(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113194936 A
(43)申请公布日 2021.07.30

(21)申请号 201980073598.8
(22)申请日 2019.11.07
(30)优先权数据
10-2018-0136107 2018.11.07 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.05.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/015055 2019.11.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/096371 KO 2020.05.14
(71)申请人 加图立大学校产学协力团
地址 韩国首尔
(72)发明人 曺美罗 申东润 崔钟荣 梁哲宇 朴盛焕 李善瑛 朴溯廷 田周燕 金世涣 徐铉范 柳在润 赵根亨
(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 刘成春 崔龙铉
(51)Int.Cl.
A61K 31/155(2006.01)
A61K 31/436(2006.01)
A61K 38/13(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)

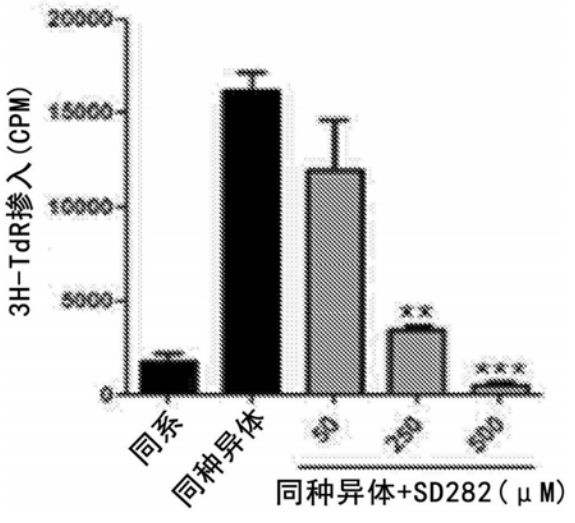
权利要求书1页 说明书13页 附图23页

(54)发明名称

含新型化合物和钙调磷酸酶抑制剂的用于预防和治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的组合物

(57)摘要

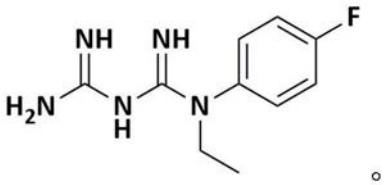
本发明涉及一种含新型化合物和钙调磷酸酶抑制剂的用于预防和治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的组合物。本发明的联合施用在体内(in vivo)或体外(in vitro)的同种异体模型、移植排斥疾病模型、皮肤移植模型和肝移植患者中具有以下效果:1)减少病原性Th1细胞或Th17细胞的活性,2)增加Treg的活性,3)具有抑制单独施用时出现的如组织损伤等副作用的效果,4)抑制各种致病途径,5)抑制炎症细胞的死亡,6)增加线粒体的活性,因此减轻单独施用现有的免疫抑制剂时可能会发生的副作用并抑制移植排斥反应。因此,可以用于与移植排斥反应或移植后可能会发生的各种免疫疾病相关的药学领域。



CN 113194936 A

1.一种用于预防或治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的药物组合物,其包含1)由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分,

[化学式1]



。

2.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述钙调磷酸酶抑制剂是FK506(他克莫司)或环孢霉素。

3.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述移植排斥反应是选自细胞、血液、组织和器官中的一种以上的移植排斥反应。

4.根据权利要求3所述的组合物,其特征在于,所述移植排斥反应是选自骨髓移植的排斥反应、心脏移植的排斥反应、角膜移植的排斥反应、肠移植的排斥反应、肝移植的排斥反应、肺移植的排斥反应、胰腺移植的排斥反应、肾脏移植的排斥反应和皮肤移植的排斥反应中的一种以上。

5.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述移植排斥疾病是移植物抗宿主病(GVHD)。

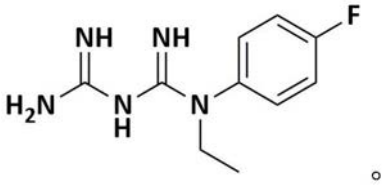
6.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述组合物抑制T细胞的增殖。

7.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述组合物减少由未分化T细胞向Th1细胞或Th17细胞的分化,或者减少Th1细胞或Th17细胞的活性。

8.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述组合物增加由未分化T细胞向Treg细胞的分化以及Treg细胞的活性。

9.一种用于移植后的免疫抑制的药物组合物,其包含1)由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分,

[化学式1]



。

10.一种预防或治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的方法,其包括向个体施用药学有效量的权利要求1所述的药物组合物的步骤。

11.一种移植后的免疫抑制和治疗方法,其包括向个体施用药学有效量的权利要求9所述的药物组合物的步骤。

含新型化合物和钙调磷酸酶抑制剂的用于预防和治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种含新型化合物和钙调磷酸酶抑制剂的用于预防和治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的组合物。

背景技术

[0002] 免疫抑制剂是阻断或降低产生针对抗原的抗体的体液免疫反应或细胞免疫反应的药物，主要用于治疗器官移植后发生的免疫排斥反应或骨髓移植后的移植物抗宿主病(graft-versus-host disease)。此外，重要的是免疫抑制剂还用于长期治疗诸如狼疮(lupus)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)的自身免疫疾病、诸如过敏症、特异反应性的超免疫反应、炎症性疾病的症状。

[0003] 目前使用的免疫抑制剂根据作用机制分为皮质类固醇(corticosteroid)、抗代谢物(antimetabolite)、钙调磷酸酶抑制剂(calcineurin inhibitor)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂(mammalian target of rapamycin inhibitor)、抗体(antibody)等，它们各自通过在不同的阶段阻断免疫系统的T细胞的增殖或活化而显示出免疫抑制效果(Dalal,P et al.Int.J.Nephrol.Renovasc.Dis.3:107-115(2010))。作为免疫抑制剂的主要靶标的T细胞在人体的胸腺中形成，并且分化为主要参与细胞介导的免疫的1型辅助细胞(Th1)或参与体液免疫的2型辅助细胞(Th2)。已知两种T细胞群相互制约以不会过度活化，当平衡被打破时，发生诸如自身免疫或超敏反应的异常反应。另外，已知可以调节免疫反应的诸如免疫调节性T细胞(Treg)或Th17的新型T细胞。Treg可以调节Th1细胞活性，抑制异常活化的免疫细胞的功能，并调节炎症反应。与此相反，Th17细胞分泌IL-17，并使炎症反应的信号最大化，从而加速疾病的进展。近年来，这些Treg或Th17已成为免疫疾病治疗剂的新靶标，并且正在对各种免疫调节治疗剂进行研究(Wood,K J et al.,Nat.Rev.Immunol.12(6):417-430,2012;Miossec,P et al.,Nat.Rev.Drug Discov.11(10):763-776,2012;Noack,M et al.,Autoimmun.Rev.13(6):668-677,2014)。

[0004] 另外，移植(transplantation)是指从一个个体获取细胞、组织或器官，即获取移植物(graft)并将其转移到另一个体的过程。提供移植物的个体称为供者(donor)，接受该移植物的个体称为受者(recipient)或宿主(host)。在移植的器官的情况下，由于针对移植物的细胞表面上存在的组织相容性抗原(移植抗原)的免疫反应，因此发生排斥反应。在未受免疫抑制的受者中移植物长期植入的情况仅限于组织相容性完全一致或大部分一致的情况，供者与受者之间的遗传关系是极大地影响移植物的植入时间的因素。通常，在自体移植(autograft)和同系移植(isograft)中几乎不发生排斥反应，但在同种异体移植(allograft)中几乎大部分会发生排斥反应。在组织或器官等的移植时，宿主免疫系统容易检测到供者与受者之间的遗传差异，从而引发宿主对移植组织的反应(宿主抗移植物反应(host-versus-graft response))和/或移植组织对宿主的反应(移植物抗宿主反应(graft-versus-host response))。这些事实已被组织和器官的移植时出现的排斥反应所

证明(Nash等,Blood,80,1838-1845,1992)。此外,据报道,由于通过针对移植的细胞的表面上存在的MHC的免疫反应所活化的T细胞,因此发生同种异体移植的组织的排斥反应(Benichou等,J.Exp.Med.175,305-308,1992;Benichou等,J.Immunol.162,352-358,1998;Fangmann等,J.Exp.Med.175,1521-1529,1992;Lombardi等,Proc.Acad.Sci.USA,86,4190-4194,1989)。

[0005] T细胞用于抑制这些移植排斥反应或移植排斥疾病,非特异性地抑制T细胞的免疫抑制剂通常伴有副作用,如细胞毒性、免疫力的降低引起的感染、糖尿病、震颤(tremor)、头痛、腹泻、高血压、恶心、肾功能障碍等,因此存在难以维持长期的治疗效果的缺点。因此,为了减少严重的副作用并提高免疫抑制治疗效果,特别是在器官移植领域中正在尝试联合施用具有彼此不同的作用机制的免疫抑制剂或替代的方法,但还没有优化的免疫抑制剂的联合施用的组合或治疗方法。

[0006] 因此,目前迫切需要开发一种可以减少现有的免疫抑制剂的副作用并可以提高治疗效果的新型的免疫抑制或免疫调节方法,并且迫切需要挖掘一种更安全且副作用少的新型免疫抑制剂候选物质。

[0007] 因此,本发明人确认了用称为SD282的化合物和钙调磷酸酶抑制剂进行联合处理的结果,抑制移植排斥反应,并减少因非特异性地抑制T细胞而引起的副作用等,而且预防和治疗移植后可能会发生的免疫疾病,从而完成了本发明。

发明内容

[0008] 要解决的技术问题

[0009] 本发明的目的在于提供一种用于预防或治疗移植排斥(transplantation rejection)反应或移植排斥疾病的药物组合物,所述组合物包含1)由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶(Calcineurin)抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分。

[0010] 此外,本发明的目的在于提供一种用于移植后的免疫抑制的药物组合物,所述组合物包含1)由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分。

[0011] 技术方案

[0012] 为了实现上述目的,本发明提供一种用于预防或治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的药物组合物,所述组合物包含1)由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分。

[0013] 此外,本发明提供一种用于移植后的免疫抑制的药物组合物,所述组合物包含1)由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分。

[0014] 有益效果

[0015] 本发明的SD282化合物和钙调磷酸酶抑制剂的联合施用在体内(in vivo)或体外(in vitro)的同种异体(allogenic)模型、移植排斥疾病模型、皮肤移植模型和肝移植患者中具有以下效果:1)减少病原性Th1细胞或Th17细胞的活性,2)增加Treg的活性,3)具有抑制单独施用时出现的如组织损伤等副作用的效果,4)抑制各种致病途径,5)抑制炎症细胞

的死亡,6)增加线粒体的活性,因此减轻单独施用现有的免疫抑制剂时可能会发生的副作用并抑制移植排斥反应。因此,可以用于与移植排斥反应或移植后可能会发生的各种免疫疾病相关的药学领域。

附图说明

[0016] 图1是示出在小鼠同种异体移植模型中通过3H-胸苷掺入(3H-thymidine incorporation)分析并确认根据SD282+FK506的联合处理的T细胞增殖反应的图。

[0017] 图2的(A)是示出在小鼠同种异体移植模型中对根据SD282+FK506的联合处理的T细胞增殖反应进行流式细胞分析的图,图2的(B)是通过图表确认结果的图。

[0018] 图3是示出在小鼠同种异体移植模型中确认根据SD282+FK506的联合处理的病原性Th17细胞的活性抑制效果的图。

[0019] 图4是示出在小鼠同种异体移植模型中确认根据SD282+FK506的联合处理的Treg的活性增加效果的图。

[0020] 图5是示出用于确认移植物抗宿主病(GVHD)动物模型中的联合施用的效果的实验方法的图。

[0021] 图6是示出在移植物抗宿主病(GVHD)动物模型中确认根据SD282和FK506的联合处理的GVHD治疗效果的图。

[0022] 图7是示出在移植物抗宿主病(GVHD)动物模型中确认根据SD282和FK506的联合处理的GVHD治疗效果的图。

[0023] 图8是示出在移植物抗宿主病(GVHD)动物模型中确认根据SD282和FK506的联合处理的器官损伤抑制功效的图(图8a:肺、肝、皮肤;图8b:大肠、小肠、盲肠)。

[0024] 图9是示出在移植物抗宿主病(GVHD)动物模型中确认根据SD282和FK506的联合处理的免疫细胞调节效果的图。

[0025] 图10是用于确认皮肤移植动物模型中根据SD282和FK506的联合处理的效果的实验的示意图。

[0026] 图11是示出在皮肤移植动物模型中确认根据SD282和FK506的联合处理的皮肤移植后的移植物的存活率增加效果和发病机制抑制效果的图。

[0027] 图12是示出在皮肤移植动物模型中确认根据SD282和FK506的联合处理的皮肤移植后的生物标志物的变化的图。

[0028] 图13是示出确认在人同种异体反应(human allo-response)条件下根据SD282和FK506的联合处理的免疫调节效果的图。

[0029] 图14是示出确认在人同种异体反应条件下根据SD282和FK506的联合处理的免疫调节效果的图。

[0030] 图15是示出确认在人同种异体反应条件下根据SD282和FK506的联合处理的免疫调节效果的图。

[0031] 图16是示出在肝移植患者的免疫细胞中确认根据SD282和FK506的联合处理的免疫细胞标志物的表达变化的图。

[0032] 图17是示出在肝移植患者中根据SD282和FK506的联合处理的活性被抑制的KEGG通路的图。

[0033] 图18是示出在肝移植患者中确认根据SD282和FK506的联合处理的病原细胞的控制效果和基因调节效果的图(图18a:STAT的控制效果,图18b:线粒体功能恢复效果,图18c:炎症细胞死亡的控制效果;图18d:细胞迁移的调节效果)。

[0034] 图19是示出在肝移植患者中确认根据SD282和FK506的联合处理的细胞死亡的抑制效果的图。

[0035] 图20是示出在肝移植模型中确认根据SD282和FK506的联合处理的细胞迁移的抑制效果的图(图20a:小鼠;图20b:人)。

[0036] 图21是示出在肝移植患者的替身(avatar)模型中确认炎症和纤维化(fibrosis)程度的图。

[0037] 最佳实施方式

[0038] 本发明提供一种用于预防或治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的药物组合物,所述组合物包含1)由以下化学式1表示的化合物(以下,称为SD282化合物)或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分。

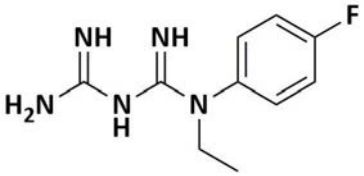
[0039] 本发明的SD282化合物和钙调磷酸酶抑制剂的联合施用在体内(in vivo)或体外(in vitro)的同种异体(allogenic)模型、移植排斥疾病模型、皮肤移植模型和肝移植患者中具有以下效果:1)减少病原性Th1细胞或Th17细胞的活性,2)增加Treg的活性,3)具有抑制单独施用时出现的如组织损伤等副作用的效果,4)抑制各种致病途径,5)抑制炎症细胞的死亡,6)增加线粒体的活性,7)减少细胞迁移,因此抑制单独施用时出现的副作用,并且有效地抑制各种种类的移植排斥反应。

[0040] 本发明的化学式1的化合物和钙调磷酸酶抑制剂的重量比可以为1:1至5000:1的范围,优选可以为1:1至2000:1、1:1至1000:1、1:1至500:1、1:1至300:1、1:1至200:1、1:1至100:1、1:1至50:1、1:1至10:1、1:1至5:1,但并不受限于此。

[0041] 就本发明的术语“移植排斥(transplantation rejection)”而言,在移植后受者的免疫系统将移植的组织识别为异物(non-self)并攻击移植的器官以去除的反应称为器官移植排斥。已知参与移植排斥的最重要的因素是主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC),并且也与次要组织相容性复合体(minor histocompatibility complex)相关。细胞介导免疫(cellmediated immune response)和体液免疫(humoral immune response)均参与排斥反应。受者的淋巴细胞接触移植器官的供者的MHC(CD4 T细胞II型MHC分子(CD4 T cell-type II MHC molecule)或CD8 T细胞I型MHC分子(CD8 T cell-type I MHC molecule))时开始发生细胞介导的反应。活化的T细胞分泌细胞因子(cytokine),并增加血管的通透性,而且引起巨噬细胞(macrophage)等单核细胞(monocytes)的浸润。其结果,发生微细血管的损伤、组织缺血、移植组织和细胞的破坏。

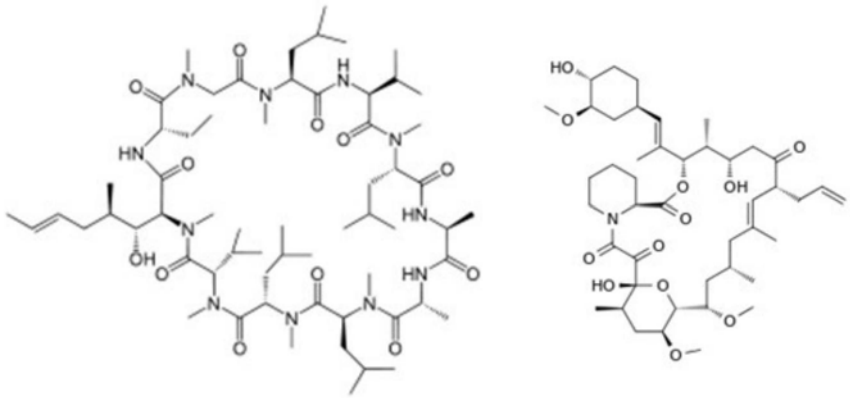
[0042] 韩国专利第10-1613371号中公开了本发明的术语“SD282化合物”,SD282化合物可以包含全部由以下化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0043] [化学式1]

[0044] 

[0045] 本发明的术语“钙调磷酸酶(Calcineurin)抑制剂”是一种免疫抑制剂,其通过干扰T淋巴细胞中的mRNA的形成来阻碍IL-2的形成,代表性的钙调磷酸酶抑制剂是环孢霉素(Cyclosporine;化学式2的左侧)和FK-506(他克莫司(Tacrolimus);化学式2的右侧)。

[0046] [化学式2]

[0047] 

[0048] 本发明的术语“FK-506”是指从筑波链霉菌(Streptomyces tsukubaensis)分离的化合物,虽然在结构上与环孢霉素不同,但作用机制相似,通过抑制T淋巴细胞显示出免疫抑制功能,已知所述FK-506的药物的效果是环孢霉素的功效的10倍至100倍。

[0049] 钙调磷酸酶不仅在免疫系统的T细胞中表达,而且也在其它细胞和组织中表达,因此环孢霉素或他克莫司对钙调磷酸酶的抑制作用除了免疫抑制之外还伴有各种副作用(Liu,E H et al,Nat Immunol 8(1):25-30,2007)。免疫抑制剂的副作用严重影响长期稳定且成功的器官移植和移植患者的存活率,并且在需要免疫抑制的器官移植之外的疾病的治疗中,所述免疫抑制剂的副作用也成为大问题。在所述钙调磷酸酶免疫抑制剂的副作用中,特别重要的是急性和慢性肾毒性(nephrotoxicity)(Naesens,M et al,Clin J Am Soc Nephrol 4(2):481-508,2009)。钙调磷酸酶免疫抑制剂引发的肾毒性表现为肾小管中的空泡形成、间质纤维化、小动脉的玻璃化等肾脏的组织变化以及有效肾血流量和肾小球滤过率的降低等肾功能下降。

[0050] 在本发明的一个实施方案中,为了消除如上所述的钙调磷酸酶免疫抑制剂的抑制Treg并增加病原性Th17细胞的副作用,用钙调磷酸酶免疫抑制剂“FK-506”和“SD282化合物”进行联合处理。其结果,确认了在体内(in vivo)和体外(in vitro)增加Treg并减少病原性Th17细胞,从而减轻钙调磷酸酶免疫抑制剂的副作用。

[0051] 所述移植排斥反应是选自细胞、血液、组织和器官中的一种以上的移植排斥反应,优选是选自骨髓移植的排斥反应、心脏移植的排斥反应、角膜移植的排斥反应、肠移植的排斥反应、肝移植的排斥反应、肺移植的排斥反应、胰腺移植的排斥反应、肾脏移植的排斥反应和皮肤移植的排斥反应中的一种以上,但并不受限于此。

[0052] 本发明的移植排斥疾病包括移植物抗宿主病(graft-versus-host disease,GVHD),但只要是通过本发明的SD282或FK-506的单独处理或联合处理进行治疗的与移植排

斥反应相关的疾病,则不受限于此。

[0053] 此外,本发明可以治疗移植后的免疫疾病,所述免疫疾病可以包括自身免疫疾病或炎症性疾病。

[0054] 就本发明的术语“自身免疫疾病”而言,活体对自身抗原的无反应称为免疫无反应性(immunologic unresponsiveness)或耐受性(tolerance),在诱导或继续保持这种自身耐受性方面发生问题时引起对自身抗原的免疫反应,因此发生攻击自身的组织的现象,所述“自身免疫疾病”是指由这种过程引起的疾病。

[0055] 本发明的术语“炎症性疾病”是指由炎症诱发物质(炎症细胞因子)引起的疾病,其中,由于炎症诱导因子或照射放射线等有害的刺激,使得人体免疫系统过度亢进,从而诸如巨噬细胞的免疫细胞分泌所述炎症诱发物质,如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-1(interleukin-1,IL-1)、IL-6、前列腺素(prostagladin)、白三烯(leukotriene)或一氧化氮(nitric oxide,NO)。

[0056] 所述免疫疾病是类风湿性关节炎、白塞氏病、多发性肌炎或皮肌炎、自身免疫性血细胞减少症、自身免疫性心肌炎、特应性皮炎、哮喘、原发性肝硬化、皮肌炎、肺出血-肾炎综合征、自身免疫性脑膜炎、干燥综合征、狼疮、爱迪生氏病、斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩病、胰岛素依赖型糖尿病、营养不良型大疱性表皮松解症、附睾炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本氏病、溶血性贫血、多发性硬化症、重症肌无力症、寻常型天疱疮、银屑病、风湿热、结节病、硬皮症、脊柱关节病、甲状腺炎、血管炎、白癜风、粘液性水肿、恶性贫血、线粒体相关综合征及溃疡性结肠炎,但并不受限于此。

[0057] 所述组合物可以抑制T细胞的增殖,并且可以减少由未分化T细胞向Th1细胞或Th17细胞的分化,或者可以减少Th1细胞或Th17细胞的活性。

[0058] 此外,所述组合物增加由未分化T细胞向Treg细胞的分化以及Treg细胞的活性,但并不受限于此。

[0059] 根据对所述Th1细胞的分化的最新研究结果,随着得知可以调节Th1细胞的活性的、作为新群体的免疫调节性T细胞(Treg)的存在,对于利用其治疗免疫疾病的研究正在兴起,Treg细胞具有通过抑制异常活化的免疫细胞的功能来控制炎症反应的特性,因此可以通过增加Treg细胞活性的作用来治疗免疫疾病。

[0060] 此外,除了Treg细胞以外,还有在分化过程中形成的另一群体的Th17细胞,已知Th17细胞是在未分化T细胞的分化过程中经过与Treg细胞的分化相似的过程而形成。即,Treg细胞和Th17细胞的分化共同地在TGF-β的存在下进行,但是Treg细胞不需要IL-6,而Th17细胞是在TGF-β和IL-6同时存在的情况下进行分化。此外,分化的Th17细胞的特征在于分泌IL-17。

[0061] 已发现所述Th17细胞与Treg细胞不同,所述Th17细胞参与免疫疾病中出现的炎症反应的最前端,使得炎症反应的信号最大化,从而加速疾病的进展。因此,在免疫疾病中的不受Treg细胞控制的自身免疫疾病的情况下,将抑制Th17细胞活性作为靶标的免疫疾病的治疗剂的开发日益受到重视。

[0062] 本发明的术语“T细胞”是参与免疫反应的细胞,并且是指表达特定细胞表面标志物(cell surface marker)的T细胞群体(population)。

[0063] 人具有多种组织相容性抗原，其中有包含HLA-A、-B、-C的I类(Class I)抗原，还有包含HLADR、-DP、-DQ的Ⅱ类(Class II)抗原。这些抗原的生物学功能是向T淋巴细胞递送抗原，I类抗原在大部分的有核细胞中表达，并且通过其递送的抗原被CD8+细胞毒性T淋巴细胞所识别。Ⅱ类抗原在已知为抗原呈递细胞的树突状细胞、B淋巴细胞、活化的T淋巴细胞、巨噬细胞等中表达，并起到向CD4+T淋巴细胞递送抗原的功能。递送到T淋巴细胞的抗原与T淋巴细胞受体结合，从而使得T淋巴细胞识别抗原，在移植过程中，T淋巴细胞以比自身的组织相容性抗原更高的频率识别源自其他人的组织相容性抗原。供者或患者的总T淋巴细胞中的1-10％左右识别源自患者或供者的组织相容性抗原，并通过对其的反应进行增殖，并且引起一系列的免疫反应，这称为“同种异体反应(Alloresponse)”。

[0064] 本发明的药物组合物中可以进一步包含佐剂(adjuvant)。所述佐剂可以不受限制地使用本技术领域中已知的任何佐剂，例如，可以进一步包含弗氏(Freund)完全佐剂或不完全佐剂以增加其免疫性。

[0065] 本发明的药物组合物可以以将有效成分混入药学上可接受的载体中的形式制备。其中，药学上可接受的载体包括制药领域中通常使用的载体、赋形剂和稀释剂。可以用于本发明的药物组合物的药学上可接受的载体可以列举乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁和矿物油，但并不受限于此。

[0066] 本发明的药物组合物可以分别根据常规的方法配制成散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、悬浮液、乳剂、糖浆剂、气雾剂等口服剂型、外用制剂、栓剂或无菌注射溶液的形式并使用。

[0067] 在配制时可以使用通常使用的填充剂、增量剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、表面活性剂等稀释剂或赋形剂来制备。用于口服施用的固体制剂包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等，这种固体制剂可以通过在有效成分中混合至少一种以上的赋形剂来制备，例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等。此外，除了简单的赋形剂之外，还可以使用润滑剂，例如硬脂酸镁、滑石粉。用于口服施用的液体制剂包括悬浮剂、液体溶液、乳剂、糖浆剂等，除了可以包含通常使用的作为稀释剂的水、液体石蜡之外，还可以包含各种赋形剂，例如湿润剂、甜味剂、芳香剂、防腐剂等。用于非口服施用的制剂包括无菌水溶液、非水溶剂、悬浮剂、乳剂、冻干制剂和栓剂。作为非水溶剂、悬浮剂，可以使用丙二醇、聚乙二醇、诸如橄榄油的植物油、诸如油酸乙酯的可注射的酯等。作为栓剂的基质，可以使用witepsol、吐温(tween)61、可可脂、月桂精油、甘油明胶等。

[0068] 本发明的药物组合物可以通过各种途径向个体施用。可以预期所有施用方式，例如，可以通过口服、静脉内注射、肌内注射、皮下注射、腹腔内注射来进行施用。

[0069] 本发明的药物组合物的施用量可以考虑个体的年龄、体重、性别、身体状态等来进行选择。所述药物组合物中包含的有效成分的浓度可以根据对象进行各种选择是显而易见的，优选地，药物组合物中可以以0.01-5000μg/ml的浓度包含有效成分。当有效成分的浓度小于0.01μg/ml时，可能不会显示出药理活性，当有效成分的浓度超过5000μg/ml时，可能会对人体产生毒性。

[0070] 就本发明的药物组合物中作为有效成分包含的钙调磷酸酶抑制剂的药学有效量

而言,环孢霉素的药学有效量为1-5mg/天/体重kg,他克莫司的药学有效量为001-01mg/天/体重kg,二甲双胍的药学有效量为5-35mg/天/体重kg。但是,所述药学有效量可以根据疾病及其严重程度、患者的年龄、体重、健康状态、性别、施用途径和治疗时间等各种因素而适当变化。

[0071] 此外,本发明可以提供一种用于移植后的免疫抑制的组合物,所述组合物包含1)由化学式1表示的化合物(以下,称为SD282化合物)或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分。

[0072] 此外,本发明提供一种方法,所述方法中在体外使用1)由化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐处理未分化T细胞,从而减少由未分化T细胞向Th1细胞或Th17细胞的分化,或者减少Th1细胞或Th17细胞的活性。

[0073] 此外,本发明提供一种方法,所述方法中在体外使用1)由化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐处理未分化T细胞,从而增加由未分化T细胞向Treg细胞的分化以及Treg细胞的活性。

[0074] 此外,本发明提供一种预防或治疗移植排斥反应或移植排斥疾病的方法,所述方法包括将药学有效量的所述1)由化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分向个体施用的步骤。此外,本发明提供一种移植后的免疫抑制和治疗方法,所述方法包括将药学有效量的1)由化学式1表示的化合物或其药学上可接受的盐和2)钙调磷酸酶抑制剂或其药学上可接受的盐作为有效成分向个体施用的步骤。

[0075] 本发明的药物组合物以治疗有效量或药学有效量施用。术语“药学有效量”是指足以以可用于医学治疗的合理的受益/风险比例来治疗疾病的量,有效剂量水平可以根据包括个体的类型和严重程度、年龄、性别、药物的活性、对药物的敏感性、施用时间、施用途径和排泄率、治疗时间、同时使用的药物在内的因素和其它医学领域中众所周知的因素来决定。

[0076] 通过以下实施例对本发明进行更详细的说明。但是,以下实施例仅用于对本发明的内容进行具体说明,本发明并不受限于此。

具体实施方式

[0077] 实施例1.实验方法

[0078] 1-1.体外(in vitro)的同系移植(syngenic graft transplantation)或同种异体移植(allogenic transplantation)模型

[0079] 在体外(in vitro),向96孔圆底板(round bottom plate)的各孔中注入2×10^5个正常受者(Balb/c,响应者(responder))的CD4+T细胞。之后,为了同系移植,将已用放射线照射的2×10^5个源自正常受者的去除T细胞的脾细胞添加到上述的各孔中。此外,为了同种异体移植,将源自供者(C57BL/6,刺激物(stimulator))的去除T细胞的脾细胞添加到上述的各孔中,对其进行混合并进行培养。

[0080] 1-2.急性移植物抗宿主病(Acute Graft versus host disease,aGVHD)动物模型

[0081] 为了制作aGVHD模型,对受者小鼠Balb/c(H-2k/d)以800cGy进行全身的放射线照射(TBI),从供者小鼠C57BL/6(H-2k/b)的股骨和胫骨中分离造血干细胞和脾细胞,并将5×

10^6的造血干细胞和1×10^7的脾细胞移植到受者小鼠Balb/c(H-2k/d)中。在发生aGVHD后,口服施用每种药物,并分析控制疾病的效果。

[0082] 1-3.皮肤移植动物模型

[0083] 为了制作皮肤移植动物模型,从皮肤移植前3天开始将药物注入到受者小鼠Balb/c(H-2k/d)中。从供者小鼠C57BL/6(H-2k/b)的皮肤制成1cm以下的切口(incision)并将其拉直以使末端不卷曲,然后移植到BALB/C小鼠中,然后通过观察进展来观察排斥反应。就药物的注入浓度而言,SD282以50mg/kg进行注入,FK506以10mg/kg进行注入。

[0084] 实施例2.确认在小鼠细胞中根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的T细胞增殖反应

[0085] 为了确认根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的T细胞增殖反应,使用所述实施例1-1的未处理的同系(syngenic)组和未处理的同种异体(allogenic)组作为对照组。此外,对于同种异体模型,用50μM、250μM和500μM的SD282或1nM、5nM的FK506进行单独处理。此外,分别用1nM、5nM的FK506和250nM的SD282进行联合处理。处理后培养4天,并通过3H-胸苷掺入、CFSE分析(assay)或流式细胞分析方法观察所培养的细胞的T细胞增殖反应,以确认同种异体反应(Alloresponse)。

[0086] 如图1a所示,确认了在未处理的同种异体组中,T细胞的增殖没有被抑制,但用250nM以上的SD282进行单独处理时,显著抑制T细胞增殖反应。此外,如图1b所示,确认了在FK506的单独处理组中抑制反应是无效的,这与未处理组是相似的程度。但是,在SD282和FK506的联合处理的情况下,确认了显著抑制同种异体T细胞的增殖。

[0087] 此外,如图2a和图2b所示,确认了在未处理的同种异体组中,T细胞增殖没有被抑制,但在SD282或FK506的单独处理组中,T细胞的增殖受到抑制,并且在SD282和FK506的联合处理组中,增殖受到更有效且显著的抑制。

[0088] 此外,为了确认根据SD282和FK506的联合处理的协同效应(synergistic effect),对联合指数(Combination Index,CI,药物疗法(drug treatment))值进行确认。CI值通过以下数学式计算,当CI值为1以下时,表示联合使用的两种药物之间具有协同效应,当CI值为1以上时,表示联合使用的两种药物之间具有拮抗作用(antagonism)。

[0089] 其结果,确认了本发明的SD282和FK506的CI值为0.6,显示出小于1的值,因此确认了具有优异的协同效应。

[0090] [数学式1]

[0091] CI=(D联合(comb))1/(D单独(alone))1+(D联合)2/(D单独)2

[0092] 实施例3.确认在小鼠细胞中根据SD282和FK506的联合处理的Th17或Treg活性

[0093] 3-1.确认病原性Th17的抑制效果

[0094] T细胞反应调节辅助性T细胞17(T helper 17cell,Th17)/白细胞介素-17(Interleukin 17,IL-17)的活性,所述IL-17被分类为炎症细胞因子。在所述实施例2中确认了通过SD282和FK506的单独处理或联合处理有效地抑制了T细胞。此外,对通过SD282和FK506的单独处理或联合处理抑制炎症细胞因子的活性进行确认。使用所述实施例1-1的未处理的同系(syngenic)组和未处理的同种异体(allogenic)组作为对照组。对于同种异体模型,用50μM、250μM和500μM的SD282或1nM、5nM的FK506进行单独处理。此外,分别用1nM、5nM的FK506和250μM的SD282进行联合处理。上述处理后培养4天,然后用抗CD3(anti-CD3)

(0.1μg/ml)刺激各组,并通过ELISA方法分析所培养的Th17细胞,以确认IL-17+CD4+T细胞和IL-17的抑制功效,并且通过对Treg细胞的分析来确认Fox3+Treg细胞的增殖。

[0095] 如图3所示,在FK506的单独处理组中没有有效地抑制病原性Th17细胞的增殖,这与作为对照组的CD3处理组相似,因此确认了不能有效地抑制炎症细胞因子IL-17的活性。另一方面,确认了通过分别用SD282和FK506进行单独处理来抑制了IL-17+CD4+T细胞(%)和IL-17的活性,并且在联合处理时更显著地抑制活性。

[0096] 3-2.确认Treg活性的增加

[0097] 对于所述实施例1-1的同种异体模型,用20μM、500μM的SD282或1nM、5nM的FK506进行单独处理。此外,分别用1nM、5nM的FK506和250μM的SD282进行联合处理,将分离的T细胞在Th17细胞分化条件下培养4天后诱导Th17细胞的分化。之后,为了确认在Th17细胞分化条件下上述的各处理组中是否也诱导Treg细胞活性,通过流式细胞术分析Foxp3 Treg细胞并确认同种异体反应。

[0098] 此外,如图4所示,确认了在FK506的单独处理组中没有增加Treg细胞的增殖,这与作为对照组的CD3处理组相似。另一方面,确认了各SD282和FK506的单独处理组和联合处理组中非常显著地增加了Treg细胞。

[0099] 因此,确认了联合施用具有减少病原性Th17的活性并增加Treg的活性的效果。

[0100] 实施例4.确认在移植物抗宿主病(Acute Graft versus host disease,GVHD)动物模型中根据SD282和FK506的联合处理的治疗效果

[0101] 4-1.根据SD282和FK506的联合处理的GVHD小鼠模型的变化

[0102] 对所述实施例1-2的GVHD动物模型进行如图5所示的实验,并且在发生GVHD后用50mg/kg或100mg/kg的SD282或10mg/kg的FK506进行单独处理。此外,通过口服施用的方式分别用10mg/kg的FK506和50mg/kg或100mg/kg的SD282进行联合处理,然后对GVHD小鼠模型的体重(g)、体重变化率(%)、体重变化率的评分(%)进行确认。

[0103] 如图6所示,确认了在用SD282和FK506进行联合处理的GVHD小鼠模型组中,保持了正常体重,并且就体重变化率及其评分(%)而言,由同种异体移植诱导的移植排斥反应所引起的体重减少率(%)显著低于SD282或FK506的单独处理组,并且显示出与同系移植组相似的变化率和评分。因此,确认了在GVHD小鼠模型中存在药物的GVHD治疗效果。

[0104] 此外,对于GVHD小鼠模型,设置20mg/kg、50mg/kg或100mg/kg的SD282的单独处理组以及2mg/kg或10mg/kg的FK506的单独处理组。此外,设置50mg/kg的SD282+2mg/kg或10mg/kg的FK506的联合处理组,并确认疾病指数(disease score)。

[0105] 如图7a所示,确认了联合处理组的疾病指数低于SD282的单独处理组。此外,如图7b所示,确认了联合处理组的疾病指数更低于FK506的单独处理组。

[0106] 此外,根据所述数学式1计算CI值的结果,确认了CI值为0.7,因此确认了SD282和FK506的联合处理显示出协同效应。

[0107] 4-2.确认根据SD282和FK506的联合处理的各组织细胞的浸润和组织损伤的抑制

[0108] 对所述实施例1-2的GVHD动物模型进行如图5所示的实验,并且在发生GVHD后用50mg/kg的SD282或10mg/kg的FK506进行单独处理。此外,通过口服施用的方式分别用10mg/kg的FK506和50mg/kg的SD282进行联合处理,然后通过表示皮肤、肺、肝、大肠(large intestine)、小肠(small intestine)和盲肠(cecum)的疾病的严重程度的组织学评分

(histological score)来确认GVHD的治疗效果。

[0109] 如图8a所示,确认了与FK506的单独处理组相比,在SD282和FK506的联合处理组中皮肤、肺和肝的组织学评分降低。此外,如图8b所示,确认了小肠、大肠和盲肠的组织学评分也降低。

[0110] 因此,观察到在SD282和FK506的联合处理组中抑制了由GVHD引起的组织中的炎症细胞的浸润和组织损伤。

[0111] 4-3.确认根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的Th17和Th1的活性

[0112] 对分泌作为细胞因子的干扰素-γ(Interferon-γ,IFN-γ)的辅助性T细胞1(T helper 1 cell,Th1)的活性、分泌作为细胞因子的白细胞介素-4(Interleukin 4,IL-4)的辅助性T细胞2(T helper 2 cell,Th2)的活性、分泌作为细胞因子的白细胞介素-17(Interleukin 17,IL-17)的辅助性T细胞17(T helper 17 cell,Th17)的活性、表达Foxp3转录因子的Treg细胞的活性进行确认。具体地,如图5所示,对于所述实施例1-2的GVHD动物模型,在发生GVHD后用50mg/kg的SD282或10mg/kg的FK506进行单独处理。此外,通过口服施用的方式分别用10mg/kg的FK506和50mg/kg的SD282进行联合处理,并对各细胞和细胞因子的活性进行确认。

[0113] 如图9a所示,在联合处理组中IFN-γ阳性CD4+T细胞(%)和IL-17阳性CD4+T细胞(%)显著减少,确认了Th1和Th17细胞的表达被抑制。此外,在联合处理组中IL-4阳性CD4+T细胞(%)和Foxp3+Treg细胞(%)显著增加,确认了Th2和Treg细胞的表达增加。

[0114] 如图9b至图9d所示,确认了在联合处理组中STAT3、IL-17阳性细胞和IFN-γ阳性细胞的数量减少,因此炎症细胞因子的抑制效果优异。此外,可以确认Foxp3+Treg细胞显著增加。

[0115] 因此,确认了本发明的SD282和FK506的联合处理在体内(in vivo)具有优异的免疫调节能力,因此对GVHD具有治疗效果。

[0116] 实施例5.确认在皮肤移植动物模型中根据SD282和FK506的联合处理的移植排斥反应

[0117] 5-1.确认根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的皮肤移植排斥反应的抑制

[0118] 为了确认皮肤移植后的排斥反应,按照如图10a和图10b所示的顺序对所述实施例1-3的皮肤动物模型进行实验。在皮肤移植后,用50mg/kg的SD282或10mg/kg的FK506进行单独处理。此外,通过口服施用的方式分别用10mg/kg的FK506和50mg/kg的SD282进行联合处理。之后,测量表皮厚度(epidermal thickness)以确认移植的皮肤组织的植入程度,并进行苏木精-伊红染色(haematoxylin and eosin stain,H&E)分析。

[0119] 如图11所示,确认了与对照组相比,在SD282和FK506的联合处理组中移植物的表皮厚度薄,因此皮肤组织的植入优异,并且皮肤移植组织的损伤小。因此,确认了移植物的存活率增加,并且炎症细胞的浸润减少,从而抑制了发病机制。

[0120] 5-2.确认根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的免疫活性调节能力

[0121] 为了确认Th17细胞的细胞因子IL-17的分泌、表达Foxp3转录因子的Treg细胞的活性、STAT3的调节能力,对处理条件与上述实施例相同的皮肤动物模型进行皮肤移植并在移植21天后获得移植的部位,并对组织内的STAT3、磷酸化STAT3(pSTAT3(Tyr705)和pSTAT3(Ser727))、IL-17和Foxp3的活性程度进行确认。

[0122] 如图12a和图12b所示，确认了与单独处理组相比，SD282和FK506的联合处理组的STAT3、磷酸化STAT3(pSTAT3(Tyr705)和pSTAT3(Ser727))、IL-17的表达显著减少。此外，确认了Foxp3的表达增加，这表明SD282和FK506的联合处理具有优异的免疫活性调节能力。

[0123] 因此，确认了本发明的SD282和FK506的联合处理在体内(in vivo)减少移植动物模型的移植排斥。

[0124] 实施例6.确认在正常人细胞中根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的T细胞增殖反应

[0125] 为了确认在正常人外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell，PBMC)中根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的T细胞增殖反应，进行混合淋巴细胞反应(mixed leukocyte reaction，MLR)和羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(Carboxyfluorescein succinimidyl ester，CFSE)染色，并且使用未处理的同系组和未处理的同种异体组作为对照组。此外，对于同种异体模型，用50μM、250μM和500μM的SD282或1nM、5nM的FK506进行单独处理。此外，分别用1nM、5nM的FK506和250μM的SD282进行联合处理。处理后培养4天，通过3H-胸苷掺入或流式细胞分析方法观察所培养的细胞的T细胞增殖反应，并确认同种异体反应。

[0126] 如图13a所示，确认了在未处理的同种异体(allogenic)组中，T细胞的增殖没有被抑制，但与对照组相比，用50nM以上的SD282进行单独处理时，抑制了T细胞增殖反应。此外，如图13b所示，确认了在FK506的单独处理组中抑制反应是无效的，这与未处理组是相似的程度。但是，确认了在SD282的单独处理组或SD282和FK506的联合处理组中显著抑制了同种异体T细胞的增殖。

[0127] 实施例7.确认在正常人血细胞中根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的炎症细胞因子活性的抑制

[0128] 为了确认在正常人外周血细胞(PBMC)中根据SD282和FK506的单独处理或联合处理的炎症细胞因子活性的抑制，使用未处理的同系组和未处理的同种异体组作为对照组。对于同种异体模型，用5μM、250μM和500μM的SD282或1nM、5nM的FK506进行单独处理。此外，分别用1nM、5nM的FK506和250μM的SD282进行联合处理。上述处理后培养4天，然后通过ELISA方法对培养的细胞的IL-17、IFN-γ和TNF-α的抑制功效进行确认。通过ELISA分析其效果，并对同种异体反应进行确认。

[0129] 如图14和图15所示，确认了与FK506的单独处理组相比，在SD282的单独处理组以及SD282和FK506的联合处理组中IL-17、IFN-γ和TNF-α的活性被抑制。

[0130] 实施例8.确认在肝移植患者中联合施用的效果

[0131] 8-1.确认联合施用的免疫细胞标志物的变化效果

[0132] 获取肝移植患者的血液，并利用ficoll分离外周血细胞(PBMC)。在TCR刺激(CD3刺激条件)条件下，用250μM的SD282和5nM的FK506进行单独处理或联合处理。培养4天后，为了确认各种药物处理是否诱导Treg细胞活性，通过流式细胞术分析各种免疫细胞亚型。

[0133] 如图16a和图16b所示，确认了在SD282和FK506的联合处理组中，免疫调节亚型细胞(CD4+Treg，CD8+Treg，浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid Dendritic cell))增加，移植排斥相关免疫细胞亚型(中央记忆型(central memory)Th17细胞、过渡性(transient)B细胞、血浆(plasma)B细胞)减少。

[0134] 8-2.分析根据联合施用的KEGG通路(pathway)和基因调节

[0135] 为了研究在肝移植患者的外周血细胞(PBMC)中根据药物处理的与免疫细胞调节相关的信号因子的变化,在TCR刺激(CD3刺激条件)条件下,对PBMC细胞用250μM的SD282和5nM的FK506进行单独处理或联合处理。培养48小时后,委托Macrogen公司进行微阵列(microarray)分析。

[0136] 如图17所示,确认了在肝移植患者中通过用SD282进行处理而抑制肝移植患者中增加的各种通路(pathway)。此外,确认了通过用SD282和FK506进行联合处理而显著减少与发病机制相关的信号,如趋化因子信号通路(chemokine signaling pathway)、IL-17信号通路(signaling pathway)等。

[0137] 分析在上述条件下实际上哪种基因增加或减少的结果,在图18a中确认了与SD282的单独施用相比,联合施用具有优异的抑制STAT3通路的效果,并且如图18b所示,确认了与SD282的单独施用相比,联合施用具有优异的线粒体功能恢复效果,并且如图18c所示,确认了与SD282的单独施用相比,联合施用具有优异的抑制炎症细胞死亡的效果,并且如图18d所示,确认了与SD282的单独施用相比,联合施用具有显著优异的抑制细胞迁移的效果。

[0138] 此外,如图19所示,确认了与SD282的单独施用相比,联合施用具有优异的抑制免疫细胞的细胞死亡的效果。

[0139] 8-3.确认控制肝移植患者的病原细胞迁移能力的效果

[0140] 用各药物处理小鼠和肝移植患者的免疫细胞48小时,然后获得细胞以进行迁移分析(migration assay)。在上部(Upper)transwell上装载2×10^5个细胞,对下部室(lower chamber)不进行任何处理或者用sDF-1进行处理,并培养2小时。2小时后,对迁移的细胞的数量进行计数。

[0141] 如图20a和图20b所示,确认了与SD282的单独施用相比,联合施用具有优异的抑制细胞迁移的效果。

[0142] 实施例9.评价在肝移植患者的替身模型中的有效性

[0143] 9-1.肝损伤人源化小鼠模型的制备

[0144] 为了构建配备有人免疫系统的肝损伤人源化小鼠模型(替身模型),将源自人的外周血单个核细胞(PBMC)静脉内注射到NSG小鼠,然后静脉内注射肝星状细胞系(liver stellate cell line)并注射CCl_4,以引起肝损伤(肝纤维化)。具体地,将正常人或肝疾病患者(HBV引起的肝硬化患者或酒精性肝硬化患者)的PBMC静脉内注射到NSG小鼠,然后1天后静脉内注射肝星状细胞和CCl_4,并在20天后确认人细胞的植入,39天后牺牲小鼠以进行组织分析。

[0145] 9-2.确认在肝损伤小鼠模型中的炎症或纤维化(fibrosis)

[0146] 在通过注入正常人或肝移植患者的血液和注入CCl_4诱导的肝损伤模型(在9-1中制备)中,与正常人的血液相比,注入移植患者的血液时引起炎症和纤维化。对根据单独处理或联合处理的炎症和纤维化程度进行确认。

[0147] 如图21a和图21b所示,确认了与SD282的单独施用相比,通过联合施用显著减少炎症和纤维化。

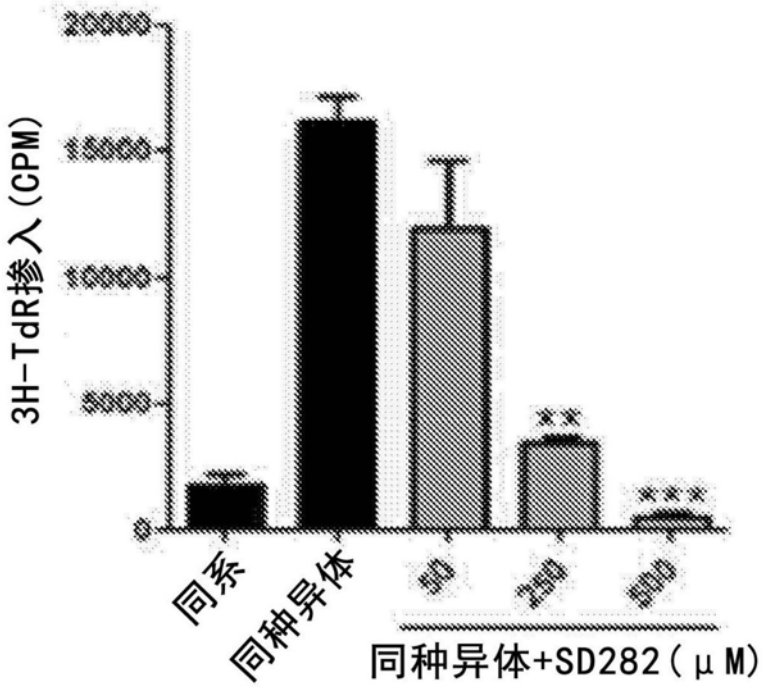

20000
15000
10000
5000
0
3H-TdR掺入(CPM)
同系
同种异体
50
250
500
同种异体+SD282(μM)

图1a

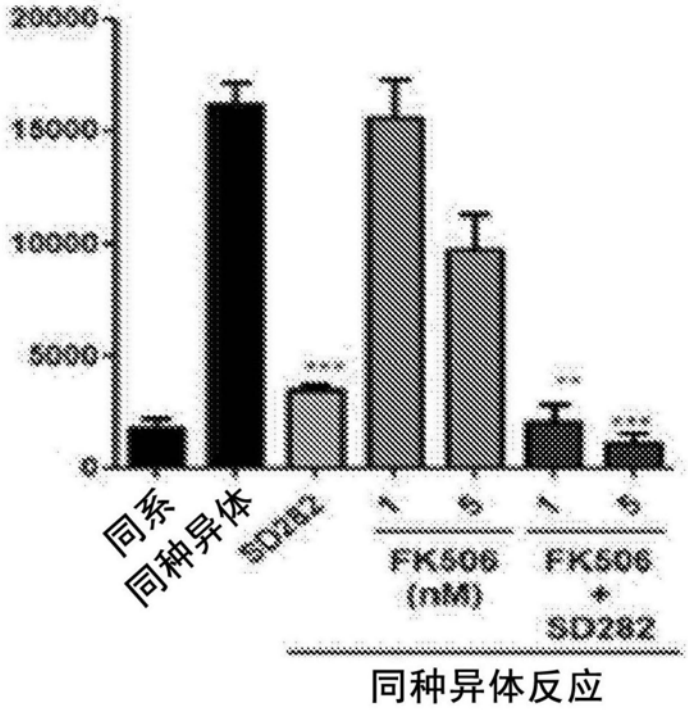

20000
15000
10000
5000
0
同系
同种异体
SD282
FK506 (nM)
FK506 + SD282
同种异体反应

图1b

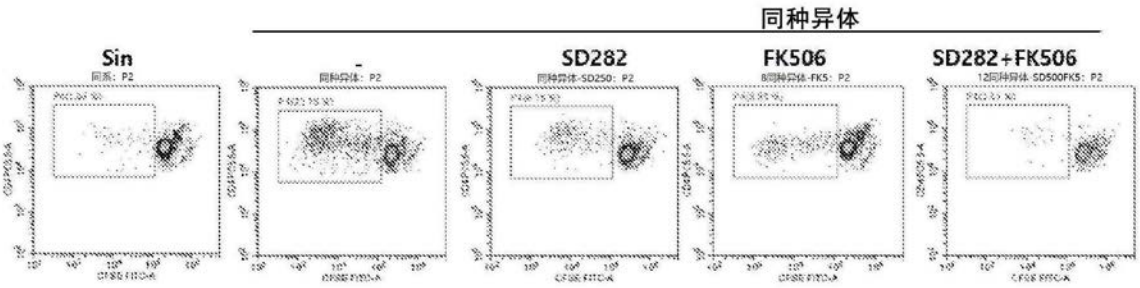


图2a

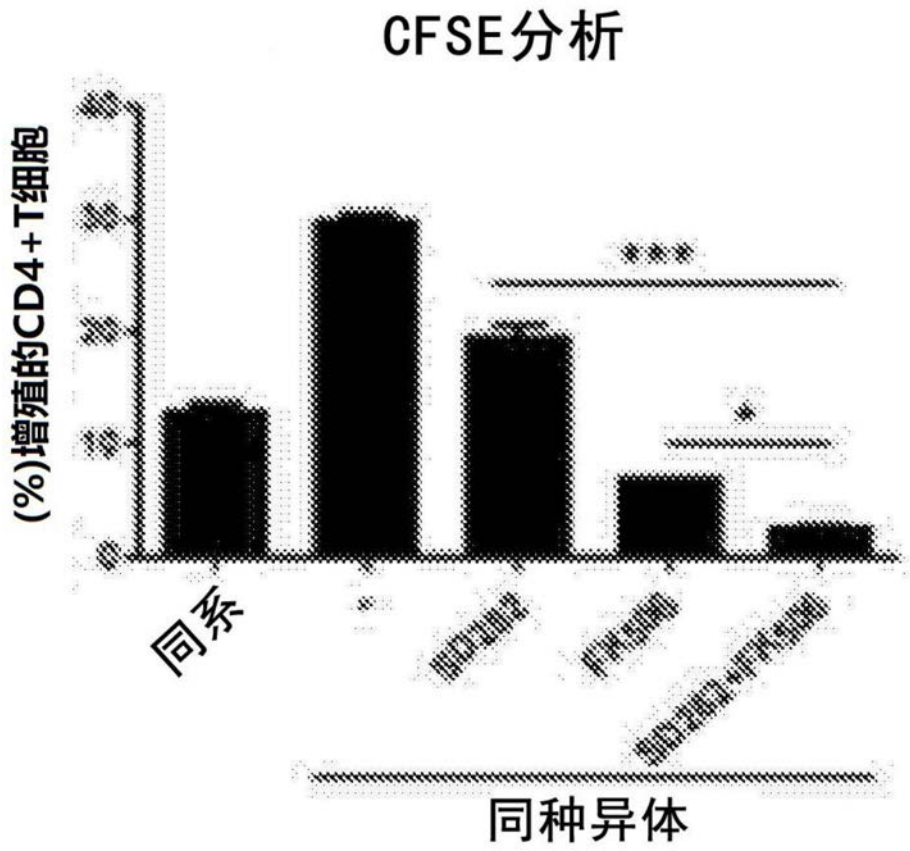


图2b

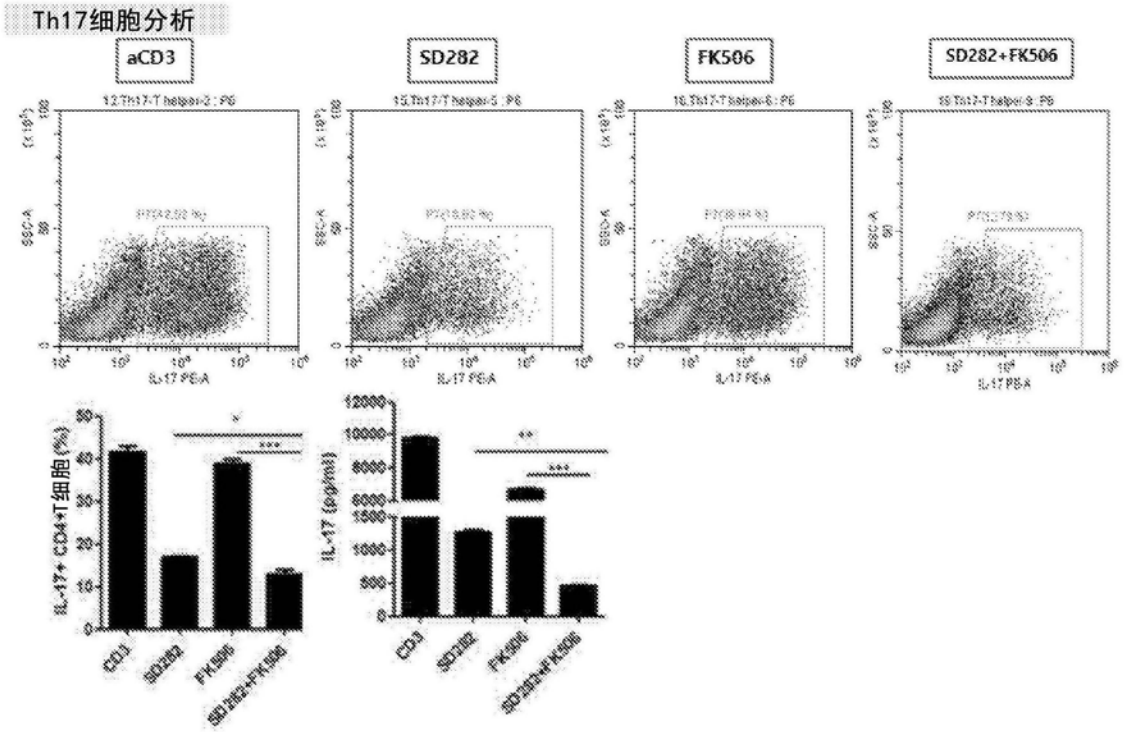

Th17细胞分析
aCD3
SD282
FK506
SD282+FK506
IL-17+ CD4+T细胞(%)
IL-17 (pg/ml)
CD3
SD282
FK506
SD282+FK506

图3

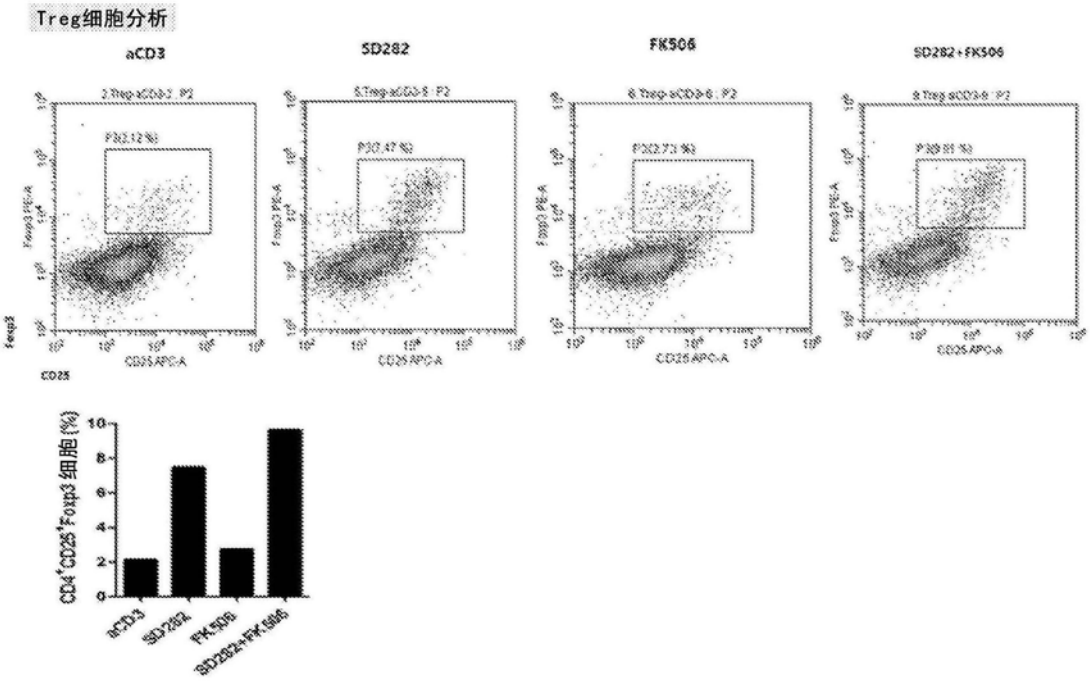

Treg细胞分析
aCD3
SD282
FK506
SD282+FK506
CD4+CD25+Foxp3细胞(%)
aCD3
SD282
FK506
SD282+FK506

图4

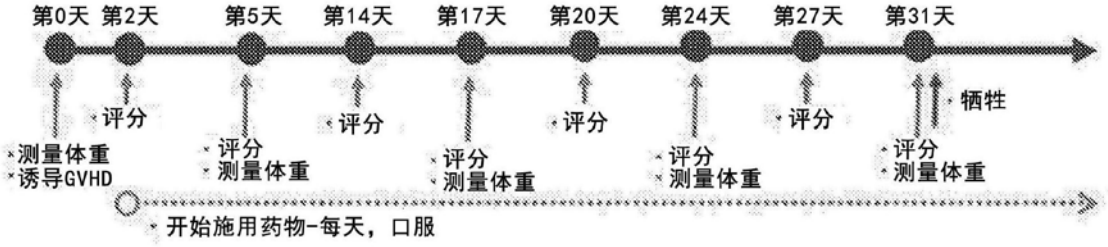

第0天
第2天
第5天
第14天
第17天
第20天
第24天
第27天
第31天
测量体重
诱导GVHD
评分
评分
测量体重
评分
评分
测量体重
评分
评分
测量体重
评分
评分
测量体重
牺牲
开始施用药物-每天，口服

图5

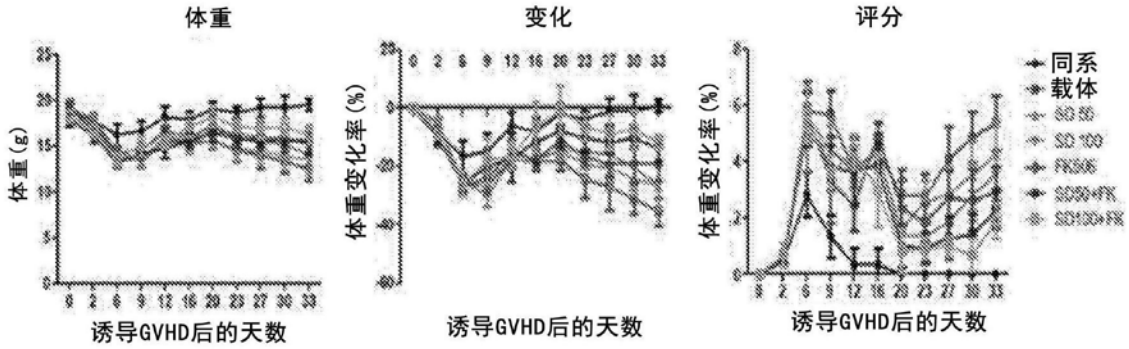

体重
变化
评分
体重(g)
体重变化率(%)
体重变化率(%)
诱导GVHD后的天数
诱导GVHD后的天数
诱导GVHD后的天数
同系
载体
SD50
SD100
FK506
SD50+FK
SD100+FK

图6

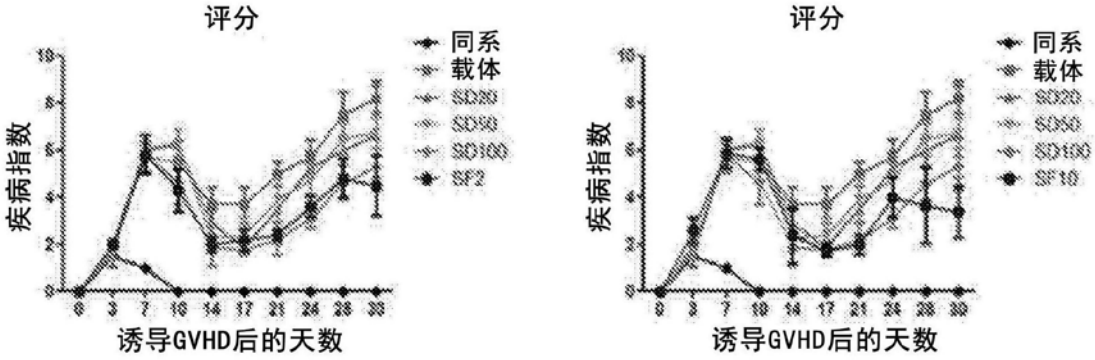

评分
评分
疾病指数
疾病指数
诱导GVHD后的天数
诱导GVHD后的天数
同系
载体
SD20
SD50
SD100
SF2
同系
载体
SD20
SD50
SD100
SF10

图7a

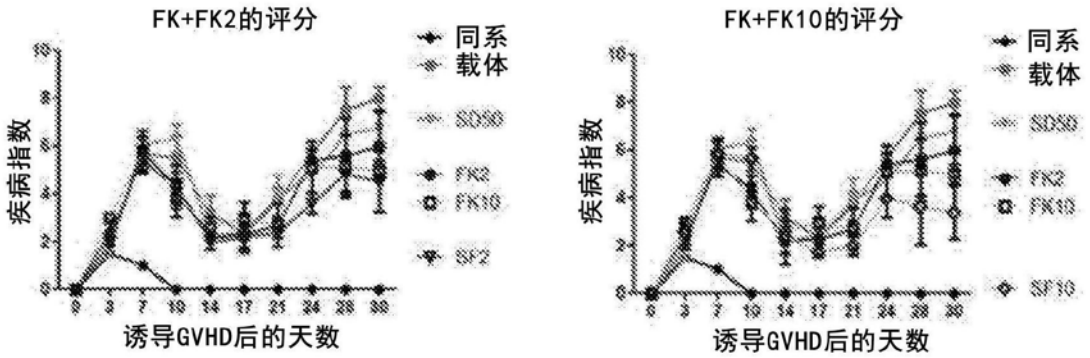

FK+FK2的评分
同系
载体
SD50
FK2
FK10
SF2
疾病指数
诱导GVHD后的天数
FK+FK10的评分
同系
载体
SD50
FK2
FK10
SF10
疾病指数
诱导GVHD后的天数

图7b

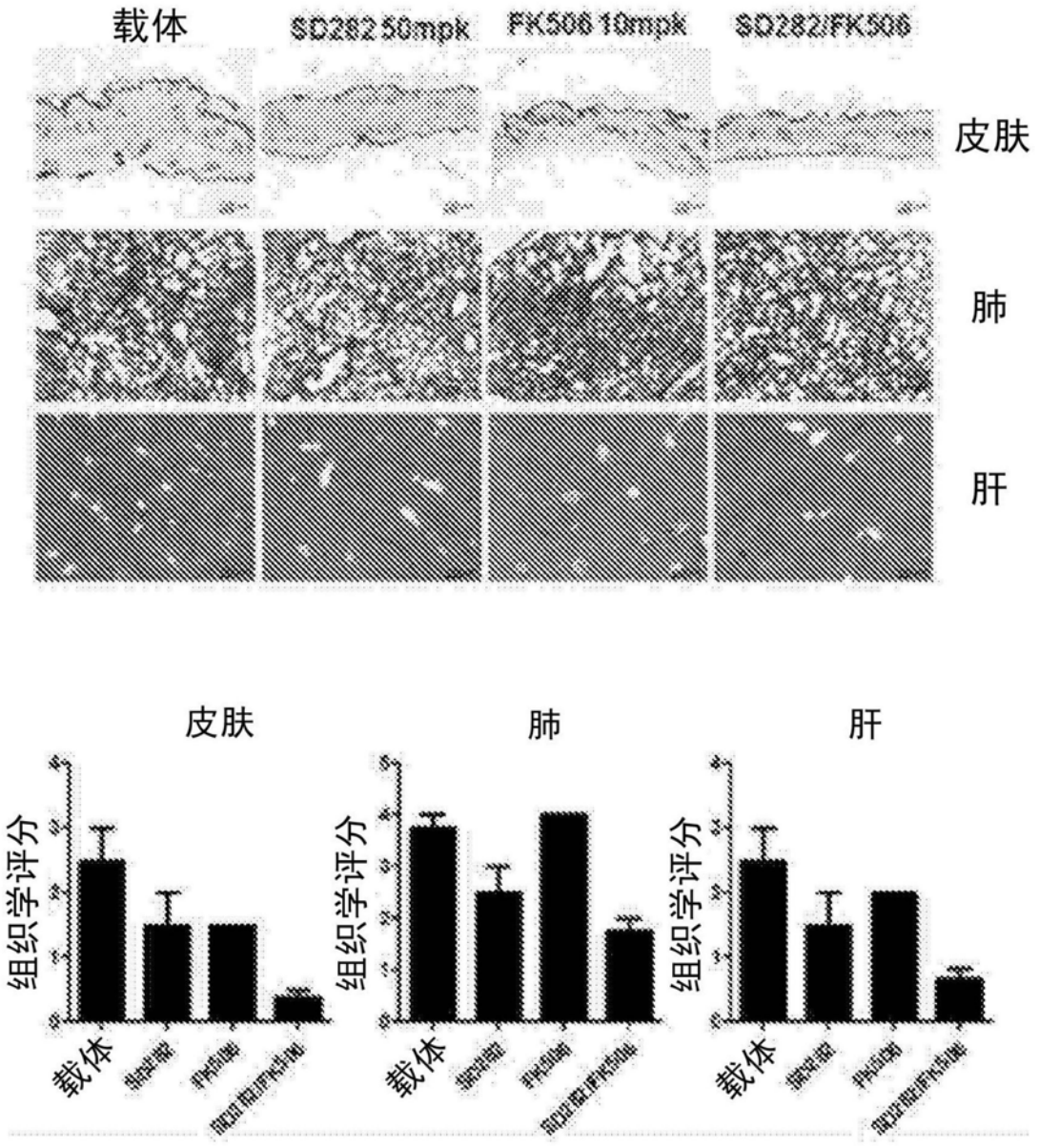

载体
SD282 50mpk
FK506 10mpk
SD282/FK506
皮肤
肺
肝
皮肤
肺
肝
组织学评分
组织学评分
组织学评分
载体

图8a

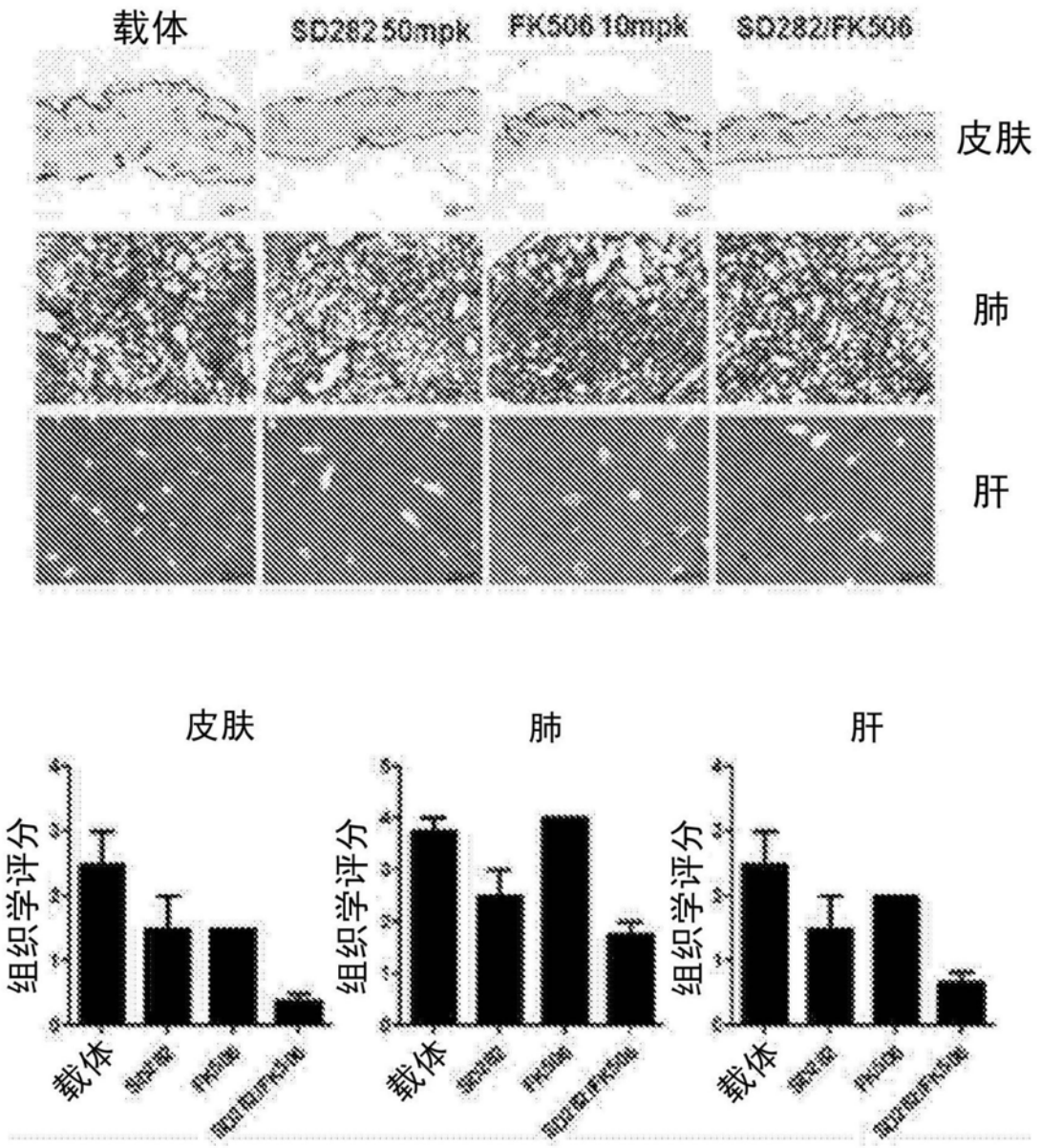

载体
SD282 50mpk
FK506 10mpk
SD282/FK506
皮肤
肺
肝
皮肤
肺
肝
组织学评分
组织学评分
组织学评分
载体
载体
载体

图8b

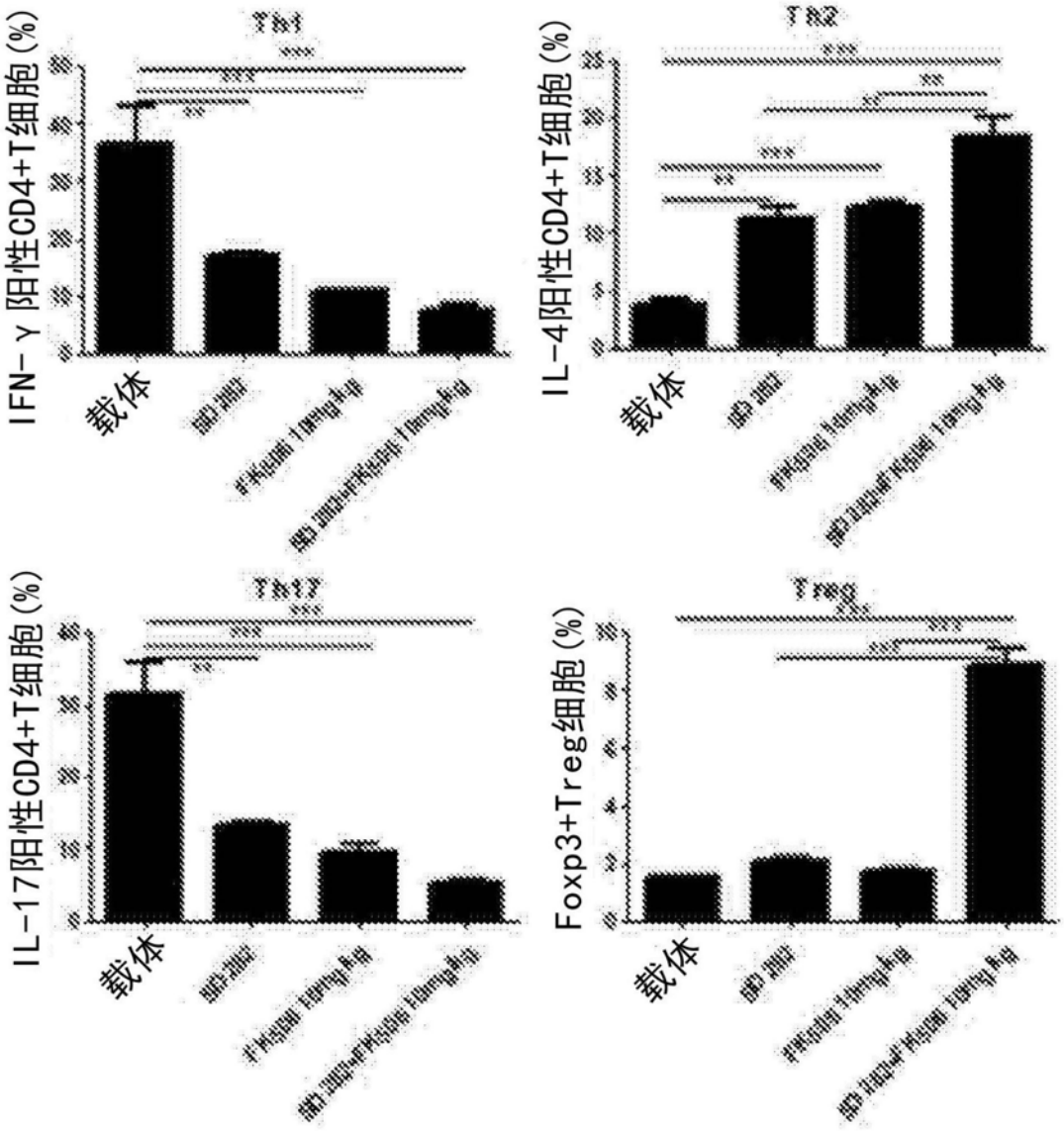


图9a

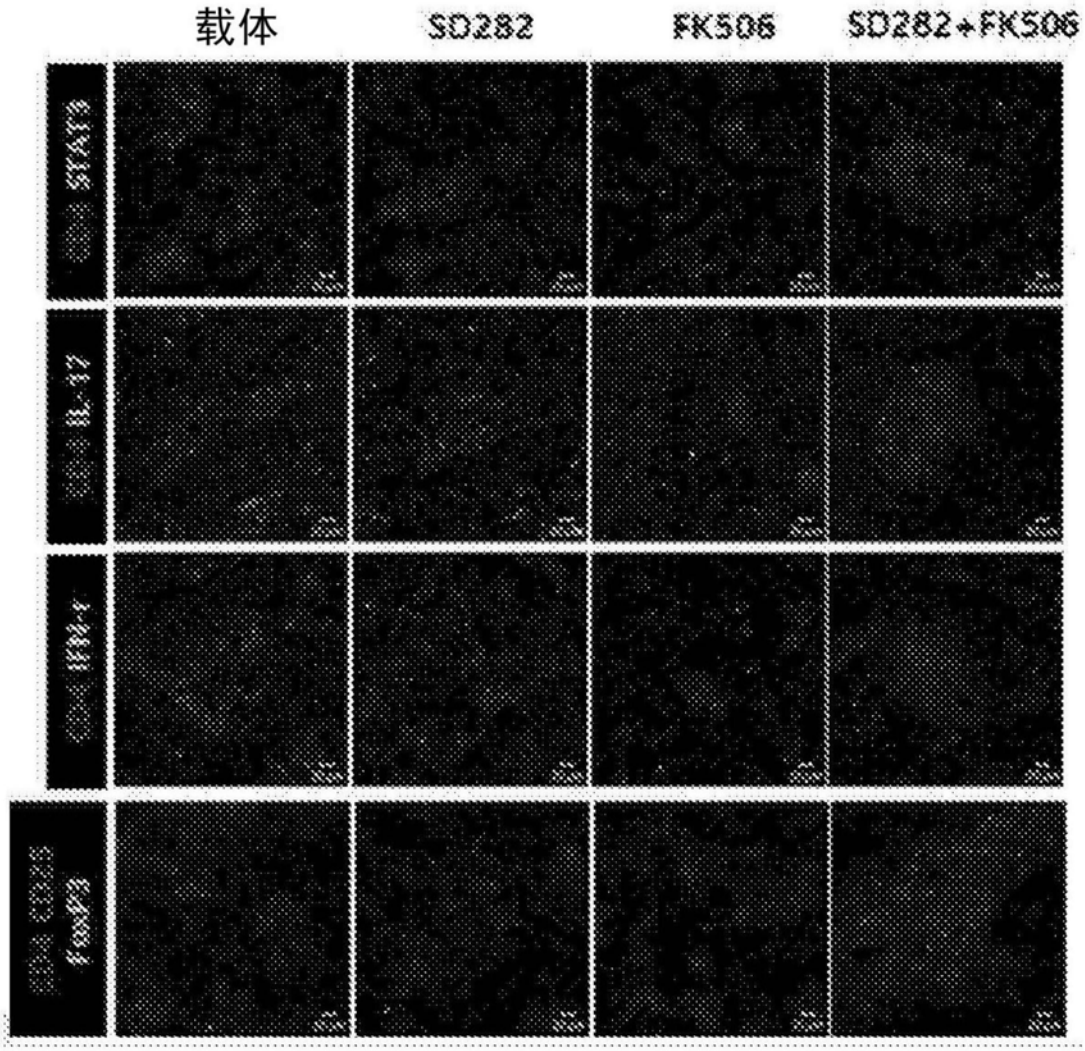

载体
SD282
FK506
SD282+FK506
STAT3
IL-17
IFN-r
FoxP3

图9b

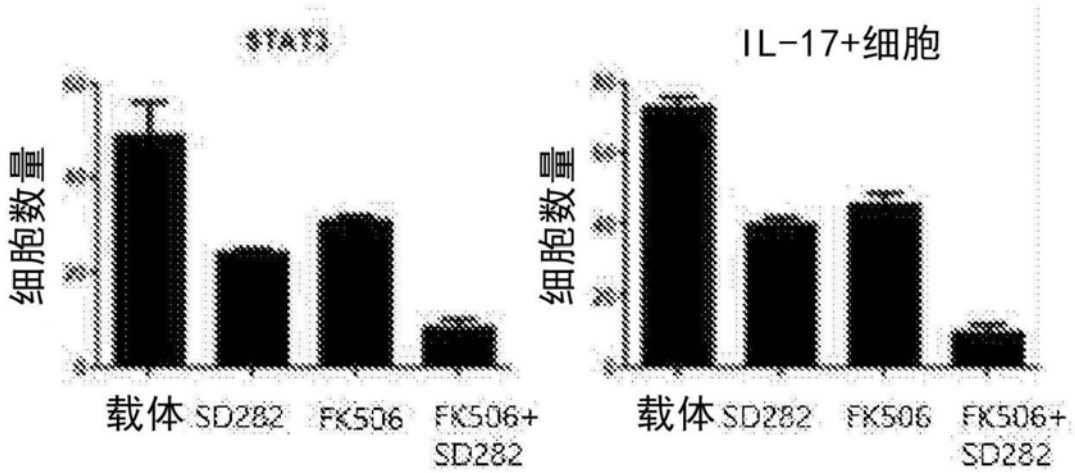

STAT3
细胞数量
载体
SD282
FK506
FK506+ SD282
IL-17+细胞
细胞数量
载体
SD282
FK506
FK506+ SD282

图9c

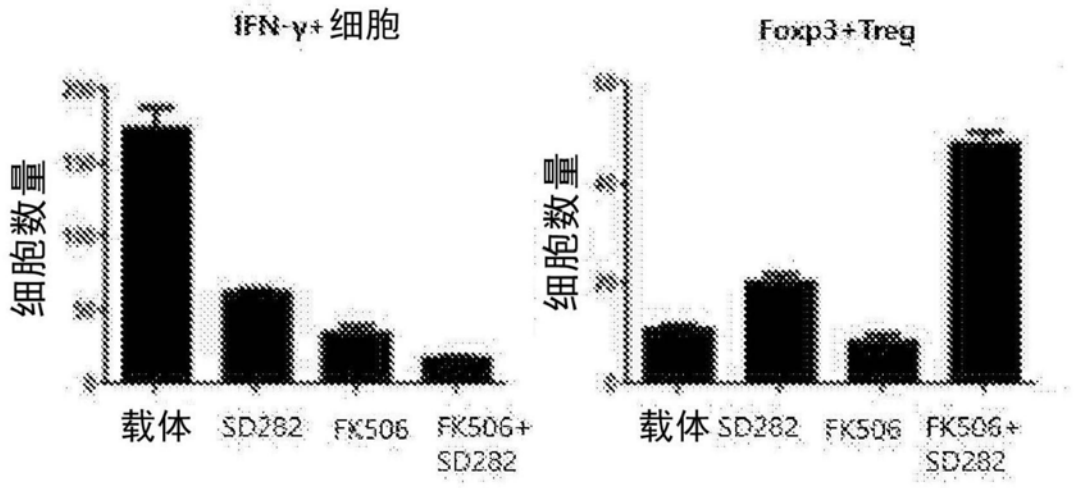

IFN-γ+细胞
细胞数量
载体
SD282
FK506
FK506+
SD282
Foxp3+Treg
细胞数量
载体
SD282
FK506
FK506+
SD282

图9d

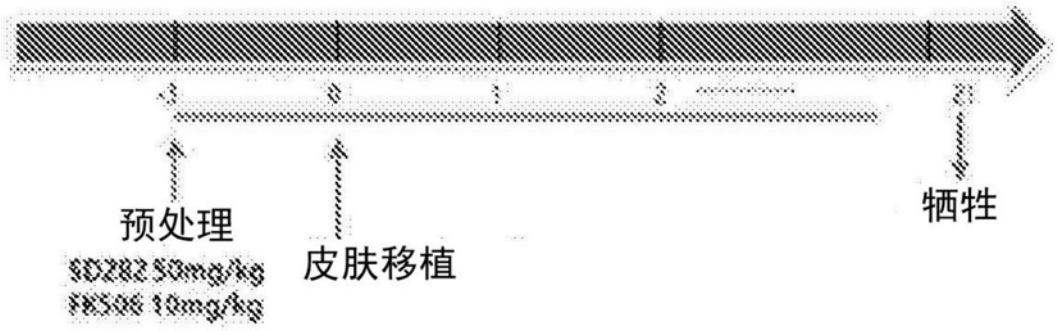

预处理
皮肤移植
牺牲

图10a

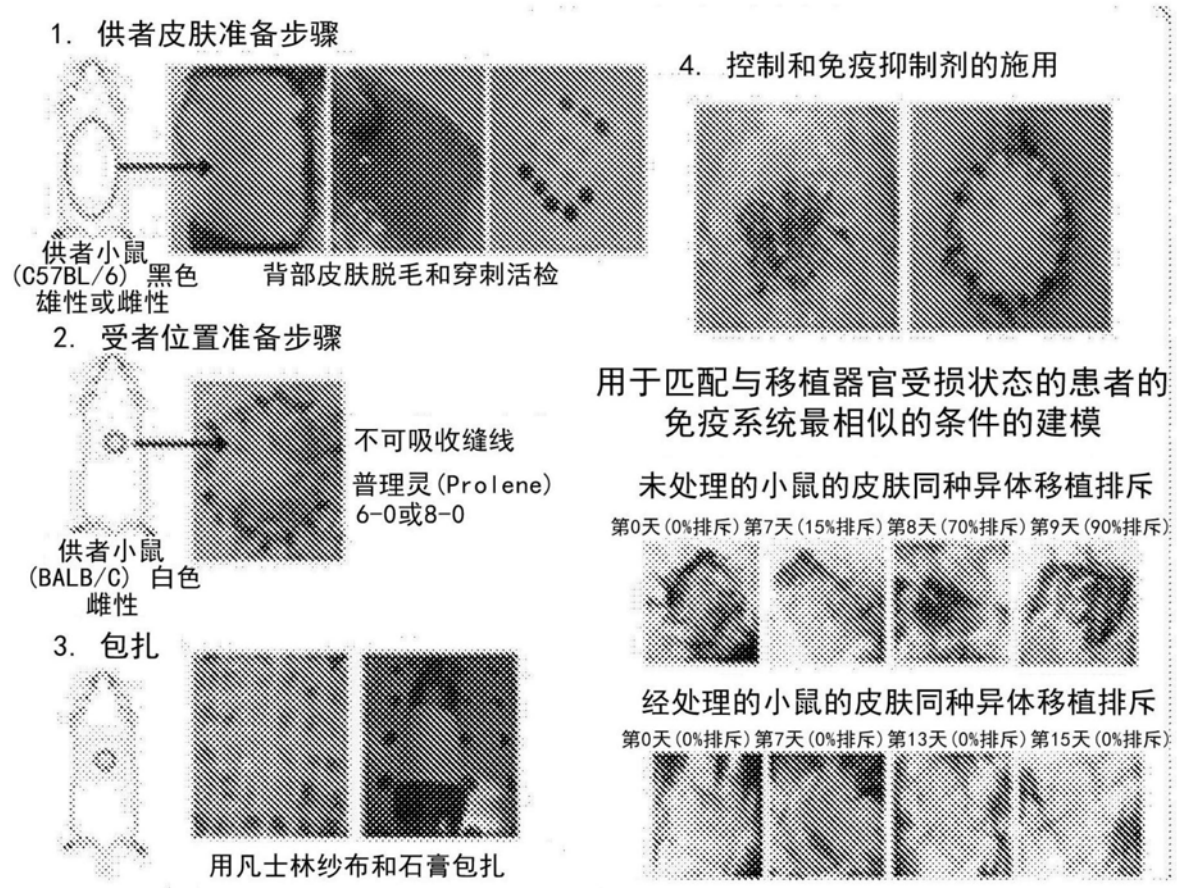

1. 供者皮肤准备步骤
供者小鼠
(C57BL/6) 黑色
雄性或雌性
背部皮肤脱毛和穿刺活检
2. 受者位置准备步骤
不可吸收缝线
普理灵(Prolene)
6-0或8-0
供者小鼠
(BALB/C) 白色
雌性
3. 包扎
用凡士林纱布和石膏包扎
4. 控制和免疫抑制剂的施用
用于匹配与移植器官受损状态的患者的
免疫系统最相似的条件的建模
未处理的小鼠的皮肤同种异体移植排斥
第0天(0%排斥)第7天(15%排斥)第8天(70%排斥)第9天(90%排斥)
经处理的小鼠的皮肤同种异体移植排斥
第0天(0%排斥)第7天(0%排斥)第13天(0%排斥)第15天(0%排斥)

图10b

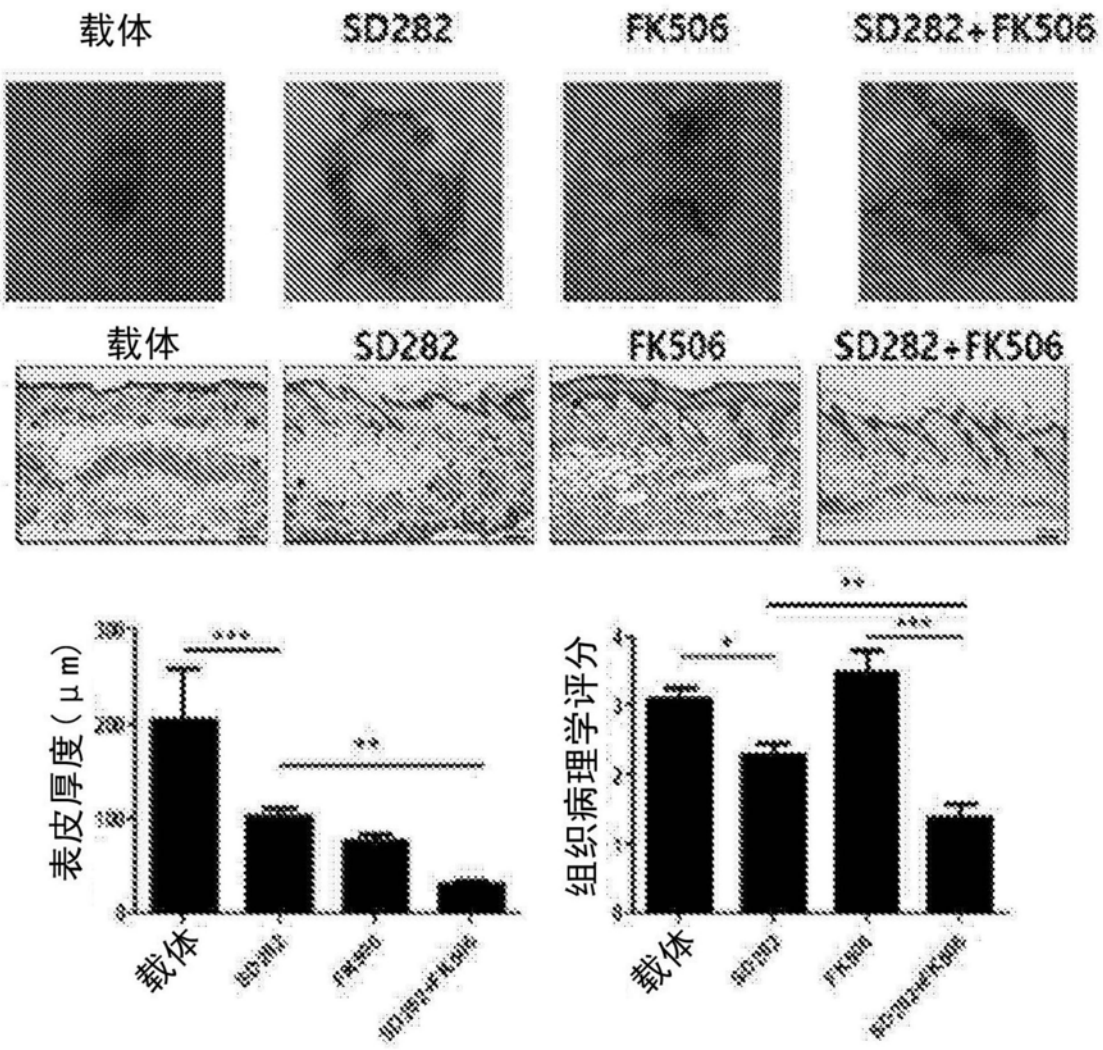

载体
SD282
FK506
SD282+FK506
载体
SD282
FK506
SD282+FK506
表皮厚度（μm）
组织病理学评分
载体

图11

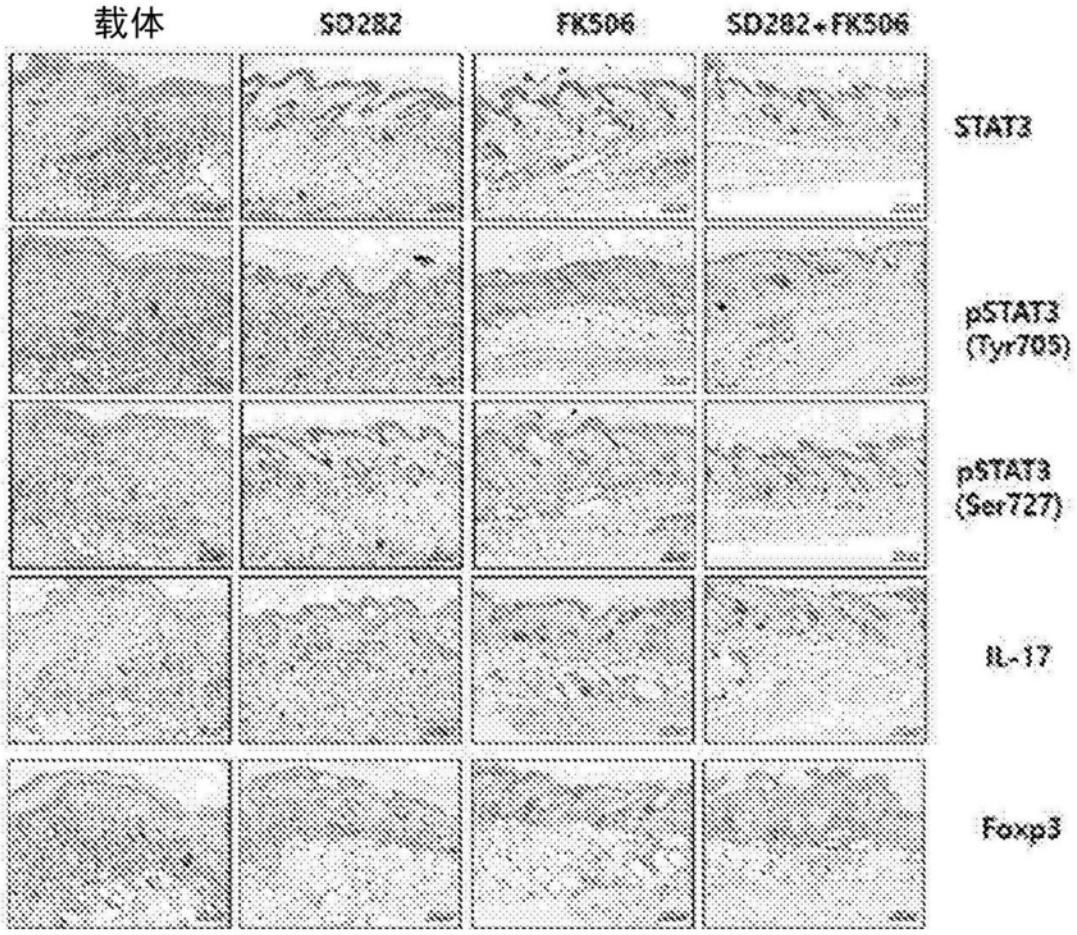

载体
SD282
FK506
SD282+FK506
STAT3
pSTAT3 (Tyr705)
pSTAT3 (Ser727)
IL-17
Foxp3

图12a

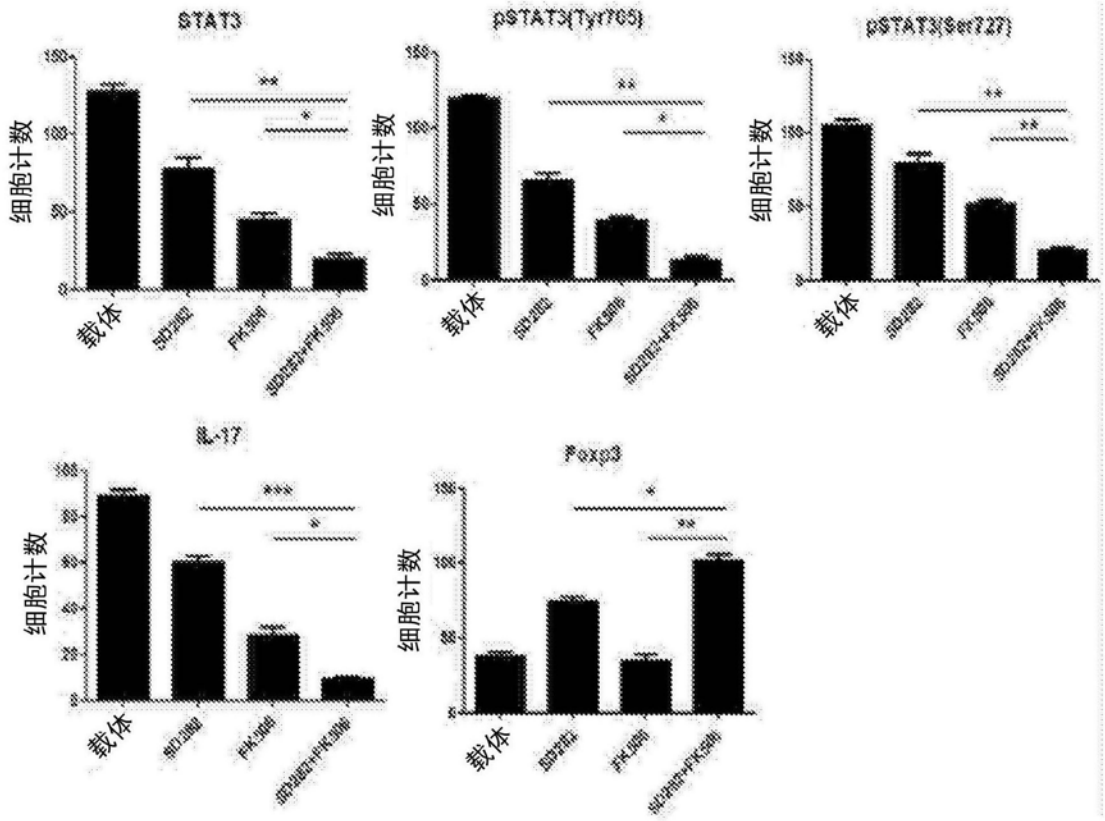

STAT3
pSTAT3(Tyr705)
pSTAT3(Ser727)
IL-17
Foxp3
细胞计数
载体

图12b

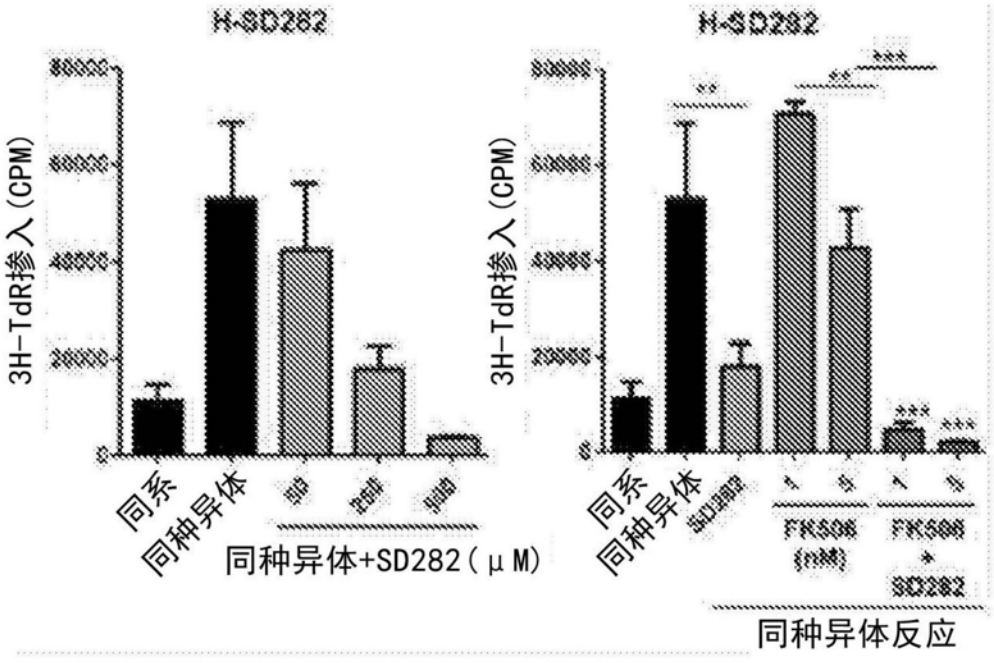

H-SD282
3H-TdR掺入(CPM)
同系
同种异体
同种异体+SD282(μM)
FK506 (nM)
FK506 + SD282
同种异体反应

图13a

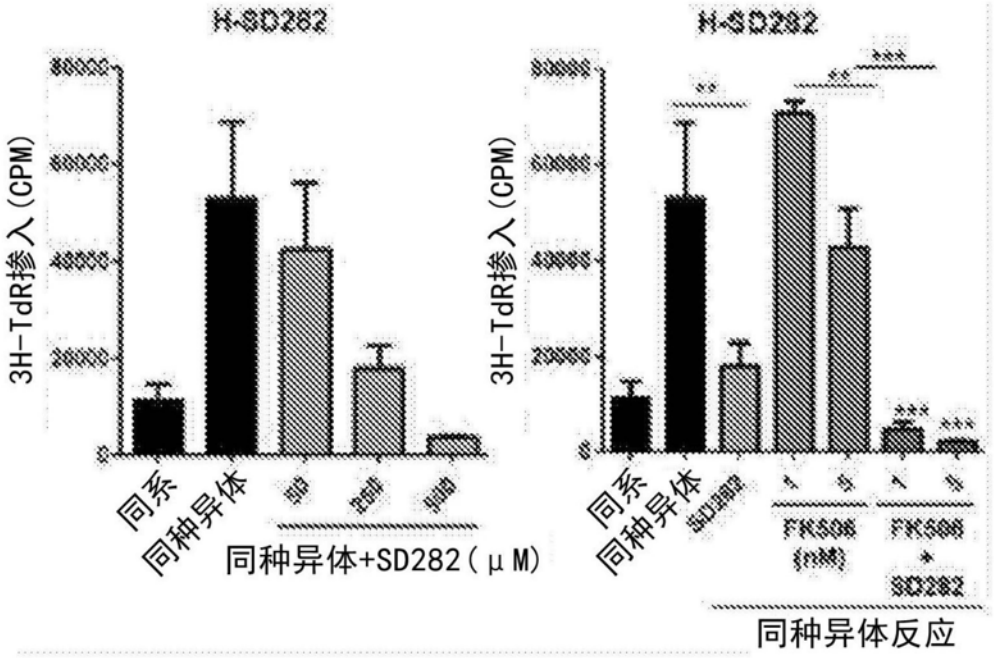

H-SD282
3H-TdR掺入(CPM)
同系
同种异体
同种异体+SD282(μM)
H-SD282
3H-TdR掺入(CPM)
同系
同种异体
FK506 (nM)
FK506 + SD282
同种异体反应

图13b

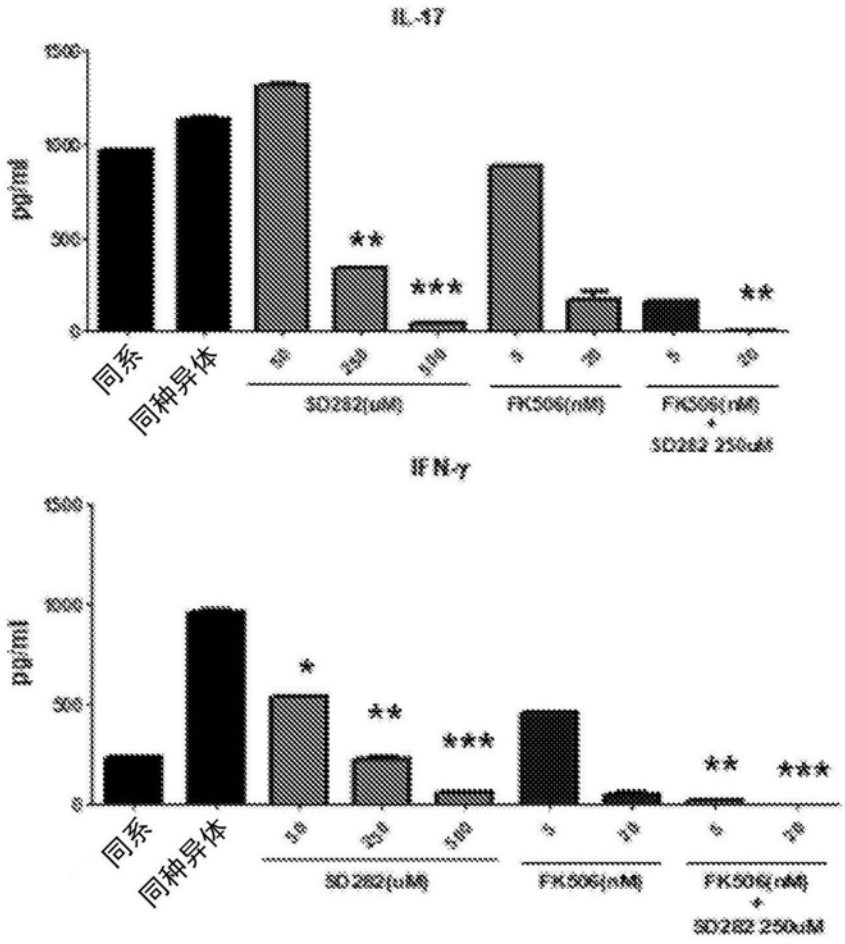

IL-17
pg/ml
**
***
**
同系
同种异体
SD282(uM)
FK506(nM)
FK506(nM)
+
SD282 250uM
IFN-γ
pg/ml
*
**
***
**
***
同系
同种异体
SD282(uM)
FK506(nM)
FK506(nM)
+
SD282 250uM

图14

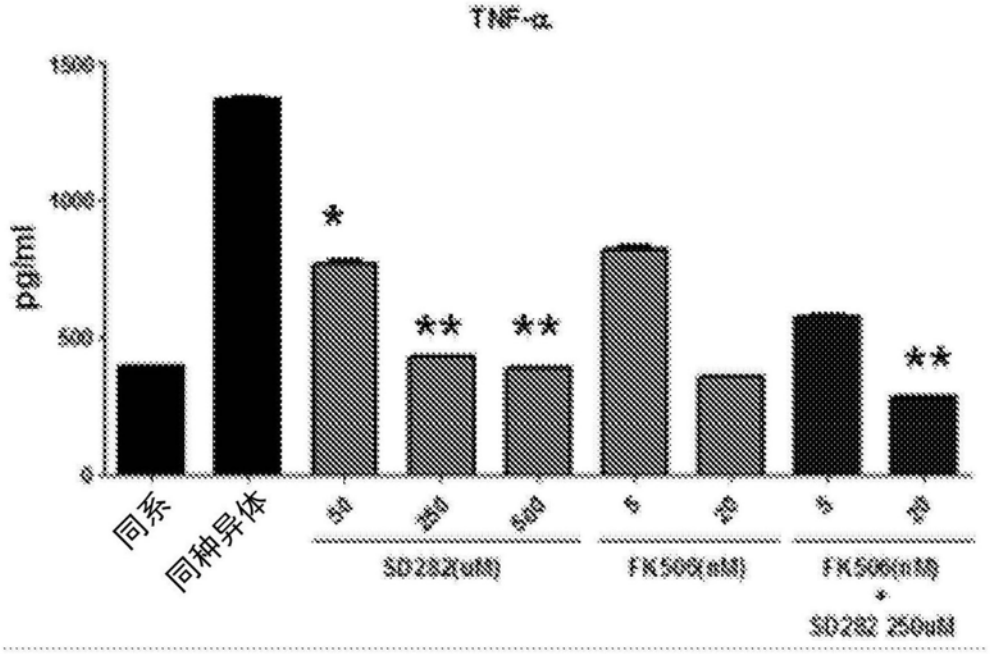


图15

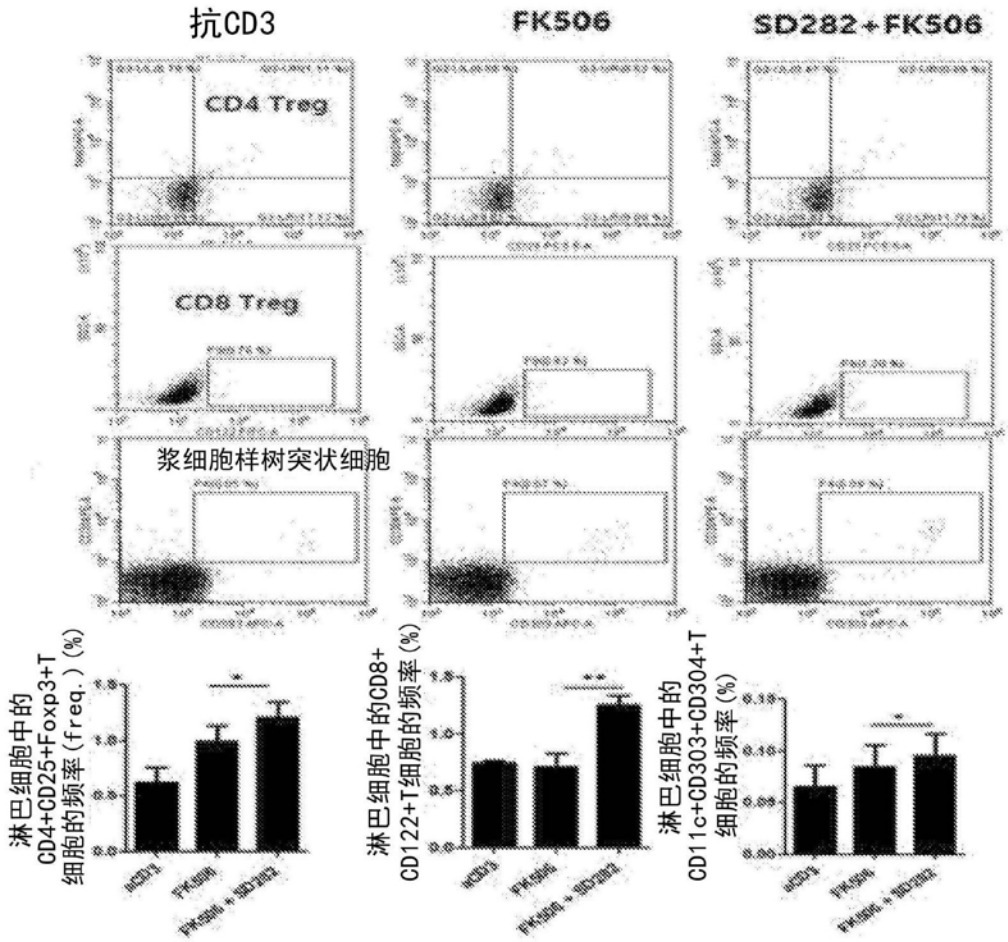

抗CD3
FK506
SD282+FK506
CD4 Treg
CD8 Treg
浆细胞样树突状细胞
淋巴细胞中的CD4+CD25+Foxp3+T细胞的频率(freq.)(%)
淋巴细胞中的CD8+CD122+T细胞的频率(%)
淋巴细胞中的CD11c+CD303+CD304+T细胞的频率(%)

图16a

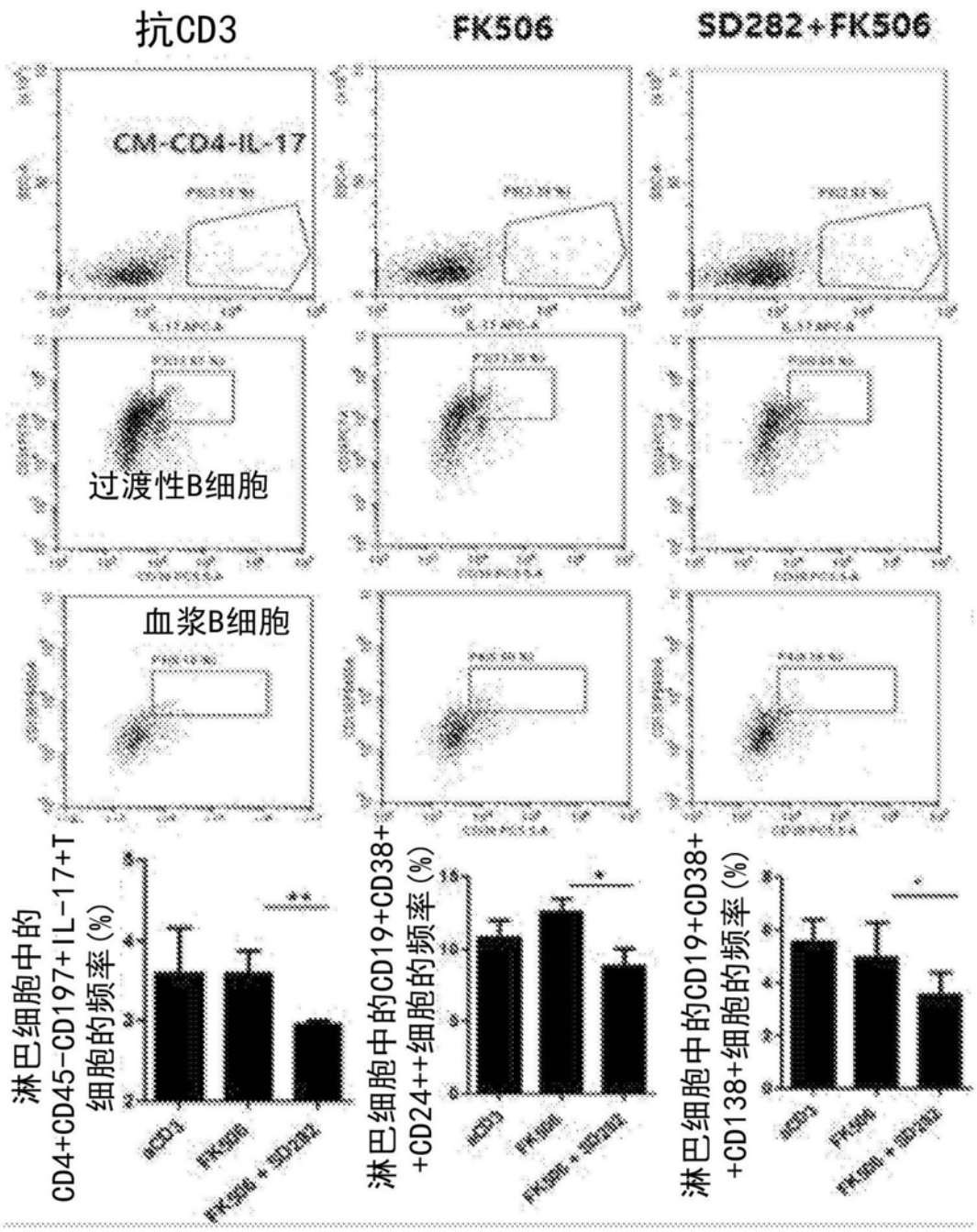

抗CD3
FK506
SD282+FK506
CM-CD4-IL-17
过渡性B细胞
血浆B细胞
淋巴细胞中的CD4+CD45-CD197+IL-17+T细胞的频率(%)
淋巴细胞中的CD19+CD38++CD24++细胞的频率(%)
淋巴细胞中的CD19+CD38++CD138+细胞的频率(%)

图16b

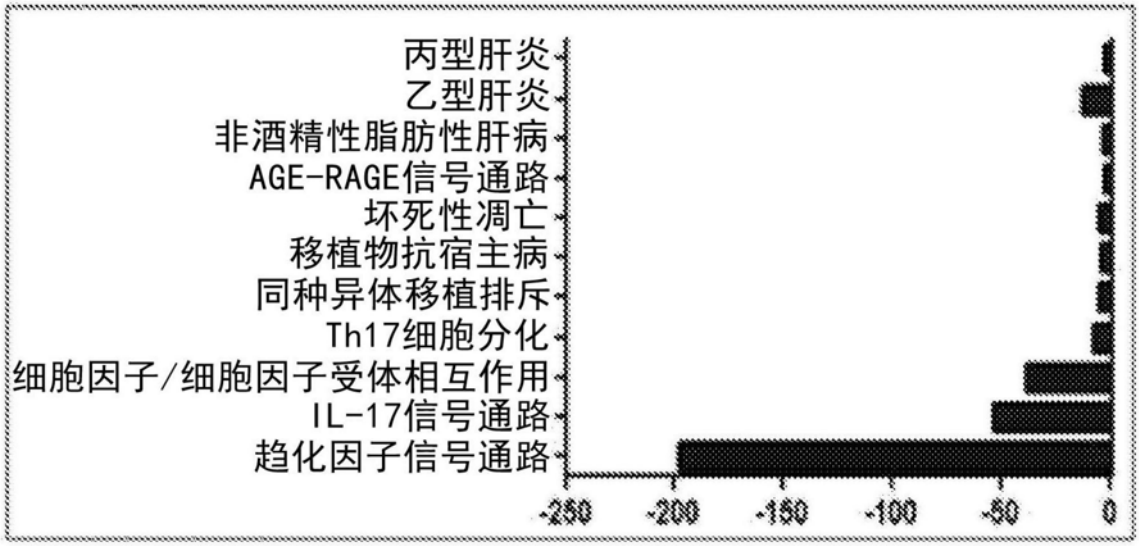

丙型肝炎
乙型肝炎
非酒精性脂肪性肝病
AGE-RAGE信号通路
坏死性凋亡
移植物抗宿主病
同种异体移植排斥
Th17细胞分化
细胞因子/细胞因子受体相互作用
IL-17信号通路
趋化因子信号通路
-250
-200
-150
-100
-50
0

图17

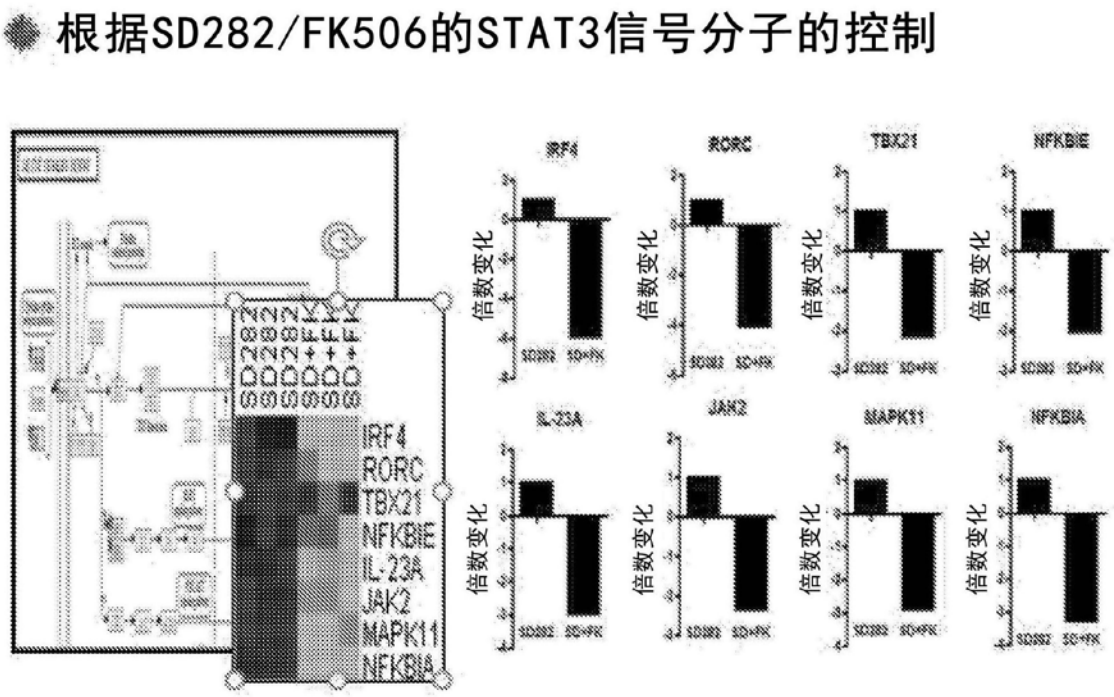

根据SD282/FK506的STAT3信号分子的控制
IRF4
RORC
TBX21
NFKBIE
IL-23A
JAK2
MAPK11
NFKBIA
倍数变化

图18a

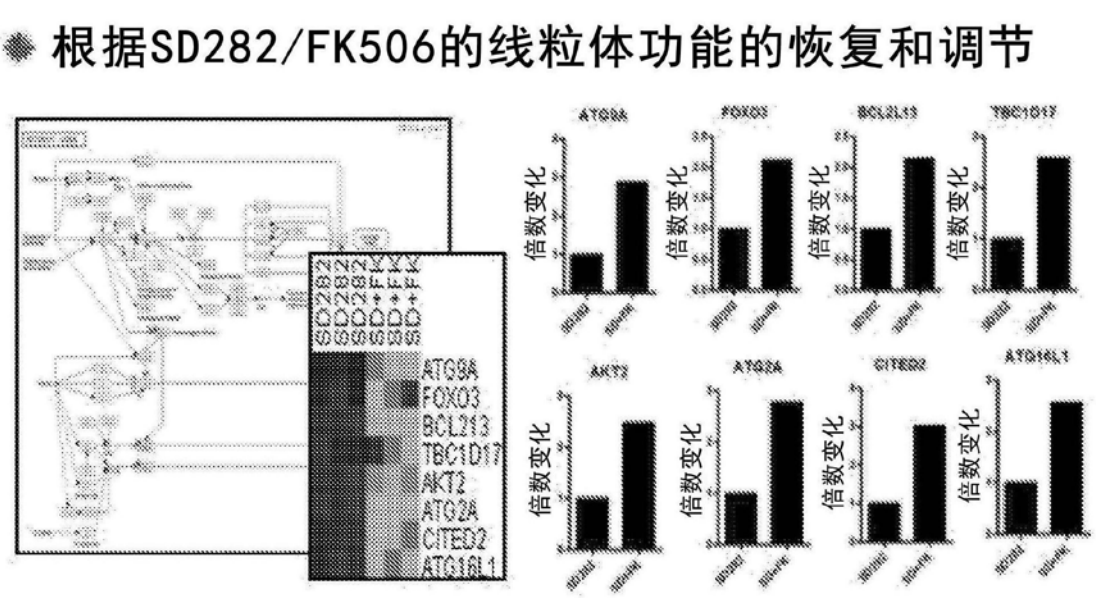

根据SD282/FK506的线粒体功能的恢复和调节
ATG9A
FOXO3
BCL2L13
TBC1D17
AKT2
ATG2A
CITED2
ATG16L1
倍数变化

图18b

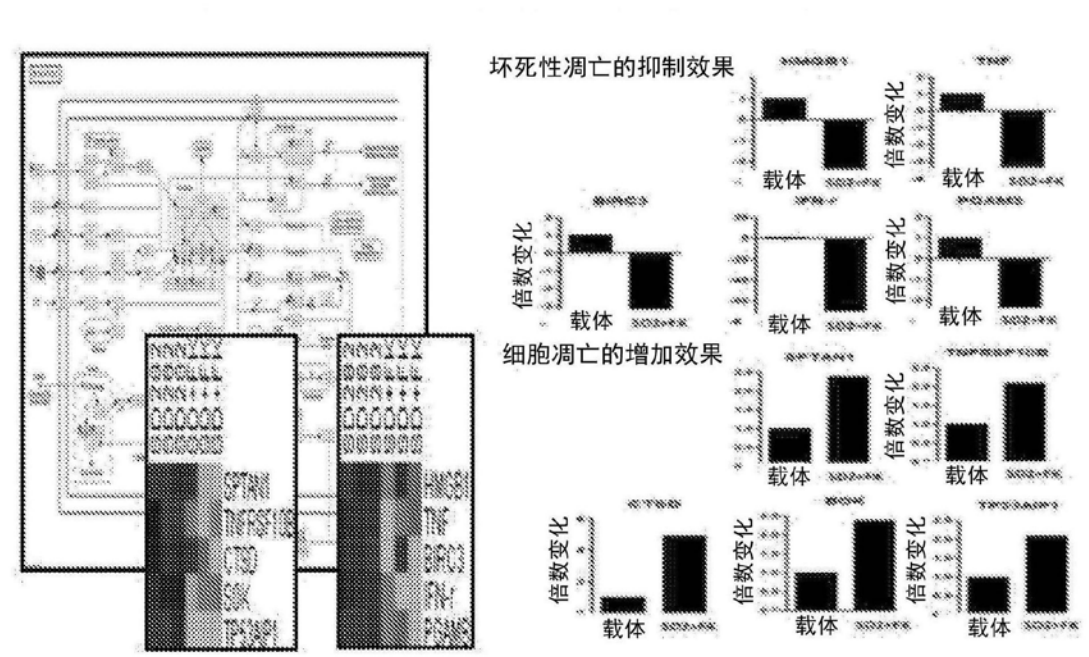

SD282/FK506的炎症细胞死亡分子的控制
坏死性凋亡的抑制效果
细胞凋亡的增加效果
倍数变化
载体

图18c

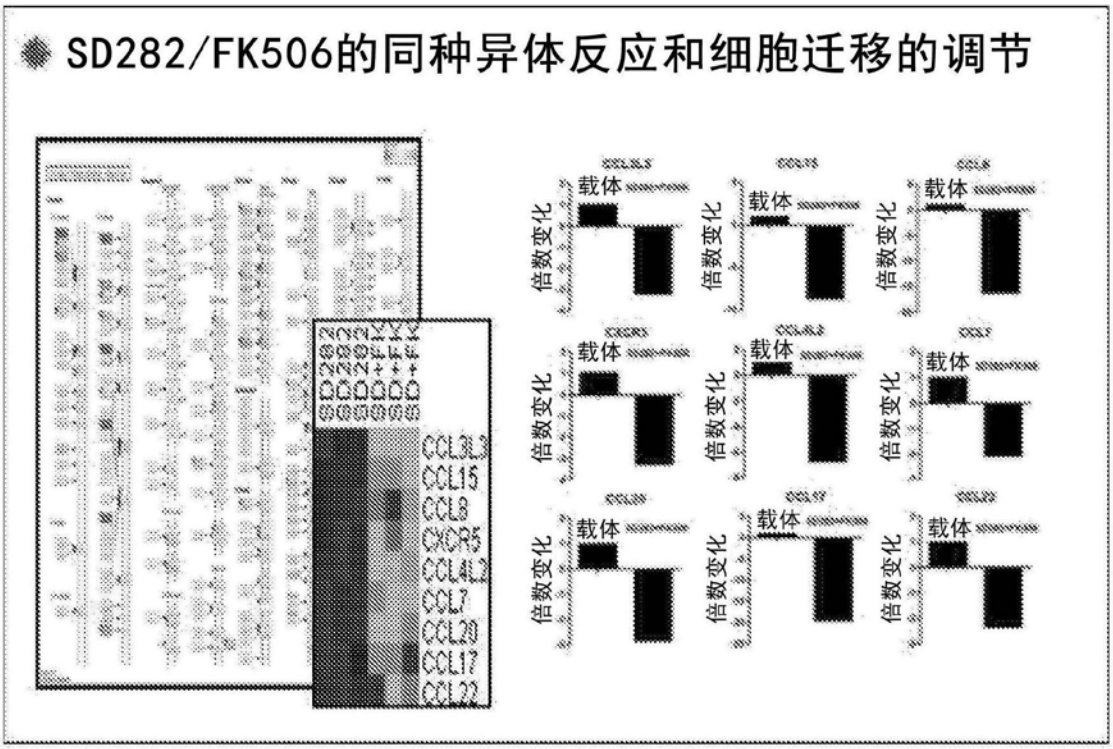


图18d

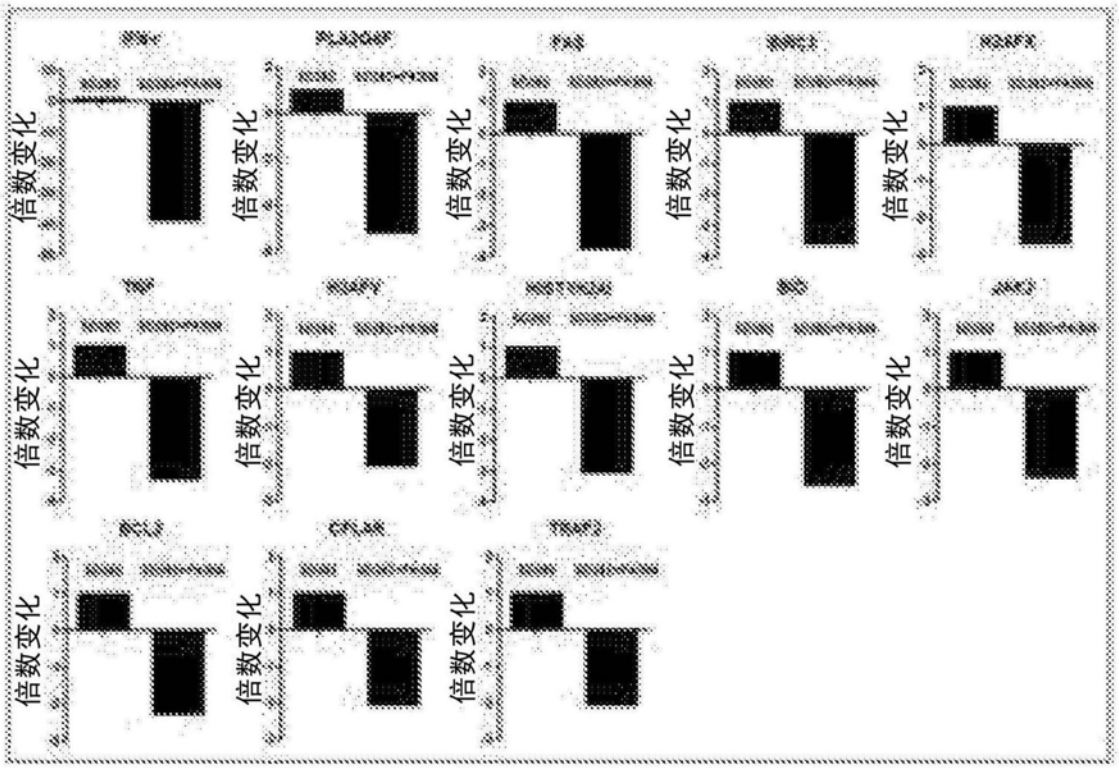


图19

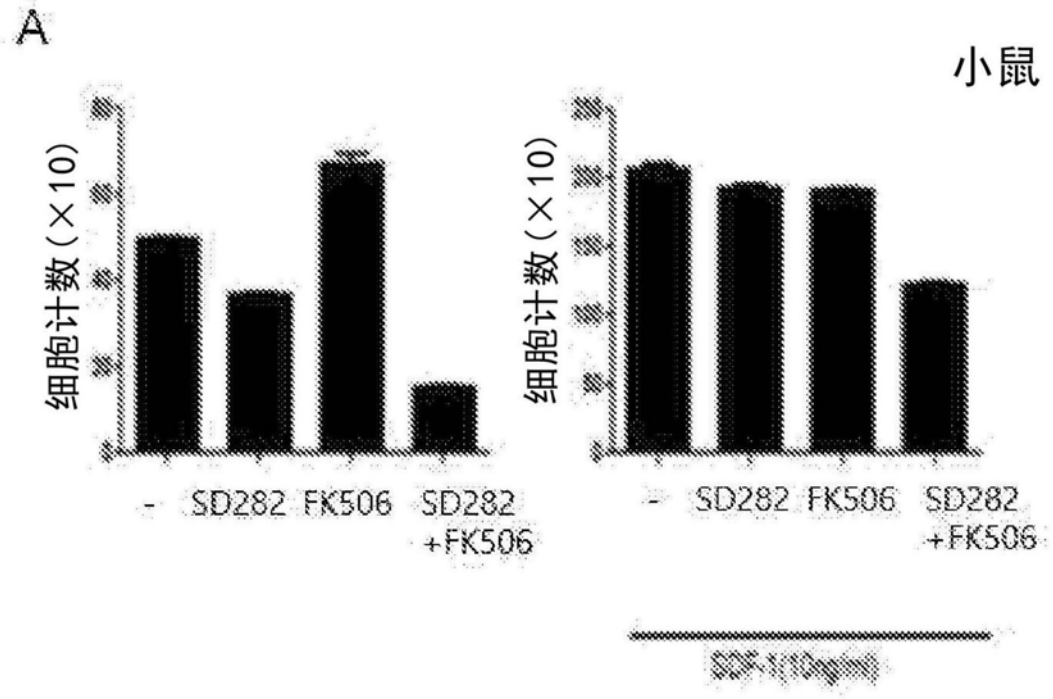

A
小鼠
细胞计数（×10）
细胞计数（×10）
- SD282 FK506 SD282 +FK506
- SD282 FK506 SD282 +FK506

图20a

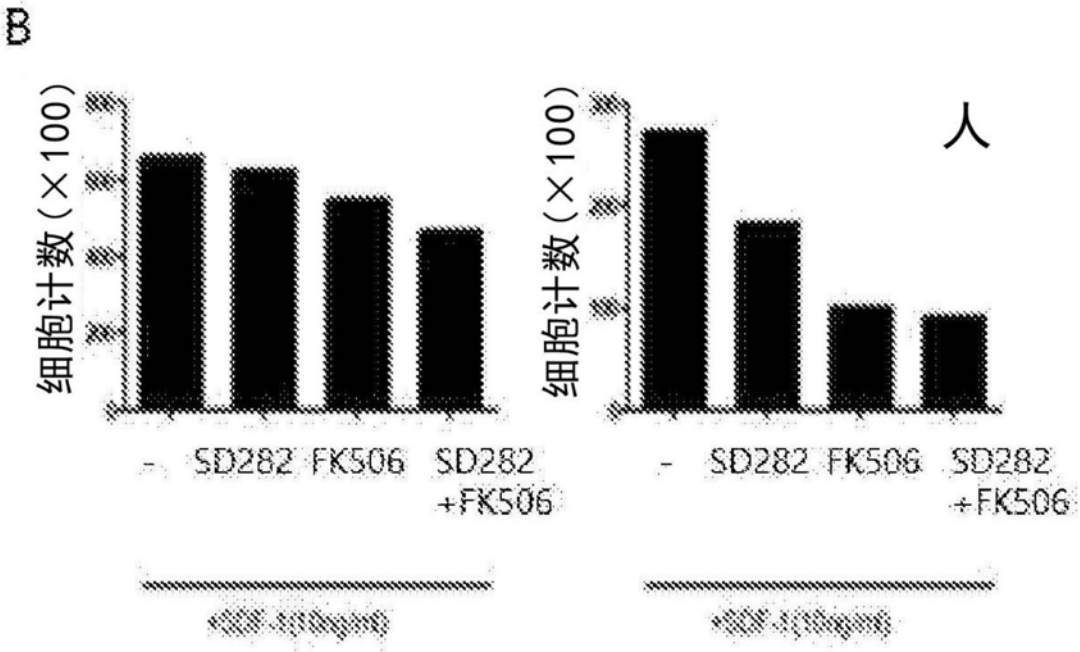

B
细胞计数（×100）
细胞计数（×100）
人
- SD282 FK506 SD282 +FK506
- SD282 FK506 SD282 +FK506

图20b

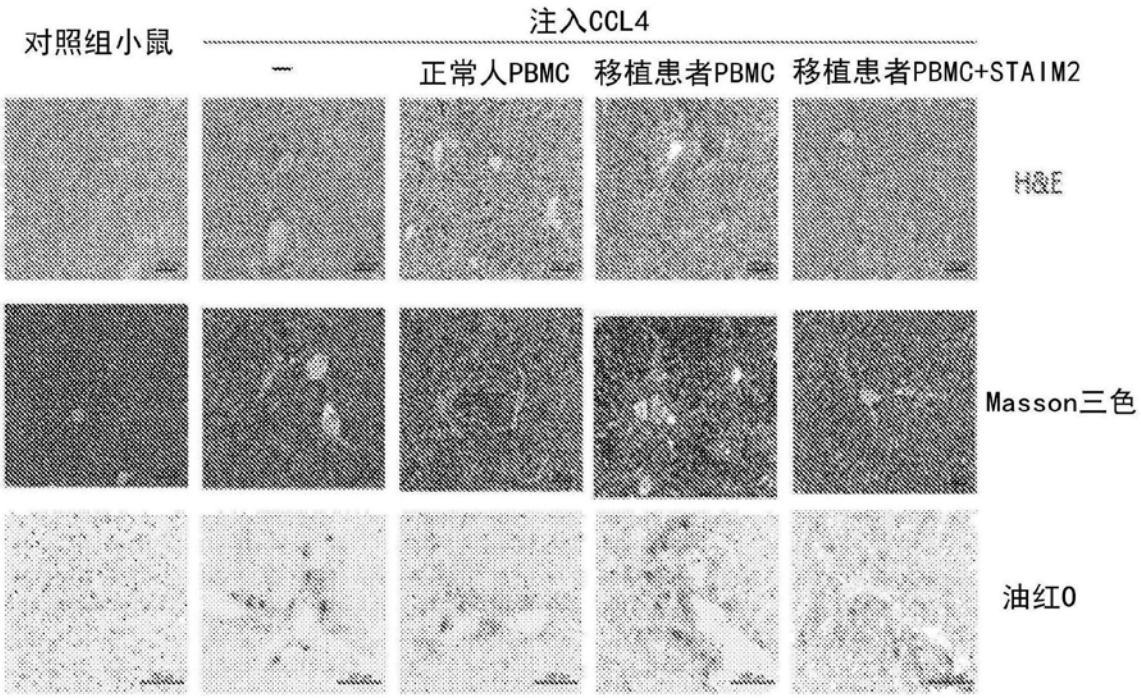

对照组小鼠
注入CCL4
—
正常人PBMC
移植患者PBMC
移植患者PBMC+STAIM2
H&E
Masson三色
油红O

图21a

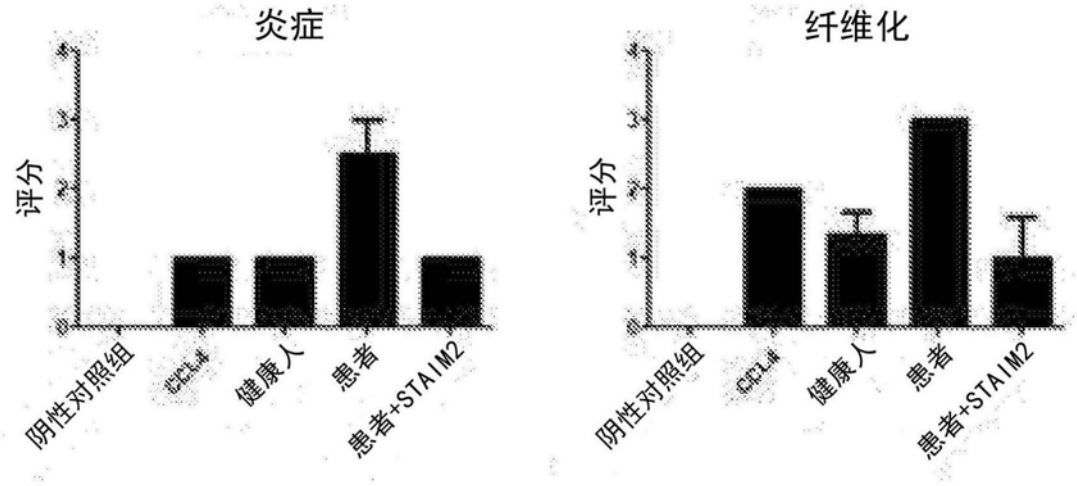

炎症
纤维化
评分
阴性对照组
CCL4
健康人
患者
患者+STAIM2

图21b