



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101375157 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 200780003133.2

(22) 申请日 2007.01.13

(30) 优先权数据

60/759,195 2006.01.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008.07.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/060533 2007.01.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/120947 EN 2007.10.25

(73) 专利权人 印第安纳大学研究和科技公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 D·S·威尔克斯 M·J·克莱门兹

(74) 专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司

公司 11225

代理人 黄威

(51) Int. Cl.

G01N 33/00(2006.01)

G01N 33/566(2006.01)

G01N 33/567(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1227565 A, 1999.09.01, 实施例.

CN 1406248 A, 2003.03.26, 实施例.

US 4444879, 1984.04.24, 说明书第15栏第10行-第34行、图6.

felix fernandez-madrid et al..

Autoimmunity to collagen in human lung cancer. 《cancer research》. 1996, 第56卷第121页-第126页.

审查员 宋国英

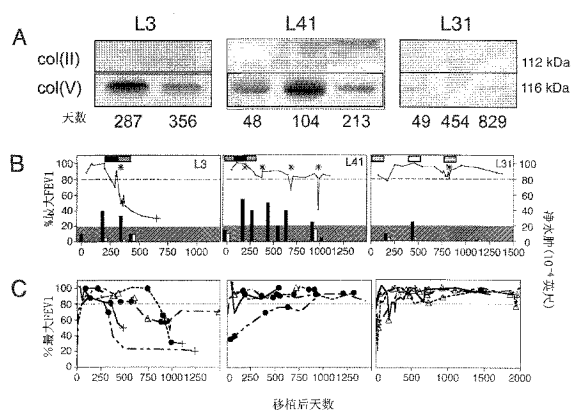
权利要求书1页 说明书39页 附图34页

(54) 发明名称

用于治疗涉及对肺中存在的结缔组织自身免疫反应的肺病的分子

(57) 摘要

本发明公开的各种实施方案包括用于诊断和治疗医学病况的方法,所述医学病况涉及对器官(例如肺)中存在的结缔组织如胶原蛋白的自身免疫反应。在一种方法中,通过分析来自患者的体液或组织样品中对各种类型胶原蛋白(包括例如V型)的自身免疫反应的证据,来诊断肺疾病和病症例如特发性肺纤维化(IPF)患者。一种证明对V型胶原蛋白发生自身免疫反应的分析方法包括如下步骤:自患者获得体液和组织样品;使至少一部分样品与抗V型胶原蛋白抗体的抗原接触;和监测样品与抗原的混合物中表明样本中存在V型胶原蛋白抗体的变化。另一实施方案包括通过施用治疗上有效剂量的各种胶原蛋白(包括V型胶原蛋白)的表位来治疗肺病例如IPF。



1. V 型胶原蛋白或其抗原片段在制备用于治疗特发性肺纤维化 (IPF) 的自身免疫基病理学的药物中的应用。
2. 权利要求 1 所述的应用, 其中 V 型胶原蛋白或其抗原片段用于口服施用、肺内灌注或静脉内注射。

用于治疗涉及对肺中存在的结缔组织自身免疫反应的肺病的分子

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求 2006 年 1 月 13 日提交的美国临时专利申请第 60/759,195 号的权益,该临时专利申请通过引用整体结合入本文。

[0003] 政府资助声明

[0004] 美国政府依据源自国立卫生研究院 (NIH) 的联邦资助号 HL60797 可拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 各种实施方案一般涉及肺病的检测和治疗,一些方面包括鉴定对肺结缔组织例如 V 型胶原蛋白的自身免疫反应的证据,另一些方面包括通过给予患者治疗上有效量的胶原蛋白和类胶原蛋白分子以使患者对例如 V 型胶原蛋白产生耐受,来调节患者对胶原蛋白的免疫反应。

背景技术

[0006] 自身免疫反应的病理学已经很清楚。患者或病畜的自身免疫系统对组织产生损害的病况包括,例如 I 型糖尿病 (青少年)、风湿性关节炎、多发性硬化和一些包括例如牛皮癣在内的炎症病况。典型地,动物的部分自身免疫系统对动物自身组织抗原发动攻势。前面提到的自身免疫疾病就是例证,其结果可以是灾难性的,从慢性可控病况像糖尿病到在多发性硬化中常发生的完全残废和夭折。

[0007] 除了特异和自身免疫反应相关的各种疾病外,其它疾病也可能跟错误的免疫反应有关。因此存在极大兴趣探究各种疾病的病源,来确定自身免疫系统在疾病进展中起什么样的作用 (如果有的话)。

[0008] 另一种涉及患者自身免疫系统攻击必需组织的病理就是器官或组织移植后的同种异体移植排斥。各种器官包括心脏、肾、肝和肺的移植经常导致移植受者的免疫系统攻击被移植的组织。为使同种异体移植排斥最小化,必须十分仔细保证器官供者和受者的匹配。然而,除了完全一样的双胞胎外,几乎不可能实现完美的匹配。为控制随后的同种异体免疫反应,绝大多数移植受者生命期间需要施用免疫抑制化合物的治疗以便控制自身免疫反应,否则该自身免疫反应会摧毁移植的器官和组织。

[0009] 对于不完全匹配的个体间的肺移植,同种异体移植排斥尤其是一个大问题。在肺移植领域,人们普遍认为相对于众多其它实体移植而言,肺移植更容易发生排斥。实际上,肺移植受者中的最主要死因是慢性排斥,称作闭塞性细支气管炎 (BO) (Trulock, 1997; Westra 等, 1990)。慢性排斥的发病机理人们知道的很少;然而发展成慢性排斥反应被认为与重复地急性排斥反应相关。

[0010] 闭塞性细支气管炎 (BO) 是一种慢性排斥反应,它对于该肺的长期接受和同种异体受者的存活是主要障碍,至少影响 60% 的五年后肺移植存活者。BO 的组织病理学研究表

明,炎症和损伤反应导致最终的共同路径,形成跟小气管闭塞相关的损伤。普遍存在的供者HLA抗原被认为是急性排斥反应的靶点和刺激物。然而,尽管较新的治疗剂能降低急性排斥的发生率,B0的发生率并没改变,这表明针对组织特异性抗原的耐药性宿主反应可能参与了慢性排斥过程。

[0011] 许多情况下,器官排斥被认为是宿主T淋巴细胞通过识别同种异体(供者)的主要组织相容性复合体(MHC)分子,导致细胞和体液免疫而引发的。各种治疗(包括施用免疫抑制剂)被用来减弱对移植器官的免疫反应强度。很不幸,许多情况下这些治疗不能阻止随后的排斥,因此诱导对同种异体移植的不明确接受(称为免疫耐受)的最终目标仍待实现。

[0012] 在排斥期间,同种异体MHC分子是免疫反应的刺激物和靶点。因此源自MHC的肽或合成的与MHC抗原一致的肽已成为试图诱导对同种异体移植免疫耐受研究的焦点(Krensky和Clayberger,1997;Oluwole等,1993)。另外,最近有报导利用衍生自MHC分子的非多态性合成肽体外诱导获得了对多种同种异体MHC分子的耐受(Murphy等,1999)。然而,这些报导似乎都没能解决同种异体移植排斥问题,尤其是肺的同种异体移植排斥。

[0013] 既然对供者MHC分子多态性区域的识别通常刺激同种异体免疫反应,那么通过衍生自供者MHC的肽诱导的免疫耐受能够特异性针对供者MHC分子的相应区域。相应地,鉴定个体间高度保守并且能诱导对众多MHC免疫耐受的蛋白/肽是很重要的,可以用此发展有效的疗法治疗正遭受或有发生同种异体移植排斥危险的患者。然而,应用该蛋白/肽来诱导肺同种异体移植的免疫耐受还没有完全评测。再者,已经鉴定的适用于这种免疫耐受的蛋白/肽很少。

[0014] 再者,尽管有不同技术来诱导对实体器官同种个体移植的耐受,例如供者特异血液输血,源自供者的APC细胞胸腺注射,移植前用衍生自供者MHC分子的肽全身性免疫(Krensky and Clayberger,1997),任何一种技术要想有效的话,必须在移植前几周就要知道特异的供者MHC分子,以便有充足时间,例如几周几个月,诱导耐受的形成。然而,在典型的情况中,鉴定潜在的供者和移植手术之间仅有几小时,那么大多情况下对大多数移植受者而言没有充足的时间诱导耐受。

[0015] 对于已经在遭受自身免疫疾病而自身又需要器官移植的移植受者来说,存在增高的对移植器官灾难性排斥的风险。相应地,如果不是移植前,那么当然移植后需要鉴定和治疗任何潜在的基于自身免疫的病状。有许多疾病和病症例如特发性肺纤维化(IPF),很难诊断和治疗,并且这些病的潜在病因未知,需要更多努力来诊断和治疗。

[0016] 那么就清楚了,需要能够鉴定自身免疫疾病例如IPF并且治疗或至少控制这些疾病的方法。在其中首要治疗(肺移植)本身可能受到存在的致病性的自身免疫反应影响的疾病情况中,这种需要尤其强烈。各个方面和实施方案涉及诊断和治疗疾病,该疾病由对肺组分(例如各种特定类型的胶原蛋白)的不希望的自身免疫反应引起或加剧。

发明内容

[0017] 概述

[0018] 一个实施方案是评测人类或动物患者肺疾病和病症(例如IPF)的方法。一个实施

方案包括如下步骤：从患者获取体液或组织样品，和分析该样本来确定患者免疫系统的任何组分是否已经对患者身体器官的结缔组织中任何成分产生免疫反应。典型的结缔组织成分可包括任何类型的胶原蛋白和 / 或胶原蛋白的抗原成分。能触发自身免疫反应的各种胶原蛋白包括例如 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白、III 型胶原蛋白、IV 型胶原蛋白、V 型胶原蛋白和 VI 型胶原蛋白。检测患者肺疾病或病况包括的步骤：自患者获得体液和组织样品；使至少一部分样品与 V 型胶原蛋白的至少一种抗原组分（表位）接触，和监测能表明样本中存在至少一种抗 V 型胶原蛋白抗体的任何信号。该测试可包括对于进行检验所必需或有益的任何类型的其它组分的存在。这些组分包括但不限于结合抗 V 型抗体的二抗，报告分子或原子，结合抗原组分的表面，缓冲剂，稳定剂和抗菌制剂等。

[0019] 一个方面是包含下列步骤的检测：从肺部或与肺接触的体液获取体液或组织样品，使至少一部分样品与 V 型胶原蛋白的至少一个表位或其它任何优先结合到抗 V 型胶原蛋白抗体的分子接触，检测与该结合相关的变化，或样品中有 V 型胶原蛋白至少一种表位时抗 V 型抗体相关的变化。该检测方法和变化可以用于检测诸如 IPF 等的肺疾病或任何其它类型的对至少一部分 V 型胶原蛋白有自身免疫反应的肺疾病和病症。

[0020] 另一个实施方案是确定患者是否对肺组分有自身免疫的方法。典型的自身免疫反应可能涉及体液免疫和细胞免疫中的一种或全部。所述反应包括例如迟发型超敏反应。具有自身免疫特点的肺疾病包括但不限于特发性肺纤维化、急性呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征、继发性胶原血管病和其它纤维化肺疾病等。

[0021] 一个实施方案包括筛选患者来鉴定具有更高风险发展成肺疾病或自身免疫病况的特殊患者或患者群体。所述疾病或病况包括但不限于特发性肺纤维化 (IPF)，急性呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征、继发性胶原血管病和其它纤维化肺疾病等，或其它至少部分是由于对肺结缔组织（例如 V 型胶原蛋白）有自身免疫反应得病况。筛选这些患者的检测包括的步骤有：从患者获取体液或组织样品，使至少部分样品与 V 型胶原蛋白的至少一个表位接触，和监测样品与抗原的混合物获取任何表明样品中存在至少一种类型抗 V 型胶原蛋白抗体的信号。

[0022] 另一实施方案包括监测患者肺病发展或监测治疗遭受该肺疾病或病症患者的各种疗法的疗效。监测这些患者的检测包括的步骤有：从患者获取体液或组织样品，使至少部分样品与 V 型胶原蛋白的至少一个表位接触，和监测任何表明样品中存在至少一种抗 V 型胶原蛋白抗体的信号。

[0023] 一个实施方案包括诊断检测疾病例，如 IPF。在一些实施方案中该检测包括的步骤有：从患者获取体液或组织样品，使至少部分样品与 V 型胶原蛋白的至少一个表位接触，和监测样品与抗原的混合物获取任何表明样品中存在至少一种类型抗 V 型胶原蛋白抗体的信号。

[0024] 另一实施方案包括评估肺移植候选人来鉴定候选者，所述候选者具有更高发展成 BOS 的风险，例如那些经检测对肺中胶原蛋白（例如 V 型胶原蛋白）自身免疫反应阳性的患者。评估候选者的方法包括的步骤有：从候选者获取体液或组织样品，使至少部分样品与 V 型胶原蛋白的至少一个表位接触，和监测抗原与样品混合物以获取样品中的抗 V 型抗体与抗原结合的证据。评估这些候选者的检测包括的步骤有：抗原连到固体表面，使样品与抗原接触，给抗原足够的时间使样品中抗体与抗原结合，洗涤结合的抗原抗体复合物以便除去

多余的抗体和 / 或样品。其它步骤可包括把报告部分连到抗原抗体复合物上和监测该系统获取能表明抗体结合抗原的任何信号变化。在某些实施方案中,检测用抗原是 V 型胶原蛋白的至少一种表位。

[0025] 另一实施方案包括鉴定对肺中结缔组织(如 V 型胶原蛋白)有自身免疫反应的检测方法。一些检测方法包括的步骤有:从给定患者获取体液或组织样品和检测至少部分样品证明存在对 V 型胶原蛋白的自身免疫反应。在一个实施方案中,对样品分析以获得对 V 型胶原蛋白或其抗原类似物表位存在迟发型超敏反应的证据。在另一实施方案中,对样品分析以证明存在 V 型胶原蛋白或其抗原类似物表位的抗体。

[0026] 另一实施方案是一种方法,该方法用于鉴定有很高风险发展成闭塞性毛细支气管炎综合征(BOS)的患者和 / 或监测病症进展或用于治疗该症状疗法的疗效。这些方法一般包括的步骤有:自患者获取血清、血液、肺间隙液、痰液、粘液或组织样品,和对样品分析以证明存在对肺结缔组织的自身免疫反应。在一个实施方案中,所述患者是肺移植的候选者或受者,对样品分析以获得宿主对 V 型胶原蛋白产生免疫反应的证据。在一个实施方案中,样品被用于分析对 V 型胶原蛋白的细胞免疫。在另一实施方案中,样品被用于分析对 V 型胶原蛋白的体液免疫。

[0027] 另一实施方案包括对组织或体液样品进行分析以便获取对 V 型胶原蛋白或类似物、其部分或组分的表位产生免疫的证据。

[0028] 另一实施方案包括是一种方法,该方法用于鉴定那些存在更高风险将要肺移植的受者,所述受者因为对 V 型胶原蛋白或其抗原部分或片段具有自体免疫反应而排斥移植的器官。

[0029] 而另一实施方案是一种方法,该方法用于监测肺组织移植受者来评估他们由于排斥移植的器官而持续的风险,该排斥是由于对 V 型胶原蛋白或其表位或抗原片段的自身免疫反应。

[0030] 另一实施方案是一种方法,该方法用于治疗有疾病或病症的患者或存在发展成疾病或病症危险的患者,该疾病或病症涉及对结缔组织,例如发现于患者器官中的 V 型胶原蛋白,产生自体免疫反应。在一个实施方案中,所述方法包括的步骤有:提供免疫抑制化合物或使患者对抗原例如 V 型胶原蛋白产生耐受的化合物,和给予既定患者治疗有效量的化合物。所述化合物包括但不限于,各种胶原蛋白或胶原蛋白的部分,例如 V 型胶原蛋白或其表位或其抗原类似物。能引起自发免疫反应的典型的结缔组织组分包括但不限于,任何类型的胶原蛋白和 / 或胶原蛋白的抗原组分(表位)。能触发自身免疫反应的各种胶原蛋白包括 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白、III 型胶原蛋白、IV 型胶原蛋白、V 型胶原蛋白、VI 型胶原蛋白和其各种抗原组分。

[0031] 而另一实施方案是一种方法,该方法通过提供胶原蛋白或胶原蛋白的抗原组分抑制患者对肺组织或移植的肺组织中的胶原蛋白或胶原蛋白的抗原组分产生的自身免疫反应,而用于治疗或预防肺疾病或病症的发生,例如特发性肺纤维化、成人呼吸窘迫综合征和其它纤维化肺病症、急性呼吸窘迫综合征、闭塞性毛细支气管炎综合征(BOS)等。所述治疗包括在确定一段时间内给予患者安全和有效量的胶原蛋白或胶原蛋白组分或其类似物,来使患者的免疫系统适应,从而更好的耐受胶原蛋白和至少部分抑制患者对胶原蛋白的自身免疫反应。在一个实施方案中,所述胶原蛋白是 V 型胶原蛋白或其抗原片段或其类似物。

[0032] 另一实施方案包括治疗因自身免疫反应而引起或恶化的一种肺疾病,所述自身免疫反应可包括对于胶原蛋白或胶原蛋白的抗原部分的 T- 细胞活性和迟发型超敏反应。在一个实施方案中患者被施用的胶原蛋白选自 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白、III 型胶原蛋白、IV 型胶原蛋白、V 型胶原蛋白、VI 型胶原蛋白和其各种抗原组分。这些组合物可通过各种方式给药,所述给药方式包括但不限于,肺腔灌注、口服、吸入、皮下注射、滴入和直接注射等。

[0033] 另一实施方案是一种方法,该方法用于鉴定对移植的器官和组织有更高排斥风险的的患者。典型地该方法包含的步骤有:自患者获得血液、血清、体液、痰液或组织样品,和分析所述样品以确定患者的免疫系统是否有任何组分对患者体内器官的结缔组织的任何组分有免疫反应。典型的器官包括但不限于,肺、心脏、肝、肾、胰腺和眼睛的组分。典型的结缔组织组分包括任何类型的胶原蛋白和 / 或胶原蛋白的抗原组分。能引发自身免疫反应的各种胶原蛋白包括 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白、III 型胶原蛋白、IV 型胶原蛋白、V 型胶原蛋白和 VI 型胶原蛋白。

[0034] 另一实施方案是一种试剂盒,该试剂盒用于检测确定一个给定患者是否存在发展成自身免疫肺病的风险,或监测已被诊断为所述病况的患者的健康。在一个实施方案中,所述实际盒包括胶原蛋白的至少一个抗原组分,例如适合用于检测对胶原蛋白的细胞或体液自身免疫的 V 型胶原蛋白或其表位、片段或其类似物。在一个实施方案中,所述实际盒进一步包括至少一个报告部分,该报告部分可以是原子或分子,至少在有指示 V 型胶原蛋白自身免疫反应的分子存在时,所述报告部分表现出信号变化。在另一实施方案中,所述试剂盒进一步包括至少一种缓冲剂、稳定剂、防腐剂、抗菌组合物和佐剂等,所述试剂能够增加半衰期、灵敏度,和 / 或监测的可靠度。在一个实施方案中,所述试剂盒进一步包括弗氏佐剂或其组分或类似物。

附图说明

[0035] 图 1,肺移植受者临床过程相关的抗 col(V)B 和 T 细胞自发反应。

[0036] A 栏,纯化自患者 L3、L41、L31BAL 样品中的用于检测抗 col(II) 或 col(V) 的 IgG 的蛋白质印迹分析。

[0037] B 栏,同样三个患者中抗 col(V) 自发免疫和移植物功能的时间过程。对于每个患者,FEV1(实线,左轴)被调整到最大值的 100%(L3 为 2.3,L41 为 2.4 和 L31 为 2.8)。BOS 水平 1 用灰色虚线表示(最大 FEV1 的 80%)。对于 col(V)(填充条,右轴)和 col(II)(开放条)的 DTH 与通过阴影面积表示的阴性 DTH 反应($< 25 \times 10^{-4}$ 英尺)一起显示。在接近图的顶部,蛋白质印迹免疫结果(来自 A 栏)用矩形表示。急性排斥事件用 * 表示。

[0038] 栏 C,与栏 B 中所见到的反应模式相似的 4 个额外受试者的临床过程和抗 col(V) 反应组合。% Max FEV1(每条线表示一名移植受者),对 col(V) 的阳性抗体和 / 或 DTH(在既定受试者 FEV1 线上的填充圆形)或对 col(V) 的阴性抗体和 / 或 DTH(在 FEV1 线上的开放三角)和受试者死亡(+) 被显示。BOS1 临界(80%最大 FEV1) 用灰色虚线表示。

[0039] 图 2,卡普兰 - 迈耶分析检测发展中抗 col(V) 反应对免于 BOS 的影响。经历移植后 326 天(A 栏)或移植后 760 天(B 栏),具有良好移植物功能的患者基于它们在所述时间之前对 col(V) 的反应被分开。A 栏中,具有阳性抗 col(V) 反应(虚线)的那些样品包括

抗体 /BAL 或 DTH/ 外周阳性血液 ;在 B 栏中, DTH 反应是用来鉴别具有前阳性抗 col(V) 反应的患者的唯一标准。在两栏中,具有阴性前抗 col(V) 反应的患者通过实线表示。Col(V) 非反应组和 Col(V) 反应组之间的差异具有显著性(A 栏, $p = 0.01$;B 栏, $p = 0.03$)。

[0040] 图 3,肺移植后患者中对 col(V) 的 DTH 反应是特异的且在移植前不存在。

[0041] A 栏,检测具有肺出血肾炎综合征(GPS, $n = 5$)的肺移植后患者($n = 8$,任何疾病)或肾移植后患者对 col(II)(开放条)、col(IV)(虚线条)或 col(V)(填充条)的 DTH 反应,这些条代表平均水肿 $\pm$ S. D.。肺移植受者对所述各种胶原蛋白的反应间差异同具有显著性(* $p = 0.001$),同样 GPS 肾移植受者的反应间差异也都具有显著性。

[0042] B 栏,检测具有各种肺疾病的非移植患者对 col(II)(开放条)、或 col(V)(填充条)的 DTH 反应,这些条代表平均水肿 $\pm$ S. D.。具有 IPF 和任何其它疾病的患者中对 col(V) 的反应间差异具有显著性(*, $p = 0.02$)。

[0043] C 栏,对移植前诊断为 IPF 或任何其它疾病的患者的移植物丢失时间的卡普兰-迈耶分析。1 年移植存活率差异具有显著性($p = 0.05$)。通过卡方分析的全部移植物存活率不具有显著的组间差异。

[0044] 图 4, IgG 免疫化学的显微照片显示出在经历急性排斥的肺中有沉淀。如以前所描述,为了检测 IgG 型沉淀,经支气管肺活检(TBB)或正常肺组织的低温断片被固定在丙酮中并染色(Wilkes 等-Journal of Immunology 1995)。A、B、C 和 D 栏显示了 TBB 的 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚型的免疫染色,所述 TBB 是在移植 100 天后经历急性排斥 2 级的肺同种异体移植物获得的。所述在支气管上皮下面的细支气管周的结缔组织中的 IgG2 沉淀(箭头)被标记。相反的,同样的样品中没有检测到 IgG1、IgG3 或 IgG4 沉淀。在上皮下基质中的 IgG2 沉淀不存在于正常肺中和静止移植状态的同种异体移植物中(数据未给出)。

[0045] 图 5,等待肺移植患者中对 V 型胶原蛋白的迟发型超敏反应。我们在大鼠肺移植模型中已报道,所述 DTH 反应是我们所报道的 T 细胞激活和反应的标志。具有 IPF 而不是其它型肺疾病的患者对 V 型胶原蛋白具有显著增强的 DTH 反应。这表明这些患者相对自身抗原已经有激活的 T 细胞。

[0046] 图 6,肺组织染色显微照片显示了被移植到未处理的 WKY 大鼠(A)、先前用鸡卵溶菌酶免疫的 WKY 大鼠(B)或先前用 V 型胶原蛋白免疫的 WKY 大鼠(C)的肺同系移植物的病理效果。数据显示来自 col(V) 而不是 HEL 的事先敏化导致在移植后 30 天肺的破坏。所有大鼠都未接受任何免疫抑制药物或其它治疗。数据是 HEL 和 col(V) 组的 6 只大鼠的典型代表并强于未治疗组 S0 大鼠。

[0047] 图 7,表 1. 患者统计资料概述。这些病况是在已经历肺移植过程的患者中诊断的并与各种手术后病理有关。

[0048] 图 8,表 2. 跟踪与 BOS 相关的各种因素的数据概述。与 BOS 相关的因素。

[0049] 图 9,使用基于检测设计的抗体微珠,在血清样品中检测抗胶原蛋白 V 抗体的数据图示。峰右移表示抗胶原蛋白 V 抗体的水平高。在左栏表示收集自专利的数据。右栏表示对照,在该对照中各种量的抗胶原蛋白 V 抗体被加入到血清中。

[0050] 图 10,移植两周后,在对照同种异体移植受者中对供者同种抗原、col(V) 和第三方同种抗原的 DTH 反应的降低。天然 WKY 是对照。动物接受 10^7 照射过的(3000rad)源于供者 F344 的脾细胞、第三方(BN)脾细胞,或 15ug 的 col(V),所述 F344 的脾细胞、第三方

(BN) 脾细胞, 或 15ug 的 col (V) 注射到右耳廓, 稀释剂注射到左耳廓。在单盲试验中注射前立即和注射后 24 小时, 用游标卡尺测量耳厚度 (Mitutoyo, Field tool Supply, Chicago, 111.) 并按照所述方法计算特定的耳水肿。数据代表以 $\text{mm} \times 10^{-3}$ 形式表示的每组中 4 只大鼠的特定耳水肿平均值 $\pm \text{SEM}$ [与用 F344 脾细胞或 col (V) 刺激天然 WKY 大鼠相比 * $p < 0.0001$ 和与用 col (V) 或 F344 脾细胞刺激天然 WKY 大鼠相比 $^+p < 0.0001$]。

[0051] 图 11A、图 11B 和图 11C, 每周四次灌注 1.5×10^5 单独的同种异源 (C57BL/6) BAL 细胞, col (II) 或 col (XI) (各 50ug), 灌注 4 周后再进行每周 4 次滴注 C57BL/6 BAL 细胞后, BALB/c 小鼠的肺组织学。图 11A 显示在接受来自 C57BL/6 小鼠 BAL 细胞灌注的 BALB/c 小鼠肺中支气管周和血管周单核细胞浸润。在接受每周灌注 col (II) (图 11B) 或 col (XI) 的 BALB/c 小鼠的肺中观察到相似病理损伤。

[0052] 图 12, 在正常 WKY 大鼠、对照同系移植肺、对照同种异体移植肺和喂食 col (V) 同种异体移植肺中的 BAL 液体差异细胞计数。移植两周后, 移植的肺进行 BAL。通过光学显微镜在细胞离心涂片器上计数 300 细胞 / 视野来确定差异细胞计数。Mac, 巨噬细胞; Lym, 淋巴细胞; PMN, 多形核细胞。数据表示 4 个正常 WKY 肺, 4 个对照同系移植、5 个对照同种异体移植和 5 个喂食 col (V) 同种异体移植肺的平均值 $\pm \text{SEM}$ 。(与正常或同系移植肺相比, 对于 PMN' s * $p < 0.038$ 和对于淋巴细胞 $^+p < 0.000001$; 和与对照同种异体移植相比, 对于 PMN' s PMN' s $^{\#}p < 0.023$ 对于淋巴细胞 $^{+\$}p < 0.0001$)。

[0053] 图 13A、图 13B 和图 13C, 移植两周后移植受者的连续胸腔 X 光照片。左肺区域 (箭头) 的短白线表示用于血管吻合的套夹。在图 13A 中, 同系移植受者对照显示正常的胸腔 X 光照片。在图 13B 中, 同种异体移植受者对照的 X 光照片显示表示严重排斥的同种异体移植物的严重浸润和完全乳浊化。在图 13C 中, 移植两周后, 喂食 col (V) 的同种异体移植受者仅显示轻微浸润。胸腔 X 光照片为每组中 5 只大鼠的代表。

[0054] 图 14A、图 14B、图 14C、图 14D、图 14E 和图 14F, 上栏: 移植两周后 (后期观测), 对照同系移植肺的大体解剖图 (图 14A), 对照同种异体移植肺的大体解剖图 (图 14B), 和喂食 col (V) 同种异体移植肺的大体解剖图 (图 14C)。在每栏中左 (L) 肺是移植的肺而右 (R) 肺是天生的肺。同种异体移植肺对照 (b 栏中“L”) 相比于天生的肺为茶褐色, 缩小且致密坚硬。然而, 喂食 col (V) 同种异体移植肺 (c 栏中“L”) 具有同系移植肺 (a 栏中“L”) 的外观。对照同系移植肺 (图 14A) 显示无病理损伤且与正常 WKY 肺一样。显微照片是每组中 5 只大鼠的代表。下栏: 移植两周后, 对照同系移植的组织学 (图 14D), 对照同种异体移植的组织学 (图 14E) 和喂食 col (V) 同种异体移植的组织学 (图 14F)。对照同系移植显示正常呼吸道和血管结构 (图 14D)。对照同种异体移植显示与严重排斥一致的广泛的血管周的、支气管周的和肺泡的单核细胞浸润 (图 14E)。相反地, 喂食 col (V) 的同种异体移植植物显示仅仅轻微至中度血管周的和支气管周的单核细胞浸润 (图 14F)。显微照片是每组中 5 只大鼠的代表。(100 $\times$ 放大)。

[0055] 图 15, 表 3. 排斥病理等级 (该表包括来自对照和移植排斥动物模型的数据)。

[0056] 图 16, 通过口服 col (V) 降低对供者同种抗原的 DTH 反应。移植两周后, 对照同种异体移植受者和喂食 col (V) 同种异体移植受者用 10^7 照射过的 (3000 拉德) 源于供者 F344 的脾细胞刺激右侧耳廓, 而稀释剂刺激左侧耳廓。在单盲试验中注射前立即和注射后 24 小时, 用游标卡尺测量耳厚度 (Mitutoyo, Field tool Supply, Chicago, 111.) 并计算特定的

耳水肿。数据表示每组中 4 只大鼠的用 $\text{mm} \times 10^{-3}$ 形式表示特定耳水肿的平均值 $\pm \text{SEM}$ 。(相比于对照同种异体移植 $*p < 0.02$)。

[0057] 图 17, 正常 WKY 大鼠、对照同种异体移植受者和喂食 col(V) 同种异体移植受者的血清中 TGF- β 水平。血清中 TGF- β 水平通过 ELISA 检测。数据表示每组 4 只大鼠的平均值 $\pm \text{SEM}$ 。(相比于对照同种异体移植 $*p < 0.05$)。

[0058] 图 18, 在喂食 col(V) 同种异体移植受者中, TGF- β 的中和恢复对供者的 DTH 反应。移植后两周, 喂食 col(V) 的 WKY 大鼠用 10^7 照射过的 (3000 拉德) 源于供者 F344 的脾细胞与 5ug 抗 -TGF- β 多克隆抗体或抗 -IL-4 或 IL-10 抗体混合物刺激右侧耳廓, 所述混合物溶于 PBS 中。左侧耳廓接受同等体积的稀释剂加上脾细胞, 并作为对照部位。对于阴性对照, 喂食 col(V) 同种异体移植的独立组接受将对照免疫球蛋白和脾细胞注射到右耳廓, 而同等体积的稀释剂加上脾细胞被注射到左耳廓。在单盲试验中注射前立即和注射后 24 小时, 用游标卡尺测量耳厚度 (Mitutoyo, Field tool Supply, Chicago, Ill.) 并按下面所描述计算特定的耳水肿。SpI, 脾细胞。数据表示每组中 4 只大鼠以 $\text{mm} \times 10^{-3}$ 形式表示的特定耳水肿平均值 $\pm \text{SEM}$ [$*p < 0.03$ 和 $^{**}p > 0.05$ 相比于用混合有对照免疫球蛋白的抗原刺激喂食 col(V) 的同种异体移植]。相对于对照同种异体移植而言, 在喂食 col(V) 的同种异体移植植物中抗 -TGF- β , 抗 -IL-4 和抗 -IL-10 抗体对 DTH 反应的恢复分别为 75.7%, 24.3% 和 39.9%。

[0059] 图 19, 移植后十周, 对照同种异体移植中对供者同种抗原、col(II)、col(V)、col(XI) 和第三方同种抗原的 DTH 反应。动物接受将 10^7 照射过的 (3000rad) 源于供者 F344 的脾细胞、第三方 (BN) 脾细胞, 或 15ug 的 col(II)、col(V) 或 col(XI), 注射到右耳廓, 稀释剂注射到左侧耳廓。在单盲试验中注射前立即和注射后 24 小时, 用游标卡尺测量耳厚度并按照下述方法计算特定的耳水肿。SpI, 脾细胞。数据表示每组中 3 只大鼠以 $\text{mm} \times 10^{-3}$ 形式表示的特定耳水肿平均值 $\pm \text{SEM}$ [$*p < 0.05$ 相比于用 F344 的脾细胞或 col(V) 刺激的天然 WKY 大鼠]。

[0060] 图 20、混合白细胞反应。不同比例的经丝裂霉素 C 处理的 F344 脾细胞 (刺激物) 与 3×10^5 来自 WKY 大鼠 (正常) 或喂食 col(V) 的 WKY 大鼠的淋巴结 T 淋巴细胞 (应答物) 孵育。完成 5 天孵育前 18 小时, 细胞经 ^3H 脉冲, 通过胸苷掺入的数量 / 分钟 (cpm) 测定增殖。刺激指数等于通过不同量刺激物细胞诱导的淋巴结淋巴细胞的增殖倍数, 所述增殖倍数是相对于单独的淋巴结淋巴细胞的增殖。数据代表三次实验。

[0061] 图 21A、图 21B、图 21C 和图 21D。上栏: 移植十周后 (后期观测), 对照同种异体移植肺的大体解剖图 (图 21A), 和喂食 col(V) 同种异体移植肺的大体解剖图 (图 21B)。在每栏中, 左 (L) 肺是移植的肺而右 (R) 肺是天生的肺。对照同种异体移植肺相比于天生的肺为茶褐色, 缩小且致密坚硬。然而, 喂食 col(V) 同种异体移植肺具有几乎正常的外观, 仅轻微变色。下栏: 移植十周后, 对照同种异体移植的组织学 (图 21C) 和喂食 col(V) 同种异体移植的组织学 (图 21D)。对照同种异体移植显示严重的隙间单核细胞浸润、纤维化和由颗粒化组织引起的小气管闭塞, 这就是 B0 病理损伤。相反地, 喂食 col(V) 同种异体移植植物仅出现轻微肺泡浸润, 无间隙炎症, 表明是轻微急性排斥的病理 (A2 级)。显微照片代表了每组的 5 只大鼠。

[0062] 图 22, 移植 10 周后, 正常 WKY 大鼠、对照同种异体移植受者和喂食 col(V) 同种异

体移植受者的血清中 TGF- β 水平。血清中 TGF- β 水平通过 ELISA 检测。数据表示每组 3 只大鼠的平均值 $\pm$ SEM。(相比于对照同种异体移植 * $p < 0.05$)。

[0063] 图 23, DTH 反应中 TGF- β 的中和。喂食 col(V) 的 WKY 大鼠接受将 10^7 照射过的 (3000rad) 源于供者 F344 的脾细胞与 5ug 多克隆鸡抗鼠 TGF- β 抗体混合物注射到右侧耳廓, 而稀释剂注射到左侧耳廓。对于阴性对照, 喂食 col(V) 同种异体移植的独立组接受 10^7 照射过的 (3000rad) 源于供者 F344 的脾细胞与 5ug 对照鸡免疫球蛋白或对照羊免疫球蛋白混合物, 该混合物被注射到右耳廓, 而稀释剂被注射到左耳廓。按照所述方法测定特定耳水肿。

[0064] 图 24, 天然和喂食 col(V) 的 WKY 大鼠中对 BSA 的 DTH 反应。天然和喂食 col(V) 的 WKY 大鼠通过皮下注射被灌注 100ug 存在于佐剂中的 BSA, 7 天后, 用 2% 热变性聚集的 BSA 溶液注入到右耳廓, 稀释剂注入到左耳廓, 来刺激大鼠。在单盲试验中注射前立即和注射后 24 小时, 用游标卡尺测量耳厚度并按照上面所述方法计算特定的耳水肿。未灌注 WKY 大鼠作为对照。数据代表以 $\text{mm} \times 10^{-3}$ 形式表示的每组中 4 只大鼠的特定耳水肿平均值 $\pm$ SEM (与未灌注天然 WKY 大鼠相比 * $p < 0.018$ 和与灌注 WKY 大鼠相比 * $p < 0.05$)。

[0065] 图 25, 表 4. 是实施例 6 中使用的试验组的清单。

[0066] 图 26, 表 5 是实施例 8 中报道的试验结果的概述。

具体实施方式

[0067] 为增进对本发明的理解, 现在将引用优选实施方案, 并用专业语言描述所述实施方案。要理解, 本发明所属领域技术人员可以对本发明原理作出包括在本发明的范围内的改变、调整和进一步应用, 但不是要由此限制本发明的范围。

[0068] 所提供的大量说明和试验是对本发明的说明, 而不是限制本发明。无论是以描述、比较、说明或举例的方式提供, 本发明的操作理论并不是限制性的。

[0069] 本文公开和暗指的组合物和方法学可用于人类和任何其它低等动物 (例如宠物、动物或家畜) 应用。因此, 下列实例和讨论是引导和说明性的, 但不是对本发明内容的限制。

[0070] 如本文所使用的, 在例如词组“评测患者的……”中所使用的术语“评测”包括但不限于, 诊断、筛选、评价和监测等任何可辨别的参数, 该参数与既定的疾病、病症或病况等相关。本发明中所用的术语“评测”包括但不限于, 至少下列一种活动: 诊断患者以确定他们是否患有特定的或一般医学病况监测有已知或可疑医学病况的患者, 以便追踪疾病发展和疗法的功效; 筛选患者以便评估他们发展成既定医学病况的可能性; 评价既定患者已具有或存在发展成既定疾病或医学病况风险的可能性; 检测疾病、症状或病况的倾向或易感性的存在; 和预测发展成或从既定医学病况、疾病、病症等恢复的长期或近期预后。

[0071] 本发明所用术语“医学病况”包括症状、疾病和病况等。

[0072] 对大鼠肺移植模型的研究表明肺被排斥是由于特异的抗 V 型胶原蛋白的自身免疫反应。其它讨论参见: 基于 2003 年 9 月 13 日由 David S. Wilkes 提交的美国专利申请第 10/243,797 号的美国专利申请公开号第 2003/0078208A 号, 并且其全部内容通过引用结合入本文; 和, Davic C. Mares 等发表的“V 型胶原蛋白调节肺中同种异体抗原诱导的病理学和免疫学,” Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, Vol. 23, pp. 62-70, 2000。V 型胶原蛋白 [col(V)]

是肺中的小胶原蛋白 (Madri 和 Furthmayr, 1980), 定位于细支气管周的结缔组织 (Madri 和 Furthmayr, 1979), 泡状间隙 (Konomi 等, 1984), 和毛细管基底膜 (Madri 和 Furthmayr, 1979)。(V) 的 $\alpha 1$ 链与 XI 型胶原蛋白的链 [(XI)] 有将近 76% 的同源性 (Cremer 等, 1994), (XI) 基因定位于小鼠和人的 II 类 MHC 位点 (Hanson 等, 1989), 与 II 类 MHC 共享氨基酸序列 (Wilson 等, 1995)。除了肺, MHC 衍生肽已经用于诱导同种异体移植中的耐受。由于 $\alpha 1$ (V) 中可能存在 MHC 样序列, 本发明选用 $\alpha 1$ (V) 来调节肺同种异体移植的免疫反应。

[0073] 现在参考实施例 1 的结果 (在下面), 对胶原蛋白自身免疫反应加强的肺移植患者似乎有更高的移植排斥风险。依照这些和其它观察, 一个实施方案是一种方法, 该方法通过测量等候或已做肺移植患者对胶原蛋白的细胞或体液自身免疫反应来预测和 / 或追踪肺移植排斥的进展。在一个实施方案中用于追踪肺移植排斥的分子标记是对 V 型胶原蛋白和 / 或 V 型胶原蛋白表位的自身免疫反应。据医学文献报道, 在心脏和皮肤同种异体移植排斥时, 自身抗原, 例如肌球蛋白和热激蛋白可能变成免疫系统的靶标 (Fedoseyeva 等, 1999; Duquesnoy 等, 1999; Birk, 1999)。还有报道说啮齿类中的同种异体排斥与 T 细胞对 V 型胶原蛋白的反应有关 (Mares 等, 2000), 该蛋白是肺和皮肤中的小蛋白, 是组织弹性和依从性所必需 (Schwarze 等, 2000)。肺移植后, $\alpha 1$ (V) 的片段被释放到支气管肺泡灌洗 (BAL) 液, 在移植的肺同系移植植物中, $\alpha 1$ (V) 特异性 T 细胞的过继转移诱导“排斥样”病理反应 (Haque 等, 2002)。在大鼠肺移植前口服施用 $\alpha 1$ (V) 来诱导耐受可削弱极性排斥和 BO 的发生 ((Yasufuku 等, 2001; Yasufuku 等, 2002)。

[0074] 一个合理的可能性就是接受肺移植的患者可能发展成针对 $\alpha 1$ (V) 的细胞和 / 或体液免疫, 该自身免疫反应增加了他们发展成 BO 的风险。实施例 2 的一些结果 (在下面) 与肺移植后的 $\alpha 1$ (V) 免疫反应一致, 表现出主要的发展成闭塞性毛细支气管炎综合征 (BOS) 的风险因子。

[0075] BO 的组织病理学表明伤处的炎症和反应导致最终共同途径, 损伤的发展导致移植丢失。除肺移植之外缺乏这种症状, 表明同种免疫机制在这一过程中起主要作用。然而, 急性排斥和 MHC 不匹配并不是导致 BOS 的必要条件, 这一事实表明其它免疫因素可能很重要。实施例 2 的结果 (在下面) 表明肺移植可诱导对自身抗原 V 型胶原蛋白的重新自身免疫 (Estenne 等, 2002)。确实, 本研究发现肺移植后 $\alpha 1$ (V) 自身免疫引起的相对风险比其它因素如急性排斥的发生率高 8-10 倍, 曾认为发生急性排斥就有移植后发展成 BOS 的风险 (Sharples 等, 2002)。

[0076] 对肺移植受者外周血中发挥 DTH 活性的 T 细胞的初步分析表明主要的 T 细胞是 $CD4^+$, 尽管不能排除 $\alpha 1$ (V) 特异性的 $CD8^+$ T 效应细胞的作用 (Burlingham, W., Rodriguez, D. 和 Jankowska-Gan, E., 未发表)。在大鼠模型中, 从排斥性肺移植植物获得并体外培养的 $\alpha 1$ (V) 特异的 II 类 MHC 限制性 $CD4^+$ T 细胞克隆能够介导左肺同种移植的非排斥病状, 同时伴随一些病状向天生右肺的蔓延 (Haque 等, 2002)。当同样的克隆注射到正常大鼠中, 为发现对天生肺产生损害, 这些结果表明自身免疫反应的起始需要伴随同种移植步骤的缺血再灌注损伤。从排斥性同种异体移植植物分离到的 T 细胞克隆并非都能够致病, 有些似乎有保护性 (D. Wilkes, 未发表), 该现象表明 $\alpha 1$ (V) 或其它组织抗原特异性 $CD4^+$ T 调节细胞可在抑制自身免疫病理中起作用。事实上, 在 L3 患者中 BOS 发生后移植物的迅速丢失和在一些抗 $\alpha 1$ (V) 自身免疫的患者中的功能稳定 (图 1B, 左栏和 1C, 中栏), 与丢失或获得供者

抗原的可控性 DTH 反应相关 (W. Burlingham 和 E. Jankowska-Gan, 未发表), 该现象曾在人 (VanBuskirk 等, 1998 ;Burlingham 等, 2000 ;Cai, 等, 2004) 和非人灵长类 (Torrealba 等, 2004) 的肾移植中有描述。

[0077] HLA DR 错配是器官移植中早期急性排斥的一个熟知因素 (Ayoub 等, 1982)。该现象部分说明了为什么 DR 错配跟 BOS 相关 (van denBerg 等, 2001)。HLA DR 错配也可能通过建立针对供者和自身抗原的免疫调控状态而在肺移植中起有益的作用 (Rodriguez, 2004)。

[0078] 在 B 细胞对 V 型胶原蛋白的自身免疫和 Goodpasture 综合征之间存在公认的联系 (Hudson 等, 2003), 该联系在本研究中用转移体内迟发型超敏反应检测法在 T 细胞水平得到确证 (图 3B)。在本疾病的大鼠模型中, 由于 T 细胞介导的损伤, IV 型胶原蛋白从肾中释放使系统倾向于 B 细胞免疫和抗肾小球基膜 IgG 沉积。相似的, 在同种异体反应的情况下, col(V) 从局部缺血损伤的肺移植植物中的释放可能会激活 col(V) 特异性效应 T 细胞, 促进局部 col(V) 特异 B 细胞反应和皮下基质中 C' - 固定的 IgG 的沉积。

[0079] 本发明实施例 2 的一个结果发现在患有 IPF 的患者中预先存在 col(V) 特异自身免疫反应。IPF 的病因仍是个秘密, 这也是这些患者肺移植后 (REF) 不良预后的原因。目前, 还有待确定 col(V) 特异 T 细胞是否有助于肺病潜在的纤维化过程或有助于肺移植后发生 IPF 的糟糕早期结果, 虽然本实施例这些数据明显与这些现象间的联系一致。

[0080] 实施例 2 的未预料到的结果是移植之前通过恢复或加强对 col(V) 的自身耐受可治疗被诊断为 IPF 或有发展成 IPF 风险的患者。一个实施方案是一种治疗 IPF 的方法, 该方法通过口服疗法 (Yasufuku 等 2001 ;Yasufuku 等, 2002) 进入肺间隙或基于已设计给药方案的脱敏策略施用 col(V) 来增强患者对胶原蛋白的耐受, 所述胶原蛋白包括但不只限于 V 型胶原蛋白和其抗原组分和变体。

[0081] 另一实施方案是一种基于抗体的分析方法, 该分析方法用于诊断和监测包括自身免疫反应在内的疾病。

[0082] 根据一些实施方案, 检测胶原蛋白抗体的存在可用任何一种免疫检测程序 (例如 ELISA) 来完成。众多免疫检测程序可参考标准免疫检测教科书, 这些免疫检测程序包括但不限于非竞争型的单位点和双位点或夹心式分析, 也可以是传统的竞争性结合试验。

[0083] 夹心式分析法属于最有用和最常用的基于抗体的分析方法, 该方法可应用于各种实施方案。也存在对夹心式分析法的大量改变, 并都包含于各种实施方案。简单来说, 在检测样品中抗体的典型检测方法中, 未标记的抗原被固定于固相基质, 被样品与被固定的抗原分子接触。经过适当时间的孵育后, 例如, 足够形成抗体 - 抗原复合物的时间, 标记有报告分子能够产生可测信号的第二种抗体例如抗 - 人 IgG 被加入和孵育, 施用足够的时间形成抗体 - 抗原 - 标记抗体复合物。任何未反应的物质被洗掉, 待测样品中抗体的存在可通过观察报告分子产生的信号来确定。所述结果可以是定性的, 例如简单观察可见信号, 也可以是定量的, 可通过比较兴趣样品产生的信号和包含已知量待测抗体的对照样品信号获得。对该检测法的改变包括同时分析, 即样品和标记的抗体同时被加入已固定的抗原中。这些技术是众所周知的, 包括任何小的变更都为技术领域人员所了解。

[0084] 在典型的夹心式分析中, 抗原被固定, 例如通过共价或被动结合到固相表面。在一些实施方案中, 典型的固相表面是玻璃和多聚体, 最通用的聚合体是纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。固相支撑物的形式包括试管、珠子、圆盘或微孔反应板

或其它任何适合进行免疫检测的表面。各种结合方法为本领域公知，一般包括将抗原交联、共价结合或物理吸附到给定表面。被固定的抗原经冲洗后可加入测试样品。然后，待测液体样品与被固定的抗原接触并孵育足够长的时间（例如 2-40 分钟），在合适的条件下（例如 25℃）使样品中任何抗体与抗原结合。实际接触时间、缓冲条件和温度等是易于调整的参数并且典型地在给定检测中容易达到。孵育之后，固定化抗原包括任何已结合的抗体经冲洗和干燥，与已结合的抗体的特异性二抗孵育，例如抗 - 人 IgG。第二种抗体连接有报告分子，该报告分子用于指示二抗与抗体 - 固定化抗原复合体的结合。

[0085] 本发明所用术语“部分”包括分子、原子和化学官能团。

[0086] 本发明所用术语“报告分子”包括通过其化学本质可提供分析上可测信号的分子，该信号可用于检测与抗原结合的抗体。检测既可以是定性的也可以是定量的。该类型检测中最通用的报告分子包括酶、荧光团或放射性分子（例如放射性同位素）和化学发光分子等。在酶联免疫分析（EIA）中，酶一般通过戊二醛和高碘酸盐的方式被偶联到二抗上。然而，大家都公认有各种各样不同偶联技术的存在，所述技术在本领域内易获取，通过最小限度实验就能很容易实现特定检测和实验的最优化或近似于最优化条件。这些类型的检验中通用的报告酶包括但不限于，辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等。针对特意酶所用的底物用来产生与报告分子或原子存在相关的既定信号的的可测变化，所属信号的产生依赖于相应酶的水解反应。也可以采用荧光底物，该荧光底物可产生荧光产物，而不是上述发色底物。大多数情况下，酶联抗体加入到一抗 - 抗原复合物中，使其结合，然后超量试剂被洗掉。含有合适底物的溶液被加入到抗体 - 抗原 - 标记抗体复合物中。底物与连到二抗上的酶反应产生可测的可见信号，该信号通常通过光度计仪器被进一步定量，以指示样品中的抗体量。所用术语“报告分子”可进一步拓展到细胞粘着或抑制粘着的使用，例如玻璃或橡胶珠等。另外，报告子也可以是放射性基团或原子，其存在可用闪烁计数来检测。

[0087] 可选择地，荧光化合物例如荧光素和若丹明可被化学偶联到抗体上，而不会明显改变其结合能力。当被特定波长的光活化时，荧光标记抗体吸收光能，包括使分子处于激发状态，随后发出特殊颜色的光，在一些实施方案中发射的光可用光学显微镜观看和检测，但在其它实施方案中所述信号可能会在可见光谱之外。就像 EIA 中一样，荧光标记抗体与一抗 - 抗原复合物结合。洗去未结合的试剂后，余下的三联复合物被暴露于合适波长的光下，观察到的荧光指示兴趣抗体的存在。免疫荧光技术和 EIA 技术都是本领域建立的很好的方法，可很容易地适用于本发明公开的各种实施方案中。另外，也可采用其它报告分子，例如放射性同位素、化学发光、荧光或生物发光分子等。

[0088] 为实践一些实施方案，必须获得纯的或部分纯的胶原蛋白或其一个表位或抗原部分。这些材料例如 V 型胶原蛋白或其抗原部分可通过各种方式容易地获得，这些方式包括但不限于，例如，动物资源、人尸体或重组方式。其它的方法包括胶原蛋白例如 V 型胶原蛋白的部分消化物。

[0089] 一个方面包含通过鉴定对肺结缔组织例如 V 型胶原蛋白的自身免疫反应的证据来诊断疾病，例如特发性肺纤维化。结缔组织的证据可包括 V 型胶原蛋白和其表位。像实施例 3 中阐明的那样，一个方法是通过测定患者体液中抗 V 型胶原蛋白抗体的量来鉴定和 / 或跟踪患有 IPF 或有很风险发展成 IPF 或 BO 或 BOS 患者。

[0090] 另一方面包括对患者的治疗,该患者被诊断有医学病况,或被认为有医学病况,或被认为有很高风险发展成与肺中自身免疫排斥相关的医学病况,对患者的治疗是通过施用安全和治疗有效量的化合物,例如 V 型胶原蛋白和 V 型胶原蛋白的各种抗原组分和 / 或其类似物。这些化合物可通过本领域已知的任何方式施用,这些方式包括口服、肺腔灌注、吸入和注射等。治疗用化合物的有效剂量和治疗持续时间可能依赖于各个患者,并且可以很容易地校准来引起治疗效应,例如至少部分移植患者对胶原蛋白例如 V 型胶原蛋白或其片段的自身免疫反应。其它有关用 MHC 表位治疗疾病的疗效或与免疫系统有关的医学病况的讨论可参见例如于 2005 年 6 月 28 日授予 Sachs 的美国专利第 6,911,220 号和 2003 年 4 月 24 日公开的美国专利第 2003/0078208A1 号 (Wilkes),所述两个专利的全部内容通过引用结合入本文内容。

[0091] 在一个实施方案中,被诊断为或被认为将会遭受肺疾病或病症的患者,可用免疫抑制药物来治疗,所述肺疾病或病症包括自身免疫反应或由于自身免疫反应所引起,所述免疫抑制药物包括,例如环孢霉素。为进一步获取环孢霉素的一般性讨论,包括环孢霉素对免疫系统的一些效应的讨论,读者可参阅于 2005 年 6 月 25 日授予 Davalian 等的美国专利第 6,410,696 号和于 1999 年 12 月 23 日授予的 Wang 第 5,990,274 号,所述两个专利的全部内容通过引用结合入本文内容。

[0092] 实施例

[0093] 实施例 1

[0094] 为了确定肺移植后患者是否也会发展成特异针对 V 型胶原蛋白的自身免疫,我们用白细胞和三种不同胶原蛋白进行了迟发型变态反应 (DTH) 检测,该检测所用白细胞来自 8 个肺移植受者和 5 个肾移植受者 (该受者患有肺出血肾炎综合征,一种 V 型胶原蛋白 (col) 自身免疫病)。如图 3 中 A 栏所示,肺移植受者的 T 细胞对 col (V) 有反应,但对 col (IV) 或 col (II) 没反应,然而来自肺出血肾炎综合征患者的 T 细胞对 col (IV) 有显著更高的 DTH 反应,而对 col (V) 或 col (II) 无反应。这一重要发现表明肺移植患者有抗 -V 型胶原蛋白自身免疫。

[0095] 接下来我们确定抗 V 型胶原蛋白自身免疫反应是否能够在任何等待肺移植患者中见到,如果这样的话,反映出预先存在的病况,这一病况会导致某些患者糟糕的肺功能和排斥。对 23 个患有各种晚期肺病并等待肺移植的患者的抗 col (V) DTH 反应分析表明,一个特殊群体确实具有对抗 V 型胶原蛋白的自身免疫反应。如图 5 所示。患有特发性肺纤维化 (IPF) 的患者显示抗 -col (V) DTH 反应几率是患其它疾病患者的 2 倍。该重要发现表明针对 V 型胶原蛋白的自身免疫反应可引起 IPF。

[0096] 为进一步支持这一发现,我们检测了由于若干不同原因引起并等待肺移植的患者对 col (V) 或 col (II) 的自身免疫反应。如图 3 中 B 栏所示,只有 IPF 患者的 T 细胞显示出对 V 型胶原蛋白的特异自身免疫反应。也很有意思的是患有 IPF 并在威斯康星大学进行移植的患者具有较低的 1 年移植存活率 ($p = 0.05$) (图 3 中 C 栏),这表明预先存在的对 V 型胶原蛋白的自身免疫反应可加快肺功能损失和死亡。图 s3 和 5 结果表明 IPF 可由对 V 型胶原蛋白的自身免疫反应引起,也表明这代表一个额外的患者群体,该群体对 V 型胶原蛋白口服耐受治疗有反应。

[0097] 像在 IPF 患者中见到的那样,预先存在的对 V 型胶原蛋白的自身免疫反应将会导

致肺损坏,为支持这一观点,我们使用了我们的大鼠移植模型。WKY 大鼠不被任何东西免疫(图 6a)或用鸡卵溶菌酶(HEL)(图 6b)或 V 型胶原蛋白(图 6c)免疫,然后进行同种肺移植。如所见到那样,不被免疫或 HEL 免疫的大鼠表现出正常的肺病理。与之对照,对 V 型胶原蛋白免疫反应活化的大鼠能在 30 天内破坏它们的同种移植肺。这些数据与以下事实一致,即比起那些对 V 型胶原蛋白无自身免疫反应的肺移植受者,对 V 型胶原蛋白的自身免疫反应意味着有更高的风险对被移植肺和肺组织产生排斥。

[0098] 实施例 2

[0099] 闭塞性毛细支气管炎综合征(BOS)是肺移植后移植丢失的主要原因。V 型胶原蛋白 col(V),一种存在于细胞外基质的小胶原蛋白涉及大鼠肺同种异体移植排斥。为检测人肺移植后对 col(V)的自身免疫将倾向于发展成 BOS 这一假设,我们分析了外周血中迟发型超敏反应(DTH)和支气管肺泡灌洗(BAL)的抗体反应。

[0100] 从 1988 年-2003 年 6 月,对所有在威斯康星大学进行的肺移植($n = 229$)进行回顾性分析其发展成 BOS 的危险系数。测定了 56 名受者,10 名正常对照和 25 名等待肺移植者的 DTH 或 col(V)或 col(II)的抗体。

[0101] 在威斯康星大学和印第安那大学,按照 IRB- 认可的预先通知同意程序获得所有受试者同意。229 名在威斯康星大学医院和门诊部于 1988 年到 2003 年间接接受初步肺移植的患者中,有 3 例由于技术原因被排除在分析之外。

[0102] 所有患者在移植后 0.5,1.3,6,9 和 12 个月和有临床指征后进行计划性支气管肺泡灌洗(BAL)和经支气管肺活检(TBB)。筛选 TBB 组织寻找巨细胞病毒(CMV)包涵体和细胞浸润。col(V)研究患者($n = 56$)包括 29 名报名参加 2000 年启动的移植后 DTH 研究者,储存的源自 23 名患者的 BAL 用于回顾性测试 col(V)抗体,4 名患者仅测试移植后 3-6 年开始的 DTH。另外,在大约 6、12 和 18 月及其后抽取血样检测 DTH。不吸烟的成年供者和进行支气管镜检和 BAL 液收集的志愿者用作阴性对照组。5 名患肺出血肾炎综合征而肾移植患者也用作 DTH 检测的对照血液供者。

[0103] BOSI 级,主要研究终点,是经诊断移植后至少 90 天 FEV1 持续下降到移植后最大值的 80% 以下(9)。

[0104] 根据制造商给出的方案,将患者和对照的 BAL 液流经商业化蛋白 G 琼脂糖柱(法玛西亚,皮斯卡塔韦,新泽西),亲和纯化获得 IgG。所有洗脱部分冻于 -80°C ,直到使用。

[0105] Col(V)抗体分析采用以前所述 Western 杂交方法(6),只是羊抗人 IgG 同种型特异抗体用于检测。牛 col(II)和 col(V)(Collaborative Biomedical Products-Becton Dickinson, Bedford MA)或从人胎盘提取的 col(V)(10)用作靶抗原。

[0106] CB-17SCID 小鼠购自 Harlan Sprague Dawley 公司(Indianapolis, IN)或本地饲养。所有动物依据 NIH 规章饲养和处理。

[0107] 转移体内检测是根据前述方法(ii)将人外周血单个核细胞(PBMC 和抗原共转到 S01D 小鼠的足垫。人 col(V)、col(IV)(Fluka, Inc., Buchs, Switzerland)或牛 col(II)(5 μg /注射;Southern Biotech, Birmingham, AL)是被试抗原。注射之前和注射 24 小时后,用度盘式厚度指示器测量足垫厚度。只共转外周血单个核细胞和缓冲液所引起的背景厚度被减去,以确定抗原特异性反应。超过背景 $\geq 25 \times 10^{-4}$ 英寸的水肿反应视为阳性(12)。

[0108] 无 BOS 存活率用 Kaplan 和 Meier 方法估算,并用时序检验比较两个组。阴性

col(V) DTH 或抗体反应的标准是严谨的 - 患者中, Western 杂交显示微弱的抗 -col(V) 带或最低限度的 DTH 反应 (25×10^{-4} 英寸) 也被看作阳性反应, 即使其它所有时间点都是阴性的。Cox 比例风险模型用于评价可以危险因素 (risk factor) 之间的联系, 有些危险因素是随时间改变的和无 BOS 存活。P < 0.05 视为有显著意义。所有的分析使用 SAS 统计软件发布版本 6.12, SAS 软件研究所 (Cary, NC)。IPF 患者亚群和其它群体的移植后 col(V) DTH 反应的比较采用 Kruskal-Wallis 检验。

[0109] 现参见表 1 (图 7), 麦迪逊威斯康星大学 226 名肺移植患者中 BOS 人口统计学和发生率总结于此。86 名 (38%) 患者发展成 BOS。单侧 (n = 133) 多于双侧 (n = 93) 肺移植。平均随访时间 3.7 年。整个人群的组成和 col(V) 研究人群子群中 BOS 的发生率、平均随访时间和每种疾病的患者比率都相似。我们曾报道在发生肺移植排斥期间, BAL 液中 IgG2 的产生选择性增加 (10)。如图 1A 所示, 从肺移植患者 L3 (BOS III 级 - 移植丢失) 和 L41 (无 BOS) 的 BAL 液分离到的 IgG 抗体能与 col(V) 而不是 col(II) 强烈结合。牛和人 col(V) 同样能被 BAL 的 IgG 识别 (数据未展示), 这表明靶表位是跨种属保守的。与患者 L3 和 L41 形成对比的是, L31 的 BAL 样品与 col(V) 结合弱或无结合, L31 未发展成 BOS (图 1A); 分离自正常志愿者 (n = 10, 数据未展示) RAL 的 IgG 也显示阴性结果。

[0110] 接下来我们运用转移体内 DTH 检测和局部抗体分析研究了外周抗 -col(V) 自身免疫和 BOS 发展的关系。同样三个患者的病程列于图 1B。患者 L3 在移植后最早期 (180 天) 具有强烈和特异抗 -col(V) DTH 反应, 此时 FEV-1 仍然在最高水平。就在发展成 BOS 之前, 当 FEV-1 值仍在最大值的 80% 左右徘徊的时候, 可检测到强烈的 col(V) 抗体反应 (黑矩形)。在 BOS 开始时, 检测 col(V) 的 DTH 和抗体反应, 但在第 45 天, BOS 的晚期阶段 (III 级), DTH 反应消失。

[0111] 患者 L41 是早期时具有强烈 col(V) 反应, 但未见同种异体移植功能持续下降的例子。在第 48 天检测 213 例患者中的抗 -col(V) 抗体 (2+), 来自 460 名患者第 188 天的 PBMC 表现出对 col(V) 的 DTH 阳性反应。自第 500 天, 抗 -col(V) DTH 反应就出现变化和下降。在第 980 天急性排斥之后, 肺功能稳定在最大 FEV1 值的 82%, 刚刚高于 BOS-1 的限定。

[0112] 患者 L31 在第 49 天有对 col(V) 的弱抗体反应, 在第 400 天有最低程度的抗 -col(V) DTH 反应, 但从没有发展成强烈自身免疫反应。患者维持优良的移植功能的时间大于 5 年, 最近的 PBMC 样品 (1600 天) 的抗 -col(V) DTH 反应仍然为阴性。

[0113] 这三种 col(V) 反应和同种异体移植功能模式代表了在 56 名患者组成的研究子群中所见到的现象。图 1C 显示的是每一类中 4 个其它患者的移植后时间历程。每条线代表单个患者的最大 FEV1 百分比, 红色标记代表 col(V) 阳性检测 (或者斯 BAL 中抗体或者是 DTH 分析中净足垫水肿 ≥ 25)。每个绿色标记代表阴性抗 col(V) 结果的检测。

[0114] 第一类 (抗 -col(V)+, BOS+) 中所有四个患者, 像患者 L3, 在移植丢失之前表现出 DTH 阳性或抗体检测阳性。第三类中 (抗 -col(V)-, BOS-) 患者很少见对 col(V) 的反应, 所有人在随后 3-6 年物 BOS 发生。中间种类的患者可能是最有趣的, 因为他们在移植后都能设法维持优良的移植功能达 1-3 年, 尽管他们重复被检出抗 col(V) 反应阳性。

[0115] 回顾性分析跟 BOS 或移植丢失相关的风险因子或单独 BOS 为终值, 结果列于表 2 (图 8)。在整个患者人群中, 预示将具有显著更高 (p < 0.05) BOS 风险的移植前因子包括: 与供者有 2DR 错配 (RR = 1.64, 和 0 或 1DR 错配), 和具有慢性阻塞性肺疾病 COPD (相对危

险度 $RR = 1.7$) 或“其它” ($RR = 1.9$)。预示将会有较低的 BOS 和移植丢失发生率的移植前因子包括:最初具有囊状纤维化 (CF) 疾病和已接受双侧肺移植,该疾病类型的主要治疗 (均为 $RR = 0.35$)。移植后的 BOS 风险因子也被评估。像预想的那样,急性排斥的发生率与高于 1.4 到 1.5 倍风险的显著 BOS 相关。然而无论是移植 CMV+ 供者肺到 CMV- 受者,还是活检已证明的移植后 CMV,都跟 BOS 无显著相关。

[0116] 再次参阅图 8,表 2,总结了功能不良 (BOSI 和移植丢失) 分析,或 56 名肺移植受者的 BOS 发展附图说明,所述 56 名受者被采用 Cox 比例风险模型分析对 col(V) 的反应。在该患者子群中,急性排斥仍然是肺功能不良的风险。移植功能不良的最高 $RR(12.3)$ 被发现于临近 BOS 发生时间点对 col(V) DTH 反应呈阳性的患者。对对照 col(II) DTH 反应与 BOS 的形成无相关性 ($RR = 1.0$),这表明对 col(V) 的 DTH 反应是 BOS 风险的特意标记。2 以图的形式表明 col(V) 的 DTH 反应与 BOS 发生的联系。移植后第 370 天 (上栏) 和第 760 天 (下栏),基于抗体和/或 DTH 分析,有良好肺功能 ($> 80\%$ 最大 FEV1) 的患者被分成两类: col(V)+ 和 col(V)- 反应者。以 BOSI 为终点进行 Kaplan-Meier 分析。过半在发展成 BOS 的时间点前具有抗 -col(V) 反应的患者在随后两年内发展成了 BOS,而对 col(V) 反应阴性的患者大都无 BOS。

[0117] 无论由于任何原因,BAL 中抗 -col(V) 抗体的水平与 BOS 发生和移植丢失显著相关 ($RR = 2.3$),与单独 BOS 风险也相关 ($RR = 2.08$)。当两种指示指标,DTH 或对 col(V) 的抗体,合并出现时,BOS 或移植丢失的 RR 是 12.7,BOS 的 RR 无法计算,因为发生 BOS 的患者在之前一些时间点就已经或者 DTH 阳性或者对 col(V) 抗体反应阳性表 2, (图 8)。

[0118] 移植后患者中见到的抗 -col(V) 反应是否只是一种预存在病况的简单反映,该预存在病况注定某些患者倾向于功能不良 (即 COPD 患者是否有更高的移植前抗 -col(V) 反应,而患 CF 的患者有更低的反应),为确定在这一猜测,我们分析了 23 名患者中的抗 -col(V) DTH 反应,所述患者患有各种晚期肺疾病并等待肺移植。如图 3A 栏所示,还有大多数晚期肺疾病的患者并没有抗 -col(V) DTH 反应,该结果与那些无疾病正常个体中的所见显著不同。患有 IPF 的患者是一个例外。这些患者中抗 -col(V) DTH 反应是患有其它疾病患者 2 倍。有意思的是,患有 IPF 并在威斯康星大学移植的患者有显著较低的 1 年移植存活率 ($p = 0.05$,数据未展示),但具有相似的 5 年存活率和 BOS 发生率 (表 1)。

[0119] 为了确定肺移植后患者中的自身免疫是特异针对 V 型胶原蛋白的,我们用 col(II)、col(IV) 和 col(V) 进行了 8 个肺移植受者的和 5 个患肺出血肾炎综合征的肾移植 (IV 型胶原蛋白自身免疫) 患者的 DTH 检验。如图 3B 栏所示,肺移植受者对 col(V) 有反应,而对 col(IV) 或 col(II) 没反应,然而患有肺出血肾炎综合征的患者对 col(IV) 有显著更高的 DTH 反应,对 col(V) 或 col(II) 无反应。

[0120] 实施例 3

[0121] 检测体液或抗体介导的抗 V 型胶原蛋白免疫反应的微珠分析方法。该方法用于检测对 V 型胶原蛋白自身免疫反应的患者的血清和 / 或肺灌洗液中 V 型胶原蛋白的抗体。该方法还提供了随同其它必须反应剂一起的 V 型胶原蛋白涂层微珠。可以向终端用户提供血清和 / 或肺灌洗液,和普通试剂例如 PBS,或者这些试剂被组装成试剂盒,来完成所述分析。简而言之,典型的分析如下所述:

[0122] 1) 链霉亲和素涂层微珠 (5 μ m, 结合能力 10-20 μ g/ 1×10^7 微珠 (Polyscience,

Warrington, PA)) 用灭过菌的 PBS 洗涤两次。微珠 (1×10^7) 和 40ug 人 V 型胶原蛋白悬于 100ul PBS, 4℃ 孵育 60 分钟。

[0123] 2) 使用 20um 兔抗人 V 型胶原蛋白抗体 (biotin) (Abeam, Cambridge, MA), 遵照与上述 1 中相同的步骤制备阳性对照。

[0124] 3) 对每一次分析, 1×10^6 偶联的微珠在 PBS 中洗两次, 在加入了 50ul 肺灌洗液血清的 100ul PBS 孵育。室温孵育 30 分钟后, 用含 10% 胎牛血清 (FCS) 的 PBS 洗涤微珠 3 次。

[0125] 4) 把微珠悬于 100ul 灭过菌的 PBS+10% 胎牛血清 (FBS), 与二抗室温孵育 30 分钟。典型地, 使用 5ul 偶联有藻红蛋白 (R-PE) 的抗 - 人 IgG 抗体 (Sigma, Saint Louis)。用含 10% FCS 的 PBS 洗涤三次, 悬于 300ul PBS/FCS 溶液中, 用流式细胞仪分析。图 9 总结了该分析的样品结果。

[0126] 对于阳性对照, 将已知量抗 V 型胶原蛋白的抗血清加入所述微珠分析。如图 9 右侧栏中所示, 随着抗 V 型胶原蛋白抗体的增多, 导致平均荧光频道 (channel) 明显右移。这样, 所述方法可测定不同量存在于患者血清中的抗体。仍参见图 9, 左栏图解说明检测四个患者血清中和健康人血清中的抗 V 型胶原蛋白抗体。如图所说明的那样, 来自患者 #457 的样品表现出最大的右移, 表明该患者中抗 V 型胶原蛋白抗体的量最高。患者 #458 和 420 表现出较小的迁移, 表明抗体量比患者 #457 要少, 然而, 患者 519 在本检测中看起来不含任何抗体。

[0127] 如图 9 中的总结的结果所示, 患者 #457 表现出最大右移, 表明该特别患者具有最大的抗 -col (V) 抗体量。与之对照地, 来自患者 #458 和 #420 的样品之表现出荧光峰的较小迁移; 患者 #595 的特别样品中, 看起来根本没有任何抗体。这些数据阐明了一种方法, 该方法用来检测特发性肺病 (IPD) 或其它基于自身免疫的肺病症或疾病和 / 或评估进行肺移植的既定患者将会对移植的器官发生排斥的可能性。所述诊断肺疾病或评估既定患者发展成 BOS 可能性的方法一般涉及搜集体液样品, 例如患者的血清或间隙液或组织, 和分析样品来确定 V 型胶原蛋白抗体的存在。

[0128] 实施例 4

[0129] 实验动物中口服耐受的介绍, 一种模型, 该模型用于调节患者或病畜对胶原蛋白或胶原蛋白的抗原组分的自身免疫反应。移植时所用无病源 MHC (RT1) - 不相容雄性大鼠是 : Fischer 344 (F344, RT1^{lv1}), Brown Norway (BN, RT1ⁿ), and Wistar Kyoto (WKY, RT1^l) 大鼠 (250-300g), 购自 Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.) 或 Taconic (Germantown, N. Y.), 并在印第安那大学医学院 (Indianapolis, Ind.) 实验动物资源中心按照规章饲养。

[0130] 简言之, V 型胶原蛋白按下列方法制备。纯化的 V 型胶原蛋白 [col (V)] 稀释于 0.005M 乙酸 (0.5mg/ml) 并存放于 4℃, 直到用于本检测。col (V) 的量通过检测羟脯氨酸含量来评测 (Woessner, 1961)。

[0131] 在该特定实验中, V 型胶原蛋白经口服施用至 WKY 雄性大鼠。通过 16 号圆珠笔式不锈钢动物喂养针 (Braintree Scientific, Braintree, Mass.) 灌胃施用至该动物 (180-200g) 溶于生理盐水的 10ug 或 50ug col (V) 或 col (II) 或 col (XI) 溶液, 所述给药方法参照以前报道 (Stark 和 Ostrow, 1990)。作为对照, 相似动物只喂稀释剂。每隔一天喂给

动物一次,共八次或四次喂药。最后一次喂药 7 天后,这些大鼠通过同位移植接受 F344 肺同种异体移植。WKY 肺被移植到 WKY 受者(同系移植)作为对照。

[0132] 迟发型超敏反应(DTH)的测定采用 Sayegh 等,1992;Yoshino 等,1995;和 Yamagami 等,1999 的步骤并稍作修改。简言之,肺移植后两周,对照或喂过 col(V)的 WKY 大鼠接受 10^7 照射过(3000 拉德(rad))并源于供者 F344 或第三方(BN)的脾细胞,所述存于 30uIPBS 中的脾细胞用 26 号针通过皮下(s.c.)注射到右耳廓,左耳廓接受相同体积的稀释剂用作对照。15ug col(V)以 30uI 体积注射到天然组或同种异体移植受者 WKY 大鼠的右耳廓,稀释剂注射到左耳廓。天然 WKY 大鼠作为阴性对照。在注射前立即和注射 24 小时后以单盲形式用游标卡尺(Mitutoyo, Field Tool Supply, Chicago, Ill.)测量耳朵厚度。抗原特异的 DTH 反应根据下面公式计算:特定耳水肿=(右耳厚度@24 小时-右耳厚度@0 小时)-(左耳厚度@24 小时-左耳厚度@0 小时) $\times 10^{-3}$ 毫米(Yamagami 等,1999)。所有报道数据都是三次测量的平均值。

[0133] 左肺同系移植物的同位移植(WKY $\rightarrow$ WKY),或同种异体移植(F344 $\rightarrow$ WKY)按以前报道进行(Sekine 等,1997),所用步骤最初由(Marck e 等,1983 和 Prop 等,1985)报道。和以前发明者报道(Sekine et al.,1997)相似,移植组的存活率超过 90%。试验期间,任何时间都没采用免疫抑制治疗。

[0134] 在移植后的第 1、6 和 13 天,用连续胸部 x-光监测移植的肺。X-光如下定级:一级,正常;二级,轻微浸润;三级,中度浸润;和四级,严重浸润或完全乳浊化。被研究的五个移植组:WKY 鼠肺移植到 WKY 受者(WKY $\rightarrow$ WKY,同系移植对照);F344 肺移植到喂食稀释剂的 WKY 受者((F344 $\rightarrow$ WKY,同种异体移植对照);F344 肺移植到喂食 col(V)的 WKY 受者((F344 $\rightarrow$ col(V)-喂食 WKY,col(V)-喂食的同种异体移植);F344 肺移植到喂食 col(II)的 WKY 受者((F344 $\rightarrow$ col(II)-喂食 WKY,col(II)-喂食的同种异体移植);F344 肺移植到喂食 col(XI)的 WKY 受者((F344 $\rightarrow$ col(XI)-喂食 WKY,col(XI)-喂食的同种异体移植)。初步试验表明与没有喂食的 WKY 大鼠相比,稀释剂喂食对于同种异体移植病理、支气管肺泡灌洗差异细胞计数或 DTH 反应无影响。

[0135] 移植一周和两周后,通过克他命麻醉(ketamine-anesthetizing)肺移植受者收集 BAL 液。简言之,天生的和移植的肺的 BAL 用缝合保护的 16 号导管通过选择性抽取右和左主支气管进行。在一段时间内,钳住对侧支气管,3ml 无菌 PBS(37°C)液体被慢慢注入主支气管和吸取。无细胞 BAL 上清液经样品离心获得,于 -70°C 储存,直到使用。使用光学显微镜对 BAL 液进行差异细胞计数,每高倍视野数 300 个细胞,来确定该样品中巨噬细胞、淋巴细胞和多形核(PMN)细胞的数量。

[0136] 为了确定肺中病例的存在,获取每一组的移植的肺,经 4%戊二醛导管滴注固定,分成几部分,用苏木精和曙红染色,在光学显微镜下检查,在事先不知道移植组情况的单盲实验中,根据由肺排斥研究组(Yousem 等,1996)建立的组织学标准评级。

[0137] BAL 液体中 PMN 的统计分析和淋巴细胞计数最初通过 ANOVA 进行,来确定在各组间有无差异存在。在此之后,如果发现差异,用 SNK 检测(Student-Newman-Keuls test)分析来确定哪一组有差异。P 值 < 0.05 视为有显著性。既然用不同抗原刺激的同种异体移植对照和天然大鼠的 DTH 数据被发现不成正态分布,采用交互作用的秩和双因素方差分析法来确定组间差异。P 值 < 0.05 视为有显著性。在同种异体移植对照和 col(V)-喂食的同种异

体移植之间, DTH 反应对供者同种异体抗原的差异用曼-惠特尼 U 检验确定。P 值 < 0.05 视为有显著性。气管和脉管病理值差异最初用 Kruskal-Wallis 检验确定, 之后用曼-惠特尼 U 检验分析。P 值 < 0.03 视为有显著性。

[0138] 本发明人前面显示了 col(V) 是小鼠中对肺同种异体抗原产生局部免疫反应的靶点。接下来本发明人说明 col(V) 在同种异体移植反应期间被识别为抗原。已有报道称, 在器官移植的各种动物模型中, 除了肺之外, DTH 反应与排斥的程度相关 (VanBuskirk 等, 1998; Lowry 等, 1985; Joo 等, 1995)。作为一种细胞免疫反应的体内试验, 对同种异体抗原的系统性 DTH 反应进行了分析。在接受 F344 肺同种异体移植两周后的 WKY 大鼠和新生非移植的 WKY 大鼠中, 检测对 F344 脾细胞、col(V) 和 BN 脾细胞 (第三方) 的 DTH 反应。图 10 所示, 接受 F344 同种异体移植物的 WKY 大鼠对 F344 脾细胞有显著 DTH 反应 ($p < 0.0001$, 与用 F344 脾细胞或 col(V) 试验的新生 WKY 大鼠相比)。接受 F344 同种异体移植物的 WKY 大鼠对 col(V) 也有显著 DTH 反应 ($p < 0.0001$, 与用 F344 脾细胞或 col(V) 试验的新生 WKY 大鼠相比) (图 11)。对照同种异体移植对 F344 脾细胞和 col(V) 的 DTH 反应无统计学差异 ($p > 0.05$)。数据显示, 接受 F344 肺同种异体移植物的 WKY 大鼠对第三方抗原 (BN 脾细胞, RT1ⁿ) 没有 DTH 反应, 这说明对 F344 同种异体移植物的免疫反应是同种特异性的。此外这些数据与在肺同种异体移植排斥反应中 col(V) 被认作抗原相一致。

[0139] 以前报道称, 口服施用抗原物可引起对供者器官的耐受 (Ishi 等, 1999), 所述抗原物是指除肺以外的同种异体移植排斥期间免疫反应的靶点。为了确定在移植之前向肺移植受者口服施用 col(V) 是否能够对供者肺的免疫耐受, 按照上面所述在移植前给 WKY 受者喂食 col(V)。每隔一天喂食 10ug col(V), 喂食八次 (总剂量 80ug), 随后在最后一次喂食 7 天后进行左肺同位移植, 初步试验显示在该模型中, 所述喂食方法对 BAL 细胞计数和排斥病理有最大影响。因此, 该喂食方法被用于随后研究中。按照上面所述, 喂食 col(V) 的受者进行左肺移植, 试验时间完成时收获样品。

[0140] 图 12 显示的是 BAL 液的差异细胞计数, 所述 BAL 液来自移植两周后的 WKY 同系移植受者、对照 WKY 同种异体移植受者和喂食 col(V) 的 WKY 同种异体移植受者的移植的肺, 和正常 WKY 大鼠的肺。与同系移植肺相比, 正常肺中 BAL 差异细胞计数无明显差异。与 (Yagyu 等, 1990) 报道相似, 对照同种异体移植 BAL 与正常或同系移植肺相比, 多形核 (PMN) 细胞和淋巴细胞显著增加 (PMN 的 $P < 0.039$, 淋巴细胞 $P < 0.00001$)。与之相反的, 与对照同种异体移植相比, 移植前喂食 col(V) 导致 BAL 液中多形核细胞和淋巴细胞显著降低 (PMN 的 $P < 0.023$, 淋巴细胞 $P < 0.0001$)。在同种异体移植 BAL 液中, 急性同种异体移植排斥通常与总细胞计数增加相关 (Hirt 等, 1999)。然而, 在移植两周后, 对照 WKY 同种异体移植肺由于同种异体移植物的破坏通常进行急性排斥反应, 不能可靠的获取充足 BAL 液来确定 BAL 总细胞数。相反的, 喂食 col(V) 的同种异体移植受者表现出较弱的严重排斥反应, 从而更容易获取 BAL 导致较高的细胞计数。由于这些原因, 在不同组间比较总细胞计数不能进行。总之, 这些数据表明, 口服施用 col(V) 与急性排斥期间同种异体移植 BAL 液中多形核细胞和淋巴细胞数目的降低相关。

[0141] 为了确定喂食 col(V) 是否能够降低对同种异体抗原的 DTH 反应, 用全同种异体 (F344) 脾细胞刺激对照 WKY 同种异体移植受者和喂食 col(V) 的 WKY 同种异体移植受者的右耳廓, PBS 刺激左侧。24 小时后, 测定 DTH 反应和特定耳水肿。如图 10 所示, 未处理的对

照 WKY 同种异体移植受者发生强烈的急性排斥,并在用供者抗原次激后表现出强烈 DTH 反应。与之对照的,喂食 col(V) 的 WKY 同种异体移植受者急性同种异体移植排斥较弱,并在用供者抗原次激后表现出显著降低的 DTH 反应。

[0142] Col(V) 引起的对同种异体抗原的免疫反应削弱有可能是由于普遍性免疫低反应状态 (Faria 和 Weiner1999),而不是由于耐受。因此,为了确定喂食 col(V) 的大鼠是否对其它抗原反应,通过呼吸道 (200 μ g/kg 至 1mg/kg) 或静脉 (1-5mg/kg) 施用脂多糖 (LPS) (Sigma, St. Louis, MO.), 已知该剂量在注射或滴注 24 到 48 小时后能引起肺部或全身性严重炎症反应 (Delcclaux 等,1999)。在最后一次喂食 col(V) 一周后,刺激大鼠。所引起的疾病类似革兰氏阴性菌诱发的肺炎和脓血症。与正常 WKY 大鼠相似,把 LPS 滴注入肺或静脉注射入喂食 col(V) 的 WKY 大鼠引起急性疾病 (毛褶皱和俯卧) 和受者肺的炎症反应。这些数据表明,移植前喂食 col(V) 能通过诱导对供者抗原的耐受来预防同种异体移植排斥,而不是普遍性免疫低反应状态。

[0143] 总之,这些数据表明, col(V),而不是 col(II) 或 col(XI),能通过诱导口服耐受,而非普遍性免疫低反应状态,来下调肺的同种异体移植排斥。进一步, col(V) 诱导的口服耐受下调对供者同种异体抗原的 DTH 反应。

[0144] 同种异体移植 BAL 液的 PMN 和淋巴细胞计数的减少与在肺同种异体移植排斥期间的 x- 光照相和组织学的严重损伤有关。为了确定肺浸润发展速度,在移植后第 1、6 和 13 天,通过连续胸部 x- 光技术监测移植受者并按上述方法分级。对照同系移植在所有监测时间点都没有被发现任何肺浸润 (图 12A)。对照同种异体移植组的连续 x- 光显示,在移植后第 6 天,左肺可见浸润的逐渐发展,导致严重浸润和两周后同种异体移植物的完全乳浊化 (图 12B)。然而,在喂食 col(V) 的同种异体移植组,与对照相比,浸润发展缓慢。X- 光显示在第 6 天正常,移植两周后仅出现轻微浸润 (图 12C)。

[0145] 现在参见图 13,上栏是来自对照组同系移植大鼠的天生和同系移植 WKY 肺的大体解剖图,和来自喂食 col(V) 的同种异体移植大鼠的天生和同种异体移植肺的大体解剖图,所述肺于移植两周后收获。图 13A 表示同系移植的 (左 -L) 和正常的 (右 -R) WKY 受者大鼠的肺外形正常。与之对照的,与天生肺相比,在对照同种异体移植组的左侧同种异体移植的肺呈茶褐色,缩小和密实 (图 13B)。由于炎症和排斥的结果,在对照同种异体移植的肺中常见壁层胸膜和脏层胸膜的融合。喂食 col(V) 同种异体移植受者中移植的左肺外形与天生的 (正常的) 或同系移植的肺 (图 13A) 相同,无胸膜粘连。

[0146] 同种异体移植 BAL 液中的 PMN 和淋巴细胞减少,胸腔 x- 光显示的同种异体移植肺中浸润减少,和保守的大体解剖学,都说明移植前喂食 col(V) 下调排斥病例的发展。图 4 下栏表示的是移植两周后,对照同系移植、对照同种异体移植和喂食 col(V) 的同种异体移植物的有代表性的组织学特征。与以前报道相似 (Prop 等,1985),所有对照同系移植肺具有正常的组织学特征而无排斥迹象 (图 4D)。对照同种异体移植肺显示广泛的血管周的、支气管周的和肺泡单核细胞浸润,这与急性排斥相一致 (图 4E)。相反的,喂食 col(V) 的同种异体移植的肺中仅检测到轻微到中等的血管周的和支气管周的浸润 (图 4F)。

[0147] 图 5 中的表 3 表示根据标准确定的移植两周后排斥病理的等级。根据脉管周单核细胞浸润的存在和程度,急性脉管排斥被分为 A0-A4,急性呼吸道排斥根据呼吸道炎症的程度和强度被分为 B0-B4 (Yousem 等 1996)。所有同系移植对照肺表现出正常的肺结构

(A0±0, B0±0)。对照 WKY 同种异体移植肺有强烈的脉管和呼吸道排斥 (分别为 A3.8±0.2, B4.±0)。相反的, 喂食 col(V) 的 WKY 同种异体移植肺表现出轻微到中等的脉管和呼吸道排斥 (分别为 A2.8±0.2, B2.6±0.2)。喂食 col(II) 和 col(XI) 的同种异体移植肺与未处理的同种异体移植具相似的排斥病理 (图 15)。这些数据表明, 喂食 col(V) 的 WKY 同种异体移植的严重排斥低于其它同种异体移植 (对于 A, $p < 0.028$ 和对于 B, $p < 0.009$)。

[0148] 这些数据表明喂食 col(V) 下调肺同种异体移植排斥, 表明在用供者同种异体抗原刺激后, 对肺同种异体移植受者的口服耐受会降低 DTH 反应。为了确定喂食 col(V) 是否能够减少对同种异体抗原的免疫反应, 用全同种 F344 脾细胞刺激对照同种异体移植受者和喂食 col(V) 的同种异体移植受者的右耳廓, PBS 刺激左侧。24 小时后测量 DTH 反应并测定特定耳水肿。如图 14 所示, 未处理的对照同种异体移植受者发生严重急性排斥, 并在用供者抗原刺激后产生强烈 DTH 反应 (图 10 显示相同的对照同种异体移植)。相反的, 喂食 col(V) 的同种异体移植受者对供者抗原具有显著降低的 DTH 反应 (与对照同种异体移植相比 $p < 0.02$)。这些数据说明移植前喂食 col(V) 通过诱导对供者抗原的耐受预防同种异体移植排斥。

[0149] 移植两周后, 严重排斥发生时 (4 级), 同种异体移植肺进行 BAL 来确定差异细胞计数, 并收集血清。收获整体天生的和移植的肺, 固定, 分成几部分、染色和根据标准按排斥病理特征分级 (Yousem 等, 1996)。根据以前报道 (Wilkes 等, 1998), 所有对排斥病例的阐明和分级由肺病理学家 Oscar W. Cummings, M.D. 完成, 他不知道处理分组情况。图 14 显示的是来自对照 WKY 同种异体移植和喂食 col(V) 的 WKY 同种异体移植受者的同系移植 WKY 肺和天生肺和同种异体移植肺的大体解剖特征。在对照 WKY 同种异体移植动物中, 图 14B 显示已移植的肺 (左) 与天生的肺相比呈茶褐色和缩小。相反的, 喂食 col(V) 的 WKY 受者中移植的左肺 (图 14C) 与天生的 (正常的) 或同系移植的肺外观一致 (图 14A)。喂食 col(II) 或 col(XI) 的 WKY 大鼠中, 同种异体移植肺的大体外观与未处理的同种异体移植的肺相似。像预想的那样, 同系移植肺看起来正常 (图 14A)。

[0150] 图 14 也阐明了移植两周后对照 WKY 同系移植、对照 WKY 同种异体移植和喂食 col(V) 的 WKY 同种异体移植肺的组织学。WKY 同系移植肺组织学正常 (图 14D)。对照 WKY 同种异体移植表现出与严重急性排斥一致的广泛的脉管周、支气管周和肺泡单核细胞浸润 (图 14E)。相反的, 在喂食 col(V) 的 WKY 同种异体移植肺中, 只检测到轻微的到中等的脉管周和支气管周浸润 (图 14F)。喂食 col(II) 或 col(XI) 的 WKY 大鼠中同种异体移植肺与未处理的同种异体移植肺具相似的病理学 (见图 15)。

[0151] 尽管口服耐受曾被报道有利于下调除肺外器官的同种反应 (Ishido 等, 1999), 肺移植中的口服耐受首先被报道于 Wilks 与 2002 年 9 月 3 日提交的美国专利申请第 10/243, 797 号。利用肺移植大鼠模型, 本发明中数据表明肺移植前向肺同种异体移植受者口服施用 col(V) 下调排斥反应。与对照同种异体移植受者相比, 对喂食 col(V) 的受者的免疫学、发射线学和组织学分析表明, 喂食 col(V) 与下列现象相关: 同种异体移植 BAL 液中 PMN 和淋巴细胞计数减少, 依据胸部 x-光同种异体移植肺中严重浸润变少, 同种异体移植肺的大体解剖学保守, 排斥病理学特征减少。最后, 口服耐受的受者对供者同种抗原的 DTH 反应减少。

[0152] 以前结果显示 col(V) 是小鼠中针对同种抗原的局部免疫反应的靶点。V 型胶原

蛋白是肺中的小型蛋白,定位于细支气管周的结缔组织、肺泡间质和毛细血管基底膜。在发明者的鼠模型中,这些组织曾被显示是在对同种抗原反应中病理损伤的位点 (Wilkes 等, 1999),也是人肺同种异体移植受者中的排斥活性位点 (Trulock, 1997)。

[0153] 抗原的口服给药是一种有效诱导外周 T 细胞耐受的方法。这一常被称为口服耐受的现象常已经在各种动物免疫模型中有了充分的研究,包括脑脊髓炎、眼色素层炎、糖尿病、重症肌无力和关节炎。然而,有到耐受的机制还未完全了解。耐受诱导的所有已知机制包括克隆无应答、克隆消除和 IL-4, IL-10 调控或 TGF- β 介导的活性抑制可能在口服耐受中起作用 (Faria 和 Weiner, 1999)。一般来说。高剂量抗原报道能诱导克隆无应答或克隆消除 (Chen 等, 1995; Whitacre 等, 1991), 然而低剂量诱导细胞因子调控和活性抑制 (Faria 和 Weiner, 1999; Chen 等, 1994)。在动物心脏移植模型中,口服施用同种异源抗脾细胞能通过绕过 Th1 活化和选择性激活源于 Th2 的抑制性细胞因子 (例如 IL-4) 而有效诱导耐受 (Ishido 等, 1999)。

[0154] 天生无病源 MHC (RTI)-不相容雄性 F344 (RTI^{1v1}) 和 WKY (RTI¹) 大鼠 (250-300g) 用于移植手术。所有大鼠购自 Harlan SpragueDawley (Indianapolis, Ind.)。左肺同种异体移植物的同位移植按以前报道进行 (Sekine 等, 1997), 和采用 Mark 和其同事 (1983) 描述的步骤。所有鼠都未接受免疫抑制。在移植后各种时间点进行排斥病理学分级。F344 $\rightarrow$ WKY 移植模型移植后第一周末发生轻微急性排斥 (1 级), 第二周末中等严重排斥 (2-3 级) 和第三周末 4 级严重排斥 (Matsumura 等, 1995)。另外, F344 $\rightarrow$ WKY 模型是唯一可再生发展成闭塞性细支气管炎 (BO) 肺的移植模型 (Hirt 等, 1999)。因此, 该模型提供了独一无二的机会来研究急性和慢性发病机理。

[0155] 尝试了不同的喂食方式来观察诱导免疫耐受的差异。数据表明与高剂量 (50ug) 相比, 多次低剂量施用 col (V) (10ug) 对排斥的抑制更有效。这样, 本发明中所用口服耐受模型中, Th2 细胞因子 (IL-4, IL-10) 调控或 TGF- β 介导的活化抑制似乎也在诱导耐受中起重要作用。

[0156] 移植耐受的诱导已经称为移植研究的主要目标, 在过去几年里, 曾采用不同的技术诱导移植耐受。供者特异血液输血 (Zheng 等, 1999)、骨髓移植 (Huang 等, 2000)、同种异源细胞胸腺注射 (Garrovillo, 1999) 或用来自供者 MHC 的肽进行全身性免疫 (Sayeghand Krensky, 1996) 已被表明能在各种动物模型中诱导移植耐受。然而这些技术在潜在的肺同种异体移植中的应用有限制, 这是因为用于耐受诱导的供者细胞没有足够时间获得以便在移植前诱导耐受。在实验用低剂量口服耐受模型中, 口服耐受后, 以抗原特异性方式触发了调节性细胞, 但以抗原非特异性方式抑制。因此, 没必要去鉴定靶自身抗原本身, 口服施用一种能够诱导分泌抑制性细胞因子的调节细胞就足够了 (Faria 和 Weiner, 1999)。本专利所用肺移植口服耐受模型表明, 口服施用非供者特异的 col (V) 能够抑制同种异体反应和诱导移植耐受。发明者预想移植前用口服 col (V) 处理移植受者将会提供治疗, 用以预防肺移植排斥和治疗已知或认为由对 V 型胶原蛋白和 / 或其抗原组分的自身免疫反应引起的疾病。在实施例 4 中报道了 10 个包括图和此处引用的参考文献, 对于所述结果的其它讨论, 读者参见 2002 年 9 月 13 日提交的授予 Wilks 的美国专利申请第 10/243, 792 号, 该专利现在在美国专利公开号第 2003/0078208A1 号, 该专利的内容通过引用结合如本文。

[0157] 实施例 5

[0158] 阐明了其它 MHC-“样”肽和胶原蛋白,所述 MHC-“样”肽和胶原蛋白可用于预防同种异体移植排斥和使动物对胶原蛋白和胶原蛋白样分子。无菌,MHC(RT1)不相容雄性大鼠用于本研究:Wistar Kyoto(WKY, RT1^l), Fischer 344(F344, RT1^{lv}),和 Brown Norway(BN, RTT)大鼠(移植时 250-300g)。所有大鼠购自 Harlan Sprague Dawley(Indianapolis, Ind.),并在印第安那大学医学院(Indianapolis, Ind.)实验动物资源中心按照规章饲养。

[0159] 按以前报道,用于本实验的 II 型胶原蛋白[col(II)]从犬软骨分离(Maves 等, 2000),或购自 Collaborative Biomedical Products, Bedford, Mass。两种制备物都荣誉 0.005M 乙酸,透析至终浓度 0.5mg/ml。

[0160] 来自胎牛软骨的牛 XI 型胶原蛋白[col(XI)](Morris 和 Bachinger 1987)购自 Biogenesis, Sandown, N. H.,用 0.005M 乙酸稀释(0.5mg/ml)并储存于 4℃直到使用。

[0161] 人 V 型胶原蛋白[col(V)],从人胎盘提取并用不同浓度 NaCl 沉淀(Mares 等, 2000),由 Jerome Seyer 博士(VA Hospital, Hampton, Va.)赠送。简言之,胎盘组织被切碎,清洗,悬于含 0.5M NaCl 的 0.5M 乙酸,用胃蛋白酶于 4℃消化。离心样品并吸出上清,收集沉淀并重复提取步骤。合并两次消化得到的上清,利用不同浓度 NaCl 沉淀将 col(V)从 0.5M 乙酸中纯化出来(Maves 等, 2000)。完整的 col(V)在 0.005M 乙酸中稀释(0.5mg/ml)待用。按以前报道方法(Maves 等, 2000),通过测定样品中羟基脯氨酸的含量测定胶原蛋白的量。

[0162] 上面制备的胶原蛋白口服施用至 WKY 大鼠。利用 16 号圆珠笔式不锈钢动物喂养针头通过灌胃法给这些大鼠喂食溶于生理盐水的 10ug col(II)、col(V)或 col(XI)(Braintree Scientific, Braintree, Mass)。对照动物只喂食稀释剂。每隔一天喂食底动物一次,共八次。最后一次喂食七天后,用作肺同种异体移植受者(下面有描述)。

[0163] 左肺同系移植(WKY → WKY)或同种异体移植(F344 → WKY)的同位移植按报道方法操作(Sekine 等, 1997),使用以前描述的和(Prop 等, 1985)报道的步骤。简言之,用克他命(40mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg)通过肌肉注射麻醉供者大鼠(F344 or WKY)后,剪开胸部,做胸廓切开术,和整个移除心和肺。然后切下左肺,用肝素处理过的乳酸林格氏液注入肺动脉。用经生理盐水浸润过消毒纱布包裹供体肺,置于无菌烧杯的冰上(4℃)直到移植。

[0164] 皮下注射阿托品(0.05mg/kg),随后吸入 2%氟烷麻醉受者大鼠。将 14 号聚四氟乙烯(Teflon)导管插入呼吸道,并利用啮齿类通气设备(Analytical Specialties Co., St. Louis, Mo.)用 100%氧气给大鼠机械通气,和吸入 1.5-2%异氟烷来维持麻醉。一旦在左侧第四肋骨腔完成胸廓切开术,用止血钳夹住左肺血管和支气管,切除左肺。用塑料套夹和 7-0 丝制缝合用线(Kono, Chiba, 日本)将供者肺的肺血管与受者吻合。用 8-0 聚丙烯纺织纤维缝合用线(Ethicon, Sommerville, N. J.)把供者和受者肺支气管缝合。支气管结合完成后,立即移去止血钳并恢复通气。在左胸廓切开的裂口用 3-0 缝合用线封盖住 16 号胸管后,终止麻醉维持,允许动物恢复。一旦开始自然呼吸,从呼吸道移除套管,胸管也被移去。供者肺的局部缺血时间大概 1 小时,获取和移植供者肺的总操作时间大约 2 小时。所有移植步骤由 K. Y. 在手术用显微镜(Micro Tech, Colorado Springs, CO.)下和无菌条件下完成。F344 → WKY 移植模型与第一周末的轻微急性排斥和第二周末的中等到严重急性排斥相关(Matsumura 等, 1995)。所有移植组的存活率超过 90%。试验期间没有应用任何免

疫抑制剂。在移植后第 1、6 和 13 天,通过连续胸部 x- 光监测移植的肺, X- 光变化如下定级:一级,正常;二级,轻微浸润;三级,中度浸润;和四级,严重浸润或完全乳浊化。

[0165] 被研究的五个移植组:WKY 鼠肺移植到 WKY 受者[同系移植对照];F344 肺移植到喂食稀释剂的 WKY 受者[同种异体移植对照];F344 肺移植到喂食 col(V) 的 WKY 受者[col(V)-喂食的同种异体移植];F344 肺移植到喂食 col(II) 的 WKY 受者[col(II)-喂食的同种异体移植];和 F344 肺移植到喂食 col(XI) 的 WKY 受者[col(XI)-喂食的同种异体移植]。

[0166] 移植两周后,按照以前报道(Sekine 等,1997),从克他命麻醉的肺移植受者收集 BAL 液。简言之,天生的和移植的肺的 BAL 用缝合保护的 16 号导管通过选择性抽取右和左主支气管进行。在一段时间内,钳住对侧支气管,3ml 无菌 PBS(37℃)液体被慢慢注入主支气管和吸取。无细胞 BAL 上清液经样品离心获得,于 -70℃ 储存,直到使用。使用光学显微镜对 BAL 液进行差异细胞计数,每高倍视野数 300 个细胞,来确定该样品中巨噬细胞、淋巴细胞和多形核(PMN)细胞的数量。

[0167] 迟发型超敏反应(DTH)的测定采用(Yamagami 等,1999)的步骤并稍作修改。简言之,肺移植后两周,对照或喂过 col(V) 的 WKY 大鼠接受 10^7 照射过(3000rad)并源于供者 F344 或第三方(BN)的脾细胞,所述存于 30ul PBS 中的脾细胞用 26 号针通过皮下(s.c.)注射到右侧,左侧接受相同体积的稀释剂用作对照。然 WKY 大鼠作为阴性对照。将 30ul 体积的 15ug col(II)、col(V) 或 col(XI) 注入到独立的天然组或同种异体移植受者 WKY 大鼠组的右耳廓,稀释剂注入左耳廓。在注射前和注射 24 小时后以单盲形式用游标卡尺(Mitutoyo, Field Tool Supply, Chicago, Ill.) 测量耳朵厚度。抗原特异的 DTH 反应根据下面公式计算:特定耳水肿 = (右耳厚度 @24 小时 - 右耳厚度 @0 小时) - (左耳厚度 @24 小时 - 左耳厚度 @0 小时) $\times 10^{-3}$ 毫米(Yamagami 等,1999)。所有报道数据都是三次测量的平均值。

[0168] 在独立实验中,将溶于 100ul 佐剂(Titermax, CytRx Corp., Norcross, Ga.) 乳浊液中的 100ug 低内毒素牛血清白蛋白(BSA)(Sigma, St. Louis) 注入天然和喂食 col(V) 大的 WKY 大鼠中。从尾基部把乳浊液皮下注入到每只大鼠。七天后,把 2% 热变性聚集的 BSA 溶液注入到右肺,稀释剂注入到左肺,来刺激大鼠(Henningsen 等,1984)。未灌注的大鼠用作这些研究的对照。注射前和注射后 24 小时,测量耳厚度,并按上面所述计算特定耳水肿。

[0169] 利用(Bickerstaff 等,2000) 描述的步骤稍作修饰来完成 DTH 部位 TGF- 的中和。简言之,肺移植后两周,喂食 col(V) 的 WKY 大鼠接受 10^7 照射过的(3000rad) 源于供者 F344 的脾细胞,所述脾细胞与 5ug 多克隆鸡抗鼠 TGF- β 抗体或 5ug 多克隆羊抗鼠 IL-4 或 IL-10 抗体(all R&D Systems, Minneapolis, Minn.) 混合于 30ul PBS 中,并用 26 号针通过皮下注射到右耳廓。左耳廓接受等体积的稀释剂,来作为对照部位。对于阴性对照,喂食 col(V) 的同种异体移植的独立组接受 10^7 照射过的(3000rad) 源于供者 F344 的脾细胞,所述脾细胞与 5ug 对照鸡免疫球蛋白或 5ug 对照羊免疫球蛋白(R&D Systems, Minneapolis, Minn.) 注射到右耳廓,稀释剂注射到左耳廓。特定耳厚度按上述确定。对照免疫球蛋白对 DTH 反应无影响。

[0170] 作为急性肺损伤模型,按照(O' Leary 等,1997) 的步骤并做了修饰进行脂多糖(LPS)(Sigma, St. Louis, MO) 肺灌注和静脉滴注。简言之,正常 WKY 大鼠或喂食 col(V) 的 WKY 大鼠,在最后一次喂食一周后,经皮下注射阿托品(0.05mg/kg) 和随后吸入 2% 氟烷被

麻醉。将 14 号聚四氟乙烯 (Teflon) 导管插入呼吸道, 并利用啮齿类通气设备 (Analytical Specialties Co., St. Louis, Mo.) 用 100% 氧气给大鼠机械通气, 和吸入 1.5-2% 异氟烷来维持麻醉。自发呼吸作用消失后, 慢慢灌输 LPS (1mg/kg, 浓度为 1mg/ml) 到呼吸道, 并机械通气 10 分钟。停止麻醉维持, 允许动物恢复意识。一旦自发呼吸恢复, 将套管移出呼吸道。在独立实验中, 将 LPS (4mg/kg, 浓度 1mg/ml) 尾静脉注射到大鼠中。刺激 24 小时后, 进行 BAL, 获取肺来评估病理学。

[0171] 按照制造商方案, 利用 TGF- β 1 免疫检测系统 (Promega, Madison, Wis.) 通过 ELISA 定量实验组血清中的 TGF- 水平。按照制造商步骤, 利用 Cytoscreen 免疫检测试剂盒 (BioSource International, Camarillo, Calif.) 通过 ELISA 定量实验组血清中的 IL-4 和 IL-10 水平。TGF- β , IL-4 和 IL-10 检测的灵敏度分别是 32、2 和 5pg/ml。

[0172] 通过检查每组中天生和移植的肺来评测病理学。获取肺样品, 固定, 分成几段, 染色用 (Yousem 等, 1996) 标准对排斥病理学分级, 该分级由病理学家 (O. W. C.) 在事先不知道移植组情况的单盲实验中, 根据以前报道 (Sekine 等, 1997) 完成。

[0173] BAL 液中 PMN 和淋巴细胞计数的统计学分析最初用 ANOVA 完成来确定组建差异是否存在。如果发现差异, 用 SNK 检测 (Student-Newman-Keuls test) 分析来确定哪一组有差异。P 值 < 0.05 视为有显著性。既然用不同抗原刺激的同种异体移植对照和天然大鼠的 DTH 数据被发现不成正态分布, 采用交互作用的秩和双因素方差分析法来确定组间差异。P 值 < 0.05 视为有显著性。在同种异体移植对照和 col (V) - 喂食的同种异体移植之间, DTH 反应对供者同种异体抗原的差异用曼 - 惠特尼 U 检验确定。P 值 < 0.05 视为有显著性。气管和脉管病理值差异最初用 Kruskal-Wallis 检验确定, 之后用曼 - 惠特尼 U 检验分析。P 值 < 0.03 视为有显著性。多重比较的 Student's t 检验用于细胞因子分析。P 值 < 0.05 视为有显著性。

[0174] 对于供者抗原的 DTH 反应, 细胞免疫的一种体内检测, 被报道与除肺以外器官移植的各种啮齿类模型中排斥程度有关 (VanBuskirk 等, 1998; Lowry 等, 1985)。本发明人前面显示了 col (V) 是小鼠中对肺同种异体抗原产生局部免疫反应的靶点 (Mares 等, 2000)。因此, 确定天然大鼠和肺同种异体受者中针对同种抗原的系统性 DTH 反应来确定在肺同种异体移植排斥期间, col (V) 是否被识别为抗原。也确定了肺同种异体移植受者是否发展成对 col (V) 的 DTH 反应。在接受 F344 肺同种异体移植两周后的, 严重急性排斥反应开始发生时 (Matsumura 等, 1995), 移植的 WKY 大鼠和天然非移植的 WKY 大鼠中, 检测对 F344 脾细胞 (供者)、col (V) 的 DTH 反应。为确定 DTH 反应对同种抗原和 col (V) 的特异性, 分析了对 col (II)、col (XI) 和第三方抗原 DTH 反应。作为关节软骨的一个主要成分, col (II) 在肺中不存在, 与 col (V) 不同源 (Smith 等, 1985)。相反的, col (XI) 与 col (V) 同源 (Morris 和 Bachinger 1987), 但与 col (II) 相似, col (XI) 存在于关节软骨, 不存在于肺。由于这些原因, col (II) 和 col (XI) 作为 col (V) 的对照。

[0175] 用特定耳水肿作为 DTH 反应的测量方法, 图 10 显示, 移植两周后, 对照同种异体移植受者发展成对 F344 脾细胞和 col (V) 的显著 DTH 反应 [与用 F344 脾细胞或 col (V) 刺激的天然 WKY 大鼠相比 $p < 0.001$; 与用 col (V) 或 F344 脾细胞刺激的天然 WKY 大鼠相比 $p < 0.0001$] (图 10)。相反的, 对照同种异体移植对第三方抗原 (BN)、col (II) 或 col (XI) 无 DTH 反应 (图 8)。天然 WKY 大鼠对 col (II) 或 col (XI) 无 DTH 反应。这些数据确证了其它

研究,所述其它研究表明 DTH 反应是同种异体移植排斥期间免疫活化的指示,所述 DTH 对供者而非第三方同种抗原具有特异性 (VanBuskirk 等,1998)。另外,也确定了本发明人在小鼠中得到的结果, (Mares 等,2000),即 col (V) 而非 col (II) 或 col (XI),是对同种抗原免疫反应的靶点。

[0176] 以前报道表明口服施用抗原能引起对除肺外供者器官的免疫耐受 (Ishido 等,1999),所述抗原是同种异体移植排斥期间免疫反应的靶点。为确定在移植前向肺移植受者口服施用胶原蛋白是否能诱导对供者肺的免疫耐受,按照上述在移植前给 WKY 受者喂食 col (II)、col (V) 或 col (XI),随后进行胸部连续 x- 光评估、同种异体移植 BAL 差异细胞计数、病理学分级和对供者抗原的 DTH 反应。

[0177] 图 10 所示,接受 F344 同种异体移植物的 WKY 大鼠对 F344 脾细胞有显著 DTH 反应 ($p < 0.0001$,与用 F344 脾细胞或 col (V) 试验的新生 WKY 大鼠相比)。接受 F344 同种异体移植物的 WKY 大鼠对 col (V) 也有显著 DTH 反应 ($p < 0.0001$,与用 F344 脾细胞或 col (V) 试验的新生 WKY 大鼠相比) (图 11)。对照同种异体移植对 F344 脾细胞和 col (V) 的 DTH 反应无统计学差异 ($p > 0.05$)。数据显示,接受 F344 肺同种异体移植物的 WKY 大鼠对第三方抗原 (BN 脾细胞, RT1n) 没有 DTH 反应,这说明对 F344 同种异体移植物的免疫反应是同种特异性的。此外这些数据与在肺同种异体移植排斥反应中 col (V) 被认作抗原相一致。

[0178] 图 12 显示的是 BAL 液的差异细胞计数,所述 BAL 液来自移植两周后的实验组和正常 WKY 大鼠,此时急性排斥反应刚开始 (Matsumura 等,1995)。与同系移植肺相比,正常肺中 BAL 差异细胞计数无明显差异。与 (Prop 等,1985 ;Yagyu 等,1990) 报道相似,对照同种异体移植 BAL 与正常或同系移植肺相比,多形核 (PMN) 细胞和淋巴细胞显著增加 (与正常或同系移植肺相比淋巴细胞 $P < 0.00001$,PMN 的 $P < 0.038$) (图 12)。与之相反的,与对照同种异体移植相比,移植前喂食 col (V) 导致 BAL 液中多形核细胞和淋巴细胞显著降低 (与对照同种异体移植相比淋巴细胞 $P < 0.0001$,PMN 的 $P < 0.023$) (图 12)。

[0179] 在同种异体移植 BAL 液中,急性同种异体移植排斥通常与总细胞计数增加相关 (Matsumura 等,1995)。然而,在移植两周后,对照 WKY 同种异体移植肺由于同种异体移植物的破坏通常出现急性排斥反应,不能可靠的获取充足 BAL 液来确定 BAL 总细胞数。相反的,喂食 col (V) 的同种异体移植受者表现出较弱的严重排斥反应,从而更容易获取 BAL 导致较高的细胞计数。由于这些原因,在不同组间比较总细胞计数不能进行。总之,这些数据表明,口服施用 col (V) 与急性排斥期间同种异体移植 BAL 液中多形核细胞和淋巴细胞数目的降低相关。

[0180] 在急性肺同种异体移植排斥中,同种异体移植 BAL 液的 PMN 和淋巴细胞计数的减少通常与严重 x- 光和组织学损伤的减少相关。为确定肺浸润的发展速度,通过连续胸部 x- 光法在移植后 1、6 和 13 天按上述方法检测和分级。如图 13 中所示,在所有监测时间点,对照同系移植无任何肺部浸润 (1 级) (图 13A)。在对照同异体移植中,左肺移植 6 天后,连续胸部 x- 光显示出轻微浸润的逐渐发展 (2 级),这导致在第二周末发生严重浸润和完全乳浊化 (4 级) (图 13B)。然而,与对照相比,喂食 col (V) 的同种异体移植中浸润的发展要慢许多。移植后第 6 天 x- 光显示正常 (1 级),在第二周仅有轻微浸润 (2 级) (图 13C)。

[0181] 图 14 上栏显示的是来自对照 WKY 同种异体移植和喂食 col (V) 的 WKY 同种异体移植受者的同系移植 WKY 肺和天生肺和同种异体移植肺的大体解剖特征。同系移植 (左 -L)

和天生肺（右 R）外形正常（图 14A）。与天生的肺相比，对照同种异体移植受者中移植的肺呈茶褐色和缩小（图 14B）。与之对照的，在喂食 col(V) 的同种异体移植受者中（图 14C）移植的左肺与天生的肺（正常的）或同系移植的肺（图 14A）外观一致。同种异体移植 BAL 液中的 PMB 和淋巴细胞减少，胸腔 x- 光显示的同种异体移植植物中浸润减少，和保守的大体解剖学，都说明移植前喂食 col(V) 下调排斥病理的发展。图 14 下栏表示的是移植两周后，对照同系移植、对照同种异体移植和喂食 col(V) 的同种异体移植植物的有代表性的组织学特征。所有对照同系移植肺具有正常的组织学特征而无排斥迹象（图 14D）。对照同种异体移植肺显示广泛的血管周的、支气管周的和肺泡单核细胞浸润，这与严重急性排斥相一致（图 14E）。相反的，喂食 col(V) 的同种异体移植的肺中仅检测到轻微到中等的血管周的和支气管周的浸润（图 14F）。

[0182] 图 5 中的表 3 表示根据标准确定的移植两周后排斥病理的等级。根据血管周单核细胞浸润的存在和程度，急性排斥被分为 A0-A4，根据呼吸道炎症的程度和强度被分为 B0-B4 (Yousem 等 1996)。所有同系移植对照肺表现出正常的肺结构 ($A0 \pm 0, B0 \pm 0$)。对照同种异体移植肺有强烈的脉管和呼吸道排斥（分别为 $A3.8 \pm 0.2, B4. \pm 0$ ）。相反的，喂食 col(V) 的同种异体移植肺表现出轻微到中等的脉管和呼吸道排斥（分别为 $A2.8 \pm 0.2, B2.6 \pm 0.2$ ）（与对照同种异体移植相比，对于 A, $p < 0.028$ ；对 B, $p < 0.009$ ）（图 15, 表 3）。实验表明，与对照同种异体移植相比，喂食 col(II) 和 col(XI) 的同种异体移植肺对同种异体移植病理的发生无影响（图 15, 表 3）。这些数据表明，喂食 col(V) 下调急性排斥病理。

[0183] 这些数据表明喂食 col(V) 下调肺同种异体移植排斥，表明肺同种异体移植受者的口服耐受会降低对供者同种抗原的 DTH 反应。为了确定喂食 col(V) 是否能够减少对同种异体抗原的免疫反应，用全同种异源 F344 脾细胞刺激对照同种异体移植受者和喂食 col(V) 的同种异体移植受者的右耳廓，PBS 刺激左侧，测量 DTH 反应。如图 16 和前面图 10 所显示，未处理的对照同种异体移植受者在用供者抗原刺激后产生强烈 DTH 反应。相反的，与对照同种异体移植受者相比，喂食 col(V) 的同种异体移植受者对供者抗原的 DTH 反应显著降低 ($p < 0.02$)（图 16）。

[0184] Col(V) 引起的对同种异体抗原的免疫反应削弱有可能是由于普遍性免疫低反应状态 (Faria 和 Weiner 1999)，而不是由于免疫耐受。因此，为了确定喂食 col(V) 的大鼠是否对其它抗原有反应，通过呼吸道 (1mg/kg) 或静脉 (4mg/kg) 施用大鼠脂多糖 (LPS)，已知该剂量在刺激 24 小时后能引起肺部和全身性严重炎症反应 (O'Leary 等, 1997)。所引起的疾病类似革兰氏阴性菌诱发的肺炎和脓血症。与正常 WKY 大鼠相似，把 LPS 滴注入肺或静脉注射入喂食 col(V) 的 WKY 大鼠引起急性疾病（毛褶皱和俯卧）和在 BAL 差异细胞计数中观察到的 PMN 和淋巴细胞大量流入肺中和病理（数据未展示）。

[0185] 为了进一步研究喂食 col(V) 诱导的免疫反应削弱是抗原特异性的，我们检测了喂食 col(V) 是否影响对不相关抗原 BSA 的 DTH 反应，BSA 是大鼠中 T 淋巴细胞依赖性抗原 (Henningsen 等, 1984)。给天然鼠和喂食 col(V) 的 WKY 大鼠皮下灌注 100ug 溶于佐剂中的 BSA，七天后用 2% 热聚集的 BSA 溶液刺激右耳廓，稀释剂刺激左耳廓。注射 24 小时后，测定 DTH 反应。未灌注的 WKY 大鼠用作这些研究的对照。如图 24 所示，把 BSA 注射到未灌注的肺不会引起显著耳水肿。相反，把 BSA 注射到未经喂食的灌注的肺会引起显著耳水肿（与未灌注的天然 WKY 大鼠比较， $*p < 0.018$ ）（图 19）。然而，喂食 col(V) 并不影响对 BSA 的

DTH 反应（与灌注的 WKY 大鼠相比 $^{*}P > 0.05$ ）（图 24）。总之，这些数据表明 col(V) 诱导的对肺同种异体移植排斥的抑制是由免疫耐受介导的，并不是于普遍性免疫低反应状态。

[0186] 在口服耐受中，作为负责抑制免疫反应的细胞因子，系统性产生的 TGF- β 、IL-4 和 IL-10，经常被提及（Faria 和 Weiner 1999）。因此，下一步需确定的是在肺同种异体移植排斥期间 col(V) 诱导的口服耐受是否与 TGF- β 、IL-4 和 IL-10 的产量上调有关。利用商业化 ELISA 定量实验组血清中的 TGF- β 、IL-4 和 IL-10。图 17 显示的是移植两周后在正常 WKY 大鼠、同种异体移植对照和喂食 col(V) 的同种异体移植血清中 TGF- β 的水平。如预期的那样，正常 WKY 大鼠血清中存在低水平的 TGF- β （Ying 和 Sanders 1998）。在对照同种异体移植植物中，TGF- β 量有轻微增加。相反，喂食 col(V) 的同种异体移植植物中，TGF- β 水平被显著上调（与对照同种异体移植受者相比）（图 17）。在相同大鼠血清中，未检测到 IL-4 和 IL-10（数据未展示）。

[0187] 尽管在血清中未检测到 IL-4 和 IL-10，但并不能排除它们在下调供者同种抗原的细胞免疫反应中的活性。为了确定 TGF- β 、IL-4 或 IL-10 是否在抑制对同种抗原的免疫反应中起作用，在对供者抗原的 DTH 检测中我们使用了这些细胞因子的中和抗体。参照（Bickerstaff 等，2000）报道的步骤并经修改，肺移植后两周，喂食 col(V) 的大鼠接受 10^7 照射过的供者 F344 脾细胞，所述脾细胞与 5ug 抗 TGF- β 多克隆抗体或 5ug 抗 IL-4 或 IL-10 多克隆抗体于 PBS 中混合，并注入右耳廓。左耳廓接受等体积的稀释剂和脾细胞作为对照。对于阴性对照，对照免疫球蛋白和脾细胞被注入独立的喂食 col(V) 的同种异体移植组的右耳廓，等体积的稀释剂家脾细胞备注入到左耳廓。如图 18 和之前图 10 和图 16 所示，经供者抗原刺激后，未处理的对照同种异体移植受者有很强的 DTH 反应，而在喂食 col(V) 的同种异体移植受者中 DTH 反应被明显减弱。然而，当抗 TGF- β 抗体与供者脾细胞混合并注射到耳廓时，喂食 col(V) 的同种异体移植显著恢复 DTH 反应 [与经抗原和对照免疫球蛋白混合物刺激的喂食 col(V) 的同种异体移植相比， $^{*}P < 0.03$]（图 18）。相反，供者脾细胞和 IL-4 或 IL-10 的中和抗体混合恢复对供者抗原的 DTH 反应的能力要弱一些 [与经抗原和对照免疫球蛋白混合物刺激的喂食 col(V) 的同种异体移植相比， $^{**}P > 0.05$]（图 18）。与对照同种异体移植相比，在喂食 col(V) 的同种异体移植中注入抗 -TGF- β 、抗 IL-4 和抗 IL-10 后，对 DTH 反应的恢复能力分别是 75.7%，24.3%，和 39.9%（图 18）。

[0188] 实施例 6

[0189] Col(V) 对急性肺同种异体移植排斥发生的口服耐受效应是剂量依赖性的。F344(RT1^{lv}) 和 WKY(RT1^l) 雄性大鼠 (200-250g) 购自 Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Ind.)。按以前所述方法 Sekine 等，1997)，将所有左肺同种异体移植植物 (F344) 或同系移植植物 (WKY) 同位移植到 WKY 受者。

[0190] 现在参见图 25 表 4，它们包括本实施例数据的总结。V 型胶原蛋白从正常出生的人胎盘或由肺癌切除手术时获得的正常肺组织样本中分离得到。精通胶原蛋白生化领域技术的 Gerald N. Smith Jr. 博士为这些研究提供纯化的 V 型胶原蛋白。

[0191] 在移植手术前，按照初步试验数据和递交的草稿中报道的灌胃方法，用胶原蛋白免疫 WKY 大鼠。如表中所述，每隔一天喂食所有大鼠一次，共 4 或 8 天。与初步试验数据相似，在历时一周的喂食后恢复期之后，将 F344 大鼠左肺（同种异体移植植物）或 WKY 大鼠左肺（同系移植植物）同位移植到 WKY 受者。本实验中所有大鼠都没接受免疫抑制药物。针对

每一胶原蛋白类型的每一个喂食组包括 20 只大鼠。现参见图 25, 表 4 包括了本处报导的实施例所使用实验组的解释。

[0192] 移植后两周末之前的 24 小时是发生严重排斥的时间 (Matsumura 等, 1995), 此时测试 10 个受者大鼠对供者抗原的 DTH 反应, 随后获取胸部器官。通过选择性将导管分别插入右和左主支气管并 37℃ 注入共 5ml PBS, 进行天生和同种异体移植肺的 BAL (Sekine 等, 1997)。无细胞 BAL 通过样品离心获得, 上清液存于 -80℃。血液收集自腔静脉和心脏穿刺, 样品离心分离血清, 冻于 -80℃。

[0193] 按照预试验数据和递交的草稿中报道的方法 (Yasufuku 等, Submitted), 在手术后两周末之前的 24 小时, 将照射过的供者 (F344) 脾细胞注射入 WKY 大鼠的右耳, 以此研究迟发型超敏反应 (DTH)。数据被报告为“特定耳水肿”。初步研究已确证其它报告中所示的最大 DTH 反应发生在耳注射 24 小时后 (Yamagami 等, 1999), 因此所有 DTH 测定在耳注射 24 小时后进行。初步研究确定 DTH 测试对系统性细胞和体液反应无影响。通过比较同系移植和同种异体移植对照受者和喂食胶原蛋白的大鼠中对供者抗原的 DTH 反应, 可以确定不同剂量的 col (V) 是否对供者抗原的 DTH 反应有不同影响。

[0194] 安乐死后, 获取胸部器官进行组织学研究。简言之, 胸部器官通过器管滴注 4% 戊二醛固定, 植于石蜡中, 切成 5-7um 小片, 用苏木精和曙红染色 (H&E), 在光学显微镜下进行组织学研究。根据人肺同种异体移植排斥标准组织学准则 (Yousem 等, 1996), 用盲法 (Wilkes 等, 1995) 对组织学损伤分级。根据血管周和支气管周的单核细胞浸润强度不同鉴定急性排斥 (Yousem 等, 1996)。既然组间细胞浸润的差异比公认急性排斥的说明更灵敏, 所以也可以通过 Sigma 扫描软件 (Jandel Scientific, Chicago, III) 对存在于数字化 H&E 染色组织芯片 (细胞 / μm^2) 上血管周和支气管周的单核细胞计数来对浸润进行定量。该数字化程序现在在我们实验室正使用。

[0195] 细胞毒性 T 细胞在肺同种异体移植排斥中起重要作用 (Trulock 1997), 细胞毒性削弱已被证明是口服耐受抑制疾病活性的重要机制 (Faria 和 Weiner 1999; Mayer 2000; Garside 和 Mowat 1997)。为确定 col (V) 耐受的肺同种异体移植受者排斥活性的减少跟抗 - 供者细胞毒性的削弱相关, 从正常 F344 (供者) 大鼠分离外周淋巴结细胞, 装载上 ^{51}Cr (New England Nuclear, Boston, Mass.), 置于 96 孔平底板中 (靶细胞, $5 \times 10^3/\text{well}$) 的完全培养基中。效应细胞 (来自每组受者 - WKY 大鼠的特异 T- 淋巴细胞) 按不同比例与靶细胞 (E/T 比例为 1 : 1, 5 : 1, 10 : 1 和 100 : 1) 于 37℃ 孵育 4 小时。利用抗 - CD3 磁珠 (Dynal Corp, Lake Success, N. Y.) 分离纯 T- 细胞 (纯度 > 95%) 并用流氏细胞仪确认。通过在每一个 E/T 比例中比较效应细胞诱导的特异性 ^{51}Cr 释放和只单独装载靶细胞组中 ^{51}Cr 的释放相比来确定细胞毒性。

[0196] 其他研究者已经证实大鼠和人的肺同种异体移植排斥与肺泡、血管和支气管组织的细胞凋亡有关, 在同种异体移植容忍过程中, 很少出现凋亡 (Blankenberg 等, 2000)。以前研究也显示对同种抗原的局部免疫反应包括小鼠血管上皮和支气管上皮凋亡的诱导产生。另外, 用 col (V) 免疫引起对供者抗原的无免疫反应能力, 在本模型中能抑制同种抗原诱导的凋亡。

[0197] 为了确定 col (V) 诱导的口服耐受抑制肺同种异体移植植物中的凋亡, 移植两周后, 采用 TdT- 介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 检测试剂盒 (原位细胞死亡试剂盒,

Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) 检测肺同种异体移植组织中的凋亡。在数字化曙红复染组织切片上 (细胞 / μm^2) 利用 Sigma 扫描软件 (Jandel Scientific, Chicago, 111.) 定量血管周和支气管周组织中凋亡细胞的数量。

[0198] 为了确定潜在的 col(V) 引起的免疫抑制介导者 IL-4、IL-10、TGF- β 、CTGF 和一氧化氮的产生, 还有移植后合成的时间进程, 用最有效移植排斥病理的 col(V) 剂量为使另一组大鼠。简言之, 同种异体移植对照大鼠和喂食 col(V) 的同种异体移植受者在移植后第 2、4、6、8、10、12 和 14 天处死, 通过 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minn.) 并按照制造商方案 ($n = 5$ 每个时间点五只大鼠) 定量血清中 IL-4, IL-10, TGF- β 水平。采用 RNA 酶保护实验 (PharMingen, San Diego, Calif.) 检测淋巴结和脾细胞中所述这些细胞因子 mRNA。对照是来自正常 WKY 大鼠的血清、淋巴结和脾细胞。

[0199] 对照同种异体移植、喂食 col(V) 的同种异体移植和正常大鼠的血清中 CTGF 水平由 George Martin 博士通过 ELISA 检测, George Martin 博士 Fibrogen, San Francisco, Calif 的科研主管, CTGF 结构和功能首席专家。采用 Northern 杂交检测外周淋巴结的脾细胞 CTGF 的 mRNA, 所用探针由 Martin 博士提供。在同一时间点, 检测了 IL-4, IL-10 和 TGF- β 的蛋白和 mRNA 表达。

[0200] 在移植后上述各个时间点, 检测对照同种异体移植、喂食 col(V) 的同种异体移植大鼠血清中在上述时间点的一氧化氮水平, 同时检测正常 WKY 大鼠中的一氧化氮水平。通过 Greiss 反应, 利用分光光度计检测血清中稳定的代谢得到的亚硝酸盐和硝酸盐的产量 (Kallio 等, 1997)。

[0201] 实施例 7

[0202] col(V) 的口服耐受对慢性肺同种异体移植排斥的影响 (细支气管炎)。用于本研究的无病原, MHC(RT1)-不相容雄性大鼠: Fischer344 (F344, RT1^{lv1}), Brown Norway (BN, RT1ⁿ) 和 Wistar Kyoto (WKY, RT1^l) 大鼠 (移植时 250-300g)。所有大鼠购自 Harlan Sprague Dawley 公司 (Indianapolis, Ind.), 并在印第安那大学医学院 (Indianapolis, Ind.) 实验动物资源中心按照规章饲养。

[0203] II 型胶原蛋白 [col(II)] 按照以前报道从犬类软骨分离得到。纯化的人 V 型胶原蛋白 [col(V)] 和 XI 型胶原蛋白 [col(XI)] 由 Jerome Seyer 博士 (VA Hospital, Hampton, Va.) 馈赠。用 0.005M 乙酸稀释胶原蛋白 (0.5mg/ml) 并存于 4℃ 直到使用。按照以前报道, 通过 16 号圆珠笔式不锈钢动物喂养针 (Braintree Scientific, Braintree, Mass.) 为该动物施用溶于 0.5ml 生理盐水的 10ug col(V) 溶液。对照动物只喂稀释剂。每隔一天喂食动物一次, 共八次喂药。最后一次喂药 7 天后, 这些大鼠用作肺同种异体移植受者。

[0204] 左肺同系移植 (WKY $\rightarrow$ WKY), 或同种异体移植 (F344 $\rightarrow$ WKY) 的同位移植按以前报道进行, 所用步骤最初由 (Marck 等, 1983 和 Prop 等, 1985) 描述。所述 F344 $\rightarrow$ WKY 移植模型在第二周末伴有严重急性排斥发生。另外该模型是唯一可再生发展成闭塞性细支气管炎 (BO) 的肺移植动物模型。试验期间的任何时间都没施用免疫抑制剂治疗。

[0205] 研究了三组移植: 将肺从 WKY 大鼠移植到 WKY 受者 [对照同系移植]; F344 肺移植到 WKY 受者 [对照同种异体移植]; 和 F344 肺移植到喂食 col(V) 的 WKY 受者 [喂食 col(V) 的同种异体移植]。在移植后 2 到 10 周将受者处死。

[0206] 迟发型超敏反应 DTH 的确定按照上述方法, 所用步骤最初源于 (Sayegh 等, 1994 和

Yamagami 等,1999) 的描述并做了修饰。简言之,肺移植 10 周后,对照或喂食过 col(V) 的 WKY 大鼠接受 10^7 照射过 (3000rad) 并源于供者 F344 或第三方 (BN) 的脾细胞,所述存于 30ul PBS 中的脾细胞用 26 号针通过皮下 (s. c.) 注射到右耳廓。左耳廓接受相同体积的稀释剂用作对照。天生大鼠作为阴性对照。为测试独立的天生 WKY 大鼠组或同种异体移植受者 WKY 大鼠组,将 30ul,15ug 的 col(II)、col(V) 或 col(XI) 注射到右耳廓,稀释剂注射到左耳廓。注射后马上和 24 小时,以单盲形式用游标卡尺测量耳厚度 (Mitutoyo, Field Tool Supply, Chicago, 111.)。特定耳厚度根据下列公式计算:特定耳水肿 = (右耳厚度 @24 小时 - 右耳厚度 @0 小时) - (左耳厚度 @24 小时 - 左耳厚度 @0 小时) $\times 10^{-3}$ 毫米。所有报道数据都是三次测量的平均值。

[0207] 在 TDH 部位 TGF- 的中和按照以前报道进行,所用方法是对 (Bickerstaff 等, 2000) 描述步骤的修饰。简言之,肺移植 10 周后,喂食 col(V) 的 WKY 大鼠受着接受 10^7 照射过的 (3000rad) 源于供者 F344 的脾细胞和 5ug 鸡多克隆抗大鼠 TGF- 抗体混合物 (R&D Systems, Minneapolis, Minn.), 所述混合物存在于 30ul PBS 并被注射到右耳廓。左耳廓接受等体积稀释剂作为对照。对于阴性对照,独立的喂食 col(V) 的同种异体移植组接受 10^7 照射过的 (3000rad) 源于供者 F344 的脾细胞和 5ug 对照鸡免疫球蛋白或对照羊免疫球蛋白的混合物 (R&D Systems, Minneapolis, Minn.), 所述混合物被注射到右耳廓,稀释剂注入到左耳廓。特定耳水肿按上述确定。对照免疫球蛋白 DTH 无影响。

[0208] 混合的白细胞反应通过以前描述步骤的修饰来进行。简言之,用丝裂霉素 C (Sigma, St. Louis, Mo.) 作为抗原递呈细胞 (APCs) 来源的 F344 脾细胞 (刺激者), 该细胞以不同比例与来自 WKY 大鼠的淋巴结 T1 淋巴细胞 (反应者) (3×10^5 /孔) 共培养于含 200ul 培养基 (RPMI, 2mM L-谷氨酸盐, 5×10^{-5} M 2-巯基乙醇, 100U/ml 青霉素, 100 μ l/ml 链霉素, 10% 热失活胎牛血清) 的 96 孔平底微孔板中 (Costar, Cambridge, Mass.)。在 37°C (5% CO₂) 培养 5 天结束前 18 小时,每孔加入 1 μ Ci/ml of ³H (Amersham 公司, Arlington Heights, 111.) 培养物经自动细胞收集器收集 (Brandel, Gaithersburg, Md.) 并用液闪计数器 (Beckman, Arlington Heights, 111.) 分析。以三盘培养物中 [³H] 胸苷掺入每分钟计数的平均值来确定细胞增殖,并报道为刺激指数。在独立的实验中,用来自实验组 WKY 大鼠的脾细胞作为刺激者和来自 F344 大鼠的淋巴结 T 淋巴细胞作为反应者进行相同检测。

[0209] 实验组血清中 TGF- 水平用 TGF- β 1 免疫检测系统 (Promega, Madison, Wis.) 根据制造商方案通过 ELISA 定量。应用 Cytoscreen 免疫检测试剂盒 (BioSource International, Camarillo, Calif.) 根据制造商方案通过 ELISA 定量血清中 IL-4 和 IL-10 水平。TGF- β , IL-4 和 IL-10 检测灵敏度分别为 32、2 和 5pg/ml。

[0210] 为评测病理学,获取来自各组的天生和移植的肺,固定,切片,染色和排斥病理学分级,所述分级由病理学家 (O. W. C) 用标准准则在事先不知道以前报道的移植组情况下以单盲形式进行。

[0211] 因为发现用不同抗原刺激的对照同种异体移植和天生大鼠中 DTH 数据呈非正态分布,采用交互秩和双因素方差分析确定组间差异。对照同种异体移植和喂食 col(V) 的同种异体移植对供者同种抗原的 DTH 反应有差异,这一差异采用曼-惠特尼 U 检验来确定。用于多重比较的 Student's 检验用于混合淋巴细胞反应 (MLR) 和细胞因子的分析。P 值

< 0.05 视为有显著性。

[0212] 已证实急性肺同种异体移植伴随对供者抗原和 col(V) 的反应。然而,最近研究已经表明对供者抗原的免疫反应随时间延长会减少。为了确定对供者抗原和 col(V) 的免疫反应是否在肺移植后长期存在,在 F344 肺同种异体移植 10 周后,检测 WKY 大鼠中对 F344(供者)脾细胞和 col(V) 的 DTH 反应。图 19 显示与天然 WKY 大鼠相比,对照同种异体移植受者对供者抗原(F344 脾细胞)和 col(V) 具有显著的 DTH 反应(* $P < 0.05$)。显著地,10 周时对供者抗原和 col(V) 的 DTH 反应与在急性排斥期(移植两周后)观察到的反应相似。Col(II) 或 col(XI)(对照)在任何时间点都不能在肺同种异体移植受者中引起 DTH 反应。

[0213] 使用源于供者抗原诱导的口服耐受在抑制对供者抗原的细胞免疫反应中有效,直到移植后两周。另外,据报道缺乏抗原递呈是另一种耐受调节免疫反应的机制。接下来检测喂食 col(V) 是否长期下调对供者抗原的细胞免疫反应,和检测 col(V) 诱导的口服耐受效应是否影响抗原递呈。如上面描述,未喂食和喂食 col(V) 的 WKY 大鼠接受 F344 肺同种异体移植。移植后两周(急性排斥期)和十周(B0 开始时间),将大鼠处死,分离淋巴结的淋巴细胞,并用供者抗原(F344 脾细胞)刺激。图 19 显示来自正常 WKY 大鼠的淋巴结淋巴细胞或分离自 F344 肺同种异体移植后二或十周的 WKY 大鼠的淋巴细胞对供者抗原有相当的增值反应。相反的,与正常和对照同种异体移植相比,col(V) 诱导的口服耐受在两个时间点都引起对供者抗原增值反应的显著降低(* $p < 0.05$)。另外,对来自喂食 col(V) 的肺同种异体移植受者淋巴细胞,10 周时的增值反应比两周时要少(* $p < 0.05$,图 20)。

[0214] 我们接下来测定 col(V) 诱导的口服耐受是否影响抗原递呈。简言之,从正常 WKY 大鼠分离到的或从 F344 肺同种异体移植二和十周后的喂食 col(V) 的 WKY 大鼠中分离得到的脾细胞(抗原递呈细胞的来源),检测它们诱导 F344 淋巴结淋巴细胞在 MLR 中增殖的能力。图 19 显示在第二和十周分离自喂食 col(V) 的同种异体移植受者的脾细胞诱导增殖与分离自正常 WKY 大鼠的脾细胞相似。

[0215] 在器官移植的各种啮齿类模型中,DTH 反应被报道与排斥活性相关。因此,在 10 周后喂食 col(V) 的肺同种异体移植受者对供者抗原 DTH 反应的减少表明在同种异体移植中的排斥病理的减弱。图 21 显示的是肺同种异体移植的大体解剖学和病理学,所述的肺获得自接受 F344 肺同种异体移植(对照同种异体移植)的 WKY 大鼠,移植 10 周后的喂食 col(V) 并接受 F344 肺同种异体移植的 WKY 大鼠。对照同种异体移植植物呈茶褐色、缩小和坚实(图 21A)。相反的,来自喂食 col(V) 的 WKY 大鼠的同种异体移植植物具有几乎正常的表外观,只有轻微变色(图 21B) 移植后第 10 周,所有对照同种异体移植植物发展广泛的间隙单核细胞浸润、纤维化和组织粒状表面造成的小气管的闭塞,这些都是 B0 的病理损伤。(n = 5,图 21C)。相反的,来自喂食 col(V) 的大鼠的同种异体移植植物只有轻微肺泡浸润,无间隙炎症,表明是轻微的急性排斥(A2 级,n = 5,图 21D)。

[0216] IL-4、IL-10 或 TGF- 的系统性产生一般被报道是口服耐受诱导免疫抑制的机制。图 22 显示了移植后 10 周,三个实验组血清中 TGF- 的水平。正常 WKY 大鼠血清中有低水平 TF-b,在接受 F344 肺同种异体移植的 WKY 大鼠中 TGF 水平有轻微但不显著的增加(对照同种异体移植-图 22)。然而,肺移植前喂食 col(V) 导致 TGF-b 水平的显著增加(图 25,* $P < 0.05$)。只喂食 col(V),不进行肺移植不会增加血清 TGF-b 水平(数据未给出)。在任何

组的血清中,都未检测到 IL-4 和 IL-10。

[0217] 对同种抗原淋巴细胞反应的下调和体外完整的同种抗原递呈的试验数据表明 col(V) 诱导的口服耐受与体内对供者抗原 DTH 反应的抑制相关。如所预料的,图 23 显示,对照同种异体移植受者对供者抗原 DTH 反应。然而,移植前喂食 col(V) 导致对供者抗原 DTH 反应的显著减少(图 26, $*p < 0.05$)。为了确定 TGF- 血清水平的增加是否有助于 col(V) 诱导的口服耐受,按以前报道,采用 TGF- 的中和抗体重复对供者抗原的 DTH 反应。图 23 显示, TGF- 的中和导致对供者抗原 DTH 反应的显著恢复。 ($*p < 0.05$, 和在对照同种异体移植中观察到的 DTH 反应的 75%)。

[0218] 实施例 8

[0219] 现在参考图 26, 表 5 列出了实施例 8 中使用的试验组, 检测存在于 col(V) α -链的溴化氰消化物中的肽是否能抑制急性排斥的发生。简言之, 这些试验组如下: 同种异体移植对照喂食完整 col(V) 2(V)。V 型胶原蛋白是从死亡者的肺中分离的。肺组织切碎后, 清洗, 并悬浮于含有 0.2M NaCl 的 1.5M 乙酸中, 通过胃蛋白酶消化, 离心样品吸出上清液, 收集颗粒物并重复提取过程。合并两次消化物的上清液, 在 -70°C 储存。V 型胶原蛋白从 0.5M 乙酸中通过差异 NaCl 沉淀, 从上清液中被纯化 (Piez 等, 1963)。重复进行样品的乙酸溶解和 NaCl 沉淀循环, 直到获得 α -链比率 $\alpha 1(V)/\alpha 2(V)$ 大约 2 的 V 型制备物, 所述 α -链比率通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 (Woodbury 等, 1989)。利用 DEAE-纤维素色谱法将 $\alpha 1(V)$ 和 $\alpha 2(V)$ 分离 (Chiang 等, 1980)。 $\alpha 1(V)$ 和 $\alpha 2(V)$ 链从柱子洗脱, 并通过检测羟脯氨酸含量来定量。

[0220] 通过用溴化氰消化使 V 型胶原蛋白的 α 链进一步片断化, 所述氰化溴可在甲硫氨酸残基处切开胶原蛋白 (Miller 等, 1971)。消化完成, 样品被稀释 50 倍并冻干以去除溴化氰。消化程度通过聚丙烯酰胺凝胶筛选。单独的肽通过离子交换和分子筛色谱联合使用来分离。

[0221] 20 只 WKY 大鼠通过灌胃法接受完整的 col(V) 或源于 $\alpha 1(V)$ 的多肽群或 $\alpha 2(V)$ 。本实施例中对于完整的 col(V) 或肽的剂量和喂食方法与实施例 5 中所述相同。移植两周后, 每组大鼠被处死并获取肺。

[0222] 实施例 9

[0223] 本实施例中数据表明本发明的方法能有效预防或减少人移植受者中的急性或慢性排斥事件, 该过程与治疗相似的 (如果不同于治疗的话)。本方法也能有效治疗特发性肺疾病或包括肺中发现的对胶原蛋白自发免疫反应的任何其它肺疾病或病症。我们预期, 当受治疗人被安排在接受移植的名单中时, 该受试者将首先接受有效量的抑制同种免疫反应的分子, 例如本发明中所描述的胶原蛋白。通过口服给药使正在经历治疗的患者接受所述化合物, 优选为通过口服或经肺灌注施用至受者。

[0224] 所述剂量由许多本领域技术人员公知的因素来决定, 从被安排在移植名单中开始到移植时, 患者每月将接受至少 3 种剂量的所述化合物。在一些病例中, 所述剂量每隔一天被施用至患者, 经历 4 天, 以达到每月接受至少三种剂量。在另一些病例中, 所述剂量每隔一天被施用至患者, 经历 8 天, 以达到移植前每月 5 次总剂量。在另一些病例中, 从被安排在移植名单中开始到移植时, 患者每周至少一次接受所述化合物。根据受试者情况, 从被安排在移植名单中开始到移植时, 可以每周至少两次施用所述化合物。

[0225] 实施例 10

[0226] 我们进一步预测,使用抑制同种免疫反应的分子,优选为胶原蛋白化合物治疗已接受移植的或患有肺疾病或病症的受治疗人,所述肺疾病或病症包括对胶原蛋白(例如 V 型胶原蛋白)的自发免疫。如上,所述化合物可以通过各种方式施用,包括通过口服或通过经肺或静脉灌输施用至受者(患者)。

[0227] 此外,所述剂量由本领域技术人员基于许多本领域技术人员公知的因素来决定。在大多数病例中,既定患者每月将可能接受至少三种剂量的所述化合物,经历至少两个月或直到疾病或病症的症状有改善。这些剂量可以以每隔一天一种剂量,经历 4 天的方式施用,如上述,一个月三种剂量。下月,移植受试者将接受另一轮的每隔一天一种剂量,经历 4 天的方式给药。如有需要该过程可以重复,这需要通过本领域技术人员来决定的。或者,移植后,如有需要,所述受试者可以接受每隔一天一种剂量,经历 8 天的方式给药,每月总共 5 种剂量。在另一些方面,所述受试者可以接受每周增量或每周 2 次的剂量等,这需要本领域技术人员决定。

[0228] 虽然在附图和前面的描述中详细说明和描述了本发明,但这些附图和描述应该解释为对特征的说明而非限制,应理解,本发明仅仅显示和描述了优选的实施方案,在本发明精神范围内的所有变化和调整都期望获得保护。并且,虽然使用特定的实施例、理论、解释和示例来说明本发明,但这些说明和随附的讨论绝不该解释为对本发明的限制。本申请所提及的所有专利、专利申请和对教科书、科学论文、出版物等的参考,通过引用整体结合入本文。

[0229] 参考文献

[0230] 下述参考文献特别通过引用结合入本文,以达到它们提供示例性程序或者其他对本文提出的那些程序的细节补充的程度。

[0231] Ayoub G, Terasaki P. HLA-DR matching in multicenter, single-typing laboratory data. Transplantation 1982 May ;33 :515-7.

[0232] Bickerstaff², Xia*, Pelletier*, and Orosz*, “Mechanisms of Graft Acceptance : Evidence That Plasminogen Activator Controls Donor-Reactive Delayed-Type Hypersensitivity Responses in Cardiac Allograft Acceptor Mice. ” 2000.

[0233] Birk OS, Gur SL, Elias D, et al. The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 ;96 :5159-63.

[0234] Blankenberg, F., Robbins, R., Stoot, J., Vriens, P., Berry, G., Tait, J. and Strauss, H., “Radionuclide Imaging of Acute Lung Transplant Rejection With Annexin V” Chest, 2000 ;117 :834-840.

[0235] Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, VanBuskirk AM, Orosz CG, Lee JH, Kusaka S. Loss of tolerance to a maternal kidney transplant is selective for HLA class II : Evidence from trans-vivo DTH and alloantibody analysis. Human Immunology 2000 ; 61 :1395-402.

[0236] Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E, et al. Minor H Antigen HA-I-specific Regulator and Effector CD8+ T Cells, and HA-I Microchimerism,

inAllograft Tolerance. J Exp Med 2004 ;199 :1017-23.

[0237] Chen, Kuchroo, Inobe, Hafler, Weiner, "Regulatory T-cell clones induced by oral tolerance :suppression of autoimmune encephalomyelitis," Science, 265 : 1237-1240, 1994.

[0238] Chen, Inobe, Marks, Gonnella, Kuchroo, Weiner, "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance," Nature, 376 :177-180, 1995.

[0239] Chiang, Mainardi, Seyer, "Type V (A-B) collagen induces platelet aggregation," J. Lab. Clin. Med. , 95 :99-107, 1980.

[0240] Cremer, Ye, Terato, Owens, Seyer, Kang, "Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat :characterization of cellular and humoral immune responses to native types XI, V, and II collagen and constituent. alpha. -chains," J. Immunol. 153 : 824-832, 1994.

[0241] Fedoseyeva, Zhang, Orr, Levin, Buncke, Benichou, "De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process," J. Immunol, 162 :6836-42, 1999.

[0242] Delclaux, S. , Rezaiguia-Delaux, C, Delacourt, C, Brun-Buission, C, Lafuma and Harf, A. , "Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats." Am J Physical Lung Cell Mol Physiol 273 :L104-L112, 1997 ; 1040-0605/97.

[0243] Duquesnoy RJ, Liu K, Fu XF, Murase N, Ye Q, Demetris AJ. Evidence for heat shock protein immunity in a rat cardiac allograft model of chronic rejection. Transplantation 1999 ;67 :156-64.

[0244] Estenne M, Maurer JR, Boehler A, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome 2001 :an update of the diagnostic criteria. J Heart Lung Transplant 2002 ; 21 :297-310.

[0245] Faria and Weiner, "Oral tolerance :mechanisms and therapeutic applications," Adv. Immunol, 73 :153-264, 1999.

[0246] Garrovillo, Ali, Oluwole, "Indirect allorecognition in acquired thymic tolerance :induction of donor-specific tolerance to rat cardiac allografts by allo peptide-pulsed host dendritic cells," Transplantation, 68 :1827-1834. 1999.

[0247] Garside and Mowat, "Mechanisms of oral tolerance." Crit Rev Immunol, 1997 ;17 (2) :119-37.

[0248] Hanson, Gorman, Oui, Cheah, Solomon, Trowsdale, "The human. alpha. 2 (XI) collagen gene (COL11A2) maps to the centromeric of the major histocompatibility complex on chromosome 6," Genomics, 5 :925-931, 1989.

[0249] Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, et al. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation :role of Type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. J Immunol 2002 Aug 1 ;169 :1542-9.

[0250] Henningsen GM, Koller LD, Exon JH, Talcott PA, and Osborne CA, "A sensitive

delayed-type hypersensitivity model in the rat for assessing in vivo cell-mediated immunity." J Immunol Methods. 1984 May 25; 70(2): 153-65.

[0251] Hirt, You, Moller, Boeke, Starke, Spranger, Wottge, "Development of obliterative bronchiolitis after allogeneic rat lung transplantation: Implication of acute rejection and the time point of treatment," J. Heart Lung Transplant, 18: 542-548, 1999.

[0252] Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and Type IV collagen. N Engl J Med 2003; 348: 2543-56.

[0253] Huang, Fuchimoto, Scheier-Dolberg, Murphy, Neville, Sachs, J. Clin. Invest., 105: 173-181, 2000.

[0254] Ishido, Matsuoka, Matsuno, Nakagawa, Tanaka, "Induction of donor-specific hyporesponsiveness and prolongation of cardiac allograft survival by jejunal administration of donor splenocytes," Transplantation, 68: 1377-1382, 1999.

[0255] Joo, Pepose, Stuart, "T-cell mediated responses in a murine model of orthotopic corneal transplantation," Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 36: 1530-1540, 1995.

[0256] Kallio*, E., Koskinen*, P., Aavik*, E., Vaali*, K., and Lemstrom*, K., "Role of Nitric Oxide in Experimental Obliterative Bronchiolitis (Chronic Rejection) in the Rat," J. Clin. Invest. Vol 100 No 12, December 1997, 2984-2994.

[0257] Konomi, Hayashi, Nakayasu, Arima, "Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin," Am. J. Pathol, 116: 417-426, 1984.

[0258] Krensky and Clayberger, "HLA-derived peptides as novel immunosuppressives," Nephrol. Dial. Transplant, 12: 865-878, 1997. Lowry, Marghesco, Blackburn, "Immune mechanisms in organ allograft rejection. VI. Delayed-type hypersensitivity and lymphotoxin in experimental renal allograft rejection," Transplantation., 40: 183-188, 1985.

[0259] Madri and Furthmayr, "Isolation and tissue localization of type AB2 collagen from normal lung parenchyma," Am. J. Pathol, 94: 323-332, 1979.

[0260] Madri and Furthmayr, "Collagen polymorphism in the lung," Human Pathology, 11: 353-366, 1980.

[0261] Marck, Prop, Widevuur, "Lung transplantation in the rat. III. Functional studies in iso- and allografts," J. Surgical Res., 35: 149-158, 1983.

[0262] Mares DC, Heidler KM, Smith GN, et al. Type V Collagen Modulates Alloantigen-Induced Pathology and Immunology in the Lung. Am J Respir Cell Mol Biol 2000 Jul 1; 23: 62-70.

[0263] Matsumura, Marchevsky, Zuo, Kass, Matloff, Jordan, "Assessment of pathological changes associated with chronic allograft rejection and tolerance in two experimental models of rat lung transplantation," Transplantation., 59: 1509-1517, 1995.

[0264] Morris and Bachinger, "Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1. alpha., 2. alpha., 3. alpha.) retaining non-triplehelical domains." J. Biological Chem., 262 :11345-11350, 1987.

[0265] Murphy, Magee, Alexander, Waaga, Snoeck, Vella, Carpenter, Sayagh, "Inhibition of allorecognition by a human class II MHC-derived peptide through the induction of apoptosis," J. Clin. Invest, 103 :859-867, 1999. O' Leary, Evans, Zuckerman, "IN Vivo Dexamethasone Effects on Neutrophil Effector Functions in a Rat Model of Acute Lung Injury," Inflammation, 21 :6, 1997.

[0266] Oluwole, Chowdhury, Jin, Hardy, "Induction of transplantation intolerance to rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogeneic soluble peptides," Transplantation, 56 (6) :1523-1527, 1993. Piez, K. A., Eigher, E. A. and Lewis, M. S. Biochemistry, 2, 58 ;1996. Prop, Nieuwenhuis, Wildevuur, "Lung allograft rejection in the rat. I. Accelerated rejection caused by graft lymphocytes," Transplantation, 40 :25-30, 1985.

[0267] Rodriguez DS, Jankowska-Gan E, Haynes LD, et al. Immune regulation and graft survival in kidney transplant recipients are both enhanced by human leukocyte antigen matching. Am J Transplant 2004 ;4 :537-43.

[0268] Sayagh, Watschinger, Carpenter, "Mechanisms of T cell recognition of alloantigen," Transplantation, 57 : (9) 1295-1302, 1994.

[0269] Sayegh, Khoury, Hancock, Weiner, Carpenter, "Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II major histocompatibility complex allopeptides in the rat," Proc. Natl. Acad. Sci, 89 :7762-7766, 1992.

[0270] Sayegh and Krensky, "Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides," Kidney Int. Suppl. 53 :S13-20, 1996.

[0271] Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the COL5A1 gene of Type V collagen are a cause of the classical form of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). Am J Hum Genet 2000 ;66 :1757-65.

[0272] Sekine, Nowen, Heidler, Van Rooijen, Brown, Cummings, Wilkes, "Role of passenger leukocytes in allograft rejection-Effect of depletion of alveolar Macrophages on the local production of TNF-alpha, T helper 1/Thelper 2 cytokines, IgG subclasses, and pathology in a rat model of lung transplantation," J. Immunol, 159 :4084-4093, 1997.

[0273] Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wallwork J. Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. J Heart Lung Transplant 2002 ;21 :271-81.

[0274] Smith Jr, Williams, Brandt, "Interaction of proteoglycans with pericellular (1alpha, 2alpha, 3alpha) collagens of cartilage," J. Biol. Chem., 260 :10761-10767, 1985.

[0275] Stark and Ostrow, Training Manual Series, Laboratory Animal Technician,

American Association for Laboratory Animal Science, 181-182, 1990.

[0276] Trulock, "Lung transplantation," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155 : 789-818, 1997.

[0277] VanBuskirk, Wakely, Sirak, Orosz, "Patterns of allosensitization in allograft recipients: long-term allograft acceptance is associated with active alloantibody production in conjunction with active inhibition of alloreactive delayed-type hypersensitivity," *Transplantation*, 65 : 1115-1123, 1998.

[0278] van den Berg JW, Hepkema BG, Geertsma A, et al. Long-term outcome of lung transplantation is predicted by the number of HLA-DR mismatches. *Transplantation* 2001; 71 : 368-73.

[0279] Westra, Prop, Kuijpers, "A paradox in heart and lung rejection," *Transplantation*, 49 : 826-828, 1990

[0280] Whitacre, Gienapp, Orosz, Bitar, "Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy," *J. Immunol.*, 147 : 2155-2163, 1991.

[0281] Wilkes, Heidler, Bowen, Quinlan, Doyle, Cummings, Doerschuk, "Allogeneic bronchoalveolar lavage cells induce the histology of acute lung allograft rejection, and deposition of IgG2a in recipient murine lungs," *J. Immunol.*, 155 : 2775-2783, 1995.

[0282] Wilkes, Thompson, Cummings, Bragg, Heidler, "Instillation of allogeneic lung macrophages and dendritic cells cause differential effects on local IFN- γ , production, lymphocytic bronchitis, and vasculitis in recipient murine lungs," *J. Leukoc. Biol.* 64 : 578-586, 1998.

[0283] Wilkes, Bowman, Cummings, Heidler, "Allogeneic bronchoalveolar lavage cells induce the histology and immunology of lung allograft rejection in recipient murine lungs. Role of ICAM-1 on donor cells," *Transplantation*, 67 (6) : 890-896, 1999.

[0284] Wilson, Ebringer, Ahmadi, Wrigglesworth, Tiwana, Fielder, Binder, Ettelaie, Cunningham, Joannou, Bansal, "Shared amino acid sequences between major histocompatibility complex class II glycoproteins, type XI collagen and *Proteus mirabilis* in rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, 54 : 216-220, 1995.

[0285] Woessner Jr., "The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid," *Arch. Biochem. Biophys.* 93 : 440-447, 1961.

[0286] Yagyu, Steinhoff, Schfers, Dammenhayn, Haverich, Borst, "Comparison of mononuclear cell populations in bronchoalveolar lavage fluid in acute rejection after lung transplantation and Mycoplasma infection in rats," *J. Heart Transplant.*, 9 : 516-525, 1990.

[0287] Yamagami, Tsuru, Ohkawa, Endo, Isobe, "Suppression of allograft rejection

with anti-alpha beta T cell receptor antibody in rat cornealtransplantation,"Transplantation,67 :600-604,1999.

[0288] Yasufuku K, Heidler KM, O' Donnell PW, et al. Oral tolerance induction by Type V collagen downregulates lung allograft rejection. Am J Respir Cell Mol Biol 2001 Jul ;25 :26-34.

[0289] Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, et al. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by Type V collagen-induced oral tolerance. Transplantation 2002 ;73 :500-5.

[0290] Yoshino, Quattrocchi, Weiner, "Suppression of antigen-induced arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen," Arthritis Rheum. 38 : 1092-1096, 1995.

[0291] Yousem, Berry, Cagle, Chamberlain, Husain, Hruban, Marchevsky, Ohori, Ritter, Stewart, Tazelaar, "Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection : Lung rejection study group," J. Heart Lung Transplant, 15 :1-15, 1996.

[0292] Zheng, Markees, Hancock, Li, Greine, Li, Mordes, Sayegh, Rossini, Strom, "CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment," J. Immunol. , 162 :4983-4990, 1999.

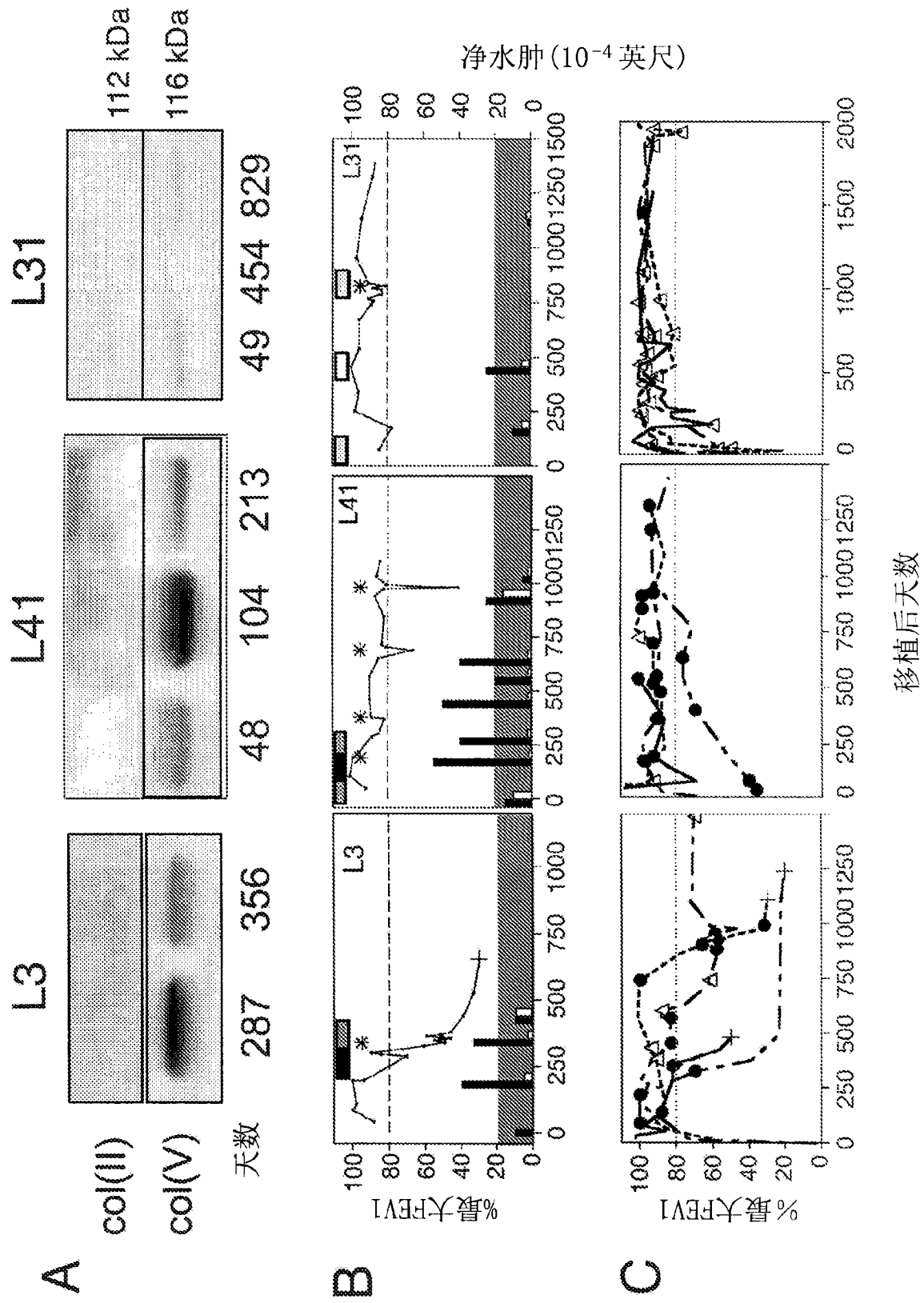


图1

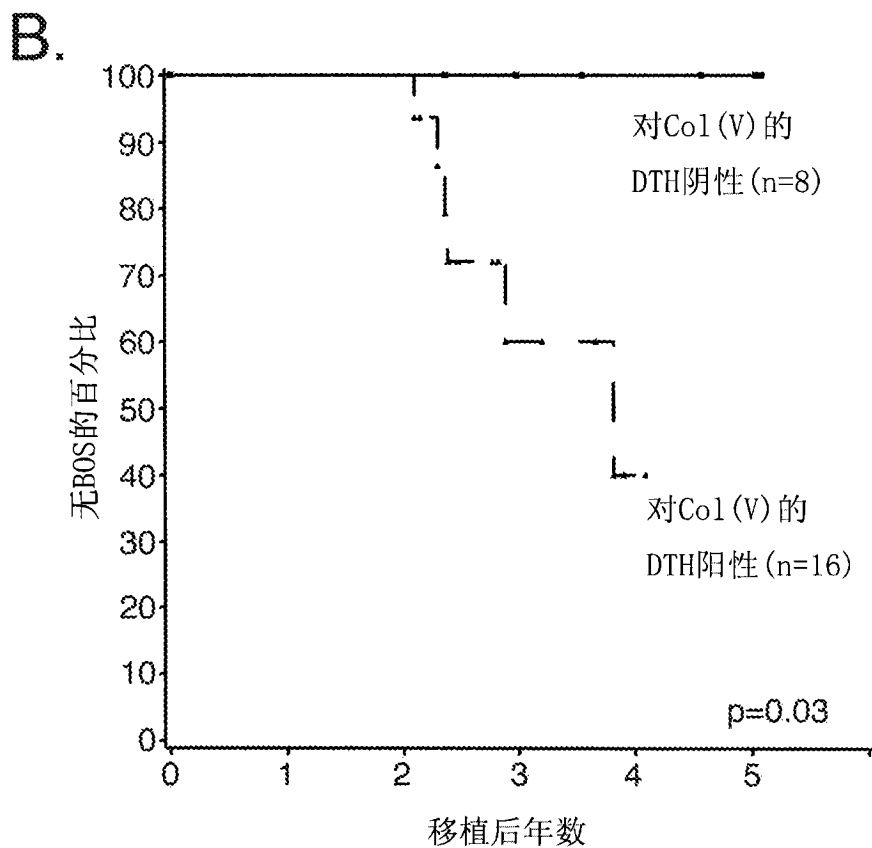
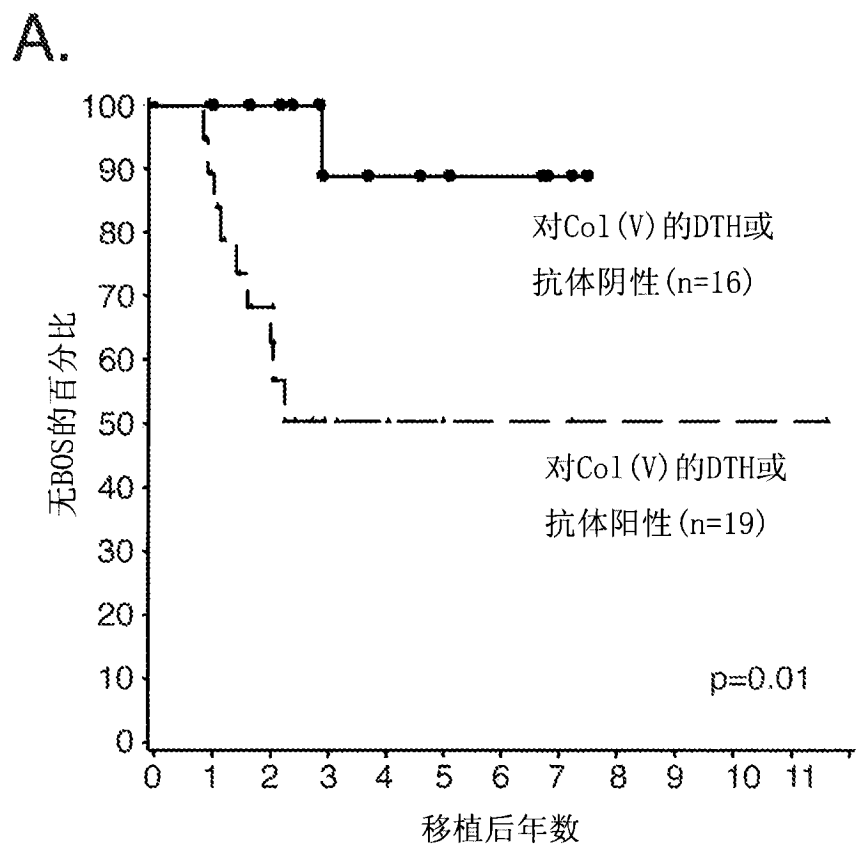
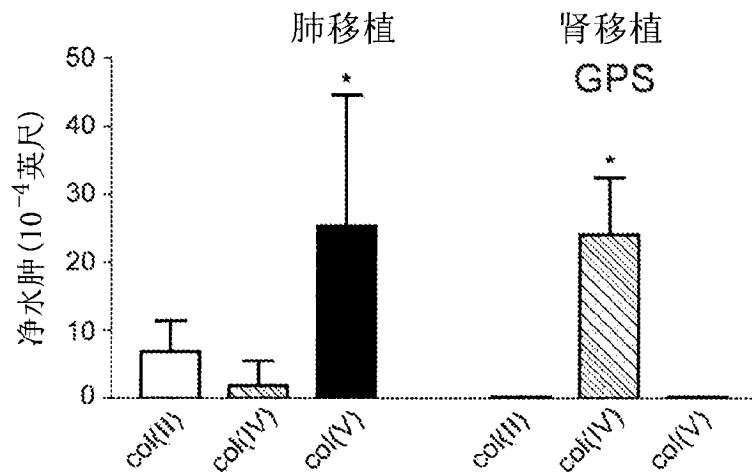
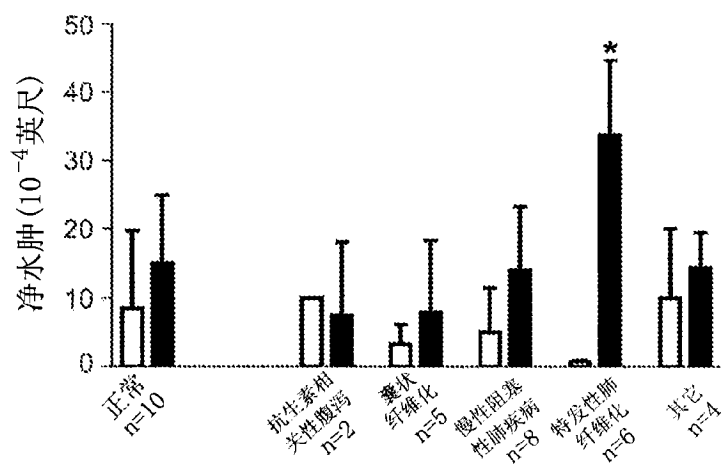


图 2

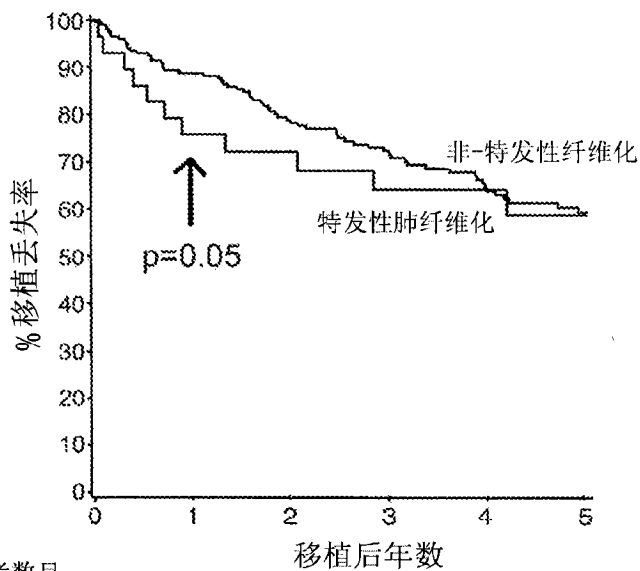
A. 移植后



B. 移植前



C. 移植存活



存在风险的受者数目

特发性肺纤维化 29

17

6

其它 197

113

56

图 3

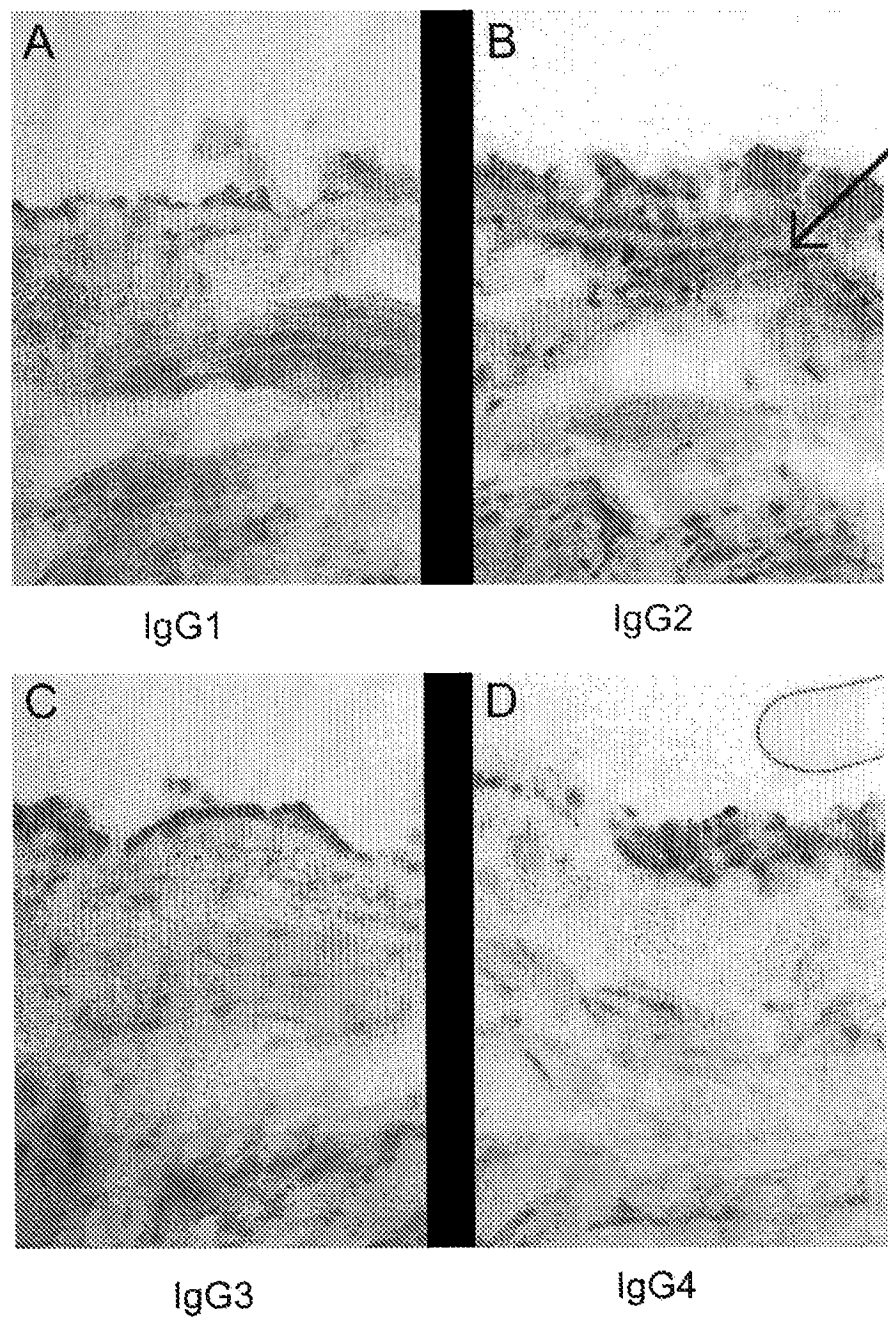


图 4

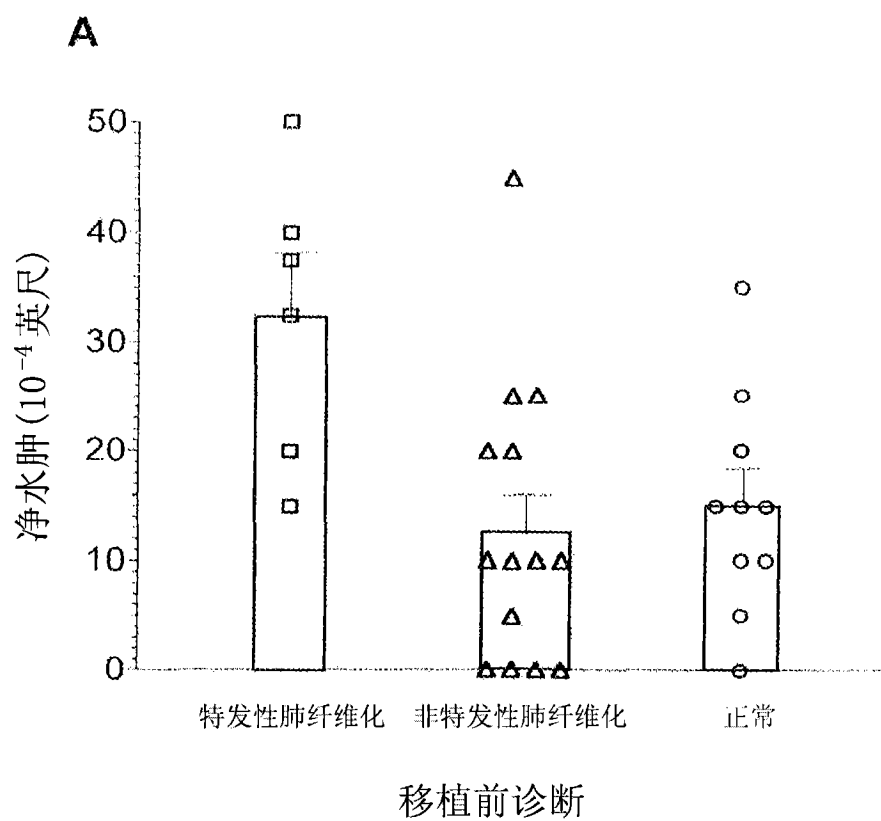


图 5

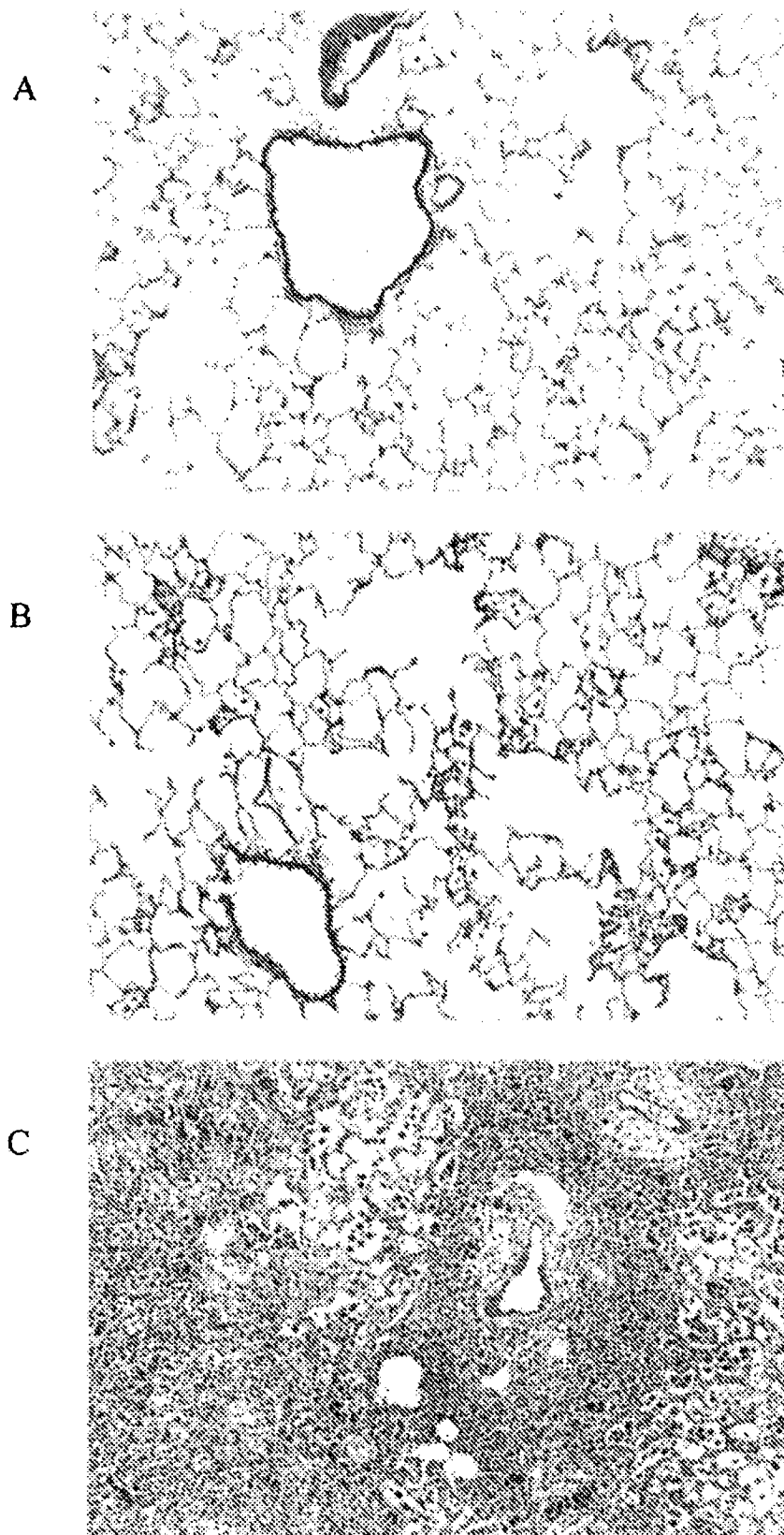


图 6

	研究组	
	总数 n=226	Co(v)子集 n=56
双侧肺移植 ^a	93 (41%)	30 (54%)
移植前诊断 ^a		
抗生素相关性腹泻(AAD)	36 (16%)	10 (18%)
囊状纤维化(CF)	50 (22%)	18 (32%)
慢性阻塞性肺疾病(COPD)	84 (37%)	14 (25%)
特发性肺纤维化(IPF)	29 (13%)	8 (14%)
其它 ^b	27 (12%)	6 (11%)
BOS ^a 病人	86 (38%)	18 (32%)
BOS ^c 平均时间	2.5 ± 1.9	2.2 ± 1.7
平均随访时间 ^c	3.7 ± 2.7	3.8 ± 2.4

表1. 患者统计

^a 病人数(总的%)^b 其他类型, 包括房间隔缺损、支气管扩张、淋巴管平滑肌瘤病、特发性闭塞性细支气管炎、闭塞性细支气管炎、肺纤维化、原发性肺动脉高压、和肉状瘤病病人^c 年±标准偏差

图 7

表2 与BOS相关的因素

Col (V) 研究组的分析	风险率	置信区间	p
DTH或对col (V) 的抗体 ^a	∞^b	NA ^b	NA ^b
对col (V) 的DTH $\geq 25^c$	12.3	1.6-97.	0.02
col (V) 抗体 $\geq 1^d$	2.08	1.1-4.0	0.02
# 排斥发作	1.58	1.1-2.3	0.02
所有病人分析			
# 排斥发作	1.40	1.2-1.7	< 0.001
原始疾病 ^e = CF	0.35	0.2-0.7	0.002
原始疾病 ^e = COPD	1.70	1.1-2.7	0.01
原始疾病 ^e = OTHER	1.90	1.1-3.4	0.02
双侧移植	0.59	0.4-0.9	0.02
HLA 错配 DR	1.62	1.0-2.6	0.03

a 表示病人是否有对col (V) 的阳性DTH或抗体反应的时间变化协变量。

b 既然所有病人都会对col (V) 反应，风险率的估计是无穷大，无置信区间，P值无意义。

c 表示阳性DTH（净水肿 ≥ 25 ）反应的时间变化协变量。

d 表示对col (V) 的阳性抗体反应的时间变化协变量。

e 每种疾病类型中病人存活与所有其它疾病的病人存活比较。

图 8

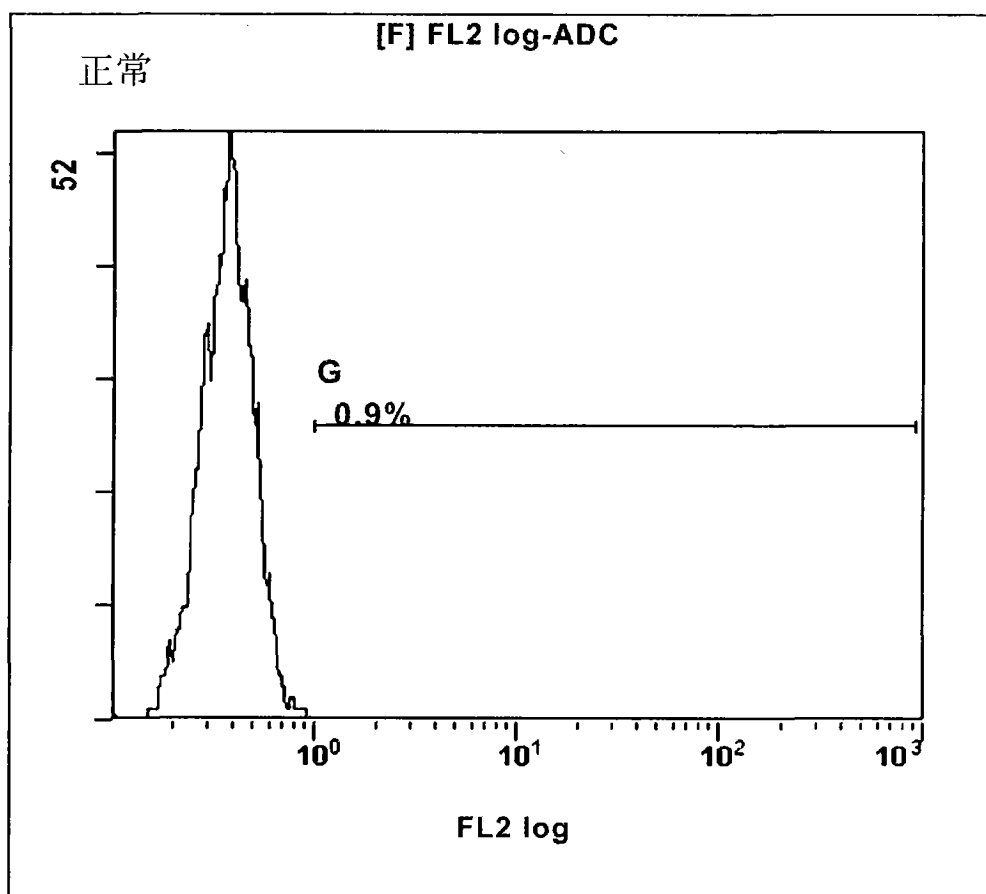


图 9A

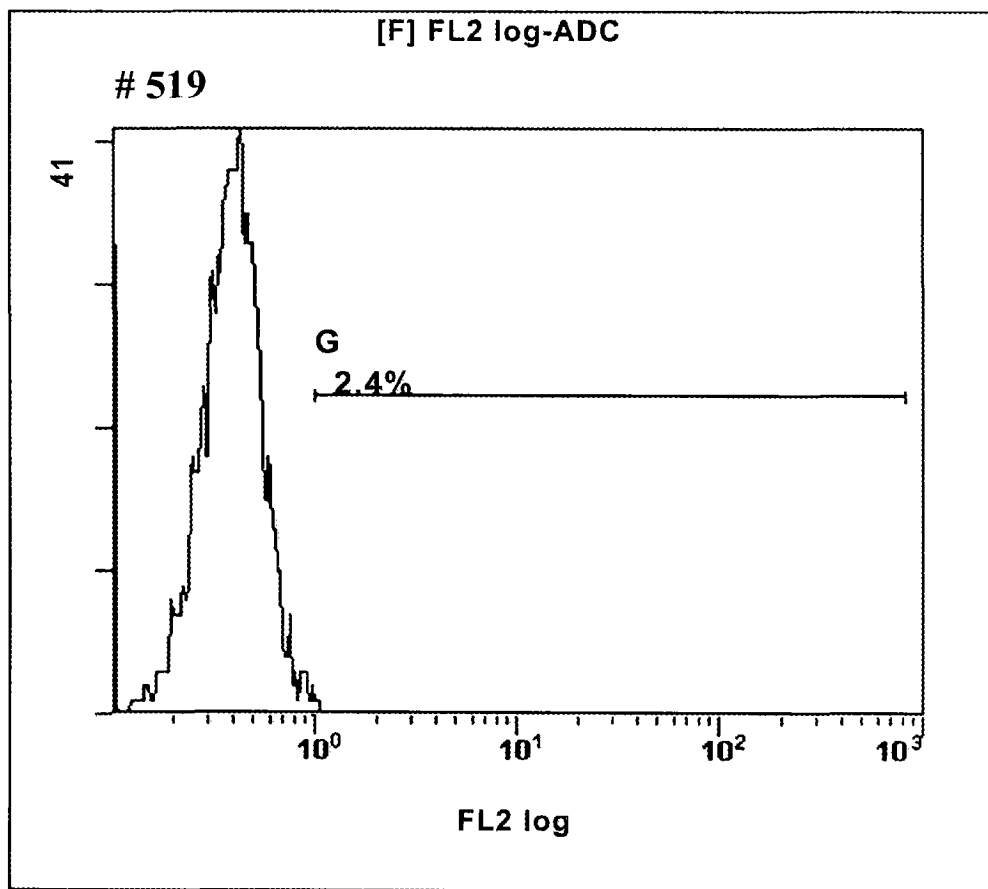


图 9B

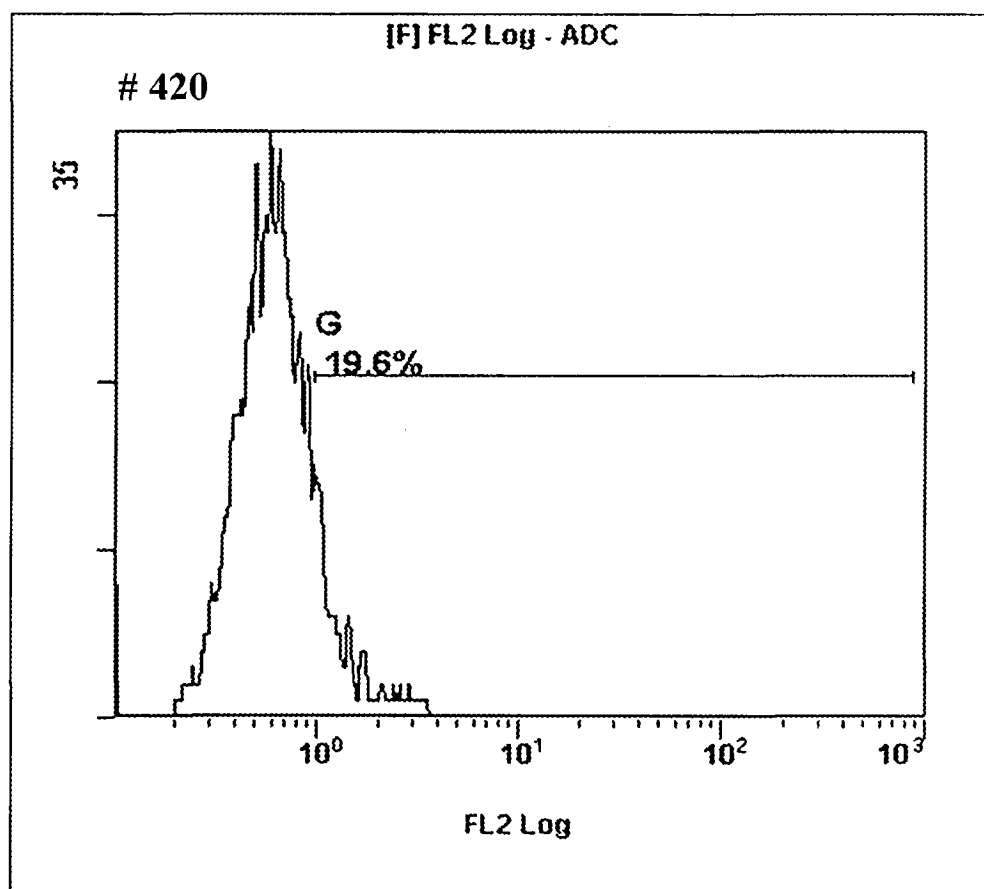


图 9C

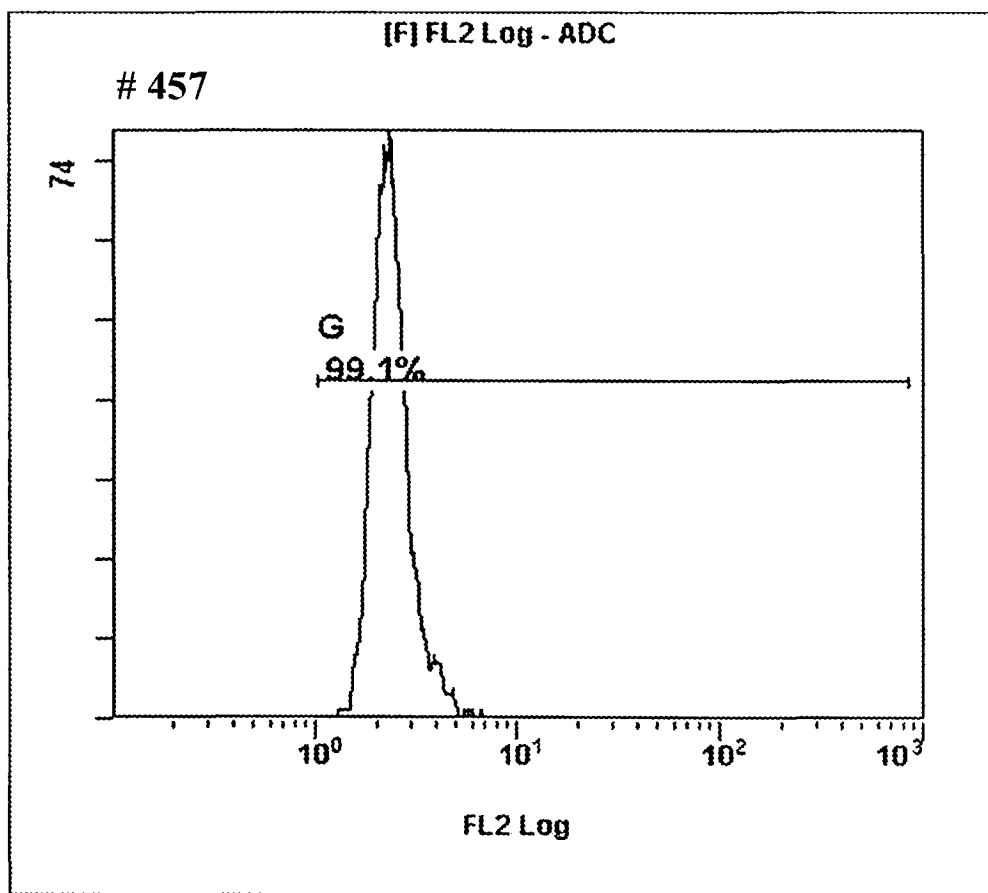


图 9D

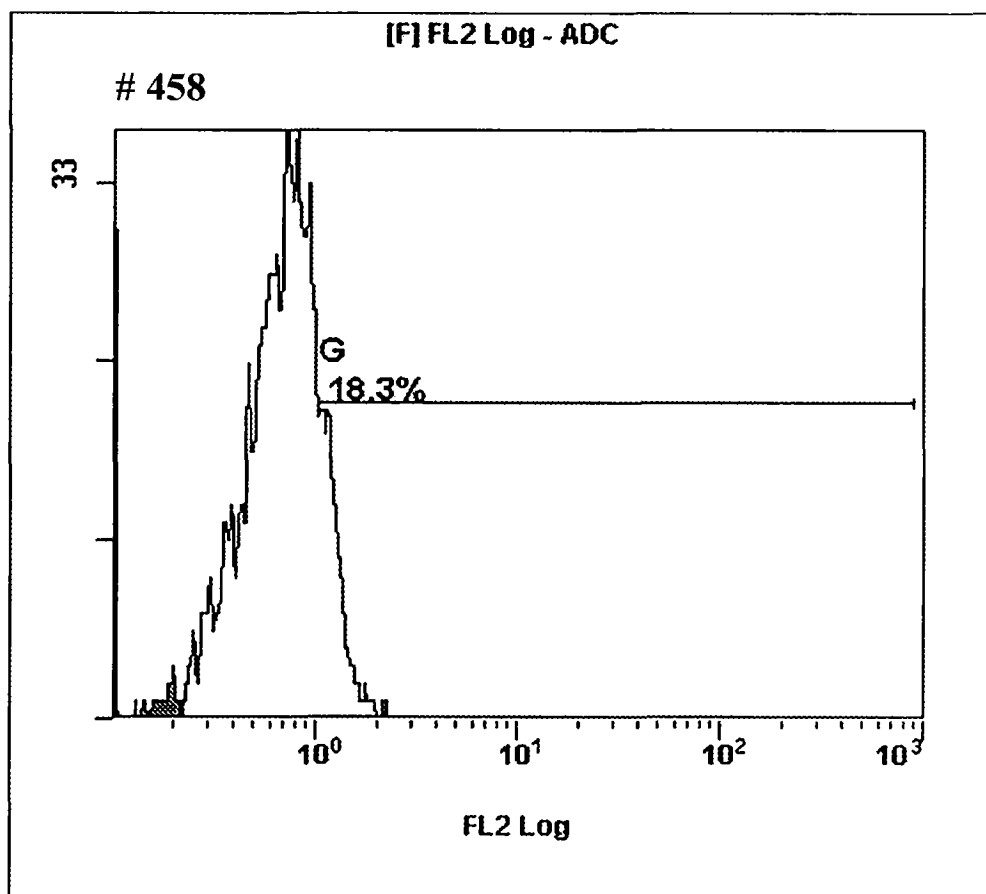


图 9E

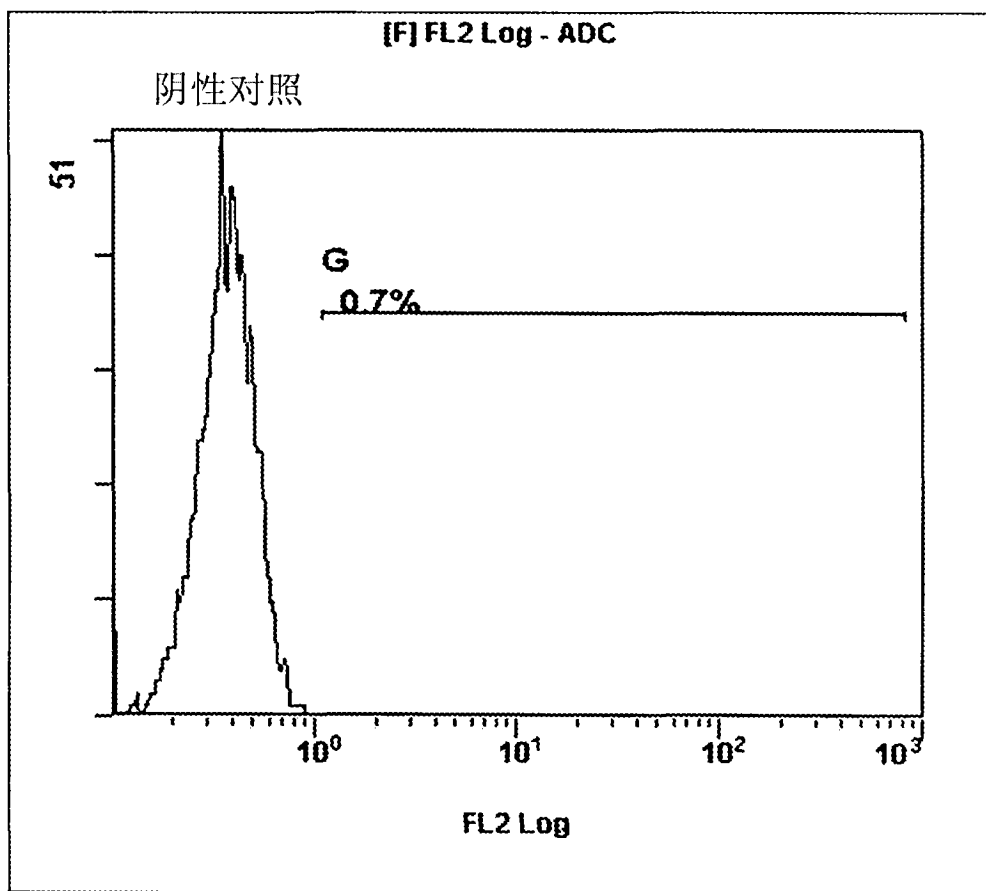


图 9F

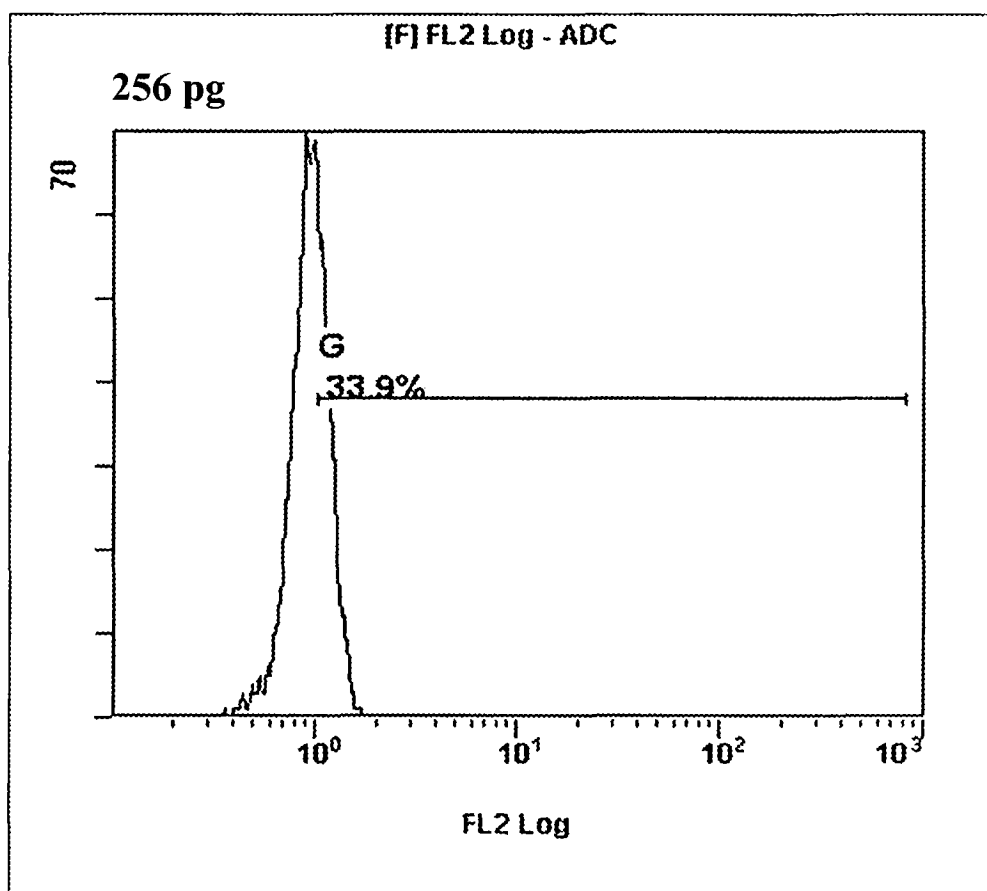


图 9G

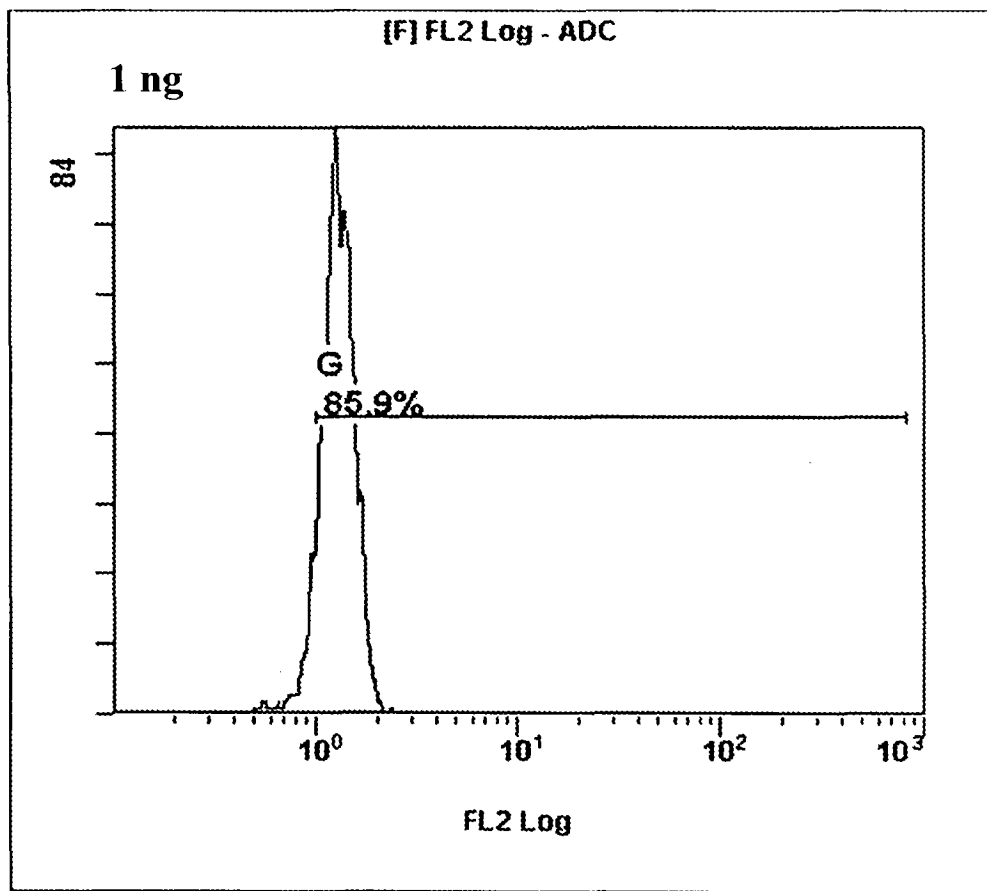


图 9H

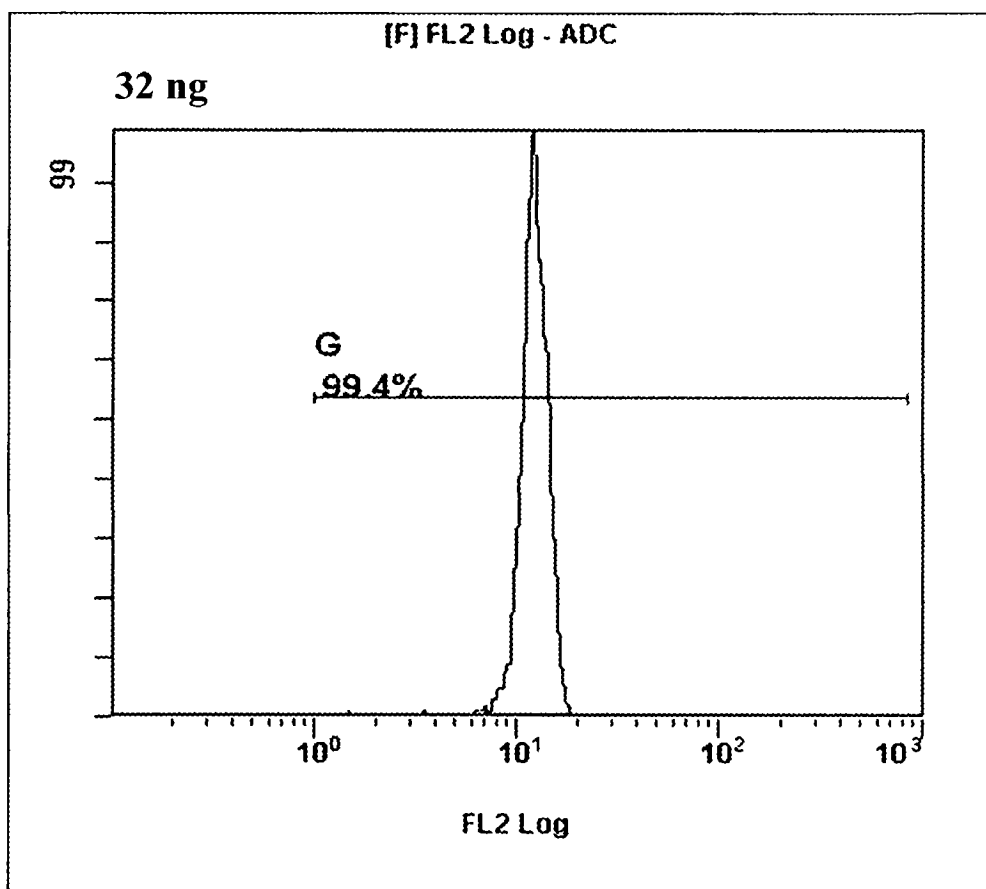


图 9I

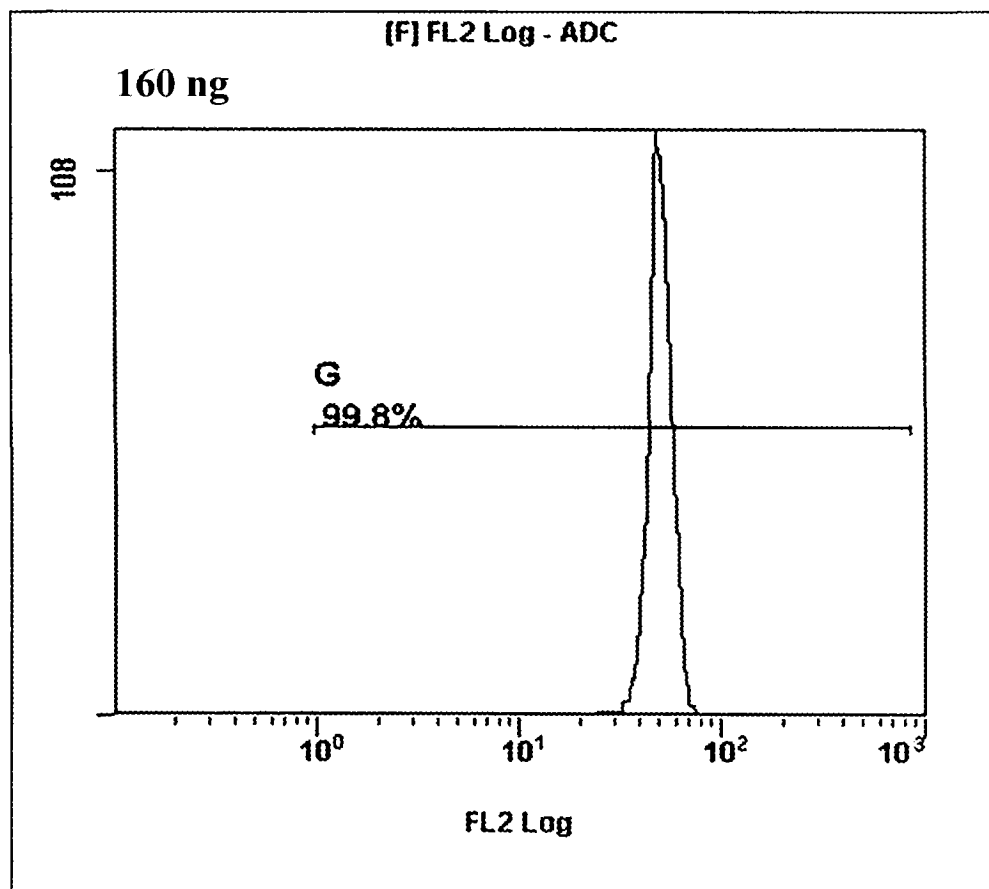


图 9J

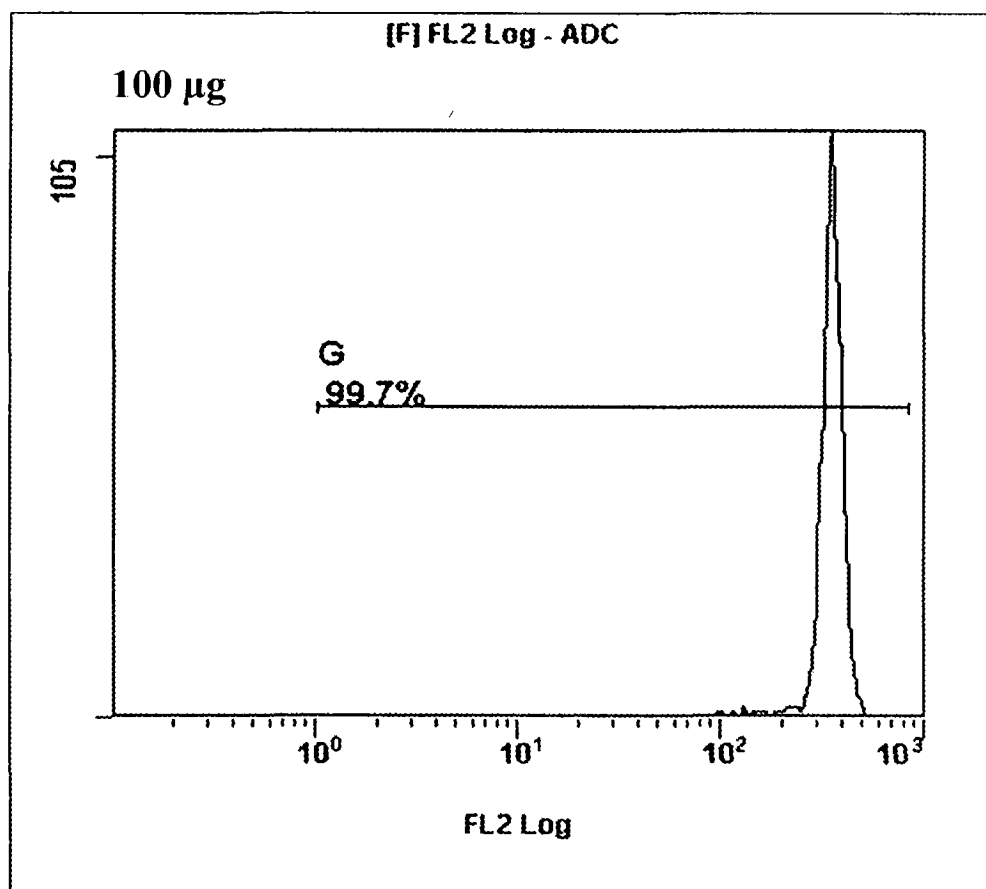


图 9K

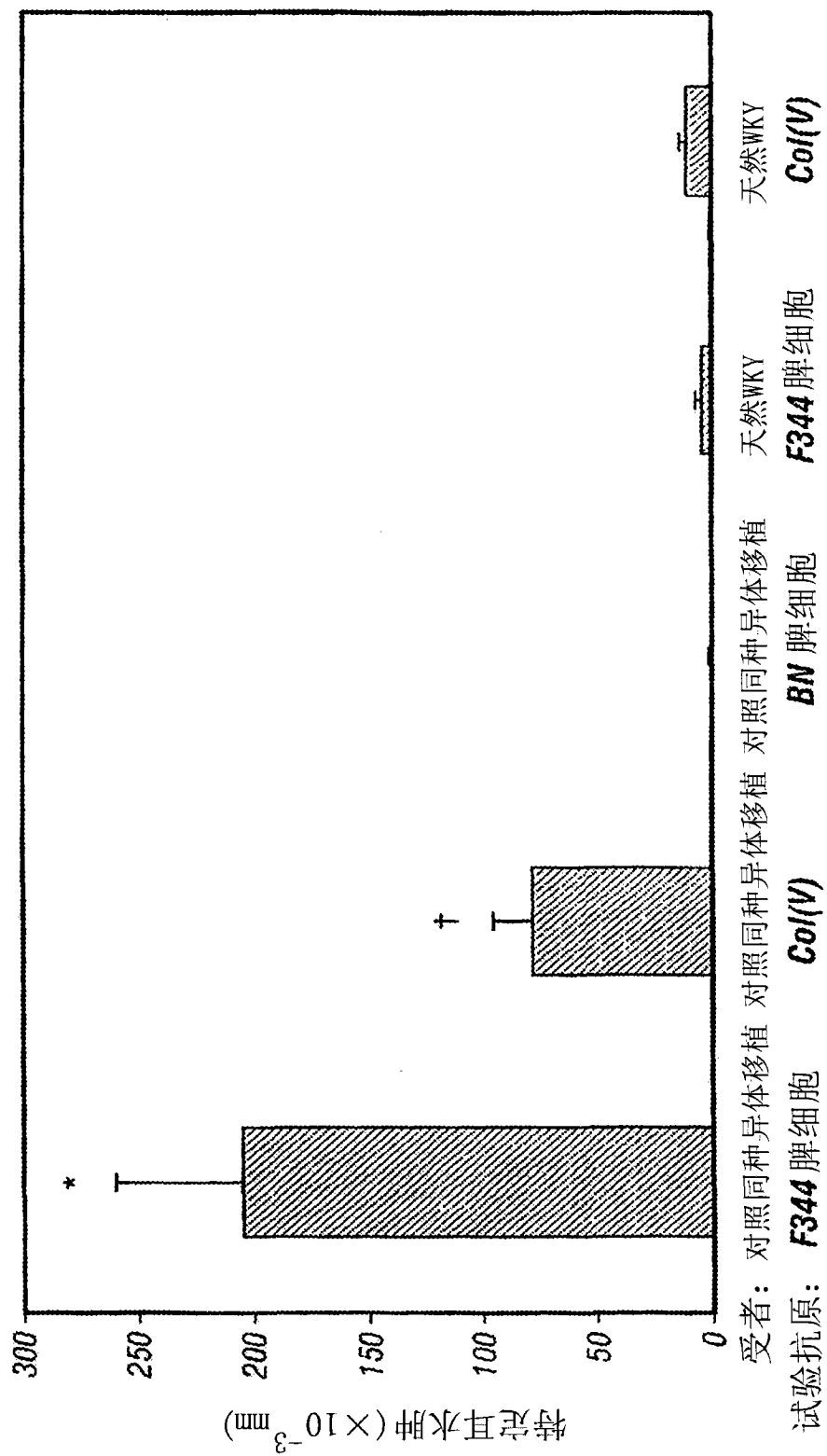


图10

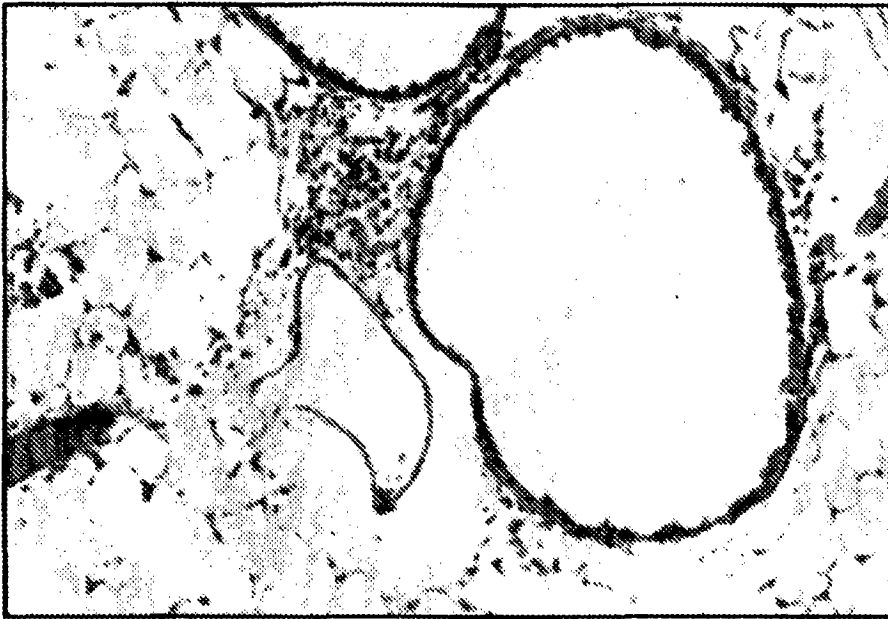


图11B

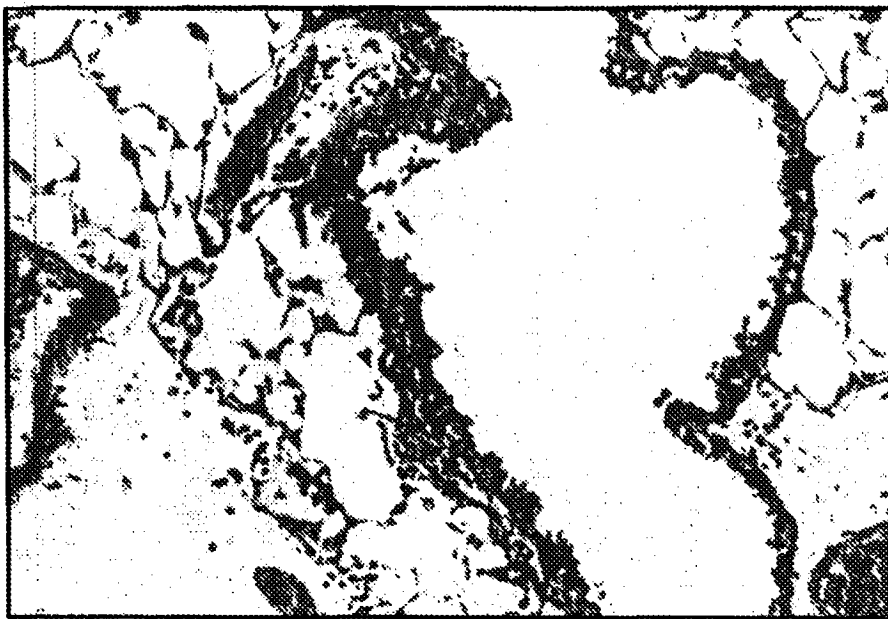


图11A

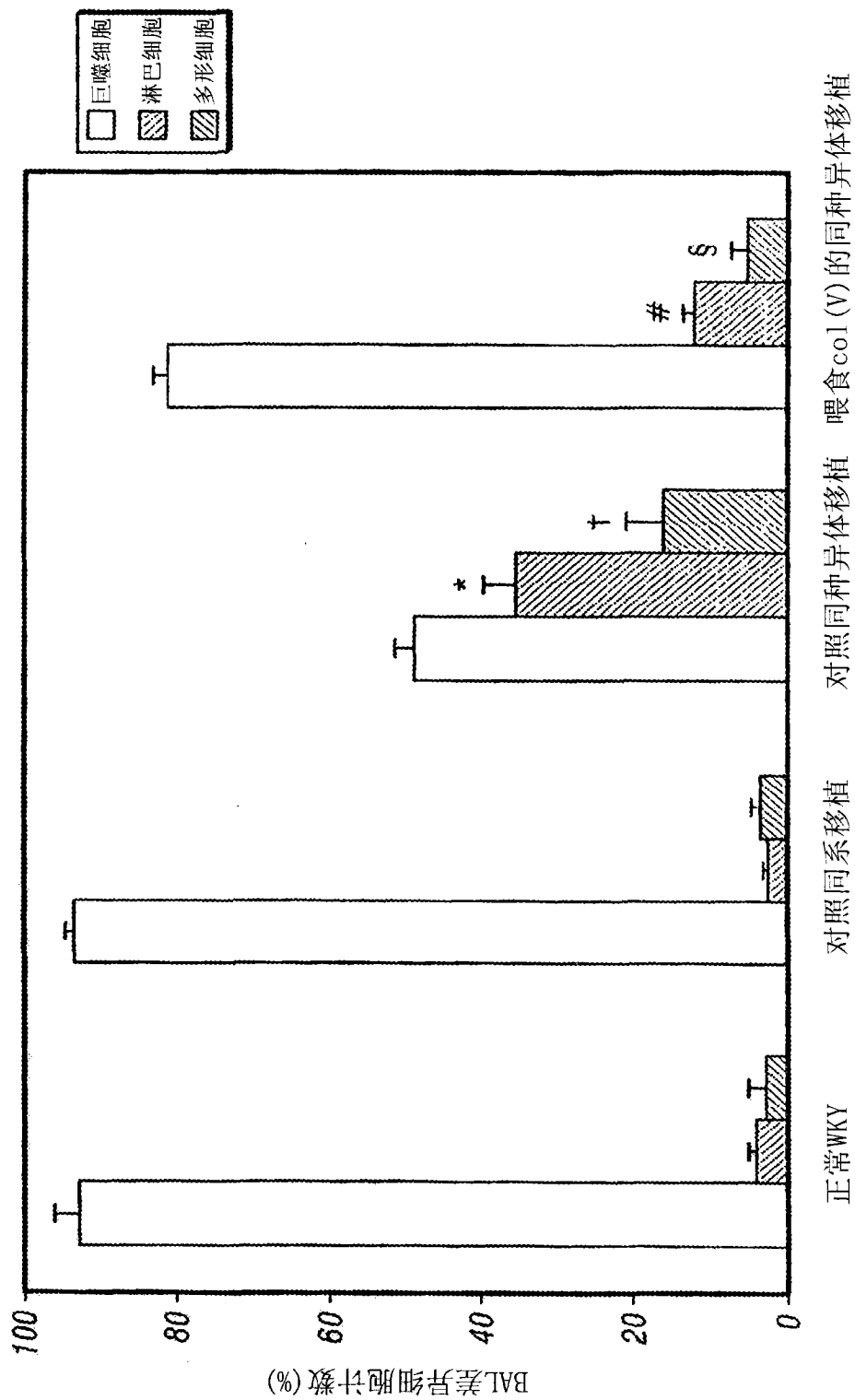


图12



图13C



图13B



图13A

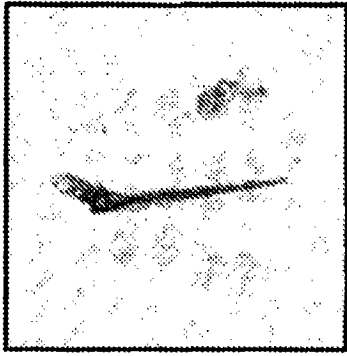


图14C

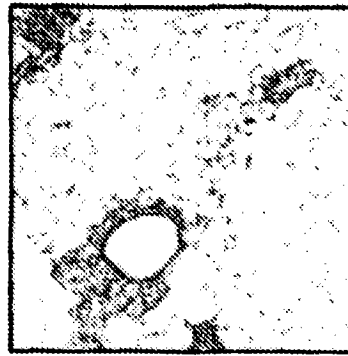


图14F

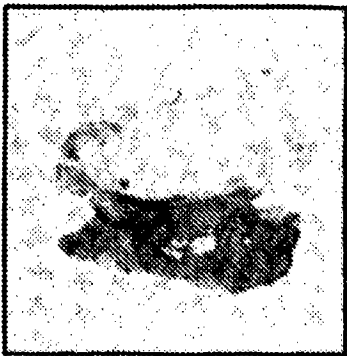


图14B



图14E

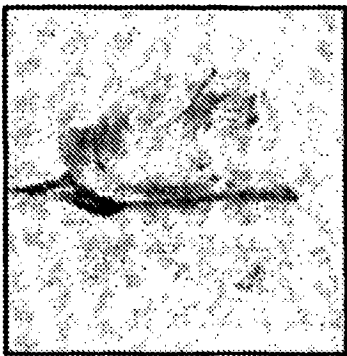


图14A

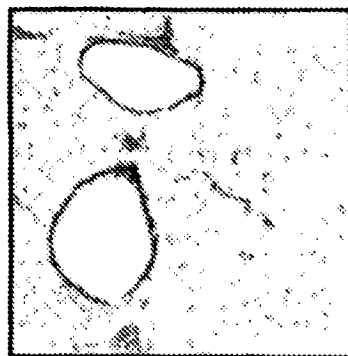
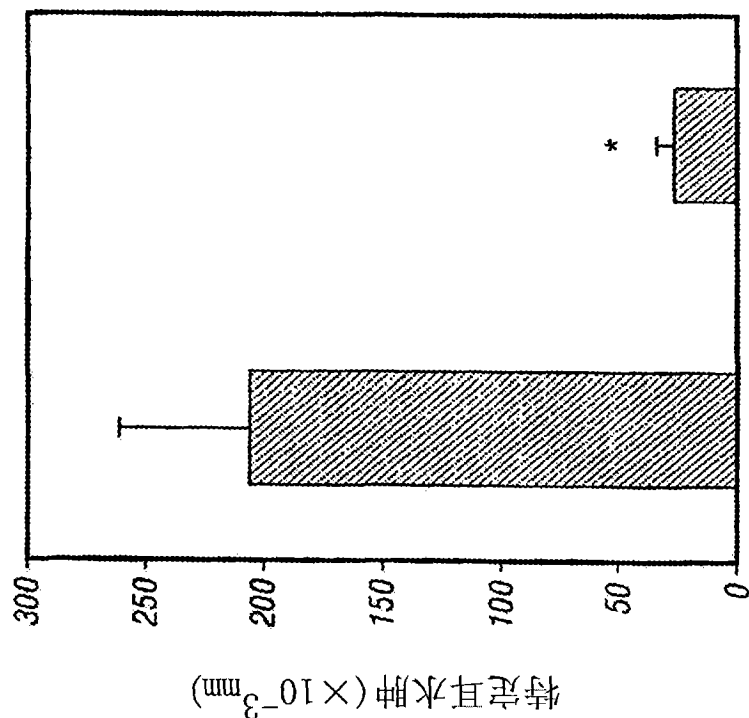


图14D

表3

排斥病理等级		
组	A(急性排斥)	B(呼吸道炎症)
对照WKY同系移植	0 ± 0	0 ± 0
对照WKY同种异体移植	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0
喂食Col (II)的WKY同种异体移植	3.9 ± 0.3	4.0 ± 0
喂食Col (XI)的WKY同种异体移植	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0
喂食Col (V)的WKY同种异体移植	$2.8 \pm 0.2^*$	$2.6 \pm 0.2^\dagger$

图 15



受者：对照同种异体移植 喂食Co1(V)的同种异体移植

实验抗原：F344 spl. F344 spl.

图16

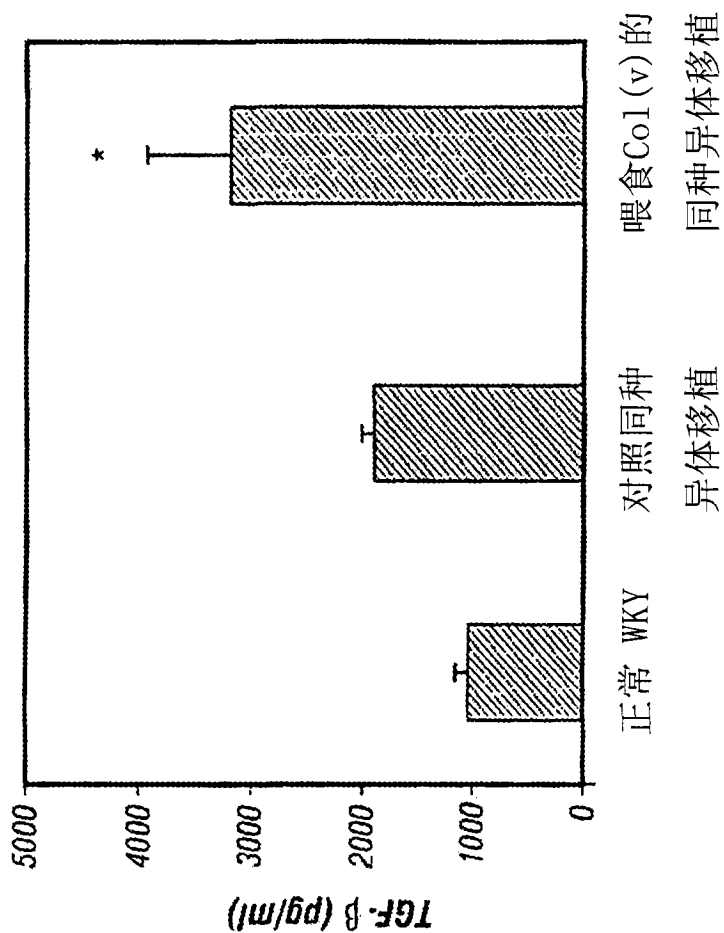


图17

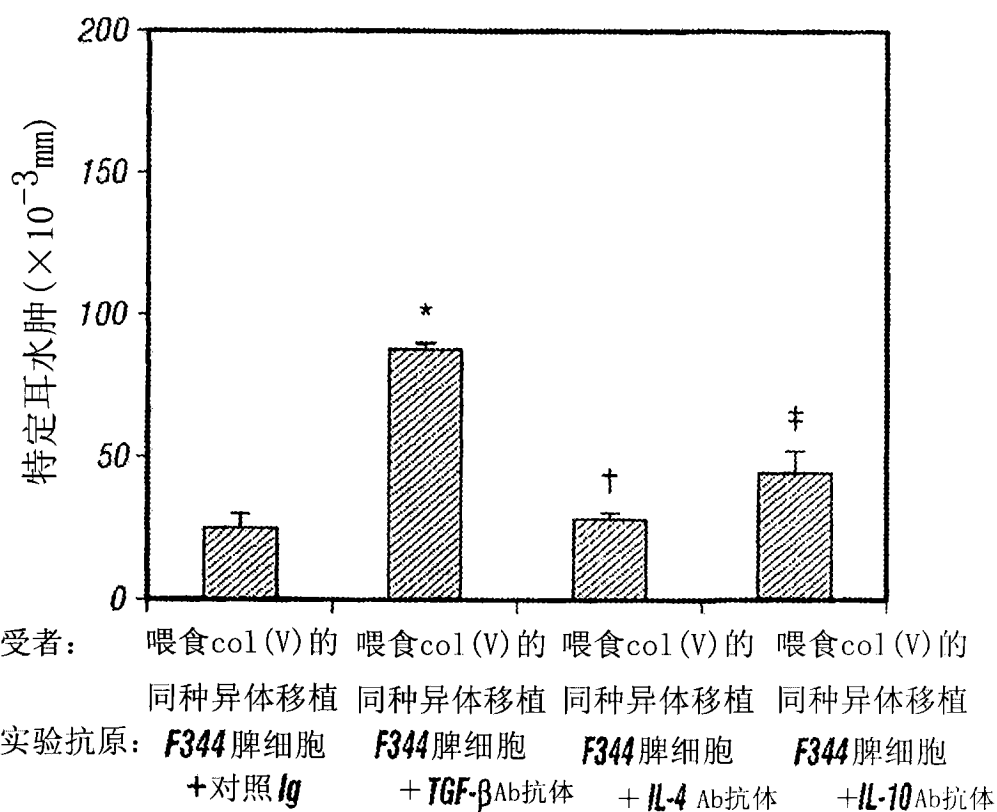


图 18

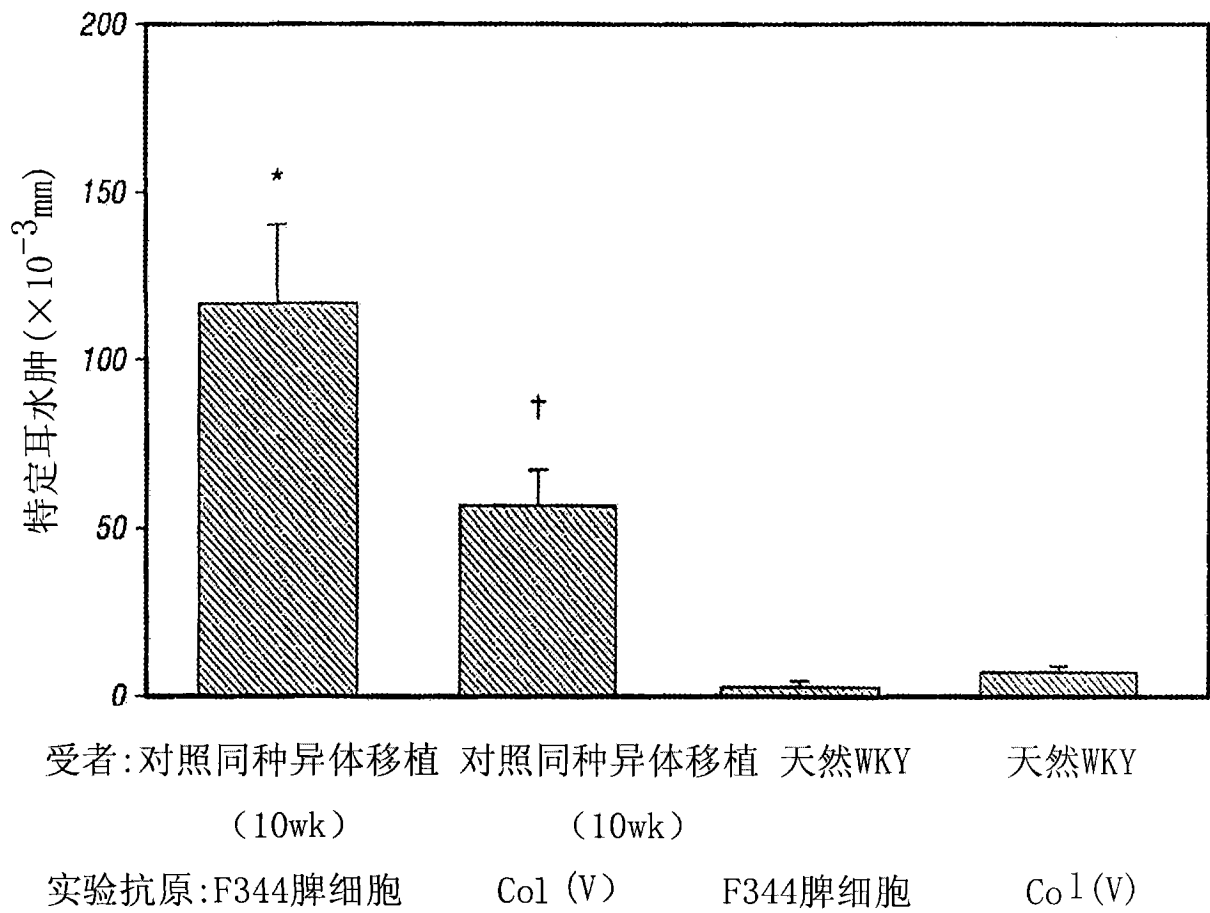


图 19

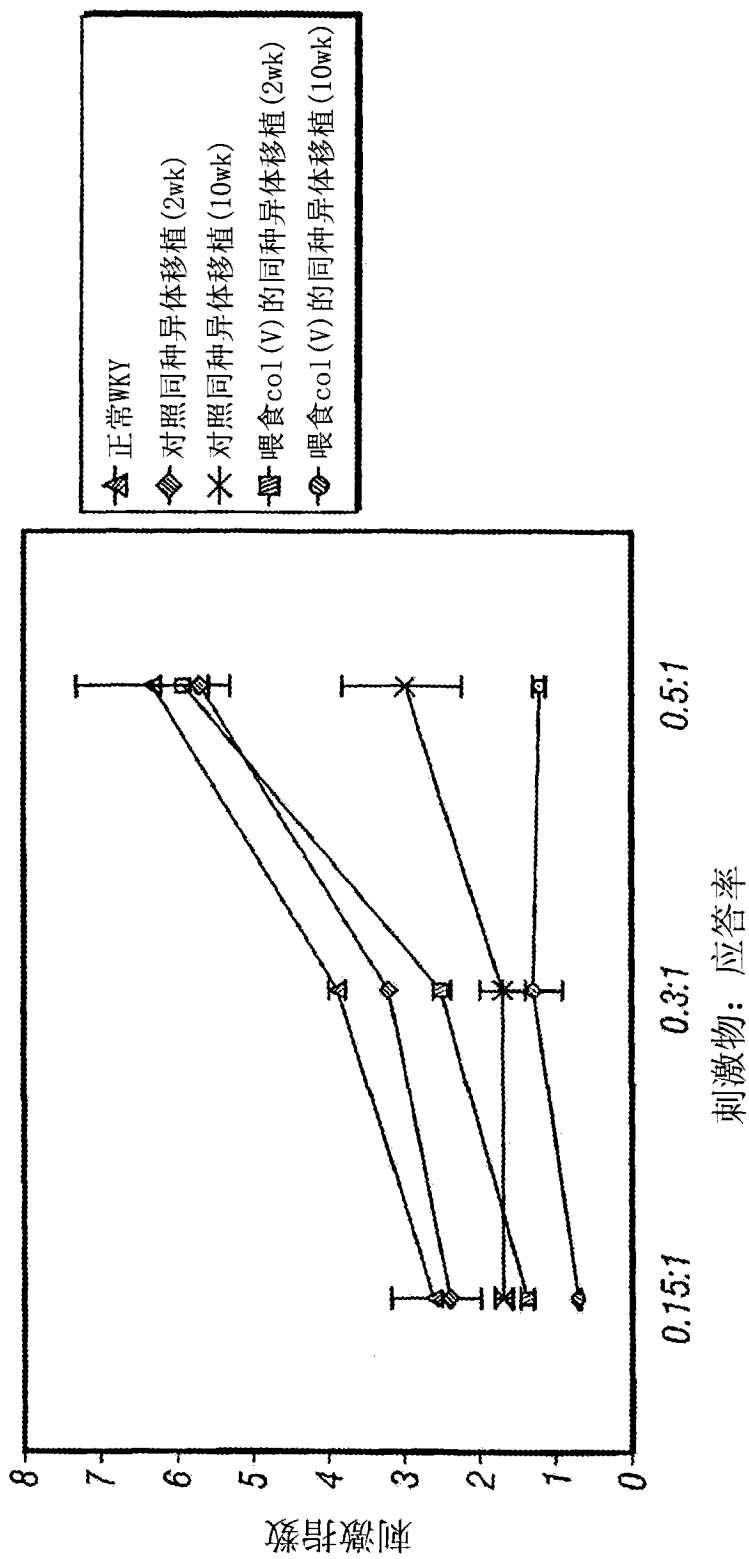


图20

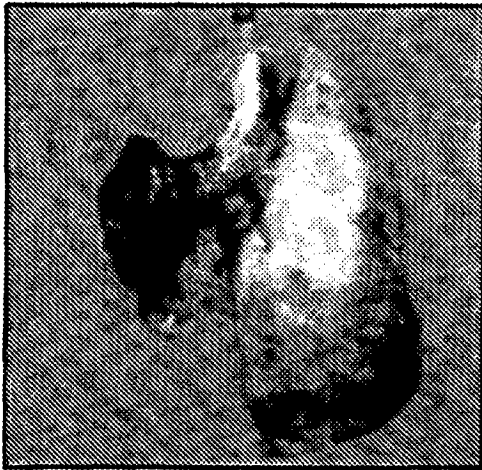


图 21A

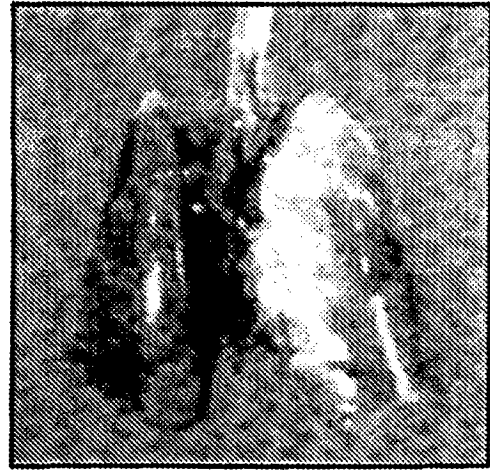


图 21B



图 21C

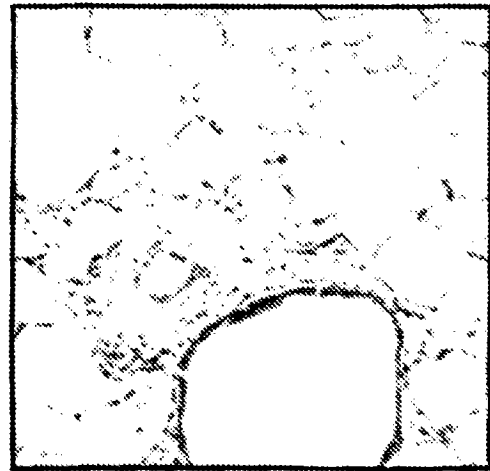


图 21D

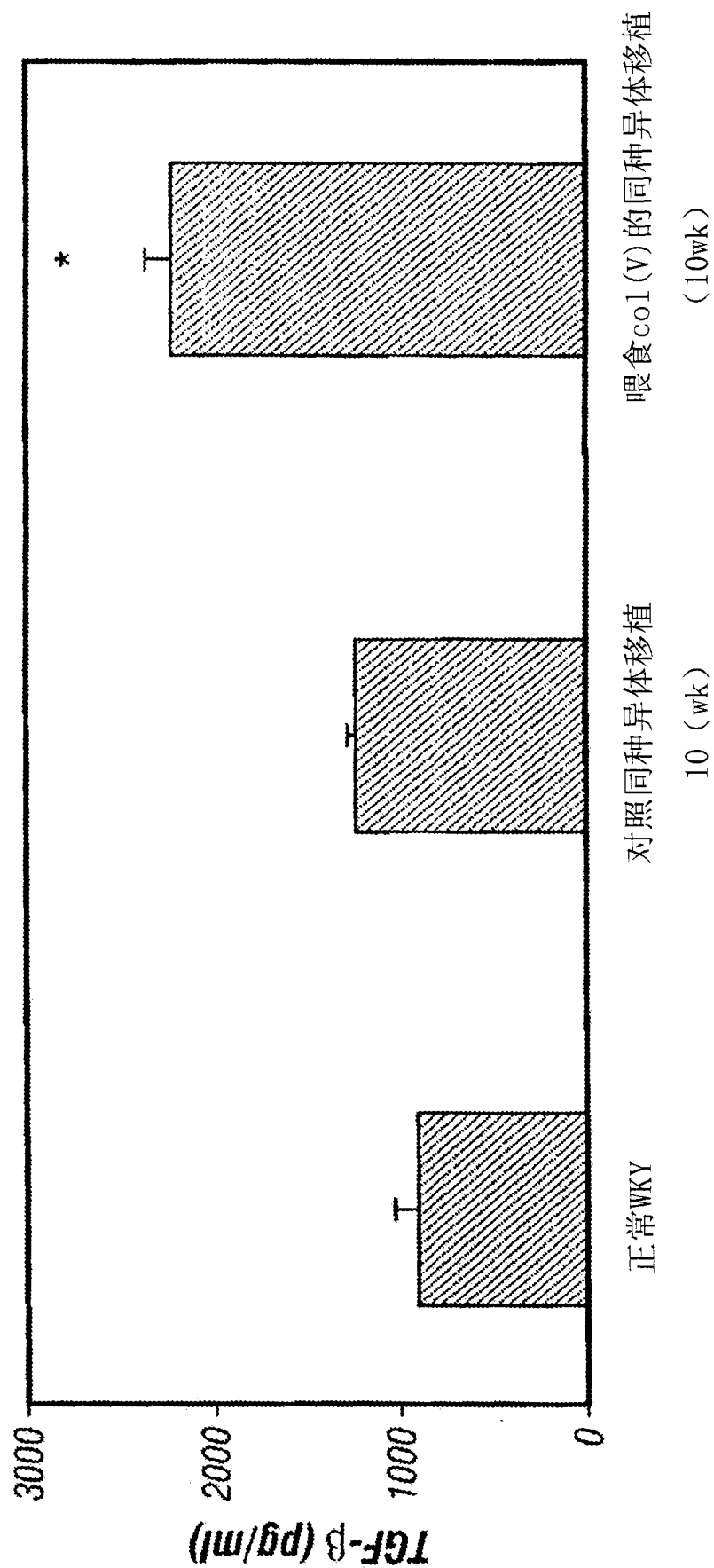


图22

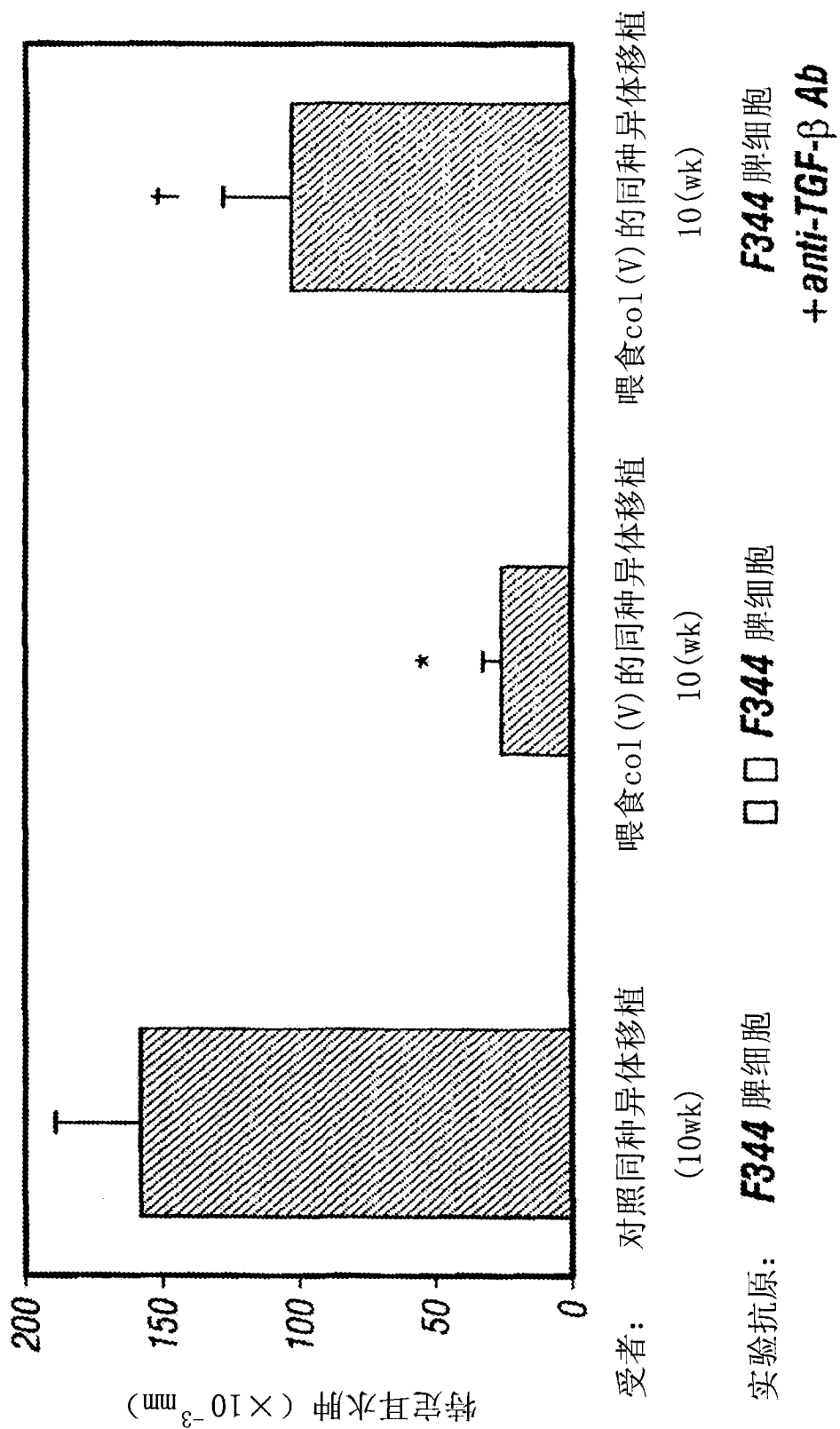


图23

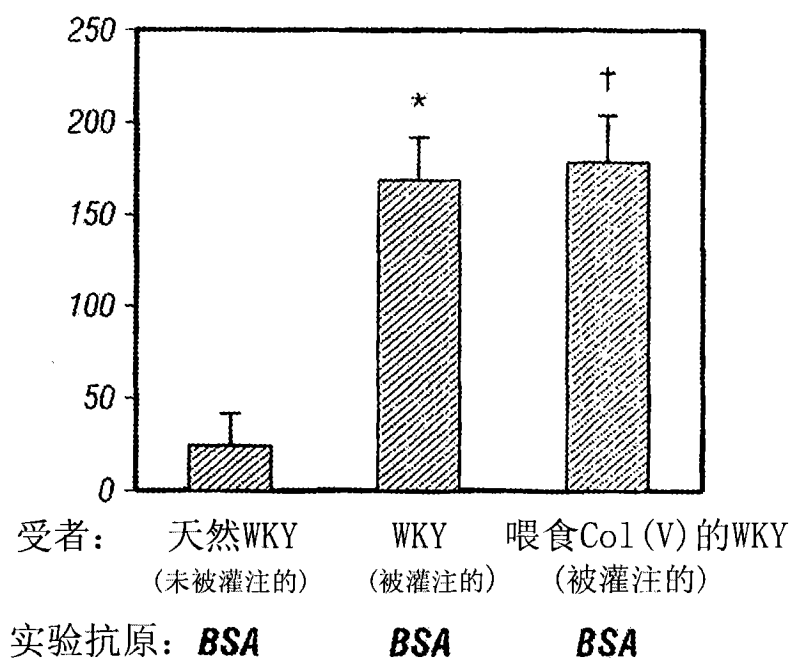


图 24

表4

喂食Col (V) 的同种异体 移植(对每一剂量和同种 异体移植, n=20)	试验组:	
	对照 (n=20)	同系移植 (n=20)
供者: f344大鼠肺 (RT1 ^{lv1})	供者: f344大鼠肺 (RT1 ^{lv1})	供者: WKY (RT1 ¹) 大鼠肺
受者: WKY (RT1 ¹) 大鼠, 被喂 食10ug, 20ug或50ug的col (V), 每隔一天喂食一次, 共4或8天	受者: WKY (RT1 ¹) 大鼠--不喂食	受者: WKY (RT1 ¹) 大鼠

图 25

表5

col (V) a-链溴化氢消化物中的肽是否能预防急性排斥反应的检测			
实验组			
同种异体移植 对照 (n=10)	喂食完整的Col (V) (n=20)	喂食1 (V) (n=20)	喂食2 (V) N=20)
供者: f344大鼠肺 (RT ^{1v1})	供者f344大鼠肺 (RT ^{1v1})	供者f344大鼠肺 (RT ^{1v1})	供者: f344大鼠肺 (RT ^{1v1})
受者: 不喂食的WKY (RT1 ¹)大鼠	受者: 喂食完整Col (V) 的WKY (RT1 ¹)大鼠	受者: 喂食1 (V)肽的 WKY (RT1 ¹)大鼠	受者: 喂食2 (V)肽的 WKY (RT1 ¹)大鼠

图 26