



(10) 授权公告号 CN 109477085 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 01

(21) 申请号 201780025135.5

(22) 申请日 2017.04.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109477085 A

(43) 申请公布日 2019.03.15

(30) 优先权数据
62/326,082 2016.04.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.10.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/028755 2017.04.21

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/184933 EN 2017.10.26

(73) 专利权人 萨鲁德医疗公司
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 科罗拉多州立大学董事会(法人
团体)

(72) 发明人 约翰·福萨叶什 雷蒙德·查韦斯
琳达·沃特金斯 彼得·格雷

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2015009955 A1,2015.01.22
US 2012058102 A1,2012.03.08
Nicola Tamassia等.Circulating
neutrophils of septic patients
constitutively express IL-10R1 and are
promptly responsive to IL-10.
《International Immunology》.2008,535-541.
Luca Crepaldi等.Up-Regulation of IL-
10R1 Expression Is Required to Render
Human Neutrophils Fully Responsive to IL-
10.《The Journal of Immunology》.2001,第167
卷(第4期),2312-2322.

审查员 范英程
权利要求书3页 说明书18页 附图2页

(54) 发明名称
增强白细胞介素10的抗炎作用的方法和组
合物

(57) 摘要
本发明涉及用于通过除了表达白细胞介素
10 (IL-10) 肽之外,还表达IL-10受体1型 (IL-
10R1) 肽以克服白细胞介素10 (IL-10) 的剂量依
赖性下调的方法和组合物。该方法可用于治疗多
种疾病和症状,包括但不限于神经性疼痛或慢性
疼痛;与多发性硬化、脊髓损伤、ALS、神经炎症、
关节炎和其他关节疾病相关的症状和生理伤害;
和自身免疫性疾病。

1. 一种治疗性组合物,所述组合物用于治疗受试者的炎症,所述组合物包含一种或更多种细菌载体、病毒载体、粘粒载体或人工染色体载体,所述一种或更多种细菌载体、病毒载体、粘粒载体或人工染色体载体包含白细胞介素10 (IL-10) 肽和白细胞介素10受体1型 (IL-10R1) 肽的编码序列;

其中所述IL-10肽和IL-10R1肽在所述受试者中的抗原呈递细胞中从一种或更多种载体表达;

其中至少一种组成型启动子驱动IL-10和IL-10R1编码序列的转录;并且

其中所述IL-10肽的位置129处的苯丙氨酸已被丝氨酸取代;

由此所述组合物克服了IL-10信号传导的下调。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体是噬菌体载体。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述组合物在抗原呈递细胞上实现组成型自分泌信号传导。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述抗原呈递细胞是IL-10R2阳性细胞。

5. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述载体还包含:

细菌骨架或病毒骨架;

内部核糖体进入位点 (IRES) 或自裂解肽;和

选自启动子序列、多腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节结构域、复制起点和内部核糖体进入位点的一种或更多种其他控制序列。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述载体还包含所述IL-10编码序列和/或所述IL-10R1编码序列的5'、3'或两者的至少一个核靶向序列。

7. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述载体还包含质粒骨架、卡那霉素抗性基因、CMV启动子、 β -珠蛋白内含子、生长激素polyA和两个AAV2 ITR。

8. 根据权利要求1、2和5-7中任一项所述的组合物,其中所述IL-10和所述IL-10R1从单一载体表达。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述载体是病毒载体。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述病毒载体是腺相关病毒载体。

11. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

12. 根据权利要求8所述的组合物,其中IL-10和IL-10R1编码序列被转录为单一mRNA。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述载体还包含在所述IL-10和IL-10R1编码序列之间的内部核糖体进入位点的编码序列。

14. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述载体还包含在所述IL-10和IL-10R1编码序列之间的自裂解2a肽的编码序列。

15. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述炎症是由神经性疼痛或慢性疼痛引起的,并且所述一种或更多种载体通过鞘内注射被递送。

16. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述炎症由多发性硬化引起,并且所述一种或更多种载体通过鞘内注射被递送。

17. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述炎症由自身免疫性疾病引起,并且所述一种或更多种载体通过鞘内注射被递送。

18. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述炎症位于关节中,并且所述一种或更多

种载体通过关节内注射被递送。

19. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述炎症是神经炎症。

20. 根据权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中所述抗原呈递细胞选自以下组成的组:成单核细胞、单核细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、泡沫细胞、成淋巴细胞和B淋巴细胞。

21. 根据权利要求1-4和20中任一项所述的组合物,其中所述抗原呈递细胞从待治疗的受试者中取出,在体外用所述一种或更多种载体转导,并施用回至所述受试者。

22. 根据权利要求1-7和20中任一项所述的组合物,其中所述抗原呈递细胞用所述一种或更多种载体稳定转化并维持在培养物中。

23. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述炎症由多发性硬化(MS)、神经性疼痛、慢性疼痛、关节炎、神经炎症或自身免疫性疾病引起。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中所述一种或更多种载体通过鞘内注射或关节内注射被递送。

25. 根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其中所述炎症位于关节中。

26. 一种单一病毒或细菌表达载体,其包含白细胞介素10(IL-10)和白细胞介素10受体1型(IL-10R1)的编码序列和至少一种组成型启动子,所述至少一种组成型启动子驱动IL-10和IL-10R1的编码序列的转录;其中IL-10肽的位置129处的苯丙氨酸已被丝氨酸取代。

27. 根据权利要求26所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述载体包含驱动所述IL-10和IL-10R1的编码序列的转录的单一启动子,并且还包含位于IL-10肽的编码序列和IL-10R1肽的编码序列之间的自裂解2a肽。

28. 根据权利要求26或27所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述载体还包含:

细菌骨架或病毒骨架;

内部核糖体进入位点(IRES)或自裂解肽;和

选自启动子序列、多腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节结构域、复制起点和内部核糖体进入位点的一种或更多种其他控制序列。

29. 根据权利要求28所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述载体还包含所述IL-10编码序列和/或所述IL-10R1编码序列的5'、3'或两者的至少一个核靶向序列。

30. 根据权利要求26或27所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述载体还包含质粒骨架、卡那霉素抗性基因、CMV启动子、 β -珠蛋白内含子、生长激素polyA和两个AAV2 ITR。

31. 根据权利要求1-2和5-6中任一项所述的组合物或根据权利要求26、28和29中任一项所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述组成型启动子选自以下组成的组:泛素启动子、CMV启动子、 β -肌动蛋白启动子、组蛋白H4启动子、EF-1 α 启动子、PGK基因启动子、U6启动子、H1启动子、7SL启动子、人类Y启动子、人类MRP-7-2启动子、腺病毒VA1启动子、人类tRNA启动子和5s核糖体RNA启动子。

32. 根据权利要求1-2和5-6中任一项所述的组合物或根据权利要求26、28和29中任一项所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述组成型启动子选自以下组成的组:由RNA聚合酶II控制的启动子、由RNA聚合酶I控制的启动子元件和由RNA聚合酶III控制的启动子元件。

33. 根据权利要求1-2和5-6中任一项所述的组合物或根据权利要求26、28和29中任一

项所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述组成型启动子是CMV启动子。

34.根据权利要求1-2和5-6中任一项所述的组合物或根据权利要求26、28和29中任一项所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述载体是质粒。

35.根据权利要求5或6所述的组合物或根据权利要求28或29所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述载体还包含标记基因。

36.根据权利要求1或2所述的组合物或根据权利要求26所述的单一病毒或细菌表达载体,其中所述组成型启动子选自由以下组成的组:U6-1、U6-8、U6-9、hY1、hY3、hY4和hY5启动子。

增强白细胞介素10的抗炎作用的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本国际PCT申请要求2016年4月22日提交的美国临时专利申请第62/326,082号的优先权。

发明领域

[0003] 本发明涉及通过除了表达白细胞介素10 (IL-10) 肽之外,还表达IL-10受体1型 (IL-10R1) 肽来减弱炎症信号传导的失活的方法和组合物。方法用于治疗多种状况,包括但不限于神经性疼痛;与多发性硬化、脊髓损伤、ALS、神经炎症、关节炎和其他关节疾病相关的症状,以及自身免疫性疾病。

[0004] 发明背景

[0005] 在下面的讨论中,将出于背景和介绍目的描述某些文章和方法。本文中包含的任何内容都不应被解释为对现有技术的“承认”。申请人明确保留在适当情况下根据适用法律规定来证明本文所引用的文章和方法不构成现有技术的权利。

[0006] 炎症与增强疼痛的促炎细胞因子和自由基 (诸如 H_2O_2 和NO) 的释放有关。为了限制炎症和伤害,还释放抗炎细胞因子诸如白细胞介素-10;例如,在发炎的组织中,IL-10升高至足以限制 (cap) 过度炎症的浓度。先前研究表明,当在神经性疼痛 (参见Watkins, USSN 14/066,581) 和多发性硬化 (MS) (参见Watkins, 等人, USSN 14/370,724) 的啮齿动物模型中通过鞘内注射以及在具有天然存在 (狗) 或手术诱导 (马) 的骨关节炎 (OA) 的大型动物中通过关节内注射 (参见Chavez, 等人, USSN 14/905,915) 时,人类白细胞介素-10 (hIL-10) 的质粒定向表达是抗触诱发痛的 (anti-allodynic)。在过去几年中进行的IND许可 (IND-enabling) 研究已经提供令人信服的证据,即,治疗慢性疼痛的该方法可能对人类安全有效。然而,在这些研究的过程中,已经变得清楚的是,IL-10当以低于1ng/ml的浓度存在时表现出最大信号传导效率,并且IL-10浓度的增加反而导致IL-10的下调。本领域对能够克服IL-10信号传导的下调以实现非剂量依赖性的更强大的IL-10介导的炎症抑制的方法和组合物存在需求。本发明解决此需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及用于通过在抗原呈递细胞中除了表达白细胞介素10 (IL-10) 肽之外,还表达IL-10受体1型 (IL-10R1) 肽 (本文中为“IL-10/IL-10R1表达载体”) 来克服IL-10的剂量依赖性下调的方法和组合物。方法用于治疗慢性疼痛或神经性疼痛;与多发性硬化、脊髓损伤、神经炎症、ALS和关节炎和其他关节疾病相关的症状和生理伤害;以及自身免疫性疾病。

[0009] 因此,在一个实施方案中,本发明提供用于治疗受试者炎症的方法,包括在受试者中的抗原呈递细胞中从一种或更多种细菌、病毒、噬菌体、粘粒或人工染色体载体表达白细胞介素-10 (IL-10) 肽和白细胞介素10受体1型 (IL-10R1) 肽。在该实施方案的一些方面中,在抗原呈递细胞中表达的IL-10肽包含在IL-10肽的铰链区中的突变,并且在一些方面中,IL-10肽包含突变,其中IL-10野生型序列的位置129处的苯丙氨酸已被丝氨酸、苏氨酸、丙

氨酸或半胱氨酸取代。在一些优选的方面中,野生型序列的位置129处的苯丙氨酸已被丝氨酸取代。

[0010] 在一些实施方案中,IL-10肽和IL-10R1肽从单一载体表达,并且在一些方面中,载体是病毒载体,病毒载体是腺相关病毒载体,或病毒载体是慢病毒载体。在一些方面中,IL-10和IL-10R1编码序列被转录为单一mRNA,并且载体包含在IL-10和IL-10R1编码序列之间的内部核糖体进入位点的编码序列或在IL-10和IL-10R1编码序列之间的自裂解2a肽的编码序列。

[0011] 在一些实施方案中,炎症由神经性疼痛或慢性疼痛引起,并且一种或更多种载体通过鞘内注射被递送。在又其他实施方案中,炎症由MS引起,并且一种或更多种载体通过鞘内注射被递送。在又其他实施方案中,炎症由自身免疫性疾病引起,并且一种或更多种载体通过鞘内注射被递送。在其他实施方案中,炎症位于关节中,并且一种或更多种载体通过关节内注射被递送。在又其他实施方案中,炎症是神经炎症。

[0012] 在一些实施方案中,抗原呈递细胞选自以下项的组:成单核细胞、单核细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、巨噬细胞、B细胞、树突细胞、泡沫细胞、成淋巴细胞和B淋巴细胞。在该实施方案的一些方面中,将抗原呈递细胞从待治疗的受试者中取出,在体外用一种或更多种载体转导,并且施用回至受试者;然而,在一些方面中,将抗原呈递细胞用一种或更多种载体稳定转化并且维持在培养物中。

[0013] 本发明的又其他实施方案提供单一病毒或细菌表达载体,其包含白细胞介素10(IL-10)和白细胞介素10受体1型(IL-10R1)的编码区。在该实施方案的一些方面中,载体是包含驱动IL-10肽和IL-10R1肽的转录的单一启动子的病毒载体,并且还包含位于IL-10肽的编码区和IL-10R1肽的编码区之间的自裂解2a肽。

[0014] 将在详述中描述本发明的这些和其他方面以及用途。

[0015] 附图简述

[0016] 图1是在神经性疼痛的慢性压迫性损伤模型中从用AAV-9-hIL-10注射大鼠获得的结果的绝对阈值(g)与注射后天数的图。

[0017] 图2是在神经性疼痛的慢性压迫性损伤模型中从用AAV9-hIL-10和AAV9-hIL10R1的1:1混合物注射大鼠获得的结果的绝对阈值(g)与注射后天数的图。

[0018] 图3是在复发-缓解型EAE大鼠中从用包封在PLGA微粒中的IL-10(圆圈)对大鼠进行鞘内注射获得的结果的运动评分与运动症状发作后的时间(天)的图。运动评分:0=正常;1=尾尖麻痹;2=全尾麻痹;3=后肢无力;4=后肢麻痹;5=完全的后肢麻痹;6-部分前肢麻痹。N=6/组。

[0019] 图4示出IL-10质粒显微注射到正常小鼠的脑和唐氏综合征的炎性小鼠模型(Dp16)的脑中的结果。

[0020] 发明详述

[0021] 定义

[0022] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文提及的所有出版物、公开的专利申请和专利通过引用全文并入,用于描述和公开可与当前描述的发明结合使用的装置、动物模型、制剂和方法。

[0023] 如本文所用的,“抗原呈递细胞”是指在其表面展示与主要组织相容性II类复合物(MHC)复合的抗原(抗原呈递)并且表达IL-10受体2型(IL-10R2)的各种细胞中的任一种。本发明的抗原呈递细胞包括但不限于星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、巨噬细胞、B细胞、树突细胞及其前体细胞。

[0024] 如本文所用的术语“抗炎”是指减少由神经、神经元、神经胶质细胞、内皮细胞、成纤维细胞、肌肉、免疫细胞或其他细胞类型产生的一种或更多种促炎细胞因子的作用或产生。

[0025] 如本文所用的术语“抗炎细胞因子”是指减少由神经、神经元、神经胶质细胞、内皮细胞、成纤维细胞、肌肉、免疫细胞或其他细胞类型产生的一种或更多种促炎细胞因子或蛋白的作用或产生的蛋白。炎性细胞因子和蛋白包括但不限于白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)等。本发明中感兴趣的抗炎细胞因子是白细胞介素-10(IL-10)、IL-10的全长分子和片段,以及修饰的IL-10肽,包括具有对天然序列的缺失、添加和取代(本质上保守的或非保守的)的那些修饰的IL-10肽,只要抗炎细胞因子为治疗上有效的即可。修饰可以有意的,如通过定点诱变,或者可以是偶然的,诸如通过产生蛋白的宿主的突变或由于PCR扩增引起的错误。因此,活性蛋白通常与亲本序列基本上同源,例如,蛋白通常与亲本序列多于70%相同。

[0026] 如本文所用的术语“自身免疫性疾病”是指由机体对通常存在于机体内的物质和组织的异常免疫应答而引起的病理状态。

[0027] 如本文所用的“慢性疼痛”是指持续比与特定类型的损伤或疾病过程相关的自然愈合的时间过程长的时间的疼痛。

[0028] 术语DNA“控制序列”共同地是指启动子序列、多腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节结构域、复制起点、内部核糖体进入位点、增强子等,它们共同地提供受体细胞中编码序列的复制、转录和翻译。并非所有这些类型的控制序列都需要存在,只要所选择的编码序列能够在合适的宿主细胞中复制、转录和翻译即可。

[0029] 例如IL-10或IL-10R1的“编码序列”或“编码”IL-10或IL-10R1的序列是当置于合适的控制序列的控制下时在体内转录(在DNA的情况下)并翻译(在mRNA的情况下)为多肽的核酸分子。编码序列的边界由与氨基末端处的起始密码子对应的核苷酸和与羧基末端处的翻译终止密码子对应的核苷酸确定。

[0030] 在本发明的方法中使用的术语“有效量”或“治疗有效量”的治疗性微粒组合物是指提供期望的反应,诸如疼痛减轻、炎症减轻、由炎性疾病引起的症状的缓解和/或预防由于炎性疾病引起的生理伤害的进展,和/或由例如MS、慢性疼痛、关节炎、神经炎症和自身免疫性疾病引起的症状的缓解的无毒但足够量的治疗性微粒组合物。所需的本发明的治疗性抗炎组合物的确切量将因受试者(取决于受试者的种类、年龄和一般状况)、待治疗的状况的严重程度、待递送的特定IL-10/IL-10R1表达载体、施用方式等而异。本文提供用于本方法的剂量参数;然而,本领域普通技术人员可通过本文所阐述的方法和常规实验确定在任一个体情况中的合适的“有效”量的优化。

[0031] 术语“赋形剂”是指添加到本发明的药物组合物中以进一步促进治疗性微粒组合物的施用的惰性物质。赋形剂的实例包括但不限于盐水、碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、任选用表面活性剂配制的透明质酸、Pluronic F-68、植物

油和聚乙二醇。

[0032] 术语“体外”是指在人工环境中(例如,在试管或反应容器中、在细胞培养物中等)发生而不是在生物体内发生的事件。

[0033] 术语“关节”是指两骨相遇之处的解剖结构,包括将骨彼此连接的韧带、将肌肉附接到骨的肌腱、关节囊、滑囊(bursa)和滑膜。可用本文的方法治疗的关节包括固定关节、屈戌关节(hinge joint)、枢轴关节或球窝关节。

[0034] 术语“关节炎症”或“关节疼痛”是指由炎症引起的所有类型的关节炎,其中类风湿性关节炎、骨关节炎是最常见的;以及由关节炎症引起的其他状况,包括肌腱炎、滑囊炎、韧带炎症、滑膜炎、痛风和系统性红斑狼疮。

[0035] 如本文所用的,术语“多发性硬化”或“MS”是指中枢神经系统的进行性神经退行性疾病,其最常以其中一段时期脱髓鞘之后是一段时期功能恢复的复发/缓解的形式发生。恢复阶段涉及经由少突胶质细胞前体细胞或少突胶质细胞祖细胞的迁移和成熟的髓鞘再生。然而,随着疾病的进展,髓鞘再生失败,功能逐渐丧失。完整轴突的髓鞘再生失败的可能解释包括少突胶质细胞前体细胞募集到脱髓鞘部位中的缺陷或少突胶质细胞前体细胞分化成髓鞘少突胶质细胞中的缺陷。虽然研究表明,少突胶质细胞前体细胞生物学的两个方面在MS中发生了改变,但是在成人中枢神经系统中协调这些过程的分子机制未被完全理解,但是已知包括炎症。

[0036] 术语“核靶向序列”是指行使功能以改善细胞中抗炎细胞因子的表达效率的核酸序列。

[0037] “可操作地连接”是指元件的布置,其中如此描述的组分被配置以执行它们的通常的功能。因此,与编码序列可操作地连接的控制序列能够影响编码序列的表达。控制序列不需要与编码序列邻接,只要它们行使功能以指导编码序列的表达即可。因此,例如,介入的非翻译但转录的序列可存在于启动子序列和编码序列之间,并且启动子序列仍然可被认为与编码

[0038] 序列“可操作地连接”。

[0039] 本文使用的术语“启动子”从其通常意义上说是指包含DNA调节序列的核苷酸区域,其中调节序列源自能够结合RNA聚合酶并启动下游(3'方向)编码序列转录的基因。转录启动子可包括“诱导型启动子”(其中与启动子可操作地连接的多核苷酸序列的表达通过分析物、辅因子、调节蛋白等被诱导),“阻抑型启动子”(其中与启动子可操作地连接的多核苷酸序列的表达通过分析物、辅因子、调节蛋白等被诱导)和“组成型启动子”。

[0040] 为了遍及本申请描述核苷酸序列在特定核酸分子中的相对位置的目的,诸如当特定核苷酸序列相对于另一个序列被描述为位于“上游”、“下游”、“3端(3')”或“5端(5')”时,应理解它是序列在如本领域中常规地被称为DNA分子的“有义”或“编码”链中的位置。

[0041] 如本文所用的术语“研究工具”是指本发明的任何方法,其使用治疗性微粒组合物进行科学探究(无论本质上是学术上还是商业上的),包括开发其他药物和/或生物治疗剂。本发明的研究工具并不旨在为治疗性的或经受监管批准;相反,本发明的研究工具旨在促进研究并且有助于这类开发活动,包括旨在产生支持监管意见书的信息而执行的任何活动。

[0042] 如本文所用的,术语“可选择标记(selectable marker)”是指引入细胞的、特别地

在本发明的上下文中引入到培养的细胞中的赋予适于人工选择的性状的基因。通常使用的可选择标记是本领域普通技术人员所熟知的。

[0043] 术语“受试者”、“个体”或“患者”在本文中可以被可互换地使用,并且指脊椎动物,优选哺乳动物。

[0044] 如本文所用的术语“治疗性组合物”或“治疗性抗炎组合物”是指具有降低炎症细胞因子的浓度和/或炎症作用的能力的IL-10/IL-10R1表达载体组合物。如在任一已知动物模型中测量的或通过人类中执行的评估,本发明的治疗性组合物可用于治疗例如MS、慢性疼痛、关节炎、神经炎症和自身免疫性疾病。

[0045] “治疗(treatment/treating)”炎症包括:(1)在可能易患炎症但尚未经历或表现出症状的受试者中减轻炎症或使炎症以较低强度发生,(2)抑制炎症,即使炎症的发展停滞或逆转由炎症引起的症状或生理伤害,或(3)减轻或逆转由炎症引起的生理伤害。

[0046] “载体”是其中另一个异源DNA区段可插入至其的复制子,诸如质粒、噬菌体、病毒构建体、粘粒、细菌人工染色体、人源人工染色体或酵母人工染色体。本文中的载体被用于转导和表达IL-10肽和IL-10R1肽。

[0047] 除非另有说明,否则本文所描述的技术的实践可采用在本领域技术人员的能力范围内的有机化学、聚合物技术、分子生物学(包括重组技术)、细胞生物学、生物化学和测序技术的常规技术和描述。通过参考本文中的实施例可获得合适技术的具体说明。然而,当然也可使用其他等同的常规程序。这些常规技术和描述可见于标准实验室手册诸如LeDoux (Ed.) (2005), *Animal Models of Movement Disorders* (Academic Press); Chow, 等人, (2008), *Using Animal Models in Biomedical Research* (World Scientific Publishing Co.); Weir和Blackwell (Eds.), *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (Blackwell Scientific Publications); Creighton (1993), *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company); Sambrook和Russell (2006), *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 和Sambrook和Russell (2002), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (均来自Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) *Biochemistry*, Fourth Ed. (W.H. Freeman); Gait (1984), “*Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*” (IRL Press); Nelson和Cox (2000), *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Third Ed. (W.H. Freeman); 和Berg等人 (2002) *Biochemistry*, Fifth Ed. (W.H. Freeman) 中; 出于所有目的, 所有这些都通过引用全文并入本文中。

[0048] 注意, 除非上下文另有明确说明, 否则如本文和所附权利要求中所使用的, 单数形式“一(a/an)”和“所述/该(the)”包括复数指示物。

[0049] 在提供数值范围的情况下, 应理解, 在该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所述范围内的任何其他所述或中间值被涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地被包括在较小范围内, 并且也被涵盖在本发明内, 服从在所述范围内任何具体排除的限值。在所述范围包括一个或两个限值的情况下, 排除这些包括的限值中的一个或两个限值的范围也被包括在本发明中。

[0050] 在以下描述中, 阐述许多具体细节以提供对本发明的更透彻的理解。然而, 对于本领域技术人员明显的是, 本发明可在没有这些具体细节中的一个或多个的情况下被实

践。在其他情况下,本领域技术人员熟知的公知特征和过程没有被描述,以避免模糊本发明。

[0051] 本发明的方法

[0052] 本发明提供通过向受试者施用表达白细胞介素-10 (IL-10) 编码序列和白细胞介素-10受体1型 (IL-10R1) 编码序列的载体来治疗与炎症相关的疾病和状况的方法。在优选的实施方案中,IL-10肽和IL-10R1肽从单一表达载体表达;然而,在可选的实施方案中,IL-10编码序列和IL-10R1编码序列从不同的表达载体表达。在一些实施方案中,一种或更多种IL-10/IL-10R1表达载体通过例如鞘内施用(用于治疗例如慢性疼痛、神经炎症、MS或自身免疫性疾病)或通过关节内注射(用于治疗关节炎)被施用至受试者。在又其他实施方案中,IL-10/IL-10R1表达载体通过细胞疗法被施用至受试者;即,IL-10/IL-10R1表达载体首先被用于转化或转导抗原呈递细胞(包括取自受试者的抗原呈递细胞),然后将抗原呈递细胞施用至受试者。本发明的方法可用于治疗炎症和由与任何疾病或状况相关的炎症引起的生理伤害,所述疾病或状况包括但不限于慢性疼痛、MS、自身免疫性疾病、神经炎症和关节炎。

[0053] 已经发现,通过抗炎细胞因子白细胞介素10 (IL-10) 的作用可实现对大范围炎症介质的显著抑制。IL-10是星形胶质细胞和小胶质细胞的天然产物,并与由这些细胞表达的受体结合,产生由这些细胞产生的局部炎症反应的自分泌调节。由于炎症的复杂性,任何具有重建正常小胶质细胞功能的能力的剂必需能够同时靶向许多不同的子系统。IL-10与两种受体(IL-10R1和IL-10R2)形成三结合体(tripartite)复合物,首先与IL-10R1结合(Ding等人,J.Immunol.,167(12):6884-92(2001)),其中该复合物然后与

[0054] IL-10R2接合。IL-10R2是比IL-10R1更丰富和混杂的信号传导亚基,其也与IL-22及其主要受体复合(Kotenko等人,J.Biol.Chem.,276(4):2725-32(2001))。IL-10R1在抗原呈递细胞的细胞膜中以低水平存在并且通过IL-10信号传导和通过炎症介质如LPS被上调(Ledeboer等人,Eur.J.Neurosci.,16(7):1175-85(2002))。上调增强通过IL-10R2受体的信号传导,激活下游效应分子诸如JAK1、TYK2和STAT1和STAT3,并且增强通过PI3K-AKT的间接信号传导。该协调的信号传导负责IL-10的抗炎作用以及其刺激IgG产生和B细胞增殖的能力,甚至它下调抗原呈递细胞诸如巨噬细胞和T细胞上的抗原呈递。当IL-10过度刺激靶细胞时,一类称为细胞因子信号传导的抑制因子(SOCS)的八个蛋白的两个成员被诱导(Ding等人,J.Immunol.,170(3):1383-91(2003),Kazi等人,Cell Mol.Life Sci.,71(17):3297-3310(2014))。SOCS1和SOCS3由IL-10以浓度依赖性方式被诱导,但SOCS1特异性地抑制IL-10信号传导(Ding等人,2003,同上),并且IL-10R1被SOCS3(一种E3泛素连接酶)泛素化,从而通过蛋白酶体靶向来下调膜结合的IL-10R1(Wei等人,J.Interferon Cytokine Res.,26(5):281-90(2006))。本发明人已经发现,在浓度超过约0.5ng/mL时,IL-10反常地抑制其自身的活性。不受任何一种理论的束缚,该抑制可解释为什么病毒介导的IL-10表达虽然是组成型的,对神经性疼痛具有早期治疗作用,该治疗作用相对较快地消失,而鞘内的质粒IL-10提供多达12周的作用。也就是说,正是这一现象解释了为什么与在IL-10质粒注射后观察到的低得多的浓度的脑脊液IL-10(~150pg/mL)对疼痛的更大作用相比,非常高水平的腺病毒驱动的脑脊液IL-10浓度(~10ng/mL)导致对疼痛缺乏治疗作用。因此,本发明提供了第二代疗法,其通过共表达IL-10与其主要受体IL-10R1以在抗原呈递(IL-10R2-

阳性)细胞上实现组成型自分泌信号传导来显著拓宽IL-10的治疗窗口。

[0055] 本发明一般性地提供了用于治疗炎症疾病和状况以及与炎症疾病相关的症状和生理伤害的方法和治疗性抗炎组合物。本发明还提供本发明的方法和治疗性抗炎组合物在炎症疾病研究中的应用,包括鉴定可与本发明的治疗性组合物以“混合物”方式联合使用的药物、小分子和/或生物制剂。该方法包括向受试者施用包含IL-10编码序列和IL-10R1编码序列的

[0056] IL-10/IL-10R1表达载体的步骤。本发明的IL-10/IL-10R1表达载体通常被悬浮在稀释剂中以形成治疗性组合物。抗炎治疗性组合物可由以下组成:能够表达IL-10和IL-10R1编码序列并转化或转导受试者中的抗原呈递细胞的单一“裸露”细菌载体或病毒载体、两种细菌或病毒载体(其中一种载体编码IL-10肽,并且另一种载体编码IL-10R1肽)、封装的载体或经转导的表达IL-10和IL-10R1的抗原呈递细胞。

[0057] 载体和载体组分

[0058] 在本发明方法的一些实施方案中使用的IL-10/IL-10R1表达载体包含细菌骨架(质粒DNA)或病毒骨架;IL-10编码序列;IL-10R1编码序列;任选地,IL-10编码序列和/或IL-10R1编码序列的5'(上游)、3'(下游)或两者的至少一个核靶向序列;内部核糖体进入位点(IRES)或自裂解肽;和至少一种启动子和一种或更多种其他DNA控制序列。尽管其中IL-10肽和IL-10R1肽从单一载体表达的实施方案是优选的,并且是本说明书中详细描述的实施方法,但应理解,IL-10肽和IL-10R1肽可在不同载体上编码并被直接共递送至受试者,或被共递送至受体抗原呈递细胞,其然后被递送至受试者。任选地,IL-10/IL-10R1表达载体还包含一个或多个标记序列,以允许在IL-10/IL-10R1表达载体的制备期间或在递送到受体抗原呈递细胞之后选择转化的细胞。

[0059] IL-10/IL-10R1表达载体包含至少一种IL-10编码序列。IL-10可以以野生型形式被使用,或IL-10可以为突变体IL-10。与野生型IL-10相比,一种特别感兴趣的突变体IL-10含有引起IL-10蛋白的“铰链”区中的氨基酸取代、添加或缺失的一个或多个突变。人类IL-10蛋白是同二聚体,其中每个单体包含6个 α 螺旋A→F,其长度分别为21、8、19、20、12和23个氨基酸。一个单体的螺旋A→D与第二单体的螺旋E和F非共价地相互作用,形成非共价的V形同二聚体。根据本发明被靶向突变的“铰链”区包含野生型IL-10的一个或两个单体上的D和E α 螺旋之间的氨基酸。例如,已经描述突变体大鼠和人类IL-10蛋白,其中野生型序列的位置129处的苯丙氨酸已被丝氨酸残基取代(参见,例如,Sommer,等人,WO2006/130580和Milligan,等人,Pain,126:294-308(2006))。所得突变体

[0060] IL-10被称为IL-10^{F129S}。氨基酸位置129处的野生型苯丙氨酸的其他取代可以为例如苏氨酸、丙氨酸或半胱氨酸。因此,本发明在又一个方面中涵盖在IL-10蛋白的铰链区内的在氨基酸位置129处或在其他氨基酸处的一个或多个取代。

[0061] IL-10R1(人类NCBI参考序列:NP_001549.2)是在某些细胞类型(主要是抗原呈递细胞)表面上表达的具有单一跨膜结构域的糖蛋白。IL-10R1结合IL-10并且是IL-10的生物活性所必需的。IL-10与其细胞表面受体的结合激活JAK-STAT信号转导途径。在配体-受体相互作用之后,受体相关的Janus酪氨酸激酶(JAK)家族的成员Jak1(与IL-10R1相关)和Tyk2(与IL-10R2相关)被磷酸化。IL-10R1在通过SOCS3的泛素化之后经历蛋白酶体降解。

[0062] 在一些实施方案中,载体可以为细菌、噬菌体或粘粒载体。细菌载体可利用本领域

技术人员已知的任何细菌骨架。通常选择的骨架是例如含有或缺少适合的限制性位点以便于克隆的骨架、可容易地制备和分离的骨架、不是免疫原性的骨架等。可被使用的示例性载体包括但不限于衍生自重组细菌噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA的那些载体。例如,可使用质粒载体,诸如pBR322、pUC 19/18、pUC 118、119和M13 mp系列载体。细菌噬菌体载体可包括 λ gt10、 λ gt11、 λ gt18-23、 λ ZAP/R和EMBL系列的细菌噬菌体载体。可利用的粘粒载体包括但不限于pJB8、pCV 103、pCV 107、pCV 108、pTM、pMCS、pNNL、pHSG274、COS202、COS203、pWE15、pWE16和卡隆粒(charomid) 9系列载体。另外的载体包括基于功能性致育质粒(F-质粒)的细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)和衍生自P1细菌噬菌体的DNA的DNA构建体(PACS)。

[0063] 在可选的实施方案中,载体是病毒载体。一般而言,基因疗法中使用的五种最常用的病毒系统类别可根据它们的基因组是否整合到宿主细胞染色质(致癌逆转录病毒和慢病毒)中或主要作为染色体外的附加体存在于细胞核中(腺相关病毒、腺病毒和疱疹病毒)而分为两组。

[0064] 可与本发明的IL-10表达构建体一起使用的一种病毒递送系统是基于来自逆转录病毒科(Retroviridae)的病毒的系统。逆转录病毒科包含单链RNA动物病毒,其特征在于两个独特的特征。首先,逆转录病毒的基因组是二倍体,由两个拷贝的RNA组成。其次,该RNA通过病毒体相关酶逆转录酶被转录为双链DNA。然后,该双链DNA或原病毒可整合到宿主基因组中,并且作为稳定整合的宿主基因组的组分从亲代细胞传递到子代细胞。

[0065] 在一些实施方案中,慢病毒是用于本发明的、特别是在其中转导的抗原呈递细胞是被施用至受试者的治疗性抗炎组合物的实施方案中的逆转录病毒科的优选成员。慢病毒载体通常用水疱性口炎病毒糖蛋白(VSV-G)假型化,并且衍生自人类免疫缺陷病毒(HIV),人类获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的病原体;Visna Maedi病毒,其引起绵羊的脑炎(Visna)或肺炎;马传染性贫血病毒(EIAV),其引起马的自身免疫性溶血性贫血和脑病;猫免疫缺陷病毒(FIV),其引起猫免疫缺陷;牛免疫缺陷病毒(BIV)其引起牛的淋巴结病和淋巴细胞增多症;和猴免疫缺陷病毒(SIV),其引起非人灵长类动物的免疫缺陷和脑病。基于HIV的载体通常保留<5%的亲本基因组,并且<25%的基因组被掺入到包装构建体中,这最小化产生恢复复制能力的HIV的可能性。通过开发含有下游长末端重复序列中调节元件的缺失的自失活载体、消除载体动员所需的包装信号的转录,进一步提高生物安全性。使用慢病毒载体的主要优点是基因转移持续存在于大多数组织或细胞类型中。

[0066] 在本发明的另一个实施方案中,利用来自细小病毒科(Parvoviridae)的病毒。细小病毒科包括小的单链、无包膜DNA病毒科,基因组的长度为约5000个核苷酸。科成员中包括腺相关病毒(AAV),一种依赖性细小病毒,根据定义,其需要与另一种病毒(通常是腺病毒或疱疹病毒)共感染,以启动和保持生产感染周期。在没有这类辅助病毒的情况下,AAV仍然能够通过受体介导的结合和内化来感染或转导靶细胞,穿透到非分裂细胞和分裂细胞二者的核中。

[0067] 腺病毒(Ad)是相对被良好表征的同源病毒的组,包括超过50种血清型。参见,例如,国际PCT申请第W0 95/27071号。腺病毒是中等尺寸(90-100nm)、无包膜(没有外部脂质双层)的二十面体病毒,其包括核衣壳和双链线性DNA基因组。在人类中存在57种描述的血清型,其导致儿童中5-10%的上呼吸道感染,以及成人中的许多感染。它们根据巴尔的摩

(Baltimore)分类方案被归类为组I,意指它们的基因组由双链DNA组成,并且是最大的无包膜病毒。由于它们的大尺寸,它们能够通过核内体转运(即,不需要包膜融合)。病毒体还具有与衣壳的每个五邻体基相关的独特“刺突”或纤维,其有助于经由宿主细胞的表面上的柯萨奇-腺病毒受体附着至宿主细胞。腺病毒基因组是在26和45kb之间的线性、非分段的双链(ds)DNA,允许病毒理论上携带22至40个基因。虽然这比其所在的巴尔的摩组中的其他病毒显著更大,但它仍然是一种非常简单的病毒且在很大程度上依赖宿主细胞以存活和复制。一旦病毒得以进入宿主细胞,核内体酸化,其通过使衣壳组分分离而改变病毒的拓扑结构。在细胞微管的帮助下,病毒被转运到核孔复合物中,其中腺病毒颗粒被分解。病毒DNA随后被释放,其可通过核孔进入核。此后,DNA与组蛋白分子缔合。因此,可进行病毒基因表达并且可生成新的病毒颗粒。

[0068] 与慢病毒不同,腺病毒DNA不整合到基因组中并且在细胞分裂期间不复制。还构建了重组腺病毒衍生的载体,特别是降低野生型病毒的重组和生成的可能性的那些载体。参见国际PCT申请第W0 95/00655和W0 95/11984号。

[0069] 本领域技术人员已知的其他病毒或非病毒系统也可被用于将本发明的IL-10/IL-10R1表达载体递送至受试者,包括但不限于基因缺失的腺病毒-转座子载体,其通过整合到宿主细胞中在体内稳定维持病毒编码的转基因(参见Yant,等人,Nature Biotech.20:999-1004(2002));衍生自辛德毕斯病毒或塞姆利基森林病毒的系统(参见Perri,等人,J.Virol.74(20):9802-07(2002));衍生自新城疫病毒或仙台病毒的系统;或缺乏细菌DNA序列的小环DNA载体(参见Chen,等人,Molecular Therapy.8(3):495-500(2003))。如美国专利公开第2004/0214329号中所描述的小环DNA公开提供持续高水平的核酸转录的载体。

[0070] 除了IL-10和IL-10R1编码序列之外,核靶向序列可存在于本发明的IL-10/IL-10R1表达载体中。核靶向序列为促进由IL-10编码序列和IL-10R1编码序列编码的蛋白的表达的序列。例如,在一个方面中,核靶向序列可与核转运伴侣蛋白结合,促进质粒DNA被细胞核摄取。这类序列包括但不限于散落性(或散布的)DNA重复序列或重复序列诸如转座因子,侧翼或末端重复序列诸如逆转录病毒基因组诸如SV40上的长末端重复序列(LTR),串联重复序列,和病毒基因组(诸如腺相关病毒和腺病毒)的反向末端重复序列(ITR)。在其他方面中,核靶向序列是起作用以结合转录因子以进入核的序列,诸如增强子序列。

[0071] 除了载体骨架、IL-10和IL-10R1编码序列和任选的一种或更多种核靶向序列之外,本发明的IL-10/IL-10R1表达载体包含一个或更多个DNA控制序列,诸如启动子序列、多腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节结构域、复制起点、内部核糖体进入位点等,它们共同地提供IL-10/IL-10R1编码序列在受体细胞中的复制、转录和翻译。并非所有这些控制序列都需要一直存在,只要IL-10/IL-10R1编码序列能够在合适的宿主细胞中被复制、转录和翻译即可。

[0072] 特别地,本发明的IL-10/IL-10R1表达载体包含至少一个驱动IL-10和IL-10R1编码序列转录的启动子。在优选的实施方案中,该启动子是组成型启动子。当提及启动子时的术语“组成型”意指启动子在不存在特定刺激(例如,热休克、化学物质、光等)的情况下指导可操作地连接的核酸序列的转录。通常,组成型启动子能够在基本上任何细胞和任何组织中指导编码序列的表达。用于转录IL-10/IL-10R1肽的启动子优选是组成型启动子,诸如由RNA聚合酶II控制的泛素、CMV、 β -肌动蛋白、组蛋白H4、EF-1 α 或PGK基因的启动子,或由RNA

聚合酶I控制的启动子元件。在优选的实施方案中,使用由RNA聚合酶III控制的启动子元件,诸如U6启动子(例如U6-1、U6-8、U6-9)、H1启动子、7SL启动子、人类Y启动子(hY1、hY3、hY4和hY5)、人类MRP-7-2启动子、腺病毒VA1启动子、人类tRNA启动子、5s核糖体RNA启动子以及任何这些启动子的功能性杂合体和组合。

[0073] 在可选的实施方案中,IL-10/I1-10R1编码序列可在诱导型启动子的控制下,诸如四环素控制的转录激活,其中转录在抗生素四环素或其衍生物诸如多西环素存在下可逆地被开启(Tet-On)或关闭(Tet-Off)。在Tet-Off系统中,四环素响应元件控制的基因的表达可被四环素及其衍生物抑制。四环素结合四环素反式激活因子蛋白,使其不能够与四环素响应元件序列结合,防止四环素响应元件控制的基因的反式激活。另一方面,在Tet-On系统中,四环素反式激活因子蛋白只有在被四环素结合时才能够启动表达;因此,四环素或多西环素的引入启动IL-10/I1-10R1肽的转录。本领域已知的另一种诱导型启动子系统是雌激素受体条件基因表达系统。与Tet系统相比,雌激素受体系统不被如此严格受控;然而,因为Tet系统依赖于靶基因的转录和随后的翻译,所以Tet系统不像雌激素受体系统那样快速起作用。

[0074] 本发明的方法涉及在相同的抗原呈递细胞中共表达IL-10肽和IL-10R1肽。为实现这一目的,本领域普通技术人员可采用多种技术,包括共转染两种或更多种质粒、使用多种或双向启动子,或优选地,建立双顺反子或多顺反子载体。与产生表达的每个基因的独特mRNA转录物的启动子不同,多顺反子载体从同一mRNA同时表达两种或更多种不同的肽——在这种情况下是IL-10肽和IL-10R1肽。真核生物中的翻译通常始于5'帽子,使得对于每个mRNA,仅发生单一翻译事件。然而,一些双顺反子载体利用称为内部核糖体进入位点(IRES)的元件,允许从mRNA的内部区域开始翻译。

[0075] 可选地,可使用“自裂解”2A肽代替多顺反子载体中的IRES元件。自裂解肽短(约20个氨基酸)并且从同一、单一mRNA产生等摩尔水平的多个基因。“裂解”发生在自裂解肽的C末端上发现的甘氨酸和脯氨酸残基之间,所述自裂解肽位于两种不同肽的编码区之间。常见的2A自裂解肽包括肽T2A、P2A、E2A和F2A。

[0076] 任选地,本发明的载体还包含选择标记基因,诸如编码抗生素抗性的基因。用于本发明的标记基因包括但不限于人类神经生长因子受体(用单克隆抗体(MAb)检测,诸如美国专利号6,365,373中所描述的);截短的人类生长因子受体(用MAb检测);突变的人类二氢叶酸还原酶(DHFR;可用荧光MTX底物);分泌型碱性磷酸酶(SEAP;可用荧光底物);人类胸苷酸合成酶(TS;赋予对抗癌剂氟脱氧尿苷的耐受性);人类谷胱甘肽S-转移酶 α (GSTA1;使谷胱甘肽缀合至干细胞选择性烷化剂白消安;CD34+细胞中的化学保护性可选择标记);造血干细胞中的CD24细胞表面抗原;赋予对N-磷酸乙酰基-L-天冬氨酸(PALA)的耐受性的人类CAD基因;人类多药耐受性-1(MDR-1;通过增加的药物耐受性或通过FACS富集可选择的P-糖蛋白表面蛋白);人类CD25(IL-2 α ;通过MAb-FITC可检测);甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT;通过卡莫司汀可选择);和胞苷脱氨酶(CD;通过Ara-C可选择)。还可采用药物可选择标记,诸如嘌呤霉素、潮霉素、杀稻瘟菌素、G418、四环素。此外,使用FAC分选,任何荧光标记基因可用于阳性选择,如化学发光标记(例如Halotags)等也可用于阳性选择。

[0077] 在构思经由鞘内或关节内注射将IL-10/IL-10R1表达载体直接递送至受试者的情况下,IL-10/I1-10R1表达载体优选是如上所描述的基于病毒的载体。然而,在如下文更详

细描述的将转化或转导的抗原呈递细胞施用至受试者的实施方案中,还构思了可将所选择的抗原呈递细胞工程化以制备表达IL-10肽和IL-10R1肽的人工染色体。全功能人类人工染色体提供优于基于病毒的递送系统的若干优势,包括增加的有效载荷尺寸、染色体外维持避免了宿主细胞破坏的事实、和避免引入的基因的转录沉默和可能的免疫并发症。目前,存在几种用于工程化人类人工染色体的方法,包括“自上而下(top down)”方法、“自下而上(bottom up)”方法、创建小染色体和诱导的从头染色体生成。人工染色体形成的“自下而上”方法依赖于细胞介导的从头染色体形成,之后用克隆的 α -卫星序列转染允许的细胞系,所述 α -卫星序列包含典型的宿主细胞适合的着丝粒和一个或更多个可选择标记基因,具有或没有端粒和基因组DNA。(关于方案和这些方法的详细描述,参见例如,Henning,等人,PNAS USA,96:592-97(1999);Grimes,等人,EMBO Rep.2:910-14(2001);Mejia,等人,Genomics,79:297-304(2002);和Grimes,等人,Mol.Ther.,5:798-805(2002))。制备人工染色体的“自上而下”方法涉及连续轮次的预先存在的染色体臂的随机和/或靶向截短,以产生包含着丝粒、端粒和DNA复制起点的精减的人工染色体。(关于方案和这些方法的详细描述,参见例如,Choo,Trends Mol.Med.,7:235-37(2001);

[0078] Barnett,等人,Nuc.Ac.Res.,21:27-36(1993);和Kato,等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.,321:280-90(2004))。“自上而下”人工染色体被最优化地构建为缺乏天然存在的表达的基因并被工程化为含有允许靶DNA序列位点特异性地整合(例如通过位点特异性DNA整合酶介导)至截短的染色体上的DNA序列。

[0079] 本领域已知的制备人工染色体的第三种方法是天然存在的小染色体的工程化。该制备方法通常涉及染色体的辐射诱导的片段化,所述染色体含有功能性的例如具有着丝粒功能的人类新着丝粒,但缺乏 α -卫星DNA序列并且被工程化为缺乏非必需DNA。(关于方案和这些方法的详细描述,参见例如,Auriche,等人,EMBO Rep.2:102-07(2001);Moralli,等人,Cytogenet.Cell Genet.,94:113-20(2001);和Carine,等人,Somat.Cell Mol.Genet.,15:445-460(1989))。与其他产生人工染色体的方法一样,工程化的小染色体可被工程化为含有允许靶DNA序列例如IL-10和IL-10R1序列的位点特异性整合的DNA序列。用于制备人工染色体的第四种方法涉及通过靶向扩增特定染色体区段来诱导从头染色体生成。该方法涉及大规模扩增位于近端着丝粒染色体上的围着丝粒/核糖体DNA区域。扩增通过共转染染色体臂间区域(诸如核糖体RNA)特异性的过量DNA、和允许例如IL-10和IL-10R1编码序列的位点特异性整合的DNA序列、以及还有整合到染色体的臂间区域中的药物可选择标记来触发。(关于方案和这些方法的详细描述,参见例如,Csonka,等人,J.Cell Sci 113:3207-16(2002);Hadlaczky,等人,Curr.Opini.Mol.Ther.,3:125-32(2001);和Lindenbaum和Perkins,等人,Nuc.Ac.Res.,32(21):e172(2004))。在该过程期间,通过共转染的DNA靶向近端着丝粒染色体的臂间区域诱导大规模染色体DNA扩增、着丝粒序列的复制/激活、以及随后的双着丝粒染色体的断裂和分离,产生含有多个位点特异性整合位点的基于“断裂”卫星DNA的人工染色体。

[0080] 递送

[0081] 可体内或体外(也称为离体)将IL-10/IL-10R1表达载体引入受试者。体内引入包括将IL-10/IL-10R1表达载体直接施用至受试者,并且体外引入包括将已被工程化为共表达IL-10和IL-10R1的抗原呈递细胞

[0082] 施用至受试者。

[0083] 用于治疗关节炎症的优选递送方法是关节注射(关节内注射),其中将皮下注射针注射到受影响的关节中,递送一定剂量的本发明的治疗性抗炎组合物。在治疗慢性或神经性疼痛、MS、神经炎症或自身免疫性疾病中,鞘内施用是优选的。鞘内注射涉及将治疗性抗炎组合物注射到椎管或蛛网膜下腔中,使其到达脑脊髓液。

[0084] 可选地,如果在体外转导,优选将期望的抗原呈递受体细胞从受试者中取出,用IL-10/IL-10R1表达载体转化或转导并重新引入受试者中(即,抗原呈递细胞是自体的)。然而,可选地,可转化或转导同基因或异种抗原呈递细胞(例如来自已经用IL-10/IL-10R1表达载体稳定转化的已建立的抗原呈递细胞系)用于递送到受试者中。可被转化或转导的抗原呈递细胞或其前体细胞包括来自单核细胞家族的任何细胞,包括成单核细胞、单核细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、巨噬细胞、B细胞、树突细胞、泡沫细胞、成淋巴细胞和B淋巴细胞。可在未分化状态下转导和培养前体抗原呈递细胞,然后在递送至受试者之前进行体外分化。

[0085] 可通过本领域已知的任何方法将IL-10/IL-10R1表达载体递送至待被工程化的抗原呈递细胞。术语转染和转化是指由宿主细胞摄取外源核酸例如表达载体(无论是否实际表达任何编码序列)。许多转染方法是普通技术人员已知的,例如,农杆菌介导的转化,原生质体转化(包括聚乙二醇(PEG)介导的转化、电穿孔、原生质体融合和微细胞融合),脂质介导的递送,脂质体、电穿孔、声孔效应、显微注射、粒子轰击和碳化硅晶须介导的转化及其组合;使用磷酸钙的直接摄取;聚乙二醇(PEG)介导的DNA摄取;脂质体转染;微细胞融合;脂质介导的运载体系统;或其他合适的方法。通常通过检测转染的细胞内IL-10/IL-10R1基因转录物或IL-10/IL-10R1肽的存在来识别成功的转染。

[0086] 因为病毒载体是本发明的优选实施方案,所以优选使用病毒载体转导抗原呈递细胞。病毒感染的使用是独特的,因为病毒天然存在的将其遗传物质引入到细胞中的方法被用来将感兴趣的核酸分子转移到细胞中。如以上所讨论的,修饰和应用于此类技术的病毒的实例包括腺病毒、腺相关病毒和逆转录病毒。通常,可将感兴趣的核酸分子克隆到病毒基因组中。病毒基因组复制和包装之后,所得病毒颗粒能够经由病毒进入机制将感兴趣的核酸递送到细胞中。通常,在添加感兴趣的核酸之前,首先通过核酸操作使病毒基因组为复制缺陷的。所得病毒基因组或病毒载体需要使用辅助病毒或包装系统来完成病毒颗粒组装和从细胞的释放。

[0087] 如果经由例如鞘内或关节内注射将IL-10/IL-10R1表达载体直接施用至受试者,则表达载体可任选地被包封用于递送。用于包封IL-10/IL-10R1表达载体的技术取决于所用微粒的类型而变化,并且这些技术描述于例如Chavez,等人,USSN.14/905,915中。微粒可包含任何可生物降解的聚合物。为了成功地用作本发明的受控药物递送制剂中的可生物降解的聚合物,该材料必需是化学惰性的并且不含可浸出的杂质。理想地,聚合物还具有适合的物理结构,具有最小的不希望的老化,并且是容易可加工的。一些材料包括聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙烯醇)、聚(丙烯酸)、聚丙烯酰胺、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(乙二醇)和聚(甲基丙烯酸)。在本发明中特别有用的可生物降解的聚合物包括聚交酯(PLA)、聚乙交酯(PGA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、聚酐、聚己内酯、聚-3-羟基丁酸酯和聚原酸酯。这类可生物降解的聚合物已被广泛表征,并

且可被配制表现出期望的降解特性,如本领域已知的(参见,例如Edlund&Albertsson, Degradable Aliphatic Polyesters, pp.67-112(2002), Barman, 等人, J. of Controlled Release, 69:337-344(2000); Cohen, 等人, Pharmaceutical Res., (8):713-720(1991))。

[0088] 在本发明的一个具体实施方案中,聚合物包含聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)。PLGA是共聚物,由于其可生物降解性和生物相容性,PLGA被用于许多FDA批准的治疗装置。取决于用于聚合的丙交酯与乙交酯的比例,可获得不同形式的PLGA:这些通常根据所用单体的比例被鉴定(例如,PLGA75:25表示其组成为75%(摩尔百分比)乳酸和25%(摩尔百分比)乙醇酸的共聚物。PLGA在水存在下通过其酯键的水解而降解。已经表明,PLGA降解所需的时间与制备中使用的单体比例相关:乙交酯单元的含量越高,降解所需的时间越短。此规则的例外是具有50:50单体比例的共聚物,其表现出更快的降解(约两个月)。此外,用酯封端的聚合物(与游离羧酸相对)表现出更长的降解半衰期。可选地,可将IL-10/IL-10R1表达载体包封在多于一批的具有不同释放曲线的微粒中;例如,待被递送的表达载体的10%可被包封在具有例如一天到四周的释放曲线的微粒中;待被递送的表达载体的30%可被包封在具有例如三周到六周的释放曲线的微粒中;待被递送的表达载体的30%可被包封在具有例如六周到十周的释放曲线的微粒中;并且待被递送的表达载体的30%可被包封在具有例如八周到十二周的释放曲线的微粒中。在这类实施方案中,可使用单一类型的可生物降解的聚合物,但是用于具有不同释放曲线的制剂中;可选地,可使用具有不同释放特性的不同可生物降解的聚合物。

[0089] 一旦获得微粒,将它们悬浮在可接受的稀释剂中以形成用于施用至动物的治疗性组合物。这类稀释剂(或赋形剂)包括本身不诱导产生对接受组合物的个体有害的抗体并且可被施用而没有过度毒性的任何药剂。药学上可接受的稀释剂可包括山梨糖醇、矾、右旋糖酐、硫酸盐、大的聚合阴离子、各种TWEEN化合物中的任一种和液体诸如水、盐水、甘油或乙醇、油和水乳液,或佐剂诸如弗氏佐剂。

[0090] 因为本发明的方法和治疗性抗炎组合物在受试者中不会显著诱导免疫应答或剂量耐受性,所以它们可根据需要被使用和/或施用以实现治疗作用。即,治疗性抗炎组合物可根据需要大约每30-90天被递送(或根据例如载体类型(细菌、病毒(整合或非整合的)、人工染色体)和可生物降解聚合物的降解曲线所要求的)被递送,以实现短期疗法的治疗作用。例如,当需要长期疗法时,治疗性组合物可根据需要大约每90天被递送以实现持续超过一年的治疗作用;并且如果必需的话,持续受试者的生命期。

[0091] 用于本发明的方法的治疗性抗炎组合物的剂量范围因受试者(取决于受试者的种类、年龄和一般状况)、待治疗的状况的严重程度和待递送的特定IL-10/IL-10R1表达载体、施用方式等而异。例如,取决于期望的持续时间和注射的解剖部位,剂量范围包括10-1000 μ g载体DNA/kg、20-500 μ g载体DNA/kg、25-250 μ g载体DNA/kg或50-100 μ g载体DNA/kg的治疗有效剂量。

[0092] 本发明的方法中使用的IL-10/IL-10R1表达载体或含有IL-10/IL-10R1表达载体的微粒可与可用于治疗炎症的其他治疗剂以“混合物”的方式共施用,所述其他治疗剂包括但不限于糖皮质激素;甲氨蝶呤;羟氯喹;柳氮磺胺吡啶;来氟米特;抗TNF剂诸如依那西普,英夫利昔单抗和阿达木单抗;阿巴西普;非甾体类抗炎药物(NSAID);醋酸格拉替雷和干扰素B,米托蒽醌和那他珠单抗。另外,本发明的方法中使用的IL-10/IL-10R1表达载体可与细

胞诸如经生物工程化为表达IL-10/IL-10R1表达载体的干细胞共施用。通常,本领域已知的任何方法都可被用于监测人类中的成功治疗,包括临床和表型指标。

[0093] 待治疗的状况

[0094] 因为本发明的组合物和治疗性抗炎组合物克服IL-10的下调,实现稳健的IL-10介导的炎症抑制,因此它们在治疗许多疾病和状况方面是有效的。例如,本发明的方法和治疗性抗炎组合物可用于治疗由多发性硬化(MS)引起的症状和伤害。MS是中枢神经系统的慢性、通常使人衰弱的自身免疫性疾病。这种疾病折磨着全世界大约2.5-3百万人,以及美国的~40万人,每周有200人被诊断出。在发病时,~85%的患者表现出复发缓解型疾病(RRMS),10%表现出原发进展型疾病(PPMS)并且5%表现出进展复发型疾病(PRMS)。完全神经恢复通常发生在RRMS的第一次发作之后,但是这些患者中的~50%在10年期间将在随后的复发中累积越来越持久性的神经功能缺陷,并且转变为疾病的继发进展期,其变得越来越致残。MS的临床症状在患者与患者之间高度不同。症状列表包括认知障碍、功能障碍,视力丧失,虚弱,痉挛,缺乏协调,失衡,疲劳,性、肠和膀胱功能障碍,感觉异常和疼痛。临床上显著的疼痛被多达65%的患者在其疾病过程中经历过并且代表最具致残性、不过未被认识到且经常未被充分治疗的症状之一。疼痛通常是神经性的,并且取决于所涉及的受伤害的神经元,性质可不同。还应注意的是,疼痛是通过目前疗法治疗效果不佳的突出的MS症状。

[0095] 除了MS之外,可使用本发明的方法和治疗性抗炎组合物治疗由髓鞘损失介导的其他状况。这些状况包括神经炎症(即由21三体引起的神经炎症)、缺血性脱髓鞘状况、炎性脱髓鞘状况、小儿脑白质营养不良、粘多糖病、围产期生发基质出血、脑瘫、脑室周围白质软化症、辐射诱发的状况和由于各种病因引起的皮质下脑白质病,以及精神疾病诸如精神分裂症。缺血性脱髓鞘状况包括皮质中风、腔隙性梗塞、缺氧后脑白质病、糖尿病性脑白质病和高血压性脑白质病。炎性脱髓鞘状况包括多发性硬化、谢耳德氏病、横贯性脊髓炎、视神经炎、接种后脑脊髓炎和感染后脑脊髓炎。小儿脑白质营养不良状况包括溶酶体贮积病(例如,泰-萨二氏病(Tay-Sachs Disease)、海绵状脑白质营养不良症(Canavan's Disease),佩梅病(Pelizaeus-Merzbacher Disease)和克拉勃球样体脑白质营养不良(Crabbe's Globoid body leukodystrophy)。粘多糖病的实例是Sly氏病(Sly's Disease)。辐射诱发的状况包括放射诱发的脑白质病和辐射诱发的脊髓炎。导致皮质下脑白质病的病因包括HIV/AIDS、头部创伤和多发梗塞状态。

[0096] 另外,本发明的方法和治疗性抗炎组合物还可用于治疗膝、肘、腕、踝、髌、肩或脊柱中的关节炎症。通过本发明的方法和治疗性抗炎组合物可治疗的状况包括类风湿性关节炎和骨关节炎,以及肌腱炎、滑囊炎、韧带炎症、滑膜炎、痛风和系统性红斑狼疮。

[0097] 本发明的方法和治疗性抗炎组合物的又另一种用途是治疗自身免疫性疾病。自身免疫性疾病代表宿主免疫系统对宿主组织中特定靶的攻击,导致功能的致命损失和病理症状。此现象的典型实例是在患有重症肌无力的患者中存在针对存在于神经肌肉接合处的烟碱乙酰胆碱受体的抗体。因为该受体在将信号从运动神经元传递到肌肉中非常重要,所以这类抗体会导致部分麻痹和其他神经肌肉缺陷。尚不清楚为什么会出现这类自身抗体,但唯一有效的治疗方法是血浆置换术;即,更换血液中的血浆部分以降低病理性抗体的循环浓度。尽管在许多情况下,已经鉴定出解释特定疾病病理学的占优势的抗体,但是在治疗这些疾病方面没有真正的进展。这可部分地因为研究人员持续关注致病性抗体及其影响,而

不是将自身免疫性疾病视为耐受性失败。

[0098] 免疫耐受性被定义为在对先前为针对抗原的抗体呈血清反应阳性的动物中施用该抗原的缩减响应。可通过将动物暴露于递增剂量的抗原来教导适应性免疫系统忽略给定的抗原。这被称为脱敏,并且它主要在人类中被用于治疗各种过敏,例如花生过敏。然而,这是缓慢且不确定的过程,往往是无效的。免疫系统对特定抗原的反应方式部分地由反应性、细胞毒性B-&T-淋巴细胞与最近发现的调节性B-&T-细胞之间的平衡所驱动。用IL-10刺激这些细胞诱导从细胞毒性转换为耐受性表型。事实上,该转换引起IL-10从这些相同的细胞(称为调节性B细胞和T细胞)中的分泌。因此,将T细胞和B细胞暴露于外源IL-10被预期会诱导对抗原的耐受性。然而,在实践中,使外源IL-10浓度达到适当浓度以实现此转变是困难的。在这些细胞中组合的IL-10和IL-10R1表达被预期诱导在某种程度上不依赖于IL-10浓度的表型转换。

[0099] 可用本发明的方法和治疗性抗炎组合物治疗或改善的自身免疫性疾病包括但不限于心肌炎、狼疮性肾炎和其他狼疮病、间质性膀胱炎、自身免疫性肝炎、斑秃、获得性大疱性表皮松解症、艾迪生氏病、1型糖尿病、格雷夫病、乳糜泻、克罗恩病、溃疡性结肠炎、再生障碍性贫血和其他贫血、强直性脊柱炎、费尔蒂综合征、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮、施尼茨勒综合征、纤维肌痛、重症肌无力、格林巴利综合征、Lambert-Eaton肌无力综合征、自身免疫性视网膜病变、Cogan综合征、Grave眼病(Grave's ophthalmopathy)、巩膜炎、梅尼埃病、Churg-Strauss综合征、川崎病、类风湿性血管炎和结节性多动脉炎。此外,可用本发明的方法和治疗性抗炎组合物治疗自身免疫性疾病常见的状况,诸如慢性疲劳综合征、复杂性区域性疼痛综合征、嗜酸细胞性食管炎、胃炎、POEMS综合征、雷诺现象、原发性免疫缺陷和坏疽性脓皮病。

[0100] 当查阅本发明以下实施例之后,本发明的另外的目的、优点和新颖特征对于本领域技术人员将变得明显,这些实施例不旨在为限制性的。在实施例中,被建设性地减少以进行实践的程序以现在时态被描述,并且在实验室中进行的程序以过去时态被阐述。

实施例

[0101] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开内容和描述,并且不旨在限制发明人视为其发明的范围,也非旨在表示或暗示下面的实验是执行的全部或仅有实验。本领域技术人员将理解,可对如具体实施方案中所示的本发明进行多种变化和/或修改,而不脱离如广泛描述的本发明的精神或范围。因此,本发明的实施方案在所有方面都被认为是说明性的而非限制性的。

[0102] 已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,份数是重量份数,分子量是重均分子量,温度是以摄氏度计,并且压力是大气压或接近大气压。

[0103] 实施例1-表达载体

[0104] XT-250是含有大鼠IL-10cDNA的表达质粒,所述大鼠IL-10cDNA在这些研究中被使用仅仅是因为rIL-10与人类IL-10(hIL-10)相比显著更好地与大鼠IL-10R1受体接合。XT-250与其hIL-10对应物XT-150一样,是DNA在D-甘露糖中的溶液。无论种类如何,所使用的IL-10cDNA都含有产生氨基酸变化F129S的点突变,已发现该氨基酸变化在疼痛模型中产

生显著更长的功效持续时间 (Milligan等人, Pain, 126(1-3):294-308(2006))。质粒骨架含有卡那霉素抗性基因、CMV启动子、 β -珠蛋白内含子、生长激素polyA和2个AAV2 ITR。该质粒也被用于制备AAV9载体。

[0105] LV02是表达质粒,其含有上述控制元件,其中CMV启动子下游的cDNA包含hIL-10R1编码序列,随后是2a(自裂解肽)和hIL-10编码序列。HT-1080细胞的测试转染揭示IL-10R1的表面表达和IL-10分泌到培养基中(2.1ng/mL)。

[0106] 实施例2-支持数据

[0107] 应当注意,IL-10在物种特异性方面显示出一些特质。例如,小鼠IL-10不与人类IL-10受体相互作用,尽管人类IL-10确实与小鼠IL-10受体结合,并且人类IL-10与大鼠IL-10受体微弱结合。由于这个原因,大鼠IL-10(rIL-10)通常用于大鼠实验,而人类IL-10(hIL-10)已被用于小鼠、狗和马研究。hIL-10仅在高浓度激活大鼠IL-10受体的事实是非常有用的特征,因为人类IL-10R1在靶大鼠组织中的共表达引起对人类IL-10的完全应答。为了简化递送,构建了编码rIL-10、hIL-10或hIL-10R1的腺相关病毒(AAV)。选择血清型9,因为当鞘内注射时AAV9分布非常好并且转导自身表达IL-10R1的多种细胞,包括抗原呈递细胞,诸如星形胶质细胞。如图1所示,AAV9-hIL-10在神经性疼痛的大鼠慢性压迫性损伤(CCI)模型中是抗触诱发痛的,但效果消退。然而,AAV9-hIL-10和AAV9-hIL10R1的1:1混合物在该模型中指导稳定的触诱发痛消除(图2),这与组合的IL-10和IL-10R1表达允许高得多的鞘内给药以在整个脊髓和白质束中驱动广泛的炎症抑制的假设一致。空心圆圈=AAV9-hIL-10R1;实心圆圈=AAV9-hIL-10+XR-101;实心方块=AAV9-hIL-10Ra+AAV9-hIL-10。

[0108] 为了简化两种cDNA的施用,构建双顺反子载体,其中EF1 α 启动子指导hIL-10R1和hIL-10的表达。初级翻译产物含有2a自裂解肽。当将该质粒瞬时转染到HT-180细胞中时,通过ELISA(R&D Systems)容易地检测到培养基中的hIL-10,约2ng/mL。此外,通过免疫荧光检测到转染的而不是对照细胞中的表面IL-10R1。

[0109] 已经发现IL-10在复发-缓解型EAE大鼠中的基于质粒的基因转移是有效的(Sloane等人,Brain, Behavior and Immunity, 23(1):92-100(2009))。在此研究中,包封在PLGA微粒中的质粒在已经发生尾部麻痹时被鞘内注射(图3)。值得注意的是,IL-10逆转尾部麻痹并消除类似MS的病理。运动评分:0=正常;1=尾尖麻痹;2=全尾麻痹;3=后肢无力;4=后肢麻痹;5=完全后肢麻痹;6-部分前肢麻痹。N=6/组。

[0110] 实施例3-通过IL-10/IL-10R1表达载体的治疗以评估运动残疾

[0111] 在当可观察到症状诸如尾部麻痹时,用MOG处理以诱导类似轻度复发-缓解型MS病理的大鼠被鞘内注射先前在此模型中显示有效的IL-10质粒剂量(Sloane等人,2009)。除了IL-10质粒之外,给予单独的大鼠群组等量的几乎相同的质粒,其中IL-10cDNA被IL-10/IL-10R1盒(命名为LV02)取代。该30天实验的目的在于确定在较高剂量LV02是否比XT-250(仅IL-10表达)更好地起作用。在低质粒剂量(3 μ g),预期两种制剂之间几乎没有差异。然而,在高剂量(~100 μ g),在观察到XT-250功效的损失时,LV02的持续功效被预期。

[0112] 成年雄性Dark Agouti大鼠(250-300g;Envigo)可用于经由皮内注射

[0113] 在不完全弗氏佐剂(1:1比例)中乳化的0.01M乙酸钠(pH 3.0)中的35 μ gMOG诱导EAE。注射后约1周,大鼠表现出进展性运动损害(和触诱发痛),从尾部麻痹(运动评分=1)

开始,最终导致评分为7,在这时将其安乐死。然而,在中期,动物在复发前自发地改善。当大鼠表现出尾部麻痹时,将大鼠(N=5/组)用XT-250或LV02以约40 μ l的体积进行鞘内注射(经由腰部4/5;L4/5)。向5只大鼠的组注射PBS(对照)或DNA(1、3、7、10、30或100 μ g)XT-250或LV02。在接下来的30天内,对动物进行运动残疾评分。

[0114] 实施例4-通过IL-10/IL-10R1表达载体的治疗以评估脊柱上病变(supra-spinal lesion)的减少

[0115] 进行剂量范围实验,其中实现LV02的剂量,其中运动缺陷方面的功效被维持但是脊柱上病变显著减少(H&E)并且脱髓鞘被减少(Luxol Fast Blue)。以在实施例3中进行的实验中发现有效的最高剂量,将LV02、XT-250或PBS鞘内注射到EAE大鼠(N=5/组)中。在动物返回到评分为0(正常)(通常<2周)时,此实验的周期结束。CSF样品取自幼稚动物、施用LV02时和紧接灌注/固定之前的相同动物。用PBS灌注动物,然后用PBS/4%多聚甲醛灌注。在切片之前,将脊髓和脑转移到冷冻保护剂(PBS中的30%蔗糖)中。用苏木精-伊红(H&E)染色脊髓(纵向)和脑(冠状)切片(40微米)以鉴定病变和淋巴细胞性浸润。相邻切片用Luxol Blue染色以鉴定脱髓鞘区域。还针对人类IL-10R1(Millipore#06-1067)、Iba1(小胶质细胞)、GFAP(星形胶质细胞)和NeuN(神经元)染色切片。与MHC-II抗体共染色鉴定出抗原呈递细胞的活化。在脊髓的每个水平(腰部、胸、颈部),计算在纵向切片中通过H&E鉴定出的病变。类似地,来自脑干、小脑、枕叶皮层和额叶皮层的切片通过H&E对病变的存在进行评分。与PBS对照相比,预期到在脊髓中在XT-250和LV02二者中病变的显著(非配对t-检验)减少。如果LV02在脑干和皮层白质束中比XT-250更好地起作用,则应检测每个切片的病变的显著差异。

[0116] 实施例5-通过IL-10/IL-10R1表达载体的治疗以评估生物分布

[0117] 评估各种剂量的LV02的质粒DNA在整个脑中的生物分布。此实验被设计旨在了解质粒随着时间的推移如何分布在白质束和脊髓中。经由幼稚大鼠的L4/5鞘内注射最高可行剂量的LV02(300 μ g)(N=3/时间点)。在注射后4小时、7天和30天从脊髓(腰部、胸、颈部)、脑干、枕叶皮层和额叶皮层中分离组织。从这些组织中提取DNA并进行定量PCR。此实验揭示LV02通过大脑如何分布以及它是否持续延长的时间段。

[0118] 实施例6-统计分析

[0119] 用统计软件计算运动缺陷评分和免疫组织化学分析数据的所有统计学比较。经由非参数Wilcoxon秩和检验分析运动缺陷评分。重复测量ANOVA统计检查在整个实验中测试的时间点的组效应。免疫组织化学标记将通过双尾t检验统计被分析。

[0120] 实施例7:在唐氏综合征模型小鼠中检测神经炎症

[0121] 在另一个实施例中(图4),将编码小鼠IL-10F129S的表达质粒注射到正常小鼠的脑中以及被工程化以模拟唐氏综合征的小鼠(dp16)的脑中表明,IL-10的过表达显著降低IL-10R1 mRNA的表达,支持来自发明人的实验室和公开的发现(参见例如,Ding,等人,J Immunol 167(12):6884-6892(2001))的其他数据。图4示出IL-10的信号传导受体(IL-10R1)的mRNA的水平。与无注射对照相比,pDNA-IL10治疗显著抑制野生型和唐氏综合征小鼠脑中IL-10R1的基因表达。

[0122] 前文仅说明本发明的原理。应当理解,本领域技术人员将能够设计各种布置,这些布置虽然未在本文中明确描述或示出,但体现本发明的原理并且包括在本发明的精神和范

围内。此外,本文叙述的所有实施例和条件语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和发明人为推动领域而贡献的概念,并且应被解释为不限于这类具体叙述的实施例和条件。此外,本文叙述本发明的原理、方面和实施方案以及其具体实施例的所有陈述旨在涵盖其结构和功能等同物。另外,这些等同物旨在包括当前已知的等同物和将来开发的等同物,即,开发的执行相同功能的任何元件,而不管结构如何。因此,本发明的范围不旨在限于本文示出和描述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求体现。在以下的权利要求中,除非使用术语“装置”,否则其中所述的特征或元件均不应被解释为根据 35U.S.C. §112, ¶6 的装置加功能限制。

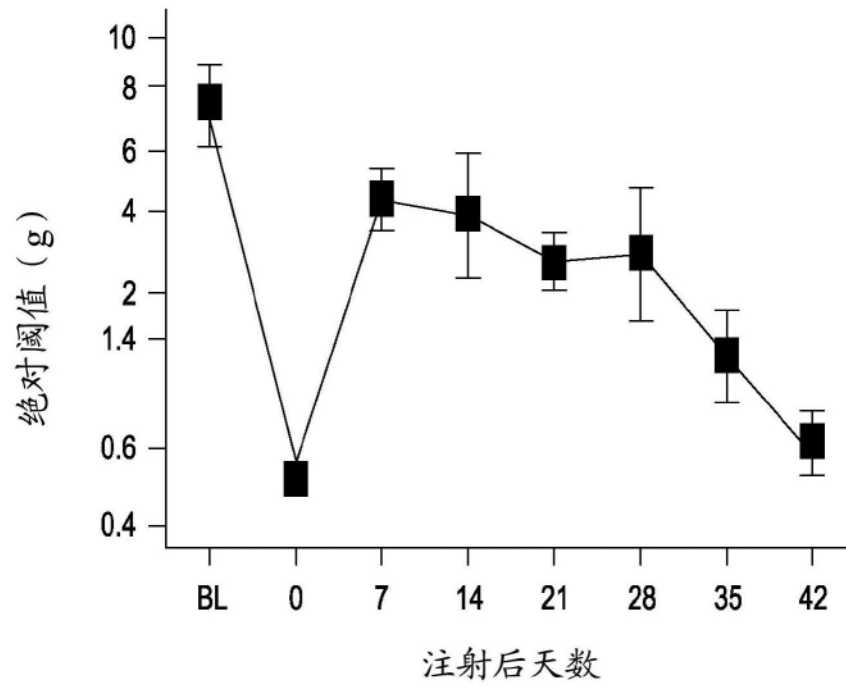


图1

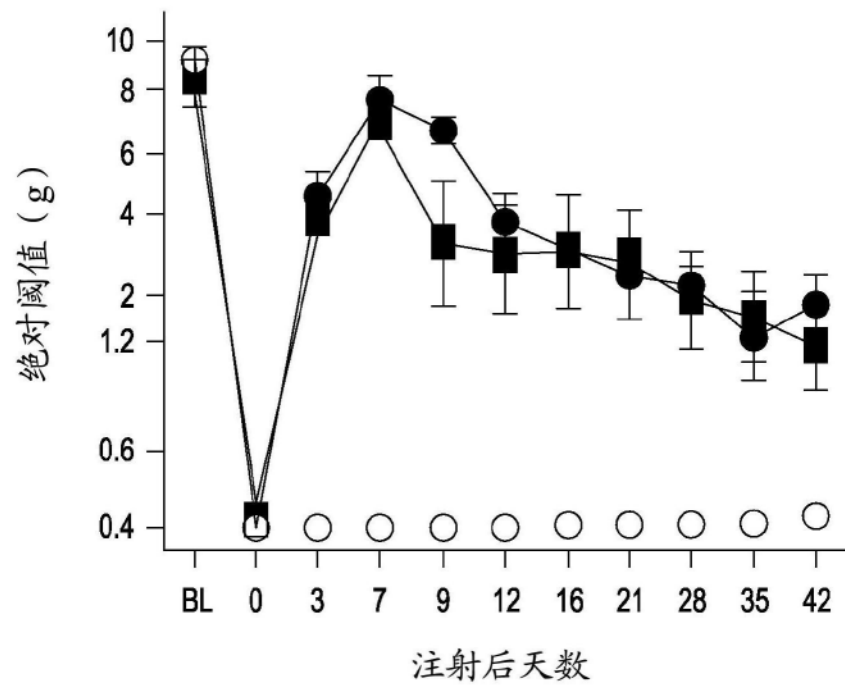


图2

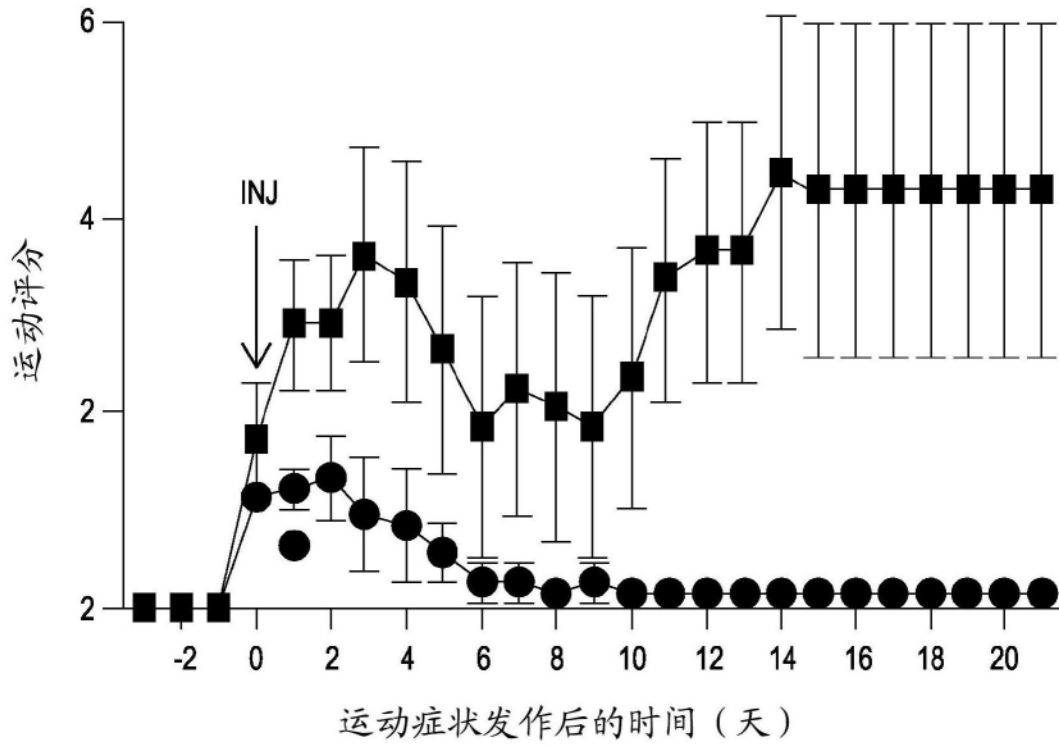


图3

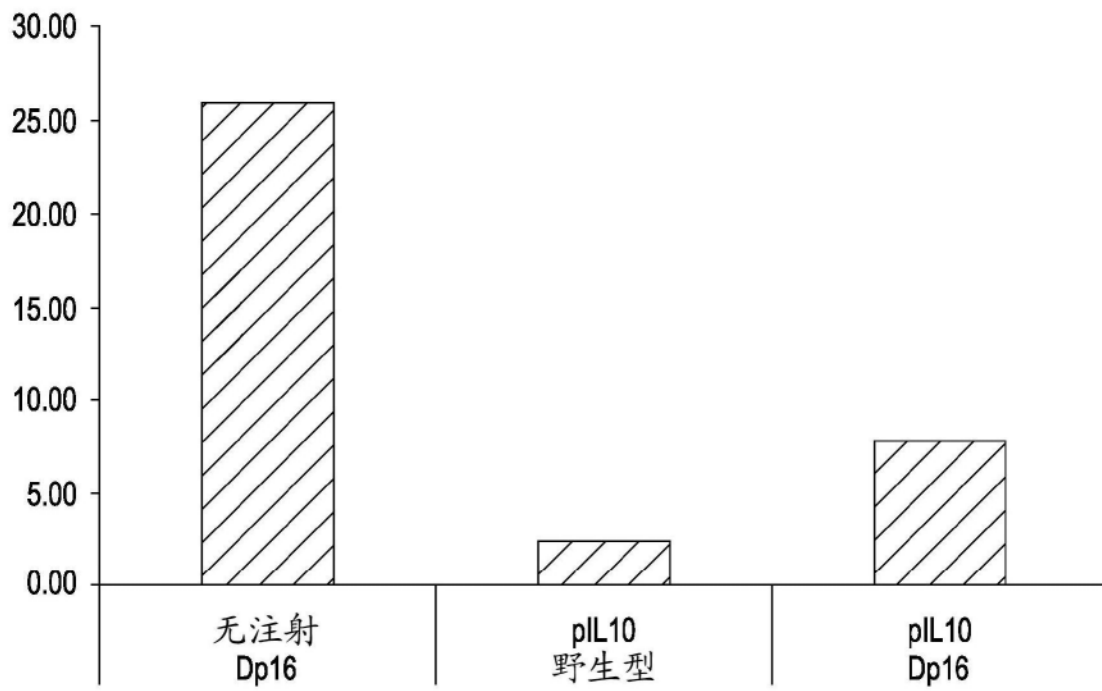


图4