



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113316588 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 28

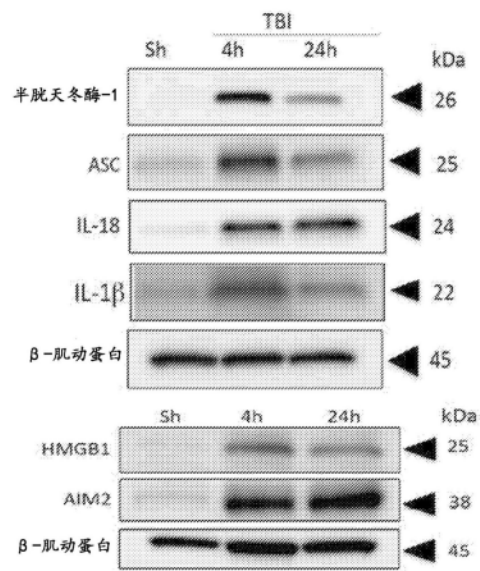
(21) 申请号 201980056542.1	(72) 发明人 R·W·基恩 W·D·迪特里希 J·P·德里韦罗·瓦卡里 H·M·布拉姆利特 R·布兰比拉
(22) 申请日 2019.07.03	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 113316588 A	(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494 专利代理师 封新琴
(43) 申请公布日 2021.08.27	
(30) 优先权数据 16/026,482 2018.07.03 US	(51) Int.Cl. C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/14 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.02.26	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2019/040635 2019.07.03	(56) 对比文件 KR 20180065772 A, 2018.06.18 US 2010150938 A1, 2010.06.17
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/010273 EN 2020.01.09	审查员 王慧
(73) 专利权人 迈阿密大学 地址 美国佛罗里达州	权利要求书4页 说明书78页 序列表13页 附图46页

(54) 发明名称

用于治疗炎性小体相关疾病或病症的组合物和方法

(57) 摘要

本文所述的组合物和方法包括抑制哺乳动物中炎性小体信号传导的药剂,如单独或与一种或多种胞外囊泡摄取抑制剂组合使用的针对炎性小体组分的抗体。本文还描述了用于治疗炎性小体相关疾病或病症的组合物及其使用方法。



1. 一种与含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,

其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 6的HCDR1、SEQ ID NO: 7的HCDR2和SEQ ID NO: 8的HCDR3;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 12的LCDR1、SEQ ID NO: 13的LCDR2和SEQ ID NO: 14的LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 18、19、20、21、22。

3. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 18、19、20、21、22;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 28、29、30、31。

4. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 18;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 28。

5. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 18;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 29。

6. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 18;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 30。

7. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 18;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 31。

8. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 19;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 28。

9. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 19;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 29。

10. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 19;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 30。

11. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 19;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 31。

12. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 20;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 28。

13. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 20;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 29。

14. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 20;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 30。

15. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 20;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 31。

16. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 21;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 28。

17. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 21;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 29。

18. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 21;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 30。

19. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 21;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 31。

20. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 22;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 28。

21. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 22;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 29。

22. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 22;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 30。

23. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 22;并且

其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 31。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白是人含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白。

25. 根据权利要求1-23中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体片段是Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、或双抗体。

26. 根据权利要求1-23中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述单克隆抗

体或其抗体片段是人的、人源化的或嵌合的。

27. 一种分离的核酸分子,其编码根据权利要求1-23中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段。

28. 一种包含根据权利要求27所述的核酸分子的表达载体。

29. 根据权利要求28所述的表达载体,其中所述核酸分子与适合于在宿主细胞中表达核酸区段的调节序列可操作地连接。

30. 一种包含根据权利要求28所述的表达载体的重组宿主细胞。

31. 一种产生与含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白特异性结合的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括:

在表达所述核酸分子的条件培养包含根据权利要求28所述的表达载体的重组宿主细胞,从而产生与含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白特异性结合的所述单克隆抗体或其抗体片段。

32. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-23中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

33. 根据权利要求1-23中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段在制备用于治疗受试者中创伤性脑损伤或急性肺损伤的药物中的用途。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。

35. 根据权利要求33所述的用途,其中所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。

36. 根据权利要求33所述的用途,其中与对照相比,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白活性降低。

37. 根据权利要求36所述的用途,其中所述对照是未治疗的受试者。

38. 根据权利要求33所述的用途,其中所述药物是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入施用的。

39. 根据权利要求1-23中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段在制备用于治疗受试者中实验性自身免疫脑脊髓炎的藥物中的用途。

40. 根据权利要求39所述的用途,其中施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。

41. 根据权利要求39所述的用途,其中所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。

42. 根据权利要求39所述的用途,其中与对照相比,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白活性降低。

43. 根据权利要求42所述的用途,其中所述对照是未治疗的受试者。

44. 根据权利要求39所述的用途,其中所述药物是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入施用的。

45. 一种与含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白结合的根据权利要求1-26中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段与含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白的表位特异性地结合,其中所述表位包

含SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 5的5-10、10-15或15-20个氨基酸的氨基酸序列或者由其组成。

用于治疗炎性小体相关疾病或病症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年7月3日提交的美国申请序列号16/026,482的优先权,出于所有目的将其通过引用以其整体并入本文。

[0003] 关于联邦赞助研究的声明

[0004] 本发明是以由国家神经障碍和中风研究所(NINDS)授予的授权号4R42BS086274-02以及由国立卫生研究院授予的授权号5R42NS086274-03由美国政府支持进行的。美国政府对本发明拥有一定的权利。

[0005] 电子提交的文本文件的说明

[0006] 将与此一起以电子方式提交的文本文件的内容通过引用以其整体并入本文:序列表的计算机可读格式副本(文件名:UNMI_010_02W0_SeqList_ST25.txt,记录日期:2019年7月3日,文件大小:约19.5千字节)。

技术领域

[0007] 本发明总体上涉及免疫学和医学领域。更具体地,本发明涉及用于调节哺乳动物的中枢神经系统(CNS)和/或肺中ASC(含有半胱天冬酶激活招募结构域(CARD)的凋亡相关斑点样蛋白)活性和黑色素瘤缺乏因子2(AIM2)炎性小体活性的组合物和方法,作为用于减少响应于在CNS和/或肺中产生炎症的损伤或病症的炎症的治疗。本发明还涉及特异性结合ASC的单克隆抗体或其片段。

背景技术

[0008] 重型颅脑损伤(TBI)是一个重大的公共卫生问题,并且是全世界死亡和发病的主要原因(Summers,C.R.等人,(2009).Traumatic brain injury in the United States:an epidemiologic overview.Mt Sinai J Med 76,105-110)。除了对脑的直接损伤之外,TBI还可导致其他器官(如肺)中的并发症。急性肺损伤(ALI;2)是创伤后常见的心肺问题,并且与高达40%的住院死亡率相关(Rincon F.等人,(2012).Impact of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after traumatic brain injury in the United States.Neurosurgery 71,795-803)。TBI患者尤其易于发展ALI,其中一些研究报告发生率高达30%(Nicolls,M.R.等人,(2014).Traumatic brain injury:lungs in a RAGE.Sci Transl Med 6,252fs234)。最近的研究已显示,全身炎症因子可能导致TBI后肺功能障碍和肺损伤(Rincon F.等人,(2012).Impact of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after traumatic brain injury in the United States.Neurosurgery 71,795-803),但TBI诱导的肺损伤的潜在确切分子机制尚不明确。

[0009] 大量分泌的炎症介质(包括细胞因子、趋化因子和由损伤细胞释放的损伤相关分子模式(DAMP))促成脑炎症并影响远端器官如肺(Nicolls,M.R.等人,(2014).Traumatic brain injury:lungs in a RAGE.Sci Transl Med 6,252fs234)。最广泛研究的DAMP中的一种是高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1,HMGB1),其可作为在多种致病状

态(包括TBI)中的早期炎症介质(Andersson U.等人,(2011).Introduction:HMGB1 in inflammation and innate immunity.J Intern Med 270,296-300)。最近的一项研究已显示, HMGB1可能参与TBI诱导的肺功能障碍的机制(Weber等人,(2014).The HMGB1-RAGE axis mediates traumatic brain injury-induced pulmonary dysfunction in lung transplantation.Sci Transl Med 6,252ra124)。HMGB1释放可以由炎性小体调节,所述炎性小体是参与TBI后半胱天冬酶-1的激活以及IL-1 β 和IL-18的加工的多蛋白复合物(Lu等人(2012).Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release.Nature 488,670-674)。

[0010] 已提出了各种解释来解释TBI后肺部并发症(包括血管通透性增加进而导致毛细血管渗漏和蛋白质碎片的渗透)的病理机制(Ware等人,(2000).The Acute Respiratory Distress Syndrome.New England Journal of Medicine 342,1334-1349)。胞外囊泡(EV)是包含膜的囊泡,其在细胞间通讯方面发挥作用(Yanez-Mo,M.等人,(2015).Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.J Extracell Vesicles 4,27066)并被认为在LPS诱导的鼠ALI模型中发展ALI的方面发挥作用。此外,已经显示EV可以携带生物活性细胞因子(如IL-1 β 和炎性小体蛋白)(Qu,Y.等人,(2007).Nonclassical IL-1 β secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages.J Immunol 179,1913-1925)(de Rivero Vaccari,J.P.等人,(2015).Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury.J Neurochem),并可能触发免疫应答并经由其向邻近和周围细胞的转运而扩大炎症。然而,尚不清楚EV介导的炎性小体信号传导是否可促成TBI诱导的ALI的病理机制。此外,还不清楚TBI诱导的ALI的病理机制是否是产生肺炎症的其他病症共有的。此外,缺少用于治疗肺炎症的联邦药品管理局(FDA)批准的药物。

[0011] 因此,迫切需要不仅阐明由TBI以及其他病症引起的肺炎症的病理机制,而且还需要开发治疗组合物及其用于治疗 and/或预防肺炎症的用途。

发明内容

[0012] 一方面,本文提供了一种与含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段与ASC的表位特异性地结合,其中所述表位包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:5的5-10、10-15或15-20个氨基酸的氨基酸序列或者由其组成。

[0013] 另一方面,本文提供了一种与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,或在HCDR1、HCDR2和/或HCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18、19、20、21、22或与SEQ ID NO:18、19、20、21或22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述ASC是人ASC蛋白。在一些情况下,所述抗体片段是Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、单结构域抗体、双抗体或单链骆驼抗体或鲨鱼抗体。在一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段是人的、人源化的或嵌合的。在一

些情况下,本文提供了一种编码所述单克隆抗体或其抗体片段的分离的核酸分子。在一些情况下,本文提供了一种包含所述核酸分子的表达载体。在一些情况下,本文提供了核酸分子,其与适合于在宿主细胞中表达核酸区段的调节序列可操作地连接。在一些情况下,本文提供了一种包含所述表达载体的重组宿主细胞。另一方面,本文提供了一种产生与ASC特异性结合的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括:在表达所述核酸分子条件下培养包含所述表达载体的重组宿主细胞,从而产生与ASC特异性结合的所述单克隆抗体或其抗体片段。在一些情况下,本文提供了一种药物组合物,其包含所述单克隆抗体或其抗体片段以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一些情况下,本文提供了一种治疗受试者中炎症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的所述单克隆抗体或其抗体片段,从而治疗所述受试者中的炎症。在一些情况下,所述施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。在一些情况下,所述炎症是炎性小体相关炎症。在一些情况下,所述炎性小体相关炎症与中枢神经系统(CNS)损伤、自身免疫疾病、自身炎性疾病或神经变性疾病相关。在一些情况下,所述CNS损伤选自创伤性脑损伤(TBI)、中风和脊髓损伤(SCI)。在一些情况下,所述自身免疫疾病或神经变性疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病、肌营养不良(MD)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、炎性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)或多发性硬化症(MS)。在一些情况下,所述炎性小体相关炎症与代谢疾病或障碍相关。在一些情况下,所述代谢疾病是代谢综合征、肥胖、糖尿病、糖尿病肾病或糖尿病肾脏疾病(DKD)、胰岛素抗性、动脉粥样硬化、脂质沉积性障碍、糖原贮积病、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝病(例如,非酒精性脂肪性肝炎(NASH))和痛风。在一些情况下,所述自身炎性疾病是冷吡林相关周期性综合征(cryopyrin-associated periodic syndrome,CAPS)。CAPS可以包括家族性寒冷型自身炎性综合征(FCAS)、穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells syndrome,MWS)和新生儿发病多系统炎性疾病(NOMID)。在一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。在一些情况下,与对照相比,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致ASC活性降低。在一些情况下,所述对照是未治疗的受试者。在一些情况下,所述施用是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入。在一些情况下,本文提供了一种治疗受试者中多发性硬化症(MS)的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的所述单克隆抗体或其抗体片段,从而治疗所述受试者中的MS。在一些情况下,所述施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。在一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。在一些情况下,与对照相比,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致ASC活性降低。在一些情况下,所述对照是未治疗的受试者。在一些情况下,所述施用是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入。

[0014] 在又一方面,本文提供了一种与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3,或在LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。在一些情况下,所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28、29、30、31或与SEQ ID NO:28、29、30或31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述ASC是人ASC蛋白。在一些情况下,所述抗体片段是Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、单结构域抗体、双抗体或单链骆驼抗体。在

一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段是人的、人源化的或嵌合的。在一些情况下,本文提供了一种编码所述单克隆抗体或其抗体片段的分离的核酸分子。在一些情况下,本文提供了一种包含所述核酸分子的表达载体。在一些情况下,本文提供了核酸分子,其与适合于在宿主细胞中表达核酸区段的调节序列可操作地连接。在一些情况下,本文提供了一种包含所述表达载体的重组宿主细胞。另一方面,本文提供了一种产生与ASC特异性结合的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括:在表达所述核酸分子的条件培养包含所述表达载体的重组宿主细胞,从而产生与ASC特异性结合的所述单克隆抗体或其抗体片段。在一些情况下,本文提供了一种药物组合物,其包含所述单克隆抗体或其抗体片段以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一些情况下,本文提供了一种治疗受试者中炎症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的所述单克隆抗体或其抗体片段,从而治疗所述受试者中的炎症。在一些情况下,所述施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。在一些情况下,所述炎症是炎性小体相关炎症。在一些情况下,所述炎性小体相关炎症与中枢神经系统(CNS)损伤、自身免疫疾病、自身炎症性疾病或神经变性疾病相关。在一些情况下,所述CNS损伤选自创伤性脑损伤(TBI)、中风和脊髓损伤(SCI)。在一些情况下,所述自身免疫疾病或神经变性疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病、肌营养不良(MD)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、炎性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)或多发性硬化症(MS)。在一些情况下,所述炎性小体相关炎症与代谢疾病或障碍相关。在一些情况下,所述代谢疾病是代谢综合征、肥胖、糖尿病、糖尿病肾病或糖尿病肾脏疾病(DKD)、胰岛素抗性、动脉粥样硬化、脂质沉积性障碍、糖原贮积病、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝病(例如,非酒精性脂肪性肝炎(NASH))和痛风。在一些情况下,所述自身炎症性疾病是冷吡林相关周期性综合征(cryopyrin-associated periodic syndrome,CAPS)。CAPS可以包括家族性寒冷型自身炎症综合征(FCAS)、穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells syndrome,MWS)和新生儿发病多系统炎症性疾病(NOMID)。在一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。在一些情况下,与对照相比,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致ASC活性降低。在一些情况下,所述对照是未治疗的受试者。在一些情况下,所述施用是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入。在一些情况下,本文提供了一种治疗受试者中多发性硬化症(MS)的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的所述单克隆抗体或其抗体片段,从而治疗所述受试者中的MS。在一些情况下,所述施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。在一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。在一些情况下,与对照相比,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致ASC活性降低。在一些情况下,所述对照是未治疗的受试者。在一些情况下,所述施用是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入。

[0015] 在又一个方面,本文提供了一种与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,或在HCDR1、HCDR2和/或HCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3,或在LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。在一些情况下,所述VH区氨基酸序

[illegible]

氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述ASC是人ASC蛋白。在一些情况下,所述抗体片段是Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、单结构域抗体、双抗体或单链骆驼抗体。在一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段是人的、人源化的或嵌合的。在一些情况下,本文提供了一种编码所述单克隆抗体或其抗体片段的分离的核酸分子。在一些情况下,本文提供了一种包含所述核酸分子的表达载体。在一些情况下,本文提供了核酸分子,其与适合于在宿主细胞中表达核酸区段的调节序列可操作地连接。在一些情况下,本文提供了一种包含所述表达载体的重组宿主细胞。另一方面,本文提供了一种产生与ASC特异性结合的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括:在表达所述核酸分子条件下培养包含所述表达载体的重组宿主细胞,从而产生与ASC特异性结合的所述单克隆抗体或其抗体片段。在一些情况下,本文提供了一种药物组合物,其包含所述单克隆抗体或其抗体片段以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一些情况下,本文提供了一种治疗受试者中炎症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的所述单克隆抗体或其抗体片段,从而治疗所述受试者中的炎症。在一些情况下,所述施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细

胞因子的水平。在一些情况下,所述炎症是炎性小体相关炎症。在一些情况下,所述炎性小体相关炎症与中枢神经系统 (CNS) 损伤、自身免疫疾病、自身炎症疾病或神经变性疾病相关。在一些情况下,所述CNS损伤选自创伤性脑损伤 (TBI)、中风和脊髓损伤 (SCI)。在一些情况下,所述自身免疫疾病或神经变性疾病是肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病、肌营养不良 (MD)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、炎性肠病 (例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎) 或多发性硬化症 (MS)。在一些情况下,所述炎性小体相关炎症与代谢疾病或障碍相关。在一些情况下,所述代谢疾病是代谢综合征、肥胖、糖尿病、糖尿病肾病或糖尿病肾脏疾病 (DKD)、胰岛素抗性、动脉粥样硬化、脂质沉积性障碍、糖原贮积病、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝病 (例如,非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)) 和痛风。在一些情况下,所述自身炎症疾病是冷吡林相关周期性综合征 (cryopyrin-associated periodic syndrome, CAPS)。CAPS可以包括家族性寒冷型自身炎症综合征 (FCAS)、穆-韦二氏综合征 (Muckle-Wells syndrome, MWS) 和新生儿发病多系统炎症性疾病 (NOMID)。在一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。在一些情况下,与对照相比,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致ASC活性降低。在一些情况下,所述对照是未治疗的受试者。在一些情况下,所述施用是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入。在一些情况下,本文提供了一种治疗受试者中多发性硬化症 (MS) 的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的所述单克隆抗体或其抗体片段,从而治疗所述受试者中的MS。在一些情况下,所述施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。在一些情况下,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。在一些情况下,与对照相比,所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致ASC活性降低。在一些情况下,所述对照是未治疗的受试者。在一些情况下,所述施用是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入。

附图说明

[0016] 图1A-图1N示出了TBI后C57/BL6小鼠皮质和肺组织中的炎性小体激活。图1A显示了TBI后活性半胱天冬酶-1、ASC、IL-18、IL- β 、HMGB1和AIM2的代表性免疫印迹。在TBI后4h和24h时,活性半胱天冬酶-1 (图1B)、ASC (图1C)、IL-18 (图1D)、HMGB1 (图1E)、AIM 2 (图1F) 和IL- β (图1G) 在皮质组织中显著升高。数据表示为平均值 \pm SEM;与假手术相比,**** $p < 0.001$ 、*** $p < 0.01$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。N=4-5/组。图1H显示了肺组织中活性半胱天冬酶-1、ASC、IL-18、IL- β 、HMGB1和AIM2的代表性免疫印迹。I、J、K、L、M、N) 在TBI后4h和24h时,活性半胱天冬酶-1 (图1I)、ASC (图1J)、IL-18 (图1K)、HMGB1 (图1L)、AIM 2 (图1M) 和IL- β (图1N) 在肺组织中显著升高。数据表示为平均值 \pm SEM。N=4-5/组,与假手术相比,**** $p < 0.001$ 、*** $p < 0.01$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

[0017] 图2A-图2C示出了炎性小体蛋白在II型肺泡上皮细胞中的表达。图2A显示了AIM2,图2B显示了活性半胱天冬酶-1并且图2C显示了ASC免疫反应性在CCI后 (4h、24h) 在肺组织中与小鼠相比的增加。AIM2、半胱天冬酶-1和ASC (绿色) 以及II型上皮细胞 (表面活性蛋白C, 红色) 的共聚焦图像。

[0018] 图3A-图3E示出了TBI增加小鼠肺中的细胞核和细胞质HMGB1表达。图3A显示了TBI后细胞核HMGB1的代表性免疫印迹。图3B显示了与假手术相比,细胞核HMGB1在4小时受损动

物中显著升高。图3C显示了TBI后细胞质HMGB1的代表性免疫印迹。图3D显示了与假手术相比,细胞质HMGB1在4小时受损动物中显著升高。数据表示为平均值 \pm SEM;与假手术相比,* $p<0.05$ 。N=4-5/组。图3E显示了当与假手术小鼠相比时,CCI后肺组织中HMGB1免疫反应性增加。HMGB1和II型上皮细胞(表面活性蛋白C,红色)的共聚焦图像。

[0019] 图4A-图4C示出了TBI后4小时小鼠肺中焦亡小体的形成。图4A显示了TBI诱导肺组织中的ASC阶梯,表明形成了焦亡小体(导致半胱天冬酶-1激活和细胞焦亡的ASC二聚体的寡聚)。图4B显示了有代表性免疫印迹并且图4C显示了消皮素的定量。在TBI后,消皮素-D在肺组织中显著升高。数据表示为平均值 \pm SEM。N=4-5/组,与假手术相比,** $p<0.01$ 。

[0020] 图5A-图5B示出了TBI诱导小鼠的肺泡形态学变化和急性肺损伤。图5A显示了在4h和24h时来自假手术和受损动物的肺切片的H&E染色。切片示出了中性粒细胞浸润(箭头)、肺泡毛细血管膜形态学变化(星号,*)、间质性水肿(短箭头)的证据以及间质和肺泡间隔增厚(镑,#)的证据。图5B显示了在4h和24h时,当与假手术相比时,受损动物的急性肺损伤得分显著增加。数据表示为平均值 \pm SEM。N=4-5/组,与假手术相比,* $p<0.05$ 。

[0021] 图6示出了来自对照和TBI损伤小鼠的血清来源的EV中CD81的表达。来自假手术对照和TBI损伤小鼠的血清来源的EV中CD81的代表性免疫印迹。

[0022] 图7A-图7G示出了来自TBI动物的EV的过继转移在未受损小鼠的肺中诱导半胱天冬酶-1和ASC。图7A示出了代表性免疫印迹,其示出当与来自假手术动物相比时,半胱天冬酶-1(图7B)、ASC(图7C)、IL-18(图7D)、AIM2(图7E)、HMGB1(图7F)在接受从TBI小鼠分离的EV的动物肺中升高。数据表示为平均值 \pm SEM;与假手术相比,* $p<0.05$ 。N=3/组。来自TBI小鼠的EV诱导肺泡形态学变化(肺泡大小减小)和炎症细胞的浸润,如通过H&E染色所确定(图7G)。与未受损小鼠相比,从受损小鼠递送的EV的ALI得分显著增加(图7G)。数据表示为平均值 \pm SEM;与未受损组相比,** $p<0.01$ 、* $p<0.05$ 。

[0023] 图8A-图8F示出了用依诺肝素(3mg/kg)和IC 100(5mg/kg)治疗减少了递送来自受损小鼠的EV的动物肺中的炎性小体表达。图8A示出了代表性免疫印迹,其显示出当与未治疗的阳性对照动物相比时,半胱天冬酶-1(图8B)、ASC(图8C)、IL-1 β (图8D)、AIM2(图8E)、HMGB1(图8F)在用依诺肝素和IC 100治疗的动物肺中减少。数据表示为平均值 \pm SEM;与假手术相比,**** $p<0.001$ 、*** $p<0.01$ 、** $p<0.01$ 、* $p<0.05$ 。N=4/组。

[0024] 图9A-图9E示出了用依诺肝素(3mg/kg)和IC 100(5mg/kg)治疗减少了递送来自受损小鼠的EV的动物肺中的ALI得分。图9A-图9D示出了来自以下的肺切片的H&E染色:盐水(图9A)、未治疗(图9B)、依诺肝素(图9C)和IC 100(抗ASC;图9D)治疗的递送来自受损动物的EV的小鼠肺。切片示出了中性粒细胞浸润、肺泡毛细血管膜形态学变化、间质性水肿的证据,以及间质和肺泡间隔增厚的证据。图9E示出了当与未治疗的动物相比时,用依诺肝素、IC 100治疗的动物的急性肺损伤得分显著降低。数据表示为平均值 \pm SEM。N=4/组,**** $p<0.01$ 、* $p<0.05$ 。

[0025] 图10A-图10F示出了递送来自TBI患者的血清来源的EV导致肺内皮细胞中的炎性小体蛋白表达增加。图10A显示了在与TBI-EV和对照EV孵育4小时后,PMVEC中半胱天冬酶-1、ASC、AIM2、HMGB1的蛋白质印迹表示。图10B-图10E显示了蛋白质印迹的量化,n=3个过滤器/组,n=6位患者,t检验,**** $p<0.001$ 、*** $p<0.01$ 、** $p<0.01$ 、* $p<0.05$ 。图10F显示了使用Ella简单plex测定(n=3个过滤器/组,n=6位患者,t检验,**** $p<0.001$ 、*** $p<0.01$ 、** $p<$

0.01、* $p < 0.05$) , IL-1 β 表达的显著增加的免疫测定结果。

[0026] 图11A-图11C示出了向肺内皮细胞递送TBI-EV增加了活性半胱天冬酶-1的免疫反应性和细胞死亡。图11A显示了半胱天冬酶-1FLICA和PI染色以及与TBI-EV孵育4小时的PMVEC的共定位。图11B显示了与对照EV孵育4小时的PMVEC中的半胱天冬酶-1FLICA和PI染色。图11C显示了与TBI和对照EV孵育4小时的PMVEC的荧光板读取器分析。 $n=6$, *** $p < 0.05$ 。

[0027] 图12A-图12E示出了用人源化抗ASC单克隆抗体(即, IC 100) 治疗改善EAE中的功能结局。图12A显示了在用媒介物或渐增剂量的IC 100治疗的C57BL/6小鼠中MOG₃₅₋₅₅诱导的EAE的临床过程。在小鼠显示出麻痹体征之前, 在第8天开始施用IC 100 (腹膜内10、30和45mg/Kg, 每4天一次)。结果以9-10只小鼠/组的每日平均临床得分 \pm SEM表示。30和45mg/Kg曲线与媒介物曲线显著不同; ** $p \leq 0.001$, 曼-惠特尼检验。图12B显示了各组间峰值临床得分(小鼠达到的最高疾病得分) 的比较; * $p \leq 0.05$, 学生t检验。图12C显示了各组间累积疾病指数(CDI) 的比较。CDI等于每只动物发病日起所有得分的总和并且是EAE严重程度的度量; * $p \leq 0.05$, 学生t检验。图12D显示了各组间发病日的比较。发病日被认为是小鼠显示出首次EAE症状的日子。图12E显示了各组间峰值疾病日的比较。峰值疾病日是小鼠达到最高疾病得分的日子。发病日被认为是小鼠显示出首次EAE症状的日子。

[0028] 图13A-图13B示出了IC 100治疗减少EAE后周围免疫细胞向脊髓或脾的浸润。在EAE后35dpi时对浸润脊髓中(图13A) 或存在于脾中(图13B) 的白细胞群进行流式细胞术定量。结果以5只小鼠/组的平均值 \pm SEM表示, * $p < 0.05$ 、** $p < 0.001$, 学生t检验。

[0029] 图14示出了IC 100治疗减少EAE后脊髓中的小胶质细胞。在EAE后35dpi时对脊髓中总小胶质细胞和MHCII⁺激活的小胶质细胞进行流式细胞术定量。结果以5只小鼠/组的平均值 \pm SEM表示, * $p < 0.05$, 学生t检验。

[0030] 图15示出了在组织中的IC 100浓度。在EAE后35dpi时对照小鼠以及用10、30和45mg/kg的IC 100治疗的小鼠中的脑、脊髓、肝和脾中IC 100的浓度(以pg/ml为单位)。数据显示为平均值 \pm SEM。 $N=2-10$ 只小鼠/组。

[0031] 图16示出了IC 100在未刺激的THP-1细胞中被吸收至ASC斑点中, 并且通过炎性小体激活增加了摄取。

[0032] 图17示出了IC 100阻止从THP-1细胞释放IL1- β 。

[0033] 图18显示了脊髓神经元的共聚焦图像, 其示出了抗ASC抗体(IC 100) 渗入脊髓神经元。

[0034] 图19示出了抗人ASC的三种不同抗体与不同种类的抗体结合的比较。

[0035] 图20示出了通过尼古丁(500nM) 在人髓核细胞中的炎性小体诱导, 并用三种不同的抗人ASC抗体(H1、H2、H3) 和两种抗小鼠ASC抗体(M1、M2) 处理。H1在阻止IL-1 β 释放/炎性小体激活方面最有效。

[0036] 图21示出了对于抗ASC单克隆抗体的原始BLI动力学分析数据。

[0037] 图22示出了三种不同的抗人ASC抗体的动力学的比较。

具体实施方式

[0038] 定义

[0039] 除非另外定义, 否则本文所用的所有技术术语均具有与本发明所属领域的普通技

术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0040] 本文使用的章节标题只是出于组织的目的,而不应解释为限制所描述的主题。在本文中引用的所有文件或文件的部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文)出于任何目的通过引用明确地以其整体特此并入。如果一个或多个并入的文件或文件的部分定义了与本申请中该术语的定义相矛盾的术语,则以本申请中出现的定义为准。然而,提及本文引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请并非且也不应被视为承认或任何形式的建议它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家公知常识的一部分。

[0041] 术语“一个”或“一种”是指一个(种)或多个(种)该实体,即可以指复数的指示物。因此,术语“一个”或“一种”、“一个(种)或多个(种)”和“至少一个(种)”在本文中可互换使用。此外,除非上下文文明确要求有一个(种)且仅有一个(种)元件,否则通过不定冠词“一个”或“一种”提及的“一个(种)元件”不排除存在多于一个(种)元件的可能性。

[0042] 除非上下文另有要求,否则在整个本说明书和权利要求中,词语“包含(comprise)”及其变体,如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”应以开放、包含性的意义解释,即“包括但不限于”。替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两者或它们的任何组合。如本文所用,除非另有说明,否则术语“约”和“基本上由……组成”意指所示范围、值或结构的 $\pm 20\%$ 。

[0043] 在整个本说明书中对“一个实施方案”或“一种实施方案”的提及意味着结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性可以包括在本公开文本的至少一种实施方案中。因此,在整个本说明书中各处出现的短语“在一个实施方案中”或“在一种实施方案中”可能不一定都指的是相同的实施方案。应了解,为明确起见在单独实施方案的上下文中描述的本公开文本的某些特征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,为简洁起见在单个实施方案的上下文中描述的本公开文本的各种特征还可以分开地或以任何合适的子组合提供。

[0044] 在整个本公开文本中,本文提供的方法和组合物的各个方面可以以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对本发明的范围的僵硬限制。因此,应当认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的各个数值。例如,对范围(如从1到6)的描述应该被认为已经特别公开了子范围(如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等)以及该范围内的单独数字,例如1、2、3、4、5和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0045] 如本文所用,“蛋白质”和“多肽”同义地用于意指任何肽连接的氨基酸链,而不管长度或翻译后修饰(例如糖基化或磷酸化)如何。

[0046] 如本文所用,术语“抗体”一般地且广义地指免疫球蛋白(Ig)分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分或片段,所述免疫球蛋白分子即含有特异性结合抗原(例如,ASC、NLRP1、AIM2等)(与其起免疫反应)的抗原结合位点的分子。本文提供的抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)、嵌合抗体、人源化抗体、针对能够以可溶性或结合形式标记的抗体的抗独特型(抗Id)抗体以及其活性片段、区域或衍生物。用于本文的用途的抗体可以是嵌合的、人源化的或人的。

[0047] “特异性结合”或“与……起免疫反应”意味着抗体与所需抗原的一个或多个抗原决定簇反应,而不与其他多肽反应。在某些实施方案中,当抗体在蛋白质和/或大分子的复

杂混合物中优先识别其靶抗原时,称抗体特异性地结合抗原。术语“抗体”广义地指免疫球蛋白(Ig)分子或保留了Ig分子的基本靶结合特征的其任何功能片段、突变体、变体或衍生物,所述免疫球蛋白分子通常包含四个多肽链即两个重(H)链和两个轻(L)链。此类突变体、变体或衍生抗体形式是本领域已知的。本发明的此类抗ASC和抗NLRP1抗体分别能够结合干扰半胱天冬酶-1激活的ASC和NLRP1部分。

[0048] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指其中将非人抗体的最小部分引入原本的人抗体中的抗体。

[0049] 如本文所用,术语“人抗体”是指一种这样的抗体,其中蛋白质的基本上每个部分在人体中基本上是非免疫原性的,其中仅很少的序列有改变或变化。

[0050] 在全长抗体中,每个重链包含重链可变区(本文缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。所述重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2和CH3。每个轻链包含轻链可变区(本文缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个结构域CL。所述VH区和VL区可以进一步细分为具有高变性的区域,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以属于任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)和类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。IgG、IgD和IgE抗体一般含有两个相同的重链和两个相同的轻链以及两个抗原结合结构域,每个抗原结合结构域由重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)构成。一般而言,IgA抗体由两个单体构成,每个单体由两个重链和两个轻链构成(如对于IgG、IgD和IgE抗体);以这种方式,所述IgA分子具有四个抗原结合结构域,每个抗原结合结构域同样由VH和VL构成。某些IgA抗体是单体的,因为它们由两个重链和两个轻链构成。分泌型IgM抗体一般由五个单体构成,每个单体由两个重链和两个轻链构成(如对于IgG和IgE抗体);以这种方式,所述IgM分子具有十个抗原结合结构域,每个抗原结合结构域同样由VH和VL构成。也存在细胞表面形式的IgM,并且它具有类似于IgG、IgD和IgE抗体的两个重链/两个轻链结构。

[0051] 如本文所用的术语“抗原结合片段”或“抗原结合部分”或“抗原结合位点”或“结合结构域”或“结合区”可以指蛋白质、多肽、寡肽或肽的结构域、区域、部分或位点或者抗体或源自抗体的保留了与抗原(例如,ASC蛋白)特异性结合的能力的结合结构域。示例性结合结构域包括单链抗体可变区(例如,结构域抗体、sFv、scFv、scFab)、包含抗体部分(例如,结构域抗体)的融合蛋白、受体胞外结构域和配体(例如,细胞因子、趋化因子)。在一个实施方案中,所述融合蛋白包含一个或多个CDR。在另一个实施方案中,所述融合蛋白包含CDR H3(VH CDR3)和/或CDR L3(VL CDR3)。出于本发明的目的,融合蛋白含有一种或多种抗体和另外的氨基酸序列,例如像附接至所述抗体或其抗体片段的N-或C-末端的来自另一区域的异源序列或同源序列。示例性异源序列包括但不限于“标签”(如FLAG标签或6His标签)或者增加所述抗体在血液中的半衰期的酶或多肽。标签是在本领域中熟知的。可包括氨基和/或羧基末端融合的所述另外的氨基酸序列的长度范围可从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。

[0052] 抗原结合位点通常可由重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)免疫球蛋白结构域形成,其中抗原结合界面由称为互补决定区(CDR)的六个表面多肽环形成。VH(HCDR1、HCDR2、HCDR3)和VL(LCDR1、LCDR2、LCDR3)中各有三个CDR,以及框架区(FR)。在某些实施方案中,所

述结合结构域包含抗原结合位点或由其组成(例如,包含可变重链序列和可变轻链序列或置于交替的框架区(FR)(例如,任选包含一个或多个氨基酸取代的人FR)中的来自抗体的三个轻链互补决定区(CDR)和三个重链CDR)。

[0053] 术语“CDR区”或“CDR”可意指由Kabat等人,1991(Kabat,E.A.等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版US Department of Health and Human Services,Public Service,NIH,Washington)和后来的版本定义的免疫球蛋白重链或轻链的高变区。抗体通常含有3个重链CDR和3个轻链CDR。

[0054] 已经显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。抗体和抗体片段实施方案也可以是双特异性、三特异性、双重特异性或多特异性形式;与两种或更多种不同的抗原特异性地结合。包含在术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的例子包括:(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段(Ward,E.S.等人,(1989)Nature 341,544-546);(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段(McCafferty等人,(1990)Nature,348,552-554);(iii)由单个抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段(Holt等人,(2003)Trends in Biotechnology 21,484-490);(iv)dAb片段(Ward,E.S.等人,Nature 341,544-546(1989),McCafferty等人,(1990)Nature,348,552-554,Holt等人,(2003)Trends in Biotechnology 21,484-490),其由VH或VL结构域组成;(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')₂片段,即包含两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域和VL结构域通过肽接头连接,所述肽接头允许这两个结构域缔合以形成抗原结合位点(Bird等人,(1988)Science,242,423-426,Huston等人,(1988)PNAS USA,85,5879-5883)。本发明还包括Fab'片段。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH是由单独的基因编码的,但它们可以通过合成接头使用重组方法接合,从而使它们成为单一蛋白质链,其中所述VL区和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv))。此类单链抗体也旨在包含在术语抗体的“抗原结合片段”内。在本发明的某些实施方案中,可将scFv分子并入融合蛋白中。在一些实施方案中,本发明包括单链骆驼抗体;(viii)双特异性单链Fv二聚体(PCT/US 92109965)和(ix)“双抗体”、通过基因融合构建的多价或多特异性片段(WO 94/13804;Holliger,P.(1993)等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 6444-6448)。双抗体是二价、双特异性抗体,其中VH和VL结构域表达在单一多肽链上,但使用太短的接头而不允许同一链上的两个结构域之间配对,从而迫使所述结构域与另一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,P.,等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.,等人(1994)Structure2:1121-1123)。此类抗体结合片段是本领域已知的(Kontermann和Dubel编辑,Antibody Engineering(2001)Springer-Verlag.纽约第790页)。在一些方面,本发明包括单结构域抗体。一般而言,当在本文中使用时,术语“抗体”包括“抗体片段”。抗体片段通常保留全长抗体的抗原结合特性。

[0055] Fv、scFv或双抗体分子可以通过并入连接VH和VL结构域的二硫桥来稳定(Reiter,Y.等人,Nature Biotech,14,1239-1245,1996)。还可制备包含与CH3结构域连接的scFv的微型抗体(Hu,S.等人,(1996)Cancer Res.,56,3055-3061)。结合片段的其他例子可以是Fab',其通过在重链CH1结构域的羧基末端处添加少量残基而不同于Fab片段,所述少量残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸;以及可以是Fab'-SH,其为其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基带有游离硫醇基团的Fab'片段。

[0056] 当在本文中使用时,“Fv”可指抗体的保留抗原识别和抗原结合位点两者的最小片段。当在本文中使用时,“Fab”可指抗体的包含轻链的恒定结构域和重链的CH1结构域的片段。术语“mAb”是指单克隆抗体。

[0057] “Fc区”或“Fc结构域”是指对应于或源自源抗体的一部分的多肽序列,所述源抗体的一部分负责与细胞上的抗体受体和补体的C1q组分结合。Fc代表“片段结晶”,即容易形成蛋白质晶体的抗体片段。最初通过蛋白水解消化来描述的不同的蛋白质片段可以定义免疫球蛋白蛋白质的总体一般结构。如文献中最初定义的,所述Fc片段由二硫化物连接的重链铰链区、CH2和CH3结构域组成。然而,所述术语最近被应用于由CH3、CH2以及至少一部分铰链组成的单链,所述至少一部分铰链使得足以与第二个这样的链形成二硫化物连接的二聚体。关于免疫球蛋白结构和功能的综述,参见Putnam, *The Plasma Proteins*, V卷 (Academic Press, Inc., 1987), 第49-140页;和Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169-217, 1994。如本文所用,术语Fc包括天然存在的序列的变体。在一个实施方案中,本文提供的抗体或由其衍生的抗体片段(例如,抗ASC单克隆抗体或其抗体片段)具有经修饰的Fc区或结构域。在一些情况下,所述经修饰的Fc区或结构域可以赋予所得抗体或由其衍生的抗体片段增加的热稳定性。增加的热稳定性可导致增加的血清半衰期。Fc区或结构域可以如US20160193295中所述进行修饰,将其内容通过引用并入本文。如US20160193295中所述,所述Fc区或结构域可以被修饰以在铰链区中具有一个或多个半胱氨酸残基的缺失以及一个或多个CH3界面氨基酸的含巯基的残基的取代。在另一个实施方案中,本文提供的抗体或由其衍生的抗体片段(例如,抗ASC单克隆抗体或其抗体片段)的Fc区或结构域可以如Wozniak-Knopp G, Stadlmann J, Rüker F (2012) Stabilisation of the Fc Fragment of Human IgG1 by Engineered Intradomain Disulfide Bonds. *PLoS ONE* 7 (1):e30083中所述通过将所述Fc区工程化以具有结构域内二硫键来稳定,将所述文献的内容通过引用并入本文。在又一个实施方案中,所述抗体具有如WO 99/58572中所述修饰的Fc区,将所述文献通过引用并入本文。在仍其他实施方案中,所述Fc区或结构域可以如US9574010中所述来修饰,将所述文献的内容通过引用并入本文。

[0058] 术语“含有半胱天冬酶激活招募结构域(CARD)的凋亡相关斑点样蛋白”和“ASC”意指ASC基因或其同种型的表达产物,或者与ASC(例如,人中的NP_037390(Q9ULZ3-1)、NP_660183(Q9ULZ3-2)或Q9ULZ3-3,小鼠中的NP_075747或者大鼠中的NP_758825(BAC43754))具有至少65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性并显示出ASC的功能活性的蛋白质。蛋白质的“功能活性”是与蛋白质的生理功能相关的任何活性。ASC的功能活性包括例如招募蛋白质以激活半胱天冬酶-1和引发细胞死亡。

[0059] 术语“ASC基因”或“ASC核酸”意指编码ASC的天然核酸序列、可以从其转录ASC cDNA的基因组序列、和/或前述各项的等位基因变体和同源物。所述术语包括双链DNA、单链DNA和RNA。

[0060] 如本文所用,术语“炎性小体”意指激活半胱天冬酶-1的多蛋白质(例如,至少两种蛋白质)复合物。此外,术语“炎性小体”可指激活半胱天冬酶-1活性进而调节IL-1 β 、IL-18和IL-33的加工和激活的多蛋白复合物。参见Arend等人2008;Li等人2008;和Martinon等人2002,将其每一篇都通过引用以其整体并入。术语“NLRP1炎性小体”、“NALP1炎性小体”、“NLRP2炎性小体”、“NALP2炎性小体”、“NLRP3炎性小体”、“NALP3炎性小体”、“NLRC4炎性小

体”、“IPAF炎性小体”或“AIM2炎性小体”意指至少半胱天冬酶-1和一种衔接蛋白(例如ASC)的蛋白质复合物。例如,术语“NLRP1炎性小体”和“NALP1炎性小体”可意指含有NLRP1、ASC、半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-11、XIAP和泛连接蛋白-1的多蛋白复合物,用于激活半胱天冬酶-1以及加工白细胞介素-1 β 、白细胞介素-18和白细胞介素-33。术语“NLRP2炎性小体”和“NALP2炎性小体”可意指含有NLRP2(又名NALP2)、ASC和半胱天冬酶-1的多蛋白复合物,而术语“NLRP3炎性小体”和“NALP3炎性小体”可意指含有NLRP3(又名NALP3)、ASC的多蛋白复合物,并且术语“NLRC4炎性小体”和“IPAF炎性小体”可意指含有NLRC4(又名IPAF)、ASC和半胱天冬酶-1的多蛋白复合物。另外,术语“AIM2炎性小体”可意指包含AIM2、ASC和半胱天冬酶-1的多蛋白复合物。

[0061] 如本文所用,短语“序列同一性”意指在比对两个序列以使亚基匹配最大化(即考虑空位和插入)时,两个序列(例如,核酸序列、氨基酸序列)中对应位置的相同亚基的百分比。序列同一性可使用序列分析软件(例如,来自Accelrys CGC, San Diego, CA的序列分析软件包)测量。

[0062] 短语“治疗有效量”和“有效剂量”意指足以产生治疗(例如,临床)所需结果的量;所述结果的确切性质将根据所治疗障碍的性质而变化。例如,在要治疗的障碍是SCI的情况下,所述结果可以是运动技能和运动功能的改进、减少的脊髓病变等。可以将本文所述的组合物从每天施用一次或多次到每周施用一次或多次。本领域熟练的技术人员将理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和定时,这些因素包括但不限于,疾病或障碍的严重程度、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄、以及存在的其他疾病。此外,使用治疗有效量的本发明组合物治疗受试者可包括单次治疗或一系列治疗。

[0063] 如本文所用,术语“治疗”被定义为向患者应用或施用本文所述或通过本文所述方法鉴定的治疗剂,或者向来自患者的分离组织或细胞系应用或施用所述治疗剂,所述患者具有疾病、疾病症状或疾病倾向,所述应用或施用的目的是治疗、治愈、缓解、减轻、改变、补救、改善、缓和或影响所述疾病、所述疾病症状或所述疾病倾向。

[0064] 术语“患者”、“受试者”和“个体”在本文中可互换使用,并且意指待治疗的哺乳动物受试者。在一个实施方案中,所述哺乳动物患者是人。在一些情况下,本发明的方法可用于实验动物、兽医应用和疾病动物模型的开发,所述动物模型包括但不限于啮齿动物(包括小鼠、大鼠和仓鼠)以及灵长类动物。

[0065] 如本文可互换使用的,“黑色素瘤缺乏因子2”和“AIM2”可以意指AIM2基因或同种型的表达产物;或者与AIM2(例如,登录号NX_014862、NP004824、XP016858337、XP005245673、AAB81613、BAF84731、AAH10940)具有至少65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性并且显示出AIM2的功能活性的蛋白质。

[0066] 如本文可互换使用的,“含有NACHT、LRR和PYD结构域的蛋白1”、“NALP1”和“NLRP1”意指NALP1或NLRP1基因或同种型的表达产物;或者与NALP1(例如,登录号AAH51787、NP_001028225、NP_127500、NP_127499、NP_127497、NP055737)具有至少65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性并且显示出NALP1功能活性的蛋白质。

[0067] 如本文可互换使用的,“NALP2”和“NLRP2”意指NALP2或NLRP2基因或同种型的表达产物;或者与NALP2(例如,登录号NP_001167552、NP_001167553、NP_001167554或NP_

060322) 具有至少65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性并且显示出NALP2功能活性的蛋白质。

[0068] 如本文可互换使用的,“NALP3”和“NLRP3”意指NALP3或NLRP3基因或同种型的表达产物;或者与NALP3(例如,登录号NP_001073289、NP_001120933、NP_001120934、NP_001230062、NP_004886、NP_899632、XP_011542350、XP_016855670、XP_016855671、XP_016855672或XP_016855673)具有至少65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性并且显示出NALP3功能活性的蛋白质。

[0069] 如本文可互换使用的,“NLRC4”和“IPAF”意指NLRC4或IPAF基因或同种型的表达产物;或者与NLRC4(例如,登录号NP_001186067、NP001186068、NP_001289433或NP_067032)共享至少65%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性并且显示出NLRC4功能活性的蛋白质。

[0070] 术语“中风”和“缺血性中风”意指当通向脑或脊髓的一部分的血流被中断时的情况。

[0071] “CNS的创伤性损伤”意指外部机械力对CNS的任何损伤,可能导致对CNS功能的永久性或暂时性损害。

[0072] 本文描述了涉及常规分子生物学技术的方法。此类技术通常是本领域中已知的并且详细描述于方法学论文中,例如以下文献:Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,第1-3卷,编辑Sambrook等人,Cold Spring Harbor Laboratory Press,冷泉港,纽约,2001;和Current Protocols in Molecular Biology,编辑Ausubel等人,Greenhouse Publishing and Wiley-Interscience,纽约,1992(定期更新)。免疫学技术通常是本领域已知的,并且在以下方法学论文中详细描述:如Advances in Immunology,93卷,Frederick W.Alt编辑,Academic Press,柏林顿,马萨诸塞州,2007;Making and Using Antibodies:A Practical Handbook,Gary C.Howard和Matthew R.Kaser编辑,CRC Press,波卡拉顿,佛罗里达州,2006;Medical Immunology,第6版,Gabriel Virella编辑,Informa Healthcare Press,伦敦,英国,2007;和Harlow和Lane ANTIBODIES:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,冷泉港,纽约州,1988。

[0073] 虽然在本发明的实践或测试中可以使用与本文所述的那些组合物和方法类似或等同的组合物和方法,但是下文中描述了合适的组合物和方法。本文提及的所有出版物、专利申请和专利均通过引用以其全文并入。在冲突的情况下,以包括定义的本说明书为准。以下讨论的特定实施方案仅是说明性而不旨在是限制性的。

[0074] 概述

[0075] 本文提供了与含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段。所述单克隆抗体或其片段可以与ASC的抗原片段特异性地结合,所述ASC的抗原片段由SEQ ID NO.5的氨基酸序列组成或基本上由其组成。就该实施方案而言,本发明考虑了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。在一个实施方案中,本文提供的单克隆抗体或其抗体片段可用于如US 8,685,400所述的减少哺乳动物炎症的方法,将其内容通过引用以其整体并入本文。所述炎症可能在肺和/或中枢神经系统(CNS)中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或

者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段可以存在于组合物(例如像本文提供的药物组合物)中。在一些情况下,在本文提供的治疗方法中,将所述单克隆抗体或其片段与一种或多种其他药剂组合使用。所述其他药剂可以是本文提供的任何药剂(例如,EV摄取抑制剂)和/或针对其他炎性小体组分(例如,IL-18、半胱天冬酶-1、NALP1、AIM2等)的抗体或抗体片段。

[0076] 本发明还包括与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,或在HCDR1、HCDR2和/或HCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。就该实施方案而言,本发明考虑了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。在一个实施方案中,本文提供的单克隆抗体或其抗体片段可用于如US 8,685,400所述的减少哺乳动物炎症的方法,将其内容通过引用以其整体并入本文。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗炎症的方法中的用途可以减少患者的先天免疫炎症或炎性小体相关炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗中枢神经系统(CNS)损伤和/或自身免疫疾病、自身炎性疾病、代谢疾病或神经变性疾病。所述CNS损伤可以选自创伤性脑损伤(TBI)、中风和脊髓损伤(SCI)。所述自身免疫疾病或神经变性疾病可以选自肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病(PD)、肌营养不良(MD)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、炎性肠病(例如(PD)),克罗恩病和溃疡性结肠炎)和多发性硬化症(MS)。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有PD的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗PD。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有狼疮性肾炎的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗狼疮性肾炎。所述代谢疾病可以选自代谢综合征、肥胖、糖尿病、糖尿病肾病或糖尿病肾脏疾病(DKD)、胰岛素抗性、动脉粥样硬化、脂质沉

积性障碍、糖原贮积病、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝病(例如,非酒精性脂肪性肝炎(NASH))和痛风。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有糖尿病肾病的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗糖尿病肾病。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有NASH的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗NASH。所述自身炎性疾病可以是冷吡林相关周期性综合征(CAPS)。CAPS可以包括家族性寒冷型自身炎性综合征(FCAS)、穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells syndrome, MWS)和新生儿发病多系统炎性疾病(NOMID)。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有CAPS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗CAPS。该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段可以存在于组合物(例如像本文提供的药物组合物)中。在一些情况下,在本文提供的治疗方法中,将所述单克隆抗体或其片段与一种或多种其他药剂组合使用。所述其他药剂可以是本文提供的任何药剂(例如, EV摄取抑制剂)和/或针对其他炎性小体组分(例如, IL-18、半胱天冬酶-1、NALP1、AIM2等)的抗体或抗体片段。

[0077] 在一些实施方案中,本发明提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3,或在LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。就该实施方案而言,本发明考虑了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。在一个实施方案中,本文提供的单克隆抗体或其抗体片段可用于如US8,685,400所述的减少哺乳动物炎症的方法,将其内容通过引用以其整体并入本文。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗炎症的方法中的用途可以减少患者的先天免疫炎症或炎性小体相关炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗中枢神经系统(CNS)损伤和/或自身免疫疾病、自身炎性疾病、代谢疾病或神经变性疾病。所述CNS损伤可以选自创伤性脑损伤(TBI)、中风和脊髓损伤(SCI)。所述自身免疫疾病或神经变性疾病可以选自肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病(PD)、肌营养不良(MD)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、炎性肠病(例如(PD),克罗恩病和溃疡性结肠炎)和多发性硬化症(MS)。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有PD的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗PD。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有狼疮

性肾炎的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗狼疮性肾炎。所述代谢疾病可以选自代谢综合征、肥胖、糖尿病、糖尿病肾病或糖尿病肾脏疾病(DKD)、胰岛素抗性、动脉粥样硬化、脂质沉积性障碍、糖原贮积病、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝病(例如,非酒精性脂肪性肝炎(NASH))和痛风。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有糖尿病肾病的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗糖尿病肾病。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有NASH的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗NASH。所述自身炎性疾病可以是冷吡林相关周期性综合征(CAPS)。CAPS可以包括家族性寒冷型自身炎性综合征(FCAS)、穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells syndrome, MWS)和新生儿发病多系统炎性疾病(NOMID)。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有CAPS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗CAPS。该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段可以存在于组合物(例如像本文提供的药物组合物)中。在一些情况下,在本文提供的治疗方法中,将所述单克隆抗体或其片段与一种或多种其他药剂组合使用。所述其他药剂可以是本文提供的任何药剂(例如,EV摄取抑制剂)和/或针对其他炎性小体组分(例如,IL-18、半胱天冬酶-1、NALP1、AIM2等)的抗体或抗体片段。

[0078] 在其他实施方案中,本发明还提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,或在HCDR1、HCDR2和/或HCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3,或在LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。就该实施方案而言,本发明考虑了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。在一个实施方案中,本文提供的单克隆抗体或其抗体片段可用于如US 8,685,400所述的减少哺乳动物炎症的方法,将其内容通过引用以其整体并入本文。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗炎症的方法中的用途可以减少患者的先天免疫炎症或炎性小体相关炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗中枢神经系统(CNS)损伤和/或自身免疫疾病、自身炎性疾病、代谢疾病或神经变性疾病。所述CNS损伤可以选自创伤性脑损伤(TBI)、中风和脊髓损伤(SCI)。所述自身免疫疾病或神经变性疾病可以选自肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病(PD)、肌营养不良(MD)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、炎性肠病(例如(CD))、克罗恩病和溃疡性结肠炎)和多发性硬化症(MS)。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体

或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于治疗MS。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有PD的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于治疗PD。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有狼疮性肾炎的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于治疗狼疮性肾炎。所述代谢疾病可以选自代谢综合征、肥胖、糖尿病、糖尿病肾病或糖尿病肾脏疾病(DKD)、胰岛素抗性、动脉粥样硬化、脂质沉积性障碍、糖原贮积病、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝病(例如,非酒精性脂肪性肝炎(NASH))和痛风。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有糖尿病肾病的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于治疗糖尿病肾病。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有NASH的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于治疗NASH。所述自身炎性疾病可以是冷吡林相关周期性综合征(CAPS)。CAPS可以包括家族性寒冷型自身炎性综合征(FCAS)、穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells syndrome, MWS)和新生儿发病多系统炎性疾病(NOMID)。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有CAPS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于治疗CAPS。该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段可以存在于组合物(例如像本文提供的药物组合物)中。在一些情况下,在本文提供的治疗方法中,将所述单克隆抗体或其片段与一种或多种其他药剂组合使用。所述其他药剂可以是本文提供的任何药剂(例如, EV摄取抑制剂)和/或针对其他炎性小体组分(例如, IL-18、半胱天冬酶-1、NALP1、AIM2等)的抗体或抗体片段。

[0079] 本文提供了用于减少先天免疫炎症或炎性小体相关炎症的组合物和方法。在一些情况下,所述炎性小体相关炎症是在已经经受或遭受如下病症的哺乳动物的CNS中,所述病症导致或引起先天免疫炎症或炎性小体相关炎症。在一些情况下,所述炎性小体相关炎症是在遭受或怀疑遭受如下病症的哺乳动物(例如,人)中,所述病症与先天免疫炎症或炎性小体相关炎症相关、导致或引起先天免疫炎症或炎性小体相关炎症。导致或引起先天免疫炎症或炎性小体相关炎症的病症可以是CNS损伤、自身免疫疾病或障碍、自身炎性疾病或障碍、神经变性疾病或障碍和/或代谢疾病或障碍。所述CNS损伤可以选自创伤性脑损伤(TBI)、中风和脊髓损伤(SCI)。所述自身免疫疾病或神经变性疾病可以选自肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病(PD)、肌营养不良(MD)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、炎性肠病(例如(PD), 克罗恩病和溃疡性结肠炎)和多发性硬化症(MS)。所述代谢疾病可以选自代谢综合征、肥胖、糖尿病、糖尿病肾病或糖尿病肾脏疾病(DKD)、胰岛素抗性、动脉粥样硬化、脂质沉积性障碍、糖原贮积病、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝病(例如,非酒精性脂肪性肝炎(NASH))和痛风。所述自身炎性疾病可以是冷吡林相关周期性综合征(CAPS)。CAPS可以包括家族性寒冷型自身炎性综合征(FCAS)、穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells syndrome, MWS)和新生儿发病多系统炎性疾病(NOMID)。本文所述的组合物和方法可以包括与哺乳动物炎性小体的至少一种组分(例如, ASC)特异性结合的如本文提供的抗体或其活性片段,和/或调节(例如,抑制或减少)胞外囊泡(EV)摄取的化合物;并且用作哺乳动物中CNS炎症的治疗。可导致CNS中炎症的病症的例子包括CNS损伤(例如,脊髓损伤(SCI)、创伤性脑损伤(TBI)或中风)、神经变性疾病、自身免疫疾病(例如,

MS)、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、间质性肺病或急性呼吸窘迫综合征。可以按治疗有效量施用所述组合物。治疗有效量可以是如本文提供的剂量。所述药剂可以是胞外囊泡(EV)摄取抑制剂、和/或与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其活性片段、或它们的组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用,例如,通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。

[0080] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有多发性硬化症(MS)的受试者中的MS的组合物和方法。本文提供的用于治疗MS的方法可以包括向患有或怀疑患有MS的受试者施用包含药剂(例如,IC 100)的组合物(例如,药物组合物)。多发性硬化症(MS)是累及脑和脊髓的自身免疫疾病。所述受试者可能呈现与MS一致的临床症状。所述受试者可能被诊断患有本领域中已知的任何类型的MS。MS可以是复发缓解型MS(RRMS)、继发进展型MS(SPMS)、原发进展型MS(PPMS)或进展复发型MS(PRMS)。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定MS诊断。在一个实施方案中,已使用2017年9月20日提交的US 62/560,963中详述的方法将受试者诊断为患有MS,将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的MS标准护理治疗、EV摄取抑制剂(例如,来自表1的任何EV摄取抑制剂)、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段(例如,抗ASC单克隆抗体或其抗体片段,例如像IC 100)或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用,例如,通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。所述标准护理治疗可以选自针对改良疾病结果、管理复发、管理症状或其任何组合的疗法。针对改良疾病结果的所述疗法可以选自 β -干扰素、乙酸格拉替雷、芬戈莫德、特立氟胺、富马酸二甲酯、米托蒽醌、奥瑞珠单抗、阿仑单抗、达克珠单抗和那他珠单抗。

[0081] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有帕金森病(PD)的受试者中的PD的组合物和方法。本文提供的用于治疗PD的方法可以包括向患有或怀疑患有PD的受试者施用包含药剂(例如,IC 100)的组合物(例如,药物组合物)。帕金森病(PD)是由于患有PD的哺乳动物(例如,人)的脑中的神经细胞逐渐分解和/或死亡而影响运动的进行性神经系统障碍。PD的出现和/或进展可以经过五期(即1-5期),并且本文提供的组合物和方法可以用于治疗患有或怀疑患有五期中任何一期的PD的个体。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定PD诊断。在一个实施方案中,已使用2018年9月20日提交的WO 2019/060516中详述的方法将受试者诊断为患有PD,将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的PD标准护理治疗、EV摄取抑制剂(例如,来自表1的任何EV摄取抑制剂)、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段(例如,抗ASC单克隆抗体或其抗体片段,例如像IC 100)或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用,例如,通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。标准护理治疗可以选自卡比多巴(Lodosyn)、左旋多巴卡比多巴-左旋多巴组合、Duopa、多巴胺激动剂、MAO B抑制剂、儿茶酚O-甲基转移酶(COMT)抑制剂、抗胆碱能药物、金刚烷胺和深部脑刺激。所述多巴胺激动剂可以选自普拉克索(乐伯克)、罗匹尼罗(力必平)和罗替戈汀(纽普罗)。所述MAO B抑制剂可以选自司来吉兰(咪多吡,Zelapar)、雷沙吉兰(雷沙吉兰片)和沙芬酰胺(Xadago)。所述COMT抑制剂可以选自恩他卡朋(诺康停)和托卡朋(答是美)。所述抗胆碱能药物可以选自苯托品(Cogentin)或苯海

索。

[0082] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有阿尔茨海默病 (AD) 的受试者中的AD的组合物和方法。本文提供的用于治疗AD的方法可以包括向患有或怀疑患有AD的受试者施用包含药剂 (例如, IC 100) 的组合物 (例如, 药物组合物)。阿尔茨海默病 (AD) 是进行性神经系统障碍, 其导致患有AD的个体中脑细胞退化和死亡, 并从轻度认知损害 (MCI) 进展为完全记忆丧失, 甚至人格和行为的改变。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定AD诊断。在一个实施方案中, 已使用2018年9月20日提交的WO 2019/060516中详述的方法将受试者诊断为患有AD, 将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的AD标准护理治疗、EV摄取抑制剂 (例如, 来自表1的任何EV摄取抑制剂)、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段 (例如, 抗ASC单克隆抗体或其抗体片段, 例如像IC 100) 或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用, 例如, 通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。标准护理治疗可以选自胆碱酯酶抑制剂和美金刚 (Namenda)。所述胆碱酯酶抑制剂可以选自多奈哌齐 (安理申)、加兰他敏 (Razadyne) 和卡巴拉汀 (艾斯能)。

[0083] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有类风湿性关节炎 (RA) 的受试者中的RA的组合物和方法。本文提供的用于治疗RA的方法可以包括向患有或怀疑患有RA的受试者施用包含药剂 (例如, IC 100) 的组合物 (例如, 药物组合物)。类风湿性关节炎 (RA) 是慢性自身免疫炎性障碍, 其导致对个体的关节以及皮肤、眼睛、肺、心脏和血管的损害。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定RA诊断。在一个实施方案中, 已使用2018年9月20日提交的WO 2019/060516中详述的方法将受试者诊断为患有RA, 将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的RA标准护理治疗、EV摄取抑制剂 (例如, 来自表1的任何EV摄取抑制剂)、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段 (例如, 抗ASC单克隆抗体或其抗体片段, 例如像IC 100) 或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用, 例如, 通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。所述标准护理治疗可以选自非甾体抗炎药 (NSAID)、类固醇 (例如, 强的松)、改善病情的抗风湿药物 (DMARD) 和生物制剂。NSAID可以包括布洛芬 (艾德维尔, Motrin IB) 和萘普生钠 (萘普生)。DMARD可以包括甲氨蝶呤 (Trexall, Otrexup等)、来氟米特 (爱若华)、羟氯喹 (赛能) 和柳氮磺胺吡啶 (Azulfidine)。生物制剂可以包括阿巴西普 (奥瑞希纳)、阿达木单抗 (修美乐)、阿那白滞素 (Kineret)、巴瑞克替尼 (Olumiant)、赛妥珠单抗 (希敏佳)、依那西普 (恩利)、戈利木单抗 (辛普尼)、英夫利昔单抗 (类克)、利妥昔单抗 (美罗华)、萨瑞鲁单抗 (Kevzara)、托珠单抗 (安挺乐) 和托法替尼 (Xeljanz)。

[0084] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有狼疮性肾炎的受试者中的狼疮性肾炎的组合物和方法。本文提供的用于治疗狼疮性肾炎的方法可以包括向患有或怀疑患有狼疮性肾炎的受试者施用包含药剂 (例如, IC 100) 的组合物 (例如, 药物组合物)。狼疮性肾炎是一种类型的肾炎症, 其通常是系统性红斑狼疮的常见并发症, 通常简称为狼疮。狼疮性肾炎是自身免疫疾病, 其中狼疮性自身抗体影响个体的肾中的结构, 这可能导致肾炎症以及血尿、蛋白尿、高血压、肾功能受损甚至肾衰竭。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定狼疮性肾炎诊断。在一个实施方案中, 已使用2018年9月20日提交的WO 2019/060516

中详述的方法将受试者诊断为患有狼疮性肾炎,将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的狼疮性肾炎标准护理治疗、EV摄取抑制剂(例如,来自表1的任何EV摄取抑制剂)、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段(例如,抗ASC单克隆抗体或其抗体片段,例如像IC 100)或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用,例如,通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。狼疮性肾炎的标准护理治疗可以包括控制血压的药物和/或低蛋白低盐的特定饮食。另外,狼疮性肾炎的标准护理治疗可以是针对狼疮的治疗,例如像非甾体抗炎药(NSAID)、抗疟药、皮质类固醇(例如,泼尼松;甲基泼尼松龙)、免疫抑制剂或生物制剂。NSAID的例子可以包括萘普生钠(萘普生)和布洛芬(艾德维尔,Motrin IB等)。抗疟药的例子可以是羟氯喹(赛能)。免疫抑制剂的例子可以包括硫唑嘌呤(移护宁、Azasan)、霉酚酸酯(CellCept)和甲氨蝶呤(Trexall)。生物制剂的例子可以包括贝利木单抗(Benlista)或利妥昔单抗(美罗华)。

[0085] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的受试者中的NASH的组合物和方法。本文提供的用于治疗NASH的方法可以包括向患有或怀疑患有NASH的受试者施用包含药剂(例如,IC 100)的组合物(例如,药物组合物)。NASH是一种类型的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)。NAFLD是影响很少饮酒或不饮酒的人的一系列肝病症的涵盖性术语。NAFLD的主要特征是肝细胞中储存过多的脂肪并以肝炎症为标志,所述肝炎症可能进展为瘢痕化和不可逆的损害。这种损害可能类似于大量饮酒所造成的损害。最严重时,非酒精性脂肪性肝炎可能进展为肝硬化和肝功能衰竭。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定NASH诊断。在一个实施方案中,已使用2018年9月20日提交的WO 2019/060516中详述的方法将受试者诊断为患有NASH,将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的NASH标准护理治疗、EV摄取抑制剂(例如,来自表1的任何EV摄取抑制剂)、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段(例如,抗ASC单克隆抗体或其抗体片段,例如像IC 100)或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用,例如,通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。NASH的标准护理治疗可以包括生活方式改变(如减肥、增加运动)、避免损害肝的药物、降低胆固醇和/或管理糖尿病。

[0086] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有糖尿病肾病的受试者中的糖尿病肾病的组合物和方法。本文提供的用于治疗糖尿病肾病的方法可以包括向患有或怀疑患有糖尿病肾病的受试者施用包含药剂(例如,IC 100)的组合物(例如,药物组合物)。糖尿病肾病是1型糖尿病和2型糖尿病的严重的肾相关并发症,其也可称为糖尿病肾脏疾病(DKD)。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定DKD诊断。在一个实施方案中,已使用2018年9月20日提交的WO 2019/060516中详述的方法将受试者诊断为患有DKD,将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的DKD标准护理治疗、EV摄取抑制剂(例如,来自表1的任何EV摄取抑制剂)、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段(例如,抗ASC单克隆抗体或其抗体片段,例如像IC 100)或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用,例如,通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。糖尿病肾病的标准护理治疗可以包括生活方式改变(如减肥、增加运动)、降低胆固醇、控制尿中蛋白质、培养骨骼

健康、控制高血压、管理糖尿病、肾透析或移植。

[0087] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有炎症肠病 (IBD) 的受试者中的 IBD 的组合物和方法。本文提供的用于治疗 IBD 的方法可以包括向患有或怀疑患有 IBD 的受试者施用包含药剂 (例如, IC 100) 的组合物 (例如, 药物组合物)。IBD 是用于描述包括个体的消化道慢性炎症的障碍的涵盖性术语。IBD 可以包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。溃疡性结肠炎是在你的大肠 (结肠) 和直肠最内层中的长期炎症和疮 (溃疡), 而克罗恩病的特征是消化道内层的炎症, 其经常向累及组织的深处蔓延。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定 IBD 诊断。在一个实施方案中, 已使用 2018 年 9 月 20 日提交的 WO 2019/060516 中详述的方法将受试者诊断为患有 IBD, 将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的 IBD 标准护理治疗、EV 摄取抑制剂 (例如, 来自表 1 的任何 EV 摄取抑制剂)、与炎症小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段 (例如, 抗 ASC 单克隆抗体或其抗体片段, 例如像 IC 100) 或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用, 例如, 通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。IBD 的标准护理治疗可以包括抗炎药、免疫系统抑制剂、抗生素、止泻药、止痛药、铁补充剂以及钙和维生素 D 补充剂。抗生素可以包括环丙沙星 (西普罗) 和甲硝唑 (灭滴灵)。免疫抑制药物的例子可以包括硫唑嘌呤 (Azasan、移护宁)、巯嘌呤 (巯基嘌呤、Purixan)、环孢菌素 (Gengraf、Neoral、山地明) 和甲氨蝶呤 (Trexall)。免疫抑制剂的其他例子可以包括肿瘤坏死因子 (TNF) - α 抑制剂或生物制剂, 例如像英夫利昔单抗 (类克)、阿达木单抗 (修美乐)、戈利木单抗 (辛普尼)、那他珠单抗 (Tysabri)、维多利珠单抗 (安吉优) 和优特吉努单抗 (喜达诺)。抗炎药可以包括皮质类固醇和氨基水杨酸盐, 例如像美沙拉明 (Asacol HD、美沙拉嗪)、巴柳氮 (Colazal) 和奥沙拉嗪 (Dipentum)。

[0088] 本文提供了用于治疗患有或怀疑患有冷吡林相关周期性综合征 (CAPS) 的受试者中的 CAPS 的组合物和方法。本文提供的用于治疗 CAPS 的方法可以包括向患有或怀疑患有 CAPS 的受试者施用包含药剂 (例如, IC 100) 的组合物 (例如, 药物组合物)。冷吡林相关周期性综合征 (CAPS) 也称为冷吡林相关自身炎症综合征, 其由如下三种与同一基因 (即 NLRP3) 中的缺陷有关的自身炎症性疾病组成: 新生儿发病多系统炎症性疾病 (NOMID)、穆-韦二氏综合征 (MWS) 和家族性寒冷型自身炎症综合征 (FCAS)。NOMID 的特征是发热与多器官中的炎症。NOMID 的早期症状可以包括不发痒的蜂窝样皮疹; 脑周围膜的炎症, 其引起头痛、失明或听力丧失; 眼睛凸出状; 以及呕吐的发作。1 岁以后, 有一半的患有 NOMID 的儿童可能发展关节疼痛和肿胀。MWS 的特征是症状反复出现, 包括皮疹、红眼睛、关节疼痛以及严重的头痛与呕吐。发作持续一天与三天之间。听力丧失 (可能是完全的) 通常发生在青少年时期。FCAS 的特征是发热、发冷、恶心、极度口渴、头痛和关节疼痛。可以使用或可以已经使用本领域中已知的任何方法来确定 CAPS 诊断。在一个实施方案中, 已使用 2018 年 9 月 20 日提交的 WO 2019/060516 中详述的方法将受试者诊断为患有 CAPS, 将所述文献的内容通过引用以其整体并入本文。所述药剂可以是本领域中已知的 CAPS 标准护理治疗、EV 摄取抑制剂 (例如, 来自表 1 的任何 EV 摄取抑制剂)、与炎症小体的组分结合的如本文提供的抗体或其抗体片段 (例如, 抗 ASC 单克隆抗体或其抗体片段, 例如像 IC 100) 或它们的任意组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用, 例如, 通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。CAPS 的标准护理治疗可以包括靶向白细胞介

素-1的生物制剂以及物理疗法、治疗关节畸形的夹板以及非甾体抗炎药、皮质类固醇或甲氨蝶呤以减少症状。

[0089] 本文提供了用于减少已经经受导致或引起肺炎症的病症或受其折磨的哺乳动物的肺炎症的组合物和方法。本文所述的组合物和方法可包括与哺乳动物炎性小体的至少一种组分(例如,ASC)特异性结合的如本文提供的抗体或其活性片段(例如,IC 100),和/或调节(例如,抑制或减少)胞外囊泡(EV)摄取的化合物;并可用作哺乳动物肺炎症的治疗。

[0090] 本文描述了用于减少患有导致和/或引起肺中炎性反应的病症的哺乳动物的肺炎症的方法。在一个实施方案中,治疗哺乳动物肺中炎症的方法包括向哺乳动物施用包含抑制炎性小体信号传导的药剂(例如,IC 100)的组合物。哺乳动物可以是如本文提供的患者或受试者。可导致肺中炎症的病症的例子包括中枢神经系统(CNS)损伤(例如,脊髓损伤(SCI)、创伤性脑损伤(TBI)或中风)、神经变性疾病、自身免疫疾病(例如,MS)、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化、间质性肺病或急性呼吸窘迫综合征。可以按治疗有效量施用所述组合物。治疗有效量可以是如本文提供的剂量。所述药剂可以是胞外囊泡(EV)摄取抑制剂、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其活性片段、或它们的组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用,例如,通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。

[0091] 本文提供了用于减少已经经受或遭受如下病症的哺乳动物的肾炎症的组合物和方法,所述病症导致或引起肾炎症。本文所述的组合物和方法可以包括与哺乳动物炎性小体的至少一种组分(例如,ASC)特异性结合的如本文提供的抗体或其活性片段(例如,IC 100),和/或调节(例如,抑制或减少)胞外囊泡(EV)摄取的化合物;并且用作哺乳动物中肾炎症的治疗。

[0092] 本文描述了用于减少患有导致和/或引起肾炎症反应的病症的哺乳动物的肾炎症的方法。在一个实施方案中,治疗哺乳动物的肾中炎症的方法包括向哺乳动物施用包含抑制炎性小体信号传导的药剂(例如,IC 100)的组合物。哺乳动物可以是如本文提供的患者或受试者。可导致肾中炎症的病症的例子包括狼疮性肾炎。可以按治疗有效量施用所述组合物。治疗有效量可以是如本文提供的剂量。所述药剂可以是胞外囊泡(EV)摄取抑制剂、与炎性小体的组分结合的如本文提供的抗体或其活性片段、或它们的组合。可将所述组合物通过任何合适的途径施用,例如,通过吸入、静脉内、腹膜内或脑室内施用。所述组合物可进一步包括至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。

[0093] 在一个实施方案中,施用本文提供的方法中的药剂(例如,单独的或与例如EV摄取抑制剂组合的抗体或由其衍生的抗体片段(例如,IC 100))可以导致受试者的CNS、肾或肺中哺乳动物炎性小体的组分的活性和/或表达水平的降低。所述降低可在肺细胞(例如像II型肺泡细胞)中。所述降低可与对照相比。所述对照可以是施用所述药剂之前的受试者。所述对照可以是未施用所述药剂的受试者中一种或多种炎性小体组分的活性和/或表达水平。在一个实施方案中,所述药剂的施用导致受试者至少CNS或CNS细胞中的半胱天冬酶-1激活的减少。在一个实施方案中,所述药剂的施用导致受试者至少肺或肺细胞中的半胱天冬酶-1激活的减少。在一个实施方案中,所述药剂的施用导致受试者至少CNS或CNS细胞中的一种或多种炎性小体组分(例如,ASC、AIM2、NALP1、NALP2、NALP2、NALP3或NLRC4)的表达水平的降低。在一个实施方案中,所述药剂的施用导致受试者至少肺或肺细胞中的一种或

多种炎性小体组分(例如,ASC、AIM2、NALP1、NALP2、NALP2、NALP3或NLRC4)的表达水平的降低。

[0094] 在另一个实施方案中,所述药剂(例如,单独的或与例如EV摄取抑制剂组合的抗体或由其衍生的抗体片段)的施用可以导致急性肺损伤(ALI)的减少或消除。在一个实施方案中,ALI的减少通过嗜中性粒细胞到肺泡和/或间质空间中的浸润减少、肺泡间隔增厚减少或不存在、或其组合来证明。所述降低可与对照相比。所述对照可以是施用所述药剂之前的受试者的ALI。所述对照可以是未施用所述药剂的患有ALI的受试者的ALI。

[0095] 在仍另一个实施方案中,所述药剂(例如,单独的或与例如EV摄取抑制剂组合的抗体或由其衍生的抗体片段(例如,IC 100))的施用可以导致受试者的CNS或肺中的细胞焦亡的减少或消除。细胞焦亡是促炎形式的细胞死亡,其涉及激活半胱天冬酶-1。细胞焦亡可由半胱天冬酶-1介导的对消皮素D(GSDMD)的切割触发。在一个实施方案中,细胞焦亡的减少通过在受试者肺或肺细胞(例如,II型肺泡细胞)中减少或缺乏GSDMD切割来证明。细胞焦亡的减少或消除可与对照相比。GSDMD切割的减少或缺乏可与对照相比。所述对照可以是施用所述药剂之前的受试者的细胞焦亡水平。所述对照可以是未施用所述药剂的患有细胞焦亡的受试者的细胞焦亡水平。

[0096] 本文提供的治疗方法(例如,治疗CNS损伤、自身免疫疾病、自身炎症性疾病、神经变性疾病或代谢疾病(例如,MS、PD、狼疮性肾炎、NASH、DKD、CAPS、炎症肠病(IBD);AD、类风湿性关节炎)、先天免疫炎症或炎性小体相关炎症、CNS炎症和/或肺炎症)的成功或对其的反应可以通过测量至少一种炎性小体蛋白的水平来监测。因此,在一些实施方案中,本文提供的治疗方法进一步包括:在治疗后测量从受试者获得的生物样品中至少一种炎性小体蛋白的水平;准备与对所述治疗的阳性反应相关的治疗炎性小体蛋白特征(signature),其中所述治疗蛋白特征包含至少一种炎性小体蛋白的降低水平;以及将展现出存在所述治疗蛋白质特征的受试者鉴定为对所述治疗有阳性反应。一种或多种炎性小体蛋白(例如,ASC、IL-18或半胱天冬酶-1)的水平、丰度或浓度的降低指示所述治疗在受试者中的功效。在治疗后获得的样品中所测量的一种或多种炎性小体蛋白可以与在治疗前获得的样品中所测量的炎性小体蛋白相同或不同。还可以将炎性小体蛋白水平用于调节治疗的剂量或频率。可以使用本文提供的或在2017年9月20日提交的US 62/560,963中发现的方法和技术来确定炎性小体蛋白水平。

[0097] 在一个实施方案中,在本文提供的治疗方法中施用的药剂是EV摄取抑制剂。EV摄取抑制剂可以是如本文提供的化合物、反义RNA、siRNA、肽、抗体或其活性片段,或其组合。所述化合物或肽可以是一种或多种选自以下的化合物:肝素、 α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO)、依诺肝素、去唾液酸胎球蛋白(Asialofetuin)、人受体相关蛋白(RAP)、RGD(Arg-Gly-Asp)肽、细胞松弛素D、细胞松弛素B、乙二胺四乙酸(EDTA)、拉春库林(Latrunculin)A、拉春库林B、NSC23766、Dynasore、氯丙嗪、5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利(EIPA)、阿米洛利、巴弗洛霉素A莫能菌素和氯喹、膜联蛋白-V、渥曼青霉素、LY294002、甲基- β -环糊精(M β CD)、菲律宾菌素、辛伐他汀、伏马菌素B1和N-丁基脱氧野尻霉素盐酸盐、U0126或质子泵抑制剂。如本文提供的EV摄取抑制剂抗体或其活性片段可以是针对表1中列出的蛋白质靶标的一种或多种抗体或其活性片段。使用EV摄取抑制剂治疗和/或减少哺乳动物的CNS或肺中的炎症的组合物可以进一步包含至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。

[0098] 表1. 示例性靶标和用于阻断EV摄取的相应抗体。

基因符号	基因名称	示例性抗体
ICAM-1	细胞间粘附分子1	Invitrogen ICAM-1 抗体(Life Technologies, 07-5403); CD54(ICAM-1)单克隆抗体(R6.5), eBioscience™
LFA-1	淋巴细胞功能相关抗原1	Abbiotec LFA-1 抗体(Abbiotech, 250944); Developmental Studies Hybridoma Bank LFA-1 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank, MHM24)
TIM-4	T细胞膜蛋白4	BioLegend TIMD4 抗体(BioLegend, 354004); LifeSpan Biosciences TIMD4 抗体(Lifespan Biosciences, LS-B1413)
MFG-E8	乳脂肪球-EGF 因子8蛋白	MBL International MFGE8 抗体(MBL, D199-3); Santa Cruz Biotechnology MFGE8 抗体(Santa Cruz, sc-8029); MBL International MFGE8 抗体(MBL, 18A2-G10)
DC-SIGN	树突细胞特异性细胞间粘附分子-3- 捕捉非整合蛋白	Invitrogen DC SIGN 抗体(eBioscience, eB-h209, 17-2099-41); BD Biosciences DC SIGN 抗体(BD, DCN46, 551186)
DEC205	分化抗原簇205	EMD Millipore LY75 抗体(Millipore, HD30); BioLegend LY75 抗体 (BioLegend, 342203)
H-2Kb	MHC I 类(H-2Kd)	BioLegend H2-K1 抗体(BioLegend, 28-8-6, 114603); BioLegend H2-K1 抗体(BioLegend, 28-14-8, 14-5999-85)
Tspan8	四次跨膜蛋白-8	R and D Systems TSPAN8 抗体(R&D Systems, MAB4734)
Tspan29	四次跨膜蛋白-29	Santa Cruz Biotechnology CD9 抗体 (Santa Cruz, sc-59140); Invitrogen CD9 抗体(eBioscience, eBioSN4; BD Biosciences CD9 抗体(BD Pharmingen, 555370)
ITGAL	整合蛋白亚基 α L	TS1/22.1.1.13.3; M17/4.4.11.9

[0099]

[0100]

基因符号	基因名称	示例性抗体
ITGAM	整合蛋白亚基 α M	CD11b单克隆抗体(VIM12)(CD11B00); BD Biosciences CD11b抗体(BD Pharmingen, ICRF44; 555385)
ITGAX	整合蛋白亚基 α X	抗整合蛋白 α X抗体, 克隆N418(MAB1399Z); BD Biosciences CD11c抗体(BD Bioscience, B-ly6; 560369)
CD44	分化抗原簇44	Invitrogen CD44抗体(eBioscience, VFF-7; MA1-82392); Invitrogen CD44抗体(eBioscience, IM7; MA1-10225); Invitrogen CD44抗体(eBioscience, 5F12; MA5-12394); BD Biosciences CD44抗体(BD Biosciences, 515; 550990或550988)
ITGA3	整合蛋白亚基 α 3	EMD Millipore整合蛋白 α 3抗体(Millipore, P1B5; MAB1952Z或MAB1952P)
ITGA4	整合蛋白亚基 α 4	Bio X Cell ITGA4抗体(BioXcell, PS/2)(BE0071-5MG); BD Biosciences ITGA4抗体(BD Biosciences, 561892); BD Biosciences ITGA4抗体(BD, 340976); EMD Millipore ITGA4抗体(Millipore, P4C2; MAB1955)
ITGAV	整合蛋白亚基 α V	Abcam整合蛋白 α v抗体(Abcam, ab77906; Abcam整合蛋白 α v抗体(Abcam, ab78289); Abcam整合蛋白 α v抗体(Abcam, ab16821); Invitrogen整合蛋白 α v抗体(Thermo Fisher Scientific, 272-17E6, MA1-91669); R & D Systems整合蛋白 α v抗体(R&D Systems, MAB2528)
ITGB3	整合蛋白亚基 β 3	Abcam整合蛋白 β 3抗体(Abcam, ab78289); Abnova整合蛋白 β 3抗体(Abnova, MHF4, MAB7098)
SELL	选择素L	BioLegend CD62L抗体(Biolegend, 304804); BioLegend CD62L抗体(Biolegend, 304810)
CD81	CD81分子	BD Biosciences CD81抗体(BD Pharmingen, 555675); R and D Systems CD81抗体(R&D Systems, MAB4615)

	基因符号	基因名称	示例性抗体
[0101]	LRP1	LDL受体相关蛋白1	Invitrogen LRP1 抗体(Life Technologies, 37-7600); Invitrogen LRP1 抗体(Thermo Fisher, MA1-27198)
	VCAM1	血管细胞粘附分子1	Invitrogen VCAM-1 抗体(Caltag, IG11B1; MA5-16429); Immunotech 抗VCAM-1 抗体
	CD151	CD151分子(Raph血型)	BD Biosciences CD151 抗体(Becton Dickinson, 556056); Epitomics CD151 抗体(Epitomics, 5901-1)

[0102] 在一个实施方案中,待施用的药剂是如本文提供的抗体或其活性片段,其针对哺乳动物炎性小体组分或由其衍生的抗原或表位。在另一个实施方案中,待施用的药剂是针对哺乳动物炎性小体组分的反义RNA或siRNA。炎性小体组分可以是本领域已知的任何炎性小体(例如像,NALP1、NALP2、NALP3、NLRC4或AIM2炎性小体)的组分。在典型的实施方案中,所述抗体与ASC或由其衍生的抗原或表位特异性地结合。然而,可以使用针对哺乳动物炎性小体(例如,NALP1、NALP2、NALP3、NLRC4或AIM2炎性小体)的任何其他组分的抗体。

[0103] 如本文所述的抗体可以是单克隆或多克隆抗体或其活性片段。所述抗体或活性片段可以是如本文所述的嵌合的、人的或人源化的。

[0104] 可以使用特异性结合ASC的如本文提供的任何合适的抗体或其活性片段,例如,抑制受试者的CNS(例如,CNS细胞)或肺细胞(例如,II型肺泡细胞)中ASC活性的抗体。在一个实施方案中,所述抗体与如下氨基酸序列特异性地结合,所述氨基酸序列与氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少85%序列同一性。在另一个实施方案中,所述抗体或其片段与如下氨基酸序列结合,所述氨基酸序列与氨基酸序列KKFKLKLLSVPLREGYGRIPR(SEQ ID NO:5)具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在又一个实施方案中,所述抗体或其片段与氨基酸序列KKFKLKLLSVPLREGYGRIPR(SEQ ID NO:5)或SEQ ID NO:5的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸结合。在仍另一个实施方案中,所述抗体或其片段与SEQ ID NO:5的2-5、5-10、10-15或15-20个氨基酸结合。在一些实施方案中,由抗体或抗体片段结合的ASC表位(例如,具有氨基酸SEQ ID NO:5的表位)是连续的。在一些实施方案中,由抗体或抗体片段结合的ASC表位(例如,具有氨基酸SEQ ID NO:5的表位)是不连续的。在一些情况下,本文提供的单克隆抗体或其抗体片段抑制或降低ASC的活性。

[0105] 如本文所用,术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或免疫球蛋白片段特异性结合的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(如氨基酸或糖侧链)组成并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。术语“表位”还指由免疫球蛋白重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区对常规结合的结构单元。表位可以定义抗体的最小结合位点,从而表示抗体的特异性靶标。

[0106] 类似地,在另一个实施方案中,所述炎性小体是NALP1炎性小体,并且所述至少一种组分是NALP1(即,NLRP1)。在此实施方案中,如本文提供的抗体或其活性片段与如下氨基

酸序列特异性地结合,所述氨基酸序列与氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4具有至少85%序列同一性、。

[0107] 在又一个实施方案中,所述药剂是一种或多种EV摄取抑制剂与结合炎性小体组分的如本文提供的一种或多种抗体或其活性片段的组合。EV摄取抑制剂可以是如本文提供的任何EV摄取抑制剂。结合炎性小体组分的抗体可以是结合如本文提供的任何炎性小体组分的任何抗体。在一个实施方案中,向患有CNS或肺炎症的受试者施用的药剂包含肝素(例如,依诺肝素)与结合AIM2炎性小体组分(例如,ASC)的抗体的组合。

[0108] 在一个实施方案中,所述方法包括:提供治疗有效量的组合物,所述组合物包含与哺乳动物炎性小体(例如,AIM2炎性小体)的至少一种组分(例如,ASC)特异性结合的如本文提供的抗体或其活性片段;并且向患有CNS或肺炎症或MS的哺乳动物施用所述组合物,其中向所述哺乳动物施用所述组合物导致哺乳动物的CNS或肺中半胱天冬酶-1激活的减少。在另一个实施方案中,所述方法包括:提供治疗有效量的组合物,所述组合物包含与哺乳动物炎性小体(例如,AIM2炎性小体)的至少一种组分(例如,ASC)特异性结合的抗体;并且向患有CNS或肺炎症或MS的哺乳动物施用所述组合物,其中向所述哺乳动物施用所述组合物导致一种或多种炎性小体组分(例如,ASC)的水平降低。在又一个实施方案中,所述方法包括:提供治疗有效量的组合物,所述组合物包含与哺乳动物炎性小体(例如,AIM2炎性小体)的至少一种组分(例如,ASC)特异性结合的抗体;并且向患有CNS或肺炎症或MS的哺乳动物施用所述组合物,其中向所述哺乳动物施用所述组合物导致ALI降低。所述CNS或肺炎症可以是CNS损伤(例如,SCI或TBI)、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、神经变性疾病或具有炎症组分的自身免疫疾病的结果。在一个实施方案中,所述肺炎症由CNS损伤(如TBI或SCI)引起。

[0109] 在一个实施方案中,本文提供的方法还需要检测来自怀疑患有CNS或肺炎症或MS的受试者的样品中哺乳动物炎性小体的一种或多种组分的水平或活性。检测水平或活性的方法需要测量从受试者获得的样品中至少一种炎性小体蛋白(例如,ASC或AIM2)的水平;确定所述至少一种炎性小体蛋白(例如,ASC或AIM2)的升高水平或活性的存在或不存在。所述至少一种炎性小体蛋白的水平或活性可能相对于对照样品中所述至少一种炎性小体蛋白的水平而增强。蛋白质特征中的所述至少一种炎性小体蛋白的水平或活性可能相对于预定参考值或参考值范围而增强。所述至少一种炎性小体蛋白可以是含有核苷酸结合富亮氨酸重复序列热蛋白结构域的蛋白1(NLRP1)、NLRP2、NLRP3、NLRC4、AIM2、含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶-1或其组合。所述样品可以是脑脊液(CSF)、唾液、血液、血清、血浆、尿液或肺吸出物。

[0110] 与哺乳动物炎性小体的至少一种组分特异性结合的抗体

[0111] 本文所述的用于减少哺乳动物的CNS和/或肺中的炎症的方法包括组合物,所述组合物包含与哺乳动物炎性小体(例如,AIM2炎性小体)的至少一种组分(例如,ASC、AIM2)特异性结合的如本文提供的抗体或其活性片段。用于治疗 and/或减少哺乳动物的CNS和/或肺中的炎症的组合物可以进一步包含至少一种药学上可接受的载体或稀释剂。针对用于本文方法的哺乳动物炎性小体组分的示例性抗体可以是US 8685400中发现的那些,将其内容通过引用以其整体并入本文。本文还提供了示例性单克隆抗体或抗体片段,例如像包含VH区和VL区的单克隆抗体或抗体片段,所述VH区使得VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,所述VL区使得VL区氨基酸序列包含

SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3。

[0112] 在一个实施方案中,用于治疗 and/或减少哺乳动物的CNS或肺中的炎症的组合物包含如本文提供的抗体或其活性片段,所述抗体或其活性片段与哺乳动物ASC蛋白(例如像人小鼠、或大鼠ASC蛋白)的结构域或其部分特异性地结合。可使用任何合适的抗ASC抗体,并且几种是可商购获得的。用于本文方法的抗ASC抗体的例子可以是US 8685400中发现的那些,其内容通过引用以其全文并入本文。用于本文提供方法的可商购获得的抗ASC抗体的例子包括但不限于04-147抗ASC、来自MilliporeSigma的克隆2EI-7小鼠单克隆抗体、来自MilliporeSigma的AB3607-抗ASC抗体、来自Biorbyt的orb194021抗ASC、来自LifeSpan Biosciences的LS-C331318-50抗ASC、来自R&D Systems的AF3805抗ASC、来自Novus Biologicals的NBP1-78977抗ASC、来自Rockland Immunochemicals的600-401-Y67抗ASC、来自MBL International的D086-3抗ASC、来自Adipogen的AL177抗ASC、单克隆抗ASC(克隆o93E9)抗体、来自Santa Cruz Biotechnology的抗ASC抗体(F-9)、来自Santa Cruz Biotechnology的抗ASC抗体(B-3)、来自Enzo Life Sciences的ASC多克隆抗体-ADI-905-173或A161抗人ASC-Leinco Technologies。所述人ASC蛋白可以是登录号NP_037390.2(Q9ULZ3-1)、NP_660183(Q9ULZ3-2)或Q9ULZ3-3。大鼠ASC蛋白可以是登录号NP_758825(BAC43754)。所述小鼠ASC蛋白可以是登录号NP_075747.3。在一个实施方案中,所述抗体与哺乳动物ASC蛋白(例如人、小鼠或大鼠ASC)的PYRIN-PAAD-DAPIN结构域(PYD)或其部分或片段结合。在此实施方案中,如本文所述的抗体与如下氨基酸序列特异性地结合,所述氨基酸序列与人、小鼠或大鼠ASC的PYD结构域或其片段具有至少65%(例如,65%、70%、75%、80%、85%)序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述抗体与哺乳动物ASC蛋白(例如人、小鼠或大鼠ASC)的C-末端半胱天冬酶-招募结构域(CARD)或其部分或片段结合。在此实施方案中,如本文所述的抗体与如下氨基酸序列特异性地结合,所述氨基酸序列与人、小鼠或大鼠ASC的CARD结构域或其片段具有至少65%(例如,65%、70%、75%、80%、85%)序列同一性。在再另一个实施方案中,所述抗体与哺乳动物ASC蛋白序列(例如人、小鼠或大鼠ASC)的位于PYD与CARD结构域之间的部分或其片段结合。在另一个实施方案中,用于治疗 and/或减少哺乳动物的CNS和/或肺中的炎症的组合物包含与大鼠ASC的区域(例如氨基酸序列ALRQTQPYLVTDLQES(SEQ ID NO:1))(即,大鼠ASC的残基178-193,登录号BAC43754)特异性结合的抗体。在此实施方案中,如本文所述的抗体与如下氨基酸序列特异性地结合,所述氨基酸序列与大鼠ASC的氨基酸序列ALRQTQPYLVTDLQES(SEQ ID NO:1)具有至少65%(例如,65%、70%、75%、80%、85%)序列同一性。在另一个实施方案中,用于治疗 and/或减少哺乳动物的CNS和/或肺中的炎症的组合物包含与人ASC的区域(例如氨基酸序列RESQSYLVEDLERS(SEQ ID NO:2))特异性结合的抗体。在仍另一个实施方案中,用于治疗 and/或减少哺乳动物的CNS和/或肺中的炎症的组合物包含与人ASC的区域特异性结合的抗体,所述区域例如氨基酸序列KKFKLKLKLSVPLREGYGRIPR(SEQ ID NO:5;即人ASC的残基21-41)或SEQ ID NO:5的5-10、10-15或15-20个氨基酸。在一个实施方案中,如本文所述的与ASC结构域或其片段结合的抗体抑制哺乳动物肺细胞(例如II型肺泡细胞)中的ASC活性。在另一个实施方案中,如本文所述的与ASC结构域或其片段结合的抗体(例如,本文提供的单克隆抗ASC抗体或其抗体片段)抑制患有或怀疑患有CNS损伤或障碍的哺乳动物的CNS中的ASC活性。CNS损伤或障碍的例子可以包括TBI、SCI、中风、肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、

多发性硬化症 (MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良症 (MD)、阿尔茨海默病 (AD)、帕金森病 (PD)。

[0113] 在某些实施方案中,本发明提供了与ASC特异性结合并包含表2所示的一个或多个氨基酸序列的抗体和抗体片段。本文还提供了编码所述单克隆抗体或其抗体片段的分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含表2所示的核酸序列。在一些情况下,表达载体包含表2的核酸分子。所述表达载体可以包含重链或轻链恒定区。用于本文提供的组合物和方法中的轻链和重链表达载体系统的例子是IgG4 (S241P) 重链和κ轻链的Antitope pANT表达载体系统。对于重链或轻链的核酸分子可以与适合于在宿主细胞中表达核酸区段的调节序列可操作地连接。

[0114] 表2. 本发明的抗ASC抗体或其抗体片段的可变重链和可变轻 (κ) 链序列。

	<u>重链(H)CDR1氨基酸序列</u> TSGMGVS(SEQ ID NO: 6)
[0115]	<u>重链(H)CDR1核酸序列</u> ACTAGTGGAATGGGTGTGAGC (SEQ ID NO: 9)

[0116]

<u>重链(H)CDR2氨基酸序列</u>
HIYWDDDDKRYNPSLKS (SEQ ID NO: 7)
<u>重链(H)CDR2核酸序列</u>
CACATTTATTGGGATGATGATAAGCGCTACAACCCATCTCTGAAGAGC (SEQ ID NO: 10)
<u>重链(H)CDR3氨基酸序列</u>
STPIVANAMDY (SEQ ID NO: 8)
<u>重链(H)CDR3核酸序列</u>
AGCACCCCATCGTGGCCAACGCCATGGACTAC (SEQ ID NO: 11)
<u>轻(κ)(L)链CDR1氨基酸序列</u>
KASQSVDDYDGDSYMN (SEQ ID NO: 12)
<u>轻(κ)(L)链CDR1核酸序列</u>
AAGGCCAGCCAGAGTGTTGACTACGACGGCGACAGTTACATGAAT (SEQ ID NO: 15)
<u>轻(κ)(L)链CDR2氨基酸序列</u>
AASNLES (SEQ ID NO: 13)
<u>轻(κ)(L)链CDR2核酸序列</u>
GCCGCATCTAACCTGGAATCC (SEQ ID NO: 16)
<u>轻(κ)(L)链CDR3氨基酸序列</u>
QQSNEPDT (SEQ ID NO: 14)
<u>轻(κ)(L)链CDR3核酸序列</u>
CAGCAATCTAATGAGGACCCTTACACT (SEQ ID NO: 17)
<u>可变重(VH)1链氨基酸序列</u>
QVTLKESGPAIVKPTQTLTLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWD DDKRYNPSLKSRLTISKDSSKNQVVLKITSVDPVDTATYSCARSTPIVANAMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 18)
<u>可变重(VH)1链核酸序列</u>
CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGCCATCGTGAAACCCACACAGACCCTC ACGCTGACCTGCAGCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAATGGGTGTG AGCTGGATCCGTCAGCCCTCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGCTTGACACACATTTAT TGGGATGATGATAAGCGCTACAACCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCC

[0117]

AAGGACAGCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTAAAATCACCAGCGTGGACCCTGT
GGACACAGCCACATATTCCTGTGCACGGAGCACCCCCATCGTGGCCAACGCCA
TGGACTACTGGGGCCAAGGAACCAGCGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 23)

可变重(VH)2链氨基酸序列

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPAGKGLEWLAHIYWD
DDKRYNPSLKSRLTISKDSSKNQVVLMTNMDPVDATYSCARSTPIVANAMDYW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 19)

可变重(VH)2链核酸序列

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGCCCTGGTGAAACCCACACAGACCCTC
ACGCTGACCTGCAGCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAATGGGTGTG
AGCTGGATCCGTCAGCCCGCCGAAAGGGCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTA
TTGGGATGATGATAAGCGCTACAACCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTC
CAAGGACAGCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTG
TGGACACAGCCACATATTCCTGTGCACGGAGCACCCCCATCGTGGCCAACGCC
ATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 24)

可变重(VH)3链氨基酸序列

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPAGKGLEWLAHIYWD
DDKRYNPSLKSRLTISKDSSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSTPIVANAMDY
WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 20)

可变重(VH)3链核酸序列

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGCCCTGGTGAAACCCACACAGACCCTC
ACGCTGACCTGCAGCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAATGGGTGTG
AGCTGGATCCGTCAGCCCGCCGAAAGGGCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTA
TTGGGATGATGATAAGCGCTACAACCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTC
CAAGGACAGCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTG
TGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGAGCACCCCCATCGTGGCCAACGCC
ATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 25)

可变重(VH)4链氨基酸序列

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPAGKGLEWLAHIYWD
DDKRYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARSTPIVANAMDY
WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 21)

[0118]

可变重(VH)4链核酸序列

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGCCCTGGTGAAACCCACACAGACCCTC
ACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAATGGGTGTG
AGCTGGATCCGTCAGCCCGCCGAAAGGGCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTA
TTGGGATGATGATAAGCGCTACAACCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTC
CAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTG
TGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGAGCACCCCCATCGTGGCCAACGCC
ATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 26)

可变重(VH)嵌合(O)链氨基酸序列

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDD
DKRYNPSLKSRITISKDSSNQVFLKITSVDTADTATYSCARSTPIVANAMDYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO: 22)

可变重(VH)嵌合(O)链核酸序列

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTC
AGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGA
GCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACT
GGGATGATGACAAGCGCTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCC
AAGGATTCCTCCAGCAACCAGGTCTTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCA
GATACTGCCACATACTCCTGTGCTCGAAGTACTCCGATTGTAGCTAATGCTATG
GACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 27)

可变κ轻(VL)1链氨基酸序列

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQP PKLLIYAAS
NLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQEEDVATYYCQQSNEDPYTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 28)

可变κ轻(VL)1链核酸序列

GACATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG
GCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGTGTTGACTACGACGGCGACAGTTA
CATGAATTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGC
CGCATCTAACCTGGAATCCGGCATCCCTGCCCGATTAGTGGCAGCGGGTCTGG
GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGAGGAAGATGTGGCAACTT
ATTACTGTCAGCAATCTAATGAGGACCCTTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGC

[0119]

TGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 32)
<u>可变κ轻(VL)2链氨基酸序列</u> DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS NLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQSNE DPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 29)
<u>可变κ轻(VL)2链核酸序列</u> GACATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG GCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGTGTTGACTACGACGGCGACAGTTA CATGAATTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGC CGCATCTAACCTGGAATCCGGCATCCCTGCCCATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTGGCAACTTA TTACTGTCAGCAATCTAATGAGGACCCTTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCT GGAGATCAAA (SEQ ID NO: 33)
<u>可变κ轻(VL)3链氨基酸序列</u> DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAA SNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQSNE DPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 30)
<u>可变κ轻(VL)3链核酸序列</u> GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGG GCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGTGTTGACTACGACGGCGACAGTTA CATGAATTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGC CGCATCTAACCTGGAATCCGGCATCCCTGCCCATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTGGCAACTTA TTACTGTCAGCAATCTAATGAGGACCCTTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCT GGAGATCAAA (SEQ ID NO: 34)
<u>可变κ轻(VL)嵌合(O)链氨基酸序列</u> DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS NLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNE DPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 31)
<u>可变κ轻(VL)嵌合(O)链核酸序列</u> GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGG

[0120]

```
GCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTAT
ATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGC
TGCATCCAATCTAGAATCTGGCATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGG
GACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
ATTACTGTGAGCAAGTAATGAGGAcCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAG
CTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 35)
```

[0121] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18、19、20、21、22或与SEQ ID NO:18、19、20、21或22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0122] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28、29、30、31或与SEQ ID NO:28、29、30或31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是

如本文提供的药物组合物。

[0123] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18、19、20、21、22或与SEQ ID NO:18、19、20、21或22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28、29、30、31或与SEQ ID NO:28、29、30或31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0124] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0125] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或

99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0126] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0127] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的

疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0128] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0129] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未

治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0130] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些情况下,包含SEQ ID NO:19的VH区氨基酸序列和包含SEQ ID NO:30的VL区氨基酸序列的单克隆抗体或其衍生的抗体片段可以称为IC 100。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0131] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述

组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0132] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0133] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0134] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:

30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0135] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或 κ 链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0136] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或 κ 链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症

或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0137] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0138] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其

衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0139] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0140] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0141] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨

氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0142] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0143] 在一个实施方案中,本文提供了与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或其抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链或κ链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。就该实施方案而言,本文提供了所述单克隆抗体或其抗体片段在治疗受试者的炎症的方法中的用途。所述炎症可以是先天免疫炎症。所述炎症可以是炎性小体相关炎症。在一个实施方案中,本文提供的

单克隆抗体或其抗体片段可用于如US 8,685,400所述的减少哺乳动物炎症的方法,将其内容通过引用以其整体并入本文。所述炎症可能在肺和/或CNS中。肺和/或CNS中的炎症可能是损伤(例如,创伤性脑损伤(TBI)或脊髓损伤(SCI))或者CNS的疾病、病症或痛苦或影响CNS的疾病、病症或痛苦的结果。如本文所提供的,CNS的疾病、病症或痛苦或者影响CNS的疾病、病症或痛苦可以是中风以及自身免疫疾病和/或CNS疾病,包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)(葛雷克氏症)、多发性硬化症(MS)、免疫功能障碍性肌肉CNS崩溃、肌营养不良(MD)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)。在治疗炎症的方法中使用所述单克隆抗体或其抗体片段可以减少患者的CNS和/或肺中的炎症。所述减少可以是与对照(例如,未治疗的患者和/或治疗前的患者)相比。在一个实施方案中,通过将所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段施用于患有或怀疑患有MS的患者,所述单克隆抗体或由其衍生的抗体片段用于治疗MS。在一些情况下,该实施方案的单克隆抗体或其抗体片段存在于组合物中。所述组合物可以是如本文提供的药物组合物。

[0144] 在另一个实施方案中,用于减少哺乳动物的CNS或肺中炎症的组合物包含如本文提供的抗体或其活性片段,所述抗体或其活性片段与NLRP1(例如,抗NLRP1鸡抗体)或其结构域特异性地结合。可使用任何合适的抗NLRP1抗体,并且几种是可商购获得的。用于本文方法的抗NLRP1抗体的例子可以是US 8685400中发现的那些,其内容通过引用以其全文并入本文。用于本文提供方法的可商购获得的抗NLRP1抗体的例子包括但不限于来自R&D Systems的人NLRP1多克隆抗体AF6788、EMD Millipore兔多克隆抗NLRP1 ABF22、Novus Biologicals兔多克隆抗NLRP1 NB100-56148、Sigma-Aldrich小鼠多克隆抗NLRP1 SAB1407151、Abcam兔多克隆抗NLRP1 ab3683、Biorbyt兔多克隆抗NLRP1 orb325922mybiosource兔多克隆抗NLRP1MBS7001225、R&D systems sheep多克隆AF6788、Aviva Systems小鼠单克隆抗NLRP1 oaed00344、Aviva Systems兔多克隆抗NLRP1 AR054478_P050、Origene兔多克隆抗NLRP1 AP07775PU-N、Antibodies online兔多克隆抗NLRP1 ABIN768983、Prosci兔多克隆抗NLRP1 3037、Proteintech兔多克隆抗NLRP1 12256-1-AP、Enzo小鼠单克隆抗NLRP1 ALX-804-803-C100、Invitrogen小鼠单克隆抗NLRP1 MA1-25842、GeneTex小鼠单克隆抗NLRP1GTX16091、Rockland兔多克隆抗NLRP1 200-401-CX5或Cell Signaling Technology兔多克隆抗NLRP1 4990。人NLRP1蛋白可以是登录号AAH51787、NP_001028225、NP_055737、NP_127497、NP_127499或NP_127500。在一个实施方案中,所述抗体与哺乳动物NLRP1蛋白(例如人NLRP1)的Pyrin、NACHT、LRR1-6、FIIND或CARD结构域、或其部分或片段结合。在此实施方案中,如本文所述的抗体与如下氨基酸序列特异性地结合,所述氨基酸序列与人NLRP1的特定结构域(例如,Pyrin、NACHT、LRR1-6、FIIND或CARD)或其片段具有至少65%(例如,65%、70%、75%、80%、85%)序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,将由Ayes Laboratories定制设计和生产的鸡抗NLRP1多克隆用于减少肺炎症。该抗体可以针对人NLRP1中的以下氨基酸序列:CEYYTEIREREREKSEKGR(SEQ ID NO:3)。在一个实施方案中,如本文所述的与NLRP1结构域或其片段结合的抗体抑制哺乳动物肺细胞(例如II型肺泡细胞)中的NLRP1活性。

[0145] 在又一个实施方案中,用于减少哺乳动物的CNS或肺中的炎症的组合物包含如本文提供的抗体或其活性片段,所述抗体或其活性片段与AIM2或其结构域特异性地结合。可使用任何合适的抗AIM2抗体,并且几种是可商购获得的。用于本文提供方法的可商购的

抗AIM2抗体的例子包括但不限于来自Proteintech的兔多克隆抗AIM2目录号20590-1-AP、Abcam抗AIMS抗体(ab119791)、来自ECM biosciences的兔多克隆抗AIM2(N-末端区域)目录号AP3851、来自Elabsciences的兔多克隆抗ASC目录号E-AB-30449、来自Santa Cruz Biotechnology的具有目录号sc-293174的称为AIM2抗体(3C4G11)的抗AIM2小鼠单克隆抗体、来自Origene的具有目录号TA324972的小鼠单克隆AIM2抗体、来自ThermoFisher Scientific的AIM2单克隆抗体(10M2B3)、来自Antibodies-online的AIM2兔多克隆抗体ABIN928372或ABIN760766、具有目录号CAE02153的Biomatix coat抗AIM2多克隆抗体。来自viva Systems Biology的抗AIM2多克隆抗体(OABF01632)、来自LSBio-C354127的兔多克隆抗AIM2抗体LS-C354127、具有目录号MA5-16259的来自Cell Signaling Technology的兔单克隆抗AIM2抗体。来自Fab Gennix International Incorporated的兔多克隆抗AIM2单克隆抗体目录号AIM2 201AP、MyBiosource兔多克隆抗AIM2目录号MBS855320、Signalway兔多克隆抗AIM2目录号36253、Novus Biological兔多克隆抗AIM2目录号43900002、GeneTex兔多克隆抗AIM2 GTX54910、Prosci兔多克隆抗AIM226-540、Biorbyt小鼠单克隆抗AIM2 orb333902、Abcam兔多克隆抗AIM2ab93015)、Abcam兔多克隆抗AIM2 ab76423、Sigma Aldrich小鼠多克隆抗AIM2 SAB1406827或Biolegend抗AIM2 3B10。人AIM2蛋白可以是登录号NX_014862、NP004824、XP016858337、XP005245673、AAB81613、BAF84731或AAH10940。在一个实施方案中,所述抗体与哺乳动物AIM2蛋白(例如人AIM2)的Pyrin或HIN-200结构域、或其部分或片段结合。在此实施方案中,如本文所述的抗体与如下氨基酸序列抗体特异性地结合,所述氨基酸序列与人AIM2的特定结构域(例如,Pyrin或HIN-200)或其片段具有至少65%(例如,65%、70%、75%、80%、85%)序列同一性。在一个实施方案中,如本文所述的与AIM2结构域或其片段结合的抗体抑制哺乳动物肺细胞(例如II型肺泡细胞)中的AIM2活性。

[0146] 如本文所述的抗炎性小体(例如,抗ASC、抗NLRP1或抗AIM2)抗体包括具有免疫球蛋白可变区的至少一个抗原结合区的多克隆和单克隆啮齿动物抗体、多克隆和单克隆人抗体或其任何部分,所述抗体与哺乳动物炎性小体(例如,AIM2炎性小体)的组分(例如像ASC或AIM2)特异性地结合。在一些情况下,所述抗体对ASC具有特异性,使得如果抗体针对多肽的表位产生并且与至少部分天然或重组蛋白结合,则所述抗体对ASC具有特异性。

[0147] 在某些实施方案中,本文提供的抗体包括具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入的多肽。例如,抗ASC单克隆抗体或ASC结合抗体片段包含如下多肽,与具有SEQ ID NO:6-8、12-14、18-22或28-31中的一个或多个的氨基酸序列的多肽相比,所述多肽具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入。本文提供的抗体可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸取代、缺失或插入。例如,抗ASC单克隆抗体或ASC结合抗体片段可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸取代、缺失或插入。可以通过标准技术引入取代、缺失或插入,如对编码抗ASC抗体或ASC结合抗体片段的多肽的核酸分子进行定点诱变或PCR介导的诱变。

[0148] 在某些实施方案中,在本文公开的抗体或抗体片段的氨基酸序列中的一个或多个位置处进行保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是用具有类似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的取代。在某些实施方案中,仅在抗体或抗体片段的FR序列中而不在CDR序列中进行保守氨基酸取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘

氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性的侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、以及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,例如,抗ASC单克隆抗体或ASC结合抗体片段的多肽中的氨基酸残基可以被来自同一侧链家族的另一个氨基酸残基替代。在某些实施方案中,氨基酸串可以被结构上类似但侧链家族成员的顺序和/或组成不同的串替代。本领域技术人员将能够通过利用常规的、本领域公认的方法(包括但不限于ELISA、蛋白质印迹、噬菌体展示等)评价包含如下多肽的抗ASC单克隆抗体或ASC结合抗体片段是否结合ASC蛋白,与具有SEQ ID NO:6-8、12-14、18-22或28-31中的一个或多个的氨基酸序列的多肽相比,所述多肽具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入。

[0149] 序列之间的序列同源性或同一性(在本文中可互换使用的术语)的计算可以如下进行。

[0150] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,出于最佳比较目的将序列进行比对(例如,可以在第一和第二个氨基酸或核酸序列中的一个或两个中引入空位以实现最佳比对,并且出于比较目的可以忽略非同源序列)。在示例性实施方案中,出于比较目的比对的参考序列的长度为所述参考序列的长度的至少30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在该位置处是相同的(如本文所用,氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。两个序列之间的同一性百分比是考虑空位数和每个空位的长度,序列具有相同位置数的函数,所述空位需要被引入以实现两个序列的最佳比对。

[0151] 可使用数学算法来完成序列比对和两个序列之间同一性百分比的确定。在一个实施方案中,使用已并入GCG软件包(可以在www.gcg.com上获得)中的GAP程序中的Needleman等人((1970)J.Mol.Biol.48:444-453)的算法,使用BLOSUM 62矩阵或PAM250矩阵以及空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。在又一个实施方案中,使用GCG软件包(可以在www.gcg.com上获得)中的GAP程序,使用NWSgapdna CMP矩阵和空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6来确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。一组参数(以及在从业人员不确定应该应用什么参数来确定分子是否在本发明的序列同一性或同源性限制内的情况下可以使用的参数)是BLOSUM 62评分矩阵以及空位罚分12、空位延伸罚分4和移码空位罚分5。

[0152] 两个氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分比可以使用已并入ALIGN程序(2.0版)的Meyers等人((1989)CABIOS 4:11-17)的算法,使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定。

[0153] 在某些方面,抗体是单克隆抗体。在其他方面,抗体是多克隆抗体。术语“单克隆抗体”是指仅含有一种能够与特定的抗原表位进行免疫反应的抗原结合位点的抗体分子的群体。因此,单克隆抗体组合物典型地展示出对于与其进行免疫反应的特定蛋白质的单一结合亲和力和。

[0154] 在一些方面,本发明的抗体(抗ASC单克隆抗体或ASC结合抗体片段)是人源化的、

嵌合的或人的。

[0155] 在一些实施方案中,本发明的抗体是人源化抗体。

[0156] 本文中使用的术语“人源化抗体”是指如下抗体,所述抗体已被工程化为在可变区中包含一个或多个个人框架区以及重链和/或轻链的非人(例如小鼠、大鼠或仓鼠)互补决定区(CDR)。在某些实施方案中,人源化抗体包括这样的序列,其中除了CDR区以外,所述序列是完全人的。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人残基替代。此外,所述人源化抗体可以包含既不在人形式的抗体中也不在导入的CDR或框架序列中发现的残基,但包括在内以进一步改善和优化抗体性能。通常,所述人源化抗体将基本上包含至少一个(并且通常是两个)可变结构域的全部,其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。可以以本领域已知的和/或本文提供的任何方式修饰FR区。所述修饰可以赋予期望的特性,如在宿主细胞中增加的半衰期和/或改善的表达。在一个实施方案中,一个或多个FR区可以如通过引用并入本文的US 20150232557中所述进行修饰或突变。其他形式的人源化抗体可以具有关于原始抗体改变的一个或多个CDR(CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDR H1、CDR H2或CDR H3),其也称为“源自”原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。人源化抗体还最佳地包含免疫球蛋白恒定区或恒定结构域的至少一部分(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区或恒定结构域的至少一部分。

[0157] 相对于非人源化抗体,人源化抗体对人的免疫原性通常较低,并因此在某些情况下提供治疗益处。例如,所述抗体恒定区可以被工程化为使得其为免疫惰性的(例如,不触发补体裂解)。参见例如,PCT公开号PCT/GB99/01441;UK专利申请号9809951.8,将其每一篇通过引用以其整体并入本文。本领域技术人员将意识到人源化抗体,并且还将意识到用于产生它的合适技术。参见例如,Hwang, W.Y.K., 等人, Methods 36:35, 2005; Queen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033, 1989; Jones等人, Nature, 321:522-25, 1986; Riechmann等人, Nature, 332:323-27, 1988; Verhoeyen等人, Science, 239:1534-36, 1988; Orlandi等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3833-37, 1989; 美国专利号5,225,539、5,530,101、5,585,089、5,693,761、5,693,762、6,180,370;以及Selig等人, WO 90/07861, 将其每一篇通过引用以其整体并入本文。还可以利用的人源化抗体的其他方法披露于以下文献中: Daugherty等人, Nucl. Acids Res. 19:2471-2476, 1991; 和美国专利号6,180,377、6,054,297、5,997,867、5,866,692、6,210,671和6,350,861;以及PCT公开号WO 01/27160, 将其每一篇通过引用以其整体并入本文。例如,本发明的抗ASC抗体或抗ASC抗原结合片段可以包含VH区氨基酸序列,所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3;和VL区氨基酸序列,所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3;以及一个或多个个人框架区序列。

[0158] 在一些实施方案中,本发明的抗体是嵌合抗体并特异性地结合ASC。在一些情况下,所述抗ASC嵌合抗体降低ASC的活性。如本文所用的术语“嵌合抗体”是指已被工程化为包含至少一个人恒定区的抗体。例如,小鼠抗体(例如,小鼠单克隆抗体)的一个或两个轻链的一个或全部可变区和/或一个或两个重链的一个或全部可变区可以各自与人恒定区(如但不限于IgG1人恒定区)连接。相对于非嵌合抗体,嵌合抗体对人的免疫原性通常较低,并因此在某些情况下提供治疗益处。本领域技术人员将意识到嵌合抗体,并且还将意识到用

于产生它的合适技术。参见例如,Cabilly等人,美国专利号4,816,567;Shoemaker等人,美国专利号4,978,775;Beavers等人,美国专利号4,975,369;以及Boss等人,美国专利号4,816,397,将其每一篇通过引用以其整体并入本文。例如,本发明的抗体或抗原结合片段可以包含含有SEQ ID NO:22的VH区、含有SEQ ID NO:31的VL区和人恒定区。

[0159] 如本文所用,术语“免疫结合”和“免疫结合特性”是指在免疫球蛋白分子(例如,抗体)与免疫球蛋白特异性针对的抗原之间发生的非共价相互作用类型。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以表示为相互作用的解离常数(K_d),其中较小的 K_d 表示较大的亲和力。可以使用本领域熟知的方法定量所选多肽的免疫结合特性。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及同样影响两个方向上的速率的几何参数。因此,“缔合速率常数”(K_{on})和“解离速率常数”(K_{off})二者均可以通过计算浓度和实际的缔合和解离速率来确定。(参见Nature 361:186-87(1993))。 K_{off}/K_{on} 的比率使得能够取消所有与亲和力无关的参数,并且等于解离常数 K_d 。(通常参见Davies等人(1990)Annual Rev Biochem 59:439-473)。当平衡结合常数(K_d)为 $\leq 10\mu\text{M}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 和 $\leq 100\text{pM}$ 至约 1pM 时,如测定(如放射性配体结合测定或本领域技术人员已知的类似测定)所测量,本发明的抗体被称为与表位(例如,具有氨基酸SEQ ID NO:5的ASC片段)特异性结合。

[0160] 在某些方面,本发明的抗体是单价或二价的,并且包含单链或双链。功能上,抗体的结合亲和力可以在 10^{-5}M 至 10^{-12}M 的范围内。例如,抗体的结合亲和力为从 10^{-6}M 至 10^{-12}M 、从 10^{-7}M 至 10^{-12}M 、从 10^{-8}M 至 10^{-12}M 、从 10^{-9}M 至 10^{-12}M 、从 10^{-5}M 至 10^{-11}M 、从 10^{-6}M 至 10^{-11}M 、从 10^{-7}M 至 10^{-11}M 、从 10^{-8}M 至 10^{-11}M 、从 10^{-9}M 至 10^{-11}M 、从 10^{-10}M 至 10^{-11}M 、从 10^{-5}M 至 10^{-10}M 、从 10^{-6}M 至 10^{-10}M 、从 10^{-7}M 至 10^{-10}M 、从 10^{-8}M 至 10^{-10}M 、从 10^{-9}M 至 10^{-10}M 、从 10^{-5}M 至 10^{-9}M 、从 10^{-6}M 至 10^{-9}M 、从 10^{-7}M 至 10^{-9}M 、从 10^{-8}M 至 10^{-9}M 、从 10^{-5}M 至 10^{-8}M 、从 10^{-6}M 至 10^{-8}M 、从 10^{-7}M 至 10^{-8}M 、从 10^{-5}M 至 10^{-7}M 、从 10^{-6}M 至 10^{-7}M 或从 10^{-5}M 至 10^{-6}M 。

[0161] 通过竞争性抑制确定单克隆抗体特异性和亲和力的方法可以见于以下文献:Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,冷泉港,纽约,1988;Colligan等人,编辑,Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc.和Wiley Interscience,纽约,(1992,1993);和Muller, Meth.Enzymol.92:589-601,1983,将所述参考文献通过引用整体并入本文。

[0162] 本发明的抗炎性小体(例如,抗ASC和抗AIM2)抗体可以根据例如但不限于以下的方法常规地制备:用多肽或抗原片段接种适当的动物、体外刺激淋巴细胞群、合成方法、杂交瘤和/或表达编码此类抗ASC或抗NLR1抗体的核酸的重组细胞。使用纯化的重组ASC或其肽片段(例如,大鼠ASC(例如,登录号BAC43754)的残基178-193(SEQ ID NO:1)、人ASC的SEQ ID NO:2或人ASC(例如,登录号NP_037390.2)的残基21-41(SEQ ID NO:5)对动物进行免疫是制备抗ASC抗体的方法的例子。类似地,使用纯化的重组NLRP1或其肽片段(例如,大鼠NALP1的残基MEE SQS KEE SNT EG-cys(SEQ ID NO:4)或人NALP1的SEQ ID NO:3对动物进行免疫是一种制备抗NLRP1抗体的方法的例子。

[0163] 特异性地结合ASC或NLRP1的单克隆抗体可以通过本领域技术人员已知的方法获得。参见例如,Kohler和Milstein,Nature 256:495-497,1975;美国专利号4,376,110;Ausubel等人,编辑,Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing

Assoc.和Wiley Interscience,纽约,(1987,1992);Harlow和Lane ANTIBODIES:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press,冷泉港,纽约,1988;Colligan等人,编辑,Current Protocols in Immunology,Green Publishing Assoc.和Wiley Interscience,纽约,(1992,1993),将所述文献的内容通过引用整体并入本文。此类抗体可以属于任何免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgE、IgA、GILD及其任何亚类。可以在体外、原位或在体内培养产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤。在一个实施方案中,产生本公开文本的抗ASC单克隆抗体的杂交瘤是ICCN1.0H杂交瘤。在另一个实施方案中,产生本公开文本的抗ASC单克隆抗体的杂交瘤产生包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的单克隆抗体,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,或在HCDR1、HCDR2和/或HCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。在另一个实施方案中,产生本公开文本的抗ASC单克隆抗体的杂交瘤产生包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的单克隆抗体,其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3,或在LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。在又另一个实施方案中,产生本公开文本的抗ASC单克隆抗体的杂交瘤产生包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的单克隆抗体,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,或在HCDR1、HCDR2和/或HCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3,或在LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。

[0164] 组合物的施用

[0165] 可以将本发明的组合物以任何合适的配制品向哺乳动物(例如,啮齿动物、人)施用。例如,抗ASC抗体可配制在药学上可接受的载体或稀释剂(如生理盐水或缓冲盐溶液)中。可基于施用模式和途径以及标准药学实践来选择合适的载体和稀释剂。示例性药学上可接受的载体和稀释剂以及药物配制品的描述可发现于Remington's Pharmaceutical Sciences(此领域的标准文本)和USP/NF中。可向组合物中添加其他用以稳定和/或保存所述组合物的物质。

[0166] 可通过任何常规技术向哺乳动物施用本发明的组合物。通常,这种施用将是通过吸入或肠胃外(例如,静脉内、皮下、瘤内、肌肉内、腹膜内或鞘内引入)进行的。还可将所述组合物通过例如外科手术递送至内部或外部靶位点或通过导管递送至血管可接近的位点来直接施用至靶位点。可以将所述组合物通过单次推注、多次注射或通过连续输注(例如,静脉内、通过腹膜透析、泵输注)施用。对于肠胃外施用,所述组合物可以以无菌无热原形式配制。

[0167] 有效剂量

[0168] 可以将上述组合物以有效量(即,能够在经治疗的哺乳动物中产生所希望结果(例如,减少经受CNS的创伤性损伤或中风或患有自身免疫疾病、自身炎症性疾病、代谢疾病、神经变性疾病或CNS疾病的哺乳动物的CNS中的炎症)的量)施用于哺乳动物(例如,大鼠、人)。可如下所述地确定有这种治疗有效量。包含如本文提供的药剂(例如,如本文提供的单克隆抗体或由其衍生的抗体片段,例如像IC 100)的组合物的治疗有效量通常可以为约0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、4、6、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、

80、85、90、95、100、125、150、175或200mg/kg患者体重。包含如本文提供的药剂(例如,如本文提供的单克隆抗体或由其衍生的抗体片段,例如IC 100)的组合物的治疗有效量通常可以为约0.001至约200mg/kg患者体重。包含如本文提供的药剂(例如,如本文提供的单克隆抗体或由其衍生的抗体片段,例如像IC 100)的组合物的治疗有效量通常可以为约0.001mg/kg至约0.01mg/kg、约0.01mg/kg至约0.1mg/kg、约0.1mg/kg至约1mg/kg、约1mg/kg至约10mg/kg、约10mg/kg至约25mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约50mg/kg至约75mg/kg、约75mg/kg至约100mg/kg、约100mg/kg至约125mg/kg、约125mg/kg至约150mg/kg、约150mg/kg至约175mg/kg或约175mg/kg至约200mg/kg受试者体重。可以将包含如本文提供的药剂(例如,如本文提供的单克隆抗体或由其衍生的抗体片段,例如像IC 100)的组合物以单剂量或多剂量施用。

[0169] 用于本发明方法的组合物的毒性和治疗功效可以通过如下标准药理学程序来确定:使用培养细胞或实验动物中的细胞来确定LD₅₀(对50%群体致死的剂量)。在毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且其可表示为LD₅₀/ED₅₀的比率。在一些情况下,本文提供的组合物展现出大的治疗指数。虽然可使用那些表现出毒副作用的组合物,但应注意可设计一种最小化此类副作用的潜在损害的递送系统。在一些情况下,本文提供的组合物的剂量落在包括ED₅₀且极小或无毒性的范围内。剂量可取决于所采用的剂型和所利用的施用途径而在这个范围内变化。

[0170] 如在医学和兽医领域中熟知的,用于任何一个受试者的剂量取决于许多因素,包括受试者的尺寸、体表面积、年龄、待施用的具体组合物、施用时间和途径、一般健康状况以及同时施用的其他药物。

[0171] 实施例

[0172] 通过以下具体实施例进一步说明本发明。提供所述实施例仅用于说明,并且不应解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0173] 实施例1:EV介导的炎性小体信号传导在TBI后ALI中的作用及其中和作用的影响

[0174] 肺功能障碍经常表现为严重创伤性脑损伤的并发症(1)。大约20%-25%的TBI受试者发展急性肺损伤(ALI)(2),但介导TBI诱导的ALI病理的机制仍然定义不明确。先前的文献支持以下观点:TBI后肺功能障碍是由于对颅内压升高的交感神经反应导致心肺功能障碍(42)。然而,最近的研究表明,全身炎症反应在TBI诱导的肺损伤中也起着关键作用(43)。具体地, HMGB1-RAGE配体受体途径作为TBI后肺功能障碍的中枢转导机制(8)。此外, HMGB1诱导AIM2炎性小体激活(37)。此外,先前的文献揭示病原体分泌携带DAMP(如HMGB1)的EV,并触发炎症(Buzas等人,2014)。各种研究表明,早在损伤后3-6小时,TBI后血脑屏障(BBB)是可渗透的,导致脑与血管内隔室之间的保护屏障受损,并导致蛋白质和流体渗漏(44)。损伤后BBB的破坏导致炎症介质(如DAMP)的分泌,这可能进一步导致脑部炎症并损伤远端器官(5)。几种炎症介质可作为脑损伤的明确标记物,然而其有效性尚未被广泛接受(45)。此外,目前还没有针对TBI诱导的ALI的临床批准的治疗或生物标记物。最近,EV已成为几种不同类型疾病(包括肺损伤(46)和TBI(47))的生物标记物研究中感兴趣的领域。先前已表明,在从患有TBI的患者的脑脊液分离的EV中,当与对照样品相比时,炎性小体蛋白质增加(14)。在此实施例中,检查了EV介导的炎性小体信号传导在TBI诱导的ALI的病因学中的贡献。

[0175] 材料和方法**[0176] 动物和创伤性脑损伤**

[0177] 所有动物程序均由迈阿密大学米勒医学院 (University of Miami Miller School of Medicine) (动物福利保证A3224-01) 的机构动物护理及使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准, 并根据实验动物护理及使用 (Care and Use of Laboratory Animals) 的NIH指南进行。在进行这项研究时遵循了ARRIVE指南。所有C57/BL6小鼠均为8-12周和24至32克。将小鼠前瞻性随机分组至用于TBI的实验组 (假手术、4h、24h)、用于过继转移和治疗的实验组 (原初、假手术-盐水、未治疗、依诺肝素、抗ASC)。对于TBI实验组, 假手术动物接受外科手术但未受损伤。对于过继转移治疗研究, 假手术-盐水组接受外科手术并接受盐水作为运载体治疗。原初动物不接受外科手术。基于功效分析 (使用G*功效分析, 其中效果大小 $F=0.85$, α 设定为0.05) 和历史数据^{49,50}, 每组使用5至6个的样品大小。将所有小鼠圈养在迈阿密大学的Lois Pope生命中心的无病毒抗原 (VAF) 动物设施中, 进行12小时光照/黑暗循环, 并随意提供食物和水。所述设施每周两次进行饲养程序, 并且每天检查动物的状况。在我们的手术室中在手术后观察动物, 将它们保持在加热垫上, 并用直肠探针控制体温, 使其保持在37°C下, 并且然后转移到动物宿舍。

[0178] 在手术之前, 用氯胺酮和甲苯噻嗪 (腹膜内, i.p.) 麻醉动物。然后将麻醉的动物置于加热垫上以确保体温为37°C。使用受控皮层撞击 (CCI) 模型进行TBI。在右侧皮质 (后部-2.5mm、前窗侧部2.0mm) 上进行5mm开颅术。使用ECCI-6.3装置 (Custom Design & Fabrication, Richmond, VA, USA) 诱导损伤, 其中3mm的撞击承受器为6m/s的速度、0.8mm的深度和150ms的撞击持续时间 (15)。在这些程序后, 将动物放回笼中并给予食物和水。如上所述, 在TBI后4小时和24小时处死动物。将假手术动物麻醉并使其经受与受损动物相同的手术前切口但未经历开颅术或挫伤。

[0179] 组织收集

[0180] 在灌注之前, 用氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉所有动物。随后对动物进行气管灌注。使用气管导管在20cm H₂O下对肺注入4%多聚甲醛 (PFA), 并且然后在4°C下在4% PFA中固定过夜。将固定肺组织用石蜡包埋, 并处理5 μ m切片 (16)。收集右肺组织用于蛋白质分离和分子分析。然后使动物接受断头处死并收集右侧皮质组织用于蛋白质分离和分子分析。

[0181] 焦亡小体分离测定

[0182] 将小鼠肺组织裂解物通过5 μ m低结合聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore) 过滤。在过滤后, 将上清液以2,700xg离心8分钟。将沉淀重悬于40 μ l 3[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-丙磺酸 (CHAPS) 缓冲液 (20mmol/L HEPES-KOH, pH 7.5, 5mmol/L MgCl₂, 0.5mmol/L EGTA, 0.1mmol/L 苯甲基磺酰氟, 蛋白酶抑制剂混合物和0.1% CHAPS) 中。通过以2,700xg离心8分钟来沉淀焦亡小体。然后将沉淀重悬浮并在27.8 μ l CHAPS缓冲液中与2.2 μ l二琥珀酰亚胺基底物 (9) 在室温下孵育30分钟以交联ASC二聚体。最后, 添加等量的2x Laemmli缓冲液, 并使用可商购的针对ASC和消皮素D (GSD) 的抗体通过免疫印迹分析蛋白质。

[0183] 细胞核和细胞质提取

[0184] 根据制造商的说明, 使用NE-PER细胞核和细胞质提取试剂 (Thermo Scientific) 提取细胞核和细胞质级分。简而言之, 将小鼠肺组织样品切成20-100mg碎片并以500x g离

心5分钟。将组织碎片用细胞质提取试剂均化,并以16,000x g离心5分钟。然后除去上清液(细胞提取物),并用细胞核提取试剂(Thermo Scientific)将沉淀以16,000x g离心10分钟。此上清液对应于细胞核级分,将其除去并储存在-80℃℃下。

[0185] 免疫印迹

[0186] 将肺和脑组织样品在液氮中快速冷冻并储存在-80℃下。将右下肺和右皮质组织的2mm切片在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Sigma, St Louis, MO, USA)的提取缓冲液中均化,并如de Rivero Vaccari等人2015(13)所述,使用针对半胱天冬酶-1(Novus Biologicals)、ASC(Santa Cruz)、IL-1 β (Cell Signaling)、IL-18(Abcam)、AIM2(Santa Cruz)和HMGB1(Millipore)的抗体在4%-20%Tris-TGX Criterion预制凝胶(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)中分解。使用Image Lab进行条带密度的量化,并将所有数据归一化为 β -肌动蛋白。

[0187] 免疫组织化学

[0188] 将组织切片在二甲苯中脱石蜡,并且然后使用乙醇和Tris缓冲盐水再水化。然后如前所述进行免疫组织化学程序以进行双重染色(16)。将切片在4℃下与针对半胱天冬酶-1和ASC(Millipore)、AIM2(Santa Cruz)、HMGB1(Millipore)和SPC(Millipore)的抗体一起孵育过夜。用Zeiss激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA)检查假手术、4小时和24小时小鼠的免疫染色肺切片。由对分组不知情的个体分析肺切片。

[0189] EV分离

[0190] 根据制造商的说明书(Invitrogen),使用总外泌体分离溶液从TBI损伤的小鼠和损伤小鼠的血清分离EV。简而言之,将100 μ l每种样品以2000x g离心30分钟。然后将上清液与20 μ l总外泌体分离(TEI)试剂在4℃下孵育30分钟,随后在室温下以10,000x g离心10分钟。弃去上清液,并且将沉淀重悬于100 μ l PBS中。EV由CD81的表达和Nanosight跟踪分析来表征(图6)。

[0191] EV的过继转移

[0192] 将来自C57BL-6TBI和假手术小鼠的血清来源的EV通过颈静脉以 1.0×10^{10} 个颗粒/克/体重⁴⁸的剂量注射到原初C57BL-6小鼠中。通过Nanosight跟踪分析测量颗粒计数,并相应地稀释样品。在手术之前,用氯胺酮和二甲苯麻醉动物。在颌骨与锁骨之间切开1-2cm的切口。将颈静脉抬高并系紧,随后放置导管。转移血清来源的EV并在注射后24小时收集肺和脑组织用于分析(n=5)。

[0193] 依诺肝素和抗ASC治疗

[0194] 将来自TBI小鼠的血清来源的EV通过颈静脉注射来注射到原初C57-BL6小鼠中。1小时后,将依诺肝素(3mg/kg)(n=4)和抗ASC(IC100;5mg/kg)(n=4)施用于受体动物。使用以下分组:1)原初组未接受治疗,2)假手术盐水组用作阴性对照并且仅接受颈静脉注射盐水,3)未治疗组接受来自未经任何治疗的TBI小鼠的EV,并用作阳性对照,4)ENOX组接受来自TBI小鼠的EV和依诺肝素,和5)抗ASC组接受来自TBI小鼠的EV和抗ASC。治疗的顺序是随机化的。注射后24小时收集肺和脑组织用于分析。应注意,在治疗实验中使用的抗ASC抗体是针对ASC的人源化单克隆抗体并且识别鼠、人和猪ASC。

[0195] 组织学与肺损伤评分

[0196] 通过标准苏木精和伊红方法对肺组织切片进行染色,用于组织学、形态测定和ALI

评分。使用来自美国胸科协会研讨会报告的肺损伤评分系统,由不知情的病理学家对肺切片进行评分(17)。选择20个随机高倍视野进行评分。ALI评分的标准是基于肺泡腔中的中性粒细胞数、间质空间、透明膜、填充空气空间的蛋白质碎片和肺泡间隔增厚。基于这些标准,给出了0(无损伤)与1(严重损伤)之间的得分。

[0197] 统计分析

[0198] 使用针对两组的学生T检验和单向ANOVA以及针对两个或更多个组的Tukey多重比较检验(GraphPad Prism版本7.0)分析数据。将D'Agostino-Pearson检验用于检验正态性。数据表示为平均值 \pm SEM。使用的显著性P值是 $*p<0.05$ 。

[0199] 结果

[0200] 严重TBI增加小鼠脑中的AIM2炎性小体蛋白和HMGB1表达

[0201] 过量的促炎细胞因子IL-1 β 和IL-18以及炎性小体蛋白与液压脑损伤后继发性损伤相关(18)。为了确定严重CCI是否诱导促炎细胞因子的加工和炎性小体蛋白水平的改变,分析皮质裂解物,然而对严重TBI中的炎性小体激活的研究有限。在该实施例中,在严重CCI后,检查损伤后4小时和24小时皮质裂解物的半胱天冬酶-1(图1A、图1B) ($p<0.001$)、ASC(图1A、图1C) ($p=0.003$)、IL-18(图1A、图1D) ($p=0.0042$)、AIM2(图1A、图1F) ($p=0.0197$)和IL-1 β (图1A、图1G) ($p=0.0141$)水平。半胱天冬酶-1、ASC、AIM2和IL-1 β 的水平在CCI后4小时达到峰值并在24小时降低。炎症细胞因子成熟的时间历程略有不同,其在TBI后24小时达到峰值。由于其他蛋白质已显示出炎性小体DAMP HMGB1激活AIM2炎性小体的作用,因此在皮质裂解物中也测定了这些蛋白质的水平。如图1A、图1E所示,CCI在损伤后4小时和24小时诱导HMGB1水平的显著增加(图1A、图1E) ($p=0.0121$)。这些数据表明,在小鼠严重CCI后,AIM2炎性小体蛋白的水平在损伤后皮质中显著升高。

[0202] 严重TBI增加小鼠肺上的AIM2炎性小体蛋白和HMGB1表达

[0203] 为了确定CCI是否在肺中诱导炎性小体激活,进行肺裂解物的半胱天冬酶-1(图1H、图1I) ($p=0.0026$)、ASC(图1H、图1J) ($p=0.0427$)、IL-18(图1H、图1K) ($p=0.0025$)、IL-1 β (图1H、图1N) ($p=0.0012$)和AIM2(图1H、图1M) ($p<0.001$)和NLRP3($p=0.0047$) (补充图1)的免疫印迹分析。与假手术对照相比,在损伤后4小时和24小时,半胱天冬酶-1、ASC、IL-18和AIM2的增加水平显著提高。然而,蛋白质表达增加的时间历程与在脑中观察到的时间历程略有不同,它们在CCI后24小时达到峰值。由于HMGB1-RAGE轴在TBI诱导肺功能障碍的机制中起作用(8),因此分析肺裂解物的HMGB1蛋白表达水平。图1H、图1L ($p=0.0158$)显示在TBI后4小时和24小时HMGB1表达增加,这表明AIM2炎性小体和HMGB1在TBI后肺中的炎症反应中起作用。

[0204] TBI诱导小鼠肺中的细胞焦亡

[0205] 如前所示,皮质神经元中AIM2炎性小体的激活导致细胞焦亡性细胞死亡(19)。为了研究TBI是否导致小鼠肺组织中的细胞焦亡,在TBI后分离肺组织中的焦亡小体。在损伤后4小时处死的TBI动物显示出与假手术动物相比ASC寡聚化的证据(图4A)。在TBI动物中观察到ASC二聚体和三聚体(分别为50、75kDA)。这些结果表明了焦亡小体的形成,其可通过ASC寡聚物的超分子组装来表征。此外,与假手术相比,在激活半胱天冬酶-1后被切割并触发细胞焦亡和释放IL-1 β (20)的消皮素D(GSDMD)在TBI动物的肺中显著增加(图4B和图4C) ($p=0.0001$)。这些发现表明,在TBI后,细胞焦亡有助于肺组织中的细胞死亡。

[0206] TBI增加II型肺泡上皮细胞中炎性小体蛋白的免疫反应性

[0207] TBI可能导致毛细血管渗漏,从而导致血管通透性增加,并对专门的肺泡上皮细胞(称为II型肺细胞)造成损害(5)。为了检查TBI对损伤后肺中炎性小体表达的细胞效应,在假手术、4小时和24小时受损动物的肺切片中进行免疫组织化学分析。已知II型肺泡上皮细胞是ALI中损伤的主要肺细胞类型(17)。用针对AIM2、半胱天冬酶-1和ASC(绿色)的抗体对肺切片进行染色,并用Pro-表面活性蛋白C(Pro-SPC,红色)(其为II型上皮细胞的标记物)和DAPI细胞核染色(蓝色)共染色。如图2A-图2C所示,活性半胱天冬酶-1(图2A)、ASC(图2B)以及AIM2(图2C)存在于SPC阳性细胞(箭头)中。TBI后这些炎性小体蛋白的免疫反应性增加。这些发现表明炎性小体蛋白在II型肺泡上皮细胞中表达,并且TBI导致这些细胞中的免疫反应性增加。

[0208] TBI增加细胞核和细胞质HMGB1表达

[0209] 为了确定TBI后肺细胞中HMGB1的细胞分布,分离来自肺匀浆的细胞核和细胞质级分(图3A、图3C) ($p=0.0337$)。免疫印迹表明两种级分在TBI后4小时HMGB1表达显著增加(图3B、图3D) ($p=0.0345$)。还进行了HMGB1的免疫组织化学分析以确定TBI后肺切片中免疫反应性的变化。针对HMGB1(绿色)和SPC(红色)以及DAPI细胞核染色(蓝色)对切片进行共染色。当与假手术相比时,HMGB1的免疫反应性在4小时和24小时增加。在SPC阳性细胞中观察到HMGB1的弱免疫反应性(箭头)(图3E);因此,提示损伤肺组织中HMGB1的变化可能是细胞质的。

[0210] TBI诱导肺形态的变化并诱导ALI

[0211] ALI的特征可在于炎症过程,其导致肺泡和间质性水肿以及炎性细胞浸润到肺泡腔中(23)。肺组织的组织病理学分析(图5A)表明严重TBI在损伤后4和24小时引起肺结构和形态学显著变化。假手术动物显示出正常的肺泡形态,而受损动物显示出肺泡水肿的急剧变化,但在损伤后24小时略有下降(长箭头)。此外,存在两个时间点处中性粒细胞浸润(箭头)和肺泡毛细血管膜形态学变化(*)的证据。受损动物显示出间质性水肿的迹象,其在损伤后4小时更明显,但在损伤后24小时仍然明显(短箭头)。最后,受损动物还显示出间质区域和肺泡间隔增厚(磅,#)的证据。

[0212] 为了确认严重损伤诱导ALI,使用由美国胸科协会定义的ALI评分系统分析组织切片(17)。此系统基于以下证据:中性粒细胞浸润到肺泡和间质空间中、透明膜形成、填充空气空间的蛋白质碎片和肺泡间隔增厚(17)。与假手术相比,这些特征在受损动物中显著升高,并且TBI动物中的ALI得分总体上更高(图5B) ($p=0.0017$)。

[0213] 在过继转移来自TBI小鼠的EV后依诺肝素和抗ASC抗体治疗显著减少炎性小体表达和ALI

[0214] 为了提供在TBI后可释放到循环中的EV及其转运物可在肺中诱导炎性小体激活的证据,使用来自严重CCI小鼠的血清衍生的EV进行经典的过继转移实验。使用EV标记物CD81的蛋白质印迹验证EV制剂(图6)。对照接受从假手术或原初动物分离的EV。如图7A-图7F所示,当与接受来自未受损或原初小鼠或原初小鼠的EV的动物肺相比时,接受来自TBI受损动物的EV的动物肺中的活性半胱天冬酶-1(图7A、图7B)、ASC(图7A、图7C)、IL-18(图7A、图7D)、AIM2(图7A、图7E)和HMGB1(图7A、图7F)显著升高。此外,在来自TBI小鼠的EV处理的肺中,炎性细胞的浸润(箭头)是明显的(图7G)。最后,接受来自受损小鼠的EV的动物的ALI

得分也显著更高(图7G)。这些研究为神经-呼吸-炎症小体轴提供了证据,其中在TBI激活肺靶细胞中的炎症小体后EV释放到循环中有助于ALI的发病机理。

[0215] 接下来,在将EV从受损小鼠过继转移至原初小鼠后,通过用依诺肝素或针对ASC的单克隆抗体(IC 100)治疗来尝试外泌体摄取阻断。阴性对照动物接受盐水,并且阳性对照动物未接受治疗。如图8A-图8F所示,在用依诺肝素或人源化单克隆抗ASC抗体(例如IC 100抗体)治疗后,半胱天冬酶-1(图8A、图8B)、ASC(图8A、图8C)、IL-1 β (图8A、图8D)、AIM2(图8A、图8E)和HMGB1(图8A、图8F)与未治疗(阳性对照)组相比显著降低($p < 0.0001$)。此外,H&E染色的肺切片显示中性粒细胞浸润到肺泡和间质空间中的显著减少,以及没有间隔增厚的迹象(图9A-图9D)。与未治疗组相比,用依诺肝素和抗ASC抗体(IC 100)治疗的动物的ALI评分显著更低(图9E) ($p < 0.0001$)。因此,在TBI后EV释放到循环中在导致ALI的肺细胞中的炎症小体激活中起作用。

[0216] 结论:

[0217] TBI可能与某些医学并发症、尤其是肺和中枢神经系统功能障碍的较高发生率相关。在该实施例中,显示严重TBI增加皮质和肺组织中的HMGB1和炎症小体表达(例如,AIM2、半胱天冬酶-1和ASC表达)并诱导与ALI一致的肺形态学变化(例如,中性粒细胞浸润到肺泡和间质空间中、肺泡间隔增厚、肺泡水肿和出血),并介绍神经呼吸炎症轴(Neural Respiratory Inflammatory Axis)的观点。重要的是,TBI导致肺组织中的细胞焦亡(例如,存在GSDMD切割)和II型肺泡上皮细胞中炎症小体蛋白的表达增加。另外,来自TBI小鼠的EV的过继转移激活炎症小体并诱导ALI,表明脑损伤诱导含有一堆炎症小体蛋白的EV的释放,然后进行到导致ALI。此外,结果表明通过抑制EV摄取(依诺肝素)和炎症小体激活(抗ASC抗体(IC 100)治疗),炎症小体蛋白表达和ALI的发展均降低。

[0218] 总之,此实施例表明AIM2炎症小体信号传导在TBI后肺损伤的病理机制中起核心作用,并证明TBI诱导的ALI涉及EV介导的炎症小体信号传导的机制。这些数据提供了以下证据:EV介导的炎症小体信号传导可发挥涉及神经元-呼吸-炎症轴的核心作用。因此,用针对炎症小体蛋白的抗体或阻断EV摄取的药物靶向此轴可在重症监护医学的所有领域中提供神经创伤诱导的ALI的治疗方法。鉴于这些结果,所公开的治疗策略通常可用于治疗肺的炎症性疾病。

[0219] 通过引用并入

[0220] 出于所有目的,以下参考文献通过引用以其整体并入。

[0221] 1.Pfeifer R,et al.(2015)Development of a standardized trauma-related lung injury model.J Surg Res 196(2):388-394.

[0222] 2.Summers CR,Ivins B,&Schwab KA(2009)Traumatic brain injury in the United States:an epidemiologic overview.The Mount Sinai journal of medicine, New York 76(2):105-110.

[0223] 3.Erickson SE,et al.(2009)Recent trends in acute lung injury mortality:1996-2005.Crit Care Med 37(5):1574-1579.

[0224] 4.Nicolls MR&Laubach VE(2014)Traumatic brain injury:lungs in a RAGE.Sci Transl Med 6(252):252fs234.

[0225] 5.Rincon F,et al.(2012)Impact of acute lung injury and acute

respiratory distress syndrome after traumatic brain injury in the United States. *Neurosurgery* 71(4):795-803.

[0226] 6. Andersson U & Rauvala H (2011) Introduction: HMGB1 in inflammation and innate immunity. *J Intern Med* 270(4):296-300.

[0227] 7. Weber DJ, et al. (2014) The HMGB1-RAGE axis mediates traumatic brain injury-induced pulmonary dysfunction in lung transplantation. *Sci Transl Med* 6(252):252ra124.

[0228] 8. Lu B, et al. (2012) Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 488(7413):670-674.

[0229] 9. de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, & Keane RW (2014) Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 34(3):369-375.

[0230] 10. Ware LB & Matthay MA (2000) The Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* 342(18):1334-1349.

[0231] 11. Yanez-Mo M, et al. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4:27066.

[0232] 12. Qu Y, Franchi L, Nunez G, & Dubyak GR (2007) Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 179(3):1913-1925.

[0233] 13. de Rivero Vaccari JP, et al. (2015) Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury. *J Neurochem. Jan;136 Suppl 1*:39-48. doi:10.1111/jnc.13036.

[0234] 14. Atkins CM, Cepero ML, Kang Y, Liebl DJ, & Dietrich WD (2013) Effects of early rolipram treatment on histopathological outcome after controlled cortical impact injury in mice. *Neurosci Lett* 532:1-6.

[0235] 15. Wu S, et al. (2010) Conditional overexpression of connective tissue growth factor disrupts postnatal lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 42(5):552-563.

[0236] 16. Matute-Bello G, et al. (2011) An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44(5):725-738.

[0237] 17. de Rivero Vaccari JP, et al. (2009) Therapeutic neutralization of the NLRP1 inflammasome reduces the innate immune response and improves histopathology after traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral*

Blood Flow and Metabolism 29(7):1251-1261.

[0238] 18.Adamczak SE,et al.(2014)Pyroptotic neuronal cell death mediated by the AIM2 inflammasome.Journal of cerebral blood flow and metabolism:official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 34(4):621-629.

[0239] 19.Liu X,et al.(2016)Inflammasome-activated gasdermin Dcauses pyroptosis by forming membrane pores.Nature 535(7610):153-158.

[0240] 20.Dolinay T,et al.(2012)Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury.Am J Respir Crit Care Med 185(11):1225-1234.

[0241] 21.Muller MC,et al.(2014)Contribution of damage-associated molecular patterns to transfusion-related acute lung injury in cardiac surgery.Blood transfusion=Trasfusione del sangue 12(3):368-375.

[0242] 22.Ragaller M&Richter T(2010)Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome.Journal of emergencies,trauma,and shock 3(1):43-51.

[0243] 23.Lee K&Rincon F(2012)Pulmonary complications in patients with severe brain injury.Critical care research and practice 2012:207247.

[0244] 24.Yasui H,Donahue DL,Walsh M,Castellino FJ,&Ploplis VA(2016)Early coagulation events induce acute lung injury in a rat model of blunt traumatic brain injury.American journal of physiology.Lung cellular and molecular physiology 311(1):L74-86.

[0245] 25.Hendrickson CM,et al.(2016)The acute respiratory distress syndrome following isolated severe traumatic brain injury.J Trauma Acute Care Surg.

[0246] 26.Cross LJ&Matthay MA(2011)Biomarkers in acute lung injury:insights into the pathogenesis of acute lung injury.Crit Care Clin 27(2):355-377.

[0247] 27.Butt Y,Kurdowska A,&Allen TC(2016)Acute Lung Injury:A Clinical and Molecular Review.Archives of pathology&laboratory medicine 140(4):345-350.

[0248] 28.Luh SP&Chiang CH(2007)Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS):the mechanism,present strategies and future perspectives of therapies.Journal of Zhejiang University.Science.B 8(1):60-69.

[0249] 29.Matute-Bello G&Martin TR(2003)Science review:apoptosis in acute lung injury.Critical care 7(5):355-358.

[0250] 30.Miao EA,Rajan JV,&Aderem A(2011)Caspase-1-induced pyroptotic cell death.Immunological reviews 243(1):206-214.

[0251] 31.Hornung V,et al.(2009)AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC.Nature 458(7237):514-518.

[0252] 32.Lam NY,Rainer TH,Chan LY,Joynt GM,&Lo YM(2003)Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients.Clinical chemistry 49(8):1286-1291.

- [0253] 33.Fernandes-Alnemri T&Alnemri ES (2008) Assembly, purification, and assay of the activity of the ASC pyroptosome. *Methods Enzymol* 442:251-270.
- [0254] 34.Man SM&Kanneganti TD (2016) Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 16(1):7-21.
- [0255] 35.Liu L, et al. (2014) HMGB1-DNA complex-induced autophagy limits AIM2 inflammasome activation through RAGE. *Biochem Biophys Res Commun* 450(1):851-856.
- [0256] 36.Hoesch RE, et al. (2012) Acute lung injury in critical neurological illness. *Critical care medicine* 40(2):587-593.
- [0257] 37.Kalsotra A, Zhao J, Anakk S, Dash PK, & Strobel HW (2007) Brain trauma leads to enhanced lung inflammation and injury: evidence for role of P4504Fs in resolution. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27(5):963-974.
- [0258] 38.Hay (2015) Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans. *J Neuropathol Exp Neurol* 74(12):1147-1157.
- [0259] 39.Zygun DA, Kortbeek JB, Fick GH, Laupland KB, & Doig CJ (2005) Non-neurologic organ dysfunction in severe traumatic brain injury. *Critical care medicine* 33(3):654-660.
- [0260] 40.Peltz ED ME, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Johnson JL, Sauaia A, Silliman CC, Banerjee A, Abraham E. (2009) HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock* 32(1):17-22.
- [0261] 41.Chi W, et al. (2015) HMGB1 promotes the activation of NLRP3 and caspase-8 inflammasomes via NF-kappaB pathway in acute glaucoma. *Journal of neuroinflammation* 12:137.
- [0262] 42.Woodcock T & Morganti-Kossmann MC (2013) The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Frontiers in neurology* 4:18.
- [0263] 43.Monsel A, Zhu YG, Gudapati V, Lim H, & Lee JW (2016) Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert opinion on biological therapy* 16(7):859-871.
- [0264] 44.Taylor DD & Gercel-Taylor C (2014) Exosome platform for diagnosis and monitoring of traumatic brain injury. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369(1652).
- [0265] 45.Guo H, Callaway JB, & Ting JP (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine* 21(7):677-687.
- [0266] 46.Silverman WR, et al. (2009) The pannexin 1 channel activates the

inflammasome in neurons and astrocytes. The Journal of biological chemistry 284(27):18143-18151.

[0267] 47. Tomura S, de Rivero Vaccari JP, Keane RW, Bramlett HM, & Dietrich WD (2012) Effects of therapeutic hypothermia on inflammasome signaling after traumatic brain injury. Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 32(10):1939-1947.

[0268] 48. Wiklander, O.P., Nordin, J.Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mager, I., Vader, P., Lee, Y., Sork, H., Seow, Y., Heldring, N., Alvarez-Erviti, L., Smith, C.I., Le Blanc, K., Macchiaroni, P., Jungebluth, P., Wood, M.J. and Andaloussi, S.E. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. J Extracell Vesicles 4, 26316.

[0269] 49. de Rivero Vaccari, J.P., Lotocki, G., Marcillo, A.E., Dietrich, W.D. and Keane, R.W. (2008). A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury. J Neurosci 28, 3404-3414.

[0270] 50. Assis-Nascimento, P., Umland, O., Cepero, M.L. and Liebl, D.J. (2016). A flow cytometric approach to analyzing mature and progenitor endothelial cells following traumatic brain injury. J Neurosci Methods 263, 57-67.

[0271] 实施例2: EV介导的炎性小体信号传导在人患者TBI后ALI中的作用

[0272] 作为实施例1中对小鼠的实验的后续, 检查了从人TBI患者分离的EV对人肺内皮细胞中炎性小体信号传导的作用。

[0273] 在第一个实验中, 使用总外泌体分离试剂盒(ThermoFisher)从TBI和对照患者分离血清来源的EV。培养肺部人微血管内皮细胞(HMVEC-Lonza)并将其涂布在12孔板上。在达到汇合后, 将来自TBI和对照患者的分离的EV(1.94×10^8 个颗粒/ml)递送至细胞, 孵育期为4小时。在孵育后, 用200 μ l裂解缓冲液收获细胞, 并将细胞裂解物用于蛋白质印迹分析。

[0274] 在第二个实验中, 使用总外泌体分离试剂盒(ThermoFisher)从TBI和对照患者分离血清来源的EV。培养肺部人微血管内皮细胞(HMVEC-Lonza)并将其涂布在96孔板上。在达到汇合后, 将来自TBI和对照患者的分离EV(1.94×10^8 个颗粒/ml)递送至细胞, 孵育期为3小时, 并且然后以1:30体积比率与半胱天冬酶-1 FAM FLICA (Immunohistochemistry Technologies) 另外孵育1小时。在孵育后, 除去培养基并用凋亡洗涤缓冲液(Immunohistochemistry Technologies)洗涤细胞3次。然后将细胞共染色, 其中采用Hoechst用于细胞核染色, 并且采用碘化丙啶用于细胞死亡染色。使用EVOX显微镜拍摄图像, 并且然后在荧光板读取器下以492nm的激发波长和520nm的发射波长对细胞进行读取。

[0275] 结果

[0276] 如图10A-图10F所示, 递送来自TBI患者的血清来源的EV增加了肺内皮细胞中的炎性小体蛋白表达。图10A-图10E显示, 与用对照-EV孵育4小时的PMVEC相比, 与TBI-EV孵育4小时的PMVEC中半胱天冬酶-1、ASC、AIM2和HMGB1升高。使用E11a简单plex测定法的免疫测定结果显示IL-1 β 表达显著增加(图10F)。

[0277] 如图11A-图11C所示, 向肺内皮细胞递送TBI-EV增加了半胱天冬酶-1的免疫反应

性和细胞死亡。

[0278] 结论

[0279] 这些研究为神经-呼吸-炎症小体轴线提供了另外的证据,其中在TBI激活肺靶细胞中的炎症小体后EV释放到循环中有助于ALI的发病机理。

[0280] 实施例3:在多发性硬化症动物模型中使用人源化抗ASC抗体的效果

[0281] 为了确定人源化抗ASC单克隆抗体在治疗MS中的实用性,将所述抗体施用于实验性变应性脑脊髓炎(EAE)小鼠。EAE是MS的动物(即啮齿动物)模型,如以下文献中所述:

Höftberger R, Leisser M, Bauer J, Lassmann H (2015年12月) . “Autoimmune encephalitis in humans: how closely does it reflect multiple sclerosis?” . Acta Neuropathol Commun. 3 (1): 80和Lassman Hans (2010年2月) . “Acute disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis” . Brain. 133: 317-319和L. Gómez Vicente 等人 Relapse in a paucisymptomatic form of multiple sclerosis in a patient treated with nivolumab, Neuro Oncol (2016) 18 (增刊4): iv25。

[0282] 方法

[0283] EAE的诱导和采用IC 100的治疗

[0284] 如先前所述(Brambilla等人, 2014) 用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白35-55肽(MOG₃₅₋₅₅, BioSynthesis) 在2月龄C57BL/6雌性小鼠中诱导活动性EAE。简言之,小鼠接受腹腔内(i.p.)注射百日咳毒素(溶于PBS中(350ng/小鼠;第0天),接着皮下施用在完全弗氏佐剂中乳化的MOG₃₅₋₅₅(300ng/小鼠;第1天),以及第二次腹腔内注射百日咳毒素(350ng/小鼠;第2天)。从EAE诱导后第8天开始,经由腹腔内注射向小鼠施用载体(0.9%生理盐水)或三种不同剂量(10、30和45mg/kg)的IC 100,每4天一次。按如下0至6级每日评估EAE的临床症状:0,无临床体征;1,尾音丢失(loss of tail tone);2,尾巴松弛;3,完全后肢瘫痪;4,完全性前肢瘫痪;5,垂死;6,死亡。

[0285] 细胞分离以用于流式细胞术

[0286] 经心灌注PBS后,收获脊髓,并将其置于不含Mg²⁺和Ca²⁺的冷Hanks'平衡盐溶液(HBSS w/o)中。将样品通过70um滤网手动分离成单细胞悬浮液,并在HBSS w/o中洗涤。将脾样品在4℃下以1200rpm旋转10min,去除上清液,并按照制造商的说明书在2ml RBC裂解缓冲液(eBioscience)中裂解红细胞(RBC)。将脾细胞重悬于PBS中。将从脊髓分离的细胞重悬于流式细胞术缓冲液(FCB, eBioscience)中,并与髓鞘去除珠II(Miltenyi)一起孵育。使用如制造商方案中所述的LS磁性柱(Miltenyi)来耗尽髓鞘。与脾细胞相似,将脊髓细胞重悬于PBS中并如下所述进行染色。

[0287] 免疫标记和流式细胞分析

[0288] 对于评估半胱天冬酶-1的实验,按照制造商的说明书使用FAM FLICA™半胱天冬酶1试剂盒(BioRad)。将细胞在4℃下在FLICA溶液(BioRad)中孵育30min,用凋亡洗涤缓冲液(BioRad)洗涤并重悬于在1ml PBS中。然后将样品与可固定的活/死细胞染色剂(Tonbo Biosciences)在4℃下一起孵育30min,在4℃下以1200rpm旋转10min,并去除上清液。将细胞重悬于100ul FACS缓冲液中,室温下用抗CD16/32(FcR block, eBioscience)封闭5min,4℃下免疫染色30min,并用1%PFA固定。用装有CytExpert 2.1软件的CytoFLEX S流式细胞仪(Beckman Coulter)分析样品。用123count eBeads(eBioscience)测定脊髓白细胞数。通

过流式细胞术与使用TC20TM自动细胞计数仪 (Bio-Rad) 的台盼蓝排阻计数的组合来测定脾白细胞数。以下表3提供了流式细胞术抗体的列表。

[0289] 表3. 用于本文提供的方法中的流式细胞术抗体。

[0290]	抗原	颜色	稀释度	提供商	目录号
	CD45	FITC	1:1000	eBioscience	11-0451-82
	CD45	PE	1:1000	eBioscience	12-0451-82
	CD4	PE/Cy7	1:200	eBioscience	25-0042-81
	CD8	Percp-Cy 5.5	1:200	Biolegend	100734
	B220	PE	1:200	Biolegend	103208
	B220	APC eFluor780	1:200	eBioscience	47-0452-80
	CD11b	APC eFluor780	1:200	eBioscience	47-0112-82
	CD11b	PE/Cy7	1:200	Biolegend	101215
	MHCII	APC	1:200	eBioscience	17-5321-81
	Ly6-G	Percp-Cy5.5	1:200	Biolegend	127616
	NK1.1	APC	1:200	Tonbo Biosciences	20-5941-U025
	Live/Dead	Violet 450	1:1000	Tonbo Biosciences	13-0863-T500

[0291] 对脱髓鞘白质体积的Luxol快蓝染色和定量

[0292] 将多聚甲醛 (PFA) 固定的脊髓段用石蜡包埋,用Leica RM 2135超薄切片机切成10mm厚的交叉切片,并用luxol快蓝 (LFB) 染色。用十个50um间隔的连续切片来估计脱髓鞘白质体积。用Olympus BX51显微镜显示脱髓鞘区的轮廓,并用Stereoinvestigator软件 (MicroBrightfield) 定量脱髓鞘白质体积。用Neurolucida软件 (MBF Bioscience) 在相同的连续切片上对脱髓鞘脊髓进行3D重建。

[0293] 对组织中的IC 100的定量

[0294] 利用由InflamaCORE,LLC使用Meso Scale Technology开发的测定,定量EAE诱导后35天 (dpi) 时脑、脊髓、肝和脾中的IC 100。使用QuickPlex SQ 120仪器 (Meso Scale Diagnostics,马里兰州) 读取测定。

[0295] 在挫伤性颈脊髓损伤的大鼠模型中进行了类似的实验,以确定抗ASC是否渗入脊髓神经元。

[0296] 为了确定IC 100是否被细胞吸收,将荧光素标记的IC 100添加到含有THP-1细胞 (人单核细胞系) 的组织培养基中。

[0297] 结果

[0298] 用抗ASC抗体IC 100治疗改善实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 中的功能结局

[0299] 为了评估IC 100的治疗潜力,对两个月大的雌性C57BL/6小鼠用MOG₃₅₋₅₅肽诱导EAE (Brambilla等人,2014),并在诱导所述疾病后8天 (dpi) 时开始单独施用IC 100或媒介物。每四天重复施用一次直至处死,处死设定为在35dpi。测试三种剂量:10、30和45mg/Kg。

[0300] 当以30和45mg/Kg的剂量使用时,IC 100显著改善了功能恢复,其中在整个实验期间临床疾病得分显著降低 (图12A)。治疗降低了平均峰值临床得分 (图12B) 以及以累积疾病指数 (CDI) 的降低来衡量的EAE的整体严重程度 (图12C)。用30和45mg/Kg IC 100治疗的小鼠也显示出延迟发病的趋势 (图12D)。未观察到小鼠达到其峰值疾病得分的日期的差异 (图

12E)。

[0301] 用抗ASC抗体IC 100治疗减少EAE后周围免疫细胞向脊髓的浸润

[0302] EAE的临床症状的启动、持续和严重程度与免疫细胞浸润至脊髓中是直接相关的。为了评价IC 100是否影响这一过程,通过流式细胞术对35dpi时从脊髓分离的免疫细胞群进行了分析。用30mg/Kg IC 100治疗显著地减少致脑炎CD4⁺T细胞以及CD8⁺T细胞(即在驱动EAE病理中最关键的免疫细胞群)的总数(图13A)。所有其他免疫细胞群都显示出明显的减少趋势。在脾中未观察到在任何IC 100剂量的情况下的细胞数的差异,这表明治疗不干扰小鼠针对EAE攻击产生充分免疫应答的能力(图13B)。

[0303] 用抗ASC抗体IC 100治疗减少EAE后小胶质细胞的数量和激活状态

[0304] 小胶质细胞参与对CNS疾病的免疫炎性反应。随着其激活状态的增加,它们增殖并上调MHCII的表面表达。为了评估IC 100是否影响这种反应,通过流式细胞术定量总小胶质细胞和脊髓中MHCII⁺激活的小胶质细胞的数量。通过用30mg/Kg IC 100治疗显著地减少了这两个群体,从而表明在该剂量下IC 100在抑制小胶质细胞激活和小胶质细胞介导的神经炎症方面是有效的(参见图14)。

[0305] IC 100渗入脑和脊髓

[0306] 在设计用于治疗MS的药物时的重要参数是确定药物是否以治疗水平渗入CNS中。这是重要的特征,特别是在治疗进展形式的MS时,因为血脑屏障在所述疾病的这一阶段显得相对完整(Lassman等人2012)。因此,我们收获脑、脊髓、肝和脾来测定IC 100在这些组织中的水平。如图15中所示,IC 100在所有三种剂量下均能渗入所有这些组织,包括脑和脊髓。有趣的是,脊髓中IC 100的水平在30mg/kg剂量下更高,这与该剂量下的更大治疗效果相一致。

[0307] 荧光素标记的IC 100被THP-1细胞(人单核细胞系)吸收,并在添加至组织培养基时并入ASC斑点中。此外,这些细胞的炎性小体诱导刺激标记的IC 100与罗丹明标记的葡聚糖一起被摄取到ASC斑点中,这表明IC100摄取是由内吞作用介导的(参见图16)。

[0308] 同样地,IC 100阻止从THP-1细胞释放IL-1 β (图17)。

[0309] 在挫伤性颈脊髓损伤的大鼠模型中,抗ASC抗体(例如,IC 100)也渗入脊髓神经元。

[0310] IC 100可以在细胞内和细胞外均起作用。在细胞内,其可以通过与ASC蛋白结合并抑制它而起作用,从而阻止多蛋白炎性小体的组装和炎性反应的启动。其也可以与ASC斑点中的ASC结合,阻止大的丝状信号传导平台的传播,从而抑制在慢性炎症性疾病中负责使炎症永久存在的前IL β 的细胞外激活。

[0311] 通过引用并入

[0312] 出于所有目的,以下参考文献通过引用以其整体并入。

[0313] Brambilla R, Morton PD, Ashbaugh JJ, Karmally S, Lambertsen K, 和 Bethea JR (2014) Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *GLIA*, 62:452-457.

[0314] Lassmann, H., van Horssen, J. 和 Mahad, D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 8, 647-656, doi:10.1038/

nrneurol.2012.168(2012)。

[0315] 实施例4:候选抗ASC单克隆抗体的动力学分析

[0316] 使用生物层干涉 (BLI) 对候选抗ASC单克隆抗体进行动力学分析。在BLI中,与表面缔合或解离导致反射光波长的改变并且测量这种改变随时间的变化使得能够确定结合动力学。

[0317] BLI测定由以下组成:

[0318] 传感器检查 (30s) -->负载Ab/上清液 (700s) --->基线 (300s) -->Ab缔合 (600s) -->解离 (600s) -->重复

[0319] 测试候选小鼠IgG抗体上清液在7种不同浓度(即540nM、180nM、60nM、20nM、6.67nM、2.22nM、0.741nM)下与人ASC肽(SEQ ID NO:5)的结合。所测试的抗体是ICCN 1.0H(即,IC 100);ICCN 2.0H;以及ICCN 3.0H。用来自未稀释的上清液的小鼠IgG负载AMC(抗小鼠IgG Fc)生物传感器。3种候选抗体的原始抗体动力学数据示于图21中,而图22显示全局KD值。

[0320] 实施例5:IC 100的吸收、分布、代谢和排泄研究

[0321] 将进行吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 实验来描述IC 100在CD-1雄性大鼠体内的部署(disposition)。

[0322] 在第一个实验中,将从Charles River获得30只六周大的CD-1雄性大鼠。实验将在Bolder BioPath(BBP)进行。这些小鼠在到达BBP后至少要适应七天。将小鼠以每笼四只动物来安置。

[0323] 将动物根据体重随机化为治疗组(每组九只),并静脉内(IV)施用IC 100的剂量。治疗组将接受5mg/kg、15mg/kg或30mg/kg IC 100。在单一IV剂量后的不同时间收集血浆以进行药代动力学(PK)监测。下表4中显示了血浆收集的示例性时间表。急性毒性将通过临床观察进行监测。血浆将被运到Antibody Solutions以进行分析。实验将持续十周。

[0324] 体重测量将在第0、7、14、21、28和35天进行。

[0325] 将使用眼球后采血来收集足够体积的血液;在样品收集之前,将小鼠用异氟烷麻醉。每组的动物1、2、3将在第1、10天被采血;动物4、5和6将在第2和15天被采血;动物7、8和9将在第5和20天被采血。

[0326] 在最后的时间点,将动物用异氟烷麻醉并采血至放血,接着双侧气胸。动物1、2和3将在第25天被处死。动物4、5和6将在第30天被处死。动物7、8和9将在第35天被处死。

[0327] 表4.样品收集列表

[0328]

组	动物编号	时间点
1,2,3	1-3	第1天(24h)
1,2,3	4-6	第2天(48h)
1,2,3	7-9	第5天
1,2,3	1-3	第10天
1,2,3	4-6	第15天
1,2,3	7-9	第20天
1,2,3	1-3	第25天(终点)
1,2,3	4-6	第30天(终点)

	1, 2, 3	7-9	第35天(终点)
[0329]	*在终点采血时进行尸检		
[0330]	实施例6. 使用雌性B6白化小鼠的IC 100生物分布及荧光成像		
[0331]	在第二个实验中, 将根据建立的VivoTag方案用VivoTag 680XL荧光标记染料标记IC 100和对照小鼠IgG, 并测定结合亲和力。简言之, 根据VivoTag方案, 标记方案将包括:		
[0332]	1. 制备抗体 (>7kDa) 溶液至在PBS中1-10mg/mL。抗体将不含铵离子或伯胺, 以减少与活性染料竞争反应。		
[0333]	2. 将0.25mg的VivoTag 680XL溶解在10 μ L的干DMSO中。重构后, VivoTag 680XL在2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C且避光下储存时稳定多达7天。		
[0334]	3. 将添加0.5mL蛋白质 (0.5-5mg)、50 μ L碳酸氢钠、2 μ L VivoTag 680XL (对于每mg蛋白质而言) 至eppendorf管中。将混合物在室温且摇动下在黑暗中孵育2小时。		
[0335]	4. 从游离染料分离蛋白质缀合物。拧下柱的底部封闭物并松开盖子。将柱置于15mL锥形收集管上, 以1,000xg离心2min。将2mL PBS添加至柱中, 并以1,000xg离心2min。将洗涤再重复两次。		
[0336]	5. 将柱置于新的15mL锥形收集管上。将所有的蛋白质样品 (200-700 μ L) 加载至柱, 并以1,000xg离心2min。将收集流过的蛋白质样品。		
[0337]	6. 可以分析收集的标记抗体样品的标记程度 (DOL)。测定纯化的缀合物在280nm和668nm处的吸光度。		
[0338]	7. 通过减去VivoTag 680XL的280nm吸光度来调整纯化的蛋白质在280nm处的吸光度, 其是668nm处吸光度的16%。		
[0339]	8. 吸光度分析可以用UV分光光度计或Nanodrop分光光度计进行。为了使用后者, 需要将样品稀释至0.5-2mg/mL范围, 然后测量。由于光路为1mm, 因此读数应使用10的因数归一化。		
[0340]	在第三个实验中, 将测定IC 100的生物分布。十五只8-12周龄雌性B6白化 (C57BL6) 小鼠将被用于研究。将动物根据第一天的体重随机分组。		
[0341]	雌性B6白化小鼠将不接受治疗 (阴性对照)、接受单剂量的用VivoTag 680XL标记的IC 100或单剂量的用VivoTag 680XL标记的小鼠IgG (阴性对照)。将治疗以100 μ g/只动物的剂量静脉内施用 (体积=200 μ L)。		
[0342]	体内荧光成像将在治疗后2hr、8hr、24hr、48hr、72hr和96hr进行, 将以不同的时间间隔直到治疗后96小时使用荧光成像来捕获背部和腹部体内全身图像。将对所有动物的脑、具有视神经的眼睛、心脏、左肾和右肾、大肠 (包括末端结肠)、肝、肺、卵巢、胰腺、小肠、脊柱、胃、甲状腺和膀胱进行离体成像。		
[0343]	将收集全血, 并分析免疫浸润物的CD4+T细胞 (CD4+CD11b-CD3+CD8-)、CD8+T细胞 (CD8+CD11b-CD3+CD4-)、B细胞 (CD3-CD11b-CD45R+)、单核细胞 (CD3-CD11b+CD115+) 和NK细胞 (CD3-CD 49b+CD335+)。将Ab-VivoTag 680XL的表达量化, 以测定所递送的标记的抗体的水平。流式细胞术检测组套 (panel) 中将包括LIVE/DEAD染料, 以将活细胞的数量进行量化。整个抗体检测组套将包括针对CD3、CD4、CD8、CD11b、CD115、CD45R、CD49b、CD335和LIVE/DEAD染料的抗体。		
[0344]	实施例7: IC 100施用对炎性小体信号传导的影响		

[0345] 将由BioReclamation IVT获得来自患有非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、糖尿病肾病和狼疮性肾炎的患者的血液,以用于炎性小体蛋白的生物标记物分析。将由Bolder BioPath获得来自患有NASH、糖尿病肾病和狼疮性肾炎的患者的组织,并从那些组织获得蛋白质裂解物,并通过免疫印迹和其他生化技术分析炎性小体信号传导蛋白(包括半胱天冬酶-1和ASC)的表达。

[0346] 此外,人癌细胞系将被用于实时检查ASC依赖性炎性小体的激活。该研究将由两个目标组成,并将在6-9周的时间段内开始。

[0347] 特定目标1:抗体标记

[0348] 将2mg IC 100用IgG-680XL-IFC (VivoTag®680XL,PerkinElmer#-NEV11120) 荧光标记染料标记,并且将根据制造商的说明书测定标记的化学计量。将对照小鼠IgG(由Charles River实验室(CRL)提供)类似地进行标记和分析。

[0349] 特定目标2:结合亲和力测定

[0350] 将人癌细胞系THP-1在对数期培养,并以每孔20,000个细胞在100μL培养基体积中铺板于白色聚苯乙烯6孔微培养板(Corning® Costar®96孔平底板,目录号3917)。然后将标记的抗体一式两份添加至孔中(10点剂量反应,1:3稀释度,最高浓度200nM)。将按照Charles River的方案检测所有孔的结合的抗体。将结合的抗体(平均荧光强度)绘制为抗体浓度的函数,并通过对数据拟合以下方程来估计结合亲和力(Kd): $Y = B_{max} * X / (Kd + X)$ 。

[0351] 实施例8:NASH大鼠模型中IC 100的体内研究

[0352] 以缺乏胆碱的高脂饮食(CDHFD)喂养的患有肝纤维化的雄性Wistar Han大鼠作为NASH的动物模型。本研究将使用55只小鼠。将从Envigo或Charles River获得8-9周龄Wistar Han大鼠。大鼠在到达Bolder BioPath后将适应3-7天。将大鼠以每笼2-3只动物来安置。以标准食物喂养动物。

[0353] 在第0天,将动物根据体重随机分为五组。第1组被喂养Teklad Global Diets-Rodent 2014,即一种标准饮食。第2、3、4、5组被喂养CDHFD饮食。

[0354] 在研究第38天,对动物采血以用于临床化学,并根据丙氨酸转氨酶(ALT)浓度置于治疗组中。在研究第42天,将开始治疗。使用如下剂量来测试IC 100的功效,所述剂量是基于从实施例5获得的药代动力学数据来确定的。一组接受用媒介物的治疗以充当阴性对照。接受标准饮食的组也将接受用媒介物的治疗。每周测量体重、摄食量和笼旁临床观察。在第38天和第63天,将经由尾静脉收集获得全血。将在第84天进行尸检。动物将在异氟烷麻醉下被处死,采血至放血,然后双侧气胸。

[0355] 将在研究的第-1、0、2、4、6、7、14、21、28、35、42、45、49、52、56、59、63、66、70、73、77、80和83天对动物称重。

[0356] 将在研究的第0、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77和84天记录摄食量(克/天/大鼠)的每周更新。

[0357] 将在第0-7、14、21、28、35、42、45、49、52、56、59、63、66、70、73、77、80、83天进行临床笼旁观察。如果动物开始显示出毒性或疾病的临床体征,则将每天观察动物并称重。

[0358] 尸检时,将测量肝、棕色脂肪组织和右侧腹股沟脂肪组织的重量。将获得肝左外叶的4x 7mm活检,将其冷冻在液氮中,并在-80℃下储存。将获得肝内叶、左外叶和右外叶的3mm横向切片,并将其在10%福尔马林中固定36-48小时,然后在环境温度下在70%乙醇中

储存以用于组织病理学。将三块100mg的脂肪组织在液氮中快速冷冻,并在-80℃下在Eppendorf安全扣管中储存。将三块相等大小的棕色脂肪组织在液氮中快速冷冻,并在-80℃下在Eppendorf安全扣管中储存。

[0359] 腹股沟皮下脂肪组织即白色脂肪组织贮库(WAT)将根据以下方案来收集。腹股沟三角形SQ贮库将通过撕脱小鼠的下半部分来揭露。一只手握住上部的附器和胸,并且另一只手将皮肤向下拉向双脚。将小鼠定位在仰卧位,注意不要用毛发污染暴露的贮库。清洗手术器械并更换手套。随后,皮下脂肪的三角形将被解剖,小心不要被肌肉、邻近脂肪、乳腺或血液污染样品。如果边界无法清晰地确定,则使用解剖显微镜。取出脂肪贮库并将其转移到固定剂与组织体积为50:1的10%中性缓冲福尔马林中,并在室温下固定36-48小时。如果要提取RNA或蛋白质,则将组织通过浸泡在液氮中冷冻,并在-80℃下储存以防止降解。通过经常更换手套来努力避免脂肪贮库之间的交叉污染。

[0360] 将由Histotox实验室进行组织学处理。LLL、MLL和RLL组织学处理将在三个肝横向切片/动物上进行。将样品用天狼星红以及苏木精和伊红(H&E)染色。

[0361] 实施例9:在BTBR Ob/Ob小鼠模型中IC 100对糖尿病肾病的影响的体内研究

[0362] 具有ob/ob瘦素缺乏突变的小鼠品系BTBR充当糖尿病肾病的小鼠模型。将利用雄性BTBR Ob/Ob小鼠来评估IC 100在逆转糖尿病肾病中的作用。五只雄性野生型(WT)BTBR小鼠将被用作阴性对照,并且不接受任何治疗。将利用50只BTBR Ob/Ob小鼠并将其分为五组。所述组将接受运载体、对照或基于实施例5确定的剂量下的IC 100。实验将进行六周。

[0363] 将由Histotox实验室对小鼠肾进行组织学。将由病理学家使用当前Bolder BioPATH方法来确定适当的参数。

[0364] 将通过剪尾巴并将一滴血液(约5μL)施加到与True Metrix血糖仪兼容的测试条上进行血糖测量。每周进行两次血糖测量,直到研究完成。

[0365] 将通过如下方法进行蛋白尿评分:将小鼠倒置并向腹部施加压力从而从小鼠挤压出尿液。将使用Albustix试剂条来测定尿液中的蛋白质量。

[0366] 如果发现动物死亡,将不取样。如果动物需要安乐死,不管是什么原因,在研究第7天后,将按照尸检时的方式取样。

[0367] 实施例10:在小鼠模型中IC 100对狼疮性肾炎的影响的体内研究

[0368] 将使用12周龄雌性MRL/MpJ-Tnfrsf6lpr/J小鼠发展为狼疮性肾炎模型。将从Bolder BioPath获得小鼠。将小鼠根据体重随机分为治疗组。每日观察动物的重要临床体征、垂死和死亡。狼疮性肾炎的发病将发生在大约12-14周龄。

[0369] 狼疮性肾炎发病后,将小鼠分为五组,并用不同剂量的IC 100(根据实施例5的结果)、媒介物或对照IgG治疗。

[0370] 将收集体重、尿液蛋白尿、淋巴结病得分和皮肤病变得分。将在第20周进行尸检,并收集组织和全血进行分析。实验预计持续15周。

[0371] 实施例11:在白化大鼠中IC 100的急性和21天范围内发现静脉内团注毒性研究

[0372] 从Charles River获得白化大鼠。将确定对于在大鼠中的确定性28天多剂量毒性和药代动力学研究的IC 100剂量水平。将大鼠分为四组,每组含有三只大鼠/性别/剂量。将进行上下(up and down)研究。

[0373] 重复剂量研究将进行三周。将大鼠分为含有五只大鼠的全部为雄性或全部为雌性

的组。每周以一个剂量水平的IC 100向大鼠给药。将执行生命参数,包括死亡、临床体征、体重和具有毒代动力学的临床检验。

[0374] 实施例12:食蟹猴中IC 100的最大耐受剂量和22天剂量范围发现研究

[0375] 在食蟹猴中确定IC 100的剂量水平和药代动力学。将在Charles River进行实验。将食蟹猴分为四组,每组含有一只食蟹猴/性别/剂量。上下(up and down)研究进行28天。

[0376] 重复剂量研究将进行三周。将食蟹猴分为含有两只食蟹猴的全部为雄性或全部为雌性的组。每周以一个剂量水平的IC 100向食蟹猴给药。将执行生命参数,包括死亡、临床体征、体重和具有毒代动力学的临床检验。

[0377] 该实验预计持续15周。

[0378] 实施例13:在大鼠中的IC 100及随后4周恢复期的毒性研究

[0379] 将确定在从Charles River获得的大鼠中静脉内施用IC 100及随后恢复期的毒性和毒代动力学。

[0380] 以三种剂量水平加上对照将大鼠分为10-15只大鼠/性别/组。另外的组将包括高剂量组和对照组,其含有5只大鼠/性别,恢复四周。

[0381] 将测量死亡、体重、摄食量、临床观察、临床病理学(血液学和临床化学)、尸检发现、器官组织病理学和毒代动力学。恢复后,将测量相同的参数,但不包括毒代动力学。

[0382] 该实验预计将持续六个月。

[0383] 实施例14:在食蟹猴中的IC 100及随后4周恢复期的毒性研究

[0384] 将在Charles River确定非人灵长类动物中静脉内施用IC 100及随后的恢复期的毒性和毒代动力学。

[0385] 以三个剂量水平加上对照将食蟹猴分为3只食蟹猴/性别/组。另外的组将包括高剂量组和对照组,其含有2只食蟹猴/性别,恢复四周。

[0386] 将测量死亡、体重、摄食量、临床观察、临床病理学(血液学和临床化学)、尸检发现、器官组织病理学和毒代动力学。恢复后,将测量相同的参数,但不包括毒代动力学。

[0387] 该实验预计将持续六个月。

[0388] 实施例15:使用hERG测定进行体外心血管研究

[0389] 将在用CHO或HEK293细胞的体外测定中评价心血管毒性(QT延长)的潜力。

[0390] 该实验将确定对于IC 100阻断HERG通道的IC₅₀。

[0391] 预计该实验将持续两个月。

[0392] 实施例16:体外血液溶血研究

[0393] 将评估IC 100静脉配制品在体外引起人红细胞溶血的潜力。将多种浓度(基于实施例5确定的)的IC 100与红细胞在体外系统中混合。将确定溶血的程度。实验预计持续两个月。

[0394] 实施例17:检查IC 100在治疗帕金森病(PD)中的体内功效

[0395] 通过在PD的若干种动物(即啮齿动物)模型中施用IC 100来评估IC 100在治疗PD中的功效。5mg/kg、15mg/kg、30mg/kg。

[0396] PD的6-OHDA大鼠模型是化学诱导的PD的单向模型(纹状体内或正中前脑束病变),其中小鼠展现出包括旋转不对称和运动缺陷在内的行为缺陷。依据组织学,6-OHDA模型展示出纹状体中多巴胺、DOPAC和HVA含量减少,并且显示出黑质中TH阳性细胞减少。

[0397] 在使用PD的6-OHDA模型的一组实验中,将总共45只雄性大鼠分为3个实验组(n=15只大鼠/组),其将按如下方式进行治疗:

[0398] 1.经治疗的假手术诱导的大鼠将用媒介物进行治疗;

[0399] 2.经治疗的6-OHDA诱导的大鼠将用媒介物进行治疗;以及

[0400] 3.经治疗的6-OHDA诱导的大鼠将用IC 100剂量1(基于PK/半衰期研究选择)进行治疗。

[0401] 研究第0天进行单向6-OHDA/假手术输注;

[0402] 每日剂量配制和给药(QD,口服)将在研究第15-28天进行。

[0403] 将在第14天(基线)、第28天和第42天进行体重跟踪和行为测试,并且行为测试将包括安非他明诱导的旋转。

[0404] 在研究第42天进行终点的血液、CSF和脑采样,接着进行HPLC以检查纹状体中的DA、DOPAC和HVA,并进行IHC以检查SNpc中的TH+细胞。

[0405] 在使用PD的6-OHDA模型的第二组实验中,将总共45只雄性大鼠分为3个实验组(n=15只大鼠/组),其将按如下方式进行治疗:

[0406] 1.经治疗的假手术诱导的大鼠将用媒介物进行治疗;

[0407] 2.经治疗的6-OHDA诱导的大鼠将用媒介物进行治疗;以及

[0408] 3.经治疗的6-OHDA诱导的大鼠将用IC 100剂量1(基于PK/半衰期研究选择)进行治疗。

[0409] 实验将进行6周的时间段,其中在研究第0天进行单向6-OHDA/假手术输注;

[0410] 每日剂量配制和给药(QD,口服)将在研究第1天进行,并将持续到6-OHDA输注后6周。

[0411] 将在第14天(基线)、第28天和第42天进行行为测试,并且行为测试将包括安非他明诱导的旋转和圆筒测试。

[0412] 在研究第42天进行终点的脑采样,接着进行HPLC以检查纹状体中的DA、DOPAC和HVA,并进行IHC以检查SNc中的TH和Iba-1(双向)。

[0413] 在使用PD的6-OHDA模型的第三组实验中,将总共90只雄性大鼠分为6个实验组(开始时n=18只大鼠/组直到第14天基线,n=15只大鼠/组作为目标),其将按如下方式进行治疗:

[0414] 1.将假手术诱导的大鼠用媒介物进行治疗

[0415] 2.将6-OHDA诱导的大鼠用媒介物进行治疗

[0416] 3.将6-OHDA诱导的大鼠用IC 100剂量1进行治疗

[0417] 4.将6-OHDA诱导的大鼠用IC 100剂量2进行治疗

[0418] 5.将6-OHDA诱导的大鼠用IC 100剂量3进行治疗

[0419] 6.将6-OHDA诱导的大鼠用IC 100剂量4进行治疗

[0420] 实验将进行6周的时间段,其中在研究第0天进行单向6-OHDA/假手术输注;

[0421] 每日剂量配制和给药(QD,口服)将在研究第15-42天进行。

[0422] 将在第14天(基线)、第28天和第42天进行行为测试,并且行为测试将包括安非他明诱导的旋转和圆筒测试。

[0423] 在研究第42天进行终点的脑采样,接着进行HPLC以检查纹状体中的DA、DOPAC和

HVA, 并进行IHC以检查SNc中的TH和Iba-1 (双向)。

[0424] 实施例18: 检查IC 100在治疗帕金森病(PD)中的体外功效

[0425] TOM20测定:

[0426] 已通过若干项研究将PD发病机制与线粒体功能障碍联系起来, 所述研究是从发现线粒体复合物I抑制剂鱼藤酮诱导帕金森症开始的。另外, 编码参与选择性清除功能障碍和多余的线粒体(线粒体自噬)的蛋白质(如PARK2和PINK1)的基因的突变存在于大多数常染色体隐性PD病例中。同样地, 越来越多的证据表明线粒体功能障碍与其他神经变性障碍(如AD、ALS和亨廷顿病(HD))有关。因此, 在疾病相关的细胞背景中, 用于测量线粒体(dys)功能的表型读数被认为是探测神经变性病理生物学和鉴定可增强线粒体自噬的潜在治疗剂的强有力预测工具。

[0427] TOM20是线粒体外膜易位酶(TOM)复合物的亚基, 并且表示线粒体丰度的生物标记物。通过在不存在(单一治疗)和存在(共治疗)已建立的线粒体自噬诱导触发物的情况下分析治疗候选物, 可以选择增强触发物诱导的线粒体清除而不直接损害线粒体的候选分子(例如, IC 100)。

[0428] TOM20损失测定是可扩展且快速的体外测定, 其用于筛选化合物在神经元背景中增强线粒体自噬的能力。

[0429] TOM20测定将利用永生化的脑中脑祖细胞(ReNcell VM)在层粘连蛋白包被的96孔板中以50,000个细胞/孔接种, 所述细胞将通过以下方法分化: 从第0天(D0)开始停用生长因子(bFGF, EGF)并添加促分化因子(cAMP, GDNF)持续七天, 并在第1天(D1)和第4天(D4)补充给养(refreshment)。然后在第7天在不存在和存在1微摩尔寡霉素/抗霉素(O/A; 常用的有丝分裂触发物)的情况下用IC 100处理细胞18小时, 接着用抗TOM20抗体和DAPI染色对TOM20进行固定免疫细胞化学染色(即在第8天)。最终, 测定将含有1 μ M O/A阳性对照和0.1% DMSO阴性对照。

[0430] 结合线粒体自噬增强化合物与1 μ M O/A的处理将导致超过单独O/A处理诱导的降低的显著TOM20水平降低。将使用Charles River实验室开发的高含量分析(HCA)算法对TOM20免疫染色强度进行定量。细胞核计数将被定量以鉴定潜在的化合物(例如, IC 100)诱导的细胞毒性。

[0431] α -突触核蛋白聚集测定:

[0432] 突触前蛋白 α -突触核蛋白的聚集体被认为是PD的主要生物标记物, 并且有证据表明 α -突触核蛋白聚集体直接介导神经元死亡。因此, 旨在减少 α -突触核蛋白聚集和毒性的策略可能具有治疗潜力。

[0433] 在该测定中, 在层粘连蛋白包被的96孔板中以10,000个细胞/孔接种的永生化的脑中脑祖细胞(ReNcell VM)将通过以下方法分化: 从第0天(D0)开始停用生长因子(bFGF, EGF)并添加促分化因子(cAMP, GDNF)持续七天。同样在D0时, 将细胞用编码野生型人 α -突触核蛋白的腺病毒转导。24小时后, 然后用IC 100处理细胞, 并在6天后通过以下方法检测 α -突触核蛋白表达和聚集: 使用检测 α/β 突触核蛋白(Syn205; Cell Signaling Technology)和聚集的 α -突触核蛋白(MJFR14; Abcam)的抗体进行免疫细胞化学, 接着进行如对于TOM20测定所述的HCA定量。最终, 所述测定还将含有10 μ M KU 0063794阳性对照和在D1和D4添加的0.1% DMSO阴性对照。

[0434] 本公开文本中编号的实施方案

[0435] 本公开文本考虑的其他主题陈述于以下编号的实施方案中：

[0436] 1. 一种治疗有需要的患者的肺中炎症的方法，所述方法包括：向所述患者施用一种包含抑制炎性小体信号传导的药剂的组合，由此治疗所述患者的肺中炎症。

[0437] 2. 根据实施方案1所述的方法，其中所述肺中炎症是由选自以下的病症导致的：中枢神经系统 (CNS) 损伤、神经变性疾病、自身免疫疾病、哮喘、慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、间质性肺病和急性呼吸窘迫综合征。

[0438] 3. 根据实施方案2所述的方法，其中所述CNS损伤选自创伤性脑损伤 (TBI)、中风和脊髓损伤 (SCI)。

[0439] 4. 根据实施方案2所述的方法，其中所述神经变性疾病选自肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、多发性硬化症 (MS) 和帕金森病 (PD)。

[0440] 5. 根据上述实施方案中任一项所述的方法，其中所述组合物的施用导致对所述患者的肺细胞中的炎性小体激活的抑制。

[0441] 6. 根据实施方案1-4中任一项所述的方法，其中与对照相比，所述组合物的施用导致所述患者的肺细胞中半胱天冬酶-1、含有核苷酸结合富亮氨酸重复片段热蛋白结构域的蛋白1 (NLRP1)、含有核苷酸结合富亮氨酸重复片段热蛋白结构域的蛋白2 (NLRP2)、含有核苷酸结合富亮氨酸重复片段热蛋白结构域的蛋白3 (NLRP3)、NLR家族含有CARD结构域的蛋白4 (NLRC4)、半胱天冬酶-11、X连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP)、泛连接蛋白-1、含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、白细胞介素-18 (IL-18)、高迁移率族蛋白B1 (HMGB1) 或黑色素瘤缺乏因子2 (AIM2) 水平的降低，其中所述对照是未治疗的患者。

[0442] 7. 根据实施方案5或6所述的方法，其中所述肺细胞是II型肺泡细胞。

[0443] 8. 根据实施方案1-5中任一项所述的方法，其中与对照相比，所述组合物的施用导致急性肺损伤 (ALI) 的减少，其中所述对照是未治疗的患者。

[0444] 9. 根据实施方案8所述的方法，其中ALI的减少通过嗜中性粒细胞到肺泡和/或间质空间中的浸润减少、肺泡间隔增厚减少或不存在、或其组合来证明。

[0445] 10. 根据上述实施方案中任一项所述的方法，其中所述药剂是胞外囊泡 (EV) 摄取抑制剂、与炎性小体组分结合的抗体或其组合。

[0446] 11. 根据实施方案10所述的方法，其中所述EV摄取抑制剂是化合物或抗体，其中所述抗体选自表1。

[0447] 12. 根据实施方案10-11中任一项所述的方法，其中所述药剂是EV摄取抑制剂和与炎性小体组分结合的抗体的组合。

[0448] 13. 根据实施方案12所述的方法，其中所述EV摄取抑制剂是肝素。

[0449] 14. 根据实施方案13所述的方法，其中所述肝素是依诺肝素。

[0450] 15. 根据实施方案10-14中任一项所述的方法，其中所述与炎性小体组分结合的抗体是与哺乳动物AIM2、NLRP1、NLRP2、NLRP3或NLRC4炎性小体的组分特异性结合的抗体。

[0451] 16. 根据实施方案10或15所述的方法，其中所述炎性小体组分是半胱天冬酶-1、ASC或AIM2。

[0452] 17. 根据实施方案16所述的方法，其中所述炎性小体组分是ASC。

[0453] 18. 根据实施方案17所述的方法，其中所述抗体与N-末端PYRIN-PAAD-DAPIN结构

域(PYD)、C-末端半胱天冬酶招募结构域(CARD)结构域、或源自所述ASC蛋白的PYD或CARD结构域的表位结合。

[0454] 19.根据实施方案17所述的方法,其中所述抗体与如下氨基酸结合,所述氨基酸与选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%序列同一性。

[0455] 20.根据实施方案17-19中任一项所述的方法,其中所述抗体抑制所述患者肺中的ASC活性。

[0456] 21.根据上述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述组合物与药学上可接受的载体或稀释剂一起配制。

[0457] 22.根据上述实施方案中任一项所述的方法,其中将所述组合物脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入施用。

[0458] 23.一种治疗已经经受中枢神经系统(CNS)损伤的患者的肺中炎症的方法,所述方法包括:向所述患者施用包含抑制炎性小体信号传导的药剂的组合物,由此治疗所述患者的肺中炎症。

[0459] 24.根据实施方案23所述的方法,其中所述CNS损伤选自创伤性脑损伤(TBI)、中风和脊髓损伤(SCI)。

[0460] 25.根据实施方案23-24中任一项所述的方法,其中所述组合物的施用导致对所述患者的肺细胞中的炎性小体激活的抑制。

[0461] 26.根据实施方案23-24中任一项所述的方法,其中与对照相比,所述组合物的施用导致所述患者的肺细胞中半胱天冬酶-1、NLRP1、NLRP2、NLRP3、NLRC4、半胱天冬酶-11、XIAP、泛连接蛋白-1、含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、白细胞介素-18(IL-18)、高迁移率族蛋白B1(HMGB1)或黑色素瘤缺乏因子2(AIM2)水平的降低,其中所述对照是未治疗的患者。

[0462] 27.根据实施方案25或26所述的方法,其中所述肺细胞是II型肺泡细胞。

[0463] 28.根据实施方案23-27中任一项所述的方法,其中与对照相比,所述组合物的施用导致急性肺损伤(ALI)的减少,其中所述对照是未治疗的患者。

[0464] 29.根据实施方案28所述的方法,其中ALI的减少通过嗜中性粒细胞到肺泡和/或间质空间中的浸润减少、肺泡间隔增厚减少或不存在、或其组合来证明。

[0465] 30.根据实施方案23-29中任一项所述的方法,其中所述药剂是胞外囊泡(EV)摄取抑制剂、与炎性小体组分结合的抗体或其组合。

[0466] 31.根据实施方案30所述的方法,其中所述EV摄取抑制剂是化合物或抗体,其中所述抗体选自表1。

[0467] 32.根据实施方案30-31中任一项所述的方法,其中所述药剂是EV摄取抑制剂和与炎性小体组分结合的抗体的组合。

[0468] 33.根据实施方案32所述的方法,其中所述EV摄取抑制剂是肝素。

[0469] 34.根据实施方案33所述的方法,其中所述肝素是依诺肝素。

[0470] 35.根据实施方案30-34中任一项所述的方法,其中所述与炎性小体组分结合的抗体是与哺乳动物AIM2、NLRP1、NLRP2、NLRP3或NLRC4炎性小体的组分特异性结合的抗体。

[0471] 36.根据实施方案30或35所述的方法,其中所述炎性小体组分是半胱天冬酶-1、ASC或AIM2。

[0472] 37.根据实施方案36所述的方法,其中所述炎性小体组分是ASC。

[0473] 38.根据实施方案37所述的方法,其中所述抗体与PYD、CARD结构域、或源自所述ASC蛋白的PYD或CARD结构域的表位结合。

[0474] 39.根据实施方案37所述的方法,其中所述抗体与如下氨基酸结合,所述氨基酸与选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%序列同一性。

[0475] 40.根据实施方案37-39中任一项所述的方法,其中所述抗体抑制所述患者肺中的ASC活性。

[0476] 41.根据实施方案23-40中任一项所述的方法,其中将所述组合物与药学上可接受的载体或稀释剂一起配制。

[0477] 42.根据实施方案23-41中任一项所述的方法,其中将所述组合物脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入施用。43.一种与含有半胱天冬酶激活招募结构域的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段与ASC的表位特异性地结合,其中所述表位包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:5的5-10、10-15或15-20个氨基酸的氨基酸序列或者由其组成。

[0478] 44.一种与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,或在HCDR1、HCDR2和/或HCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。

[0479] 45.一种与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3,或在LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。

[0480] 46.一种与ASC特异性结合的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述抗体或所述抗体片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:6的HCDR1、SEQ ID NO:7的HCDR2和SEQ ID NO:8的HCDR3,或在HCDR1、HCDR2和/或HCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的LCDR1、SEQ ID NO:13的LCDR2和SEQ ID NO:14的LCDR3,或在LCDR1、LCDR2和/或LCDR3中具有至少一个氨基酸取代的其变体。

[0481] 47.根据实施方案44所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18、19、20、21、22或与SEQ ID NO:18、19、20、21或22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0482] 48.根据实施方案45所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28、29、30、31或与SEQ ID NO:28、29、30或31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0483] 49.根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18、19、20、21、22或与SEQ ID NO:18、19、20、21或22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28、29、30、31或与SEQ ID NO:28、29、30或31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0484] 50. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0485] 51. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0486] 52. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0487] 53. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:18或与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0488] 54. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0489] 55. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0490] 56. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0491] 57. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:19或与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0492] 58. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0493] 59. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基

酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0494] 60. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0495] 61. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0496] 62. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0497] 63. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段, 其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列; 并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0498] 64. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0499] 65. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0500] 66. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:28或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0501] 67. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0502] 68.根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:30或与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0503] 69. 根据实施方案46所述的单克隆抗体或其抗体片段, 其中所述VH区氨基酸序列包含SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同

的氨基酸序列;并且其中所述VL区氨基酸序列包含SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0504] 70.根据实施方案44-69中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述ASC是人ASC蛋白。

[0505] 71.根据实施方案44-70中任一项所述的单克隆抗体片段,其中所述抗体片段是Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、单结构域抗体、双抗体或单链骆驼抗体。

[0506] 72.根据实施方案44-71中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段,其中所述单克隆抗体或其抗体片段是人的、人源化的或嵌合的。

[0507] 73.一种分离的核酸分子,其编码根据实施方案44-72中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段。

[0508] 74.一种包含根据实施方案73所述的核酸分子的表达载体。

[0509] 75.根据实施方案32所述的表达载体,其中所述核酸分子与适合于在宿主细胞中表达核酸区段的调节序列可操作地连接。

[0510] 76.一种包含根据实施方案74或75所述的表达载体的重组宿主细胞。

[0511] 77.一种产生与ASC特异性结合的抗体或抗体片段的方法,所述方法包括:在表达所述核酸分子的条件下培养包含根据实施方案74或75所述的表达载体的重组宿主细胞,从而产生与ASC特异性结合的所述单克隆抗体或其抗体片段。

[0512] 78.一种药物组合物,其包含根据实施方案44-72中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0513] 79.一种治疗受试者中炎症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案44-72中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段,从而治疗所述受试者中的炎症。

[0514] 80.根据实施方案79所述的方法,其中所述施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。

[0515] 81.根据实施方案80所述的方法,其中所述炎症是炎性小体相关炎症。

[0516] 82.根据实施方案81所述的方法,其中所述炎性小体相关炎症与中枢神经系统(CNS)损伤、自身免疫疾病、自身炎症性疾病、代谢疾病或神经变性疾病相关。

[0517] 83.根据实施方案82所述的方法,其中所述CNS损伤选自创伤性脑损伤(TBI)、中风和脊髓损伤(SCI)。

[0518] 84.根据实施方案82所述的方法,其中所述自身免疫疾病或神经变性疾病是肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病、帕金森病、肌营养不良(MD)、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、炎症肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)或多发性硬化症(MS)。

[0519] 85.根据实施方案82所述的方法,其中所述自身炎症性疾病是冷吡林相关周期性综合征(CAPS)。

[0520] 86.根据实施方案85所述的方法,其中所述CAPS选自家族性寒冷型自身炎症综合征(FCAS)、穆-韦二氏综合征(MWS)和新生儿发病多系统炎症性疾病(NOMID)。

[0521] 87.根据实施方案82所述的方法,其中所述代谢疾病是代谢综合征、肥胖、糖尿病、糖尿病肾病或糖尿病肾脏疾病(DKD)、胰岛素抗性、动脉粥样硬化、脂质沉积性障碍、糖原贮积病、中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症、非酒精性脂肪性肝病(例如,非酒精性脂肪性肝炎

(NASH)) 和痛风。

[0522] 88. 根据实施方案79-87中任一项所述的方法, 其中所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。

[0523] 89. 根据实施方案79-87中任一项所述的方法, 其中与对照相比, 所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致ASC活性降低。

[0524] 90. 根据实施方案89所述的方法, 其中所述对照是未治疗的受试者。

[0525] 91. 根据实施方案79-90中任一项所述的方法, 其中所述施用是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入。

[0526] 92. 一种治疗受试者中多发性硬化症 (MS) 的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据实施方案44-72中任一项所述的单克隆抗体或其抗体片段, 从而治疗所述受试者中的MS。

[0527] 93. 根据实施方案92所述的方法, 其中所述施用所述单克隆抗体或其抗体片段降低了至少炎性细胞因子的水平。

[0528] 94. 根据实施方案92所述的方法, 其中所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致对所述受试者中炎性小体激活的抑制。

[0529] 95. 根据实施方案92-94中任一项所述的方法, 其中与对照相比, 所述单克隆抗体或其抗体片段的施用导致ASC活性降低。

[0530] 96. 根据实施方案95所述的方法, 其中所述对照是未治疗的受试者。

[0531] 97. 根据实施方案92-96中任一项所述的方法, 其中所述施用是经由脑室内、腹膜内、静脉内或通过吸入。

[0532] *****

[0533] 上述不同的实施方案可以组合以提供另外的实施方案。本说明书中提到的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过引用以其全文并入本文。如果必要的话, 可以修改实施方案的方面, 以采用不同专利、申请和公开案的概念以提供又另外的实施方案。

[0534] 根据上文详细说明, 可以对实施方案作出这些和其他改变。总体上, 在以下权利要求书中, 所使用的术语不应解读为将权利要求书限制为说明书和权利要求书中公开的具体实施方案, 而应解读为包括所有可能的实施方案连同这些权利要求所享有的等效权利的全部范围。因此, 权利要求书不受本公开文本的限制。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 迈阿密大学
- [0003] R • W • 基恩
- [0004] W • D • 迪特里希
- [0005] J • P • 德里韦罗 • 瓦卡里
- [0006] H • M • 布拉姆利特
- [0007] R • 布兰比拉
- [0008] <120> 用于治疗炎性小体相关疾病或病症的方法和组合物
- [0009] <130> UNMI-010/02W0 316457-2045
- [0010] <150> US 16/026,482
- [0011] <151> 2018-07-03
- [0012] <160> 35
- [0013] <170> PatentIn 3.5版
- [0014] <210> 1
- [0015] <211> 16
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)
- [0018] <400> 1
- [0019] Ala Leu Arg Gln Thr Gln Pro Tyr Leu Val Thr Asp Leu Glu Gln Ser
- [0020] 1 5 10 15
- [0021] <210> 2
- [0022] <211> 14
- [0023] <212> PRT
- [0024] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0025] <400> 2
- [0026] Arg Glu Ser Gln Ser Tyr Leu Val Glu Asp Leu Glu Arg Ser
- [0027] 1 5 10
- [0028] <210> 3
- [0029] <211> 19
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0032] <400> 3
- [0033] Cys Glu Tyr Tyr Thr Glu Ile Arg Glu Arg Glu Arg Glu Lys Ser Glu
- [0034] 1 5 10 15
- [0035] Lys Gly Arg
- [0036] <210> 4
- [0037] <211> 15
- [0038] <212> PRT

[0039]	<213>	褐家鼠 (Rattus norvegicus)
[0040]	<400>	4
[0041]		Met Glu Glu Ser Gln Ser Lys Glu Glu Ser Asn Thr Glu Gly Cys
[0042]	1	5 10 15
[0043]	<210>	5
[0044]	<211>	21
[0045]	<212>	PRT
[0046]	<213>	人工序列
[0047]	<220>	
[0048]	<223>	半胱天冬酶激活招募结构域的抗原片段 (ASC)
[0049]	<400>	5
[0050]		Lys Lys Phe Lys Leu Lys Leu Leu Ser Val Pro Leu Arg Glu Gly Tyr
[0051]	1	5 10 15
[0052]		Gly Arg Ile Pro Arg
[0053]		20
[0054]	<210>	6
[0055]	<211>	7
[0056]	<212>	PRT
[0057]	<213>	人工序列
[0058]	<220>	
[0059]	<223>	重链 CDR1 氨基酸序列
[0060]	<400>	6
[0061]		Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
[0062]	1	5
[0063]	<210>	7
[0064]	<211>	16
[0065]	<212>	PRT
[0066]	<213>	人工序列
[0067]	<220>	
[0068]	<223>	重链 CDR2 氨基酸序列
[0069]	<400>	7
[0070]		His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
[0071]	1	5 10 15
[0072]	<210>	8
[0073]	<211>	11
[0074]	<212>	PRT
[0075]	<213>	人工序列
[0076]	<220>	
[0077]	<223>	重链 CDR3 氨基酸序列

[0078]	<400> 8
[0079]	Ser Thr Pro Ile Val Ala Asn Ala Met Asp Tyr
[0080]	1 5 10
[0081]	<210> 9
[0082]	<211> 21
[0083]	<212> DNA
[0084]	<213> 人工序列
[0085]	<220>
[0086]	<223> 重链 CDR1 核酸序列
[0087]	<400> 9
[0088]	actagtggaa tgggtgtgag c 21
[0089]	<210> 10
[0090]	<211> 48
[0091]	<212> DNA
[0092]	<213> 人工序列
[0093]	<220>
[0094]	<223> 重链 CDR2 核酸序列
[0095]	<400> 10
[0096]	cacatttatt gggatgatga taagcgctac aacccatctc tgaagagc 48
[0097]	<210> 11
[0098]	<211> 33
[0099]	<212> DNA
[0100]	<213> 人工序列
[0101]	<220>
[0102]	<223> 重链 CDR3 核酸序列
[0103]	<400> 11
[0104]	agcaccccca tcgtggccaa cgccatggac tac 33
[0105]	<210> 12
[0106]	<211> 15
[0107]	<212> PRT
[0108]	<213> 人工序列
[0109]	<220>
[0110]	<223> 轻(κ)链 CDR1 氨基酸序列
[0111]	<400> 12
[0112]	Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
[0113]	1 5 10 15
[0114]	<210> 13
[0115]	<211> 7
[0116]	<212> PRT

[0117]	<213> 人工序列
[0118]	<220>
[0119]	<223> 轻(κ)链 CDR2 氨基酸序列
[0120]	<400> 13
[0121]	Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
[0122]	1 5
[0123]	<210> 14
[0124]	<211> 9
[0125]	<212> PRT
[0126]	<213> 人工序列
[0127]	<220>
[0128]	<223> 轻(κ)链 CDR3 氨基酸序列
[0129]	<400> 14
[0130]	Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
[0131]	1 5
[0132]	<210> 15
[0133]	<211> 45
[0134]	<212> DNA
[0135]	<213> 人工序列
[0136]	<220>
[0137]	<223> 轻(κ)链 CDR1 核酸序列
[0138]	<400> 15
[0139]	aagccagcc agagtgttga ctacgacggc gacagttaca tgaat 45
[0140]	<210> 16
[0141]	<211> 21
[0142]	<212> DNA
[0143]	<213> 人工序列
[0144]	<220>
[0145]	<223> 轻(κ)链 CDR2 核酸序列
[0146]	<400> 16
[0147]	gccgcatcta acctggaatc c 21
[0148]	<210> 17
[0149]	<211> 27
[0150]	<212> DNA
[0151]	<213> 人工序列
[0152]	<220>
[0153]	<223> 轻(κ)链 CDR3 核酸序列
[0154]	<400> 17
[0155]	cagcaatcta atgaggaccc ttacact 27

[0156]	<210> 18
[0157]	<211> 121
[0158]	<212> PRT
[0159]	<213> 人工序列
[0160]	<220>
[0161]	<223> VH1 重链序列
[0162]	<400> 18
[0163]	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Ile Val Lys Pro Thr Gln
[0164]	1 5 10 15
[0165]	Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
[0166]	20 25 30
[0167]	Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
[0168]	35 40 45
[0169]	Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
[0170]	50 55 60
[0171]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val
[0172]	65 70 75 80
[0173]	Val Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Ser
[0174]	85 90 95
[0175]	Cys Ala Arg Ser Thr Pro Ile Val Ala Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[0176]	100 105 110
[0177]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0178]	115 120
[0179]	<210> 19
[0180]	<211> 121
[0181]	<212> PRT
[0182]	<213> 人工序列
[0183]	<220>
[0184]	<223> VH2 重链序列
[0185]	<400> 19
[0186]	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
[0187]	1 5 10 15
[0188]	Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
[0189]	20 25 30
[0190]	Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu
[0191]	35 40 45
[0192]	Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
[0193]	50 55 60
[0194]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val

[0195]	65	70	75	80
[0196]	Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Ser			
[0197]	85	90	95	
[0198]	Cys Ala Arg Ser Thr Pro Ile Val Ala Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly			
[0199]	100	105	110	
[0200]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0201]	115	120		
[0202]	<210> 20			
[0203]	<211> 121			
[0204]	<212> PRT			
[0205]	<213> 人工序列			
[0206]	<220>			
[0207]	<223> VH3 重链序列			
[0208]	<400> 20			
[0209]	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln			
[0210]	1	5	10	15
[0211]	Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser			
[0212]	20	25	30	
[0213]	Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu			
[0214]	35	40	45	
[0215]	Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser			
[0216]	50	55	60	
[0217]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val			
[0218]	65	70	75	80
[0219]	Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr			
[0220]	85	90	95	
[0221]	Cys Ala Arg Ser Thr Pro Ile Val Ala Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly			
[0222]	100	105	110	
[0223]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0224]	115	120		
[0225]	<210> 21			
[0226]	<211> 121			
[0227]	<212> PRT			
[0228]	<213> 人工序列			
[0229]	<220>			
[0230]	<223> VH4 重链序列			
[0231]	<400> 21			
[0232]	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln			
[0233]	1	5	10	15

[0234]	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
[0235]				20					25					30		
[0236]	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
[0237]			35					40					45			
[0238]	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ser
[0239]		50					55				60					
[0240]	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
[0241]	65					70					75				80	
[0242]	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
[0243]					85					90					95	
[0244]	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	Asn	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
[0245]				100					105					110		
[0246]	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
[0247]			115					120								
[0248]	<210> 22															
[0249]	<211> 121															
[0250]	<212> PRT															
[0251]	<213> 人工序列															
[0252]	<220>															
[0253]	<223> VH0 (嵌合) 重链															
[0254]	<400> 22															
[0255]	Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln
[0256]	1			5					10					15		
[0257]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
[0258]				20					25					30		
[0259]	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
[0260]			35					40					45			
[0261]	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ser
[0262]		50					55					60				
[0263]	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Gln	Val
[0264]	65					70					75				80	
[0265]	Phe	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Ser
[0266]					85					90					95	
[0267]	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Pro	Ile	Val	Ala	Asn	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
[0268]				100					105					110		
[0269]	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
[0270]			115					120								
[0271]	<210> 23															
[0272]	<211> 363															

[0273]	<212> DNA	
[0274]	<213> 人工序列	
[0275]	<220>	
[0276]	<223> VH1 重链序列	
[0277]	<400> 23	
[0278]	caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgcc atcgtgaaac ccacacagac cctcacgctg	60
[0279]	acctgcagct tctctgggtt ctactcagc actagtggaa tgggtgtgag ctggatccgt	120
[0280]	cagccctcag gaaagggcct ggagtggctt gcacacattt attgggatga tgataagcgc	180
[0281]	tacaacccat ctctgaagag caggctcacc atctccaagg acagctccaa aaaccaggtg	240
[0282]	gtccttaaaa tcaccagcgt ggaccctgtg gacacagcca catattcctg tgcacggagc	300
[0283]	accccatcg tggccaacgc catggactac tggggccaag gaaccagcgt caccgtctcc	360
[0284]	tca	363
[0285]	<210> 24	
[0286]	<211> 363	
[0287]	<212> DNA	
[0288]	<213> 人工序列	
[0289]	<220>	
[0290]	<223> VH2 重链序列	
[0291]	<400> 24	
[0292]	caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgcc ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg	60
[0293]	acctgcagct tctctgggtt ctactcagc actagtggaa tgggtgtgag ctggatccgt	120
[0294]	cagcccgccg gaaagggcct ggagtggctt gcacacattt attgggatga tgataagcgc	180
[0295]	tacaacccat ctctgaagag caggctcacc atctccaagg acagctccaa aaaccaggtg	240
[0296]	gtccttacia tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattcctg tgcacggagc	300
[0297]	accccatcg tggccaacgc catggactac tggggccaag gaaccctggt caccgtctcc	360
[0298]	tca	363
[0299]	<210> 25	
[0300]	<211> 363	
[0301]	<212> DNA	
[0302]	<213> 人工序列	
[0303]	<220>	
[0304]	<223> VH3 重链序列	
[0305]	<400> 25	
[0306]	caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgcc ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg	60
[0307]	acctgcagct tctctgggtt ctactcagc actagtggaa tgggtgtgag ctggatccgt	120
[0308]	cagcccgccg gaaagggcct ggagtggctt gcacacattt attgggatga tgataagcgc	180
[0309]	tacaacccat ctctgaagag caggctcacc atctccaagg acagctccaa aaaccaggtg	240
[0310]	gtccttacia tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgcacggagc	300
[0311]	accccatcg tggccaacgc catggactac tggggccaag gaaccctggt caccgtctcc	360

[0312]	tca 363
[0313]	<210> 26
[0314]	<211> 363
[0315]	<212> DNA
[0316]	<213> 人工序列
[0317]	<220>
[0318]	<223> VH4 重链序列
[0319]	<400> 26
[0320]	caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgcc ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60
[0321]	acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actagtggaa tgggtgtgag ctggatccgt 120
[0322]	cagcccgccg gaaagggcct ggagtggctt gcacacattt attgggatga tgataagcgc 180
[0323]	tacaacccat ctctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccagggtg 240
[0324]	gtccttataa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgcacggagc 300
[0325]	acccccatcg tggccaacgc catggactac tggggccaag gaaccctggt caccgtctcc 360
[0326]	tca 363
[0327]	<210> 27
[0328]	<211> 363
[0329]	<212> DNA
[0330]	<213> 人工序列
[0331]	<220>
[0332]	<223> VH0 (嵌合) 重链
[0333]	<400> 27
[0334]	caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
[0335]	acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120
[0336]	cagccttcag gaaagggtct ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180
[0337]	tataacccat ccctgaagag ccggctcaca atctccaagg attcctccag caaccaggtc 240
[0338]	ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catactcctg tgctcgaagt 300
[0339]	actccgattg tagctaattgc tatggactac tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc 360
[0340]	tca 363
[0341]	<210> 28
[0342]	<211> 111
[0343]	<212> PRT
[0344]	<213> 人工序列
[0345]	<220>
[0346]	<223> VL1 轻链序列
[0347]	<400> 28
[0348]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0349]	1 5 10 15
[0350]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

[0351]	20	25	30
[0352]	Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
[0353]	35	40	45
[0354]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
[0355]	50	55	60
[0356]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[0357]	65	70	75
[0358]	Ser Leu Gln Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
[0359]	85	90	95
[0360]	Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0361]	100	105	110
[0362]	<210> 29		
[0363]	<211> 111		
[0364]	<212> PRT		
[0365]	<213> 人工序列		
[0366]	<220>		
[0367]	<223> VL2 轻链序列		
[0368]	<400> 29		
[0369]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[0370]	1	5	10
[0371]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp		
[0372]	20	25	30
[0373]	Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
[0374]	35	40	45
[0375]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
[0376]	50	55	60
[0377]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[0378]	65	70	75
[0379]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
[0380]	85	90	95
[0381]	Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0382]	100	105	110
[0383]	<210> 30		
[0384]	<211> 111		
[0385]	<212> PRT		
[0386]	<213> 人工序列		
[0387]	<220>		
[0388]	<223> VL3 轻链序列		
[0389]	<400> 30		

[0390]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
[0391]	1				5					10					15	
[0392]	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp
[0393]				20					25					30		
[0394]	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
[0395]			35					40					45			
[0396]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
[0397]		50					55					60				
[0398]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[0399]	65					70				75					80	
[0400]	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
[0401]					85					90					95	
[0402]	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
[0403]				100					105					110		
[0404]	<210> 31															
[0405]	<211> 111															
[0406]	<212> PRT															
[0407]	<213> 人工序列															
[0408]	<220>															
[0409]	<223> VL0 嵌合轻链序列															
[0410]	<400> 31															
[0411]	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
[0412]	1				5					10					15	
[0413]	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp
[0414]				20					25					30		
[0415]	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
[0416]			35					40					45			
[0417]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
[0418]		50					55					60				
[0419]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
[0420]	65					70				75					80	
[0421]	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
[0422]					85					90					95	
[0423]	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
[0424]				100					105					110		
[0425]	<210> 32															
[0426]	<211> 333															
[0427]	<212> DNA															
[0428]	<213> 人工序列															

[0429]	<220>
[0430]	<223> VL1 轻链序列
[0431]	<400> 32
[0432]	gacatcgtgc tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
[0433]	atcaactgca aggccagcca gagtgttgac tacgacggcg acagttacat gaattggtac 120
[0434]	cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacg ccgcatctaa cctggaatcc 180
[0435]	ggcatccctg cccgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc 240
[0436]	agcctgcagg aggaagatgt ggcaacttat tactgtcagc aatctaataa ggacccttac 300
[0437]	acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333
[0438]	<210> 33
[0439]	<211> 333
[0440]	<212> DNA
[0441]	<213> 人工序列
[0442]	<220>
[0443]	<223> VL2 轻链序列
[0444]	<400> 33
[0445]	gacatcgtgc tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
[0446]	atcaactgca aggccagcca gagtgttgac tacgacggcg acagttacat gaattggtac 120
[0447]	cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacg ccgcatctaa cctggaatcc 180
[0448]	ggcatccctg cccgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc 240
[0449]	agcctgcagc ctgaagatgt ggcaacttat tactgtcagc aatctaataa ggacccttac 300
[0450]	acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333
[0451]	<210> 34
[0452]	<211> 333
[0453]	<212> DNA
[0454]	<213> 人工序列
[0455]	<220>
[0456]	<223> VL3 轻链序列
[0457]	<400> 34
[0458]	gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
[0459]	atcaactgca aggccagcca gagtgttgac tacgacggcg acagttacat gaattggtac 120
[0460]	cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacg ccgcatctaa cctggaatcc 180
[0461]	ggcatccctg cccgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc 240
[0462]	agcctgcagc ctgaagatgt ggcaacttat tactgtcagc aatctaataa ggacccttac 300
[0463]	acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa 333
[0464]	<210> 35
[0465]	<211> 333
[0466]	<212> DNA
[0467]	<213> 人工序列

[0468] <220>
[0469] <223> VL0 嵌合轻链序列
[0470] <400> 35
[0471] gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
[0472] atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggg atagttatat gaactggtac 120
[0473] caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
[0474] ggcattcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
[0475] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggacccgtac 300
[0476] acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

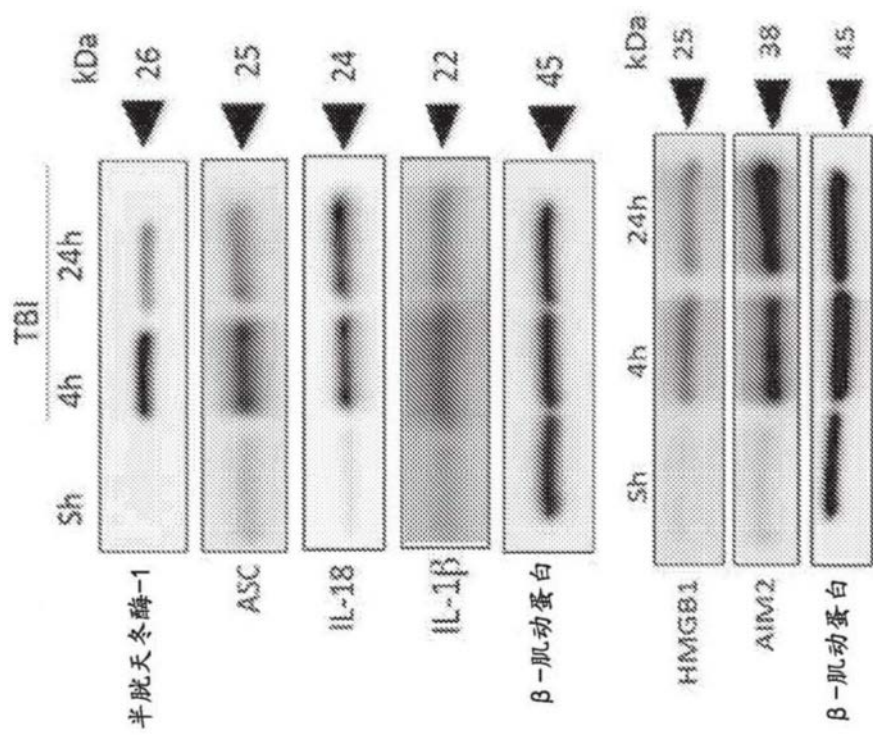


图1A

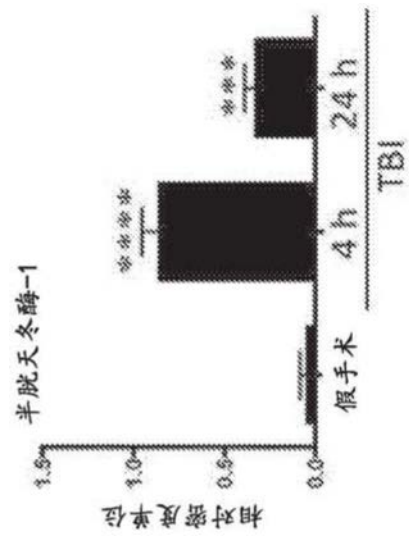


图1B

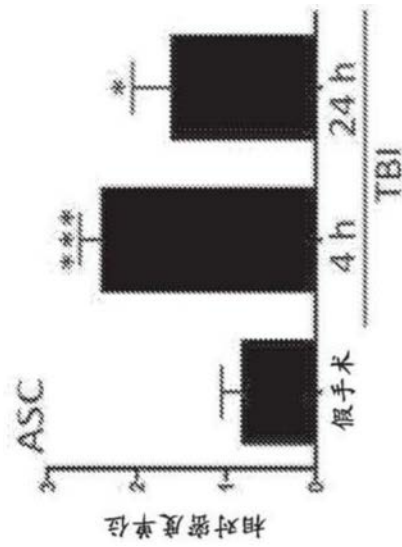


图1C

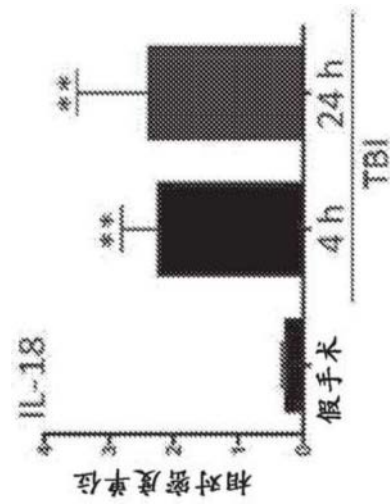


图1D

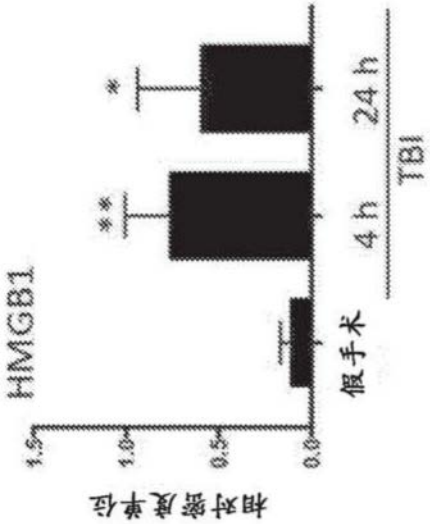


图1E

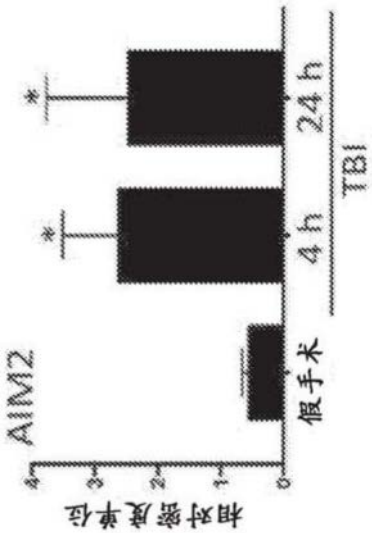


图1F

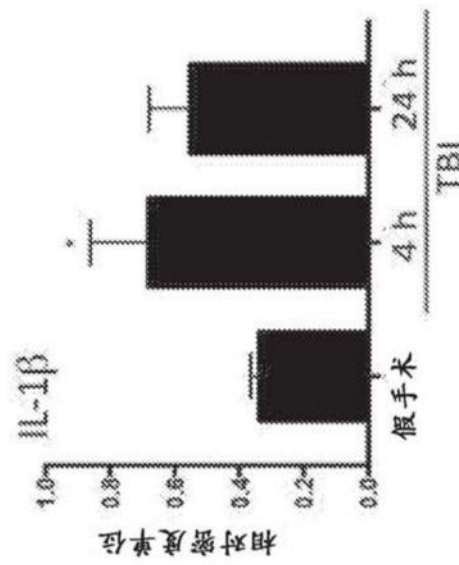


图1G

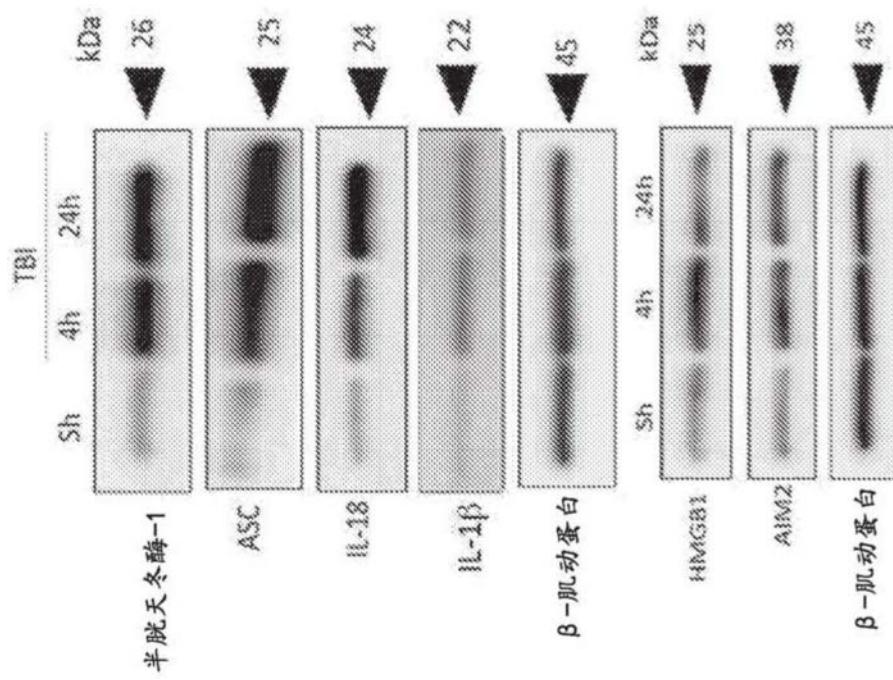


图1H

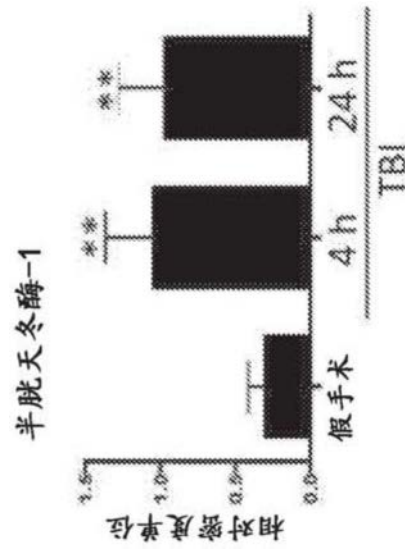


图1I

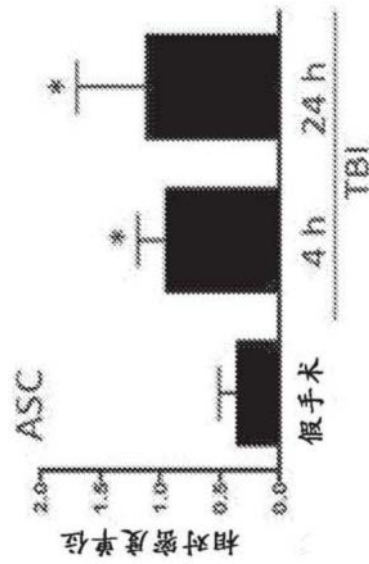


图1J

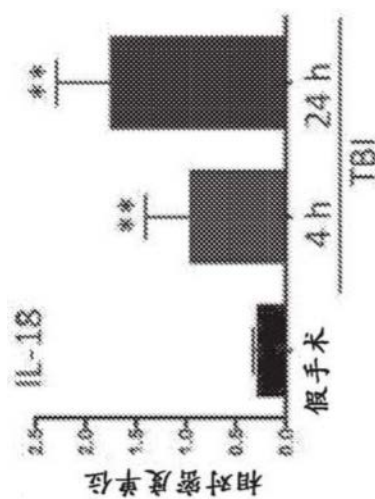


图1K

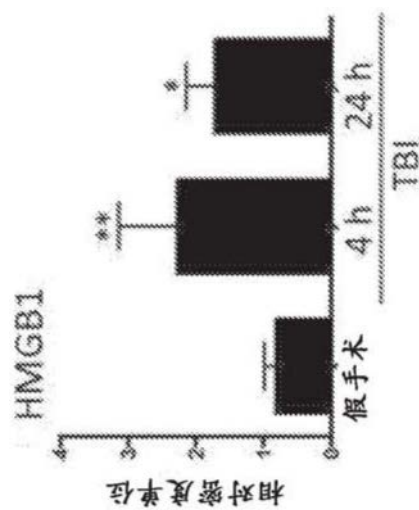


图1L

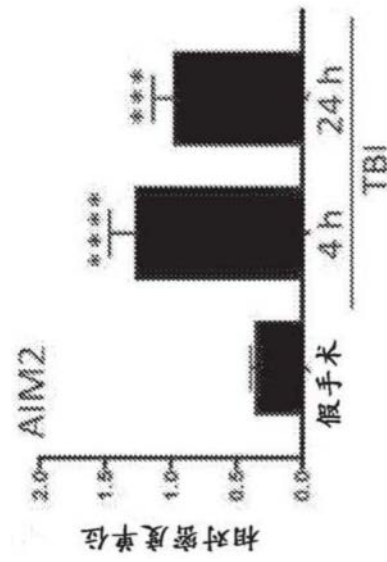


图1M

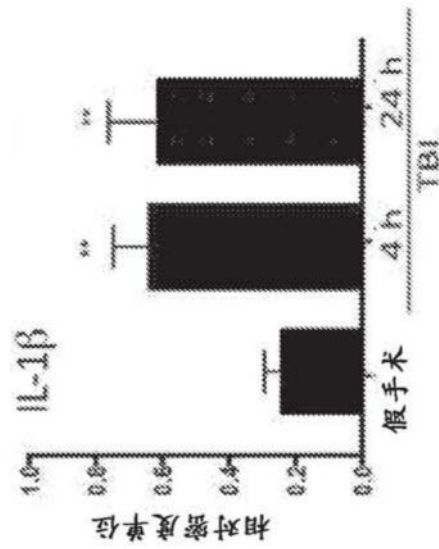


图1N

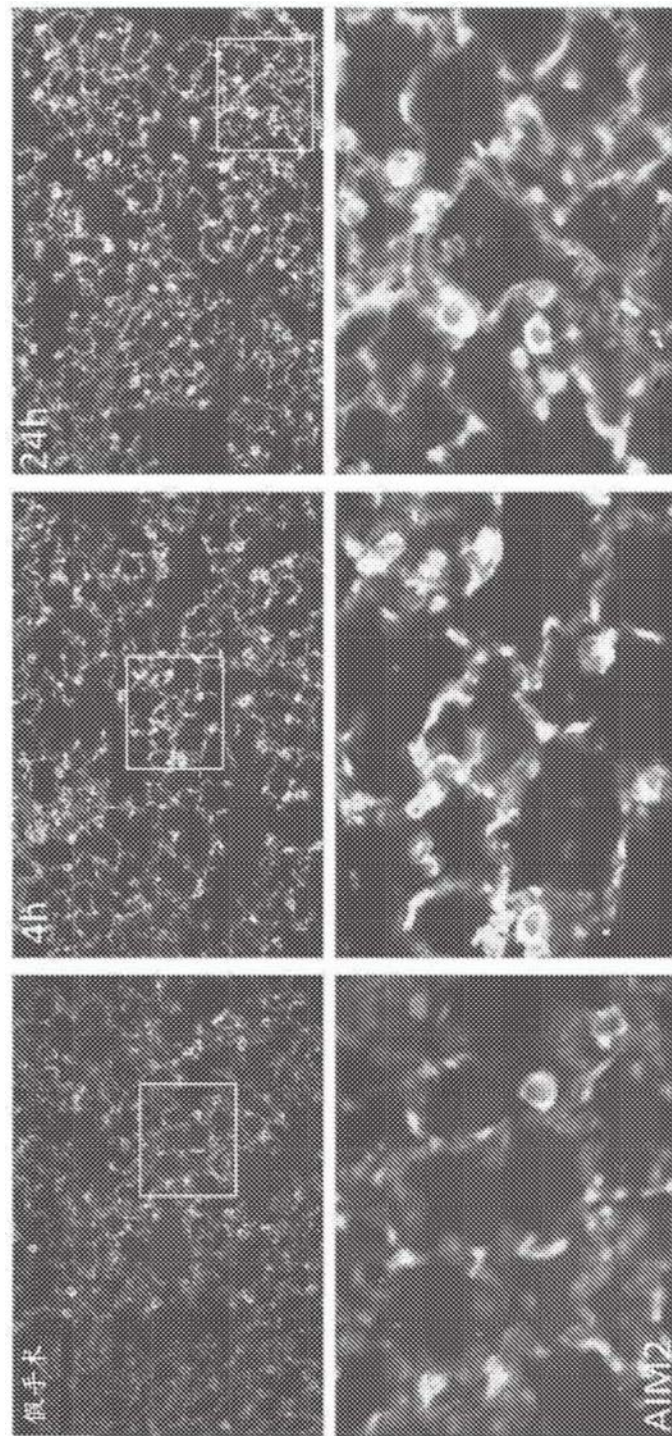


图2A

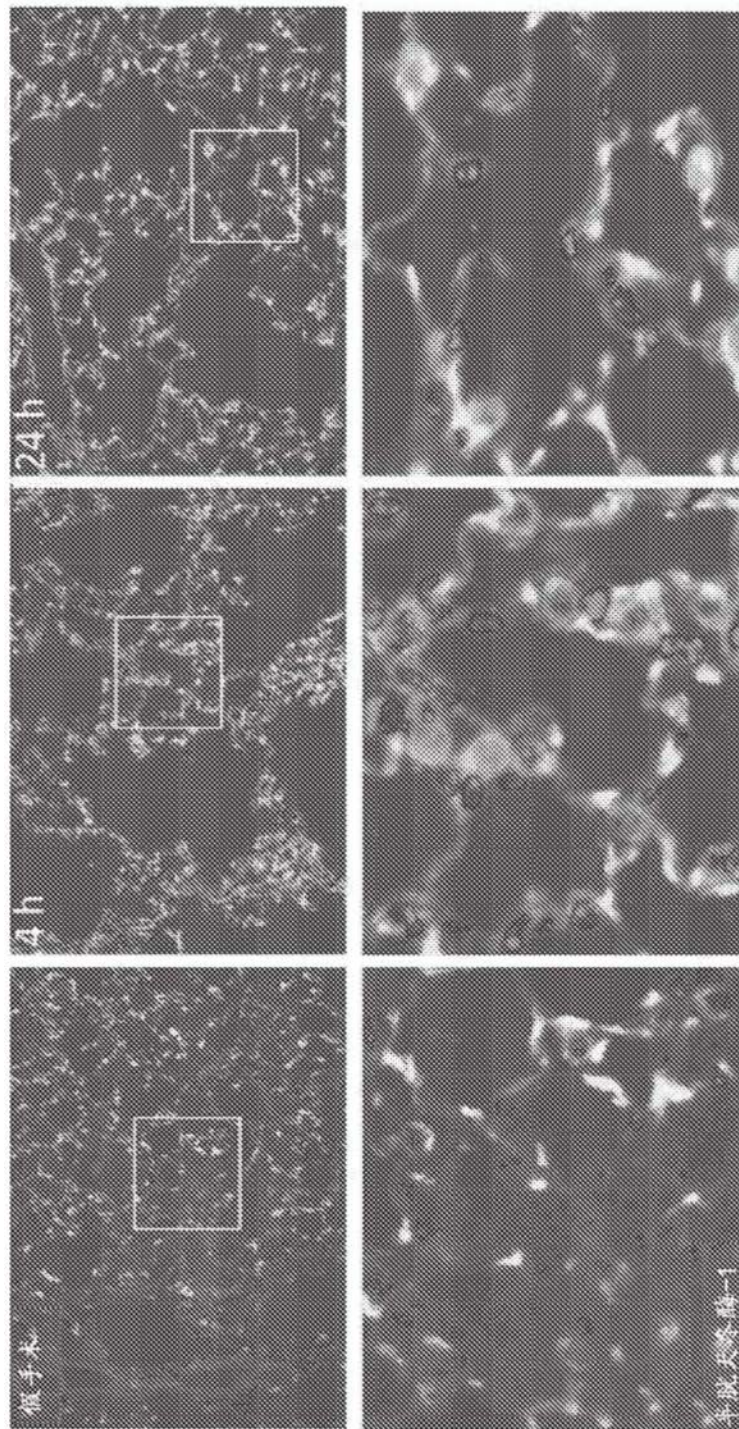


图2B

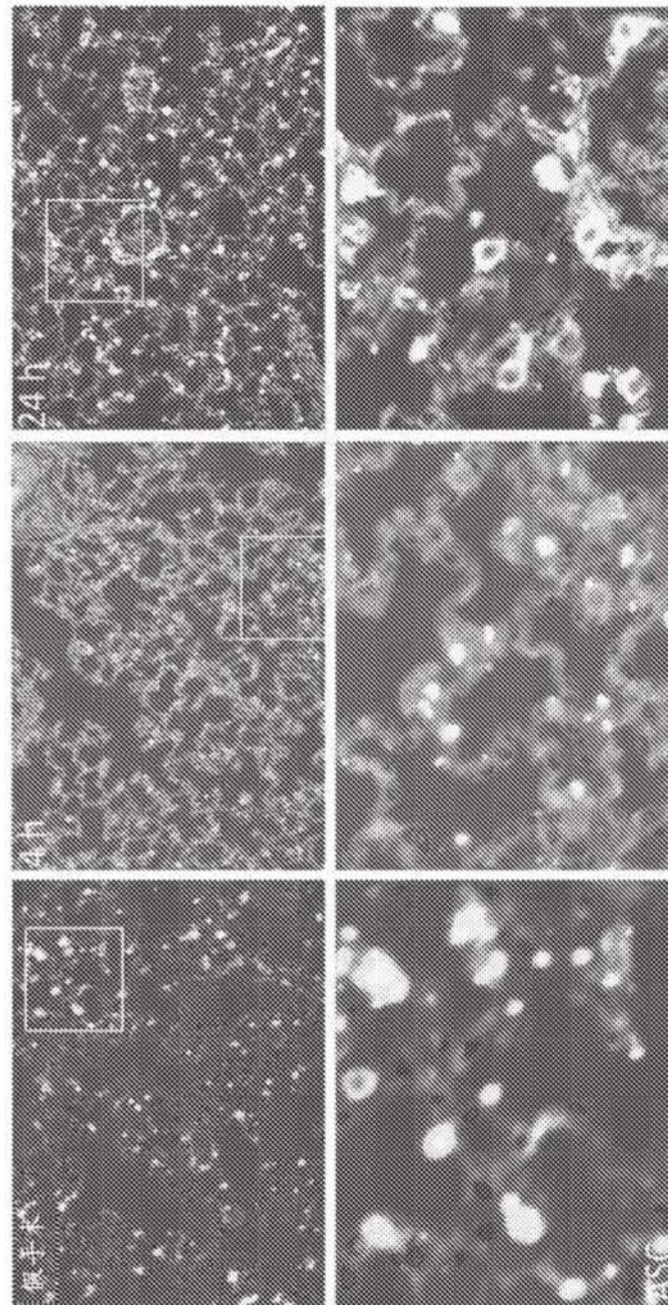


图2C

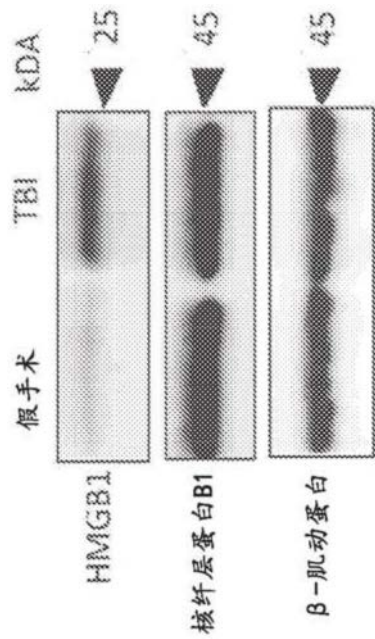


图3A

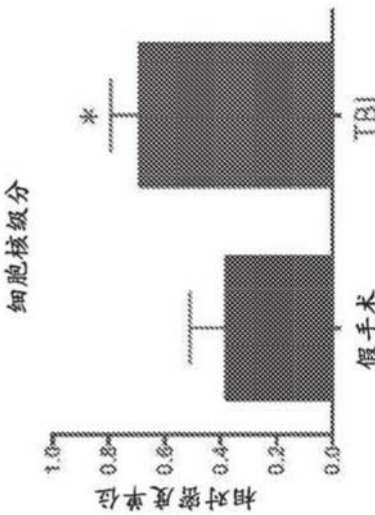


图3B

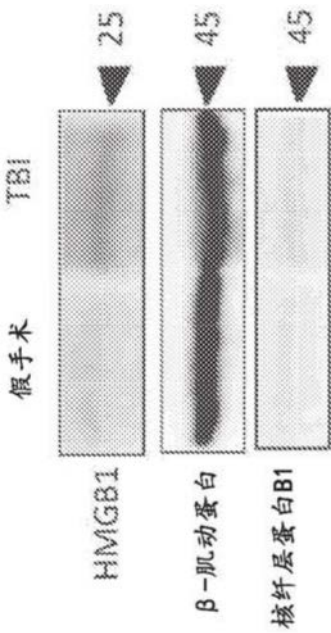


图3C

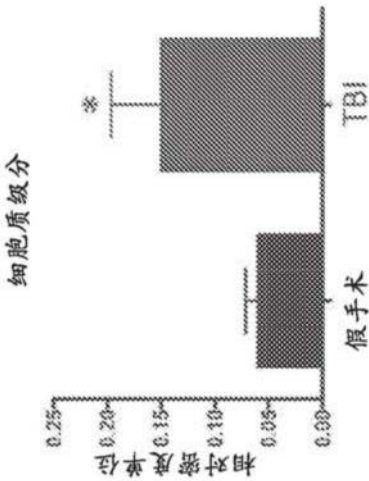


图3D

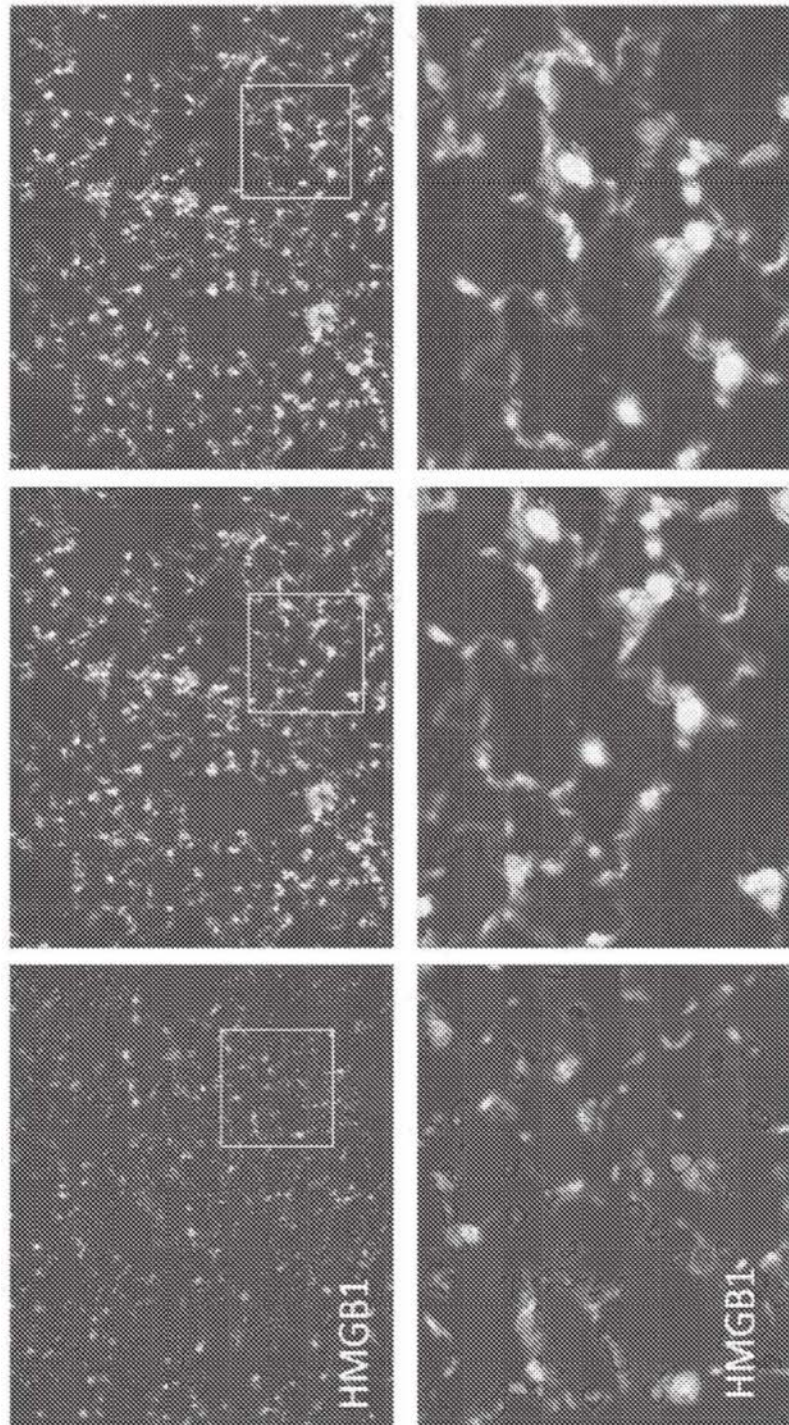


图3E

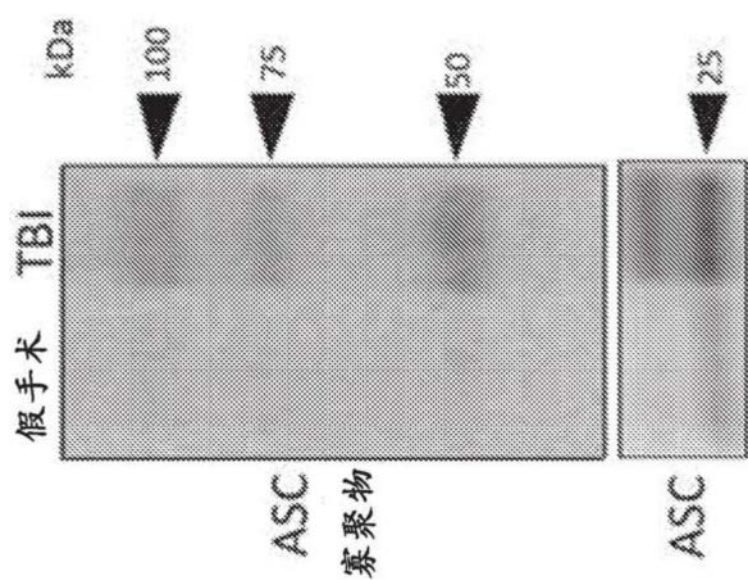


图4A

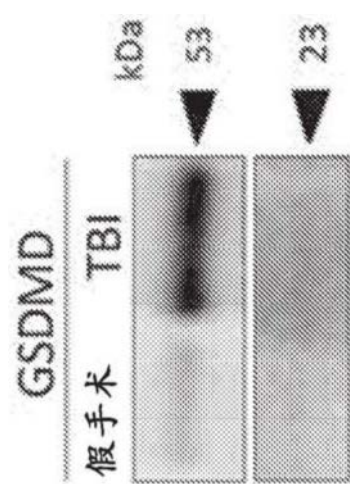


图4B

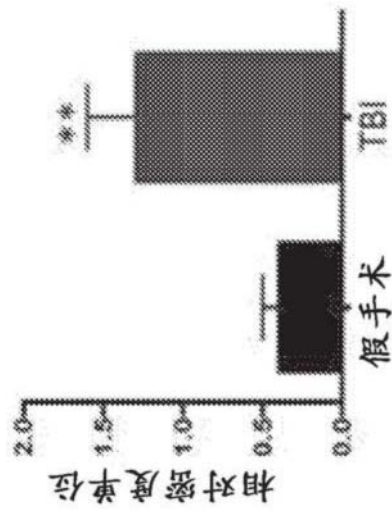


图4C

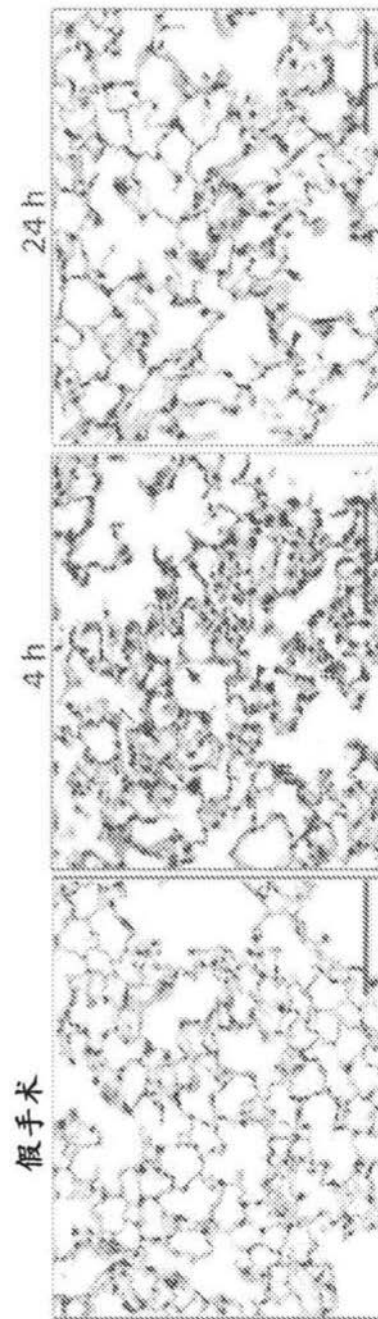


图5A

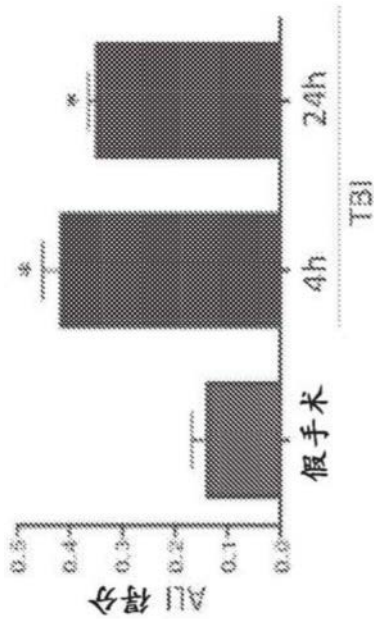


图5B

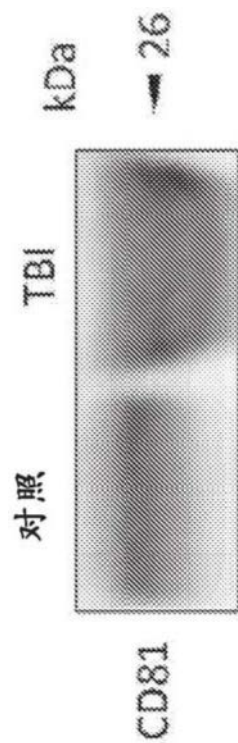


图6

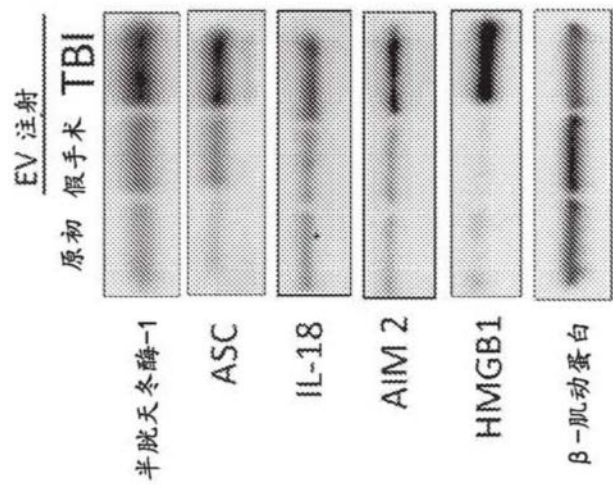


图7A

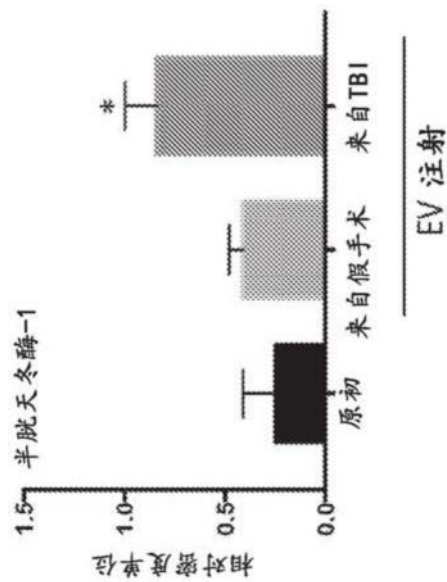


图7B

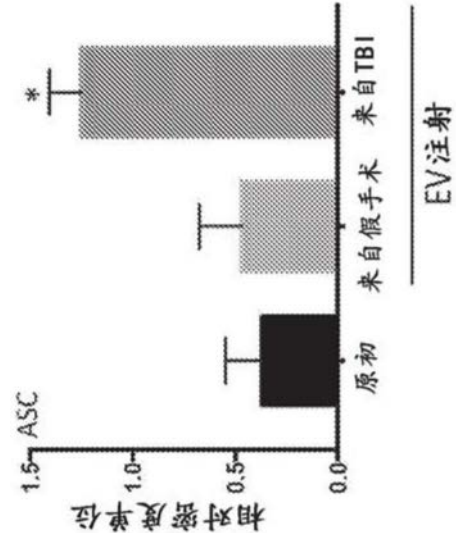


图7C

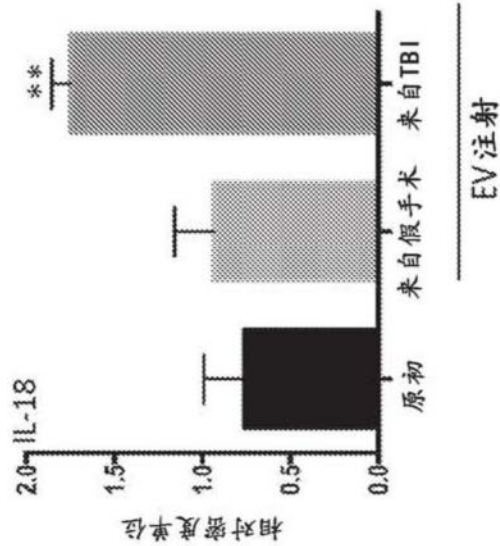


图7D

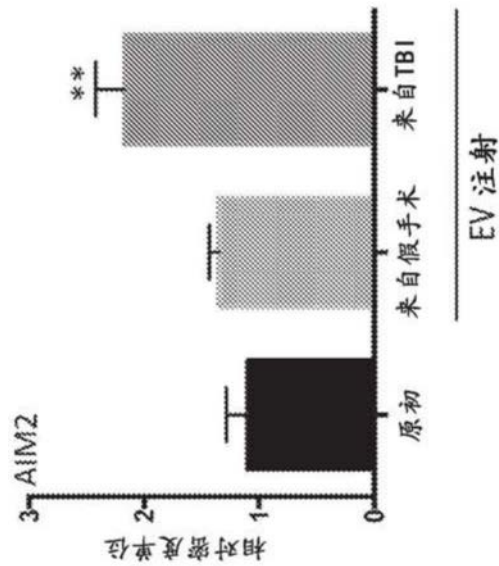


图7E

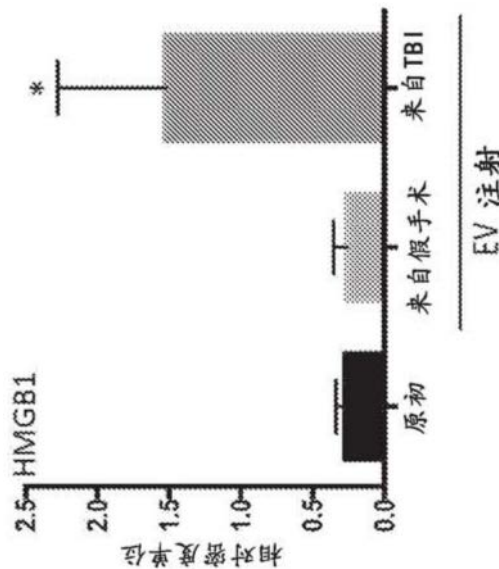


图7F

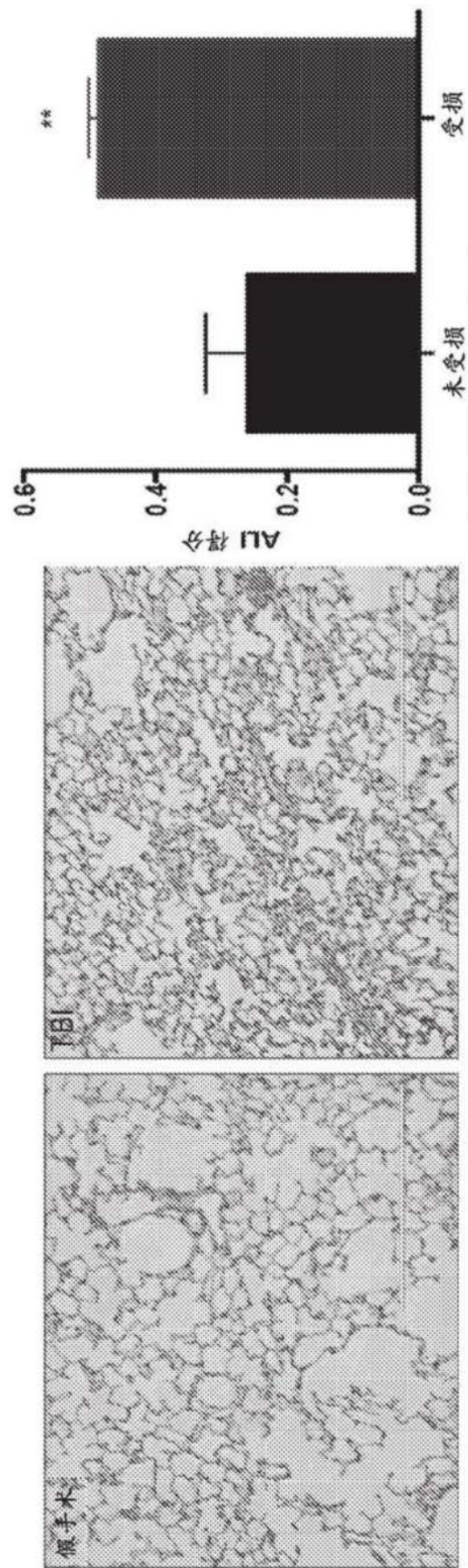


图7G

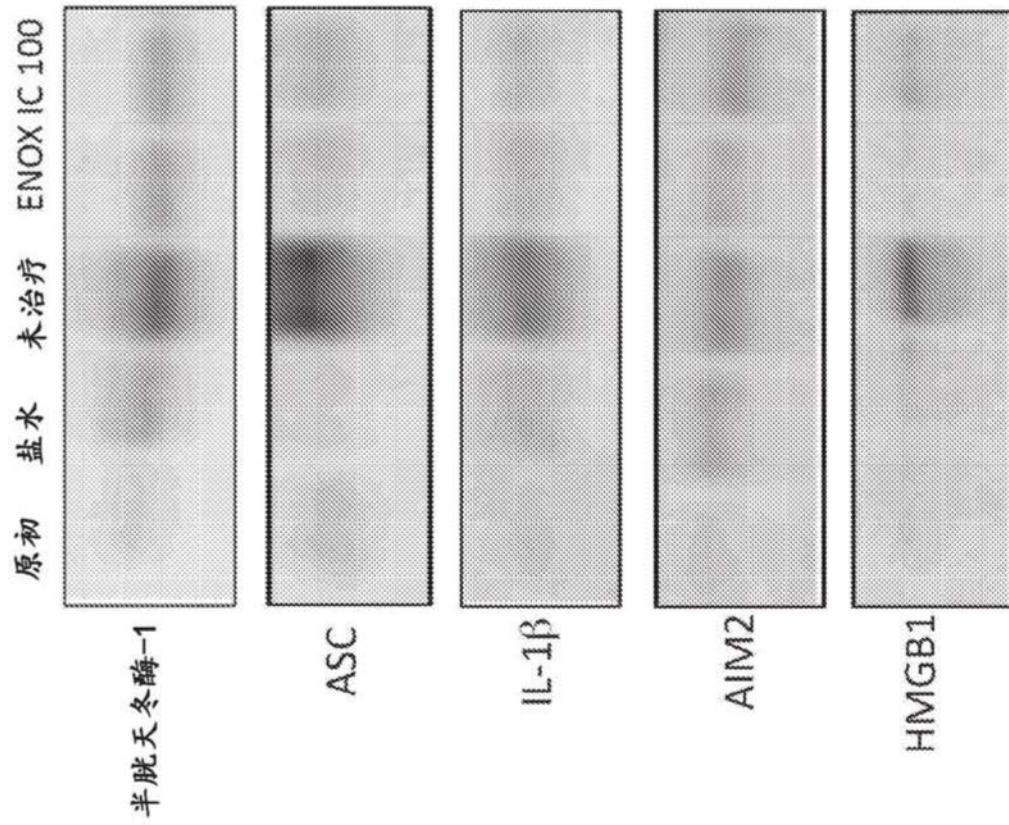


图8A

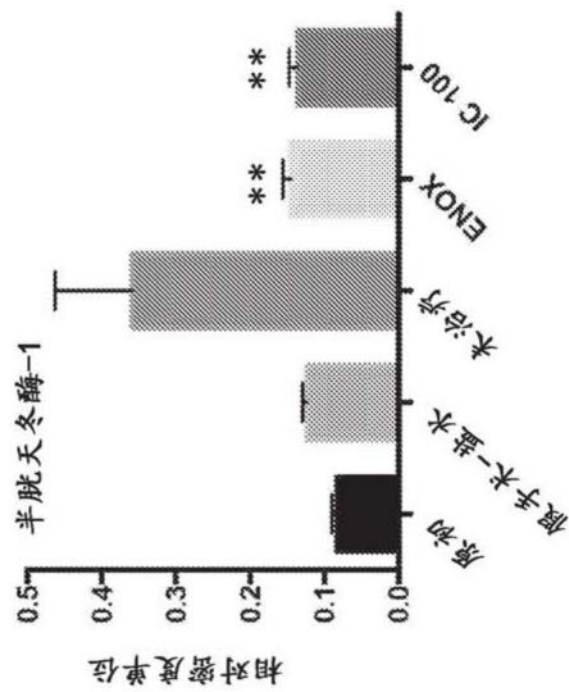


图8B

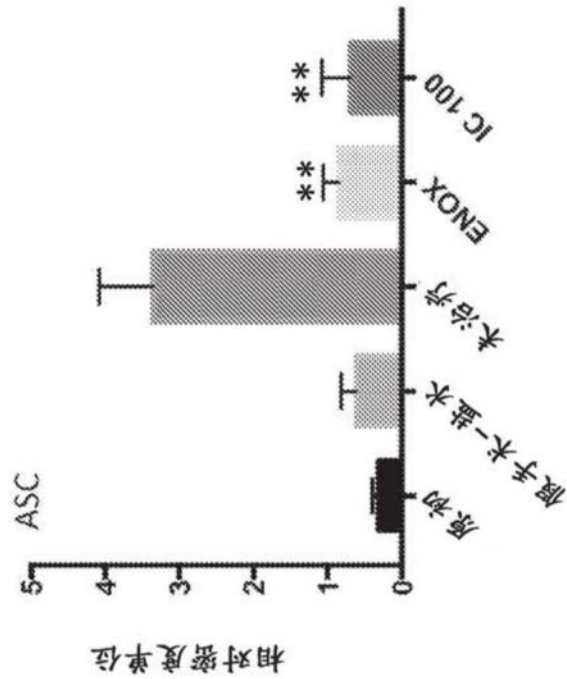


图8C

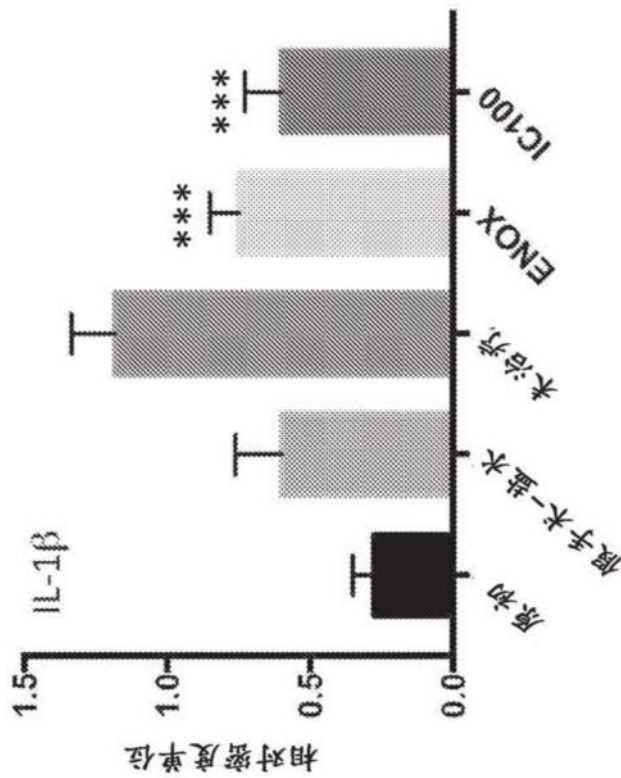


图8D

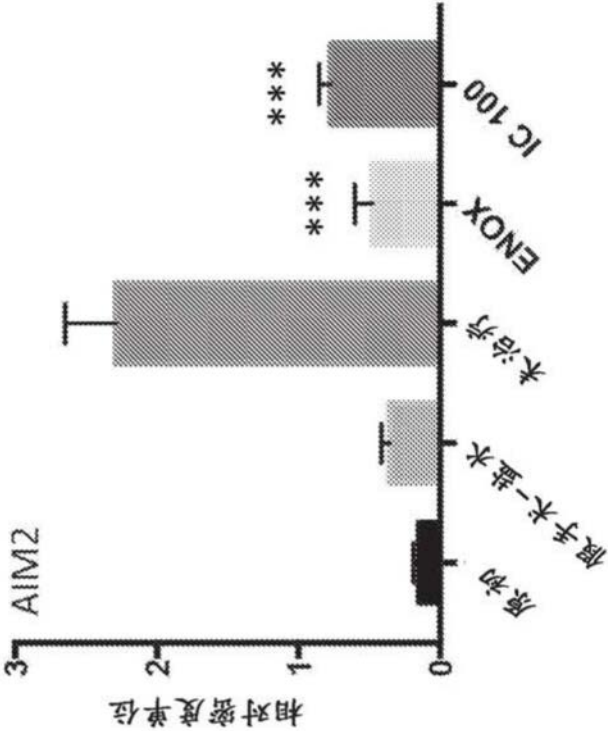


图8E

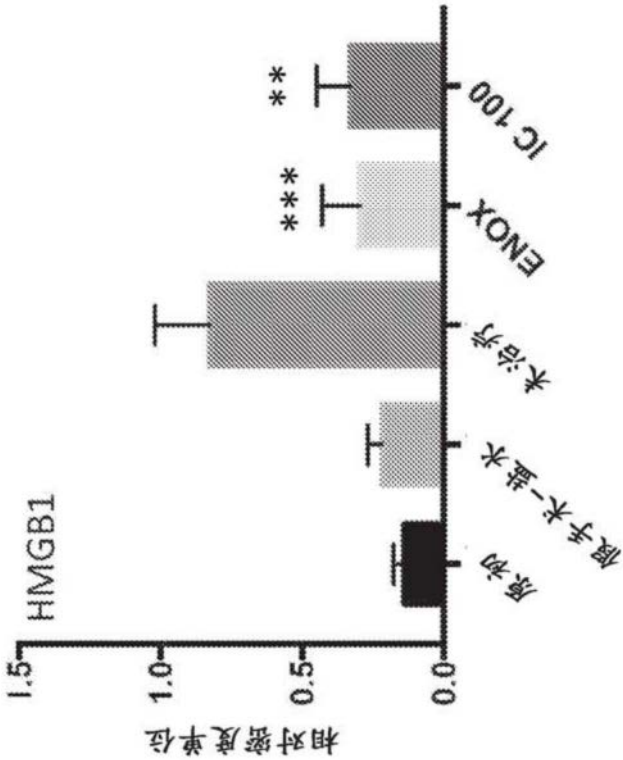


图8F

假手术媒介物

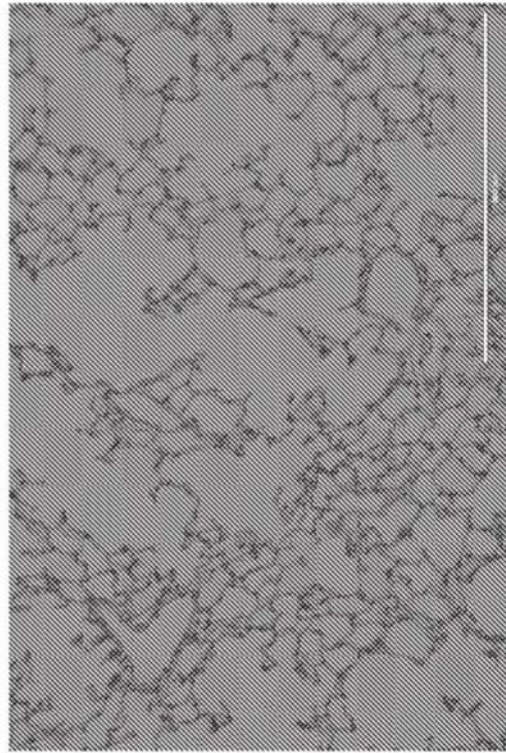


图9A

未治疗

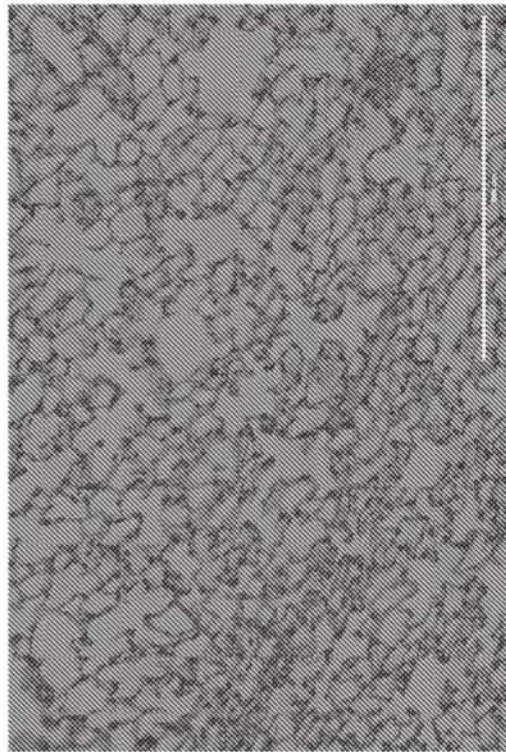


图9B

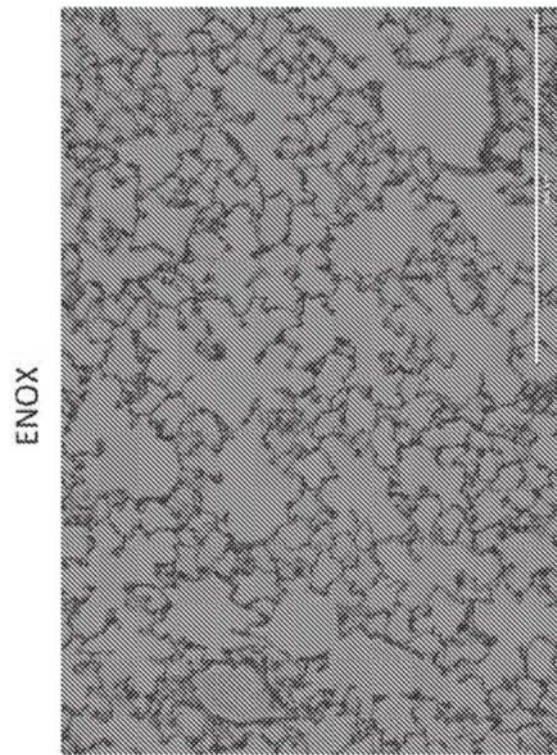


图9C

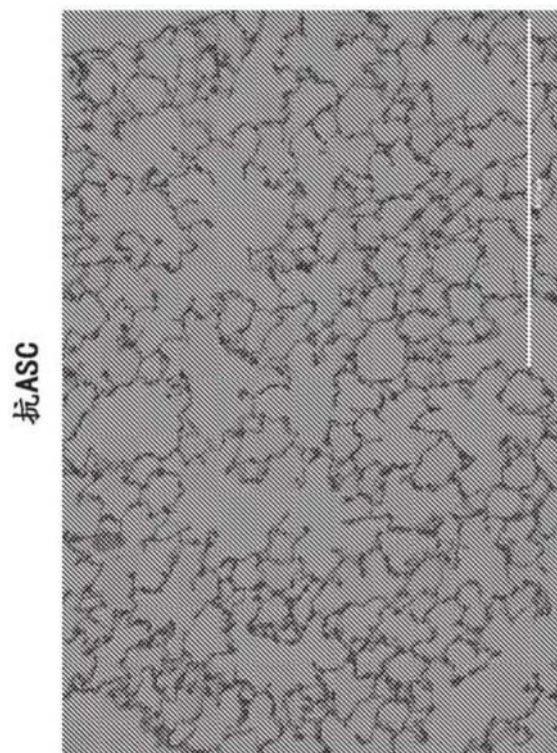


图9D

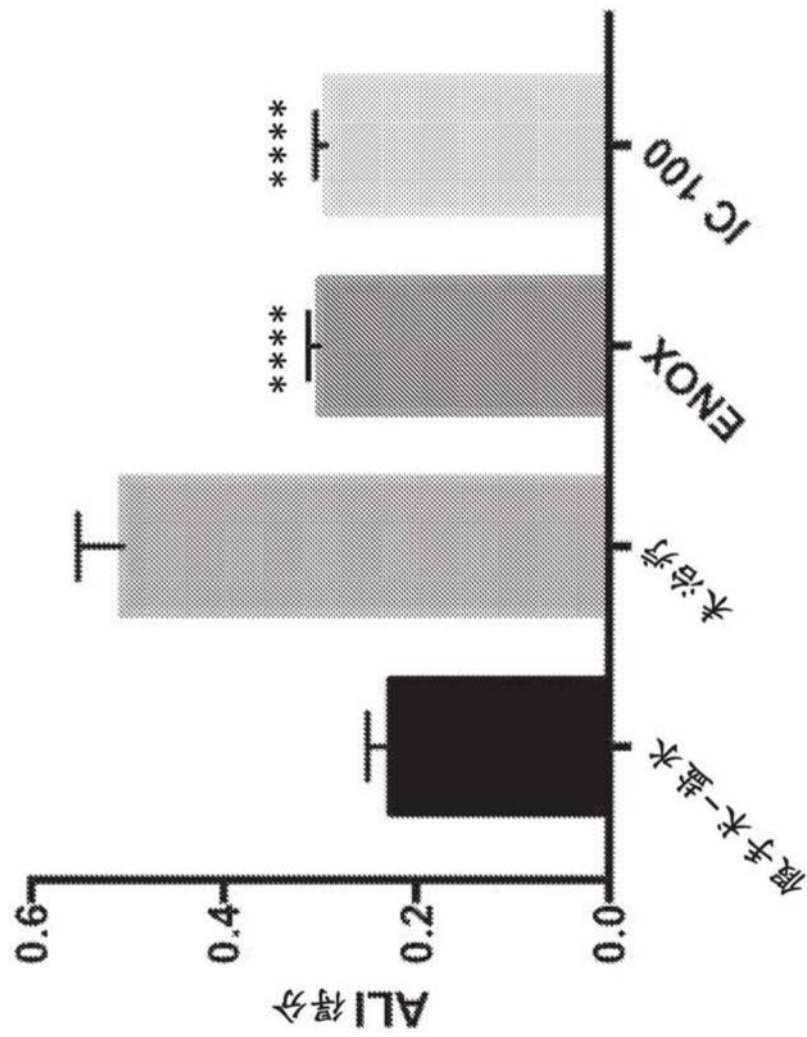


图9E

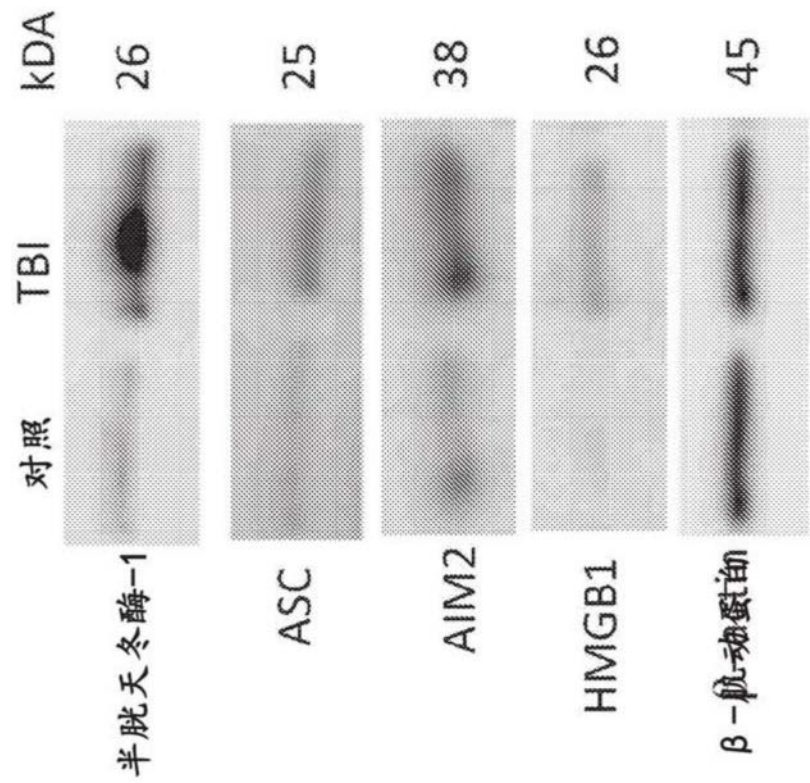


图10A

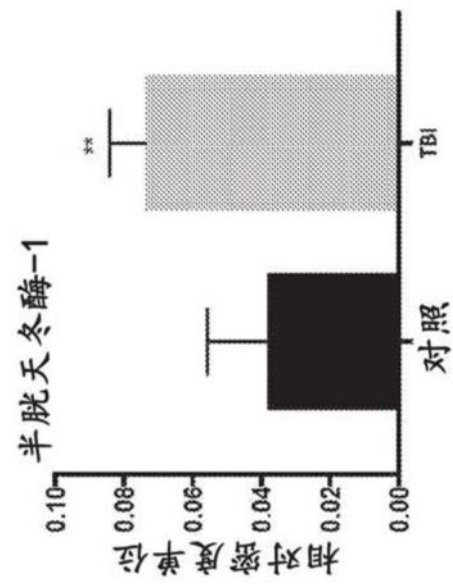


图10B

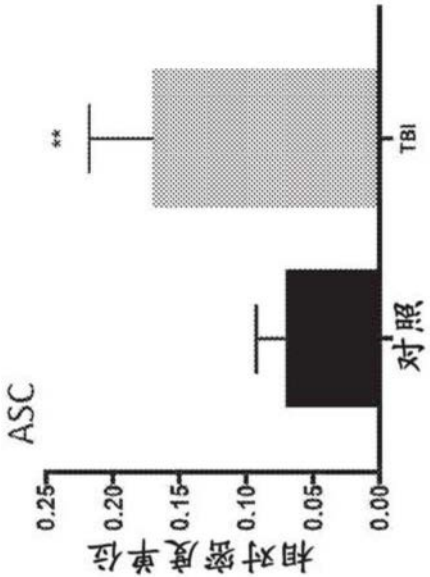


图10C

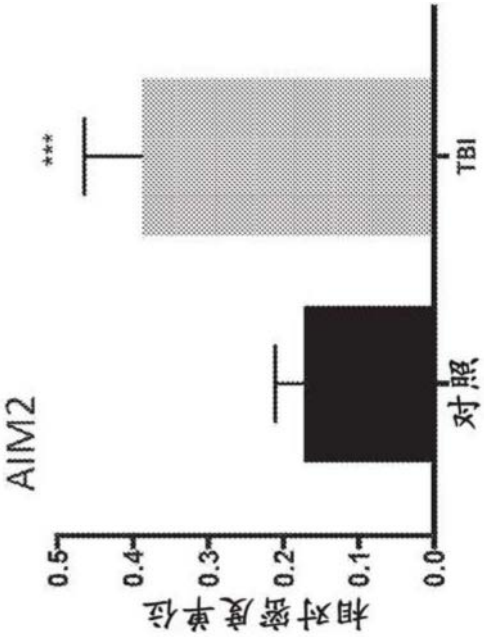


图10D

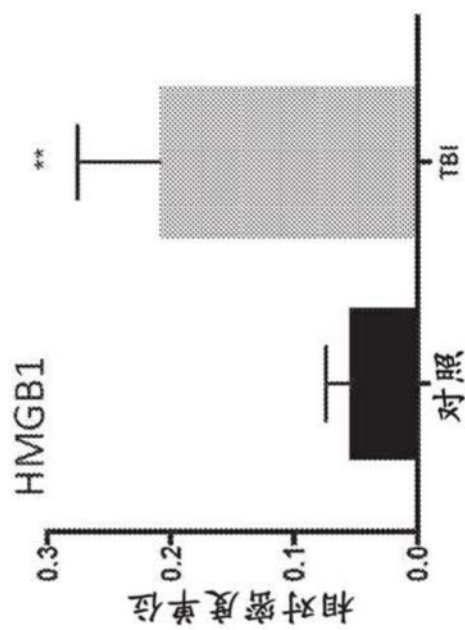


图10E

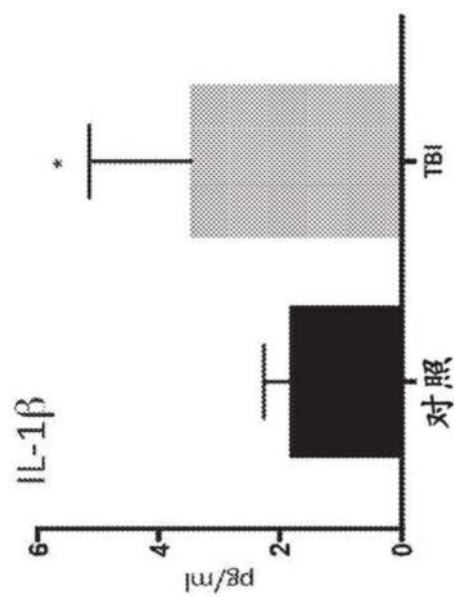


图10F

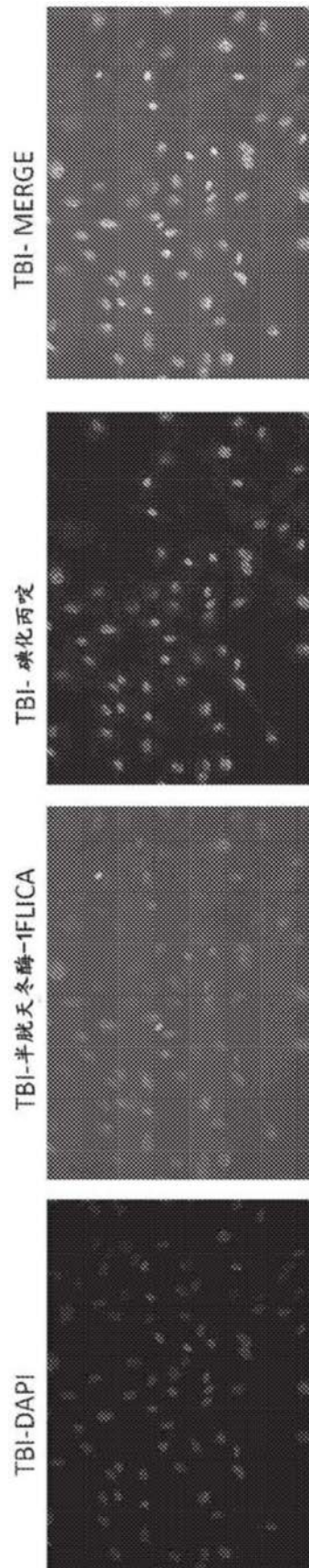


图11A

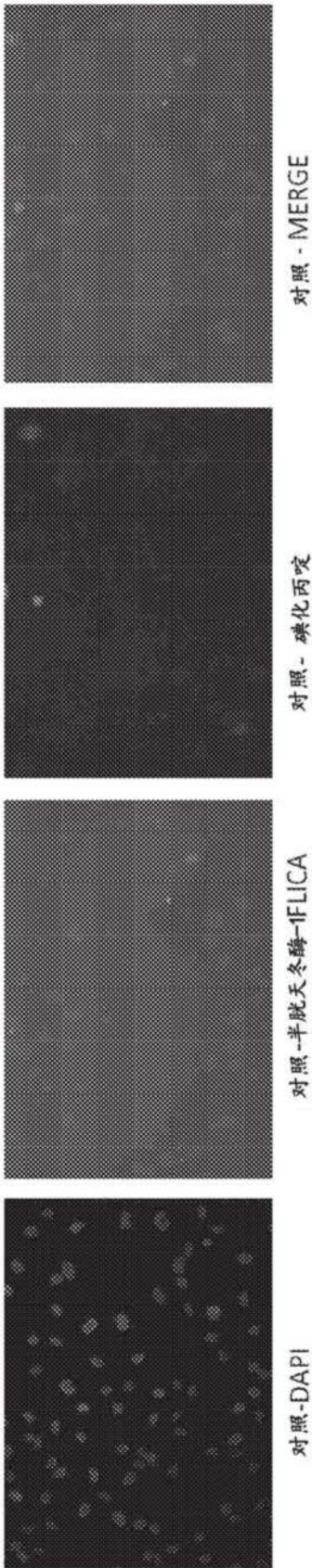


图11B

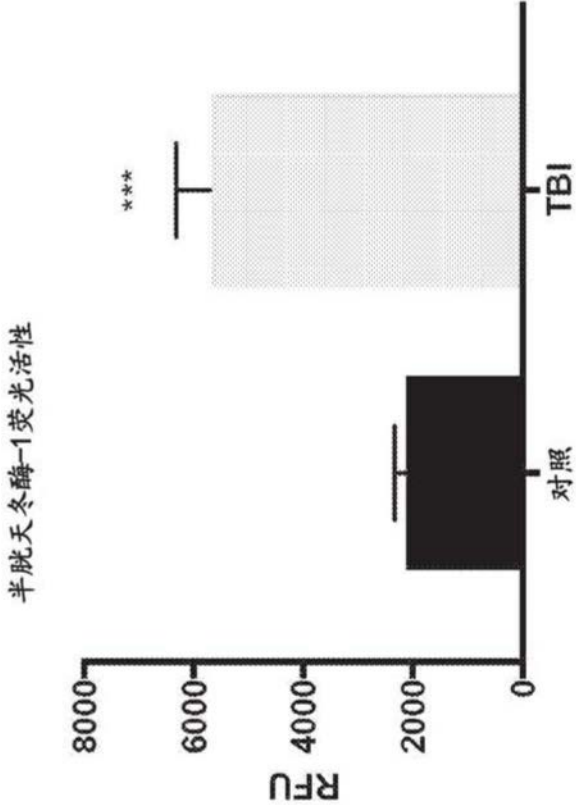


图11C

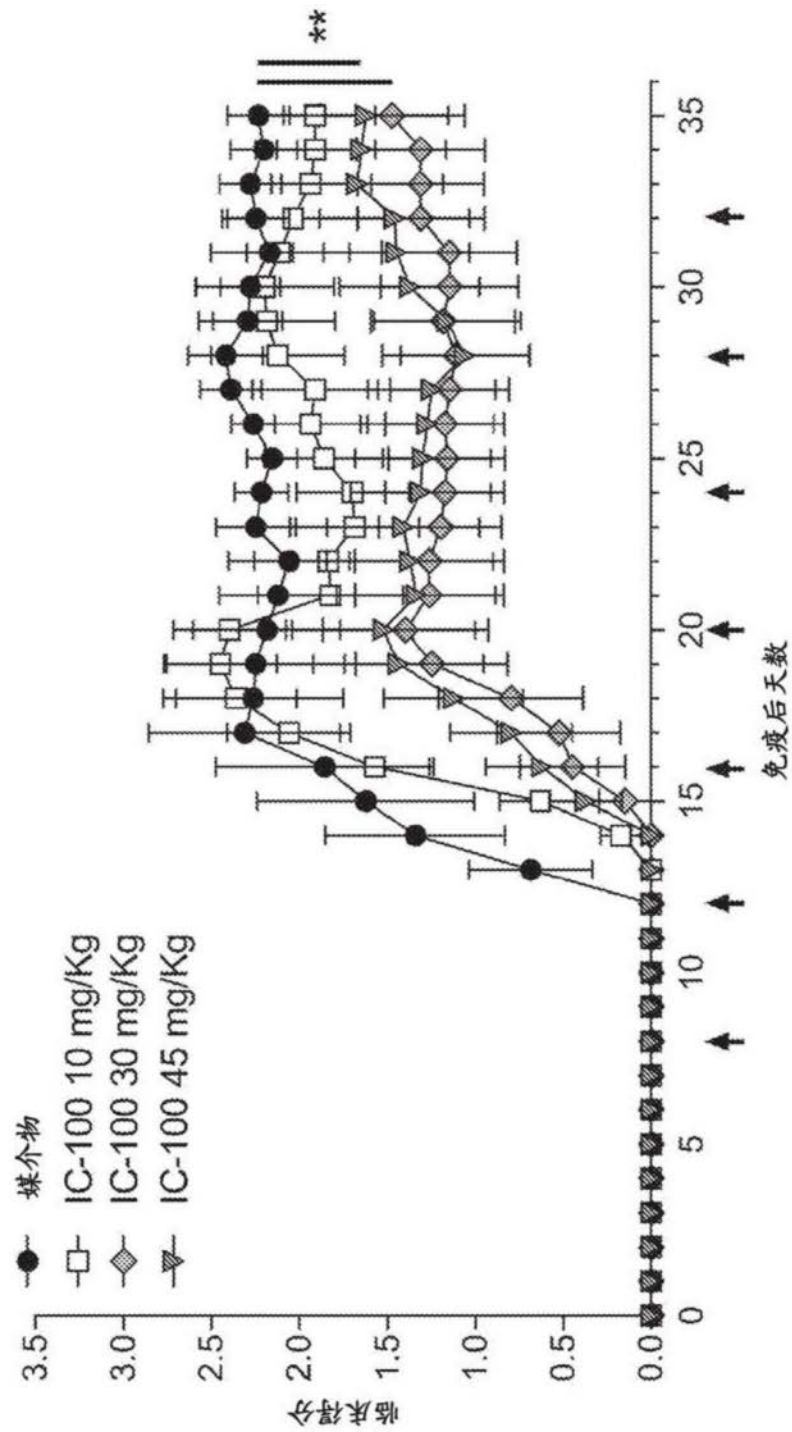
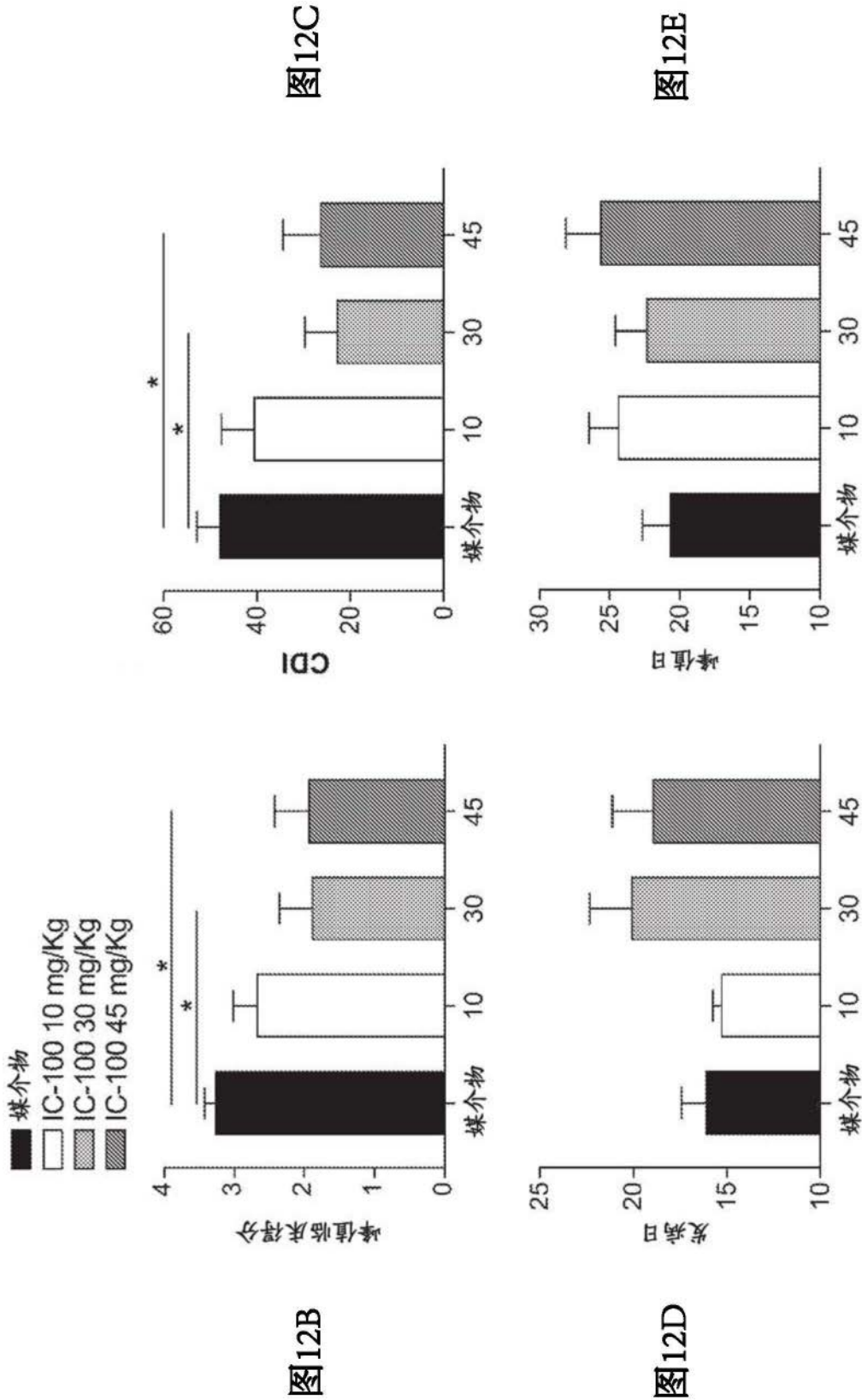


图12A



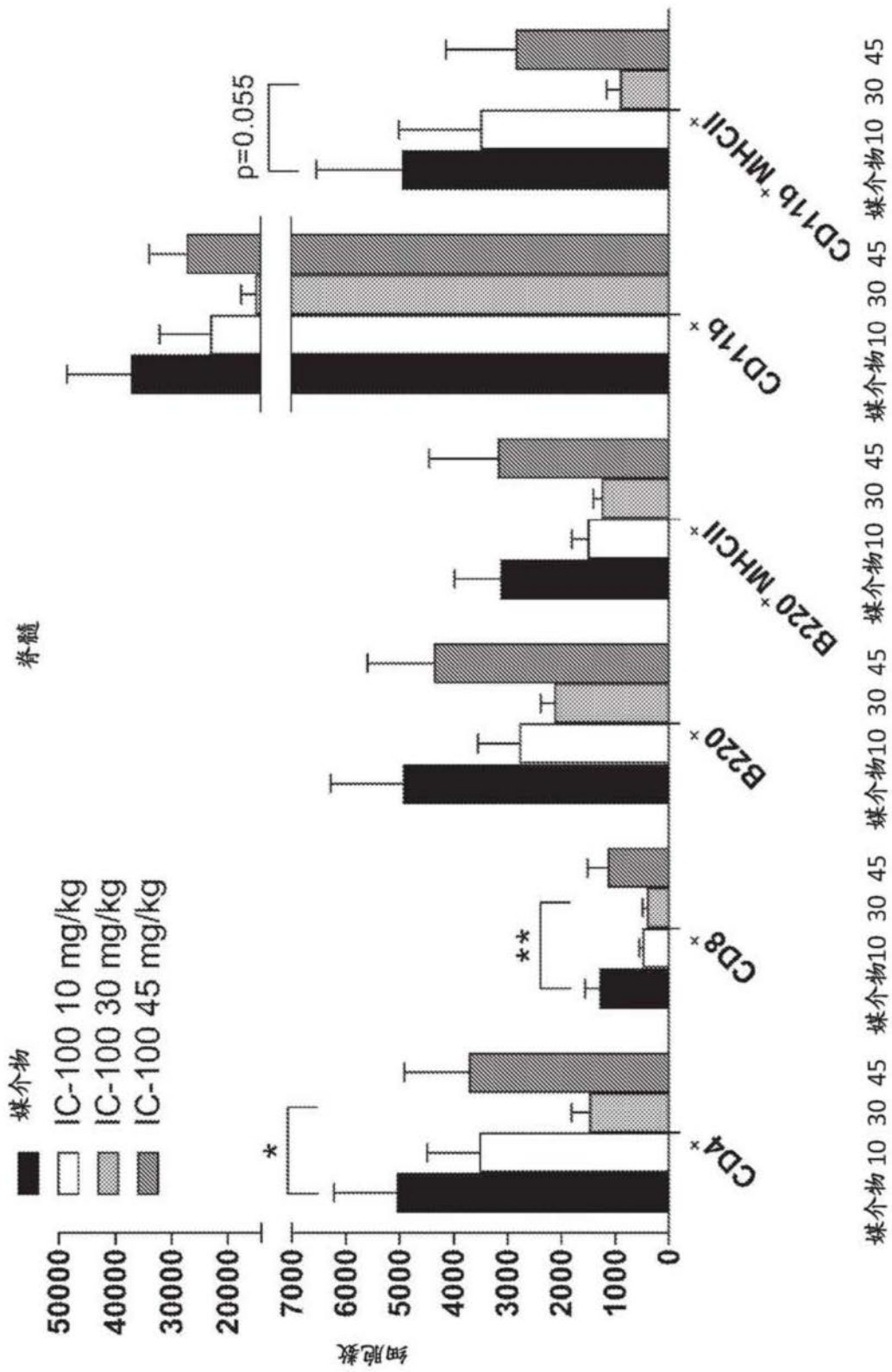


图13A

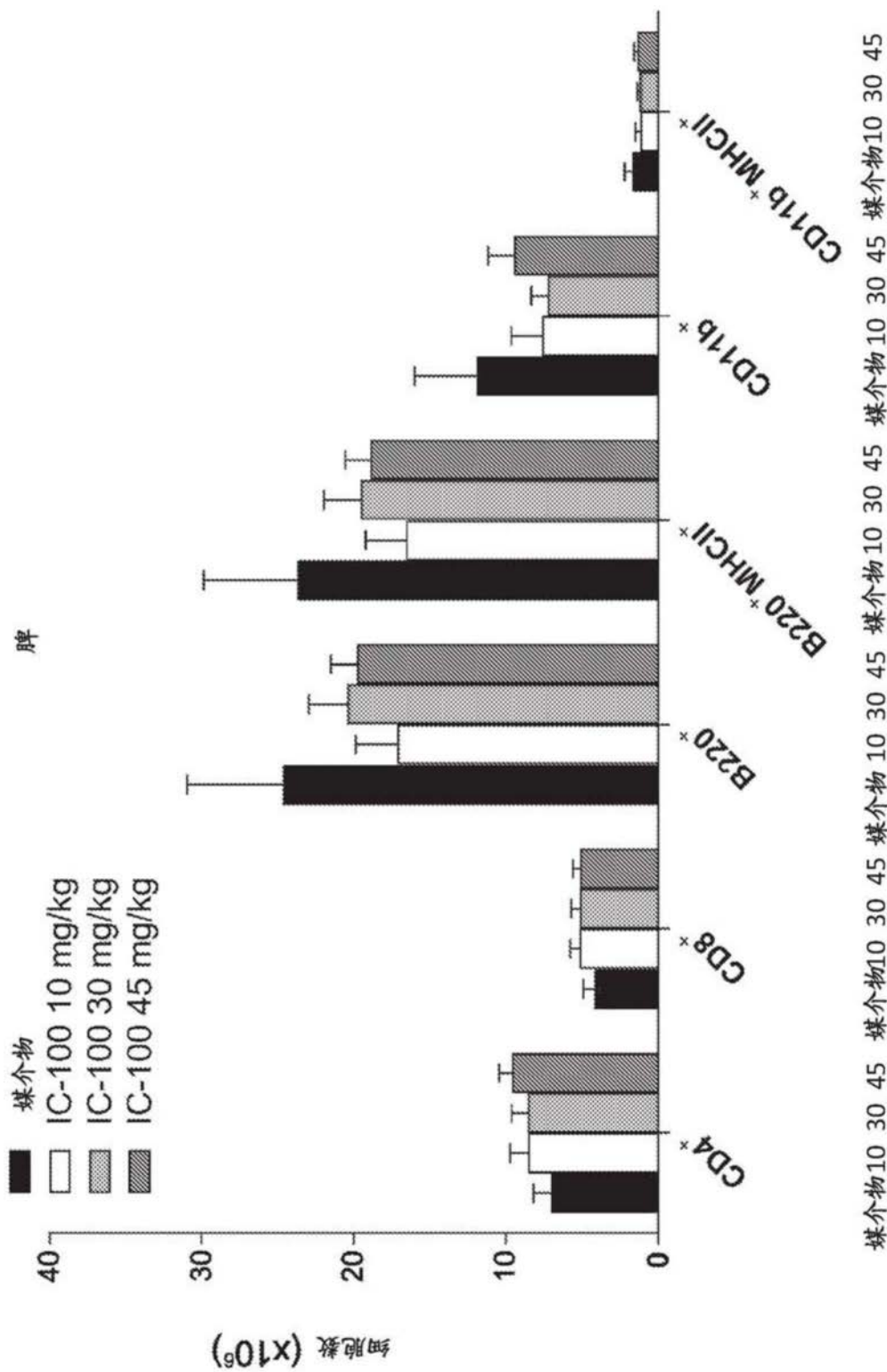


图13B

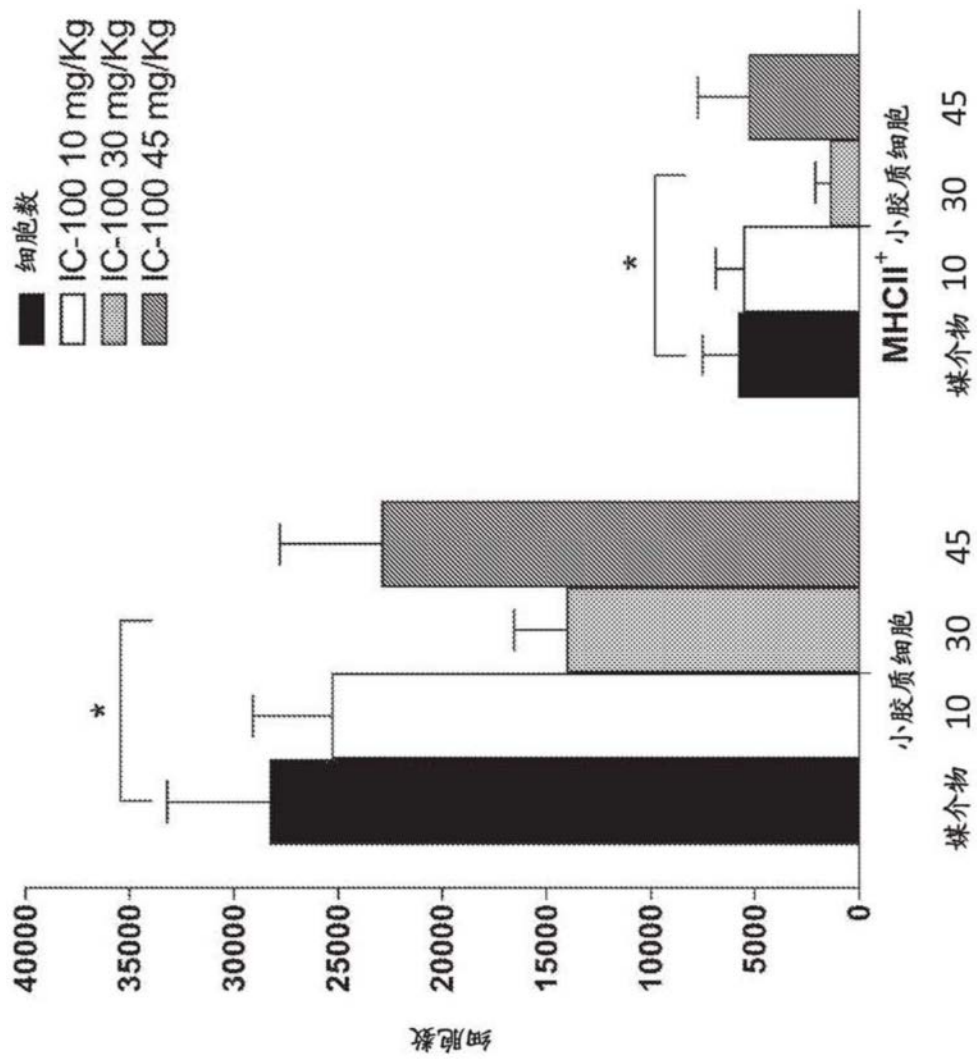


图14

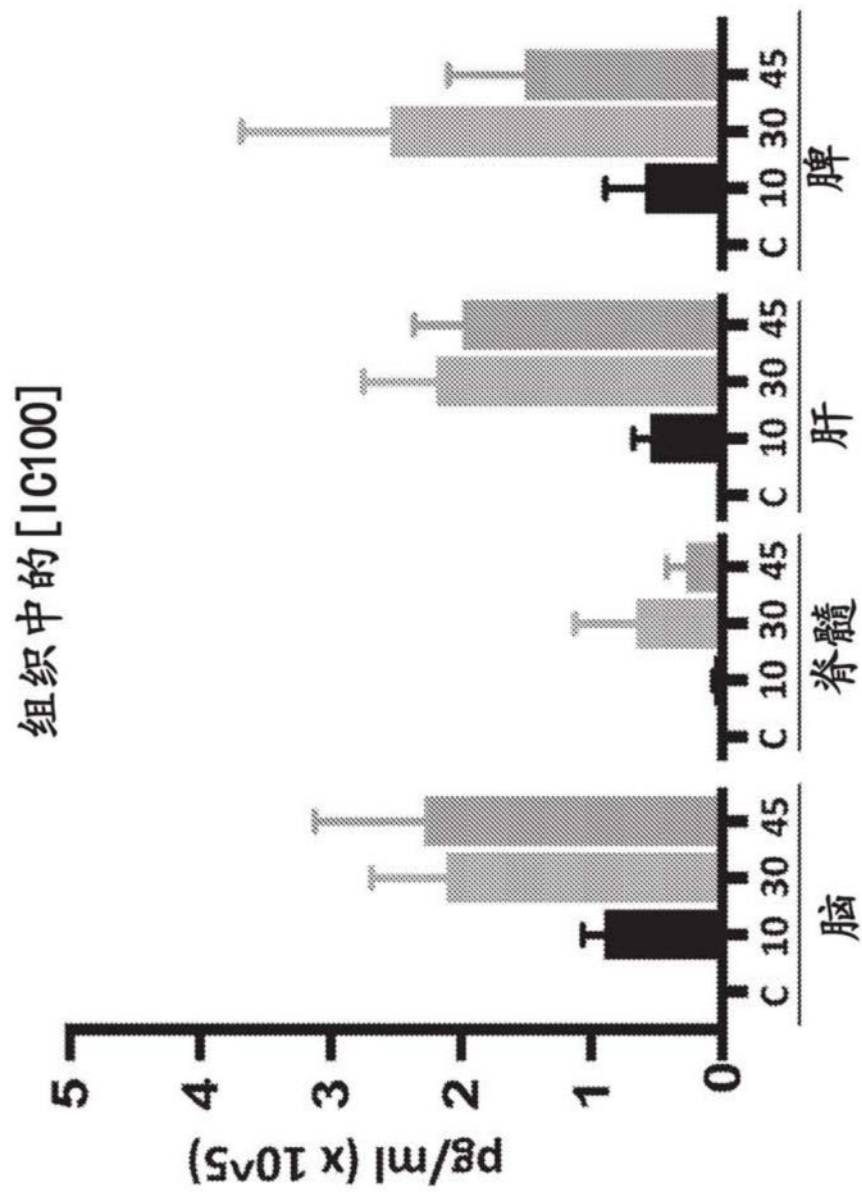


图15

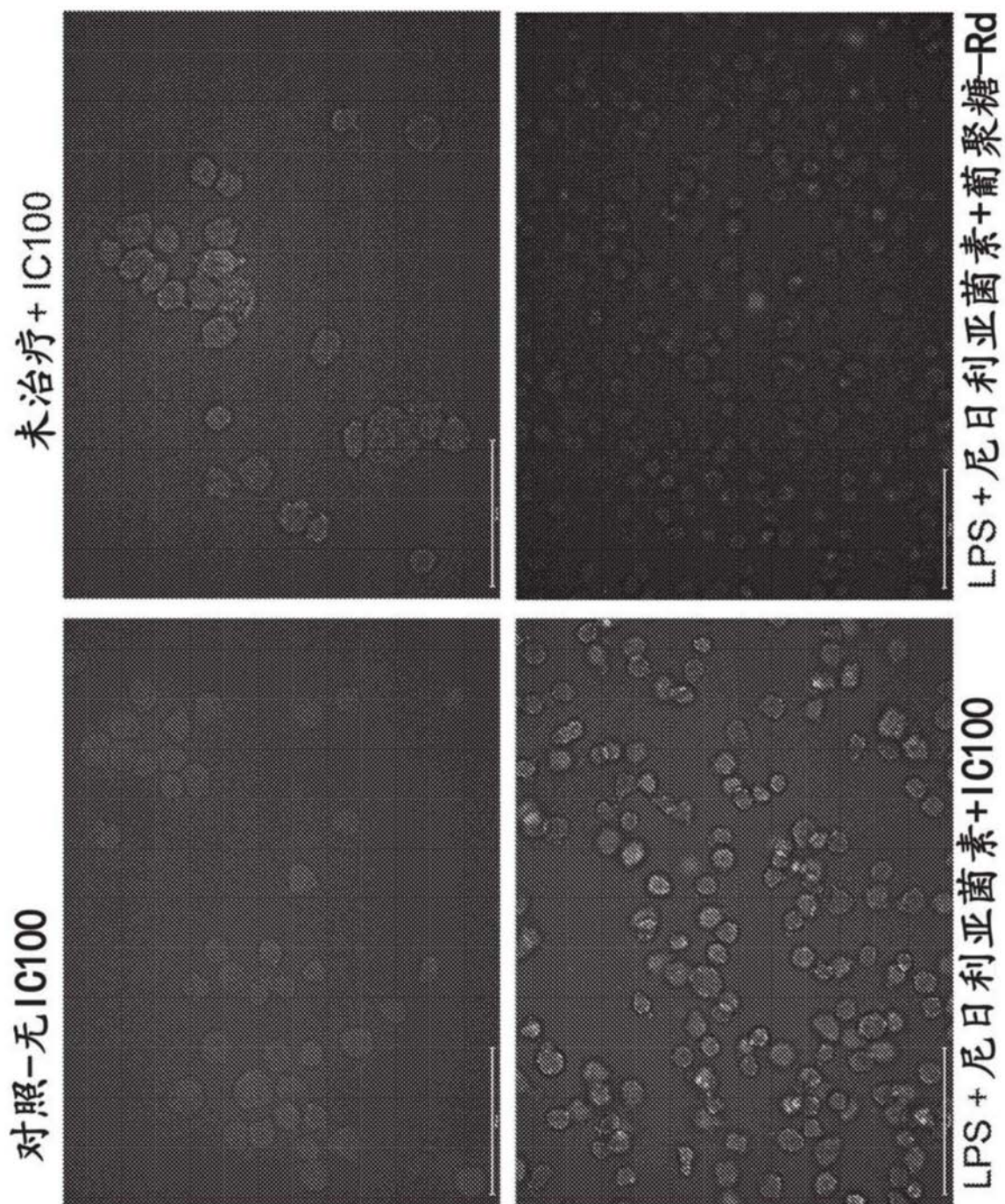


图16

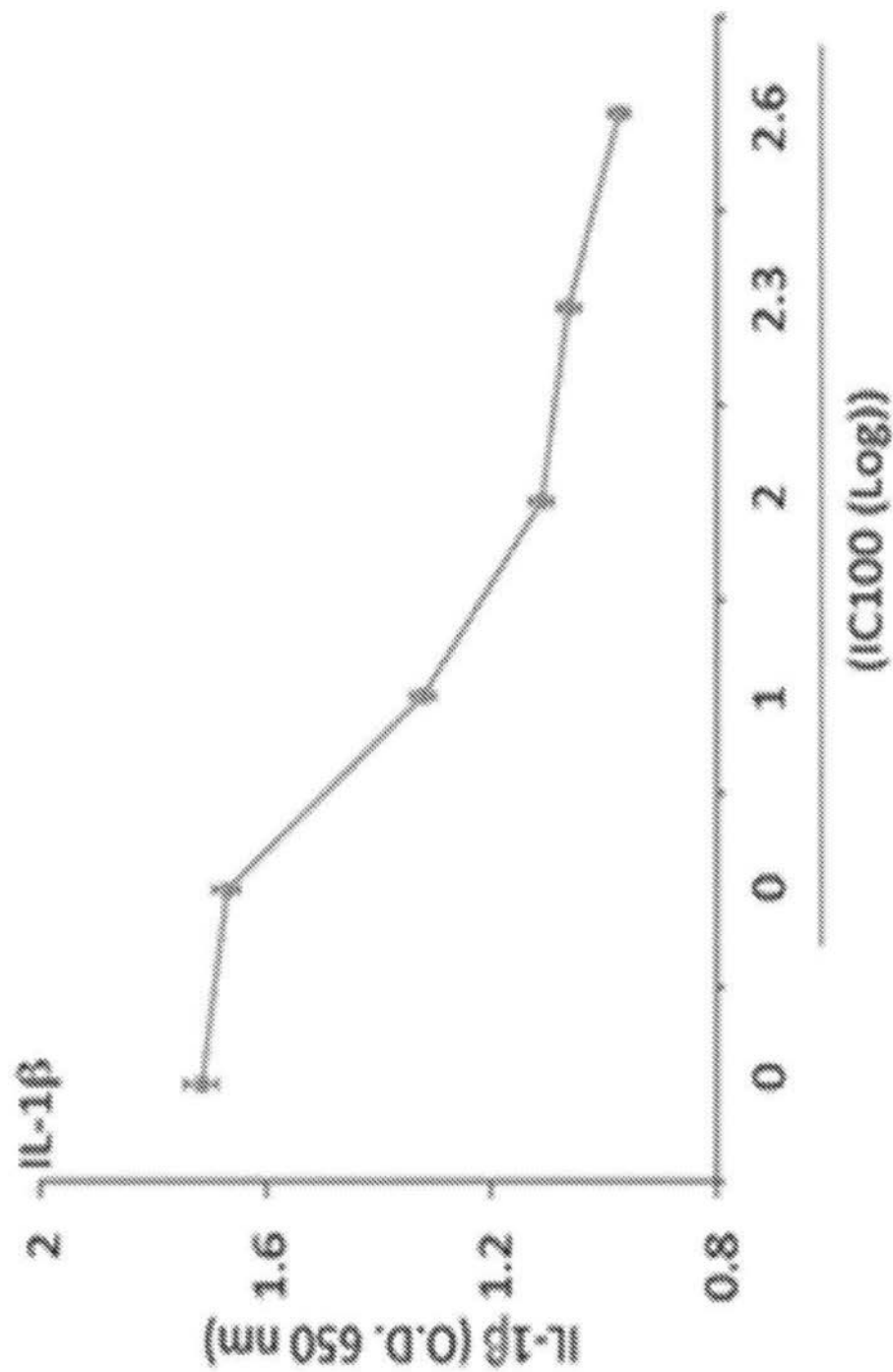


图17

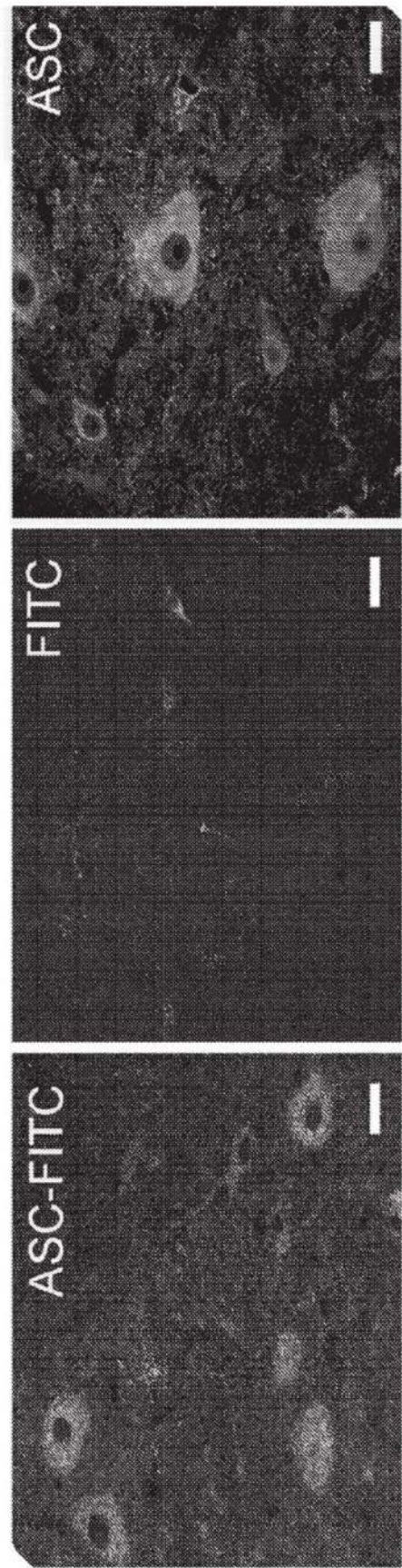


图18

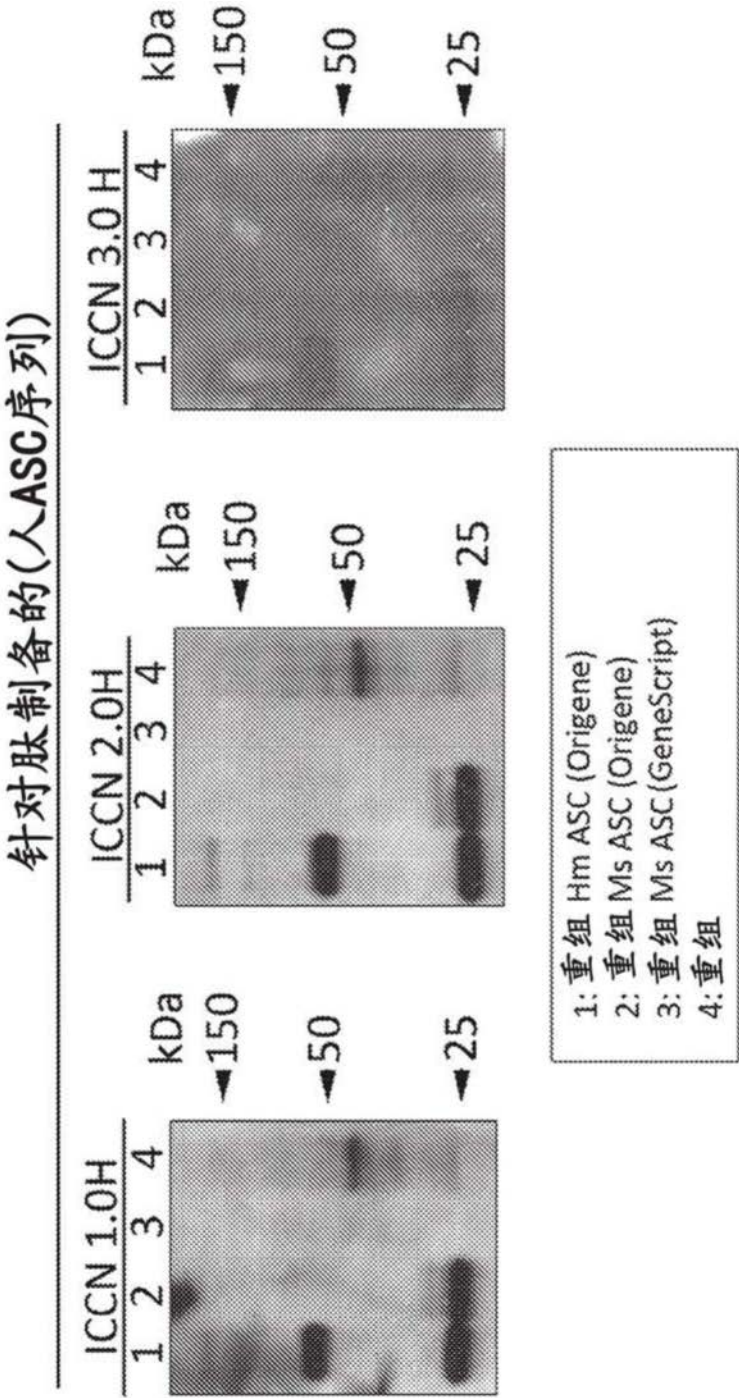


图19

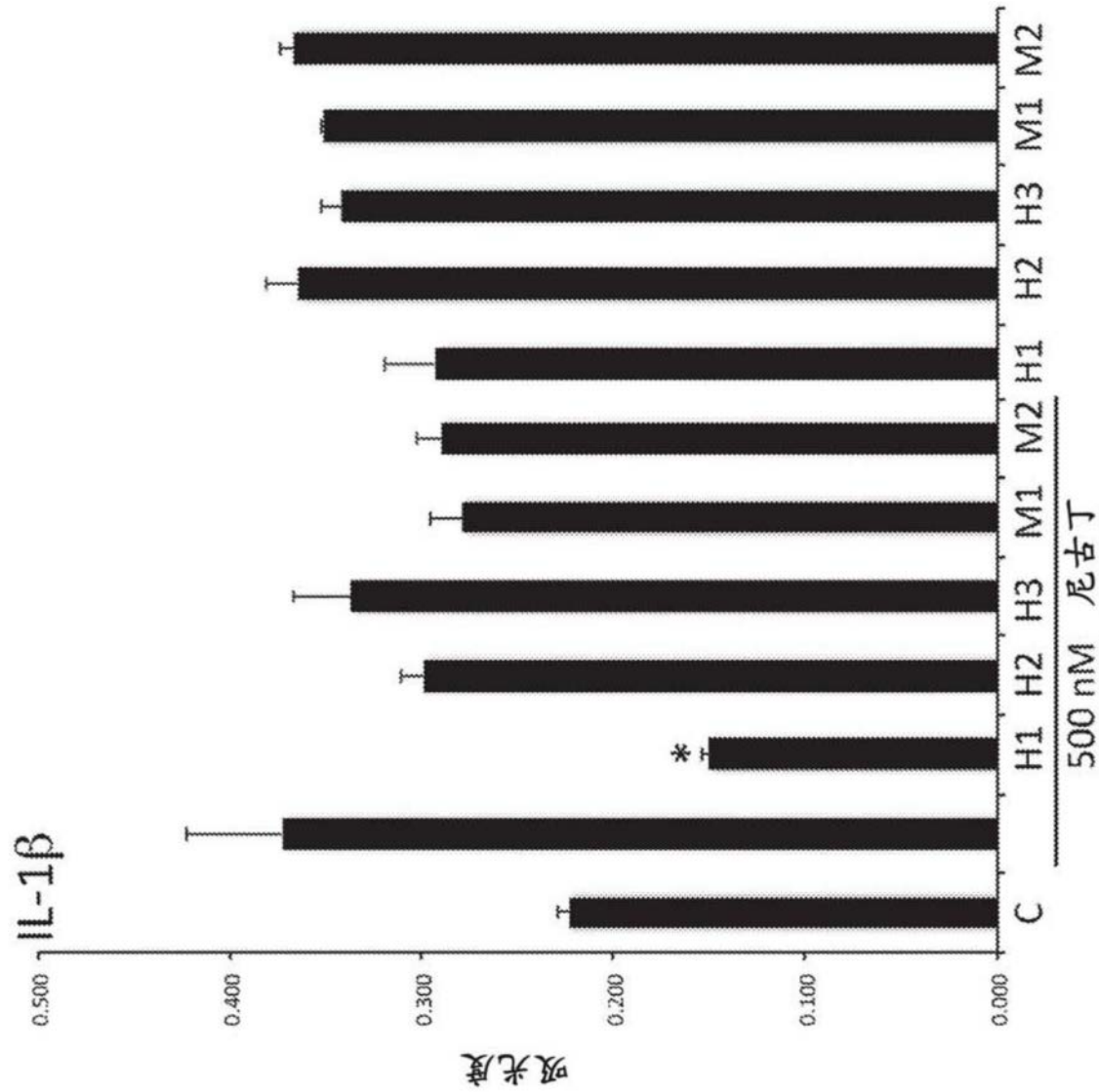


图20

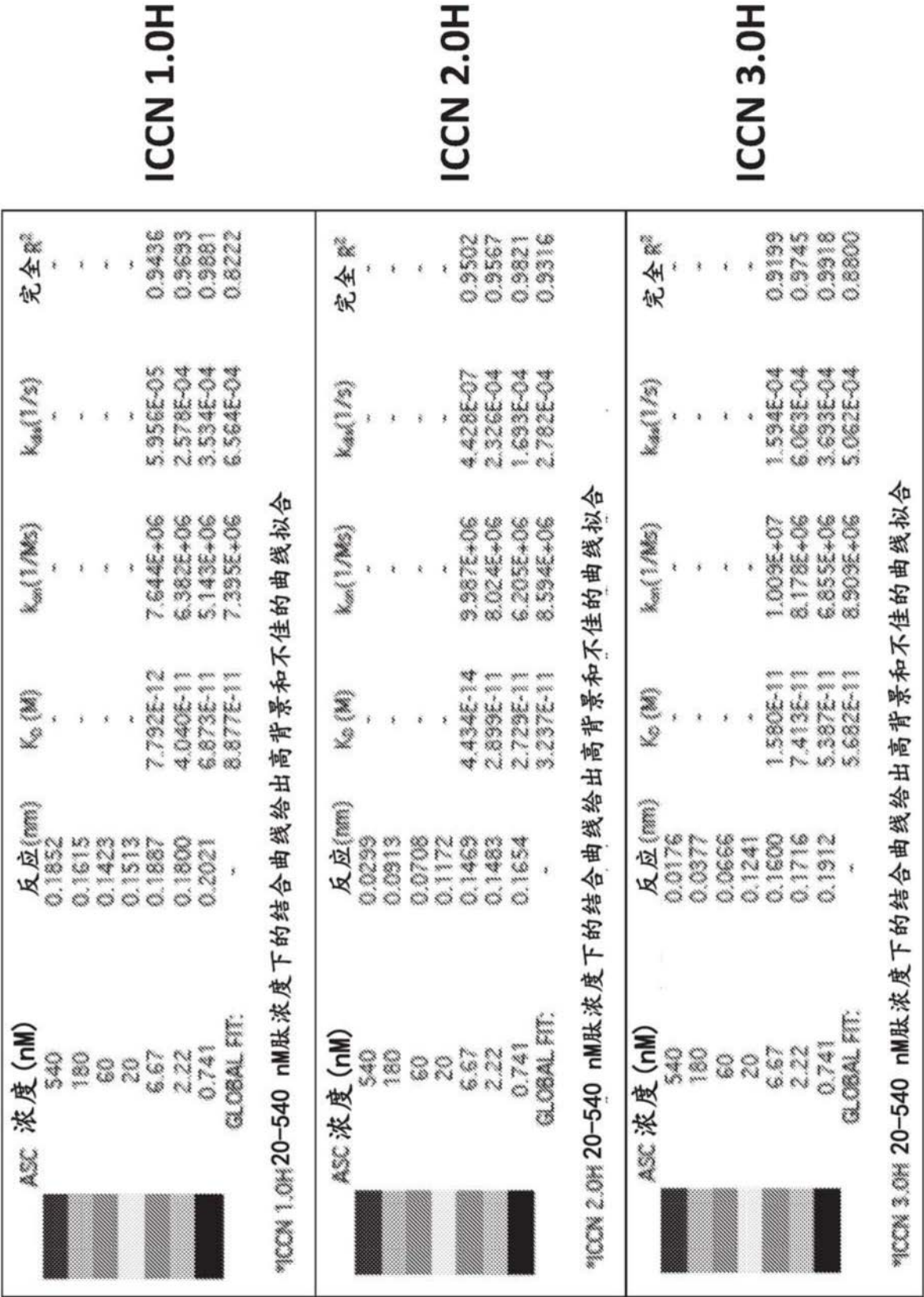


图21

同种型		ICCN 1.0H
		IgG1
与肽结合 (K _D , M)		8.87E11
K _{on} (1/Ms) ¹		7.39E+06
K _{dis} (1/s) ¹		6.56E-04
交叉反应性		人, 小鼠, 大鼠
功能活性		抑制炎症性小体途径
同种型		ICCN 2.0H
		IgG2 _b
与肽结合 (K _D , M)		3.24E11
K _{on} (1/Ms) ¹		8.59E+06
K _{dis} (1/s) ¹		2.78E-04
交叉反应性		人, 小鼠, 大鼠
功能活性		抑制炎症性小体途径
同种型		ICCN 3.0H
		IgG1
与肽结合 (K _D , M)		5.68E11
K _{on} (1/Ms) ¹		8.91E+06
K _{dis} (1/s) ¹		5.06E-04
交叉反应性		人, 小鼠, 大鼠
功能活性		抑制炎症性小体途径

图22