



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102985100 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201180019387. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 04. 18

A61K 38/00 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/325, 241 2010. 04. 16 US

61/416, 102 2010. 11. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 10. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/032910 2011. 04. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02011/130745 EN 2011. 10. 20

(71) 申请人 米迪缪尼有限公司

地址 英国剑桥

申请人 麦克马斯特大学

(72) 发明人 D·芬奇 A·科伊尔

M·施藤普夫利

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

司 31100

代理人 韦东

权利要求书 3 页 说明书 40 页

序列表 20 页 附图 16 页

(54) 发明名称

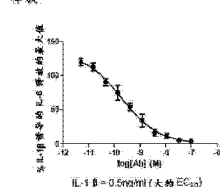
用于治疗 COPD 恶化的组合物和方法

(57) 摘要

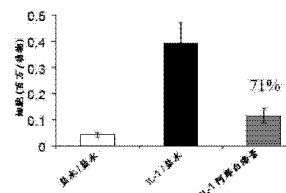
本公开涉及用白细胞介素 1 受体 1 (IL-1R1) 或 IL-1 α 的抗体和拮抗剂治疗慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化的方法。

在体外和在体内 IL-1 β 活性受 IL-1R1 阻断的抑制

a) 抗-IL-1R1 抗体 6 (Ab6) 抑制人原代 COPD 肺成纤维细胞中 IL-1 β 介导的 IL-6 释放



b) 阿那白滞素抑制小鼠肺中 IL-1 β 诱导的嗜中性粒细胞介导的炎症



1. 一种在有此需要的患者中减轻气道炎症的方法,其中所述患者是患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合和抑制 IL-1R1 的抗体的组合物。

2. 一种在有此需要的患者中降低 IL-1 α 信号转导的方法,其中所述患者是患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合和抑制 IL-1R1 的抗体的组合物。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述抗体是抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 结合的重组抗体。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述抗体是抑制 IL-1R1 与 IL-1 β 结合的重组抗体。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其中减轻气道炎症是治疗 COPD 恶化的方法的一部分。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中减轻气道炎症包括降低嗜中性粒细胞向肺的流入。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的方法,其中所述抗体具有大于或等于约 25 千道尔顿的分子量。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的方法,其中所述抗体抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 和 IL-1 β 的结合。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其中所述重组抗体是人抗体。

10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其中所述方法是用于治疗 COPD 的治疗方案的一部分。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述用于治疗 COPD 的治疗方案包括类固醇的施用。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的方法,其中所述 COPD 恶化由细菌感染引起。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中所述 COPD 恶化由病毒感染引起。

14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的方法,其中所述 COPD 恶化由吸烟引起。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的方法,其中当通过 BiacoreTM 测量时,所述抗体以 50pM 或更低的 K_D 特异性结合 IL-1R1。

16. 如权利要求 1-15 中任一项所述的方法,其中所述组合物的施用是全身施用。

17. 如权利要求 1-16 中任一项所述的方法,其中所述方法不包括所述组合物的鼻内施用。

18. 如权利要求 1-17 中任一项所述的方法,其中在所述 COPD 恶化之前,所述患者患有分类为 GOLD III 期或 GOLD IV 期的 COPD。

19. 一种在有此需要的患者中减轻气道炎症的方法,其中所述患者是患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的重组抗体的组合物。

20. 一种特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 结合的抗体,其用于治疗 COPD 恶化。

21. 一种特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的抗体,其用于治疗 COPD 恶

化。

22. 一种在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于人鼻病毒诱导的气道炎症而患有 COPD 恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 结合的抗体的组合物。

23. 一种在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于病毒或细菌感染而患有 COPD 恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 结合的抗体的组合物。

24. 如权利要求 22 或 23 所述的方法,其中减轻气道炎症是治疗 COPD 恶化的方法的一部分。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其中减轻气道炎症包括降低嗜中性粒细胞向肺的流入。

26. 如权利要求 20-24 中任一项所述的方法或抗体,其中治疗 COPD 恶化包括减轻气道炎症。

27. 如权利要求 20-25 中任一项所述的方法或抗体,其中治疗 COPD 恶化包括降低嗜中性粒细胞向肺的流入。

28. 如权利要求 20-27 中任一项所述的方法或抗体,其中所述抗体具有大于或等于约 25 千道尔顿的分子量。

29. 如权利要求 20-27 中任一项所述的方法或抗体,其中所述抗体具有大约 150 千道尔顿的分子量。

30. 如权利要求 20 或 22-29 中任一项所述的方法或抗体,其中所述抗体抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 和 IL-1 β 的结合。

31. 如权利要求 20-30 中任一项所述的方法或抗体,其中所述抗体是人抗体。

32. 如权利要求 20 或 22-31 中任一项所述的方法或抗体,其中所述抗体是可特异性结合人 IL-1R1 的重组抗体。

33. 如权利要求 20 或 22-32 中任一项所述的方法或抗体,其中所述抗体是可特异性结合来自一种或多种非人灵长类物种的 IL-1R1 的重组抗体。

34. 如权利要求 20 或 22-33 中任一项所述的方法或抗体,其中所述抗体不特异性结合鼠 IL-1R1。

35. 如权利要求 20-34 中任一项所述的方法或抗体,其中所述方法或抗体是用于治疗 COPD 的治疗方案的一部分。

36. 如权利要求 35 中任一项所述的方法或抗体,其中所述用于治疗 COPD 的治疗方案包括类固醇的施用。

37. 如权利要求 20-36 中任一项所述的方法或抗体,其中 COPD 恶化由细菌感染、病毒感染或其组合引起。

38. 如权利要求 20-37 中任一项所述的方法或抗体,其中在 COPD 恶化之前,所述患者患有分类为 GOLD III 期或 GOLD IV 期的 COPD。

39. 如权利要求 20 或 22-38 中任一项所述的方法或抗体,其中当通过 Biacore™ 测量时,所述抗体以 50pM 或更低的 K_D 特异性结合 IL-1R1。

40. 如权利要求 20 或 22-39 中任一项所述的方法或抗体,其中所述重组抗体是抗体 6

或具有抗体 6 的 CDR 的抗体。

41. 如权利要求 20 或 22-39 中任一项所述的方法或抗体,其中所述重组抗体与 IL-1Ra 竞争结合 IL-1R1。

42. 如权利要求 20-41 中任一项所述的方法或抗体,其中施用是全身施用。

43. 如权利要求 20-42 中任一项所述的方法或抗体,其中所述方法不包括所述组合物的鼻内施用。

44. 如权利要求 20-42 中任一项所述的方法或抗体,其中所述方法不包括所述组合物的鼻内施用并且不包括所述组合物向肺的其他形式的局部施用。

45. 一种特异性结合和抑制 IL-1R1 或 IL-1 α 的抗体,其用于治疗由于病毒或细菌感染造成的 COPD 恶化。

用于治疗 COPD 恶化的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请依据 35 U.S.C. § 119(e) 要求 2010 年 4 月 16 日提交的美国临时申请第 61/325,241 号,和 2010 年 11 月 22 日提交的美国临时申请第 61/416,102 号的权益,每个所述公开通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请含有经 EFS-Web 以 ASCII 格式提交的序列表,并通过引用整体并入本文。所述 ASCII 拷贝创建于 2011 年 4 月 18 日,名称为 MED562PC.txt,大小为 21,079 字节。

发明领域

[0005] 本公开涉及使用诸如抗体的抗-IL-1R1 和抗-IL-1 α 拮抗剂治疗慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化的方法。

[0006] 发明背景

[0007] COPD 代表严重且日益增加的全球健康问题。到 2020 年, COPD 将由全球死亡最常见原因的第 6 位 (其目前的) 上升至第 3 位。在英国, COPD 目前每年引起 30,000 例死亡,而在美国,认为其每年引起多达 120,000 例死亡 (Lopez & Murray 1998)。临床上, COPD 是异质性疾病,其涵盖两种主要的病理表现,两种表现的各个方面经常见于同一患者:伴有纤维化和小气道阻塞的慢性阻塞性支气管炎,和伴有空间扩大和肺实质破坏的肺气肿、肺弹性的丧失和小气道的闭合 (Barnes2004)。

[0008] COPD 的恶化在其对患者的延长的有害作用、加速疾病进展和高医疗保健成本方面具有重大意义 (Wedzicha & Donaldson 2003)。

[0009] 白细胞介素 (IL)-1 是多功能细胞因子,其在免疫介导的疾病和感染期间的炎症反应中起重要作用。IL-1 由受到细菌产物、病毒、细胞因子或免疫复合物的刺激后的各种细胞类型产生。IL-1 展现对多种细胞类型的自分泌和旁分泌活性,促进炎症介导体如前列腺素、一氧化氮、细胞因子、趋化因子、金属蛋白酶和粘附分子的产生。

[0010] 发明概述

[0011] COPD 恶化是 COPD 患者的严重并发症。存在治疗 COPD 的恶化 (COPD 恶化) 的需要。这一独特的患者亚组 (具有恶化或处于恶化时期的那些) 具有与 COPD 相关的增加的发病率和死亡率,包括显著疾病进展的增加了的风险。一类此种试剂是特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 以及任选地 IL-1 β 的结合的试剂。另一类试剂是特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 结合 IL-1R1 的试剂。在某些实施方案中,本公开的试剂是拮抗剂。在某些实施方案中,本公开的试剂是抗体或抗体片段。

[0012] 本公开涉及治疗 COPD 恶化的方法。在某些实施方案中,本公开涉及在有此需要的患者中减轻气道炎症的方法。在某些实施方案中,本公开涉及在有此需要的患者中增加肺功能的方法。

[0013] 在第一方面,本公开提供在有此需要的患者中减轻气道炎症的方法,其中所述患者是患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化的患者。该方法包括向所述患者施用有效量的包含

特异性结合 IL-1R1 的抗体的组合物。例如,该抗体特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 的结合。在某些实施方案中,该抗体还抑制 IL-1R1 与 IL-1 β 的结合。

[0014] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化的方法。该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1R1 的抗体的组合物。例如,该抗体特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 的结合。在某些实施方案中,该抗体还抑制 IL-1R1 与 IL-1 β 的结合。

[0015] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于人鼻病毒诱导的气道炎症而患有 COPD 恶化的患者。该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1R1 的抗体的组合物。例如,该抗体特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 的结合。在某些实施方案中,该抗体还抑制 IL-1R1 与 IL-1 β 的结合。

[0016] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于病毒感染而患有 COPD 恶化的患者。该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1R1 的抗体的组合物。例如,该抗体特异性结合 IL-1R 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 的结合。在某些实施方案中,该抗体还抑制 IL-1R1 与 IL-1 β 的结合。

[0017] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于细菌感染而患有 COPD 恶化的患者。该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1R1 的抗体的组合物。例如,该抗体特异性结合 IL-1R 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 的结合。在某些实施方案中,该抗体还抑制 IL-1R1 与 IL-1 β 的结合。

[0018] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中降低 IL-1 α 信号转导的方法,其中所述患者是患有慢性阻塞性肺病 (COPD) 恶化的患者。该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 结合的抗体的组合物。

[0019] 治疗的方法包括施用单次剂量,以及根据治疗时间表施用多于一次剂量。

[0020] 以下列出的各种特征适用于本公开的任何前述或下述方面 (和实施方案)。在某些实施方案中,减轻气道炎症是治疗 COPD 恶化的方法的一部分。在某些实施方案中,减轻气道炎症包括降低嗜中性粒细胞向肺的流入。在某些实施方案中,治疗 COPD 恶化包括减轻气道炎症。在某些实施方案中,治疗 COPD 恶化包括降低嗜中性粒细胞向肺的流入。

[0021] 在某一实施方案中,抗体具有大于或等于约 25 千道尔顿的分子量。在某些实施方案中,抗体具有约 150 千道尔顿的分子量。

[0022] 在某些实施方案中,所述抗体抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 和 IL-1 β 的结合。

[0023] 在某些实施方案中,所述抗体是人抗体。在某些实施方案中,所述抗体可特异性结合人 IL-1R1。在某些实施方案中,所述抗体可特异性结合来自一种或多种非人灵长类物种的 IL-1R1。在某些实施方案中,所述抗体不特异性结合鼠或啮齿动物 IL-1R1。

[0024] 在某些实施方案中,所述方法是用于治疗 COPD 的治疗方案的一部分。在某些实施方案中,用于治疗 COPD 的治疗方案包括类固醇的施用。

[0025] 在某些实施方案中,COPD 恶化由细菌感染、病毒感染或其组合引起。在某些实施方案中,在 COPD 恶化之前,所述患者患有分类为 GOLD III 期或 GOLD IV 期的 COPD。

[0026] 在某些实施方案中,当通过 Biacore™ 测量时,所述抗体以 50pM 或更低的 K_D 特异性结合 IL-1R1。在某些实施方案中,当通过 Biacore™ 测量时,所述抗体以 300pM 或更低的 K_D 特异性结合 IL-1R1。

[0027] 在某些实施方案中,所述抗体与 IL-1Ra 竞争结合 IL-1R1。

[0028] 在某些实施方案中,施用是全身施用。在某些实施方案中,所述方法不包括所述组合物的鼻内施用。在某些实施方案中,所述方法不包括所述组合物的鼻内施用并且不包括所述组合物向肺的其他形式的局部施用。在某些其他实施方案中,拮抗剂经由两种不同的途径施用。此类施用可以是在相同时间或在不同时间。例如,在某些实施方案中,拮抗剂是全身(如静脉内)和鼻内施用。在其他实施方案中,拮抗剂经由全身途径和经由局部递送至肺的途径施用。

[0029] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中减轻气道炎症的方法,其中所述患者是患有慢性阻塞性肺病(COPD)恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的抗体的组合物。相似地,包括 IL-1 α 拮抗剂的施用。

[0030] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗慢性阻塞性肺病(COPD)恶化的方法,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的抗体的组合物。相似地,包括 IL-1 α 拮抗剂的施用。

[0031] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于人鼻病毒诱导的气道炎症而患有 COPD 恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的抗体的组合物。相似地,包括 IL-1 α 拮抗剂的施用。

[0032] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于病毒感染而患有 COPD 恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的抗体的组合物。相似地,包括 IL-1 α 拮抗剂的施用。

[0033] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于细菌感染而患有 COPD 恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的抗体的组合物。相似地,包括 IL-1 α 拮抗剂的施用。

[0034] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中降低 IL-1 α 信号转导的方法,其中所述患者是患有慢性阻塞性肺病(COPD)恶化的患者,包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的抗体的组合物。相似地,包括 IL-1 α 拮抗剂的施用。

[0035] 治疗的方法包括施用单次剂量,以及根据治疗时间表施用多于一次剂量。

[0036] 以下列出的各种特征适用于本公开的任何前述或下述方面(和实施方案)。在某些实施方案中,减轻气道炎症是治疗 COPD 恶化的方法的一部分。在某些实施方案中,减轻气道炎症包括降低嗜中性粒细胞向肺的流入。在某些实施方案中,治疗 COPD 恶化包括减轻气道炎症。在某些实施方案中,治疗 COPD 恶化包括降低嗜中性粒细胞向肺的流入。

[0037] 在某些实施方案中,所述抗体具有大于或等于约 25 千道尔顿的分子量。在某些实施方案中,所述抗体具有大约 150 千道尔顿的分子量。

[0038] 在某些实施方案中,所述抗体是人抗体。在某些实施方案中,所述抗体可特异性结合人 IL-1 α 。在某些实施方案中,所述抗体可特异性结合来自一种或多种非人灵长类物种

的 IL-1 α 。在某些实施方案中,所述抗体不特异性结合鼠 IL-1 α 。

[0039] 在某些实施方案中,所述方法是用于治疗 COPD 的治疗方案的一部分。在某些实施方案中,用于治疗 COPD 的治疗方案包括类固醇的施用。在某些实施方案中,COPD 恶化由细菌感染、病毒感染或其组合引起。在某些实施方案中,在 COPD 恶化之前,所述患者患有分类为 GOLD III 期或 GOLD IV 期的 COPD。

[0040] 在某些实施方案中,施用是全身施用。在某些实施方案中,所述方法不包括所述组合物的鼻内施用并且不包括所述组合物向肺的其他形式的局部施用。在某些实施方案中,所述方法不包括所述组合物的鼻内施用。在某些其他实施方案中,拮抗剂经由两种不同的途径施用。此类施用可以是在相同时间或在不同时间。例如,在某些实施方案中,拮抗剂是全身(如静脉内)和鼻内施用。在其他实施方案中,拮抗剂经由全身途径和经由局部递送至肺的途径施用。

[0041] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于人鼻病毒诱导的气道炎症而患有 COPD 恶化的患者。该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合和抑制 IL-1R1 的 IL-1R1 拮抗剂的组合物。在某些实施方案中,IL-1R1 拮抗剂特异性结合和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 和 / 或 β 的结合。在某些实施方案中,使用本文描述的任何测定评估拮抗作用。

[0042] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于病毒感染而患有 COPD 恶化的患者。该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合和抑制 IL-1R1 的 IL-1R1 拮抗剂的组合物。在某些实施方案中,IL-1R1 拮抗剂特异性结合和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 和 / 或 β 的结合。在某些实施方案中,使用本文描述的任何测定评估拮抗作用。

[0043] 在另一方面,本公开提供在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于细菌感染而患有 COPD 恶化的患者。该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合和抑制 IL-1R1 的 IL-1R1 拮抗剂的组合物。在某些实施方案中,IL-1R1 拮抗剂特异性结合和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 和 / 或 β 的结合。在某些实施方案中,使用本文描述的任何测定评估拮抗作用。

[0044] 治疗的方法包括施用单次剂量,以及根据治疗时间表施用多于一次剂量。

[0045] 以下列出的各种实施方案适用于本公开的任何前述或下述方面(和实施方案)。在某些实施方案中,拮抗剂特异性结合和抑制人 IL-1R1。

[0046] 在某些实施方案中,IL-1R1 拮抗剂选自特异性结合 IL-1R1 和 IL-1Ra 的人抗体。在某些实施方案中,IL-1R1 拮抗剂是重组 IL-1Ra。在某些实施方案中,拮抗剂特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 的结合。

[0047] 在某些实施方案中,治疗 COPD 恶化包括减轻气道炎症。在某些实施方案中,治疗 COPD 恶化包括降低嗜中性粒细胞向肺的流入。

[0048] 在某些实施方案中,拮抗剂具有大于或等于约 25 千道尔顿的分子量。

[0049] 在某些实施方案中,所述方法是用于治疗 COPD 的治疗方案的一部分。在某些实施方案中,用于治疗 COPD 的治疗方案包括类固醇的施用。

[0050] 在某些实施方案中,拮抗剂与 IL-1Ra 竞争结合 IL-1R1。

[0051] 在某些实施方案中,施用是全身施用。在某些实施方案中,所述方法不包括所述组

合物的鼻内施用。在某些实施方案中,所述方法不包括所述组合物的鼻内施用并且不包括所述组合物向肺的其他形式的局部施用。在某些其他实施方案中,拮抗剂经由两种不同的途径施用。此类施用可以是在相同时间或在不同时间。例如,在某些实施方案中,拮抗剂是全身(如静脉内)和鼻内施用。在其他实施方案中,拮抗剂经由全身途径和经由局部递送至肺的途径施用。

[0052] 在某些实施方案中,在 COPD 恶化之前,所述患者患有分类为 GOLD III 期或 GOLD IV 期的 COPD。

[0053] 本公开涵盖任何前述方面和实施方案的所有组合,以及与详述和实施例列举的任何实施方案的组合。

[0054] 表格和图的简述

[0055] 图 1 显示在体外和在体内 IL-1 β 活性受 IL-1R1 阻断的抑制。图 1A 显示在体外抗体 6 抑制原代人 COPD 肺成纤维细胞中 IL-1 β 诱导的 IL-6 释放。图 1B 显示阿那白滞素 (Anakinra) 抑制小鼠肺中 IL-1 β 诱导的嗜中性粒细胞介导的炎症。显示的数据是总嗜中性粒细胞计数,该数据是从用 IL-1 β +/- 抗体治疗气管内攻击后 4 小时支气管肺泡灌洗液 (BAL) 定量的。

[0056] 图 2 是说明吸烟诱导的肺炎模型的图示。

[0057] 图 3 显示 IL-1 β 阻断抑制吸烟诱导的肺炎。存在四幅图,显示对于研究中的不同组在图示中指示的研究终点从支气管肺泡灌洗液 (BAL) 定量的总细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞,所述不同组即盐水对照组,室内空气或吸烟 (CS) 攻击;同种型对照组 (MAB005),吸烟攻击;IL-1R1 抗体 (35F5),吸烟攻击;或阿那白滞素 (ALZET 渗透泵),吸烟攻击。

[0058] 图 4 显示 IL-1 α 和 IL-1 β 在诱导嗜中性粒细胞炎症应答的香烟暴露模型中表达,该诱导依赖于 IL-1R1 但独立于半胱天冬酶 -1。(A) 显示 IL-1 α 和 β 在室内空气和吸烟暴露的小鼠中的表达的代表性图像。插图代表来自细胞间隙的巨噬细胞。IL-1 α (B) 和 β (C) 蛋白的总水平通过 ELISA 从室内空气和吸烟暴露的动物 (n=5 只小鼠/组) 的肺匀浆物测量。野生型和 IL-1R1- 缺陷 (n=5 只小鼠/组) (D-F) 或半胱天冬酶 -1- 缺陷 (G-I) 小鼠 (n=3-6 只小鼠/组) 经受室内空气或吸烟暴露。评估室内空气和吸烟暴露的小鼠的支气管肺泡灌洗液 (BAL) 中的总细胞 (D 和 G)、单核细胞 (E 和 H) 和嗜中性粒细胞 (F 和 I)。IL-1 α (J) 和 β (K) 蛋白的总水平通过 ELISA 从室内空气和吸烟暴露的野生型和半胱天冬酶 -1- 缺陷小鼠 (n=4-6 只小鼠/组) 的肺匀浆物中测量。

[0059] 图 5 显示 IL-1 α 但不是 IL-1 β 的抗体阻断抑制吸烟诱导的炎症。吸烟暴露和室内空气对照小鼠保持未处理 (无 Rx),或施用同种型抗体 (IgG 同种型),或抗 -IL-1 α 或抗 -IL-1 β 阻断抗体。(A) 计数支气管肺泡灌洗液 (BAL) (n=4-5 只小鼠/组) 中的嗜中性粒细胞数。相对于无治疗室内空气对照动物 (n=5 只小鼠/组) 的 cxcl-1 (B) 和 il-1 β (D) 或 cxcl-2、cxcl-10 或 cxcl5 (F) 转录物表达通过富鲁达 (fluidigm) 阵列评估, CXCL-1 (C) 和 IL-1 β (E) 的总蛋白水平使用 Meso Scale Discovery 技术 (MSD) 测量 (n=10 只小鼠/组)。

[0060] 图 6 显示为 COPD 患者的镜像的吸烟暴露的小鼠中 IL-1R1 的表达模式并且是吸烟诱导的炎症的抗辐射的非造血细胞需要的。(A) 来自室内空气和吸烟暴露的小鼠的代表性

图像中的 IL-1R1 表达。(B) 显示获自 GOLD III COPD 患者的肺活检中评估的 IL-1R1 的表达的代表性图像。(C) 产生了各种嵌合小鼠(按骨髓供体基因型进入接受者基因型编码)。(D) 计数来自暴露于室内空气或吸烟的骨髓嵌合小鼠(n=5-7 只小鼠/组)的支气管肺泡灌洗液(BAL)的嗜中性粒细胞。cxc1-1(E)、gm-csf(F)和 mmp-12(G)的表达通过富鲁达阵列测量(n=6-8 只小鼠/组)。

[0061] 图 7 显示 IL-1R 拮抗剂抑制急性肺炎的鼠吸入 LPS 模型中 LPS 介导的炎性细胞向肺的流入。存在四幅图,显示吸入攻击后 48 小时的研究终点时从 BAL 定量的总细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞。显示了接受无治疗(幼稚的)、媒介物或阿那白滞素(经由 ALZET 泵)和盐水或 LPS 吸入攻击的动物组的数据。

[0062] 图 8 显示在体外 IL-1R1 阻断减轻人鼻病毒(HRV)诱导的炎症。图 8A 显示 BEAS-2b/H292(上皮细胞系)细胞的 HRV14 感染和 IL-1R1 拮抗剂治疗的研究方案。图 8B 显示 IL-1R1 拮抗剂治疗对 BEAS-2b/H292 细胞的 HRV14 依赖的 IL-8 释放的作用。图 8C 显示 BEAS-2b 细胞的 HRV14 感染和 IL-1R1 拮抗剂治疗的替代研究设计。图 8D 显示使用该方案降低 BEAS-2B 细胞中 HRV 诱导的 IL-8 释放的阿那白滞素的剂量范围。图 8E 显示阿那白滞素和 IL-1R1 抗体二者对于降低原代正常人支气管上皮(NHBE)细胞中针对 HRV14 的 IL-8 应答的效力,相比之下,使用同种型对照抗体未见效应。

[0063] 图 9 显示 IL-1R1 抗体减轻急性鼻病毒诱导的肺炎的小鼠模型中病毒诱导的炎症。显示的组用磷酸盐缓冲盐水(PBS)、同种型对照抗体(MAB005)或抗-IL-1R1 抗体(35F5)腹膜内或鼻内以所示的剂量处理,和用 PBS、HRV-1b 或 UV-照射的 HRV1b(UV-HRV1b)鼻内处理。测量的细胞是 HRV 或盐水施用后 24hr 在研究终点从 BAL 定量的总细胞。抗体或盐水在 HRV 之前 24 小时施用。

[0064] 图 10 显示 IL-1R1 受体阻断或缺陷对吸烟、吸烟+病毒或吸烟和病毒模拟诱导的炎症的影响。图 10A 显示 BEAS-2B 细胞中的吸烟+IL-1R1 拮抗剂研究设计。图 10B 显示阿那白滞素对吸烟诱导的 IL-8 释放的剂量依赖效应。图 10C 显示 BEAS-2B 细胞中的吸烟+病毒+IL-1R 拮抗剂(阿那白滞素)研究设计。图 10D 显示阿那白滞素抑制当使用吸烟和病毒二者作为炎症刺激物时见到的增加的 IL-8 释放。图 10E 显示在吸烟暴露的精密肺切片(precision cut lung slice)(PCLS)中 IL-1R1 缺陷减弱针对病毒刺激物的肺固有应答。用病毒模拟物聚 I:C 离体(ex vivo)刺激从室内空气或吸烟暴露的野生型和 IL-1R1-缺陷动物产生的 PCLS。相对于室内空气对照模拟刺激的 PCLS(数据未显示)的 cxc1-1(图 10E 中最左侧的图)、cxc1-2(图 10E 中居中的图)、和 cxc1-5(图 10E 中最右侧的图)的表达通过实时定量 RT-PCR 评估(n=7-14 个来自 3 个独立实验的肺切片)。

[0065] 图 11 显示 IL-1R1 缺陷和 IL-1 α 抗体阻断减弱吸烟暴露的小鼠的 H1N1 流感病毒感染模型中恶化的炎症。(A-C) 室内空气或吸烟暴露野生型或 IL-1R1-缺陷小鼠用媒介物灌输或用 H1N1 甲型流感病毒感染。感染后五天,计数来自支气管肺泡灌洗液(BAL)(n=19-20 只小鼠/组)的总细胞数(A)、单核细胞(B)和嗜中性粒细胞(C)数。(D-F) 用同种型或 IL-1 α 阻断抗体每天处理的室内空气和吸烟暴露野生型小鼠用媒介物灌输或用 H1N1 甲型流感病毒感染。感染后五天,计数来自 BAL(n=4-5 只小鼠/组)的总细胞数(D)、单核细胞(E)和嗜中性粒细胞(F)数。

[0066] 图 12 显示在 COPD 的恶化期间 COPD 患者中的 IL-1 α 和 IL-1 β 水平。图 A 显示

疾病的稳定或恶化时期过程中通过痰测量的 COPD 患者中的 IL-1 α 和 IL-1 β 水平。蓝色条 - 恶化的时期 ; 红色线 IL-1 α 和绿色线 IL-1 β 。图 B 显示增加的 IL-1 β 水平与 COPD 肺中的细菌存在相关。

[0067] 图 13 显示 IL-1 α 和 IL-1 β 在 COPD 患者的肺中增加。代表性图像显示在获自 GOLD I/II 期 COPD 患者的肺活检中评估的 IL-1 α (A) 和 β (B) 的表达。(C) 计数获自每个患者 (n=5, 非 COPD ; 和 n=9, COPD GOLD I-II 期患者) 的两种活检样品的阳性细胞。统计学显著性使用广义线性混合效应模型以负二项分布 (调整离差) 确定以考虑同一患者的多次取样。箱线图的须代表 1-99 百分位数。如下对来自同一活检样品的肺切片进行上皮中 IL-1 α (D) 和 β (E) 染色的评分 : 0, 无染色 ; 1, 偶见染色 ; 2, 显著的局灶性染色 ; 3, 显著的弥散性染色。使用分层威尔科克森秩和检验 (Wilcoxon Ranksum test) 比较染色类别 (0、1、2 和 3) 的频率, 并以图形表示 (块的大小与频率成正比)。非 COPD 和 COPD 样品之间的 IL-1 α 上皮染色无显著差异, 但是 COPD 对比非 COPD 样品, IL-1 β 染色显著不同 ($p < 0.0001$)。IL-1 α 和 β 的水平在获自处于稳定疾病 (F)、恶化发作 (G) 及恶化后 7 天 (H) 和 35 天 (I) 的登记患者的痰样品中测量。IL-1 α 和 β 水平在所有就诊中显著相关。

[0068] 表 1a 列出了抗体 1-3 中每一个的 CDR 的氨基酸序列。表 1a 按出现的顺序分别公开了 SEQ ID NO 2-3、11、2-3、12、2-3、13-15、14-15 和 14-18。

[0069] 表 1b 列出了抗体 4-10 中每一个的 CDR 的氨基酸序列。表 1b 按出现的顺序分别公开了 SEQ ID NOS 2-3、19、2-3、20、2-4、2-3、21、2-3、22、2-3、23、2-3、24、6-7、6-7、6-7、6-7、6-7、6-7、6-7、25-26、8 和 27-30。

[0070] 详述

[0071] (i) 引言

[0072] 炎症已被充分确立为 COPD 的标志, 在 COPD 恶化过程中炎症增加 (在恶化时期增加)。然而, 驱动这些炎症应答的分子机制了解很少。本文公开了用于减轻气道炎症的方法和治疗 COPD 恶化的方法。具体地, 所述方法包括使用结合 IL-1R、抑制 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 的抗体。气道炎症的减轻可通过测量促炎性介导物和副产物的减少 (如细胞因子或炎性细胞的流入) 在微观水平测量或通过 COPD 严重度的慢性阻塞性肺病全球倡议 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) (GOLD) 五期分级所分类的增加的肺功能在宏观水平测量。

[0073] 平滑肌的肥大、气道组织的慢性炎症和气道壁所有部分的总体增厚可减小患有 COPD 的患者中的气道直径。气道周围组织的炎症和水肿也可降低气道的直径。气道壁中的组织释放的炎症介导物可用作气道平滑肌收缩的刺激物。减少炎症介导物的产生和释放的疗法可降低平滑肌收缩、气道的炎症和水肿。炎症介导物的实例是细胞因子、趋化因子和组胺。产生和释放炎症介导物的组织包括气道平滑肌、上皮和肥大细胞。用本文公开的组合物和方法进行的治疗可降低气道细胞产生或释放炎症介导物的能力。释放的炎症介导物的减少将减轻慢性炎症以及 COPD 恶化时期过程中所见的急性炎症, 从而增加气道内径, 并且还可降低气道平滑肌的高反应性。

[0074] 细胞因子的 IL-1 家族由十一种个体成员组成, 其中的四种, 即 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18 & IL-1Ra (IL-1 受体拮抗剂), 已被更全面地表征并与多种疾病中的病理过程相联系 (1)。IL-1 以两种不同的形式存在 ; IL-1 α 和 IL-1 β , 不同基因的产物。这些蛋白在氨基

酸水平是相关的, IL-1 α 和 IL-1 β 共有 22% 同源性, 而 IL-1 α 和 IL-1Ra 共有 18% 同源性。IL-1 β 与 IL-1Ra 共有 26% 同源性。IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-1Ra 的基因位于人染色体 2q14 中的相似区域 (2,3)。

[0075] IL-1 α 和 IL-1 β 二者均被合成为 31-kDa 前体肽, 该前体肽被裂解以产生 17kDa 成熟 IL-1 α 和 IL-1 β 。IL-1 β 由包括上皮细胞和巨噬细胞的多种细胞类型产生。其在被半胱氨酸蛋白酶半胱天冬酶-1 (IL-1 β 转化酶 (ICE) (4)) 裂解后从细胞释放。IL-1 α 被钙蛋白酶 (calpain) 蛋白酶裂解, 并可保留在质膜上, 其在质膜上似乎经由直接的细胞与细胞接触激活细胞 (5)。前-IL-1 α 在其氨基末端含有核定位序列, 这可导致激活多种细胞途径 (6)。

[0076] IL-1Ra 是天然存在的 IL-1 系统抑制剂。其作为衍生自可变 mRNA 剪接和可变翻译起始的四种不同同工型产生。IL-1Ra 的 17kDa 分泌同工型表达为 22-25kDa 的可变糖基化物类 (7,8), 现在称为 sIL-1Ra。18kDa 胞内同工型称为 icIL-1Ra1 (9)。同工型 icIL-1Ra2 通过从位于 icIL-1Ra1 和 sIL-1Ra 第一外显子之间的外显子的可变转录剪接产生 (10)。还鉴定了称为 icIL-1Ra3 的第三种 16kDa 胞内同工型 (11)。KINERET[®] (也称为阿那白滞素) 是人白细胞介素-1 受体拮抗剂 (IL-1Ra) 的重组、非糖基化形式。KINERET[®] 与天然人 IL-1Ra 的不同之处在于其在氨基末端具有单个甲硫氨酸残基的添加。KINERET[®] 由 153 个氨基酸组成和具有 17.3 千道尔顿的分子量。KINERET[®] 被批准用于治疗中度至重度活动性类风湿性关节炎。阿那白滞素 (本文称作阿那白滞素和 / 或 KINERET[®]) 是拮抗 IL-1R1 信号转导的 IL-1R1 拮抗剂的实例。在某些实施方案中, 本公开的方法包括施用 IL-1R1 拮抗剂, 如阿那白滞素或 IL-1Ra 的相似形式。

[0077] IL-1 α 和 IL-1 β 通过结合跨膜受体 IL-1R1 (人 IL-1R1 为 RefSeqNM_00877) 发挥其生物效应, IL-1R1 属于 IL-1 受体家族。IL-1 受体家族有三个成员; IL-1 受体 1 (IL-1R1 (80kDa), IL-1RII (68kDa) 和 IL-1 受体辅助蛋白 (IL-1RacP)。IL-1R1 和 IL-1RacP 在细胞膜中形成复合物以产生在结合 IL-1 α 或 IL-1 β 后能够进行信号转导的高亲和力受体。IL-1Ra 结合 IL-1R1 但不与 IL-1RacP 相互作用。IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-1Ra 还结合 IL-RII, IL-RII 不具有胞内信号转导结构域。

[0078] IL-1R1 被称为信号转导受体, 原因是配体结合和与 IL-1RacP 复合后, 经由其 213 个氨基酸残基的胞质尾启动信号转导 (12)。目前的文献表明, IL-1RII 仅作为 '诱饵受体' 在细胞表面或以可溶形式在胞外起作用 (13)。调控 IL-1R1 与 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 的结合是用于调控 IL-1 信号转导的方法。

[0079] IL-1 信号转导在许多慢性炎症疾病中具有重要作用。在某些实施方案中, 本公开包含通过施用特异性结合 IL-1R1 和通过至少抑制与至少 IL-1 α 的结合抑制 IL-1R1 活性的 IL-1R1 抗体来抑制 IL-1 信号转导 (作为 COPD 恶化的治疗的一部分)。在某些实施方案中, 该抗体还抑制 IL-1R1 与 IL-1 β 的结合。在某些实施方案中, 本公开包含通过施用 IL-1R1 拮抗剂 (IL-1R1 的拮抗剂) 来抑制 IL-1 信号转导 (作为 COPD 恶化的治疗的一部分)。前述 IL-1R1 抗体是 IL-1R1 的此类拮抗剂的实例。其他实例包括阿那白滞素和 IL-1Ra 的天然存在的形式。在某些实施方案中, 本公开包含通过施用特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 结合的 IL-1 α 抗体来抑制 IL-1 信号转导 (作为 COPD 恶化的治疗的一部分)。

[0080] 本文描述了这些方法和可以在这些方法中使用的组合物的其他特征。

[0081] (ii) 术语

[0082] 在继续进一步详细地描述本公开之前,应理解本公开不限于特定的组合物或方法步骤,因为这些都可以变化。必须注意,如本说明书和所附的权利要求书中所使用的,除非上下文明确另外指明,否则单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“该(the)”包括复数指代物。

[0083] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所涉及的领域的普通技术人员所通常理解的含义相同的含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版,2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版,1999, Academic Press; 和 Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修订版,2000, Oxford University Press, 为技术人员提供了本公开中使用的许多术语的一般词典。

[0084] 氨基酸在本文中可通过它们通常所知的三字母符号或由 IUPAC-IUB 生化命名委员会建议的单字母符号表示。类似地,核苷酸可通过它们通常所接受的单字母代码表示。

[0085] 除非另外指明,否则抗体的可变结构域、互补决定区(CDR)和构架区(FR)中的氨基酸编号遵循 Kabat 定义,如 Kabat 等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 中所列的。使用这一编号系统,实际的线性氨基酸序列可含有更少或另外的氨基酸,对应于可变结构域的 FR 或 CDR 的缩短或向其中的插入。例如,重链可变结构域可包括 H2 的残基 52 之后的单一氨基酸插入(残基 52a, 根据 Kabat)和重链 FR 残基 82 之后的插入残基(如残基 82a、82b 和 82c 等,根据 Kabat)。给定抗体的残基的 Kabat 编号可通过在同源性区域将抗体的序列与“标准”Kabat 编号的序列比对来确定。构架残基的最大比对经常要求在编号系统中插入“间隔”残基,以用于 Fv 区。此外,由于种间或等位基因趋异,任何给定 Kabat 位点编号的特定个体残基的身份可在抗体链与抗体链间不同。

[0086] 如本文所用,术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”,也称为免疫球蛋白,涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、至少两种不同的表位结合片段形成的多特异性抗体(如,双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、骆驼源化(camelised)抗体、嵌合抗体、单链 Fv(scFv)、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、展现期望的生物活性的抗体片段(如抗原结合部分)、二硫键连接的 Fv(dsFv)、和抗-独特型(抗-Id)抗体(包括,如,针对本公开的抗体的抗-Id 抗体)、细胞内抗体、和以上任何一项的表位结合片段。具体地,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即,含有至少一个抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以是任何同种型(如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、亚同种型(如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或同种异型(如, Gm, 如 G1m(f、z、a 或 x)、G2m(n)、G3m(g、b 或 c)、Am、Em 和 Km(1、2 或 3))。抗体可衍生自任何哺乳动物,包括但不限于人、猴、猪、马、兔、狗、猫、小鼠等或其他动物诸如鸟类(如鸡)。在某些实施方案中,抗体可基于其分子量进一步描述。在某些实施方案中,分子量大于或等于 25 千道尔顿。在某些实施方案中,所述抗体是包含恒定区的全长抗体。

[0087] 如本文所用,术语“拮抗剂”指抑制生物活性的化合物。例如 IL-1R1 拮抗剂是

IL-1R1 信号转导的拮抗剂。例如,结合 IL-1R1 和经由 IL-1R1 抑制 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 信号转导的化合物是 IL-1R1 拮抗剂。中和抗体,如特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 的结合的抗体是 IL-1R1 拮抗剂的实例。IL-1Ra 化合物,如阿那白滞素,是 IL-1R1 拮抗剂的另一实例。在某些实施方案中,拮抗剂可以是蛋白。在某些实施方案中,拮抗剂可以是非多肽拮抗剂,如核酸或小分子。

[0088] 当过量的抗体使与受体结合的配体的量减少至少 50%、60% 或 80%,以及更通常地大于约 85%(如在体外竞争性结合测定中所测量的)时,抗体抑制配体与受体的结合。

[0089] 如本文所用,术语“气道”意指暴露于空气的受试者的部分或整个呼吸系统。因此“气道”包括上和下气道通路,其包括但不限于气管、支气管、细支气管、末端和呼吸性细支气管、肺泡小管和肺泡囊。气道包括鼻窦、鼻道、鼻粘膜和鼻上皮。气道还包括但不限于喉、喉头、气管支气管树和扁桃体。

[0090] 如本文所用,术语“IL-1R1”意指白细胞介素 1 受体 1。人 IL-1R1 的核酸和氨基酸序列是可公开获得的(RefSeq NM_000877)。在一些实施方案中,IL-1R1 可以是人或食蟹猴 IL-1R1。如本文其他地方所述的,IL-1R1 可以是重组的,和 / 或可以是糖基化的或未糖基化的。

[0091] 如本文所用,术语“IL-1 α ”或“IL-1 α (IL-1alpha)”意指白细胞介素 1 α 。人 IL-1 α 的核酸和氨基酸序列是可公开获得的(RefSeq NM_000575.3)。在一些实施方案中,IL-1 α 可以是人或食蟹猴 IL-1 α 。如本文其他地方所述的,IL-1 α 可以是重组的,和 / 或可以是糖基化的或未糖基化的。

[0092] 如本文所用,术语“IL-1 β ”或“IL-1 β (IL-1beta)”意指白细胞介素 1 β 。人 IL-1 β 的核酸和氨基酸序列是可公开获得的(RefSeq NM_000576)。在一些实施方案中,IL-1 β 可以是人或食蟹猴 IL-1 β 。如本文其他地方所述的,IL-1 β 可以是重组的,和 / 或可以是糖基化的或未糖基化的。

[0093] 如本文所用,术语“几何平均 (Geomean)”(也称为几何平均 (geometric mean)),指数据集的对数值的平均值转换回以 10 为底的数字。T 这要求存在至少两次测量,如至少 2、优选至少 5、更优选至少 10 次重复。本领域技术人员将理解,重复的次数越多,几何平均值越稳健。重复次数的选择可由本领域技术人员判定。

[0094] 如本文所用,术语“单克隆抗体”指特异性结合同一表位的大致均一的抗体群体的抗体。术语“mAb”指单克隆抗体。

[0095] 此处方便地指出,本文所使用的“和 / 或”应视为具体公开有或无另一组分时两个指定特征或组分中的每一个。例如“A 和 / 或 B”应视为具体公开 (i)A、(ii)B 和 (iii)A 和 B 中的每一个,如同本文单独列出其中的每一个。

[0096] 如本文所用,术语“恶化”指相对于患者的基线状况的 COPD 症状的加剧。在某些实施方案中,COPD 恶化可被定义为疾病天然过程中以下特征的事件:超出正常的每天变化的患者的基线肺功能、呼吸困难、咳嗽和 / 或痰的变化,急性发作和可以为患有潜在 COPD 的患者的药物治疗变化的正当理由。在某些实施方案中,COPD 的恶化可以是呼吸短促和 / 或喘鸣症状的突然增加和 / 或脓性痰(含有脓汁的痰)产生的增加。

[0097] (iii) 抗体和拮抗剂

[0098] 本公开的治疗 COPD 恶化的方法包括施用包含结合 IL-1R1 或 IL-1 α 的拮抗剂和

/ 或抗体的组合物。在某些实施方案中,拮抗剂可以是结合和抑制靶标,在一些情形中通过其他配体防止结合的蛋白、核酸或小分子。

[0099] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体是结合和抑制 IL-1R1 的 IL-1R1 抗体(美国公布第 20040097712 号;和 US20100221257,各自通过引用并入本文)。在某些实施方案中,所述抗体特异性结合 IL-1R1,如人 IL-1R1。在某些实施方案中,所述抗体结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 的结合。在某些实施方案中,所述抗体是人抗体。在某些实施方案中,所述抗体与抗体 6 结合相同的表位或与抗体 6 竞争结合 IL-1R1。在某些实施方案中,所述抗体与 IL-1Ra 竞争结合 IL-1R1。在某些实施方案中,本公开的抗体不与 IL-1Ra 竞争结合 IL-1R1。

[0100] 举例来说,本文提供了特异性结合 IL-1R1 的示例性人抗体。这些人抗体的 CDR 的氨基酸序列在表 1a 和 1b 中列出。这些抗体中的一个(抗体 6)的 VH 和 VL 的氨基酸序列以及其种系化形式在本文提供。特异性结合 IL-1R1 的示例性啮齿动物抗体是来自 BDPharmingen/BD Biosciences 的可商购的 35F5 抗体。

[0101] 在另一实施方案中,示例性人抗体包括美国公布第 20040097712 号中公开的那些,包括 US 20040097712 的图 5、6、7、8、9、10 和 11 中公开的 26F5、27F2 和 15C4,这些图通过引用明确并入本文。本文提供了这些抗体的氨基酸序列。

[0102] 特异性结合 IL-1R1 和抑制与 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 结合的这些和其他抗体是在本发明的方法中有用的示例性 IL-1R1 抗体。此类抗体也是 IL-1R1 拮抗剂的实例。

[0103] 另外的示例性 IL-1R1 拮抗剂包括阿那白滞素或 IL-1Ra 的其他形式。

[0104] 可适合用于本公开的方法的 IL-1R1 或 IL-1 α 的另外的拮抗剂已公开在至少以下国际专利申请中:W02004/022718;W02005/023872;W02007/063311;W02007/063308;W02005/086695;W01995/014780 和 W0 2006/059108。

[0105] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的化合物特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 的结合。示例性化合物是特异性结合 IL-1 α 的抗体,如来自 R&D Systems(目录号 MAB4001)的可商购的抗体 ALF161。

[0106] 可描述用于所要求保护的方法的抗体和拮抗剂的示例性特征在下文描述。

[0107] 在另一实施方案中,对于 30pM IL-1 β 存在下抑制 IL-1 β 诱导的人全血中的 IL-6 产生,用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂具有低于 1nM 的平均 IC₅₀。在另外的实施方案中,平均 IC₅₀ 低于 800pM、低于 700pM、低于 600pM、低于 500pM、低于 400pM、低于 300pM、低于 200pM 或低于 100pM。

[0108] 本公开的拮抗剂(抗体或非抗体拮抗剂)结合 IL-1R1 或 IL-1 α 和以例如高效价中和 IL-1R1 或 IL-1 α 。中和意指抑制 IL-1R1 或 IL-1 α 的生物活性。本公开的拮抗剂可中和 IL-1R1 的一种或多种生物活性,通常用于所要求保护的方法的拮抗剂抑制 IL-1 α 和 IL-1 β 结合 IL-1R1。

[0109] 在某些实施方案中,所述抗体或拮抗剂特异性结合和抑制人 IL-1R1。在某些实施方案中,所述抗体或拮抗剂特异性结合和抑制人 IL-1 α 。在某些实施方案中,所述抗体或拮抗剂还可结合和中和非人 IL-1R1 或 IL-1 α ,意即在人以外的物种中天然存在的 IL-1R1 或 IL-1 α 直系同源物。在某些实施方案中,所述非人物种是一种或多种非人灵长类物种,如食蟹猴。

[0110] 结合特异性可在例如标准竞争测定中确定或展现。

[0111] 用于测量 IL-1R1 或 IL-1 α 的中和的合适测定包括,例如,配体受体生化测定和表面等离子体共振 (SPR) (如, BIACORE™)。

[0112] IL-1R1 或 IL-1 α 抗体和拮抗剂的结合动力学和亲和力(表示为平衡解离常数 K_D) 可以如使用表面等离子体共振 (BIACORE™) 确定。本公开的抗体和拮抗剂一般对 IL-1R1 或 IL-1 α , 如人 IL-1R1 或 IL-1 具有低于约 1nM 的亲和力 (K_D), 和在一些实施方案中, 具有低于约 500pM、400pM、300pM、250pM、200pM、100pM 的 K_D , 在其他实施方案中具有低于约 50pM 的 K_D , 在其他实施方案中具有低于约 25pM 的 K_D , 在其他实施方案中具有低于约 10pM 的 K_D , 在其他实施方案中具有低于约 1pM 的 K_D 。

[0113] 许多方法可用来测量抗体或拮抗剂对其抗原的结合亲和力, 一种此类方法是 KinExA。动力学排除测定 (Kinetic Exclusion Assay) (KinExA) 是能够测量抗原 / 抗体相互作用的平衡解离常数以及缔合和解离速率常数的通用免疫测定平台 (从根本上说, 流量荧光分光光度计)。因为 KinExA 是在获得平衡后进行的, 所以是用于测量高亲和力相互作用的 K_D 的有利技术, 高亲和力相互作用的解离速率可能非常低。KinExA 的使用对于其中抗体和抗原的亲和力高于表面等离子体共振分析可以准确预测的亲和力的这一情形是特别适合的。KinExA 方法可如 Drake 等人 (2004) Analytical Biochemistry 328, 35-43 中的描述进行。

[0114] 在本公开的一个实施方案中, 本公开的抗体或拮抗剂以对 IL-1R1 具有 300pM 或更低的 K_D 的特异性, 如使用 KinExA 方法所测量的。可选地, 200pM 或更低、100pM 或更低、50pM 或更低、20pM 或更低的 K_D , 或 10pM 或更低或 1pM 或更低的 K_D 。

[0115] 生物活性的抑制可以是部分的或完全的。拮抗剂可抑制 IL-1R1 生物活性, 如 CYNOM-K1 细胞中 IL-1 β 诱导的 IL-8 释放或 HeLa 细胞中 IL-1 α 和 IL-1 β 诱导的 IL-8 释放达 100%, 或可选地达: 至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60% 或至少 50% 的不存在拮抗剂下诱导最大可能活性的 50% 或 80% 的 IL-1 α 或 β 浓度的活性。拮抗剂可抑制 IL-1 α 生物活性, 如 HeLa 细胞中 IL-1 α 诱导的 IL-8 释放达 100%, 或可选地达: 至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60% 或至少 50% 的不存在拮抗剂下诱导最大可能活性的 50% 或 80% 的 IL-1 α 浓度的活性。

[0116] 拮抗剂的中和效价一般表示为 IC_{50} 值, 除非另外指明, 否则 IC_{50} 值以 nM 计。在功能测定中, IC_{50} 是降低生物应答达其最大值的 50% 的拮抗剂浓度。在配体结合研究中, IC_{50} 是降低受体结合达最大特异性结合水平的 50% 的浓度。 IC_{50} 可通过将 % 最大生物应答作为拮抗剂浓度的 log 的函数绘图和使用软件程序如 Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) 以将数据拟合 S 形函数产生 IC_{50} 值来计算。效价可使用技术人员已知和 / 或本文所述或引用的一种或多种测定来确定或测量。拮抗剂的中和效价可表示为几何平均值。

[0117] 在某些实施方案中, 拮抗剂对 IL-1R1 或 IL-1 α 活性的中和使用本文描述的测定或表明拮抗剂结合和中和 IL-1R1 或 IL-1 α 的任何标准测定来展示。可用于确定拮抗剂与 IL-1R1 或 IL-1 α 的结合的其他方法包括 ELISA、蛋白质印迹、免疫沉淀、亲和层析和生化测定。

[0118] 用于所要求保护的方法的本公开的拮抗剂可对人 IL-1R1 或 IL-1 α 具有与对其他物种的 IL-1R1 或 IL-1 α 相似或更强的亲和力。拮抗剂对人 IL-1R1 或 IL-1 α 的亲和力可

以与对食蟹猴 IL-1R1 或 IL-1 α 的亲 和力相似,或例如在 5 或 10- 倍内。

[0119] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的本公开的拮抗剂包含,包含一个或多个 CDR 的 IL-1R1 结合基序,如构架内的‘CDR 集’。CDR 集包含选择以下的一个或多个 CDR : HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 (其中 H 指重链和 L 指轻链)。在一个实施方案中, CDR 集包含表 1a 或 1b 中所列的 HCDR3,任选地与选自以下的一个或多个 CDR 组合 : HCDR1、HCDR2、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,如表 1a 或 1b 中所列的。在另一实施方案中,CDR 集包含表 1a 或 1b 中所列的 HCDR3 和 LCDR3,任选地与选自以下的一个或多个 CDR 组合 :HCDR1、HCDR2、LCDR1 和 LCDR2,例如选自以下的一个或多个 CDR :HCDR1、HCDR2、LCDR1 和 LCDR2,如表 1a 或 1b 中所列。在另一实施方案中, CDR 集包含表 1a 或 1b 中所列的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

[0120] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体是具有表 1a 中所示的 CDR 的抗体。简要而言,分离具有表 1a 中所示的 CDR 序列集的人亲代抗体分子 (参见抗体 1)。通过优化过程,产生编号 2-3 的一组人抗体克隆,具有衍生自亲代 CDR 序列的 CDR 序列和具有表 1a 中所示位置的修饰。因此,例如,可从表 1a 中看到,抗体 2 具有亲代 HCDR1、HCDR2、LCDR1 和 LCDR2,和具有亲代 HCDR3 序列,其中 :Kabat 残基 100E 被替代为 T,Kabat 残基 100F 被替代为 V,Kabat 残基 100G 被替代为 D,Kabat 残基 100H 被替代为 A,Kabat 残基 100I 被替代为 A,Kabat 残基 101 被替代为 V 和 Kabat 残基 102 被替代为 D。

[0121] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体是具有表 1b 中所示的 CDR 的抗体。简要而言,分离具有表 1b 中所示的 CDR 序列集的第二亲代人抗体分子 (参见抗体 4)。通过优化过程,产生编号 5-10 的一组人抗体克隆,具有衍生自亲代 CDR 序列的 CDR 序列和具有表 1b 中所示位置的修饰。因此,例如,可从表 1b 中看到,抗体 5 具有亲代 HCDR1、HCDR2、LCDR1 和 LCDR2,和具有亲代 HCDR3 序列,其中 :Kabat 残基 100A 被替代为 A,Kabat 残基 100B 被替代为 P,Kabat 残基 100C 被替代为 P,Kabat 残基 100D 被替代为 P,Kabat 残基 100E 被替代为 L,Kabat 残基 100F 被替代为 G 和 Kabat 残基 100I 被替代为 G。

[0122] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂是具有表 1a 或 1b 中所列的一个或多个 (1、2、3、4、5 或 6) CDR 的人抗体。在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体是具有表 1a 或 1b 中所列的 CDR 的人抗体,其中所述 CDR 中的一个或多个具有一个或多个氨基酸添加、置换、缺失和 / 或插入。例如,在某些实施方案中,此类抗体相对于抗体 1 或抗体 4 的亲代序列具有一至五 (1、2、3、4 或 5) 个添加、置换、缺失和 / 或插入,并保留特异性结合 IL-1R1 的能力。

[0123] 在某些实施方案中,所述抗体或拮抗剂具有抗体 6 的 CDR。在某些实施方案中,所述抗体是抗体 6 的种系化形式。在某些实施方案中,所述抗体包含抗体 6 的 VH 和 / 或 VL 或其种系化形式。本文提供了抗体 6 的氨基酸序列和抗体 6 的种系化形式。在某些实施方案中,所述抗体结合与抗体 6 相同或大致相同的表位。在某些实施方案中,所述抗体与抗体 6 竞争结合 IL-1R1。

[0124] 在某些实施方案中,所述抗体或拮抗剂包含具有以下置换或缺失中的一个或多个的抗体 1HCDR3 :

[0125] Kabat 残基 100E 替代为 T ;

[0126] Kabat 残基 100F 替代为 V 或 L ;

- [0127] Kabat 残基 100G 替代为 D；
- [0128] Kabat 残基 100H 替代为 A 或 P；
- [0129] Kabat 残基 100I 替代为 A 或 P；
- [0130] Kabat 残基 101 替代为 V 或 G；
- [0131] Kabat 残基 102 替代为 D 或 V。
- [0132] 在某些实施方案中，所述抗体或拮抗剂包含具有以下置换或缺失中的一个或多个的抗体 4HCDR3：
- [0133] Kabat 残基 100A 替代为 A 或 E；
- [0134] Kabat 残基 100B 替代为 P、Q 或 A；
- [0135] Kabat 残基 100C 替代为 P、Y、S 或 L；
- [0136] Kabat 残基 100D 替代为 P、G 或 A；
- [0137] Kabat 残基 100E 替代为 L 或 V；
- [0138] Kabat 残基 100F 替代为 G、V 或 P；
- [0139] Kabat 残基 100G 替代为 V；
- [0140] Kabat 残基 100H 替代为 Y；
- [0141] Kabat 残基 100I 替代为 G 或 D；
- [0142] Kabat 残基 100J 替代为 A 或缺失。
- [0143] Kabat 残基 101 替代为 F；
- [0144] Kabat 残基 102 替代为 V。
- [0145] 在某些实施方案中，所述抗体或拮抗剂包含具有以下置换中的一个或多个的抗体 1LCDR3：
- [0146] Kabat 残基 94 替代为 H 或 A；
- [0147] Kabat 残基 95 替代为 A；
- [0148] Kabat 残基 95A 替代为 E 或 R；
- [0149] Kabat 残基 95B 替代为 Q 或 V；
- [0150] Kabat 残基 97 替代为 H 或 L。
- [0151] 在一些实施方案中，所述抗体或拮抗剂可包含具有以下置换中的一个或多个的抗体 4LCDR3：
- [0152] Kabat 残基 94 替代为 A、V、D、H、L 或 R；
- [0153] Kabat 残基 95 替代为 G、R 或 A；
- [0154] Kabat 残基 95A 替代为 G、L、A、V 或 D；
- [0155] Kabat 残基 95B 替代为 H、R、A 或 D；
- [0156] Kabat 残基 96 替代为 H、P 或 A。
- [0157] Kabat 残基 97 替代为 H、V 或 Q。
- [0158] 在某些实施方案中，所述抗体或拮抗剂包含具有以下置换或添加中的一个或多个的抗体 6HCDR3：
- [0159] Kabat 残基 100A 替代为 G 或 A；
- [0160] Kabat 残基 100B 替代为 S、P 或 A；
- [0161] Kabat 残基 100C 替代为 D、P、S 或 L；

- [0162] Kabat 残基 100D 替代为 Y、P 或 A；
- [0163] Kabat 残基 100E 替代为 T 或 L；
- [0164] Kabat 残基 100F 替代为 T、G 或 P；
- [0165] Kabat 残基 100G 替代为 V；
- [0166] Kabat 残基 100H 替代为 Y；
- [0167] Kabat 残基 100I 替代为 G 或 D；
- [0168] 抗体 6 中缺失的 Kabat 残基 100J 复原为 A 或 F；
- [0169] Kabat 残基 101 替代为 D；
- [0170] Kabat 残基 102 替代为 I。
- [0171] 在一些实施方案中，所述抗体或拮抗剂包含具有以下置换中的一个或多个的抗体 6LCDR3：
- [0172] Kabat 残基 94 替代为 S、A、D、H、L 或 R；
- [0173] Kabat 残基 95 替代为 L、G 或 A；
- [0174] Kabat 残基 95A 替代为 S、G、A、V 或 D；
- [0175] Kabat 残基 95B 替代为 G、R、A 或 D；
- [0176] Kabat 残基 96 替代为 S、P 或 A。
- [0177] Kabat 残基 97 替代为 L、H 或 Q。
- [0178] 在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的拮抗剂可以是与 IL-1Ra 和 / 或与具有表 1a 和 1b 中所列的 CDR 的抗体竞争或交叉竞争结合 IL-1R1 的拮抗剂。在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的拮抗剂是与具有表 1a 和 1b 中所列的 CDR 的抗体结合相同表位的拮抗剂。在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的拮抗剂是与抗体 6 或包含抗体 6 的 CDR 的抗体结合相同表位的拮抗剂。拮抗剂之间的竞争可在体外容易地测定，例如使用 ELISA 和 / 或通过标记特定报告分子至一种拮抗剂，其可以在一种或多种其他未标记的拮抗剂存在下被检测，使得能够鉴定结合相同表位或重叠表位的拮抗剂。此类方法是本领域普通技术人员容易获知的，并在本文更详细地描述。
- [0179] 在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的 IL-1R1 或 IL-1 α 抗体是人、嵌合或人源化抗体。抗体可以是单克隆抗体，特别是人、鼠、嵌合或人源化来源的，其可根据本领域技术人员熟知的标准方法获得。在某些实施方案中，所述拮抗剂是非抗体拮抗剂。
- [0180] 在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的 IL-1R1 拮抗剂是包含与抗体 6 的 VH 结构域具有至少 60、70、80、85、90、95、98 或 99% 氨基酸序列同一性的 VH 结构域，或包含表 1a 或 1b 中所示的 HCDR 集（如，HCDR1、HCDR2 和 / 或 HCDR3）的抗体。所述抗体分子可任选地还包含与抗体 6 的 VL 结构域具有至少 60、70、80、85、90、95、98 或 99% 氨基酸序列同一性的 VL 结构域，或具有表 1a 或 1b 中所示的 LCDR 集（如，LCDR1、LCDR2 和 / 或 LCDR3）。可用于计算两个氨基酸序列的 % 同一性的算法包括，如 BLAST[14]、FASTA[15] 或 Smith-Waterman 算法 [16]，如采用默认参数。
- [0181] 在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的 IL-1R1 拮抗剂是包含人抗体 26F5、27F2 或 15C4 的 VH 结构域和 / 或人抗体 26F5、27F2 或 15C4 的 VL 结构域的抗体。在某些实施方案中，所述拮抗剂是包含人抗体 26F5 的 VH 和 VL 结构域或人抗体 27F2 的 VH 和 VL 结构域，或人抗体 15C4 的 VH 和 VL 结构域的人抗体。在其他实施方案中，用于所要求保护的

方法的 IL-1R1 拮抗剂是包含 1、2、3、4、5 或 6 个人抗体 26F5、27F2 或 15C4 的 CDR 的抗体。在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的 IL-1R1 拮抗剂是包含与人抗体 26F5、27F2 或 15C4 的 VH 结构域具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 或 99% 同一性的 VH 结构域和 / 或与人抗体 26F5、27F2 或 15C4 的 VL 结构域具有至少 80%、85%、90%、95%、99% 或 99% 同一性的 VL 结构域的抗体。

[0182] 用于所要求保护的方法的抗体可还包含抗体恒定区或其部分,如人抗体恒定区或其部分。例如,VL 结构域可在其 C- 末端连接至包括人 C 或 C λ 链的抗体轻链恒定结构域。相似地,基于 VH 结构域的拮抗剂可在其 C- 末端连接至免疫球蛋白重链的整体或部分(如 CH1 结构域),该免疫球蛋白重链衍生自任何抗体同种型,如 IgG、IgA、IgE 和 IgM 和任何同种型亚类,特别是 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。IgG1 由于其易于制造和稳定性如半衰期所以是有利的。调控拮抗剂功能和 / 或性质如稳定可变区的任何合成或其他恒定区变体在本公开中可能也是有用的。

[0183] 此外,可能期望根据本公开修饰本文所述的氨基酸序列,特别是人重链恒定区的序列,以将该序列改编为期望的同种异型,如高加索群体中发现的同种异型。

[0184] 在某些实施方案中,所述抗体可包括人种系基因序列的构架区,或是非种系化的。因此,构架可被种系化,其中构架内的一个或多个残基被改变以匹配最相似的人种系构架中等同位置的残基。因此,用于所要求保护的方法的拮抗剂可以是分离的人抗体分子,其具有包含人种系构架如人种系 IgG VH 构架中的 HCDR 集的 VH 结构域。所述拮抗剂还可具有包含如人种系 IgG VL 构架中的 LCDR 集的 VL 结构域。

[0185] 在某些实施方案中,所述抗体可包含用非天然存在的或非标准氨基酸替代一个或多个氨基酸残基,将一个或多个氨基酸残基修改为非天然存在的或非标准形式,或向序列中插入一个或多个非天然存在的或非标准氨基酸。序列中改变的数目和位置的实例在本文其他地方描述。天然存在的氨基酸包括 20 种“标准”L- 氨基酸,通过其标准单字母代码标识为 G、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、E。非标准氨基酸包括可掺入到多肽主链或由对现有氨基酸残基的修饰得到的任何其他残基。非标准氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。多种天然存在的非标准氨基酸是本领域已知的,如 4- 羟基脯氨酸、5- 羟基赖氨酸、3- 甲基组氨酸、N- 乙酰基丝氨酸等 [17]。在其 N- α 位置衍生的那些氨基酸残基将只能位于氨基酸序列的 N- 末端。一般而言,氨基酸是 L- 氨基酸,但其可以是 D- 氨基酸。因此改变可包含将 L- 氨基酸修饰或替代为 D- 氨基酸。氨基酸的甲基化、乙酰基化和 / 或磷酸化形式也是已知的,且本公开中的氨基酸可进行此类修饰。

[0186] 在某些实施方案中,所要求保护的方法中使用的抗体使用一个或多个选定 VH 和 / 或 VL 基因的随机诱变以产生整个可变结构域内的突变来产生。此类技术由 Gram 等人 [18] 描述,其使用易错 PCR。在一些实施方案中,在整个可变结构域或 CDR 集内生成一个或两个氨基酸置换。

[0187] 可使用的另一方法是对 VH 或 VL 基因的 CDR 区的直接诱变。此类技术由 Barbas 等人 [19] 和 Schier 等人 [20] 公开。

[0188] 所有上述技术同样是本领域已知的,并且技术人员将能够使用此类技术来使用本领域的常规方法提供本公开的拮抗剂。

[0189] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂是抗体片段。片段的

实例包括 (i) Fab 片段, 其由 VL、VH、恒定轻链结构域 (CL) 和恒定重链结构域 1 (CH1) 结构域组成; (ii) Fd 片段, 其由 VH 和 CH1 结构域组成; (iii) Fv 片段, 其由单一抗体的 VL 和 VH 结构域组成; (iv) dAb 片段 [21、22、23], 其由 VH 或 VL 结构域组成; (v) 分离的 CDR 区; (vi) F(ab')₂ 片段, 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 结构域通过允许两个结构域缔合以形成抗原结合位点的肽接头连接 [24、25]; (viii) 双特异性单链 Fv 二聚体 (例如 WO 1993/011161 中所公开的) 和 (ix) 通过 基因融合构建的“双链抗体”、多价或多特异性片段 (例如 W094/13804 和 [26] 中所公开的)。Fv、scFv 或双链抗体分子可通过掺入连接 VH 和 VL 结构域的二硫桥来稳定 [27]。还可生成包含与 CH3 结构域连接的 scFv 的微型抗体 (Minibodies) [28]。结合片段的其他实例是 Fab', 其与 Fab 片段的不同在于在重链 CH1 结构域的羧基末端添加了几个残基, 包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸, 和 Fab'-SH, 其是其中恒定结构域的半胱氨酸残基携带自由巯基的 Fab' 片段。

[0190] 在某些实施方案中, 合适的片段可获自本文公开的人或啮齿动物抗体中的任一种。在其他实施方案中, 合适的片段获自与本文所述的抗体中的任一种结合相同表位或任何此类抗体竞争结合抗原的人或啮齿动物抗体。

[0191] 在某些实施方案中, 用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂被标记、被修饰以增加半衰期和类似性质。例如, 在某些实施方案中, 所述抗体或拮抗剂是化学修饰的, 如通过聚乙二醇化或通过掺入到脂质体中。

[0192] 在某些实施方案中, 用于所要求保护的方法的拮抗剂可在非抗体分子内包含抗原结合位点, 一般通过非抗体蛋白支架中的一个或多个 CDR 如 CDR 集提供, 如以下进一步讨论的。

[0193] 抗原结合位点可借助在非抗体蛋白支架, 如纤连蛋白或细胞色素 B 等 [29、30、31] 上排列 CDR 而提供, 或通过将蛋白支架内的环上的氨基酸残基随机化或突变以赋予对期望靶标的结合特异性而提供。用于在蛋白中工程化新的结合位点的支架已由 Nygren 等人 [31] 详述。抗体模拟物的蛋白支架公开于 W0200034784, 其通过引用整体并入本文, 其中发明人描述了包括具有至少一个随机化环的纤连蛋白 III 型结构域的蛋白 (抗体模拟物)。向其中嫁接一个或多个 CDR 如 HCDR 集的合适的支架可由免疫球蛋白基因超家族的任何结构域成员提供。支架可以是人或非人蛋白。非抗体蛋白支架的优点是它可在比至少一些抗体分子更小和 / 或更易于制造的支架分子中提供抗原结合位点。拮抗剂的小尺寸可赋予有用的生理性质, 如进入细胞、深入穿透组织或到达在其他结构内的靶标、或结合靶抗原的蛋白腔的能力。非抗体蛋白支架中抗原结合位点的使用综述于 Wess, 2004 [32]。典型的是具有稳定主链和一个或多个可变环的蛋白, 其中一个或多个环的氨基酸序列被特异性或随机地突变以产生结合靶抗原的抗原结合位点。此类蛋白包括金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的蛋白 A 的 IgG 结合结构域、转铁蛋白、四连接素、纤连蛋白 (如第 10 纤连蛋白 III 型结构域)、脂笼蛋白以及 γ 晶体 (gamma-crystalline) 和其他 AffilinTM 支架 (Sci1 蛋白)。其他方法的实例包括合成的基于环蛋白 (cyclotide) - 具有分子内二硫键的小蛋白的“微体 (Microbodies)”、微生物蛋白 (Microproteins) (VersabodiesTM, Amunix Inc, Mountain View, California, USA) 和锚蛋白重复蛋白 (DARPin, Molecular Partners AG, Zürich-Schlieren, Switzerland)。此类蛋白还包括小的、工程化的蛋白结构域, 如, 例如免

疫结构域（参见例如，美国专利公布第 2003/082630 和 2003/157561 号）。免疫结构域含有抗体的至少一个互补决定区（CDR）。

[0194] 在某些实施方案中，拮抗剂可包含其他氨基酸，如形成肽或多肽，如折叠的结构域，或赋予分子除了结合抗原的能力之外的另一功能特征。拮抗剂可携带可检测的标记，或可缀合至毒素或靶向部分或酶（如经由肽键或接头）。

[0195] 在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的拮抗剂或抗体的半衰期是至少约 4 至 7 天。在某些实施方案中，平均半衰期是至少约 2 至 5 天、3 至 6 天、4 至 7 天、5 至 8 天、6 至 9 天、7 至 10 天、8 至 11 天、8 至 12 天、9 至 13 天、10 至 14 天、11 至 15 天、12 至 16 天、13 至 17 天、14 至 18 天、15 至 19 天或 16 至 20 天。

[0196] 在另一实施方案中，本公开提供包容器的制品。容器包括含有本文公开的拮抗剂或抗体的组合物，和说明组合物可用于治疗 COPD 恶化和 / 或 COPD 恶化的症状的包装说明书或标签。

[0197] 在其他实施方案中，本公开提供试剂盒，试剂盒包含含有本文公开的拮抗剂或抗体的组合物，和将组合物施用于需要治疗的受试者的说明。

[0198] 在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂包含变体 Fc 区。即，非天然存在的 Fc 区，例如包含一个或多个非天然存在的氨基酸残基的 Fc 区。本公开的变体 Fc 区还涵盖包含氨基酸缺失、添加和 / 或修饰的 Fc 区。

[0199] 在某些实施方案中，用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂具有大于或等于约 25 千道尔顿的分子量。在其他实施方案中，用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂具有大于或等于约 50、约 75、约 90、约 100、约 110 或约 125 千道尔顿的分子量。在其他实施方案中，抗体或拮抗剂具有大于或等于约 150 千道尔顿的分子量。

[0200] 本公开涵盖了具有前述特征的一个或多个的任何组合的抗体和拮抗剂的使用。例如，特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 的结合以及可具有前述特征的任何一个或多个的抗体或拮抗剂可用于本文所述的方法。相似地，特异性结合 IL-1 α 和抑制 IL-1 α 与 IL-1R1 的结合以及可具有前述特征的任何一个或多个的抗体或拮抗剂可用于本文所述的方法。

[0201] (iv) 使用方法

[0202] 在某些实施方案中，所要求保护的方法中使用的抗体和拮抗剂可用于治疗和 / 或预防 COPD 的恶化。在某些实施方案中，所要求保护的方法中使用的抗体和拮抗剂可用于在 COPD 的恶化期间增加肺功能。在某些实施方案中，所要求保护的方法中使用的抗体和拮抗剂可用于降低恶化的持续时间。在某些实施方案中，所要求保护的方法中使用的抗体和拮抗剂可用于降低恶化的频率。在某些实施方案中，所要求保护的方法中使用的抗体和拮抗剂可用于在恶化期间减轻气道炎症。在某些实施方案中，所要求保护的方法中使用的抗体和拮抗剂可用于在恶化期间降低 IL-1 信号转导。在某些实施方案中，所要求保护的方法中使用的抗体和拮抗剂可用于在恶化期间减轻 IL-1 α 和 IL-1 β 信号转导。在某些实施方案中，COPD 的恶化是由于肺的感染（如，病毒感染、人鼻病毒诱导的气道炎症、细菌感染）或空气污染（如，吸烟）。在某些实施方案中，减轻气道炎症是治疗 COPD 恶化的方法的一部分。在某些实施方案中，减轻气道炎症包括降低炎性细胞向肺的流入。在某些实施方案中，治疗 COPD 恶化包括减轻炎性细胞向肺的流入。在某些实施方案中，炎性细胞是嗜中性粒细

胞。在某些实施方案中,炎性细胞是巨噬细胞。在某些实施方案中,炎性细胞是淋巴细胞。在某些实施方案中,炎性细胞是单核细胞。在某些实施方案中,治疗 COPD 恶化包括减轻气道炎症。在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体具有大于或等于约 25 千道尔顿的分子量。在某些其他实施方案中,所用的抗体具有大于或等于约 50、60、75、100、110、125 或 150 千道尔顿的分子量。在某些实施方案中,所用的抗体具有约 150 千道尔顿的分子量。相似地,在某些实施方案中,使用具有任何前述范围的分子量的非抗体拮抗剂。

[0203] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体可用于治疗和 / 或预防 COPD 的症状的恶化。在某些实施方案中,COPD 的恶化的症状包含以下的一个或多个:增加的气喘、增加的咳嗽和痰产生、痰的颜色和 / 或稠度的变化、喘鸣、胸闷、发烧。COPD 的恶化代表患者的基线、平均 COPD 状况的变化,其可通过例如评估肺功能来评估。

[0204] 慢性阻塞性肺病的全球倡议 (GOLD) 制定了 COPD 严重度的五期分级来指导治疗方法 (Executive Summary:Global Strategy for the Diagnosis,Management,and Prevention of COPD(2009 年更新))。在这些患者中,0 期定义特征为咳嗽、痰和气喘而无气流阻塞的经典临床症状(如,正常的呼吸量测定)的状况。I 期定义以下患者:具有 <70% 的一秒用力呼气量 (FEV1)/ 用力肺活量 (FVC),和预测 >80% 的 FEV1,有或无可能意识到或意识不到的疾病状态的慢性症状。II 期 (FEV1/FVC<70%、FEV130 - 79%) 根据患者在亚阶段 IIb 经历更大的恶化速率而分成亚阶段 IIa (FEV150 - 79%) 和 IIb (FEV130 - 49%),恶化速率继而与健康状态不利地相关。然而,亚阶段 IIb 在本领域和本文中经常被称为 III 期。最后,IV 期 (FEV1/FVC<70% 和 FEV1<30% 预测、低氧血症、或右心衰竭的临床迹象) 预期与最差的健康状态相关。

[0205] 因此,在某些实施方案中,本公开的方法可用于治疗患有 I 期或更高 GOLD 评分 COPD 的患者,如恶化之前所测量的。在某些实施方案中,本公开的方法可用于治疗患有 II 期或更高 GOLD 评分 COPD 的患者。在某些实施方案中,本公开的方法可用于治疗患有 III 期或更高 GOLD 评分 COPD 的患者,如恶化之前所评估的。在某些实施方案中,本公开的方法可用于治疗患有 IV 期 GOLD 评分 COPD 的患者,如恶化之前所评估的。

[0206] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体可用于预防或减轻由病毒感染、细菌感染和 / 或环境因素引起的 COPD 的症状的恶化。在某些实施方案中,环境因素是吸烟。在某些实施方案中,细菌感染与 LPS 有关。在某些实施方案中,病毒感染是人鼻病毒 (HRV) 感染。

[0207] 在某些实施方案中,提供了在有此需要的患者中治疗 COPD 恶化的方法,其中所述患者是由于人鼻病毒诱导的气道炎症而患有 COPD 恶化的患者,该方法包括向所述患者施用有效量的包含特异性结合 IL-1R1 和抑制 IL-1R1 与 IL-1 α 结合的抗体的组合物。HRV 感染导致具有增加的炎性细胞因子的嗜中性粒细胞流入。宿主炎症应答,特别是 IL-8,在普通感冒症状的病理发生中起关键作用。在患有慢性肺病的患者中,这可导致潜在呼吸状况的症状的恶化。三分之二的 COPD 恶化之前有病毒感染症状。40% 的住院的急性恶化患者的鼻和 / 或痰样品中有 HRV 存在。因此,治疗患有由于人鼻病毒诱导的气道炎症导致的 COPD 恶化的患者代表可显著降低 COPD 恶化风险和显著改善患有 COPD 的患者的健康的重要干预。因此,本发明组合物和方法可用于治疗、减轻和预防由 HRV 或其他气道病毒感染诱导的 COPD 恶化。

[0208] 在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体是人、嵌合或人源化抗体。在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体是抗体片段,如具有大于或等于 25 千道尔顿的分子量的片段。在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂可特异性结合人 IL-1R1 或 IL-1 α 。在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体或拮抗剂可特异性结合来自人和 / 或来自一个或多个非人灵长类物种的 IL-1R1 或 IL-1 α 。在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体不特异性结合鼠 IL-1R1 或 IL-1 α 。

[0209] 在某些实施方案中,所述方法是通过管理 COPD 恶化治疗 COPD 的治疗方案的一部分。在某些实施方案中,用于治疗 COPD 的治疗方案包括类固醇的施用。在某些实施方案中,当通过 Biacore™ 测量时,抗体或拮抗剂以 50pM 或更低的 K_D 特异性结合人 IL-1R1 或 IL-1 α 。在某些实施方案中,用于所要求保护的方法的抗体是抗体 6 或 6g1(种系化的)。在某些实施方案中,抗体或拮抗剂与 IL-1Ra 竞争结合 IL-1R1。在某些实施方案中,施用是全身施用。在某些实施方案中,所述方法不包括所述组合物的鼻内施用。在某些实施方案中,所述方法包括经由两种施用途径施用拮抗剂:全身的和局部的。例如,拮抗剂全身施用,如静脉内和鼻内或经由至肺的局部施用的其他形式施用。在某些实施方案中,所述方法包括以低于或等于一天一次的给药方案施用所述组合物。

[0210] 在某些实施方案中,在治疗之前、治疗期间或治疗之后监测 COPD 症状。在某些实施方案中,监测是连续的。在某些实施方案中,监测以固定的间隔在治疗过程中发生,如每小时、每天或每周。在某些实施方案中,监测以固定的间隔在治疗后发生,如每天、每周或每月。监测的间隔可由本领域技术人员基于状况的严重度容易地确定。在某些实施方案中,COPD 症状通过肺功能测试如呼吸量测定法监测。在某些实施方案中,COPD 症状通过胸部 X-线和 / 或计算机断层(CT)扫描监测。胸部 X-线或 CT 扫描可显示肺气肿,其是 COPD 的主要原因之一。在某些实施方案中,COPD 症状通过动脉血气分析监测。在某些实施方案中,COPD 症状通过痰检查监测。在某些实施方案中,使用前述测试中的任何一个或多个评价治疗效力。在某些实施方案中,治疗降低恶化的严重度、持续时间或频率。在某些实施方案中,患者的状况(如,基线肺功能等)在治疗后回到恶化前基线水平。

[0211] 在某些实施方案中,在本领域普通技术人员已知的吸烟暴露的动物模型、动物鼻病毒模型或慢性肺病模型中分析本公开的组合物或方法。(如,Contoli 等人,Contrib Microbiol. 2007;14:101-12)。在某些实施方案中,动物模型是小鼠模型(如,Bartlett 等人,Nat Med. 2008Feb;14(2):199-204)。在某些实施方案中,小鼠模型选自弹性蛋白酶和 LPS 暴露的小鼠模型(参见,Sajjan 等人,Am JPhysiol Lung Cell Mol Physiol. 2009 Nov;297(5):L931-44)。在某些实施方案中,可使用实施例中所列的任何细胞或动物模型。

[0212] 在某些实施方案中,如果症状严重,可能要求住院。在某些实施方案中,如果症状较轻,患者可作为门诊患者进行治疗。

[0213] 在某些实施方案中,吸烟、住院、缺乏肺康复计划、吸入器使用不当和药物治疗计划遵从性差都与 COPD 恶化发作的更频繁和 / 或更长的持续时间相关。在某些实施方案中,本公开的方法可用于治疗展现以下的一个或多个的患者:吸烟、住院、缺乏肺康复计划、吸入器使用不当和药物治疗计划遵从性差。在某些实施方案中,本公开的方法可用于治疗具有 COPD 恶化发作的更频繁和 / 或更长的持续时间的患者。在某些实施方案中,本公开的方法可用于治疗处于 COPD 恶化的特定风险的患者。

[0214] 本公开还提供拮抗 IL-1R1 或 IL-1 α 的至少一种作用的方法,该方法包括接触或施用有效量的一种或多种本公开的拮抗剂,使得 IL-1R1 或 IL-1 α 的所述至少一种作用被拮抗。可被本公开的方法拮抗的 IL-1R1 的作用包括 IL-1 α 和 / 或 IL-1 β 介导的生物应答,和作为这些结合反应的后果产生的任何下游作用。当使用多种本公开的拮抗剂时,它们可在相同时间或不同时间施用。在某些实施方案中,使用多种本公开的拮抗剂,且所述方法包括施用 IL-1R1 拮抗剂,如抗体,和 IL-1 α 拮抗剂,如抗体。多种拮抗剂可经由相同的施用途径或经由不同的施用途径施用。

[0215] 对于前述的任一种,所述方法一般包括施用包适当剂量的抗 -IL-1R1 或 IL-1 α 试剂的组合物。

[0216] 术语“治疗 (treatment)”、“治疗 (treating)”和类似术语在本文一般用于指通过向有此需要的受试者提供药物以改善受试者的状况来获得期望的药理和 / 或生理作用。在某些实施方案中,治疗可包括降低恶化的频率和 / 或严重度。在某些实施方案中,治疗可包括治疗气道炎症。在某些实施方案中,治疗可包括阻止或减少炎性细胞如嗜中性粒细胞向肺的流入。如本文所用的“治疗”包括:(a) 抑制恶化(如,阻止其发展以使得症状不恶化);或(b) 缓解疾病或状况(如,如引起疾病或状况的消退、提供一个或多个症状的改善、减少恶化的持续时间、降低恶化的频率)。任何状况的改善可根据本领域已知的标准方法和技术容易地评估。在某些实施方案中,在有效治疗后,患者的状况回到恶化前的基线状况。在某些实施方案中,在恶化之前,患者具有中度或重度 COPD(如,分类为 GOLD III 期或 GOLD IV 期的 COPD)。

[0217] 术语“治疗有效剂量”或“有效量”意指产生其施用的期望效应的剂量。精确的剂量将依赖于治疗目的,并且将是本领域技术人员使用已知的技术可确定的(参见,如, Lloyd(1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)。

[0218] 本公开涵盖其中组合本公开的前述或以下的方面和 / 或实施方案中的任何一个或多个的方法。例如,任何抗体或拮抗剂(拮抗 IL-1R1 或 IL-1 α 的任何组合物)可用于本文描述的任何方法。而且,本文描述的任何抗体或拮抗剂可单独或组合使用,如与本公开的另一抗体或拮抗剂组合使用。

[0219] (v) 药物组合物

[0220] 因此,本公开的进一步方面提供了抗体或拮抗剂治疗 COPD 恶化的用途,如本文所述。抗体和拮抗剂可作为组合物,例如包含抗体或拮抗剂的药物组合物施用。在某些实施方案中,所述抗体或拮抗剂是重组产生的,如通过在宿主细胞中表达编码抗体或拮抗剂的核酸。组合物可配制在药学上可接受的赋形剂中。在某些实施方案中,组合物是无热原的或大致无热原的。

[0221] 药学上可接受的赋形剂可以是进入药物组合物的以下化合物或化合物的组合:不引起次级反应并且允许,例如,促进活性化合物的施用,其在体内的寿命和 / 或效力的增加,在溶液中的溶解度的增加或其保存的改善。这些药学上可接受的赋形剂是众所周知的,且将由本领域技术人员根据所选的活性化合物的性质和施用方式的影响而修改。

[0222] 本公开的抗体和拮抗剂将通常以药物组合物的形式施用,其可包含除了拮抗剂之外的至少一种组分。因此,根据本公开和根据本公开使用的药物组合物可包含除了活性成分之外的药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲液、稳定剂或本领域技术人员熟知的其他材

料。此类材料应该是非毒性的,并且不应干扰活性成分的效力。载体或其他材料的精确性质将取决于施用的途径。在某些实施方案中,组合物是全身施用,如通过静脉内、腹膜内、肌肉内或皮下注射。在某些实施方案中,组合物是口服施用。在某些实施方案中,所述方法明确不包括所述组合物直接向肺的施用,例如通过吸入、肺灌洗或鼻内递送。在其他实施方案中,相同或不同的抗体/拮抗剂经由相同或不同的施用途径施用。例如,抗体可全身施用,而相同或不同的拮抗剂可全身或局部施用。

[0223] 液体药物组合物一般包含液体载体,如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。生理盐水溶液、右旋糖或其他糖溶液或二醇类,如可使用或包括乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0224] 对于静脉内注射,活性成分将为胃肠外可接受水溶液的形式,该水溶液是无热原的且具有合适的 pH、等渗性和稳定性。本领域的相关技术人员能够容易地制备合适的溶液,使用例如,等渗的媒介物,如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸格氏注射液。防腐剂、稳定剂、缓冲液、抗氧化剂和/或其他添加剂可根据需要使用,包括缓冲液,如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,如抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3'-戊醇;和间甲酚);低分子量多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如 EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;形成盐的反荷离子,如钠;金属复合物(如 Zn-蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂,如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇(PEG)。

[0225] 本公开的拮抗剂和抗体可根据分子的物理化学性质和递送途径而配制成液体、半固体或固体形式。制剂可包括赋形剂或赋形剂的组合,例如:糖类、氨基酸和表面活性剂。液体制剂可包括广泛范围的抗体浓度和 pH。固体制剂可通过例如冻干、喷雾干燥或通过超临界流体技术干燥来产生。

[0226] 在某些实施方案中,本公开的组合物,包括药物组合物,是非热原性的。换言之,在某些实施方案中,所述组合物是大致无热原的。在一个实施方案中,所述制剂是大致不含内毒素和/或相关的热原性物质的无热原制剂。内毒素包括限制在微生物体内并在微生物降解或死亡时释放的毒素。热原性物质也包括来自细菌和其他微生物的外膜的引起发热的、热稳定的物质(糖蛋白)。如果施用于人,这两种物质均可引起发热、低血压和休克。由于潜在的有害效应,即使少量的内毒素也必须从静脉内施用的药物溶液中除去。食品和药品管理局(The Food & Drug Administration) (“FDA”) 设定对于静脉内药物施用,一个小时时段中每千克体重每剂量 5 个内毒素单位(EU) 的上限(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1):223(2000))。当治疗用蛋白以每千克体重数百或数千毫克的量施用时,如对于抗体可能的情形,即使是痕量的有害和危险的内毒素也必须除去。在某些特定的实施方案中,组合物中的内毒素和热原水平低于 10EU/mg、或低于 5EU/mg、或低于 1EU/mg、或低于 0.1EU/mg、或低于 0.01EU/mg、或低于 0.001EU/mg。

[0227] 在某些实施方案中,组合物通过静脉内输注施用。在某些实施方案中,输注是在至少 10、至少 15、至少 20 或至少 30 分钟的时段。在其他实施方案中,输注是在至少 60、90 或

120 分钟的时段。无论输注时段如何,本公开预期每种输注是根据固定的时间表(如,每天、每周、每月一次等)施用抗体或拮抗剂的整体治疗计划的一部分。相似地,无论施用途径如何,本公开预期每个剂量是根据固定的时间表(如,每天、每周、每月一次等)施用抗体或拮抗剂的整体治疗计划的一部分。

[0228] 在某些实施方案中,本公开的组合物(如,抗-IL-1R1 抗体、抗-IL-1 α 抗体、抗-IL-1R1 拮抗剂)可用作治疗 COPD 恶化的组合治疗或治疗方案的一部分。组合治疗可用于提供加成性的或协同性的效应,特别是抗-IL-1R1 或 IL-1 α 拮抗剂与一种或多种其他药物的组合。当治疗方案涉及施用多种化合物(如,药物、生物试剂)时,此类化合物可例如同时施用或顺序施用或作为组合制品施用。在某些实施方案中,治疗方案包括类固醇治疗。

[0229] 在某些实施方案中,本公开的组合物可用作具有一种或多种可用的 COPD 治疗的治疗方案的一部分。

[0230] 根据本公开的组合物可作为单独治疗提供,或与一种或多种其他的本公开的试剂和/或与一种或多种以下的试剂组合提供或另外提供:

[0231] - 糖皮质激素,如氟尼缩松、曲安奈德、二丙酸倍氯米松、布地奈德、丙酸氟替卡松、环索奈德和/或糠酸莫米松;

[0232] - 抗菌剂,如青霉素衍生物、四环素、大环内酯、 β -内酰胺、氟喹诺酮、甲硝唑和/或吸入型氨基葡萄糖苷;和/或抗病毒剂,如阿昔洛韦、泛昔洛韦、伐昔洛韦、更昔洛韦、西多福韦;金刚烷胺、金刚乙胺;利巴韦林;扎那米韦和/或奥司他韦;蛋白酶抑制剂,如茚地那韦、那非那韦、利托那韦和/或沙奎那韦;核苷逆转录酶抑制剂,如去羟肌苷、拉米夫定、司他夫定、扎西他滨、齐多夫定;非核苷逆转录酶抑制剂,如奈韦拉平、依法韦仑。

[0233] 组合治疗可包括抗生素。大约 50% 的急性恶化主要是由于细菌肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) (引起肺炎)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) (引起流感)、和卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) (引起肺炎) 引起。许多抗生素可有效治疗这些感染。

[0234] 组合治疗可包括呼吸刺激剂。皮质类固醇在 COPD 的急性恶化中可能是有益的。类固醇可静脉内给予。在急性恶化期间可增加支气管扩张药剂量以减轻急性支气管痉挛。在 COPD 的急性恶化期间可使用茶碱。

[0235] 在某些实施方案中,氧气需求可能增加,可提供补充供氧。

[0236] 患有 COPD 的急性恶化的患者可处于发展呼吸衰竭的风险。当呼吸需求超出呼吸系统应答的能力时,发生呼吸衰竭。在某些实施方案中,组合可包括机械通气。

[0237] 机械通气是通过呼吸机将空气推入患者的肺中来代替患者使用其呼吸肌吸入空气的手段。因此,机械通气减轻或消除了患者的呼吸工作,患者继续接受空气到其肺中,并被动呼气而无需任何努力。COPD 中有两种常用的机械通气方法:无创的和有创的。

[0238] 在有创通气过程中,将气管内导管,一种小直径塑料管,置于气管中,然后连接到呼吸机,呼吸机推动空气进入肺中。有创通气可施用于无意识的或重度镇静的患者,其比无创通气更加有效。

[0239] 无创通气可用于有意识的、合作的患者。在这一方法中,氧气通过在鼻或口和鼻周围形成密封的面罩递送。

[0240] 在某些实施方案中,组合治疗可包括肺炎和 / 或季节流感疫苗。

[0241] 根据本公开,提供的组合物可施用于哺乳动物,如人患者。施用通常是以“有效量”,这足以对患者显示益处。此类益处可以是至少一种症状的至少缓解。示例性症状包括气道炎症、嗜中性粒细胞向肺的流入、降低的肺容量。

[0242] 施用的实际量以及施用的速率和时程将取决于所治疗的疾病的性质和严重程度、治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、疾患的原因、组合物的递送位点、拮抗剂的类型、施用的方法、施用的时间安排和医学执业者已知的其他因素。治疗处方,如剂量的确定等,由普通执业者和其他医生负责,并可取决于症状的严重程度和 / 或所治疗的疾病的进展。抗体的适当剂量是本领域熟知的 [33、34]。可使用在本文或 Physician' s Desk Reference (2003) 中指出的对于所施用的药物的类型适当的具体剂量。治疗有效量或合适的剂量可通过比较其体外活性和在动物模型中的体内活性来确定。从小鼠和其他试验动物的有效剂量外推人的有效剂量的方法是已知的。精确剂量将取决于抗体的精确性质 (如完整抗体、片段或双链抗体)、患者状况、给药方案。典型的抗体剂量对于全身应用将在 100 μ g 至 1g 范围内。在某些实施方案中,可施用初始的较高加载剂量,然后施用一个或多个更低剂量。典型的,抗体将是完整抗体,如 IgG1 同种型、IgG2 同种型、IgG3 同种型或 IgG4 同种型。这是成年患者一次治疗的剂量,可将该剂量按比例调整用于儿童和婴儿,和根据分子量成比例地调整用于其他抗体形式。治疗可根据医师的判断以每天、每两周、每周或每月的间隔重复。在某些实施方案中,治疗可以是对皮下施用每两周至四周和对于静脉内施用每四周至八周。在某些实施方案中,本公开的组合物需要在受试者以后的生命中定期给药。

[0243] 在某些实施方案中,本公开的组合物是全身施用。在某些实施方案中,本公开的组合物通过静脉内施用。在某些实施方案中,本公开的组合物不能通过吸入有效递送。在某些实施方案中,本公开的组合物不能通过非全身递送有效递送。在某些实施方案中,本公开的组合物需要连续给药。在某些实施方案中,本公开的组合物要求在 1、2、3、4、5、6 或 7 天时段的连续给药。在某些实施方案中,本公开的组合物要求持续 1、2、3、4、5 或 6 周时段的连续给药。在某些实施方案中,本公开的组合物要求持续 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月时段的连续给药。在某些实施方案中,本公开的组合物要求在受试者以后的生命中连续给药。

[0244] (vi) 抗体和拮抗剂的制备

[0245] 在某些方面,本公开提供其中有效试剂是特异性结合 IL-1R1 的抗体的方法。在某些方面,本公开提供其中有效试剂是特异性结合 IL-1 α 的抗体的方法。示例性抗体包括鼠、嵌合、人源化和人抗体,以及抗原结合片段。合适的抗体可使用本领域熟知的方法制备。例如,抗体可重组产生、使用噬菌体展示制备、使用杂交瘤技术产生等。技术的非限制性实例在下面简述。

[0246] 一般而言,对于单克隆抗体或其功能片段的制备,特别是鼠来源的单克隆抗体或其功能片段的制备,可以参考手册“Antibodies”[35] 中具体描述的技术或参考 Köhler 和 Milstein [36] 描述的从杂交瘤制备的技术。

[0247] 单克隆抗体可以获自例如从针对 IL-1R1 或 IL-1 α 、或含有所述单克隆抗体识别的表位的其片段之一免疫的动物获得的细胞。包含它们的合适的片段和肽或多肽可用于免疫动物以产生针对 IL-1R1 或 IL-1 α 的抗体。所述 IL-1R1 或 IL-1 α 、或其片段之一可根据

通常的工作方法产生,从编码 IL-1R1 或 IL-1 α 或其片段的 cDNA 序列中含有的核酸序列开始通过基因重组产生,从 IL-1R1 或 IL-1 α 和 / 或其片段的肽序列中包含的氨基酸序列开始通过肽合成产生。

[0248] 单克隆抗体可以例如在亲和柱上纯化,该亲和柱上已预先固定了 IL-1R1 或 IL-1 α 或含有所述单克隆抗体识别的表位的其片段之一。更具体地,单克隆抗体可通过以下纯化:在蛋白 A 和 / 或 G 层析,然后进行或不进行旨在消除残留蛋白污染物以及 DNA 和脂多糖 (LPS) 的离子交换层析,本身然后进行或不进行在 SepharoseTM 凝胶上的排阻层析以消除由于二聚体或其他多聚体的存在导致的可能聚集物。在一个实施方案中,所有这些技术可以同时或相继使用。

[0249] 可以采用单克隆和其他抗体并使用重组 DNA 方法的技术产生结合靶抗原的其他抗体或嵌合分子。此类技术可涉及将编码抗体的免疫球蛋白可变区或 CDR 的 DNA 引入到不同的免疫球蛋白的恒定区、或恒定区加构架区。参见,例如 EP-A-184187、GB 2188638A 或 EP-A-239400 和大量随后的文献。杂交瘤或产生抗体的其他细胞可经受基因突变或其他变化,这可改变或不可改变产生的抗体的结合特异性。

[0250] 抗体工程领域可用的另外技术使得能够分离人和人源化抗体。例如,可根据 Kontermann & Dubel[37] 的描述制备人杂交瘤。噬菌体展示,用于产生拮抗剂的另一公认技术,已详细描述于许多出版物中,如 Kontermann & Dubel[37] 和 W092/01047(下文进一步讨论),及美国专利 US 5,969,108、US 5,565,332、US 5,733,743、US 5,858,657、US 5,871,907、US 5,872,215、US 5,885,793、US 5,962,255、US6,140,471、US 6,172,197、US 6,225,447、US 6,291,650、US 6,492,160 和 US6,521,404。

[0251] 可以使用其中小鼠抗体基因已被灭活且被人抗体基因功能性取代同时保留小鼠免疫系统的其他组分完整性的转基因小鼠来分离人抗体 [38]。人源化抗体可使用本领域已知的技术产生,如使用例如 W091/09967、US 5,585,089、EP592106、US 5,565,332 和 W093/17105 中公开的技术。此外, W02004/006955 描述了用于人源化抗体的方法,该方法基于从人抗体基因选择可变区构架序列,通过比较非人抗体可变区的 CDR 序列的标准 CDR 结构类型和人抗体序列如种系抗体基因区段文库的相应 CDR 的标准 CDR 结构类型。具有与非人 CDR 相似的标准 CDR 结构类型的人抗体可变区形成从中选择人构架序列的成员人抗体序列子集。子集成员可根据人和非人 CDR 序列之间的氨基酸相似性进一步排序。在 W02004/006955 的方法中,选择排序最靠前的人序列来提供用于构建人 CDR 序列被使用选择的子集成员人构架的非人 CDR 对应物功能性替代的嵌合抗体的构架序列,从而提供高亲和力和低免疫原性的人源化抗体而无需比较非人和人抗体之间的构架序列。还公开了根据所述方法制备的嵌合抗体。

[0252] 合成抗体分子可提供从借助合成的寡核苷酸产生的基因表达并在合适的表达载体中组装而产生,例如如 Knappik 等人 [39] 或 Krebs 等人 [40] 所述。

[0253] 注意,无论目标抗体初始是如何鉴定或制备的,任何此类抗体均可使用重组技术相继产生。例如,可在宿主细胞中表达编码抗体的核酸序列。此类方法包括从单独的载体表达编码重链和轻链的核酸序列,以及从同一载体表达所述核酸序列。使用多种细胞类型的这些和其他技术是本领域熟知的。

[0254] 可在一种或多种测定中测试合适的抗体。例如,可在实施例提供的任何测定中

测试抗体以证实它们与这些代表性抗体拥有相似的功能性质。另外或可选地,可测试抗体以评估它们是否与任何所述抗体结合相同或大致相同的表位。还可进行证实抗体特异性结合来自一个或多个期望物种的靶抗原的结合测定。此外,可测试中和能力(如,抗-IL-1R1 抗体阻止 IL-1R1 与 IL-1 α 和 / 或 β 结合的能力。

[0255] 在非抗体拮抗剂的情形中,此类拮抗剂可使用本领域中已知的方法制备。例如,蛋白拮抗剂可使用重组技术或合成地制备。示例性蛋白拮抗剂是 KINERET,一种 IL-1Ra 的可商购形式。

[0256] 示例

[0257] 现在总体描述了本公开,其通过参考以下实施例将更容易理解,包括所述实施例仅是为了说明本公开的某些方面和实施方案,并非旨在限制本公开。例如,本文公开的具体构建体和实验设计代表用于验证正确功能的示例性工具和方法。

[0258] 实施例 1-IL-1R1 阻断在体外和在体内抑制 IL-1 β 的效应。

[0259] 本实施例和另外的实施例中使用的一些工具是抗体 6(特异性结合 IL-1R1 的人抗体;本文提供了序列)和阿那白滞素(也称为 KINERET)。抗体 6 完全抑制原代人 COPD 成纤维细胞中 IL-1 β 诱导的 IL-6(图 1A),当气管内灌输到小鼠中时,阿那白滞素抑制 IL-1 β 增加 4 小时后 BAL 中回收的嗜中性粒细胞的能力达 71%(图 1B)。这与关于阿那白滞素和其他抗-IL-1R1 抗体如抗小鼠 IL-1R1 抗体 35F5 的文献一致,已显示它们抑制 IL-1 β 介导的对 IL-1R1 的效应。如实施例中进一步详述的,本公开揭示了对 IL-1 α 介导的活性的另外的且令人吃惊的效应,因此首次暗示 IL-1 α 参与 COPD。

[0260] 为了检查 COPD 组织中 IL-1R1 对 IL-1 β 的效应,检查了用 IL-1R1 拮抗剂处理的原代 COPD 肺成纤维细胞中的 IL-6 水平。IL-1R1 拮抗性抗体 6(特异性结合人 IL-1R1 的人抗体;本实验中使用种系化形式)抑制 COPD 肺成纤维细胞中 IL-1 β 诱导的 IL-6 释放(图 1A)。IL-1 β 处理浓度为 0.5ng/ml(大约 EC₅₀)。

[0261] 如上所述,还检查了 IL-1R1 拮抗剂处理对小鼠肺中 IL-1 β 诱导的嗜中性粒细胞介导的炎症的效应(图 1B)。5ng/50 μ l 的 IL-1 β 处理前一小时,皮下给药阿那白滞素(KINERETTM)。一小时后,通过 BAL 获得细胞计数。与对照 IL-1 处理的动物相比,阿那白滞素减少细胞计数达 71%。

[0262] 体外方法:

[0263] COPD 成纤维细胞作为从接受肺移植的严重 COPD 患者的 COPD 肺组织产生内皮细胞的副产物产生。在摘除组织时,患者的疾病是稳定的且没有恶化。

[0264] 组织培养瓶用无菌过滤后的明胶(0.2%,于蒸馏水中)包被,并在使用前用细胞培养基漂洗。

[0265] 从胸膜解剖组织,并使用美扎鲁那刀(mezzaluna)在 RPMI+(RPMI+为 RPMI 培养基+10%FCS、1%青霉素/链霉素/两性霉素 B 溶液)培养基中剁碎。将剁碎的组织(当足够细能够被标准巴斯德吸管容易地吸取时)在 40 微米过滤器上洗涤以除去残屑和红细胞。使用无菌仪器将细胞从过滤器上取下,并在 RPMI、0.1%BSA 和 0.2%II 型胶原酶中悬浮以进行消化。将组织在滚筒上在室温下孵育 2 小时。不时温和摇动试管以防止组织凝块和沉降。2 小时后,温和搅拌悬浮液,然后经由大筛目粗滤器过滤,然后通过 100 微米过滤器。然后将滤液在 1200rpm 在室温下离心 5 分钟。然后在 RPMI+ 中洗涤细胞沉淀并重复离心和洗涤。

然后将细胞重悬在内皮培养基 (EGM-2-MVBulletKit, CLonetics #CC3202) 和涂布到明胶包被的烧瓶中。细胞以约 2×10^7 细胞 / T225 烧瓶涂布。第二天, 用培养基冲洗细胞, 当细胞达到汇合时, 使用细胞解离液传代细胞。此时, 使用 CD31Dynabeads 富集内皮细胞, 对于与珠的缔合为阴性的细胞大部分是成纤维细胞并可进行计数和用于 COPD 成纤维细胞测定。

[0266] 从此时起, 细胞培养在补充有 10% 胎牛血清 (FCS) 的 DMEM 中。将成纤维细胞以 1×10^5 细胞 / 孔涂布在 96 孔平底聚苯乙烯板中, 并在 37°C 孵育过夜以允许粘附。在加入 IL-1 β 浓度为 0.5 ng/ml 最终测定浓度的 IL-1 β (R&D Systems 201-LB/CF) 之前, 将抗体或培养基单独与细胞在两个孔中预孵育 30 分钟。每个孔的终体积为 200 μl 。将板在 37°C 5% CO_2 下孵育 24 小时。将板短暂离心, 然后取出上清液用于使用 R&D Systems ELISA (DY206) 分析 IL-6 水平。

[0267] 体内方法:

[0268] 小鼠为成年 Balb/c 雌性。在使用 5 ng 于 50 μl 中的剂量气管内施用 IL-1 β 到小鼠肺之前, 皮下给药阿那白滞素。4 小时后, 灌洗小鼠的肺, 基本与急性吸烟模型 (实施例 2) 一样, 并进行总细胞和不同细胞的计数。

[0269] 实施例 2-IL-1R1 拮抗剂抑制肺炎的急性吸烟模型中细胞的流入。

[0270] 抗体 35F5 是结合小鼠 IL-1R1 并阻止 IL-1 β 和 IL-1 α 二者与受体 IL-1R1 结合的单克隆抗体。阿那白滞素拮抗 IL-1 β 和 IL-1 α 二者的效应。白细胞介素 1 显示与人中炎性过程的稳定疾病和吸烟诱导的改变的强烈疾病关联。此实施例中显示的数据证实 35F5 对 IL-1R1 的抑制减轻了由与 COPD 相关的刺激如吸烟诱导的鼠肺炎的急性模型中的炎症。这与公共领域之前的观察和与使用 IL-1Ra (阿那白滞素; IL-1 受体拮抗剂) 的其他研究一致。在此小鼠模型中, 吸烟引起吸烟后 4 天嗜中性粒细胞 BAL 细胞数目的显著增加。为了研究 IL-1R1 途径抑制针对吸烟的急性炎症应答的效应, 将 Balb/c 小鼠每天两次暴露于吸烟 (持续 50 分钟) 5 天, 并每天一次腹膜内给药 35F5、同种型对照 大鼠 IgG1 (MAB005) 或盐水, 开始于第一次吸烟暴露前 48 小时并持续 4 天。在第 5 天, 处死动物并进行 BAL。包括另外的处理臂, 其中动物如上暴露于吸烟但在第一次吸烟暴露前 48 小时开始用阿那白滞素使用输注泵 (ALZET) 皮下 (SC) 连续给药。35F5 和通过 ALZET 的阿那白滞素施用二者均显著抑制小鼠 BAL 中吸烟诱导的急性炎症细胞浸润, 而同种型对照抗体 (MAB005) 没有作用。35F5 显著降低吸烟诱导的总细胞 ($p < 0.001$)、嗜中性粒细胞 ($p < 0.01$) 和淋巴细胞 ($p < 0.001$) 的增加。在此研究中, BAL 中的巨噬细胞未响应吸烟暴露而显著增加。吸烟暴露和 IL-1R1 拮抗剂抑制对肺炎性细胞的效应的总结提供于图 3。研究的方案显示于图 2 并在方法中描述。在驯化和处理之间进行用于 ALZET 处理的渗透泵的植入, 以允许处理前的恢复。35F5 是由 BD Biosciences/BD Pharmingen 销售的可商购的啮齿动物抗体。MAB005 同种型对照是从 R&D Systems 可获得的。

[0271] 方法:

[0272] 两种研究均使用成年 Balb/c 雌性小鼠。抗体 35F5 来源于 BDBioscience (San Diego) (纯化的 NA/LE 大鼠抗 - 小鼠 CD121a, 目录号 624094), 为 IL-1R1 特异性的大鼠 IgG1 单克隆抗体。其含有非常低水平的内毒素 ($< 0.01 \text{ ng}/\mu\text{g}$ 内毒素) 且不含防腐剂。大鼠同种型对照来源于 R&D Systems (目录号 MAB005, 批次 CAN070905A) 且含有低内毒素水平 ($< 0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$)。阿那白滞素获自药店 - Kineret DB00026 (BTD00060; BIOD00060) 批

号 1004729(004699)exp072009(Amgen)。使用去除过滤嘴的 Kentucky 研究等级香烟 IR3F(Tobacco and Health Research Institute,University of Kentucky)。用于在一些小鼠中连续施用阿那白滞素的渗透泵是 ALZET 2001 型,标称性能(在 37℃下)0.93ul/hr,7 天持续时间,0.23ml 贮库体积。向泵充入已达到室温的阿那白滞素(避光)。将 150mg/ml 贮液在等渗盐水中稀释以提供 48mg/kg/天的剂量,泵的充入按照生产商的说明在无菌条件下进行。

[0273] 动物在实验开始至少 7 天前收到,使其适应暴露箱增加的与吸烟机连接的时间段而不接受吸烟,并保持在具有 12hr 光/暗周期、 $21\pm 2^\circ\text{C}$ 和 $55\pm 15\%$ 湿度的设施中。它们可以随意食用标准饲料和饮用自来水。在研究开始前,将动物随机分组。将具有渗透泵植入的那些动物称重并用异氟烷混合物(N_2O 、 O_2 1.4:1.2 和 3% 异氟烷)麻醉,在麻醉状况下,刮净左肩胛骨区域并清洁,然后在马库斯下肩胛骨(margus caudalis scapulae)后 5mm 处进行小的背-腹皮肤切口。将切口区域浸泡在卫生处理液(sanitising fluid)(麻卡因 50mg/ml)中,然后用剪刀在皮下组织中开出口袋。将充满的泵插入口袋中,首先是递送端,以使与开口的相互作用最小。在无菌条件下用缝线闭合开口,观察小鼠直到恢复。吸烟(CS)期间开始于此程序后不低于 48 小时。

[0274] 抗体(或阿那白滞素,在腹膜内阿那白滞素组中)以 $<200\text{ul}$ 体积腹膜内(i.p.)施用(每个个体研究方案 4 次注射)以不超过 10ml/kg 体重。抗体(或阿那白滞素,在腹膜内阿那白滞素组中)以 15mg/kg 标称浓度给药。

[0275] 渗透泵植入后 48 小时或腹膜内抗体施用后 1 小时,小鼠接受它们的第一次吸烟期间。在每个吸烟暴露期间中,小鼠被随机放在全身暴露箱中并在第 1-4 天每天两次暴露于吸烟 50 分钟。吸烟 50 分钟等于 10 支香烟;吸烟机交替空气和吸烟喷雾。对照组接受相同的程序但是用空气代替吸烟。在第 5 天通过施用戊巴比妥处死小鼠(最后一次吸烟暴露后 16 小时)。暴露气管后,用室温 PBS(不含 Mg 和 Ca)在 23cm 流体静力压下灌洗肺(2min 进和 1min 出,并重复)。离心细胞-上清液可用于分析介导体,而细胞用于使用自动计数仪如 Sysmex XT-1800i Vet 分析总细胞和不同细胞计数。使用学生 t-检验计算组之间的差异显著性,以单尾分布和双样本不等方差作为最小显著性(单侧学生 t-检验,不等方差)。p-值的限值为 $p \leq 0.05$ 。

[0276] 实施例 3- 在急性小鼠模型中,IL-1 α 在吸烟驱动的炎症中起关键作用。

[0277] 没有研究描述吸烟诱导的炎症模型中 IL-1 α 的抑制。在体外的简单活性测定中,IL-1 α 和 IL-1 β 二者在相似的浓度诱导同等的 IL-1R1 激活,因此我们推测如果在疾病中存在,IL-1 α 和 IL-1 β 二者均可激活 IL-1R1。然而,文献尚未描述 IL-1 α 在疾病中的任何参与。这里我们展示 IL-1 α 在急性吸烟诱导的炎症中起关键作用。

[0278] 首先我们证明 IL-1 α 和 IL-1 β 二者均存在于吸烟暴露的小鼠的肺中。室内空气对照小鼠中 IL-1 α 的表达主要局限于肺泡空间内的巨噬细胞以及有时局限于支气管粘膜内的上皮内细胞,支气管上皮细胞和上皮分泌细胞偶见低等级染色(图 4A)。在吸烟暴露的小鼠中,扩大的肺泡巨噬细胞群体上显著的 IL-1 α 表达是关键的组织学表型;虽然在增生性支气管上皮细胞上也偶见 IL-1 α 染色。值得注意的是,支气管和血管外膜区室内的浸润细胞是阴性的。

[0279] 与 IL-1 α 表达模式形成对比,在室内空气和吸烟暴露的小鼠中观察到 IL-1 β 的

广泛组织表达（图 4A）。在室内空气对照中，注意到肺泡巨噬细胞群体上的可变表达。此外，肺泡 I 型（ATI）和 ATII 细胞上，尤其是在 ATII 细胞的终末肺泡芽上，和偶发的肥大性 ATII 细胞上存在表达。在吸烟暴露的动物中，观察到扩大的肺泡巨噬细胞群体中的显著染色。此外，在 ATI 和 ATII 细胞，特别是肥大形式的细胞中均观察到了增加的表达。还在支气管上皮上观察到 IL-1 β 的广泛和显著表达。这在肥大性细胞和上皮分泌细胞上尤其明显。如通过与实施例 12 以及图 13A 和 B 比较可见的，吸烟暴露的小鼠中 IL-1 α 和 β 的组织表达涉及与 COPD 患者中所见的相似的炎性浸润和驻留细胞群体。

[0280] 鉴于 COPD 患者样品中 IL-1 α 和 β 表达谱和以上小鼠模型中之间的相似性，我们使用此实验模型作为检查 IL-1 α 和 IL-1 β 对吸烟诱导的炎症和病毒恶化的功能重要性的平台。前述预期模拟 COPD 和 COPD 恶化。我们观察到吸烟暴露的动物的肺中总 IL-1 α 和 IL-1 β 与对照相比的增加了的水平（分别为图 4B 和 4C）。

[0281] 为了评估嗜中性粒细胞炎症在我们的模型中的作用，将 IL-1R1 缺陷和野生型小鼠暴露于吸烟。嗜中性粒细胞增多症在 IL-1R1 缺陷动物的支气管肺泡灌洗液（BAL）中与野生型对照相比被完全减弱（图 4F）。IL-1R1 缺陷没有影响吸烟暴露的小鼠的 BAL 中的总细胞或单核细胞数目（分别为图 4D 和 4E）。虽然表达募集嗜中性粒细胞的趋化因子，CXCL-1、-2 和 -5 在野生型小鼠吸烟暴露后是增加的。IL-1R1 缺陷显著降低此诱导。

[0282] 鉴于半胱天冬酶 -1 将前 -IL-1 β 裂解成其生物活性形式和已显示该过程促进吸烟诱导的嗜中性粒细胞炎症，我们将半胱天冬酶 -1 缺陷小鼠暴露于吸烟。半胱天冬酶 -1 缺陷没有显著改变 BAL 中吸烟诱导的嗜中性粒细胞增多症（图 4I）。相似地，BAL 的总细胞和单核细胞数在吸烟暴露的半胱天冬酶 -1 缺陷小鼠中与野生型对照相比没有降低（分别为图 4G 和 H）。有意思的是，我们观察到野生型和半胱天冬酶 -1 缺陷小鼠中相似的总 IL-1 α 和 IL-1 β 蛋白水平（分别为图 4J 和 K），暗示 IL-1 β 的加工和激活也可能独立地或在不存在半胱天冬酶 -1 下实现，或 IL-1 β 的检测不能区分无活性的前 -IL-1 β 和活性的成熟 IL-1 β 。

[0283] 为了确认 IL-1 α 和 IL-1 β 对嗜中性粒细胞炎症的相对作用，我们向吸烟暴露的小鼠施用抗 -IL-1 α 或抗 -IL-1 β 阻断抗体或同种型对照抗体。虽然抗 -IL-1 α 干预消除了吸烟诱导的嗜中性粒细胞增多症（图 5A），但是抗 -IL-1 β 阻断以及同种型对照的施用均没有影响吸烟诱导的炎症。这些数据暗示 IL-1 α 在介导吸烟诱导的炎症中的关键作用。

[0284] 因为 IL-1 α 显著减弱嗜中性粒细胞向吸烟暴露的小鼠的肺的募集，我们评估了募集嗜中性粒细胞的趋化因子是否被 IL-1 α 的阻断优先降低。我们观察到 CXCL-1RNA 和蛋白在吸烟暴露后显著增加的表达（分别为图 5B 和 C）。抗 -IL-1 α 而不是抗 -IL-1 β 降低吸烟暴露的小鼠中 CXCL-1RNA 和蛋白表达。同种型抗体递送没有改变转录物或蛋白表达水平。此外，在吸烟暴露后增加的 CXCL-2、CXCL-10 和 CXCL-5 基因表达在用抗 -IL-1 α 而不是 IL-1 β 处理后降低（图 5F）。总之，这些数据与以下结论一致：吸烟暴露的动物中观察到的嗜中性粒细胞炎症需要 CXCL-1、-2 和 -5 的表达，而这些因子的表达被 IL-1 α 而不是 IL-1 β 的阻断衰减。

[0285] 因为 IL-1 α 和 IL-1 β 二者均通过 IL-1R1 传递信号，我们接下来检查了 IL-1 α 抑制是否降低 IL-1 β 的表达。图 5 显示接受抗 -IL-1 α 抗体的吸烟暴露的小鼠中显著降低的 IL-1 β 转录物和蛋白水平（分别为图 D 和 E）。相似地，我们观察到 GM-CSF 的降低表

达,GM-CSF 是最近被暗示参与吸烟诱导的炎症的细胞因子。我们还发现抗-IL-1 α 而不是 IL-1 β 抑制显著降低巨噬细胞弹性蛋白酶 MMP-12 的表达水平。这些数据证明 IL-1 α 而不是 IL-1 β 对于介导导致嗜中性粒细胞在吸烟暴露的小鼠的肺中积累的信号是关键的。

[0286] 动物。BALB/c 小鼠 (6-8 周龄) 购自 Charles River 实验室 (Montreal, Canada)。C57BL/6、IL-1R1- 缺陷和半胱天冬酶 -1- 缺陷小鼠获自 Jackson 实验室 (Bar Harbor, ME, USA)。小鼠维持在无特定病原体条件的访问受限区域, 12 小时光-暗周期, 随意提供食物和水。

[0287] 吸烟暴露。小鼠使用 SIU-48 全身吸烟暴露系统 (Promech Lab AB, Vintrosa, Sweden) 如前所述地暴露于吸烟。简而言之, 将小鼠暴露于除去过滤嘴的 12 R4F 参考香烟 (Tobacco and Health Research Institute, University of Kentucky, Lexington, KY, USA) 持续大约 50 分钟时段。这一吸烟暴露方案已经过验证并且显示与经常吸烟的人中发现的水平相当的血液碳氧血红蛋白和可替宁水平。对照动物仅暴露于室内空气。

[0288] 抗体的施用。在第一次吸烟暴露之前 12 小时, 向小鼠腹膜内注射 400 μ g 的抗-IL-1 α (克隆 ALF161; R&D Systems, Burlington, Canada)、抗-IL-1 β (克隆 B122; R&D Systems) 或美国仓鼠同种型对照抗体 (Jackson ImmunoResearch, Burlington, Canada), 然后在第二次吸烟暴露后 1 小时每天注射。在体外 (除了供应者质量控制步骤之外) 通过证明对 IL-1 诱导的 IL-6 从 bEnd-3 的 (小鼠内皮细胞系) 细胞的释放的抑制证实 IL-1 α 和 IL-1 β 抗体的生物活性。

[0289] 样本采集和测量。在用 0.25ml 冰冷的 1x PBS 然后 0.2ml 的 1xPBS 灌充肺后采集支气管肺泡灌洗液 (BAL)。总细胞数使用血细胞计数器获得。制备细胞离心涂片器用于不同细胞计数和用 Hema3 (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ, USA) 染色。每个细胞离心涂片器计数 300 个细胞, 并使用标准血细胞学标准分类单核细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0290] 组织学分析和免疫组织化学。在小鼠肺的 BAL 后, 在 30cm H₂O 压力下用 10% 福尔马林固定左肺叶。在石蜡块中包埋肺, 产生 4 μ m 厚的横切片。对于 IL-1 α 和 IL-1 β 染色, 在一抗孵育之前, 向每个玻片添加 Rodent M Block (Biocare Medical, Concord, CA, USA) 持续 30 分钟, 然后用具有 0.05% Tween-20 的 Tris- 缓冲的盐水 (TBS-T) 洗掉。在 Ultra Antibody Diluent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) 中制备 10 μ g/ml 山羊抗-小鼠 IL-1 α 和 IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 并与玻片孵育 1 小时。根据生产商的说明使用二级山羊聚合物辣根过氧化物酶 (BioCare Medical; Concord, CA, USA)。

[0291] 用于富鲁达分析的 RNA 提取。使用 Qiagen RNeasy Fibrous Tissue 试剂盒根据生产商的方案 (Qiagen, Hilden, Germany) 从单一小鼠肺叶中提取 RNA。定量 RNA 并进行标准化, 使用 Agilent RNA 6000 Nano 试剂盒 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 通过 Agilent Bioanalyzer 评估 RNA 完整性。cDNA 产生用 Life Technologies 的 Super Script III 试剂盒利用生产商的方案进行 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)。相对转录物表达使用加载了如前所述的目标转录物的探针的 Fluidigm Biomark Dynamic 阵列评估。

[0292] ELISA 和中尺度发现分析。IL-1 α 和 IL-1 β 的酶联免疫吸附测定试剂盒购自 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), 测定根据建议的方案进行。角蛋白衍生的细胞因子 (KC) 和 IL-1 β 的多阵列平台细胞因子检测使用 Meso Scale Discovery (MSD; Gaithersburg,

MD, USA) 开发的多阵列鼠促炎性和 Th1/Th2 细胞因子系列检测系统进行。

[0293] 数据和统计分析。数据使用 Graphpad Prism Software 版本 5 (La Jolla, CA, USA) 分析, 并表示为平均值 $\pm$ SEM。统计分析用 SPSS 统计软件, 版本 17.0 (Chicago, IL, USA) 进行。我们使用 SPSS 单因变量一般线性模型 (SPSS Univariate General Linear Model Univariate General Linear Model) 评估显著性 ($p < 0.05$), 随后对于两组比较进行 t- 检验或对于多重组比较进行具有邓奈特事后检验的单向 ANOVA。

[0294] 实施例 4- 抗辐射的基质细胞上的 IL-1 受体表达对于吸烟诱导的炎症是必要的。

[0295] 如通过比较图 6A 和 B 可见的, 吸烟暴露的小鼠中 IL-1R1 的组织表达涉及与 COPD 患者中见到的相似的驻留细胞群体。

[0296] 为了测试 COPD 的吸烟诱导的炎症模型中造血细胞和非造血细胞之间交谈的重要性, 我们产生了 IL-1R1- 缺陷的骨髓嵌合小鼠。将来自野生型或 IL-1R1- 缺陷小鼠的骨髓细胞静脉内转移至照射的野生型或 IL-1R1- 缺陷的接受者小鼠 (图 6C)。重构 8 周后, 将小鼠暴露于吸烟并评估各种炎性参数。接受野生型骨髓细胞的野生型动物 (WT 到 WT) 响应于吸烟暴露发展强壮的嗜中性粒细胞增多症 (图 6D); 而用 IL-1R1- 缺陷的骨髓细胞重构的 IL-1R1- 缺陷动物 (KO 到 KO) 中未观察到嗜中性粒细胞增多症。将野生型造血细胞转移到照射的 IL-1R1- 缺陷小鼠得到的嵌合小鼠 (WT 到 KO) 未能展示对吸烟的嗜中性粒细胞应答, 暗示非造血抗辐射细胞上的 IL-1R1 表达对于吸烟诱导的炎症是必要的。最后, 将 IL-1R1- 缺陷造血细胞转移到照射的野生型接受者小鼠 (KO 到 WT) 显示吸烟诱导的嗜中性粒细胞增多症的显著但部分的降低。

[0297] 我们还研究了多种基因的表达, 包括 CXCL-1、GM-CSF 和 MMP-12 (分别为图 6E-G), 所有这些基因均在用 IL-1R1 缺陷的骨髓细胞重构的 IL-1R1 缺陷动物 (KO 到 KO) 中降低。有意思的是, 当与 WT 到 WT 对照动物相比时, 虽然吸烟暴露的 WT 到 KO 嵌合动物显著降低了基因表达, 但是 KO 到 WT 动物则没有。这些结果支持 IL-1R1 介导的非造血细胞激活是吸烟诱导的炎症的必要条件, 而造血细胞上的 IL-1R1 表达是最大嗜中性粒细胞浸润所需要的。这是重要的, 因为肺中上调的 IL-1 α 和 β 将理论上快速和局部地作用于表达 IL-1R1 的肺驻留细胞来诱导炎症。不受理论束缚, 这些结果可表明 IL-1R1 阻断策略可能比阻断可溶性 IL-1 更加有效, 且在肺和全身二者阻断 IL-1R1 将具有另外的益处。

[0298] 方法:

[0299] 关于人切片中 IL-1R1 染色的免疫组织化学, 参见实施例 12。小鼠免疫化学基本与实施例 3 相同, 但替代抗 -IL-1 α 或 β 抗体使用 5 μ g/ml 山羊抗 - 小鼠 IL-1R1 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 在玻片上孵育 1 小时。

[0300] IL-1R1- 缺陷的骨髓嵌合小鼠的产生。将 500 万个 C57BL/6 野生型或 IL-1R1- 缺陷的骨髓细胞静脉内注射到照射的 (550 拉德, 2 个剂量 (共 11 戈瑞)) 接受者 C57BL/6 野生型 (WT) 或 IL-1R1- 缺陷的 (敲除 (KO)) 小鼠。在照射前一周和照射后两周, 接受者小鼠饮用甲氧苄啶和磺胺甲噁唑抗生素处理的水。允许小鼠重构造造血骨髓细胞 8 周。吸烟施用基本与实施例 3 相同。

[0301] 下一实施例涉及与 COPD 的急性恶化 (AECOPD) 相关的模型。

[0302] 实施例 5-IL-1R1 拮抗剂抑制 LPS 介导的炎性细胞向肺的流入。

[0303] 脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性细菌的细胞壁组分。已显示这些细菌是 COPD 的急性

恶化的一种触发因素,吸入的 LPS 诱导的炎症是模拟此类事件的一种途径。在 LPS 介导的炎性细胞向肺的流入的小鼠模型中检查了 IL-1R1 拮抗剂阿那白滞素的效应。与对照 LPS 处理的小鼠相比,阿那白滞素抑制 LPS 介导的炎性细胞向肺的流入达 47%,如通过 BAL 总细胞所测量的 ($P < 0.001$) (图 7)。

[0304] 方法:

[0305] 阿那白滞素使用 ALZET 渗透泵递送,如对于急性吸烟模型所述,并在 LPS 施用前 48 小时施用于小鼠。小鼠为成年雌性 Balb/c 小鼠。

[0306] 将小鼠置于半开放的暴露吸入箱(最多 10 只小鼠),并暴露于气雾化的 LPS 一次 - 总吸入期间时间 12 分钟。铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) LPS 以 5mg/ml 的浓度使用,并使用雾化器气雾化(如 PariStar Jet Star 雾化器),充入 5ml 体积,自雾化器的流速为 5l/min(压力 = 2 巴)。对照组接受相同的程序但是使用 PBS。LPS 攻击后 48 小时使用腹膜内注射戊巴比妥处死小鼠,暴露气管,并使用室温 PBS(不含 Ca 或 Mg)以 23cm 流体压采用 2 分钟进和 1 分钟出灌洗肺,然后重复该程序。然后离心 BAL - 使用标准的自动化细胞计数和不同细胞计数分析细胞沉淀。还摘除肺进行匀浆化以用于 mRNA 分析或细胞因子 / 介导物分析。组之间的差异显著性使用学生 T 检验以单尾分布和双样本不等方差进行计算。使用不等方差 T- 检验的 p- 值限值: $p < 0.05$ 。

[0307] 实施例 6-IL-1R1 调控肺上皮细胞系和原代正常人支气管上皮细胞对鼻病毒感染的应答。

[0308] 人鼻病毒是已被暗示参与 COPD 的急性恶化 (AECOPD) 的常见病毒。已显示 COPD 患者具有对鼻病毒加剧的应答。为了研究 IL-1 在人鼻病毒 (HRV) - 介导的炎症应答中的作用,使用 PEG 纯化的 HRV14 感染 BEAS-2b/H292 细胞(可从 ATCC 获得的人细胞),同时将这些细胞暴露于 IL-1R 拮抗剂(图 8A)。方法参见实施例 8。在处理和 HRV14 感染细胞后检查原型炎症介导物 IL-8 (CXCL-1) (图 8)。IL-8 水平被种系化的抗体 6 和阿那白滞素二者降低(图 8B),但不被同种型对照抗体降低。对细胞使用的阿那白滞素的浓度是 25nM。另外使用了替代的方案,如图 8C 所示,结果在图 8D 中显示。测试了阿那白滞素的 3 个浓度,所有浓度均降低响应于 HRV14 的 BEAS-2B 细胞中的 IL-8 释放。BEAS-2B 和 H292 细胞是上皮细胞系,所以另外在生理上更相关的来源于 Lonza 的原代正常人支气管上皮细胞中分析了此应答(图 8E)。正常人支气管上皮 (NHBE) 细胞的人鼻病毒感染 (HRV1b) 造成培养基中增加的 IL-8 释放,感染后 48 小时测量。当与鼻病毒 + 同种型对照相比时,种系化的抗体 6 (Ab6GL; 10nM) 显著抑制对鼻病毒的应答。Ab6GL 抑制应答的程度与阿那白滞素 (Kineret®) 相似,阿那白滞素用作阳性对照。当与单独的鼻病毒组相比时,阿那白滞素 (10nM) 对响应于鼻病毒感染的人鼻病毒的上皮细胞的 IL-8 产生具有显著效应(图 8E)。在这些实验中使用人鼻病毒 -1b (少数组病毒),以便可以比较 IL-1R1 阻断在体外和在体内(参见实施例 7)的效应:人鼻病毒 -1b 能够感染小鼠,而多数组 HRV (如 HRV14) 不能感染小鼠。IL-1 阻断对少数和多数组鼻病毒 (HRV14) 诱导的 IL-8 产生的体外效应显示相似的趋势。这说明 IL-1R1 阻断在体外降低对人鼻病毒的促炎性应答。这一特质在标准化针对鼻病毒感染的 COPD 加剧的应答中是有用的。

[0309] 实施例 7-IL-1R1 阻断减轻急性小鼠模型中针对 HRV 的病毒诱导的炎症。

[0310] 为了研究抗 -IL-1R1 是否可以消除针对病毒的促炎性嗜中性粒细胞应答,在鼠

HRV 攻击模型中使用可商购的抗 - 小鼠 IL-1R1 抗体 35F5 (上文已描述)。已显示少数组血清型 HRV1b 感染小鼠上皮细胞并在小鼠肺中诱导急性炎症,在此研究中使用。为了测试抗 -IL-1R1 抑制是否在体内在病毒攻击模型中具有相似的抗炎效应,测定了全身和鼻内施用的 35F5 降低 HRV 诱导的肺中的细胞炎症的能力。人鼻病毒 -1b 鼻内施用 (纯化病毒,107 噬斑形成单位 [pfu]/mL) 显著增加病毒施用后 24 小时 BAL 中的总细胞和嗜中性粒细胞计数。由于模型的急性性质,未测量病毒载量。紫外照射的鼻病毒产生降低的炎症应答,如通过 BAL 中的细胞浸润所测量的,显示显著部分的应答依赖于完整病毒。在用纯化的 HRV1b 鼻内攻击前 24 小时,将抗 - 小鼠 IL-1R1 抗体 35F5 或同种型对照 (大鼠 IgG1 ;MAB005) 以 15mg/kg 的单次剂量腹膜内给予或 100 μ g 的剂量鼻内给予小鼠。病毒灌输后 24 小时测量动物 BAL 中的细胞浸润。35F5 显著降低响应于 HRV1b 攻击的小鼠 BAL 中的总细胞浸润 (图 9) 和嗜中性粒细胞的流入。响应于病毒的嗜中性粒细胞炎症的降低可能是在 COPD 中有益的, COPD 中潜在的慢性炎症被病毒感染加剧。

[0311] 实施例 8-IL-1R1 阻断减轻上皮细胞中响应于吸烟和吸烟 + 病毒的炎症。

[0312] 在体外测量了响应于烟雾调节的培养基,或烟雾调节的培养基和病毒中上皮细胞的炎症应答。烟雾调节的培养基通过使香烟烟雾通过组织培养基 (TC) 产生,并在本实施例的下文称为 ‘吸烟’ 或细胞的 ‘吸烟处理’。一根除去过滤嘴的香烟通过 25mL 培养基等于 100% 吸烟的培养基。滴定吸烟处理的培养基的 IL-8 释放和 BEAS-2b 细胞上的细胞汇合。对所有实验使用 20% 吸烟的培养基,因为其诱导促炎性细胞因子释放而没有显著的细胞死亡。

[0313] 为了检查 IL-1R 在吸烟和病毒诱导的炎症中的作用,细胞首先进行吸烟处理,伴有 IL-1R 拮抗剂预处理,然后根据需要,用 HRV 病毒感染,伴有 IL-1R 拮抗剂阿那白滞素的另一预处理 (图 10A 和 10C)。实验进行四次,使用不同浓度的阿那白滞素 (如图中所示)。

[0314] 阿那白滞素处理造成吸烟诱导的 IL-8 应答的部分抑制 (图 10B)。吸烟和病毒刺激物就 IL-8 应答而言是加成性的。吸烟和病毒暴露后的阿那白滞素处理抑制组合的吸烟和病毒 IL-8 应答 (图 10D)。实现了浓度依赖的和完全的抑制。这些结果表明,用 IL-1R 拮抗剂处理可抑制对病毒感染的炎症应答,以及对吸烟和病毒感染的组合的炎症应答,如通过 IL-8 应答的抑制所评估的。

[0315] 方法 (与实施例 6 和实施例 8 二者相关) :

[0316] 用于上皮吸烟和病毒工作的细胞是获自 ATCC 的 BEAS-2B 细胞 (目录号 CRL-9609) 并按供应商的说明培养,或来自 ECACC 的 H292 (目录号 91091815NCI-H292), 也按供应商的说明培养。

[0317] 将点着的香烟 (没有过滤嘴) 通过管线连接到支持在玻璃烧瓶中的含有组织培养基的 falcon 管 (50ml 容量)。蠕动泵抽吸烟雾通过管线并进入组织培养基。将废烟抽吸到具有去污剂的烧杯中。整个程序在通风橱中进行以保护操作者和实验室的其他使用者。因此,该程序不是无菌的。为了尽可能地保持无菌性,使用已用 70% 乙醇擦拭的镊子将含有培养基的 falcon 管置于锥形瓶中。插过塞子递送烟雾到组织培养基的吸管每次更换并在临近程序之前用 70% 乙醇擦拭。用镊子回收 falcon 管并尽可能快地更换盖子。然后将吸烟的培养基稀释并尽可能快地置于细胞上,优选在完成吸烟程序的一小时内 [n. b. 培养基不含用于烟雾抽取程序的血清]。另外,在这些细胞的标准培养 / 测定培养基中,包括了抗生

素（庆大霉素（gentomycin））。该细胞系的基础培养基（BEBM）以及所有添加剂作为试剂盒获自 Lonza/Clonetics Corporation :BEGM, 试剂盒目录号 CC-3170。

[0318] 根据所示的方案将细胞暴露于鼻病毒（多数组 HRV14, 使用 HeLa-Ohio 细胞通过标准做法制备和滴定, 使用粗制的或 PEG 沉淀的病毒）。

[0319] 将细胞接种于胶原蛋白包被的透明的平底板并在 37°C 5%CO₂ 下孵育, 让其过夜粘附。除去孔中的培养基, 并用 150u1 的培养基 +/- 阿那白滞素（阿那白滞素为 2x 终浓度）替代。细胞在 37°C 5%CO₂ 下孵育 30 分钟。吸烟培养基根据描述制备（烟雾提取物可使用 Kentucky 研究等级香烟制备）。将烟雾提取物用培养基稀释至 40%, 然后以 150u1 添加到细胞而不去除培养基 +/- 阿那白滞素。一些细胞用单独的培养基作为对照。将这些细胞孵育 24 小时。取出 200u1 的上清液并冷冻用于稍后的细胞因子分析。取出剩余的培养基并丢弃。将阿那白滞素或培养基以 100u1 替换到细胞上, 并在 30 分钟后以通过在 HeLa OHIO 细胞上的病毒储液的滴度确定的稀释度添加病毒, 以确定以另外的 100u1 制备的每个批次的等同活性。细胞在 37°C 5%CO₂ 下孵育 3 小时。然后除去细胞的所有培养基, 向细胞添加阿那白滞素或新鲜培养基并在 37°C 5%CO₂ 下孵育另外 48 小时。

[0320] 使用 ELISA 试剂盒 (R&D Systems DuoSet DY208) 根据生产商的说明和使用 R&D 重组蛋白作为测定的标准品测量上清液中的 IL-8。

[0321] 实施例 9 - 吸烟暴露的精密肺切片 (PCLS) 中 IL-1R1 缺陷减弱对病毒刺激物的肺驻留应答。

[0322] 在本实施例中, 我们评估了吸烟暴露的肺对病毒攻击的不同应答是否存在相似的机制。我们从室内空气 - 和吸烟 - 暴露的野生型和 IL-1R1- 缺陷的小鼠的肺产生了精密肺切片 (PCLS)。用 dsRNA 配体聚肌苷酸聚胞苷酸（聚 I:C）离体刺激 PCLS, 并评估关键介导物的表达。与室内空气暴露的对照相比, 我们在从吸烟暴露的野生型产生的 PCLS 中观察到响应于聚 I:C 刺激的募集嗜中性粒细胞的趋化因子 CXCL-1 和 CXCL-5 的显著更大的诱导和 CXCL-2 的中度增加（图 10E）。测量的所有转录物在病毒模拟刺激的吸烟暴露的 IL-1R1- 缺陷 PCLS 中显著减弱。联合地, 这些数据证明肺驻留细胞在促进吸烟诱导的炎症中的作用, 并支持 IL-1R1 在吸烟暴露的肺对病毒感染的不同应答中的作用。

[0323] 方法：

[0324] 精密肺切片和培养。使用根据之前已在 Bergner 等人, 2002, Journal of General Physiology 119:187-198 中描述的标准方案修改的方案对肺进行切片。这种修改在 Khan 等人, 2007, European Respir Journal 30:691-700 中进一步描述。简要而言, 用大约 1.4ml 的以下琼脂糖 (VII-A 型低胶凝温度; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 充填肺：升温至 37°C 并在汉克斯缓冲盐水溶液 (HBSS) 中制备为 2% 浓度, 补充有 N-2- 羟乙基哌嗪 -N' -2- 乙磺酸 (HEPES) (0.2M, pH 7.4)。随后, 将 0.2ml 空气注射到肺中以将琼脂糖 -HBSS 溶液冲出导气道。通过将肺冷却至 4°C 持续 15 分钟胶凝琼脂糖。解剖肺叶, 与支气管平行且近尾部地在肺叶上切出平整表面。在切片之前和过程中, 将肺叶保持在冰冷的 1x HBSS 溶液中。在 4°C 使用振动切片机产生 120 μm 厚切片 (Leica; 型号 VT 1000S, Richmond Hill, Canada)。从每个小鼠肺分离大约 40 个切片。

[0325] 随后将肺切片转移至补充以下的达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (DMEM)/F12 (Gibco, Burlington, Canada) 并培养: 35 μg/ml

L- 抗坏血酸 (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada)、5 μ g/ml 转铁蛋白 (Gibco, Burlington, Canada)、2.85 μ g/ml 胰岛素 (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) 和 3.25ng/ml 硒 (原子吸收标准溶液; Sigma-Aldrich, Oakville, Canada)。将溶液使用 0.22 μ m 孔过滤器过滤灭菌。在 DMEM/F12 溶液中进一步补充 250ng/ml 两性霉素 B (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) 和 1% 青霉素 / 链霉素。培养的前 3 小时, 每 1 小时更换培养基以去除任何残留的琼脂糖和肺切片培养物的细胞碎屑。第二天用 100ug/ml 已在磷酸盐缓冲盐水中重构的 dsRNA 模拟物聚肌苷酸聚胞苷酸 (GE Healthcare, Mississauga, Canada) 刺激肺切片 6 小时, 或保持未处理。在 RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) 中收集样品并在 -80°C 保存直至提取 RNA。

[0326] 精密肺切片的 RNA 提取和实时定量 RT-PCR。采集肺切片并置于 200 μ l 的 RNA later (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), 在 -80°C 储存至需要时。根据来自 RNeasy 试剂盒 (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) 的动物组织方案从肺切片中提取 RNA。任选地进行柱上 DNA 酶消化。使用 Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) 定量 RNA。分离的 RNA 的量和完整性使用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA) 确定。随后, 使用 100U Superscript II (Invitrogen, Burlington, Canada) 以 20 μ l 总体积对 100ng 总 RNA 进行反转录。使用随机六聚体引物在 42°C 合成 cDNA 50 分钟, 然后在 70°C 孵育 15 分钟。实时定量 RT-PCR 按一式三份进行, 总体积 25 μ l, 使用 Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。CXCL-1、CXCL-2、CXCL-5、GAPDH 的引物以及 FAM- 标记的探针购自 Applied Biosystems。PCR 使用 ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System 使用 Sequence Detector Software 版本 2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 进行。使用 δ , δ Ct 法分析数据。简而言之, 将基因表达针对看家基因 (GAPDH) 进行标准化并表示为相比于对照组 (室内空气对照, 模拟) 的倍数变化。

[0327] 实施例 10 - IL-1R1 缺陷和 IL-1 α 抗体阻断减弱吸烟暴露的小鼠的 H1N1 流感病毒感染模型中加剧的炎症。

[0328] 确立了 IL-1 α 在经由 IL-1R1 介导信号用于诱导吸烟诱导的炎症中的重要性, 和鉴于显示了吸烟暴露的肺的驻留细胞在响应于病毒损伤中所起的作用 (参见实施例 9), 接下来我们试图评估这些机制是否存在于在体内病毒感染后观察到的加剧的炎症应答中。将野生型和 IL-1R1- 缺陷小鼠暴露于吸烟, 随后用 H1N1 流感病毒感染。与病毒感染的室内空气对照小鼠相比, 在病毒感染后在吸烟暴露的野生型小鼠的 BAL 中观察到加剧的炎症应答 (图 11A)。虽然 IL-1R1 缺陷适度地减弱了 ($p=0.089$) 吸烟暴露的流感感染小鼠中的总 BAL 炎症, 但是这些动物中的嗜中性粒细胞增多症与野生型对照相比被显著减轻 (图 11C)。这些数据暗示 IL-1R1 依赖的机制促进了病毒感染后吸烟暴露的小鼠中炎症应答的加剧。

[0329] 虽然 IL-1R1 缺陷可减轻吸烟暴露的流感感染的动物中加剧的炎症应答, 我们假设 IL-1 α 将在促进这一应答中起支配作用。为了测试这一假设, 我们在吸烟暴露和病毒感染过程中每天用抗 -IL-1 α 或同种型抗体注射动物。感染后 5 天, 观察到吸烟暴露的小鼠中对甲型流感病毒的加剧的应答 (图 11D)。抗 -IL-1 α 中和显著减弱了 BAL 总炎症, 该效应显著影响单核细胞, 但不影响嗜中性粒细胞 (分别为图 11E 和 F)。综合起来, 这些数据支持以下结论: 旨在阻断 IL-1 α / IL-1R1 的治疗在疾病不稳定时期, 特别是 COPD 恶化过程中可能是有益的。

[0330] 方法：基本与实施例 3 中对吸烟模型的描述相同。在感染过程中，流感感染的动物还每天接受腹膜内注射。

[0331] 流感感染。麻醉的小鼠用在 $35 \mu\text{l}$ $1\times$ 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 媒介物中的 50PFU 小鼠 - 适应的 H1N1 甲型流感 (A/FM/1/47-MA) 病毒鼻内感染。对照动物接受 $35 \mu\text{l}$ PBS 媒介物。A/FM/1/47-MA 是完全测序的、噬斑纯化的制品，生物特征在于小鼠肺感染。在病毒递送当日或病毒感染的整个过程中，动物不暴露于吸烟。

[0332] 对于病毒研究，在 BAL 之前，从右肺摘除一个肺叶以测定病毒滴度。将右肺的剩余部分保存在 RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) 中，和用福尔马林灌充左肺用于组织学评估。

[0333] 下一实施例与人 COPD 尤其相关。

[0334] 实施例 11-COPD 患者恶化与增加的 IL-1 α 和 IL-1 β 水平相关。

[0335] 在长时段内分析 COPD 人患者的痰测量的 IL-1 α 和 IL-1 β 水平以与恶化时程比较。使用 PBS 处理而不是 DTT 处理来处理痰以使对痰细胞因子含量的干扰最小。在该患者中，IL-1 α 和 IL-1 β 二者均在 COPD 的恶化后上调 (图 12A)。恶化的时期与增加的 IL-1 α 和 IL-1 β 水平强烈相关。

[0336] 在不同的患者子集中，还分析了细菌状态和 IL-1 β 的关联。对于痰中的细菌测试为阳性的患者，其中的 IL-1 β 显著较高 (图 12B)。

[0337] 实施例 12-IL-1 α 和 IL-1 β 在 COPD 患者的肺中是增加的。

[0338] 在本实施例中，我们检查了 GOLD I & II COPD 患者的肺中 IL-1 α 和 IL-1 β 的表达。肺切片活体染色对于 IL-1 α 和 β 二者均为阳性 (分别为图 13A 和 B)。与非 COPD 对照相比，从 GOLD I&II COPD 患者采集的活检样品中观察到的 IL-1 和 β 阳性细胞的数目显著更大 (图 13C)。

[0339] 鉴于肺结构细胞在起始炎症应答中的重要性 (参见实施例 4)，我们评估了与非 COPD 对照相比 COPD 患者的肺上皮中的 IL-1 α 和 β 染色。虽然与 COPD 对照相比，COPD 患者的上皮中的 IL-1 α 没有增加，但是 IL-1 β 染色显著增加 ($p < 0.0001$) (分别为图 13D 和 E)。从 COPD 患者的痰中回收的 IL-1 α 和 β 的水平在稳定的疾病期间、恶化发作时 (在另外的治疗之前) 和恶化后 7 和 35 天 (图 13F-I) 是显著相关的 ($p < 0.0001$)。IL-1 α 和 β 之间的相关性在恶化后 7 天最强。在患者的子集中，IL-1 α 和 β 的水平在恶化时与稳定疾病就诊过程中测量的水平相比增加。综合起来，这些数据支持以下结论：IL-1 信号转导不仅在稳定 COPD 中起作用，而且在急性恶化的发作过程中也起作用，阻断 IL-1R1 代表治疗治疗恶化的成功策略。

[0340] 方法：人肺活检和痰样品。肺切片获自从 GOLD I ($n=3$, 1 名男性和 2 名女性；目前吸烟者， $n=3$ ；FEV1/FVC% 的平均值 $\pm$ SD = 60 ± 8) 和 GOLD II ($n=6$, 4 名男性和 2 名女性；目前吸烟者， $n=2$ ；FEV1/FVC% 的平均值 $\pm$ SD = 56 ± 10) COPD 患者采集的活检样品。合并这两组的活检数据。将数据与获自解剖学上正常的肺叶区域的癌症肺叶切除术的非 COPD 材料进行比较。痰样品获自登记处于稳定疾病、恶化发作及恶化发作后 7 天和 35 天的 COPD 患者。恶化定义为 48 小时时段内两个主要 (呼吸困难、痰量或痰脓汁) 症状或一个主要症状和一个次要 (咳嗽、喘鸣、喉痛、鼻涕、发热) 症状的增加。向患者给予就诊环境下的正常标准护理，痰样品的采集由研究人员决定。

[0341] 对于 IL-1 α 、IL-1 β 、和 IL-1R1 的人表达,通过将切片在蒸馏水中的 0.2% 胰蛋白酶 /0.2%CaCl₂ 中在 37℃ 下孵育 10 分钟进行抗原回收。内源过氧化物酶活性使用 6%H₂O₂ 阻断 10 分钟。为了阻断与二级抗体的非特异性结合,将玻片在 20% 正常兔或山羊血清中孵育 20 分钟。除去过量的血清,将玻片与 IL-1 α 兔抗 - 人抗体 (Abcam, 9614, 2.5 μ g/ml)、IL-1 β 兔抗 - 人抗体 (Abcam, 2105, 10 μ g/ml) 或 IL-1R1 山羊抗 - 人抗体 (R&D Systems, Ab-269-NA, 10 μ g/ml) 或者兔或山羊 IgG 阴性对照孵育 1 小时。将玻片与生物素化的兔抗 - 山羊二级 (1:200) 或猪抗 - 兔 (1:200) 抗体孵育 20 分钟。在人组织集上采用两种抗原检测方案:1) Strep AB 复合物 /HRP (Dako) 在室温 20 分钟, 2x10 分钟缓冲液洗涤和施加 DAB 1 分钟。2) Strep AB 复合物 /AP (Dako) 在室温 30 分钟, 2x10 分钟缓冲液洗涤和 Fuchsin Substrate-Chromagen System (Dako) 5 分钟。玻片用苏木精复染 (Sigma)。计数间隔大约 10 μ m 从每个患者采集的两个单独活检样品的阳性细胞。250mm² 标线与基膜对齐,并在固有层中在 3 个邻近区域计数细胞。

[0342] 序列:

[0343] 下面提供了某些抗体的序列信息。

[0344] 抗体 6VH 氨基酸序列 =Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly GlyGly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser GlyPhe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly LysGly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr AlaAsp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn ThrLeu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr TyrCys Ala Lys Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr AspAla Phe Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO :1)

[0345] 抗体 6 重链 CDR1=Ser Tyr Ala Met Ser (SEQ ID NO :2)

[0346] 抗体 6 重链 CDR2=Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr TyrAlaAsp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO :3)

[0347] 抗体 6 重链 CDR3=Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp Ala Phe Val (SEQ ID NO :4)

[0348] 抗体 6VL 氨基酸序列 =Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser ValSer Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser AsnIle Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr AlaPro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro AspArg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ala Gly LeuGln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Val ArgLeu His His Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQ ID NO :5)

[0349] 抗体 6 轻链 CDR1=Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly TyrAsp Val His (SEQ ID NO :6)

[0350] 抗体 6 轻链 CDR2=Gly Asp Thr His Arg Pro Ser (SEQ ID NO :7)

[0351] 抗体 6 轻链 CDR3=Gln Ser Tyr Asp Thr Val Arg Leu His His Val (SEQ ID NO :8)

[0352] 抗体 6VH - 种系化的 =Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly GlyLeu Val Gln

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly PheThr Phe Ser Ser Tyr Ala
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys GlyLeu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly
Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala AspSer Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
Asn Ser Lys Asn Thr LeuTyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
Tyr Tyr CysAla Lys Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp AlaPhe
Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO :9)

[0353] 抗体 6VL - 种系化的 =Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser ValSer Gly Ala
Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser AsnIle Gly Ala Gly Tyr
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr AlaPro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asp
Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala
Ser Leu Ala Ile Thr GlyLeu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr
Asp Thr ValArg Leu His His Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu (SEQID
NO :10)

[0354] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly ArgSer Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr GlyMet His Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala GlyIle Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys
Tyr His Ala His Ser Val Arg Gly ArgPhe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
Leu Tyr Leu Gln Met AsnSer Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Ala Arg SerPhe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val ThrVal
Ser Ser(SEQ ID NO :31)

[0355] CDR1、CDR2 和 CDR3 标有下划线并加粗。

[0356] CDR1=NYGMH(SEQ ID NO :32)

[0357] CDR2=GIWNDGINKYHAHSVRG(SEQ ID NO :33)

[0358] CDR3=ARSFDWLLFEF(SEQ ID NO :34)

[0359] 抗体 26F5 - VL(轻链可变结构域)

[0360] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly GluArg
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu AlaTrp Tyr Gln Gln
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp AlaSer Asn Arg Ala Thr Gly Ile
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser GlyThr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Glu Pro Glu Asp Phe Ala ValTyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
Phe Gly GlyGly Thr Lys Val Glu Ile Lys(SEQ ID NO :35)

[0361] CDR1、CDR2 和 CDR3 标有下划线并加粗。

[0362] CDR1=RASQSVSSYLA(SEQ ID NO :36)

[0363] CDR2=DASNRAT(SEQ ID NO :37)

[0364] CDR3=QQRSNWPPLT(SEQ ID NO :38)

[0365] 抗体 27F2 - VH(重链可变结构域)

[0366] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly ArgSer Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr GlyMet His Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala AlaIle Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys

His His Ala Gly Ser Val Arg Gly ArgPhe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
Leu Tyr Leu Gln Met AsnSer Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Gly Arg TyrPhe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val ThrVal
Ser Ser (SEQ ID NO :39)

[0367] CDR1、CDR2 和 CDR3 标有下划线并加粗。

[0368] CDR1=TFSNYGMH (SEQ ID NO :40)

[0369] CDR2=AIWNDGENKHHAGSVRG (SEQ ID NO :41)

[0370] CDR3=GRYFDWLLFEY (SEQ ID NO :42)

[0371] 抗体 27F2 - VL (轻链可变结构域)

[0372] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly GluArg
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu AlaTrp Tyr Gln Gln
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp AlaSer Asn Arg Ala Thr Gly Ile
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser GlyThr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Glu Pro Glu Asp Phe Ala ValTyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO :35)

[0373] CDR1、CDR2 和 CDR3 标有下划线并加粗。

[0374] CDR1=RASQSVSSYLA (SEQ ID NO :36)

[0375] CDR2=DASNRAT (SEQ ID NO :37)

[0376] CDR3=QQRSNWPPLT (SEQ ID NO :38)

[0377] 抗体 15C4-VH (重链可变结构域)

[0378] Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu SerLeu
Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Phe His Trp IleAla Trp Val
Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile IleHis Pro Gly Ala Ser Asp
Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly GlnVal Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser SerLeu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala
Arg Gln Arg Glu LeuAsp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
Ser (SEQ ID NO :43)

[0379] CDR1、CDR2 和 CDR3 标有下划线并加粗。

[0380] CDR1=FWHIA (SEQ ID NO :44)

[0381] CDR2=IIHPGASDTRYSPSFQG (SEQ ID NO :45)

[0382] CDR3=QRELDYFDY (SEQ ID NO :46)

[0383] 抗体 15C4 - VL (轻链可变结构域)

[0384] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Vsl Thr Pro LysGlu Lys
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser LeuHis Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys TyrAla Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
Glu Ala Glu Asp Ala AlaAla Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr Phe
Gly Gly GlyThr Lys Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO :47)

[0385] CDR1、CDR2 和 CDR3 标有下划线并加粗。

[0386] CDR1=RASQSIGSSLH (SEQ ID NO :48)

[0387] CDR2=YASQSFS (SEQ ID NO :49)

[0388] CDR3=HQSSSLPLT (SEQ ID NO :50)

[0389] 通过引用并入

[0390] 本文提及的所有出版物和专利通过引用整体并入本文，如同专门和单独地指明每个单独的出版物或专利通过引用并入。

[0391] 虽然已讨论了本公开的具体实施方案，以上说明书仅是示例性的而非限制性的。本公开的许多变化将在本领域技术人员参阅本说明书和下面的权利要求书后变得明显。本公开的完整范围应参考权利要求书以及其等同物的完整范围、和说明书以及此类变化确定。

[0001]

序列表

<110> 米迪缪尼有限公司 (MEDIMMUNE LIMITED)
麦克马斯特大学 (MCMASTER UNIVERSITY)

<120> 用于治疗 COPD 恶化的组合物和方法

<130> MED0562. PCT

<140>

<141>

<150> 61/416, 102

<151> 2010-11-22

<150> 61/325, 241

<151> 2010-04-16

<160> 50

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45		
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50					55					60		
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65							70						75		80

[0002]

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Gln	Tyr	Gly	Val	Val	Tyr	Asp
			100					105					110		
Ala	Phe	Val	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115				120						125			

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 2

Ser	Tyr	Ala	Met	Ser
1			5	

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 3

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1			5				10						15		
Gly															

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 4

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp Ala Phe
1 5 10 15
Val

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 5

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asp Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Val Ile Ala Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Val
 85 90 95
Arg Leu His His Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 6

Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Asp	Val	His
1				5					10				

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 7

Gly	Asp	Thr	His	Arg	Pro	Ser
1			5			

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 8

Gln	Ser	Tyr	Asp	Thr	Val	Arg	Leu	His	His	Val
1				5				10		

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

[0005]

<400> 9

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
           20           25           30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
           50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Lys Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Val Val Tyr Asp
           100          105          110
Ala Phe Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           115          120          125

```

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 10

```

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1           5           10           15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
           20           25           30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
           35           40           45
Leu Ile Tyr Gly Asp Thr His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
           50           55           60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65           70           75           80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Val
           85           90           95
Arg Leu His His Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

```

[0006]

100	105	110
<210> 11 <211> 17 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的描述：合成的肽 <400> 11 Asp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Trp Gly Tyr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp 1 5 10 15 Val <210> 12 <211> 17 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的描述：合成的肽 <400> 12 Asp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Trp Gly Tyr Thr Val Asp Ala Ala Val 1 5 10 15 Asp <210> 13 <211> 17 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的描述：合成的肽		

[0007]

<400> 13

Asp Gly Ala Ser Ser Thr Asn Trp Gly Tyr Thr Leu Asp Pro Pro Gly
1 5 10 15
Val

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 14

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Phe
1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 15

Trp Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0008]

<400> 16

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Leu Val

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 17

Ala Ala Trp Asp Asp His Leu Glu Gln Leu His

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 18

Ala Ala Trp Asp Asp Ala Ala Arg Val Leu Leu

1 5 10

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 19

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Asp Tyr Thr Thr Tyr Asp Ala Phe

[0009]

1	5	10	15
Asp Ile			

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 20

Pro	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Pro	Pro	Pro	Leu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Phe
1				5					10					15	
Asp Ile															

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 21

Pro	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Ala	Pro	Pro	Leu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Phe
1					5					10				15	
Asp Ile															

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0010]

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 22

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Ala Pro Ser Pro Leu Gly Tyr Asp Gly Phe
1 5 10 15
Asp Ile

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 23

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Gln Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Ala Phe
1 5 10 15
Asp Ile

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 24

Pro Leu Tyr Tyr Tyr Asp Glu Ser Leu Ala Leu Pro Val Tyr Asp Ala
1 5 10 15
Asp Ile

<210> 25

<211> 11

[0011]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 25

Gln	Ser	Tyr	Asp	Thr	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu
1				5					10	

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 26

Gln	Ser	Tyr	Asp	Thr	Ala	Gly	Gly	Gly	His	His
1				5					10	

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 27

Gln	Ser	Tyr	Asp	Thr	Asp	Ala	Ala	Arg	His	Gln
1				5					10	

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 28

Gln Ser Tyr Asp Thr His Leu Val Ala His Val
1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 29

Gln Ser Tyr Asp Thr Leu Leu Leu Ala Pro Gln
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 30

Gln Ser Tyr Asp Thr Arg Ala Asp Asp Ala His
1 5 10

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0013]

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 31

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40					45				
Ala	Gly	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Ile	Asn	Lys	Tyr	His	Ala	His	Ser	Val
	50					55				60					
Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70				75						80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Pro	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Ala	Arg	Ser	Phe	Asp	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu	Phe	Trp	Gly	Gln
		100						105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120									

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 32

Asn	Tyr	Gly	Met	His
1			5	

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0014]

<400> 33

Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala His Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 34

Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe

1 5 10

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 35

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

[0015]

				85					90			95
Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
			100					105				

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 36

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 37

Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr
1				5		

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 38

Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro	Leu	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0016]

1 5 10

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 39

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ala	Ala	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Glu	Asn	Lys	His	His	Ala	Gly	Ser	Val
	50					55				60					
Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120									

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 40

Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His
1				5			

[0017]

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 41

Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala Gly Ser Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 42

Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 43

Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

[0018]

Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Phe	His
			20					25					30		
Trp	Ile	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	His	Pro	Gly	Ala	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
		50				55					60				
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Tyr
65					70				75						80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gln	Arg	Glu	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100				105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 44

Phe His Trp Ile Ala

1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 45

Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

[0019]

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 46

Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<400> 47

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

[0020]

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 48

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 49

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 50

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

BAL总细胞计数 * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ BAL=支气管肺泡灌洗液; CS=吸烟

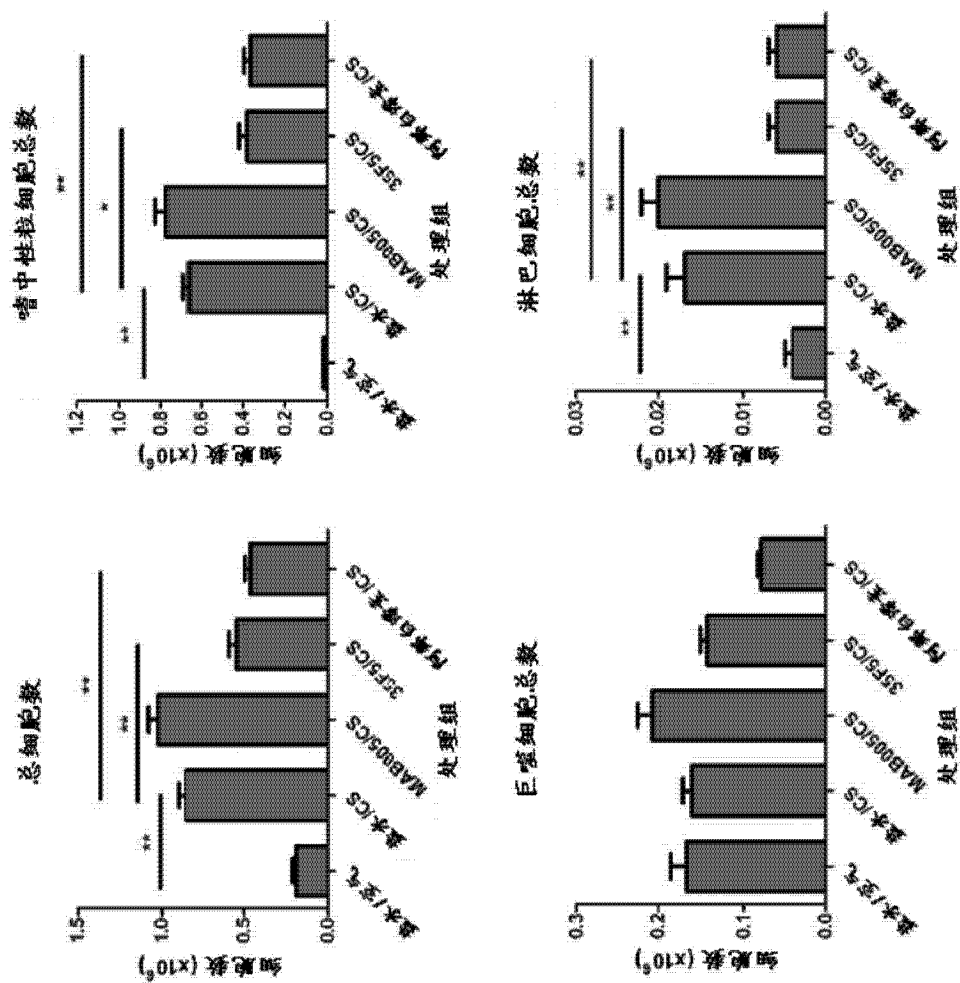


图3:IL-1R 阻断抑制吸烟诱导的肺炎

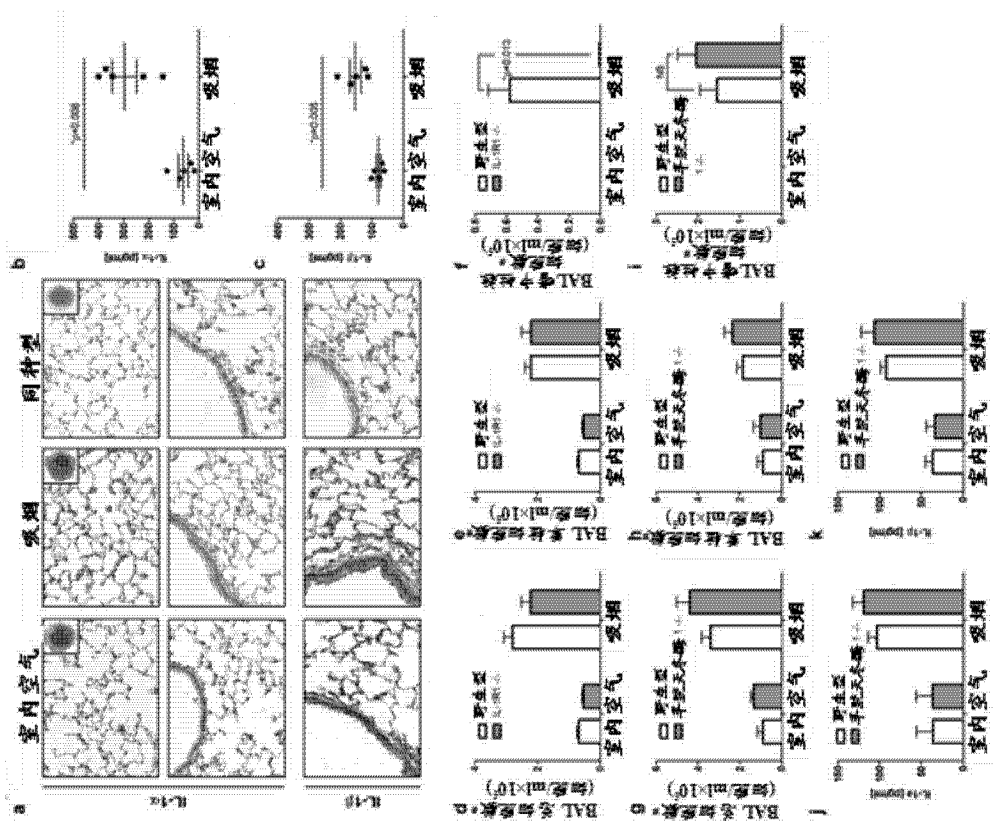


图4:IL-1α 急性小鼠模型中吸烟驱动的炎症中起关键作用 (1)

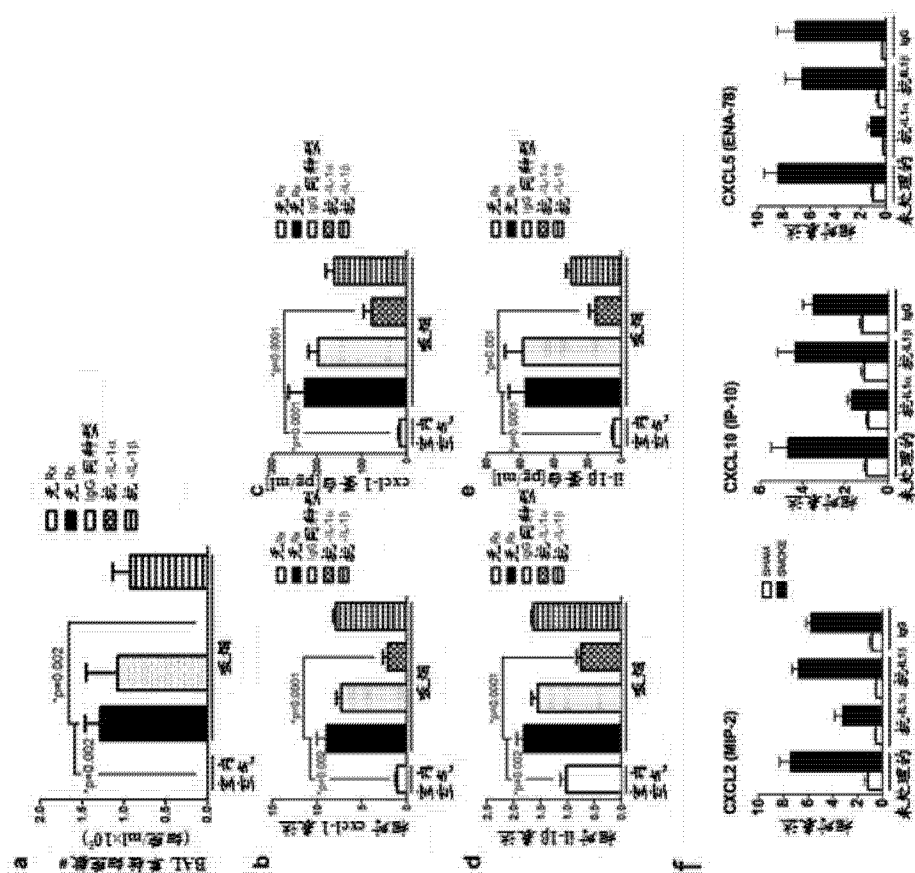


图 5: IL-1 α 在急性小鼠模型中吸烟驱动的炎症中起关键作用 (2)

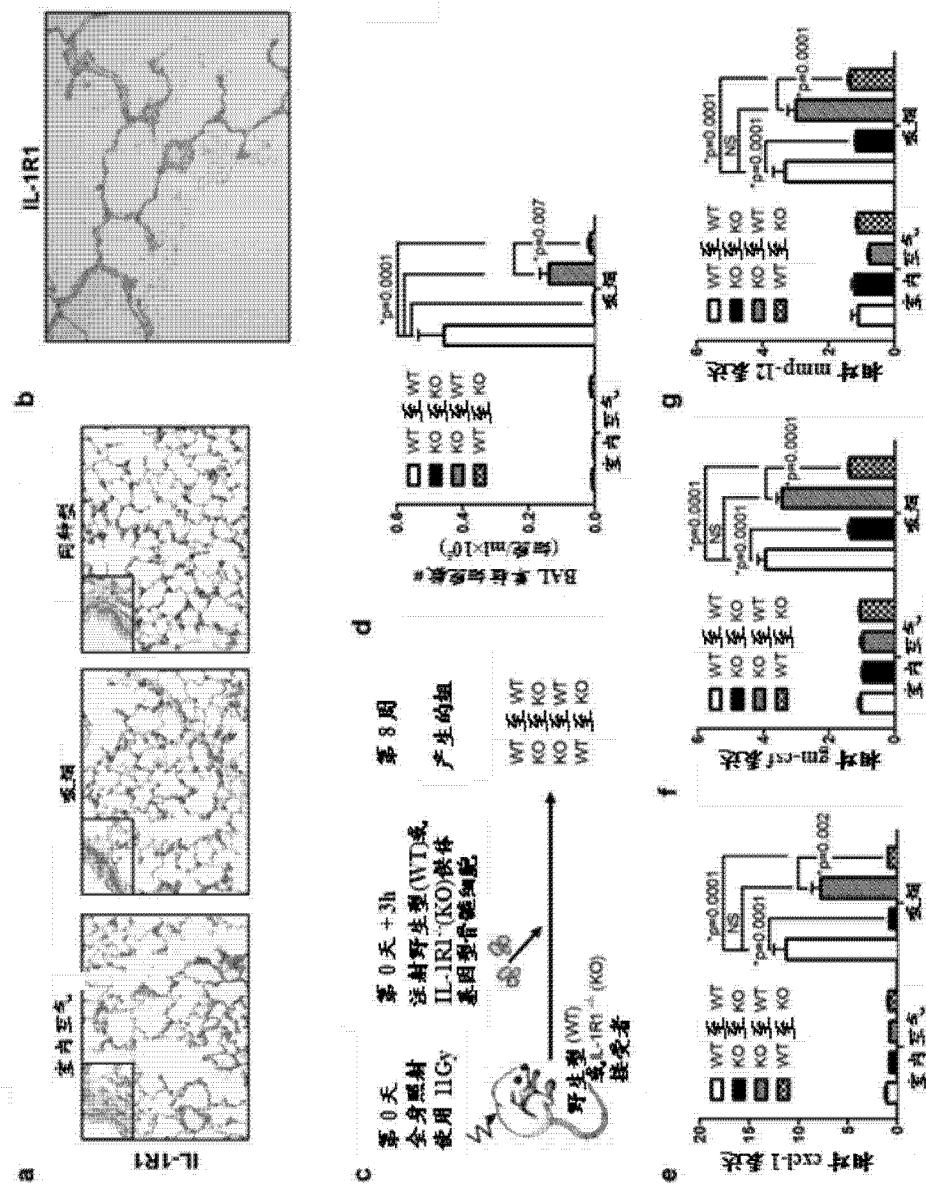


图6- 为 COPD 患者的镜像的吸烟暴露的小鼠中 IL-1R 的表达模式
并且是炎症的抗辐射的非造血细胞需要的

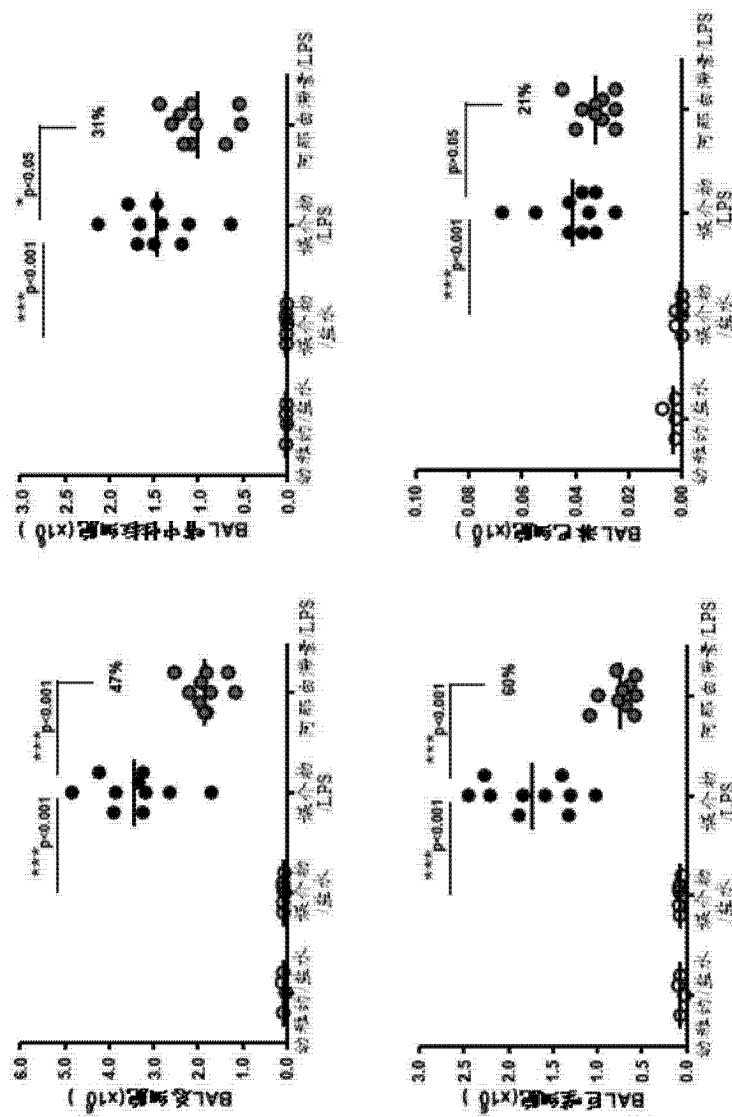


图 7 与 AECOPD 相关的模型图 7-IL-1R 阻断减轻 LPS 诱导的急性肺炎

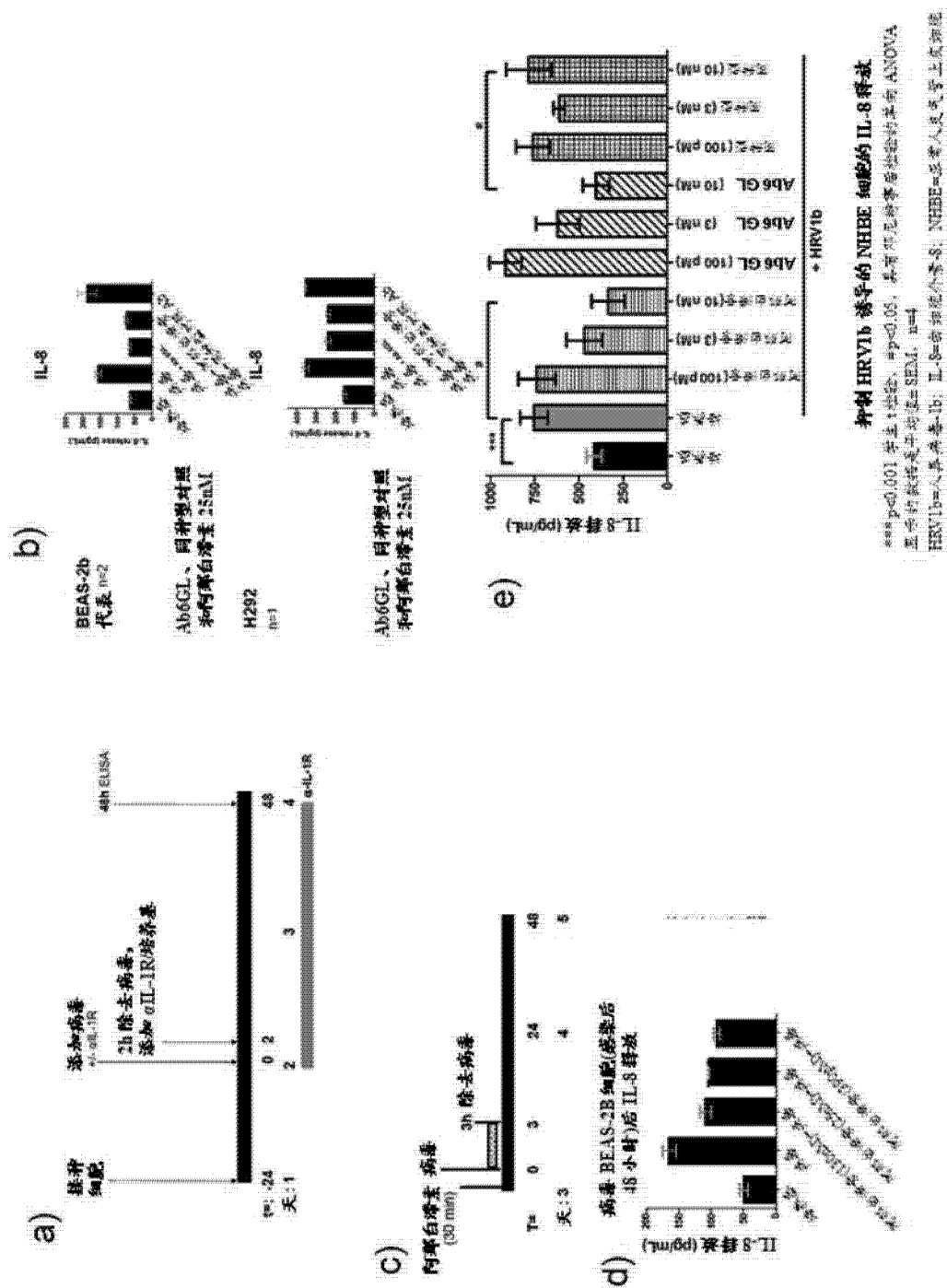


图 8 :在体外 IL-1R 阻断减轻 HRV 诱导的炎症

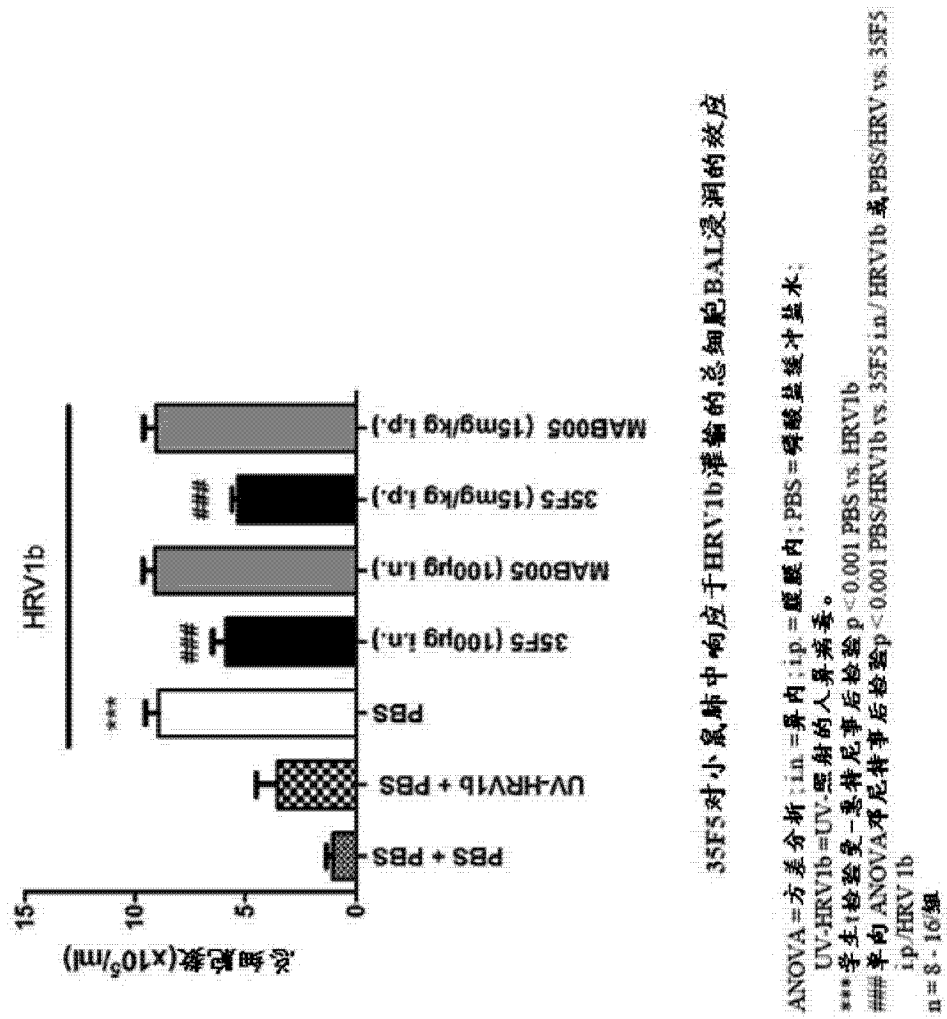


图 9 :IL-1R1 阻断减轻急性小鼠模型中 HRV 病毒诱导的炎症

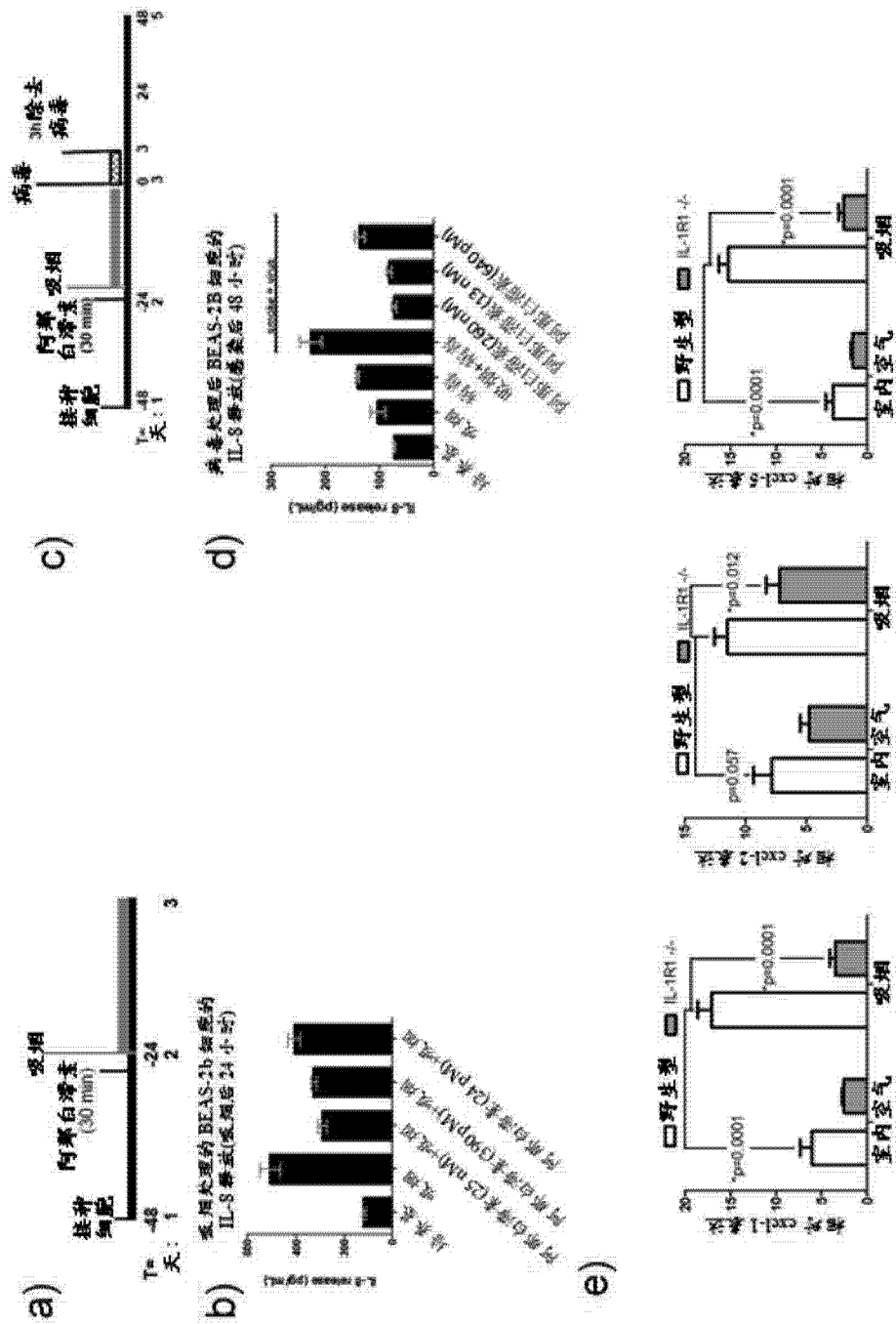


图 10 :体外对吸烟和吸烟 + 病毒诱导的炎症的影响或离体的肺切片中聚 -IC 的效应

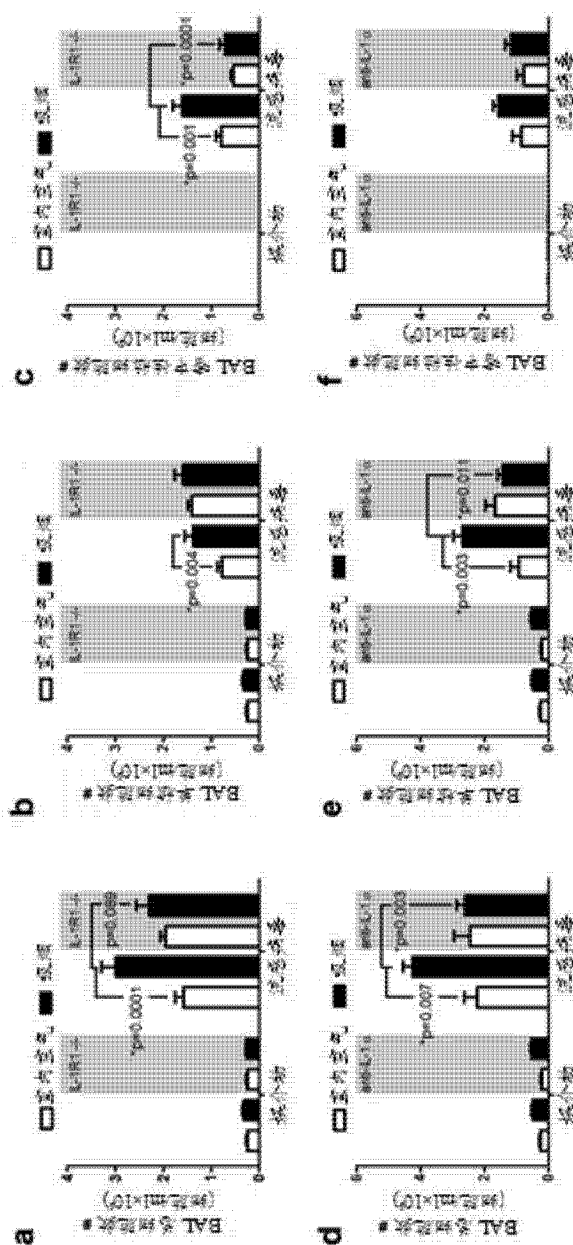


图 11 :IL-1R1 和 IL-1 α 阻断在体内减轻吸烟 + 病毒炎症

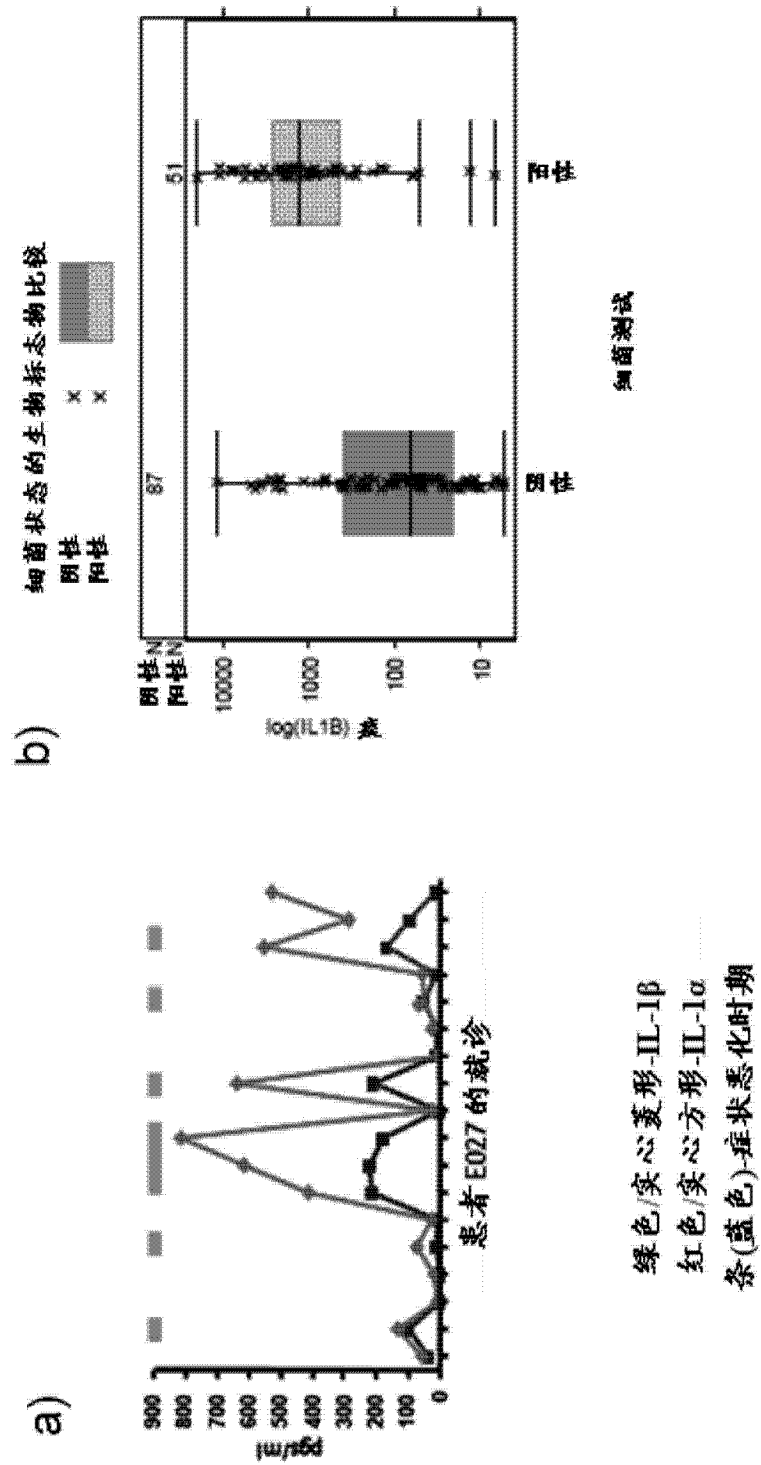


图 12 与人 COPD 的相关性图 12 :COPD 痰中的 IL-1 表达

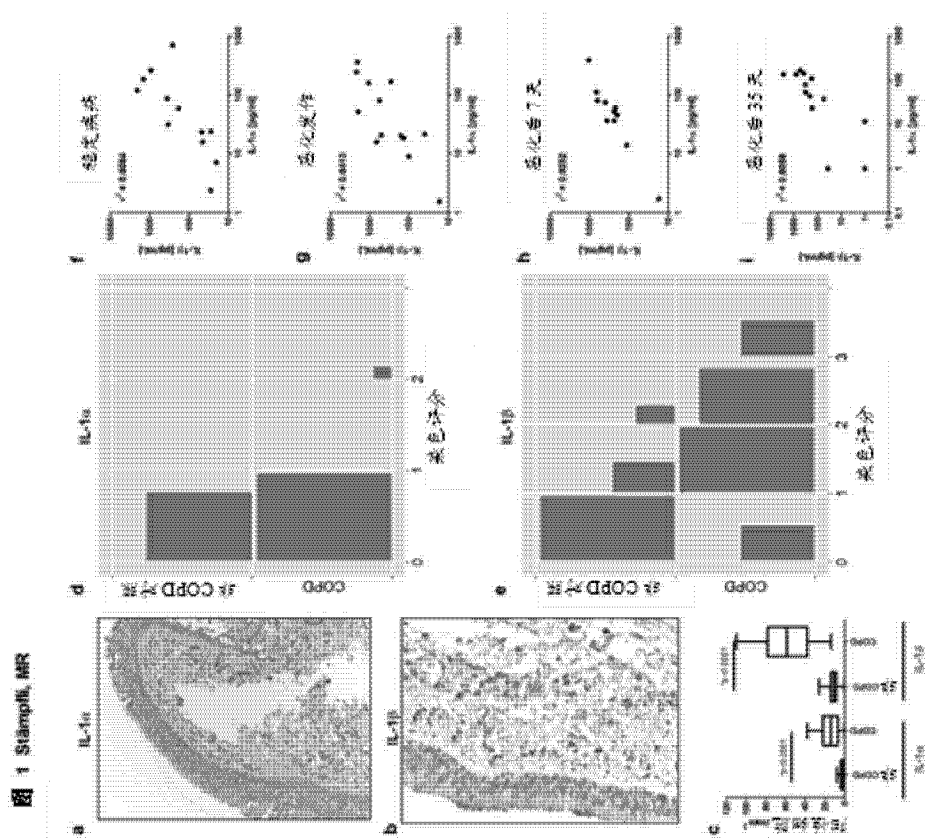


图 13 :COPD 组织中的 IL-1 α 和 B 表达 ;IL-1 α 和 β 在稳定的和 AECOPD 痰中相关

表 1a
注意 - 对于HCDR1, 序列的位置 34 是M。

Kabat 编号	HCDR1					HCDR2										HCDR3																							
	31	32	33	34	35	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	101	102
抗体 1	S	Y	A		S	A	I	S	G	S	G	S	T	Y	A	D	S	V	K	G			D	G	A	S	S	T	N	W	G	Y	N	Y	Y	G	M	D	Y
抗体 2																																	T	V	D	A	A	V	D
抗体 3																																T	L	D	P	P	G	V	

LCDR1										LCDR2										
Kabat 编号	24	25	26	27	27A	27B	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56
抗体 1	S	G	S	S	S	N	I	G	S	N	Y	V	F	W	N	N	Q	R	P	S
抗体 2																				
抗体 3																				

LCDR3									
Kabat 编号		89	90	91	92	93	94	95	95A
抗体 1		A	A	W	D	D	S	L	S
抗体 2							H	E	Q
抗体 3							A	A	R

表 1b

Kabat 编号	HCDR1					HCDR2										HCDR3																								
	31	32	33	34	35	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	100J	101	102
抗体 4	S	Y	A	M	S	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	P	L	Y	Y	Y	D	G	S	D	Y	T	T	Y	D	A	P	D	I
抗体 5																													A	P	P	L	G				G			
抗体 6																													E	Q	Y	G	V	V				/	F	V
抗体 7																													A	A	P	P	L	G			G			
抗体 8																													A	P	S	P	L	G			G			
抗体 9																													E	Q	Y	G	L	Y						
抗体 10																													E	L	A	L	P	V	Y	D	A			

Kabat 编号	LCDR1										LCDR2																													
	24	25	26	27	27	27	27	27	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56		
抗体 4	T	G	S	S	S	S	S	S	S	I	G	A	G	Y	D	V	H	G	D	T	H	R	P	S																
抗体 5																																								
抗体 6																																								
抗体 7																																								
抗体 8																																								
抗体 9																																								
抗体 10																																								

Kabat 编号	LCDR3											
	89	90	91	92	93	94	95	95A	95B	96	97	
抗体 4	Q	S	Y	D	T	S	L	S	G	S	L	
抗体 5						A	G	G	H	H	H	
抗体 6						V	R	L	H	H	V	
抗体 7						D	A	A	R	A	Q	
抗体 8						H	V	V	A	H	V	
抗体 9						L	L	L	A	P	Q	
抗体 10						R	A	D	D	A	H	

参考文献

本说明书中任何地方引用的所有参考文献，包括以上任何地方引用的那些参考文献，通过引用整体且为所有目的并入本文。

-
- 1 Dinarello 2002
 - 2 Patterson 1993
 - 3 Steinkasser 1992
 - 4 Black 1988
 - 5 Niki 2004
 - 6 Wessendorf 1993
 - 7 Carter 1990
 - 8 Eisenberg 1990
 - 9 Dewberry 2000
 - 10 Muzio 1995
 - 11 Gabay 1997
 - 12 Sims 1994
 - 13 Colotta 1994
 - 14 Altschul 等 (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410
 - 15 Pearson 和 Lipman (1988) *PNAS USA* 85: 2444-2448
 - 16 Smith 和 Waterman (1981) *J. Mol Biol.* 147: 195-197
 - 17 Voet 和 Voet, *Biochemistry*, 第 2 版 (Wiley) 1995.
 - 18 Gram 等, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:3576-3580
 - 19 Barbas 等, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:3809-3813
 - 20 Schier 等, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551-567
 - 21 Ward, E.S. 等, *Nature* 341, 544-546 (1989)
 - 22 McCafferty 等 (1990) *Nature*, 348, 552-554
 - 23 Holt 等 (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
 - 24 Bird 等, *Science*, 242, 423-426, 1988
 - 25 Huston 等, *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988
 - 26 Holliger, P. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993

- 27 Reiter, Y. 等, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996
- 28 Hu, S. 等, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996
- 29 Haan 和 Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1-A6
- 30 Koide 等 (1998) Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151.
- 31 Nygren 等 (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469
- 32 Wess, L. In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004
- 33 Ledermann J.A. 等 (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664
- 34 Bagshawe K.D. 等 (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
- 35 Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., 第 726 页, 1988
- 36 Köhler 和 Milstein, Nature, 256:495-497, 1975
- 37 Kontermann, R 和 Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 38 Mendez, M. 等 (1997) Nature Genet, 15(2): 146-156
- 39 Knappik 等 J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86
- 40 Krebs 等 Journal of Immunological Methods 254 2001 67-84