



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102018715 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 20

(21) 申请号 201010166738. 7	A61P 21/00(2006. 01)
(22) 申请日 2003. 06. 17	A61P 29/00(2006. 01)
(30) 优先权数据	A61P 19/04(2006. 01)
60/389, 577 2002. 06. 17 US	A61P 7/00(2006. 01)
60/414, 831 2002. 09. 27 US	A61P 1/00(2006. 01)
(62) 分案原申请数据	A61P 9/00(2006. 01)
03819529. 1 2003. 06. 17	A61P 25/00(2006. 01)
(71) 申请人 费城健康与教育公司	A61P 5/18(2006. 01)
地址 美国宾夕法尼亚	A61P 3/10(2006. 01)
(72) 发明人 B·A·詹姆森 A·A·特雷蒂亚科瓦	A61P 17/00(2006. 01)
H·C·戴维森	A61P 17/06(2006. 01)
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专	A61P 15/00(2006. 01)
利商标事务所 11038	A61P 27/16(2006. 01)
代理人 唐伟杰	A61P 27/02(2006. 01)
(51) Int. Cl.	A61P 13/10(2006. 01)
A61K 31/5415(2006. 01)	A61P 13/12(2006. 01)
A61P 37/02(2006. 01)	A61P 43/00(2006. 01)
A61P 21/04(2006. 01)	

权利要求书 1 页 说明书 74 页 附图 57 页

(54) 发明名称

免疫调节及对涉及血清素家族受体及血脑屏障的细胞过程的作用

(57) 摘要

本发明涉及免疫调节及对涉及血清素家族受体及血脑屏障的细胞过程的作用。具体地,本发明发现了经由1B、2、4和6型血清素受体的信号传递对T细胞活化的重要性,因此抑制这些信号传递,如用氟奋乃静抑制,可用于调节免疫应答、细胞增殖、和凋亡、及其他细胞进程。此免疫调节用于治疗免疫疾病或病症,且用于这些疾病或病症的潜在疗法的发展。本发明进一步发现在发生细胞周期进程的细胞中,抑制血清素信号传递可抑制细胞的该进程并诱导凋亡和形态学变化。这些抑制血清素能信号传递的效用可用于实施选择性的细胞杀伤和用于鉴定抑制该信号传递的化合物。此外,提供了使用方法,也提供了鉴别及生产实质上不透血脑屏障的抑制剂的方法。

1. 有效量氟奋乃静的吩噻嗪衍生物在制备用于治疗哺乳动物由细胞介导的疾病的药物中的应用，其中所述细胞需要经由血清素受体的血清素信号传递，其中所述药物接触细胞后抑制血清素与所述细胞上的血清素受体的相互作用，其中所述抑制对所述细胞是有害的使得所述细胞不介导所述疾病，其中所述吩噻嗪衍生物相对氟奋乃静具有升高的极化。

2. 权利要求 1 所述的用途，其中所述的吩噻嗪衍生物是 QSS-1、QSS-3、QSS-5、QSS-6、QSS-12 或 QSS-13。

3. 权利要求 1 的应用，其中所述自身免疫疾病选自重症肌无力、特发性炎症肌病、慢性嗜中性白血球减少症、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血综合症、抗磷脂抗体综合症、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、心肌炎、Gillian-Barre 综合症、血管炎、多发性硬化症、视神经脊髓炎 (Devic 综合症)、淋巴细胞性垂体炎、格雷夫斯病、爱迪生病、甲状旁腺功能减退症、一型糖尿病、系统性红斑狼疮、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、牛皮癣、银屑病关节炎、子宫内膜异位、自身免疫性睾丸炎、结节病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性耳聋、斯耶格伦病、自身免疫性色素层视网膜炎、间质性膀胱炎、肺出血肾炎综合症及纤维肌痛。

4. 权利要求 1 所述的用途，其中所述的疾病是多发性骨髓瘤。

5. 权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述拮抗剂实质上不透血脑屏障。

6. 权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述药物适于经口施用。

7. 权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述药物适于肠胃外施用。

8. 权利要求 1-4 中任一项所述的用途，其中所述药物适于快速注射施用。

9. 用于治疗由细胞介导的疾病的试剂盒，其中所述细胞需要经由血清素受体的血清素信号传递，所述试剂盒包括有效量的氟奋乃静的吩噻嗪衍生物，所述吩噻嗪衍生物相对氟奋乃静而言具有升高的极化，所述试剂盒进一步包括用药器及其使用说明材料。

10. 权利要求 9 所述的试剂盒，其中所述的吩噻嗪衍生物是 QSS-1、QSS-3、QSS-5、QSS-6、QSS-12 或 QSS-13。

免疫调节及对涉及血清素家族受体及血脑屏障的细胞过程的作用

[0001] 本申请是申请日为 2003 年 6 月 17 日、发明名称为“免疫调节及对涉及血清素家族受体及血脑屏障的细胞过程的作用”以及申请号为 038195291 的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据 35U.S.C. § 119(e) 要求以下优先权：2002 年 6 月 17 日提交的美国临时申请 60/389,577 和 2002 年 9 月 27 日美国临时申请 60/414,831，其在此均全文引用。

[0004] 发明背景

[0005] 血清素（又名 5-羟色胺或 5-HT）是一种神经递质，在病理生理学上应用广泛，常用于治疗多种神经精神性障碍。血清素通过多种血清素家族受体分子（此处引用为“5-HT 受体” or “5-HTR”）发挥功效。传统概念中，血清素受体家族成员根据对不同血清素拮抗剂的特异性等药理学特征分为 7 种亚型。因此，尽管所有这些 5-HT 受体都特异性地与血清素结合，它们却由不同的基因编码，并在药理学上有显著的不同。迄今为止，已经鉴定出 14 种哺乳动物的血清素受体并对其进行了序列分析。具体来说，已将这 14 种不同的 5-HT 受体划分到 7 种药理学亚型，分别表示为 5-HT1、5-HT2、5-HT3、5-HT4、5-HT5、5-HT6 和 5-HT7。根据药理学特征这 7 种亚型又被进一步细分为如下几种类型：5-HT1A、5-HT1B、5-HT1D、5-HT1E、5-HT1F、5-HT2A、5-HT2B、5-HT2C、5-HT3A、5-HT3B、5-HT4、5-HT5A、5-HT6 及 5-HT7。然而，当比较这些受体的核酸和氨基酸序列时，这些亚型的相同序列百分比却与其药理学分型不相关。

[0006] 在已被克隆的 14 种不同哺乳动物血清素受体中，除一个以外其余全部是 G-蛋白偶联受体超家族的成员；也即，它们通常偶联不同的第二信使通路而连接到鸟嘌呤核苷酸调节蛋白（G-蛋白）。例如，血清素受体 5-HT1A、5-HT1B、和 5-HT1D 抑制腺苷酸环化酶；而 5-HT2 受体能激活磷脂酶 C 通路，引起多磷酸肌醇的降解。5-HT2 受体属于视紫质样信号转导蛋白家族，其显著特征为 7 个跨膜结构及其与 G-蛋白偶联的功能。

[0007] 一直以来血清素受体亚型的区分建立于其药理学结合特点、第二信使偶联、且对于更好表征的血清素受体而言基于其生理学功效。该领域大多数用于表征 5-HT 受体的数据是建立在对组织模型的实验观察上，而不是建立在某一纯化的受体蛋白或基因的性质上。

[0008] 如前所述，14 种血清素受体依据结构同源性、第二信使系统活化、和对特定配基的药物亲和性及其他特征被归类为 7 种亚型。分子克隆的方法证明 5-HT 受体至少属于 2 个蛋白超家族：一个是有 7 个推定的跨膜结构域（TMD）的 G-蛋白结合受体（5-HT1A、1B、1D、1E、5-HT2）；另一个是有 4 个推定的 TMD 的配基门控离子通道受体（5-HT3）。其中 5-HT2 亚类又被进一步划分为 3 个类别 5-HT2A、5-HT2B 及 5-HT2C。据信 5-HT2A 和 5-HT2C 受体拮抗剂有助于治疗抑郁、焦虑、精神病及饮食障碍。5-HT2A 同 5-HT2C 受体整体上有约 51% 的氨基酸同源性，而在跨膜区同源性约有 80%。在重组哺乳动物细胞系中对 5-HT2A 受体的研究表明该受体有一高一低两个亲和区。

[0009] 5-HT_{2A} 和 5-HT_{2C} 受体都与磷脂酶 C 偶联并通过磷脂酰肌醇介导应答。以激动剂及拮抗剂研究显示出广泛的受体应答，这表明有多种调节机制操纵受体活性。同时 5-HT_{2A} 和 5-HT_{2C} 受体也是致幻药的作用位点。

[0010] 在中枢神经系统 (CNS) 中，认为血清素与学习、记忆、睡眠、温度调节、运动、疼痛、性欲和攻击行为、食欲、神经内分泌调节及生物节律有关。此外血清素还与一些病理生理状况相关，例如：焦虑、抑郁、强迫症、精神分裂症、自杀、自闭、偏头痛、呕吐、酒精中毒及神经退化性障碍。

[0011] 在哺乳动物 CNS 中血清素调节多种感觉、运动及行为功能。此生物胺神经递质是由投射于 CNS 的脑干神经元合成，在基底核和边缘结构密度最高 (Steinbusch, 1984, In: Handbook of Chemical Neuroanatomy 3: 68-125, Bjorklund 等, Eds., Elsevier SciencePublishers, B.V.)。认为 5-羟色胺能的传递与多种行为及精神病症相关，如焦虑、睡眠调节、攻击性、喂食及抑郁 (Cowen, 1991, British J.Psych., 159: 7-14; 和 Lucki, 1992, Neurosci.& Biobehav.Rev., 16: 83-93)。要理解 5-HT 如何介导多种生理活性需鉴定及分离相应的 5-HT 受体。

[0012] 最近，研究表明血清素可能在免疫系统中起到一定作用，因为有数据表明血清素受体出现在免疫系统的多种细胞中。“精神 / 实体”问题已经困扰不同学科的研究者几个世纪了。一直以来都认为剧烈的情感或压力与免疫系统间有某种联系。血清素是种广泛分布的神经递质，并在情绪障碍及抑郁症中起主要作用。然而其在调节免疫应答上的功用从未受到重视，其原理更不清楚。

[0013] 胎儿在子宫中的存活一直以来都是免疫学上的矛盾现象。理论上胎儿应该患有母体的异源排斥反应。然而大多数情况下胎儿并不被排斥，这是与免疫学相矛盾的。解释为何母体免疫系统选择性的抑制对胎儿的异源排斥而保留其他所有免疫应答完好无损已经是免疫学的“圣杯”。如果人们能明白这个过程并将其运用于治疗中，将会为自身免疫疾病的潜在疗法打开一扇基础性的新大门，并将为治疗移植术的排斥症状开创一个非凡的新方法。然而直到本发明为止，一直未能达到改性自身免疫疾病及异源排斥反应疗法所需的要求。本发明达到了这些要求。

[0014] 1998 年 Munn 等 (1998, Science 281: 1191-1193) 解决了这个难题的主要部分。这一研究小组证明“当用吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (IDO, 一种由滋养母细胞和巨噬细胞表达的色氨酸分解代谢酶) 的药理抑制剂处理怀孕小鼠时，发生了所有异源妊娠的急剧的 T 细胞诱导的排斥反应。因此，通过色氨酸分解代谢哺乳动物孕体抑制 T 细胞活性并保护自身抵制排斥反应。”换言之，雌性怀孕不久就产生一种酶 (IDO)，此酶能在代谢反应的第一步就将色氨酸转向烟酸生成。这明显意味着色氨酸必定在启动和维持免疫应答中起着重要的作用，并且 / 或者犬尿素生成 (烟酸通路的第一步) 有抑制效应。尽管已经明白 IDO 的摄入会抑制 T 细胞增殖并可能在异源接受现象中起作用 (Alberati-Giani 等, 1998, Amino Acids 14: 251-255; Munn 等, 1999, J.Exp.Med.189: 1362-1373; Widner 等, 2000, Immunol.Today20: 469-473; Pan 等, 2000, Transpl.Immunol.8: 189-194; Mellor 等, 2001, Nature Immunol.2: 64-68)，但仍不清楚为什么色氨酸代谢会抑制免疫应答。

[0015] 色氨酸是细胞合成新蛋白所需的 10 种必须氨基酸之一。尽管不很确定，但色氨

酸分解代谢可能导致饥饿，且因此解释了 T 细胞抑制现象。不过其他 9 个必需氨基酸并不参与控制 T 细胞应答。但在色氨酸水平的局部耗尽及 T 细胞功能抑制间却有明显的相关性 (Munn 等, 1999, *J.Exp.Med.*189 : 1362-1373 ; Widner 等, 2000, *Immunol.Today* 20 : 469-473 ; Frumento 等, 2001, *Transplant.Proc.*33 : 428-430)。

[0016] 色氨酸是目前所知生成 5-羟色胺 (又名血清素) 的唯一来源。如果局部色氨酸水平的调节与在 T 细胞反应中观测到的调节经由 5-羟色胺能通路相关, 那么很明显血清素在 T 细胞活性中起着关键性作用。然而, 尽管在生化史上血清素是研究最广的生物活性分子, 但直到本发明为止, 血清素在 T 细胞活性通路中的作用一直未被确认及研究。

[0017] 曾有向有丝分裂原刺激的淋巴细胞培养物中加入外源血清素可起免疫调节功效的报道。在某些环境中, 血清素刺激活化的 T 细胞 (Foon 等, 1976, *J.Immunol.*117 : 1545-1552 ; Kut 等, 1992, *Immunopharmacol.Immunotoxicol.*14 : 783-796 ; Young 等, 1993, *Immunology* 80 : 395-400), 然而大多数实验报道却是加入高浓度的血清素可抑制增殖 (Slauson 等, 1984, *Cell.Immunol.*84 : 240-252 ; Khan 等, 1986, *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*81 : 378-380 ; Mossner & Lesch, 1998, *Brain, Behavior, and Immunity*12 : 249-271)。因此, 如果血清素在调节免疫应答中起任何作用的话, 它到底起什么功效? 现有技术仍无法解答。

[0018] 近几年, 有报道证明在 14 种药理学特性不同的血清素受体中, 淋巴细胞表达静息细胞上的 2a、2b、2c、6 和 7 型受体 (Ameisen 等, 1989, *J.Immunol.*142 : 3171-3179 ; Stefulj 等, 2000, *Brain, Behavior, and Immunity* 14 : 219-224), 而细胞活化时 1a 型和 3 型受体的活性上调 (Aune 等, 1993, *J.Immunol.*151 : 1175-1183 ; Meyniel 等, 1997, *Immunol.Lett.*55 : 151-160 ; Stefulj 等, 2000, *Brain, Behavior, and Immunity* 14 : 219-224)。尽管这些受体在淋巴细胞中的功能还不清楚, 普遍认为除 3 型离子通道受体外其他血清素受体都是有 7 个跨膜结构域的 G-偶联受体 (所述参见 Barnes 和 Sharp, 1999, *NeuroPharm.*38 : 1083-1152)。具体言之, 1 型受体作用于腺苷酸环化酶使 cAMP 下调 (De Vivo & Maayani, 1986, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*238 : 248-252)。例如, 弗司扣林, 一种腺苷酸环化酶的激动剂, 可使 cAMP 上调从而可作为 T 细胞活化的抑制剂。另一方面加入血清素可缓解弗司扣林对 T 细胞的抑制 (Aune 等, 1990, *J.Immunol.*145 : 1826-1831 ; Aune 等, 1993, *J.Immunol.*151 : 1175-1183)。

[0019] 与 1a 型受体相反, 6 型和 7 型受体存在于静息 T 细胞上, 在对血清素应答时经由上调 cAMP 起作用 (Ruat 等, 1993, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*193 : 268-276 ; Ruat 等, 1993, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90 : 8547-8551)。来看违反直觉, 在静息细胞上存在的 6 型和 7 型受体应该起减缓 T 细胞应答的功能而 1a 型受体应对抗来自于 6 型和 7 型受体的信号。2a 和 2c 型受体都与磷脂酶 C 正偶联, 且导致环己六醇磷酸盐及胞内 Ca^{2+} 的聚集, 从而开启蛋白激酶 C 信号传导级联 (所述参见 Boess 和 Martin, 1994, *Neuropharmacology* 33 : 275-317)。

[0020] 关于免疫应答的功能控制, Gershon 等 (1975, *J.Exp.Med.*142 : 732-738) 推测血清素对于引发小鼠 T 细胞介导的迟发型超敏 (DTH) 反应是必需的。然而此研究作者将 DTH 反应对血清素的依赖性归因于该生物胺的血管特性。

[0021] 在康纳迪克州 West Haven 的 Miles Research Center 所进行的系列研究表明

5-HT 1a 受体出现在人与鼠的 T 细胞中并参与其活动 (Aune 等, 1990, *J.Immunol.*145 : 1826-1831 ; Aune 等, 1993, *J.Immunol.*151 : 1175-1183 ; Aune 等, 1994, *J.Immunol.*153 : 1826-1831)。这些研究确定了可以通过阻断色氨酸羟化酶 (即参与色氨酸转化到血清素的第一个酶) 来抑制 IL-2 刺激的人 T 细胞的增殖 ; 而此抑制可通过加入 5-羟色氨酸 (受抑制酶的代谢产物) 被逆转。此外, 他们还在体外用 5-HT 1a 特异性受体拮抗剂阻断了人 T 细胞增殖。在鼠模型中他们证明是 1a 型受体拮抗剂而不是 2 型受体拮抗剂能在体内抑制对羟扎封 (oxazalone) 的接触性过敏反应而不是抗体反应。

[0022] Laberge 等 (1996, *J.Immunol.*156 : 310-315) 证明同时用 1a 型和 2 型受体拮抗剂, 则血清素能从 CD8+T 细胞中诱导趋化因子 IL-16, 而且这种活性在加入 2 型受体抑制剂后能被特异性的抑制, 但 1a 受体拮抗剂却不能抑制此活性。因此尽管现有技术指出血清素在免疫系统中起到一定作用, 然而到底是什么样的作用却并不清楚, 也没有任何现象表明使用受体拮抗剂能调节免疫系统。

[0023] 少数文献指出血清素在免疫应答中起一定作用。1989 年著名免疫学家 Philip Askenase 和其同事证明, 在小鼠中 5-HTR2 拮抗剂能抑制迟发型超敏反应 (DTH) (Amiesen 等, 1989, *J.Immunol.*142 : 3171-3179)。Amiesen 等解释为“后期作用的 DTH 效应 T 细胞可能表达功能 5-HT2R, 而这些受体需体内活化以使 T 细胞局部产生 DTH 的炎症淋巴因子依赖型现象”。可能因为啮齿类动物肥大细胞中含血清素而人类中不含, 致使此结论不能用于人类免疫应答, 所以这些结果后来被孤立。后来 Aune 等 (1994, *J.Immunol.*153 : 489-498) 证明 5-HTR 1a 拮抗剂能在体内抑制鼠 DTH 反应, 并证明抑制色氨酸羟化酶 (参与色氨酸向血清素转化的第一个酶) 能抑制 T 细胞增殖。这些作者再次提供了重要的信息, 但仍不能识别血清素在引发 T 细胞依赖型应答中的重要作用。

[0024] 巨噬细胞和淋巴细胞表达的受体可对血清素起反应的第一个证据出现在 1984 年 (Roszman 等, 1984, *Soc.Neurosci.*10 : 726)。其间, 已证明在 14 个已知药理学特异性的血清素受体中, 静息淋巴细胞表达 5-HT2A、2B、2C、6、和 7 型受体 (Ameisen 等, 1989, *J.Immunol.*142 : 3171-3179 ; Stefulj 等, 2000, *Brain, Behavior, and Immunity*14 : 219-224), 而 5-HT1A 和 5-HT3 受体在活化时上调 (Aune 等, 1993, *J.Immunol.*151 : 1175-1183 ; Meyniel 等, 1997, *Immunol.Lett.*55 : 151-160 ; Stefulj 等, 2000, *Brain, Behavior, and Immunity*14 : 219-224)。

[0025] 尽管还未确定血清素受体在淋巴细胞及免疫调控中的功能 (如果有的话), 普遍认为, 除 3 型离子通道受体外, 其他血清素受体都是 G-偶联受体, 都含有 7 个跨膜结构域 (所述参见 Barnes 和 Sharp, 1999, *NeuroPharm.*38 : 1083-1152)。具体来说, 1 型受体作用于腺苷酸环化酶, 导致 cAMP 下调 (De Vivo & Maayani, 1986, *J.Pharmacol.Exp. Ther.*238 : 248-252)。

[0026] 与 5-HT1A 受体相反, 5-HT6 和 5-HT7 受体出现在静息 T 细胞中, 在对血清素应答时经由上调 cAMP 起作用 (Ruat 等, 1993, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*193 : 268-276 ; Ruat 等, 1993, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90 : 8547-8551)。违反直觉地, 在静息细胞中表达的 5-HT6 和 5-HT7 受体应该起减缓 T 细胞应答的功能, 而 1a 型受体应对抗来自于 5-HT6 和 5-HT7 受体的信号。5-HT2A 和 5-HT2C 受体都与磷脂酶 C 正偶联, 导致环己六醇磷酸盐及胞内 Ca²⁺ 的聚集, 从而开启蛋白激酶 C 的信号信号传递级联 (综述

参见 Boess 和 Martin, 1994, *Neuropharmacology* 33 : 275-317)。

[0027] 以前曾推测血清素是引发小鼠 T 细胞介导的迟发型超敏反应 (DTH) 所必需的 (Gershon 等, 1975, *J.Exp.Med.*142 : 732-738), 并推论 DTH 反应对血清素的依赖性源于该生物胺的血管特性。有多种文献交相报道血清素的免疫调节功效。在某些环境中, 外源 5-HT 表现为刺激活化的 T 细胞 (Foon 等, 1976, *J.Immunol.*117 : 1545-1552 ; Kut 等, 1992, *Immunopharmacol.Immunotoxicol.*14 : 783-796 ; Young 等, 1993, *Immunology* 80 : 395-400), 然而大多数实验室的报道为高浓度的外源 5-HT 抑制活化 T 细胞的增殖 (Slauson 等, 1984, *Cell.Immunol.*84 : 240-252 ; Khan 等, 1986, *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*81 : 378-380 ; Mossner & Lesch, 1998, *Brain, Behavior, and Immunity* 12 : 249-271). 因此, 既然研究表明该神经递质即上调又下调免疫应答, 那么如果血清素在免疫系统中起任何作用的话, 它到底是什么功用? 这仍然不清楚。

[0028] 发展用来调整免疫应答的疗法, 尤其是那种可调节免疫应答特定方面而不影响其他方面的疗法, 是长期以来的需求。因此急需识别用于调节免疫应答的潜在治疗靶点。本发明满足了这些要求。此外还需要优选不引起神经精神功效而调节免疫应答的方法。本发明也满足了这些要求。

[0029] 发明概述

[0030] 本发明包含在哺乳动物中调节免疫应答的方法。此方法包括给哺乳动物施用有效量的抑制剂, 该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用, 从而调节哺乳动物中的免疫应答。

[0031] 一方面, 血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0032] 另一方面, 抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂、选择性的 4 型血清素受体拮抗剂和选择性的 6 型血清素受体拮抗剂。

[0033] 另一方面, 抑制剂为血清素受体拮抗剂, 其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY53857、SB 206553、SB 242084、MDL 11939、SB 216641 和美赛西平。

[0034] 一方面, 抑制剂为氟奋乃静; 且另一方面, 抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0035] 另一方面, 抑制剂经改性使之实质上不透血脑屏障。

[0036] 另一方面, 改性的抑制剂为该抑制剂的吩噻嗪衍生物。

[0037] 另一方面, 抑制剂为氟奋乃静且其吩噻嗪衍生物选自 QSS-5 和 QSS-12。

[0038] 本发明包括抑制哺乳动物免疫应答的方法。该方法包括给哺乳动物施用免疫应答抑制量的抑制剂, 该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用, 从而抑制哺乳动物中的免疫应答。

[0039] 一方面, 血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0040] 另一方面, 抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂、选择性的 4 型血清素受体拮抗剂和选择性的 6 型血清素受体拮抗剂。

[0041] 另一方面, 抑制剂为血清素受体拮抗剂, 其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、

米安色林、LY53857、SB 206553、SB 242084、MDL 11939、SB 216641 和美赛西平。

[0042] 另一方面，抑制剂可为氟奋乃静。

[0043] 另一方面，抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0044] 另一方面，抑制剂可经改性使之实质上不透血脑屏障。

[0045] 另一方面，改性的抑制剂为吩噻嗪的衍生物。

[0046] 另一方面，抑制剂为氟奋乃静且其吩噻嗪衍生物选自 QSS-5 和 QSS-12。

[0047] 本发明包括抑制免疫细胞产生免疫反应的方法。该方法包括抑制细胞上血清素受体传递的血清素信号，其中抑制信号也就抑制了细胞的活化，而且其中抑制血清素信号包括用有效剂量的抑制剂（可抑制血清素与血清素受体的相互作用）接触免疫细胞，由此抑制细胞的免疫反应。

[0048] 一方面，免疫细胞选自 T 细胞和 B 细胞。

[0049] 一方面，血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0050] 另一方面，抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂、选择性的 4 型血清素受体拮抗剂和选择性的 6 型血清素受体拮抗剂。

[0051] 另一方面，抑制剂为血清素受体拮抗剂，其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB 242084、MDL 11939、SB 216641 和美赛西平。

[0052] 另一方面，抑制剂为氟奋乃静。

[0053] 另一方面，抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0054] 另一方面，抑制剂可经改性使之实质上不透血脑屏障。

[0055] 另一方面，改性的抑制剂为吩噻嗪的衍生物。

[0056] 另一方面，抑制剂为氟奋乃静且其吩噻嗪衍生物选自 QSS-5 和 QSS-12。

[0057] 本发明还包括调节患自身免疫疾病的哺乳动物中免疫应答的方法，这些疾病由被血清素信号活化的免疫细胞介导。该方法包括给哺乳动物施用有效量的抑制剂，该抑制剂可抑制血清素与血清素受体的相互作用，从而调节哺乳动物中的免疫应答。

[0058] 一方面，抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0059] 另一方面，血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体和 2C 型血清素受体。

[0060] 另一方面，抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0061] 另一方面，该抑制剂为血清素受体拮抗剂，其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY53857、SB 206553、SB 242084 和 MDL 11939。

[0062] 另一方面，抑制剂为一种特异性结合血清素受体的抗体。另一方面，血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体及 2C 型血清素受体。

[0063] 另一方面，自身免疫疾病选自：重症肌无力、特发性炎症肌病、慢性中性粒细胞减少症、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫溶血综合症、抗磷脂抗体综合症、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、心肌炎、Gilliam-Barre 综合症、血管炎、多发性硬化症、视神经脊髓炎 (Devic 综合症)、淋巴细胞性垂体炎、格雷夫斯病、爱

迪生病、甲状旁腺功能减退症、一型糖尿病、系统性红斑狼疮、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、牛皮癣、银屑病关节炎、子宫内膜异位、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性勃起障碍、结节病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性耳聋、斯耶格伦病、自身免疫色素成视网膜膜炎 (autoimmune uveoretinitis)、间质性膀胱炎、肺出血肾炎综合症及纤维肌痛。

[0064] 另一方面, 该调节作用为抑制作用。

[0065] 本发明包括抑制哺乳动物免疫应答的方法, 此处免疫应答是被 T 细胞上血清素受体活化所介导的。本方法包括用有效量的抑制剂接触 T 细胞, 该抑制剂可抑制血清素与血清素受体间的相互作用, 从而抑制哺乳动物的免疫应答。

[0066] 一方面, 该方法进一步包括通过快速注射给药抑制剂。

[0067] 另一方面, 血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体和 2C 型血清素受体。

[0068] 另一方面, 抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0069] 另一方面, 抑制剂为血清素受体拮抗剂, 其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY53857、SB 206553、SB 242084 和 MDL 11939。

[0070] 另一方面, 抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0071] 本发明包括抑制哺乳动物免疫细胞活化的方法, 其中该活化由免疫细胞上血清素受体的活化所介导。该方法包括给哺乳动物施用有效量的抑制剂, 该抑制剂可抑制血清素与血清素受体间的相互作用, 且其中用抑制剂接触免疫细胞, 进而抑制免疫细胞的活化。

[0072] 一方面, 该血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体和 2C 型血清素受体。

[0073] 另一方面, 该抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0074] 另一方面, 抑制剂为血清素受体拮抗剂, 其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB 242084 和 MDL 11939。

[0075] 另一方面, 抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0076] 本发明还包括抑制哺乳动物二级免疫应答的方法。该方法包括给哺乳动物施用有效量的抑制剂, 该抑制剂可抑制血清素与血清素受体间的相互作用, 从而抑制哺乳动物的二级免疫应答。

[0077] 一方面, 血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、和 2C 型血清素受体。

[0078] 另一方面, 抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0079] 另一方面, 该抑制剂为血清素受体拮抗剂, 其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB 242084 和 MDL 11939。

[0080] 另一方面, 抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0081] 本发明包括治疗哺乳动物中由细胞介导的疾病的方法, 此处的细胞需经由血清

素受体传递血清素信号。该方法包括抑制细胞中血清素与血清素受体的相互作用，其中该抑制对细胞是有害的使得该细胞不介导此疾病。

[0082] 一方面，对血清素相互作用的抑制是通过使细胞接触抑制血清素与血清素受体相互作用的抑制剂来实现的。

[0083] 另一方面，该血清素受体选自 1 型血清素受体、2 型血清素受体、4 型血清素受体及 6 型血清素受体。

[0084] 再有，疾病选自多发性骨髓瘤、重症肌无力、特发性炎症肌病、慢性嗜中性白血球减少症、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血综合症、抗磷脂抗体综合症、炎症肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、心肌炎、Gillian-Barre 综合症、血管炎、多发性硬化症、视神经脊髓炎 (Devic 综合症)、淋巴细胞性垂体炎、格雷夫斯病、爱迪生病、甲状旁腺功能减退症、一型糖尿病、系统性红斑狼疮、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、牛皮癣、银屑病关节炎、子宫内膜异位、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性勃起障碍、结节病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性耳聋、斯耶格伦病、自身免疫性色素层视网膜炎、间质性膀胱炎、肺出血肾炎综合症及纤维肌痛。

[0085] 一方面，血清素受体是 1B 型血清素受体，而且其中疾病是多发性骨髓瘤。

[0086] 另一方面，抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0087] 本发明包括诱导细胞凋亡的方法。该方法包括抑制经由细胞上的血清素受体传递血清素信号，其中抑制作用诱导凋亡；而且其中抑制细胞上血清素与血清素受体的相互作用包括用有效量的抑制此相互作用的抑制剂接触细胞，进而诱导细胞凋亡。

[0088] 一方面，抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0089] 本发明还包括诱导细胞死亡的方法。本方法包括抑制经由细胞上的血清素受体传递血清素信号，其中抑制诱导细胞死亡；而且其中该抑制包括用有效量的抑制剂接触该细胞，该抑制剂可抑制血清素与血清素受体的相互作用，由此诱导细胞死亡。

[0090] 另一方面，抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0091] 本发明包括鉴别用于治疗哺乳动物自身免疫疾病的化合物的方法。该方法包括用待测化合物接触血清素受体，并比较接触此化合物的血清素受体及未接触此化合物的血清素受体与血清素的结合水平，当前者的血清素结合水平低于后者时表示此化合物可用于治疗哺乳动物自身免疫疾病。一方面，该哺乳动物是人。

[0092] 本发明包括用该方法鉴定出的化合物。

[0093] 一方面，血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体及 6 型血清素受体。

[0094] 另一方面，该方法进一步包括评估化合物穿透血脑屏障的能力并选择实质上不透血脑屏障的化合物。本发明包括用该方法鉴定的化合物。另一方面，该化合物选自 QSS-5 和 QSS-12。

[0095] 本发明包括鉴别用于治疗哺乳动物异源移植反应的化合物的方法。该方法包括用待测化合物接触血清素受体，并比较接触此化合物的血清素受体及未接触此化合物的血清素受体与血清素的结合水平，当前者的血清素结合水平低于后者时表示此化合物可用于治疗哺乳动物异源移植反应。

[0096] 本发明包括用该方法鉴别出的化合物。

[0097] 另一方面, 该方法进一步包括评定此化合物穿透血脑屏障的能力, 从而选取实质上不穿透血脑屏障的化合物。 本发明包括用此方法鉴定的化合物。

[0098] 一方面, 血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体及 6 型血清素受体。

[0099] 本发明包括用于抑制 T 细胞活化的化合物的方法, 其中活化是由 T 细胞上血清素受体与血清素相结合而介导的。 该方法包括用待测化合物接触 T 细胞并比较与此化合物接触的 T 细胞及未与此化合物接触的 T 细胞的活化水平, 当前者的活性水平低于后者时表示此化合物可用于抑制 T 细胞活化, 其中该活化指由 T 细胞上 2 型血清素受体与血清素结合而介导的活化。

[0100] 另一方面, 该方法进一步包括评估此化合物穿透血脑屏障的能力, 并选取实质上不穿透血脑屏障的化合物。 本发明包括用此方法鉴定的化合物。

[0101] 另一方面, 该方法进一步包括改性化合物使之实质上不穿透血脑屏障。

[0102] 本发明还包括鉴别经由细胞上血清素受体影响信号传递的化合物的方法。 本方法包括用化合物接触细胞, 并与接触该化合物前的细胞 进行比较, 评估任何细胞形态学上的变化。 当接触过该化合物的细胞与接触该化合物前的细胞相比较, 细胞形态学发生变化时表明该化合物影响经由细胞上血清素受体的信号传递, 由此鉴别出影响经由细胞上血清素受体信号传递的化合物。

[0103] 本发明包括用此方法鉴别出的化合物。

[0104] 另一方面, 本方法进一步包括改性该化合物使之实质上不穿透血脑屏障。 本发明包括用此方法鉴别出的化合物。

[0105] 本发明包括影响细胞周期过程的方法。 本方法包括抑制经由细胞上血清素受体的信号传递, 而且其中抑制经由细胞上血清素受体的信号传递包括用有效量的抑制剂接触细胞, 该抑制剂可抑制血清素与其受体的相互作用, 从而影响细胞周期过程。

[0106] 一方面, 抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0107] 本发明包括影响表达血清素受体的细胞的凋亡的方法。 本方法包括抑制经由受体的信号传递, 且其中该抑制包括用有效量的抑制剂接触细胞, 该抑制剂可抑制血清素与其受体的相互作用, 从而影响细胞凋亡。

[0108] 一方面, 抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0109] 本发明包括一种方法, 该方法可诱导表达血清素受体的细胞凋亡, 本方法包括抑制经由受体的信号传递, 进而诱导细胞凋亡。

[0110] 本发明包括调节哺乳动物免疫应答的试剂盒。 该试剂盒包括有效量的抑制剂, 该抑制剂可抑制血清素与其受体间的相互作用。 本试剂盒还包括用药器和使用说明材料。

[0111] 一方面, 血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体及 6 型血清素受体。

[0112] 一方面, 抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0113] 本发明包括影响表达血清素受体的细胞的细胞周期过程的试剂盒。 该试剂盒包括有效量的抑制剂, 该抑制剂可抑制血清素与其受体间的相互作用。 本试剂盒还包括用药器和使用说明材料。

[0114] 一方面，抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0115] 本发明包括诱导表达血清素受体的细胞的凋亡的试剂盒。该试剂盒包括有效量的抑制剂，该抑制剂可抑制血清素与其受体间的相互作用。本试剂盒还包括用药器和使用说明材料。

[0116] 一方面，抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0117] 附图简述

[0118] 为阐明本发明，此处列解出用于本发明实施方案的图例。然而，本发明并不局限于图例所述实施方案的确实顺序和实施方法。

[0119] 图一是描述巨噬细胞条件培养基对淋巴细胞应有丝分裂原活化信号的增殖应答的影响的图表。

[0120] 图二描述血清素合成及降解的主要代谢通路。化合物的名字列在结构图的左侧，催化单步反应的酶列于右侧。

[0121] 图三描述色氨酸水解酶抑制剂（对氯苯丙氨酸，PCPA）对人淋巴细胞有丝分裂刺激作用的影响。也即，通过加入 $1 \mu\text{g/ml}$ ConA 刺激人外周血淋巴细胞（PBL）。

[0122] 图四描述血清素、色氨酸及苯乙肼对用 ConA 刺激的人 PBL 活化的影响。在图示时间点收集测定。所加试剂浓度为 $400 \mu\text{M}$ 。

[0123] 图五包括 3 个小图，描述色氨酸 (trp)，血清素 (5-HT)，及苯乙肼 (Pz) 在不同 ConA 浓度下对人 T 细胞有丝分裂刺激的影响。也即，图 5A 描述 $0.1 \mu\text{g/ml}$ ConA 的作用；图 5B 描述 $1 \mu\text{g/ml}$ ConA 的作用；图 5C 描述 $10 \mu\text{g/ml}$ ConA 的作用。每幅图中的虚线为不加任何试剂时 ConA 的基线刺激水平。

[0124] 图六描述色氨酸、血清素的添加对苯乙肼对活化淋巴细胞的抑制作用。所加各试剂 (Pz、Trp、和 5-HT) 浓度都为 $100 \mu\text{M}$ 。

[0125] 图 7A 描述滴定已知的选择性 5-HTR 1 受体激动剂和拮抗剂对 ConA ($5 \mu\text{g/ml}$) 刺激的人淋巴细胞活化的剂量反应作用。在引发 ConA 刺激后 72 小时收集细胞并测定。用于此实验的药物详细定义如下：(R)8-OH DPAT：选择性 5-HTR 1A 受体激动剂；WAY 100635：选择性 5-HTR 1A 受体拮抗剂；普萘洛尔：常用 5HT 1 受体拮抗剂同时也是 beta- 肾上腺素能拮抗剂；L 694247：选择性 1B/1D 激动剂；GR 55562：选择性 1B/1D 拮抗剂；SB 216641：选择性 1B 拮抗剂；和 BRL 15522：选择性 1D 拮抗剂；BRL 54443：选择性 1E/1F 激动剂。

[0126] 图 7B 描述滴定已知的选择性 5-HTR 1 受体激动剂和拮抗剂对人淋巴细胞异源刺激（也作混合淋巴细胞反应）的剂量反应作用。在引发刺激后 120 小时收集细胞并测定。用于此实验的药物详细定义如下：(R)8-OH DPAT：选择性 5-HTR 1A 受体激动剂；WAY 100635：选择性 5-HTR 1A 受体拮抗剂；普萘洛尔：常用 5HT 1 受体拮抗剂，同时也是 beta- 肾上腺素能拮抗剂；L 694247：选择性 1B/1D 激动剂；GR 55562：选择性 1B/1D 拮抗剂；SB 216641：选择性 1B 拮抗剂；BRL 15522：选择性 1D 拮抗剂；BRL 54443：选择性 1E/1F 激动剂。

[0127] 图 8A 描述滴定已知靶向 5-HTR2 受体的激动剂和拮抗剂对 ConA ($5 \mu\text{g/ml}$) 刺激的人淋巴细胞活化的剂量反应作用。在引发 ConA 刺激后 72 小时收集细胞并测定。用于此实验的药物详细定义如下：DOI：5HT2 激动剂（受体对此化合物的延长暴露可导致

它们的下调)；LY 53857：选择性 5HT_{2A/2B/2C} 拮抗剂；MDL 11939：选择性 5HT_{2A} 拮抗剂；SB206553：选择性 5HT_{2B/2C} 拮抗剂；SB 242084：选择性 5HT_{2C} 拮抗剂；美西麦角：部分 1 型激动剂/2 型拮抗剂；美赛西平：通用 1、2、6 及 7 型拮抗剂。

[0128] 图 8B 描述滴定靶向 5-HTR₂ 受体的激动剂和拮抗剂对人淋巴细胞异源刺激（也作混合淋巴细胞反应）的剂量反应作用。在引发刺激后 120 小时收集细胞并测定。用于此实验的药物详细定义如下：DOI：5HT₂ 激动剂（受体对此化合物的延长暴露可导致它们的下调）；LY 53857：选择性 5HT_{2A/2B/2C} 拮抗剂；MDL 11939：选择性 5HT_{2A} 拮抗剂；SB206553：选择性 5HT_{2B/2C} 拮抗剂；SB 242084：选择性 5HT_{2C} 拮抗剂；美西麦角：部分 1 型激动剂/2 型拮抗剂；美赛西平：通用 1、2、6 和 7 型拮抗剂。

[0129] 图 9A 描述滴定已知靶定或者 5-HTR₃、4、6 或者 7 受体的激动剂和拮抗剂对 ConA (5 μ g/ml) 刺激的人淋巴细胞活化的剂量反应影响。在引发 ConA 刺激后 72 小时收集细胞并测定。用于此实验的药物详细定义如下：SR 57222A：选择性 5HT₃ 激动剂；托泊西隆 (Troposetron)：选择性 5HT₃ 拮抗剂（临床验证的抗催吐剂）；RS67333：选择性 5HT₄ 激动剂（延长接触时下调受体）；SB 204070：选择性 5HT₄ 受体拮抗剂；Ro 047690：选择性 5HT₆ 拮抗剂；SB 269970：选择性 5HT₇ 拮抗剂。

[0130] 图 9B 描述滴定已知靶定或者 5-HTR₃、4、6 或者 7 受体的激动剂和拮抗剂对人淋巴细胞异源刺激（也作混合淋巴细胞反应）的剂量反应作用。在引发刺激后 120 小时收集细胞并测定。用于此实验的药物详细定义如下：SR 57222A：选择性 5HT₃ 激动剂；托泊西隆：选择性 5HT₃ 拮抗剂（临床验证的抗催吐剂）；RS 67333：选择性 5HT₄ 激动剂（延迟接触时下调该受体）；SB 204070：选择性 5HT₄ 受体拮抗剂；Ro 047690：选择性 5HT₆ 拮抗剂；SB 269970：选择性 5HT₇ 拮抗剂。

[0131] 图 10 描述鼠混合淋巴细胞反应试验 (BALB/c 相对于 C57BL6)，检测 5HT_{3R} 激动剂和选择性 5HT_{6R} 拮抗剂相对于 5HT_{1R} 激动剂作用的效用。

[0132] 图 11 描述当有丝分裂刺激人淋巴细胞活化时 1 型 5HT 受体拮抗剂和 2 型 5HT 受体拮抗剂对细胞数目的影响。用 10 μ g/ml ConA 刺激细胞。加入抑制剂前用 Ficoll 梯度重提纯细胞。用锥虫蓝排除计数活细胞量。

[0133] 图 12A 描述高效选择性 2 型 5HT 受体拮抗剂，LY 53857，对人淋巴细胞有丝分裂原刺激（用 1 μ g/ml ConA 刺激，且 72 小时后收集细胞）的影响。结果描述的是在 0 时或测定开始后 48 小时加入抑制剂的效用。

[0134] 图 12B 描述高效选择性 2 型 5HT 受体拮抗剂，SB 206553，对人淋巴细胞有丝分裂原刺激（用 1 μ g/ml ConA 刺激，且 72 小时后收集细胞）的影响。结果描述的是在 0 时或测定开始后 48 小时加入抑制剂的效用。

[0135] 图 12C 描述高效选择性 2 型 5HT 受体拮抗剂，MDL 11939，对人淋巴细胞有丝分裂原刺激（用 1 μ g/ml ConA 刺激，且 72 小时后收集细胞）的影响。结果描述的是在 0 时或测定开始后 48 小时加入抑制剂的效用。

[0136] 图 12D 描述高效选择性 2 型 5HT 受体拮抗剂，SB 242084，对人淋巴细胞有丝分裂原刺激（用 1 μ g/ml ConA 刺激，且 72 小时后收集细胞）的影响。结果描述的是在 0 时或测定开始后 48 小时加入抑制剂的效用。

[0137] 图 13 描述用于研究血清素受体拮抗剂对抗环孢菌素 A 效用的鼠异体移植模型

的结果。本文公开数据源于细胞毒性 T 细胞的杀伤试验，其中用处理鼠的脾细胞相对于 p815 靶细胞。

[0138] 图 14 描述 5HT_{2R} 选择性拮抗剂，SB 206553，在鼠异源移植模型中的效用。3 只用 SB 206553 处理的小鼠标记为 SB#226h、SB#226i、和 SB#226j。其中 2 只处理的小鼠的异源反应被全部抑制。只有一只小鼠 (SB#226j) 显示出治疗后没有免疫效应。然而，为对 SB#226j 给药需重复进行尾静脉注射。即使注射时很小心，尾静脉注射仍有很大的技术难度，并不总能一次性成功。

[0139] 图 15 为扩增静息和活化的淋巴细胞及单核细胞的 RT PCR 引发的胶图象。(+) 道表示建 cDNA 文库前用有丝分裂原 ConA 刺激 48 小时的细胞。(-) 道表示静息细胞。

[0140] 图 16 是用来显示 14 种不同血清素受体表达水平的 DNA 印记，印记用适当的内源寡核苷酸探测，其序列如下：1A：ctgcagaacgtggccaattatcttattggctcttt (SEQ ID NO：1)；1B：gtggagtactcagctaaaaggactcccaagaggg (SEQ ID NO：2)；1D：ctctcttttcaaccacgtgaaatcaagcttct (SEQ ID NO：3)；1E：atctagatcaccagagagaacgtcagcagatctcta (SEQ ID NO：4)；1F：gagcagcaaagacattataccacaagagacaagcaa (SEQ ID NO：5)；2A：tcgctcttttgtgtcattttcattcccttaacca (SEQ ID NO：6)；2B：ctcaacgcctaacaatggttgactgtgtctacagttt (SEQ ID NO：7)；2C：taactgacattttcaatacctccgatggtggacgct (SEQ ID NO：8)；3A：gggagtcagcatggaaagcagtaactactatgcag (SEQ ID NO：9)；3B：ttcaatctatcagcaactacctccaaactcagga cc (SEQ ID NO：10)；4：caccattctttgtcaccaatattgtggatccttc (SEQ ID NO：11)；5：c tttttggctggggagagacgtactctgagg (SEQ ID NO：12)；6：atcctcaacctctgectcatcagcctggac (SEQ ID NO：13)；7：tgaaaggaaaacatctccatctttaagcgagaaca (SEQ ID NO：14)。

[0141] 图 17 描述多种 1 类 5-HT 选择性药物的功能行为。8-OH DPAT 是选择性 1A 激动剂；WAY 100635 是选择性 1A 拮抗剂；普萘洛尔是通用 1 型受体拮抗剂 (也是 beta- 肾上腺能拮抗剂)；SB 216641 是选择性 1B 拮抗剂；L694247 是选择性 1B/1D 激动剂；GR 55562 是选择性 1B/1D 拮抗剂；BRL 54443 是选择性 1E/1F 激动剂。如本发明其他部分所述，在 5mg/ml ConA 刺激人淋巴细胞的 0 时加入药物。

[0142] 图 18A 是用描述于本发明其他部分的鼠异体移植模型获得的数据。简而述之，本图描述的数据源自单一典型性研究。2 个阳性对照表示观测到的诱导的细胞毒杀伤活性，反之原初的对照从未接触 P815 细胞，因而提供了此种测定方法的背景测量。用美西麦角 (MS) 处理的小鼠显示出对这种诱导的杀伤效应的完全抑制。

[0143] 图 18B 是用描述于本发明其他部分的鼠异体移植模型获得的数据。此处的数据显示多种测定的汇合结果，此处用效应物：靶位点为 100 : 1 的比率来计量抑制的百分数。每单一柱形图表示数据收集于一只小鼠。

[0144] 图 19A 描述 5-HT_{2A/B/C} 受体拮抗剂 LY53587 在 16 小时对 RPMI8226 细胞存活能力的影响。

[0145] 图 19B 描述 5-HT_{2A/B/C} 受体拮抗剂 LY53587 在 48 小时对 RPMI8226 细胞存活能力的影响。

[0146] 图 20A 描述 5HT-2A/B/C 受体拮抗剂在 16 小时对 RPMI 8226 细胞线粒体活性的影响。

[0147] 图 20B 描述 5HT-2A/B/C 受体拮抗剂在 48 小时对 RPMI 8226 细胞线粒体活

性的影响。

[0148] 图 20C 描述 5HT-2A/B/C 受体拮抗剂在 16 小时对 RPMI 8226 细胞 DNA 合成的影响。

[0149] 图 20D 描述 5HT-2A/B/C 受体拮抗剂在 48 小时对 RPMI 8226 细胞 DNA 合成的影响。

[0150] 图 21 描述 5HT-2A/B/C 受体拮抗剂对 RPMI 8226 细胞 DNA 合成的影响。

[0151] 图 22 描述多种 5-HT 受体激动剂和拮抗剂对 RPMI 8226 细胞增殖的影响。

[0152] 图 23 描述多种靶向 1 型 5-HTR 受体的 5-HT 受体激动剂及拮抗剂的效用。试验读数为多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞的增殖。

[0153] 图 24 描述多种靶向 2 型 5-HTR 受体的 5-HT 受体激动剂及拮抗剂的效用。试验读数为多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞的增殖。

[0154] 图 25 描述多种靶向 3、4、6 或 7 型 5-HTR 受体的 5-HT 受体激动剂及拮抗剂的效用。试验读数为多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞的增殖。

[0155] 图 26 是一个胶图，描述在用多种试剂（包括 5-HTR 2A/2B/2C）处理的 RPMI 8226 细胞中与凋亡相关的典型 DNA 片断化。

[0156] 图 27，包括 A 到 F 的 6 幅小图，描述了 RPMI 8226 细胞的 FACS 特征，这些细胞或是用多种浓度的喜树碱、选择性 1B/D 型 5-HTR 拮抗剂处理过的，或是用膜联蛋白 (Annexin)（沿纵坐标方向）及碘化丙啶 (PI)（横坐标方向）染色的所有未处理细胞。

[0157] 图 28 含 4 幅小图，描述对应的用苏木精和伊红（上）及双苯甲酰胺（下）染色的 RPMI-8226 细胞图象，这些是用 2 μ M 喜树碱（左）处理及用 50 μ M SB 216641 处理以抑制 1B 型 5-HT 受体信号（右）9 小时后的细胞。在 2 个处理组中都可见大量染色质凝聚及核片断化，显示出广泛的细胞凋亡现象。

[0158] 图 29 描述对应的用苏木精和伊红（上）及双苯甲酰胺（下）染色的 RPMI-8226 细胞图象，这些是用 50 μ M SB242084 处理 9 小时以抑制 2C 型 5-HT 受体信号（右）的细胞及载体对照（左）。对样品可见均一染色质染色，表明生存细胞；然而在用 SB242084 处理过的细胞中却可见聚集及片段化的染色质，表明发生细胞凋亡。

[0159] 图 30 包括 A-D 小图，是显微照片，显示在 5-羟色胺能信号传递被抑制的情况下细胞的可见变化。细胞在有选择性的 1B 型拮抗剂 (SB216641) 的条件下孵育，且 24 小时后可见细胞形态学上发生变化。

[0160] 图 31 描述 RPMI-8226 细胞对氟奋乃静及马来酸甲基麦角新碱的剂量依赖性细胞增殖反应。试验读数是氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷结合到细胞 DNA 中的每分钟计数 (CPM)。

[0161] 图 32 描述 RPMI-8226 细胞对多种 5-HT 受体激动剂和拮抗剂的剂量依赖性细胞增殖反应。试验读数是氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷结合到细胞 DNA 中的每分钟计数 (CPM)。

[0162] 图 33 描述有丝分裂原诱导的 T-细胞增殖试验中，多种 5-HT 受体激动剂和拮抗剂的剂量依赖性功能行为。按本文其他部分所述，用 5 μ g/ml ConA 刺激细胞，并在 72 小时后收集计数。

[0163] 图 34 包括图 34A 至 34I，是一系列源于流式细胞分析的 FACS 图，这些细胞是用

多种浓度的氟奋乃静处理并用 PI 及膜联蛋白-V 染色的 RPMI 8226 细胞。该 FACS 图是控制流式细胞分析使之只包括 PI 阴性细胞（非坏死细胞）的情况下产生的。膜联蛋白-V 染色级别作为测量细胞凋亡的度量。图的黑色区域表示没经处理的对照细胞，亮的区域表示氟奋乃静处理的细胞。

[0164] 图 35 包括图 35A 到 35D，是一系列胶图象，描述细胞 DNA 核小体间 (internucleosomal) 断裂，这是细胞凋亡的一个标志。用标示浓度的氟奋乃静、SB216641 (5HT-1BR 拮抗剂)、喜树碱（拓扑异构酶 II 抑制剂，细胞凋亡对照）处理 RPMI-8226 细胞，并在所示时间点抽提基因组 DNA。

[0165] 图 36，不希望受任何理论限制，描述由于 T 细胞和瘤 B 细胞上血清素和 1B 型 5-HT 受体相互作用引起的信号通路。其中 1B 型 5-HT 受体的信号传递特性与 AKT（又名蛋白激酶 B）相结合。1B 型 5-HT 受体的激活导致 AKT 蛋白的磷酸化。而后此磷酸化形式的蛋白又使半胱天冬酶 9 磷酸化，从而抑制细胞凋亡反应。撤除 1B 型 5-HT 信号，如（但不限于）使用氟奋乃静，会关闭 AKT 从而使半胱天冬酶系统得以活化，进而导致程序性细胞死亡。

[0166] 图 37 包括图 37A 和 37B 是 2 个跑胶图，表示所示滴定已知的 1 型 5-HT 选择性拮抗剂 (SB 216641) 的效应。如本文其他部分所述，数据表明阻遏 1B 型 5-HT 信号会下调 AKT 活性，进而诱导程序性细胞死亡。

[0167] 图 38 表明氟奋乃静引起的对细胞增殖的典型抑制。氟奋乃静为常用抗精神病药，它是 HEK-293 细胞表达的人 5HT_{2C-1NI} 受体同工型的有效反激动剂。图示结果源于重复 3 次的实验，该实验用于测定氟奋乃静对 HEK-293 细胞表达的人 5HT_{2C-1NI} 受体的组成型 PI 水解活性的抑制能力。数据显示为 3 次测定的均值 $dpm \pm S.E.M.$ ，并获自 Rauser 等 (2001, J.Pharmacol.Exp.Ther.299: 83-89)。

[0168] 图 39 显示氟奋乃静及其 2 个带正电的吩噻嗪衍生物，名为 QSS-5 和 QSS-13 的结构式。与亲本化合物氟奋乃静相比，QSS-5 和 QSS-12 上的额外氨基都可减少化合物的亲脂性。

[0169] 图 40 显示氟奋乃静、QSS-5、和 QSS-12 对细胞毒性 T 细胞的相对的细胞杀伤功效。在此测定中，用 P815 刺激 BALB/c 小鼠脾细胞，显示了完全 MHC 不匹配。根据标准程序，将待测的细胞放在一起孵育 7 天，并用 CTL 测定它们裂解 P815 靶细胞的能力。所示数据以用未经处理的细胞群检测的杀伤率为参照。

[0170] 图 41，包括图 41A 和 41B，描述多种化合物减弱细胞增殖的功效，这些细胞源于人多发性骨髓瘤细胞系。图 41A 描述梯度浓度氟奋乃静 QSS 衍生物对 RPMI-8226 细胞生长的功效。图 41B 描述氟奋乃静及其 QSS 衍生物对于减弱 U266 细胞增殖的功效。2 个细胞系都源于人多发性骨髓瘤。多种化合物的不同剂量按 μM 提供。细胞增殖用摄入的氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷的吸收（计量 DNA 合成）表示。

[0171] 图 42 描述多种氟奋乃静吩噻嗪衍生物的结构式，例如 QSS-1、QSS-3、QSS-5 和 QSS-6。

[0172] 图 43 描述不同浓度的氟奋乃静、QSS-1、QSS-3、QSS-5 和 QSS-6 对细胞增殖的影响。测定了所示不同浓度的化合物对人多发性骨髓瘤细胞系 ARH-77 的细胞增殖的影响（用测定摄入氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷测量 DNA 合成）。

[0173] 图 44 为描述血清素，多巴胺及 QSS-5 的分子模型。分子以 CPK 模式显示，表示出不同化合物相应的范德华原子半径及位置。

[0174] 发明详述

[0175] 血清素家族受体在神经系统中起重要作用，同时正如本发明所揭示的，其在免疫系统中也起重要作用。本文公开的数据显示影响 2 型血清素受体活化能调节免疫应答。具体来说，抑制血清素与 2B/2C 型或与少量的 2A 受体结合可以介导 T 细胞活化的减低或抑制，也可抑制哺乳动物中初级及二级 T 细胞应答。这种对 T 细胞应答的抑制为自身免疫疾病、异源移植排斥反应及其他疾病提供了一个有效的治疗方法，这些疾病目前都还未见有效疗法。

[0176] 定义

[0177] 本发明中，下列每一术语有本部分所述相应含义。

[0178] 本发明中的非特指名词指一个或多个（即至少一个）文中所述物质。例如“元素”指一个或多于一个元素。

[0179] 本发明所用 T 细胞“活化”指 T 细胞与化合物，分子，或能产生免疫应答的细胞（如促细胞分裂素 ConA 或 PHA）接触时表面标记发生可测性上调，例如 CD25，即 IL2 受体，引发包括 p56lck 的磷酸化级联，引起细胞因子及白介素的释放，增加 DNA 合成（可通过检测嵌入原始 DNA 链的 ^3H -胸腺嘧啶水平或通过其他方法测定）并引发细胞增殖。

[0180] 本发明所用血清素“激动剂”指当对哺乳动物给药时可增强、提高或扩展血清素存在或水平的生物学活性的物质成份，此处指与不加该物质时的血清素生物学活性相比。

[0181] 血清素“拮抗剂”是指当对哺乳动物，如人，给药时在可测水平抑制血清素存在或其水平的生物学活性的物质成份。

[0182] 血清素“反向激动剂”是一种物质成份，该成份在对哺乳动物给药时可检测到将血清素能受体介导的信号抑制到其基线水平以下。例如，拮抗剂能阻止配基发挥其对受体的阳性信号效应，而反向激动剂（在本领域也叫做“阴性拮抗剂”）会将受体介导的信号抑制到低于平衡水平。也即，在配基不存在的情况下经由血清素能受体的信号也可显现某一特定可测基线水平，而反向激动剂能将此水平减低到基线以下。

[0183] 本发明所用术语“选择性的激动剂”或“选择性的拮抗剂”指一种化学制剂，该制剂与靶血清素受体的亲和力至少比与血清素家族受体的其他成员的亲和力强 5 倍以上。

[0184] 本发明所用术语“缓解”疾病指减轻该疾病一种或多种症状的严重程度。

[0185] 本发明所用术语“异源移植”指种内任何组织的移植，其中含有免疫标记的不匹配，例如（但不限于）主要组织相容性复合物（MHC）和 / 或次要抗原。

[0186] 本发明所用术语“异源移植反应”指针对移入受体的非自身组织的任何免疫反应。移植程序包括（但不限于）在诸如骨髓移植及器官移植之类操作中施用非自身细胞、组织或器官。

[0187] “反义”特指编码蛋白的双链 DNA 分子中非编码的核酸序列，或指与非编码链完全同源的序列。如本发明定义的，反义序列与编码蛋白的双链 DNA 分子的序列是互补

的。反义序列不必独与 DNA 分子编码链的编码区互补，反义序列可以与编码蛋白的 DNA 分子的编码链中特定的调节序列互补，该调节序列控制编码序列的表达。

[0188] “扩增”指任何拷贝多核苷酸序列的方法，从而可使该多核苷酸分子扩增到更多数目，例如，反转录、聚合酶链反应及连接酶链反应。

[0189] 本发明所用术语“凋亡”指一种活性过程，包括由细胞外或细胞内信号诱导的预成细胞通路的活化，导致细胞死亡。具体来说，细胞死亡包括在细胞膜完整的细胞中细胞核片断化、染色质凝聚等现象。

[0190] 本发明所用术语“用药器”指任何包括（但不限于）皮下注射、吸管之类的仪器，用于给哺乳动物施用本发明的抑制剂，该抑制剂可抑制血清素与 2 型血清素受体的相互作用，如 2 型血清素受体拮抗剂。

[0191] 本发明所用术语“细胞周期过程”指任何与细胞周期及其各种时期相关的细胞功能或过程。因此细胞周期过程是指通过细胞周期任何时期的，介导或参与细胞进程或与其相关的一个过程。

[0192] 本发明所指抑制血清素信号传递对细胞“有害”是指该抑制使细胞生存力发生有害的降低。细胞生存力可通过本领域熟知的标准方法测定，包括（但不限于）测定生物分子合成的水平（例如蛋白合成、核酸合成等）、锥虫蓝排斥水平、MTT 还原水平、碘化丙啶（propidium iodide）吸收水平、细胞表面磷脂酰丝氨酸的暴露水平、DNA 片断化和 / 或 DNA 梯形成水平等等。

[0193] “疾病”指动物的某种健康状况，其中如动物不能维持内环境稳定且其中若疾病不能得到改善则动物的健康就会持续恶化。反之“障碍”指另一种健康状况，即动物可以维持内环境稳定，但动物的健康状况比不存在该障碍时略差。如不治疗障碍不会引起动物健康状况的进一步降低。

[0194] 本发明所用“实质上不穿透血脑屏障”指用标准测定方法检测（如本发明所述、本领域所知或将来发展的测定化合物穿透血脑屏障参透性的方法）抑制剂不可在可测水平穿透血脑屏障。这些测定方法包括（但不限于）测定给动物服药时的神经精神效应。进一步，试验法包括测定一定时间后越过屏障的化合物浓度或穿过本领域所知的血脑屏障模型的化合物浓度（及其他方法），从而测定化合物对屏障的参透性。

[0195] 可以理解用现有技术可使抑制剂不在可测水平渗透及穿过血脑屏障。进一步说，目标抑制剂可用本领域现有技术进行改性而使之不能在可测水平穿透血脑屏障，或是与未改性前相比以更低的水平穿透血脑屏障。在两种情况下，不论是化合物丧失在可测水平穿透血脑屏障的能力或是与改性前相比失掉在较低水平穿透血脑屏障的能力，都认为该化合物已达到本部分“实质上不穿透血脑屏障”的目的。

[0196] 本文所用术语“有效量”指抑制剂的量，该量足以调节细胞中经由血清素受体的血清素信号传递，使之发生可测的降低。可用本领域众所周知的方法检测血清素信号的传递，例如（但不限于）本发明其他部分所述方法，包括测定血清素与受体结合水平和 / 或测定细胞活化水平。

[0197] 技术人员应理解该量是可变的，实际上可被众多因素调节，如待治疾病或状况、待治哺乳动物的年龄、健康及精神状况等等。一般来说，剂量变动于 1mg/kg 和 25mg/kg 之间。在一种实施方案中，通过静脉快速注射法给药。这种给药方式可确保所

有免疫相关细胞接触足够量的药，进而阻断它们受体介导的信号。然而，本发明不局限于此种给药方式。

[0198] 本发明所用“同源的”指两个多聚分子间亚序列的相似度，例如两个核酸分子间，两个 DNA 分子或两个 RNA 分子间或两个多肽分子间的相似度。当两个分子的亚单位都由相同的单体亚单位组成时，例如如果两个 DNA 分子在位点都是腺嘌呤，则它们在该位点是同源的。两个序列间的同源性是由匹配或同源位点的数目直接决定的，例如，如果两个化合物一半位点（如 10 个亚单位长的聚合物中的 5 个位点）是同源的，那么这两个序列是 50% 同源；如果 90% 的位点（如 10 个亚单位长的聚合物中的 9 个位点匹配或同源）相同，则这两个序列分享 90% 的同源性。例如：3' ATTGCC5' 和 3' TATGGC 这两个 DNA 序列有 50% 的同源性。

[0199] 本发明所用术语“免疫反应”指刺激和 / 或激活免疫细胞后的可检测结果。

[0200] 本发明所用术语“免疫应答”指在 T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞 (NK)、和 / 或抗原递呈细胞中导致效应器功能活化和 / 或启动的过程。因此，本领域技术人员应理解免疫应答包括（但不限于）任何可检测的辅助性 T 细胞或细胞毒性 T 细胞应答的抗原特异活化或异源活化、抗体的产生、过敏反应的 T 细胞介导活化等。

[0201] 本发明所用术语“免疫细胞”指任何参与激发免疫应答的细胞。这些细胞包括（但不限于）T 细胞、B 细胞、NK 细胞和抗原递呈细胞等。

[0202] 本发明所用术语“抑制血清素与 2 型血清素受体相互作用的抑制剂”指任何在可测水平抑制经由 2 型受体信号传递的化合物或分子。这些化合物包括血清素受体拮抗剂、反向激动剂等

[0203] 本发明所用术语“说明材料”包括刷品、碟片、图表或任何表达媒介，可用于指示本发明试剂盒中核酸、多肽和 / 或化合物的使用方法，使之可有效地缓解或治疗多种本发明所述疾病或障碍。指导材料可任意或选择性地描述缓解哺乳动物细胞或组织中疾病或障碍的一种或多种方法。试剂盒的指导材料可贴附于盛核酸、多肽和 / 或本发明的化合物的容器上或与盛核酸、多肽和 / 或化合物的容器一起包装运输。又或者，指导材料可以与容器分开运输，令使用者可结合该指导材料使用化合物。

[0204] “分离的核酸”指核酸片断或片段，它们是从原来自然相连部分分离出来的，例如从正常相连部分（如自然状况下与片断相连的基因组序列）脱离下来的 DNA 片断。此术语也用于指从其他成份上纯化下来的核酸，这些成份与该核酸自然结合，例如细胞中与之结合的 RNA、DNA 或蛋白质。因此本术语包括：结合入载体、自发复制质粒、原核或真核基因组 DNA 上的重组 DNA；或是以单个分子存在（如 cDNA 或是由 PCR 或限制酶消化产生的基因组或 cDNA 片断）不依赖于其他序列的重组 DNA。还包括属于编码其他多肽序列的杂和基因一部分的重组 DNA。

[0205] 本发明所用术语“调节”免疫应答指与不被治疗或接触化合物的哺乳动物免疫应答水平相比，和 / 或与除不接受治疗其他方面都相同的哺乳动物的免疫应答相比，使免疫应答水平发生可测的升高或降低。本术语包括扰乱和 / 或影响天然信号或应答，从而在哺乳动物，优选人中介导了有益的治疗反应。

[0206] “引物”指可特异性结合到指定的多核苷酸模板上，从而为合成互补多核苷酸提供起始点的多核苷酸。当将多核苷酸引物置于可诱导合成的环境中，即存在核苷酸、

互补多核苷酸链、起聚合作用的试剂（如 DNA 聚合酶）中时，此合成反应发生。引物一般为单链，但也可以为双链。引物一般为脱氧核糖核酸，但大量合成及天然形成的引物被用于多种方案中。引物与模板互补，设计引物使之与模板杂交，作为引发合成的起始位点，但引物不必反映模板的全部序列。在此情况中，引物与模板的特异性杂交依赖于杂交条件的严格性。可用如发光、放射或荧光部分等标记引物并用作可检测的部分。

[0207] “重组多核苷酸”指含非天然相结合序列的多核苷酸。扩增的或组合的重组多核苷酸可包括于适当的载体中，且该载体可用于转化合适的宿主细胞。

[0208] 重组多核苷酸也可起非编码功能（如启动子、复制起点、核糖体结合位点等）。

[0209] 包含重组多核苷酸的宿主细胞为“重组宿主细胞”。在重组宿主细胞中包含的重组多核苷酸的基因表达产生“重组多肽”。

[0210] “重组多肽”是由重组多核苷酸的表达产生。

[0211] “载体”是包含分离的核酸的物质成份，可用于将分离的核酸传递到细胞内部。本领域很多已知载体包括（但不限于）线性多核苷酸、与离子或两亲化合物结合的多核苷酸、质粒及病毒。因此该术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也可理解为包括有助于将核酸转移到细胞中的非质粒及非病毒化合物，如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体包括（但不限于）腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体等。

[0212] “表达载体”指包含重组多核苷酸，也包含与表达核酸序列相连的表达控制序列的载体。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件；其他表达所需元素可由宿主细胞提供或存在于载体表达系统。本领域表达载体包括所有已知载体，如粘粒、质粒（裸露于或包含在脂质体中）及结合重组多核苷酸的病毒。

[0213] 术语“血清素家族受体”指可被分类于血清素、肾上腺素能、组胺、褪黑激素或多巴胺能受体的受体。也即，该受体特异性的与这些分子中的任一成员结合且不与样品中其他分子结合。

[0214] “血清素受体”包括特异性与血清素结合的多肽。

[0215] 本发明所用术语“血清素信号”指作为受体介导的与血清素相互作用结果的任何细胞内生化通路平衡的改变，或是特异性药物与任何血清素特异性受体相互作用的结果，或是两者一起引起的结果。

[0216] 相似地，本发明所用“血清素的活化”受体指细胞中血清素与血清素受体的结合诱导了细胞内外与此结合有关的特定级联。

[0217] “受体”是与配基特异性结合的化合物。

[0218] 本发明所用术语“特异性结合”指受体识别并结合样品中的血清素家族蛋白（即多巴胺能蛋白、肾上腺素能蛋白、组胺、褪黑激素及血清素），而实质上不识别及结合样品中的其他分子。

[0219] 本发明所用术语“治疗”疾病指减少疾病或障碍的频率，减低动物患有的一种或多种疾病或障碍症状的频率。

[0220] 说明

[0221] 本发明涉及用于调节哺乳动物免疫应答的新方法。本发明涉及一个发现，即用特异性拮抗剂抑制细胞中血清素与细胞上的 2 型血清素受体相互作用，和 / 或用反向激动

剂抑制经由 2 型血清素受体的信号转化可以抑制 T 细胞活化。本发明揭示了抑制多种免疫疾病、障碍或状况的方法，即通过使用已知或开发的 2 型血清素受体拮抗剂抑制血清素与 2 型血清素受体的相互作用，并通过抑制血清素与受体的相互作用阻止或抑制 T 细胞的活化，进而可抑制由该相互作用介导的免疫应答。

[0222] I. 方法

[0223] A. 调节免疫应答的方法

[0224] 本发明包括调节哺乳动物免疫应答的方法。本方法包括因治疗需要给哺乳动物施用可抑制血清素与血清素受体间相互作用的抑制剂。因为本领域技术人员应理解本发明所述教导表明抑制血清素与 5-HT 受体相互作用会抑制或阻止含该受体的 T 细胞活化。而后，如本文公开数据所详细阐述的，T 细胞的抑制会阻止免疫应答的产生。

[0225] 具体来说，本发明涉及可用多种抑制血清素与 1B 型、2 型、4 型和 6 型血清素受体相互作用的抑制剂来抑制此相互作用。也即，基于本文公开数据本领域技术人员应理解，抑制血清素与 1B、2(A、B 和 / 或 C)、4 和 6 型受体结合的化合物包括，但不局限于，抗体、反义核酸、核酶、小分子、肽模拟物 (peptidomimetic) 和药物化合物，或是已知或是开发中的抑制血清素与血清素受体相互作用的物质。

[0226] 基于本文公开数据本领域技术人员应理解，本发明的抑制剂包括阻止或抑制细胞表面上血清素受体结合血清素的分子和化合物。即，本发明认为，阻止受体表达使之不会呈现在细胞表面的反义和 / 或反义分子可作为本发明的抑制剂。

[0227] 抑制血清素与 1B、2、4 或 6 型血清素受体间相互作用的抑制剂优选 1、2、4 和 6 型受体的拮抗剂，如利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB 242084、MDL 11939、SB 216641、美赛西平及其他。此外，基于本文公开数据本领域技术人员应理解，1B、2、4 和 6 型受体拮抗剂包括那些将来发现的拮抗剂，因为技术人员应理解根据本领域众所周知的药理学标准鉴别出的任何 1B、2、4 或 6 型受体拮抗剂，因其对血清素与血清素受体相互作用的抑制性可抑制 T 细胞活性，进而可抑制免疫应答，如其他部分所例证说明的。因此，本发明不仅局限于在此所述特定的 1B、2(A/B/C)、4 和 6 型受体拮抗剂，而是包括那些本领域所知或将开发出的拮抗剂。

[0228] 2 型血清素受体拮抗剂可特异于任何一种 2A、2B 和 2C 型受体或其任何组合。另外，本发明包括不特异的 2 型受体拮抗剂，其可影响血清素与任何 2 型受体的结合。特异及非特异的 2 型血清素受体拮抗剂包括 (但不限于) 利哌酮、米安色林、利坦色林、酮色林、美西麦角、甲氧禾胺 (methoxygamine)、赛庚啶、氯氮平、SB 206553、LY 53857、MDL 11939、SB 242084、甲麦角林、N-去甲氯氮平、匹仑哌隆、氯氮平 N-氧化物、氯替平、洛沙平、美舒麦角等及其任何组合。

[0229] 基于本文公开数据技术人员也应理解，本发明包括使用实质上不透血脑屏障的化合物。因为本领域技术人员应理解由于血清素受体存在于神经细胞而且如本发明所揭示的也出现于免疫系统细胞，包括源于这些细胞的肿瘤 (如多发性骨髓瘤等)，最好 (但不必) 抑制经由免疫细胞上血清素受体的信号传递而不影响经由神经细胞上血清素受体的信号传递。在这种情况下，最好能使用可抑制信号传递但不可穿透血脑屏障进而影响神经细胞上血清素信号传递的化合物。

[0230] 相应地，本发明包括包括使用一种化合物，其抑制经由细胞血清素受体的血清

素信号传递但不会大量穿透血脑屏障。这样的化合物为一种新的化合物，它自始在实质上不穿透血脑屏障的同时拥有本发明所述的其他期望的特性（如影响血清素信号传递、特异性抑制某些类型的血清素受体、诱导细胞的凋亡、调节细胞的免疫应答等）。或者，基于本文提供的技术，技术人员应该理解本发明包括这样的化合物：可抑制血清素信号传递但穿透血脑屏障，而后经过改性使其穿透屏障的能力减低或优选消失的化合物。

[0231] 基于本文公开数据本领域技术人员应理解，改性化合物影响其穿透血脑屏障的方法是本领域所熟知的，同时本领域教导了用于测定物质穿透屏障能力的多种方法。本文公开了这样一种方法，即将多种侧基加入化合物（如氟奋乃静），从而使改性后的氟奋乃静穿透血脑屏障的能力降低。本文公开了改性后的氟奋乃静化合物，命名为如 QSS-5 和 QSS-12，但此应用决不局限于这些或任何其他已知血清素抑制剂的特殊衍生物。反之，本发明包括任何有本发明抑制剂所期望的免疫调节特性且同时有期望的较低的穿透血脑屏障能力的化合物。生产和鉴定有这些特性的化合物是本领域的常规方法，如用于评估化合物穿透血脑屏障的渗透的测定法。同产生有期望特性的目标化合物的方法一样，这些测定法列举于本发明。但是，本发明决不局限于这些或任何其他方法；而是包括产生和鉴定实质上不穿透血脑屏障但仍然抑制经由血清素受体的血清素信号传递的化合物的方法，如那些本发明所公开的、本领域所熟知的或将来会发展出的方法。

[0232] 此外，基于本文公开数据本领域技术人员能容易的生产及鉴定新的化合物，该化合物可抑制血清素信号传递但实质上不穿透血脑屏障，而鉴定这些新化合物的方法在本发明其他部分有述，且通过鉴别及生成这样的化合物，如（但不限于）改性后的氟奋乃静酚噻嗪衍生物 QSS-5 和 QSS-12，例举了实行这些方法的成功简化例证。基于本文的公开，本领域技术人员能鉴定本发明的其他化合物，而且技术典型的涉及这些实验，不需要创造性劳动。

[0233] 总之，本发明包括使用及鉴别可抑制血清素信号传递并且实质上不穿透血脑屏障的化合物。因此，下述方法都包括使用这样的抑制剂。

[0234] 此外，本领域技术人员应理解本发明包括抑制经由任何已知或将来会被鉴定的血清素受体的血清素介导的信号传递，其中抑制血清素信号会影响细胞生长、分裂、存活力、凋亡等，以及其中细胞参与或介导免疫应答。因此，本发明不局限于对经由 1B、2、4 和 6 型血清素受体信号传递的抑制；而是包括（但不限于）抑制经由血清素受体的信号传递，其中该抑制作用抑制免疫应答。

[0235] 基于本文公开数据本领域技术人员应理解，可通过使用已知或将发展出的抗体、反义核酸、核酶、小分子、肽模拟物和药物化合物等介导这样的抑制，该作用可抑制血清素与 1 型血清素受体的相互作用。也即，本发明包括使用 1 型受体抑制化合物，如（但不限于）SB-216641，其抑制 1B 型受体，和 BRL-15572，其选择性抑制 1D 型受体（参见 Price 等，1997，Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.356：312-320）。因为，如本发明其他部分公开数据所证实的，对经由 1B 型受体介导的血清素信号传递的抑制可抑制细胞生长，且更优选如 DNA-梯所证实的凋亡，其与细胞大小的可测增加相关。

[0236] 然而，本发明并不局限于这些或任何其他血清素受体抑制剂。具体来说，如本发明前面其他部分所论述的，这些化合物包括已知化合物及将来开发的抑制血清素与血清素受体相互作用的化合物。已知血清素受体激动剂及拮抗剂的列表可在英国 Tocris™

商业公共网站获得，该网站包括大量 G.A.Kennet 对多种血清素受体已知特性的评论，讨论多种影响它们生物学活性的化合物 (Kennet, 发表于 1997 年 5 月, universal resource locator at Tocris company website, UnitedKingdom)。

[0237] 一旦结合本文公开知识，本领域技术人员应理解，本发明包含使用特异性结合某受体的抗体来抑制血清素与该血清素受体的结合。特异性与血清素受体结合的抗体，包括那些与每种类型的受体结合的抗体，是本领域众所周知的和 / 或可由技术人员通过标准方法生产。

[0238] 技术人员应进一步理解抗体可作为蛋白、编码蛋白的核酸或两者同时给药。即，本领域有许多众所周知的载体，可以使蛋白（包括抗体）进入细胞或组织。因此，本发明包括施用特异性与血清素受体结合的抗体从而抑制血清素与该受体的结合，并且该抗体可直接给药进入细胞或是通过对细胞施用编码该抗体的核酸使该抗体进入细胞，本发明也包括抗体的这些给药方法。

[0239] 一般来说，抗体不易穿透血脑屏障。因此技术人员应理解使用抗体也提供了这样一种优势，即在抑制免疫细胞血清素信号传递的同时，由于血脑屏障使抗体无法接近神经细胞，因而抗体不会在可测水平影响神经细胞中的信号传递。

[0240] 此外，基于本文公开数据技术人员应理解，本发明包括通过阻止细胞中血清素受体的表达（如不阻止，该细胞会表达受体）来抑制血清素信号的传递，否则该信号会经由血清素受体传递。例如，技术人员应理解本发明包括对细胞施用核酶或反义核酸，从而抑制细胞中的血清素受体表达，如下简述，其中设计和使用这些分子来抑制细胞中目标蛋白表达的方法是本领域众所周知的。

[0241] 反义分子及其在抑制基因表达方面的应用是本领域众所周知的（参见，Cohen, 1989, In : Oligodeoxyribonucleotides, AntisenseInhibitors of Gene Expression, CRC Press)。反义核酸为至少与特定 mRNA 分子的一部分互补的 DNA 或 RNA 分子 (Weintraub, 1990, Scientific American 262 : 40)。细胞中，反义核酸杂交到相应的 mRNA 上形成双链分子，从而抑制基因的转录。

[0242] 用反义方法抑制基因转录是本领域所熟知，如 Marcus-Sakura 曾有所描述 (1988, Anal.Biochem.172 : 289)。这些反义分子可如 Inoue 所述的，用编码反义分子的 DNA 的遗传表达来提供给细胞 (1993, 美国专利 5,190,931)。

[0243] 或者，可合成反义分子而后提供给细胞。优选的反义寡聚体为 10 至 100，且优选是 15 至 50 个核苷酸，因为它们容易合成且易于导入靶细胞。本发明所用的合成反义分子包括本领域熟知的寡核苷酸衍生物，其与未改性的寡核苷酸相比它们的生物学活性得以提高（参见 Cohen, 见上；Tullis, 1991, 美国专利 5,023,243, 在此全文引用）。

[0244] 核酶及它们在抑制基因表达方面的应用也是本领域所熟知的（参见，Cech 等, 1992, J.Biol.Chem.267 : 17479-17482 ; Hampel 等, 1989, Biochemistry 28 : 4929-4933 ; Eckstein 等, 国际公开文本 WO92/07065 ; Altman 等, 美国专利 5,168,053, 在此全文引用)。核酶是 RNA 分子，可以类似于 DNA 限制性内切酶的特性特异性剪切其他单连 RNA。通过改造编码这些 RNA 的核酸序列，可将分子设计成识别 RNA 分子中特异核酸序列并能将其剪切 (Cech, 1988, J.Amer.Med.Assn.260 : 3030)。此方法的主要优势在于其序列特异性，只有含特殊序列的 mRNAs 才会失活。

[0245] 核酶有两种基本类型，即，四膜虫型 (Hassel hoff, 1988, Nature334 : 585) 及锤头型。四膜虫型核酶识别的序列为四碱基长，而锤头型核酶识别 11-18 碱基长的序列。序列越长，靶 mRNA 种类中序列专一性发生的可能就越大。因此，锤头型核酶比四膜虫型核酶更适用于使特殊 mRNA 种类失活，而且 18 碱基识别序列比短些的识别序列更优选，因为短序列可能会在多种不相关的 mRNA 分子中随机存在。

[0246] 除对细胞施用抗体抑制血清素与细胞表面血清素受体的相互作用外，本发明包括施用特异性与目标血清素受体结合的抗体或编码该抗体的核酸，其中该分子进一步包含细胞内保留序列，因此抗体可与血清素受体结合并阻止其在细胞表面的表达。这些抗体，通常表示为“细胞内抗体”是本领域所熟知的，如 Marasco (美国专利 6,004,490) 和 Beerli 等所描述的 (1996, Breast Cancer Research and Treatment38 : 11-17)。因此，本发明包括含抑制血清素与目的受体结合的方法，其中受体呈现在细胞表面 (如抗体、化学化合物、小分子、肽模拟物、药物等)，本发明也包括抑制结合的方法，包括抑制受体呈现在细胞表面 (如核酶、反义分子、细胞内抗体等)，并且包括诸如将来发展的抑制细胞表面上血清素与血清素受体间配基受体相互作用的方法。

[0247] 基于本文公开的数据技术人员应理解，抑制血清素与 (1B、2、4 或 6 型) 血清素受体相互作用的抑制剂可与任何其他抑制剂一起给药。另外，本发明包括用至少一种血清素抑制剂 (如抗体、反义核酸、核酶、肽模拟物、血清素受体拮抗剂等) 与其他免疫调节剂一起给药 (其之前及之后或同时给药)，免疫调节剂为 (但不限于) 基因表达调节剂 (如抑制白介素 2 表达的糖皮质激素等)、为已知诱变素的烷化剂 (如环磷酰胺)、作用于神经钙蛋白和 JNK/p38 激酶通路和细胞周期蛋白激酶级联的激酶及磷酸酶的抑制剂 (如环孢霉素 A、他克莫司 [FK506] 及雷帕霉素)、作为鸟嘌呤核苷酸合成的抑制剂并用于阻止异源排斥及治疗进行性排斥的嘌呤从头合成抑制剂 (如麦考酚酯 motefil)、用于治疗风湿性关节炎患者的嘧啶从头合成的抑制剂 (如雷抑素) 等。因此，本发明包括至少用一种可抑制血清素与 (1B、2、4 或 6 型) 血清素受体相互作用的抑制剂与传统免疫调节物和化合物一同给药。

[0248] 此外，实质上不穿透血脑屏障的抑制剂可与穿透屏障的抑制剂一同给药，并且本发明决不局限于穿透或不可穿透血脑屏障抑制剂的结合。

[0249] 一旦结合本发明所授知识，本领域技术人员应理解，既然免疫细胞 (如淋巴细胞，更具体来说如 T 细胞、或抗原递呈细胞，如 B 细胞或巨噬细胞) 上血清素与 2 型血清素受体的结合是受体活化所必需的，而后受体活化介导 T 细胞活化，那么抑制血清素与受体的相互作用可调节这些免疫细胞介导的免疫应答。此外，本文公开数据表明抑制经由 1B、4 或 6 型血清素受体的血清素信号的传递可抑制表达这些受体的免疫细胞的活化，抑制血清素与这些受体的结合可抑制细胞活化，因此也抑制了细胞的免疫反应，进而抑制由该细胞产生的免疫应答。也即，抑制免疫细胞上由血清素受体介导的相互作用会影响由所影响的免疫细胞产生的免疫应答 (即免疫反应) (如由受体 / 配基结合介导的有丝分裂应答受抑制，从而 T 细胞增殖不发生，并且 / 或者发生凋亡等)，因此相对于拮抗剂不存在而其他方面相同的细胞所产生的免疫应答，该细胞的应答、免疫或其他方面发生可测的增加或减少。本文公开数据清楚表明不论在活化反应的任何阶段，不论是由异源刺激或是有丝分裂刺激引发，抑制由 1B、2、4 和 6 型 5HT 受体介导的信号可导致应

答的立即停止。

[0250] 因此，本文公开数据充分证实了一种抑制哺乳动物（优选人）中免疫应答的方法，因为抑制血清素与（1B、2A、2B、2C、4 和 / 或 6 型）血清素受体的结合可抑制免疫细胞活性，因此抑制该细胞引起的免疫反应，进而抑制该细胞介导的免疫应答。

[0251] 相似地，本发明包括一种可抑制由免疫细胞引起的免疫反应的方法。因为，如本文其他部分详细说明书的，抑制免疫细胞上血清素与血清素受体的结合可抑制该细胞活化，进而与不抑制细胞血清素结合时相比其免疫反应受抑制，和 / 或与其中除血清素与血清素受体的结合不被抑制外其他方面都相同的细胞相比其免疫反应受抑制。

[0252] 相同的，基于本文公开数据技术人员应理解，本发明包括调节哺乳动物免疫应答的方法，此处免疫应答是由血清素信号活化的免疫细胞所介导的。因为，如本文前面其他部分所述，免疫细胞活化需要血清素与其相关 1B、2A、2B、2C、4 和 / 或 6 型受体结合，因此抑制该结合就抑制了活化，进而阻止了细胞介导的免疫应答。因此，本领域技术人员应理解抑制血清素信号（可由本文其他部分详述的多种方法实现）可抑制需要该信号的免疫应答的产生。此外，如本文前面其他部分所揭示的，该方法包括使用实质上不透血脑屏障的抑制剂。

[0253] 此外，基于本文公开数据技术人员应理解，本发明包括抑制 T 细胞上血清素受体活化介导的免疫应答的方法。即，如本文前面其他部分所述，抑制免疫细胞（优选 T 细胞）上血清素与血清素受体（如 1B、2A、2B、2C、4 和 6 型受体）的结合可抑制该细胞活化，并进而抑制该细胞引起的免疫反应及该细胞介导的免疫应答。因此基于本文公开数据技术人员应理解，本发明包括这样的方法。

[0254] 本发明也包括抑制哺乳动物（优选人）的免疫细胞活化的方法，其中该活化由细胞上的血清素受体活化所介导。再次，正如本文其他部分详细叙述的，本文公开数据首次证明抑制经由免疫细胞上 1B、2(A/B/C/)、4 或 6 型血清素受体的血清素信号传递抑制该细胞活化，并因此也抑制了该细胞本应产生的免疫应答。如本文其他部分所详述的，抑制血清素信号的方法或是本文所描述的或是本领域熟知的，且包含在本发明中。再次，本文公开的每种方法都包括使用实质上不透血脑屏障的抑制剂。

[0255] 基于本文公开数据技术人员应理解，此处公开的方法用于抑制任何对哺乳动物不利的免疫应答。这些多余的免疫应答包括（但不限于）与疾病、障碍或状况相关的免疫应答，包括二级免疫应答、自身免疫应答、异源移植排斥应答等。

[0256] 因此，本发明包括抑制哺乳动物二级免疫应答的方法。即当此二级免疫应答由需血清素信号活化的细胞所介导时，可如此文它处所述通过抑制细胞上血清素与 1B、2、4 和 6 型血清素受体的结合来抑制血清素信号。该抑制进而抑制细胞活化，然后抑制该细胞介导的免疫应答，如（但不限于）二级免疫应答、CD8+ 细胞介导的应答和 / 或 CD4+ 细胞介导的免疫应答。

[0257] 抑制血清素受体介导信号的化合物或分子（如，像血清素受体拮抗剂或反向激动剂之类的药物化合物）可给药于细胞、组织或动物，或是用于抑制细胞上血清素与 1B、2、4 和 / 或 6 型血清素受体的相互作用。不论该抑制剂为抗体或 1B、2、4 和 / 或 6 型血清素受体拮抗剂，此处所描述的安全有效的抑制剂给药方法是本领域技术人员所熟知的。例如，血清素拮抗剂的给药法参照标准文献描述。即，许多影响血清素的制剂的

给药法在 Physician' s Desk Reference(1996 版, Medical Economics Co., Montvale, NJ) 中都有详述, 其公开内容在此全文引用。

[0258] 此外, 血清素受体抑制剂的给药参数是药学领域所熟知的且在此不必重复。

[0259] 组合物也可用于治疗由于受体表达改变所介导的疾病、障碍或状况, 因此减低或增加受体表达, 或改变细胞、组织及动物中的蛋白水平对动物是有益的。即, 当动物的疾病、障碍或状况是由血清素表达水平或蛋白水平改变所介导或与之相关时, 可用该组合物调节受体的表达或蛋白水平。

[0260] 为对哺乳动物给药, 可将化合物、抑制血清素与 1B、2、4 和 / 或 6 型血清素受体结合的抑制剂、多肽、或是编码多肽的核酸、和 / 或与其全部或部分互补的反义核酸混悬在任何可药用载体中, 如 HEPES 缓冲的 pH 约 7.8 的盐水中。

[0261] 其他可药用载体包括(但不限于)甘油、水、盐水、乙醇和其他可药用的盐溶液, 如磷酸盐及有机酸盐。这些及其他可药用载体在 Remington' s Pharmaceutical Sciences 中有所描述(1991, MackPublication Co., New Jersey), 其公开内容在此全文引用。

[0262] 药学组合物可以无菌注射液、油悬浮液或溶液的形式制备、包装或出售。此悬浮液或溶液可根据已知技术制备, 除活性成份外还可包括附加成份, 如分散剂、湿润剂或本文所述悬浮剂。这些无菌注射制剂可通过合适的非毒性肠道外可用的稀释剂或溶剂制备, 如水或 1, 3- 丁二醇。其他适宜的稀释剂及溶剂包括(但不限于)Ringer 溶液、等渗氯化钠溶液和合成的单 / 双甘油酯之类的脂肪油。

[0263] 本发明所用药物组合物可以适于经口、直肠、阴道、肠胃外、局部、肺部、鼻内、颊、眼部或其他给药途径的制剂形式施用、制备、包装和 / 或销售。其他制剂包括投射的毫微粒、脂质体制剂、含活性成份的再封红细胞及免疫学基础的制剂。

[0264] 本发明组合物可由多种途径给药, 包括(但不限于)经口、直肠、阴道、肠胃外、局部、肺部、鼻内、颊、或眼部给药。这些给药方法技术人员是易于理解的, 并取决于多种因素, 包括待治疾病类型及程度、待治动物或人的类型及年龄等。

[0265] 本发明方法所用药物组合物可通过口服固体制剂、眼部用药、栓剂、气雾剂、局部用药或其他类似制剂给药。除如硫酸乙酰肝素或其生物学等效物之类的化合物, 这些药物组合物可包括可药用载体及其他已知可用于提高或促进药物施用的成份。其他可能的制剂, 如毫微粒、脂质体、再封红细胞及免疫学基础的系统也可根据本发明的方法用于受体蛋白和 / 或编码该蛋白的核酸的施用。

[0266] 如现在所述, 用本文所述任何方法鉴别的化合物都可制成制剂并给哺乳动物施用以治疗免疫系统状况(即自身免疫疾病及异源排斥)。

[0267] 本发明包括制备和使用药学组合物, 其包括用于治疗多种病症, 如 T 细胞淋巴瘤、自身免疫病症(见下文)、由实体器官移植引起的并发症、皮肤移植排斥反应、骨髓移植中的移植物抗宿主病等。

[0268] 此种药物组合物可以适于对目标个体给药的形式只包含活性成份, 或者该药物组合物可包括活性成份及一种或多种可药用载体、一种或多种附加成份或一些以上物质的组合。活性成份可以以生理适宜的酯或盐的形式存在于药物组合物中, 如结合以本领域熟知的生理适宜的阳离子或阴离子。

[0269] 本文所用术语“可药用载体”是指一种化学组分，活性成份可与之结合，且这种结合可将该活性成份给药于目标个体。

[0270] 本文所用术语“生理适宜的”酯或盐，指活性成份的酯或盐形式，其与该药物组合物中其他任何成份相容，其对该组合物给药的目标个体无毒害作用。

[0271] 本文所述药物组合物制剂可由任何药学领域已知或今后开发的方法制备。一般来说，这样的制备方法包括将活性成份与载体或一种 / 多种其他附加成份结合，然后如需要，可将产品制模或包装成所需的单或多剂量单位。

[0272] 尽管此处提供的药物组合物的说明主要针对那些适于对人给药的 药物组合物，技术人员应理解这些组合物通常也适于对各种动物给药。 改性可用于对人给药的药物组合物以适于对多种动物给药是众所周知的，如需要，兽医药理学家可用很常规的实验设计并实行此种改性。 本发明中药物组合物的给药目标个体预期包括（但不限于）人和其他灵长类、哺乳动物（包括如牛、猪、马、羊、猫和狗等商业相关的哺乳动物）。

[0273] 本发明方法中使用的药物组合物可以以适宜于经口、直肠、阴道、肠胃外、局部、肺部、鼻内、颊部、眼部或其他给药途径的制剂形式制备、包装或销售。 其他制剂包括投射的毫微粒、脂质体制剂、含活性成份的再封红细胞及免疫学基础的制剂。

[0274] 本发明的药物组合物可以以单剂量单位或以多个单剂量单位形式制备、包装或销售。 本文所用“单位剂量”指含预定量活性成份的不连续量的药物组合物。 活性成份量通常等于给目标个体施用的活性成份剂量或此剂量的一个合适的部分量，例如此剂量的一半或三分之一。

[0275] 本发明药物组合物中的活性成份、可药用载体及任何附加成份的相关量会根据被治疗个体的特性、大小及状况变动，且根据该组合物的给药方式变动。 例如，组合物可含 0.1% 至 100% (w/w) 的活性成份。

[0276] 除活性成份外，本发明的药物组合物可进一步包括一或多种附加药物活性剂。 特殊预期的附加物包括抗吐药及清除剂，如氰化物和氰酸盐清除剂。

[0277] 本发明药物组合物的控制或缓释制剂可由传统技术制得。

[0278] 本发明适于口服给药的药物组合物制剂可以以单个固体剂量单位的形式制备、包装或出售，包括（但不限于）片剂、硬或软胶囊、扁囊剂、含片或锭剂，每种形式都包括预定量的活性成份。 其他适宜口服给药的制剂包括（但不限于）粉或粒剂、水或油悬浮液、水或油溶液或乳剂。

[0279] 本文所用“油”液，指由含碳液体分子组成且与水相比极性较弱的液体。

[0280] 包含活性成份的片剂可由活性成份任选与一种或多种附加成份一起压制或模制而得。 压制片剂可用适当的设备压制存在于流动粉状或粒状制品中的活性成份（任选与一种或多种粘合剂、润滑剂、赋形剂、表面活性剂及分散剂混和）而制备。 模制片可在适当的设备中将活性成份、药学适宜溶媒及至少足以湿润该混合物的液体一起灌模制得。 用于生成片剂的可药用赋形剂包括（但不限于）惰性稀释剂、粒化及崩解剂、粘合剂、和润滑剂。 已知的分散剂包括（但不限于）马铃薯淀粉和钠淀粉乙交酯。 已知表面活性剂包括（但不限于）十二烷基硫酸钠。 已知的稀释剂包括（但不限于）碳酸钙、碳酸钠、乳糖、微晶纤维素、磷酸钙、磷酸氢钙、和磷酸钠。 已知的粒化及崩解剂包括（但不限于）玉米淀粉和海藻酸。 已知的粘合剂包括（但不限于）明胶、阿拉伯胶、预胶化

的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮和羟丙基甲基纤维素。已知润滑剂包括（但不限于）硬脂酸镁、硬脂酸、硅石及滑石。

[0281] 片剂可不被包衣或可用已知方法包衣以延迟在目标个体肠胃道中的裂解，从而使活性成份得以缓释并延缓吸收。例如可用单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯包衣片剂。此外，可用美国专利 4,256,108；4,160,452 中描述的方法包衣片剂以形成控制渗透的释放片剂。为使药物精美可口，片剂可进一步包含甜味剂、调味剂、着色剂、防腐剂或它们的混合物。

[0282] 含活性成份的硬胶囊可用生理可降解的组分制得，如明胶。这些硬胶囊包含活性成份，且可进一步包含附加剂，如惰性固体稀释剂，如碳酸钙、磷酸钙或高岭土。

[0283] 含活性成份的软明胶胶囊可用生理可降解的组分制得，如明胶。这些软胶囊包含的活性成份可与一些水或油介质混合在一起，如花生油、液体石蜡或橄榄油。

[0284] 适于口服的含本发明药物组合物的液体制剂可以液体或干产品形式（使用时用水或其他适宜溶剂重构）制备、包装及销售。

[0285] 液体悬浮液可用传统方法制备，使活性成份悬浮于水或油溶媒中。水溶媒包括，水和等渗盐水。油溶媒包括例如杏仁油、油脂、乙醇、如花生、橄榄、芝麻或椰子油等的植物油、分馏的植物油及如液体石蜡之类的矿物油。液体悬浮液可进一步包括一种或多种附加成份，包括（但不限于）悬浮剂、分散剂或湿润剂、乳化剂、粘滑剂、防腐剂、缓冲液、盐、调味剂、着色剂及甜味剂。油悬浮液可进一步包括增厚剂。已知的悬浮剂包括（但不限于）山梨醇糖浆、氢化的可食脂、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄耆树胶、阿拉伯树胶及纤维素衍生物，如羟甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素。已知的分散或湿润剂包括（但不限于）天然磷脂（如卵磷脂）、烯基氧化物与脂肪酸的缩合物、与长链脂肪醇的缩合物、与脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合物、与脂肪酸和己糖醇酐衍生的偏酯的缩合物（分别例如，聚氧乙烯硬脂酸酯、heptadecaethyleneoxycetanol、聚氧乙烯山梨醇单油酸酯及聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯）。已知的乳化剂包括（但不限于）卵磷脂及阿拉伯胶。已知的防腐剂包括（但不限于）甲基、乙基或正丙基 - 对羟基苯甲酸盐、抗坏血酸及山梨酸。已知的甜味剂包括（但不限于）甘油、丙二醇、山梨醇、蔗糖及糖精。用于油悬浮液的已知增稠剂包括（但不限于）蜂蜡、硬石蜡及鲸蜡醇。

[0286] 含活性物质的水或油液体溶液可用与液体悬浮液相同的方式制备，它们的主要区别在于活性物质是溶解而不是悬浮于其中。本发明药物组合物的液体溶液可包括在液体悬浮液部分所述的任何成份，可理解不必加悬浮剂帮助活性物质溶解在溶剂中。水溶剂包括水和等渗盐等。油溶剂包括杏仁油、油酯、乙醇、植物油，如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油，分馏的植物油及矿物油，如液体石蜡。

[0287] 本发明药物制品的粉末及粒状制剂可用已知方法制得。这些制剂可直接对目标个体给药，它们可用于制得，例如，片剂、填充胶囊或通过加入水或油溶媒制成水或油悬浮液或溶液。这些制剂每个都可进一步包含一或多种分散剂或湿润剂、悬浮剂及防腐剂。这些制剂中也可包括其他赋形剂，如填料及甜味剂、调味剂或着色剂。

[0288] 本发明药物组合物也可以水包油乳剂或油包水乳剂的形式制备、包装或销售。油相可为植物油，如橄榄油或花生油、矿物油，如液体石蜡或这些物质的混合物。这些

组分可进一步包括一或多种乳化剂，如阿拉伯胶或黄耆树胶之类的天然树胶、大豆或卵磷脂之类的天然磷脂、酯或由脂肪酸及己糖醇酐的结合物衍生的偏酯，如山梨聚糖单油酸酯及这些偏酯与环氧乙烷的缩合物，如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯。这些乳剂也可包含附加成份，如甜味剂或调味剂。

[0289] 本发明药物组合物可在适于直肠给药的制剂中制备、包装或出售。该组合物可制成栓剂、保留灌肠剂及直肠或结肠冲洗液的形式。

[0290] 栓剂可通过将活性成份与非刺激性药物适宜赋形剂混合而制得，该赋形剂在常温（即约 20℃），为固体，在直肠温度时（即健康人的约为 37℃）是液体。适当的药物适宜赋形剂包括（但不限于）可可脂、聚乙二醇及多种甘油酯。栓剂可进一步包括多种附加成份，包括（但不限于）抗氧化剂和防腐剂。

[0291] 用于直肠或结肠冲洗的保留灌肠剂或溶液可通过将活性成份及药物适宜的液体溶媒混合制得。如本领域所熟知，灌肠剂可用于给药并可包装在适合于目标个体直肠结构的传送设备上。灌肠剂可进一步包含多种附加剂，包括（但不限于）抗氧化剂及防腐剂。

[0292] 本发明药物组合物可以在适于阴道给药的制剂中制备、包装或销售。这些组分可以栓剂、或浸渍或包衣的可插入阴道的物质的形式，如卫生栓、灌洗剂、用于阴道冲洗的胶、乳液或溶液。

[0293] 用化学组分浸渍或包被物质的方法是本领域所熟知的，包括（但不限于）将化学组分沉淀或结合到材料表面的方法、在材料合成时将化学物质结合到其结构中的方法（如结合到生理可降解的物质上），及用吸收性材料吸收水或油溶液，再将其干燥 / 或不用将其干燥。

[0294] 用于阴道冲洗的灌洗剂或溶液可通过将活性成份及药物适宜液体溶媒混合制得。如本领域所熟知的，灌洗剂可用在适合于目标个体阴道结构的的传送设备给药并可包装其中。灌洗剂可进一步包含多种附加剂，包括（但不限于）抗氧化剂、抗生素、抗真菌剂及防腐剂。

[0295] 如本文所用，药物组合物的“肠胃外给药”包括任何以目标个体组织的物理刺口为特点，并将药物组合物经由该刺口给药的给药途径。因此，肠胃外给药包括（但不限于）通过注射该组合物给药、通过手术切口给药、通过组织穿透非手术伤口给药等。具体来说，肠胃外给药预期包括（但不限于）皮下、腹腔内、肌内、胸内注射，及肾透析输液术。

[0296] 适于肠胃外给药的药物组合物制剂包括与药物适宜性溶媒（如无菌水或无菌等渗生理盐水）结合的活性成份。这些制剂可以适合快速注射给药或持续给药的形式制备、包装或销售。可注射制剂可以以单位剂量的形式制备、包装或销售，如装于安瓶或含防腐剂的多剂量容器中。肠胃外给药制剂包括（但不限于）悬浮液、溶液、油或水载体的乳剂、糊剂及可植入的缓释剂或可生物降解的制剂。这些制剂可进一步包含一种或多种附加成份，包括（但不限于）用于悬浮、稳定或分散的物质。在一种肠胃外给药制剂的实施方案中，所提供活性成份为干燥形式（即粉末或颗粒），肠胃外给药之前可在合适的媒介中重构（如无菌无热源水）。

[0297] 药物组合物可以以无菌注射水 / 油悬浮液 / 溶液的形式制备、包装或销售。该

悬浮液或溶液可根据已知技术制备，除活性成份外还可包含附加成份，如本文所述分散剂、湿润剂或悬浮剂。这些无菌注射制剂可用非毒性、肠胃外适宜的稀释剂或溶剂制得，如水或 1, 3- 丁烷二醇。其他适宜的稀释剂和溶剂包括（但不限于）林格溶剂、等渗氯化钠溶剂、和脂肪油，如合成的单甘油酯或甘油二酯。其他可用的肠胃外给药制剂包括那些含微晶形活性成份的脂质体制剂或作为生物可降解聚合物系统的成份。用于缓释或植入的组合物可包含药物适宜多聚或疏水物质，如乳剂、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

[0298] 适于局部给药的制剂包括（但不限于）液体或半液体制剂，如搽剂、洗液、油包水或水包油乳剂（如乳脂、软膏或糊剂）、溶液或悬浮液。局部给药制剂可例如包含约 1% 到 10% (w/w) 的活性成份，尽管活性成份的浓度可能高达活性物质在溶媒中的溶解极限。局部给药制剂可进一步包含一个或多个本文所述的附加成份。

[0299] 本发明的药物组合物可以适于经由口腔的肺部给药制剂中制备、包装或销售。此制剂可包括含活性成份的干燥颗粒，其直径范围在约 0.5 到约 7 纳米且优选在约 1 到 6 纳米间。这些组合物便于使用含干粉储器的设备以干粉的形式给药，其中推进流可直接分散这些粉末，或是使用自推溶剂 / 粉末分散器，例如，其中活性成份溶解或悬浮于低沸点推进剂并密封于容器中的设备。这些粉末优选包含这样的颗粒：至少 98% 重量的颗粒直径大于 0.5 纳米且至少 95% 数量的颗粒直径小于 7 纳米。更优选，至少 95% 重量的颗粒直径大于 1 纳米且至少 90% 数量的颗粒直径小于 6 纳米。干粉组合物优选包括固体细粉稀释剂（如糖），且方便地以单位计量的形式提供。

[0300] 低沸点推进剂通常包括在大气压下沸点低于 65F 的液体推进剂。一般来说，推进剂可占组合物的 50 到 99.9% (w/w)，且活性成分可占组分的 0.1 到 20% (w/w)。推进剂可进一步包含附加成份，如液态非离子或固体阴离子型表面活性剂或固体稀释剂（优选与所含活性成份相同大小的粒子）。

[0301] 本发明中配制的用于肺部输送的药物组合物也可以溶液或悬浮液小滴的形式提供活性成份。这些制剂可以含活性物质的水或稀释的醇溶液或悬浮液的形式制备、包装或销售、可选消毒且可方便地通过用喷雾或雾化设备给药。这些制剂可进一步包括一种或多种附加剂，包括（但不限于）调味剂，如糖精钠、挥发油、缓冲剂、表面活性剂或防腐剂，如甲基羧基苯甲酸酯。此给药途径提供的小滴优选平均直径在约 0.1 到 200 纳米间。

[0302] 本文所述用于肺部递送的制剂也可用于本发明药物组合物的鼻部递送。

[0303] 另一适于鼻部给药的制剂为粗粉末，含活性成份且平均颗粒直径约在 0.2 到 500 微米之间。此制剂通过吸入给药，即从贴近鼻孔的盛药容器经鼻腔快速吸入。

[0304] 适于经鼻给药的制剂可含少至 0.1% (w/w)，且多至 100% (w/w) 的活性成份，且可进一步含一种或多种此处描述的附加成份。

[0305] 本发明药物组合物可以适于颊部给药的制剂形式制备、包装或出售。此制剂可为用传统方法制成的片剂或锭剂，还可含例如 0.1 到 20% (w/w) 的活性成份，其平衡含有口腔溶解或降解组分及可选的含一或多种本文所述附加成份。或者，适于颊部给药的制剂可包括含活性成份的粉末 / 雾化 / 原子化的溶液或悬浮液。当分散时，此粉末或气雾制剂粒子或小滴大小最好在约 0.1 到 200 纳米之间，且该制剂可进一步包括一种或多种

本文所述附加成份。

[0306] 本发明的药物组合物可以适于眼部给药的制剂制备、包装或销售。此制剂可为眼药水，包括如在水或油液体溶媒中含 0.1-1.0% (w/w) 活性成份的溶液或悬浮液。此药滴可进一步包括缓冲液、盐或一或多种本文所述附加剂。其他有用的眼部用药制剂包括那些含活性成份的微晶形或脂质体制剂。

[0307] 本文所用，“附加剂”包括（但不限于）一种或多种如下物质：赋形剂；表面活性剂；分散剂；惰性稀释剂；粒化及崩解剂；粘合剂；润滑剂；甜味剂；调味剂；着色剂；防腐剂；如明胶之类的生理可降解组分；水载体及溶剂；油载体及溶剂；悬浮剂；分散或湿润剂；乳化剂；粘滑剂；缓冲剂；盐；增稠剂；填料；乳化剂；抗氧化剂；抗生素；抗真菌剂；稳定剂；及药物适宜聚合或疏水材料。其他包含于本发明药物组合物中的“附加剂”为本领域所熟知的，如 Genaro 等所述（1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA），此处引用作为参考。

[0308] 一般来说，本发明用于对动物（优选人）给药的化合物剂量随众多因素变动，包括（但不限于）动物类型及待治疾病状态类型、动物年龄及给药途径。

[0309] 可给动物施用化合物频繁至每天数次，或以较少的频率给药，如一天一次、一周一次、两周一次、一月一次或甚至更低的频率，如数月一次或甚至一年一次或更少。技术人员应易掌握剂量频率，且给药频率取决于多种因素，如（但不限于）待治疾病类型及严重程度、动物类型及年龄等。优选，化合物以（但不必须）快速注射给药，这可提供注射后至少一天的持久效用。可以腹膜内进行快速注射。

[0310] 技术人员应理解通过阻止 T 细胞应答的建立，本发明还提供了一种抑制二级应答的方法，因为通过取消和减弱起始应答，可抑制二级应答产物。

[0311] 同样，技术人员应理解，本发明包括治疗细胞介导的疾病的方法，其中该细胞需经由其表面血清素受体的血清素信号传递。因为，如本发明他处所详细阐述的，某些细胞需血清素信号，因此抑制信号会抑制其他情况下该细胞介导的特定过程。当细胞需接受血清素信号来参与或介导疾病、障碍或状况时，抑制信号会抑制细胞参与这些疾病、障碍或状况。这些状况、障碍和疾病在本发明其他部分详细叙述。

[0312] 基本上，一旦用本领域熟知方法（和/或这些方法在本发明其他部分描述和/或例证）确定疾病、障碍或状况是由需血清素信号的细胞所介导的，且信号需经 1B、2、4 或 6 型血清素受体传递，则可用多种方法抑制这些信号，且从而治疗和/或缓解该疾病、障碍或状况。一旦抑制了所需的血清素信号，则细胞不会再介导该疾病、障碍或状况，从而治疗并/缓解该疾病、障碍或状况。可根据本发明所述方法治疗的疾病包括（但不限于）重症肌无力、特发性炎症肌病、慢性嗜中性白血球减少症、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血综合症、抗磷脂抗体综合症、炎症肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、心肌炎、Gilliam-Barre 综合症、血管炎、多发性硬化症、视神经脊髓炎（Devic 综合症）、淋巴细胞性垂体炎、格雷夫斯病、爱迪生病、甲状旁腺功能减退症、一型糖尿病、系统性红斑狼疮、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、牛皮癣、银屑病关节炎、子宫内膜异位、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性勃起障碍、结节病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性耳聋、斯耶格伦病、自身免疫性色素层视网膜炎、间质性膀胱、肺出血肾炎综合症及纤维肌痛。

[0313] 因此, 本发明包括治疗或预防自身免疫疾病及异源移植排斥反应的方法, 这些疾病是由针对自身抗原和 / 或呈现于移植的细胞或组织上的非自身抗原的异常或增加的免疫应答所介导的。进一步, 通过阻止起始免疫应答, 例如抑制介导应答的细胞中的血清素信号传递, 本发明也消除了可能发生的二级应答。

[0314] 因此, 一旦结合本文提供的知识, 技术人员应理解, 本发明包括含抑制剂的快速注射给药, 该抑制剂可抑制血清素与血清素受体的相互作用。优选, 受体为 5HT_{1B} 受体且抑制剂为氟奋乃静。不希望受任何理论的限制, 快速注射给药可介导特定细胞凋亡, 如活化的 T 细胞或癌性 B 细胞 (如多发性骨髓瘤细胞), 因此不必重复给药抑制剂, 因为快速注射介导细胞的死亡记忆或其他, 否则此处的细胞会介导免疫应答, 而该应答可引起移植细胞或组织排斥反应。氟奋乃静在 5HT_{1B} 受体上的局部浓度可介导该效用, 此浓度足以抑制血清素信号传递, 从而介导细胞死亡和 / 或抑制该细胞引起的免疫应答。

[0315] 此外, 本发明包括治疗其中已建立二级免疫应答的疾病。这是因为即便不是全部, 大部分自身免疫疾病为慢性状况。尽管大多数自身免疫疾病的病因还不清楚, 但已了解 CD4⁺ 记忆辅助 T 细胞和 / 或 CD8⁺ 记忆细胞毒性 T 细胞参与其中。这些二级 T 细胞有不同的细胞标记且以与初级 T 细胞不同的方式发挥作用 (综述参见, Dutton 等, 1998, *Ann.Rev.Immunol.* 16 : 201-223)。因此, 本发明包括抑制哺乳动物免疫细胞活化的方法, 其中活化是由细胞上 2 型血清素受体所介导。本方法包括施用有效量的抑制剂, 该抑制剂可抑制血清素与 2 型血清素受体的相互作用。这是因为, 如说明书所论证的, 抑制免疫细胞 (如 T 细胞) 上血清素与 2 型血清素受体的相互作用可阻止免疫细胞活化, 从而抑制该细胞引起的免疫应答。

[0316] 可用本发明方法治疗的自身免疫疾病包括 (但不限于) 重症肌无力、特发性炎症肌病、慢性嗜中性白血球减少症、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血综合症、抗磷脂抗体综合症、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、心肌炎、Gillian-Barre 综合症、血管炎、多发性硬化症、视神经脊髓炎 (Devic 综合症)、淋巴细胞性垂体炎、格雷夫斯病、爱迪生病、甲状旁腺功能减退症、一型糖尿病、系统性红斑狼疮、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、牛皮癣、银屑病关节炎、子宫内膜异位、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性勃起障碍、结节病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性耳聋、斯耶格伦病、自身免疫性色素层视网膜炎、间质性膀胱、肺出血肾炎综合症及纤维肌痛。

[0317] 本发明进一步包括抑制哺乳动物二级免疫应答的方法。该方法包括施用有效量的抑制剂, 该抑制剂可抑制血清素与 2 型血清素受体的相互作用。因为如本发明其他部分所述, 当用 2 型血清素受体拮抗剂及其他抑制血清素与 2 型血清素受体的相互作用时, 可抑制初级及二级免疫应答。即, 本发明首次论证了抑制免疫细胞上血清素与 2 型血清素受体的相互作用可阻止或抑制免疫应答。因此, 本发明为治疗多种自身免疫疾病及异源抑制排斥反应提供了新的特异性免疫调节疗法, 这些疾病和反应都是由血清素与 2 型血清素受体相互作用引起的 T 细胞活化所介导的。

[0318] 基于本文公开的数据, 技术人员应理解本发明包括治疗突发性艾滋病患者的方法。因为, 在此疾病的最终阶段病人的 CD4 细胞计数很低, 而且病人通常死于偶发性感染。如果检测遗留的 CD4 细胞, 人们可发现很异常的事件, 也即, 大约 50% 的遗留 CD4

细胞有活性。这是因为人免疫缺陷病毒 (HIV) 需要 T 细胞的活性增殖来进行其自身复制。基于本文公开数据且不希望受任何理论的限制,即使在 AIDS 末期的增值可能也需要由 2 型血清素受体介导的血清素信号。因为如细胞计数及本文其他公开数据所证实的,阻断 2C 型 5HT 信号显然会诱导细胞死亡,所以如马来酸二甲麦角新碱之类的快速注射可给末期病人施用。因此通过诱导活化 CD4 细胞凋亡,可有效的消除病毒库,因此病人也许可再生非感染的 CD4 细胞,进而康复。

[0319] B. 鉴别有用化合物的方法

[0320] 本发明包括鉴别可抑制血清素与其家族受体相互作用的化合物的方法。基于本文所公开数据,技术人员应理解可通过评估 T 细胞活化及其他方法来检测血清素与其家族受体的相互作用,可通过比较接触化合物的细胞与其他方面相同只是不接触该化合物的细胞中相同的参数来测定 T 细胞活化。技术人员应理解此种化合物可用于抑制由血清素与血清素受体相互作用所介导和 / 或与其相关的疾病、障碍或状况。基于本文所公开内容技术人员应进一步理解,其用于在减低血清素与其特异性亚型受体相互作用的同时不影响血清素与其他类型血清素受体的作用。

[0321] 基于本文所公开内容技术人员应理解,本发明包括鉴别可用于治疗哺乳动物自身免疫疾病或异源移植反应的化合物的方法。方法包括鉴别抑制血清素与 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体相互作用的物质或化合物。因为,如本文其他地方所述,已发现抑制血清素与 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体的相互作用可抑制免疫细胞活化,从而抑制免疫应答。因此,根据本发明所授知识技术人员应理解,抑制此种相互作用的化合物是治疗由血清素 / 受体相互作用介导的自身免疫疾病或异源移植反应的潜在疗法。

[0322] 本方法包括将待测化合物与 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体接触,并将血清素与 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体的结合水平与除不与此化合物接触其他方面全一样的 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体与血清素的结合水平相比较。技术人员应理解,如接触化合物的血清素受体与血清素的结合水平与其他方面全一样只是不与此化合物接触的 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体与血清素的结合水平相比结合水平降低,则表明该化合物抑制血清素 / 受体的相互作用,并因而可用于治疗哺乳动物中的自身免疫疾病或异源移植反应。基于本文所公开内容,技术人员也应理解,本领域所熟知的标准结合测定法或将来出现的方法都可用于测定在缺少或存在待测化合物的情况下血清素与 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体的结合水平,进而鉴别出有用的化合物。因此,本发明包括任何用此方法鉴定出的化合物。

[0323] 本发明还包括鉴定可抑制血清素信号传递的化合物,如本文前面其他部分所述,其中也需考虑该化合物相对于血脑屏障的渗透性。具体来说,本发明包括将用本发明方法鉴别出的任何化合物进行对血脑屏障渗透性的测定。测定化合物通过血脑屏障能力的方法或是本文所公开的,或是本领域所熟知的,还包括将来出现的方法。因此,本发明包括测定目标化合物穿透血脑屏障的能力,且选择实质上不穿透血脑屏障的化合物。如本文前面其他部分更详细说明的,该化合物是有用的,因为有时期望化合物可抑制非神经细胞的血清素信号传递,而在可检测水平内不会影响神经细胞中的血清素信号传递。既然血脑屏障阻止了进入神经细胞的通路,不可穿透血脑屏障的抑制剂可用于抑

制目标细胞中的血清素信号传递，而不会影响（至少部分不被影响）神经细胞中的血清素信号传递。

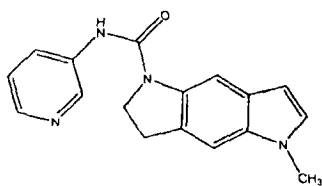
[0324] 此外，本发明包括改性用本文其他部分所述方法鉴别出的有用化合物，从而减低该化合物穿透血脑屏障的能力。再次，这是有用的，因为实质上不穿透血脑屏障的化合物可用于抑制，如免疫细胞中的血清素信号传递，而不会影响神经细胞中的血清素信号传递，因其被血脑屏障所保护。一旦结合本文公开的知识本领域技术人员应理解，改造化合物影响其血脑屏障渗透性的方法是本领域所熟知的或是本文所例证的、也包括将来发展起来的方法。

[0325] 本发明也包括鉴别用于抑制 T 细胞活化的化合物的方法，其中该活化是由血清素与 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体结合所介导的。具体来说，该方法包括评估接触待测化合物的 T 细胞的活化水平，并将此活化水平与除不接触该化合物外其他部分都一样的 T 细胞的水平相比较。与除不接触该化合物外其他部分都一样的 T 细胞的活化水平相比，如果接触该化合物的 T 细胞活化水平较低则表明该化合物可用于抑制 T 细胞活化。因为本发明首次公开了 T 细胞活化需要血清素与 T 细胞表面 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体的相互作用，因此当血清素 / 受体相互作用被抑制时，活化被抑制，进而可抑制该细胞引起的免疫应答。很清楚，如本文其他部分所说明的，抑制血清素与 T 细胞表面 1B、2A、2B、2C、4 及 6 型血清素受体相互作用的化合物是用于治疗自身免疫疾病及异源移植排斥反应的潜在治疗化合物。

[0326] 再次，本发明包括进一步评估化合物穿透血脑屏障能力的方法，因此可鉴别和 / 或生产具备期望的抑制效应且实质上不穿透血脑屏障的化合物。

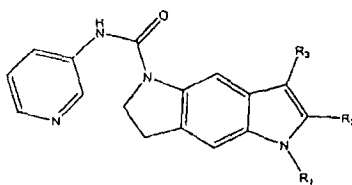
[0327] 拮抗血清素家族受体的化合物（即阻断受体结合的化合物）中，SB 206553 可作为一个例子，其结构示于 Forbes 等，1993, J.Med.Chem.36 : 1104-1107。如本文数据所示，将此拮抗剂施用于表达受体的淋巴细胞可有效地抑制免疫应答。本领域技术人员应理解如 SB 206553 之类的拮抗剂可通过阻断血清素家族受体结合来帮助调节免疫应答，从而治疗自身免疫疾病或其他增强的免疫应答对患者有害的疾病：

[0328]



[0329] 也可理解通过对可变位置 (R) 所指明的位置的修饰可改变或提高该化合物的特性，如 Forbes 等在 1996, J.Med.Chem.39 : 4966-4977 所述，表示如下：

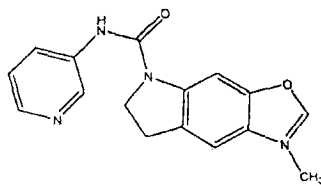
[0330]



[0331] 此结构的另一实施方案中，Forbes 等描述了一含醚的衍生物 (1996, J.Med.Chem.39 : 4966-4977)，它有更好的效用但缺少有效的口服活性。该衍生物的结构描述

如下：

[0332]



[0333] 此外，本发明包括氟奋氟静的新衍生物，如 QSS-1、QSS-3、QSS-5、QSS-6 和 QSS-12 及其他，其结构见图 39、42 和 44，及其他。

[0334] 此外，基于本文公开的数据本领域技术人员应理解，如以下例证所示：缺少内源血清素受体表达的细胞可用含分离的核酸的载体转染（此分离的核酸编码该受体），进而在细胞中实施该受体的表达。再用待测化合物接触该转染细胞，进而鉴定该化合物是否影响与血清素受体的相互作用。因此，结合本发明本领域技术人员可用受体表达载体选择性转染在检测水平缺少该受体的细胞，从而鉴定出选择性影响血清素 / 受体结合的化合物。

[0335] 此外，本发明包括对经由血清素受体抑制信号传递的化合物的测定法，此处该测定基于检测细胞的物理和 / 或形态变化。也即，基于本文所公开内容技术人员应理解，抑制血清素信号传递会介导细胞发生可检测的改变或与之相关。具体来说，如本文其他部分公开数据所证明，抑制细胞中血清素信号可使细胞大小和 / 或形态增加，且可检测到与细胞凋亡、死亡和 / 或坏死相关的细胞特性。这些变化可用多种技术检测及定量，包括（但不限于）显微镜方法（电镜、光镜等）、任何测定密度、形态之类的技术。本发明包括所有这些方法及将来发展的方法。

[0336] 本文公开方法可快速筛选物质以测定其抑制细胞中血清素信号传递的能力，在抑制血清素能信号传递可利于治疗的方法中，这些化合物是重要的潜在治疗物，包括（但不限于）开发用于治疗抑郁、呕吐之类的化合物及用于治疗不与中枢神经系统相关的疾病、障碍或状况，如（但不限于）自身免疫疾病、多发性骨髓瘤、阻塞性气道病（如哮喘）、异源移植排斥反应等的化合物，如本文其他部分所详细论述的。

[0337] C. 治疗或缓解哺乳动物中由 T 细胞上异常 2 型血清素受体引起的疾病障碍或状况的方法。

[0338] 本发明包括缓解由血清素家族受体异常，即失常表达，引起的疾病障碍或状况的方法。当疾病、障碍或状况与血清素过量 / 不足的表达相关时，本方法包括让患者施用与编码相应受体的核苷酸互补的反义核酸，这些患者患有由受体表达增高而引起的疾病、障碍或状况，即与其他方面相同的正常组织（也即检测不出任何与待治或待缓解的疾病、障碍或症状相关的病理参数的组织）相比受体表达量增高。这样可减低受体表达量，从而缓解了由受体高表达引起的疾病、障碍或状况。这些疾病、障碍或状况包括（但不限于）重症肌无力、特发性炎症肌病、慢性嗜中性白血球减少症、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血综合症、抗磷脂抗体综合症、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、心肌炎、Gillian-Barre 综合症、血管炎、多发性硬化症、视神经脊髓炎 (Devic 综合症)、淋巴细胞性垂体炎、格雷夫斯病、爱迪生病、甲状旁腺功能减退症、一型糖尿病、系统性红斑狼疮、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、牛皮癣、

银屑病关节炎、子宫内膜异位、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性勃起障碍、结节病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性耳聋、斯耶格伦病、自身免疫性色素层视网膜炎、间质性膀胱、肺出血肾炎综合症及纤维肌痛。

[0339] 基于本文公开数据技术人员应理解，本发明包括治疗与 5HT 受体过量 / 不足的表达相关或由其介导的疾病。本领域技术人员应理解这些疗法包括（但不限于）治疗表达（及其他）1A 型 5HT 受体的患者。因为受体刺激引起的 cAMP 信号减低与 6 型 5HT 受体的上调信号相竞争。因此，可用减低细胞中 6 型 5HT 受体表达治疗疾病，用 6 型 5HT 受体的反义物及其他物质来调节 2 个受体信号间的平衡，进而治疗患者的疾病。

[0340] 此外，基于本文所公开内容本领域技术人员应理解，本发明包括治疗由血清素家族受体增加或减少所介导的疾病。因为本文公开的数据证明某些特定疾病、障碍或状况与血清素受体表达水平的增高或降低相关或由其介导。本文公开数据证明用 5-HT_{2B/2C} 特异性拮抗剂拮抗血清素家族受体的表达可抑制免疫应答，因而淋巴细胞不会进一步增值。该抑制可用于治疗自身免疫疾病及其他与过量免疫应答相关的疾病。因此，减低受体表达或阻断受体结合可治疗与增高的受体水平相关或由其介导的疾病。从而鉴别可减低血清素家族受体表达水平的化合物有助于治疗和 / 或缓解与增加的受体表达相关的疾病、障碍或状况。

[0341] 因此抑制血清素家族受体表达的反义核酸也可用于制备治疗特定疾病、障碍或状况的药物，当与不感染该疾病、障碍或状况的细胞或病人中的受体表达量相比时其受体表达量增高并由此引起该疾病、障碍或状况。

[0342] 抑制细胞中核酸表达的技术是本领域所熟知的，包括本文公开的方法（如用抗体、反义核酸、核酶等抑制）。其他用于抑制编码血清素家族受体核酸表达的方法包括（但不限于）使用靶向受体启动子特异序列的核苷酸试剂等。

[0343] 基于本文所公开内容技术人员应理解，使用阻止细胞中编码受体的核酸表达的核酸来抑制或消除 T 细胞上 2 型血清素受体的核酸表达。如本文其他部分详细说明，已知血清素受体的核酸及氨基酸序列时，可用本领域所熟知的多种方法抑制细胞表面上的受体表达。这些方法包括（但不限于）抗体、核酶及反义分子。一旦技术人员获知编码受体的治疗靶位点的核酸序列，就可很好的设计及使用这些化合物，因此本文不引用这些在本领域熟知的方法。例如，设计反义分子及核酶使之有效抑制 2 型血清素受体表达而不影响其他血清素家族受体表达可有效地抑制 T 细胞活化，其中不影响其他血清素家族受体是必要的，因为如此才可避免由于非特异性的抑制血清素与其他可能必要的受体的相互作用而引起的有害效应。

[0344] 不论增高还是降低受体蛋白表达、多肽水平或其活性，基于本文公开内容本领域技术人员应理解，减低或诱导血清素表达的方法包括给药或是表达受体或是缺少受体表达的细胞。

[0345] 本发明另一实施方案中，可通过补充、增加、和 / 或用缺少受体表达的细胞替代缺陷细胞来治疗患有与受体表达相关或由其介导的免疫疾病、障碍或状况的个体。细胞可来自源于正常同源匹配供体的细胞或来自待治个体。细胞可用遗传学手段改性使之抑制受体表达。

[0346] 除用修复的细胞或源于匹配供体的正常细胞来替换缺陷细胞外，本发明方法还

可用于增强目的蛋白的表达，该蛋白在动物体分泌时有有益效用。也即，可分离细胞、将编码血清素家族受体的基因导入细胞、然后将其导入供体或同源匹配的受体。该受体的表达可起到治疗效用。

[0347] 本发明的这方面涉及基因治疗，其中给个体施用治疗量的血清素家族受体。

[0348] 根据本发明一些方面，用编码血清素家族受体的核酸、反义核酸或本发明的敲除靶载体转染的重组细胞也可用作细胞治疗剂以治疗以血清素家族受体表达或缺乏其表达为特征的疾病、障碍或状况。

[0349] 根据本发明，将含本发明核苷酸序列的基因构建物导入细胞。也即，本文称为“重组细胞”的细胞通过遗传改变以引入了编码血清素家族受体的核酸或抑制此种受体在重组细胞中表达的核酸，从而使施用重组细胞的受体发生有益的效用。根据本发明的一些方面，源于相同待治个体或另一个体的细胞，或是源于非动物的细胞可通过遗传改变替代缺陷基因和/或引入其表达对个体有益或抑制受体表达进而对个体有益的基因。

[0350] 在本发明某些方面，可通过提供含正常有效的编码血清素受体的核酸复本的基因构建体而补充、提高和/或替代编码血清素家族受体的缺陷或不足的核酸来治疗患有疾病、障碍或状况的个体。

[0351] 在将编码血清素家族受体的基因转染到细胞中的所有案例中，核酸都连接到合适的启动子/调控序列上，后者是该核酸在重组细胞中表达所必须的。这种启动子/调控序列包括（但不限于）组成型及可诱导的和/或组织特异性及分化特异性的启动子，这在本文其他部分有所叙述。组成型启动子包括（但不限于）巨细胞病毒即早型启动子及劳氏肉瘤病毒启动子。此外，也可使用如那些调节持家基因表达的持家启动子。其他启动子包括优选在中枢神经系统细胞表达的启动子，如（但不限于）编码神经胶质原纤维酸蛋白的基因的启动子。此外，可选择启动子/调控元件从而诱导基因表达。如可使用四环素诱导型启动子（Freundlich 等，1997，Meth.Enzymol.283：159-173）。

[0352] 基因构建物优选可以表达载体提供，该载体包含本发明使用地有效地连接到特定启动子/调控序列上的血清素家族受体的编码序列，从而当载体转入细胞时，细胞表达编码序列。编码序列有效地连接到细胞表达该序列所需的启动子/调控元件上。编码蛋白的核酸序列可为 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 或其杂交物或是如 mRNA 之类的 RNA 分子。

[0353] 含有效连于启动子/调控元件的编码受体的核酸序列的基因构建物可以功能附加体分子的形式留在细胞中或是整合到该细胞的染色体 DNA 中。遗传物质可以质粒的形式导入细胞并作为独立的遗传物质留在细胞中。又或者，将可整合到宿主细胞染色体上的线性 DNA 导入细胞。当将 DNA 导入细胞时，可加入促进 DNA 整合到染色体上的试剂。在 DNA 分子中也可包含用于促进整合的 DNA 序列。再或者，可将 RNA 导入细胞。

[0354] 为了使表达载体上的遗传物质得以表达，启动子/调控元件必需连到编码该蛋白的核酸序列上。为了使蛋白产物最大化，可选择最适于使基因在目标细胞中表达的启动子/调控序列。此外，应选择可在细胞中可最有效转录的密码子。本领域技术人员可制得重组遗传物质，作为在目的细胞中有功能的表达载体。

[0355] 重组遗传物质可导入细胞，该物质可编码平时在细胞中存在量不足和 / 或功能不足的蛋白从而纠正细胞的遗传缺陷，和 / 或是该物质编码有助于治疗或预防特殊相关疾病、障碍或状况的蛋白，且抑制细胞血清素受体在细胞上表达（如敲除靶载体、反义核酸等）；除此之外，也可将遗传物质导入本发明所用的重组细胞，以提供一种对该细胞期望的选择性终结方法。这些用于靶向重组细胞进行毁减的方法可引入重组细胞。

[0356] 根据本发明，可将使重组细胞对毁减特异性敏感的遗传物质装配到重组细胞中。如可将编码细胞毒素剂特异性靶向的受体的基因引入重组细胞。可将用于诱导选择性细胞死亡的基因表达结构引入重组细胞。在这样的系统中，表达由该基因编码蛋白的细胞在特殊条件下或在存在或缺少特殊试剂的情况下对靶向的致死方式敏感。如可将疱疹病毒胸腺嘧啶激酶基因 (herpes tk) 的表达结构引入重组细胞，并用于诱导选择性细胞死亡。当含 herpes tk 基因的遗传物质导入个体中时，可产生 herpes tk。如希望或必须杀死植入的重组细胞，可给个体施用药物 gancyclovir，它可选择性的杀死任何产生 herpes tk 的细胞。因此，可提供允许选择性毁减植入的重组细胞的系统。

[0357] 基于本文公开内容本领域技术人员应理解，本发明包括在哺乳动物中生产 / 提供血清素家族受体或抑制受体表达的重组细胞。也即，可用该细胞对动物施用受体蛋白或是传送分子（如敲除定向载体、反义核酸、核酶及特异性与受体结合的抗体等）。

[0358] 本发明进一步包括用表达目的受体的重组细胞作为筛选可用于治疗相关免疫疾病的新血清素受体激动剂、反向激动剂及拮抗剂的靶物。因此，可用待测化合物接触该细胞，而后将细胞活性与除不接触该化合物外其他方面都相同的细胞活性相比较。接触化合物的细胞活性比不接触化合物的细胞活性偏高或偏低都说明该化合物影响血清素受体介导的活化，并因而是可用于治疗相关免疫疾病的潜在的血清素受体激动剂、反向激动剂和 / 或拮抗剂。

[0359] 对动物施用血清素家族受体可作为研究血清素或其他受体配基作用机制的模型系统，或是用于开发模型系统以发展用于诊断和 / 或治疗与受体表达相关的疾病、障碍或状况。

[0360] 进一步，用表达血清素家族受体的重组细胞将血清素受体导入动物可用于治疗或缓解疾病、障碍或状况，其中血清素受体水平的增高引发治疗效应。

[0361] 或者，含核酸的重组细胞（该核酸的表达可抑制或减少血清素受体表达、活化和 / 或细胞分泌）可作为开发用于与受体表达、活性和 / 或分泌相关或由其介导的疾病、障碍或状况的诊断和 / 或治疗剂的模型。本发明包括：重组细胞可产生抑制受体表达分子，从而可将这样的分子导入动物。或者，不希望受任何理论的限制，重组细胞自身也是功能细胞（只是不可表达受体），可完成除不是重组细胞其他方面相同的细胞所能完成的功能，而不必不经由血清素信号通路。

[0362] 可用本领域技术人员所熟知的现有技术转染细胞，细胞可来自动物或商业可得或培养的已知细胞系或是体外培养的原代细胞。因此，本发明不限于只从供体动物或病患动物自身获得细胞。反之，本发明包括任何用本发明核酸改造的细胞，因此可使重组细胞或是表达或是不表达或低表达血清素受体。

[0363] 可用标准方法将核酸导入细胞，用这些方法将基因构建体导入细胞后，该细胞可表达基因编码蛋白或表达抑制血清素受体表达分子。在一些实施方案中，用磷酸钙

沉淀转染、DEAE 葡聚糖转染、电穿孔、微注射、脂质体介导转移、化学物质介导的转移、配基介导的转移或是重组病毒载体转移的方法转染细胞。

[0364] 当对动物施用本发明的分离的受体多肽、特异性与受体结合的抗体、受体的反义核酸、和 / 或重组细胞以提高或减少动物中受体水平时，基于本文所公开内容，本领域技术人员应理解，用于对动物给药的多肽、核酸、抗体或细胞的量可通过测定受体表达水平或受体多肽水平或编码存在于动物组织中受体的核酸来滴定。

[0365] 测定受体表达水平的方法（如，在蛋白质印记或其他如 ELISA 之类的免疫分析中使用抗受体的抗体），和 / 或评估细胞和 / 或组织中受体表达水平的方法（如，RNA 印记等）在本文中公开或是本领域技术人员所熟知的。这些分析方法可用于决定受体多肽、核酸、抗体、反义核酸、核酶、重组细胞等对动物给药以减少或增加受体表达水平的“有效量”。

[0366] D. 抑制经由血清素受体的信号传递的相关方法

[0367] 本发明包括通过抑制经由血清素受体的血清素信号传递影响细胞周期过程的方法。也即，基于本文公开内容技术人员应理解移除或抑制经由 5-HT 受体传递的血清素信号可影响细胞周期过程。因为本文公开数据表明抑制血清素能信号对正进行细胞周期的细胞有极大影响，如果消除信号会导致经由凋亡的快速细胞死亡（也即，膜联蛋白染色细胞说明在表面有 PI 暴露、可检测到 DNA 碎片、并且细胞大小增加、形态改变等）。因为以前的研究集中于不发生细胞周期的非分裂细胞，即神经或肌肉细胞，以治疗多种神经疾病，所以本发明结果是惊人的。不希望受任何理论的限制，以前相关于多种血清素信号抑制剂使用的研究包括接触不发生细胞周期的非分化细胞，如（但不限于）神经元，因此实际上不会也不能观察、识别或理解细胞周期中血清素信号的消减和 / 或抑制的作用效果。因此，本文公开数据首次说明经由抑制血清素受体影响细胞周期的新方法。

[0368] 本文公开数据也首次说明可生产和 / 或改性抑制血清素信号的化合物使之实质上不穿透血脑屏障。这样的化合物是有用的，因为有利的是的血清素抑制剂给药用以调节免疫应答而不会影响被血脑屏障隔离的神经细胞中的血清素信号。因此，本发明包括实质上不穿透血脑屏障的抑制剂实行本文其他部分公开的所有方法的用途。

[0369] 基于本文公开内容技术人员应理解，特定细胞含有血清素受体，且经由这些受体的信号对发生细胞周期的细胞是至关重要的。因此，本发明包括一种方法，该方法可通过抑制经由受体的血清素能信号传递而影响细胞周期过程。技术人员进一步理解，可用于抑制血清素能信号传递的化合物有很多，如（但不限于）本文其他部分所述拮抗剂。进一步，本发明包括将来出现的可抑制经由血清素受体的血清素能信号传递的化合物。

[0370] 本方法包括鉴别目的细胞上血清素受体的存在（如果不知该细胞表达受体），且可进一步辨别该受体以评估用哪种（些）化合物抑制经由该受体的信号。用于评估细胞上血清素受体存在与否的方法，及用于鉴定抑制经由该受体信号的化合物的方法，不论是药理学方法、重组体或其他方法，都是本领域所熟知的且在本文其他部分有例证说明。本发明还包括将来出现的方法，这些方法可用于鉴定细胞上血清素受体存在与否及哪种（些）化合物影响经由目的受体的信号传递。

[0371] 本发明也包括影响细胞凋亡的方法。该方法包括抑制本应该经由该细胞上血清素

受体的信号传递。因为，本文公开数据说明，抑制进行细胞周期的细胞（如增殖或分裂）中血清素能信号，可介导该细胞凋亡。因此基于本文公开内容技术人员应理解，抑制经由 5-HT 受体的信号传递提供了一种诱导凋亡的新方法。

[0372] 本发明方法是有用的，因为首次使生长细胞选择性地凋亡而不会 影响邻近不分化或表面没有或有不同血清素受体的细胞。也即，本发明方法不会影响不发生细胞周期过程的细胞或其表面不表达与靶细胞相同类型血清素受体的细胞。因为有 14 种不同的血清素受体，基于对多种激活或拮抗经由受体的信号的化合物的药理特异性分为 7 种不同亚型，上述内容尤其真实。因此，一旦鉴定及识别出目的细胞上的血清素受体，基于本文其他部分公开的惊人数据技术人员应理解，可通过选择性抑制靶细胞中的血清素能信号传递诱发该细胞凋亡，而不影响其他细胞中的任何血清素能信号传递，此处其他细胞或没有血清素能受体或有与靶细胞不同药理亚型受体的细胞，因而用于诱导目的细胞凋亡的化合物不会影响经由那种受体的信号传递。

[0373] 此外，本发明包括选择性抑制非神经细胞中的血清素信号传递，而不影响被血脑屏障保护的神经细胞中的血清素信号传递。也即，本发明包括使用实质上不穿透血脑屏障的抑制剂，从而将抑制剂的效应限制于非神经细胞。

[0374] 基于本文公开内容技术人员应理解，本发明包括诱导细胞凋亡的方法。因为，如本文其他部分所述，本文首次证明细胞周期过程需要血清素信号，因而抑制该信号传递可介导细胞凋亡。具体来说，已证明抑制需血清素信号的细胞上 1B、2、4 和 / 或 6 型血清素受体与血清素的结合可导致经由传统凋亡途径的细胞死亡。

[0375] 进一步，基于本文公开内容技术人员应理解，本发明包括诱导细胞死亡的方法。也即，本文公开数据表明抑制表达 1B、2、4 或 6 型血清素受体的细胞中的血清素信号传递可导致该细胞死亡。因此，基于本文公开内容技术人员应理解，本发明包括由抑制血清素与 (1B、2A、2B、2C、4 或 6 型) 血清素受体结合的诱导细胞死亡的方法。

[0376] II. 试剂盒

[0377] 本发明包括多种涉及抑制血清素与 2 型血清素受体相互作用的试剂盒，因为如本文其他部分所公开的，抑制此种相互作用会抑制免疫细胞活化，从而抑制免疫应答。因此，一方面，本发明包括调节哺乳动物中免疫应答的试剂盒。该试剂盒包括有效量的抑制血清素与 2 型血清素受体相互作用的抑制剂。此种抑制剂包括，优选 2 型血清素受体拮抗剂。且该试剂盒还包括用药器及使用说明材料。

[0378] 此外，基于本文公开内容本领域技术人员应理解，抑制剂可为实质上不穿透血脑屏障的化合物。因为，如本文其他部分所详细介绍的，化合物抑制非神经细胞中的血清素信号传递而不影响受血脑屏障保护的神经细胞中此类信号传递是有利的。

[0379] 基于本文公开内容技术人员应理解，本发明包括用于抑制 2 型受体介导的信号传递的试剂盒，它可与腺病毒载体的施用相结合，用于基于腺病毒载体的方法来对哺乳动物进行基因治疗。因为，尽管大多数运载基因的有效载体为腺病毒载体，但机体对此载体仍有免疫应答反应，这限制了该载体在基因治疗中的效用并导致表达丧失。因此，每个携带新载体（及其内含物）的细胞都在数周内被清除，致使技术失效。本文所公开数据表明施用符合腺病毒相关免疫应答的 2 型反向激动剂 / 拮抗剂可有效地消除反应性细胞，废除针对载体的免疫应答，从而使基因治疗成为可能。

[0380] 本发明包括多种试剂盒，它们包含如编码血清素家族受体的核酸之类、特异性结合这种受体的抗体及编码该抗体的核酸、与编码这种受体的核酸互补但与转录物是反义方向的核酸的化合物、和 / 或本发明的组合物、涂药器及如何按本发明方法使用化合物的说明材料。尽管在下文有试剂盒的例证描述，在本文公开内容的启示下技术人员易于明白其他有用的试剂盒的成份。本发明包括上述每种试剂盒。

[0381] 一方面，本发明包括用于缓解由血清素家族受体失常表达引起的疾病的试剂盒。依据本文公开方法使用该试剂盒。简而述之，可用试剂盒将细胞与核酸接触，该核酸与编码血清素受体的核酸互补，其中该核酸是转录的反义方向，以减少受体表达；或者可用试剂盒将细胞与特异性结合受体的抗体接触，或是与编码抗体的核酸接触，其中受体表达、量或活性的减少可导致有益的功效。此外，试剂盒包括涂药器及介绍如何使用试剂盒的说明材料。这些说明简要的列举了本文提供的例证。

[0382] 试剂盒包括可药用载体。如本文其他部分所述该组合物提供了适宜量的组分。此外，给药途径及给药频率与本文其他部分详细说明了的相同。

[0383] 本发明在此描述引用如下实施例。这些实施例只用于说明，决不应仅限于这些实施例来理解本发明，而应理解为包括任何及所有明显为本文所提供知识之结论的变化方式。

实施例

[0384] 例 1：血清素受体及免疫调节

[0385] 色氨酸为组成细胞新蛋白十种必须氨基酸之一。尽管不确定，色氨酸分解代谢可能导致饥饿，且从而解释了所观察到的 T 细胞抑制现象。然而，其他九种重要氨基酸不参与控制 T 细胞应答。

[0386] 众所周知色氨酸有两个代谢途径。在一个途径中，色氨酸转变为烟酸。色氨酸最多只占细胞所用烟酸的 50%（大多数源自饮食供应，因此其不为限速反应）。色氨酸另一个代谢命运为转变成 5-羟色胺 (5-HT)，也叫血清素（见图 1）。另一方面这是血清素的唯一已知来源。血清素一直是研究最广泛的有争议性的生物活性化合物。迄今为止，血清素在发动免疫应答方面的作用，如果有的话，还很不清楚。事实上，作为本科及研究生免疫学教学课程标准课本的 5 个主要大学水平教科书只在血小板章节提及血清素，及其在创伤位点诱导血管收缩的作用或是只提到它存在于啮齿类肥大细胞中 (Sharon, 1998, In: Basic Immunology, Williams 和 Wilkins, Baltimore, MD; Kugy, 1997, In: Immunology, W.H.Freeman & Co; Abbas 等, 1997, In: Cellular and Molecular Immunology, W.B.Saunders; Janeway & Travers, In: Immunobiology—the immune system in health and disease, Garland Publishing, Inc.; Roitt 等, 1998, In: Immunology, Mosby, London)。

[0387] 胚胎发育观念中，所有的淋巴细胞都衍生于神经脊。不希望受任何理论的限制，最早的原始免疫防御可能基于“神经冲动”范例，因而受血清素控制。随时间推逝，自然界增加了许多精细复杂的层面来调节这一基本通路。不希望受任何理论的限制，本文公开数据表明色氨酸相关于 IDO 分解代谢的效应事实上源于其在血清素通路中的效应。近 40 年的医学相关文献表明尽管有零散的血清素可能影响某些 T 细胞活性的报

告,直到本发明,没有研究曾证明血清素受体活化是发动 T 细胞应答的基本性、限速性必要条件。

[0388] 本文公开数据表明 5-HT 在协调及绝对控制 T 细胞介导的免疫应答方面的基本功效。在本文公开的研究中,用到了从粘附的细胞群纯化的人原代外周血淋巴细胞及同样从粘附细胞纯化的鼠脾细胞。因此,获得了半纯化的 (CD3- 阳性) T 细胞群,而后可加入有丝分裂原,如植物血细胞凝集素 (PHA) 或刀豆素 A (ConA) 活化细胞。这些植物凝集素用作有丝分裂原因为其通过交连 T 细胞表面受体起作用,参与初级及二级活化信号,从而引发很强的刺激信号。因此,基于本文公开内容本领域技术人员应理解,如果可调节 T 细胞对这些凝集素的响应,其原理同样可用于其他免疫原。

[0389] 如本文其他部分所指出的,在某些情况中,5-HT 显示出刺激活化 T 细胞的效用 (Kut 等, 1992, Immunopharmacol.Immunotoxicol.14 : 783-796 ; Young 等, 1993, Immunology 80 : 395-400), 然而大多数实验报道加入的高浓度 5-HT 抑制增殖 (Mossner & Lesch, 1998, Brain, Behavior and Immunity 12 : 249-271)。为探讨这一明显的矛盾,我们测定了色氨酸及 5-HT 对 T 细胞基本活化通路的影响。

[0390] 材料及试剂

[0391] 以下化合物来自 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) : 色氨酸、5-羟色胺、血清素 - 盐酸盐、苯乙肼、2-氨基 -2-降苈烷羧酸 (BCH)、L-p- 氯苯丙氨酸、氟西汀、m- 羟苄肼双氢氯化物 (NSD-1015)、(S)- 普萘洛尔、(S)- 及 (R)-8-OH DPAT- 氢溴酸盐、WAY 100635、LY 53857、SB 206553、SB 242084、美西麦角 - 马来酸盐、2-甲基 -5-HT、Ro046790、利哌酮、3-托烷 - 吡啶 -3- 羧化物、氯氮平、酮色林、米安色林、SDZ 205557、alpha- 甲基 -DL-tryrosine- 甲基酯盐酸盐。

[0392] 以下化合物来自 Tocris Cookson (St.Louis, MO) : MDL 11939。贮存液一般配成 1mM 的浓度,如汉克斯平衡盐溶液 (HBSS) 所述。利哌酮及 MDL 11939 例外,它们先溶于盐酸 (大约终体积的 1/10), 然后用 HBSS 稀释,再用氢氧化钠滴定到中性 pH。制备 5mM 浓度的 L-p- 氯苯丙氨酸,用含 10% FBS 的 RPMI 溶解以使其溶解度达到最大程度。

[0393] RPMI 溶媒来自 Gibco BRL, HBSS、胎牛血清 (FBS)、人 A/B 血清、Histopaque-1077、M-CSF、刀豆素 A (ConA)、氟西汀及 BCH[2-氨基 -2 降苈烷羧酸] 来自 Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO)。所有一次性塑料制品来自 Corning Costar (Corning Inc. Life Sciences, Acton, MA)。氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷来自 DuPont-NEN (Lincoln Park, NJ)。Vacutainer 收集设备及肝素处理的收集瓶来自 Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ)。除非特指所有细胞在 37°C、5% CO₂ 条件下培养。

[0394] 动物

[0395] 6-8 周大 BALB/c/BYJ (H-2^d) 及 C57/B6J (H-2^b) 小鼠来自 Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME)。

[0396] PCR 引物

[0397] 测序引物为: T7 TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO : 15), BghTAGAAGGCACAGTCGAGG (SEQ ID NO : 16)。用于特异性扩增 5-HT 受

体的引物如下：1A型受体：1af CGGTCAAAAAGGTGGAGAAG (SEQ ID NO: 17)，1ar GAGGCAAGTGCTCTTTGGAG (SEQ ID NO: 18)，期望的产物大小为 234bp。2A型受体：2ar AGTCCTCCTGCCTGTGTAGG (SEQ ID NO: 19)，2af CGCCGATGATAACTTTGTCC (SEQ ID NO: 20)，期望的产物大小为 247bp。2B型受体：2bf ACTGGCTGCCTTCTTCACAC (SEQ ID NO: 21)，2br TGTCTTTTCGAGAACCATCC (SEQ ID NO: 22)，期望的产物大小为 206bp。2C型受体：2cf ATGGTGAACCTGAGGAATGC (SEQ ID NO: 23)，2cr TTCCATGCTTACTGCCATGA (SEQ ID NO: 24)，期望的产物大小为 256bp。3A型受体：3af CAATGAGTTCGTGGATGTGG (SEQ ID NO: 25)，3ar TGACCACATAGAAGAGGGGC (SEQ ID NO: 26)，期望的产物大小为 216bp。3B型受体：3bf ACACCGTCTTCAGGGTCAAC (SEQ ID NO: 27)，3br GCTCTCCATACAGCGAGGAC (SEQ ID NO: 28)，期望的产物大小为 270bp。4型受体：4f GAGACCAAAGCAGCCAAGAC (SEQ ID NO: 29)，4r TTGTGGTTGAACAAGGGACA (SEQ ID NO: 30)，期望的产物大小为 289bp。所有的引物由 Sigma-Genosys 合成 (The Woodland, TX)。

[0398] 反转录及 PCR

[0399] 用描述于 Current Protocols in Immunology 的 Ficoll 梯度分级来自健康捐赠者的全血。收集外周血淋巴细胞并将之放于六孔板，每孔 2×10^7 细胞。使细胞附着于塑料 1.5 小时，移去悬浮细胞并用每孔 10^7 细胞的浓度从新铺新的六孔板。用 ConA ($5 \mu\text{g/ml}$) 刺激附着及悬浮的细胞，或保留不经处理。用 ConA 刺激后 48 小时后，收集细胞用 Qiagen RNAeasy 小制备系统根据操作手册 (Quiagen, Chatsworth, CA) 提取总 RNA。用溴乙锭 (EtBr) 染色胶测定 RNA 样品量，且在 cDNA 合成中每个 RNA 样品用约 $1 \mu\text{g}$ 的量。用 Qiagen 反转录试剂盒根据使用手册实行 cDNA 合成，使用寡 T₁₂₋₁₈ 引物或是受体特异性反转录引物。所得 cDNA 作为 35 循环的 PCR 反应的模板 (用 Sigma 的 Taq DNA 聚合酶)，使用的引物为 5-HT 受体特异性引物。50 微升 PCR 反应系统中用 25pM 的每种特异性引物。PCR 条件为 95°C 进行 45 秒，61.5°C 进行 45 秒，72°C 进行 45 秒。35 个 PCR 循环后在 72°C 延伸 10 分钟。最终 PCR 产物用琼脂糖胶分析 (TAE 缓冲) (NuSieve 3 : 1 现成琼脂糖胶来自 BMA, Rockland, ME)。

[0400] 为验证序列，如操作手册推荐的将 PCR 产物直接克隆到 TA 表达载体 (pCR3.1) (Invitrogene, Carlstad, CA)。用 PCR 产物转化 TOP10F 细胞后，将细菌细胞铺于含 25mg/ml 氨苄青霉素的琼脂板上。第二天，用快速 PCR 筛选方法筛选细菌克隆是否插入了片段。此种方法可每天筛选数百个克隆。

[0401] 简而言之，用 200 微升的移液头接触细菌克隆，然后用 50 微升的无菌水浸泡移液头，在 95°C 煮沸 5 分钟。用 25 微升煮过的样品用为模板，用 T7 及 Bgh 质粒引物 (见测序引物) 做 35 循环的 PCR 反应。用 2% 的琼脂糖胶在 TAE 缓冲液中鉴定 PCR 产物。鉴定阳性克隆，再对选出的克隆小批量制备质粒 (根据操作手册使用 Qiagen 小批量质粒制备系统)。用正向 (T7) 及反向 (Bgh) 质粒引物在宾州大学的测序设备上对所得质粒测序。

[0402] 巨噬细胞条件培养基研究

[0403] 用改自 Current Protocols in Immunology (1999, 14.1.3-14.1.6 节; Coligan 等编, 1994-1997, In: Current Protocols in Immunology, vol.1-3, John Wiley & Sons Inc.) 的操作方法分离 C57/B6J 小鼠单核细胞。股骨及胫骨来自 6-8 周大 C57/B6J 小鼠后肢 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)。移去骨顶端露出髓质。用 22 口径针 (Becton-Dickinson, Lincoln Park, NJ) 用含 2% FBS 的 RPMI 培养基冲髓出腔。用尼龙网过滤细胞悬浮液以去除基质细胞。用 ACK (氯化铵钾裂解缓冲液; 0.15M NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 0.1mM EDTA) 缓冲液裂解血红细胞, 如 Current Protocols in Immunology (3.1.5 节) 中所述。

[0404] 以 10^7 细胞/ml 的浓度在 RPMI 介质中再此悬浮细胞, 其含 10% FBS、500 单位/ml 的鼠 M-CSF, 并将 3ml/孔 的细胞悬浮液铺于 6 孔平板上。24 小时后, 收集非粘附细胞 (单核细胞) 以每孔 0.4 兆的浓度铺于 24 孔平板上, 介质为含 200 单位/ml M-CSF 及 15% FBS 的 0.65ml RPMI。让细胞生长 4 天。收集 6-8 周大 BALB/c/BYJ 小鼠的脾并制得单细胞悬浮液。用上述方法除去血红细胞。在尼龙毛柱上孵育 1.5 小时去除粘附细胞, 收集悬浮细胞。而后将 BALB/c 细胞以每孔 1.2×10^6 细胞的浓度铺于 0.65ml 体积 (使终体积为每孔 1.3ml) C57/B6 细胞上面 (见前)。让细胞生长 2.5 天。适当时在此次培育初始可加入氟西汀或 BCH。收集混合的细胞培养物, 在 1200RPM 离心去除细胞, 用 0.22 微米注射器 (Corning) 过滤器过滤。滤过培养基用于另一轮的细胞增殖。

[0405] 鼠 T 细胞纯化

[0406] 脾来自于 BALB/c 或 C57/Black6 小鼠 (Jackson Laboratories)。在旋转培养基中破碎 (RPMI 1640 Medium (GibcoBRL) 加有 2% 胎牛血清 (Sigma), 1% 青霉素及链霉素 (Pen-Strep; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 和 1% L-Glu (谷氨酸; BioWhittaker)) 以获得单细胞悬浮液。将细胞在 1200RPM 中离心 10 分钟, 并移除上清液。用 ACK 缓冲液裂解血红细胞 (RBC) (如 Colligan 等所述, 1999, Current Protocols in Immunology, 3.1.3-3.1.5 节)。

[0407] 残留细胞用旋转培养基重悬, 并加载于尼龙毛柱以去除粘附细胞。细胞在柱上 (5% CO_2 , 37°C) 孵育约 2 小时。用旋转培养基将非粘附细胞从柱上洗下。离心细胞, 在致敏 (Sensitization) 培养基 (RPMI 1640 培养基, 含 10% 牛血清、1% 青霉素及链霉素、和 1% L-Glu, beta-MKE) 中重悬。

[0408] 鼠促有丝分裂刺激

[0409] 如 Current Protocols in Immunology (1999, 3.1.5 节, 和 3.12.2-3.12.4 节) 所述方法取得 6-8 周大 BALB/c/BYJ 小鼠原代脾 T 细胞。所有药物在加入细胞悬浮液前以不同浓度预铺在 96 孔 U 低板上。所有实验条件至少重复 3 遍。纯化的原代细胞以每孔 100,000 细胞的浓度铺于含药的孔中。将 ConA 加入细胞悬浮液, 除非特殊表明其终浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 。总体积为每孔 200 μl 。对照组不加 ConA 刺激。让细胞生长 60 小时。每孔加 $1 \mu\text{Ci}$ 氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷, 12 小时后用半自动 PHD 收集器 (Brandel, Gaithersburg, MD) 收集平板, 72 小时后加入 ConA。

[0410] 鼠混合淋巴细胞反应 (MLR)

[0411] 按 Current Protocols in Immunology (1999, 3.12.6-3.12.7 节) 上所述方法实行。也即, 获自 C57/B6J 小鼠的原代脾细胞用作刺激物。按 Current Protocols in

Immunology(1999, 3.1.5 节)所述方法纯化,在 Hahnemann 医院(Philadelphia, PA)血库设备上照射(35Gy)。用尼龙毛柱去除 BALB/c/BYJ 的原代脾细胞中的粘附细胞,并用之作为应答物。

[0412] 多种抑制剂预铺于 96 孔 U 底板且所有实验条件至少测定 3 次。将加有 10% FBS 含 100,000C57/B6 细胞的 RPMI 培养基铺于各孔。将 200,000BALB/c/BYJ 细胞铺在刺激物细胞上,使终体积为每孔 200 μ l。用不含 BALB/c 细胞或不含 C57/B6 细胞的作为背景对照。4 天后每孔加一微 Ci 的氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷,并在 12 小时后收集平板。

[0413] 人 T 细胞纯化

[0414] 填好所有必须信息后从多个健康人供者取得血样,用根据标准方法 Ficoll-Hypaque(Sigma)梯度法分离外周血单个核细胞(PBM)。从 Ficoll-血清界面收集细胞,并广泛洗去 Ficoll 残留物。洗涤细胞后用旋转培养液重悬(RPMI 1640 培养液,加有 2%胎牛血清、1%青霉素-链霉素及 1% L-Glu)。在 37°C, 5% CO₂ 孵育细胞约 4 小时以去处粘附细胞。收集悬浮的细胞,在致敏培养液中重悬细胞(RPMI 1640 培养基,含 10%人血清(Sigma)、1%青霉素-链霉素、和 1% L-Glu 及 β -MKE)。

[0415] 药物处理

[0416] 在 6 孔培养皿中培养 2.0×10^5 RPMI-8226 细胞,其中加有特定的药物浓度,总共有 5mL 加了 10% FBS RPMI-1640。收集全部孔中物分为 2 个相同的样品组用于细胞离心涂片。

[0417] 细胞离心涂片

[0418] 从每个处理组取 1.0×10^5 RPMI-8226 细胞加到细胞漏斗中,用中等加速度在 500rpm 离心 4 分钟。然后将玻片在 PBS 中逐级稀释的甲醇中固定(100%, 5 分钟; 80%, 5 分钟; 50%, 5 分钟)用 PBS 洗涤 5 分钟,然后置于 PBS 中 4°C 保存,备染色用。

[0419] 组织化学

[0420] 用苏木精和伊红对细胞离心涂片玻片染色,而后进行核染、双苯甲酰胺染色、根据标准染色步骤漂洗及固定。玻片在日光及荧光下都显现以使相同视野中产生匹配图像(见图 28 及 29)。

[0421] 人促细胞分裂刺激

[0422] 用静脉穿刺从健康志愿者中取血,用 Vacutainer 收集设备及肝素化收集瓶收集。用 HBSS 1 : 1 稀释血至 50ml 锥形管(FisherScientific, Co., Pittsburgh, PA)中总体积为 30ml 的样品。在 30ml 血溶液下 10.5ml Histopaque-1077 分层,管子在室温以 1200RPM 速度旋转 45 分钟,以获得单个核细胞。收集棕黄层细胞,加入 HBSS 再离心去除残余的 Histopaque。洗涤后用含 2% FBS 的 RPMI 以每 ml 5 百万细胞的浓度重悬细胞。为去除粘附细胞,将悬浮液铺于 6 孔平板(Corning Costar), 3ml/孔,在 37°C, 5% CO₂ 条件下孵育 2 小时。孵育后收集非粘附细胞、计数并在含 10%人血清的 RPMI(Sigma)中重悬。

[0423] 按 Current Protocols in Immunology(3.12.2-3.12.4 节)中所述进行促有丝分裂刺激。再将细胞悬浮液加入 96 孔圆底板的每孔前在其中预铺上所有药物。所有实验条件至少测定 3 次。将悬浮于含 10%人血清的 RPMI 中的细胞以每孔 100,000 细胞的量铺板,使其终体积为 200 μ l。加入 ConA 使其终浓度为 1 μ g/ml。用不加 ConA 刺激为对照样。

在 37°C, 5% CO₂ 条件下孵育培养板。60 小时后每孔加入 1 微居里氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷, 并在 12 小时后收集培养板。

[0424] 人混合淋巴细胞反应程序

[0425] 如上所述从两个健康非亲缘捐赠者收集血样。按如前所述方法分离外周血单个核细胞。按前面所述将两个捐赠者悬浮细胞中的粘附细胞去除。两个捐赠者(供者 A 和 B)的悬浮细胞都用作应答物。两个供者的剩余的粘附细胞作为对不同供者的刺激物(A 悬浮细胞对 B 粘附细胞且 A 粘附细胞对 B 悬浮细胞)。用 35Gy 照射刺激物细胞。药物预铺于 96 孔 U 底板(三份)。每孔铺 200,000 个存在于含 10% 人血清的 RPMI 中的“刺激物”细胞。将在相同培养基中的 200,000 个“应答物”细胞铺在刺激物上, 使终体积为 200 μ l/孔。无刺激物细胞或无应答物细胞的作为背景对照。培养板在 37°C, 5% CO₂ 孵育。4.5 天后每孔加入 1 微居里氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷, 并于 12 小时后收集培养板。

[0426] 鼠异源移植模型

[0427] 用 Zhan 等 2000 年所述本领域认可的鼠异源排斥模型进行体内验证筛选。此鉴定用了整套 MHC 错配系统, 其中在实验第 0 天将 5×10^6 P815 细胞([H-2^d]DBA/2 肥大细胞瘤)注入 C57BL/6J(H-2^b) 小鼠腹腔。这些小鼠一般对 P815 细胞产生剧烈的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应。开始接种 P815 细胞后使其产生 CTL 反应(通常需 10-14 天)。在研究的第 6 及 8 天时, 将实验药物进行快速静脉注射。如图所示在实验第 14 天处死鼠, 如前所述测定异源 CTL 反应(Tretiakova 等, 2000, Nature Biotechnology 18 : 984-988)。处理及未处理动物的原代脾细胞用于直接 CTL 读数。新鲜原代脾细胞与 [³H] 标记靶细胞(P815 细胞)以 100 : 1、50 : 1、25 : 1 及 12.5 : 1 的比率在 37°C 一起孵育 3.5 小时, 而后用 PHD 收集器收集。特异性杀伤百分率用如下公式计算: % 杀伤 = (S-E)/S, 此处 S 指不存在效应淋巴细胞时靶细胞残留的 DNA 量而 E 指存在效应细胞时残留的 DNA 量(用每分钟计数表示; cpm)。

[0428] 本文所公开数据首次表明色氨酸介导的对免疫系统的效应是由于其为血清素代谢的前体。具体来说, 如本文所公开的, 进行的系列研究证明了色氨酸传送抑制剂或选择性血清素重吸收抑制剂(SSRI)的效用。

[0429] 阻断色氨酸或血清素的 IDO 介导的分解代谢等效于 T 细胞增殖的条件化培养基的功能。-也即, 图 1 所述实验为在本研究“条件”期阻断活化巨噬细胞摄取色氨酸(用色氨酸转运抑制剂 2-氨基 2-降羟烷羧酸)或是阻断本研究“条件”期对血清素的吸收(用选择性血清素重吸收抑制剂氟西汀 [ProzacTM])。此测定会产生多种结果。有时巨噬细胞会耗尽培养基, 有时不会(即, 色氨酸有时, 而不是总是, 可恢复条件培养基中新 T 细胞增殖的能力)。尽管有些变化, 观测到的总体模式为: 如果阻断巨噬细胞对色氨酸或血清素的摄取会阻止培养基的条件化效用。图 1 所示实验中, 加入色氨酸没有效用, 而加入血清素只大概地有回复效用。然而, 相似的检验证明色氨酸及血清素可恢复 T 细胞在条件化培养基中增殖的能力。

[0430] 设计下一系列研究是为了证明血清素在引起 T 细胞活化应答中的所有作用。首选检测了血清素从头合成在激活应答中的作用, 同时检测了向 T 细胞加入外源血清素的作用。图 2 显示色氨酸转化为血清素的代谢通路。色氨酸羟化酶是参与该代谢转化的第

一个酶。理论上，如果启动活化应答需要血清素的从头合成，那么抑制代谢转化通路的第一个酶会抑制应答。此外，加入缺失酶的终端产物来恢复活化应答可用于显示该抑制的特异性。

[0431] 图 3 所示实验用来检测是否抑制色氨酸羟化酶会破坏 T 细胞对促有丝分裂信号的应答能力。一般来说，用对氯苯丙氨酸来抑制该酶 (PCPA)。图 3 所示研究表明加入 PCPA 可以剂量依赖的方式抑制促有丝分裂应答，而且此抑制可由加入该酶的代谢终产物 5-羟色氨酸得以逆转。不存在 PCPA 时，加入 $25 \mu\text{M}$ 5-羟色氨酸可明显提高增殖应答。

[0432] 尽管数据表明血清素从头合成可推动 T 细胞活化过程向前进行，但 PCPA 的抑制机制使解释并不清晰。加入生长细胞的 PCPA 作为氨基酸类似物参与蛋白合成，从而进入新生成的蛋白。尽管 PCPA 加入色氨酸羟化酶会破坏其酶活性，但很难预知其进入细胞其他蛋白中产生的副作用。

[0433] 而后，测定所加外源血清素系色氨酸的效用，并检测色氨酸 - 血清素转化中不同代谢阻断的效用。关于代谢阻断，在对由阻断单胺氧化酶引起的细胞内血清素集聚的应答反应中存在关闭芳香族氨基酸脱羧酶（催化 5-羟色氨酸向血清素转化的酶）活性的高敏感反馈机制 (Carlsson 等, 1976)。此研究中，用苯乙肼 (Pz) 作为单胺氧化酶抑制剂。图 4 显示这些数据。高剂量的血清素与色氨酸 ($400 \mu\text{M}$) 增加细胞的最大刺激，反之加入单胺氧化酶抑制剂 Pz 可完全关闭该刺激。这些数据与启动及维持免疫应答需要血清素从头合成的观念相吻合。以前的某些研究表明 5-HT 刺激活化的 T 细胞 (Kut 等, 1992; Young 等, 1993)，然而大多数实验室报道加入高浓度的 5-HT 抑制增殖 (Mossner & Lesch, 1998)。因此，检测了色氨酸及 5-HT 两者在 T 细胞基本活化通路中的作用。

[0434] T 细胞活化及增殖是非常复杂的且被高度调控的过程。不论是用促细胞分裂剂还是特异性抗原引发，T 细胞活化过程是时间及活化信号强度的函数。当活化进程用时间相对细胞数（或 DNA 合成活性）的函数绘制时，图象显示为钟形曲线。一般来说，促细胞分裂刺激的增殖在 48-60 小时（取决于起始信号强度）达峰值，然后是平台期，而后迅速减低为基线水平。事实上，如果忽略时间度量，产生免疫应答的曲线与神经脉冲的极为相似。

[0435] 促细胞分裂刺激实验的建立通常使用单一、优化好的活化促细胞分裂剂浓度，且在预先定好的终末端观测数据。然而，如果外加试剂改变钟形曲线形状，但不改变活化水平峰值，并且实验者在单一时间点进行测定，那么可能误读结果。考虑加入试剂会缩短钟形曲线宽度的情况。在采样时，缩短的钟形曲线已经接近其末端，而未处理的细胞仍在平台期。实验者自然得出待侧试剂抑制测定的结论，然而细胞峰效应可能本是相同的，只是效应时间改变了。

[0436] 检测多种化合物在不同强度活化信号下的效应，而在恒定时间点收集 (72 小时)。理论上，最大的起始信号强度，也即用最高浓度的 ConA 可使钟形曲线前移，反之，弱些的信号会延迟曲线。当维持采样恒定时间时，用不同浓度的 ConA 刺激 T 细胞，可在活化的“钟形曲线”不同点检测化合物效应。图 5 表明每种试剂对被刺激的淋巴细胞的效用。信号强度最弱时 ($0.1 \mu\text{g/ml}$ ConA)，色氨酸增强增殖应答，此增强水平随 ConA 浓度的增加而减弱，因此当 ConA 浓度最高时无增强效果。直到 ConA 达最高剂量时血清素对测定方有效，与“钟形曲线”的最近部分相吻合。因此，不希望受任何理论

的限制, 显然色氨酸及血清素对活化细胞有相同功效, 只是色氨酸的活性作用发生在血清素之后。

[0437] 图 5A 和 5B 中, 正如预期的对脱羧酶的反馈抑制, 加入苯乙肼在其最高浓度, 也即 10-100 μM , 显示出明显的抑制效果。然而 ConA 最高剂量时 (10 $\mu\text{g/ml}$), 观察不到抑制作用 (图 5C), 因为苯乙肼抑制曲线在较高 ConA 刺激时向右漂移, 所以全效抑制作用发生在苯乙肼浓度为 100-400 μM 时。

[0438] 如果观测到的抑制是由于抑制了 L- 芳香酸脱羧酶而产生的, 从而阻止色氨酸向血清素的转化, 那么向系统加入外源血清素, 而不是色氨酸, 将缓解该阻断作用。图 6 中, 用 1 $\mu\text{g/ml}$ ConA 刺激人 T 细胞, 并考察色氨酸及血清素消除已发生抑制作用的能力。此检验条件下, 向 ConA 刺激细胞加入色氨酸可提高增殖应答, 但加入血清素不能。向苯乙肼抑制的细胞中加入血清素可使测定返回到基线水平, 然而加入色氨酸却几乎没有效用 (图 6)。综合考虑, 这些数据与 T 细胞功能活化需血清素从头合成的理论相符, 并证实了这一概念。

[0439] 为了检验血清素能受体信号在免疫应答中的功效, 进行实验通过使用已确定的 5-HT 受体系统的激动剂及拮抗剂来产生不同的免疫应答。具体来说, 检测 1 型受体在淋巴细胞活化过程中的效用。

[0440] 图 7A 及 7B 为这些实验的数据。A 图显示用 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA 刺激人淋巴细胞, 而 B 图表示异源刺激人淋巴细胞的数据, 也即混合淋巴细胞反应。从数据可清楚看出, 用化合物 SB 216641 对 1B 型 5-HT 受体信号的高度选择性抑制致使对活化应答的完全抑制。

[0441] 数据进一步表明选择性的 1B 型 5-HT 拮抗剂 (SB 216641) 的量效曲线部分取决于细胞活化方法的信号强度。也即, 用植物凝集素 ConA 交连细胞外受体使之不需二级信号输入, 这时 1B 型 5-HT 的抑制具有大约 200nM 的 IC_{50} , 然而如果使用异源刺激 (较弱的信号强度), 相同化合物的 IC_{50} 约为 50nM。应注意选择性 1B/1D 拮抗剂在相应药理相关浓度下明显发生抑制作用, 然而高度选择性 1D 拮抗剂 (BRL15572) 对增殖应答没有效用。因此, 本文公开数据证明了人 1B 及 1D 受体在免疫应答中的功能差别, 并且证明了选择性消除 1B 型 5-HT 受体信号可完全取消淋巴细胞活化应答。

[0442] 在同系列研究中, 测定了靶向 2 型血清素能受体的激动剂及拮抗剂调节免疫应答的能力。图 8A 及 8B 显示其数据。再次, 比较了药物对促细胞分裂刺激的人淋巴细胞的效用及相同药物在人混合淋巴细胞反应中的效用, 分别表示在 A 及 B 图中。在这些研究中, 多种测试药物在其相应药理浓度下都可抑制活化应答, 如美赛西平 (通用 1、2、6 及 7 型 5-HTR 拮抗剂)、LY 53857 (2A/2B/2C 型 5-HT 受体选择性抑制剂)、SB 206553 (2B/2C 型 5-HT 受体选择性抑制剂) 及 SB 242084 (2C 型 5-HT 受体高选择性抑制剂)。这些药物的共性为其抑制 2C 型 5-HT 受体信号的能力。因此, 数据表明选择性消除 1B 型 5-HT 受体信号可完全抑制人淋巴细胞的活化进程。

[0443] 图 9A 及 9B 显示抑制或干扰 3、4、6 及 7 型 5-HTR 受体信号的效用 (没考察 5 型 5-HT 受体, 因为没有可用于特异性靶向该受体系统的激动剂或拮抗剂)。3 型 5-HT 受体的激动剂及拮抗剂对细胞增殖能力都无效用, 不论这些细胞是受促细胞分裂剂刺激还是异源刺激。4 型 5-HT 受体的激动剂及拮抗剂都抑制应答。在这点上, 一般认为 4

型受体激动剂使受体下调，导致信号的消减。在 CD4- 依赖性分析中，特异性抑制 6 及 7 型 5-HT 受体无效用。

[0444] 尽管使用 1 及 2 型拮抗剂见到的功效最大，但同时也检测了刺激 3 型 5-HT 受体及选择性抑制 6 型 5-HT 受体的功效。具体来说，用鼠 mined 淋巴细胞应答测试 (MLR) 测定功效。Ro 04-679，选择性的 6 型拮抗剂，对测定结果无效用，然而用目前所知 3 型激动剂，5- 甲基羟色胺会使之略为上升，以前及本文都未发现促细胞分裂刺激及异源刺激间的抑制行为有实质性的差异。

[0445] 以前的试验表明 ^3H - 胸腺嘧啶核苷可插入到生长 DNA 链，也即 DNA 合成中。不希望受任何理论的限制，如果一种化合物虽然使细胞可存活但使之不能生长，而另一种化合物可诱导凋亡（程序化细胞死亡），那么当使用 DNA 合成作为试验的终点时，可鉴别出相同的结果。

[0446] 为进一步评定蔡心安（通用 1 型 5-HTR 拮抗剂）及利哌酮（通用 2 型 5-HTR 拮抗剂）对促细胞分裂刺激的淋巴细胞培养物的效用，在试验过程中手工计量存活细胞数。图 11 显示细胞计量。如细胞不受刺激，则检测不到存活细胞数的改变。用 ConA 刺激细胞时，可观察到一小段滞后期，并且将在没有抑制剂情况下观测到的刺激应答曲线同生长期起始比较。1 型 5HT 受体拮抗剂阻止细胞生长。显然，与初始细胞数相比，细胞数目不降低或增加。还不清楚这是由于无反应力还是无法启动活化通路所引起的，或是由两者共同引起的。另一方面，利哌酮先引起细胞的短暂增加，而后培养基中细胞消亡。需要强调只能通过手工计量细胞数而得这些数据；DNA 合成试验应表明两种化合物产生相同结果。因此，基于此处显示数据，各种抑制 2 型血清素受体的拮抗剂为淋巴细胞活化进程的限速物。

[0447] 因为本文公开数据表明 T 细胞活化信号主要是对经由 1B 或 2 型 5HT 受体的信号应答，所以设计药理实验来检验 3 种 2 型受体中哪种对免疫系统的影响最大。因而，检测了一系列 2 型 5HT 拮抗剂，它们特异性不同且不与其他受体系统交互作用（图 12）。第一个化合物为 LY 53857，靶向所有 2 型受体。第二个化合物为 SB 206553，仅选择性靶向 2B 及 2C 型 5HT 受体。第三个化合物为 MDL 11939，只靶向 2A 型 5HT 受体。第四个化合物为 SB 242084，是高选择性的 2C 型 5HT 受体。所有药物都在试验起始（0 时）或二次活化期开始时（48 小时）给药。本文公开数据显示 2C 型 5HT 特异性拮抗剂有保留的全部抑制特性（见图 12）。不希望受任何理论限制，本文公开数据表明 2C 型 5HT 受体信号是淋巴细胞活化过程的限速信号。

[0448] 所以，本文公开数据表明色氨酸在 T 细胞活化应答时活性地转化为血清素。此外，药理学特性显示 1 型 5HT 受体，尤其是 1A 型受体，可启动活化应答。此现象是惊人的，因为以前的技术显示 1A 型 5HT 受体不存在于静息细胞中，而且只在 T_H1 活化时上调。与 1 型受体相反，2 型 5HT 受体显示出在活化应答的早期及晚期相都需要血清素介导的信号。在应答的任何时间点阻断该信号会导致活化的即刻停止。具体来说，本文公开数据首次表明，启动及维持免疫应答绝对需要通过 2C 5HT 受体的信号。

[0449] Mellor 等 (1998, Science 281 : 1191-1193) 探讨了胎儿如何在异源排斥反应中存活（胎儿为半母体半父体）。大约子宫受孕 8 天后，一种酶（吲哚胺 2,3- 双加氧酶，IDO）上调。此酶分解代谢如色氨酸及血清素之类的吲哚胺。在妊娠及该酶上调间的时

间延迟给 T 细胞应答的活化提供了充分的时间。换言之，机体使免疫应答可以发生并且在任何损坏发生前，IDO 上调，突然撤回了血清素的局部供应。尽管不希望受任何理论限制，很可能血清素能信号的突然消失诱导了活化的细胞群的凋亡，从而功能性去除了可能对胎儿有反应的细胞，而留下了静息细胞群以准备应答任何外来病原体。为了在体内验证体外数据，选用健康的经过技术领域内认可的异源排斥模型。

[0450] 因为本文公开数据提出了一种可能机制，用于解释自然界如何对抗妊娠期由孕体产生的不必要的异源排斥应答，所以用 P815 细胞（源于 DBA 小鼠肥大细胞瘤的快速生长的细胞系）在 C57BL/6 小鼠中构建了强有效的排斥应答，并检测了异源排斥模型中 5-HT₂ 活性。该模型是基于 Han 等 (2000) 所述的本领域认可的异源排斥模型。该模型中，P815 细胞 (H-2^d) 与 C57BL/6 小鼠 (H-2^b) 间存在完全的 MHC 错配，因此产生攻击性免疫应答。图 13 所公开数据描述了包括 6 个处理组的实验结果，每个处理组包括 3 只小鼠。每只小鼠在实验第 0 天腹腔注入 5×10^6 P815 细胞。第一组为未处理对照组，用来建立小鼠对异源刺激的基线应答。这些小鼠，不经任何进一步处理，与其他处理组小鼠一起在实验第 14 天处死，测试其脾细胞对 P815 细胞特异靶定的杀灭。

[0451] 当效应器与靶比率为 100 : 1 时未处理组观测到的平均杀灭约为 45%。第二组用 2 型 5HT 拮抗剂利哌酮处理，在实验 6 及 8 天经由尾静脉注射给药 (200 μ g/注射)。选择给药时间以确保药物处理前 T 细胞完全活化。第三组用 1 型 5HT 拮抗剂萘心安处理。所有 5HT 受体拮抗剂处理组用与利哌酮处理组相同的方法处理。第四组用环孢霉素 A 慢性处理。在实验前 2 天开始对小鼠注射剂量为 100 μ g/注射的环孢霉素 A，也即，在 -2 天开始，研究期间每日持续注射。

[0452] 环孢菌素 A 可有效地阻止 T 细胞启动活化应答，目前是治疗移植过程中并发症可选药物之一。第五及第六组用 SB206553 (高选择性的 2C 型 5HT 拮抗剂) 及美西麦角 (临床也叫 SansertTM) 处理，它们分别是通用的 1 型及 2 型 5HT 拮抗剂。如本文公开数据所示，环孢菌素 A 处理的小鼠如所预期的，对异源移植不形成细胞毒性应答 (图 13)。萘心安处理组不能使小鼠免受异源排斥反应。该现象与 1 型 5HT 受体主要影响活化应答早期阶段的观念一至。

[0453] 利哌酮、SB206553 及美西麦角处理组在不同程度上都抑制异源移植应答。如在拮抗剂处理组观测到的免疫调节性质的例示，图 14 描述了 SB 206553 处理组每只鼠的个体应答现象。3 只处理鼠中 2 只鼠抑制异源移植应答，其程度等同于用环孢霉素 A 处理的动物的中所观测到的。对药物处理没反应的一只鼠需要多次注射药物，因为其起始的尾静脉注射失败。数据表明体外剂量抑制曲线从无抑制迅速发展为 100% 抑制，就好像一个“阈型”应答。不希望被任何理论限制，可能这只非应答鼠没收到全剂量药物，或是多次注射的压力诱导了小鼠的血清素应答。

[0454] 血清素作为神经递质，根据存在于应答细胞表面 5HT 受体的不同类型而发挥不同的效用。免疫应答受高度调控，并且其应答的表达随递呈的抗原的性质及环境而有细微变化。因此，不希望受任何理论限制，由于血清素在调节免疫应答中起重要作用，可想象应答细胞表达不同的血清素受体群。已清楚单核细胞及淋巴细胞都表达血清素特异性受体。然而对现有技术的综述得出了令人费解的受体表达模式。表 1 显示这些研究以及其对血清素受体和免疫系统细胞所作出的总结。

[0455] 表 1

[0456]

引用文献	5HT 受体	证据类型
Ameisen 等, 1989	2 型 5HT (小鼠)	药理学
Aune 等, 1993	1A 型 5HT [非 2 型] (小鼠)	反转录 PCR
Meyniel 等, 1997	3 型 5HT (仅活化细胞) (虹鳟鱼)	药理学

[0457]

Stefulj 等, 2000	静息的: 1B、1F、2A、2B、6 及 7 型 5HT 活化的: 3 型 5HT (大鼠)	反转录 PCR
Marazziti 等, 2001	2C 及 5 型 5HT (人)	反转录 PCR

[0458] 最早的药理学研究表明 2 型 5HT 受体在 T 细胞中存在，然而后来的文章（由 Miles Research Center 发表）提供了 RT PCR 证据表明 T 细胞中存在的是 1A 受体而不是 2 型 5HT 受体。此外，他们发现 1A5HT 受体仅存在于 T 细胞中。在 Serbo-Croatia 的一个实验室 (Stefulj 等, 2000) 的工作发现 1A 及 2C 型 5HT 受体都不存在，他们使用针对 14 个已知药理学差异的受体中 13 个受体的引物，做反转录聚合酶链反应 (RT PCR)。最近

Pisa 大学 Marazziti 等 (2001, *Neuropsychobiology* 43 : 123-126) 指出存在 2C 型 5HT。这些研究相互矛盾。本文公开数据与体内及体外数据一致。因此,用血清素受体的序列特异性引物进行系列研究来探讨 5HT 受体在上述试验所用的人细胞上的表达。

[0459] 为进行研究,设计特异性扩增 1A、2A、2B、2C、3A、3B 及 4 型 5HT 受体的 PCR 引物(见上,方法部分实验详述及各引物序列)。为进行促细胞分裂刺激及人 MLR,根据本文其他部分公开的程序纯化人外周血细胞。从淋巴细胞中分离由单核细胞组成的抗原递呈细胞。用受 $10 \mu\text{g/ml}$ ConA 刺激前的细胞群或刺激后的细胞群构建 cDNA 文库。用 RT PCR 用于检测各受体的存在。

[0460] 用 1A 型 HT5 特异性的引物所得的数据是出乎意料的。预期片断大小为 234bp。此条带只在活化淋巴细胞群中略微可见,当胶存照形成图 15 所示图象后检测不到此条带。反之,由该引物扩增主要产物为一约 387bp 的带,而图 15 中所有其他受体的扩增片断都与预期片断大小 精确相符。此 387bp 的条带与任何 1A 型 5HT 受体多态性或任何已知剪切形式都不相符。

[0461] 图 15 所示 PCR 扩增的同时,用受体特异性引物 PCR 扩增各个 cDNA 文库,并克隆到表达载体,即 TA 表达载体或 pCR 3.1 (Invitrogen),用于 DNA 测序。

[0462] 尽管此处公开的 PCR 数据不是定量 PCR,我们试图使本文所述所有 PCR 反应在规范化的条件下进行。图 15 中用 1A 型 5HT 特异性引物扩增的条带在静息淋巴细胞及活化单核细胞中的量多于其在静息单核细胞及活化淋巴细胞中的扩增量。将此 384bp 条带及预期大小的片断都克隆到 TA 载体。将用测序的方法来鉴别这些 PCR 产物。

[0463] 对于 2 型 5HT 受体,2A 型 5HT 受体在淋巴细胞上存在,并且其条带在静息淋巴细胞中的量强于在活化细胞中的量。2B 型 5HT 受体只存在于静息单核细胞和淋巴细胞,且当细胞活化时消失。2C 型 5HT 受体既存在于静息淋巴细胞也存在于活化淋巴细胞。没检测到 3 型 5HT 受体。考虑到文献报道及本文实验所得药理学数据,其结果是惊人的。不希望受任何理论限制,可能受体 mRNA 中有没预测到的多态形式或其他差异使本文所用的设计的引物不能扩增出相应的 cDNA。用不同组引物重复此 RT PCR。

[0464] 此外,本试验检测出预期大小的 4 型 5HT 受体扩增条带。此条带出现在静息淋巴细胞及活化单核细胞中。如前所述,图 15 所示每一条带都被克隆及测序验证。

[0465] 以血清素能为基础的免疫疗法被自然界所用。此方法可用于设计治疗多发性硬化症、1 型糖尿病、类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎及许多其他自身免疫疾病。同一药物疗法可用于停止排斥反应中的免疫应答,如遗传错配实体器官排斥、血液及干细胞移植排斥及针对基因治疗载体产生的应答。

[0466] 目前用于治疗这些疾病状态的疗法不但有毒而且随着每天服药会阻断患者全部免疫系统,使其余生都免疫妥协。尽管器官暂时得到保护或是短期不会复发,然而却使患者很易发生偶发性感染。

[0467] 本文所公开数据使一种新的特异性治疗方法成为可能。事实上,细胞在胎儿-母体期表达一种酶 (IDO),可局部降解吲哚胺,如血清素与色氨酸。免疫细胞需经其表面的特异性受体接收血清素信号,因此血清素缺失使关键的活化信号(们)突然消失,从而使活化的 T 细胞群功能丧失,进而保护了作为异源物的胎儿。

[0468] 相关酶只在妊娠期早期需要(大约前三个月)。需注意免疫应答抑制只局限于

酶活性期的活化细胞。不希望受任何理论限制，在无其他感染或疾病的怀孕期间，只有活化的细胞是那些特异性靶向胎儿的；因此，只有这些细胞应被抑制。血清素信号的暂时消除足以阻断怀孕时针对胎儿的免疫应答，然而一旦酶停止作用且局部恢复血清素水平，则可进行任何其他正常免疫应答。

[0469] 不希望受任何理论的限制，血清素受体药物治疗易于操作，只要选择性的模仿血清素缺失既可。不用通过去除血清素来阻止其结合，受体信号抑制剂或可与该神经递质竞争结合位点或非竞争性的抑制该受体信号，都可产生相同的结果。自身免疫疾病或抑制状况都与怀孕相似，因为健康人中只有活化的免疫细胞是那些靶向该“自身”组织或外源器官的细胞。可以脉冲式治疗给药的以血清素为基础的治疗可同样靶向这些患者中的活化细胞，而当药物从循环中清除时，使他们的静息免疫系统可随时预备应答。

[0470] 为了改性治疗性处理方法，发展并测试了新的实验性治疗法。阻断 CD40/CD154 costimulatory 通路的生物学技术可能是迄今为止评估的所有实验系统中最有前景的 (Diehl 等, 2000, *J.Molec.Med.*78 : 363-366)。用非消除性抗 CD154 抗体来延长恒河猴的全 MHC 错配移植存活 (Kirk 等, 1999, *Nature Medicine* 5 : 686-693 ; Kenyon 等, 1999, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*96 : 8132-8136)。抗体治疗明显利用活化诱导的细胞死亡 (AICD) 作为其对延长异源存活疗效的重要特征 (Markees 等, 1998, *J.Clin. Invest.*101 : 2446-2452)。此外，数据表明用抗 CD 154 抗体诱导的耐受性不只包括潜在攻击性 T 细胞的缺失，还抑制新的移植反应性 T 细胞群 (Graca 等, 2000, *J.Immunol.*165 : 4783-4786)。然而，大多数对抗 CD154 抗体的研究表明异源移植由于动脉硬化最终被排除。实验动物中发生的移植动脉硬化显然源于 CD8+ 细胞毒 T 细胞的侵入 (Honey 等, 1999, *J.Immunol.*163 : 4805-4810)。目前数据表明 CD8+T 细胞不能被 CD154 阻断有效靶向 (Ensminger 等, 2000, *Transplantation*69 : 2609-2612)。尽管 CD8+CTL 应答可逃脱 CD40 配基阻断，但施用抗 CD154 单克隆抗体的治疗效果仍是惊人的，并且似乎并无任何主要的不利副作用 (Kenyon 等, 1999, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96 : 8132-8136)。

[0471] 单克隆抗体作为新医疗方法正且将继续起到重要作用。这些抗体占目前现有的生物药物的四分之一，当前应用或正被研究的药物约有 30 种 (Breeveld, 2000, *Lancet* 355 : 735-740)。然而，单克隆抗体本身有一些局限性。如任何相关大分子蛋白一样，与生产（更为传统的）小有机药物所用成本相比，用于人体治疗应用的商业化生产及纯化操作成本巨大 (Hillegass 等, 1999, *Am.Heart J.*138 : S24-32)。尽管单抗的短期副作用是可接受及可预测的，但其长期安全性还需评估。尽管体内一星期或更长时间的半衰期不是不寻常的，单克隆抗体经常有组织透过性的问题，如在类风湿关节炎中它们不能有效的穿透 sinovial 组织 (Colcher 等, 1998, *Q.J.Nucl.Med.*42 : 225-241)。简而言之，单克隆抗体可迅速处理一些不能解决的医疗问题，但是不表示可长期解决这些问题。如大型制药公司所经常提及的，最好的药还是传统小有机分子。

[0472] 有此说法“移植研究的圣杯是用过短期脉冲治疗诱导耐受性。”（见 Herman Waldmann 教授, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, UK)。本文运用的原理为利用活化诱导细胞死亡, AICD, 建造短其脉冲疗法的策略。淋巴细胞 5-HT 受体多样性足以对活化应答进行正调控及负调控。不希望受任何理论限制，推测血清素系统代表原始防御系统，而且多种为免疫应答提供精细调节元件的细胞决定簇随时间逐渐参与此

系统。事实上，广泛认为免疫应答的产生涉及与神经连接不同的“免疫联合”（Bromley 等，2001，*Ann.Rev.Immunol.* 19：375-396）。为保证种族增殖，自然界用于防止胎儿排斥的机制必须是进化中的早期事件。如果血清素通路代表原始防御通路，那么可理解自然界选择经由色氨酸缺失来控制血清素水平，从而保护怀孕期的胎儿。

[0473] 靶向血清素能信号用于控制“多余的”炎症应答，其优势为可利用关于血清素受体系统药理-药物选择性拮抗剂的巨大信息数据库。与单克隆抗体为基础的治疗方法不同，此策略为一种可功能性去处所有参与产生免疫应答的活化T细胞（辅助者和细胞毒性T细胞）的方法。

[0474] 使用自然的通路来控制免疫的显而易见的好处为单次治疗可至少提供数月的保护。此保护的最终期限并不知道。而且，明显的治疗靶点涉及包含致病炎症应答的多种疾病，如多发性硬化症及类风湿性关节炎。与目前所用的COX-2酶抑制剂（如Celebrex™）不同，设计以血清素为基础的治疗可功能性的去除负责产生该疾病的细胞，而不是仅暂时缓解应答。

[0475] 综上所述，血清素受体拮抗剂可用于模拟设计的或出于胎儿存活需要而产生的强效、自然、原始免疫保护机制。本文所公开数据为治疗自身免疫疾病及移植免疫方法的发展提供了有用的工具。这些领域治疗目的类似于试图抑制多余的免疫应答而不伤害将来感染所需的静息免疫细胞群。此治疗策略适应治疗多发性硬化症、1型糖尿病、类风湿性关节炎、克罗恩病及溃疡性结肠炎、以及许多其他自身免疫疾病。此治疗策略也可用于保护遗传错配的实体组织、血液及干细胞移植体及当前用于基因治疗的载体。

[0476] 实施例 2：5-HT 受体亚型 mRNA 的差异表达

[0477] 根据生产商技术手册用 Qiagen RNAeasy 小批量抽提试剂盒提取总细胞 RNA。RNA 样品用 EtBr 染的胶定量，各 RNA 样品取约 1 μg 用于 cDNA 合成。根据生产商技术手册用 Qiagen 反转录酶及寡 T₁₂₋₁₈ 引物合成 cDNA。所得 cDNA 作为 PCR (Taq DNA polymerase, Sigma) 模板，用 5-HT 受体特异性引物扩增。PCR 条件为 95°C 45 秒，61.5°C 45 秒，72°C 45 秒 25 循环后于 72°C 延伸 10 分钟。用 3% 琼脂糖胶电泳分析 PCR 产物 (TAE 缓冲液)。为进一步验证，用 PCR 产物进行 DNA 印记杂交，用放射性标记的受体特异性的内部寡核苷酸为探针。PCR 产物从琼脂糖胶转移到 HyBond 膜，杂交反应按 Current Protocols InMolecular Biology 操作。简而言之，膜用 6XSSC 预封闭，其含 10XDenhardt 溶液、0.5% SDS、1 μg/ml 多聚 A 及 100 μg/ml of SS DNA。每一杂交反应加 20pmol 放射性标记探针，过夜反应 (73°C)。第二天洗去过量探针，膜用 Kodak 胶片曝光。内部寡核苷酸为：1A：ctgcagaacgtggccaattatcttattggctcttt (SEQ ID NO：1)；1B：gtggagtactcagctaaaaggactcccaagaggg (SEQ ID NO：2)；1D：ctctcttttcaaccacgtga aatcaagcttgct (SEQ ID NO：3)；1E：atctagatcaccaggagaacgtcagcagatcteta (SEQ ID NO：4)；1F：gagcagcaaagacattataccacaagagacaagcaa (SEQ ID NO：5)；2A：tcggctctttt gtgtcatttttcattcccttaacca (SEQ ID NO：6)；2B：ctcaacgcctaacaatggttgactgtgtctacagttt (SEQ ID NO：7)；2C：taactgacattttcaatacctccgatggtggacgct (SEQ ID NO：8)；3A：gggagttc agcatggaaagcagtaactactatgcag (SEQ ID NO：9)；3B：ttcaatctatcagcaactacctcaaaactcaggac c (SEQ ID NO：10)；4：caccattctttgtcaccaatattgtggatcctttc (SEQ ID NO：11)；5：c tttttggctggggagagacgtactctgagg (SEQ ID NO：12)；6：atcctcaacctctgcctcatcagcctggac

(SEQ ID NO : 13) ; 7 : tgaaggaaaaacatctccatctttaagcgagaaca (SEQ ID NO : 14).

[0478] 本文公开实验结果如下。

[0479] 关于人淋巴细胞上 5-HT 受体特异性 mRNAs 的表达, 本文公开数据显示随活化过程进行受体 mRNA 水平是否存在动力学调控, 而不是鉴别刺激 48 小时的细胞与静息细胞上 5-HT 受体 mRNA 的存在与否。为进行这些研究, 在实验起始 (0 时) 用 $5 \mu\text{g/ml}$ ConA 处理细胞。时间点选择为 0、0.5、2、4、6、12、24 及 48 小时。在每一时间点用 $1 \mu\text{g}$ 总细胞 RNA 制备寡 -dT 引发的文库。这些寡 -dT 引发的文库在扩增 14 个 5-HT 受体中的每一个时作为模板。克隆及测序各扩增产物时, 用 RNA 印记杂交确认产物的真实性, 如本文其他部分所述用受体特异性的内部寡核苷酸为探针。用基因组 DNA 扩增作为阳性对照; 不经反转录步骤的扩增的 RNA 作为阴性对照以对照 DNA 污染。

[0480] 图 16 显示此研究数据。印记上部及下部标示多种样品的时间点 (刺激后小时数), 各 5-HT 受体标于印记左侧。“M”表示分子标记带。应注意图示 2C 5-HT 受体的数据不是 DNA 印记, 而是溴乙锭染色胶, 显示 PCR 产物及阳性对照都为预期大小。

[0481] 图 16 所示数据表示每一血清素受体特异性的信号所特有的协调的表达模式。没有证据表明 1F 或 3B 5-HT 受体表达, 重新设计相关引物仍是扩增不出产物。延长曝光时间会看到与 3A 受体相符的很弱但可重复性条带。

[0482] 关于 1A 及 2A 受体的数据, 用取自不同个体的血及更长的时间框架重复。1A 型 5-HT 在受刺激 54 小时后出现。此时间点与试验峰值及活性开始衰退的时间相符。用 2 轮 PCR (每次 25 循环) 扩增 2A 受体, 检测到预期大小的 RT-PCR 产物, 而只作一次 PCR (25 循环) 时无法用 DNA 印记检测到产物。其他试验数据中 2A 型 5-HT 表现为受调控带 (一受刺激后立即上调, 且在细胞分裂前立即重现)。这些数据表明 2A 型 5-HT mRNA 存在于淋巴细胞中。用 DNA 印记杂交验证 2A 5-HT 产物的身份。

[0483] 进一步, 本文所公开数据显示了血清素能受体激动剂及拮抗剂在人及鼠淋巴细胞中的药理学行为。图 17 显示了系列 1 级特异性药物对人淋巴细胞促细胞分裂刺激的结果, 在鼠中观察到相同结果。总之, 观测到相对 1B 型 5-HT 受体信号选择性消减的惊人的应答抑制。然而对 1B 及 1D 信号的同时抑制并不产生相同的抑制曲线, 尽管两种药物对 1B 受体的结合动力学是相同的 (5-HTR 药物详见 www.tocris.com)。

[0484] 图 17 数据表明多种药物对摄取 ^3H -胸腺嘧啶的效用。这应该反映 CD4⁺ 亚组细胞中 DNA 合成。因此, 这些数据表示药物在体外对辅助 T 细胞的效用。

[0485] 最终, 用 CD8⁻ 依赖型异源抑制排斥模型进行体内研究, 其中 P815 细胞 (源于 DBA 小鼠肥大细胞瘤的快速生长的细胞系) 扩增并用于在 C57BL6 小鼠中引起正常排斥应答。在研究的第 0 天向小鼠腹腔注入 5×10^6 P815 细胞。第一组为不处理对照组 (首次用于实验的动物), 用于获得小鼠抗异源刺激的基线应答。阳性对照为施以异源细胞但不作进一步处理的小鼠。这些动物用于评定对 P815 细胞产生的异源排斥应答。

[0486] 所有处理组在研究第 14 天处死, 其脾细胞用于测定对 P815 细胞的靶特异性的杀灭 (当效应器与靶的比率为 100 : 1 时阳性对照组的总体平均杀伤率为 45%)。在研究第 5 及 7 天, 用尾静脉注射施用血清素特异性化合物 ($300 \mu\text{g}$ / 注射)。选择给药时间以确保药物处理前 T 细胞已活化。

[0487] 图 18A 所示数据表示用单组处理鼠的代表性研究。试验读数为靶细胞的氚标记

的脱氧胸腺嘧啶核苷的 CPM 滞留。换言之，用脱氧胸腺嘧啶核苷放射性标记细胞，并与效应细胞一起孵育。如果这些细胞被活化的 CTL 裂解，则其 CPM 相应减少。如本文公开数据证明（图 18A）用美西麦角处理消除异源杀伤应答。

[0488] 图 18B 显示此种完全处理研究。第一个对照组用环孢菌素 A ($n = 3$) 慢性处理。以 $100 \mu\text{g}$ /注射的剂量在开始实验前 2 天通过静脉注射施用环孢菌素 A (CsA)，即从 -2 天起，并在实验期间每天都持续注射。环孢菌素 A 可有效地阻止 T 细胞引发活化应答，它是目前用于治疗移植过程中并发症的可选用药物之一。载体对照是用与血清素能药物处理完全相同的方法处理的缓冲液。表中每一条形柱表示从一个动物个体所得的数据。因此，可明显看出环孢菌素 A 处理可阻止异源应答，而载体处理没有效用（如所预期）。如 2B/2C 型选择性抑制剂 (SB206553) 的特性，美西麦角（部分 1 型激动剂 / 2 型拮抗剂）的抑制特性是惊人的。

[0489] 基于用辅助性 T 细胞的体外实验的惊人结果是从选择性 1B/1D 抑制剂及选择性的 6 型 5-HT 抑制剂所得的数据。1B/1D 抑制剂是目前体外辅助性 T 细胞最有效的抑制剂，然而在体内却没观察到对 CD8- 依赖性应答的明显效用。还不清楚这是否因为 1B/1D 拮抗剂的生物利用度。此外，其他数据表明选择性 1B 拮抗剂是 CD8- 依赖性异源移植应答的有效抑制剂，这与本文所公开体外数据相符。另一方面，6 型抑制剂增强辅助性 T 细胞的体外增殖，但却不能消除体内 CD8- 依赖性异源移植应答。

[0490] 实施例 3：血清素在阻塞性气道病（包括哮喘）中的作用

[0491] 本文所公开数据首次充分证明过敏性哮喘应答的免疫成份受一种已知神经递质的调节——血清素。以前并不知道血清素对免疫应答的调节作用。本文所公开数据表明血清素在免疫应答中的作用为治疗人哮喘病患者提供了一种新的治疗方法。

[0492] 神经学及免疫学领域的最新发展为神经及免疫系统是在进化历史早期彼此分歧的这一观点提供了有力的基础。而且，本文其他部分所公开数据表明血清素在调节免疫应答中起到关键的作用。这些数据表明血清素介导的信号为过敏性哮喘的免疫组分形成过程中的限速物。这一发现为治疗人哮喘及其他多种阻塞性气道病提供了新的治疗方法。

[0493] 一方面，本文公开的实验说明了对树突细胞及 CD4+ 辅助性 T5 细胞亚群上的血清素特异性受体模式的识别。这些是参与发动过敏性免疫应答的主要细胞。用 RT-PCR 鉴定细胞上有 14 种已知药理不同的血清素能受体中的哪些。因为血清素在一些精神障碍中起主要作用，如控制呕吐、情感障碍的产生、控制偏头痛相关的疼痛，所以在本领域以前已经进行了大量药学研究，以期获得可选择性调节各 5-HT 受体的药物群。因此，可用这些性质明确的血清素受体特异性药物来分析个别受体在树突细胞介导的 CD4+ 辅助性 T 细胞活化中起的作用，进而鉴定在活化应答产生过程中限速的特异性血清素能信号。此外，实验阐述了用体内气道高反应性模型来检验以前试验所鉴别的潜在治疗药物的应用。实验有助于我们理解参与启动过敏性应答的调节性过程，并为治疗阻塞性气道病患者提供了新的治疗策略。本文所公开策略可用于鉴别治疗其他疾病或状况的药物，其中介导病理过程或应答的细胞需要血清素介导的信号，因此可通过抑制信号治疗。

[0494] 本文公开数据表明血清素为哮喘肺抗原递呈中的潜在介质。此外，免疫学近期发展使本领域人员意识到 T 细胞及抗原递呈细胞的基本相互作用 / 通讯类似于神经突触

连接（近期综述见 Bromley 等，2001，*Annu.Rev.Immunol.*19：375-96.）。事实上，免疫系统及神经系统共有许多特性。例如：最近已证实聚焦蛋白，一个在神经肌肉连接中发现并已明确性的糖蛋白，在免疫系统中是关键调节物（Khan 等，2001，*Science* 292：1681-1686）。Khan 等认为聚焦蛋白参与 T 细胞抗原受体复合物的聚集。

[0495] 另一方面，最近证明 I 级主要组织相容性复合体（MHC），免疫应答生成中已知的重要糖蛋白，在神经联合中起关键作用（Huh 等，2000，*Science* 290：2155-2159）。Huh 等证明 I 级 MHC 在神经系统发育及成熟过程中参与连接的活性依赖性重塑及可塑性。此外，现在知道 L1 神经粘附蛋白是 T 细胞活化应答中的重要蛋白（Balaian 等，2000，*Eur.J.Immunol.*30：938-43）。因其在“对抗及逃脱”（应答中的贡献而早被识别的主要神经递质，如多巴胺及去甲肾上腺素，也通过在淋巴细胞中表达同源受体而调节免疫应答（Santambrogio 等，1993，*J.Neuroimmunol.*45：113-119；Kohm 和 Sanders，2000，*ImmunologyToday* 21：539-542；Saha 等，2001，*Neuroimmunomodulation*9：23-33）。综上所述，数据表明免疫及神经系统在进化时间线的早期点上相互分开。此外，本文所公开数据表明在启动免疫应答过程中血清素起到限速的作用，表明肺树突细胞表面血清素应答受体的存在，并显示了血清素在引发哮喘应答中的重要调节作用。

[0496] 当遇到吸入抗原时，气道的树突细胞（DC）移动到肺的引流淋巴结，上调共同刺激性配体，与原初 CD4⁺ 淋巴细胞相互作用，引发原初免疫应答（Wills-Karp，1999，*Annu.Rev.Immunol.*17：255-81）。数据表明响应于血清素能信号树突细胞/淋巴细胞的相互作用被调节。尽管对树突细胞上 5-HT 受体的存在与否所知甚少，本文公开数据充分证明它们的存在。因此，用 RT-PCR 检验树突细胞血清素能受体的表达。本文公开数据阐述未成熟小鼠髓样树突细胞在初始研究中的应用。将不成熟细胞及在 LPS 及 IL-4 条件下成熟的树突群中多种 5-HT 受体的 mRNA 水平进行比较。此外，检测了存在于静息/原初及活化的 CD4⁺ 辅助性 T 细胞群中的受体分布。本文前面其他部分公开的人外周血淋巴细胞相关数据表明存在多种对活化信号（如 Con A）应答的不同的上调或下调的 5-HT 受体。

[0497] 鉴别细胞上 5-HT 受体（们），然后用合适的血清素能受体调节剂选择性地靶向树突细胞及 CD4 辅助性 T 细胞亚类中的 5-HT 受体。混合淋巴细胞反应（MLR）中用 DC 作为抗原递呈细胞。除通过整合的 ³H-脱氧胸腺嘧啶核苷监控 DNA 合成，也监控 1 型及 2 型标记的生成（分别为 IL-12 及 IL-4）。

[0498] 本文使用了卵白蛋白诱导的气管高反应性（AHR）体内鼠模型。试验描述了在哮喘整体动物模型中阻断血清素能信号的效用。最终用关键 5HT 受体同类系，在不同的 AHR 模式中也检测了携带 5HTR 不同等位基因的小鼠。

[0499] 本文前面其他部分公开数据表明多种不同的血清素特异性受体存在于静息淋巴细胞，并且其表达模式随活化而改变。2C 型 5-HT 受体产生的信号显示为鼠及人 CD4⁺ 辅助性 T 细胞及 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞活化的限速物。选择性抑制 1B/1D 受体对人及鼠辅助性 T 细胞增殖有很强的效用，但对细胞毒性 T 细胞活性无影响。另一方面，选择性抑制 6 型 5-HT 受体有相反效用。

[0500] 在哮喘应答方面，树突细胞是变态反应最可能的抗原递呈细胞。进而，该细胞活化 CD4⁺ 辅助性 T 细胞，诱导 Th2- 型应答。本文其他部分公开的实验描述了 DC 及

CD4+ 辅助性 T 细胞中血清素能受体的表达模式。基于本文其他部分所公开的数据, 1B 及 1D 型 5-HT 受体存在于 CD4+T 细胞, 而不存在于 CD8+T 细胞亚群。数据表明活化和维持 T 细胞介导的过敏反应必须有一种特异性 5-HT 信号。本文其他部分公开数据表明通过选择性撤消适当的受体信号可诱导活化的 T 细胞群中的凋亡, 导致来自该贮库的这些细胞的功能性缺失。这会打乱引发嗜曙红细胞及肥大细胞脱粒的反馈通路, 并导致哮喘应答的“短路”。

[0501] 5-HT 受体在不成熟及成熟 DC 及 CD4+ 辅助性 T 细胞亚类中的分布, 其负责在哮喘应答中驱动 IL-4 及 IgE 产生, 这都被详细说明。目前, 还未见关于血清素特异性受体在上述类型细胞中分布的数据。这是本文其他部分公开数据的直接延伸, 且为理解分别地引发 CD4- 依赖性或是 CD 8- 依赖性的免疫应答的信号过程提供了基础。

[0502] 如上所述, 鉴定了在不成熟髓样树突细胞及在 LPS 及 IL-4 存在下或是在 LPS 及 IL-12 存在下成熟的树突细胞中所表达的 5HT 受体, 也鉴定了在 CD4+ 辅助性 T 细胞中表达的受体。这些研究在 BALBc 小鼠中用阴性筛选技术富集树突细胞集辅助性 T 细胞, 所用试剂盒来自 StemCell Technologies Inc (Vancouver, British Columbia)。对于树突细胞群, 从骨髓收集物中分离出鼠造血祖细胞(用股骨及胫骨), 用含 5% FBS 及 1mM EDTA 的 PBS 冲出。离心后, 用含 5% 正常大鼠血清的冲洗培养基以 5×10^7 细胞/ml 的浓度重悬成核细胞。4°C 孵育 15 分钟后, 根据制造商操作手册处理细胞悬浮液来富集树突细胞前体(用 StemSep™ 试剂盒)。根据 Pulendran 等(1999, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96 : 1036-1041) 所述方法, 将树突前体细胞在 1000 单位/ml 鼠重组 GM-CSF 中孵育 5 天。根据 Pulendran 等, 1999 年描述的方法使这些细胞成熟。

[0503] 为 CD4+T 细胞富集, 也用 StemSep™ 细胞分离系统根据厂商提供指导步骤操作。简而言之, 处理过程中使用全鼠脾细胞悬浮液。鼠细胞制备时, 用正常大鼠血清阻止与 Fc 受体的非特异性结合。原初 T 细胞纯化时, 先加入特异性生物素化的抗体。样品在冰上孵育 10-30 分后, 加入适当的淋巴细胞富集混合物(如 CD8+, CD19+ 等)(冰上放置 30 分), 而后加入磁性胶体悬浮液(冰上放置 30 分)。孵育过程中, 与四聚抗体结合的多余细胞偶联到磁性珠上。而后将细胞-抗体复合物加到预处理过的分离柱上(内部放有厂商提供的磁石)。用 3X 柱容积液洗脱, 收集含目的细胞群的洗脱液。对多数细胞亚型来说富集细胞的一般纯度为 90-99%。如必要, 回收的富集细胞的纯度在 MCPHahnemann 大学的核心流式细胞仪做 FACS 分析检验。StemSep™ 纯化系统用于处理 1.5×10^{10} 总细胞, 因此可为构建亚型特异性 cDNA 文库提供足够量的细胞。

[0504] 用 Qiagen RNAeasy 小量抽提系统按厂商指导手册提取总细胞 RNA。用 EtBr 染色胶定 RNA 样品量, 且大约 1 微克 RNA 样品用于 cDNA 合成。用 Qiagen Reverse Transcriptase 及寡 T₁₂₋₁₈ 引物按厂商指导手册进行 cDNA 合成。所得 cDNA 作为 PCR 反应模板(用 Sigma 的 Taq DNA 聚合酶), 使用 5-HT 受体特异性的引物。PCR 条件为 95°C 进行 45 秒, 61.5°C 进行 45 秒, 72°C 进行 45 秒。35PCR 循环后在 72°C 延伸 10 分钟。最终 PCR 产物用 3% 琼脂糖胶电泳 (TAE 缓冲)。为进一步鉴定, 可用 PCR 产物进行 DNA 印记杂交, 用放射性标记的受体特异性内部寡核苷酸为探针。

[0505] 从琼脂糖胶中将 PCR 产物转到 HyBond 膜上, 按 Current Protocols In Molecular Biology 所述进行杂交反应。简而言之, 膜用 6XSSC 预封闭, 含 10X Denhardt 溶液、0.5%

SDS、 $1\ \mu\text{g/ml}$ 多聚 A、及 $100\ \mu\text{g/ml}$ 的 SS DNA。每一杂交反应加 20pmol 放射性标记探针，温育过夜 (73°C)。第二天洗去过量探针，且膜用 Kodak 胶片曝光。

[0506] 对于一般 cDNA 文库，一般需要 0.5 到 2 微克总细胞 RNA。从鼠脾细胞回收的 RNA 从 1×10^6 细胞得约 3.5 微克（每 350 微克脾）。一只鼠的脾足以制成一种亚群细胞的 cDNA 文库（因此完成本实验至少需 7-10 只鼠）。

[0507] 在 CD4+ 辅助性 T 细胞的体外活化中测定选择性 5-HT 受体信号的功能依赖性。按上述方法纯化来自 C57BL/6J 小鼠的成熟树突细胞，并用于对 BALBc 鼠衍生的淋巴细胞进行异源刺激。用 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷掺入新合成 DNA 链的多少来测定细胞活化。用 ELISA 检测无细胞组织培养液上清中的 IL-4 及 IL-12 水平 (R&D Systems, 按厂商指导手册操作)。

[0508] 血清素能的激动剂及抑制剂选自制造商 (Tocris Cookson Inc., Ellisville, MI)。在 0 时 (试验开始时) 或 48 小时加入受体特异性的调节物。一般来说，在起始活化信号传递及第一轮细胞分裂之间有 2 天的延迟。本文前面其他部分公开数据表明是在试验 $t = 0$ 或 $t = 48$ 小时加入药物，其对试验结果有本质上不同的影响。测定的药物加入的其他变量为在 0 时加入再在 $t = 2$ 小时后洗去的药物的效用。这对测试许多 5-HT 特异性激动剂是尤为重要的。当延迟接触时大多数激动剂使受体脱敏（导致明显的抑制）。最初检测的药物浓度范围为 0.1、1、10 及 100 微克。

[0509] 收集 BALBc 小鼠 (Jackson Laboratories) 脾以获得 BALBc 淋巴细胞。在旋转培养液中捣碎脾 (RPMI 1640 培养基 (GibcoBRL), 含 2% 胎牛血清 (Sigma)、1% 青霉素-链霉素 (Sigma) 及 1% L-Glu (BioWhittaker)) 以获得单个细胞悬浮液。细胞在 1200RPM 离心 10 分钟，去除上清液。用 ACK 缓冲液 (如 Colligan 等所述, 1999, In: Current Protocols in Immunology, 3.1.3-3.1.5 节) 裂解红细胞 (RBC)。在旋转培养基中重悬剩余细胞，并加载于尼龙毛柱以去除粘附细胞。细胞在柱上 (5% CO_2 , 37°C) 大约孵育 2 小时。用旋转培养液洗脱非粘附细胞，离心，并在致敏 (Sensitization) 培养液 (RPMI 1640 培养液，含 10% 牛血清、1% 青霉素-链霉素及 1% L-Glu, \square -MKE) 中重悬。

[0510] 基本按照 Current Protocols in Immunology (3.12.6-3.12.7 节, 1999) 所述进行混合淋巴细胞反应 (MLR)。也即，用来自 C57/B6J 鼠的富集的成熟的树突细胞作刺激物。用来自 BalbC/BYJ 的原代淋巴细胞作效应器。药物预铺于 96 孔 U 底板。所有实验条件至少测定 3 次。将培养于含 10% FBS 的 RPMI 培养液中的 C57/B6 细胞每孔铺 100,000 个。200,000 个 BalbC/BYJ 细胞铺于刺激细胞之上，使终体积为 200 微升/孔。不含 BalbC 细胞或不含 C57/B6 细胞的做为背景对照。4 天后每孔加入 1microCi 的氚标记脱氧胸腺嘧啶核苷，并于 12 小时后收集。

[0511] 试验所得数据点用 Mann-Whitney U 检验分析，每对数据用 Wilcoxon signed-rank 检验分析，用 JMP Statistics Guide (SAS Institute Inc., Cary, NC) 进行 Student t 检验及 Spearman rho 校正。

[0512] 最终，本文所述试验为体外异源刺激试验所得数据提供了一种验证方法。BALBc 鼠气道高反应性 (AHR) 模型用于检测我们的药物活性。一般来说，用含卵白蛋白 (OVA) 的明矾免疫鼠两个多星期来构建此模型。这样引发原发免疫应答。在应答高峰，用 OVA 喷雾驱动肺中 DC 呈递抗原并将应答转向 Th2- 型应答。鼠一旦被致敏，用

乙酰甲胆碱引发类哮喘应答。

[0513] Ro 04-6790, 一种 6 型 5HT 受体选择性拮抗剂。通过受体介导的信号可正偶联到腺嘌呤环化酶上。因而, 刺激 6 型 5HT 受体导致细胞 cAMP 增加, cAMP 可阻断 T 细胞活化途径。拮抗此信号可缓解该阻断并促进免疫应答。

[0514] 1-(1-萘基)哌嗪为 1 类 5HT 受体的选择性激动剂。这些受体可负偶联到腺嘌呤环化酶上。刺激这些受体可引起细胞中 cAMP 水平的减低, 从而辅助免疫应答。

[0515] 托泊西隆为 3 型 5HT 受体选择性拮抗剂。刺激此受体辅助 Ca²⁺ 流入细胞, 从而推动免疫应答。拮抗此信号能阻碍活化应答。

[0516] WAY 100635 为 1A 型 5HT 受体选择性拮抗剂。如前所述, 1 型受体负偶联于腺嘌呤环化酶。体外, 此药可明显抑制活化应答。此药的抑制作用在活化应答前给药时效果最显著。

[0517] SB 206553 为 2B/2C 型 5HT 选择性拮抗剂。2 型 5HT 受体与蛋白激酶 C 正偶联。本文其他部分公开的体外资料表明在活化应答的任何时刻撤消 2B/2C 型 5HT 信号可引起增殖的即刻停止(不希望受任何理论限制, 其显而易见地是通过诱导程序性细胞死亡的途径起作用)。

[0518] SB 242084 为 2C 型 5HT 受体选择性拮抗剂。选择此化合物来确定阻断 2B 及 2C 型受体而非只阻断 2C 受体是否有任何优势。

[0519] PBS 中的药物以 300 微克/剂量的浓度通过尾静脉注射给药, 该剂量和给药途径基于本文前面其他部分所公开数据而定。一组鼠在给药乙酰甲胆碱前 3 天施用该药, 另一组在给药乙酰甲胆碱 3 小时后施用该药。选择给药时间点以确保给药时 T 细胞已完全活化。理想的是, 去除活化的 T 细胞群会使免疫成分出现功能性缺口。研究主要分为 4 组。前 2 组各由 3 只鼠组成, 作为载体对照。对于药物处理组, 每种药用 5 只鼠, 所以每组各包括 30 只鼠。每组的鼠数目用 Mann-Whitney U 检测分析, 用 Wilcoxon' s signed-rank 检测分析每对数据, 用 JMP Statistics Guide (SAS Institute Inc., Cary, NC) 进行 Student' t 检测及 Spearman' s rho 校正, 以确保数据的统计显著性。

[0520] 按 Brewer 等 (1999, Am.J.Respir.Crit.Care Med.160: 1150-1156) 所述免疫 BALBc 小鼠, 在两周疗程中两次静脉注射含 OVA (10 微克, Sigma Grade III, St.Louis, MO) 及 1mg Al(OH)₃ 的 0.2ml 生理盐水。第二次免疫 7-10 天后, 将鼠暴露于 6% wt/vol 的气雾 OVA (用超声雾化器传输) 中。将鼠每天在气雾变态反应原中每天暴露 60 分钟以形成气管致敏。

[0521] 用于检测多种血清素受体亚型的 RT-PCR 引物在本文其他部分有述, 按本文其他部分所述进行 RT PCR 反应。

[0522] 在未成年孩子中哮喘的发病率及死亡率异常的高。不完全知道哮喘发病的遗传及环境因素。已知 ETS (吸烟环境) 可引起哮喘的早期发病, 是导致哮喘加重的危险因子 (Malveaux 和 Fletcher-Vincent, Environmental Health Perspectives, 1995)。本文公开数据有助与在本领域认可的人类哮喘的鼠模型中研究遗传因素, 此模型与人类哮喘有许多共性, 可用其了解已知的重要基因产物在转导变态反应性信号到淋巴细胞过程中所起的作用, 以及其转导支气管收缩信号到肺平滑肌中所起作用。此哮喘鼠模型系统受小鼠遗传背景影响很大, 并因此可说明此病不论在鼠还是最终在人中的发生都必需的遗传成份。

[0523] 用鼠作为模型系统，可在数种遗传处理的动物中测定暴露于变应原中的变应性及妨碍性后果。所得数据可揭示组胺在变应原敏感最初阶段中的作用，也可揭示组胺在长期二级应答中的作用。考虑到哮喘在儿童中的发病率，例如哮喘现在是贫困城市邻近地区有色人种孩童缺课的主要原因 (Kinney 等, 2002, *Am.J.Public Health*92 : 24-26)，更好的理解变应原致敏初始阶段及后续气管疾病可为药品研制提供新的靶点，或是至少可改进对这类疾病的治疗时机。因为与其他药相比抗组胺药对改性晚期哮喘症状的效用较弱，所以它们对疾病初始期可能比较敏感；最好在可控制遗传操作及诱导摄入的动物模型中研究这些效用。

[0524] 实施例 4：多发性骨髓瘤细胞中与血清素受体相关的凋亡诱导

[0525] 多发性骨髓瘤 (MM) 是美国第二大常见恶性血液病，每年会诊断出 15,000 新病例。此病为渐进性的并通常致死，占恶性白细胞疾病死亡的 15%，占西方国家所有癌症死亡的 2%。尽管多发性骨髓瘤病理生理取得了显著的进展，但此病的分子机制仍不清楚。

[0526] 临床上，多发性骨髓瘤表示为 B- 细胞肿瘤，以恶性浆细胞的骨髓浸润为特征，恶性浆细胞分泌单克隆免疫球蛋白碎片。患者通常表现为多位点溶骨损伤，其后伴有高血钙，因为骨髓瘤细胞既可刺激破骨细胞的骨重吸收又可抑制其重塑。该疾病本身发展分为三个不同阶段：惰性阶段，其中主要为成熟、不增殖的恶性细胞；活性阶段，其中出现少量较少分化的、增生的浆母细胞；和暴发期，其中不成熟浆母细胞的髓外大量增殖。这些不同疾病期的存在支持近期关于多发性骨髓瘤发病机理为逐步恶性转化的理论。

[0527] 事实上几乎所有 MM 病例都可检测到核型改变，易位最常涉及免疫球蛋白重链位点与多种伴侣基因的违规开关重整。此病也涉及癌基因 (c-myc, ras)、肿瘤抑制基因 (p16, p15) 及细胞凋亡调节物 (BCL-2, Fas) 异常表达，因其参与事件的复杂级联过程，所以认为对滤泡中心 B- 细胞向恶性浆母细胞克隆的转化起作用。

[0528] 认为生成骨髓瘤细胞的原初克隆为后发育中心 B- 细胞 (post-germinal center B-cell)。大量高突变重排免疫球蛋白基因的表达表明初始至癌事件的发生在长生浆细胞分化之后或是不干涉正常长生浆细胞分化。多发性骨髓瘤的惊人特性为在疾病的主要病程期内转化的浆母细胞倾向于居留于骨髓中，其中微环境可提供适当的细胞因子 (也即 IL-6 及 IL-10) 及缓慢分裂的肿瘤细胞群的生长及存活所需的粘附分子。然而，在疾病的暴发期，骨髓瘤细胞变为基质非依赖性的，并且其后接着发生浆母细胞的大量髓外增殖。

[0529] MM 是异质性疾病，在生物学、预后、临床过程及个体患者对治疗介入的反应方面都不同。理解导致稳定恶性浆细胞群生成的事件，以及理解驱使细胞群克隆扩增的信号和细胞摆脱基质依赖性成为髓外疾病所需的因素对理解疾病进程的主要机制都是至关重要的。

[0530] 如果 MM 细胞可摆脱基质依赖性且向骨髓外克隆扩增，那么这些细胞必定自身生成生存及扩增所需所有元素。此外，如果这些细胞仍依赖血清素能信号通路，那么 MM 细胞很可能已有能力合成及释放它们自身的血清素。本文公开数据为治疗 MM 患者提供了新的疗法，其中用 5HT 拮抗剂突然性消减 MM 细胞组成型活化所需的重要信号

(血清素能信号), 从而诱导凋亡。

[0531] 总而言之, MM 是成熟(终末分化的)B 细胞的癌性状况。此类 B 细胞正常情况下应存在于循环系统。MM 的特点之一为这些(癌性)B 细胞回到骨髓, 并在那里导致实质性损害。不希望受任何理论的限制, 形成“发育完全的”癌细胞的过程是以断续步骤发生的。当 B 细胞癌在受害个体中形成时, 癌性 B 细胞发育成不依赖其局部环境的存活模式。目前, 除骨髓移植外没有有效治疗 MM 患者的方法。多数患者开始都对皮质类固醇类治疗物(如氟美松)有反应, 但几乎所有案例中, 该病对这些药物形成完全耐药性。多数情况下, 诊断为多发性骨髓瘤就等同于死亡宣言。本文公开的方法研究了该种细胞的生长非依赖性, 并发现细胞周期应答需要经由血清素受体的信号, 因此抑制此信号可使细胞死亡。

[0532] 也即是说, 结合本领域近期进展, 本文其他部分公开数据充分表明免疫及神经系统在进化发育早期相互分开。此外, 免疫相关细胞的活化通路表现为依赖血清素诱导的信号。因此, 这些资料表明, 不希望受任何理论限制, 既然癌细胞不能依赖外源血清素, 那么它们必定会启动合成其自身血清素的机制。已知所有活化和增殖细胞为维持其完整性需依赖生长/活化相关信号的精确性及时限性。突然撤消限速信号, 尤其是癌细胞中的信号, 会引起程序细胞死亡通路(凋亡)的活化。基于本文公开数据, 且不希望受任何理论限制, 三种最可能的限速信号源(因此为三个最可能的靶点)为 5HT₁、5HT₂ 和 / 或 5HT₄ 受体。通过使用这些受体信号的选择性、非竞争性拮抗剂(或拮抗剂的混合剂)来撤消这些信号, 从而可检测对 MM 细胞的效用。

[0533] 以下实验证明多发性骨髓瘤细胞(恶性浆细胞)在体外系统对血清素(5-HT)诱导的信号依赖性。人多发性骨髓瘤细胞系, RPMI8226, 是所用的体外系统。起初, 用评估细胞存活及增殖来监控多种 5-HT 受体调节剂对培养基中 RPMI 8226 细胞的效用。一旦鉴别出影响骨髓瘤细胞系生长及存活的化合物, 即设计实验研究其机制, 由此一些受体调节剂会诱导 RPMI 8226 细胞死亡。具体来说, 分析受影响的细胞的凋亡特性(形态学、DNA 碎片及细胞外磷脂酰丝氨酸表达)。

[0534] 如本文公开数据表明, 已明白骨髓瘤细胞依赖于经由血清素受体的信号。最引人注意的是撤消 1B 型 5-HT 受体信号的功效。当缺少来自 1B 型 5HT 受体信号时, 骨髓瘤细胞发生剧烈的细胞死亡。形态学上, 细胞死亡与传统的凋亡不同, 凋亡时细胞固缩、核凝聚且形成膜泡。反之, 撤消 1B 型 5-HT 信号, 细胞剧烈膨胀、破裂且 3 小时内培养物 100% 死亡。然而, 进一步分析后, 这些细胞显示典型的和 / 或与凋亡相关的特性(如, 核小体间(internucleosomal)DNA 断裂和细胞表面磷脂酰丝氨酸表达)。因而这些数据表明撤消血清素信号经由凋亡和 / 或凋亡样过程介导细胞死亡。

[0535] 细胞系

[0536] 人浆细胞瘤(多发性骨髓瘤)细胞系, RPMI 8226 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) 在 RPMI 1640 培养基上培养, 培养基含 10mM HEPES、1mM 丙酮酸钠、4.5g/L 葡萄糖、1.5g/L 碳酸氢盐及 20% FBS(非热失活的)。

[0537] 细胞增殖测定

[0538] 用三种方法检测细胞增殖 -- 用锥虫蓝排除术定量培养基中存活的细胞数; 用 3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基四唑溴 (MTT) 测定线粒体活性(从而测定细

胞生存力)；用 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷的摄入测定活性 DNA 合成。

[0539] 5-HT 受体调节体外试验

[0540] 测试以下 5-HT 受体调节化合物在指定浓度范围内对体外培养的、具有所述密度并跨所述浓度范围的 RPMI 8226 细胞的效用。

[0541] 表 2

[0542]

化合物	主要作用
WAY 100635	5-HT (1A) 受体拮抗剂
8-OH-DPAT	5-HT (1A) 激动剂
SB 216641	5-HT (1B) 受体拮抗剂
L 694247	5-HT (1B/1D) 受体激动剂
GR 55567	5-HT (1B/1D) 受体拮抗剂
BRL 54443	5-HT (1E/F) 受体激动剂
美西麦角	5-HT (2) 及 5HT (1) 拮抗剂
LY 53857	5-HT (2A/2B/2C) 受体拮抗剂
SB 206553	5-HT (2B/2C) 受体拮抗剂
MDL 11939	5-HT (2A) 受体拮抗剂
SB 242084	5-HT (2C) 受体拮抗剂
DOI	5-HT (2A/2C) 激动剂
RO 046790	5-HT (6) 受体拮抗剂
SB 269970	5-HT (7) 受体拮抗剂
HMBA	诱导细胞终末分化

[0543] DNA 断裂

[0544] 实验处理后用冰冷过的 PBS 洗涤细胞 (8×10^5)，离心沉淀 ($500 \times g$, 5min)。细胞沉淀在冰上用裂解缓冲液 (1% IGEPAL-CA630、20mM EDTA、50mM Tris-HCL、pH 7.5) 孵育 5 分。裂解物在 $1,600 \times g$ 离心 5 分钟。上清加 50 μL 裂解缓冲液。提取物加 1% SDS 并用 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNase A (57°C) 处理 2 小时之后用 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 蛋白酶 K 处理 2 小时 (37°C)。RNA 及蛋白消化后，加入一半体积的 10M 醋酸铵并用 2.5 体积的乙醇沉淀 DNA，用 70% 乙醇洗，空气干燥，并在 TE 缓冲液中溶解。用 1.5% 琼脂糖胶电泳分离 DNA 片段，按 Siegel 等 (1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95: 162-166) 所述步骤进行。

[0545] 流式细胞分析

[0546] 通过共染先前暴露于每一实验条件的细胞检测早期凋亡的细胞。简而言之，按本文其他部分详述的，将细胞在每种试验的或对照的凋亡诱导剂的不同浓度下孵育一段时间。孵育后，用冰冷的 PBS 洗涤细胞、用膜联蛋白 V-Alexa 粉 488 和 PI (Molecular Probes, Eugene, OR) 染色、用双色流式细胞分析仪分析。认为膜联蛋白 V⁺ 及 PI⁺ 细胞被认为是早期凋亡细胞。已知骨髓瘤细胞终末分化剂，HMBA (环六亚甲基-双-乙酰胺) 及拓扑异构酶抑制剂，camtothecin，为凋亡的阳性对照，分别为 5mM 及 2 μM 。

[0547] 用三个独立指标研究 5-HT 受体调节剂对人多发性骨髓瘤细胞系 (RPMI 8266) 的效用。以 4 种不同密度铺板细胞，且再用不同浓度的 LY53587 (2A/2B/2C 型 5-HT 受体的拮抗剂) 处理。用锥虫蓝染料排除术作为鉴定细胞生存力的指标。对应所加药物浓度绘细胞数曲线。

[0548] MTT 还原也是检测细胞生存力的指标 (具体来说为线粒体活性)。而后对应药

物浓度绘 OD₅₇₀ 吸收值曲线。最终用测定 ³H- 脱氧胸腺嘧啶核苷摄入量评测 DNA 合成，并对应药物浓度绘每分计数 (CPM) 曲线。所有三种分析方法都产生清晰的量效曲线。此外，曲线形状不依赖于所用测定方法（也即，在测定药物对细胞群效用的试验中没有一种方法优于其他方法）（见图 19A、19B 及 20A-D）。

[0549] 用 ³H- 脱氧胸腺嘧啶核苷摄入测定 DNA 合成来检测拮抗剂对不同 2 型 5-HT 受体亚型的效用（图 21）。

[0550] 也分析了其他多种 5-HT 受体调节化合物对 RPMI-8226 细胞的效用。用脱氧胸腺嘧啶核苷摄入作为 DNA 合成标记，再次测定细胞增殖。图 22 表示每种 5-HT 受体拮抗剂或激动剂的效果，用相对载体处理的对照的增殖百分比表示。1B 型 5-HT 受体拮抗作用在很宽的浓度范围内对骨髓瘤细胞产生显著的抑制作用。与单独的 1B 型 5-HT 拮抗剂相比，用 1B/1D 型 5-HT 特异性拮抗剂处理细胞，其对细胞生长的抑制效率较低。

[0551] 检测了多种 5-HT 受体激动剂及拮抗剂对人多发性骨髓瘤 RPMI8266 细胞的低剂量滴定（图 23、24 及 25）。如数据所示，低剂量高选择性的 1B 型 5-HT 拮抗剂 (SB216641) 可完全抑制癌细胞的生长。此外，用美赛西平（通用的 1、2、6 及 7 型 5-HTR 拮抗剂）或高选择性 2C 5-HT 拮抗剂 (SB 242084) 可观察到对生长的强效抑制作用。因此，本文公开数据清楚表明可通过选择性撤消 1B 型 5-HT 受体信号或 2C 型 5-HT 受体信号来抑制多发性骨髓瘤细胞的生长。

[0552] 进一步探讨了撤消 5-HT 受体信号如何诱导 RPMI 8266 细胞死亡的机制。具体来说，检测了当 1B/D 型 5-HT 信号撤消时发生的细胞死亡过程中是否存在凋亡的任何特征事件。如锥虫蓝排除细胞计数数据所示，测定了已知诱导 RPMI 8266 细胞系死亡的 5-HT 受体拮抗剂对引起死亡细胞核小体间断裂的能力。

[0553] 实验结果列于图 26 中。本文公开数据表明终末分化物，HMBA（环六亚甲基 - 双 - 乙酰胺）（已知诱导约 30% 的骨髓瘤细胞凋亡）只显示很弱的 DNA 梯。然而，用对 1B/D、2A/B/C 及 2B/C 受体特异性的药物撤消 5-HT 受体信号可产生清晰的 DNA 梯，且用某些化合物在仅 24 小时就可出现。

[0554] 用 5-HT (1A)、5-HT (1B) 及 5-HT (1B/D) 拮抗剂处理后再用膜联蛋白 V 及 PI 共染色的细胞也用来鉴定撤消信号引起的细胞死亡。膜联蛋白 V 与磷脂酰丝氨酸特异性结合，磷脂酰丝氨酸为只在存活的细胞内膜小叶表达的膜脂。然而，凋亡时，磷脂酰丝氨酸不再存在于内膜小叶处，因而可作为凋亡早期事件之一的指标。另一方面，PI 染料只有在膜损伤时才进入胞浆及核，这是细胞凋亡晚期或坏死时才发生的事件。因此，可用双标流式细胞分析来鉴定膜联蛋白⁺但 PI⁻的细胞群，表明此类细胞是由于凋亡至死。

[0555] 本文公开流式细胞分析数据清楚表明在试验时间点当用 (1B) 5-HT 拮抗剂处理 RPMI-8266 细胞时，细胞以剂量和时间依赖的方式发生凋亡，而当使用 (1A) 5-HT 或 (1B/D) 5-HT 特异性拮抗剂处理时却没有此类现象（图 27）。也即，用 1B/D 型拮抗剂对细胞的处理引起膜联蛋白染色细胞的变换。进一步处理表明 PI 染色细胞增加，说明细胞不仅死亡而且还溶解或坏死。

[0556] 本文公开数据（如图 28 及 29）结论性表明撤消多发性骨髓瘤细胞中 1B 型 5-HT 受体信号（图 28）或 2C 型 5-HT 受体信号（图 29）可导致典型细胞凋亡，如显微照片中所示的浓缩及断裂的核染质结构所证明的。结果表明 RPMI-8266 细胞的生长需要通过

5HT(1B) 及 5HT(2C) 两个受体的信号, 用特异性 5HT 受体拮抗剂, 即 SB 242084(2C) 或 SB 216641(1B) 撤消这两受体中任何一种受体信号都诱导程序性细胞死亡, 其效果可与拓扑异构酶 I 抑制剂喜树碱的诱导效果相当。然而, 这两种化合物所诱导凋亡的程度及时间进程都不同。数据表明, 不希望受任何理论限制, 可能这两种血清素受体亚型诱导凋亡的机制不同。

[0557] 本文公开数据充分表明恶性浆细胞依赖于 5-HT 受体传导的信号, 撤消不同受体的信号可产生明显不同的应答。此外, 抑制单一受体的信号与抑制多个受体组合的信号的反应不同。抑制经由恶性浆细胞 5-HT 受体转导的必须信号可作为治疗多发性骨髓瘤的有效方法, 在本发明前本领域还未有对此疾病的有效疗法。

[0558] 此外, 本文其他部分公开数据清楚表明血清素能信号参与或介导多种细胞进程。更具体的, 数据表明阻断 5-HTR1B 或 1B/1D 受体介导细胞系 (RPMI 8226) 的凋亡, RPMI 8226 为本领域认可的多发性骨髓瘤模型。因此, 本发明包括影响细胞进程的方法, 如(但不限于)细胞增殖及凋亡。因为如本文所述, 多种非神经细胞在其表面都有血清素受体, 当从信号传递中阻断对细胞生存关键的血清素能信号时, 细胞受到影响, 最终, 5HTR 信号的减少会导致细胞死亡。

[0559] 因此, 本发明提供通过抑制血清素信号传递(这些信号正常情况下是由细胞表面血清素受体传递的)介导目的靶细胞死亡或抑制其生长的有效方法。相应的, 可用本领域熟知方法和/或本文所授方法来鉴定目的细胞上血清素受体的存在。此外, 如本文在 RPMI 8266 细胞中所示, 可检测是否撤消对细胞的血清素信号会对细胞有害, 而且可用多种血清素信号抑制剂特异性抑制信号, 从而杀死细胞或抑制其功能、生长和/或分裂, 但却不影响其他不表达血清素受体或表达与靶细胞不同的血清素受体的细胞。

[0560] 本文其他部分公开的惊人结果在以前的研究中未曾有提及, 这可能是因为, 不希望受任何理论限制, 以前关于血清素能信号的研究是在神经及/肌肉细胞中进行的, 这些细胞不生长或分裂也不进行细胞周期。尽管用 5-HTR 拮抗剂接触肌肉及神经细胞会介导细胞去极化, 而抑制血清素能信号对细胞周期过程的影响, 包括其影响免疫细胞调节免疫应答, 是完全没有预料、没有先例且从未观察到的。因此, 细胞增殖和/或生存需要经由细胞表面血清素受体的信号的此发现为其中抑制含血清素受体的细胞的生长可有助于治疗的疾病或状况的治疗剂开发提供了一个重要的新工具。

[0561] 实施例 5: 抑制经血清素受体的血清素信号传递所介导的细胞改变的相关试验

[0562] 本文其他部分公开数据首次表明抑制经血清素受体的血清素信号传递可诱导、调节或与细胞可测变化相关。具体来说, 用某些血清素拮抗剂接触细胞可改变细胞形态和/或引起其他物理特性变化, 这可用多种本领域已知方法检测, 包括光学显微镜术。

[0563] 简而言之, 用 5-HTR 拮抗剂(如, 选择性的 1B 型抑制剂, SD 216641)孵育细胞, 24 小时后检测处理效果。可检测到细胞形态变化, 如细胞大小增加(图 30)。这些数据表明可用本领域已知方法或将来出现的方法通过测定细胞形状、形态之类的变化来评定血清素信号的抑制效果。例如, 可用光学设备(电及光学显微镜及荧光活化的细胞分选等)评定对细胞变化的检测, 或是用任何其他设备检测及评定细胞大小、密度、形态之类的改变。这些仪器为本领域所熟知的, 所以不在此处详述。

[0564] 实施例 6: 血清素受体拮抗剂氟奋乃静对细胞增殖、凋亡等的效用

[0565] 如本文其他部分公开数据所示,抑制经由血清素受体的信号传递可在可检测水平改变细胞功能及活性。也即,用血清素受体信号抑制剂接触细胞可改变其生理进程如(但不限于)增殖及凋亡。这些细胞生理进程的变化可用本领域接受的方法识别及测定,如本文公开方法,包括(但不限于)细胞增殖试验、膜联蛋白 V 及 PI 染色、荧光活化的细胞分选、DNA 梯等。

[0566] 如本文其他部分所述,多发性骨髓瘤(MM)是一种致命疾病,目前许多疗法,如皮质类固醇疗法,都无法治愈。骨髓移植是唯一的可存活治疗方法,但象其他所有移植术一样,捐赠者骨髓的可用性及适宜性是其限制因素。如本文公开数据所证明的,用血清素受体拮抗剂氟奋乃静(其为 5-HT(1B/1D)、5-HT(2C)及 D2 血清素受体特异性拮抗剂)处理 MM 细胞可显著的减少 MM 细胞增殖能力,且与不用该化合物接触的对照细胞相比其凋亡率增加。因此,数据证实了一种新方法,可用来抑制含 5-HT(1B/1D)、5-HT(2C)及 D2 型血清素受体细胞的增殖及启动细胞凋亡,此类细胞包括 MM 细胞。另外,此效用有助于调节动物的免疫应答以及治疗瘤形成、移植排斥和自身免疫疾病(如类风湿性关节炎及多发性硬化症)及其他由含 5HT1B/1C 受体的细胞(如 B 和 T 细胞)介导的疾病。

[0567] 氟奋乃静也叫做 Proloxin 或盐酸氟奋乃静,可从 Schering-Plough(Kenilworth, NJ)及 Mylan Laboratories(Pittsburgh, PA)等厂商获得。氟奋乃静最初是做为抗精神病药及拮抗 5-HT(1B/1D)、5-HT(2C)及 D2 血清素受体药销售。

[0568] RPMI-8226 细胞为源于多发性骨髓瘤(MM)患者的细胞系。所有 RPMI-8226 细胞按本文其他部分所述获得并在细胞培养基中增殖。

[0569] 为检测氟奋乃静及其他药物对 RPMI-8266 细胞的抗增殖效用,在多种药物存在或不存在的条件下测定过氘标记脱氧胸腺嘧啶核苷的摄入来评定细胞增殖。简而言之,将 RPMI-8226 细胞铺板并用氟西汀、溴隐亭、丁螺环酮、氯丙嗪、氯氮平、二氢麦角碱甲磺酸盐、非诺多泮甲磺酸盐、氟奋乃静、氟哌啶醇和马来酸甲基麦角新碱在 0.1、1、5、10、25 及 50 μ M 的浓度中处理。细胞培养和药及 3 H-脱氧胸苷的施用如本文其它部分所述

[0570] 实验都重复三次,各数据点取平均值用每分计数(CPM)测定 DNA 合成,而后根据药物浓度绘曲线。如本文公开数据所示,氟奋乃静形成清晰的量效曲线,且 EC_{50} 为 5-10 μ M 时抑制 RPMI-8226 细胞增殖(图 31 和 32)。

[0571] 如下实验证明氟奋乃静对 RPMI-8266 细胞的体外凋亡作用。如本文其他部分所述,可用膜联蛋白 V 和 PI 染色及 DNA 梯分析来鉴定是否血清素受体拮抗剂诱导凋亡。凋亡的两个特征为细胞 DNA 核小体间断裂及细胞表面磷脂酰丝氨酸外化。

[0572] 用本文其他部分所述方法,在所述用氟奋乃静、SB216641(5HT-1BR 拮抗剂)、喜树碱(拓扑异构酶 II 抑制剂;凋亡对照)处理细胞后,从 RPMI-8226 细胞中抽提基因组 DNA。如本文其他部分所述,用本领域熟知凝胶电泳技术检测 DNA 梯程度。与对照细胞提取物相比用 SB216641 及氟奋乃静处理的 RPMI-8226 细胞的 DNA 梯增多(图 35)。

[0573] 如本领域所熟知和如本文其他部分所述,可用膜联蛋白 -V 与细胞表明磷脂的结合来测定凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸的外化。因此,可用测定膜联蛋白 -V 阳性及 PI

染色（坏死细胞）阴性细胞来评估细胞群凋亡程度。细胞如本文其他部分所详述培养及染色，用氟奋乃静在所示浓度及时间处理。凋亡程度通过分析流式细胞数据及生成 FACS 图检测，通过控制使其只包括 PI 阴性细胞（非坏死细胞）。而后测定 PI 阴性细胞中的膜联蛋白-V 阳性细胞水平来测量凋亡（图 34）。数据证明氟奋乃静处理的细胞比其他任何对照细胞群的凋亡程度都明显加大，因而可得结论为用氟奋乃静处理多发性骨髓瘤患者衍生的细胞系 (RPMI-8266) 可通过诱导培养物中程序性细胞死亡来减低细胞增殖能力。

[0574] 如本文公开数据所示，5-HT 受体拮抗剂抑制促细胞分裂剂活化的 T 细胞的增殖。简而言之，按本文其他部分所述方法分离 T 细胞并用 ConA 刺激。用 $5 \mu\text{g/ml}$ ConA 及多种 5-HT 受体拮抗剂和激动剂在指示浓度处理细胞。如本文其他部分所述用氘标记胸腺嘧啶核苷的整合测定细胞增殖。如数据所示，与用其他 5-HT 拮抗剂和激动剂处理相比，用氟奋乃静处理促细胞分裂剂活化的 T 细胞可导致剧烈的且剂量依赖性的增殖减低（图 33）。

[0575] 如本文公开数据所证实的，1B 型 5-HT 受体对 T 细胞活化及瘤性 B 细胞的周期过程都是非常关键的。此外，1B 型 5-HT 受体的信号转导特性与 Akt（也做蛋白激酶 B）活性相关。1B 型 5-HT 受体活化导致 Akt 蛋白的磷酸化。此蛋白的磷酸化形式再磷酸化半胱天冬酶 9 并抑制凋亡应答，也即使诱导细胞存活。撤消 5-HT 1B 信号会关闭 AKT，而允许半胱天冬酶系统导致程序性细胞死亡（图 36）。

[0576] 为证明 1 型 5-HT 选择性拮抗剂 (SB 216641) 对 AKT 磷酸化的作用，检测 AKT 的剂量依赖性抑制作用。用 0、6.25、12.5 及 $25 \mu\text{M}$ 的 SB216641 处理 5×10^6 RPMI-8226 细胞 3 小时。用裂解缓冲液 (1% IGEPAL CA-635、150mM NaCl、20mM Tris-Cl pH 7.4、1mM PMSF、1mM EGTA、1mM NaF、 $1 \mu\text{g/ml}$ 抑肽酶、 $10 \mu\text{g/ml}$ 亮肽酶素、1mM Na₂Ova、5mM BGP) 在冰上裂解细胞 15 分钟，然后离心 10 分钟去除膜碎片。收集上清并用 BioRad Detergent Compatible Kit (Hercules, CA) 测定蛋白浓度。

[0577] 每泳道加 100mg 蛋白，用 4% SDS-PAGE 成层胶及 12% SDS-PAGE 分离胶分离。在转移缓冲液 (25mM Tris、192mM 甘氨酸、20% 甲醇、0.1% SDS) 中将蛋白电转到硝化纤维膜上。用抗磷酸化 Akt 抗体 (NewEngland Biolabs, Beverly, MA) 免疫印记此膜以检测 AKT 活化所需的丝氨酸-473 磷酸化残基并且用增强的化学发光系统显现任何结合的抗体。可测到磷酸化-(ser473)-AKT 的剂量依赖性降低（图 37）。

[0578] 本文公开数据表明在活化 T 细胞或瘤性 B 细胞（如多发性骨髓瘤细胞）中，撤消 1B 型 5-HT 信号就下调 AKT 活性，从而诱导程序性细胞死亡。氟奋乃静，因其对 1B 型 5-HT 受体的效用，可用来启动半胱天冬酶介导的凋亡。

[0579] 数据表明氟奋乃静有多种重要的治疗用途，包括氟奋乃静可有效地抑制促细胞分裂剂活化的 T 细胞，因而可用于治疗自身免疫疾病，如类风湿性关节炎和多发性硬化症；同时它也可用于调节异源移植过程产生的排斥反应。另外，本文公开数据表明多发性骨髓瘤细胞依赖于血清素诱导的信号，并且突然撤消这些信号会诱导程序性细胞死亡。此处所示数据表明氟奋乃静可用于治疗 B 细胞瘤形成，如多发性骨髓瘤。

[0580] 实施例 7：血清素拮抗剂和血脑屏障

[0581] 前面已证明血清素能通路在免疫应答中起到重要作用，且可用抑制多种血清素受体的信号来调节此免疫应答。参见国际公开文本 WO02/078643 及美国专利申请

US2003/0100570A1, 其公开内容在此全文引用。

[0582] 本文公开数据表明血清素能通路存在于淋巴细胞、T 及 B 细胞上, 并完全参与其活化途径。此外, 与 5-HT 受体选择性或非选择性作用的药物可用于治疗性调节活化的 B 及 T 细胞, 并且也可用于控制血液恶性病, 如多发性骨髓瘤 (MM) 及慢性淋巴细胞白血病 (CLL)。

[0583] 基于本文公开数据, 技术人员应理解用于经血清素信号调节 T 和 B 细胞的药物可 (但不必) 穿透血脑屏障来发挥其疗效。此外, 可通过阻止药物穿透血脑屏障来减低或消除由于药物与中枢神经系统 (CNS) 中血清素能通路相互作用而引起的潜在副作用。因此, 本发明包括生产及鉴定化合物的方法, 其抑制血清素受体信号从而影响本文所述多种细胞过程, 其中化合物实质上不穿透血脑屏障, 或是与其他除穿透血脑屏障外相同的化合物相比穿透量要小的多。因此, 本发明包括使用抑制血清素受体信号但不穿透血脑屏障或穿透量很小的化合物来影响本文其他部分更详细论述的多种细胞进程。

[0584] 传统医学化学结构活性相关性研究可用于改造穿透血脑屏障的“亲本”化合物, 从而使改造后的化合物不再穿透屏障, 但仍保留所期望的与相关 5-HT 受体相互作用的能力, 进而产生预期效应。筛选此类新化合物的一种方法为使用平行实验, 包括相关的体外细胞分析 (如 (但不限于) 人多发性骨髓瘤细胞系增殖 / 凋亡读数) 同时包括简单的体内研究以筛选不利 CNS 影响的消除。这些分析及研究在后面详细叙述。

[0585] 为维持和执行其生理功能脑神经元需要一个严格控制的环境。血脑屏障保护大脑组织远离血液中的有害物质, 脑毛细血管内皮的传输过程帮助大脑提供适当的液体环境。“血脑屏障”是一术语, 用来描述脑内毛细血管内皮细胞紧密连接使得仅允许很小的分子或活性转运的分子通过此“屏障”。通常, 血脑屏障对水、二氧化碳、氧及多数脂溶物, 如乙醇, 是高通透性的。该屏障对电解质, 如钠、氯化物及钾可微量透过, 而对血浆蛋白和多数带电的有机分子几乎不可穿透。因此, 血脑屏障常使脑脊液和 / 或脑薄壁组织中的蛋白抗体或带电的药物不可能达到有效浓度。

[0586] 从事药物开发致力于发展血清素能激动剂和拮抗剂的制药公司常屏弃可在 CNS 中不发挥效用的前导化合物, 也即, 它们不穿透血脑屏障。最近一篇 SmithKline Beecham Pharmaceuticals (Bromidge 等, 2000, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 10 : 1863-1866) 发表的医学化学论文阐述了此点。此研究的目的是开发双丙烯醚高选择性 5-HT_{2C} 抑制剂。此研究开发的数种化合物对 2C 受体的亲和力及选择性比还需进一步发展的最新化合物明显更好。然而, 那些屏弃的化合物对 CNS 无效用。尽管这些化合物可能没有抗抑郁或抗焦虑活性, 但他们可作为治疗血液学恶性病的高效免疫调节剂或化疗试剂。也即, 这些“被屏弃”的化合物是潜在的治疗物, 因为他们可抑制 5-HT_{2C} 且更具有不穿透血脑屏障的优势, 因此, 不会引起多余的和 / 或不利的神经精神效用。

[0587] 基于本文公开数据, 本领域技术人员应理解, 有很多调节化合物以影响其穿透血脑屏障能力的方法。例如, 有意减少化合物亲油性是显著降低化合物透过血脑屏障可能性的方法。因此, 人们可对既可在 CNS 发挥效用又对淋巴细胞有抗增值效用的化合物进行改造, 使其 CSN 影响减低而抗增值效用不变或增加。如果治疗目标为对血液学恶性病的免疫调节和生长抑制, 那么减少化合物亲油性可用于选择性减弱或消除 (多余和 / 或不必要的) CNS 影响, 同时选择性地增强期望的疗效。

[0588] 如本文例证, 本文公开数据显示了对氟奋乃静的成功改造。氟奋乃静为 FDA 批准的标准抗精神病药(多余/不必要的 CNS 影响), 近来本文显示它可作为 2C 型 5-HT 受体有效的抑制剂(反向激动剂), 所需的效用(图 38)。本文其他部发公开数据表明氟奋乃静抑制 T 细胞应答, 也抑制多发性骨髓瘤细胞系生长, 并减少从慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 患者的外植骨髓吸取物中的肿瘤细胞负荷。此外, 氟奋乃静为强效镇静剂, 注射针从血管抽出前就可诱使动物睡眠。

[0589] 为测试降低氟奋乃静(也做 ProlixinTM 及 PermitilTM) 亲脂性的功效, 用本领域熟知标准方法合成图 39 所示化合物, 即名为 QSS5 及 QSS12 的化合物。这些化合物用原发异源细胞毒性 T 细胞试验(图 40) 及在两种不同的人多发性骨髓瘤细胞系(图 41A, 41B) 测定分析, 相互比较。也即, 在异源细胞毒性 T 细胞试验起始时施用所述化合物。试验中, 按本领域标准方法用代表完全 MHC 错配的 P815 刺激 BALB/c 鼠脾细胞。根据本领域熟知标准程序将细胞一起孵育 7 天, 并用细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 测试其裂解 P815 靶细胞的能力。公开数据以相对于未处理细胞群的杀伤率表示。

[0590] 本文公开数据表明与其他类似物相比 QSS 12 类似物活性特征明显提高。将每种化合物, 氟奋乃静、QSS 5 及 QSS 12 以 15mg/kg 的量静脉内注射(尾静脉注射)到 BALB/c 鼠中。注射氟奋乃静的鼠立即安静下来(如所预期的)一直睡大约 10 小时。而 QSS 5 和 QSS 12 注射的鼠在 72 小时内观测都没显示任何镇静信号和任何异常行为。

[0591] 仅提高亲本化合物(氟奋乃静)亲脂性不足以提高类似物活性。例如, 本文公开数据显示了多种氟奋乃静衍生物降低细胞增值的功效, 这些细胞源于人多发性骨髓瘤细胞系。具体来说, 如图 41A 所述, 测定了 QSS-5、QSS-12、氟奋乃静、SB216641 及 WAY100635 抑制 RPMI-8226 细胞增值的功效。图表描述了各化合物在所剂量对氘标记脱氧胸腺嘧啶核苷的摄入, 来测定 DNA 合成, 进而表示其增值功效。

[0592] 同样, 图 41B 表示相同的这些化合物通过测定整合氘标记脱氧胸腺嘧啶核苷量(用来测定 DNA 合成)来检测其对 U266 细胞增值的功效。图表显示多种剂量(以 μ M 为单位)。

[0593] 此外, 图 43 表示具有不同修饰的系列氟奋乃静类似物对细胞增值的效用。图 42 描述了多种吩噻嗪 QSS 系列化合物的结构。在 ARH 细胞(也是衍生于人多发性骨髓瘤的细胞系)中检测这些类似物。数据显示氟奋乃静的磺酸衍生物(QSS1)及乙醇盐衍生物(QSS3)活性丧失, 也即与氟奋乃静相比失去抑制多发性骨髓瘤细胞生长的能力。尽管磺酸盐衍生物(QSS6)保留一些活性, 但 QSS5 不仅保留活性而且与氟奋乃静相比活性明显增强。

[0594] 通过增强化合物相对于亲本化合物的极性来合成 QSS 系列化合物以缓和或消除氟奋乃静的体内主要副作用。也即, 在亲本氟奋乃静的基础上改造这些类似物, 减低对血脑屏障的通透性, 但仍保留氟奋乃静对血清素受体的抑制活性。分析 QSS5 及 QSS6 两者在体内的即刻“睡眠”效应。两者都不诱导即刻睡眠, 并且施用 15mg/kg 剂量后 24 小时内也无其他明显反应。QSS6 对鼠的普通协调有轻微效应。

[0595] 尽管氟奋乃静与血清素受体有交叉反应性, 但它最初开发为多巴胺拮抗剂。用计算化学/分子模拟技术将 QSS 系列化合物与血清素与多巴胺相比较, 发现 QSS5 化合物因其加入的氨基(模拟血清素所含氨基)与血清素最相似。即, 图 44 为血清素、多巴

胺及 QSS5 的分子模型图。CPK 模型表示分子，展示多种分子范德华半径的相应大小和位置。计算机模型表明 QSS 5 更类似血清素而不是多巴胺。本文其他部发公开体外数据与此模型一致。

[0596] 因此，本文公开数据说明了成功改性血清素抑制剂（如氟奋乃静）以降低其对血脑屏障的通透性而同时该改性的化合物还保留了抑制通过特异性血清素受体（如 5HT_{2C} 受体）信号的能力。技术人员应理解可用不论是本领域熟知方法还是将来出现的方法来改性其他目的血清素抑制剂以类似地降低其穿透血脑屏障的能力而保留或提高其抑制受体血清素信号传递的功能。

[0597] 在此所引用的各专利、专利申请、和公开文本在此都全文作为参考引用。

[0598] 尽管本文参考具体实施方案进行公开，但很明显本领域技术人员可不偏离本发明的精神及范围而构建其他的实施方案或本发明方案的变体。附加的权利要求书包括所有这些实施方案及等效变体。

[0599] 本申请还涉及如下 93 个项目：

[0600] 1. 调节哺乳动物免疫应答的方法，该方法包括给所述哺乳动物施用有效量的抑制剂，该抑制剂抑制血清素与血清素受体间的相互作用，从而调节该哺乳动物中的所述免疫应答。

[0601] 2. 项目 1 的方法，其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0602] 3. 项目 2 的方法，其中所述抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂、选择性的 4 型血清素受体拮抗剂和选择性的 6 型血清素受体拮抗剂。

[0603] 4. 项目 3 的方法，其中所述抑制剂为血清素受体拮抗剂，其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB 242084、MDL 11939、SB 216641 和美赛西平。

[0604] 5. 项目 4 的方法，其中所述抑制剂为氟奋乃静。

[0605] 6. 项目 3 的方法，其中所述抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0606] 7. 项目 2 的方法，其中所述抑制剂经改性使之实质上不透血脑屏障。

[0607] 8. 项目 7 的方法，其中所述改性的抑制剂为该抑制剂的吩噻嗪衍生物。

[0608] 9. 项目 8 的方法，其中所述抑制剂为氟奋乃静且所述氟奋乃静的所述吩噻嗪衍生物选自 QSS-5 和 QSS-12。

[0609] 10. 抑制哺乳动物免疫应答的方法，该方法包括给哺乳动物施用免疫应答抑制量的抑制剂，该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用，从而抑制该哺乳动物中的所述免疫应答。

[0610] 11. 项目 10 的方法，其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0611] 12. 项目 10 的方法，其中所述抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂、选择性的 4 型血清素受体拮抗剂和选择性的 6 型血清素受体拮抗剂。

[0612] 13. 项目 12 的方法，其中所述抑制剂为血清素受体拮抗剂，其选自利哌酮、氟奋

乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB 242084、MDL 11939、SB 216641 和美赛西平。

[0613] 14. 项目 13 的方法，其中所述抑制剂为氟奋乃静。

[0614] 15. 项目 10 的方法，其中所述抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0615] 16. 项目 12 的方法，其中所述抑制剂经改性而使之实质上不穿透血脑屏障。

[0616] 17. 项目 16 的方法，其中所述改性的抑制剂为该抑制剂的吩噻嗪衍生物。

[0617] 18. 项目 17 的方法，其中所述抑制剂为氟奋乃静且所述氟奋乃静的所述吩噻嗪衍生物选自 QSS-5 和 QSS-12。

[0618] 19. 抑制免疫细胞的免疫反应的方法，该方法包括抑制由所述细胞上的血清素受体传递的血清素信号，其中抑制该信号就抑制所述细胞活化，而且其中所述抑制血清素信号包括用有效量的抑制血清素与血清素受体相互作用的抑制剂接触免疫细胞，从而抑制该细胞的所述免疫反应。

[0619] 20. 项目 19 的方法，其中所述免疫细胞选自 T 细胞和 B 细胞。

[0620] 21. 项目 19 的方法，其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0621] 22. 项目 21 的方法，其中所述抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂、选择性的 4 型血清素受体拮抗剂和选择性的 6 型血清素受体拮抗剂。

[0622] 23. 项目 22 的方法，其中所述抑制剂为血清素受体拮抗剂，其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB242084、MDL 11939、SB 216641 和美赛西平。

[0623] 24. 项目 23 的方法，其中所述抑制剂为氟奋乃静。

[0624] 25. 项目 19 的方法，其中所述抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0625] 26. 项目 22 的方法，其中所述抑制剂经改性而使之实质上不穿透血脑屏障。

[0626] 27. 项目 26 的方法，其中所述改性后的抑制剂为该抑制剂的吩噻嗪衍生物。

[0627] 28. 项目 27 的方法，其中所述抑制剂为氟奋乃静且所述氟奋乃静的所述吩噻嗪衍生物选自 QSS-5 和 QSS-12。

[0628] 29. 在患有自身免疫疾病的哺乳动物中调节免疫应答的方法，所述疾病由被血清素信号活化的免疫细胞所介导，该方法包括给所述哺乳动物施用有效量的抑制剂，该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用，从而调节该哺乳动物中的所述免疫应答。

[0629] 30. 项目 29 的方法，其中所述抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0630] 31. 项目 29 的方法，其中所述抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0631] 32. 项目 31 的方法，其中所述抑制剂为血清素受体拮抗剂，其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB242084 和 MDL 11939。

[0632] 33. 项目 29 的方法，其中所述自身免疫疾病选自重症肌无力、特发性炎症肌病、慢性嗜中性白血球减少症、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血综合症、抗磷脂抗体综合症、炎症肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、心肌炎、

Gillian-Barre 综合症、血管炎、多发性硬化症、视神经脊髓炎 (Devic 综合症)、淋巴细胞性垂体炎、格雷夫斯病、爱迪生病、甲状旁腺功能减退症、一型糖尿病、系统性红斑狼疮、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、牛皮癣、银屑病关节炎、子宫内膜异位、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性勃起障碍、结节病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性耳聋、斯耶格伦病、自身免疫性色素层视网膜炎、间质性膀胱炎、肺出血肾炎综合症及纤维肌痛。

[0633] 34. 项目 29 的方法, 其中所述调节作用为抑制作用。

[0634] 35. 抑制哺乳动物免疫应答的方法, 其中所述免疫应答是由 T 细胞上的血清素受体活化所介导的, 该方法包括用有效量的抑制剂接触所述的 T 细胞, 该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用, 从而抑制所述哺乳动物中的所述免疫应答。

[0635] 36. 项目 35 的方法, 该方法进一步包括以快速注射施用该抑制剂。

[0636] 37. 项目 35 的方法, 其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体和 2C 型血清素受体。

[0637] 38. 项目 37 的方法, 其中所述抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0638] 39. 项目 38 的方法, 其中所述抑制剂为血清素受体拮抗剂, 其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB242084 和 MDL 11939。

[0639] 40. 项目 38 的方法, 其中所述抑制剂实质上不透透血脑屏障。

[0640] 41. 抑制哺乳动物免疫细胞活化的方法, 其中所述活化是指由该免疫细胞上血清素受体活化所介导的, 该方法包括给所述哺乳动物施用有效量的抑制剂, 该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用, 从而抑制所述免疫细胞的活化。

[0641] 42. 项目 41 的方法, 其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体和 2C 型血清素受体。

[0642] 43. 项目 42 的方法, 其中所述抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0643] 44. 项目 43 的方法, 其中所述抑制剂为血清素受体拮抗剂, 其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB242084 和 MDL 11939。

[0644] 45. 项目 44 的方法, 其中所述抑制剂实质上不透透血脑屏障。

[0645] 46. 抑制哺乳动物二级免疫应答的方法, 该方法包括给所述哺乳动物施用有效量的抑制剂, 该抑制剂抑制血清素与血清素受体间的相互作用, 从而抑制该哺乳动物中的所述二级免疫应答。

[0646] 47. 项目 46 的方法, 其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体和 2C 型血清素受体。

[0647] 48. 项目 47 的方法, 其中所述抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0648] 49. 项目 48 的方法, 其中所述抑制剂为血清素受体拮抗剂, 其选自利哌酮、氟奋乃静、酮色林、米安色林、LY 53857、SB 206553、SB242084 和 MDL 11939。

[0649] 50. 项目 49 的方法, 其中所述抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0650] 51. 治疗哺乳动物由细胞介导的疾病的方法, 其中所述细胞需要经由血清素受体的血清素信号传递, 该方法包括抑制所述细胞中的血清素与血清素受体的相互作用, 其中该抑制对此细胞是有害的使得该细胞不介导所述疾病。

[0651] 52. 项目 51 的方法, 其中用抑制血清素与血清素受体相互作用的抑制剂接触细胞来介导所述对血清素相互作用的抑制。

[0652] 53. 项目 52 的方法, 其中所述血清素受体选自 1 型血清素受体、2 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0653] 54. 项目 53 的方法, 其中所述自身免疫疾病选自多发性骨髓瘤、重症肌无力、特发性炎症肌病、慢性嗜中性白血球减少症、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血综合症、抗磷脂抗体综合症、炎症肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、心肌炎、Gilliam-Barre 综合症、血管炎、多发性硬化症、视神经脊髓炎 (Devic 综合症)、淋巴细胞性垂体炎、格雷夫斯病、爱迪生病、甲状旁腺功能减退症、一型糖尿病、系统性红斑狼疮、寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮、牛皮癣、银屑病关节炎、子宫内膜异位、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性勃起障碍、结节病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性耳聋、斯耶格伦病、自身免疫性色素层视网膜炎、间质性膀胱炎、肺出血肾炎综合症及纤维肌痛。

[0654] 55. 项目 54 的方法, 其中所述血清素受体为 1B 型血清素受体而且所述疾病为多发性骨髓瘤。

[0655] 56. 项目 55 的方法, 其中所述抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0656] 57. 诱导细胞凋亡的方法, 该方法包括抑制所述细胞中经由血清素受体的血清素信号传递, 其中所述抑制诱导凋亡, 而且其中所述抑制该细胞上血清素与血清素受体的相互作用包括用有效量的抑制剂接触该细胞, 该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用, 从而诱导所述细胞的凋亡。

[0657] 58. 项目 57 的方法, 其中所述抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0658] 59. 诱导细胞死亡的方法, 该方法包括抑制所述细胞上经由血清素受体的血清素信号传递, 其中该抑制诱导该细胞死亡, 而且其中所述抑制包括用有效量的抑制剂接触该细胞, 该抑制剂抑制血清素与所述血清素受体的相互作用, 从而诱导所述细胞的死亡。

[0659] 60. 项目 59 的方法, 其中所述抑制剂实质上不透血脑屏障。

[0660] 61. 鉴别用于治疗哺乳动物自身免疫疾病的化合物的方法, 该方法包括用待侧化合物接触血清素受体, 并将同该化合物接触的所述血清素受体与血清素的结合水平与其他方面相同只是不与此化合物接触的血清素受体与血清素的结合水平相比较, 其中同该化合物接触的所述血清素受体与血清素的结合水平低于其他方面相同只是不与此化合物接触的血清素受体与血清素的结合水平表示此化合物可用于治疗该哺乳动物中所述自身免疫疾病。

[0661] 62. 项目 61 的方法, 其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0662] 63. 用项目 61 的方法鉴定出的化合物。

[0663] 64. 项目 62 的方法, 该方法进一步包括评估所述化合物穿透血脑屏障的能力并选择实质上不穿透血脑屏障的化合物。

[0664] 65. 用项目 64 的方法鉴定出的化合物。

[0665] 66. 项目 65 的化合物, 其中所述化合物选自 QSS-5 和 QSS-12。

[0666] 67. 鉴别用于治疗哺乳动物异源移植应答的化合物的方法, 该方法包括用待侧化合物接触血清素受体, 并将同该化合物接触的所述血清素受体与血清素的结合水平与其他方面相同只是不与此化合物接触的血清素受体与血清素的结合水平相比较, 其中同该化合物接触的所述血清素受体与血清素的结合水平低于其他方面相同只是不与此化合物接触的血清素受体与血清素的结合水平表示此化合物可用于治疗该哺乳动物的所述异源移植应答。

[0667] 68. 项目 67 的方法, 其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0668] 69. 用项目 67 的方法鉴定出的化合物。

[0669] 70. 项目 67 的方法, 该方法进一步包括评估该化合物穿透血脑屏障的能力且选用实质上不穿透血脑屏障的化合物。

[0670] 71. 用项目 70 的方法鉴定出的化合物。

[0671] 72. 项目 67 的方法, 该方法包括改性所鉴定的化合物使之实质上不穿透血脑屏障。

[0672] 73. 鉴定用于抑制 T 细胞活化的化合物的方法, 其中所述活化是由血清素与该 T 细胞上血清素受体结合介导的, 该方法包括用待侧化合物接触 T 细胞, 并将同该化合物接触的所述血清素受体与血清素的结合水平与其他方面相同只是不与此化合物接触的血清素受体与血清素的结合水平相比较, 其中同该化合物接触的所述血清素受体与血清素的结合水平低于其他方面相同只是不与此化合物接触的血清素受体与血清素的结合水平表示此化合物可用于抑制 T 细胞活化, 其上所述活化是由血清素与此 T 细胞中 2 型血清素受体结合所介导的。

[0673] 74. 项目 73 的方法, 该方法进一步包括评估该化合物穿透血脑屏障的能力且选用实质上不穿透血脑屏障的化合物。

[0674] 75. 用项目 73 的方法鉴定出的化合物。

[0675] 76. 项目 73 的方法, 该方法包括改性所鉴定的化合物使之实质上不穿透血脑屏障。

[0676] 77. 鉴定影响经由细胞上血清素受体的信号传递的化合物的方法, 该方法包括用化合物接触细胞, 并将该细胞形态与接触此化合物前的形态相比较, 评估任何变化, 其中与接触该化合物前的所述细胞的所述形态相比接触所述化合物的所述细胞在所述形态上的改变表示该化合物影响经由该细胞上血清素受体的信号传递, 从而鉴定出影响经由细胞上血清素受体信号传递的化合物。

[0677] 78. 用项目 77 的方法鉴定出的化合物。

[0678] 79. 项目 77 的方法, 该方法包括改性所鉴定的化合物使之实质上不穿透血脑屏障。

[0679] 80. 用项目 79 的方法鉴定出的化合物。

[0680] 81. 影响细胞中细胞周期过程的方法，该方法包括抑制经由所述细胞上血清素受体的信号传递，而且其中所述抑制经由所述细胞上血清素受体的信号传递包括用有效量的抑制剂接触该细胞，该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用，从而影响细胞周期过程。

[0681] 82. 项目 81 的方法，其中所述抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0682] 83. 影响表达血清素受体的细胞凋亡的方法，该方法包括抑制经由所述受体的信号传递，而且其中所述抑制包括用有效量的抑制剂接触该细胞，该抑制剂抑制血清素与血清素受体的相互作用，从而影响该细胞的凋亡。

[0683] 84. 项目 83 的方法，其中所述抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0684] 85. 诱导表达血清素受体的细胞凋亡的方法，该方法包括抑制经由该受体的信号传递，从而诱导该细胞的凋亡。

[0685] 86. 用于调节哺乳动物免疫应答的试剂盒，该试剂盒包括有效量的抑制血清素与血清素受体相互作用的抑制剂，该试剂盒进一步包括用药器及其使用说明书材料。

[0686] 87. 项目 86 的试剂盒，其中所述血清素受体选自 1B 型血清素受体、2A 型血清素受体、2B 型血清素受体、2C 型血清素受体、4 型血清素受体和 6 型血清素受体。

[0687] 88. 项目 87 的试剂盒，其中所述抑制剂选自选择性的 1B 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2A 型血清素受体拮抗剂、选择性的 2B 型血清素受体拮抗剂和选择性的 2C 型血清素受体拮抗剂。

[0688] 89. 项目 88 的试剂盒，其中所述抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0689] 90. 影响表达血清素受体的细胞的细胞周期进程的试剂盒，该试剂盒包括有效量的抑制血清素与血清素受体相互作用的抑制剂，该试剂盒进一步包括用药器及其使用说明书材料。

[0690] 91. 项目 90 的试剂盒，其中所述抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

[0691] 92. 诱导表达血清素受体的细胞凋亡的试剂盒，该试剂盒包括有效量的抑制血清素与血清素受体相互作用的抑制剂，该试剂盒进一步包括用药器及其使用说明书材料。

[0692] 93. 项目 92 的试剂盒，其中所述抑制剂实质上不穿透血脑屏障。

读出鼠 MLR (C57BL6 vs. BALB/c)

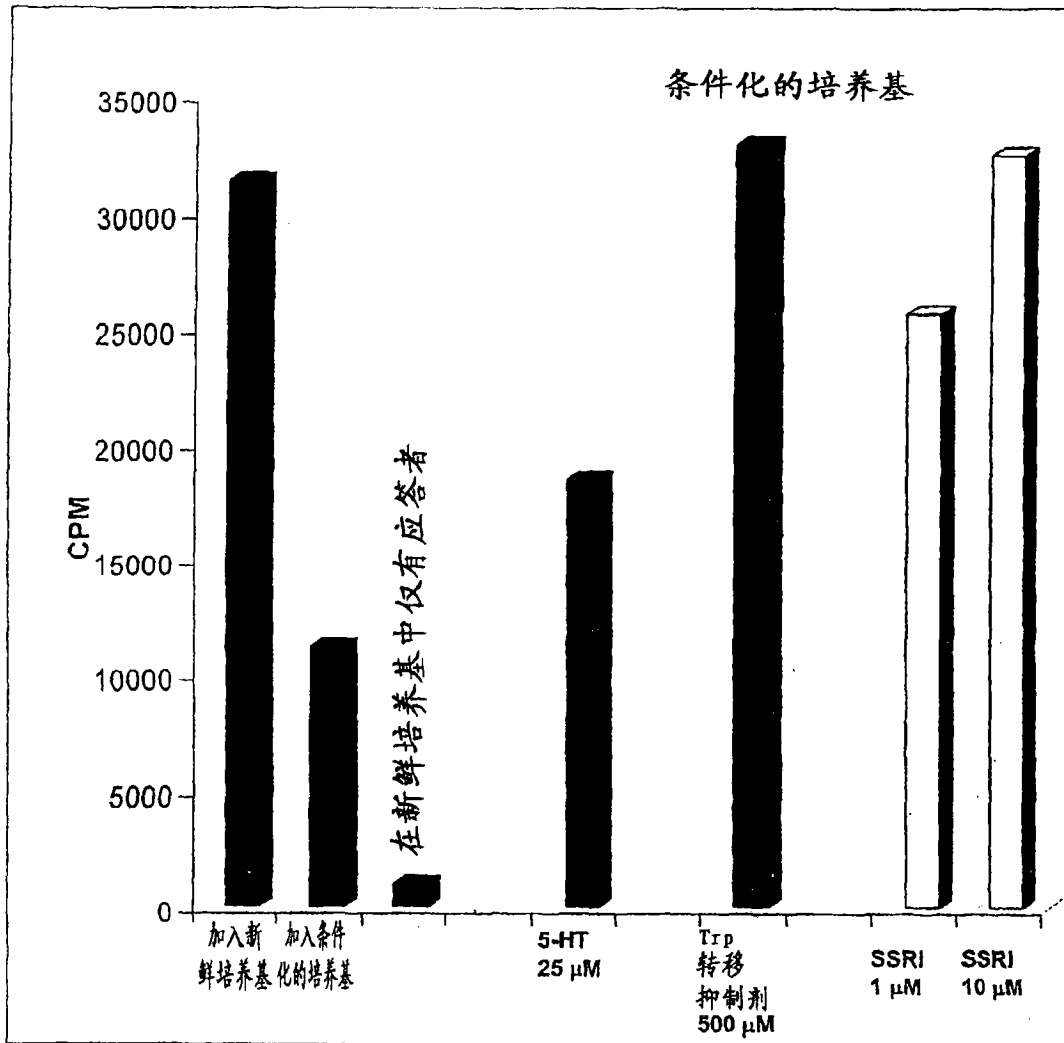


图 1

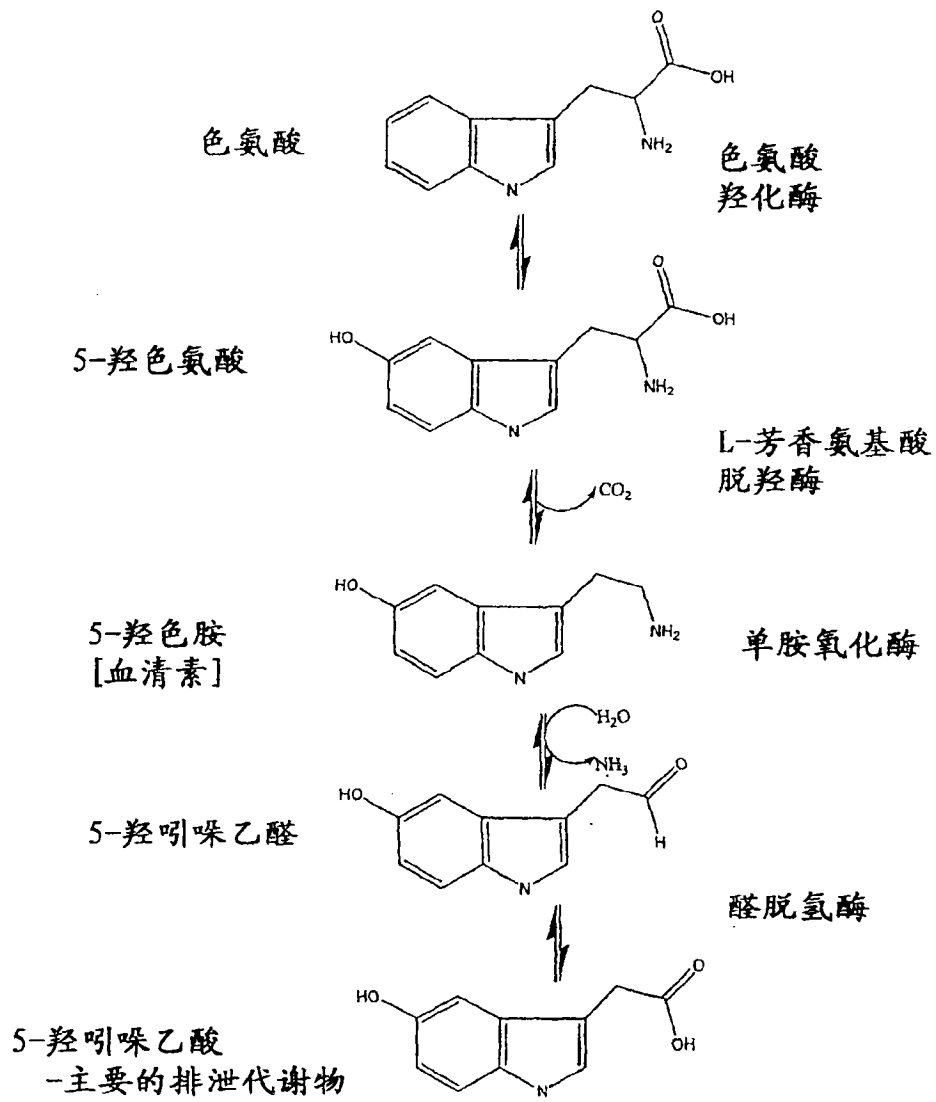


图 2

ConA 刺激 (人)

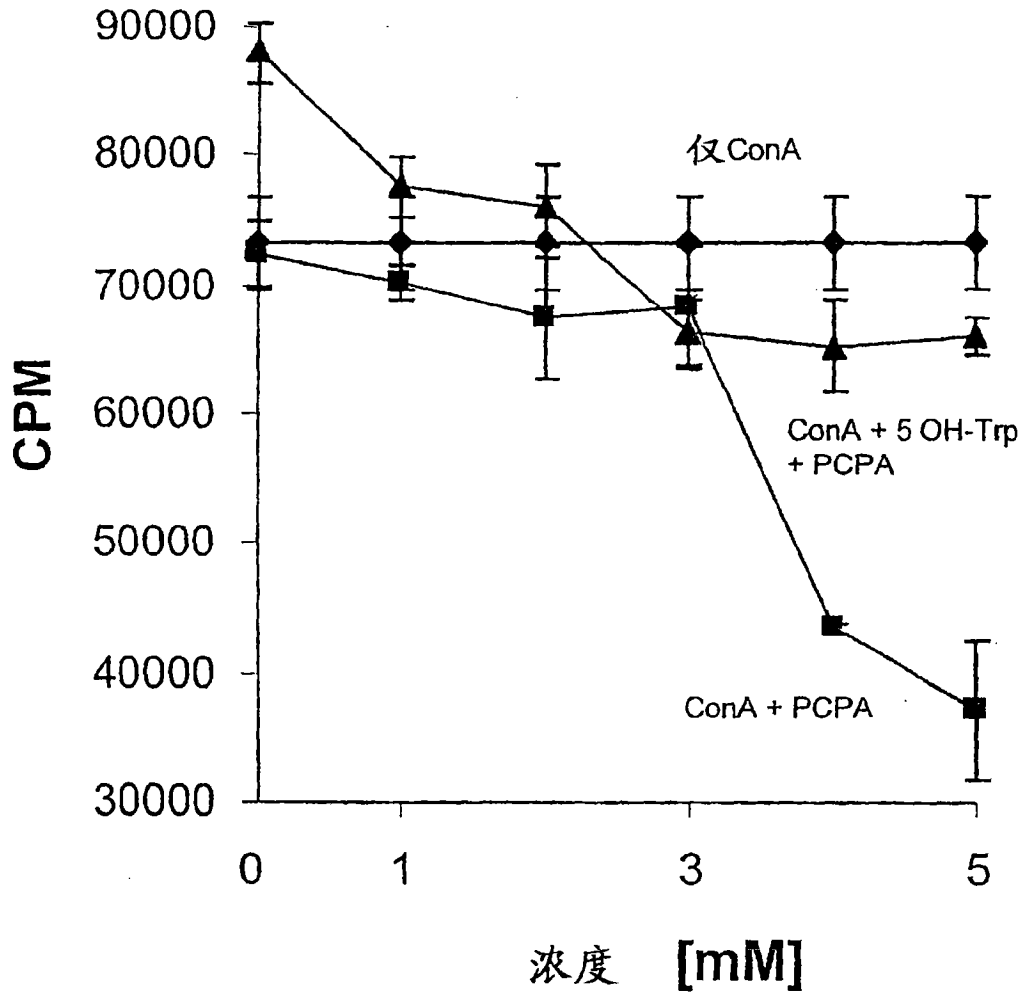


图 3

ConA刺激的时间滴定($\mu\text{g/ml}$)

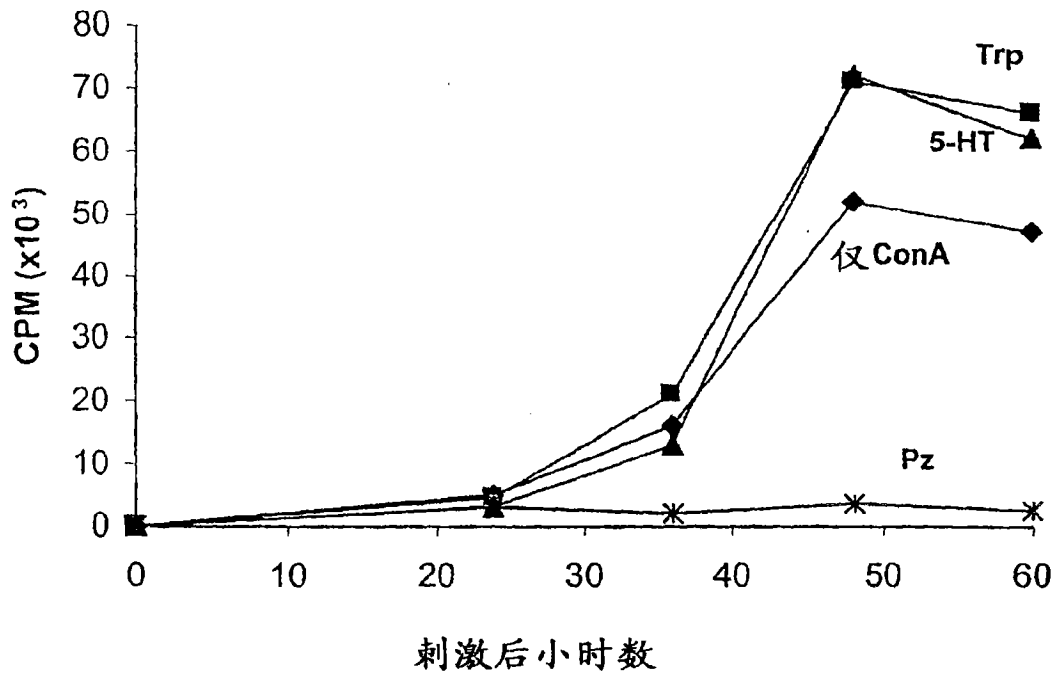


图 4

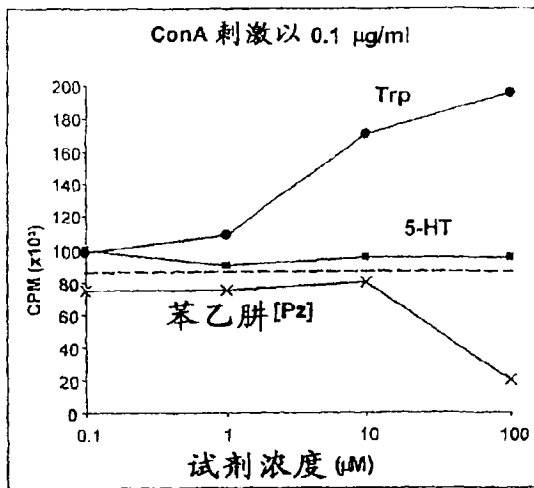


图 5A

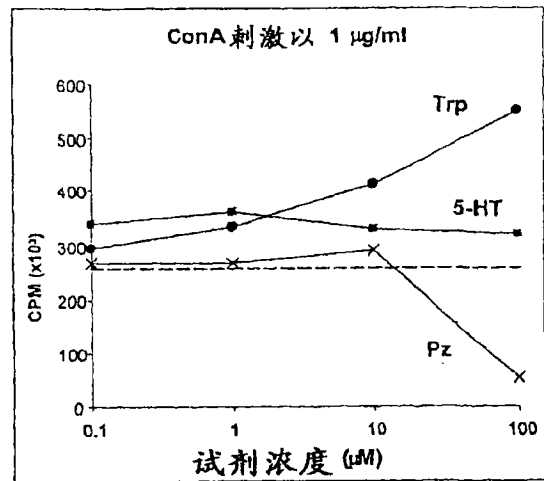


图 5B

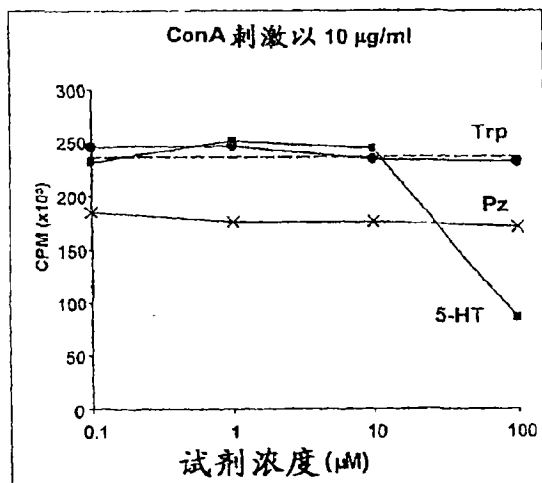


图 5C

conA刺激(1μg/ml),在72小时收获

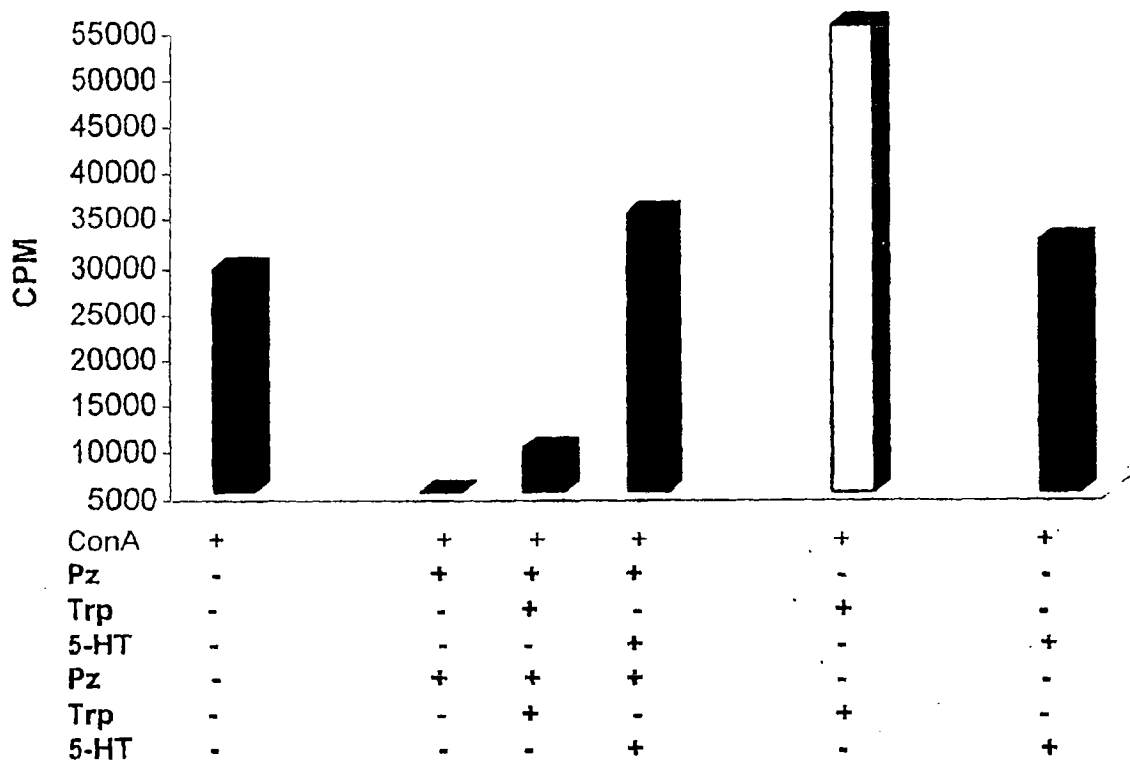


图 6

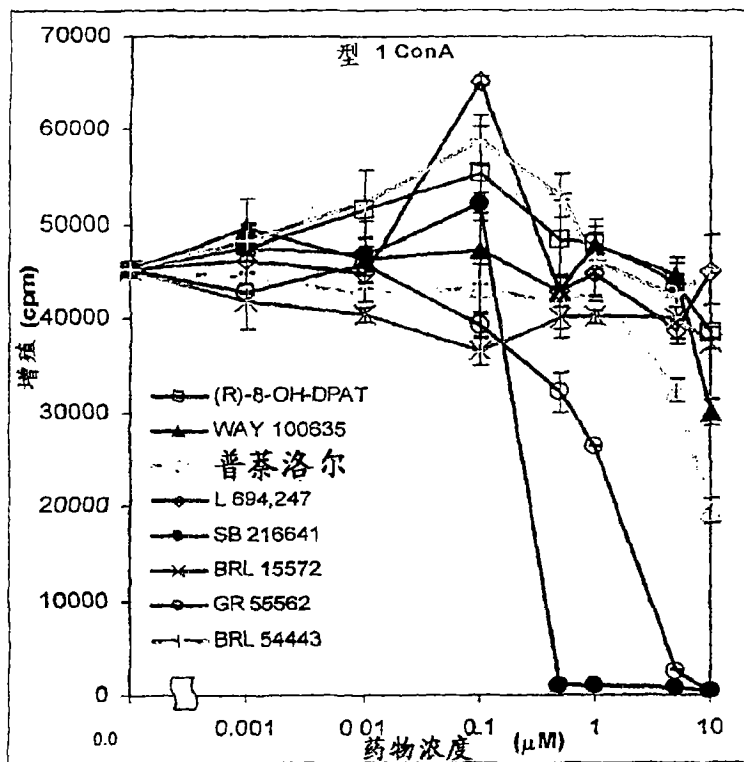


图 7A

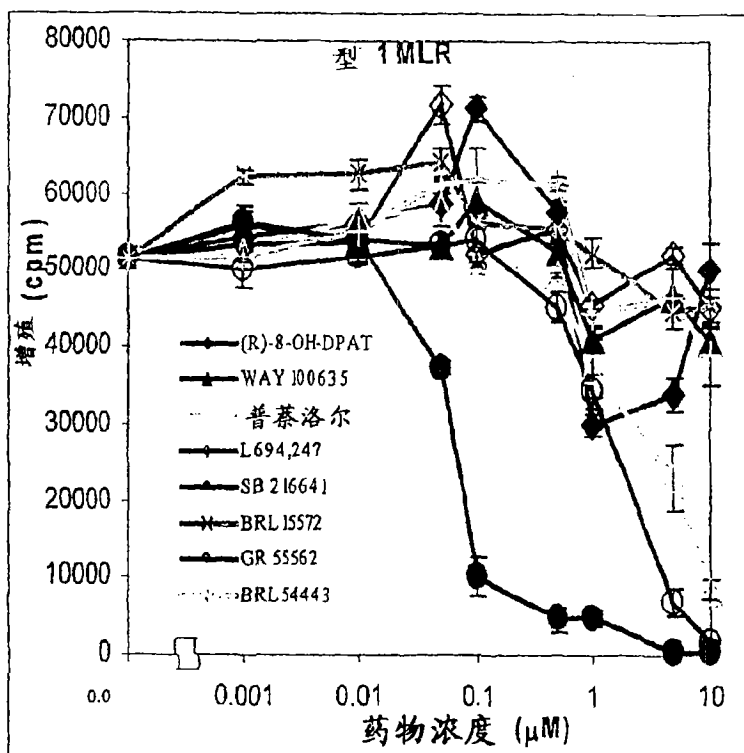


图 7B

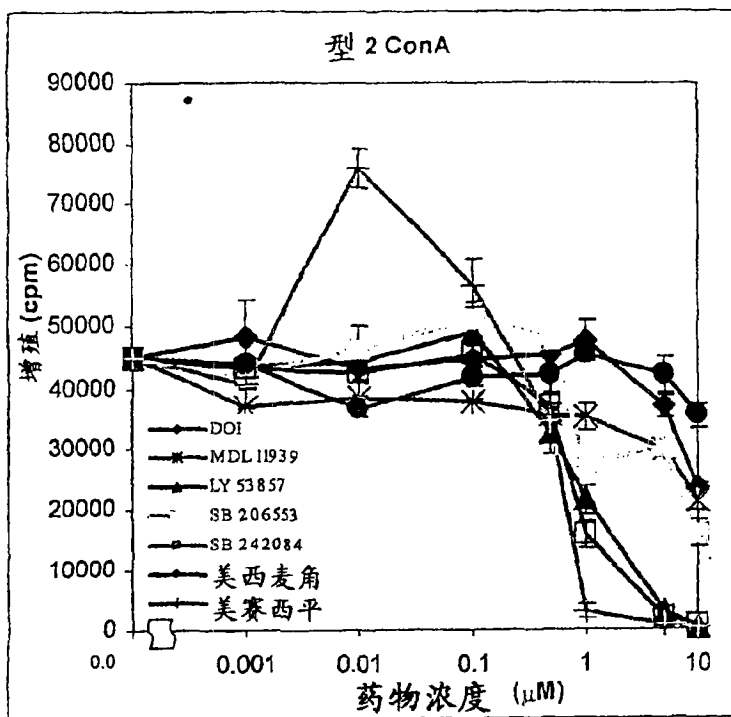


图 8A

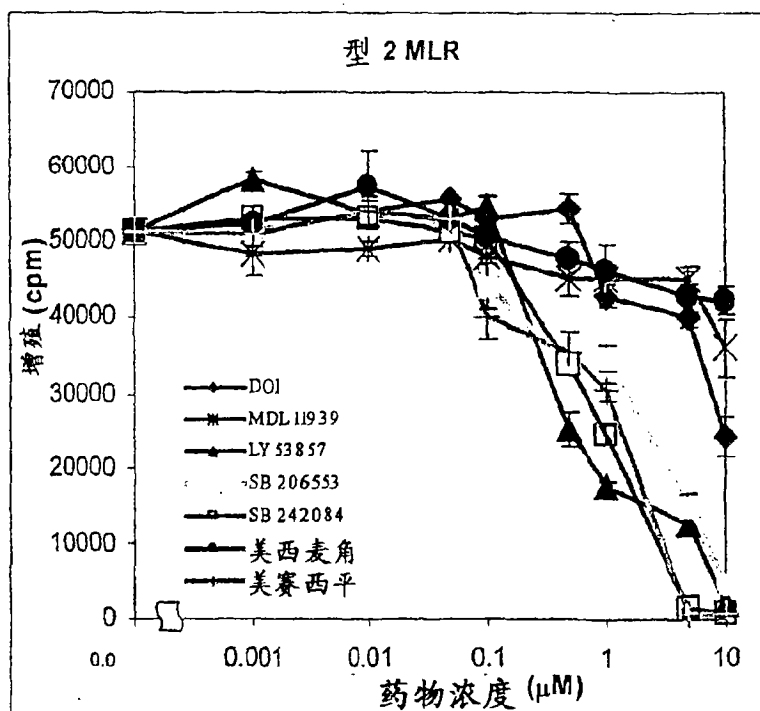


图 8B

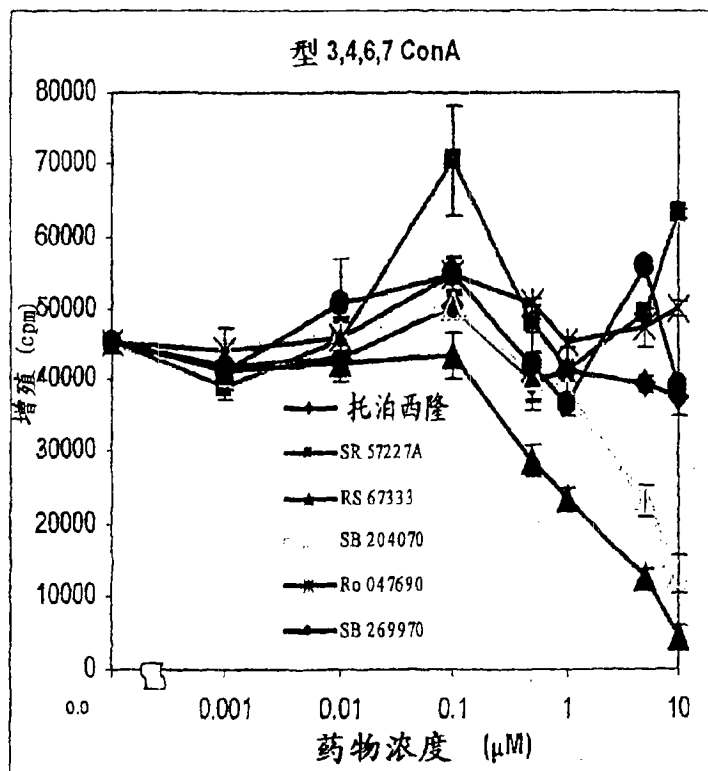


图 9A

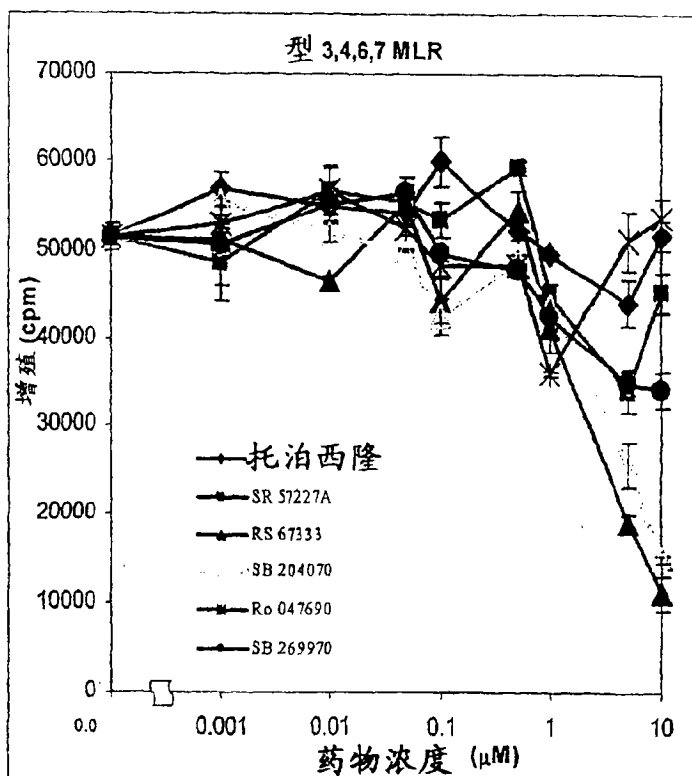


图 9B

鼠 MLR

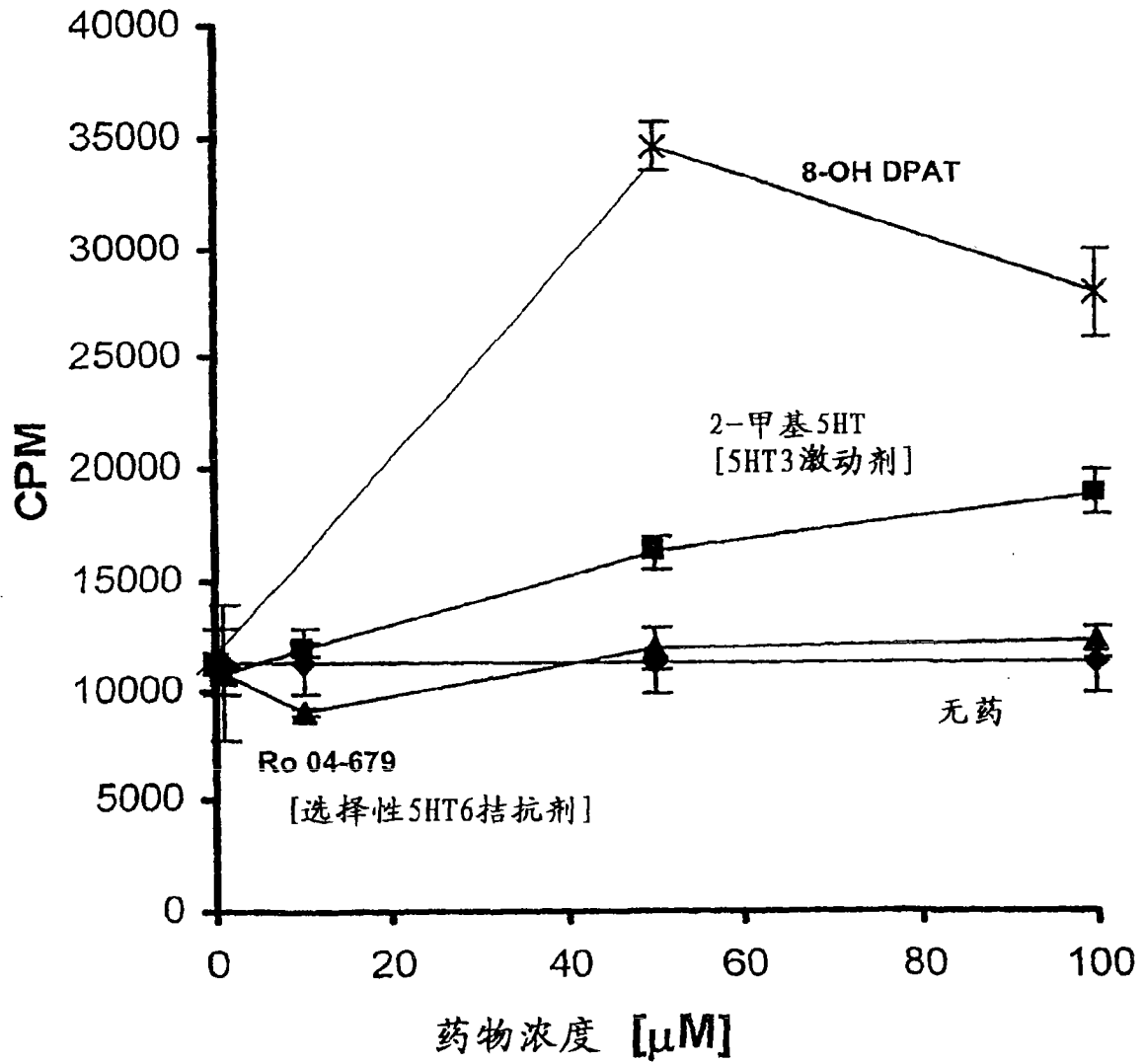


图 10

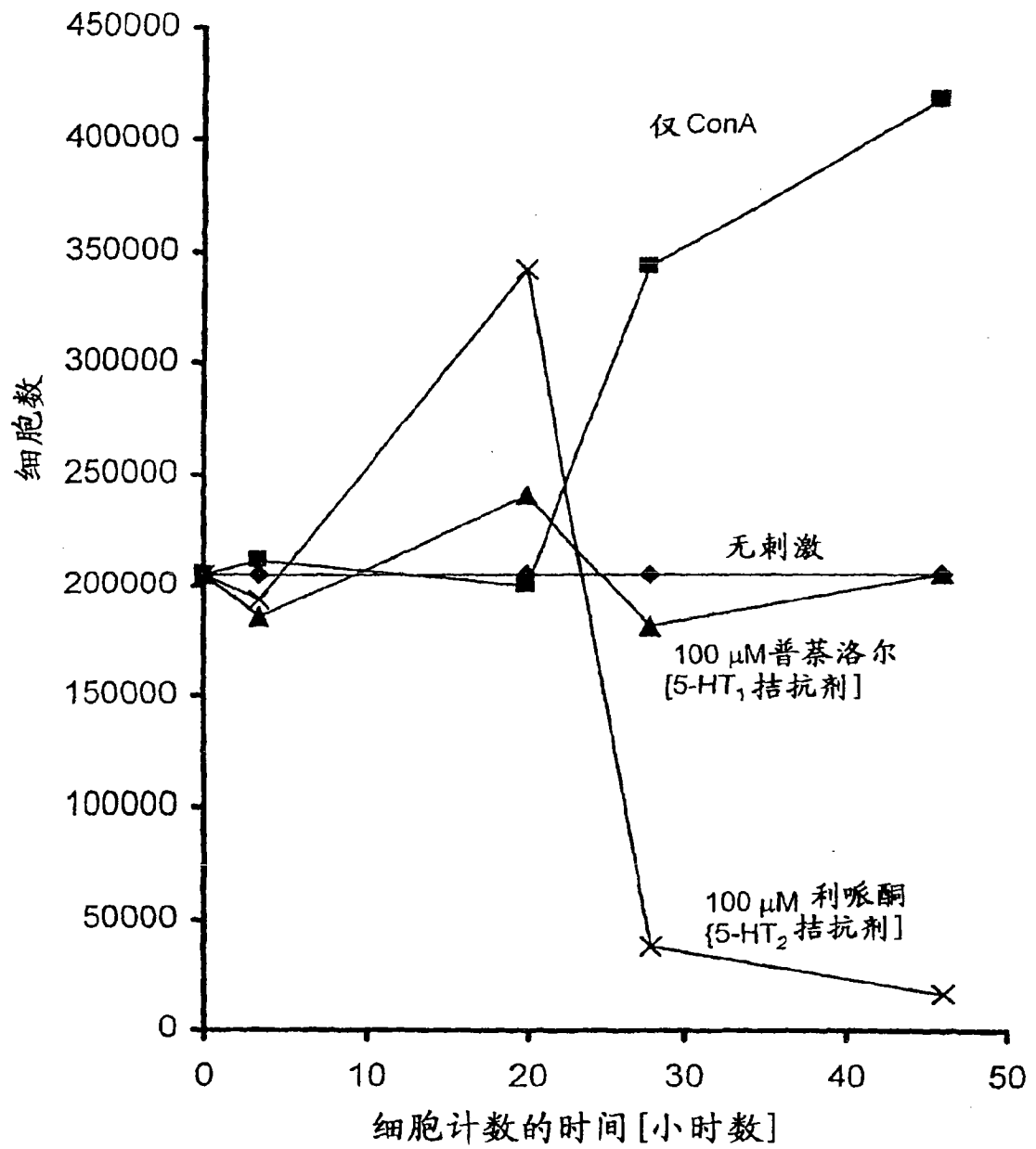


图 11

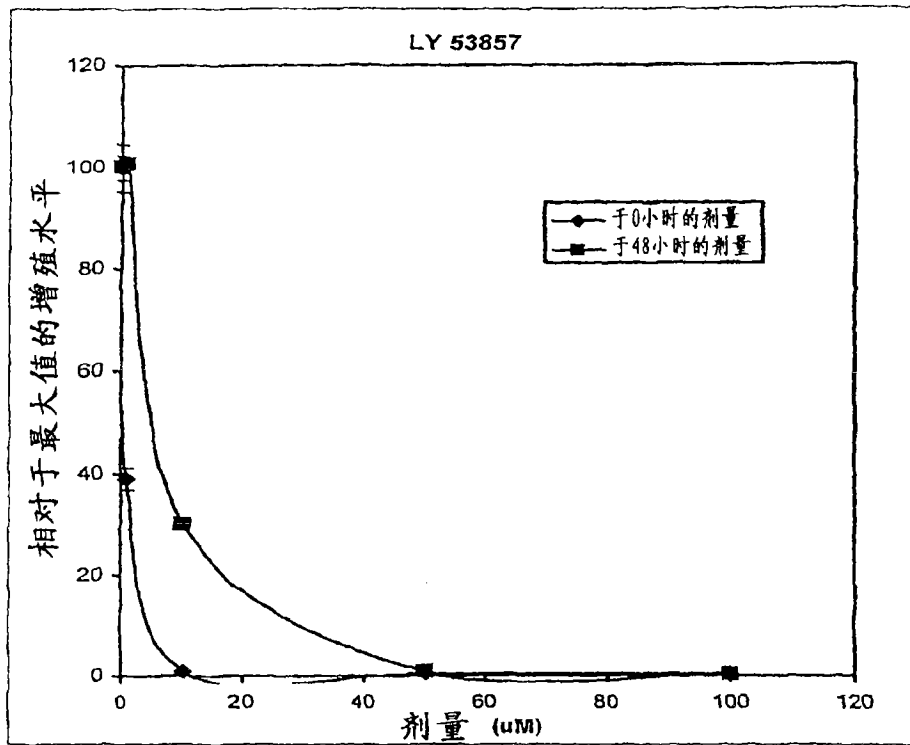


图 12A

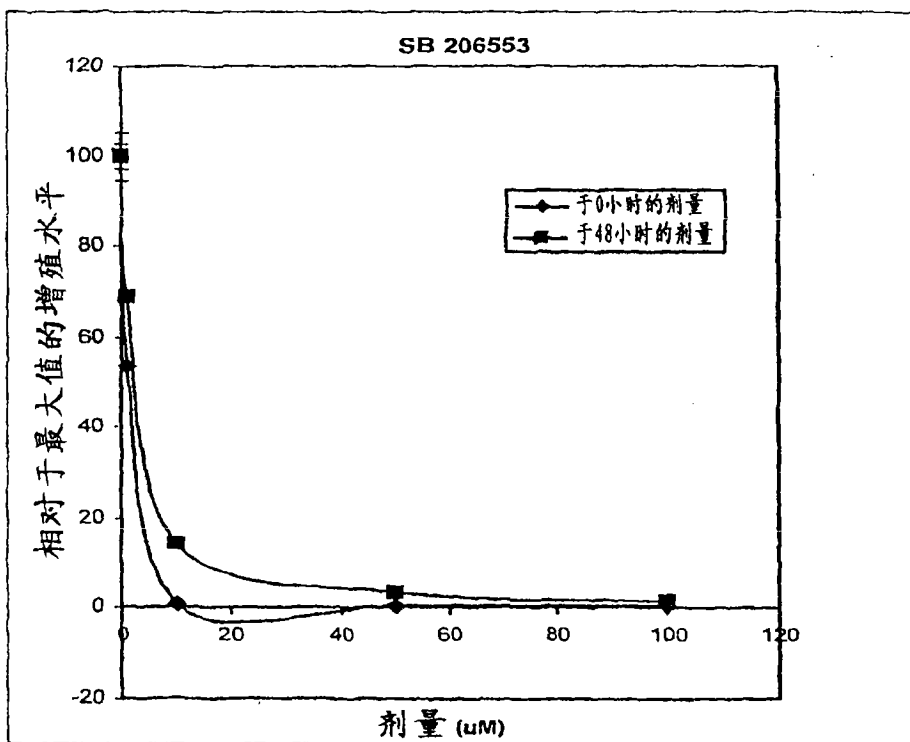


图 12B

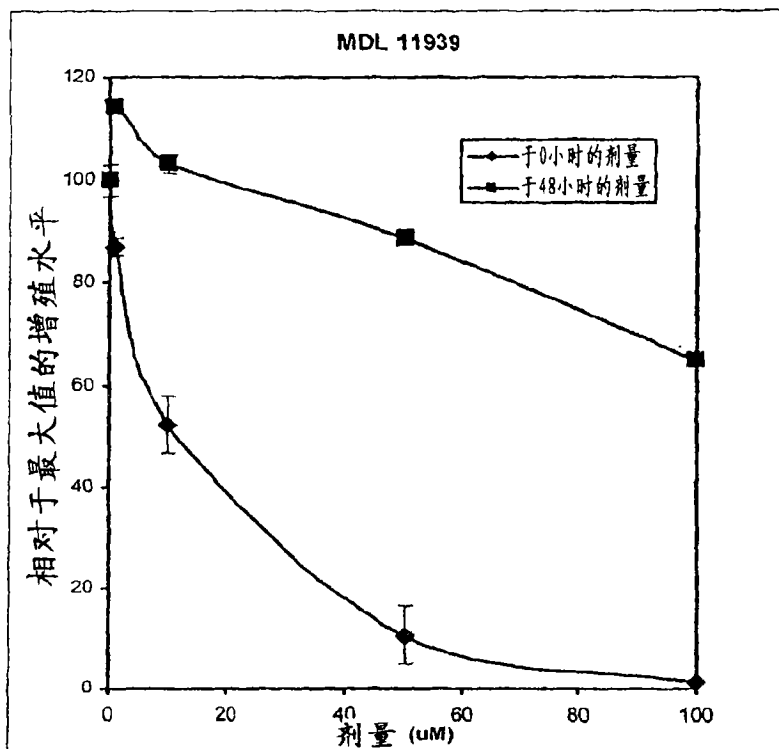


图 12C

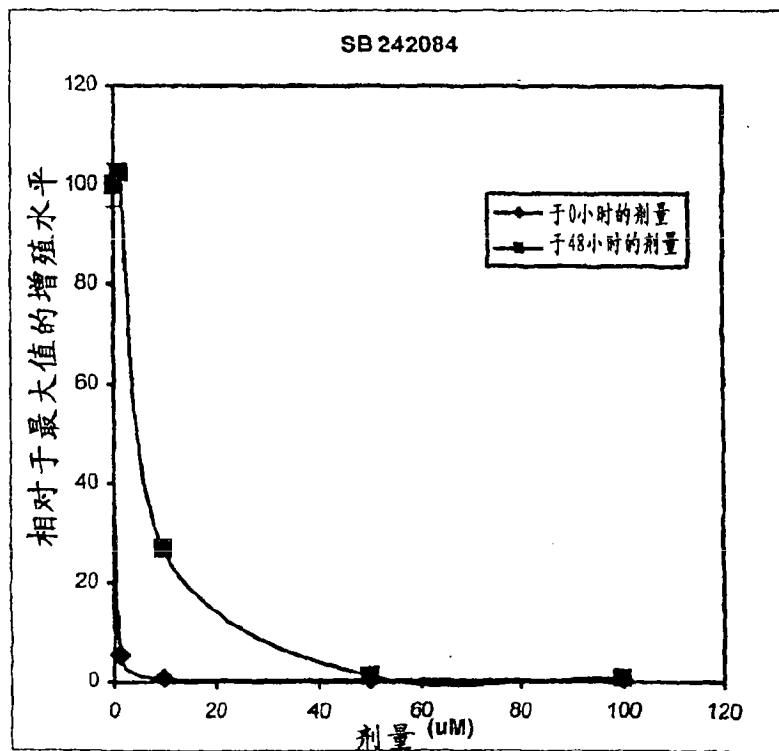


图 12D

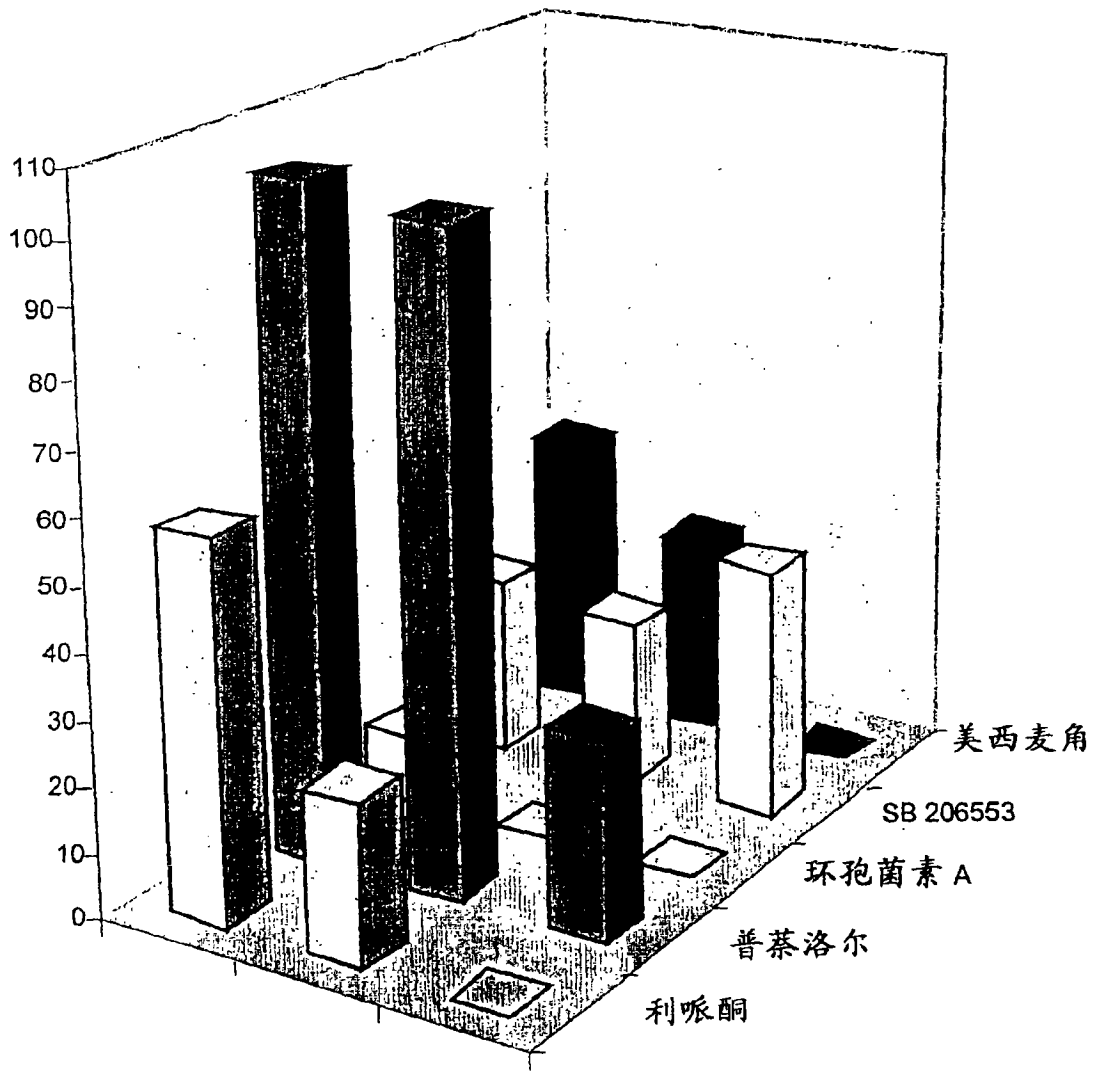


图 13

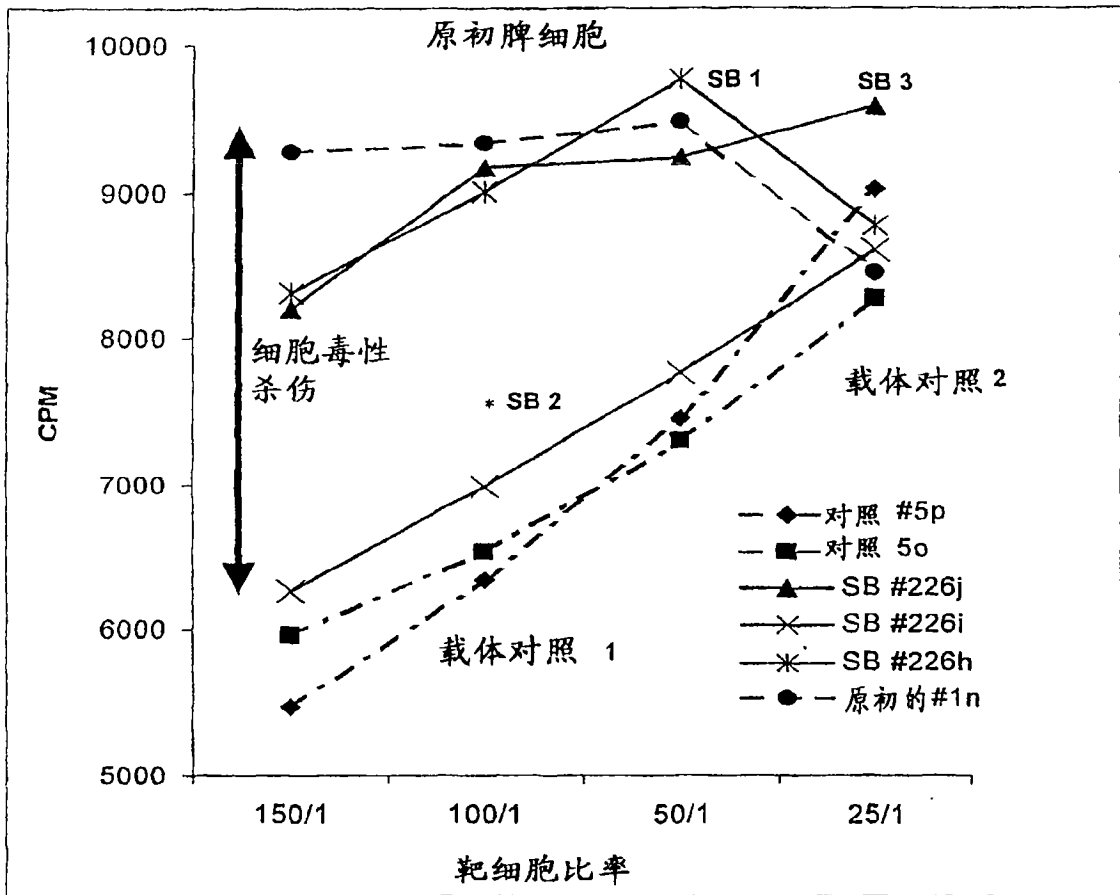


图 14

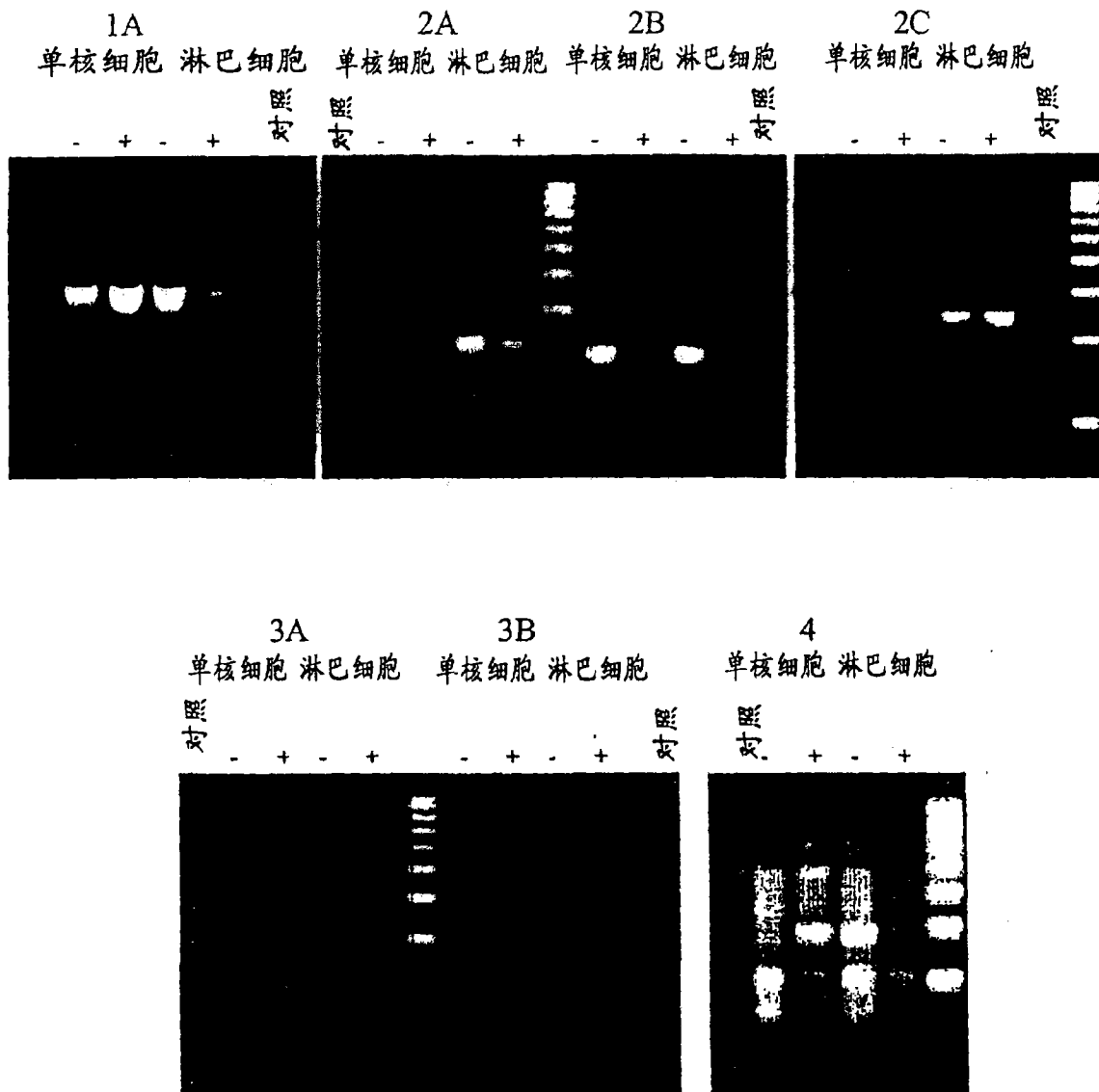


图 15

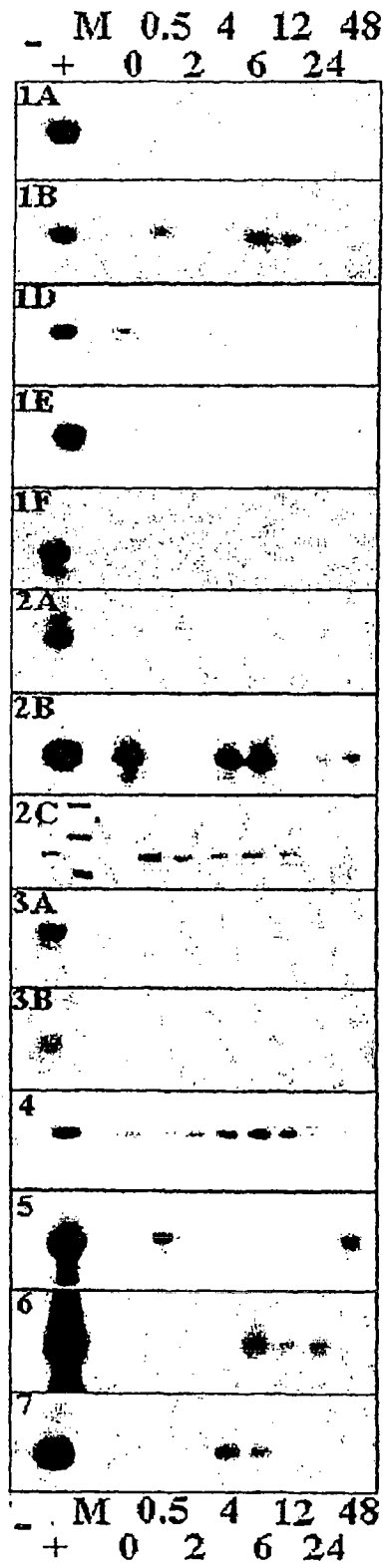


图 16

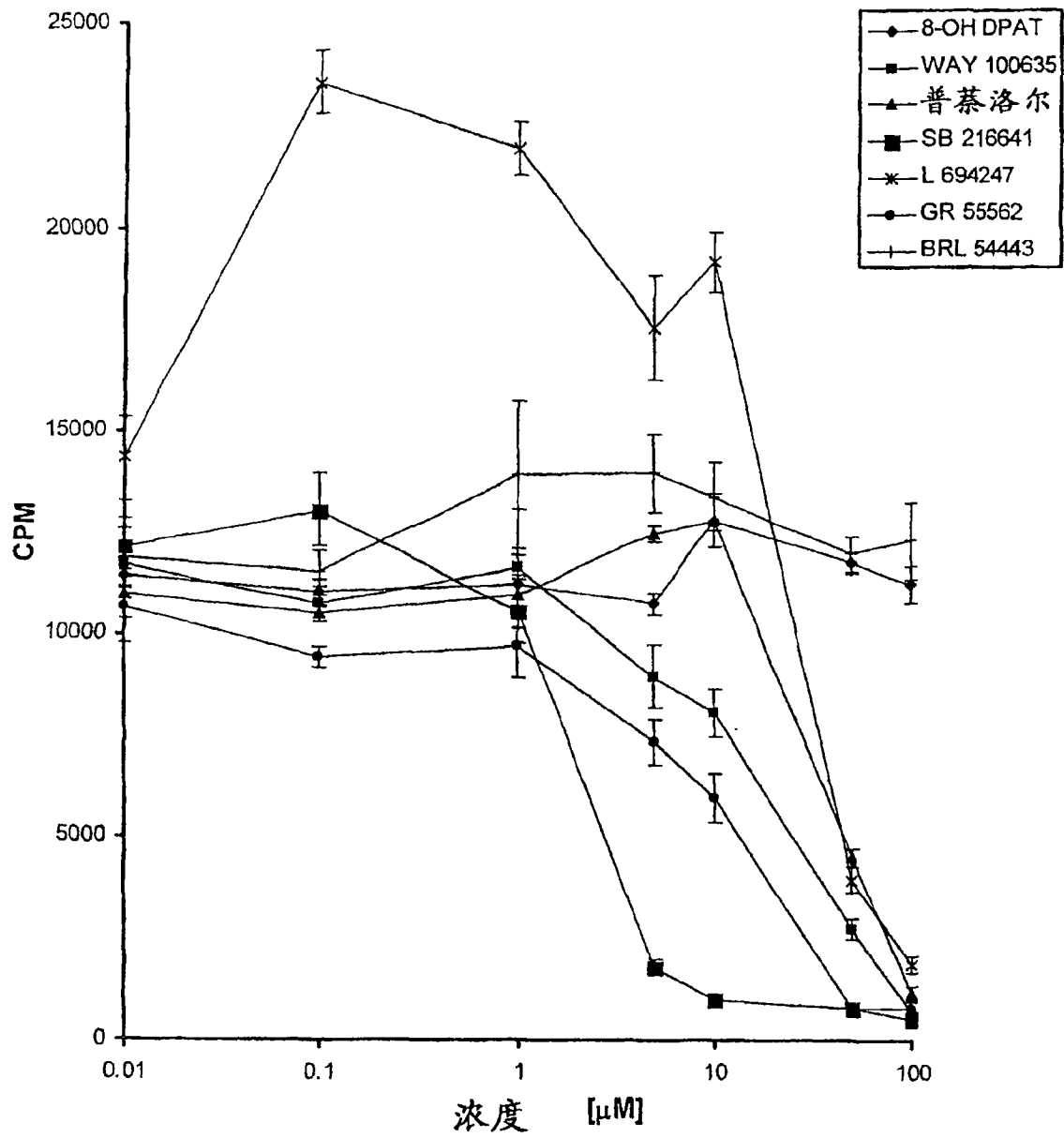


图 17

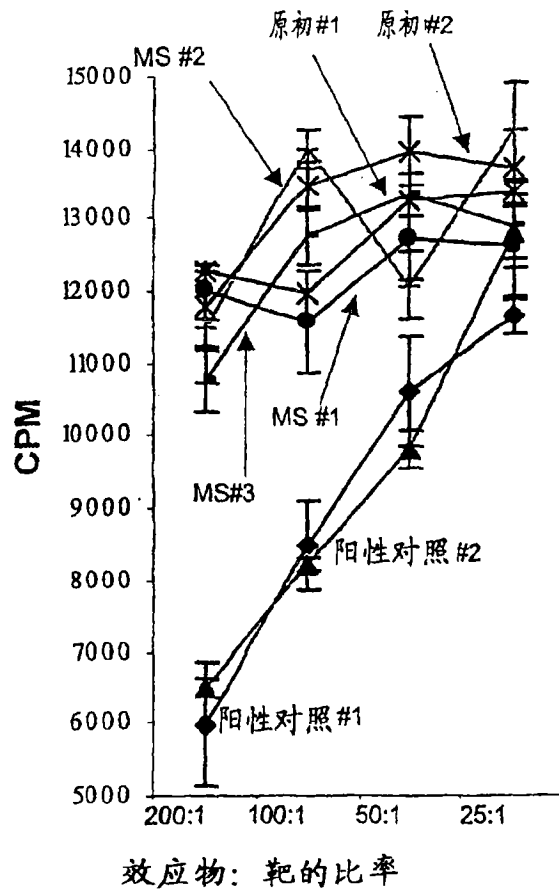


图 18A

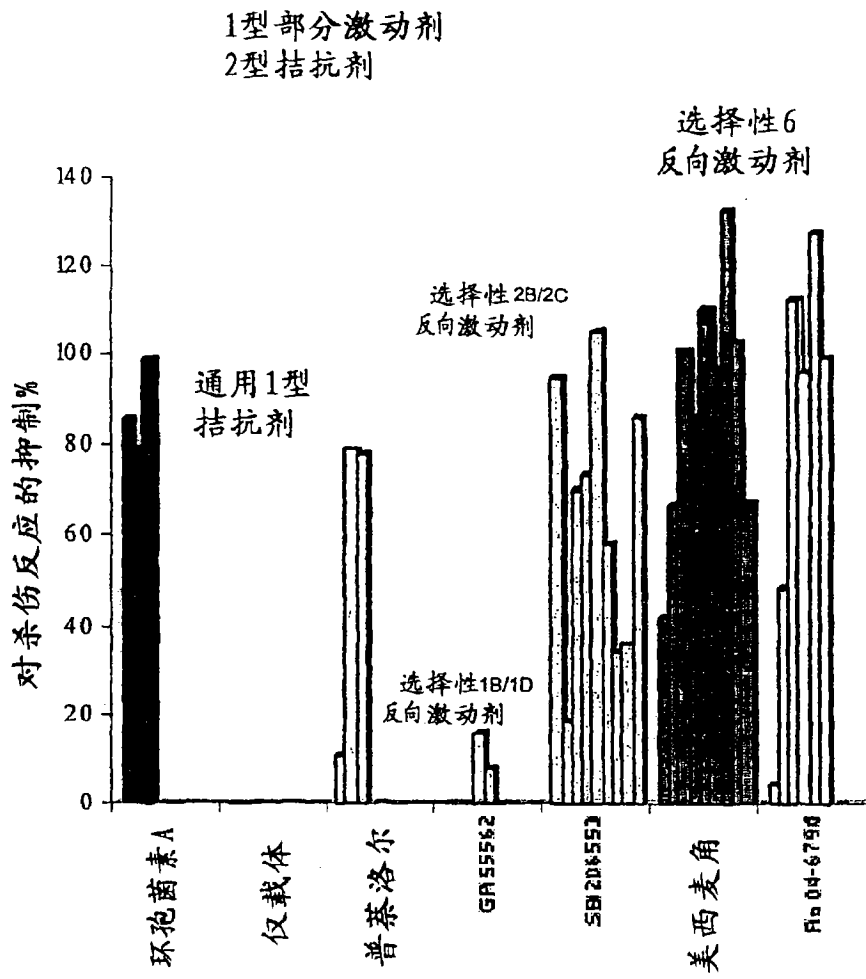


图 18B

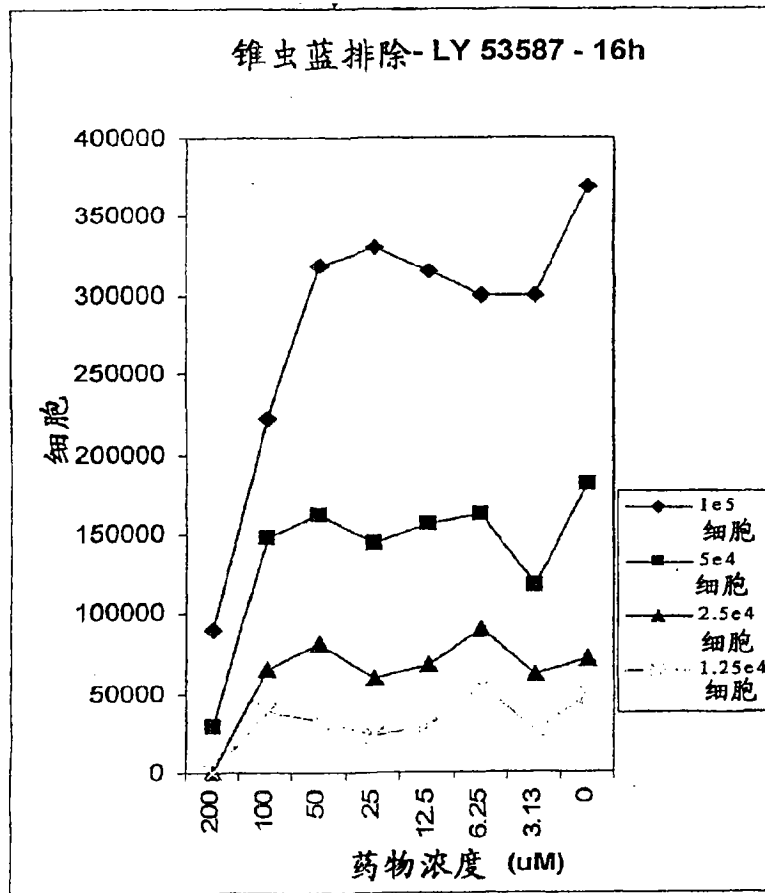


图 19A

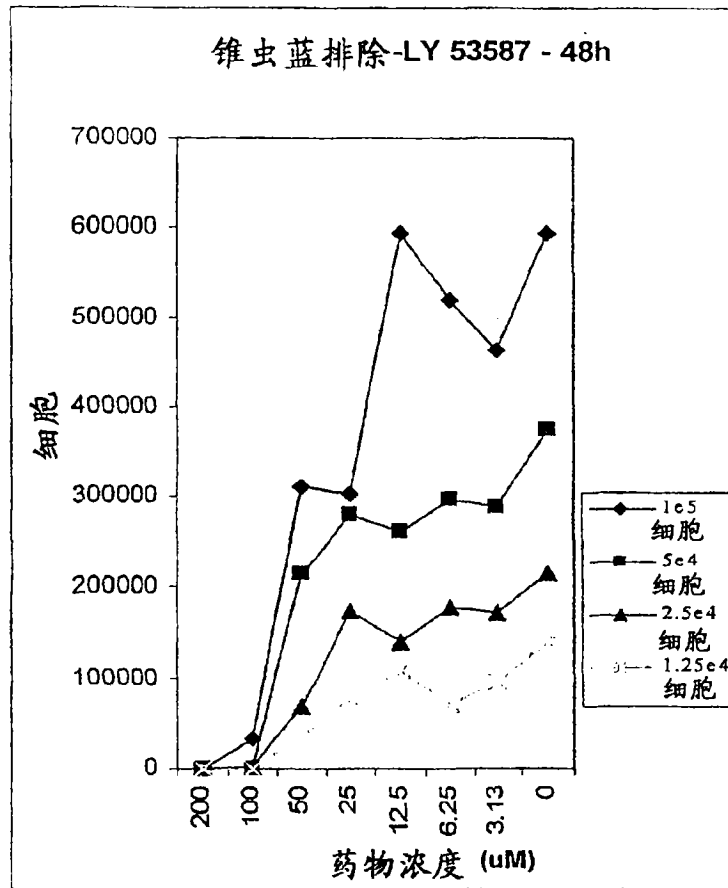


图 19B

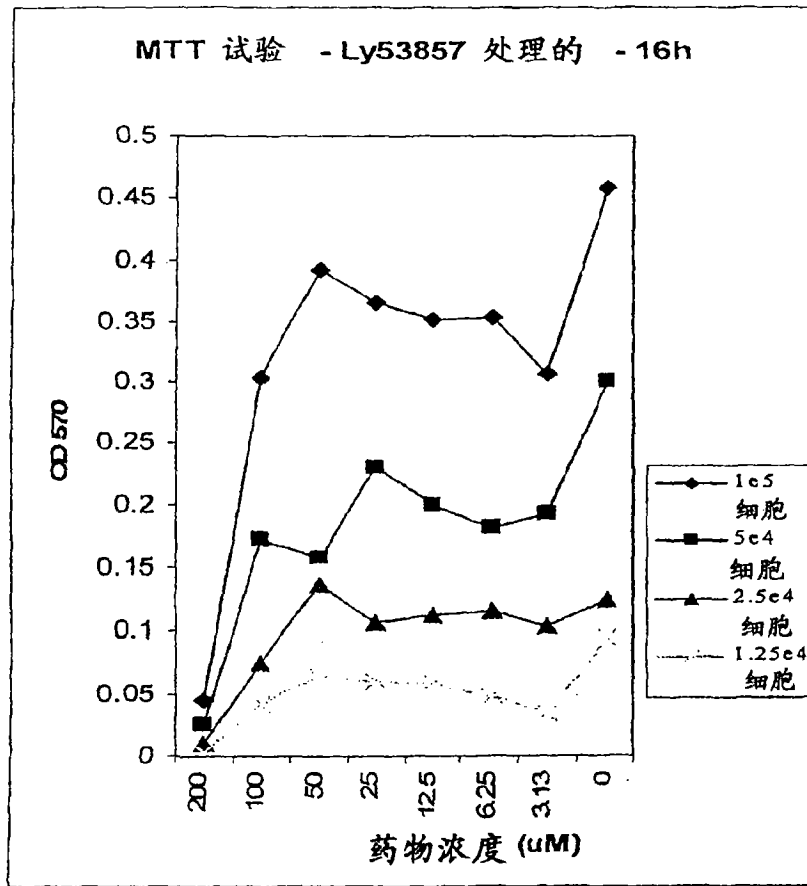


图 20A

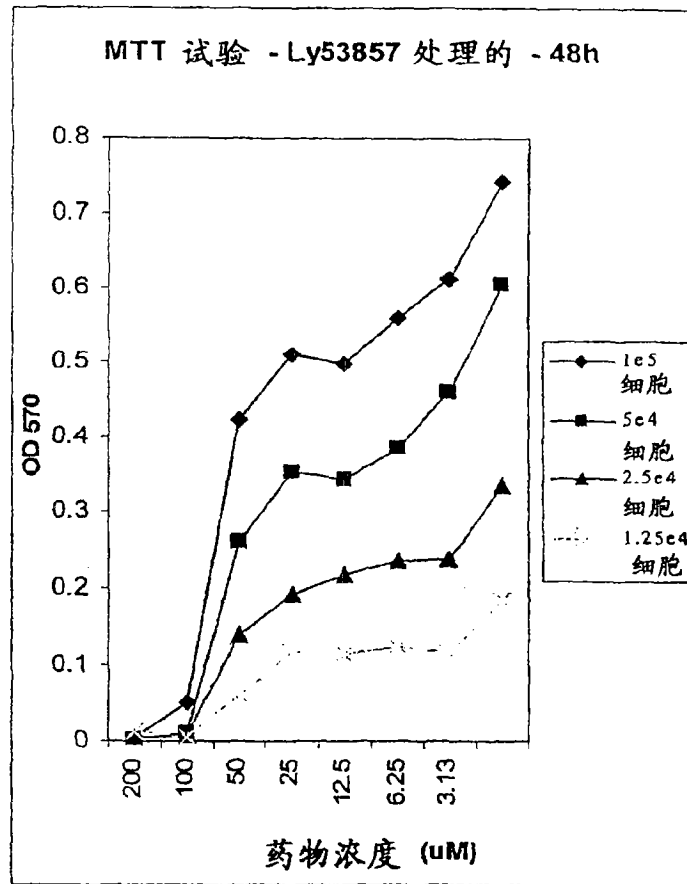


图 20B

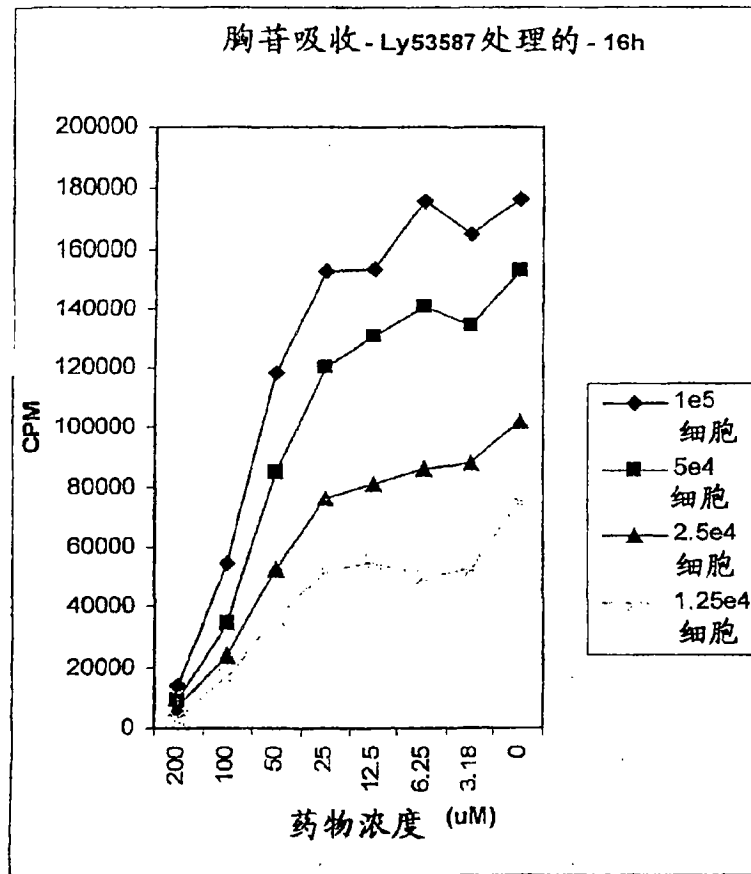


图 20C

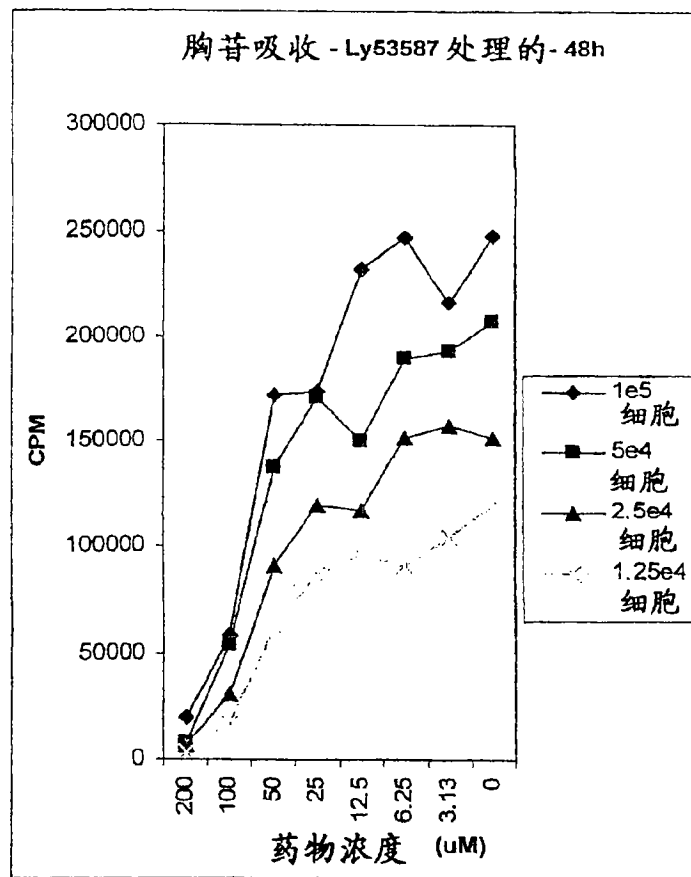


图 20D

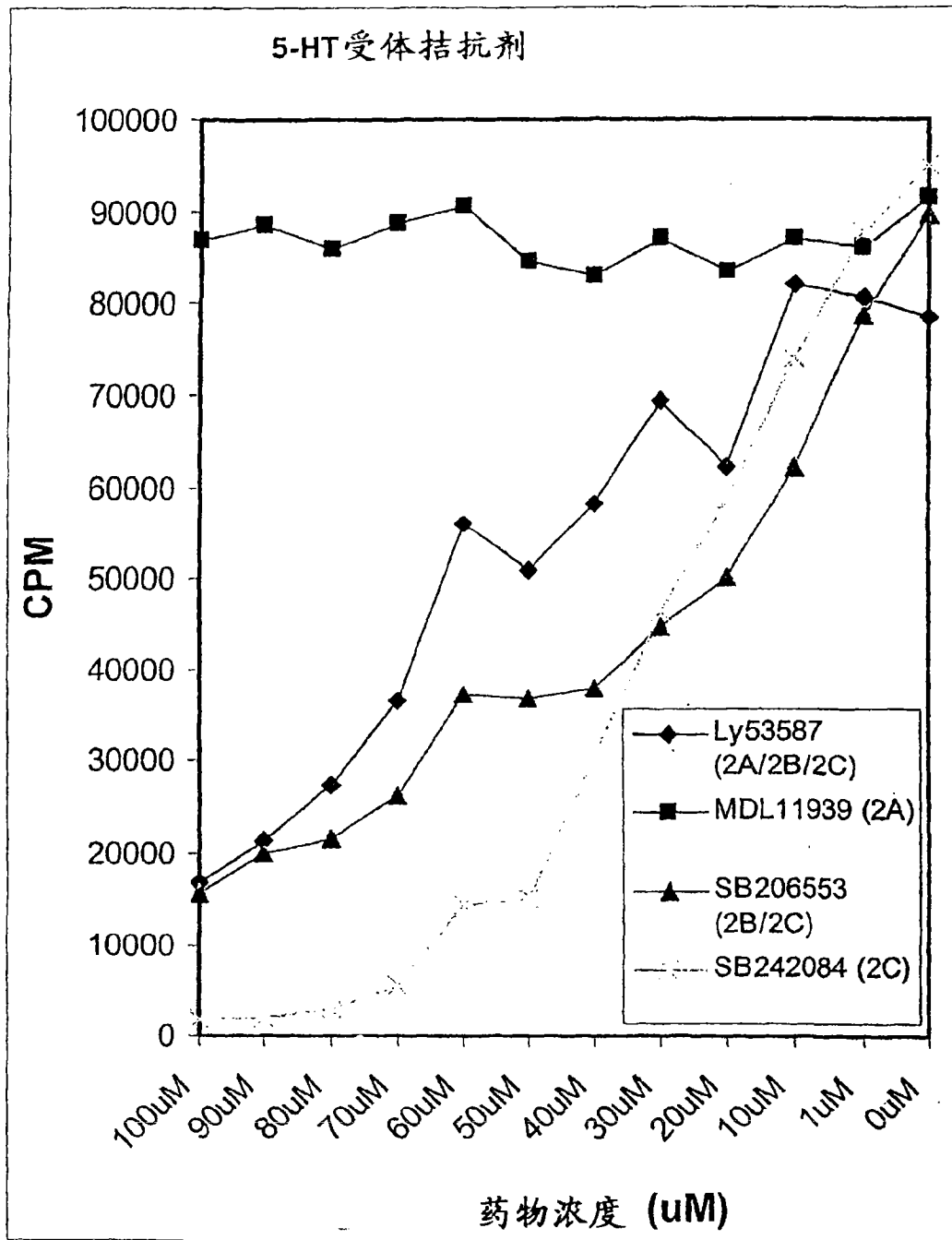


图 21

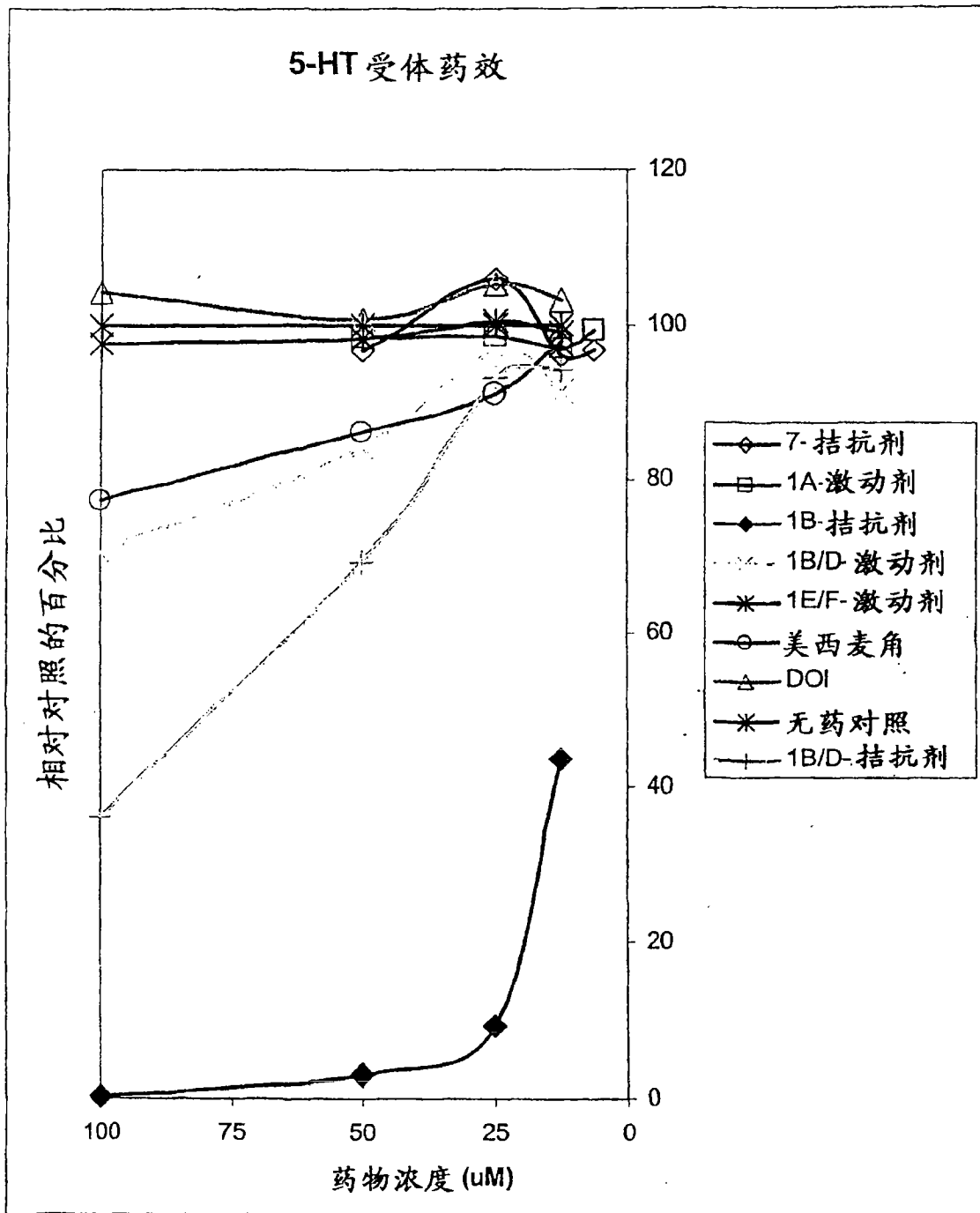


图 22

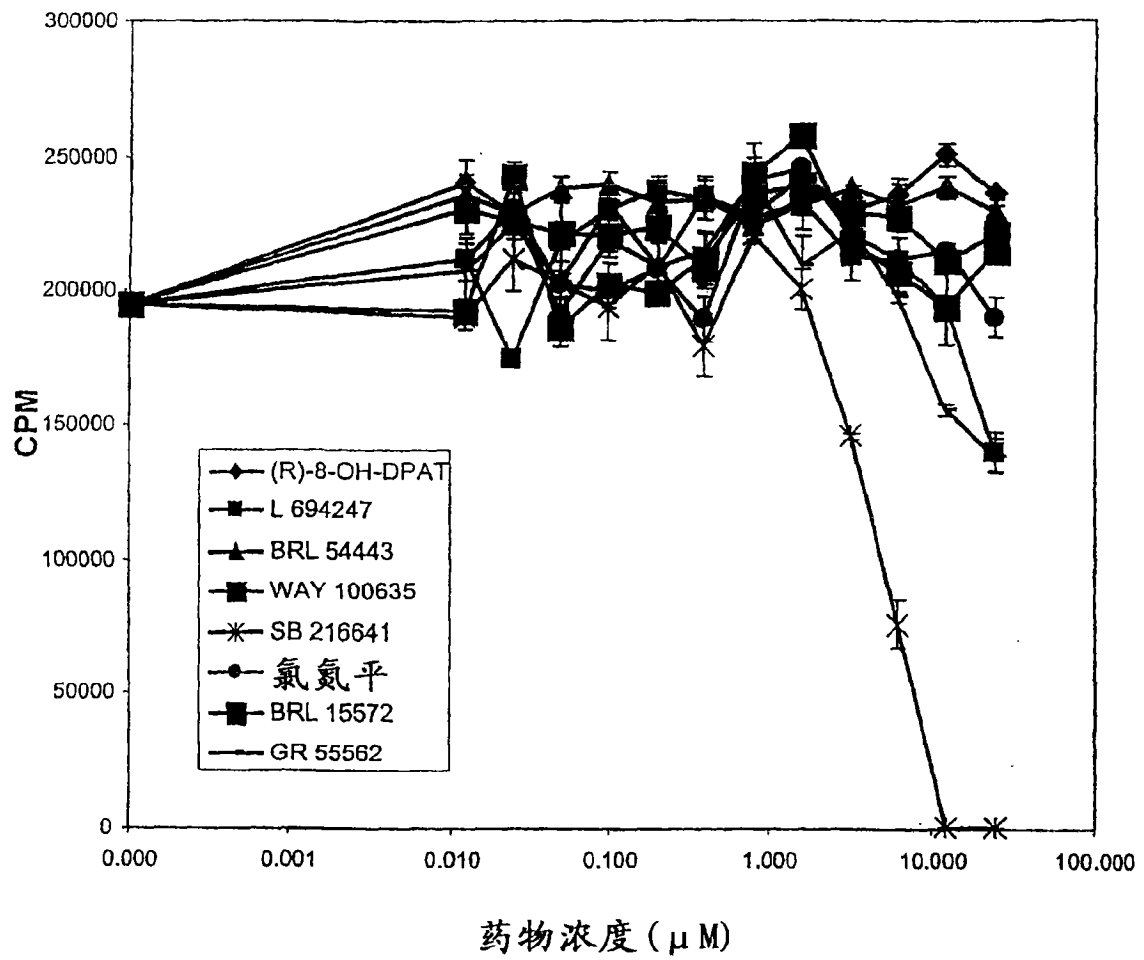


图 23

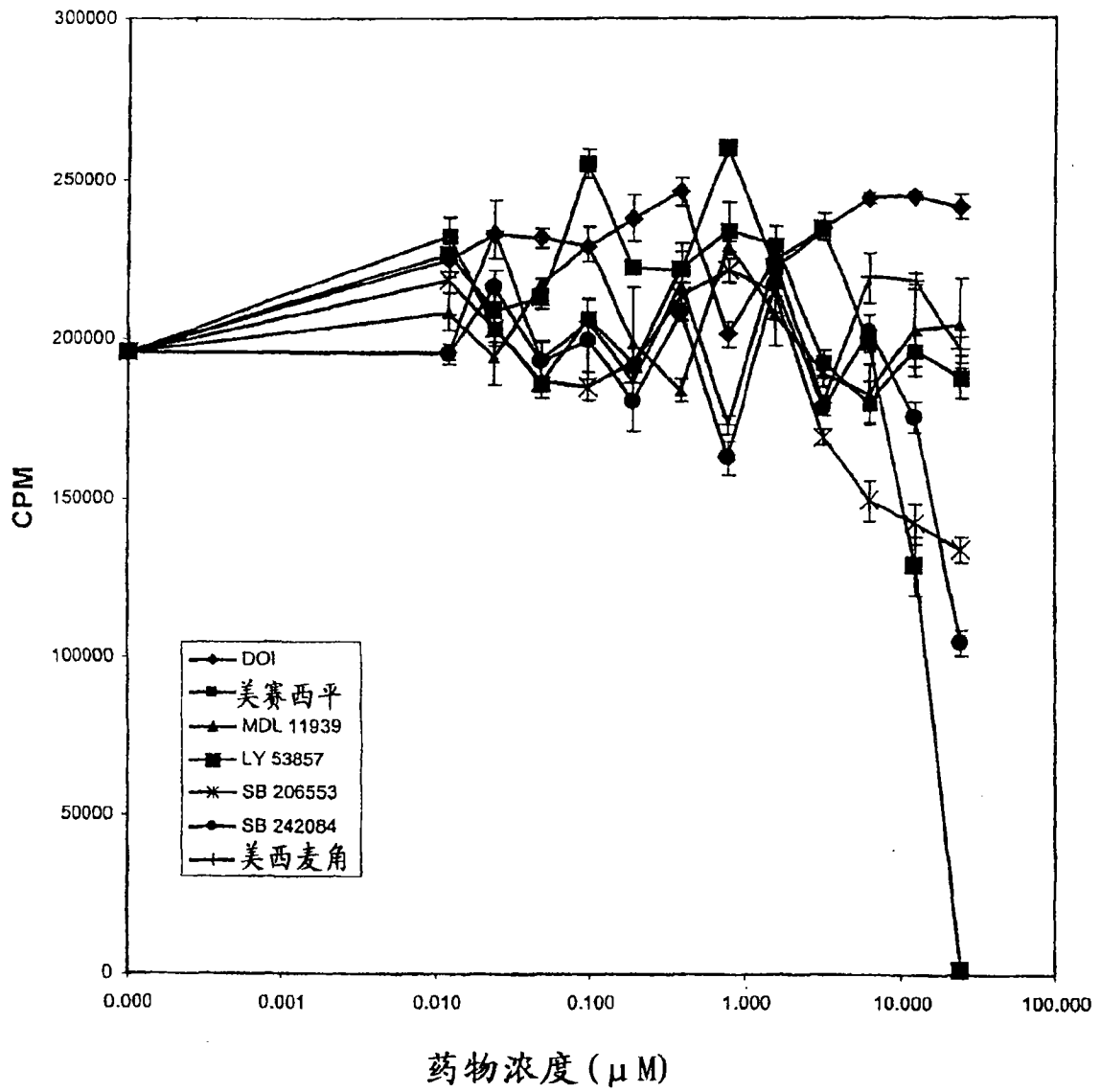


图 24

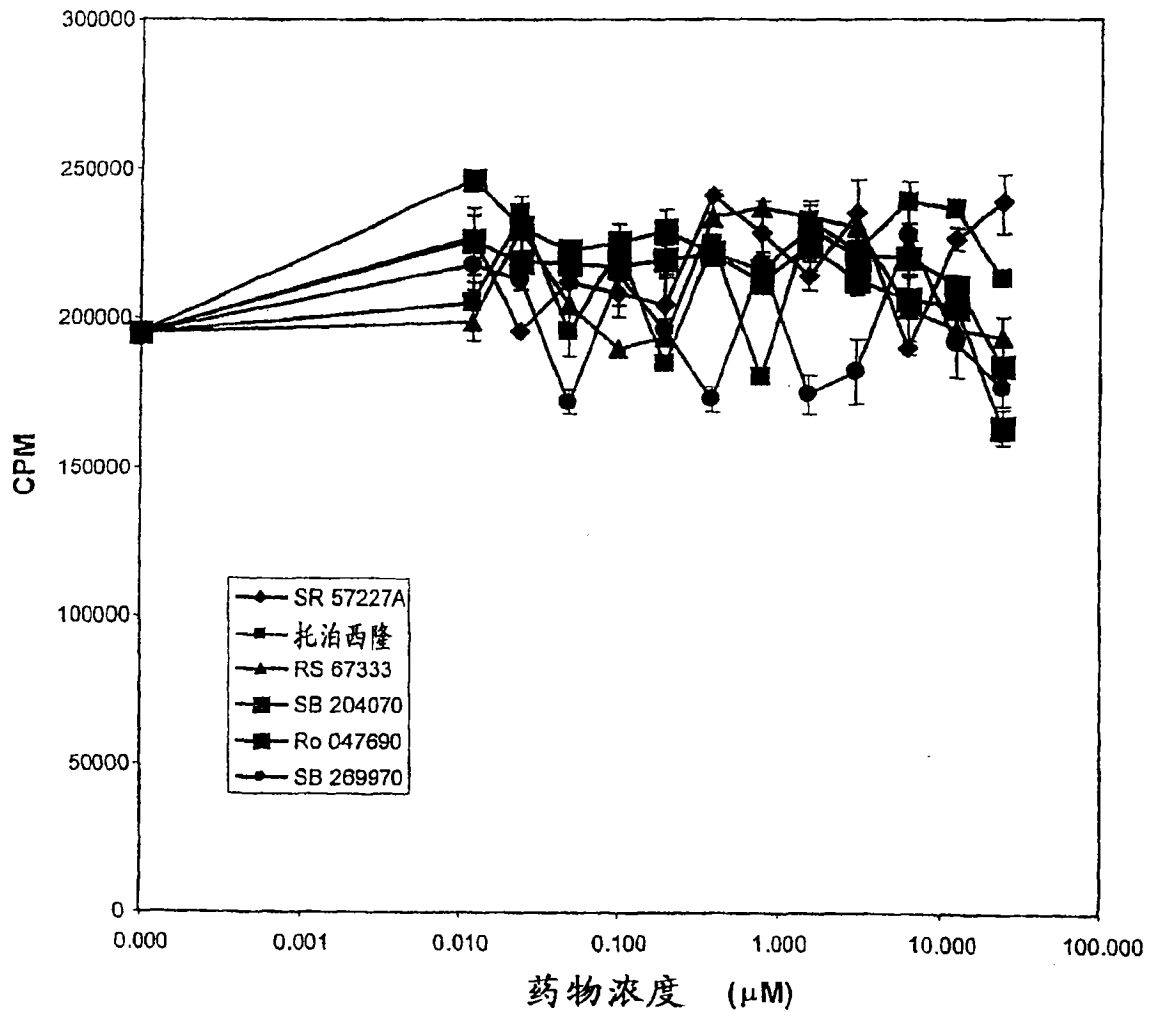


图 25

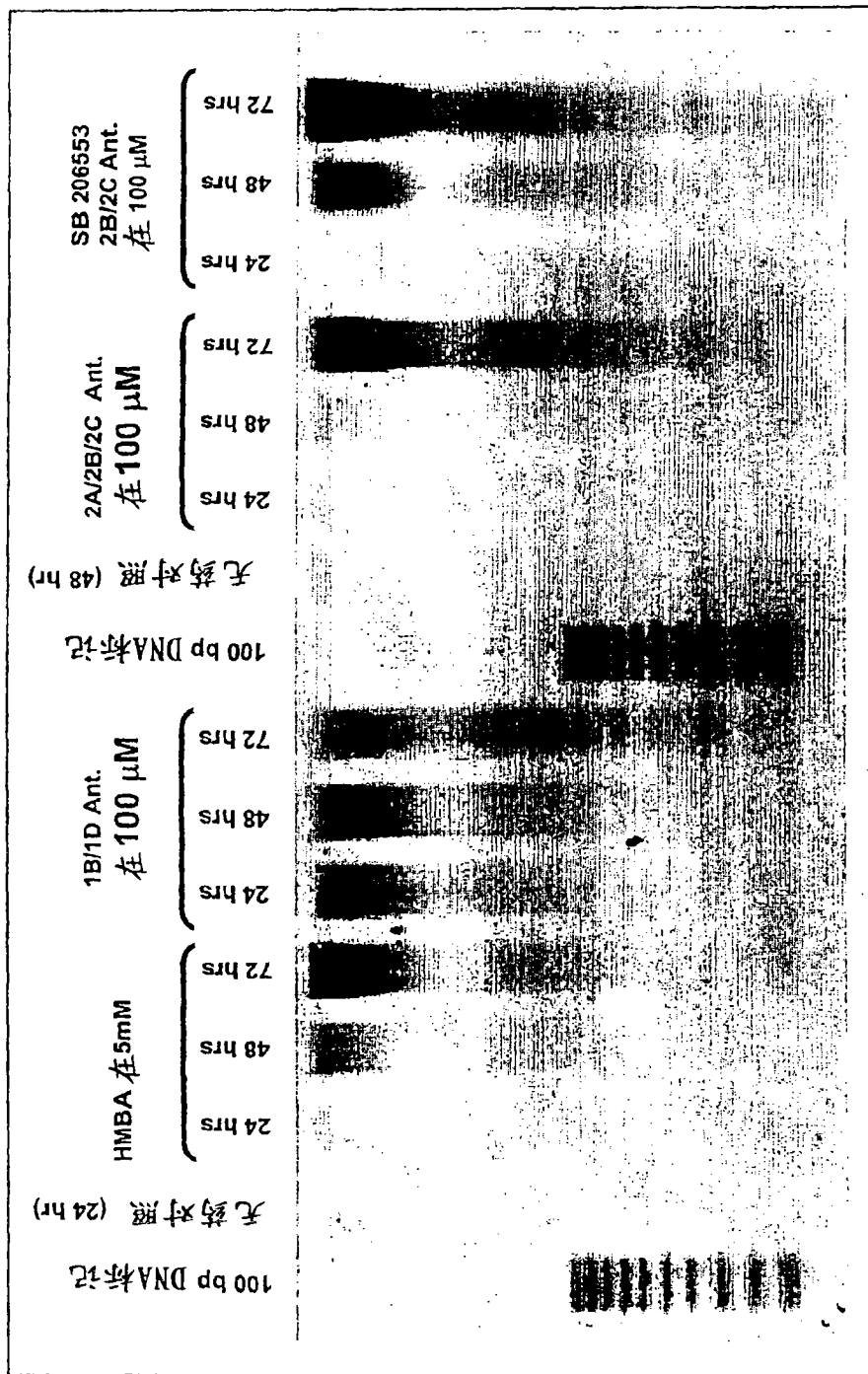


图 26

图 27C

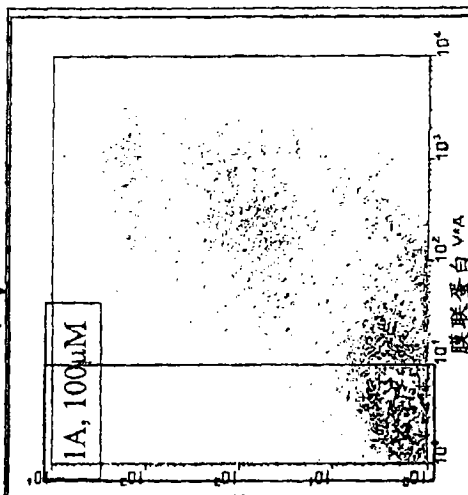


图 27B

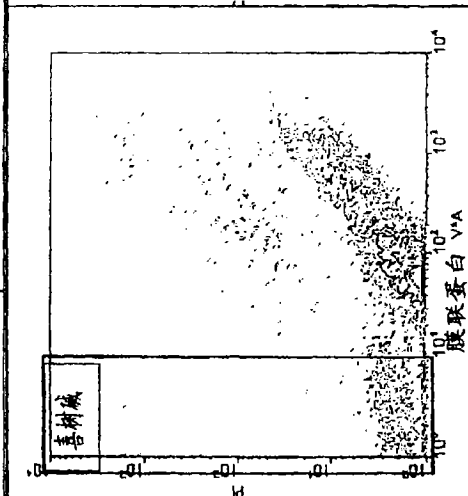


图 27A

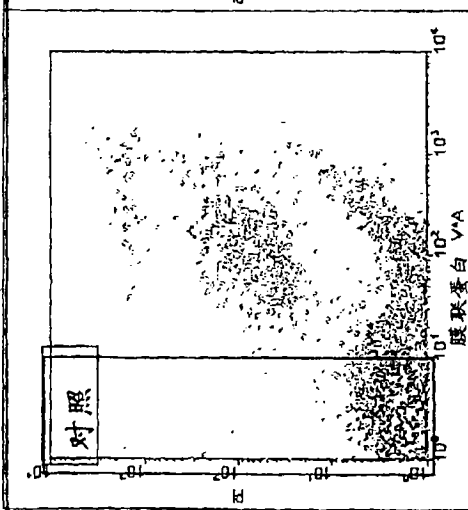


图 27F

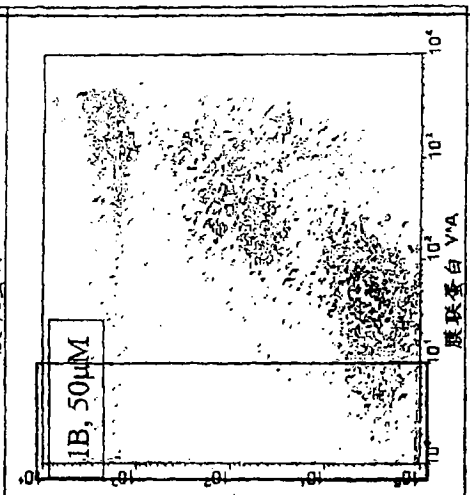


图 27E

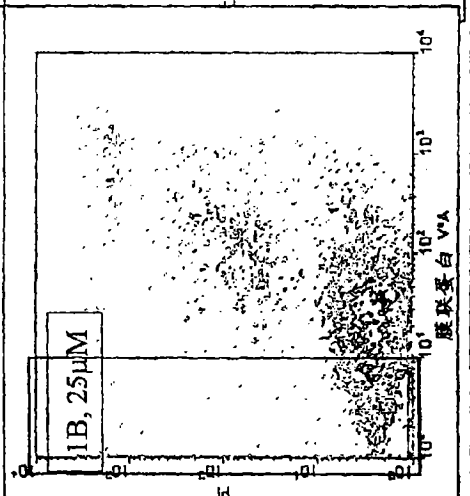
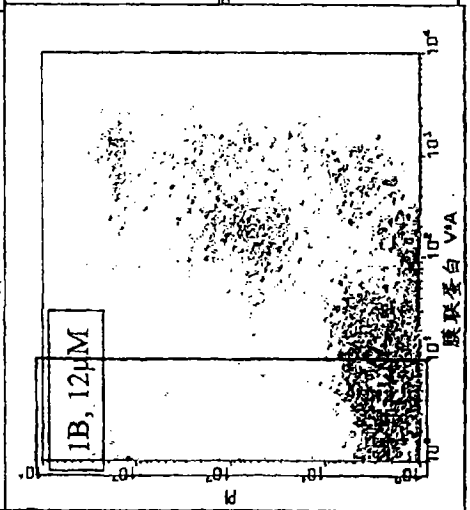


图 27D



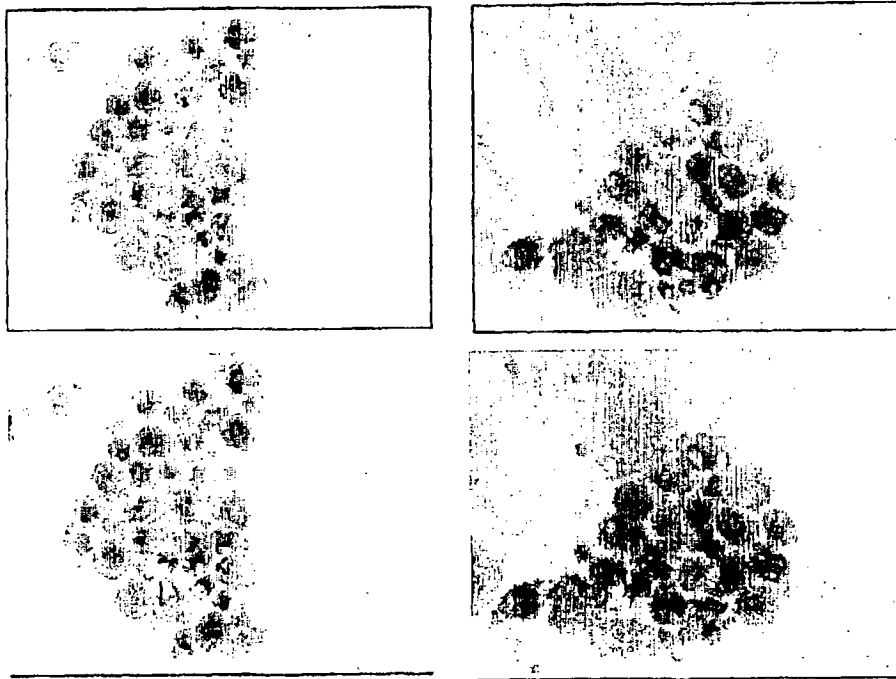


图 28

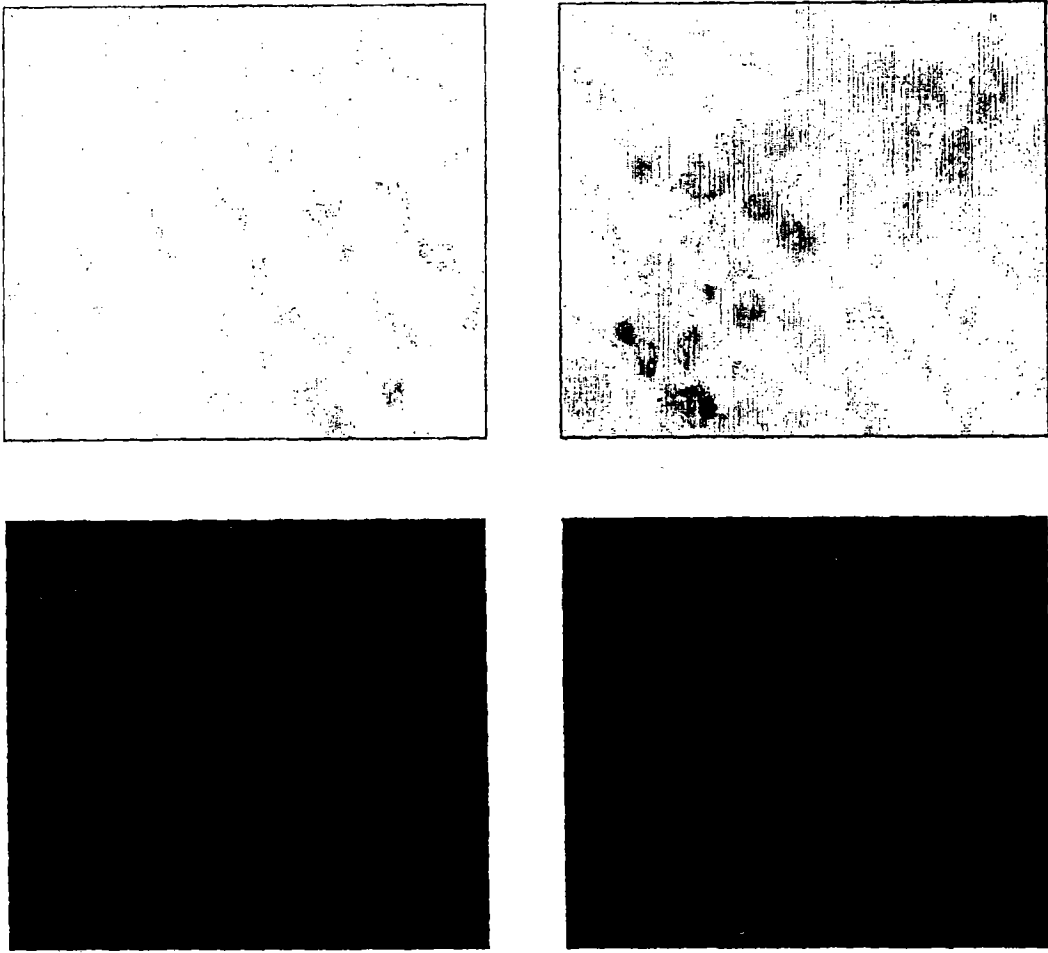


图 29

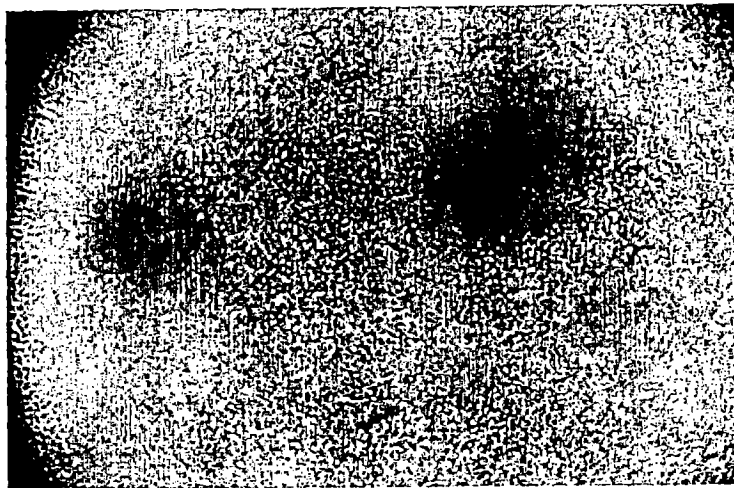


图 30A

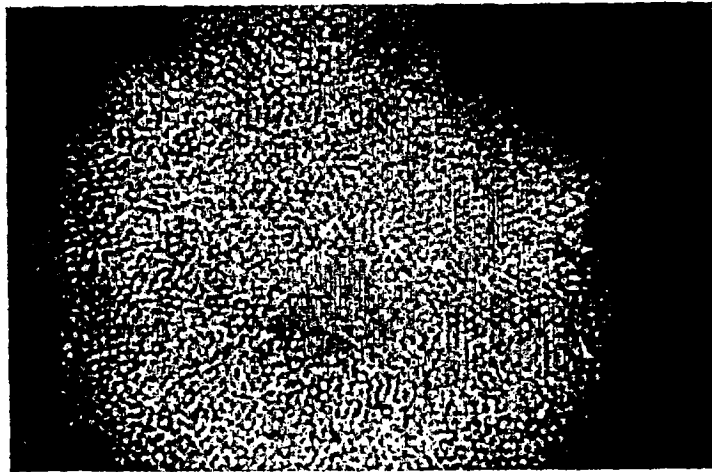


图 30B

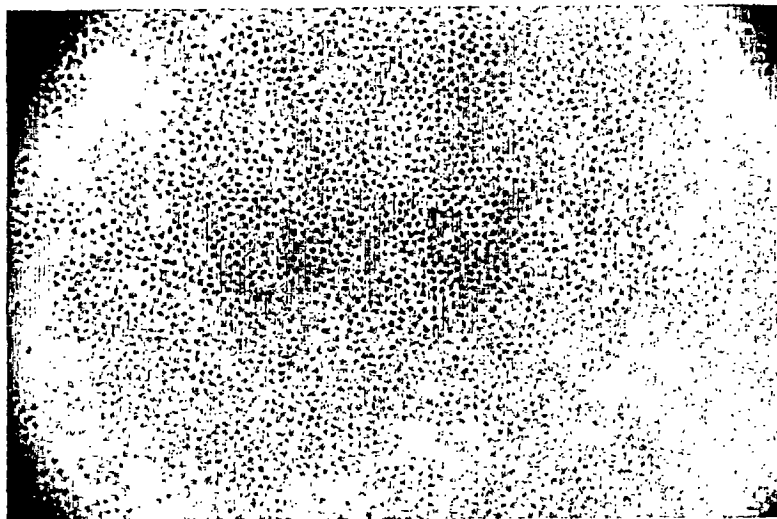


图 30C

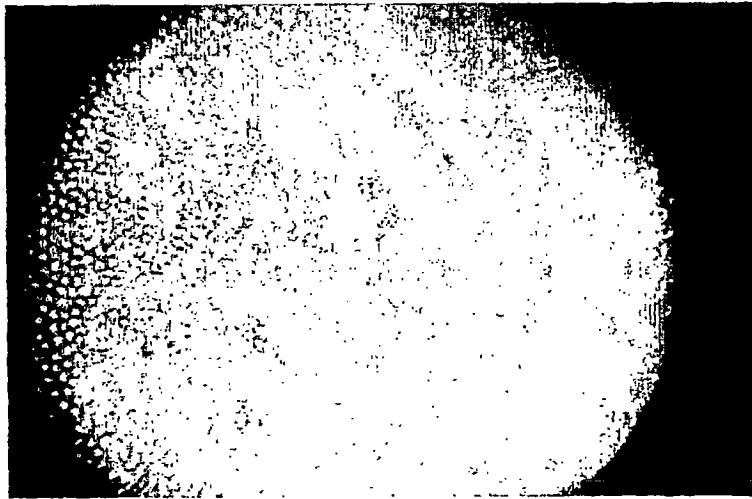


图 30D

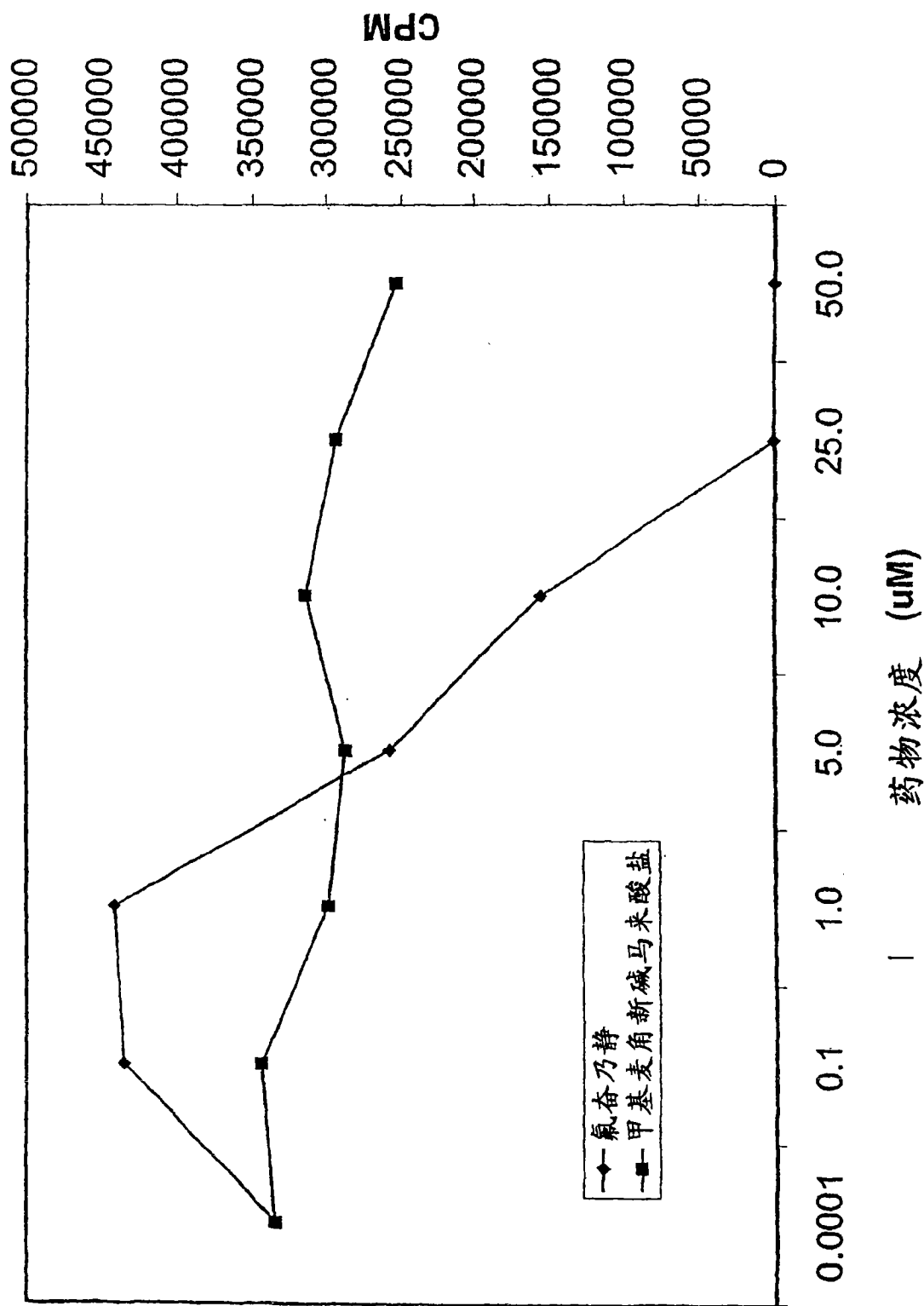


图 31

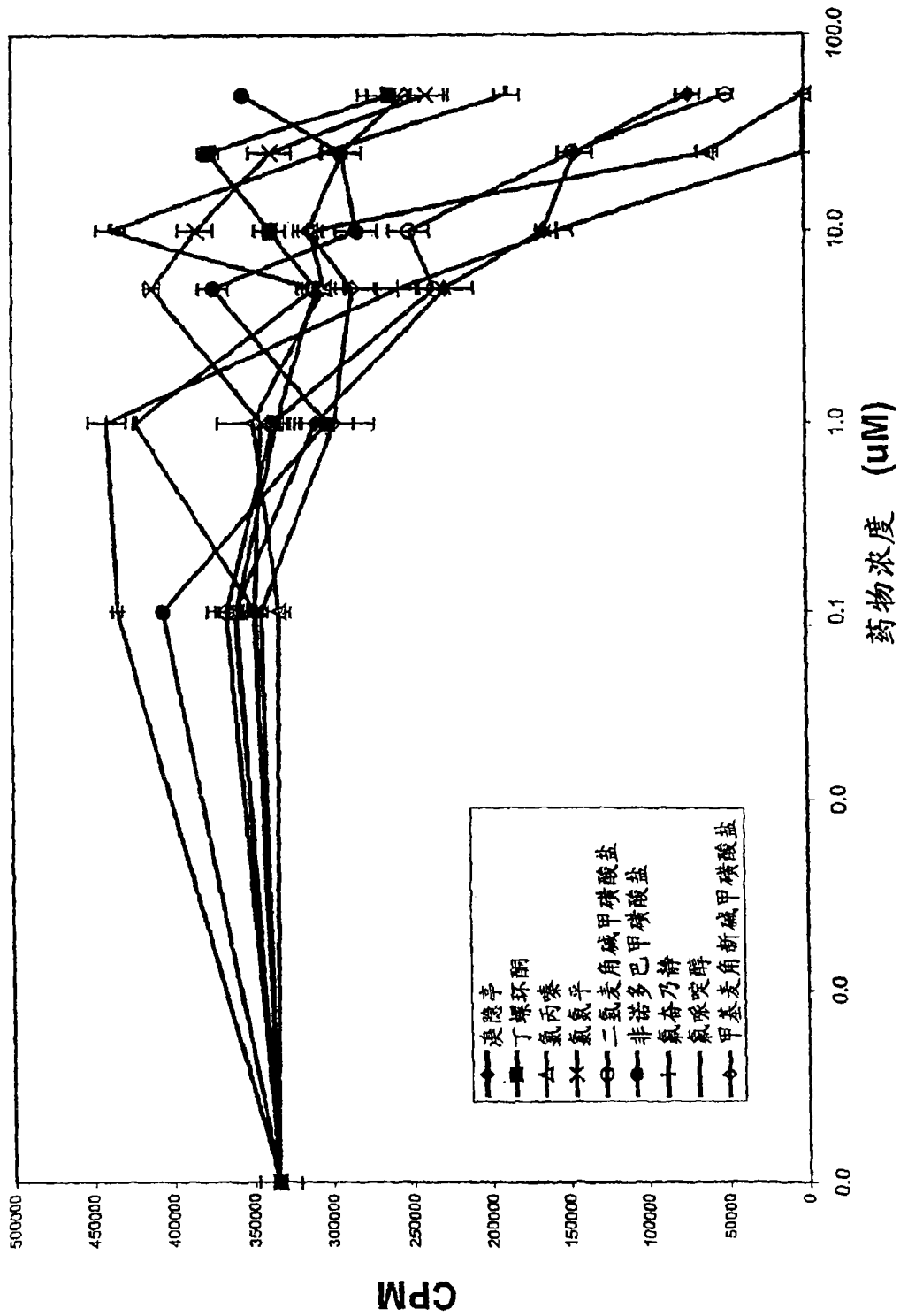


图 32

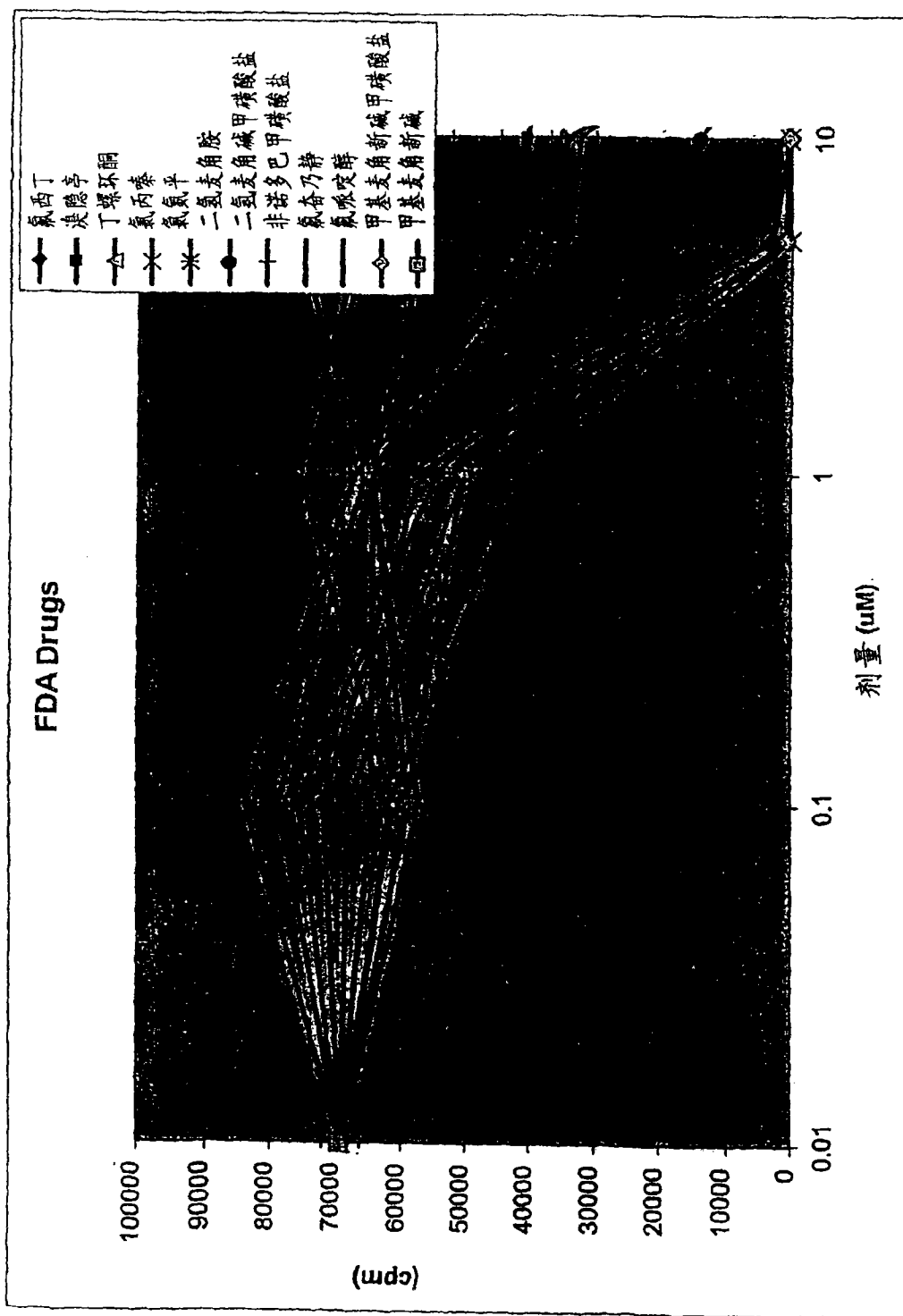


图 33

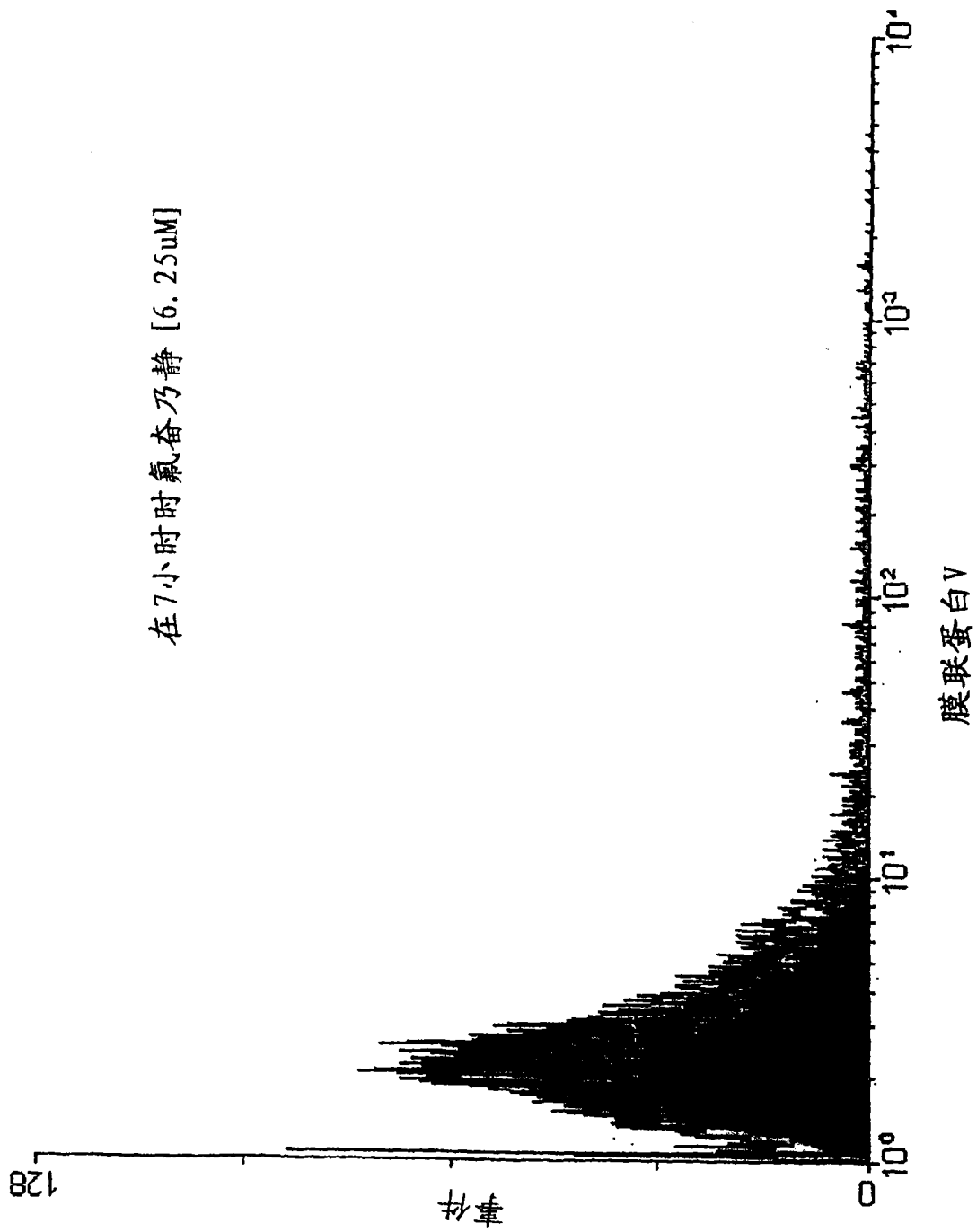


图 34A

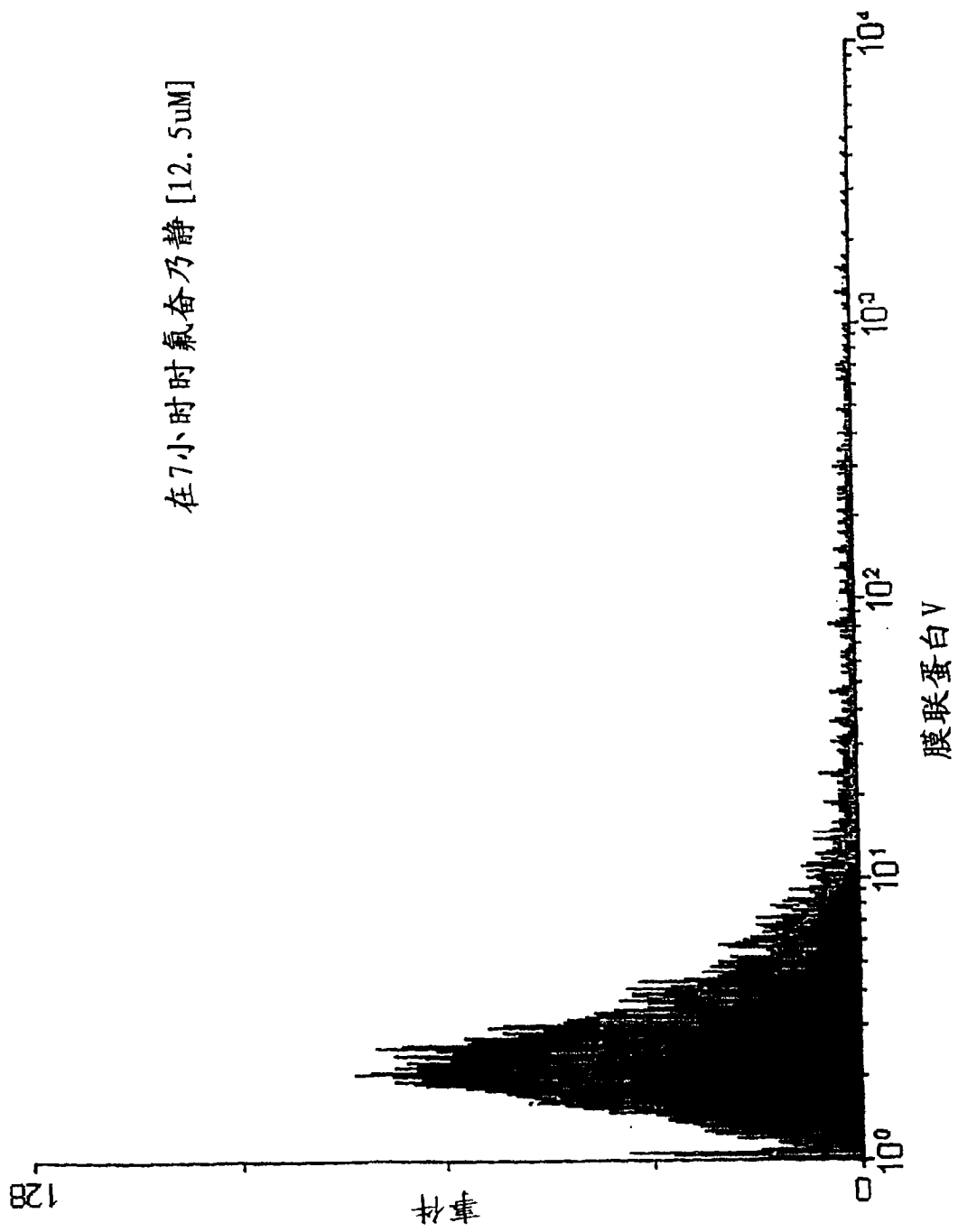


图 34B

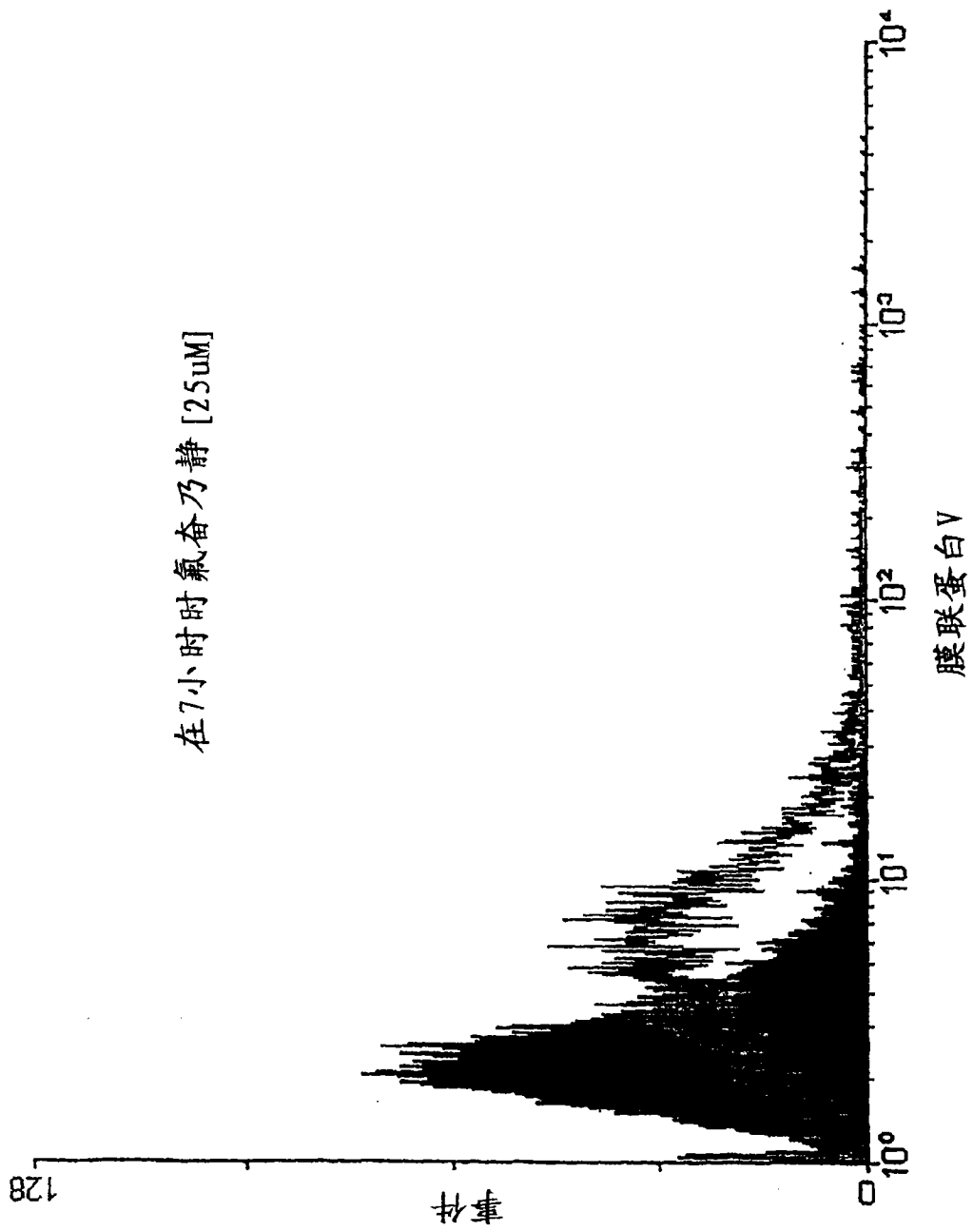


图 34C

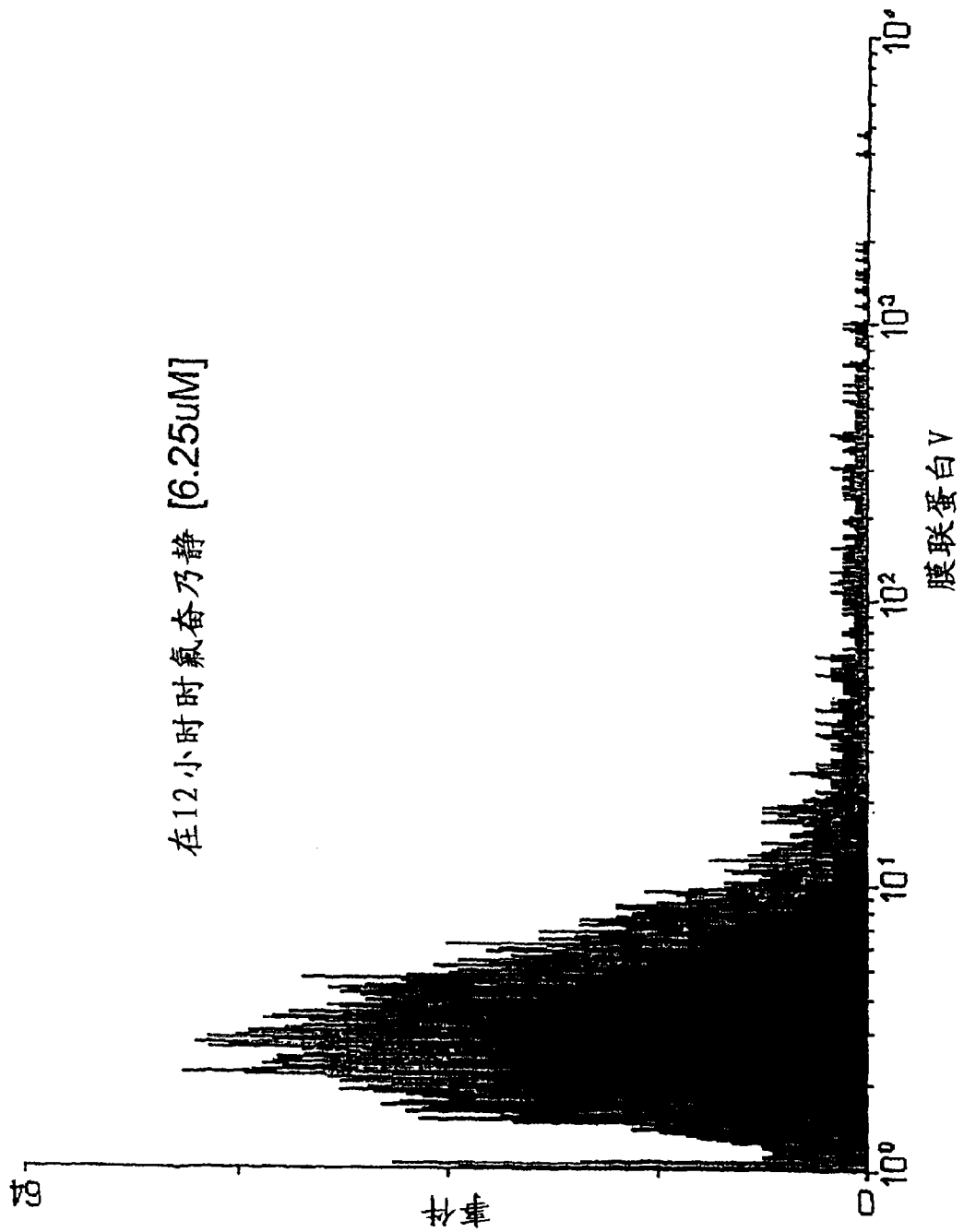


图 34D

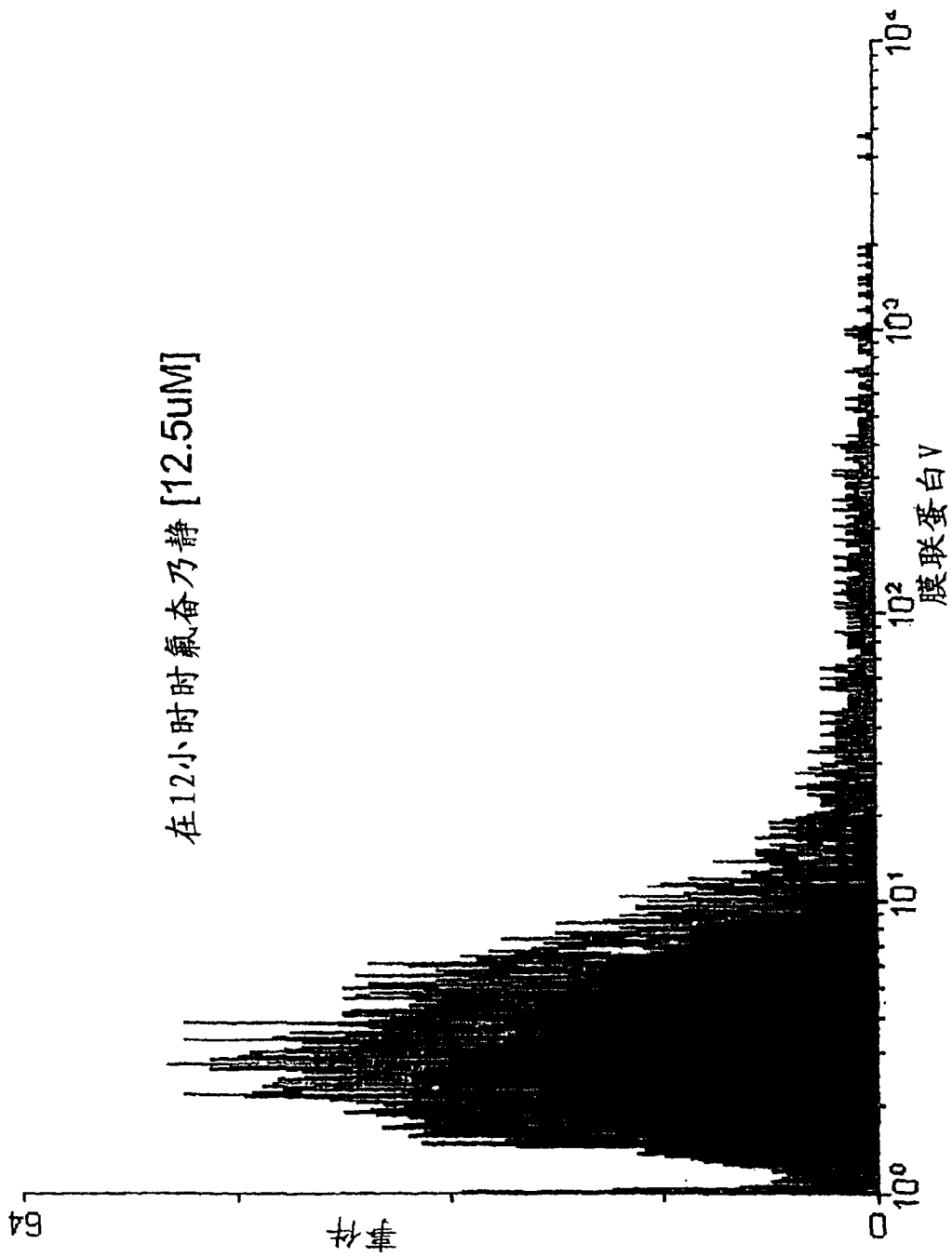


图 34E

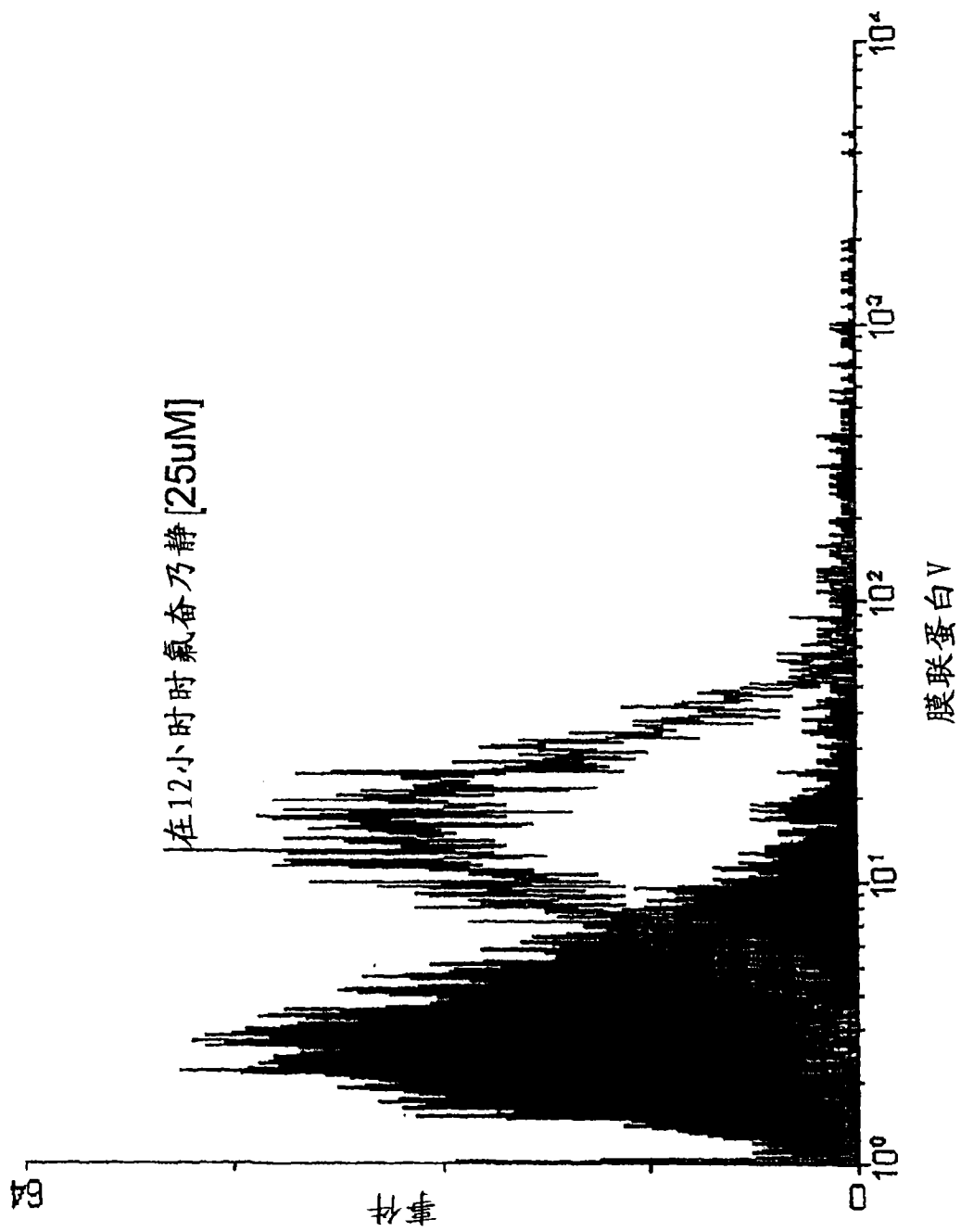


图 34F

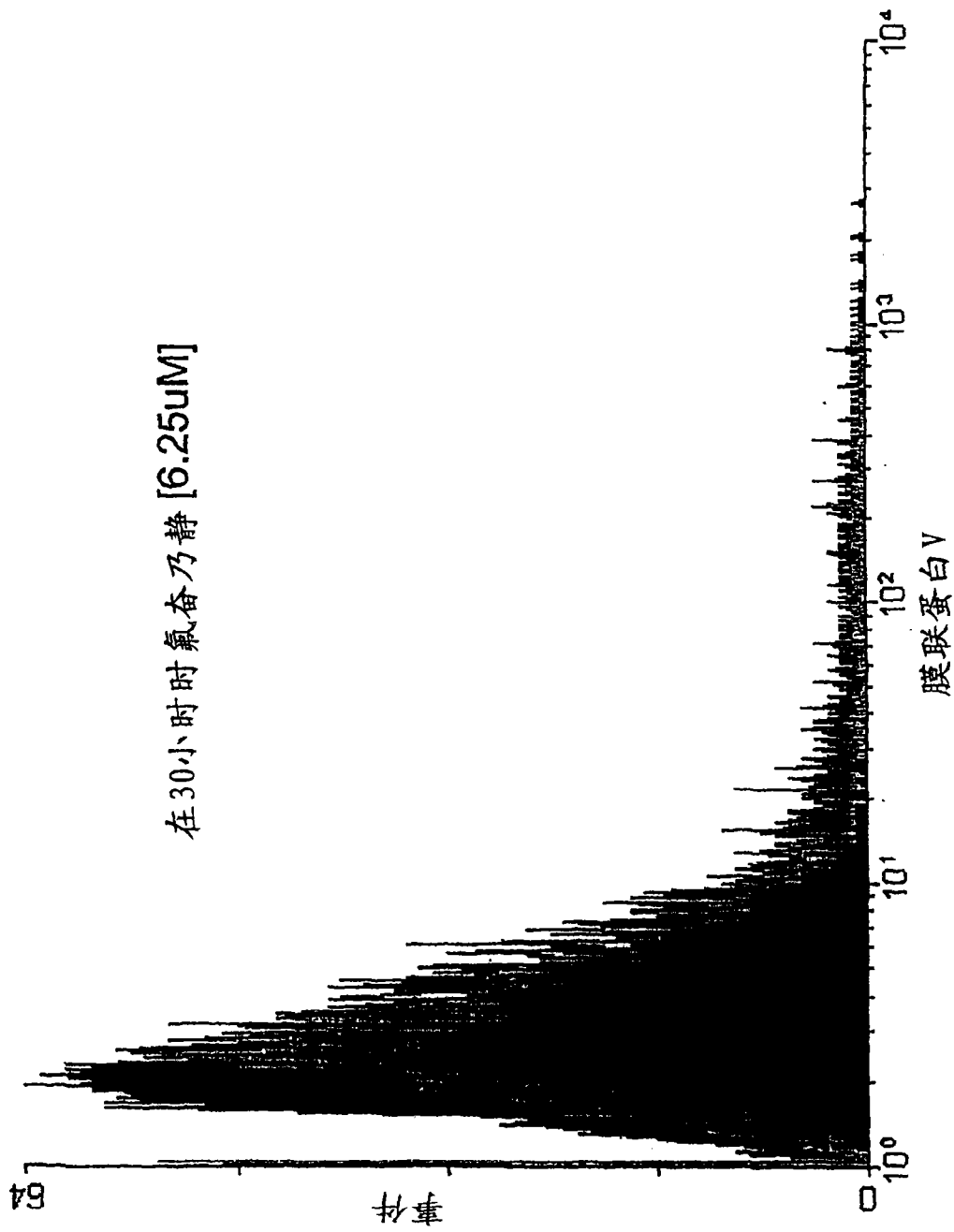


图 34G

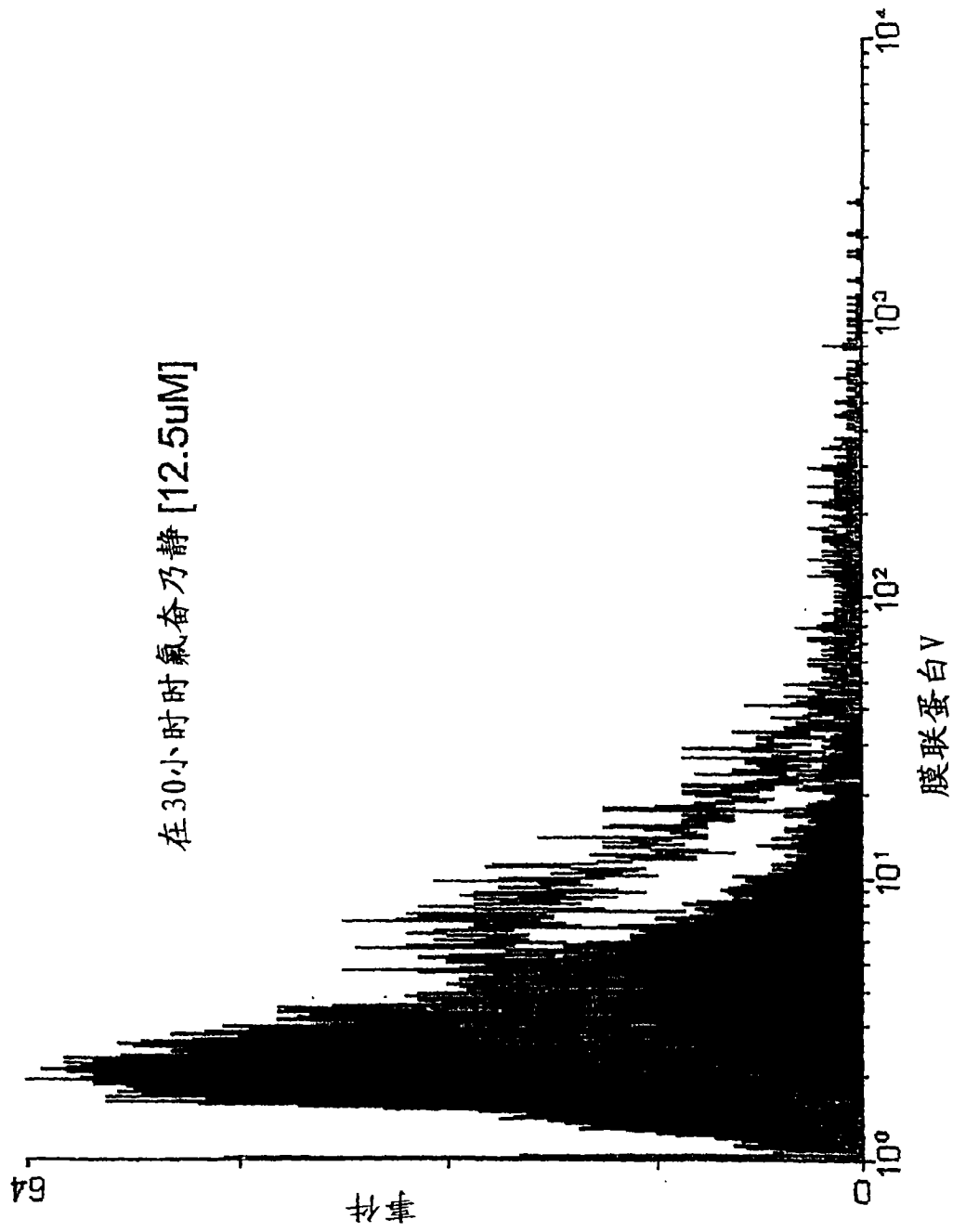


图 34H

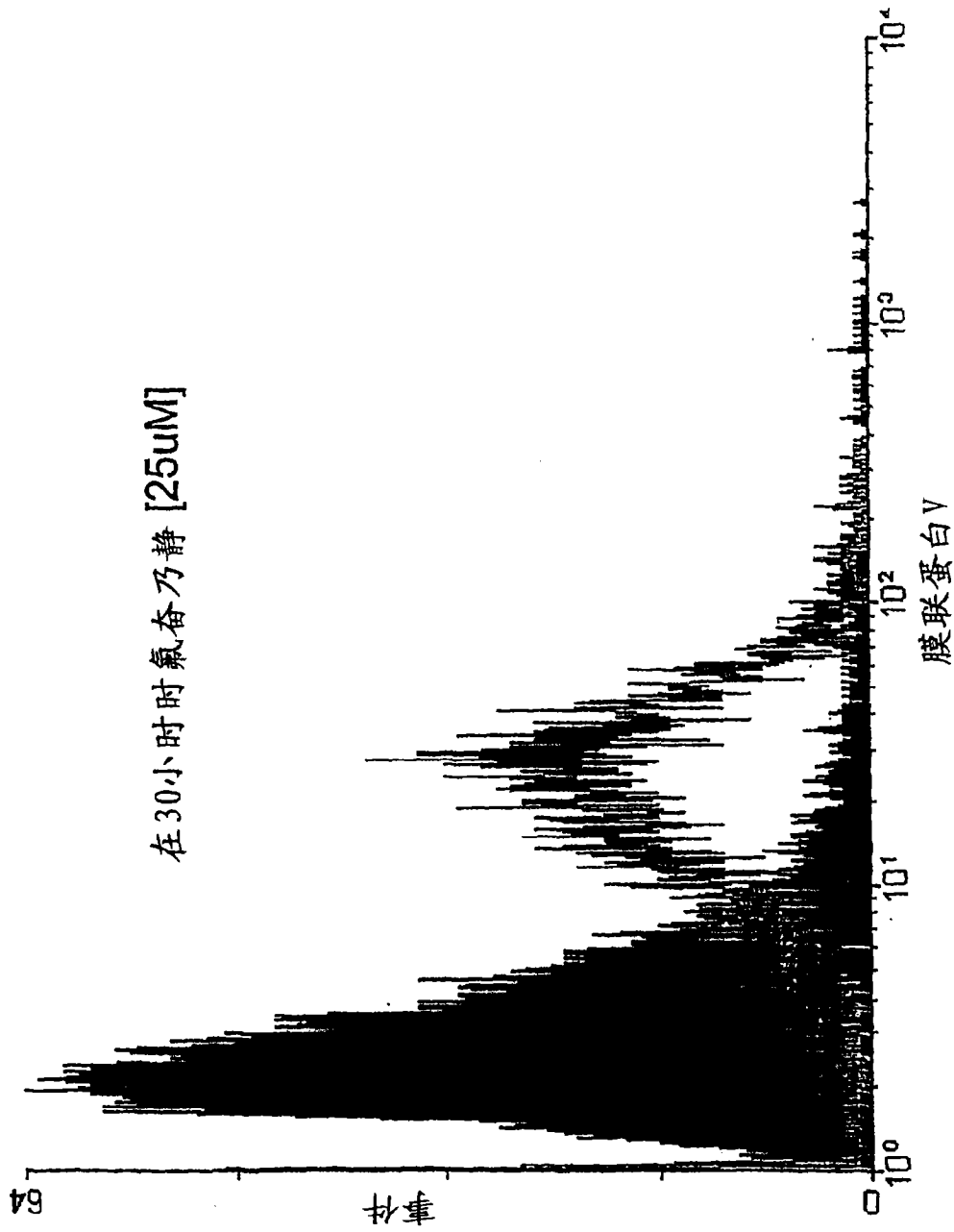


图 34I

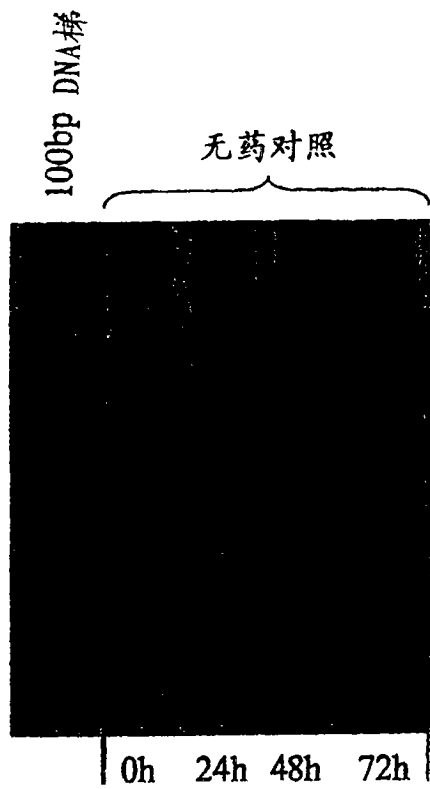


图 35A



图 35B

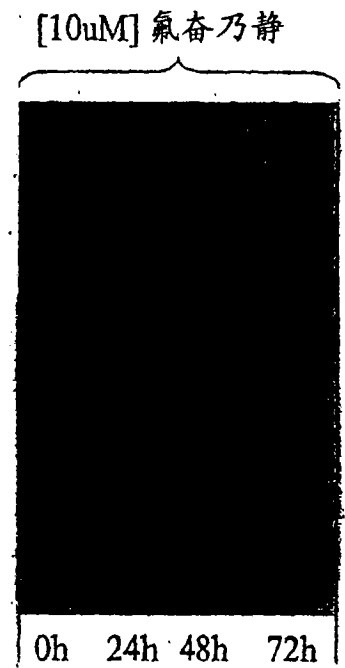


图 35C



图 35D

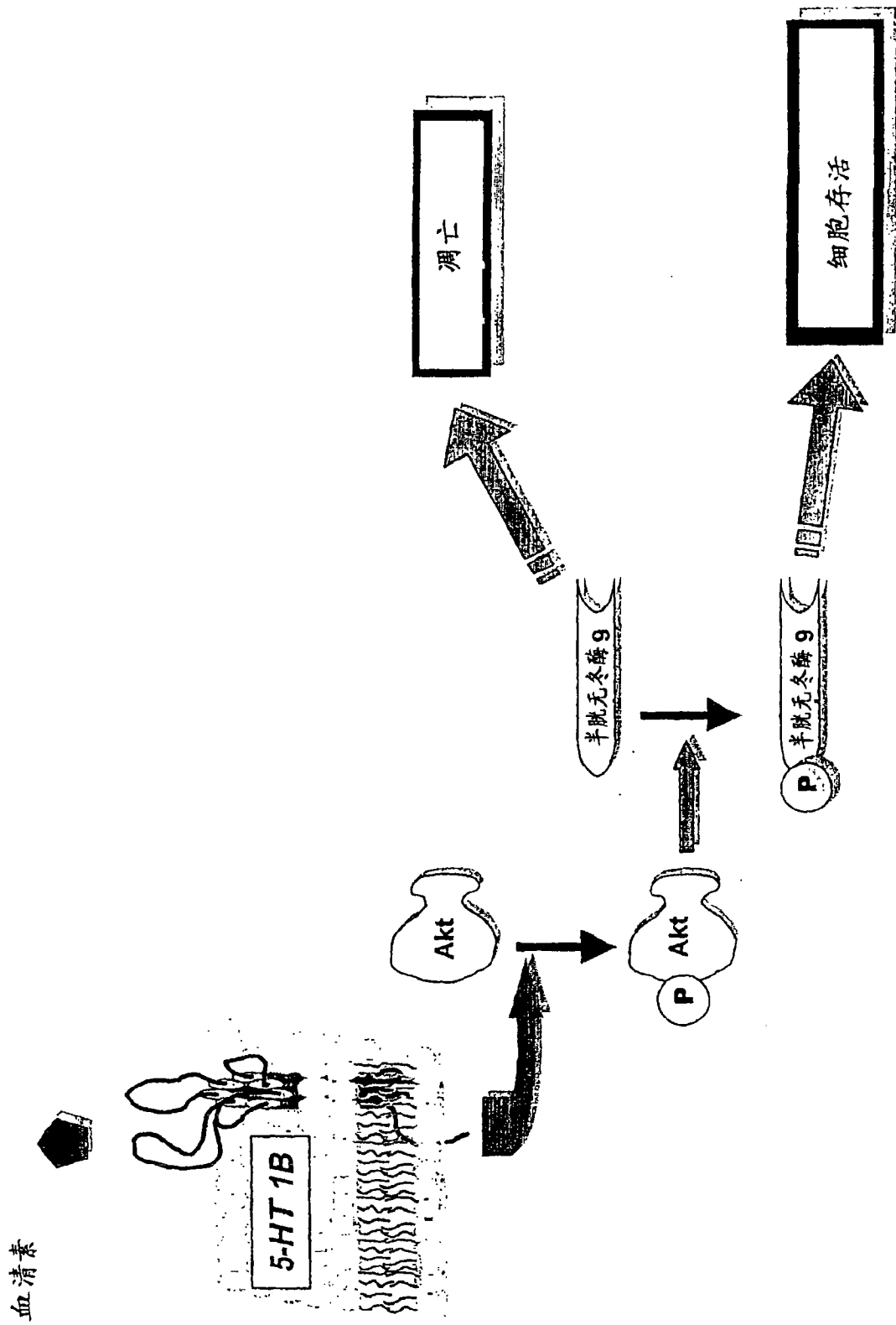


FIG. 36

图 36

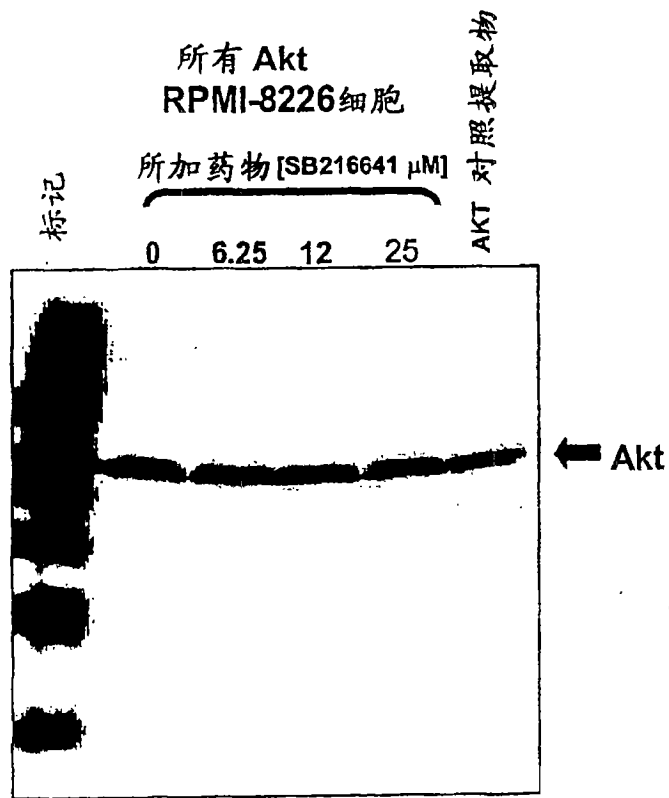


图 37A

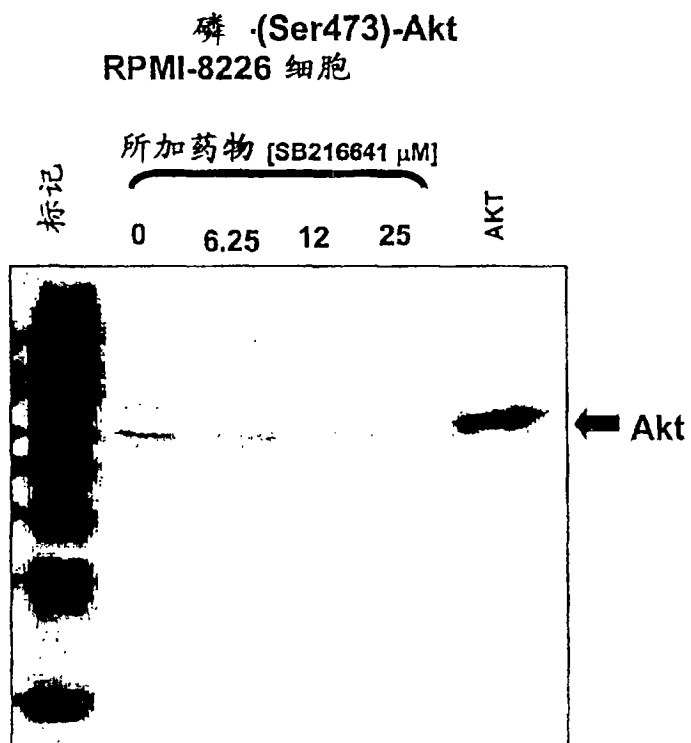


图 37B

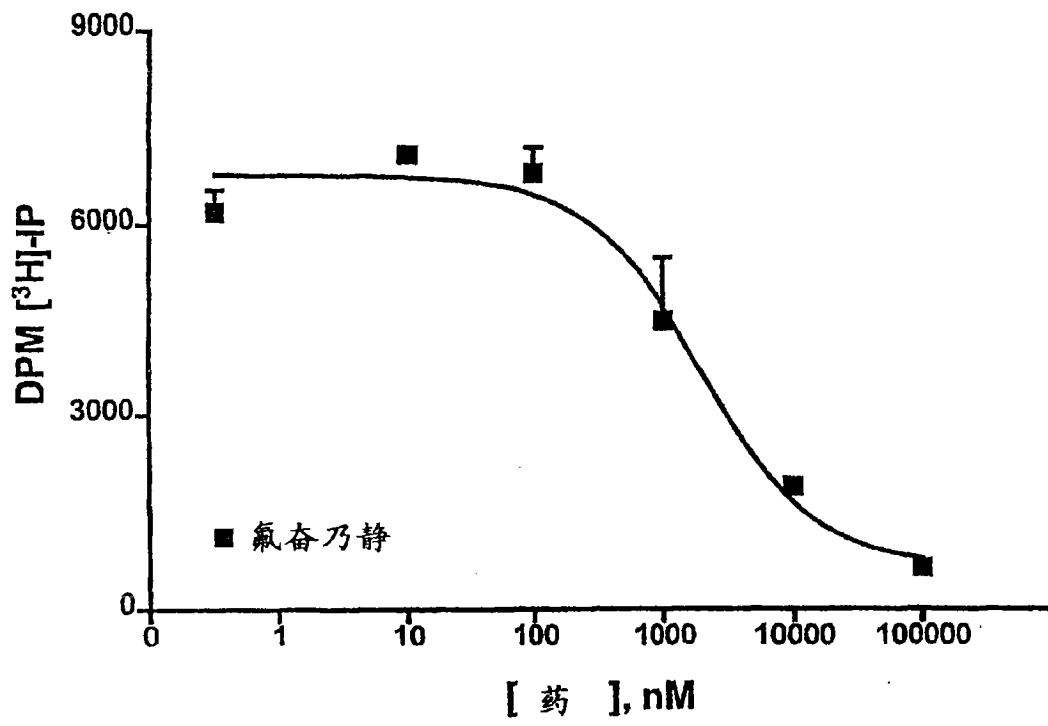


图 38

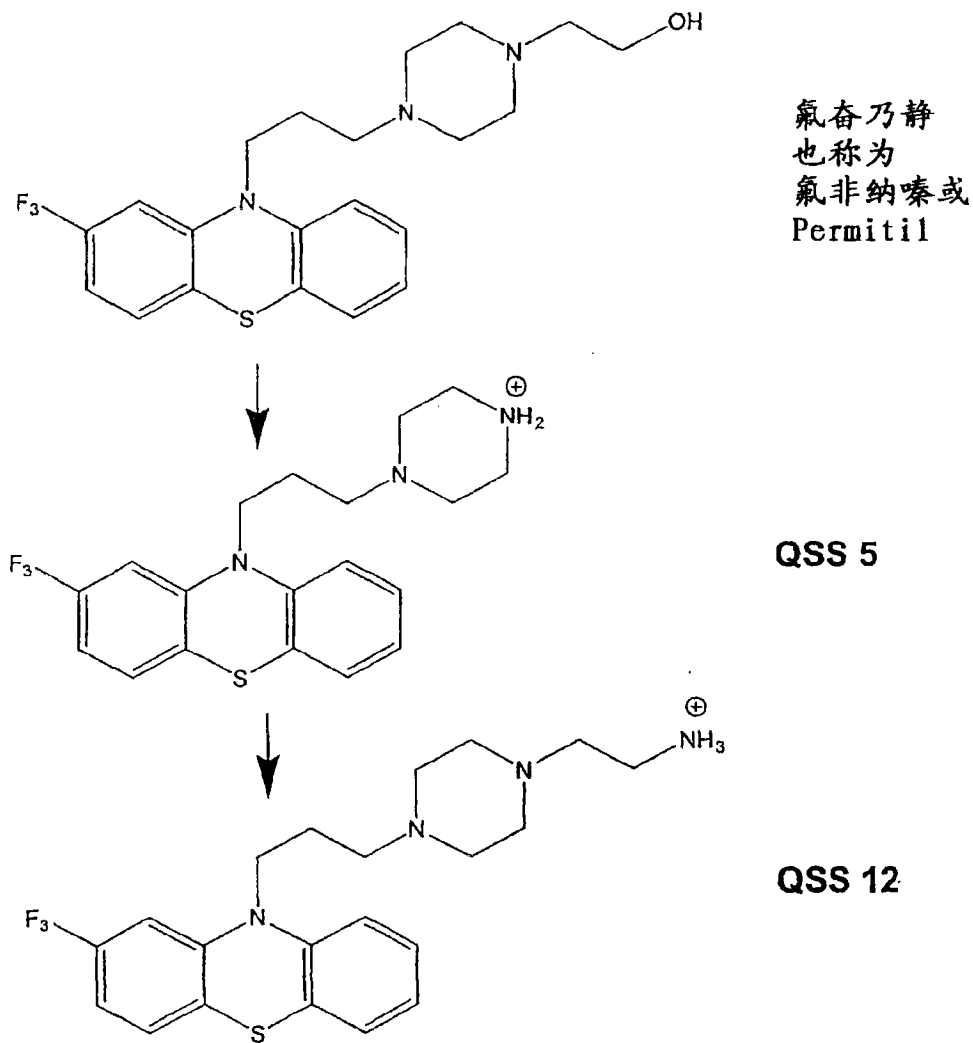


图 39

氟奋乃静-Exp2_Day0

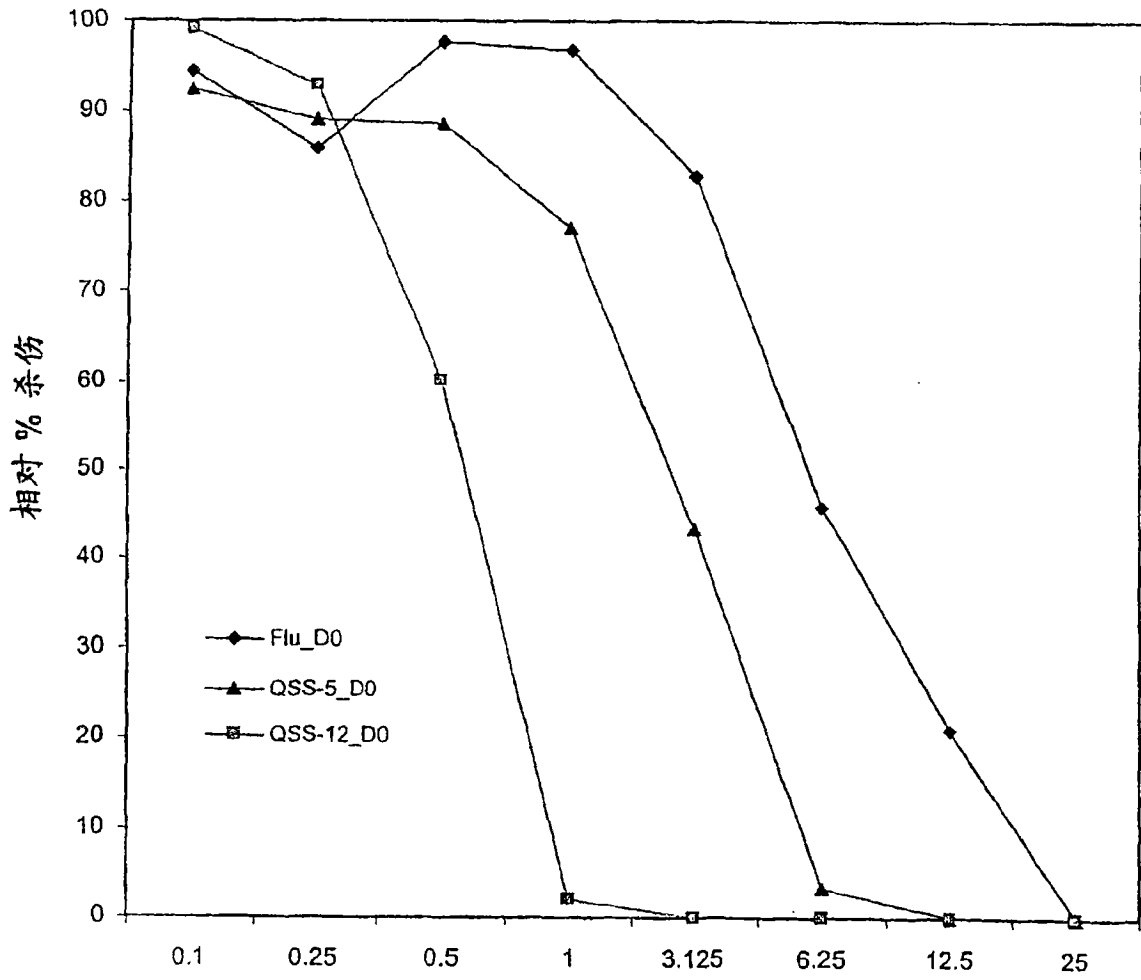


图 40

氟奋乃静衍生物在降低RPMI-8226细胞增殖中的效率

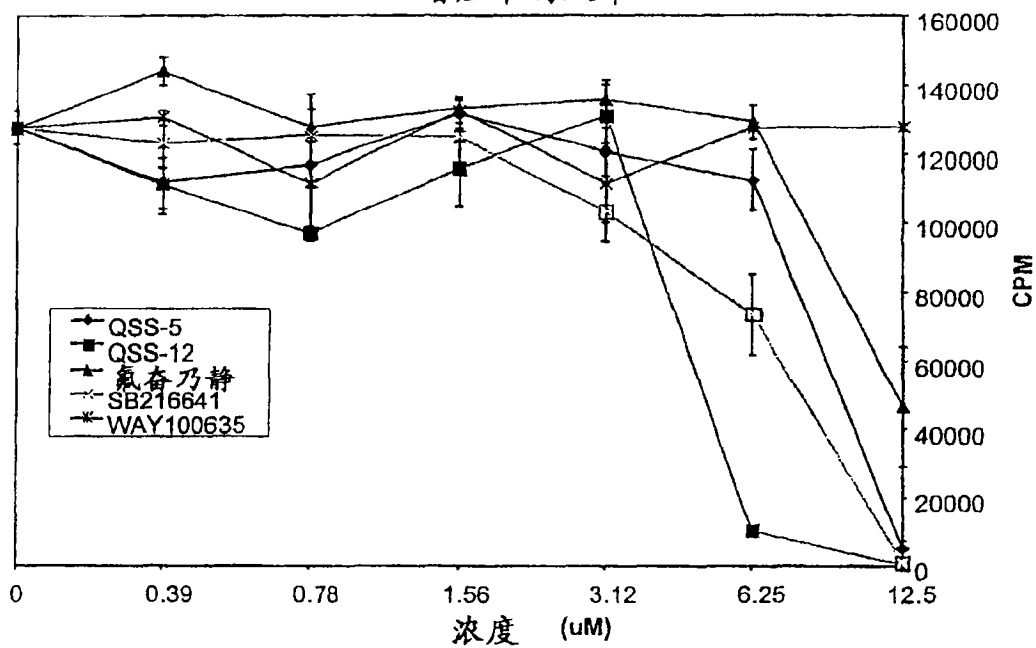


图 41A

氟奋乃静衍生物在降低U266细胞增殖中的效率

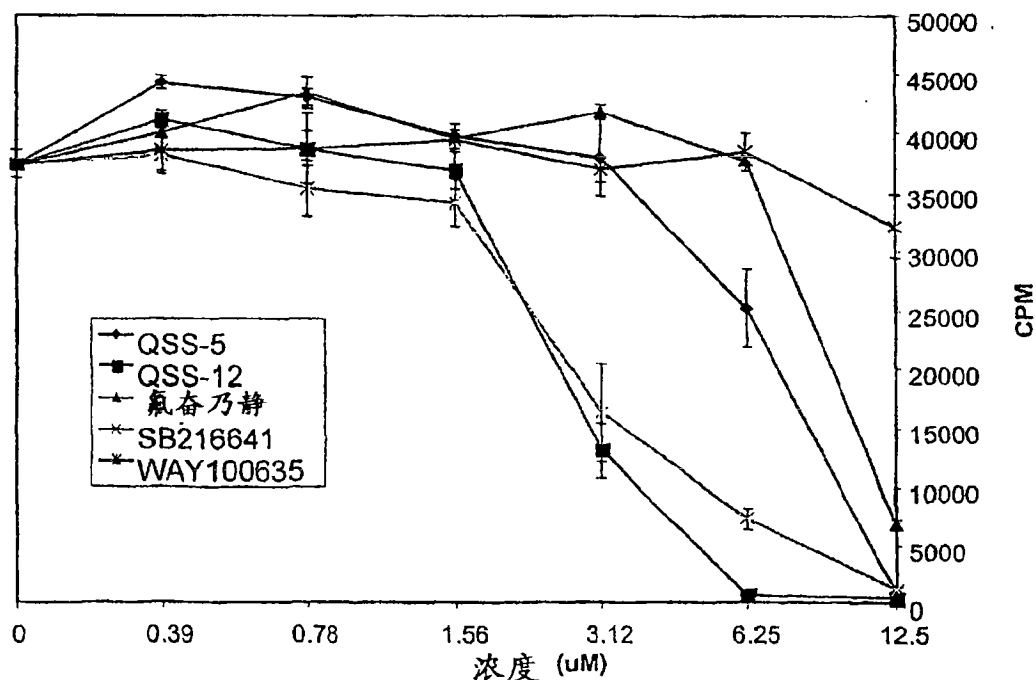


图 41B

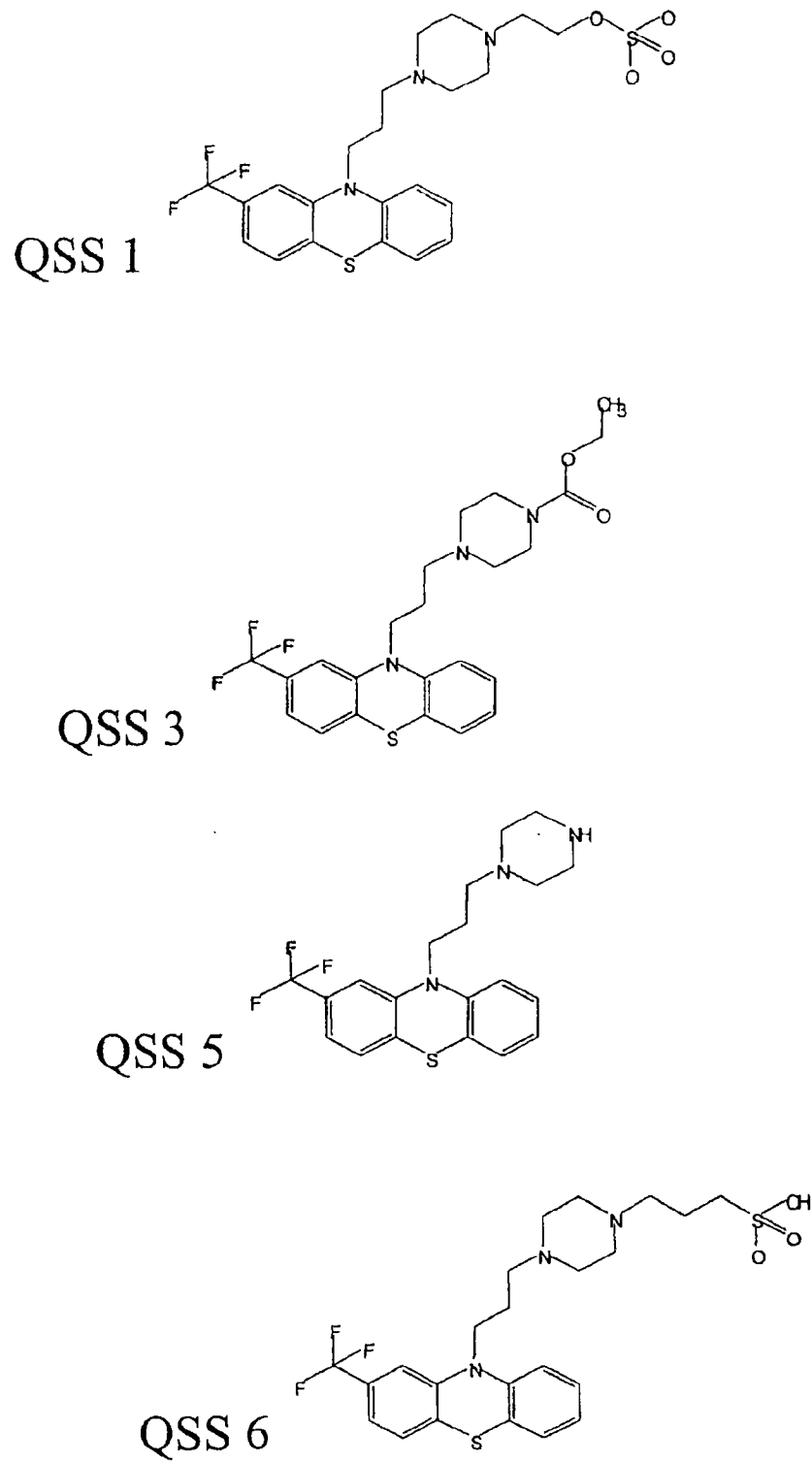


图 42

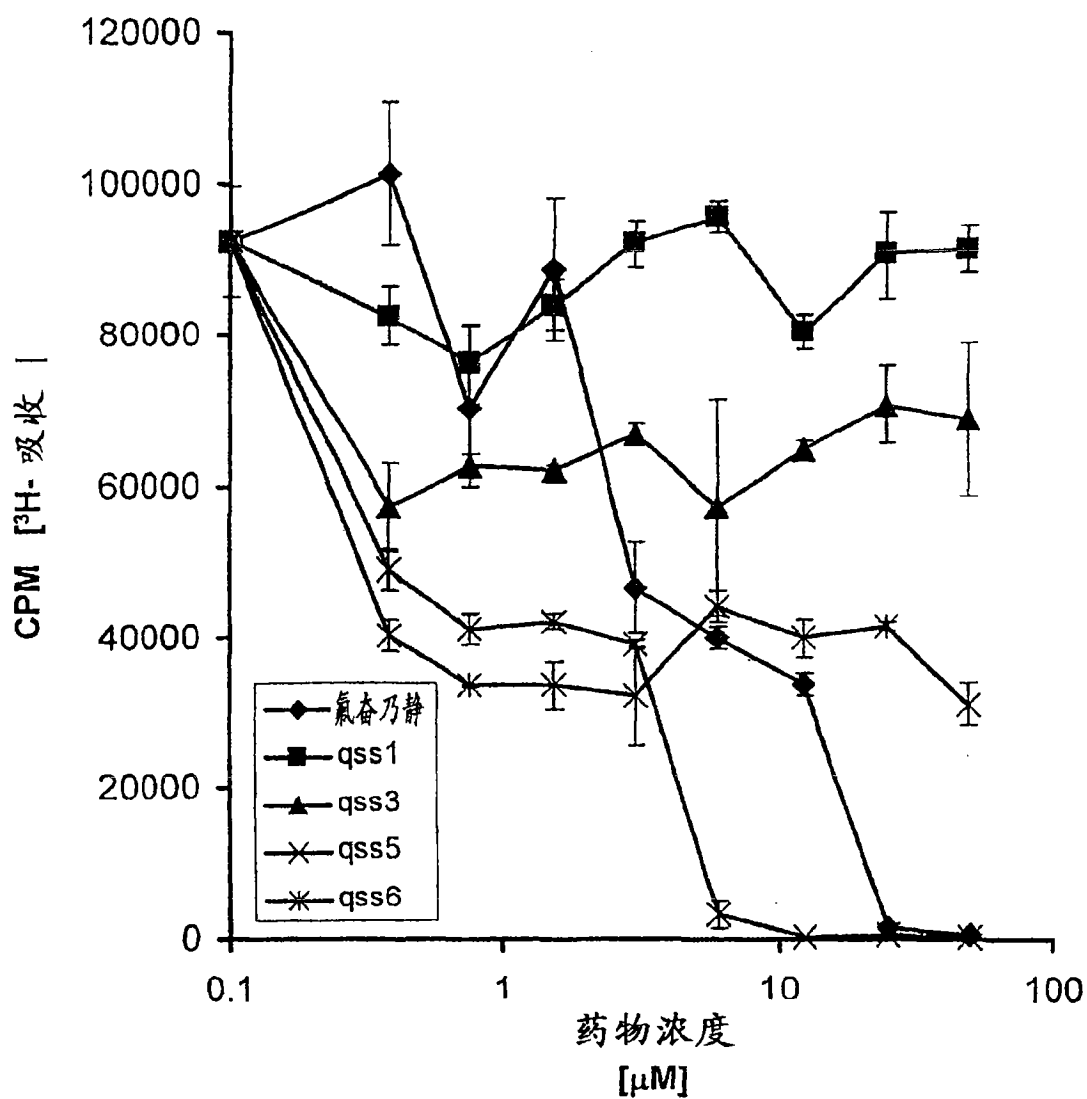


图 43

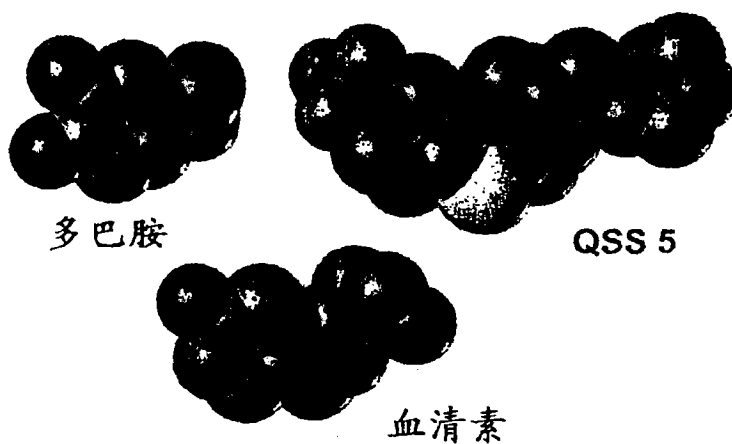


图 44