

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2013年11月7日 (07.11.2013)



(10) 国际公布号
WO 2013/163887 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 38/28 (2006.01) A61K 31/52 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/13 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/000429
- (22) 国际申请日: 2013年4月12日 (12.04.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210108159.6 2012年4月13日 (13.04.2012) CN
- (71) 申请人: 北京艾棣维欣生物技术有限公司 (BEIJING ADVACCINE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区西二旗西路2号B区36楼102, Beijing 100085 (CN)。
- (72) 发明人: 王宾 (WANG, Bin); 中国北京市海淀区西二旗西路2号B区36楼102, Beijing 100085 (CN)。 郑国兴 (ZHENG, Guoxing); 中国北京市海淀区西二旗西路2号B区36楼102, Beijing 100085 (CN)。 耿爽 (GENG, Shuang); 中国北京市海淀区西二旗西路2号B区36楼102, Beijing 100085 (CN)。 王意忠 (WANG, Yizhong); 中国北京市海淀区西二旗西路2号B区36楼102, Beijing 100085 (CN)。 俞庆龄 (YU, Qingling); 中国北京市海淀区西二旗西路2号B区36楼102, Beijing 100085 (CN)。
- (74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市西城宣武门西大街甲129号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING AND/OR PREVENTING TYPE I DIABETES AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 治疗和/或预防 I 型糖尿病的药物组合物及其应用

(57) Abstract: The present invention provides a composition for treating and/or preventing type I diabetes and an application thereof. The active ingredient of the composition is 1.) or 2.) or 3.), as follows: 1.) a mixture of a type I diabetes protein antigen and an immunosuppressor, 2.) a mixture of a type I diabetes protein antigenic epitope polypeptide and an immunosuppressor, 3.) a mixture of a type I diabetes protein antigen, a type I diabetes protein antigenic epitope polypeptide, and an immunosuppressor; the type I diabetes protein antigen is at least one of insulin, glutamic acid decarboxylase, and islet amyloid polypeptide, and the immunosuppressor is at least one of dexamethasone, cyclosporine A, tacrolimus, mycophenolate mofetil, azathioprine, prednisone, early prednisolone, anti-CD4 monoclonal antibody, and anti-CD3 monoclonal antibody.

(57) 摘要: 本发明提供了一种用于治疗 and/或预防 I 型糖尿病的组合及其应用。该组合物的活性成分为如下 1) 或 2) 或 3): 1) I 型糖尿病蛋白抗原和免疫抑制剂的混合物, 2) I 型糖尿病蛋白抗原的表位多肽和免疫抑制剂的混合物, 3) I 型糖尿病蛋白抗原、I 型糖尿病蛋白抗原的表位多肽和免疫抑制剂的混合物; 所述 I 型糖尿病蛋白抗原为胰岛素、谷氨酸脱羧酶和胰岛淀粉样多肽中的至少一种, 所述免疫抑制剂为地塞米松、环孢素 A、他克莫司、骁悉、硫唑嘌呤、强的松、早基强的松龙、抗 CD4 单抗和抗 CD3 单抗中至少一种。

WO 2013/163887 A1

治疗和/或预防 I 型糖尿病的药物组合物及其应用

技术领域

本发明涉及一种用于治疗 and/或预防 I 型糖尿病的组合剂及其应用。

5 背景技术

世界卫生组织 (WHO) 的专家预测, 糖尿病将是 21 世纪主要的健康危机, 尤其在亚洲, 它的威胁比禽流感和艾滋病更加严重。WHO 估计全球的糖尿病患者到 2010 年将增加到两亿人, 到 2025 年将超过 3.3 亿人。而从目前的情况分析, 在未来 10 年时间里, 全球所有病例中有 60% 都将出现在亚洲。据透露, 西太平洋地区 (包括中国) 和东南亚地区 (包括印度) 是世界上糖尿病患者最多的地区。在世界糖尿病患者最多的五个国家里, 四个在亚洲。

我国在向小康社会发展过程中, 人们对脂肪与糖类的摄取量未能得到合理的控制, 在老龄化及多方位应激因素影响下, 糖尿病的发生率已逐年上升, 与 20 世纪 90 年代中期相比, 国内许多地区平均每年以千分之一的速度递增, 我国专家预测糖尿病发病率在近 10 余年间将呈迅速上升趋势, 较 WHO 的预测更为严峻。据我国国内的调查显示, 全国 20 岁以上的糖尿病患者达 2500 万人以上, 糖耐量异常者不低于 3500 万人, 总计在 6000 万人以上。其中, 富裕地区的发病率显著高于贫困地区, 城市发病率普遍高于农村, 肥胖者高于正常体重者, 高龄者高于低龄者, 而且发病年龄也日益趋于年轻化。40 岁以下人群新发病例增多, 40 岁以上的平均患病率约占糖尿病总数 87%, 患者高峰年龄在 50 岁~70 岁。由于我国人口老龄化逐渐加剧, 使糖尿病药物市场潜力进一步加大。

I 型糖尿病是以 CD4⁺ T 细胞, CD8⁺ T 细胞和巨噬细胞浸润胰岛而造成胰岛中产生胰岛素的细胞被破坏为特征的一类自身免疫疾病。它约占所有糖尿病患者的 5-10% (ADA [American Diabetes Association]. 1997. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 20:1183-1197; Atkinson MA, Leiter EH. 1999. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? Nature 5:601-604)。主要发病机理是自身反应的 T 淋巴细胞破坏了胰腺中产生胰岛素的细胞引起的, 以 CD4⁺ T 细胞, CD8⁺ T 细胞和巨噬细胞浸润胰岛而造成胰岛中产生胰岛素的细胞被破坏为特征 (Atkinson MA, Maclaren NK. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 331:1428-1436; Benoist C, Mathis D. 1997. Autoimmune diabetes: Retrovirus as trigger, precipitator or marker? Nature 388:833-834; Bjork S. 2001. The cost of diabetes and diabetes care. Diabetes Res Clin Pract 54(Suppl 1):13-18)。

人们已经发现 I 型糖尿病胰岛炎现象, 即淋巴细胞浸润胰岛, 以后相继在 I 型糖尿病患者中发现了抗胰岛细胞自身抗体 (ICA), 对胰岛素、羧肽酶、热休克蛋白产生自主反应的 T 细胞。

实验证明胰岛素 B 链肽 9-23 可以结合到 II 类组织相容性复合体 (MHC) 等位基

因叫 I-Ag7。1 型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病，是一种 T 细胞介导性疾病，导致高血糖的胰腺 β 细胞的自身免疫性破坏的结果。这胰岛 B 肽可能是一种自身抗原可能引发的疾病的候选 (Devendra, D. et al. *Diabetes* 54, 2549, 2005; Starwalt, S. et al. *Protein Eng.* 16, 147 (2003); Lee, L. et al. *PNAS* 102, 15995, 2005)。进一步实验还证明胰岛素 B 链 15 至 23 氨基酸片段可以被 T 细胞识别。它在糖尿病病人体内可以被检测到表达干扰素- β 和 IL-17 的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞的生产。这种肽可以与 B 链胰岛素 CTL 克隆反应，但不会与脾 $CD8^+$ T 细胞反应 (Hu, C. et al. *J. Clin. Invest.* 117, 3857, 2007; Amrani, A. et al. *Nature* 406, 739, 2000)。实验证明胰岛素 C 链肽也是一个一起自身免疫反应的抗原 (Arif, T. I. Tree, T. P. Astill et al. *Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. The Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, no. 3, pp. 451-463, 2004)。

至 1990 年 Beakkeskov 证明 I 型糖尿病患者血清中存在的 64 K 抗体就是谷氨酸脱羧酶(GAD)自身抗体和自主反应的 T 细胞，认为 GAD 是 I 型糖尿病自身免疫反应的关键抗原 (Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. Itamar Razl, Roy Eldor² and Yaakov Naparstek. *TRENDS in Biotechnology* 23:128, 2005; Enee, E. et al. *J Immunol* 180, 5430, 2008; 龙秀荣, 杜文斌, 苏钟浦, 魏庆珍. 儿童糖尿病的谷氨酸脱羧酶抗体检测. 中华儿科杂志. 1998 年第 10 期)。

另外，有大量的报道发现胰岛淀粉样多肽 (islet amyloid polypeptide, IAPP) 所形成的淀粉样蛋白沉积，具有破坏胰岛 beta 细胞膜结构、诱导 beta 细胞凋亡和损伤 beta 细胞功能、及激活免疫细胞攻击 beta 细胞的作用，被认为是糖尿病的重要致病原因之一。最新研究也表明抑制 IAPP 的聚集可有效减少 beta 细胞的凋亡，提高胰岛移植的成功率。同时，因此，IAPP 已成为糖尿病治疗中一个具有良好前景的靶点。

在目前，T1D 的治疗主要以外源性胰岛素替代治疗为主，患者需每日注射胰岛素。此方法不仅每天给患者带来极大不方便，而且易发生注射感染或过敏反应；且此治疗方案只能缓解高血糖等临床症状，但常有血糖波动和低血糖发生，也无法改变自体病理性 T 细胞攻击胰腺的状况，更加无法恢复受损胰腺功能，也就不能控制远期并发症。即使目前最为有效的胰岛素强化治疗方案，也仅能减少并发症发生率的 35%~90%，同时患者难免遭受着注射所带来的不便和痛苦。因此，寻求调节和抑制自身免疫反应，改善甚至恢复胰腺正常功能，成为从根本上治疗 T1D，解除患者痛苦，提高患者尤其是青少年患者生活质量的必经之路。

由于 I 型糖尿病是 T 细胞引起的自身免疫性疾病，所以在临床上也使用的免疫抑制剂来抑制此类疾病，如：地塞米松 (DMS)，普乐可复(FK506)，环孢素 A(CsA)，骁悉(MMF)，硫唑嘌呤(Aza)，强的松(Pred)，早基强的松龙(MP)；或利用抗体如：抗淋巴细胞球蛋白(ALG)，抗 $CD4$ 单克隆抗体(OKT4)，每年治疗费用在几十亿元。由于这些药物是非特异性免疫抑制，所以疗效不理想，而且大剂量使用免疫抑制剂都有其毒副作用，若使用不当，一方面可因过度抑制机体免疫反应性而引发多种并发症，更有导致抑制器官功能衰竭风险。所以，急需一种毒性低，具有特异性疗效的药物。

发明公开

本发明的目的是提供一种组合物。

本发明所提供的组合物的活性成分为如下 1) 或 2) 或 3) :

- 1) I 型糖尿病的蛋白抗原和免疫抑制剂的混合物;
- 5 2) 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽和所述免疫抑制剂的混合物;
- 3) 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原、所述 I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽和所述免疫抑制剂的混合物;

上述组合物中的活性成分, 即 I 型糖尿病的蛋白抗原、I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽和免疫抑制剂可以独立包装, 也可以混合在一起后整体包装。

- 10 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原为胰岛素、谷氨酸脱羧酶和胰岛淀粉样多肽中的至少一种。所述免疫抑制剂为地塞米松, 环孢素 A, 他克莫司 (普乐可复), 骁悉, 硫唑嘌呤, 强的松, 早基强的松龙, 抗 CD4 单克隆抗体和抗 CD3 单克隆抗体中的至少一种。所述表位多肽为单一抗原表位的多肽或多个抗原表位组合而成的多肽。

- 15 其中, 所述胰岛素可来源于人、狗、猫, 也可以来自于重组基因表达的产物。人的胰岛素可以用于狗和猫的 I 型糖尿病治疗。人、狗、猫和鼠的基因序列非常相似。在核酸序列水平上, 鼠与人胰岛素相似性为 95%, 猫与人的相似性为 84%, 狗与人的相似性为 89%。

- 20 所述谷氨酸脱羧酶可来源于人、狗、猫, 也可以来自于重组基因表达的产物。人的谷氨酸脱羧酶也用于小鼠 I 型糖尿病治疗。在核酸序列水平上, 两者的序列相似度为 90%。

所述胰岛淀粉样多肽可来源于人、狗、猫, 也可以来自于重组基因表达的产物。

所述表位多肽可来源于人、狗、猫序列, 并可以进行化学合成得到。

- 25 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原具体可为人胰岛素 (Insulin)。所述人胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 1 (该多肽的名称为 B9-23), 或序列 2 (该多肽的名称为 B15-23), 或序列 3 (该多肽的名称为 C 肽), 或序列 12 (该多肽的名称为 B23-39), 或序列 13 (该多肽的名称为 B10-C5) 所示。

- 30 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原具体可为狗胰岛素。所述狗胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 4 (该多肽的名称为 B9-23), 或序列 5 (该多肽的名称为 B15-23), 或序列 12 (该多肽的名称为 B23-39), 或序列 13 (该多肽的名称为 B10-C5) 所示。

所述 I 型糖尿病的蛋白抗原具体可为猫胰岛素。所述猫胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 6 (该多肽的名称为 B9-23), 或序列 7 (该多肽的名称为 B15-23), 或序列 12 (该多肽的名称为 B23-39), 或序列 13 (该多肽的名称为 B10-C5) 所示。

- 35 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原具体可为人谷氨酸脱羧酶-65(GAD65)。所述人谷氨酸脱羧酶-65 的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 8 (该多肽的名称为 G114-123) 所示。

所述 I 型糖尿病的蛋白抗原具体可为人胰岛淀粉样多肽 islet amyloid polypeptide (IAPP)。所述人胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中的序列 9(该多肽的名称为 1-36) 所示。

所述 I 型糖尿病的蛋白抗原具体可为狗胰岛淀粉样多肽。所述狗胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中的序列 10 (该多肽的名称为 1-36) 所示。

所述 I 型糖尿病的蛋白抗原具体可为猫胰岛淀粉样多肽。所述猫胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中的序列 11 (该多肽的名称为 1-36) 所示。

其中, 序列 1 由 15 个氨基酸组成; 序列 2 由 9 个氨基酸组成; 序列 3 由 31 个氨基酸组成; 序列 4 由 15 个氨基酸组成; 序列 5 由 9 个氨基酸组成; 序列 6 由 15 个氨基酸组成; 序列 7 由 9 个氨基酸组成; 序列 8 由 10 个氨基酸组成; 序列 9 由 37 个氨基酸组成; 序列 10 由 37 个氨基酸组成; 序列 11 由 37 个氨基酸组成; 序列 12 由 17 个氨基酸组成; 序列 13 由 27 个氨基酸组成。

上述 1) 中所述 I 型糖尿病的蛋白抗原与所述免疫抑制剂的使用配比 (质量比) 为 1: 20 到 20: 1, 如 1: 1 到 10: 1。在本发明中, 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原与所述免疫抑制剂的使用配比 (质量比) 具体为 1: 1 (10 μ g 蛋白抗原+10 μ g 免疫抑制剂), 或 10: 1 (10 μ g 蛋白抗原+1 μ g 免疫抑制剂)。

上述 2) 中所述表位多肽与所述免疫抑制剂的使用配比为 1g:1g。

本发明所提供的组合物具有如下功能中的至少一种:

(1) 治疗和/或预防脊椎动物 I 型糖尿病;
(2) 提高哺乳动物动物 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞增殖水平;
(3) 提高哺乳动物 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞与 CD4⁺ T 细胞的比例;
(4) 提高哺乳动物 T 细胞对 IL-10 的分泌水平;
(5) 抑制哺乳动物自身免疫反应性 CD8 T 细胞的杀伤作用; 在本发明的实施例中, 所述抑制自主免疫 CD8 T 细胞的杀伤作用具体为对胰岛细胞和/或脾脏细胞的杀伤作用。

(6) 控制 I 型糖尿病患者 (哺乳动物) 血糖水平;
(7) 提高哺乳动物外周血单核细胞和/或脾脏细胞中 IL-10 和/或 TGF- β 的转录水平;

(8) 抑制哺乳动物 DC 细胞成熟; 所述抑制 DC 细胞成熟体现为降低 DC 分泌 CD40、CD80、CD83 和 CD86 中的至少一种。

所述脊椎动物为哺乳动物, 具体可为小鼠、家兔、狗或人。

本发明所提供的组合物在制备治疗和/或预防 I 型糖尿病的产品中的应用也属于本发明的保护范围。

本发明所提供的组合物在制备具有如下 a) -h) 中至少一种功能的产品中的应用也属于本发明的保护范围:

a) 提高哺乳动物 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例;
b) 提高哺乳动物 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞增殖水平;

- c) 提高哺乳动物 T 细胞对 IL-10 的分泌水平;
 - d) 控制患 I 型糖尿病的哺乳动物血糖水平;
 - e) 抑制自身免疫反应性 CD8 T 细胞所起的杀伤作用;
 - f) 提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中 IL-10 和/或 TGF- β 的转录水平;
 - 5 g) 抑制哺乳动物 DC 细胞成熟;
 - h) 降低哺乳动物 DC 细胞分泌 CD40、CD80、CD83 和 CD86 中的至少一种.
- 所述脊椎动物为哺乳动物, 具体可为小鼠、家兔、狗或人。

本发明所提供的药物组合物在治疗和/或预防 I 型糖尿病中应用也属于本发明的保护范围。

10 本发明所提供的药物组合物经过注射机体, 体内可以产生 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞, 从而抑制 I 型糖尿病发生。

本发明所提供的药物组合物, 在使用过程中: 1) 作为 I 型糖尿病的蛋白抗原的胰岛素浓度为 0.01~1IU/Kg 体重, 如 0.15~0.25IU/Kg 体重, 免疫抑制剂地塞米松的浓度为 0.01~600 μ g/Kg 体重, 如 1~5 μ g/Kg 体重;

15 2) 作为 I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽 B23-39 浓度为 0.05~1 μ g/Kg 体重, 如 0.1~0.5 μ g/Kg 体重, 免疫抑制剂地塞米松的浓度为 0.01~1 μ g/Kg 体重, 如 0.05~0.2 μ g/Kg 体重;

20 3) 作为 I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽 B10-C5 浓度为 0.05~1 μ g/Kg 体重, 如 0.1~0.5 μ g/Kg 体重, 免疫抑制剂地塞米松的浓度为 0.01~1 μ g/Kg 体重, 如 0.05~0.2 μ g/Kg 体重;

4) 作为 I 型糖尿病的蛋白抗原的谷氨酸脱羧酶浓度为 0.05~1 μ g/Kg 体重, 如 0.1~0.5 μ g/Kg 体重, 免疫抑制剂地塞米松的浓度为 0.01~1 μ g/Kg 体重, 如 0.05~0.2 μ g/Kg 体重;

25 5) 作为 I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽 G114-123 浓度为 0.05~1 μ g/Kg 体重, 如 0.1~0.5 μ g/Kg 体重, 免疫抑制剂地塞米松的浓度为 0.01~1 μ g/Kg 体重, 如 0.05~0.2 μ g/Kg 体重。

本发明所提供的治疗和/或预防 I 型糖尿病的药物组合物可通过注射、喷射、滴鼻、滴眼、渗透、吸收、物理或化学介导的方法导入机体, 如肌肉、皮内、皮下、静脉、粘膜组织; 或是被其他物质混合或包裹后导入机体。

30 所述药物组合物每 3-30 天给药一次, 一般共需 4-8 次。

附图说明

图1为确定Treg量效关系的结果, 即人胰岛素(诺和灵R)与地塞米松不同剂量免疫NOD小鼠后, 检测脾脏CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的比例。其中, A为流式细胞检测结果; B为对A流式细胞检测结果的统计比较结果。A和B中, 1均代表第1组(10+10
35 组), 即注射10微克人胰岛素(诺和灵R)混合10微克地塞米松; 2均代表第2组(100+100组), 即注射100微克人胰岛素(诺和灵R)混合100微克地塞米松; 3均代表第3组(500+100组), 即注射500微克人胰岛素(诺和灵R)混合100微克地塞米松; 4均代

表未经免疫的NOD小鼠对照组。

图2为确定Treg增殖量效关系的结果，即人胰岛素（诺和灵R）与地塞米松不同剂量免疫NOD小鼠后，纯化脾脏CD4⁺CD25⁺调节性T细胞，标记CFSE，体外用抗原人胰岛素（诺和灵R）或人胰岛素表位多肽B9-23重新刺激后，检测Treg的增殖情况。其中，A为流式细胞检测结果；B为对A流式细胞检测结果的统计比较结果。A和B中，1均代表阳性对照Anti-CD3；2均代表无关抗原对照OVA323-339；3均代表未刺激阴性对照；（1、2、3均为未经免疫的NOD小鼠）；4均代表10微克人胰岛素（诺和灵R）混合10微克地塞米松刺激组；5均代表100微克人胰岛素（诺和灵R）混合100微克地塞米松刺激组；6均代表500微克人胰岛素（诺和灵R）混合100微克地塞米松刺激组；7均代表10微克人胰岛素表位多肽B9-23混合10微克地塞米松刺激组；8均代表100微克人胰岛素表位多肽B9-23混合100微克地塞米松刺激组；9均代表500微克人胰岛素表位多肽B9-23混合100微克地塞米松刺激组。

图3为确定IL-10量效关系的结果，即胰岛素抗原与地塞米松不同剂量免疫NOD小鼠后，纯化脾脏CD4⁺CD25⁺调节性T细胞，体外用抗原人胰岛素（诺和灵R）或人胰岛素表位多肽B9-23重新刺激后，检测上清中IL-10表达（皮克每毫升）。1代表阳性对照Anti-CD3；2代表无关抗原对照OVA323-339；3代表未刺激阴性对照；（1、2、3均为未经免疫的NOD小鼠）；4代表10微克人胰岛素（诺和灵R）混合10微克地塞米松刺激组；5代表100微克人胰岛素（诺和灵R）混合100微克地塞米松刺激组；6代表500微克人胰岛素（诺和灵R）混合100微克地塞米松刺激组；7代表10微克人胰岛素表位多肽B9-23混合10微克地塞米松刺激组；8代表100微克人胰岛素表位多肽B9-23混合100微克地塞米松刺激组；9代表500微克人胰岛素表位多肽B9-23混合100微克地塞米松刺激组。

图4为即发I型糖尿病治疗效果的血糖检测结果，即STZ诱导NOD小鼠I型糖尿病发病后，分别用高剂量组（人胰岛素（诺和灵R）100μg+地塞米松100μg）和低剂量组（人胰岛素（诺和灵R）10μg+地塞米松10μg）治疗，观察血糖变化（毫摩）。其中，空心圆实线代表发病不治疗组；实心圆实线代表低剂量治疗组（10+10）；空心圆虚线代表高剂量治疗组（100+100）。

图5为即发I型糖尿病治疗效果的CTL（细胞杀伤）检测结果，即STZ诱导NOD小鼠I型糖尿病发病后，分别用高剂量组（人胰岛素（诺和灵R）100μg+地塞米松100μg）和低剂量组（人胰岛素（诺和灵R）10μg+地塞米松10μg）治疗，将与Insulin10-18CD8 T细胞表位孵育的细胞标记CFSE，转移到治疗后的小鼠体内，12h后检测CTL杀伤。其中，A为流式细胞检测结果；B为对A流式细胞检测结果的统计比较结果。A和B中，1均代表第1组（发病组）小鼠的CTL检测结果；2均代表第2组（10+10组），即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组小鼠的CTL检测结果；3均代表第3组（100+100组），即注射人胰岛素100μg混合地塞米松100μg组小鼠的CTL检测结果；4均代表第3组（100+100组）小鼠事先注射anti-CD8抗体，敲除CD8细胞后的CTL检测结果。

图6为即发 I 型糖尿病治疗后血糖与自主免疫CTL的相关性结果。每个点代表一只小鼠。

图7为即发 I 型糖尿病治疗效果的调节性T细胞 (Foxp3⁺CD4⁺) 检测结果, 即STZ诱导NOD小鼠 I 型糖尿病发病后, 分别用高剂量组 (人胰岛素 (诺和灵R) 100μg+地塞米松100μg) 和低剂量组 (人胰岛素 (诺和灵R) 10μg+地塞米松10μg) 治疗, 检测治疗后小鼠的调节性T细胞 (Foxp3⁺CD4⁺) 占CD4⁺ T细胞的百分含量。其中, 1代表对照组, 即未经免疫且未致病的NOD小鼠的调节性T细胞 (Foxp3⁺CD4⁺) 检测结果; 2代表第1组(发病组)小鼠的调节性T细胞(Foxp3⁺CD4⁺)检测结果; 3代表第2组(10+10组), 即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组小鼠的调节性T细胞 (Foxp3⁺CD4⁺) 检测结果; 4代表第3组 (100+100组), 即注射人胰岛素100μg混合地塞米松100μg组小鼠的调节性T细胞 (Foxp3⁺CD4⁺) 检测结果。

图8为长期 I 型糖尿病治疗效果的生存曲线, 即NOD小鼠 I 型糖尿病发病后, 以低剂量组 (人胰岛素 (诺和灵R) 10μg+地塞米松10μg) 治疗, 定时统计小鼠的存活率。其中, 空心圆实线代表第1组 (发病组); 实心圆实线代表第2组 (治疗组)。

图9为长期 I 型糖尿病治疗效果的血糖变化检测结果, 即STZ诱导NOD小鼠 I 型糖尿病发病后, 用低剂量组 (人胰岛素 (诺和灵R) 10μg+地塞米松10μg) 治疗, 观察血糖变化。其中, 空心圆实线代表第1组 (发病组); 实心圆实线代表第2组 (治疗组)。

图10为长期T1D治疗效果的Insulin10-18 CTL检测结果, 即STZ诱导NOD小鼠 I 型糖尿病发病后, 用低剂量组 (人胰岛素 (诺和灵R) 10μg+地塞米松10μg) 治疗, 将与Insulin10-18CD8 T细胞表位孵育的细胞标记CFSE, 转移到治疗后的小鼠体内, 12h后检测CTL杀伤。其中, 1代表第1组 (发病组) 小鼠的CTL检测结果; 2代表第2组 (治疗组), 即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组小鼠的CTL检测结果; 3代表Anti-CD8单抗阻断发病组小鼠CTL的结果。

图11为长期 I 型糖尿病治疗效果的胰岛细胞CTL检测结果, 即STZ诱导NOD小鼠 I 型糖尿病发病后, 用低剂量组 (人胰岛素 (诺和灵R) 10μg+地塞米松10μg) 治疗, 将胰腺细胞标记CFSE, 转移到治疗后的小鼠体内, 12h后检测CTL杀伤。其中1代表第1组 (发病组) 小鼠的CTL检测结果; 2代表第2组 (治疗组), 即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组小鼠的CTL检测结果。

图12为家兔IL-10和TGF-β量效关系, 即抗原人胰岛素 (诺和灵R) 与地塞米松不同剂量免疫家兔后, 分离脾脏细胞, 体外用人胰岛素 (诺和灵R) 重新刺激后, RT-PCR检测IL-10和TGF-β表达。其中, A为PBMC中IL-10和TGF-β的RT-PCR电泳图。具体的, 泳道1表示第1组 (100+100组), 即注射100微克人胰岛素混合100微克地塞米松组, 泳道2表示第2组 (10+10组), 即注射10微克人胰岛素混合10微克地塞米松组, 泳道3表示第3组 (10+1组), 即注射10微克人胰岛素混合1微克地塞米松组, 泳道4表示第4组 (DEX100组), 即注射100微克地塞米松组, 泳道5表示第5组 (Ins100组), 即注射10微克人胰岛素组, 泳道6表示第6组 (阴性对照组), 即注射PBS 100微升组。

B为RT-PCR检测PBMC和脾脏中IL-10和TGF- β 表达的柱形图。具体的，B1-1为PBMC分泌IL-10的RT-PCR检测结果，B1-2为PBMC分泌TGF- β 的RT-PCR检测结果，B2-1为脾细胞分泌IL-10的RT-PCR检测结果，B2-2为脾细胞分泌TGF- β 的RT-PCR检测结果。B1-1、B1-2、B2-1和B2-2中，1均代表第1组（100+100组），即注射100微克人胰岛素混合100微克地塞米松组，2均代表第2组（10+10组），即注射10微克人胰岛素混合10微克地塞米松组，3均代表第3组（10+1组），即注射10微克人胰岛素混合1微克地塞米松组，4均代表第4组（DEX100组），即注射100微克地塞米松组，5均代表第5组（Ins100组），即注射10微克人胰岛素组。

图13狗IL-10和TGF- β 量效关系，即抗原人胰岛素（诺和灵R）与地塞米松不同剂量免疫T1D狗后，在第-3，0，8，20，28天分离脾脏细胞，体外用人胰岛素（诺和灵R）重新刺激后，RT-PCR检测IL-10和TGF- β 表达。其中，A为IL-10表达的检测结果；B为TGF- β 表达的检测结果。A和B中的1，2，3，4，5均分别代表第-3，0，8，20，28天的检测结果。

图14为狗即发I型糖尿病治疗效果的Treg检测结果，即Alloxan诱导狗T1D发病后，用胰岛素+地塞米松治疗，检测治疗后狗胰腺的Treg占CD4 T细胞和占有细胞的百分比。其中，A为Treg占CD4 T细胞的百分比；B为Treg占有细胞的百分比。A和B中，1均表示发病组，2均表示100+1.5治疗组。

图15为狗T1D治疗后生存结果，即人胰岛素（诺和灵R）与地塞米松的混合药物或人胰岛素（诺和灵R）与环孢霉素的混合药物免疫T1D狗后，跟踪生存情况。其中，1为人胰岛素（诺和灵R）（0.15IU/kg体重）与地塞米松（1 μ g/kg体重）组；2为人胰岛素（诺和灵R）（0.15IU/kg体重）与环孢霉素（100 μ g/kg体重）组；3为发病模型对照组。灰色为免疫治疗期，每次3针。

图16为狗T1D治疗后血糖变化结果，即人胰岛素（诺和灵R）与地塞米松的混合药物免疫T1D狗后，跟踪血糖变化情况。其中，实线为人胰岛素（诺和灵R）（0.15IU/kg体重）与地塞米松（1 μ g/kg体重）组；虚线为发病模型对照组。灰色为免疫治疗期，每次3针。横线为高血糖判定线。

图17为狗T1D治疗后血糖变化结果，即人胰岛素（诺和灵R）与环孢霉素的混合药物免疫T1D狗后，跟踪血糖变化情况。其中，实线为人胰岛素（诺和灵R）（0.15IU/kg体重）与环孢霉素（100 μ g/kg体重）组；虚线为发病模型对照组。灰色为免疫治疗期，每次3针。横线为高血糖判定线。

图18为狗T1D治疗后体重减轻结果，即人胰岛素（诺和灵R）与地塞米松的混合药物或人胰岛素（诺和灵R）与环孢霉素的混合药物免疫T1D狗后，跟踪体重变化情况。其中，1为人胰岛素（诺和灵R）（0.15IU/kg体重）与地塞米松（1 μ g/kg体重）组；2为人胰岛素（诺和灵R）（0.15IU/kg体重）与环孢霉素（100 μ g/kg体重）组；3为发病模型对照组。灰色为免疫治疗期，每次3针。

图19为人PBMC转化DC受刺激后的CD40和IL-10表达，即分离正常人和T1D病人的外周血单核细胞（PBMC），在GM-CSF和IL-4作用下诱导CD1a⁺ DC，用胰岛素和

地塞米松刺激后，检测CD40和IL-10的表达。其中，A为CD40的表达检测结果；B为IL-10的表达检测结果。A和B中的1-1和1-2均为2份 I 型糖尿病患者血样检测结果；2-1、2-2和2-3均为3份正常人血样检测结果；1-1、1-2、2-1、2-2和2-3中的1均表示阴性对照组，2均表示终浓度为10 μ g/ml的人胰岛素（诺和灵R）组；3均表示终浓度为10 μ g/ml的地塞米松组；4均表示人胰岛素（诺和灵R）混合地塞米松（两者终浓度均为10 μ g/ml）组。

图20为药物组合物的抑制剂筛选大量样本结果，即人PBMC在胰岛素加抑制剂影响下的免疫DC细胞分子CD40，CD80，CD83和CD86的变化。其中，1表示阴性对照组；2表示终浓度为10 μ g/ml的人胰岛素（诺和灵R）组；3表示人胰岛素（诺和灵R）混合地塞米松（两者终浓度均为10 μ g/ml）组；4表示人胰岛素（诺和灵R）混合雷帕霉素（两者终浓度均为10 μ g/ml）组；5表示人胰岛素（诺和灵R）混合环孢素A（两者终浓度均为10 μ g/ml）组；6表示人胰岛素（诺和灵R）混合普乐可复（两者终浓度均为10 μ g/ml）组。每个点代表一个病人血样。

实施发明的最佳方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

药物来源和混合：本发明中，所用的 I 型糖尿病的蛋白抗原具体为人胰岛素（诺和灵 R）（丹麦诺和诺德公司 Novo Nordisk A/S），1IU 胰岛素折合重量为 45.4 微克；所用的 I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽为氨基酸序列是序列表中序列 1 的多肽，该多肽为人胰岛素中 B 链上的第 9-23 位氨基酸组成的，将其命名为 B9-23（由北京 aoke 公司合成）；所用的免疫抑制剂可为地塞米松（DEX）（国药准字 H34023626），雷帕霉素（Rap）（产品号 SR039501），普乐可复(FK506)（国药准字 H20080457），或环孢素 A(CsA)（国药准字 H10940045），均为临床用药，购自国药集团。注射前混合胰岛素和免疫抑制剂。

实施例 1、NOD 小鼠药物量效实验

一、NOD 小鼠免疫

1、免疫由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物

将 NOD 小鼠均分为 4 组，每组 3 只。在第 1，4，7 天，腹部皮下注射药物组合物：第 1 组（10+10 组）每只小鼠分别注射含 10 微克人胰岛素（诺和灵 R）混合 10 微克地塞米松的 PBS 100 微升，第 2 组（100+100 组）每只分别注射 100 微克胰岛素混合 100 微克地塞米松的 PBS 100 微升，第 3 组（500+100 组）每只分别注射含 500 微克胰岛素混合 100 微克地塞米松的 PBS 100 微升。

2、免疫由人胰岛素表位多肽 B9-23 和地塞米松组成的药物组合物

将 NOD 小鼠均分为 4 组，每组 3 只。在第 1，4，7 天，腹部皮下注射药物组合物：第 1 组（10+10 组）每只小鼠分别注射含 10 微克人胰岛素表位多肽 B9-23 混合 10 微克地塞米松的 PBS 100 微升，第 2 组（100+100 组）每只分别注射 100 微克 B9-23 混合 100 微克地塞米松的 PBS 100 微升，第 3 组（500+100 组）每只分别注射含 500

微克 B9-23 混合 100 微克地塞米松的 PBS 100 微升。

二、检测调节性 T 细胞的比例、增殖及分泌 IL-10 的情况确定药物量效关系

1、检测调节性 T 细胞的比例确定药物量效关系

上述步骤一免疫小鼠后第 8 天进行检测，利用调节 T 细胞比例，反映药物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物）注射产生的抑制效果。

具体方法如下：（1）脱臼处死小鼠，用 70%乙醇浸泡 15 分钟；（2）在提前紫外灯灭菌 20 分钟的超净工作台中，无菌条件下取出小鼠脾脏于提前加有 2ml RPMI1640 培养液的细胞培养皿中；（3）将铜网灼烧后降温放入平皿中，利用无菌注射器将脾脏磨碎，制成细胞悬浮液，并过滤到 13ml 细胞离心管内；（4）将离心管口用封口膜封好，2000rpm 离心 10 分钟；（5）弃上层培养液，加 2~3ml 红细胞裂解液，悬浮细胞，裂解 2 分钟后，加等体积 RPMI1640 培养基（或胎牛血清）中止反应，将离心管口用封口膜封好，离心 2000rpm 离心 10 分钟；（6）弃上层培养液，加 3~4ml 的 RPMI1640（含 2%胎牛血清）培养基悬浮细胞；（7）用玻璃棉 37°C 滤过细胞，保证细胞充分和玻璃棉结合以除去 B 细胞，得到淋巴细胞；（8）用血球计数板细胞计数；（9）用 PBS 洗掉培养基，并最终用 PBS 溶液 1ml 悬浮 2×10^7 个细胞；（10）将淋巴细胞染色 CD4 和 CD25：取 10^6 个细胞，参照抗体说明书用量，加入 0.2 μ l PE-anti-CD4 和 0.2 μ l APC-anti-CD25（eBioscience 12-0041，17-0251），室温避光染色 10min，清洗两次，分析 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞（简称 Treg）占 CD4⁺T 细胞的百分比。同时设置未经免疫的 NOD 小鼠作为对照组。

结果如图 1 所示，与对照组相比，第 1 组（10+10 组），即注射人胰岛素 10 μ g 混合地塞米松 10 μ g 组，Treg 明显上升至 16%，而其他组则维持在 10%-12%。

2、检测调节性 T 细胞的增殖确定药物量效关系

上述步骤一免疫小鼠后第 8 天进行检测，利用 T 细胞增殖试验，CFSE 染色，流式细胞仪检测，用来反映 Treg 细胞针对胰岛素（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物）和 B9-23（由人胰岛素表位多肽 B9-23 和地塞米松组成的药物组合物）的增殖能力。

具体方法如下：（1）-（9）同上述步骤 1 的（1）-（9）；（10）加入 3 μ M CFSE 储备液至终浓度为 1.5 μ M，室温下轻轻振荡 8 分钟；（11）加入等体积胎牛血清终止反应，将细胞放入水浴 10 分钟，2000rpm 5 分钟离心，弃上清，悬浮细胞，并用 1ml PBS 溶液洗细胞，离心弃上清，重复 3 次；（12）将每组细胞悬液分 4 份加入 96 孔培养板中（每个孔中加入 2×10^5 个细胞）。其中一份作为阳性对照加入 100 μ l Anti-CD3 抗体（AbDSerotec MCA500GA）至终浓度为 1 μ g/ml，一份作为无关抗原对照加入 OVA323-339（氨基酸序列：ISQAVHAAHAEINEAGR）作为刺激物至终浓度为 5 μ g/ml，一份作为阴性对照不加刺激物，一份加入特异抗原人胰岛素至终浓度为 10 μ g/ml，一份加入特异抗原人胰岛素表位多肽 B9-23 至终浓度为 10 μ g/ml。同时设有不加刺激物和不用 CFSE 染色的细胞对照；（13）将细胞放入细胞培养箱，37°C，5% CO₂ 培养，3 天后用流式细胞仪检测调节性 T 细胞的增殖情况。同时设置未经免

疫的 NOD 小鼠作为对照组。

结果如图 2 所示, 与对照组相比, 对于由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物, 第 1 组 (10+10 组), 即注射人胰岛素 10 μ g 混合地塞米松 10 μ g 组, Treg 增殖明显, 而其他组则不增殖; 对于由人胰岛素表位多肽 B9-23 和地塞米松组成的药物组合物, 第 1 组 (10+10 组), 即注射人胰岛素表位多肽 B9-23 10 μ g 混合地塞米松 10 μ g 组, Treg 增殖明显, 而其他组则不增殖。

3、检测调节性 T 细胞分泌 IL-10 的情况确定药物量效关系

上述步骤一免疫小鼠后第 8 天进行检测, 利用体外抗原刺激, 检测上清中 IL-10 表达, 用来反映 Treg 细胞针对胰岛素 (由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物) 和 B9-23 (由人胰岛素表位多肽 B9-23 和地塞米松组成的药物组合物) 分泌抑制型细胞因子 IL-10 的能力。

具体方法如下: (1) - (9) 同上述步骤 1 的 (1) - (9); (10) 将每组细胞悬液分 4 份加入 96 孔培养板中 (每个孔中加入 2×10^5 个细胞)。其中一份作为阳性对照加入 100 μ l Anti-CD3 抗体至终浓度为 1 μ g/ml, 一份作为无关抗原阴性对照加入 OVA323-339 作为刺激物至终浓度为 5 μ g/ml, 一份作为阴性对照不加刺激物, 一份加入特异抗原胰岛素至终浓度为 10 μ g/ml, 一份加入特异抗原胰岛素 B9-23 表位至终浓度为 10 μ g/ml。(11) 将细胞放入细胞培养箱, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养, 24 小时后, 收集上清, 将 30 μ l 上清与 30 μ l PBS (含 0.1 μ l FlexSet 微球, 为美国 BD 公司产品, 558300) 孵育 30 分钟, 再加入 30 μ l PBS (含 0.1 μ l PE 抗体, 为美国 BD 公司产品, 558300) 孵育 30 分钟, 清洗后, 检测上清中 IL-10, 流式细胞仪分析。同时设置未经免疫的 NOD 小鼠作为对照组。

结果如图 3 所示, 对于由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物, 第 1 组 (10+10 组), 即注射人胰岛素 10 μ g 混合地塞米松 10 μ g 组, IL-10 分泌明显上升; 对于由人胰岛素表位多肽 B9-23 和地塞米松组成的药物组合物, 第 1 组 (10+10 组), 即注射人胰岛素表位多肽 B9-23 10 μ g 混合地塞米松 10 μ g 组, IL-10 分泌明显上升。

综上所述, 本实施例的结果表明, 人胰岛素混合地塞米松可以增强 NOD 小鼠的 Treg 产生, 并且 Treg 针对人胰岛素和人胰岛素表位多肽 B9-23 起增殖反应和分泌抑制型细胞因子 IL-10, 且最佳剂量为人胰岛素 (或人胰岛素表位多肽 B9-23) 10 μ g 混合地塞米松 10 μ g。

实施例 2、NOD 小鼠即发 I 型糖尿病的治疗效果试验

一、NOD 小鼠的致病及免疫

在实施例 1 确定药物量效关系后, 利用 NOD 小鼠诱导 I 型糖尿病, 判定为高血糖 (>12mmol) 后, 进行腹腔注射药物组合物 (由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物)。具体操作如下:

18 只 NOD 小鼠, 连续 5 天腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) (Sigma Aldrige, S0130)

40mg/kg, 诱导 I 型糖尿病。判定为高血糖 ($>12\text{m mol}$), (首次注射 STZ 记为第 1 天, 约 10 天后, 即得到 NOD 小鼠即发 I 型糖尿病模型) 后均分为 3 组, 每组 6 只, 第 1 组 (发病组) 不进行治疗, 第 2 组 (10+10 组) 每只分别注射 10 微克人胰岛素混合 10 微克地塞米松的 PBS 100 微升作为治疗组, 第 3 组 (100+100 组) 每只分别
5 注射含 100 微克胰岛素混合 100 微克地塞米松的 PBS 100 微升作为治疗对照组。在将 NOD 小鼠判定为高血糖后的第 1, 4, 7 天各进行一次腹部皮下注射。

二、小鼠血糖变化、CTL 及调节性 T 细胞比例的检测

1、小鼠血糖变化检测

不同时间点 (以首次注射 STZ 为第 1 天计算, 第 5、7、11、17、19、24、28、
10 32、37 天)。检测各组小鼠的血糖变化, 反映药物 (由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物) 注射产生的治疗效果。

具体方法如下: (1) 准备血糖试纸和测试仪; (2) 小鼠眼眶采血 $10\mu\text{l}$ 滴于血糖试纸; (3) 读数。

结果如图 4 所示, 第 2 组 (10+10 组), 即注射人胰岛素 $10\mu\text{g}$ 混合地塞米松 $10\mu\text{g}$
15 的治疗组, 血糖明显得到控制, 稳定在 $10\text{-}12\text{mmol}$, 而治疗对照组, 即注射人胰岛素 $100\mu\text{g}$ 混合地塞米松 $100\mu\text{g}$ 的第 3 组 (100+100 组), 则在产生一定效果后血糖又继续升高, 最终和发病组一样高。

2、小鼠 CTL 检测

在以首次注射 STZ 为第 1 天计算, 第 37 天, 利用体内杀伤性 T 细胞裂解试验,
20 来反映 Treg 细胞抑制功能对自身免疫反应性 CD8 T 细胞的控制作用。

具体方法如下: (1) 事先给上述步骤一免疫后的 100+100 组小鼠注射 (以首次
注射 STZ 为第 1 天计算, 第 35, 36 天) Anti-CD8 单抗 (eBioscience, 克隆 53-6.7), 清除体内 CD8 T 细胞作为对照; (2) 将正常的 NOD 小鼠脾脏细胞分离计数, 同实施例一二步骤 1 中的 (1) - (9); (3) 等分后分别加入 $5\mu\text{M}$ 和 $20\mu\text{M}$ CFSE 室温染
25 色 8 分钟, 各自加入等体积胎牛血清终止反应并用含有血清的 PBS 溶液洗细胞, 离心弃上清, 重复 3 次; (4) 将 $20\mu\text{M}$ CFSE 细胞孵育 $50\mu\text{g/ml}$ Insulin10-18 CD8 T 细胞表位 (氨基酸序列: HLVEALYLV), 37°C , 5% CO_2 培养 30min 后清洗; (5) 将 $5\mu\text{M}$ 对照细胞 (上述步骤 (3) 中的 $5\mu\text{M}$ CFSE 室温染色的细胞) 和 $20\mu\text{M}$ 靶细胞
(上述步骤 (4) 中的 $20\mu\text{M}$ CFSE 细胞孵育 $50\mu\text{g/ml}$ Insulin10-18 CD8 T 细胞表位得
30 到的细胞) 1: 1 混合, 尾静脉注射入 (注射 Anti-CD8 单抗后的第 1 天) 上述步骤一免疫后的 NOD 小鼠体内; (6) 12 小时后处死小鼠, 分离脾脏细胞, 用流式细胞仪检测 CFSE 信号, 按照公式: $1\text{-靶细胞数}/\text{对照细胞数} \times 100\%$, 计算靶细胞相对对照细胞的杀伤比例。

结果如图 5 所示, 第 2 组 (10+10 组), 即注射人胰岛素 $10\mu\text{g}$ 混合地塞米松 $10\mu\text{g}$
35 组, 病鼠的自身免疫反应性 CD8 T 细胞所起的杀伤作用得到明显控制, 而治疗对照组, 即注射人胰岛素 $100\mu\text{g}$ 混合地塞米松 $100\mu\text{g}$ 组则仍然很高。且这种杀伤作用可以被 CD8 的抗体阻断。并且, 分析血糖水平和杀伤功能相关性后, 发现两者正相关

(如图 6 所示), 也证明治疗改善了自身免疫反应性从而控制血糖。

3、小鼠调节性 T 细胞比例的检测

上述步骤一免疫小鼠(以首次注射 STZ 为第 1 天计算, 第 37 天)进行检测, 利用调节 T 细胞比例, 反映药物(由人胰岛素(诺和灵 R)和地塞米松组成的药物组
5 合物)注射产生 Treg。

具体方法同实施例 1 步骤二 1 所述方法。同时设置未经免疫且未致病的 NOD 小鼠作为对照组。

结果如图 7 所示, 与发病组及对照组小鼠相比, 第 2 组(10+10 组), 即注射胰岛素 10 μ g 混合地塞米松 10 μ g 组, Treg 明显上升至 15%, 而其他组则维持在 8%-10%。

综上所述, 本实施例的结果表明, 人胰岛素混合地塞米松可以在 NOD 小鼠上治
10 疗 I 型糖尿病。这种治疗效果是由于药物注射后引起的 Treg 产生, 抑制了自身免疫反应性的 CD8 T 细胞对胰岛细胞的杀伤。

实施例 3、NOD 小鼠长期 I 型糖尿病的治疗效果试验

在实施例 2 证明药物组合物(由人胰岛素(诺和灵 R)和地塞米松组成的药物组
15 合物)对即发 I 型糖尿病具有治疗效果后, 对长期 I 型糖尿病的治疗效果进行治疗评价, 具体如下:

一、NOD 小鼠的致病及免疫

16 只 NOD 小鼠, 连续 5 天腹腔注射 STZ 40mg/kg, 诱导 I 型糖尿病, 发病 2 个
20 月后, 进行注射治疗。均分为 2 组, 每组 8 只, 第 1 组(发病组)不进行治疗, 第 2 组(治疗组)每只分别注射 10 微克人胰岛素混合 10 微克地塞米松的 PBS 100 微升作为治疗组。在第 1, 4, 7 天各进行一次腹部皮下注射, 为 1 个疗程, 中间间隔 2 周, 再进行一个疗程。

二、小鼠生存曲线、血糖变化及 CTL 检测

1、小鼠生存曲线的检测

25 对经上述步骤一免疫的小鼠进行生存曲线的检测, 反映治疗对病鼠的生活质量的提高。具体如下: 自上述步骤一对发病小鼠进行注射治疗时起, 定期对各组小鼠进行存活率统计, 至 100 天。

结果如图 8 所示, 第 1 组(发病组)小鼠在 60-80 天全部死亡, 而第 2 组(治疗
30 组)小鼠在 100 天仍然有约 60%的小鼠存活, 证明由人胰岛素(诺和灵 R)和地塞米松组成的药物组合物可以提高 I 型糖尿病的生存质量。

2、小鼠血糖变化的检测

不同时间点(以首次注射 STZ 前一天为第 0 天计算, 第 0、40、53、60、69、
72、73、80、85、87、90、93、97、100 天)检测各组小鼠的血糖变化, 反映药物(由
35 人胰岛素(诺和灵 R)和地塞米松组成的药物组合物)注射产生的治疗效果。

具体方法如下: (1) 准备血糖试纸和测试仪; (2) 小鼠眼眶采血 10 μ l 滴于血糖试纸; (3) 读数。

结果如图 9 所示, 第 2 组 (治疗组) 小鼠经过两个疗程治疗, 血糖明显得到控制, 稳定在 10-15mmol, 而第 1 组 (发病组) 小鼠的血糖一直较高。

3、小鼠 CTL 检测

在步骤一末次免疫小鼠后 (以首次注射 STZ 前一天为第 0 天计算, 第 60 天检测发病组, 第 100 天检测治疗组), 利用体内杀伤性 T 细胞裂解试验, 来反映 Treg 细胞抑制功能对自身免疫反应性 CD8 T 细胞的控制作用。

具体方法同实施例 2 二中步骤 2 所述方法。

另外, 还针对胰岛细胞的杀伤作用做了检测, 即正常 NOD 小鼠胰腺细胞分离计数后, 作为靶细胞检测 CTL。具体步骤为: (1) 在无菌条件下, 处死 NOD 小鼠, 做腹部切口暴露肝脏和胰腺; (2) 结扎胰腺入肠的外分泌管, 沿胆道向胰腺内注入 10ml 含有 1mg/ml Collagenase P (罗氏 Roche, Cat. No. 11213857001) 的 PBS, 分离胰腺, 37 度消化 1h; (3) 250×g 离心 1 分钟弃上清, PBS 清洗两次, 弃尽上清; (4) 将沉淀重悬于 3ml 25% 的 Ficoll 溶液中 (Roche), 在上层依次加入 23% (2ml)、20% (2ml) 和 11% (2 ml) 的 Ficoll 溶液, 800×g 离心 10 min, 取交界处胰岛层, PBS 清洗两次去除 Ficoll; (5) 将胰岛用 0.25% 胰酶 Trypsin (Sigma) 37 度消化 10 分钟, 制备单细胞 (胰岛细胞) 悬液; (6) 将步骤 (5) 所得胰岛细胞染色 20uM CFSE, 作为靶细胞, 加入 5uM CFSE 染色的效应细胞杀伤。

结果表明, 经 2 个疗程治疗后, 病鼠的自身免疫反应性 CD8 T 细胞针对 Insulin10-18 表位所起的杀伤作用得到明显控制 (第 2 组 (治疗组))。且这种杀伤作用可以被 CD8 的抗体 (Anti-CD8 单抗) 阻断 (图 10); 同样, 针对胰岛细胞的杀伤作用也被治疗控制 (图 11)。

实施例 4、家兔药物量效试验

在实施例 1-3 证明药物组合物 (由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物) 对 NOD 小鼠 I 型糖尿病具有治疗效果后, 进一步对家兔上药物的剂量和效果进行评价。

一、家兔的免疫

18 只家兔 (新西兰白兔), 在第 1, 4, 7 天, 腹部皮下注射药物组合物 (由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物) 作为一个疗程: 均分为 6 组, 每组 3 只, 第 1 组 (100+100 组) 每只分别注射含 100 微克人胰岛素混合 100 微克地塞米松的 PBS 100 微升, 第 2 组 (10+10 组) 每只分别注射 10 微克人胰岛素混合 10 微克地塞米松的 PBS 100 微升, 第 3 组 (10+1 组) 每只分别注射含 10 微克人胰岛素混合 1 微克地塞米松的 PBS 100 微升, 第 4 组 (DEX100 组) 每只分别注射含 100 微克地塞米松的 PBS 100 微升, 第 5 组 (Ins100 组) 每只分别注射 10 微克人胰岛素的 PBS 100 微升, 第 6 组 (阴性对照组) 每只分别注射 PBS 100 微升。两周后, 再次注射一个疗程 (第 21, 24, 27 天)。

二、检测抑制型细胞因子 IL-10 和 TGF-β 的分泌

在上述步骤一末次免疫后第 2 天（即第 28 天）检测家兔 PBMC 细胞和脾细胞分泌抑制型细胞因子 IL-10 和 TGF- β 的情况，反映药物组合物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物）的效果。

具体方法如下：（1）收集家兔的外周血，Ficoll 分离外周血单核细胞（PBMC），
5 在 15ml 离心管中加入 4ml Ficoll400（Sigma），在上层加入 8ml PBS 稀释后的家兔外周血，1500rpm 离心 15 分钟，取交界处的白膜层，清洗后计数培养，加入 10 μ g/ml 的人胰岛素（诺和灵 R）刺激；（2）收集家兔脾脏，研磨制备单细胞悬液，裂解红细胞，加入 2ml 红细胞裂解液（碧云天），室温裂解 2 分钟，2ml 血清终止，PBS
10 清洗后计数培养，加入 10 μ g/ml 的人胰岛素（诺和灵 R）刺激；（3）刺激 24h，分别收集步骤（1）和步骤（2）的细胞，各按 10⁷ cell/ml 加入 Trizol；（4）氯仿抽提 RNA，利用 ToyoboReverTraAce 试剂盒，按照说明书将 RNA 反转录为 cDNA；（5）设计合成兔 HPRT，IL-10，TGF- β 引物：

HPRT 上游：5'-CCATCACATTGTAGCCCTCTGT-3'

HPRT 下游：5'-CTTGCGACCTTGACCATCTTT-3'

15 IL-10 上游：5'-TATGTTGCCTGGTCTTCCTGG5-3'

IL-10 下游：5'-CTCCACTGCCTTGCTCTTGT-3'

TGF- β 上游：5'-AACAAAGAGCAGAAGGCGAATG-3'

TGF- β 下游：5'-ACAGCAAGGAGAAGCGGATG-3'

以步骤（4）所得 cDNA 为模板，以 HPRT 上游和 HPRT 下游为引物，进行 PCR
20 扩增，通过电泳将各组的 HPRT 条带亮度调整一致；（6）以步骤（4）所得 cDNA 为模板，以 IL-10 上游和 IL-10 下游为引物 PCR 扩增 IL-10；以 TGF- β 上游和 TGF- β 下游为引物 PCR 扩增 TGF- β ，用 1%琼脂糖凝胶电泳区分目的条带，EB 染色 1 分钟后拍照，用 Gelpro 软件分析细胞因子转录强度。

结果如图 12 所示，在 PBMC 和脾脏中，IL-10 和 TGF- β 转录在第 3 组（10+1 组），
25 即注射 10 微克人胰岛素混合 1 微克地塞米松组均最高或次高（脾脏中 TGF- β 转录在第 3 组（10+1 组），即注射 10 微克人胰岛素混合 1 微克地塞米松组次高）。

实施例 5、狗的药物量效试验

在实施例 4 摸索药物组合物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组
30 合物）在家兔上的量效关系后，进一步对狗的药物剂量和效果进行评价。

一、狗的免疫

9 只狗（狼犬），体重 15kg，在第-3 天用 60mg/kg 体重的 Alloxan（Sigma）诱导 T1D，跟踪血糖，在连续两天血糖值高于 12mM 后判定为 T1D 发病，记为第 0 天。
35 在第 1，4，7 天，腹部皮下注射混合药物作为一个疗程：均分为 3 组，每组 3 只，第 1 组（100+15 组）每只分别注射含 100 微克人胰岛素（0.15IU/kg 体重）混合 15 微克地塞米松（1 μ g/kg 体重）的 PBS 100 微升，第 2 组（100+1.5 组）每只分别注射 100 微克人胰岛素混合 1.5 微克地塞米松（0.1 μ g/kg 体重）的 PBS 100 微升，第 3 组（发

病组) 每只分别注射 PBS 100 微升。两周后, 再次注射一个疗程(第 21, 24, 27 天)。

二、狗抑制型细胞因子 IL-10 和 TGF- β 分泌, 以及调节性 T 细胞比例的检测

1、狗抑制型细胞因子 IL-10 和 TGF- β 分泌的检测

在第-3, 0, 8, 20 和 28 天(对应于上述步骤一的天数), 检测抑制型细胞因子
5 IL-10 和 TGF- β 的分泌, 反映药物组合物(由人胰岛素(诺和灵 R) 和地塞米松组成的
药物组合物) 的效果。

具体方法如下: (1) 收集狗的外周血, Ficoll 分离外周血单核细胞(PBMC),
在 15ml 离心管中加入 4ml Ficoll400 (Sigma), 在上层加入 8ml PBS 稀释后的狗外
周血, 1500rpm 离心 15 分钟, 取交界处的白膜层, 清洗后计数培养, 加入 10 μ g/ml
10 人胰岛素(诺和灵 R) 刺激; (2) 刺激 24h, 收集上述步骤(1) 的细胞, 按 10⁷ 个
细胞/ml 加入 Trizol; (3) 氯仿抽提 RNA, 利用 ToyoboReverTraAce 试剂盒, 按照
说明书将 RNA 反转录为 cDNA; (4) 设计合成狗 HPRT, IL-10, TGF- β 引物:

HPRT 上游: 5'-AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC-3'

HPRT 下游: 5'-TTATAGTCAAGGGCATATCC-3'

15 IL-10 上游: 5'-ATGCATGGCTCAGCACCGCT-3'

IL-10 下游: 5'-TGTTCTCCAGCACGTTTCAGA-3'

TGF- β 上游: 5'-TGGAAGTGGTGAAGCGGAAG-3'

TGF- β 下游: 5'-TTGCGGAAGTCAATGTAGAGC-3'

以步骤(3) 所得 cDNA 为模板, 以 HPRT 上游和 HPRT 下游为引物, 进行 PCR 扩
20 增, 通过电泳将各组的 HPRT 条带亮度调整一致; (5) 以步骤(3) 所得 cDNA 为
模板, 以 IL-10 上游和 IL-10 下游为引物 PCR 扩增 IL-10; 以 TGF- β 上游和 TGF- β
下游为引物 PCR 扩增 TGF- β , 用 1% 琼脂糖凝胶电泳区分目的条带, EB 染色 1 分钟
后拍照, 用 Gelpro 软件分析细胞因子转录强度。同时设置未经免疫, 且未致病的狗
对照。

25 结果如图 13 所示, 在 PBMC 中, IL-10 和 TGF- β 转录水平在治疗组(第 1 组和
第 2 组) 均有升高, 剂量依赖不明显。(图 13)。

2、狗调节性 T 细胞比例的检测

在上述步骤一末次免疫后第 2 天(即第 28 天) 检测, 利用调节 T 细胞比例, 反
映药物组合物(由人胰岛素(诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物) 注射产生
30 Treg。

上述步骤一末次免疫后第 2 天(即第 28 天) 处死动物, 收集胰腺, 制备单细胞
悬液。具体步骤为: (1) 结扎胰腺入肠的外分泌管, 沿胆道向胰腺内注入 100ml 含
有 1mg/ml Collagenase P (罗氏 Roche, Cat. No. 11213857001) 的 PBS, 分离胰腺,
37 度消化 1h; (2) 250g 离心 1 分钟, 弃上清, PBS 清洗两次, 弃尽上清; (3) 将
35 沉淀重悬于 15ml 25% 的 Ficoll 溶液中 (Roche), 在上层依次加入 23% (9ml)、20%
(6ml) 和 11% (6 ml) 的 Ficoll 溶液, 800 \times g 离心 10 min, 取交界处胰岛层, PBS
清洗两次去除 Ficoll; (4) 将胰岛用 0.25% 胰酶 Trypsin (Sigma) 37 度消化 10 分

钟，制备单细胞悬液；（5）表面染色 CD4（FITC-anti-CD4，eBioscience11-5040），胞内染色 Foxp3（PE-anti-Foxp3，eBioscience 12-5773），流式检测调节性 T 细胞（Foxp3⁺）的比例。

5 结果如图 14 所示，第 2 组（100+1.5 组）的调节性 T 细胞（Foxp3⁺）占 CD4 细胞比例有所上升，而且调节性 T 细胞（Foxp3⁺）占所有细胞比例明显上升。

实施例 6、狗 I 型糖尿病的治疗效果试验

在实施例 5 摸索药物组合物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物）在狗上的量效关系后，加入（由人胰岛素（诺和灵 R）和环孢霉素组成的药物组合物），进一步对狗 I 型糖尿病的治疗效果进行评价。

一、狗的致病及免疫

15 模型建立如实施例 5。15 只狗（狼犬），体重 15kg，在第-5 天用 60mg/kg 体重的 Alloxan（Sigma）诱导 T1D，跟踪血糖，在连续两天血糖值高于 12mM 后判定为 T1D 发病，记为第 0 天。在第 1，4，7 天，腹部皮下注射混合药物作为一个疗程：均分为 3 组，每组 5 只，第 1 组每只分别注射含 100 微克人胰岛素（0.15IU/kg 体重）混合 15 微克地塞米松（1 μ g/kg 体重）的 PBS 100 微升，第 2 组每只分别注射 100 微克人胰岛素混合 1.5 毫克环孢霉素（100 μ g/kg 体重）的 PBS 100 微升，第 3 组（发病组）每只分别注射 PBS 100 微升。一周后，再次注射一个疗程（第 21，24，27 天）。

20 二、狗生存曲线、血糖变化及体重变化

1、狗生存曲线的检测

对经上述步骤一免疫的狗进行生存曲线的检测，反映治疗对病狗的生活质量的提高。具体如下：自上述步骤一对发病狗进行注射治疗时起，对各组进行存活率统计。

25 结果如图 15 所示，第 3 组（发病组）狗在 7 天全部死亡，而第 1 组在 21 天有 2 只存活（40%），第 2 组在 21 天仍然有 3 只存活（60%），证明由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物及人胰岛素（诺和灵 R）和环孢霉素组成的药物组合物可以提高 I 型糖尿病的生存质量。

2、狗血糖变化的检测

30 跟踪检测各组狗的血糖变化，反映药物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物，及由人胰岛素（诺和灵 R）和环孢霉素组成的药物组合物）注射产生的治疗效果。

具体方法如下：（1）准备血糖试纸和测试仪；（2）狗腿静脉采血 10 μ l 滴于血糖试纸；（3）读数。

35 结果显示，第 1 组狗的血糖有所控制，但出现反跳（如图 16 中实线所示）；第 2 组狗经过两个疗程治疗，血糖明显得到控制，稳定在 10-15mmol（如图 17 中实线所示）。而第 3 组全部死亡（如图 16 和图 17 中虚线所示）。

3、狗体重变化的检测

跟踪检测各组小鼠的体重变化，反映药物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物及由人胰岛素（诺和灵 R）和环孢霉素组成的药物组合物）注射产生的对“三多一少”的控制。

5 结果如图 18 所示，第 1 组狗的体重降低有所控制，第 2 组狗经过两个疗程治疗，体重有所恢复。而第 3 组全部死亡。

实施例 7、人 PBMC 诱导 DC 的药物效果试验

在实施例 5 摸索药物组合物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物）在狗体内的量效关系后，进一步对人外周血单核细胞（PBMC）诱导树突状细胞（DC）的药物效果进行评价。

一、人血样的采集及处理

正常人血样 3 份，I 型糖尿病患者血样 2 份，10ml 每份。对正常人和 I 型糖尿病患者共 5 份血样，采用 Ficoll 分离 PBMC，在 15ml 离心管中加入 4ml Ficoll400（Sigma），在上层加入 8ml PBS 稀释后的人外周血，1500rpm 离心 15 分钟，取交界处的白膜层，清洗后，在 rhGMCSF（R&D System 公司产品）和 rhIL-4（R&D System 公司产品）刺激 3 天后诱导出树突状细胞，换培养液后进行细胞计数，将细胞均分为 4 孔，每孔 2×10^6 个细胞，其中 1 个孔不加入刺激物，作为阴性对照组，另外 3 个孔依次分别加入 1) 抗原人胰岛素（诺和灵 R）至其终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ ；2) 地塞米松至其终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ ；3) 人胰岛素（诺和灵 R）混合地塞米松，两者终浓度均为 $10 \mu\text{g/ml}$ 。

二、树突状细胞相关标记分子，及抑制型细胞因子 IL-10 分泌的检测

1、树突状细胞的 CD40，CD80，CD83，CD86，MHCII 的检测

在上述步骤一刺激的第 3 天，检测树突状细胞的 CD40，CD80，CD83，CD86，MHCII，反映药物组合物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物）对 DC 成熟的抑制效果。

25 具体方法如下：（1）收集细胞，表面双染 CD1a-FITC（eBioscience, 11-0019）和 CD40-PE（eBioscience, 12-0409），CD1a-FITC（eBioscience, 11-0019）和 CD80-PE（eBioscience, 12-0809），CD1a-FITC（eBioscience, 11-0019）和 CD83-PE（Biolegend, 305322），CD1a-FITC（eBioscience, 11-0019）和 CD86-PE（eBioscience, 12-0869），或 CD1a-FITC（eBioscience, 11-0019）和 MHC-II-PE；按照 $0.25 \mu\text{l}$ 每 10^6 个细胞的比例加入上述抗体；（2）染色室温避光 10 分钟，清洗细胞，流式检测。

30 结果如图 19 中 A 所示，无论正常人还是 I 型糖尿病患者，在 PBMC 诱导 DC 中，CD40 都在混合药物作用下降低，指示 DC 在混合药物作用下较少成熟，减少了对自主免疫的协助。

2、抑制型细胞因子 IL-10 分泌的检测

35 在上述步骤一刺激的第 3 天，检测抑制型细胞因子 IL-10 的分泌，反映药物组合物（由人胰岛素（诺和灵 R）和地塞米松组成的药物组合物）的抑制效果。

具体方法如下：（1）收集培养上清，用 FlexSet 检测 IL-10 的表达量，将 $30 \mu\text{l}$

上清与 30 μ l PBS (含 0.1 μ l FlexSet 微球) 孵育 30 分钟, 再加入 30 μ l PBS (含 0.1 μ l PE 抗体) 孵育 30 分钟, 清洗后; (2) 流式检测。

结果如图 19 中 B 所示, 药物组合物 (由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物) 对 IL-10 有明显的增强作用, 指示在体外具有抑制自主免疫的效果。

5

实施例 8、人 PBMC 诱导 DC 的免疫抑制剂筛选试验

在实施例 6 摸索药物组合物 (由人胰岛素 (诺和灵 R) 和地塞米松组成的药物组合物) 在人 PBMC 诱导 DC 的抑制效果后, 进一步对免疫抑制剂筛选以提高药物效果。

10 本实施例所涉及的免疫抑制剂为地塞米松 (DEX), 雷帕霉素 (Rap), 环孢素 A (CsA) 和他克莫司 (普乐可复, FK506)。

15 试验材料: I 型糖尿病患者血样 25 份, 10ml 每份。Ficoll 分离 PBMC, 在 15ml 离心管中加入 4ml Ficoll400 (Sigma), 在上层加入 8ml PBS 稀释后的人外周血, 1500rpm 离心 15 分钟, 取交界处的白膜层, 清洗后, 在 rhGMCSF 和 rhIL-4 刺激 3 天后诱导出树突状细胞, 换培养液后进行细胞计数, 将细胞均分为 6 孔, 每孔 2×10^6 个细胞, 其中 1 个孔不加入刺激物, 作为阴性对照组, 另外 5 个孔依次分别加入 1) 抗原人胰岛素 (诺和灵 R) 至其终浓度为 10 μ g/ml; 2) 人胰岛素 (诺和灵 R) 混合地塞米松, 两者终浓度均为 10 μ g/ml; 3) 人胰岛素 (诺和灵 R) 混合雷帕霉素, 两者终浓度均为 10 μ g/ml; 4) 人胰岛素 (诺和灵 R) 混合环孢素 A, 两者终浓度均为 10 μ g/ml; 20 5) 人胰岛素 (诺和灵 R) 混合普乐可复, 两者终浓度均为 10 μ g/ml。

二、树突状细胞相关标记分子, 及抑制型细胞因子 IL-10 分泌的检测

1、树突状细胞的 CD40, CD80, CD83, CD86, MHCII 的检测

在上述步骤一刺激的第三天, 检测树突状细胞的 CD40, CD80, CD83, CD86, MHCII, 反映上述各药物组合物对 DC 成熟的抑制效果。

25 具体方法如下: (1) 收集细胞, 表面双染 CD1a-FITC 和 CD40-PE, CD1a 和 CD80-PE, CD1a-FITC 和 CD83-PE, CD1a-FITC 和 CD86-PE, 或 CD1a-FITC 和 MHC-II-PE; 按照 0.25 μ l 每 10^6 细胞的比例加入上述抗体; (2) 染色室温避光 10 分钟, 清洗细胞, 流式检测。

30 结果显示, 在 PBMC 诱导 DC 中, CD40, CD80, CD83 和 CD86 都在混合药物作用下有所降低。且地塞米松和环孢素 A 的抑制效果较明显。(图 20)

工业应用

35 本发明所提供的治疗和/或预防 I 型糖尿病的药物组合物能够提高免疫动物 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例; 促进 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞增殖; 促进 T 细胞分泌 IL-10; 控制 I 型糖尿病患者的血糖水平; 抑制自身免疫反应性 CD8 T 细胞所起的杀伤作用; 提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中 IL-10 和/或 TGF- β 的转录水平; 抑制 DC 细胞的成熟; 从而诱导免疫抑制的产生, 进而达到有效地治疗 I 型糖尿病的目的。

权利要求

1、组合物，其活性成分为如下 1) 或 2) 或 3)：

- 5 1) I 型糖尿病的蛋白抗原和免疫抑制剂的混合物；
 2) 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽和所述免疫抑制剂的混合物；
 3) 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原、所述 I 型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽和所
述免疫抑制剂的混合物；

 所述 I 型糖尿病的蛋白抗原为胰岛素、谷氨酸脱羧酶和胰岛淀粉样多肽中的至少一种；所述免疫抑制剂为地塞米松，环孢素 A，他克莫司，骁悉，硫唑嘌呤，强的松，早基强的松龙，抗 CD4 单克隆抗体和抗 CD3 单克隆抗体中的至少一种。

10 2、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于：所述表位多肽为单一抗原表位的多肽或多个抗原表位组合而成的多肽。

 3、根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于：所述胰岛素为人胰岛素、狗胰岛素，或猫胰岛素；所述谷氨酸脱羧酶为人谷氨酸脱羧酶、狗谷氨酸脱羧酶，或猫谷氨酸脱羧酶；所述胰岛淀粉样多肽为人胰岛淀粉样多肽、狗胰岛淀粉样多肽，
15 或猫胰岛淀粉样多肽；所述表位多肽来源于人、狗、猫或化学合成。

 4、根据权利要求 3 所述的组合物，其特征在于：所述人胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 1 或序列 2 或序列 3 或序列 12 或序列 13 所示；所述狗胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 4 或序列 5 或序列 12 或
20 序列 13 所示；所述猫胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 6 或序列 7 或序列 12 或序列 13 所示。

 5、根据权利要求 3 所述的组合物，其特征在于：所述人谷氨酸脱羧酶的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 8 所示。

 6、根据权利要求 3 所述的组合物，其特征在于：所述人胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 9 所示；所述狗胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 10 所示；所述猫胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列 11 所示。

 7、根据权利要求 1-6 中任一所述的组合物，其特征在于：1) 中所述 I 型糖尿病的蛋白抗原与所述免疫抑制剂使用的质量配比为 1：20 到 20：1；2) 中所述表位多肽与
30 所述免疫抑制剂使用的质量配比为 1：1。

 8、根据权利要求 1-6 中任一所述的组合物，其特征在于：所述组合物具有如下功能中的至少一种：

- 1) 治疗和/或预防 I 型糖尿病；
 2) 提高 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞增殖水平；
35 3) 提高 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞与 CD4⁺T 细胞的比例；
 4) 提高 T 细胞对 IL-10 的分泌水平；
 5) 抑制自身免疫反应性 CD8 T 细胞的杀伤作用

- 6) 控制 I 型糖尿病患者血糖水平;
 - 7) 提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中 IL-10 和/或 TGF- β 的转录水平;
 - 8) 抑制 DC 细胞成熟。
- 9、根据权利要求 7 所述的组合物，其特征在于：所述组合物具有如下功能中
- 5 的至少一种：
- 1) 治疗和/或预防 I 型糖尿病;
 - 2) 提高 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞增殖水平;
 - 3) 提高 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞与 CD4⁺T 细胞的比例;
 - 4) 提高 T 细胞对 IL-10 的分泌水平;
- 10 5) 抑制自身免疫反应性 CD8 T 细胞的杀伤作用
- 6) 控制 I 型糖尿病患者血糖水平;
 - 7) 提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中 IL-10 和/或 TGF- β 的转录水平;
 - 8) 抑制 DC 细胞成熟。
- 10、权利要求 1-9 中任一所述的组合物在制备治疗和/或预防 I 型糖尿病的产品
- 15 中的应用。
- 11、权利要求 1-9 中任一所述的组合物在制备具有如下 a) -h) 中至少一种功能的产品中的应用：
- a) 提高 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例;
 - b) 提高 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞增殖水平;
- 20 c) 提高 T 细胞对 IL-10 的分泌水平;
- d) 控制 I 型糖尿病患者的血糖水平;
 - e) 抑制自身免疫反应性 CD8 T 细胞所起的杀伤作用;
 - f) 提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中 IL-10 和/或 TGF- β 的转录水平;
 - g) 抑制 DC 细胞成熟;
- 25 h) 降低 DC 细胞分泌 CD40、CD80、CD83 和 CD86 中的至少一种。

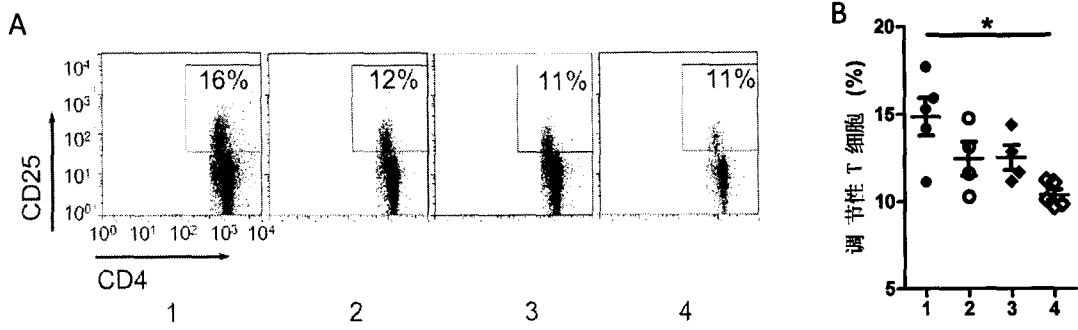


图 1

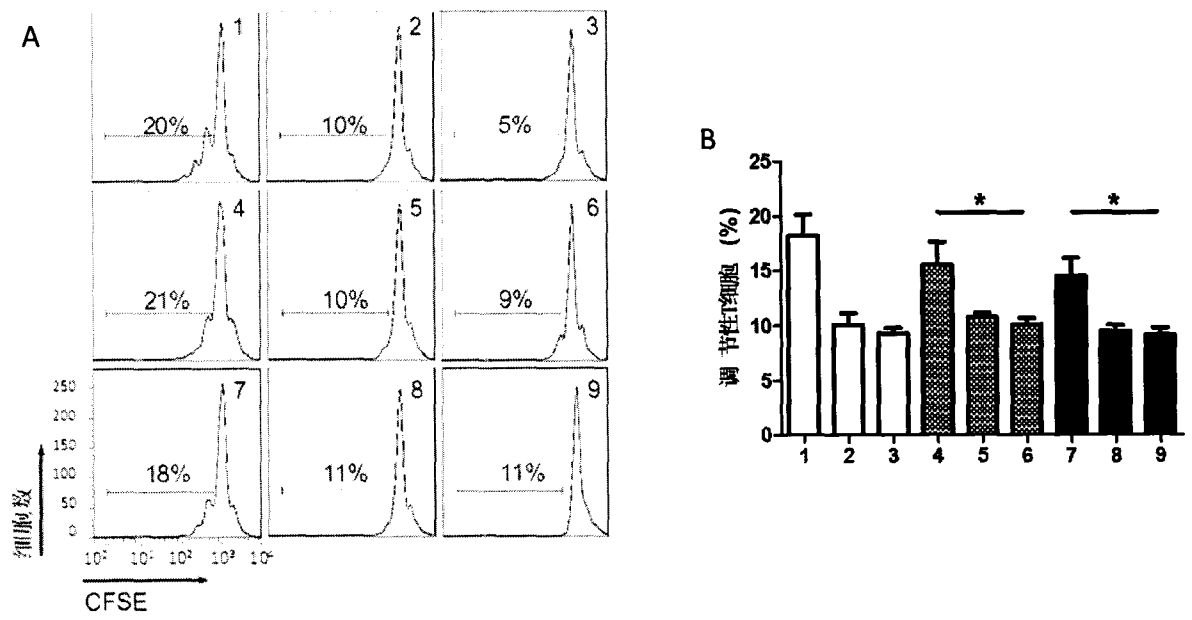


图 2

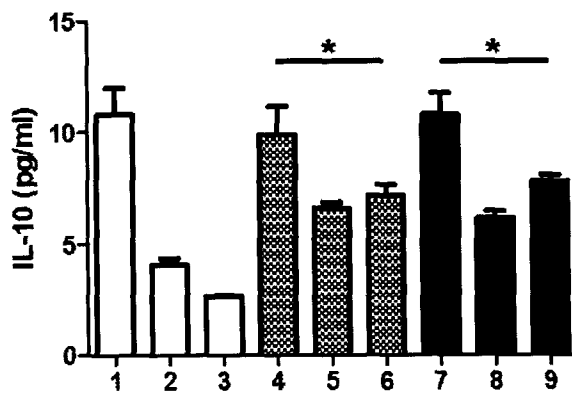


图 3

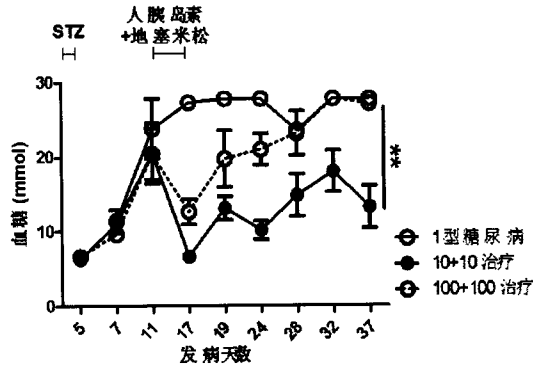


图 4

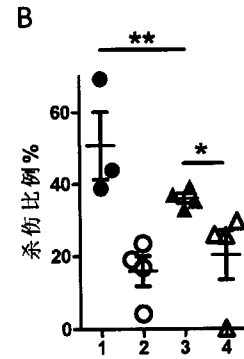
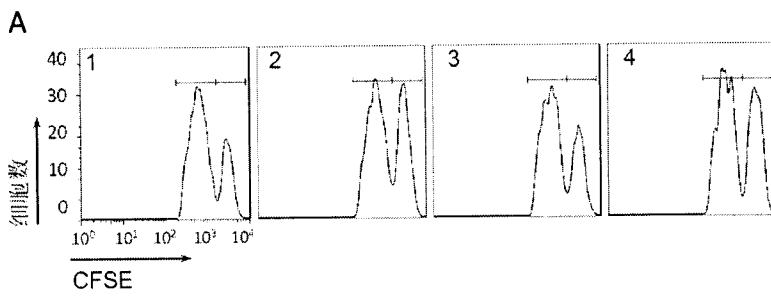


图 5

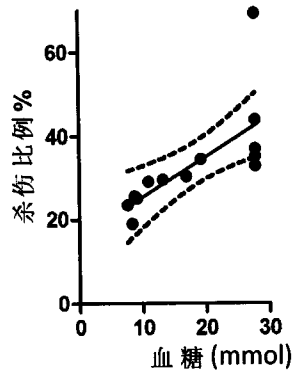


图 6

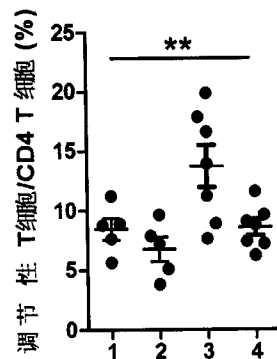


图 7

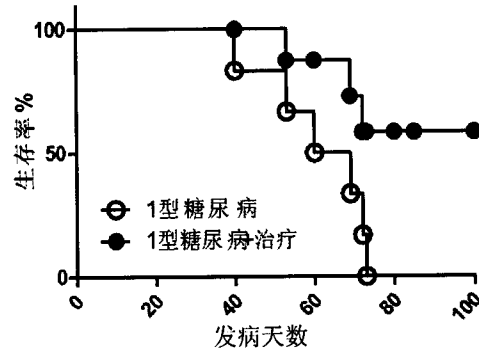


图 8

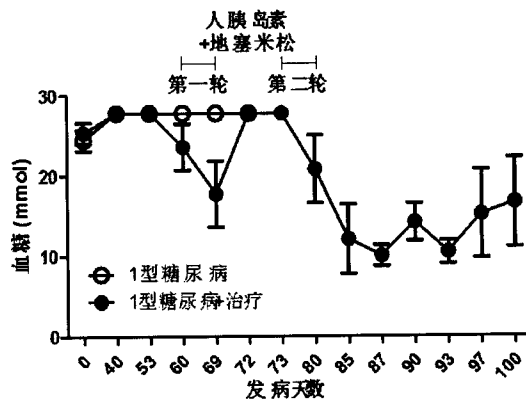


图 9

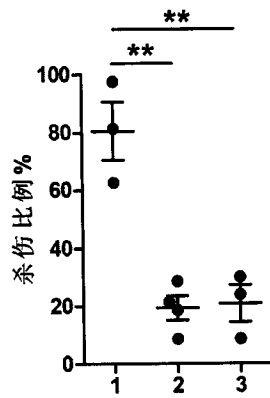


图 10

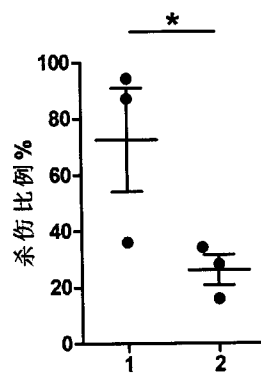
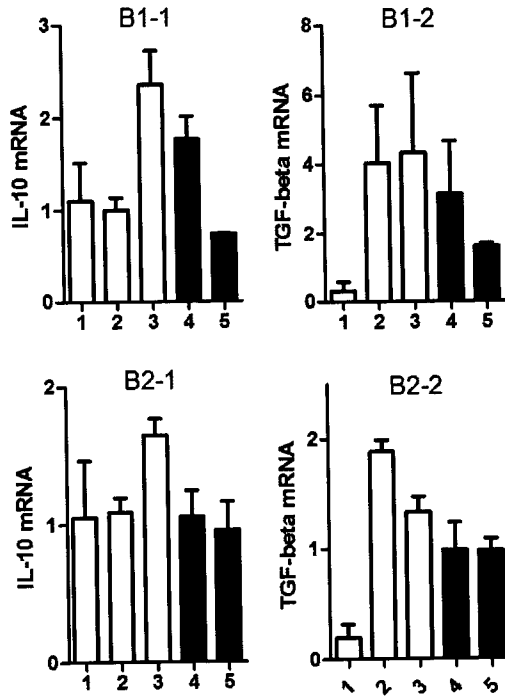
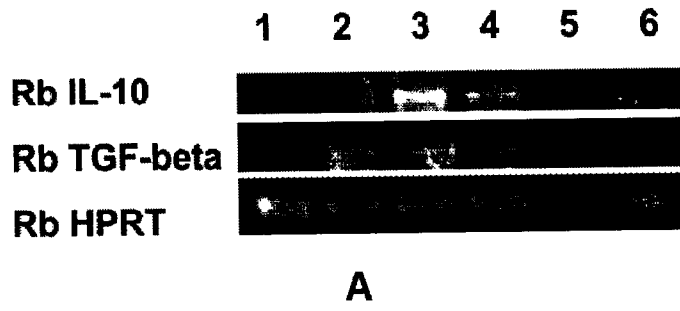


图 11



B

图 12

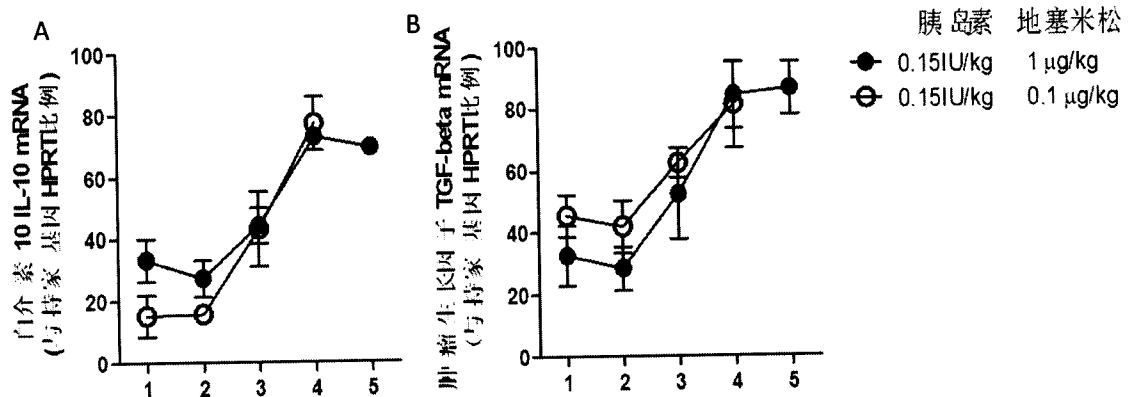


图 13

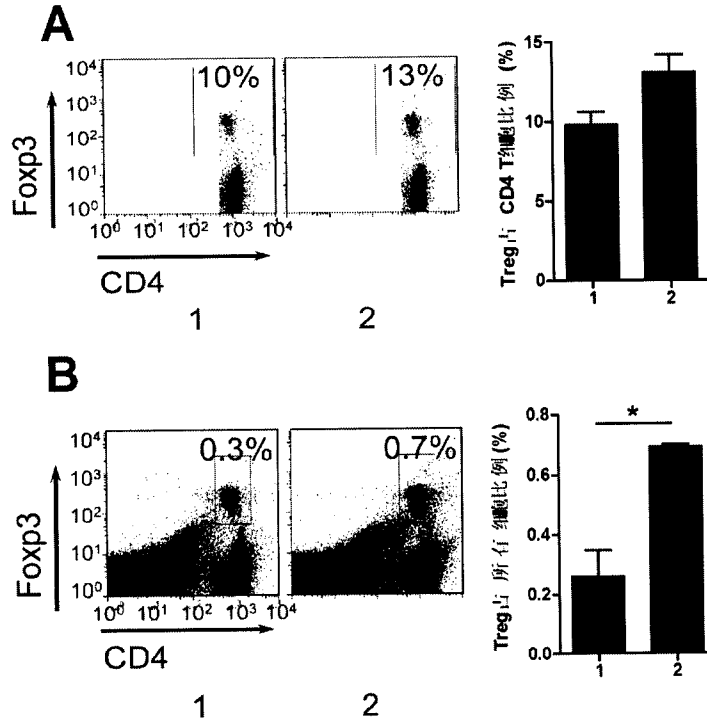


图 14

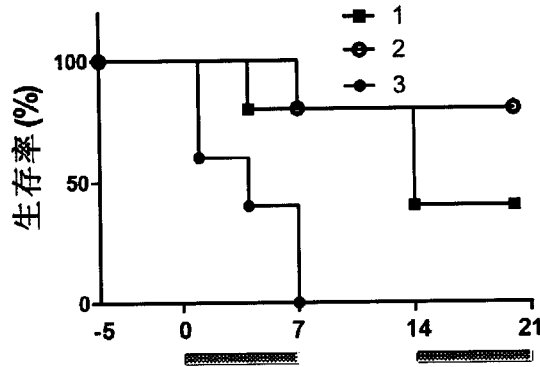


图 15

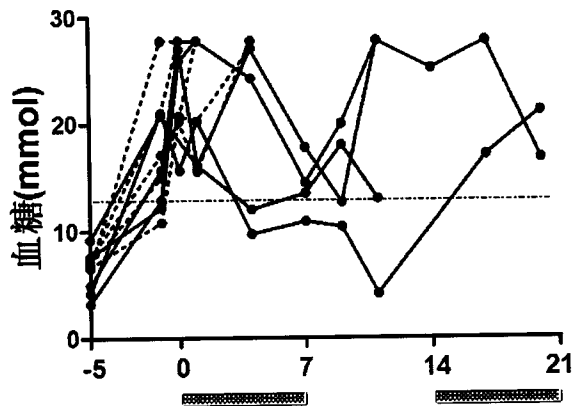


图 16

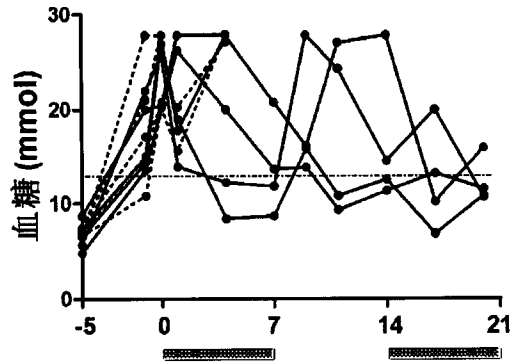


图 17

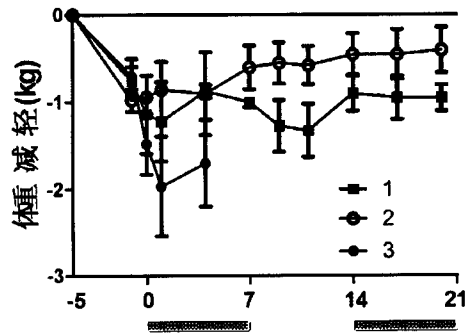


图 18

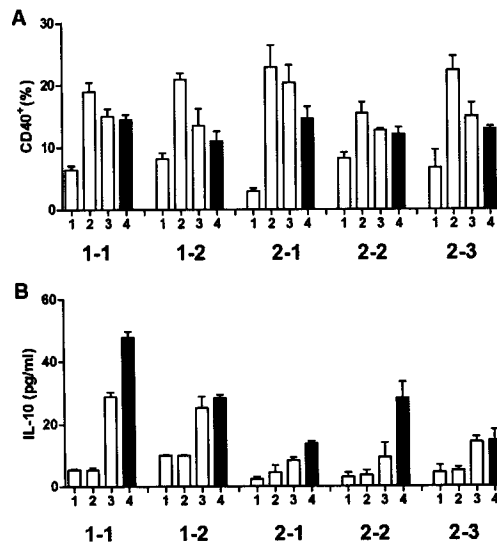


图 19

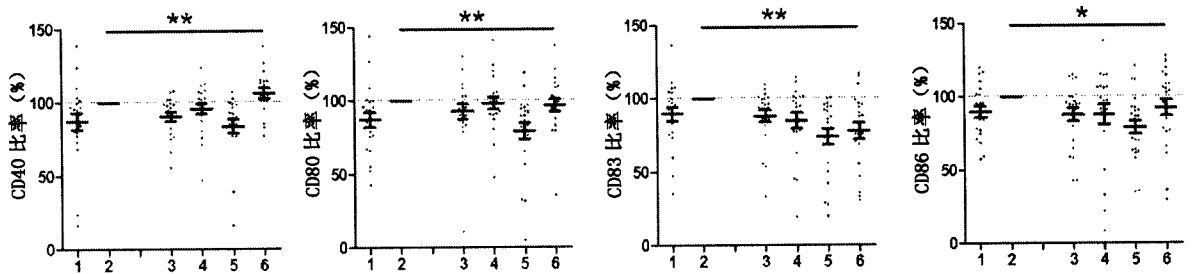


图 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/000429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNKI, ISI Web of Knowledge, Google Scholar, Genbank: CellCept, type I diabetes, insulin dependent diabetes, insulin, glutamate decarboxylase, GAD, islet amyloid polypeptide, IAPP, dexamethasone, cyclosporine A, tacrolimus, FK506, mycophenolate mofetil, azathioprine, prednisone, prednisolone, CD4 antibody, CD3 antibody; sequence search based on sequences 1-13

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATTHEWS, J.B. et al, Developing combination immunotherapies for type 1 diabetes: recommendations from the ITN-JDRF type 1 diabetes combination therapy assessment group, CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, May 2010, vol. 160, no. 2, pages 176-184	1-3, 7-11
X	BRESSON, D. et al., Genetic-induced variations in the GAD65 T-cell repertoire governs efficacy of anti-CD3/GAD65 combination therapy in new-onset type 1 diabetes, MOLECULAR THERAPY, February 2010, vol. 18, no. 2, pages 307-316	1-3, 5, 7-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 08 July 2013 (08.07.2013)	Date of mailing of the international search report 25 July 2013 (25.07.2013)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer TIAN, Tian Telephone No.: (86-10) 62412276

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/000429**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRESSION, D. et al., Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs, THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, May 2006, vol. 116, no. 5, pages 1371-1381	1-4, 7-11
A	ZHANG, Xin; Research Progress on Islet Amyloid Polypeptide, CHINESE BULLETIN OF LIFE SCIENCE, June 2010, vol. 22, no. 6, pages 567-574	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/000429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/28 (2006.01) i

A61K 38/16 (2006.01) i

A61K 31/573 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

A61K 31/52 (2006.01) i

A61K 38/13 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) i

A61P 37/02 (2006.01) i

A. 主题的分类		
见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNKI, ISI Web of Knowledge, Google Scholar, Genbank: I 型糖尿病、胰岛素依赖型糖尿病、胰岛素、谷氨酸脱羧酶、胰岛淀粉样多肽、地塞米松、环孢素 A、他克莫司、骁悉、硫唑嘌呤、强的松、早基强的松龙、CD4 抗体、CD3 抗体; type I diabetes、insulin dependent diabetes、insulin、glutamate decarboxylase、GAD、islet amyloid polypeptide、IAPP、dexamethasone、cyclosporine A、tacrolimus、FK506、mycophenolate mofetil、azathioprine、prednisone、prednisolone、CD4 antibody、CD3 antibody; 基于序列 1-13 的序列检索。		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Matthews J.B.等, Developing combination immunotherapies for type 1 diabetes: recommendations from the ITN-JDRF type 1 diabetes combination therapy assessment group, Clinical and Experimental Immunology, 5 月 2010, 第 160 卷, 第 2 期, 第 176-184 页。	1-3、7-11
X	Bresson D.等, Genetic-induced variations in the GAD65 T-cell repertoire governs efficacy of anti-CD3/GAD65 combination therapy in new-onset type 1 diabetes, Molecular Therapy, 2 月 2010, 第 18 卷, 第 2 期, 第 307-316 页。	1-3、5、7-11
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 08.7 月 2013 (08.07.2013)		国际检索报告邮寄日期 25.7 月 2013 (25.07.2013)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 田甜 电话号码: (86-10) 62412276

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Bresson D.等, Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs, The Journal of Clinical Investigation, 5月2006, 第116卷, 第5期, 第1371-1381页。	1-4、7-11
A	张鑫, 胰岛淀粉样多肽的研究进展, 生命科学, 6月2010, 第22卷, 第6期, 第567-574页。	6

A. 主题的分类

A61K 38/28 (2006.01) i

A61K 38/16 (2006.01) i

A61K 31/573 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

A61K 31/52 (2006.01) i

A61K 38/13 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) i

A61P 37/02 (2006.01) i