

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02803556.9

[51] Int. Cl.

A61K 39/38 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年9月9日

[11] 授权公告号 CN 100536919C

[22] 申请日 2002.1.8 [21] 申请号 02803556.9

[30] 优先权

[32] 2001. 1. 9 [33] US [31] 60/260,541

[86] 国际申请 PCT/US2002/000343 2002.1.8

[87] 国际公布 WO2002/067760 英 2002.9.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.9

[73] 专利权人 贝勒研究院

地址 美国德克萨斯州

[72] 发明人 J·F·班策罗 A·K·帕卢卡

P·布兰科

[56] 参考文献

US5888511A 1999.3.20

US5919452A 1999.7.6

EP0627487A2 1994.12.7

US5889151A 1999.3.30

Islet Expression of Interferon - Alpha precedes Diabetes in both the BB Rat and Streptozotocin - Treated Mice. HUANG X et al. . Immunity, Vol. 1 No. 6. 1994

Oral Feeding of Interferon Tau can prevent the Acute and Chronic Relapsing Forms of Experimental Allergic Encephalomyelitis. SOOS et al. . J Neuroimmunology, Vol. 75 No. 1. 2. 1997

审查员 周洋

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 张广育

权利要求书 1 页 说明书 36 页 附图 19 页

[54] 发明名称

干扰素拮抗剂和 Flt3L 拮抗剂的用途

[57] 摘要

本发明提供了通过给予受试者干扰素拮抗剂和 Flt3L 配体 (Flt3L) 拮抗剂从而对自身免疫疾病进行治疗的方法。本发明也提供了含有一种或多种干扰素拮抗剂和一种或多种 Flt3L 拮抗剂的组合物、确定受试者发生自身免疫疾病的风险的体外测定法、以及用于此测定的试剂盒。

1. 干扰素拮抗剂在制备用于治疗有需要的受试者的自身免疫疾病的药物中的用途，该药物含有有效量的干扰素拮抗剂。

2. 权利要求 1 中的用途，其中的干扰素拮抗剂包括 TNF、TNF 激动剂或 TNF 受体激动剂。

3. 权利要求 1 中的用途，其中自身免疫疾病选自获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、强直性脊柱炎、关节炎、再生障碍性贫血、白塞氏病、糖尿病、移植物抗宿主病、格雷夫斯病、溶血性贫血、低 γ 球蛋白血症、高 IgE 综合征、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、多发性硬化症 (MS)、重症肌无力、牛皮癣、狼疮及它们的任何组合。

4. 权利要求 1 中的用途，其中的自身免疫疾病包括系统性红斑狼疮 (SLE)、药物诱导的狼疮或其组合。

5. 权利要求 1 中的用途，其中的自身免疫疾病包括糖尿病、I 型糖尿病、II 型糖尿病、幼年起病型糖尿病或它们的任何组合。

6. 权利要求 1 中的用途，其中的自身免疫疾病包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎或它们的任何组合。

7. 权利要求 1 中的用途，其中干扰素拮抗剂以包括约 1-10 倍摩尔过量于干扰素的量存在于药物中。

8. 权利要求 1 中的用途，其中干扰素拮抗剂减少了以下一种或多种：(i) I 型干扰素与其受体的结合；(ii) 干扰素依赖性信号转导；(iii) 干扰素血清水平；(iv) 利用干扰素受体结合测定法所测定的细胞的干扰素分泌；(v) 通过干扰素受体结合测定法所测定的血清中干扰素的生物利用度；或 (vi) 通过单核细胞分化测定法所测定的受试者中产生 I 型干扰素的细胞的发育。

9. 权利要求 1 中的用途，其中干扰素拮抗剂包括可溶性 IFN- α 受体。

干扰素拮抗剂和 F1t3L 拮抗剂的用途

相关专利申请的交叉参考

本发明要求2001年1月9日提交的美国临时专利申请60/260,541的优先权，在此处引用其所有内容作为参考。

发明领域

本发明涉及自身免疫疾病治疗和与自身免疫疾病相关的诊断测定。

发明背景

自身免疫疾病是破坏性的和致残的疾病，并且当患者的自身免疫系统通过攻击患者自己的身体或组织而对抗自身时发生。自身免疫疾病的一个示例为系统性红斑狼疮（SLE），其特征为涉及多器官及包括存在自身反应性 T 细胞和 B 细胞在内的免疫异常。抗核小体的自身抗体表现为 SLE 的标志特性，这表明对濒死（凋亡）细胞的不适当处理可能代表了在 SLE 发展过程中的关键致病事件。SLE 是由免疫系统的体液和细胞免疫的调节障碍引起的，表明最初的改变可能是在参与并控制免疫效应物的细胞，即树突细胞（DC）的细胞水平上。

树突细胞（DC）是特化的、可引发 T 细胞介导的免疫应答的抗原呈递细胞（Steinman, R. M. (1991) *Ann. Rev. Immunology*, Vol. 9, pp. 271-296 和 Banchereau et al. (2000) *Ann. Rev. Immunol.* 18: 767)。DC 诱导并支持免疫应答，并且已经证明其可捕获濒死细胞并将它们的抗原呈递给 CD4+ T 细胞，而 CD4+ T 细胞随后激活包括 B 细胞在内的其他免疫效应物。骨髓中的 DC 祖细胞产生了循环中的祖细胞，它们到达各组织，在其中作为具有高吞噬能力的未成熟细胞而停留。当组织受到损伤时，DC 捕获抗原（Ag）并随后迁移到淋巴器官，它们在此选择稀有的 Ag-特异性 T 细胞从而引发免疫应答。DC 细胞将抗原呈递给 CD4+ T 细胞，其随后调节包括如 CD4+ T 细胞和 B 细胞等抗原特异性的以及如巨噬细胞、嗜酸性细胞和 NK 细胞等非特异性的免疫效应物。DC 也可直接激活 B 细胞并诱导它们体外分化为浆细胞。

三种 DC 前体（“DCpre”）亚型在血液中循环：(1) CD14⁺单核细胞，(2) CD11c⁺髓样 DCpre 以及 (3) CD11c⁻浆细胞样（淋巴样）DCpre。

单核细胞可分化为展示出未成熟 DC 或巨噬细胞 (MΦ) 的特征的细胞。当利用 CD40L 和/或 LPS 处理或当利用包括 TNF、IL1 和 IL-6 在内的细胞因子联合培养时, 未成熟 DC 成为成熟 DC。CD11c⁺髓样 DCpre 产生了间质 DC (intDC)、朗氏细胞 (LC) 或依赖于局部细胞因子环境的 MΦ。

CD11c⁻IL-3Rα⁺淋巴样 DC 前体是干扰素-α (IFN-α) 的主要来源。在狼疮血清中常常发现高水平的 IFN-α (Kim et al., Clin. Exp. Immunol. 70: 562-269, 1987)。此外, IFN-α 治疗常常诱导出现自身抗体并最终发展成为包括 SLE 在内的自身免疫疾病 (Ronblum et al., J. Intern. Med. 227: 207-210, 1990)。已经报道了在 SLE 患者中存在抗 IFN-α 抗体 (Suit et al., Clin. Exp. Rheumatol. 1: 133-135)。

已经有报道浆细胞样 (plasmacytoid) DC 可产生能够随后影响髓样 DC 分化及 B 细胞生长和激活的 IFN-α。Spits 等 (J Exp Med 192 (12): 1775-84, 2000) 和 Blom 等 (J Exp Med 192 (12): 1785-96, 2000) 报道, 人 CD11c⁻浆细胞样 DCs 是淋巴来源。Siegal 等 (Science 284: 1835, 1999) 报道, 当暴露于失活的单纯疱疹病毒时, 淋巴样 DC (浆细胞样 DC) 产生了大量的 IFN-α。Cella 等 (Nature Medicine 5 (8): 868-70, 1999) 报道, 淋巴样 DC (浆细胞样 DC) 反应于产生了大量的 IFN-α 及 CD40 连接。

SLE 中的自身抗体 (autoAb) 可鉴定为三类: (1) 抗核和抗双链 DNA 抗体; (2) 直接抗内皮细胞和血小板表面 (抗磷脂/β2 糖蛋白) 的 autoAb; 以及 (3) 直接抗造血细胞表面上的分子的 autoAb (见如 Cabral 和 Alarcon-Segovia 的综述, (1998) Curr. Opin. Rheumatol. 10: 409)。除由细胞和/或组织抗原-抗体相互作用引起的直接损伤之外, 这些疾病症状中的许多症状是由免疫复合物在组织上的沉积造成的间接损伤。已经证明此机理对某些形式的 SLE 肾炎、关节炎和血管炎负责 (Lahita, R. G. 1999. Systemic Lupus Erythematosus. Academic Press; Kammer, G. M., and G. C. Tsokos. 1999. Lupus, Humans Press)。包括包含 Fc 受体 ("FcR") 和 C3b-受体 ("C3b-R") 功能障碍及补体蛋白和 C-反应蛋白 (均为抗 DNA/核小体复合物清除的必需作用分子) 的遗传缺陷在内的免疫复合物清除缺陷均有助于 SLE 的发展 (Lahita, R. G. 1999. Academic Press; Kammer,

G. M., and G. C. Tsokos. 1999 Humana Press)。B细胞在SLE的发病机制中起主要作用，因为它们负责产生自身抗体和高 γ 球蛋白血症。

Hooks等(N. Engl. J. Med. 301: 5, 1979)对患有包括SLE在内的自身免疫疾病的患者中存在的循环免疫干扰素进行了描述。Kim等公开了与临床活性指数相关的IFN- α 水平。Preble等(J. Exp. Med. 157: 214, 1983)和von Wussow等(Arthritis Rhum. 32: 914, 1989)公开了在血清IFN阳性和血清IFN阴性SLE患者单核细胞中发现高水平2-5A合成酶和MX蛋白，它们是由IFN- α 特异性诱导产生的两种蛋白。Vallin等(J. Immunol. 163: 6306 1999)公开了IFN- α 诱导的因子作用于具有未成熟DC的特征的白细胞。Batteux等(Eur. Cytokine Netw. 10: 509, 1999)公开了利用SLE血清诱导产生IFN- α 是依赖于Fc γ RII (CD32)的。

IFN- α 治疗的一种并发症为诱导自身免疫紊乱(约4%-19%的患者中)，其中最普遍的为甲状腺功能障碍(Ehrenstein et al., Arthritis Rheum. 36: 279, 1993; Okanoue et al., J. Hepatol. 25: 283, 1996; Ronnblom et al., Ann. Intern. Med. 115: 178, 1991; Kalkner et al., Qim. 91: 393, 1998)。的确，Schilling等(Cancer 68: 1536, 1991)公开了IFN- α 治疗也可诱发几率为0.15%-0.7%的SLE。每个病例都与诱导或显著增加抗核抗体和抗DNA抗体的滴度相关联。

I型糖尿病为另一种自身免疫疾病，其中IFN- α 起了重要的致病作用。Foulis等(Lancet 2: 1423, 1987)和Huang等(Diabetes 44: 658, 1995)公开了胰岛对IFN- α 的表达和人自身免疫糖尿病的产生间存在强关联。此外，Chakrabarti等(J. Immunol. 157: 522, 1996)公开了胰岛中的B细胞对IFN- α 的表达在转基因小鼠模型中引起了糖尿病。此外，Fabris等(Lancet 340: 548, 1992)和Guerci等(Lancet 343: 1167, 1994)公开了IFN- α 治疗可诱导人I型糖尿病。

FMS样酪氨酸激酶3 ("Flt3")是也包括KIT (c-kit RTK)、FMS (M-CSF RTK)和血小板来源的生长因子(PDGF)受体在内的III型酪氨酸激酶受体家族中的成员。与KIT和FMS受体的配体，即干细胞因子和M-CSF类似，Flt3受体由命名为Flt3-配体("Flt3L")的相关分子所激活。Flt3为与c-fms和c-kit受体相关的酪氨酸受体的变体形式

(Rosnet et al. *Oncogene*, 6, 1641-1650, 1991)。Flt3L 为已经证明可促进 DC 的增殖并产生抗肿瘤免疫应答的造血细胞因子(见美国专利 No. 5, 554, 512, "Flt3 受体的配体")。已经发现 Flt3L 可调节祖细胞和干细胞的生长与分化(Blazar et al. (2001) *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 7: 197-207 及见美国专利 No. 5, 843, 423)。已经证明单核细胞培养物的 Flt3L 处理可造成髓样和淋巴样相关的 DC 绝对数目的显著增加以及供体脾 T 细胞比例减少(Blazar et al)。

本专利申请中参考的所有出版物的公开内容(包括美国专利、公开的 PCT 申请、科学文献、书、手册等)在此处全文引用作为参考文献。

发明简述

本发明涉及治疗受试者的自身免疫疾病的方法, 其包括给予受试者有效量的 (a) 至少一种降低 I 型干扰素活性的干扰素拮抗剂, 以及 (b) 至少一种降低 Flt3L 活性的 Flt3 配体 (Flt3L) 拮抗剂, 从而减少受试者的单核细胞到树突细胞的分化并治疗自身免疫疾病。

本发明也涉及抑制单核细胞分化为能够进行抗原呈递的树突细胞的治疗组合物, 该组合物包含 (a) 至少一种降低 I 型干扰素活性的干扰素拮抗剂, 以及 (b) 至少一种降低 Flt3L 活性的 Flt3 配体 (Flt3L) 拮抗剂。这样的组合物构成了用于治疗包括但并不局限于 SLE 以及其他包括但并不局限于糖尿病、关节炎、AIDS、银屑病及甲状腺炎在内的 IFN- α 介导的自身免疫疾病的治疗组合物。

本发明也涉及确定受试者发生自身免疫疾病的风险的体外测定法, 该方法包括 (a) 从受试者获取血清样品, (b) 对血清样品中的 IFN- α 和 Flt3 配体 (Flt3L) 进行定量; 以及 (c) 将 IFN- α 和 Flt3L 的量与患有自身免疫疾病的患者血清中的 IFN- α 和 Flt3L 量进行比较, 从而确定受试者发生自身免疫疾病的风险。

本发明也涉及用于确定受试者发生自身免疫疾病的风险或用于监测受试者的自身免疫疾病状态的试剂盒, 该试剂盒包含可有效检测受试者生物样品中的 Flt3L 和 IFN- α 的量的特异性结合于 Flt3L 和 IFN- α 的组合物。此试剂盒含有的组合物中包含 (a) 结合 Flt3L 的单克隆抗体及 (b) 结合 IFN- α 的单克隆抗体。此外, 这些组合物是可进行检测的。此试剂盒可以包含一种或多种用于检测与一个或多个样品结合

的组合物的量的试剂。

附图简述

图 1 图示了 SLE 中的树突细胞亚型间的相互作用，其展示了淋巴样（浆细胞样）DC 和/或它们的产物如 I 型干扰素间的关系以及髓样 DC 的分化。髓样 DC 的分化起始了抗原呈递级联从而导致了有助于 SLE 发病的自身反应性 T 细胞和 B 细胞分化。

图 2A-2E 为展示从正常供体纯化的单核细胞的照片，当利用 SLE 患者血清培养时而不是利用自体血清 (AS) 培养时，这些单核细胞可聚成簇并获得树突细胞的形态学。利用 AS 血清 (图 2C) 或 SLE 血清 (图 2A-2B) 对单核细胞进行培养。图 2D 描述了 SLE 血清诱导的面纱细胞簇。在图 2E 中，对利用 SLE 血清培养了 24 小时的细胞自旋 (cytospun) 单核细胞进行吉姆萨染色展示了具有典型的成熟 DC 形态学的细胞 ("SLE-DCs" = SLE 血清诱导的 DC)。

图 3 图示了用 SLE 血清培养的获得了成熟 DC 表型的单核细胞的流式细胞术结果。每个图展示了对特异于每个图下所列的细胞表面标记的标记抗体进行的检测的增加。利用 SLE 血清 (下图) 培养的单核细胞，而不是利用自体血清 (上图) 培养的单核细胞下调 CD14 表达、上调 HLA-DR 及共刺激分子如 CD86、CD80 和 CD40 的表达并获得了成熟 DC 标记 CD83 的表达。水平轴表示同种型对照 (虚线) 和特异性抗体 (实线) 的荧光强度的对数值。纵轴表示相关的细胞频率。

图 4A-4E 图示了流式细胞术结果，其表明利用 SLE 血清培养的富集的单核细胞可捕获可溶性抗原。利用 SLE 血清 (图 4D 和 4E) (SLE 1 和 SLE 2 表示取自两个不同 SLE 患者的血清) 或 AS 血清 (图 4C) 对富集的单核细胞进行培养并在 4°C (细线) 和 37°C (粗线) 下利用 FITC-葡聚糖 (FITC-DX) 摄取确定它们的内吞活性。利用 GM-CSF 和 IFN- α ("GM-IFN α ") 培养的细胞 (图 4B) 以及利用 GM-CSF 和 IL-4 ("GM/IL4") 培养的细胞 (图 4A) (其为体外 DC 培养的标准) 展示出相当的 FITC-DX 摄取水平。利用 AS 血清培养的单核细胞不摄取 FITC-DX。

图 5 为一直方图，其表明利用 SLE 血清培养，而不是利用 AS 血清培养的单核细胞诱导了异体幼稚 CD4⁺ T 细胞的增殖。对利用 GM/IFN- α 、GM/IL4、SLE 1、SLE 2 和 AS 血清培养的单核细胞进行洗涤，并在分级剂量 (1000 细胞和 5000 细胞) 下利用 1×10^5 个幼稚

CD4+CD45RA+异体 T 淋巴细胞培养 5 天。利用胸苷掺入对 T 细胞增殖进行确定 (cpm x 10³, 纵轴)。

图 6 图示了在 AS 血清中培养的 SLE-DC 或 DC 诱导的 T 细胞产生的 T 细胞细胞因子水平。利用 ELISA 测定法测定了细胞因子的释放, 且在纵轴上以 pg x 10³/mL 显示 IL-10 和 IFN- γ 。

图 7A、7B 和 7C 利用照片展示了 SLE-DC 对自体凋亡细胞的捕获。对利用 SLE 血清 (图 7A 和 7B) 和 AS 血清 (图 7C) 的过夜培养物的细胞自旋进行吉姆萨染色。箭头表示对利用 SLE 血清培养的培养物中的细胞碎片的捕获。

图 8A 和 8B 图示了对异体凋亡细胞的捕获以及将它们抗原呈递给自体 CD4+ T 细胞。图 8A 描述了利用 7AAD 水平的升高表示的 SLE-DC 对含有凋亡小体的 DNA 的捕获的流式细胞术结果。加载了抗原的 DC 用作自体 CD4+ T 细胞增殖的刺激物 (利用胸苷掺入测定, 纵轴) (图 8B)。

图 9A-9B 图示了 SLE 疾病活动与 SLE-DC 的 IFN- α 诱导活性间的关系。图 9A 展示了诱导活性和 SLEDAI 间的关系。图 9B 展示了诱导能力和血清中 IFN- α 水平之间的关系。每个图上的每个点表示从患者中取出的血清。

图 10 图示了对 SLE 患者血清中的 IFN- α 的阻断。如图所示, 在不添加或添加同种型对照或抗体中和 IFN- α 的情况下, 利用 SLE 血清产生了抗原呈递细胞。对细胞进行洗涤, 并以指定剂量利用纯化的异体 CD4+ T 细胞 (1 x 10⁵) 将其作为刺激物细胞进行培养 5 天。利用胸苷掺入对 T 细胞增殖进行确定 (cpm x 10³, 纵轴)。

图 11 表明 SLE 患者具有高 IFN- α 血清水平。从 45 个 SLE 患者和 28 个正常患者中采取血清样品。

图 12 图示了 SLE 患者外周血单核细胞 (PBMC) 反应于病毒引发而体外分泌 IFN- α 。在存在或不存在流感病毒 (10 μ g/mL) 的 96 孔板中培养总 PBMC。培养 24 小时后收集上清液, 并利用 ELISA 进行 IFN- α 释放测定。"A11-" 表示不含病毒的对照培养物中的水平。"+" 表示利用病毒进行的培养。"ND" 表示正常供体。

图 13A 和 13B 展示了 IFN- α 体外诱导 BAFF/B1ys (TNF 家族的 B 细胞激活因子)/B1ys (B 淋巴细胞刺激物) 在单核细胞上的表达以及

BCMA (B 细胞成熟抗原) 在 PBMC 上的表达。图 13A 展示了在指定条件下 (IFN- α U/mL) 进行 72 小时培养的单核细胞中的相对 BAFF 表达 (ng/ng 18S 核糖体 RNA)。NI 指取自同一供体的对照未培养单核细胞。图 13B 展示了在未培养的 (NI) 或利用 1000U/mL IFN- α 进行指定时间培养的 PBMC 中的相对 BCMA 表达 (ng/ng 18S)。利用 ABI PRISM 7700 序列检测系统 (ABI) 进行实时 PCR 以评估相对 RNA 表达。利用靶表达 (BAFF 或 BCMA) 对参照 (18S 核糖体 RNA) 的比值对表达水平进行标准化。

图 14A-14C 图示了利用浆细胞样 DC (pDC) 对 IFN- α 分泌进行的 TNF 调节。图 14A 表明内源 TNF 的中和导致由 CD123+pDC 持续释放 IFN- α 。垂直轴展示了在指定条件下产生的、以 ng/mL 表示的 IFN- α 水平。图 14B-14C 表明向 pDC 中添加 TNF 抑制了病毒诱导的 IFN- α 释放。图 14B 在垂直轴上表明分泌到培养物上清液中的 IFN- α 的抑制百分比。图 14C 在垂直轴上展示了培养物上清液中以 ng/mL 表示的 IFN- α 的水平。

图 15 图示了流式细胞术实验, 其表明 TNF 阻断了浆细胞样 DC 的分化, 而有利于髓样 DC 的分化。此图描述了从定向造血祖细胞产生 pDC 的 TNF 抑制。在进行培养的第一周, 在 F1t3L (100ng/mL)、TPO (30ng/mL) 及 IL-6 (25ng/mL) 或 TNF 100ng/mL 存在下培养 CD34+CD45RA-造血祖细胞。其后, 对细胞进行洗涤, 并仅仅利用 F1t3L (100ng/mL) 对其进行为期 3 周的额外培养。利用 CD11c 阴性 CD123 阳性染色对 pDC 进行鉴定, 对细胞表面标记表达进行流式细胞术以确定 pDC 的分化。

图 16 图示表明浆细胞样 DC 中的途径, 该途径可被作为干扰素拮抗剂的外源 TNF 所抑制。

图 17 图示了 SLE 患者血清中 F1t3L (pg/mL) 水平的升高。

图 18 图示了 SLE 患者中的 F1t3L 血清水平与利用 SLEDAI 测得的疾病活动度间的关系。利用线性回归和 Pearson 分析确定了其统计学意义。

图 19A-19D 利用照片展示了利用添加有 F1t3L 的培养基培养的单核细胞向具有 DC 形态的细胞的分化。

图 20 图示表明利用添加有 F1t3L (100ng/mL) 的培养基培养的单

核细胞能够激发幼稚 CD4⁺ T 细胞。

图 21 图示了 DC 亚型发育和分化中的几个途径，并且可通过阻断 Flt3L 和 IFN α 的活性来对这些途径进行改变。

图 22 图示了 SLE 中的细胞因子和 DC 间的相互作用并对有意用于本发明中的治疗组合物的细胞因子和/或细胞靶进行鉴定。

发明详述

本发明涉及治疗受试者的自身免疫疾病的方法，其包括给予受试者有效量的 (a) 至少一种降低 I 型干扰素活性的干扰素拮抗剂，以及 (b) 至少一种降低 Flt3L 活性的 Flt3 配体 (Flt3L) 拮抗剂，从而减少受试者的单核细胞到树突细胞的分化并治疗自身免疫疾病。此外，本发明提供了可用于抑制单核细胞分化为能够进行抗原呈递的树突细胞 (DC) 的组合物，该组合物包含 (a) 至少一种降低 I 型干扰素活性的干扰素拮抗剂，以及 (b) 至少一种降低 Flt3L 配体活性的 Flt3 配体拮抗剂。例如，组合物的一种成分可为减少或抑制 I 型干扰素 (如 IFN- α) 及其受体间结合或相互作用的拮抗剂。此组合物也包含减少或抑制 Flt3L 及其受体间的结合或相互作用的拮抗剂。

此处所用的 "SLE-DC" 指通过利用 SLE 患者血清 ("SLE 血清") 培养单核细胞而获得的树突细胞。

此处所用的 "干扰素拮抗剂" 包括能够降低受试者的细胞中或体外细胞中 I 型干扰素的活性或功能的抗体、抗体的抗原结合片段、多肽、肽模拟物、编码多肽的核酸、有机分子或其组合。

此处所用的 "多肽" 包括任何长度的肽及蛋白质，不管它们的功能如何。

此处所用的 "I 型干扰素" 包括 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 和 IFN- τ 。Oritani 等 (2001) Cytokine Growth Factor-Rev. 12 (4): 337-48) 提供了对其他 I 型干扰素示例的描述。

干扰素拮抗剂干预了 I 型干扰素 (如 IFN- α) 及其受体间的相互作用，通过减少单核细胞到成为抗原呈递细胞的 DC 的分化而减少抗原呈递细胞的产生。可通过一或多种不同的机理来实现抗原呈递细胞的生成减少，但确切的机理对于本发明来讲并非重要的。例如，TNF 和/或激动性抗 TNF 受体抗体可通过加速 pDC 到 I 型 IFN 非生产细胞的分化来减少 I 型干扰素的分泌。

可利用多种测定方法来鉴定化合物是否为本发明中有用的干扰素拮抗剂。这些测定法对于本领域中的技术人员来讲是已知的。一种测定法为树突细胞分化测定，其中在适于单核细胞分化为 DC 的条件下将待测定化合物添加到单核细胞培养物中。实验条件包括添加 SLE 血清或干扰素，这样单核细胞就可诱导分化为 DC。因此，与没有进行化合物添加的培养物中的单核细胞分化相比，如果化合物引起了对干扰素和/或 SLE 血清驱动的单核细胞到 DC 的分化的抑制，那么此化合物便为干扰素拮抗剂。

另一种可鉴定干扰素拮抗剂化合物的测定法为结合测定，其中测定了对标记的干扰素与细胞上的受体间的结合的抑制。如果化合物能够抑制干扰素与其受体或与具有干扰素受体的细胞的结合，则此化合物为干扰素拮抗剂。

此外，一种可确定化合物是否为干扰素拮抗剂的测定法为测定细胞对反应于正常情况下诱导干扰素产生和/或分泌的触发因素，如病毒而产生的干扰素的抑制的测定法。因此，如果存在化合物和触发因素（如病毒），能够正常产生干扰素的细胞不产生干扰素或产生了水平降低的干扰素，那此化合物为干扰素抑制剂。

另一种确定化合物是否为干扰素拮抗剂的测定法为肿瘤细胞存活测定。干扰素通过直接生长抑制和/或诱导肿瘤细胞死亡而具有抗肿瘤活性。这些易感于干扰素的肿瘤细胞的示例包括黑色素瘤细胞系。这种肿瘤细胞存活测定法测定了在干扰素和干扰素拮抗剂存在情况下培养的易感黑色素瘤细胞的存活。因此，与不含待测化合物的完全相同的培养物相比，如果肿瘤细胞在含有待测化合物的培养基中能够存活，那此化合物为干扰素拮抗剂。

作为实例，另一种鉴定化合物是否为干扰素拮抗剂的测定法为对包括 MXA 蛋白在内的干扰素可诱导的蛋白以及干扰素调节因子的表达（在蛋白质和/或 RNA 水平上）进行定量的测定法。因此，将待测化合物添加到培养基中并测定特定干扰素可诱导的蛋白的蛋白质和 RNA 水平。如果化合物的添加降低了蛋白质和/或 mRNA 表达水平，那么此化合物为干扰素拮抗剂。

另一种确定化合物是否为干扰素拮抗剂的测定法为体外保护测定。正常情况下，向细胞培养物中添加干扰素可保护细胞免于遭受由

导入细胞培养物中的病毒引起的细胞裂解，从而提高了培养基中细胞的存活。因此，添加干扰素拮抗剂取消了此保护且细胞存活将不会增加。因此，如果测定到对干扰素的抗病毒活性的抑制，那么此化合物为干扰素拮抗剂。此抑制性测定是基于对易感于病毒的细胞的死亡确定。

干扰素拮抗剂的示例包括但并不局限于特异性结合 IFN- α 的单克隆抗体。干扰素拮抗剂的另一实施例为可溶性 IFN- α 受体。可溶性受体可用于结合循环 I 型干扰素从而防止其与其天然受体结合并阻止单核细胞到 DC 的分化。在本发明的另一实施方案中，干扰素拮抗剂可为与结合 IFN- α 受体结合但并不引起此结合的下游效应的有机分子，也即非功能性受体配体模拟物。这样的有机分子可与受体的 IFN- α 结合袋特异性结合而不引起受体激活，从而替代可进行这样的结合的 IFN- α 并使受体无效。在本发明进一步的实施方案中，干扰素拮抗剂包括含有可特异性结合干扰素或 Flt3L 或二者的单克隆抗体互补决定区 (CDR) 的肽。而在本发明的另一实施方案中，干扰素拮抗剂为融合蛋白。

本发明中有用的干扰素拮抗剂可通过多种不同的机理降低 I 型干扰素的活性，并且本发明不依赖于任何特定机理。本发明的干扰素拮抗剂包括但并不局限于具有降低的体内活性或不具有体内活性的修饰的 IFN- α 。对于利用 I 型干扰素破坏抗原呈递细胞的产生来讲，干扰素可在干扰素信号传递途径中的多种不同的接合部位影响 I 型干扰素的活性。正如一些例子，拮抗剂可阻断干扰素蛋白本身的活性；可阻断 I 型干扰素受体的活性；抑制干扰素与受体的结合；阻断 I 型干扰素信号传递和/或转导途径；阻断 I 型干扰素从正常产生 I 型干扰素的细胞中释放；阻断正常产生 I 型干扰素的细胞的生成；以及阻断 I 型干扰素从正常分泌 I 型干扰素的细胞中分泌。对正常产生干扰素的细胞的分化或产生的抑制可通过给予细胞 TNF 和/或激动性抗 TNF 受体抗体和/或可提供给细胞 TNF 样信号的分子来实现。这些类型的化合物是本发明提供的干扰素拮抗剂示例。此外，抗原呈递细胞的分化和生长所需的 I 型干扰素辅因子的灭活为本发明的干扰素拮抗剂的另一可能机理。

此处所用的"Flt3L 拮抗剂"包括能够降低 Flt3L 活性的抗体、抗

体的抗原结合片段、多肽、肽模拟、编码多肽的核酸、及有机分子或它们的组合。例如，F1t3L 拮抗剂可干扰 F1t3 配体 ("F1t3L") 及其受体间的相互作用从而抑制祖细胞分化为树突细胞。抗原呈递细胞产生的减少可通过一或多种不同机理来实现。例如，F1t3L 有助于持续的 DC 激活，从而依次驱动 SLE 中的自身抗原呈递，因此，F1t3L I 为治疗干预的靶。F1t3L 有可能在 SLE 自身免疫病的发生或持续中起重要的作用，从而使得 F1t3L 拮抗剂在自身免疫疾病治疗中具有有用性。

在一个实施方案中，鉴定干扰素拮抗剂的治疗性有效剂量的测定法为确定降低干扰素受体与待治疗的受试者血清体外结合所必需的干扰素拮抗剂量。在该实例中，降低 50% 体外结合所必需的浓度为体内治疗的有效浓度。可利用一相同的 F1t3L 测定来确定用于特定患者或受试者的 F1t3L 拮抗剂的有效量。

可利用多种测定法来测定一种化合物是否为本发明中有用的 F1t3L 拮抗剂。一个测定法为树突细胞分化测定法，其中要在适于单核细胞分化为 DC 的条件下将待检测化合物添加到单核细胞培养物中。这些条件包括向单核细胞培养物中添加 F1t3L，这样可诱导单核细胞分化为 DC。因此，与没有添加化合物的单核细胞培养物相比，如果化合物至少抑制了 50% 的单核细胞到 DC 的分化，那么此化合物为 F1t3L 拮抗剂。

另一确定化合物是否为 F1t3L 拮抗剂的测定法是确定对标记的 F1t3L 与其受体间结合的抑制的测定法。在此测定法中，将可检测标记连接到 F1t3L 上，并在存在和不存在化合物的条件下允许此标记的 F1t3L 与其受体进行结合。如果在存在化合物的条件下引起 F1t3L 与其受体结合下降，则此化合物为 F1t3L 拮抗剂。

另一用于确定化合物是否为 F1t3L 拮抗剂的测定法为体外增殖测定。为了诱导它们的分化和/或增殖，将人造血祖细胞与 F1t3L 进行培养。将待检测化合物添加到一些培养物中，而另一些培养物不添加化合物。对比添加和不添加化合物的培养物以确定增殖和分化的量。如果存在对 F1t3L 驱动的人造血祖细胞的增殖和/或分化的抑制，那此化合物为 F1t3L 拮抗剂。

另一用于确定化合物是否为 F1t3L 拮抗剂的测定法为体外增殖测定。在向培养物中添加或不添加化合物的情况下培养人因子依赖型 B

细胞系。这样的细胞系的一个示例为进行工程化来表达 F1t3 的细胞系。如果添加有化合物的培养物展示出 F1t3L 驱动的、对人因子依赖型 B 细胞系增殖至少 50% 的抑制，那么此化合物为 F1t3L 拮抗剂。

另一用于确定化合物是否为 F1t3L 拮抗剂的测定法为体内测定。给予小鼠 F1t3L，对它们的包括树突细胞在内的造血细胞进行体内增殖。给予对这些小鼠待检测化合物或不给予待检测化合物，并对小鼠中的造血细胞水平进行测定。因此，小鼠体内包括树突细胞在内的造血细胞的 F1t3L 介导的增殖的抑制表明此化合物为 F1t3L 拮抗剂。

F1t3L 拮抗剂的一个示例为特异性结合 F1t3L 的单克隆抗体。另一 F1t3L 拮抗剂示例为可溶性 F1t3L 受体。可溶性受体可用于结合循环 F1t3L 从而防止其与其天然受体结合并阻止单核细胞到 DC 的分化。在本发明的一个实施方案中，F1t3L 拮抗剂可为与 F1t3L 受体结合但并不引起此结合的下游效应的有机分子，也即受体配体模拟物。这样的有机分子可与受体的 F1t3L 结合袋特异性结合，从而替代可进行这样的结合的 F1t3L。本发明的 F1t3L 拮抗剂也包括含有上述单克隆抗体的互补决定区 (CDR) 的多肽，或为其融合蛋白。

此处应用的术语"人单克隆抗体" (HuMAb) 指从人 B 细胞获得的 HuMAb (例如，不管抗体是通过培养永生化和/或激活的人 B 细胞制备得到的，还是从编码此 HuMAb 的人 B 细胞 cDNA 重组获得的，也不管此抗体与可改变其生物活性的分子如受体或配体、酶、毒素、载体等结合与否) 以及将本发明中一个同种型 (如 IgG4) 的 HuMAb 的可变区与另一同种型 (如人 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgM 或 IgE) 的人抗体的恒定区重组制得的抗体。制备这些 HuMAb 的重组方法在本领域中是已知的 (见美国专利 No. 5,959,085)。

给予干扰素拮抗剂和 F1t3L 拮抗剂的联合可取得利用较少的每种分子来减少 DC 产生的优势。这样的协同性在允许降低本发明的方法和组合物中每种拮抗剂的治疗有效量方面是有益的。

在本发明的一个实施方案中，干扰素拮抗剂和 F1t3L 拮抗剂或二者可为多肽。此多肽可为肽模拟物、合成多肽、天然多肽的衍生物、修饰的多肽、标记的多肽，或包含非天然肽的多肽。此多肽可完全或部分为具有自然界未发现的手性，也即 D-氨基酸或 L-氨基酸之外的手性的非天然多肽。这些肽中非天然键的应用可延长半衰期并保护肽免

于天然酶的降解。

在本发明的另一实施方案中，自身免疫疾病选自获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、强直性脊柱炎、关节炎、再生障碍性贫血、白塞氏病、糖尿病、移植物抗宿主病、格雷夫斯病、溶血性贫血、低 γ 球蛋白血症、高 IgE 综合征、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、多发性硬化症 (MS)、重症肌无力、牛皮癣、狼疮及它们的任何组合。

糖尿病 (diabetes) 可为但并不局限于糖尿病 (diabetes mellitus)、I 型糖尿病、II 型糖尿病、幼年起病型糖尿病及它们的组合。关节炎可为但并不局限于类风湿性关节炎、幼年型类风湿关节炎、牛皮癣关节炎或它们的任何组合。狼疮可为系统性红斑狼疮 (SLE) 或药物诱导的狼疮。

在本发明的一个实施方案中，受试者为哺乳动物。哺乳动物可为人或灵长类动物。受试者可为人类患者或展示人免疫疾病症状的动物，因此也可为人疾病的动物模型，如鼠转基因疾病模型或灵长类动物疾病模型或在 SCID 小鼠中利用人免疫系统重建的人疾病模型。哺乳动物可为但并不局限于人、灵长类动物、大鼠、狗、猫、猪。在本发明的另一方面，受试者为鼠受试者、牛受试者、灵长类动物受试者、马受试者、猪受试者或犬受试者。在本发明的另一方面，受试者患有 SLE。

在本发明的一个实施方案中，干扰素拮抗剂包括抗 IFN- α 抗体或其抗原结合片段。在本发明的另一实施方案中，干扰素拮抗剂为 TNF。在本发明的另一实施方案中，F1t3L 拮抗剂包括抗 F1t3L 抗体或其抗原结合片段。

在本发明的一个实施方案中，可作为组合物的成分的抗体包括单克隆抗体、嵌合抗体、抗独特型抗体、人源化抗体、灵长类动物化 (primatized) 抗体及它们的任何结合。

在本发明的另一实施方案中，干扰素拮抗剂和 F1t3L 拮抗剂为一个分子的部分。在本发明的一个实施方案中，干扰素拮抗剂的有效量为相对于受试者血清中干扰素量约 1-10 倍摩尔过量。在本发明的另一方面，F1t3L 拮抗剂的有效量为相对于受试者血清中 F1t3L 量约 1-10 倍摩尔过量。

本发明的方法包括给予患者组合物，其中组合物抑制了通过 IFN- α 诱导髓样 DC 成熟为具有抗原呈递活性的 DC。组合物给药可通过静脉内注射、硬膜下注射、口服、局部给药、皮肤给药、皮下给药、肠胃外给药和通过气溶胶给药。本发明中的组合物对受试者的给药方式包括病变内、腹膜内、肌内或静脉内注射；输注；脂质体介导的递送；或局部、鼻、口、眼或耳递送。在进一步的实施方案中，给药包括气管内给药、肛门或鞘内给药。本发明中的组合物可进行每小时、每天、每周、每月、每年给药（如以缓释形式）或一次性递送。此递送可为持续一段时间的连续递送，如静脉内递送。本领域中的技术人员可很容易的确定优选的给药途径和给药时间。

在本发明的一个实施方案中，干扰素拮抗剂减少了 I 型干扰素与其受体的结合。在另一实施方案中，干扰素拮抗剂干预了干扰素与受试者细胞上受体结合后的信号转导。在另一实施方案中，干扰素拮抗剂减少受试者体内细胞产生的干扰素。在另一实施方案中，干扰素拮抗剂减少了患者体内细胞的干扰素分泌。而在另一实施方案中，干扰素拮抗剂降低了患者体内干扰素的生物利用度。在进一步的实施方案中，干扰素拮抗剂为 TNF。

在本发明的另一个实施方案中，组合物进一步包含载体。在本发明的另一实施方案中，载体包括含水载体、脂质体或脂质载体。

包含在本发明的组合物中的化合物可以是至少部分为非天然的肽模拟化合物。肽模拟化合物可为具有 F1t3L 或 F1t3L 受体或 I 型干扰素或 I 型干扰素受体的部分氨基酸序列的小分子类似物。此化合物由于其模拟作用而具有提高的稳定性、有效性、效力和生物利用度。此外，化合物具有降低的毒性。肽模拟化合物具有增强的粘膜肠通透性。此化合物可通过合成方法制备。本发明的化合物可包括 L-、D-或非天然氨基酸、 α, α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸（丙氨酸的等电类似物）。化合物的肽主链至少可以具有至少一个被 PSI- [CH=CH] 所取代的键。化合物可以进一步包括三氟酪氨酸、对氯苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、聚-L-烯丙基甘氨酸、聚-D, L-烯丙基甘氨酸或聚-L-烯丙基甘氨酸。

本发明的一个实施方案为肽模拟化合物，其中此化合物具有被合适的模拟物取代的键、肽主链或氨基酸成分。可被合适的氨基酸模拟

物取代的非天然氨基酸的示例包括 β -丙氨酸、L- α -氨基丁酸、L- γ -氨基丁酸、L- α -氨基异丁酸、L- ϵ -氨基己酸、7-氨基庚酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、半胱氨酸(乙酰氨基甲基)、N- ϵ -Boc-N- α -CBZ-L-赖氨酸、N- ϵ -Boc-N- α -Fmoc-L-赖氨酸、L-甲硫氨酸砒、L-正亮氨酸、L-正缬氨酸、N- α -Boc-N- δ CBZ-L-鸟氨酸、N- δ -Boc-N- α -CBZ-L-鸟氨酸、Boc-对硝基-L-苯丙氨酸、Boc-羟基脯氨酸、Boc-L-硫代脯氨酸。

在一个实施方案中，化合物为肽，其中游离氨基已通过衍生作用进行了灭活。例如，肽可为芳基衍生物、烷基衍生物或酰衍生物。可对肽进行乙酰化。对肽进行衍生以中和其净电荷。

本发明中的组合物的一个实施方案为能够切割编码 I 型干扰素或 F1t3L 的 mRNA 的核酶。见 Cech 等，美国专利 No. 4,987,071; Altman 等，美国专利 No. 5,168,053; Haseloff 等，美国专利 No. 5,254,678; 公开的欧洲专利申请 No. Hampel 等，EP 360,257。在一个实施方案中，本发明的治疗组合物为重组核酶，并对其进行工程化以切割 I 型干扰素 mRNA 和/或 F1t3L mRNA。在本发明的另一方面，组合物可以包含重组的核酸，该重组核酸为能够切割编码 IFN- α 的 mRNA 及编码 F1t3L 的 mRNA 的核酶。此外，本发明提供了能够结合编码 F1t3L 或 I 型干扰素的 mRNA 并抑制这样的 mRNA 翻译为蛋白质的反义核酸。

本发明表明树突细胞是 SLE 和其他自身免疫疾病发病中的关键因素，这样，树突细胞和/或它们的产物是治疗 SLE 和其他自身免疫疾病的关键靶。作为自身免疫疾病的一个示例，SLE 是淋巴样 DC 释放大量包括 IFN- α 在内的细胞因子的疾病，随后这些细胞因子激活髓样 DC 以激发并维持自身免疫反应。DC 亚型间的相互作用可用来解释在 SLE 患者血清中发现的 (1) 具有广谱的、主要抗核抗原的自身抗体的显著 B 细胞改变，(2) 自身反应性 CD4+ T 细胞和 (3) 高水平 I 型干扰素。这些观察结果支持了树突细胞明显参与 SLE 和其他自身免疫疾病的发病。

如此处所公开的，图 1 图解了不受控制的 IFN- α 释放的结果及其在 SLE 发病机制中的作用。SLE 起始损伤是触发浆细胞样(淋巴样) DC 以不受控制的方式分泌 IFN- α 的一个因素。触发成分包括病毒、细菌及它们的产物如 CpG DNA 以及药物。不受控制的 IFN- α 释放由持续存

在的浆细胞样（淋巴样）DC 激活剂如慢性病毒感染、或没有从循环中适当清除的免疫复合物，如通过 FcR 多态性或缺乏补体成分所起始。浆细胞样 DC 分化为可向 T 细胞呈递触发成分的成熟 DC。释放的 IFN- α （可能有其他细胞因子）诱导包括单核细胞在内的髓样 DC 循环前体的激活，而这些前体可捕获 SLE 血液中日益增加的凋亡细胞。髓样 DC 对凋亡细胞进行加工并将它们的抗原呈递给自身反应性 T 细胞和/或 B 细胞。自身反应性 T 细胞和加载了凋亡细胞的 DC 一起进一步激活了自身反应性 B 细胞。在 DC 的帮助下，这些细胞分化为浆细胞。IFN- α 也直接促成自身反应性 B 细胞的产生，因为其可打开 SLE 中特征为循环血 B 细胞的部分生发中心表型（CD38 诱导）。

利用单核细胞，即健康供体血液中髓样 DC 的最丰富的前体，开发了利用 SLE 患者血清诱导免疫原性 DC 的方法。这样的 DC 是活性抗原呈递细胞，它们可捕获凋亡细胞并将它们的抗原呈递到自体 CD4+ T 细胞，从而推动它们的激活和增殖。这样的事件序列解释了 SLE 的致病事件。狼疮血清中 I 型干扰素的阻断可防止这样的 DC 的形成，可通过将 DC 前体与 I 型干扰素一起培养来增殖 DC。浆细胞样（淋巴样）DC 的产物诱导髓样 DC 的分化，因此支持抗原呈递，从而推动了致病进程。

在本发明的一个实施方案中，本发明中的治疗组合物包括两种成分 (1) F1t3L 拮抗剂和 (2) 干扰素拮抗剂。在本发明的另一实施方案中，可将这些成分一起融合到一种化合物或分子中，如包含抗每种 F1t3L 和 IFN- α 或另一 I 型干扰素的拮抗性或竞争性肽的融合蛋白。因此，融合肽可以包含作为 F1t3L 活性的竞争性抑制剂和作为 IFN- α 的活性的竞争性抑制剂的肽的部分。在本发明的另一方面，组合物可以包含抗每种 F1t3L 和 IFN- α 、每种抗体的抗原结合片段（如 CDR 片段）或包含抗体的活性（抗原结合）片段的融合蛋白的单克隆抗体。在本发明的另一方面，组合物可由能够干扰 F1t3L 及其受体间的相互作用且能够干扰 IFN- α 活性的小有机分子组成。在本发明的一个方面，组合物可包含与 F1t3L 和 IFN- α 特异性结合的单克隆抗体的互补决定区 (CDR)。

可用作 I 型干扰素如 IFN- α 或 F1t3L 的拮抗剂的多肽可为源于各自的受体的结合位点的多肽。此外，可合成非功能性 IFN- α 或 F1t3L (竞争受体结合但并不在具有受体的细胞中激发应答的多肽)。这

样的非功能性肽的示例为具有与受体结合的完全能力但不具有激活具有受体的细胞的任何能力的肽。可对多肽中的正常氨基酸进行取代或添加或缺失。保守氨基酸取代包括：缬氨酸取代丙氨酸；赖氨酸取代精氨酸；谷氨酰胺取代天冬酰胺；谷氨酸取代天冬氨酸；丝氨酸取代半胱氨酸；天冬酰胺取代谷氨酰胺；天冬氨酸取代谷氨酸；脯氨酸取代甘氨酸；精氨酸取代组氨酸；亮氨酸取代异亮氨酸；精氨酸取代赖氨酸；亮氨酸取代蛋氨酸、亮氨酸取代苯丙氨酸；甘氨酸取代脯氨酸、苏氨酸取代丝氨酸；丝氨酸取代苏氨酸；酪氨酸取代色氨酸；苯丙氨酸取代酪氨酸以及亮氨酸取代缬氨酸。

本发明提供了治疗自身免疫疾病的新颖方法，其包括阻断 I 型干扰素对抗原呈递细胞产生的促进能力。此外，本发明也提供了体外诊断测定法以评估患者发生自身免疫疾病的相对风险和/或监测患者的疾病进展。本发明提供了 (a) 降低 I 型干扰素活性 (例如降低 I 型干扰素及其受体间的结合) 的干扰素拮抗剂，以及 (b) 降低 F1t3 配体 (F1t3L) 活性 (例如减少 F1t3L 及其受体间的结合) 的 F1t3 配体 (F1t3L) 拮抗剂在制备可用于治疗受试者的自身免疫疾病的组合物中的应用。

在本发明的一个实施方案中，在分开的时间给予受试者至少一种干扰素拮抗剂和至少一种 F1t3L 拮抗剂。在另一实施方案中，同时给予两者。例如，可在早上给予一种拮抗剂而在晚上给予另外一种拮抗剂。拮抗剂给药的时间和频率不一定相同。

如本发明所示，I 型干扰素或含有 I 型干扰素的血清是产生包括但并不局限于 DC 的抗原呈递细胞的必要因素。本发明展示了这些抗原呈递细胞，它们可通过呈递捕获的凋亡细胞的抗原来驱动自体 CD4+ T 细胞的增殖。在本发明中，通过阻断 I 型干扰素的活性就可减少分化、抗原捕获和抗原呈递这一过程。此治疗方法可用于通过在具有适当的遗传背景和高发病风险的患者中抑制疾病的进展 (治疗应用) 和抑制疾病发生 (预防性治疗) 来治疗自身免疫疾病。

I 型干扰素蛋白和/或 F1t3L 的阻断包括但并不局限于利用抗体 (多种抗体) 来中和它们产生抗原呈递细胞的能力。I 型干扰素受体或 F1t3L 受体的阻断包括但并不局限于利用抗体、肽或化学物质特异性阻断可导致抗原呈递细胞产生的配体及其受体间相互作用。本发明中有

用的用于递送抑制性拮抗剂（也即本发明中的组合物）的方法包括但并不局限于蛋白和编码蛋白的载体。

在本发明的一个实施方案中，给予受试者编码阻断 I 型干扰素和/或 Flt3L 的功能的肽的核酸。例如，可利用基于病毒的载体（例如基因转移载体）将这些核酸递送至受试者，这样可在体内对肽进行翻译。基因转移载体可为能够在宿主细胞内复制的任何构建体，包括但并不局限于质粒、DNA 病毒、逆转录病毒以及分离的核苷酸分子。例如，可选用基于逆转录病毒或腺病毒的载体。在作为表达载体，尤其是人基因治疗方面，腺病毒吸引了越来越多的注意 (Berkner, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 39-66 (1992))。这些病毒含有所有的或部分病毒基因组，例如长末端重复 ("LTRs")、启动子(如 CMV 启动子、SV40 启动子、RSV 启动子)、增强子等。无论如何，载体可含有不只一种病毒的元件。本发明中应用的腺病毒的例子在本领域中是众所周知的，其包括 40 多种不同的人腺病毒，如 Ad12 (亚属 A)、Ad3 和 Ad7 (亚属 B)、Ad2 和 Ad5 (亚属 C)、Ad8 (亚属 D)、Ad4 (亚属 E)、Ad40 (亚属 F) (Wigand et al, In: *Adenovirus DNA*, Doerfler, Ed., Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 408-441 (1986))。制备腺病毒载体的方法在本领域中是众所周知的 (Berkner et al, *Nucleic Acids Res.*, 11: 6003-6020 (1983); van Doren et al, *Mol. Cell. Biol.*, 4: 1653-1656 (1984); Ghosh-Choudhury et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147: 964-973 (1987); McGrory et al, *Virology*, 163: 614-617 (1988); 及 Gluzman et al, In: *Eukaryotic Viral Vectors*, Ed. Gluzman, Y. p187-192, Cold Spring Harbor Laboratory (1982))。将得到的载体导入（例如通过转染或转化，或感染，或通过注射等）受试者体内或体外的宿主细胞。在本发明中也施行了脂质体介导的基因转移载体的转移。

用于将基因转移到细胞中以施行本发明中治疗患者自身免疫疾病的方法的病毒载体示例包括，但并不局限于逆转录病毒如 Moloney 鼠白血病病毒 (MoMuLV)；乳头多瘤空泡病毒如 JC、SV40、多瘤病毒、腺病毒、Epstein-Barr 病毒 (EBV)；乳头状瘤病毒如 I 型乳头状瘤病毒 (BPV)；牛痘和脊髓灰质炎病毒；慢病毒载体和其他人类和动物病毒。

在本发明中有用的 I 型干扰素和 FLT3L 信号传递和/或转导途径的阻断包括,但并不局限于应用可特异性靶定相关的信号传递和/或转导途径的化学试剂。

本发明中有用的 I 型干扰素释放和/或产生的阻断包括,但并不局限于(1)利用特异性的化学试剂阻断细胞的 I 型干扰素的合成;(2)靶定可产生 I 型干扰素的细胞从而降低它们产生 I 型干扰素的能力,以及(3)靶定细胞产生和/或释放 I 型干扰素的信号传递所必需的受体从而减少或抑制其产生和释放。在本发明的一个方面,这些细胞为浆细胞样树突细胞。在本发明的另一方面,可产生本发明中的组合物所靶定的 I 型干扰素的细胞包括,但并不局限于处于不同分化时期的成纤维细胞、内皮细胞以及浆细胞样树突细胞(如骨髓前体和血液前体)。上述的通过组合物靶定细胞并降低其作用包括,但并不局限于递送特异性阻断造血前体细胞分化为浆细胞样树突细胞的化学试剂,而不管这些分化在何处发生。

利用本发明中的组合物靶定 I 型干扰素信号产生和/或释放的信号传递所必需的受体包括,但并不局限于利用组合物阻断细胞上的甘露糖受体和/或 CD32 的功能。

在一个方面,本发明提供了体外诊断测定法,其在监测受试者的自身免疫疾病的状况或鉴定受试者是否具有发生自身免疫疾病的风险方面是有用的。诊断测定法包括以下步骤(1)从待检测受试者获取一定量的血清;(2)利用任何已知方法(如利用通过特异于 F1t3L 和 IFN- α 的抗体进行的 ELISA)确定受试者血清样品中的 F1t3L 水平和 IFN- α 水平;(3)比较受试者血清与从年龄匹配和性别匹配的正常、健康受试者获取的血清样品中测得的 F1t3L 水平和 IFN- α 水平;(4)确定从待检测受试者测得的水平是否高于或低于健康个体的水平,从而监测患者的自身免疫疾病的状况或评估受试者发生自身免疫疾病的风险。

本发明也涉及确定受试者发生自身免疫疾病的风险的体外测定法,包括(a)从受试者获取血清样品;(b)对血清样品中的 IFN- α 和 F1t3 配体(F1t3L)进行定量;以及(c)将步骤(b)中测得的 IFN- α 和 F1t3L 量与从健康受试者获取的血清和从自身免疫疾病患者获取的血清中的 IFN- α 和 F1t3L 量进行比较,从而确定受试者发生自身免疫疾病的风险。当通过上文步骤(b)得到的量在从自身免疫疾病患者测得的

量的 30%范围内时,表示发生自身免疫疾病的高风险。当其量为 20%时风险增加。在本发明的另一方面,患者为年龄匹配的。

本发明也涉及用于确定受试者发生自身免疫疾病的风险或用于监测受试者自身免疫疾病状况的试剂盒,该试剂盒包含特异性结合受试者生物样品中的 F1t3L 和 IFN- α 的组合物,其中的组合物时可进行检测的。可检测的标记包括,但并不局限于荧光标记、放射性标记、酶标记、比色标记、化学发光标记或它们的任何组合。

在本发明的一个实施方案中,生物样品为血液样品或血清样品。在本发明的另一实施方案中,组合物包含(a)结合 F1t3L 的单克隆抗体和(b)结合 IFN- α 的单克隆抗体的混合物。在本发明的进一步的方面中,试剂盒进一步含有用于检测和比较与一个或多个样品结合的组合物的一种或多种试剂。在本发明的另一实施方案中,试剂盒进一步含有用于在与生物样品结合的组合物和发生自身免疫疾病的相对风险或自身免疫疾病的相对状况间建立联系的成分。在本发明的另一方面,利用可检测的标记对组合物进行了标记。可检测的标记可为,但并不局限于荧光标记、放射性标记、酶标记、比色标记、化学发光标记及它们的任何组合。试剂盒也包括在样品中进行标准化或规范化的组分,从而确保诊断测定法比较相对等量的细胞或血清体积。

本发明提供了用于确定受试者发生自身免疫疾病的风险的体外测定法,包括:(a)从受试者获取血清样品;(b)对血清样品中的 IFN- α 和 F1t3 配体(F1t3L)进行定量;及(c)将 IFN- α 和 F1t3L 的量与患有自身免疫疾病的受试者血清中的 IFN- α 和 F1t3L 量进行比较,从而确定受试者发生自身免疫疾病的风险。

此外,本发明也提供了用于确定受试者发生自身免疫疾病的风险的体外测定法,包括(a)从受试者获取血清样品;(b)在适于单核细胞分化的条件下将血清与单核细胞混合;(c)测定受试者的血清诱导单核细胞分化为能够进行抗原呈递的树突细胞的能力;以及(d)将步骤(c)中测定的能力与(i)从健康受试者获取的血清的能力和与(ii)从患有自身免疫疾病的受试者获取的血清的能力进行比较,从而确定受试者发生自身免疫疾病的风险。

在另一方面,本发明提供了体外诊断测定法,通过此方法可确定并监测患者发生自身免疫疾病的风险。此诊断测定法测定了患者血清

诱导单核细胞体外分化为树突细胞的能力，从而对患者患自身免疫疾病的风险进行评估。在此方面，如果患者血清较已知正常标准（其可利用一些年龄匹配、性别匹配的健康个体的血清来确定）更有效地诱导单核细胞分化为树突细胞，则此测定就是自身免疫疾病患者中疾病发作的预示和/或不管患者是否存在发生自身免疫疾病的风险都必需进行详细诊断评估的指征。此外，此诊断测定在监测患者疾病状况方面是有用的，如果已经诊断为患有自身免疫疾病，则患者可在家中或其他方便的地点利用本发明中的诊断测定法以便监测自身免疫疾病的进程或改善并相应调整他/她的治疗方案。

组合物的有效量依赖于应用的实际组合物。实际的有效量是基于化合物的大小、化合物的生物降解能力、化合物的生物活性及化合物的生物利用度。如果化合物不会很快降解并且是生物可利用的且具有高度活性，那只需很少量就有效。本领域中的熟练技术人员可对有效剂量进行确定；此有效剂量也依赖于化合物的形式、化合物的大小以及化合物的生物活性。本发明中的熟练技术人员可常规进行经验化合物活性测定以确定生物测定中的生物活性，从而确定有效量。

本发明提供的药物组合物包含治疗有效量的多肽组合物和化合物以及合适的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体。这些组合物可为液体或冻干的或其他干燥制剂，并且包含多种缓冲组分（如 Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐）、pH 和离子强度的稀释剂、添加剂如白蛋白和明胶以防止为表面所吸附、去污剂（如 TWEEN™ 20, TWEEN™ 80, Pluronic F68, 胆酸盐）、增溶试剂（如甘油、聚乙二醇）、抗氧化剂（如抗坏血酸、焦亚硫酸钠）、防腐剂（如硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯）、膨胀物质或渗透压调节剂（如乳糖，甘露醇）、聚乙二醇等聚合物与与化合物共价附着物、与金属离子形成络合物，或将化合物掺入如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶等聚合物颗粒制剂中或表面上，或掺入到脂质体、微乳剂、微胶粒、单层或多层囊泡、红细胞血影或原生质球。这些组合物将会影响化合物或组合物的生理状态、溶解度、稳定性、体内释放速度以及体内清除速度。组合物的选择依赖于组合物的物理和化学特性。

控制的或持续释放的组合物包括亲脂贮存物（如脂肪酸、蜡、油）中的制剂。

本发明也包括包被有聚合物(如 poloxamers 或 poloxamines)的颗粒组合物及偶联于抗组织特异性受体、配体或抗原的抗体的治疗性组合物,或偶联于组织特异性受体的配体或其他靶向于组织或细胞的肽的治疗组合物。本发明的治疗组合物的其他实施方案包括用于包括肠胃外、肺、鼻和口的多种给药途径的颗粒形式的保护性包衣、蛋白酶抑制剂或渗透增强剂。

当进行给药时,化合物常常很快的就从循环系统中清除,因此引起相对短的药理活性。因此,维持治疗效果需要经常注射相对大剂量的生物活性化合物。相对于没有进行修饰的相应化合物,已知利用水溶性聚合物如聚乙二醇(PEG)、聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯氨酸共价连接而修饰的化合物静脉注射后在血液中展示出显著更长的半衰期。这样的修饰也可增加化合物在水溶液中的溶解度、消除聚集、增强化合物的物理和化学稳定性并显著降低化合物的免疫原性和反应性。结果,通过以较未修饰的化合物低的频率或较低的剂量给予这样的聚合物-化合物加合物获得了需要的体内生物活性。

聚乙二醇(PEG)与化合物的连接尤其有用,这是因为 PEG 在哺乳动物中具有很低的毒性(Carpenter et al., 1971)。例如,腺苷脱氨酶的 PEG 加合物已经在美国得到批准用于治疗人重症联合免疫缺陷综合征。PEG 偶联的另一优点为其可有效降低异源化合物的免疫原性和抗原性。例如,人肽的 PEG 加合物可用于治疗其他哺乳动物物种的疾病而不存在触发严重的免疫应答的风险。本发明中的多肽或组合物可在微胶囊化装置中进行递送,这样就可降低或避免抗多肽或抗产生此多肽的细胞的宿主免疫应答。本发明中的多肽或组合物也可微胶囊化在膜,如脂质体中进行递送。

作为示例,聚合物如 PEG 可很方便的连接到治疗组合物的肽中的一或多个反应性氨基酸残基上,例如氨基末端氨基酸的 α -氨基、赖氨酸侧链的 ϵ -氨基、半胱氨酸侧链的巯基、天冬氨酰和谷氨酰侧链的羧基、羧基末端氨基酸的 α -羧基、酪氨酸侧链,或连接到与某些天冬酰胺、丝氨酸或苏氨酸残基连接的糖基链的活性衍生物上。

PEG 的多种活性形式适于与已经进行描述的蛋白进行直接反应。与蛋白质氨基反应的有用的 PEG 试剂包括羧酸的活性酯或羧酸酯衍生

物，尤其是那些其中的离去基团为 N-羧基琥珀酰亚胺、对硝基苯酚、咪唑或 1-羟基-2-硝基苯-4-磺酸酯的羧酸酯或羧酸酯衍生物。含有马来酰亚胺或卤代酰基基团的 PEG 衍生物是用于对蛋白的游离巯基进行修饰的有用试剂。同样的，含有氨基胍或酰胍基的 PEG 试剂在与蛋白质中糖基的高碘酸盐氧化产生的醛进行反应时是有用的。

在一个优选实施方案中，药物载体可为液体并且药物组合物将以溶液形式存在。在另一同样优选的实施方案中，药物可接受载体为固体并且组合物是以粉剂或片剂形式存在。在进一步的实施方案中，药物载体为凝胶，而组合物是以栓剂或乳膏的形式存在。在进一步的实施方案中，活性成分可制剂化为药物可接受的经皮贴剂的一部分。

固体载体可包括能够作为调味剂、润滑剂、增溶剂、悬浮剂、填料、助流剂、压缩助剂、粘合剂或片剂崩解剂的一种或多种物质；其也可作为胶囊化的物质。在粉剂中，载体是进行了精细分割的固体，与精细分割的活性成分混合。在片剂中，活性成分与具有适当比例的必需压缩特性并压缩为所需形状和大小的载体相混合。粉剂和片剂优选含有高达 99% 的活性成分。合适的固体载体包括，如磷酸钙、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、糊精、淀粉、明胶、纤维素、聚乙烯吡咯烷、低熔点蜡和离子交换树脂。

在制备溶液、悬浮液、乳剂、糖浆、酞剂和压缩组合物中应用液体载体。可以将活性成分溶解或悬浮在药物可接受的液体载体如水、有机溶剂、二者的混合物或药物可接受的油或脂中。液体载体可含有其他合适的药物添加剂如增溶剂、乳化剂、缓冲剂、防腐剂、增甜剂、调味剂、悬浮剂、增稠剂、色素、粘度调节剂、稳定剂或渗透压调节剂。用于口服给药和肠胃外给药的液体载体的适当示例包括水（部分含有上述添加剂如纤维素衍生物，优选羧甲基纤维素钠溶液）、醇（包括一元醇和多元醇，如乙二醇）及它们的衍生物以及油（如分馏的椰子油和花生油）。对于肠胃外给药来讲，载体也可作为油性酯如油酸乙酯和十四酸异丙酯。无菌液体载体在用于肠胃外给药的无菌液体形式的组合物中是有用的。用于压缩组合物的液体载体可为卤代烃或其他药物上可接受的推进剂。

无菌溶液或悬浮液形式的液体药物组合物可用于如肌肉内、鞘内、硬脑膜外、腹膜内或皮下注射。无菌溶液也可以静脉内给药。活

性成分可制备成无菌固体组合物，当对其进行给药时可利用无菌水、盐水或其他合适的无菌可注射介质对其进行溶解或悬浮。载体包括必需且惰性的粘合剂、悬浮剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、防腐剂、染料和包衣。

本发明中的治疗组合物的活性成分（也即 Flt3L 拮抗剂和干扰素拮抗剂）可以含有使溶液等渗的其他溶质或悬浮剂，如足够的盐水或葡萄糖、胆盐、阿拉伯胶、明胶、脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯 80（山梨醇的油酸酯及其与环氧乙烷共聚化的酞）等的无菌溶液和悬浮液形式进行口服给药。

活性成分也可以液体或固体组合物形式进行口服给药。适于口服给药的组合物包括固体形式，如丸剂、胶囊、颗粒、片剂和粉剂，及液体形式如溶液、糖浆、酞剂和悬浮液。在肠胃外给药中有用的形式包括无菌溶液、乳剂和悬浮液。

除非另外指明，本发明应用了本领域技术人员掌握的分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术和免疫学等传统技术。这些技术在下列文献中有说明：见如 Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) ; *DNA Cloning*, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. K. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); the series, *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); 及 *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications)。

正如此处所用，单词“或”指特定列表中的任一成员并且也包括这些成员的任何组合。

正如此处所用，除非具有其他清楚的指示，单数形式“一个”、及“一种”包括复数形式。

本发明将通过下列实施例进行进一步描述，然而，我们应该理解，本发明并不局限于这些实施例。更正确的，对于描述目前用来实践本发明的最佳方式的本公开内容来讲，在不偏离本发明的领域和精神的条件下会有和多改进和变化。在本发明的权利要求相当的的目的和范围之内的所有改变、改进和变化都在本发明的范围之内。

实施例 1: SLE 血清诱导单核细胞分化为具有与树突细胞相似的特性的细胞

正常单核细胞体外暴露于 SLE 血清: 在 12-24 小时内，注意到单核细胞成簇；在 24-48 小时内，成簇的细胞展示出很好的 DC 培养物胞质突出物发光(图 2A 和 2B)。仅仅 SLE 血清在 12 - 24 小时内诱导单核细胞成簇并获得了面纱细胞的形态学 (图 2A-2B, 与图 2C 中的 AS 相比)。

SLE 血清: 在知情同意后,从符合美国风湿病学会 (ACR) 制定的 SLE 诊断标准的患者获取血液。将全血收集到含有 EDTA 或肝素的管中,并在立即在 4℃ 下以 100xg 转速进行离心分离。收取血浆,利用纤维蛋白酶 (Jones Pharma Incorporated, MO) 进行处理并在 -80℃ 下贮存直至应用。利用在获取血液标本当天确定的 SLE 疾病活动度指数 (SLEDAI) 评分 (Lahita, R. G. 1999. Systemic Lupus Erythematosus. Academic Press 3rd edition) 评估疾病的活动度。

细胞培养和表型分析: 在 Ficoll-Paque™ 梯度离心后,通过利用纯化的抗-CD3、抗-CD 19、抗-CD56 和抗-血型糖蛋白 A 抗体去除 T-细胞、B-细胞和 NK 细胞及随后利用免疫磁性去除 (Dynabeads), 从而从血液单核细胞中分离单核细胞。在 100ng/mL GM-CSF 和 1000UI/mL IFN- α 、或 100ng/mL GM-CSF 和 20ng/mL IL-4、或狼疮血清、或自体血清存在下,在 6 孔板 (1×10^6 /孔) 中对富集的 CD14⁺单核细胞进行为期 3 天的培养。在第三天时,收获细胞并利用抗 CD14-PE 抗体、抗 CD83-PE 抗体、抗 HLA-DR-PrCP (peridnine 叶绿素蛋白) 抗体、抗甘露糖-受体-PE 抗体、抗 CD80 PE (藻红蛋白) 抗体、抗 CD86-PE 抗体、抗 CD40 PE 抗体、抗 CD16-PE 抗体、抗 CD32 PE 抗体、抗 CD64-PE 抗体和抗 CD1a-FITC 抗体进行染色。

将取自正常供体的富集的 CD14⁺单核细胞与 20% 狼疮血清或自体血清进行培养 (1×10^6 /孔)。将单核细胞与 SLE-DC 进行培养,并且在第

三天时,收获细胞,并通过流式细胞术评估其表达特定细胞表面分子的能力。流式细胞术证明,CD14 下调、MHC II 类、共刺激分子:CD40、CD86 和 CD80、CD83 及甘露糖受体、CD32 和 CD36 的表达增加(图 3)。单核细胞分化为具有 DC 的形态学和表型的细胞而不是巨噬细胞(M Φ)的诱导限定于那些在 SLE 血清中生长的 DC。实际上,自体或异源血清都没有诱导这样的表型(图 2C)。

利用了下列抗原的单克隆抗体(mAbs):CD14、HLA-DR (Becton Dickinson);CD86、CD40、HLA-ABC、CD1a (Dako, Carpinteria, CA);CD80、CD83 (Beckman Coulter/Immunotech, New York)。

由于 SLE 血清诱导的细胞展示了抗原捕获受体并且由于捕获抗原的能力是 DC 的重要特性,所以确定了在培养物中分化的细胞是否能够捕获可溶性抗原。为了此目的,用 FITC-葡聚糖孵育 SLE 血清培养的单核细胞。如图 4A-4E 中所示,SLE 血清诱导的细胞与 GM-CSF/IL-4 诱导的 DC 在 FITC-葡聚糖摄取方面同样有效。

通过在 37 $^{\circ}$ C 下用 100 μ g/mL FITC-葡聚糖孵育细胞 1 小时确定了在培养物中分化的细胞的内吞活性。作为对照,将一些细胞在冰上用 FITC-葡聚糖孵育。利用冷 PBS/FCS 对细胞进行洗涤并进行流式细胞术。

因此,形态学、表型和抗原捕获表明 SLE 血清指导单核细胞分化为能够捕获抗原的细胞,也即表达抗原捕获分子如 CD14、甘露糖受体和 CD36 (未成熟 DC 和 M ϕ 的特征),以及表达包括 HLA-DR、共刺激分子和成熟 DC 的标记 CD83 在内的对于抗原呈递来讲重要的分子。

下一步确定利用 SLE 血清培养的单核细胞是否能够诱导幼稚 CD4+ T 细胞的分化,即所有抗原呈递细胞中 DC 的一个独特特性。如图 5 中所示,利用自体血清培养的单核细胞诱导了异体 CD4+ T 淋巴细胞的增殖,而利用 SLE 血清培养的单核细胞诱导了与 GM-CSF/IL-4 DC 所诱导的相似的强 T 细胞增殖,这是 DC 在体外的标准特征。图 6 展示了 AS 血清中培养的 SLE-DC 或 DC 诱导的 T 细胞产生的 T 细胞细胞因子的水平。SLE-DC 诱导 T 细胞产生 IFN- γ 而不是产生 IL-10 (除可忽略的水平外),从而证明了 I 型极化(Th1)。对利用 SLE 血清、AS 血清、GM-CSF/IFN- α 或 GM-CSF/IL-4 培养的单核细胞进行洗涤并与异体 CD4+ T 细胞一起铺板。培养 5 天后收取上清液,并利用 PHA 重新刺激过夜。

利用 ELISA 测定对细胞因子释放进行测定, IL-10 和 IFN- γ 在纵轴上以 $\text{pg} \times 10^3/\text{mL}$ 来表达。因此, 激活的 CD4⁺ T 淋巴细胞分泌了与 I 型极化相一致的高水平的干扰素- γ 、低水平的 IL-10 以及不分泌 IL-4。

T-细胞增殖和细胞因子测定: 在 cRPMI 加 10% 人 AB 血清中, 将分级剂量的 DC 与 1×10^5 个新分离的 CD4⁺ 异体 T 细胞培养 5 天或与幼稚的 CD4⁺CD45RA⁺ 异体 T 淋巴细胞进行培养。为了对自体 T 细胞增殖进行测定, 利用 DNA 小体对 M-CSF/IFN- α 或 GM-CSF/IL4 或狼疮细胞进行 4 小时的脉冲处理并以分级剂量与 1×10^5 个自体 T 细胞进行培养。每个孔中的细胞利用 0.5 μCi [3H] 胸苷 (New England Nuclear, Boston, MA) 脉冲处理最后 16 个小时。对于细胞因子分析来讲, 在培养 5 天后收取上清液, 在新鲜培养基中利用 PHA 对细胞进行为期 24 小时的重刺激。利用 ELISA 试剂盒 (R & D Systems, Minneapolis, MN) 对细胞因子的释放进行测定。

实施例 2: SLE-DC 从捕获的凋亡细胞呈递抗原

免疫系统对凋亡细胞的非正常和不适当处理是 SLE 的一个致病事件。因此, 下一步需要确定是否 SLE-DC 能从捕获的凋亡细胞呈递抗原。对此目的来讲, 已经证明 SLE-DC 能够捕获培养物中的凋亡细胞碎片 (图 7A-7B)。

SLE-DC 也可捕获含有源自黑色素瘤细胞的凋亡小体的 DNA。图 8A 和 8B 展示了对异体凋亡细胞的捕获及将它们抗原呈递给自体 CD4⁺ T 细胞。如 CD4⁺ T 细胞增殖的诱导所展示的 (图 8B), SLE-DC 捕获了含有凋亡小体的 DNA (图 8A) 并将它们的抗原呈递给 CD4⁺ T 细胞。AS 血清、SLE 血清和 GM-CSF/IL-4 诱导的 HLA-DR⁺ 单核细胞捕获了 7AAD 标记的 DNA 小体 (通过 γ -照射 (150Gy) 杀灭的黑色素瘤细胞系)。为了对凋亡小体进行捕获, 将抗原呈递细胞与已杀灭的细胞混合并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 小时。其后, 利用流式细胞术对这些 SLE-DC 进行分类并与自体 CD4⁺ T 细胞进行培养。5 天后确定 T 细胞的增殖。

随后将这些被加载的 SLE-DC 与自体 CD4⁺ T 细胞进行培养。如图 8B 中所展示的, 被加载的 SLE-DC 能够诱导自体 CD4⁺ T 细胞的增殖。因此, SLE 血清诱导单核细胞分化为能够捕获并呈递凋亡细胞加工抗原的功能性 DC。

实施例 3: 只有含活性 IFN- α 的 SLE 血清诱导单核细胞分化为 SLE-DC

进行了实验来确定是否所有 SLE 血清能够指导单核细胞分化为 DC。利用 19 种不同的待测 SLE 血清培养单核细胞以测定它们刺激混合的白细胞反应或混合的淋巴细胞反应 (MLR) 的能力。如表 1 所示, 用自体血清培养的单核细胞只能诱导很低的 T 细胞增殖 (阴性对照), 用 GM-CSF/IL-4 培养的单核细胞产生了诱导 100% MLR 的 DC (阳性对照), 平均增殖为 7.5% ($\pm 6.4\%$, $n=5$)。当以同样的方式对 SLE 血清培养的单核细胞进行评估时, 考虑到作为分界点 (利用自体血清培养的单核细胞的平均值+2SD) 的 20% 增殖, 19 种血清中的 11 种血清诱导了单核细胞分化为异体刺激 DC, 平均增殖为 $41\% \pm 15\%$ 。由于患有皮炎的患者血清不能产生此偏移, 并且由于患有皮炎的患者是利用与 SLE 患者相同的类固醇治疗方案, 所以我们得出结论 SLE 血清的影响不依赖于类固醇。此外, 取自两个新诊断的但未进行治疗的患者的血清有效使单核细胞分化为 SLE-DC。重要的是, 在可诱导 SLE-DC 的 11 种血清中, 进行 IFN- α 水平检测的 7 种血清含有大于 190 pg/mL IFN- α , 而其他绝大多数不能诱导 SLE-DC 的血清含有较测定法中可检测到的 IFN- α (12pg/mL) 少的 IFN- α (表 1)。此外, SLE 血清的 DC 诱导能力与疾病活动度相关。在图 9A-9B 中, 展示了 SLE 疾病活动度与 SLE-DC 的诱导活性间的关系。利用取自患有活动性狼疮 (SLE 疾病活动度指数 (SLEDAI) > 6) 或非活动性狼疮 (SLEDAI < 6) 患者的 11 种不同 SLE 血清培养单核细胞, 并对产生的细胞诱导 T 细胞增殖的能力进行测定。作为对照, 利用 GM-CSF 和 IL-4 培养单核细胞。纵轴展示了诱导的异体刺激能力的百分比。因此, SLE 血清倾向于使单核细胞分化为 DC 的能力是疾病特异性的且与 IFN- α 的水平相关。

表 1: 含有 IFN- α 的 SLE 血清诱导单核细胞获得刺激混合淋巴细胞反应的能力

血清	MLR	IFN- α 水平 pg/ml	SLEDAI
SLE1	53%	ND	20
SLE 2	58%	> 500	8
SLE 3	27%	192	12
SLE 4	28%	ND	24
SLE 5	33%	>500	12
SLE 6	5%	<12.5	2
SLE 7	45%	733	14
SLE 8	34%	410	17
SLE 9	26%	>500	10
SLE 10	4%	<12.5	6
SLE 11	12.5%	25	6
SLE 12	70%	>500	12
SLE 13	4%	<12.5	4
SLE 14	50%	ND	4
SLE 15	10%	<12.5	6
SLE 16	16%	78	6
SLE 17	30%	>500	8
SLE 18	60%	>500	17
SLE 19	7.5%	<12.5	14
SLE 20	4%	<12.5	2
AS (n=8)	7%	<12.5	
幼年型关节炎 (n=2)	3%	<12.5	
皮炎 (n=3)*	4%	<12.5	
GM/ IL4	100%		

利用不同的 SLE 血清 (表 1, 第 1 列) 培养单核细胞并对生成的细胞诱导异体 T 细胞增殖的能力进行测定 (混合淋巴细胞反应 {第 2 列, 表 1, MLR}). 作为对照, 利用 GM-CSF 和 IL-4 对单核细胞进行培养并作为 100% 标准。利用 SLE 血清培养的单核细胞的异体刺激活性以相对于 GM-CSF 和 IL-4 的 T 细胞增殖的百分比来表示, 并且与血清中的 IFN- α 水平 (第 3 列, 表 1) 和疾病活动度 (SLEDAI, 第 4 列, 表 1) 相关。SLEDAI 由 9 组临床和实验室标准组成, 其包括对下列器官系统的评估: CNS、血管、肾脏、肌肉骨骼、浆膜、皮肤、免疫系统和血液系统。ND 指未进行实验, AS 指健康供体的自体血清, SLE 指 SLE 患者的血清。

实施例 4: 通过阻断 IFN- α 可破坏 SLE 血清诱导 SLE-DC 的能力

DC 使单核细胞的分化倾斜于产生抗原呈递细胞的能力与 SLE 血清中 IFN- α 的水平相关。SLE-DC 的表型让人想到通过 GM-CSF 和 IFN- α 进行的诱导, 因此, 用抗 IFN- α 中和抗体预孵育 SLE 血清。与测定它们诱导 MLR 的能力一样, 对利用这些血清培养的细胞诱导单核细胞分化为 DC 的能力进行检测。IFN- α 的中和抑制了 SLE 血清诱导功能性 DC 的能力, 但同种型对照 (如图 10 中所示) 和其他 IL-4、CD40-L 和 IL-10 的阻断性抗体则不能抑制, 其表明 IFN- α 对诱导 SLE-DC 来讲是必需的。图 10 例示了从 SLE 患者获得的单核细胞培养血清中 IFN- α 的阻断。干扰素阻断抗体的添加造成诱导异体 CD4+ T 细胞增殖的能力大幅下降。结果表明, SLE 血清的 DC 诱导活性是依赖于 IFN- α 的并可为用于培养单核细胞的 SLE 血清中的阻断性 IFN- α 所破坏。在 IFN- α 阻断性 Ab (SLE ab) (Biosource) 的饱和浓度下和利用相应浓度的同种型对照 (SLE ctrl), 利用 SLE 血清培养纯化的单核细胞或利用血清进行 30min 预孵育。3 天后, 对细胞诱导异体 CD4+ T-细胞增殖的能力进行评估。

实施例 5: SLE 患者具有高血清水平的 IFN- α

确定了几科 SLE 患者体内的 IFN- α 的血清水平。如图 11 中所示, 从 SLE 患者中取得的血清较从健康受试者 (对照) 取得的血清具有高的多的 IFN- α 水平。从 SLE 患者获取血清。利用基于人干扰素国际参考标准 (为国家卫生部所认可) 的 ELISA 试剂盒 (BioSource, 按照制造者的推荐) 对血清中的 IFN- α 进行测定。利用 HRP 和 TNB 对比色反应进行显色。利用微量滴定板阅读器确定 450nm 的吸光度。应用测定法

的延伸范围操作规程，其可确定的血清水平范围为 10-5000 pg/mL。

实施例 6: PBMC SLE 患者可反应于病毒触发而分泌 IFN- α

当暴露于流感病毒时，SLE 患者的 PBMC 较暴露于流感病毒的健康成人的 PBMC 释放出高水平的 IFN- α (见图 12)。

实施例 7: IFN- α 诱导了单核细胞上的 BAFF/B1ys 表达和 PBMC 上的 BCMA 表达

在 DC 和 T-细胞上发现了命名为 BAFF/B1ys-L (属于 TNF 族的 B 细胞激活因子)的 TNF 族新成员，它们结合到 B 细胞上的两个受体，也即 BCMA 和 TACI 上，并诱导它们的增殖和免疫球蛋白分泌。因此，确定了 IFN- α 是否调节在两种细胞类型上的两种分子(也即 BCMA 和 TACI)的表达。如图 13A-13B 所示，如通过实时 PCR 所确定的，IFN- α ，而不是其他因子，诱导了单核细胞中高水平的 BAFF/B1ys。此外，IFN- α 诱导了正常 PBMC 上 BCMA 表达。

实施例 8: 筛选可在体外诊断测定中诱导单核细胞分化的患者血清
按照其诱导单核细胞分化为树突细胞的能力筛选患者血清，而此分化作用可随后为中和性 I 型干扰素所阻断。

按照实施例 1 中详细叙述的程序，获得了患者血清。按照实施例 1 中概述的程序，将一份患者血清添加到一份从正常患者取得的纯化的单核细胞中。大约 3 天后，利用本领域中已知的任何方法评估单核细胞分化为树突细胞的程度。示范性的测定法包括直接的形态分析、利用流式细胞术进行表型分析、利用 FITC-葡聚糖摄取进行可测定的抗原捕获、以及通过胸苷掺入诱导可测定的异体幼稚 CD4+ T 细胞。为了对从受试者血清样品中获得的结果进行分类，此体外诊断测定法包括已知的一组标准。简单来讲，对正常患者，也即已知未患自身免疫疾病的患者的血清进行测定并将获得的结果作为发生自身免疫疾病的低风险指示标准。同样的，获取已知患有自身免疫疾病，如 SLE 的患者的血清并进行测定，将获得的结果作为发生自身免疫疾病的高风险指示标准。我们认为，支持可被 I 型干扰素阻断的单核细胞向树突细胞的高度分化的患者血清将患者置于患自身免疫疾病的高风险境地。在测定法中，利用以前确定的高风险、低风险和任何其他中间风险值的患者血清，通过对比单核细胞的分化数量就可确定“高度”的单核细胞分化。每个自身免疫疾病风险水平都与测定中观察到的单核

细胞分化水平相关联。如果患者血清不支持可被 I 型干扰素阻断的单核细胞向树突细胞的高度分化,那么患者发生自身免疫疾病的风险水平会很低或者没有此风险。对于诊断患有自身免疫疾病的患者来讲,以这种测定法对患者血清进行周期性的评估提供了一种检测疾病发作或其进展的方法。

实施例 9: TNF 抑制 pDC 分泌 I 型干扰素

Kadowaki 等(J. Exp. Med. 2000,192: 1785-96)公开了虽然自分泌 TNF- α 诱导了它们成熟为不能产生 IFN- α 的成熟 pDC,但自分泌 IFN- α 支持了 pDC 的存活。因此,进行了研究来确定向正常 DC 培养物中添加中和性 TNF 抗体是否维持它们反应于病毒触发而产生 IFN- α 。

对于这些研究来讲,通过流式细胞术对 CD11c 阴性和 CD123 阳性细胞进行分类,从而从 CD34+造血前体培养物中分离 pDC。用纯化的流感病毒(5 μ L)和对照抗体或中和性抗-TNF 抗体培养浓度为 50,000 个细胞/孔/200 μ L 的分离的 pDC(第一次培养)。经过 24 小时的初次培养后,对培养板进行离心,收集上清液,并将细胞重新培养在添加有新鲜剂量(5 μ L)流感病毒的新鲜培养基中进行重培养(第二次培养)。在第二次培养额外的 24 小时后,收集上清液并对其中的 IFN- α 水平进行评估。

图 14A-14C 展示了通过浆细胞样 DC (pDC) 进行的 IFN- α 分泌的 TNF 调节。用 Flt3L (100ng/mL) 及血小板生成素(TPO) (30ng/mL) 培养 CD34+造血前体细胞,而体外产生的纯化 DC 以 50,000 个细胞/孔的浓度用纯化的流感病毒(5 μ L) 及对照抗体(5 μ g/mL) 或中和性抗 TNF 抗体(5 μ g/mL) 或外源 TNF (100ng/mL) 进行培养(第一次培养)。第一次培养 24 小时后,对培养板进行离心,收集上清液,并将细胞重新培养在添加有新鲜剂量流感病毒的新鲜培养基中进行重培养(第二次培养)。在第二次培养额外的 24 小时后,收集上清液并对其中的 IFN- α 水平进行评估。如图 14A 所示,中和性抗 TNF 抗体的添加造成了第二次培养物中 IFN- α 释放 3 倍增加。相反的,添加 TNF 造成 pDC 的第一次培养物中高达 70% 的 IFN- α 释放的抑制(见图 14B)。如图 14C 中所示,第一次培养物上清液中的 IFN- α 浓度从 100 ng/mL 降至 40 ng/mL。

此研究提供了图 16 中总结的关于未成熟 pDC 怎样通过在 TNF (或

拮抗性抗 TNF 受体结合试剂) 中进行孵育来阻断 IFN- α 分泌的非限制性理论。因此, 可促使 TNF 孵育的 pDC 变成不能分泌 IFN- α 的成熟的 pDC。

实施例 10: TNF 抑制 pDC 个体发生

然后进行实验来确定是否 TNF 对 pDC 的影响限于它们的成熟/IFN- α 产生, 或是否 TNF, 这一主要的促炎细胞因子参与髓样树突细胞细胞分化的调节, 以及是否影响造血细胞前体到 pDC 的分化。对于这些研究来说, 利用流式细胞术对 CD34+CD45RA-造血前体细胞分类至超过 90% 的纯度, 并随后在 Flt3L (100ng/mL, R & D)、血小板生成素(TPO, 30ng/mL, R & D) 以及白细胞介素-6 (IL-6, 25ng/mL, R & D) 或肿瘤坏死因子(TNF, 100 ng/mL, R & D) 存在下进行培养, 在培养第一周的密度为 $2/5 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ 个/孔。其后, 对细胞进行洗涤并仅仅利用 Flt3L (100 ng/mL) 对其进行额外的 3 周培养。

图 15 展示了流式细胞术实验结果, 其表明 TNF 阻断了浆细胞样的分化而支持了髓样 DC 的分化。对利用经 CD11c 阴性 CD123 阳性染色鉴定的 pDC 表达的细胞表面标记进行流式细胞术确定了 pDC 的分化。因此, 在第一个周添加 TNF 造成了前体细胞分化为 CD123+CD11c-pDC 的完全抑制并将分化向 CD123-DC11c+ 髓样 DC 倾斜。因此, 均可刺激前体细胞表面上的 TNF 受体的 TNF 和/或激动性抗 TNF 受体抗体阻断了 pDC 的分化并更改了前体细胞向髓样 DC 的分化。

此研究提供了图 16 所展示的关于 IFN- α 产生和分泌怎样为前体细胞暴露于 TNF (和拮抗性抗 TNF 受体结合试剂) 所阻断的非限制性理论。这样的暴露导致了可产生干扰素的 pDC 的发育抑制, 从而阻断了干扰素产生和分泌。

实施例 11: 在患有 SLE 的患者血清中 Flt3L 水平升高

如上述实施例中所描述的, 我们认为未减少的 DC 诱导驱动了 SLE 中破坏性的自身免疫应答, 如此处所描述的, 其通过靶定 IFN- α 和 Flt3L 所控制。然而, 此处命名为"DC-生成素"的其他细胞因子可动员和/或激活 DC 以在体内分化为抗原呈递细胞。DC 的动员或激活可以多种不同方式进行。例如, 这些 DC-生成素可提高 preDC 到成熟的树突细胞的分化, 而成熟的树突细胞可进一步增强免疫原性应答并恶化自身免疫应答。作为另一示例, DC-生成素可增加新成熟的 DC 的实际产

生，而新成熟的 DC 有助于个体的自身免疫应答，或者 DC-生成素可增强成熟 DC 的活性。

一个非限制性 DC-生成素为 Flt3L，已经证明其可在人和小鼠模型中体内动员大量的髓样 DC 和浆细胞样 DC (Maraskovsky et al (1997) Adv. Exp. Med. Biol. 417: 33-40; (1996) J. Exp. Med. 184 (5): 1953-62 ; (2000) Blood 96 (3): 878-84)。此外，如本发明所证明的，利用 Flt3L 培养 CD34+造血干细胞不仅生成了浆细胞样 DC，也生成了 CD11c+髓样 DC 和单核细胞。

利用商业购买的 ELISA (R & D)对 SLE 患者 (83 个血液样品)及健康对照 (35 个血液样品)的 Flt3L 血清水平进行了确定。如图 17 所示，SLE 患者较从健康个体获得的血清具有显著较高的 Flt3L ($p < 0.002$)血清水平，其范围为 $< 12.5 - 582$ pg/mL。利用商业购买的 ELISA 对 83 个 SLE 患者血液样品和 35 个健康患者 (健康对照)血液样品进行测定。利用参数和非参数分析确定了血清样品中的 Flt3L 水平差异在统计学上是显著的。

实施例 12: Flt3L 的血清水平与自身免疫疾病活动度相关

利用 SLE 疾病活动度指数 (SLEDAI) 进行的测定，确定了 Flt3L 的血清水平与疾病活动度相关。如图 18 所展示的，存在显著的正相关 ($p=0.02$)，这表明具有高血清水平 Flt3L 的那些个体也展示出高 SLE 疾病活动度。因此，血清中出现升高的 Flt3L 水平是个体中自身免疫风险和活性指征。

实施例 13: Flt3L 允许单核细胞分化为 DC

将从健康供体外周血液单核细胞 (PBMCs) 中分离的单核细胞利用 CD 14 珠进行阳性筛选或通过粘附进行富集，随后在添加有 Flt3L (100 ng/mL) 和 IL-3 (10ng/mL) 和/或 IFN- α (1000 U/mL) 的完全培养基 (添加有 10% 热灭活的胎牛血清的 RPMI1640) 中进行为期 2 天的培养。利用 GM-CSF 和 IL-4 进行对照培养。图 19A 展示了利用 Flt3L/IFN- α (1000u/mL) 培养的细胞。图 19B 展示了利用 GM-CSF (100ng/mL)/IL-4 (5ng/mL) 培养的细胞。图 19C 展示了利用 IFN- α (1000u/mL)/IL-3 (10ng/mL) 培养的细胞。图 19D 展示了利用 Flt3L/IFN- α (1000u/mL)/IL-3 (10 ng/mL) 培养的细胞。培养 2 天后，对细胞自旋单核细胞进行吉姆萨染色。因此，利用 Flt3L 和 IFN- α 培养的单核细

胞分化成的细胞展示出通过形态学(图 19A-19D)、表型(CD14 低, DC-SIGN+, CD40+, HLA-DR+, CD11c+)和功能确定的 DC 特征, 也即诱导作为树突细胞功能标志的异体 CD4+ T 细胞的增殖的能力(图 20)。在图 20 中, 将 10^5 个纯化的异体 CD4+ T 细胞与分级数量的抗原呈递细胞(水平轴)共培养 5 天。通过胸苷掺入(纵轴, $\text{cpm} \times 10^3$)以及随后利用添加有 F1t3L 的培养基进行培养来测定 T 细胞增殖。图 21 展示了一个图表, 总结了可通过阻断 F1t3L 和 IFN- α 的活性而进行改变的 DC 亚型的几个发育和分化途径。这些治疗靶包括: 1) 从造血前体细胞到 pDC 的分化途径, 其可为 TNF 或 F1t3L 拮抗剂或 TNF 和 F1t3L 拮抗剂的联合所阻断, 其最终结果为通过抑制可生产干扰素的细胞的分化而抑制干扰素的产生, 2) pDC 成熟途径, 其可为 TNF 所加速, 最终结果为 pDC 成为非干扰素生产细胞从而降低干扰素水平, 3) 从单核细胞到树突细胞的分化途径, 其可为干扰素拮抗剂或 F1t3L 拮抗剂或干扰素拮抗剂与 F1t3L 拮抗剂的联合所阻断, 最终结果为抑制能够通过诱导自身反应性 B 细胞和自身反应性 T 细胞分化而捕获并呈递凋亡细胞且驱动自身免疫疾病的树突细胞的分化。

实施例 14: SLE 血清中的中和性 F1t3L 抑制了 SLE 血清诱导的单核细胞分化为树突细胞

利用 SLE 患者的血清培养单核细胞。在适于单核细胞分化的培养条件下, 将饱和浓度, 也即约 1-10 倍摩尔过量的浓度范围内的、有效量的可与 F1t3L 特异性结合的单克隆抗体(抗-F1t3L 单克隆抗体)添加到单核细胞培养物中。孵育 3 天后, 分化为 DC 的单核细胞数目较没有接受单克隆抗体的完全相同的单核细胞培养物要少。因此, 可中和培养物中的 F1t3L 活性的抗 F1t3L 单克隆抗体抑制了 SLE 诱导的单核细胞分化为 DC。

实施例 15: 向生长在 SLE 血清中的单核细胞中添加 F1t3L 拮抗剂和干扰素拮抗剂的组合物可抑制单核细胞分化为抗原呈递 DC

此处示范了治疗患者的自身免疫疾病的方法, 其中给予患者本发明中的治疗组合物以减少或抑制抗原呈递细胞的产生, 而抗原呈递细胞可引起能够在受试者中产生自身抗体的自身反应性 T 细胞和自身反应性 B 细胞的刺激。

利用分别约 1-10 倍于待治疗的患者的血清中的 F1t3L 和 IFN- α

水平的量的(a) 抗 F1t3L 单克隆抗体和(b) 抗 IFN- α 单克隆抗体制备治疗组合物。制备抗 F1t3L 的单克隆抗体的方法是已知的, 例如美国专利 No. 5, 843, 423, "利用 f1t3 配体刺激造血细胞的方法" 实施例 6 中的方法。制备抗 IFN- α 的单克隆抗体的方法是已知的, 例如, 美国专利 No. 5, 919, 453 中给出的方法。

从患有自身免疫疾病的受试者中获取血清并进行检测以确定血清中具有足够的 F1t3L 和 IFN- α 水平来保证治疗组合物的给药。

每日通过注射或通过静脉递送方法给予组合物, 以保证组合物中两种成分的血清水平在 F1t3L 和/或 IFN- α 的约 1-10 倍摩尔过量的范围内。在整个治疗期内监测受试者的状况以便确定 APC 的产生水平。在整个治疗期内对患者中存在的 DC 进行监测。当自身免疫紊乱症状平息时停止治疗, 当在连续两次血液分析中 F1t3L 和/或 IFN- α 水平表现出升高的趋势时和/或当自身免疫紊乱症状恶化时重新进行治疗。

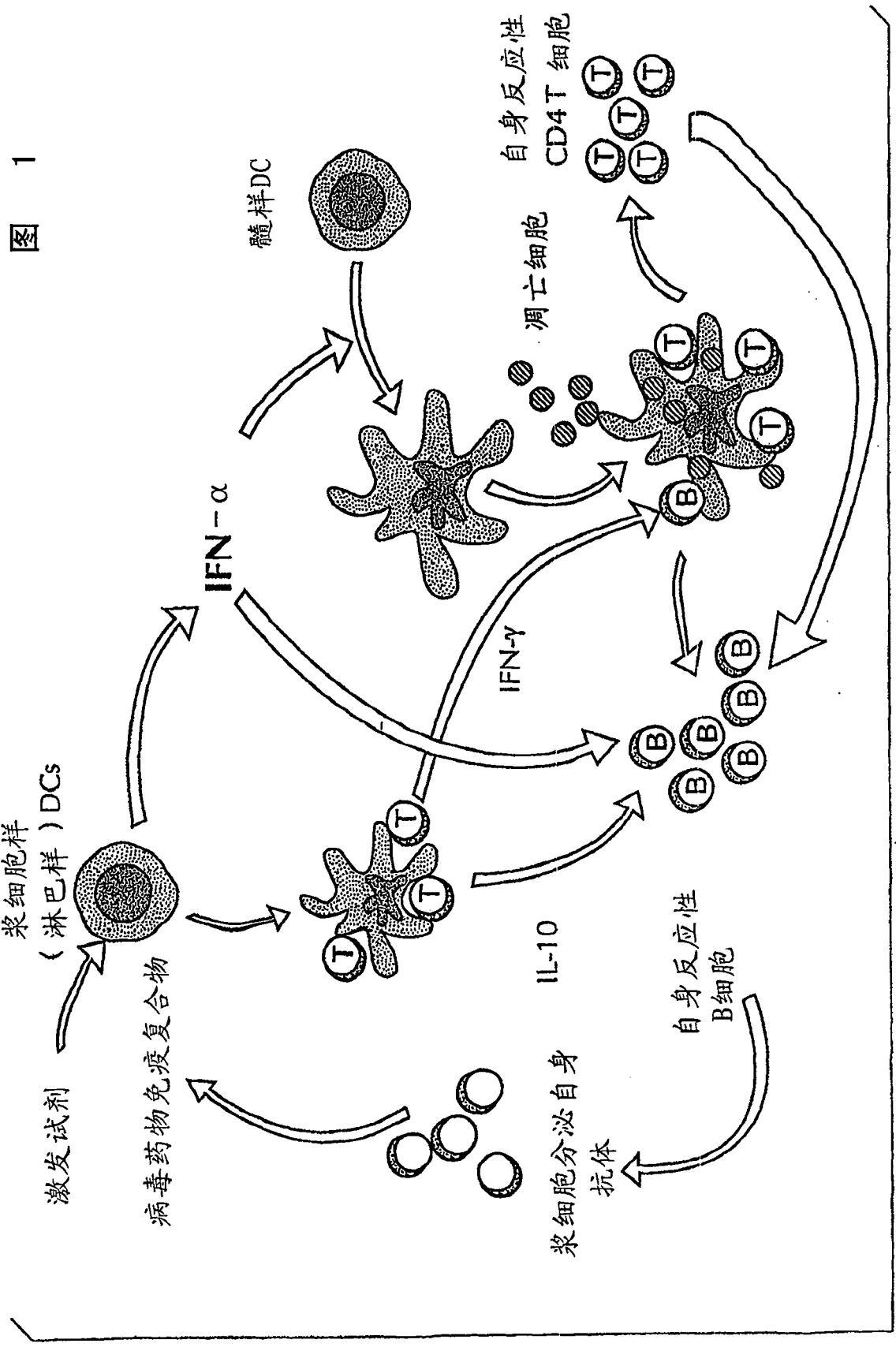


图 1

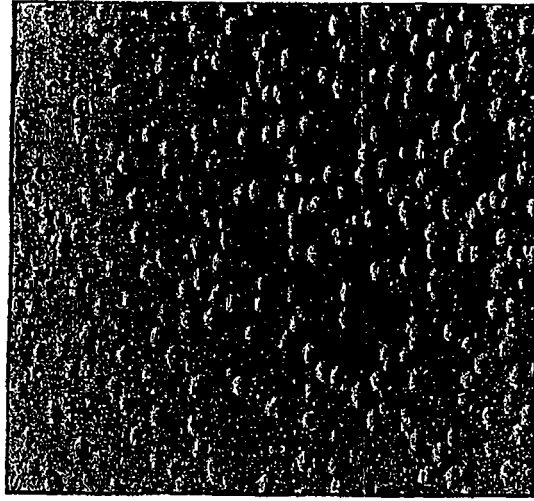


图 2C

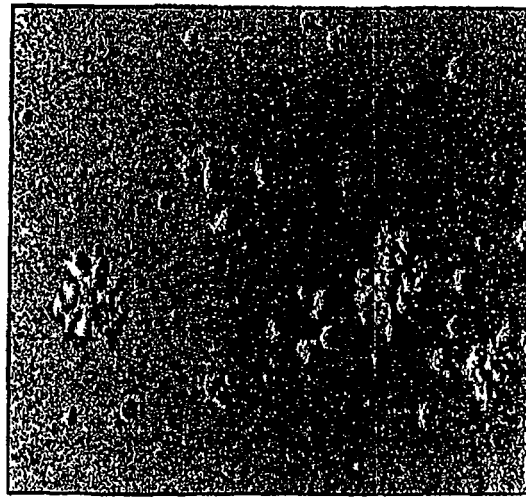


图 2B

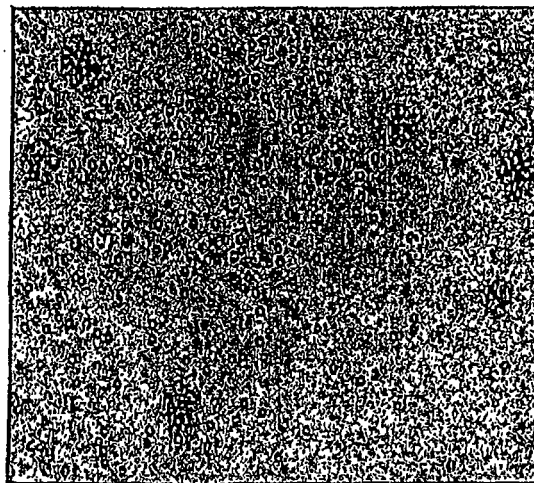


图 2A

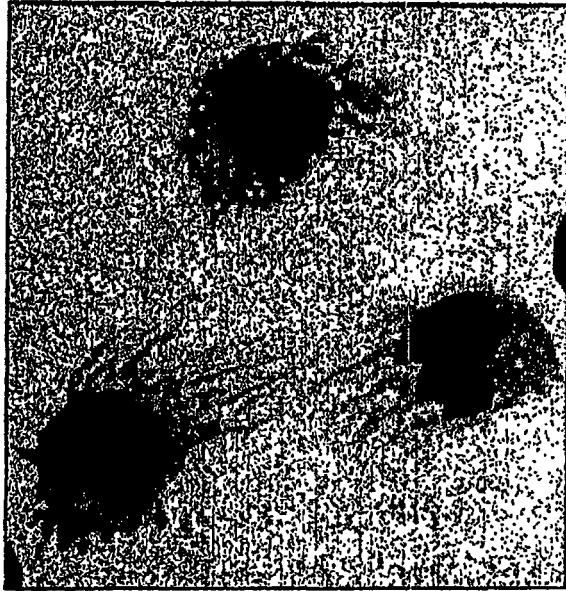


图 2E

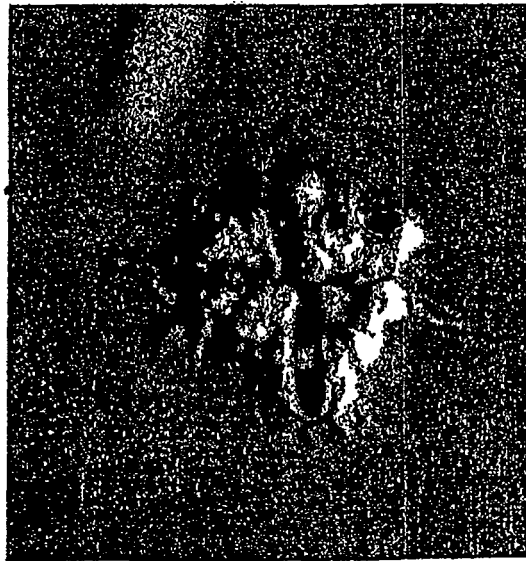


图 2D

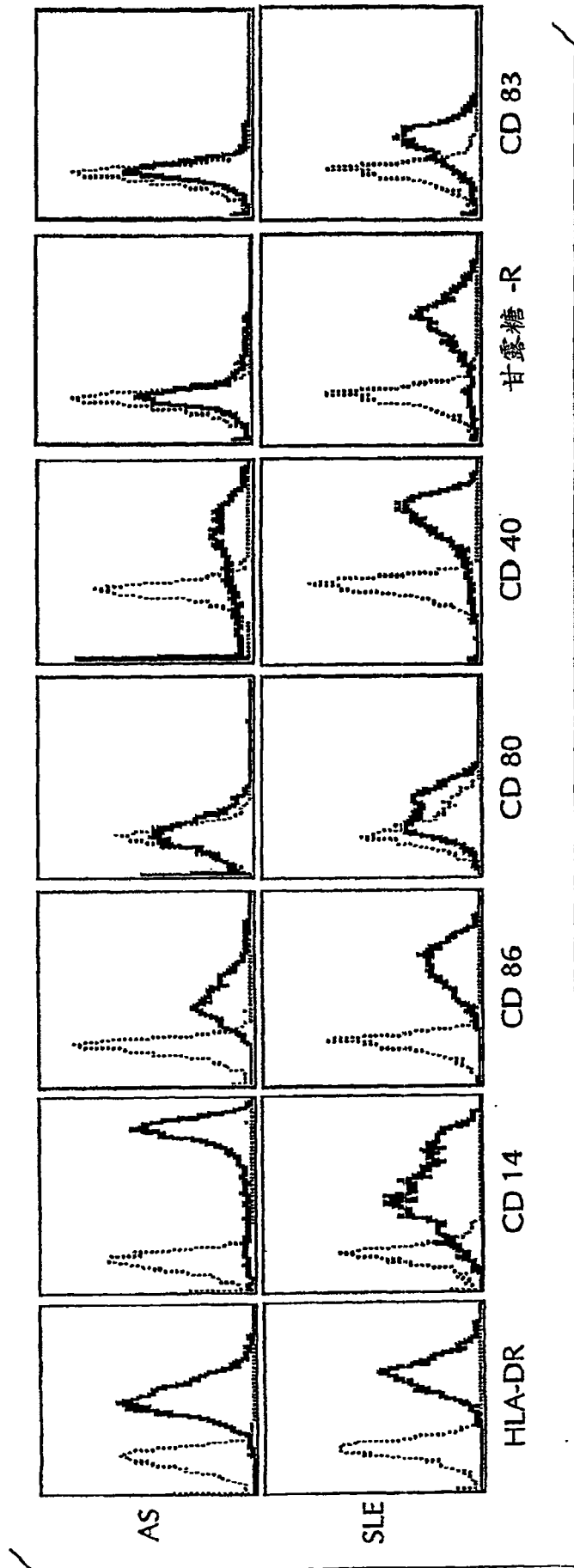
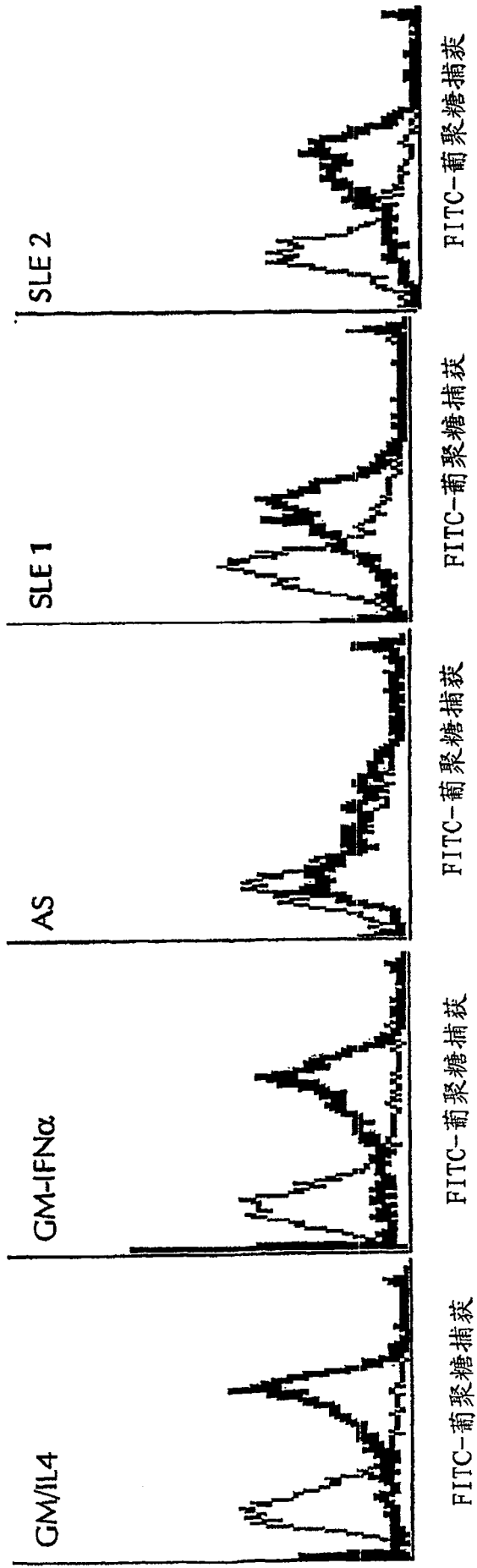


图 3

图 4A 图 4B 图 4C 图 4D 图 4E



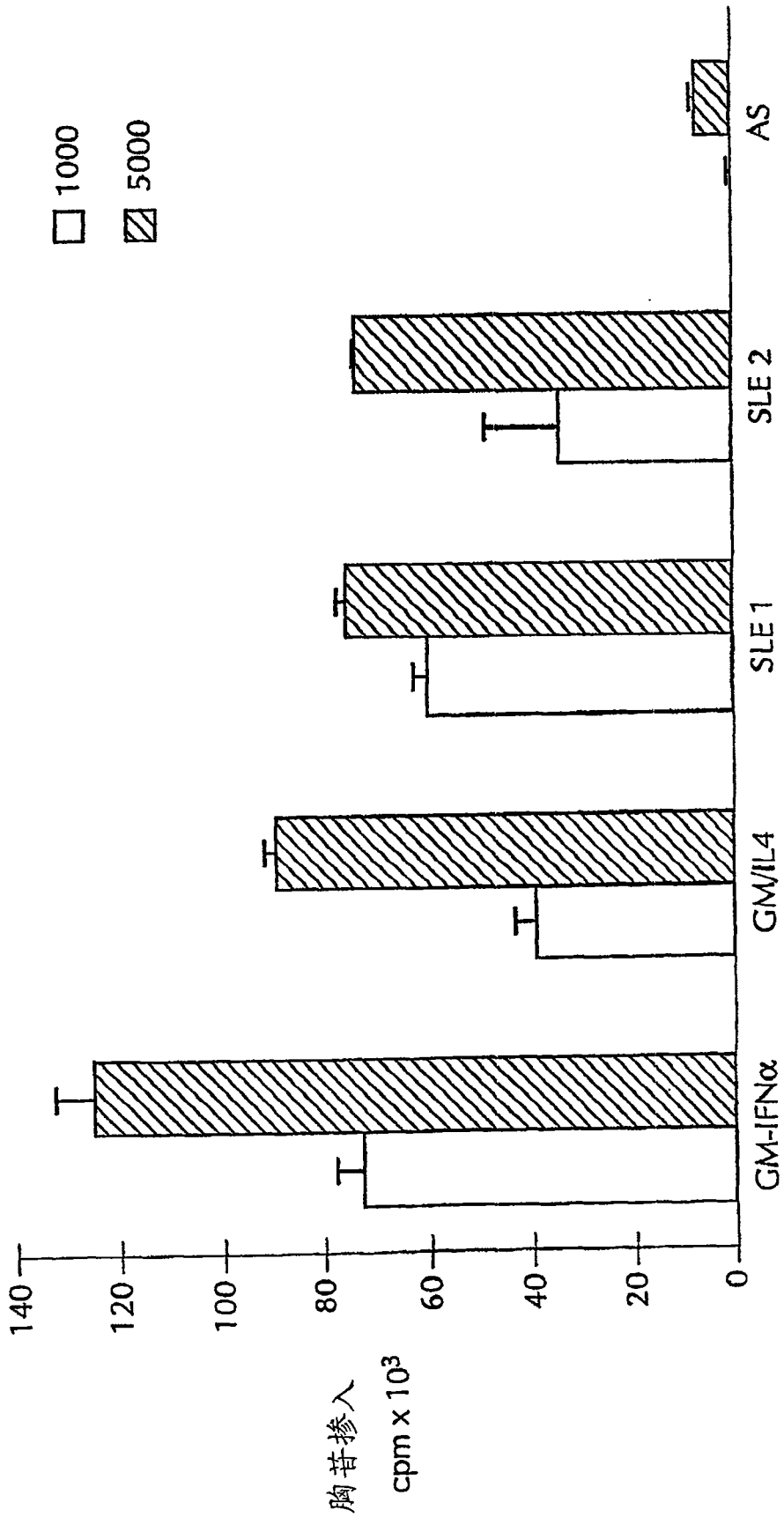


图 5

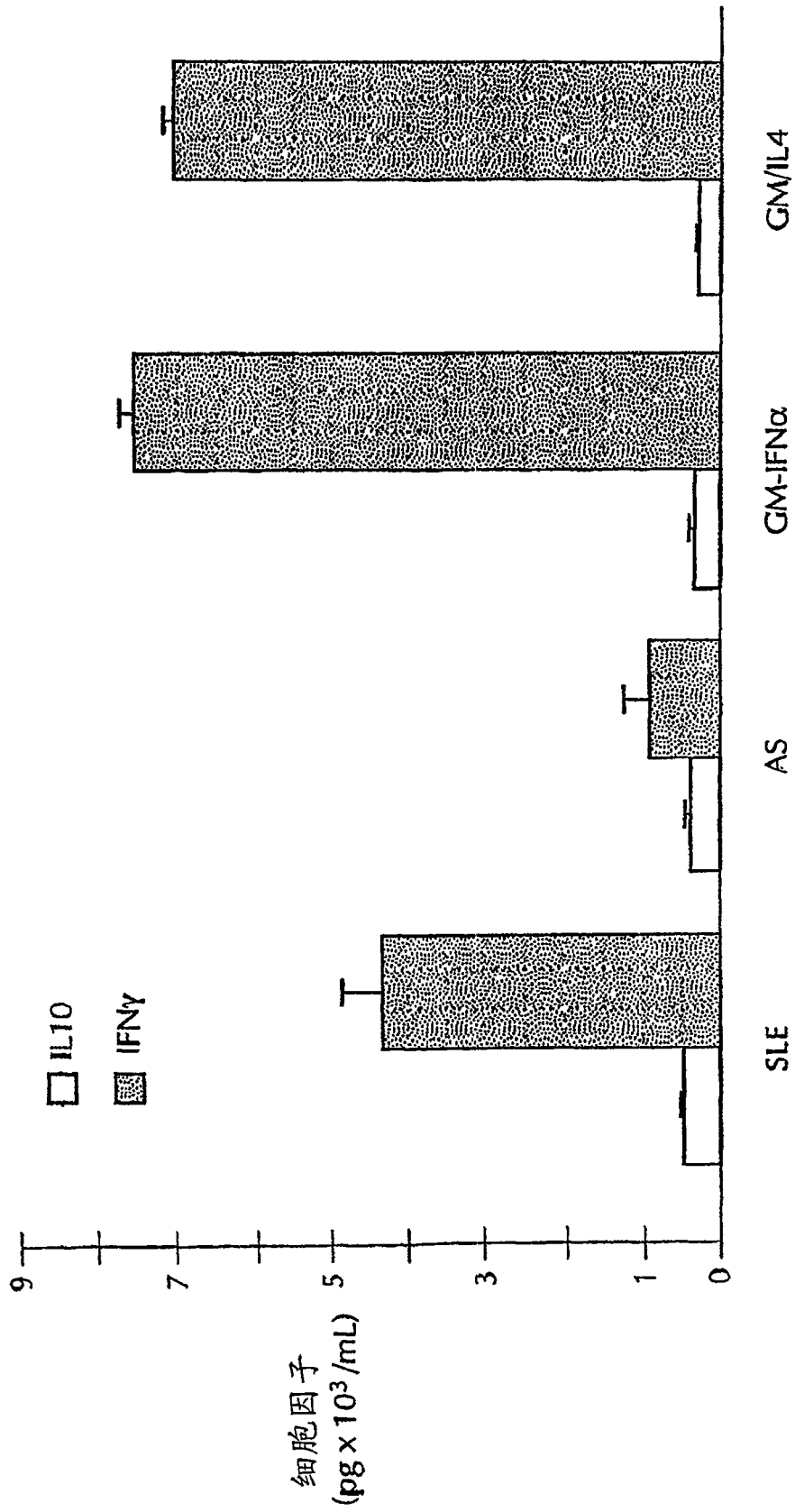


图 6

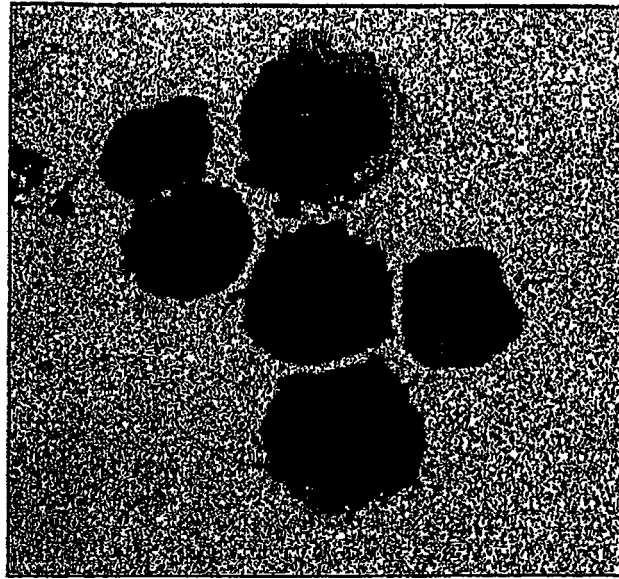


图 7C

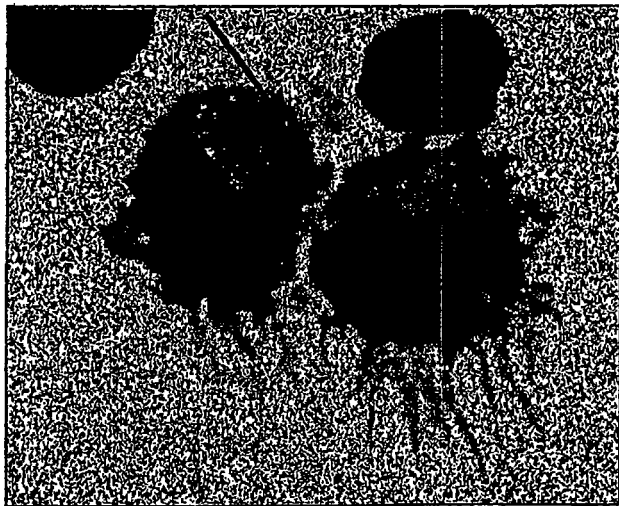


图 7B



图 7A

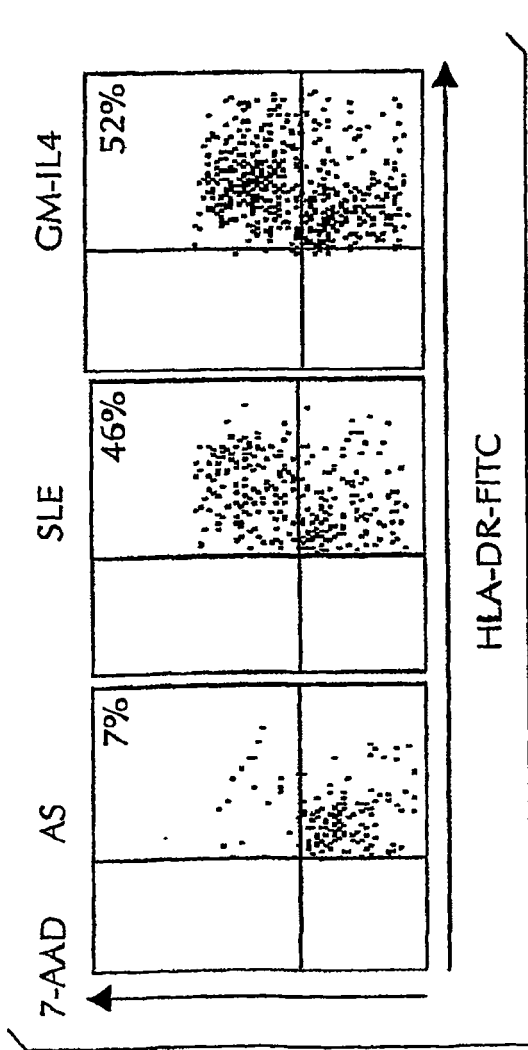


图 8A

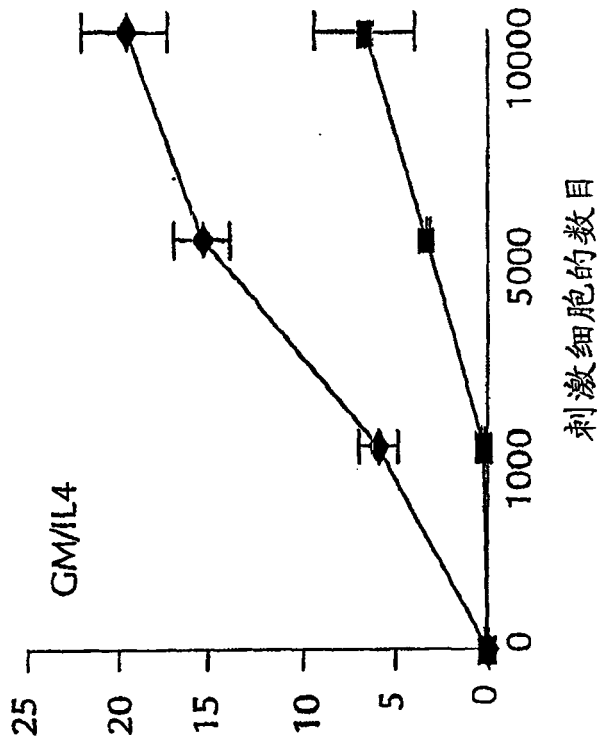


图 8B

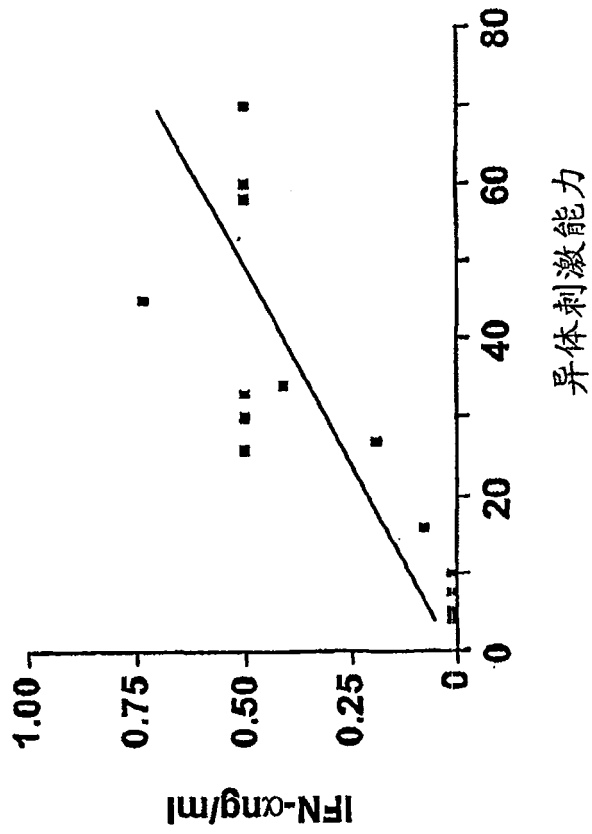


图 9B

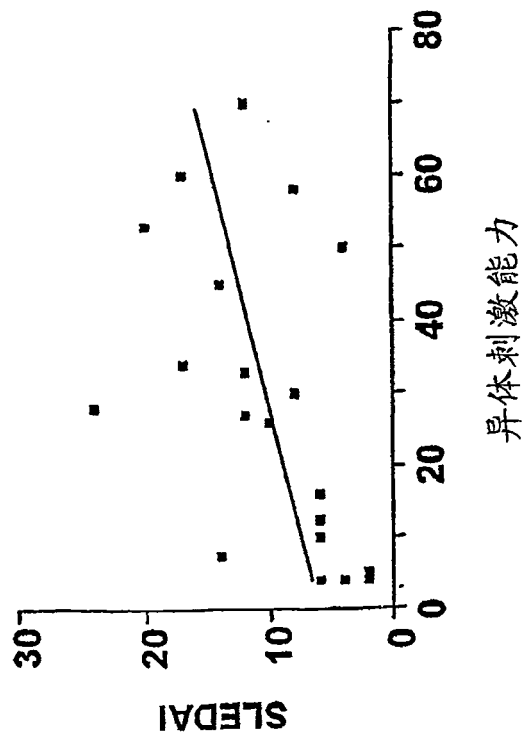


图 9A

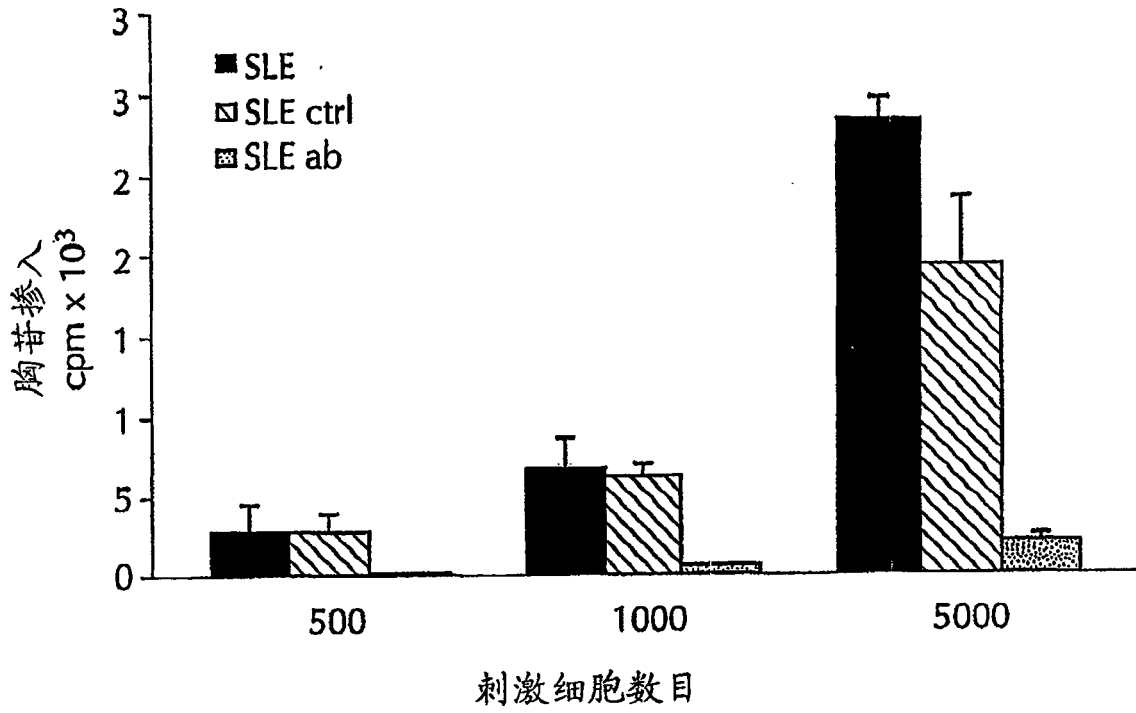


图 10

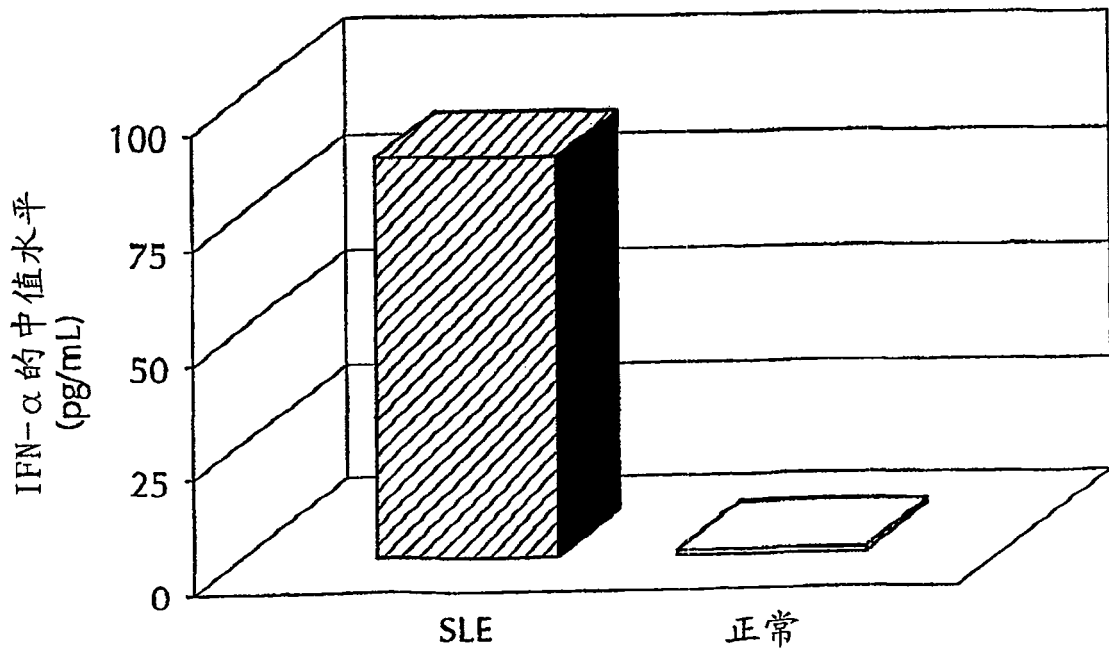


图 11

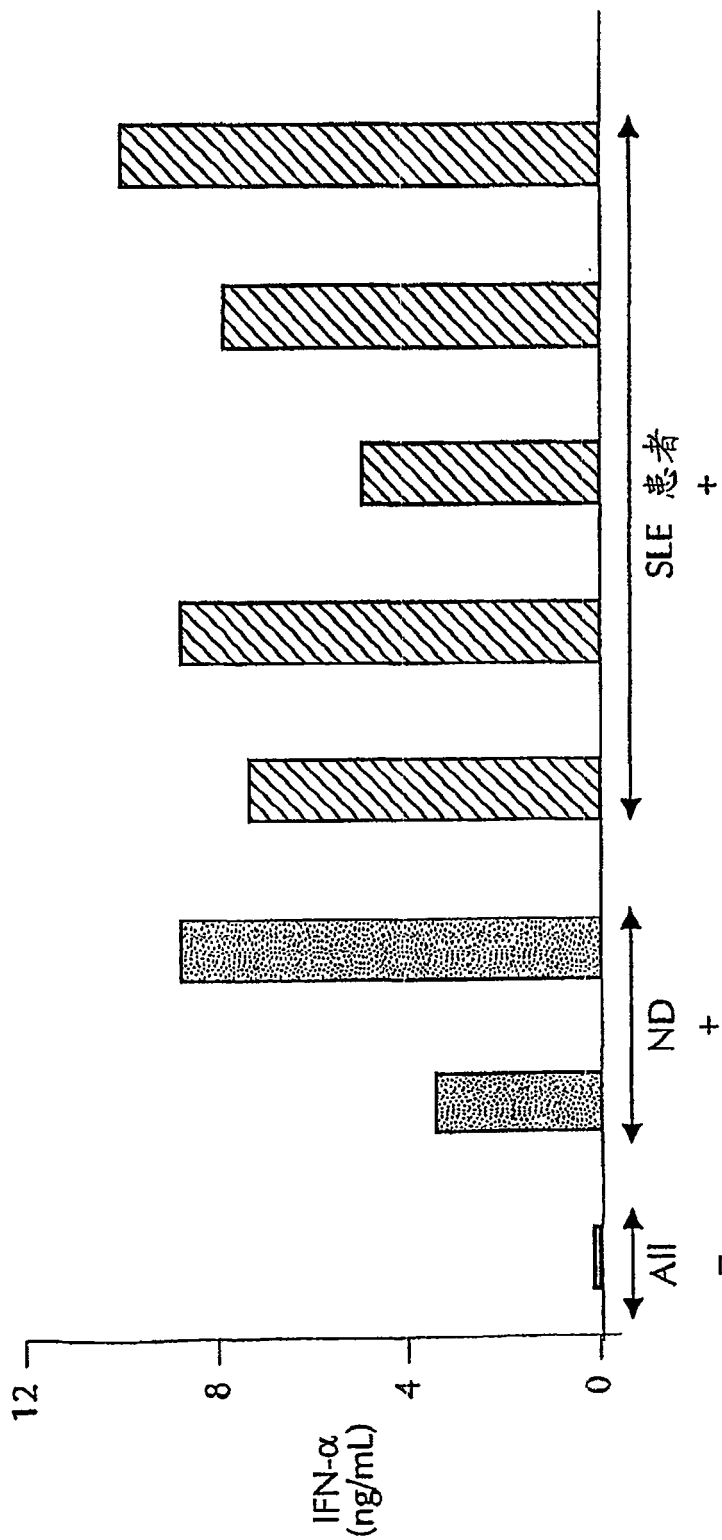


图 12

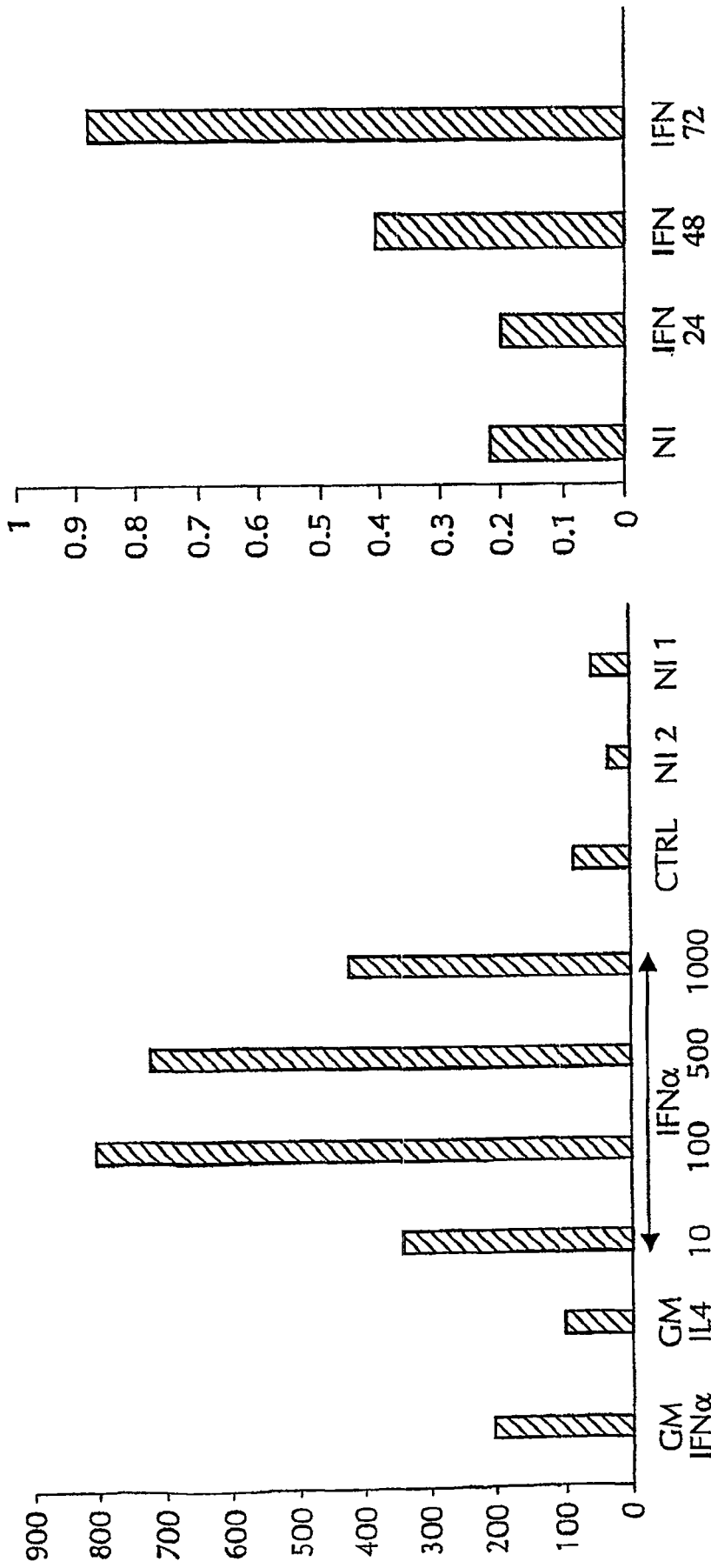


图 13B

图 13A

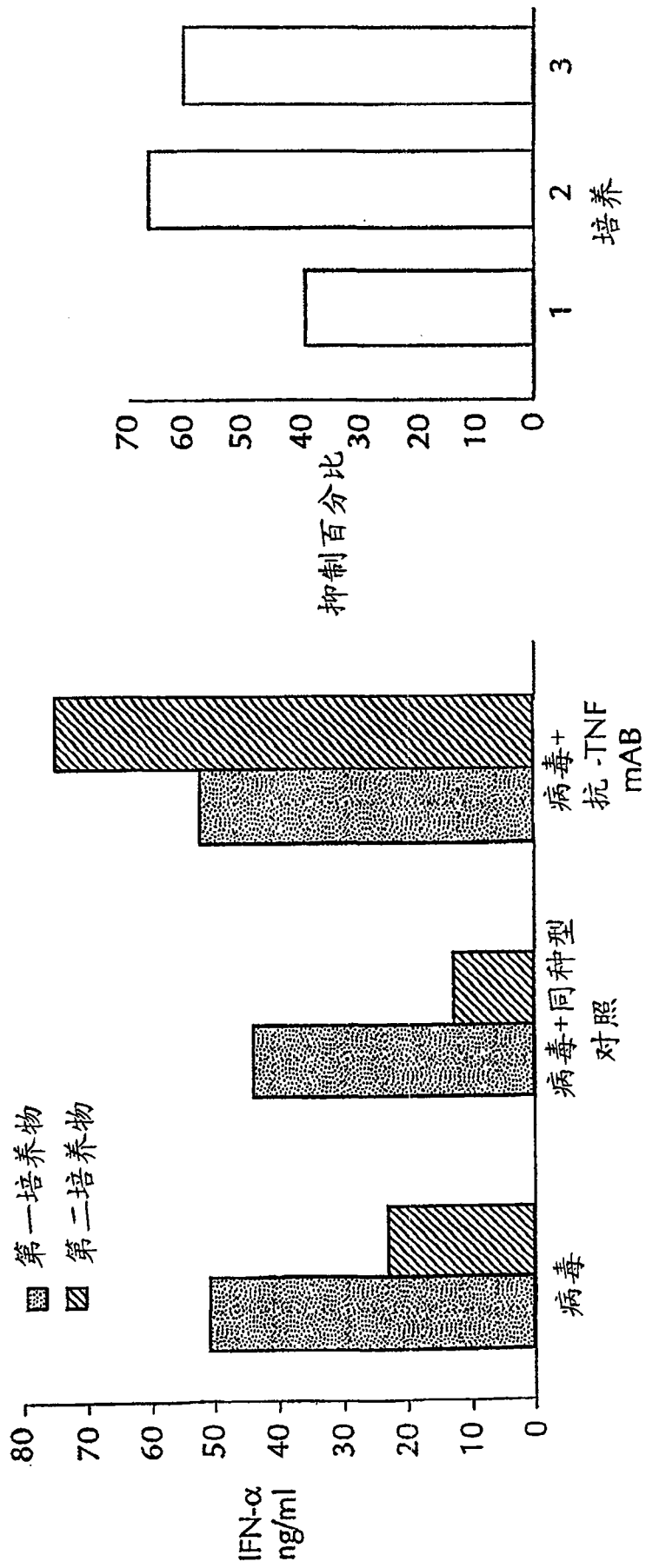


图 14B

图 14A

图 14C

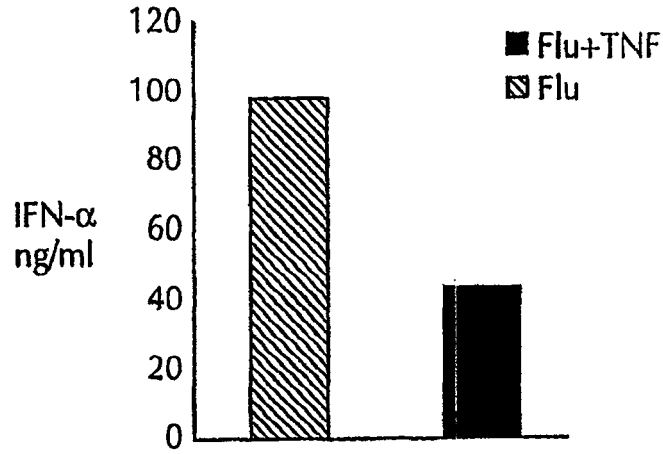


图 15

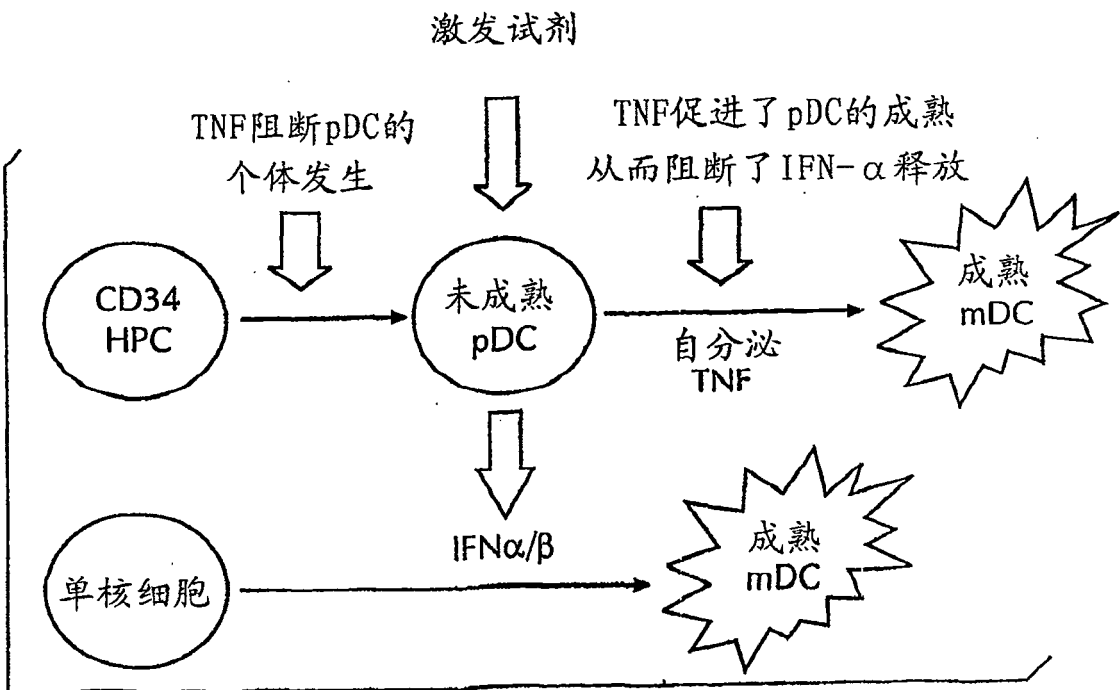
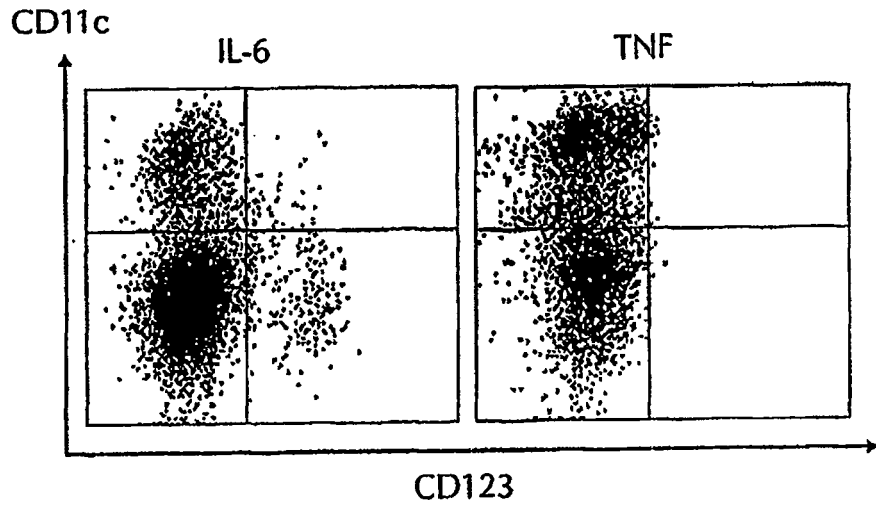


图 16

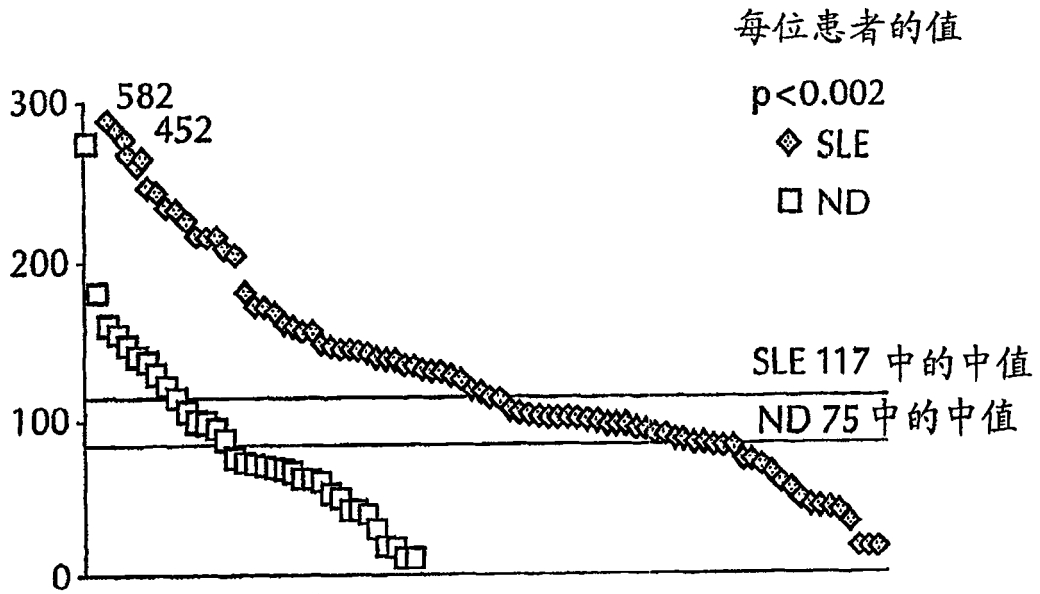


图 17

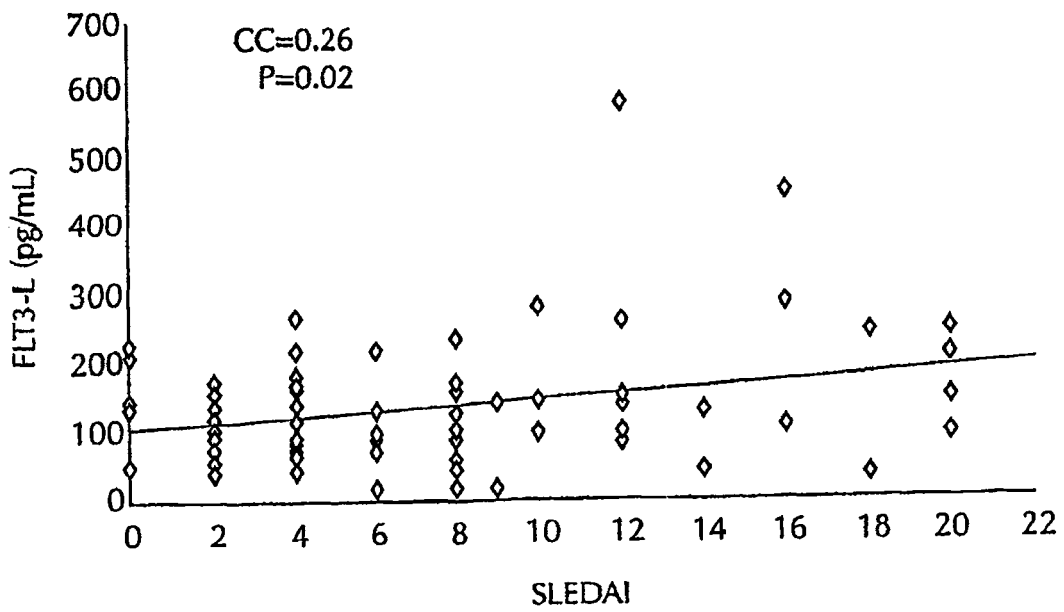


图 18

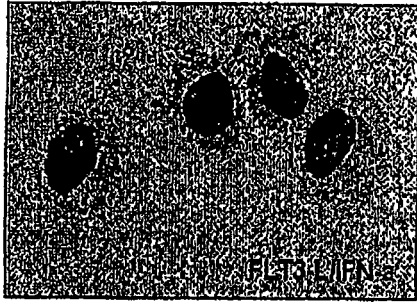


图 19A

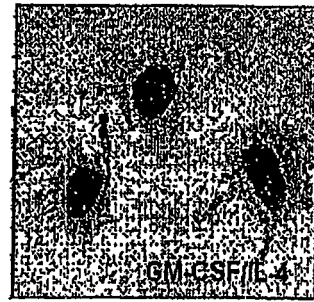


图 19B

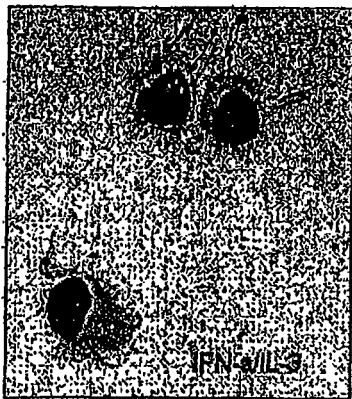


图 19C

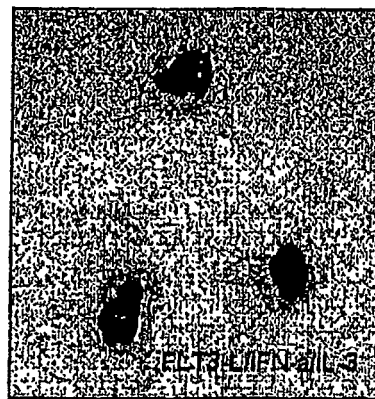


图 19D

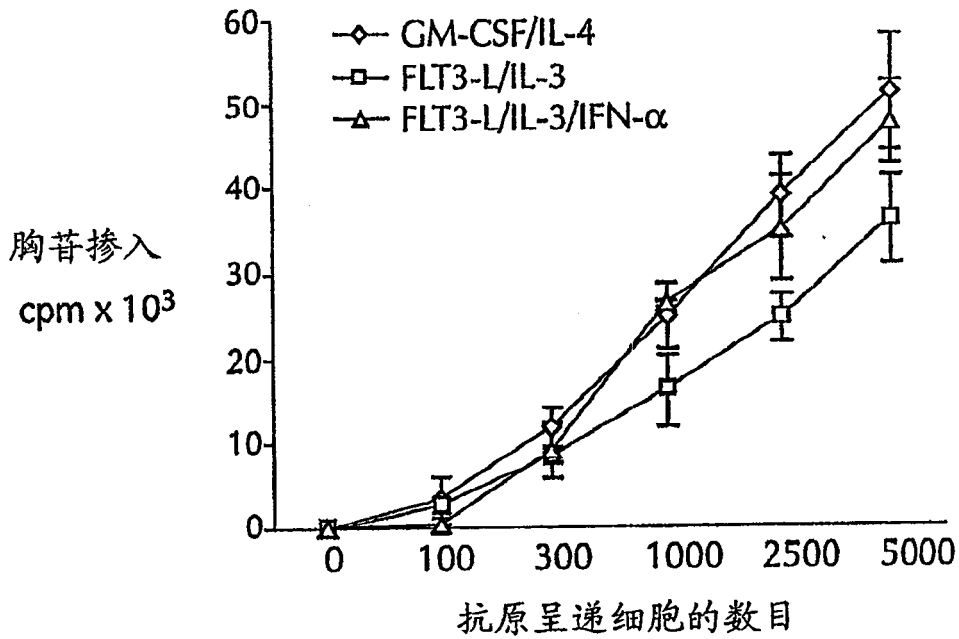


图 20

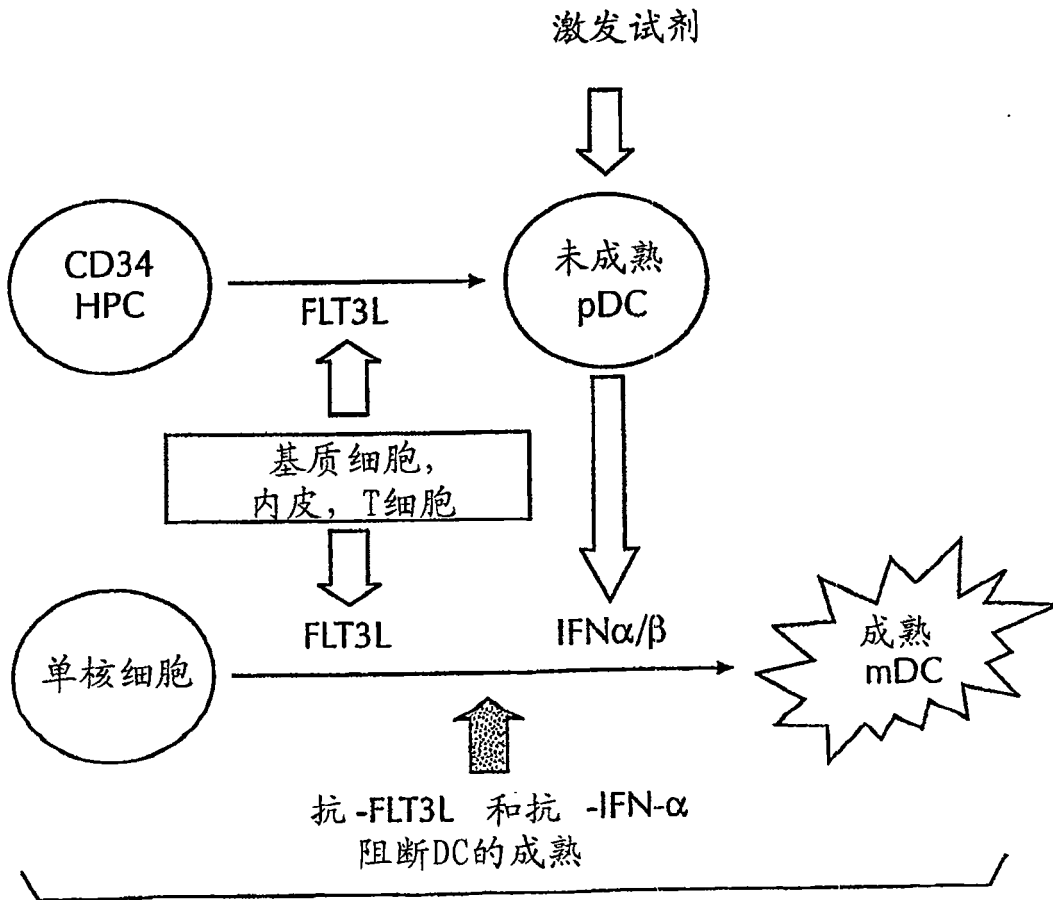


图 21

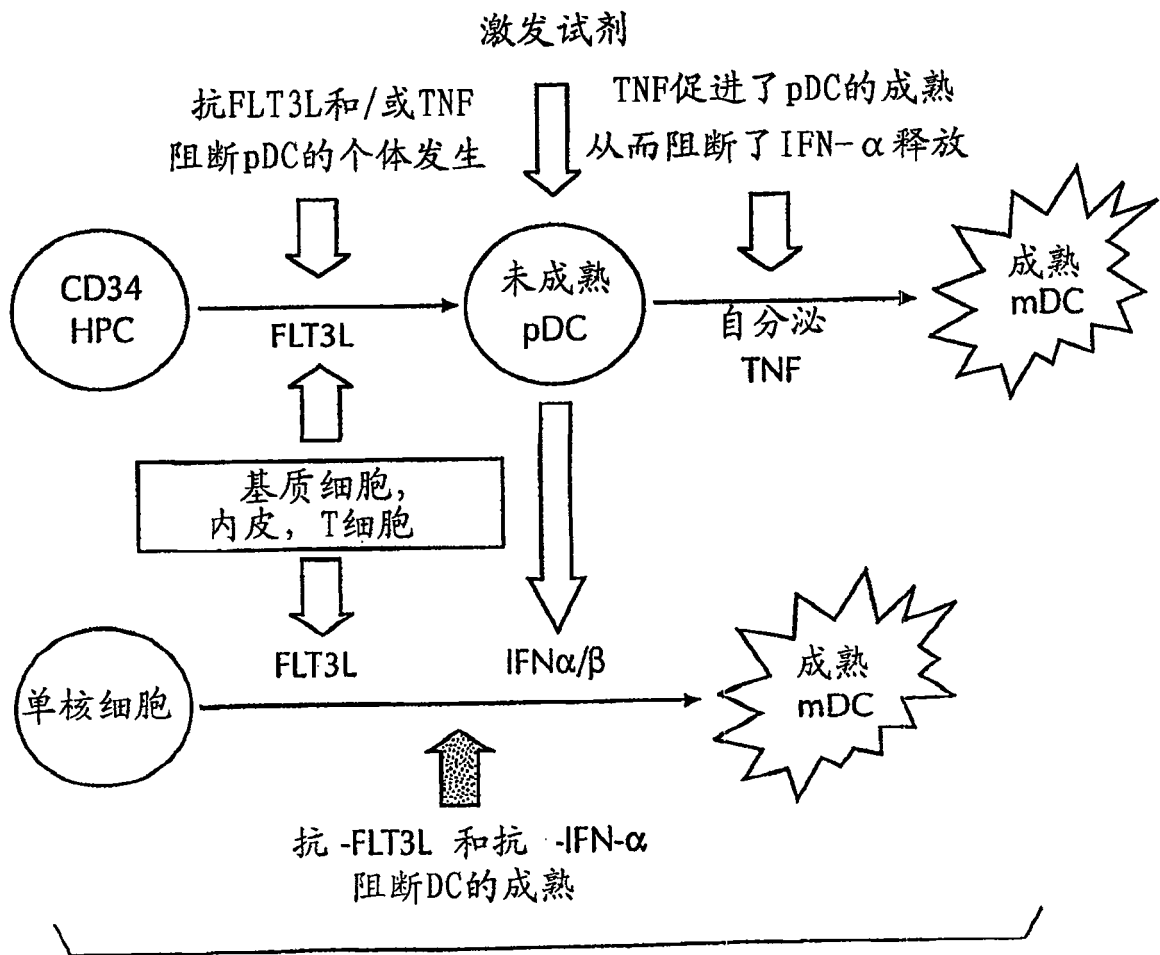


图 22

专利名称(译)	干扰素拮抗剂和Flt3L拮抗剂的用途		
公开(公告)号	CN100536919C	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN02803556.9	申请日	2002-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	贝勒研究协会		
申请(专利权)人(译)	贝勒研究院		
当前申请(专利权)人(译)	贝勒研究院		
[标]发明人	JF班策罗 AK帕卢卡 P布兰科		
发明人	J·F·班策罗 A·K·帕卢卡 P·布兰科		
IPC分类号	A61K39/38 A61K39/00 A61K38/19 A61K38/21 A61K38/40 A61K39/42 G01N33/53 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P37/06 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/40 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/564 G01N33/577 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/191 C07K16/22 G01N33/564 C07K16/24 G01N33/6866 C07K16/249 A61K38/1793 A61K2039/505 G01N2800/24 C07K2317/73 A61K38/179 G01N33/6863 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00		
审查员(译)	周洋		
优先权	60/260541 2001-01-09 US		
其他公开文献	CN1529617A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了通过给予受试者干扰素拮抗剂和Flt3L配体(Flt3L)拮抗剂从而对自身免疫疾病进行治疗的方法。本发明也提供了含有一种或多种干扰素拮抗剂和一种或多种Flt3L拮抗剂的组合物、确定受试者发生自身免疫疾病的风险的体外测定法、以及用于此测定的试剂盒。

