

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 33/40

A61P 37/00 A61P 35/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98811885.8

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1152691C

[22] 申请日 1998.10.6 [21] 申请号 98811885.8

[30] 优先权

[32] 1997.10.6 [33] US [31] 60/060953

[86] 国际申请 PCT/IB1998/001676 1998.10.6

[87] 国际公布 WO1999/017787 英 1999.4.15

[85] 进入国家阶段日期 2000.6.6

[71] 专利权人 奥克索化学有限公司

地址 瑞士弗里堡

[72] 发明人 F·W·库尼 M·麦格拉斯

E·G·恩格莱曼

审查员 王晓浒

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

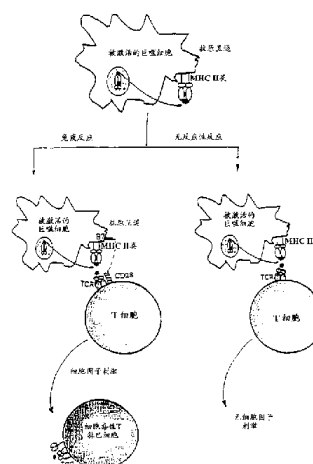
代理人 罗宏 杨丽琴

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 12 页

[54] 发明名称 使用经过化学稳定的亚氯酸盐溶液用于抑制抗原特异性的免疫反应的用途

[57] 摘要

本文公开了一种使用经过稳定的亚氯酸盐溶液来抑制抗原特异性免疫反应的方法。当把经过稳定的亚氯酸盐溶液施用给对其有需要的哺乳动物时，它可以防止抗原呈递细胞对抗原的呈递。因此，经过稳定的亚氯酸盐溶液在治疗，特别是，自身免疫疾病的过程中，在治疗由不适当的免疫反应造成的疾病的过程中，在治疗淋巴增生性疾病以及在抑制移植患者的排斥反应的过程中，是有用的。



1. 经过稳定的亚硝酸盐溶液用于制备一种药剂的应用，该药剂含有有效抑制剂量的所述溶液，用以治疗哺乳动物中与抗原不恰当或过度的呈递有关的疾病，由此抗原特异性免疫反应通过无反应性反应的激活而被抑制。

2. 根据权利要求1中所述的应用，其中抗原呈递细胞是树突细胞。

3. 根据权利要求1中所述的应用，其中抗原呈递细胞是巨噬细胞。

4. 根据权利要求1中所述的应用，其中抗原特异性免疫反应是一抗原受体诱导的T细胞反应。

5. 根据权利要求1中所述的应用，用以治疗自身免疫疾病。

6. 根据权利要求5中所述的应用，其中施用所述经过稳定的亚硝酸盐溶液导致部分或完全地阻断了抗原呈递细胞的抗原呈递。

7. 根据权利要求6中所述的应用，其中抗原呈递细胞是树突细胞。

8. 根据权利要求6中所述的应用，其中抗原呈递细胞是巨噬细胞。

9. 根据权利要求6中所述的应用，其中施用经过稳定的亚硝酸盐溶液导致抗原特异性免疫反应的抑制。

10. 根据权利要求9中所述的应用，其中抗原特异性免疫反应是一抗原受体诱导的T细胞反应。

11. 根据权利要求5中所述的应用，其中所述的疾病是选自以下疾病组成的组：重症肌无力、系统性红斑狼疮、血清疾病、I型糖尿病、风湿性关节炎、青少年风湿性关节炎、风湿热、斯耶格伦综合症、全身性硬化、脊椎关节病、莱姆病、结节病、自身免疫溶血、自身免疫肝炎、自身免疫中性白血球减少、自身免疫多腺疾病、自身免疫甲状腺疾病、多发性硬化、炎症性肠病、结肠炎、局限性回肠炎、慢性疲劳综合症。

12. 根据权利要求 11 中所述的应用, 其中上述的疾病是系统性红斑狼疮。

13. 根据权利要求 1 中所述的应用, 其中器官移植的排斥作用被抑制。

14. 根据权利要求 13 中所述的应用, 其中施用上述经过稳定的亚硝酸盐溶液导致部分或完全地阻断了抗原呈递细胞的抗原呈递。

15. 根据权利要求 14 中所述的应用, 其中抗原呈递细胞是树突细胞。

16. 根据权利要求 14 中所述的应用, 其中抗原呈递细胞是巨噬细胞。

17. 根据权利要求 13 中所述的应用, 其中施用经过稳定的亚硝酸盐溶液导致抗原特异性免疫反应的抑制。

18. 根据权利要求 17 中所述的应用, 其中抗原特异性免疫反应是一抗原受体诱导的 T 细胞反应。

19. 根据权利要求 1 中所述的应用, 其中炎症被减轻。

20. 根据权利要求 19 中所述的应用, 其中上述的疾病是选自以下疾病组成的组: 乙肝、丙肝、慢性肝炎、以及慢性阻塞性肺病。

21. 根据权利要求 20 中所述的应用, 其中上述的疾病是乙肝。

22. 根据权利要求 20 中所述的应用, 其中上述的疾病是丙肝。

23. 根据权利要求 20 中所述的应用, 其中上述的疾病是慢性肝炎。

24. 根据权利要求 20 中所述的应用, 其中上述疾病是慢性阻塞性肺病。

25. 根据权利要求 1 中所述的应用, 其中所述的疾病是淋巴增生性疾病。

26. 根据权利要求 25 中所述的应用, 其中所述的淋巴增生性疾病是淋巴瘤。

使用经过化学稳定的亚氯酸盐溶液用于
抑制抗原特异性的免疫反应的用途

5

发明领域

本发明涉及的是使用经过稳定的亚氯酸盐 (chlorite) 溶液用于抑制抗原特异性的免疫反应的用途。经过稳定的亚氯酸盐溶液通过阻止抗原呈递细胞对抗原的呈递来抑制抗原特异性的免疫反应。因此, 经过稳定的亚氯酸盐溶液在治疗由不需要的或不适当的抗原特异性免疫反应造成或与其相关联的疾病包括例如, 自身免疫疾病, 乙肝, 丙肝, 慢性肝炎, 慢性阻塞性肺疾病, 系统性红斑狼疮的治疗, 以及对防止器官移植患者的排斥反应 (移植与宿主疾病) 的过程中是有用的。稳定的亚氯酸盐溶液还可用于治疗淋巴瘤、特别是滤泡非霍奇金淋巴瘤。

15

发明背景

免疫反应的一个普通特征是对抗原 (外来或自身的, 但被认为是外来的) 的识别, 以及免疫系统随后对抗原的处理。典型地, 抗原在细胞 (通常是巨噬细胞、树突细胞及其它的抗原呈递细胞 (APC) 的细胞质、内质网 (ER) 以及溶酶体中, 或在血清中被酶降解。降解后的抗原由 MHC I 类或 II 类分子呈递到 APC 的表面上。抗原决定部位由 MHC 分子呈递并随后结合到 T 细胞的 T 细胞受体 (TCR) 上的过程称为抗原呈递。参照, 例如, Rodgers 等人, CLINICAL IMMUNOLOGY, PRINCIPLES AND PRACTICE (RICH): “ Antigen and antigen presentation, ” 第 7 章, 第 114 - 131 页, Mosby, St. Louis, MO (1996); Roitt, ESSENTIAL IMMUNOLOGY, Blackwell Science, Oxford, England (1997) 。

在体内循环的 T 细胞通过其表面上的 TCR 识别并结合由 MHC (I 或 II 类) 分子呈递的抗原决定部位 (抗原) 。 TCR 成功结合到所呈递的抗原决定部位之后即发生一系列事件。例如, 当 T 细胞遇到位于 APC 表面的结合着 MHC 分子的抗原时, 它们即产生深刻的表形变化, 其特征是基因表达、效应器功能、淋巴因子分泌、以及, 在适当环境下, 细

胞的增殖都发生变化。然而，不适当的免疫反应也以类似的方式发生，并可导致不需要的 T 细胞增殖、不需要的淋巴因子分泌，以及导致自身免疫状态。

在正常的免疫反应的过程中，TCR 必须首先能够识别并结合所呈递的抗原。然而，据信，需要有更多的过程，而不仅仅是抗原的简单结合，来导致上述一系列事件的发生。因此，认为存在于 APC 上的配体必需与 T 细胞上的共刺激受体反应以引发淋巴细胞的激活。具体地，位于 APC 表面的 B7 分子与其位于 T 细胞上的反受体 CD28 分子（该分子形成 TCR 的一部分）相互作用。Siegel 等人，CLINICAL IMMUNOLOGY, PRINCIPLES AND PRACTICE (RICH)： “ Signal Transduction and T lymphocyte activation, ” 第 12 章，第 192 至 216 页，Mosby, St. Louis, MO (1996)。同时参照 Roitt，文献同上，第 169 - 170 页。

最强烈的免疫反应中有一种称为“异源反应”，它涉及的是免疫系统对非自身的 MHC 同种抗原产生反应。这种类型的反应见于例如非自身移植物例如移植的器官的排斥，此时这明显是不合需要的。然而，已报导的通过干扰同种识别（即通过移植物抗原的损耗，APC 功能的抑制，表面受体/共受体分子的阻塞，等等）来产生作用的抑制免疫反应机制对于防止或减轻异源反应的严重程度是无效的，这是因为它们具毒副作用，而且活性周期短。RICH 文献同上，于“Concepts and challenges in solid organ transplantation,” 第 104 章，第 1593 - 1607 页。另外，还未见有能够有效阻断 B7/CD28 共刺激相互作用的治疗方法的报导。

大部分哺乳动物的免疫系统能够适当地识别自身及外来抗原并对其产生应答。免疫系统对自身抗原不产生应答的这种现象被称为免疫耐受。Triptett, J. Immunol. 86: 505 - 510 (1962)。然而，对自身抗原的耐受性有时候失灵了，从而造成自身免疫，此时 T 或 B 细胞（或两者），以及哺乳动物中多种不同的细胞因子，对哺乳动物自身组织中的抗原产生反应并把其破坏。另外，哺乳动物经常对外来抗原产生不适当的免疫反应，从而导致免疫系统的过度刺激或过度激活，最终导致对正常、健康的组织产生损害。

这些自身免疫反应及不适当的免疫反应导致了一系列全身性免疫疾病的发生，这些疾病包括重症肌无力、系统性红斑狼疮、血清疾病、I

型糖尿病、风湿性关节炎、青少年风湿性关节炎、风湿热、斯耶格伦综合征、全身性硬化、脊椎关节病、莱姆病、结节病、自身免疫溶血、自身免疫肝炎、自身免疫中性白血球减少、自身免疫多腺疾病、自身免疫甲状腺疾病、多发性硬化、炎症性肠病、结肠炎、局限性回肠炎、慢性疲劳综合症，等等。

自身免疫疾病的一个重要因素是 T 细胞被呈递给自身组织或器官。当抗原（或自身抗原）由 APC 呈递时，含有这些抗自身受体的 T 细胞结合到被呈递的抗原决定部位上并开始分化和增殖，从而导致把抗原（或自身抗原）破坏。Davis, *Annu. Rev. Biochem.*, 59: 475 (1990)。已经提议了几种防止抗自身 T 细胞分化的机制。一种机制是克隆的无反应性，这是对 T 细胞进行功能性灭活。Schwartz, 于 Rich, 文献同上，“Mechanisms of Autoimmunity,” 第 69 章，第 1053 - 61 页。无反应性的 T 细胞无法表达 IL - 2，后者是 T 细胞增殖必需的一种细胞因子。这样，T 细胞无法增殖，从而无法导致自身免疫疾病症状的发生。

对抗自身免疫反应的传统的方法通过在抗原呈递之后防止或抑制 T 细胞的增殖来减弱免疫反应。这些方法试图在抗原呈递及细胞因子（IL - I，IL - 2，TNF，等）释放之后抑制细胞毒素 T 细胞的形成和扩张。例如，已知可以用环孢菌素来在抗原呈递之后通过阻断 IL - 2 的生产来防止 T 细胞的增殖。在抗原呈递之后，通过调控免疫反应来试图对经过刺激的 T 细胞的生产进行干扰的这一方法特征性地需要施用大量的治疗剂，这会导致不合需要的毒副作用。

另外，虽然抗自身 T 细胞的扩张是一些自身免疫疾病所必需的，但是仅有它们存在并不足以引起所有的自身免疫反应。Schwart, 文献同上，第 1055 页。例如，多克隆 B 细胞激活是系统性红斑狼疮的一个普通特征。Klinman 等人，*J. Exp. Med.* 165: 1755 (1987)。另外，自身抗体的存在在器官特异性的自身免疫疾病中并不普遍。Bernard 等人，*Diabetes*, 41: 40 (1992)。因此，仅仅防止抗自身 T 细胞增殖可能并不能有效地对许多自身免疫疾病进行治疗。

有不同于自身免疫疾病的其它病例，其中并不需要免疫反应，或者其中需要把免疫反应抑制到一定程度。对抗原的过敏反应以及过度炎症就是免疫系统已经起动一不适当的免疫反应的例子。肝炎病毒如乙肝或

丙肝病毒的慢性病毒感染是过度免疫反应炎症导致末期肝功能障碍以及如肝硬化及肝细胞瘤等疾病的例子。另外一个例子是对移植的器官或组织产生排斥。另外，移植的器官或其它移植物有时会引出移植物对抗宿主的反应，此时移植物或器官就会介导一个对抗健康宿主细胞的免疫反应。

当进行器官或组织移植时，对所移植器官的外来抗原产生免疫反应是不利的。此时，免疫系统必须对外来抗原产生免疫耐受力。类似地，移植的器官或移植物的免疫系统也必须对宿主抗原产生耐受力。在器官移植领域，可以用可影响淋巴及造血系统的其它部分的细胞毒素剂来抑制器官接受者对外来移植物的细胞免疫反应。对移植物的接受情况受到器官接受者对这些细胞毒素化学物质（它们许多都与抗瘤（抗增殖）药剂类似）的耐受力的局限。同样，当使用细胞毒素抗微生物药剂，特别是抗病毒药时，或使用细胞毒素药用于自身免疫治疗如系统性红斑狼疮的治疗时，一个严重的局限是其对骨髓及身体造血细胞的毒性效应。另外一个局限是细胞毒素剂无法诱导对外来抗原的免疫耐受力。

对正常组织及细胞的毒副作用也限制了许多类型的非外科手术癌症治疗方法如外部放射或化学疗法的效力，这是因为这些形式的治疗对瘤细胞的特异性都是有限的。当把抗瘤抗体用以为毒性剂，如同位素，药物、毒素寻找癌症位置时，这一局限也十分重要，因为抗体作为一种自身性的物质，可以循环到敏感的细胞隔室如骨髓之中。在急性辐射损伤中，淋巴及造血隔室被破坏，这是发生败血病及最终导致死亡的主要因素。

已有几种不同的方法可以被用于保护生物体免受辐射或毒性化学试剂的副作用伤害。一种方法是在已经产生毒性后把骨髓细胞替换掉。另外一种方法是注射一种可以竞争毒性药物作用位置的化学阻断剂。

Neta 等人（J. Immunol. 136: 2483 - 2485, 1986）证实，用重组白细胞间介素 - 1（IL - 1）进行预处理可以以依赖于剂量的形式保护小鼠免受外部光束辐射对其的致死作用，其中 IL - 1 是在辐射前 20 小时施用的。其它研究已显示用其它的细胞因子来改善放射治疗及化学治疗的毒副作用。然而，还没有报导指出防止细胞因子的分泌以及/或者抑制抗原呈递细胞（巨噬细胞，树突细胞等）中的抗原呈递对于改善这

些副作用是有用的。

传统的免疫抑制反应在治疗器官移植的排斥作用上也是无效的。首先，大部分的免疫抑制剂如抗增殖剂和皮质甾类的免疫抑制效力都较低。第二，过量的免疫抑制剂如单克隆抗体 OKT3 会对 T 及 B 细胞产生毒性作用，从而导致淋巴细胞中出现潜隐的病毒感染，或导致淋巴细胞出现肿瘤疾病。第三，施用大剂量的免疫抑制剂，如环孢菌素，会导致对不属于免疫系统的器官产生毒性作用。

抗原在 APC 上的呈递还具有可以刺激辅助 T 细胞来“帮助” B 细胞进行增殖并随后进行分化的作用。在每次分裂之后，以更高的亲和力结合抗原的 B 细胞可以再次分裂，而那些免疫球蛋白保持不被改变或亲和力较低的 B 细胞则死亡。这样，B 细胞开始增殖并随后分化为浆细胞，浆细胞分泌诸如 Ig 亚族的免疫球蛋白。典型地，B 细胞首先分泌 IgM，然后分泌 IgG, IgA 及 IgE。如果 B 细胞继续增殖，但却未能分化，那么它们将导致淋巴增生性疾病，如淋巴瘤。Gause, 于 Rich, 文献同上，第 113 章，第 1745 至 1767 页。

非淋巴肉芽肿滤泡性淋巴瘤 (non - HIV) 是美国最普遍的淋巴瘤之一。每年诊断出大约四万个淋巴细胞淋巴瘤的新病例，且每年估计有 19,000 人死亡。Ries 等人, Cancer Statistics Review 1973 - 1988, National Institutes of Health Publ 91 - 2789, Washington, DC, 1991, National Cancer Institute. 滤泡性淋巴瘤发展得相对较慢且几乎不需治疗，除非它使病人感到不适或导致了危及生命的并发症。虽然滤泡性淋巴瘤属于淋巴瘤中的低级类别，但在现有治疗条件下却无法治愈，而最终普遍都导致死亡。

在 1981 年首次用由患者自身的 B 细胞淋巴瘤制备的抗独特型抗体对患者进行治疗。Miller 等人, N. Engl. J. Med. 306: 517 (1982)。在十多年前，研究者们把单克隆抗独特型抗体来治疗滤泡性淋巴瘤。这一研究发现，淋巴瘤对抗独特型治疗的反应与在淋巴瘤中共存的 T 细胞的比例有直接的关系。这些发现提示，恶性 B 细胞不知何故与 T 细胞相互作用，而抗独特型抗体则不知何故或者改变了淋巴细胞的生长条件，或者改变了 T 细胞对 B 细胞的免疫反应。然而，抗独特型治疗并没有被采用，因为由于抗独特型抗体是从患者自身的 B 细胞（此种细胞有改变

它们自身结构的固有的能力)制备的,所以B细胞肿瘤也能够自主地变异它们的抗原结合部位(即独特型),从而使它们不受抗独特型治疗的影响。Gause,文献同上,第113章,第1745至1767页。

5 新近,与淋巴瘤独特型(肿瘤特异性免疫球蛋白)一起保温的树突细胞已被用于对患者进行免疫以对抗他们自身的滤泡性淋巴瘤。其中,从患者中取出血液树突细胞并把其与患者自身的肿瘤特异性抗体一起保温,然后再注射回患者内。经过上述注射之后的一些患者的肿瘤收缩了,从而显示树突细胞诱导了T细胞对抗恶性B细胞的应答。这些观察结果提示滤泡性淋巴瘤可以顺从免疫操作。

10 滤泡性淋巴瘤处理过程中的一个病原性损害是巨噬细胞抗原处理及/或呈递。虽然已经有了许多针对滤泡性淋巴瘤的治疗方法而且最近在癌症的生物治疗试验上有所进展,但是对淋巴瘤的治疗仍没有显著的进展。文献同前,第1763页。另外,迄今仍不知道通过调控APC中的抗体呈递来治疗淋巴瘤。

15 抑制不适当的免疫反应以及抑制及/或防止抗原的呈递虽然可以有利于改善自身免疫紊乱、过敏性反应以及移植排斥等,但却有减弱免疫系统抗感染能力的缺点。因此,已知的治疗免疫抑制反应的治疗通常是与施用药剂同时进行的,这些药剂刺激吞噬细胞,如巨噬细胞、单核细胞以及多形核白细胞(PMNs)吞噬细胞活性,以便抵抗其它的感染。

20 尚未知道有一种疗法可以在抑制抗原特异性免疫反应的同时能刺激吞噬细胞活性。

最近已有人假设身体在免疫反应过程中能够控制伴随着巨噬细胞激活的炎症反应的持续时间和严重程度的一个重要原因是存在有被“可选地激活”的巨噬细胞。Stein等人,(J. Exp. Med. 176: 287 (1992))。

25 不同的是,“经典”的巨噬细胞激活是由干扰素- γ , INF- α 、IL-12或细胞脂多糖诱导的。可选的途径是由IL-4, IL-10, 或IL-13诱导的,其特征在于AMAC-1基因被表达,生产MIP-4蛋白(巨噬细胞炎性蛋白-4)并减少发炎前细胞因子的分泌。见Kodelja等人, J. Immunol. 160: 1411 (1998); Schebesch等人, Immunology 92: 478 (1997)。被可选地激活的巨噬细胞已表明可以活跃地抑制由分裂素介导的淋巴细胞的增殖。同样地,巨噬细胞激活的可选途径被认为是

30

充当了发炎前巨噬细胞反应的一个重要的调制过程。确实，已有人假设被可选地激活的巨噬细胞在减弱过敏及自身免疫疾病中的炎症的过程中发挥着重要的作用。

可被用于静脉给药的经过化学稳定的亚氯酸盐的水溶液是已知的。

- 5 已知还有其它的含氯溶液具有所报告的医药用途。例如，美国专利第 5, 019, 402 号公开了一种含有二氧化氯，或者一种能释放二氧化氯的亚氯酸盐混合物、一种微呈酸性的缓冲液以及一种热激活的糖类的溶液，这一溶液可被用于对贮存的血液成分进行体外杀菌。然而，这一方法特别地不能适用于含有红血球，即含有白血球，血小板，凝血因子及球蛋白的血液制品。对全血则不进行如上的消毒处理，大概是因为二氧化氯攻击红血球的速度比攻击靶向微生物体还要快。

- DE - OS 32 13 389, 美国专利第 4, 507, 285 号以及美国专利第 4, 296, 103 号描述了经化学稳定的适用于外用及口服治疗的亚氯酸盐基质。以这种方式除了可以治疗各种不同的细菌感染以外，还可以对病毒感染，如单纯疱疹及带状疱疹进行外部治疗。然而，这些文献并没有报导通过静脉给予亚氯酸盐基质来抑制抗原特异性的免疫反应。

- 欧洲专利 EP 0 200 157 及美国专利第 4, 725, 437 号进一步描述了一种用于静脉或手术前后给药的经过化学稳定的亚氯酸盐溶液。这一药剂已被证明在白色念珠菌感染的治疗中有效。由 EP 0 200 157 中可知，可以把上述的经过稳定的亚氯酸盐基质在由寄生虫、真菌、细菌、病毒及/或支原体造成的感染中进行静脉及/或局部给药。这一作用被认为是通过吞噬细胞的刺激来产生的，其中在感染不久后单次施用有效剂量的亚氯酸盐复合物即可完成对吞噬细胞的刺激。在这些文献中并没有描述把免疫反应往下调控以及抑制抗原特异性免疫反应的方法；反之，其中所假定的通过巨噬细胞的刺激来产生作用的这一原理将导致相反的预测。

- 因此，急切需要一种对免疫反应进行修改的新方法。具体地，急需确定一种新的方法用以治疗与不适当抗原呈递相关联的疾病，如自身免疫疾病，移植排斥，以及系统性红斑狼疮，以及用以治疗因为不适当的巨噬细胞激活而产生慢性炎症症状的疾病，如乙肝及丙肝，慢性肝炎，以及慢性阻塞性肺病。同样，显而易见通过防止抗原呈递来治疗淋巴增生性疾病的方法也是合乎需求的。

本发明的概述

需要开发一种方法,使其在通过抑制或防止抗原呈递来抑制抗原特异性免疫反应的同时,还刺激吞噬细胞的活性。因此,本发明的一个目的是提供一种通过部分或完全阻断抗原在抗原呈递细胞上的呈递来抑制免疫反应的方法。本发明的另外一个目的是通过部分或完全阻断抗原在抗原呈递细胞上的呈递来抑制细胞因子的释放和被刺激的 T 细胞的增殖。本发明的另外一个目的是提供一种方法,使其在抑制抗原特异性免疫反应的同时,还刺激吞噬细胞的活性。

依照本发明以上及其它的目的,提供了一种抑制免疫反应的方法,包括施用含有有效抑制剂量的经过稳定的亚氯酸盐溶液,上述溶液含有一 ClO_2^- 含量为 5 至 100 mMol/L 的等渗溶液。这一方法可以部分地或完全地阻断抗原在抗原呈递细胞包括特别是树突细胞及巨噬细胞上的呈递。

依照本发明的另外一个目的,提供了一种抑制不适当的免疫反应的方法,包括施用含有有效抑制剂量的亚氯酸盐溶液,上述溶液含有一 ClO_2^- 含量为 5 至 100 mMol/L 的等渗溶液。另外再依据本发明的另外一个目的,提供了一种治疗自身免疫疾病的方法,包括抑制抗原在抗原呈递细胞中的呈递。这一目的可以通过给有需要的哺乳动物施用一含有有效抑制剂量的亚氯酸盐的溶液来实现,上述溶液含有一 ClO_2^- 含量为 5 至 100 mMol/L 的等渗溶液。

具体地,提供了治疗以下一组疾病的其中之一的多种方法:重症肌无力、系统性红斑狼疮、血清疾病、I 型糖尿病、风湿性关节炎、青少年风湿性关节炎、风湿热、斯耶格伦综合症、全身性硬化、脊椎关节病、莱姆病、结节病、自身免疫溶血、自身免疫肝炎、自身免疫中性白血球减少、自身免疫多腺疾病、自身免疫甲状腺疾病、多发性硬化、炎症性肠病、结肠炎、局限性回肠炎、慢性疲劳综合症。

依照本发明的另外一个目的,提供了一种抑制哺乳动物移植器官或移植植物排斥作用的方法,包括抑制抗原在抗原呈递细胞中的呈递。这一目的可以通过给有需要的哺乳动物施用一含有有效抑制剂量的亚氯酸盐的溶液来实现,上述溶液含有一 ClO_2^- 含量为 5 至 100 mMol/L 的等渗溶液。

依照本发明的另外一个目的, 提供了一种通过给患者施用治疗有效剂量的经过稳定的亚氯酸水溶液来治疗以下一组疾病的其中一种疾病: 淋巴增生性疾病、乙肝、丙肝、慢性肝炎、以及慢性阻塞性肺病。

从下面的详细描述中可以显而易见地发现本发明的其它目的、特征及优点。然而应该理解的是, 这些详细的描述和具体的实施例只是解释性的代表了本发明的优选实施方案, 本领域技术人员在阅读完这些详细描述之后都可以很容易地在本发明的实质和范围内作各种不同的变化和修改。

附图的简要描述

图 1 所示的是抗原呈递细胞呈递抗原以激活 T 细胞并引起免疫反应或者没能呈递抗原从而导致无反应性反应的机制。

图 2 所示的是本发明的亚氯酸盐溶液抑制 T 细胞从经异源混合白血球反应刺激的树突细胞增殖的效果。

图 3 所示的是本发明的亚氯酸盐溶液抑制 T 细胞从经异源混合白血球反应刺激的单核细胞增殖的效果。

图 4 所示的是本发明的亚氯酸盐溶液抑制可溶性抗原诱导的 T 细胞从树突细胞增殖的效果。

图 5 所示的是本发明的亚氯酸盐溶液抑制可溶性抗原诱导的 T 细胞从单核细胞增殖的效果。

图 6 所示的是在施用 WF - 10 的患者中, $CD14^+/CD69^+$ 细胞数目/ μl 之间随着时间的相互关系。

图 7 所示的是在施用 WF - 10 的患者中, $CD14^+/TNF$ 细胞数目/ μl 随着时间的相互关系。

图 8 所示的是在施用 WF - 10 的患者中, $CD3^+/CD8^+/CD28^-$ 细胞数目/ μl 之间随着时间的相互关系。

图 9 所示的是在施用 WF - 10 的患者中, $CD3^+/CD8^+$ 细胞数目/ μl 随着时间的相互关系。

图 10 所示的是在施用 WF - 10 的患者中, 以细胞数目/ μl 表示的吞噬细胞指数随着时间的相互关系。

图 11 所示的是在施用 WF - 10 的患者中, $CD14^+/DR^+$ 细胞数目/ μl

随着时间的相互关系。

图 12 所示的是在对患有系统性红斑狼疮的患者用 WF - 10 进行治疗后，抗体对应于双链 DNA 的减少情况。

5

本发明的详细描述

本发明提供了抑制患有与不适当或过度的抗体呈递相关联的临床疾病的患者的抗原呈递的方法。该方法涉及给患者施用有效治疗剂量的经过稳定的亚硝酸盐溶液，这一溶液足以抑制抗原的呈递并减轻与临床状态相关联的症状。具体地，本发明的方法对于防止移植排斥；治疗自身免疫疾病、系统性红斑狼疮、淋巴增生性疾病（例如淋巴瘤）、以及慢性炎症相关联的疾病是有用的。与慢性炎症相关联的疾病包括慢性肝炎、乙肝及丙肝、慢性阻塞性肺疾病、以及所有粘膜疾病中的炎症（如局限性回肠炎及结肠炎）。

施用给患者以实现想得到的治疗结果的经过稳定的亚硝酸盐制剂的剂量取决于各种不同的因素，包括患者的体重和性别。根据体重、性别、及其它的代谢因素来调节所服用的剂量的方法在本领域中是公知的。所实现的具体的治疗终点将因待治疗疾病的病理学及症状的不同而不同，但是这些治疗终在本领域中都是公知的。例如，乙肝和慢性永久性肝炎都伴随有通过实验室研究即可发现的转氨酶活性水平的显著提高。亚硝酸盐制剂的治疗效力可以通过在治疗前后对转氨酶水平进行测量来评估。类似地，患有系统性红斑狼疮的患者对应于双链 DNA 的抗体滴度高，因此，在治疗之后这一滴定度降低即显示了治疗的效力。然而，本领域技术人员很容易理解的是，通过观察患者所报告的症状的整体改善，而不需对临床反应进行定量的测量，即可容易地确定临床上的效益。类似地，在特定的实验室研究中未能发现有可测量的反应并不能自然而然地排除在临床上存在着显著的效益。

在本发明的上下文中，本领域技术人员将可理解术语“有效抑制量”表示的是当把一定量的溶液施用到患者体内时，它将抑制抗原的呈递，从而抑制 T 细胞的增殖。溶液的有效治疗量指的是能够在治疗上显著地减少所治疗疾病的一种或多种症状，或者可以在统计学上显著地改善该疾病公认的临床标志的数量。典型地，亚硝酸盐溶液的有效抑制量介于

大约 0.1 ml/kg 至大约 1.5 ml/kg 之间, 优选地, 大约为 0.5 ml/kg 体重, 其浓度分别为含有大约 40 至 80 mMol/L ClO_2^- , 优选地含有大约 60 mMol/L 的 ClO_2^- 。不受理论的约束, 本发明申请者相信在治疗特定疾病的过程中, 上述的对抗原呈递的影响与临床所获得的结果之间的关系意味着有效治疗量与有效抑制量是相似的或相同的。

优选地, 本发明的亚氯酸盐溶液每天给药一次, 持续大约 3 至 7 天, 优选地持续 5 天, 然后休息 10 至 20 天, 优选地休息 14 至 18 天, 更优选地, 休息 16 天, 以构成一个治疗周期。优选地, 对患者进行一次以上的治疗, 更优选地, 至少治疗三个周期, 最优选地, 至少治疗五个疗程。然而, 本领域技术人员将认识到, 其它的服法也是可能的, 而且可能实际上是优选的。实施这类服法的方法是本领域所公知的。

例如, 一种替代的治疗服法包括通过静脉给予本发明的经过稳定的亚氯酸盐溶液, 一天一次, 给药五天, 然后休息两天 (如在周末休息), 然后再给药五天, 接着休息一至四周, 以构成一个周期。优选地, 给患者治疗一个周期以上, 更优选地, 治疗三个周期以上。本领域技术人员可以根据所治疗的疾病以及患者身材的大小, 使用以下的指导原则对本发明的经过稳定的亚氯酸盐溶液的给药方法进行修改。

用含有经过稳定的亚氯酸盐溶液的水溶液治疗创伤和感染在本领域中是公知的。美国专利第 4, 507, 285 及 4, 725, 437 号 (这两项发明所公开的全部内容于此作为参照) 以及 EP 0 200 157 (该发明所公开的全部内容也于此作为参照) 描述了使用经过稳定的亚氯酸盐溶液来刺激人伤口的愈合反应, 以及用其来治疗由寄生虫、真菌、细菌、病毒及/或支原体引起的感染。Kuhne 等人的欧洲专利第 200156 号 (该发明所公开的全部内容于此作为参照) 描述了在放射治疗的同时使用经过稳定的亚氯酸盐溶液以帮助修复被辐射损伤的组织及减少副作用。

治疗被损伤的及/或被感染的组织的作用模式被认为是涉及在有生物激活物如血红素化合物参与的情况下, 扩增吞噬细胞的“氧化爆发”反应。伤口的愈合以及所报导的感染的治疗被认为是通过巨噬细胞的激活来实现的, 巨噬细胞接着激活成纤维细胞, 后者刺激创伤的愈合反应。经过稳定的亚氯酸盐溶液被认为是通过与位于巨噬细胞膜中的血红素部分形成复合物来激活巨噬细胞的。一旦被激活, 巨噬细胞刺激成纤维细

胞，后者接着产生胶原蛋白及内皮细胞，后两者对由创伤或感染造成的损伤组织的修复是有用的。

5 不受任何理论的约束，本发明者相信巨噬细胞是由经过稳定的亚氯酸盐溶液通过下列事件顺序来刺激的。在有血红素化合物（如血红蛋白，肌红蛋白，过氧化物酶，细胞色素，等等，它们存在于血清中，同时也是吞噬细胞如巨噬细胞细胞膜的一部分）存在的情况下，经过稳定的亚氯酸盐溶液变成一次要氧化剂，其氧化特性不同于亚氯酸盐及过氧化氢。确切地，当把本发明的经过稳定的亚氯酸盐溶液与等摩尔数的亚氯酸盐溶液进行比较时，可以发现它们存在显著的药理学差异。

10 本发明者进而相信已知的通过使用本发明的亚氯酸盐溶液来激活巨噬细胞从而使伤口愈合的机制同时也可刺激并增强巨噬细胞的吞噬活性。因此，被刺激的巨噬细胞做好了吞咽、消化及除掉外来抗原的准备。使用经过稳定的亚氯酸盐溶液来实施巨噬细胞的吞噬活性的方法描述于 EP 0 200 157 中。

15 然而，在本发明之前还不知道经过稳定的亚氯酸盐溶液还可以抑制抗原特异性免疫反应，并可同时增强吞噬细胞的活性。不受任何理论的约束，本发明者相信当把经过稳定的亚氯酸盐溶液施用给对其有需要的哺乳动物时，它可以通过激活可选的巨噬细胞激活途径来部分或完全阻止抗原呈递细胞（APC）对抗原的呈递。贯通全文，用语“抗原呈递细胞”指的是可以呈递抗原并诱发免疫反应的细胞。使用的抗原呈递细胞
20 包括巨噬细胞和树突细胞。在实施例1中，用体外实验的数据说明了施用经过稳定的亚氯酸盐溶液对抗原呈递的抑制作用。

一个典型的免疫反应包括刺激一巨噬细胞，被刺激的巨噬细胞把结合 MHC I 及 II 类细胞的抗原呈递到表面，当该抗原与 T 细胞受体相偶
25 合时，将刺激 T 细胞（典型地是 T 细胞亚群如 CD4 或 CD8 细胞等）进行增殖并生成细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL），后者随即杀死表达抗原的细胞。在抗原呈递之后且当与 T 细胞受体相偶合时，被刺激的 APC（巨噬细胞及等等）也分泌各种不同的细胞因子，这些细胞因子可以辅助 CTLs 的增殖。细胞因子，或称生长因子，是由性质不同的细胞生产的激素样肽类，它们能够调控特定细胞类型的增殖、成熟及功能性激活。在
30 此，细胞因子指的是性质不同的一系列生长因子，如造血细胞生长因子

(如红细胞生成素, 集落刺激因子及白细胞介素)、神经系统生长因子(如神经胶质生长因子及神经生长因子)、大部分的间充质生长因子(如表皮生长因子)、源于血小板的生长因子、以及成纤维细胞生长因子 I、II 及 III, 包括干扰素。

5 应该理解有好几种细胞因子参与诱导细胞分化和成熟, 而且细胞因子可以有其它的生物学功能。在 IL - 1 的情形中, 可以有多种形式, 如 IL - 1 α 及 IL - 1 β , 但是它们都有类似的生物学活性特征。那些主要与诱导细胞的分化及骨髓以及可能其它造血细胞的成熟相关联的细胞因子包括, 特别是 IL - 1、G - CSF、M - CSF、GM - CSF、多 -
10 CSF (IL - 3)、以及 IL - 2 (T 细胞生长因子, TCGF)。IL - 1 主要影响骨髓细胞, IL - 2 主要影响 T 细胞, IL - 3 影响多种淋巴细胞前体, G - CSF 主要影响粒性白细胞及骨髓细胞, M - CSF 主要影响巨噬细胞, GM - CSF 影响粒性白细胞及巨噬细胞。其它的生长因子影响未成熟的血小板(凝血细胞)细胞、类红细胞等。

15 如图 1 中所示, 当抗原被呈递给一个具有正常的, 或强健的免疫系统的患者时, 一般会发生以下一系列事件。这一机制可以参考图 1 左手侧标有“免疫反应”的地方。抗原(或异物)被包裹在巨噬细胞的囊泡中, 并被其分解成较小的抗原性肽段。一个 MHC II 类分子把其中的一个较小的抗原性肽段运输到巨噬细胞的表面, 并于此把该肽段呈递给 T
20 细胞受体(TCR)。与细胞受体的结合触发了激活因子及细胞因子(如 IL - 1, TNF 等)的释放, 后者恢复巨噬细胞的自我防卫并增强在细胞内对异物的杀灭力。如果没有结合, 激活因子没被释放, 巨噬细胞无法把异物分解为较小的肽段。如本文描述中所使用的, 用语“抗原呈递”因而表示把一拷贝到 MHC II 类分子上的外来抗原呈递到一 APC 的表
25 面, 然后与 TCR 结合的过程。

 如上所述, 可选的巨噬细胞激活途径被认为充当了发炎前巨噬细胞反应一个非常重要的调节因素, 而且被可选地激活的巨噬细胞被认为在减轻过敏性及自身免疫疾病的炎症的过程中发挥重要作用。不受任何理论的约束, 本发明者相信通过施用经过稳定的亚氯酸盐溶液来防止及/或
30 抑制抗原呈递的机制之一是通过可选的巨噬细胞激活途径的激活。确切地, 值得一提的是经过稳定的亚氯酸盐溶液对抗原呈递的抑制时间(大

概持续几周的时间而不用进一步用药)，与被可选地激活的巨噬细胞中 MIP - 4 表达的持续时间接近平行，MIP - 4 在延长的一段时间内也保持提高的水平。MIP - 4 表达这一延长的时间表明巨噬细胞也保持激活状态并可以在整个激活期间发挥消炎的作用。

- 5 预先已知的防止 T 细胞增殖的治疗方法典型地是在细胞因子刺激之后对细胞毒性 T 细胞进行作用。例如，环孢菌素 A 被认为是作用于细胞毒性 T 淋巴细胞上（如图 1 的左下部所示）以防止 T 细胞的增殖。然而此时 APC 已经释放了细胞因子，这些细胞因子可能会协助 CTL 的增殖。因此，必须施用大量的这些药物以防止 CTL 的增殖。然而，尚没有可以
- 10 阻止免疫反应的公知方法，其中对 APC 或 TCR 进行某种形式的影响以使其部分或完全地中断 APC 与 T 细胞之间抗原呈递的相互关系。

- 因为免疫反应不恰当而导致患者患上自身免疫疾病及由不恰当的免疫反应造成的疾病，如重症肌无力、系统性红斑狼疮、血清疾病、I 型糖尿病、风湿性关节炎、青少年风湿性关节炎、风湿热、斯耶格伦综合
- 15 症、全身性硬化、脊椎关节病、莱姆病、结节病、自身免疫溶血、自身免疫肝炎、自身免疫中性白血球减少、自身免疫多腺疾病、自身免疫甲状腺疾病、多发性硬化、炎症性肠病、结肠炎、局限性回肠炎、慢性疲劳综合症，等等。慢性阻塞性肺病（COPD）也可能会有些自身免疫的病因学，至少于一些患者中如此。当发生自身免疫反应时，患者的身体产生太多的 CTL，或其它的细胞因子，后者反过来攻击身体自己的健康细胞并把其毁坏。在移植后的患者中产生不恰当的免疫反应是因为免疫系统把被移植的器官或移植物的抗原当成外来的，从而把其毁坏。其结果就是移植物排斥作用。类似地，接受移植后的患者会发生一移植物对抗宿主的反应，此时被移植的器官或移植物的免疫系统把宿主的抗原
- 20 识别为外来的并把其毁坏。其结果是导致移植物对抗宿主的疾病。其它的不恰当的免疫反应见于过敏性哮喘，过敏性鼻炎及异位性皮炎中。

- 另外，出现慢性炎症的疾病也涉及不恰当的免疫反应，其特征在于巨噬细胞的过度激活。例如，对组织损割（如物理创伤）或病原生物体（如细菌或病毒）感染的健康反应包括巨噬细胞的激活（通过“常规的”
- 30 发炎前途径）并导致炎症反应。然而，这一反应可能会不恰当地过度表现，从而导致慢性炎症（如果发炎前免疫反应未能被抑制的话）。诸如

乙肝及丙肝、慢性肝炎、以及 COPD 表现（如阻塞性支气管炎及肺气肿，它们显然是因为长时间暴露于非特异性支气管及肺部刺激物中而导致的）这些疾病的特征是由巨噬细胞的过度激活所引起的慢性炎症（在肝炎中是肝发炎，在 COPD 中是肺部组织发炎）。

- 5 自身免疫疾病，如系统性红斑狼疮，以及移植排斥的常规治疗方法使用细胞毒性剂，特别是那些影响淋巴系统（特别是抑制 T 细胞增殖的）细胞毒性剂。这些细胞毒性药物与那些经常用于癌症化学治疗的是类似的，并且公知的对骨髓及其它的造血部位有副作用。除了这些药物以外还有一些特定的抗淋巴细胞特别是 T 细胞的抗体，也已被用作免疫抑制
- 10 剂。例如，Uchiyama 等人（J. Immunol. 126: 1393 至 1398（1981））描述了一种抗 Tac 的单克隆抗体，它特异性地结合在被激活的 T 细胞的人 IL - 2 受体上，并可与细胞毒性剂，如药物、毒素、或放射性同位素相接合以便相对较有选择性地杀灭那些与器官排斥有关的细胞。这种抗体可以与 β - 或 α - 放射性同位素相接合，并可以在器官移植之前，以及
- 15 如果需要，在移植之后施用给患者。可以用含有经过稳定的亚氯酸盐溶液的水溶液替代上述的药剂。可选地，也可以把经过稳定的亚氯酸盐溶液与常规的免疫抑制剂结合使用。

- 给哺乳动物施用含有经过稳定的亚氯酸盐溶液的水溶液可以在抑制抗原特异性免疫反应的同时完全不危害到免疫系统，因为这一溶液也可以有效地增强吞噬细胞活性。因此，本发明包括用以治疗自身免疫疾病；
- 20 防止移植器官或移植物的排斥以及由此造成的脓毒性休克；以及减少不恰当免疫反应，如过度炎症或过敏反应的方法。由于已有其它公知的治疗这些失调症的方法，所以本领域技术人员能够根据本文所提供的方针，通过施用一有效抑制量的含有经过稳定的亚氯酸盐溶液的水溶液来
- 25 对已知的技术进行修改。例如，本领域技术人员可以设计用于治疗任何一种上述失调症的方法，通过使用本发明的经过稳定的亚氯酸盐溶液并改变剂量、给药频率、或给药方式进行治疗。

- 本发明治疗方法的一个优选实施方案需要给有需要的哺乳动物施用一种称为“四氯十氧阴离子复合物”（通常缩写为“TCDO”）的产品
- 30 的水溶液。这种物质可以使用实施例 1（美国专利第 4, 507, 285 号（“285”号专利））中所描述的步骤进行制备，它是一种清澈的水溶

液, 易与醇类相混合, 其熔点为 -3°C 。拉曼光谱显示 403, 802 的条带(亚氯酸盐)以及 1562 cm^{-1} (被激活的氧)。本领域技术人员应该认识到任何一种经过化学稳定的亚氯酸盐溶液都可以被用于本发明的方法中, 而且也应认识到本发明的范围并不局限于使用“285”专利中所描述的产品。

经过上面综合的描述之后, 通过参照下列的实施例可以更容易地理解本发明。下列实施例是示范性的, 并不是本发明的局限。在实施例中, “WF 10”指的是经过稳定的亚氯酸盐水溶液。

10 实施例 1

在实施本实施例及随后的实施例 2 至 4 中所采用的方法的细节可以参照 Fagnoni 等人, *Immunology*, 85: 467 - 74 (1995), 该文所公开的全部内容作为参照结合于此文。本实施例以及随后的实施例 2 至 4 阐明了经过稳定的亚氯酸盐溶液在防止由树突细胞介导的共刺激中所发挥的作用。

WF 10 对由树突细胞 (DC) 刺激的异源 (allogeneic) MLR 的影响

树突细胞、T 细胞及单核细胞是用 Fagnoni 等人所描述的方法获得的。为了评估 WF 10 对 DC 依赖性 T 细胞激活的影响, 在 DC 中有及没有 WF 10 存在的情形中用异源 MLR 激活新鲜分离的 CD4^{+} T 细胞。在含有 200 μl 完全培养基的 U 形底 96 孔板中把经过纯化的静息 CD4^{+} T 细胞 ($5 - 10 \times 10^{+}$ /孔) 与经过照射 (25 Gy) 的外源 DC 一起培养。在 37°C , 8 % CO_2 以及湿润的空气中维持 5 天。在收获前 19 小时, 用 1 μCi 脉冲输送 [^3H]胸腺嘧啶脱氧核苷 (6 - 7 Ci/mm, New England Nuclear, Boston MA)。将增殖细胞所结合的 [^3H]胸腺嘧啶脱氧核苷用闪烁计数器进行测量。把 WF 10 加入到由 DC 刺激的异源 MLR DC 中并在 4°C 保温约 3 分钟, 然后加入 CD4^{+} T 细胞。在不使用 WF 10 的样品中增殖的 T 细胞的数目以及在使用 WF 10 的样品中增殖的 T 细胞的数目示于图 2 中。图 2 中所示的结果是一式四份的培养基的平均值 $\pm$ SEM, 数据代表的是四次实验的结果。

如图 2 中所示, 对由 DC 刺激的异源 MLR 产生反应的 CD4^{+} T 细

胞以依赖于剂量的形式由 WF 10 所抑制。在时间 0 把剂量为 25 $\mu\text{g/ml}$ 或 50 $\mu\text{g/ml}$ 的 WF 10 加入到培养基中。如图 2 中所示, 显然每个孔中树突细胞 (DC) 的数目增加了, CPM + SE (每分钟的计数 + 标准偏差) 的数目大致保持不变, 其中 WF 10/1600 达到最大程度的抑制效果。用语
5 WF 10/数目代表的是 WF 10 的稀释倍数, 同时表示每毫升溶液中所含的 WF 10 的数量。例如, WF 10/1600 代表的是每 1600 毫升溶液含有 1 毫升 WF 10 的 WF 10 稀释液。

实施例 2

10 WF 10 对由单核细胞刺激的外源 MLR 的影响

重复实施例 1, 只是把其中的 DC 替换成粘附性单核细胞, 后者是依照 Fagnoni 等人的方法获得的。结果示于图 3 中。结果显示 WF 10 可以有效地抑制从由 MLR 刺激的单核细胞中增殖出 CD4^+ T 细胞。实际上, 当施用 WF 10/1600 时, 其中的经过稳定的亚硝酸盐溶液可以有效地
15 完全抑制由异源 MLR 刺激的单核细胞增殖 CD4^+ T 细胞, 尽管每一孔中单细胞的浓度不断升高。

因此, 实施例 1 及 2 中的结果示明 WF 10 可以有效地抑制从由外源 MLR 刺激的 DC 及单核细胞中增殖 CD4^+ 细胞。

20 实施例 3

实施例 3 及 4 是用以确定 WF 10 对由各种不同抗原诱导的 T 细胞增殖的影响。在这一实施例中, 在含有 200 μl 完全培养基的 U 形底 96 孔板中把经过纯化的静息 CD4^+ T 细胞 ($5 - 10 \times 10^4/\text{孔}$) 与经过照射 (25 Gy) 的自体 DC 一起培养。在 37 $^\circ\text{C}$, 8 % CO_2 以及湿润的空气中
25 将培养物培养 6 天。在收获前 19 小时用脉冲给培养基输送 1 μCi [^3H] 胸腺嘧啶核苷 (6 - 7 Ci/mm, New England Nuclear, Boston MA)。用 β - 闪烁计数器测量增殖细胞所结合的 [^3H] 胸腺嘧啶核苷的数量。

在自体的 DC 中加入钥孔血蓝蛋白 (KLH) 以及破伤风毒素 (TT)。在不加 WF 10, 加入 WF 10/200 以及 WF 10/800 (分别代表
30 在时间 0 在培养基中加入 0、1 ml/200 ml 以及 1 ml/800 ml 的 WF 10 溶液) 以确定在 DC 没有呈递抗原、TT、KLH 25 (25 $\mu\text{g/ml}$) 以及 KLH

50 (50 $\mu\text{g/ml}$) 时 CD4^+ T 细胞的增殖情况。在没有使用 WF 10 以及使用了 WF 10 的样品中所增殖的 T 细胞的数目示于图 4 中。图 4 中所示的结果代表的是一式四份的培养基的平均值 $\pm$ SEM, 数据代表的是四次实验的结果。

- 5 如图 4 中所示, 当 DC 呈递可溶性抗原 KLH 及 TT 时, CD4^+ T 细胞有显著的增殖。然而, WF 10 的给药, 在 DC 呈递 KLH 或 TT 时, 几乎完全抑制了 CD4^+ T 细胞的增殖。

实施例 4

- 10 重复实施例 3, 只是把其中的 DC 替换成单核细胞, 用于抗原呈递。另外, 所施用的 WF 10 按照 WF 10/200、WF 10/400、WF 10/800 以及 WF 10/1600 递增。结果示于图 5 中。如图 5 所示, 当单核细胞呈递可溶性抗原 KLH 及 TT 时, CD4^+ T 细胞有显著的增殖。然而, WF 10 的给药, 在单核细胞呈递 KLH 或 TT 时, 几乎完全抑制了 CD4^+ 细胞的增殖。
- 15

- 通过施用含有经过稳定的亚氯酸盐溶液的水溶液所获得的结果揭示了它可以抑制抗原特异性免疫反应。已有报导指出施用含有经过稳定的亚氯酸盐溶液的水溶液可以有效地增强吞噬活性。因此, 现在可以通过仅施用一种药物来在抑制一种类型免疫反应 (抗原呈递及 T 细胞增殖) 的同时增强另外一种类型的免疫反应 (吞噬作用) 。
- 20

实施例 5

- 在 San Francisco General Hospital 进行了二期试验。在研究中, 用 18 名患者对 WF - 10 的吞噬作用进行公开标记研究。给患者每天输注 1 小时的 WF - 10, 输注一周, 然后休息两周。在第三周继续给患者每天输注 1 小时 WF - 10, 输注一周, 然后再休息两周。所研究的参数包括巨噬细胞激活/功能性免疫性激活以及 HIV 病毒负荷的测量值。RBC 溶血评估研究包括 51 例 Cr - RBC 存活研究, 与血红蛋白、触珠蛋白以及网状细胞的数值的变化进行比较。
- 25

- 30 在 18 名患者中都没有观察到副作用。汇总了八名患者的数据并列于下表中, 并在图 6 - 13 中进行解释。用流式细胞仪 (FACSCAN, 如由

Becton - Dickinson 所推荐的)测得的下列与药物施用有关的参数有急剧的增加,这些参数为 CD - 4, CD - 8, $CD14^+/CD69^+$, $CD14^+$ /侧散, $CD20/DR^+$ 细胞, 它们的变化通常在给药后两周内返回到接近基线。有几个数值贯穿整个研究过程一直在升高, 在研究终点没有显示下降的趋势, 它们可能代表那些由 WF - 10 诱导的长期变化。这些变化包括巨噬细胞吞噬作用指数的升高以及 T 细胞 $CD3^+/CD8^+/CD28^-$ 亚群的增加。

在下列类别中有潜在的下降趋势: 巨噬细胞胞内 TNF - α 分泌, 以及循环中 $CD14^+/DR^+$ 细胞数目的减少。已有报导指出当循环中的 $CD14^+/DR^+$ 细胞下降到阈值时, 将导致免疫瘫痪。T 细胞 PHA 激活值或 HIV 负荷(由 HIV bDNA 化验测得)没有明显变化(大部分患者在整个研究过程中测不到 HIV)。RBC 存活研究的结果显示并没有因为对治疗产生反应而导致溶血。

如图 6 中所示, WF 10 的给药导致 $CD14^+/CD69^+$ 细胞的增加, 在输注后立即有戏剧性的增加。图 7 显示在施用 WF 10 之后 $CD14^+/TNF$ 分泌减少, 从而表明经过稳定的亚氯酸盐溶液可以有效地减少肿瘤坏死因子细胞因子的分泌。

图 8 及 9 显示给患者体内施用 WF 10 导致 $CD3^+/CD8^+$ 数目的稳定增加以及 $CD3^+/CD8^+/CD28^-$ T 细胞数目的稳定增加。上述的体外实验数据显示用 $CD4^+$ T 细胞来抑制抗原的呈递, 而图 8 及 9 则显示循环中 $CD28^-$ T 细胞 ($CD3^+$ T 细胞)数目的增加。图 10 显示在施用 WF 10 之后吞噬作用指数的升高。图 11 显示在施用 WF 10 之后, 因为 $CD4^+/DR^+$ 细胞的减少而导致免疫功能的减少。这样, 本发明者相信本发明的经过稳定的亚氯酸盐溶液可以增强吞噬作用, 而且同时可以减弱或抑制由细胞介导的及体液免疫反应。

列于下表中的结果概括了 15 个患者的结果并显示了所测量的各种不同参数在治疗的第 8 天至第 47 天之间的变化。第 8 天代表施用 WF 10 的第一天, 因为治疗的前 7 天致力于对患者进行评估。

所测量的参数	p - 值*	方向
CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD28 ⁻	0.027	增加
CD14 ⁺ , TNF ⁻	0.017	减少
CD14 ⁺ , DR ⁺	0.032	减少
CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD38 ⁺ (MF CD38 抗原)	0.021	减少
CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD28 ⁺ (MF CD28 抗原)	0.010	减少
CD20 ⁺ , DR ⁺ (MF DR 抗原)	0.014	减少
所有的 CD14 ⁺	0.037	减少

* 单向 p - 值, 从 15 个患者取样, 使用 Wilcoxon 秩统计量。

- 5 这些数据显示在人体内施用 WF 10 可使 CD8⁺ T 细胞的 CD28⁻ 亚群的产量增加。数据同时还显示巨噬细胞激活的增加导致吞噬作用。数据进而显示没有 RBC 溶血的迹象。结合显示抑制抗原呈递给 CD4⁺ 细胞的体外研究, 可以相信在体内施用 WF - 10 可抑制及/或防止抗原在 APC 中的呈递, 并且可以刺激巨噬细胞的激活, 从而增强吞噬作用。

实施例 6

- 10 根据上述的体内实验数据可以发现, 施用 WF 10 可以持续地减少 CD14⁺/DR⁺ 细胞并具有统计显著性。另外, 在体内施用 WF 10 可使 CD3⁺/CD8⁺/CD28⁺ 细胞全面减少, 并使 CD3⁺/CD8⁺/CD28⁻ 细胞能够长期地显著地增加。上述的体外实验数据同时还显示 WF 10 可以有效地抑制及/或防止抗原的呈递。抗原呈递的减少在抑制淋巴增生性疾病, 具体地抑制 B 细胞淋巴瘤的过程中可能发挥着重要作用, 因此, WF 10 治疗被期望可以有效地治疗淋巴瘤。与这一期望一致的是, 当用 WF 10 治疗一个患有 B 细胞淋巴瘤的患者时, 患者的肿瘤尺寸显著地减少, 迄今仍没有复发。

- 20 从患有低级滤泡性淋巴瘤的成年患者中根据他们接受此种治疗的情况进行挑选。在治疗前用 CT 扫描确定患者淋巴结的尺寸, 选出 15 名淋巴结直径大于 1 cm 的患者进行公开标记, 单臂 (Singlt arm), 单心 (Single center) 的研究。患者在第 1 至 5 天 (第一周) 及第 8 至 12 天 (第二周) 定期输注 0.5 ml/mg WR 10。在筛选评估完成后 (大约 14 天

后) 在第 0 周对符合条件的患者进行研究前调查以获得基线数据。

筛选标准包括:

十八岁以上的男女患者;

已通过组织学方法确定为滤泡性淋巴瘤的;

5 可测量的疾病, 定义为通过 CT 测量, 其淋巴结直径大于 1 cm 的;

足够的肾功能, 由血清肌酸酐 < 2 倍制度上的 ULN 证明;

足够的肝功能, 由血清肝血素 ≤ 1.5 mg/gl 及 SGOT (AST) 或 SGPT (ALT) < 5 倍制度上的正常上限 (ULN) 证明;

参加这一研究并愿意遵从所有步骤及预订调查的书面允诺;

10 女性血红蛋白 > 9.0 g/dl, 男性血红蛋白 > 10.0 g/dl;

血小板计数 $> 75,000/\text{mm}^2$; 以及

嗜中性粒细胞绝对计算 $> 750/\text{mm}^2$ 。

按照 0.5 ml/kg 体重的剂量把 WF 10 稀释到 250 至 500 ml 正常的生理盐水中, 然后静脉输注 1 小时。在第 0 周、第 15、30 及 45 天用 CT
15 测量以确定肿瘤的尺寸。随后持续 3 个月, 最后在第 90 天用 CT 进行最终测量。

CT 的测量结果揭示了施用 WF 10 可使淋巴结的尺寸减少。患者的 $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+/\text{CD28}^-$ 增加, $\text{CD14}^+/\text{DR}^+$ 以及 CD40 T 细胞亚群也增加。

虽然已经参照实施例及具体的优选实施方案对本发明进行了详细的
20 描述, 但是本领域技术人员可以理解可以对本发明进行各种不同的修改而不致脱离本发明的实质和范围。所有上面提到的文献都作为参照结合于本文中。于 1997 年 10 月 6 日提交的美国临时专利 60/060,953 中说明书的全部具体内容特别地作为参照结合于本文中, 上述临时专利已经根据 USC § 119 提出利益要求。

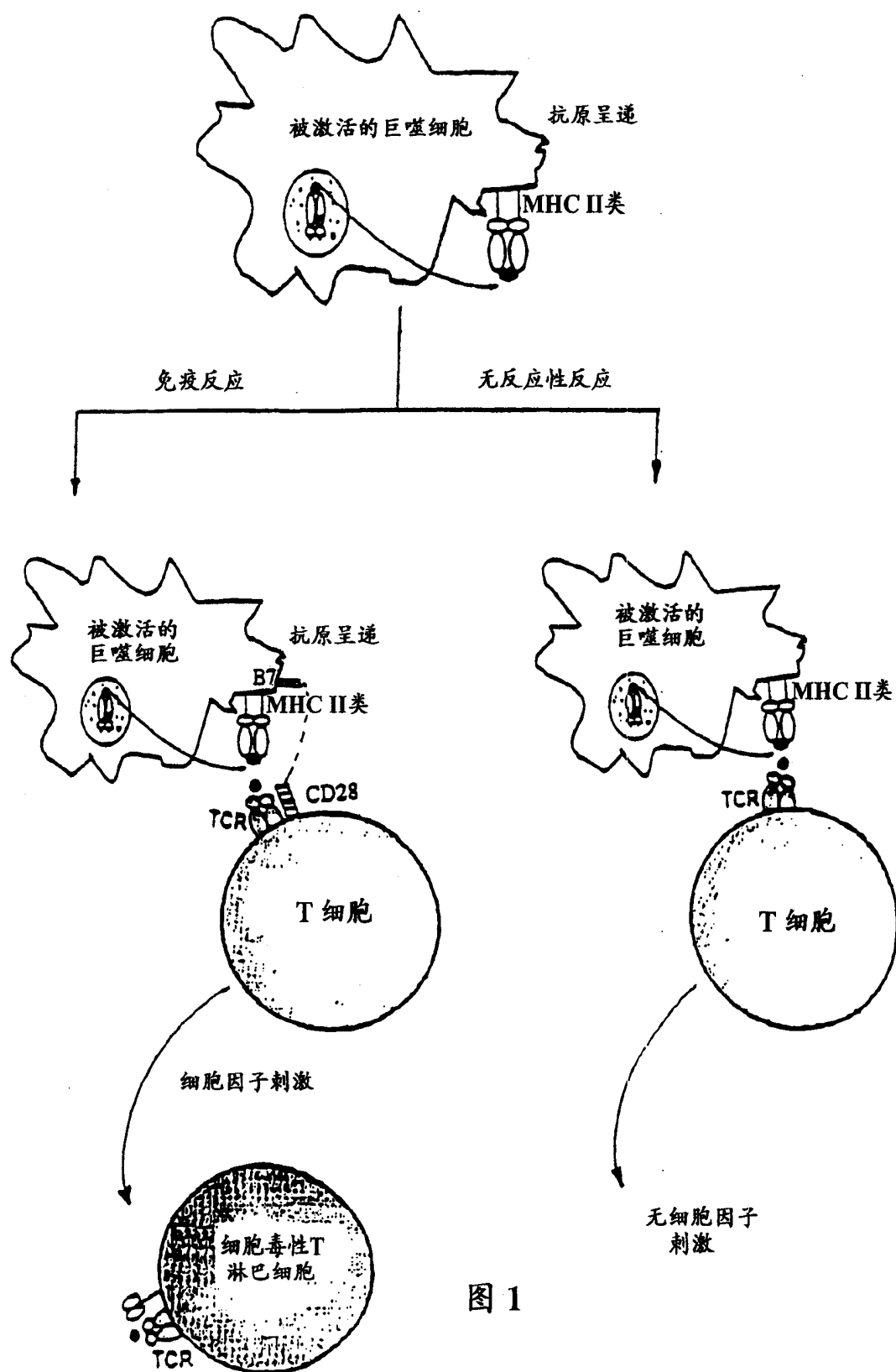


图 1

WF10 对由 DC 刺激的异源 MLR 的影响

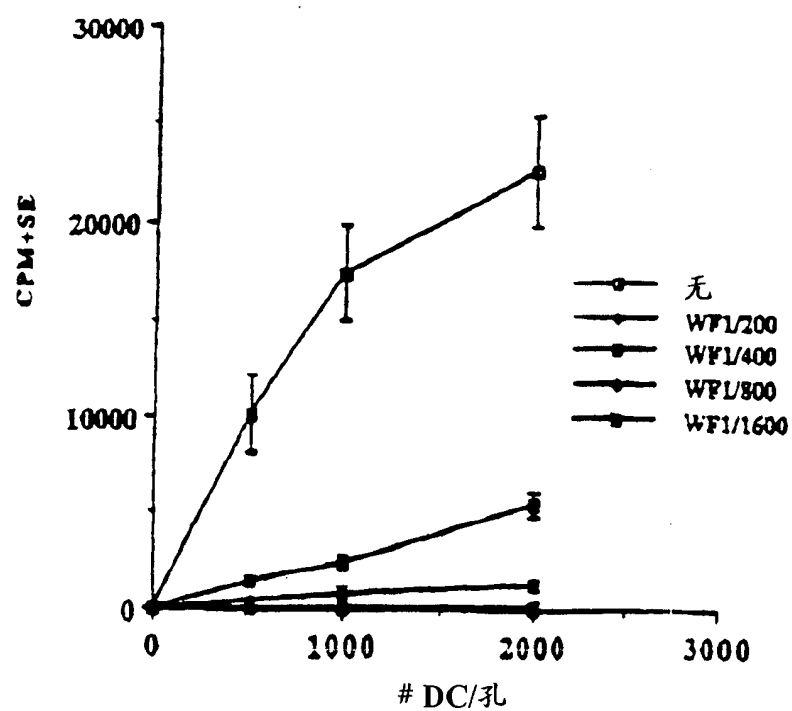


图 2

WF10 对由单核细胞刺激的异源 MLR 的影响

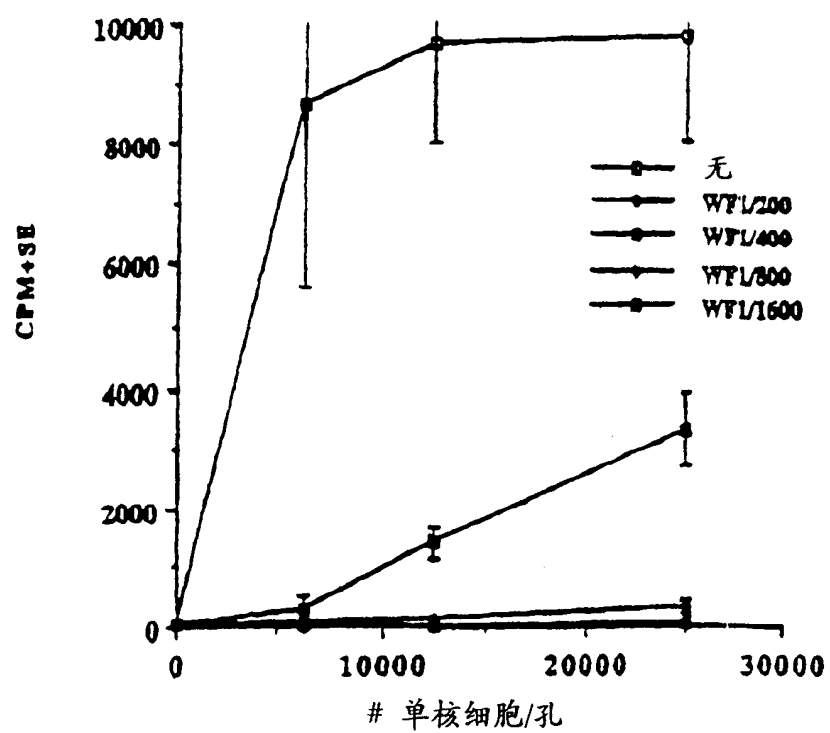


图 3

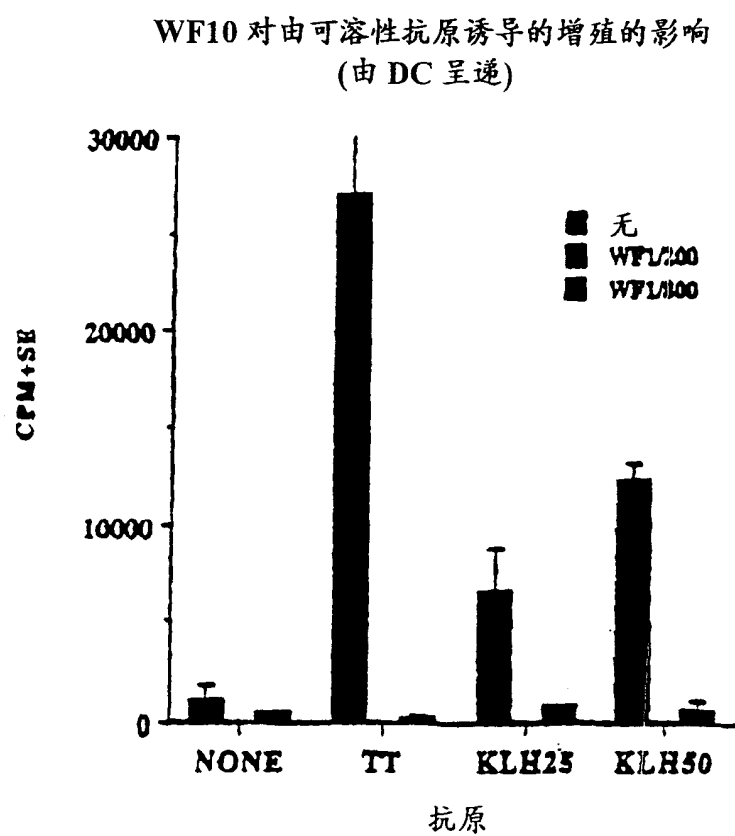


图 4

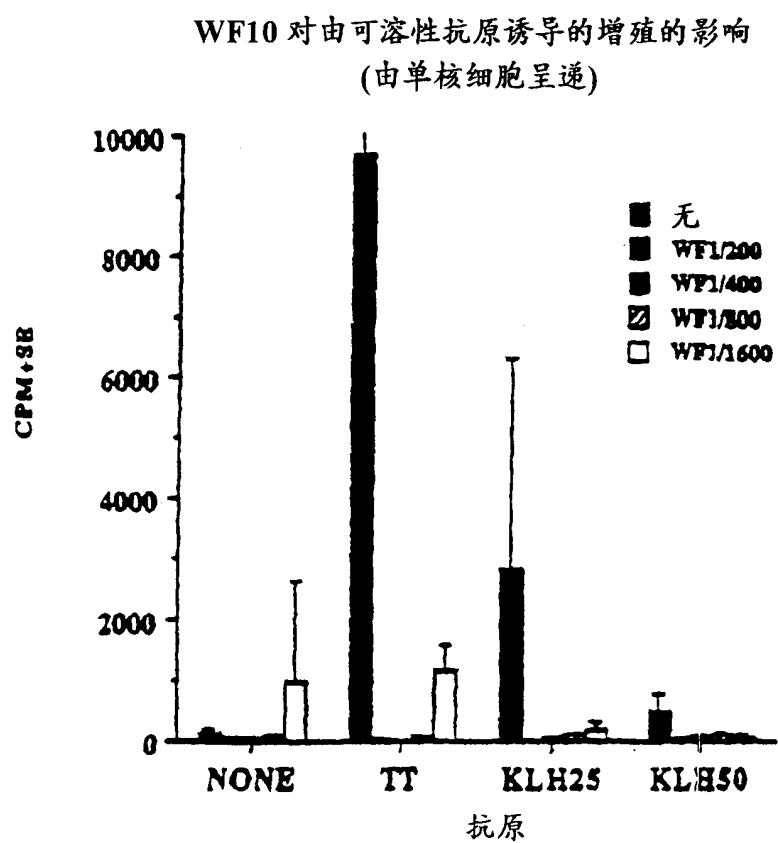
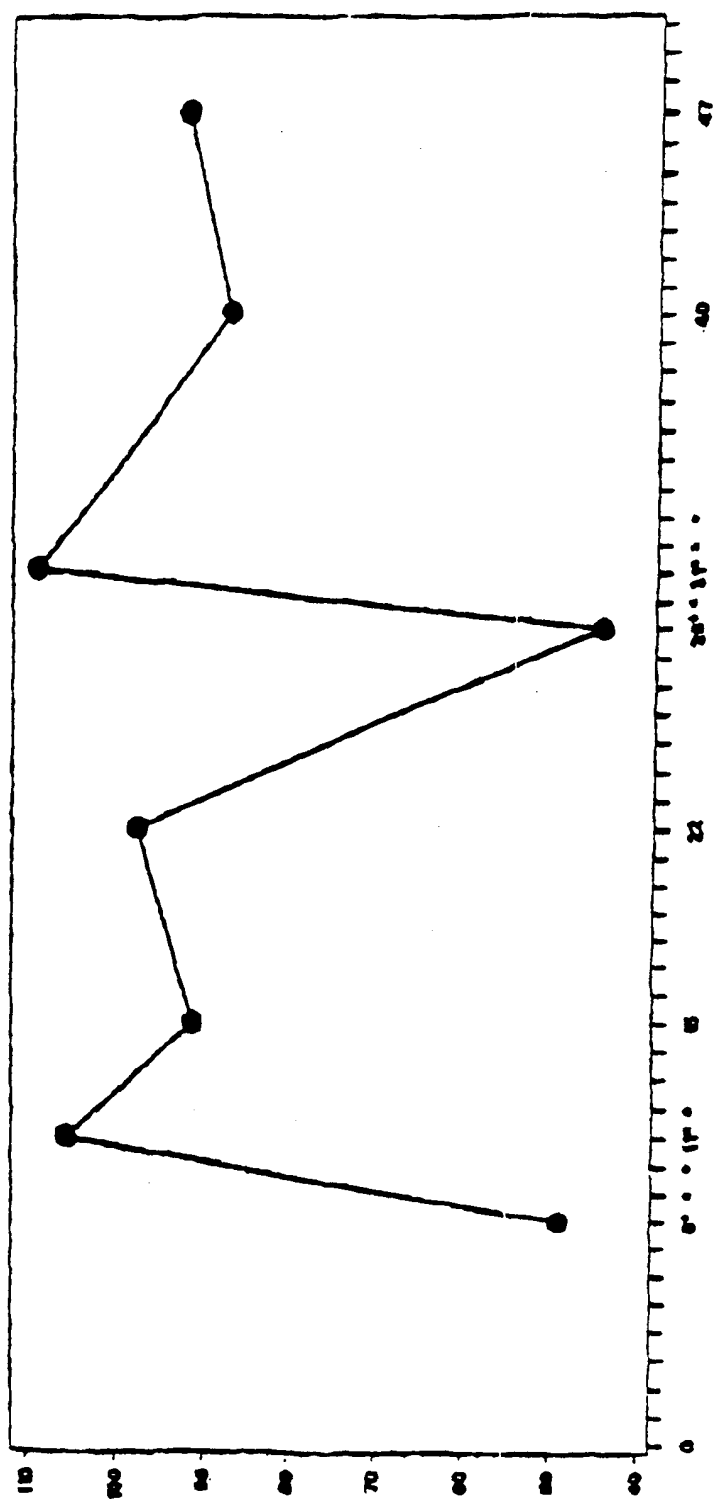


图 5

平均免疫函数 - CD14⁺, CD69⁺ (细胞数/uL), 由调查天数确定[1]



调查天数

图 6

CD14⁺, CD69⁺ 平均绝对值(细胞数/uL)

平均免疫函数 - $CD14^+$, TNF (细胞数/uL), 由调查天数确定 [1]

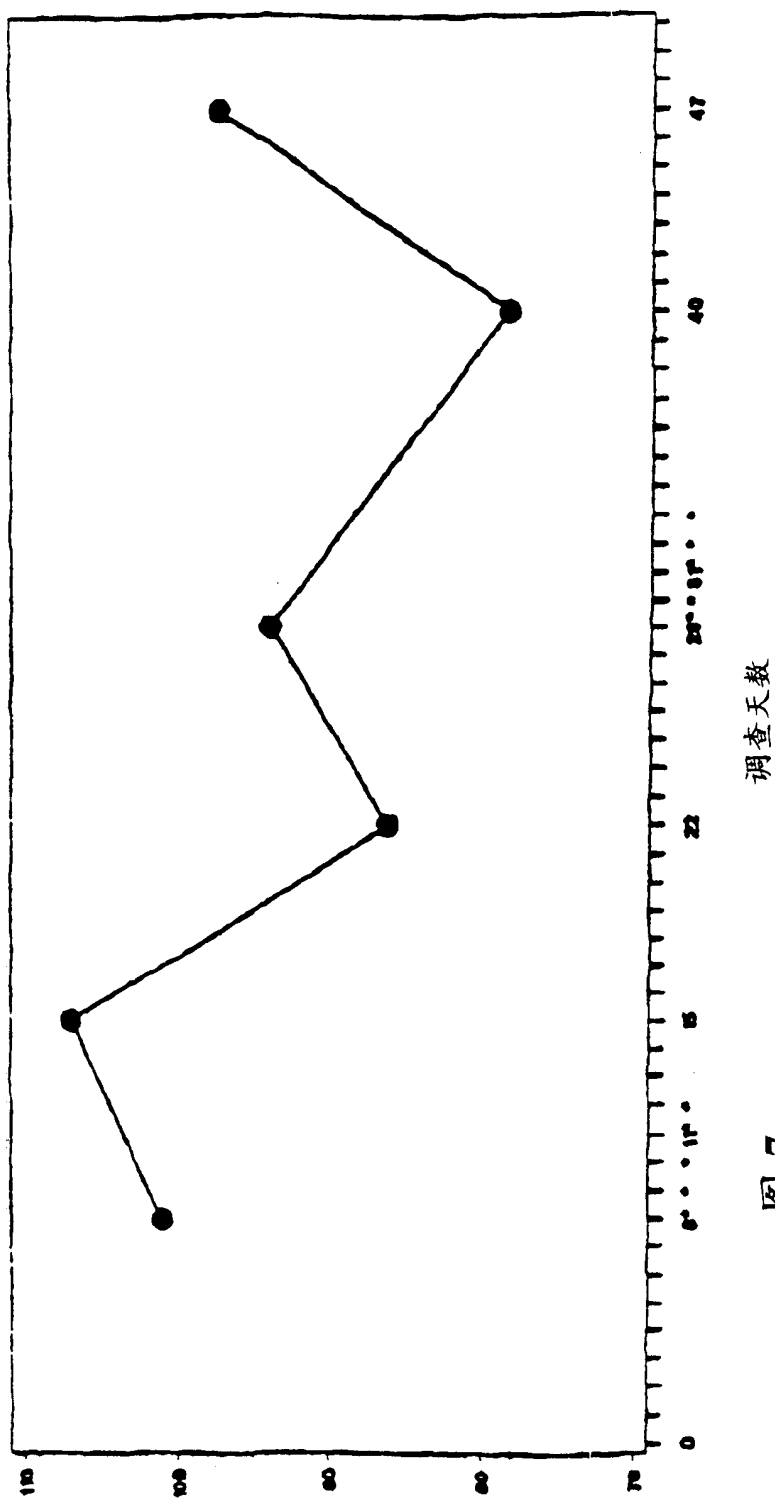


图 7

$CD14^+$, TNF 的绝对平均值(细胞数/uL)

平均免疫函数 - $CD3^+$, $CD5^+$, $CD28^-$ (细胞数/uL), 由调查天数确定 [1]

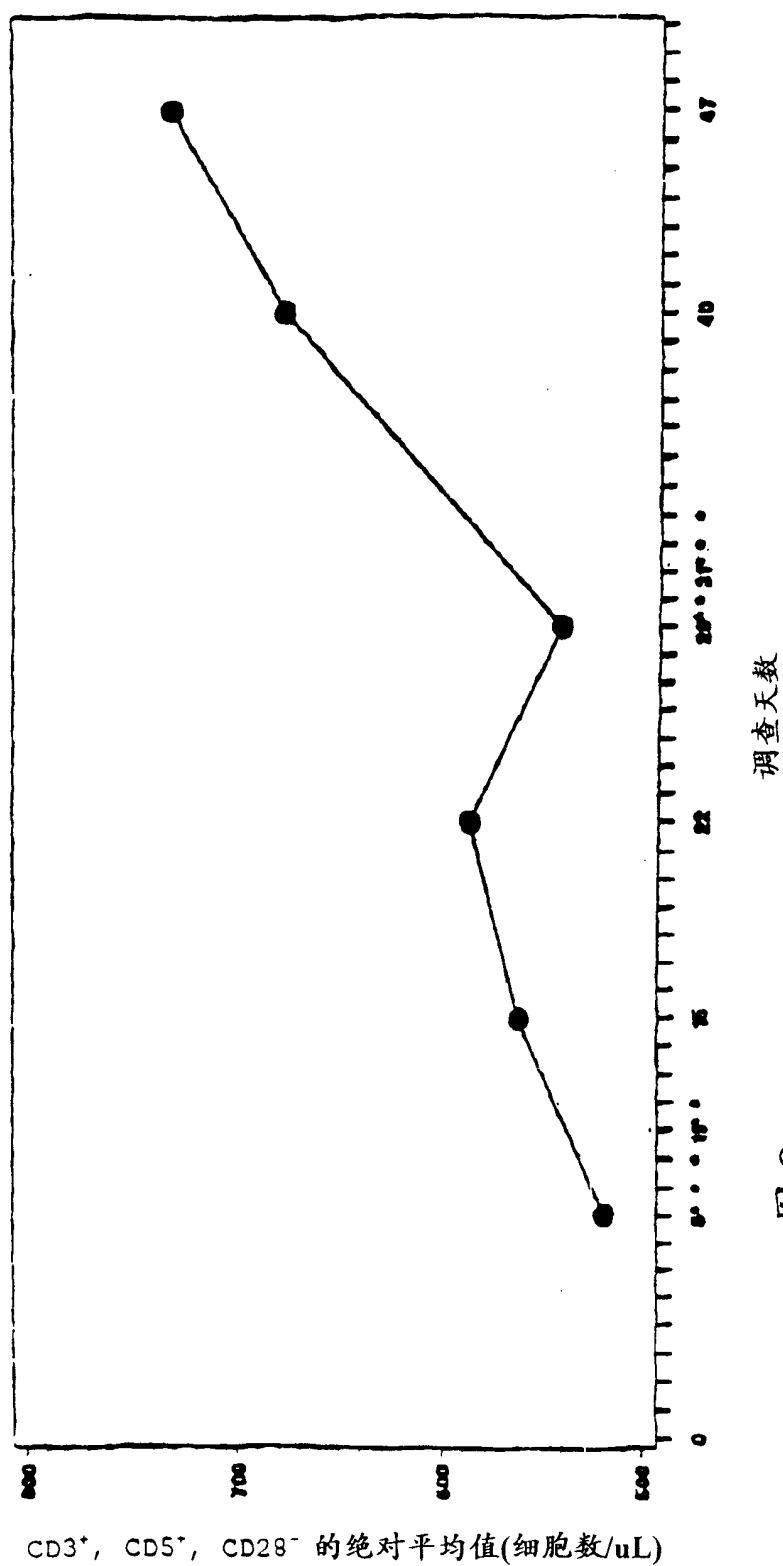


图 8

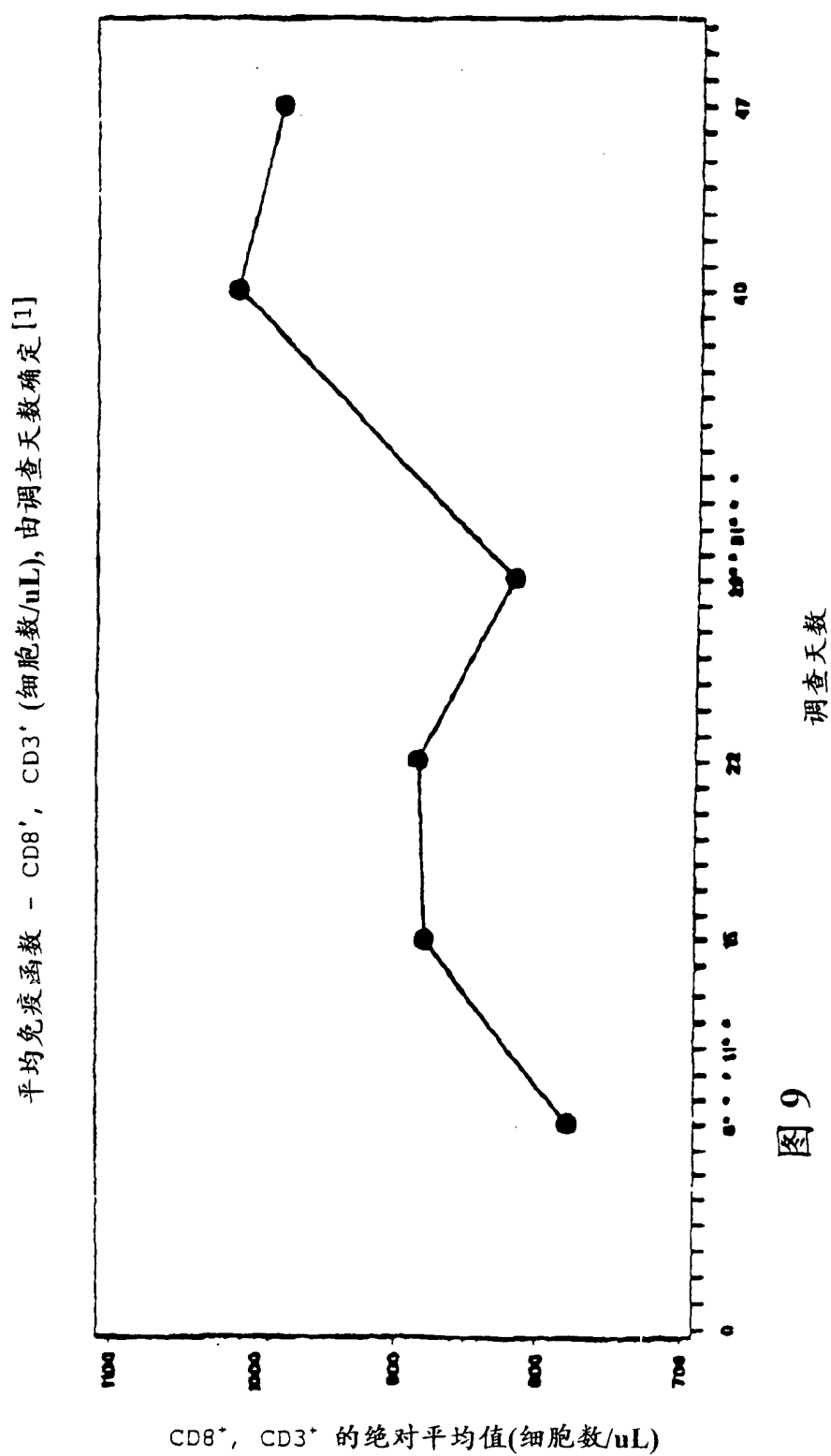


图 9

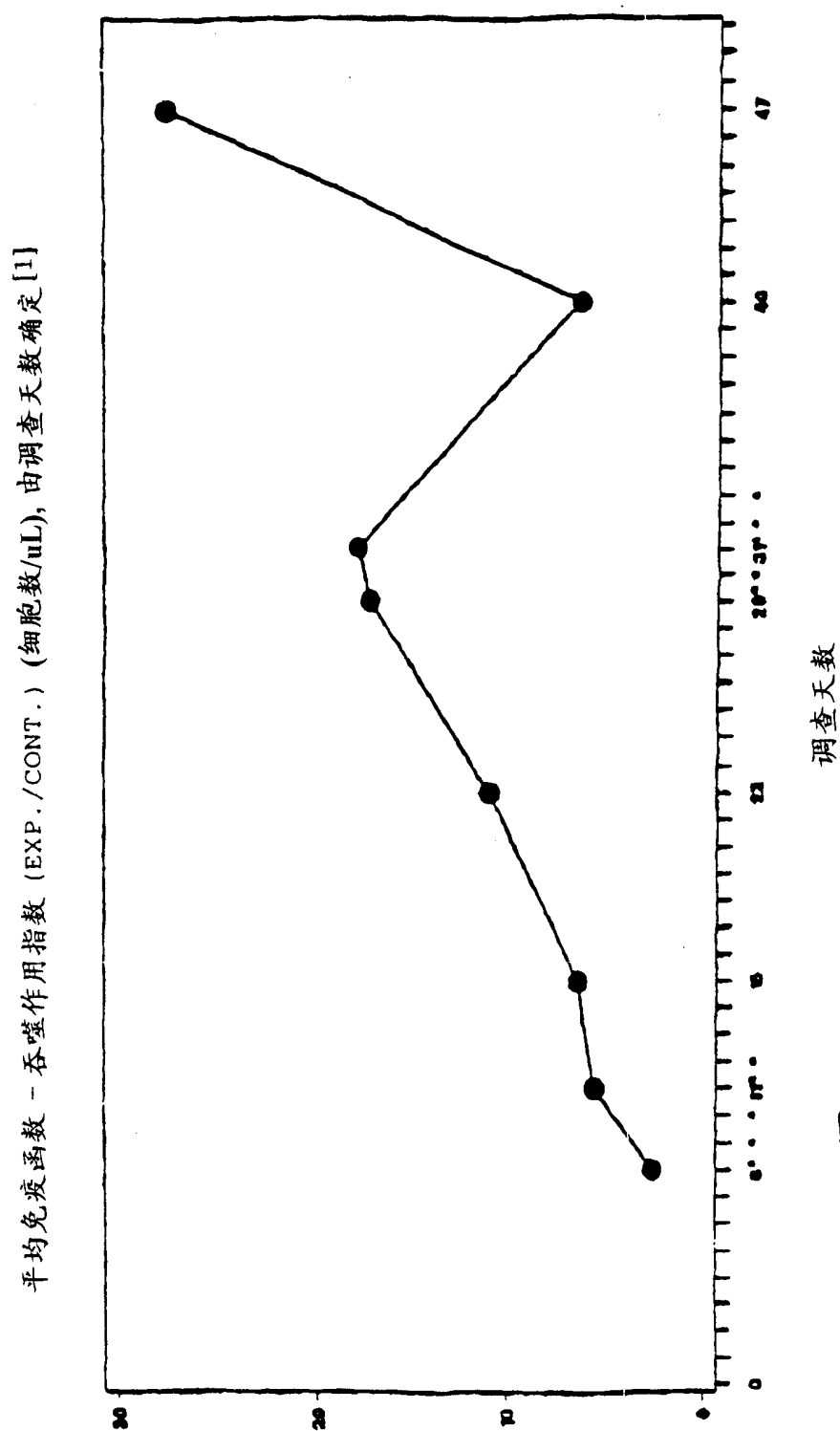


图 10

吞噬作用指数的绝对平均值(EXP.CONT.)(细胞数/uL)

平均免疫函数 - $CD14^+$, DR^+ (细胞数/uL), 由调查天数确定 [1]

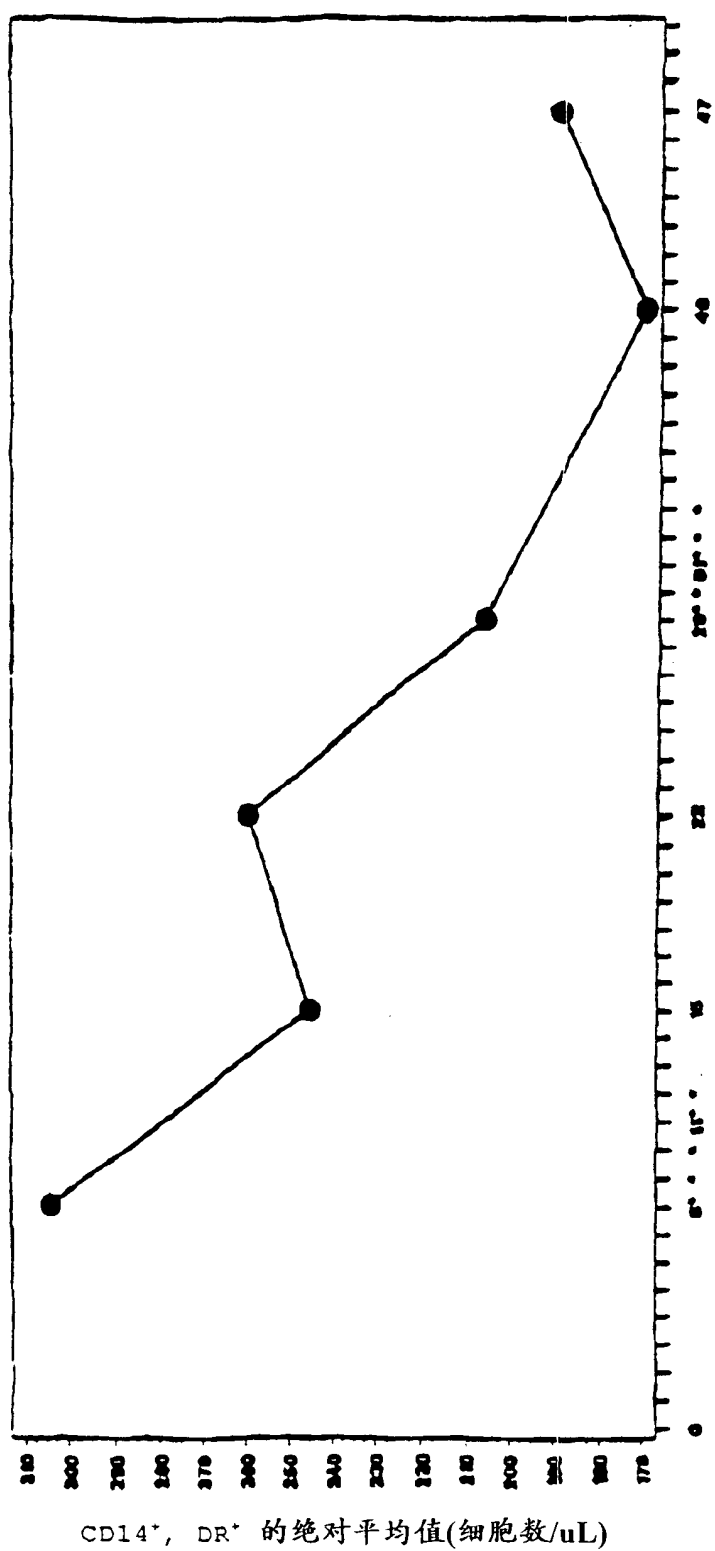


图 11

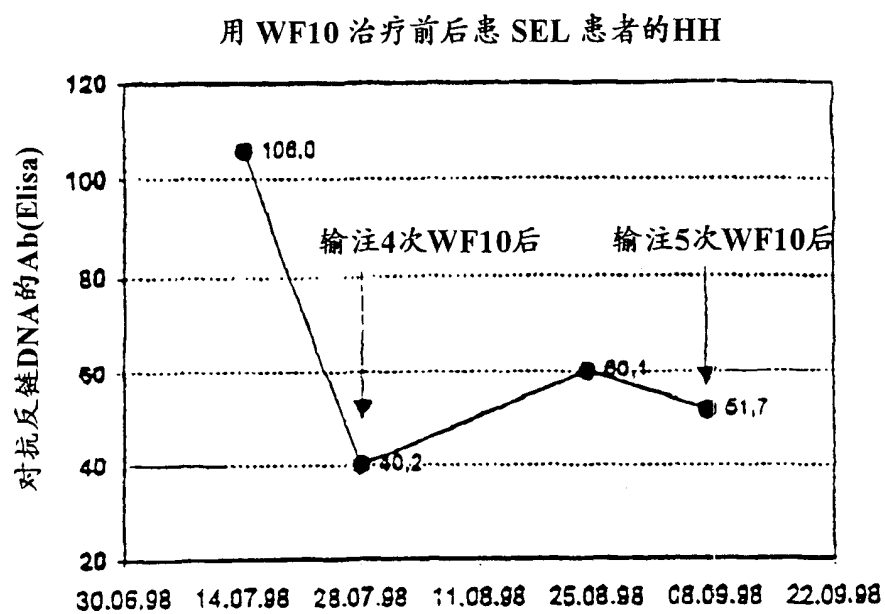


图 12