



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105358678 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201480022386. 4

A61K 38/00(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 10

(30) 优先权数据

61/775, 115 2013. 03. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/022321 2014. 03. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/138725 EN 2014. 09. 12

(71) 申请人 密苏里大学董事会

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 H·扎奥阿尼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 韩威威

(51) Int. Cl.

C12N 5/07(2006. 01)

C12N 5/16(2006. 01)

权利要求书2页 说明书26页

序列表3页 附图15页

(54) 发明名称

治疗和 / 或预防 1 型糖尿病的方法和组合物

(57) 摘要

本公开一般涉及治疗或预防糖尿病的方法和组合物,其是通过向对象施用包括一定量的干细胞和 / 或祖细胞和至少一种抗原特异性疗法的组合物。

1. 治疗或预防对象中糖尿病的方法,所述方法包括:向所述对象施用包括一定量的一个或多个干细胞和/或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法的组合物。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述糖尿病是1型糖尿病。

3. 权利要求1所述的方法,其中所述对象是哺乳动物。

4. 权利要求3所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

5. 权利要求1所述的方法,其中所述干细胞和/或祖细胞是全能的、多能的、多功能的或单能的。

6. 权利要求1所述的方法,其中所述干细胞和/或祖细胞分离自骨髓。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述干细胞和/或祖细胞是纯化的骨髓内皮祖细胞。

8. 权利要求1所述的方法,其中所述干细胞和/或祖细胞是同种异体细胞。

9. 权利要求1所述的方法,其中所述干细胞和/或祖细胞是自体细胞。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述至少一种抗原特异性疗法是免疫球蛋白-多肽嵌合体。

11. 权利要求10所述的方法,其中所述免疫球蛋白-多肽嵌合体是可溶的。

12. 权利要求10所述的方法,其中所述免疫球蛋白-多肽嵌合体是聚集的。

13. 权利要求10所述的方法,其中所述免疫球蛋白-多肽嵌合体包括具有CDR3区域的免疫球蛋白,和其中致糖尿病抗原决定部位插在CDR3区域中。

14. 权利要求13所述的方法,其中所述致糖尿病抗原决定部位包括GAD2(SEQ ID NO:1)、GAD1(SEQ ID NO:2)或INS β (SEQ ID NO:3)。

15. 一种组合物,其包括一定量的一个或多个干细胞和/或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法。

16. 权利要求15所述的组合物,其中所述干细胞和/或祖细胞是全能的、多能的、多功能的或单能的。

17. 权利要求15所述的组合物,其中所述干细胞和/或祖细胞分离自骨髓。

18. 权利要求15所述的组合物,其中所述干细胞和/或祖细胞是纯化的骨髓内皮祖细胞。

19. 权利要求15所述的组合物,其中所述干细胞和/或祖细胞是同种异体细胞。

20. 权利要求15所述的组合物,其中所述干细胞和/或祖细胞是自体细胞。

21. 权利要求15所述的组合物,其中所述至少一种抗原特异性疗法是免疫球蛋白-多肽嵌合体。

22. 权利要求21所述的组合物,其中所述免疫球蛋白-多肽嵌合体是可溶的。

23. 权利要求21所述的组合物,其中所述免疫球蛋白-多肽嵌合体是聚集的。

24. 权利要求21所述的组合物,其中所述免疫球蛋白-多肽嵌合体包括具有CDR3区域的免疫球蛋白,和其中致糖尿病抗原决定部位插在CDR3区域中。

25. 权利要求24所述的组合物,其中所述致糖尿病抗原决定部位包括GAD2(SEQ ID NO:1)、GAD1(SEQ ID NO:2)或INS β (SEQ ID NO:3)。

26. 治疗或预防对象中糖尿病的方法,所述方法包括:向所述对象施用组合物,其包括一定量的纯化骨髓内皮祖细胞和免疫球蛋白Ig-GAD2。

27. 治疗或预防对象中糖尿病的方法,所述方法包括:向对象施用组合物,其包括一定

量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞。

28. 权利要求 27 所述的方法, 其中所述祖细胞包括一定量的纯化骨髓内皮祖细胞。

29. 权利要求 27 或 28 所述的方法, 其中所述干细胞和 / 或祖细胞直接递送至所述对象的胰腺。

治疗和 / 或预防 1 型糖尿病的方法和组合物

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 8 日提交的美国临时专利申请系列号 61/775,115 的优先权,其全部内容通过引用和参考并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本工作受来自美国政府通过国立卫生研究院资助的资助号 R56-AI-095235 的支持。美国政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明一般地涉及治疗或预防 1 型糖尿病 (“T1D”) 的方法和组合物。

背景技术

[0006] 1 型糖尿病 (T1D), 曾经称为青少年糖尿病, 是自身免疫介导的疾病, 其特异性靶向胰腺 β 细胞 (Castano 等, Ann. Rev. Immunol. 8:647-680(1990))。疾病发病机理涉及 T 细胞浸润至胰岛, 其导致随后产生胰岛素的 β 细胞的破坏 (Bach, Endroc. Rev. 15:516-542(1994))。没有胰岛素, 不能储存血糖 (葡萄糖) 并且稍后用作能量 (Bach, Endroc. Rev. 15:516-542(1994))。T1D 的早期症状包括尿频、过度疲劳和兴奋 (Van Belle 等, Physiol. Rev. 91:79-118(2011))。延长暴露于血流中的高水平的葡萄糖可造成对整个身体器官系统的严重损伤 (Bach, Endroc. Rev. 15:516-542(1994))。不清楚 T1D 的准确原因, 但是怀疑自身免疫、遗传和环境因素 (Tisch 等, Cell. 85:291-297(1996))。世界上大概三百万人遭受 T1D, 一百万是美国人, 报道的增加速度是每年 3 至 5% 范围的增加 (Melmed 等, Williams Textbook of Endocrinology: 第 12 版 (2011))。尽管该疾病的高发病率, 但是糖尿病仍不能治愈。受 T1D 折磨的人必须求助于膳食改变, 持续监测他们的血糖水平和胰岛素注射或通过泵持续胰岛素注入 (Freeborn 等, J. Clin. Nurs. doi:10.1111/jocn.12046(2013))。即使短时间血糖水平处理不当可造成严重的后果, 包括: 肾衰竭、视力改变、心脏病、中风或甚至死亡 (Simone 等, Diabetes Care. 22(Suppl. 2):B7-B15(1999); Livingstone 等, PLoS Med. 9(10):e1001321(2012); Secrest 等, Diabetes Care. 33:2573-2579(2010))。

[0007] 就许多自身免疫性疾病, T1D 可能涉及多个自体抗原和不同的 T 细胞特异性 (Bach, Endroc. Rev. 15:516-542(1994); Tisch 等, Cell. 85:291-297(1996))。基因修饰以表达自身和改变的自身肽 (Ig- 嵌合体) 的免疫球蛋白 (“Igs”) 可用于抑制病理学免疫应答 (Miller 等, Nat. Rev. Immunol. 7:665-677(2007))。这些 Ig- 嵌合体已经显示, 由于 Ig- 嵌合体的内化、在内体隔间中加工和肽对新合成的 MHC 分子的无限获取, 对 T 细胞的呈递相对于游离肽增加了 100 倍 (Zaghouani 等, Science. 259:224-227(1993); Legge 等, J. Exp. Med. 185:1043-1053(1997); Brumeanu 等, J. Exp. Med. 178:1795-1799(1993))。因为 Igs 是自分子, 即使当需要重复注射时副作用最小, 并且因此有助持续疗法。Ig- 嵌合体允许特异性阻断自活性免疫细胞的有害作用, 同时保持身体的免疫系统清理外源抗原的能力

(Miller 等, Nat. Rev. Immunol. 7:665-677 (2007))。所以, 表达致糖尿病肽的 Ig- 嵌合体是吸引人的治疗或预防 T1D 的抗原特异性治疗方法。

发明内容

[0008] 本公开提供了在需要其的对象中治疗或预防 1 型糖尿病 (“T1D”) 的方法和组合。在一个方面中, 本公开提供了递送抗原特异性疗法用于下调致糖尿病 T 细胞 (免疫调节) 和同时施用干细胞和 / 或祖细胞用于在胰岛中再生内皮细胞用于治疗或预防 T1D 的方法。

[0009] 本公开提供了在需要其的对象中治疗或预防糖尿病的方法, 方法包括: 向对象施用治疗有效量的包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法的组合物。

[0010] 本公开也提供了组合物, 其以治疗有效量包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法。

[0011] 本公开也提供了以治疗有效量包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法的组合物, 以维持 β - 细胞和内皮细胞形成和逆转糖尿病。

[0012] 本公开也提供了在需要其的对象中治疗或预防糖尿病的方法, 方法包括: 向对象施用治疗有效量的包括一定量的纯化骨髓内皮祖细胞和免疫球蛋白 Ig-GAD2 的组合物。

[0013] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 糖尿病是 1 型糖尿病。

[0014] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 对象是哺乳动物包括, 例如, 人。

[0015] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 干细胞和 / 或祖细胞是全能的、多能的、多功能的或单能的。

[0016] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 干细胞和 / 或祖细胞分离自骨髓。

[0017] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 干细胞和 / 或祖细胞是纯化的骨髓内皮祖细胞。

[0018] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 干细胞和 / 或祖细胞是同种异体细胞。

[0019] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 干细胞和 / 或祖细胞是自体细胞。

[0020] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 至少一种抗原特异性疗法是免疫球蛋白 - 多肽嵌合体。

[0021] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 免疫球蛋白 - 多肽嵌合体是可溶的。

[0022] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 免疫球蛋白 - 多肽嵌合体是聚集的。

[0023] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 免疫球蛋白 - 多肽嵌合体包括具有 CDR3 区域的免疫球蛋白, 和其中致糖尿病抗原决定部位插在 CDR3 区域中。

[0024] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 致糖尿病抗原决定部位源自 GAD, 例如包括 GAD2 (SEQ ID NO:1) 或 GAD1 (SEQ ID NO:2)。

[0025] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 致糖尿病抗原决定部位源自 INS β , 例如, 包括 INS β (SEQ ID NO:3)。

附图说明

[0026] 当结合附图阅读时,将更好理解本公开的前述内容,以及下述详细说明。为了图解本公开的目的,图中显示了显示了目前优选的实施方式。但是,应理解,本公开不限于显示的精确布置、实施例和手段。

[0027] 图 1A-D 显示单独 Ig-GAD2 治疗不能克服明显 T1D, 尽管诱导免疫耐受。图 1A 显示在用 Ig-GAD2 治疗的明显糖尿病小鼠中没有恢复血糖量正常。下图指示,在 Ig-GAD2 治疗的糖尿病小鼠中,尽管 Ig-GAD2 不能恢复血糖量正常,但是治疗导致如脾中根除 Th17 细胞但是 Th1 细胞驻留显示的致诱导免疫耐受,和 IFN γ 和 / 或 IL-10 的增加 (图 1B-D)。

[0028] 图 2A-E 显示在用 Ig-GAD2 和骨髓 (BM) 移植治疗的明显糖尿病小鼠中恢复血糖量正常。图 2A 描绘了治疗方案的示意性表示。图 2B 显示与单独接收 BM 或 Ig-GAD2 的小鼠相比,在接收 Ig-GAD2+BM 的组合治疗之后,维持血糖量正常的小鼠的百分数增加。图 2C 显示在接收 Ig-GAD2+BM 的小鼠的脾和胰腺细胞中产生的细胞因子的增加。图 2D 显示在脾和胰腺的细胞中产生的 IL-17 的下降。图 2E 显示 Th1 和 Th17 细胞的签名转录因子的下降。

[0029] 图 3A-G 显示 Ig-GAD2+BM 接受小鼠中胰腺 β -细胞的再生。图 3A-D 显示在 Ig-GAD2+BM 治疗的小鼠接受者中相比单独 Ig-GAD2 或 BM 治疗,血糖量正常的持续恢复。Ig-GAD2+BM 治疗的小鼠接受者具有更多的胰岛和更多的 β -细胞,所述胰岛大部分没有胰岛炎,其具有最小渗透和丰富胰岛素阳性细胞 (图 3B-C)。而且,用 Ig-GAD2+BM 的治疗恢复产生胰岛素的细胞和 β -细胞群的数量 (图 3E-G)。

[0030] 图 4A-D 显示从健康至高血糖至糖尿病的进展期间,在外周血液和胰腺中表达 PECAM1 的内皮细胞的下降。

[0031] 图 5A-C 显示内皮细胞的恢复与 β -细胞再生平行。图 5A 显示与单独接收 Ig-GAD2 或 BM 的那些小鼠相比,来自用 Ig-GAD2+BM 治疗的小鼠的胰腺胰岛切片中增加的 PECAM1 和胰岛素染色。图 5B 显示相对于未治疗的糖尿病小鼠,接收 Ig-GAD2+BM 的小鼠中内皮细胞的功能标记物的增加。来自 Ig-GAD2+BM 治疗的小鼠的胰腺切片显示和增加数量的胰岛素⁺ki-67⁺胰腺细胞 (图 5C)。

[0032] 图 6A-B 显示新的胰腺内皮细胞源自供体 BM。

[0033] 图 7A-D 显示 Ig-GAD2 的治疗期间内皮细胞祖细胞的转移维持 β -细胞再生并且恢复血糖量正常。图 7A-B 显示与年龄相当的健康的小鼠相比,糖尿病小鼠中表达内皮祖细胞 (EPC) 标记物 c-kit 和 FLK-1 的 BM 细胞明显减少。相比全 BM- 接受者小鼠,接收来自健康供体的 EPC 的糖尿病小鼠展示更高的恢复速度 (图 7C)。从糖尿病 NOD-GFP 小鼠分离的 EPC 产生最小疾病恢复和最小移植 GFP 细胞至胰岛 (图 7C-D)。

[0034] 图 8 显示用 Ig-GAD2+BM 治疗糖尿病小鼠使得消除与出现糖尿病相关的胰岛素-抗性。

[0035] 图 9 显示在 Ig-GAD2+BM 治疗期间,源自供体 BM 的细胞和产生胰岛素的细胞在第 30、60 或 120 天没有共定位 (左图)。在无糖尿病的小鼠中富含源自供体 BM 的细胞,但是在相同方案的仍糖尿病的那些接受者中最小 (右图)。

[0036] 图 10 显示用 IgGAD2+BM 治疗的无糖尿病的小鼠的胰腺中上调编码血管生成因子的基因,包括 VEGFa、血管生成素 1 和血管生成素 2 (图 10A)。图 10B 显示新形成的产生胰岛素的 β -细胞也产生 VEGFa。

[0037] 发明详述

[0038] 用于治疗包括 1 型糖尿病 (T1D) 的糖尿病的有效疗法仍具有重要的医学需要。最近发现, 抗原特异性疗法 (例如, Ig-GAD) 诱导高血糖对象中的免疫调节, 其能够控制胰腺炎、刺激 β - 细胞再生和预防 T1D 进展。但是, 当相同的抗原特异性疗法给予具有明显 T1D 的对象时, 尽管与在治疗高血糖对象中看到的类似的免疫调节, 不能逆转疾病的过程。令人吃惊地, 发明人已经发现当伴随着骨髓 (BM) 细胞 (例如, 祖细胞) 的转移时, 抗原特异性疗法能够维持从明显 T1D 的恢复。这样, 本公开提供了用于治疗或预防 T1D 的组合物和方法。这样的方法可包括选择患 T1D 的对象, 和向对象施用有效量的组合物, 其包括大量 (例如, 有效量) 的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和大量 (例如, 有效量) 的至少一种抗原特异性疗法。公开的组合物和方法可用于替换或补充用于治疗或 / 或预防 T1D 的其他药学方法。

[0039] 本公开提供了在需要其的对象中治疗或预防糖尿病的方法, 方法包括: 向对象施用治疗有效量的组合物, 其包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法。

[0040] 本公开也提供了组合物, 其以治疗有效量包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法。

[0041] 本公开也提供了组合物, 其以治疗有效量包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法, 以维持 β - 细胞和内皮细胞形成和逆转糖尿病。

[0042] 在本公开的一种实施方式中, 糖尿病是 1 型糖尿病。1 型糖尿病 (T1D) 的特征在于自身免疫攻击和损失胰腺中胰岛的产生胰岛素的贝塔细胞 (β - 细胞)。疾病通过在本领域通常称为胰岛炎前、胰岛炎、高血糖, 和明显糖尿病的数个阶段进展。可通过血糖水平、淋巴细胞渗透至胰腺细胞的程度, 和胰腺 β - 细胞群确定疾病阶段的诊断。如本文所使用, 术语“胰岛炎”指发生胰腺渗透, 使得受影响的胰岛已经丢失了它们的大部分 β - 细胞群 (约 80% 丢失)。如本文所使用, 术语“胰岛炎前”指胰腺渗透的早期阶段使得有较小程度的 β - 细胞群丢失 (约 0% -40% 丢失)。如本文所使用, 术语“高血糖”指出现更高的正常禁食血糖水平, 通常大于约 126mg/dL。如本文所使用, 术语“明显糖尿病”指基于血浆葡萄糖水平, 通常为约 300mg/dL 或更高、胰腺渗透, 和大大减少的 β - 细胞群, 诊断对象中完全发作的糖尿病。

[0043] 在一个实施方式中, 组合物施用至在 T1D 的胰岛炎前阶段的对象。在仍另一实施方式中, 在对象经历 IAA 血清转化之前, 组合物施用至对象。在仍另一实施方式中, 在对象已经血清转化并且产生针对一个或多个 β - 细胞相关抗原的自抗体之前组合物施用至对象。在仍另一实施方式中, 组合物施用至 IAA 阳性的对象。在另一实施方式中, 组合物施用至 T1D 胰岛炎阶段的对象。在仍另一实施方式中, 在对象已经发展了高血糖之前化合物施用至对象。在本发明的另一实施方式中, 当开始治疗时, 对象已经发展了高血糖。在仍另一实施方式中, 对象已经诊断患明显糖尿病。

[0044] 在任何上述方法或组合物的实施方式中, 对象是哺乳动物包括, 例如, 人。

[0045] 术语“治疗 (treatment)”、“治疗 (treat)”和“治疗 (treating)”, 如结合如本文所描述的方法使用时, 指临时或永久、部分或完全消除、减少、抑制或减轻 T1D 的临床症状、表现或进展 (例如, 诊断的事件、疾病或病况的症状、表现或进展)。另外, 或可选地, 术语“治疗 (treatment)”、“治疗 (treat)”和“治疗 (treating)”, 如本文结合如描述的方法

所使用指临时或永久、部分或完全抑制、延迟、抑制、减少、治疗、消除或减轻 T1D 的临床症状或表现。在一些实施方式中,与在治疗之前进行的症状、迹象和 / 或病况的基线测量相比,治疗包括有效减轻对象中 T1D 的症状、迹象和 / 或病况至少约 10% (例如,15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100%)。在一些实施方式中,与在治疗之前进行的基线评估相比,治疗有效改善包括用于诊断对象中 T1D 的评估。如本文提供的这样的治疗不需要绝对有效。

[0046] 如本文所使用,术语“预防 (prevention)”“预防 (prevent)”或“预防 (preventing)”指与没有进行测量的出现相比,消除或减少如本文所描述的 T1D 发病率或出现。

[0047] 如本文所使用,术语“需要治疗的”指护理人员判断患者需要或得益于治疗。该判断的进行基于护理人员领域的各种因素,但是包括患者展示 T1D 的临床症状或表现的知识。

[0048] 如本文所使用,术语“有效量”指单独或作为药学组合物一部分的大量的组合物 (例如,包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法的组合物),其当施用至对象 (例如,作为一个或多个剂量) 时,能够对疾病状态或病况的任何症状、方面、参数或特征具有任何可检测的积极作用。这样的作用不需要是绝对有益的。

[0049] 干细胞和祖细胞和抗原特异性疗法

[0050] 本公开考虑任何干细胞和 / 或祖细胞和抗原特异性疗法。

[0051] 干细胞和 / 或祖细胞可分离自身体的许多组织。如本文所使用,术语“干细胞”指能够自我更新的未分化的细胞,意思是每个细胞分裂至少一个也是干细胞的子细胞。干细胞也能够分化成更成熟的细胞类型 (例如,外胚层细胞系、中胚层细胞系和 / 或内胚层细胞系的细胞)。如本文所使用,术语“祖细胞”指源自干细胞的未分化的细胞,其能够自我更新并且分化,但是通常与干细胞相比,具有更受限的发育潜能。

[0052] 在一个实施方式中,干细胞和 / 或祖细胞是全能的、多能的、多功能的或单能的。如本文所使用,术语“全能”意思是具有无限能力产生身体的任何细胞类型和所有胚胎外细胞类型。如本文所使用,术语“多能”意思是具有无限能力产生身体的任何细胞。如本文所使用,术语“多能”意思是具有无限能力产生大于一种,但不是身体的所有的细胞类型。如本文所使用,“单能”意思是具有产生仅仅一种细胞类型的能力。

[0053] 如本文所使用,提及细胞,术语“分离的”指在与该细胞天然存在的环境 (例如细胞天然存在于生物体中的情况) 不同的环境中的细胞和从其天然环境移除的细胞。干细胞可从胚胎、胎儿、出生后、幼年或成人组织中分离。也可通过形成体细胞的细胞和通过技术人员已知的任何方式和方法 (例如,病毒方法、RNA 方法、蛋白质方法、miRNA 方法、化学介导的再编程方法) 诱导成干细胞样状态而分离干细胞。祖细胞通常出现在出生后动物中,位于需要细胞修复或替换的组织和器官中 (例如肌肉中出现的卫星细胞、脑区域中出现的神经祖细胞、骨髓中出现的内皮祖细胞)。

[0054] 在一个实施方式中,干细胞和 / 或祖细胞分离自骨髓 (BM)。BM 样品可通常获得自对象的髌骨、股骨、胫骨、脊椎、肋骨或其他骨髓空间。可容易使用本领域已知的方法分离骨髓细胞。例如,可通过骨髓抽吸分离骨髓细胞。美国专利号 4,481,946 描述了骨髓抽吸方

法和装置,其中可通过在期望移除的位点插入一对抽吸针实现从供体有效的回收骨髓。通过连接一对注射器,可调节压力,以通过一个抽吸针选择性移除骨髓和正弦血液,同时通过另一抽吸针积极迫使静脉内溶液替换从位点移除的骨髓。骨髓和正弦血液可吸入腔用于和另一静脉内溶液混合并且其后迫使进入收集袋。

[0055] 美国专利号 4,486,188 描述了骨髓抽吸的方法和装置,其中一系列线从腔部分引导至静脉内溶液来源。抽吸针、静脉内溶液的第二来源和适当的分离或收集来源。腔部分能够同时施加负压至从静脉内溶液源引导的溶液线,以便准备好它们并且清除它们的任何空气。然后闭合溶液线并且施加正压,以重新引导静脉内溶液进入供体,同时施加负压,以将骨髓材料吸收至腔,用于和静脉内溶液混合,其后施加正压以将静脉内溶液和骨髓材料的混合物转移至分离或收集源。

[0056] 在另一实施方式中,干细胞和 / 或祖细胞分离自外周血液。收集外周血液的方法是本领域已知的,并且任何已知的方法可用于收集外周血液。

[0057] 在一个实施方式中,干细胞和 / 或祖细胞是纯化的骨髓内皮祖细胞。通过使用系细胞消耗试剂盒,消耗系⁺(Lin⁺)细胞的骨髓(BM)或外周血液纯化内皮祖细胞(EPC)。用抗 c-Kit、抗 FLK-1 或 EPC 的本领域技术人员已知的任何其他标记物,比如 CD34 使 Lin 细胞染色。也用 7-氨基-放线菌素 D(7-AAD) 标记细胞,以区分活细胞和死细胞。c-Kit⁺7-AAD Flk-1⁺群体表示纯化的活 EPC。可通过本领域已知的任何方法进行细胞分选,以分选细胞。优选的分选程序是通过荧光激活细胞分选(FACS)。内皮祖细胞的磁珠细胞分选(MACS)是优选的。Miltenyi 等,Cytometry. 11:231-238(1990) 描述了常规的 MACS 程序。尤其优选的分选程序是无标签分选方法。可使用本领域技术人员熟知的技术分离和纯化 EPC。

[0058] 可体外扩展本文提供的干细胞和 / 或祖细胞一段时间,然后使用本领域已知的细胞培养方案施用至个体。用于体外生长和扩展 EPC 的方法可以是,例如,比如 Eggermann 等,Cardiovascular Research. 58:478-486(2003) 描述的那些。在一些方法中,细胞可使用本领域已知的分化方案体外分化成内皮系的细胞。用于扩展和将干细胞分化成内皮细胞的方法可以是,例如,比如 Li 等,Stem Cells and Development. 20:1701-1710(2011) 描述的那些。

[0059] 在一个实施方式中,干细胞和 / 或祖细胞是同种异体细胞。如本文所使用,术语“同种异体”表示细胞获得自如对象接收细胞相同物种的遗传上不同的供体。同种异体细胞可由与对象不相关的来源捐献,但是优选地是非常亲近的亲属,最优选地对象的家庭成员,比如对象的父母或兄弟姐妹。

[0060] 在一个实施方式中,干细胞和 / 或祖细胞是自体细胞。如本文所使用,术语“自体”表示细胞获得自需要治疗和 / 或预防糖尿病的同一样本。自体细胞的使用可提供某些优势,包括不需要免疫抑制剂和 / 或避免从另一个体意外传播致病因子。

[0061] 在一个实施方式中,当收获和 / 或体外扩展细胞时,通过简单离心浓缩细胞。细胞可进一步冲洗和再悬浮在最终临床上使用的溶液,比如生理盐水,缓冲的生理盐水或,可选地,再悬浮在冷冻介质比如介质加二甲亚砜,或任何其他适当的冷冻保护剂,并且冷冻用于储存。

[0062] 本公开也提供了基因修饰的干细胞和 / 或祖细胞。在一些实施方式中,干细胞和

/ 或祖细胞是用下述基因修饰的：1) 外源 VEGF 核酸；2) 外源 ANG-2 核酸；3) 外源 VCAM 核酸；4) 外源 HGF 核酸；5) 外源 CADHERIN 核酸；或 6) 上面提到的核酸的任何组合。术语“基因修饰”指细胞中引入外源核酸序列之后，诱导的永久性或瞬时基因改变。“外源核酸序列”是通常或天然不出现在和 / 或天然细胞产生的序列。在一些实施方式中，细胞是体外基因修饰。将核酸引入细胞的方法是本领域已知的，并且任何已知的方法可用于将核酸引入细胞。适当的方法包括，例如感染、脂质转染、电穿孔、微注射、磷酸钙沉淀、DEAE- 葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染等。

[0063] 本公开也考虑有或没有干细胞和 / 或祖细胞的抗原特异性疗法。

[0064] 在任何上述方法或组合物的实施方式中，至少一种抗原特异性疗法是免疫球蛋白 - 多肽嵌合体。

[0065] 如本文所使用，术语“抗原特异性疗法”涉及其中免疫球蛋白 (Igs) 用于递送用于抑制病理学免疫应答的自体肽和改变的自体肽的治疗。基因修饰以表达疾病特异性肽的 Ig 在本文称为“免疫球蛋白 - 多肽嵌合体”或“Ig- 嵌合体”。对应疾病特异性 T 细胞或 B 细胞抗原决定部位的肽可被基因修饰成 Ig，以使得下调病原性免疫应答和治疗自身免疫性疾病，如 T1D。递送 Ig- 嵌合体相对于游离肽明显增加对 T 细胞的呈递 (Legge 等, J. Exp. Med. 191:2039-2051 (2011) ;Zaghouani 等, Science. 259:224-227 (1993))。

[0066] 在本公开的仍另一实施方式中，免疫球蛋白或其上的部分可以是人的或人源化的，比如，例如，人 IgG，比如 IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 / 或 IgG4。

[0067] 在一些实施方式中，肽插入免疫球蛋白或其部分的可变区，并且免疫球蛋白或其部分，包括人 IgG 或人源化的 IgG。

[0068] 在仍另一实施方式中，肽插入免疫球蛋白或其部分的至少一个可变区，包括互补决定区 (CDR) CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区域。说明性地，通过缺失 D 区段和插入肽，将肽插在免疫球蛋白或其部分的 CDR3 区域中。(Legge 等, J. Exp. Med. , 191:2039-2052 (2000) ;Legge 等, J. Exp. Med. , 196:217-227 (2002) ;Gregg 等, J. Immunol. , 173:7308-7316 (2004) ;Gregg 等, J. Immunol. , 174:662-670 (2005))。技术人员可容易制备大规模转染瘤并且通过柱分离纯化 Ig- 嵌合体。(Jain 等, J. Exp. Med. , 205:207-218 (2008))。

[0069] 在一个实施方式中，用于下调致糖尿病 T 细胞的抗原特异性疗法包括与蛋白质片段或肽连接的免疫球蛋白或其部分。在仍另一实施方式中，免疫球蛋白，或其部分，可结合或能够结合 Fc 受体。

[0070] 在本公开的实施方式，免疫球蛋白 - 多肽嵌合体包括具有 CDR3 区域的免疫球蛋白，和其中肽插在 CDR3 区域中。

[0071] 在一个实施方式中，肽包括致糖尿病 T 细胞抗原决定部位。在另一实施方式中，肽包括后期抗原决定部位，其是在糖尿病晚期检测到的抗原决定部位。在其他实施方式中，肽源自 GAD65。在其他实施方式中，肽源自胰岛素。在其他实施方式中，肽源自 IA-2。在其他实施方式中，肽源自 ZnT8。在仍其他实施方式中，肽源自 IGRP。

[0072] 在一个实施方式中，致糖尿病抗原决定部位包括 GAD2 (SEQ ID NO:1)。

[0073] 在一个实施方式中，致糖尿病抗原决定部位包括 GAD1 (SEQ ID NO:2)。

[0074] 在一个实施方式中，致糖尿病抗原决定部位包括 INS β (SEQ ID NO:3)。

[0075] 在一些实施方式中，免疫球蛋白是可溶的，例如，可溶的 Ig-GAD2、可溶的 Ig-GAD1

或可溶的 Ig-INS β 。

[0076] 在本公开的仍另一实施方式中,免疫球蛋白-多肽嵌合体是聚集的。嵌合体可通过用 50% - 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀而聚集,如先前在 Chase 等, *Methods in Immunology and Immunochemistry*. 2 :249 - 341 (1968) 中描述或使用本领域技术人员已知的其他技术。

[0077] 治疗方法

[0078] 本公开也考虑治疗或预防对象中糖尿病的方法,包括向对象施用包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法的组合物。

[0079] 在一个实施方式中,细胞被浓缩或稀释至适当的密度,其可以与施用细胞的细胞密度相同或不同。细胞可用药理学上可接受载体浓缩或稀释。如本文所使用,术语“药理学上可接受的载体”指稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介,利用其施用本公开的干细胞和 / 或祖细胞并且其被联邦或州政府批准或列在美国药典或其他用于动物,和更尤其人的一般认可的药典中。主要的药理学载体可以是液体,比如水和油,包括下述那些:石油、动物、蔬菜或合成来源的,比如花生油、大豆油、矿物质油、芝麻油等。药理学载体可以是生理盐水、金合欢树胶、明胶、淀粉糊剂、滑石、角质、胶体二氧化硅、尿素等。当施用至患者时,干细胞和 / 或祖细胞和药理学上可接受的载体可以是无菌的。当干细胞和 / 或祖细胞静脉内施用时,水是有用的载体。生理盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液也可用作液体载体,尤其用于可注射的溶液。适当的药理学载体也包括赋形剂比如葡萄糖、乳糖、蔗糖、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。本组合物,如果需要,也可包含小量的湿润或乳化剂,或 pH 缓冲剂。本组合物有利地可采用溶液、乳液、持续释放的制剂形式,或适于使用的任何其他形式。选择适当的载体本领域普通技术人员的范围内。

[0080] 在一个实施方式中,细胞被浓缩的密度为约 1,000 至约 200,000 个细胞 / 微升。在一个实施方式中,使用的密度是约 5,000 至约 50,000 个细胞 / 微升。在另一实施方式中,使用的密度是约 10,000 至 30,000 个细胞 / 微升。

[0081] 一般而言,包括干细胞和 / 或祖细胞的组合物可施用的每个剂量的范围为 10. sup. 5-10. sup. 8 细胞每 kg 体重,优选地范围是 10. sup. 6-10. sup. 7 细胞每 kg 体重。细胞剂量取决于比如注射位点、施用途径、疾病状态,对于有益作用必须的最小剂量,和考虑的毒副作用的因素。技术人员根据患者的具体情况,可容易确定优选的施用方案。

[0082] 其中悬浮干细胞和 / 或祖细胞用于递送至治疗区域的溶液(例如,药理学上可接受的载体)的体积本文可称为注射体积。注射体积取决于许多因素,包括注射位点、施用细胞的数量和疾病的状态。更具体而言,注射体积的下限可由高细胞密度的黏性悬液的实际液体处理以及细胞聚簇的趋势确定。注射体积的上限可通过注射体积展示的必须避免宿主组织损伤的压缩力的限制,以及实际的外科手术时间确定。

[0083] 在一个实施方式中,包括大量的干细胞和 / 或祖细胞的组合物可根据已知的方法施用至对象,比如静脉内给药,例如,作为药丸或通过在规定时间内通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入路径持续注入。静脉内、腹膜内或皮下施用细胞是优选的,静脉内或腹膜内路径是尤其优选的。可通过注射至门静脉施用于干细胞和 / 或祖细胞;但是,本领域熟知的可使用其他细胞施用方案。

[0084] 在一个实施方式中,本发明干细胞和 / 或祖细胞的组合物配制为可注射的制剂并且包括,例如,适于静脉内递送的活性成分的水溶液或悬液。当制备用于注射,尤其用于静

脉内递送的组合物时,可存在连续相,其包括张力调节剂的水溶液,缓冲至 pH 小于约 7,或小于约 6,例如约 2 至约 7,约 3 至约 6 或约 3 至约 5。张力调节剂可包括,例如,氯化钠、葡萄糖、甘露醇、海藻糖、甘油、或其他药物制剂,其使得制剂的渗透压力与血液等渗。可选地,当大量的张度修饰剂用于制剂时,其可被稀释然后与药学上可接受的稀释剂一起注射以使得混合物与血液等渗。

[0085] 在另一实施方式中,通过静脉内 (IV) 注入或动脉内施用在期望的时间段内 (例如,弹丸注射 5min、15min、30min、1hr、2hr、3hr、6hr、24hr、48hr、72hr 或 96 小时注入) 施用本发明的组合物。在本发明的一个实施方式中,施用的时间段不大于约 3 小时。

[0086] 在一个实施方式中,用同种异体细胞移植的本公开的治疗涉及施用包括一个或多个免疫抑制剂的组合物以控制干细胞和 / 或祖细胞的排斥。优选的免疫抑制剂包括但不限于强的松、甲基去氢氢化可的松、硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢素、巴利昔单抗、他克莫司、吗替麦考酚酯或西罗莫司。用于这样的免疫抑制剂的制剂和给药方案可使用根据制造商的说明或从业者凭经验确定。

[0087] 在本发明的一个实施方式中,细胞施用一次。在另一实施方式中,每天 (或每天 1 至 5 次)、每周或每月施用细胞。说明性地,每周施用细胞三周,并且这样的施用实现,例如, T1D 的抑制。但是,其他施用方案是本文可操作的。优选的施用方案取决于治疗的具体对象、疾病状态、施用的干细胞和 / 或祖细胞的类型,和熟练的从业者熟知的其他因素。

[0088] 在任何上述的方法的一些实施方式中,施用包括大量的干细胞和 / 或祖细胞的组合物施用一次。在任何上述方法的一些实施方式中,施用初始剂量的包括大量的干细胞和 / 或祖细胞的组合物,接着施用一个或多个随后剂量。可用于本公开方法的给药方案的例子 (例如,第一次给药和一个或多个随后给药之间的间隔) 包括约每周一次至约每 12 个月一次的间隔,约每两周一次至约每 6 个月一次的间隔,约每个月一次至约每 6 个月一次的间隔,约每个月一次至约每 3 个月一次的间隔,或约每 3 个月一次至约每 6 个月一次的间隔。在一些实施方式中,每月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月或 T1D 复发时施用。

[0089] 本发明也涉及治疗或预防 T1D 的治疗性方法,其中用抗原特异性疗法的治疗是明示的。

[0090] 在本公开的一种实施方式中,每天 (或每天 1 至 5 次)、每周或每月施用抗原特异性疗法。说明性地,一周施用组合物三次持续五周并且然后每周一次,持续另外的五周,并且这样的施用实现了例如 T1D 的抑制。

[0091] 可施用的剂量和给药方案提供最佳期望的响应 (例如,治疗响应)。抗原特异性疗法的剂量可测量为单位 mg/kg 患者体重。可选地,抗原特异性疗法的剂量测量为单位 mg/kg 患者瘦体重 (例如,体重减去身体脂肪含量)、单位 mg/m² 的患者身体表面积,或单位 mg/ 施用至患者的剂量 (例如,固定剂量)。剂量的任何测量可结合本发明的组合物和方法使用并且剂量单位可通过本领域标准转换。

[0092] 方法包括施用本发明的抗原特异性疗法至需要其的对象。在一个实施方式中,预防、缓解或减轻 T1D 的给药方案对应一天一次或一天两次剂量,并且可包括,例如,约 0.0001mg/kg、约 0.0005mg/kg、约 0.001mg/kg、约 0.01mg/kg、约 0.05mg/kg、约 0.1mg/kg、约 0.5mg/kg、约 1mg/kg、约 2mg/kg、约 5mg/kg、约 10mg/kg、约 15mg/kg、约 20mg/kg、约 30mg/

kg、约 40mg/kg、约 50mg/kg、约 60mg/kg、约 70mg/kg、约 80mg/kg、约 90mg/kg、约 100mg/kg、约 110mg/kg、约 120mg/kg、约 130mg/kg、约 140mg/kg、约 150mg/kg、约 160mg/kg、约 170mg/kg、约 180mg/kg、约 190mg/kg、约 200mg/kg、约 220mg/kg、约 240mg/kg、约 250mg/kg、约 500mg/kg、约 750mg/kg 或约 1,000mg/kg (按对象的体重计) 本发明的抗原特异性疗法的剂量,并且可根据各种因素修改。这些具体的 mg/kg 量可以改变,例如、约 0.01% 至约 20% 或更多,这取决于应用和期望的治疗结果。其他因素包括对象的类型、年龄、体重、性别、膳食和对象的医学条件以及疾病的严重程度。因此,实际采用的给药方案可非常不同并且所以偏离上面阐释的给药方案。

[0093] 用于任何上述方法的抗原特异性疗法可以以一个或多个剂量施用 (例如,初始剂量任选地随后一个或多个随后剂量)。本领域技术人员认识到与维持方案相比,对于初始治疗剂量一般更大和 / 或施用频率更大。在某些实施方式中,施用两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、十个或更多个或十一个或更多个随后的抗体剂量。上述的剂量指 mg (抗原特异性疗法) / kg (待治疗个体的体重)。

[0094] 用于任何上述方法的抗原特异性疗法可作为固定剂量施用,不依赖于剂量每个对象体重比。

[0095] 在一些实施方式中,以一个或多个固体剂量施用抗原特异性疗法:约 1000mg 或更少、500mg 或更少、或 250mg 或更少、100mg 或更少、90mg 或更少、80mg 或更少、70mg 或更少、60mg 或更少、50mg 或更少、40mg 或更少、30mg 或更少、20mg 或更少,或 10mg 或更少的抗原特异性疗法。在一些实施方式中,以至少 0.5mg、至少 1mg 的抗原特异性疗法,或至少 10mg 的抗原特异性疗法,施用一个或多个剂量的抗原特异性疗法。在一些实施方式中,以一个或多个剂量的 1mg 至 100mg 的抗原特异性疗法,施用其抗原特异性疗法。

[0096] 在某些实施方式中,固定剂量抗原特异性疗法是约 1mg 至约 10mg、约 1mg 至约 25mg、约 10mg 至约 25mg、约 10mg 至约 50mg、约 10mg 至约 100mg、约 25mg 至约 50mg、约 25mg 至约 100mg、约 50mg 至约 100mg、约 50mg 至约 150mg、约 100mg 至约 150mg、约 100mg 至约 200mg、约 150mg 至约 200mg、约 150mg 至约 250mg、约 200mg 至约 250mg、约 200mg 至约 300mg、约 250mg 至约 300mg、约 250mg 至约 500mg、约 300mg 至约 400mg、约 400mg 至约 500mg、约 400mg 至约 600mg、约 500mg 至约 750mg、约 600mg 至约 750mg、约 700mg 至约 800mg、或约 750mg 至约 1000mg。在一些实施方式中,其抗原特异性疗法的固定剂量小于 100mg。

[0097] 在各种实施方式中,本发明的剂量单位包含,例如,约 1ng 至约 2000mg、约 0.001mg 至约 750mg、约 0.01mg 至约 500mg、约 0.1mg 至约 300mg 或约 1mg 至约 100mg 的本发明的抗原特异性疗法。说明性地,这样的单位剂量形式可包含约 0.001mg、或约 0.01mg、或约 0.1mg、或约 1mg、或约 2mg、或约 5mg、或约 10mg、或约 15mg、或约 20mg、或约 30mg、或约 40mg、或约 50mg、或约 60mg、或约 70mg、或约 80mg、或约 90mg、或约 100mg、或约 110mg、或约 120mg、或约 130mg、或约 140mg、或约 150mg、或约 160mg、或约 170mg、或约 180mg、或约 190mg、或约 200mg、或约 300mg、或约 400mg、或约 500mg、或约 750mg、或约 1,000mg 的本发明的抗原特异性疗法。

[0098] 说明性地,剂量单位每个包含约 0.1mg、约 1mg、约 5mg、约 10mg、约 15mg、约 20mg、约 40mg、约 80mg、约 100mg、约 250mg、约 500mg、或约 1000mg 的本发明的抗原特异性疗法。可

选择剂量单位形式,以调整期望的用于实现具体每日剂量的施用频率。在一个实施方式中,以足够至约 0.1 至约 15mg、约 0.5 至约 10mg,和或约 1 至约 5mg 的活性试剂,例如 Ig-GAD2, Ig-GAD1 等将本发明的组合物施用至对象。

[0099] 在任何上述方法的一些实施方式中,施用抗原特异性疗法一次,以治疗或预防 T1D。在任何上述方法的一些实施方式中,施用初始剂量的抗原特异性疗法随后施用一个或多个随后剂量。可用于本公开方法的给药方案(例如,第一剂量和一个或多个随后剂量之间的间隔)的例子包括约每周一次至约每 12 个月一次的间隔、约每两周一次至约每 6 个月一次的间隔、约每个月一次至约每 6 个月一次的间隔、约每个月一次至约每 3 个月一次的间隔,或约每 3 个月一次至约每 6 个月一次的时间间隔。在一些实施方式中,每月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月或 T1D 复发时施用。

[0100] 本公开也提供了用于任何上述方法的给药方案,其中对于施用抗原特异性疗法给药方案包括大于一个给药间隔。在一些实施方式中,给药方案对于施用抗原特异性疗法包括至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个)不同的给药间隔。在一些实施方式中,给药方案对于施用抗原特异性疗法包括两个不同的给药间隔。在一些实施方式中,对于施用抗原特异性疗法,给药方案包括两个不同的给药间隔,其中第一给药间隔包括施用一个或多个剂量的其抗原特异性疗法和第二给药间隔包括施用一个或多个剂量的其抗原特异性疗法,和其中第一给药间隔时间上比第二给药间隔更短。例如,第一给药间隔可以是数天或周,和第二给药间隔可以是数月。在一些实施方式中,第一给药间隔是约 5 天至约 28 天、约 7 天至约 21 天、约 12 天至约 16 天,或约 14 天。在一些实施方式中,第二给药间隔是约 1 个月至约 3 个月、约 1 个月至约 2 个月,或约 1 月。

[0101] 在任何上述方法的一些实施方式中,剂量可升高或下降,以维持血液或组织,比如,但不限于胰腺中的恒定剂量。在相关的实施方式中,剂量升高或下降约 2%、5%、8%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、和 95%,以便维持期望水平的抗原特异性疗法。

[0102] 在任何上述方法的一些实施方式中,抗原特异性疗法施用至对象,使得剂量之间的间隔是足够维持所述抗原特异性疗法在对象中的血浆浓度为至少约 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、至少约 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 、至少约 1 $\mu\text{g/ml}$ 或至少约 2 $\mu\text{g/ml}$ 水平的时间。在一些实施方式中,这些血浆浓度值指为用根据本文公开的抗原特异性疗法治疗的个体获得的值。

[0103] 在任何上述方法的一些实施方式中,施用初始剂量的抗原特异性疗法,随后施用一个或多个随后剂量,和其中所述一个或多个随后剂量的量与初始剂量大约相同或更小。

[0104] 在任何上述方法的一些实施方式中,施用初始剂量的抗原特异性疗法,随后施用一个或多个随后剂量,和其中至少一个随后剂量的大于初始剂量。

[0105] 在任何上述方法的一些实施方式中,施用抗原特异性疗法,其中施用初始剂量的抗原特异性疗法,随后施用一个或多个随后剂量,和其中在用所述初始剂量和一个或多个随后剂量的治疗期间的施用之间,所述抗原特异性疗法在人的血浆浓度允许下降低于约 0.1 $\mu\text{g/mL}$,约 0.07 $\mu\text{g/mL}$,约 0.05 $\mu\text{g/mL}$,约 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 或约 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 水平的时间大于约 1 周和小于约 6 月。在一些实施方式中,血浆浓度值指为用根据本文公开的抗原特异性疗法治疗的个体获得的值。

[0106] 对于引起疗效必要的抗原特异性疗法的量可通过实验基于下述而确定:例如基

于抗原特异性疗法在血液血清中的吸收速度、原特异性疗法的生物利用度和内化程度和 Ig- 嵌合体肽的呈递。但是, 应理解用于具体对象的本发明的抗原特异性疗法的具体剂量水平取决于各种因素, 包括采用的具体化合物的活性、对象的年龄、体重、一般健康、性别和膳食 (包括, 例如, 对象是否禁食或进食状态)、施用的时间、排泄速度、药物组合、糖尿病的严重程度和施用的形式。治疗剂量一般可滴定至优化的安全性和效力。典型地, 来自体外和 / 或体内测试的剂量 - 效应关系初始可提供对对象施用的适当剂量的有用指导。动物模型中的研究一般可用于和治疗根据本发明的糖尿病不是或疾病的有效剂量指导。根据治疗方案, 应当认识到待施用的剂量取决于数个因素, 包括施用的具体抗原特异性疗法、施用的路径、具体的对象的病况等。一般而言, 人们期望施用大量的抗原特异性疗法一段时间, 其引起期望的疗效, 例如, 使血糖水平降低至可接受的水平, 或改善或消除症状, 和由本领域技术人员选择为适当测量的其他指示。这些参数的测定是本领域熟知的。

[0107] 在一些实施方式中, 包括抗原特异性疗法的组合物可根据已知的方法施用至对象, 比如静脉内给药, 例如, 作为药丸或通过持续注入一段时间, 通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入路径。静脉内、腹膜内或皮下施用细胞是优选的, 静脉内或腹膜内路径是尤其优选的。

[0108] 在一个实施方式中, 本发明的抗原特异性疗法配置为可注射的制剂并且包括, 例如, 适于静脉内递送的活性成分的水溶液或悬液。当制备用于注射, 尤其用于静脉内递送的抗原特异性疗法时, 可存在连续相, 其包括张力调节剂的水溶液, 缓冲至 pH 小于约 7, 或小于约 6, 例如约 2 至约 7, 约 3 至约 6 或约 3 至约 5。张力调节剂可包括, 例如, 氯化钠、葡萄糖、甘露醇、海藻糖、甘油, 或使得制剂的渗透压与血液等渗的其他药物制剂。可选地, 当更大量的张度修饰剂用于制剂时, 其可被稀释然后与药学上可接受的稀释剂一起注射, 以使得混合物与血液等渗。

[0109] 在另一实施方式中, 通过静脉内 (IV) 注入或动脉内施用在期望的时间内施用本发明的抗原特异性疗法 (例如, 弹丸注射, 5min、15min、30min、1hr、2hr、3hr、6hr、24hr、48hr、72hr 或 96 小时注入)。在本发明的一个实施方式中, 施用的时间段大于约 3 小时。

[0110] 在本发明的另一实施方式中, 本发明的抗原特异性疗法为固体剂型, 例如片剂 (包括但不限于可吞咽的片剂、咀嚼片剂、悬浮片剂等)、胶囊、囊片、锭剂、锭片、粉末、颗粒剂等。通过混合治疗剂与药学赋形剂, 以形成包含治疗剂和赋形剂的均质混合物的固体预制剂组合物来说明性地制备固体组合物。当提及这些预制剂化合物为均质的时, 意思是试剂基本上均匀遍及组合物分布, 从而组合物可容易等同细分为有效的单位剂量形式, 比如片剂、丸剂和胶囊。该固体预制剂然后细分为本文所述类型的单位剂量形式。

[0111] 压缩片剂是通过压缩包含抗原特异性疗法和赋形剂的制剂制备的固体剂型, 所述赋形剂选择为有助于加工和改善产品的特性。术语“压缩片剂”一般指用于口服吞咽的未包衣的素片剂, 其通过单个压缩或通过预压缩开孔随后最终压缩制备。

[0112] 本发明的固体剂型可以是包衣的或以其他方式化合, 以提供给予改善的处理或储存特征优势的剂型。例如, 片剂或丸剂可包括内剂量和外剂量组分, 后者为前者上的包膜形式。

[0113] 本发明的抗原特异性疗法可进一步包括一个或多个药学上可接受的赋形剂。适当的赋形剂是制药学上任何那些常用的赋形剂并且应基于和药物制剂的相容性以及期望的

剂型的释放曲线特性选择。任何适当的赋形剂可存在于本发明的组合物的量为约 1% 至约 80%、约 2% 至约 70%、约 3% 至约 60%、约 4% 至约 50% 或约 5% 至约 40%，按重量计。

[0114] 示意性药学赋形剂类型包括粘合剂、崩裂剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、防腐剂、润滑剂、湿润剂、稀释剂、制片剂、助流剂等。

[0115] 在一个实施方式中，本发明的组合物包括防腐剂。示意性防腐剂包括苯扎氯铵，对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、氯代丁醇、苯甲醇、苯酚、苯甲酸钠或 EDTA。

[0116] 示意性粘合剂包括阿拉伯胶、藻酸和其盐、纤维素衍生物、甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、硅酸铝镁、聚乙二醇、树胶、多糖酸、膨润土、羟丙基甲基纤维素、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮 / 乙酸乙烯酯共聚物、交聚维酮、聚维酮、聚甲基丙烯酸酯、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、淀粉、预糊化淀粉、乙基纤维素、黄蓍胶、糊精、微晶纤维素、蔗糖或葡萄糖等。

[0117] 示意性崩裂剂（也称为崩解剂）包括淀粉、预糊化玉米淀粉、预糊化淀粉、纤维素、交联羧甲基纤维素、羟甲基淀粉钠、交聚维酮、交联聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠、钙、藻酸钠复合物、粘土、藻酸盐、树胶或羟甲基淀粉钠，和用于固体制剂的任何崩解剂。

[0118] 示意性填充剂包括乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉末、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预糊化淀粉、蔗糖、木糖醇、拉克替醇、甘露醇、山梨糖醇、氯化钠、聚乙二醇等。

[0119] 示意性表面活性剂包括月桂基硫酸钠，单油酸脱水山梨糖醇酯，聚氧乙烯单油酸脱水山梨糖醇酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆、胆盐、单硬脂酸甘油酯、Pluronic™ 系（BASF）等。

[0120] 示意性增溶剂包括柠檬酸、琥珀酸、反式丁烯二酸、苹果酸、酒石酸、马来酸、戊二酸碳酸氢钠和碳酸钠等。

[0121] 也可使用示意性稳定剂比如抗氧化剂、缓冲液或酸等。

[0122] 示意性润滑剂包括硬脂酸镁、氢氧化钙、滑石、硬脂酰醇富马酸钠、氢化植物油、硬脂酸、山嵛酸甘油酯（glyceryl behapate）、硬脂酸镁、硬脂酸钙和硬脂酸钠、硬脂酸、滑石、蜡、Stearowet、硼酸、苯甲酸钠、醋酸钠、氯化钠、DL- 亮氨酸、聚乙二醇、油酸钠或月桂基硫酸钠等。

[0123] 示意性湿润剂包括油酸、单硬脂酸甘油酯、单油酸脱水山梨糖醇酯、山梨糖醇酐一月桂酸、三乙醇油酸胺、聚氧乙烯单油酸脱水山梨糖醇酯、聚氧乙烯山梨糖醇酐一月桂酸、油酸钠或月桂基硫酸钠等。

[0124] 示意性稀释剂包括乳糖、淀粉、甘露醇、山梨糖醇、右旋糖、微晶纤维素、磷酸氢钙、基于蔗糖的稀释剂、糖果的糖、硫酸二氢钙一水化物、硫酸钙二水合物、乳酸钙三水合物、葡萄糖结合剂、肌醇、水解谷类固体、直链淀粉、粉末纤维素、碳酸钙、甘氨酸或膨润土等。

[0125] 示意性抗粘附剂或助流剂包括滑石、玉米淀粉、DL- 亮氨酸、月桂基硫酸钠，和硬脂酸镁、硬脂酸钙，或硬脂酸钠等。

[0126] 示意性药学上兼容的载体包括阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糊精、丙三醇、硅酸镁、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、氯化钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、硬脂酰基乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯或预糊化淀粉等。

[0127] 另外，药物制剂讨论在，例如，Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975 中。药物制剂的另一讨论可

见 Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Decker, New York, N. Y., 1980。

[0128] 在制备本发明的组合物时,个体组分可与药学上可接受的赋形剂混合,被赋形剂稀释或包裹在胶囊、小袋、纸或其他容器中。

[0129] 当赋形剂用作稀释剂时,其可以是固体、半固体或液体材料,其用作活性成分的媒介、载体或介质。因此,组合物可为下述形式:片剂、丸剂、粉末、锭剂、小袋、扁囊剂、酏剂、锭剂、悬浮、乳液、溶液、糖浆剂、气溶胶(作为固体或在液体介质)、软胶囊和硬胶囊、无菌包装的粉末,可分散式粉末、细粒或液体。

[0130] 在本发明的一个实施方式中,制造工艺可采用下述一个方法或组合:(1)干燥混合、(2)直接压缩、(3)研磨、(4)干燥或非水性成粒,(5)湿式成粒,或(6)融合。Lachman等, *Theory and Practice of Industrial Pharmacy* (1986)。这样的片剂也可包括薄膜包衣,其当口服吞咽或当接触稀释剂时崩裂。

[0131] 遭受糖尿病的对象用抗原特异性疗法治疗的的初始治疗指示为可以上述指示的剂量进行。治疗通过继续需要的时间段,数小时、数天、数周至数月或数年直到病况或不适已经被控制或消除。在一个实施方式中,本发明的组合物可以以多个剂量施用至对象。说明性地,这样的施用可包括每小时、每天、每周、每两周、或每月持续(例如,通过渗透泵、包装、凝胶、乳霜或注入设备施用)施用组合物任何期望的时间段,例如约1周、约2周、约1个月或更长、约3个月或更长、约6个月或更长、约9个月或更长、约1年或更长、约3年或更长、约5年或更长的时间,或贯穿对象的生命。

[0132] 可通过本领域熟知的任何方法常规监测用本文公开的抗原特异性疗法进行治疗的对象,以确定疗法的效力。持续分析这样的数据允许修饰疗法期间的治疗方案,从而在任何时间点使用最佳有效量的本发明的抗原特异性疗法,并且从而也可测定治疗的持续时间。这样,可在疗法期间合理修饰治疗方案/给药方案,从而使用展示满意效力的最低量的抗原特异性疗法,并且从而继续施用仅仅只要必须成功治疗病况或不适。

[0133] 在一些实施方式中,可共施用干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法。组成疗法的干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法可以是组合的剂型或期望基本上同时施用的分开剂型。也可顺序施用干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法,通过称为多步骤施用的方案施用干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法。因此,方案可需要顺序施用干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法,间隔开施用分开的活性试剂。多个施用步骤之间的时间段的范围可以是,例如,数分钟至数个小时至数天,这取决于干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法的特性,比如治疗性化合物的效价、溶解度、生物利用度、血浆半衰期和动力学特点,以及取决于对象的食物吞咽和年龄和条件。靶分子浓度的生理节律变化也可决定最佳剂量间隔。是否同时、基本上同时,或顺序施用干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法,可涉及称为通过静脉内路径和通过口服路径、经皮路径、静脉内路径、肌内路径的抗原特异性疗法,或通过例如经粘膜组织直接吸收施用干细胞和/或祖细胞的方案。无论干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法是否口服,通过吸入喷雾、直肠、局部、口腔(例如,舌下),或肠胃外(例如,皮下、肌内、静脉内和皮内注射,或注入技术),分别或一起施用,每个这样的治疗性化合物包含在药学上可接受的赋形剂、稀释剂或其他制剂组分的适当药物制剂中。

[0134] 组合

[0135] 本方法也可用于与另一药物制剂组合（“组合疗法”），所述另一药物制剂指示治疗、预防、抑制或延迟 T1D 的出现，比如，例如，胰岛素、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、胰岛素敏化剂、抗体或高血糖试剂，其通常施用以治疗与该不适相关的症状和 / 或并发症。与抗体的组合疗法用于治疗、预防、抑制或延迟 T1D 的出现，包括，例如，短程抗 CD3 单克隆抗体疗法。这些药物具有与它们的使用相关的某些缺点。一些这些药物不完全有效治疗上述病况和 / 或产生不利的副作用，比如低血糖症、微血管疾病和大血管疾病。但是，当结合本发明使用，即，在组合疗法中时，如果不是全部的话，许多这些有害的副作用可被降低或消除。这些药物降低的副作用特征一般归因于例如，减少与施用的组合一起实现疗效必要的剂量。

[0136] 如本文所使用，短语“组合疗法”指结合另一药物制剂施用一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法。

[0137] 短语“组合疗法”包括结合另一药物制剂施用本发明的组合物，作为具体治疗方案的一部分旨在从这些治疗剂对于治疗 T1D 的协同作用提供有益的作用，所述另一药物制剂指示在对象中治疗或预防 T1D。组合的有益作用包括但不限于源自治疗剂组合的药物代谢动力学或药效协同作用。组合施用这些治疗剂通常在限定的时间段内进行（通常基本上同时、数分钟、数小时、数天、数周、数月或数年，这取决于选择的组合）。“组合疗法”一般不旨在包括施用两个或更多个这些治疗剂作为偶然和不经意产生本发明组合的分开单药疗法方案一部分。“组合疗法”旨在包括以顺序方式施用这些治疗剂，即，其中每个治疗剂在不同的时间施用，以及以基本上同时的方式施用这些治疗剂，或至少两个治疗剂。可例如通过施用至对象具有固定比例的每个治疗剂的单个注射、片剂或胶囊，或以每个治疗剂的多个、单个注射、胶囊或片剂实现基本上同时施用。可通过任何适当的路径实现顺序或基本上同时施用每个治疗剂。例如，本发明的组合物可口服、经皮、静脉内、肌肉内、和 / 或通过粘膜直接吸收施用，而组合的另一治疗剂或试剂可通过用于该具体试剂或多个试剂的任何适当的路径施用，包括但不限于口服路径、经皮路径、静脉内路径、肌肉内路径，或通过经粘膜组织的直接吸收。不限制施用治疗剂的顺序。“组合疗法”也可包括以与其他生物活性成分的进一步组合施用如上述的治疗剂，所述其他生物活性成分是比如，但不限于（1）消炎药，比如甾族或非甾族消炎药药物，和 / 或 5-脂氧合酶抑制剂；或（2）治疗心血管疾病或不适的试剂，比如，例如，抗高血压药试剂，包括，例如，血管紧张肽转化酶抑制剂（ACE-抑制剂）、 α -肾上腺素能激动剂、 β -肾上腺素能激动剂、 α -肾上腺素能阻断剂、血管紧张肽 II 受体拮抗物；利尿剂，包括，例如，醛固酮拮抗物、苯并噻二嗪衍生物、有机汞制剂、嘌呤、甾族化合物（例如，坎利酮、夹竹桃苷、螺甾内酯）、磺酰胺衍生物，或尿嘧啶；抗心绞痛剂；抗心律失常药试剂；抗动脉硬化试剂；抗高脂蛋白药试剂；抗胆结石形成试剂；抗胆固醇学试剂；抗高胆甾醇血试剂；抗高脂试剂；抗高血压药；抗低血压试剂；抗血脂试剂；钙通道阻断剂；心脏抑制剂；多巴胺受体激动剂；多巴胺受体拮抗物；HMG CoA 还原酶抑制剂；降血胆固醇试剂；降血脂剂；降血压试剂；单胺氧化酶抑制剂；肌肉松弛剂；钾通道活化剂；升压剂；血清素吸收拮抗物；血栓溶解剂；血管舒张剂；血管扩张剂；或血管保护剂（部分基于 The Merck Index, Merck&Co. Rahway, N. J. (2001) 提供的列举，其通过引用并入本文）；和与非药物治疗法组合，比如，但不限于外科手术。

[0138] 组成组合疗法的治疗性化合物可以是期望基本上同时施用的组合剂型或分开的剂型。也可顺序施用组成组合疗法的治疗性化合物，通过称为两个步骤施用的方案施用治

疗性化合物。因此,方案可需要顺序施用治疗性化合物,间隔开施用分开的活性试剂。多个施用步骤之间的时间段的范围可以是,例如,数分钟至数小时至数天,这取决于每个治疗性化合物的特性,比如治疗性化合物的效价、溶解度、生物利用度、血浆半衰期和动力学特点,以及取决于对象的食物吞咽和年龄和条件。靶分子浓度的生理节律变化也可决定最佳剂量间隔。组合的疗法是否同时、基本上同时或顺序施用,可涉及需要通过口服路径施用一个治疗性化合物和通过口服路径、经皮路径、静脉内路径、肌内路径,或通过例如经粘膜组织直接吸收施用另一治疗性化合物的方案。无论组合疗法的治疗性化合物是否口服、通过吸入喷雾、直肠、局部、口腔(例如,舌下),或肠胃外(例如,皮下、肌内、静脉内和皮内注射,或注入技术),分别或一起施用,每个这样的治疗性化合物包含在药学上可接受的赋形剂、稀释剂或其他制剂组分的适当药物制剂中。

[0139] 本公开考虑包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法的组合物。

[0140] 如本文所使用,术语“组合物”或“多个组合物”指单独干细胞和 / 或祖细胞、单独抗原特异性疗法,或干细胞和 / 或祖细胞和抗原特异性疗法的组合。

[0141] 干细胞和 / 或祖细胞和抗原特异性疗法可配制在组合物,尤其药学组合物中,用于本文公开的方法。这样的组合物在在适当的载体,例如,药学上可接受的试剂的混合物中包括大量(例如,治疗或预防性有效量)的干细胞和 / 或祖细胞和其抗原特异性疗法。典型地,干细胞和 / 或祖细胞和其抗原特异性疗法足够纯化用于施用至动物(例如,人),然后配制在药学组合物中。

[0142] 药学上可接受的试剂包括例如载体、赋形剂、稀释剂、抗氧化剂、防腐剂、着色剂、调味品和稀释剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、填充剂、疏松剂、缓冲液、递送媒介、张度剂、助溶剂、湿润剂、络合剂、缓冲剂、抗微生物剂和表面活性剂。

[0143] 中性缓冲生理盐水或与白蛋白混合的生理盐水是示例性适当的载体。药学组合物可包括抗氧化剂比如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白质,比如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物比如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸比如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖、和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂比如 EDTA;糖醇类比如甘露醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子比如钠;和 / 或非离子表面活性剂比如 Tween、pluronic 或聚乙二醇(PEG)。也作为例子,适当的张度增强试剂包括碱金属卤化物(优选氯化钠或氯化钾)、甘露醇、山梨糖醇等。适当的防腐剂包括苯扎氯铵、乙基汞硫代水杨酸钠、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、洗必泰、山梨酸等。过氧化氢也可用作防腐剂。适当的助溶剂包括甘油,丙二醇,和 PEG。适当的络合剂包括咖啡因,聚乙烯吡咯烷酮,β-环糊精或羟基丙基-β-环糊精。适当的表面活性剂或湿润剂包括山梨聚糖酯、聚山梨醇酯,比如聚山梨醇酯 80、氨基丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊等。缓冲液可以是常规的缓冲液比如乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐或 Tris-HCl。乙酸盐缓冲液可以是约 pH 4-5.5,和 Tris 缓冲液可以是约 pH 7-8.5。另外的药物制剂阐释在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990 中。

[0144] 组合物可为液体形式或为冻干或冷冻干燥的形式并且可包括一个或多个冻干保护剂、赋形剂、表面活性剂、高分子量结构添加剂和 / 或疏松试剂(见例如美国专利

6, 685, 940、6, 566, 329 和 6, 372, 716)。在一个实施方式中,包括冻干保护剂,其是非还原糖比如蔗糖、乳糖或海藻糖。一般包括的冻干保护剂的量使得,当重构时,所得制剂将是等渗的,尽管高渗或稍微低渗制剂也可能是合适的。另外,冻干保护剂的量应足够防止当冷冻干燥时,蛋白质不可接受量的降解和 / 或聚集。预冷冻干燥制剂中用于糖(例如,蔗糖、乳糖、海藻糖)的示例性冻干保护剂浓度是约 10mM 至约 400mM。在另一实施方式中,表面活性剂包括,比如例如,非离子表面活性剂和离子表面活性剂比如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80);泊洛沙姆(例如泊洛沙姆 188);聚乙二醇苯基醚(例如 Triton);十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基、肉豆蔻基、亚油基或硬脂酰磺基甜菜碱;月桂基、肉豆蔻基、亚油基或硬脂酰肌氨酸;亚油基、肉豆蔻基或十六烷基甜菜碱;月桂酰氨基丙基、椰油酰胺丙基、亚油酰胺丙基、肉豆蔻酰胺丙基、棕榈酰胺基丙基,或异硬脂酰胺基丙基甜菜碱(例如月桂酰氨基丙基);肉豆蔻酰基丙基、棕榈酰胺基丙基或异硬脂酰胺基丙基二甲胺;钠甲基椰油酰基或甲基酰基牛磺酸二钠;和 MONAQUAT™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.),聚乙二醇、聚丙二醇,和乙烯和丙二醇的共聚物(例如 Pluronic, PF68 等)。可存在于预冷冻干燥制剂中的示例性量的表面活性剂是约 0.001-0.5%。高分子量结构添加剂(例如填充剂、粘合剂)可包括例如,阿拉伯胶、白蛋白、藻酸、磷酸钙(dibasic)、纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、葡聚糖、糊精、葡萄糖结合剂、蔗糖、泰乐士、预糊化淀粉、硫酸钙、直链淀粉、甘氨酸、膨润土、麦芽糖、山梨糖醇、乙基纤维素、磷酸氢二钠、磷酸二钠、焦亚硫酸氢钠、聚乙烯醇、明胶、葡萄糖、瓜耳树胶、液体葡萄糖、可压榨的糖、硅酸铝镁、麦芽糊精、聚环氧乙烷、聚甲基丙烯酸酯、聚维酮、藻酸钠、黄蓍胶微晶纤维素、淀粉和玉米蛋白。高分子量结构添加剂的示例性浓度是按重量计 0.1% 至 10%。在其他实施方式中,可包括疏松试剂(例如,甘露醇、甘氨酸)。

[0145] 组合物可适于肠胃外施用。示例性组合物适于通过本领域可用的任何路径注射或注入动物,比如关节内、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、大脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、病灶内、直肠内、经皮、口服和吸入路径。肠胃外制剂通常是无菌的无热原等渗水溶液,任选地包含药学上可接受的防腐剂。

[0146] 水性载体包括水、醇 / 水溶液、乳液或悬液,包括生理盐水和缓冲介质。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油比如橄榄油,和可注射的有机酯比如油酸乙酯。肠胃外媒介包括氯化钠溶液, Ringer 右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸化的 Ringer,或不挥发油。静脉内媒介包括流体和养分补充剂、电解质补充剂,比如基于 Ringer 右旋糖的那些等。也可存在防腐剂和其他添加剂,比如,例如,抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。一般而言,见 Remington's Pharmaceutical Science, 第 16 版, Mack Eds., 1980, 其通过引用并入本文。

[0147] 本文所述的可药组合物配制为用于在具体局部环境中以提供产品(例如,药丸、储存作用)持续释放和 / 或增加稳定性或半衰期局部浓度的方式控制或持续递送。本发明考虑,在某些实施方式中这样的组合物可包括明显更大量的干细胞和 / 或祖细胞和抗原特异性疗法,而在任何时间点实际释放和可用的干细胞和 / 或祖细胞和抗原特异性疗法的有效量根据本文的公开是比初始存放更低的量。组合物可包括干细胞和 / 或祖细胞和其抗原特异性疗法的制剂,以及聚合化合物的微粒制剂,比如聚乳酸、聚乙醇酸等,以及试剂

比如生物可降解的基质、可注射的微球、微泡颗粒、微胶囊、可生物消化颗粒珠、脂质体和可植入的递送设备,其提供活性试剂的控制或持续释放,其然后可作为储库式注射递送。配制这样的持续或控制递送方式的技术是已知的并且已经开发了各种聚合物并且用于控制药物的释放和递送。这样的聚合物通常是生物可降解的和生物相容的。聚合物水凝胶,包括有对映体聚合物或多肽区段络合的那些,和具有温度或 pH 灵敏特性的水凝胶,可期望用于提供药物储存作用,因为捕获生物活性蛋白质试剂(例如,抗体)的温和和水性条件。见,例如,PCT 申请公开 W0 93/15722 中用于递送药学组合物的控制释放多孔聚合微粒的描述。

[0148] 用于该目的的适当的材料包括聚交酯(见,例如,美国专利 3,773,919),聚(α -羟基羧酸)的聚合物,比如聚 D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988A),L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman 等, Biopolymers, 22 :547-556(1983))、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer 等, J. Biomed. Mater. Res., 15 :167-277(1981),和 Langer, Chem. Tech., 12 :98-105(1982)), 乙烯乙酸乙烯酯,或聚 D(-)-3-羟基丁酸。其他生物可降解聚合物包括聚(内酯)、聚(缩醛),聚(原酸酯),和聚(原碳酸酯)。持续释放组合物也可包括脂质体,其可通过本领域已知的数个方法的任何一种制备(见,例如, Eppstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-92(1985))。载体本身,或其降解产品,应在靶组织中是无毒的并且不应进一步使病况恶化。这可通过在靶不适的动物模型或,如果这样的模型不可用,则在正常动物中的常规筛选确定。

[0149] 可口服施用包含干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法的某些制剂。以该方式施用的制剂可用或不用通常在化合固体剂型比如片剂和胶囊中使用的那些载体配制。例如,胶囊可设计为在胃肠道点释放制剂的活性部分,当生物利用度最大和循环前降解最小化时。可包括另外的试剂,以利于选择性粘合剂的吸收。也可采用稀释剂、风味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂和粘合剂。

[0150] 另一的制剂可涉及在与适于制造片剂的无毒赋形剂的混合物中有效量的干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法。通过将片剂溶解在无菌水,或另一适当的媒介中,溶液可制备为单位剂量形式。适当的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,比如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或粘合剂,比如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂比如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0151] 可根据本公开和制剂技术的公知常识确定适当的和/或优选的药物制剂,这取决于期望的施用路径、递送形式和期望的剂量。无论施用的方式,可根据患者体重、身体表面积,或器官尺寸计算有效剂量。用于确定与本文所述的每个制剂相关的治疗的适当的剂量的进一步优化的计算在本领域常规进行并且在本领域常规进行的工作范围内。适当的剂量可通过使用适当的剂量响应数据确定。

[0152] 药学组合物可结合其他活性试剂(例如,干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法之外的)包括干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法。可选地,药学组合物可结合其他药学组合物,包括,例如,包括一个或多个活性试剂(例如,干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法之外的)的药学组合物,包括干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法。这样的组合是用于它们期望目的的那些。是本发明一部分的组合可以是干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法,比如例如本文所述的那些,和至少一种另外的试剂。可用于下面阐释的组合的活性试剂的例子是该目的示意性的并且不旨在是限制性的。如果组合使得形成的组合

物可执行其期望的功能,组合也可包括大于一种另外的试剂,(例如,两种或三种另外的试剂)。

[0153] 本公开进一步考虑包括一个或多个其他活性试剂的另外药学组合物可分别从干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法施用(例如,同时治疗方案,对象接收同时治疗),并且这样分开的施用可同时或不同时进行,比如例如同一天或不同一天,或同一天的不同时间。其他药学组合物和/或活性试剂的施用可根据本领域已知的标准医学实践,或当结合施用干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法时,施用可被修饰(例如,剂量之间更长的间隔、更小的剂量水平、延迟开始),比如本文公开的。

[0154] 在一些实施方式中,活性试剂可包括抗微生物试剂包括,例如,抗生素比如青霉素(例如,青霉素、阿莫西林、苄青霉素、氨苄西林、沃格孟汀)、聚酮抗生素(例如,大环内酯类、阿奇霉素、红霉素、克拉霉素)、头孢菌素(例如,头孢羟氨、头孢克肟、头孢氨苄)、林可酰胺(例如,克林霉素)、喹诺酮(例如,环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星)、叶酸合成抑制剂(例如,二氢叶酸还原酶抑制剂、甲氧苄氨嘧啶、氨苯砞、复方新诺明)、四环素(例如,四环素、米诺环素、强力霉素、去甲金霉素、土霉素)、利福霉素(例如,利福平、利福布汀、利福喷丁)、磺酰胺(例如,磺胺甲基异唑、磺胺醋酰)、氨基糖苷类(例如,新霉素、阿米卡星、妥布霉素)、梭链孢酸、多肽抗生素(例如,杆菌肽、多粘菌素 B)、脂肽抗生素(例如,达托霉素)、氯霉素和莫匹罗星。

[0155] 进一步考虑根据本公开施用至对象的干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法可结合(例如,同时)至少一种另外药学组合物(例如,包括活性试剂),比如例如任何上述活性试剂治疗施用。在一个实施方式中,保持用至少一种活性试剂的治疗。在另一实施方式中,在治疗(例如,用在恒定给药方案中保持的干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法)过程期间,减少(例如,逐渐减少)或中断(例如,当对象稳定时)用至少一种活性试剂的治疗。在另一实施方式中,减少(例如,逐渐减少)或中断(例如,当对象稳定时)用至少一种活性试剂的治疗,并且减少(例如,更低的剂量、较不频繁的给药、更短的治疗方案)用干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法的治疗。在另一实施方式中,减少(例如,逐渐减少)或中断(例如,当对象稳定时)用至少一种活性试剂的治疗,并且增加(例如,更高的剂量、更频繁的给药、更长的治疗方案)用干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法的治疗。在仍另一实施方式中,保持用至少一种活性试剂的治疗并且减少或中断(例如,更低的剂量、较不频繁的给药、更短的治疗方案)用干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法的治疗。在仍另一实施方式中,减少或中断(例如,更低的剂量、较不频繁的给药、更短的治疗方案)用至少一种活性试剂的治疗和用干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法的治疗。

[0156] 在一些实施方式中,减少用至少一种活性试剂(例如,干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法之外的)的治疗是减少治疗过程期间施用的活性试剂的积累量。在一些实施方式中,减少用至少一种活性试剂(例如,干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法之外的)的治疗是减少施用的活性试剂的实际剂量。在一些实施方式中,减少用至少一种活性试剂的治疗提供全身性免疫抑制的减少。

[0157] 本公开中使用的药学组合物可包括治疗有效量的或预防性有效量的干细胞和/或祖细胞和其抗原特异性疗法。治疗有效量指以必要的剂量和时间段,有效实现期望的治疗性结果的量。治疗有效量的干细胞和/或祖细胞和抗原特异性疗法可根据下述因素变

化,比如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及抗体或抗体部分引起个体期望响应的能力。治疗有效量也是其中干细胞和 / 或祖细胞和抗原特异性疗法的任何有毒或有害作用超过治疗有益作用的量。预防性有效量指以必要的剂量和时间段有效实现期望的预防性结果的量。

[0158] 包括干细胞和 / 或祖细胞和其抗原特异性疗法的药学组合物的治疗或预防性有效量取决于例如治疗目的,比如组合物使用的症状、施用的路径,和对象的病况。以治疗或预防性有效量施用药学组合物,以治疗或预防糖尿病。

[0159] 不需进一步描述,相信本领域普通技术人员可,使用前述说明书和下述示意性实施例,利用和使用本公开的试剂和实施要求的方法。提供下述工作实施例,以利于本公开的实施例,并且决不解释为限制本公开的其他部分。

实施例

[0160] 通过下述实施例进一步阐释本发明,其决不应解释为限制性的。下面描述如在下述实验实施例中使用的材料和方法。

[0161] 实施例 1 :材料和方法

[0162] 下述材料和方法用于下面提供的实施例中。显而易见,适当的这些材料和方法可替换其他已知材料和方法以实现相同期望的目的和 / 或结果。

[0163] 动物模型

[0164] NOD 和 NOD-GFP (在 β -肌动蛋白启动子下表达绿色荧光蛋白质) 小鼠先前描述在 Wallet 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 106:24810-4815 (2009) 中。所有的小鼠在实验期间保持在动物设施中并且对这些动物进行的实验程序根据动物关爱与使用委员会的指导进行。

[0165] 糖尿病的评价

[0166] 每周从尾静脉对小鼠取血并且血液样品用于评估葡萄糖含量和抗胰岛素抗体。为了测量葡萄糖,血滴直接放置在测试条上并且使用 Accu-Chek 高级监测系统 (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) 读取葡萄糖含量。为了检测抗胰岛素抗体,使血液在室温下凝聚 1 小时并且分离血清并且用于 ELISA。开始在 10 周龄开始血糖水平 (BGL) 监测。当血糖连续两周高于 300mg/dL 时,认为小鼠是糖尿病的。

[0167] 肽和 Ig- 嵌合体

[0168] 所有的肽通过 HPLC 纯化 >90% 纯度。GAD2 肽 (SEQ ID NO:1) 对应谷氨酸脱羧酶 -65 (GAD) 的氨基酸残基 206-220。通过将 GAD2 肽序列插入 91A3IgG2b, κ Ig 重链可变区的 CDR3 区域的可变区产生 Ig-GAD2 嵌合体。融合重链基因然后与亲本 κ 轻链基因一起转染,用于作为完整的自 Ig 分子表达 (Legge 等, J. Exp. Med., 191:2039-2052 (2000) ;Legge 等, J. Exp. Med., 196:217-227 (2002) ;Gregg 等, J. Immunol., 173:7308-7316 (2004) ;Gregg 等, J. Immunol., 174:662-670 (2005))。在 DME 培养基上进行转染瘤细胞的大规模培养并且用琼脂糖珠纯化 (Jain 等, J. Exp. Med., 205:207-218 (2008))。源自 GAD 或人胰岛素蛋白质 (α 和 β 链) 的其他肽在本发明的范围内。

[0169] 用 Ig-GAD2 和供体 BM 或供体 EPC 治疗

[0170] 确定是糖尿病的小鼠首先给予 2 个持续释放胰岛素移植物 (LinShin, Toronto, Ontario, Canada), 插入腹部皮下, 以临时维持血糖量正常 2-3 周。然后, 给予小鼠 300 μ g

Ig-GAD2 腹膜内 (i. p.) 每周 3 次, 5 周并且然后一周一次, 另外 5 周。从健康的 (无糖尿病) NOD 小鼠的股骨和胫骨分离供体 BM 细胞并且在诊断后第 2、3 和 4 周, 每周静脉内 (i. v.) 转移 10×10^6 个细胞。监测小鼠的 BGL, 直到第 120 天。相同的治疗方案给予用内皮祖细胞 (EPC) 治疗的小鼠, 不同之处是 FLK-1⁺EPC 给予 5×10^4 个细胞每次注射, 而 FLK-1⁻ EPC 给予 3×10^6 个细胞每次注射。为了分离 EPC, 从健康的或糖尿病小鼠收获 BM 并且使用系细胞消耗试剂盒根据制造商的指导 (Mitenyi Biotec) 分离 Lin 细胞。用抗 c-Kit、抗 FLK-1 和 7-AAD 使 Lin 细胞染色并且适当分选。

[0171] 流式细胞术分析

[0172] 使样品染色, 用于检测细胞表面标记物 PECAM1 (PE-cy7- 缀合的抗 PECAM1 ; eBiosciences)、FLK-1 (APC- 缀合的抗 FLK1 ; eBiosciences), c-Kit (PE-cy7- 缀合的抗 c-Kit ; BD Biosciences) 和 CD45 (APC- 缀合的抗 CD45 ; BD Biosciences)。为了探测凋亡细胞, 用 7-AAD (EMD Biosciences) 使细胞染色。为了探测 CD4⁺T 细胞中的细胞内 IFN γ 、IL-10 和 IL-17, 在存在布雷非德菌素 A ($10 \mu\text{g/mL}$) 的情况下, 用 PMA (50ng/mL) 和离子霉素 (500ng/mL) 刺激细胞 4 小时, 并且然后用多甲藻素-叶绿体-蛋白质 (PerCP)-cy5.5- 缀合的抗 CD4、PE- 缀合的抗 V β 8.1/8.2 和 FITC- 缀合的抗 CD8 抗体 (BD Biosciences) 染色。

[0173] 对于细胞内标记物, 细胞随后用 2% 甲醛固定, 用 0.2% 皂苷通透化并且用 PE-cy7- 缀合的抗 IFN γ 、APC- 缀合的抗 IL-10 或 APC- 缀合的抗 IL-17 抗体 (eBiosciences) 染色。使用 Beckman Coulter CyAn ADP 读取样品并且使用 Summit V4.3 (Dako) 分析数据。使用 Beckman Coulter MoFlo XDP 分选器进行细胞分选 (>98% 纯度)。

[0174] 用于组织学分析的组织样品制剂。

[0175] 胰腺冷冻在组织冷冻介质 (Triangle Biomedical Sciences) 和非连续 8- μm 后切片分开切割 150- μm 。在组织学程序之前, 切片固定在 4% 甲醛中 10 分钟。为了见组织中的 eGFP 表达, 胰腺在 4°C 下固定在 4% 甲醛中 4 小时并且浸入 30% 蔗糖中过夜然后冷冻。然后进行 H&E 染色, 以分析胰岛炎。

[0176] 免疫组织化学

[0177] 为了检测 β -细胞, 胰腺切片与 HRP- 缀合的抗胰岛素亲和体分子 (Abcam) 一起温育并且通过温育玻片与 DAB 色原和底物 (ScyTek) 5 分钟鉴定胰岛素⁺细胞。用苏木精对细胞核复染色。

[0178] 免疫荧光

[0179] 用包含 1% BSA、10% 山羊或驴血清, 和 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液处理胰腺切片。然后, 切片在 4°C 下在一抗 (兔子抗胰岛素 (Santa Cruz)、荷兰猪抗胰岛素 (Abcam)、兔子抗 PECAM1 (Santa Cruz)、兔子抗 Ki67 (Abcam)、山羊抗 VEGF (Santa Cruz) 温育过夜。用 PBS 中的 Triton X-100 冲洗玻片三次, 并且然后在室温下用相应的二抗 (Texas red- 缀合的山羊抗兔子 IgG、FITC- 缀合的山羊抗荷兰猪 IgG、FITC- 缀合的驴抗山羊 IgG ; Santa Cruz) ; DyLight 405- 缀合的驴抗兔子 IgG 或 DyLight 549- 缀合的驴抗山羊 IgG (Jackson ImmunoResearch) 染色 1 小时。在一些实验中, 用 DAPI (Santa Cruz) 对细胞核复染色。

[0180] 激光捕获显微切割

[0181] 胰腺切片为胰岛素或 PECAM1 染色并且用 Arcturus 脱水组分充分脱水。用 CapSure HS LCM caps 和 Autopix 100 激光捕获显微切割系统根据制造商的指导切割胰岛素⁺或

PECAM1⁺细胞。对于每个个体小鼠,从 3-10 个非连续切片切割细胞。使用 PicoPure DNA 提取试剂盒 (Applied Biosystems) 从切割细胞提取基因组 DNA。

[0182] 通过 PCR 检测 Y 染色体。

[0183] 使用 20ng DNA 模板和 Maxima qPCR master mix (Fermentas) 进行检测 Y 染色体和 β -肌动蛋白。

[0184] 定量 PCR 分析

[0185] 使用 TRI RNA 分离试剂 (Sigma) 从胰岛提取总 RNA。使用 Power SYBR Green 试剂盒和 StepOnePlus 工具 (Applied Biosciences) 进行定量 PCR。在用内部对照 18S 核糖体 RNA 表达归一化之后,基于 $\Delta\Delta CT$ 计算相对量 (RQ)。

[0186] 应理解,本文所述的目前优选的实施方式的各种改变和修饰对本领域技术人员是显而易见的。在不背离公开的方法的精神和范围的情况下,可做出这样的改变和修饰,而不会减少其期望的优势。所以,期望所附的权利要求覆盖这样的改变和修饰。

[0187] 实施例 2 :Ig-GAD2 驱动的免疫调节不足以克服明显的 I 型糖尿病

[0188] 在患明显 T1D 的对象中测试抗原特异性疗法。在一个示例性方法中,通过 PCR 诱变将 GAD2 核苷酸序列插入 91A3 重链的 CDR3 可变区并且通过 DNA 测序分析所得嵌合重链基因。(见实施例 1)。

[0189] 令人吃惊地,尽管 Ig-GAD2 治疗在所有的高血糖小鼠中恢复血糖量正常,但是明显糖尿病动物都没有从糖尿病恢复 (图 1A)。更有趣地,患病的动物展示脾中 Th17 细胞的根除和 Th1 细胞的保留 (图 1B-D),与先前在高血糖小鼠的治疗中观察的免疫调节类似 (Jain 等, J. Exp. Med. 205:207-218 (2008))。事实上, Ig-GAD2 治疗的糖尿病小鼠具有增加频率的产生 IFN γ 和 / 或 IL-10 的 CD4⁺CD8⁻ β 8.1/8.2⁺T 细胞 (图 1B),但是脾或胰腺中相对于未治疗的患病动物消失了 Th17 细胞 (图 1C)。而且,因为它们签名转录因子,分别 T-bet 和 ROR γ t 的 mRNA 明显减少,胰腺中 Th1 或 Th17 细胞减少 (图 1D)。总体上, Ig-GAD2 驱动的免疫调节不足以恢复明显糖尿病小鼠中的血糖量正常。

[0190] 实施例 3 :与 Ig-GAD2 治疗一起移植 BM 细胞克服了明显 T1D

[0191] 进行骨髓 (BM) 移植,以研究用 Ig-GAD2 和细胞替换疗法的同时治疗是否产生明显糖尿病的持续恢复。因此,从健康供体的 BM 细胞移植结合 70-天 Ig-GAD2 治疗并且评估血糖量正常的恢复 (治疗示意性显示在图 2A 中)。给予 Ig-GAD2 和 BM 移植二者 (Ig-GAD2+BM) 的大部分小鼠避免了疾病,无论 BM 是否来自雄性或雌性供体,而在单独给予 Ig-GAD2 或 BM 的小鼠中没有观察到保护 (图 2B)。治疗消除了与糖尿病出现相关的胰岛素-抗性 (图 8)。用 Ig-GAD2+BM 方案治疗的糖尿病小鼠,如单独 Ig-GAD2 的那些接受者,具有增加频率的产生 IFN γ 和 / 或 IL-10 的 CD4⁺CD8⁻ β 8.1/8.2⁺T 细胞 (图 2C),但是脾和胰腺中的 Th17 细胞消失 (图 2D)。相反,单独 BM 的糖尿病小鼠接受者仍患病并且产生 IFN γ 和 / 或 IL-10 的细胞不增加或 Th17 细胞减少 (图 2C-D)。而且,在 Ig-GAD2+BM 组的胰腺中, T-bet 和 ROR γ t 的 mRNA 相对于单独 BM 的动物接受者明显减少 (图 2E),指示 Th1 和 Th17 细胞二者在该位点最少。因此,添加 BM 移植至 Ig-GAD2 方案持续从糖尿病恢复,而不影响免疫调节。

[0192] 实施例 4 :BM 移植与 Ig-GAD2 协同驱动健康胰岛的形成

[0193] 因为 Ig-GAD2+BM 而不是单独 Ig-GAD2 恢复血糖量正常,可能添加 BM 移植维持 β -细胞的再生,所述 β -细胞能够在 Ig-GAD2 削减的最小炎症下兴旺。为了测试这些假

设,用 Ig-GAD2+BM 治疗展示持续恢复至血糖量正常的小鼠与单独 Ig-GAD2 或 BM 的那些接受者比较(图 3A),检查胰腺渗透和健康胰岛的形成的减少。Ig-GAD2+BM 治疗的小鼠接受者具有的胰岛大部分没有胰岛炎或胰岛具有胰岛周围炎形式的最小渗透(图 3B-C)。单独 Ig-GAD2 的小鼠接受者,其不能从糖尿病恢复,具有的胰岛没有胰岛周围炎,指示有效的免疫调节。相反,单独 BM 的动物接受者具有非常严重的胰岛炎(图 3B-C)。而且,尽管用 Ig-GAD2+BM 治疗的小鼠具有结构化的具有丰富胰岛素阳性细胞的胰岛,而给予单独 Ig-GAD2 或 BM 的那些具有较少的具有更少 β -细胞的胰岛,如未治疗的、刚刚诊断糖尿病的小鼠(图 3D)。汇集结果指示 Ig-GAD2+BM 治疗的小鼠中产生胰岛素的 β -细胞的数量、胰岛的数量和 β -细胞群明显增加,在单独 Ig-GAD2 或 BM 的动物接受者中不明显(图 3E-G)。因此, BM 细胞协同 Ig-GAD2 驱动的免疫调节的富集,维持能够兴旺并且维持血糖量正常的 β -细胞的数量。

[0194] 实施例 5 :BM 移植和 Ig-GAD2 治疗的小鼠接受者展示胰岛中增加的内皮细胞数量

[0195] 为了确定用 Ig-GAD2+BM NOD-GFP 治疗的小鼠中新的形成的 β -细胞的起源,小鼠用作 BM 的来源并且产生胰岛素的 β -细胞评估治疗之后的 GFP 表达。结果显示在 Ig-GAD2+BM 治疗期间在任何时间点没有 GFP/胰岛素共定位(图 9)。此外,无糖尿病的小鼠中富含的 GFP⁺细胞在具有相同方案但是仍糖尿病的那些接受者中最小(图 9)。因此, BM 移植好像不用作产生胰岛素的 β -细胞的来源但是在恢复小鼠的胰岛中产生 GFP⁺细胞的移植。因此, BM 移植好像不用作产生胰岛素的 β -细胞的来源但是在恢复小鼠的胰岛中产生 GFP⁺细胞的移植。所以, β -细胞令人吃惊地不源自供体细胞,如在其他模型中观察到的(Hess 等, Nat. Biotechnol., 21:763-770(2003); Mathews 等, Diabetes, 53:91-98(2004); Choi 等, Diabetologia, 105:16242-16247(2003); Lechner 等, Diabetes, 53:616-623(2004))。

[0196] 接下来的问题是 GFP⁺移植是否表示这样的细胞,其不能被宿主的 BM 提供但是对于维持内源 β -细胞是必要的。结果显示在糖尿病对健康小鼠中,循环的和胰岛内 PECAM1⁺EC 的频率明显下降(图 4)。的确,随着小鼠朝着明显糖尿病进展,外周血液 EC 的频率明显下降(图 4A-B)。类似地,随着小鼠变得是糖尿病胰岛中 EC 的频率下降,其是与 β -细胞丢失的现象(图 4C-D)。这指示 EC 的频率在糖尿病小鼠的外周血液和胰腺二者中都下降。

[0197] 有趣地, Ig-GAD2+BM 的小鼠接受者而不是单独给予 Ig-GAD2 或 BM 的那些恢复胰岛中的 PECAM1⁺内皮细胞(EC)(图 5A)。而且,当分析编码表示 EC 的功能标记物的 VE-钙粘着蛋白(Cdh5)、血管生成素受体(Tie1)和 VEGF 受体 1(Flt1)的基因表达时,相对于未治疗的糖尿病动物,在 Ig-GAD2+BM 的小鼠接受者中,这些基因有明显的 mRNA 增加(图 5B)。给予单独 Ig-GAD2 或 BM 的那些不显示基因表达的类似增加(图 5B)。EC 的增加可能促进血管生成,用于胰岛形成血管和 β -细胞的兴旺。事实上,在用 Ig-GAD2+BM 治疗的无糖尿病的小鼠胰腺中存在编码血管生成因子,包括 VEGFa(vegfa)、血管生成素 1(angpt1)和血管生成素 2(angpt2)的基因的强上调(图 10A)。此外,新形成的 β -细胞产生 VEGFa(图 10B),其对于内皮细胞的发展和胰岛形成血管是重要的(Brissova 等, Diabetes, 55:2974-2985(2006); Lammert 等, Curr. Biol., 13:1070-1074(2003))。Ig-GAD2+BM 细胞移植小鼠中, β -细胞分裂的平行恢复进一步证明了内皮和 β 细胞之间的共生关系(图 5C)。的确,当与正常小鼠

的静息 β -细胞或与未治疗的糖尿病小鼠中残留的 β -细胞比较时, β -细胞显示对增殖标记物 ki-67 的明显的染色(图 5C)。这些结果提示用 Ig-GAD2 治疗期间的 BM 移植持续修复内皮网络, 导致 β -细胞的有效再生。后者能够产生重要的血管生成因子 VEGFa, 以维持共生关系和胰岛的健康。

[0198] 实施例 6 :供体 BM 移植产生胰岛内皮细胞

[0199] 为了测试源自 GFP⁺细胞的移植供体 BM 是否表示 EC, 我们检查了 GFP⁺细胞表达内皮标记物 PECAM1 和相对于产生胰岛素的 β 细胞的定位。结果显示, 在无糖尿病的小鼠中, 在表达 PECAM1 的胰岛中有 GFP⁺细胞, 如通过治疗的 30 和 60 天的两个标记物的共定位所指示(图 6A)。在仍糖尿病的相同方案的小鼠接受者中没有观察到这样的共定位。而且, GFP⁺PECAM1⁺细胞不与胰岛素染色共定位, 指示 BM 移植在保护 T1D 期间产生 EC。这些观察得到当 BM 移植来自雄性供体时, 在内皮细胞但不是 β -细胞中的 Y 染色体的测所支持。的确, 当 DNA 提取自 Ig-GAD2+BM 小鼠接受者中大量胰腺细胞时, 可检测到 Y 染色体(图 6B)。更具体而言, 当 PECAM1⁺和胰岛素⁺细胞使用激光捕获系统微切割并且通过 PCR 分析基因组 DNA 时, 在 PECAM1⁺中检测到 Y 染色体但是胰岛素⁺细胞中没有, 以及这限于给予 Ig-GAD2+BM 移植的无糖尿病的小鼠(图 6C-D)。这些结果指示供体 BM 产生从糖尿病恢复需要的 EC。

[0200] 实施例 7 :内皮祖细胞替换 BM 移植并且有助于 Ig-GAD2 逆转 T1D

[0201] 为了测试供体 EPC 的移植与 Ig-GAD2 治疗一起是否产生能够有助于 β 细胞的生存和发挥功能成熟的 EC 和恢复血糖量正常, 从健康 NOD-GFP 小鼠的 BM 纯化 EPC 并且代替全部的 BM。注意, BM 系阴性 (Lin⁻) 群体表达 EPC 标记物 c-Kit 并且糖尿病小鼠相对于年龄相当的健康小鼠中 FLK-1 明显减少(图 7A-B)。

[0202] 用 Ig-GAD2 治疗期间, 来自健康供体的纯化的 GFP⁺Lin⁻c-Kit⁺FLK-1⁺ (hFLK-1⁺) 细胞的移植, 替换全部 BM 移植, 使得大部分小鼠从疾病恢复, 而给予 Lin⁻c-Kit⁺FLK-1⁻ (hFLK-1⁻) 细胞的对照组, 尽管接收 60 倍更高细胞数量, 具有相当更低的恢复速度(图 7C)。另外, 当 hFLK-1⁺细胞被移植而没有 Ig-GAD2 时, 没有观察到从疾病明显的恢复(图 7C)。当 FLK-1⁺细胞源自患病 NOD-GFP 小鼠 (sFLK-1⁺) 时, 疾病的恢复最小(图 7C)。此外, 在这些小鼠的胰岛中, 没有明显的 GFP⁺细胞, 其解释了 PECAM1⁺细胞中没有 PECAM1⁺细胞的增加(比较图 7D 中的右图与左图)。事实上, 在 Ig-GAD2+FLK-1⁻或 FLK-1⁺细胞而没有 Ig-GAD2 下, 在未从糖尿病恢复的小鼠中观察到类似的结果(图 7D)。这些结果指示 EPC 可替换 BM 移植并且产生成熟的 EC, 其有助于 β -细胞兴旺和恢复血糖量正常。此外, 仅仅当 EPC 源自健康的供体时出现 EPC 的成熟和 EC 的增加, 其解释了糖尿病小鼠不能使用它们自己的 EPC 修复胰腺内皮网络。

[0203] 实施例 8 :治疗患 1 型糖尿病的对象

[0204] 进行研究, 以确定包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法的组合物在患 T1D 的对象中的作用。例如, 进行多中心、随机、双盲、安慰剂-对照研究, 以评估基于体重的或固定剂量的组合物在诊断患 T1D 的人对象中的治疗, 所述组合物包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法。更具体而言, 进行临床研究, 以检查包括一定量的一个或多个干细胞和 / 或祖细胞和一定量的至少一种抗原特异性疗法的组合物的效力和安全性。组合物有效治疗包括, 预防 T1D。

[0205] 除非另外指出,在本说明书和权利要求书中使用的表示成分、性质,比如分子量、反应条件等的数量都已经解释为受术语“约”的修饰。因此,除非相反指出,在说明书和所附权利要求书中阐释的数量参数是近似值,其可取决于本公开期望获得的期望特性而改变。至少,并且不试图限制权利要求使用等同原则,每个数值参数应至少从报告的有效数字解释并且施加普通的四舍五入技术。

[0206] 尽管阐释本公开宽范围的数值范围和参数是近似值,在具体实施例中阐释的数值报告为尽可能精确的。但是,任何数值,固有地包含必定源自在它们各自测试测量出现的标准偏差的某些误差。

[0207] 在描述本公开的背景下(尤其在下述权利要求的背景下)使用的术语“一个(a)”、“一个(an)”、“所述(the)”和类似的指示物解释为覆盖单数和复数二者,除非本文另外指出或明显与上下文相反。本文数值的范围的叙述仅仅旨在用作分别提及每个分开的值落在范围内的速记方法。除非本文另外指出,每个单个值并入说明书,如同其在本文单独叙述。本文所述的所有方法可以以任何适当的顺序进行,除非本文另外指出或否则明显与上下文相悖。本文提供的任何和所有实施例,或示例性语言(例如,“比如”)的使用期望仅仅更好阐释本公开并且不限制另外要求的本公开的范围。说明书的语言不应解释为指示对于实施本公开必要的任何非要求的要素。

[0208] 本文公开的可选的要素或实施方式的分组不解释为限制性的。可单独提及或要求每个组成员或与该组的其他成员或帮我出现的其他要素任意组合。预期,为了方便和/或专利性,组中的一个或多个成员可包括在组中,或从组中删除。当任何这样的包括或删除发生时,说明书视为包含这样修饰的组,因此满足在所附权利要求书中使用的马库什组的书面描述。

[0209] 本公开的某些实施方式是本文所述的,包括发明人已知的进行本公开的最佳形式。当然,在阅读前述说明书之后,这些描述的实施方式的变化对本领域技术人员显而易见。发明人预期技术人员适当地采用这样的变型,并且发明人期望本公开以本文具体所述的其他方式实施。因此,本公开包括本文所附权利要求叙述主题的适用法律允许的所有修饰和等同物。而且,在所有其可能变型中上述要素的任何组合包括在本公开中,除非本文另外指出或以其他方式明确与上下文相悖。

[0210] 本文公开的具体实施方式使用由组……成或基本上由……组成语言可进一步限于权利要求中。当在权利要求中使用,无论提交的或经修改添加的,过渡术语“由……组成”排除权利要求中未指出的任何要素、步骤或成分。过渡术语“基本上……由组成”将权利要求的范围限于具体的材料或步骤和不实质上影响基本和新的特征(一种或多种)的那些。如此要求的本公开的实施方式是本文内在或明确描述和可行的。

[0211] 应当理解,本文公开的实施方式是本公开原理的示意。可采用的其他修饰在本公开的范围内。因此,作为例子,但是不是限制性的,可根据本文教导使用本公开可选的构造。因此,本公开不限于精确显示和描述的。

[0212] 尽管通过参考具体的材料、程序和实施例本文已经描述和阐释了本公开,但是,应理解,本公开不限于为该目的选择的材料和程序的具体组合。这些细节的许多变型可能是暗示的,如本领域技术人员认识到。期望说明书和实施例仅仅解释为示例性的,本公开的真是范围和精神由下述权利要求指示。本申请中提及的所有参考文献、专利和专利申请通过

引用以它们的整体并入本文。

[0213] 序列表

[0214]

SEQ ID No.	描述	序列
1	GAD2	TYEIAPVFVLLLEYVT
2	GAD1	SRLSKVAPVIKARMMEYGTT
3	INS β	SHLVEALYLVCGERG
4	Y 染色体正向	GGTGAGAGGCACAAAGTTGG
5	Y 染色体反向	ATCTCTGTGCCTCCTGGAAA
6	β -肌动蛋白正向	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTGC
7	β -肌动蛋白反向	GTGTCCGTTCTGAGTGATCCTCAG
8	<i>angpt1</i> 正向	AGCATCTGGAGCATGTGATGGA
9	<i>angpt1</i> 反向	TATCTCAAGCATGGTGGCCGT
10	<i>angpt2</i> 正向	AACACCGAGAAGATGGCAGTGT
11	<i>angpt2</i> 反向	AGACAAACTCATTGCCCAGCCA
12	<i>cdh5</i> 正向	TTCGCACCAGGTATTCAACGCA
13	<i>cdh5</i> 反向	TCATCTGCATCCACTGCTGTCA
14	<i>flt1</i> 正向	TGCAGGAAACCACAGCAGGAA
15	<i>flt1</i> 反向	TTCAATGTTGCAGGCGAGCCAT
16	<i>tie1</i> 正向	CAGCATGAAACTTCGCAAGCCA
17	<i>tie1</i> 反向	TGGGCACTTCAAACCTCTGCTGT
18	<i>vegfa</i> 正向	TGCAGGCTGCTGTAAACGATGAA
19	<i>vegfa</i> 反向	TGCTGTGCTGTAGGAAGCTCAT
20	<i>tbx21</i> 正向	TCCAAGTTCAACCAGCACCAGA
21	<i>tbx21</i> 反向	TCCACCAAGACCACATCCACAA
22	<i>rorc</i> 正向	ACAGCCACTGCATTCCCAGTTT
23	<i>rorc</i> 反向	TCTCGGAAGGACTTGCAGACAT

[0001]

序列表

<110> 密苏里大学董事会
H. 扎格赫安尼

<120> 治疗和/或预防1型糖尿病的方法和组合物

<130> 88936-8004.W000

<150> US 61/775,115

<151> 2013-03-08

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Thr Tyr Glu Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr Val Thr
1 5 10 15

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Ser Arg Leu Ser Lys Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met Glu
1 5 10 15

Tyr Gly Thr Thr
20

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
1 5 10 15

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 4

ggtgagaggc acaagttgg

19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 5

atctctgtgc ctcttgaaa

20

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 小家鼠

[0002]

<400> 6	
gccttccttgc agctcctteg ttgc	24
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 7	
gtgtccggttc tgagtgatec tcag	24
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 8	
agcatctgga gcatgtgatg ga	22
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 9	
tatctcaagc atggtggccg t	21
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 10	
aacaccgaga agatggcagt gt	22
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 11	
agacaaactc attgcccagc ca	22
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 12	
ttcgaccag gtattcaacg ca	22
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 13	
tcattetgeat ccaactgetgt ca	22
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 14	
tgcaggaaac cacagcagga a	21

[0003]

<210>	15	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	15	
ttcaatgttg caggegagcc at		22
<210>	16	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	16	
cagcatgaaa cttagcaagc ca		22
<210>	17	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	17	
tgggcacitc aaactctget gt		22
<210>	18	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	18	
tgcaggetgc tgtaacgatg aa		22
<210>	19	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	19	
tgtgtgtctg taggaagctc at		22
<210>	20	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	20	
tccaagtcca accagcacca ga		22
<210>	21	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	21	
tcacccaaga ccacatccac aa		22
<210>	22	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	22	
acagccactg catteccagt tt		22
<210>	23	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	23	
tctcgaagg acttcagac at		22

[0004]

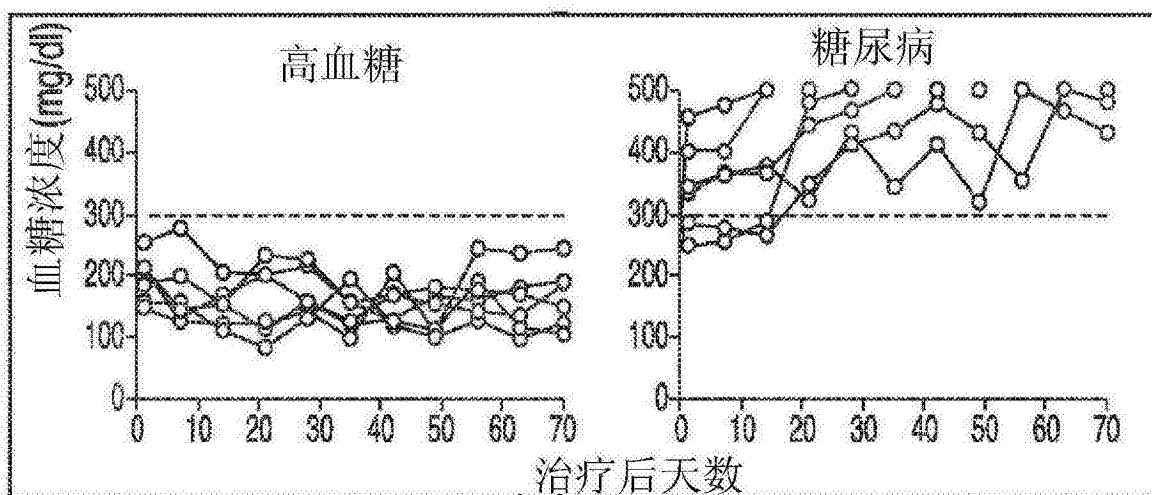


图 1A

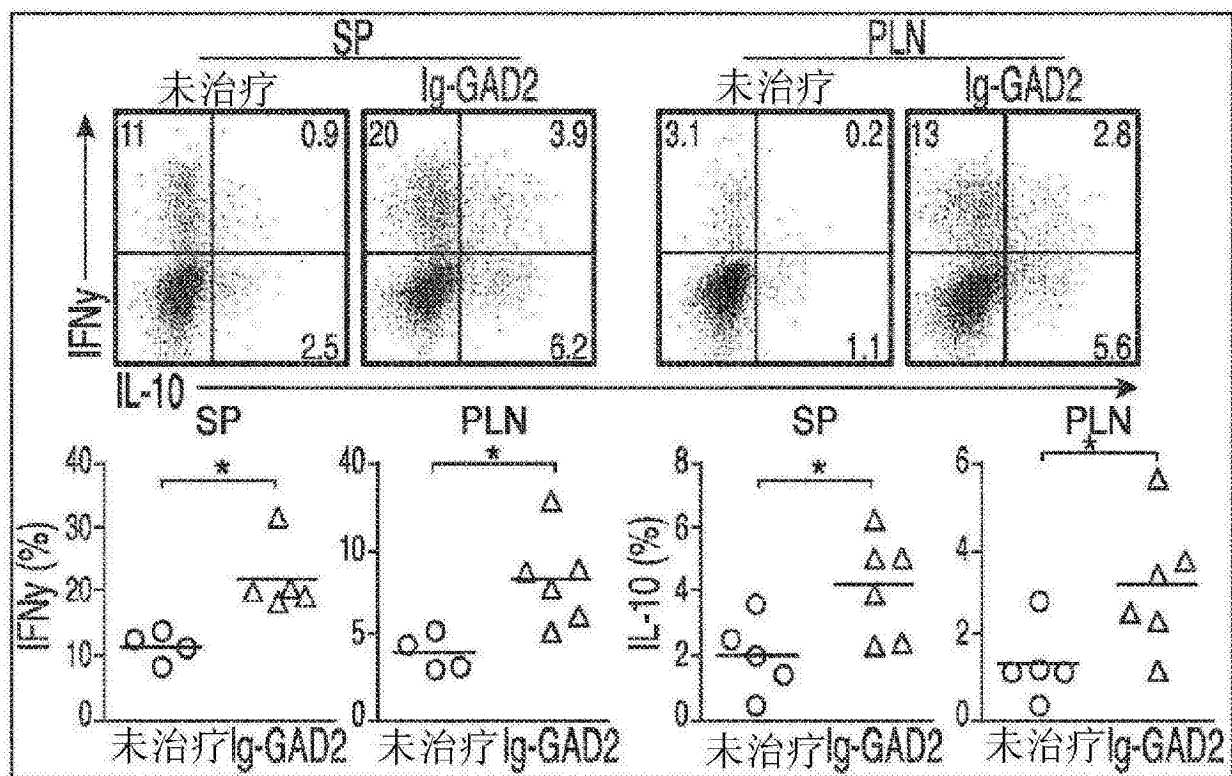


图 1B

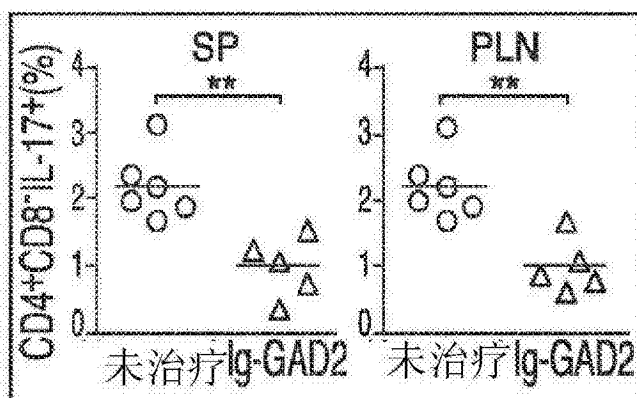


图 1C

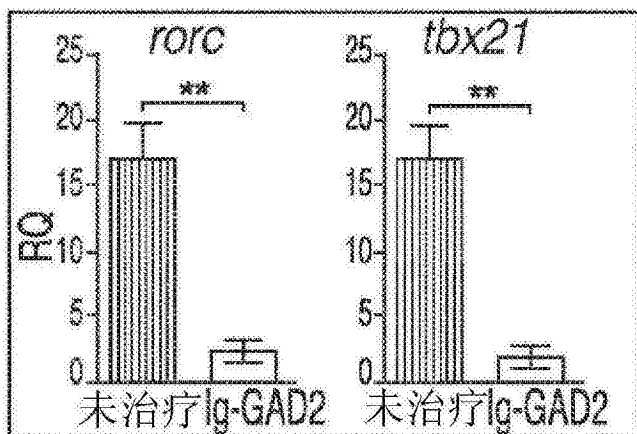


图 1D

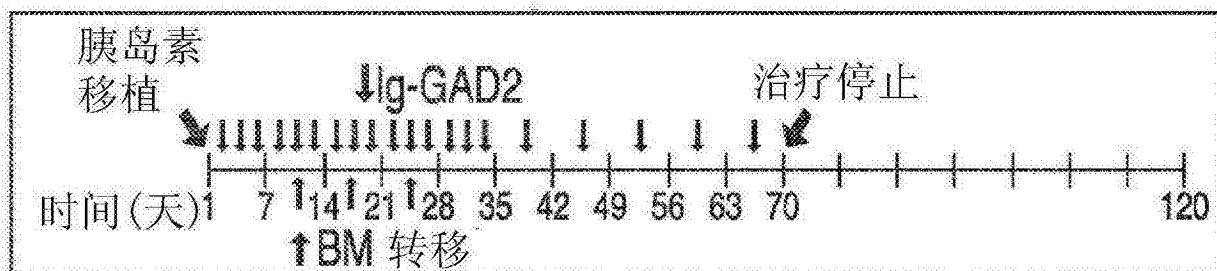


图 2A

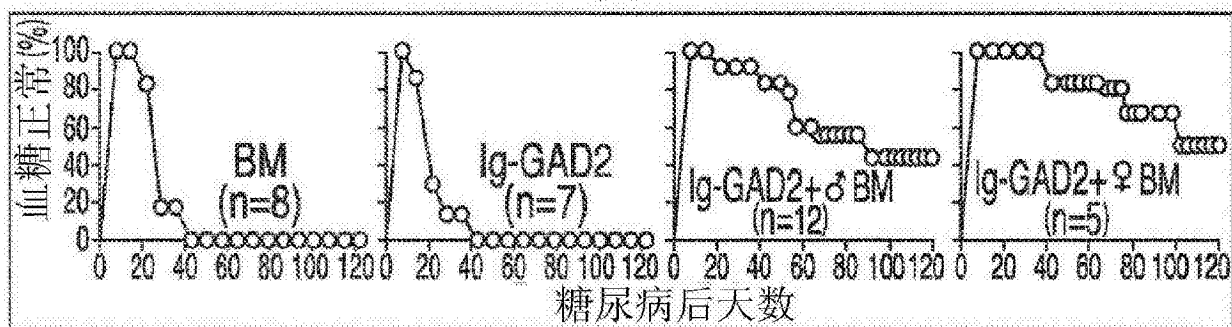


图 2B

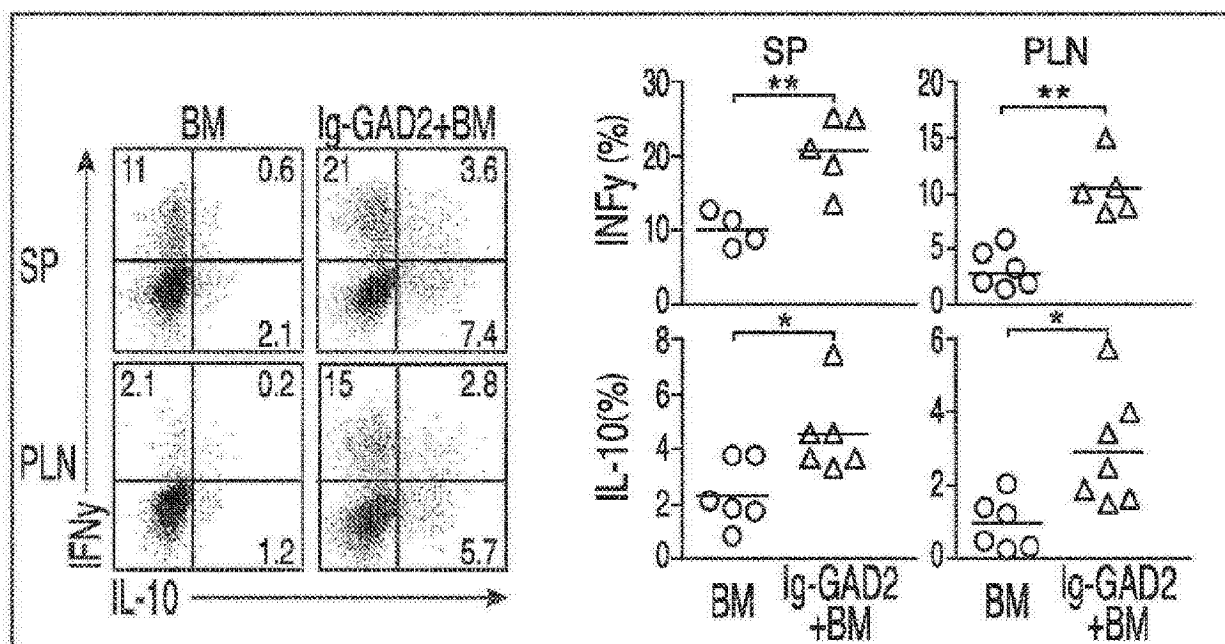


图 2C

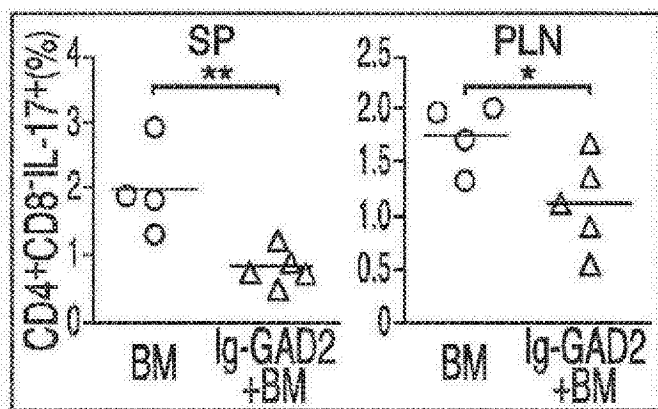


图 2D

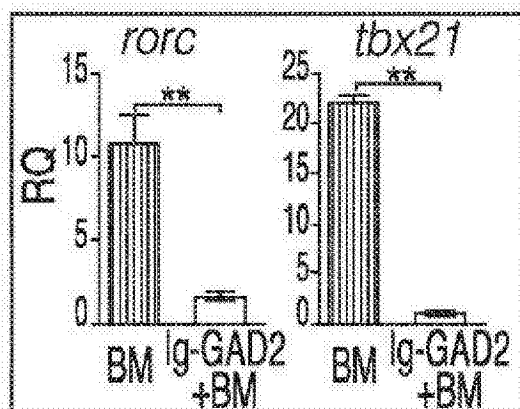


图 2E

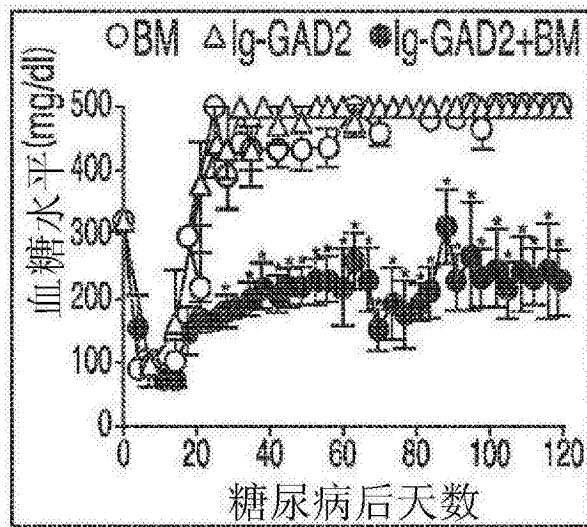


图 3A

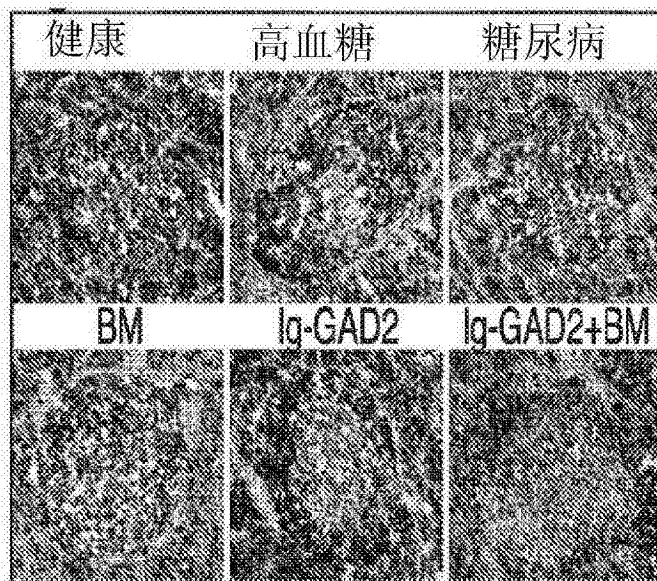


图 3B

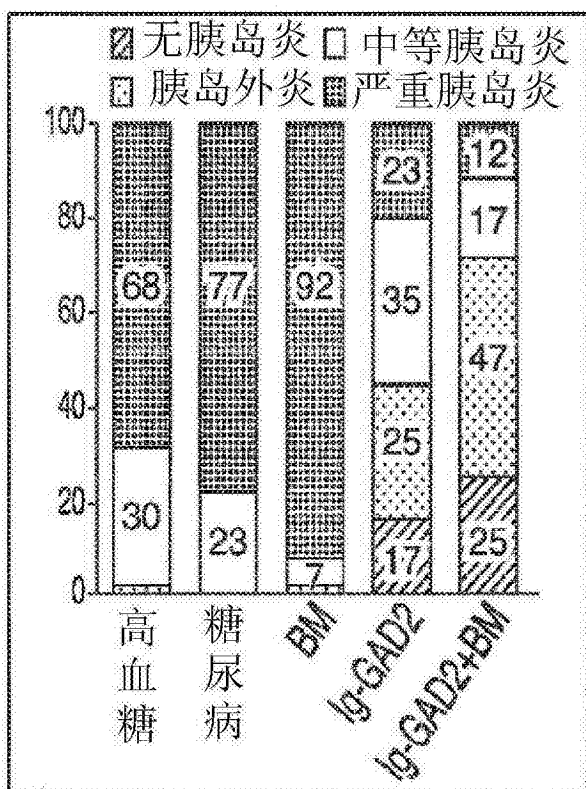


图 3C

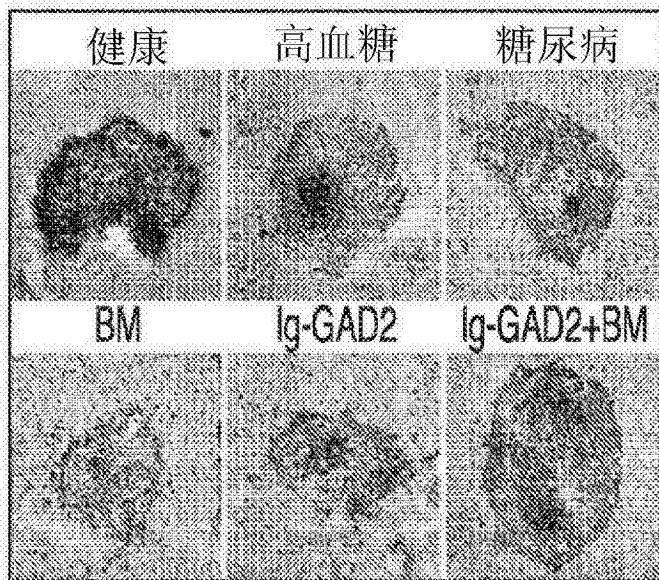


图 3D

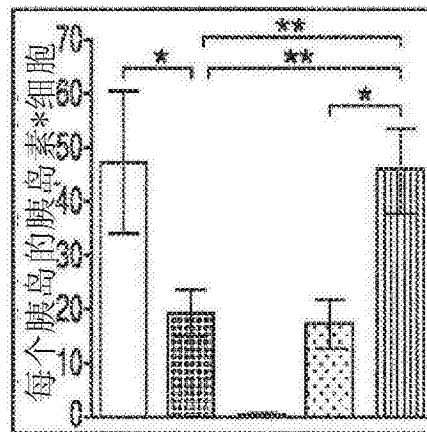


图 3E

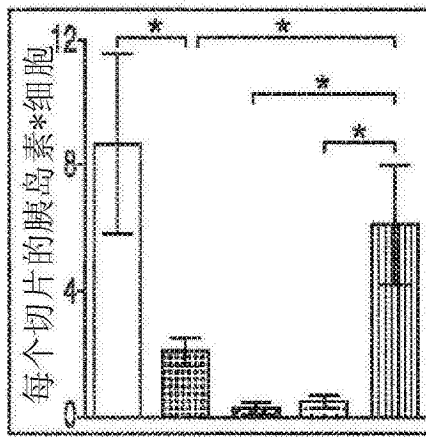


图 3F

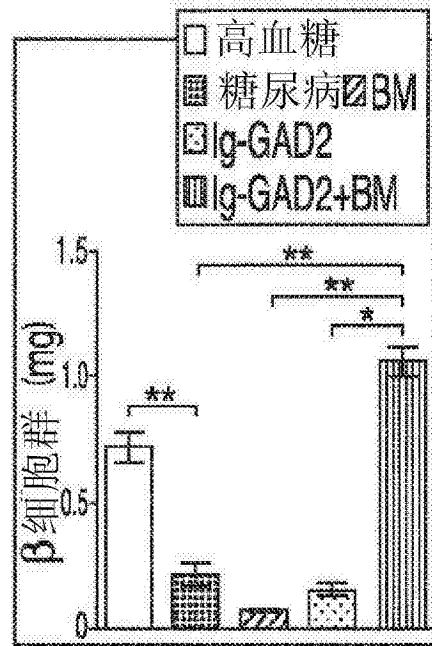


图 3G

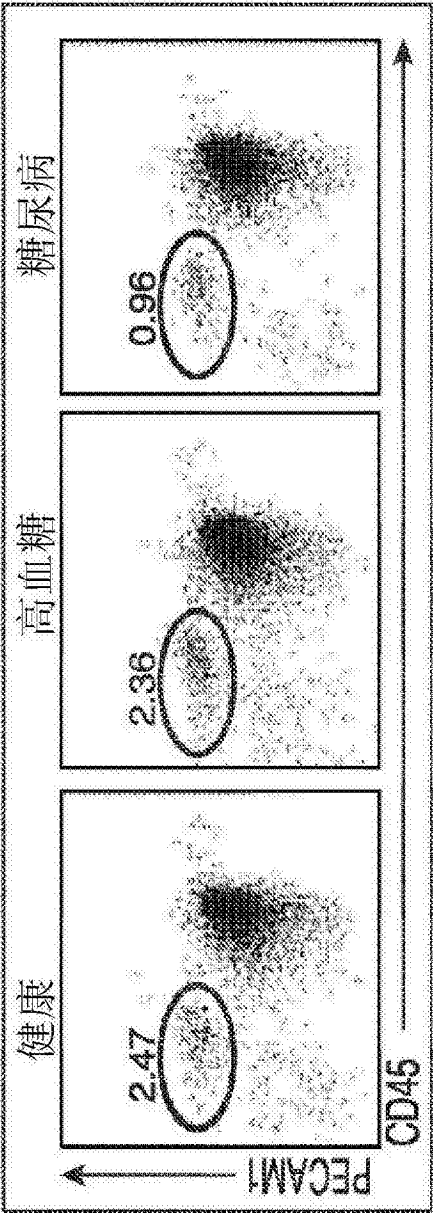


图 4A

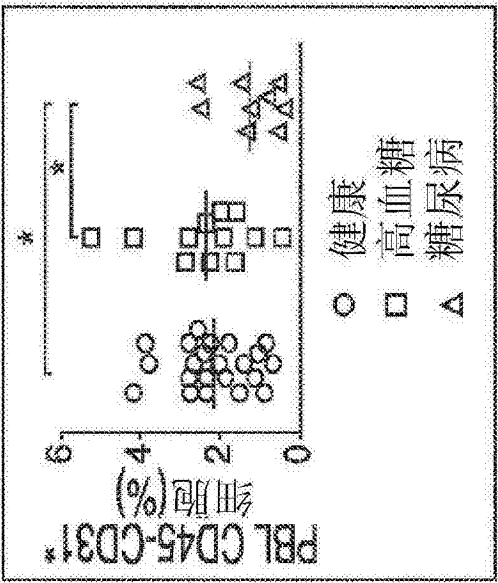


图 4B

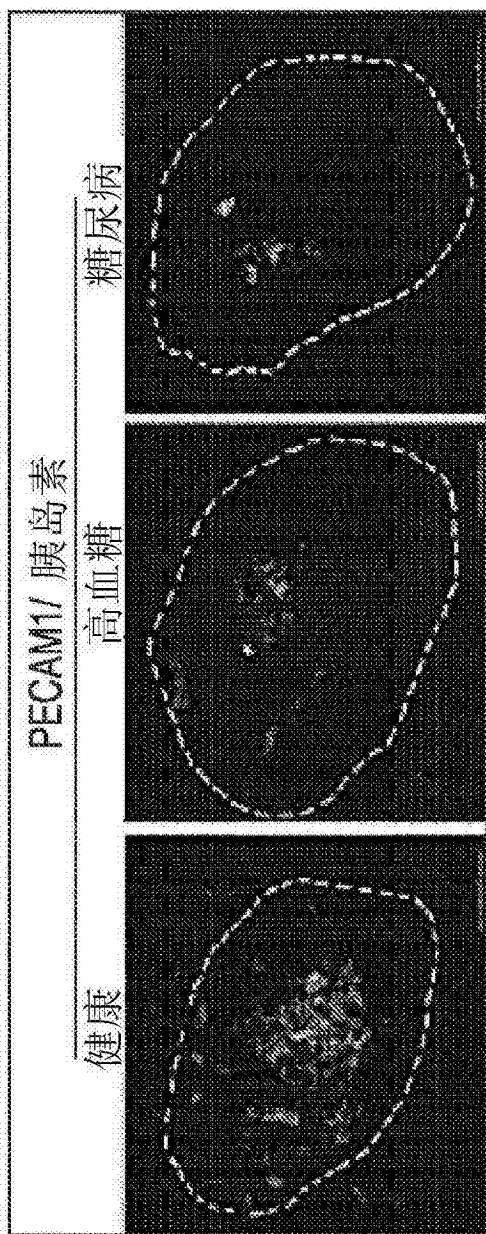


图 4C

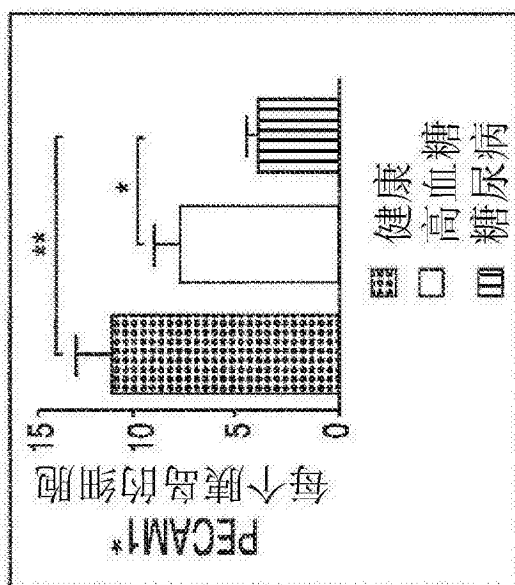


图 4D

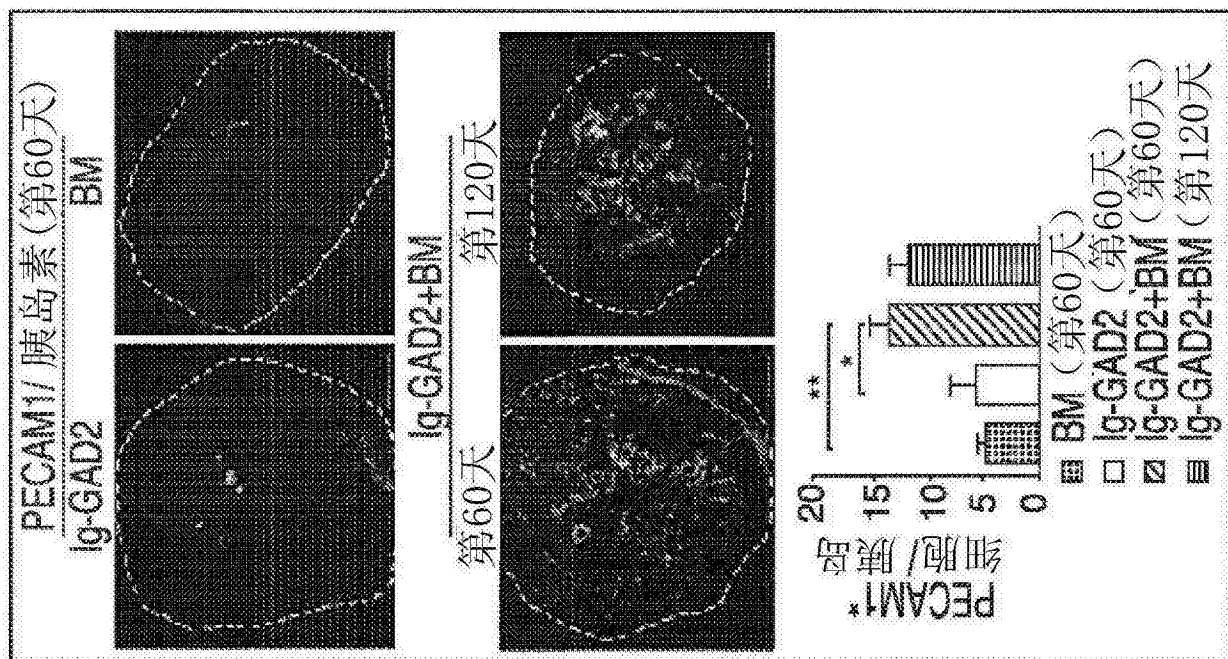


图 5A

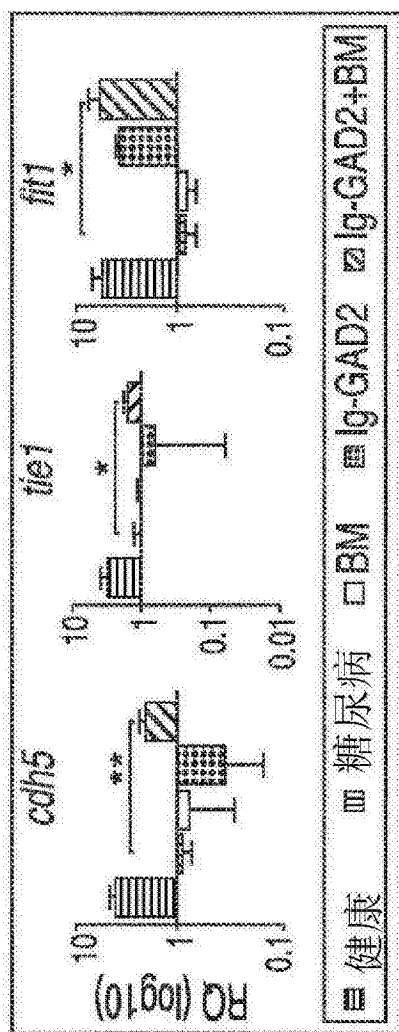


图 5B

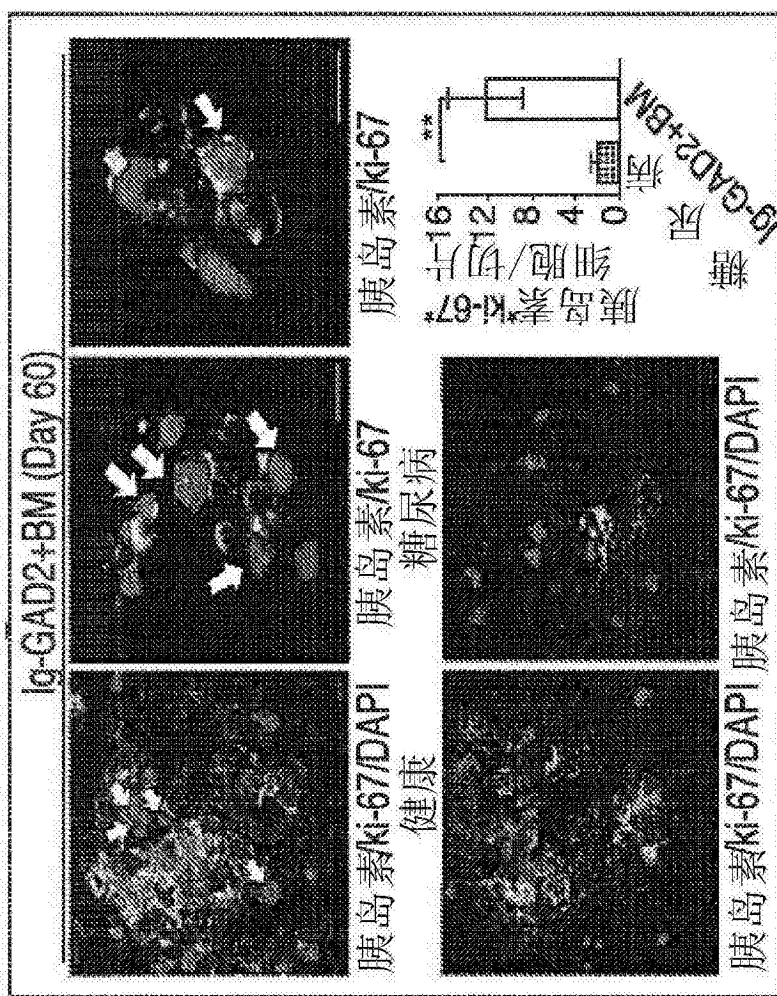
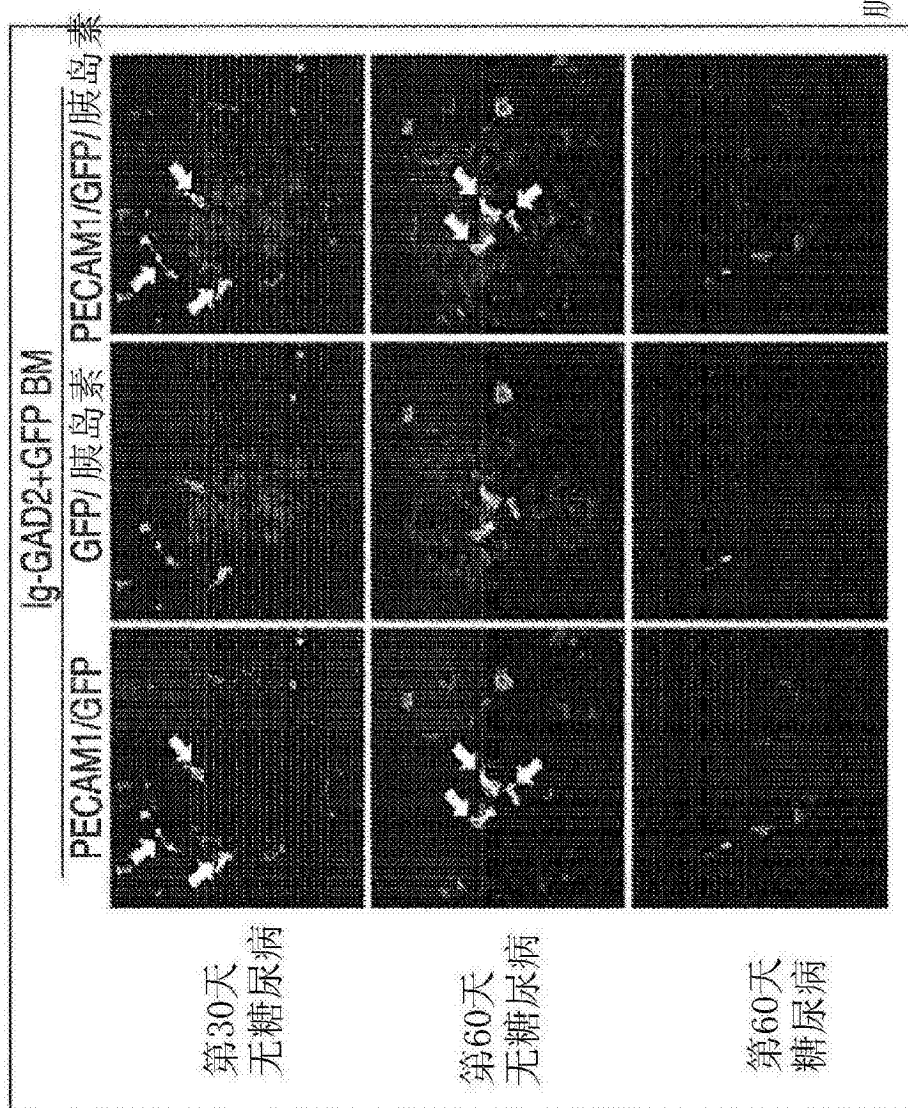
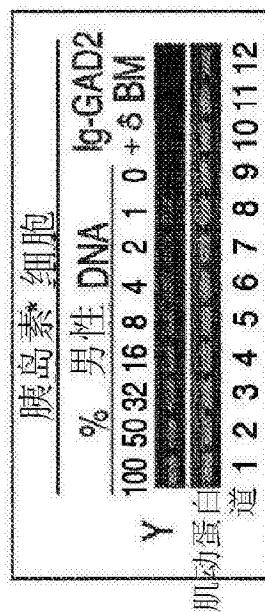
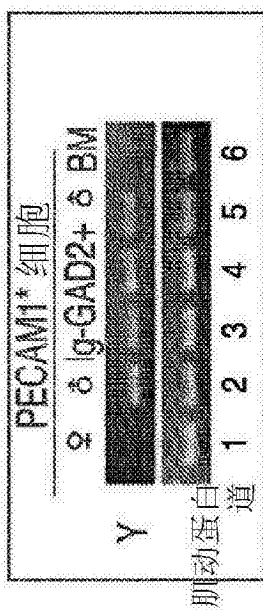
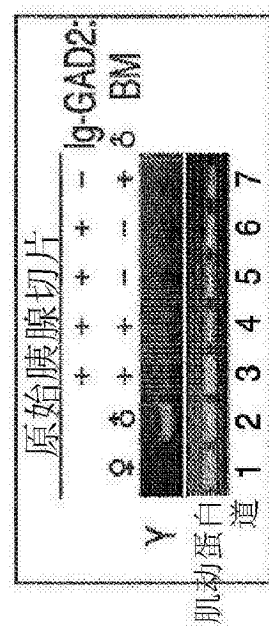


图 5C



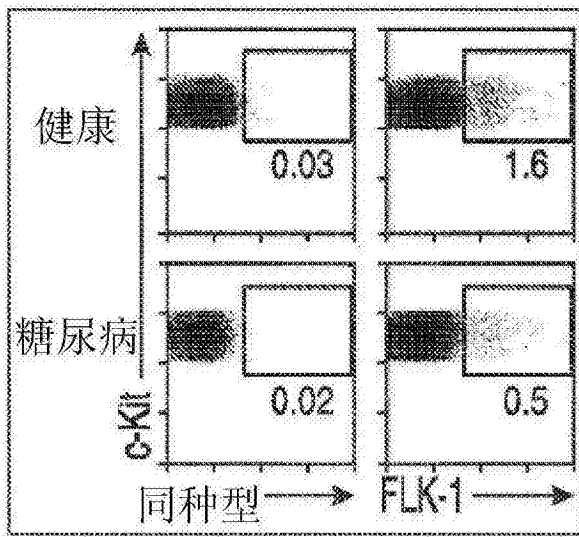


图 7A

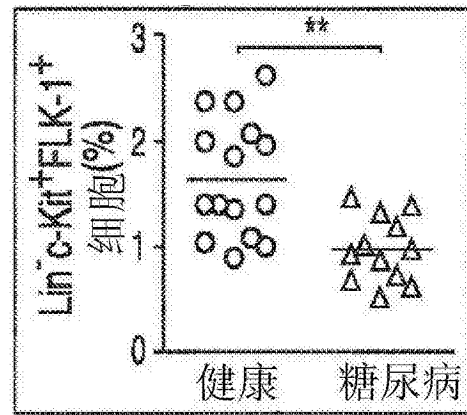


图 7B

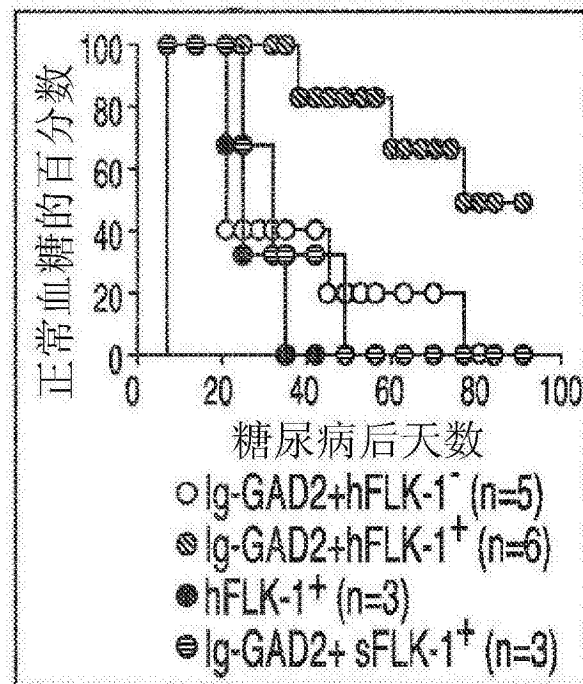


图 7C

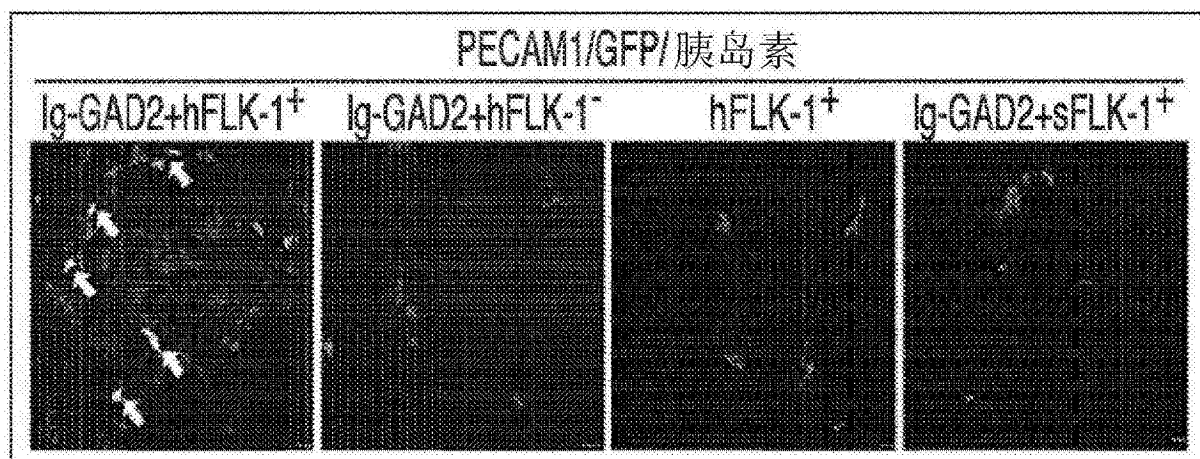


图 7D

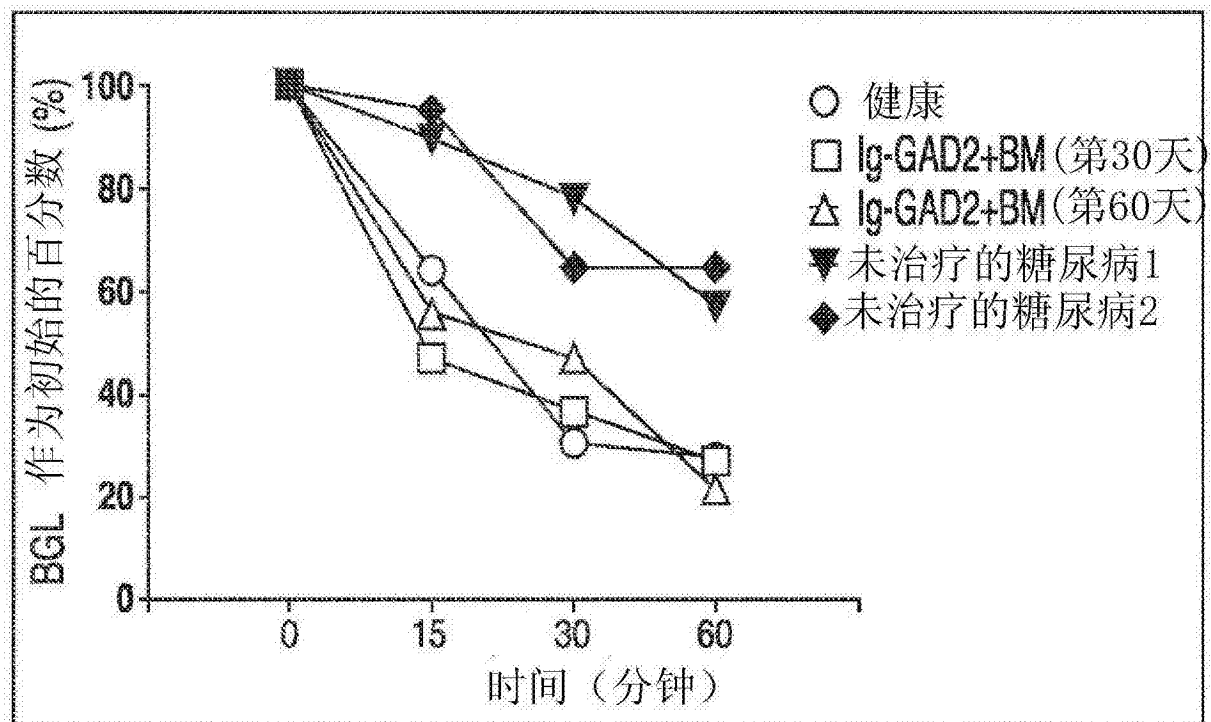


图 8

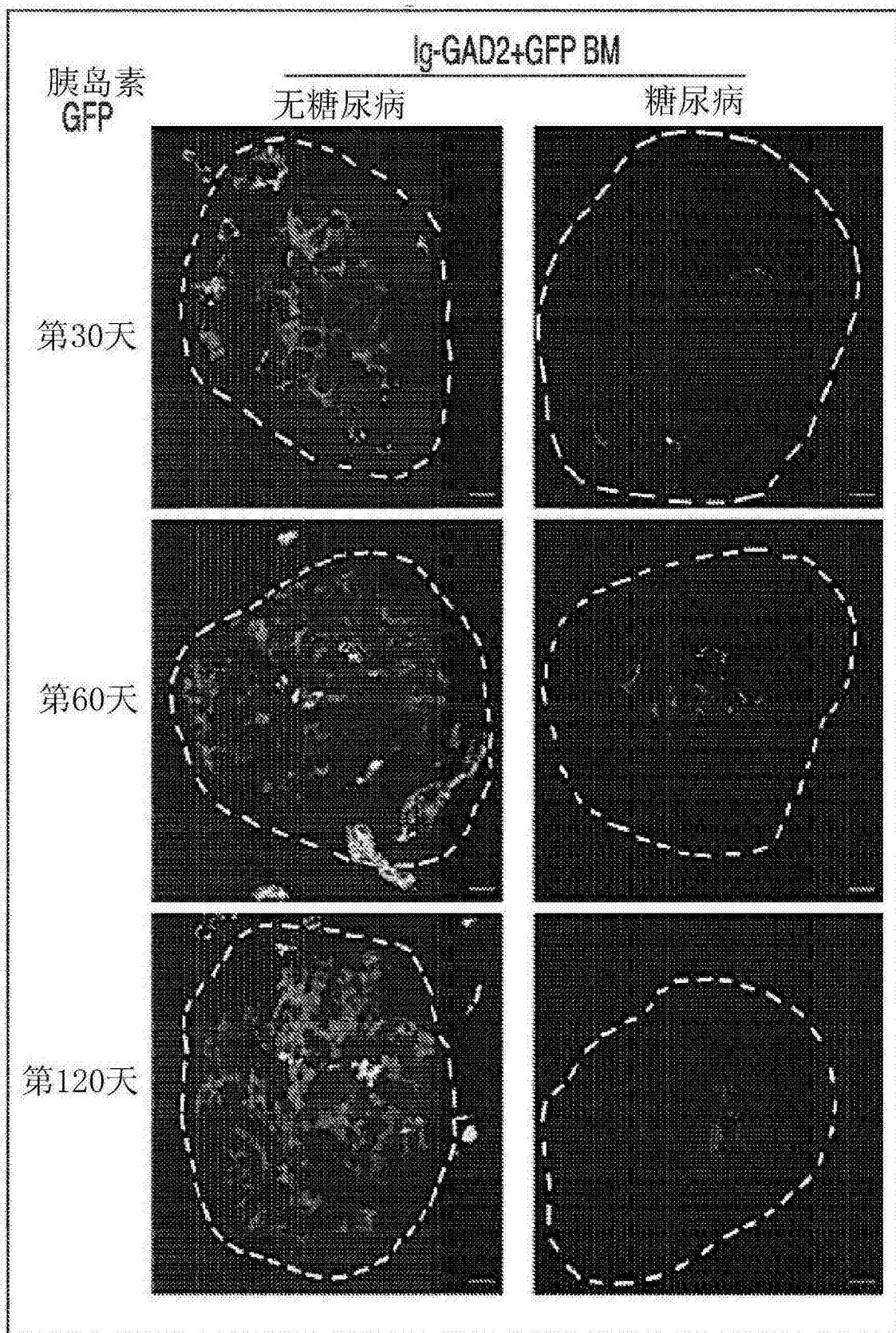


图 9

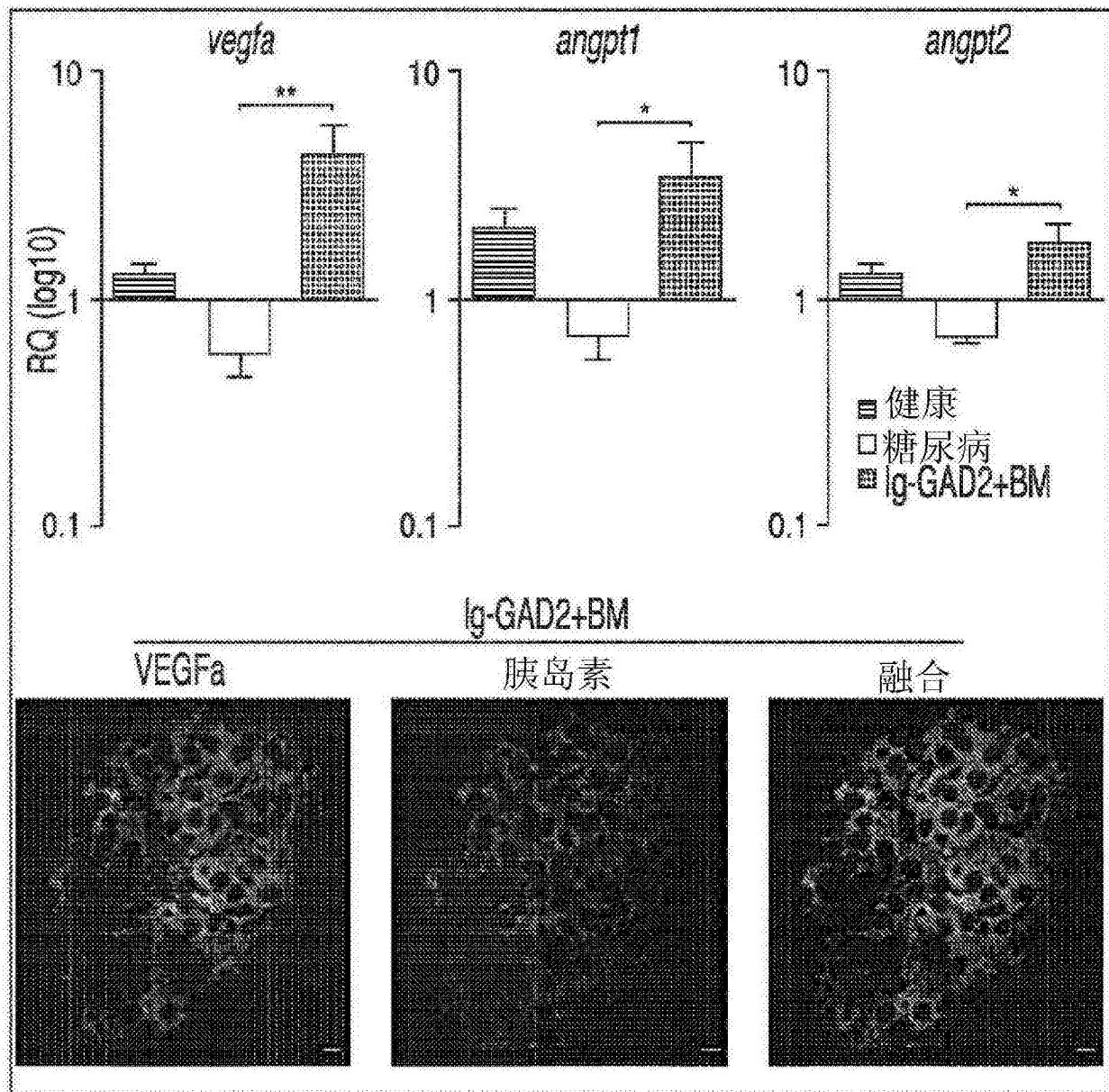


图 10