

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 38/00

A61K 39/395 G01N 33/567



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817512.3

[43] 公开日 2005 年 2 月 2 日

[11] 公开号 CN 1575184A

[22] 申请日 2002.9.9 [21] 申请号 02817512.3

[30] 优先权

[32] 2001. 9. 7 [33] US [31] 60/318,096

[32] 2002. 3.26 [33] US [31] 60/367,578

[86] 国际申请 PCT/US2002/028708 2002.9.9

[87] 国际公布 WO2003/022296 英 2003.3.20

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.8

[71] 申请人 波士顿大学理事会

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 安·马沙克-罗斯坦

伊丽莎白·利德贝特 伊恩·瑞弗金

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 3 页 说明书 48 页 附图 12 页

[54] 发明名称 治疗免疫复合物相关疾病的方法和组合物

合或未复合的自身抗原)所启动的信号通路。

[57] 摘要

本发明提供了用于治疗免疫复合物相关疾病(ICAD)的方法和组合物,用于患有ICAD的受试者或者ICAD高危受试者,所述ICAD的实例包括SLE、类风湿性关节炎、丙型肝炎相关的免疫复合物疾病(例如冷球蛋白血症)。本发明基于如下令人意外的发现,即含有染色质的免疫复合物通过双受体结合过程而活化自身反应性B细胞和树突状细胞,并且在这两种细胞中均涉及Toll样受体(TLR)。治疗ICAD的方法包括:给予需要治疗的个体一种具有如下属性的化合物:或者1)抑制免疫复合物的形成,其或者通过阻止其形成,和/或通过与TLR相结合而实现上述功能;或者2)干扰含有自身抗原的免疫复合物(或其抗原成分)与TLR相结合;或者3)抑制由BCR和TLR(在B细胞中)或FcR和TLR(在树突状细胞中)双结合(通过免疫复

ISSN 1008-4274

1. 一种方法，用于治疗患有免疫复合物相关疾病 (ICAD)或系统性自身免疫疾病的患者或者 ICAD 或系统性自身免疫疾病的高危患者，包括：给予所述患者有效量的化合物，其中所述化合物抑制所述免疫复合物或自身抗原使其不能与 Toll 样受体相结合或使 Toll 样受体活化，其中所述免疫复合物包含自身抗体以及与细胞受体相结合的自身抗原。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的 ICAD 是系统性红斑狼疮。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的 ICAD 是类风湿性关节炎。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的 ICAD 是丙型肝炎相关的免疫复合物疾病。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的 Toll 样受体是 Toll 样受体 9。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的 Toll 样受体是 Toll 样受体 3。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的化合物选自由以下成员构成的组：
  - (a) 与免疫复合物的组成成分相结合并阻止其形成或其与 Toll 样受体相结合的化合物；
  - (b) Toll 样受体诱饵；
  - (c) 抑制 MyD88 活性或 TLR 起始的信号级联的其他成分活性的化合物；
  - (d) 抑制免疫复合物成分的生产的化合物；以及
  - (e) Toll 样受体拮抗剂。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述的化合物是与 Toll 样受体相结合的抗体。
9. 如权利要求 8 所述的方法，其中所述的抗体是单链抗体。
10. 如权利要求 7 所述的方法，其中使用了一种化合物溶液 (cocktail)，所述化合物抑制与受体组合的结合，其中所述受体组合由 Toll 样受体 2、Toll 样受体 3、Toll 样受体 9 中的至少两种所构成。
11. 如权利要求 7 所述的方法，其中所述的 Toll 样受体拮抗剂是抑制性寡核苷酸。
12. 如权利要求 7 所述的方法，其中所述的 Toll 样受体拮抗剂是负显性 Toll 样受体。

13. 一种用于筛选能抑制免疫复合物形成或与 Toll 样受体结合的化合物的方法，所述方法包括将免疫复合物成分与待筛选的化合物相接触，并检测 B 细胞的活化和/或增殖和/或免疫复合物的抗原片段与 Toll 样受体的结合，其中所述的免疫复合物包括自身抗体和自身抗原。
14. 一种用于筛选能抑制免疫复合物的形成或与 Toll 样受体结合的化合物的方法，所述方法包括将免疫复合物成分与待筛选的化合物相接触，并检测树突状细胞的活化和/或免疫复合物的抗原片段与 Toll 样受体的结合和/或细胞形态，其中所述的免疫复合物包括自身抗体和自身抗原。
15. 抑制免疫复合物或自身抗原使其不能与 Toll 样受体相结合或使 Toll 样受体活化的化合物在治疗患有免疫复合物相关疾病 (ICAD) 或系统性自身免疫疾病的患者或者 ICAD 或系统性自身免疫疾病的高危患者中的应用，其中所述的免疫复合物包含自身抗体以及与细胞受体相结合的自身抗原。
16. 如权利要求 15 所述的化合物，其中所述的化合物选自由以下成员构成的组：
  - (a) 与免疫复合物的组成成分相结合并阻止其形成或其与 Toll 样受体相结合的化合物；
  - (b) Toll 样受体诱饵；
  - (c) 抑制 MyD88 活性或 TLR 起始的信号级联的其他成分活性的化合物；
  - (d) 抑制免疫复合物成分的生产的化合物；以及
  - (e) Toll 样受体拮抗剂。

## 治疗免疫复合物相关疾病的方法和组合物

本发明是在政府支持下进行的，由国立卫生研究院给予资助，合同号为 R01 AR-35230 和 K08 DK-02597。政府在该发明中享有一定权利。

### 技术领域

本发明涉及治疗免疫复合物相关疾病的方法和组合物，特别适用于系统性红斑狼疮 (SLE) 以及与患有 Toll 样受体 (TLR) / B cell 受体 (BCR) 双结合 (在 B cells 中) 或者 TLR/Fc gamma 受体双结合 (在树突状细胞和/或巨噬细胞) 异常的患者相关的其他系统性自身免疫疾病。

### 背景技术

自身免疫疾病是一系列很常见的疾病，但目前对其知之甚少；在患有自身免疫疾病的个体中，其免疫系统或者 1) 开始将自身抗原作为外源抗原加以识别，并且开始破坏表达此类抗原的组织从而引发疾病；或者 2) 与这些抗原形成免疫复合物，这些免疫复合物随后沉积在组织中并引发炎症反应。此类自身免疫疾病包括：例如，糖尿病，其中免疫系统发生转变，破坏产生胰岛素的胰岛细胞；多发性硬化症，其中目标抗原是髓鞘保护的神经元，导致运动神经元功能的破坏；牛皮癣，其中免疫系统的目标是皮肤；类风湿性关节炎，其中目标器官是软骨；以及系统性红斑狼疮 (SLE)，其特征是没有明显特异性或选择性地多种组织

作为靶标，但是目标抗原本身却非常一致并且很独特。由于人们对导致自身免疫疾病发展的机制总的来说还几乎一无所知，因此对它们的治疗通常是一般性地抑制免疫系统。此类一般性免疫抑制疗法往往会产生很多不良的副作用，包括癌症，不育症，对病毒、真菌、酵母和细菌的易感性增加等。因此，人们很希望能理解引起免疫系统发生转变从而识别自身抗原的机制，从而使人们可以发展出特异性更强的治疗自身免疫疾病的方法。

人们知之甚少的自身免疫疾病的一个实例是系统性红斑狼疮 (SLE)，通常称为狼疮。SLE 的特征是免疫系统调节失常，从而导致了抗核抗体的产生，循环系统中免疫复合物的产生以及补体系统的活化。免疫复合物在组织和关节中积累从而引发炎症以及关节和组织的降解。虽然术语“系统性”恰当地暗示了该疾病影响整个机体和大多数器官系统，但最为常见的是，该疾病涉及炎症反应以及相应的对关节、皮肤、肾、大脑、体腔膜、肺、心脏和胃肠道的损害。患有 SLE 的个体通常会经历预想不到的急性期或“暴发”以及同样令人意外的恢复。该疾病的病理特征是反覆、分布广以及类似皮疹的多种脉管损伤或皮肤表面的变化。

在美国，SLE 的流行是一个有争议的话题。预计流行范围在 250,000 到 2,000,000 人之间。虽然在年龄很大的老人以及年龄非常小的孩子中也有报道，但该疾病主要的感染对象是育龄妇女。在孩子之中，女孩子患有 SLE 的比例比男孩子患 SLE 的比例高三倍。60% 的 SLE 患者的发病时间在青春期和四十岁之间，在该人群中，女性与男性的比例为 9:1。此后，女性的患病比例仍然占优势，这与在青春期前的孩子们身上所观察到的相同（也就是 3:1）。此外，非洲和亚洲后裔患有该疾病的比例似乎比白种人后裔高三倍。

SLE 的病因仍然不为人知。已经有人提出，遗传易感性、性激素的系统性增加以及各种环境诱因例如病毒感染在诱发该疾病的典型特征即免疫反应异常方面具有一定作用。在 SLE 患者之中，两种组织相容性抗原 HLA-DR2 和 HLA-DR3 的百分比提高，这暗示了遗传的作用。此外，在被感染的个体中，扩展单体型 HLA-A1、B8 和 DR3 的频率提高。在同卵双胞胎中，该疾病的一致性（concordance）进一步支持了遗传的作用。但是，该一致性比例也暗示了这种遗传易感性的多基因属性以及环境因素的作用，据报道，该一致性比例在 25%到 60%之间，仅仅是中等水平。

SLE 精确的发病原因仍然不为人知。但是一般认为，该疾病的大部分临床表现是直接或间接地由自身抗体的产生和后续的致病免疫复合物的形成而导致的。这些由调节失常的 B 淋巴细胞所产生的自身抗体具有不同的特异性，识别不同的核自身抗原，包括 DNA、核小体、亚核小体（subnucleosome）等。某些 RNA/蛋白质复合物，包括 Sm 抗原以及核内小核糖核蛋白(snRNP)，是另外的特征性自身抗原种类（specificities）。致病免疫复合物通过自身抗体与其相应的核自身抗原相结合而形成。

SLE 患者的自身抗体通常与其相应的自身抗原相结合并以免疫复合物（IC）的形式参加循环。在小鼠和人中，染色质或染色质片段例如 DNA、核小体或亚核小体微粒是特别常见的自身抗原种类（Tan, E. Adv. Immunol. 44, 93 - 151 (1989); Monestier and Novick, Mol. Immunol. 33: 89 - 99, 1996)。

因此在 SLE 的治疗中，最核心的目的或者是努力抑制功能失常的 B 淋巴细胞从而减少自身抗体的生产，或者是在免疫复合物一旦形成后，努力减少其致病性。目前，这些目的只能通过利用广谱系统性免疫抑制药物进行治疗而实现，但通常不能完全实现这些目的，其中所采用的药物例如可的松、硝基咪唑硫嘌呤、羟

化氯喹以及环磷酰胺。这些疗法往往会有多种严重的不良副作用，包括感染、不育、视网膜病以及癌症。因此，人们很希望获得治疗 SLE 以及其他自身免疫疾病的新方法。

## 发明概述

因此，本发明的目的是提供用于治疗免疫复合物相关疾病 (ICAD) 的方法和组合物，用于患有 ICAD 的受试者或者 ICAD 高危受试者，ICAD 的实例包括系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎、丙型肝炎相关的免疫复合物疾病 (例如冷球蛋白血症)。

我们已经发现，含有染色质的免疫复合物通过一个双受体结合过程而活化 B 细胞和树突状细胞。在这两种细胞中均涉及 Toll 样受体 (Toll-like receptor, 以下简称为 TLR)。TLR9 位于胞浆的囊泡内，是细胞活化所必需的第二个受体。对于 B 细胞而言，B 细胞抗原受体位于细胞表面，是细胞活化所必需的第一个受体。对于树突状细胞而言，刺激性 Fc gamma 受体位于细胞表面，是细胞活化所必需的第一个受体。我们已经发现了一种治疗 ICAD 的方法，给予需要治疗的个体一种具有如下属性的化合物：或者 1) 抑制免疫复合物 (也就是自身抗体和核自身抗原) 的形成，其或者通过阻止其形成，和/或通过 Toll 样受体 (TLR) 相结合而实现上述功能；或者 2) 干扰含有自身抗原的免疫复合物 (或其抗原成分) 与 TLR 相结合；或者 3) 抑制由 BCR 和 TLR (在 B 细胞中) 或 FcR 和 TLR (在树突状细胞中) 双结合 (通过免疫复合 (complexed) 或未复合的自身抗原) 所启动的信号通路。在给药时，将该化合物置于药学上可以接受的载体中。

ICAD 优选为 SLE、类风湿性关节炎或丙型肝炎相关的免疫复合物疾病 (例如冷球蛋白血症)。在另一个实施例中，所述 ICAD 与器官移植后宿主的免疫反应有关。

虽然并不想受理论上的限制，但是我们相信含有自身抗原（例如染色质）的免疫复合物（immune complexes，以下简称为 IC），而不是含有外源抗原的 IC，能够活化自身反应性 B 细胞，并且这种活化完全依赖于含有自身抗原的 IC 与 B 细胞的 B 细胞受体或树突状细胞的 Fc $\gamma$ R 以及第二种受体（一种 Toll 样受体）顺序结合的能力。这一发现在先天性免疫系统和获得性免疫系统之间建立了一种新的联系，并进而建立了一种一般性机制，对蛋白质/核酸自身抗原具有特异性的自身反应性 B 细胞通过该机制而被活化。

本发明的一个方面提供了一种治疗患有 ICAD 的受试者或者 ICAD 高危受试者的方法，包括鉴定出一位患有 ICAD 的个体，并给予有效量的化合物，所述化合物能够抑制自身抗原或自身抗原/免疫复合物的形成和/或抑制自身抗原或自身抗原/免疫复合物激活 B 细胞或树突状细胞。

ICAD 或系统性自身免疫疾病的高危人包括：至少有一位父母、祖父母或兄妹患有 ICAD 或系统性自身免疫疾病的个体。

所述化合物选自一个组，所述的组由与免疫复合物的组成成分相结合的化合物所构成，这些化合物或者阻止所述免疫复合物的形成，或者阻止自身抗原活化 Toll 样受体 (TLR)。此类化合物包括：Toll 样受体诱饵 (decoys)，抑制 MyD88 活性的化合物，抑制免疫复合物成分的生产的化合物（例如反意核苷酸），负显性（dominant-negative）TLR，Toll 样受体拮抗剂，以及抑制信号通路的化合物，其中所述信号通路由免疫复合物或自身抗原片段与 TLR 的结合或相互作用而活化。较为理想的是，所述化合物与 Toll 样受体 TLR2、TLR3、TLR9 或其功能性结构域结合和/或抑制其功能。更为理想的是，所述 TLR 是 TLR3、TLR9 或其功能性片段。

与免疫复合物的组成成分相结合并阻止其形成或者阻止复合物与 Toll 样受体相结合的化合物以及抑制 MyD88 信号传导的化合物包括：多克隆或单克隆抗体，能够阻断野生型 TLR 的活性或阻断 TLR 介导的信号级联成分的负显性蛋白质，抑制性寡聚脱氧核苷酸(ODN) 例如 S-ODN 2088 (Lenart, et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 4, 247 - 256 (2001)), 翻译核苷酸 (包括 RNA 和经修饰的核苷酸), 或其他的通路特异性激酶抑制剂。所述化合物中不包括氟奎。

在一个实施方案中，本发明提供了筛选能抑制复合物形成或与 Toll 样受体结合和/或抑制 B 细胞/树突状细胞活化的化合物或试剂的方法。所述方法包括将免疫复合物成分与待测试剂相接触，并检测 B 细胞或树突状细胞的活化和/或增殖和/或复合物与 Toll 样受体的结合。

在另一个实施方案中，本发明还提供了诊断 ICAD 的方法。该方法包括：从被怀疑患有 ICAD 的个体身上提取生物样品，其中含有 IgG；将所述生物样品与 RF+ B 细胞或树突状细胞一起进行培养；测定 RF+ B 细胞或树突状细胞活化，其中，与暴露于来自对照个体的含有 IgG 的生物样品的 RF+ B 细胞或树突状细胞相比，暴露于从被怀疑患有 ICAD 的个体身上提取的生物样品的 RF+ B 细胞或树突状细胞活性的变化表明患有 ICAD。较为理想的是，该变化是活性的增加。可以测定 B 细胞的活化，例如通过测定 B 细胞的增殖或者各种共刺激分子（例如 CD80 或 CD86）的表达或 MHC II 类分子的上调节。树突状细胞的活化可以通过多种方式加以评估，例如通过测定共刺激分子的表达，细胞因子例如 TNF- $\alpha$  的生产，或者树突状细胞表现型的变化。

在有一个实施方案中，本发明提供了一种体内模型系统，用于评价化合物或者试剂在治疗 ICAD 方面的功效。该模型系统包

括给 ICAD 模型动物(包括小鼠和大鼠模型)服用一种待测试剂,并测定在此类动物中 B 细胞或树突状细胞的活化和/或增殖和/或复合物与 Toll 样受体的结合,其中,如果活化减少则表明该试剂能够治疗 ICAD。可选地,人们可以使用表达 Toll 样受体的细胞系,并筛选调节(最好是抑制或阻断)此类受体的化合物。

本发明的其他方面将在下面进行描述。

## 附图说明

附图被插入到本申请的说明书中,并构成了本申请说明书的一部分;附图与说明书一起解释了本发明的实施方式,用于解释和说明本发明的目的、优点以及原理。在附图中,

图 1 表明 AM14 RF+ B 细胞的抗核小体抗体 (PL2-3)刺激对 Dnase 敏感。IgG2a 抗核小体抗体与从培养物的 B 细胞中释放出来的染色质相结合,以形成免疫复合物,所述免疫复合物可由 B 细胞通过其 IgG2a 特异性抗原受体所识别。在加入山羊抗小鼠 IgM F (ab')<sub>2</sub>, PL2-3 (IgG2a<sup>j</sup> 抗核小体 mAb)或 LPS 之前,将 AM14 RF+脾细胞与不同浓度的 DNase I (0, 5, 15 或 50 μg/ml)预培养 15 分钟。结果表示为在 Dnase 不存在的情况下对每种配体最大反应的百分比。

图 2A - 2B 表明抗 TNP/TNP-BSA IC 不能有效地刺激 AM14 RF+ B 细胞的增殖。将抗 TNP mAbs Hy 1.2 (IgG2a<sup>a</sup>) 和 C4010 (IgG2a<sup>b</sup>) 与不同浓度的 TNP-BSA [50 μg/ml (圆圈), 12.5 μg/ml (正方形), 3.1 μg/ml (上三角形)]相混合,以便形成抗体/蛋白质比例分别为 1:1、4:1 和 16:1 的 IC。在图 2A 中,通过 Clq 结合活性相对于未复合抗体(下三角形)的偏移而确认 IC 的形成。在图 2B 中,将上述抗 TNP/TNP-BSA IC 刺激 RF+ B 细胞增殖的能

力与抗核小体 mAb PR1-3、未复合的 Hy 1.2、C4010 或 50  $\mu\text{g/ml}$  TNP-BSA 所诱导的刺激相比较。

图 3 表明, RF+ B 细胞的自身抗体/自身抗原 IC 刺激不依赖于补体受体。利用山羊抗小鼠 IgM F(ab')<sub>2</sub>、CpG S-ODN 1826、抗核小体 mAbs PR1-3 (IgG2a<sup>j</sup>)、PL2-3 (IgG2a<sup>j</sup>)、PL2-8 (IgG2b) 或来自代表性自身免疫小鼠(lpr/gld 和 gld) 的 3%血清来刺激来自两种 WT 对照小鼠(灰色)、RF+CR+/+小鼠(白色)以及 RF+CR-/-小鼠(阴影线)的脾细胞。

图 4A-4C 表明, RF+ B 细胞的 autoAb/autoAg-IC 刺激依赖于 MyD88。在图 4A 中, 利用 B220 和个体基因型特异性抗体 4G7 对来自野生型 (WT) 和 RF+ MyD88-/-小鼠的被去除 T 的脾细胞进行染色。在图 4B 中, 通过 PCR 对 MyD88 WT 或敲除小鼠进行鉴定。在图 4C 中, 利用抗 IgM F(ab')<sub>2</sub>、CpG S-ODN 1826、抗核小体 mAbs PR1-3、PL2-3、PL2-8 或 3% lpr/gld 血清来刺激来自两种 WT (灰色)、RF+ MyD88+/+ (白色) 以及 RF+ MyD88-/-小鼠(阴影线)的脾细胞。抗 IgM 刺激的培养物的总 cpm 为 83,414/39,049 (WT); 93,126/61,315 (RF+ MyD88+/+) 以及 39,826/57,484 (RF+MyD88-/-)。结果被表示为抗 IgM 反应的百分比, 并代表了四个分开进行的实验。

图 5A-5C 表明, RF+ B 细胞的 autoAb/autoAg-IC 刺激可以被 TLR9 信号通路的抑制剂所阻断。在图 5A 中, 在加入刺激性配体抗 IgM F(ab')<sub>2</sub>、5-50  $\mu\text{g/ml}$  PL2-3、0.3-2.0  $\mu\text{g/ml}$  CpG S-ODN 1826、LPS 脂肽或孔蛋白 B 之前, 将 RF+ B 细胞与 1 或 2  $\mu\text{g/ml}$  的氯奎(a)预培养 15 分钟, 与 concanamycin B (b) 预培养 2 小时, 或与抑制性 CpG S-ODN 2088 (c) 预培养 30 分钟。在图 5B 中, 在加入刺激性配体之前, 将 RF+ B 细胞与 12  $\mu\text{g/ml}$  的 CpG S-ODN 2088 预培养 30 分钟。结果被表示为在抑制剂不存在的情况

下抗 IgM 反应的百分比。图 5A 和图 5C 中的数据代表了 2-4 个试验，而图 5B 是两个试验的平均值。

图 6A-B 示出了试验结果，在所述试验中，MyD88-缺陷型 (MyD88<sup>-/-</sup>) Fas-充足小鼠与 MyD88-充足 (MyD88<sup>+/+</sup>) Fas-缺陷型 (lpr/lpr) 自身免疫小鼠杂交，以产生 MyD88<sup>-/-</sup> lpr/lpr 小鼠以及合适的对照组。按照前述方法 (Rifkin et al., Journal of Immunology. 161: 5164 - 5170, 1998) 以 HEp-2 细胞为底物，通过间接免疫荧光法检测年龄匹配的 MyD88<sup>+/+</sup> lpr/lpr (图 6A) 和 MyD88<sup>-/-</sup> lpr/lpr (图 6B) 同窝小鼠 (12-13 周龄) 血清中的抗核抗体 (ANA)。来自患病的自身免疫 MRL-lpr/lpr 小鼠的血清作为阳性对照，来自非自身免疫 BALB/c 小鼠的血清作为阴性对照。该体内试验证明，在广泛使用的标准狼疮小鼠模型株系中，自身抗体的产生需要通过 MyD88 的信号传导。这强烈暗示，在该模型中 TLR 的活化对狼疮的发展是必需的。

在图 7A-7B 表明，B 细胞可通过 TLR9 而被活化，并且这种活化可以被 ODN 2088 导致的 TLR9 抑制所阻断。B 细胞从 MRL<sup>+/+</sup> 小鼠的脾脏中纯化得到，并与不同剂量的 ODN2088 (一种特异性地阻断通过 TLR9 的信号传导的抑制性寡聚脱氧核苷酸) 预培养 30 分钟，也可以不进行上述的预培养操作。然后向培养物中加入通过 B 细胞受体发挥活化作用的抗 IgM F (ab')<sub>2</sub> (抗 IgM) (7A)，或者通过 TLR9 发挥特异性活化作用的 (7B) 刺激性 ODN 1826。在 20-24 小时之后，向培养物中加入 <sup>3</sup>[H] 胸腺嘧啶核苷，在另外的 14-18 小时之后，通过检测胸腺嘧啶核苷的掺入而确定增殖，其中使用了 LKB Wallac 1212 Rackbeta counter。只有通过 TLR9 的刺激被 ODN 2088 阻断，这表明了抑制效果的特异性：由 B 细胞受体交联所诱导的刺激没有被抑制。

图 8A-8C 表明,树突状细胞可以通过 TLR9 被特异性地活化,并且这种活化可以被 ODN 2088 导致的 TLR9 抑制所阻断。

图 9 表明,ODN 2088 对含有染色质的免疫复合物所介导的 B 细胞增殖的抑制性效果是长期的。B 细胞从 MRL+/+小鼠的脾脏中纯化得到,并与 12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ODN 2088 (一种特异性地阻断通过 TLR9 的信号传导的抑制性寡聚脱氧核苷酸) 预培养 16-20 小时,也可以不进行上述的预培养操作。在预培养之后冲洗细胞以便将 ODN 2088 从培养物中除去,然后培养 B 细胞,或者单独用培养基培养,或者与新鲜的浓度为 12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ODN 2088 一起培养。三十分钟之后,向培养物中加入抗染色质单克隆抗体 PL2-3 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 或 LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。在 20-24 小时之后,向培养物中加入  $^3\text{[H]}$  胸腺嘧啶核苷,在另外的 14-18 小时之后,通过检测胸腺嘧啶核苷的掺入而确定增殖,其中使用了 LKB Wallac 1212 Rackbeta counter。

### 具体实施方式

本发明提供了用于治疗 and/或预防免疫复合物相关疾病 (ICAD) 的方法和组合物,用于患有 ICAD 的受试者或者 ICAD 高危受试者。

出于本发明的目的,术语“免疫复合物相关疾病”(immune complex associated diseases) 或“ICAD”的含义包括但不限于:系统性红斑狼疮 (SLE) 以及相关的结缔组织疾病、风湿性关节炎、丙型肝炎 (Hepatitis-C) 及乙型肝炎 (Hepatitis-B) 相关的免疫复合物疾病 (例如冷球蛋白血症)、贝切特氏病 (Behcets disease)、自身免疫肾小球性肾炎 (autoimmune glomerulonephritides) 以及与 LDL/抗 LDL 免疫复合物的存在有关的血管病变等疾病。

我们发现，含有自身抗原（例如染色质）的免疫复合物（immune complexes，以下简称为 IC），而不是含有外源抗原的 IC，能够活化自身反应性 B 细胞，并且这种活化依赖于含有自身抗原的 IC 与 B 细胞受体和第二种受体（一种 Toll 样受体）顺序结合的能力。这一发现在先天性免疫系统和获得性免疫系统之间建立了一种新的联系，并进而建立了一种一般性机制，对蛋白质/核酸自身抗原具有特异性的自身反应性 B 细胞通过该机制而被活化。

Toll 样受体（TLRs）是一个膜结合受体蛋白质家族，它们在先天性免疫反应中具有重要作用，识别与病原体有关的、看来是微生物所特有的分子模式（molecular patterns）或决定簇（determinants），并且参与活化免疫细胞以对抗这些微生物微粒的来源。

Toll 样受体家族在其胞外结构域上具有富含亮氨酸的重复序列，在其胞内结构域上具有 Toll / IL-1 受体同源结构域。Toll 家族在进化上是高度保守的。第一个被发现的成员是 toll 基因的产物，它是与果蝇 *Drosophila melanogaster* 早期发育阶段背腹极性形成有关的信号通路的一部分。

目前已经鉴定出了十种哺乳动物同源体，称为 TLR1 到 TLR10。IL-1 受体和 TLRs 具有相似的下流效应，例如免疫反应基因的活化；所有这些受体都通过信号级联（包括适配蛋白 MyD88）（Mussio et al., *Science* 278:1612; Wesche et al., *Immunity* 7: 837）发挥作用，此前 MyD88 被描述为髓样分化蛋白（Lord et al., *Oncogene* 5: 1095）。一般认为，不同的 TLRs 通过不同类型的微生物微粒活化（Hemmi et al., *Nature* 408: 740-745 (2000); Underhill et al., *Nature* 402: 39- 43 (1999); Aliprantis et al., *EMBO J.*, 19: 3325-3336 (2000)。但是有越来越多的证据表明，除了微

生物微粒以外，哺乳动物的 TLRs 也可以识别某些自身（哺乳动物）抗原，更具体地说，是细胞死亡所产生的、从细胞中释放出来的胞浆成分 (Akira et al., Nat. Immunol., 2: 675-680 (2000))。

此处，术语“Toll 样受体”的含义包括完整的 Toll 样受体，例如在 Online Mendelian Inheritance in Man 中所描述的登记号如下的 Toll 样受体：\*601194 TOLL 样受体 1, TLR1；\*603028 TOLL 样受体 2, TLR2；\*603029 TOLL 样受体 3, TLR3；\*603030 TOLL 样受体 4, TLR4；\*603031 TOLL- LIKE RECEPTOR 5, TLR5；\*605403 TOLL 样受体 6, TLR6；\*300365 TOLL 样受体 7, TLR7；\*300366 TOLL 样受体 8, TLR8；\*605474 TOLL 样受体 9, TLR9；and\*606270 TOLL 样受体 10, TLR10 或其功能性片段，例如 Toll 样受体的可溶形式，也就是膜结合结构域已经被去掉或已改变，在某些实施例中，胞内结构域也不存在，或者 Toll 样受体的 MyD88 结合或相互作用片段，或者能够与 MyD88 结合或发生相互作用的 Toll 样受体类似物。更为优选的 TLR 是 TLR 9。

通过在这方面所进行的实验，我们已经确证了 TLR9 和含有染色质的免疫复合物中的染色质成分之间的相互作用很重要。但是，在 SLE 以及相关疾病中，免疫复合物通常由自身抗体和不同的 RNA/蛋白质抗原复合物所形成，所述 RNA/蛋白质抗原复合物包括 Sm 抗原以及核内小核糖核蛋白(snRNP) (Tan, E. Adv. ImmunoL 44, 93 - 151 (1989))。此外，在免疫复合物相关疾病例如丙型肝炎中，致病的免疫复合物在抗体和含有 RNA 的病毒之间形成。已经证实 TLR3 是双链 RNA 的一种特异性受体 (Alexopoulou, Nature. 413, 732 - 738 (2001))。因此，可以合理地预测 TLR3 的结合在由这些含有 RNA 的免疫复合物所引发的活化过程中有重要作用。

优选的 TLR 是 TLR3 或者 TLR 9, 或者其功能性片段, 或者与 TLR3 或 TLR 9 同源并且能够与 MyD88 结合或发生相互作用的片段。

根据本发明的较为有用的 Toll 样受体也可以是融合受体, 其中, Toll 样受体与另一种蛋白质例如 Myc-tag 相融合。优选的 Toll 样受体包括: Toll 样受体 2 或 Toll/白细胞介素 1 样受体 4 (Toll/Interleukin-1 receptor-like 4) (Chaudhary, et al., Blood 91: 4020 - 4027, 1998), Toll 样受体 3 (Rock, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 588 - 593, 1998), Toll 样受体 9 (Chuang and Ulevitch, Europ.Cytokine Netw. 11: 372 - 378, 2000; Du, et al., Europ. Cytokine Netw. 11: 362 - 371, 2000), 或者其功能性片段, 或者具有类似功能 (例如与 MyD88 相结合) 的同源物。

此处所使用的术语“治疗”包括: (1) 阻止受试者感染此类疾病, 其中, 所述的受试者对于此类疾病易感, 但尚未被诊断为患有所述疾病; (2) 抑制此类疾病, 也就是阻止其发展; 或者 (3) 改善或者缓解此类疾病的症状, 也就是引发患病状态的消退。

这些化合物优先抑制 B 细胞 (BC) 或树突状细胞 (DC) 的活化, 在下面所讨论的体外或体内试验中, 其抑制作用至少为约 50%。这些化合物更为优先地抑制 B 细胞或树突状细胞通过 Toll 样受体的自身抗原活化, 其抑制作用为 75%, 最为的是 95%。在筛选试验中, 还鉴定并测试了其他一些化合物, 下面将对其进行更为详细的讨论。

根据本发明的较为有用的化合物选自一个组, 所述的组由与免疫复合物或 Toll 样受体的组成成分相结合的化合物所构成。这些化合物或者阻止所述免疫复合物的形成; 阻止自身抗原或者所述免疫复合物的自身抗原片段, 使其不能活化 Toll 样受体

(TLR), 或者阻止源自 Toll 样受体的下游分子信号传导, 例如通过 MyD88 介导的信号传导。此类化合物包括: Toll 样受体诱饵 (decoys), 抑制 MyD88 活性的化合物, 抑制免疫复合物成分的生产的化合物 (例如反意核苷酸), 负显性 TLR, Toll 样受体拮抗剂或阻断剂 (例如 ODN 2088 或抗 TLR 的抗体), 以及抑制信号通路的化合物, 其中所述信号通路由免疫复合物的自身抗原片段与 TLR 的结合或相互作用而活化。较为理想的是, 所述化合物与 Toll 样受体 TLR2、TLR3、TLR9 或其功能性结构域结合和/或抑制其功能。更为理想的是, 所述 TLR 是 TLR3、TLR9 或其功能性片段。

本发明还提供了有效的筛选方法, 以鉴定药理学试剂 (pharmacological agents) 或者抑制免疫复合物 (或其自身抗原成分) 与 TLR 结合的试剂的先导化合物 (lead compound), 优选为 TLR2、TLR3、TLR9 或其任意组合, 最为优选的是 TLR3 或 TLR9。所述方法适用于自动化的较为经济的高通量药物筛选, 并且在很多药物发展项目中有直接的应用。

一般来讲, 这些筛选方法涉及对化合物的试验, 其中所述化合物调节与 TLR 的自身抗原相互作用, 优选为 TLR2、TLR3、TLR9 或其任意组合, 最为优选的是 TLR3 或 TLR9。同样, 更为理想的是, 所述化合物调节与 TLR9 的自身抗原相互作用。还提供了多种用于结合试剂 (binding agents) 的试验, 包括标记式体外蛋白-蛋白结合试验, 免疫试验, 基于细胞的试验等。

体外结合试验中使用一种由多种成分构成的混合物, 包括 TLR 多肽, 优选为 TLR2、TLR3、TLR9 或其任意组合, 最为优选的是 TLR3 或 TLR9, 更进一步优选的是 TLR9, 它可以是与另一种肽或多肽所形成的融合产物的一部分, 例如用于检测或锚定的标签。试验中所采用的上述混合物中也可以包含天然的细胞内

TLR 结合靶标，例如 MyD88。虽然可以使用天然的全长结合靶标，但通常较为优选的是使用其某些部分（例如肽），只要所述的部分提供了与受试者 MyD88 多肽的结合亲和力（affinity and avidity）并且所述亲和力在试验中可以很方便的测量即可。试验中所采用的混合物中也可以包含候选的药理学试剂。候选试剂覆盖多种化学类别，虽然它们通常是有机化合物；较为优选的是小分子有机化合物，可由多种来源获得，包括合成化合物库或天然化合物库。所述混合物中也可以包含很多其他试剂。这些试剂包括盐、缓冲剂、中性蛋白（例如清蛋白）、去污剂、蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗菌剂等。

所获得的混合物在一定条件下（在候选药理学试剂的存在下）进行温育，使得 TLR 多肽与细胞的结合靶标、部分或类似物以参考值的结合亲和力发生特异性的结合。所述混合物的成分可以以任何适当的顺序加入，但要能提供必需的结合；温育可以在任何有利于使结合效果最佳的温度下进行。同样可以对温育时间进行选择，以便使结合效果最佳，但也应使之尽量短，以便有利于使筛选过程更快、产率更高。

在温育之后，通过任何方便的手段将 TLR 多肽与一种或多种结合靶标的结合检测出来，其中所述结合是对试剂有选择性的（agent-biased）。在不存在所述试剂的情况下所述 TLR 多肽对靶标的结合亲和力与存在所述试剂情况下的结合亲和力之间的差别说明，所述试剂调节 TLR 多肽与所述 TLR 结合靶标之间的结合。类似地，在下面所描述的基于细胞的试验中，在试剂存在和不存在的条件下 TLR 依赖型转录活化之间的差别说明所述试剂调节 TLR 的功能，例如与 MyD88 的结合。此处所使用的术语“差别”是指在统计学上具有显著性，并且优选为代表至少 50%，更优选为至少 75%，再进一步优选为至少 90% 的差别。

在检验药理学试剂阻断 B 细胞或树突状细胞活化的能力的优选试验中，包括 RF+ B 细胞或树突状细胞，将其与待测试剂和 TLR 刺激剂例如 PR1-3、PL2-3 或 CpG S-ODN 1826 (参见 Leadbetter et al., Nature, 416: 603 - 607, 2002)在适当的细胞培养基中进行温育。可以在加入刺激剂之前或者在加入刺激剂的同时，进行与待测试剂的温育。

可以通过本领域技术人员公知的多种技术观察到 B 细胞的活化。例如，可以通过 <sup>3</sup>[H] 胸腺嘧啶核苷掺入试验检测 B 细胞的增殖。或者也可以通过荧光激活细胞分类术 (FACS)分析 B 细胞的活化，以检测某些物质在细胞表面的表达，例如 CD80、CD86 或 MHC II 类分子。树突状细胞的活化可以通过检测细胞因子，例如 TNF- $\alpha$ 、干扰素  $\alpha$ 、IL-12 以及 BAFF，或者共刺激分子，例如 CD80、CD86 或 MHC II 类分子，的生产而观察到(Banchereau, et al., Annu. Rev. Immunol. 18: 767 - 811, 2000 ; Mackay and Browning, Nat. Rev. Immunol. 2: 465 - 475)。

树突状细胞的活化也可以通过检测 DC 的形态变化而观察到 (Banchereau, et al., Annu. Rev. Immunol. 18: 767 - 811, 2000)。

如果对表达 (例如共刺激分子) 的刺激由于加入了待测试剂而减小，那么就可以认为该待测试剂是一种可能用于治疗 ICAD 的试剂。与未加入待测试剂的细胞样品相比，如果表达量减少了至少约 50%，更优选为至少约 60 - 75%，最优选为至少约 90%，那么可以认为表达量减少了。更具体的细节将在本部分末尾的实施例部分中给出。

在实施例中描述了本发明优选的试验混合物。本发明的试验混合物中也包含候选的药理学试剂。一般来讲，多种试验混合物与不同浓度的候选试剂平行地进行试验，以便获得对各种浓度的

不同反应。典型地，以这些试验混合物中的一种作为对照，也就是浓度为零或者在试验所能检测的限度以下。候选试剂覆盖多种化学类别，虽然它们通常是有机化合物，较为优选的是小分子有机化合物。例如，较为合适的小分子有机化合物的分子量可以大于约 50 但小于约 2,500。候选试剂可以包含与蛋白质和/或 DNA 相互作用的化学官能团。

候选试剂由多种来源获得，包括合成化合物库或天然化合物库。例如，现有多种手段用于随机地或定向地合成很多有机化合物和生物分子，包括随机化寡核苷酸和肽的表达。作为另一种选择，细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库也可以得到，或者可以很容易地生产出来。库可以由较小的多肽（参见例如 Lam et al., *Nature*, 354: 82, 1991 以及 WO92/00091; Geysen et al., *J Immunol Meth*, 102: 259, 1987; Houghten et al., *Nature*, 354: 84, 1991 以及 WO92/09300 以及 Lebl et al., *Int J Pept Prot Res*, 41, 201, 1993)。作为另一种选择，非肽小分子库可以基于共同的模板或核心结构（例如，苯并二氮模板参考 Ellman and Bunin, *J Amer Chem Soc*, 114: 10997, 1992; 唑酮和 aminidine 模板参考 WO 95/32184; 苯并二氢吡喃 (dihydrobenzopyran) 模板参考 WO 95/30642, 四氢吡咯模板参考 WO95/35278)。

此外，可以通过常规的化学、物理以及生物化学手段很容易地对天然的以及合成的库和化合物进行修饰。而且，可以对已知的药理学试剂进行定向的或随机的化学修饰，例如酰化、烷基化、酯化、amidification 等。

抗体，以及能够与免疫复合物成分相结合并阻止形成或 TLR 结合的所述抗体的结合片段或适体 (aptamers) (例如可从 SomaLogic Inc., Boulder, CO 获得) 也是有用的。根据本发明的有用的抗体实例包括抗 TLRs 的单克隆抗体，例如抗 TLR3 的单克

隆抗体 (Matsumoto et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293: 1364 - 1369, 2002), 抗 TLR-9 (Toll 样受体 9, Imgenex, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)或其人化版本 (humanized versions)。

此处所使用的术语“负显性 Toll 样受体”是指被工程化从而具有某种缺陷, 例如下游信号传导所需的结构域缺失, 但能结合免疫复合物的抗原部分的 Toll 样受体。

抗体及其结合片段可以是多克隆的或单克隆的, 但优选为单克隆的。如果是多克隆的, 那么抗体的形式可以是抗血清或者单一特异性的抗体, 例如用经纯化的蛋白质免疫动物而制得的纯化的抗血清。但是优选为单克隆抗体, 以便使给予个体的外源蛋白质最少。可以根据公知的试验方法制备单克隆抗体。参见例如 Skare et al., *J Biol. Chem.* 268: 16302 - 16308 (1993); 以及美国专利 4,918, 163 和 5,057, 598, 此处以引用的方式将其包括在本文中。抗体可以是完整抗体、Fab's、单链、单结构域重链等。单链抗体是优选的。在美国专利 4,946, 778 中详细地描述了单链结合多肽的制备方法, 此处以引用的方式将其包括在本文中。

当使用抗体或其他蛋白质或肽时, 肽最好与载体相偶联, 所述载体的实例包括生物素或聚碱性氧化物 (例如聚乙二醇)。可以使用多种聚合物, 例如葡聚糖、聚乙烯基砒络烷酮、多糖、淀粉、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或其他类似的聚合物。聚碱性氧化物 (poly (alkylene oxide)) 可以包括单甲氧基聚乙二醇、聚乙二醇、聚乙二醇嵌段共聚物等。作为聚碱性氧化物的聚乙二醇是优选的。聚合物的末端也可以由 C<sub>1-4</sub> 的烷基而不是单甲氧基进行加帽 (capped)。

对于人类的给药而言, 例如作为体内治疗组合物的一种成分, 单克隆抗体最好基本是人源的或者是人化的以便使免疫原性

最小，并且最好基本是纯净的。“基本是人源的”是指所述组合物的免疫球蛋白部分通常含有至少约 70% 人类抗体序列，优选为至少约 80% 人类抗体序列，最优选为至少约 90-95% 或更大比例的人类抗体序列。

在治疗实践中，所述化合物可以被适当地给予受试者例如哺乳动物，特别是人，可以单独给予或者作为药物组合物的一部分给予，所述药物组合物中包含所述化合物以及一种或多种可接受的载体以及可以选择加入的其他治疗成分。所述载体在与制剂的其他成分相容方面必须是“可以接受的”，并且对其接受者无害。

本发明的药物组合物包括那些适用于口腔、直肠、鼻腔、局部（包括口腔和舍下）、阴道、非肠道（包括皮下、肌肉、静脉内以及皮下）、眼部（使用滴眼液）、经肺给药（使用气雾剂化或雾状药物）的组合物。制剂可以以单位剂量的形式方便地给予，例如药片和缓释胶囊以及位于脂质体中，可以通过制药领域公知的任何方法制备这些制剂（参见例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy by Alfonso R. Gennaro (Ed.) 20th edition, December 15, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins; ISBN: 0683306472.）。

此类制备方法包括一个步骤，在该步骤中，使待给予的分子与诸如载体之类的成分相互联系，其中所述成分构成了一种或多种添加剂。一般来讲，通过使活性成分与液态载体、脂质体或粉碎得很细的固态载体或两者均一而密切地相互联系，从而制备所述组合物；然后，必要时可以对产品进行成形。

本发明适用于口腔给药的组合物可以以不连续单位（discrete units）的形式给予，例如胶囊、扁胶剂（cachets）或药片，其中的每一个含有预定量的活性成分；可以作为粉末或颗粒；可以作

为水性液体或非水性液体的溶液或悬浊液；或者作为水中油液体乳浊液或油中水液体乳浊液，或者包装在脂质体中，以及作为大药丸等。

药片可以通过挤压或成型（molding）而进行制备，可以选择性地加入一种或多种辅助成分。挤压的药品可以通过在合适的机器中挤压自由流动形式（例如粉末或颗粒）的活性成分而获得，可以选择性地与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂进行混合。成型的药品可以通过在合适的机器中对已用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物进行成型而获得。可以选择性地对药品进行包被或划线；可以对其进行配制，以便使其较慢地或持续地释放其中所含有的活性成分。

适用于局部给药的组合物包括：锭剂（lozenges），其中包含带有味道的成分，通常是蔗糖、阿拉伯树胶或黄蓍胶；以及软锭剂（pastilles），其中包含惰性成分，例如明胶和甘油，或者蔗糖以及阿拉伯树胶。

适用于非肠道给药的组合物包括：水性和非水性的无菌注射溶液，其中可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使得该制剂与预期服药者的血液等渗的溶质；水性和非水性的无菌悬浊液，其中可以包括悬浮剂和增稠剂。制剂可以以单位剂量或多剂量容器的形式给予，例如密封的安瓿和管形瓶；可以储存在冰冻干燥（冻干）条件下，仅需要在马上就要使用之前加入无菌的液态载体例如水以便用于注射。现成可用的（Extemporaneous）注射溶液和悬浊液可以由无菌粉末、颗粒和药片制得。

应当理解，在给定的治疗中所使用的给定化合物的实际优选量将会根据多种因素而有所变化，例如所使用的具体化合物，所配制的具体组合物，应用方式，给药的具体位置，患者的体重、

一般健康状况、性别等，有待治疗的具体指征（indication）等，以及可以被本领域普通技术人员所认知的其他此类因素，包括巡诊医师或兽医。对于给定的给药方案而言，本领域普通技术人员可以通过常规的剂量确定试验而容易地确定最佳的给药量。

本发明还提供了诊断个体是否患有 ICAD 的方法。该方法包括测定由 Toll 样受体所介导的、由生物样品所诱导的 B 细胞或树突状细胞活化，其中，所述生物样品中含有免疫复合物，所述免疫复合物由自身抗原和自身抗体所构成。B 细胞 Toll 样受体的活化可以直接测定，例如通过测定 B 细胞的增殖、各种共刺激分子例如 CD80 或 CD86 的表达或 MHC II 类分子的上调节。树突状细胞 Toll 样受体的活化可以通过多种方式测定，例如通过观察经/不经特异性染色后树突状细胞的形态变化，或者通过测定共刺激分子例如 CD80 或 CD86 的表达，或者通过测定活化标志物例如 CD69 的上调节，或者通过测定趋化因子例如 CCR7 的上调节，或者通过测定细胞因子例如 TNF- $\alpha$  的生产，可以使用多种不同的技术，包括检测 mRNA 或蛋白质的水平。

例如，TNF- $\alpha$  表达的变化可以利用从树突状细胞中所分离到的 RNA 来加以测定。RNA 定量方法包括基于聚合酶链式反应 (PCR) 的方法，例如 TaqMan system (Applied Biosystems), Brilliant Quantitative PCR (Stratagene), Platinum quantitative PCR (Resgen, Inc. )。RNA 是从生物样品例如血液样品中分离出来的，所述生物样品来自被怀疑患有 ICAD 的个体。Toll 样受体 mRNA 的量利用诸如前面所列出的方法进行测定，并与来自对照个体的样品进行比较。

较为理想的是，利用诸如 FACS 分析等试验来测定共刺激分子蛋白质的表达。如果这些共刺激分子的表达量增加，那么就表

明该个体已经感染了 ICAD。如果试验表明，与对照样品相比，共刺激分子的量增加至少约 5%，那么就认为活性增加了。

或者，将来自被怀疑患有 ICAD 的待测个体的血清注射到细胞培养物中，所述细胞培养物表达功能性 Toll 样受体通路。然后平行地测定经对照血清和待测受试者的血清处理过的细胞培养物中 Toll 样受体的活性。与经对照血清处理的细胞相比，如果经待测个体的血清处理过的细胞中的 Toll 样受体活性增加，那么这说明该个体已经感染 ICAD。如果与对照样品相比表达量增加了至少约 5%，那么就认为表达量增加了。

应当理解，尽管本发明是参照其特定的优选实施例来描述的，但是前面的描述以及后面要描述的实施例都是出于解释和说明的目的，而不是对本发明范围的限制。对于本领域的技术人员而言，在本发明的范围内，其他的方面、优点和修改将是清楚明了的。

### 实施例 1

自身反应性 B 细胞存在于健康个体的淋巴组织中，但通常处于静止状态 (quiescent)。当这种动态平衡被打破时，自身反应性抗体的形成可能会产生严重的病理效应。表达对自身 IgG 具有特异性的抗原 - 受体的 B 细胞制造一类被称为类风湿因子 (rheumatoid factor, 以下简称为 RF) 的自身抗体。此处我们证明 RF+ B 细胞的有效活化是通过 IgG2a/染色质免疫复合物介导的，并且需要所述抗原 - 受体和 MyD88 依赖型 Toll 样受体家族成员的顺序结合。这些数据在系统性自身免疫疾病的发展上，在先天性免疫系统和获得性免疫系统之间建立了一种新的联系，并解释了对核酸/蛋白质微粒具有反应性的自身抗体为何占优势。这种双结合通路 (dual-engagement pathway) 独有的特性应该有助于特异性地将自身反应性 B 细胞作为靶标的疗法的发展。

目前我们已经发展出了一种体外系统模型，用于分析在自身免疫疾病中自身反应性 B 细胞和树突状细胞的活化所涉及的因子。在红斑狼疮易感性 lpr 小鼠中，一种常见的特异性自身抗体是类风湿因子 (RF)。RFs 是能够与自身 IgG 进行反应的抗体。在自身免疫的小鼠品系中，RF B 细胞被活化，数量增多，并分化为可分泌抗体的细胞，但是在没有自身免疫背景的小鼠中则没有上述现象。为了研究该病理活化过程所涉及的机理，我们研究了从小鼠脾脏中获得的原代 RF+ B 细胞，此处所使用的小鼠已经被基因工程化以表达一对转基因，所述的转基因可以使其具有对大部分 B 细胞有特异性的某种 RF。这些 B 细胞是 SLE 患者体内所发现的自身反应性 B 细胞的原型。

最初的时候，我们证明了这些 RF+ B 细胞被来自自身免疫小鼠的血清样品所活化，但来自非自身免疫小鼠的血清不能使其活化 (Rifkin et al, 2000)。我们又进一步证明了血清中的刺激因子实际上是 IgG2a。但是，从非自身免疫的血清中所分离出来的数量相当的 IgG2a 却没有刺激作用，这表明并不是所有的 IgG2a 都足以刺激 RF+ B 细胞。因此，我们认为自身免疫的血清中的 IgG2a 具有独特的性质。为了进一步鉴定出有关的 IgG2a 成分，我们使用了 IgG2a 的单克隆抗体 (mAbs)，并证明了对自身抗原，例如 DNA-组蛋白复合物，有特异性的 mAbs 具有刺激作用，而对外源抗原或非自身抗原具有特异性的抗体不具有刺激作用。

接下来我们考虑了自身抗体/自身抗原免疫复合物是相关成分的可能性。当使用血清和 mAbs 的实验在 DNase 的存在下进行，RF+ B 细胞的刺激被显著减弱 (图 1)。这些数据暗示，DNA 骨架的断裂导致了自身抗体/自身抗原 (DNA)免疫复合物的解离。这清楚地表明自身抗原/自身抗体免疫复合物具有独特的性质，优先活化自身反应性 B 细胞。含有非自身抗原的免疫复合物不能活化自身反应性 B 细胞，如图 2 所示。

我们研究了自身抗体/自身抗原免疫复合物能够与第二个受体相结合的可能性，而这种结合有助于 RF B 细胞的活化。最近的研究表明，被称为 Toll 样受体 (TLR) 的蛋白质家族可以与细菌 DNA 相结合，并导致巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞的活化，因此，我们考虑了 TLR 在这些自身反应性 RF B 细胞的活化中发挥作用的可能性。目前，TLR 是一个很热门的研究领域，已经证明 TLR 与很多病原体相关分子模式 (PAMPS) 的结合和识别有关，因此，与先天性免疫反应的这种关联将是自身免疫的一种很独特的联系。所有已知的哺乳动物 TLR 都通过适配器蛋白 MyD88 进行信号传导。通过基因工程将小鼠的 MyD88 敲除，在这种小鼠中，TLR 介导的活化被严重破坏，并且通过 TLR9 介导的信号被完全破坏。我们将 RF+转基因小鼠与 MyD88<sup>-/-</sup>背景进行杂交。所得到的小鼠对 RF 转基因而言是阳性的 (图 4A)，但缺乏 MyD88 信号分子(图 4B)。

我们发现，RF MyD88<sup>-/-</sup>小鼠不能对任何一种能刺激 RF MyD88<sup>+/+</sup> B 细胞增殖的自身抗体做出反应 (参见图 4C)。我们测试了多种形式的自身抗体：血清、抗核小体抗体和抗 Sm 抗体。这与如下假设是一致的，即：自身抗体/自身抗原免疫复合物中含有重复模式成分 (repeating pattern components)，例如 DNA 或 RNA，其能与 Toll 受体在 B 细胞内部(DNA/TLR9) 或 B 细胞表面 (RNA/TLR3)相结合。对于自身反应性 RF+ B 细胞而言，自身抗体/自身抗原免疫复合物可能与 BCR 和 TLR 顺序结合，导致增强的活化和增殖。这是 BCR 和 TLR 的共结合(co-engagement) 能够导致自身反应性 B 细胞活化的第一个证据。这种联系在自身免疫和人体的先天性免疫反应之间提供了一种很独特的联系，可以为自身免疫疾病，例如 SLE 和类风湿性关节炎，中的很多病原反应提供一种初始机制。

后续研究表明，已知的通过刺激性 CpG ODN 通过 TLR9 阻断 B 细胞活化的药物，例如氟奎及 concanamycin A，能够完全阻断含有染色质的 IC 刺激 RF+ B 细胞的能力。这种反应也可以被抑制性 CpG ODN 阻断，而抑制性 CpG ODN 通过 TLR9 特异地抑制活化。这些数据表明，TLR9 在自身反应性 B 细胞的活化中是一个重要的受体。这些数据表明，免疫复合物中的 IgG 成分与 BCR 相结合，导致免疫复合物的内化 (internalization) 以及向内部囊泡的运送。接下来，TLR9 在该内部囊泡中被 IC 的染色质成分所结合，从而导致 B 细胞的活化。对生物利用度 (availability) 的增强以及由此而来的对染色质本身的摄取 (SLE 的易感性因子) 有贡献的因子，也能通过类似的机制导致 B 细胞的活化。值得注意的是，抗染色质的抗体是在 SLE 患者以及自发性 SLE 动物模型的血清中可被最先检测到的自身抗体。

## 实施例 2

受 SLE 和其他系统性自身免疫疾病困扰的患者会产生多种特异性自身抗体。这些自身抗体非常频繁地结合到染色质或其他亚细胞核酸/蛋白质微粒上 (Tan, E. Adv. Immunol. 44, 93 - 151 (1989))。MRL/lpr 小鼠是一种研究得较为透彻的用于系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎的鼠类模型，它也产生非常高滴度的 IgG 抗 IgG 类风湿因子 (RF) (Theofilopoulos, et al., J. Exp. Med. 162, 1 - 18 (1985); Wolfowicz, et al., Clin. Immunol. Immunopath. 46, 382 - 395 (1988))。这种 RF 反应为研究自身抗体的调控提供了高度相关的转基因模型。AM14 转基因小鼠种系的 B 细胞表达对 IgG2a<sup>a/j</sup> 具有特异性的抗原受体，其最初是从患病的 MRL/lpr 小鼠的脾脏中作为杂交瘤产品而获得的 (Shlomchik, et al., Int. Immunol. 5, 1329 - 1341 (1993))。AM14 对于单体 IgG2a 的同种异型特异性和相对较低的亲和力，对于与 RF 库 (repertoire) 有关的疾病来说是很典型的 (Jacobson, et al., J. Immunol. 152, 4489

- 99 (1994) )。在野生型小鼠中, AM14 RF+ B 细胞发育正常, 并且保持功能上的幼稚状态 (naive) (Hannum, et al., J. Exp. Med. 184, 1269 - 1278 (1996) )。但是, 在同种异型的易发自身免疫 lpr 的背景下, 它们被活化, 发生增殖并且分泌自身抗体 (Wang, and Shlomchik, J Exp. Med. 190, 639 -649 (1999) )。某些因子可能对于 lpr 小鼠的 AM14 B 细胞的活化具有一定作用, 其中, 自身抗原 IgG2a 的状态起到了较为重要的作用。

### RF+ B 细胞被自身抗体/自身抗原免疫复合物所活化

前面我们已经表明, AM14 RF+ B 细胞可以在体外被 IgG2a<sup>aj</sup> 所活化, 其中的 IgG2a<sup>aj</sup> 是从自身免疫小鼠的血清中分离得到的; 但是, 水平相当的、存在于野生型小鼠血清中的 IgG2a 却不能将其活化 (Rifkin, et al., J. Immunol. 165, 1626 - 1633 (2000) )。我们也发现, RF+ B 细胞可以在对亲和纯化的对核小体 (一种自身抗原) 具有特异性的 IgG2a<sup>j</sup> mAbs 做出反应时迅速增殖, 但是, 对于半抗原或其他外源抗原具有特异性的 IgG2a<sup>aj</sup> mAbs 却只能做出很弱的反应 (如果有的话) (Rifkin, et al., J. Immunol. 165, 1626 - 1633 (2000) )。这些研究表明, 由 IgG2a 核小体特异性 mAbs 和从共培养细胞中释放出来的染色质片段所形成的免疫复合物 (IC) (Emlen, et al., J. Immunol. 148, 3042 - 3048 (1992) ) 能够有效地活化 RF+ B 细胞, 而单体状态的抗半抗原 IgG2a 抗体却不能。为了进一步测试这一假设, 向实验用培养基中加入 DNase 以破坏假定的 IC。纯化的抗核小体 mAb PL2-3 (Monestier and Novick. Mol. Immunol. 33, 89 - 99 (1996) ) 或自身免疫血清通常所能引发的强烈的增殖反应被显著减弱 (图 1)。DNase 非特异性的毒性并不是其中的一个因素, 因为对 F(ab')<sub>2</sub> 抗-IgM 和 LPS 的反应并未受到影响 (图 1)。这些数据证实了 RF+ B 细胞对含有 DNA 的 IgG2a IC 做出反应, 而对单体状态的 IgG2a 抗体不能单独做出反应。

如果 IgG2a IC 对 RF+ B 细胞的活化仅仅是因为抗原抗体交联的效果比单体状态的 IgG2a 可能的效果更好的话,那么常规的抗-半抗原/半抗原-蛋白质复合物也应该强烈地刺激 RF+ B 细胞。为了解决这一问题,将 IgG2a 抗 TNP 的单克隆抗体与不同浓度的 TNP-BSA 进行预培养,从而制备 ICs;通过 C1q 结合活性的增加而证实复合物的形成(图 2a)。正如原来所期望的那样,C4010(一种 IgG2a<sup>b</sup> 抗 TNP mAb)的 IC,在各种抗 TNP / TNP-BSA 比例下均不能刺激 RF+ B 细胞。令人意外的是,与含有抗核小体 mAb 的 IC 所引发的增殖反应相比,Hy1.2(一种 IgG2a<sup>a</sup> 抗 TNP mAb)的 IC 仅仅引发了很温和的增殖反应。这一差异表明,由 IC 所引发的 RF+ B 细胞增殖的程度取决于抗体和(自身)抗原的性质。

#### 由 IC 所引发的活化不依赖于补体受体的共结合

对于抗核小体 IC 和抗 NTP IC 在刺激能力上的这一巨大差异,一种可能的解释是,只有前者能够协同地与 B 细胞受体(BCR)和位于 B 细胞表面的第二个受体相结合。一种潜在的候选受体是补体受体 CD21,因为已经表明,补体成分可以与自身抗原 IC 相结合,并且理论上能够与 CD19/CD21 和 BCR 有效地共结合(Carter et al., J Immunol. 141, 457 - 463 (1988))。但是,当 AM14 重链和轻链转基因物(transgenics)被杂交(breed)到缺乏 CR1/2Cr2 的小鼠(Aheam, et al. Immunity 4, 251 - 262 (1996))中时,来自 CR1/2-缺乏和 CR1/2-充足的同窝小鼠的 RF+ B 细胞对 IgG2a 抗核小体 mAbs 和自身免疫血清的反应大致相当(图 3)。来自作为对照的 RF-同窝小鼠的 B 细胞不能对任何形式的 IgG2a 做出反应,证实了在本研究中所采用的配体的特异性。包括致有丝分裂的甲基化不足的 CpG 寡聚脱氧核苷酸,它在此处用作对照刺激。这些数据表明,对于 RF+ B 细胞对自身抗体/自身抗原 IC 做出反应来说,补体受体并不是必需的。

## MyD88 依赖性受体的作用

潜在的候选受体包括 Toll 样受体 (TLR) 家族的成员。这些模式识别受体 (pattern recognition receptor) 最早是在果蝇 *Drosophila* 中被描述的, 已经证明它们能在果蝇中引发抗真菌肽的释放 (Lemaitre et al., Cell 86, 973 - 983 (1996))。人们发现, 后来被确认的哺乳动物同源物能够识别一系列保守的微生物产物 (也就是 LPS、微生物脂蛋白以及甲基化不足的 CpG DNA), 后者被称为病原体相关的分子模式 (pathogen associated molecular pattern, 简称为 PAMPs) (Medzhitov, et al., Nature 388, 323 - 324 (1997); Akira, et al., Nat. Immunol. 2, 675 - 680 (2001))。最初的研究重点是微生物产物对先天性免疫系统的细胞的效果, 此前人们发现, 这些微生物产物能够刺激很多炎症调节因子 (inflammatory mediators) 的释放 (Akira, et al., Nat. Immunol. 2, 675 - 680 (2001))。但是, 后来证明除了外源性微生物配体之外, TLRs 也能够识别从损伤的哺乳动物细胞或胁迫状态下的哺乳动物细胞中释放出来的内源性配体 (Li, et al., J Immunol. 166, 7128 - 7135 (2001))。所有已知的哺乳动物 TLRs 信号通路都使用适配器蛋白 MyD88 (Akira, et al., Nat. Immunol. 2, 675 - 680 (2001)), 但是对于 TLR4 而言, 已经描述了另外一种不依赖于 MyD88 的通路 (Horng, et al., Nat. Immunol. 2, 835-841 (2001))。

为了研究 TLRs 在介导 RF+ B 细胞对自身抗体/自身抗原 IC 所做出的反应中的潜在作用, 我们将 AM14 转基因交叉到 MyD88<sup>-/-</sup>背景上 (Adachi, et al., Immunity 9, 143 - 150 (1998))。对来自 RF- MyD88<sup>+/+</sup> (野生型), RF+ MyD88<sup>+/+</sup> 以及 RF+ MyD88<sup>-/-</sup> 子代的 B 细胞 (通过将 PCR 和 FACS 分析结合在一起进行鉴定 (图 4A - 4B)) 进行检测, 分析它们对抗 IgM, CpG ODN, LPS, 以及一组 (panel) 抗核小体 mAbs 和自身免疫血清的反应能力。来自 MyD88 缺乏型小鼠的 B 细胞能够对抗 IgM 做出正常的反应, 但

不能对刺激性 CpG DNA 做出反应 [Hacker, et al., *J. Exp. Med.* 192, 595 - 600 (2000)]。它们对 LPS 的反应要比野生型小鼠低的多, 但仍然是可以检测到的, 这与通过 MyD88 的部分活化是一致的; 它们只对 LPS 做出较弱的反应, 已经公知, LPS 是部分地通过不依赖 MyD88 的机制产生刺激 (Horng, et al., *Nat. Immunol.* 2, 835 - 841 (2001)) (图 4C)。最值得注意的是, 来自 RF+ MyD88 缺乏型小鼠的 B 细胞完全不能对抗核小体 mAbs PR1-3 或 PL2-3 或任何一种能有效刺激 RF+ MyD88 +/+ B 细胞的自身免疫血清做出反应(图 4C)。这些结果清楚地表明自身抗体/自身抗原 IC 对于 RF+ B 细胞而言刺激特别强, 因为它们能够协同地与 BCR 和 MyD88 依赖性受体相结合。

甲基化不足的 CpG 模体 (motifs) 是细菌 DNA 的共同特征, 但它们也存在于哺乳动物 DNA 的启动子元件中 (Singal and Ginder. *Blood* 93, 4059 - 4070 (1999))。由于 B 细胞对 CpG 寡聚脱氧核糖核苷酸 (ODN) 的反应是通过 TLR9 来介导的 (Hemmi, et al., *Nature* 408, 740 - 745 (2000)), 因此我们假定含有染色质的 IC 能够通过 TLR9 的共结合而刺激 RF B 细胞。TLR9 介导的对 CpG S-ODN 的反应与其他已知的 TLR 信号通路是不同的, 其区别特征在于其对内体酸化和/或成熟的假定的要求, 这一点可以通过对氯奎和氯化铵的敏感性而确定 (Yi, et al., *J. Immunol.* 160, 4755-4761(1998); Hacker, et al., *EMBO J.* 17, 6230 - 6240 (1998))。Concanamycin B 和 bafilomycin A 是负责内体酸化的 V 型 ATPase 的特异性抑制剂 (Benaroch, et al., *EMBO J.* 14, 37 - 49 (1995))。为了研究 TLR9 在 RF+ B 细胞活化中的作用, 对氯奎、concanamycin B、bafilomycin A 和氯化铵对 mAb PL2-3 以及已知的 TLR2 (脂蛋白, 孔蛋白 B) (Massari, et al., *R Immunol.* 168: 1533 - 1537, 2002)、TLR4 (LPS) 以及 TLR9 (CpG S-ODN 1826) 配体的刺激能力的作用进行了测定。正如原来所期望的, 氯奎抑

制了 CpG S-ODN 反应，而且这些抑制剂对 TLR2 和 TLR4 配体的反应作用很小。值得注意的是，所有四种能够阻断氯奎的试剂也抑制 RF+ B 细胞对 mAb PL2-3 的反应 (图 5A、图 5B)。与氯奎的这种联系是很有意思的，因为氯奎是治疗包括类风湿性关节炎和 SLE 在内的自身免疫疾病的有效手段 (Canadian Hydroxychloroquine Study Group, *N. Engl. J Med.* 324,150 - 154 (1991); Furst, et al., *Arth. Rheu.* 42, 357 - 365 (1999))。因此，我们的数据表明，氯奎的治疗效果至少部分地来源于其干扰 TLR 介导的信号的能力，而所述信号对于自身抗体的产生或者前炎症调节因子 (proinflammatory mediators) 的产生是有作用的。

B 细胞对刺激性 CpG S-ODN 1826 的反应也可以被一组紧密相关的抑制性 CpG S-ODN 所阻断，例如 S-ODN 2088 (Lenart, et al., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 4,247 - 256 (2001))。我们发现，S-ODN 2088 严重抑制了对 S-ODN 1826 的增殖反应，但对于抗 IgM 或我们的 TLR2 和 TLR4 配体的反应则没有效果(图 5C、图 5B)。最为重要的是，S-ODN 2088 也显著地阻断了 RF+ B 细胞对 mAb PL2-3 的反应。总的来说，这些数据强烈地暗示了在 RF+ B 细胞的活化中，内涵体处理和/或内涵体相关 TLR (最有可能的是 TLR9) 的结合。

已经清楚地表明，自身反应性 B 细胞克隆可以经历类别转换 (isotype switching) 和体细胞突变 (somatic mutation)，这与 B 细胞对外源抗原的常规反应所具有的 T 依赖性的特征很相似 (Shlomchik, et al., *Nature* 328, 805 - 811 (1987))。但是，最近的研究报告暗示，自身反应性 B 细胞可以在外周淋巴组织中与常规 B 细胞分隔开；自身反应性 B 细胞往往定位于脾脏骨髓<sup>26</sup>的边缘区域 (Zeng, et al., *J. Immunol.* 164, 5000 - 5004 (2000))，而常规 B 细胞则通过归巢作用迁移至滤泡区域。此外，在某些情况下，自身反应性 B 细胞的扩张和体细胞突变也可以发生在生发中心

(germinal center) 的外面。这些离散的定位模式可以反应出刺激性自身抗体/自身抗原 IC 在这些位点的优先积累。或者, 这种相对独特的归巢模式 (homing pattern) 可能是由于不同的趋化因子受体谱图 (profiles) 所致, 后者是在对 BCR/TLR 结合的共同效应进行反应时所产生的。需要进行进一步的研究, 以便比较单独通过 BCR 交联而活化的 B 细胞和通过 BCR/TLR 双结合而活化的 B 细胞的功能特性。

识别 DNA/核小体的自身抗体是 SLE 患者和 SLE 的鼠类模型中定义的和最常见的特异性种类 (specificity), 而 RFs 在一部分 SLE 患者、自身免疫易感性 lpr 小鼠和 RA 患者中是一个典型特征。值得注意的是, 这些同样的自身抗原是一些新型的鼠类自身免疫模型的靶标, 而所述的鼠类自身免疫模型是通过突变而破坏淋巴细胞的动态平衡或自身抗原代谢而得到的 (Botto, et al., Nature Genetics 19, 56 - 59 (1998); Bickerstaff, et al., Nature Medicine 5, 694 - 697 (1999); Napirei, et al., Nat. Gen. 25, 177 - 180 (2000); Scott, et al., Nature 411, 207 - 211 (2001)). 在过去的很长时间之中, 人们一直在寻找这些具体的特异性种类之所以占优势的原因。我们的数据提供了一种解释, 也就是对由含有染色质的免疫复合物介导的 BCR/TLR 信号传导的有效的协同作用。在我们的实验系统中, 依赖于内涵体/溶酶体定位的 TLR9 (Hacker, et al., EMBO J: 17, 6230 - 6240 (1998)), 可以合理地推断自身抗体/自身抗原 IC 与 BCR 的结合触发了 IC 相关抗原的胞饮作用, 并导致染色质片段被高效地运送至内涵体相关的 TLR9。与公开的研究结果 (Bell, et al., J. Clin. Invest. 85, 1487 - 1496 (1990); Bell, et al., Clin. Immunol Immunopath. 60, 1326 (1991)) 相反, 我们不能单独通过培养物上清液或染色质片段而活化 B 细胞。其他的小鼠品系是否会对我们的片段反应更为敏感仍有待证实。

除了目前的实验模型外，一般来讲，BCR/TLR 双结合的原理对于自身免疫而言具有广泛的意义。诸如半抗原化的 LPS 和半抗原化的 LPSLPS 偶联的 SRBC 的模型配体也可以共同对 BCRs 和 TLRs 进行信号传递，而且对于具有相关受体的 B 细胞而言相当有效并且具有较高的特异性 (Pike, *Methods Enzymol.* 1987; 150: 265 - 75, 1987)。因此，在很多不同的环境中，这种模式的活化很可能是外周 B 细胞耐受丢失中的主要事件；其他的自身抗原可以通过 TLR9 之外的其他 TLRs 进行信号传导。总的来讲，这些数据证实了内源性 TLR 配体在自身免疫的获得性免疫系统异常活化中的重要作用，并解释了自身抗体库为何经常性地不正常地识别亚细胞核酸/蛋白质微粒 (Tan, E. *Adv. Immunol.* 44, 93 - 151 (1989)) 的原因。

## 方法

小鼠. 将前面所描述的 MRL+/+ AM14 BCR Tg 小鼠 (Hannum, et al., *J. Exp. Med.* 184, 1269 - 1278 (1996); Riflcin, et al., *J. Immunol.* 165, 1626 - 1633 (2000)) 与 Cr2 缺陷型小鼠杂交，后者由 Michael Carroll 博士提供 (哈佛大学医学院，波士顿)，F1 子代进行互交 (intercross) 以产生 AM14 Cr2 缺陷型以及 Cr2 充足型 (sufficient) 对照小鼠。最初由 Shizuo Akira 博士 (大阪大学，大阪，日本) 制备的 MyD88 -/- 小鼠 (Adachi, et al., *Immunity* 9, 143 - 150 (1998)) 由 Douglas Golenbock 博士 (麻萨诸塞大学医学院，伍斯特，麻萨诸塞州) 提供，将这种小鼠与 AM14 MRL+/+ 小鼠进行杂交，以产生 AM14 MyD88 -/- 小鼠以及作为对照的子代同窝小鼠。首先通过 PCR 鉴定 RF+ 子代，然后通过流式细胞术分析外周血淋巴细胞或脾脏细胞而证实对它们的鉴定，使用所述的 4-G7 单克隆抗个体基因型 (4-G7 monoclonal anti-idiotypic) (Shlomchik, et al., *Int. Immunol.* 5, 1329 - 1341 (1993))。采用 FITC-偶联的 7G6 抗体 (Pharmingen, 圣

地亚哥, 加利福尼亚州) 通过流式细胞术确定补体受体的基因型。MyD88 的基因型通过 PCR 技术利用下列引物进行确定: MyD88F (5'- TGG CAT GCC TCC ATC ATA GTT AAC C-3') [SEQ ID NO:1], MyD88R (5'- GTC AGA AAC AAC CAC CAC CAT GC-3') [SEQ ID NO: 2], 以及 neoR (5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC G-3') [SEQ ID NO: 3] (MWG Biotech, 海波因特, 北卡罗来那州), 以获得长度分别为约 550 bp 和 750 bp 的野生型和敲除产物。

**细胞培养物和试剂.** 脾细胞制备物中的 T 被去除, 并与适当的配体共同培养 40 - 48 小时。在某些实验中, 按照文献中描述的方法将 B 细胞与 CD40L 一起进行预培养 (Rifkin, et al., J. Immunol. 165, 1626 - 1633 (2000) )。在培养的最后 16 小时内加入 <sup>3</sup> [H] - 胸腺嘧啶核苷以评估增殖状况。数据是以三组培养物抗 IgM 反应的平均百分比表示的。按照下述公式计算抗 IgM 反应的百分比:  $[(\text{cpm 实验条件} - \text{cpm CD40L 单独}) / (\text{cpm 抗 IgM} - \text{cpm CD40L 单独}) \times 100]$ 。

配体包括: 山羊抗小鼠 IgM F (ab')<sub>2</sub> (15 μg/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, 宾夕法尼亚州); 核小体特异性 mAbs PR1-3 (IgG2a'), PL2-3 (IgG2a') 以及 PL2-8 (IgG2b) (浓度均为 50 μg/ml), 由 Marc Monestier 博士提供 (坦普尔大学医学院, 费城, 宾夕法尼亚州) (Monestier and Novick Mol. Immunol. 33, 89 - 99 (1996) ); 10 μg/ml LPS (Sigma, 圣路易斯, 密苏里州); 0.3-2 g/ml 的刺激性 CpG S-ODN 1826 (Yi, et al., J. Immunol. 160, 4755 - 4761 (1998) ) (Oligo's Etc, Wilsonville, 俄亥俄州), 10 μg/ml 脑膜炎双球菌 (Neisseria Meningitidis) 孔蛋白 B (由 Lee Wetzler 博士提供, 波士顿大学医学院, 波士顿, 麻萨诸塞州); 10 μg/ml 合成的脂肽 Pam<sub>3</sub>Cys-Sk<sub>4</sub> (G. Jung 博士, Univ. of Tuebingen, 德国, 由 Doug Golenbock 博士提供); 以及抗 TNP

mAbs Hy 1.2 (IgG2a<sup>a</sup>) 和 C1040 (IgG2a<sup>b</sup>) (Hannum, et al., J Exp. Med. 184, 1269 - 1278 (1996)) (浓度均为 50  $\mu$ g/ml), 与不同浓度的 TNP-BSA 相络合 (complexed)。在某些实验中, 在加入配体之前的 15 - 30 分钟 - 2 小时, 将 DNase I (IV 类) (Sigma, 圣路易斯, 密苏里州), 氟奎 (Sigma), concanamycin B, bafilomycin A (Sigma) 或 12 pg/ml 的抑制性 CpG S-ODN 2008 (Lenart, et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 4, 247 - 256 (2001)) (Oligo's Etc.) 加入到培养物中。通过鲎鱼阿米巴状细胞溶解物 ELISA (Limulus Amebocyte Lysate ELISA) (Bio-Whittaker, Walkersville, 马里兰州) 证明所有的 mAb 和 ODN 制备物均不含内毒素。

### 实施例 3

我们进一步证明树突状细胞可以被含有染色质的免疫复合物活化, 其通过与 Fc 受体和 TLR 9 的顺序结合而发挥作用。这与前面所描述的 B 细胞活化的机理很相似, 其区别在于: 对于 B 细胞而言, 相关的细胞表面受体是 B 细胞抗原受体; 而对于树突状细胞而言, 相关的细胞表面受体是 Fc gamma 受体 (Fc $\gamma$ R)。这两种细胞表面受体的作用都是将染色质运送到位于内涵体/溶酶体囊泡中的 TLR9。

在图 8A - 图 8C 中, 我们表明树突状细胞可以通过 TLR9 而被特异性地活化, 这种活化可以被 ODN 2088 所形成的 TLR9 抑制而阻断。这些实验证明, 我们在后续实验中所使用的树突状细胞 (示于下面的表 1 和表 2 中) 表达功能性的 TLR9, 因为特异性活化 TLR9 的配体 ODN 1826 诱导树突状细胞产生 TNF- $\alpha$  和 IL-12 (图 8A, 图 8B), 而且还进一步诱导共刺激分子的上调节 (图 8C)。ODN 2088 是 TLR9 介导的活化的特异性抑制剂, 因为 ODN 2088 阻断了 ODN 1826 介导的活化, 但是对于 LPS 介导的活化却没有作用 (如图 8A、8B、8C 所示)。

树突状细胞来源于 C57BL/6 小鼠的骨髓中,通过在体外利用 GM-CSF 和 IL-4 培养 6 天而获得。在第六天时将 CD11c 阳性的树突状细胞分离出来,分离过程中采用磁性珠子 (magnetic beads, Miltenyi Biotec), 并与 ODN2088 (一种特异性地阻断通过 TLR9 的信号传导的抑制性寡聚脱氧核苷酸) 预培养 30 分钟;也可以不进行上述的预培养操作。然后向培养物中加入通过 TLR9 发挥特异性活化作用的刺激性 ODN 1826 (CpG, 3  $\mu\text{g/ml}$ ) 或者通过 TLR4 发挥活化作用的脂多糖 (LPS, 10  $\mu\text{g/ml}$ ), 或者仅加入培养基。在 48 小时之后,通过 ELISA (结果以测得的 405nm 处的吸收的 OD 值表示) 测定培养物上清液中 TNF- $\alpha$  (图 8A) 和 IL-12 (图 8B) 的水平。在除去上清液之后,将细胞收集起来,并用流式细胞术分析共刺激分子 CD86 的表达 (图 8c)。“未刺激”是指在只有培养基的情况下 CD86 的表达水平,“刺激”是指在存在刺激物 (ODN 1826 或 LPS) 的情况下 CD86 的表达水平。

下面的表 1 表明,含有染色质的免疫复合物 (复合物中含有自身抗体和染色质自身抗原) 活化了树突状细胞,使其生产 TNF- $\alpha$ ; 而含有外源抗原 (TNP-BSA) 的免疫复合物则不能诱导树突状细胞的这种活化。此外,含有染色质的免疫复合物所诱导的活化可以被 TLR9 的特异性抑制剂 ODN 2088 所完全阻断,这表明 TLR9 的结合 (可能是通过位于含有染色质的免疫复合物内的染色质) 在上述活化过程中是一个很重要的因素。

表 1

刺激	无	2088
培养基 (无刺激)	< 50	< 50
ODN 1826	2347	< 50
LPS	2514	2393
PL2-3	1653	< 50
TNP/ $\alpha$ TNP-BSA IC 1:1	< 50	< 50
TNP/ $\alpha$ TNP-BSA IC 4:1	< 50	< 50
TNP/ $\alpha$ TNP-BSA IC 16:1	< 50	< 50

表 1 说明, 含有染色质的免疫复合物所诱导的树突状细胞对 TNF- $\alpha$  的生产被 TLR9 的特异性抑制剂 ODN 2088 所阻断。树突状细胞来源于 C57BL/6 小鼠的骨髓中, 通过在体外利用 GM-CSF 和 IL-4 培养 6 天而获得。在第六天时利用磁性珠子 (Miltenyi Biotec) 将 CD11c 阳性的树突状细胞分离出来。然后将树突状细胞与浓度为 12  $\mu\text{g/ml}$  的 ODN2088 预培养 30 分钟, 也可以不进行上述的预培养操作。然后向培养物中加入通过 TLR9 发挥特异性活化作用的刺激性 ODN 1826 (3  $\mu\text{g/ml}$ ), 通过 TLR4 发挥活化作用的脂多糖 (LPS, 10  $\mu\text{g/ml}$ ), 抗染色质抗体 PL2-3 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), 抗体/蛋白质比例不同的三种  $\alpha\text{TNP/TNP-BSA}$  免疫复合物 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), 或者仅加入培养基。在 48 小时之后, 通过 ELISA 测定培养物上清液中 TNF- $\alpha$  的水平(结果以  $\text{pg/ml}$  表示; 检测灵敏度的下限水平 (lower level) 是 50  $\text{pg/ml}$ )。此处示出了三个类似实验中的一个有代表性的实验。

表 2 说明, 含有染色质的免疫复合物能够诱导来自野生型小鼠的树突状细胞生产 TNF- $\alpha$  (这一点在表 1 中所示的 ODN 2088 不存在时的研究结果中也能看到), 但是完全不能诱导来自 Fc 受

体  $\gamma$  链缺陷型小鼠的树突状细胞生产 TNF- $\alpha$ 。这说明在含有染色质的免疫复合物活化树突状细胞的过程中，参与活化作用的 Fc 受体是绝对必要的。

表 2

刺激	野生型	Fc 受体 $\gamma$ 链缺陷型
培养基 (无刺激)	< 50	< 50
ODN 1826	7899	2373
LPS	7056	3411
PL2-3	4554	< 50
PL2-8	3964	< 50
TNP/ $\alpha$ TNP-BSA IC 1:1	< 50	< 50
TNP/ $\alpha$ TNP-BSA IC 4:1	< 50	< 50

表 2 证明，含有染色质的免疫复合物能够诱导来自野生型小鼠的树突状细胞生产 TNF- $\alpha$ ，但是不能诱导来自 Fc 受体  $\gamma$  链缺陷型小鼠的树突状细胞生产 TNF- $\alpha$ 。树突状细胞来源于 C57BL/6 小鼠以及缺乏 Fc 受体  $\gamma$  链的 C57BL/6 小鼠的骨髓，通过在体外将所述骨髓细胞与 GM-CSF 和 IL-4 培养 6 天而获得。在第六天时利用磁性珠子将 CD11c 阳性的树突状细胞分离出来。然后向树突状细胞培养物中加入通过 TLR9 发挥特异性活化作用的刺激性 ODN 1826 (3  $\mu$ g/ml)，脂多糖 (LPS, 10  $\mu$ g/ml)，抗染色质抗体 PL2-3 (50  $\mu$ g/ml; IgG2a) 和 PL2-8 (50  $\mu$ g/ml; IgG2b)，抗体/蛋白质比例不同的二种  $\alpha$ -TNP/TNP-BSA 免疫复合物 (50  $\mu$ g/ml)，或者仅加入培养基。在 48 小时之后，通过 ELISA 测定培养物上清液中 TNF- $\alpha$  的水平(结果以 pg/ml 表示；检测灵敏度的下限水平是 50 pg/ml)。此处示出了二个类似实验中的一个有代表性的实验。

将上述的表 1 和表 2 合在一起考虑，其中的数据证明：含有染色质的免疫复合物所诱导的树突状细胞的活化，需要一个通过参与活化的 Fc $\gamma$  受体的信号以及由 TLR9 介导的一个信号。

下面将简要介绍一下用于评价该 Fc $\gamma$ R/ TLR 双结合通路的机理和结果的其他实验。

### 生产 TNF- $\alpha$ 的树突状细胞亚群 (subset) 的描述

小鼠株系。 已经描述了自身免疫狼疮样 (Lupus-Like) 小鼠株系和非自身免疫小鼠株系之间在树突状细胞和巨噬细胞功能上的差异。这些差异包括在免疫复合物的处理 (Jones et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 36 : 30 - 39, 1985; Magilavy et al., J. Immunol. 131 : 2784 - 2788, 1983)、吞噬作用 (Russell, and Steinberg Clin. Immunol. Immunopathol. 27: 387 - 402, 1983)、Fc 受体的表达和功能 (Pritchard et al., Current Biology. 10: 227 - 230, 2000; Jiang et al., Immunogenetics. 51: 429 - 435, 2000) 以及细胞因子生产 (Alleva et al., J. Immunol. 159: 5610 - 5619., 1997; Koh et al., J. Immunol. 165 : 4190-4201, 2000)等方面的差异。因此，直接比较来自自身免疫和非自身免疫小鼠株系的树突状细胞是很重要的。MRL+/+ 和 (NZBxNZW) F1 是我们所使用的两个自身免疫狼疮样株系，C57BL/6 和 BALB/c 是我们所使用的两个非自身免疫小鼠株系。

树突状细胞亚群的纯化。 有两个对于 SLE 的发病机制特别重要的树突状细胞亚群：CD11c+ CD8 $\alpha$ + 以及 CD11c+ B220+ Gr-1+。这些细胞或者是从脾脏直接获得 (Hochrein et al., J. Immunol. 166: 5448 - 5455, 2000; Nakano et al., J. Exp. Med. 194: 1171 - 1178, 2001)，或者是在 Flt3 配体的存在下通过体外培养骨髓细胞而获得 (Brasel et al., Blood. 96: 3029-3039, 2000; Gilliet et

al., J. Exp. Med. 195 : 953 - 958, 2002)。按照文献中所述的方法分离脾树突状细胞 (Vremec et al., J. Immunol. 164: 2978 - 2986, 2000); 在经过适当的荧光抗体染色之后, 特定的树突状细胞亚群被分开, 并采用 MoFlo 细胞分类器 (Cytomation, 柯林斯堡, 科罗拉多州) 进行收集。在脾脏中也能发现的 CD11c<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> 树突状细胞亚群与作为目标的 CD11c<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>树突状细胞亚群被同时分离出来, 并且在实验中被用作对照。

为了获得来源于骨髓的树突状细胞, 将骨髓细胞收集起来并在重组鼠 Flt3 配体的存在下体外培养 6 - 10 天, 采用的是已知的实验方案 (Gilliet et al., J. Exp. Med. 195: 953 - 958, 2002; Labeur et al., J. Immunol. 162: 168 - 175, 1999)。在 Flt3 配体存在下生长的骨髓细胞被富集于目标种群, 也就是 CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 以及 CD11c<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup>树突状细胞。通过上面描述的细胞分类法将来源于脾的树突状细胞分开。

确定 TLR9 在特定的树突状细胞亚群中的表达。通过定量反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 测定 TLR9 mRNA。此外, 通过测定共刺激分子的表达和细胞因子的生产而比较树突状细胞亚群对 TLR9 特异的刺激性配体 S-ODN 1826 的反应 (Ballas et al., J. Immunol. 167: 4878 - 4886, 2001)。可以通过本领域普通技术人员公知的技术生产鼠 TLR9 的特异抗体。

## IC 的制备以及树突状细胞对 IC 的结合和吸收

免疫复合物的制备。将抗核小体单克隆抗体 PL2-3 (IgG2a)、PL2-8 (IgG2b) 以及 PL9-7 (IgG3) 与脾细胞 24 小时体外培养物的上清液进行培养, 以制备抗核小体/染色质的 IC。染色质从培养物中的脾细胞内自发地释放出来 (Bell et al., *J. Clin. Invest.* 85: 1487 - 1496, 1990); 抗核小体的抗体与上述染色质的结合导致了 IC 的形成, 这可以通过 Clq 免疫试验进行测定 (Riflin et al., *Journal of Immunology.* 165: 1626 - 1633, 2000)。我们已经进一步证明, 与培养液预培养过的生物素化的 PL2-3 与类风湿因子 B 细胞特异性结合, 这可以通过流式细胞术检测出来; 而单体状态的生物素化的 PL2-3 则不结合。使用抗 TNP 单克隆抗体 Hyl. 2 (IgG2a) 或 C4010 (IgG2b) 并将其与 TNP-BSA 进行培养, 从而制备非自身抗原对照 IC; IC 形成的确认也是通过 Clq 结合进行的 (Leadbetter et al., *Nature.* 416: 603 - 607, 2002)。另外的非自身抗原对照 IC 是利用本实验室制备的抗卵清蛋白单克隆抗体 Ov1 (IgG2a) 和 Ov2 (IgG2b), 并将其与卵清蛋白进行培养而制备的。除了用 Clq 结合试验证明 IC 的形成以外, 还使用了 FPLC 作为证实 IC 形成的另一种实验手段。

树突状细胞对免疫复合物的结合和吸收。在建立含有 IC 和树突状细胞的实际实验培养物之前, 有必要确定来自不同株系的纯化的树突状细胞亚群所能结合和吸收 IC 的程度。考虑到所报道的自身免疫和非自身免疫小鼠株系之间在 IC 处理 (Jones et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 36: 30 - 39, 1985; Magilavy et al., *J. Immunol.* 131: 2784 - 2788, 1983) 和 Fc 受体表达 (Pritchard et al., *Current Biology.* 10: 227 - 230, 2000; Jiang et al., *Immunogenetics.* 51: 429 - 435., 2000) 等方面的差别, 这一点是特别重要的。该实验方法是通过组合利用流式细胞术和共聚焦显微

镜术而追踪免疫复合物中的抗体成分。抗核小体抗体 PL2-3 (IgG2a)、PL2-8 (IgG2b) 以及 PL9-7 (IgG3) 已经通过标准步骤与生物素进行了偶联；通过上述方法制备生物素-抗核小体/染色质 IC。为了证实生物素-抗核小体/染色质 IC 保留了其功能，对生物素-PL2-3/染色质 IC 能否在诱导类风湿因子 B 细胞的增殖上达到非生物素-PL2-3/染色质 IC 所能达到的程度进行了评估 (Rifkin et al., Journal of Immunology. 165: 1626 - 1633, 2000)。生物素-PL2-8/染色质 IC 和生物素-PL9-7/染色质 IC 不能通过这种方式进行测定，因为 IgG2b 和 IgG3 不能被类风湿因子 B 细胞受体所识别，但是人们认为在不考虑同种异型时，生物素偶联在功能上的影响是相似的。同种异型匹配的生物素-抗 TNP / TNP-BSA IC 以及生物素-抗卵清蛋白/卵清蛋白 IC 以类似方法制备。没有进入复合物的单独的生物素偶联抗体被用作对照。生物素偶联 IC 和生物素偶联抗体被单独加到不同的树突状细胞亚群中，利用流式细胞术检测细胞表面的结合。通过与特异的荧光染料相偶联的抗生物素单克隆抗体，可以看到生物素标记的化合物 (分子探针：抗生物素小鼠单克隆 2F5 Alexa Fluor 488 偶联物)。接下来，使用共聚焦显微镜术评估在培养 1 - 12 小时并用 3% 多聚甲醛固定之后，树突状细胞对抗核小体抗体 (生物素-抗核小体/染色质 IC)、抗 TNP 抗体 (生物素-抗 TNP / TNP-BSA IC) 或抗卵清蛋白抗体 (生物素-抗卵清蛋白/卵清蛋白 IC) 的内化作用。

此外，还进行了共定位研究，其中采用了与对内涵体/溶酶体囊泡具有特异性的荧光标记单克隆抗体进行的共染色，或者能分配到酸性细胞器中的荧光 pH 指示剂 (分子探针)。

## 含有染色质的 IC 所导致的树突状细胞活化的测定以及 Toll 样受体和 Fc gamma 受体作用的确定

IC 所导致的树突状细胞活化的测定. 将前述的抗核小体/染色质 IC、抗 TNP / TNP-BSA IC 以及抗卵清蛋白/卵清蛋白 IC 与树突状细胞亚群进行培养, 树突状细胞的活化通过测定共刺激分子的上调节和细胞因子的产生而确定。对照包括单独的处于单体状态未形成符合物的抗体, 单独的抗原, 作为 TLR9 信号传导阳性对照的刺激性 CpG S-ODN 1826, 作为 TLR4 信号传导阳性对照的 LPS 以及作为 TLR2 信号传导阳性对照的孔蛋白 B。通过 ELISA 测定细胞因子, 所述细胞因子包括 IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 以及 IFN- $\alpha$ 。IL-12 和 TNF- $\alpha$  是用作树突状细胞活化标记的最常用的两种细胞因子 (Banchereau et al., Annu. Rev. Immunol. 18: 767 - 811, 2000), IFN- $\alpha$  是与 CD11c+ CD8 $\alpha$ + 以及 CD11c+ B220+ Gr-1+树突状细胞亚群的活化关系最为密切的细胞因子。有必要测定 IL-10, 因为已经表明, 巨噬细胞 Fc 受体的结合可能导致由后续刺激所诱导的 IL-10 的生产; 而所述刺激在 Fc 受体未结合的情况下, 会导致 IL-12 而不是 IL-10 的生产 (Gerber and Mosser J. Immunol. 166: 6861 - 6868, 2001)。MHC II 类分子以及共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40 表达的增加通过流式细胞术进行测定。

Toll 样受体和 Fc gamma 受体在 IC 介导的树突状细胞活化中的作用. S-ODN 2088 是一种抑制性 CpG S-ODN, 它特异性地阻断通过 TLR9 的信号传导 (Lenert et al., Antisense and Nucleic Acid Drug Development. 11: 247 - 256, 2001)。我们已经证明, S-ODN 2088 强烈抑制含有染色质的 IC 所诱导的 B 细胞增殖, 其中所述 B 细胞来自类风湿因子 B 细胞受体转基因小鼠 (Leadbetter et al., Nature. 416: 603 - 607, 2002 (Leadbetter et al., Nature. 416: 603 - 607, 2002)。我们也已经证明, S-ODN 2088 通过对 TLR9 的

作用而完全阻止了刺激性 CpG S-ODN (例如 S-ODN 1826) 对树突状细胞的活化。上面所介绍的这些实验是在 S-ODN 2088 存在/不存在的情况下进行的, 以便评价 TLR9 在 IC 介导的树突状细胞活化中的作用。这些实验也是在内涵体酸化抑制剂存在/不存在的情况下进行的, 所述抑制剂包括氯奎、concanamycin B 和 bafilomycin A, 其能够阻止通过 TLR9 的信号传导。此外, 还将来自 C57BL/6 MyD88+/+ 小鼠的树突状细胞和来自 C57BL/6 MyD88-/- 小鼠的树突状细胞进行了比较, 以便确定对 TLR 信号传导的需要。

为了评估对 Fc gamma 受体 (Fc $\gamma$ R) 信号传导的需要, 我们还在 2.4.G2 (一种单克隆抗体, 能够特异性地阻断鼠 Fc $\gamma$ R II 和 Fc $\gamma$ R III) (Araujo- Jorge et al., *Infect Immun.* 61: 4925 - 4928, 1993) 存在/不存在的情况下进行进行了实验。但是, 第三种类型的鼠 Fc gamma 受体, Fc $\gamma$ R I, 不能被 2.4G2 所阻断, 并且可以介导 IC 诱导的炎症反应 (Ioan-Facsinay et al., *Immunity.* 16: 391 - 402, 2002; Barnes et al., *Immunity.* 16: 379 - 389, 2002)。树突状细胞表达所有这三种 Fc $\gamma$ R (Fc $\gamma$ R I、Fc $\gamma$ R II 和 Fc $\gamma$ R III) (Ravetch and Bolland, *Ann. Rev. Immunol.* 19: 275 - 290, 2001)。因此, 可以利用 Fc $\gamma$ R 敲除的小鼠进行另外的研究。这种小鼠可以从 Jackson 实验室获得, 包括: i) Fc $\gamma$ R I 和 Fc $\gamma$ R III 基因缺陷型小鼠, 这种小鼠是通过将上述两种受体所共有的刺激性信号传导 gamma 链敲除而获得的 (Takai et al., *Cell.* 76: 519 - 529, 1994); ii) Fc $\gamma$ R II 敲除小鼠 (Takai et al., *Nature.* 379: 346 - 349, 1996); 以及 iii) Fc $\gamma$ R III 敲除小鼠 (Hazenbos et al., *Immunity.* 5: 181 - 188, 1996)。

IC 和 TLR9 在树突状细胞的抗原处理和呈递中的作用。在人类以及 SLE 的鼠类模型中, CD4+ 自身反应性 T 细胞在 SLE 的发病过程中有很重要的作用 (Craft et al., *Immunol. Res.* 19: 1999; Hoffman, *Front. Biosci.* 6: D1369 -78, 2001; Shlomchik et al.,

Nature Rev. Immunol. 1: 147 - 153, 2001)。在 T 细胞应答的启动中，树突状细胞是关键性的抗原呈递细胞(Banchereau et al., Annu. Rev. Immunol. 18: 767 - 811, 2000); 已经证明，TLR9 的结合强烈地促进了 Th1 型免疫反应的发展 (Jakob et al., J. Immunol. 161: 3042 - 3049, 1998 ; Lipford et al., J. Immunol. 165: 1228 - 1235, 2000)。为了证明 TLR9 的结合是否改变了 T 细胞对包含在免疫复合物中的抗原的反应，我们按照文献中所述的方法将卵清蛋白与刺激性 CpG S-ODN 1826 偶联在一起 (Shirota et al., J. Immunol. 164: 5575 - 5582, 2000)。因此，IC 是通过将未偶联的卵清蛋白或卵清蛋白-CpG 偶联物与抗卵清蛋白单克隆抗体 Ov1 (IgG2a) 或 Ov2 (IgG2b) 进行培养而制得。来自 BALB/c 小鼠 (H-2<sup>d</sup>) 的树突状细胞亚群与这些 IC 进行脉冲式接触。CD4<sup>+</sup> T 细胞在 H-2A<sup>d</sup> 的环境中识别卵清蛋白；将 CD4<sup>+</sup> T 细胞从卵清蛋白特异性 T 细胞受体转基因小鼠 (DO11.10 小鼠) 的淋巴结中纯化出来 (Murphy et al., Science. 250: 1720 - 1723, 1990)。将这些 CD4<sup>+</sup> T 细胞与经过 IC 脉冲式接触的树突状细胞一起培养；在初次 T 细胞应答以及再次 T 细胞应答中，检测 T 细胞的增殖和细胞因子的生产 (IFN-gamma, IL-4 以及 IL-2)。使用 S-ODN 2088 和内涵体酸化抑制剂来评价 TLR9 的作用。

## 参考文献

1. 高级免疫学第 44 期, 1989 年 [Tan, E. Adv. Immunol. 44, 93 - 151 (1989). ]
2. 实验医学第 162 期, 1985 年 [Theofilopoulos, et al., J Exp. Med. 162, 1 - 18 (1985). ]
3. 临床免疫学和免疫病原学, 第 46 期, 1988 年 [Wolfowicz, et al., Clin. Immunol. Immunopath. 46, 382 - 395 (1988).]

4. 国际免疫学杂志第 5 期, 1993 年[Shlomchik,et al., Int. Immunol. 5, 1329 - 1341 (1993). ]
5. 免疫学杂志第 152 期, 1994 年[Jacobson, et al., J. Immunol. 152, 4489 - 99 (1994). ]
6. 实验医学杂志第 184 期, 1996 年[Hannum, et al., J Exp. Med. 184, 1269 - 1278 (1996). ]
7. 实验医学杂志第 190 期, 1999 年[Wang, and Shlomchik, J Ex. Med. 190, 639 - 649 (1999). ]
8. 免疫学杂志第 165 期, 2000 年[Rifkin,et aL, J ImmunoL 165, 1626 - 1633 (2000). ]
9. 免疫学杂志第 148 期, 1992 年[Emlen, et al., J Immunol. 148, 3042 - 3048 (1992). ]
10. 分子免疫学第 33 期, 1996 年[Monestier and Novick Mol. Immunol. 33, 89 - 99 (1996). ]
11. 免疫学杂志第 141 期, 1988 年[Carter et al., J Immunol. 141, 457 - 463 (1988). ]
12. 免疫学第 4 期, 1996 年[Ahearn, et al., Immunity 4, 251 - 262 (1996). ]
13. 细胞, 第 86 期, 1996 年[Lemaitre et al., Cell 86, 973 - 983 (1996). ]
14. 自然, 第 388 期, 1997 年[Medzhitov, et al., Nature 388, 323 - 324 (1997). ]

15. 自然免疫学第 2 期, 2001 年[Akira, et al., Nat. Immunol. 2, 675 - 680 (2001). ]
16. 免疫学杂志, 第 166 期, 2001 年[Li, et al., J. Immunol. 166, 7128 - 7135 (2001). ]
17. 自然免疫学, 第 2 期, 2001 年[Horng, et al., Nat. Immunol. 2, 835 - 841 (2001). ]
18. 免疫学, 第 9 期, 1998 年[Adachi, et al., Immunity 9, 143 - 150 (1998). ]
19. 实验医学杂志, 第 192 期, 2000 年[Hacker, et al., J, Exp. Med 192, 595 - 600 (2000). ]
20. 第 93 期血液杂志, 1999 年[Singal and Ginder Blood 93, 4059 - 4070 (1999). ]
21. 自然, 第 408 期, 2000 年[Hemmi, et al., Nature 408, 740 - 745 (2000). ]
22. 免疫学杂志, 第 160 期, 1998 年[Yi, et al., J Immunol 160, 4755 - 4761 (1998). ]
23. 胚胎杂志, 第 17 期, 1998 年[Hacker, et al., EMBO J. 17, 6230 - 6240 (1998). ]
24. 胚胎杂志, 第 14 期, 1995 年[Benaroch, et al., EMBO J 14, 37 - 49 (1995). ]
25. 免疫学杂志 (正在印刷) [ Massai, et al., J. Immunol. (in press). ]

- 
26. 新英格兰医学杂志, 第 324 期, 1991 年[ Group, T. C. H. S. N. Engl. J. Med. 324, 150 - 154 (1991). ]
  27. 关节炎, 第 42 期, 1999 年[Furst, et al., Arth. Rheu. 42, 357 - 365 (1999). ]
  28. 反义核酸药物, 第 4 期, 2001 年[Lenart, et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 4, 247 - 256 (2001).]
  29. 自然, 第 328 期, 1987 年[Shlomchik, et al., Nature 328, 805 - 811 (1987). ]
  30. 免疫学杂志, 第 164 期, 2000 年[Zeng, et al., J. Immunol. 164, 5000 - 5004 (2000). ]
  31. 自然遗传, 第 19 期, 1998 年[Botto, et al., Nature Genetics 19, 56 - 59 (1998). ]
  32. 自然药物, 第 5 期 1999 年[Bickerstaff, et al., Nature Medicine 5, 694 - 697 (1999). ]
  33. 自然遗传, 第 25 期, 2000 年[Napirei, et al., Nat. Gen. 25, 177 - 180 (2000). ]
  34. 自然, 第 411 期, 2001 年[Scott, et al., Nature 411, 207 - 211 (2001). ]
  35. 临床诊断杂志, 第 85 期, 1990 年[Bell, et al., J. Clin. Invest. 85, 1487 - 1496 (1990). ]
  36. 临床免疫学和免疫病原学, 第 60 期, 1991 年[Bell, et al., Clin. Immunol. Immunopath. 60, 1326 (1991). ]

- 
37. 细胞免疫学, 第4期, 1972年[Moller, et al., Cell. Immunol. 4, 416 - 424 (1972). ]
  38. 科学, 第294期, 2001年[Blanco, et al., Science. 294: 1540 - 1543, 2001. ]
  39. 临床实验免疫学, 第115期, 1999年[Vallin, et al., Clin. Exp. Immunol. 115: 196 - 202, 1999. ]
  40. 免疫学杂志, 第163期, 1999年[Vallin, et al., J. Immunol. 163: 6306 - 6313, 1999. ]
  41. 自然医学, 第5期, 1999年[Cella, et al., Nat. Med. 5: 919 - 923, 1999. ]
  42. 科学, 第284期, 1999年[Siegal, et al., Science. 284: 1835 - 1837, 1999. ]
  43. 新英格兰医学杂志, 第301期, 1979年[Hooks, et al., N. Engl. J. Med. 301: 5 - 8, 1979. ]
  44. 风湿性关节炎, 第25期, 1982年[Ytterberg, et al., Arthritis Rheum. 25: 401 - 406, 1982. ]
  - \*45. 红斑狼疮, 第9期, 2000年[Bengtsson, et al., Lupus. 9: 664 - 671, 2000. ]

此处以及本说明书中所引用的参考文献以引用的方式将其全部内容包括在本文中。

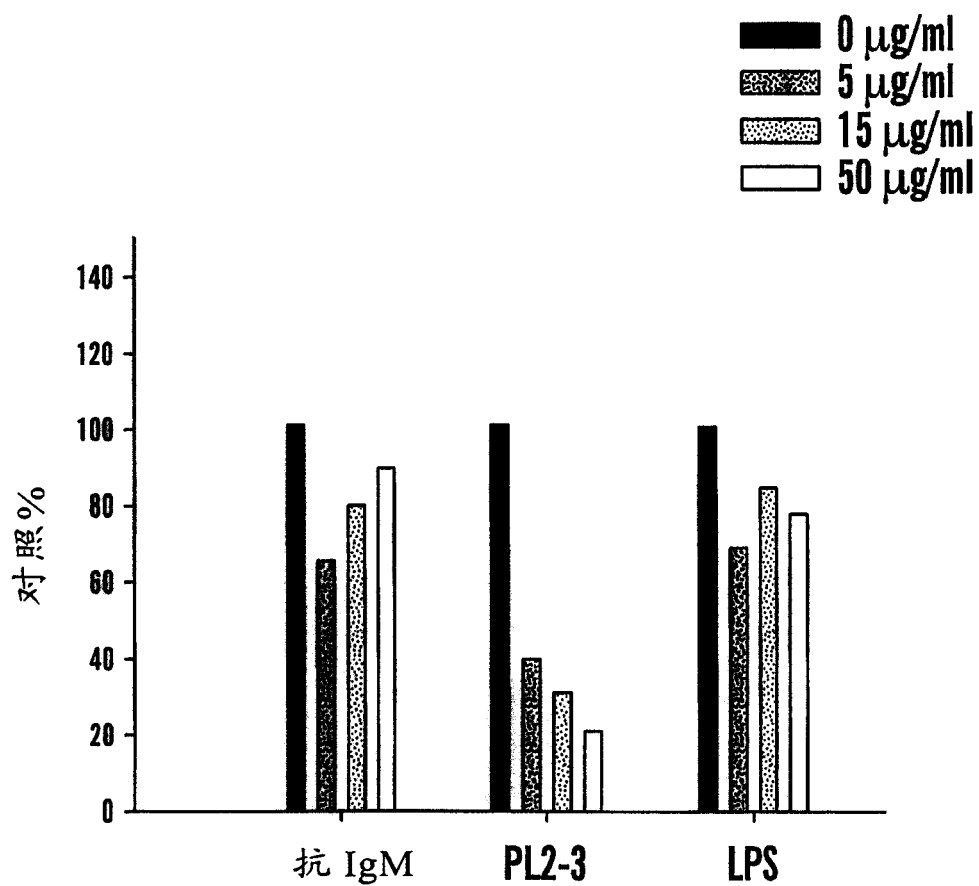


图 1

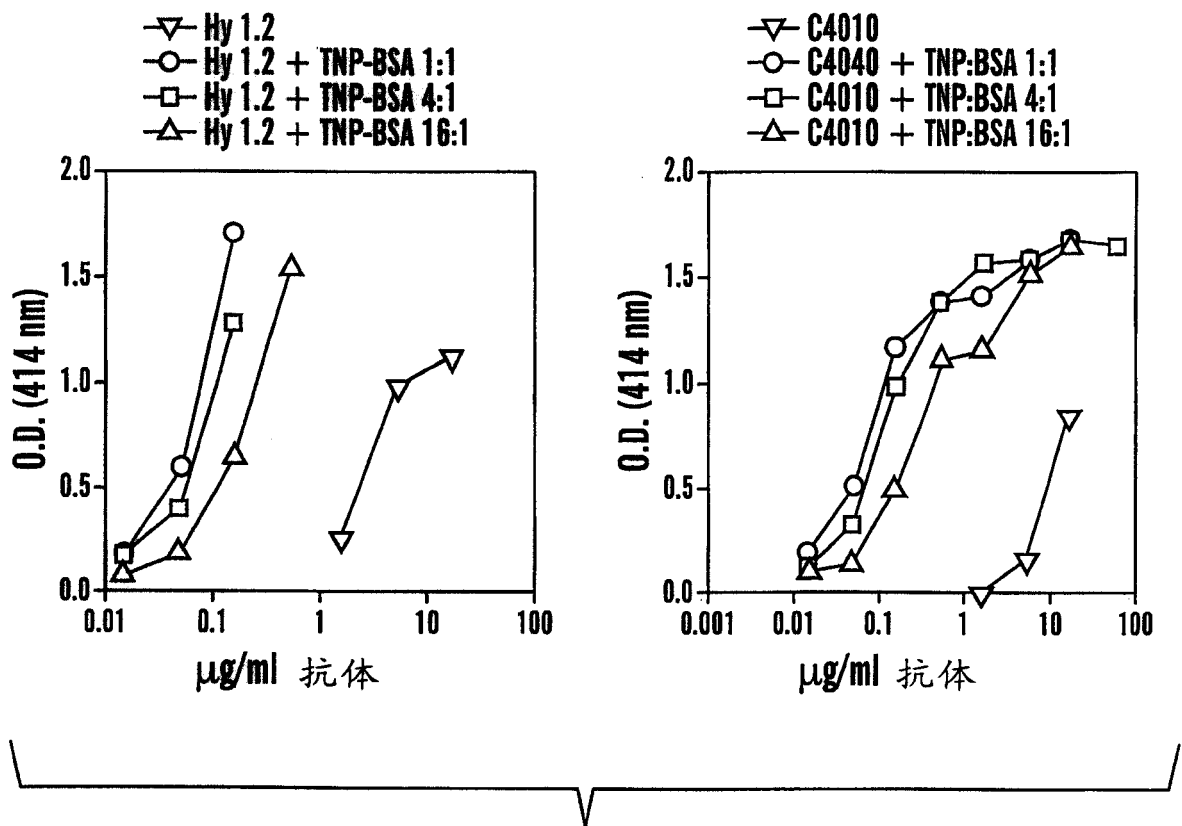


图 2a

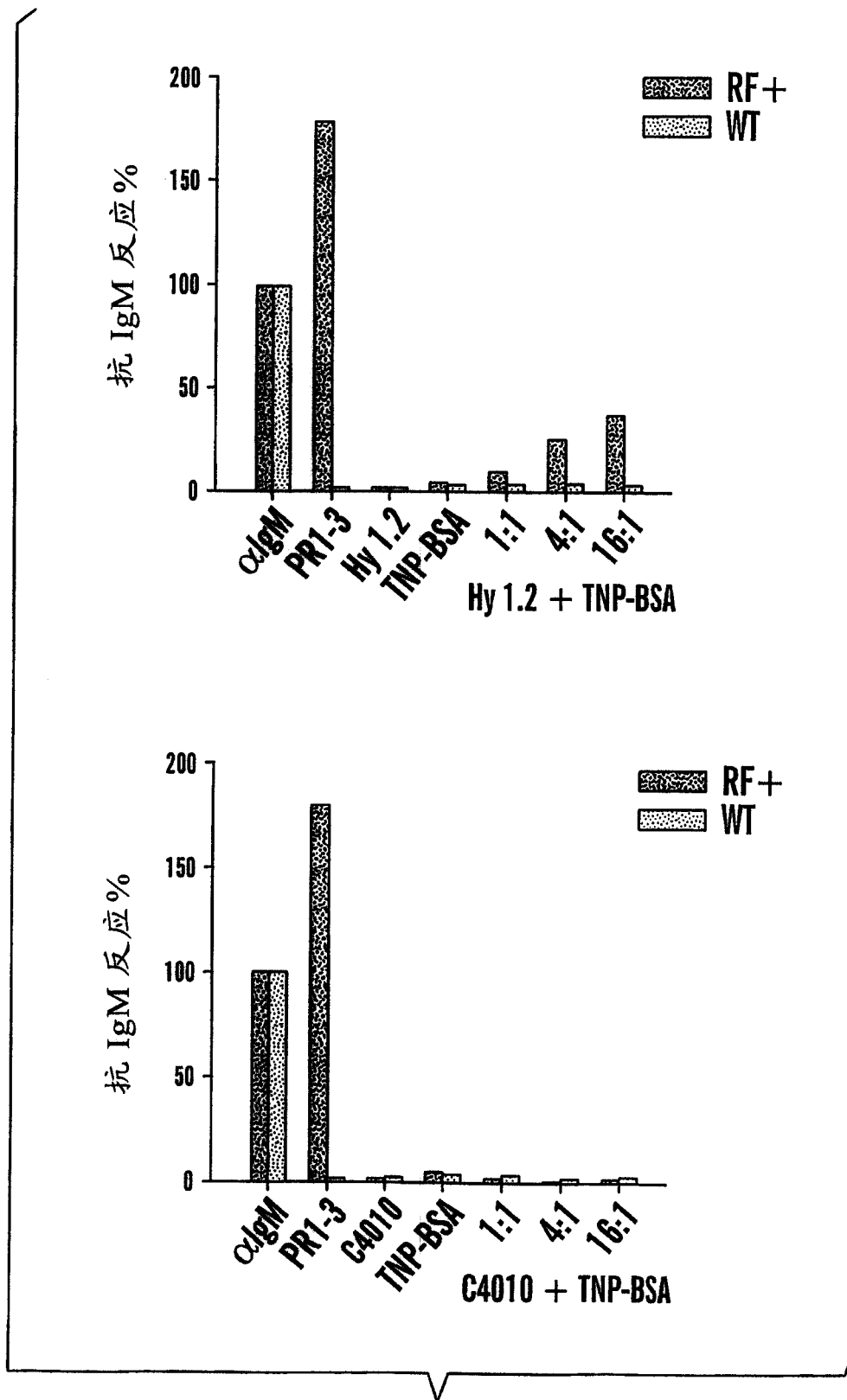


图 2b

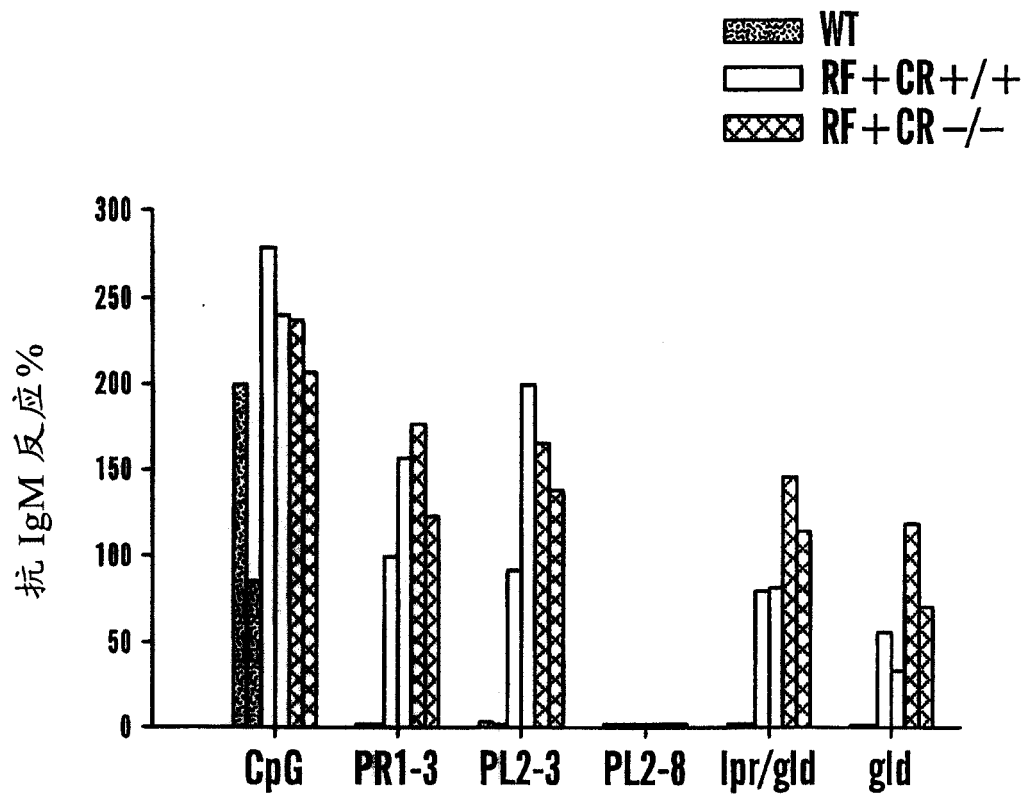


图 3

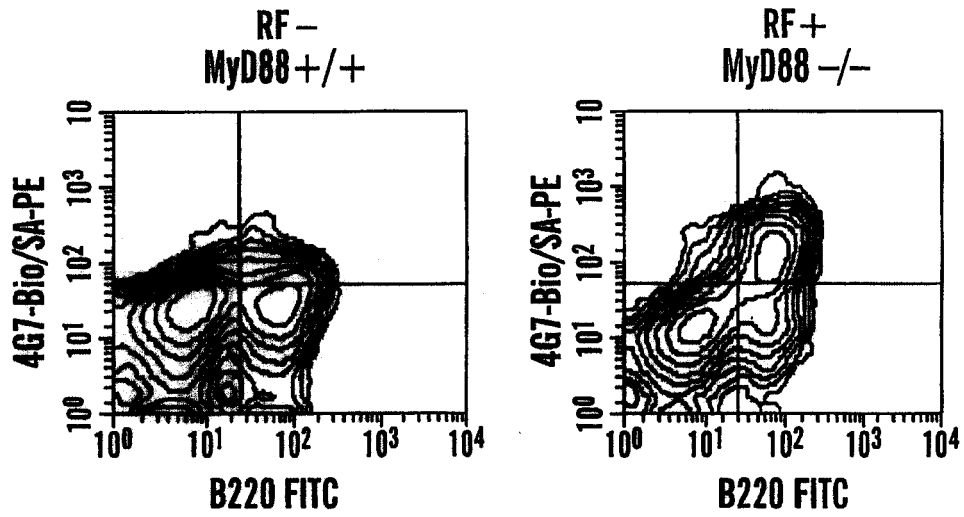


图 4a

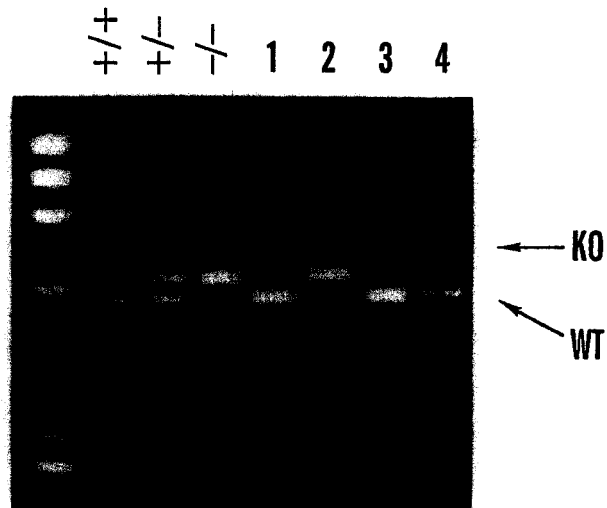


图 4b

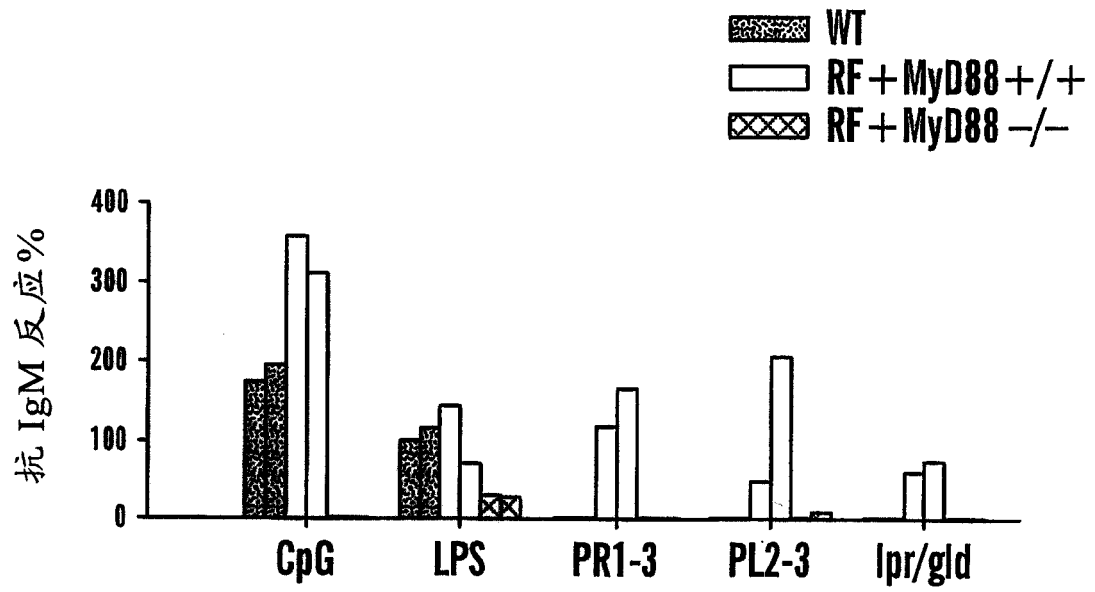


图 4c

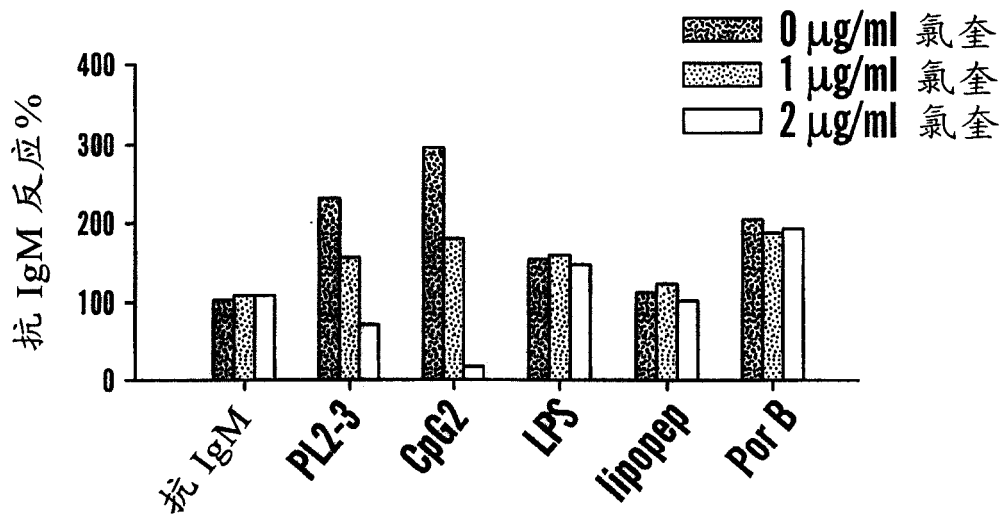


图 5a

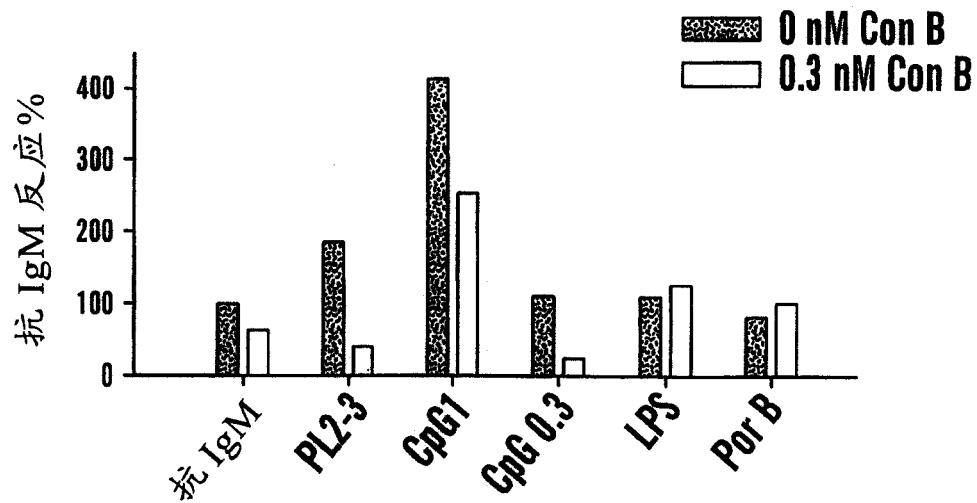


图 5b

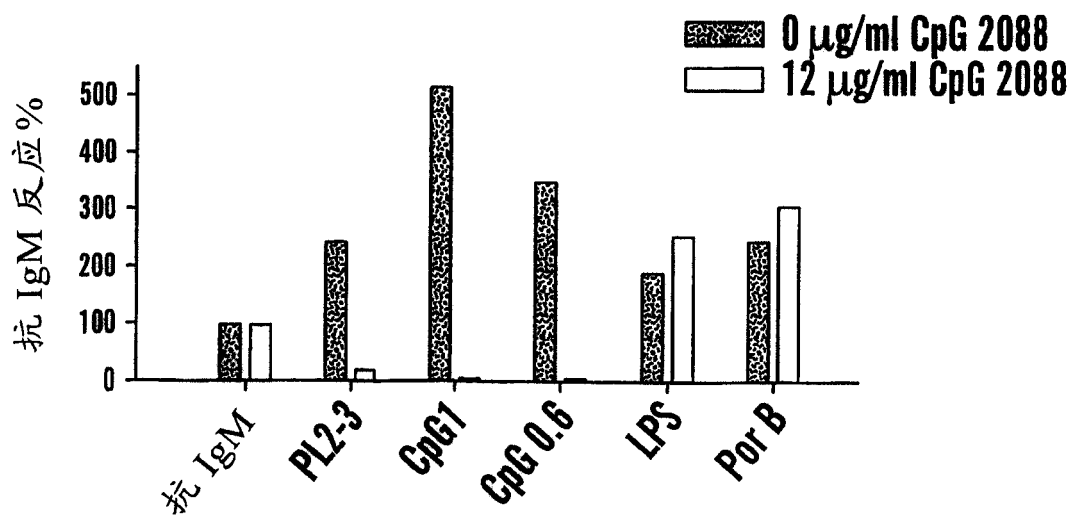


图 5c



图 6A



图 6B

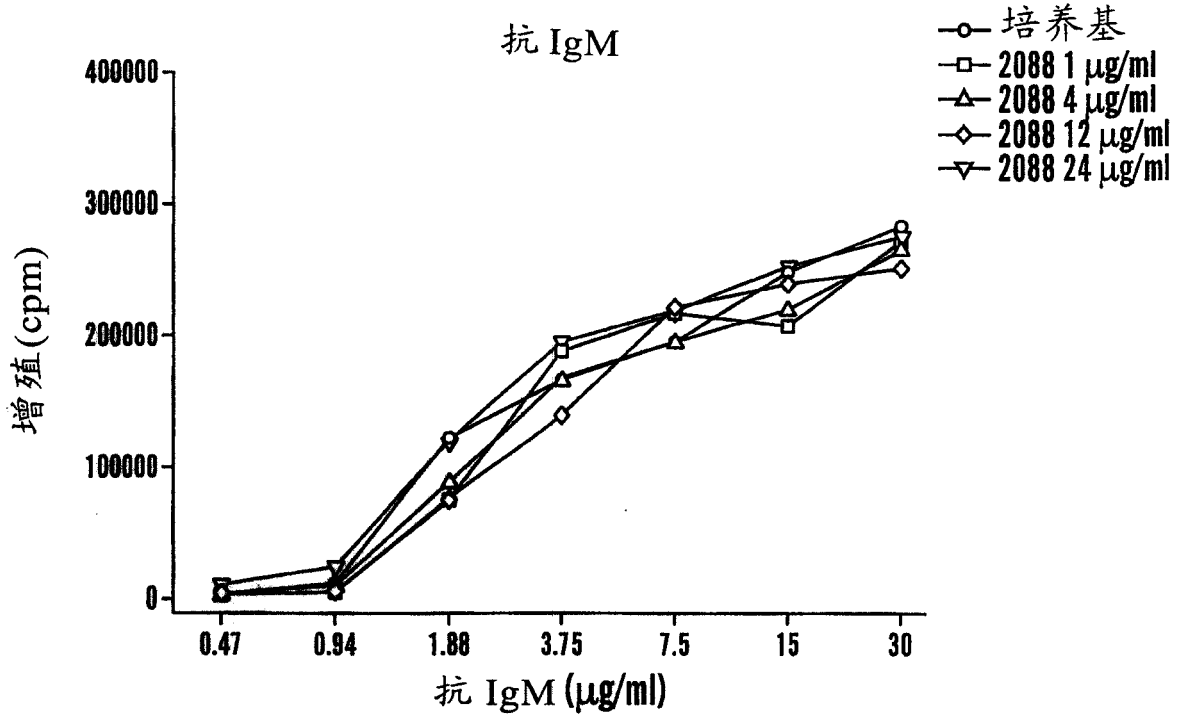


图 7A

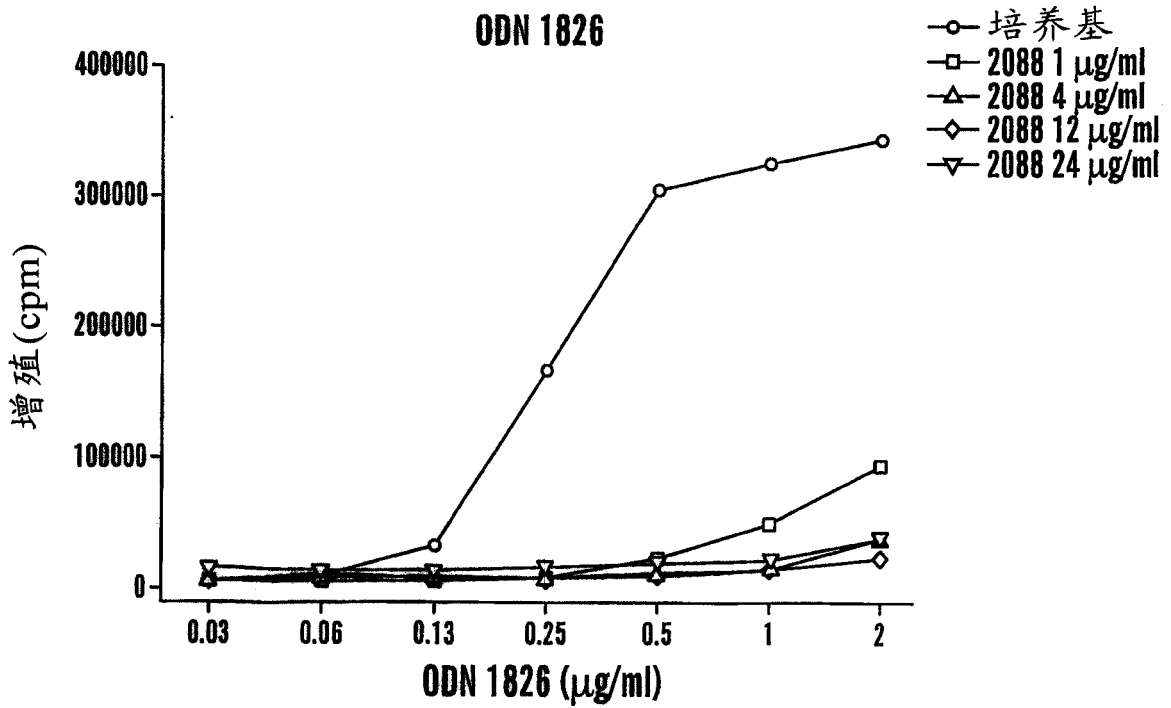
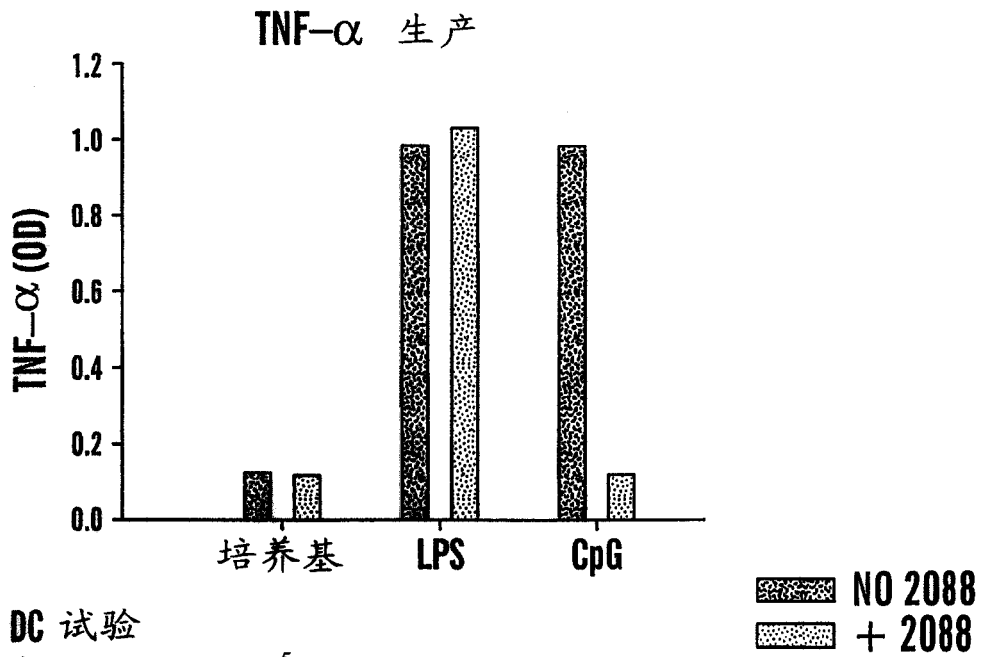


图 7B

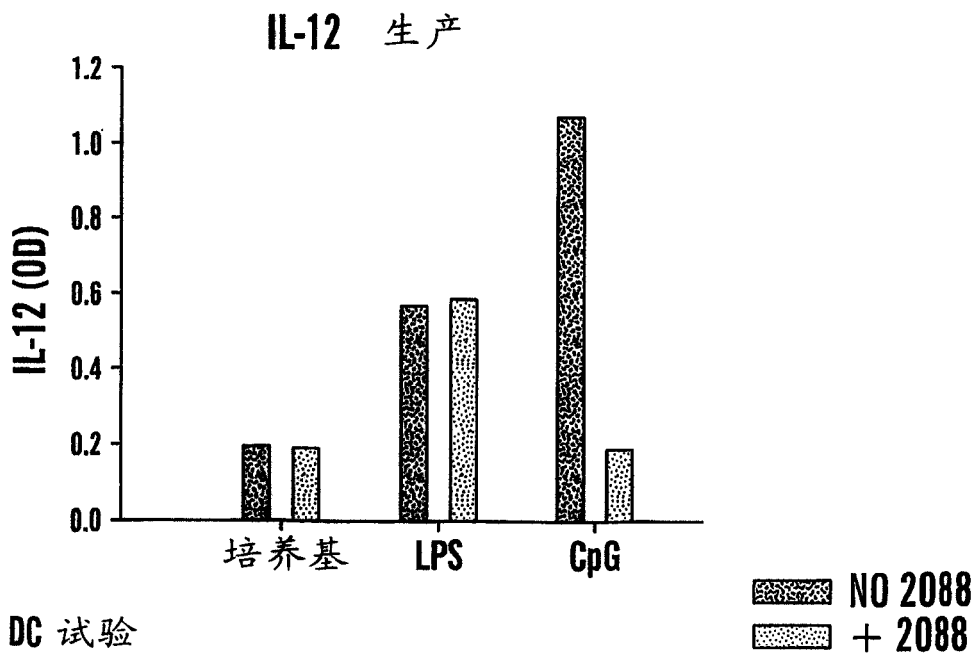


— 4.5.02 DC 试验

— DCs 涂布为  $7.5 \times 10^5$ /孔

— 在加入刺激之前与浓度为  $12 \mu\text{g/ml}$  的 2088 预培养 30 分钟

图 8A



— 4.5.02 DC 试验

— DCs 涂布为  $7.5 \times 10^5$ /孔

— 在加入刺激之前与浓度为  $12 \mu\text{g/ml}$  的 2088 预培养 30 分钟

图 8B

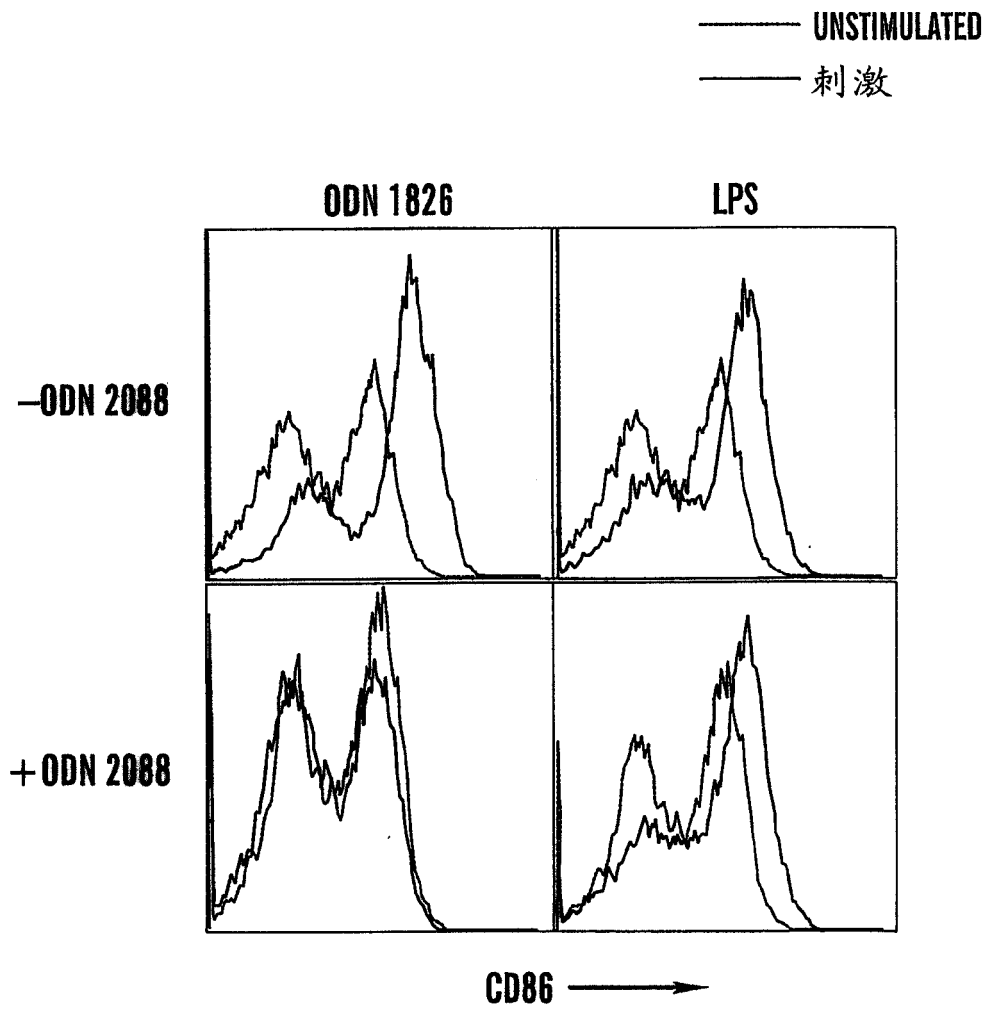


图 8C

与 ODN 2088 预培养 24 小时阻断了含有染色质的 IC 对 B 细胞的活化

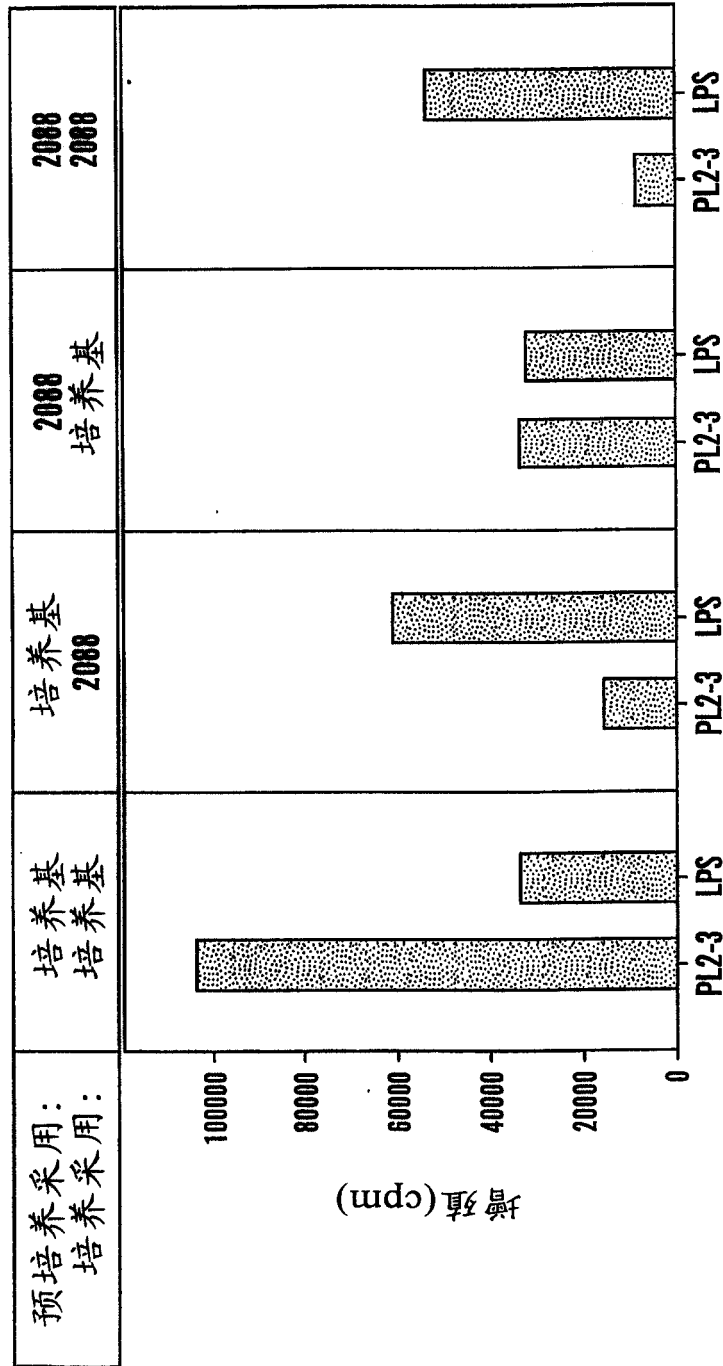


图 9

专利名称(译)	治疗免疫复合物相关疾病的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN1575184A</a>	公开(公告)日	2005-02-02
申请号	CN02817512.3	申请日	2002-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	波士顿大学		
申请(专利权)人(译)	波士顿大学理事会		
当前申请(专利权)人(译)	波士顿大学理事会		
[标]发明人	安马沙克罗斯坦 伊丽莎白利德贝特 伊恩瑞弗金		
发明人	安·马沙克·罗斯坦 伊丽莎白·利德贝特 伊恩·瑞弗金		
IPC分类号	A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/16 A61P19/02 A61P37/02 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/44 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/567		
CPC分类号	G01N2500/02 G01N2800/102 C07K2317/21 C07K16/28 G01N33/564 C07K16/44 G01N2500/00 A61K2039/505 C07K16/18 G01N33/5047 A61P1/16 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00		
优先权	60/318096 2001-09-07 US 60/367578 2002-03-26 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于治疗免疫复合物相关疾病(ICAD)的方法和组合物，用于患有ICAD的受试者或者ICAD高危受试者，所述ICAD的实例包括SLE、类风湿性关节炎、丙型肝炎相关的免疫复合物疾病(例如冷球蛋白血症)。本发明基于如下令人意外的发现，即含有染色质的免疫复合物通过双受体结合过程而活化自身反应性B细胞和树突状细胞，并且在这两种细胞中均涉及Toll样受体(TLR)。治疗ICAD的方法包括：给予需要治疗的个体一种具有如下属性的化合物：或者1)抑制免疫复合物的形成，其或者通过阻止其形成，和/或通过TLR相结合而实现上述功能；或者2)干扰含有自身抗原的免疫复合物(或其抗原成分)与TLR相结合；或者3)抑制由BCR和TLR(在B细胞中)或FcR和TLR(在树突状细胞中)双结合(通过免疫复合或未复合的自身抗原)所启动的信号通路。

