



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110869051 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201880045963.X

(22)申请日 2018.05.30

(30)优先权数据

62/512,457 2017.05.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/035064 2018.05.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/222670 EN 2018.12.06

(71)申请人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 巴哈雷·阿贾米 劳伦斯·斯坦曼

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务所(普通合伙) 11363

代理人 郭放 许伟群

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书30页 附图19页

(54)发明名称

对神经炎症性疾病的治疗

(57)摘要

本文提供了用于通过向受试者施用有效剂量的抗 α 5剂来治疗炎症性疾病的方法和组合。具体来说,提供用于治疗炎症性疾病,包括神经炎症性疾病,诸如神经炎症性脱髓鞘性自体免疫疾病,包括多发性硬化症(MS)和视神经脊髓炎(NMO),以及治疗肌萎缩性侧索硬化(ALS)的方法。

1. 一种用于治疗患者的炎症性疾病或疾患的方法,所述方法包括:
向所述患者施用治疗有效剂量的抗整合素- α_5 剂。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述患者是人。
3. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述炎症性疾病是多发性硬化症。
4. 一种用于治疗患者的肌萎缩性侧索硬化的方法,所述方法包括:
向所述患者施用治疗有效剂量的抗整合素- α_5 剂。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗整合素- α_5 剂使巨噬细胞活性降低以使对纹身的移除增强。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述抗 α_5 剂阻断整合素 α_5 与纤维连接蛋白的结合。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述抗 α_5 剂是特异性结合至整合素 α_5 、整合素 β_1 、或异二聚体整合素 $\alpha_5\beta_1$ 的抗体。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述抗体是对整合素 α_5 具有特异性的嵌合或人源化抗体或其特异性结合片段。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述抗体包含人IgG4Fc区。
10. 如权利要求3所述的方法,其进一步包括施用额外治疗剂以治疗多发性硬化症。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述额外治疗剂选自他汀、细胞因子;芬戈莫德;和克帕松。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述细胞因子是IFN β 。
13. 如权利要求1所述的方法,其中所述患者是关于对细胞因子疗法的响应性加以分析的患者,并且其中对治疗剂的选择基于此类分析。
14. 一种包括包装的组合物,所述包装包括抗 α_5 剂和包装插页或标签,所述包装插页或标签指示所述抗 α_5 剂将向患者施用以治疗神经炎症性疾病或ALS。

对神经炎症性疾病的治疗

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2017年5月30日提交的美国临时专利申请号62/512,457的权益,所述申请以引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 在欧洲和北美洲,多发性硬化症(MS)是最普遍的脑和脊髓炎症性疾病。在世界范围内有超过一百万人受影响,包括在美国的400,000人。症状经常开始于青壮年期,并且包括运动麻痹、视觉障碍和失明、肠和膀胱失禁、感觉丧失、以及不协调和共济失调。在美国,第一线核准疗法是乙酸格拉默(glatiramer acetate)(克帕松(Copaxone))、IFN- β 1a(爱莫内(Avonex)和立比扶(Rebif))和IFN- β 1b(倍泰龙(Betaseron)和艾塔维(Extavia)),并且第二线核准疗法是米托蒽醌(mitoxantrone)(诺凡特龙(Novantrone))和他他珠单抗(natalizumab)(泰萨布里(Tysabri))。近来,芬戈莫德(fingolomid)、特立氟胺(terflunimide)和反丁烯二酸二甲酯(dimethyl fumarate)已分别由美国FDA核准为用于治疗复发性MS的口服施用第一线疗法的新选项。

[0004] 当前核准的针对MS的治疗在它们的功效方面受限制,并且是昂贵的。因此,仍然急需发现针对MS的更好有效治疗。那他珠单抗(Natalizumab),作为一种针对 α 4整合素的人源化抗体,是最强力的治疗剂,但受累于威胁生命的严重副作用。超过1/500的用那他珠单抗治疗的个体已显现毁灭性机会性脑感染,即进行性多灶性脑白质病(PML)。这个不利作用归因于这个药物能够阻断T淋巴细胞以及单核细胞向CNS的归巢。然而,T细胞为对抗约翰坎宁安(John Cunningham,JC)病毒感染的再活化所需。对JC的T细胞免疫性会防止出现由JC病毒性感染所致的PML。

[0005] 本文提供使这些不合需要副作用降低的改进治疗方法。

发明内容

[0006] 提供用于治疗炎症性疾病,包括神经炎症性疾病,诸如像神经炎症性脱髓鞘性自体免疫疾病,诸如多发性硬化症(MS)和视神经脊髓炎(NMO)等,并且也包括治疗肌萎缩性侧索硬化(ALS)的治疗方法。在本发明方法中,以有效稳定或减轻疾病的临床症状的剂量向罹患神经炎症性疾病的受试者施用有效剂量的一种针对 α 5整合素(CD49e)的拮抗剂或针对 α 5整合素(CD49e)的拮抗剂的混合物。如本文所示,在疾病状态以及疾病状态的发展期间,与中枢神经系统(CNS)疾病相关的特定骨髓细胞群体表达CD49e。细胞群体的概述提供于表4中。群体A、B和C对应于小神经胶质细胞,其在ALS疾病的情况下上调CD49e。群体D、E、F、G和H是浸润性单核细胞,其与神经炎症性疾病相关,并且在神经炎症性脱髓鞘性疾病诸如MS、EAE等的发展中的特定阶段期间表达CD49e。

[0007] 在各个方面和实施方案中,方法可包括向罹患神经炎症性疾病的受试者施用有效剂量的特异性结合CD49e的抗体,其中治疗使疾病的临床症状减轻或稳定。在一些实施方案中,抗CD49e剂与第二治疗剂组合,所述第二治疗剂包括但不限于他汀(statin)、细胞因子、抗

体、克帕松、芬戈莫德等。在一些实施方案中，抗CD49e剂与处于有效控制血清胆固醇水平的剂量的他汀组合。

[0008] 在一个实施方案中，提供一种包括抗CD49e剂和包装插页或标签的包装（例如盒、瓶、或瓶和盒），所述包装插页或标签指示抗 α_5 剂将向患者施用以治疗神经炎症性疾病例如MS、NMO、ALS等。

[0009] 在一个实施方案中，提供一种治疗神经炎症性疾病例如MS、NMO等或ALS的方法，其包括向患者施用有效剂量的单独或与他汀组合，或与一种或多种治疗性化合物，包括但不限于细胞因子；抗体，例如泰萨布里；芬戈莫德（捷灵亚（Gilenya））；克帕松等组合的抗 α_5 剂。各药物在组合疗法的情况下的有效剂量可低于同一药物在单药疗法的情况下的有效剂量。在一些实施方案中，并行施用组合疗法。在一些实施方案中，逐步执行两种疗法，例如其中一种化合物初始以单一药剂形式提供，例如作为维持手段，并且其中第二化合物在复发期间施用，例如在复发起始时或之后，在复发达到高峰时等。

[0010] 在一实施方案中，提供一种用于治疗肌萎缩性侧索硬化的方法，所述肌萎缩性侧索硬化在本文中被显示在脊髓中具有高含量的CD49e⁺骨髓细胞。施用有效剂量的一种针对CD49e的拮抗剂或针对CD49e的拮抗剂的混合物以使ALS的临床症状稳定或减轻。在一些实施方案中，例如通过鞘内递送等来将针对CD49e的拮抗剂递送至脑脊髓液中。在一些实施方案中，递送是全身性的。

[0011] 在另一实施方案中，提供一种用于通过向个体施用一种针对CD49e的拮抗剂或针对CD49e的拮抗剂的混合物以移除需要移除的纹身来移除纹身的方法，其中针对CD49e的拮抗剂使促成纹身的永久性的巨噬细胞的活性降低。在一些实施方案中，将针对CD49e的拮抗剂局部递送至纹身部位。在一些实施方案中，通过持续释放制剂来将针对CD49e的拮抗剂递送至纹身部位。在其他实施方案中，递送是全身性的。

[0012] 或者，抗CD49e剂初始以单一药剂形式提供，例如作为维持手段，并且额外药剂在复发期间施用，例如在复发起始时或之后，在复发达到高峰时等。在某些所述实施方案中，提供一种包装，其包括抗CD49e剂和一种或多种第二治疗性化合物、以及包装插页或标签，所述包装插页或标签指示所述抗CD49e剂将与所述第二化合物组合向患者施用以治疗神经炎症性疾病。

[0013] 在本发明的一些实施方案中，分析患者对疗法的响应性，其中对治疗剂的选择基于所述分析。免疫调节性治疗对中枢神经系统的神经炎症性疾病例如多发性硬化症、视神经脊髓炎、EAE等的功效取决于患者主要具有TH1型疾病亚型还是主要具有TH17型疾病亚型。可通过测定标志物的水平来将患者分类成各亚型，所述标志物包括IL-17；内源性 β -干扰素、IL-23、PDGFBB、sFAS配体、M-CSF、MIP1 α 、TNF- β 、IFN α 、IL-1RA、MCP-1、IL-2、IL-6、IL-8、FGF β 、IL-7、TGF- β 、IFN β 、IL-13、IL-17F、嗜酸性粒细胞趋化因子（EOTAXIN）、IL-1a、MCP-3、LIF、NGF、RANTES、IL-5、MIP1b、IL-12p70和HGF等。细胞因子诸如 β -干扰素可与抗CD49e剂组合来向主要具有TH1型疾病亚型的个体施用。

[0014] 在其中待治疗的疾患是神经炎症性疾患例如MS、EAE、NMO等的一些实施方案中，可在CD49e单核细胞群体浸润CNS时治疗患者。对应于疾病阶段的群体变化的概述显示于图5C中。举例来说，可观察到增加，其中频率是存在于CSF中的总细胞的大于约1%、大于约2%、大于约3%。也可相对于正常对照，或相对于对应于正常对照中的水平的参照值来测量增

加。相对于健康对照,在疾病的情况下,群体中产生两种或更多种细胞因子,例如如图12中所示,表达TNF α 、GM-CSF、IL-6、IL-10和TGF β 中的两者或更多者的细胞的数目也增加。在一些实施方案中,从来自患者的样品测量存在于CSF中的细胞的指示浸润性骨髓细胞的标志物,以及变化的存在性,所述变化特别是表达CD49e的细胞的变化,以作为治疗的基础加以利用。

[0015] 在CNS中的群体D、G和H中存在细胞数目增加指示症状发生前疾病。这个增加提供一种适用于症状发生前疾病的生物标志,并且可在观察到增加时用抗CD49e剂治疗患者。在疾病发作时,在CNS中,在群体D、E、F和G中存在细胞数目增加是显著的,并且可在观察到这种增加时用抗CD49e剂治疗患者。在疾病达到高峰时,群体D的增加是特别显著的,但其他群体也增加,并且可在观察到这种增加时用抗CD49e剂治疗患者。引起关注的是,恢复与增加数目的表达单一细胞因子TNF α 、IL-6、TGF β 或不表达细胞因子TNF α 、IL-6、TGF β 的群体F细胞相关。

附图说明

[0016] 当与附图联合加以阅读时,本发明根据以下具体实施方式而得以最佳了解。需要强调的是,根据惯例,附图的各种特征并非按比例绘制。相反,各种特征的尺寸为明晰起见而加以任意扩大或缩减。附图中包括下图。

[0017] 图1.实验策略的图示。分析在健康、实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)的五个不同临床阶段以及作为明确确定的亨廷顿氏病(HD)小鼠模型的R6/2转基因小鼠的情况下的免疫应答概况。如材料和方法中所述制备来自各状况的CNS(脑和脊髓)和全血的单细胞混悬液。个别样品通过使用条形码化策略(材料和方法)来同时处理。将条形码化样品汇合,用一组39种抗体(图12、图2和图3以及材料和方法)染色,并且通过质谱流式细胞术(CyTOF)来分析。将原始质谱流式细胞术数据关于随时间的信号变化加以标准化并解条形码,并且使用X偏移算法来分析,所述X偏移算法是一种非参数聚类方法,其通过搜索多维标志物空间中细胞事件密度的局部最大值来自动鉴定细胞群体。结果显示为最小生成树(MST)布局。各实验独立地进行七至十次。在各实验中,将来自十只小鼠的组织汇合以提供足够细胞数目。

[0018] 图2A-图2D.数据驱动无监督聚类确定CNS中三个不同骨髓性群体。图2A通过使来自所有状况和它们的生物重复测定的CNS样品组合来构建的X偏移簇的复合CNS最小生成树(MST)与来自血液样品的复合MST的比较显示为CNS所特有的三个骨髓性(CD11b+)群体(群体A、B和C)。图2B基于通过X偏移/DMT算法确定的标志物的手动门控确认存在群体A、B和C。图2C-图2D MST图2C说明各状况的X偏移聚类频率以及条形图,图2D呈现基于手动门控的平均频率分析,证明群体A、B和C在EAE模型与HD模型两者中均存在于CNS中。误差棒代表跨越重复测定的标准偏差。色彩编码的标度代表各标志物的 $\text{arsinh}(x/5)$ 变换CyTOF信号强度,如材料和方法中所述。数据来自五个或六个独立实验。

[0019] 图3A-图3D.CNS驻留骨髓细胞中免疫活化路径的关键信号传导分子的动态。线形图显示每个群体原始CyTOF信号强度的平均表达水平的中值。误差棒代表跨越生物重复测定的标准误差(SE)(数据来自五个或六个独立实验)。灰色区域代表样品中的所有细胞中给定信号传导分子的跨越重复测定加以平均化的四分位数间距,因此指示各标志物的总体表达范围。

[0020] 图4A-图4D.对由三个CNS驻留骨髓性子组应答于不同疾病状况达成的细胞因子产生的单细胞分析。图4A分布图(小提琴图)显示根据疾病状况和细胞群体加以分组的所指示细胞内细胞因子的表达水平。各图在Mathematica中创建。各图显示 $\text{arsinh}(x/5)$ 变换CyTOF信号强度。图4B-图4D对健康和患病状态下CNS驻留骨髓细胞中细胞因子共同表达的分析,所述分析证明在各子群体中具有异质性子组。表达零种、一种或两种细胞因子的单细胞的百分比以叠加条形图表示。数据来自三个独立实验。

[0021] 图5A-图5D.相对于退变性疾患,在炎症性疾患的情况下,血液源性单核细胞向CNS中迁移的动力学。图5A复合MST揭示CNS中的五个不同 $\text{Ly6C}^+\text{Ly6G}^-$ 骨髓性群体(血液源性单核细胞)。图5B各群体通过基于通过X偏移/DMT算法确定的标志物的手动门控来确认。图5C基于手动门控的平均频率分析证明在健康和神经变性疾患的情况下存在血液源性单核细胞的最小积累。在EAE疾病的情况下,视疾病状态而定,不同血液源性单核细胞子组进行积累。误差棒代表跨越重复测定的标准偏差。图5D血液源性单核细胞表达MHC-11。数据来自五个或六个独立实验。

[0022] 图6A-图6C.在炎症性疾患的情况下,相对于驻留骨髓细胞,在浸润性骨髓细胞上细胞表面表型和信号传导分子具有差异性表达。图6A细胞表面表型分析揭示相较于CNS驻留骨髓细胞,高表达的CD49d(4整合素)和CD49e(5整合素)仅处于浸润性单核细胞上。CD49e仅在单核细胞上表达,而CD49d也在T细胞和DC上表达。图6B相较于同种型对照,用针对CD49e($\alpha 5$ 整合素)的抗体治疗的EAE小鼠的平均临床评分。相较于同种型对照,用针对CD49e($\alpha 5$ 整合素)的抗体治疗的小鼠($n=5$)展现疾病发作的显现的延迟以及所治疗动物中显著减轻的总体疾病严重性。实验由于对照小鼠具有高罹病率而终结。误差棒代表标准误差(SE)。图6C表示在存在所有五个单核细胞子组所处的症状发生前、发作和高峰的情况下,在CNS驻留骨髓细胞与血液源性单核细胞之间,各信号传导分子的原始CyTOF信号强度的平均表达水平的中值的比较的热图。色彩表示信号传导分子表达范围,从蓝色(不可检测)至白色(中等)至红色(最大)。质谱流式细胞术数据来自五个或六个独立实验。

[0023] 图7A-图7B.对由不同血液源性单核细胞子组应答于不同疾病状况达成的细胞因子产生的单细胞分析。图7A根据疾病状况和细胞群体加以分组的所指示细胞内细胞因子的水平的分布图。各图在Mathematica中创建。数值通过 $\text{arsinh}[x/5]$ 来换算。图7B对血液源性单核细胞子组中细胞因子的共同表达的X偏移分析表明视各疾病状况而定,各子群体含有异质性子组。表达零种、一种、两种、三种或四种细胞因子的单细胞的百分比以叠加条形图表示。数据来自三个独立实验。

[0024] 图8.三个CNS驻留骨髓性子组中若干标志物的表达类似性。群体A、B和C表达不同水平的CD88、I类MHC(H2)、TAM受体酪氨酸激酶Mer(MerTK)以及新近提出的小神经胶质细胞标志物4D4和fcr1s。

[0025] 图9.三个CNS驻留骨髓性子组中若干标志物的表达的变化。在三个CNS驻留骨髓细胞中检测到许多标志物的差异性表达。群体B和C表达不同水平的CD80、TAM受体Ax1、T细胞免疫球蛋白粘蛋白4(TIM4)、CD274(PD-L1)、CD195(CCR5)、CD194(CCR4)以及低水平的CD206和TREM2。群体A缺乏所有这些标志物的表达。

[0026] 图10.CNS驻留骨髓性子组中YFP的表达。在健康条件性 $\text{Cx3cr}^{\text{creER}} \text{Rosa26-YFP}$ 小鼠中,对群体A和B(仅有的在健康状况下存在的两个群体)进行手动门控,并且确认了YFP在它

们之中的表达。门控策略描述于图2b中。

[0027] 图11. 五个血液源性单核细胞子组中若干标志物的表达的变化。在血液源性单核细胞子组中检测到许多标志物的差异性表达。相较于其他三个子组,群体D和E具有更高表达的吞噬受体如TAM受体酪氨酸激酶Mer、Ax1、共刺激性分子(CD80、CD86)、嘌呤能信号传导中涉及的受体(CD38、CD39)和TREM2以及CD206。

[0028] 图12. 在神经炎症性疾病期间,骨髓性群体D-H中细胞因子的表达。

[0029] 图13. 在作为鼠ALS模型的过度表达人突变超氧化物歧化酶1(mSOD)的小鼠中,在疾病终末阶段时,小神经胶质细胞群体中CD49e表达增加。

[0030] 图14. 在mSOD1疾病的发展期间,CSF中小神经胶质细胞群体的频率。

[0031] 图15. 在mSOD1疾病的发展期间,小神经胶质细胞中细胞因子的表达。

具体实施方式

[0032] 在描述本发明方法之前,应了解本发明不限于所述特定方法,因此,当然可变化。也应了解本文所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不意图具有限制性,因为本发明的范围将仅受限于随附权利要求。

[0033] 当提供数值范围时,应了解除非上下文另外明确规定,否则在那个范围的上限与下限之间的达到下限单位的十分之一的各间插值以及在那个陈述的范围内的任何其他陈述值或间插值都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在较小范围内,服从于陈述范围内的任何明确排除的限值。除非上下文另外明确规定,否则如本文以及随附权利要求中所用,单数形式“一个(种)”和“这个(种)”包括复数个(种)指示物。

[0034] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本发明所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。尽管与本文所述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料也都可用于实施或测试本发明,但现时描述优选方法和材料。本文提及的所有出版物都以引用的方式并入本文以公开和描述与引用所述出版物有关的方法和/或材料。

[0035] 本文讨论的出版物仅由于它们的公开内容在本申请的提交日期之前而加以提供。本文中没有任何内容应解释为承认本发明无权借助先前发明而先于所述出版物。此外,提供的公布日期可不同于可能需要独立确认的实际公布日期。

[0036] 分子和细胞生物化学中的一般性方法可见于诸如以下的标准教科书中: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版(Sambrook等, Harbor Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 第4版(Ausubel等人编, John Wiley&Sons 1999); *Protein Methods*(Bollag等, John Wiley&Sons 1996); *Nonviral Vectors for Gene Therapy*(Wagner等人编, Academic Press 1999); *Viral Vectors*(Kaplift和Loewy编, Academic Press 1995); *Immunology Methods Manual*(I.Lefkovits编, Academic Press 1997); 以及 *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*(Doyle和Griffiths, John Wiley&Sons 1998)。本公开中提及的用于遗传操作的试剂、克隆载体和试剂盒可从商业供应商诸如BioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-Aldrich和ClonTech获得。

[0037] 本发明已关于由本发明者发现或提出来包括用于实施本发明的优选模式的特定

实施方案加以描述。本领域技术人员应了解,鉴于本公开,可在不脱离本发明的预定范围下,在例示的特定实施方案中进行众多修改和变化。所有所述修改都意图包括在随附权利要求要求的范围内。

[0038] 疾病改进疗法在神经疾病的情况下的使用方面的改进受到极大临床关注。在某些方面和实施方案中,本发明方法和组合物解决这个需要。

[0039] 主题方法可用于防治性或治疗性目的。如本文所用,术语“治疗”用于指代对预先存在疾患的复发的预防与对预先存在疾患的治疗两者。举例来说,预防自体免疫疾病可通过在复发显现之前施用药剂来实现。如本文所用的“治疗”涵盖对特别是人的哺乳动物的疾病的任何治疗,并且包括:(a) 预防疾病或症状在可易患疾病或症状,但尚未被诊断为患有它的受试者中出现;(b) 抑制疾病症状,即遏止它的发展;或(c) 减轻疾病症状,即导致疾病或症状的消退。对进行性疾病的治疗受到特别关注,其中治疗使患者的临床症状稳定或改进。

[0040] “抑制”病症的发作将意指减小所述病症的发作的可能性,或完全预防所述病症的发作。减轻复发的严重性将意指相比于在未治疗疾病的情况下,在疗法存在下,与复发相关的临床迹象的严重性较小。如本文所用,发作可指患有进行性复发缓解型疾病的患者中的复发。本发明方法特定用于已被诊断有神经炎症性疾病的患者。治疗旨在治疗复发或减轻复发的严重性,所述复发是预先存在疾患的恶化。

[0041] 如本文所用的“诊断”通常包括确定受试者对疾病或病症的易感性,关于受试者是否当前受疾病或病症影响进行确定,对受疾病或病症影响的受试者进行预后(例如鉴定疾病状态、MS的阶段、或MS对疗法的响应性),以及使用治疗度量(例如监测受试者的状况以提供关于疗法的作用或功效的信息)。

[0042] 术语“生物样品”涵盖从生物体获得的多种样品类型,并且可用于诊断或监测测定中。所述术语涵盖血液、脑脊髓液、以及其他生物来源液体样品、固体组织样品诸如活检试样或组织培养物或其获得的细胞及其子代。所述术语涵盖在取得样品之后已以任何方式加以操作的样品,所述方式诸如通过用试剂处理、溶解、或使某些组分富集。所述术语涵盖临床样品,并且也包括细胞培养中的细胞、细胞上清液、细胞溶解产物、血清、血浆、生物流体和组织样品。

[0043] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用,并且是指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者,例如人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、豚鼠、兔等。

[0044] “抑制”细胞中基因的表达将意指减小所述基因被表达的程度,或完全阻止所述表达。

[0045] 整合素是介导细胞粘附的异二聚跨膜受体。大多数整合素结合细胞外基质(ECM)糖蛋白诸如基底膜中的层粘连蛋白(laminin)和胶原或结缔组织组分如纤维连接蛋白(fibronectin)。结合整合素的许多ECM蛋白共有共同整合素结合基序Arg-Gly-Asp(RGD),其存在于纤维连接蛋白、玻连蛋白(vitronectin)、纤维蛋白原(fibrinogen)和许多其他蛋白中。其他整合素结合相邻细胞上的反受体、细菌多糖或病毒外壳蛋白。整合素介导的粘附调节控制细胞运动性、存活、增殖和分化的信号传导级联。

[0046] 对于许多生物过程,最特别是止血和免疫性,重要的是整合素介导的粘附可受调控。整合素-配体联结的数目可通过细胞形状的变化、整合素在膜中的侧向扩散、以及整合

素簇集来调控;可通过细胞骨架组构来控制各个方面。另外,个别整合素对它们的配体的内在亲和力可从细胞内部加以调控,这是一种被称为“由内向外信号传导(inside-out signaling)”的过程。

[0047] 整合素啮合会触发形成膜延伸部分,所述膜延伸部分为细胞在ECM表面上的散布、细胞向其他细胞片层中的迁移、或粒子或病原体由吞噬细胞吞噬所需。最终,配体、整合素、细胞骨架蛋白和信号传导分子以高局部浓度在质膜的各侧上组装成聚集物,从而在整合素结合ECM蛋白的情况下形成“细胞-基质粘附”。整合素功能主要取决于整合素与细胞骨架的连接。整合素细胞质尾部通过受精巧调控的多蛋白复合物来连接于F-肌动蛋白微丝。

[0048] 整合素 $\alpha 5$ (CD49e、ITGA5)参照蛋白质序列可以Genbank登录号NP_002196获取。 α 链常常与整合素 $\beta 1$ 配对,即 $\alpha 5\beta 1$,其结合纤维连接蛋白内的Arg-Gly-Asp(RGD)基序。纤维连接蛋白中在RGD基序外部的残基为整合素-配体对提供特异性以及高亲和力。 $\alpha 5\beta 1$ 整合素和Fn形成原型整合素-配体对,其介导纤维连接蛋白原纤维形成,并且操纵对体内细胞功能至关重要的细胞外基质组装。缺乏 $\alpha 5\beta 1$ 或Fn会导致早期胚胎致死性。除存在于Fn III型模块10中的RGD序列之外,存在于Fn III型模块9中的一组残基(协同位点)也促进由 $\alpha 5\beta 1$ 达成的高亲和力识别。

[0049] 如本文所用,“拮抗剂”或“抑制剂”是指在与靶标蛋白质相互作用(例如结合)时使所述靶标蛋白质的数量或生物活性的作用持续时间降低的分子(例如在募集和迁移时白细胞与内皮细胞之间的相互作用)。拮抗剂可包括蛋白质、核酸、碳水化合物、抗体或使蛋白质的作用降低的任何其他分子。除非另外规定,否则术语“拮抗剂”可与“抑制剂”或“阻断剂”以可互换方式使用。

[0050] 如本文所用的术语“剂”包括任何物质、分子、元素、化合物、实体或其组合。它包括但不限于例如蛋白质、寡肽、小有机分子、多糖、多核苷酸等。它可为天然产物、合成化合物或化合物、或两种或更多种物质的组合。除非另外规定,否则术语“剂”、“物质”和“化合物”可以可互换方式使用。

[0051] 术语“类似物”在本文中用于指代在结构上类似于目标分子,但已通过用替代性取代基替换参照分子的特定取代基来以靶向和受控制方式加以修饰的分子。相较于起始分子,类似物可展现相同、类似或改进效用。合成和筛选类似物以鉴定已知化合物的具有改进性状(诸如在特定受体类型下的效能更高,或在所靶向受体类型下的选择性更高以及其他受体类型下的活性水平更低)的变体是一种在药物化学中熟知的方法。

[0052] 抗整合素 $\alpha 5$ 剂。如本文所用,抗整合素 $\alpha 5$ (抗 $\alpha 5$)剂阻断特别是人整合素 $\alpha 5$ 的整合素 $\alpha 5$ 的活性。在一些实施方案中,抗 $\alpha 5$ 剂是特异性结合 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 和/或 $\alpha 5\beta 1$ 整合素的抗体。在一些实施方案中,抗 $\alpha 5$ 剂是可包含RGD基序的肽或肽模拟物。在一些实施方案中,抗 $\alpha 5$ 剂是小分子。在一些实施方案中,抗 $\alpha 5$ 剂阻断 $\alpha 5$ 和/或 $\alpha 5\beta 1$ 与纤维连接蛋白的结合。在一些实施方案中,抗 $\alpha 5$ 剂阻断抗 $\alpha 5$ 剂与 $\beta 1$ 整合素的相互作用。

[0053] 特定目标抗 $\alpha 5$ 剂包括不限于人源化或嵌合形式的小鼠抗人CD49e抗体:IIA(BD biosciences,功能阻断性鼠抗体);抗人 $\alpha 5$ (CD49e)整合素抗体:NKI-SAM-1;整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抗体M200(伏洛昔单抗(Volociximab)),即鼠IIA1抗体的嵌合人IgG4形式;F200,即 $\alpha 5\beta 1$ 功能阻断性鼠抗体IIA1的嵌合人IgG4形式的Fab衍生物;抗体PF-04605412,即阻断整合素与基底的连接的靶向整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的完全人Fc经工程改造IgG1单克隆抗体。对人 $\beta 1$ 整合素具有特

异性的抗体在本领域中也是已知的,包括例如TS2/16、Poly6004等。以引用的方式明确并入本文的美国专利号8,350,010教导小分子肽抑制剂Ac-PHSCN-NH₂(公开于W0-9822617A1中)。ATN-161是一种源于具有人纤维连接蛋白PHSRN序列的协同区域的五氨基酸乙酰化酰胺化PHSCN肽。原始序列中的精氨酸氨基酸用半胱氨酸残基替换。ATN-161的类似物包括例如ATN-453、PHSCN-多赖氨酸树枝状聚合物(Ac-PHSCNGGK-MAP)、PhScN(其中组氨酸和半胱氨酸用D-异构体替换)、PHSC(S-OAc)N、PHSC(S-Me)N、PHSC(S-acm)N,所述类似物已被报道比ATN-161更强力。

[0054] 诸如伏洛昔单抗的抗体的例如用于达成安全性概况、可行性、活性、药物动力学和药理学特性的给药和抗体施用方案可遵循用于癌症治疗的给药,或可改变剂量以治疗自体免疫疾病。举例来说,剂量水平可在约0.1至约25mg/kg的范围内,每日、每半周、每周、每隔一周、每月等加以施用。对于递送诸如伏洛昔单抗的抗体,用于成人的剂量可为约0.1mg/kg;约0.25mg/kg;约0.5mg/kg;约0.75mg/kg;约1mg/kg;约1.25mg/kg;约2.5mg/kg;约5mg/kg;多达约25mg/kg、多达约15mg/kg;多达约10mg/kg。供人使用的平均总每日剂量可为多达约250mg;可为多达约200mg;可为多达约100mg,可为多达约75mg,可为多达约50mg。

[0055] 目标拮抗剂包括如上所述的抗体。也包括可溶性受体、受体和Fc区的缀合物等。通常,如所述术语在说明书中所用,“抗体”或“抗体部分”意图包括具有会配合于表位以及识别表位的特定形状的任何含多肽链分子结构,其中一种或多种非共价结合相互作用使所述分子结构与所述表位之间的复合物稳定。原型抗体分子是免疫球蛋白,并且来自所有来源(例如人、啮齿动物、兔、母牛、绵羊、猪、狗、其他哺乳动物、鸡、火鸡、鹌鹑、其他鸟类等)的所有类型的免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA、IgE、IgD等)都被视为“抗体”。用于本发明中的抗体可为多克隆抗体,但单克隆抗体是优选的,因为它们可通过细胞培养或重组来再产生,并且可被修饰以使它们的抗原性降低。

[0056] 抗体融合蛋白可包括一个或多个恒定区结构域,例如可溶性受体-免疫球蛋白嵌合体是指将可溶性粘附分子反受体的一部分与免疫球蛋白序列组合的嵌合分子。免疫球蛋白序列优选但未必是免疫球蛋白恒定结构域。免疫球蛋白部分可从IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型、IgA、IgE、IgD或IgM获得,但优选从IgG1或IgG3获得。

[0057] 简明免疫粘附素(immunoadhesin)将“粘附素”蛋白的结合区与免疫球蛋白重链的铰链和Fc区组合。通常,编码可溶性粘附分子的核酸将在C末端融合于编码免疫球蛋白恒定结构域序列的N末端的核酸,然而,N末端融合也是可能的。通常,在所述融合物中,所编码嵌合多肽将保留免疫球蛋白重链的恒定区的至少功能活性铰链、CH₂和CH₃结构域。也进行与恒定结构域的Fc部分的C末端的融合,或紧靠在重链的CH₁的N末端的融合,或与轻链的相应区域的融合。进行融合所处的精确位点不是关键的;特定位点是熟知的,并且可加以选择以使生物活性、分泌或结合特征最优化。

[0058] 在人中诱导猛烈或有害免疫应答(诸如过敏性休克)的倾向降低,并且也展现引发将阻止用抗体治疗剂进行重复给药的免疫应答的倾向降低的抗体优选用于本发明中。这些抗体对于包括鞘内施用的所有施用途径都是优选的。因此,在向人施用产生较小免疫应答的人源化、嵌合或异种异体人抗体优选用于本发明中。

[0059] 嵌合抗体可通过以下方式以重组手段制备:使从鼠(或其他动物源性)杂交瘤克隆获得的鼠可变轻链区和重链区(VK和VH)与人恒定轻链区和重链区组合,以产生主要具有人

结构域的抗体。所述嵌合抗体的产生在本领域中是熟知的,并且可通过标准手段来实现(例如在以引用的方式完全并入本文的美国专利号5,624,659中所述)。人源化抗体被工程改造来含有甚至更具人样的免疫球蛋白结构域,并且仅并有动物源性抗体的互补决定区。这通过以下方式来实现:仔细检查单克隆抗体的可变区的高变环的序列,以及使它们与人抗体链的结构相配合。或者,多克隆或单克隆抗体可由已被遗传改变来产生人免疫球蛋白的动物产生,诸如Abgenix Xenomouse或Medarex **HuMAb®**技术。或者,单链抗体(Fv,如下所述)可由含有人可变区的噬菌体文库产生。

[0060] 除整个免疫球蛋白(或它们的重组对应物)之外,包含表位结合位点的免疫球蛋白片段(Fab'、F(ab')₂或其他片段)也适用作本发明中的抗体部分。所述抗体片段可通过无花果蛋白酶(ficin)、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶或其他蛋白酶裂解来从整个免疫球蛋白产生。可利用重组免疫球蛋白技术设计“片段”或最小免疫球蛋白。举例来说,用于本发明中的“Fv”免疫球蛋白可通过使可变轻链区通过肽接头(例如多甘氨酸或不形成 α 螺旋或 β 片层基序的另一序列)连接于可变重链区来产生。

[0061] 小分子剂涵盖众多化学类别,但通常,它们是有机分子,例如具有超过50以及小于约2,500道尔顿的分子量的小有机化合物。候选药剂包含为与蛋白质进行结构相互作用特别是氢键合所必需的官能团,并且通常包括至少胺、羰基、羟基或羧基,优选包括至少两个官能性化学基团。候选药剂经常包含被一个或多个以上官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳族或多芳族结构。候选药剂也见于生物分子之中,包括肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、其衍生物、结构类似物或组合。

[0062] 候选药剂从包括合成或天然化合物的文库的广泛多种来源获得。举例来说,众多手段可用于随机和定向合成广泛多种有机化合物和生物分子,所述手段包括使随机化寡核苷酸和寡肽表达。或者,呈细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物的文库是可用的或易于产生的。另外,天然或合成产生的文库和化合物易于通过常规化学、物理和生物化学手段来修饰,并且可用于产生组合文库。可使已知药理学药剂经受定向或随机化学修饰,诸如酰化、烷基化、酯化、酰胺化等以产生结构类似物。测试药剂可例如从文库诸如天然产物文库或组合文库获得。

[0063] 候选化合物的文库也可通过合理设计来制备。(大体上参见Cho等, Pac.Symp.Biocompat.305-16, (1998);Sun等, J.Comput.Aided Mol.Des.12:597-604, (1998);各自以引用的方式整体并入本文)。举例来说,GABA_A抑制剂的文库可通过合成组合化学文库来制备(大体上参见DeWitt等, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 90:6909-13, 1993;国际专利公布W0 94/08051;Baum, Chem.&Eng.News, 72:20-25, 1994;Burbaum等, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 92:6027-31, 1995;Baldwin等, J.Am.Chem.Soc.117:5588-89, 1995;Nestler等, J.Org.Chem.59:4723-24, 1994;Borehardt等, J.Am.Chem.Soc.116:373-74, 1994;Ohlmeyer等, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 90:10922-26, 其全都以引用的方式整体并入本文。)

[0064] 可通过任何适合标准手段来测试候选拮抗剂的活性。作为第一筛选,可测试抗体对目标粘附分子的结合。作为第二筛选,可测试抗体候选物与适当细胞系例如白细胞或内皮细胞或与原代肿瘤组织样品的结合。对于这些筛选,候选抗体可加以标记以进行检测(例如采用荧光素(fluorescein)或另一荧光部分,或采用酶诸如辣根过氧化物酶)。在确定与

靶标的选择性结合之后,可测试候选抗体或如下所述产生的抗体缀合物的适当活性,包括在如本文所述的体内模型诸如适当小鼠或大鼠癫痫模型的情况下阻断白细胞向中枢神经系统的募集的能力。

[0065] 供治疗的疾患

[0066] 神经炎症性疾病。术语“炎症性”应答是产生体液(抗体介导)和/或细胞(由抗原特异性T细胞或它们的分泌产物介导)应答。中枢神经系统的炎症性脱髓鞘性疾病受到特别关注,并且包括不限于多发性硬化症(MS)、视神经脊髓炎(NO)和实验性获得性脑炎(EAE)。外周神经系统的脱髓鞘性炎症性疾病包括亚型是急性炎症性脱髓鞘性多神经根神经病变、急性运动轴突神经病变、急性运动和感觉轴突神经病变、米勒费雪综合征(Miller Fisher syndrome)和急性全自主神经异常的格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome,GBS);亚型是经典CIDP、CIDP伴糖尿病、CIDP/意义未确定的单克隆 γ 球蛋白病(MGUS)、感觉性CIDP、多灶性运动神经病变(MMN)、多灶性获得性脱髓鞘性感觉和运动神经病变或路易斯-萨姆纳综合征(Lewis-Sumner syndrome)、多灶性获得性感觉和运动神经病变、以及远端获得性脱髓鞘性感觉神经病变的慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病变(CIDP)。尽管在传统上不被分类为炎症性疾病,但已发现ALS具有增加数目的CD49e巨噬细胞,并且可通过本文所述的方法来治疗。

[0067] 多发性硬化症的特征在于具有CNS功能异常的各种症状和征象,伴有缓解和复发恶化。用于通过本发明方法进行的分析的目标分类包括复发缓解型MS(RRMS)、原发性进行性MS(PPMS)和继发性进行性MS(SPMS)。最常见的呈现症状是一个或多个肢端中、躯干中、或面部的一侧上的感觉异常;腿或手衰弱或笨拙;或视觉障碍,例如部分失明以及一只眼疼痛(眼球后视神经炎)、视力模糊或有暗点。其他常见早期症状是导致双视(复视)的眼麻痹、一个或多个肢端的短暂衰弱、肢体的略微僵硬或异常易疲劳、轻微步态障碍、膀胱控制困难、眩晕和轻度情绪障碍;全都指示分散化CNS受累,并且经常在认识到疾病之前数月或数年发生。过热可使症状和征象加重。

[0068] 过程是高度变化的,不可预测的,并且在大多数患者的情况下是间歇性的。首先,数月或数年的缓解可将发作分隔开,尤其是当疾病以眼球后视神经炎开始时。然而,一些患者具有频繁发作,并且快速失能;对于少许情况,过程可为快速进行性的(原发性进行性MS,PPMS),或可为继发性进行性多发性硬化症(SPMS)。复发缓解型MS(RRMS)的临床特征在于复发和缓解历经数月至数年发生,其中在发作之间神经缺陷部分或完全恢复。所述患者每年显现约1次发作或复发。历经10至20年,约50%的RRMS患者显现继发性进行性MS(SPMS),其特征是在发作之间不完全恢复以及神经缺陷积累,从而导致失能渐增。

[0069] 诊断通常是间接的,通过根据临床特征、放射摄影特征(磁共振[MR]扫描时的脑斑块),以及在较小程度上根据实验室特征(CSF分析时的寡克隆条带)进行推断。典型病例可通常在临床背景上加以确信诊断。在首次发作之后,可对诊断进行推测。稍后,缓解和恶化历史以及CNS病变在超过一个区域中散播的临床迹象具有高度提示性。

[0070] MRI,作为最灵敏的诊断成像技术,可显示斑块。它也可检测处于脊髓和髓质的接合部的有时导致可变和变动谱系的运动和感觉症状,从而模拟MS的可治疗非脱髓鞘性病变(例如蛛网膜下囊肿、枕骨大孔肿瘤)。钆造影增强可将活性剂炎症区域与老旧脑斑块进行区分。MS病变也可在造影增强CT扫描时可见;灵敏性可通过给与两倍碘剂量以及使扫描延

迟(双剂量延迟CT扫描)来增加。

[0071] 视神经脊髓炎(NMO)或德维克氏病(Devic's disease)是一种视神经和脊髓自体免疫炎症性疾病。尽管炎症可影响脑,但所述病症不同于多发性硬化症,具有不同的疗法响应样式,可能具有不同的自体抗原样式以及涉及不同淋巴细孢子组。

[0072] 德维克氏病的主要症状是视力和脊髓功能丧失。就视神经炎的其他病因而言,视觉受损通常显现为视觉敏锐度降低,但视野缺陷或色彩视觉丧失可单独或在正式丧失敏锐度之前发生。脊髓功能异常可导致肌肉衰弱、感觉降低、或膀胱和肠控制丧失。脊髓中的损害可在从炎症性脱髓鞘至坏死性白质和灰质损害的范围内。德维克氏病中的炎性病变已被分类为II型病变(补体介导的脱髓鞘),但它们由于它们主要分布在血管周围而不同于MS样式II病变。因此,炎症样式经常十分不同于在MS的情况下所见的炎症样式。

[0073] 发作惯常用短程高剂量静脉内皮质类固醇诸如静脉内甲基泼尼松龙(methylprednisolone)加以治疗。当发作进展或不对皮质类固醇治疗起响应时,可使用血浆除去法。通常使用的免疫抑制治疗剂包括咪唑硫嘌呤(azathioprine)(依木兰(Imuran))加泼尼松(prednisone)、霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil)加泼尼松、利妥昔单抗(Rituximab)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、静脉内免疫球蛋白(IVIG)和环磷酰胺(cyclophosphamide)。

[0074] 疾病可为单相的,即单次发作伴有永久缓解。然而,至少85%的患者具有所述疾病的复发形式,伴有横贯性脊髓炎和/或视神经炎反复发作。在具有单相形式的患者中,横贯性脊髓炎和视神经炎同时发生或在彼此的数天内发生。具有复发形式的患者更可能在初始发作之间经历数周或数月,并且在初始横贯性脊髓炎事件之后具有更好运动恢复。复发通常在早期发生,其中约55%的患者在第一年中经历复发,并且90%的患者在前5年中经历复发。不同于MS,德维克氏病很少具有继发性进行性阶段,在所述阶段中,患者在发作之间具有渐增的神经衰退而无缓解。而是,由急性发作引起失能。

[0075] 肌萎缩性侧索硬化是一组罕见神经疾病,其主要涉及负责控制随意肌肉运动的神经细胞(神经元)。它的特征在于皮质脊髓束、前角细胞、延髓运动核或组合的稳定、不间断、进行性变性。症状在严重性方面有变化,并且可包括肌肉衰弱和萎缩、束化、情绪不稳定和呼吸肌衰弱。诊断涉及神经传导研究、肌电描记术以及通过MRI和实验室测试来排除其他病症。当前治疗是支持性的。大多数ALS病例(90%或更多)被视为是散发性的。

[0076] 大多数ALS患者呈现有由手(最通常)或足的痉挛、衰弱和肌肉萎缩组成的随机不对称症状。衰弱进展至前臂、肩部和下肢。很快跟随的是束化、僵直、深腱反射过度活跃、跖伸肌反射、笨拙、运动僵硬、重量减轻、疲劳以及难以控制面部表情和舌部运动。其他症状包括嘎声、吞咽困难和言语不清;因为吞咽有困难,所以流涎似乎增加,并且患者倾向于被液体噎住。在病症的晚期,出现假性延髓情绪,伴有不当、非自愿和不可控制的过度笑或哭。感觉系统、意识、认知、随意眼动、性功能、以及尿和肛门括约肌通常免遭影响。死亡通常由呼吸肌衰退引起;50%的患者在发作3年内死亡,20%生存5年,并且10%生存10年。存活期>30年是罕见的。

[0077] 药物利鲁唑(riluzole)(力如太(Rilutek))和依达拉奉(edaravone)(雷迪卡瓦(Radicava))已被核准用以治疗某些形式的ALS,并且可与 α 5整合素拮抗剂组合提供。利鲁唑据信会通过使在神经细胞与运动神经元之间传送信息的谷氨酸的水平降低来使对运动

神经元的损害减轻。在患有ALS的人员中进行的临床试验显示利鲁唑使存活期延长数月,特别是在延髓形式疾病的情况下,但不逆转已对运动神经元进行的损害。已在对患有ALS的人士的日常功能发挥的临床评估中显示依达拉奉会减缓衰退。

[0078] ALS动物模型包括SOD1基因中的突变。染色体21上SOD1基因中的错义突变是常染色体显性ALS的首先鉴定原因。SOD1是一种普遍存在的细胞质和线粒体酶,其以二聚状态起催化有害反应性氧物质(ROS)的分解,由此防止氧化应激的作用。Sod1^{-/-}小鼠不具有任何运动神经元丧失,但它们具有显著远端运动轴突病变,从而证明SOD1在正常神经元功能中具有重要作用。表达突变SOD1的转基因小鼠中运动神经元显著丧失可能由毒性功能获得所致。

[0079] 本文公开的方法例如通过使中枢神经系统中CD49e+单核细胞的活性降低来使MS、NMO或ALS的临床症状稳定或减轻。

[0080] 在一实施方案中,提供用于使对纹身的移除增强的方法。真皮的骨髓细胞中占优势的是DT敏感性的满载黑色素的细胞,所述细胞对应于已从相邻黑素细胞摄取黑素体的巨噬细胞。那些细胞在人中已被称为噬黑素细胞。这些噬黑素细胞负责捕集和保持纹身颜料粒子,所述粒子可经受连续捕集-释放-再捕集循环而无任何纹身消失。通过施用针对CD49e的拮抗剂来抑制巨噬细胞活性,可使对非所需纹身的移除增强。拮抗剂可通过局部化植入、真皮内注射等来提供,或可以全身性方式递送。

[0081] 额外药剂

[0082] 他汀是HMG-CoA还原酶的抑制剂,并且可与抗 α_5 剂一起以组合疗法提供,例如用于治疗MS或NMO。他汀被详细描述,例如如美国专利号3,983,140中公开的美伐他汀(mevastatin)和相关化合物、如美国专利号4,231,938中公开的洛伐他汀(lovastatin)(美维诺林(mevinolin))和相关化合物、诸如美国专利号4,346,227中公开的普伐他汀(pravastatin)和相关化合物、如美国专利号4,448,784和4,450,171中公开的辛伐他汀(simvastatin)和相关化合物;如美国专利号5,354,772中公开的氟伐他汀(fluvastatin)和相关化合物;如美国专利号4,681,893、5,273,995和5,969,156中公开的阿托伐他汀(atorvastatin)和相关化合物;以及如美国专利号5,006,530和5,177,080中公开的西立伐他汀(cerivastatin)和相关化合物。额外化合物公开于美国专利号5,208,258、5,130,306、5,116,870、5,049,696、RE 36,481和RE 36,520中。

[0083] 他汀的有效剂量是在持续适合时期施用时将证实疾病的严重性减轻和/或控制血清胆固醇水平的剂量,所述时期通常是至少约一周,并且可为约两周或更多,多达约4周的时期。本领域技术人员应了解可持续所述时期施用初始剂量,继之以施用维持剂量,在一些情况下,所述维持剂量将处于降低的剂量下。

[0084] 他汀的配制和施用是熟知的,并且将通常遵循常规用法。为治疗自体免疫疾病所需的剂量可为相同的,或可从在不存在抗 α_5 剂治疗下用于管理胆固醇的水平变化。

[0085] 他汀可通过与适当药学上可接受的载体或稀释剂组合来并入多种制剂中以进行治疗性施用,并且可配制成呈固体、半固体、液体或气体形式的制剂,诸如片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液、栓剂、注射液、吸入剂、凝胶剂、微球体和气雾剂。制剂任选与抗 α_5 剂以单位剂量组合。

[0086] 干扰素 β 是干扰素家族中用于治疗多发性硬化症(MS)的药物,并且可与抗 α_5 剂一

起以组合疗法提供以治疗MS。IFN- β 1a由哺乳动物细胞产生,而干扰素 β -1b在经修饰大肠杆菌(E.coli)中产生。已显示干扰素使MS复发率降低约18-38%,并且减缓MS患者的失能的进展。可商购获得的产品包括爱莫内(Biogen Idec);立比扶(EMD Serono);和西洛维(CinnoVex)(CinnaGen)。密切相关的是干扰素 β -1b,其在美国以倍泰龙或艾塔维进行销售。

[0087] 各种制剂和剂量常规用于用IFN- β 治疗MS患者,所述剂量可用于本发明的组合治疗中,或可在较低剂量下加以利用,例如常规剂量的90%、常规剂量的80%、常规剂量的70%、常规剂量的60%、常规剂量的50%或更小剂量。

[0088] 爱莫内以两种制剂进行售卖,即需要复原的冻干粉剂和预混合液体注射器药盒;它通常在30 μ g的剂量下通过肌肉内注射来每周施用一次。立比扶在22 μ g或44 μ g的剂量下通过皮下注射来每周施用三次。干扰素 β -1b通常在250 μ g下隔天施用。

[0089] “适合条件”将具有取决于使用这个术语所处的情形的含义。也就是说,当与抗体关联使用时,所述术语将意指容许抗体结合它的相应抗原的条件。当与使药剂与细胞接触关联使用时,这个术语将意指容许能够这样做的药剂进入细胞,并且执行它的预定功能的条件。在一个实施方案中,如本文所用的术语“适合条件”意指生理条件。

[0090] “受试者”或“患者”在本教义的情形下通常是哺乳动物。除人以外的哺乳动物可有利地用作代表炎症动物模型的受试者。受试者可为雄性或雌性。

[0091] 用以“分析”包括通过测量样品中的标志物(诸如像存在或不存在标志物或成分表达水平)来测定与所述样品相关的一组值,以及将测量结果相对于在来自同一受试者或其他对照受试者的样品或一组样品的情况下的测量结果进行比较。本教义的标志物可通过本领域中已知的各种常规方法中的任一者来分析。用以“分析”可包括进行统计分析以例如确定受试者是对疗法(例如如本文所述的IFN治疗)的响应者还是非响应者。

[0092] “药学上可接受的赋形剂”、“药学上可接受的稀释剂”、“药学上可接受的载体”和“药学上可接受的佐剂”意指适用于制备药物组合物的通常安全、无毒,并且既不在生物学上不合需要也不在其他方面不合需要的赋形剂、稀释剂、载体和佐剂,并且包括可为兽医学使用以及人药物使用所接受的赋形剂、稀释剂、载体和佐剂。如说明书和权利要求中所用的“药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体和佐剂”包括一种所述赋形剂、稀释剂、载体和佐剂与超过一种所述赋形剂、稀释剂、载体和佐剂两者。

[0093] 如本文所用,“药物组合物”意图涵盖适于向受试者施用的组合物,所述受试者诸如是哺乳动物,尤其是人。一般来说,“药物组合物”是无菌的,并且优选不含能够在受试者内引发不合需要应答的污染物(例如药物组合物中的化合物是药品级的)。药物组合物可被设计用于通过许多不同施用途径来向有需要的受试者或患者施用,所述施用途径包括口服、经颊、经直肠、胃肠外、腹膜内、真皮内、气管内、肌肉内、皮下等。

[0094] “剂量单位”是指适合于待治疗的特定个体的呈单位剂量形式的物理离散单位。各单位可含有被计算来产生所需治疗作用的预定量的活性化合物以及所需药物载体。剂量单位形式的规格可由以下因素决定:(a)活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗作用,和(b)混配所述活性化合物的领域中固有的限制。

[0095] “药学上可接受的赋形剂”意指适用于制备药物组合物的通常安全、无毒以及合乎需要的赋形剂,并且包括可为兽医学使用以及人药物使用所接受的赋形剂。所述赋形剂可为固体、液体、半固体,或在气雾剂组合物的情况下可为气体。

[0096] “药学上可接受的盐和酯”意指药学上可接受,并且具有所需药理学性质的盐和酯。所述盐包括可当存在于化合物中的酸性质子能够与无机或有机碱反应时形成的盐。适合无机盐包括与碱金属例如钠和钾、镁、钙和铝形成的那些。适合有机盐包括与有机碱,诸如胺碱,例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、缓血酸胺、N-甲基还原葡萄糖胺等形成的那些。所述盐也包括与无机酸(例如盐酸和氢溴酸)和有机酸(例如乙酸、柠檬酸、顺丁烯二酸以及烷烃磺酸和芳烃磺酸诸如甲烷磺酸和苯磺酸)形成的酸加成盐。药学上可接受的酯包括由存在于化合物中的羧基、磺酰基氧基和膦酰氧基形成的酯,例如C₁₋₆烷基酯。当有两个酸性基团存在时,药学上可接受的盐或酯可为单酸-单盐或单酯或二盐或二酯;并且类似地,当有超过两个酸性基团存在时,一些或所有所述基团可被盐化或酯化。本发明中命名的化合物可以未盐化或未酯化形式,或以盐化和/或酯化形式存在,并且对所述化合物的命名意图包括原始(未盐化和未酯化)化合物与它的药学上可接受的盐和酯两者。此外,本发明中命名的某些化合物可以超过一种立体异构形式存在,并且对所述化合物的命名意图包括所有单一立体异构体和所述立体异构体的所有混合物(无论是外消旋混合物还是另外混合物)。

[0097] 术语“药学上可接受”、“生理上可耐受”及其语法变化形式在它们涉及组合物、载体、稀释剂和试剂时可互换使用,并且表示物质能够向人或对人施用,而不在将禁止施用组合物的程度上产生不合需要的生理作用。

[0098] “治疗有效量”意指在向受试者施用以治疗疾病时,足以实现对那个疾病的治疗的量。

[0099] 本发明已关于由本发明者发现或提出来包括用于实施本发明的优选模式的特定实施方案加以描述。本领域技术人员应了解,鉴于本公开,可在不脱离本发明的预定范围下,在例示的特定实施方案中进行众多修改和变化。归因于生物功能等效性考虑,可在蛋白质结构方面进行变化而不在种类或数量方面影响生物作用。所有所述修改都意图包括在随附权利要求的范围内。

[0100] 方法

[0101] 本公开提供用于治疗可为脱髓鞘性自体免疫疾病诸如多发性硬化症的神经炎症性疾病的方法。方法包括向受试者施用有效量的是抗 α_5 剂的药剂,所述抗 α_5 剂呈单一药剂形式或与额外一种或多种药剂组合。

[0102] 在某些实施方案中,抗 α_5 剂与治疗剂量的他汀组合。活性剂可以单独制剂形式施用,或可例如以单位剂量加以组合。制剂可用于口服施用。任选地,抗 α_5 剂作为单一药剂或与他汀一起以与第二化合物诸如细胞因子;抗体例如泰萨布里;芬戈莫德(捷灵亚);克帕松等组合的方式加以组合。在一些实施方案中,细胞因子是IFN- β 。

[0103] 在其他实施方案中,抗 α_5 剂可在不存在他汀下与药剂,诸如细胞因子;抗体例如泰萨布里;芬戈莫德(捷灵亚);克帕松等组合。在一些实施方案中,分析患者对细胞因子疗法的响应性,其中对治疗剂的选择基于所述分析。

[0104] 在一些实施方案中,并行施用组合疗法,其中任一化合物的施用剂量可为常规剂量,或小于常规剂量。在一些实施方案中,逐步执行两种疗法,例如其中一种化合物初始以单一药剂形式提供,例如作为维持手段,并且其中第二化合物在复发期间施用,例如在复发起始时或之后,在复发达到高峰时等。

[0105] 在本文所述的方法和组合物的各个方面和实施方案中,施用治疗性组合物可使用

为本领域技术人员所知的各种方法和递送系统中的任一者来实现或进行。施用可例如静脉内、口服、通过植入物、经粘膜、经皮、肌肉内、鞘内和皮下进行。递送系统采用许多常规使用的药物载体。

[0106] 在使用方法中,有效剂量的本发明的抗 α_5 剂单独或与用于治疗如上所列的疾患的额外活性剂组合施用。有效剂量可为约1ng/kg重量、10ng/kg重量、100ng/kg重量、1 μ g/kg重量、10 μ g/kg重量、25 μ g/kg重量、50 μ g/kg重量、100 μ g/kg重量、250 μ g/kg重量、500 μ g/kg重量、750 μ g/kg重量、1mg/kg重量、5mg/kg重量、10mg/kg重量、25mg/kg重量、50mg/kg重量、75mg/kg重量、100mg/kg重量、250mg/kg重量、500mg/kg重量、750mg/kg重量等。剂量可根据需要多次施用,例如每4小时、每6小时、每8小时、每12小时、每18小时、每日、每2天、每3天、每周施用等。剂量可口服施用。

[0107] 组合物可以单次剂量或以多次剂量施用,通常,多次剂量历经一段时期,例如每日、每隔一天、每周、每半周、每月等,持续足以减轻炎症性疾病的严重性的时期,所述剂量可包括1、2、3、4、6、10次或更多次剂量。

[0108] 根据本发明方法确定药剂的治疗或防治有效量可使用常规计算方法基于动物数据来进行。有效剂量将至少部分地取决于施用途径。

[0109] 药物组合物

[0110] 以上讨论的化合物可使用任何适宜赋形剂、试剂和方法来配制。组合物以具有药学上可接受的赋形剂的制剂形式提供。广泛多种药学上可接受的赋形剂在本领域中是已知的,并且无需在本文中详细讨论。药学上可接受的赋形剂已充分描述于多种出版物中,包括例如A.Gennaro(2000)“Remington:The Science and Practice of Pharmacy,”第20版,Lippincott,Williams,&Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C.Ansel等人编,第7版,Lippincott,Williams,&Wilkins;以及Handbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H.Kibbe等人编,第3版Amer.Pharmaceutical Assoc。

[0111] 药学上可接受的赋形剂诸如媒介物、佐剂、载体或稀释剂可易于为公众所获得。此外,药学上可接受的辅助物质,诸如pH调整和缓冲剂、张力调整剂、稳定剂、湿润剂等,可易于为公众所获得。

[0112] 在一些实施方案中,在水性缓冲液中配制主题化合物。适合水性缓冲液包括但不限于强度从5mM至100mM进行变化的乙酸盐、丁二酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐缓冲液。在一些实施方案中,水性缓冲液包括提供等张溶液的试剂。所述试剂包括但不限于氯化钠;以及糖,例如甘露糖醇、右旋糖、蔗糖等。在一些实施方案中,水性缓冲液进一步包括非离子表面活性剂诸如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。任选地,制剂可进一步包括防腐剂。适合防腐剂包括但不限于苯甲醇、苯酚、氯丁醇、苯扎氯铵等。在许多情况下,将制剂在约4 $^{\circ}$ C下储存。也可使制剂冻干,在所述情况下,它们通常包括低温保护剂诸如蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖醇等。冻干制剂可甚至在环境温度下历经延长时期加以储存。在一些实施方案中,配制主题化合物以用于持续释放。

[0113] 在一些实施方案中,将抗 α_5 剂与第二药剂一起在药学上可接受的赋形剂中配制。

[0114] 主题制剂可口服、皮下、肌肉内、胃肠外或以其他途径施用,所述途径包括但不限于例如口服、经直肠、经鼻、经表面(包括经皮、气雾剂、经颊和舌下)、经阴道、胃肠外(包括

皮下、肌肉内、静脉内和真皮内)、膀胱内或向受影响器官中注射。

[0115] 活性剂各自可以约0.1 μ g、0.5 μ g、1 μ g、5 μ g、10 μ g、50 μ g、100 μ g、500 μ g、1mg、5mg、10mg、50mg、100mg、250mg、500mg、750mg或更大的单位剂量提供。

[0116] 抗 α_5 剂可以单位剂型施用,并且可通过本领域中熟知的任何方法来制备。所述方法包括使主题化合物与构成一种或多种辅助成分的药学上可接受的载体或稀释剂组合。药学上可接受的载体基于所选施用途径和标准药物规范加以选择。各载体在可与制剂的其他成分相容,并且不对受试者有损伤的意义上必须是“药学上可接受的”。这个载体可为固体或液体,并且通常基于所用施用类型来选择类型。

[0117] 适合固体载体的实例包括乳糖、蔗糖、明胶、琼脂和散装粉末。适合液体载体的实例包括水、药学上可接受的脂肪和油、醇或包括酯的其他有机溶剂、乳液、糖浆或酞剂、混悬液、溶液和/或混悬液、以及从非泡腾颗粒复原的溶液和/或混悬液和从泡腾颗粒复原的泡腾制剂。所述液体载体可含有例如适合溶剂、防腐剂、乳化剂、混悬剂、稀释剂、甜味剂、增稠剂和熔融剂。优选载体是可食用油,例如玉米油或加拿大油菜油。聚乙二醇例如PEG也是良好载体。

[0118] 可使用提供本公开的给药方案的任何药物递送装置或系统。广泛多种递送装置和系统为本领域技术人员所知。

[0119] 实施例1

[0120] 单细胞分析揭示相对于神经变性模型,在来自对比神经炎症模型的骨髓细胞的情况下,分子标签具有差异性

[0121] 两极是脑病理学中得到更多关注的对象:神经炎症相对于神经变性。此处,我们使用单细胞质谱流式细胞术(CyToF),其与无偏数据分析一起进行以相对于作为脑典型炎症性疾病的多发性硬化症(MS)的实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)小鼠模型,对作为神经变性疾患的亨廷顿氏病(Huntington's disease, HD)的R6/2小鼠模型中的免疫应答进行全系统范围分析。我们鉴定了三个专属于中枢神经系统(CNS)并且存在于神经炎症性疾患(EAE)与神经变性疾患(HD)两者中的骨髓细胞群体。作为CNS驻留骨髓细胞的对应物的血液源性单核细胞由五个子群体组成,并且在EAE的情况下检测到,但不存在于HD中。单细胞分析揭示相较于HD,在EAE的情况下的类似骨髓性群体内在信号传导活性和细胞因子产生方面具有巨大不一致。在神经炎症性疾患的情况下,紧密组织的信号传导事件以逐步方式发生,而这些相同信号传导事件在神经变性疾患的情况下不存在。此外,在这两种神经病变之间,在单细胞水平上,在细胞因子概况方面存在显著差异,其中多功能性细胞同时分泌与EAE的情况下的神经炎症相关的多种细胞因子。这些研究结果强调在炎症性脑病与退变性脑病之间在神经病理学方面有差异,并且揭示针对这些特定脑病变的选择性治疗靶标。

[0122] 脑病理学中的两极赋予神经炎症与神经变性相对比的构思。在前述情况下的细胞应答包含外周适应性和先天性免疫细胞的浸润。在后者的情况下,病变的特征在于具有CNS驻留免疫细胞即小神经胶质细胞和血管周围骨髓细胞的活性。在诸如亨廷顿氏病(HD)以及阿尔茨海默氏病(AD)或朊病毒疾病的病症的情况下,关于外周免疫系统的细胞进入CNS内基本不存在或不存在的证据。这不同于其中存在猛烈炎症,伴有外周免疫细胞向CNS中迁移的多发性硬化症、急性播散性脑脊髓炎、中风和微生物感染。举例来说,在MS的情况下,用针对关键整合素的抗体阻断外周免疫细胞进入脑中已充当现时已核准十年的最有力核准疗法

的机理基础。然而,在包括阿尔茨海默氏病、朊病毒疾病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)和亨廷顿氏病的其他神经病症的情况下,不存在相同经典炎症性应答的证据。然而,在现代文献中,这些神经变性病症经常被称为神经炎症性或神经免疫病症。

[0123] 在相对于神经变性来定义神经炎症方面的混乱可由小胶质细胞增生—小神经胶质细胞的增殖和活化—引起,所述小胶质细胞增生是对CNS的任何伤害的明确确定标志。小神经胶质细胞的活化伴有通常由外周免疫系统的细胞产生的过多炎症性介质(包括趋化因子和细胞因子)的上调以及释放。

[0124] 此处阐述对神经炎症性病变相对于神经变性病变的构思的细化。近年来,对来自整体处理样品的基因转录物的分析鉴定了参与CNS疾病中的若干路径。一项新近研究将来自外周内毒素血症模型的炎症性过程与神经变性疾病(如阿尔茨海默氏和ALS)模型进行比较。

[0125] 此处,我们通过使用质谱流式细胞术(CyTOF)来分析免疫应答,从而允许我们在单细胞水平上同时测量脑病中的多个参数。

[0126] 为此,使用质谱流式细胞术(CyTOF)以及对数据进行无偏生物信息学分析,我们提供对CNS驻留细胞群体和血液源性细胞群体在两种神经病症—实验性自体免疫脑脊髓炎和亨廷顿氏病中的涉及的全系统范围见解,这两种神经病症占据神经炎症和神经变性的谱系的不同端点。我们报道在脑病变的这两个对立实例的情况下在系统水平信号传导和细胞因子产生方面的差异,并且帮助阐明在神经病变的这两极的情况下在病理学方面的巨大差异。

[0127] 结果

[0128] 异质性CNS驻留骨髓性群体。为探究神经炎症性疾患和神经变性疾患的情况下的免疫应答,我们在这两种对立神经病理学疾患的实例的情况下采用来自中枢神经系统(脑和脊髓)以及以外周血液获得的单细胞混悬液分析了细胞表型、信号传导性质和细胞因子产生。我们采用单细胞质谱流式细胞术(CyTOF)来将不同临床阶段的作为类似于MS的神经炎症性疾病模型的实验性自体免疫脑脊髓炎(EAE)与作为亨廷顿氏病(HD)模型的R6/2转基因小鼠进行比较,此时小鼠显示震颤、步态不规律、运动异常和癫痫发作(图1)。

[0129] 为探究CNS和血液中免疫细胞群体的表型多样性,我们将所有单细胞数据集组合(处于所有疾病状况下的所有EAE、HD和健康小鼠),并且应用称为X偏移(X-shift)的群体作图算法。这个算法被特定开发以使得能够通过多维标志物空间中的细胞事件密度进行非参数作图来发现不良表征生物系统中的稀有细胞群体。X偏移的一个最有用特征是算法自动估计细胞群体的数目。因此,表型空间可被自动作图,并且不同于大多数其他单细胞聚类算法,这个方法不需要使用者输入。为显现细胞群体的表型连续区间,将输出组织成最小生成树(MST),从而创建2维布局。将细胞簇表示为节点,并且与边缘连接并根据它们的基于全组套表面标志物的总体表型相似性加以组织。在状况之间在各子群体的细胞频率方面的差异通过与给定状况下相应簇的频率成比例的方式改变各节点的尺寸来显现。在群体之间在标志物表达水平方面的差异通过根据状况特异性标志物表达水平对节点着色来显现。对节点尺寸和表达水平的目视检查允许我们鉴定MST内的谱系特异性群组,并且描绘疾病特异性细胞群体。

[0130] 所有血液样品的复合MST与来自所有CNS样品的复合MST的比较揭示存在于CNS中

但不存在于外周血液中的CD11b⁺骨髓性群体的三个不同子群体,由此将它们鉴定为CNS特异性骨髓性群体。这些群体在此处被定义为群体A、B和C(图2a)。

[0131] 为推导限定目标聚类群体的门的序列,我们应用称为分裂标志物树(Divisive Marker Tree, DMT)算法的X偏移算法的特征,所述分裂标志物树算法会自动构建最优标志物基簇分类。在根据计算确定的阈值来设置门的情况下,我们能够通过手动门控来验证群体A、B和C,所述群体可根据CD45、CD11b、CD317(BST2/PDCA-1)、II类主要组织相容性复合物(MHCII)、CD39和CD86的细胞表面标志物表达加以区分(图2b)。

[0132] 除以上提及的描绘各群体的区分的主要标志物之外,群体A、B和C也表达若干其他细胞表面标志物。我们的分析揭示所有三个群体都表达低水平至中等水平的CD88、I类MHC(H2)、TAM受体酪氨酸激酶Mer(MerTK)以及近来鉴定的小神经胶质细胞标志物4D4和fcr1s。群体A、B和C缺乏淋巴细胞谱系标志物诸如CD3(T细胞)、CD45R/B220(B细胞)、单核细胞标志物(Ly6C)和粒细胞性标志物(Ly6G)的表达(图8)。这三个CNS特异性群体的特征也在于差异性表达许多标志物。群体B和C表达不同水平的CD80、TAM受体Ax1、T细胞免疫球蛋白粘蛋白4(TIM4)、D274(PD-L1)、CD195(CCR5)、CD194(CCR4)以及低水平的CD206和TREM2,而群体A缺乏所有这些标志物的表达(图9)。这些标志物的表达水平视疾病状况而变化。

[0133] 对于区分CNS驻留骨髓细胞—小神经胶质细胞—与外周血液源性巨噬细胞的特定标志物,缺乏共识。然而,随着新抗体和转基因小鼠模型的出现,已在CNS驻留骨髓细胞与浸润性骨髓性群体之间进行区分。此处,我们基于这三个群体(A、B和C)仅存在于CNS中(而非外周血液中),联同表达表型标志物、低CD45—在传统上据信标记CNS中的小神经胶质细胞—和Fcr1s来将它们确定为CNS驻留骨髓细胞。我们使用在施用他莫昔芬(tamoxifen)之后表达YFP的条件性Cx3cr1^{CreER} Rosa26-YFP小鼠确认这个可能性。持续存在的YFP使鉴定小神经胶质细胞和其他长寿命巨噬细胞的可能性升高,而在短寿命细胞例如外周单核细胞中,YFP消失。此处,我们能够鉴定条件性Cx3cr1^{CreER} Rosa26-YFP小鼠中的这三个群体,并且确认它们表达YFP(图10)。在本论文中,为简单起见,我们避免将它们称为小神经胶质细胞,并且将它们提及为CNS驻留骨髓细胞,其可包含小神经胶质细胞、脑膜巨噬细胞和血管周围巨噬细胞。总之,这个多参数分析提供对存在于CNS驻留骨髓性群体内的表型异质性的高分辨率见解。

[0134] 神经炎症性疾患和神经变性疾患标记一致CNS骨髓细胞群体。为探究疾病特异性线索是否调节三种CNS驻留骨髓细胞的存在性和频率,我们在健康、HD以及EAE的五个不同状态:症状发生前、发作、高峰、慢性和恢复的所有生物重复测定中分析MST并通过手动门控来确认研究结果(图2c、图2d)。

[0135] 在各疾病状态的独立生物重复测定中的细胞频率分析和MST中的代表性节点证明所有三个群体都与疾病状态关联而改变(图2c、图2d)。值得注意的是,所有三个CNS驻留骨髓性群体都存在于神经变性疾患与神经炎症性疾患两者中。这些数据强化来自先前研究的表明神经变性疾患和神经炎症性疾患激起类似“免疫应答”的结论,因为乍一看,确实观察到类似群体。

[0136] 子群体C由EAE疾病状况与HD疾病状况两者引发,并且在健康CNS中几乎不可检测(0.1%的频率)。在EAE小鼠中,子群体C从症状发生前阶段(1.8%的频率)持续扩增至疾病高峰(频率9.7%)。此后,在具有永久麻痹的慢性EAE动物中以及在恢复的EAE小鼠中,子群

体C的频率下降(分别是0.9%和1.7%)(图2d)。慢性EAE长久以来已被视为类似于MS的进行性形式,所述进行性形式被分类为疾病的神经变性方面。

[0137] 相对于神经变性疾患,在神经炎症性疾患的情况下在CNS骨髓细胞中具有不同信号传导表型。尽管以上对细胞频率的分析表明在神经炎症性疾患与神经变性疾患两者中具有类似性,但如下讨论的对信号传导路径的分析揭示在包括细胞信号传导和细胞因子产生的各种关键参数方面具有差异。

[0138] 为解析群体A、B和C在信号传导方面的差异,我们同时比较在不同EAE阶段以及亨廷顿氏病的情况下的细胞内信号传导特性。为对此进行考查,我们分析磷酸化信号转导子和转录活化子(STAT)1、3、5、cAMP应答元件结合蛋白(CREB)、MAP激酶活化的蛋白质激酶2(MAPKAPK2)、核因子- κ B(NF- κ B(p65))、CCAAT/增强子结合蛋白 α 和 β (C/EBP α 、C/EBP β)蛋白的丰度。对这些信号传导路径的分析揭示三个目标区域。

[0139] 首先,跨越所有三个CNS骨髓性子组,在这些信号传导蛋白质的表达样式方面存在实质性差异,其中群体B和C显示高水平的信号传导,但群体A实质上不同于这两个子组,具有信号传导蛋白质的极低表达水平(图3a-图3d),从而潜在反映这些群体中的每一个具有不同功能性作用。

[0140] 其次,这个分析表明在EAE的发展期间,在群体B和C中,CNS中炎症性应答的产生和进展是一种紧密协调过程,依序涉及关键炎症性信号传导路径。在EAE的症状发生前阶段—其中在小鼠中尚未显现疾病的临床体征,显著增加水平的pCREB和pMAPKAPK2表达代表群体B和C中的仅有信号传导特征(相较于健康小鼠,分别增加至超过3倍和6倍)(图3a、图3b)。在EAE疾病高峰时,群体B和C中第二波pCREB和pMAPKAPK2表达增加作为信号传导标志而出现(图3a、图3b),类似于我们在症状发生前阶段时所观察并且与先前研究一致。引起关注的是,在慢性EAE的情况—其中动物从未从麻痹中恢复—群体B和C中与C/EBP β 一致的NF- κ B(p65)上调被鉴定为信号传导级联的仅有参与者(图3c、图3d)。这些数据指示在EAE的情况下,存在一系列炎症性信号传导步骤。

[0141] 最后,相较于EAE,在HD的情况下,这些炎症性信号传导标志明显不存在于群体A、B和C中(图3a-图3d),从而表明相较于神经炎症性疾患(EAE),在神经变性疾患(HD)中,在CNS驻留骨髓细胞群体的信号传导性质方面具有可观差异。

[0142] 尽管在神经炎症性疾患与神经变性疾患两者的情况下鉴定了类似CNS驻留骨髓细胞群体,但在这些疾患下,信号传导性质的特性明显不同,从而表明这些细胞在各疾病状况的情况下具有不同功能性能力。

[0143] 相对于神经变性,在神经炎症的情况下的多细胞因子产生性骨髓细胞。为获得对相对于HD,在EAE的情况下合成什么细胞因子的更全面了解,我们评价了由这些确定骨髓细胞群体达成的体内细胞因子产生。我们避免任何离体刺激,并且仅使用蛋白质转运体抑制剂来避免细胞因子的分泌(参见材料和方法)。为了测试任何所鉴定群体是否具有细胞因子产生能力,我们修改了CyTOF技术以在单细胞水平上定量一组八种合成细胞因子:肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、IFN- β 、白介素-10、IL-6、IL-17A、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和转化生长因子- β (TGF- β)。各子群体根据以上确定的准则加以手动门控(参见图2b)。我们计算各簇的被检测到分泌给定细胞因子的细胞的分数,其根据表达值超过健康样品的第90百分位数来确定。

[0144] 在评价的八种细胞因子之中, TNF- α 是三个所鉴定CNS驻留骨髓性群体(A、B、C)中最显著产生的细胞因子, 其中相较于健康细胞, 在神经炎症性疾患与神经变性疾患两者下, TNF- α 表达性细胞的百分比均显著增加(图4a)。最值得注意的是, 在不同临床评分的EAE疾病—症状发生前、发作、高峰期间在群体B和C中, 以及在慢性状况下在群体C中—大多数细胞(多达80%)产生TNF- α , 而在神经变性模型(HD)中, TNF- α 表达性细胞的百分比在30%–50%的范围内。除TNF- α 之外, 这三个群体中有适度百分比的细胞表达GM-CSF、IL-6、IL-10和TGF- β (图4a)。

[0145] 新近单细胞研究表明在各给定细胞群体的单细胞细胞因子特征之间存在显著异质性。为在单细胞水平上利用各群体的多功能特性, 我们随后应用X偏移聚类算法。各群体仅基于细胞因子的表达样式加以聚类, 并且评估各疾病状况下在单细胞水平上单独或以任何组合产生各细胞因子的细胞的频率。引起关注的是, 在各群体内鉴定了在细胞因子表达样式方面的高水平功能异质性, 当细胞表面标志物是唯一聚类准则时, 所述各群体被确定为是相对同质的。

[0146] 基于产生TNF- α 、IL-6、TGF- β 、以及TNF- α 与IL-6、GM-CSF、IL-10的组合或缺乏细胞因子产生, 在单细胞水平上描绘群体A、B和C中细胞因子产生性细胞的七个不同子组(图4b)。这些不同子组的频率和细胞因子产生样式直接关于各疾病状态而不同。

[0147] 在对各群体中以及不同疾病状况下这七个所鉴定子组中的各者的分数进行定量的情况下, 我们发现在健康状态下, 细胞产生单一细胞因子或完全不产生细胞因子, 其中大多数(42–44%)细胞不产生细胞因子(图4b)。相较于健康状态, 在神经炎症性疾患与神经变性疾患两者的情况下, 单阳性TNF- α 产生性细胞的频率显著增加, 而IL-6和TGF- β 产生性细胞的频率降低(图4b)。

[0148] 疾病状况促使出现三个可明确鉴定的多功能性子组: 双重TNF- α 和GM-CSF产生性细胞、双重TNF- α 和IL-10产生性细胞、以及双重TNF- α 和IL-6产生性细胞(图4b)。最值得注意的是, 在神经炎症性疾患期间, 尤其是在EAE疾病的发作和高峰时, 群体B和C中GM-CSF和TNF- α 共表达性子组的频率显著增加, 从而使得这个子组成为细胞因子产生性细胞之中第二最丰富子组(分别多达18%和29%)(图4b)。相反, 在神经变性疾患的情况下, 在所有三个群体中, 这个子组的频率都极低—0%至2%。关于其他多功能性子组, 神经炎症性疾患与神经变性疾患两者也引发出现低频率的TNF- α ⁺IL-6⁺和TNF- α ⁺IL-10⁺多功能性细胞(2–3%)。通过比较神经炎症性疾患和神经变性疾患的情况下的细胞因子概况, 然后我们可将GM-CSF、TNF- α 双重产生性子组鉴定为神经炎症性疾患的一个限定性特征(图4b)。

[0149] 此外, 在三个CNS驻留群体(A、B和C)之中, 不同于其他两个群体, 在群体A中, 在健康和疾病状况的情况下, 重大分数的细胞不产生细胞因子, 并且即使在疾病状况期间, 细胞因子产生性子组中占优势的也是单细胞因子产生性细胞, 其中多功能性子组包含极小百分比的细胞(仅1%)(图4b)。这个结果是重要的, 因为如上陈述的对这个群体的信号传导性质的分析显示群体A相较于其他两个群体具有较低表达水平的信号传导分子(图4b)。

[0150] 总之, 这些数据通过证明根据细胞表面标志物被确定为相对同质的各群体实际上含有基于它们的细胞因子分泌概况是异质性的功能性子组来强调三个所鉴定CNS驻留骨髓细胞群体的基本性质。对炎症或对变性的应答使各群体的细胞因子概况向增加偏斜, 并且驱动同时产生两种细胞因子的多功能性子组的发育。尽管神经炎症性疾患与神经变性疾患

两者均引发双阳性TNF- α 、GM-CSF产生性细胞的发育,但高频率的这个子组与神经炎症性疾病的高度最佳关联,即在EAE-高峰和发作-的情况下在两个群体(B和C)中。群体B和C也显示显著炎症性信号传导性质。然而,在诸如HD的病变的情况下,或在具有极低炎症性信号传导性质的群体A中(在HD或EAE的情况下),这些子组中的细胞的频率极低或未观察到。

[0151] 相对于退变性状态,在炎症性状态下,血液源性单核细胞子组展现向CNS中迁移的不同动力学。在经典炎症的范式中,炎症性应答以作为第一防线的组织驻留巨噬细胞的活化以及白细胞从血液向受影响组织中进行后续募集加以定义。在这个级联中突出的是单核细胞向外周组织中迁移以促进炎症性过程以及对驻留组织巨噬细胞进行补充。在一些情况下,这些单核细胞消失而不对组织驻留巨噬细胞汇集物作贡献。如同外周组织中的炎症一样,单核细胞浸润已与中枢神经系统的疾病中的炎症性应答相关联。举例来说,血液源性巨噬细胞使EAE病变恶化;然而,它们不促进神经变性疾病中的炎症。

[0152] 因为CNS中炎症性应答的重大部分归因于外周源性骨髓细胞的进入,所以我们接着表征在神经炎症性疾病(EAE)和神经变性疾病(HD)下这些细胞的性质。单核细胞基于表达它们的关键表面标志物Ly6C以及缺乏Ly6G表达而不同于其他骨髓细胞(CD11b⁺细胞)。来自组合的所有样品的复合最小生成树(MST)揭示CNS样品中的五个离散Ly6C⁺Ly6G⁻细胞簇(图5a)。X偏移算法将Ly6C区室分成五个单独簇(D、E、F、G和H),并且分裂标志物树可视化揭示驱动区分的主要标志物是CD274(PD-L1)、CD88、IL-17R和MHCII(图5b)。为了解循环单核细胞对CNS中免疫细胞异质性的相对贡献,我们分析在健康状态下以及在不同临床阶段的神经炎症和神经变性下这五个单核细胞子组各自的频率(图5c)。分析健康动物以及在不同阶段的EAE和HD的情况下CNS中这五个子组各自的频率指示在不同疾病状况的情况下这些单核细胞子组进行选择募集(图5c)。神经炎症性疾病与神经变性疾病之间的最惊人差异是与先前研究一致,我们观察到在神经变性疾病HD的情况下,单核细胞在CNS中无贡献(平均小于0.4%)。也值得注意的是,并且根据较早报道,类似于HD,在健康和恢复的CNS中,存在极低频率的单核细胞(分别是0.8%至1.2%),并且仅检测到一个所鉴定群体-群体F。相比之下,EAE的炎症性阶段-症状发生前、发作和高峰-引起所有五个所鉴定单核细胞子组的存在(图5c)。在慢性EAE的情况下,我们观察到低频率(0.5至0.9%)的3/5所鉴定单核细胞子组(图5c)。

[0153] 由这些数据协同我们的先前研究结果以及其他人的那些研究结果一起显现出的一个主题是单核细胞的大量募集是短暂性和炎症驱动事件。一旦炎症消失或显著减弱,单核细胞即基本上不见。作为根据我们自身的先前研究和其他研究而提出的构思,单核细胞作为在EAE的情况下触发疾病向麻痹阶段进展的关键参与者的形象,鉴于我们发现这个细胞群体的可观异质性而现时变得更加微妙。

[0154] 为获得对在不同疾病状态下这些各种单核细胞子组如何促进炎症的详细了解,我们比较它们的表型和功能性概况以确定是否存在任何可察觉差异。我们发现在群体D和E中,共刺激性分子(CD80、CD86)、嘌呤能信号传导中涉及的受体(CD38、CD39)、针对凋亡细胞的吞噬受体如TAM受体酪氨酸激酶Mer、Ax1和甘露糖受体CD206以及TREM2被上调,而群体F与G两者均表达低水平的这些标志物,并且群体H表达中等水平(图11)。与它们的共刺激性分子(CD80、CD86)表达一致,群体D和E中II类MHC的表达(图5d)进一步表明Ly6C⁺区室中的抗原递呈功能。此外,群体D和E仅在EAE的症状发生前、发作和高峰阶段被检测到,并且它们

的数目随着疾病从症状发生前阶段向高峰阶段进展而增加。相反,这两个群体不存在于慢性和恢复的EAE中以及健康动物和HD中(图5c)。考虑到它们的出现时机以及它们仅在T细胞介导的疾患诸如EAE的情况下而非在神经变性疾患HD的情况下观察到的事实,这两个子组潜在负责在EAE的情况下抗原特异性T细胞的活化。

[0155] 相对于驻留骨髓细胞,在浸润性骨髓细胞上细胞表面表型的差异性表达揭示治疗靶标。小神经胶质细胞和外周源性骨髓细胞具有不同发育起源、更新机制,并且在病理过程中施加不同功能,尽管它们共有类似形态和主要谱系细胞表面标志物。我们关于表型表面蛋白和功能性标志物—诸如信号传导和细胞因子来探究这些不同细胞类型。

[0156] 将所鉴定CNS驻留骨髓细胞群体(A、B、C)中的细胞表面标志物与所鉴定单核细胞群体(D、E、F、G、H)进行比较,我们观察到粘附分子CD49d($\alpha 4$ 整合素)和CD49e($\alpha 5$ 整合素)的表达仅存在于血液源性骨髓性群体中而非CNS驻留骨髓细胞群体中(图6a)。尽管CD49d($\alpha 4$ 整合素)也在其他血液源性群体诸如T细胞、DC和粒细胞簇中表达,但CD49e仅由Ly6C⁺子群体表达(图6a)。CD49e结合纤维连接蛋白,即一种沉积在多发性硬化症病变中,特别是在血管周围的细胞外基质糖蛋白。CD49e在单核细胞上表达表明CD49e-纤维连接蛋白相互作用促进这些细胞向CNS实质中迁移。

[0157] 为探究通过阻断它们的进入来干扰单核细胞进入CNS中是否将影响EAE疾病的过程,我们用对CD49e具有特异性的MFR5抗体或它的作为对照的同种型治疗EAE小鼠。相较于对照组,用抗CD49e抗体治疗的小鼠中疾病的发作显著延迟。显著的是,抗体治疗使疾病的严重性减轻,并且动物从未达到麻痹阶段(图6b)。

[0158] 使用对 $\alpha 4$ 整合素具有特异性的抗体阻断T淋巴细胞和单核细胞向CNS的归巢抑制了EAE,并且使MS患者的复发率降低。不幸的是,在一子组个体中,这个治疗导致病毒性感染的再活化以及进行性多灶性脑白质病。在T细胞上缺乏CD49e($\alpha 5$ 整合素)以及其能够在EAE的情况下的疾病严重性减轻提供特异性靶向单核细胞进入的治疗策略的基本原理。相比于现有疗法,这种策略可能具有潜在较少副作用。

[0159] 相对于驻留骨髓细胞,浸润性骨髓细胞的信号传导性质的表达以及细胞因子概况具有差异。我们的较早发现和其他发现表明在CNS炎症期间,在血液源性巨噬细胞与CNS驻留骨髓细胞之间具有功能性差异的证据。我们接着确定相较于CNS驻留骨髓细胞群体,单核细胞群体应答于相同疾病状况是否具有不同或类似信号传导状态以鉴定潜伏在它们的所报道功能性差异以下的机理。跨越这两个细胞类型的不同群体进行的对信号传导分子的相对表达的比较确认在相同疾病状况下,若干信号传导蛋白被差异性表达(图6c)。

[0160] 相较于所有三个CNS驻留骨髓细胞群体,在EAE的发作(群体D和E)和高峰(群体D、E和H)时,若干单核细胞群体中的pSTAT3表达是更高的(图6c)。转录因子pSTAT3的增加被认为是MS患者中炎症的重要介导因素。

[0161] 相比之下,相对于单核细胞群体,在CNS驻留骨髓细胞中,pCREB表达显著更高,特别是群体B和C(图6c),从而证实浸润性单核细胞在相较于驻留性CNS驻留骨髓细胞时具有基本差异。近来已报道在EAE的过程期间,CNS驻留骨髓细胞而非单核细胞的增殖,以及在CNS驻留骨髓细胞中增殖相关基因诸如fos的上调。CREB是fos基因的主要转录调控子。本结果证明pCREB表达与小神经胶质细胞增殖和fos表达的样式一致,并且表明CREB路径促进在EAE期间CNS驻留骨髓细胞的增殖。在EAE疾病期间,在CNS驻留骨髓细胞群体而非单核细胞

群体中, NF- κ B和C/EBP β 表达也增加(图6c)。

[0162] 这些研究支持骨髓细胞的信号传导特性参与EAE疾病的病理学中的模型;在症状发生前阶段, CNS驻留骨髓细胞是主要参与者, 以pCREB和MAPKAPK2上调作为它们的信号传导特征。在临床疾病的发作时, 信号传导路径转向血液源性骨髓细胞, 以pSTAT3展现它们的主要信号传导应答。在疾病的高峰时, 两个细胞类型均参与信号传导应答中, 但具有不同表型, 其中CNS驻留骨髓细胞主要上调pCREB和MAPKAPK2, 而单核细胞上调pSTAT3。在慢性疾病中, 信号传导转回CNS驻留骨髓细胞, 在EAE的慢性阶段期间表达NF- κ B和C/EBP β 。

[0163] 相较于单核细胞群体, CNS驻留骨髓细胞群体的由相同疾病状况引发的信号传导应答的差异可解释在炎症的不同阶段期间它们的迥异效应物性质。基于这些结果, 我们假设CNS驻留骨髓细胞和浸润性单核细胞的不同表型(图6a)和信号传导性质(图6c)应反映在EAE病变期间细胞因子表达概况不同。

[0164] 因此, 我们接着使用如上在CNS驻留骨髓细胞群体的情况下所述的相同方法, 通过在我们的细胞因子测定中手动门控各单核细胞群体来评估各单核细胞群体的细胞因子产生能力。单核细胞和CNS驻留骨髓细胞群体具有类似细胞因子表达概况, 主要产生TNF- α , 继之以IL-6、GM-CSF、IL-10和TGF- β (图7a)。然而, 因为这个整体分析会掩蔽各群体内在单细胞水平上基于细胞因子的任何组合的异质性, 所以我们接着使用X偏移聚类算法来分析由单细胞群体产生的多种细胞因子的概况。仅基于细胞因子的表达样式来将各群体聚类。五个单核细胞群体与三个CNS驻留骨髓细胞群体的比较分析揭示除在CNS驻留骨髓细胞群体中鉴定的七个不同细胞因子产生性细胞群体(图4b-图4d)之外, 在EAE的情况下, 一些单核细胞群体具有三个额外多细胞因子产生性子组(图7b)。这三个新的多功能性子组由三重细胞因子产生细胞TNF- α ⁺GM-CSF⁺IL-6⁺和TNF- α ⁺IL-6⁺IL-10⁺、以及四重细胞因子产生细胞TNF- α ⁺GM-CSF⁺IL-6⁺IL-10⁺(图7b)组成, 而小神经胶质细胞群体中的多功能性子组仅是双阳性的(图4b-图4d)。这三个子组仅在EAE的发作和高峰时得以鉴定, 并且相较于发作, 在疾病的高峰时具有显著更高频率(图7b)。因此, 尽管CNS驻留骨髓细胞群体与单核细胞群体两者均产生类似细胞因子, 但在单细胞水平上在这两个细胞类型的由相同疾病刺激引发的细胞因子产生概况方面存在显著差异。

[0165] 此处, 我们对以下普遍见解提出异议: 其中跨越各种神经病理学疾患的细胞和分子活化被常规标记为“神经炎症”, 即使在这些疾患在显微镜下如何显现以及它们在临床上如何呈现方面存在惊人差异。我们用质谱流式细胞术在单细胞水平上分析CNS病理学、EAE和亨廷顿氏病中的不同两极, 并且进行若干严格观察。首先, 在这两种病变的情况下, 跨越包括所活化的生物化学信号传导路径和所产生的细胞因子的许多特征, CNS驻留骨髓细胞中分子应答的细节十分不同。因此, 这些驻留骨髓细胞的活化不应以笼统描述诸如“炎症性”或“免疫”加以提及。其次, 在这两种病理学疾患下, 在CNS中, CNS驻留骨髓细胞和它们的外周源性骨髓性对应物具有相异分子应答。

[0166] 定义脑外部即所谓外周中(在血脑屏障外部)的炎症的细胞和分子指导方针由三个特征组成: 某些细胞因子和趋化因子升高、组织驻留巨噬细胞活化、以及白细胞从外周血液向脑中损伤部位募集, 从而导致局部组织病变。然而, 对CNS的疾病中的炎症的定义是有争论的。

[0167] 在过去二十年, 是指CNS内的炎症的术语神经炎症已表示在CNS的疾病或损伤的情

况下观察到的细胞和分子反应的任何级联。不幸的是,这个过度简单化已导致对神经变性疾患和神经炎症性疾病指定相同细胞病理生理学状况。一个后果是类似治疗方法已被建议作为对广泛迥异病变的推定治疗。

[0168] 尽管作为脑的典型和最普遍炎症性疾病的MS的特征在于在脑中的具有先天性和适应性炎症的各个方面的相当“经典的”免疫反应,但神经变性疾病中的病理学涉及完全不同的病理学要素,主要是包括小神经胶质细胞和血管周围骨髓细胞(CNS驻留细胞的活化和增殖,以及细胞因子和趋化因子的释放,而不涉及适应性体液或细胞免疫应答。然而,小神经胶质细胞活化以及检测到脑中细胞因子的水平升高不诱导外周免疫细胞向脑中迁移,也不诱导脑中的适应性免疫性。因此,小神经胶质细胞活化本身不应当用于将疾病分类为具有神经炎症性应答。

[0169] 实际上,众多研究描述在早期发育期间以及在成熟脑(其中它们在神经发生、突触可塑性和止血方面均起必需作用)中,在不存在任何病变下存在细胞因子以及活化的CNS驻留骨髓细胞。在正常发育脑中的所述发现不指示免疫应答。

[0170] 此处,采用无偏数据驱动方法,我们在EAE模型与HD模型两者中鉴定了三个CNS特异性骨髓性群体(A、B、C)。在两种病变EAE和HD下,这些群体的总频率均增加。这个结果为涉及小神经胶质细胞的不同CNS疾病具有“类似性”的论点提供至少一定基础。这些类似性是否足以允许迥异病变被称为是“神经炎症性的”是有疑问的。在任何病变的情况下CNS驻留骨髓细胞的活化都不应被基准标记为免疫应答。

[0171] 此处,我们显示当相较于在其中常规炎症存在于脑中的EAE的不同临床阶段时它们的对应物时,在HD的情况下三个CNS驻留骨髓性群体显示高度不一致信号传导性质。在EAE的情况下,两个CNS驻留骨髓性群体产生一系列密切配合的信号传导事件,在疾病的症状发生前阶段期间和在临床麻痹之前,以及在疾病的显现麻痹所处的高峰时,以pCREB和MAPKAPK2作为信号传导的特征,而NF- κ B与C/EBP β 信号传导路径两者均是慢性状态的特征。相比之下,具有临床疾病的HD样品中的这些群体不展现这些信号传导路径的任何重大表达,这与先前报道相反。特定来说,值得注意的是,在HD与慢性阶段EAE之间缺乏信号传导活性类似性,其中两个模型中的小鼠均显现永久功能性损害。慢性EAE,或MS的继发性进行性阶段,已在文献中被反复描述为MS的“神经变性”阶段。

[0172] 我们的显示在慢性EAE的情况下在CNS驻留骨髓细胞中进行NF- κ B和C/EBP β 信号传导以及在HD的情况下在其中缺乏任何此类信号传导活性的结果强调尽管慢性EAE和HD均被分类为神经变性疾患,但它们中的病理学应答的特性是相异的。

[0173] 相较于MS模型,在HD模型中CNS驻留骨髓细胞的功能性质的差异也反映在它们的相应细胞因子分泌概况方面。根据对总群体的分析,尽管在健康和两种疾病状况的情况下这三个群体显示能够产生类似细胞因子—即使以不同频率,但在单细胞水平上的分析确认各群体实际上含有基于它们的细胞因子产生概况而不同的子组。此外,在对立疾病状况的情况下,这些子组以相异方式得以改变。

[0174] MS模型与HD模型之间的惊人差异是在EAE的情况下分泌多种细胞因子—例如TNF- α 和GM-CSF的细胞激增。在疾病的发作和高峰时,此类双重分泌者构成总细胞因子产生性细胞的实质性部分。这些研究结果指示基于细胞表面标志物而纯化的子组内的各细胞可具有微妙细胞因子概况。对作为免疫应答的标志的细胞因子水平的分析可在细胞分泌单一细胞

因子还是多种细胞因子的情形下加以解释。

[0175] 确定在不同神经疾患的情况下血液源性骨髓细胞在疾病的过程中的程度和作用是关键。在利用多参数细胞计量术和无监督细胞类型作图的情况下,此处,我们显示具有髓单核细胞性细胞表面表型—Ly6C⁺、Ly6G⁺的细胞分化成五个子组。类似于先前研究,我们确认髓单核细胞性细胞向脑中的募集不存在于表征为神经变性疾患的HD中。相比之下,它们存在于EAE的所有不同临床阶段中,但它们的频率不同。值得注意的是,具有共刺激性分子和抗原递呈中涉及的其他分子的群体D和E即使在症状发生前疾病的情况下也存在,以及稍后在临床疾病的发作和高峰时存在。D和E不存在于慢性和恢复阶段中。这些动态变化的一个暗示是在中枢神经系统内,所述细胞在引发适应性免疫应答方面具有作用。

[0176] 相对于经募集的血液源性骨髓细胞来确定CNS驻留骨髓细胞在不同CNS疾病的发病机理中的相对影响和功能性差异对了解病理学以及对开发治疗策略均至关重要。由于缺乏任何特定区分标志物,所以对这些经募集细胞的作用的了解不充分。

[0177] 先前通过阻止血液源性骨髓细胞向CNS中浸润,我们提出CNS驻留骨髓细胞的活化为引发EAE所需,并且处于血液源性细胞进入之前。然而,EAE的进展(疾病发作往后)归因于血液源性骨髓细胞的进入。此处,我们显示在确定疾病状况下,这两个细胞类型具有不同信号传导表型。我们的数据显示在神经炎症的情况下区分CNS驻留骨髓细胞与血液源性骨髓细胞的信号传导差异。实际上,血液源性骨髓细胞的炎症性属性反映在它们的细胞因子表达概况方面,其中在这些细胞中,多种细胞因子产生性细胞—包括三重和四重细胞因子—在疾病的发作和高峰时增加。

[0178] 这些研究说明质谱流式细胞术具有用于了解CNS骨髓细胞的先前未确定群体的效力。相对于其中不存在经典炎症的疾病—HD,它们在其中炎症是明确组成部分的疾病—EAE的情况下的差异性特性可允许我们进一步在分子水平上区分神经炎症与神经变性。如我们已在此处所显示,出乎意料的治疗靶标如 $\alpha 5$ 整合素通过这个先进技术而得以被阐明以对神经病变进行分析。

[0179] 材料和方法:

[0180] 小鼠。处于7周的C57BL/6J雌性小鼠从Jackson Laboratory (Sacramento, CA) 购买。使动物在斯坦福大学 (Stanford University) 的研究动物设施处静息2周,并且在9周龄时诱发EAE。处于7-8周龄的R6/2雌性小鼠从Jackson Laboratory购买,并且在13周龄时在它们显现严重震颤、步态不规律、运动异常和癫痫发作时加以收集。动物实验由在斯坦福大学的机构动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 核准,并且依照机构动物护理和使用委员会的国立卫生研究院 (National Institute of Health) 指导方针来进行。所有动物都在12小时光照循环下舍饲。每笼的最大舍饲动物数目是五只小鼠。在这个研究中随机选择和使用动物。

[0181] 通过用MOG和佐剂进行免疫来在小鼠中诱发EAE。通过以下方式在处于9周龄的雌性C57BL/6J小鼠 (Jackson Laboratory) 中诱发EAE:用含有处于盐水中的200 μ g髓磷脂寡树突细胞糖蛋白35-55 (MOG35-55;MEVGWYRSPFSRVVHLYR NGK) 的乳液和含有4 μ g/ml结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis) H37RA的相等体积的完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant) (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) 在侧腹中进行皮下免疫。在0小时和免疫后48小时,向所有小鼠腹膜内施用400ng百日咳毒素 (List Biological

Laboratories, Inc., Campbell, CA)。如下对神经损害评分：症状发生前：EAE诱发后10天，不患有临床疾病；发作：尾部紧张度丧失和后肢衰弱，高峰：完全后肢麻痹，恢复：从后肢麻痹中恢复并且维持改善，慢性：在3-6个月之后显现永久功能性损害，并且从未恢复。

[0182] 抗体。所用抗体的概述可见于表1、表2和表3中，所述各表包括它们的初级制造商、克隆、相应金属缀合物和最终操作浓度。使用MaxPAR抗体缀合试剂盒 (Fluidigm, Markham, ON, Canada)，遵循制造商方案，一次以从100至500 μg 变化的量制备抗体。在用它们的相应金属缀合物标记之后，通过使用Nanodrop 2000分光光度计 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) 在280nm下测量它们的吸光度来测定产率百分比。使用Candor PBS抗体稳定化溶液 (Candor Bioscience GmbH, Wangen, Germany) 将抗体稀释至0.3mg/mL，接着在4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。使用原代鼠样品和细胞培养物来滴定各抗体以获得最优染色浓度。

[0183] 单细胞分离。使小鼠深度麻醉，并且加以监测。在丧失伤害性反射后，用冰冷PBS对动物进行穿心灌注。将脑和脊髓移除，并且在冰上在冷HBSS (Life Technologies, 14175-095) 中温和均质化。根据先前报道的方案，用30%/70% Percoll (GE Healthcare, Marlborough, MA) 梯度离心来分离单核细胞。

[0184] 将细胞混悬液于具有2%FCS和2mM EDTA的PBS中洗涤两次，并且根据制造商说明书 (Smart Tube Inc., Palo Alto, CA) 使用1:1.4蛋白质组稳定剂在室温下固定10分钟并在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻。

[0185] 在对动物灌注之前通过眶后来收集外周血液，并且将其于RMPI 1640中进行1:1稀释来转移至经肝素钠涂布真空管中，根据制造商说明书 (Smart Tube Inc., Palo Alto, CA) 使用1:1.4蛋白质组稳定剂在室温下固定10分钟并在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻。

[0186] 在各实验中，将10-12只小鼠汇合以提供足够细胞数目。采用单独的免疫和小鼠群组重复各实验7至10次。

[0187] 质量标签细胞条形码化。对来自各状况的样品进行质量标签细胞条形码化 (MCB)。在各样品中，六种钇同位素的独特组合用于编码20种独特质量标签条形码，如先前所述61。这个技术允许在单一管内将所有样品汇合和染色，从而消除在抗体染色时管与管之间的可变性，并且使可变仪器灵敏性的影响最小化。对于各样品，对来自各状况的 1.5×10^6 个细胞进行条形码化。用细胞染色培养基 (CSM，具有0.5%BSA、0.02%NaN₃的PBS) 将甲醇-渗透化的细胞洗涤一次，接着用PBS洗涤一次。接着将含钇MCB试剂于DMSO中的不同组合混合物在1:100DMSO下在涡旋下添加至各个样品中，接着在室温下孵育15分钟，随后用CSM洗涤三次。接着将各个样品汇合以进行抗体染色和质谱流式细胞术分析。在数据收集之后，使用质谱流式细胞术解条形码算法对各状况进行去卷积。

[0188] 抗体染色。接着将条形码化细胞再混悬于具有0.5%BSA和0.02%NaN₃的PBS中，并且在20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下添加针对CD16/32的抗体，在振荡器上在室温下持续10分钟以阻断Fc受体。将细胞用金属缀合表面标志物抗体的混合物染色 (图12)，从而产生500 μL 最终反应体积，并且在振荡器上在室温下染色30分钟。在染色之后，用具有0.5%BSA和0.02%NaN₃的PBS将细胞洗涤2次。接着，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下用4 $^{\circ}\text{C}$ 甲醇对细胞进行渗透化10分钟。接着于具有0.5%BSA和0.02%NaN₃的PBS中洗涤细胞两次以移除剩余甲醇。接着将细胞用细胞内抗体 (表1针对信号传导实验，并且表2针对细胞因子实验) 在500 μL 的情况下在振荡器上在室温下染色30分钟。接着于具有0.5%BSA和0.02%NaN₃的PBS中洗涤样品两次。使细胞与1mL在具有1.6%

PFA的PBS中稀释的1:4000 191/193Ir DNA嵌入剂(DVS Sciences/Fluidigm,Markham,ON)一起在4℃下孵育过夜。次日,将细胞用具有0.5%BSA和0.02%NaN₃的PBS洗涤一次,接着用双去离子(dd)H₂O洗涤两次。

[0189] 质谱流式细胞术测量。在分析之前,将经染色和插入的细胞集结块再混悬于含有聚苯乙烯归一化珠粒的ddH₂O中,所述珠粒含有镧-139、镨-141、铽-159、铕-169和镱-175,如先前所述62。在配备有超级进样器进样系统(Victorian Airship&Scientific Apparatus,Alamo,CA)的CyTOF 2 (Fluidigm,Markham,ON)上在每秒200至300个细胞的事件速率下分析经染色细胞。所有质谱流式细胞术文件都使用可供免费下载的质谱流式细胞术数据归一化算法来一起归一化。

[0190] 分析。聚类:使原始CyTOF数据经受 $\text{arsinh}(x/5)$ 变换。我们选择来自各样品的细胞,其接着被汇合在一起以进行聚类,从而产生数据集,其中信号传导数据集具有总计1,800,183个细胞,并且细胞因子数据集具有总计1,967,893个细胞。这些数据集用称为X偏移的新型基于密度的聚类方法加以聚类。X偏移被开发来计算大型多维数据集,并且自动确定最优簇数目。简单地说,X偏移使用加权K最近邻密度估计来发现多维标志物空间中数据点(细胞事件)密度的局部最大值。X偏移计算各数据点的密度估计值,接着搜索最近邻图中的局部密度最大值,其变为簇质心。所有其余数据点都接着通过图中的密度升高路径来连接于质心,由此形成簇。最后,算法检查相邻质心之间直线段上的密度最小值的存在性,必要时合并紧密对齐的簇。总之,基于标志物表达空间中细胞事件密度的局部梯度来将细胞指定至不同群体中。如果群体的中心之间的直线上的任何点中的细胞密度低于群体中心中的密度,那么将两个细胞群体视为单独细胞群体。换句话说,代表两个群体的细胞事件密度峰值必须由裂隙分隔。此外,将以小于2.0的马哈拉诺比斯距离(Mahalanobis distance)分隔的簇合并在一起。通过遍及K来找到簇数目图的肘点,以数据驱动方式将最优最近邻参数K选为70。所有数据处理都用Vortex聚类环境进行。

[0191] 用于门控的分裂标志物树(DMT):为有助于反向门控经X偏移聚类群体,我们将簇组织成分裂标志物树(DMT)。DMT算法构建以涵盖所有簇的根节点起始的二元决策树;这组簇接着经受迭代二元分裂。这个过程导致对细胞类型进行类似于手动门控层次的层次二元分类。通过追踪来自根的标志物分裂的序列,我们能够推断各细胞群体的基于标志物的简明特征,所述特征将各细胞群体与其他群体相区分。

[0192] CD49e($\alpha 5$ 整合素)治疗。将EAE小鼠($n=5$ /组)每日用200 μg CD49e($\alpha 5$ 整合素)抗体(克隆=5H10-27(MFR5))或同种型对照(低内毒素无叠氮化物抗体,并且同种型对照由Biolegend为这个实验定制)治疗。每日在不知晓哪个小鼠在接受治疗的情况下以盲化方式针对EAE的临床体征来评估EAE评分。每日评估小鼠,并且根据以下状况来评分:0,无临床疾病;1,尾部衰弱;2,后肢衰弱;3,完全后肢麻痹;4,后肢麻痹以及一定前肢衰弱;5,濒死或死亡。实验由于对照小鼠具有高罹病率而终结。

[0193] 表1

[0194]

蛋白质	克隆	制造商	金属同位素	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	目录号
B220	RA3-6B2	BioLegend	Pr141	2	103202
CD11b	M1/70	BioLegend	Nd142	0.5	101202
CD11c	N418	BioLegend	Nd143	8	117302
CD194	2G12	BioLegend	Gd160	8	131202
CD195	HM-CCR5(7A4)	eBioscience	Gd155	8	14-1951-85
CD200R	OX2R	BioLegend	Yb172	8	123902
CD206	MR5D3	AbD Serotec	Er166	8	MCA2235
CD217 (IL-17RA)	PAJ-17R	eBioscience	Lu175	4	12-7182-82
CD274	B7-H1	BioLegend	Nd146	2	124302
CD3	145-2C11	BioLegend	In113	4	100302
CD38	90	BioLegend	Dy161	4	102702
CD39	Duhs59	BioLegend	Er170	3	143802
CD4	RM4-5	BioLegend	Nd150	1	100506
CD45	30-F11	BioLegend	Yb176	1	103102
CD49d	9C10 (MFR4.B)	BioLegend	Sm147	4	103708
CD49e	5H10-27(MFR5)	BioLegend	Nd148	4	103801
CD80	16-101	BD Pharmigen	Er168	4	553766
CD86	GL-1	BioLegend	Tb159	4	105002
H-2	M1/42	BioLegend	Nd145	1	125502
Ly6C	HK1.4	Novus Biologicals	Eu151	1	NBP1-28046
Ly6G	1A8	BioLegend	ce140	2	127632
MHCII	M5/114.15.2	BioLegend	In115	2	107602
CD317 (PDCA-1)	120GB	Novus /ingenx	Eu153	4	DDX0390-067
TIM4	Kat5-18	Hycult Biotech	Dy163	8	11550M0512
MerTK	多克隆	R&D	Dy162	4	DGS0213111
AXL	多克隆	R&D	Er167	4	CTC0213041
TREM2	78.18	BioRad	Tm169	4	1113
4D4		合作者赠品*	Sm154	0.5	赠品
Fcrls		合作者赠品*	Sm152	2	赠品

4

[0195] 表2

蛋白质	克隆	制造商	金属同位素	浓度 (ug/mL)	目录号
C/EBPα	D56F10	CST	Hol65	4	8178S
C/EBPβ	E299	Abcam	Dy164	4	ab32358
pCREB	87G3	CST	Yb174	1	9198BF
pSTAT1	58D6	CST	Gd155	4	9167BF
pSTAT3	4/P-STAT3	DVS	Gd158	1	3158005A
pSTAT5	47	BD Pharmingen	Nd144	1	624084
NF-κB (p65)	K10-895.12.50	BD Pharmingen	Yb171	4	558393
MAPKAPK2	27B7	CST	Yb173	1	3007BF
cPARP	F21-852	BD Pharmingen	La139	1	519000017

[0196] 表3

蛋白质	克隆	制造商	金属同位素	浓度 (ug/mL)	目录号
GM-CSF	MP1-22E9	BioLegend	Dy164	4	505402
IFN-α	F1	Hycult Biotech	Yb173	4	HM1001
IFN-γ	XMG1.2	DVS	Hol65	4	3165003B
IL-10	JESS-16E3	DVS	Gd158	4	3158002B
IL-17A	TC11-18H10.1	DVS	Tm169	4	3169005B
IL-6	MP5-20F3	DVS	Er167	4	3167003B
TGF-beta	19D8	BioLegend	Yb171	4	521704
TNF-α	MP6-XT22	DVS	Dy162	2	3162002B

[0199] 实施例2

[0200] 骨髓细胞群体的概述

[0201] 本文讨论的骨髓细胞群体的表型概述于表4中。群体A、B和C对应于小神经胶质细胞。这些群体等效于人脑中的CD45中等、CD11b+细胞。

[0202] 在EAE和MS疾病以及许多炎症性疾患中，存在单核细胞从外周血液进行的浸润。我们已鉴定了EAE小鼠的中枢神经系统中的五个单核细胞群体，在本文中称为D、E、F、H、G。在人中，这些群体对应于CD11b+CD14+CD16+单核细胞。在这些群体的情况下的细胞因子表达概括显示在EAE疾病的发作或高峰时，相较于细胞仅表达一种细胞因子所处的健康状态，一定百分比的这些细胞表达多种炎症性细胞因子 (TNF-α+GMCSF)。

[0203] 表4

群体	CD45 ^o	CD11b ^o	Ly6G ^o	CD49d ^o	CD317 ^o	CD39 ^o	CD86 ^o	MHC II ^o	CD274 ^o	LY6C ^o	CD88 ^o	CD217 ^o
A ^o	中等	阳性	阴性	阴性	阳性	阳性	阴性	o	o	o	o	o
B ^o	中等	阳性	阴性	阴性	阳性	阳性	阳性	阴性	o	o	o	o
C ^o	中等	阳性	阴性	阴性	阳性	阳性	阳性	阳性	o	o	o	o
D ^o	高	阳性	阴性	阳性	o	o	o	阳性	阳性	阳性	o	o
E ^o	高	阳性	阴性	阳性	o	o	o	阴性	阳性	阳性	o	o
F ^o	高	阳性	阴性	阳性	o	o	o	o	阴性	阳性	阴性	阴性
G ^o	高	阳性	阴性	阳性	o	o	o	o	阴性	阳性	阳性	阴性
H ^o	高	阳性	阴性	阳性	o	o	o	o	阴性	阳性	阳性	阳性

[0205] 实施例3

[0206] 肌萎缩性侧索硬化

[0207] 我们的先前研究和其他研究已证明小神经胶质细胞是作为鼠ALS疾病模型的mSOD1小鼠的脑和脊髓中的仅有骨髓细胞，并且不存在骨髓细胞从外周血液进行的浸润 (Ajami等 (2007) Nature Neuroscience 10:1538-1543; Chiu等 (2013) Cell Reports4 (2) : 385-401)。此外，若干研究已证明小神经胶质细胞参与ALS的发病机理中，并且限制小神经

胶质细胞中突变SOD的表达将使变性延迟,并且使运动mSOD表达性运动神经元的存活延长 (Clement等(2003) Science 302:113-117;Lino等(2002) The Journal of Neuroscience 22(12):4825-4832)。

[0208] 如图13中所示,在作为鼠ALS模型的过度表达人突变超氧化物歧化酶1(mSOD)的小鼠中,在疾病终末阶段时,存在小神经胶质细胞群体中CD49e表达增加。我们将在疾病发作时(95天,重量开始减轻,基于Boillee等2006) CD49e($\alpha 5$ 整合素)的表达水平与疾病终末阶段(140天,此时小鼠完全麻痹,并且必须终止实验)进行比较。相较于疾病的发作,在疾病终末阶段时,CD49e的表达水平增加。

[0209] 我们将在疾病发作时(95天龄小鼠,此时重量开始减轻)和在疾病终末阶段时(140天,此时小鼠完全麻痹)这些群体的频率进行比较。在疾病发作时,群体A占CNS中总细胞群体的2%,群体B占5%,并且群体C占2%。在疾病终末阶段时,群体A占CNS中总细胞群体的4%,群体B占12%,并且群体C占2%。这指示在疾病的终末阶段时,群体B显著增加。

[0210] 将mSOD1小鼠中在疾病发作和疾病终末阶段时群体A、B和C的细胞因子概况进行比较证明了群体A、B、C表达IL-10、IL-6、TNF- α 、GMCSF和TGF- β 。重要的是,在mSOD1小鼠中,在疾病终末阶段时,表达主要炎症性细胞因子TNF α 的细胞的频率增加。如图15中所示,在群体A中,TNF- α 表达性细胞的频率从发作时的10%增加至终末阶段时的30%,在群体B中,TNF- α 表达性细胞的频率从疾病发作时的20%增加至终末阶段时的40%,在群体C中,TNF- α 表达性细胞的频率从10%增加至40%。

[0211] 基于这个数据和已证明小神经胶质细胞在ALS的mSOD1模型中在疾病进展中是重要的先前研究,抑制CD49e是ALS疾病的治疗靶标。

[0212] 为评估治疗,在疾病发作之前,用100微克抗CD49e抗体每周三次治疗6周龄mSOD1小鼠。对照组用类似剂量的同种型对照治疗。

[0213] 对于人,抗CD49e剂作为治疗剂用于改进在肌萎缩性侧索硬化的情况下的运动活动。

[0214] 实施例4

[0215] 纹身移除

[0216] 对纹身移除的增强通过以下方式来实现:每周3次持续6周全身性、肌肉内、腹膜内、真皮内或静脉内施用100微克抗CD49e。可在各6周轮次之后一周开始继续所述方案以进行多轮治疗。

[0217] 本说明书中引用的各出版物据此出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0218] 应了解本发明不限于描述的特定方法、方案、细胞系、动物物种或属类以及试剂,因此可变化。也应了解本文所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不意图限制本发明的将仅由随附权利要求限制的范围。

[0219] 除非上下文另外明确规定,否则如本文所用,单数形式“一个(种)”和“这个(种)”包括复数个(种)指示物。因此,举例来说,提及“一个(种)细胞”包括复数个(种)所述细胞,并且提及“这个(种)培养物”包括提及一个(种)或多个(种)培养物及其为本领域技术人员所知的等效物,诸如此类。除非另外明确指示,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与为本发明所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。

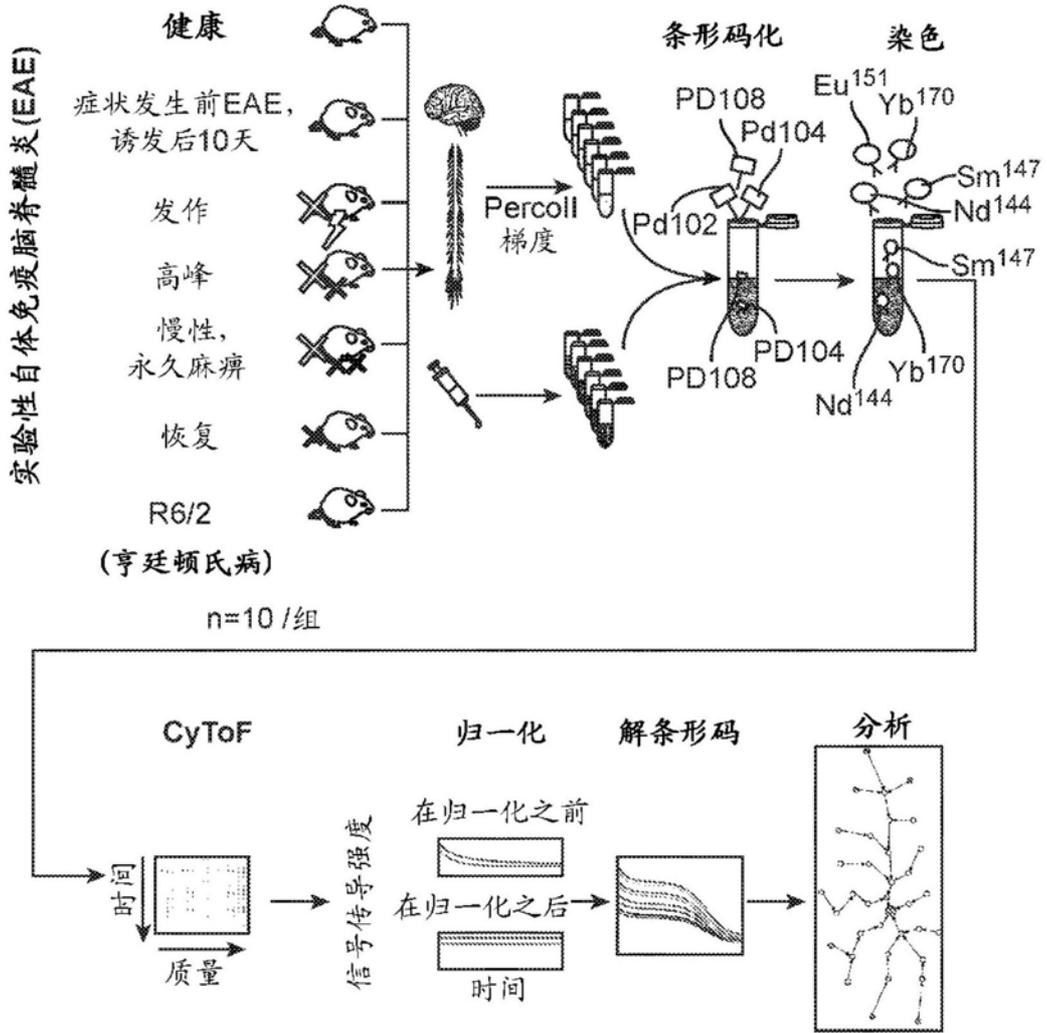


图1

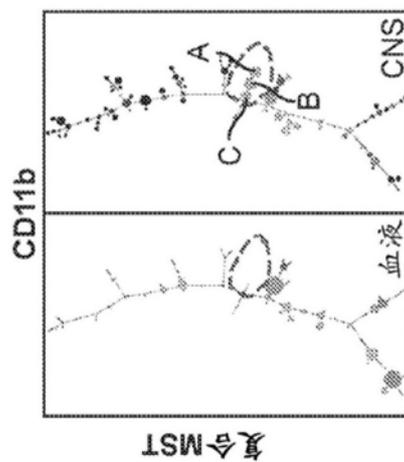


图2A

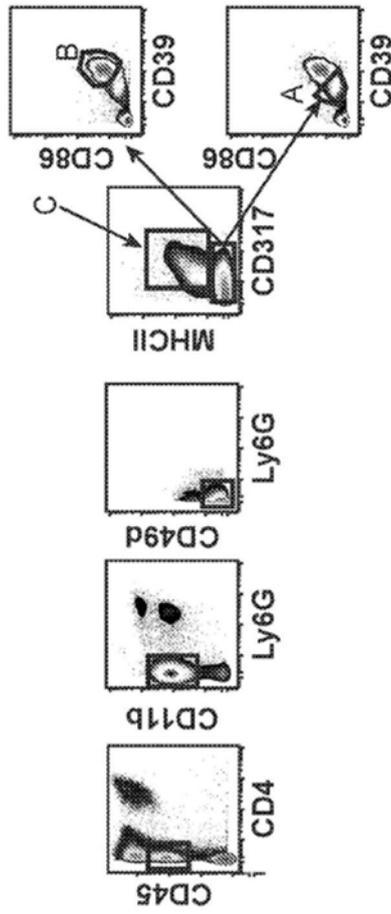


图2B

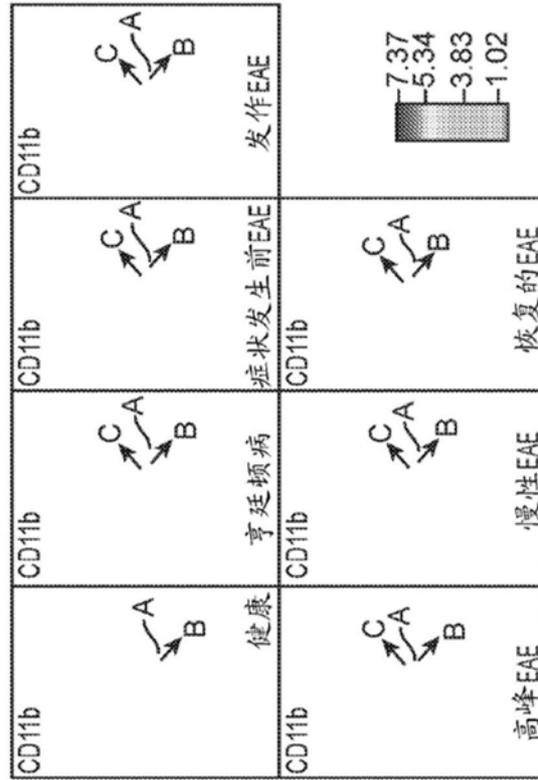


图2C

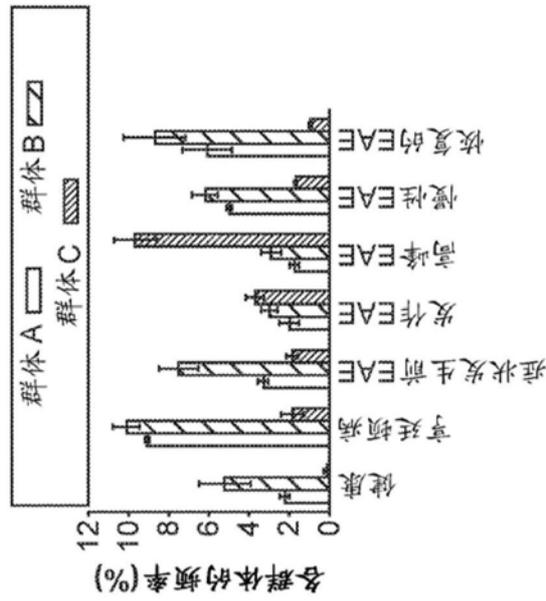


图2D

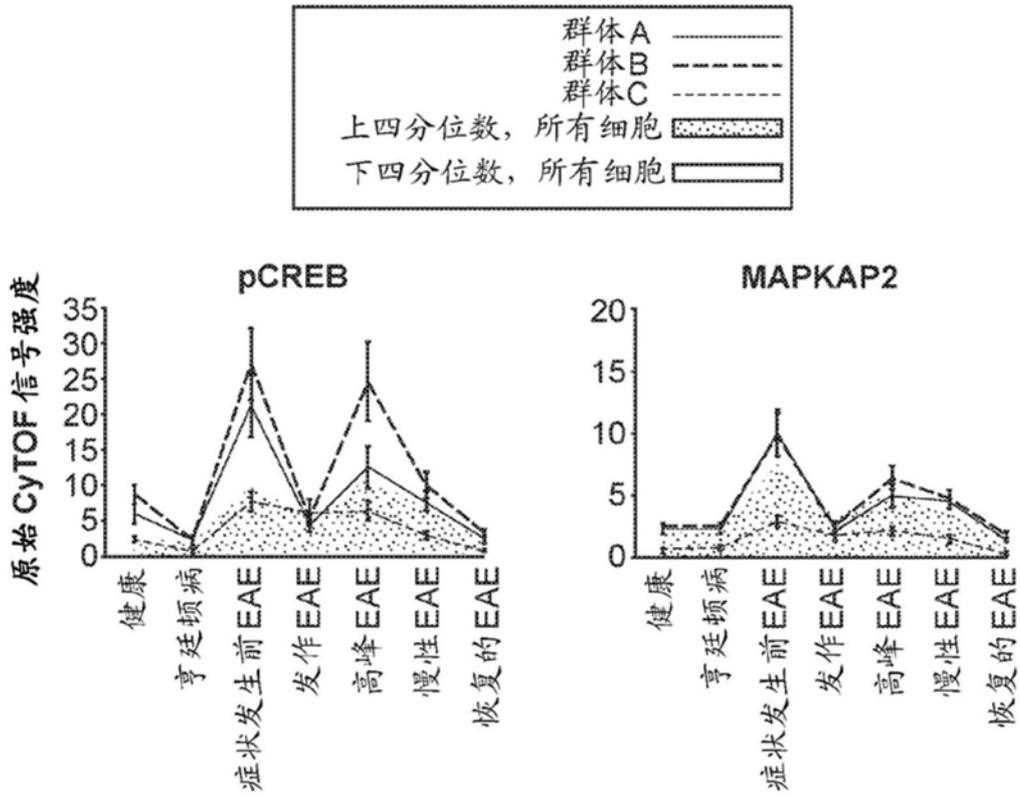


图 3A

图 3B

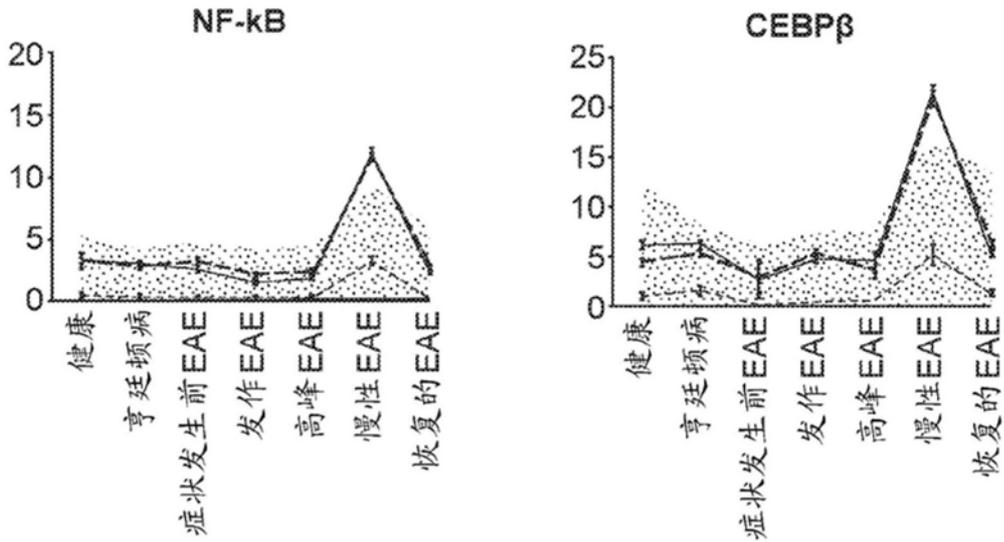


图 3C

图 3D

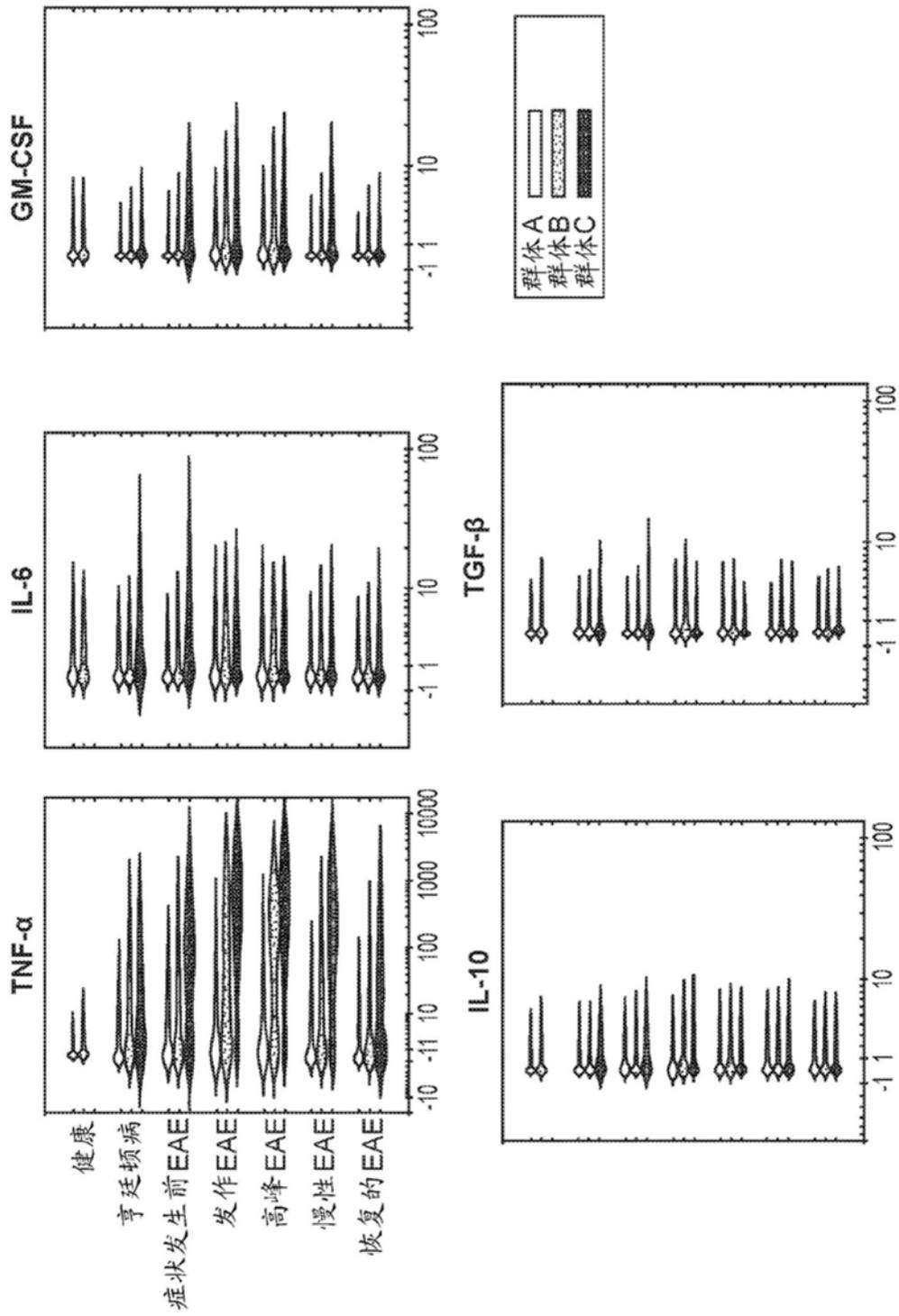


图4A

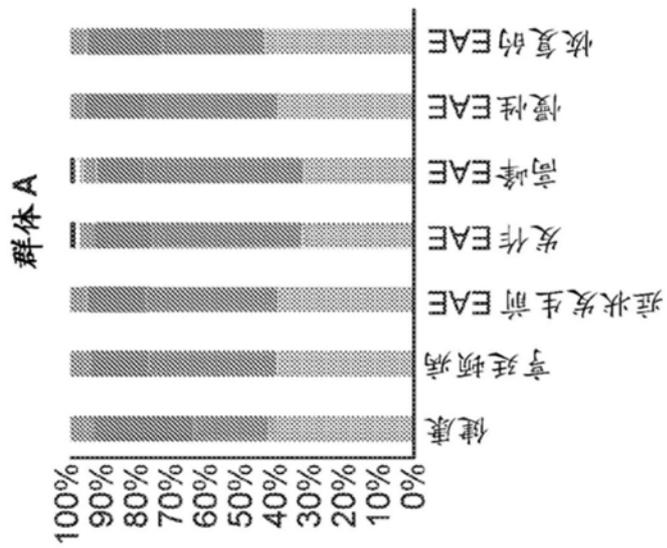
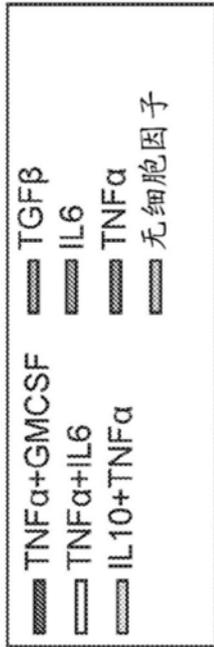


图 4B

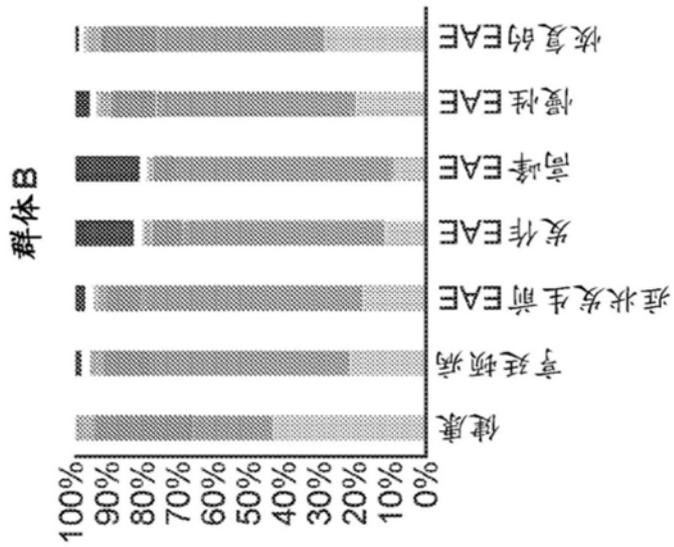


图 4C

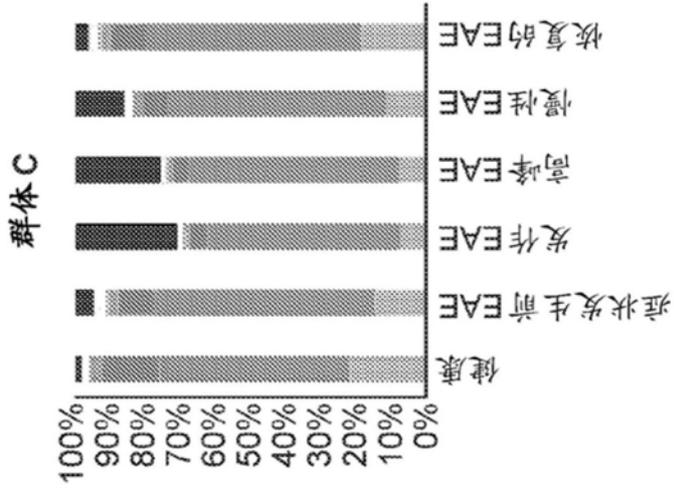


图 4D

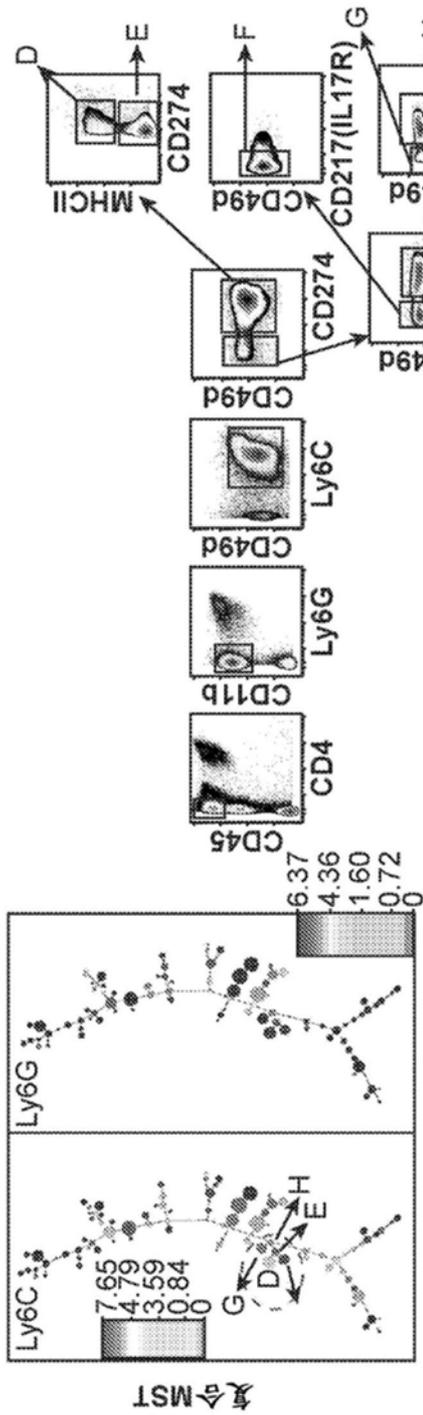


图 5A

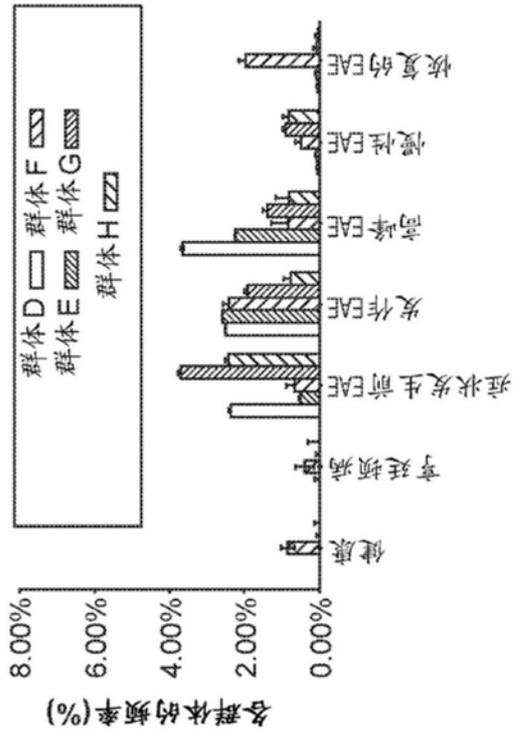


图 5C

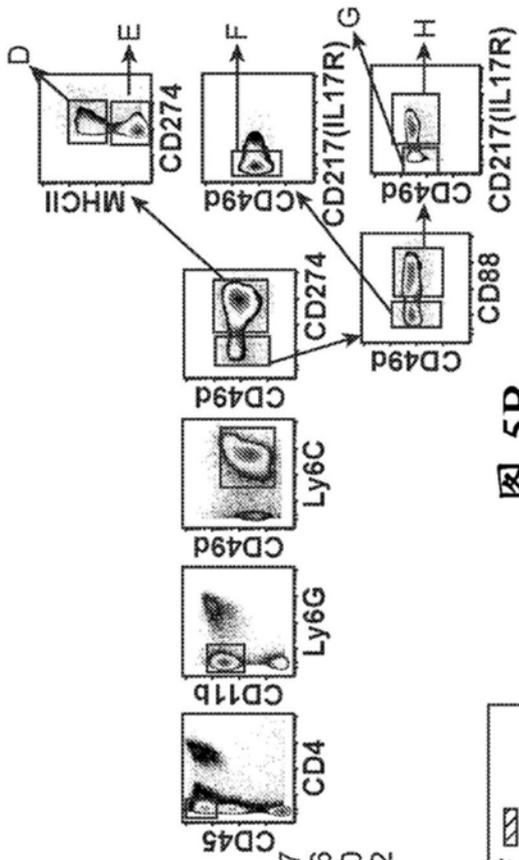


图 5B

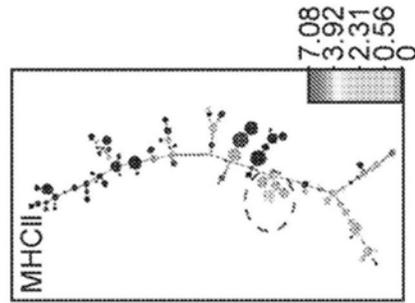


图 5D

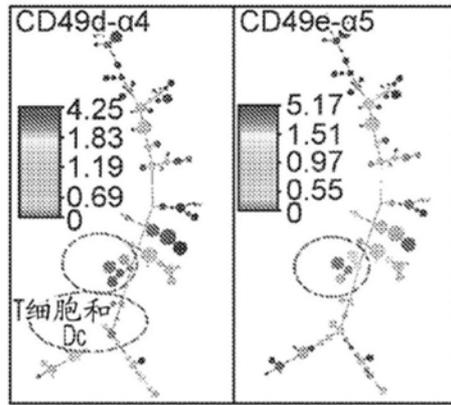


图6A

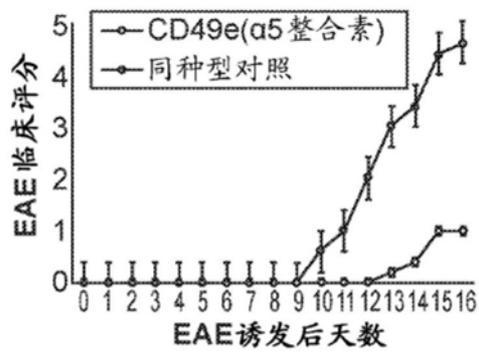


图6B

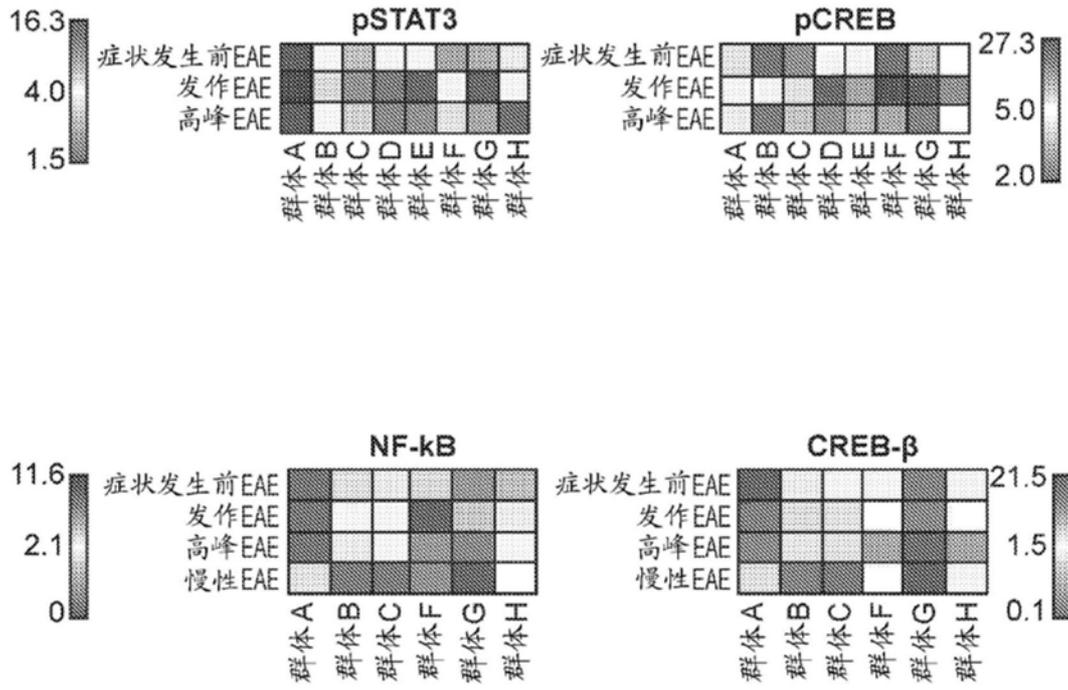


图6C

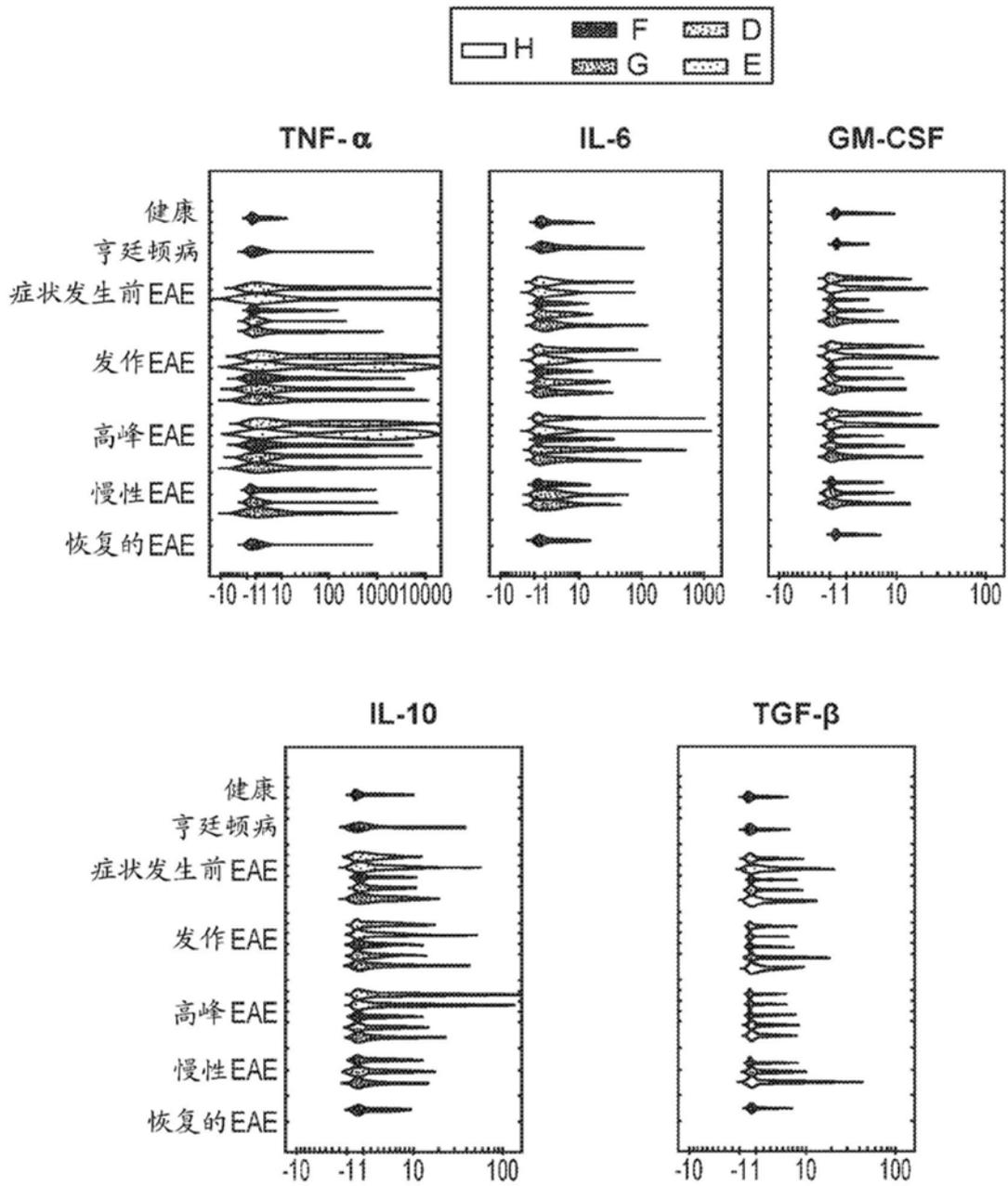


图7A

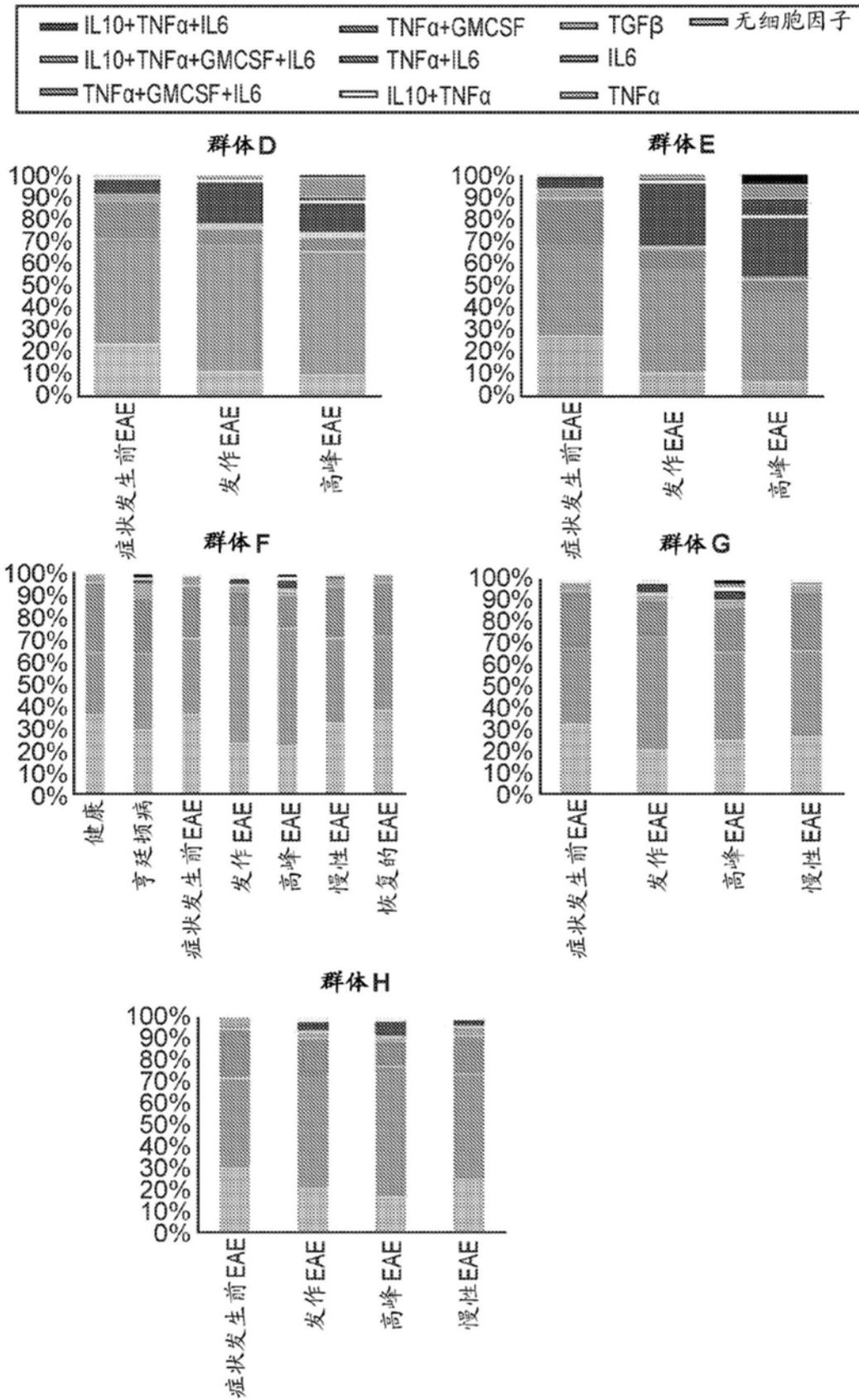
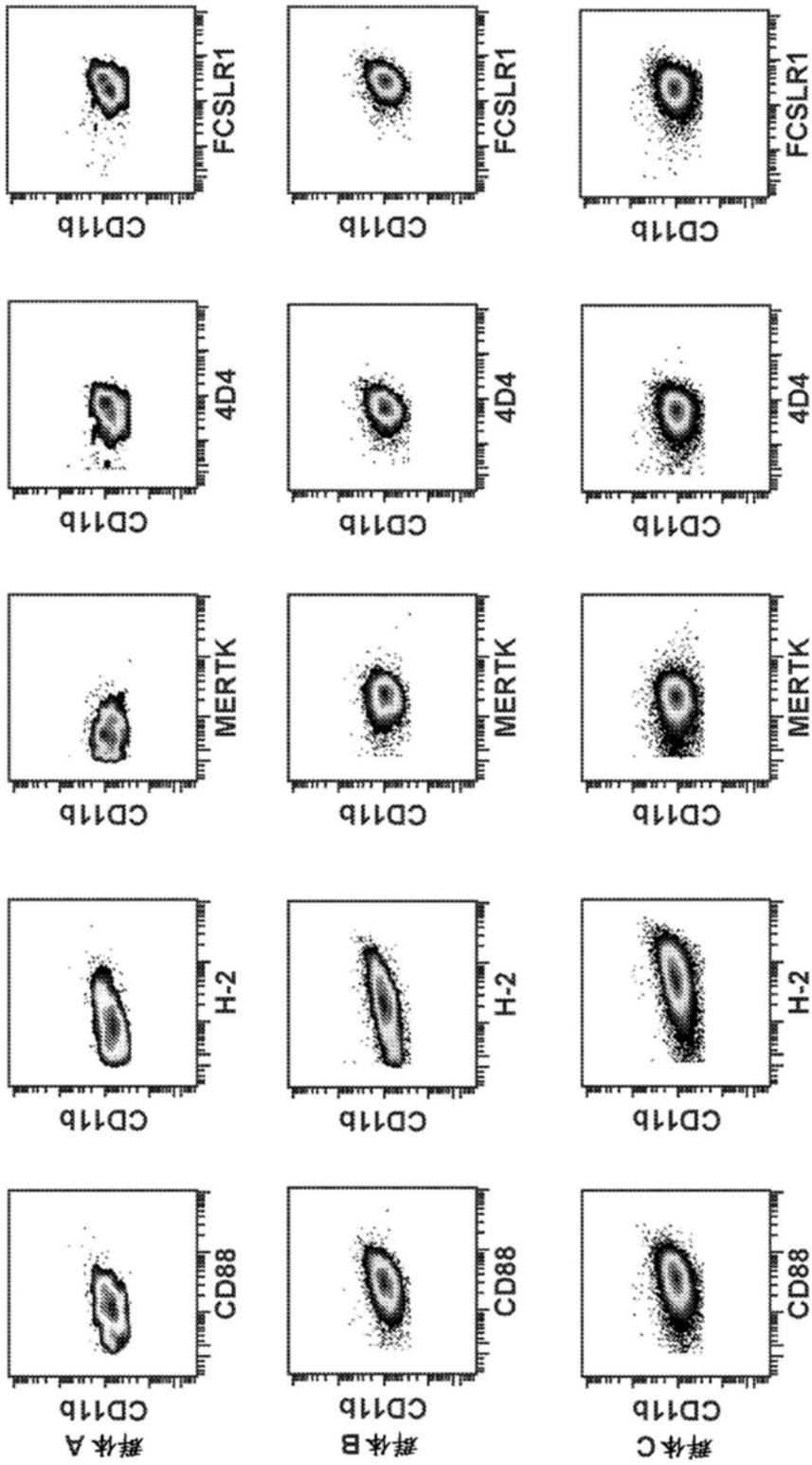


图7B



三个CNS驻留骨髓性子组中若干标志物的表达的类型性。
群体A、B和C表达不同水平的CD88、I类MHC (H2)、TAM受体酪氨酸激酶Mer (MerTK)以及新近提出的小神经胶质细胞标志物4D4和fcrls。

图8

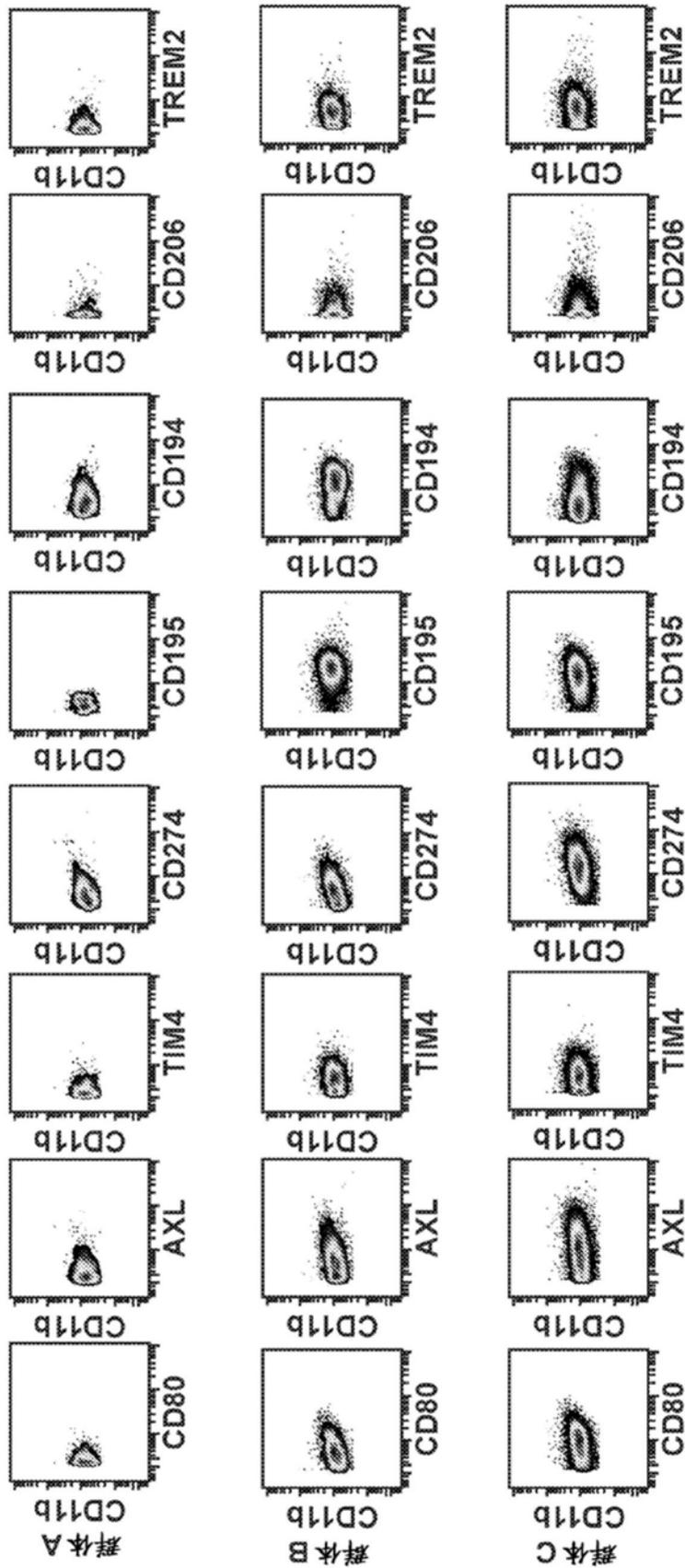


图9

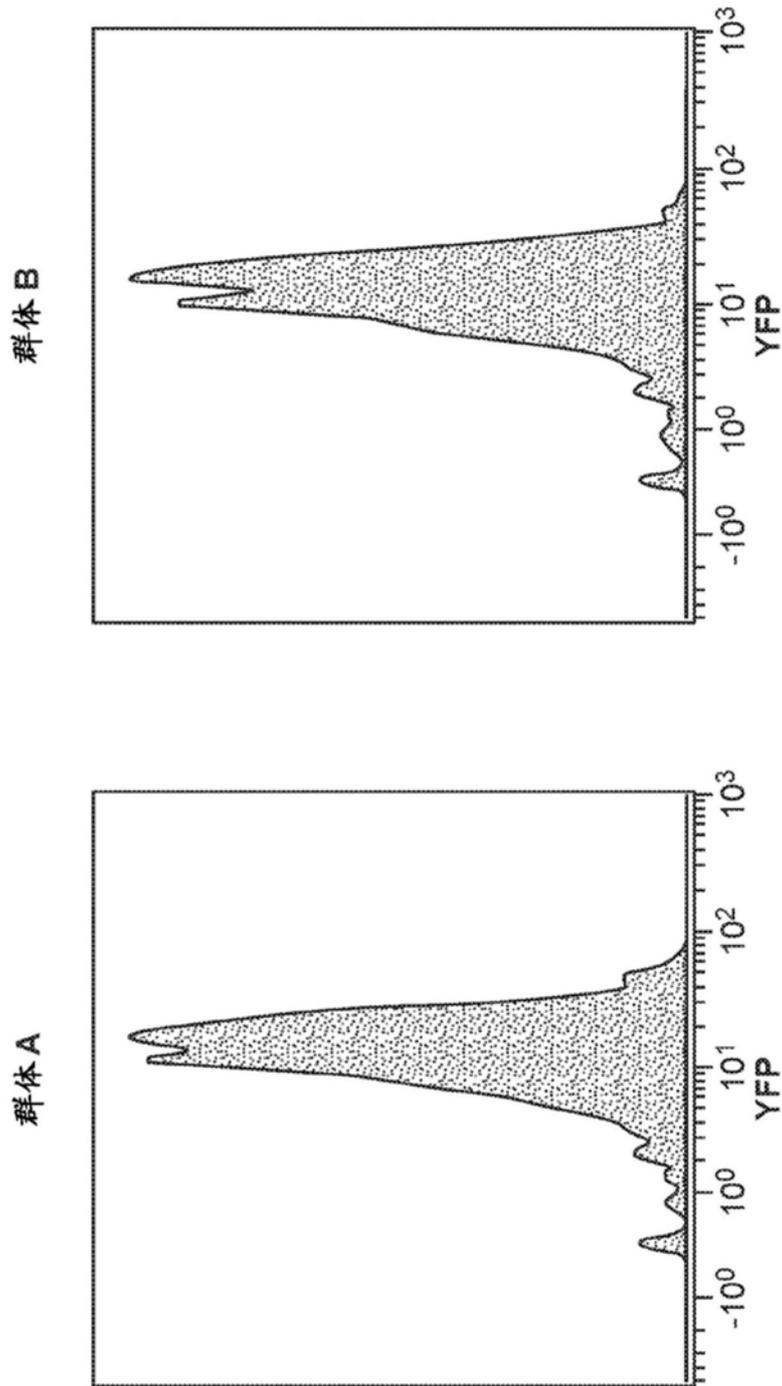


图10

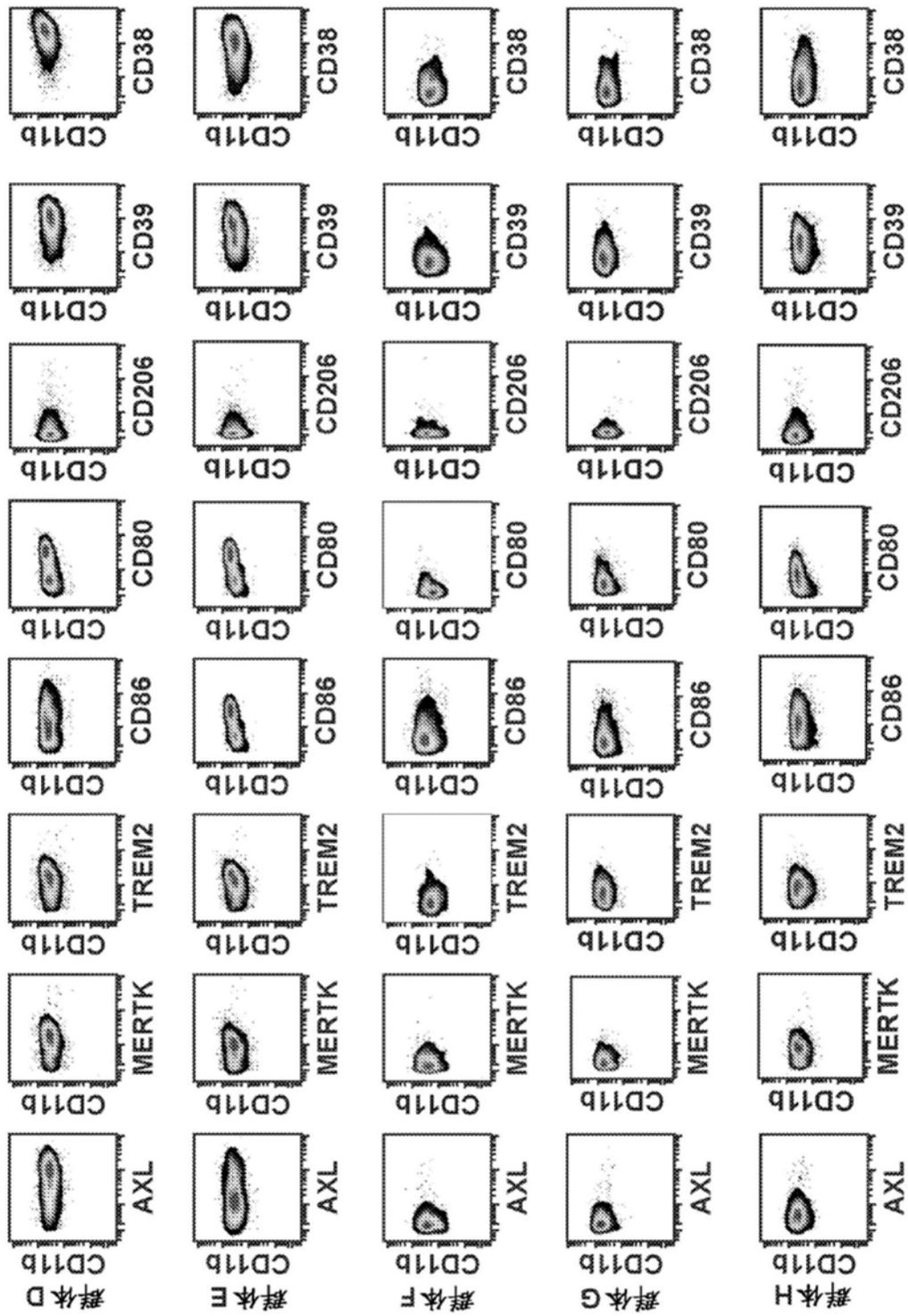


图11

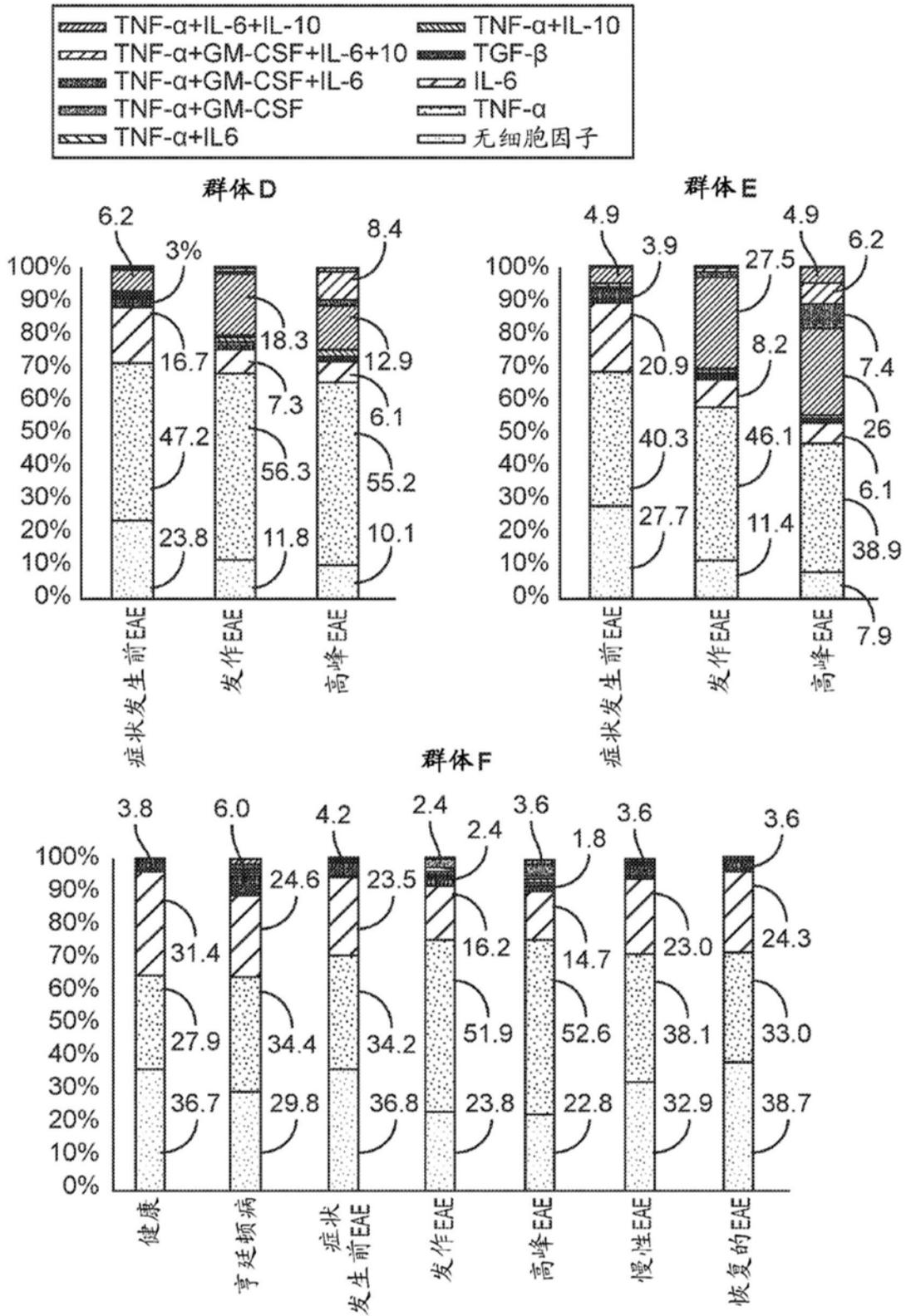


图12

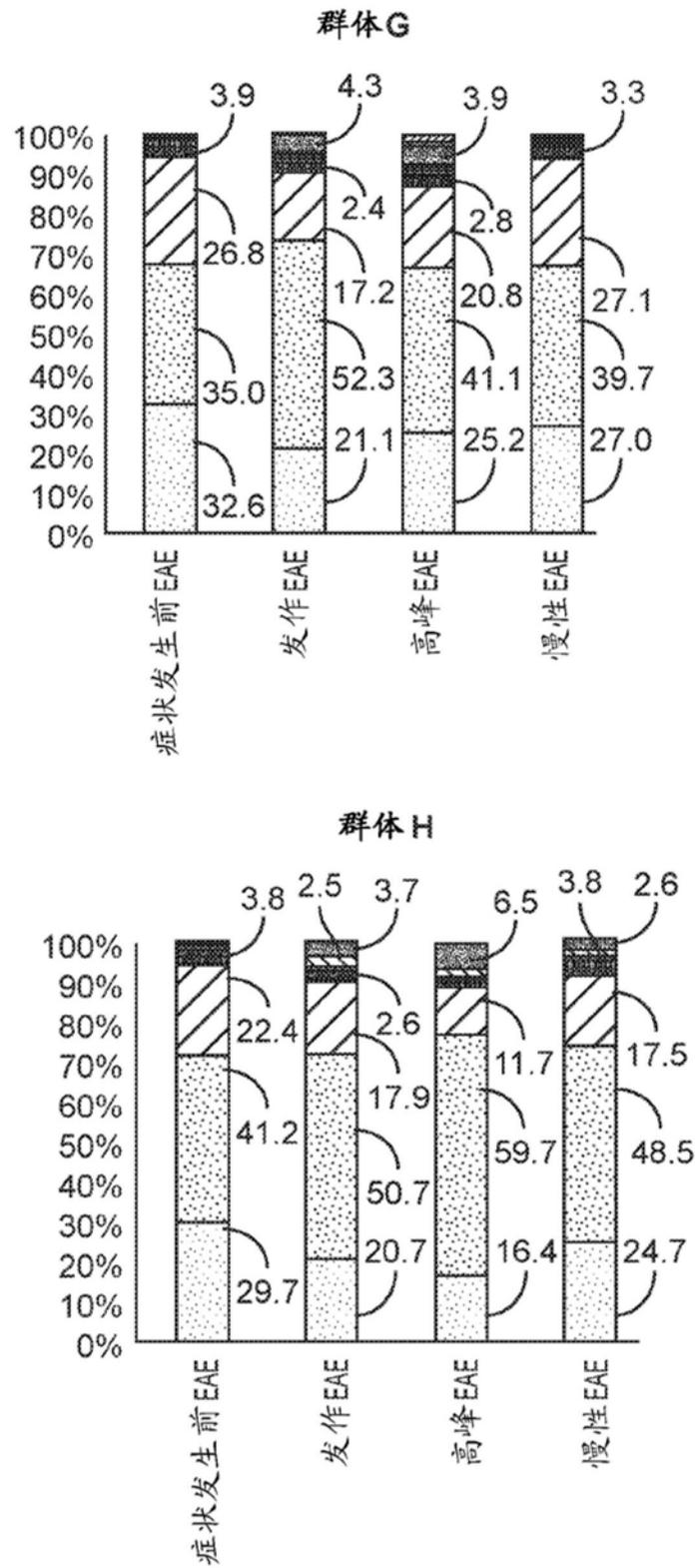


图12(续)

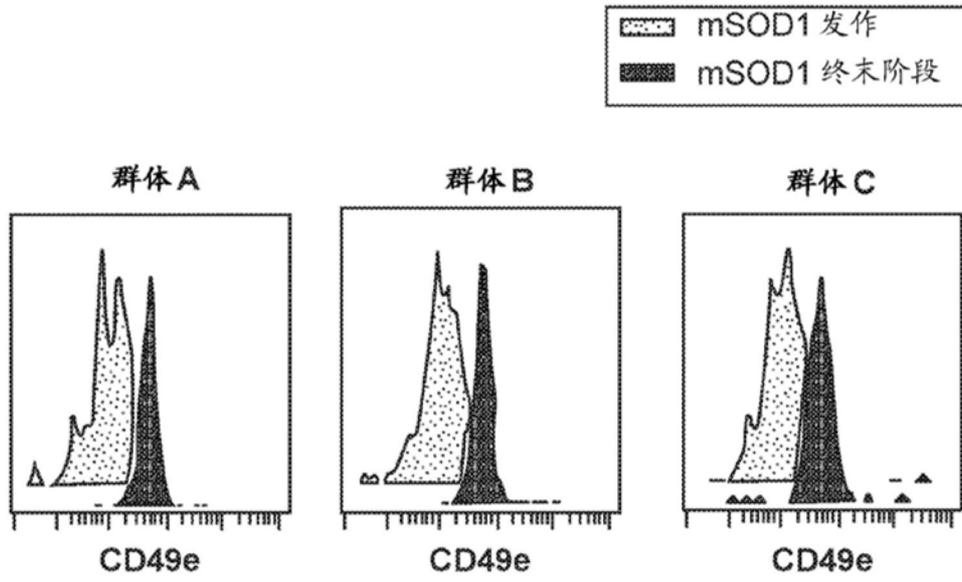


图13

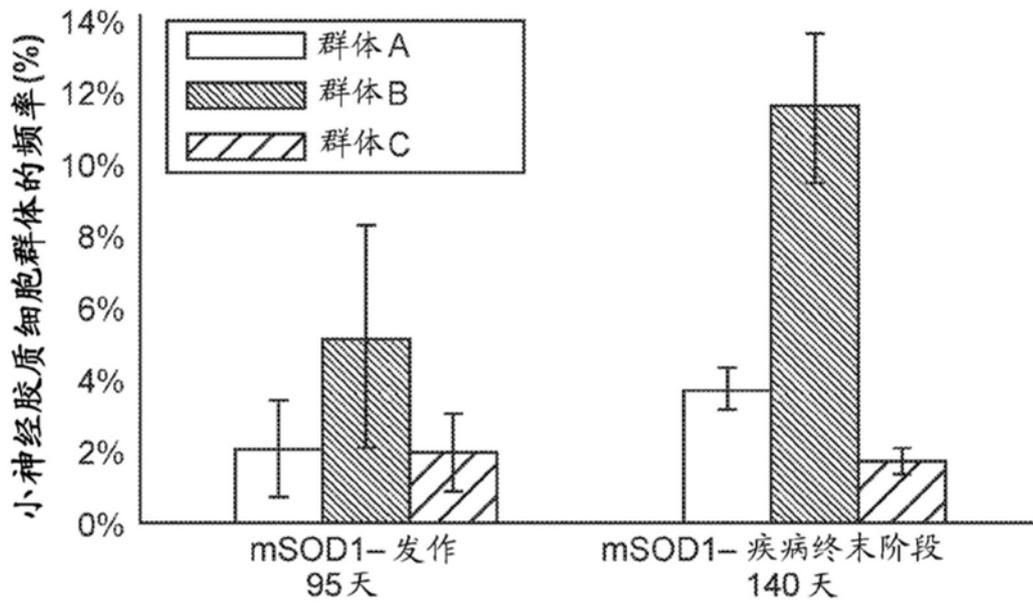


图14

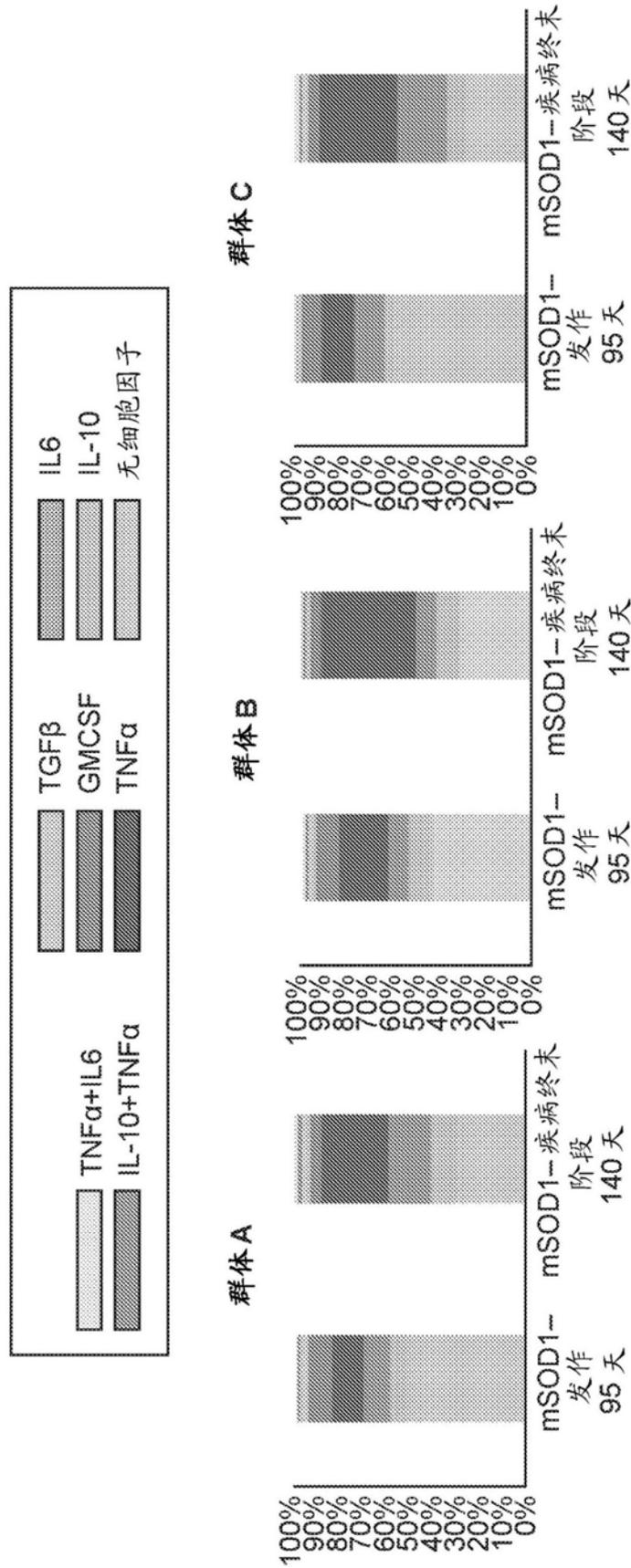


图15