



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105102485 B

(45)授权公告日 2019.04.19

(21)申请号 201480020199.2  
 (22)申请日 2014.02.05  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 105102485 A  
 (43)申请公布日 2015.11.25  
 (30)优先权数据  
 61/760,668 2013.02.05 US  
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日  
 2015.10.08  
 (86)PCT国际申请的申请数据  
 PCT/IL2014/050124 2014.02.05  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 W02014/122646 EN 2014.08.14  
 (73)专利权人 特普塞拉公司  
 地址 以色列耶路撒冷  
 (72)发明人 耶胡达·休恩菲尔德  
 米丽亚姆·布兰克  
 (74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245  
 代理人 张全信 赵蓉民  
 (51)Int.Cl.  
 C07K 19/00(2006.01)  
 C07F 9/02(2006.01)  
 C07H 3/06(2006.01)

A61K 31/66(2006.01)  
 A61P 37/00(2006.01)  
 (56)对比文件  
 US 2008/0175852 A1,2008.07.24,  
 US 2008/0175852 A1,2008.07.24,  
 WO 03/024474 A2,2003.03.27,  
 WO 2006003518 A2,2006.01.12,  
 EP 2260873 A1,2010.12.15,  
 Harnett M M等.The phosphorychline moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis.《Ann rheum dis》.2008,第67卷(第4期),  
 Dagan S等.Tuftsins and tuftsins conjugates potentiate immunogenic processes:effects and possible mechanisms..《J BIOL RESPONSE MOD》.1987,第6卷(第6期),  
 Lukas K等.Stimulating effect of tuftsins and its analogues on the defective monocyte chemotaxis in systemic lupus erythematosus.《Immunopharmacology》.1984,第7卷(第3-4期),

审查员 黎舒婷

权利要求书2页 说明书18页  
序列表5页 附图11页

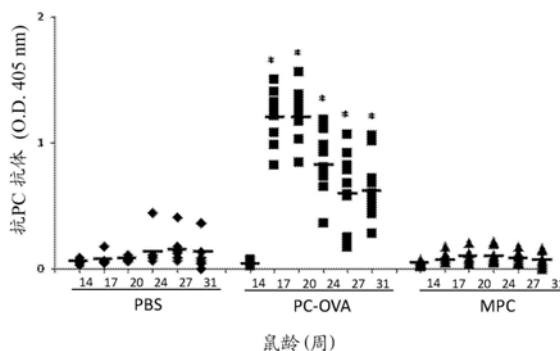
(54)发明名称

磷酸胆碱缀合物及其用途

(57)摘要

本发明提供了用于预防或治疗自身免疫性疾病的磷酸胆碱(PC)-缀合物和包含磷酸胆碱(PC)-缀合物的药物组合物,特别是疫苗。特别地,本发明的PC-缀合物有效预防或治疗与病理炎症相关的自身免疫性疾病。

CN 105102485 B



1. 一种磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的至少一种载体,其中所述磷酸胆碱衍生物选自:4-氨基苯基磷酸胆碱、4-重氮基苯基磷酸胆碱、4-硝基苯基磷酸胆碱和12-(3-碘苯基)十二烷基磷酸胆碱。

2. 如权利要求1所述的磷酸胆碱缀合物,其中所述至少一种载体是促吞噬素。

3. 如权利要求1所述的磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含连接至所述至少一种载体的一个磷酸胆碱部分或其衍生物。

4. 如权利要求1所述的磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含连接至所述至少一种载体的多个磷酸胆碱部分或其衍生物。

5. 如权利要求1所述的磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含连接至磷酸胆碱部分或其衍生物的多个载体。

6. 如权利要求1所述的磷酸胆碱缀合物,其中所述磷酸胆碱部分或其衍生物和所述至少一种载体被间隔物所分离。

7. 一种药物组合物,所述药物组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含连接至由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的至少一种载体的至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物,并且所述药物组合物还包含药学上可接受的稀释剂或载体,其中所述磷酸胆碱衍生物选自:4-氨基苯基磷酸胆碱、4-重氮基苯基磷酸胆碱、4-硝基苯基磷酸胆碱和12-(3-碘苯基)十二烷基磷酸胆碱。

8. 如权利要求7所述的药物组合物,其中所述药物组合物是疫苗。

9. 如权利要求8所述的药物组合物,所述疫苗还包含佐剂。

10. 如权利要求9所述的药物组合物,其中所述佐剂选自由以下组成的组:油包水乳剂、水包油乳剂和脂质体。

11. 权利要求8-10中任一项所述的药物组合物用于制造用于治疗需要其的受试者中自身免疫性疾病的药物的用途。

12. 如权利要求11所述的用途,其中治疗包括以下的至少一种:预防所述自身免疫性疾病的发作、减弱所述自身免疫性疾病的进展和抑制所述自身免疫性疾病的进展。

13. 如权利要求11所述的用途,其中所述受试者具有发展所述自身免疫性疾病的高风险。

14. 如权利要求11所述的用途,其中所述自身免疫性疾病与异常炎症相关。

15. 如权利要求11所述的用途,其中所述自身免疫性疾病选自由以下组成的组:类风湿性关节炎、狼疮、多发性硬化、寻常型天疱疮、抗磷脂综合征、银屑病、自身免疫性肝炎、结节病、炎性肠病、结肠炎、克罗恩病和慢性阻塞性肺疾病。

16. 如权利要求11所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

17. 如权利要求16所述的用途,其中所述受试者是人类。

18. 如权利要求11所述的用途,其中所述自身免疫性疾病是狼疮。

19. 如权利要求18所述的用途,其中所述载体是促吞噬素。

20. 如权利要求18所述的用途,其中所述磷酸胆碱缀合物包括磷酸胆碱-促吞噬素。

21. 如权利要求11所述的用途,其中所述自身免疫性疾病是结肠炎。

22. 如权利要求21所述的用途,其中所述载体是促吞噬素。

23. 如权利要求21所述的用途,其中所述磷酸胆碱缀合物是磷酸胆碱-促吞噬素。

24. 如权利要求11所述的用途,其中所述自身免疫性疾病是类风湿性关节炎。

25. 如权利要求24所述的用途,其中所述载体是促吞噬素。

26. 如权利要求24所述的用途,其中所述磷酸胆碱-缀合物是磷酸胆碱-促吞噬素。

27. 一种用于治疗自身免疫性疾病的试剂盒,所述试剂盒包含疫苗组合物,所述疫苗组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的至少一种载体,其中所述磷酸胆碱衍生物选自:4-氨基苯基磷酸胆碱、4-重氨基苯基磷酸胆碱、4-硝基苯基磷酸胆碱和12-(3-碘苯基)十二烷基磷酸胆碱。

## 磷酸胆碱缀合物及其用途

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于预防和治疗自身免疫性疾病,特别是与病理学炎症相关的自身免疫性疾病的基于磷酸胆碱的剂和包含其的药物组合物。

### [0002] 发明背景

[0003] 改善的公共卫生与自身免疫性综合征和自身炎性综合征的患病率的显著增加之间的强相关性已在西方国家被证实。此外,报道了寄生虫(蠕虫)在某些地理区域的存在与保护免受特应性、自身免疫性、和自身炎性疾病之间的相关性。这些研究产生了“卫生假说”,假定,最近自身免疫性疾病在西方国家发生率的增加反映了由传染原(infectious agent),包括寄生虫在儿童时期适当引发免疫应答的缺乏。

[0004] 在过去几十年期间,许多研究报道了用寄生性蠕虫感染,或用蠕虫提取物的系统性治疗,可减少与自身免疫性疾病,诸如多发性硬化(MS)、类风湿性关节炎(RA)、I型糖尿病(T1DM)和炎性肠病(IBD)相关的炎症。

[0005] 尽管此类研究是成功的,使用潜在病原体作为治疗剂已产生了伦理和安全问题。因此,已花费相当大的努力鉴定和表征负责寄生虫的免疫调节的寄生虫来源的分子。

[0006] 目前最明确定义的线虫来源的免疫调节分子是ES-62。ES-62是具有通过N型聚糖附接的磷酸胆碱(PC)部分的四聚体糖蛋白(62kDa亚基)。

[0007] 已提出了,ES-62的免疫调节活性归因于PC部分的存在。关于PC免疫调节活性的进一步支持,在仅表达PC-免疫调节部分的其他寄生性线虫如猪蛔虫(*Ascaris suum*)中发现。

[0008] 美国专利号5,455,032公开了可用于诱导针对由病原生物体感染的免疫保护的组合物,该病原生物体包含磷酸胆碱抗原,包括肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和在其膜或衣壳上具有磷酸胆碱抗原组分的其他微生物。还公开了,用于诱导针对这些病原生物体感染的免疫保护的疫苗和方法。

[0009] 美国专利号7,067,480公开了,包含磷酸胆碱的糖蛋白,特别是ES-62在治疗或预防与异常炎症相关的自身免疫性疾病诸如类风湿性关节炎中的用途。

[0010] 美国专利号8,012,483公开了通过确定针对磷酸胆碱的抗体,特别是IgM抗体的存在来鉴定处于发展缺血性心血管疾病的风险中的受试者的方法,并且还公开了在治疗或预防动脉粥样硬化中用于主动免疫原或被动免疫原的药物组合物,所述药物组合物包含磷酸胆碱缀合物、或具有对磷酸胆碱缀合物的特异性的抗体。

[0011] 美国专利申请公布号2010/0303721公开了以蠕虫寄生虫制品治疗过度免疫应答,包括异常/增强的Th1应答的方法。自身免疫性疾病包括克罗恩病和溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、I型糖尿病、红斑狼疮、结节病、多发性硬化、自身免疫性甲状腺炎、过敏性鼻炎、结肠息肉/结肠癌和哮喘。

[0012] 对开发作为安全和稳定的免疫原、具有最低不良副作用、用于治疗自身免疫性疾病,特别是与异常炎症相关的疾病的小分子仍存在需要。

### [0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了包含磷酸胆碱(PC)缀合物的药物组合物,以及其用于治疗 and/或预

防自身免疫性疾病和紊乱,诸如,类风湿性关节炎、狼疮、多发性硬化和炎性肠病的用途,所述药物组合物包括疫苗组合物。

[0015] 本发明部分地基于预料不到的发现,即,PC-缀合物,诸如,PC-OVA、MPC和PC-促吞噬素,对系统性红斑狼疮(SLE)的发展和进展显示体内抑制作用。本发明所基于的另一个预料不到的发现是,PC-促吞噬素体内改善炎性肠病的发展。

[0016] 根据一些实施方案,本发明提供了磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物和选自由以下组成的组的至少一种载体:单糖、寡糖、糖蛋白、多糖、肽和脂质。

[0017] 根据一些实施方案,至少一种载体选自促吞噬素和聚糖。

[0018] 根据一些实施方案,至少一种载体是聚糖。根据一些实施方案,聚糖是N型聚糖或O型聚糖。根据一些实施方案,聚糖是N型聚糖,所述N型聚糖包括N-乙酰葡萄糖胺和Gal $\beta$ 1-4[Fuca1-3]GlcNAc的至少一种。根据一些实施方案,磷酸胆碱-聚糖缀合物还包括ES-62。

[0019] 根据一些实施方案,至少一种载体是促吞噬素。

[0020] 根据一些实施方案,磷酸胆碱缀合物包含连接至载体的一个磷酸胆碱部分或其衍生物。

[0021] 根据一些实施方案,磷酸胆碱缀合物包含连接至载体的多个磷酸胆碱部分或其衍生物。

[0022] 根据一些实施方案,磷酸胆碱缀合物包含连接至磷酸胆碱部分或其衍生物的多个载体。

[0023] 根据一些实施方案,磷酸胆碱部分或其衍生物和载体被间隔物所分离。

[0024] 根据一些实施方案,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含连接至选自促吞噬素和聚糖的至少一种载体的至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物,并且所述药物组合物还包含药学上可接受的稀释剂或载体。

[0025] 根据一些实施方案,所述药物组合物是疫苗。根据一些实施方案,所述药物组合物还包含佐剂。根据一些实施方案,佐剂选自由以下组成的组:油包水乳剂、水包油乳剂和脂质体。

[0026] 根据一些实施方案,本发明提供了用于治疗需要其的受试者中自身免疫性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用疫苗组合物,所述疫苗组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物和选自由以下组成的组的至少一种载体:聚合物、单糖、寡糖、多糖、肽、多肽和脂质,从而调节所述受试者的免疫应答朝向抗炎表型。

[0027] 根据一些实施方案,所述治疗包括以下的至少一种:预防所述自身免疫性疾病的发作、减弱所述自身免疫性疾病的进展和抑制所述自身免疫性疾病的进展。

[0028] 根据一些实施方案,所述受试者具有发展所述自身免疫性疾病的高风险。根据一些实施方案,自身免疫性疾病与异常炎症相关。根据一些实施方案,自身免疫性疾病选自由以下组成的组:类风湿性关节炎、狼疮、多发性硬化、寻常型天疱疮、抗磷脂综合征、银屑病、自身免疫性肝炎、结节病、炎性肠病、结肠炎、克罗恩病和慢性阻塞性肺疾病。

[0029] 根据一些实施方案,疫苗组合物以选自由以下组成的组的施用途径施用:静脉内、肌内、口服、舌下、粘膜内、腹膜内、鼻、皮下、局部、皮内或经皮。

[0030] 根据一些实施方案,受试者是哺乳动物。根据一些实施方案,受试者是人类。

[0031] 根据一些实施方案,自身免疫性疾病是狼疮。根据一些实施方案,载体选自自由以下组成的组:卵清蛋白、促吞噬素和2-甲基丙烯酰氧乙基(2-methacryloyloxyethyl)。根据一些实施方案,磷酸胆碱缀合物包括磷酸胆碱-促吞噬素、磷酸胆碱-卵清白蛋白和2-甲基丙烯酰氧乙基-磷酸胆碱的至少一种。

[0032] 根据一些实施方案,自身免疫性疾病是结肠炎。根据一些实施方案,载体是促吞噬素。根据一些实施方案,磷酸胆碱缀合物是磷酸胆碱-促吞噬素。

[0033] 根据一些实施方案,自身免疫性疾病是类风湿性关节炎。根据一些实施方案,载体选自自由以下组成的组:促吞噬素、聚糖和2-甲基丙烯酰氧乙基。根据一些实施方案,PC-缀合物包括磷酸胆碱-促吞噬素、磷酸胆碱-聚糖和2-甲基丙烯酰氧乙基-磷酸胆碱的至少一种。

[0034] 根据一些实施方案,本发明提供了疫苗组合物用于治疗自身免疫性疾病的用途,所述疫苗组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物和选自自由以下组成的组的至少一种载体:聚合物、单糖、寡糖、多糖、肽、多肽和脂质。

[0035] 根据一些实施方案,本发明提供了用于治疗自身免疫性疾病的试剂盒,所述试剂盒包含疫苗组合物,所述疫苗组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物和选自自由以下组成的组的至少一种载体:聚合物、单糖、寡糖、多糖、肽、多肽和脂质。

[0036] 本发明适用性的另外的实施方案和全部范围将从下文给出的详细描述变得明显。然而,应当理解,详细描述和具体实施例,虽然指示本发明的优选的实施方案,但仅通过说明性方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种变化和修改从该详细描述对本领域技术人员将是明显的。

[0037] 附图简述

[0038] 图1示出了在用PC-OVA(正方形;\*= $p < 0.001$ )、MPC(三角形; $p > 0.05$ )或PBS(对照;菱形)处理的NZBxNZW/F1小鼠(“狼疮小鼠”)的血清中抗PC抗体的水平(以405nm处的光密度,0.D.为单位)。

[0039] 图2示出了在用PC-OVA(正方形)、MPC(三角形)或PBS(对照;菱形)处理的狼疮小鼠中的蛋白尿进展作为尿中至少100mg/dl( $p < 0.02$ )的蛋白水平的百分比。

[0040] 图3A-3B示出了用PC-OVA处理的狼疮小鼠的用抗小鼠IgG-FITC Fc特异性抗体探测(A)、用高碘酸希夫氏(Periodic acid-Schiff,PAS;B)染色的肾切片。

[0041] 图4A-4B示出了用MPC处理的狼疮小鼠的用抗小鼠IgG-FITC Fc特异性抗体探测(A)、用高碘酸希夫氏(PAS;B)染色的肾切片。

[0042] 图5A-5C示出了用PBS处理的对照狼疮小鼠的用抗小鼠IgG-FITC Fc特异性抗体探测(A)、用高碘酸希夫氏(PAS;B-C)染色的肾切片。

[0043] 图6是示出了用PC-OVA(三角形;\*= $p < 0.01$ )、MPC(正方形; $p < 0.04$ )或PBS(对照;菱形)处理的狼疮小鼠的存活的Kaplan-Meier图。

[0044] 图7示出了用PC-促吞噬素(TPC)或PBS(对照)处理的具有蛋白尿(蛋白水平高于100mg/dl)的狼疮小鼠的百分比, $p < 0.02$ 。

[0045] 图8A-8B示出了用PBS(对照;A)或PC-促吞噬素(B)处理的狼疮小鼠的PAS染色的肾

切片。

[0046] 图9A-9B示出了用PBS(对照;A)或PC-促吞噬素(B)处理的狼疮小鼠的用抗小鼠IgG-FITC Fc特异性抗体探测的肾切片。

[0047] 图10示出了在用PC-促吞噬素(TPC)或PBS处理的狼疮小鼠的脾细胞中抗炎细胞因子TGF $\beta$ ( $p < 0.001$ )和促炎细胞因子IFN  $\gamma$ ( $p < 0.03$ ;相对于 $\beta$ -肌动蛋白)的相对mRNA表达水平。

[0048] 图11示出了在用PC-促吞噬素(TPC)或PBS(对照)处理的狼疮小鼠的脾细胞中抗炎细胞因子TGF $\beta$ 和IL-10以及促炎细胞因子IFN  $\gamma$ 和IL-17的蛋白水平(以pg/ml为单位)。\*= $p < 0.001$ ,\*\*= $p < 0.02$ 。

[0049] 图12示出了在用PC-促吞噬素(TPC; $p < 0.02$ )、磷酸胆碱(PC; $p < 0.01$ )、促吞噬素(T; $p < 0.01$ )或PBS( $p < 0.01$ )处理的狼疮小鼠中调节性T细胞水平(Treg-CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、FOXP3<sup>+</sup>)的FACS分析。

[0050] 图13A-13D示出了在经历DSS诱导炎性肠病(“IBD小鼠”)、随后用PC-促吞噬素(空心圆形)和PBS(实心圆形)处理的小鼠中随时间的进展作为每日疾病活动(DAI;A; $p < 0.02$ )、直肠出血(B; $p < 0.001$ )、体重损失(相对于 $t = 0$ ;C; $p < 0.001$ )和存活(D)的函数。

[0051] 图14A-14B示出了在用PC-促吞噬素(TPC)或PBS处理后的IBD小鼠中的结肠(A)和结肠长度分析(B; $p < 0.02$ )。

[0052] 图15A-15G示出了与来自未经DSS诱导IBD(C、G)的小鼠的结肠切片相比,用PBS(对照;A、E)或PC-促吞噬素(B、F)处理的IBD小鼠的H&E染色的结肠切片。

[0053] 发明详述

[0054] 本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包括疫苗组合物,所述疫苗组合物包含至少一种磷酸胆碱(PC)-缀合物。根据一些实施方案,本发明的药物组合物显示免疫调节活性。根据一些实施方案,药物组合物用于治疗、改善自身免疫性疾病的进展,以及防止自身免疫性疾病的发作。根据一些实施方案,本发明的PC-缀合物被合成产生,以确保这些化合物的稳定性和再现性,同时保持或甚至增强它们的活性。根据一些实施方案,PC-缀合物可用作针对Th2表型的受试者的免疫系统的刺激物。

[0055] 如本文所用的,提及本发明的PC-缀合物,术语“免疫调节”、“免疫调节活性(immunomodulation activity)”、“免疫调节活性(immunomodulatory activity)”或“调节免疫应答”是指,缀合物引发以下的至少一种的能力:减少淋巴细胞(B-淋巴细胞和T-淋巴细胞两者)响应于抗原增殖的能力;诱导T和/或B调节(抑制)细胞的产生;和影响巨噬细胞和树突状细胞。影响巨噬细胞和树突状细胞的功能包括但不限于,刺激凋亡细胞的清除和诱导耐受性树突状细胞;抑制巨噬细胞产生促炎细胞因子诸如IL-12、TNF- $\alpha$ 和IL-6的能力;调节树突状细胞成熟以优先引发Th2样应答;和诱导脾细胞产生抗炎细胞因子IL-10和以Th2/抗炎方向偏置抗体应答。PC-缀合物的免疫调节活性在本文中还可称为“抗炎”活性。

[0056] 如本文所用的,术语“磷酸胆碱(PC)-缀合物”,是指任选地经由间隔物连接至载体的磷酸胆碱部分。结构元件磷酸胆碱可包括磷酸胆碱的衍生物。载体可以是肽、多肽、单糖、寡糖、多糖、糖蛋白、脂质、聚合物等。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0057] 如本文所用的,术语“磷酸胆碱的衍生物”除了其他的以外包括但不限于以下:4-氨基苯基磷酸胆碱、4-重氮基苯基磷酸胆碱(4-diazoniophenylphosphorylcholine)、4-硝

基苯基磷酸胆碱和12-(3-碘苯基)十二烷基磷酸胆碱(12-(3-Iodophenyl)dodecylphosphocholine)。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0058] 载体可以是免疫原性的或无免疫原性。

[0059] 如本文所用的,术语“免疫原性载体”是指能够诱导针对PC分子的免疫应答的各种分子或物质。

[0060] 根据其他实施方案,载体是糖蛋白或免疫原性聚合物分子。PC被不同范围的生物体表达。在革兰氏阳性细菌肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)中,PC被直接衔接至糖残基,通常认为是N-乙酰基半乳糖胺。还已在宽范围的革兰氏阳性细菌,包括梭菌属(*Clostridium*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和革兰氏阴性细菌流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)中检测到PC。其中已检测到PC的真核生物体包括许多重要的致病原(disease-causing agent),诸如原生动物的利什曼原虫(*Leishmania major*)和克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*);宽范围的真菌;吸虫类曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*);绦虫阔节裂头绦虫(*Diphyllobothrium latum*);一些胃肠道线虫和所有物种丝虫线虫。在人类中,PC出现在细胞膜的内小叶上,并且由凋亡细胞暴露于免疫系统。

[0061] 如本文所用的,术语“非免疫原性载体”是指不引起免疫应答的各种分子或物质。

[0062] 根据一些实施方案,PC-缀合物选自以下组成的组:PC-促吞噬素和PC-聚糖。

[0063] 根据其他实施方案,PC-缀合物是PC-促吞噬素。

[0064] 如本文所用的,术语“促吞噬素”是指四肽(苏氨酸-赖氨酸-脯氨酸-精氨酸,TKPR; SEQ ID NO:17)。促吞噬素可化学合成或从脾脏由IgG重链的Fc结构域的酶裂解分离。已知促吞噬肽的吞噬刺激活性和体外和体内增强巨噬细胞的抗原呈递的能力。根据一些实施方案,促吞噬素可被认为是佐剂。应当理解,促吞噬素是指促吞噬素及其衍生物,除了其他的以外包括但不限于以下:苏氨酸-赖氨酸-脯氨酸TKP;TKPXaa;SEQ ID NO:18)、苏氨酸-赖氨酸-脯氨酸-脯氨酸-精氨酸(TKPPR;SEQ ID NO:19)、丝氨酸-赖氨酸-脯氨酸-精氨酸(SKPR;SEQ ID NO:20)、苏氨酸-精氨酸-脯氨酸-精氨酸(TRPR;SEQ ID NO:21)和丝氨酸-赖氨酸-脯氨酸-赖氨酸(SKPK;SEQ ID NO:22)。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0065] 根据一些实施方案,PC-缀合物为PC-聚糖。

[0066] 根据一些实施方案,术语“聚糖”是指N型聚糖和O-型聚糖。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0067] 如本文所用的,术语“N-型聚糖”和“N-聚糖”是可互换的,并且是指通过N-糖苷键共价键合至物质(substrate),诸如PC的聚糖。任何类型的N-聚糖可用于形成本发明的PC-缀合物。

[0068] 根据一些实施方案,将PC缀合至N型聚糖,所述N型聚糖除了其他的以外是N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0069] 如本文所用的,术语“O-型聚糖”和“O-聚糖”是可互换的,并且是指通过O-糖苷键共价键合至物质,诸如PC的聚糖。任何类型的O-聚糖可用于形成本发明的PC-缀合物。

[0070] 根据一些实施方案,将PC缀合至O型聚糖,所述O型聚糖除了其他的以外是-N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)和 $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -L-Fuc-[1 $\rightarrow$ 2])-D-Gal。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0071] 根据一些实施方案,聚糖除了其他的以外包含选自以下组成的组的单糖:N-乙

酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、唾液酸、葡萄糖、岩藻糖和甘露糖。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0072] 根据其他实施方案,PC-缀合物是PC-聚糖,其还包括ES-62。

[0073] 术语“ES-62”是指经由N型聚糖附接至磷酸胆碱(PC)部分的四聚体糖蛋白(62kDa亚基)。ES-62由啮齿类丝虫线虫*Acanthocheilonema viteae*分泌,并被发现在人类丝虫寄生线虫包括马来丝虫(*Brugia malayi*)和盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)中具有直系同源物。ES-62作用以偏置免疫应答朝向有益于蠕虫存活和宿主健康两者的抗炎/Th2表型。例如,尽管ES-62最初诱导巨噬细胞产生低水平的IL-12和TNF $\alpha$ ,暴露于寄生虫产物最终使细胞不能响应于经典刺激物诸如LPS/IFN $\gamma$ 产生这些细胞因子。该分子能够直接与免疫系统的许多细胞,包括B淋巴细胞、树突状细胞、巨噬细胞和肥大细胞相互作用。相互作用表现为取决于与Toll样受体4(TLR4)产生复合物,并导致调节许多信号转导分子包括MAP激酶、PI-3激酶和NF- $\kappa$ B的活性。

[0074] 寄生性蠕虫在自身免疫性疾病中的作用的实例包括,在通过摄入猪蠕虫猪鞭虫(*Trichuris suis*)的活卵治疗的具有活动性溃疡性结肠炎和克罗恩病的患者中的研究。在该研究中,疾病在摄入卵后缓解。此外,采用实验性自身免疫性模型,疾病活动性的改善通过蠕虫或蠕虫衍生物施用来实现。另外,用非肥胖糖尿病(NOD)小鼠的研究表明,使用卵抗原或蠕虫抗原以旋毛虫(*Trichinella spiralis*)、*Heligmosomoides polygyrus*、或曼氏血吸虫的接种显著减少试验性I型糖尿病(T1DM)的比率并且抑制胰腺的胰岛中的淋巴样浸润。此外,实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的改善在蠕虫治疗后实现;血吸虫(*Schistosoma*)蠕虫感染预防结肠炎,改变免疫应答朝向Th2表型;且*Syphacia oblevata*感染的大鼠比未感染的大鼠发展较不严重的关节炎。线虫猪蛔虫、曼氏血吸虫和*Acanthocheilonema viteae*的提取物也被发现降低小鼠中胶原诱导的关节炎(CIA)的严重程度。

[0075] 根据一些实施方案,本发明提供了磷酸胆碱(PC)-缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含连接至选自由以下组成的组的至少一种载体的至少一个磷酸胆碱部分或其衍生物:肽、多肽、脂质、多糖、单糖、寡糖和聚合物。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0076] 根据一些实施方案,磷酸胆碱缀合物包含连接至载体的一个PC部分或其衍生物。

[0077] 根据其他实施方案,磷酸胆碱缀合物包含连接至载体的多个PC部分或其衍生物。

[0078] 根据其他实施方案,磷酸胆碱缀合物包含连接至单个PC部分或其衍生物的多个载体。

[0079] 根据一些实施方案,磷酸胆碱缀合物由至少一个PC部分或其衍生物和选自由以下组成的组的至少一种载体组成:单糖、寡糖、多糖、肽和脂质。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0080] 根据另外的实施方案,磷酸胆碱部分或其衍生物和载体被间隔物所分离。

[0081] 如本文所用的,术语“间隔物”,是指载体和PC部分之间的连接或以其他方式桥接元件,所述元件通常通过化学方法或生物学方法与其连接。间隔物的非限制性实例除了其他的以外包括:氨基酸、肽、多肽、蛋白、烃类和聚合物。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0082] 根据一些实施方案,PC-缀合物包含彼此连接的PC和载体。

[0083] 如本文所用的,术语“连接”除了其他的以外是指附接、连接、键合至、缔合以及偶联至。

[0084] 根据一些实施方案,PC和载体通过共价键连接。

[0085] 根据另外的实施方案,本发明的合成PC-缀合物可如下文的实施例部分所描述的被合成。

[0086] 根据一些实施方案,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含连接至选自促吞噬素和聚糖的至少一种载体的至少一个PC部分或其衍生物,并且所述药物组合物还包含药学上可接受的载体、赋形剂、或稀释剂。

[0087] 根据其他实施方案,药物组合物呈溶液、悬浮液、片剂、咀嚼片剂、胶囊剂、糖浆剂、鼻内喷雾剂、栓剂、经皮贴剂,以及其他类型的药物组合物的形式。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0088] 根据其他实施方案,药物组合物是长效、控释、延长释放或缓慢释放的制剂。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0089] 根据另外的实施方案,药物组合物是疫苗。如本文所用的术语“疫苗”是指其的施用意在引发能够预防和/或减轻一种或更多种自身免疫性疾病或紊乱和炎症以及其他疾病或紊乱的严重程度的免疫应答的产品。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0090] 根据另外的实施方案,本发明提供了疫苗组合物,所述疫苗组合物包含至少一种PC-缀合物。疫苗有效预防、治疗或减轻自身免疫性疾病的进展。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0091] 本发明的PC-缀合物可预防性地作为疫苗来施用。本发明的疫苗包含作为活性成分的磷酸胆碱和载体的至少一种缀合物。有用的药学上可接受的载体是本领域所熟知的,并且包括,例如,甲状腺球蛋白、白蛋白诸如人血清白蛋白、破伤风类毒素、聚氨基酸诸如聚(D-赖氨酸:D-谷氨酸)、流感、乙型肝炎病毒核心蛋白和乙型肝炎病毒重组疫苗。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0092] 疫苗还可包含生理上可耐受的(可接受的)稀释剂,诸如水、磷酸盐缓冲的盐水、或盐水,并且还可包括佐剂。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0093] 根据一些实施方案,疫苗还包含佐剂。如本文所用的术语“佐剂”是指修饰其他剂的作用且特别是增强对抗原的免疫应答的药理学和/或免疫学的剂。佐剂可以是无机或有机的化学品、大分子或某些细菌的整个细胞。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0094] 根据一些实施方案,佐剂除了其他的以外选自由以下组成的组:油包水乳剂、水包油乳剂、脂质体、不完全弗氏佐剂、磷酸铝、氢氧化铝和明矾。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0095] 本发明的药物组合物适合于在各种药物递送系统中使用,如下文详细描述。适于本发明中使用的药学上可接受的载体可参见Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)。

[0096] 根据另外的实施方案,本发明提供了用于治疗需要其的受试者中的自身免疫性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用疫苗组合物,所述疫苗组合物包含至少一种PC-缀合物,其中PC-缀合物包含至少一个PC部分或其衍生物和选自由以下组成的组的至少一种载体:单糖、寡糖、糖蛋白、多糖、肽和脂质,从而调节所述受试者的免疫应答朝向抗炎表型。每

个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0097] 根据一些实施方案,本发明提供了疫苗组合物用于治疗自身免疫性疾病的用途,所述疫苗组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个PC部分或其衍生物和选自自由以下组成的组的至少一种载体:聚合物、单糖、寡糖、多糖、肽、多肽和脂质。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0098] 如本文所用的,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是可互换的,并且除了其他的以外是指以下的任何一种或更多种:预防自身免疫性疾病的发作,减弱所述自身免疫性疾病的进展和抑制自身免疫性疾病的进展。

[0099] 根据一些实施方案,需要其的受试者是哺乳动物。根据一些实施方案,需要其的受试者是人类。

[0100] 根据一些实施方案,本发明的方法包括以下的步骤:(i)确定受试者的自身免疫性疾病的风险;(ii)选择具有所述疾病的风险的受试者;和(iii)用本发明的PC-缀合物治疗具有所述风险的所述受试者。

[0101] 根据另外的实施方案,自身免疫性疾病与异常炎症相关。根据另外的实施方案,疾病或紊乱是自身免疫性疾病。根据另外的实施方案,自身免疫性疾病选自自由以下组成的组:类风湿性关节炎、狼疮、多发性硬化、自身免疫性皮肤病紊乱,包括寻常型天疱疮和银屑病、抗磷脂综合征、自身免疫性肝炎、结节病、结肠炎、炎性肠病、包括克罗恩病和慢性阻塞性肺疾病。每个可能性代表了本发明的单独的实施方案。

[0102] 如本文所用的,狼疮、或红斑狼疮,是指一类系统性自身免疫性疾病的集合。这些疾病的症状可影响许多不同的身体系统,包括关节、皮肤、肾脏、血细胞、心脏和肺。至今已知四种主要类型的狼疮:系统性红斑狼疮、盘状红斑狼疮、药物引起的红斑狼疮、和新生儿红斑狼疮。在这些中,系统性红斑狼疮是狼疮的最常见和严重的形式。异常免疫应答允许对各种组织和系统引起损害的致病性自身抗体和免疫复合物的持续产生。异常免疫应答可能取决于多种遗传因素和环境因素的相互作用。

[0103] 根据一些实施方案,本发明的方法用于治疗狼疮,其中PC-缀合物的载体是卵清蛋白、促吞噬素和2-甲基丙烯酰氧乙基的一种或更多种。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0104] 根据一些实施方案,本发明的方法用于治疗狼疮,其中PC-缀合物是PC-促吞噬素、PC-卵清蛋白和2-甲基丙烯酰氧乙基-PC的一种或更多种。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0105] 如本文所用的,术语“类风湿性关节炎”和“RA”是可互换的,并且是指以持续性炎性滑膜炎,通常涉及对称分布的外周关节为特征的慢性疾病。这种炎症可导致骨侵蚀、软骨损伤和关节破坏。它是约1%人群的痛苦。发病率随年龄而增加,并且女性比男性更加频繁受影响。RA的传播是由CD4<sup>+</sup>Th1细胞驱动的免疫介导的事件。

[0106] 根据一些实施方案,本发明的方法用于治疗类风湿性关节炎,其中PC-缀合物的载体是促吞噬素、聚糖和2-甲基丙烯酰氧乙基的一种或更多种。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0107] 根据一些实施方案,本发明的方法用于治疗类风湿性关节炎,其中PC-缀合物是PC-促吞噬素、PC-聚糖和2-甲基丙烯酰氧乙基-PC的一种或更多种。每个可能性是本发明的

单独的实施方案。

[0108] 如本文所用的,术语“多发性硬化”和“MS”,是可互换的,并且通常是指中枢神经系统的慢性复发、多灶性炎性紊乱,其导致脑的病灶脱髓鞘和瘢痕形成。它是常见的疾病,影响约35万美国人,在成年早期到中期期间显现。MS是至少部分由Th1细胞介导的自身免疫性疾病。MS的损伤类似于由包含活化的T细胞和巨噬细胞的迟发型超敏反应诱导的那些。实验性自身免疫性脑脊髓炎,还称为实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE),是脑炎症的动物模型。它是中枢神经系统(CNS)的炎性脱髓鞘疾病。它主要以啮齿动物使用并被作为人类CNS脱髓鞘疾病,包括疾病多发性硬化和急性播散性脑脊髓炎(ADEM)的动物模型广泛研究。EAE通常还是T细胞介导的自身免疫性疾病的原型。

[0109] 如本文所用的术语“结肠炎”除了其他的以外是指以下疾病和紊乱的任何一种或更多种:炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎(diversion colitis)、白塞氏病和不确定结肠炎。

[0110] 尽管IBD的起因仍然未确定,推测起因于肠道粘膜免疫系统的异常调节。粘膜中的炎性细胞通常具有针对腔内含物的保护作用。这种高效的慢性炎症被严格控制,以限制组织损伤。IBD可能起因于对腔的因素的不适当剧烈的免疫应答。克罗恩病(CD)表现为产生IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ 的过度剧烈的Th型炎症。克罗恩病在工业化社会的发病率已从20世纪50年代增加,直到80年代中期,且现在是每年每10万人约1至8个病例。这表明,我们的环境中的未知变化影响了克罗恩病的频率。溃疡性结肠炎(UC)的性质尚不明确。

[0111] 存在慢性肠道炎症的几种动物模型。事实上,具有遗传工程的基因缺失的小鼠可发展类似于IBD的慢性肠炎。这些包括携带除了其他的以外IL-2、IL-10和MHC II类基因或TCR基因的靶向缺失的突变小鼠。已证明,在一些动物模型中,异常调节的免疫系统本身可介导肠损伤。几种动物模型中的粘膜炎症产生了大量的IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ ,表明Th1型细胞因子的过度产生是疾病的发病机理潜在的一个共同机制。此外,阻断Th1回路可防止炎症。CD是Th1应答。因此,这些模型在这种人类疾病过程中的免疫病理学中可具有直接影响。

[0112] 根据一些实施方案,本发明的方法用于治疗结肠炎,其中PC-缀合物的载体是促吞噬素。

[0113] 根据一些实施方案,本发明的方法用于治疗结肠炎,其中PC-缀合物是PC-促吞噬素。

[0114] 根据一些实施方案,疾病或紊乱是自身免疫性皮肤病紊乱。存在许多不同类型的皮肤相关的自身免疫性紊乱,包括,例如硬皮病、银屑病、皮炎、大疱性表皮松解和大疱性类天疱疮。寻常型天疱疮是具有皮肤损害的慢性起水疱性皮肤病,是很少瘙痒的、但其通常是疼痛的。该疾病由针对桥粒芯蛋白1和桥粒芯蛋白3两者的抗体引起,导致表皮中角化细胞间凝聚的损失。它以广泛的松弛性水疱和皮肤粘膜糜烂为特征。当免疫系统误解皮肤细胞为病原体时,银屑病发生,并发出加速皮肤细胞的生长周期的有错误的信号。该疾病是慢性复发性状况,其在严重程度方面有差异,从轻微局部的斑块至全身覆盖。手指甲和脚趾甲经常受到影响(银屑病指甲营养不良),并可能被视为单独的症状。银屑病还可导致关节炎,其被称为银屑病关节炎。

[0115] 根据另外的实施方案,疫苗组合物以选自由以下组成的组的施用途径施用:静脉内、肌内、口服、舌下、粘膜内、腹膜内、鼻、皮下、局部和皮内或经皮。每个可能性代表了本发

明的单独的实施方案。

[0116] 因此,本发明提供了用于肠胃外施用的组合物,所述组合物包含溶解或悬浮于可接受的载体,诸如水性载体中的以上所述的剂的溶液。可使用多种药学上可接受的水性载体,例如,水、缓冲的水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸透明质酸等。这些组合物可通过常规的、熟知的灭菌技术灭菌,或可无菌过滤。所得的水溶液可被包装用于原样使用,或被冻干,冻干的制品在施用前与无菌溶液组合。组合物可根据需要包含物质作为药学上可接受的载体,以接近生理条件,诸如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如,乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、失水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。每个可能性是本发明的单独的实施方案。

[0117] 本发明的药物组合物可呈固体状态。对于固体组合物,可使用常规的无毒的药学上可接受的载体,其包括,例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。其中赋形剂是固体的适用于口服施用的药物制剂,例如,呈现为单位剂量制剂诸如,丸剂,胶囊或片剂,各自包含本发明的预定量的PC-缀合物作为活性化合物。片剂可通过任选地与一种或更多种辅助成分一起压制或模制来制备。压制的片剂可通过在合适的机器中,将呈自由流动形式,诸如粉末或颗粒的活性化合物,任选地与粘合剂、润滑剂(lubricant)、惰性稀释剂、润滑剂(lubricating agent)、表面活性剂或分散剂混合压制来制备。模制片剂可通过将活性化合物与惰性液体稀释剂模制来制备。片剂可任选地被包衣,并且如果未包衣,可任选地被刻痕。胶囊可通过将活性化合物单独的或与一种或更多种辅助成分混合填充进胶囊壳,并然后将它们以通常的方法密封来制备。扁囊剂类似于胶囊,其中活性化合物连同任何辅助成分一起被密封在米纸药袋中。活性化合物还可被配制为可分散的颗粒,其例如在施用之前可悬浮于水中,或撒在食物上。颗粒可被包装在例如小袋中。

[0118] 对于气雾剂施用,本发明的药物组合物例如连同表面活性剂和任选地推进剂作为药学上可接受的载体一起以细碎的形式被提供。当然,表面活性剂必须是无毒的,并且优选地可溶于推进剂。此类剂的代表是包含从6个至22个碳原子的脂肪酸,诸如己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、胆甾酸和油酸与脂族多元醇或其环酐的酯或偏酯(partial esters)。每个可能性是本发明的单独的实施方案。可采用混合的酯,诸如混合的或天然的甘油酯。如期望,载体还可包括,例如,用于鼻内递送的卵磷脂。

[0119] 本发明的药物组合物可呈脂质体的形式。脂质体提供用于本发明的免疫调节分子的递送和呈现的另一种递送系统。脂质体是包含通常围绕水性中心的磷脂和其他甾醇类的双层囊泡,PC-缀合物或其他产物可被包封于其中。脂质体结构是高度通用的,许多类型范围在纳米至微米尺寸,从约25nm至约500 $\mu$ m。已发现脂质体有效地将治疗剂递送至皮肤和粘膜表面。脂质体可进一步被修饰用于通过例如将特定抗体掺入表面膜来靶向递送。完整脂质体结构的平均存活时间或半衰期可以包含允许延长体内释放的某些聚合物,诸如聚乙二醇来被延长。脂质体可以是单层或多层。

[0120] 本发明的药物组合物可呈微米颗粒和纳米颗粒的形式。微米颗粒和纳米颗粒采用充当用于疫苗递送的储库的生物可降解的球体。聚合物微球相比于其他储库作用的佐剂具有的主要优势是,它们是非常安全的并已在美国经食品和药物管理局批准用于在人类医学作为合适的缝合线使用和用于作为生物可降解的药物递送使用。共聚物水解的速率被非常

良好表征,其又允许制造具有经延长的时间段持续释放免疫调节剂的微粒。

[0121] 本发明的药物组合物可作为微粒被肠胃外施用。特别是如果微粒掺入延长的释放特性,它们引起持久免疫。释放速率可通过将经不同时间段水解的聚合物的混合物和它们的相对分子量进行调节。不希望受限于理论,由于大颗粒在可用于巨噬细胞摄取之前必须分解成较小颗粒,不同大小的颗粒(1 $\mu$ m至200 $\mu$ m)的制剂还可有助于持久的免疫应答。以这种方式,单注射疫苗可通过整合各种粒径,从而延长PC-缀合物呈现来开发。

[0122] 将包含本发明的PC-缀合物的疫苗组合物施用至患者,以引发受试者的免疫应答的调节朝向如本文定义的抗炎活性。足以实现期望的治疗活性的量被定义为“免疫调节有效剂量”。为该用途有效的量将取决于,例如PC-缀合物组合物、施用的方式、患者的体重和一般健康状况、以及处方医师的判断。

[0123] 本发明的PC-缀合物可在药物疫苗中被使用,所述药物疫苗包含PC-缀合物和药学可接受的载体。这些组合物适用于单个施用或一系列施用(免疫接种程序)。当作为一系列提供时,提供继初始施用之后的接种以加强免疫应答,并且通常被称为加强接种。

[0124] 当免疫接种程序要求两个或更多个单独的剂量时,有必要考虑剂量之间的间隔。两个连续的剂量之间的间隔可以是相同的,或它可在整个程序中改变。根据某些实施方案,免疫接种程序还包括将受试者再暴露于包含本发明的PC-缀合物的疫苗(加强剂量)。如本领域技术人员所知的,第一次施用的时机的各种优选的条件和各种可能的组合和子组合,施用的最短间隔、最大间隔和总数目(以绝对项,或在规定时期内)存在。应该理解,所有这些组合和子组合都在本发明的教导的范围内。

[0125] 本发明还提供了用于治疗自身免疫性疾病的试剂盒,所述试剂盒包含一个或更多个容器,所述容器填充有疫苗组合物,所述疫苗组合物包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个PC部分或其衍生物和选自由以下组成的组的至少一种载体:聚合物、单糖、寡糖、多糖、肽、多肽和脂质。任选地此类容器可附有以管理药物或生物制品的生产、使用或销售的政府机构规定的形式的布告,所述布告反映了被该机构批准用于人类施用的生产、使用或销售。

[0126] 根据一些实施方案,本发明提供了用于治疗自身免疫性疾病或紊乱的试剂盒,所述试剂盒包含第一容器,所述第一容器包含磷酸胆碱缀合物,所述磷酸胆碱缀合物包含至少一个PC部分或其衍生物和选自由以下组成的组的至少一种载体:聚合物、单糖、寡糖、多糖、肽、多肽和脂质;第二容器,所述第二容器包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂;和任选地,第三容器,所述第三容器包含佐剂。所述试剂盒还可包含用于从所述第一和第二容器的内含物,和任选地,还从所述第三容器中的内含物制备疫苗的方案。

[0127] 本发明的PC-缀合物可用于用于自身免疫性疾病,特别是炎症疾病的预防、治疗和进展抑制的疫苗和免疫方案中。

[0128] 根据一些实施方案,本发明的PC-缀合物当施用至哺乳动物时,引发哺乳动物的免疫调节活性。可使用本领域技术人员已知的各种模型以确立本发明的缀合物的免疫调节能力。可使用细胞培养物测试PC-缀合物对细胞增殖、细胞因子谱、致耐受性树突状细胞的发育和调节性T细胞的发育的作用。例如,对于以下促炎细胞因子和抗炎细胞因子,包括,但不限于,IL-1、IL-2、IFN $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-15、IL-17和TNF $\alpha$ 可使用商品化试剂盒。如为本领域技术人员所知并如本文以下所例示的动物模型,可被用于测试本发明的PC-缀合物在治

疗、预防自体免疫疾病或减少自体免疫疾病的进展中的活性。

[0129] 根据一些实施方案,本发明的PC-缀合物的免疫调节能力以自身免疫性疾病,包括胶原诱导的关节炎(CIA)、结肠炎和系统性红斑狼疮(SLE)的动物模型在下文被例示。

[0130] 下文实施例是为了更充分地说明本发明的某些实施方案而呈现。然而,其不应以任何方式被解释为限制本发明的宽范围。本领域技术人员可容易地设想本文公开的原则的许多变化和修改,而不偏离本发明的范围。

## 实施例

[0131] 实施例1:PC-缀合物对系统性红斑狼疮(SLE)的发展的作用

[0132] 磷脂是非免疫原性的。因此,磷酸胆碱(PC)通常被用作不同载体的缀合物。载体可用作佐剂。在本研究中,使用以下PC-缀合物:PC-卵清蛋白(PC-OVA)和2-甲基丙烯酰氧乙基-PC(MPC)。

[0133] PC-OVA购自Biosearch Technologies, Inc.。

[0134] 在MPC中,PC呈现作为蠕虫上的部分。具体地,MPC是聚合物(2-甲基丙烯酰氧乙基)核心上的PC部分,定义为MPC。MPC购自NOF Inc.。

[0135] PC-缀合物免疫调节狼疮的潜力在NZBxNZW/F1小鼠中进行研究,所述NZBxNZW/F1小鼠在遗传背景上发展了狼疮。

[0136] 小鼠:雌性NZBxNZW/F1从Harlan Olac获得,并由Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)在8-10周龄时提供。将小鼠维持在Sheba Medical Center, Israel的Sheba动物设施中。所有动物如以色列卫生部的伦理审查委员会和科学动物指南(Ethical Review Committee of Israeli Ministry of Health and Sciences animal guidelines)批准的来照管。

[0137] NZBxNZW/F1小鼠中狼疮性肾炎的血清学和临床表现如先前所述被评价(Shoenfeld Y等人, Int Immunol. 2002, 14(11):1303-1311)。简言之,PC特异性的抗体如下文所描述的通过ELISA测量。dsDNA特异性的抗体如先前由我们所描述的通过ELISA来检测(Shoenfeld等人, 2002, 同上)。蛋白尿使用Albustix试剂盒(Bayer Diagnostic)通过标准半定量测试来测量。肾免疫复合物沉积(ICD)如先前所描述的来确定(Shoenfeld等人, 2002, 同上)。ICD的强度分级如下:0, 无ICD; 1, 低强度的ICD; 2, 中等强度的ICD; 和3, 高强度的ICD。ICD分析通过两类受试者来进行, 所述两类受试者的每只小鼠是否是处理小鼠或对照小鼠是未知的。

[0138] 结果显示了PC-OVA和MPC处理对NZBxNZW/F1狼疮小鼠中狼疮肾炎发展的抑制作用。抑制作用通过延迟的蛋白尿和肾小球基底膜上减少的免疫复合物沉积来证明。该结果是基于在起始于8周龄的疾病早期阶段的处理。每只小鼠每周3次皮下给予3 $\mu$ g/0.1ml PC-OVA、MPC或PBS, 每组n=20。每2周对小鼠取血用于测量PC和dsDNA特异性抗体。每2周对蛋白尿进行评价。

[0139] 用PC-OVA缀合物(图1, 正方形)的处理是免疫原性的, 且该小鼠与PBS(图1, 菱形)和MPC(图1, 三角形)处理的组相比形成升高的滴度的抗PC抗体( $p < 0.001$ ), 而MPC(聚合物核心上的多聚PC)是非免疫原性的且不引起抗PC抗体的产生( $p > 0.05$ )。抗PC抗体的数据以1:400的血清稀释度呈现。结果作为在405nm处的O.D.给出。PC特异性抗体在小鼠血清中的存

在通过ELISA针对PC-KLH(PC-钥孔虫凝集素)来检测,其中与KLH的结合用作对照参考。未观察到对KLH的应答。PC-OVA和MPC在所有时间点不具有对抗dsDNA抗体产生的任何作用(数据未示出)。

[0140] PC-OVA和MPC处理的作用未记录在如图1所示的抗dsDNA抗体产生中。

[0141] 在30至33周龄时,用PC-OVA(图2,正方形)或MPC(图2,三角形)处理的狼疮小鼠中的蛋白尿(定义为尿中至少100mg/dl蛋白)与用PBS(图2,菱形)处理相比被显著推迟( $p < 0.02$ )。

[0142] 分析来自用PC-OVA(图3A-3B)、MPC(图4A-4B)和PBS(图5A-5C)处理的狼疮小鼠的肾切片的肾小球性肾炎。应用两种染色程序(i)组织染色(PAS);和(ii)肾的肾小球膜处的免疫复合物沉积使用抗小鼠Fc-FITC缀合物的免疫组织染色。如图5A-5C中所示,用PBS处理的小鼠显示严重的(阶段VI)肾小球性肾炎,通过强的免疫复合物沉积(5A)、扩散的增殖性肾小球性肾炎(5B)和新月坏死性肾小球性肾炎(5C)例示。然而,用MPC(图4A-4B)和PC-OVA(图3A-3B)处理的狼疮小鼠在34周的相同时间点时仅显示肾小球性肾炎的早期阶段(阶段II)。

[0143] Kaplan-Meier分析显示,与PBS处理的小鼠(图6,菱形)相比,用PC-OVA(图6,三角形)处理的狼疮小鼠的存活时间显著更长(图6\*= $p < 0.01$ )。MPC处理的小鼠(图6,正方形)的存活时间仅显示显著性的趋势( $p < 0.04$ )。

[0144] 实施例2:PC-促吞噬素对体内蛋白尿发展的作用

[0145] 磷脂是非免疫原性的,因此,PC被缀合为可用作佐剂的PC-促吞噬素。

[0146] PC-促吞噬素:促吞噬素是四肽(苏氨酸-赖氨酸-脯氨酸-精氨酸,TKPR;SEQ ID NO:17)。在自身免疫性模型诸如EAE和狼疮中,它具有对疾病进展的抑制作用(Dagan S等人,J Biol Response Mod.1987,6(6):625-636)。缀合至促吞噬素的PC基于Michaelson化学反应合成。用于缀合物构建的PC衍生物4-氨基苯基磷酸胆碱购自Biosearch Technologies。

[0147] PC-促吞噬素对蛋白尿的作用在狼疮的小鼠模型,特别是在遗传背景上发展狼疮的雌性NZBXW/F1小鼠中确定。蛋白尿水平使用Multistix(Bayer Diagnostics)进行测量。这种类型的测量通常用于临床评价狼疮肾炎的表现。狼疮肾炎是由系统性红斑狼疮(SLE)造成的肾脏的炎症。

[0148] 来自14周龄的小鼠每周三次、以每只小鼠50 $\mu$ g/0.1ml的浓度皮下接受PC-促吞噬素(处理;N=10)或PBS(对照;N=10)。蛋白尿被定义为尿液中具有高于100mg/dl的蛋白水平。

[0149] 结果显示PC-促吞噬素处理对肾小球性肾炎的发展的抑制作用。如图7中所示,与对照组,即,仅接受载体(PBS)的小鼠相比,在用PC促吞噬肽(TPC)处理的小鼠的组中显示蛋白尿中的显著减弱( $p < 0.02$ )。

[0150] 实施例3:PC-促吞噬素对体内肾脏的形态的作用

[0151] PC-促吞噬素对肾脏的形态的作用在如实施例2中的狼疮小鼠模型中被确定。将从处理后处死的小鼠的肾脏获得的肾切片进行石蜡包埋。使用PAS染色检测肾炎的病理学。免疫荧光染色用于检测免疫复合物沉积。后者通过将石蜡包埋的切片与FITC缀合的抗小鼠IgG温育来实现。评价由病理学家进行。

[0152] 来自14周龄的小鼠每周三次、以每只小鼠50 $\mu$ g/0.1ml的浓度皮下接受PC-促吞噬素(处理;N=10)或PBS(对照;N=10)。

[0153] 结果显示PC-促吞噬素对肾小球性肾炎的发展的显著抑制作用。具体地,如图8A-8B中所示,用PC-促吞噬素处理的小鼠未显示肾炎的任何病理,例示了正常的肾小球(图8B;x60)。然而,对照组,即,仅接受载体(PBS)的小鼠显示严重的肾小球性肾炎、肾小球的强烈破坏、以及淋巴细胞的浸润(图8A;x60)。

[0154] 如图9A-9B中所示,与呈现严重的免疫复合物沉积的对照组(PBS)相比(图9A;x20),在用PC-促吞噬素处理的狼疮小鼠中,肾小球中显示了非常轻度的免疫复合物沉积(图9B;x40)。

[0155] 实施例4:PC-促吞噬素对体内免疫系统的作用

[0156] PC-促吞噬素对免疫系统的作用在如实施例2中的狼疮小鼠模型中被确定。测量了细胞因子分析物和调节性T细胞谱;这些类型的研究通常用于临床评价狼疮肾炎的表现。

[0157] 来自14周龄的小鼠每周三次、以每只小鼠50 $\mu$ g/0.1ml的浓度皮下接受PC-促吞噬素(处理;N=10)或PBS(对照;N=10)。在细胞因子研究中,促炎细胞因子IFN $\gamma$ 和抗炎细胞因子TGF $\beta$ 的相对mRNA表达水平使用LightCycler(Roche)通过实时RT-PCR进行分析。总RNA从脾细胞分离,并通过使用莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶(Promega)逆转录成cDNA。将所得的cDNA根据制造商的说明在特异性引物的存在下进行实时RT-PCR(表1)。20 $\mu$ l反应体积包含3mM MgCl<sub>2</sub>、LightCycler HotStart DNA SYBR Green I mix(Roche)、特异性引物对和5微升的cDNA。IFN $\gamma$ 和TGF $\beta$ 的相对表达针对 $\beta$ 肌动蛋白水平被标准化。

[0158] 表1-RT-PCR引物(分别为正向和反向)

[0159]

引物	序列(5`至3`)	SEQID NO:
IFN $\gamma$	gaacgctacacactgc	1
IFN $\gamma$	ctggacctgtgggttg	2
IL-1 $\beta$	ccccaactggtaaataca	3
IL-1 $\beta$	ccgaggactaaggagtg	4
IL-10	aacctegtttgactctct	5
IL-10	caccatagcaaagggc	6
IL-17a	gggcaagggatgctctctag	7
IL-17a	ctgaagctgctgcagagctg	8
TNF- $\alpha$	acgtcgtagcaaaccac	9
TNF- $\alpha$	agatagcaaatcggtg	10
TGF- $\beta$	gaacccccattgctgt	11
TGF- $\beta$	gcctgtattccgtct	12
Foxp3	taccacaatatgacgaccc	13
Foxp3	ctcaaattcatctacggtcc	14
$\beta$ -肌动蛋白	gtgacgttgacatccg	15
$\beta$ -肌动蛋白	cagtaacagtccgct	16

[0160] 结果表明,PC-促吞噬素(TPC)发挥了对肾小球性肾炎的发展的显著抑制作用。如

图10中所示,与源自PBS处理的小鼠的TGFβ mRNA相比,在用PC-促吞噬素处理的小鼠中抗炎细胞因子TGFβ的脾细胞相对mRNA表达被显著增强 ( $p < 0.001$ )。相比之下,与PBS对照组的IFN  $\gamma$  mRNA相比,在用PC-促吞噬素 (TPC) 处理的小鼠中促炎细胞因子IFN  $\gamma$  的脾细胞相对mRNA表达水平被显著降低,即改善 ( $p < 0.03$ )。结果表明,PC-促吞噬素抑制与肾炎相关的炎症的发展。

[0161] 抗炎细胞因子TGFβ和IL-10以及促炎细胞因子IFN  $\gamma$  和IL-17的脾细胞蛋白水平根据制造商的说明通过DuoSet (R&D Systems) 定量。简言之,收获来自用PC-促吞噬素或PBS处理的小鼠的脾脏,分离脾细胞 ( $5 \times 10^6$ /ml) 并温育72小时,然后评价分泌的细胞因子的含量。

[0162] 结果显示由PC-促吞噬素发挥的对肾小球性肾炎的发展的显著抑制作用。如图11中所示,与PBS处理相比,用PC-促吞噬素 (TPC) 处理的小鼠显示抗炎细胞因子TGFβ和IL-10的分别5.1和4.8增加的蛋白水平 ( $p < 0.001$ )。同时,与对照组相比,在PC-促吞噬素 (TPC) 处理的小鼠中促炎细胞因子IFN  $\gamma$  和IL-17的浓度分别降低了5.2和2.7倍 (分别,  $p < 0.001$ 、 $p < 0.02$ )。这些结果进一步表明,PC-促吞噬素处理导致促炎细胞因子的显著抑制和抗炎细胞因子的增强的表达,从而减少和甚至阻止肾炎的发生。

[0163] 最后,调节性T细胞 (Treg) 谱测定在与以下抗体温育的分离的脾细胞中进行:抗-CD4<sup>+</sup>FITC、抗-CD25<sup>+</sup>APC和抗-FOXP3<sup>+</sup>PE (eBioscience),并通过FACS分析。调整正向和侧向散射门控以包含所有细胞并排除碎片 (Becton Dickinson)。将细胞对CD4<sup>+</sup>细胞门控,并且对于细胞内染色,将细胞与固定溶液温育、洗涤并重悬浮于透化溶液 (Serotec)。同种型对照用作参考。

[0164] 在此,结果同样显示PC-促吞噬素处理对肾小球性肾炎的发展的显著抑制作用。如图12中所示,用PC-促吞噬素 (TPC) 处理的12只小鼠显示在Treg中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>表达水平的 $18 \pm 2\%$ 的增加 ( $p < 0.02$ ),而用PBS处理的小鼠观察到仅 $4 \pm 0.6\%$ 的增加 ( $p < 0.01$ )。显著地,磷酸胆碱 (PC) 或促吞噬素 (T),未引起Treg水平的任何显著升高 ( $p < 0.01$ )。此外,用PC-促吞噬素获得的Treg的相对量高于从PC和促吞噬素各自获得的相对Treg的总和。因此,PC-促吞噬素显示协同治疗作用。

[0165] 实施例5:PC-促吞噬素对体内结肠炎发展的作用

[0166] PC-促吞噬素对结肠炎发展的作用在经历通过葡聚糖硫酸钠 (DSS) 处理诱导急性结肠炎的小鼠模型中确定。具体地,结肠炎的诱导在雄性C57BL/6小鼠 (“结肠炎小鼠”) 通过补充具有DSS (mol. wt. 36,000-50,000) 的饮用水 (2.5%wt/v) 持续五天来进行。

[0167] 两组小鼠每日使用喂养针通过口服摄取,每只小鼠 $500 \mu\text{g}/0.1 \text{ml}$ 浓度的PC-促吞噬素 (处理;  $n = 10$ ) 或PBS (对照;  $n = 10$ )。在11天期间,DSS施用前两天开始的11天期间给予这些化合物。第三组小鼠 ( $n = 10$ ) 不诱导结肠炎,即不接受DSS,也没有任何处理。所有小鼠组具有相同的平均体重 (27-29克)。

[0168] 通过每两天监测体重、直肠出血、大便稠度和存活,进行结肠炎发展的评价。肠出血通过Hemocult测试追踪并观察肛门出血迹象或总出血。每日疾病活动指数 (DAI) 通过在0至4的量表分级以下参数来计算:体重变化 (0,  $< 1\%$ ; 1, 1-5%; 2, 5-10%; 3, 10-15%; 和4,  $> 15\%$ )、肠出血 (0, 阴性; 4, 阳性)、和大便稠度 (0, 正常; 2, 便溏; 4, 腹泻)。然后将组合的评分除以三以获得最终的疾病活动指数。疾病诱导十天后,处死小鼠并收集大肠并评价结肠长度和微观结肠损伤。为了微观评分,结肠的近端、中间、和远侧部分和盲肠被固定在10%磷

酸盐缓冲的福尔马林中。石蜡包埋的切片用H&E染色。组织学损伤和炎症的程度是由专家级病理学家以盲法分级。

[0169] 结果显示PC-促吞噬素对DSS诱导的结肠炎的发展的改善作用。如图13A中所示,用PC-促吞噬素(空心圆形)处理的结肠炎小鼠的DAI评分在实验的最后一天即第8天时为约0.9 ( $p < 0.02$ ),其比对照组(PBS,实心圆形)的DAI显著更低。后者随时间逐渐增加,5天后达到2.6的值。

[0170] 此外,如在图13B-13C中所示,与对照(PBS处理的,实心圆形)小鼠相比,用PC-促吞噬素(空心圆形)处理的小鼠显示出显著低的直肠出血(13B;  $P < 0.001$ )和体重损失(13C;  $P < 0.001$ )。最后,如图13D中所示,用PC-促吞噬素(空心圆形)处理的小鼠显示显著更高的存活。5天后,用PBS处理的小鼠(实心圆形)显示存活的下降,而用PC-促吞噬素(空心圆形)处理的小鼠甚至在12天后仍然100%存活。

[0171] 如图14A-14B中所示例的,与从8cm缩短至5-6cm的对照(PBS处理的)小鼠相比,用PC-促吞噬素(TPC)处理的小鼠的结肠长度是8cm ( $p < 0.02$ )。

[0172] 最后,如图15A-15G中所示,来自所有三个小鼠组的结肠的结肠切片的组织学分析显示,相对于对照处理,即,PBS处理(图15A; X10, 15E;  $\times 40$ )和健康的小鼠,即未经历DSS诱导结肠炎的小鼠(图15C; X20, 15G; X60),PC-促吞噬素处理(图15B; X20, 15F; X60)减弱了结肠破坏。在健康小鼠(图15C、15G)和用PC-促吞噬素(图15B、15F)处理的结肠炎小鼠的结肠上皮细胞的结构中未发现到差异,而在用PBS(图15A、15E)处理的结肠炎小鼠中观察到细胞的强烈浸润和腺体的缩小。

[0173] 实施例6:PC-缀合物对胶原诱导的关节炎(CIA)的体内作用

[0174] 在先的研究表明,CIA小鼠,即具有胶原诱导的关节炎的小鼠的PC-OVA处理,导致与从Th1转移至Th2应答相关的炎症的进展的改善。在本研究中,评价PC-促吞噬素、PC-聚糖和MPC对具有胶原诱导的关节炎的雄性DBA/1小鼠中疾病进展的作用。

[0175] 为获得PC-聚糖,将PC或PC衍生物直接衔接至聚糖部分,诸如Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc和N-乙酰葡萄糖胺,以分别形成PC-Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc和PC-N-乙酰葡萄糖胺(PC-GlcNAc)。

[0176] 根据以下两个方案进行用本发明的PC-缀合物处理关节炎动物模型:(1)预防性的(预防性)方案,用胶原诱导的关节炎(CIA)小鼠,其中在通过注射胶原II诱导关节炎之前两天施用PC-缀合物;在八周龄时施用PC-缀合物,然后检测关节炎的临床表现;(2)治疗性方案,其中当疾病在进展状态时(例如,20周龄时CIA,其与24周龄时狼疮相似)施用PC-缀合物。

[0177] 雄性DBA/1小鼠在尾的基部接受50 $\mu$ g的鸡II型胶原(CII)与弗氏完全佐剂以1:1的乳剂。小鼠由两个盲观察者每周三次评价关节炎的迹象。评价是基于以下的严重程度评分:0=正常,1=红斑,2=红斑加肿胀,3=功能的延迟/损失,以及总评分=四肢的总和。对于预防性方案,小鼠在-2天、0天和第21天时用每只小鼠3 $\mu$ g/0.1ml的PC-缀合物皮下处理。对于治疗性研究,小鼠在CIA是临床上可检测的1天后开始每周三次用PC-缀合物、3 $\mu$ g/0.1ml PBS皮下处理14天。对照小鼠在与对PC-缀合物使用的那些相似的时间点接受载体(PBS)或单独的部分(例如促吞噬素、聚合物2-甲基丙烯酸酰氧乙基和聚糖)。

[0178] 增殖评价如下:引流淋巴结细胞(DLN)和脾细胞以 $2 \times 10^6$ /ml在RPMI-1640培养基中

培养96小时,该RPMI-1640培养基补充有10%热灭活胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、0.1mM非必需氨基酸、100U/ml青霉素、100 $\mu$ g/ml链霉素和50 $\mu$ M 2-ME。细胞用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记并与或不与胶原II(50 $\mu$ g/ml)共培养5天。然后,收获淋巴细胞,增殖通过CFSE稀释法和流式细胞术评价,并表示为MFI(平均荧光强度)。

[0179] 细胞因子的谱评价如下:脾细胞和DLN细胞的培养液在分别暴露于胶原II(50 $\mu$ g/ml)或刀豆蛋白A(Con-A;5 $\mu$ g/ml)48小时和72小时后收获并存储在约-80 $^{\circ}$ C。PC-缀合物的作用通过以下Th1/Th2/Th17选择的细胞因子来检查。具体地,促炎细胞因子和抗炎细胞因子(IL-1、IL-2、IFN $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-15、IL-17和TNF $\alpha$ )的水平使用MILLIPLEX MAP小鼠细胞因子试剂盒(Millipore)根据制造商的说明在Luminex(Bio-plex $^{\circledR}$ )上进行监测。通过ELISA试剂盒监测TGF $\beta$ 水平。

[0180] 基于该细胞因子谱,选择的细胞因子被选择用于使用定量实时RT-PCR测量mRNA水平,如实施例4中详细描述。cDNA样品使用特异性引物(表1)来扩增。

[0181] 血液中自身抗体表达水平如下评价:在不同时间点从不同组的小鼠采集血液,并通过ELISA追踪血清中抗胶原II和抗PC的滴度。简言之,用PBS中的胶原-II(10 $\mu$ g/ml)、PC-KLH(10 $\mu$ g/ml)、聚糖(10 $\mu$ g/ml)、促吞噬素(10 $\mu$ g/ml)或2甲基丙烯酰氧乙基聚合物(10 $\mu$ g/ml)包被ELISA板,4 $^{\circ}$ C下过夜。然后,将BSA(在PBS中3%)封闭的板在室温下暴露于不同稀释度的血清(1:200至1:10,000)持续2小时。结合用缀合至碱性磷酸酶的抗小鼠IgG或IgM和适当的底物来探测。数据在405nm参考(ref.)600nm处读取。抗CCP(环瓜氨酸肽)抗体滴度使用抗DIASTAT抗CCP2按照制造商的说明并具有以下修改来确定:小鼠血清以样品稀释液稀释至1:10或1:100,且第二抗体被碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠IgG代替。

[0182] 小鼠爪子的组织病理学也如下被评价:小鼠爪子被固定在4%中性缓冲的福尔马林(Sigma)中,脱钙,切片,并用H&E或核固宝红-苯胺蓝-橙G(Nuclear Fast Rubine-Aniline Blue-Orange G)染色。间隔80 $\mu$ m的四个冠状切片由两个独立的观察员评分,对于细胞浸润、渗出、和血管翳以低倍(lower power),且对于骨侵蚀和软骨破坏以低倍(610)和高倍(high power)(6100)。使用如下的从0至3的半定量分级量表:0,无变化;1,轻度变化;2,中度变化;和3,在实验中观察到的最严重的变化。软骨破坏被确定为软骨相对于总软骨面积的损失。每个动物的平均评分以各自参数来确定,并且评分被平均以确定组平均数。

[0183] 调节性T评价如下进行:CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Treg可在蠕虫感染期间被诱导。来自其中CIA进展在用PC-缀合物处理后减弱的小鼠的脾细胞和DLN细胞被进一步分析Th1/Th2/Th17细胞因子产生和CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ ,调节性T细胞(Treg)表型。Treg水平的测量使用磁珠阴性选择CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ 调节性T细胞分离试剂盒通过FACS来进行。试剂盒包含针对CD8(Ly-2)、CD11b(Mac-1)、CD45R(B220)、CD49b(DX5)、Ter-119的谱系特异性生物素缀合的抗体的混合物,和用于消耗非CD4 $^{+}$ T细胞的抗生物素微珠,以及用于CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ 调节性T细胞的随后阳性选择的CD25-PE和抗PE微珠。细胞通过流式细胞术分析。Foxp3的mRNA水平也通过实时RT-PCR如以上对细胞因子描述的来分析。使用的引物除了其他的以外包括在以上表1中所列的那些。

[0184] 具体实施方案的以上描述将非常如此充分地揭示本发明的一般性质,以至于其他人无需过度实验便可通过应用现有知识,为了各种应用容易地修改和/或调整此类具体实施方案且不偏离一般概念,并因此,此类调整和修改应该并意图被包含在所公开的实施方案的等同物的含义和范围内。应理解,本文所采用的措辞或术语是为了描述性目的而非限

制性目的。用于实施各种公开的功能的方法、材料和步骤可采取多种替代性形式而不偏离本发明。

## 序列表

	<110> 堤乐哈修门医学研究基础建设及服务有限公司	
	<120> 磷酸胆碱缀合物及其用途	
	<130> SBA 006	
	<150> 61/760668	
	<151> 2013-02-05	
	<160> 22	
	<170> PatentIn 版本 3.5	
	<210> 1	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IFN- $\gamma$ 引物	
	<400> 1	
	gaacgctaca cactgc	16
	<210> 2	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IFN- $\gamma$ 引物	
	<400> 2	
[0001]	ctggacctgt gggttg	16
	<210> 3	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IL-1 $\beta$ 引物	
	<400> 3	
	ccccactgg taaatca	17
	<210> 4	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IL-1 $\beta$ 引物	
	<400> 4	
	ccgaggacta aggagtg	17
	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IL-10 引物	

	<400> 5 aacctcgttt gtacctct	18
	<210> 6 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> IL-10 引物 <400> 6 caccatagca aagggc	16
	<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> IL-17a 引物 <400> 7 gggcaaggga tgctctctag	20
[0002]	<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> IL-17a 引物 <400> 8 ctgaagctgc tgcagagctg	20
	<210> 9 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> TNF- $\alpha$ 引物 <400> 9 acgtcgtagc aaaccac	17
	<210> 10 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> TNF- $\alpha$ 引物 <400> 10 agatagcaaa tcggctg	17
	<210> 11 <211> 16 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> TGF- $\beta$ 引物	
	<400> 11	
	gaaccccat tgctgt	16
	<210> 12	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> TGF- $\beta$ 引物	
	<400> 12	
	gccctgtatt ccgtct	16
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Foxp3 引物	
	<400> 13	
	taccacaata tgcgaccc	18
[0003]	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Foxp3 引物	
	<400> 14	
	ctcaaattca tctacgtcc	20
	<210> 15	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> $\beta$ -肌动蛋白	
	<400> 15	
	gtgacgttga catccg	16
	<210> 16	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> $\beta$ -肌动蛋白引物	
	<400> 16	
	cagtaacagt ccgcct	16
	<210> 17	
	<211> 4	

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <400> 17  
 Thr Lys Pro Arg  
 1

<210> 18  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X 不存在或是 Arg。  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X 不存在或是 Arg。  
 <400> 18  
 Thr Lys Pro Xaa  
 1

[0004]

<210> 19  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <400> 19  
 Thr Lys Pro Pro Arg  
 1                    5

<210> 20  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <400> 20  
 Ser Lys Pro Arg  
 1

<210> 21  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>

[0005]      <223> 合成肽  
             <400> 21  
             Thr Arg Pro Arg  
             1  
  
             <210> 22  
             <211> 4  
             <212> PRT  
             <213> 人工序列  
             <220>  
             <223> 合成肽  
             <400> 22  
             Ser Lys Pro Lys  
             1

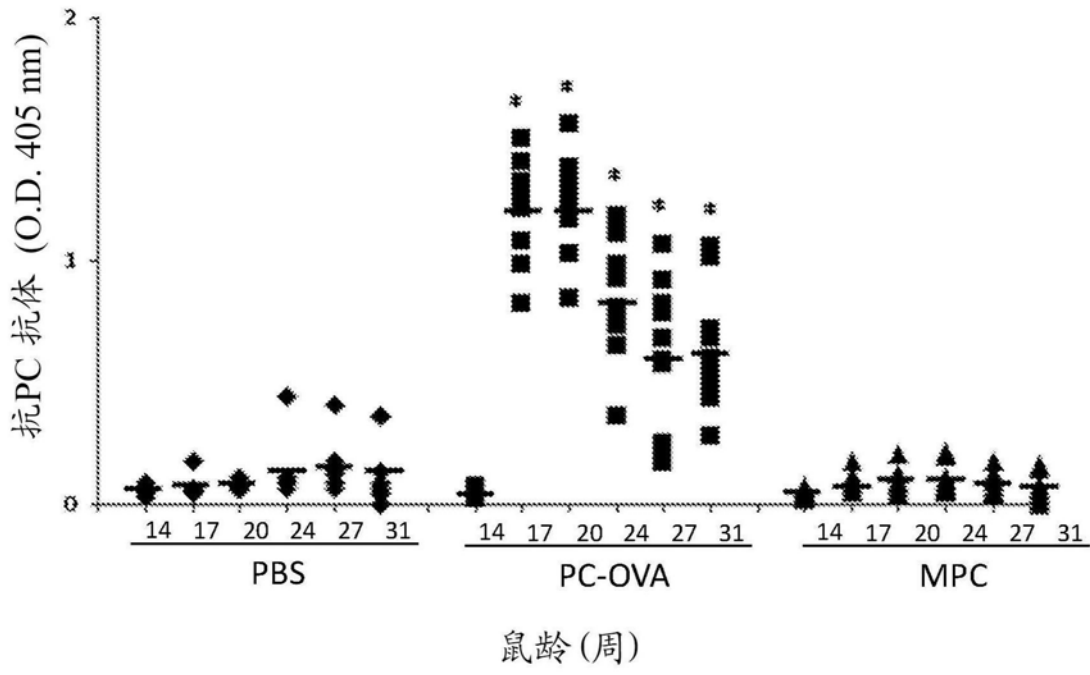


图1

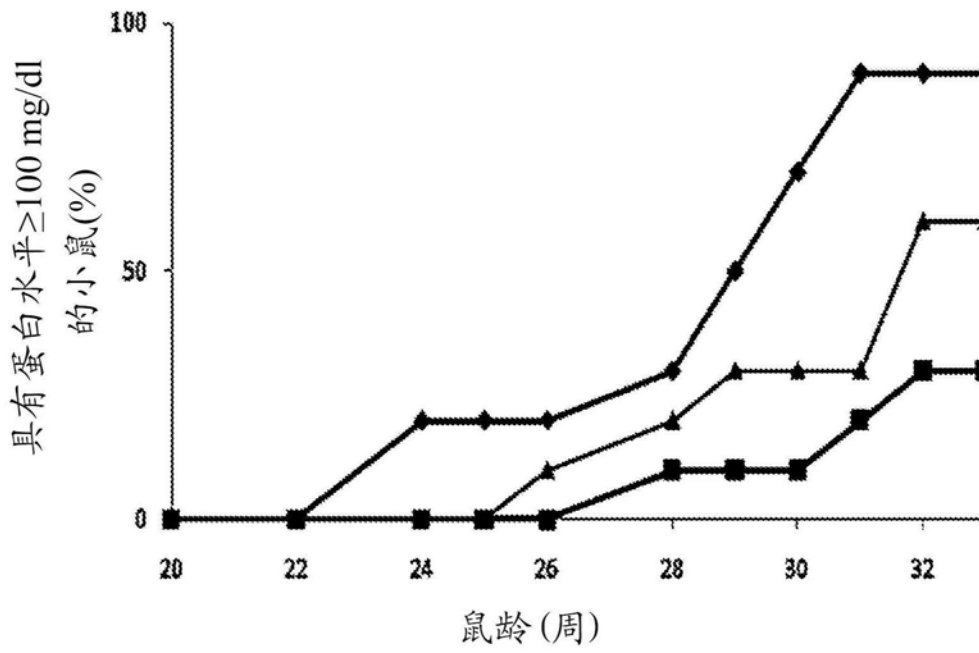


图2

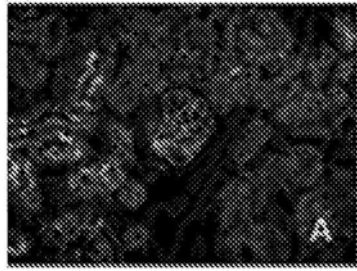


图3A

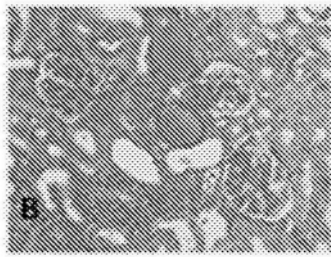


图3B

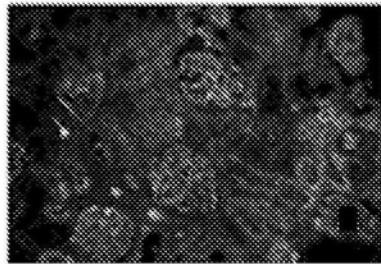


图4A

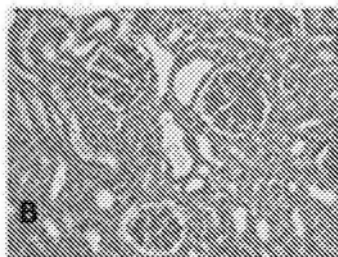


图4B

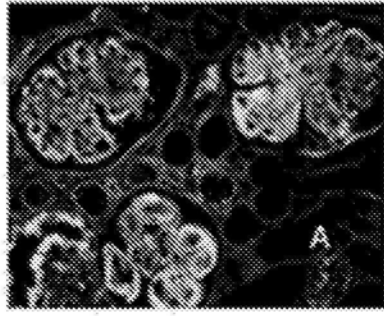


图5A

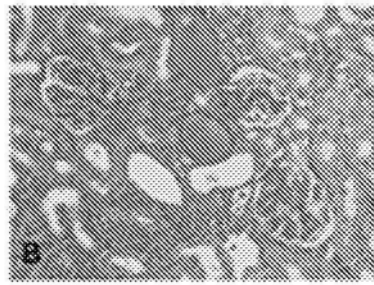


图5B

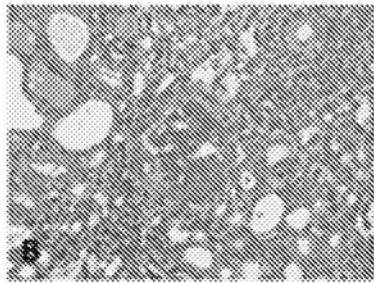


图5C

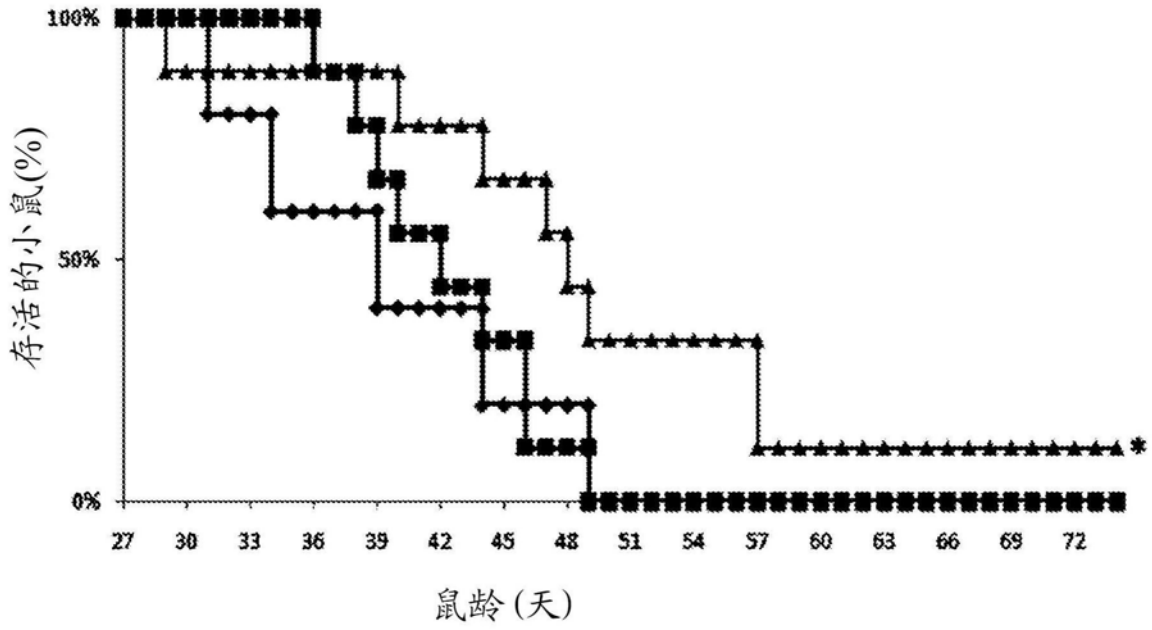


图6

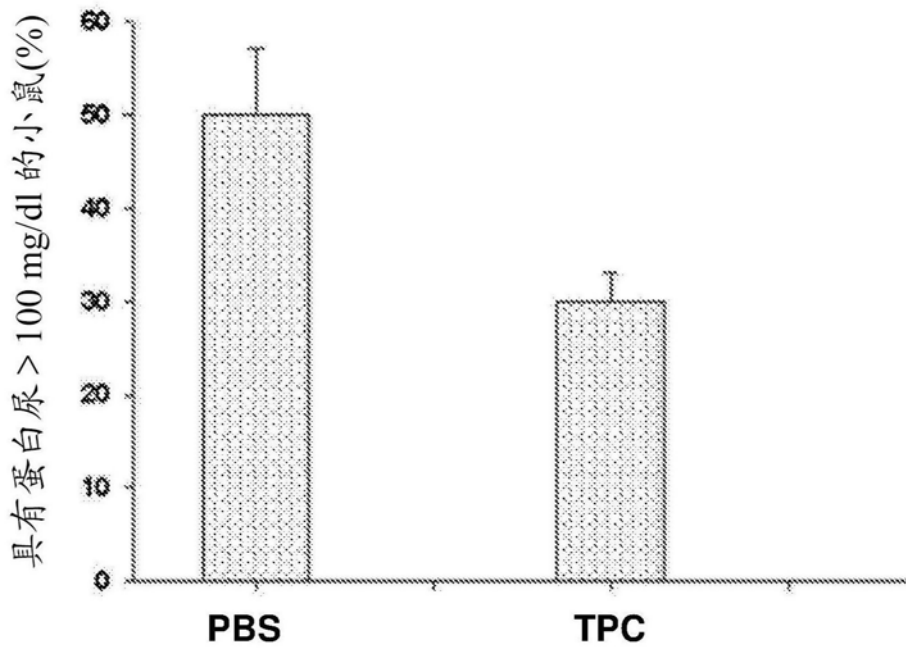


图7

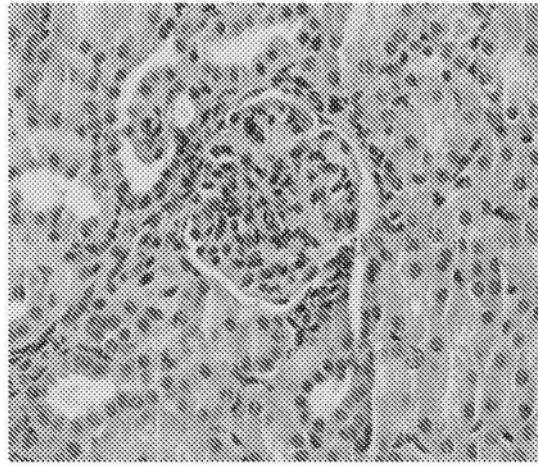


图8A

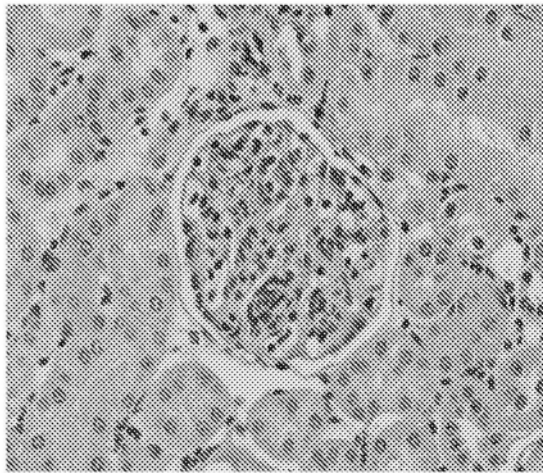


图8B

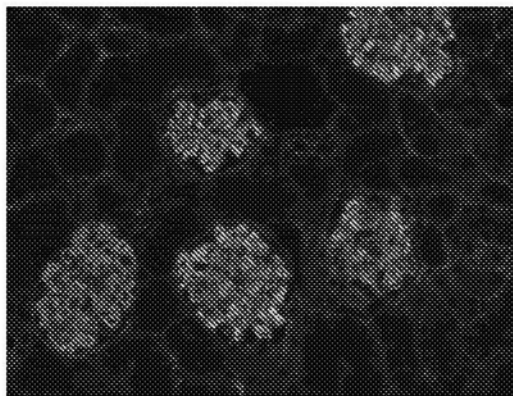


图9A

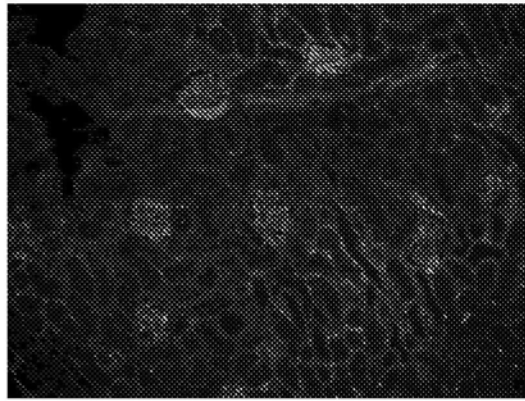


图9B

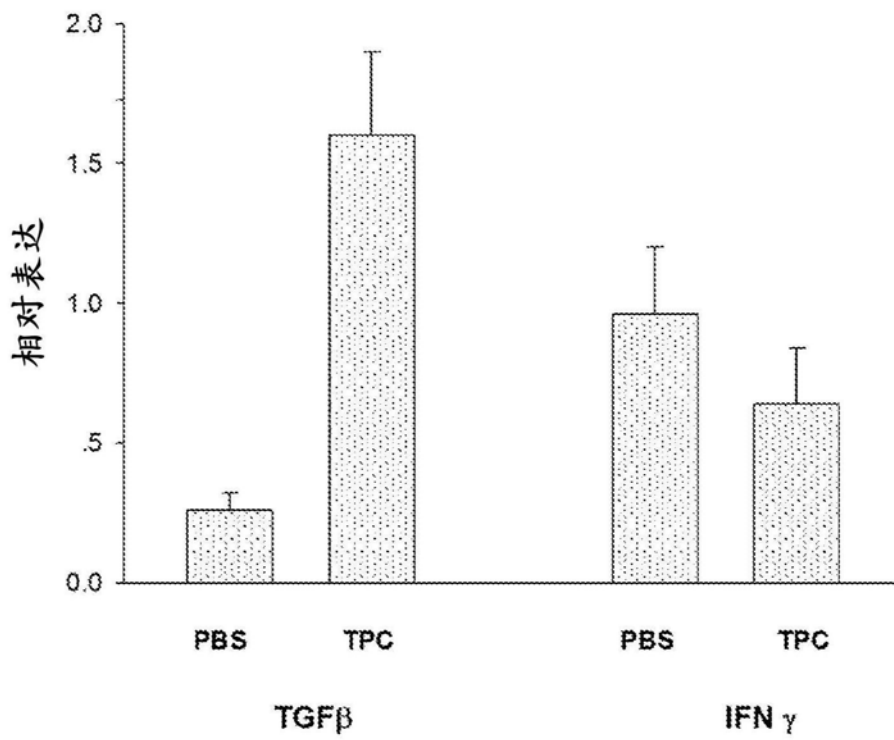


图10

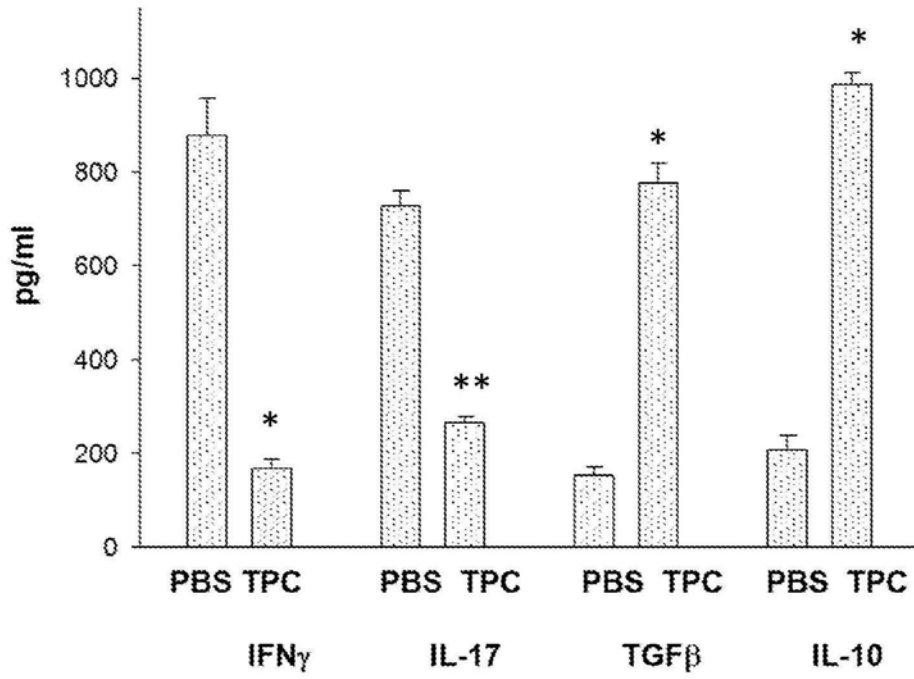


图11

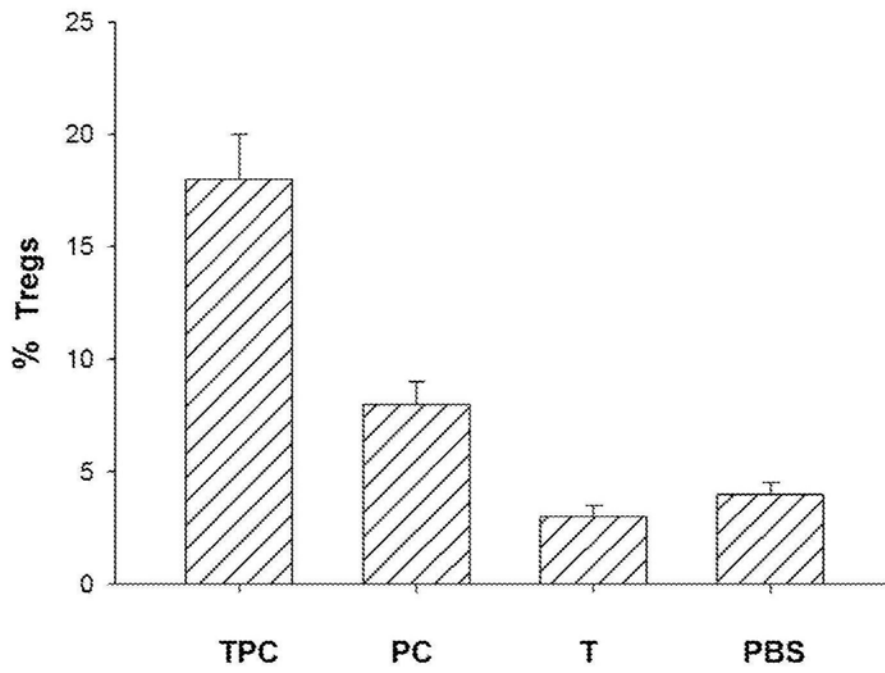


图12

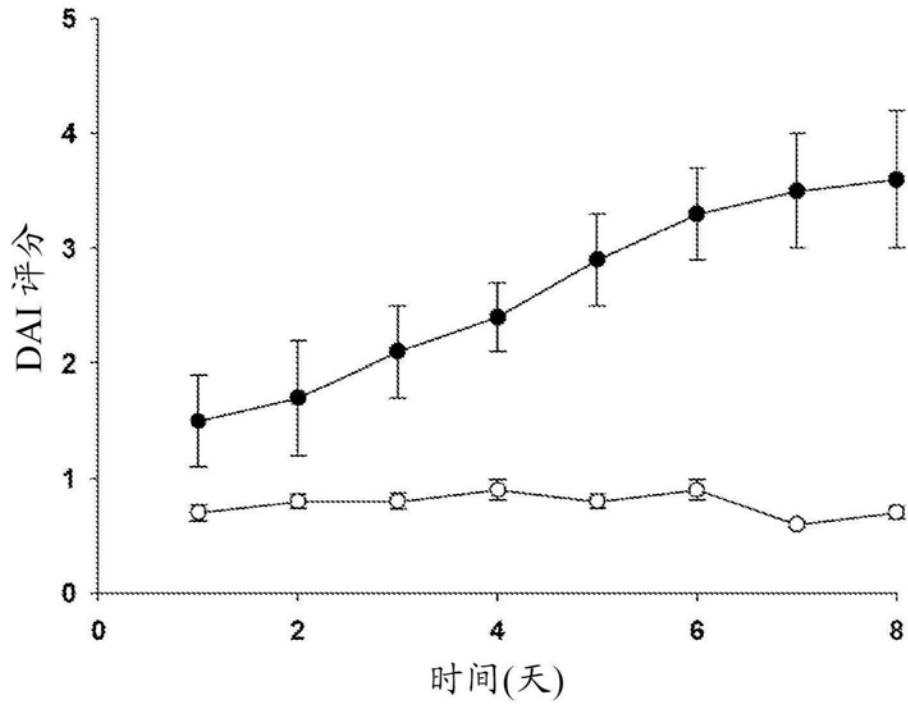


图13A

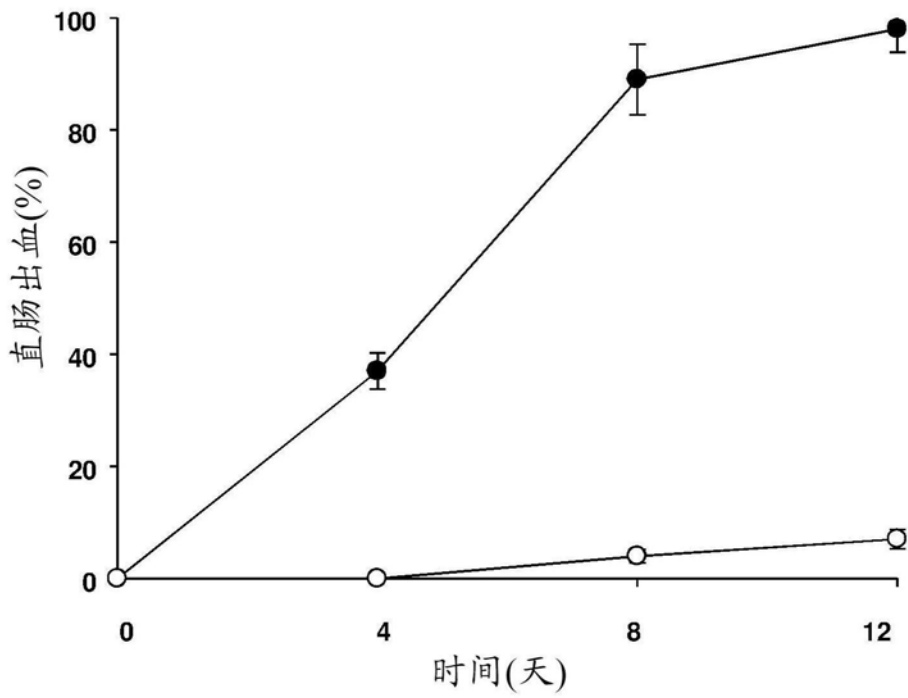


图13B

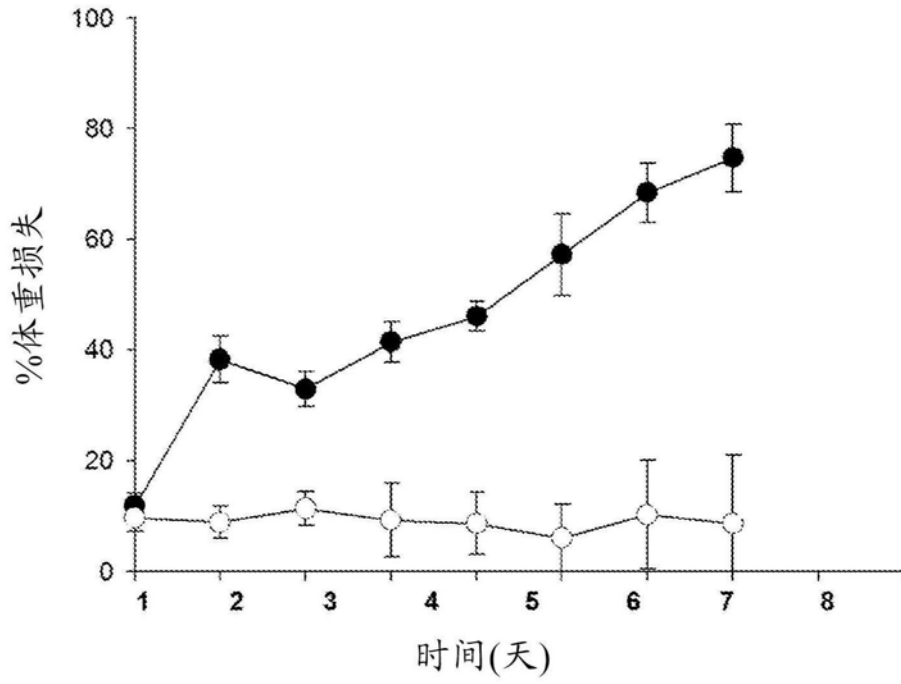


图13C

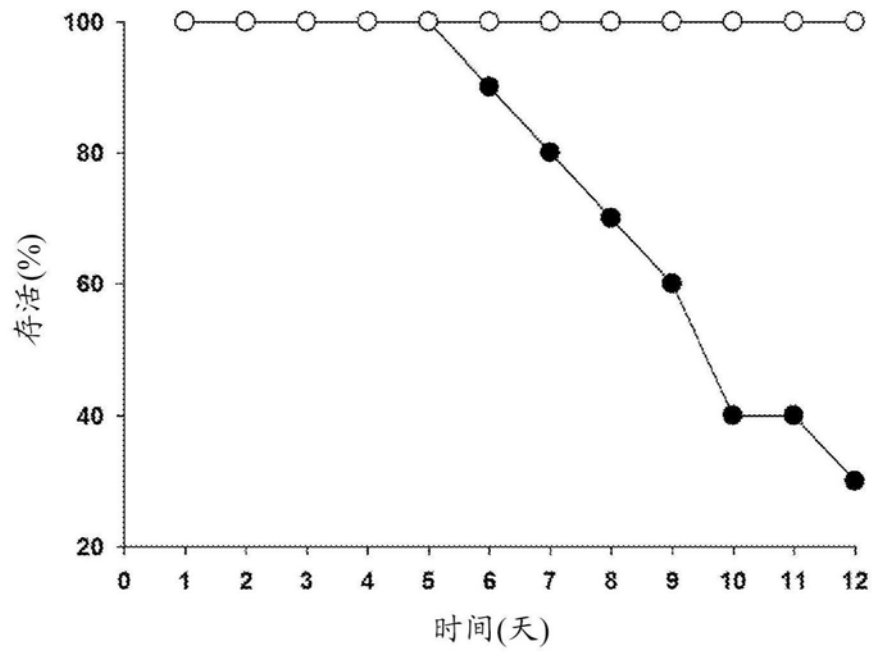


图13D

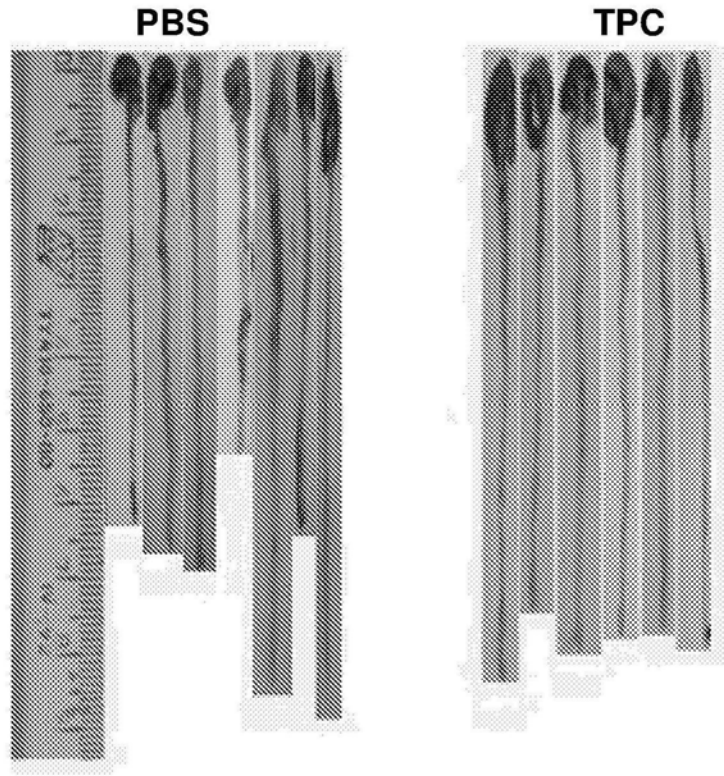


图14A

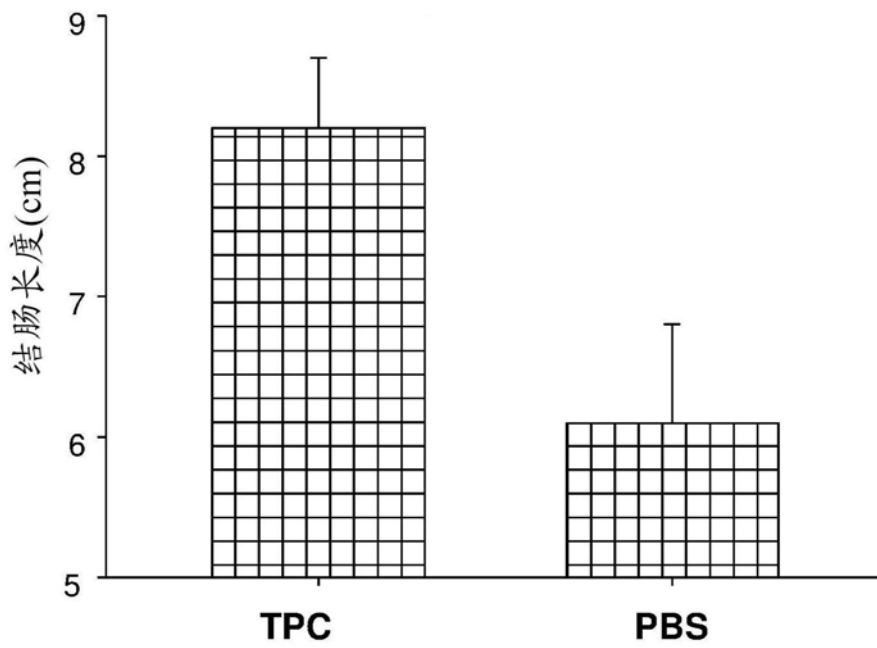


图14B

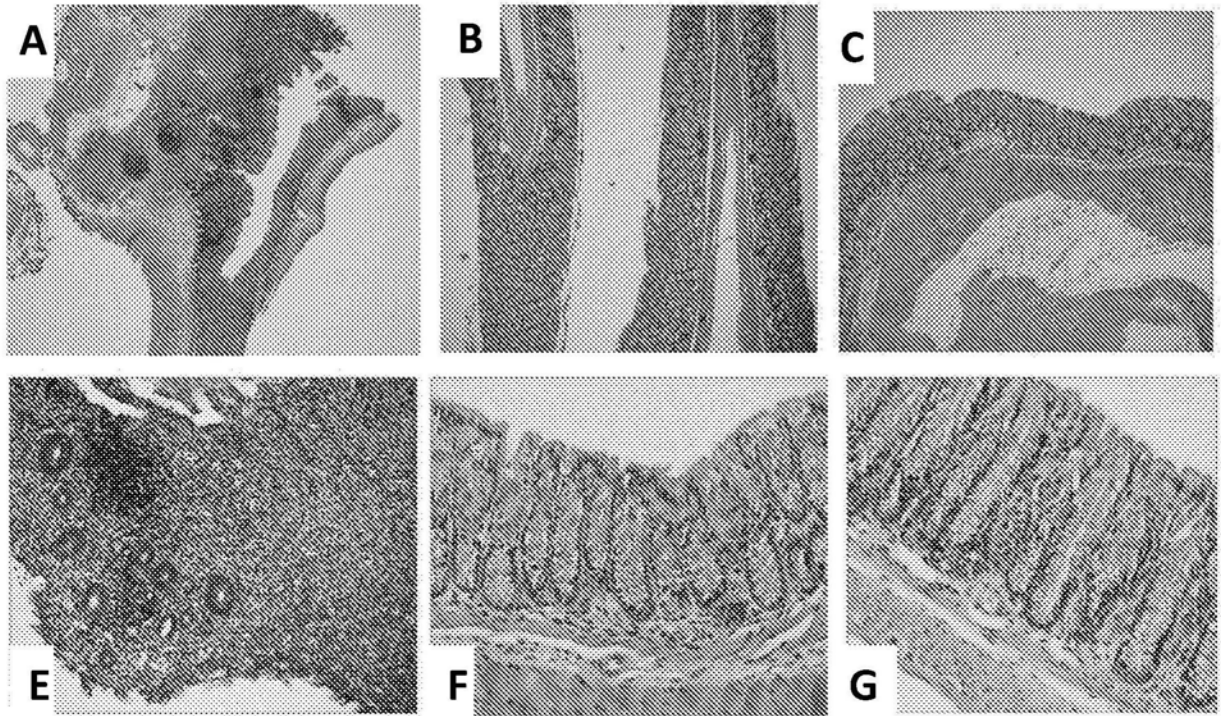


图15