

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480001876.2

[51] Int. Cl.

A61K 31/00 (2006.01)  
A61K 31/4535 (2006.01)  
A61K 31/138 (2006.01)  
A61K 31/40 (2006.01)  
A61K 31/55 (2006.01)  
A61P 37/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 1 月 18 日

[11] 公开号 CN 1723013A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 37/06 (2006.01)

[22] 申请日 2004.1.5

[21] 申请号 200480001876.2

[30] 优先权

[32] 2003.1.6 [33] US [31] 60/438,123

[86] 国际申请 PCT/US2004/000037 2004.1.5

[87] 国际公布 WO2004/062653 英 2004.7.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.5

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 M·M·埃罗索 R·米切尔

D·C·哈尼什 S·J·阿德尔曼

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 7 页

[54] 发明名称

雌激素受体  $\alpha$  调节剂在治疗多发性硬化症中的用途

[57] 摘要

本发明提供了治疗哺乳动物中的自身免疫疾病的方法,包括给予所述哺乳动物具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的试剂,特别是选择性雌激素受体调节剂,所述试剂的量足以减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子的产生。本发明还提供了一种筛选适用于治疗多发性硬化症的化合物的方法,包括选择具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的化合物。

1. 一种治疗哺乳动物自身免疫疾病的方法，包括给予所述哺乳动物至少一种具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的试剂，所述试剂的量足以减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子的产生。
- 5 2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的自身免疫疾病选自多发性硬化症、类风湿性关节炎、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、葡萄膜炎、炎症性肠病和 Sjögren's 综合征。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的哺乳动物为雌性。
4. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的哺乳动物为雄性。
- 10 5. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的哺乳动物为人。
6. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的哺乳动物为非人类。
7. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的试剂通过选自口服、经皮、呼吸、皮下及静脉内给药的途经给药。
8. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的 TH-1 细胞因子选自  
15 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-2。
9. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的 TH-2 细胞因子选自 IL-4、IL-5 和 IL-10。
10. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的试剂降低了核因子- $\kappa$  B 的活性。
- 20 11. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的试剂是非甾族的。
12. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的试剂是选择性雌激素受体调节剂，以足以减少 TH-1 和 TH-2 细胞因子的产生的量给药。
13. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的自身免疫疾病选自多发性硬化症、类风湿性关节炎、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、葡萄膜炎、炎症性肠病和 Sjögren's 综合征。  
25
14. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的哺乳动物为雌性。
15. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的哺乳动物为雄性。
16. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的哺乳动物为人。
17. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的哺乳动物为非人类。
- 30 18. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的选择性雌激素受体调节剂通过选自口服、经皮、呼吸、皮下及静脉内给药的途经给药。
19. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的 TH-1 细胞因子选自

TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-2。

20. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的 TH-2 细胞因子选自 IL-4、IL-5 和 IL-10。

21. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的选择性雌激素受体调节剂降低了核因子- $\kappa$ B 的活性。

22. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的选择性雌激素受体调节剂选自雷洛昔芬、他莫昔芬、拉索昔芬、艾多昔芬、屈落昔芬、bazedoxifene 和妥瑞咪芬。

23. 一种筛选适用于治疗多发性硬化症的化合物的方法，包括选择具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的化合物。

24. 根据权利要求 23 的方法，其中所述的化合物是选择性雌激素受体调节剂。

25. 根据权利要求 23 的方法，其中所述的化合物降低了 TNF- $\alpha$  的产量至少约 20%。

## 雌激素受体 $\alpha$ 调节剂在治疗多发性硬化症中的用途

### 技术领域

5 本发明一般地涉及治疗自身免疫疾病的疗法，更具体地说，涉及具有雌激素受体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 激动剂活性的化合物在治疗自身免疫疾病中的用途。具体而言，本发明涉及选择性雌激素受体调节剂 (SERMS) 在治疗自身免疫疾病中的用途。此外，本发明涉及选择适用于治疗自身免疫疾病的化合物的方法。

10

### 背景技术

多发性硬化症 (multiple sclerosis, 简称为 MS) 是中枢神经系统 (CNS) 的自身免疫疾病，其中免疫系统对髓磷脂成分作出不适当的免疫反应。其特征为 CNS 发炎以及髓磷脂损伤。CD4<sup>+</sup> 辅助 T-细胞-1 (TH-1) 细胞及其产物 (例如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$  (TNF- $\gamma$ ) 以及金属蛋白酶) 在很大程度上介导了该免疫病理过程。

与很多自身免疫疾病相同，多发性硬化症在女性中的发病率 (2 至 3 倍) 高于男性<sup>1</sup>。雌激素在 MS 中的免疫调节作用已被证实。例如，在怀孕期间临床病症得以改善，此时雌激素水平较高；而在产后阶段则恶化<sup>2-4</sup>。此外，已经报道给予雌二醇的 MS 患者的症状得以改善<sup>5</sup>。雌激素可能直接影响 T 细胞的功能，来自 MS 患者的 T 细胞克隆的细胞因子生产的调节已被证实<sup>6-8</sup>。此外，在这些细胞中，雌三醇对转录因子 NF- $\kappa$ B 的抑制已被证实<sup>8</sup>。

也已证明雌激素调节鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 中的疾病活性，该模型是用于多发性硬化症的成熟模型<sup>9-13</sup>。该模型用于测试采用 SERMS/组织选择性雌激素 (TSEs) 和雌激素受体  $\alpha$  选择性激动剂的治疗方法。

SERMS 是一类与雌激素受体结合并表现出组织选择性作用的药物。例如，SERM 雷洛昔芬 (raloxifene) 对骨、脂质和凝血因子具有雌激素激动作用，对乳房和子宫具有雌激素拮抗作用<sup>19</sup>。SERMS 可能包括：1) 此前被认为是抗雌激素的试剂，例如 16-表雌三醇、乙胺氧三苯醇、氯米芬及他莫昔芬 (tamoxifen)；2) 19-去甲睾酮衍生

物、替勃龙；3) 雷洛昔芬及其类似物；以及4) 新的三苯乙烯衍生物，例如屈落昔芬 (droloxifene)、妥瑞咪芬 (toremifene)、艾多昔芬 (idoxifene) 和 levomeloxifene<sup>19</sup>。SERMS 与内源性雌激素竞争结合受体，并可能激活或阻断雌激素的作用<sup>19</sup>。

- 5 本发明的一个目的是提供通过给予具有雌激素受体  $\alpha$  活性的试剂特别是 SERMS 来治疗自身免疫疾病 (pathology) 的新方法。

### 发明概述

10 本发明提供了一种治疗哺乳动物中的自身免疫疾病的方法，包括给予所述哺乳动物至少一种具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的试剂，所述试剂的量足以减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子的产生。

本发明提供了一种治疗哺乳动物中的自身免疫疾病的方法，包括给予所述哺乳动物选择性雌激素受体调节剂，所述选择性雌激素受体调节剂的量足以减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子的产生。

15 本发明还提供了一种筛选适用于治疗多发性硬化症的化合物的方法，包括选择具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的化合物。

### 附图的简要说明

20 在阅读了详细说明和附图之后，可以更充分地理解本发明，其中附图形成了本申请的一部分。

图 1A 示出了 ER 拮抗剂 ICI 对雌激素介导的疾病抑制的作用。

图 1B 示出了雷洛昔芬相对于化合物 A 对 EAE 的作用。

图 2 示出了 ER 选择性配体对 EAE 的作用。

25 图 3A 示出了体内给予 ER 选择性配体对 EAE 小鼠脾细胞 TNF- $\alpha$  的产生的作用。

图 3B 示出了体内给予 ER 选择性配体对 EAE 小鼠脾细胞 IL-4 的产生的作用。

图 3C 示出了体内给予 ER 选择性配体对 EAE 小鼠脾细胞 IFN- $\gamma$  的产生的作用。

30 图 3D 示出了体内给予 ER 选择性配体对 EAE 小鼠脾细胞 IL-5 的产生的作用。

图 3E 示出了体内给予 ER 选择性配体对 EAE 小鼠脾细胞 IL-2

的产生的作用。

图 3F 示出了体内给予 ER 选择性配体对 EAE 小鼠脾细胞 IL-10 的产生的作用。

图 4A 示出了化合物对抗原刺激后 CD4-细胞增殖的作用。

5 图 4B 示出了化合物对抗原刺激后 CD4+细胞增殖的作用。

图 5A 示出了化合物对抗原刺激后效应 T 细胞对 TNF- $\alpha$  的产生的作用。

图 5B 示出了化合物对抗原刺激后效应 T 细胞对 IFN- $\gamma$  的产生的作用。

10 图 5C 示出了化合物对抗原刺激后效应 T 细胞对 IL-4 的产生的作用。

图 5D 示出了化合物对抗原刺激后效应 T 细胞对 IL-2 的产生的作用。

## 15 发明详述

如此处所公开的，给予哺乳动物具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的试剂降低了自身免疫疾病的严重性。这些效果可能部分地是因为此类激动剂减少了疾病位点处或其周边的 T 细胞产生的 TH1 和/或 TH-2 细胞因子。

20 因此，本发明提供了一种治疗哺乳动物中的自身免疫疾病的方法，包括给予所述哺乳动物具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的试剂，所述试剂的量足以减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子的产生。本发明还提供了一种治疗哺乳动物中的自身免疫疾病的方法，包括给予所述哺乳动物选择性雌激素受体调节剂，所述选择性雌激素受体调节剂的量足以减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子的产生。

25 本发明的方法可以用于多种自身免疫疾病。此类疾病是本领域已知的，包括但不限于多发性硬化症、类风湿性关节炎、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、葡萄膜炎 (uveitis)、重症肌无力、炎症性肠病和 Sjögren's 综合征。在本发明的优选实施方案中，所述哺乳动物可以是雌性、雄性、人类或非人类。

30 在本发明的一个实施方案中，具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的试剂通过选自口服、经皮、呼吸、皮下及静脉内给药的途经给药。

在本发明的优选实施方案中，所述 TH-1 细胞因子选自 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-2，所述 TH-2 细胞因子选自 IL-4、IL-5 和 IL-10。本领域技术人员知道，TH-1 介导的免疫反应的特征在于前炎症细胞因子的分泌，包括 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-2。TH-2 介导的免疫反应的特征在于抗炎细胞因子例如 IL-4、IL-5 和 IL-10 的分泌。在本发明的一个优选实施方案中，TH-1 细胞因子的产生被给予的试剂所抑制。在本发明的另一个优选实施方案中，TH-1 和 TH-2 细胞因子的产生被抑制。在本发明的又一个实施方案中，TH-1 细胞因子的产生被抑制，而 TH-2 细胞因子的产生增加。

作为一个优选实施方案，ER $\alpha$  激动剂表现出抗炎活性，例如 NF- $\kappa$  B 活性的降低。在另一个优选实施方案中，ER $\alpha$  激动剂是非甾族的。

在本发明的又一个实施方案中，SERM 选自雷洛昔芬、他莫昔芬、拉索昔芬、艾多昔芬、屈落昔芬、bazedoxifene、妥瑞咪芬及其衍生物和类似物。在本发明的另一个优选实施方案中，所述选择性雌激素受体调节剂对脑或中枢神经系统产生生物学作用。

本发明还提供了一种筛选适用于治疗多发性硬化症的化合物的方法，包括选择具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的化合物。采用受体例如荧光素酶的用于检测体外激动剂活性的传统检测方法是本领域公知的。下列出版物中给出了示例性的激动剂检测，这些出版物以引用的方式被包括在本文中，可用于参考其中的 ER $\alpha$  激动剂检测：Lyttle CR, Damian-Matsumura P., Juul H., Butt TR, Human estrogen receptor regulation in a yeast model system and studies on receptor agonists and antagonists, *J. Steroid Biochem Mol Biol* 42: 677-685 (1992); Katzenellenbogen BS, Bhardwaj B, Fang H, Ince BA, Pakdel F, Reese JC, Schodin D, Wrenn CK, Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analyses using mammalian and yeast systems, *J Steroid Biochem Mol Biol* 47: 39-48 (1993); PCT 国际公开号 WO 00/37681; Webb P, Lopez GN, Greene GL, Baxter JD, Kushner PJ, 1992, The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response, *Mol Endocrinology*, 6(2): 157-67。优选地，在此类检测中，“雌激素受体  $\alpha$  激动剂”被定义为在选定的雌激素活性试验中，基本模拟了 17- $\beta$  雌二醇的 ER- $\alpha$  活性的化合物。

在本发明的一个优选实施方案中，所述化合物是 SERM。在本发明的另一个实施方案中，所述化合物降低了 TNF- $\alpha$  的产量至少约 20 %-100%，如实施例 2 中所述。在可供选择的实施方案中，所述的降低可以是至少 30%、40%、50%、60% 或 80%。

5

#### 缩写和术语的定义

下面提供的定义是为了充分理解说明书和权利要求书中所使用的术语和缩写。

此处及所附的权利要求中所使用的单数形式 “a”、“an”、“the” 也包括复数，除非上下文中明确的其它说明。因此，例如，“雌激素受体  $\alpha$  激动剂” 包括多种此类激动剂。

说明书和权利要求书中所使用的缩写对应于测量、技术、性质或化合物的单位，如下所述：“ $\mu\text{g}$ ” 是指微克，“ml” 是指毫升，“ $\mu\text{M}$ ” 是指微摩尔，“mM” 是指毫摩尔，“s.c.” 是指皮下，“i.p.” 是指腹腔，“p.o.” 是指每次口服。

- “多发性硬化症” 简写为 MS。
- “中枢神经系统” 简写为 CNS。
- “辅助 T 细胞-1” 和 “辅助 T 细胞-2” 分别简写为 TH-1 和 TH-2。
- “肿瘤坏死因子- $\alpha$ ” 简写为 TNF- $\alpha$ 。
- “干扰素- $\gamma$ ” 简写为 IFN- $\gamma$ 。
- “核因子 (Nuclear Factor) -  $\kappa\text{B}$ ” 简写为 NF- $\kappa\text{B}$ 。
- “实验性自身免疫性脑脊髓炎” 简写为 EAE。
- “选择性雌激素受体调节剂” 简写为 SERMS。
- “组织选择性雌激素” 简写为 TSEs。
- “雌激素受体” 简写为 ER。
- “白细胞介素” 简写为 IL。
- “蛋白脂质蛋白肽 (proteolipid protein peptide)” 简写为 PLP。
- “完全弗氏佐剂” 简写为 CFA。
- “转移后” 简写为 PT。

此处所使用的术语 “自身免疫疾病” 是指由有害的自身免疫反应所介导的疾病。在大多数自身免疫疾病中，T 细胞将一种或多种组织中的宿主成分识别为外来物，并攻击该组织。

此处所使用的术语“治疗 (treatment)”包括预防性 (例如预防疾病的)、治疗性或缓解性治疗,“治疗 (treating)”也包括预防性、治疗性或缓解性治疗。“治疗”,当用于自身免疫疾病时,是指任何可以观察到的治疗效果。有益效果可以由易感哺乳动物中临床症状的延迟发作、疾病的某些或全部临床症状严重性的降低、疾病发展的延缓、疾病复发数的降低、疾病位点处或循环系统中致病 T 细胞数量或活性 (例如细胞因子分泌) 的降低、个体的总体健康状况或舒适度的改善或者本领域公知的对该特定疾病具有特异性的其它参数来佐证。

此处所使用的术语“具有雌激素受体  $\alpha$  激动剂活性的试剂”是指表现出 ER $\alpha$  活性的试剂,包括但不限于选择性雌激素受体调节剂和组织选择性雌激素。该术语也可以包括部分激动剂、肽、多肽、基因、基因片段、非肽小分子、天然产物、反义 DNA 及 mRNA。

此处所使用的术语“哺乳动物”是指人、非人类灵长类动物、犬、猫、牛、羊、猪、鼠或其它兽医或实验室用哺乳动物。本领域技术人员知道,在一种哺乳动物中降低免疫疾病严重性的疗法可以预测其效果在另一种哺乳动物中也存在。本领域技术人员也知道,人类免疫疾病的可靠动物模型是已知的,包括 EAE,其为多发性硬化症的可靠动物模型。

术语“减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子产生的有效量”是指,就剂量和必需时间段而言,对于获得治疗自身免疫疾病的预期效果来说有效的量。可以理解,在本发明的方法中,雌激素受体  $\alpha$  激动剂的减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子产生的有效量将随着个体的不同而变化,其不仅取决于所选择的特定激动剂、给药途径以及该激动剂在个体中引发预期反应的能力,还取决于其它因素例如疾病状况或待缓解病症的严重性,个体的年龄、性别、体重,患者的状况,以及所治疗的疾病症状的严重性,同时服用的药物或特定个体随后所遵循的特种膳食,以及本领域技术人员知道的其它因素,并且适当的剂量最终是由当值医生决定的。可以调整剂量安排以改善治疗反应。“减少 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子产生的有效量”也指在所述量下,该激动剂的有益治疗效果超过了该激动剂的任何毒性或有害效果。

优选地,在本发明的方法中给予雌激素受体  $\alpha$  激动剂,其剂量和时间使得 TH-1 和/或 TH-2 细胞因子的产量与治疗开始时这些细胞因

子的产量相比有所下降。这种治疗对于降低自身免疫疾病症状的总体严重程度（相对于治疗开始前症状的严重程度）来说也可能是有益的。在一个优选实施方案中，剂量范围为 5mg/kg/天到 500mg/kg/天，或者至少约 10、50、100 或 150mg/kg/天。

5

### 实施例

本发明在下面的实施例中进一步说明。应当理解，虽然这些实施例中给出了本发明的优选实施方式，但提供这些实施例的目的仅仅是为了说明本发明。从上面的讨论以及这些实施例中，本领域技术人员可以确定本发明的必要特征，并且在不脱离其精神和范围的情况下，本领域技术人员可以对本发明进行各种改变和变型，以使其适应于各种用途和情况。

#### 实施例 1 在多发性硬化症动物模型中体内给予化合物的效果

该实施例表明，在多发性硬化症动物模型中，体内给予雌激素受体  $\alpha$  选择性激动剂延迟了疾病的发作并降低了疾病的发病率和严重性。

#### 材料和方法

动物 用 25 只完好无损的雌性（6-8 周龄）SJL 小鼠（Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME）作为 EAE 过继转移模型（adoptive transfer model）的供体小鼠。

实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）的诱导 采用此前描述的方法<sup>20</sup>的改进方法，通过 PLP 致敏的脾细胞的过继转移诱导 EAE。用在完全弗氏佐剂（CFA）中乳化的蛋白脂质蛋白肽 139-151（PLP）对小鼠进行免疫。每只动物接受 150 $\mu$ g 的 PLP，其溶于 0.2ml 的 CFA 中，并且 CFA 中含有 4mg/ml 热杀死并干燥的 *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA 菌株)。PLP/CFA 乳液皮下注射到两个位点上（背部和尾巴的根部（base））。每个位点注射 0.1ml。10 天后，对小鼠实施安乐死，收集脾脏。由所述脾脏制备单细胞悬浮液。在红血球溶解后，以 5 $\times$ 10<sup>6</sup> 细胞/ml 的浓度，在 75cm<sup>2</sup> 组织培养瓶中的 RPMI-10（RPMI 培养基，其中含有 10% 热失活的胎牛血清、100U/ml 的青霉素、100 $\mu$ g/ml

25  
30

链霉素、2mM 谷氨酰胺、50 $\mu$ M 2-巯基乙醇) 中培养细胞 3 天。加入 PLP 至终浓度为 5 $\mu$ g/ml。在 5% 的 CO<sub>2</sub> 中于 37 $^{\circ}$ C 培养细胞。培养之后，收获 PLP 刺激的效应细胞，用磷酸缓冲液冲洗，并腹腔注射到切除卵巢的雌性 (6-8 周龄) SJL 小鼠 (1.5 $\times$ 10<sup>7</sup> 细胞/小鼠) 中。疾病发作通常在细胞转移后 (PT) 7-14 天发生。

根据表 1 中所示的等级，每天对疾病的严重程度进行监控。

表 1 疾病严重程度的等级

0	没有明显的疾病体征
1	跛尾 (limp tail)
2	跛尾/后腿虚弱 (通过蹒跚步态观察到; 小鼠后腿掉进铁丝笼顶部)
3	后腿部分麻痹 (小鼠不能再保持臀部的姿态, 但仍然能在某种程度上移动一条或两条腿)
4	后腿完全麻痹 (后腿完全不能运动; 动物拖着后腿; 能够没有困难地抓住栏杆并将自己拖起来)
5	后腿完全麻痹和/或轻微的前腿虚弱 (仍然能够抓住栏杆; 但在将自己拖起来方面有些困难)
6	后腿完全麻痹, 前腿严重虚弱或麻痹; 濒临死亡

为了评价化合物对疾病的作用，按照指明的剂量每天将化合物给予 (皮下或口服给药) 受体小鼠，使用 10% 乙醇/90% 玉米油载体。对照组动物只接受载体。在对供体细胞进行过继转移之前 5-7 天开始对小鼠给药。

**组织学分析** 在疾病高峰时 (转移后 14 天)，用 CO<sub>2</sub> 对小鼠施行安乐死。在尸体解剖时移走脑和脊髓，并固定在 10% 的缓冲福尔马林中。将脑切成三段 (粗略来说，大脑、中脑和小脑) 并作为一整块进行包埋。将脊髓在 10% HCl 中脱钙，并切成颈、胸和腰 (lumber) 段，作为一整块进行包埋。由来自每只小鼠的每一块组织 (脑和脊髓) 制备标准 H&E (苏木精和伊红) 载玻片，每只被评价的小鼠得到两块 H&E 载玻片。

对切片进行评价，针对存在与否 (P = 存在) 和/或严重性对看到

的损伤进行主观评分。严重性等级为：0 = WNL（在正常范围内），1 = 微小或最小，2 = 轻微，3 = 中等，4 = 显著，5 = 严重。发现的位置（相对于所述器官）被记为血管周围、室周围、室管膜或脑膜，并且也被记为局部（在很小的区域内，或不是整个切片上都有）或扩散（所检查的整个切片都有）。局部被定义为非常局部化，并且不影响每个结构。没有被定义为局部的发现是扩散的或影响每一个结构（例如所有的脉管）。看到的白细胞主要是淋巴细胞和巨嗜细胞，偶尔有嗜中性粒细胞。观察到的脊髓白质束中的明显空洞即为脱髓鞘作用。

典型的小鼠 EAE 模型具有微小至中等大小淋巴细胞聚集体的弥散分布，很少在受影响的组织中有扩散的渗透物。

PLP 特异性 Recall 反应分析：细胞因子产生 为了检查体内给予的化合物对 EAE 小鼠脾细胞的细胞因子产生的作用，在疾病高峰时（转移后 14 天），用 CO<sub>2</sub> 对小鼠施行安乐死，收集脾脏。脾脏被分别处理为单细胞悬浮液。在红血球溶解后，将细胞重悬在 RPMI-10 中，并在 24 孔组织培养板中以 5×10<sup>6</sup> 细胞/ml 的浓度进行培养。用 5μg/ml PLP 刺激细胞。3 天后收集上清液并冷冻在 -20℃ 待用。用市售的流式细胞仪试剂盒 (Cytometric Bead Array, Becton Dickinson BioSciences, San Diego, CA) 检测上清液中的细胞因子 (TNF-α、IFN-γ、IL-5、IL-4、IL-2)。通过 IL-10 特异性 ELISA 试剂盒 (Becton Dickinson BioSciences) 检测 IL-10。

为了体外检测化合物对 PLP 诱发的效应细胞的细胞因子产生的作用，利用乳化在 CFA 中的 PLP 免疫 SJL 小鼠。10 天后，收集脾脏并制备单细胞悬浮液。在红血球溶解后，于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 的条件下，用 5μg/ml PLP 在化合物存在下刺激脾细胞 3 天。对照样品不进行刺激，仅在培养基中进行培养（“培养基”）。加入化合物至终浓度为 1μM。在 3 天的培养之后，收集上清液并保存在 -20℃。利用 Cytometric Bead Array 试剂盒检测上清液中的细胞因子 (TNF-α、IFN-γ、IL-5、IL-4、IL-2)。

化合物对抗原刺激后效应 T 细胞增殖的作用 为了体外检测对响应于 PLP 刺激的效应 T 细胞增殖的作用，通过流式细胞术按下述试验方法检测 T 细胞的增殖。利用乳化在 CFA 中的 PLP 免疫 SJL 小鼠。10 天后，收集脾脏并制备单细胞悬浮液。在红血球溶解后，用羧基荧

5 光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 标记脾细胞。然后, 于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 的条件下, 用 PLP 温育 CFSE 标记的细胞 3 天。加入化合物至终浓度为 1μM。为了确定分裂的 CD4<sup>+</sup> 细胞的比例, 在进行流式细胞术分析之前, 利用对 CD4 标记具有特异性的抗体对 CFSE 标记的细胞进行染色。

## 结果

### I. SERMs/组织选择性雌激素对 PLP 诱导的效应细胞的过继转移所诱导的 EAE 的作用

10 如前所示, 用 17-β 雌二醇 (E2) 进行治疗延迟了疾病的发作并降低了疾病的发病率和严重性 (图 1A)。为了确定该模型中雌激素的保护作用是否是雌激素受体介导的, 用 E2 和雌激素受体拮抗剂 ICI 182, 780 共同治疗小鼠。ICI 破坏了 E2 对疾病的作用 (图 1A)。

15 用 E2 或 SERMs 雷洛昔芬或化合物 A [2-(羟基苯基)-3-甲基-1-[4-(2-哌啶-1-基-乙氧基)苯甲基]-1H-吡啶-5-醇盐酸一水合物] 进行治疗延迟了疾病的发作并降低了疾病的发病率和严重性 (图 1B 及表 II)。与这些化合物对疾病的临床体征的作用一致, 与其它治疗组小鼠相比, 用化合物 A 治疗过的小鼠中透过脊髓和脑的炎症细胞数量降低了。此外, 用化合物 A 治疗过的小鼠中, 在脊髓上没有检测到脱髓鞘作用。

表 II 组织学发现

治疗	脑膜/血管周围 白细胞渗透	脑损伤分布	脊髓脑膜/血管周 围白细胞渗透	脊髓脱髓鞘 作用
载体	3/3 <sup>a</sup> (2.33) <sup>b</sup>	脑膜, 血管周围 及室管膜周	3/3 (2)	3/3 (2)
E2	4/4 (2.5)	脑膜, 血管周围 及室管膜周	3/4 (1.7)	3/4 (1.3)
雷洛昔芬	5/5 (2.4)	脑膜, 血管周围 及室管膜周	5/5 (1.4)	5/5 (1.2)
化合物 A	3/5 (2.7)	脑膜, 血管周围 及室管膜周	1/5 (1)	0/5

a=有现象的脑的数量/总评价数

b=看到的损伤的平均严重性等级;

0=在正常范围内, 1 = 微小 (slight), 2 = 轻微 (mild), 3 = 中等, 4 = 显著, 5 = 严重

## II. 雌激素受体选择性激动剂对 PLP 诱导的效应细胞的过继转移所诱导的 EAE 的作用

- 5 用 E2 或 ER $\alpha$  选择性激动剂 PPT (丙基吡唑三醇) 进行治疗延迟了疾病的发作并降低了疾病的发病率和严重性 (图 2)。此外, 与用载体或 ER $\beta$  选择性激动剂治疗的小鼠相比, 用 PPT 治疗的小鼠在脑和脊髓中的炎症减少 (图 3)。组织学检查表明, 与载体对照小鼠相比, 给予 PPT 的小鼠具有最多的正常组织。所有四只小鼠都在脑膜中有微
- 10 小的白细胞渗透, 但只在脑的基部 (仅在腹面的后脑/小脑/脑桥/髓质附近)。这些小鼠中没有一只有脊髓损伤; 这些小鼠的脊髓都在正常范围内。

表 III

治疗	脑膜/血管周围 白细胞渗透	脑损伤分布	脊髓脑膜/血管周 围白细胞渗透	脊髓脱髓鞘 作用
载体	4/4 <sup>a</sup> (2.75) <sup>b</sup>	室周围 及室管膜	4/4 (2)	1/4 (1)
E2	3/4 (1.7)	脑膜	2/4 (1)	1/4 (1)
ER $\alpha$ -PPT (ER $\alpha$ )	4/4 (1)	脑基部	0/4	0/4
ER $\beta$ -041 (ER $\beta$ )	4/4 (2.3)	室周围 及室管膜	2/4 (1.5)	2/4 (1.5)

a=有现象的脑的数量/总评价数

b=看到的损伤的平均严重性等级;

0=在正常范围内, 1 = 微小, 2 = 轻微, 3 = 中等, 4 = 显著, 5 = 严重

### III. ER 选择性激动剂对 PLP 特异性 Recall 反应的作用: 细胞因子生产

5 与 ER $\alpha$  选择性激动剂 PPT 对疾病的作用一致, 用 PPT 治疗小鼠降低了在体外用 PLP 刺激脾细胞之后的细胞因子的产生 (图 3)。Th1/前炎症细胞因子 (TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2) 和 Th2/抗炎 (IL-4、IL-5、IL-10) 细胞因子被 PPT 的体内治疗所抑制, 这表明 PPT 可能通过抑制 T 细胞活化而抑制疾病, 而不是通过由致病的 Th1 反应向保护性 Th2 反应的免疫偏离来抑制疾病。与此相反, ER $\alpha$  选择性激动剂对细胞因子产生没有效果 (\*,  $p < 0.05$ , 与载体组相比)。

#### 实施例 II 化合物体外对抗原特异性免疫反应的效果

15 组织选择性雌激素 (化合物 A) 和 ER $\alpha$  选择性配体 (PPT) 对抗原特异性免疫反应的效果在体外进行了检测。

##### A. 化合物对抗原刺激后效应 T 细胞增殖的作用

用组织选择性雌激素化合物 A 或 ER $\alpha$  选择性激动剂 PPT 治疗 PLP 诱导的效应细胞减少了抗原特异性 T 细胞的增殖 (图 4)。CD4<sup>+</sup> 和 CD4<sup>-</sup> 细胞群的增殖都被抑制。这些结果表明这些化合物中的每一种可能

部分地通过限制抗原特异性 T 细胞克隆的扩大而起作用。

#### B. 化合物对抗原刺激后效应细胞的细胞因子产生的作用

用组织选择性雌激素化合物 A 或 ER $\alpha$  选择性激动剂 PPT 治疗 PLP 诱导的效应细胞减少了抗原刺激后的细胞因子产生 (图 5)。两种化合物都抑制了前炎症 (TH-1) 细胞因子 TNF- $\alpha$  的产生。化合物 A 和 ER $\alpha$  选择性激动剂 PPT 也都抑制了 IFN- $\gamma$  的产生。将这些细胞与组织选择性雌激素化合物 A 温育也同时增加了抗炎细胞因子 IL-4, 但其它化合物没有作用。这些结果表明 ER $\alpha$  选择性激动剂 (PPT) 可能与组织选择性雌激素在对抗原特异性细胞因子的生产上具有不同的作用。前者可能通过抑制前炎症 (TH-1) 细胞因子的生产而抑制 EAE, 而组织选择性雌激素可能还促进了向保护性抗炎/TH-2 免疫反应的免疫偏离。

#### 结论

用 SERMs/TSEs 雷洛昔芬和化合物 A 以及 ER $\alpha$  选择性激动剂 PPT 进行治疗, 抑制了 EAE, 延迟了疾病的发作并降低了疾病的发病率和严重性。在用这些化合物治疗过的小鼠中, 疾病临床体征的抑制与脑及脊髓中的病理和白细胞渗透的减少有关。这表明这些化合物可能通过限制致病细胞向脑及脊髓中转移而缓解疾病, 例如, 通过减少粘附分子的表达和/或通过影响趋化因子/趋化因子受体的表达。SERMs/TSEs 以及 ER $\alpha$  选择性激动剂对 PLP 诱导的效应细胞的过继转移所诱导的疾病的抑制作用表明, 这些化合物具有改变致脑炎的效应细胞活性的能力。这些发现与原有的看法相反, 此前认为, 与初生细胞相比, 分化的效应细胞对雌激素的作用更迟钝。

此处所提供的体外数据表明, ER $\alpha$  选择性激动剂, 优选 SERMs 或 ER-抗炎配体, 可能对抗原特异性 T 细胞的增殖和细胞因子的产生有直接作用, 从而限制了致病 T 细胞的扩增和分化。所有三种类型的配体都有效地抑制了前炎症 (TH-1) 细胞因子的产生。但是, 组织选择性雌激素可能还促进了保护性抗炎 (TH-2) 细胞因子的产生, 这表明这些分子可能对 PLP 特异性免疫反应具有不同的作用。

我们观察到 SERMs/TSEs 能够改变该模型中的疾病病程, 基于 SERMs 和雌激素拮抗剂在鼠系统性红斑狼疮 (狼疮的小鼠模型) 中

已知的作用，这多少有些令人吃惊。业已证明 SERMs 对狼疮具有有益的治疗效果，狼疮是一种自身免疫疾病，雌激素会使该疾病恶化<sup>14-18</sup>。由于 SERMs 可能以拮抗剂的方式作用于狼疮，因此可以预期 SERMs 将对 EAE 有类似的拮抗剂活性。因此，可以预测 SERMs 或者对 EAE 没有作用，或者将恶化 EAE。正相反，SERMs 表现出了疾病抑制活性。

### 参考文献

1. Whitacre C.C. 2002. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2:777-780.
2. Abramsky O. 1994. Pregnancy and multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 36(suppl):S38-S41.
3. Confavreux C, Hutchinson M, Hours M.M. et al. 1998. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. N Engl J Med.* 339:285-291.
4. Damek D.M., Shuster E.A. 1997. Pregnancy and multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc.* 72:977-989.
5. Scotte N.L, Liva S.M., Klutch R. et al. 2002. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Ann Neurol.* 52:421-428.
6. Gilmore W., Weiner L.P., Correale J. 1997. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.* 158:446-451.
7. Correale J. Arias M., Gilmore W. 1998. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.* 161:3365-3374.
8. Zang Y.C.Q. Halder J.B., Hong, J. Rivera V.M., Zhang J.Z. 2002. Regulatory effects of estriol on T cell migration and cytokine profile: inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B. *J. Neuroimmunol.* 124:106-114.
9. Jansson L., Olsson T., Holmdahl R. 1994. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol.* 53:203-207.
10. Kim S., Liva S.M., Dalal M.A., Verity M.A., Voskuhl R.R. 1999. Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease. Implications for multiple sclerosis. *Neurol.* 52:1230-1238.
11. Offner H., Adlard K., Zamora A., Vandenbark A.A. 2000. Estrogen potentiates treatment with T-cell receptor protein of female mice with experimental encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 105:1465-1472.

12. Ito A., Bebo B.F., Jr., Matejuk A., Zamora A., Silverman M., Fyfe-Johnson A., Offner H. 2001. Estrogen treatment down-regulates TNF- $\alpha$  production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol.* 167:542-552.
13. Bebo B.F., Jr., Fyfe-Johnson A., Adlard K., Beam A.G., Vandenberg A.A., Offner H. 2001. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol.* 166:2080-2089.
14. Duvic M., Steinberg A.D., Klassen L.W. 1978. *Arthritis and Rheumatism.* 21:414-417.
15. Sturgess A.D., Evans D.T.P., Mackay I.R., Riglar A. 1984. Effects of the oestrogen antagonist tamoxifen on disease indices in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Lab. Immunol.* 13:11-14.
16. Stoeber Z.M., Bentwich Z., Zinger H., Mozes E. 1994. The beneficial effect of the estrogen antagonist, Tamoxifen, on experimental lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 21:2231-2238.
17. Apeltgren L.D., Bailey D.L., Fouts R.L., Short L., Bryan N., Evans G.F., Sandusky G.E., Zuckerman S.H., Glasebrook A., Bumol T.F. 1996. The effect of a selective estrogen receptor modulator on the progression of spontaneous autoimmune disease in MRL *lpr/lpr* mice. *Cell. Immunol.* 173:55-63.
18. Wu W.-M., Lin B.-F., Su Y.-C., Suen J.-L., Chiang B.-L. 2000. Tamoxifen decreases renal inflammation and alleviates disease severity in autoimmune NZB/W F1 mice. *Scand. J. Immunol.* 52:393-400.
19. Kankaanpaa JTJ. October, 1999. Raloxifene – a multifunctional medicine: review. *APIMALL General Practice Issue* 1.0.
20. Leonard, J.P., Waldburger K.E., Goldman S.J., 1995. *J. Exp. Med.* 181:P381-386.

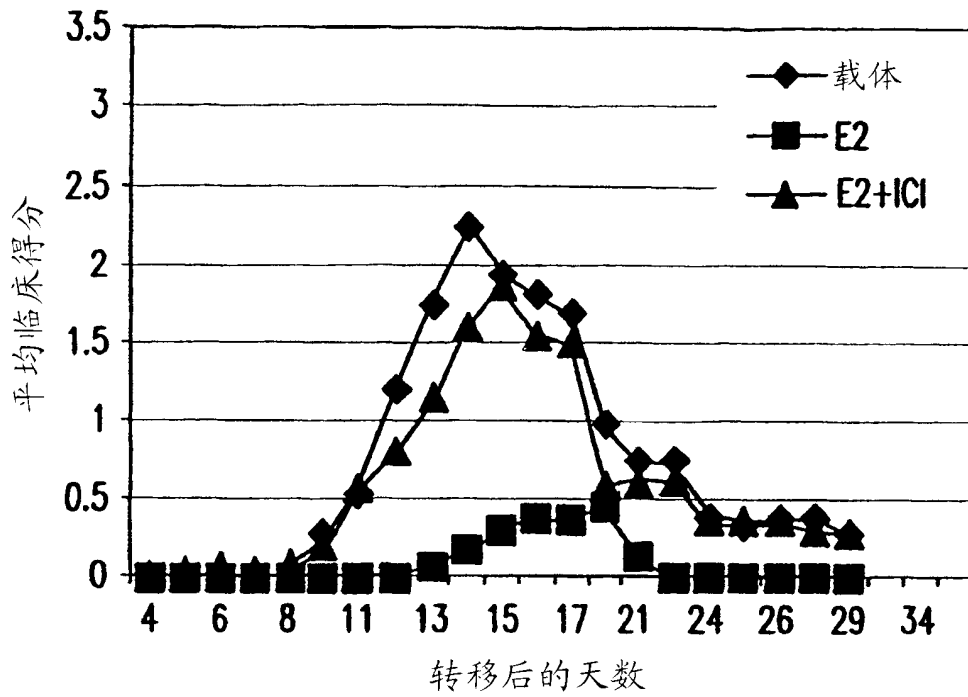


图 1A

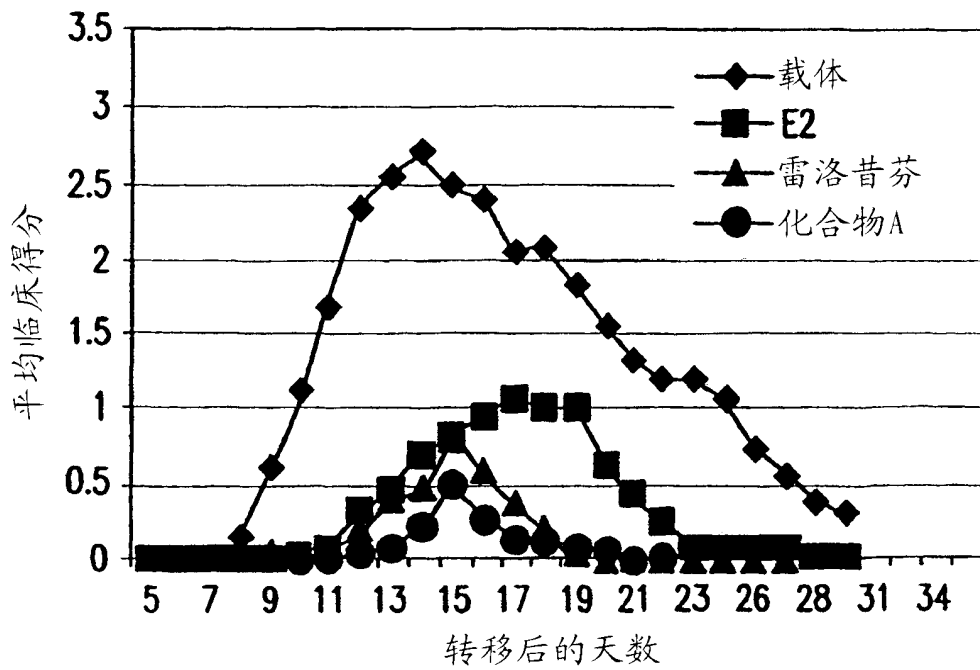


图 1B

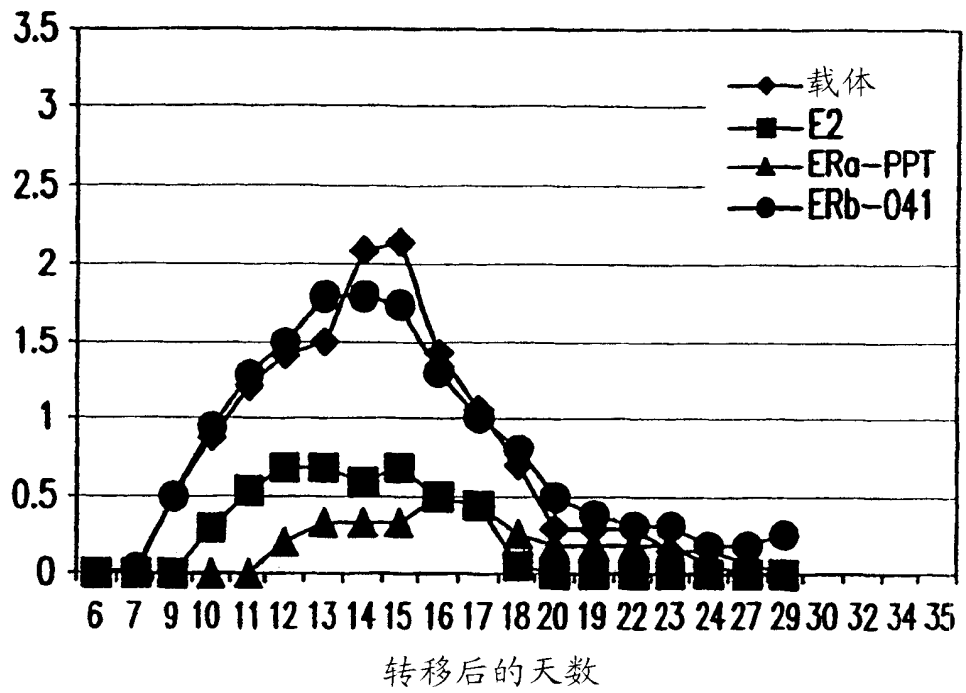


图 2

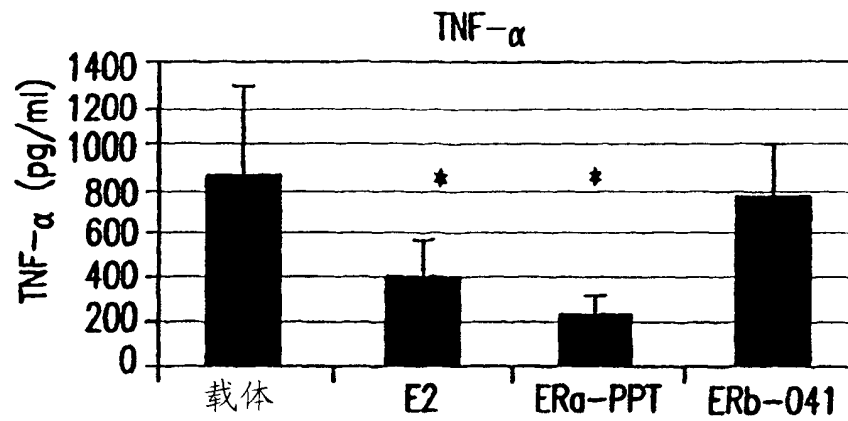


图 3A

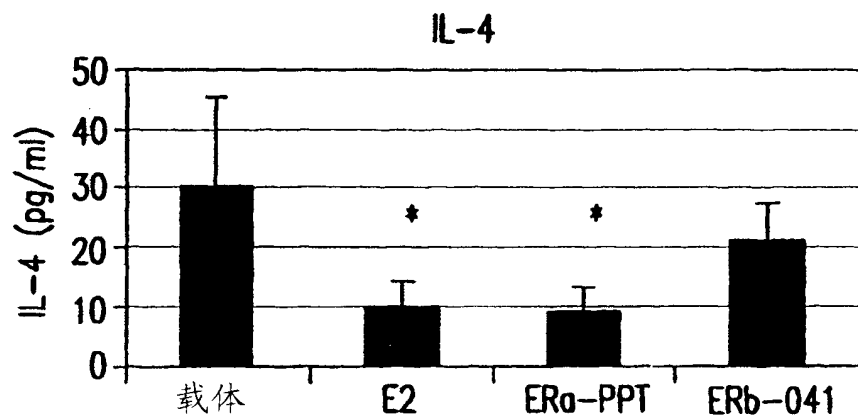


图 3B

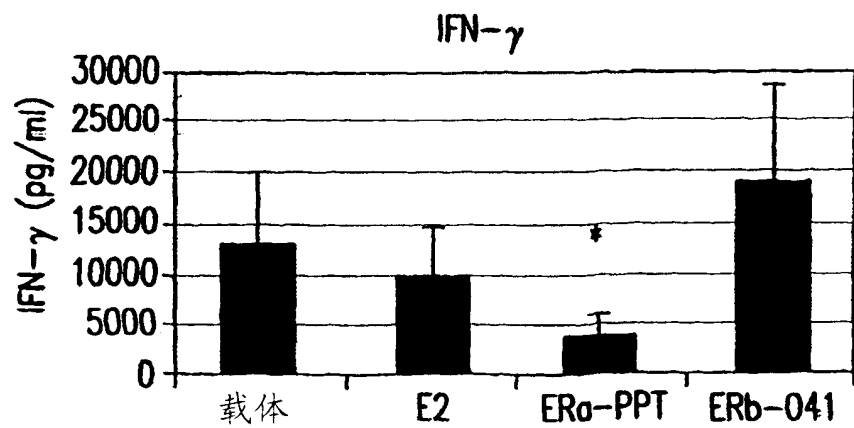


图 3C

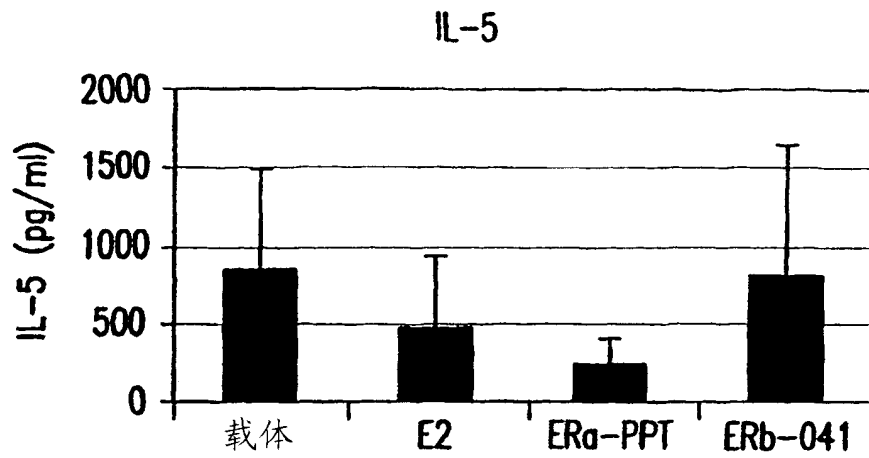


图 3D

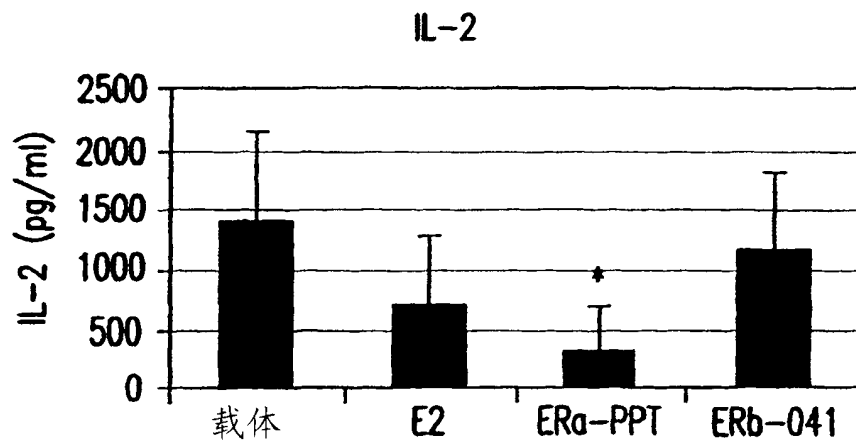


图 3E

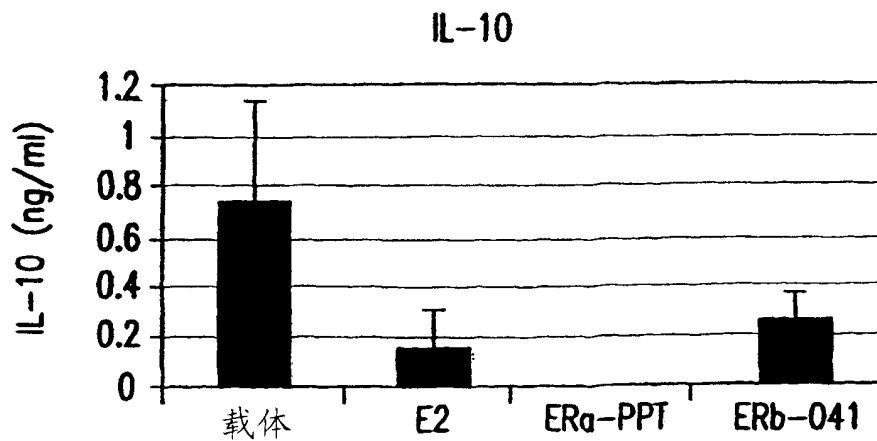


图 3F

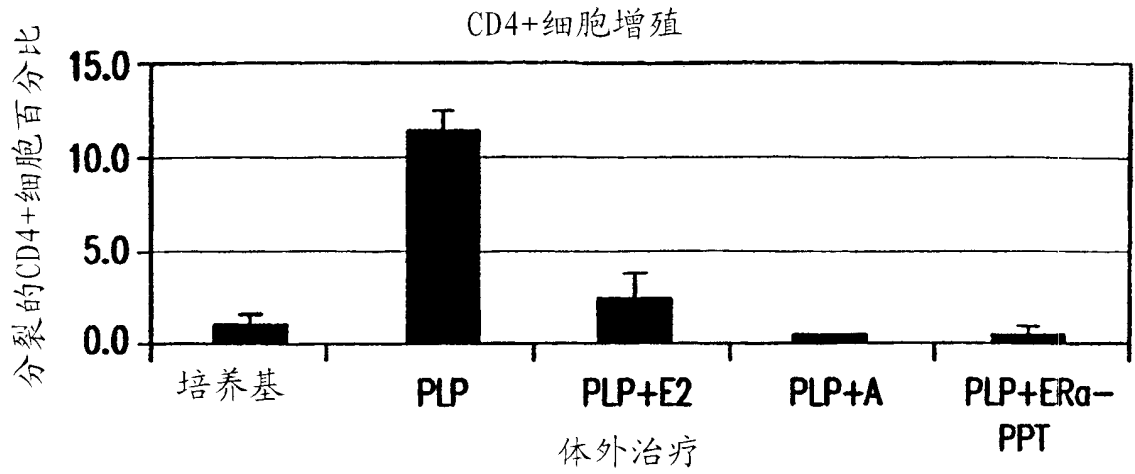


图 4A

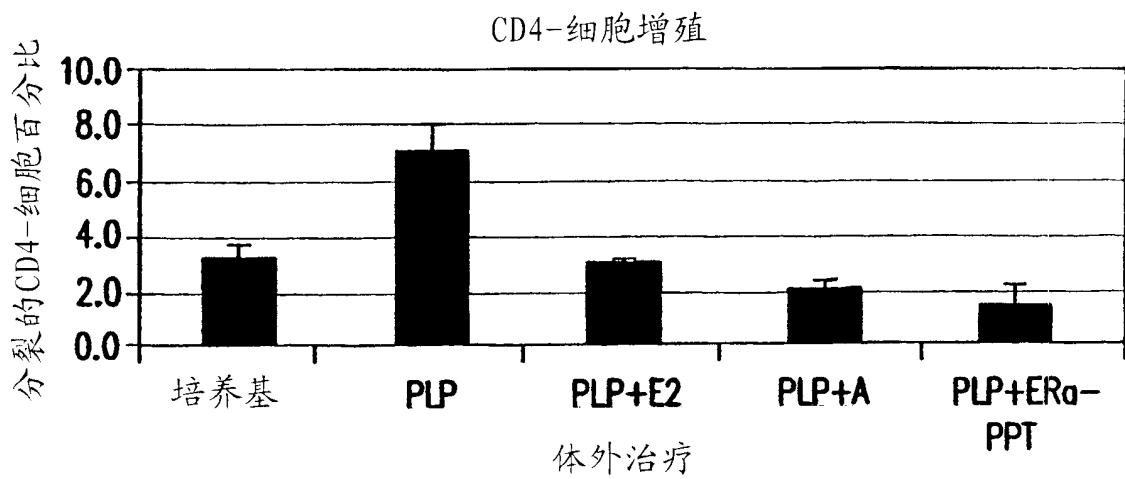


图 4B

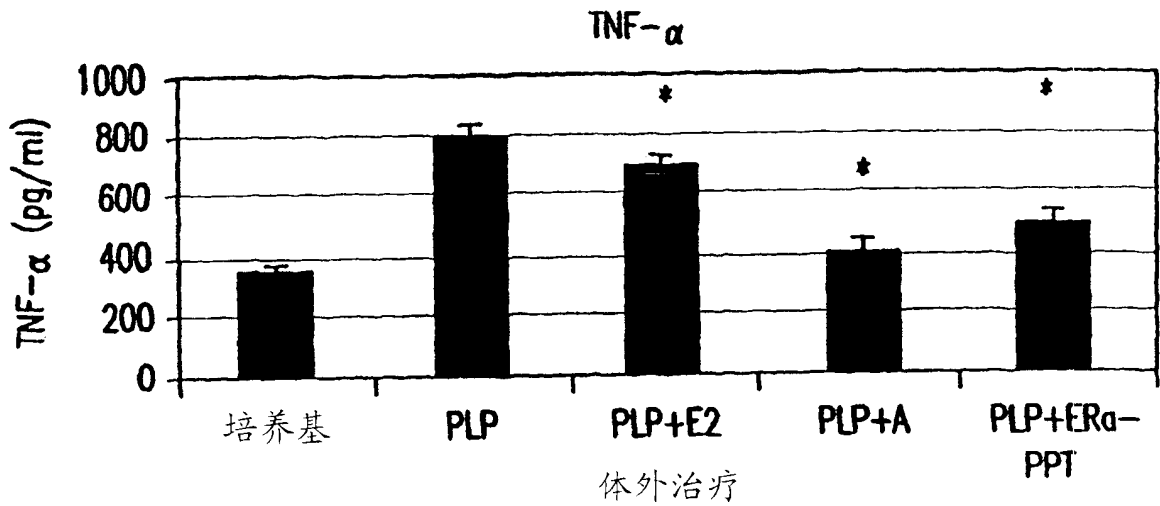


图 5A

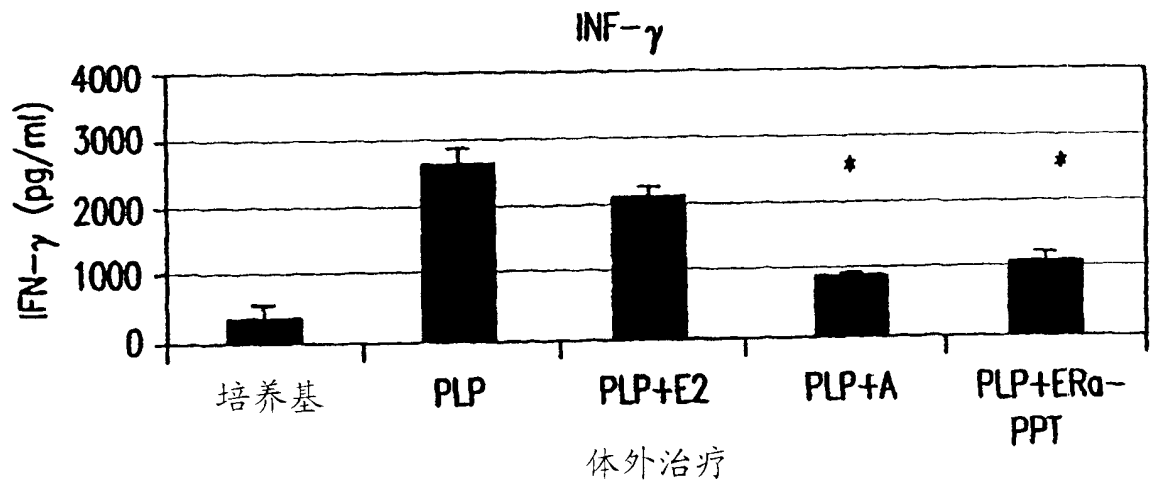


图 5B

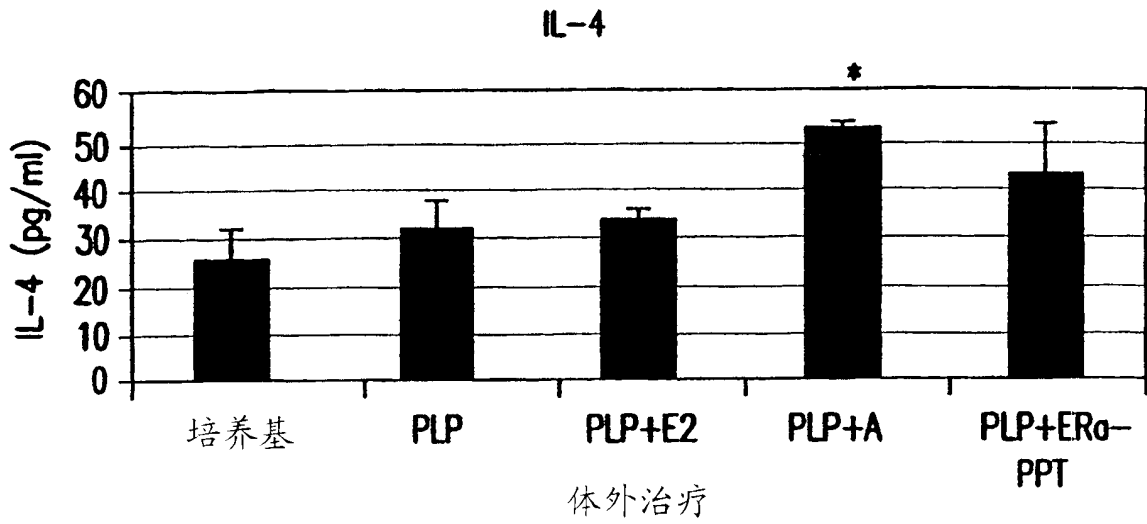


图 5C

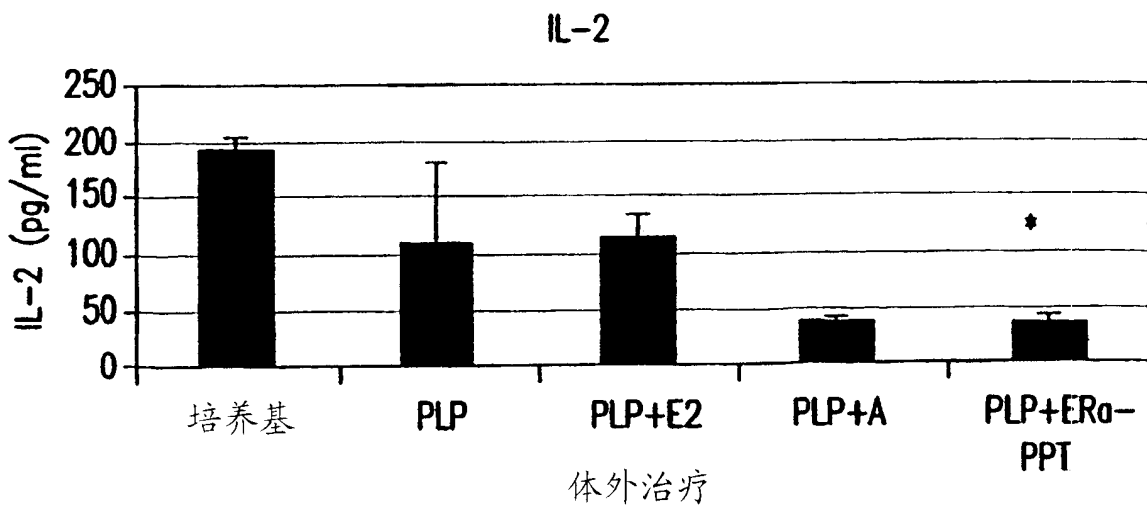


图 5D