1的功能。

[0380] 本文所描述的工作显示由miR-15a或miR-412诱导的静止样HSC引起CC14激发小鼠中肝损伤和纤维化的改善。给出miR-15a或miR-412在CC14模型中的有益效果,小鼠治疗研究可使用胆汁淤积性纤维化模型、胆管结扎(BDL)、和3,5-二乙氧羰基-1,4-二氢三甲基吡啶(3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrochollidine,DDC)来扩展。可试验三种不同的miRNA递送系统:1)使用组成型表达miR-15a或miR-412的静止样HSC的细胞疗法,2)将表达miR-15a或miR-412的慢病毒注射至尾静脉,和3)将包装在脂质基载体中的miR-15a或miR-412的化学修饰的模拟物注射至尾静脉。对照和处理小鼠可用于分析结果。

[0381] 本文描述的工作显示MiR-15a可直接靶向WISP1以抑制其在HSC中的促纤维化功能。可限定BDL和DDC激发的背景中的WISP1-空(null)小鼠的肝表型。可评价激发后的肝损伤和HSC功能障碍的严重程度,并与野生型小鼠的那些相比较。胆汁淤积型纤维化的小鼠模型可由WISP1阻断抗体处理,然后用于分析结果。

[0382] 曾被命名为原发性胆汁性肝硬化的原发性胆汁性胆管炎(PBC)是潜伏性的肝病,导致肝内胆管的进行性破坏、胆汁淤积、门静脉周炎症、和最终的胆纤维化,结束于肝硬化末期肝病。尽管遗传和环境因素可能相互作用以呈现疾病,它是发病机理不明的自身免疫性疾病。有趣地,PBC影响女性远远大于男性,具有9:1女性对男性疾病比。在美国,每1百万

人-年的PBC的年龄调整的发病率对于女性为45,男性为7,而每1百万人的患病率对于女性为654,男性为121[1]。

[0383] 亲水性胆汁盐熊去氧胆酸(UDCA)仍是具有已证明对PBC的生存益处的唯一药物。其已显示延迟由改善的组织学和生物化学参数证明的疾病进展。尽管其活动的确切机制不明,其看起来针对有毒胆汁盐保护胆管细胞。不幸地,在次最优应答的情况下,30%-40%的UDCA治疗的个体仍经历疾病进展[2]。为了填补该治疗缺口,许多不同试剂已处于临床试验,但例如奥贝胆酸等一些重要的试验药物仍具有明显的副作用并且缺少生存益处的证据[3]。

[0384] 如大部分的慢性肝病一样,PBC从炎症进展至纤维化。在该病理级联反应中,肝星状细胞(HSC)被认为在肝纤维发生中起到中心作用[4-6]。HSC以两种形式存在。在健康个体中,它们为静止的,表征为多个富有类维生素A的脂滴。然而,一旦被激活,它们失去它们的脂滴并且成为促纤维化肌成纤维细胞,分泌促进瘢痕形成的胶原和介体[7,8]。尽管已完善确立肝纤维化中HSC的重要性,关于该细胞类型仍有很多未知的地方。

[0385] 在关于HSC的知识的多个缺口中,是目前微小RNA(miRNA)在确定HSC激活状态中的作用的理解。MiRNA是短的、非编码基因,通常长度为22个核苷酸并且涉及全部生物学和病理学过程。它们通过在它们mRNA靶内与互补序列不完美的碱基配对以诱导破坏或翻译抑制来下调特定编码基因。各miRNA可调控许多不同编码基因,同时各个靶基因可被许多不同miRNA调控,构成基因调控网络的复杂层[9]。本文所描述的实验已显示miRNA对于细胞增殖和重编程是必需的[10-12]。然而,miRNA在HSC激活或逆转至静止中的作用仍未被彻底探索。

[0386] 尽管各组已在HSC中描述了总体miRNA表达模式,它们的表达状态的功能显著性在很大程度上仍为不明的[13-15]。作为回答,代替依赖于大规模表达谱,已开发功能性筛选来系统性鉴定强制激活HSC返回至静止的miRNA,并且通过该努力,鉴定miR-15a和miR-412。先前未在肝星状细胞的背景下研究miR-15a和miR-412。然后,miR-15家族被发现在心脏中抑制Tgf- β 途径以潜在减弱纤维化[16]。通过这些miRNA或它们的下游靶标促进HSC静止可防止PBC中的纤维化进展。该研究的目的在于评价miR-15a、miR-412、和它们的直接靶标在治疗PBC中的治疗效果。

[0387] 结果

[0388] 本文所描述的无偏见的功能性筛选利用当HSC在塑料表面上生长时成为激活的HSC的自然趋势。随着HSC成为激活的,它们失去在静止HSC中大量存在的脂滴。利用该有用的表型二分法,通过追踪在细胞质中再形成的脂滴的水平来搜索强制激活HSC以变得更静止样的miRNA。由于miRNA已知同时靶向多个编码基因以影响例如器官发育、致癌作用、或细胞重编程等整个细胞程序[17],预期即使单个miRNA也可诱导转分化(transdifferentiation)。

[0389] 为了鉴定促进激活的HSC向静止的逆转的那些miRNA,在激活的HSC从全基因组miRNA库接受单个miRNA模拟物之后,对具有类维生素A的细胞内脂滴的再现度扫描以作为静止的标记(图2)。实际上,一些孔中的HSC在三天内显示再形成的Bodipy染色阳性脂滴。该初始筛选产生15个原始击中(primary hit)。基于在小鼠和人HSC中人直系同源的存在和再形成脂滴的能力(图3),选择miRNA即miR-15a和miR-412用于进一步的研究。新形成的脂滴

由紫外线下的荧光证明为类维生素A阳性,这与静止HSC中的那些相符(数据未显示)。转染的HSC的整体大小减小10-100倍,变得更加静止样(图4)。此外,miR-15a或miR-412的强制表达下调激活的两种最重要的基因标记, α 平滑肌肌动蛋白(Acta2)和 α -1I型胶原(Coll 1a1)(图4)。

[0390] 对于更多的综合表达分析,深度RNA测序表明,接受的miR-15a或miR-412具有比激活的细胞40-50%更接近静止样HSC的全局转录图谱(数据未显示)。最重要的,通过miR-15a或miR-412成为静止样的HSC具有类似于真正静止的HSC的功能性表型。离体实验表明,当两种细胞类型共培养时,静止样HSC在健康肝细胞中不诱导脂肪变性。相反,当它们共培养时,未由候选物miRNA处理的激活的HSC诱导肝细胞脂肪变性(图5)。此外,这些逆转的HSC能够从共培养的人肝细胞癌细胞系HepG2和Huh7减少促炎细胞因子表达(图6)。最终,如期望的,与静止HSC相比,内源miR-15a和miR-412在激活的HSC中具有减少的表达水平,尽管对于miR-15a不显著(图7),并且miR-41看起来在促进激活的培养条件中强制激活的HSC朝向静止的逆转。这和其它关键离体观察对于以下试验是允许的:这些miRNA是否可被体内递送以减弱传统CCl₄小鼠模型(口服管饲100 μ l的40% CCl₄,一周两次)中肝病理学水平,特别是由于表达miR-15a或miR-412的HSC即使在具有激活促进信号的患病肝中可维持静止样状态。通过细胞接触和可溶介体,静止样HSC可在肝内诱导其它细胞类型以抑制它们的促进炎症或纤维化的信号。

[0391] 尽管存在递送miRNA至活的小鼠的不同方法,被选择注射的HSC通过组成型表达miR-15a或miR-412来离体成为静止样。重编程的HSC在四周CCl₄激发的第三周中注射一次。通过肝细胞内发射的GFP信号的可视化来确认注射的HSC接枝在肝上,插入表达miRNA的piggyBac载体[18](图8)。更重要地,由静止样HSC处理的小鼠具有显示减少的肝中的气球样(ballooning)、细胞凋亡、炎症、和纤维化(图8)、和较少肝胶原表达(图9)的组织学。

[0392] 这两种miRNA候选物可能下调促进肝炎症和纤维化的HSC基因。尽管可能许多基因被miR-15a和miR-412抑制,WISP1已实验地验证miR-15a的直接靶向。激活的HSC表达的WISP1几乎为静止HSC水平的30倍(数据未显示),并且人PBC中的HSC表达的WISP1远远高于正常肝中(图10)。最终,miR-15a被预测靶向在3'-UTR内含有两个潜在miR-15a结合序列的WISP1。因此,在组成型激活荧光素酶报告基因的后面克隆推测的靶序列或它们的突变变体。当这些报告子之一与miR-15a模拟物共转染时,具有野生型序列的报告子具有减少的荧光素酶表达,而具有突变序列的报告子不具有减少的荧光素酶表达,表明miR-15a结合至WISP1靶序列二者(图11)。WISP1是实现HSC中一些miR-15a作用的关键靶基因。

[0393] 在胆管炎的小鼠模型中试验miR-15a和miR-412

[0394] 递送miR-15a或miR-412是用于PBC的疗法:鉴于本文所描述的令人惊讶的结果,扩展体内实验以进一步评价miR-15a和miR-412在治疗PBC中的潜力。为了评价这些miRNA是否仅通过HSC发挥它们的功能或通过其它细胞类型更广泛地发挥它们的功能,可使用病毒载体或模拟物全身递送miRNA代替细胞疗法。对于所有体内处理实验,功效可通过进行以下来评价:肝中的促纤维化基因的PCR、包括H&E和天狼星红染色的组织学、肝羟脯氨酸试验、和测定血浆ALT和碱性磷酸酶。

[0395] PBC的各模型在表示人PBC方面存在优点和缺点。对于该研究的目的,需要模型相对快地始终进展至胆纤维化以试验可导致纤维化和炎症减少的miRNA候选物和WISP的抑

制。大部分的PBC的遗传模型不导致肝纤维化或非常慢地导致肝纤维化[19]。因此,可使用通过胆管结扎(BDL)手术地诱导和由3,5-二乙氧羰基-1,4-二氢三甲基吡啶(DDC)化学诱导可靠地达到纤维化的两种胆管炎模型。所有实验对于BDL模型可在3周后结束并且对于DDC模型可在4周后结束,因为这些需要时间来发展显著水平的胆汁淤积纤维化[20-22]。

[0396] 使用间充质干细胞和巨噬细胞,多个组已容易地尝试对肝纤维化的细胞疗法,并且取得一些成功[23]。然而,本文所描述的实验首次利用有目的地工程化HSC以防止肝纤维化。尽管初始体内处理是引人注目的,考虑到迄今为止仅检查CCl₄模型,在胆管炎的小鼠模型中检查该细胞疗法的效果为有用的。对于全部细胞疗法实验,可对脾和由miR-15a或miR-412重编程的500,000个静止样HSC进行注射。全部合适的对照,还可包括例如无处理的对照组和由未被重编程的HSC处理的对照组。

[0397] 由BDL激发21天的小鼠通常发展显著的纤维化。在BDL激发的21天过程中,可在第7天和第14天注射重编程的HSC。在第21天处死全部小鼠。由DDC激发28天的小鼠通常发展显著纤维化。在DDC激发的28天过程中,可在第14天和第21天注射重编程的HSC。在第28天处死全部小鼠。

[0398] 初始实验表明,注射由miR-15a或miR-412重编程的HSC可降低CCl₄诱导的肝纤维化中的胶原表达和肝损伤的整体水平。尽管通过细胞疗法递送miRNA已显示为有希望的,可探索其它递送方法。一种方法是注射表达miRNA的慢病毒。在BDL激发的21天过程中的第7天和第14天,慢病毒可表达miR-15a或miR-412至尾静脉。在第21天处死全部小鼠。在DDC激发的28天过程中的第14天和第21天,慢病毒可表达miR-15a或miR-412。在第28天处死全部小鼠。

[0399] 作为另一递送方法,可测试注射包装在脂质基运载体(B100 Scientific的MaxSuppressorTM)中的更稳定的、化学修饰的miRNA模拟物(Exiqon和Invitrogen)的可行性[24,25]。通过避免慢病毒,该方法或其变体具有用于人中的潜力。在BDL激发的21天过程中的第7天和第14天,可将含有miR-15a或miR-412的运载体注射至尾静脉。在第21天处死全部小鼠。在DDC激发的28天过程中的第14天和第21天,可注射含有miR-15a或miR-412的运载体。在第28天处死全部小鼠。

[0400] 由于在雌性小鼠中诱导肝纤维化是困难的,雄性小鼠可有利于用于本文所描述的体内处理研究。效能计算(power calculation)显示,8只小鼠用于各组以在0.01的p值和90%效能下的测定中检测 α 1I型胶原水平中50%减少,具有20%标准偏差。由miRNA处理HSC的最大的挑战之一是开发特异性靶向该细胞类型以最小化脱靶效果的递送系统。该递送系统可被优化以提高特异性。例如,最近开发的两种有希望的HSC递送系统为p75神经营养因子受体肽(p75NTRp)-标记的腺病毒和AAV6载体[26,27]。

[0401] 在胆管炎小鼠模型中评价WISP1的功能

[0402] MiR-15a靶Wisp1在PBC中促进炎症和纤维化:WISP1是基质细胞蛋白的Ccn家族的成员,所述基质细胞蛋白Ccn家族包括Cyr61(Ccn1)、Ctgf(Ccn2)、Nov(Ccn3)、WISP1(Ccn4)、Wisp2(Ccn5)、和Wisp3(Ccn6)。Ctgf已被确立为肝中重要的促纤维化因子[28]。

[0403] 有趣地,WISP1被发现在人先天性肺纤维化中被上调,并且用中和WISP1抗体处理博莱霉素导致肺纤维化的减弱[29]。此外,小动物研究显示,阻断WISP1改善CCl₄诱导的肝纤维化[30]。然而,WISP1在肝中的作用还未被详细研究,特别是在PBC背景中的。

[0404] 尽管,WISP1是miR-15a的直接靶标,其对HSC激活状态的影响和其在PBC的发病机理中的作用尚不清楚。已产生WISP1-空小鼠系以说明WISP1在骨形成中的作用,但其在肝中的功能未被研究[31]。这些小鼠为可生育的并且不具有明显的肝表型。它们的突变等位基因保存在加利福尼亚大学戴维斯分校中MMRRC设施(MMRRC facility in University of California at Davis)中的冷冻精子和胚胎中,其确保成功的突变小鼠来源。

[0405] 可通过肝病理学的整体严重程度来评价表型。可用BDL和DDC激发WISP1-空小鼠。可将由WISP1-空小鼠承受的所得肝损伤与野生型小鼠相比较。给出Wisp1在包括肺的其它器官中的已知促纤维化作用,WISP1-空小鼠被期望具有减少的肝纤维化和可能甚至减少的炎症。对于所有体内实验,可通过进行以下来评价肝表型:肝中促纤维化基因的PCR、包括H&E和天狼星红染色的组织学、肝羟脯氨酸检验、和测定血浆ALT和碱性磷酸酶。最后,可评价收获自胆纤维化的这些小鼠模型的HSC的功能性表型。可用BDL激发雄性野生型和WISP1-空小鼠。它们在第21天被处死。可用DDC激发雄性野生型和WISP1-空小鼠。它们在第28天被处死。

[0406] 然后,可从用BDL激发21天和用DDC激发28天的小鼠分离HSC。将这些HSC与健康肝细胞共培养以确定促炎介体是否被诱导。可将结果与经历相同激发的野生型HSC的结果相比较。

[0407] 由中和抗体阻断WISP1在小鼠肺中减弱博莱霉素诱导的纤维化[29]。类似地,阻断Wisp1可减少PBC中发生的炎症和纤维化水平。可用WISP1抗体处理胆管炎的小鼠模型并评价肝表型。

[0408] 由BDL激发21天的小鼠通常发展显著纤维化。处理组可在第7天和第14天接受先前用于处理博莱霉素诱导的肺纤维化的市售可得的WISP1抗体(R&D Systems)[29]。对照组可接受IgG。全部小鼠在第21天被处死。由DDC激发28天的小鼠通常发展显著纤维化。可在DDC激发的28天过程中第14天和第21天注射WISP1阻断抗体。全部小鼠在第28天被处死。

[0409] 如本文所述,WISP1是促炎和促纤维化介体,其可由抗体中和以减少炎症和体内纤维化的水平。因此,预期阻断WISP1还可改善胆纤维化。因此,通过分析激活的HSC的条件培养基,可鉴定旁分泌或自分泌的介体。可通过质谱法分析激活的HSC条件培养基的更详细的分析以鉴定作为药物靶标的其它介体。:

[0410] 参考文献-实施例1:

[0411] 1.Pandit S and Samant H(2017)Primary Biliary Cholangitis (PrimaryBiliary Cirrhosis).StatPearls,Treasure Island (FL)

[0412] 2.Pares A,Caballeria L and Rodes J(2006)Excellent long-term survival inpatients with primary biliary cirrhosis and biochemical response toursodeoxycholic Acid.Gastroenterology 130:715-20.doi:

[0413] 10.1053/j.gastro.2005.12.029

[0414] 3.Khanna Aand Jones DE(2017)Novel strategies and therapeutic optionsfor the management of primary biliary cholangitis.Therap AdvGastroenterol 10:791-803.doi:10.1177/1756283X17728669

[0415] 4.Friedman SL(2008)Mechanisms of hepatic fibrogenesis.

[0416] Gastroenterology 134:1655-69.doi:10.1053/j.gastro.2008.03.003

- [0417] 5.Friedman SL(2008)Hepatic stellate cells:protean,multifunctional, andenigmatic cells of the liver.Physiol Rev 88:125-72.doi:
- [0418] 10.1152/physrev.00013.2007
- [0419] 6.Puche JE, Lee YA, Jiao J, Aloman C, Fiel MI, Munoz U, Kraus T, Lee T, Yee HF, Jr. and Friedman SL (2013) A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice.
- [0420] Hepatology 57:339-50.doi:10.1002/hep.26053
- [0421] 7.Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, Iwaisako K, Moore-Morris T, Scott B, Tsukamoto H, Evans SM, Dillmann W, Glass CK and Brenner DA (2012) Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A 109:9448-53.doi:10.1073/pnas.1201840109
- [0422] 8.Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP and Schwabe RF (2013) Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. Nat Commun 4: 2823.doi:10.1038/ncomms3823
- [0423] 9.Szabo G and Csak T (2016) Role of MicroRNAs in NAFLD/NASH. Dig Dis Sci.doi:10.1007/s10620-015-4002-4
- [0424] 10.Kim BM, Thier MC, Oh S, Sherwood R, Kanellopoulou C, Edenhofer F and Choi MY (2012) MicroRNAs are indispensable for reprogramming mouse embryonic fibroblasts into induced stem cell-like cells. PLoS One 7:e39239.
- [0425] 11.Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM and Rajewsky K (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. Genes Dev 19:489-501.
- [0426] 12.Kim BM and Choi MY (2012) Non-canonical microRNAs miR-320 and miR-702 promote proliferation in Dgcr8-deficient embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun 426:183-9.
- [0427] 13.Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY and Li DG (2009) Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. FEBS J 276:5163-76.doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07213.x
- [0428] 14.Maubach G, Lim MC, Chen J, Yang H and Zhuo L (2011) miRNA studies in in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. World J Gastroenterol 17: 2748-73.doi:10.3748/wjg.v17.i22.
- [0429] 15.Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, Russo MW, Bonkovsky HL and Schrum LW (2012) Inhibitory effects of microRNA19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. Hepatology 56:300-10.doi:10.1002/hep.25613

- [0430] 16.Tijssen AJ, van der Made I, van den Hoogenhof MM, Wijnen WJ, vanDeel ED, de Groot NE, Alekseev S, Fluiter K, Schroen B, Goumans MJ, vander Velden J, Duncker DJ, Pinto YM and Creemers EE (2014) The microRNA-15 family inhibits the TGFβ-pathway in the heart. *Cardiovasc Res* 104:61-71. doi:10.1093/cvr/cvu184
- [0431] 17.Ivey KN and Srivastava D (2010) MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* 7:36-41.
- [0432] 18.Griffin TA, Anderson HC and Wolfe JH (2015) Ex vivo gene therapy using patient iPSC-derived NSCs reverses pathology in the brain of a homologous mouse model. *Stem Cell Reports* 4:835-46. doi:10.1016/j.stemcr.2015.02.022
- [0433] 19.Katsumi T, Tomita K, Leung PS, Yang GX, Gershwin ME and Ueno Y (2015) Animal models of primary biliary cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 48:142-53. doi:10.1007/s12016-015-8482-y
- [0434] 20.Fickert P, Stoger U, Fuchsbichler A, Moustafa T, Marschall HU, Weiglein AH, Tsybrovskyy O, Jaeschke H, Zatloukal K, Denk H and Trauner M (2007) A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol* 171:525-36. doi:10.2353/ajpath.2007.061133
- [0435] 21.Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F and Clavien PA (2008) Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg* 95:646-56. doi:10.1002/bjs.605022. Pollheimer MJ and Fickert P (2015) Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 48:207-17. doi:10.1007/s12016-014-8442-y
- [0436] 23.Terai S and Tsuchiya A (2017) Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the "point of no return" in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 52:129-140. doi:10.1007/s00535-016-1258-1
- [0437] 24.Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG and Slack FJ (2011) Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* 19:1116-22. doi:10.1038/mt.2011.48
- [0438] 25.Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D and Bader AG (2010) Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 70:5923-30. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0655
- [0439] 26.Song G, Pacher M, Balakrishnan A, Yuan Q, Tsay HC, Yang D, Reetz J, Brandes S, Dai Z, Putzer BM, Arauzo-Bravo MJ, Steinemann D, Luedde T, Schwabe RF, Manns MP, Scholter HR, Schambach A, Cantz T, Ott M and Sharma AD (2016) Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* 18:797-808. doi:10.1016/j.stem.2016.01.010
- [0440] 27.Rezvani M, Espanol-Suner R, Malato Y, Dumont L, Grimm AA, Kienle E, Bindman JG, Wiedtke E, Hsu BY, Naqvi SJ, Schwabe RF, Corvera CU, Grimm D and

Willenbring H(2016) In Vivo Hepatic Reprogramming of Myofibroblasts with AAV Vectors as a Therapeutic Strategy for Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* 18:809-16. doi:10.1016/j.stem.2016.05.005

[0441] 28. Chen L, Charrier A, Zhou Y, Chen R, Yu B, Agarwal K, Tsukamoto H, Lee LJ, Paulaitis ME and Brigstock DR (2014) Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology* 59:1118-29. doi:10.1002/hep.26768

[0442] 29. Konigshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Gunther A and Eickelberg O (2009)

[0443] WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119:772-87. doi:10.1172/JCI33950

[0444] 30. Li X, Chen Y, Ye W, Tao X, Zhu J, Wu S and Lou L (2015) Blockade of CCN4 attenuates CCl4-induced liver fibrosis. *Arch Med Sci* 11:647-53. doi:

[0445] 10.5114/aoms.2015.52371

[0446] 31. Maeda A, Ono M, Holmbeck K, Li L, Kilts TM, Kram V, Noonan ML, Yoshioka Y, McNerny EM, Tantillo MA, Kohn DH, Lyons KM, Robey PG and Young MF (2015) WNT1-induced Secreted Protein-1 (WISP1), a Novel Regulator of Bone Turnover and Wnt Signaling. *J Biol Chem* 290:14004-18.

[0447] doi:10.1074/jbc.M114.628818.

[0448] 实施例2:非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的治疗

[0449] 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 在下一个5-10年中在发达国家中已变为末期肝病、肝移植、和肝细胞癌的最常见原因。目前,由于不存在FDA批准的药物,降低可导致NAFLD的风险因素是主要的管理方式。因此,开发对于NAFLD有效的疗法是极其重要的。

[0450] 激活的肝星状细胞 (HSC) 已知在肝的纤维化进展中起到关键作用,并且本文展示的数据表明,微小RNA miR-15a和miR-412独立地恢复激活的HSC返回至静止。此外,miR-15a直接靶向WISP1以抑制其在激活的HSC中的促脂肪变性 (pro-steatotic) 和促炎症功能。希望不受特定理论的限制,推测miR-15a和miR-412在HSC中促进静止,这可其后抑制NAFLD中的纤维化进展。

[0451] 随着针对乙型肝炎和丙型肝炎的高度有效的抗病毒疗法的到来,非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 已变为最严重的肝病。NAFLD目前被认为是发达国家中最常见的肝病[1],并且预测在2025年成为末期肝病、肝移植和肝细胞癌的主要原因[2,3]。所述疾病在例如美国等富裕国家中特别常见,在那里64百万人预计受到影响,因为包括肥胖、糖尿病、和高脂血症等风险因素的高流行。此外,NAFLD的经济负担是惊人的,每年直接医疗费用推测为约1030亿美元[4]。所述疾病作为肝脂肪变性开始,但可进展至非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、纤维化,和最终的肝硬化性肝衰竭 (cirrhotic liver failure) 或肝细胞癌。NAFLD目前主要受到降低的风险因素的管理。然而,这些措施通常难以实现,并且甚至消除它们不确保有所改善[5]。考虑到NAFLD变成肝相关发病率的最常见原因并且目前没有药物来管理其,需要更好的治疗选项。如本文所描述的,是开发用于NAFLD的新疗法的第一步。

[0452] NAFLD以通过脂肪变性、炎症、和纤维化的逐步方式进展。在该病理学级联中,肝星状细胞(HSC)被认为在肝纤维发生中起到中心作用[6-8]。HSC以两种形式存在。在健康个体中,它们是静止的,表征为多个富有类维生素A的脂滴(图12)。然而,一旦被激活,它们失去它们的脂滴并且变成促纤维化肌成纤维细胞,分泌促进瘢痕化的胶原和介体(图12)[9, 10]。

[0453] 尽管HSC在肝纤维化中的重要性已被良好确立,关于该细胞种类仍有很多是未知的。例如,是否存在可逆转激活的HSC返回至静止的基因?HSC是否还涉及早期NAFLD、促进脂肪变性和验证,而不仅涉及纤维化?如果HSC有助于脂肪性肝炎或纤维化,涉及这些过程的关键介体是什么?回答这些问题并获得更好的生物学洞察力可导致用于管理NAFLD的新想法。

[0454] 在目前知识的许多缺口中,对微小RNA(miRNA)在确定HSC激活状态中的作用的解释是特别贫乏的。尽管各组已描述在HSC中的总体miRNA表达模式,它们的表达状态的功能显著性在很大程度上是不清楚的[11-13]。作为回答,研究已关注于首先确定miRNA功能,探索影响HSC的激活状态的关键miRNA。代替依赖于大范围表达谱,已开发功能性筛选和检验来系统性地鉴定强制激活的HSC返回至静止的miRNA,并且通过该努力,鉴定miR-15a和miR-412。通过这些miRNA或它们的下游靶标来促进HSC静止可防止NAFLD中的纤维化进展。

[0455] 最终,导致纤维化的激活的HSC对于NAFLD不为独特的。在达到肝硬化前,大部分慢性肝病涉及HSC促进纤维化几年。因此,如果治疗剂可通过靶向HSC来降低纤维化进展的速率,可以在NAFLD以外的其它肝病中使用该方法。这样的疗法的潜在影响是巨大的。即使对于已确立药物疗法的例如原发性胆肝硬化或自身免疫性肝炎等疾病来说,抑制纤维化进展的附加试剂可显著改善管理这些慢性疾病的能力。总言之,给出NAFLD的重要性和HSC在其纤维化进展中起到的中心作用,本文所描述的研究的重要性是广泛的。

[0456] 尽管几种化合物已在人体试验中用于治疗NAFLD,它们都不以防止或逆转HSC激活作为首要目标[5, 14, 15]。作为回答,第一主要创新开始于试图控制HSC的激活状态作为防止进行性肝损伤和纤维化的方法。本文所描述的体外筛选利用当HSC在塑料表面上生长时变得激活的自然趋势。随着HSC变得激活,它们失去在静止HSC中大量存在的脂滴(图12)。利用该有用的表型二分法,通过追踪在细胞质中再形成的脂滴的水平来寻找强制激活的HSC变得更静止样的miRNA。由于miRNA已知同时靶向多个编码基因以影响例如器官发育、致癌作用、或细胞重编程等整个细胞程序[16],有理由认为即使单个miRNA能够诱导该转分化。实际上,通过无偏见调查,鉴定出看起来逆转HSC从激活状态返回至静止的几个miRNA候选物,所述逆转由细胞内脂滴的再现来表明(图3)。这些miRNA的子集也导致朝向HSC静止的其它表型改变,包括基因表达模式、增殖速率、和对附近肝细胞的影响。利用miRNA来控制HSC激活状态的该创新奠定了开发防止肝纤维化的疗法的全新种类的基础。

[0457] 第二主要创新为使用静止样HSC的新细胞疗法的形式。尽管使用由miR-15a或miR-412的模拟物的瞬时转染完成了初始筛查和后续的体外检验,当使用可整合至基因组以在HSC中组成型表达任一种miRNA的piggyBac转座子载体时[17],它们看起来朝向静止样状态永久转分化,伴有形态学、表达、和功能中的巨大改变。引人注目地,当将这些重编程HSC注射至由0014激发的小鼠时,它们接枝在肝上并提高肝损伤和纤维化的水平。其它组已使用间充质干细胞或巨噬细胞在肝硬化中尝试细胞疗法[18],但这是第一次将工程化HSC用作

肝纤维化或NASH的疗法。

[0458] 最后一个主要创新是技术性的。如果HSC已知是NASH中肝纤维化的主要驱动因子,可以破坏它们的作用。然而,对该努力存在基础性挑战。阻碍HSC功能和作用机制的研究的最大的障碍之一是缺乏HSC与其它细胞类型的相互作用的、允许简单试验来评价功能性表型和作用机制的良好体外模型。为了满足该需要,开发使用原代小鼠HSC和肝细胞的共培养系统来重建这两种细胞类型在极为靠近的情况下的肝微环境。此外,通过将该技术与NASH的小鼠模型组合,可容易地测定NASH-HSC对附近肝细胞的效果。有趣地,来自胆碱缺乏的、L氨基酸限定的高脂饮食(CDAHFD模型(图13)的NASH-HSC在收获自健康小鼠的共培养肝细胞中诱导脂肪变性并刺激促炎细胞因子的表达(图14、15)[19]。该信号传导不需要细胞-细胞接触,因为共培养中的两种细胞类型可通过transwell来分离,意味着由HSC的可溶性因子(一种或多种)的分泌。实际上,即使当将来自培养的NASH-HSC的条件培养基施加于正常肝细胞而无共培养时,可再现肝细胞中脂肪累积的诱导(图16)。因此,该系统允许在肝细胞中诱导脂肪变性和促炎细胞因子的HSC分泌的介体的鉴定。通过使用简单、仍加强的、离体系统对NAFLD中HSC和肝细胞之间的相互作用建模,已建立可用于机械学和药物研发实验的技术。特别地,通过利用原代细胞代替细胞系,该共培养系统更忠实地模拟这两种细胞类型的体内病理生理微环境[20]。共培养系统是可行的,通过改良收获和培养这些细胞的现有方案使得质量最大化、同时最小化努力[21]。这些技术增强对于使用原代细胞递送一致且可再现结果是有用的。

[0459] 确定miR-15a和miR-412影响HSC激活的机制和程度。

[0460] 肝星状细胞(HSC)占肝中全部细胞的仅5%至15%,但已良好认识在进行性肝病中,他们激活后的巨大的促纤维化影响[6,7,23,24]。尽管几个研究表明激活的对静止的HSC中不同的miRNA表达[11-13],激活过程中的miRNA的功能在很大程度上仍为不清楚的。甚至很少有人了解miRNA在激活的HSC返回至静止的逆转中的作用,这是肝炎症和纤维化的解决方案中的HSC的一种可能的命运[9,25]。

[0461] 为了鉴定促进激活的HSC朝向静止的逆转的那些miRNA,设计无偏见功能筛选来寻找在激活的HSC接受来自全基因组miRNA库的单个miRNA模拟物后,具有作为静止的标志的类维生素A的细胞内脂滴的再现(图2)。调查在96孔板中进行,培养几乎无脂滴的激活的HSC。一旦将单个miRNA转染至各个孔,一些孔中的HSC在三天内显示Bodipy染色阳性脂滴再形成。该初始筛选产生15个原始击中。选择miRNA miR-15a和miR-412用于进一步的调查,基于小鼠和人HSC中人同源直系物的存在和再形成脂滴的能力(图3)。新形成的脂滴是由紫外线下荧光证明为类维生素A阳性的,这与静止HSC中的那些相符(图17)。转染的HSC的整体大小减小10-100倍,变得更加静止样(图4)。此外,miR-15a或miR-412的强制表达下调激活的两种最重要的基因标记, α 平滑肌肌动蛋白(Acta2)和 α -1I型胶原(Coll a1)(图4)。

[0462] 对于更多的综合表达分析,深度RNA测序表明,接受miR-15a或miR-412的静止样HSC具有比激活的细胞40-50%更接近静止HSC的全局转录图谱(图18)。最惊人地,通过miR-15a或miR-412变得静止样的HSC具有类似于真正静止的HSC的功能性表型。离体实验表明,当两种细胞类型共培养时,静止样HSC在健康肝细胞中不诱导脂肪变性。相反,当共培养时,未由候选物miRNA处理的激活的HSC或NASH-HSC诱导肝细胞脂肪变性(图19)。此外,这些逆转的HSC能够从共培养的人肝细胞癌细胞系HepG2和Huh7降低促炎细胞因子表达(图6)。最

终,如期望的,与静止HSC相比,内源性miR-15a和miR-412在激活的HSC中具有减少的表达水平,尽管对于miR-15a不显著(图7)。

[0463] 并未在肝星状细胞的背景中研究过miR-15a和miR-412。然而,miR-15a家族被发现在心脏中抑制Tgf- β 途径以潜在地减弱纤维化[26],并且还已知为慢性淋巴细胞白血病中的关键肿瘤抑制因子[27,28]。相反,对于miR-412不存在具体文献,从而其功能是完全未知的。miRNA通常为短的、非编码基因,通常长度为22个核苷酸并且涉及全部生物学和病理学过程。它们通过与它们miRNA靶内互补序列的不完美碱基配对以诱导降解或翻译抑制来下调靶编码基因。各个miRNA可调控许多不同编码基因,同时各个靶基因可受到许多不同miRNA的调控,构成基因调控网络的复杂层。miRNA直接靶向全部哺乳动物编码基因的约50%,表明它们在基因调控中的广泛影响[29]。已显示,miRNA对于细胞增殖和重编程是必要的[30-32]。尽管如此,miRNA在HSC激活或逆转至静止中的作用仍未被探索。

[0464] 如本文所说明的,是miRNA-15a和miR-412在HSC中的引人注目的静止促进效果和作用机制。WISP1被鉴定为miR-15a的直接靶标,但对于miR-15a和miR-412二者可能有其它相关靶标。许多预测算法基于序列互补性预测miRNA的潜在直接靶标,但这些预测的靶标的大部分不是可经受实验验证的真实靶标。因此,在各种激活状态中进行HSC的RNA-Seq以确定可鉴定miR-15a和miR-412的真正直接靶标的表达谱。

[0465] 深度测序三种HSC:1)新鲜收获自健康小鼠的静止HSC,2)已在细胞培养皿中传代多次的激活的HSC,和3)已通过接受miR-15a或miR-412从激活状态逆转至静止的静止样HSC。由于在接受miR-15a或miR-412后仅三天测序静止样HSC,mRNA水平中任何编码基因的降低可能是直接miRNA靶向的结果。因此,在接受miR-15a或miR-412后具有减少的mRNA水平的基因的集合与基于预测算法的潜在直接靶标的集合重叠[33](图20)。源自两个亲代集合的共同基因的该新集合(从现在起称为靶候选物集合)具有更高的包含真实直接靶标的可能性。

[0466] 由于靶候选物集合仍具有太多的基因待分析,选择已知是促进HSC激活的两个最有名的信号途径的部分的靶候选物基因,Tgf- β 和Pdgf的那些。当PANTHER分析用于过滤作为这两个途径的部分的基因时,miR-15a和miR-412分别保留12和11个靶候选物(图20)[34]。可通过构建具有或不具有克隆在组成型激活荧光素酶基因后面的突变miRNA结合序列的报告子来测试这些基因。这些报告子构建体之一和miRNA模拟物可被共转染至293细胞或原代HSC。如果共转染的miRNA可退火至该序列并且抑制荧光素酶蛋白的翻译,这可表明编码基因是测试的miRNA的真实直接靶标。突变结合序列可防止miRNA退火并允许荧光素酶的几乎正常的表达,进一步支持测试的编码基因序列是真实miRNA靶标。预测该实验是耗费时间的,因为真实和突变形式二者中的23个高潜在靶候选物基因序列需要被克隆至荧光素酶载体。然而,寻找直接靶标在说明miRNA的作用机制方面是不可替代的[32]。

[0467] 到目前为止,本文已描述了将miR-15a或miR-412递送至激活的HSC的作用。为了进一步理解miR-15a和miR-412的功能,可通过如先前所述使用CRISPR技术删除原代HSC中的这些基因来完成决定性的功能丧失实验[35]。

[0468] 对原代HSC使用该技术的可行性已通过递送在过去使用的数字删除载体(digit deletion vector)来验证(图21)[35]。可产生三种靶向的HSC系:1)miR-15a-空,2)miR-412-空,和3)miR-15a/miR-412-空。由于这些miRNA的二者促进HSC静止伴有过表达,预期它

们的删除可导致激活的表型,特别是在miR-15a/miR-412双重空系中。独特表型的缺乏还可能是因为miRNA已知具有任何功能冗余。激活水平可由通过RNA-Seq限定它们的总体表达并与激活的和静止的HSC二者相比较来确定。形态学和增殖可在培养在塑料和Matrigel上的同时评价。激活的野生型HSC已知在Matrigel上逆转返回至静止[36],并且敲除HSC的表型可在该环境中表征。如果miR-15a或miR-412删除有助于HSC激活,该效果可克服Matrigel的静止促进效果。miRNA删除的HSC与肝细胞的相互作用可由共培养系统来评价。激活的HSC导致共培养的肝细胞变得脂肪变性并且表达促炎症介体。miRNA删除的HSC还可被评价具有比激活的野生型HSC的促脂肪变性表型甚至更高的促脂肪变性表型。最终,可在分别的删除系中评价的重构的miR-15a或miR-412可挽救野生型表型。删除的miRNA的重构可通过转染已被克隆并且已用于功能获得实验的miRNA表达piggyBac载体来实现。

[0469] 尽管miR-15a或miR-412已单独地表达,本文还具体预期在相同的HSC中一起表达它们。此外,递送这些miRNA的仅一者可将总体基因表达模型沿连接它们的转录轴从激活状态移位约一半返回至静止(图11)。过表达两种miRNA可逆转激活的HSC返回至静止,甚至比表达任一者miRNA单独更接近。该功能获得实验可通过在单个piggyBac载体中克隆两种miRNA并将其转染至激活的HSC来进行。piggyBac载体可允许miRNA基因整合至基因组,组成型表达它们[17]。同时表达两种miRNA的HSC可以是具有本文所描述的类似参数的表型以表征其它HSC系,包括使用RNA-Seq的总体基因表达、形态学、使用MTT检验的增殖、和使用该共培养方法的与肝细胞的相互作用。

[0470] 如果表达两种miRNA的原代HSC的表型甚至更接近类似的静止HSC,可在CCl₄诱导的肝纤维化和饮食诱导的NASH的背景中测试细胞疗法,HSC过表达单一miRNA。该HSC系可防止或减少肝损伤和纤维化,甚至比单独表达miR-15a或miR-412的HSC系所观察到的更多。

[0471] 试验miR-15a或miR-412递送至肝纤维化或NAFLD的小鼠模型

[0472] 试验来自miR-15a或miR-412的NASH的饮食模型的HSC并在肝细胞中将它们逆转返回至静止(图12)。此外,miR-15a和miR-412看起来即使在促进激活的培养条件中也强制激活的HSC逆转至静止。这些关键的离体观察允许测试这些miRNA是否可体内递送以减弱传统CCl₄小鼠模型中肝病理学水平,特别是由于表达miR-15a或miR-412的HSC即使在具有激活促进信号的患病肝中维持静止样状态。通过细胞接触和可溶性介体,静止样HSC可诱导肝中的其它细胞类型以抑制它们促进脂肪变性、炎症、或纤维化的信号。

[0473] 尽管存在不同方法以递送miRNA至活的小鼠,注射的HSC通过组成性表达miR-15a或miR-412而变得静止样。因此,使用已被工程化为静止样状态的HSC进一步测试用于肝病的新细胞疗法的可行性。该实验通过在四周CCl₄激发的第三周中注射重编程HSC一次来进行。注射的HSC接枝在肝上,通过在发射已被插入至表达miRNA的piggyBac载体中的GFP信号的肝细胞中目视确认[17](图8)。更重要地,由静止样HSC处理的小鼠具有显示减少的肝中的气球样、细胞凋亡、炎症、和纤维化(图8)和较少肝胶原表达(图9)的组织学。给出该观察,可扩展体内实验以使用肝纤维化和NASH的附加小鼠模型进一步评价miR-15a和miR-412在治疗肝脂肪变性、炎症、和纤维化中的潜力。为了评价这些miRNA是否仅通过HSC发挥它们的功能或通过其它细胞类型更广泛地发挥它们的功能,可使用病毒载体或模拟物代替细胞疗法全身递送miRNA。对于所有体内处理实验,可通过进行以下来评价功效:肝中促纤维化基因的PCR、包括H&E和天狼星红染色的组织学、肝羟脯氨酸检验、和测定血浆ALT。

[0474] 使用间充质干细胞和巨噬细胞,多个组已进行对于肝纤维化的细胞疗法,并且取得一些成功[18]。然而,这些实验第一次使用有目的地工程化的HSC以防止或逆转肝纤维化。HSC源自分离的、同类系的小鼠,并且500,000个细胞在CCl₄的四周过程的第三周中被注射一次。尽管起始结果是引人注目的,但不清楚肝形态学中的改善是否来源于在CCl₄施用的第四周激发的肝损伤的预防或来源于CCl₄激发的前三周中遭受的损伤的逆转。考虑到迄今为止仅使用CCl₄模型,该细胞疗法在NASH中的作用未被良好理解。最终,细胞疗法的有益效果可随着多于一次的注射而增加。为了回答这些重要的问题,除了NASH的CDAHFD模型以外,还可使用肝纤维化的CCl₄模型(口服管饲100u1的40% CCl₄,一周两次)[19]。对于所有的细胞疗法实验,可由miR-15a或miR-412重编程500,000个静止样HSC。可包含例如无处理或由尚未被重编程的HSC处理的组等全部合适的对照。

[0475] 为了试验静止样HSC是否可防止或逆转肝纤维化,可使用具有不同细胞注射时间表的两个分别的实验。所有CCl₄施用可通过一周两次口服管饲来进行。用CCl₄激发8周的小鼠通常发展晚期纤维化。重编程的HSC可在CCl₄激发的8周过程中在第2周、第4周、和第6周注射。可在第8周末处死所有小鼠。为了试验与对照相比,细胞疗法是否可以逆转预先存在的肝纤维化,HSC可在已完成CCl₄激发的8周过程后的第9周和第11周注射。可在第12周末处死所有小鼠。胆碱缺乏的、L-氨基酸限定的、高脂饮食(CDAHFD)模型在第3周发展显著NASH并在第9周发展2期纤维化(以0-4的比例)[19]。可在第5周完成细胞疗法的单一注射或第3周、第5周、和第7周完成三次注射。可在第9周末处死所有小鼠。

[0476] 先前已显示,激活的人HSC在接受miR-15a或miR-412的人直系同源物后,可逆转为静止样状态(图8)。这些逆转的细胞再形成类维生素A阳性脂滴并且能够从共培养的人肝细胞癌细胞系HepG2和Huh7减少促炎细胞因子表达(图6)。作为翻译用于人疗法的发现的桥梁,在确定miR15a和miR-412的治疗潜力中,原代人HSC可用于治疗肝纤维化的CCl₄小鼠模型。可一周两次管饲CCl₄以在严重的联合免疫缺陷小鼠(SCID)中诱导肝纤维化,选择所述SCID以防止人细胞的免疫排斥。其它组已成功用SCID小鼠产生基于CCl₄的肝纤维化模型[37]。纤维化预防研究:可在SCID小鼠中在CCl₄激发的8周过程中的第2周、第4周、和第6周注射人HSC。纤维化逆转研究:为了测试与对照相比,重编程的人HSC是否可以逆转预先存在的肝纤维化,可在已完成0014激发的8周过程后的第9周和第11周注射HSC。可在第12周末处死所有小鼠。

[0477] 初始实验表明,注射由miR-15a或miR-412重编程的HSC可减少CCl₄诱导的肝纤维化中的胶原表达和肝损伤的整体水平。一种递送miRNA的方法是注射表达miRNA的慢病毒。CCl₄纤维化研究:可在CCl₄激发的8周过程中的第2周、第4周、和第6周将表达miR-15a或miR-412的慢病毒注射至尾静脉。可在第8周末处死所有小鼠。CDAHFD NASH研究:可在CDAHFD的9周中的第3周、第5周、和第7周注射表达miR-15a或miR-412的慢病毒。可在第9周末处死所有小鼠。

[0478] 作为另一递送方法,可试验注射包装在脂质基运载体(B100 Scientific的MaxSuppressor™)中的更稳定的、化学修饰的miRNA模拟物(Exiqon和Invitrogen)的可行性[38,39]。通过避免慢病毒,该方法或其变体具有用于人的潜力。CCl₄纤维化研究:可在CCl₄激发的8周过程中的第2周、第4周、和第6周将含有miR-15a或miR-412的脂质载体注射至尾静脉。可在第8周末处死所有小鼠。CDAHFD NASH研究:可在CDAHFD的9周中的第3周、第5

周、和第7周注射含有miR-15a或miR-412的脂质载体。可在第9周末处死所有小鼠。

[0479] 确定WISP1在肝脂肪变性、炎症、和纤维化中的功能

[0480] 已知miRNA通过靶向多个编码基因来发挥一般功能,这两个候选物可能下调促进肝炎和纤维化的HSC基因。尽管miR-15a和miR-412可能抑制许多基因,WISP1已作为首先实验验证的miR-15a的直接靶标出现。WISP1首先被鉴定为在使用保留>100个典型细胞因子、趋化因子、和细胞外基质蛋白的细胞因子阵列印记检测的CDAHFD诱导的NASH-HSC培养基中的多个上分泌的蛋白(up-secreted protein)之一(图22)。更具体的分析显示,激活的HSC表达的WISP1为静止HSC的水平几乎30倍(图23)。WISP是基质细胞蛋白的Ccn家族的成员,所述Ccn家族包括Cyr61 (Ccn1)、Ctgf (Ccn2)、Nov (Ccn3)、WISP1 (Ccn4)、Wisp2 (Ccn5)、和Wisp3 (Ccn6)。Ctgf已被公认为肝中重要的促纤维化因子[42]。有趣地,WISP1被发现在人先天肺纤维化中被上调,并且由中和WISP1抗体处理博莱霉素激发的小鼠导致肺纤维化的减弱[43]。此外,小动物研究显示,阻断WISP1改善CCl₄诱导的肝纤维化[44]。然而,WISP1在肝中的作用未被详细研究,特别是在NASH的背景中的。

[0481] 已知CDAHFD诱导的NASH-HSC促进共培养肝细胞中的脂肪变性(图14、16),WISP1可有助于该表型。实际上,当WISP1在收获自健康小鼠的HSC中过表达时,来自这些细胞的条件培养基在初始健康的原代肝细胞中导致脂肪变性(图24)。此外,miR-15a预测靶向在3'-UTR中含有两个潜在miR-15a结合序列的WISP1。因此,推测的靶序列或它们的突变变体被克隆在组成型激活荧光素酶报告基因的后面。当这些报告子之一与miR-15a模拟物共转染时,具有野生型序列的报告子具有减少的荧光素酶表达,而具有突变序列的报告子不具有,表明miR-15a结合至两个WISP1靶序列(图11)。鉴于这些数据和公布文献,WISP1可能是完成HSC中一些miR-15a作用的关键靶基因,并且还可以是用于管理NASH的药物靶标。本文预期WISP1的肝功能是潜在的用于NASH的治疗靶标。

[0482] 尽管WISP1是miR-15a的直接靶标,其对HSC激活状态的影响和其在NAFLD发病机理中的作用是不清楚的。已产生WISP1-空小鼠系来说明WISP1在骨形成中的作用,但没有研究其在肝中的功能[45]。这些小鼠是可育的并且不具有明显的肝表型。它们的突变等位基因保存在加利福尼亚大学戴维斯分校中MMRRC设施(MMRRC facility in University of California at Davis)中的冷冻精子和胚胎中,这确保成功的突变小鼠来源(参见附件文件)。首先,通过从WISP1-空小鼠收获HSC并离体表征它们的表型以在HSC中说明WISP1的功能。

[0483] 静止状态中的野生型HSC在塑料上培养7-10天后变得激活,并且本文所示RNA-seq数据表明这两组之间的总体基因表达中的明显不同(图11)。使用WISP1-空HSC的平行实验可用于评价WISP1删除是否将总体表达谱朝向HSC静止的总体表达谱改变,即使在激活促进环境中。在从WISP1-空小鼠分离HSC后,可在塑料盘上培养所述细胞1天(静止的)或28天(在野生型中激活)。可通过RNA-seq确定它们的总体基因表达并将结果与野生型HSC的结果相比较。可通过多维标度法分析完成总体比较,并且可鉴定区别表达的基因用于详细分析。

[0484] 可在塑料上培养的同时比较细胞形态学、增殖、和迁移。可使用例如大小、细胞过程的程度、脂滴的存在和他们是否为UV-荧光阳性等参数来确定形态学,所述UV-荧光阳性是类维生素A和静止的标志。可由PCNA和Ki-67检查增殖,以防止WISP1-空HSC具有减少增殖,类似于静止HSC。还可如过去所完成的进行MTT检验来定量细胞增殖率[32]。由于本文所

示的初始数据和公布文献指出WISP1为促纤维化基因,删除WISP1可促进HSC中的静止,也许甚至当在塑料盘上培养时。最终,在敲除HSC中再构建WISP1可挽救野生型表型。可通过转染WISP1表达piggyBac载体来实现再构建WISP1。由WISP1表达载体转染的WISP1-空HSC可由用于未转染的WISP1-空细胞的相同体外检验来表征。

[0485] WISP1-空HSC与肝细胞的相互作用可由本文所描述的共培养系统评价。激活的野生型HSC导致共培养的肝细胞变得脂肪变性(图14)。过表达WISP1的HSC诱导附近的肝细胞变得甚至更严重的脂肪变性(图24)。WISP1-空HSC可具有减弱的促脂肪变性表型。共培养检验的读出(readout)包括用于脂滴的Bodipy染色和共培养的肝细胞的PCR以测定促炎症因子的表达。

[0486] 可通过肝病理学的整体严重程度来评价表型。WISP1-空小鼠可由CCl₄和CDAHFD激发以分别建模毒素诱导的肝纤维化和NASH。由WISP1-空小鼠承受的所得肝损伤可由野生型小鼠的肝损伤来评价。已知WISP1在包括肺的其它器官中的促纤维化作用,期望WISP1-空小鼠具有减少的肝纤维化和可能甚至减少的脂肪变性和炎症。对于所有体内实验,肝表型可通过以下来评价:肝中促纤维化基因的PCR,包括H&E和天狼星红染色的组织学,羟脯氨酸检验和测定血浆ALT。最后,可确定收获自肝病的这些小鼠模型的HSC的功能表型。

[0487] CCl₄纤维化模型:雄性野生型和WISP1-空小鼠可由一周两次CCl₄管饲来激发。它们可接受CCl₄ 8周并且可在第8周末被处死。CDAHFD NASH模型:可对野生型和WISP1-空小鼠喂养CDAHFD 9周。一半的小鼠可在第6周末被处死和另一半可在第9周末被处死以限定WISP1在具有2期纤维化的中度NASH(6周的CDAHFD)和末期NASH(9周的CDAHFD)中的作用。

[0488] HSC可分离自由4周的CCl₄和3周的CDAHFD激发的小鼠。这些HSC可与健康肝细胞共培养以确定它们是否发展脂肪变性和表达促炎症因子。结果可与经受相同激发的野生型HSC的结果相比较。

[0489] 用中和抗体阻断WISP1减弱小鼠肺中博莱霉素诱导的损伤[43]。类似地,中和WISP1可减少NASH中发生的炎症和纤维化的水平。NASH的小鼠模型可由WISP1抗体处理并在6周和9周的治疗后评价肝表型。

[0490] CDAHFD NASH模型:可对野生型小鼠喂养CDAHFD 9周。处理组可接受市售可得抗体(R&D Systems)[43]或通过每周注射的抗体[46]。对照组可接受IgG。一半的小鼠可在第6周末被处死和另一半可在第9周末被处死以测试WISP1阻断分别在具有纤维化的中度和末期NASH中的效果。

[0491] 此外,分析来自NASH的HSC的条件培养基,可鉴定自分泌或旁分泌的因子。通过质谱法的NASH-HSC条件培养基的更详细的分析可鉴定可能为药物靶标的其它介体。最后,本文所描述的共培养系统可用于研究其它肝病,只要它们是典型的小鼠模型。例如,通过分离酒精饲养小鼠中的细胞类型,可在酒精相关性肝病中建模肝细胞和HSC的相互作用[47]。

[0492] 参考文献-实施例1/2:

[0493] 1.Clark JM,Brancati FL and Diehl AM(2003)The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States.Am J Gastroenterol

[0494] 98:960-7.doi:10.1111/0572-0241.2003.07486.x

[0495] 2.Charlton MR,Burns JM,Pedersen RA,Watt KD,Heimbach JK and Dierkhising

- RA (2011) Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* [0496] 141:1249-53. doi:10.1053/j.gastro.2011.06.061
- [0497] 3. Starley BQ, Calcagno CJ and Harrison SA (2010) Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* [0498] 51:1820-32. doi:10.1002/hep.23594
- [0499] 4. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, Racila A, Hunt S and Beckerman R (2016) The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* 64:1577-1586. doi:10.1002/hep.28785
- [0500] 5. Lassailly G, Caiazzo R, Pattou F and Mathurin P (2016) Perspectives on Treatment for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2016.03.004
- [0501] 6. Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655-69. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.003
- [0502] 7. Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88:125-72. doi:10.1152/physrev.00013.2007
- [0503] 8. Puche JE, Lee YA, Jiao J, Aloman C, Fiel MI, Munoz U, Kraus T, Lee T, Yee HF, Jr. and Friedman SL (2013) A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage in mice. *Hepatology* 57:339-50. doi:10.1002/hep.26053
- [0504] 9. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, Iwaisako K, Moore-Morris T, Scott B, Tsukamoto H, Evans SM, Dillmann W, Glass CK and Brenner DA (2012) Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:9448-53. doi:10.1073/pnas.1201840109
- [0505] 10. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP and Schwabe RF (2013) Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* 4:2823. doi:10.1038/ncomms3823
- [0506] 11. Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY and Li DG (2009) Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J* 276:5163-76. doi:10.1111/0742-4658.2009.07213.x
- [0507] 12. Maubach G, Lim MC, Chen J, Yang H and Zhuo L (2011) miRNA studies in in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 17:2748-73. doi:10.3748/wjg.v17.i22.
- [0508] 13. Lakner AM, Steuerwald NM, Walling TL, Ghosh S, Li T, McKillop IH, Russo

MW, Bonkovsky HL and Schrum LW (2012) Inhibitory effects of microRNA19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. *Hepatology* 56:300-10. doi:10.1002/hep.25613

[0513] 14. Schuppan D and Kim YO (2013) Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest* 123:1887-901. doi:10.1172/JCI66028

[0514] 15. Corey KE and Rinella ME (2016) Medical and Surgical Treatment Options for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. doi:10.1007/s10620-016-4083-8

[0515] 16. Ivey KN and Srivastava D (2010) MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* 7:36-41.

[0516] 17. Griffin TA, Anderson HC and Wolfe JH (2015) Ex vivo gene therapy using patient iPSC-derived NSCs reverses pathology in the brain of a homologous mouse model. *Stem Cell Reports* 4:835-46. doi:10.1016/j.stemcr.2015.02.022

[0517] 18. Terai S and Tsuchiya A (2017) Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the "point of no return" in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 52:129-140. doi:10.1007/s00535-016-1258-1

[0518] 19. Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, Katsume A and Sudoh M (2013) An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 94:93-103. doi:10.1111/iep.12008

[0519] 20. Herrmann J, Gressner AM and Weiskirchen R (2007) Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med* 11:704-22. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00060.x

[0520] 21. Mederacke I, Dapito DH, Affo S, Uchinami H and Schwabe RF (2015) High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc* 10:305-15. doi:10.1038/nprot.2015.017

[0521] 22. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L and Wymer M (2015) Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence and Outcomes. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.28431

[0522] 23. Geerts A (2001) History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21:311-35. doi:10.1055/s-2001-17550

[0523] 24. Yin C, Evason KJ, Asahina K and Stainier DY (2013) Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest* 123:1902-10. doi:10.1172/J0166369

[0524] 25. Deleve LD, Wang X and Guo Y (2008) Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* 48:920-30. doi:10.1002/hep.22351

[0525] 26. Tijssen AJ, van der Made I, van den Hoogenhof MM, Wijnen WJ, van Deel

- ED,de Groot NE,Alekseev S,Fluiter K,Schroen B,Goumans MJ,vander Velden J, Duncker DJ,Pinto YM and Creemers EE (2014) ThemicroRNA-15 family inhibits the TGFbeta-pathway in the heart.CardiovascRes 104:61-71.doi:10.1093/cvr/cvul84
- [0526] 27.Aqeilan RI,Calin GAand Croce CM (2010)miR-15a and miR-16-1 incancer:discovery,function and future perspectives.Cell Death Differ17:215-20.doi:10.1038/cdd.2009.69
- [0527] 28.Klein U,Lia M,Crespo M,Siegel R,Shen Q,Mo T,Ambesi-Impiombato A, Califano A,Migliazza A,Bhagat G andDalla-Favera R (2010)The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cellproliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia.CancerCell 17:28-40.doi:10.1016/j.ccr.2009.11.019
- [0528] 29.Szabo G and Csak T (2016) Role of MicroRNAs in NAFLD/NASH.DigDis Sci.doi:10.1007/s10620-015-4002-4
- [0529] 30.Kim BM,Thier MC,Oh S,Sherwood R,Kanellopoulou C,Edenhofer Fand Choi MY (2012)MicroRNAs are indispensable for reprogrammingmouse embryonic fibroblasts into induced stem cell-like cells.PLoS One7:e39239.
- [0530] 31.Kanellopoulou C,Muljo SA,Kung AL,Ganesan S,Drapkin R,Jenuwein T, Livingston DM and Rajewsky K (2005)Dicer-deficient mouseembryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing.Genes Dev 19:489-501.
- [0531] 32.Kim BM and Choi MY (2012)Non-canonical microRNAs miR-320 andmiR-702 promote proliferation in Dgcr8-deficient embryonic stem cells.Biochem Biophys Res Commun 426:183-9.
- [0532] 33.Betel D,Koppal A,Agius P,Sander C and Leslie C (2010)Comprehensive modeling of microRNAtargets predicts functionalnon-conserved and non-canonical sites.Genome Biol 11:R90.
- [0533] 34.Mi H,Muruganujan A and Thomas PD (2013)PANTHER in 2013:modeling the evolution of gene function,and other gene attributes,in thecontext of phylogenetic trees.Nucleic Acids Res 41:D377-86.doi:10.1093/nar/gks1118
- [0534] 35.Daneshvar K,Pondick JV,Kim BM,Zhou C,York SR,Macklin JA,Abualteen A,Tan B,Sigova AA,Marcho C,Tremblay KD,Mager J,ChoiMY and Mullen AC (2016) DIGIT Is a Conserved Long Noncoding RNAthat Regulates GSC Expression to Control Definitive EndodermDifferentiation of Embryonic Stem Cells.Cell Rep 17:353-365.doi:10.1016/j.celrep.2016.09.017
- [0535] 36.Sohara N,Znoyko I,Levy MT,Trojanowska M and Reuben A (2002)Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on abasement membrane-like substrate.J Hepatol 37:214-21.
- [0536] 37.Melhem A,Muhanna N,Bishara A,Alvarez CE,Ilan Y,Bishara T,Horani A, Nassar M,Friedman SL and Safadi R (2006)Anti-fibrotic activityofNK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC.JHepatol 45:60-

71.doi:10.1016/j.jhep.2005.12.025

[0537] 38.Trang P,Wiggins JF,Daige CL,Cho C,Omotola M,Brown D,WeidhaasJB, Bader AG and Slack FJ (2011) Systemic delivery of tumor suppressormicroRNAmimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther* 19:1116-22.doi:10.1038/mt.2011.48

[0538] 39.Wiggins JF,Ruffino L,Kelnar K,Omotola M,Patrawala L,Brown D and Bader AG (2010) Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 70:5923-30.doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0655

[0539] 40.Song G,Pacher M,Balakrishnan A,Yuan Q,Tsay HC,Yang D,Reetz J, Brandes S,Dai Z,Putzer BM,Arauzo-Bravo MJ,Steinemann D,Luedde T,Schwabe RF, Manns MP,Scholer HR,Schambach A,Cantz T,Ott M and Sharma AD (2016) Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* 18:797-808.doi:10.1016/j.stem.2016.01.010

[0540] 41.Rezvani M,Espanol-Suner R,Malato Y,Dumont L,Grimm AA,Kienle E, Bindman JG,Wiedtke E,Hsu BY,Naqvi SJ,Schwabe RF,Corvera CU,Grimm D and Willenbring H (2016) In Vivo Hepatic Reprogramming of Myofibroblasts with AAV Vectors as a Therapeutic Strategy for Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* 18:809-16.doi:10.1016/j.stem.2016.05.005

[0541] 42.Chen L,Charrier A,Zhou Y,Chen R,Yu B,Agarwal K,Tsukamoto H,Lee LJ, Paulaitis ME and Brigstock DR (2014) Epigenetic regulation of connective tissue growth factor by MicroRNA-214 delivery in exosomes from mouse or human hepatic stellate cells. *Hepatology* 59:1118-29.doi:10.1002/hep.26768

[0542] 43.Konigshoff M,Kramer M,Balsara N,Wilhelm J,Amarie OV,Jahn A,Rose F, Fink L,Seeger W,Schaefer L,Gunther A and Eickelberg O (2009) WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119:772-87.doi: 10.1172/JCI33950

[0543] 44.Li X,Chen Y,Ye W,Tao X,Zhu J,Wu S and Lou L (2015) Blockade of CCN4 attenuates CCl4-induced liver fibrosis. *Arch Med Sci* 11:647-53.doi:

[0544] 10.5114/aoms.2015.52371

[0545] 45.Maeda A,Ono M,Holmbeck K,Li L,Kilts TM,Kram V,Noonan ML,Yoshioka Y,McNerny EM,Tantillo MA,Kohn DH,Lyons KM,Robey PG and Young MF (2015) WNT1-induced Secreted Protein-1 (WISP1), a Novel Regulator of Bone Turnover and Wnt Signaling. *J Biol Chem* 290:14004-18.

[0546] doi:10.1074/jbc.M114.628818

[0547] 46.Ono M,Inkson CA,Sonn R,Kilts TM,de Castro LF,Maeda A,Fisher LW, Robey PG,Berendsen AD,Li L,McCartney-Francis N,Brown AC,Crawford NP,Molinolo A,Jain A,Fedarko NS and Young MF (2013)

[0548] WISP1/CCN4:a potential target for inhibiting prostate cancer growth andspread to bone.PLoS One 8:e71709.doi:10.1371/journal.pone.0071709

[0549] 47.Hamarneh SR,Kim BM,Kaliannan K,Morrison SA,Tantillo TJ,TaoQ, Mohamed MMR,Ramirez JM,Karas A,Liu W,Hu D,Teshager A,GulSS,Economopoulos KP, Bhan AK,Maio MS,Choi MY and Hodin RA

[0550] (2017) Intestinal Alkaline Phosphatase Attenuates Alcohol-InducedHepatosteatosis in Mice.Dig Dis Sci.doi:10.1007/s10620-017-4576-0实施
例3-HSC分离方案

[0551] 以下方案用于本文所描述的实验以分离HSC,例如,mod-Hep/HSC。

[0552] 1.借助静脉留置针或蝶型针插管门静脉。

[0553] 2.以6mL/分钟、用37℃下的溶液灌注肝:

[0554] 30mL HBSS(无Ca²⁺和Mg²⁺),灌注开始后不久,剪切IVC

[0555] 30mL 0.05%胶原酶[0.5mg/mL-->对于50mL,500ul的50mg/mL胶原酶原液](例如,胶原酶B;Roche 11088815001)。

[0556] 3.灌注后,小心地切除肝(特别是胆囊)并且去除格利森氏囊(Glisson'scapsule)。

[0557] 4.将肝转移至无菌烧杯并切成非常薄的片。

[0558] 5.添加剩余的20mL的0.05%胶原酶并在37℃下在培养箱中保持30分钟[添加DNase(10ug/mL)](例如,DNase I;Roche 10104159001)。

[0559] 6.用移液枪抽打(pipette up and down)并在皮氏培养皿中用细胞筛(70um)过滤。添加PBS+DNase(10ug/mL)补充至45mL。

[0560] 7.通过在x 50g下离心3分钟去除肝细胞,并将上清液转移至新管。

[0561] 8.通过在x 635g下离心10分钟来形成沉淀。

[0562] 9.用45mL PBS+DNase(10ug/mL)洗涤并在x 635g下离心10分钟。

[0563] 10.通过70um细胞筛过滤细胞悬液。

[0564] 11.用45mL PBS+DNase(10ug/mL)洗涤并在x 635g下离心10分钟。

[0565] 12.吸出上清液。向沉淀添加PBS至6.5mL的总体积。

[0566] 13.添加3.5mL的percoll(9份Percoll,1份10x PBS)至10mL的总体积,混合,并转移至15mL管(例如,Percoll;Percoll plus,GE Healthcare 17-5445-02)。

[0567] 14.向柱的顶部小心地添加1mL的PBS。

[0568] 15.在室温下以x 1130g离心柱30分钟(加速9,刹车0)。

[0569] 16.离心后,HSC在位于PBS和35%percoll之间的层中。

[0570] 17.用微量移液枪吸出HSC并用10mL DMEM洗涤,在x 635g下离心6分钟。

[0571] 18.吸出上清液。

[0572] 19.重悬沉淀并置于DMEM+20% FBS+1% P/S中。

[0573] 实施例4:用于肝病的治疗和预防的抑制WISP1的抗体

[0574] 特异性结合并抑制WISP1的抗体可用于治疗或预防例如原发性胆汁性胆管炎(PBC)和自身免疫性肝炎(AIH)等肝病。

[0575] 具体地,抑制WISP1的领导候选物包括ant-WISP1 IgG1/IgG4抗体和IgG1ADCC)。用

于工程化抗WISP1抗体的策略包括但不限于:Fc工程化用于半衰期延长;双特异性抗体技术能够同时抑制两个抗纤维化靶标;和富集技术(sweeping technology),其(1)通过驱动靶标分解代谢将抗体从隔离实体(sequestering entity)转变为催化性药物,(2)显著降低CoG、剂量水平、和剂量的频率,(3)增加皮下剂量的可能性,和(4)消除对完全阻断潜能的需求。

[0576] 为了评价抗WISP1抗体抑制WISP1的能力,在新鲜HSC上测试抗体。在37°C下用条件培养基培养WISP1抗体(Ab WISP1或WISP1 IgG, RND Systems, 1 µg/mL) 1小时,然后施加至HSC。作为阴性对照,仅用条件培养基培养HSC。作为阳性对照,还向HSC添加重组WISP1 (Rc-WISP1, 100 ng/mL) 代替抗体。处理后48小时评价HSC样品(图38A)。Rc-WISP1为,例如WISP1-CCN4,获得自鉴定为登录号054774的细胞系,并且由R&D Systems市售可得。Rc-WISP1被发现在培养后第1天和第2天显著增加细胞数(图38B)、HSC中的Acta2 mRNA表达(图38C)、和Colla1 mRNA表达(图38D),表明HSC在重组WISP1的存在下变得激活。惊人地,市售可得的抗WISP1 IgG(Ab Wisp1)阻止HSC中的HSC激活;与由rc WISP1培养的HSC相比,与抗WISP1的培养导致在培养后第1天和第2天显著降低细胞数(图38B)、Acta2 mRNA表达(图38C)、和Colla1 mRNA表达(图38D)。

[0577] 然后在分离自胆碱缺乏的、L-氨基酸限定的高脂饮食诱导的脂肪变性(CDAHFD)小鼠模型的原代肝细胞上测试抗WISP1 IgG。例如NALFD和病毒性肝炎等肝病的标志为患病肝细胞中的脂滴的增加。为了评价脂滴的存在,采用BODIPY染色。如期望地,由对照IgG处理的CDAHFD细胞具有增加的BODIPY染色(图38E和38F)。相反,由抗WISP1 IgG处理的CDAHFD细胞具有减少的BODIPY染色,类似于对照、健康细胞(图38E和38F)。因此,本文所示数据显示,抗WISP1 IgG可将患病肝细胞恢复至健康肝细胞。

[0578] 最终,为了显示抗WISP1 IgG调控HSC迁移的能力,培养HSC以形成单层,然后使其受损(图39A-图39B)。在生长培养基中在60 mm盘中以90%汇合度培养细胞。使用无菌P200移液枪枪头产生单一线性刮痕伤。用PBS洗涤细胞以去除漂浮的细胞碎片并再添加重组Wisp1蛋白(100 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN) 和单克隆Wisp1抗体(1 µg/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN) 24小时。在引入刮痕伤时、或受损12和24小时后使用倒置显微镜拍照伤口闭合或细胞迁移。使用置于图像上的标准模板测定各个时间下的盘中的伤口边缘之间的面积。数据表示为相对于初始划痕面积的划痕面积(百分比)。使用公共可获得的ImageJ (NIH) 软件测定划痕面积。

[0579] 受损后,用Rc WISP1或抗WISP1 IgG培养HSC。与对照或抗WISP1 IgG处理的HSC相比,由rc WISP1培养的HSC显示更快速的迁移,特别是在12小时时间点后。相反,由抗WISP1 IgG培养的HSC导致更慢的迁移,类似于对照处理的HSC(图39A-39B)。与由Rc-WISP1处理的HSC相比,抗WISP1 IgG在受损后防止HSC迁移。该结果确证了抑制WISP1的抗体可防止HSC激活和迁移,使它们成为治疗肝病的有用的试剂。

[0580] 序列

[0581] SEQ ID NO:1为编码人WNT1诱导信号通路蛋白1同种型1前体的氨基酸序列。

[0582]

MRWFLPWTAAVTA AAAASTVLATALSPAPTTMDFTPAPLEDTSSRPQFCKWPCECPPSPPRCPLGVSLIT
DGCECCKMCAQQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVGVCVLDGVRYNNGQSFQPNC
KYNCTCIDGAVGCTPLCLRVRRPRLWCPHPRRVSIPGHCCEQWVCEDDAKRPRKTAPRDTGAFAVGEVE
AWHRNCIAYTSPWSPCSTSCGLGVSTRI SNVNAQCWPEQESRLCNLRPCDVDIHTLIKAGKKCLAVYQPE
ASMNFTLAGCISTRSYQPKYCGVCMNRCCIPYKSKTIDVSFQCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDI
FADLESYPDFSEIAN

[0583]

SEQ ID NO:2为编码人WNT1诱导信号通路蛋白1同种型2前体的氨基酸序列。

[0584]

MRWFLPWTAAVTA AAAASTVLATALSPAPTTMDFTPAPLEDTSSRPQFCKWPCECPPSPPRCPLGVSLIT
DGCECCKMCAQQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAHVGVEAWHRNCIAYTSPWSPCSTSCGLG
VSTRI SNVNAQCWPEQESRLCNLRPCDVDIHTLIKAGKKCLAVYQPEASMNFTLAGCISTRSYQ
PKYCGVCMNRCCIPYKSKTIDVSFQCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDI FADLESYPDFSEIAN

[0585]

SEQ ID NO:3为编码人WNT1诱导信号通路蛋白1同种型3前体的氨基酸序列。

[0586]

MRWFLPWTAAVTA AAAASTVLATALSPAPTTMDFTPAPLEDTSSRPQFCKWPCECPPSPPRCPLGVSLIT
DGCECCKMCAQQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCARREEVSGCVPARGIHELHTCGLHQ
HTLLSTQVLWSLHGQ

[0587]

SEQ ID NO:4为编码人WNT1诱导信号通路蛋白1同种型4前体的氨基酸序列。

[0588]

MRWFLPWTAAVTA AAAASTVLATAGKKCLAVYQPEASMNFTLAGCISTRSYQPKYCGVCMNRCCIPYKSKTIDVSF
QCPDGLGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDI FADLESYPDFSEIAN

[0589]

列。

SEQ ID NO:5为人WNT1诱导信号通路蛋白1 (WISP1), 转录变体1, mRNA的核苷酸序

[0590]

ATATCTGCTGCTCCTGATGGGCCGCGCCAGTCTGGGCCAGCTCCCCGAGAGGTGGTCGGATCCTCTGGGCTGCTC
GGTCGATGCCTGTGCCACTGACGTCCAGGCATGAGGTGGTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAG
CCGCCAGCACCGTCCTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTTACCCAGCTCCACTGGAGGA
CACCTCCTCAGCCCCCAATTCTGCAAGTGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCGCTGCCGCTGGGGGTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACGACGGAGGCTGCCA
TCTGTGACCCCCACCGGGCCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGCACA
GGTGGTCGGTGTGGGCTGCGTCCTGGATGGGCTGCGCTACAACAACGGCCAGTCCTTCCAGCCTAACTGCAAGTAC
AACTGCACGTGCATCGACGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTCCGAGTGCGCCCCCGCGTCTCTGGTGCC
CCCACCCGCGGCGCGTGAGCATACCTGGCCACTGCTGTGAGCAGTGGGTATGTGAGGACGACGCCAAGAGGCCACG
CAAGACCGCACCCCGTGACACAGGAGCCTTCGATGCTGTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCACAGGAACTGCATAGCC
TACACAAGCCCCCTGGAGCCCTTGCTCCACCAGCTGCGGCCCTGGGGTCTCCACTCGGATCTCCAATGTTAACGCCC
AGTGCTGGCCTGAGCAAGAGAGCCGCTCTGCAACTTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGC
AGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAACCTTACACTTGCGGGCTGCATCAGCACACGC
TCCTATCAACCCAAGTACTGTGGAGTTTGCATGGACAATAGGTGCTGCATCCCCTACAAGTCTAAGACTATCGACG
TGTCCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGGCTTCTCCCGCCAGGTCTATGGATTAATGCCTGCTTCTGTAACCTGAG
CTGTAGGAATCCCAATGACATCTTTGCTGACTTGGAATCCTACCCTGACTTCTCAGAAATTGCCAACTAGGCAGGC
ACAAATCTGGGTCTTGGGGACTAACCAATGCCTGTGAAGCAGTCAGCCCTTATGGCCAATAACTTTTCACCAAT

[0591]

GAGCCTTAGTTACCTGATCTGGACCTTGGCCTCCATTTCTGTCTCTAACCATTCAAATGACGCCTGATGGTGCT
GCTCAGGCCCATGCTATGAGTTTTCTCCTTGATATCATTACAGCATCTACTCTAAAGAAAAATGCCTGTCTCTAGCT
GTTCTGGACTACACCAAGCCTGATCCAGCCTTTCCAAGTCACTAGAAAGTCCTGCTGGATCTTGCCTAAATCCCAA
GAAATGGAATCAGGTAGACTTTTAATATCACTAATTTCTTCTTTAGATGCCAAACCACAAGACTCTTTGGGTCCAT
TCAGATGAATAGATGGAATTTGGAACAATAGAATAATCTATTATTTGGAGCCTGCCAAGAGGTACTGTAATGGGTA
ATTCTGACGTCAGCGCACCAAACTATCCTGATTCCAAATATGTATGCACCTCAAGGTCATCAAACATTTGCCAAG
TGAGTTGAATAGTTGCTTAATTTTGATTTTAAATGGAAAGTTGTATCCATTAACCTGGGCATTGTTGAGGTTAAGT
TTCTCTTACCCCTACACTGTGAAGGTACAGATTAGGTTTGTCCCAGTCAGAAATAAAATTTGATAAACATTCTT
GTTGATGGGAAAAGCCCCAGTTAATACTCCAGAGACAGGGAAAGGTCAGCCCGTTTCAGAAGGACCAATTCACTC
TCACACTGAATCAGCTGCTGACTGGCAGGGCTTTGGGCAGTTGGCCAGGCTCTTCTTGAATCTTCTCCCTTGTC
TGCTTGGGGTTTCATAGGAATGGTAAGGCCTCTGGACTGGCCTGTCTGGCCCTGAGAGTGGTGCCCTGGAACACT
CCTCTACTCTTACAGAGCCTTGAGAGACCCAGCTGCAGACCATGCCAGACCCACTGAAATGACCAAGACAGGTTCA
GGTAGGGGTGTGGGTCAAACCAAGAAGTGGGTGCCCTTGGTAGCAGCCTGGGGTGACCTCTAGAGCTGGAGGCTGT
GGGACTCCAGGGGCCCCCGTGTTCAGGACACATCTATTGCAGAGACTCATTTCACAGCCTTTCGTTCTGCTGACCA
AATGGCCAGTTTTCTGGTAGGAAGATGGAGTTTACCGTTGTTTAGAAACAGAAATAGACTTAATAAAGGTTTAA
AGCTGAAGAGGTTGAAGCTAAAAGGAAAAGGTTGTTGTTAATGAATATCAGGCTATTATTTATTGTATTAGGAAAA
TATAATATTTACTGTIAGAATCTTTTTATTAGGGCCTTTTCTGTGCCAGACATTGCTCTCAGTGCTTTGCATGTA
TTAGCTCACTGAATCTTCAGACAATGTTGAGAAGTTCCCATTATTATTTCTGTTCTTACAAATGTGAAACGGAAG
CTCATAGAGGTGAGAAACTCAACCAGAGTCACCCAGTTGGTGACTGGGAAAGTTAGGATTCAGATCGAAATTGGA
CTGTCTTTATAACCCATATTTTCCCCCTGTTTTTAGAGCTTCCAAATGTGTGAGAAATAGGAAAACATTGCAATAAA
TGGCTTGATTTTTTAATGTCATTTTTCCCTCTTATAGTCTTTCTAGCTCCTTTTCAAAGACGAGAAATATCTGATT
TTCTGATAATTTAGGTGCTTAAGCATCCAAATACATGGGACACACAAAATCCAGGAATCCCCTGTAGCTTATTC
CCTCTTTCCCATCGGAACCAGCTCTCATCACACATTTAAAAGATGATTCTGTTTACCCAATGCTGCATATTGAATG
TTGTGTAGTTATTACAGGGAATTCTGTGCACTGTGCAGAGAGATTCCCTAAACGGGAAAAGGACTGGGAATACATC
CTCCTTACTGTGACCTCCCCAAAACCTAGTCCAGTGCAAGGTATACAGTGGTGCTCATTAAATACTTGATGAATAC
AGGAAGCTGTGCATGTGTTCTACTTTTTATTGGAAGCTCTCTTCTTCCAAAGCTACATGAAAATAGAATTTTAAACA
GTCAAATTTTATATTAAGTGCCTTAGCAAAAGAGACATTTAATATTTCAAAGAAATGCATATGTATGTATACATA
TATTTGTGTATGCGTATGCAAGAATTCTTGTATAAAGAGAATTCACCTCCATGAATGATCTCTTCTGTAAGTCAGTG
TGAATCATGTTAGATTTTCTGAGAGTGAAACACCTGCCATCTACAAATTACAAGGCTGGATAACAGCTCACTCCA
TTTGAAATTCAGTGGAACCCAAGAGCTAGGTTCTTACTGAATTTGCATCTCAATTTGGGAACTGAACTTAGCTT
TCAAAGATCATAGGAAGTCTGGTTGGAGAACTAGGGATTATTCTGGCAATGGGTGCAGGAAGGTGGTCAGAATAA
CCCAGTCGCCATTGGTTTTGAGAAACGGAATCTTATGCAGAGCCCGAGGGCAAGTCTCAGACCCATGGGTTG
AAGCCATGGAGAAGGAAATTTGGATCCAATGTAATGAAGCGCTTTCTAAGTCAGAAATTTCCCTGCAATGGTGTGGC
CTGATTCAATAAAAAATTAAGAATAATAAATAAATGGAATAAATCTCCACTGATTGAGTGTTTACTTGGTGCCAA
GCACATGCTAAGTTGTTCAATTATTTATTTAATTGTTACAGCAATTTTGAGTATGCATCTTTCCTACTATTTTATAA

GTGGAAAAGAGAAGTGCCCCAAAAGTTAGAGCTCAAACAGCAGCTTATTCTACCAGCCCCTGCTCTTGCGGAGG
CCTCTGGAAAAGACCTGAATGACACCTATTGGAGAATTACATCTACAAGGGGCTTCAAACAGACCAAATAGATCAT
CACCTCTGTGGTCCCTTGTTAACTATATGTTCTGAGACAAAGGAAAGCTACCCTAAGGGTTAGTTAACCTTTGCTG
AGGAAATTTACATTCTACTTAGAGTGAATTACTCAGGTGTGCTTAGGTGTGCAAAAGGGAAGGAGACCTGAATTC
ACCAAGTTAAATCTTGCTAAACCTTATCATAAGCATTTTTTTGAGCGCTTAGCATACACCAAGCCTTGTTGGAAGGTG
CTTTCCTGCCATATCTCATTTAATCCTCACAGCAAACCTATAGAATATGGCATTATCATCTGAGTCTCACAGAAGT
TTAGTCGTGTACTCAAGGTCTTACCAGCTAGTGAACAGCAGACCAAGACTGGAAACCCAGGATAGTCTGATACCTG
AGCCATCTCTTCTGTGCTACGCCTAGTTATTCTGTCCCCCAAATCAAAGGCATGACCTTTATAAGAGGCGCTTT
[0592] ACTGACAATAGCTGCAATTTTAACTTTGAAAATGATTTCAGAATTATCAAAGATAGTAGATTGCAATGACATGATTG
TCTATAATCTCGCTAGCCTTGTAAGTGTGTGTCATAGCAATTACAGGGAAGTAATCTAGCTCCTGACTATTATGTT
GAACTATGTGCTGCTTTTTTACAACTTGTCTTGATCCAAAGCAGTCACAATGATAACCTGCATATCTGGGAATC
ATAAGTCAACTATGTATCCCTGTGTGTGTATATATATGTATGTATGTATCTATTTTCAAACCTGTGATTTAATATTT
AAATATTCCTACTGCCATTTTTGTGACTGAAAACTACACATGAGGAAACGTCTTAGAATTTTCCAATAGAGGAAA
AATAACACTTGGGCAATCTGTCATGTTTCAACAGTTCATCTTTTCTCATGATTTGTGTAGCGTGGAAATGTGTT
TGCTCAATGTGAAGGGTTTTCATTGCTCAATTTCTGTGTGAAGTCTTTTCCCTAAGGTAATAAACCATCAGCAAA
GTCACATACTGGAGTTGGTGGCTTTTCTGTACAGGCAGTTGTTATGAGACAATGATGGAGCATTGAGCATGTTCA
ATAAATGTGCAGATGGTGGAAAAAA

[0593] SEQ ID NO:6为小鼠WNT1诱导信号通路蛋白1前体[小家鼠 (*Mus musculus*)]的氨基酸序列。

MRWLLPWTLAAVAVLRVGNILATALSPTPTMTFTPAPLEETTRPEFCKWPCECPQSPPRCPLGVSLIT
DGCECKKICAQQLGDNCTEAAICDPHRGLYCDYSGDRPRYAIGVCAQVVGVCVLDGVRYTNGESFQPNCRYNCTC
[0594] IDGTVGCTPLCLSPRPRLWCRQPRHVRVPGQCCEQWVCDDDARRPRQTALLDTRAFASGAVE
QRYENCIAYTSPWSPCSTTCGLGISTRISNVNARCWPEQESRLCNLRPCDVIDQLHIKAGKKCLAVYQPE
EATNFTLAGCVSTRTPKYCGVCTDNRCIPYKSKTISVDFQCPEGPGFSRQVLWINACFCNLSCRNPNDIFADL
ESYPDFEEIAN

[0595] SEQ ID NO:7为小鼠WNT1诱导信号通路蛋白1 (*Wisp1*), 转录变体1, mRNA[小家鼠 (*Mus musculus*)]的核苷酸序列。

AGAAAAAGTTTTTTTAGAGGAAAATGCAGGGCTAGTCTGTTGGCCTGACGTCAGATGTCGCTTTGACAAACGCCCC
CGGGGGCTGAGGAAGGCTCTCCGCTGCTCTGATGGGCCAGCCAGTCCTGGCCAGCTCCCTGGAGAGGCATCCGC
ATCCTCTGGGCTGAGCCGTAGCTCCTGTGACGCTGACTCCAGGCATGAGGTGGCTCCTGCCCTGGACGCTGGCAG
[0596] CCGTGGCAGTCTGAGGGTGGGCAACATCCTGGCCACGGCCCTCTCTCAACCCCCACAACATGACCTTCACCCC
AGCACCCTAGAGGAAACGACTACACGCCCCGAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCACAAATCCCCACCTCGC
TGCCACACGCGCTCAGCCTAATCACAGATGGCTGTGAATGCTGTAAGATATGTGCCACGAGCTTGGGACAAC
GCACAGAGGCTGCCATCTGTGACCCACACCGGGGCTCTACTGCGATTACAGTGGGGATCGCCCGAGGTACGCAAT

[0597]

AGGAGTGTGTGCACAGGTGGTCGGTGTGGGCTGTGTCTGGATGGCGTACGCTACACCAATGGCGAGTCCTTCCAA
CCCAACTGCAGGTACAACGTACCTGCATTGATGGCACGGTGGGCTGCACACCGCTGTGCCTAAGCCCCAGGCCCC
CACGCCCTGGTGGCGCCAGCCCCGGCACGTGAGAGTCCCTGGCCAGTGCTGTGAGCAGTGGGTGTGTGATGATGA
CGCAAGGAGACCACGCCAGACTGCACTGTTGGACACCAGAGCCTTTGCAGCGTCAGGCGCCGTGGAGCAACGGTAT
GAGAACTGCATAGCCTACACTAGTCCCTGGAGCCCCCTGCTCTACCACCTGTGGCCTAGGTATCTCCACTCGGATCT
CTAACGTCAATGCCCCGGTGTGGCCAGAGCAGGAAAGTCGCCCTCTGCAACCTGCGGCCATGTGATGTGGACATCCA
ACTACACATCAAGGCAGGGAAGAAATGCCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGAGGCCACGAACTTCACTCTCGCAGGC
TGTGTGACACACGCACCTACCGACCCAAGTACTGCGGAGTCTGTACTGACAATAGGTGTGCATCCCCCTACAAGT
CCAAGACCATCAGTGTGGATTTCCAGTGTCCAGAGGGGCCAGGTTTCTCCGGCAGGTCTATGGATTAATGCTTG
CTTCTGCAACCTGAGCTGCAGGAATCCTAACGATATCTTTGCTGACTTGGAATCTTACCCTGACTTCGAAGAGATT
GCCAATTAGGTGGGTGTGTGGCTCAGGGTAAAGTTCCATGCTGCAAAGCAGCCAGCCCTTTGTGGTCCAGGACTTC
ACAATTGAGCCTTATTTTCATCTACTTCTTACTCGATTCTGAATTTCCAGTTTCTGTTCCTGTTTTGACAATCGTAA
TGGCCCAGGAGAGTGTGCTCAGGCTCAGACAATGGGTTCCTCCTTGGGGACATTCTACATCATTTCCAGGAAAAC
ACATCTCTGACTGTTTACAATGGAAGCAAAGCCTGGCCCAGCTAGTCTGGCTCCAGCCTGGGCAAGTTGTCAGAAG
TTGTGATGGGATTGTCCAAGGAAAAGCATCAGCTGAAGAACCAGTATCATGAAGTCCTTCCCTCAGATGCCAAGCCT
AGGGATGCTGGGATCCTTTTCAGACAGATGGATGGGATTGGGGACACAGGAATAAGCTATTATTTTACCCTTGCCAA
ATGATACTATCCTGGGTATTTCTGCCTAAAACATACAAAAGTGTTCTTGTTCCTGATCTGTATATCACAAAGTC
ACCAAACATTTTCCAGGTGAGGACCATAGTTGTGTTCATTCTGTTTTGCTATTGAAAATCATTTTAAAAAGAAGGAA
AAAAAAAAAAGAAAAGAAAAGAAAGTCAATTCATTAAGTGGGCACCTTCTCCTCTCACCCCATATTCTATAAAGG
GCTAAACTTGGGTCTTGTGATCAGGAATGTAATTTGAGAAGTCTTACTTTTGAGGGAGATGGTAGCCCTCAAT
TCATCCCGTAGGGATGGGACAAGGCCAGCCAATCTTTCAAGCCATAGCTGGGCAGGTCACTGAATCTGCTGCTGGC
CAAGTTCTTAGGACAATTAGCCAAAATCTGGGCCTCTCTCTCCCTAGGGTTCATGGGAGTTGGTAGGGACCGTAGA
GTGACTTGTCTGTTGTCTCAAAAAGTAAGATGGAAAGATGTTCTCATGGCCCTTAGAAGACTCTTTTGAAGTCTAC
GCCAGACCTAACAGAATATGTGCATCAACAAACAAGTGGATCACCCCTCCCATGGCCTGGGTGACCTCTAGCAGTC
ACCCAGTGACTGTGGTAAGGCCACAGTAGTCCCTGGACCCAGGACAAATCTTTTTTGTTCAGTGACCTACTTTAC
AGCCTCAGTGTCTATGAAGAAAGTTAACTCAGTTTTCTCATCTGAAGACAGAAGTCGACCAGCCATTGAGAAATGG
GGATCTATTTAGTAGTGGTAAACGTTAAAGAGTTTGTAAAGCTAAAGAAATATTTTTTTTCTAAGTGATAATGAGG
TTGTTACCTATTTTAGAGGTAGAATTTTCTGTCTATCATCCTTTTATTGTGTTCTACATACTACCCATTGTTCTCAA
TATTTGCCACACATTTACTCATTGAACTTGTGATAACACAGAGGACTTCCCTTAATGATTTCTGTCTTGACAC
TGTGAAATATCAATTCAAAGAGGCTAATAAGTTCAATCAAAGTCACCTATCTGAAGACTCATAGCCAGAGAAGATT
GCCTTCATATTTCCCTTTTGCTTCTGGACCTTGTAACATGTCAGGGCAGGAAAGCATACAGAAGTCAGCAGCTTG
CCCTCTTAGTATTGGCTCTCTAGCCCCCTTTCAGTAAGAGGAGAGTGTGTCTAGGTACTAAGGATCCAACTAAAC
TGGACAGAAAAGGGCATGTGCATTATCCCCGTGGCTCCTCCTGCCCTGGAATCAGAACTAGCTTACAGCATGCTT
TTATATGATGATTCAAGTTTGGCCCCACACCATACATATGGGCATATGGGAGAACTATACACACACTCATAAATGGAT
TTGTAAGTAGGAAAGGGGACTTGAGATTTCCCTCCTTCTGCAACTTCCCAAAGGCCTGGCCTTATGCAAGGCAA

- ACAGTGGTGCTTAAGATGTATTTTGGGAAGAAAATACTATATATATATATTCCTATTTTCTTAGAAGCCTTTTC
TTCCAGGATCTCATCTTAACAGTAAGAAATCCTCTCTTAAGAGAGGCCTAGTATTTTGAGTAAACATATGTTTCATA
TGTGTACAAGTACTTGTATGTAAATATAAGTTACCACTGTGGGTATTAAATTAGGTAAATTTTATGTGGTATCATA
TTTGATTTTCTTCTATTGGAAAAATCTGCCTTAACAGCTAACTCTGTAAGAACTTCCATAGGAGCCATAAGCTAGG
GTCTTCCCAGGTATCCATCCTCTTTTGGGAACTGAGCTGAGCATCTTCAACCAAAGGAGTTAGGGTGATCATTGG
GAATAGGAGAAAGGGATGGCCAGGGTAGCTCCATCGTTATTAGAAACAGACCTGGCATACAGAACCAGCCAGAGGA
ACCAACCTTCTTTGAACCAAGGGAAAAAGACTTGGATGTAATATATAGAAGCTTTTCTAATAGTCAGAAACAGAC
TTTAATTGTATGGCCTGGTTCAAGGAAAGTTAAGAATGTCCATTATCGTTAAAAACAAAAGTCCATTATTGATAGC
TTATTTGGTGCTAAGCCCTACGGTGCATTTTGTCCGGCTATCACTTAGCAGAGCCATGCTCAGTACACAGTCTTTC
TCTATTCAATAAATAGAAACGCTGAAGCTCAAAGGCACTGAGGAGCTGAGGCTCAGAAGCATGTTTAGTCCACTCT
ATCAGGGGGGGAAGAGATCTTGACGGAACCTAAATGACTACTATTGGAACTCATATTTGAAAGCTTTCAGAAGTC
CCACCCCCACCCCATCCCCAGATGCTTAGAACTAAAGAAGCAATGAGGATGAGCTAGCCTTCAGTGAAGAGGTTTC
[0598] ACTACTGCACCAAGAGTGAATGTCTTAGGTGTACTTAGTCATTGGACAGGGAGACCTGAGTGAGTTTGTGAACCTG
CAGCTTACTAAACCTTACAATGAGCATTGGAGAGCCAAGACTGCTTCTCGGCGCTTTACTGACATGGCTTGCTTA
ATCTTCTCAGTGAGCCCAAGAGTCAGGGCGTTACCACTGCCATTTTAGGGCTGAGAAAGCAAATCTCCAGGAGT
TAAGTGATTGCTCAAGTTTAAACCAACCGAGGCACTGCAGATAAACTCCGAAGCCCAGTGTATGTAACATGCC
CATGCCATCTCTCCGGACACGCAGCCATTTTCTGTTCCTAAACCAAAGGCTCAGAGTCACCAGAACCAACTCAC
AGGACAGTGCAGAAATCTAATGTCGAGGGTGATTAGAGACTGATCAAAGAAAGTAATTTCAAATGATATGATTGT
TTGTAAGCACCCCTAGTTAATTCTGGAATACATATGCATAGAGATTGTGAAGAACATTACAGCCTGTGACTATAACG
TTGACTTCTGTCAATTTCTTTTAAAGACTTGTTTTTTTTTTTTACTCAAAGGACCCACAGTGACAGCCCTGAATG
GTTGAGAAGCATTGATTAGCTGTGAGTCCTGCATATGTAAGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTATTTGTATGTACTT
ATCTATTTCAAAGTGTGATTGTGTATTTAAATATTCCTCCTGCCATTTTGTAAAGTATTACGCATAAAGAAACAC
CTTTGAATGTCTAATAAAGGAGAGCTAGCCCTTGGGCGGCTGTCACATTTTGCCACTTTCCTCATTTTCTCAT
GATCTGTGTAGCAGGAATGTGTTTGTCAACCATGATGAGTTTTCATTGTTCAAATCTTTGTTTACAGCTTTTC
TCCTTAAAGCAATAAATCATCAGCAACAGTAA
- [0599] SEQ ID NO:8为人MiR 15a的核苷酸序列。
- CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGGAUUUUGAAAAGGUGCAGGCCAUUUGUGCUGCCU
[0600] CAAAAAUACAAGG
(SEQ ID NO: 8)
- [0601] SEQ ID NO:9为人Mir-412的核苷酸序列。
- CUGGGGUACGGGAUGGAUGGUCGACCAGUUGGAAAGUAAUUGUUUCUAAUGUACUUCACCUGGUCCACU
[0602] AGCCGUCCGUAUCCGCUGCAG
(SEQ ID NO: 9)
- [0603] SEQ ID NO:10为小鼠MiR 15a的核苷酸序列。
- CCCUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGGAUGUUGAAAAGGUGCAGGCCAUACUGUGCUGCC
[0604] UCAAAAUACAAGGA
(SEQ ID NO: 10)
- [0605] SEQ ID NO:11为小鼠Mir-412的核苷酸序列。
- GGGUAUGGGACGGAUGGUCGACCAGCUGGAAAGUAAUUGUUUCUAAUGUACUUCACCUGGUCCACUAGCC
[0606] GUCGGUGCCC
(SEQ ID NO: 11)
- [0607] SEQ ID NO:12-31为对于IgG的家鼠属(Rattus)重链互补决定区。

[0608]

SEQ ID NO:	登录号	名称	生物体名称	长度
12	1bfo_B	CAMPATH-1G IGG2B 大鼠单克隆 FAB	黑家鼠(<i>Rattus rattus</i>)	216
13	1bfo_D	CAMPATH-1G IGG2B 大鼠单克隆 FAB	黑家鼠	216
14	1bfo_F	CAMPATH-1G IGG2B 大鼠单克隆 FAB	黑家鼠	216
15	1bfo_H	CAMPATH-1G IGG2B 大鼠单克隆 FAB	黑家鼠	216
16	1c5d_B	针对人肌肉乙酰胆碱受体的主要免疫原性区域的大鼠单克隆抗体的 FAB 片段的晶体结构	褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	215
17	1c5d_H	针对人肌肉乙酰胆碱受体的主要免疫原性区域的大鼠单克隆抗体的 FAB 片段的晶体结构	褐家鼠	215
18	1f3r_B_i	FV 抗体片段和乙酰胆碱受体的主要免疫原性区域的类似物之间的复合 (complex)	褐家鼠	138
19	1fn4_B	FAB198 的晶体结构, 针对肌无力原性抗体(myasthenogenic antibody)的乙酰胆碱受体的有效保护子	褐家鼠	218
20	1fn4_D	FAB198 的晶体结构, 针对肌无力原性抗体(myasthenogenic antibody)的乙酰胆碱受体的有效保护子	褐家鼠	218
21	2arj_B	与 YTS 105.18 FAB 复合的 CD8ALPHA-ALPHA	褐家鼠	215
22	2arj_H	与 YTS 105.18 FAB 复合的 CD8ALPHA-ALPHA	褐家鼠	215
23	3iy7_B	适合于病毒-FAB F 复合物的冷冻电子显微镜重建的 FAB F 的计算机产生的模型(WAM)的可变结构域	褐家鼠	115
24	4why_G	结合至广泛地中和抗体 3/11, P21 晶体形式的丙型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 抗原区域 412-423 的结构	褐家鼠	252
25	4why_I	结合至广泛地中和抗体 3/11, P21 晶体形式的丙型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 抗原区域 412-423 的结构	褐家鼠	252
26	4why_K	结合至广泛地中和抗体 3/11, P21 晶体形式的丙型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 抗原区域 412-423 的结构	褐家鼠	252
27	4yny_A	单克隆抗人平足蛋白抗体 NZ-1 的晶体结构	褐家鼠	238

[0609]

28	4yny_C	单克隆抗人平足蛋白抗体 NZ-1 的晶体结构	褐家鼠	238
29	5aum_A	具有配体肽的 FAB 片段的晶体结构	家鼠属	242
30	5aum_H	具有配体肽的 FAB 片段的晶体结构	家鼠属	242
31	5hbv_D	FAB35 和小鼠 NACHR ALPHA1 的复合结构	褐家鼠	219

[0610] SEQ ID NO:32-51为对于IgG的家鼠属轻链互补决定区。

[0611]

SEQ ID NO:	登录号	名称	生物体名称	长度
32	1bfo_A	CAMPATH-1G IGG2B 大鼠单克隆 FAB	黑家鼠	214
33	1bfo_C	CAMPATH-1G IGG2B 大鼠单克隆 FAB	黑家鼠	214
34	1bfo_E	CAMPATH-1G IGG2B 大鼠单克隆 FAB	黑家鼠	214
35	1bfo_G	CAMPATH-1G IGG2B 大鼠单克隆 FAB	黑家鼠	214
36	1c5d_A	针对人肌肉乙酰胆碱受体的主要免疫原性区域的大鼠单克隆抗体的 FAB 片段的晶体结构	褐家鼠	213
37	1c5d_L	针对人肌肉乙酰胆碱受体的主要免疫原性区域的大鼠单克隆抗体的 FAB 片段的晶体结构	褐家鼠	213
38	1f3r_B_ii	FV 抗体片段和乙酰胆碱受体的主要免疫原性区域的类似物之间的复合	褐家鼠	119
39	1fn4_A	FAB198 的晶体结构, 针对肌无力原性抗体的乙酰胆碱受体的有效保护子	褐家鼠	211
40	1fn4_C	FAB198 的晶体结构, 针对肌无力原性抗体的乙酰胆碱受体的有效保护子	褐家鼠	211
41	2arj_A	与 YTS 105.18 FAB 复合的 CD8ALPHA-ALPHA	褐家鼠	211
42	2arj_L	与 YTS 105.18 FAB 复合的 CD8ALPHA-ALPHA	褐家鼠	211
43	3iy7_A	适合于病毒-FAB F 复合物的冷冻电子显微镜重建的 FAB F 的计算机产生的模型(WAM)的可变结构域	褐家鼠	106
44	4why_H	结合至广泛地中和抗体 3/11, P21 晶体形式的丙型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 抗原区域 412-423 的结构	褐家鼠	220
45	4why_J	结合至广泛地中和抗体 3/11, P21 晶体形式的丙型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 抗原区域 412-423 的结构	褐家鼠	220
46	4why_L	结合至广泛地中和抗体 3/11, P21 晶体形式的丙型肝炎病毒包膜糖蛋白 E2 抗原区域 412-423 的结构	褐家鼠	220
47	4yny_B	单克隆抗人平足蛋白抗体 NZ-1 的晶体结构	褐家鼠	233
48	4yny_D	单克隆抗人平足蛋白抗体 NZ-1 的晶体	褐家鼠	233

[0612]

		结构		
49	5aum_B	具有配体肽的 FAB 片段的晶体结构	家鼠属	239
50	5aum_L	具有配体肽的 FAB 片段的晶体结构	家鼠属	239
51	5hbv_C	FAB35 和小鼠 NACHR ALPHA1 的复合结构	褐家鼠	213

[0613] SEQ ID NO:52-71为对于IgG的绵羊 (Ovis aries) 重链互补决定区。

[0614]

重					
SEQ ID NO:	登录号	名称	克隆	生物体名称	长度
52	AAD52588.1	免疫球蛋白重链前体	14	绵羊	124
53	AAD52589.1	免疫球蛋白重链前体	17	绵羊	115
54	AAD52590.1	免疫球蛋白重链前体	22	绵羊	114
55	AAD52591.1	免疫球蛋白重链前体	23	绵羊	120
56	AAD52592.1	免疫球蛋白重链前体	34	绵羊	120
57	AAD52593.1	免疫球蛋白重链前体	35	绵羊	119
58	AAD52594.1	免疫球蛋白重链前体	47	绵羊	122
59	AAD52595.1	免疫球蛋白重链前体	52	绵羊	121
60	AAD52596.1	免疫球蛋白重链前体	53	绵羊	114
61	AAD52597.1	免疫球蛋白重链前体	57	绵羊	122
62	AAD52598.1	免疫球蛋白重链前体	58	绵羊	120
63	AAD52599.1	免疫球蛋白重链前体	70	绵羊	114
64	AAD52600.1	免疫球蛋白重链前体	81	绵羊	116
65	AAD52601.1	免疫球蛋白重链前体	92	绵羊	122
66	AAD52602.1	免疫球蛋白重链前体	96	绵羊	118
67	AAD52603.1	免疫球蛋白重链前体	100	绵羊	117
68	AAD52604.1	免疫球蛋白重链前体	138	绵羊	124
69	AAD52605.1	免疫球蛋白重链前体	139	绵羊	114
70	AAD52606.1	免疫球蛋白重链前体	146	绵羊	123
71	CAA89052.1	VH 区前体	VRB7	绵羊	143

[0615] SEQ ID NO:72-90为对于IgG的绵羊轻链互补决定区。

[0616]

轻					
SEQ ID NO:	登录号	名称	克隆	生物体名称	长度
72	AAD51674.1	免疫球蛋白轻链可变区	17	绵羊	111
73	AAD51675.1	免疫球蛋白轻链可变区	35	绵羊	113
74	AAD51676.1	免疫球蛋白轻链可变区	14	绵羊	110
75	AAD51677.1	免疫球蛋白轻链可变区	146	绵羊	110
76	AAD51678.1	免疫球蛋白轻链可变区	23	绵羊	112
77	AAD51679.1	免疫球蛋白轻链可变区	34	绵羊	111
78	AAD51680.1	免疫球蛋白轻链可变区	100	绵羊	111

[0617]

79	AAD51681.1	免疫球蛋白轻链可变区	81	绵羊	111
80	AAD51682.1	免疫球蛋白轻链可变区	22	绵羊	110
81	AAD51684.1	免疫球蛋白轻链可变区	47	绵羊	113
82	AAD51685.1	免疫球蛋白轻链可变区	96	绵羊	111
83	AAD51686.1	免疫球蛋白轻链可变区	53	绵羊	110
84	AAD51687.1	免疫球蛋白轻链可变区	58	绵羊	111
85	AAD51688.1	免疫球蛋白轻链可变区	138	绵羊	112
86	AAD51689.1	免疫球蛋白轻链可变区	92	绵羊	112
87	AAD51690.1	免疫球蛋白轻链可变区	70	绵羊	108
88	AAD51691.1	免疫球蛋白轻链可变区	57	绵羊	111
89	AAD51692.1	免疫球蛋白轻链可变区	139	绵羊	108
90	AAD51693.1	免疫球蛋白轻链可变区	52	绵羊	110

[0618] SEQ ID NOs:91-110为对于IgG的山羊 (*Capra hircus*) 重链互补决定区。

[0619]

重					
SEQ ID NO:	登录号	名称	克隆	生物体名称	长度
91	ABX89999.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	2M2	山羊	137
92	ABX90000.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	2M3	山羊	146
93	ABX90001.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	2M4	山羊	149
94	ABX90002.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	2M5	山羊	130
95	ABX90003.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	2M6	山羊	141
96	ABX90004.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y1	山羊	137
97	ABX90005.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y2	山羊	137
98	ABX90006.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y3	山羊	137
99	ABX90007.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y4	山羊	143
100	ABX90008.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y5	山羊	140
101	ABX90009.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y8	山羊	136
102	ABX90010.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y9	山羊	130
103	ABX90011.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y10	山羊	140
104	ABX90012.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y11	山羊	142
105	ABX90013.1	免疫球蛋白 mu 重链可变区	3Y12	山羊	136
106	ABY65924.1	免疫球蛋白重链可变区前体	1M1	山羊	145
107	ABY65925.1	免疫球蛋白重链可变区前体	1M2	山羊	131
108	ABY65926.1	免疫球蛋白重链可变区前体	1M3	山羊	145
109	ABY65927.1	免疫球蛋白重链可变区前体	1M4	山羊	143
110	ABY65928.1	免疫球蛋白重链可变区前体	1M5	山羊	132

[0620] SEQ ID NOs:111-121为对于IgG的兔科 (*Leporidae*) (兔) 重链互补决定区。

[0621]

重				
SEQ ID NO:	登录号	名称	生物体名称	长度
111	004492	BS-1	兔科	107
112	004493	K-25	兔科	117

[0622]

113	004515	BS-5	兔科	114
114	004520	3374	兔科	104
115	004604	3547	兔科	101
116	004608	120	兔科	49
117	004614	K4820	兔科	29
118	004619	K29-213	兔科	25
119	004623	2717	兔科	14
120	004624	XP-1	兔科	14
121	004628	AH80-5	兔科	11

[0623] SEQ ID NOs:122-141为对于IgG的兔科(兔)轻链互补决定区。

[0624]

轻				
SEQ ID NO:	登录号	名称	生物体名称	长度
122	7173	K29-213	兔科	110
123	7174	AH80-5	兔科	115
124	7185	K4820	兔科	110
125	7187	BS-1	兔科	109
126	7188	BS-5	兔科	109
127	7189	3547	兔科	109
128	7193	3374	兔科	110
129	7202	K-25	兔科	109
130	7204	2717	兔科	111
131	7205	120	兔科	109
132	7211	XP-1	兔科	98
133	48258	k-176'CL	兔科	111
134	48259	k-188'CL	兔科	112
135	48260	k-217'CL	兔科	110
136	48261	k-221'CL	兔科	110
137	48262	k-227'CL	兔科	112
138	48263	k-235'CL	兔科	113
139	48264	k-237'CL	兔科	109
140	48265	k-246'CL	兔科	111
141	48266	k-248'CL	兔科	111

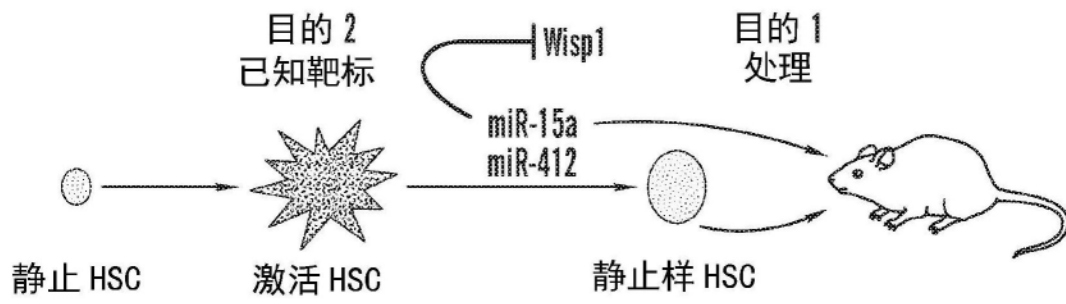


图1

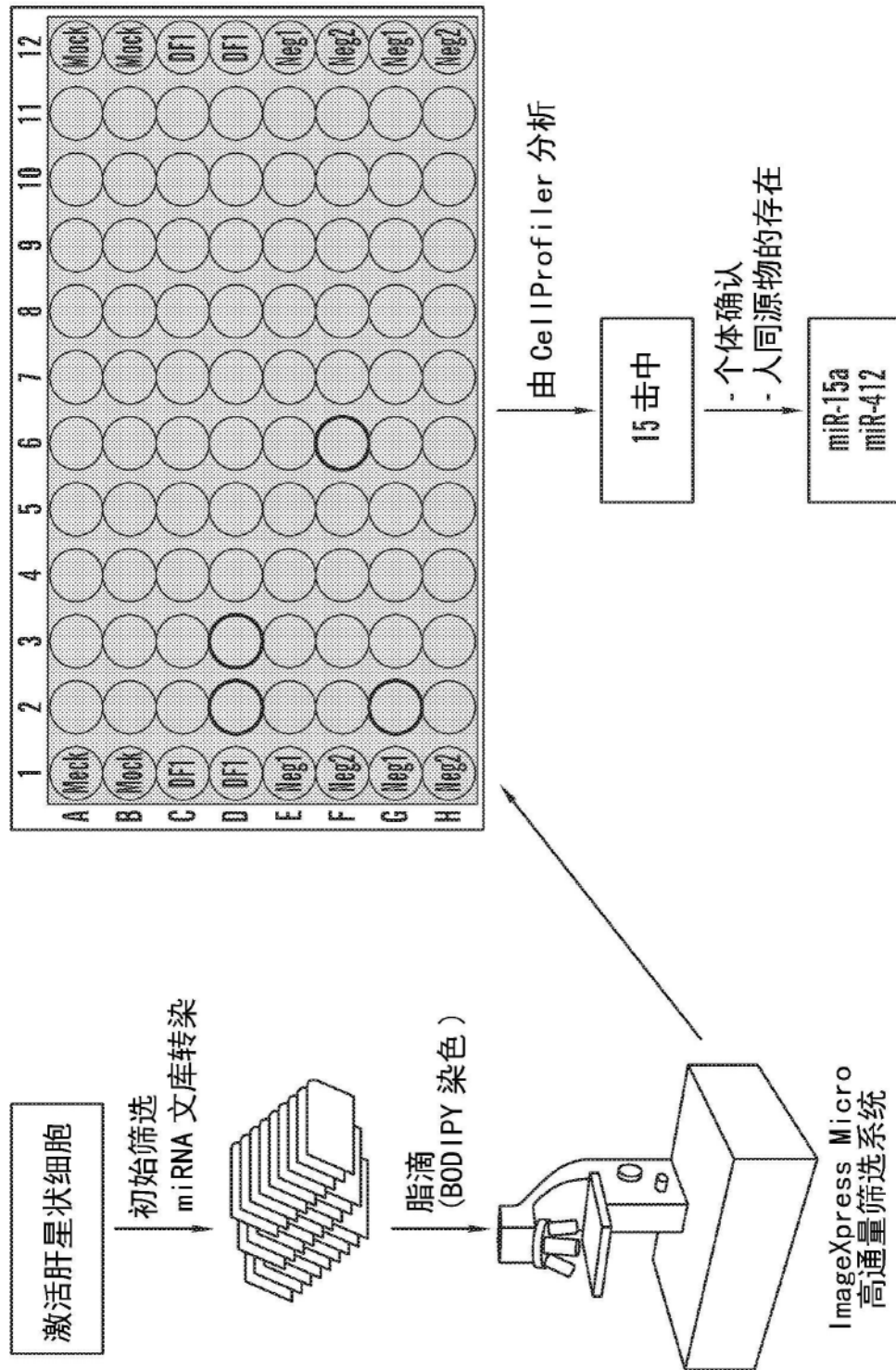


图2

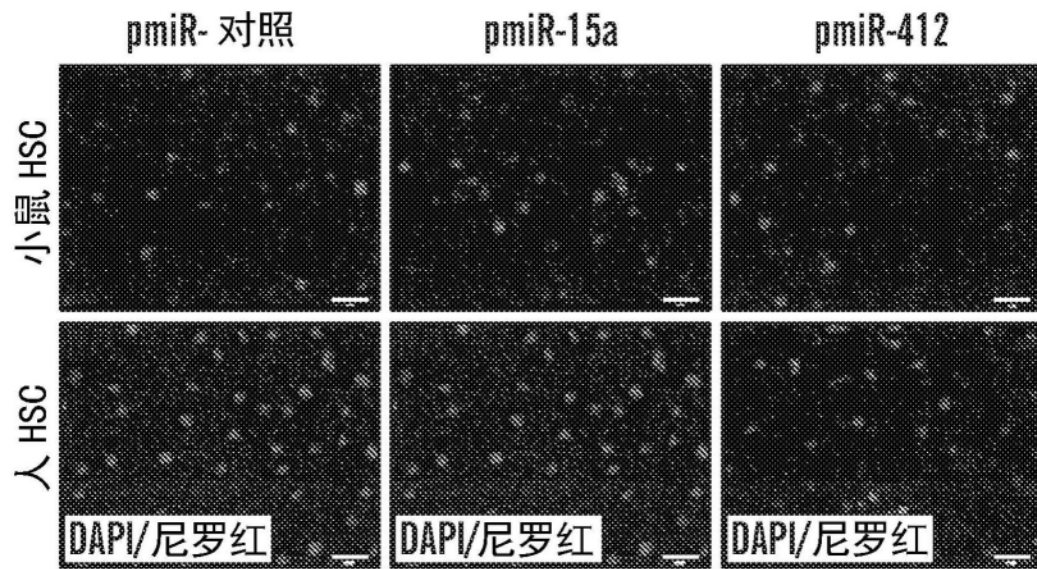


图3

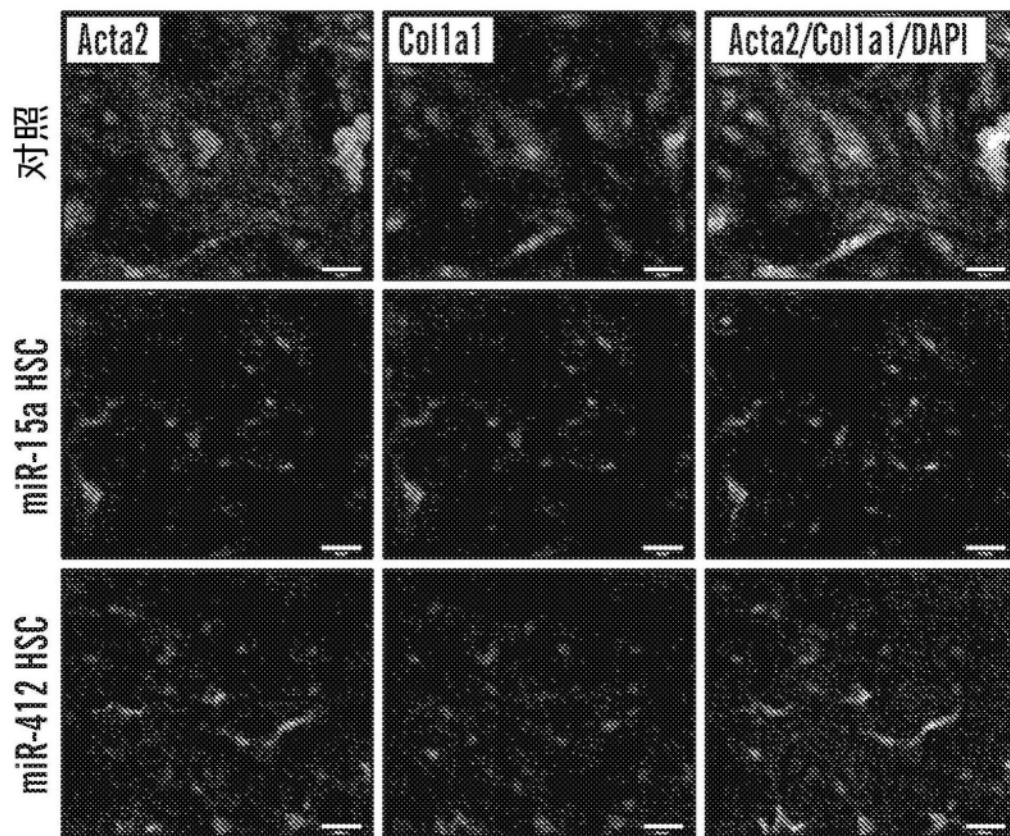


图4A

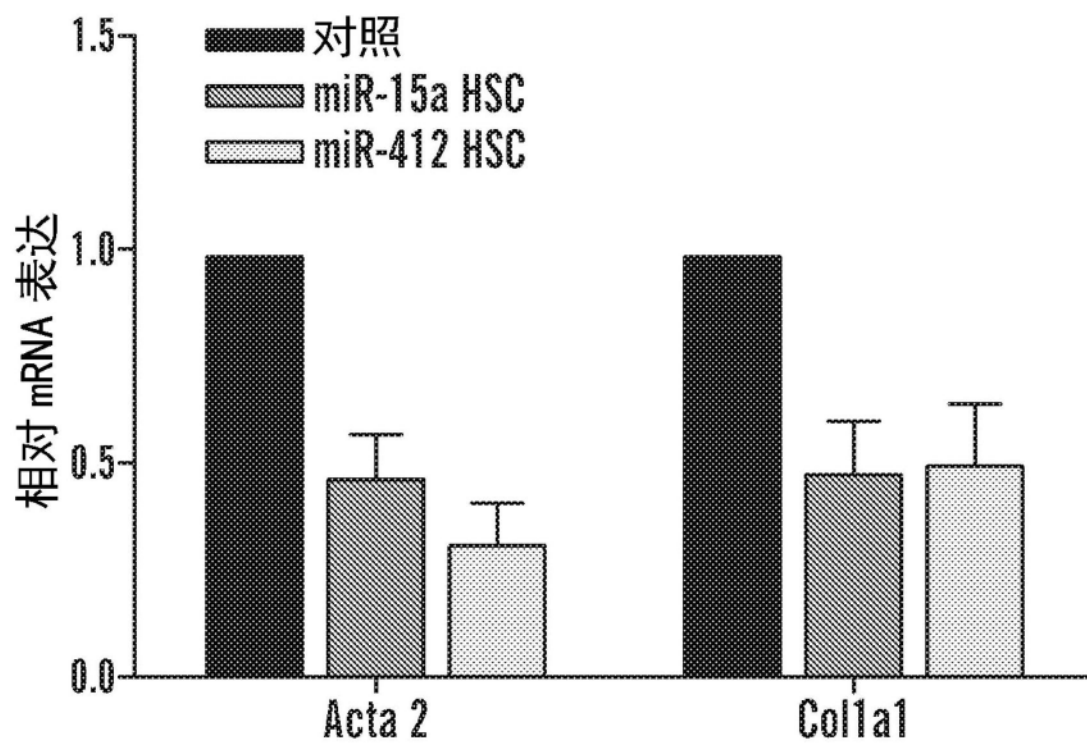


图4B

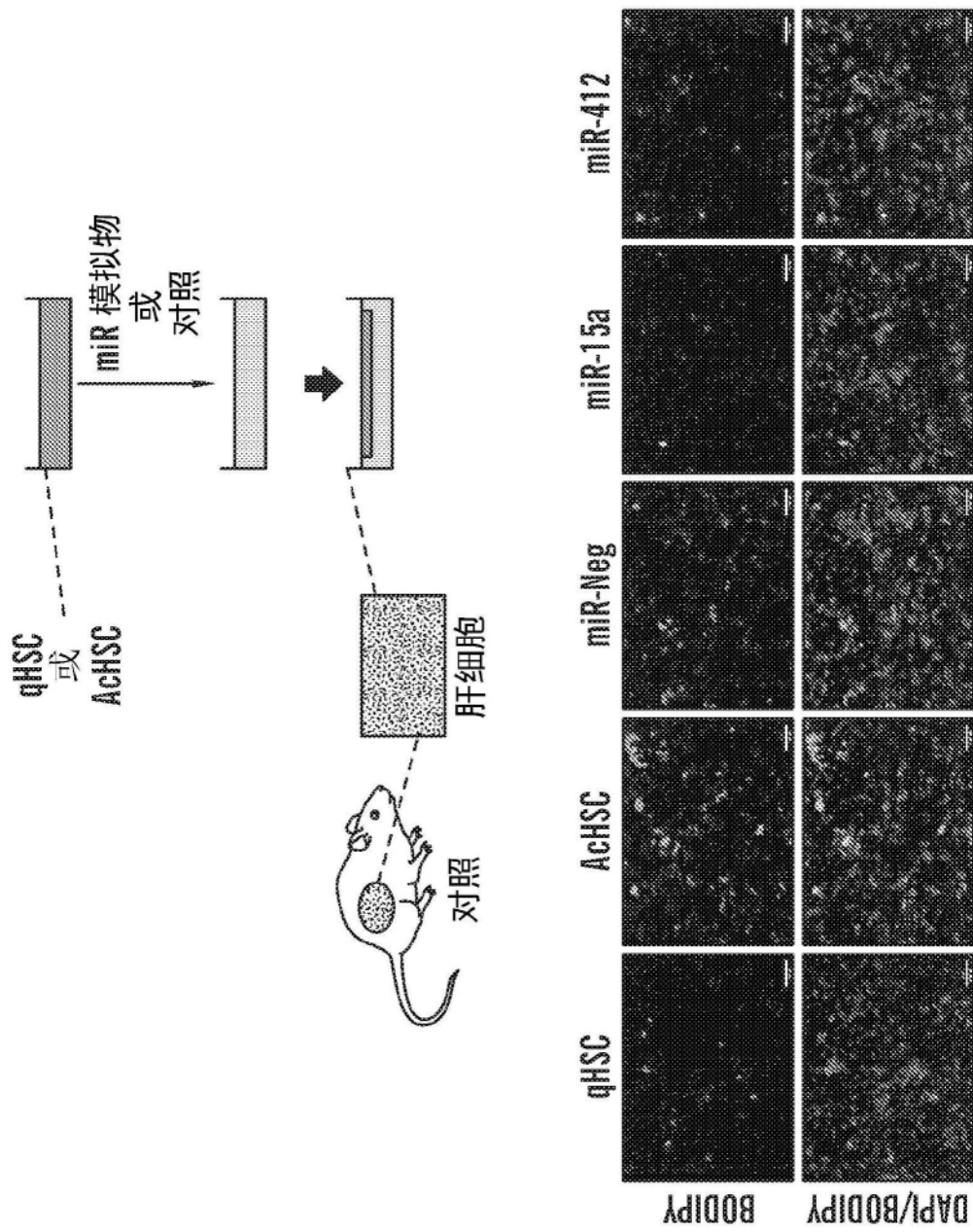


图5

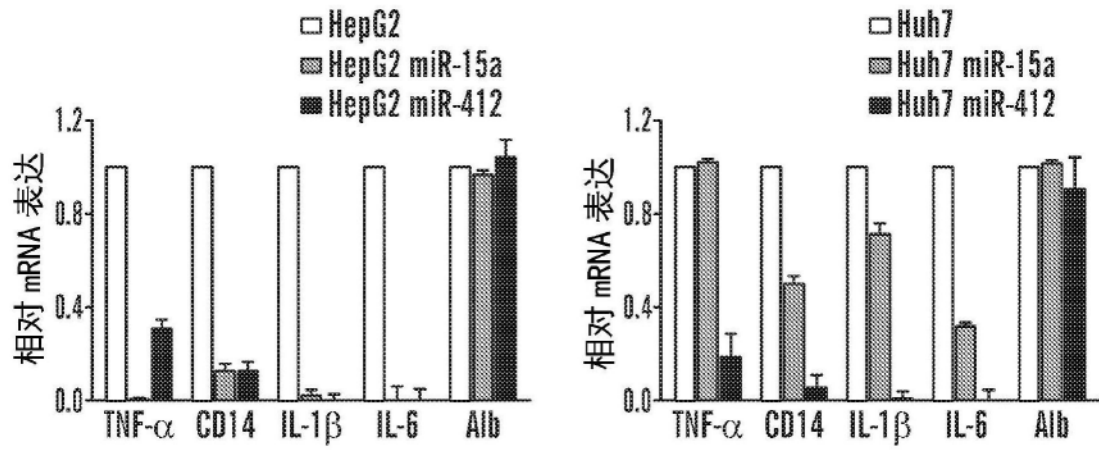


图6

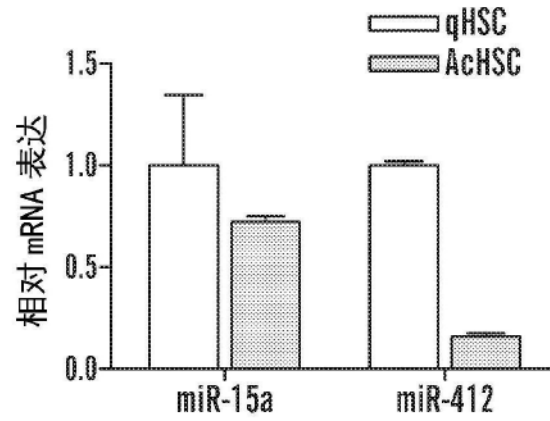


图7

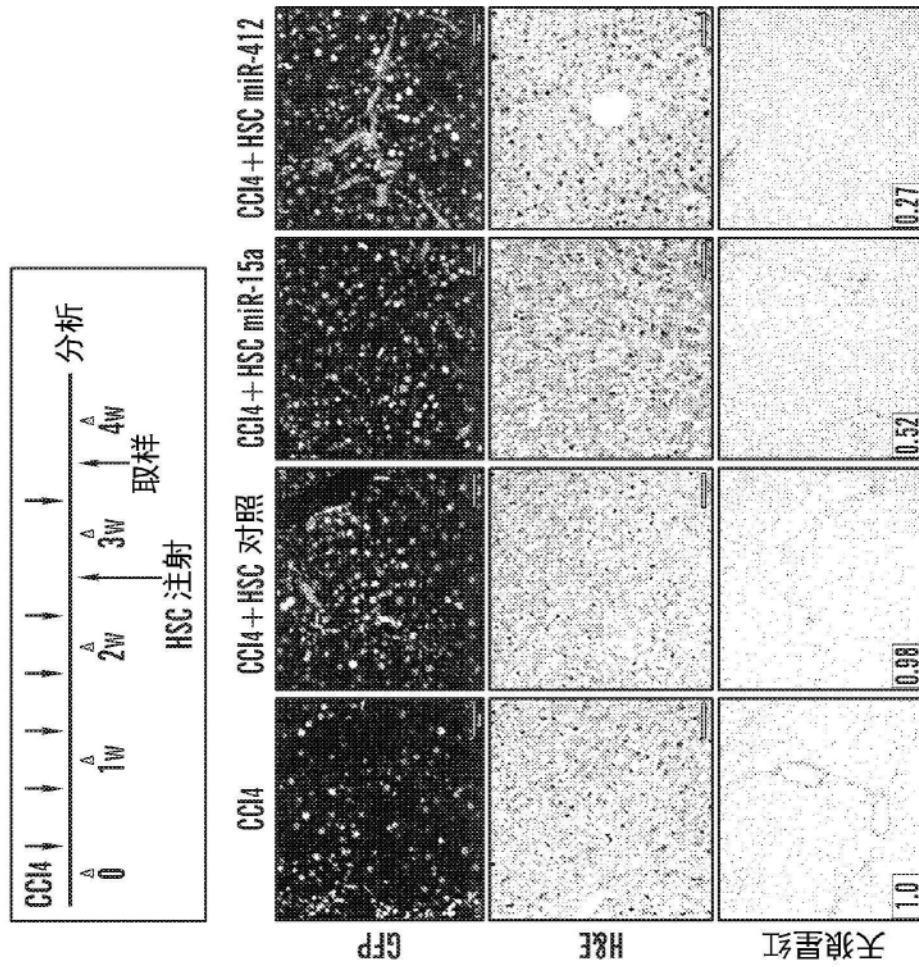


图8

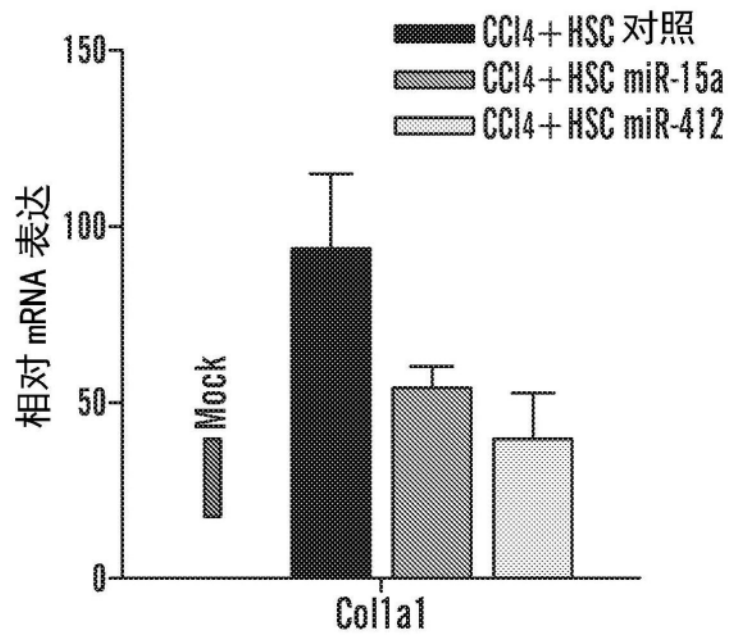


图9

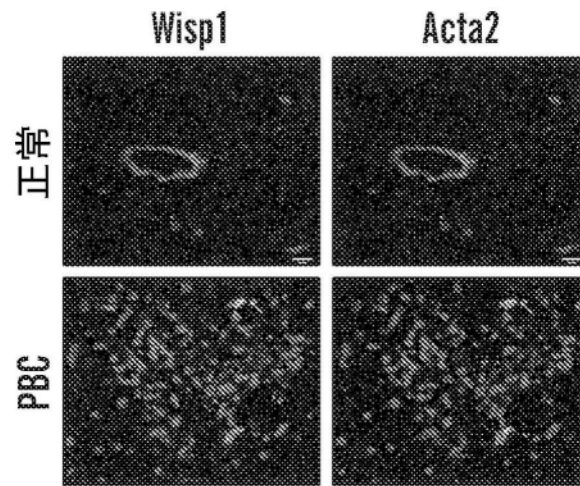


图10

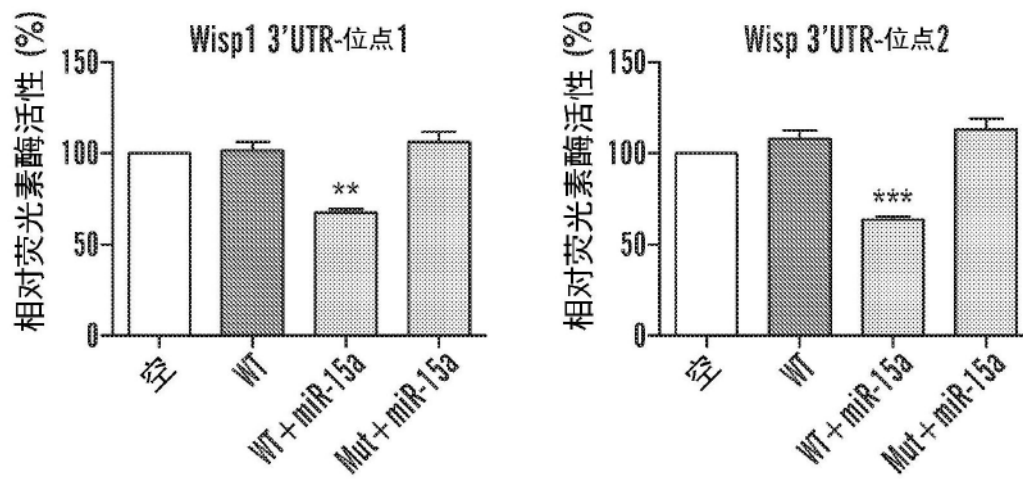


图11

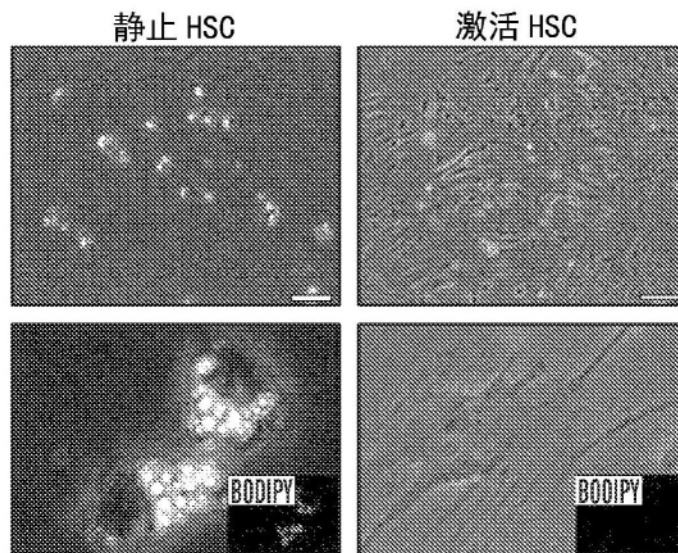


图12

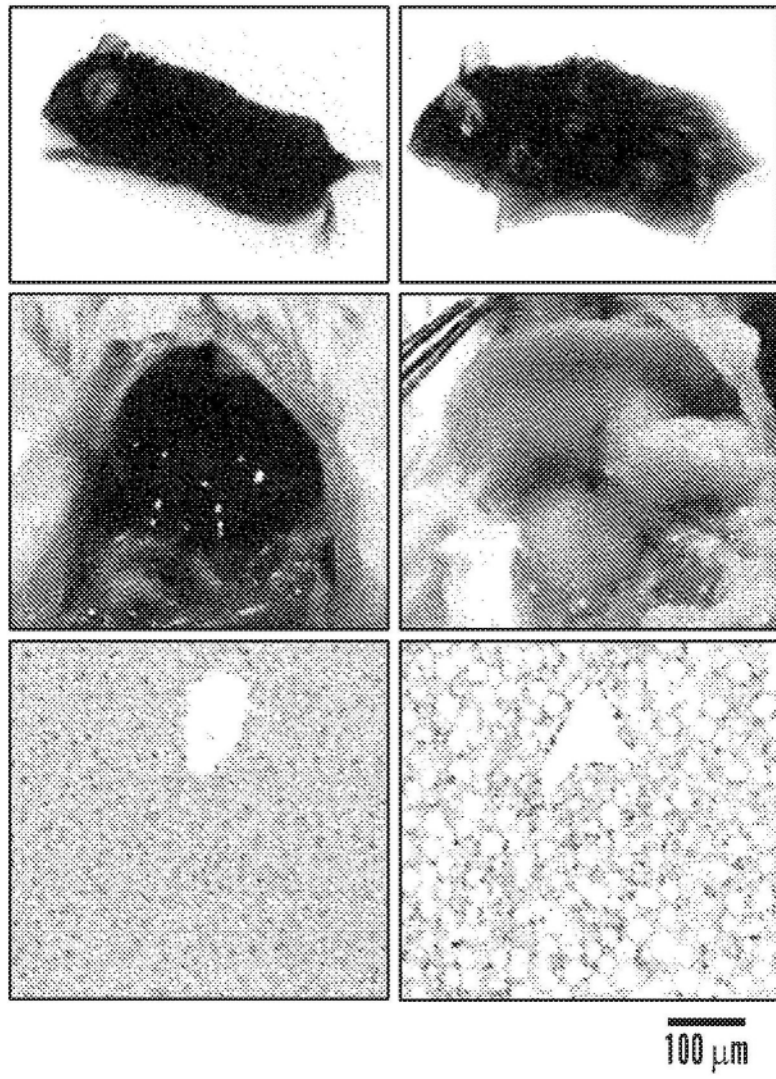


图13

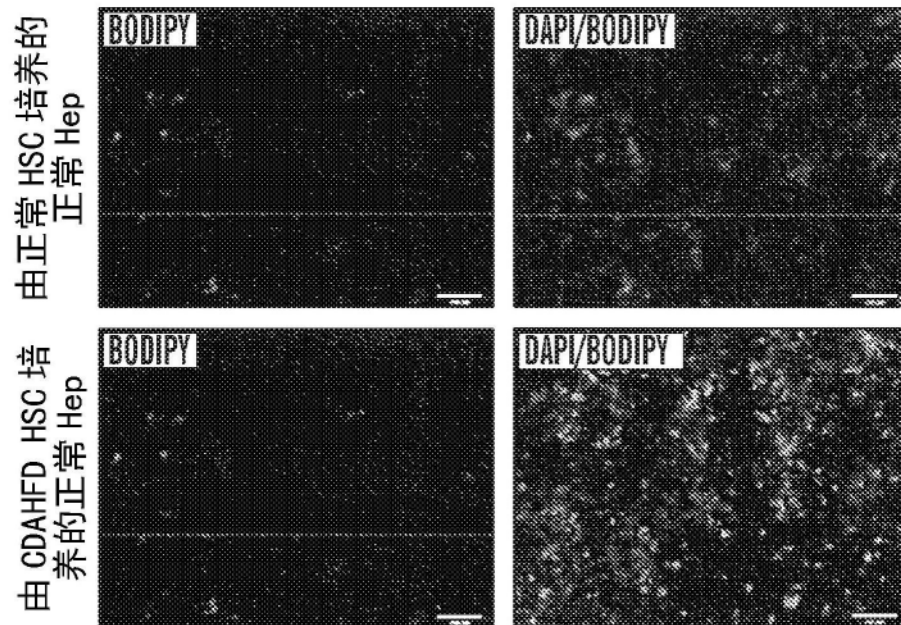
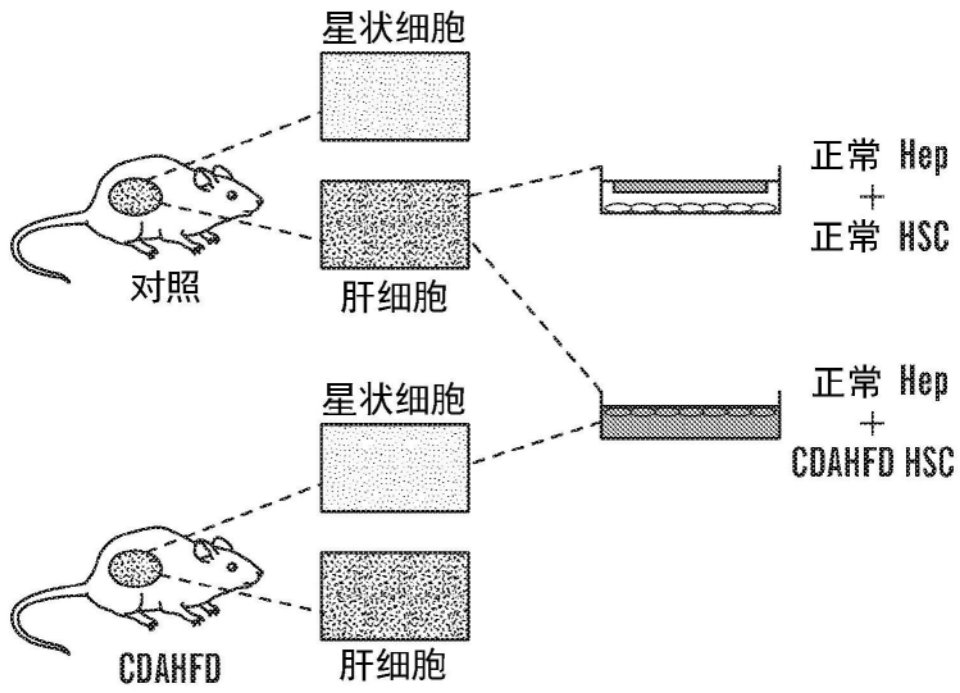


图14

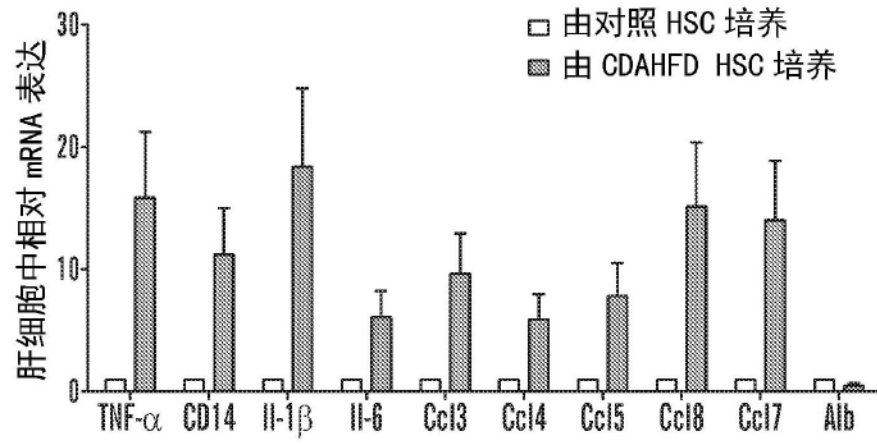


图15

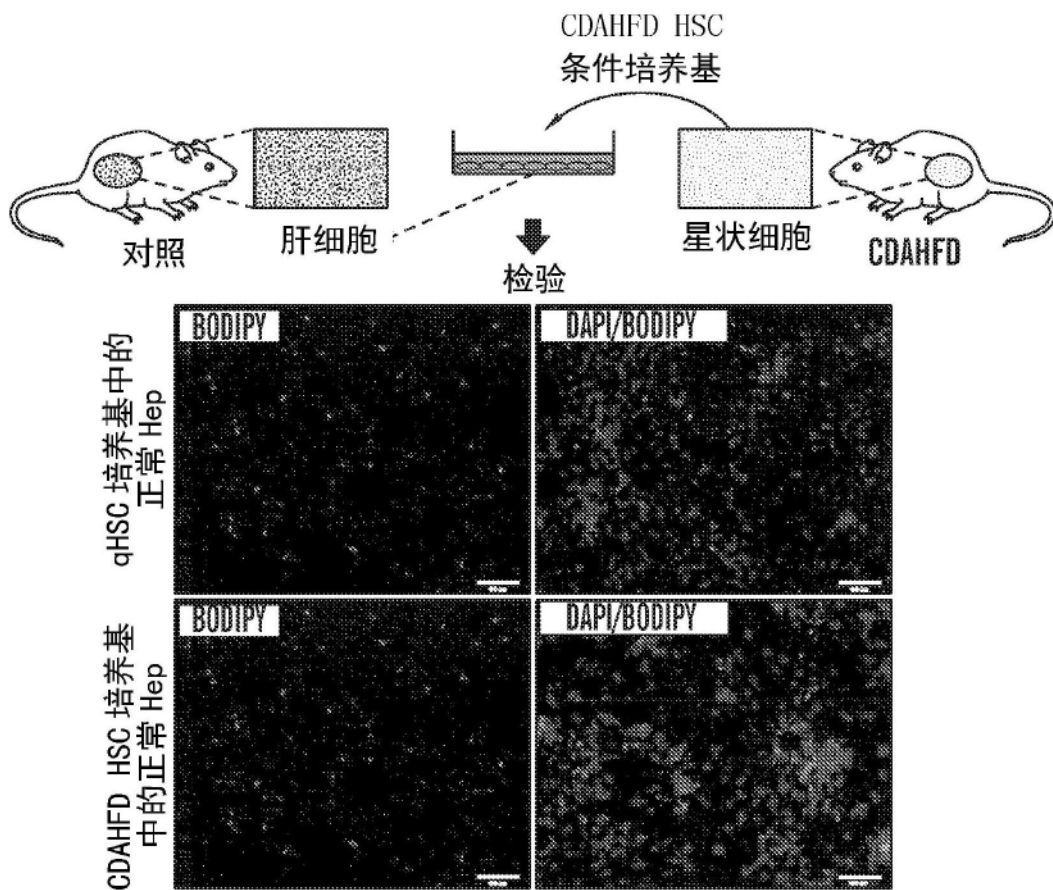


图16

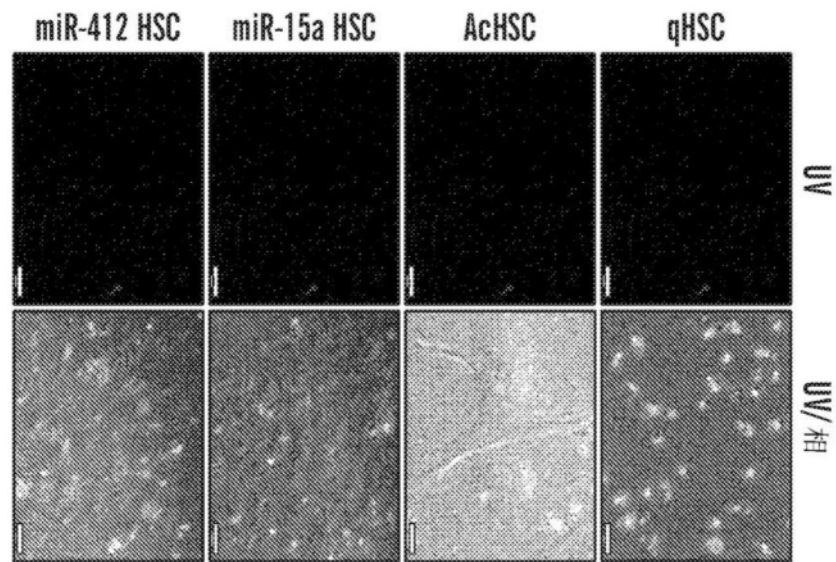


图17

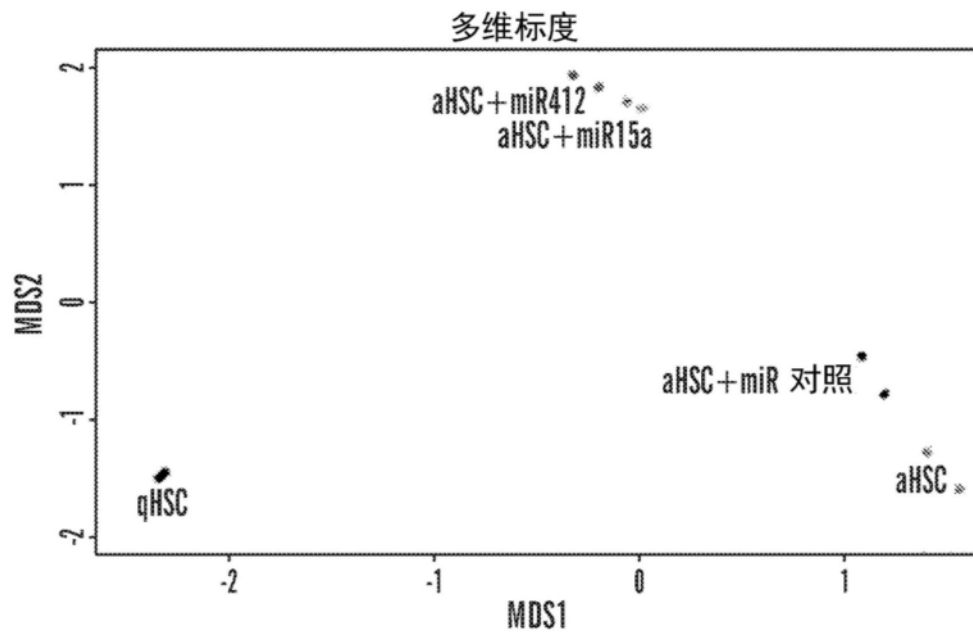


图18

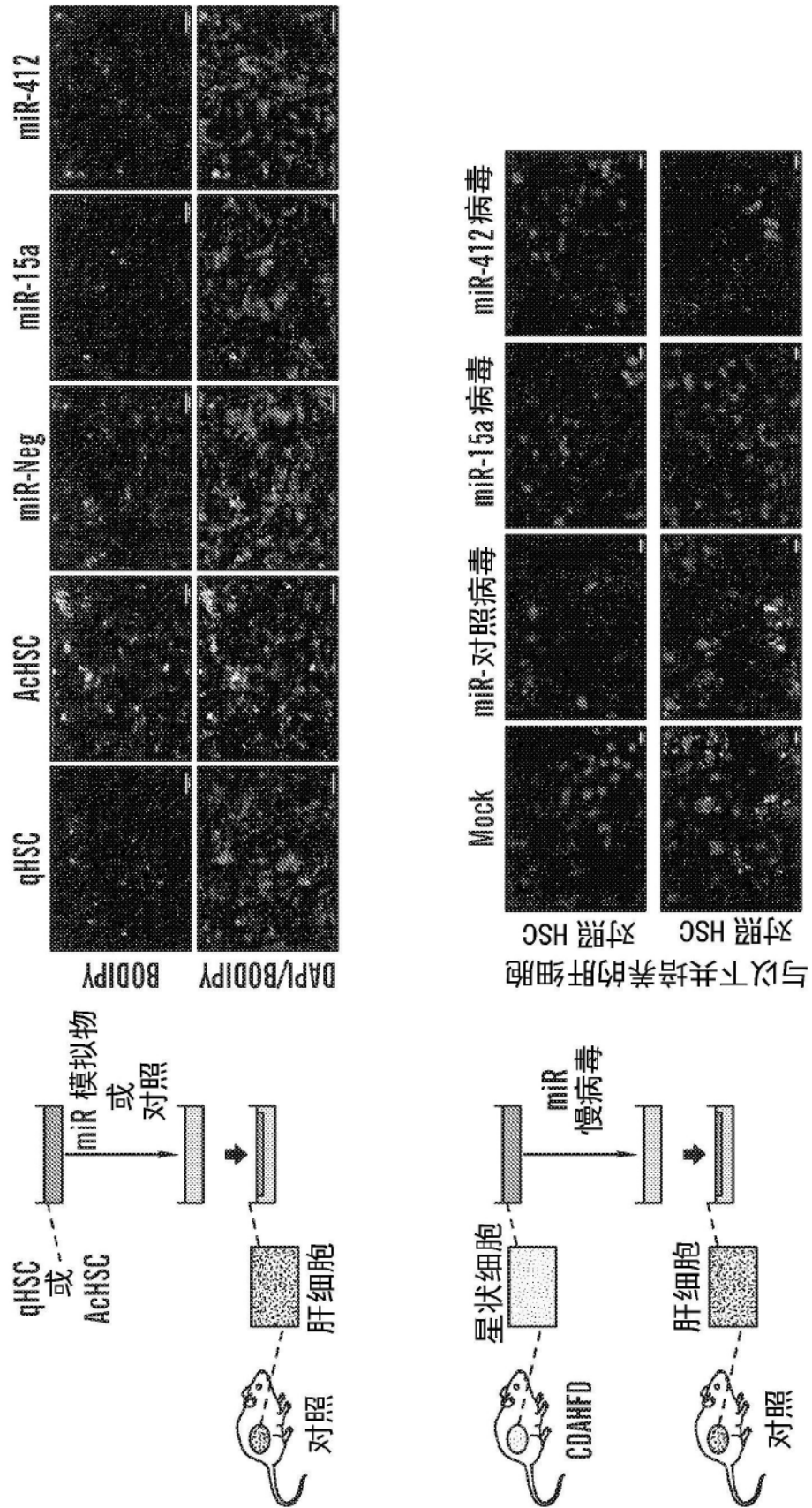


图19

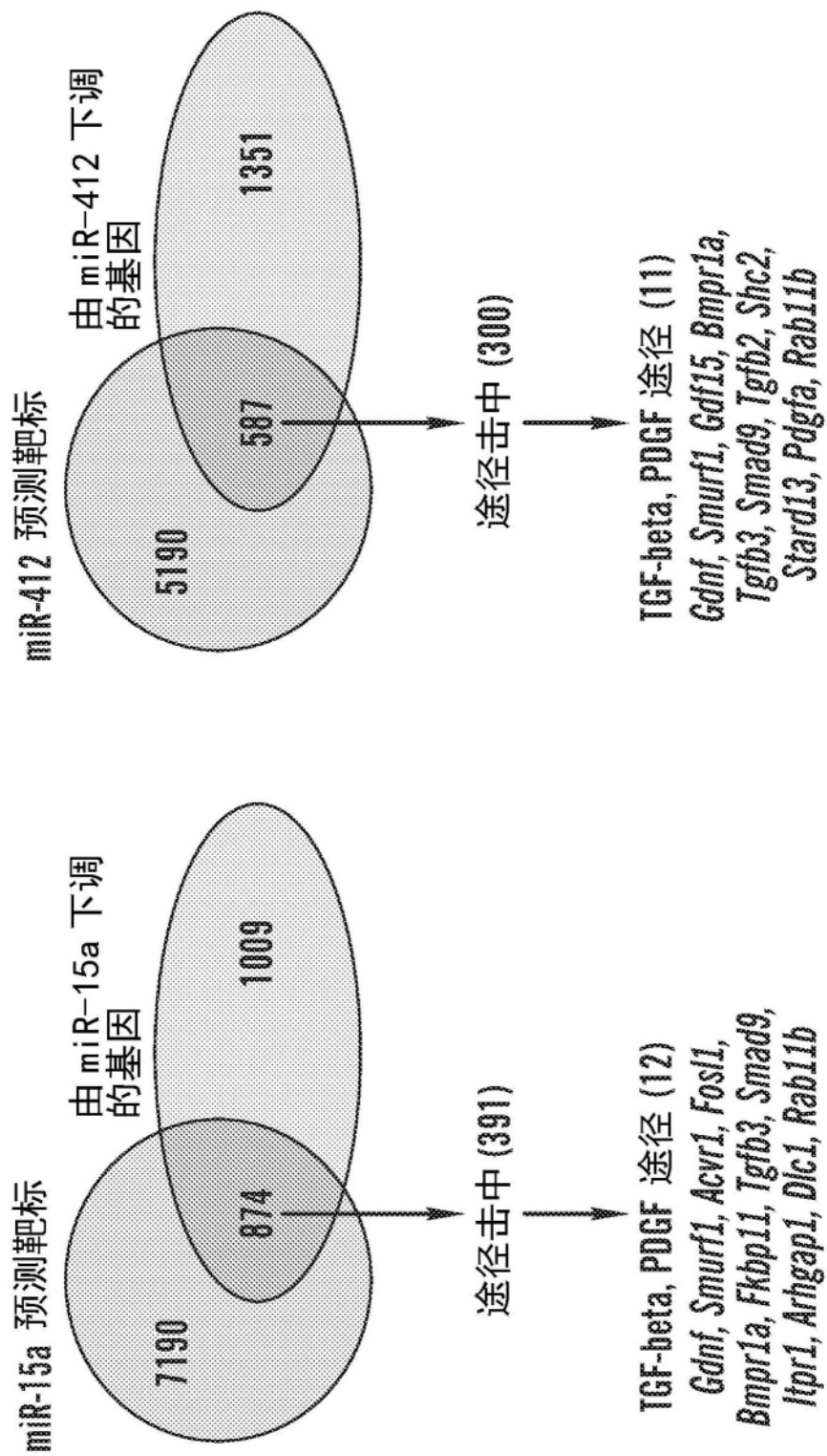


图20

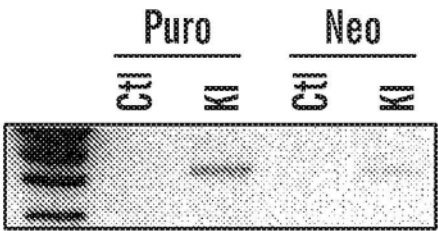


图21

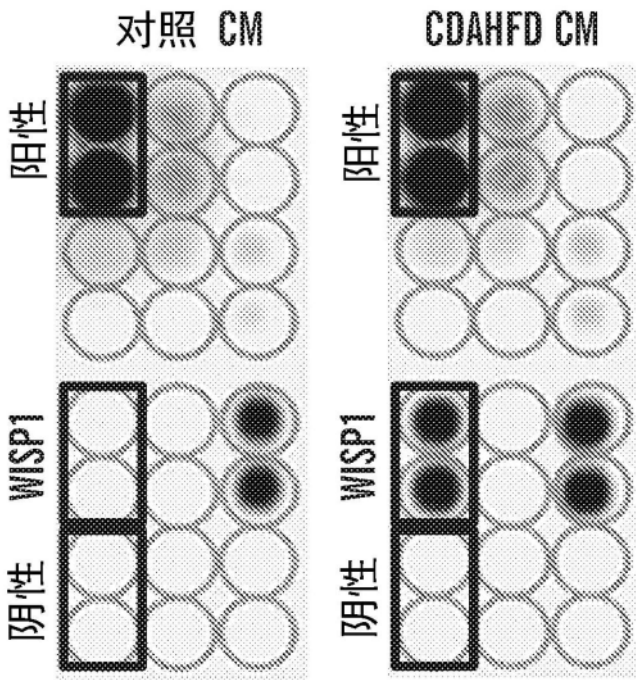


图22

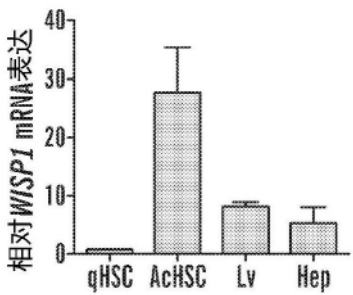


图23

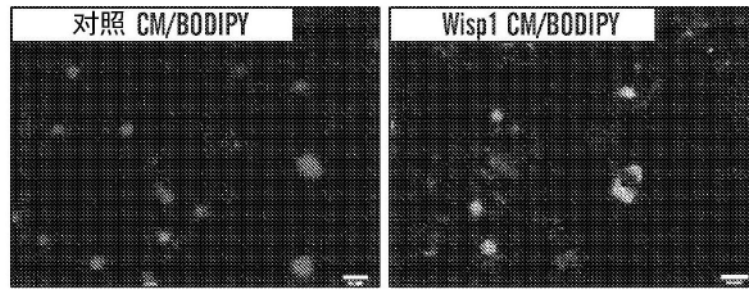


图24

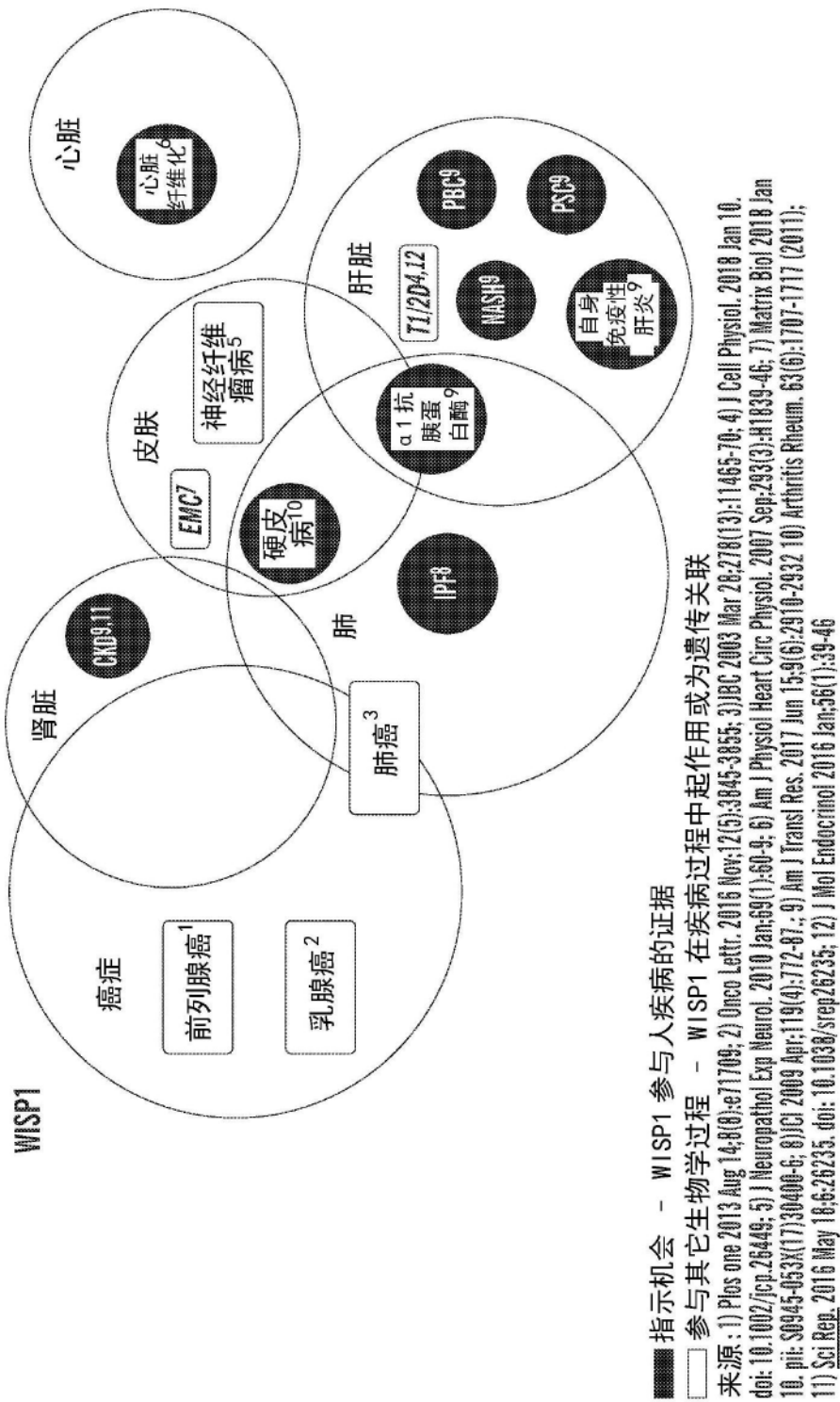


图25

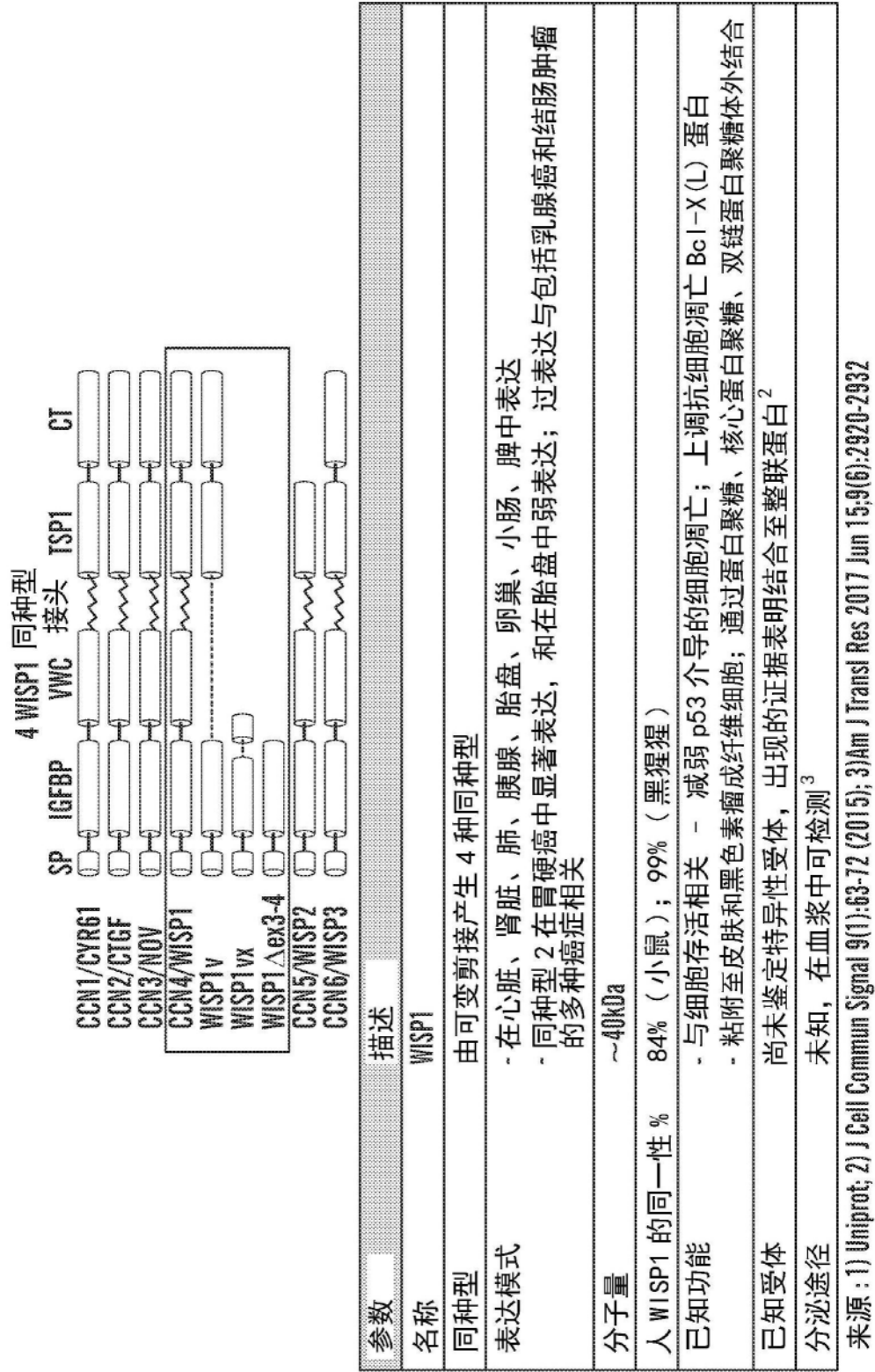
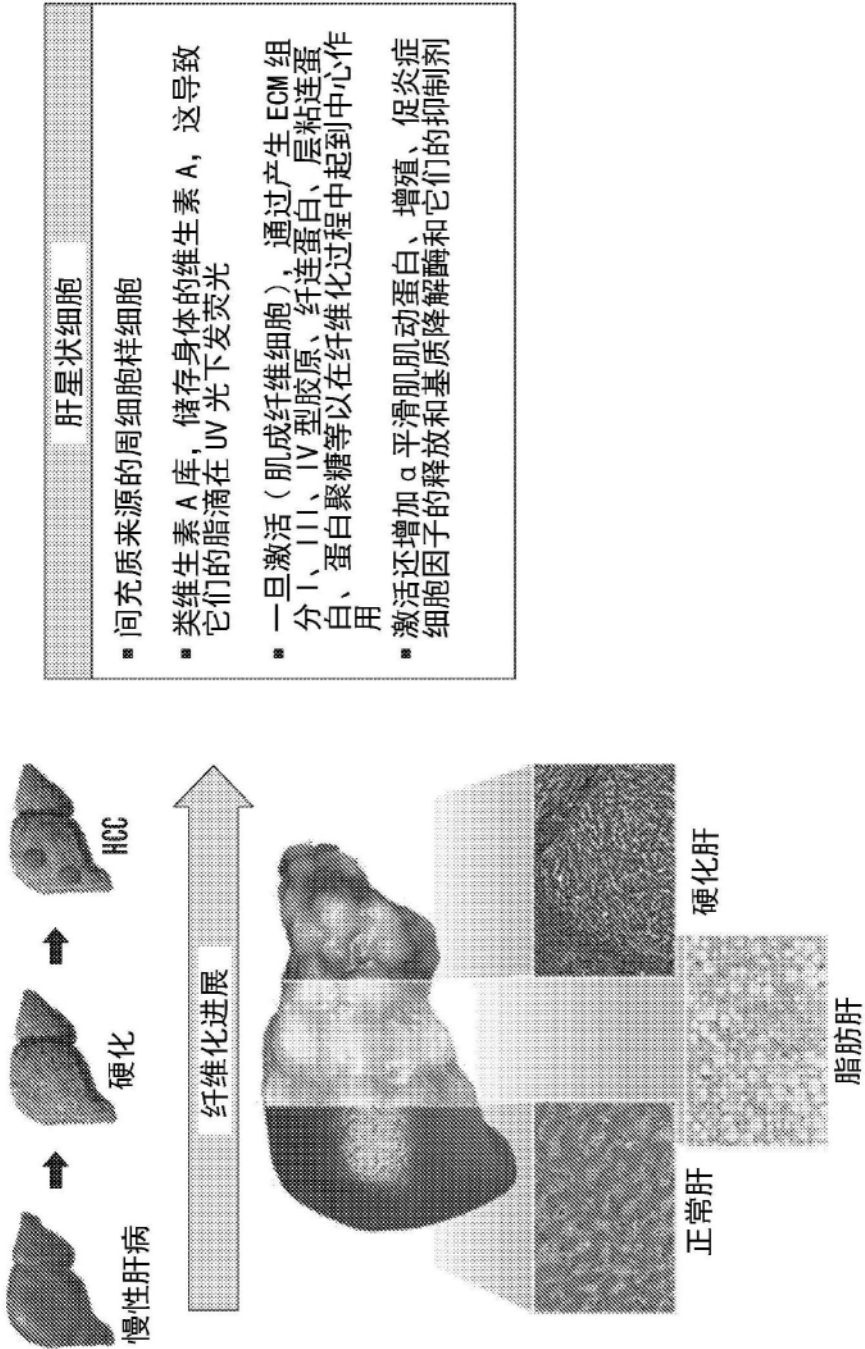


图26



Takahashi, 2013; Bhatia, 2014

图27

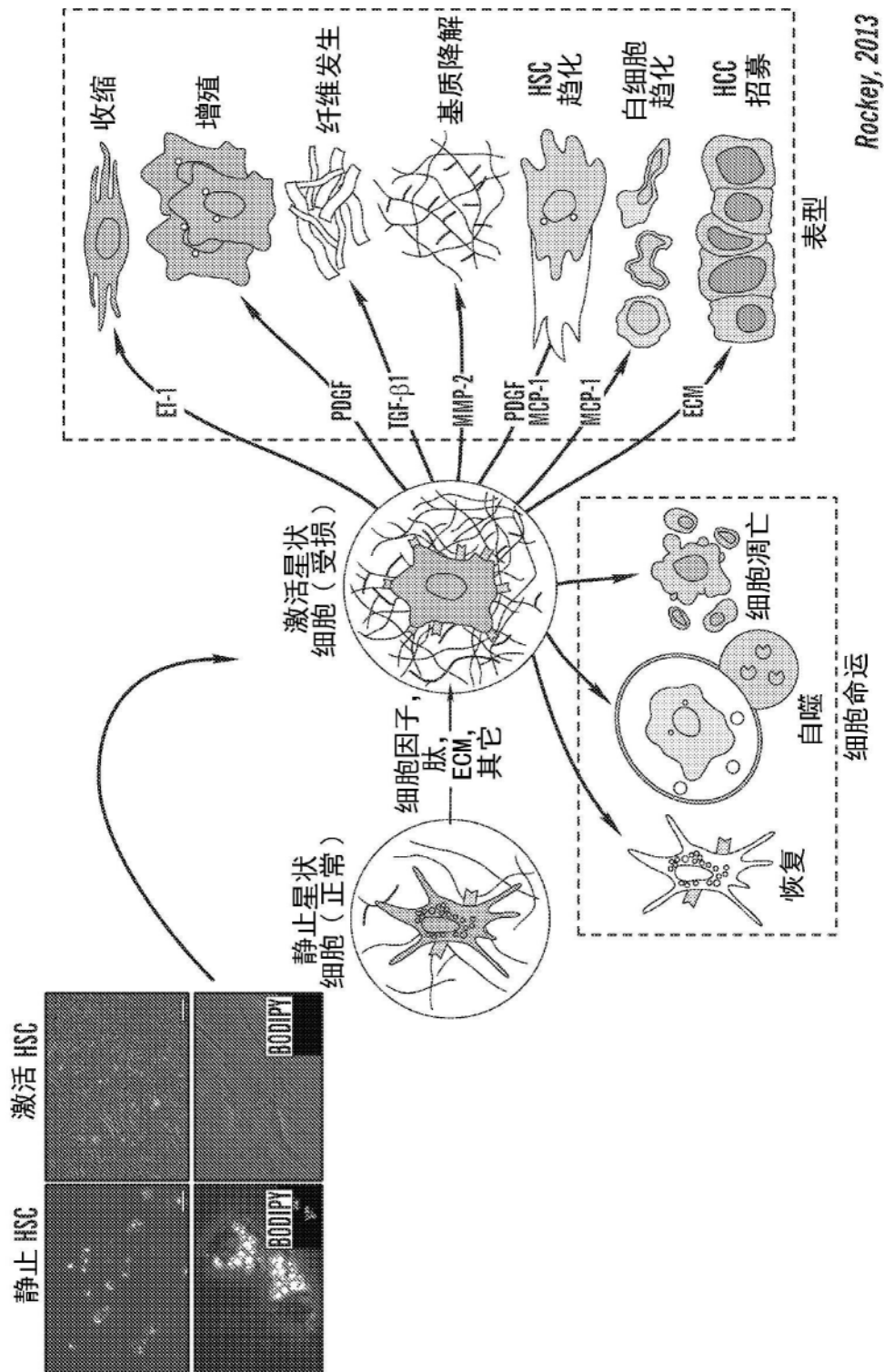


图28

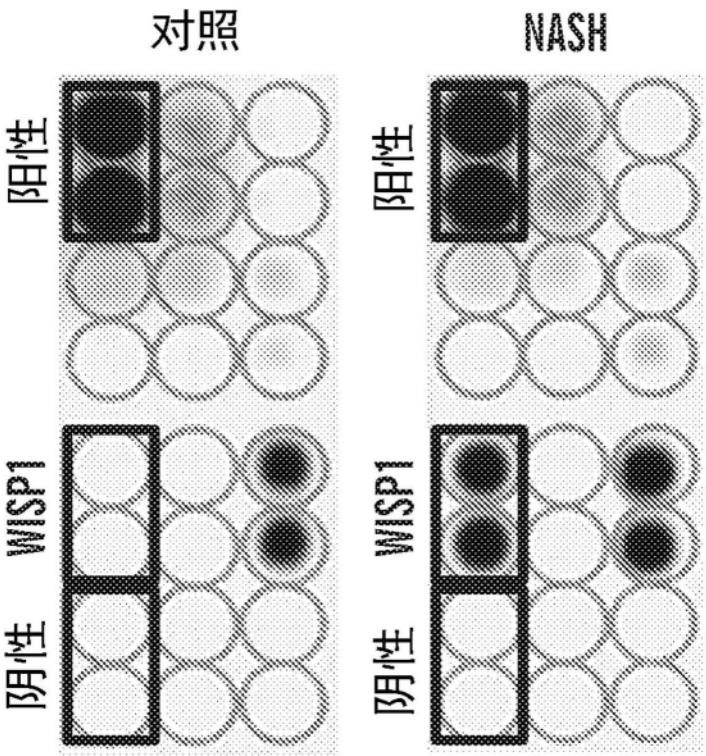


图29A

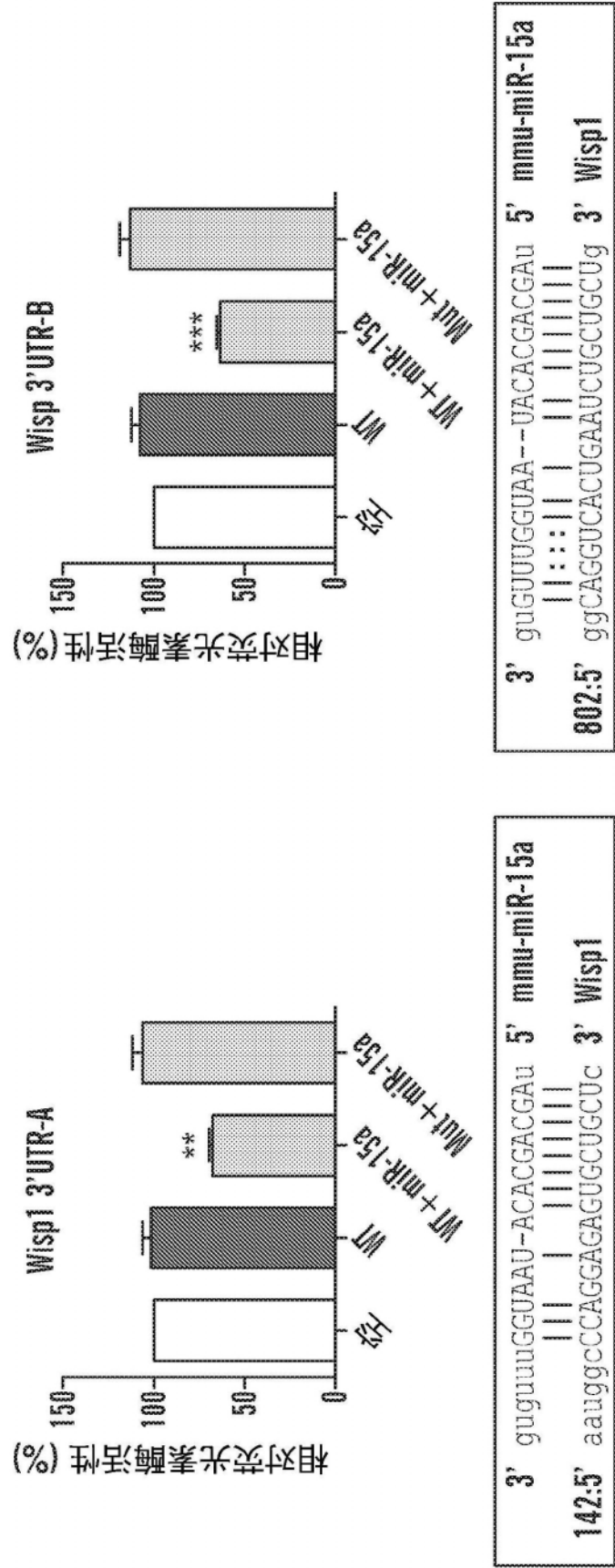


图29B

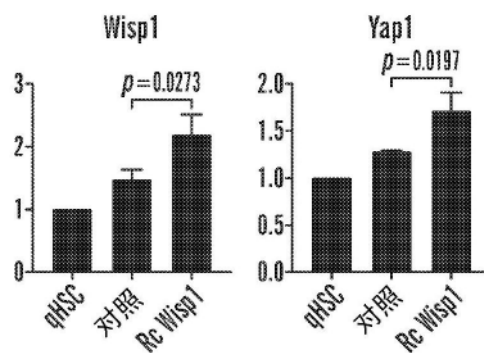


图30A

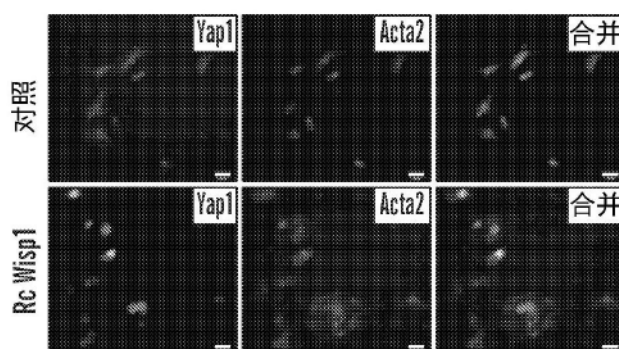


图30B

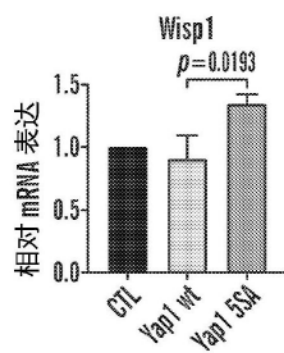


图30C

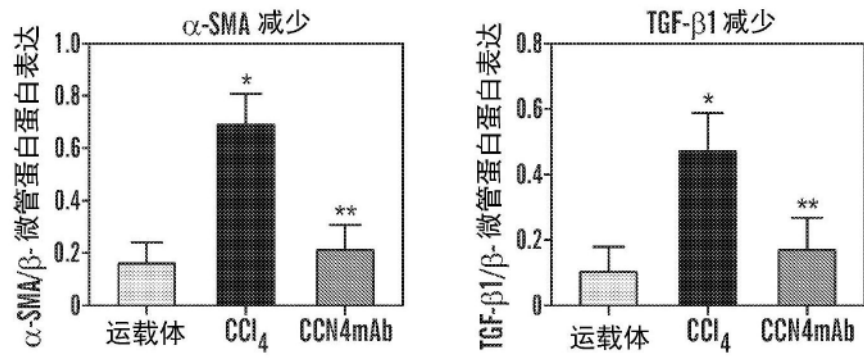


图31A

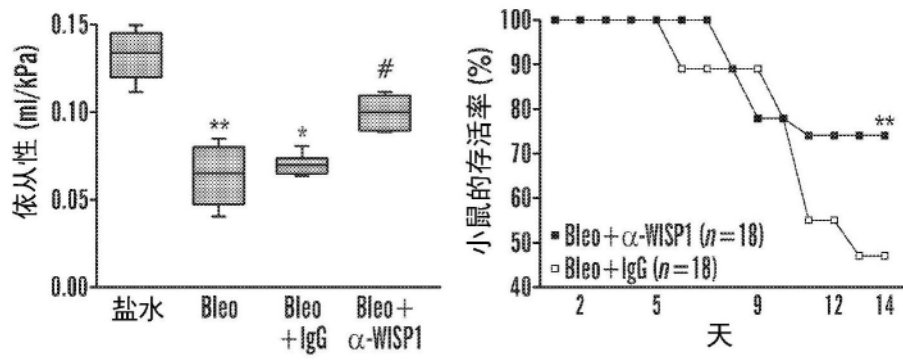


图31B

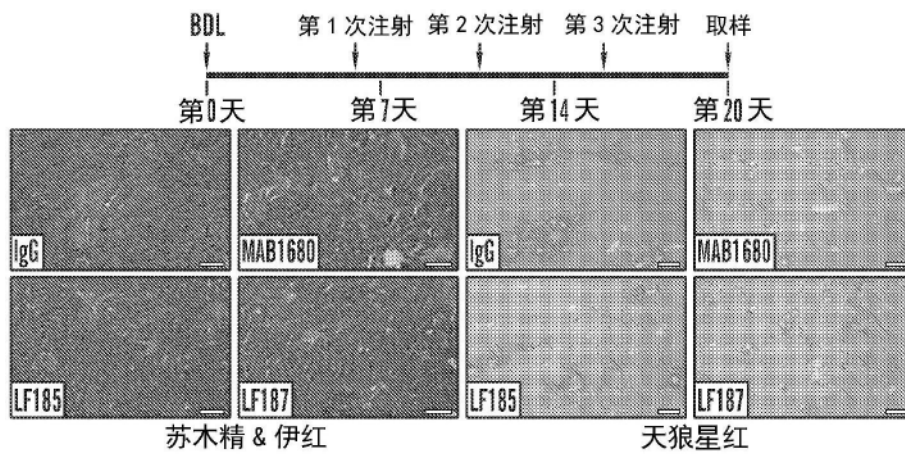


图32A

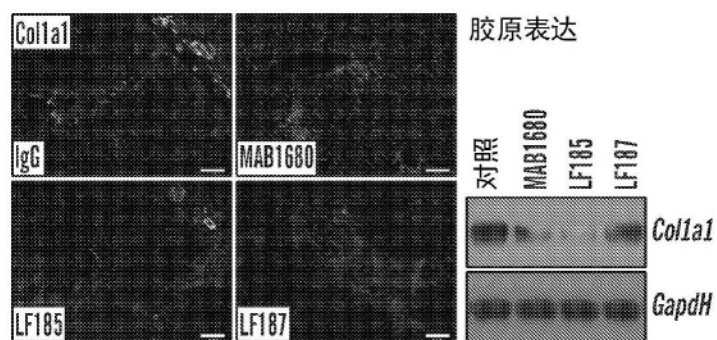


图32B

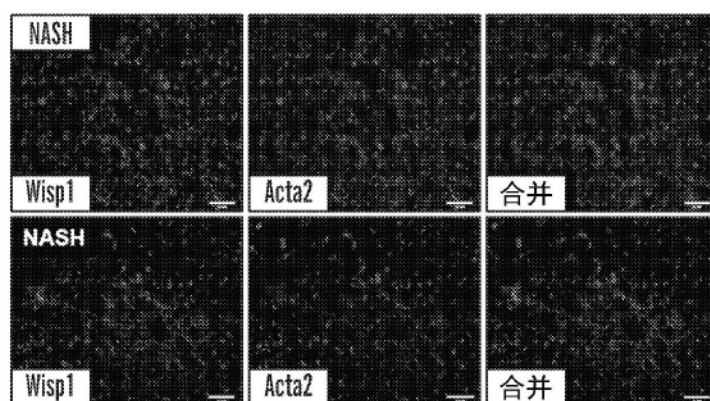


图33A

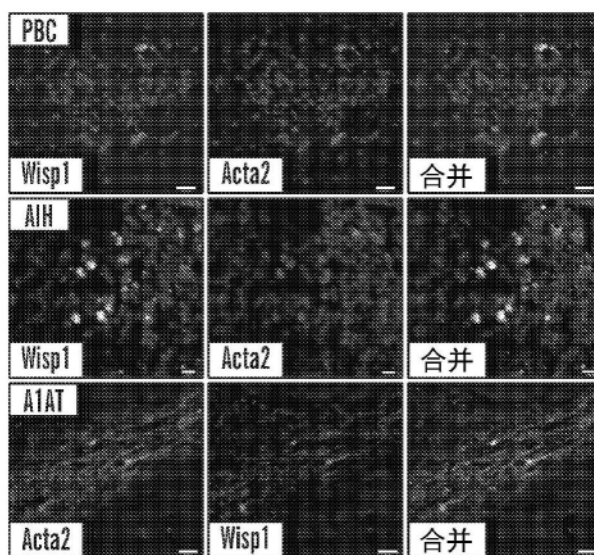


图33B

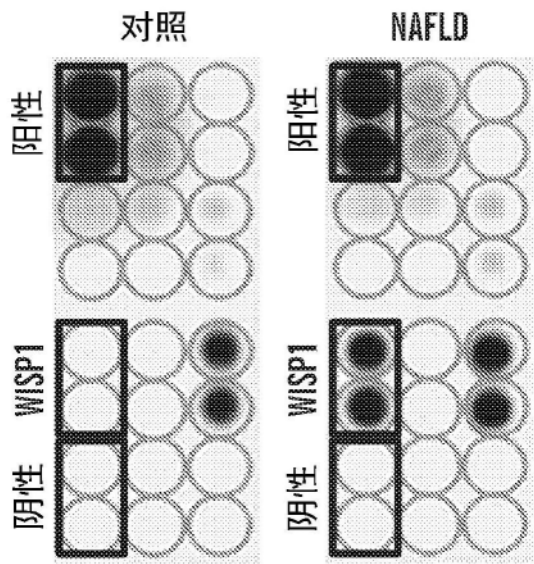


图34A

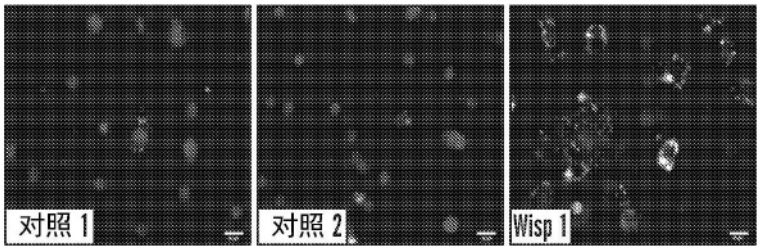


图34B

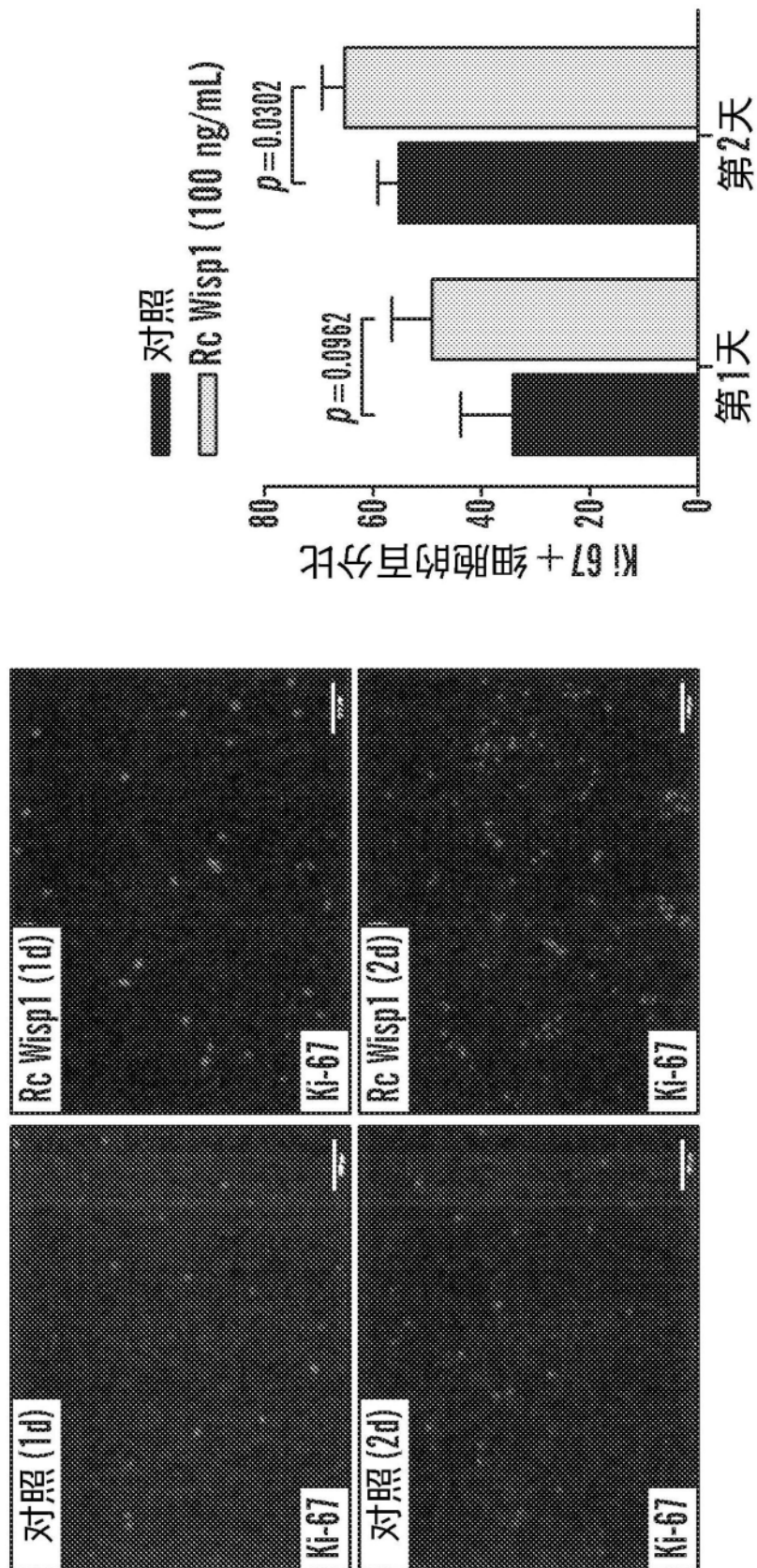


图35

mmu-15a	2	CCTTGGAGTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATGTTGAAAAGGTGCAGGCCATA	61
hsa-15a	1	CCTTGGAGTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATTTTGAAAAGGTGCAGGCCATA	60
mmu-15a	62	TGTGCTGCTCAAAAATACAAGG	83
hsa-15a	61	TGTGCTGCTCAAAAATACAAGG	83
mmu-412	1	GGGTAATGGGATGGATGGTGCACCCAGCTGGAAAGTAATGTTTCTAATGTACTTCACCTG	59
hsa-412	4	GGGTAATGGGATGGATGGTGCACCCAGCTGGAAAGTAATGTTTCTAATGTACTTCACCTG	63
mmu-412	60	GTCCACTAGCCGTC	73
hsa-412	64	GTCCACTAGCCGTC	77

图36

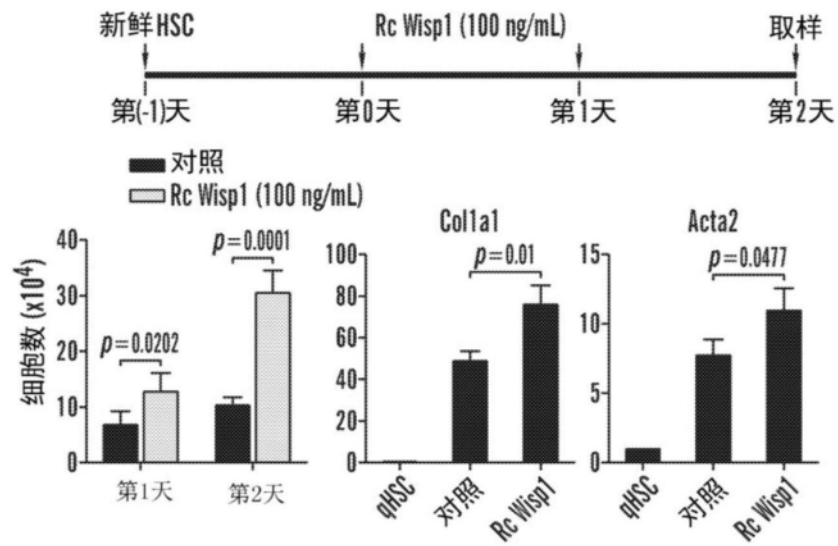


图37A

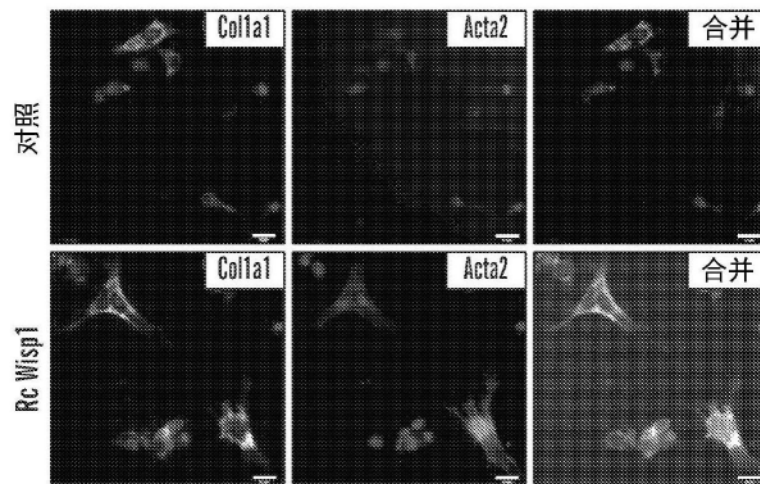


图37B

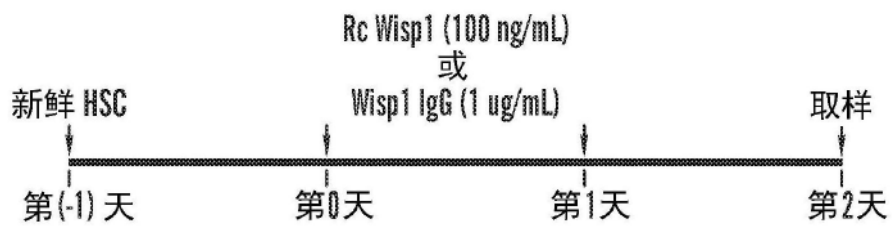


图38A

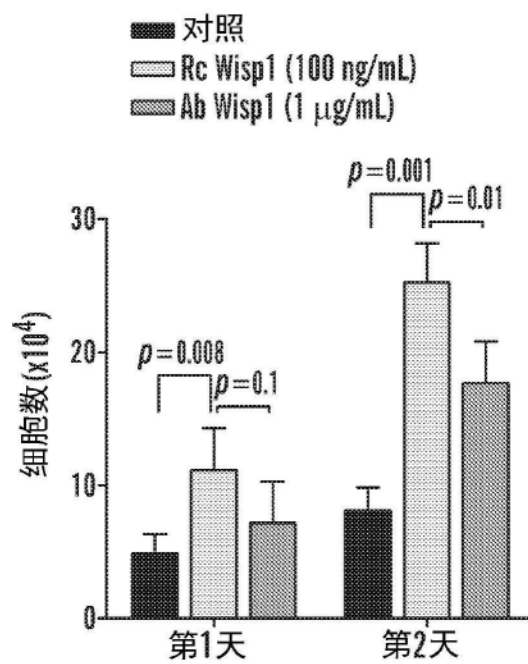


图38B

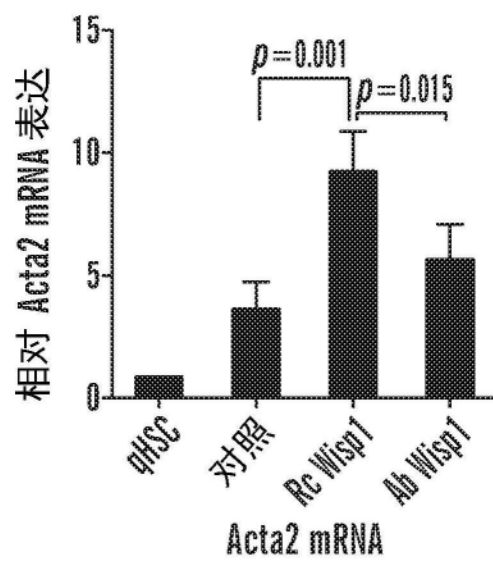


图38C

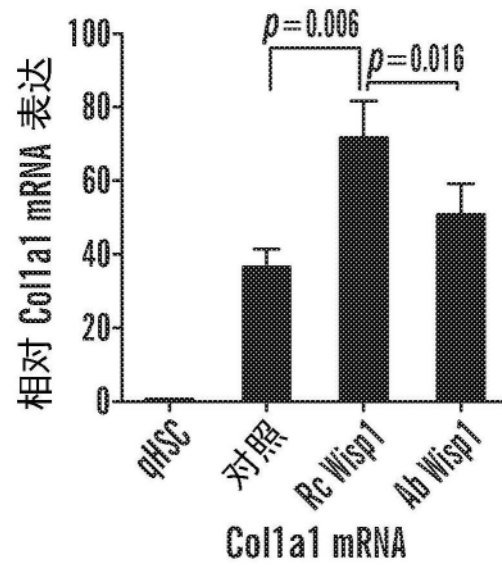


图38D

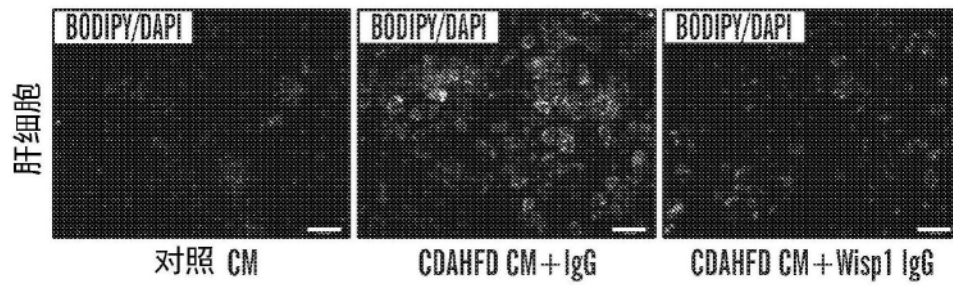


图38E

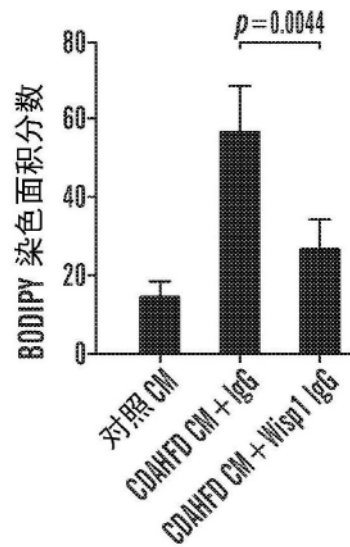


图38F

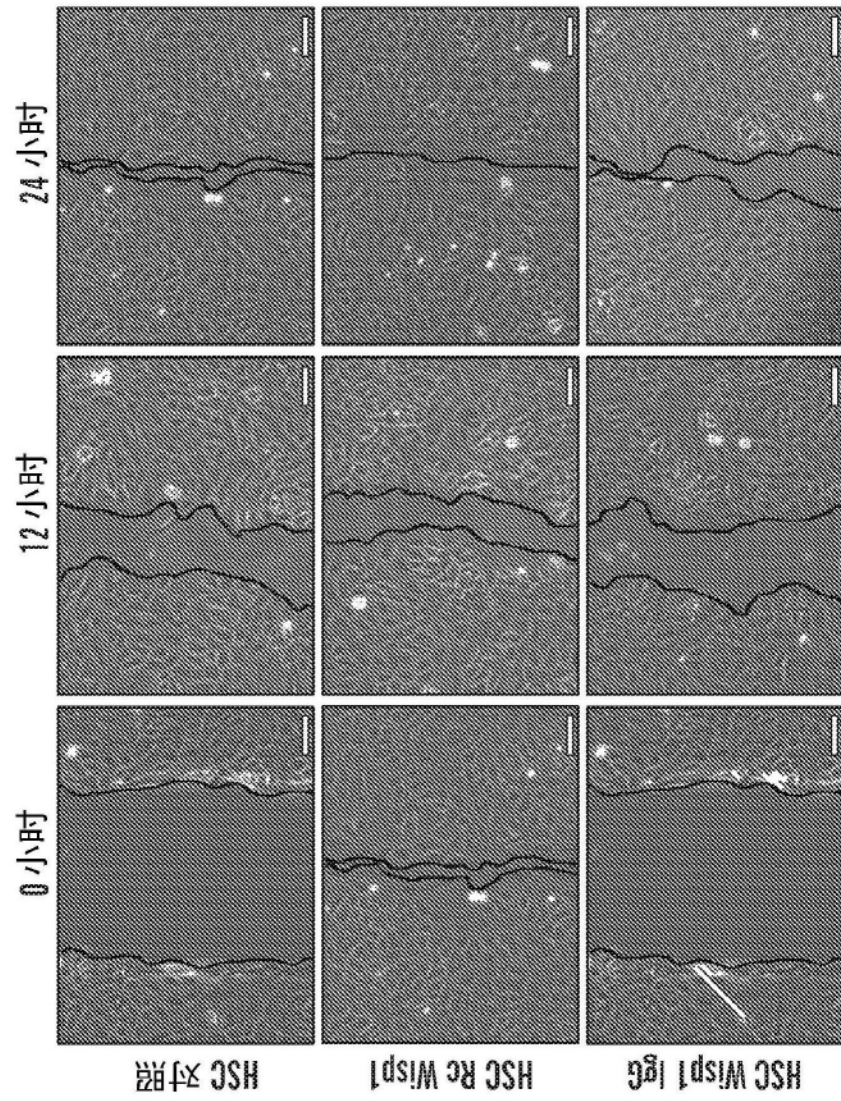


图39A

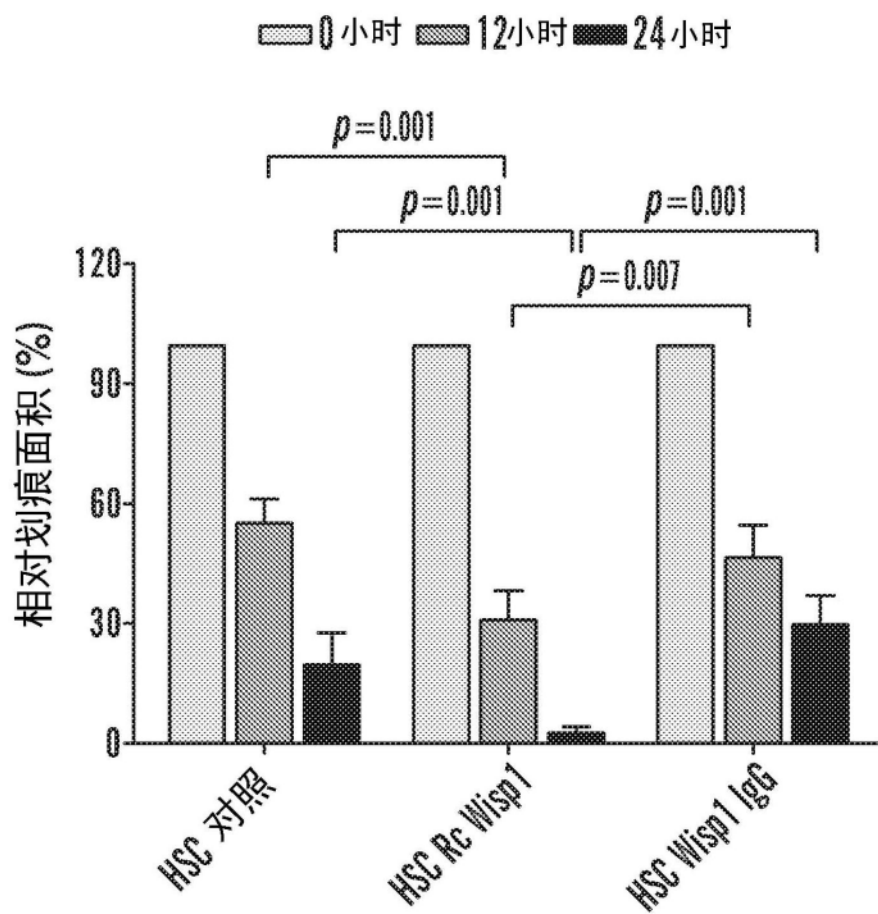


图39B