

[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 01805293.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1322897C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 37/02 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

[22] 申请日 2001.2.20 [21] 申请号 01805293.2

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 21 [33] EP [31] 00103590.6

[32] 2000. 2. 21 [33] EP [31] 00103597.1

[32] 2000. 10. 4 [33] EP [31] 00121651.4

[32] 2000. 11. 23 [33] EP [31] 00125633.8

[86] 国际申请 PCT/EP2001/001867 2001. 2. 20

[87] 国际公布 WO2001/062285 英 2001. 8. 30

[85] 进入国家阶段日期 2002. 8. 19

[73] 专利权人 应用研究系统 ARS 股份公司

地址 荷属安的列斯群岛库拉索市

共同专利权人 耶达研究发展有限公司

[72] 发明人 Y·奇韦提克 C·迪纳埃罗

C·普拉特尔-齐贝克

S·冯 德文特 M·鲁宾斯坦

D·诺维克 S·H·金

[56] 参考文献

WO9909063A1 1999. 2. 25

EP0974600A2 2000. 1. 26

EP0864585A1 1998. 9. 16

审查员 郭晓勇

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余 颖

权利要求书 1 页 说明书 46 页 附图 14 页

[54] 发明名称

IL-18 抑制剂的应用

[57] 摘要

本发明涉及到在制备治疗和/或预防肝脏损伤的药物中, 应用 IL-18 抑制剂。 本发明涉及到在制备治疗和/或预防关节炎, 特别是类风湿性关节炎的药物中, 应用 IL-18 抑制剂。 此外, 本发明涉及到在制备治疗和/或预防炎症性肠病, 特别是 Crohn's (节段性回肠炎) 病和溃疡性结肠炎的药物中, 应用 IL-18 抑制剂。

1. 选自抗 IL-18 抗体和 IL-18 结合蛋白的 IL-18 抑制剂与肿瘤坏死因子 TNF 遮蔽性拮抗剂在制造治疗和/或预防 T 细胞介导的肝损伤的药物中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用, 所述肝损伤是酒精性肝炎、病毒性肝炎、肝硬化和原发性胆汁性肝硬化。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 所述 IL-18 抑制剂是 IL-18 抗体。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 所述 IL-18 抑制剂是人化 IL-18 抗体。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 所述 IL-18 抑制剂是人 IL-18 抗体。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 其中 IL-18 结合蛋白是 PEG 化 IL-18 结合蛋白。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 其中 IL-18 抑制剂是融合蛋白, 它包含融合于免疫球蛋白所有部分或一部分的全部或部分的 IL-18 结合蛋白, 并且所述融合蛋白结合 IL-18。

8. 根据权利要求 7 所述的应用, 其中融合蛋白包含免疫球蛋白所有或部分恒定区。

9. 根据权利要求 8 所述的应用, 其中免疫球蛋白是 IgG1 或 IgG2 同种型。

10. 根据权利要求 9 所述的应用, 其中 TNF 遮蔽性拮抗剂是可溶性 TNF 受体。

11. 根据权利要求 10 所述的应用, 其中 TNF 遮蔽性拮抗剂是可溶性 TNF 受体 I。

12. 根据权利要求 10 所述的应用, 其中 TNF 遮蔽性拮抗剂是可溶性 TNF 受体 II。

13. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 所述药物制成适合将 IL-18 抑制剂和/或干扰素与 TNF 拮抗剂同时, 先后或分开给药的形式。

14. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 所述药物制成适合皮下注射给药的形式。

15. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 所述药物制成适合肌肉注射给药的形式。

IL-18 抑制剂的应用

发明领域

本发明涉及到在几种病理状况下治疗性使用 IL-18 抑制剂。更具体说，本发明涉及治疗和/或预防关节炎、治疗和/或预防肝脏疾病，以及治疗和/或预防炎症性肠道病症（IBD）。

发明背景

1989 年有人描述了从小鼠脾细胞获得的能诱导 γ 干扰素（IFN- γ ）的一种内毒素诱导的血清活性（Micallef 等，1996）。此种血清活性不是作为 IFN- γ 的直接诱导剂，而是与 IL-2 或有丝分裂原一起作为协同刺激剂起作用。尝试从内毒素（诱导）后的小鼠血清纯化此种活性，显示一种看起来均一的 50-55KDa 的蛋白质。因为其他细胞因子对 IFN- γ 的产生可能起协同刺激作用，抗 IL-1、IL-4、IL-5、IL-6 或 TNF 的中和抗体不能中和此种血清活性，提示它是一种独特的因子。1995 年，还是这些科学家证实，产生 IFN- γ 所需的内毒素诱导的协同刺激物存在于用 Pacnas 预处理的小鼠肝脏提取液中（Novick 等，1992）。在此模型中，肝脏巨噬细胞（枯否细胞）扩增，低剂量的细菌脂多糖（LPS）（在未预处理的小鼠中不致死）引起了这些小鼠死亡。该因子称为 IFN- γ 诱导因子（IGIF），后命名为白介素 18（IL-18），并从 1200 克重的 Pacnas 处理小鼠肝脏中，纯化至均一成分。采用纯化 IL-18 的氨基酸序列衍生的变性寡核苷酸克隆了小鼠的 IL-18cDNA（Novick 等，1992）。IL-18 是一种 157 个氨基酸的 18-19KDa 蛋白质，与数据库中的任何肽没有明显的相似性。已在枯否细胞和活化巨噬细胞中检测到 IL-18 和 IL-12 的信使 RNA。比起 IL-12，重组 IL-18 诱导 IFN- γ 能力更强，看来是通过另一途径（Novick 等，1992）。与内毒素诱导的血清活性相似，IL-18 本身不诱导 IFN- γ ，其主要功能是作为有丝分裂原或 IL-2 的协同刺激剂。IL-18 增强 T 细胞增殖看来是通过 IL-2 依赖途径，并增加体外 Th1 细胞因子的产生，以及在与 IL-12 联合增加 IFN- γ 产生时显示协同效应。（Maliszewski 等，1990）。

抗小鼠 IL-18 的中和抗体显示在 Pacnas 预处理的小鼠中能防止低剂量 LPS 引起的死亡。其他学者曾报告在预处理小鼠中 IFN- γ 作为 LPS 致死性介质的重要性。例如，中和性抗 IFN- γ 抗体保护小鼠抵抗了施瓦茨曼样休克（Fantuzzi 等，1998），IFN- γ 受体缺陷性小鼠经半乳糖胺处理后抵抗了 LPS 诱导的死亡（Byrn，1990）。因此没有

预计到抗小鼠 IL-18 中和性抗体会保护 Pacnas 预处理小鼠抵御致死性 LPS (Novick 等, 1992)。抗小鼠 IL-18 治疗也保护存活小鼠抵御了严重的肝细胞毒性。

在克隆了小鼠的 IL-18 后, 1996 年报道了人 IL-18 的 cDNA 序列 (Okamura 等, 1995)。重组人 IL-18 表现出天然 IL-18 的活性 (Okamura 等, 1995)。重组的人 IL-18 对人 T 细胞无直接诱导 IFN- γ 的活性, 而是在产生 IFN- γ 和其他 Th1 细胞因子中起协同刺激作用 (Okamura 等, 1995)。迄今认为 IL-18 主要作用是 Th1 细胞因子 (IFN- γ 、IL-2 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子) 产生的协同刺激剂 (Izaki, 1978), 也是 FAS 配体介导的小鼠自然杀伤细胞克隆细胞毒性的协同刺激剂 (Novick 等, 1989)。

通过从受影响组织克隆 IL-18 和研究 IL-18 的基因表达, 发现该细胞因子与自身免疫性疾病密切相关。非肥胖性糖尿病 (NOD) 小鼠自发性产生自身免疫性胰岛炎和糖尿病, 通过一次注射环磷酰胺可加速此病和同步化。胰岛炎早期在 NOD 小鼠胰腺中用逆转录 PCR 证实有 IL-18 mRNA。环磷酰胺治疗后 IL-18 mRNA 水平迅速升高, 先于 IFN- γ mRNA 的升高, 随之发生糖尿病。令人感兴趣的是, 这种动力学 (变化) 模拟了 IL-12-p40 mRNA 的 (变化), 导致个体 mRNA 水平密切相关。从胰腺 RNA 克隆了 IL-18cDNA, 随后测序, 揭示与从枯否细胞和体内预先活化的巨噬细胞克隆的 IL-18 序列相同。还有, NOD 小鼠巨噬细胞对环磷酰胺的反应伴有 IL-18 基因表达, 而同样处理的 Balb/c 小鼠的巨噬细胞则无。因此在自身免疫性 NOD 小鼠中 IL-18 表达受到异常调节, 与糖尿病的发展密切相关 (Novick 等, 1992)。

IL-18 通过增强 Th1 细胞上的 Fas 配体的功能活性, 在免疫调节或炎症中起着重要作用 (Conti 等, 1997)。IL-18 也在肾上腺皮质中表达, 因而可能是一种分泌性神经免疫调节剂, 在经历应激后免疫系统的和谐合作中 (Chapter, 1986) 起着重要作用。

体外通过切割前 IL-18 形成 IL-18, 其内源性活力来说明了它是 Pacnas 和 LPS 介导死亡中 IFN- γ 产生的原因。成熟的 IL-18 由其前体经 IL-1 β 转化酶 (ICE, caspase-1) 作用而产生。

IL-18 受体由至少两个成分组成, 在配体结合中起协同作用。在小鼠 IL-12 激活的 T 细胞中发现存在 IL-18 的高亲和力和低亲和力位点 (Yoshimoto 等, 1998), 提示其为多条链受体复合物。迄今已鉴定出二个受体亚基, 二者均属于 IL-1 受体家族 (Parnet 等, 1996)。IL-18 的信号传导涉及 NF- κ B 的激活 (DiDonato 等, 1997)。

几个已知的细胞因子结合蛋白是可溶性细胞因子受体, 对应于其各自细胞表面细胞因子受体的胞外配体结合功能域。它们产生于 Pre-mRNA 的交替剪接 (对细胞表面受体常见), 或细胞表面受体的蛋白水解切割。这种可溶性受体先前已有描述, 包括 IL-6 和 IFN- γ (Nakamura 等, 1989)、TNF (Dao 等, 1996; Engelmann 等, 1989)、

IL-1 和 IL-4 (John, 1986)、IFN- α/β (Mizushima 和 Nagata, 1990) 等的可溶性受体。一种称为 osteoprotegerin (OPG) 的细胞因子结合蛋白, 也称为破骨细胞抑制因子 (OCIF), 为 TNFR/Fas 家族的一个成员, 看来是仅作为分泌性蛋白存在的可溶性受体的第一个例子 (Anderson, 1997; Bollon, 1980)。

最近已从人尿中分离到对 IL-18 有高亲和力的可溶性受体, 并描述了人和小鼠的 cDNA (Novick 等, 1999, W099/09063), 该蛋白被命名为 IL-18 结合蛋白 (IL-18BP)。

IL-18BP 不是已知的 IL-18 受体之一的胞外结构域, 而是一种分泌性天然循环性蛋白, 它属于分泌性蛋白的一个新家族。该家族还包括对 IL-18BP 有高度同源性的几种痘病毒编码蛋白质 (Novick 等, 1999)。IL-18BP 在脾脏中组成性表达, 属于免疫球蛋白超家族, 与 IL-1 的 II 型受体具有有限的同源性。其基因位于人染色体 11q13 上, 在 8.3Kb 的基因组序列中未发现编码跨膜区的外显子。

在不同的 cDNA 文库中, 发现因 mRNA 剪接产生的 4 个人和 2 个小鼠 IL-18BP 同工型, 并已表达、纯化并对其结合和中和 IL-18 生物活性的能力进行了评估 (Kim 等, 2000)。人 IL-BP 同工型 a (IL-18BP_a) 对 IL-18 显示出最大的亲和力, 结合快, 解离慢, 解离常数 ($K(d)$) 为 399pM。IL-18BP_c 具有 IL-18BP_a 的 Ig 结构域, 除 29 个 C 末端氨基酸外。IL-18BP_c 的 $K(d)$ 小 10 倍 (2.94nM)。然而在超过 2 摩尔浓度时, IL-18BP_a 和 IL-18BP_c 可中和 >95% 的 IL-18。IL-18BP_b 和 IL-18BP_d 同工型缺乏完整的 Ig 结构域, 并缺乏结合或中和 IL-18 的能力。小鼠 IL-18BP_c 和 IL-18BP_d 同工型具有相同的 Ig 结构域, 在超过 2 摩尔浓度时也可中和 >95% 的小鼠 IL-18。而具有与人 IL-18BP_a 共同 C 末端基序的小鼠 IL-18BP_d 也能中和人 IL-18。分子模型鉴定到 IL-18BP 的 Ig 结构域中有一个大的静电和疏水性混合结合位点, 这可解释其与配体的高亲和力结合 (Kim 等, 2000)。

最近有人提出, 白介素 IL-18 参与了慢性炎症性疾病的病理过程, 包括内毒素性休克、肝炎和自身免疫性糖尿病 (Kahiwamura 和 Okamura, 1998)。Tsuij 等 (1999) 发表的实验显示脂多糖诱导的急性肝损伤小鼠模型中 IL-18 水平升高, 表明了 IL-18 在肝损伤产生中可能起作用。然而, 迄今尚未阐明该多功能因子 IL-18 在肝损伤产生中的作用机理。

肝损伤可能有不同原因, 例如, 可能由于病毒或细菌感染、滥饮酒、免疫性疾病或癌症。

病毒性肝炎, 例如由乙肝病毒和丙肝病毒引起的肝炎是很难对付的疾病, 影响到世界上许多人。已知肝炎病毒的数量持续增加, 除乙肝和丙肝病毒外, 迄今已发现至少 4 个引起病毒相关肝炎的其他病毒, 称为甲、丁、戊、庚肝炎病毒。

酒精性肝病是另一种广泛分布的与长期消费酒精相关的疾病。免疫性肝炎是一种罕见的自身免疫病，很难对付。肝损伤还包括胆管损伤。原发性胆汁性肝硬化（PBC）是一种自身免疫性肝病，其特征是肝内胆管的破坏。

几项研究显示酒精性肝炎、肝硬化、病毒性肝炎和原发性胆汁性肝硬化这些疾病中，肝损伤与 T 辅助细胞-1（Th1）应答反应相关。一项研究中，通过将含卵白蛋白的脂质体导向肝脏，随后过继性转移卵白蛋白特异性 Th1 细胞，建立了一种小鼠新型肝损伤模型。用含卵白蛋白的脂质体和 Th1 细胞转移联合处理小鼠，导致血清转氨酶活性增高，与血清 IFN- γ 水平升高相平行。恰恰相反，卵白蛋白特异性 Th2 细胞转移导致血清 IL-4 水平增高，但不诱导肝损伤。抗 IFN- γ 抗体和抗肿瘤坏死因子（TNF- α ）抗体可阻止肝损伤。这些发现表明 Th1 细胞是急性肝损伤中的主要效应细胞（Nishimura 和 Ohta, 1999）。另一系列研究表明，过度表达 IFN- γ 的小鼠在无任何病原体或其他刺激物时表现出自发性肝炎（Okamoto 等, 1998）。

另一项研究表明原发性胆汁性肝硬化（PBC）中有 Th1 应答反应。PBC 是一种自身免疫性肝病，其特征是肝内胆道破坏。一般认为细胞免疫机制（尤其涉及 T 细胞）导致了这种胆管损伤。最近提出，Th1 和 Th2 应答反应的相对强度是各种自身免疫病病理生理过程的重要因素。在此项研究中通过检测这两种 T 细胞亚组的特导性细胞因子，即 Th1 细胞的 IFN- γ 和 Th2 细胞的 IL-4，评价了 PBC 中细胞亚组的平衡。用非同位素原位杂交和免疫组化方法，计数了 18 个 PBC 病人和 35 个疾病对照（包括慢性活动性丙肝、肝外胆道阻塞）和正常肝脏的肝切片中 IFN- γ 和 IL-4 信使 RNA（mRNA）阳性细胞数。表达 IFN- γ 和 IL4 mRNA 的单个核的细胞聚集在 PBC 肝脏发炎的肝门管道中，但罕见于肝外胆道阻塞、酒精性纤维化或正常肝切片中。PBC 肝脏中检测到的 IFN- γ 和 IL-4 mRNA 阳性细胞数比对照肝脏明显高（ $P < 0.01$ ）。而 PBC 肝中 IFN- γ mRNA 的表达比 IL-4 表达更常检测到，IFN- γ mRNA 表达水平与肝门炎症活动程度高度相关。检测到 IFN- γ mRNA 阳性细胞主要在损伤的胆管周围，围绕以淋巴样聚集体。该资料表明 Th1 细胞是 PBC 淋巴样渗出中较重要的 T 细胞亚组（Harada 等, 1997）。

还认为，病毒抗原识别的细胞因子模式，对分辨病毒感染和病毒清除起着深刻影响。一项研究调查了细胞因子向 Th2 型应答转移而失平衡是否再慢性乙肝中起作用，用 RT-PCR 分析了与慢性乙肝相关的外周血单个核细胞的细胞因子谱。乙肝表面抗原（HBsAg）刺激后，在 41%、8%、41%和 50%的病人中分别检测到 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 的表达。这些细胞因子中，Th1 细胞因子 IFN- γ 的表达与血清 AST/ALT（天冬氨酸氨基转移酶/丙氨酸氨基转移酶）高水平（肝损伤的典型标志）相关。Th2 细胞

因子没有显示出对肝细胞有保护性作用。结论是：HBsAg 反应性细胞产生 Th1 细胞因子 IFN- γ 与慢性乙肝的肝细胞损伤相关 (Lee 等, 1999)。据报告乙肝病人的肝脏中有高水平的 FAS 配体及其受体 (CD95) (Luo 等, 1997), 认为 FAS 配体是导致肝细胞凋亡的重要细胞毒因子之一。

另一项研究鉴定了三十位未治疗的慢性肝炎丙肝病毒/RNA (HCV/RNA) 阳性病人中, 与肝损伤进展相关的因子。用 Ishak's 评分法评价了坏死性炎症性和结构性损伤。通过 α 平滑肌肌动蛋白 (α SMA) 免疫组化测定, 显示出激活的肝星形细胞 (HSC), 并用形态测定法定量, 用竞争性 RT-PCR 法评价血浆 HCV/RNA。为研究涉及肝损伤进展的免疫应答反应类型, 用免疫组化评价 IFN- γ 阳性细胞 (Th1 样应答的表达) 并用形态测定法定量。发现大多数在靠近小叶坏死性炎症或衬垫的纤维中隔区域可检测到 HSC。 α SHA 和 Sirius 红阳性的实质, 与坏死性炎症和结构性评分显著相关。肝门外周区域测到的 IFN- γ 阳性细胞与炎症渗出相关与结构破坏显著相关。因此结论是, HSC 的激活和肝损伤进展与 Th1 样应答相关 (Baroui 等, 1999)。与乙肝情况相似, 在丙肝病人的肝脏和血清中发现了 Fas 配体及其受体 (hiramatsu 等, 1994; Okazaki 等, 1996; Lio 等, 1998)。

已发现 Th1 细胞因子和其他 Th1 标志与酒精性肝炎和肝硬化相关。炎性刺激和脂质过氧化激活了核因子 κ B (NF- κ B) 并上调促炎性细胞因子和趋化因子。一项研究中, 评价了病理性肝损伤、内毒素血症、脂质过氧化和 NF- κ B 激活之间的关系及促炎症和抗炎症细胞因子之间的失衡。通过胃内灌注给大鼠 (每组 5 只) 喂食乙醇和含饱和脂肪、棕榈油、玉米油或鱼油的饮食。对照大鼠用等卡路里的葡萄糖代替乙醇, 进行了病理分析和内毒素测定, 包括脂质过氧化, NF- κ B 和促炎症细胞因子 (TNF α 、IL-1 β 、IFN- γ 和 IL-12), C-C 趋化因子 (调节活化, 由正常 T 细胞表达和分泌 [RANTES], 单核细胞趋化蛋白 [MCP]-1、巨噬细胞炎性蛋白 [MIP]-1- α), C-X-C 趋化因子 (诱导中性粒细胞趋化附着的细胞因子 [CINC]、MIP-2、IP-10 和上皮中性粒细胞活化蛋白 [ENA]-78) 及抗炎症细胞因子 (IL-10、IL-4 和 IL-13) 的信使 RNA (mRNA) 水平。在显示坏死性炎症损伤 (鱼油-乙醇和玉米油-乙醇) 的大鼠中观察到 NF- κ B 激活和促炎细胞因子 C-C 及 C-X-C 趋化因子的表达增加。这几组大鼠还有最高水平的内毒素和脂质过氧化。在显示炎性肝损伤的组中 IL-10 和 IL-4 mRNA 水平较低。因此在存在促炎症刺激时, 发生 NF- κ B 激活并导致 Th1 促炎症细胞因子和趋化因子表达增加 (Naji 等, 1999)。酒精性肝病中 FAS 配体及其受体也升高, 再次提示 Th1 细胞因子参与了酒精性肝炎的自身免疫过程 (Galle 等, 1995; Taieb 等, 1998; Fiore 等, 1999)。

在酒精相关的肝坏死炎症病理过程中, TNF- γ 也出现于共同途径中, 文献报道酒精性肝病的动物模型中和人酒精性肝病中, 肝和血清 TNF 水平升高, 推测这种 TNF 代谢异常在酒精性肝病的许多代谢性并发症和肝损伤中起了作用 (Grove 等, 1997; McClain 和 Cohen, 1999)。例如, 一项研究发现酒精性肝炎患者 TNF- α 水平 (均值 26.3ng/L; 95%可信限 (CI) 21.7-30.9) 比正常人 (6.4ng/L; CI 5.4-7.4) 高。后来死亡的患者的 TNF- α 水平 (34.7 ng/L; CI 27.8-41.6) 比存活者 (16.6ng/L; CI 14.0-19.2) 高。酒精性肝炎患者 TNF- α 水平与血清胆红素 ($r=0.74$; $p=0.0009$) 和血清肌酸酐 ($r=0.81$; $p=0.0003$) 正相关。酒精性肝炎患者的 TNF- α 水平比非活动性酒精肝硬化患者 (11.1ng/L; CI 8.9-13.3) 和无肝病严重饮酒 (6.4ng/L; CI 5.0-7.8) 高。肾功能异常患者 TNF- α 水平 (14.1ng/L; CI 5.4-22.8) 比酒精性肝病患者低。因此结论是: 酒精性肝炎 TNF- α 升高在疾病严重时最显著, 提示 TNF- α 在致病过程中起了作用 (Bird 等, 1990)。

TNF 介导了内毒素的许多生物作用。最近的研究显示给予 TNF 可引起肝损伤, TNF 可能介导肝细胞毒素半乳糖胺的致死性。内毒素是最强的 TNF 诱导剂之一。由于酒精性肝病患者常有内毒素血症, 由于酒精性肝炎的许多临床表现是已知的 TNF 的生物作用, 故在酒精性肝炎病人中评价其作用。测定了 16 位酒精性肝炎病人和 16 位健康志愿者外周血单核细胞 (TNF 产生的主要来源) 的基础 TNF 和脂多糖刺激后的 TNF 释放, 16 位酒精性肝炎病人有 8 人, 16 位健康志愿者只有 2 人具有可检测的自发性 TNF 活性 ($P<0.05$)。脂多糖刺激后, 酒精性肝炎病人的平均单核细胞 TNF 释放显著增加, 超过健康对照的二倍 (25.3 ± 3.7 对 10.9 ± 2.4 单位/ml, $p<0.05$)。因此结论是: 与健康志愿者的单核细胞相比, 酒精性肝炎病人的单核细胞具有显著增加的自发性 TNF 和脂多糖刺激的 TNF 释放 (McClain 和 Cohen, 1989)。

脂多糖 (LPS) 结合蛋白 (LBP) 和 CD14 在内毒素激活细胞中起着关键的中介作用。推测肠 LPS 参与了酒精性肝病中促进肝损伤的病理过程。已证明胃内喂食油和酒精 4 周的大鼠, 其枯否细胞和肝细胞中 CD14 和 LBP 水平升高, 非骨髓性细胞中的 CD14 mRNA 表达也升高。LBP 和 CD14 表达升高迅速增加了 LPS 诱导的各种促炎症细胞因子的表达, 并与酒精性肝病的病理性肝损伤相关 (Su 等 1998; Lukkari 等 1999)。

关节炎是一种涉及关节炎症的疾病。这些关节呈现肿胀、僵硬、触痛、发红或发热, 可能伴有体重减轻、发烧或虚弱症状。当这些症状持续 2 周以上时, 原因可能是炎症性关节炎, 如类风湿性关节炎。关节炎症也可由感染引起, 导致脓毒性关节炎。一种非常常见的关节炎是退行性关节病 (骨关节炎)。

关节炎和相关疾病的常用处方药是非类固醇抗炎药 (NSAID)，其包括阿斯匹林和阿斯匹林类药物，它们可减轻引起关节疼痛的炎症，关节僵硬和肿胀。然而 NSAID 是非特异性药物，有许多副作用，包括胃出血（华盛顿大学关节炎矫形外科，Frederick Matsen(Chairman), www.orthop.washington.edu）。除 NSAID 外，采用 Celebrex™，一种环氧合酶（COX 类-2）抑制剂来缓解成人骨关节炎和类风湿关节炎的体征和症状，它还可治疗家族性腺瘤息肉病人。

WO01/00229 描述了用肿瘤坏死因子 (TNF) 拮抗剂和 COX-2 抑制剂联合治疗炎症。TNF 拮抗剂也用于治疗关节炎，如 W09103553 中所述。

最近研究表明，IL-18 在关节代谢中起着促炎症作用。Olee 等（1999）证明，IL-18 由关节软骨细胞产生并诱导促炎症和分解代谢反应。软骨细胞中 IL-1 β 诱导了 IL-18 mRNA。软骨细胞产生 IL-18 前体并在对 IL-1 刺激反应中分泌成熟形式的 IL-18。研究 IL-18 对软骨细胞的作用进一步证明它抑制 TGF- β 诱导的增殖和增加 NO 产生。IL-18 激发正常人关节软骨细胞中的几种基因的表达，包括可诱导性 NO 合成酶、可诱导性环氧合酶、IL-6 和 Stromelysin。基因表达与相应蛋白质的合成相关。用 IL-18 处理正常人关节软骨增加了葡糖胺聚糖的释放。这些发现鉴定 IL-18 是一种调节软骨细胞反应和对软骨退化有作用的细胞因子。

Saha 等（1999）已证明 IL-1 β 转化酶 (ICE) /Caspase-1 位于人骨关节炎组织中，在 IL-1 β 和 IL-18 成熟中起作用，他研究了人正常软骨和骨关节炎 (OA) 软骨及滑液中 Caspase-1 的表达和产生，定量测定了骨关节炎软骨细胞中的 ICE 水平，检测了 ICE、IL-1 β 和 IL-18 局部分布之间的关系以及软骨细胞的凋亡。该研究所做的实验表明，人滑膜和软骨均表达和合成 ICE，OA 组织中阳性染色细胞数明显高于正常组织。关节软骨的浅表层和上中层优先产生 ICE。OA 软骨外植体和软骨细胞产生成熟的 IL-1 β ，用特异性 ICE 抑制剂处理完全阻抑了软骨细胞，ICE 抑制剂还明显减少 IL-18 阳性细胞的数量。活性 IL-1 β 和 ICE 之间的这种关系提示，ICE 可能通过激活此促炎症细胞因子而促进 OA 的发展，IL-18 可能在软骨病理学中起作用。

Gracie 等（1999）提出，IL-18 在类风湿关节炎中有促炎症作用。他们检测到类风湿关节炎滑膜组织中的 IL-18 mRNA 和蛋白水平明显高于骨关节炎对照。还证明体外 IL-12 或 IL-15 与 IL-18 联合诱导了滑膜组织产生 IFN- γ 。给予用胶原/弗氏不完全佐剂免疫的小鼠 IL-18，加速了其侵蚀性炎症关节炎的发展，提示 IL-18 在体内可能是促炎症的。

然而迄今除了化学药物外，采用可溶性受体或单克隆抗体只阻断 TNF α 和 IL-1 β ，已显示能降低小鼠胶原诱导的关节炎 (CIA，是类风湿关节炎的一种小鼠模型)

(Williams 等, 1994), 从而提示可用作类风湿关节炎的活疗药物。

术语“慢性或特发性炎症性肠病”包括至少两种状况: 节段性回肠炎和溃疡性结肠炎, 二者都是肠胃道疾病。节段性回肠炎最常影响小肠, 当其还涉及结肠时与溃疡性结肠炎的鉴别诊断可能是一个问题。

节段性回肠炎的慢性炎症和溃疡通常以小肠梗阻或腹痛开始, 这可能类似于急性阑尾炎, 其他主诉可能是关于其并发症的。该病进程缓慢, 尽管治疗也可能恶化和缓解, 通常发生于青壮年, 约一半病例年龄在 20-30 岁之间, 90%在 10-40 岁之间, 男性略多于女性。

显微镜检查反映了该病的总体外观, 炎症涉及部位是不连续的, 呈局灶性或斑块状。主要在粘膜和粘膜下层见到淋巴细胞和浆细胞集聚, 但常影响全层(穿透性炎症)。节段性回肠炎的典型显微镜特征是存在颗粒细胞, 围绕着淋巴细胞套。特发性炎症性肠病的发生率显示因地理而有相当差异。北欧和美国这些病的发病率比南欧、非洲、南美和亚洲国家高得多, 虽然南欧部分地区和日本都市化和财富的增加导致较高的发病率 (General and Systematic Pathology, Churchill Livingstone 第三版, 2000, JCE Underwood 编)。

节段性回肠炎临床上有二种主要类型, 第一种病人在发作后三年内病情持续缓解, 第二种病人病情持续三年以上。

不论病因学如何, 有证据表明此病具有持续和不恰当的 T 细胞和巨噬细胞激活, 伴有促炎症细胞因子, 特别是白介素 1, 2, 6 和 8, IFN- γ 和 TNF- α 产生的增高。节段性回肠炎的特征是伴有纤维化的持续性(慢性)炎症。成纤维细胞增殖和胶原沉积过程可能由转化生长因子 β 所介导, 该因子具有明确的抗炎症作用, 即成纤维细胞募集、基质合成和下调炎性细胞的下调, 但可能牵涉到许多其他介质。

溃疡性结肠炎是大肠的一种非特异性炎症, 通常起始于直肠, 以不同程度向邻近结肠延伸。不象节段性回肠炎, 溃疡性结肠炎局限于大肠。

越来越多的证据表明, 溃疡性结肠炎是一种改变的自身免疫性反应, 但粘膜损伤也可能是 T 细胞不恰当激活和巨噬细胞、中性粒细胞的细胞因子、蛋白酶和反应性氧代谢物造成的间接损伤所致。对结肠上皮造成损伤的后一种机制称为“无辜旁观者”损伤。有利于自身免疫的证据是存在自身反应性 T 淋巴细胞和针对结肠上皮细胞和内皮细胞的自身抗体及抗中性粒细胞胞浆性自身抗体 (ANCA)。然而, 不应考虑溃疡性结肠炎是自身免疫病, 其粘膜损伤是对自身抗原的免疫反应的直接结果 (General and Systematic Pathology, Churchill Livingstone 第三版, 2000, JCE Underwood 编)。

关于节段性回肠炎的治疗, 大多数人首先用含 mesalamine (一种有助于控制炎症

的物质) 治疗。不能从其获益或不能耐受此药的病人可用其他含 mesalamine 的, 通常称为 5-ASA 的药。Mesalamine 制剂的可能副作用包括恶心、呕吐、胃灼热、腹泻和头痛。

某些病人服用皮质类固醇以控制炎症, 这些药对急性节段性回肠炎最有效, 但可引起严重副作用, 包括对感染的易感性增大。也可采用抑制免疫系统的药物来治疗此病, 最常用处方药是 6-巯基嘌呤及相关药物硫唑嘌呤。免疫抑制剂通过阻断产生炎症的免疫反应而起作用。这些药物可能引起副作用, 如恶心、呕吐和腹泻, 并可降低病人对感染的抵抗力。当合用皮质类固醇和免疫抑制药治疗病人时, 可减少皮质类固醇的剂量。某些研究提示免疫抑制药可增强皮质类固醇的效果。

美国食品和药物管理局批准了药物 infliximab 用于治疗对标准疗法 (mesalamine, 皮质类固醇, 免疫抑制剂) 无反应的中度-重度节段性回肠炎和治疗开放性引流瘘。首次批准专用于节段性回肠炎治疗的 infliximab 是一种抗 TNF 单克隆抗体。抗 TNF 单抗在 TNF 到达小肠前从血流中去除 TNF 从而预防了炎症。

狭窄、瘘管或外科手术引起的小肠中细菌过度生长可用抗生素治疗。对此常见问题, 医生可处方以下抗菌素之一或多种: 氨苄青霉素、磺胺、头孢菌素、四环素或灭滴灵。

炎症消退时腹泻和痉挛性腹痛常缓解, 但还可能需要其他药物, 可采用几种抗腹泻药, 包括 diphenoxylate、loperamide 和可待因。因腹泻而脱水的病人常输液和电解质治疗。故仍然需要有效的疗法来治疗和/或预防炎症性肠病, 特别是节段性回肠炎和溃疡性结肠炎, 该疗法应减少副作用或甚至无副作用为理想。

组织学和免疫学观察表明, 细胞介导免疫力和 T 细胞激活是节段性回肠炎 (CD) 的关键特征。对人和实验动物模型的研究提示, 在此病中, 局部免疫应答反应倾向于以 Th1 型为主 (Desreumaux 等, 1997), 局部释放的细胞因子, 如 IFN- γ 、IL-1 β 和 TNF- α 导致促进和扩大炎症反应 (Reimund 等, 1996)。

细胞因子 IL-18 在 Th1 介导的免疫应答反应中, 与细胞因子 IL-12 合作, 通过刺激 IFN- γ 分泌、增强自然杀伤细胞的细胞毒性和刺激 Th1 细胞分化, 而起着重要作用 (Uchito 等, 1996)。

IL-18 与 IL-12、IL-2、抗原、有丝分裂原, 可能还有其他因子一起作用, 诱导产生 IFN- γ 。IL-18 还增强 GM-CSF 和 IL-2 的产生, 促进抗 CD₃ 诱导的 T 细胞增殖和加强自然杀伤细胞的 Fas 介导的杀伤。成熟的 IL-18 由其前体经 IL-1 β 转化酶 (ICE caspase-1) 而产生。IL-18 受体由至少二个组分组成, 在配体结合中起协同作用。在小鼠受 IL-12 激活的 T 细胞中发现有 IL-18 的高亲和力和低亲和力结合位点 (Okamoto

等, 1998) 提出其为多条链的受体复合物。迄今已鉴定到二个受体亚基, 二者均属于 IL-1 受体家族(Okamoto 等, 1999)。IL-18 的信号传导涉及 NF- κ B 的激活(Matsumoto 等, 1997)。

最近有人提出 IL-18 涉及炎症性肠病(Pizarro 等, 1999; Monteleone 等, 1999)。

Pizarro 等(1999)特征分析了节段性回肠炎病人结肠标本中 IL-18 的表达和定位并分离了粘膜细胞群。采用半定量 RT-PCR 法, 与溃疡性结肠炎(UC)和非炎症对照病人相比, 发现 CD 病人新鲜分离的小肠上皮细胞和固有层单个核细胞中 IL-18 mRNA 转录增加。与固有层单个核细胞相比, 小肠上皮细胞中的 IL-18 mRNA 转录更加丰富。免疫组化分析手术切除的结肠组织将 IL-18 定位于固有层单个核细胞(尤其是巨噬细胞和树突状细胞)以及小肠上皮细胞。Western blot 分析揭示, 与重组和成熟的人 IL-18 蛋白相符的 18.3KDa 条带, 主要见于 CD 而非 UC 的肠粘膜活检标本中。在 CD 和 UC 二者活检标本的非炎症区域中检测到与无活性 IL-18 前体相符的第二条 24KDa 条带。此条带在非炎症对照中是唯一的形式。

Monteleone 等(1999)证实了这些发现, 采用半定量 RT-PCR 和 Western blot 分析检测了 12 个 CD、9 个 UC 病人和 15 个非炎症性肠病对照者的整个肠粘膜组织和固有层单个核细胞中的 IL-18。发现所有测试标本中均有 IL-18 转录, 然而与 UC 和对照相比, 在 CD 的粘膜和固有层单个核细胞样本中均检测到 IL-18 mRNA 积累增高。CD 中取自炎症区域的粘膜标本中 IL-18 转录更丰富。与成熟 IL-18 相符的 18KDa 条带主要见于 CD 粘膜标本中。非炎症性肠病(non-IBD)对照粘膜标本中 IL-18 以 24KDa 多肽存在。与此相一致, CD 或 UC 标本中表达了活性 IL-1 β 转化酶(ICE)的亚基(p20), 而 non-IBD 对照的结肠粘膜中, 只合成 ICE 的前体(p45)。

Dayer(1999)综述了 IL-18 的不同和部分相矛盾的功能。总结为, IL-18 是一种多功效的白介素, 具有炎症增强和减弱功能。一方面它能增强促炎性细胞因子如 TNF α 的产生从而促进炎症。另一方面, 它诱导产生 NO(一种 Caspase-1 的抑制物)而阻止 IL-1 β 和 IL-18 的成熟, 可能减弱炎症。IL-18 的这种双向作用引起了对 IL-18 抑制剂在炎症性疾病中效果的疑问。此外, 由于在炎症调节中存在多种不同细胞因子和趋化因子的相互作用, 通过仅阻断其中之一来治疗或预防炎症性疾病, 有无良效是不可预测的。

发明概述

本发明基于 IL-18 抑制剂对治疗和/或预防(几种)不同疾病有效的发现。

本发明的第一个目的是提供一种新方法来治疗和/或预防肝损伤。因此本发明涉及

使用 IL-18 抑制剂来制造治疗和/或预防急性和慢性肝损伤的药物。更具体说,本发明涉及治疗和/或预防酒精性肝炎,病毒性肝炎,免疫性肝炎,暴发性肝炎,肝硬化和原发性胆汁性肝硬化。

本发明第二个目的是提供一种新方法來治疗和/或预防关节炎。因此本发明涉及使用 IL-18 抑制剂来制备治疗和/或预防关节炎的药物。IL-18 抑制剂的有益效果包括降低此病的严重性和防止此病传播。这是意外的发现,因为从以上描述的本领域现状不可能得出结论:阻断参与关节炎的一种特定因子,即白介素 IL-18,会导致关节炎缓解或者甚至治愈患病的关节。

还发现在小鼠关节炎模型中,给予 IL-18 抑制剂显著减轻软骨的侵蚀。故本明还涉及使用 IL-18 抑制剂来制造治疗和/或预防软骨破坏的药物。

本发明第三个目的是提供一种新方法來治疗和/或预防炎症性肠病(IBM),特别是节段性回肠炎和溃疡性结肠炎。因此本发明还涉及使用 IL-18 抑制剂来制造治疗和/或预防 IBM 的药物。根据本发明,发现节段性回肠炎病人活检标本中粘膜炎症区域内 IL-18BP mRNA 和蛋白的浓度增高。而且在小鼠炎症性肠病模型中已证明两种不同的 IL-18 抑制剂保护了动物避免患病。

按照本发明,还考虑联合应用 IL-18 抑制剂和/或干扰素和/或 TNF 拮抗剂和/或 COX-2 抑制剂。为了应用基因疗法递送 IL-18 抑制剂给患病组织或细胞,本发明另一内容涉及采用含 IL-18 抑制剂编码序列的表达载体来治疗和/或预防疾病。本发明还涉及应用内源性基因激活 IL-18 抑制剂和应用基因工程改造的细胞表达 IL-18 抑制剂来治疗和/或预防肝损伤,关节炎和 IBM。

附图简述

图 1 显示小鼠注射 LPS 1 小时前注射不同剂量重组 IL-18BP (0; 0.04; 0.4; 4mg/kg) 后血清 IFN- γ 水平 (pg/ml)。血样品采集自 LPS 注射后 5 小时,用 ELISA 分析其循环 IFN- γ 。

图 2 显示丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的血清水平。注射 LPS 之前给 Pacnas 致敏小鼠注射递增剂量的重组人 IL-18BP (0; 0.04; 0.4; 4mg/kg)。注射 LPS 后 5 小时采血样测定 ALT 血清水平。SF=Sigma-Frankel: 1SF 单位的 AST/ALT 在 25pH7.5 时将形成 4.82×10^{-4} μ mol 谷氨酸/分。

图 3 显示注射 LPS 后小鼠存活时间。注射 LPS 前 20 分钟给 Pacnas 致敏小鼠注射不同剂量的重组人 IL-18BP (0; 0.04; 0.4; 4mg/kg)。: 4mg /kg; : 0.4; 0.04; : 不注射 IL-18BP (只注射 LPS)。

图4 显示注射 LPS 前 20 分钟, 给 P.acnas 致敏小鼠注射不同量的 IL-18BP (0; 0.04; 0.4; 4mg/kg), 5 小时后测得的 IFN- γ 血清水平。

图5 显示注射大肠杆菌(图 5A)或伤寒杆菌(图 5B) LPS 40mg/ml (致死剂量) 前 30 分钟注射多克隆 IL-18 抗血清或正常兔血清(NDS=对照)的小鼠的成活情况。 : 注射 IL-18 抗血清小鼠; : 注射 NDS 小鼠。X 轴显示 LPS 攻击后天数。
*P<0.05。

图6 显示按下述方法治疗的每组 5 只小鼠的均值+标准差。小鼠腹腔内注射(ip)抗 IL-18 抗血清、可溶性 TNF- α 受体(TNFsRp55)或运载体(盐水)后, 立即静脉给予伴刀豆球蛋白 A (ConA, 图 6A)或 PEA (绿脓杆菌, 图 6B)。**p<0.01; ***p<0.001, 对比 ConA 或单用 PEA; #p<0.01, 对比 TNFsRp55 或抗 IL-18 阶乘的 ANOVA。

图7 显示关节炎小鼠模型中 IL-18BP 对临床评分的影响。7A 显示每日给予(ip)小鼠不同量 IL-18BP 或 IFN- β 或运载体(NaCl)后测得的临床评分。符号: : 10000IU IFN- β , : 10mg/kg IL- β BP, : 3mg/kg IL-18BP, : 1mg/kg IL-18BP, : 0.5mg/kg IL-18BP, : 0.25mg/kg IL-18BP, : NaCl。X 轴显示治疗天数, Y 显示临床评分平均值。用 Mann Whitney 检验作统计学分析。图 7B 显示从图 7 产生的 AUC (曲线下区域)。n=动物数目。

图8 显示 IL-18BP 对脚爪肿胀的影响。图 8A 显示测量经不同量 IL-18BP 治疗的各动物患病后爪的厚度(肿胀)所得结果。Y 轴显示从治疗开始时爪厚的毫米变化。符号意义同图 7。图 8B 显示从图 8A 产生的 AUC。n=动物数目。

图9 显示急性关节炎, 即此病扩散到其他关节时, 患病后爪数目分析。符号: : NaCl (对照); : 10mg/kg IL-18BP; : 3mg/kg IL-18BP; : 1mg/kg IL-18BP; : 0.5mg/kg IL-18BP; : 0.25mg/kg IL-18BP。

图10 显示患病关节软骨的侵蚀评分。

图11 显示小鼠关节的组织病理学。如下述实施例 10 所述, 实验结束时切下首先发生关节炎的爪子, 固定。图 11A 正常小鼠关节, 图 11B 关节炎小鼠关节, 图 11C 用 rhIL-18BP 治疗小鼠的关节。

图12 显示分别用 3mg/kg IL-18BP 或盐水(载体)治疗的小鼠的 IgG1 (空心直方图)或 IgG2a (影线直方图)同种型抗 II 型胶原抗体的水平。于患病 4 天(D4)或 8 天(D8)时测定。

图13 显示分别用 1、3 或 10mg/kg IL-18BP, 10000IU IFN- β , 正常小鼠血清(NMS)或盐水(NaCl)治疗动物的 IL-6 水平(pg/ml)。

图 14 显示活动性节段性回肠炎、溃疡性结肠炎患者或正常健康人的肠活检标本中 hIL-18BP 的表达和 IL-18 mRNA 转录。显示 IL-18BP, IL-18 和管家基因 (β -肌动蛋白) 的代表性 RT-PCR 产物 (图 14A)。用 Kodak 数码成像软件进行了溴乙锭染色条带的相对定量测定, 报告为靶基因对 β -肌动蛋白的比例。靶基因在图 14B 中为 IL-18, 在图 14C 中为 IL-18BP。

图 15 显示人脐带静脉内皮细胞 (HUVEC) 的 hIL-18BP mRNA 转录和蛋白质表达, 以及人单核细胞系 THP1 的蛋白质表达。从未处理的内皮细胞和用 IL-1 β 、TNF α 、IFN γ 刺激的内皮细胞分离 RNA。阳性对照: 节段性回肠炎病人的结肠; 阴性对照: 无 cDNA。以半定量 RT-PCR 分析了 IL-18BP 和 IL-18 表达 (图 15A)。用 ELISA 分析未处理 (培养液) 和以 IL-1 β 、TNF α 、IFN γ 激活 24 小时的 HUVEC 细胞 (图 15B) 或 THP1 (图 15C) 细胞的培养上清液。

图 16 显示 IBD 小鼠模型腹腔内给予盐水 (NaCl) 或 IL-18BP (8mg/kg) 后 1-10 天之间体重的发展。体重变化以自第一天体重变化的百分比表示, 显示两组 (每组 8 只小鼠) 的平均值和标准差。

图 17 显示 IL-18BP 治疗和未治疗的 IBD 小鼠的结肠尾侧淋巴结和脾脏的分析结果。图 17A 显示 6 厘米长结肠的重量。图 17B 显示尾侧淋巴结中细胞总数。图 17C 显示脾中 CD4⁺/CD69⁺染色阳性细胞的百分数。数据为平均值和标准差。*表示有显著性差异。

图 18 显示用 CD3/CD28 刺激后 48 小时尾侧淋巴结细胞 (图 18A 和 C) 和脾细胞 (图 18B 和 D) 上清液中产生的 IFN γ 量 (18A 和 B) 和 TNF α 量 (图 18C 和 D)。以均值和标准差表示。

图 19 显示结肠匀浆中的 TNF α (图 19A) 和 IFN γ (图 19B) 含量。数据按结肠重量校正。以均值和标准差表示。*表示有显著性差异。

发明详述

本发明基于 IL-18 抑制剂在 (几种) 不同疾病中有良好效果的发现。

本发明上下文中的术语 “IL-18 抑制剂”, 指能以减弱、降低或部分地、大量地或完全地防止或阻断 IL-18 产生和/或作用的方式来调节 IL-18 的产生和/或作用的任何分子。术语 “IL-18 抑制剂” 包括 IL-18 产生的抑制剂以及 IL-18 作用的抑制剂。

产生的抑制剂可以是负面影响 IL-18 合成、加工或成熟的任何分子。本发明考虑的抑制剂可以是 IL-18 基因表达的抑制剂、降低或阻止 IL-18 mRNA 转录或导致该 mRNA 降解的反义 mRNA, 损害正确折叠或部分或基本上阻止 IL-18 分泌的蛋白质,

一旦 IL-18 合成能降解其的蛋白酶，切割 IL-18 前体产生成熟 IL-18 的蛋白酶的抑制剂例如，caspase-1 抑制剂等。

IL-18 作用抑制剂可以是 IL-18 拮抗剂。例如，可以是以足够亲和力和特异性结合或隔离 IL-18 分子本身而部分或基本上中和 IL-18 或 IL-18 结合位点（负责 IL-18 与其配体结合的位点，例如，其受体）的拮抗剂。拮抗剂也可抑制在 IL-18/受体结合时细胞中所激活的 IL-18 信号传递通路。

IL-18 作用抑制也可以是可溶性 IL-18 受体或模拟受体的分子，或阻断 IL-18 受体的物质，或 IL-18 抗体，如多克隆抗体或单克隆抗体，或阻止 IL-18 与其靶结合的其它物质或分子，从而减弱或阻止 IL-18 介导的细胞内外反应的触发。

依据本发明第一方面内容，IL-18 抑制剂用于制造治疗和/或预防肝损伤的药物。较佳的是，本发明使用 IL-18 抑制剂来制造治疗和/或预防急慢性肝病的药物，更佳的是防治酒精性肝炎、病毒性肝炎、免疫性肝炎、暴发性肝炎、肝硬化和原发性胆汁性肝硬化的药物。

本文中的术语肝损伤或肝病包括各种不同病理状况。本发明所考虑到的几种状况已在上述发明背景中有详细解释。其他本发明可治疗和/或预防的肝病包括，例如，热原质性肝脓肿，也称为细菌性肝脓肿，是一种肝中产脓空洞。肝脓肿的病因有多种，可以由腹部感染（如阑尾炎、憩室炎或肠穿孔）、血液感染、胆道（肝分泌）感染或肝撞伤受感染发展而来。引起肝脓肿的最常见微生物是大肠杆菌、*Proteus vulgaris* 和产气肠杆菌，发病率 1/万。

酒精性肝病可用本发明 IL-18 抑制剂治疗和/或预防。该病包括滥饮酒所致的急慢性肝脏炎症。酒精性肝炎通常发生在多年过度饮酒之后。饮酒时间越长，饮酒量越大，产生肝病的可能性越大，因酒精缺乏卡路里、食欲减退和营养吸收障碍（小肠吸收营养不足）而发生营养不良，营养不良引起肝病。酒精对肝脏的毒性，个体对酒精诱导肝病的易感性和遗传因素也对产生酒精性肝病有作用。

根据本发明，可用 IL-18 治疗和/或预防肝硬化。肝硬化是一种慢性肝病，引起肝组织损伤，肝脏疤痕化（纤维化，结节性再生），肝功能进行性减退，腹水过多，出血性疾病（凝血病），血管压力增高（门脉高压）和脑功能障碍（肝性脑病）。受损和疤痕化的肝脏不能充分排出血中的废物（毒素），疤痕组织的形成导致肠脾到肝脏的静脉压力增高（门脉高压）。过度饮酒是肝硬化的主要原因，其他病因包括感染（如肝炎），胆汁引流系统疾病和缺陷（如胆道狭窄或堵塞），囊性纤维化和铁铜吸收增加。

肝硬化类型取决于病因。肝硬化并发病可能严重。肝硬化是美国第九位死亡原因，可产生神经方面问题（如肝性脑病），体蛋白减少、钠增加和肝血管中压力增加导致

腹腔液体（腹水）增加。门脉高压可引起食道血管压力、体积和充盈度增加（食道血管曲张）。可发生出血和凝血问题。血管压力升高和血凝问题可能增加发生威胁生命的严重出血的可能性。

本发明术语“肝损伤”包括的另一疾病是自身免疫性肝炎，此病是由于免疫系统相互反应所引起的肝脏炎症。自身免疫性肝炎是一种慢性活动性肝炎。细胞免疫反应可能是其病因。慢性活动性肝炎病人血中可发现各种循环性自身抗体。其他自身免疫性疾病也可伴有慢性活动性肝炎或可发生在慢性活动性肝炎病人的亲属中。这些疾病是甲状腺炎、糖尿病、溃疡性结肠炎、抗球蛋白试验阳性出血性贫血，增殖性肾小球肾炎和 Sjogren 综合症。危险因素可包括这些疾病，或者危险因素与慢性活动性肝炎相关。发病率为 4/万。

胆道闭锁是“肝损伤”范围内的另一种疾病，它是由于出身前胎内胆道不能正常发育所致的堵塞。胆道闭锁由肝内外胆道发育异常和不足所引起。胆道系统的目的是去除肝中废物和将脂肪消化所需的胆盐运送到小肠。此病胆汁由肝流向胆囊受阻，可导致肝损伤和肝硬化，若不治疗最终致死。

按照本发明，IL-18 抑制剂也用于制造治疗和/或预防慢性活动性肝炎的药物。慢性活动性肝炎又称为慢性进行性肝炎。它是一种肝脏的持续性炎症，造成肝细胞损伤。慢性活动性肝炎的病因包括病毒感染、药物反应/摄食、代谢障碍或自身免疫疾病，也可无明显原因。此病的特征是肝细胞坏死或死亡、活动性炎症和导致肝衰竭、硬化和死亡的纤维化，发病率 1/万。危险因素是自身免疫病、原先有的丙肝感染或甲肝或乙肝抗原阳性 6 个月以上。

慢性持续性肝炎是一种轻度非进行性肝脏炎症，也包括在本发明的术语“肝损伤”内。

按照本发明，IL-18 抑制剂也用于制造治疗和/或预防原发性胆汁性肝硬化（PBC）的药物。PBC 是一种肝中胆汁流动受阻而致的炎症，导致肝细胞损伤。由未明病因引起肝内胆管发炎。此病最常影响中年妇女，症状发作是逐步的，皮肤瘙痒为最初症状，肝中胆管发生炎症，最终发生肝硬化。此病与自身免疫疾病有关，发病率 8/10 万。本发明考虑也可用 IL-18 抑制剂来治疗急性肝中毒，如大量服用扑热息痛所引起的急性肝中毒，这是偶然事故或有意而为。

如以下实施例所述，本发明的发明者惊奇地发现 IL-18 抑制剂在预防和治疗暴发型肝炎（急性肝炎）中特别有效。因此本发明宜涉及预防和/或治疗暴发型肝炎。

本发明第二方面的内容是用 IL-18 抑制剂来制造治疗和/或预防关节炎的药物。

本文所用术语“关节炎”包括所有不同类型的关节炎和关节疾病，急慢性关节炎，

见华盛顿大学矫形科关于关节炎主页中的例子 (www.orthop.washington.edu)。关节病的例子是：关节强硬性脊椎炎，背痛，腕沉积综合征，Ehlers-Danlos 综合征，痛风，青少年关节炎，盘状红斑，疮，肌炎，骨质疏松症，成骨不全，多关节炎，多肌炎，牛皮癣性关节炎，Reiter 综合征，硬皮病，肠病关节炎，Behcets 病，儿童关节炎，退变性关节病，纤维肌痛症，感染性关节炎，莱姆病，Marfan 综合症，骨关节炎，骨坏死，Pagets 病，风湿性多肌痛症，假痛风，交感神经反射性营养不良，类风湿性关节炎，风湿病，Sjogren 综合征，家族性腺瘤息肉病等。

较佳地按照本发明，提供 IL-18 抑制剂来治疗和/或预防炎症性关节炎。炎症性关节炎分类为慢性关节炎，这是按其连续性，持久性或复发病程而划分。

本发明的一个优选实施例中，炎症性关节炎是类风湿性关节炎 (RA)。RA 引起关节衬膜 (滑膜，一层细胞层上皮) 和/或内部器官炎症。此病倾向持续多年，通常影响全身很多不同关节，最终引起软骨、骨、肌腱和韧带损伤。RA 可影响颈、肩、肘、髋、腕、手、膝、踝和足关节。例如，许多 RA 病例对称型的关节发炎。

RA 在美国 1% 人群中流行，遍布所有种族和年龄。全世界都有此病。RA 病人中，妇女多于男子，为 3:1。

如以下实施例所示，已证明 IL-18 抑制剂对软骨侵蚀显示出非常好的效果。因此本发明还涉及使用 IL-18 抑制剂来制造治疗和/或预防软骨破坏的药物，即用 IL-18 抑制剂作为软骨保护剂。IL-18 抑制剂可用于软骨破坏或发生侵蚀的任何情况。软骨破坏是关节软骨结构完整性的进行性衰退，它发生于影响关节软骨的疾病中，如类风湿性关节炎、青少年性类风炎或骨关节炎，也见于感染性滑膜炎。

本发明第三方面涉及使用 IL-18 抑制剂来制造治疗和/或预防炎症性肠病的药物。其根据是发现 CD 病人发炎的粘膜中 IL-18 上调。另一根据是发现小鼠结肠炎模型中给予不同的 IL-18 抑制剂具有保护作用。文献中已描述了 CD 病人患病粘膜中 IL-18 上调 (Monteleone 等，1999; Pizarro 等，1999)。

本发明在证明肠粘膜发炎区域中存在高含量 IL-18BP 后，甚至更令人惊讶的是发现全身给予 IL-18BP 对动物模型结肠炎的发展和症状有显著的良好效果。虽然 CD 病人肠中 IL-18BP 已内源性上调，如以下实施例所证明，但机体所能够产生的 IL-18BP 量似乎不足以战胜疾病。

本发明所述的炎症性肠病，优选节段性回肠炎或溃疡性结肠炎。

在本发明一优选实施例中，IL-18 抑制剂选自 caspase-1(ICE)抑制剂。抗 IL-18 抗体、抗 IL-18 受体亚基之一的抗体，IL-18 信号传导通路抑制剂，能与 IL-18 竞争和阻断 IL-18 受体的拮抗剂，以及 IL-18 结合蛋白质，其同工型、突变型蛋白、融合蛋白、

功能性衍生物、活性片段或具有相同活性的循环性变换衍生物。

本文所用术语“IL-18 结合蛋白”与“IL-18BP”同义。其包括 WO99/09063 中或 Novick 等人 1999 所述 IL-18 结合蛋白，包括 Kim 等 2000 所述的 IL-18 结合蛋白的剪接变体和/或同工型。按照本发明，特别可用人 IL-18BP 的同工型 a 和 c，按照本发明有用的蛋白质可以是糖基化或非糖基化的，它们可衍生于自然来源如尿，或较好用重组方法生产。重组表达可在原核表达系统如大肠杆菌中、或在真核（优选哺乳动物）表达系统中进行。

本文所用术语“突变型蛋白”指 IL-18BP 的同类物，或病毒性 IL-18BP 的同类物，此同类物中天然 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 的一个或多个氨基酸残基被不同氨基酸残基所置换，或缺失，或 IL-18BP、病毒性 IL-18BP 的天然序列中加入了一个或多个氨基酸残基，但所产生的产物的活性与野生型 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 相比无显著改变。采用已知的合成和/或定点诱变技术，或任何适合的其他已知技术制备这些突变型蛋白。

这类突变型蛋白宜具有与 IL-18BP 充分重复或与病毒性 IL-18BP 充分重复的氨基酸序列，从而具有与 IL-18BP 基本上相似的活性。IL-18BP 的活性之一是其能结合 IL-18。只要该突变型蛋白具有与 IL-18 实质性结合的活性。它就可用于纯化 IL-18，如借助亲和层析，从而认为其具有与 IL-18BP 基本上相似的活性。因此，可借助常规实验来确定某个突变型蛋白是否具有与 IL-18BP 基本相同的活性，包括对该突变型蛋白进行简单的夹心竞争试验来确定它是否能结合适当标记的 IL-18，如放射免疫试验或 ELISA 试验。

本发明所用的 IL-18BP 多肽突变型蛋白或病毒性 IL-18BP 突变型蛋白，或它们的编码核酸，包括一组有限的基本上相应的序列，如置换肽或多肽，本领域普通技术人员可根据本文所述的技术和指导用常规方法获得，而无须过多实验。

本发明突变型蛋白中的优选变化是所谓的“保守性”置换。IL-18BP 多肽或蛋白或病毒性 IL-18BP 的保守性氨基酸置换可包括具有足够相似的理化特性的一组内的同义氨基酸，该组成员之间的置换将保存该分子的生物功能（Grantham, 1974）。已清楚在上述序列中还可进行氨基酸的插入和缺失而不改变其功能，特别是如果这种插入或缺失只涉及少数氨基酸时，如 30 个以下，较佳为 10 个以下。不要去或置换对功能性构象起关键作用的氨基酸，如半胱氨酸残基。这类缺失和/或插入产生的蛋白质和突变型蛋白属于本发明范围。

较佳的同义氨基酸组是表 I 所示的那些组，更佳的同义氨基酸组是表 II 所示的那些组。最佳的同义氨基酸组是表 III 所示的那些组。

表 1 较佳的同义氨基酸分组

氨基酸	同义组
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

表 2 更佳的同义氨基酸组

氨基酸	同义组
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His

Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

表 3 最佳的同义氨基酸组

氨基酸	同义组
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

在蛋白质中产生氨基酸置换的实施例可用来获得 IL-18BP 多肽或蛋白质的突变型蛋白，或病毒性 IL-18BP 的突变型蛋白，任何已知的方法步骤都可用于本发明，如授予 Mark 等人的美国专利 RE33653, 4959314, 4588585 和 4737462；授予 Koths 等人的 5116943；授予 Namen 等人的 4965195；授予 Chong 等人的 4879111 和授予 Lee 等人的 5017691 专利中提出的方法，以及美国专利 No. 4904584（Shaw 等）中提出的赖氨酸置换蛋白。

术语“融合蛋白”指与另一蛋白质（如在体液中滞留时间延长的蛋白质）融合的

含 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 或其突变蛋白或片段的多肽。故 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 可与另一蛋白质、多肽等如免疫球蛋白或其片段融合。

本文“功能性衍生物”，包括用本领域已知方法以残基侧链或 N 端或 C 端基团存在的功能基团制备的 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 的衍生物及其突变蛋白和融合蛋白。只要它们仍然在药学上可接受，即它们不会破坏与 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 活性基本上相似的蛋白质活性，并且不会使含它们的组合物具有毒性，均包括在本发明中。

例如，这些衍生物可以包括聚乙二醇侧链，其可遮蔽抗原位点并延长 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP 在体液中的滞留。其他衍生物包括羧基的脂肪酯，羧基与氨或伯胺或胺反应产生的酰胺、氨基酸残基的游离氨基与酰基基团（如烷酰基或碳环芳酰基）形成的 N-酰基衍生物、或游离羟基（如丝氨酸或苏氨酸残基的游离羟基）与酰基基团形成的 O-酰基衍生物。

本发明的 IL-18BP 或病毒性 IL-18BP、突变型蛋白和融合蛋白的活性部分包括该蛋白分子多肽链的片段或前体，或单独或与相关分子或与其相连的残基如糖或磷酸根残基一起，或该蛋白分子或糖残基自身的凝聚物，只要所述部分具有与 IL-18BP 基本上相似的活性。

本发明另一优选实施例中，IL-18 抑制剂是 IL-18 抗体。抗 IL-18 抗体可以是多克隆或单克隆抗体，嵌合，人化或甚至完全是人的抗体。重组抗体或其片段特征是能与 IL-18 高亲和力体内结合，毒性低。可用于本发明的抗体应具有的特征是经过对病人足够时间的治疗，它们能良好至优异地减退或缓解病情或与病情相关的一种症状或多种症状，并且毒性低。

通过 IL-18 免疫接种，易在家兔、山羊或小鼠等动物中产生中和抗体。免疫小鼠特别可提供 B 细胞来源用于制备杂交瘤，进而培养杂交瘤产生大量抗 IL-18 单克隆抗体。

嵌合抗体是具有来自不同动物种系的二个或多个节段或部分的免疫球蛋白分子。通常嵌合抗体的可变区来自非人哺乳动物抗体，如鼠单克隆抗体，而该免疫球蛋白的恒定区来自人免疫球蛋白分子。最好如常规方法测得的这两个区域及其联合具有低免疫原性（Elliott 等，1994）。人化抗体是用基因工程技术构建的免疫球蛋白分子，该技术中用人配对物置换鼠恒定区而保留鼠抗原结合区。所产生的鼠-人嵌合抗体降低了免疫原性并改善了在人体中的药物动力学（Knight 等，1993）。

因此在另一优选实施例中，IL-18 抗体是人化 IL-18 抗体，欧洲专利申请 EP0974600 中描述了人化抗 IL-18 抗体的优选例子。

另一优选实施例中，IL-18 抗体完全是人抗体，在 WO00/76310，WO99/53049，

US6162963 或 AU5336100 中详细描述了产生人抗体的技术。完全的人抗体优选以转基因动物（如异种移植小鼠，含有所有或部分的人 Ig 功能性基因座）产生的重组抗体。

本发明一个更优选实施例中，IL-18 抑制剂是 IL-18BP，或其同工型、突变型蛋白、融合型蛋白、功能性衍生物、活性部分或环状变换衍生物。这些同工型、突变型蛋白、融合蛋白或功能性衍生物保留了 IL-18BP 的生物活性，特别是结合 IL-18 的活性，优选至少基本上活性类似于 IL-18BP。理想的话，这些蛋白质具有生物活性甚至比未修饰的 IL-18BP 更高。优选的活性部分所具有的活性比 IL-18BP 更好或更具优点，如稳定性更好，毒性或免疫原性更低，或它们更易大量生产，或更易提纯。

IL-18BP 及其剪接变体/同工型的序列可从 WO99/09063（Novick 等，1999）以及（Kim 等，2000）中获得。

可将 IL-18BP 的功能性衍生物与聚合物交联以改进该蛋白质的性能，如稳定性，半衰期，生物利用度，人体耐受性，或免疫原性。为达到此目的可将 IL-18BP 联接于聚乙二醇（PEG）。例如按 WO92/13095 所述已知方法进行 PEG 化。

因此，本发明的一优选实施例中，IL-18BP 是 PEG 化的。

本发明另一优选实施例中，IL-18 抑制剂是融合蛋白，包含 IL-18 结合蛋白的全部或一部分，与免疫球蛋白全部或一部分融合。本领域技术人员知道所产生的融合蛋白保留 IL-18BP 的生物活性，特别是结合 IL-18 的活性。这种融合可以是直接的，或通过长度短至 1-3 个氨基酸残基或较长（如 13 个氨基酸残基长度）的一个短肽接头相融合。所述接头可以是 E-F-M（谷氨酸-苯丙氨酸-甲硫氨酸）序列之 3 肽；或含 Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met 的 13 个氨基酸的接头序列，位于 IL-18BP 序列和免疫球蛋白序列之间。所产生的融合蛋白具有改进的性能，如体内滞留期（半衰期）延长，比活性提高，表达水平增加或有利于融合蛋白的纯化。

一优选实施例中，IL-18BP 融合于 Ig 分子的恒定区，优选融合于重链区域例如，人 IgG1 的 CH2 和 CH3 结构域。产生的特定融合蛋白包含有 WO 99/09063 的实施例 11 中所述的 IL-18BP 和免疫球蛋白的一部分。Ig 分子的其它同种型也适合用来产生本发明的融合蛋白，例如，同种型 IgG₂ 或 IgG₄，或其他 Ig 类，如 IgM 或 IgA。融合蛋白可以是单体或多聚体，异质或同质多聚体。

主要知道干扰素对病毒复制和细胞增殖有抑制作用。例如，干扰素- α 在促进免疫和炎症反应中起重要作用。干扰素 β （IFN- β ，I 型干扰素）据说有抗炎症作用。Triantaphilopoulos 等（1999）发表的研究表明 IFN- β 治疗类风湿关节炎有良好效果：如该病的小鼠模型—胶原诱导关节炎（CIA）模型所证明。IFN- β 的

这种良好效果在以下实施例中得到验证。

本发明还涉及联合使用 I L - 1 8 抑制剂和干扰素来制造治疗关节炎、特别是类风湿关节炎的药物。

也可将干扰素与聚合物交联以改进该蛋白质的稳定性，例如，WO99/55377 中描述了干扰素 β 和多元醇聚乙二醇 (P E G) 之间的交联。

本发明另一优选实施例中，干扰素是 I F N - β ，更优选 I F N - β 1 a。

I L - 1 8 产生和/或作用的抑制剂宜与干扰素同时、先后或分开使用。

本发明另一实施例中，I L - 1 8 抑制剂与 T N F 拮抗剂联用。T N F 拮抗剂以几种方式发挥其活性。首先，该拮抗剂能以足够的亲和力和特异性结合或封蔽 T N F 分子本身，而部分或基本上中和了 T N F 表位（负责与 T N F 受体结合）（以下称为遮蔽性拮抗剂）。例如，一种遮蔽性拮抗剂可以是针对 T N F 的抗体。

或者，T N F 拮抗剂可抑制 T N F 结合细胞表面受体后激活的信号传递通路（以下称为信号传递拮抗剂）。这二组拮抗剂可单独或一起，与 I L - 1 8 抑制剂联合使用来治疗关节炎，特别是类风湿关节炎。

通过在体外敏感细胞系（如 T N F 能引起其增殖和分泌免疫球蛋白的人 B 细胞）中常规筛检候选药物对天然 T N F 活性的影响，易于鉴定和评价 T N F 拮抗剂。此试验包括不同稀释度的候选拮抗剂（例如，为试验所用 T N F 摩尔量的 0.1 倍 - 1 0 0 倍）的 T N F 制剂，以及无 T N F 或只有拮抗剂的对照（Tucci 等，1992）。

封蔽拮抗剂是用于本发明的优选 T N F 拮抗剂。封蔽拮抗剂中那些能高亲和力结合 T N F 并具有低免疫原性的多肽是优选的，可溶性 T N F 受体分子和 T N F 中和抗体特别优选。例如，T N F - R I 和 T N F - R I I 可用于本发明。这些受体的截短形式，包括受体的胞外结构域或其功能部分是本发明特别优选的拮抗剂。截短的可溶性 T N F - I 型和 T N F - I I 型受体在 E P 914431 中有所描述。

截短形式的 T N F 受体是可溶的，在尿和血清中已检测到，为 3 0 K D 和 4 0 K D 的 T N F 抑制性结合蛋白，分别称为 T B P I 和 T B P I I（Engelmann 等，1990）。本发明宜同时、先后或分别使用 I L - 1 8 抑制剂和 T N F 拮抗剂和 / 或干扰素。

根据本发明，T B P I 和 T B P I I 和优选的 T N F 拮抗剂和 I L - 1 8 抑制剂联用。此受体分子的衍生物、片段、区段和生物活性部分，装配成功能性受体分子可用于本发明。该受体分子的这种生物活性等价物或衍生物，指多肽部分或编码该受体分子的序列部分，其大小足够并能结合 T N F，其结合亲和力使与膜结合的 T N F 受体相互作用而抑制或封闭它。

本发明另一优选实施例中，可溶性人TNF-R1(TBPI)是用于本发明的TNF拮抗剂。天然和重组的可溶性TNF受体分子及其生产方法在欧洲专利EP 3 083 78、EP 3 983 27和EP 4 339 00中有所描述。

IL-18抑制剂可与TNF抑制剂同时、先后或分开使用。联合使用IL-18抗体或抗血清和具有TNF抑制活性的可溶性TNF受体为佳。

本发明另一优选实施例中，这种药物还包括COX-抑制剂，优选COX-2抑制剂。COX抑制剂是本领域已知的。例如具体的COX-2抑制剂在WO01/00229中有描述。

本发明还涉及联用IL-18抑制剂和/或干扰素和/或TNF拮抗剂和/或COX-2抑制剂。这种联用适合于治疗和/或预防关节炎，特别是类风湿关节炎，治疗和/或预防肝损伤以及治疗和/或预防炎症性肠病，特别是节段性回肠炎和溃疡性结肠炎。可同时、先后或分开使用这些活性成分。

本发明一优选实施例中，IL-18抑制剂用量为大约0.0001-10mg/kg体重，或大约0.01-5mg/kg体重，或约0.1-3mg/kg体重，或约1-2mg/kg体重。另一优选实施例中，IL-18抑制剂用量为约0.1-1000μg/kg体重，或约1-100μg/kg体重，或约10-50μg/kg体重。

本发明还涉及使用含有IL-18抑制剂编码序列的表达载体来制备预防和/或治疗关节疾病或关节炎特别是类风湿关节炎、治疗肝损伤和治疗炎症性肠病的药物。即采用基因疗法来治疗和/或预防疾病。优点是IL-18抑制剂的原位表达将有效地直接阻抑受疾病影响的组织或细胞中的IL-18。

为治疗和/或预防关节炎，含IL-18产生和/或作用的抑制剂序列的基因治疗载体可直接注射入患病关节，从而可避免全身给予基因治疗载体所涉及的问题，如载体稀释，抵达和靶向靶细胞或组织，及副作用。

本发明还考虑在平常不表达IL-18抑制剂或该抑制剂表达不充分的细胞中，使用能诱导和/或增强内源性产生IL-18抑制剂的载体。该载体可包含在所需细胞中起作用的调控序列以表达IL-18抑制剂，例如这类调控序列可以是启动子或增强子。然后可通过同源重组将该调控序列导入基因组的正确基因座中，使调控序列与基因可操作性相连，所需要的该基因的表达即被诱导或被增强。该技术通常称为内源性基因活化(EGA)，在例如WO91/09955中有所描述。

本领域技术人员懂得，也可能用同一技术降低IL-18表达，即导入一个负调节元件(如沉默元件)到IL-18的基因座中，如此导致下调或防止IL-18表达。本领域技术人员懂得，IL-18表达的这种下调或沉默具有使用IL-18抑制剂相同的效果，用以

防治疾病。

本发明还涉及使用经过基因修饰的能产生 IL-18 抑制剂的细胞来制造治疗和/或预防肝损伤、关节炎或炎症性肠病的药物。

本发明还涉及特别是用于预防和/或治疗炎症性关节炎、肝损伤或炎症性肠病的药物组合物，其含有治疗有效量的 IL-18 抑制剂和治疗有效量的干扰素。作为 IL-18 抑制剂，该组合物可包括 caspase-1 抑制剂、抗 IL-18 抗体、抗 IL-18 受体任一亚基的抗体、IL-18 信号传递通路的抑制剂与 IL-18 竞争并阻断 IL-18 受体的 IL-18 拮抗剂，和具有相同活性的 IL-18 结合蛋白、同种型、突变型、融合蛋白、功能性衍生物、活性部分或其环状变换衍生物。

上述 IL-18BP 及其同种型、突变型、融合蛋白、功能性衍生物、活性部分或环状变换衍生物是该药物组合物的优选活性成分。

该药物组合物中包括的干扰素优选 IFN- β 。

在另一优选实施例中，该药物组合物包含有治疗有效量的 IL-18 抑制剂。任选的干扰素和 TNF 拮抗剂。此 TNF 拮抗剂可以是中和 TNF 活性的抗体，也称为 TBPI 和 TBPII 的截短的可溶性 TNF 受体片段。本发明的药物组合物还可包含一种或多种 COX 抑制剂，优选 COX-2 抑制剂。

定义“药学上可接受的”，指包含不会干扰活性成分的生物活性效果并对给药的宿主无毒性的任何运载体。例如，为了非肠胃道给药，可将这些活性蛋白以注射用剂量单位形式配制在运载体（如盐水，葡萄糖液，血清白蛋白和 Ringer 液）中。

本发明药物组合物的活性成分可以各种方法给予个体。给药途径包括皮内、透皮（如缓释配方）、肌肉、腹膜内、静脉内、皮下、口服、硬膜外、局部和鼻内途径。也可采用其他治疗有效途径给药，例如通过上皮或内皮组织吸收或通过基因治疗将编码活性药物的 DNA 分子给予病人（如通过载体），导致该活性药物在体内表达和分泌。此外，可将本发明的蛋白质与生物活性药物的其他组分（如药学上可接受的表面活性剂、赋形剂、运载体、稀释和载体剂等）一起给药。

对于非肠胃道（如静脉内、皮下、肌肉）给药，可将活性蛋白质配制成溶液、悬浮液、乳液或与药学上可接受的肠胃道外载体（如水，盐水，葡萄糖液）和能维持等渗性（如甘露醇）或化学稳定性（如防腐剂和缓冲液）的添加剂一起制成冻干粉。采用常规使用的技术给制剂灭菌。

本发明的活性蛋白质也可用偶联方法增加其在人体内的半衰期而改善其生物利用度。例如，将活性蛋白分子与聚乙二醇相连接，PCT 专利申请 WO 92/13095 中有描述。

活性蛋白的治疗有效量是很多变量的函数，包括拮抗剂类型、拮抗剂对 IL-18 的亲和力、拮抗剂显示的残留毒性、给药途径、病人临床状态（包括维持内源性 IL-18 活性的非毒性水平是否合乎需要）。

“治疗有效量”是给药时 IL-18 抑制剂导致 IL-18 生物活性受抑制的量。给予个体单剂或多剂的剂量视各种因素而不同，包括 IL-18 抑制剂的药物动力学性能，给药途径，病人状态和特征（性别，年龄，体重，健康状况和块头大小）、症状程度，相关治疗，治疗频度和所要求的效果。判定和维持已确定的剂量范围在本领域技术人员能力之内。以及个体 IL-18 抑制的体内外测定方法。

按照本发明，IL-18 抑制剂的用量为约 0.0001-10mg/kg 或约 0.01-5mg/kg 体重，或约 0.01-5mg/kg 体重，或约 0.1-3mg/kg 体重，或约 1-2mg/kg 体重。更优选的 IL-18 抑制剂用量是约 0.1-1000 μ g/kg 体重，或约 1-100 μ g/kg 体重或 10-50 μ g/kg 体重。

本发明优选的给药途径是皮下途径，肌肉内给药也是本发明优选的。

在另一优选实施例中，IL-18 抑制剂是每日或每隔一日给药。

每日药量通常分成几剂或以缓释形式给予，以有效获得所需结果。第二次或后几次给药可用与首次或原先给予该个体的相同剂量、少于或多于此剂量进行。第二次或后几次给药可在疾病发作时或发作前给予。

按照本发明，IL-18 抑制剂可以治疗有效量先于其他治疗方案或药物（如多种药物方案）特别是干扰素和/或 TNF 拮抗剂和/或 COX-2 抑制剂，同时或依次预防性或治疗性地给予个体。活性药物可在相同或不同的组合物中与其他治疗剂同时给予。

本发明还涉及包括将有效量 IL-18 抑制剂和/或干扰素和/或 TNF 拮抗剂和/或 COX 抑制剂与药学上可接受的载体混合的药物组合物的制备方法。

参照以下提供的实施例将会更容易理解本发明所述内容，但以下实施例是用于阐述而不意味着对本发明的限制。

实施例

第一部分：实施例 1-8 关于在肝损伤中 IL-18 抑制剂的使用

实施例 1：IL-18BP-His tag 的产生

在 CHO 细胞中产生含组氨酸尾的纯化重组人 IL-18BP (r-hIL-18BP-His tag)。本领域技术人员知道可在真核细胞中产生重组蛋白质。可利用熟知的方法来构建载有编码 IL-18BP 的 DNA 的恰当载体，其适合于转染真核细胞以产生重组 IL-18BP。为了细胞表达，将编码 IL-18BP 的 DNA（见 Novick 等，1999）切下并插入适合转染细胞的表达载体中。或者，可用适当的有义和反义引物作 PCR 制备这种 DNA。然后用本

领域熟知的技术将产生的 cDNA 构建物插入适当构建的真核表达载体中 (Manaitis, 1982)。将该重组蛋白纯化至 95%以上纯度, 发现其在体内和体外是有生物活性的, 对其配体有高亲和力。

实施例 2: IL-18BP 对内毒素诱导死亡小鼠模型的保护效应

采用小鼠模型来检验 IL-18BP (IL-18 抑制剂) 是否能保护小鼠抵抗高剂量脂多糖 (LPS)。LPS 引起急性肝损伤后小鼠迅速死亡。

给 C57BL/6 小鼠腹腔内 (ip) 注射含 his-尾的重组人 IL-18BP (rhIL18BPhis, 得自该蛋白质的重组产生) 4mg/kg, 1 小时后, 注射 60mg/kg LPS (致死剂量), 与只接受 LPS (无 IL-18BP) 的动物组比较小鼠存活率。

与对照小鼠相比, 注射 rhIL-18BP-his 的 7 只小鼠有 5 只在注射 LPS 后存活, 而对照组所有小鼠三日内死亡。

在缺乏或存在递增剂量的 rhIL-18BP-his 时, 注射 LPS 后 5 小时采集血样, 作 ELISA 分析循环性 IFN- γ (图 1)。0.4 和 4mg/kg rhIL-18BP 导致血清 IFN- γ 降低 2 倍。在较低剂量 rhIL-18BP (0.004 和 0.04mg/kg) 时, 无此种抑制。

实施例 3: IL-18BP 在小鼠病理模型中具有抵抗肝损伤的保护作用

采用暴发性肝炎小鼠模型来测试 IL-18BP 的效应。当相继给予 *Propionibacterium acnes* (P.acnas) 和脂多糖 (LPS) 后, 小鼠发生了肝损伤。

注射 LPS 前在不同时间 (1 小时, 20 分, 同时) 给 P.acnas 致敏的 C57BL/6 小鼠注射递增剂量的 rhIL-18BP-his (4, 0.4, 0.04, 0mg/kg)。当与 LPS 同时 ip 给予 rhIL-18BP-his 时无小鼠存活并且循环 IFN- γ 和 TNF- α 水平不受影响。令人惊奇的是, rhIL-18BP (4 和 0.4mg/kg) 导致循环丙氨酸氨基转移酶 (肝损伤的一种标志) 降低 70%, 如图 2 所示。

此外, 监测了小鼠存活率 (图 3), 当 LPS 前 20 分钟 ip 给予 rhIL-18BP 时, 与对照鼠 (接受 NaCl 代替 IL-18BP) 相比, 两个最高剂量 IL-18BP (4 和 0.4mg/kg) 使小鼠死亡延迟 10 小时。

血清 IFN- γ 水平测定结果见图 4。rhIL-18BP(4mg/kg)抑制了 90%的循环性 IFN- γ 水平和 80%循环丙氨酸氨基转移酶(没显示)。当 LPS 之前 1 小时给予 rhIL-18BP-his 时, 存活曲线和循环性 TNF- γ 水平类似于 LPS 之前 20 分钟给予 rhIL-18BP his 时所见, 但循环性丙氨酸氨基转移酶水平不受影响 (未显示)。

此外用苏木精-伊红染色和导管显微镜术分析了小鼠肝组织, 与正常肝组织相比, 已引起严重肝炎的小鼠肝脏显示出严重坏死。与此相反, 经 IL-18BP 治疗小鼠的肝组织比未治疗小鼠坏死病灶少得多。

实施例 4: 抗 IL-18 抗体保护小鼠抵抗致死性内毒素血症

为了评价用 IL-18 抗体阻抑 IL-18 是否能保护小鼠抵抗致死量的细菌脂多糖的攻击,给 C57BL/6J 小鼠先注射兔抗小鼠 IL-18 中和抗体(多克隆)或以正常兔血清(NDS)作为对照。抗体治疗后 30 分钟,注射致死量的大肠杆菌 LPS (图 5A) 或伤寒杆菌 LPS (图 5B)。实验包括 10-20 只小鼠/组,在不同时间进行 2 次。

图 5A 显示,用抗 IL-18 抗血清治疗小鼠防止了 40mg/kg 大肠杆菌 LPS 导致的死亡,100%小鼠在抗 IL-18 治疗后存活,而用正常兔血清治疗小鼠仅 10%存活($P<0.005$)。

图 5B 显示,抗体治疗小鼠也受到保护,抵御了伤寒杆菌 LPS 的致死作用(存活率 50%对 0%, $P<0.05$)。

实施例 5: 阻抑 IL-18 和 TNF- α 保护小鼠避免 ConA 和 PEA 诱导的肝细胞毒性

采用两个肝细胞毒性实验模型评价 IL-18 和 TNF- α 在肝损伤中的作用。给小鼠注射伴刀豆球蛋白 A (ConA) 和绿脓杆菌 (PEA), 均引起肝损伤, 是 T 细胞介导肝炎的模型。

用抗 IL-18 抗血清或可溶性 TNF- α 受体 (TNFsRp55) 预处理 C57BL/6j 小鼠。测定血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平作为肝细胞损伤指标 (图 6)。

如图 6A 所示, 与 5 只注射载体(无热原质盐水)的对照相比, IL-18 抗血清和可溶性 TNF 受体均明显降低 ConA 诱导的血清 ALT 水平。联合给予可溶性 TNF 受体和 IL-18 抗血清导致完全抑制 ConA 诱导的肝损伤。

如图 6B 所示, 在注射 PEA 的小鼠中, TNF- α 抑制剂或抗 IL-18 抗体的中和作用导致血清 ALT 水平分别受到 93%和 83%抑制。二者联合阻抑产生 99%保护。

实施例 6: 评价慢性肝病病人中 IL-18 结合蛋白的血浆水平

采用 IL-18BP 单克隆抗体作特异性 ELISA, 测定了 133 名不同病因的慢性肝病病人 (CLD) 和 31 名健康对照者的 IL-18BP 血浆水平。

CLD 病人血浆 IL-18BP 水平 ($12.91\pm0.89\text{ng/ml}$, 均值 $\pm$ 标准差) 比健康受试者 ($4.96\pm0.43\text{ng/ml}$) 高得多 ($p<0.001$)。肝硬化 CLD 病人比非肝硬化病人水平高得多 ($19.23\pm1.28\text{ng/ml}$, $n=67$ 对 $6.49\pm0.51\text{ng/ml}$, $n=66$, $p<0.001$)。Child-Pugh 分类法 B 期病人 IL-18BP 水平比 A 期病人高 ($22.48\pm2.44\text{ng/ml}$, 对 $9.57\pm1.25\text{ng/ml}$, $p<0.001$)。然而, Child B 和 C 之间无显著性差别 ($22.48\pm2.44\text{ng/ml}$ 对 $20.62\pm4.75\text{ng/ml}$, $p=0.7$)。IL-18BP 血浆水平与 GOT、胆红素、红细胞沉降速率正相关, 与凝血酶原时间负相关。

结论: 该结果显示 CLD 中 IL-18BP 血浆水平升高, 并与疾病严重程度相关, 与疾病病因无关。虽然 CLD 中促炎症性 IL-18 的内源性拮抗剂 IL-18BP 水平升高, 但似乎不足以抵销占优势的促炎症介质的作用。

实施例 7: IL-18BP 抑制酒精性肝炎

胃内灌注给 4 组大鼠（每组 5 只）喂饲乙醇和含玉米油饮食 4 周，对照大鼠以等卡路里葡萄糖代替乙醇，大鼠每日注射小鼠 IL-18BP（1mg/kg）或盐水。对肝切片作病理分析并测定血清肝酶、TNF- α 、Fas 配体和 IFN- γ 。在喂饲乙醇和注射盐水的大鼠中发现肝坏死性炎症损伤及肝酶、TNF α 、Fas 配体和 IFN- γ 的表达。

注射小鼠 IL-18BP 大鼠得到保护，避免了坏死性炎症损伤，并且肝酶、TNF- α ，Fas 配体和 IFN- γ 水平明显降低（>90%）。

实施例 8: IL18BP 抑制伴刀豆球蛋白 A 诱导的肝炎

给 Balb/c 小鼠注射 12mg/kg 伴刀豆球蛋白 A（ConA），在给予 ConA 前 2 小时、然后每日注射或不注射小鼠 IL-18BP（1mg/kg）。测定肝酶、TNF- α 、Fas 配体和 IFN- γ 血清水平来评价肝损伤。与只用 ConA 处理的小鼠比较肝组织病理学。

IL-18BP 预处理显著降低了肝酶和 TNF- α 的血清水平。与用 ConA 处理的对照小鼠相比，组织病理学检查无炎症证据。

第二部分 实施例 9 和 10 关于 IL-18 抑制剂在关节炎中的应用

实施例 9 IL-18BP-His 尾的产生

在以下实施例 10 中对该实验有详述。在 CHO 细胞中产生含 6 个残基组氨酸尾的重组人 IL-18BP（rhIL-18BP-His 尾）并如 Kim 等（2000）所述进行纯化。发现纯化后的该重组蛋白纯度超过 95%。体内外均有生物活性，对其配体有高亲和力。

本领域技术人员知道可在其他真核系统中生产带尾或不带尾的重组蛋白质，不带尾有利于重组蛋白的纯化。可采用熟知的方法来构建携带编码 IL-18BP 的 DNA 并适合转染真核细胞的适宜载体，以生产重组 IL-18BP。为了在细胞中表达，从此克隆载体上切下编码 IL-18BP 的 DNA（例如见 Novick 等，1999），并将其插入适合转染细胞的表达载体中。或者可用适当的正义和反义引物作 PCR 制备这种 DNA。用本领域已知技术将产生的 cDNA 构建物插入已适当构建好的真核表达载体中（Maniatis 等，1982）。

实施例 10 阻抑关节炎小鼠模型中的内源性 IL-18

方法

胶原诱导的关节炎（CIA）的产生

如前所述（Plater-Zyberk 等，1995），用 II 型天然牛胶原（CII）免疫接种 DBA/1 小鼠（8-12 周龄）诱导 CIA，CII 免疫后 25 天起，逐日检验小鼠发病情况。

用 rhIL-18BP-6his 治疗

在首次出现疾病临床症状时开始对 CII 免疫的 DBA/1 小鼠进行治疗。用含 6 个组氨酸尾的重组人 IL-18BP (rhIL-18BP_{6his}) 中和该胶原处理小鼠的内源性 IL-18。每日以 5 种不同浓度 10, 3, 1, 0.5, 0.25mg/kg 腹腔内注射 rhIL-18BP-6his, 共七天。安慰剂对照小鼠只注射运载体 (0.9%NaCl)。

评估疾病进展

临床评价 (临床评分)

从首次出现临床症状起, 由一个不知治疗方案的研究者每天检查小鼠。就疾病严重程度给每个肢体分等级 (评分 0~3.5, 最高分=14/小鼠)。用精密卡尺对出现疾病症状的第一个脚爪测定其肿胀 (炎症) 的进展 (Proctest 2T, Kroeplin Langenmesstechnik)。发病后每日评估疾病进展 8 天, 然后处死所有小鼠, 收集脚爪作组织病理检查。

软骨侵蚀和显微炎症的组织学评估

实验末, 即发病后第 8 天, 处死小鼠解剖切下首先发生疾病症状的脚爪。固定诸关节、脱钙、石蜡包埋。制作诸关节的标准切片 (5~7 μ m) 并用苏木精/伊红/Safranin O 染色。由不知道治疗方案的二名研究者给各关节评分, (无软骨或骨破坏=0, 软骨局部侵蚀=1~2, 更广泛侵蚀=3, 整个软骨破坏和存在骨侵蚀=4)。每只小鼠的最终评分为所有计分关节结果的平均值。显微炎症或滑膜评分为如下 0~4: 无炎症=0, 衬膜层轻度增厚和/或衬膜下层有一些浸润性细胞=1~2, 衬膜层增厚和/或衬膜下层细胞更明显渗入=3, 滑液腔中有细胞并且滑膜中有许多炎症细胞浸润=4。

测定抗胶原抗体

用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检查了抗 II 型牛胶原抗体, 测定了 IgG₁ 和 IgG_{2a} 滴度。简言之, 用 10 μ g 牛胶原包被板, 用 0.1M 乙醇胺 (Sigma) 封闭非特异性结合位点, 加入 1: 2 系列稀释血清然后与同种特异性山羊抗小鼠过氧化物酶 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) 培育, 再与底物 (5-氨基水杨酸, Sigma) 培育。于 492nm 读取此板, 滴度以产生半数最大值的均值土标准差稀释度表示。

IL-6 试验

用商品化 ELISA 试剂 (R&D systems, Minneapolis MN, USA) 测定 IL-6 水平。用 B₉ 细胞增殖试验测定 IL-6 生物活性。简言之, 在园底微滴板中每孔接种 200 μ l 5%FCS—RpMI 1640 培养液, 含 5×10^3 B₉ 细胞, 培养 3 天, 用重组人 IL-6 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 作标准物。培养末每孔加入 0.5 μ Ci ³[H]胸腺嘧啶 (NEN-Dupont, Boston, MA, USA)。3 小时后收获细胞测定胸腺嘧啶掺入量。IL-6 生物试验的测定限度为 1pg/ml。

统计学分析

采用 Sigma Stat 统计学分析程序和 GraphPad Prism 程序经 Mann Whitney 检验评估了差异有无显著性。

结果

采用小鼠实验模型 CIA（胶原诱导的关节炎）评估 IL-18BP 作为治疗关节炎药物的效果。给予 DBA/1 小鼠胶原和弗氏不完全佐剂诱导产生侵蚀性炎性关节炎，这提供了探索 IL-18BP 治疗潜能的理想机会。最后，用 IL-18BP 中和内源性 IL-18 并评价其对各种病理参数的作用。

进行了剂量相关性研究。以 5 剂量 IL-18BP 腹腔注射（ip）治疗三组胶原诱导关节炎 DBA/1 小鼠。在首次出现疾病临床症状时给予 10、3、1、0.5 或 0.25mg/kg 浓度的 IL-18BP。注射生理盐水（NaCl）作为对照。此外，ip 给予 10000IU 的 IFN- β 来评估 IFN 在该关节炎实验模型中的效果。如上所述，逐日对各脚爪进行评分以监测药物对病情严重程度影响。发病后第 8 天处死小鼠，测定以下数值：

- 肉眼临床评分（每脚爪 0~3.5）（图 7A 和 B）
- 首先患病脚爪（如果是后爪）的关节肿胀/水肿（mm., 用卡尺测量）情况（图 8）
- 继而患病的脚爪数目
- 首先患病脚爪的侵蚀评分（0~4 软骨破坏，图 10）
- 首先发生关节炎脚爪的组织病理学分析（图 11）
- 抗 II 型胶原抗体水平（图 12）
- IL-6 水平（图 13）

疾病的临床严重程度

如图 7A 和 B 所示，用 1mg/ml($P<0.01$)和 0.5mg/ml($0.01<P<0.05$) rhIL-18BP 治疗的组中此病的临床严重程度明显降低。接受低剂量（0.25mg/kg）或高剂量（10mg/kg）rhIL-18BP 的小鼠临床评分类似于安慰剂组，1mg/kg 剂量的 IL-18BP 效果与 IFN- β 大致相同。（图 7A）。

关节炎症和脚爪肿胀（水肿）

从发病第一天至实验结束的第 8 天测定了脚爪肿胀研究宏观炎症（肿胀），结果见图 8A 和 B。IL-18BP 的有效剂量为 1.3 和 10mg/kg，给予较低剂量对肿胀无有益效果。如图 8A 和 B 所示，10000IU 浓度的 IFN- β 对脚爪肿胀显示了有益效果。

实验结束时对组织病理切片作显微滑膜炎检查以评分表示（“滑膜炎评分”），炎症（肿胀）结果和滑膜炎评分小结于表 1。用 1 和 3mg/kg 剂量 rhIL-18BP 治疗有肿胀减

低倾向，但任一剂量的 IL-18BP 治疗对炎症性滑膜只有有限的效果（图 1）

表 1 IL-18BP 治疗关节炎症的效果

治疗	肿胀 (AUC, 均值± SEM)	滑膜炎评分 (均值± SEM)
Rh IL-18BP-6his 3mg/kg	1.55±0.64	2.17±0.5
1mg/kg	1.53±0.60	1.98±0.4
0.5mg/kg	3.38±0.70	1.92±0.5
0.25mg/kg	3.06±0.90	2.08±0.5
安慰剂	3.11±0.77	2.23±0.3

图 9 显示给予 IL-18BP 受疾病影响的脚爪数目减少，特别是治疗性注射 1 和 0.5mg/kg 剂量的 IL-18BP 减少了继后患病的脚爪数，证明体内阻抑 IL-18 制止了关节炎向其他关节的扩散。用 1 和 0.5mg/kg IL-18BP 治疗甚至看来能够将某些发炎关节变成正常。

保护关节避免遭破坏

用 rhIL-18BP 治疗小鼠结果保护了其关节免遭破坏（图 10）。一项半定量评分体系证明骨侵蚀显示剂量相关性保护效应，这在 10 和 3mg/kg 时表现明显 ($P < 0.05$, 图 10)，接受 1mg/kg rhIL-18BP 的小鼠骨侵蚀比只接受载体的小鼠轻，而 0.5mg/kg 和 0.25mg/kg 剂量未见保护作用。令人感兴趣的是，3 和 10mg/kg 剂量 IL-18BP 对关节保护的效果比得上 10000IU 的 IFN- β 的良好效果，或甚至更显著

（图 11）显示健康关节（A）和患病关节（B）与用 IL-18BP 治疗的动物关节（C）相比较的组织学情况。切片于实验未取自首先发生关节炎的那些脚爪。

患关节炎小鼠的关节显示有严重的破坏性关节炎，伴软骨缺损和侵蚀，发炎的滑膜中有许多浸润细胞。而 rhIL-18BP 治疗小鼠的关节中，软骨看起来几乎正常，尽管滑膜腔中存在炎症细胞，软骨量较多，而且软骨外觀光滑。

抗 IL-18 治疗调节了抗 II 型胶原抗体的水平

CIA 小鼠血循环中抗 II 型胶原的 IgG₁ 和 IgG_{2a} 抗体水平升高。同种型 IgG₁ 抗体与 Th₂ 介导的疾病相关，而同种型 IgG_{2a} 和 IgG_{2b} 抗体与 Th₁ 介导的疾病相关。关节炎通常归类为 Th₁ 介导的疾病。

测定了用 IL-18BP 治疗动物的血清中抗 II 型胶原（C11）IgG₁ 和 IgG_{2a} 抗体（图 12）。在临床上患病的第 4 天或第 8 天（D₄、D₈），IL-18BP 治疗没有显著改变抗 C11 同种型 IgG₁ 和 IgG_{2a}（相加后的）IgG 水平。然而胶原特异性 IgG₁/IgG_{2a} 比率在 1 和 3mg/kg rh IL-18BP 治疗 8 天后分别降低了 2.6 和 3.4 倍。图 12 实验采用 3mg/kg。采用 1mg/kg 量的 IL-18BP 所获结果基本相同。抗 C11 抗体 IgG₁/IgG_{2a} 比率下降表明抗

II 型胶原同种性 IgG_{2a} 抗体浓度下降和抗 II 型胶原同种性 IgG₁ 抗体浓度升高, 提示此关节炎模型向 Th₂ 介导的疾病转移。

IL-18 被中和后 IL-6 水平下降

为了观察 IL-18 阻抑的效果, 测定了 IL-18BP 治疗动物的血清 IL-6。图 13 显示接受 1、3 和 10mg/kg 各剂量 IL-18BP 治疗和 IFN- β 治疗的动物生物活性 IL-6 水平显著降低。用 3mg/kg rh IL-18BP 治疗的动物血清中测得的 IL-6 免疫活性水平比盐水治疗动物显著降低 ($P<0.0023$), 而用 1、3 或 10mg IL-18BP 或 10000IU IFN- β 治疗的患病动物血清 IL-6 水平与健康动物即未患炎症疾病的动物的正常小鼠血清 (NMS) 水平相似。

这些发现证明发病期间 IL-18 控制着 IL-6 水平。因为 IL-6 是一种炎症标志, 这些发现表明用 IL-18BP 治疗患病小鼠减少了动物炎症。

从上述实验可得出以下结论:

- 给予 IL-18BP 可降低关节炎的临床严重程度
- IL-18BP 还可抑制此病的进展或扩散
- 给予 IL-18BP 可减轻水肿
- IL-18BP 治疗后血清 IL-6 水平降低, IgG₁/IgG_{2a} 抗 C11 抗体比率下降。

以上资料表明中和发病后的 IL-18 的生物活性代表了一种缓解病情的抗风湿疗法, 这些结果清楚地表明阻抑 IL-18 减慢了关节炎的临床进程, 更重要的是停止了软骨和骨破坏的进程。因此以 IL-18BP、抗 IL-18 抗体或其他 IL-18 阻抑剂阻抑 IL-18, 代表了一种新的缓解病情的抗风湿疗法。

以上具体实施例的描述揭示了本发明总的本质, 因此其他人应用目前的知识, 不难对这些具体实施例进行修饰和/或适合于各种应用的修改, 但这并未脱离本发明的总思路。应强调这种适应性修改和修饰均在所公开的实施例的含义和范围之内。应懂得本文所用措词和术语目的是为了描述而非限制。

第三部分 实施例 11-12 关于炎症性肠病

实施例 11 活动性节段性回肠炎时内皮细胞和巨噬细胞的 IL-18BP 表达

收集样品

自 CD 或 UC 病人外科手术切除样本分离出肠粘膜标本。包括 14 名 CD 病人 (3 男 11 女), 平均年龄 37.8 岁 (20-78 岁), 患病时间 8.3 年 (1-21 年)。8 个病人疾病位于回肠, 6 个病人位于结肠, 12 名病人服用免疫抑制药。组织病理学检查和根据以下标准诊断为活动性 CD: 存在溃疡、炎症细胞数目增加, 跨肠壁性炎症。鉴定为活动性 CD 七人, 非活动性疾病七人。活动性和非活动性 CD 病人之间的年龄、患病部位、性别、用药和患病时间未见显著性差异。5 名 UC 病人 (3 男 2 女) 平均年龄 37.6 岁 (30-44 岁)。所有病人病变于结肠, 均接受免疫抑制剂治疗。平均患病时间 4 年 (1-9

年)。对照样品取自 5 名非 1BD 相关疾病 (3 男 2 女) 手术切除样品, 此组平均年龄 55.2 岁 (24-76 岁), 所有病人病变位于结肠。

人 IL-18 和 IL-18BP 的半定量 RT-PCR

抽提 CD、UC 病人和对照病人冰冻肠道活检样品的总 RNA, 采用 Trizol(Gibco) 按厂家说明书进行 RNA 抽提。获得样品并通过测定 260nm 吸收值定量。在 1% 琼脂糖凝胶上电泳估计 RNA 完整性。用 Promega 的逆转录系统按厂家方案自 1 μ g 总 RNA 合成 cDNA。在含 1 μ AmpliTag DNA 聚合酶 (Perkin Elmer Roche, USA)、2.5mM dNTP(Amersham, USA) 和 50pmole 正向和反向 PCR 引物的 150 μ l 总体积中进行 PCR 反应。反应物培育在 PTC-200 Peltier Effect 热循环仪 (MJ Research, USA) 中按以下条件进行: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟。测定条带饱和前 IL-18BP、IL-18 和 β -肌动蛋白所需的最佳循环次数 (分别为 31、28 和 25 轮), 根据发表的序列 (AF110799, D49950, X00351) 设计如下 PCR 引物: IL-18: 反向 5'-GCGTCACTACACTCAGCTAA-3', 正向 5'-GCCTAGAGGTATGGCTGTAA-3'。IL-18BP : 正向 5'-ACCTGTCTACCTGGAGTGAA-3' , 反向 5'-GCACGAAGATAGGAAGTCTG-3' 。 β - 肌 动 蛋 白 : 反 向 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3' ; 反 向 5'-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3'。为了排除污染样品基因组 DNA 的扩增, 在没有 cDNA 模板时进行 PCR 反应。在 1% 琼脂糖凝胶上以 1 $\times$ TAE 缓冲液对 PCR 产物 (10 μ l) 作电泳分析。凝胶染色后与 1kb 梯 (Gibco) 比较验证 PCR 产物大小。在 UV 灯下用 kodak 数字科学分析软件进行溴乙锭染色条带的相对定量测定, 报告为靶基因 (h IL-18BP、h IL-18) 对管家基因 (h β -肌动蛋白) 的比值。

抗 h IL-18BP 单克隆抗体的产生

于 0, 7 和 28 天给 BALB/C 小鼠四肢皮下和淋巴结内注射以 PBS 和佐剂 (MPL+TDM Emulsion, RIBI Immunochem Research, Inc.) 配的同工型 rh IL-18BP-6his (从中国仓鼠卵巢细胞提纯, Interpharm Laboratories, Nes Ziona Israel) 50 μ g。第三次免疫后 4 天取得淋巴结用 2.4% g/ml 胶原酶 (collagenase 1V, Worthington Biochemical Corp.) 和 0.1% DNA 酶 (Sigma) 消化。将分离得到的细胞用 PEG1000(LUKAa) 与 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合。重悬细胞于含 10% FCS (Gibco) 和 HAT (次黄嘌呤、氨基喋呤、胸腺嘧啶) 的 DMEM-F12 中, 以 5×10^4 细胞/ml 浓度分种于 96 孔板中。以直接筛检试验筛检杂交瘤培养上清液样品是否存在反应性抗体。为此, ELISA 板用山羊抗小鼠 F(ab')₂ 抗体 (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland) 包被, 加入杂交瘤培养上清液后, 加生物素化 rhIL-18BP-6his (如 Novick 等 1999 所述, 自 COS 细胞纯化而得), 加或不加 rhIL-18 (自重重组大肠杆菌纯化, Serono Pharmaceutical Research Institute, Geneva), 最后加链酶亲和素-辣根过氧化物酶 (HRP, Jackson

Immuno Research, Milan analytica, Switzerland), 用邻苯二胺(OPD, Sigma)显色, 选出非中和抗体并亚克隆。在此研究中采用 95-H20, 一种小鼠 IgG₁ 单克隆抗体。

IL-18BP 阳性细胞定位的免疫组化研究

快速冻结组织样品保存于-80℃。获得一系列冰冻切片(10 μm), 置于聚 L-赖氨酸包被的 Superfrost/Pus 玻片(Polyalbo, Plan-les-Ouates, Switzerland)上, 以冰冷丙酮固定, 用单抗 95-H20 作免疫组化分析人 IL-18BP 蛋白的定位。以 PBS 简单复水后, 将切片在添加了 2%FCS(Cansera, Ontario, Canada)、1%人血清(AB⁺血清, Transfusion Center, Annemasse, France)和 0.5%BSA(Sigma, St.Louis, MO, USA)的 PBS 中预培育 30 分钟。将玻片置于含 2%FCS、1%人血清、0.5%BSA 和 1%过氧化氢(H₂O₂, Fluka, Switzerland)的 PBS 液中 1 小时, 封闭内源性过氧化物酶的活性。以 PBS 淋洗后, 切片与单抗 95-H20 不稀释的培养上清液培育过夜。再用 PBS 洗涤后, 切片与生物素化山羊抗小鼠抗体(Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland)(5 μg/ml)在含 0.5%BSA 的 PBS 中培育 1 小时, 与亲和素 DH/生物素化 HRP 复合物(Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, CA, USA)培育 30 分钟增加染色灵敏度。用 PBS 洗涤玻片, 用 30% H₂O₂、3,3-氨基-9-乙基咔唑(AEC, Sigma)、N,N-二甲基甲酰胺(Merck)的 pH5 乙酸盐缓冲液显色。用苏木精(Sigma)反染色, 切片上覆盖甘油和盖玻片。采用小鼠 IgG₁ 抗体(R 和 D system)作同型对照。

为了鉴定人 IL-18BP 的细胞定位, 对肠粘膜切片进行了双色免疫组化研究。10 分钟后, 以 PBS 复水, 将切片在添加了 2%FCS、1%人血清和 0.5%BSA 的 PBS 中预培育 30 分钟。为了共同定位内皮细胞, 将切片与混合有 FITC-交联小鼠抗人 CD31(1:50, Pharmingen, CA, USA)的生物素化单抗 95-H20(20 μg/ml)在 PBS/0.5%BSA 中培育过夜。为了共同定位巨噬细胞, 将切片与混有 FIET 交联抗人 CD68(1:25, Dako, Denmark)的生物素化单抗 95-H20(20 μg/ml)培育过夜。PBS 洗涤后, 加入链酶亲和素 Texas 红(Southern Biotechnology Associates, AL, USA)1 小时。再洗涤玻片。切片用 moviol 和盖玻片覆盖。用生物素化小鼠 IgG₁ 抗体(Pharmingen)然后链酶亲和素 Texas 红作为同种型对照。

细胞培养

采用添加了重组人上皮生长因子(hEGF, 10ng/ml)、氢化可的松(1 μg/ml)、庆大霉素和两性霉素 B(50 μg/ml)、牛脑提取物(BBE, 3mg/ml)和 2%胎牛血清(FBS)(Clonetics Corp., San Diego, CA)的内皮细胞生长培养液(EGM), 按厂家说明书培养人脐带静脉内皮细胞(HUVEC, Clonetics Corp., San Diego, CA)。组织培养皿用人纤连蛋白(10 μg/cm², Boehringer, Mannheim)预先包被。细胞培养在潮湿的 5%CO₂ 孵箱中, 用第三代 HUVEC 进行实验。用人 IL-1 β(10ng/ml)、TNF₂(10ng/ml)和 IFN γ(20ng/ml)(R&D, system Germany)处理 HUVEC 24 小时。培养结束时收集

细胞, 分离 RNA 作 RT-PCR 进行 IL-18BP 和 IL-18 mRNA 转录分析。收集上清液用 ELISA 分析 IL-18BP 和 IL-18 蛋白的表达。

将人单核细胞系 THP-1 悬浮培养于添加了 10% 热失活 FCS、L-谷氨酰胺 (2mM)、青霉素-链霉素 (10U/ml, Gibco BRL, Life Technologies) 和 β -巯基乙醇 (50 μ M, Fluka) 的 RPMI 培养液中。细胞培养于潮湿的 5%CD₂ 孵箱中每 5 天以 1:10 传代。实验前三天用维生素 D3 (80nm, Biomol Research Laboratories, USA) 将人单核细胞分化成 0.4×10^6 细胞/ml 密度并使其粘附。一旦粘附, 向细胞培养物中加入 LPS (100ng/ml, Calbiochem)、人 IL-1 β (10ng/ml)、TNF α (10ng/ml) 和 IFN γ (20ng/ml)。48 小时时, 收集上清液用 ELISA 分析 IL-18BP 和 IL-18 蛋白质表达。

测定人 IL-18BP 和 IL-18 的产生

用 ELISA 评价了用混合细胞因子 (IL-1 β 、TNF α 、IFN γ) 刺激或不刺激 24 小时的 HUVEC 以及 (LPS、IL-1 β 、TNF α 、IFN γ) 刺激和不刺激 48 小时的 THP-1 细胞系的无细胞上清液中 IL-18BP 的存在。为此, 用抗 rhIL-18BP (同工型 a) 的捕获单抗 (克隆 657.27, 0.5 μ g/100 μ l/孔, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel) 包被测试板过夜。用兔抗 rh IL-18BP-6his (从中国仓鼠卵巢细胞纯化而得, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel) 多克隆抗体 (稀释度 1/10000), 然后与亲和纯化的过氧化物酶偶联山羊抗兔 IgG (稀释度 1/20000, Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland) 培育来检测可溶性 h IL-18BP。捕获单抗和兔多克隆抗体都经 Western blot 测试以证实其 IL-18BP 的特异性。采用重组人 IL-18BP-6his 作为标准品, ELISA 的灵敏度为 100pg/ml。平行试验用人 IL-18 ELISA 试剂盒 (MBL Immunotech) 定量测定 IL-18 水平, 此 ELISA 的灵敏度为 12.5pg/ml。

CHO 细胞中 h IL-18BP α -His6 的表达

从中国仓鼠卵巢细胞纯化获得重组人 IL-18BP (hIL-18BP α -His6 尾, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel)。

结果

肠活检样品中 IL-18BP mRNA 转录物的表达。

对活动性 CD 非活动性 CD 或 UC 病人的肠手术样本或和非炎性肠组织的组织匀浆进行了 IL-18BP mRNA 表达的分析 (图 14), 在所有测试的肠匀浆中检测到 IL-18BP 和肌动蛋白转录。与此相似, 在 CD、UC 或非 IBD 对照者的所有组织匀浆中发现了 IL-18 转录 (图 14A)。IL-18BP 或 IL-18 与对照肌动蛋白 mRNA 水平的比率显示, 在活动性 CD 病人的活检样品中 IL-18BP 和 IL-18 二者的转录量比非活动性 CD、UC 和非 IBD 对照者活检样品相比, 有统计学显著意义的升高 (见后述) (图 14B 和 C)。这些资料表明活动性 CD 时粘膜组织中 IL-18BP 上调, 提供了第一个证据, 证明活动性 CD 的 IL-18BP 表达水平与非活动性 CD、UC 及非 IBD 对照者明显不同。

对肠活检样品中 IL-18BP mRNA 转录表达的统计学分析

将所有可得数据放在一起进行方差分析, 输出信号清楚地表明, 关于活动性 CD 组中的一名病人 (其 IL-18 的 OD 比率很高, 为 16252, IL-18BP 的 OD 比率很低, 为 1058) 有统计学分离现象 (outlier)。测定的这种单一而非常不规则的耦合并没有证实 ANOVA 模式 (Shapiro-Wilks 检验对残差的标准化 P 值 <0.0001), 为此决定忽略统计学分析中这种测定耦合。

所用 ANOVA 模式考虑了因素分组 (对照、活动性 CD、非活动性 CD 和 UC), 蛋白质 (IL-18 或 IL-18BP) 和病人数目 (23 人)。组内有显著性差异 ($P<0.0001$)。还令人感兴趣的是注意到 IL-18 和 IL-18BP 之间的 OD 比率差异不显著 ($P=0.369$)。而且还进行了 IL-18 和 IL-18BP 表达之间的相关性 (研究)。IL-18 与 IL-18BP 之间的相关系数等于 0.67, 这提示测得的 IL-18 和 IL-18BP 的 OD 比率之间有很强联系。随访有关分组影响的结果, 用 Shceff'e 方法比较了不同的组, 可得出结论为活动性 CD 的 IL-18BP 和 IL-18 表达的 OD 比率明显高于对照 (+3280)、UC (+2590), 特别是非活动性 CD (+4580)。

IL-18BP 在肠组织中的免疫组化定位

为了评估 IL-18BP 的原位细胞表达, 采用抗 h IL-18BP 特异性单抗, 对获自活动性 CD 和非 IBD 对照者肠组织的冰冻切片进行了免疫组化分析。在固有层、粘膜下层和肌层内检测到 IL-18BP 阳性细胞 (未显示)。存在于固有层和粘膜下层中的阳性染色单核细胞拥有丰富的胞浆、囊网状核, 形态上与组织巨噬细胞相一致。肌层中阳性染色细胞具有丰富的胞浆, 某些时候中部有开放腔隙, 提示为阳性染色的微血管, 形态上与内皮细胞相一致。大血管也被抗 h IL-18BP 单抗特异性染色。在获自活动性 CD 病人的样品中阳性染色细胞比获自非 IBD 对照者的样品明显增多, 此与 RT-PCR 分析观察到 IL-18BP 表达增加相关。将毗连切片与相关的小鼠同种型对照 (抗体) 一起培育。

鉴定存在于粘膜活检样品中的 IL-18BP 产生细胞

用巨噬细胞 (抗 CD68) 和内皮细胞 (抗 CD31) 的特异性标志鉴定了发炎肠组织中的 IL-18BP 阳性细胞 (未显示)。在活动性 CD 病人肠组织固有层和粘膜下层检测到 CD68 阳性细胞 (绿色) 和 IL-18BP 阳性细胞 (红色) (未显示)。粘膜下层中检测到 CD31 阳性细胞 (绿色) 和 IL-18BP 阳性细胞 (红色)。为证实巨噬细胞和内皮细胞也是 IL-18BP 阳性, 一起分析了两种颜色: 抗 CD68 或抗 CD31 为绿色, 抗 IL-18BP 为红色, 证明结合抗 IL-18BP 抗体的所有细胞或 CD68 阳性或为 CD31 阳性 (橘黄色)。该免疫双标记证明巨噬细胞和内皮细胞是 CD 病人炎症组织中 IL-18BP 染色的主要来源。

内皮细胞表达 IL-18BP mRNA 和蛋白质

为了研究人内皮细胞产生 IL-18BP 的能力以及证实整个活检样品免疫染色和 RT-PCR 所见结果, 对人脐带静脉内皮细胞 (HUVEC) 也进行了 RT-PCR 实验 (图 15A)。用混合细胞因子 (hIL-1 β 、hTNF α 、IFN γ) 处理内皮细胞, 24 小时后收集细胞作 RNA 抽提和 RCR 分析, IL-18BP 与对照肌动蛋白的 mRNA 水平的比率显示, 24 小时后处理细胞中 IL-18BP 的量比未刺激细胞增加。而且 IL-18BP mRNA 在内皮细胞中似乎为组成性表达。还分析 IL-18 mRNA 水平, 显示处理细胞中轻度升高, 然而在未刺激内皮细胞中无 IL-18 mRNA 表达。

用非刺激细胞的 (培养液) 上清液和处理 24 小时的 HUVEC 作 ELISA, 揭示培养液中和受刺激细胞中均有 IL-18BP, 刺激 24 小时后增加 30 倍 (图 15B)。

单核细胞系 (THP-1) 表达 IL-18BP 蛋白质

用 ELISA 分析了非刺激和受刺激而分化的 THP-1 细胞培养上清液中 IL-18 和 IL-18BP 的表达 (图 15C), 该实验显示, LPS、h IL-1 β 、hTNF α 、hIFN γ 刺激 48 小时后 IL-18BP 表达增加, 刺激后 IL-18 分泌平行增加 (图 15C)。

小结

本研究特征性分析了节段性回肠炎和溃疡性结肠炎病人粘膜组织中 IL-18BP 的表达和定位。采用半定量 RT-PCR 方案, 发现活动性节段性回肠炎病人粘膜活检样品中 IL-18BP mRNA 转录比溃疡性结肠炎和非炎症对照病人增高。粘膜活检样品的免疫组化分析将 IL-18BP 蛋白定位于内皮细胞和患病时渗入粘膜的巨噬细胞。证实在原代人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和体外受刺激的 THP1 单核细胞系中内皮细胞和激活的巨噬细胞表达 IL-18BP。刺激后这些细胞分泌生物活性 IL-18BP。

实施例 12 IL-18 抑制剂治疗缓解了实验性结肠炎

材料与方法

小鼠和结肠炎的诱导

荷兰 Amsterdam 大学动物研究道德委员会批准了所有的实验。BALB/c 小鼠获自 Harlan Sprague Dawley Inc (Horst, the Netherlands)。小鼠饲养在标准条件下, 供应水和食物 (AM-11 10mm, Hoke Farms, Woerden, The Netherlands)。

用 8 周和 10 周龄 BALB/c 小鼠进行实验, 直肠给予两剂量 (间隔 7 天) 用 48% 乙醇 (Merck, Darmstadt, Germany) 配制的 2mg2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) (Sigma Chemical CO. St Louis, MO, USA) 诱导结肠炎, 采用乙烯导管将其置于离肛门 3 厘米处 (每组 10 只小鼠)。置管时用异氟烷 (1-氯-2,2,2-三氟乙基-异氟烷-二氟甲基醚, Abbott Laboratories, Queenborough, Kent, UK) 麻醉小鼠, 置管后保持管子垂直 60 秒。对照小鼠经历同样过程但用生理盐水代替。首次给予 TNBS 后 9 天 (即第二次 TNBS 攻击后 48 小时) 处死所有小鼠。

用 500 μ l 0.9% 盐水配的人 IL-18BP 腹腔注射治疗小鼠

hIL-18 是在 CHO 表达系统中生产的带 6 个组氨酸尾的注射重组蛋白质, hIL-18BP 生物活性是抑制 KG-1 细胞系产生 IFN γ 和减少小鼠脾细胞产生 IFN γ (Kim 等 2000)。

炎症评估

每日记录体重, 处死, 收集脾、尾淋巴结和结肠。通过中央切口取出结肠沿长轴切开, 取出粪便后记录 6cm 长的湿重作为与疾病相关的肠壁增厚的指标。然后沿长轴将结肠分成二份, 一份用作组织学评估。

组织学分析

卷起沿长轴分开的结肠, 以 4% 甲醛固定, 包埋石蜡中作常规组织学检查。两位对小鼠处置不知情的研究人员按下列参数进行评分: 1) 涉及区域的百分比; 2) 滤泡聚集增生; 3) 水肿; 4) 侵蚀/溃疡; 5) 滤泡丧失和 6) 单核细胞和多形核细胞浸润。涉及区域百分比和滤泡丧失评分范围为如下 0~4 分: 正常 0 分, 不到 10% 1 分; 10%~20% 2 分; 20%-50% 3 分; 50% 以上 4 分。侵蚀定为: 如果上皮完整为 0 分, 涉及固有层 1 分, 溃疡涉及粘膜下层 2 分, 溃疡穿入肌层 3 分。其他参数的严重程度评分范围为如下 0~3 分: 缺乏 0 分, 弱 1 分, 中等 2 分, 严重 3 分。此评分范围从 0 到最高 26 分。

结肠匀浆

收集结肠用组织匀浆器在 9 体积 Greenbarger 裂解缓冲液 (300mM NaCl、15mM Tris、2mM MgCl₂、2mM Triton X-100、抑胃酶肽 A、亮抑酶肽、抑蛋白酶肽 ng/ml), pH7.4) 中制匀浆。冰上裂解组织 30 分钟, 然后离心 (10 分, 14000g) 二次。匀浆贮存于 -20°C 直至使用。

细胞培养和细胞因子 ELISA 测定

为制备脾和尾淋巴结细胞悬液, 采用细胞过滤器 (Becton/ Dickinson Labware, New Jersey, USA)。用含 10% FCS 和 ciproxin (10 μ g/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 的 RPMI 1640 培养液 (BioWhittaker Boehringer, Verviers Belgium) 悬浮细胞。用无菌 Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 离心脾细胞, 将单个核细胞移入 RPMI 并对细胞悬液计数。以含抗菌素和 10% FCS 的 200 μ l RPMI (Biowittaker Europe, A Cambrex Company, Verviers, Belgium) 培育总数每孔 1×10^5 细胞, 一式三孔。以抗 CD₃ 单抗 (1:30 浓度, 145.2C11 克隆) 和可溶性抗 CD28 抗体 (1:1000 浓度, Pharmigen) 预先包被来刺激细胞。48 小时后取上清, 用 ELISA 试验测定 IFN γ (Pharmigen) 和 TNF α (R&D system, Abingdon, UK) 浓度。

流式细胞术

用 FACS 缓冲液 (PBS, 含 0.5% BSA, 0.3mM EDTA 和 0.01% N₂N₃) 洗涤分离的脾细胞并保持在冰上以待进行基余步骤。每孔 2×10^5 细胞 (96 孔 V 形微孔板, Greiner B.V. Labor techniek, Alphen ann de Rijn, The Netherlands) 与下述抗体 (mAb) 共培育:

Cy-chrome 偶联的大鼠抗小鼠 CD4 (克隆 RM4-5)、Fits-偶联的大鼠抗小鼠 CD69 和 Fics-偶联的大鼠抗小鼠 CD25 (Pharmigen, San Diego, CA), 用 FACScan 流式细胞仪结合 Facscan 软件 (Becton Dickinson, Mountain View, USA) 前散射和侧散射门控淋巴细胞, 计数 5000 个细胞, 结果表示为所用 mAb 阳性门控细胞百分率。

统计学分析

每治疗组给出平均值 $\pm$ SEM。用非参数性 Mann-Whitney U 检验分析组间差异, 用单向方差分析分析体重随时间的变化, $P<0.05$ 为有显著意义, 所有分析采用 SPSS 统计学软件 (SPSS inc., Chicago, USA)。

结果

IL-18BP 保护结肠炎小鼠模型避免体重损失

为了研究实验性结肠炎中 IL-18 的作用, 特别是 IL-18 结合蛋白 (IL-18BP) 的保护作用, 在 BALB/c 小鼠中诱发了 TNBS 结肠炎。此模型包括局部接触三硝基苯磺酸 (TNBS, 以 40%乙醇配), 它激发了对半抗原 (三硝基苯) 修饰的自身抗原的迟发型过敏反应, 此反应是 Th1 型, 伴有增强的促炎症细胞因子产生。

每日用人 IL-18BP 或对照药腹内注射 (ip) 治疗小鼠。

每日腹内注射剂量 $12.5\mu\text{g}\sim 50\mu\text{g}$ hIL-18BP 对疾病的严重性无影响 (资料未展示)。然而用每日 $200\mu\text{g}$ 剂量 hIL-18BP 腹内注射有效减少了与此病相关的体重损失。

如预计的那样, 直肠内放置 TNBS 导致腹泻和消瘦, 如图 16 所示, 二治疗组动物第 3 天时损失 15%基线体重。但与对照小鼠相反, 从 TNBS 放置后 4 天开始, hIL-18BP 治疗的小鼠从最初的体重损失迅速复原, 第 8 天时回复到基线体重。对照组小鼠第 8 天第 2 次给予 TNBS 导致显著失重, 给予 hIL-18BP 则基本上制止了失重。盐水处理小鼠给予 hIL-18BP 无效 (资料未显示)。因此, 给予 hIL-18BP 显著减轻与 TNBS 诱导的结肠炎相关的体重损失。

对炎症参数的作用

第 10 天处死小鼠, 测定最后 6 厘米结肠的重量 (图 17A)。TNBS 结肠炎时结肠重量比盐水治疗小鼠增加, 但 hIL-18BP 治疗小鼠的结肠重量增加少得多 ($181.6\text{mg}\pm 11.4$, 而盐水治疗小鼠为 $268\text{mg}\pm 27.3$, $P<0.05$)。先前已有报告, TNBS 结肠炎伴有细胞向尾淋巴结迁移增加 (Camoglio 等, 2000)。与用盐水治疗的 TNBS 小鼠尾淋巴结细胞数相比, IL-18BP 减少侵入尾淋巴结的细胞数 (图 17B)。

CD69 表达是早期 T 淋巴细胞激活的一种标志, 用 Facscan 分析对其进行了测定 (图 17C) 表达 CD69 的 CD4⁺脾细胞 TNBS 处理小鼠为 11.4%, 而 hIL-18BP 治疗的 TNBS 小鼠 CD4⁺/CD69⁺细胞为 7.3% ($P<0.05$)。

脾、尾淋巴结和结肠匀浆的细胞因子产量

为研究 T 细胞受体活化后 hIL-18BP 对 T 淋巴细胞合成促炎症细胞因子能力的影

响，从尾淋巴结和脾分离细胞，并用抗 CD3/CD28 抗体刺激 48 小时，测定上清液中 IFN γ 和 TNF α 的产量（图 18）。IL-18BP 治疗和对照治疗小鼠细胞因子产量之间未见明显差异，因此用 hIL-18BP 中和 IL-18，不导致 T 淋巴细胞对 T 细胞受体活化应答反应能力的下降。

分析了结肠匀浆的细胞因子水平，测定了细胞因子的局部产量（图 19），TNBS 小鼠和用 hIL-18BP 治疗的 TNBS 小鼠的结肠匀浆 IFN γ 水平没测到差别（分别为 134pg/ml $\pm$ 7.8 和 139pg/ml $\pm$ 23），然而，hIL-18BP 治疗小鼠的结肠匀浆中 TNF α 水平明显降低，TNBS 小鼠为 110pg/ml $\pm$ 3，而 hIL-18BP 治疗的 TNBS 小鼠为 59pg/ml $\pm$ 2.7。

组织学发现

为了研究 hIL-18BP 是否介导炎症参数的降低，是否还影响组织学评分，对石蜡切片进行了组织病理学分析。h IL-18BP 治疗小鼠与对照治疗小鼠相比，组织学炎症总评分显著降低（未治疗小鼠 15.9 $\pm$ 1.1，hIL-18BP 治疗小鼠 9.8 $\pm$ 1.3），主要是因为渗入粘膜的白细胞数减少之故（ $P<0.05$ ）。一项显著发现是 IL-18BP 治疗小鼠完全没有粘膜溃疡（ $P<0.05$ ）。这些发现总结于下述表 2 中。IL-18BP 治疗小鼠完全预防了溃疡的产生，是特别显著的。

表 2 TNBS 小鼠用盐水或 rhIL-18BP α 治疗的各项结肠炎评分

	对照治疗的 TNBS 小鼠	h IL-18BP 治疗的 TNBS 小鼠
涉及面积%	3.4 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.5
滤泡聚集	2.0 $\pm$ 2.4	1.5 $\pm$ 0.4
水肿	2.1 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.3
纤维变性	0.85 $\pm$ 0.26	0.50 $\pm$ 0.2
溃疡	2.0 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0*
滤泡丧失	1.7 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3
多形核细胞	2.6 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2*
单个核细胞	1.1 $\pm$ 0.1	0.33 $\pm$ 0.21*

数据以均值 $\pm$ SEM 表示, 范围为 0~4, * 表示有显著性差异。

抗 mIL-18 多克隆抗体保护右旋糖酐硫酸钠诱导的结肠炎小鼠模型不患病。

在此模型中, 从 0 天开始至动物处死, 在饮水中给予右旋糖酐硫酸钠 (DSS)。第 0、4 和 8 天 ip 给予抗 IL-18BP 多克隆抗体, 剂量是 200 μ l 和 400 μ l 兔血清, 该最高剂量 (400 μ l) 显著减少了体重损失, 临床评分, 直肠出血和结肠缩短 (未显示)。兔抗 mIL-18 治疗显示延迟此病发作并防止其进展 (未显示)。

小结

上述实施例 12 表明, 给予 hIL-18BP 或抗 IL-18 多克隆抗血清来中和 IL-18, 有效地降低了小鼠实验性诱导结肠炎的严重程度。

每日 hIL-18BP 腹腔内注射治疗的小鼠, 与对照治疗小鼠相比, 从最初的体重减少迅速复原。通过结肠重量和细胞进入尾淋巴结测得的其他结肠炎症参数在 h IL-18BP 治疗小鼠中也降低。治疗小鼠组织病理学特征是组织破坏 (溃疡) 严重程度降低, 渗出细胞数相当程度降低。如脾细胞 CD69 表达降低所证明的, hIL-18BP 的作用也是全身性的。

结肠匀浆中测得的 TNF α 局部产生的 hIL-18BP 治疗的 TNBS 小鼠中明显降低, 这表明 TNF α 在此病发展中起了重要作用。TNBS 小鼠和用 h IL-18BP 治疗的 TNBS 小鼠之间的 IFN γ 水平相当, 可能解释是诱导 IFN γ 的刺激减少。

结论, 上述资料表明, IL-18 抑制剂在治疗炎症性结肠病中具有良好效果。

参考文献

1. Afford, S.C., et al., 酒精性肝炎和酒精性肝硬化中细胞因子表达的不同模式与白细胞募集有关, *J Pathol*, 1998. 186(1): p.82-9.
2. Anderson, D.M., et al., TNF 受体同类物和其配体增强 T 细胞生长和树突细胞功能, *Nature*, 1997. 390(6656): p. 175-179.
3. Baroni, G.S., et al., 慢性丙肝中肝星状细胞激活和肝纤维增生与坏死性炎症损伤及 Th1 样应答反应有关, *Liver*, 1999. 19(3):p.212-9.
4. Bird, G.L., et al., 严重酒精性肝炎中血浆肿瘤坏死因子升高. *Ann Intern Med*, 1990. 112(12):p.917-20.
5. Bollon, D. P., et al. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10:39-48.
6. Botstein, D., et al. (1982) *Miami Wint. Symp.* 19:265-274.
7. Broach, J. R., “酵母菌分子生物学:生命周期和遗传”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp.445-470(1981).
8. Broach, J.R., (1982) *Cell* 28:203-204.
9. Byrn R. A. et al., 1990, *Nature (London)* 344:667-670.
10. Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. IFN- γ 受体缺陷小鼠中半抗原诱导的结肠炎与持续性 Th1 和炎症应答反应相关. *Eur J Immunol* 2000; 30:1486-95.
11. Car, B. D., V. M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gallay, D. Heumann, M. Aguet, and B. Ryffel. 1994. IFN- γ 受体缺陷小鼠能耐受内毒素性休克. *J. Exp. Med.* 179:1437-44 issn: 0022-1007.
12. Chater, K. F. et al., “关于放线菌生物学的第六届国际研讨会”, Akademiai Kaido, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54.
13. Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son, and T. H. Joh. 1997.在肾上腺皮质中诱导 IFN- γ 诱导因子, *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037.
14. Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, and H. Okamura. 1996.干扰素- γ 诱导因子, 一种增强小鼠 Th1 细胞的 Fas 配体介导的细胞毒性的新细胞因子, *Cell-Immunol.* 173:230-5 issn: 0008-8749.
15. Dayer, J-M(1999). *J. Clin. Inv.* 104, 1337-1339.
16. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombel JF.节段性回肠炎早期和慢性回肠病灶中的不同细胞因子模式, *Gastroenterology* 1997; 113: 118-126.
17. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E and Karin, M. (1997), *Nature* 388, 16514-16517.
18. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H., and Woody, J.N., 1994, *Lancet* 344, 1125-1127.
19. Engelmann, H., D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Wallach. 1989.从人尿中纯化至均一的肿瘤坏死因子结合蛋白保护细胞抵制肿瘤坏死因子的毒性. *J. Biol. Chem.* 264:11974-11980.
20. Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. 自人尿纯化的两种肿瘤坏死因子

结合蛋白, 与细胞表面肿瘤坏死因子受体发生免疫交叉反应的证据. *J.Biol. Chem.* 265:1531-1536.

21. Fantuzzi, G., et al., IL-18 调节 IFN- γ 产生和细胞增殖, 如 IL-1 β 转化酶缺陷小鼠中所揭示的那样 *Blood*, 1998. 91:p.2118-2125.

22. Fiore, G., et al., 慢性丙肝时肝组织表达 CD80 和 CD95 抗原: 与生物活性和组织学疾病活性的关系, *Microbios*, 1999. 97(386): p.29-38

23. Galle, P.R., et al.肝损伤涉及 CD95 (APO-1/Fas) 受体和配体 *J Exp Med*, 1995. 182(5):p. 1223-30.

24. Gracie, A J, Forsey, R J, Chan, W L, Gilmour, A, Leung, B P, Greer, A R, Kennedy, K, Carter, R, Wei, X-Q, Xu, D., Field, M, Foulis, A, Liew, F Y, and McInnes, I B.(1999). *J. Clin. Inv.* 104:1393-1401

25. Grantham(1974), *Science*, 185. 862-864.

26. Grove, J., et al.,肿瘤坏死因子启动子多形性与对酒精性脂肪肝炎的易感性相关 *Hepatology*, 1997. 26(1):p. 143-6.

27. Gryczan, T., “杆菌的分子生物学”, Academic Press, NY (1982), pp. 307-329.

28. Gutkind, J.S., et al., EB 病毒感染的 B 淋巴细胞而不是正常单核细胞所利用的一种新的 c-fgr 外含子. *Molec. Cell. Biol.*, 1991. 11:p. 1500-1507.

29. Harada, K., et al., 原发性胆汁性肝硬化中细胞因子的原位核酸杂交: Th1 亚组占优势 *Hepatology*, 1997. 25(4):p. 791-6.

30. Heremans, H., J. Van Damme, C. Dillen, R. Dijkmans and A. Billiau. 1990.干扰素- γ , 小鼠脂多糖诱导的致死性施瓦茨曼样休克的一种介质, *J. Exp. Med.* 171:1853-69 issn: 0022-1007.

31. Hill, D.B., et al., 酒精性肝炎中 IL-6 血浆浓度升高, *J Lab Clin Med*, 1992. 119(5): p.547-52.

32. Hill, D.B., L.S. Marsano, and C.J. McClain, 酒精性肝炎中 IL-8 血浆浓度升高, *Hepatology*, 1993. 18:p. 576-580.

33. Hiramatsu, N., et al., 慢性丙肝病人肝组织中 Fas 抗原的免疫组化检测, *Hepatology*, 1994. 19(6):p. 1354-9.

34. Huang, Y.S., et al., 酒精性肝病的 IL-8 血清水平; 与病程、生化参数和存活率的关系, *J Hepatol*, 1996. 24(4):p. 377-84.

35. Iio, S., et al., 慢性丙肝病人可溶性 Fas 抗原的血清水平, *J Hepatol*, 1998. 29(4): p.517-23.

36. Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33:729-742.

37. John, J. F., et al. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8:693-704.

38. Kahiwamura, S., Okamura, H. (1998), *Nippon. Rinsho.* 56, pp. 1798-1806.

39. Kendall, K. J. et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:4177-4183.

40. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. 6 种天然产生的 IL-18 结合蛋白的同工型抑制 IL-18 的结构要求 *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1190-1195.

41. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallan B, Moore MA,

- Vilcek J, Daddona P, et al. 构建和初步分析小鼠-人嵌合性抗 TNF 抗体, *Mol Immunol* 1993 Nov 30:16 1443-53
42. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN- γ 诱导因子 (IGIF) 是一种激活 Th1 而非 Th2 细胞的协同刺激因子, 其作用不依赖于 IL-12, *J. Immunol.* 158: 1541-1550.
43. Lee, M., et al., 慢性乙肝病人中对 HBsAg 和 HBxAg 应答反应的 Th1 和 Th2 型细胞因子表达, *J Korean Med Sci*, 1999. 14(2): p. 175-81.
44. Lukkari, T.A., et al., 短时酒精接触促进了大鼠肝中枯否细胞 CD14 受体和脂多糖结合蛋白的表达, *Alcohol Alcohol*, 1999. 34(3): p. 311-9.
45. Luo, K.X., et al., 原位调查慢性乙肝感染和相关肝病中 Fas/FasL 的表达, *J Viral Hepat*, 1997. 4(5): p. 303-7.
46. Maliszewski, C.R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Bechmann, and K. H. Grabstein. 1990. 细胞因子受体和 B 细胞功能, I. 重组可溶性受体特异性体外抑制 IL-1 和 IL-4 诱导的 B 细胞激活, *J. Immunol.* 144:3028-3033.
47. Maniatis, T., “细胞生物学: 优秀论文 第 3 卷 基因表达”, Academic Press, NY, pp. 563-608(1980).
48. Maniatis et al., 分子克隆实验手册, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
49. Martinez, F., et al., 乙醇和细胞因子的分泌, *Alcohol*, 1992. 9(6): p. 455-8.
50. McClain, C.J., et al., 肿瘤坏死因子和酒精性肝病, *Alcohol Clin Exp Res*, 1998. 22(5 Suppl): p. 248S-252S.
51. McClain, C.J. and D.A. Cohen, 酒精性肝炎中单核细胞产生肿瘤坏死因子增加, *Hepatology*, 1989. 9(3): p. 349-51.
52. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. 干扰素- γ 诱导因子增强了激活的人 T 细胞产生 Th1 细胞因子: 与 IL-12 协同促进 IFN- γ 产生, *Eur-J-Immunol* 26:1647-51 issn: 0014-2980.
53. Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, 一种哺乳动物强表达载体, *Nucleic Acid Res.* 18:5322-5328.
54. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Luliano R, Luzzi F, Fusco A, Pallone F. 节段性回肠炎生物活性 IL-18 表达上调, *J Immunol* 1999; 163:143-147.
55. Muhl H, Kampf H, Bosmann M, Frank S, Radeke H, Pfeilschifter J. IFN- γ 介导非白细胞中的 IL-18 结合蛋白表达, *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267:960-963.
56. Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata, and T. Tamura. 1989. 内毒素诱导的血清因子刺激 IFN- γ 产生, *Infect-Immun* 57:590-5 issn: 0019-9567.
57. Nanji, A.A., et al., 大鼠实验性酒精性肝病时核因子 KB 激活和细胞因子失衡, *Hepatology*, 1999. 30(4): p.934-43.
58. Nishimura, T. and A. Ohta, 抗原特异性 Th1 细胞在小鼠急性肝损伤中的关键作用, *J. Immunol*, 1999. 162: p.6503-6509.
59. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. 人 IFN α / β 受体, 特征和分子克隆, *Cell* 77:391-400.

60. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1992. 体液中存在可溶性 IFN- α 受体分子, *FEBS Lett* 314:445-448.
61. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. 正常人尿中存在可溶性细胞因子受体, *J. Exp. Med.* 170:1409-1414.
62. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikow, L, Dinarello, C, and Rubinstein, M(1999). *Immunity* 10, 127-136
63. Ohlinger, W., et al., 免疫组化检测酒精性肝炎病人肝脏中 TNF- α 、其他细胞因子和粘附分子, *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993. 423(3): p. 169-76.
64. Okamura, h., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. 诱导 T 细胞产生 IFN- γ 的一种新细胞因子的克隆, *Nature* 378:88-91.
65. Okamoto. T., et al., 诱导 IFN- γ 转基因小鼠肝脏中 Fas 配体和 Fas 抗原 mRNA 的表达, *Jpn J Pharmacol*, 1998. 78(2): p. 233-5.
66. Okazaki, M., et al., 慢性丙肝病人干扰素治疗前后肝细胞 Fas 抗原的表达, *Dig Dis Sci*, 1996. 41(12): p. 2453-8.
67. Okamoto, T., K. Yamamura, and O. Hino, 小鼠 IFN- γ 转基因慢性肝炎模型 (综述) 等, *Int J Mol Med*, 1999. 3(5): p.517-20.
68. Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. (1999). *J Immunol* 162:2 1096-100
69. Parnet, P Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K, and Sims, J E.(1996), *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.
70. Plater-Zyberk C, Bonnefoy JY. 用抗 CD23 抗体体内治疗显著缓解已建立的胶原诱导关节炎, *Nat Med* 1995; 1:781-785.
71. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadham J. Smith MF, Jr., Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F.一种新的免疫调节细胞因子 IL-18, 在节段性肠炎中上调: 肠粘膜细胞中的表达和定位 *J Immunol* 1999; 162:6829-6835.
72. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B.溃疡性结肠炎和节段性回肠炎病人肠活检样品中粘膜炎症性细胞因子的产量, *J Clin Immunol* 1996; 16:144-150.
73. Rothe, H., N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and H. Kolb. 1997. 自身免疫性糖尿病急性期与位于 Idd2 附近的一种新细胞因子 IGIF 的表达相关连, *J-Clin-Invest* 99:469-74 issn: 0021-9738.
74. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J.(1999). *Arthritis Rheum* 42:8 1577-87.
75. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and M. T., 分子克隆实验手册 第二版 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
76. Simonet, W.S., et al., 一种涉及骨密度调节的新分泌性蛋白质 *Cell*, 1997. 89(2): p. 309-319.
77. Sheron, N., et al., 酒精性肝炎血浆 IL-6 升高, 严重性和死亡率增加, *Clin Exp Immunol*, 1991. 84(3): p. 449-53.

78. Sompayrac, L.H. and K.L. Danna, 用猿猴病毒 40 的 DNA 有效感染猴细胞, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981. 78: p. 7575-7578.
79. Sparks, C.A., et al., 核有丝分裂装置蛋白 NuMA 基因在人染色体 11q13 中的分布 *Genomics*, 1993. 17: p. 222-224.
80. Su, G.L., et al., 酒精性肝病大鼠模型中 CD14 和脂多糖结合蛋白的表达, *Am J Pathol*, 1998. 152(3): p. 841-9.
81. Taieb, J., et al., 酒精性肝病中血浆可溶性 Fas 和 Fas 配体升高, [通信], *Lancet*, 1998. 351(9120): p. 1930-1.
82. Triantaphyllopoulos, K A, Williams, R, Tailor, H, and Chernakovsky, Y (1999). *Arthritis and Rheumatism* 42, 90-99.
83. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. 1996. IFN- γ 诱导因子上调小鼠自然杀伤细胞克隆的 Fas 配体介导的细胞毒活性, *J Immunol*. 157:3967-73 issn: 0022-1767.
84. Tsuij, H., Mukaida, N., Harada A., Kaneko, s., Matsushita, E., Nakanuma, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Tagawa, m Y, Iwakura, Y., Kobayashi, K., and Matsushima, K.(1999), *J. Immunol*. 162, pp. 1049-1055
85. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M., and Zubler, R.H., 1992 *J.Immunol* 148,2778-2784.
86. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, and M. Kurimoto. 1996. 人 IFN- γ 诱导因子 cDNA 的克隆, 在大肠杆菌中表达和该蛋白生物活性的研究, *J. Immunol*. 156:4274-4279.34. Okayama, H. and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol*. 3:280-289.
87. Williams RO, Mason LJ, Feldmann M, Maini RN. 抗 CD4 和抗肿瘤坏死因子协同缓解已建立的胶原诱导关节炎 *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 Mar 29 91:7 2762-6.
88. Yasuda, H., et al., 破骨抑制因子(OCIF)和 Osteoprotegerin(OPG)的鉴定; OPG/OCIF 抑制体外破骨的机制。 *Endocrinology*, 1998. 139: p. 1329-1337.
89. Yoshimoto Y, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S and Nakanishi, (998) , *J. Immunol*. 161, 3400-3407.

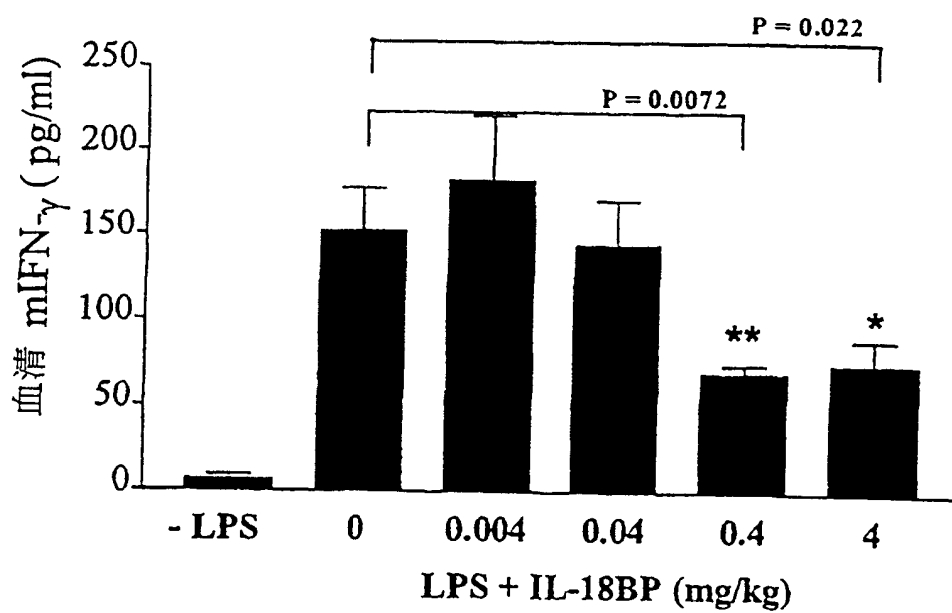


图 1

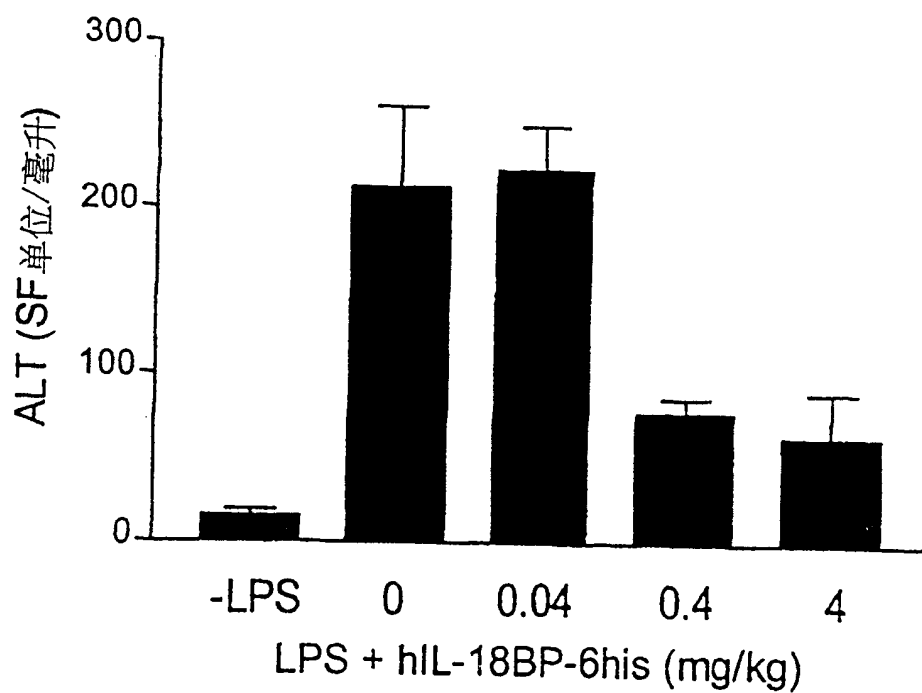


图 2

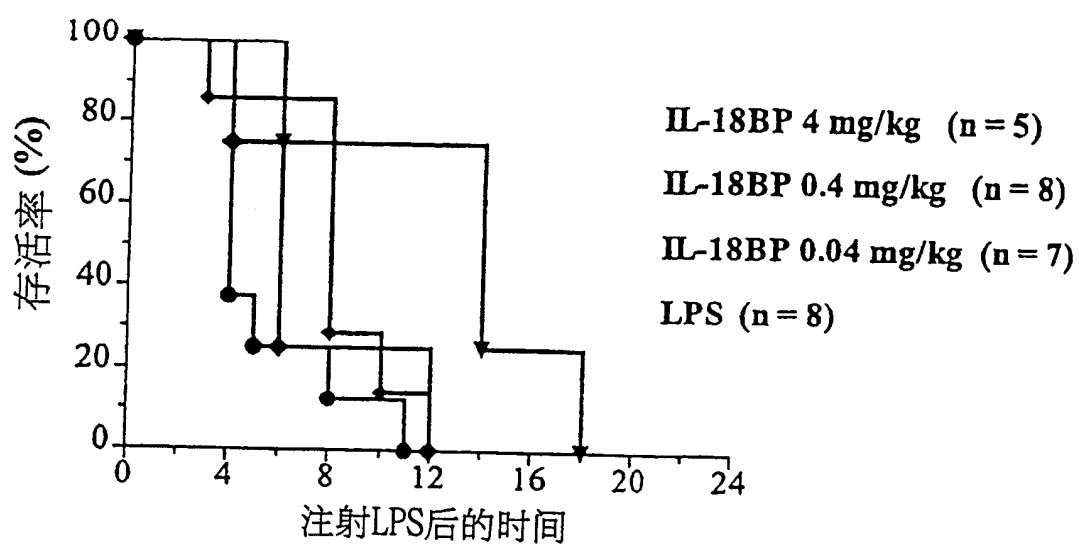


图 3

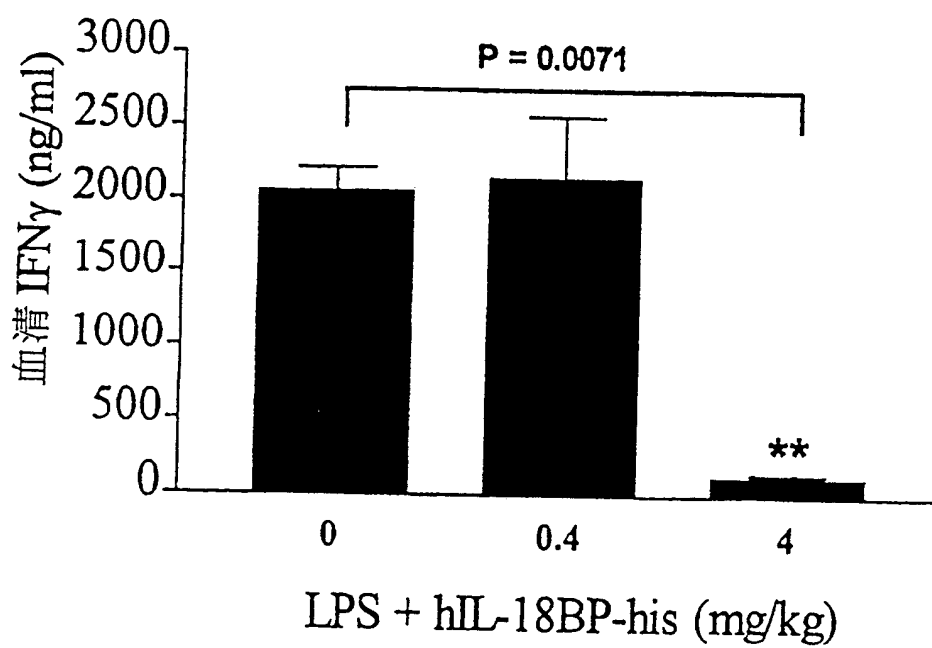


图 4

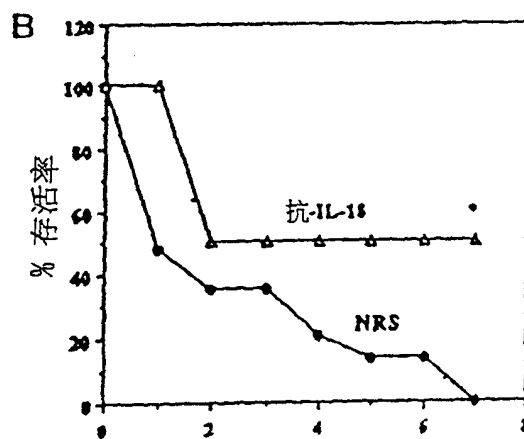
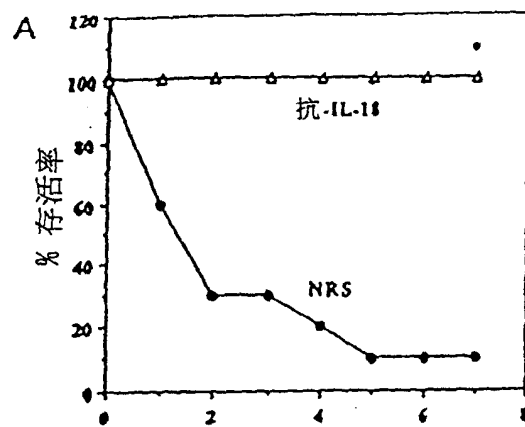


图 5

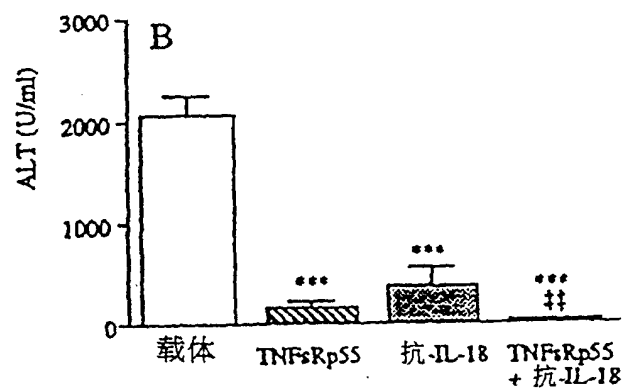
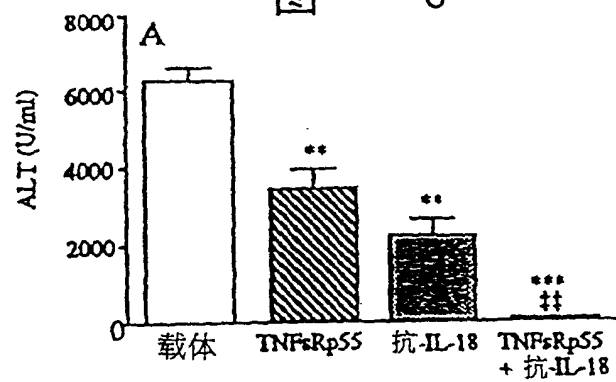


图 6

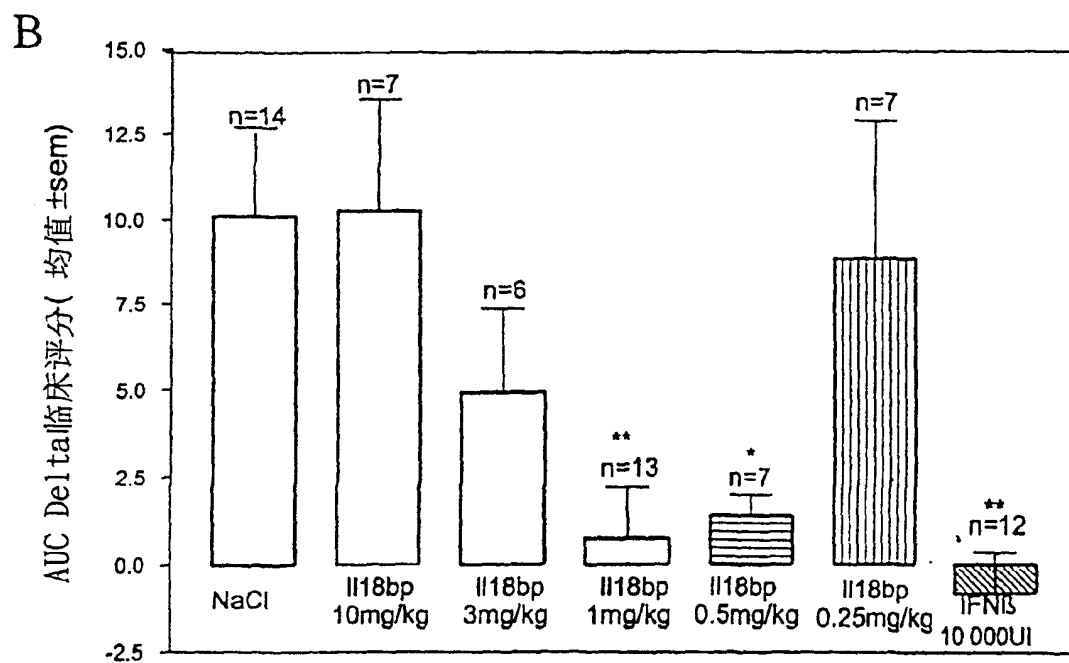
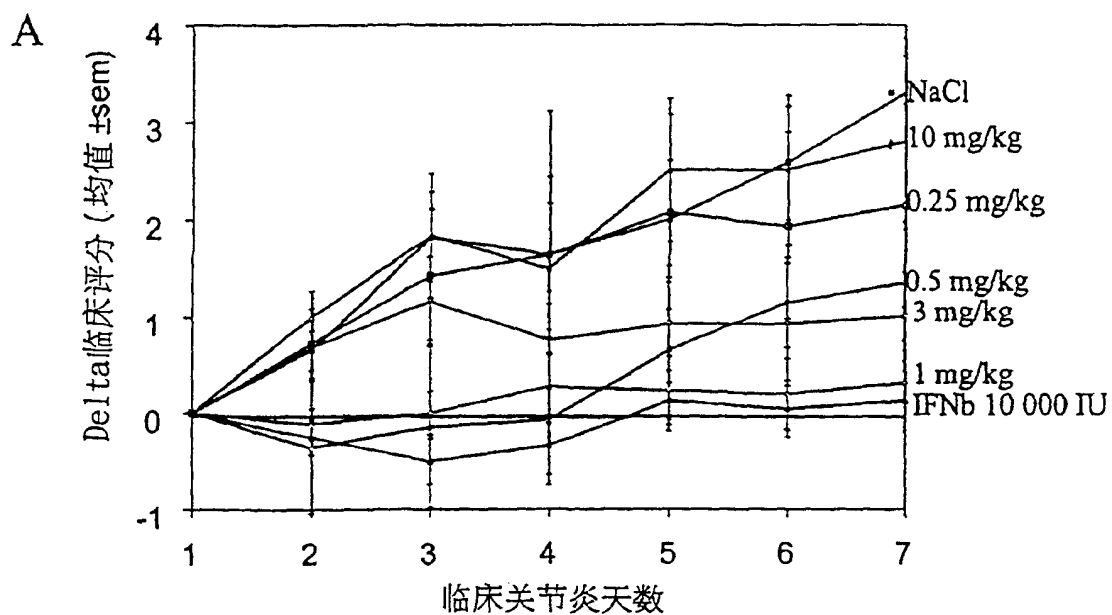
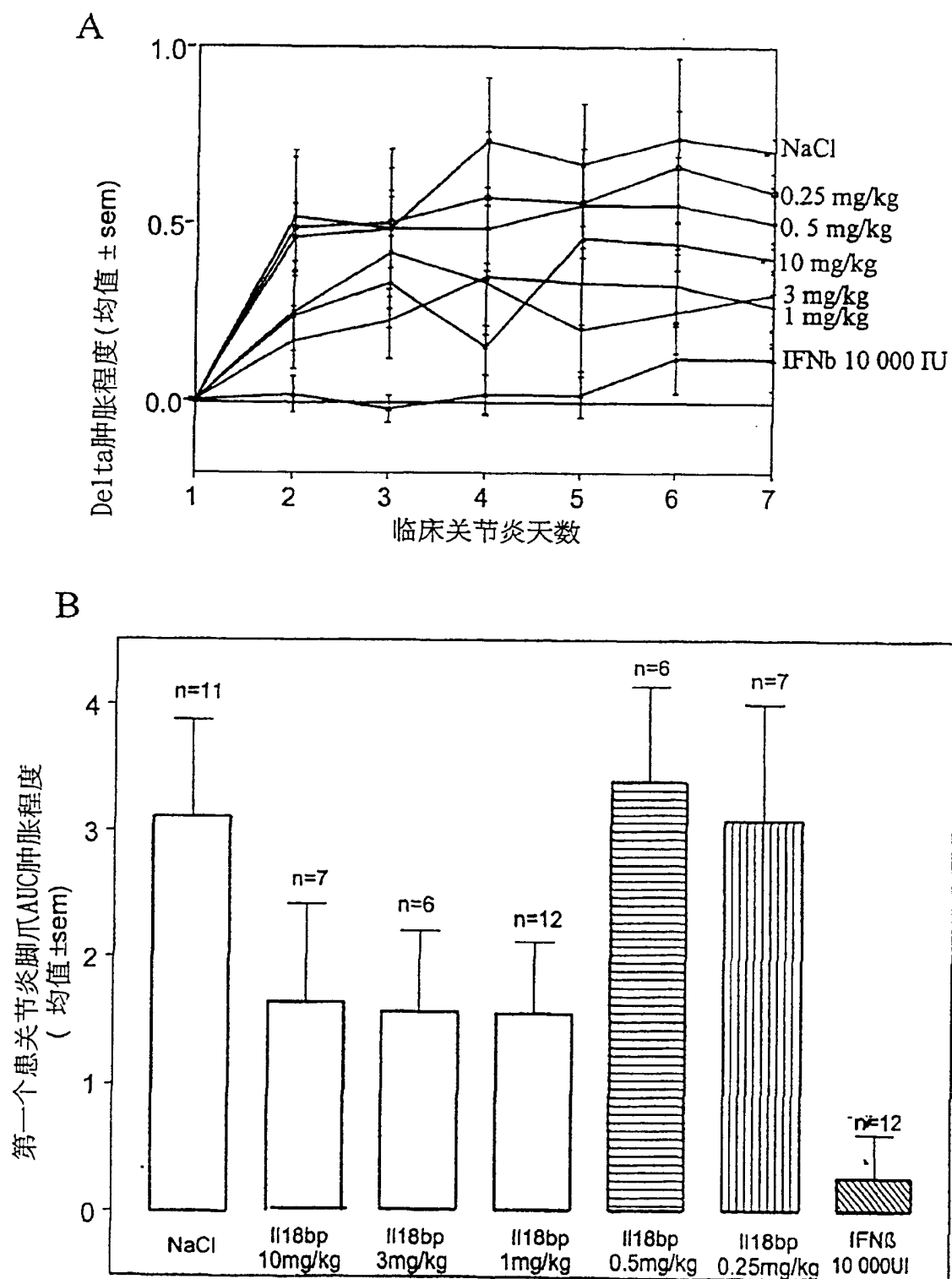


图 7



图

8

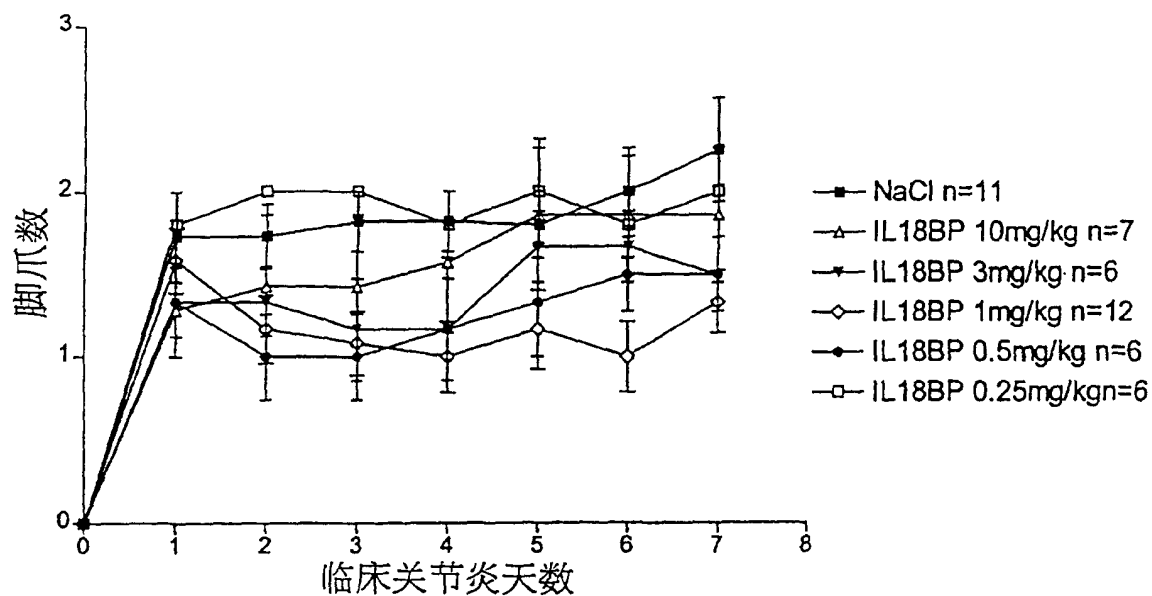


图 9

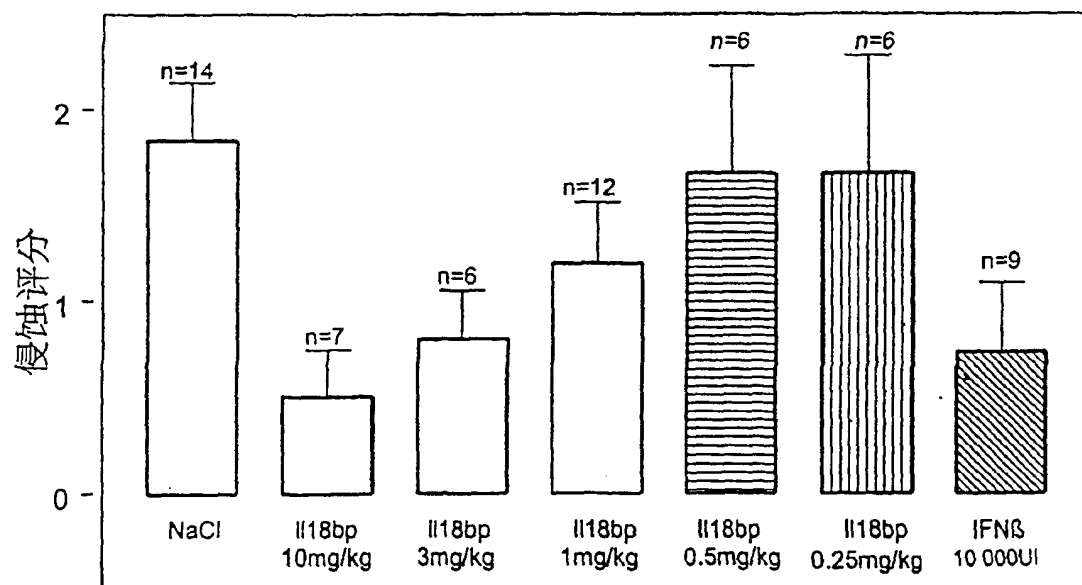
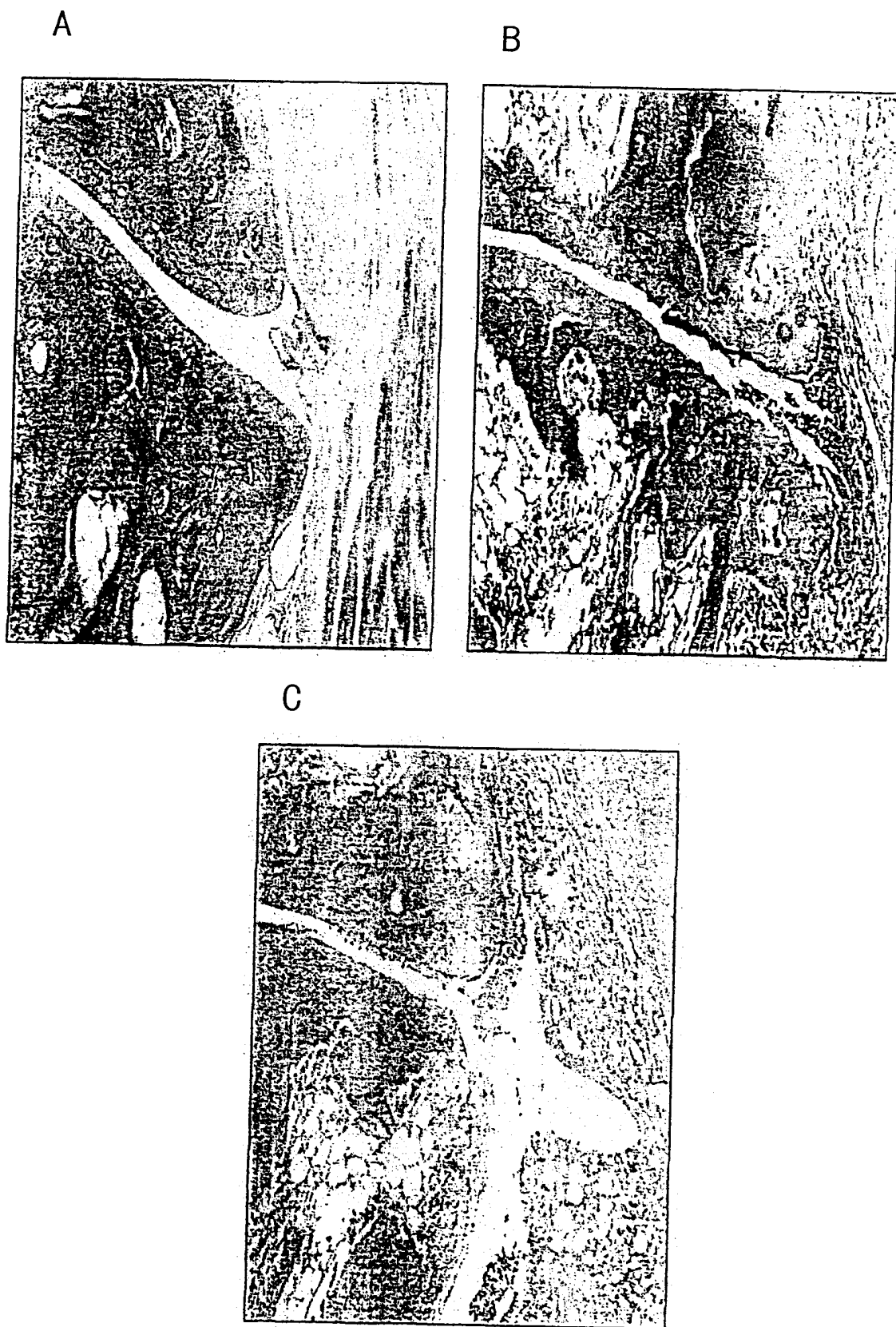


图 10



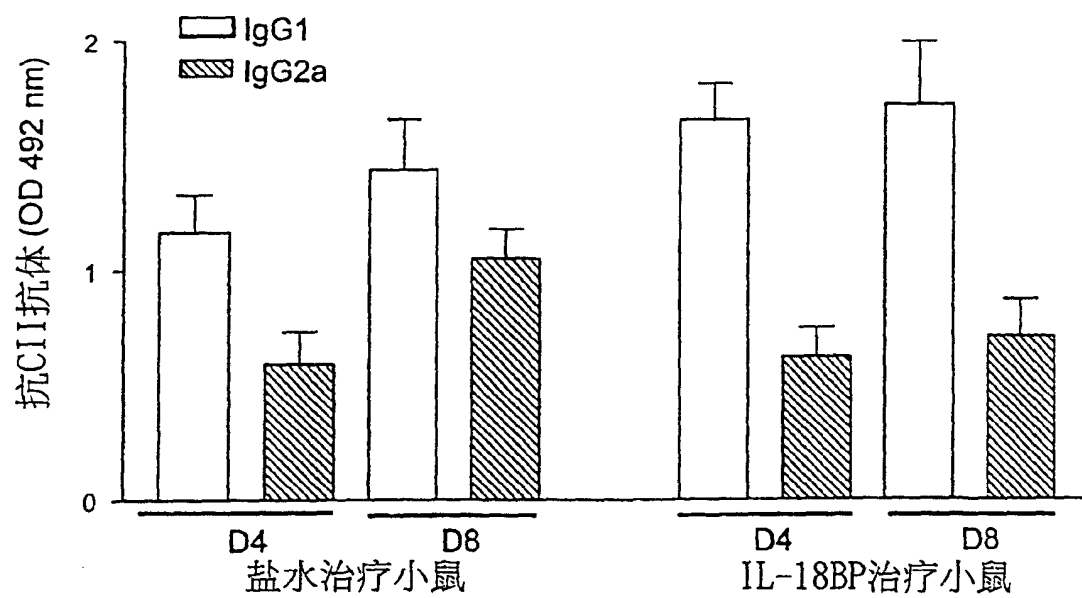


图 12

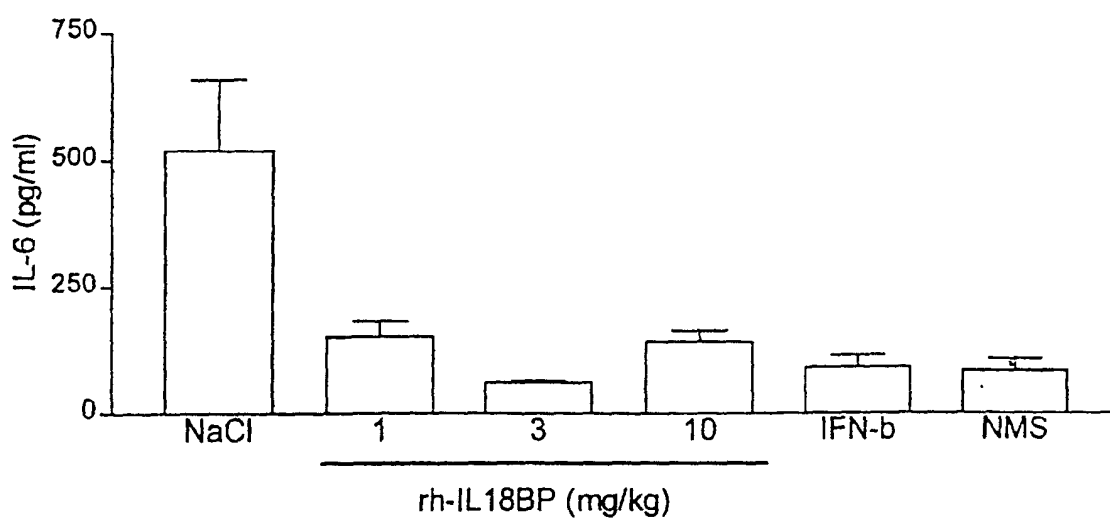


图 13

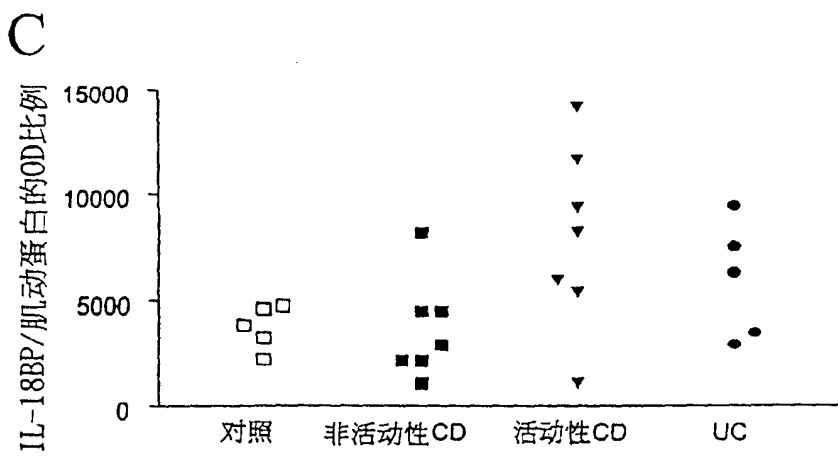
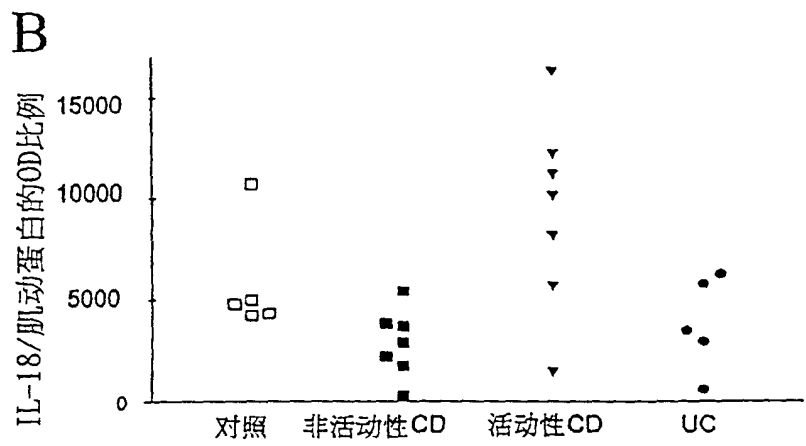
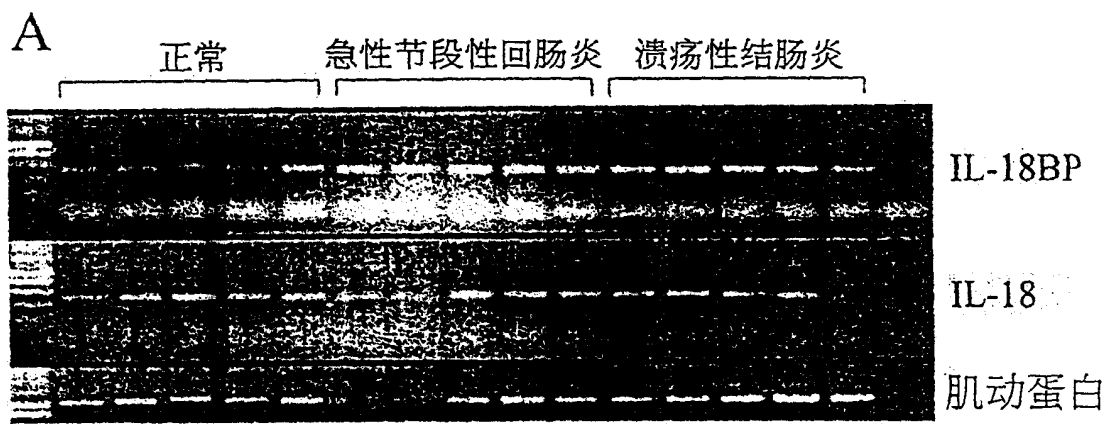
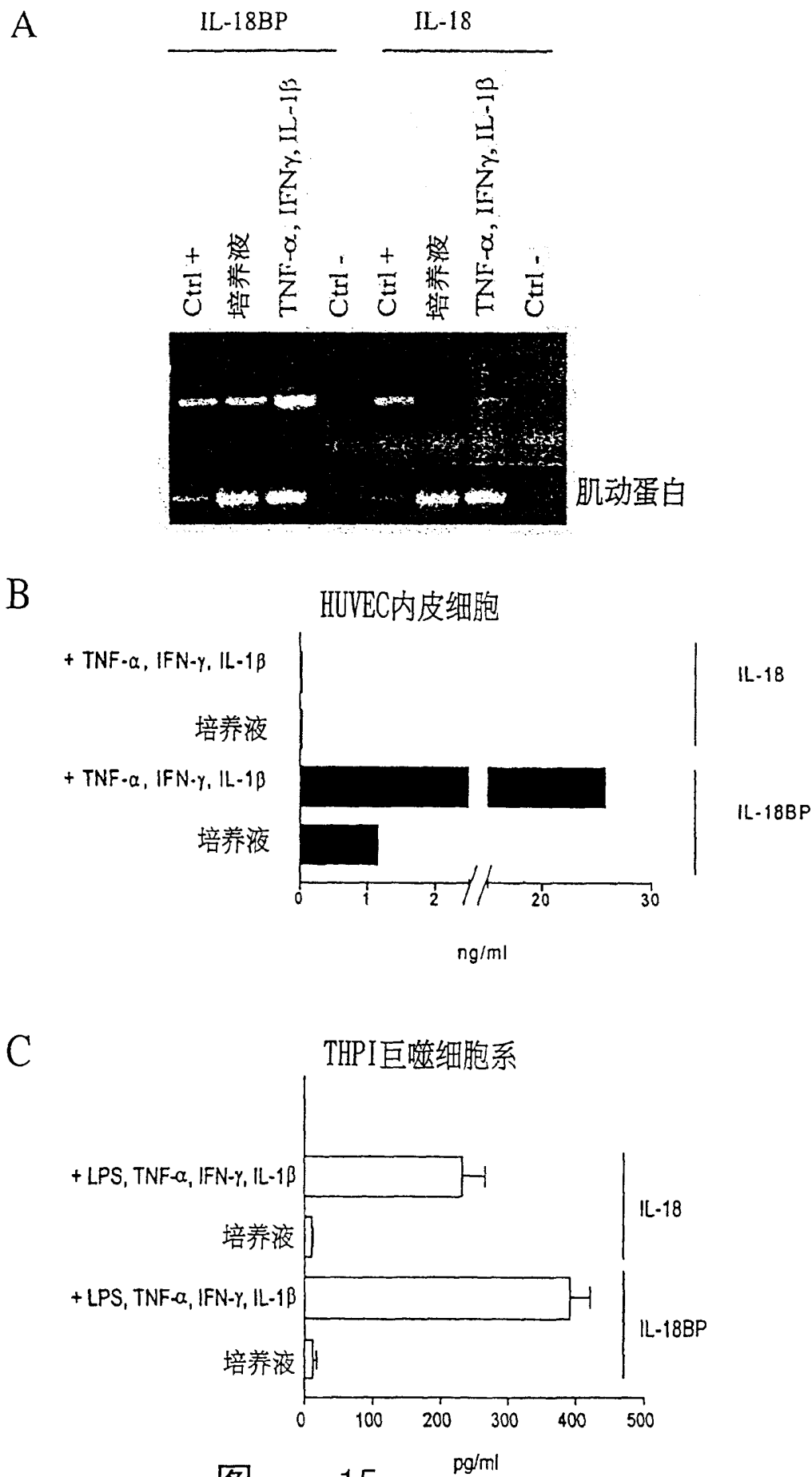


图 14



图

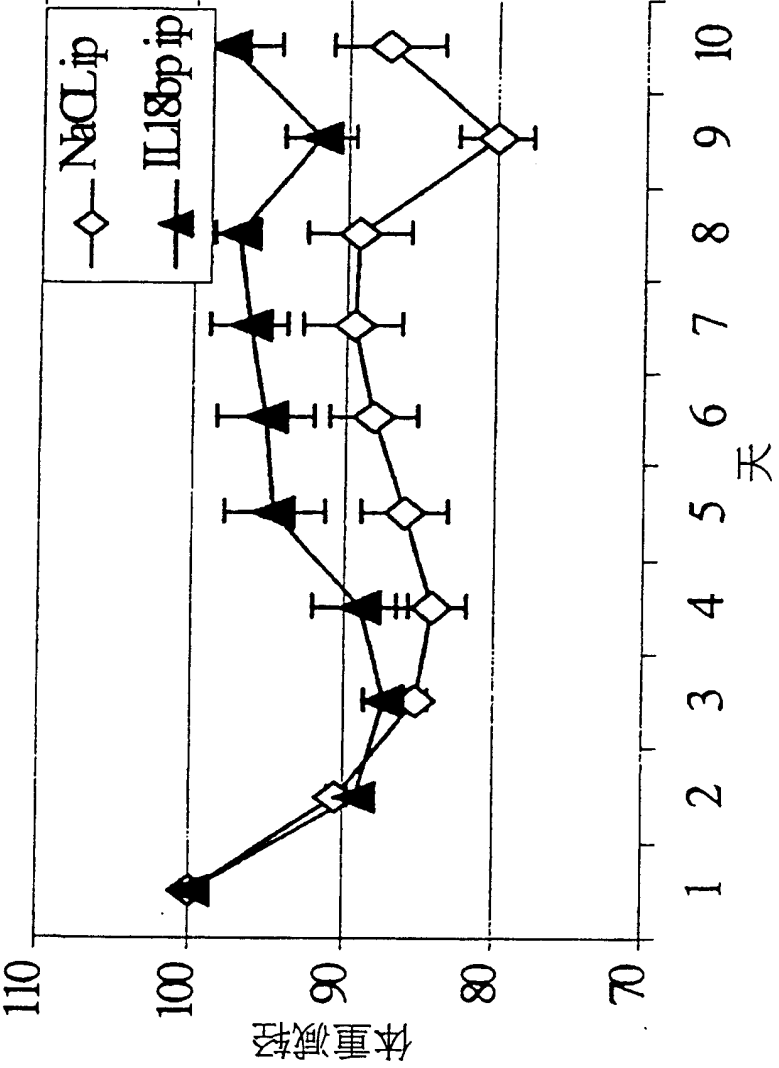


图 16

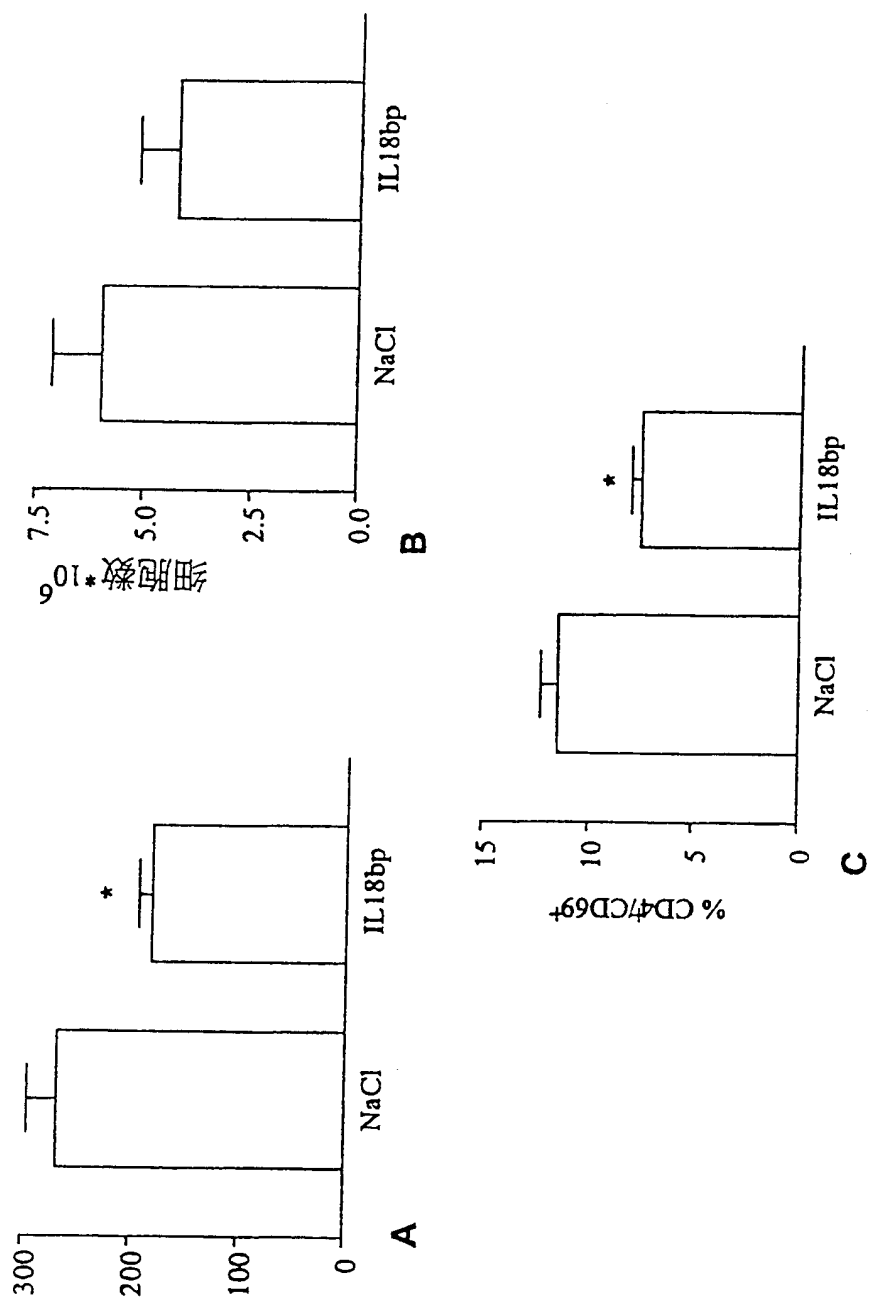


图 17

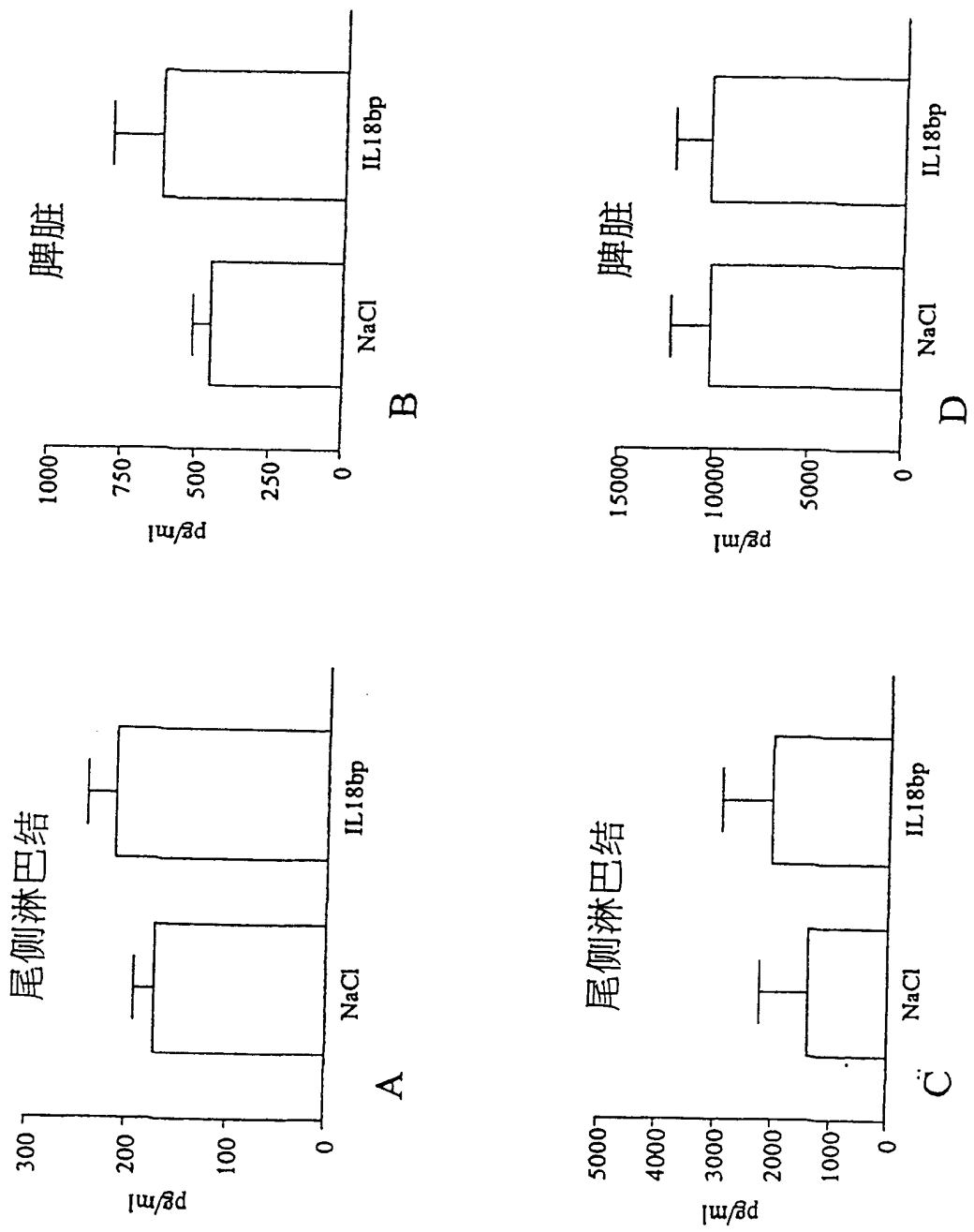


图 18

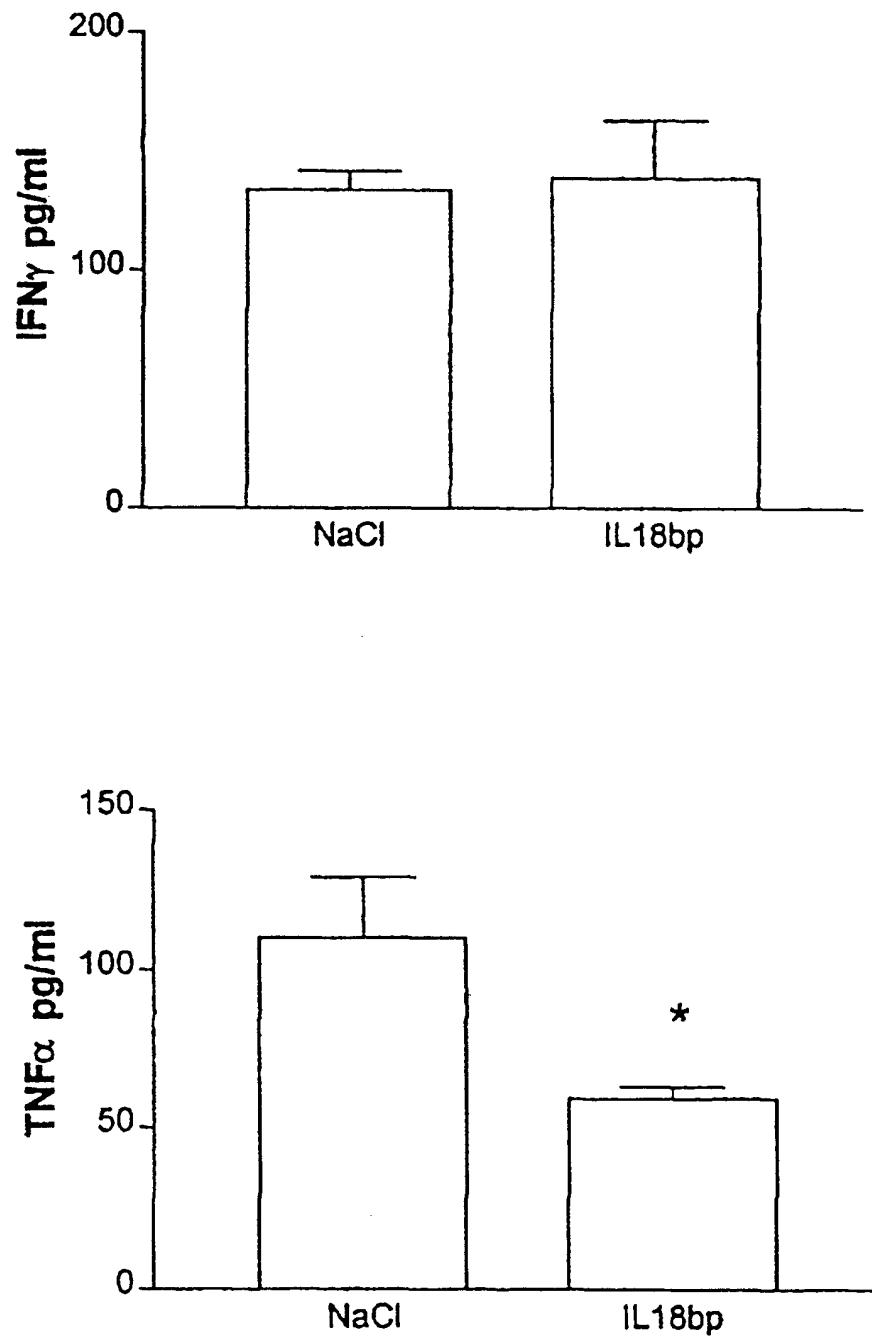


图 19