



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93105903.8

[51]Int.Cl<sup>5</sup>

A61K 37/48

[43]公开日 1994年8月31日

[22]申请日 93.4.22

[30]优先权

[32]92.4.22 [33]US[31]871,968

[32]93.4.19 [33]US[31]046,611

[71]申请人 分子阿克司公司

地址 美国南卡罗来纳州

[72]发明人 E·L·克兰

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 唐伟杰

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 用于治疗包括免疫机能障碍在内的失调症的方法和组合物

[57]摘要

本发明提供了一用于治疗包括免疫机能障碍在内的失调症的方法和组合物。本发明包括对患有免疫机能障碍失调的人或动物施用低剂量的核糖核苷酸聚合酶蛋白质或其一种衍生物。

# 权 利 要 求 书

---

1. 一种治疗人或动物免疫机能障碍失调的方法，包括对人或动物施用具有疗效量的核糖核苷酸聚合酶的步骤。

2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于核糖核苷酸聚合酶选自RNA聚合酶和反转录酶或它们的混合物。

3. 如权利要求1所述的方法，其特征在于核糖核苷酸聚合酶是RNA聚合酶。

4. 如权利要求1所述的方法，其特征在于定期施用核糖核苷酸聚合酶。

5. 如权利要求1所述的方法，其特征在于通过皮下注射来施用核糖核苷酸聚合酶。

6. 如权利要求1所述的方法，其特征在于舌下施用核糖核苷酸聚合酶。

7. 如权利要求1所述的方法，其特征在于核糖核苷酸聚合酶已被失活。

8. 如权利要求1所述的方法，其特征在于对人或动物施用具有疗效量的核糖核苷酸聚合酶和增效剂。

9. 如权利要求8所述的方法，其特征在于增效剂选自甘油、组胺、谷酰胺以及神经氨酸苷酶。

10. 一种用于治疗免疫机能障碍的组合物，包括在药用的载体中的具有疗效量的核糖核苷酸聚合酶。

11. 如权利要求10所述的组合物，其特征在于该核糖核苷酸聚合

酶选自RNA聚合酶和反转录酶或它们的混合物。

12. 如权利要求11所述的组合物, 其特征在于核糖核苷酸聚合酶是RNA聚合酶。

13. 如权利要求10所述的组合物, 其特征在于药用的载体是一种固体。

14. 如权利要求10所述的组合物, 其特征在于药用的载体是随时间流释而不断释放的基质。

15. 如权利要求10所述的组合物, 其特征在于药用的载体是盐水。

16. 如权利要求15所述的组合物, 其特征在于还包括浓度约为0.1%的酚。

17. 如权利要求10所述的组合物, 其特征在于核糖核苷酸聚合酶是失活的。

18. 如权利要求10所述的组合物, 还包括一种增效剂。

19. 如权利要求18所述的组合物, 其特征在于增效剂选自组胺、谷酰胺和神经氨糖酸苷酶。

# 说明书

---

## 用于治疗包括免疫机能障碍在内的失调症的方法和组合物

本发明涉及一种用于治疗包括免疫机能障碍在内的各种失调症的方法和组合物。本发明特别涉及治疗特定的免疫失调的方法，该方法包括对有免疫机能障碍的人或动物施用很低浓度的核糖核苷酸聚合酶或一种与核糖核苷酸聚合酶有关的化合物的步骤。在一些情况下，增效剂（例如，甘油、谷酰胺或其他增效剂）可与核糖核苷酸聚合酶一起施用，以提高治疗活性。

在动物或人体内的细胞间介的免疫反应和/或体液免疫反应的异常可导致失调，这种失调实质上不是过敏性的，但它会成为一些疾病组织的异常靶向。包括免疫机能障碍的失调会引起各种各样的症状。免疫缺陷失调的例子是遮蔽免疫目标的疾病（例如各种恶性肿瘤、与失调有关的各种疱疹、获得性免疫缺陷综合症（HIV感染）），以及宿主自身产生的自身有害物质的疾病（这些疾病包括但不限于全身红斑狼疮、关节炎、糖尿病、甲状腺炎、溶血性贫血病、萎缩性睾丸炎、古德帕斯彻疾病、自动免疫视网膜病、自动免疫血小板减少症、交感神经系眼炎、严重的肌无力、格雷夫斯病（突眼性甲状腺肿）、原发性胆汁肝硬化、慢性侵袭性肝炎、溃疡结肠炎、膜肾小球性肾炎、皮炎、板炎、慢性肾小球性肾炎、斯耶格伦综合症、赖特尔综合症肌炎、全身硬化多关节炎以及多发性硬化。

在前几年，人们认为，抗自体反应是有害的，并且通常不会出现

这样的反应。最近,人们普遍认为正常免疫反应包括自身自动识别。而且,许多个体产生与自身抗原反应的非致病抗体。结果,我们现在的理解是:仅在抗自体反应或者过度或产生特殊有害的免疫反应时,这种疾病才会发生。

由对外来的或内在的免疫原应答的体液或细胞间介的异常靶向所引起的疾病状态表现为过敏性反应,这样的反应通常为四类反应:

类型I: 过敏反应, 这种反应是用结合到肥大细胞上的受体上的IgE抗体间介。当与抗原出现交联时, IgE抗体刺激肥大细胞, 释放一定量的具有药理学活性的物质, 这些物质可能引起过敏性症状。这些对抗原激发的反应是直接的并可能危及生命。类型I 反应的例子包括(但不限于)过敏性鼻炎、胃肠过敏、特应性皮炎、支气管哮喘和马气喘病以及板炎。一种包括过敏性反应的自动免疫失调是在牛的牛奶过敏。

类型II: 细胞毒性(细胞溶解)反应。这些细胞表面反应起因于抗原与IgM和/或IgG的相互作用, IgM和/或IgG可活化补体串, 导致细胞的毁灭。类II反应的例子包括(但不限于)白细胞减少症、新生儿的溶血疾病以及古德帕斯彻疾病。包括细胞毒性/细胞溶解反应的自动免疫失调是溶血性贫血、血小板减少症以及甲状腺炎。

类型III: 免疫综合反应。在抗原和IgG或IgM的大量复合体在循环或在组织中大量积累, 固定了补体时, 会发生III型反应。粒性白细胞附着到补体结合部位, 并从粒中释放出有害的溶解酶, 这种类型反应的一个例子是血清病。包括在III型反应中的自动免疫失调包

括全身红斑狼疮、慢性肾小球性肾炎以及类风湿性关节炎。

类型IV: 细胞间介免疫性反应 (MCI) , 或延滞型超过敏性反应 (DTH) 。与前面的三个免疫反应类型相反, 这种超过敏性反应是由T细胞而不是抗体间介的。活化的T细胞释放出淋巴因子, 该因子可能引起会损害局部组织的巨噬细胞、K细胞和NK 细胞的积累和活化。这种反应可能在抗原激发后1-2天出现。第IV类反应的例子包括 (但不限于) 接触性皮炎、结核病、过敏性大脑炎、 甲状腺炎以及原发同种移植排异反应。自动免疫失调幼稚糖尿病可以包括这种类型反应。

在正常情况下, 所有上述类型的反应为个体提供了疾病防护。超过敏性反应虽然通过同样的基础细胞和分子机理起作用, 但表现为一个能破坏宿主的过大的或不适宜的反应。这样, 可以把上述的许多疾病表现称为抗自体失调或“自动免疫”疾病。

近来已变得很明显, 正常免疫反应包括自体-自体识别。这些识别是免疫细胞与自身抗原以非致病方式反应的结果。当抗自身反应进行过度或产生特别有害的免疫反应时就发生了疾病。例如, 现在相信, 在正常情况下存在许多T细胞和B细胞的自体反应克隆, 但这些克隆受体内平衡机制的调节。这种控制机制的崩溃会导致自体反应克隆的活化和自动免疫疾病。

虽然B淋巴细胞和它们子代应对抗体的产生负责, 在大多数情况下, 它们需要辅助T淋巴细胞功能以便活化和分化进分泌抗体的细胞。而且辅助T细胞和它们的衍生产物表现出向下调节免疫反应的能力。如果T细胞种群是自身能耐受的, 它可预防能分化进入产生自体抗体

的细胞的B细胞增殖和分化。在免疫途经的几个阶段的任何一个都可能出现自身耐受机制中的缺陷。带有能产生已被T细胞阻止了的致病自体抗体的B细胞的个体在这种情况下能产生大量的有害抗体。因为确定是否有疾病发生的依据是自体抗体的数量，所以免疫调节和免疫刺激的量的大小对疾病发展上有较少免疫异常较为健康之间的平衡是至关重要的。

此外，强免疫刺激可能压倒正常调节机制并激励B细胞产生抗体和自体抗体，而不需通常的T细胞来调节。这样的刺激的例子包括移植对宿主的疾病(就象同种骨髓移植后出现的疾病)，或由各种强有力的多克隆免疫因子(肠毒素)或甚至刺激B细胞(Epstein Barr virus)(非洲淋巴细胞瘤病毒)的病毒来刺激。奇怪的是，现已证明这些同样的抗原也是具有疗效。现已证明，肠毒素可降低在鼠中自体免疫狼疮肾炎的严重程度，并可保护动物免受实验性过敏性脑脊髓炎的侵害。仅仅几百个分子的这种物质(例如种毒素)就可以触发免疫细胞的传染和复制。

如上所述的抗自身反应过度的自体免疫情况的一个例子是全身红斑狼疮(SLE)，这种病因未知的疾病的特征在于具有各种自身抗原，这些抗原包括核、细胞质和细胞膜抗原决定簇。这里没有出现能诊断为这种疾病的临床或实验室异常。虽然有大约70%的带SLE病人中出现抗DNA抗体，但各病人的临床症状和实验室研究结果的差异很大。结果，现已发展并改进了试图包括全身红斑狼疮病人并排除其他失调(包括但又不限于类风湿关节炎、进行性的全身硬化症、多肌炎以及斯耶格伦综合症的病人)的标准。

不同病人表现的临床征候和症状中存在惊人的变异性。一些病人中，较高疾病活性期与数月或数年的较低疾病活性期交替发生。这样的变异性要求针对各病人的情况进行预防和治疗。一些全身红斑狼疮病人有大量的抗DNA并且LE细胞试验呈阳性，其他病人不这样。在临床范围的一端是多半疲劳、关节痛、日光过敏、疹以及抗细胞核抗体为特征的温和疾病的病人，在该范围的另一端是表现急性进行性肾炎或严重CNS机能障碍的病人。大部分病人处于需要一点儿或不需治疗的最温和类病人和需要增强治疗的病人及主要器官的严重病人之间。除了自生的特发的全身红斑狼疮病人外，这种疾病可在人体内由特定药物诱发。许多其他动物(如狗、猫、水貂、马以及鼠)也会产生一种类似全身红斑狼疮的综合症。

关节炎(特别是类风湿关节炎)是另一种炎性自体免疫失调。通常认为遗传和环境因素决定这种疾病的病程。该疾病通常始于在四肢上一个或多个关节的疼痛、触痛以及肿胀。一般来说，该疾病对称发作，但主要侧病症更严重。虽然该病通常也发生在手和脚的小关节、腔、踝关节、膝、肘及髌，但该病特别涉及到接近指(趾)节间的、跖趾的、掌指的关节。

在疾病初期，对类风湿因子和抗核抗体阳性的病人很有可能会出现病情恶化。皮肤溃疡是最普通的网状组织外的表现。对类风湿因子的高滴定度的阳性试验、存在循环免疫复合体以及适当降低的补体滴定度是有全身表现的病人的特征。在马的跗关节中的后脚踝关节内肿病具有与之相似的病原学特征。

直到今天，对由免疫机能障碍引起的绝大多数疾病还没有令人

满意的疗法。因此需要一种能有效地缓解这些疾病症状而又不引起其他副作用的方法和组合物。该方法应该是安全的，并能有效地治疗与上述多种疾病有关的症状。

本发明提供了一种用于减轻与免疫缺陷和与异常的体液和细胞间免疫失调有关的疾病的的症状的方法和组合物。本发明包括对有免疫机能障碍的人或动物施用具有疗效量的核糖核苷酸聚合酶或一馏分或它们的衍生物。较好的核糖核苷酸聚合酶是RNA聚合酶。有效剂量极低，并且不会引起副作用（例如对核糖核苷酸聚合酶的过敏性反应）。此外，给人或动物施用的RNA聚合酶的剂量通常将不引起抗体反应。

人们已经发现，给有免疫机能障碍的人或动物施用极低量的核糖核苷酸聚合酶会减轻或消除免疫机能障碍症状。这种核糖核苷酸聚合酶可以与增效剂一起施用，以提高其疗效，这类增效剂的例子包括（但不限于）甘油、谷酰胺、组胺以及神经氨酸苷酶。

因此，本发明的一个目的是提供一种用于治疗包括免疫机能障碍在内的失调的方法和组合物。

本发明的另一个目的是提供一种用于治疗全身红斑狼疮病的方法和组合物。

本发明的第三个目的是提供一种用于治疗板炎的方法和组合物。

本发明的第四个目的是提供一种用于治疗皮炎的方法和组合物。

本发明的第五个目的是提供一种用于治疗关节炎的方法和组合物。

本发明的第六个目的是提供一种用于治疗自体免疫视网膜失调（如Voyt-Aoyanagi-Harada综合症）的方法和组合物。

本发明的第七个目的是提供一种用于治疗癌的方法和组合物。

本发明的第八个目的是治疗特定的某些感染疾病(例如AIDS)。

参考了下面公开的实施例的描述和所附的权利要求书后, 将变得这些目的和其它目的、特征以及优点明显。

图1是DBA/IJ鼠对用胶原蛋白II免疫的反应的示意图。

图2是DBA/IJ鼠对用胶原蛋白II免疫的抗体反应的示意图。

图3是对DBA' IJ鼠的各种治疗反应的示意图, 这些鼠在施用胶原蛋白II以后关节被相应地固定。

此处, 术语“核糖核苷酸聚合酶”指任何这样的蛋白质, 该蛋白质具有核糖核苷酸聚合酶活性, 或有一个基本上类似于一个有核糖核苷酸聚合酶活性的蛋白质的氨基酸顺序。这种核糖核苷酸聚合酶包括(但不限于)核糖核酸(RNA聚合酶)聚合酶以及反转录酶。可以用于实现本发明的这种核糖核苷酸聚合酶也可以是一种灭活的酶或该酶的一个部分。

术语“免疫机能障碍”包括(但不限于)由于免疫系统衰退以及有关系统的一免疫反应发生增加为特征的任何免疫机能障碍失调, 和/或由于外部或内部免疫原物质所致的体液和细胞传递损害。这个术语也包括迷乱免疫反应(例如在自体免疫疾病中观察到的迷乱免疫反应)。

此处, 术语“核糖核苷酸聚合酶的疗效量”指足以减轻或消除免疫机能障碍失调症状的核糖核苷酸聚合酶的量。在此公开了优选的有代表性的剂量和浓度。

术语“增效剂”用在此处是指能提高RNA聚合酶疗效的任何化合

物或组合物。

本发明提供了一种用于减轻与免疫机能障碍有关的疾病症状的方法和组合物。本发明包括对有免疫机能障碍的人或动物施用具有疗效量的核糖核苷酸聚合酶或一馏分或其衍生物，这个有效剂量极低，不会引起对核糖核苷酸聚合酶型蛋白质的过敏性反应。

实际上，本发明包括对有免疫机能障碍的人或动物施用每核糖核苷酸聚合酶剂量单位少于约 $10^{-2}$ 毫克的组合物，核糖核苷酸聚合酶或它的活性衍生物的合适剂量大约 $10^{-2}$ 毫克- $10^{-8}$ 毫克之间。更合适的核糖核苷酸聚合酶的剂量在 $10^{-8}$ 毫克和 $10^{-7}$ 毫克之间，最合适的核糖核苷酸聚合酶的剂量是大约 $10^{-4}$ 毫克。较可取的是每个受治疗者整个疗程中每日剂量不超过大约 $10^{-2}$ 毫克，而更可取的剂量不超过约 $5 \times 10^{-3}$ 毫克- $10^{-4}$ 毫克。这样，本发明包括组合物，该组合物包括一核糖核苷酸聚合酶或其一活性衍生物的溶液，酶或其衍生物在该溶液中的浓度在大约 $10^{-8}$ - $10^{-7}$ 毫克/毫升之间。

因为在一批到另一批以及一个制造商到另一个制造商的RNA聚合酶的特异活性受酶的来原、纯化方法等因素的影响而可能有很大的变化。这里推荐用“活性单位”来表示RNA聚合酶的剂量。所定义的RNA聚合酶活性单位随RNA聚合酶的来源的不同而有所不同。术语“单位”由各个制造商而定。下面所提供的定义引用了几个制造商的定义，并包括了反转录酶：

A. 来自E. coli K-12 (Sigma Chemical Company) 的RNA聚合酶用腓肠胸腺DNA作模板，在PH7.9、 $37^{\circ}\text{C}$ 下，在10分钟内，一个单位将释放1.0纳摩尔( $10^{-9}$ )摩尔的PP。

B. T3 RNA聚合酶(由噬菌体T3而来的RNA聚合酶, Pharmacia Biotech, Inc.): 用含T3启动基因的质粒, 一个单位在50微升试验缓冲液中, 60分钟内, 在37℃下催化1纳摩尔AMP加入不溶于酸的产物。

C. AMV反转录酶(Promega Corporation): 一个单位定义为在10分钟内, 37℃下, 在0.05M Tris-HCl, pH8.3, 40mM KCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0.1mg/ml BSA, 0.5mM <sup>3</sup>H-dTTT, 以及130 μg/ml rA400: dT50, 10:1的不溶于酸的剂型中催化掺入1纳摩尔dTTT时所需的酶量。

D. M-MLV反转录酶, RNA酶 H Minus (Promega Corporation): 一个单位是这样定义的, 它将结合1纳摩尔dTTT掺入, 在10分钟, 37℃, 在50mM Tris-HCl, pH8.3, 40mM KCl, 10mM DTT, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mg/ml BSA, 0.5mM <sup>3</sup>HdTTT, 以及130 μg/ml rA400: dT50, 10:1 (注: 此定义与对C的定义相同, 但是在目录中是用不同的语言表达的)。

提供反转录酶的Promega Corporation 不提供所定批次中的反转录酶中的蛋白质质量的信息, 因此无法精确计算特异活性。Promega所提供的酶的单位为单位/毫升数, 典型的是20000-25000单位/毫升的AMV反转录酶, 以及100000-200000单位/毫升的M-MLV反转录酶。为计算起见, 我们假定蛋白质浓度是1毫克/毫升。因此反转录酶的特异活性与RNA聚合酶的特异活性是完全不同的。

同样, 两种RNA聚合酶的特异活性也因其来源不同而差别很大。来自E. coli K-12的RNA聚合酶的特异活性在1000-5000单位/毫克之

间; T3 RNA聚合酶的特异活性在200000-400000单位/毫克之间, 在本发明的蛋白质范围的计算中考虑到了这些差别。

这样, 在实施本发明的过程中, 可以测定RNA聚合酶的特异活性, 然后利用总的活性在0.0004-4000单位之间的酶量, 所述的单位相应于在大约 $1 \times 10^{-9}$ 毫克-4.0毫克之间的蛋白质。RNA聚合酶活性的优选范围在0.04-100单位, 更合适的范围在0.1-10单位活性之间。

本发明的第二个方面是, 提供一种药物组合物, 它包括一种用于施用核糖核苷酸聚合酶或其一馏分或其衍生物的载体和多种无药效的成份, 所述的载体含高达约 $10^{-2}$ 毫克的核糖核苷酸聚合酶或其一馏分或其衍生物。优选的药物组合物含约 $10^{-2}$ -约 $10^{-8}$ 毫克的核糖核苷酸聚合酶或其馏分或其衍生物。RNA聚合酶的体积最好在大约0.05毫升-0.5毫升之间。但是, 在实施本发明时也可用其他剂量体积的组合物。

本发明包括在每24小时期间施用不超过大约 $10^{-2}$ 毫克量的核糖核苷酸聚合酶, 当然, 在一定的情况下, 在任何一天中所施用的总量都可能超过这个优选的限量。核糖核苷酸聚合酶可以液体形式施用, 或者, 也可以固体形式施用, 此时, 核糖核苷酸聚合酶是被包埋或被混合在可生物降解或腐蚀的基质中。这个基质可以是一种随时间流逝而逐渐释放的基质。对本领域的普通技术人员来说, 这类基质是公知的, 而且对本发明来说并不很关键。可以通过皮下注射或舌下途经来施用核糖核苷酸聚合酶; RNA聚合酶也可以经过肌肉注射、腹膜内注射或静脉内注射来给药; RNA聚合酶也可以透过皮肤或通粒膜来给药。RNA聚合酶给药较合适的途经是通过皮下注射或舌下途经。

在另一个实施例中，核糖核苷酸聚合酶可以与其他化合物一起施用以提高其治疗效果。可与其他影响免疫系统的分子(增效剂)共同使用的核糖核苷酸聚合酶的一个例子包括(但不限于)剂是在约 $5 \times 10^{-1}$ - $2 \times 10^{-8}$ 毫克/剂量之间的甘油，剂量在约 $2.2 \times 10^{-2}$ - $2 \times 10^{-8}$ 毫克/剂量之间的谷酰胺，剂量在约 $10^{-2}$ 毫克- $10^{-8}$ 毫克/剂量之间的组胺。

在一个实施例中，载体是一种惰性容器中的水溶液。在另一种变型中，该制剂呈栓剂剂型。虽然其他注射方式也是本发明的一部分，液体剂型的制剂最好经皮下注射，此外，也可以通过粘膜(例如鼻粘膜)来施用该制剂。液体载体包括(但不限于)在盐水(0.9%NaCl)中0.1%的酚，其他药理学承认的载体也可用于施用核糖核苷酸聚合酶。

在实施本发明时可以使用的核糖核苷酸聚合酶包括(但不限于)RNA聚合酶(三磷酸核苷:RNA核苷酸转移酶[由DNA导向]; EC2.7.7.6)以及反转录酶(由RNA导向的DNA聚合酶、DNA核苷酸转录酶[由RNA导向]、复原酶、EC2.7.7.49)。应该注意到，核糖核苷酸聚合酶可以有酶活性也可以没有酶活性。此外，具有基本类似的氨基酸顺序的蛋白质也可作为天然酶来实施本发明。可以预期，以不同核糖核苷酸聚合酶的混合物的形式施用核糖核苷酸聚合酶也是本发明的一部分。可以理解，核糖核苷酸聚合酶的来源对本发明而言并非关键。例如，在完成本发明中，来自*E. coli*的RNA聚合酶和由噬菌体T3来的RNA聚合酶都能有效地实施本发明。

可以用标准方法来施用核糖核苷酸聚合酶，这些方法包括(但不

限于)肌肉内和皮下途经给药。也可以通过舌下和鼻内途经来施用核糖核苷酸聚合酶。因一个剂量的核糖核苷酸聚合酶的有效量很低,所以本发明的组合物也可以通过皮肤、肛门或口施用。剂量单位或者可以是液体或者也可以是固体。虽然在一定情况下更大的剂量可以施用,一般来说施用量最多为每天约4倍的剂量单位。

用下面的例子来进一步说明本发明,这些例子能以任何方式来限制本发明的范围。与之相反,可以清楚地理解,这种手段可以有各种其他实施例、改进和等同例,在读了在此的描述后,本领域普通技术人员可以提出这类例子,而且这类例子不脱离本发明的精神和/或所附权利要求书的范围。

#### 例 I. 在DBA/IJ鼠中胶原II型诱导的关节炎模式

Trentham等人, (Treutham D. E. 等人, "对胶原 II的自体免疫:关节炎的一实验模式", J. Exp. Med. Vol. 146, pp. 857-868, 1977)最先报告了用带完善的Freund佐剂(CFA)的胶原II 在鼠类动物中诱导炎性关节炎来研究在关节炎中的自体免疫的模式。其他类型的胶原以及注射有Freund佐剂的胶原(完全或不完全的)都不能诱导多关节炎。每天都对这些动物进行临床检查,发现注射CII-CFA后的 14-60天是关节炎开始的时间。随后用DBA/IJ系近交鼠进行研究,同样采用CII-CFA,在4-5周内这种鼠发生了炎性多关节炎。这些研究也表明,没有CFA或用其他类型胶原的情况下,这些动物不发生关节炎。这种关节炎病的最后导致一个肢体或多个肢体的固定。对胶原II的体液和细胞二者的免疫反应显然包括在关节炎的诱导中。研究表明,在疾病的发展过程中,免疫系统起着关键性的作用。在这种关节炎

动物模式中已经观察到对关节中常常发现的蛋白质(例如胶原II)的自体免疫性。

DBA/IJ鼠是在Jackson实验室(Bar Harbor, Maine)得到的。这种鼠为7-10周龄。把这种鼠在聚碳酸酯笼中分为二或三个组。使这种鼠饲用标准的实验室食物,并随意给水。在这个研究中使用的胶原II是按Trentham等人用上面描述的方法制备的。在将CII用于对照研究之前所进行的试验性研究表明,CII能够诱发关节炎。在该鼠尾部的基部真皮内注射含在等体积的CFA中乳化的100微克CII的0.1ml乳剂。15天后施用等量的加强剂量。如前面描述的那样每天检查肢肿胀。当动物有一个肢体发生固定(即在该关节处不能弯曲)时,可以认为关节炎完全表现出来。这通常发生在CII初次注射后的30-35天之间。

在初始胶原注射前5天,的确定4个治疗组,每组8只鼠:

盐水对照组;

用二甲基甘油(DMG)处理后的鼠;

用含氯萘处理后的鼠;

RNA聚合酶。

[\*含氯萘是New Zealand Limpet制造的一种可能的抗可炎剂]。

在整个研究期间,每个鼠每天皮下注射0.1ml的相应的试验药剂。当盐水对照组发生关节炎时。除对14只发生肢固定的鼠外,对其它鼠这项结束研究。为使这14只鼠的症状好转,接着进行治疗和观察。为进行反转研究,对两个各有7只鼠的治疗组中的个鼠每天皮下注射对照用盐水或RNA聚合酶0.1ml。在这项研究中的RNA聚合酶的用浓

度为每剂量0.4单位(0.15  $\mu$ g)的酶制备的。将该酶的浓缩物首先在0.4%酚的盐水中失活4小时,然后用注射用无菌盐水进行稀释。对照盐水经过同样的处理。每周一次从这些鼠的眶窦后抽取血液样品。收集血清并在-20℃冰冻贮存,供以后进行抗体检测所用。DMG的剂量是100  $\mu$ g/kg体重,而含氯萘的剂量是1.3克/kg体重。

在盐水对照级、DMG组和含氯萘组中,首先观察到炎性反应,然后发现与类风湿关节炎相似的症状(关节固定)。用RNA聚合酶处理的组中没有诱发炎性反应,也没有出现关节炎症状(图1)。

在每个试验组都存在对胶原II的抗体。当出现关节炎时,在盐水、DMG以及含氯萘组中对胶原II的抗体滴定度急剧升高,高于关节炎发生(图2)时所处的1.1ELSA单位。用RNA聚合酶治疗未发生关节炎组时胶原II抗体的滴定度没有急剧地升高。RNA聚合酶组的抗体滴定度没有上升到认为发生关节炎的0.1 ELISA单位水平之上,但该值逐渐升高,然后在低于1.1ELSA单位之下的一滴定度处整平。

对因注射CII而患关节炎的DBA/1J鼠每天施用低水平的RNA聚合酶,在三天内就降低了关节的肿胀和僵硬程度。这些动物在五天内已无症状,并且在10天的实验期间保持无症状。在患关节炎后,用盐水处理的鼠在10天时症状没有好转。随后,宰杀这些鼠。

从几个实验中收集因胶原诱导产生关节炎(关节固定)的7个盐水对照鼠,并用每天0.4单位的RNA聚合酶进行治疗,直到症状减退(5天)。在RNA聚合酶治疗开始时和5天时取血液样品,用ELISA检验法测定类风湿病因子。表I中示出了该实验的结果。

表 I

## RNA聚合酶对关节炎鼠中在类风湿因子(RF)滴定度的影响

### RF滴定度(ELISA单位)

动物编号	关节固定	关节不固定	减少%
1	0.687	0.546	21
2	1.107	0.898	19
3	0.735	0.470	36
4	0.680	0.532	22
5	0.747	0.598	20
6	0.672	0.556	17
7	1.050	0.605	42

### 例 II

对一个20年的在10年前慢性变跛混合饲养的切去肢体的家畜,有6天内每天在颈部皮下单独施用0.4单位的RNA聚合酶。在这项研究中,用浓度为每剂量0.4单位(0.15 $\mu$ g)酶制备RNA聚合酶。该酶的浓缩物首先在0.4%酚的盐水中失活4小时,然后用注射用无菌盐水进行稀释,在例I到XVI中的所有RNA聚合酶的制备方法都与之类似。

主人继续过度地饲养这些马。治疗三天后这些动物的症状明显好转,并且在6天内症状消失。这匹马直到现在仍然没有症状,从无症状开始至今已有四个月了。

### 例 III

X-射线诊断发现,一个12年的Morgan母马的跗关节有后脚踝关节内肿病(关节炎)。对该马每天皮下施用0.4单位的RNA聚合酶前后达6天,在6天内该马的症状显著改善,并在以后的5个月内没有出现

关节炎症状。

#### 例 IV

一个18岁的母马视力严重降低,在眼部没有毛,并且眼周围区域色素严重沉着。经诊断,该马患自体免疫视网膜病(Voyt-aoyanagi-harada Syndrome),并每天在颈部皮下注射单一剂量为0.4单位的RNA聚合酶。治疗6天后,该马的视力有所改善。眼部周围的色素开始再现,眼周围的毛开始再生。在治疗后的两个半月,这匹马的情况仍然正常。

#### 例 V

一严重变跛的10岁母马,并患有自体免疫视网膜病(Voyt-aoyanagi-harada Syndrome),该马眼周围的毛发生减少,并且眼周围缺乏色素。每天在颈部皮下注射剂量为0.4单位的RNA聚合酶治疗该马。在6天内该马变跛和视网膜病的症状发生好转。

#### 例 VI

一个9年的割去一肢的马,在跗关节它有严重的刺伤伤疤,致使大量流体排出,并有炎症,以及皮肤伤疤。连续6天内每天在该马的颈部皮下单独施用0.4单位的RNA聚合酶。6天的治疗对该马非常有效,此后该马从异常症状中恢复过来。

#### 例 VII

一个全身红斑狼疮的26岁的截肢的畜(眼肿起合拢,而且所有四肢变跛,对用Banamine和butadiazol的治疗没有反应)。对该畜每天在颈部皮下单独施用0.4单位的RNA聚合酶,连续给药6天。治疗3天后,该马眼部肿起和角膜炎的症状大大降低,并且治疗6天后,该马接

近正常, 该马的症状继续改善并且在一个半星期内症状消失。6个月后, 这匹马仍无症状。

#### 例 VIII

对用葡萄球菌诱发浓皮病(在用林可霉素和先锋霉素治疗后葡萄球菌感染肿胀没有消退)的两个8周小狗, 每天在颈部皮下单独施用0.4单位的RNA聚合酶, 连续给药6天。在3天内肿胀消失, 并且每只小狗的症状都没有复发。

#### 例 IX

对一有严重髌发育异常的12周德国牧羊犬(它对类固醇治疗无反应), 每天在颈部皮下单独施用0.4单位RNA聚合酶, 连续给药6天。治疗6天后, 发育异常消失, 并且这个狗一直没有出现髌发育异常的征兆。

#### 例 X

对一个有严重板炎的三年一季度的马, 每天在颈部皮下单独施用0.4单位的RNA聚合酶, 连续给药6天。随着6天治疗, 该马的板炎症状大大降低。继续进行两天治疗后, 该马的炎症完全消失。该马现在又成为了赛马。

#### 例 XI

对一个有严重退化的马膝骨疣失调7年的Thoroughbred, 每天在颈部皮下单独施用0.4单位的RNA聚合酶, 连续给药6天。这个马完全恢复, 并且现在又成为赛马。

#### 例 XII

对一个有红斑狼疮的25岁的女子, 每天在皮下单独施用0.4单位

RNA聚合酶,连续施用6天。治疗三天后,该妇女的关节疼痛显著减轻,与狼疮有关的极端疲劳感也显著减轻,眼周围膜和组织的肿胀也已减轻。治疗6天后,该病人已无疾病症状。在以后的几个月内,该病人仍无症状。

#### 例 XIII

对一有全身红斑狼疮的32岁的女子,每天在舌下单独施用两次0.4单位RNA的聚合酶,连续施用7天。治疗7天后,她的疾病症状消失。并且在一出现疾病症状就舌下施用0.4单位RNA聚合酶的基础上,在一年多的时间里,她保持无症状。

#### 例 XIV

一个十一年割去一肢的马,诊断认为可能患有持续性抑止关节炎,该马对其他治疗手段不敏感。对该马在一个月內每天皮下注射0.5ml剂量的0.4单位的RNA聚合酶(这种酶是用从Pharmacia LKB Technologies购买的T3噬菌体制备的)。该马在这段时间所用的药物只是T3 RNA聚合酶。该马在1992年3月由马医给它装上蹄铁,在二年中它第一次站了起来。在1992年12月,该马仍然很好,没有表现出任何以前的抑止关节炎的症状。

#### 例 XV

一个有髌发育异常的8岁的德国牧羊犬,用0.5ml剂量的0.4单位T3 RNA聚合酶(Pharmacia LKB Technologies, Piscataway, N. J.)治疗。连续治疗6天后,该动物的病情有很大改善从此该动物保持无症状。

#### 例 XVI

一个有严重脊柱关节炎的 25 岁的阉畜，对类固醇或其他治疗药物无反应。用 0.5ml 剂量的 0.4 单位 T3 RNA 聚合酶 (Pharmacia LKB Technologies, Piscataway, N. J.) 对它进行治疗。每天皮下注射该药 6 天后，该马的病情和运动能力有很大改善。

当然，应该想到，前面的叙述仅涉及本发明一些优选的实施例，这里可以在不离开如所附权利要求书陈述的本发明的精神和范围的前提下对之作出大量的改进或替换。

附图说明：

图 1

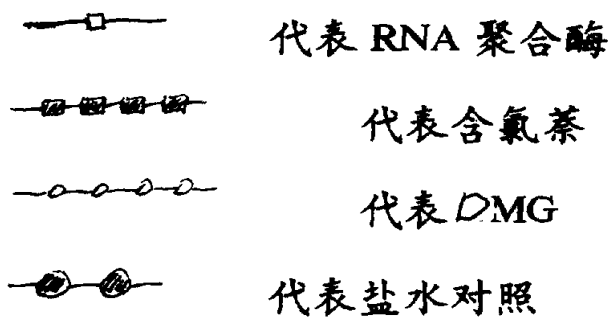
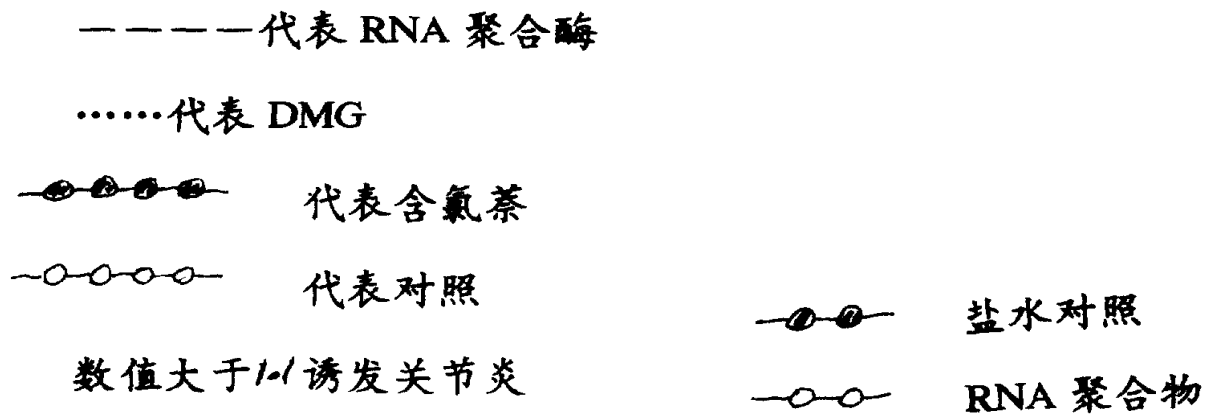


图 2:



数值大于 1.0 诱发关节炎

图 3:

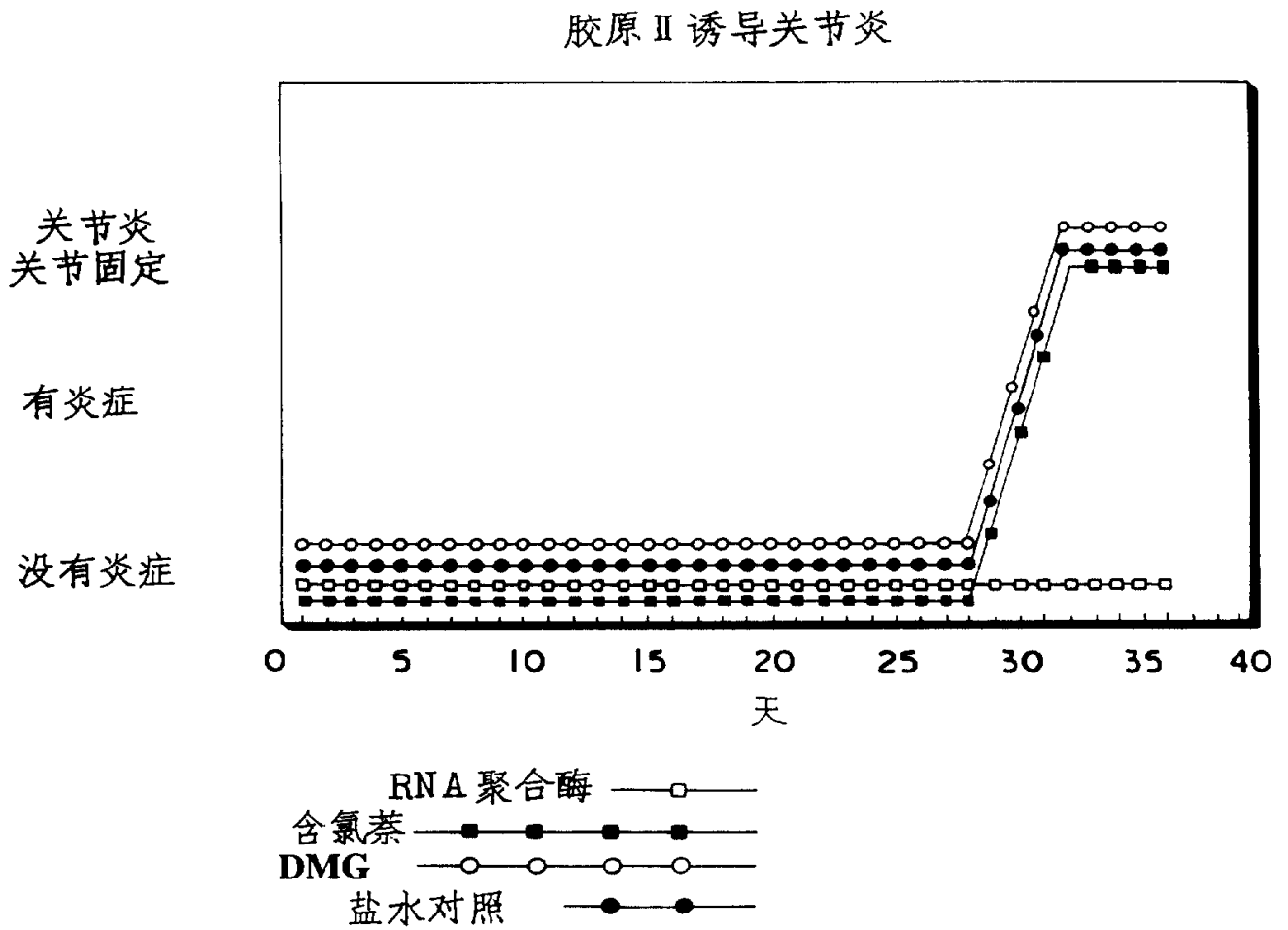


图 1

### 胶原 II 抗体

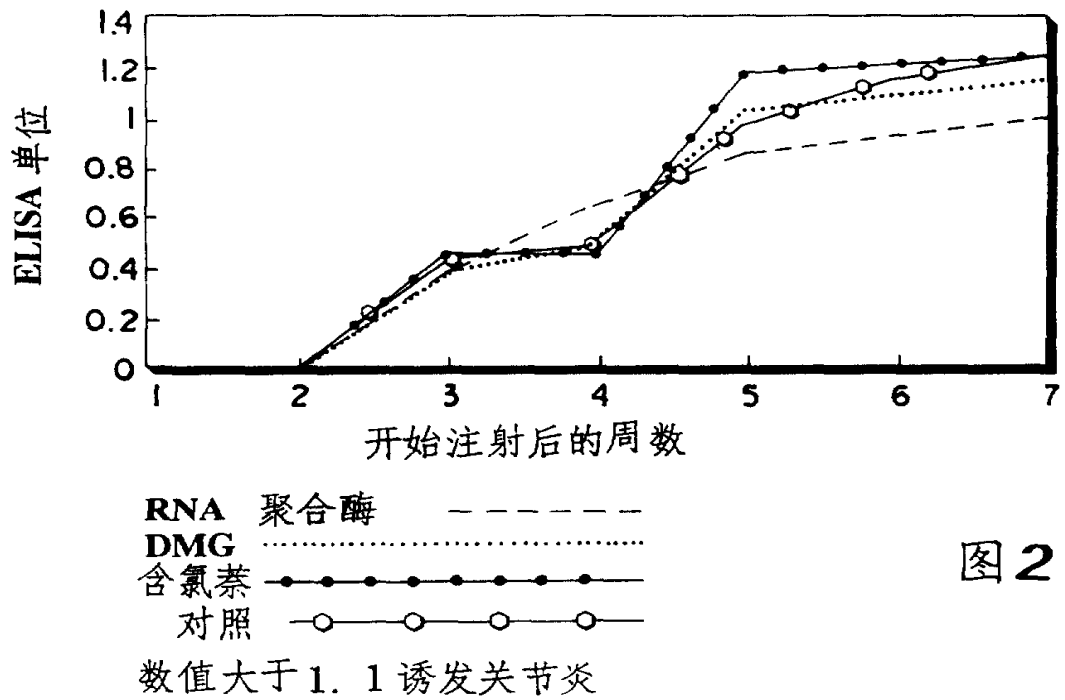


图 2

### 用胶原诱导关节炎的恢复

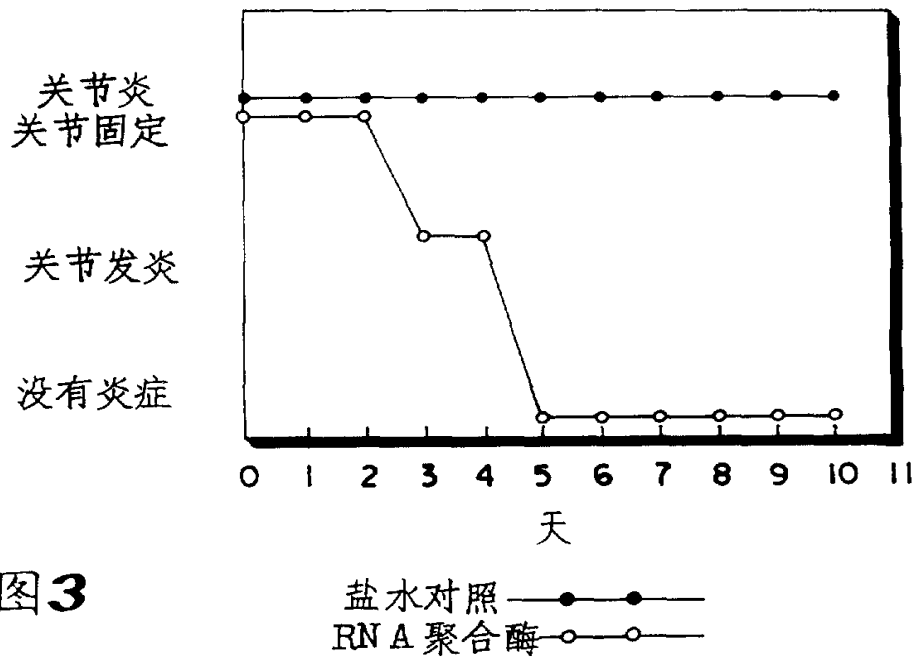


图 3