



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103800309 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201210461826. 9

*A61P 1/00* (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 11. 15

(71) 申请人 中国科学院上海药物研究所

地址 201203 上海市浦东新区张江祖冲之路  
555 号

(72) 发明人 谢欣 张菲菲 魏巍

(74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理  
有限公司 11225

代理人 朱梅 徐琳

(51) Int. Cl.

*A61K 31/194* (2006. 01)

*A61P 37/02* (2006. 01)

*A61P 25/00* (2006. 01)

*A61P 19/02* (2006. 01)

*A61P 29/00* (2006. 01)

*A61P 19/04* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

金精三羧酸在制备靶向趋化因子受体的药物  
中的用途

(57) 摘要

本发明涉及金精三羧酸(ATA)作为非选择性趋化因子受体抑制剂的用途。ATA可以抑制CCR2、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR9、CXCR4、CXCR5、CXCR6等趋化因子受体介导的细胞信号转导及细胞迁移。此外,本发明还提供了ATA在制备用于预防和/或治疗自身免疫性疾病的药物中的用途。本发明提供的趋化因子受体抑制剂ATA可用于治疗包括多发性硬化症、类风湿性关节炎、红斑狼疮和炎症性肠病等在内的多种自身免疫性疾病。

1. 金精三羧酸或含有金精三羧酸的药物组合物在制备靶向趋化因子受体的药物中的用途。
2. 如权利要求 1 所述的用途,其中,所述靶向趋化因子受体的药物为趋化因子受体抑制剂。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中,所述趋化因子受体包括 CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6。
4. 根据权利要求 3 所述的用途,其中,所述趋化因子受体为选自 CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 和 CXCR6 中的一种或多种。
5. 根据权利要求 3 所述的用途,其特征在于,金精三羧酸同时靶向 3 个以上的所述趋化因子受体。
6. 金精三羧酸或含有金精三羧酸的药物组合物在制备用于预防和 / 或治疗自身免疫性疾病的药物中的用途。
7. 如权利要求 6 所述的用途,其中所述自身免疫性疾病选自多发性硬化症、类风湿性关节炎、红斑狼疮和炎症性肠病。
8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的用途,其中,所述含有金精三羧酸的药物组合物包含治疗有效量的金精三羧酸和任意的可药用载体。
9. 一种预防和 / 或治疗自身免疫性疾病的方法,所述方法包括向需要其的对象施用治疗有效量的金精三羧酸或含有金精三羧酸的药物组合物。
10. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述自身免疫性疾病选自多发性硬化症、类风湿性关节炎、红斑狼疮和炎症性肠病。

## 金精三羧酸在制备靶向趋化因子受体的药物中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体而言,涉及金精三羧酸在制备靶向趋化因子受体的药物中的用途,进而涉及金精三羧酸在制备预防和/或治疗自身免疫性疾病的药物中的用途。

### 背景技术

[0002] 多发性硬化症(Multiple sclerosis,MS)是一种发生在中枢神经系统中的自身免疫性疾病,表现为中枢神经系统的脱髓鞘及神经退行性病变。实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis,EAE)的病理特征与MS相似,是研究MS的理想动物模型。被广泛接受的观点认为,CD4<sup>+</sup>T细胞的过度活化,尤其是辅助型T细胞1(T helper-1cell,Th-1)或者辅助型T细胞17(T helper-17cell,Th-17)两种亚群的过度活化,是导致这种疾病的直接原因。在EAE动物模型中,血脑屏障的完整性被破坏,外周致炎性CD4<sup>+</sup>T细胞向中枢神经系统中浸润,并引起其他免疫细胞的聚集,激活小胶质细胞,最终导致神经髓鞘脱落,轴突损伤,影响神经冲动的传导并可致瘫痪。

[0003] T细胞的活化和分化需要抗原递呈细胞(antigen-presenting cells,APCs)的参与。树突状细胞(dendritic cells,DC)是专职的抗原递呈细胞,其在EAE的发病过程中发挥了非常重要的作用。外周组织中的未成熟DC,尤其是与周围环境接触的组织,像皮肤和黏膜中的DC,一旦遇到抗原,未成熟DC即会将它们扑捉,加工成小肽,由主要组织相容性复合物分子将其递呈到细胞表面。同时,来自病原体或炎症因子的信号启动DC的成熟过程,进一步加强它们的抗原递呈能力。成熟DC携带抗原,从组织中迁出,到达次级淋巴器官。在这里,DC通过细胞与细胞的接触和细胞因子的分泌,刺激T细胞的增殖和分化,从而启动抗原特异性免疫反应。

[0004] 成熟DC细胞向次级淋巴器官的迁移以及致病性T细胞向中枢神经系统的迁移很大程度上受趋化因子的调控。趋化因子可被广泛的分为两大类:诱导表达的趋化因子和组成性表达的趋化因子。组成性表达的趋化因子诱导基本的白细胞迁移转运,形成次级淋巴器官的构成体系,而诱导表达的趋化因子主要招募白细胞对生理应激产生反应,刺激炎性细胞向炎症组织的迁移。许多研究已经证明,在EAE的过程中多种趋化因子的表达会上调。通过趋化因子的特异抗体干预其功能后,能很好地抑制或缓解EAE的病情。趋化因子根据其N末端非常保守的半胱氨酸残基被分为四类:CXC,因其临近的两个半胱氨酸残基之间有一个氨基酸残基;CC,两个保守的半胱氨酸残基紧邻;CX3C,两个保守的半胱氨酸残基之间被3个氨基酸残基隔开;C,此类趋化因子N末端只有一个保守的半胱氨酸残基。其中,CXC和CC是两类最主要的趋化因子家族。因此,本发明人以这两类趋化因子的受体作为主要的研究对象。趋化因子通过趋化因子受体来发挥其功能,一种趋化因子可以成为多个趋化因子受体的配体,一个趋化因子受体也可以有多个趋化因子配体。趋化因子受体是一类具有七次跨膜结构的G蛋白偶联受体,且大部分与G<sub>αi</sub>偶联,其转导的信号可被百日咳毒素所抑制。趋化因子受体,在很多细胞中表达,如T细胞、中性粒细胞、单核细胞、单核细胞来

源的巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞等参与炎症和免疫反应的细胞,不仅如此,在小胶质细胞、星形胶质细胞、神经元和内皮细胞等中枢神经系统的细胞中也有表达。不同的免疫细胞,其表面特异性高表达的趋化因子受体也有所不同,如成熟 DC 高表达 CCR7, Th1 细胞高表达 CCR5 和 CXCR3,而 Th17 细胞特异性高表达 CCR6。因此,可以通过干预这些趋化因子受体的功能,抑制相应的细胞向炎症部位的迁移,达到缓解 EAE 病情的目的。

## 发明内容

[0005] 本发明人致力于研究自身免疫性疾病的发病原因和机理,以及趋化因子受体抑制剂在治疗自身免疫性疾病中的用途。在化合物筛选中,发明人发现金精三羧酸(Aurintricarboxylic acid,ATA)可以抑制多种趋化因子受体介导的细胞信号转导及细胞迁移,这些趋化因子受体包括 CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6。ATA 是一种蛋白-核酸相互作用的抑制剂,因此能够抑制许多涉及 DNA 或 RNA 的酶类。其铵盐被称作铝试剂,用来检测水、生物组织和食物中的铝含量。此外,ATA 被发现可通过阻断 HIV 外壳蛋白 gp120 和 CD4 分子的结合发挥抗 HIV 活性。本发明中,发明人发现 ATA 能显著减轻小鼠 EAE 模型的临床症状及病理改变。炎症细胞的过度激活及对组织的浸润是许多自身免疫疾病(包括多发性硬化症、类风湿性关节炎、红斑狼疮、炎症性肠病等)的共同特征。机制研究显示,ATA 并不直接影响致病性 Th1 或 Th17 细胞的分化,而是通过抑制抗原递呈的 DC 细胞向脾脏内的迁移聚集,从而减少 T 细胞的活化和分化;ATA 还能抑制致病性 T 细胞向中枢神经系统中的迁移浸润,从而缓解疾病。

[0006] 因此,本发明的一个目的是提供 ATA 或含有 ATA 的药物组合物在制备靶向趋化因子受体的药物中的用途。

[0007] 本发明的另一个目的是提供 ATA 或含有 ATA 的药物组合物在制备用于预防和/或治疗自身免疫性疾病的药物中的用途。

[0008] 本发明中,优选地,所述趋化因子受体包括 CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6。

[0009] 本发明中,优选地,所述趋化因子受体为选自 CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 和 CXCR6 中的一种或多种。

[0010] 本发明中,优选地,金精三羧酸同时靶向 3 个以上的所述趋化因子受体。

[0011] 本发明中,优选地,所述自身免疫性疾病包括多发性硬化症、类风湿性关节炎、红斑狼疮、炎症性肠病(inflammatory bowel disease)。

[0012] 此外,本发明还提供了一种预防和/或治疗自身免疫性疾病的方法,所述方法包括向需要其的对象施用治疗有效量的 ATA 或含有 ATA 的药物组合物。

[0013] 本发明中,优选地,所述含有 ATA 的药物组合物包含治疗有效量的金精三羧酸和任意的可药用载体。

[0014] 本发明与现有趋化因子抑制剂相比,具有如下优点:

[0015] ATA 可同时靶向包括 CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6 等在内的多个趋化因子,同时抑制 DC 细胞向二级淋巴器官的迁移及致病性 T 细胞向中枢神经系统的迁移,在自身免疫病发病的多个环节同时起到抑制作用,与靶向单个趋化因子的药

物相比,可能具有更好的疗效。

### 附图说明

[0016] 图 1 显示 ATA 抑制趋化因子受体的功能。其中：

[0017] A 为显示 ATA 的分子结构式的图。

[0018] B 为显示 ATA 抑制趋化因子激起的钙流反应的图。稳定表达 G $\alpha$  16 及各个受体 (CCR6、CCR7、CXCR4、S1P1、KOR 或  $\beta$  2AR) 的 HEK293 或 CHO 细胞系,与染料 fluo4-AM 孵育 45 分钟后,先和 ATA 预孵育 10 分钟,然后再用相应配体 (30nM) 刺激,记录钙信号。数据来自三次独立实验,每次实验三复孔,表示为平均值  $\pm$  标准误差 (mean  $\pm$  SEM)。

[0019] C 为显示 ATA 抑制趋化因子诱导的细胞趋化的图。分离自雌性 C57/B6 小鼠的脾细胞,用 10  $\mu$ g/ml LPS 刺激 48 小时后加入到 Transwell<sup>®</sup> 穿膜小室夹层培养体系的上层小室内,上下层小室以带微孔的膜隔开;SDF-1、CCL19、CCL20 或 S1P (均为 30nM) 等能诱导细胞迁移的因子加入到下层小室内;不同浓度的 ATA 被加入到上层及下层小室。3 小时后,从上层小室迁移到下层小室的细胞通过流式细胞仪计数。数据来自三次独立实验,每次实验三复孔,表示为平均值  $\pm$  标准误差。

[0020] D 为显示 ATA 抑制趋化因子受体内吞的图。表达 CXCR4、CCR6 或 S1P1 受体的细胞在 ATA 存在或不存在的条件下,以相应的配体刺激后,进行受体免疫荧光染色,观察其定位情况。无尾箭头所指为受体定位于膜上,有尾箭头所指为受体内吞后进入胞内形成的内吞点。

[0021] 图 2 显示 ATA 减轻 EAE 的临床症状及组织损伤。其中：

[0022] 用 MOG<sub>35-55</sub> 免疫雌性 C57/B6 小鼠诱导 EAE,从免疫后第 3 天(A)、第 12 天(C)起每天一次腹腔给药至实验结束;或从第 3 天开始,给药至第 12 天(B);对照组给予磷酸缓冲液,每天记录临床评分。数据表示为平均值  $\pm$  标准误差(每组为 6 只小鼠)。<sup>####</sup>p < 0.001, <sup>#</sup>p < 0.05 (双方向方差检验 (two-way ANOVA test));与对照组相比, <sup>\*</sup>p < 0.05, <sup>\*\*</sup>p < 0.01 (曼-惠特尼检验 (Mann-Whitney test))。D 和 E 为正常或免疫后对照组及 ATA 给药组 (20mg/kg, 第 3 天给药,至实验结束) 的小鼠脊髓组织石蜡切片的 H&E 染色 (D) 及快蓝染色 (E) 图片。F 为正常或免疫后对照组及 ATA 给药组 (20mg/kg, 第 3 天给药,至实验结束) 的小鼠脊髓组织冰冻切片的 CD45<sup>+</sup> 细胞免疫荧光染色图片,图片中左下角的图片为中央方框的放大图像。G-I 为对 D-F 中细胞浸润总数、脱髓鞘面积及 CD45<sup>+</sup> 细胞浸润数目进行的定量分析,数据以平均值  $\pm$  标准误差表示。每组取 3 只小鼠,每只小鼠脊髓取 10 块切片进行分析,与对照组比较, <sup>\*\*\*</sup>p < 0.001 (史蒂顿特氏 t 检验 (Student' st-test))。

[0023] 图 3 显示 ATA 抑制体内但不影响体外 T 细胞分化。其中：

[0024] A :EAE 免疫后第 12 天,对照组及 ATA 给药组 (20mg/kg/天,第 3 天给药至第 12 天) 小鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD11c<sup>+</sup>DC、Th1 (IFN- $\gamma$ ) 细胞和 Th17 (IL-17<sup>+</sup>) 细胞比例的流式分析;B :EAE 免疫后第 12 天,对照组及 ATA 给药组 (20mg/kg/天,第 3 天给药至第 12 天) 小鼠的脾细胞用 MOG<sub>35-55</sub> 重刺激 48 小时后收集上清,用 ELISA 检测 IL-17a、IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量;数据表示为平均值  $\pm$  标准误差(每组为 6 只小鼠),与对照组比较, <sup>\*</sup>p < 0.05, <sup>\*\*</sup>p < 0.01, <sup>\*\*\*</sup>p < 0.001 (史蒂顿特氏 t 检验);C 和 D :在分化因子及各种浓度 ATA 存在下,来源于 6-8 周龄小鼠脾内幼稚型 CD4<sup>+</sup>T 细胞在体内向 Th1 (C) 或 Th17 (D) 分化的状况,数据

来自三次独立实验,表示为平均值 ± 标准偏误差;E:向分离自 8-10 周龄小鼠脾内的 DC 加入不同浓度的 ATA 或喜树碱(0-30 μ M),培养 18 小时,annexin V/ 碘化丙啶(PI)染色,流式分析其凋亡情况。数据来自三次独立实验,每次实验三复孔,表示为平均值 ± 标准误差。

[0025] 图 4 显示 ATA 抑制趋化因子介导的 DC 的迁移,但不影响 DC 的其他功能。其中:

[0026] A:将分离自 EAE 免疫后第 12 天的小鼠脾内的 DC 加入到 Transwell® 穿膜小室夹层培养体系的上层小室内,上下层小室以带微孔的膜隔开;将 30nM CCL19 加入到下层小室内;将 10 μ M ATA 加入到上层及下层小室。3 小时后,从上层小室迁移到下层小室的细胞通过流式细胞仪计数。数据来自三次独立实验,每次实验三复孔,表示为平均值 ± 标准误差。与 CCL19 未处理组比较,\*\*\*\*p<0.001;与 ATA 未处理组比较,\*\*\*p<0.001(史蒂顿特氏 t 检验)。

[0027] B 和 C:将分离自 EAE 免疫后第 12 天的未经 ATA 治疗的小鼠脾脏的 CD4<sup>+</sup>T 细胞用 CFSE 标记,在 MOG<sub>35-55</sub> (25 μ g/ml) 存在或不存在的条件下,与分离自 EAE 免疫后第 12 天的对照组或 ATA 给药组(20mg/kg/天,第 3 天给药至第 12 天)的 CD11c<sup>+</sup>DC 共培养 72 小时,用流式检测 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖(B)或用 ELISA 方法检测上清中 IL-17a、IFN-γ、IL-6 和 TNF-α 等细胞因子的含量(C)。

[0028] D-H:CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD11c<sup>+</sup>DC 均分离自 EAE 免疫后第 12 天的未经 ATA 治疗的小鼠脾脏,CD4<sup>+</sup>T 细胞用 CFSE 标记后,在 MOG<sub>35-55</sub> (25 μ g/ml) 及 ATA (10 μ M) 存在或不存在条件下,共培养 72 小时,用流式测 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖(D)或 ELISA 测上清中 IL-17a、IFN-γ、IL-6 和 TNF-α 等细胞因子的含量(E-H)。数据来自三次独立实验,表示为平均值 ± 标准误差。

[0029] 图 5 显示 ATA 阻断致炎性 T 细胞向中枢神经系统浸润。其中:

[0030] A:用 37-70% 硅石胶态悬浮液 (Percoll®) 分离出 EAE 免疫后第 18 天小鼠(ATA 20mg/kg/天,第 3 天给药至第 18 天)的中枢神经系统浸润细胞,并用流式仪分析 CD4<sup>+</sup>T 细胞、Th1 (IFN-γ) 细胞和 Th17 (IL-17<sup>+</sup>) 细胞的数目。数据表示为平均值 ± 标准误差(每组为 5 只小鼠),与对照组比较,\*\*p<0.05(史蒂顿特氏 t 检验)。

[0031] B:EAE 免疫后第 18 天(ATA 20mg/kg/天,第 3 天给药至第 18 天),对照组和 ATA 给药组小鼠血液中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD11c<sup>+</sup>DC、Th1 (IFN-γ) 细胞和 Th17 (IL-17<sup>+</sup>) 细胞的比例流式分析结果。数据表示为平均值 ± 标准误差(每组为 6 只小鼠),与对照组比较,\*\*p<0.05(史蒂顿特氏 t 检验)。

[0032] C:正常组或免疫后第 18 天对照组及 ATA 给药组(20mg/kg/天,第 3 天给药至第 18 天)小鼠脑部脉络丛 CD45<sup>+</sup> 细胞免疫荧光染色图片。

[0033] D:对 C 图中 CD45<sup>+</sup> 细胞浸润数目进行的定量分析,数据以平均值 ± 标准误差表示。每组取 3 只小鼠,每只小鼠取 5 块切片进行分析,与对照组比较,\*\*p<0.01(史蒂顿特氏 t 检验)。

## 具体实施方式

[0034] 在下文中,将参照附图,结合举例说明本发明的实施例来更加详细地描述本发明,但其不以任何形式限制本发明。

[0035] 实施例

[0036] 材料与方法

[0037] 实验动物：

[0038] C57BL/6 雌鼠购自上海实验动物中心(上海,中国)并饲养于上海药物研究所实验动物室 SPF 级实验室,维持光-暗 12 小时循环交替,给以充足的食料和洁净饮水,至 8 周龄开始实验。所有实验均获得批准,并按照上海药物研究所动物管理与使用委员会的指引进行。

[0039] 试剂：

[0040] CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6, S1P1, DOR, KOR,  $\beta$  2AR 和 G $\alpha$  16 质粒均购自 Missouri S&T cDNA 资源中心。金精三羧酸(ATA), 脂多糖, Hoechst33342, 福斯高林(forskolin), GLP-1, U50488 和异丙肾上腺素均购自 Sigma-Aldrich。抗小鼠 CD3 (145-2C11) 单克隆抗体, 抗小鼠 CD28 (37.51) 单克隆抗体和抗小鼠 IFN- $\gamma$  (R4-6A2) 单克隆抗体均购自 BD Pharmingen。藻红蛋白-蓝色素 7 (Phycoerythrin-cyanine 7, PE-Cy7) 抗小鼠 CD4 (RM4-5), 别藻蓝素(Allophycocyanin, APC) 抗小鼠 CD8a (53-6.7), 别藻蓝素(Allophycocyanin, APC) 抗小鼠 IFN- $\gamma$  (XMG1.2), 藻红蛋白(Phycoerythrin, PE) 抗小鼠 CD11c (N418) 和抗小鼠 CD45 (30-F11) 购自 eBiosciences。抗 myc 和抗 HA 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology。Alexa Fluor 488 羊抗小鼠 IgG 抗体, Alexa Fluor 488 羊抗大鼠 IgG 抗体和 Fluo-4AM 购自 Invitrogen。重组 MCP-1, TARC, RANTES, MIP-3 $\alpha$ , MIP-3 $\beta$ , TECK, SDF-1, CXCL13 和 CXCL16 购自 PeproTech。重组鼠 IL-12, 重组鼠 IL-6, 重组人 TGF- $\beta$  1, 重组鼠 IL-1 $\beta$ , 重组鼠 IL-23 和重组鼠 TNF- $\alpha$  购自 R&D Systems。

[0041] 细胞系：

[0042] 实验涉及的各种稳定表达受体和 G $\alpha$  16 的细胞系均由实验室内部构建。具体步骤如下: HEK293 或 CHO 细胞经胰酶消化后, 离心, 加入 200  $\mu$ l 电转液(ATP 200g/L, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 120g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12g/L, NaHCO<sub>3</sub> 1.2g/L), 以 100-200 万细胞/200  $\mu$ l 电转液的浓度加入受体质粒和 G $\alpha$  16 质粒各 2  $\mu$ g, 混匀, 用 Scientz-2C 基因导入仪(宁波新芝生物技术有限公司)进行电击。电击后的细胞转入培养板或培养皿中继续培养细胞, 24 小时后即可用于钙流实验进行检测。培养皿中的细胞 24 小时后加入抗生素进行筛选, 并挑选阳性克隆细胞, 建立单克隆细胞系。

[0043] 实施例 1 :EAE 诱导及小鼠给药

[0044] 雌性 C57BL/6 小鼠皮下注射 200  $\mu$ g MOG<sub>35-55</sub>(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, 购自吉尔生化) 辅以完全弗氏佐剂及 5mg/ml 热灭活结核杆菌(H37Ra 菌株, 购自 Difco Laboratories)。免疫当天为第 0 天。第 0 天及第 2 天每只小鼠腹腔注射百日咳毒素 200ng (Calbiochem)。每天为小鼠评分, 评分按“5 分制”标准如下: 0 分, 无临床症状; 1 分, 尾部瘫痪; 2 分, 后肢轻度瘫痪(单侧或双侧后肢无力, 不完全瘫痪); 3 分, 截瘫(双侧后肢完全瘫痪); 4 分, 截瘫并前肢无力或瘫痪; 5 分, 濒死状态或死亡。

[0045] 小鼠给药：

[0046] EAE 给药组: 从免疫后第 3 天或第 12 天起经腹腔注射给予 ATA(10-20mg/kg), 直至实验结束; 或从免疫后第 3 天起给药(经腹腔注射给予 ATA(10-20mg/kg))至第 12 天。溶解 ATA 的溶剂为含有 0.4% 二甲亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)的磷酸盐缓冲液(phosphate

buffered saline, PBS)。

[0047] EAE 对照组:从免疫后第 3 天或第 12 天起经腹腔注射给予溶剂对照,即含有 0.4% 二甲亚砜的磷酸盐缓冲液。

[0048] 实施例 2:组织病理与免疫荧光分析

[0049] 将实施例 1 中 EAE 给药组和 EAE 对照组的疾病小鼠麻醉,经 PBS 灌流及 4% 多聚甲醛灌流固定。取出的脊髓组织样品在 4% 多聚甲醛中固定过夜。固定的脊髓组织样品经石蜡包埋后,用苏木精和伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色分析炎症细胞浸润,用快蓝染色分析脊髓脱髓鞘现象。脊髓和脑的冰冻切片用抗小鼠 CD45 一抗及相应荧光二抗染色;细胞核用 Hoechst 33342 室温染色 10 分钟,切片用荧光封片剂(Dako)封片。

[0050] 实施例 3:中枢神经系统浸润细胞分离

[0051] 将实施例 1 中 EAE 给药组和 EAE 对照组的疾病小鼠的脊髓及脑组织放在 40  $\mu$ m 滤网上碾碎,获得的细胞悬液在 4 $^{\circ}$ C, 500g 离心 10 分钟后,用 8ml 37% Percoll<sup>®</sup>试剂重悬,小心加入到 4ml 70% Percoll<sup>®</sup>试剂中,在 25 $^{\circ}$ C 780g 条件下离心 25 分钟。收集位于 37%~70% Percoll<sup>®</sup> 中间层细胞并进行流式检测。

[0052] 实施例 4:流式细胞检测

[0053] 将取自实施例 1 中 EAE 给药组和 EAE 对照组的疾病小鼠的脾细胞或取自实施例 3 中的浸润到小鼠中枢神经系统的细胞进行表面染色。细胞与荧光标记的抗小鼠 CD4, CD11c 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。对于胞内染色,细胞先与 12-十四酸佛波酯-13-乙酸盐(phorbol 12-myristate 13-acetate) (50ng/ml; Sigma)、伊屋诺霉素(ionomycin) (750ng/ml; Sigma) 和布雷菲德菌素 A(brefeldin A) (3.0  $\mu$ g/ml; Sigma) 混合后在 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 小时,细胞重悬于固定/通透液(Cytofix/Cytoperm 试剂盒; BD Pharmingen) 中,胞内 IL-17a 和 IFN- $\gamma$  染色按产品说明操作。结果用 Guava easyCyte<sup>™</sup> 8HT 流式细胞仪和 GuavaSoft 软件进行分析。

[0054] 实施例 5:CD4<sup>+</sup>T 细胞分离和体外分化

[0055] 用磁珠(Dynal<sup>®</sup> Mouse CD4 Cell Negative Isolation kit; Invitrogen) 分离 6-8 周龄正常雌性 C57BL/6 小鼠脾中幼稚型 CD4<sup>+</sup>T 细胞,分离后的 CD4<sup>+</sup>T 细胞加入抗 CD3 (2  $\mu$ g/ml; 145-2C11; BD Pharmingen) 和抗 CD28 (2  $\mu$ g/ml; 37.51; BD Pharmingen) 抗体激活后分别加入 IL-12 (10ng/ml; R&D) 和抗 -IL-4 (10  $\mu$ g/ml; 11B11; BD Pharmingen) 诱导分化为 Th1 细胞,或加入抗 -IL-4、抗 -IFN- $\gamma$  (10  $\mu$ g/ml; BD Pharmingen) 及含 TGF- $\beta$  1 (3ng/ml)、IL-6 (30ng/ml; eBioscience)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor) (10ng/ml; R&D)、IL-23 (10ng/ml; R&D) 和 IL-1 $\beta$  (10ng/ml; R&D) 的 Th-17 “分化因子组合”来诱导分化为 Th-17 细胞。在上述分化过程中,同时加入各种浓度(0-30  $\mu$ M)的 ATA 以评估其对 T 细胞分化的影响。三天后收集细胞进行胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-17a 的染色。

[0056] 实施例 6:DC 分离及 DC-T 细胞共培养实验

[0057] 用 MACS 磁珠(Miltenyi Biotec) 分选来源于实施例 1 中 EAE 对照组小鼠(免疫后第 12 天)或 EAE 给药组小鼠(ATA, 20mg/kg/天,第 3 天给药至第 12 天)脾脏中的 CD11c<sup>+</sup>DC 细胞后,与 CFSE 标记的来源于 EAE 对照组小鼠(免疫后第 12 天)脾脏中的 CD4<sup>+</sup>T 细胞以 3:1 的比例混合,在 MOG<sub>35-55</sub> (25  $\mu$ g/ml) 存在或不存在的条件下,培养 72 小时;或 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 DC 细胞均分离自 EAE 对照组小鼠(免疫后第 12 天),在共培养体系中加入 ATA (10  $\mu$ M),培



养 72 小时后,流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖情况,ELISA 方法检测上清液中细胞因子 IFN- $\gamma$ , IL-17a, IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量 (Dakewe, Shenzhen, China)。

[0058] 实施例 7 :DC 凋亡实验

[0059] 将分选自 8-10 周龄正常 C57BL/6 小鼠脾脏中的 CD11c<sup>+</sup>DC 与 ATA (0-30  $\mu$ M) 或喜树碱(0-30  $\mu$ M) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 18 小时。收集细胞进行 Annexin V/ 碘化丙啶染色。早期凋亡表现为 Annexin V 阳性,碘化丙啶阴性,晚期凋亡表现为 Annexin V 和碘化丙啶双阳性,用流式细胞仪检测。

[0060] 实施例 8 :趋化实验

[0061] 体外趋化实验采用 5  $\mu$ m 孔径穿膜小室(Transwell<sup>®</sup>, Corning)。从实施例 1 中的 EAE 对照组小鼠(免疫后第 12 天)中提取全脾细胞或 DC 细胞,并且将该细胞用含 10  $\mu$ g/ml LPS 的 RPMI-1640 培养液培养 48 小时,细胞洗后用含 0.5%BSA 的 RPMI-1640 培养液稀释成密度为  $1 \times 10^7$  细胞 /ml 悬液。将各种趋化因子受体的相应配体(SDF-1、CCL19、CCL20 或 S1P (均为 30nM)) 加入到下层小室内而将 100  $\mu$ l 细胞悬液加入到上层小室内。对于趋化阻滞实验,各种浓度的 ATA (0-100  $\mu$ M)被加入到下层小室及上层小室内。正常培养 3 小时后从上层小室迁移至下层小室内的脾细胞用流式细胞仪计数。

[0062] 实施例 9 :钙流实验

[0063] 将稳定表达各种 G 蛋白偶联受体(包括 CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 和 CXCR6)和 G $\alpha$  16 的 HEK293 细胞株(如上所述由实验室自行构建)接种在 96 孔板里,培养 24 小时后,将细胞与 2  $\mu$ M fluo 4-AM 染料在 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 分钟,移去染料,加入 50  $\mu$ l 含不同浓度 ATA (0-100  $\mu$ M) 或者 1%DMSO (阴性对照)的 HBSS,室温孵育 10min,然后再用相应配体(SDF-1、CCL19、CCL20, S1P 等(均为 30nM))作为激动剂进行刺激,记录钙信号。用 Flex Station 3 微孔板检测仪(Molecular Devices)读数。检测仪在指定时间点,可自动将 25  $\mu$ l 激动剂(终浓度 30nM)加入到反应体系中,同时用 485nm 的光激发并于 525nm 波段检测细胞内钙离子浓度变化引起的染料荧光强度的变化。

[0064] 实施例 10 :受体内吞实验

[0065] 将稳定表达 Myc-CXCR4、EGFP-CCR6 或 HA-S1P1 的 HEK293 细胞株(如上所述由实验室自行构建)接种在盖玻片上,培养过夜。细胞先用 ATA (0-30  $\mu$ M) 预孵育 10 分钟,后用相应的配体(SDF-1、CCL20 或 S1P) 30nM 刺激 30 分钟。然后,将细胞用 4% 多聚甲醛固定,0.3%TritonX-100 破膜后,用抗 myc 或 HA 标签的抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,相应的 Alexa Fluor 488 二抗室温孵育 1 小时, Hoechst33342 染核后,用荧光共聚焦显微镜(Olympus FV10i confocal microscope)拍照。

[0066] 数据处理

[0067] 数据用 GraphPad Prism 软件分析处理。非线性回归分析产生剂量依赖曲线并计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。数据表示为平均值  $\pm$  标准误差, EAE 小鼠处理组间统计学差异用双方向方差检验(two-way ANOVA test)分析,时间点内 EAE 评分统计学差异用曼-惠特尼检验(Mann-Whitneytest)分析。其他数据分析(如基因表达,细胞因子生成后病理学统计分析)用史蒂顿特氏 t 检验分析。p<0.05 为有统计学意义。

[0068] 结果

[0069] ATA 抑制多种趋化因子受体的功能

[0070] 趋化因子受体是一类 G 蛋白偶联受体 (GPCR), 它们对细胞的迁移有非常重要的作用, 对 EAE 的发病机制也有一定的贡献。在筛选趋化因子受体拮抗剂时, 发明人发现 ATA (图 1A) 能抑制多种趋化因子导致的细胞信号转导和迁移。首先, 实施例 9 中, 发明人利用稳定表达 G $\alpha$  16 和各类 GPCR (其中趋化因子受体包括: CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 或 CXCR6; 非趋化因子受体包括: S1P1, DOR, KOR, GLP-1R 和  $\beta$  2AR) 的细胞系检测了 ATA 对 GPCR 介导的钙流反应的抑制作用。G $\alpha$  16 是一类泛宿主性的 G 蛋白, 常与 G 蛋白偶联受体偶联, 启动下游钙信号通路。实施例 9 的结果显示, ATA 剂量依赖性地抑制大多数趋化因子受体介导的钙流反应, 仅 CCR2 除外 (图 1B, 下表 1)。但是对于其他非趋化因子受体, ATA 则没有显示出抑制效应 (图 1B, 下表 1)。

[0071] 实施例 8 中, 发明人随后检测了 ATA 对几个不同趋化因子受配体对如 CCL19/CCR7, CCL20/CCR6 或 SDF-1/CXCR4 介导的脾细胞迁移活性的影响。实施例 8 的结果显示, ATA 剂量依赖性的抑制 CCL19, CCL20 或 SDF-1 所诱导的脾细胞的迁移, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 0.24, 3.36, 11.46  $\mu$ M (图 1C, 下表 1); S1P1 受体在淋巴细胞迁出次级淋巴器官过程中发挥了重要作用, 但 ATA 并不影响 S1P1 介导的细胞趋化 (图 1C, 下表 1)。

[0072] 受体内吞是 GPCR 被其配体刺激后的一种常见现象。实施例 10 中, 发明人也检测了 ATA 对配体刺激后的 CXCR4, CCR6 和 S1P1 受体内吞效应的影响。表达 CXCR4, CCR6 或 S1P1 受体的细胞与 ATA 预孵育 10 分钟后, 再用相应的配体 SDF-1, CCL20 或 S1P 刺激 30 分钟, 然后进行受体免疫荧光染色。实施例 10 的结果显示, 未经配体刺激地细胞, 受体都定位在细胞膜上, 配体刺激后, 受体内吞至胞内 (图 1D); 加入 ATA 处理后, 配体刺激导致的 CXCR4 和 CCR6 受体内吞显著减少; 但 ATA 不影响 S1P1 受体的内吞 (图 1D)。综上所述, ATA 抑制许多趋化因子受体的功能, 但不影响其他的 GPCR 的功能。

[0073] ATA 减轻 EAE 的临床症状及病理学特征

[0074] 实施例 1 中, 用 MOG<sub>35-55</sub> 免疫 8-9 周的雌性 C57BL/6 小鼠诱导 EAE, 从第 3 天或第 12 天起开始腹腔注射 ATA (10 或 20mg/kg) 至实验结束, 或者在第 3 天到第 12 天给药。溶剂对照为含 0.4%DMSO 的 PBS。EAE 的临床评分数据见图 2A-2C 和下表 2。ATA 剂量依赖性地缓解 EAE 的临床评分 (图 2A), 并显著降低疾病的最高临床评分和累计临床评分 (图 2A, 下表 2)。当仅第 3 天到第 12 天给药时, ATA 也能够在 EAE 疾病发生的起始和高峰阶段降低其严重程度, 但在 20 天后疾病的分数又有上升的趋势, 表明药物的移除导致了疾病的再次发生 (图 2B)。在疾病开始之后 (第 12 天起) 给药, 20mg/kg ATA 仍能有效减轻 EAE 的严重程度 (图 2C, 表 2), 表明该药物不仅有预防效果, 也能达到治疗疾病的目的。

[0075] 实施例 2 中, 发明人分析了免疫 21 天后脊髓的病理切片。实施例 2 的研究结果显示, 相较于对照组, ATA 给药可明显减少白细胞对脊髓的浸润 (图 2D 和 2G); 快蓝染色显示对照组的 EAE 小鼠脊髓白质出现广泛的脱髓鞘现象, 而给予 ATA 后, 脱髓鞘现象明显减少 (图 2E 和 2H); 冰冻切片免疫荧光染色的结果显示, ATA 给药后能明显减少 EAE 小鼠脊髓中 CD45+ 细胞的数量 (图 2F 和 2I)。

[0076] ATA 减少疾病起始阶段脾脏内 DC 和效应 T 细胞的比例

[0077] CD4+T 细胞的活化, 增殖和分化是 EAE 疾病发生的前提。实施例 4 中, 发明人利用流式分析检测了 EAE 免疫后第 12 天, 小鼠脾脏内各细胞亚群的比例。与对照组相比, ATA 给药组小鼠的 CD11c<sup>+</sup>DC 和 EAE 中两种主要效应 T 细胞 Th1 和 Th17 细胞的比例显著下降 (图

3A)。与此结果一致,给药组小鼠脾细胞在体外用 MOG<sub>35-55</sub> 重刺激,上清中的细胞因子(包括 IFN- $\gamma$ , IL17, IL6 和 TNF- $\alpha$ ) 也有显著性减少(图 3B)。

[0078] 发明人随后进一步验证 ATA 是否是通过直接影响 Th1 或 Th17 细胞的分化,而使脾脏中这两种细胞比例减少的。实施例 5 中,用免疫磁珠从 6-8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠脾细胞中分选出幼稚型 CD4<sup>+</sup>T 细胞,用抗 -CD3 和抗 -CD28 抗体激活后加入不同分化因子及各种浓度的 ATA,将细胞诱导分化为 Th1 或 Th17 细胞。三天后收集细胞进行胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-17a 的染色。流式分析后发现 ATA 并不直接影响 Th1(图 3C)或 Th17(图 3D)的体外分化。体内 Th1 或 Th17 的分化很大程度上受到 DC 的影响,既然 ATA 不直接影响 Th1 或 Th17 的分化,那么这些细胞在体内的减少很可能是因为 CD11c<sup>+</sup>DC 的减少所引起(图 3A)。实施例 7 中,发明人检测了 ATA 是否会促进 DC 的凋亡,从而使脾脏中 DC 的含量减少。图 3E 显示, I 型拓扑异构酶抑制剂喜树碱剂量依赖性的促进 DC 的凋亡,但 ATA 却没有这种效应,说明 ATA 对 DC 的凋亡没有促进作用。

[0079] ATA 抑制 DC 的迁移,但不影响其其他功能

[0080] DC 在外周组织中捕获、加工并向 MHC 分子递呈抗原。DC 随后向次级淋巴器官中迁移,并在这些器官中,向幼稚型 T 细胞递呈抗原,促使它们向 Th1 或 Th17 分化,从而启动抗原特异性免疫反应。因为 ATA 不会促进 DC 的凋亡,那么它很有可能是抑制了 DC 向脾脏的迁移。实施例 8 中,发明人用趋化实验研究 ATA 对于 DC 迁移的作用。CCR7 是成熟 DC 上高表达的介导 DC 迁移的主要的趋化因子受体。结果显示,ATA (10  $\mu$  M)能够完全抑制 CCR7 的配体 CCL19 所诱导的 EAE 免疫后第 12 天小鼠脾脏中分离的获得的 DC 的趋化效应(图 4A)。

[0081] 实施例 6 中,发明人为了进一步验证 ATA 是否影响 DC 向 CD4<sup>+</sup>T 细胞的抗原递呈及其细胞因子的分泌,设计了 DC-CD4<sup>+</sup>T 细胞共培养实验。CD4<sup>+</sup>T 细胞分离自对照组小鼠,用 CFSE 标记后,与分离自对照组 EAE 或 ATA 给药组 EAE 小鼠的 CD11c<sup>+</sup>DC 共培养 72 小时。来自 ATA 给药组 EAE 小鼠的 DC 与来自对照组 EAE 小鼠的 DC 具有相同的刺激 CD4<sup>+</sup>T 细胞增殖(图 4B)及促进它们分泌细胞因子的能力(图 4C)。同时,发明人设计了另一个实验,将均分离自对照组 EAE 小鼠的 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD11c<sup>+</sup>DC 共培养,并向培养体系中加入 ATA (10  $\mu$  M),72 小时后分别用流式和 ELISA 检测 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖(图 4D)及它们细胞因子的分泌(图 4E-4H)。结果显示,CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD11c<sup>+</sup>DC 共培养能显著增强 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖及其细胞因子的产生。MOG<sub>35-55</sub> 重刺激能进一步加强这种效应。但 ATA 并不影响该系统中 CD4<sup>+</sup>T 细胞的增殖及它们细胞因子的分泌。综上所述,ATA 在 EAE 上展现出来的保护作用是通过抑制 DC 向脾脏内的迁移聚集,从而减少了 T 细胞的活化和分化。

[0082] ATA 阻断致病性淋巴细胞向中枢神经系统的浸润

[0083] ATA 在疾病开始之后也表现除了一定的治疗效果(图 2C)。所以发明人进一步验证了 ATA 是否会影响致病性 T 细胞向中枢神经系统浸润的过程。利用流式分析技术对免疫后第 18 天 CNS 白细胞浸润情况的进行检测,ATA 给药后,CD4<sup>+</sup>T 细胞和两个主要致病细胞 Th1 和 Th17 细胞的数目显著性减少(图 5A)。然而,同时发现血液中 Th17 细胞的比例,与对照组相比,ATA 给药组有显著性上升(图 5B)。这个有趣的现象表明 ATA 可能抑制了致炎性 T 细胞向 CNS 中的浸润,从而导致 Th17 细胞在血液中的积累。脉络丛形成了血脑屏障的一部分,T 细胞穿过脉络丛进入中枢神经系统是 EAE 病情起始的关键一步。有文献报道,CCL20/CCR6 介导的 Th17 细胞向 CNS 的浸润触发了 EAE 的开始。CCR6 基因敲除小鼠的 CD45<sup>+</sup> 细胞

不能穿过血脑屏障,积聚在脉络丛中。图 5C 和 5D 显示,与对照组相比,ATA 给药组 EAE 小鼠脉络丛中有更多的 CD45<sup>+</sup> 细胞的聚集,这些都说明了 ATA 同时还会抑制致病性 T 细胞向 CNS 的浸润,从而缓解 EAE 的病情。

#### [0084] 讨论

[0085] 趋化因子是一类与白细胞迁移和炎症反应相关的细胞因子,根据它们的结构性质可被分为两个大的家族(CXC 和 CC)和两个小的家族(C 和 CX3C)。趋化因子受体下游信号通过异源三聚体 G 蛋白传递。G 蛋白能够调节多种信号传导通路,包括细胞内钙离子,丝裂酶原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPK),PLC $\beta$ ,PI3K,Ras 和 Rho GTPases 等。这些转导信号被认为负责细胞的运动及免疫细胞的运输。

[0086] 抗原进入外周组织后,未成熟 DC 在病原体或炎症因子诱导下慢慢成熟。携带抗原的成熟 DC 迁出外周组织到达次级淋巴器官,并在此刺激 T 细胞的增殖和分化。DC 成熟过程中,其表面表达的趋化因子受体类型会改变。决定携带抗原的成熟 DC 在 T 细胞富集区域积累的趋化因子受体 CCR7 的表达会逐渐上调。最近的研究也表明 CXCR4 和 CCR7 介导的信号协同调节 DC 向脾骨髓迁移。抑制 DC 迁移的药物已经用于治疗自身免疫疾病。例如,环孢霉素 A (CyclosporinA,CsA)在临床上是一种非常重要的有效的免疫抑制剂,用于治疗器官移植,变应性紊乱,自身免疫疾病和急性炎症。CsA 主要通过抑制 DC 在 LPS 刺激下产生 PGE<sub>2</sub>,进而干预了趋化因子受体的表达,损伤 DC 的迁移能力。发明人的数据显示,ATA 非特异性地抑制趋化因子受体的功能,且它对于抑制 CCL19/CCR7 介导的 DC 趋化的活性也是最好的。这表明抑制 DC 向次级淋巴器官的归巢也许是治疗自身免疫疾病的一种有效方法。

[0087] 淋巴细胞向 CNS 的浸润是 EAE 这种神经退行性疾病发生的另外一个关键步骤,它也是由趋化因子受体所调节。白细胞从血液向血管外渗出是一个多步骤的过程。在这一级联反应中的关键一步是循环中的白细胞表面表达的趋化因子受体与血管内皮细胞表面的趋化因子结合,启动细胞内信号,导致整合素活化,白细胞阻滞及外渗。最近的证据表明表达 IL-17 的 Th17 细胞是 EAE 中最重要的致炎性 T 细胞。Th17 细胞高表达趋化因子受体 CCR6,并且其配体 CCL20 在健康的及 EAE 小鼠的脉络丛细胞上高表达。Reboldi 等报道 CCR6+Th17 细胞穿过脉络丛上皮细胞进入 CNS 的过程对于 EAE 的起始是非常重要的。CCR6 基因敲除后能阻滞 Th17 细胞的浸润,减轻 EAE 的病情。发明人也证明了 ATA 抑制 CCL20/CCR6 介导的脾细胞的趋化,并减少致炎性 T 细胞向 CNS 的浸润。

[0088] 许多其他的趋化因子受体在 EAE 发病过程中的作用也有报道,而 ATA 作为一个多趋化因子受体的非特异性抑制剂正是其对 EAE 有治疗效果的原因。值得注意的是 ATA 已经被报道可通过抑制 CD4 与病毒包膜糖蛋白 gp120 的结合来抑制 HIV 的进入。众所周知,CCR5 和 CXCR4 是 HIV 入侵的共受体。通过发明人的数据显示,ATA 也许还通过抑制 CCR5 和 CXCR4 来阻挡 HIV 进入 CD4<sup>+</sup>T 细胞。

[0089] 本发明公开了 ATA 抑制趋化因子受体功能的活性,并公开了 ATA 通过抑制 CCL19/CCR7 介导的 DC 向次级淋巴器官的归巢及 CCL20/CCR6 介导的 Th17 细胞进入 CNS 的过程,可以达到治疗 EAE 的目的。

[0090] 表 1 :ATA 抑制趋化因子受体介导的钙流反应及细胞迁移。其中:

[0091] 通过钙流和趋化实验检测 ATA 在多种趋化因子受体和其他 GPCR 上的抑制活性。数据来自三次独立实验,每次实验三复孔,表示为平均值  $\pm$  标准误差。

[0092] 【表 1】

[0093]

受体	钙流实验		趋化实验	
	IC50 ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	最高抑制率 (%) <sup>a</sup>	IC50 ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	最高抑制率 (%) <sup>a</sup>
CCR2	>100	16.65 ± 16.03	NA	NA
CCR4	14.30 ± 4.24	100.01 ± 7.62	NA	NA
CCR5	3.49 ± 0.65	100.44 ± 1.47	NA	NA
CCR6	4.12 ± 0.40	99.82 ± 0.46	3.36 ± 0.92	96.26 ± 11.32
CCR7	2.46 ± 0.77	97.89 ± 3.77	0.24 ± 0.03	99.26 ± 6.46
CCR9	0.75 ± 0.20	98.99 ± 0.58	NA	NA
CXCR4	19.90 ± 6.00	97.41 ± 0.95	11.46 ± 2.38	107.89 ± 3.04
CXCR5	5.74 ± 0.96	98.71 ± 1.04	NA	NA
CXCR6	43.40 ± 1.90	98.11 ± 0.17	NA	NA
S1P1	>100	-3.63 ± 2.64	>100	-1.56 ± 14.4
GLP-1R	>100	29.37 ± 16	NA	NA
KOR	>100	-1.63 ± 5.41	NA	NA
DOR	>100	-6.72 ± 3.90	NA	NA
$\beta$ 2AR	>100	0.73 ± 5.40	NA	NA

[0094] <sup>a</sup> 数据表示为平均值 ± 标准误差；

[0095] NA : 未检测

[0096] 表 2 : ATA 减轻 EAE 临床评分。其中：

[0097] ATA 不同给药剂量及给药方式对 EAE 病情临床评分的影响统计表。

[0098] 【表 2】

[0099]

给药时间	组别	发病率	平均发病起 始天数 <sup>a</sup>	平均最高临 床评分 <sup>a</sup>	累计临床评 分 <sup>a</sup>
第3天至 实验结束	对照组	14/18	15.43 ± 1.35	2.01 ± 0.71	9.9 ± 4.63
	ATA 10mg/kg	14/19	15.71 ± 1.53	1.57 ± 0.72	7.8 ± 4.59
	ATA 20mg/kg	5/19	16.6 ± 1.56	0.47 ± 0.53 <sup>***</sup>	1.87 ± 2.13 <sup>***</sup>
第3天至 第12天	对照组	11/12	14 ± 0.52	1.98 ± 0.5	11.77 ± 3.2
	ATA 20mg/kg	9/12	14.78 ± 1.18	1.27 ± 0.58	5.9 ± 3 <sup>*</sup>
第12天 至实验结 束	对照组	16/18	13.5 ± 0.67	2.04 ± 0.61	13.5 ± 4.52
	ATA 20mg/kg	13/18	13.62 ± 2.85	1.1 ± 1.57 <sup>**</sup>	7.46 ± 4.6 <sup>*</sup>

[0100] <sup>a</sup> 平均值 ± 标准误差；

[0101] <sup>\*\*\*</sup>p<0.001, <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*</sup>p<0.05(史蒂顿特氏 t 检验)。

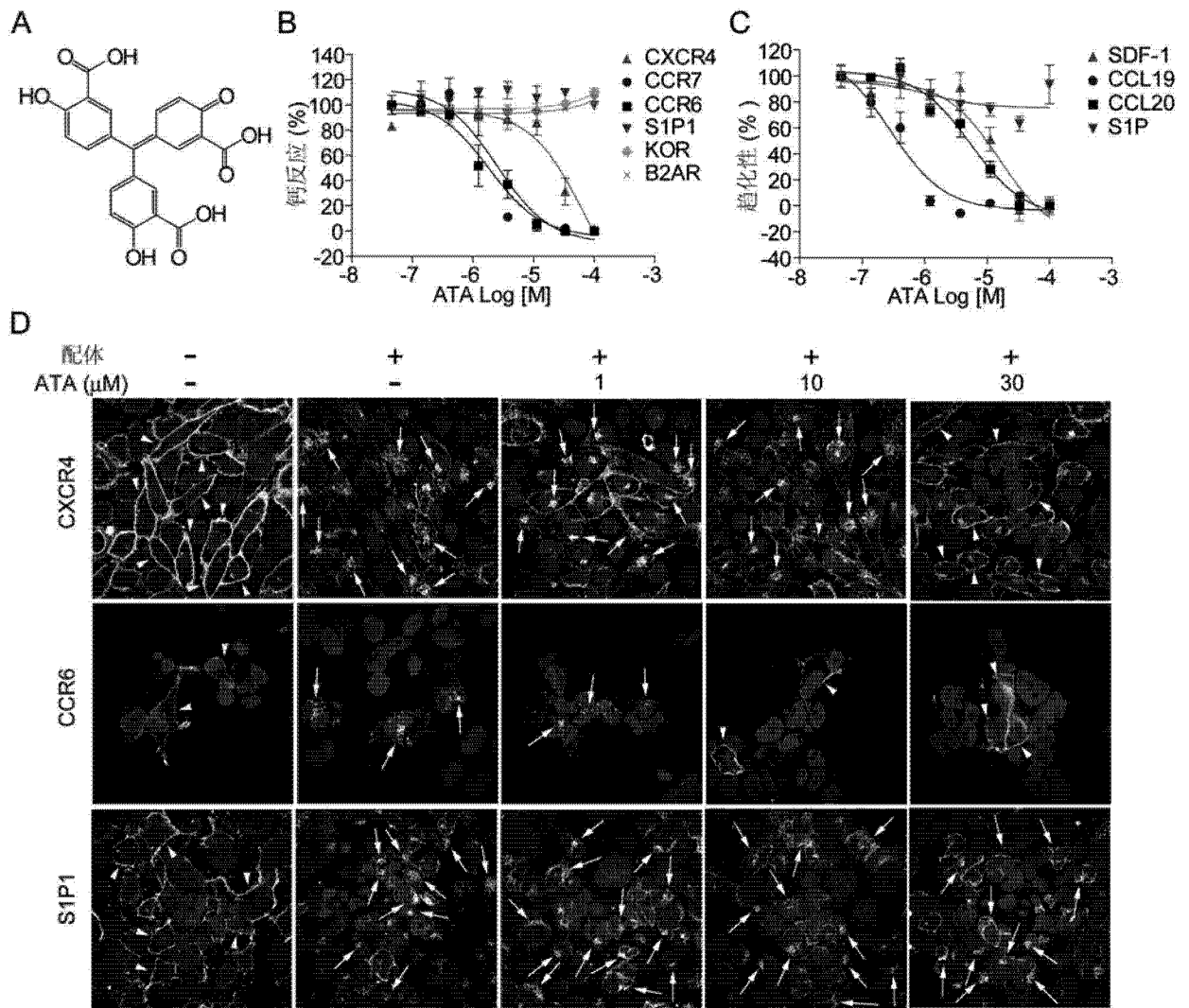


图 1

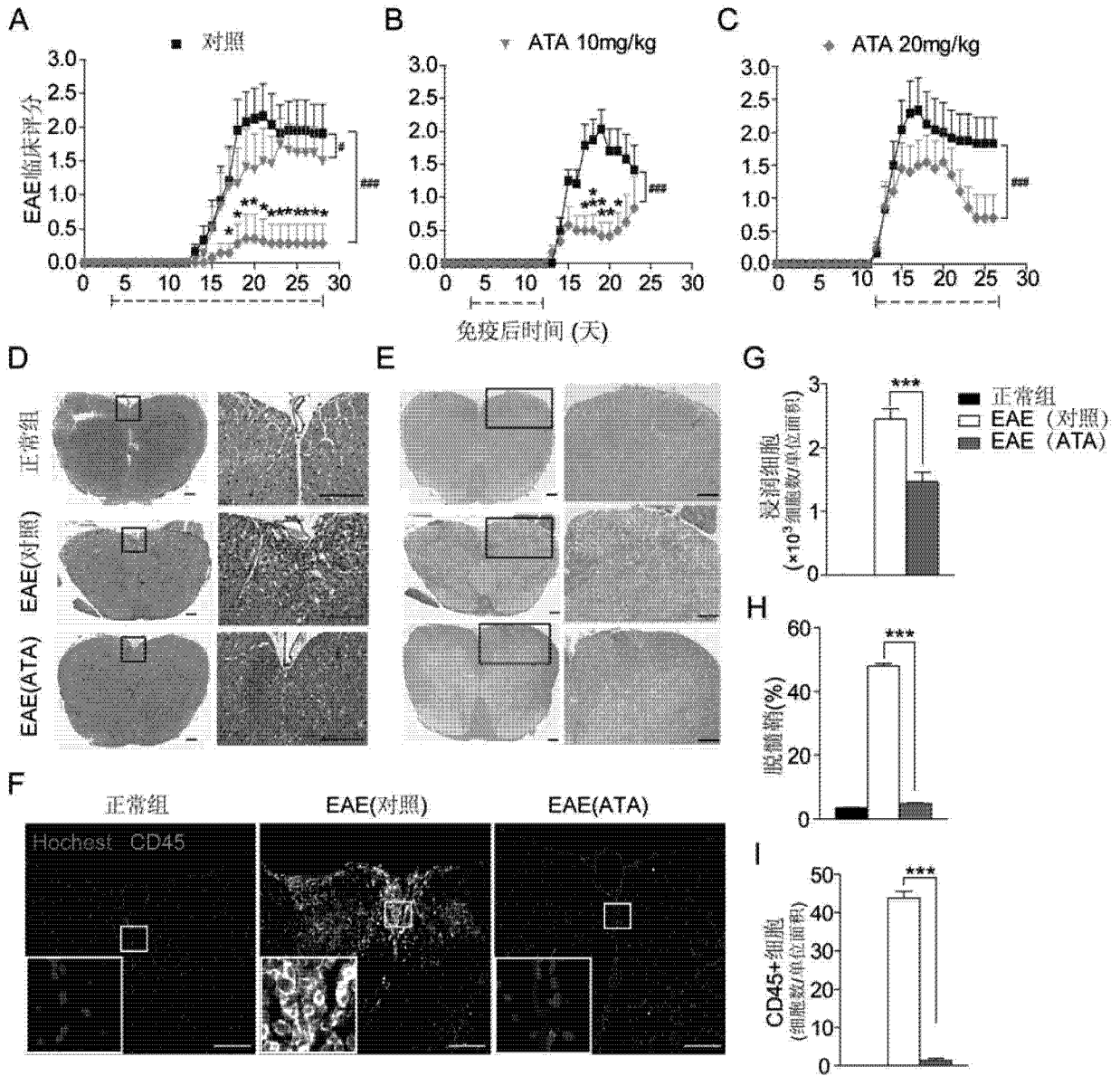


图 2



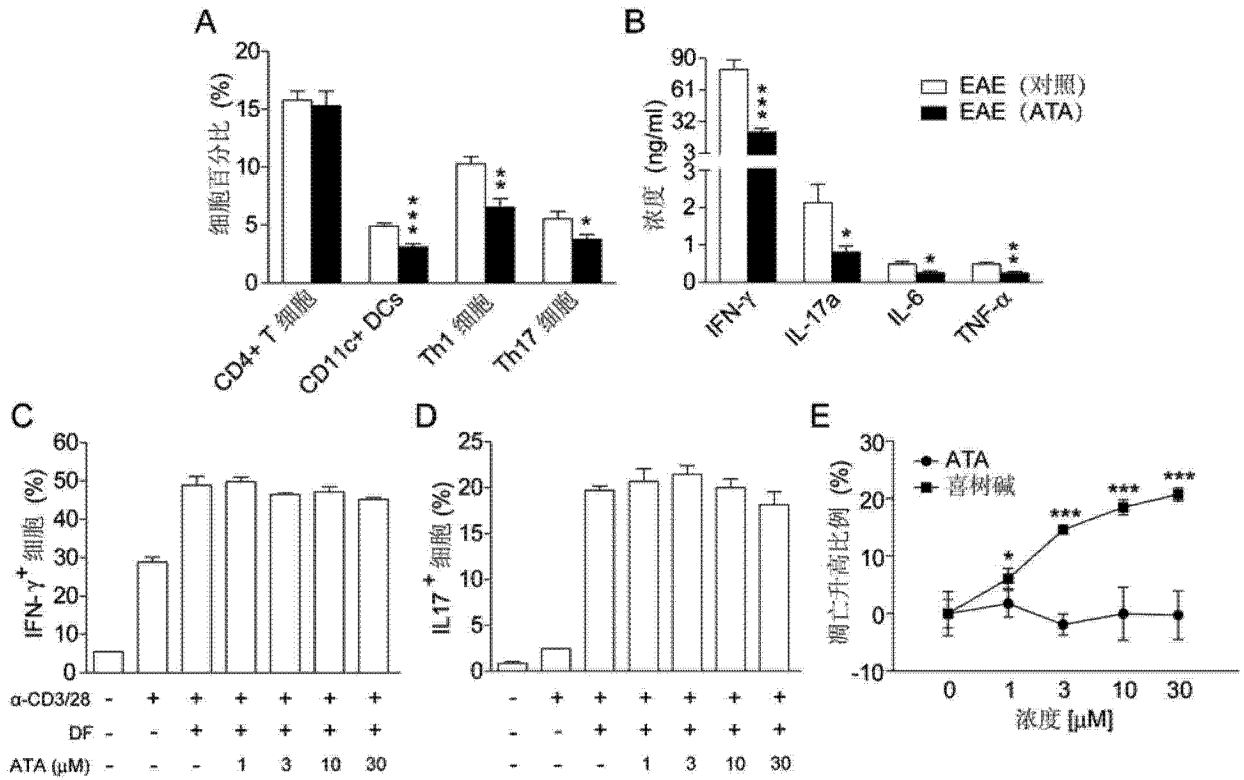


图 3

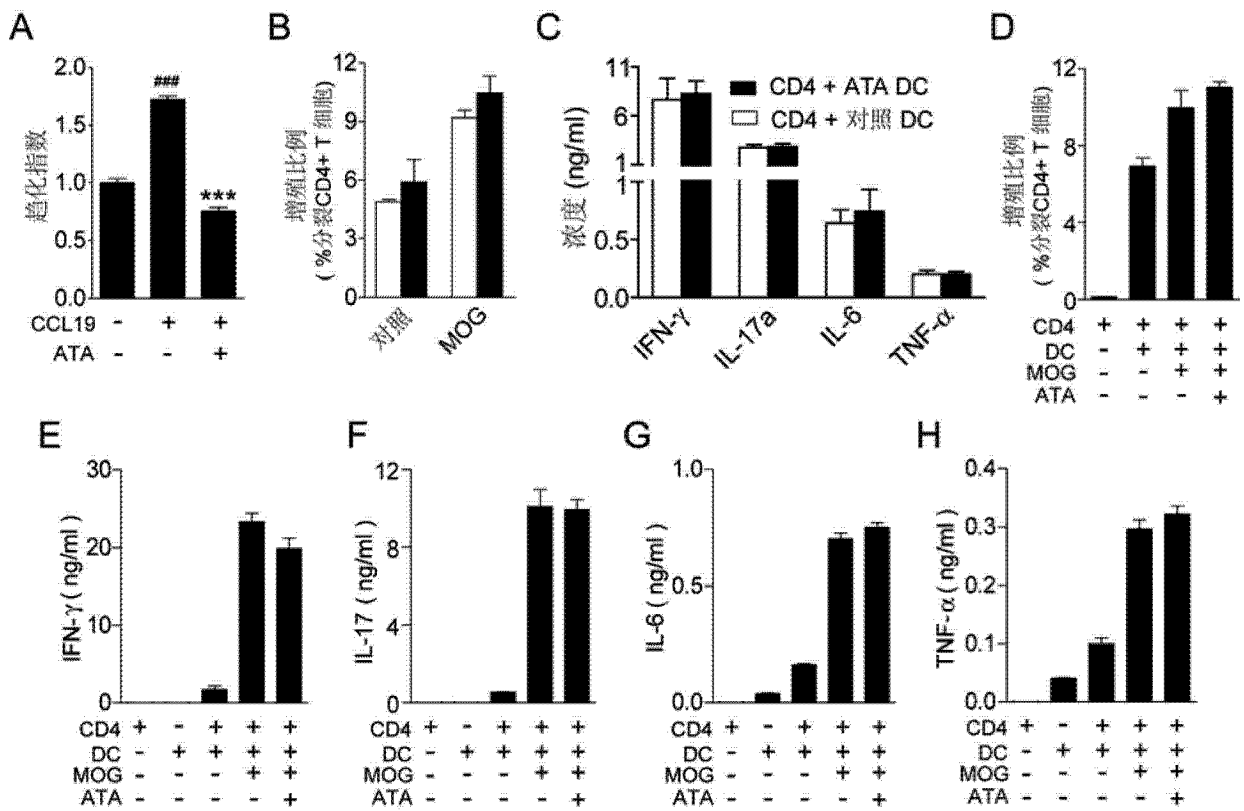


图 4

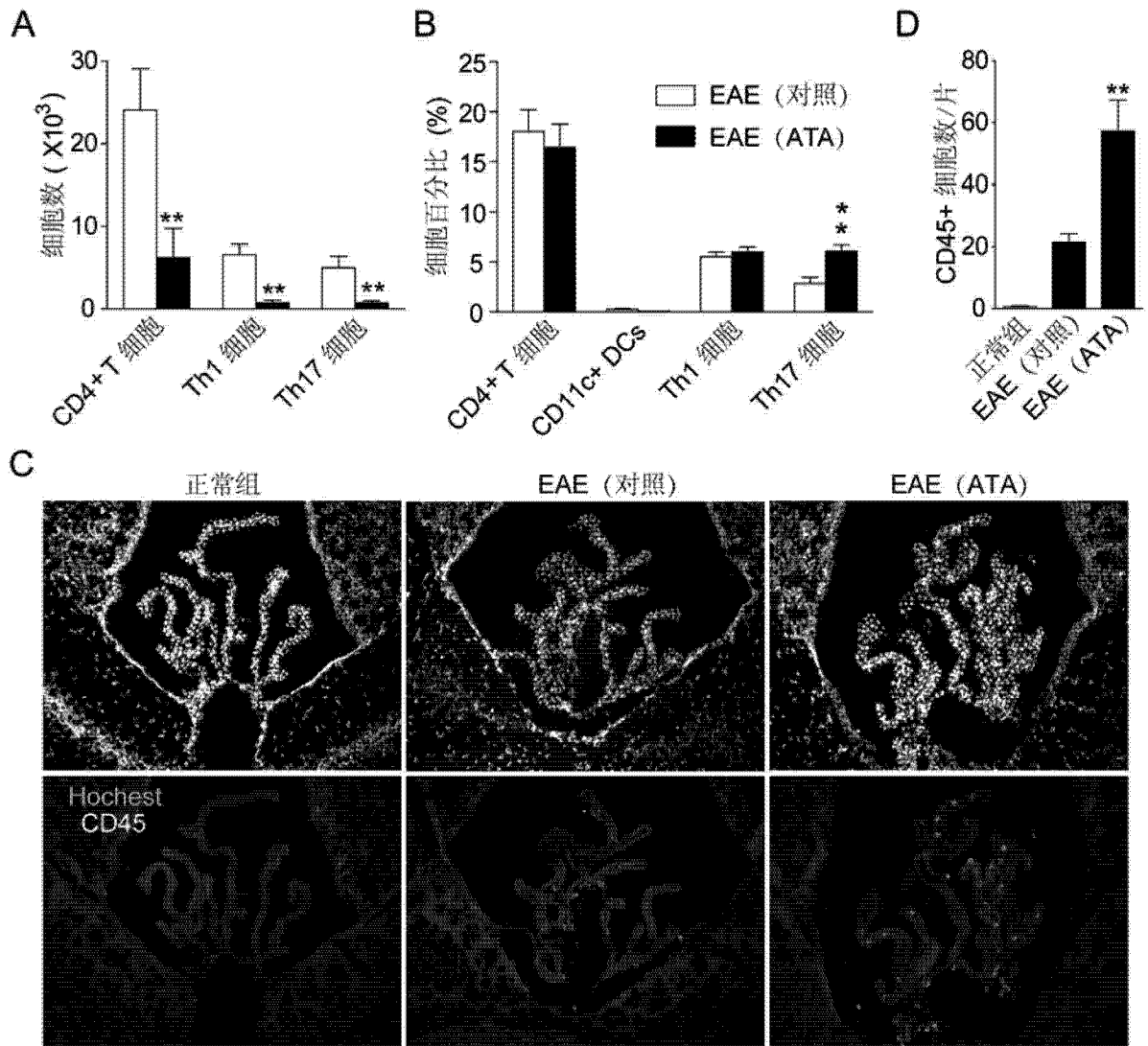


图 5