

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99804346. X

A61K 38/17
A61K 38/16 A61K 31/70
//(A61K38/17 31: 00)
(A61K38/16 31: 00)
(A61K38/17 39: 395)
(A61K38/16 39: 395)
(A61K38/17 38: 00)
[11]公开号 CN 1324243A

[43]公开日 2001年11月28日

[22]申请日 1999.1.22 [21]申请号 99804346. X

[30]优先权

[32]1998.1.23 [33]US [31]09/012,330

[86]国际申请 PCT/US99/01421 1999.1.22

[87]国际公布 WO99/37319 英 1999.7.29

[85]进入国家阶段日期 2000.9.22

[71]申请人 国家犹太医疗及研究中心

地址 美国科罗拉多州

[72]发明人 E·W·盖尔芬德 A·F·哈茨库
K·V·卢卡克斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 周慧敏

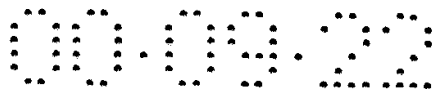
权利要求书5页 说明书33页 附图页数7页

[54]发明名称 使用热激蛋白治疗炎性疾病的方法

[57]摘要

本发明涉及保护哺乳动物免受与炎性反应有关的疾病的方法,特别是免受以嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th-2 型免疫应答 为特征的炎性疾病的方法。该方法包括对患有这类疾病的哺乳动物给 药热激蛋白。还公开了在本发明方法中有用的制剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1、热激蛋白在制备用于保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的药物中的用途。

5 2、保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的方法，所述方法包含对患有所述疾病的哺乳动物给药热激蛋白。

3、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述疾病与白介素-4(IL-4)、白介素-5(IL-5)、白介素-6(IL-6)、白介素-9(IL-9)、
10 白介素-10(IL-10)、白介素-13(IL-13)或白介素-15(IL-15)的产生增加有关。

4、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述疾病是变应性气道疾病、嗜酸细胞增多综合征、肠虫寄生虫感染、变应性鼻炎、过敏性结膜炎、皮炎、湿疹、接触性皮炎或食物变态反应。

15 5、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述疾病是以嗜酸细胞增多性气道炎症和气道应答性过强为特征的呼吸系统疾病。

6、如权利要求5所述的用途或方法，其中所述呼吸系统疾病是变应性气喘、内因性气喘、变应性支气管肺曲霉病、嗜酸性肺病、变应性支气管炎支气管扩张、职业性气喘、反应性气道疾病综合征、间质性肺疾病、嗜酸细胞增多综合征或寄生虫性肺疾病。

7、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述疾病与对变应原的致敏作用有关。

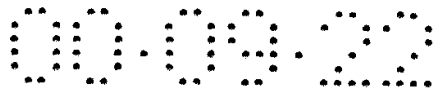
8、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述疾病是变应性气喘。

25 9、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白是HSP-60族热激蛋白、HSP-70族热激蛋白、HSP-90族热激蛋白或HSP-27族热激蛋白。

10、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白是HSP-60族热激蛋白、HSP-70族热激蛋白或HSP-27族热激蛋白。

30 11、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白是HSP-90族热激蛋白或HSP-27族热激蛋白。

12、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋



白是细菌热激蛋白或哺乳动物热激蛋白。

13、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白是分枝杆菌热激蛋白。

14、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白是分枝杆菌热激蛋白-65 (HSP-65)。

15、如权利要求2的方法，其中所述热激蛋白通过选自经口、经鼻、局部、吸入、经皮、直肠或胃肠外途径的至少一种途径给药。

16、如权利要求2的方法，其中所述热激蛋白通过选自吸入和经鼻途径的途径给药。

17、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白减少所述哺乳动物的嗜酸粒细胞增多。

18、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白将所述哺乳动物体内的嗜酸细胞数减少至约0-约300细胞/mm³。

19、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白将所述哺乳动物体内的嗜酸细胞数减少至约0-约100细胞/mm³。

20、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白将所述哺乳动物体内的嗜酸细胞数减少至所述哺乳动物体内白细胞总数的约0%-约3%。

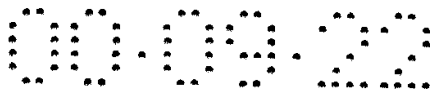
21、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白在所述哺乳动物体内诱导T淋巴细胞产生干扰素- γ (IFN- γ)。

22、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白在所述哺乳动物体内抑制T淋巴细胞产生白介素-4 (IL-4) 和白介素-5 (IL-5)。

23、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白降低了所述哺乳动物的气道乙酰甲胆碱应答性。

24、如权利要求1的用途或权利要求2的方法，其中所述热激蛋白减少了所述哺乳动物的气流受限，使所述哺乳动物的FEV₁/FVC值至少为约80%。

25、如权利要求2的方法，其中所述热激蛋白导致了哺乳动物PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁值的改善，使得当哺乳动物用首浓度的乙酰甲胆碱刺激时给药所述热激蛋白之前得到的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁值与当哺乳动物用首浓度乙酰甲胆碱的双倍量刺激时给药所述热激蛋白后得到的PC₂₀乙酰甲胆碱



FEV₁值相同。

26、如权利要求 25 的方法，其中所述浓度的乙酰甲胆碱为约 0.01mg/ml - 约 8mg/ml。

27、如权利要求 1 的用途或权利要求 2 的方法，其中所述热激蛋白使所述哺乳动物的 FEV₁ 比其预计 FEV₁ 提高了约 5% 至约 100%。

28、如权利要求 1 的用途或权利要求 2 的方法，其中所述热激蛋白减少了所述哺乳动物的气流受限，使得所述哺乳动物的 R_L 值降低了至少约 20%。

29、如权利要求 2 的方法，其中所述热激蛋白以约 0.1μg × Kg⁻¹ - 约 10mg × Kg⁻¹ (哺乳动物体重) 的量给药。

30、如权利要求 2 的方法，其中所述热激蛋白以约 1μg × Kg⁻¹ - 约 1mg × Kg⁻¹ (哺乳动物体重) 的量给药。

31、如权利要求 2 的方法，其中当所述热激蛋白通过气雾剂释放时，该热激蛋白以约 0.1mg × Kg⁻¹ - 约 5mg × Kg⁻¹ (哺乳动物体重) 的量给药。

32、如权利要求 2 的方法，其中当所述热激蛋白不经肠道释放时，该热激蛋白以约 0.1μg × Kg⁻¹ - 约 10μg × Kg⁻¹ (哺乳动物体重) 的量给药。

33、如权利要求 2 的方法，其中所述热激蛋白存在于药学上可接受的赋形剂中给药。

34、如权利要求 1 的用途或权利要求 2 的方法，其中所述哺乳动物是人。

35、用于保护哺乳动物使其不发生与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的制剂，它包含热激蛋白和抗炎剂。

36、如权利要求 35 的制剂，其中所述抗炎剂是抗原、变应原、半抗原、促炎细胞因子拮抗剂、促炎细胞因子受体拮抗剂、抗 CD23、抗 IgE、白三烯合成抑制剂、白三烯受体拮抗剂、糖皮质类固醇、类固醇化学衍生物、抗环加氧酶剂、抗胆碱能剂、β-肾上腺素能兴奋剂、甲基黄嘌呤、抗组胺药、cromones、zileuton、抗 CD4 试剂、抗 IL-5 试剂、表面活性剂、抗血栓烷试剂、抗 5-羟色胺试剂、酮替芬、cytoxin、环孢菌素、甲氨蝶呤、大环内酯类抗生素、肝素、低分子量肝素或其混合物。



37、如权利要求 35 的制剂，其中所述制剂包括药学上可接受的赋形剂。

38、如权利要求 35 的制剂，其中所述制剂包括选自下列成员的药学上可接受的赋形剂：生物相容性聚合物、其他聚合物基质、胶囊、
5 微胶囊、微粒、药团制剂、渗透泵、扩散装置、脂质体、脂肪球和经皮释放系统。

39、如权利要求 35 的方法，其中所述热激蛋白是 HSP-60 族热激蛋白、HSP-70 族热激蛋白、HSP-90 族热激蛋白或 HSP-27 族热激蛋白。

40、如权利要求 35 的方法，其中所述热激蛋白是分枝杆菌热激蛋白。
10

41、如权利要求 35 的方法，其中所述热激蛋白是分枝杆菌热激蛋白-65 (HSP-65)。

42、热激蛋白在制备用于保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的气道应答性过强为特征的疾病的药物中的用途。

43、保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的气道应答性过强为特征的疾病的方法，所述方法包含对患有所述疾病的哺乳动物给药热激蛋白。
15

44、热激蛋白在制备用于保护哺乳动物免受以 Th2 型免疫应答为特征的炎症疾病的药物中的用途。

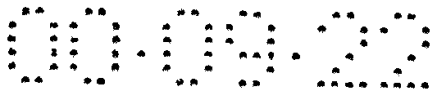
45、保护哺乳动物免受以 Th2 型免疫应答为特征的炎症疾病的方法，所述方法包含对患有所述疾病的哺乳动物给药热激蛋白。
20

46、编码热激蛋白的核酸分子用于保护哺乳动物免受以嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强或 Th2 型免疫应答为特征的疾病的用途，其中这些特征与炎症反应有关。

47、保护哺乳动物免受由选自嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强或 Th2-型免疫应答的特征确定的疾病的方法，所述特征与炎症反应有关，所述方法包括对患有所述疾病的哺乳动物给药编码热激蛋白的核酸分子。
25

48、如权利要求 46 的用途或权利要求 47 的方法，其中所述核酸分子可操作地与转录控制序列相连。
30

49、如权利要求 47 的方法，其中所述核酸分子与选自下列成员的药学上可接受的赋形剂一起给药：生理平衡水溶液、人造含脂质底物、



天然含脂质底物、油、酯、乙二醇、病毒、金属颗粒或阳离子分子。

50、如权利要求 47 的方法，其中所述药学上可接受的赋形剂是脂质体、胶粒、细胞或细胞膜。

51、如权利要求 47 的方法，其中所述核酸分子以选自下列成员的方式给药：皮内注射、肌肉注射、静脉注射、皮下注射或来自体内给药。

52、与牵涉炎性反应的疾病有关的气道应答性过强或气流受限的指定治疗方法，该方法包括：

(a) 对哺乳动物给药热激蛋白；

10 (b) 测量所述哺乳动物为响应刺激因素而发生的肺功能的变化，以确定所述热激蛋白是否调制气道应答性过强或气流受限；和

(c) 基于所述肺功能的变化而指定一种有效减少炎症的药物疗法，该疗法包含对所述哺乳动物给药所述热激蛋白。

15 53、如权利要求 52 的方法，其中所述疾病以气道嗜酸粒细胞增多为特征。

54、如权利要求 52 的方法，其中所述刺激因素是直接刺激或间接刺激。

20 55、如权利要求 52 的方法，其中所述刺激因素是变应原、乙酰甲胆碱、组胺、白三烯、盐水、换气过度、运动、二氧化硫、腺苷、普萘洛尔、冷空气、抗原、缓激肽、乙酰胆碱、前列腺素、臭氧、环境空气污染物或其混合物。

56、如权利要求 52 的方法，其中所述测量步骤包括测量选自下列成员的值： FEV_1 ， FEV_1/FVC ， PC_{20} 乙酰甲胆碱 FEV_1 ，后增强 h(Penh)，电导，动态顺应性，肺阻力 (R_L)，气道压力时间指数 (APTI) 或最高流量。



说明书

使用热激蛋白治疗炎症性疾病的方法

5

发明领域

本发明涉及保护哺乳动物免受炎症性疾病的方法，特别是免受以与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多为特征的疾病。

10 发明背景

牵涉到炎症的疾病的特征在于某些细胞型和介体的流入，它们的存在可导致组织损害，有时甚至是死亡。当牵涉炎症的疾病危及到呼吸系统时是特别有害的，会导致梗阻性呼吸、血氧过少、高钙酸血和肺组织损害。气道的梗阻性疾病的特征在于气流受限（即，气流阻塞
15 或缩小），是由于气道平滑肌收缩、水肿和粘液分泌过多导致呼吸增加、呼吸困难、血氧过少和高钙酸血等引起的。尽管在梗阻性呼吸过程中肺的机械性能是不同类型的梗阻性气道疾病共有的，但它们的病理生理学可能不同。

许多致炎因素可刺激气流受限，包括变应原、冷空气、运动、感
20 染和空气污染。特别是，变应性或致敏动物中的变应原和其他因素（即，抗原和半抗原）引起炎症介体释放，这些介体募集与炎症有关的细胞。这类细胞包括淋巴细胞、嗜酸细胞、肥大细胞、嗜碱细胞、嗜中性白细胞、巨噬细胞、单核细胞、成纤维细胞和血小板。炎症导致气道应答性过强。各种各样的研究已将炎症过程的程度、严重性和
25 时间选择与气道应答性过强的程度连结起来。因此，炎症的通常后果是气流受限和/或气道应答性过强。

哮喘是一种严重的肺部疾病，它影响了将近一千六百万美国人。哮喘的典型特征是周期性气流受限和/或对各种刺激的应答性过强，从而导致气道过度狭窄。其他特征包括气道炎症和嗜酸粒细胞增多。更
30 特别的是，变应性哮喘经常以高 IgE 水平、嗜酸细胞性气道炎症和气道应答性过强等为特征。

哮喘的流行（即，发生率和持续时间）正在增加。目前的流行接

近人群的 10% 并且在近 20 年里已升高了 25%。然而，其中更令人忧虑的是死亡率的上升。若与急诊室患者和住院患者人数的上升联系起来，近期的资料提示哮喘的严重性正在上升。尽管多数哮喘病例容易控制，但对于患有更严重疾病的那些患者来说，花费高、副作用以及
 5 太经常发作、治疗无效等，都存在严重问题。对慢性抗原接触的纤维增殖反应可解释哮喘的严重性和对治疗的不良应答，尤其是如果治疗被延迟的话。大多数哮喘患者的症状非常轻，容易治疗，但也有许多哮喘患者具有更严重的症状。另外，慢性哮喘与因某些未知机理导致的进行性和不可逆转的气流受限的进展有关。

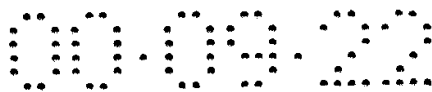
10 目前，用于治疗炎症性疾病诸如中度至重度哮喘的疗法主要包括使用免疫抑制性糖皮质类固醇。用于治疗气道炎症的其他抗炎剂包括色甘酸和茶多罗米。采用 β -兴奋剂、抗胆碱能剂和甲基黄嘌呤的症状疗法在临床上对于缓解不适是有利的，但不能终止导致疾病的基础炎症过程。频繁使用全身性糖皮质类固醇有许多副作用，包括但不限于：
 15 体重增加、糖尿病、高血压、骨质疏松症、白内障、动脉粥样硬化、对感染的敏感性增加、脂质和胆固醇增加、和容易碰伤。雾化糖皮质类固醇具有较少的副作用，但有效性较小，且具有严重的副作用，诸如鹅口疮。

20 其他抗炎剂，诸如色甘酸和茶多罗米，比糖皮质类固醇的有效性更小，副作用也更少。主要用作免疫抑制剂和抗癌剂的抗炎剂（例如，环磷酰胺、甲氨蝶呤和 Immuran）也已用于治疗带有混合结果的气道炎症。但是，这些药剂有严重的副作用可能，包括但不限于：对感染的敏感性增加、肝脏毒性、药物诱导的肺疾病和骨髓抑制。因此，这类药物只有限地临床用于治疗多数气道应答性过强的肺疾病。

25 抗炎剂和症状缓解剂的使用是一个严重问题，这是因为它们存在的副作用或它们无法对抗炎性反应的基础起因。一直以来都需要有害性较小且能更有效地治疗炎症的药剂。因此，仍然需要使用比现有的抗炎疗法具有更低副作用曲线和更小毒性的药剂来治疗炎症的方法。

30 发明概述

总的来说，本发明涉及保护哺乳动物免受与炎症反应有关的疾病的方法，特别是免受以嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th-2



型免疫应答为特征的疾病，其中该特征与炎症反应有关。所述方法包括对已患有这类疾病的哺乳动物给药热激蛋白的步骤。在一个优选的实施方案中，所述哺乳动物是人。

5 本发明的一个实施方案涉及保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的方法。该方法包括对患有这种疾病的哺乳动物给药热激蛋白的步骤。优选的是，治疗以嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的这种方法减少了哺乳动物体内嗜酸粒细胞增多的情况。在一个实施方案中，这种方法将哺乳动物体内的嗜酸细胞血计数减少到了约 0 - 约 300 细胞/mm³，更优选的是，减少到了约 0 - 约 100
10 细胞/mm³。在另一个实施方案中，这种方法将哺乳动物体内的嗜酸细胞血计数减少到了哺乳动物体内总白细胞的约 0% - 约 3%。

可以用本发明的方法给予保护的疾病包括：变应性气道疾病、嗜酸细胞增多综合征、肠虫寄生虫感染、变应性鼻炎、过敏性结膜炎、皮炎、湿疹、接触性皮炎或食物变态反应。在另一个实施方案中，该
15 疾病是以嗜酸粒细胞增多性气道炎症和气道应答性过强为特征的呼吸系统疾病，这样的疾病包括但不限于：变应性气喘、内因性气喘、变应性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞性肺病、变应性支气管炎支气管扩张、职业性气喘、反应性气道疾病综合征、间质性肺疾病、嗜酸细胞增多综合征或寄生虫性肺疾病。在另一个实施方案中，这样的疾病是
20 与变应原致敏有关的疾病，在优选的实施方案中，是变应性气喘。

在一个实施方案中，用于本发明方法的热激蛋白选自 HSP-60 族热激蛋白、HSP-70 族热激蛋白、HSP-90 族热激蛋白或 HSP-27 族热激蛋白。在另外的本发明方法的实施方案中，热激蛋白选自 HSP-60 族热激蛋白、HSP-70 族热激蛋白或 HSP-27 族热激蛋白；HSP-90 族热激蛋白
25 或 HSP-27 族热激蛋白；或者选自细菌热激蛋白和哺乳动物热激蛋白。在一个优选的实施方案中，热激蛋白是分枝杆菌热激蛋白，更优选为分枝杆菌热激蛋白-65 (HSP-65)。

在有些实施方案中，用本发明方法保护的疾病是以气道应答性过强为特征的。在这类实施方案中，此方法优选降低了哺乳动物的气道乙酰甲胆碱应答性。在其他实施方案中，哺乳动物的气流受限减少了，
30 哺乳动物的 FEV₁/FVC 值至少为约 80%。在另一个实施方案中，给药热激蛋白使得哺乳动物的 PC₂₀ 乙酰甲胆碱 FEV₁ 值得到改善，哺乳动物用首浓

度的乙酰甲胆碱刺激时给药热激蛋白之前得到的 PC_{20} 乙酰甲胆碱 FEV_1 值与哺乳动物用双倍剂量的首浓度的乙酰甲胆碱刺激时给药热激蛋白后得到的 PC_{20} 乙酰甲胆碱 FEV_1 值相同。在另一个实施方案中，给药热激蛋白改善了哺乳动物的 FEV_1 ，使其比哺乳动物预计 FEV_1 提高了约 5% 至约 100%。在另一个实施方案中，给药热激蛋白减少了哺乳动物的气流受限，使哺乳动物的 R_L 值降低了至少约 20%。

在一个实施方案中，用本发明的方法保护的疾病可以是与选自下列成员的细胞因子的产生增加有关的：白介素-4 (IL-4)、白介素-5 (IL-5)、白介素-6 (IL-6)、白介素-9 (IL-9)、白介素-10 (IL-10)、白介素-13 (IL-13) 或白介素-15 (IL-15)。因此，本发明方法的一个实施方案是，给药热激蛋白诱导哺乳动物体内 T 淋巴细胞产生干扰素- γ (IFN- γ)。在另一个实施方案中，给药热激蛋白抑制哺乳动物体内 T 淋巴细胞产生白介素-4 (IL-4) 和白介素-5 (IL-5)。

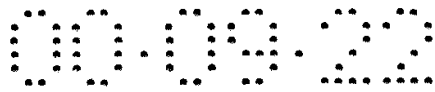
按照本发明的方法，热激蛋白可以以约 $0.1\mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$ - 约 $10\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$ (哺乳动物体重) 的量给药；更优选的是，以约 $1\mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$ - 约 $1\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$ (哺乳动物体重) 的量给药。如果热激蛋白通过气雾剂释放，则热激蛋白可以以约 $0.1\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$ - 约 $5\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$ (哺乳动物体重) 的量给药。如果热激蛋白不经肠道释放，则热激蛋白可以以约 $0.1\mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$ - 约 $10\mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$ (哺乳动物体重) 的量给药。

在此时以前描述的本发明方法的一个实施方案中，热激蛋白存在于药学上可接受的赋形剂中给药。优选的给药方式包括选自下列成员的至少一种途径：经口、经鼻、局部、吸入、经皮、直肠或胃肠外途径，更优选的是，包括吸入或经鼻途径。

本发明的另一个实施方案涉及保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的气道应答性过强为特征的疾病的方法，该方法包含对患有这种疾病的哺乳动物给药热激蛋白。上面已描述了关于以嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的这种方法的特定实施方案。

本发明的另一个实施方案涉及保护哺乳动物免受以 Th2-型免疫应答为特征的炎症疾病的方法，该方法包含对患有这种疾病的哺乳动物给药热激蛋白。上面已描述了关于以嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的这种方法的特定实施方案。

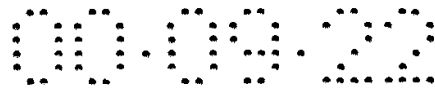
本发明的另一个实施方案涉及与牵涉炎症反应的疾病有关的气道



应答性过强或气流受限的指定治疗方法。该方法包括下列步骤：(a) 对哺乳动物给药热激蛋白；(b) 测量哺乳动物为响应刺激因素而发生的肺功能的变化，以确定热激蛋白是否调制气道应答性过强或气流受限；和(c) 基于肺功能的变化而指定一种有效减少炎症的药物疗法，
5 包含对哺乳动物给药热激蛋白。在一个实施方案中，测量步骤包括测量选自下列成员的值：FEV₁，FEV₁/FVC，PC₂₀ 乙酰甲胆碱 FEV₁，后增强 h(Penh)，电导，动态顺应性，肺阻力(R_L)，气道压力时间指数(APTI) 或最高流量。刺激因素可包括直接和间接刺激，优选包括选自下列成员的因素：变应原、乙酰甲胆碱、组胺、白三烯、盐水、换气过度、
10 运动、二氧化硫、腺苷、普萘洛尔、冷空气、抗原、缓激肽、乙酰胆碱、前列腺素、臭氧、环境空气污染物及其混合物。在该方法的一个实施方案中，疾病的特征是气道嗜酸粒细胞增多。

本发明的另一个实施方案涉及用于保护哺乳动物使其不发生以与炎性反应有关的嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的制剂，该制剂包括热
15 激蛋白和抗炎剂。该抗炎剂可包括，但不限于：抗原、变应原、半抗原、促炎细胞因子拮抗剂、促炎细胞因子受体拮抗剂、抗 CD23、抗 IgE、白三烯合成抑制剂、白三烯受体拮抗剂、糖皮质激素、类固醇化学衍生物、抗环加氧酶剂、抗胆碱能剂、β-肾上腺素能兴奋剂、甲基黄嘌呤、抗组胺药、cromones、zileuton、抗 CD4 试剂、抗 IL-5 试剂、
20 表面活性剂、抗血栓烷试剂、抗 5-羟色胺试剂、酮替芬、cytoxin、环孢菌素、甲氧蝶呤、大环内酯类抗生素、肝素、低分子量肝素或其混合物。在一个实施方案中，本发明的制剂包括药学上可接受的赋形剂，优选选自下列成员的药学上可接受的赋形剂：生物相容性聚合物、其他聚合物基质、胶囊、微胶囊、微粒、药团制剂、渗透泵、扩散装
25 置、脂质体、脂肪球或经皮释放系统。

本发明的另一个实施方案涉及保护哺乳动物免受由下列特征确定的疾病的方法，所述特征选自嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和 Th2-
型免疫应答，这些特征与炎性反应有关。该方法包括对患病的哺乳动物给药编码热激蛋白的核酸分子的步骤。在一个实施方案中，该核酸
30 分子可操作地与转录控制序列相连。在另一个实施方案中，该核酸分子与选自下列成员的药学上可接受的赋形剂一起给药：生理平衡水溶液、人造含脂质底物、天然含脂质底物、油、酯、乙二醇、病毒、金



属颗粒和阳离子分子。在一个优选的实施方案中，药学上可接受的赋形剂选自脂质体、胶粒、细胞或细胞膜。该核酸分子可以以选自下列成员的方式给药：皮内注射、肌肉注射、静脉注射、皮下注射或来自体内给药。

5

附图的简要描述

图 1 柱形图说明了在 7 日卵白蛋白致敏方案中，用分枝杆菌 HSP-65 处理上调了小鼠体内非特异性和抗原特异性 T 细胞的增殖。

10 图 2A 线形图显示了小鼠用卵白蛋白次最优致敏后用分枝杆菌 HSP-65 处理上调了脾中抗原特异性 T 细胞的增殖。

图 2B 线形图显示了小鼠用卵白蛋白次最优致敏后用分枝杆菌 HSP-65 处理上调了支气管周淋巴结中抗原特异性 T 细胞的增殖。

图 3 柱形图说明了小鼠用卵白蛋白致敏和刺激后用分枝杆菌 HSP-65 处理上调了非特异性和抗原特异性 T 细胞的增殖反应。

15 图 4A 柱形图显示了小鼠用卵白蛋白致敏和刺激后用分枝杆菌 HSP-65 处理在体外对由卵白蛋白刺激的脾细胞产生干扰素- γ 的影响。

图 4B 柱形图显示了小鼠用卵白蛋白致敏和刺激后用分枝杆菌 HSP-65 处理在体外对由卵白蛋白刺激的脾细胞产生 IL-4 的影响。

20 图 4C 柱形图显示了小鼠用卵白蛋白致敏和刺激后用分枝杆菌 HSP-65 处理在体外对由卵白蛋白刺激的脾细胞产生 IL-5 的影响。

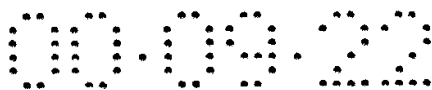
图 5A 柱形图显示了小鼠用卵白蛋白致敏和刺激后用分枝杆菌 HSP-65 处理在体外对由卵白蛋白刺激的脾细胞产生卵白蛋白特异性 IgG2a 的影响。

25 图 5B 柱形图显示了小鼠用卵白蛋白致敏和刺激后用分枝杆菌 HSP-65 处理在体外对由卵白蛋白刺激的脾细胞产生卵白蛋白特异性 IgG1 的影响。

图 5C 柱形图显示了小鼠用卵白蛋白致敏和刺激后用分枝杆菌 HSP-65 处理在体外对由卵白蛋白刺激的脾细胞产生卵白蛋白特异性 IgE 的影响。

30 图 6 柱形图说明了小鼠用分枝杆菌 HSP-65 处理在体内消除了由卵白蛋白致敏和刺激诱导的嗜酸细胞性气道炎症。

图 7 线形图显示了小鼠用分枝杆菌 HSP-65 处理在体内消除了卵白



蛋白致敏和刺激后气道对乙酰甲胆碱的应答性过强。

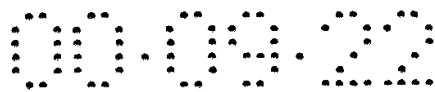
发明详述

总的来说，本发明涉及保护哺乳动物免受与炎性反应有关的疾病的方法和制剂，特别是免受以嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型免疫应答为特征的疾病，其中这些特征与炎性反应有关。本发明人已发现，对哺乳动物给药热激蛋白显著抑制了炎症，更具体地说，显著抑制了与炎症有关的嗜酸粒细胞增多。另外，在牵涉气流受限和/或气道气道应答性过强的呼吸系统疾病中，本发明人已发现，给药热激蛋白同样显著抑制了气道应答性过强。最后，本发明人已表明，对患有以 Th2 型应答为特征的炎性疾病的哺乳动物给药热激蛋白，例如通过调节细胞因子和/或免疫球蛋白同种型的生成而产生了从 Th2 型免疫应答向 Th1 型免疫应答的转变（即调节）。

热激蛋白是高免疫原性蛋白质，并且已与多种炎性细胞因子（包括 Th1 和 Th2 相关细胞因子，下文中有详细说明）的产生和某些疾病，诸如自身免疫性和理所当然的分枝杆菌感染，联系起来。因此，本发明人有关对哺乳动物给药免疫刺激性热激蛋白能有效地治疗炎性疾病的发现是令人惊奇的，特别是由于目前对这类疾病的治疗强调免疫抑制。不受理论的束缚，本发明人相信，本发明的给药热激蛋白来保护哺乳动物免受炎性疾病的方法提供了免疫刺激性作用，这导致有害的炎性免疫应答调节为有益或保护性的免疫应答，或至少是无害的免疫应答。

按照本发明，热激蛋白（HSP）可以是属于最初由它们为响应抬高的温度和其他应力相关刺激而使得表达增加而识别的一组蛋白质中的任何一种，它们在本领域中统称为“热激蛋白”。现在已知热激蛋白不仅响应细胞应力而产生，而且可以组成型存在于细胞中并完成各种内务功能。

目前热激蛋白根据蛋白质大小分成至少五个主要家族。这五个家族是 HSP-100 族（即蛋白质大小为约 100kD）；HSP-90 族（即蛋白质大小为约 90kD）；HSP-70 族（即蛋白质大小为约 70kD）；HSP-60 族（即蛋白质大小为约 60kD）；和 HSP-27 族（即蛋白质大小为约 27kD）。热激蛋白具有几个独特性质。例如，HSP-27、HSP-60 和 HSP-70 参与蛋



白质加工和折叠，并且在适当的抗原呈递中可以是重要的。HSP-27 和 HSP-90 已知参与类固醇与其受体的结合。分枝杆菌蛋白质，特别是 HSP-60 族热激蛋白中的成员之一——分枝杆菌热激蛋白-65 (HSP-65)，已知它是细胞免疫应答的强诱导物，特别是，已知它能增强单核细胞/巨噬细胞和 T 细胞功能。

用于本发明的热激蛋白可以是来自任何一个已知热激蛋白家族中的热激蛋白，包括上面已确定的热激蛋白家族。优选的是，用于本发明的热激蛋白来自包括 HSP-90、HSP-70、HSP-60 和 HSP-27 的热激蛋白族。在一个实施方案中，用于本发明的热激蛋白来自 HSP-90 族或 HSP-27 族。在另一个实施方案中，用于本发明的热激蛋白来自 HSP-60 族、HSP-70 族和/或 HSP-27 族。在一个优选的实施方案中，用于本发明的热激蛋白来自 HSP-60 族。

用于本发明的热激蛋白可以衍生自或从任何有机体得到，优选从哺乳动物或细菌得到，甚至更优选从分枝杆菌属成员得到。可以得到热激蛋白的特别优选的分枝杆菌属物质包括但不限于：结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和麻风分枝杆菌。在一个实施方案中，用于本发明的热激蛋白是分枝杆菌热激蛋白-65 (HSP-65)，这是 HSP-60 族中 65kD 的分枝杆菌成员。

用于本发明方法的热激蛋白可以例如从其天然来源得到、利用重组 DNA 技术生产或者通过化学合成。本文中所用的热激蛋白可以是全长热激蛋白或这种蛋白质的任何同系物，诸如其中氨基酸已被删除（例如蛋白质的截短变型，如肽）、插入、倒置、取代和/或衍生（例如，通过糖基化、磷酸化、乙酰化、豆蔻酰化、异戊二烯化、棕榈酸化、酰胺化和/或加入糖基磷脂酰肌醇）的热激蛋白。热激蛋白的同系物是具有与天然热激蛋白氨基酸序列充分类似的氨基酸序列的蛋白质，编码该同系物的核酸序列能够在严格条件下杂交到编码天然热激蛋白的核酸分子上（即与其杂交）（即，杂交到编码天然热激蛋白氨基酸序列的核酸链的互补物上）。任何核酸序列的核酸序列互补物指的是与被引证序列的链互补（即，可以与之形成完全双螺旋）的核酸链的核酸序列。用于本发明方法的热激蛋白包括但不限于：利用具有全长热激蛋白编码区的核酸分子编码的蛋白质；利用具有部分热激蛋白编码区的核酸分子编码的蛋白质，其中这类蛋白质保护哺乳动物免受以选自下

列成员的特征确定的疾病：嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型免疫应答；融合蛋白；和嵌合蛋白或化学偶联蛋白，它包含不同热激蛋白的结合物，或热激蛋白与其他蛋白质、诸如抗原或变应原的结合物。在另一个实施方案中，用于本发明方法的热激蛋白包括具有与天然产热激蛋白的氨基酸序列至少有约 70% 相同、更优选有约 80% 相同、甚至更优选有约 90% 相同的氨基酸序列的热激蛋白。

术语“热激蛋白 (HSP)”也可指由等位变体编码的蛋白质，包括已知编码热激蛋白的核酸分子的天然产等位变体，它具有与天然产或野生型的编码热激蛋白的核酸序列类似但并不完全相同的核酸序列。等位变体是实质上在与热激蛋白基因相同的基因组中的基因座上存在的基因，但是由于例如突变或重组而引起的自然变异，使之具有类似但不完全相同的序列。等位变体一般编码具有与由它们与之对照的基因编码的蛋白质类似活性的蛋白质。等位变体也可包含在基因的 5' 或 3' 非翻译区（例如，在调节控制区）上的变更。

按照本发明，短语“给药热激蛋白”可包括直接对哺乳动物给药蛋白质，诸如通过下文中详细描述的任何一种蛋白质给药方式，或者，“给药热激蛋白”可以指对哺乳动物给药编码热激蛋白的核酸分子，使该热激蛋白在哺乳动物体内表达。下文中详细讨论了本发明的对哺乳动物给药编码热激蛋白的核酸分子的实施方式。

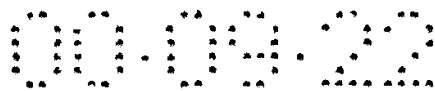
按照本发明，热激蛋白可以给予脊椎动物亚门哺乳纲的任何成员，非限制性地包括灵长类动物、啮齿动物、牲畜和家庭宠物。优选的是，本发明的方法目的在于保护和/或治疗哺乳动物的与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型应答为特征的疾病。优选的利用热激蛋白予以保护的哺乳动物包括人，啮齿动物，猴，羊，猪，猫，狗和马。甚至更优选的要予以保护的哺乳动物是人。

在本文中，短语“保护哺乳动物免受涉及炎症的疾病”指的是：减少对致炎因素（即能引起炎症应答的因素，例如：乙酰甲胆碱、组胺、变应原、白三烯、盐水、换气过度、运动、二氧化硫、腺苷、普萘洛尔、冷空气、抗原或缓激肽）产生炎症反应（即涉及炎症的反应）的可能性；减少疾病或炎症反应的发生；和/或降低疾病或炎症反应的严重度。优选的是，发生炎症反应的可能性被最理想地减小到哺乳动物不再感受不适和/或接触致炎因素后功能不再改变的程度。例如，保

护哺乳动物可以是指当化合物对哺乳动物给药后，它防止疾病发生和/或治愈或减轻疾病症状、体征或病因的能力。特别是，保护哺乳动物是指调节炎性反应，以抑制（例如降低、抑制或阻断）活动过度的或有害的炎性反应，这可包括诱导有益的、保护性的或无害的免疫应答。特别是，保护哺乳动物也可以是指调节细胞介导的免疫和/或体液免疫（即 T 细胞活性和/或免疫球蛋白活性，包括 Th1 型和/或 Th2 型细胞和/或体液活性）。术语“疾病”是指与哺乳动物的正常健康状态的任何偏差，包括存在疾病症状时的状态，以及已发生偏差（例如感染、基因突变、遗传缺损等）但还未表现出症状的疾病。

10 本发明的方法保护的疾病可包括以嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型免疫应答为特征的任何疾病，其中这些特征与炎性反应有关。这样的疾病包括但不限于：变应性气道疾病、嗜酸细胞增多综合征、肠虫寄生虫感染、变应性鼻炎、过敏性结膜炎、皮炎、湿疹、接触性皮炎或食物变态反应。在一个实施方案中，可用本发明的方法保护的疾病包括以嗜酸粒细胞增多性气道炎症和/或气道应答性过强为特征的呼吸系统疾病。这样的呼吸系统疾病包括上面所提到的变应性气道疾病，它可包括但不限于：变应性气喘、变应性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞性肺病、变应性支气管炎支气管扩张、职业性气喘（即在工作场所，由致敏剂、诸如变应原、刺激剂或半抗原引起的哮喘，喘鸣，胸部发紧和咳嗽）、反应性气道疾病综合征（即与导致哮喘的因素单一接触）和间质性肺疾病。甚至更优选的是，可以用本发明方法保护的呼吸系统疾病包括但不限于：变应性气喘、内因性气喘、变应性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞性肺病、变应性支气管炎支气管扩张、职业性气喘、反应性气道疾病综合征、间质性肺疾病、嗜酸细胞增多综合征和寄生虫性肺疾病。在另一个实施方案中，可以用本发明的方法保护的疾病包括与对变应原的致敏作用有关的疾病。上文中描述了这类疾病的实例。在一个优选的实施方案中，本发明的方法保护哺乳动物免受哮喘，特别是变应性气喘。

30 如上所述，本发明的方法保护哺乳动物免受以与炎性反应有关的嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型免疫应答为特征的疾病。尽管在下文中分别详细讨论了嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和 Th2 型免疫应答等每种特征，但应理解：本发明的方法可用于保护

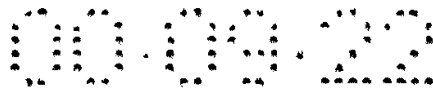


哺乳动物免受具有与炎症反应有关的任何一种特征或这些特征的组合的疾病。因此，用本发明方法得到的特定结果和/或可用本发明方法有效治疗的疾病的其他特征可以应用于具有上述任何一种特征或这些特征的组合的疾病。

5 本发明的一个实施方案涉及保护哺乳动物发生以与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的方法。该方法包括向患有这种疾病的哺乳动物给药热激蛋白的步骤。本文中所用的术语“嗜酸粒细胞增多”是指与正常哺乳动物（即未患此疾病的哺乳动物）中存在的嗜酸细胞数相比，其中患有嗜酸粒细胞增多的哺乳动物中存在的嗜酸细胞
10 数增加或提高的临床认可疾病。在未患以嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的正常哺乳动物中，嗜酸细胞一般为该哺乳动物体内白细胞总数的约0% - 约3%。哺乳动物的嗜酸细胞数可以利用本领域技术人员已知的方法测量。特别是，哺乳动物的嗜酸细胞数可以利用活体染色剂、诸如根皮红B或Diff Quick来测量。

15 按照本发明的方法，对患有以嗜酸粒细胞增多为特征的疾病的哺乳动物给药热激蛋白优选导致哺乳动物体内嗜酸粒细胞增多的减少。优选的是，在本发明的方法中给药热激蛋白将哺乳动物体内嗜酸细胞数减少到约0 - 470 细胞/mm³，更优选减少到约0 - 300 细胞/mm³，甚至更优选减少到约0 - 100 细胞/mm³。在一个优选的实施方案中，在本发
20 明的方法中给药热激蛋白使哺乳动物体内的嗜酸细胞数减少到白细胞总数的约0% - 约3%。

 本发明的另一个实施方案涉及保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的气道应答性过强为特征的疾病的方法。该方法包括对患有这种疾病的哺乳动物给药热激蛋白。术语“气道应答性过强”（AHR）是指气
25 道异常使得它们太易狭窄和/或对能导致气道受限的刺激反应性太高。AHR可以是因炎症或气道再造型（例如象通过胶原沉积）引起的呼吸系统的功能改变。气流受限是指气道缩小，这可能是不可逆的，也可能是可逆的。胶原沉积、支气管痉挛、气道平滑肌肥大、气道平滑肌收缩、粘液分泌、细胞沉积、上皮破坏、上皮渗透性的改变、平
30 滑肌功能或敏感性的改变、肺实质异常、平滑肌功能神经调节的异常（包括肾上腺素能的、胆碱能的和非肾上腺素能-非胆碱能的调节）以及气道内或周围的浸润疾病等可引起气流受限或气道应答性过强。



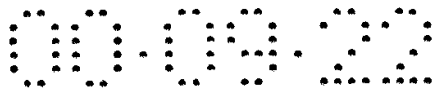
AHR 可以用应力试验进行测量，该试验包括测量哺乳动物呼吸系统功能对刺激因素（即刺激物）的反应性。AHR 可测量为呼吸功能从基线开始的变化，其对刺激因素剂量作图（下文的实施例中详细描述了这一测量的过程和有用的哺乳动物模型）。呼吸功能可以利用例如肺量测定法、体积描记器、最高流量、症状打分、物理征候（即呼吸速率）、喘鸣、运动耐力、使用援救药物（即支气管扩张药）和血内气体等来测量。

对于人，肺量测定法可以用于测量与刺激因素、诸如乙酰甲胆碱或组胺联合的呼吸功能的变化。对于人，肺量测定法是通过让某人深呼吸并尽可能长时间、努力而快速地吹气到测量气流和容积的计量器中而进行的。在第 1 秒内呼出气体的容积叫做用力呼气量（ FEV_1 ），呼出气体的总量叫做用力肺活量（FVC）。对于人，可以得到正常的预计 FEV_1 和 FVC 并根据体重、身高、性别和种族将其标准化。对于某个特定人来说，无病个体的 FEV_1 和 FVC 至少为正常预计值的 80%， FEV_1/FVC 比值也至少为正常预计值的 80%。测定刺激因素吸入之前（即，代表哺乳动物的休息状态）和之后（即，代表哺乳动物更高的肺耐力状态）的 FEV_1 和 FVC 值。所得曲线的形态指示了气道对刺激因素的敏感性。

提高刺激因素的剂量或浓度对肺功能的影响可通过测量用刺激因素刺激后的哺乳动物的 1 秒钟用力呼气量（ FEV_1 ）和 FEV_1 与用力肺活量的比（ FEV_1/FVC 比）来确定。对于人，导致 FEV_1 下降 20% 的刺激因素（即乙酰甲胆碱或组胺）的剂量或浓度（ $PD_{20} FEV_1$ ）指示 AHR 的程度。 FEV_1 和 FVC 值可以用本领域技术人员已知的方法测量。

气道阻力（ R_L ）和动力顺应性（ C_L ）和应答性过强等肺功能量度可以通过测量经肺压力来确定，测量为气道口和人体体积描记器之间的压力差。容积是人体体积描记器中的校准压力变化，流量是容积信号的数字微分。阻力（ R_L ）和顺应性（ C_L ）利用本领域技术人员已知的方法得到（例如，通过使用运动方程的递归最小二乘法）。实施例中详细描述了气道阻力（ R_L ）和动力顺应性（ C_L ）。

各种各样的刺激因素可以用于测量 AHR 值。合适的刺激因素包括直接和间接刺激物。优选的刺激因素包括，例如：乙酰甲胆碱（Mch）、组胺、变应原、白三烯、盐水、换气过度、运动、二氧化硫、腺苷、普萘洛尔、冷空气、抗原、缓激肽、乙酰胆碱、环境气载污染物（例如



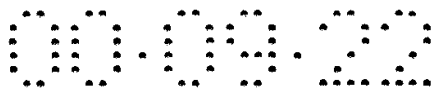
微粒、NO、NO₂)、前列腺素、臭氧及其混合物。优选乙酰甲胆碱作为刺激因素。在浓度应答曲线中使用的乙酰甲胆碱的优选浓度为约0.001-约100毫克/毫升(mg/ml)。在浓度应答曲线中使用的乙酰甲胆碱的浓度更优选为约0.01-约50mg/ml。在浓度应答曲线中使用的乙酰甲胆碱的浓度甚至更优选为约0.02-约25mg/ml。当用乙酰甲胆碱作为刺激因素时，AHR的程度由导致哺乳动物的FEV₁下降20%所需的乙酰甲胆碱的激发浓度(PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁)来定义。例如，对于人并使用本领域中的标准方案，正常人一般PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁>8mg/ml乙酰甲胆碱。因此，对于人，AHR定义为PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁<8mg/ml乙酰甲胆碱。

10 对于患有或易患AHR的哺乳动物，药物保护哺乳动物免受AHR的有效性一般以双倍量测量。例如，如果哺乳动物给药前的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁为1mg/ml乙酰甲胆碱，给药后为2mg/ml乙酰甲胆碱，则该药物保护哺乳动物免受AHR的有效性是显著的。与此类似，如果哺乳动物给药前的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁为2mg/ml乙酰甲胆碱，给药后为4mg/ml乙酰甲胆碱，则该药物被认为是有效的。

15 在本发明的一个实施方案中，热激蛋白降低了哺乳动物体内的乙酰甲胆碱应答性。优选的是，给药热激蛋白将用该热激蛋白处理的哺乳动物的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁提高了约1倍浓度，使其更接近正常哺乳动物的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁。正常哺乳动物是指已知其未患异常AHR或对异常AHR不敏感的哺乳动物。测试哺乳动物是指怀疑患有异常AHR或对异常AHR敏感的哺乳动物。

25 在另一个实施方案中，对哺乳动物给药热激蛋白使哺乳动物的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁值得到改善，当哺乳动物用首浓度的乙酰甲胆碱刺激时给药热激蛋白之前得到的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁值与当哺乳动物用双倍于首浓度的乙酰甲胆碱刺激时给药热激蛋白后得到的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁值相同。热激蛋白的优选给药量包括使哺乳动物的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁值得到改善的量，它使得当哺乳动物用一定浓度的乙酰甲胆碱刺激时在给药热激蛋白之前得到的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁值为约0.01mg/ml-约8mg/ml，与当哺乳动物用双倍浓度的乙酰甲胆碱刺激时在给药热激蛋白后得到的、在约0.02mg/ml-约16mg/ml之间的PC₂₀乙酰甲胆碱FEV₁值相同。

30 按照本发明，呼吸功能可以用各种静态试验来评估，这些试验包含在不存在刺激因素的情况下测量哺乳动物的呼吸系统功能。静态试



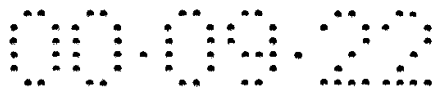
5 验的实例包括，例如：肺量测定法、体积描记器、最高流量、症状打
分、物理征候（即呼吸速率）、喘鸣、运动耐力、使用援救药物（即支
气管扩张药）和血内气体。用静态试验评估肺功能可以通过测量例如
总肺活量（TLC）、胸腔气体容量（TgV）、功能残气量（FRC）、残气量
10 （RV）和肺容量的电导率（SGL）、肺一氧化碳弥散量（DLCO）、动脉血
液气体包括用于气体交换的 pH、 P_{O_2} 和 P_{CO_2} 等进行。FEV₁ 和 FEV₁/FVC
可以用于测量气流受限。如果对人使用肺量测定法，则个体的 FEV₁ 可
以与预计的 FEV₁ 值进行对比。预计 FEV₁ 值可为基于哺乳动物的年龄、
性别、体重、身高和种族的标准正常图所利用。正常哺乳动物一般 FEV₁
15 为哺乳动物预计 FEV₁ 的至少约 80%。气流受限使得 FEV₁ 或 FVC 小于预
计值的 80%。另一种测量气流受限的方法是基于 FEV₁ 和 FVC 的比值
（FEV₁/FVC）。无病的个体定义为具有至少约 80% 的 FEV₁/FVC 比值。
气流阻塞引起 FEV₁/FVC 比值下降到小于预计值的 80%。因此，患有气
流受限的哺乳动物由 FEV₁/FVC 小于约 80% 来定义。

15 药物对患有或易患气流受限的哺乳动物的保护的有效性可以通过
测量药物给药前后 FEV₁ 和/或 FEV₁/FVC 比值的改善百分数来确定。在
一个实施方案中，按照本发明方法给药热激蛋白减少了哺乳动物的气
流受限，使哺乳动物的 FEV₁/FVC 值至少为约 80%。在另一个实施方案
中，给药热激蛋白将哺乳动物的 FEV₁ 优选比其预计 FEV₁ 提高了约 5%
20 - 约 100%，更优选提高了约 6% - 约 100%，更优选提高了约 7% -
约 100%，甚至更优选提高了约 8% - 约 100%（或约 200ml）。

应当注意，与测量人的 FEV₁ 和/或 FEV₁/FVC 比值相类似，测量非
人类哺乳动物（例如小鼠）的气道阻力（R_L）值可以用于诊断气流阻
塞。在本发明的一个实施方案中，给药热激蛋白减少了哺乳动物的气
25 流受限，使得哺乳动物的 R_L 值下降了至少约 10%，更优选下降了至少
约 20%，甚至更优选下降了至少约 30%，甚至更优选下降了至少约 40
%。

在本发明的范围内，静态试验可以在给予用于应力试验的激发剂
之前或之后进行。

30 在另一个实施方案中，在本发明的方法中给药热激蛋白减少了哺
乳动物的气流受限，使得当在入睡前的傍晚和醒来时的早晨进行测量
时，哺乳动物的 FEV₁ 或 PEF 值的变化小于约 75%，优选小于约 45%，

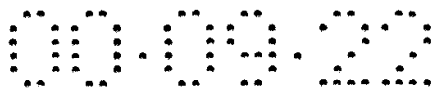


更优选小于约 15%，甚至更优选小于约 8%。

本发明的再一个实施方案涉及保护哺乳动物免受以 Th2 型免疫应答为特征的炎症性疾病的方法。该方法包括对患有这种疾病的哺乳动物给药热激蛋白。按照本发明，以 Th2 型免疫应答（也叫做 Th2 免疫应答）为特征的疾病可以描绘为这样的疾病：它与本领域中已知为 Th2 型 T 淋巴细胞（或 Th2 淋巴细胞）的辅助 T 淋巴细胞的亚群与 Th1 型 T 淋巴细胞（或 Th1 淋巴细胞）的活化相比的优势活化有关。按照本发明，Th2 型 T 淋巴细胞的特点在于它们产生一种或多种细胞因子，统称为 Th2 型细胞因子。在此处，Th2 型细胞因子包括白介素-4 (IL-4)、白介素-5 (IL-5)、白介素-6 (IL-6)、白介素-9 (IL-9)、白介素-10 (IL-10)、白介素-13 (IL-13) 和白介素-15 (IL-15)。相反，Th1 型淋巴细胞产生包括 IL-2 和 IFN- γ 的细胞因子。另外，有时 Th2 型免疫应答的特点在于包括 IgG1（其近似的人类等价物是 IgG4）和 IgE 的抗体同种型的优势生成，而有时 Th1 型免疫应答的特点在于 IgG2a 或 IgG3 抗体同种型（其近似的人类等价物是 IgG1、IgG2 或 IgG3）的生成。

按照本发明的方法，对患有 Th2 型应答为特征的疾病的哺乳动物给药热激蛋白优选导致哺乳动物的免疫应答从 Th2 型应答调制为更占优势的 Th1 型应答。优选的是，在本发明的方法中给药热激蛋白减少（或抑制）了由 T 淋巴细胞生成 Th2 型细胞因子、诸如 IL-4 和 IL-5。另外，或者换个办法，在本发明的方法中给药热激蛋白增加（或诱导）了由 T 淋巴细胞生成 Th1 型细胞因子，诸如 IFN- γ 。此外，在本发明方法中给药热激蛋白有时可减少 Th2 型抗体同种型、诸如 IgG1 和 IgE 的生成，和/或增加 Th1 型抗体同种型、诸如 IgG2a 或 IgG3 的生成。

在一个实施方案中，对如本文所述患病的哺乳动物给药热激蛋白优选可将哺乳动物血清中的 IgG1（其近似等价的人类同种型是 IgG4）的含量减少到约 0 - 约 100 国际单位/ml，优选减少到约 0 - 约 50 国际单位/ml，更优选减少到约 0 - 约 25 国际单位/ml，甚至更优选减少到约 0 - 约 20 国际单位/ml。IgG1 在哺乳动物血清中的浓度可以使用本领域技术人员已知的方法测量。特别是，IgG1 在哺乳动物血清中的浓度或在体外由哺乳动物的 B 细胞生成的 IgG1 的浓度可以通过例如使用在酶联免疫测定或放射免疫测定中与 IgG1 特异性结合的抗体来测量。

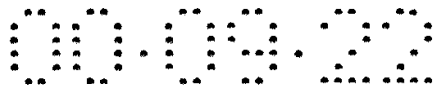


在又一个实施方案中，对如本文所述患病的哺乳动物给药热激蛋白可将哺乳动物血清中的 IgG2a（其近似等价的人类同种型是 IgG1、IgG2 或 IgG3）的含量增加到约 0 - 约 100 国际单位/ml，优选增加到约 10 - 约 50 国际单位/ml，更优选增加到约 15 - 约 25 国际单位/ml，甚至更优选增加到约 20 国际单位/ml。

如上所述，本发明的一个实施方案正是 T2 型免疫应答可与能用本发明的方法保护的疾病的以前已描述过的其他特征（例如嗜酸粒细胞增多和/或气道应答性过强）有关。例如，嗜酸粒细胞增多与细胞因子 IL-5 的生成有关，气道应答性过强可能与细胞因子 IL-4 的生成有关。在保护患有与炎症疾病有关的嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型免疫应答为特征的疾病的哺乳动物的方法的一个实施方案中，这样的疾病还可进一步与选自下列成员的细胞因子的生成增加有关：白介素-4 (IL-4)、白介素-5 (IL-5)、白介素-6 (IL-6)、白介素-9 (IL-9)、白介素-10 (IL-10)、白介素-13 (IL-13) 和白介素-15 (IL-15)。

按照本发明，可接受的给药热激蛋白的方案包括给药方式和意欲给予哺乳动物的热激蛋白的量，包括单独剂量大小、药剂数和给药频率。这类方案的确定可以由本领域技术人员来完成。合适的给药方式可包括但不限于：经口、经鼻、局部、吸入、经皮、直肠和非肠道途径。优选的非肠道途径可包括但不限于：皮下、皮内、静脉、肌内和腹膜内途径。优选的局部途径包括通过气雾剂（即喷雾）吸入、经鼻给药或应用于哺乳动物皮肤的局部表面。在一个优选的实施方案中，在本发明方法中所用的热激蛋白通过选自经鼻和吸入途径的途径给药。下文中详细讨论了编码热激蛋白的核酸分子的特别优选的给药方式。

如上所述，在本发明的方法中对哺乳动物给药热激蛋白可对哺乳动物产生一种或多种作用，这包括但不限于：减少嗜酸粒细胞增多（包括但不限于气道嗜酸粒细胞增多型炎症），减少气道应答性过强，诱导 T 细胞生成 IFN- γ ，和/或抑制 T 细胞生成 IL-4 和/或 IL-5。按照本发明的方法，给予哺乳动物的热激蛋白的有效量包括能减少气道应答性过强（AHR）、嗜酸粒细胞增多、减少气流受限和/或症状（例如：呼吸短促、喘鸣、呼吸困难、运动受限或夜间觉醒）、诱导 T 细胞生成 IFN- γ 、

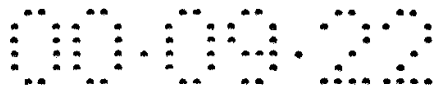


和/或抑制 T 细胞生成 IL-4 和/或 IL-5 但对哺乳动物没有毒性的量。对哺乳动物有毒性的量包括导致哺乳动物的结构或功能发生损害的任何量（即有毒的）。

5 给予哺乳动物的热激蛋白的合适的单次量，是当在合适的时期内给药一次或多次时，能保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型免疫应答为特征的疾病的剂量。特别是，热激蛋白的合适的单次量包含能改善由双倍剂量的刺激因素引起的 AHR 的量或能改善哺乳动物的静态呼吸功能的量。另外，热激蛋白的合适的单次量包含能将哺乳动物体内的嗜酸细胞数减少到
10 以前所述水平、能增加 Th1 型细胞因子（例如 IFN- γ ）的生成和/或抑制 Th2 型细胞因子（例如 IL-4 和 IL-5）的生成的剂量。

热激蛋白的单次量优选为约 $0.1\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ - 约 $10\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ 哺乳动物体重。热激蛋白的单次量更优选为约 $1\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ - 约 $10\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ 哺乳动物体重。热激蛋白的单次量甚至更优选为约 $1\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ - 约 $5\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$
15 哺乳动物体重。热激蛋白的单次量特别优选为约 $1\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ - 约 $1\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ 哺乳动物体重。在另一个实施方案中，如果热激蛋白通过气雾剂释放，则热激蛋白的单次量特别优选为约 $0.1\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ - 约 $5\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ 哺乳动物体重。如果热激蛋白非肠道释放，则热激蛋白的另一个特别优选的单次量是约 $0.1\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ - 约 $10\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ 哺乳动物体重。

20 在另一个实施方案中，本发明的热激蛋白可以与能增强热激蛋白保护哺乳动物免受以与炎症反应有关的嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型免疫应答为特征的疾病的能力的化合物同时或顺序给药。本发明还包括含有热激蛋白和至少一种保护哺乳动物免受涉及炎症的疾病的化合物的制剂。意欲与热激蛋白同时或顺序给药的合适
25 的化合物包括能调节 IgG1 或 IgE 生成（即，抑制白介素-4 诱导的 IgE 合成）、上调干扰素- γ 生成、调节 NK 细胞增殖和活化、调节淋巴因子激活的杀伤细胞（LA-K）、调节辅助 T 细胞活性、调节肥大细胞脱粒、保护感觉神经末梢、调节嗜酸细胞和/或胚细胞活性、防止或松弛平滑肌收缩、降低微血管渗透性或调制 Th1 和/或 Th2 T 细胞亚群分化的化
30 合物。意欲与热激蛋白同时或顺序给药的化合物优选包括但不限于任何抗炎剂。按照本发明，抗炎剂可以是本领域中已知的、具有抗炎性能的任何化合物，也可包括在某些情况下和/或通过与热激蛋白联合给



药而能提供抗炎作用的任何化合物。意欲与热激蛋白同时或顺序给药的抗炎剂优选包括但不限于：抗原、变应原、半抗原、促炎细胞因子拮抗剂（例如：抗细胞因子抗体、可溶性细胞因子受体）、促炎细胞因子受体拮抗剂（例如抗细胞因子受体抗体）、抗 CD23、抗 IgE、白三烯合成抑制剂、白三烯受体拮抗剂、糖皮质类固醇、类固醇化学衍生物、抗环加氧酶剂、抗胆碱能剂、 β -肾上腺素能兴奋剂、甲基黄嘌呤、抗组胺药、cromones、zyleuton、抗 CD4 试剂、抗 IL-5 试剂、表面活性剂、抗血栓烷试剂、抗 5-羟色胺试剂、酮替芬、cytoxin、环孢菌素、甲氧蝶呤、大环内酯类抗生素、肝素、低分子量抗生素及其混合物。

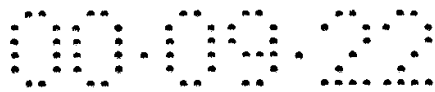
5 意欲与热激蛋白联合给药的化合物的选择可以由本领域技术人员根据哺乳动物的各种特性作出。特别是根据哺乳动物的遗传背景、炎症病史、呼吸困难、体检时的喘鸣、症状打分、物理征候（即呼吸速率）、运动耐力、使用援救药物（即支气管扩张药）和血液气体等。

意欲对哺乳动物给药的本发明的热激蛋白和/或制剂还可包括其他成分，如药学上可接受的赋形剂。例如，本发明的制剂可以配制成存在于要保护的哺乳动物能容许的赋形剂中。这类赋形剂的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲溶液、林格液、葡萄糖溶液、Hanks 液、含有聚乙二醇的生理平衡盐溶液和其他生理平衡盐水溶液、也可以使用不含水的载体，诸如不挥发油、芝麻油、油酸乙酯或三甘油酯。其他有用的制剂包括含有粘度增强剂、诸如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖的悬浮液。赋形剂还可含有较少量的添加剂，诸如增强等渗性和化学稳定性的物质或缓冲液。缓冲液的实例包括磷酸盐缓冲液、碳酸氢盐缓冲液和 Tris 缓冲液，而防腐剂的实例包括硫汞撒、间甲酚或邻甲酚、福尔马林和苯甲醇。标准制剂既可以是可注射液体，也可以是可溶解于适宜的液体中成为注射用悬浮液或溶液的固体。因此，在非液体制剂中，赋形剂可以包含葡萄糖、人血清白蛋白、防腐剂等，给药前向该制剂中加入无菌水或盐水。下文中详细描述了对于编码热激蛋白的核酸分子的给药来说特别有用的药学上可接受的赋形剂的实例。

15 20 25

在本发明的一个实施方案中，本发明的热激蛋白或制剂可包括能将本发明的热激蛋白或制剂缓慢释放到哺乳动物体内的控释组合物。本文中所述的控释组合物包含存在于控释载体中的本发明的热激蛋白或制剂。适宜的控释载体包括但不限于：生物相容性聚合物、其他聚

30



合物基质、胶囊、微胶囊、微粒、药团制剂、渗透泵、扩散装置、脂质体、脂质球、干燥粉末和经皮释放系统。本发明的其他控释组合物包括随着对哺乳动物给药而原位形成固体或凝胶的液体。优选的控释组合物是可生物降解的（即易受生物侵蚀的）。

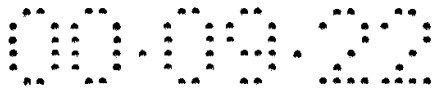
5 本发明的优选的控释组合物能将本发明的热激蛋白或制剂以恒定速率释放到哺乳动物的血液中并足以达到热激蛋白或该制剂的治疗剂量水平，从而在热激蛋白的毒性参数的基础上在数天到数月的时间内预防炎症。本发明的控释制剂能起到优选至少约 6 小时的保护作用，更优选至少约 24 小时的保护作用，甚至更优选至少约 7 天的保护作用。

10 本发明的另一个实施方案包含与涉及炎性反应的疾病有关的气道应答性过强和/或气流受限的指定治疗方法，该方法包括：（1）对哺乳动物给药热激蛋白；（2）测量哺乳动物为响应刺激因素而产生的肺功能的变化，以确定热激蛋白是否能够调制气道应答性过强和/或气流受限；和（3）基于肺功能的变化而指定一种有效减少炎症的药物疗法。在另一个实施方案中，该疾病是以气道嗜酸粒细胞增多为特征的。

15 肺功能的变化包括测量热激蛋白给药前后的静态呼吸功能。按照本发明，接受热激蛋白的哺乳动物已知具有涉及炎症的呼吸系统疾病。测量为响应刺激因素而产生的肺功能的变化可以使用本领域技术人员已知的各种技术来完成。这类刺激因素可包括直接和间接刺激物，并可包括前面所提到的任何一种刺激因素。特别是，肺功能的变化可以通过测定刺激因素接受者的 FEV_1 ， FEV_1/FVC ， PC_{20} 乙酰甲胆碱 FEV_1 ，后增强 h(Penh)，电导，动态顺应性，肺阻力 (R_L)，气道压力时间指数 (APTI) 和/或最高流量等来测量。测量肺功能变化的其他方法包括，

20 例如：气道阻力，动态顺应性，肺容量，最高流量，症状打分，物理征候（即呼吸速率），喘鸣，运动耐力，使用援救药物（即支气管扩张药）和血液气体。合适的有效减少哺乳动物炎症的药物疗法可以通过测定给药热激蛋白是否对哺乳动物的肺功能有作用和作用到何种程度来评估。如果肺功能的变化由给药热激蛋白引起，则该哺乳动物可以用热激蛋白进行治疗。根据肺功能变化的程度，可以对哺乳动物给药

25 其他化合物以增强对哺乳动物的治疗效果。如果给药热激蛋白未引起肺功能的变化或变化足够小，则该哺乳动物应当用热激蛋白的替代化

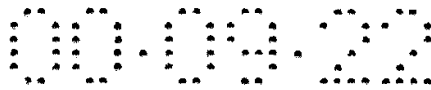


合物进行治疗。本发明的用于呼吸系统疾病的指定治疗方法还可包括对患者的其他特性进行评估，诸如患者的呼吸病史、感染剂的存在、患者的习惯（例如吸烟）、患者的工作和生活环境、变态反应、有生命危险的呼吸事件历史、疾病的严重程度、疾病的持续时间（即急性或慢性的）以及以前对其他药物和/或疗法的反应等。

5 本发明的另一个实施方案涉及保护哺乳动物免受由选自嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和 Th2 型免疫应答中的一种或多种特性确定的疾病的方法，其中所述特性与炎性反应有关。该方法包括对患有这种疾病的哺乳动物给药编码热激蛋白的核酸分子的步骤。然后，这种
10 编码热激蛋白的核酸分子可以通过哺乳动物体内的宿主细胞表达，分离的核酸分子释放到宿主细胞中。已表达的热激蛋白可以在其释放部位以本文前面所描述的关于本方法中有用的热激蛋白的相同方式起作用（即，保护哺乳动物免受以与炎性反应有关的嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 免疫应答为特征的疾病）。

15 按照本发明，核酸分子可包括 DNA、RNA、或 DNA 或 RNA 的衍生物。编码热激蛋白的核酸分子可以从其天然来源得到，既可以是整个（即完全）基因，也可以是其一部分，该部分能编码（当给予哺乳动物这种蛋白质和/或编码这种蛋白质的核酸分子时）能保护哺乳动物免受由选自嗜酸粒细胞增多、气道应答性过强和/或 Th2 型免疫应答等特征确定的疾病的热激蛋白。也可以利用重组 DNA 技术（例如聚合酶链式反
20 应(PCR)扩增，克隆）或化学合成来生产核酸分子。核酸分子包括天然核酸分子及其同系物，包括但不限于天然等位变体和修饰核酸分子（其中核苷酸已被插入、删除、取代和/或倒置，这些修饰方式不会实质上干扰核酸分子编码本发明方法中有用的热激蛋白的能力）。在一个实施
25 方案中，编码用于本发明的热激蛋白的核酸分子具有与天然产热激蛋白的核酸序列至少约 70% 相同、更优选至少约 80% 相同、甚至更优选至少约 90% 相同的核酸序列。分离或生物纯的核酸分子是已从其自然环境中移开的核酸分子。因此，“分离的”和“生物纯的”不需要反映核酸分子已纯化的程度。

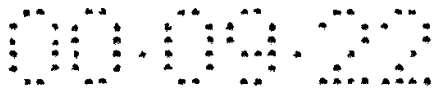
30 核酸分子同系物可以用本领域技术人员已知的许多方法生产（参见，例如：Sambrook 等，《分子克隆：实验室手册》，Cold Spring Harbor Labs Press, 1989 年）。例如，核酸分子可以用各种技术进行修饰，



所述技术包括但不限于经典诱变技术和重组 DNA 技术，诸如定点诱变、对核酸分子进行化学处理以诱导突变、核酸片段的限制酶切割、核酸片段的连接、聚合酶链式反应（PCR）扩增和/或核酸序列选定区域的诱变、寡核苷酸混合物的合成和混合基因连接而“建立”核酸分子的混合物及其结合物。核酸分子同系物可以通过对由该核酸分子编码的蛋白质的功能（例如热激蛋白活性，视情况而定）进行筛选而从修饰核酸的混合物中选择。对热激蛋白活性进行筛选的技术是本领域技术人员已知的。

尽管短语“核酸分子”主要是指物理核酸分子，短语“核酸序列”主要是指核酸分子上核苷酸的序列，但这两个短语可以互换使用，尤其是关于能编码热激蛋白的核酸分子或核酸序列。另外，短语“重组分子”主要是指与转录控制序列可操作相连的核酸分子，不过可以与短语“核酸分子”（对哺乳动物给药的）互换使用。

如上所述，编码用于本发明方法的热激蛋白的核酸分子可以与一个或多个转录控制序列可操作地相连而形成重组分子。短语“可操作地相连”是指核酸分子与转录控制序列以当该分子转染（即转化、转导或转染）到宿主细胞中时能被表达的方式相连。转录控制序列是控制转录起始、延伸和终止的序列。特别重要的转录控制序列是控制转录起始的那些，诸如启动子、增强子、操纵基因和阻抑物序列。合适的转录控制序列包括能在本发明的方法中用于热激蛋白表达、和/或用于在对哺乳动物给药的重组细胞中起作用的任何转录控制序列。各种各样的这类转录控制序列都是本领域技术人员已知的。优选的转录控制序列包括在哺乳动物、细菌或昆虫细胞中、特别是在哺乳动物细胞中起作用的那些。更优选的转录控制序列包括但不限于：猿猴病毒 40 (SV-40)、 β -肌动蛋白、逆转录病毒长末端重复序列 (LTR)、劳斯肉瘤病毒 (RSV)、巨细胞病毒 (CMV)、*tac*、*lac*、*trp*、*trc*、羟脯氨酸 (oxy-pro)、*omp/lpp*、*rrnb*、 λ 噬菌体（诸如 λ_{pL} 和 λ_{pR} 以及包括这些启动子的融合物）、T7 噬菌体、T7 *lac*、T3 噬菌体、SP6 噬菌体、SP01 噬菌体、金属硫蛋白、 α 交配因子、毕赤酵母醇氧化酶、甲病毒次基因组启动子（诸如新培斯病毒次基因组启动子）、杆状病毒、玉米夜蛾昆虫病毒、牛痘病毒和其他痘病毒、疱疹病毒和腺病毒转录控制序列，以及其他能控制真核细胞中基因表达的序列。其他合适的转录控制序



列包括组织特异性启动子和增强子（例如 T 细胞特异性增强子和启动子）。本发明的转录控制序列还可包括天然产的转录控制序列，这些序列与编码用于本发明方法的热激蛋白的基因天然相联。

5 本发明的重组分子（可以是 DNA 或 RNA）还可含有其他调节序列，诸如翻译调节序列、复制起点和与重组细胞匹配的其他调节序列。在一个实施方案中，本发明的重组分子还含有分泌信号（即信号段核酸序列），以使已表达的热激蛋白能从生成该蛋白质的细胞中分泌出来。合适的信号段包括：（1）细菌信号段，特别是热激蛋白信号段；或（2）能指导热激蛋白从细胞中分泌的任何异源信号段。优选的信号段包括
10 但不限于与前述任何一种热激蛋白天然相联的信号段。

本发明的一个或多个重组分子可以用于生产编码产物（即热激蛋白）。在一个实施方案中，编码产物是通过在有效生成蛋白质的条件下表达本发明的核酸分子而生成的。优选的生成编码蛋白质的方法是通过用具有编码热激蛋白的核酸序列的一个或多个重组分子转染宿主细胞而形成重组细胞。合适的用于转染的宿主细胞包括能被转染的任何
15 细胞。宿主细胞既可以是未转染的细胞，也可以是已用至少一个核酸分子转化的细胞。用于本发明的宿主细胞可以是能生成热激蛋白的任何细胞，包括细菌、真菌、哺乳动物和昆虫细胞。优选的宿主细胞包括哺乳动物细胞。更优选的宿主细胞包括哺乳动物淋巴细胞、肌细胞、
20 造血前体细胞、肥大细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、上皮细胞、内皮细胞、树状细胞、间质细胞、嗜酸细胞、肺细胞和角质细胞。

按照本发明，宿主细胞可以在体内转染（即通过将核酸分子释放到哺乳动物体内）、来自体内转染（即再引入到哺乳动物体内的该哺乳
25 动物的外部，诸如通过将核酸分子引入到组织培养物中的已从哺乳动物体内移出的细胞中，接着将该细胞再引入到该哺乳动物体内）；或在体外转染（即哺乳动物的外部，诸如在用于生产重组热激蛋白的组织培养物中）。将核酸分子转染到宿主细胞中可以利用将核酸分子插入到细胞中的任何方法来完成。转染技术包括但不限于：转染、电穿孔、显微注射、脂转染、吸附和原生质体融合。优选的体内转染宿主细胞
30 的方法包括脂转染和吸附。本发明的重组细胞包含已用编码热激蛋白的核酸分子转染的宿主细胞。本领域技术人员可以领会：使用重组 DNA

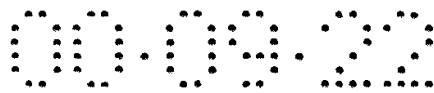
技术，通过操纵例如宿主细胞中核酸分子的拷贝数目、这些核酸分子被转录的效率、所得转录物被翻译的效率和翻译后修饰的效率，可提高已转染核酸分子的表达。用于增加编码热激蛋白的核酸分子的表达的重组技术包括但不限于：核酸分子与高拷贝数目的质粒可操作地相
5 连、核酸分子整合到一个或多个宿主细胞染色体中、向质粒中加入载体稳定性序列、转录控制信号（例如启动子、操纵基因、增强子）的取代或修饰、翻译控制信号（例如核糖体结合位点、核糖体结合顺序）的取代或修饰、与宿主细胞的密码子选择相对应的核酸分子的修饰、使转录不稳定的序列的缺失。已表达的重组热激蛋白的活性可以通过
10 分割、修饰或衍生化编码该蛋白质的核酸分子而提高。

按照本发明，在一个实施方案中，编码热激蛋白的核酸分子可以与药学上可接受的赋形剂一起给药。药学上可接受的赋形剂可包括但不限于：生理平衡水溶液、人造含脂质物质、天然含脂质物质、油、
15 酯、乙二醇、病毒、金属颗粒或阳离子分子。特别优选的用于给药编码热激蛋白的核酸分子的赋形剂包括脂质体、胶粒、细胞和细胞膜。

要在本发明的方法中给药的重组核酸分子包括：（a）用于本发明方法中的存在于非导向载体中的重组分子（例如，“裸”DNA分子，诸如在Wolff等，1990年，《科学》247期，1465-1468页中讲到的）；
20 和（b）与本发明的释放载体复合的本发明的重组分子。用于局部给药的合适的释放载体包括脂质体。用于局部给药的释放载体可进一步包含将载体导向特定部位的配体（如本文中的详细描述）。优选的是，编码热激蛋白的核酸分子通过下列方法给药，所述方法包括：皮内注射、肌肉注射、静脉注射、皮下注射或来自体内给药。

在一个实施方案中，用于本发明方法的重组核酸分子直接注射到
25 患者的肌细胞内，这导致该重组分子延长表达（例如数周至数月）。优选的是，该重组分子为“裸DNA”的形式并通过直接注射到患者的肌细胞中给药。

能导向的药学上可接受的赋形剂在本文中称之为“释放载体”。本发明的释放载体能将制剂、包括热激蛋白和/或编码热激蛋白的核酸分子
30 释放到哺乳动物体内的目标部位。“目标部位”是指哺乳动物体内的想要释放治疗制剂的部位。例如，目标部位可以是肺细胞、抗原呈递细胞或淋巴细胞，通过直接注射或使用脂质体或其他释放载体释放而



对准它们。释放载体的实例包括但不限于人造和天然含脂质释放载体。天然含脂质释放载体包括细胞和细胞膜。人造含脂质释放载体包括脂质体和胶粒。本发明的释放载体可以进行修饰以对准哺乳动物体内的特定部位，由此导向并在该部位使用核酸分子。合适的修饰包括

5 操纵该释放载体脂质部分的化学式和/或将能够将释放载体特异性导向优选部位的化合物、例如优选的细胞型引入到该载体中。特异性导向是指通过载体中的化合物与细胞表面上的分子的相互作用而使该释放载体结合到特定细胞上。合适的导向化合物包括能在特定部位选择性（即特异性）结合另一个分子的配体。这类配体的实例包括抗体、

10 抗原、受体和受体配体。例如，在肺细胞表面上发现的抗原特异性抗体可以引入到脂质体释放载体的外表面，使得该释放载体对准肺细胞。操纵释放载体脂质部分的化学式可以调制释放载体的细胞外或细胞内定向。例如，可以将化合物加入到脂质体的脂质中，改变该脂质体脂质双层的电荷，使得该脂质体与具有特定电荷特性的特定细胞融

15 合。

本发明的优选释放载体是脂质体。脂质体能在哺乳动物体内足够长时间地保持稳定，以将本发明中所述的核酸分子释放到哺乳动物体内的优选部位。本发明的脂质体已给药到哺乳动物体内后最好稳定至少约 30 分钟。更优选稳定至少约 1 小时，甚至更优选稳定至少约 24

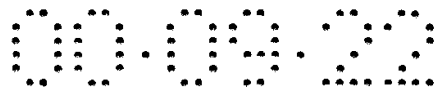
20 小时。

本发明的脂质体包含能将本发明中所述的核酸分子导向哺乳动物体内的特定或选定部位的脂质组合物。优选的是，该脂质体的脂质组合物能导向哺乳动物的任何器官，更优选导向哺乳动物的肺、脾、淋巴结和皮肤，甚至更优选导向哺乳动物的肺脏。

25 本发明的脂质体包含能与靶向细胞的质粒膜融合而将核酸分子释放到细胞中的脂质组合物。优选的是，本发明脂质体的转染效率为约 0.5 微克 (μg) DNA/16 纳摩尔 (nmol) 已释放到约 10^6 细胞中的脂质体，更优选为约 1.0 μg DNA/16nmol 已释放到约 10^6 细胞中的脂质体，甚至更优选约 2.0 μg DNA/16nmol 已释放到约 10^6 细胞中的脂质体。本发明的

30 优选脂质体的直径在约 100 - 500 纳米 (nm) 之间，更优选在约 150 - 450nm 之间，甚至更优选在约 200 - 400nm 之间。

合适的用于本发明的脂质体包括任何脂质体。本发明的优选脂质



体包括在例如本领域技术人员已知的基因释放方法中一般性使用的那些脂质体。更优选的脂质体包含具有多阳离子脂质组合物的脂质体和/或具有与聚乙二醇结合的胆固醇主链的脂质体。

脂质体与本发明核酸分子的复合可以用本领域中的标准方法完成（参见例如实施例中描述的方法）。本发明核酸分子加入到脂质体中的适宜浓度包括能有效释放足量核酸分子到细胞中，使得该细胞可以所需方式生产足够超级抗原和/或细胞因子蛋白质来调节效应细胞免疫的浓度。优选的是，约 0.1 μ g-约 10 μ g 的本发明的核酸分子与约 8nmol 脂质体结合，更优选约 0.5 μ g-约 5 μ g 核酸分子与约 8nmol 脂质体结合，甚至更优选约 1.0 μ g 核酸分子与约 8nmol 脂质体结合。

另一个优选释放载体包含重组病毒颗粒疫苗。本发明的重组病毒颗粒疫苗包括用于本发明方法的重组核酸分子，其中重组分子包装在病毒外壳中，这容许 DNA 进入细胞，使 DNA 在该细胞中表达。有许多重组病毒颗粒可以使用，包括但不限于基于甲病毒、痘病毒、腺病毒、疱疹病毒、沙粒病毒和逆转录病毒的那些。

下列实施例是为了说明本发明而不打算限制本发明的范围。

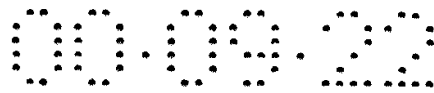
实施例

实施例 1

下列实施例证明：对于气道应答性过强的小鼠模型，在用存在于明矾中的卵白蛋白短期致敏后，分枝杆菌热激蛋白 65 (HSP-65) 上调了 T 细胞增殖反应。

疾病的动物模型是非常宝贵的，它可提供证据来支持假设或证明人类实验的正确性。小鼠具有许多蛋白质，这些蛋白质与相应的人类蛋白质的同源性大于 90%。对于下列实验来说，本发明人使用了抗原驱动小鼠系统，其特征在于免疫 (IgE) 反应、对 Th2 型应答的依赖和嗜酸细胞反应。该模型的特征在于显著的气道应答性过强和其进展。

慢性需氧抗原接触的通用小鼠系统（与深度嗜酸粒细胞增多和显著、持久而进行性的气道应答性过强有关）的开发提供了一个空前的机会来研究用于预防或治疗呼吸炎症和/或与嗜酸粒细胞增多和 Th2 型免疫应答有关的炎症的潜在治疗组合物（即治疗制剂）。本文所述小鼠系统的特征在于显著的嗜酸粒细胞增多，接着是气道纤维变性和胶



原沉积。本发明人已利用该小鼠系统表明：给药分枝杆菌热激蛋白-65 (HSP-65) 有效地消除了致敏小鼠的气道应答性过强和嗜酸粒细胞增多。

5 从 Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) 得到 8-12 周龄的雌性 BALB/c 小鼠。小鼠在无病原菌的条件下饲养并维持无卵白蛋白 (OA) 的饮食。下列实施例中所述的实验用 8-12 周龄的、年龄和性别匹配的各组动物进行。

为了确定分枝杆菌 HSP-65 是否有助于对抗原致敏的免疫应答，研究体外分枝杆菌 HSP-65 对来自 OA 致敏小鼠的 T 细胞反应的作用。

10 在该实验中，小鼠通过腹膜内 (i. p.) 注射存在于 100 μ l PBS (磷酸缓冲盐水) 中的 20 μ g 卵白蛋白 (OA) (Grade V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 和 20mg 明矾 (Al (OH)₃) (注射明矾; Pierce, Rockford, IL)、或者只注射 PBS 使其致敏。OA 注射后，小鼠立即静脉 (i. v.) 接受存在于 PBS 中的 100 μ l 100 μ g 麻风分枝杆菌热激蛋白-65 (分枝杆菌
15 HSP-65) (由 Dr. Kathleen Lukacs, National Heart & Lung Institute, London 提供)，或者只接受 PBS。7 天后，将小鼠处死，取出脾并置于无菌 PBS 中。用脾制备单细胞悬浮液，单核细胞通过密度梯度离心而纯化。这些细胞在 96 孔圆底组织培养板中以 2×10^6 /ml 的密度培养，细胞一式三份用单独的培养基 (培养基：含有热灭活胎牛血清 (10%)
20 的 RPMI 1640; L-谷酰胺 (2 mM); 2-巯基乙醇 (5 mM); HEPES 缓冲液 (15 mM); 青霉素 (100 U/ml); 链霉素 (100 μ g/ml); 所有成分来自 GIBCO/BRL) 温育、用 100 μ g/ml 卵白蛋白 (OA) 温育、或者用佛波醇 12, 13-二丁酸酯 (10 nM) 和伊屋诺霉素 (0.5 μ gM) 的混合物温育 48 小时。通过测量 (H^3)-胸苷的细胞摄取情况来评定细胞增殖。收获无细胞
25 的上清液并在 -20 $^{\circ}$ C 下储存，直至用于细胞因子 ELISA 测定。

利用 ELISA 测定分泌到单核细胞培养物上清液中的细胞因子的含量。简言之，96 孔培养板 (Immulon) 用初级抗细胞因子捕捉抗体 (1 μ g/ml) 覆盖过夜 (4 $^{\circ}$ C)。从 Pharmingen (San Diego, CA) 获得纯化大鼠抗小鼠 IL-4、IL-5 和 IFN- γ 。然后培养板用 PBS/吐温 20
30 (Fisher) 洗涤三次并用 PBS/10% FCS 封闭过夜。洗涤后，向各孔中加入 100 μ l 细胞培养物上清液样品。按稀释倍数 0.33 制备系列稀释的标准物。在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜后，洗涤培养板并加入 1 μ g/ml 的与生物素



缀合的抗细胞因子抗体 (Pharmlngen)。培养板温育过夜,接着洗涤 6 次,再加入抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物 (Sigma St. Louis, MO) 和底物并在室温下温育。显现出绿色并用分光光度计 (Biorad 2550, Japan) 在 410nm 波长处读取数据。利用标准曲线计算每个培养板中的
5 细胞因子数。检出的界限是: IL-4 和 IL-5 为 5pg/ml, IFN- γ 为 3pg/ml。使用重组小鼠 IL-4 (pharmlngen)、IL-5 (pharmlngen) 和重组鼠 IFN- γ (Genentech, San Francisco, CA) 作为标准物。

为了确定抗体含量, ELISA 板 (Dynatech, Chantilly, VA) 用 OA (20 μ g/ml, NaHCO₃ 缓冲液, pH9.6) 包被, 或者用多克隆山羊抗小鼠
10 IgE 3 μ g/ml (The Binding Site Ltd., San Diego, CA) 包被, 并在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜。培养板用 0.2% 明胶缓冲液 (pH8.2) 在 37 $^{\circ}$ C 下封闭 2 小时。在本发明人的实验室中利用 Oshiba 等 1996 年在《临床研究杂志》97: 1398-1408 页中描述的方法 (该文献全文引用在此作为参考) 生
15 产含有 OA 特异性 IgE 和 IgG 的标准物。ELISA 数据利用 Macintosh 计算机用的“微量培养板管理软件程序” (BioRad Labs, Richmond, VA) 进行分析。

本申请所有附图中的数据均表示为均值 \pm SEM。非参数方差分析 (Kruskal-Wallis 法) 用于确定各组间的显著性差异。如果有显著性
20 差异, 则用 Mann-Whitney U 检验分析单个两组间的差异。在多重对比的情况下, 使用 Bonferroni 校正。p 值小于 0.05 被认为是显著的。为了确定变量间的关系, 进行回归分析。数据用 MINITAB 标准统计程序包 (Minitab Inc., State College, PA, USA) 进行分析。

图 1 显示: 致敏小鼠用分枝杆菌 HSP-65 免疫接种显著地上调了仅含有培养基或含有 OA 的培养物中脾细胞的增殖反应 (p<0.05; n=6)。
25 在分枝杆菌 HSP-65 处理的小鼠中, 非特异性增殖反应和卵白蛋白特异性增殖反应都被上调了。在来自用分枝杆菌 HSP-65 处理小鼠的培养物上清液中, IL-4、IL-5 和 IFN- γ 含量以及免疫球蛋白含量也被上调了, 但是在来自 PBS 处理小鼠的培养物中未被调节 (未显示)。总之, 这些数据
30 显示: 用 OA 致敏 7 天后, 已用分枝杆菌 HSP-65 免疫接种的小鼠, 其 OA 依赖性免疫过程增强了, 而只用 PBS 免疫接种的小鼠则没有。

实施例 2

下列实施例证明: 在变应性致敏的小鼠模型用卵白蛋白经气雾剂

刺激而次最佳致敏后，分枝杆菌 HSP-65 上调了 T 细胞增殖反应。

既然小鼠 i. p. 致敏后用分枝杆菌 HSP-65 免疫接种增强了 T 细胞对 OA 的反应（实施例 1），就会提出这样一个问题：在抗原特异性 T 细胞反应通常不会被检测出来的条件下（即，用卵白蛋白次最佳致敏），分枝杆菌 HSP-65 是否将上调反应。另外，设计下列实验来检测分枝杆菌 HSP-65 短期处理将怎样影响气道反应（支气管肺泡灌洗（BAL）细胞构成和气道对乙酰甲胆碱刺激的反应）。

小鼠在第 1、2、3 和 6 天时接触 OA 气雾剂（1%）（次最佳方案），并在第 1 天和第 6 天时静脉注射 100 μ g 分枝杆菌 HSP-65 或 PBS。应注意：在最佳小鼠模型方案中，免疫接种和随后的抗原（OA）刺激都是观察小鼠反应所必需的。第 7 天时，测量气道对乙酰甲胆碱（MCh）的反应，分析支气管肺泡灌洗（BAL）样品的细胞含量，取出脾和支气管周淋巴结（PBLN）用于研究增殖反应。

用以前描述过的方法的改进方法，用大鼠和小鼠来评定支气管应答性，评定为气道用雾化乙酰甲胆碱经气道刺激后其功能的变化（参见 Haczku 等，1995 年，《免疫学》85: 598-603；和 Martin 等，1988 年，《应用生理学杂志》64: 2318-2323；这两篇文献的内容均全文引用在此作为参考）。简言之，小鼠腹膜内注射戊巴比妥钠（70-90mg/kg）麻醉。不锈钢 18G 管作为气管造口术插管插入并通过容纳小鼠的有机玻璃室中的一个孔。一个四通连接管与该气管造口术管连接，有两个端口与换气设备（683 型，Harvard Apparatus, South Natwick, MA）的吸气和呼气侧相连。换气速率为 160 次/分钟，潮流气量 0.15ml，正端呼气压力为 2-4cm H₂O。有机玻璃室与填充了铜丝网的 1.0 升玻璃瓶相连，以稳定热漂移的容积信号。

跨肺压估计为 P_{A0} ，参照利用压差传感器（Validyne MP-45-1-871 型，Validyne Engineering Corp., Northridge, CA）得到的体积描述计中的压力。肺容量的变化通过利用第二个压差传感器检测体积描述室中相对于参比盒中压力的变化来测量。这两个传感器和放大器电子定相到从 1 至 30Hz 时小于 5 度，然后利用 16 比特模拟-数字宽型 NB-MIO-16X-18 仪器（National Instruments Corp., Austin, TX）在 600 比特/秒/频道下将模拟信号转换为数字信号。将数字化信号输入 Macintosh Quadra 800 计算机（M1206 型，Apple Computer, Inc.,

Cupertino, CA)并用实时计算机程序 LabVIEW(National Instruments Corp., Austin, TX) 进行分析。利用容积信号的差异确定流量, 顺应性计算为吸气期和呼气期的零流量点时的容积变化除以压力变化。平均顺应性计算为每次呼吸的吸气和呼气顺应性的算术均数。按照

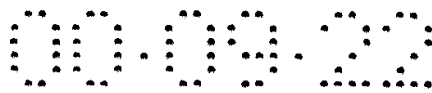
- 5 Amdur 等(《美国生理学杂志》第 192 卷, 1958 年, 364-368 页)的方法, LabVIEW 计算机程序使用压力、流量、容积和平均顺应性继续计算出肺阻力 (R_L) 和动态顺应性 (C_{dyn})。将 R_L 、顺应性、电导和特定顺应性等连续呼吸结果列表显示, 所报告的值是在对每种剂量的最高应答下至少 10-20 次呼吸的平均值。应当注意: 测量小鼠的 R_L 值, 与
10 测量人的 FEV_1 和/或 FEV_1/FVC 比值类似, 可以用于诊断气流阻塞。

- 雾化支气管收缩剂经置于换气设备的呼气口和四通连接管之间的超声雾化器通过旁路管给药。雾化药剂以 0.5ml 潮气流量的 10 秒钟。给予一剂吸入 PBS 后的 R_L 值作为基线。从接触盐水后的 3 分钟开始, 通过吸入(呼吸 10 次)给予递增浓度的乙酰甲胆碱, 起始浓度设定为 0.4mg/ml。递增浓度间隔 5-7 分钟给药。在每个乙酰甲胆碱浓度
15 之间使用过度膨胀两倍的潮气流量, 通过人工封闭换气设备的流出来完成, 目的是反转任何剩余的肺膨胀不全并确保刺激前的恒定容积史。从每次气雾剂刺激后的 20 秒直至三分钟, 连续采集 R_L 和 C_{dyn} 数据, 用 R_L 和 C_{dyn} 最大值来表示鼠气道功能的变化。

- 20 测量完肺功能参数后, 肺用 1ml 0.9%(wt/vol) 无菌 NaCl 等分试样(室温)通过与气管插管相连的聚乙烯注射器进行灌洗。将灌洗液离心(4°C 下, 500 × g, 10 分钟), 细胞颗粒再悬浮于 0.5ml RPMI 组织培养基中。将每份 BAL 样品的无细胞上清液储存在 -20°C 下, 用于随后的细胞因子 ELISA 分析(如实施例 1 中所述)。

- 25 如实施例 1 中所述, 利用增殖测定分析 PBLN 和脾细胞。图 2 显示, 即使是在用 OA 次最佳致敏后, 分枝杆菌 HSP-65 处理仍显著地上调了脾细胞(图 2A)和支气管周淋巴结(PBLN)细胞(图 2B)对 OA 的 T 细胞增殖反应, 特别是来自局部引流 PBLN 的细胞($p < 0.05$; ANOVA)。在 BAL 中没有发现细胞变化, 尽管在用分枝杆菌 HSP-65 处理的组中对
30 乙酰甲胆碱的肺阻力 (R_L) 升高了(未显示)。

这些数据表明, 即使用 OA 次最佳致敏后, 分枝杆菌 HSP-65 仍上调了抗原特异性免疫应答。并且, 如果分枝杆菌 HSP-65 在肺功能测量



前 24 小时给药，还会影响气道的乙酰甲胆碱应答性。

实施例 3

以下实施例证明，在气道应答性过强的小鼠模型用存在于明矾中的卵白蛋白最佳致敏并刺激后，分枝杆菌 HSP-65 上调了 T 细胞增殖反

5 应。

在本文中所用的气道应答性过强和变应性致敏的小鼠模型中，已确定全身性致敏和局部气道刺激导致与气道的嗜酸细胞增多性炎症有关的气道应答性过强 (AHR)，而这是人气喘的主要特征 (参见，例如 Bentley 等, 1992 年, 《美国呼吸系统疾病评论》146: 500-506; Houston 等, 1953 年, 《胸腔》8: 207-213; 或 Dunhill 等, 1960 年, 《临床病理学杂志》13: 27-33; 这些出版物全文引用在此作为参考)。为了调查分枝杆菌 HSP-65 处理对气道的这些病理学变化的作用, 在第 1 天和第 14 天时, 小鼠腹膜内给药存在于 100 μ l PBS (磷酸盐缓冲溶液) 中的 20 μ g OA (V 级, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 和 20mg 明

10 矾 ($Al(OH)_3$) (注射明矾; Pierce, Rockford, IL) 致敏, 或仅注射 PBS 致敏。之后, 在第 24、25 和 26 天时, 小鼠用 1% OA/PBS 溶液进行 OA 气雾剂刺激 20 分钟。当嗜酸细胞增多性炎症和气道反应推定达到最高值时, 将小鼠处死并研究 48 小时。

如实施例 1 中所述, 将来自用 OA 致敏并刺激的小鼠的脾单核细胞

20 纯化、培养, 评定对 OA 的增殖反应。图 3 显示, 来自用 OA 致敏和刺激的小鼠 (仅用 PBS 免疫接种) 的单核细胞显示出明显的对 OA 的增殖反应 (参见图 3, PBS 组)。另外, 在 OA 的存在下以及在单独的培养基中, 来自用 OA 致敏和刺激的、用分枝杆菌 HSP-65 处理过的小鼠的单核细胞的增殖 (参见图 3, HSP 组) 显著增强了。

25 这些结果表明, 来自用分枝杆菌 HSP-65 处理小鼠的单核细胞在体内激活并将在体外显示出抗原特异性和非特异性增殖。

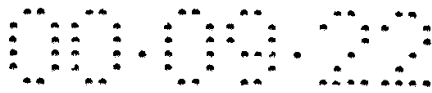
实施例 4

以下实施例证明: 在气道应答性过强的小鼠模型用存在于明矾中的卵白蛋白最佳致敏并刺激后, 分枝杆菌 HSP-65 上调了 Th1 相关细胞

30 因子和抗体同种型的产生, 并向下调节了 Th2 相关细胞因子的产生。

变应性气喘的特征在于高 IgE 含量、嗜酸粒细胞增多性气道炎症和

气道应答性过强。T 细胞在该疾病中起主要作用, 随着对变应原的



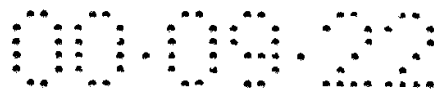
识别，它们能产生大量细胞因子亚群，本领域中统称为 Th2 型细胞因子。在 Th2 细胞因子中，IL-4 在诱导 IgE 生成中具有独特作用，而 IL-5 在组织嗜酸粒细胞增多的进程中是必需的。虽然 Th1 型细胞因子的产生通常将是 T 细胞激活的结果，Th2 细胞因子的合成需要特定条件，
5 但它们的性质和有效性是含糊的。不受理论的束缚，本发明人相信：变应性炎症可反映 Th2 对 Th1 型细胞因子产生的病理学失衡，并且，对普通环境抗原的这些反应可能是由于调节机能不全，正常的话将会对它们进行抑制调节。目前描述的气道应答性过强的鼠模型提供了一个理想系统，其中要确定给药热激蛋白是否能调节在该模型中观察到的
10 的占优势的 Th2 型免疫诱导。

来自实施例 3 中所述的分枝杆菌 HSP-65 处理和 PBS 处理小鼠的脾单核细胞培养 48 小时。收获培养物上清液并如实施例 1 中所述利用 ELISA 分析细胞因子释放情况。图 4 说明，当与来自 PBS 处理小鼠的细胞对比时 ($p < 0.05$, $n=6$)，在佛波酯/伊屋诺霉素 (PI) 刺激的培养物
15 中，来自分枝杆菌 HSP-65 处理小鼠的脾细胞产生了显著增加量的 IFN- γ (图 4A)，而在 OA 刺激的培养物中则没有。同时，从分枝杆菌 HSP-65 处理小鼠中分离的脾细胞与从 PBS 处理小鼠中分离的脾细胞相比，在 PI 刺激和 OA 刺激的培养物中，IL-4 (图 4B) 和 IL-5 (图 4C) 的产生被向下调节了，这提示分枝杆菌 HSP-65 处理对体外 T 细胞的细
20 胞因子产生可能有调节作用。

为了评定免疫球蛋白的产生，将从如实施例 3 中所述经过处理的小鼠分离得到的脾单核细胞在不同浓度的 OA (列于图 5 的 X 轴) 存在下培养 14 天。收集上清液，如实施例 1 中所述利用 ELISA 分析 OA 特异性免疫球蛋白释放情况。图 5 显示，与来自 PBS 处理小鼠的细胞相比，来自用分枝杆菌 HSP-65 处理小鼠的细胞的 OA 特异性 IgG2a 的产
25 生 (图 5A) 显著增加了 ($p < 0.05$; $n=6$)。在分枝杆菌 HSP-65 处理小鼠中，OA 特异性 IgG1 (图 5B) 和 IgE (图 5C) 的体外产生似乎比 PBS 处理小鼠稍有下降，尽管这些结果不是决定性的。

这些数据表明，小鼠用分枝杆菌 HSP-65 免疫接种调节了 T 细胞和
30 B 细胞的功能，并且，分枝杆菌 HSP-65 可以将炎症免疫应答从 Th2 型向 Th1 型免疫应答调制。

实施例 5



以下实施例证明：在气道应答性过强的小鼠模型中，分枝杆菌 HSP-65 消除了由卵白蛋白致敏和刺激诱导的嗜酸粒细胞增多性气道炎症。

5 气道的变应性致敏与以嗜酸细胞占优势的大规模炎症有关。为了确定变应性致敏后分枝杆菌 HSP-65 对嗜酸粒细胞增多性气道炎症的作用，评定如实施例 3 中所述经过处理的各组小鼠的 BAL 的细胞含量。如上述实施例 2 中所述，支气管肺泡灌洗在最后一次 OA 气雾剂刺激后进行 48 小时。将 BAL 细胞再悬浮于 RPMI 并用血细胞计数器计数。如前所述（参见 Haczku 等，同上），不同细胞数由 cytopsin 制剂得到。10 利用标准形态学将细胞区分为巨噬细胞、嗜酸细胞、嗜中性白细胞和淋巴细胞的百分比和绝对数。

图 6 显示，用 OA 致敏并与 OA 接触和用 PBS 处理的小鼠（作为气道应答性过强的正常对照）显示出明显的气道炎症（黑条；n=8）。在 15 BAL 中，所有细胞的大约 60% 由嗜酸细胞组成，而嗜中性白细胞数也显著增加了。与单独的 OA 气雾剂接触 3 天的幼稚小鼠（白条；n=8），其 BAL 样品中没有嗜酸细胞。令人惊奇的是，在用分枝杆菌 HSP-65 处理的动物中没有检测到嗜酸粒细胞增多（阴影条；n=8），并且这些小鼠的细胞含量实际上与对照幼稚小鼠的相等。PBS 处理动物和 HSP-20 65 处理动物之间 BAL 细胞含量的差异在嗜酸细胞数（ $p < 0.001$ ）和嗜中性白细胞数（ $p < 0.001$ ）两方面都是显著的。

这些结果表明，用 OA 致敏并与 OA 接触后，分枝杆菌 HSP-65 消除了嗜酸粒细胞增多性气道炎症。

实施例 6

25 以下实施例证明：在气道应答性过强的小鼠模型中，小鼠用卵白蛋白致敏和刺激后，分枝杆菌 HSP-65 消除了气道对乙酰甲胆碱的应答性过强。

在该实验中，支气管应答性评定为用雾化乙酰甲胆碱经气道刺激后气道功能的变化。将如实施例 3 中所述用分枝杆菌 HSP-65 或 PBS 处 30 理过的小鼠在最后一次抗原刺激后麻醉 48 小时，并如实施例 2 中所述插管和换气。幼稚小鼠进行测量前 48 小时接受喷雾 3 天。仍如实施例 2 中所述，测量跨肺压、肺容量和流量，并继续计算肺阻力（ R_L ）。

图 7 说明：用 OA 致敏和刺激并用 PBS i. p. 处理的小鼠（作为气道应答性过强的正常对照），与幼稚小鼠（圆圈）相比，其对于乙酰甲胆碱刺激的肺阻力（ R_L ）（三角）显著升高了。用 OA 致敏和刺激并用分枝杆菌 HSP-65 处理的小鼠显示出正常的乙酰甲胆碱应答性（方块）（即，几乎与幼稚小鼠的相等），且显著小于用 PBS 处理的小鼠（ $p < 0.001$ ），这指示：对于用 OA 致敏并与 OA 接触的小鼠，分枝杆菌 HSP-65 处理消除了气道应答性过强。

总之，在上述实验中，来自用分枝杆菌 HSP-65 处理过的致敏小鼠的单核细胞经过体外培养后，研究了 OA 特异性免疫应答。通过研究对乙酰甲胆碱（MCh）的肺阻力来测量体内气道应答性。还评定了气道炎症和肺组织嗜酸粒细胞增多。在分枝杆菌 HSP-65 处理的小鼠中，OA 特异性 T 细胞增殖明显被上调了，而脾细胞培养物的上清液含有明显增加的 IFN- γ 和 IgG2a。令人惊奇的是，在 OA 致敏和刺激的小鼠中显现出的严重气道嗜酸粒细胞增多和对乙酰甲胆碱的应答性升高，在还接受了体内分枝杆菌 HSP-65 给药的小鼠中被消除了。

虽然已详细描述了本发明的各种实施方案，但对那些实施方案进行改进和改良对于本领域技术人员来说是显而易见的。不过，应清楚地理解，这种改进和改良都在本发明的范围内，正如以下的权利要求书中所述。

说明书附图

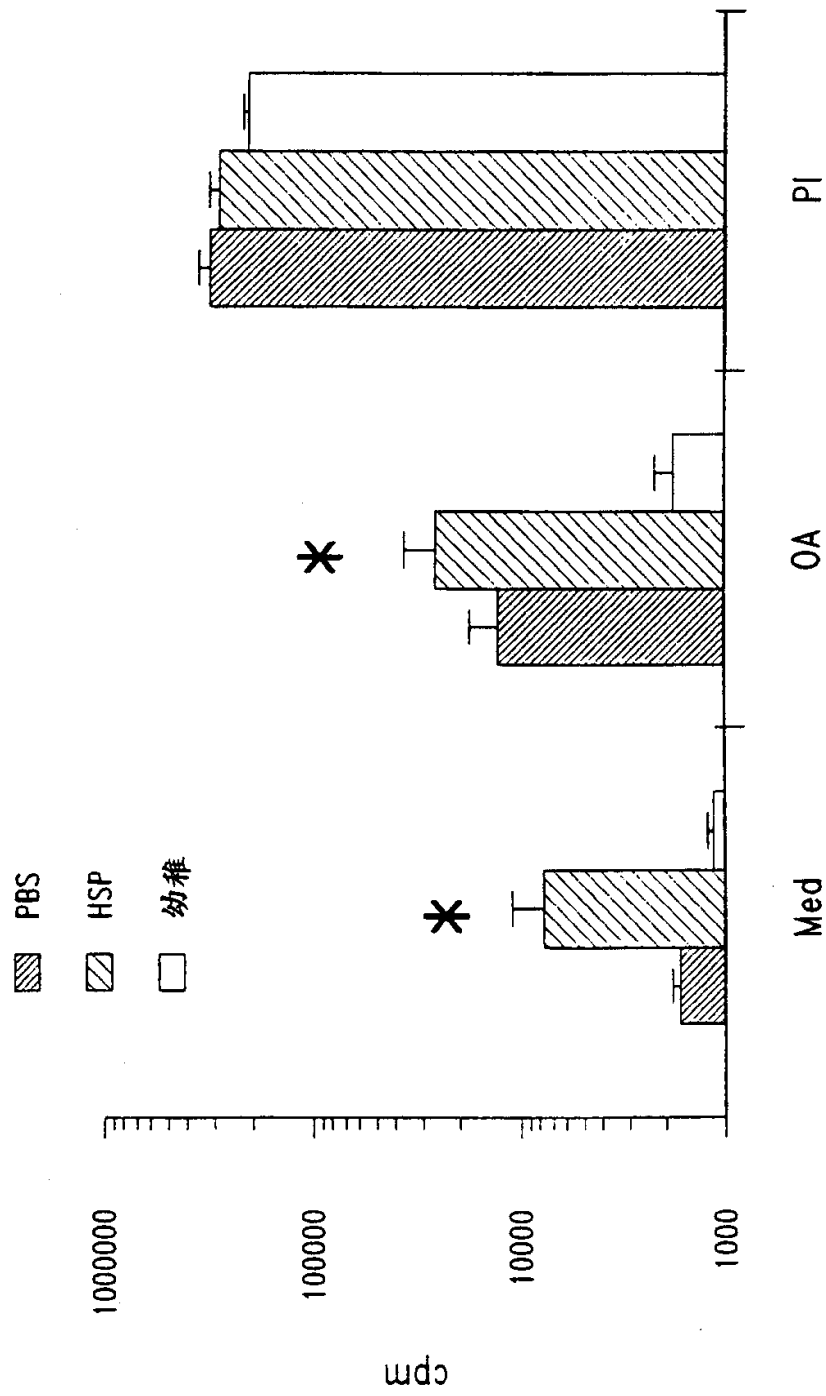
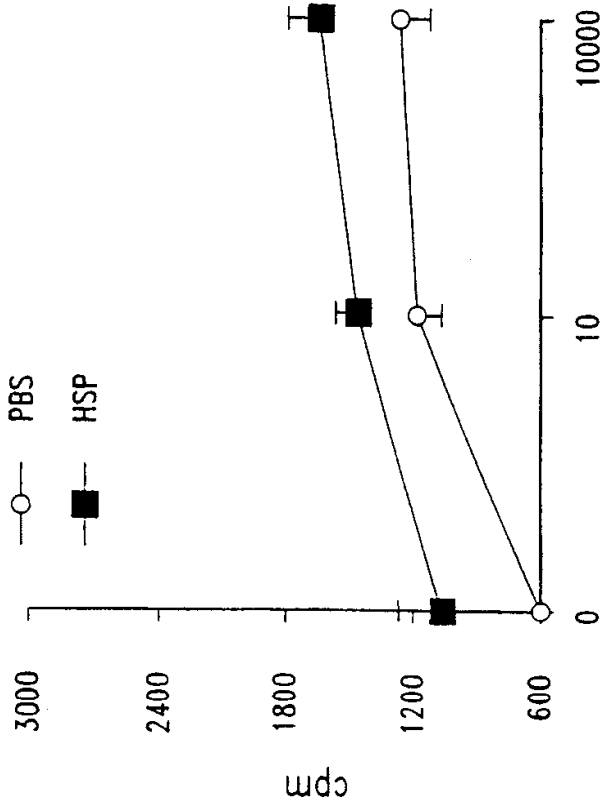


图 1

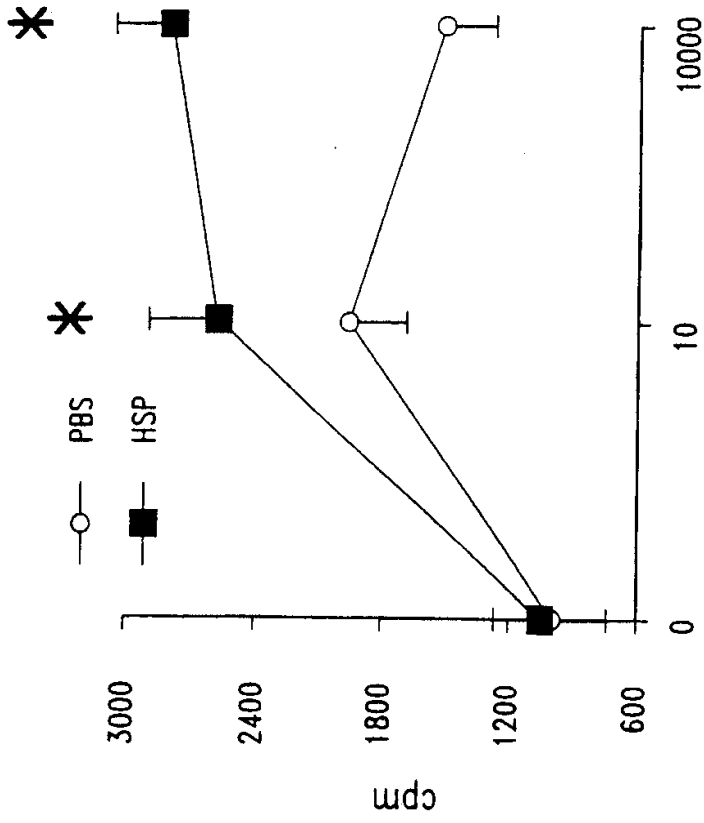
脾细胞



卵白蛋白 (ng/ml)

图 2A

PBLN 细胞



卵白蛋白 (ng/ml)

图 2B

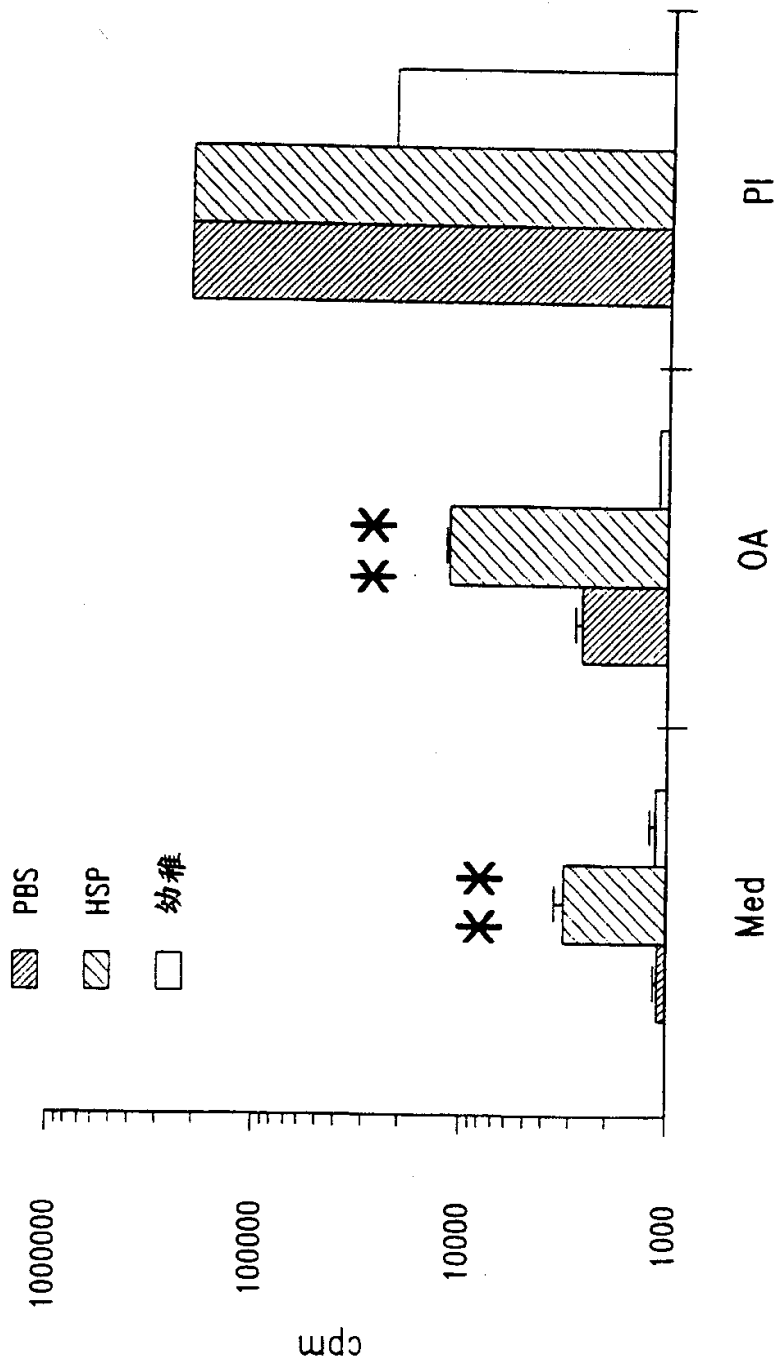


图 3

3 3 3 3

IL-5

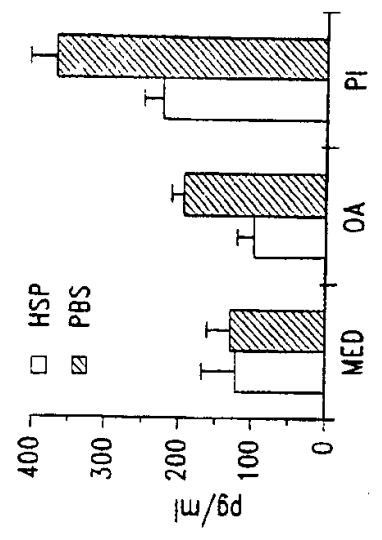


图 4C

IL-4

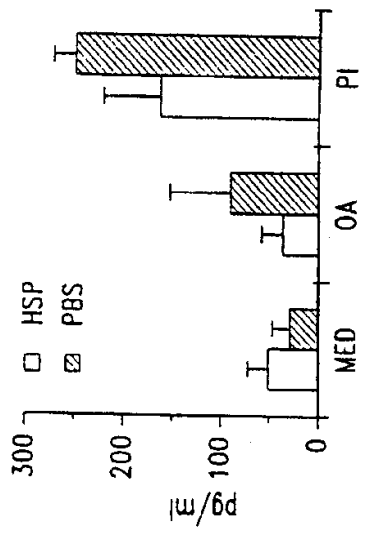


图 4B

IFN- γ

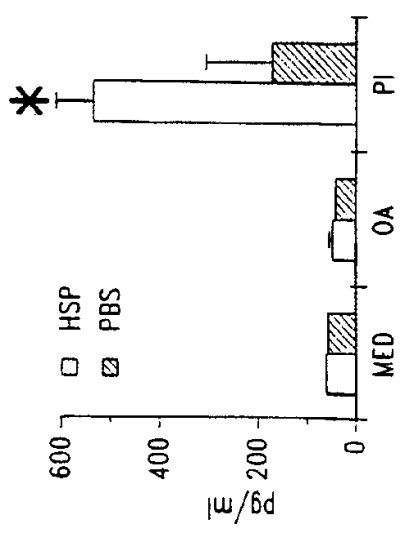


图 4A

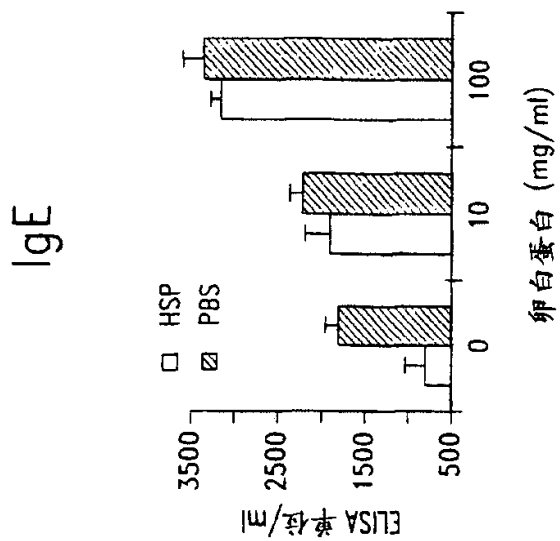


图 5C

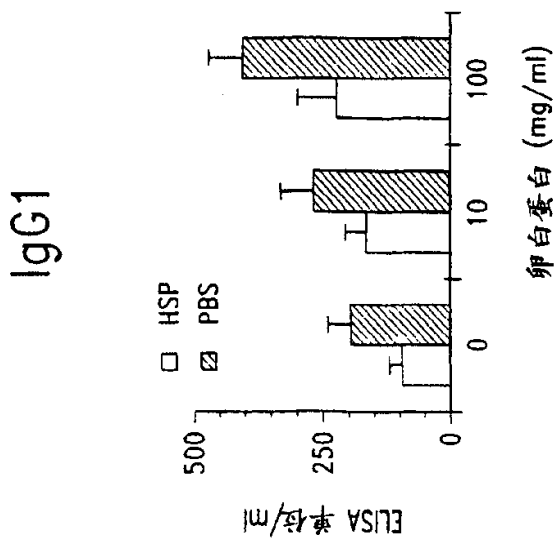


图 5B

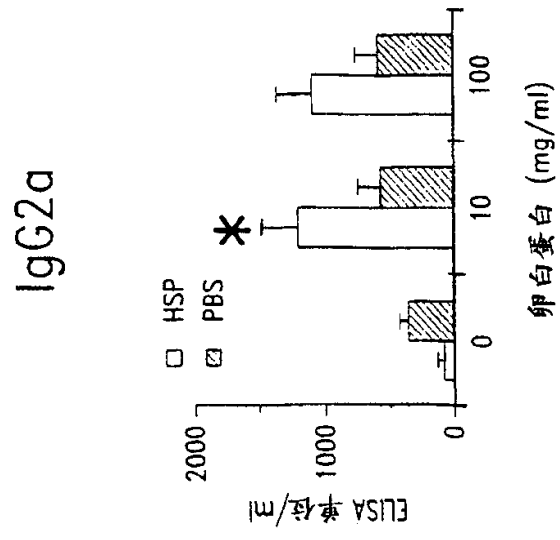


图 5A

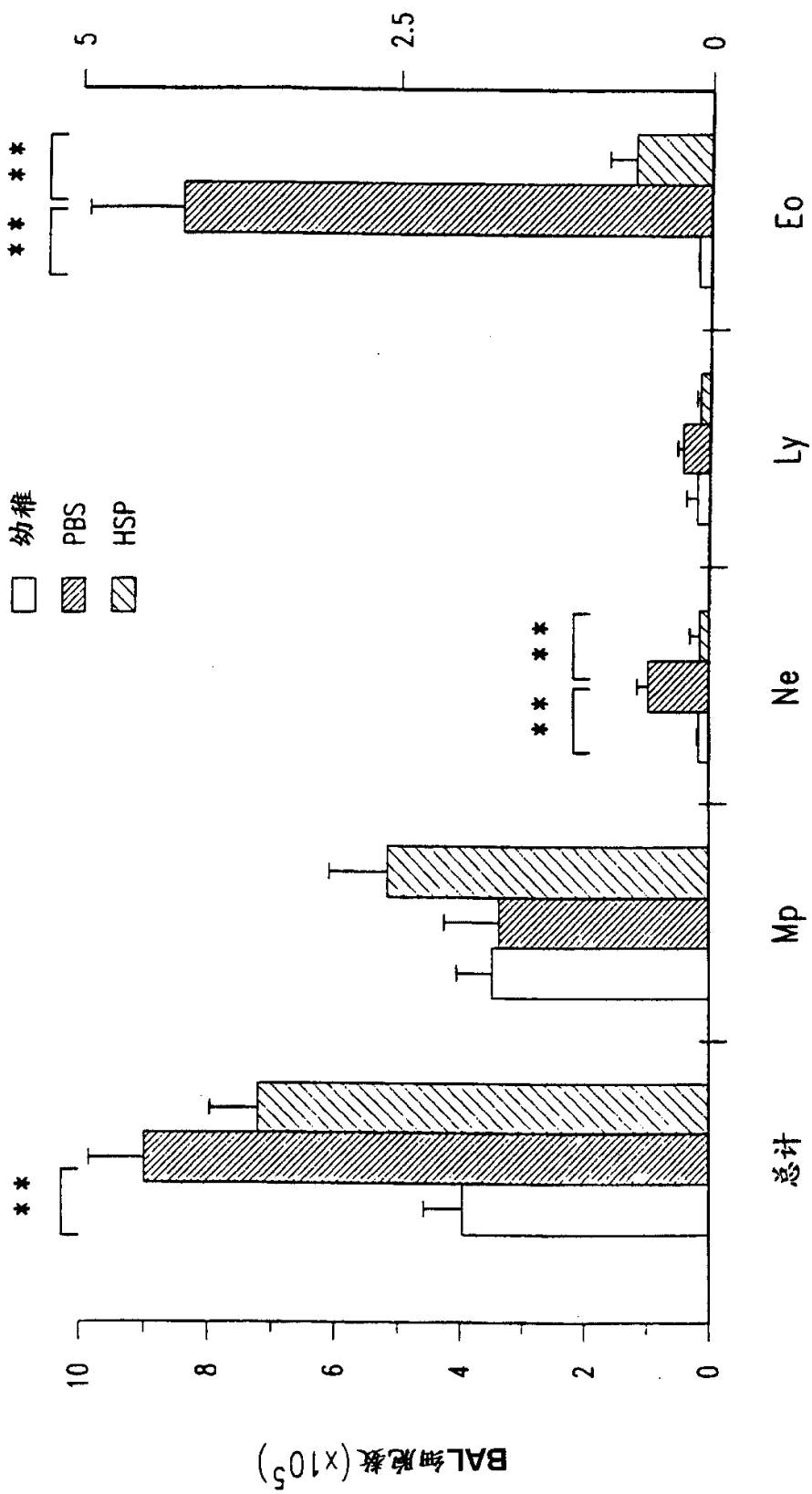


图 6

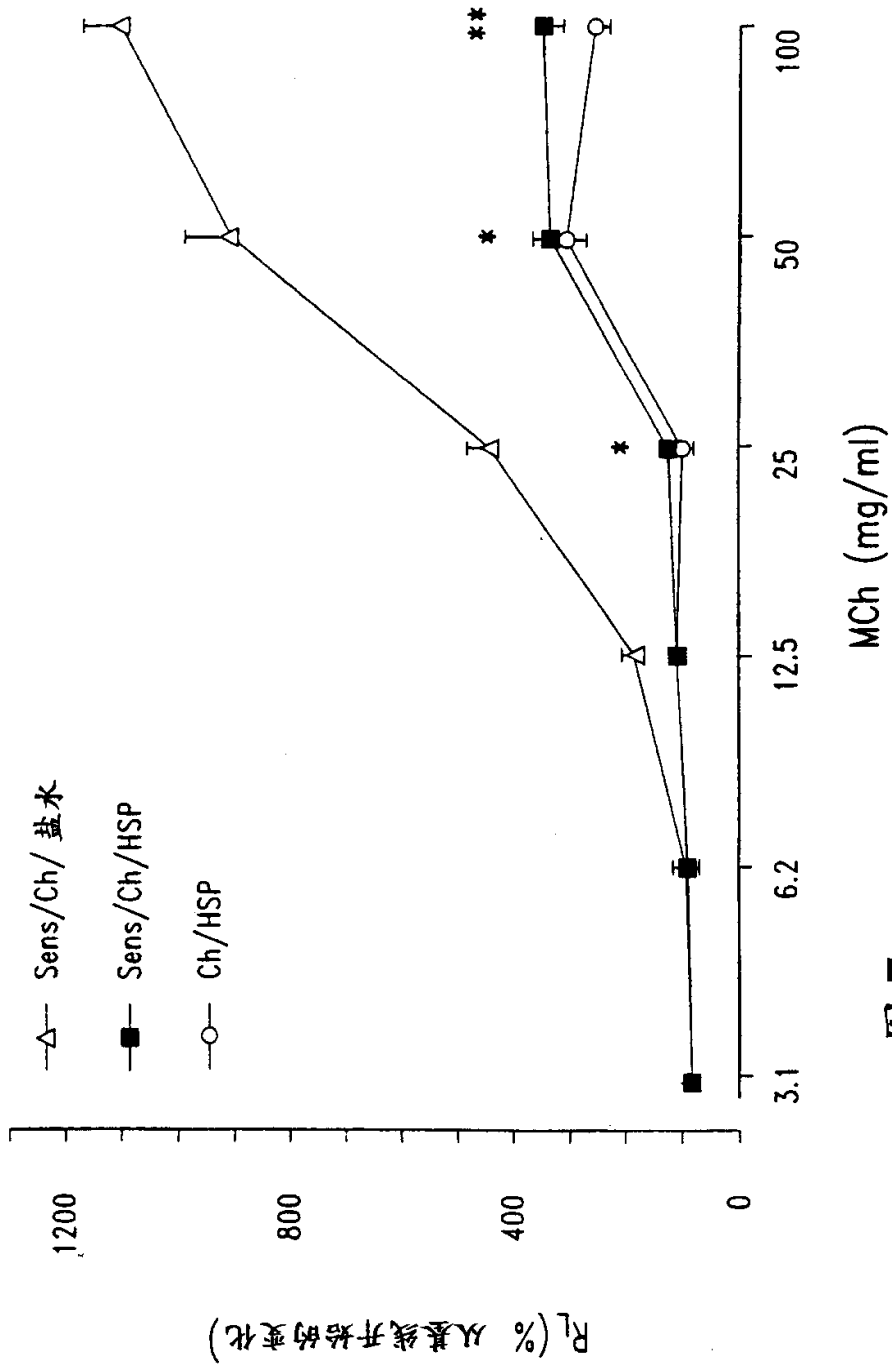


图 7