

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780018614.0

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 6 月 3 日

[11] 公开号 CN 101448528A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

[22] 申请日 2007.5.15

[21] 申请号 200780018614.0

[30] 优先权

[32] 2006.5.15 [33] US [31] 60/800,029

[86] 国际申请 PCT/IB2007/001264 2007.5.15

[87] 国际公布 WO2007/132338 英 2007.11.22

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.21

[71] 申请人 埃克斯生物科技公司

地址 美国德克萨斯州

[72] 发明人 J·赛玛德

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民 路小龙

权利要求书 4 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称

白细胞介素-1 α 免疫诱导预防动脉粥样硬化的自身抗体

[57] 摘要

本发明涉及白细胞介素-1 α 免疫诱导预防动脉粥样硬化的自身抗体。用 IL-1 α 免疫哺乳动物引起哺乳动物产生 IL-1 α 自身抗体，可用于降低哺乳动物动脉粥样硬化相关疾病的风险和严重程度，或降低其进展。使用这种治疗，可降低动脉粥样硬化相关疾病如外周缺血性心脏病、冠状动脉疾病、脑血管疾病和外周动脉的疾病的进展。

1. 白细胞介素-1 α 在制备降低哺乳动物动脉粥样硬化相关疾病的风险和严重程度的药物中的用途。
2. 编码 IL-1 α 的重组病毒在制备降低哺乳动物动脉粥样硬化相关疾病的风险和严重程度的药物中的用途。
3. 与 IL-1 α 化学连接的病毒样颗粒在制备降低哺乳动物动脉粥样硬化相关疾病的风险和严重程度的药物中的用途。
4. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的用途，其中所述哺乳动物选自鼠、猪、山羊、狗、猫和绵羊。
5. 根据权利要求 3 所述的用途，其中所述哺乳动物是小鼠，并且所述小鼠是 ApoE^{-/-}。
6. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的用途，其中所述哺乳动物是人。
7. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的用途，其中所述动脉粥样硬化相关疾病是外周动脉疾病。
8. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的用途，其中所述动脉粥样硬化相关疾病是外周缺血性心脏病。
9. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的用途，其中所述动脉粥样硬化相关疾病是冠状动脉疾病。
10. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的用途，其中所述动脉粥样硬化相关疾病是脑血管疾病。

11. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的用途，其中所述动脉粥样硬化相关疾病是外周动脉的疾病。

12. 根据权利要求 1 或权利要求 3 所述的用途，其中所述 IL-1 α 是重组 IL-1 α 。

13. 根据权利要求 2 或权利要求 12 所述的用途，其中所述重组 IL-1 α 是鼠的或人的。

14. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述 IL-1 α 是与载体相连的。

15. 根据权利要求 14 所述的用途，其中所述载体是结核菌素的纯化蛋白质衍生物(PPD)。

16. 根据权利要求 1、权利要求 2 或权利要求 3 所述的用途，其中所述 IL-1 α 在佐剂存在下使用。

17. 根据权利要求 16 所述的用途，其中所述佐剂是氢氧化铝。

18. ApoE^{-/-}小鼠，其用 IL-1 α 免疫。

19. ApoE^{-/-}小鼠，其包括 IL-1 α 自身抗体。

20. 治疗哺乳动物以降低动脉粥样硬化相关疾病的风险和严重程度的方法，其包括用 IL-1 α 免疫所述哺乳动物。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述哺乳动物选自小鼠、猪、山羊、狗、猫和绵羊。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述哺乳动物是小鼠，且所述小鼠是 ApoE^{-/-}。

23. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。

24. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述动脉粥样硬化相关疾病是外周动脉疾病。

25. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述动脉粥样硬化相关疾病是外周缺血性心脏病。

26. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述动脉粥样硬化相关疾病是冠状动脉疾病。

27. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述动脉粥样硬化相关疾病是脑血管疾病。

28. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述动脉粥样硬化相关疾病是外周动脉的疾病。

29. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述哺乳动物用重组 IL-1 α 免疫。

30. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述重组 IL-1 α 是鼠的或人的。

31. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述哺乳动物用与载体相连的 IL-1 α 免疫。

32. 根据权利要求 31 所述的方法, 其中所述载体是结核菌素的纯化蛋白质衍生物(PPD)。

33. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述哺乳动物在佐剂存在下用 IL-1 α 免疫。

34. 根据权利要求 33 所述的方法，其中所述佐剂是氢氧化铝。

35. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述哺乳动物用编码 IL-1 α 的重组病毒免疫。

36. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述哺乳动物用与 IL-1 α 化学相连的病毒样颗粒免疫。

白细胞介素-1 α 免疫诱导预防动脉粥样硬化的自身抗体

【0001】本申请要求2006年5月15日提交的序列号 60/800,029的权益，并通过引用将其引入。

发明背景

【0002】白细胞介素-1 α (IL-1 α) 被很好地表征为炎症的主要介质 (primary mediator)，并且其在炎症相关疾病中的作用已在几个动物模型中得到暗示。在普通人群中已经相对较高频率地检测到抗白细胞介素 (IL)-1 α 的人IgG自身抗体 (autoantibodies, aAb)。事实上，据报道20%以上的表面健康的人具有高度特异性的IL-1 α aAb。虽然对携带天然IL-1 α aAb的男性的观察已表明内源性IL-1 α 的中和性在降低炎症相关疾病——如动脉粥样硬化或风湿性关节炎——进展风险中的作用，但是，这些研究没有排除在这些个体内存在其它的自身抗体，并且，一直难以建立因果关系，这些抗IL-1 α 抗体的生理作用还没有明确确定。

附图简述

【0003】图1 C57BL/6小鼠三次皮下注射在明矾中的IL-1 α -PPD偶联物后，在第56天在C57BL/6小鼠中抗IL-1 α 自身抗体的形成 (◆)。对照小鼠仅用在明矾中的PPD免疫 (■)。

【0004】图2 抗体依赖性补体介导的EL-4细胞杀伤。EL-4细胞与连续稀释的小鼠抗小鼠IL-1 α 多克隆抗血清一起温育。死亡细胞与活细胞的比例与血清浓度成正比。人抗小鼠IL-1 α 单克隆抗体作为阳性对照。与小鼠血清温育或仅与培养基温育作为两个阴性对照。

发明详述

【0005】ApoE^{-/-}小鼠具有工程改造的脂类运输缺陷 (lipid transport defect)，该脂类运输缺陷导致在主动脉中动脉粥样硬化样斑块快速发展。这些小鼠被认为是人类动脉粥样硬化最有说服力的模型 (most compelling model)，因为它们是高胆固醇血的，并自然地发展成动脉病变。ApoE^{-/-}小鼠也因此被广泛用作研究动脉粥样硬化和进行治疗的模型系统。

【0006】本发明提供了IL-1 α 的抗体中和的动物模型，其可通过例如对ApoE^{-/-}小鼠进行抗IL-1 α 的免疫来获得。所有被免疫的动物会产生抗IL-1 α 的IgG aAb，其会保持在高水平。来源于免疫小鼠血清的IL-1 α aAb抑制IL-1 α 与IL-1 α 反应性鼠T细胞系NOB-1的结合，并在体内中和IL-1 α （而不是IL-1 β 诱导的IL-6）。

【0007】被喂食高脂肪饮食的对照ApoE^{-/-}小鼠在主动脉里形成动脉粥样硬化样病变。该病变的标志是巨噬细胞浸润、坏死性核和具有不同量细胞外基质的平滑肌细胞增殖。与此相比，进行抗IL-1 α 免疫的ApoE^{-/-}动物，其动脉粥样硬化病变的水平已大幅度降低，并产生惊人的对动脉粥样硬化进展的抗性。在免疫前已具有脂肪纹（动脉粥样硬化病变的开始）的小鼠中，用IL-1 α 免疫可以阻止动脉粥样硬化病变的发展，以使血管床保持基本健康。

【0008】在通过免疫产生的内源性IL-1 α 自身抗体存在的情况下，ApoE^{-/-}小鼠得以良好预防动脉粥样硬化相关疾病（如外周缺血性心脏病、冠状动脉疾病、脑血管疾病和外周动脉的疾病(peripheral arterial disease)）。因此，本发明提供了精致的动物模型 (elegant animal model)，其支持我们以前的临床观察：具有天然IL-1 α aAb的男性与不具有中和性IL-1 α aAb的男性相比，具有降低的动脉粥样硬化相关心脏疾病发病率。

【0009】由于已经发现天然产生IL-1 α aAb的人发生动脉粥样硬化的风险较小，所以很可能天然IL-1 α aAb可在中和血管内皮细胞中的IL-1 α 有害炎症作用方面发挥生理作用。因此，本发明还提供了治疗个体的方法，所述个体包括人类，其处于动脉粥样硬化相关疾病（如外周缺血性心脏病、冠状动脉疾病、脑血管疾病和外周动脉的疾病）发生的风险下，该方法是通过诱导对抗这些疾病的保护性IL-1 α 自身抗体实现的。在大约20

%没有明显的健康缺陷的人群中临床观察到IL-1 α 自身抗体，表明施用抗IL-1 α 的中和性自身抗体不会造成健康风险。此外，IL-1 α 敲除小鼠也显然是健康的，其支持了这种方法是安全的。因此，在人体内诱导IL-1 α aAb是降低动脉粥样硬化相关疾病的风险和严重性的安全有效的方法。

【0010】可使用本领域已知的任何免疫方法以在动物模型或哺乳动物（如猫、狗、绵羊、猪、山羊；优选人类）患者中达到期望的自身抗体反应（见下表）。

佐剂	实例
无机盐	氢氧化铝，磷酸钙，氢氧化铍
递送系统	不完全弗氏佐剂
细菌产物	完全弗氏佐剂，BCG，质粒
DNA	CpG 基序
免疫刺激复合物（Immune Stimulatory Complexes, ISCOMS）	含有病毒蛋白的Quil A混合物
细胞因子	GM-CSF, IL-12, IL-1, IL-2
重组病毒	流感病毒
病毒样颗粒偶联物	2/6 VLP，含有牛轮状病毒VP2和人轮状病毒VP6
重组细菌	减毒鼠伤寒沙门氏菌

【0011】在本公开内容中引用的所有专利、专利申请和参考文献通过引用明确引入于此。上述公开内容一般性地描述本发明。更加完整的理解可通过参考以下具体实施例获得，实施例只提供用于说明目的，而不企图限制本发明范围。

实施例 1
ApoE 敲除小鼠

【0012】ApoE^{-/-}小鼠取自Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME。只使用雄性动物，以避免性别对血管病变发生可能的影响；此外，进行观

察IL-1 α aAb在动脉粥样硬化进展中的保护作用的临床研究，这一点，只在男性中进行。使用10周龄小鼠，喂食高胆固醇含量膳食（1.25%的胆固醇、0%的胆酯；Research Diets, New Brunswick, NJ）。小鼠喂养该膳食10周，然后处死。采集血样，并灌注主动脉，分割成部分，然后按照标准方法固定或冷冻。

实施例 2

用鼠 IL-1 α 免疫

【0013】根据Svenson等, J Immunol Methods. 2000 Mar 6; 236(1-2):1-8所述方法，使用以0.41(w/w)的比率偶联至结核菌素纯化蛋白衍生物（PPD）的鼠IL-1 α 免疫小鼠。在尾基部皮下注射接种小鼠。重复接种3次，相隔三周。为了分析IL-1 α aAb，每次注射后2周从小鼠眼眶后丛（retroorbital plexus）取血。对照动物使用不含IL-1 α 的PPD溶液，按相同时间表接种。

实施例 3

分析

【0014】小鼠IgG对IL-1 α 的反应按照Svenson等人，2000所述进行测定。IL-1 α 对IgG的饱和结合分析如所述（Svenson等，J Clin Invest. 1993 Nov; 92(5): 2533-9）实施。同样的样本在蛋白G Sepharose柱和含Sephadex G-75特级的柱上平行运行（Svenson等，Cytokine. 1992 Mar;4(2):125-33），用以将与血清IgG结合的¹²⁵I-IL-1 α 同与血清的总结合进行比较。

【0015】按照Svenson等，2000中所述，利用NOB-1鼠T细胞系实施细胞受体分析。IL-1 α RIA和IL-6 ELISA也按照Svenson等，2000所述实施。

【0016】体内IL-6诱导按照Svenson等，2000所述实施。

实施例4

ApoE^{-/-}小鼠中天然抗IL-1 α aAb的缺乏

【0017】从15只10周到10个月大的ApoE^{-/-}小鼠得到的血清都为IgG抗

IL-1 α aAb阴性。

实施例 5

在 ApoE^{-/-}小鼠中产生 IL-1 α aAb

【0018】用偶联至PPD的IL-1 α 接种四次后，所有小鼠都具有高IL-1 α IgG aAb效价。在仅用PPD接种的对照小鼠血清中没有发现aAb。在接种后3个月，组间没有显著重量差异。

实施例6

诱导的 IL-1 α aAb 的表征

【0019】在检测到阳性小鼠接种后的2周和6周，收集血清。与血清结合的总IL-1 α 和与IgG结合的总IL-1 α 之间没有差异。 K_d 范围从0.1 nM到1.3 nM（例如，0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3 nM）。

实施例 7

诱导的抗 IL-1 α aAb 的表征

【0020】用RIA检测IL-1 α aAb。抗血清功能与Svenson等, 2000所公开的相似。

实施例 8

受体结合的抑制

【0021】¹²⁵I-IL-1 α 与鼠细胞系NOB-1的结合被所有接种两周后收集的aAb阳性血清抑制至少10%（例如，至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95%），并且如Svenson等, 2000所述进行检测。aAb-阴性对照作是阴性的。

实施例 9

IL-1 α 的体内中和

【0022】代表性抗血清的中和活性按照Svenson等, 2000所述检测。数据表明, IL-1 α aAb在NOB-1细胞中中和IL-1 α 活性。

实施例10

动脉粥样硬化病变的分析

【0023】在不同时间点杀死小鼠, 对动脉粥样硬化的程度进行评估。斑块沉积和动脉粥样硬化病变在主动脉根和胸腹主动脉中评定, 并根据标准化方法(例如: Trogan等, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 19; 99(4): 2234-9; Chaabane等, Invest Radiol. 2003 Aug;38(8):532-8) 量化。在IL-1 α 免疫的ApoE $^{-/-}$ 小鼠中, 主动脉根动脉粥样硬化病变区与ApoE $^{-/-}$ 对照小鼠相比, 显著降低(例如, 至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95%)。动脉粥样硬化病变的发展也在用苏丹(Sudan) IV染色的降主动脉的制品中检测。在IL-1 α 免疫的ApoE $^{-/-}$ 小鼠的腹部主动脉中, 嗜苏丹的脂富集病变的形成与它们同窝出生的对照组相比, 显著降低(例如, 至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85, 90或95%)。同样地, 与对照相比, 在IL-1 α 免疫的动物中, 主动脉弓部分中动脉粥样硬化病变的形成——其用苏木精-伊红染色后显现——显著减少(例如, 至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95%)。

【0024】对照ApoE $^{-/-}$ 小鼠的冠状动脉腔面积(luminal area), 与对照小鼠相比显著减少(例如, 至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95%)。主动脉根的组织学分析表明ApoE $^{-/-}$ 对照的心血管内膜中存在CD68-阳性细胞, 而IL-1 α 免疫的动物没有存在CD68-阳性细胞。

实施例 11

材料和方法

用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量抗 IL-1 α 抗体效价

【0025】人或鼠 IL-1 α 分别在 96 孔 ELISA 板上温育过夜，每孔用 0.5 μ g/ml 100 μ l 体积的量。板随后用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) + 0.05% 吐温 20 (Tween 20) 洗涤 4 次，然后用封闭液进行饱和，所述封闭液含有在 PBS + 0.05% 吐温 20 中的 1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)。在室温下，每孔使用 200 μ l 这种封闭缓冲液 1-2 小时。然后用 PBS+0.05% Tween 20 (PBST) 再洗涤板 4 次。100ml 连续稀释的血清样品 (在 PBST+1% BSA 中 1:2 稀释) 随后加入，并在室温下温育一小时或 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。然后再次用 PBST 洗涤板 4 次。然后加入辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 偶联的抗 Fc-抗体作为二抗 (在具有 1% BSA 的 PBST 中 1:2000 稀释，每孔加 100 μ l，1 小时，室温)。人：0.2 μ l 山羊抗人 IgG-HRP 在 400 μ l PBST+1% BSA 中。小鼠：0.5 μ l HRP 山羊抗小鼠 IgG (H+L)。然后，板再次用 PBST 洗涤 4 次。用 ABTS 缓冲液进行显色反应 (coloring reaction)。ABTS 缓冲液 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸, Sigma 目录号 A-1888, 150 mg; 0.1M 柠檬酸, Fisher anhydrous, 目录号 A-940, 500 毫升; 用 NaOH 颗粒将 pH 值调整到 4.35, 11ml 等分样品被保存在 -20 $^{\circ}$ C、40% SDS (80 g SDS 溶于 200 ml dd H₂O) 中，并添加 200ml DMF (N,N -二甲基甲酰胺))。向每个孔加 100 μ l ABTS 缓冲液。当良好对比度可见时，通过加入 100 μ l 2% 草酸溶液停止反应。然后，用 ELISA 读数器在波长 405nm 下测量光密度。

小鼠

【0026】ApoE $^{-/-}$ 小鼠从 Jackson 实验室 (Bar Harbor, Maine, B6.129P2-Apoe^{tmlUnc}7J 株) 获得。Apoe^{tmlUnc} 突变纯合小鼠表现出血浆总胆固醇水平的显著增加，这不受年龄或性别的影响。在 3 月龄时，在主动脉近端发现脂肪纹。病变随着年龄而发展，病变的发展伴随脂质减少和伸长的细胞增加，这是前动脉粥样硬化病变更晚期的典型特征。已报道在混合的 C57BL/6 $\times$ 129 遗传背景上携带这一突变的小鼠中甘油三酯水平适度增加。老年 ApoE 缺陷小鼠 (大于 17 个月) 已显示出在大脑中形成

黄瘤性病变 (xanthomatous lesion), 所述大脑大部分由结晶胆固醇裂隙、脂质小球和泡沫细胞组成。在脉络丛和腹穹窿中可见较小的黄瘤。最近的研究表明, ApoE缺陷小鼠具有对应激的改变的反应、受损的空间学习和记忆、改变的长时程增强和突触损伤。C57BL/6和SCID小鼠从Harlan (Horst, 荷兰)获得。

用与 PPD 偶联的 IL-1 α 和 IL-1 β 免疫小鼠

【0027】IL-1 α 和IL-1 β 从eBioscience (San Diego, CA) 获得。PPD从Statens Serum Institute (Copenhagen, Denmark) 获得。偶联方法改编自Svenson等(Svenson M. 2000)。IL-1 α 和IL-1 β 在4 $^{\circ}$ C与PPD以0.41 (w/w) 的比例并且在0.1%戊二醛存在下温育48小时(IL-1/PPD = 0.41)。作为对照, PPD被平行处理, 但不含IL-1 α 或IL-1 β 。偶联物随后被吸附到Al(OH)₃ (Rehydragel; Reheis Chemical, Dublin, Ireland), 以使终体积中具有1.5%的Al(OH)₃。

【0028】与明矾在室温下温育90分钟。颗粒随后用0.9%NaCl洗涤, 并将其重悬在0.9%NaCl中, 达到11 μ g IL-1 α /100 μ l悬液, 假设70%IL-1 α 被吸附到Al(OH)₃ (使用¹²⁵I-IL-1 α 在实验性研究中发现)。IL-1 β 偶联物以同样方式制备。对照悬液同样地稀释以匹配IL-1 α -PPD偶联物中PPD的量。该偶联物储存在4 $^{\circ}$ C备用。

实施例 12

C57BL/6 小鼠中抗 IL-1 α 抗体反应的产生

【0029】由于免疫系统对自身蛋白质如细胞因子的耐受, 所以主动免疫必须打破自身耐受性。对大多数自身蛋白来说, 免疫耐受是由于缺乏特异性T细胞——这是胸腺中负选择的结果——引起的。相反, 潜在的自身反应B细胞通常存在。当仅注射像IL-1 α 这样的自身蛋白时, 由于缺乏T细胞的帮助, 这些B细胞不会应答。将一种外源蛋白, 如PPD, 与自身抗原IL-1 α 偶联, 就提供了T细胞对B细胞刺激的帮助, 因为T细胞识别PPD, 导致受刺激的B细胞针对IL-1 α 和PPD产生抗体。

【0030】因此，我们用明矾中的IL-1 α -PPD偶联物接种小鼠，以确保T细胞对IL-1 α -特异性B细胞产生有效的帮助。抗体效价用ELISA测定。5只小鼠的组接受用15 μ g 偶联至10 μ g PPD的重组IL-1 α 进行的皮下免疫，该偶联采用与戊二醛温育的步骤进行。IL-1 α -PPD偶联物随后吸附到明矾。小鼠接受三次这样的皮下免疫，时间间隔为2周。这种免疫产生高效价的抗IL-1 α 抗体，而用明矾中的PPD免疫的对照小鼠未能诱导出可检测的抗体效价（图1）。抗IL-1 α 抗体的诱导需要至少2次注射。在仅仅注射一次明矾中的重组IL-1 α -PPD偶联物之后，血清中检测不到抗体反应。但在用明矾中的重组IL-1 α -PPD偶联物第三次注射后，所有接种的小鼠都产生抗IL-1 α 抗体。

实施例 13

对 IL-1 α 的主动免疫防止动脉粥样硬化的形成

【0031】在第0天、第14天和第28天，通过在颈部区域皮下给药，用在氢氧化铝中与10 μ g PPD（由结核分枝杆菌（*M. tuberculosis*）纯化的蛋白衍生物）偶联的15 μ g鼠IL-1 α 对ApoE敲除小鼠（6周龄）进行主动免疫。注射体积为100 μ l，氢氧化铝的量为约1mg。对照小鼠进行类似处理，但是使用含有相同量的PPD和氢氧化铝，但不包含IL-1 α 的制品。在第0、28、42和56天，从尾静脉血液取样，用ELISA法测量抗IL-1 α 抗体反应。首次免疫后4周，开始给小鼠动脉粥样硬化膳食，其中食物小球包含16%脂肪、1.16%胆固醇和0.5%胆酸，这是已知的加速动脉粥样硬化的膳食。然后，小鼠在18周龄处以安乐死。其主动脉被移出用于肉眼和显微镜分析。组织学切片用苏木精和伊红（HE），以及苏丹（Sudan）染色。

【0032】此时间点后，在双目显微镜下检查切开的主动脉，在针对IL-1 α 主动免疫的ApoE $^{-/-}$ 小鼠中显示出动脉粥样硬化斑块明显地减少，但仅针对PPD免疫的ApoE $^{-/-}$ 对照小鼠没有这种减少。

实施例 14

对 IL-1 α 的被动免疫防止动脉粥样硬化的形成

【0033】使用明矾中的 IL-1 α -PPD 偶联物三次皮下注射,对 C57BL/6 小鼠进行对 IL-1 α 的主动免疫。56 天后,采集它们的血清,并用 ELISA 确定抗 IL-1 α 抗体效价的产生。200 μ l 这种血清被动转移至 6 周龄的 ApoE 敲除小鼠。每周重复这些被动血清转移。对照 ApoE $^{-/-}$ 小鼠每周被动地接受来自幼 C57BL/6 小鼠血清的被动转移。从这些被动血清转移开始, ApoE $^{-/-}$ 小鼠被喂食动脉粥样硬化膳食,其中食物小球含有 16%脂肪、1.16%胆固醇和 0.5%胆酸,用以加速动脉粥样硬化的形成。对照 ApoE $^{-/-}$ 小鼠以每周间隔被动转移 200ml 来自幼 C57BL/6 小鼠的血清。6 周后小鼠被处以安乐死,进行主动脉的肉眼分析和组织学分析。组织学分析包括横切片的苏木精和伊红染色,以及苏丹染色。

【0034】这 6 周后,在双目显微镜下检查切开的主动脉,在被动转移抗 IL-1 α 抗血清的 ApoE $^{-/-}$ 小鼠中显示出动脉粥样硬化斑块明显地减少,但仅接受幼血清的 ApoE $^{-/-}$ 对照小鼠没有这种减少。

实施例 15

对 IL-1 α 的主动免疫保持动脉粥样硬化没有效果

【0035】在第0天、第14天和第28天,通过在颈部区域皮下给药,用在氢氧化铝中与10 μ g PPD (由结核分枝杆菌纯化的蛋白衍生物)偶联的15 μ g鼠IL-1 α 对ApoE敲除小鼠(6周龄)进行主动免疫。注射体积为100 μ l,氢氧化铝的量为约1mg。对照小鼠进行类似的处理,但是使用含有相同量的PPD和氢氧化铝,但不包含IL-1 α 的制品。在第0、28、42和56天,从尾静脉血液取样,用ELISA法测量抗IL-1 α 抗体反应。首次免疫后4周,开始给小鼠动脉粥样硬化膳食,其中食物小球包含16%脂肪、1.16%胆固醇和0.5%胆酸,这是已知的加速动脉粥样硬化的膳食。然后,小鼠在18周龄处以安乐死。其主动脉被移出用于肉眼和显微镜分析。组织学切片用苏木精和伊红(HE)以及苏丹染色。

【0036】此时间点后,在双目显微镜下检查切开的主动脉,在对 IL-1 α 抗血清免疫的 ApoE $^{-/-}$ 小鼠和对照 ApoE $^{-/-}$ 小鼠两者中,显示出具有相同程度的动脉粥样硬化斑块。

实施例 16

对 IL-1 α 的被动免疫保持动脉粥样硬化没有效果

【0037】使用明矾中 IL-1 α -PPD 偶联物三次皮下注射，对 C57BL/6 小鼠进行对 IL-1 α 的主动免疫。56 天后，采集它们的血清，并用 ELISA 确定抗 IL-1 α 抗体效价的产生。200 μ l 这种血清被动转移至 6 周龄的 ApoE 敲除小鼠。每周重复这些被动血清转移。对照 ApoE $^{-/-}$ 小鼠接受来自幼 C57BL/6 小鼠 200 μ l 血清转移。从这些被动血清转移开始，ApoE $^{-/-}$ 小鼠被喂食动脉粥样硬化膳食，其中食物小球含有 16%脂肪、1.16%胆固醇和 0.5%胆酸，用以加速动脉粥样硬化的形成。对照 ApoE $^{-/-}$ 小鼠以每周间隔被动转移 200 μ l 来自幼 C57BL/6 小鼠的血清。6 周后小鼠被处以安乐死，用于主动脉的肉眼分析和组织学分析。组织学分析包括横切片的苏木精伊红染色，以及苏丹染色。

【0038】这 6 周后，在双目显微镜下检查切开的主动脉，在接受抗 IL-1 α 抗血清和接受来自幼小鼠的血清的 ApoE $^{-/-}$ 小鼠中，显示出具有相同程度的动脉粥样硬化斑块。

实施例 17

ADCK-抗体依赖性补体介导杀伤

【0039】使用明矾中的 IL-1 α -PPD 偶联物三次皮下注射，对 C57BL/6 小鼠进行对 IL-1 α 的主动免疫。56 天后，采集它们的血清，并用 ELISA 确定抗 IL-1 α 自身抗体效价的产生。热灭活血清。50 μ l EL-4 细胞悬液被铺入 96 孔板。向这些孔的每一个中加入 15 μ l 的热灭活血清的 1:2 连续稀释液。然后在 37 $^{\circ}$ C 温育板 20 分钟。随后将 25 μ l 鼠血清加入每个孔。在 37 $^{\circ}$ C 下另外温育 5h 后，对孔进行拍照，随后使用台盼蓝将死细胞与活细胞区分，在计数室对细胞进行计数。

【0040】EL-4 细胞的多克隆小鼠抗小鼠 IL-1 α 抗血清介导的补体依赖性杀伤为浓度依赖方式。见图 2。

图1

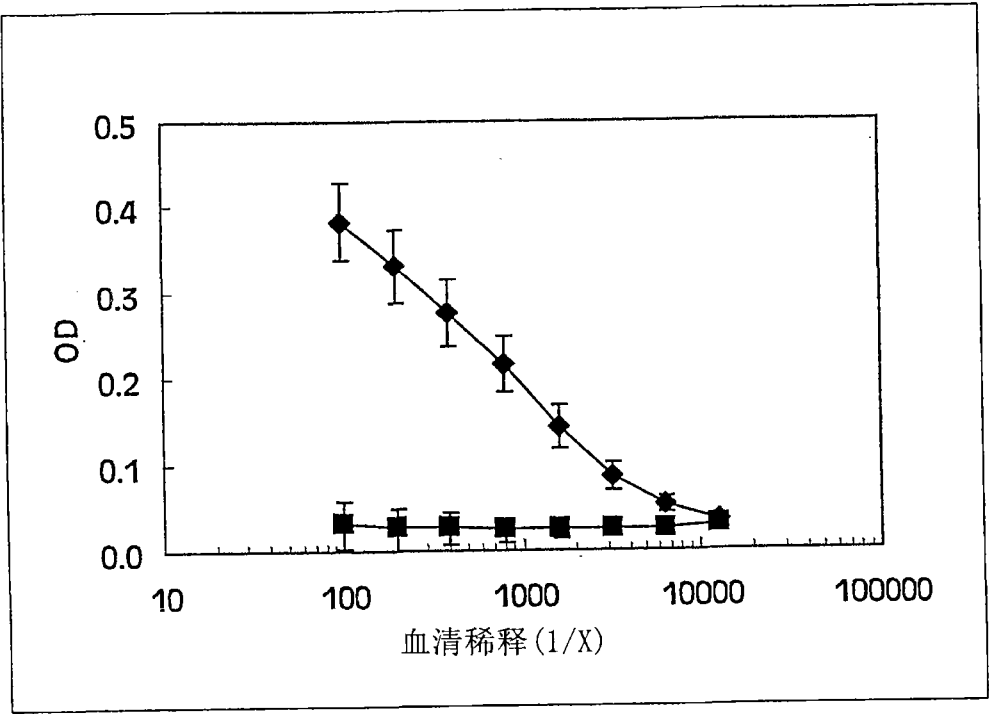


图2

EL-4细胞的ADCK

