



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114375329 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 19

(21) 申请号 202080064037.4

(22) 申请日 2020.07.13

(30) 优先权数据

62/873,439 2019.07.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/041769 2020.07.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/011448 EN 2021.01.21

(71) 申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 迈克尔·利姆

克里斯托弗·杰克逊

拉斐尔·J·塔玛尔戈 约翰·崔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李敏春 郑霞

(51) Int.Cl.

C12N 5/0786 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

序列表2页 附图26页

(54) 发明名称

用于治疗脑血管痉挛的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及炎症领域。更具体地,本发明提供用于治疗脑部炎症及其相关后遗症包括脑血管痉挛的组合物和方法。在一种实施方案中,治疗患者脑血管痉挛的方法包括向患者施用PD-1激动剂的步骤,其中从患者获得的血液样品包含相对于对照升高的单核细胞上的PD-1表达。

1. 一种方法,包括:
 - a. 测量从患者获得的血液样品中单核细胞上的程序性死亡-1 (PD-1) 表达;和
 - b. 如果PD-1表达相对于对照增加,则用PD-1激动剂治疗所述患者。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中使用流式细胞术测量单核细胞上的PD-1表达。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PD-1激动剂是可溶性PD-L1或其类似物。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中可溶性PD-L1或其类似物是PD-L1融合蛋白。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述PD-L1融合蛋白包括GX-P2。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PD-1激动剂是抗体或其抗原结合片段。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段包括CC-90006。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者患有与表达PD-1的炎性单核细胞相关的状况。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者患有动脉瘤性蛛网膜下腔出血。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者患有脑血管痉挛。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者患有脑损伤。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者患有出血性中风或缺血性中风。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述患者患有或怀疑患有单核细胞介导的炎症。
14. 一种方法,包括向相对于对照具有增加的单核细胞上的PD-1表达的患者施用PD-1激动剂。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述PD-1激动剂是可溶性PD-L1或其类似物。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中可溶性PD-L1或其类似物是PD-L1融合蛋白。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述PD-L1融合蛋白包括GX-P2。
18. 根据权利要求13所述的方法,其中所述PD-1激动剂是抗体或其抗原结合片段。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段包括CC-90006。
20. 根据权利要求13所述的方法,其中所述患者患有与表达PD-1的炎性单核细胞相关的状况。
21. 根据权利要求13所述的方法,其中所述患者患有动脉瘤性蛛网膜下腔出血。
22. 根据权利要求13所述的方法,其中,所述患者患有脑血管痉挛。
23. 根据权利要求13所述的方法,其中所述患者患有脑损伤。
24. 根据权利要求13所述的方法,其中所述患者患有出血性中风或缺血性中风。
25. 根据权利要求13所述的方法,其中所述患者患有或怀疑患有单核细胞-脑部炎症。
26. 一种用于治疗患者的脑血管痉挛的方法,包括向所述患者施用PD-1激动剂的步骤,其中从所述患者获得的血液样品包含相对于对照升高的单核细胞上的PD-1表达。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述患者患有脑损伤。
28. 根据权利要求26所述的方法,其中所述患者患有中风。
29. 根据权利要求26所述的方法,其中所述患者患有心肌梗塞。
30. 一种用于治疗患者的脑血管痉挛的方法,包括以下步骤:
 - a. 测量从患者获得的血液样品中单核细胞上的程序性死亡-1 (PD-1) 表达;和
 - b. 如果PD-1表达相对于对照增加,则用PD-1激动剂治疗所述患者。
31. PD-1激动剂在制造用于治疗脑血管痉挛、动脉瘤性蛛网膜下腔出血、脑损伤、中风

或心肌梗塞的药物中的用途。

32.PD-1激动剂在制造用于治疗与表达PD-1的炎性单核细胞相关的状况的药物中的用途。

用于治疗脑血管痉挛的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年7月12日提交的美国临时申请第62/873,439号的权益,该申请通过引用被整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及炎症领域。更具体地,本发明提供用于治疗脑部炎症及其相关后遗症包括脑血管痉挛的组合物和方法。

[0004] 通过引用并入以电子形式提交的材料

[0005] 本申请包含序列表。该序列表已作为名称为“P15683-02_ST25.txt”的ASCII文本文件经EFS-Web以电子形式提交。该序列表大小为2,886字节,且创建于2020年7月8日。该序列表在此通过引用以其整体并入。

[0006] 发明背景

[0007] 动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aSAH)在美国具有每年约30,000名患者的发生率。脑血管痉挛发生在动脉瘤破裂后3-20天,是大约30%的aSAH患者发病率和死亡率的重要来源。脑血管痉挛的治疗目前由预防性尼莫地平和支持性护理组成,其中对于导致急性缺血的难治性血管痉挛患者保留选择性动脉内化学和/或机械解痉。异常炎症已被牵涉在脑血管痉挛中,但其确切机制知之甚少,并且目前没有用于血管痉挛预防或治疗的免疫调节剂。

[0008] 附图简述

[0009] 图1A-图1F.脑血管痉挛与脑中PD-1+髓细胞(myeloid cells)的频率增加有关。图1A:ICA穿孔(ICAp)和小脑延髓池(cisterna magna,CM)注射技术。图1B:ICAp产生弥漫性SAH。图1C-图1D:CM注射导致同侧末端ICA的口径变化最小,而ICAp导致严重的血管痉挛($p=0.0002$)。图1E:对髓细胞(CD3⁻、CD45⁺、CD11b⁺)、CD4淋巴细胞(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁻)、CD8淋巴细胞(CD3⁺、CD4⁻、CD8⁺)、粒细胞(CD45⁺、CD11b⁺、Ly6g⁺)和NK细胞(CD45⁺、CD3⁻、Cd49b⁺)的流式细胞术分析显示,与CM相比,ICAp中髓细胞上的PD-1表达增加($p=0.037$)。图1F:在ICAp前一小时施用IP普萘洛尔(5mg/kg)降低24小时时PD-1+髓细胞的频率($p=0.0009$)。使用双尾T检验分析数据。误差线代表 $\pm$ SEM。

[0010] 图2A-图2B:SAH后在骨髓和外周血中可检测到PD-1+单核细胞。图2A:代表性流式细胞术图,显示ICAp后6小时、24小时和48小时脑浸润性巨噬细胞、小胶质细胞、外周血单核细胞和骨髓单核细胞上的PD-1表达。图2B:ICAp后,高CD45脑巨噬细胞($p=0.001$)以及血液中的单核细胞($p=0.0063$)和骨髓中的单核细胞($p=0.0059$)上的PD-1表达增加,但在CD45-dim小胶质细胞上没有。使用双尾T检验分析数据。误差线代表 $\pm$ SEM。

[0011] 图3A-图3E:aSAH患者外周血中的PD-1+单核细胞频率与次日脑血流速度的变化相关。图3A:动脉瘤破裂后第1-8天患者5的代表性流式细胞术图。在CD14与CD16图中,红点代表PD-1+细胞。图3B:随着时间推移的最大TCD速度和%PD-1+单核细胞。图3C:%PD-1+单核细胞变化与次日最大TCD速度变化的线性回归分析,不包括来自患者1的第3天时间点的异常值(比SD高>4倍)。相关系数(r)=0.486(95%CI 0.171-0.71), $p=0.0037$ 。图3D:PD-1+单

核细胞变化%与次日最大TCD速度的变化%配对的热图。图3E:PD-1+单核细胞>5%与<5%的次日最大TCD值的小提琴图($p=0.0012$)。

[0012] 图4A-图4G:施用PD-L1通过抑制活化的单核细胞迁移到CNS来防止脑血管痉挛。图4A:ICA末端段的代表性H&E切片。图4B:在ICA_p后1小时IP注射PD-L1 (50 μ g)防止了48小时时的血管痉挛($p<0.0001$),而在ICA_p前1小时施用200 μ g PD-1阻断抗体消除了PD-L1对血管痉挛的影响($p<0.0001$,同侧; $p=0.0002$,对侧)。图4C-图4D:施用PD-L1增加了48小时时血液中PD-1+、Ly6c+、CCR2+单核细胞的频率。图4E-图4F:用PD-L1治疗的SAH小鼠在48小时时在血液中具有更高的VLA-4+单核细胞的频率($p=0.032$)。图4G:在ICA_p后的24和48小时,使用PD-L1治疗的小鼠脑中PD-1+、Ly6c+、CCR2+、CD45-高巨噬细胞的频率较低。使用双尾T检验分析数据。误差线代表 $\pm$ SEM。

[0013] 图5:颈内动脉末端段的组织学定位。

[0014] 图6A-图6B。图6A:代表性直方图,显示CM和ICA_p模型中髓细胞、CD4 T细胞、CD8 T细胞、粒细胞和NK细胞上的PD-1表达。图6B:小鼠髓细胞门控策略。

[0015] 图7:在ICA_p后48小时,未经治疗的SAH小鼠和用普萘洛尔治疗的SAH小鼠中的Garcia中风量表。

[0016] 图8:基于荧光减一(FMO)样品为每位患者设置PD-1门的代表性人类髓细胞门控策略。

[0017] 图9:动脉瘤破裂后第3-8天患者1的代表性流式细胞术图。在CD14与CD16图中,红点代表PD-1+细胞。

[0018] 图10:单核细胞PD-1+%的变化与次日最大TCD速度的变化,包括患者1、第3天的数据点。相关系数(r)=0.326 (95%CI-0.14-0.598, $p=0.0597$)。

[0019] 图11:陈述头痛3天并且精神状态改变的57岁女性被发现具有颅内动脉瘤破裂导致的蛛网膜下腔出血。使用以下方案每天分析外周血的单核细胞上的PD-1表达。在血管痉挛前一天观察到PD-1+单核细胞的急升,如通过经颅多普勒超声和血管成像确定的。在血管痉挛期间,PD-1水平保持轻度升高,并在血管痉挛消退时回到与健康受试者没有差异的水平。

[0020] 图12:心肌梗塞后CD14+、CD16-单核细胞的峰值预测了心肌补救。在MI中观察到最初优势的CD14+、CD16-经典单核细胞,随后CD16+单核细胞增加的模式与本发明人在蛛网膜下腔出血中的数据一致。此外,本发明人已发现这些细胞表达PD-1,其代表用于使该病理细胞群体失活的新治疗靶标。上述数据来自Tsujioka等人。

[0021] 发明详述

[0022] 应当理解,本发明不限于本文描述的特定方法和组件等,因为这些可以变化。还应当理解的是,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案而非旨在限制本发明的范围。必须注意,如本文以及在所附的权利要求中使用的,除非上下文另有清楚的指示,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代对象。因此,例如,对“蛋白质”的提及是对一种或更多种蛋白质的提及,并且包括本领域技术人员已知的其等同物等等。

[0023] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域内的普通技术人员通常理解的相同含义。描述了具体的方法、装置和材料,尽管与本文描述的那些相似或等效的任何方法和材料都可以用于本发明的实践或测试。

[0024] 本文引用的所有出版物均通过引用并入本文,包括所有期刊文章、书籍、手册、已公布的专利申请和已授权的专利。此外,提供了在说明书、实施例和所附权利要求中使用的某些术语和短语的含义。这些定义在本质上并不意味着限制而是用于提供对本发明的某些方面更清晰的理解。

[0025] 本发明至少部分地基于发现PD-1激动剂可用于治疗脑部炎症及其相关后遗症,包括脑血管痉挛。如本文所述,本发明人的数据表明,全身施用程序性死亡配体1 (PD-L1) 通过抑制表达PD-1的髓细胞消除了蛛网膜下腔出血小鼠模型中的脑血管痉挛。该途径以前未在脑血管痉挛中描述过,并且代表了一种新的干预靶标。

[0026] 通过对蛛网膜下腔出血和血管痉挛的研究,本发明人发现PD-1/PD-L1途径是一种新型炎性单核细胞介质,不仅可用于阻止血管痉挛的炎症,还可用于阻止由这些细胞引起的任何疾病。在特定实施方案中,已知或发现由PD-1+、CD14+、CD6+单核细胞介导的任何疾病包括但不限于心肌梗塞、中风、肾病、炎性肠病和类风湿性关节炎。

[0027] 因此,一方面,本发明提供了用于检测PD-1表达的组合物和方法。在某些实施方案中,测量从患者获得的血液样品中单核细胞上的PD-1表达。可以使用任何可用的技术(包括但不限于流式细胞术)测量单核细胞上的PD-1表达。

[0028] 在其他实施方案中,方法包括将PD-1激动剂施用于相对于对照而言单核细胞上的PD-1表达增加的患者的步骤。在某些实施方案中,PD-1激动剂是可溶性PD-L1或其类似物。在具体实施方案中,可溶性PD-L1或其类似物是PD-L1融合蛋白。在更具体的实施方案中,PD-L1融合蛋白包括GX-P2。在可选的实施方案中,PD-1激动剂是抗体或其抗原结合片段。在更具体的实施方案中,抗体或其抗原结合片段包括CC-90006。

[0029] 本发明可用于识别和/或监测患有或怀疑患有与表达PD-1的炎性单核细胞相关的状况的患者。在一种实施方案中,患者患有动脉瘤性蛛网膜下腔出血。可选地,患者患有脑血管痉挛。在另一种实施方案中,患者患有脑损伤。在某些实施方案中,患者患有出血性或缺血性中风。在另一种实施方案中,患者患有或怀疑患有致病性单核细胞介导的炎症。在这样的实施方案中,患者患有非中枢神经系统状况或疾病。在另一种具体实施方案中,患者患有或怀疑患有单核细胞介导的脑部炎症。

[0030] 在另一种实施方案中,本发明提供了一种用于治疗患者脑血管痉挛的方法,包括向患者施用PD-1激动剂的步骤,其中从患者获得的血液样品相对于对照包含单核细胞上PD-1表达的升高。在另一种实施方案中,用于治疗患者脑血管痉挛的方法包括以下步骤:(a) 测量从患者获得的血液样品中单核细胞上的程序性死亡-1 (PD-1) 表达;(b) 如果PD-1表达相对于对照增加,则用PD-1激动剂治疗患者。在具体实施方案中,患者患有脑损伤。在另一种具体实施方案中,患者患有中风。在又另一种实施方案中,患者患有心肌梗塞。

[0031] 在特定实施方案中,PD-1激动剂是可溶性PD-L1或其片段或类似物。人类PD-L1的氨基酸序列是公开可得的,登录号Q9NZQ7。另参见SEQ ID NO:1。

[0032] 在某些实施方案中,PD-1激动剂包含抗体或其抗原结合片段。在一种实施方案中,PD-1激动剂抗体包括CC-90006 (AnaptysBio, Inc. (San Diego, CA))。参见,例如,美国专利第10,428,145号的权利要求1-139,该专利通过引用以其整体并入。在另一种实施方案中,PD-1激动剂抗体包括ANB030。在其他实施方案中,PD-1激动剂是美国专利第9,181,342号(权利要求1-14)和第8,927,697号(权利要求1-10) (Isis Innovation Limited (Oxford,

GB)) 以及美国专利第9,683,043号(权利要求1-11)(Oxford University Innovation Limited(Oxford,GB))中描述的抗体。在另一种实施方案中,PD-1激动剂是美国专利第9,701,749号(权利要求1-19)(Ono Pharmaceutical Co.,Ltd.(Osaka,JP))中描述的抗体。在又另一种实施方案中,PD-1激动剂是美国专利第10,493,148号(权利要求1-8)(Eli Lilly& Co.(Indianapolis,IN))中描述的抗体。可用于本发明实施方案的PD-1激动剂的另外实例包括但不限于UCB克隆19或克隆10、PD1AB-1、PD1AB-2、PD1AB-3、PD1AB-4和PD1AB-5、PD1AB-6(Anaptys/Celgene)、PD1-17、PD1-28、PD1-33和PD1-35(Collins等人,US 2008/0311117A1 Antibodies against PD-1 and uses therefor,其通过引用并入)。

[0033] 在其他实施方案中,PD-1激动剂是包含PD-L1或其片段的融合蛋白。在具体实施方案中,PD-1激动剂是GX-P2(Genexine,Inc.(New York,NY))。参见例如,美国专利第8,586,038号(权利要求1-12)和第7,867,491号(权利要求1-21)。

[0034] 在特定实施方案中,本发明提供了针对单核细胞/巨噬细胞而非淋巴细胞上PD-1信号传导的组合物和方法,其中PD-1已在癌症免疫疗法的背景下进行了远为更广泛的研究。在单核细胞/巨噬细胞上的PD-1信号传导中,至少没有MHC/TCR相互作用,MHC/TCR相互作用对于淋巴细胞中的PD-1信号传导很重要。不受任何特定理论的限制,本发明人认为这就是为什么可溶性PD-L1在本文描述的模型(以及潜在的其他疾病如MI和中风)中起作用,但在抑制淋巴细胞方面几乎没有效果的原因。事实上,特异性抑制单核细胞可能会导致整体免疫抑制减少并降低感染风险。因此,在某些实施方案中,PD-1激动剂是单特异性PD-1激动剂,例如可溶性PD-L1单体。

[0035] 在另一个方面,本发明提供了诊断组合物和方法。如下文进一步描述,本发明人发现,与正常对照相比,动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aSAH)患者外周血中单核细胞上的PD-1表达升高。重要的是,在脑血管痉挛之前,表达PD-1的单核细胞百分比增加了大约10倍。因此,在某些实施方案中,单核细胞上的PD-1表达可用作动脉瘤性蛛网膜下腔出血、出血性和缺血性中风以及创伤性脑损伤中病理性脑部炎症的生物标志物。

[0036] 另一方面,本发明涉及筛选PD-1激动剂的方法。在特定实施方案中,该方法涉及评估候选药剂如何作用于不同免疫细胞群体。在具体实施方案中,方法包括用候选激动剂在体外培养各种免疫细胞谱系并测量刺激后的功能和/或细胞因子分泌。在可选的实施方案中,使用本文所述的ICAp SAH模型以及感染模型进行体内筛选,以鉴定防止血管痉挛并且还使感染易感性的增加最小化的候选物。在特定实施方案中,方法涉及用于致病性单核细胞介导的炎症的PD-1激动剂。

[0037] 无需进一步详尽说明,认为本领域的技术人员可使用前面的描述最大程度地利用本发明。以下实施例仅是说明性的,并且丝毫不以任何方式限制本公开内容的其余部分。

实施例

[0038] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供如何制备和评价本文描述和要求保护的化合物、组合物、物品、装置和/或方法的完整公开内容和描述,并且意图是单纯说明性的,并且不意图限制发明人视为他们的发明的范围。已经努力确保关于数字(例如,量、温度等)的精确性,但一些误差和偏差应在本文被考虑。除非另外指示,否则份是重量份,温度以摄氏度计或是在环境温度,并且压力是在大气压或接近大气压。存在可以用于优化由

所描述的工艺获得的产物纯度和收率的反应条件的许多变化和组合,所述反应条件例如组分浓度、期望的溶剂、溶剂混合物、温度、压力和其他反应范围和条件。只需要合理和常规的实验来优化这样的工艺条件。

[0039] 实施例1:PD-1+单核细胞介导蛛网膜下腔出血后的脑血管痉挛

[0040] 概述:动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aSAH)占中风的5%,但不成比例地导致中风相关的发病率和死亡率¹。动脉瘤破裂后,70%的患者检测到影像学脑血管痉挛,并且20%的患者出现迟发性脑缺血(DCI)²。脑血管痉挛的频率和严重程度与出血量相关³并与异常炎症有关⁴。然而,潜在炎症过程的确切机制尚不清楚。在此,本发明人表明,表达程序性死亡-1(PD-1+)的单核细胞是aSAH后脑血管痉挛的介质。本发明人在脑血管痉挛动物模型中发现,炎性PD-1+、Ly6c+、CCR2+单核细胞从骨髓中释放,并以儿茶酚胺依赖性方式进入外周血。在aSAH患者的外周血中也检测到PD-1+单核细胞,并且这些细胞的频率与脑血流速度的变化相关。SAH后一小时用可溶性程序性死亡配体-1(PD-L1)治疗小鼠防止脑血管痉挛并抑制炎性单核细胞进入大脑。本发明人的结果将PD-1+单核细胞鉴定为脑血管痉挛的介质,并建议将PD-1激动作为潜在的治疗策略。本发明人预计,发现PD-1+单核细胞的致病作用不仅将导致开发基于血液的脑血管痉挛生物标志物和干预aSAH患者的新靶标,而且更广泛地作为研究先天免疫细胞介导的炎症性疾病中PD-1途径的基础。

[0041] PD-1是一种抑制性免疫检查点,限制慢性感染环境中的附带损害⁵并针对自身免疫进行保护⁶。肿瘤使用PD-1信号传导来避免免疫消除⁷的发现已成为临床肿瘤学的基石⁸。关于PD-1在急性炎症中的作用知之甚少。几项研究已将脑血管痉挛与动脉瘤破裂后的异常炎症联系起来⁹⁻¹⁴;然而,潜在免疫反应的细节尚不清楚。本发明人试图确定PD-1是否在脑血管痉挛潜在的炎症反应中起作用。

[0042] 材料和方法

[0043] 小鼠.根据Johns Hopkins大学机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准的动物方案,将雄性C57BL/6J小鼠(6-8周)(Jackson Laboratory)在无病原体条件圈养。对于所有实验,通过IP注射氯胺酮(100mg/kg)/赛拉嗪(10mg/kg)麻醉小鼠。

[0044] 组织学.对于以ICA测量为终点的实验,小鼠被深度麻醉并接受10mL PBS然后4%多聚甲醛/PBS的经心灌注。通过在颅底急剧横切血管,小心地取出大脑以保持颅内脉管系统。将大脑在PFA中固定至少24小时,然后在4摄氏度在30%蔗糖/PBS中冷冻保护48小时。将大脑用石蜡包埋,切成10 μ m切片并用苏木精和伊红(H&E)染色。

[0045] 小脑延髓池注射模型.将小鼠麻醉并俯卧放置,头部略微弯曲。制造一个中线切口,并松动后颈部肌肉以观察枕骨嵴和寰枕膜。通过心脏穿刺从供体小鼠获得血液。用32g的针头刺破寰枕膜以引流脑脊液。然后使用Hamilton注射器和32g针头在大约2分钟的时间内通过寰枕膜将60 μ L血液注入蛛网膜下腔。闭合切口,并将小鼠放在加热垫上恢复。

[0046] ICA穿孔模型.将小鼠麻醉并仰卧放置。从胸骨到下颌制造一个中线切口,并在低放大率的手术显微镜下松动皮下脂肪垫。将脂肪垫向上回缩,胸锁乳突肌向外侧回缩以暴露颈总动脉。在高放大率下,解剖颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉,使周围组织解离。颈内动脉的解剖在至少翼腭动脉(PPA)的水平上方继续进行。然后使用5-0尼龙缝线封闭颈内动脉和颈总动脉。颈外动脉用5-0丝线永久结扎。在目测确认血流被阻塞后,将颈外动脉横切并用无菌PBS从管腔冲洗血液。以一定角度切割5-0尼龙缝线(细丝)以形成锋利的末端。使该

末端穿过颈外动脉的内腔,并经过颈动脉分叉而引导进入颈内动脉。此时,移除封闭颈内动脉的5-0缝线,并在直接观察下将细丝引导通过颅底穿过PPA。推进缝线,直到在ICA终止处遇到阻力。此时再推进细丝2-3mm,直到不再感觉到阻力,表明细丝穿过血管壁并进入蛛网膜下腔。然后将5-0缝线松散地系在颈外动脉残端周围,而细丝仍然在原位。抽出细丝,收紧5-0丝,并移除阻塞颈总动脉的5-0尼龙缝线以允许血管再灌注。用简单的连续缝线闭合切口,并将小鼠放在加热垫上恢复。

[0047] 血管测量.基于解剖标志识别包含末端ICA的切片(图1)。图像使用Zeiss Axiocam (Zeiss) 显微镜获得,放大倍数为20倍。使用ImageJ (NIH) 测量血管壁厚度和管腔直径。

[0048] 组织收获和细胞制备.将小鼠深度麻醉,并使用毛细管通过眶后穿刺抽取60μL的血液。使用ACK裂解缓冲液(Thermo Fisher) 裂解红细胞并重悬于PBS中进行染色。去除双侧股骨和胫骨并吸出骨髓,并且在ACK裂解缓冲液中裂解红细胞,并将剩余的细胞重悬于PBS中进行染色。取出大脑,并机械解离组织,通过70um过滤器拉紧,并在无制动的情况下在30%/70%**PERCOLL**® (Sigma-Aldrich) 梯度以2200rpm离心20分钟。在界面处提取脑免疫细胞并重悬于PBS中进行染色。

[0049] 鼠髓细胞的染色和流式细胞术分析.使用以下抗小鼠抗体对髓细胞进行CD3、CD45、CD11b、CD11c、Ly6c、Ly6g、CCR2、PD-1、VLA-4和CD49b染色:PerCP-Cy5.5 CD3 (BD, 批次551163)、APC/Fire 750 CD45 (BioLegend批次103154)、AF700 CD11b BioLegend (批次101222)、FITC CD11c BioLegend (批次117306)、BV650 Ly6g BioLegend (批次127641)、PE CCR2 BioLegend (批次150610)、PE-Cy7 PD-1eBioscience (批次25-9985-82)、BV421 PD-1 BioLegend (批次109121)、APC CD49d (VLA-4) BioLegend (批次103622)、PE CD49b (Pan-NK) BioLegend (批次108908)。使用FACSCelesta (BD) 获取数据并使用FlowJo (BD) 进行分析。

[0050] 人类受试者.所有研究均得到Johns Hopkins大学机构审查委员会 (IRB) 的批准。在Johns Hopkins医院或Johns Hopkins Bayview Medical Center就诊的具有SAH和一个或多个经脑血管造影证实的脑动脉瘤的六名连续患者被纳入研究。在动脉瘤破裂后长达14天,与血管痉挛风险期相对应,从留置的桡动脉导管或静脉穿刺中连续抽取外周血。每位患者获得平均11个时间点,范围为8-12个时间点。TCD由专业的TCD技师作为标准护理的一部分执行,并且对于本研究,没有改变这些数据的采集或解释。根据临床指征,患者通过CT血管造影、MR血管造影和/或基于导管的血管造影进行血管成像。没有获得专门用于本研究目的的临床试验。

[0051] 人类单核细胞的流式细胞术分析.通过**FICOLL**® (Sigma-Aldrich) 密度梯度离心从全血液样品分离白细胞。将细胞洗涤并重悬于PBS中,并用以下抗人类抗体对CD3、CD45、CD11b、CD19、CD15、CD14、CD16进行染色:FITC CD3 (Biolegend, 批次300440)、AF700 CD45 (Biolegend, 批次304024)、BV421 CD11b (Biolegend, 批次301324)、FITC CD19 (Biolegend, 批次302206)、FITC CD15 (ThermoFisher, 批次11-0159-42)、APC-H7 CD14 (Biolegend, 批次325620)、E-Cy7 CD 16 (Biolegend, 批次302016)。使用FACSCelesta (BD) 获取数据并使用FlowJo (BD) 进行分析。

[0052] PD-L1和抗PD-1施用.将具有多His标签的PD-L1蛋白 (ACROBiosystems, 批次PD1-M5220) 在无菌PBS中重构,并在ICAp后1小时和24小时通过IP注射施用50μg。对于涉及PD-1阻断的实验,在ICAp前一小时通过IP注射施用200μg剂量的抗PD-1单克隆抗体(从G4杂交瘤

培养物纯化的仓鼠抗小鼠PD-1)。

[0053] 统计学分析.所有重复都是生物学重复。对于小鼠实验,使用GraphPad Prism软件用双尾Student T检验分析数据。 $p < 0.05$ 被认为是显著的。获得对每个患者PD-1+单核细胞频率和TCD速度的多次测量。通过从前一天的值减去每天的值来计算PD-1+单核细胞频率和最大TCD速度的变化。使用SAS软件(版本9.4;SAS Institute)估计Pearson相关系数和Cohen的kappa系数的评估者间一致性。

[0054] 结果与讨论

[0055] 危重疾病和患者异质性混淆了aSAH的炎症反应¹⁵。为了鉴定与脑血管痉挛相关的具体机制,本发明人通过测量颈内动脉(ICA)的末端段(图5)比较了两种SAH小鼠模型(图1A)。将血液注入小脑延髓池(CM)会导致促炎性触珠蛋白2-2小鼠的血管痉挛⁴,但在野生型C57BL/6小鼠中导致的ICA血管痉挛最小(图1C、图1D)。相反,ICA的血管内穿孔(ICAp)产生弥漫性SAH(图1B)和严重的血管痉挛(图1C、图1D)。

[0056] 已经研究了多种免疫细胞群体作为脑血管痉挛的介质,包括巨噬细胞¹⁶、小胶质细胞¹⁷、淋巴细胞¹⁸、粒细胞¹⁹和自然杀伤(NK)细胞²⁰。本发明人发现,在这些脑浸润性免疫细胞群体中PD-1表达不同(图6A)。只有CD45+、CD11b+髓细胞(图S2b)在ICAp和CM模型(图1E)之间表现出PD-1表达的显著增加($p = 0.037$)。PD-1在感染环境中抑制巨噬细胞²¹,但除此之外,关于PD-1信号传导对髓细胞的功能知之甚少。基于本发明人比较ICAp和CM模型的数据,本发明人假设,PD-1+巨噬细胞/小胶质细胞介导脑血管痉挛中的炎症反应。

[0057] 为了将脑髓细胞上的PD-1表达与SAH在机制上联系起来,本发明人测试了 β -肾上腺素能阻断对ICAp后CD45+、CD11b+、PD-1+脑髓细胞频率的影响。 β -肾上腺素能信号传导在创伤和败血症²²中刺激促炎反应并且与aSAH后的脑血管痉挛有关^{23,24}。然而, β 阻断在aSAH中的临床有效性是模棱两可的²⁵。在ICAp前一小时施用普萘洛尔可降低脑中PD-1+髓细胞的频率(图1F) ($p = 0.0009$)。值得注意的是,这些动物在24小时被处死,因为大多数普萘洛尔治疗的小鼠在48小时时间点之前死亡并伴有严重的神经功能缺损(图7)。总之,这些数据表明, β 阻断在aSAH患者中临床结果的不一致可能是由于局部炎症减少和脑血流自动调节受损的竞争效应。

[0058] 交感神经系统的参与表明系统性而非局部免疫反应。为了确定脑髓细胞上PD-1表达的起源和时间,本发明人在ICAp后6小时、24小时和48小时从小鼠采集脑、外周血和骨髓。在6、24和48小时时间点,CD45-dim小胶质细胞表达稳定水平的PD-1(图2A)。相反,PD-1+巨噬细胞的频率从6小时到24小时增加($p = 0.001$)并在48小时恢复到基线(图2B)。随着SAH后24小时血液和骨髓中PD-1+单核细胞的频率增加(分别为 $p = 0.0063$ 和 $p = 0.0059$),外周单核细胞中PD-1的表达模式与脑浸润巨噬细胞的表达模式一致。这些数据表明,SAH刺激PD-1+单核细胞从骨髓中释放,并且这些单核细胞随后以与脑血管痉挛一致的时间过程运输到大脑。

[0059] 为了确定外周血中的PD-1+单核细胞频率是否与脑血管痉挛相关,本发明人研究了入住本发明人机构的患有aSAH的六名连续患者。患者和动脉瘤特征总结在表1中。如图8所示,在动脉瘤破裂后长达14天连续测量外周血中表达PD-1的单核细胞百分比。在医院经过放射学证实发展血管痉挛的两名患者(患者1和5)中,在血管痉挛之前,外周血中PD-1+单核细胞频率增加。患者5从第6天开始表现出循环PD-1+单核细胞的频率升高,在第7天达到

峰值,为9.31% (图3A)。第8天,患者5出现血压依赖性失语症,并且计算机断层扫描血管造影(CTA)证实左侧大脑中动脉出现血管痉挛。经颅多普勒超声(TCD)还在第7天检测到血流速度的升高(图3B)。患者1在动脉瘤破裂后第三天到医院就诊。在就诊时,患者1中有22%的外周血单核细胞是PD-1+ (图9)。在第4天,TCD速度增加,并持续上升直到第8天(图3B)。影像学血管痉挛在第5天通过磁共振血管造影(MRA)证实,并在第10天通过基于导管的脑血管造影证实。

[0060] 表1:患者和动脉瘤特征

[0061]	患者	性别	年龄	动脉瘤位置	入院 GCS	Hunt and Hess	修正 Fisher	动脉瘤治疗	临床和/或影像学血管痉挛
	1	女性	57	小脑上动脉	7	4	4	盘绕	是
	2	女性	58	后交通动脉	14	2	4	盘绕	否
	3	女性	83	后交通动脉	6	5	4	盘绕	否
	4	女性	66	基底动脉	15	2	3	盘绕	是
	5	女性	54	后交通动脉	15	2	3	剪切	是
	6	女性	51	大脑中动脉	7	4	3	剪切	否

[0062] 在这两名患者中,存在CD14++、CD16- (经典) 单核细胞的早期丰度,随后CD14++、CD16+ (中间) 群体增加,并且CD14+、CD16+ (非经典) 群体增加较慢(图3A、图9)。在其他血管病变,包括急性心肌梗塞和缺血性中风²⁶中,这种模式已被描述为阴性预后指标。PD-1+单核细胞通常为CD14++、CD16+ (中间) 亚型(图3A),这与慢性肾病患者的心血管事件以及类风湿性关节炎的疾病严重程度有关²⁶。PD-1在中间单核细胞上表达的发现表明,PD-1可能是炎性单核细胞的更普遍标志物,并且可能是干预多种炎症性疾病过程的潜在靶标。

[0063] 基于本发明人的临床前数据表明PD-1+单核细胞源自骨髓,本发明人假设血管痉挛之前可能有外周血中PD-1+单核细胞频率的增加。本发明人将PD-1+单核细胞频率的每日变化与次日最大TCD速度的每日变化配对。通过Cohen的kappa系数评估PD-1+单核细胞频率的每日变化和次日最大TCD速度的变化之间的评估者间一致性, ($\kappa=0.48$ (95%CI:0.2-0.76; $p=0.0018$) (图3C)。将PD-1+单核细胞二分为高频率和低频率表明,与<5%PD-1+单核细胞相比,>5%PD-1+单核细胞与更高的次日TCD速度相关 ($p=0.0012$) (图3D)。最后,使用Pearson相关系数在 $r=0.33$ (95%CI:-0.01-0.60; $p=0.06$) 与所有数据对估计可能的相关性(图10)。在第4-8天观察到的TCD速度上升反映了第1-2天PD-1+单核细胞频率的显著增加,这是合理的,但由于患者延迟就诊而没有被捕获。因此,本发明人进行了敏感性分析,排除了第3天异常值,并且发现 $r=0.486$ (95%CI:0.17-0.71; $p=0.0037$) (图3E)。本发明人预计,在更大的患者群中进行的确认性研究将把该测定的参数改进为脑血管痉挛的临床生物标志物。

[0064] 为了评估PD-1作为脑血管痉挛的治疗靶标,本发明人在SAH后1小时通过IP注射施用PD-L1并在48小时测量末端ICA(图4A)。本发明人发现,施用PD-L1防止了血管痉挛,而在SAH之前1小时用PD-1阻断性抗体进行预处理取消了PD-L1的治疗作用(图4B)。Ly6c+单核细胞在骨髓中被激活并被许可迁移到组织中并发挥炎症功能²⁷。表达CC趋化因子受体2 (CCR2) 的单核细胞与炎症性中枢神经系统 (CNS) 病理有关²⁸。当本发明人在SAH后24小时和48小时测量血液、骨髓和脑中PD-1+单核细胞上的Ly6c和CCR2表达时,本发明人发现与未治疗的动

物相比,PD-L1治疗的小鼠血液中PD-1+单核细胞的频率更高(图4C、图4D)。此外,经PD-L1治疗的动物具有频率更高的表达极晚期抗原4(VLA-4)的血液单核细胞(图4E、图4F),极晚期抗原4是一种促进跨血管内皮迁移的粘附分子²⁹并已被确定为CNS炎症的介质³⁰。在这些时间点脑浸润单核细胞的分析显示,在PD-L1治疗的动物中,Ly6c+、CCR2+单核细胞的频率相应较低(图4G)。虽然需要谨慎,因为CCR2在进入组织后被单核细胞下调²⁸,然而这些数据表明,SAH环境中的PD-1信号传导通过抑制活化的单核细胞进入CNS来防止血管痉挛。

[0065] 在脑血管痉挛患者中观察到异常炎症;然而,这种免疫反应的细节一直难以捉摸。本发明人的结果表明,活化的PD-1+单核细胞在SAH后以儿茶酚胺依赖性方式从骨髓中释放出来。全身施用PD-L1通过抑制炎症性单核细胞迁移到CNS中来防止脑血管痉挛。这项研究确定了PD-1在单核细胞迁移中的新作用,并表明PD-1激动剂可能有效防止aSAH患者的脑血管痉挛。

[0066] 参考文献

[0067] 1.Ferro,J.M.,**Canhão**,P.&Peralta,R.Update on subarachnoid haemorrhage.J Neurol 255,465-479(2008) .

[0068] 2.Charpentier,C.,Audibert,G.,Guillemin,F.,Stroke,T.C.1999.Multivariate analysis of predictors of cerebral vasospasm occurrence after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.Am Heart Assoc

[0069] 3.Hijdra,A.,Van Gijn,J.,Nagelkerke,N.J.,Stroke,M.V.1988.Prediction of delayed cerebral ischemia,reebleeding,and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.Am Heart Assoc

[0070] 4.Chaichana,K.L.,Levy,A.P.,Miller-Lotan,R.,Shakur,S.&Tamargo,R.J.Haptoglobin 2-2 Genotype Determines Chronic Vasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage.Stroke 38,3266-3271(2007) .

[0071] 5.Barber,D.L.et al.Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.Nature 439,682-687(2005) .

[0072] 6.Fife,B.T.&Pauken,K.E.The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance.Annals of the New York Academy of Sciences 1217,45-59(2011) .

[0073] 7.Dong,H.et al.Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis:A potential mechanism of immune evasion.Nat Med 8,793-800(2002) .

[0074] 8.Topalian,S.L.,Drake,C.G.&Pardoll,D.M.Immune Checkpoint Blockade:A Common Denominator Approach to Cancer Therapy.Cancer Cell 27,450-461(2015) .

[0075] 9.Gaetani,P.,Tartara,F.,Pignattiti,P.,Neurological,F.T.1998.Cisternal CSF levels of cytokines after subarachnoid hemorrhage.Taylor&Francis 20,337-342(2016) .

[0076] 10.Kaynar,M.Y.et al.Detection of soluble intercellular adhesion molecule—1 and vascular cell adhesion molecule—1 in both cerebrospinal fluid and serum of patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.Journal of Neurosurgery 101,1030-1036(2019) .

- [0077] 11.Polin,R.S.et al.Detection of soluble E-selectin,ICAM-1,VCAM-1,and L-selectin in the cerebrospinal fluid of patients after subarachnoid hemorrhage.Journal of Neurosurgery 89,559-567 (2019) .
- [0078] 12.Kikuchi,T.,Okuda,Y.,Kaito,N.,research,T.A.N.1995.Cytokine production in cerebrospinal fluid after subarachnoid haemorrhage.Taylor& Francis 17,106-108 (2016) .
- [0079] 13.Xie,X.,Wu,X.,Cui,J.,Li,H.&Yan,X.Increase ICAM-1 and LFA-1 expression by cerebrospinal fluid of subarachnoid hemorrhage patients: Involvement of TNF- α .Brain Research 1512,89-96 (2013) .
- [0080] 14.Schneider,U.C.,Schiffler,J.,Hakiy,N.,Horn,P.&Vajkoczy,P.Functional analysis of Pro-inflammatory properties within the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro.J Neuroinflammation 9,330-2 (2012) .
- [0081] 15.Barrow,J.,Turan,N.,Wangmo,P.,Roy,A.&Pradilla,G.The role of inflammation and potential use of sex steroids in intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage.Surg Neurol Int 9,150-2 (2018) .
- [0082] 16.Froehler,M.T.et al.Vasospasm after subarachnoid hemorrhage in haptoglobin 2-2 mice can be prevented with a glutathione peroxidase mimetic.Journal of Clinical Neuroscience 17,1169-1172 (2010) .
- [0083] 17.Schallner,N.et al.Microglia regulate blood clearance in subarachnoid hemorrhage by heme oxygenase-1.J.Clin.Invest.125,2609-2625 (2015) .
- [0084] 18.Kubota,T.,Handa,Y.,Tsuchida,A.,Stroke,M.K.1993.The kinetics of lymphocyte subsets and macrophages in subarachnoid space after subarachnoid hemorrhage in rats.Am Heart Assoc 24,1993-2000 (1993) .
- [0085] 19.Provencio,J.J.et al.CSF Neutrophils Are Implicated in the Development of Vasospasm in Subarachnoid Hemorrhage.Neurocrit Care 12,244-251 (2009) .
- [0086] 20.Spitzer,D.et al.Activation of Cytotoxic Natural Killer Cells After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage.World Neurosurgery 101,666-676.e1 (2017) .
- [0087] 21.Huang,X.et al.PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis.Proceedings of the National Academy of Sciences 106,6303-6308 (2009) .
- [0088] 22.Loftus,T.J.,Efron,P.A.,Moldawer,L.L.&Mohr,A.M. β -Blockade use for Traumatic Injuries and Immunomodulation.SHOCK 46,341-351 (2016) .
- [0089] 23.Bunc,G.,**Kovačič**,S.&Strnad,S.The influence of noradrenergic blockade on vasospasm and the quantity of cerebral dopamine β -hydroxylase following subarachnoid haemorrhage in rabbits.Wien Klin Wochenschr 115,652-659 (2003) .

[0090] 24.Chalouhi,N.et al.Beta-blocker therapy and impact on outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage:a cohort study.Journal of Neurosurgery 125,730-736 (2019) .

[0091] 25.Chang,M.M.et al.Beta Blockade and Clinical Outcomes in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage.TONEUJ 10,155-163 (2016) .

[0092] 26.Stansfield,B.K.&Ingram,D.A.Clinical significance of monocyte heterogeneity.Clin Trans Med 4,2527-2 (2015) .

[0093] 27.Mildner,A.et al.Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP β Transcription Factor Dependence of Ly6C-Cells.Immunity 46,849-862.e7 (2017) .

[0094] 28.Prinz,M.&Priller,J.Tickets to the brain:Role of CCR2 and CX3CR1 in myeloid cell entry in the CNS.Journal of Neuroimmunology 224,80-84 (2010) .

[0095] 29.Huo,Y.,Hafezi-Moghadam,A.,research,K.L.C.2000.Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions.Am Heart Assoc.

[0096] 30.Yednock,T.A.et al.Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4\beta 1$ integrin.Nature 356,63-66 (1992) .

[0097] 实施例2:单核细胞上的PD-1表达作为病理性中枢神经系统炎症的生物标志物.使用颅内出血和血管痉挛(血管内穿孔)的小鼠模型,本发明人已经表明,施用可溶性PD-L1减少血管周围炎症并防止脑血管痉挛。这种效应被常用于癌症免疫治疗的PD-1阻断抗体的预处理消除,证实了作为PD-L1唯一已知配体的PD-1是这种效应的介质(图4A-图4B)。

[0098] 本发明人发现,与正常对照相比,动脉瘤性蛛网膜下腔出血(aSAH)患者外周血中CD45⁺、CD11b⁺、CD11b⁺、CD3⁻、CD15⁻、CD19⁻细胞(单核细胞)上的PD-1表达升高。重要的是,在脑血管痉挛之前,表达PD-1的单核细胞百分比增加了大约10倍(图11)。本发明人设想将该发现在临床上转化为动脉瘤性蛛网膜下腔出血、出血性和缺血性中风以及创伤性脑损伤中病理性脑部炎症的生物标志物。

[0099] 患有这些状况的患者将每天抽血,并通过如下所述的流式细胞术测量单核细胞上的PD-1表达。根据本发明人的数据,本发明人预期单核细胞上的PD-1表达增加超过基线3倍或更多(该阈值将随着收集更多患者数据而改进)表明即将发生脑部炎症和其相关的后遗症(血管痉挛、中风、神经元损伤、认知能力下降等)。

[0100] 鉴于本发明人发现可溶性PD-L1防止小鼠单核细胞介导的脑部炎症后遗症,本发明人相信该测试作为PD-L1、其类似物或其他PD-1激动剂的伴随诊断是有价值的。所提议的算法将是向具有PD-1单核细胞升高的患者施用PD-1激动剂。从机制上讲,这将使血液中的炎性单核细胞在进入大脑之前失效。在小鼠中给药全长、未修饰的PD-L1表明每日给药方案是有效的。治疗的持续时间尚未确定,但本发明人的数据显示,单核细胞上的PD-1从该细胞群体的初始急升起至少持续一周保持升高,并且与经颅多普勒超声测量的升高的血流速度相关,经颅多普勒超声是目前血管痉挛监测的标准方法。

[0101] 用于定量PD-1+单核细胞的流式细胞术方案.如机构审查委员会(IRB)批准的方案中所示,获得了所有患者的采血同意书。

[0102] 外周血单个核细胞 (PBMC) 的样本采集和处理. 将5cc全血收集在乙二胺四乙酸 (EDTA) 管中, 随后将其与等体积的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 混合。通过巴斯德移液管将12ml室温Ficoll-Paque™ Plus铺在下面, 然后在Sorvall Legend X1R离心机中使梯度溶液在室温以2200rpm不中断地离心20分钟。然后提取血沉棕黄层并混合到40ml PBS溶液中, 然后在室温以1400rpm旋转5分钟。将上清液倒出并将样品重新悬浮在30ml PBS中, 然后以1000rpm离心10分钟以去除血小板。将细胞沉淀重悬于1ml PBS中并使用血细胞计数器计数。

[0103] PD-1+骨髓组染色. 如表2所示, 以用PBS的特定稀释度对细胞进行几种细胞外标志物染色。FcBlock用于防止流式抗体与髓细胞的非特异性Fc受体结合。样品在4℃以最少曝光用荧光团缀合的抗体染色30分钟。在染色前后用PBS洗涤样品两次。

[0104] 表2

标志物	荧光团	稀释度 (在PBS中)
CD45	AF700	1:100
CD11b	BV421	1:100
CD14	APC-Cy7	1:50
CD16	PE-Cy7	1:50
PD-1	PE	1:100
CD3	FITC	1:20
CD15	FITC	1:200
CD19	FITC	1:100

[0106] 流式细胞术门控策略. 对细胞进行门控以最大化来自CD14+单核细胞的PD-1的信号读取 (参见图11)。谱系“废物门 (dump gate)”用于排除其他不感兴趣的细胞类型 (即中性粒细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞)。荧光减一 (FMO) 样品用于替代同种型对照以进行PD-1+染色。每天使用FMO来比较样品的相对PD-1单核细胞表达。

[0107] 实施例3: 单核细胞介导的病理性炎症的共同模式将脑损伤/血管痉挛和其他CNS以及一些非CNS炎症性疾病联系起来。由于PD-1之前尚未被确定为治疗这些疾病过程背后的病理性炎症的标志物和潜在靶标, 因此本发明人在SAH中的发现可能具有更广泛的适用性, 因为PD-L1可能在由这些炎性单核细胞介导的任何疾病过程中具有活性。对最初在本发明人的小鼠模型中鉴定并随后在aSAH患者中鉴定的这种新型PD-1+单核细胞群体的分析表明, 这种致病性PD-1+细胞群体在脑损伤后几天经历了从CD14+、CD16-经典表型到CD14+、CD16+中间表型的转变。这种模式与其他疾病过程中报告的模式相关。例如, 在心肌梗塞中, CD14+、CD16-经典单核细胞的峰值是心肌补救的阴性预后指标 (图12)。类似地, 本发明人发现, aSAH中的血管痉挛之前是高水平的CD14+、CD16-单核细胞 (图12)。将这些单核细胞表达PD-1的本发明人在患者中的发现与表明施用PD-L1减轻了该细胞群体的病理后遗症的本发明人的鼠类数据结合, 假设PD-L1或其类似物可能是防止与这种单核细胞激活模式相关的心脏缺血性损伤或其他炎症性疾病的治疗是合理的。

[0108] 本发明人的数据表明, 在血管痉挛期间, PD-1+单核细胞在血液中持续保持低水平。这些细胞从CD14+、CD16-转变为CD14+、CD16+单核细胞。CD14+、CD16+单核细胞是“中间”单核细胞, 其与多种自身免疫性和慢性炎症性疾病, 包括心血管疾病、克罗恩病、肾脏疾病和类风湿性关节炎有关。然而, 在这些状况中从未描述过PD-1作为疾病改善靶标。基于本发明人在该已知致病细胞群体上发现PD-1, PD-L1可能在治疗这些状况方面具有改善疾病

的活性是合理的。

[0109] 总结. 在蛛网膜下腔出血小鼠模型中, PD-L1治疗通过充当PD-1激动剂来防止血管痉挛的炎症后遗症。对aSAH患者血液单核细胞的分析表明, PD-1表达的显著增加先于血管痉挛, 因为这些致病性细胞在前往大脑的途中穿过血液。因此, 本发明人提出PD-1+单核细胞是即将发生血管痉挛的生物标志物, 并开发了一种基于流式细胞术的测定, 用于测量该细胞群体上的PD-1表达。鉴于本发明人发现PD-L1给药防止小鼠脑部炎症和血管痉挛, 本发明人还假设, 使用该方法测量PD-1可用作PD-L1或任何其他以此目的开发的PD-1激动剂的伴随诊断。此外, 本发明人已发现, 该PD-1+单核细胞群体遵循脑损伤后的CD14/CD16表达模式, 该模式反映了其他炎症病理学中描述的模式。然而, 本发明人首次鉴定该细胞群体上的PD-1并展示PD-1信号传导防止由这些单核细胞引起的病理性炎症。因此, 通过研究PD-L1减轻脑部炎症和防止血管痉挛的机制, 本发明人发现了治疗由表达PD-1的炎性单核细胞介导的疾病的新靶标。

序列表

<110> 约翰霍普金斯大学

<120> 用于治疗脑血管痉挛的组合物和方法

<130> P15683-02

<150> 62/873,439

<151> 2019-07-12

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (290)

<223> PD-L1氨基酸序列

<400> 1

Met	Arg	Ile	Phe	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Met	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Leu
1				5					10					15	
Asn	Ala	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr
				20				25					30		
Gly	Ser	Asn	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu
				35				40					45		
Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile
				50				55				60			
Ile	Gln	Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser
65				70				75				80			
Tyr	Arg	Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn
				85				90					95		
Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr
				100				105					110		
Arg	Cys	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val
				115				120					125		
Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val
				130				135					140		
Asp	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr
145				150				155					160		
Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser

				165					170					175		
Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	
				180					185					190		
Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	
				195					200					205		
Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu	
				210					215					220		
Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg	Thr	His	
225						230					235				240	
Leu	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile	Leu	Leu	Cys	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Thr	
				245					250					255		
Phe	Ile	Phe	Arg	Leu	Arg	Lys	Gly	Arg	Met	Met	Asp	Val	Lys	Lys	Cys	
				260					265					270		
Gly	Ile	Gln	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Glu	
				275					280					285		
Glu	Thr															
				290												

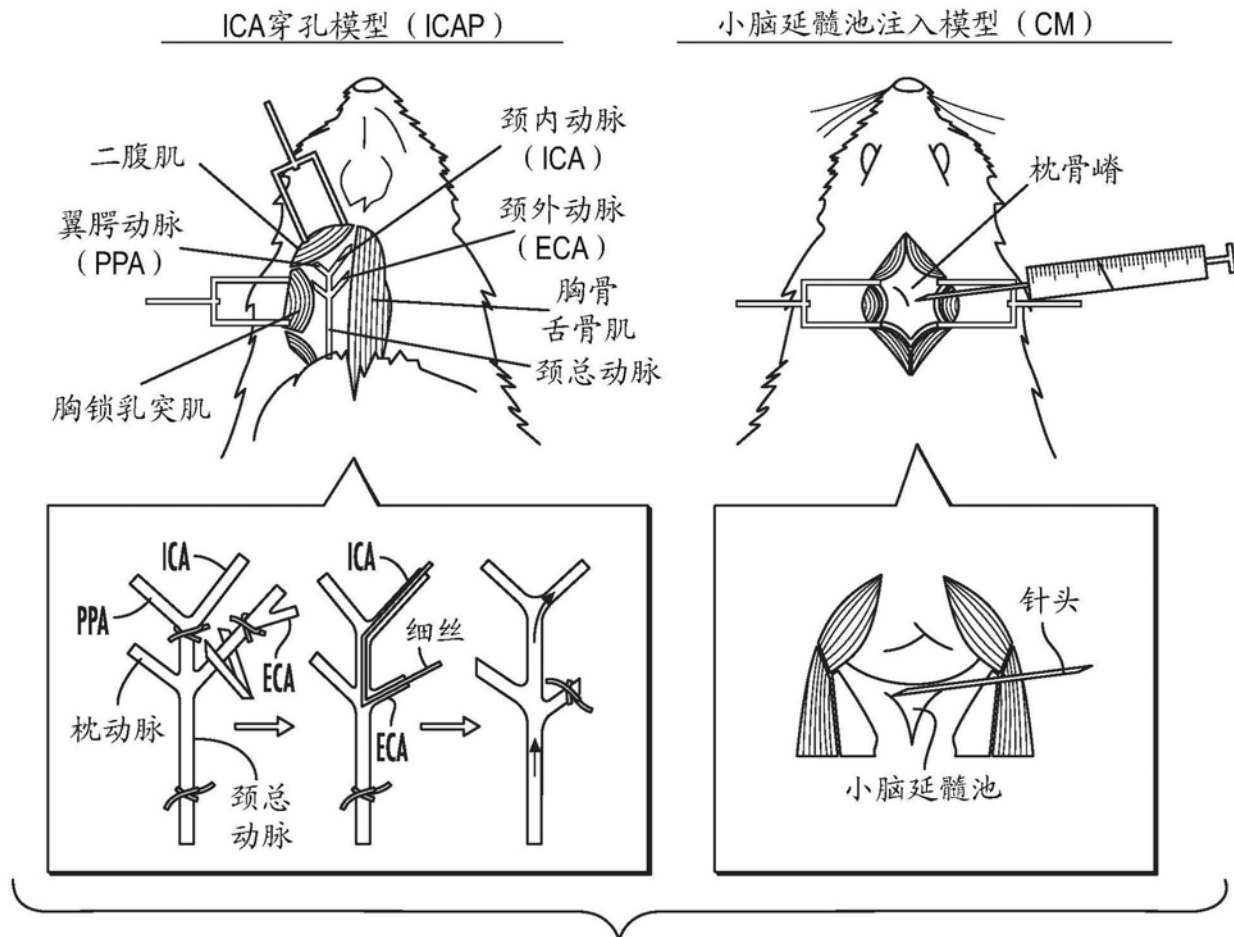


图1A

图1A

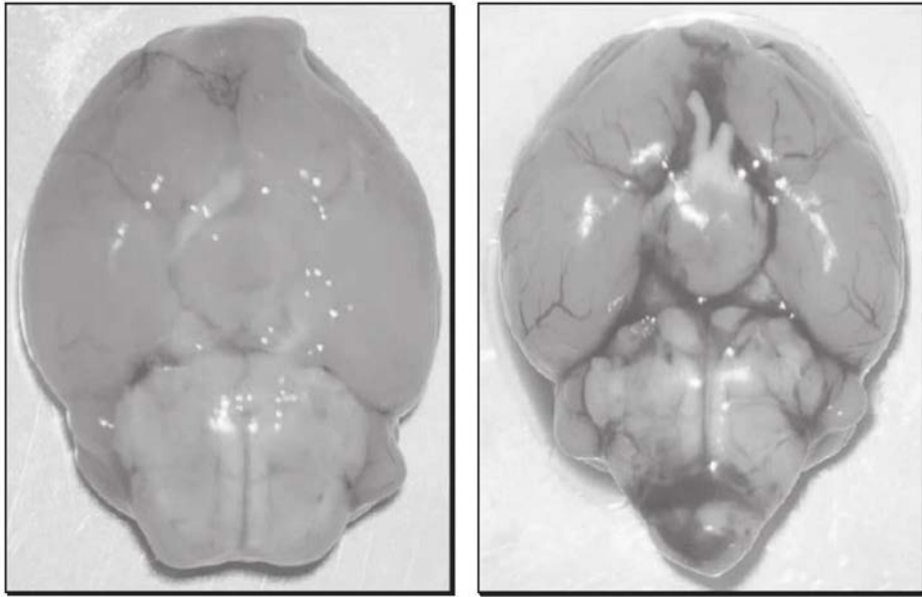


图 1B

图1B

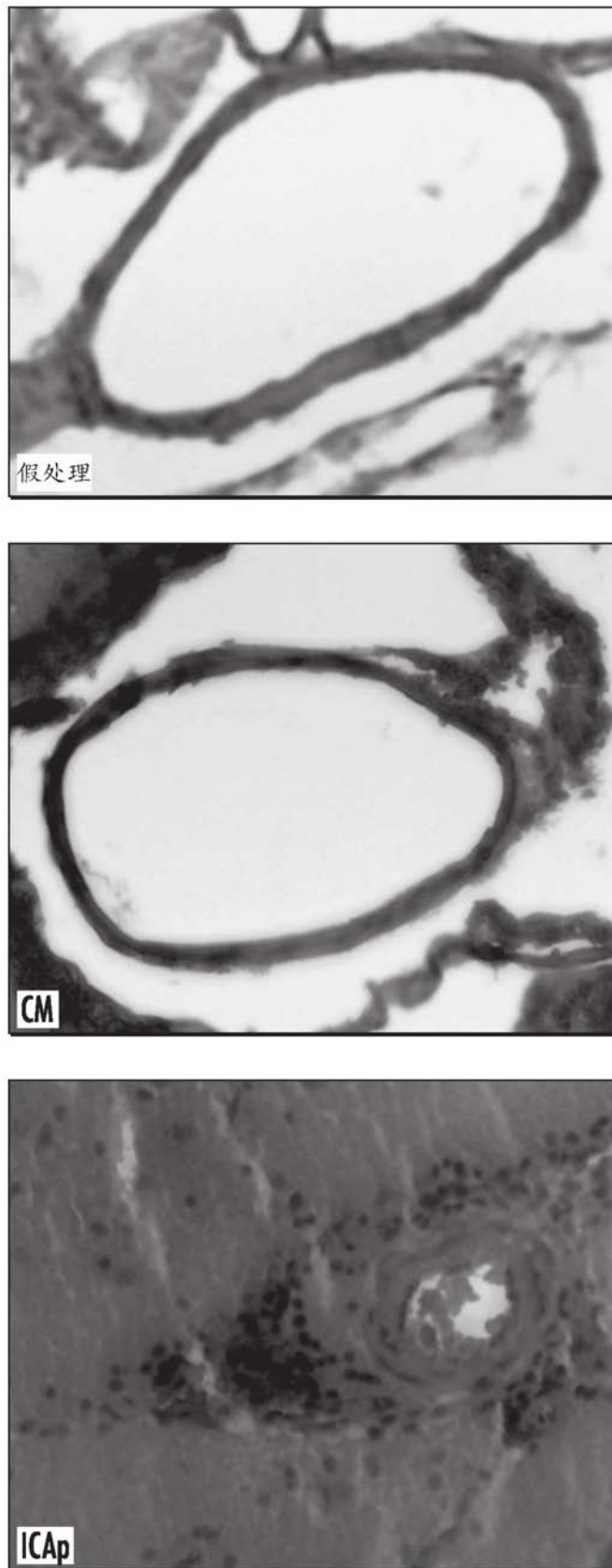


图1C

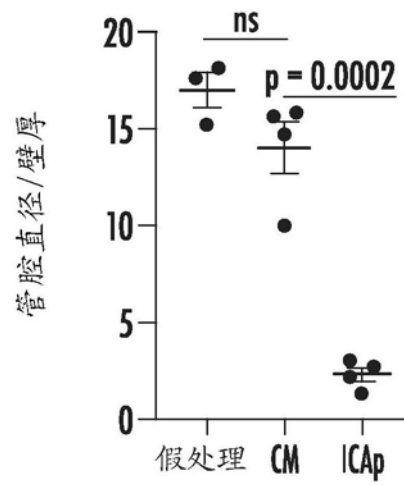


图1D

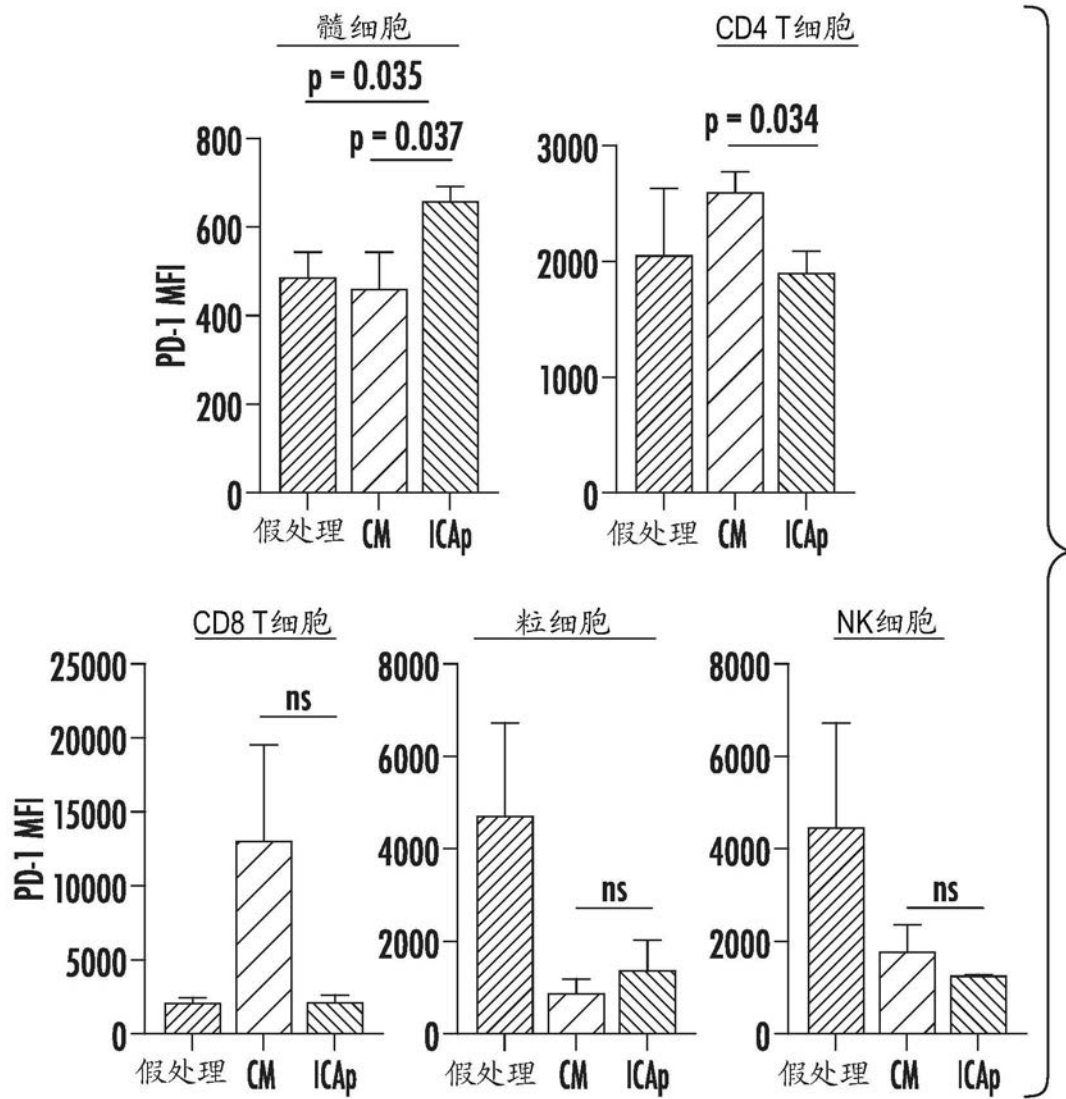


图1E

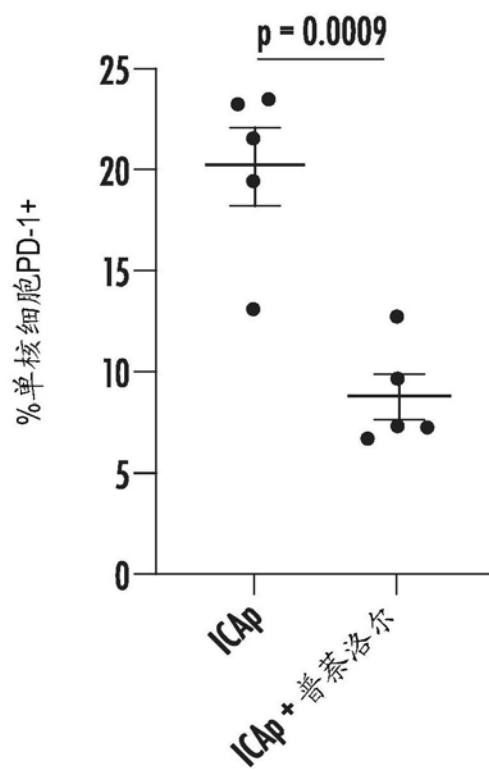


图1F

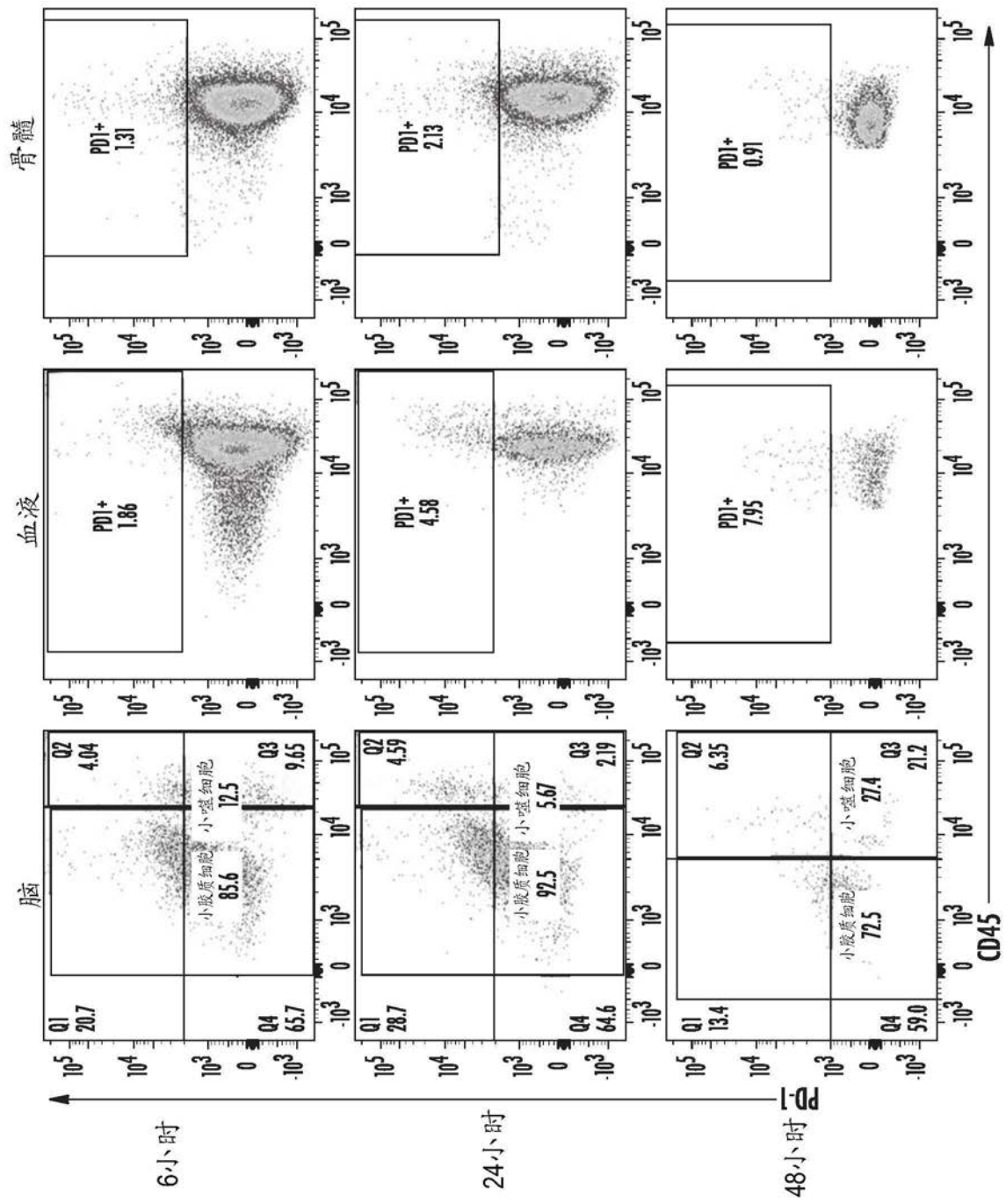


图2A

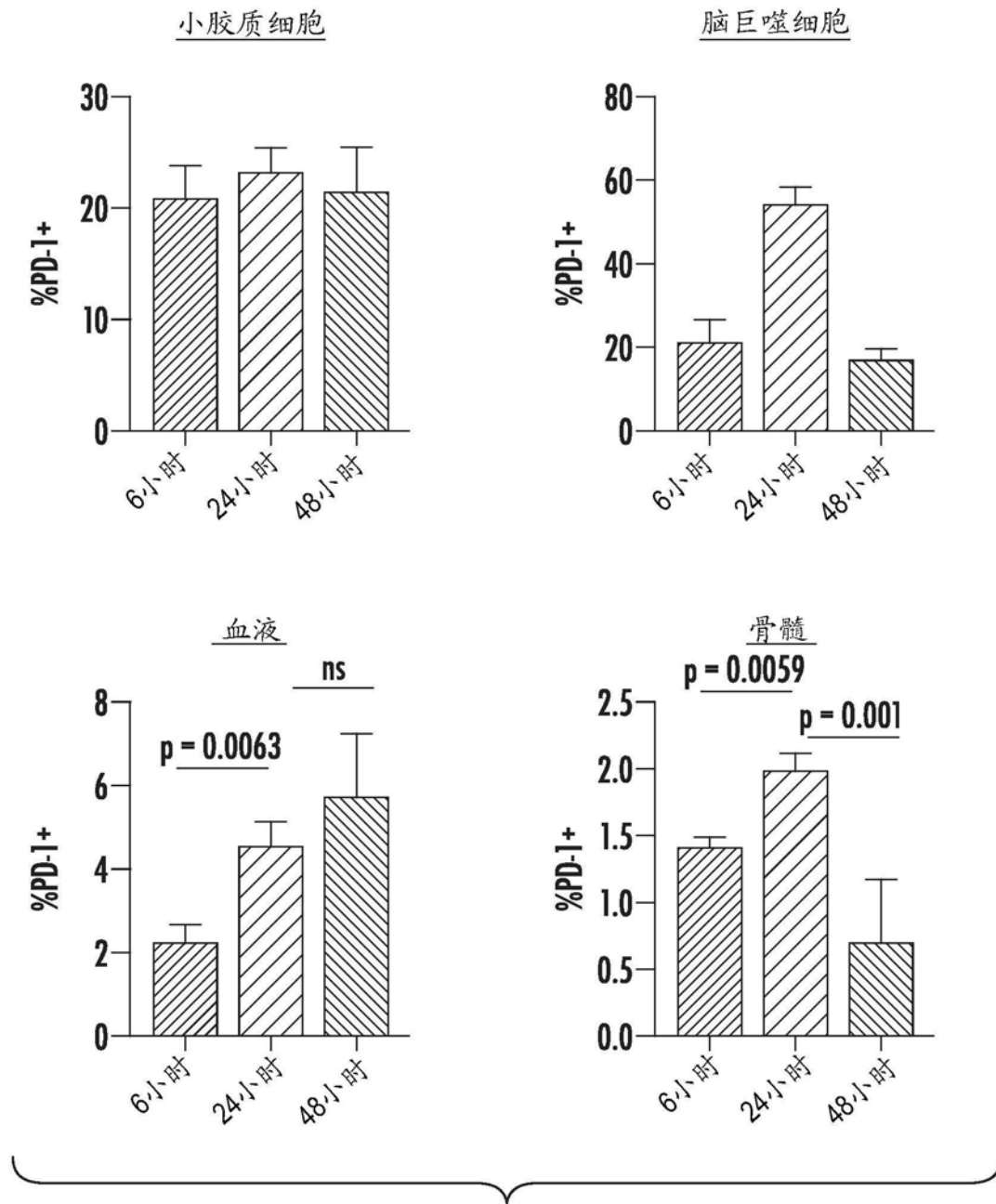


图2B

图2B

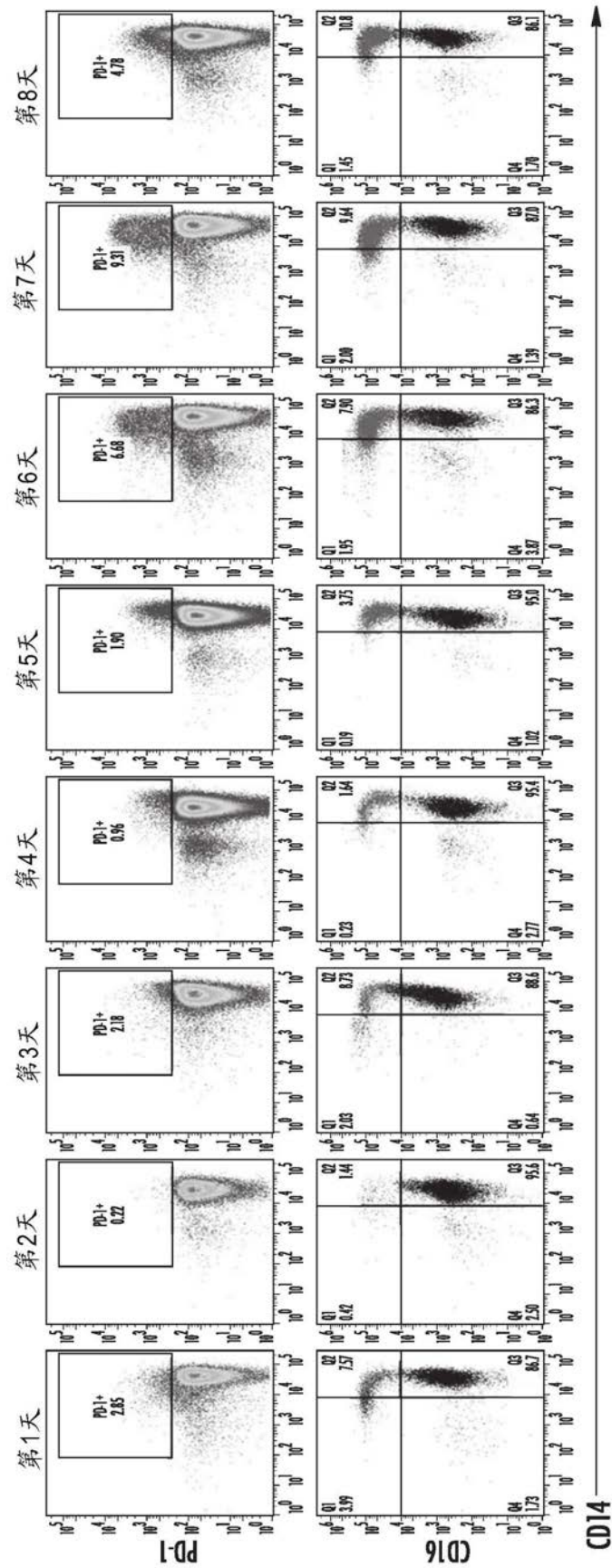


图3A

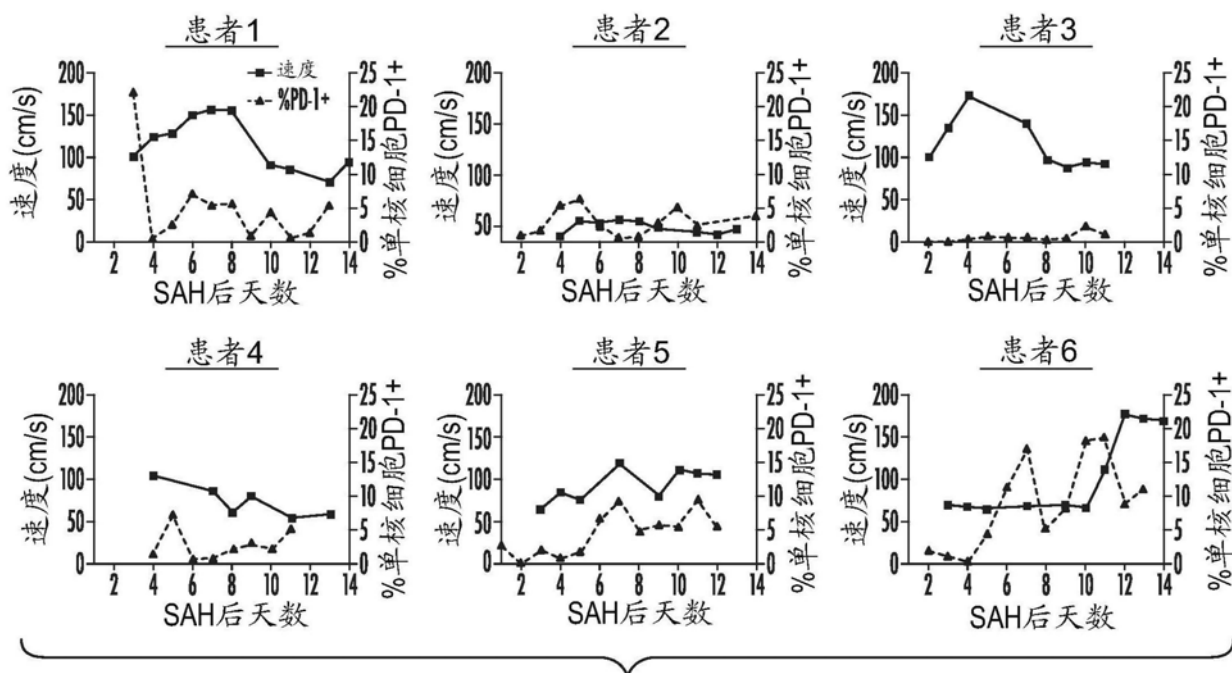


图 3B

图3B

单核细胞PD-1+%的变化与
次日TCD速度的变化

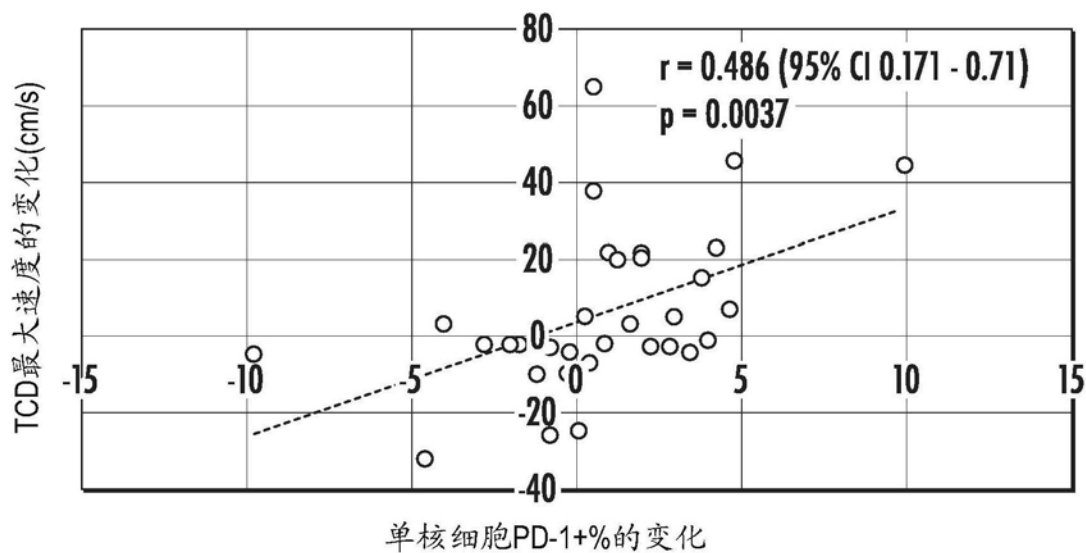


图3C

患者	单核细胞PD-1+%的变化	次日TCD速度的变化
患者1	-21.53	5
	1.96	22
	4.58	7
	-1.77	2
	3.45	4
	4.23	23
	3.8	15
患者2	0.88	2
	-4.02	3
	-1.98	2
	0.41	7
	-2.78	2
	0.505	38
	-0.25	10
患者3	0.26	5
	1.62	3
	0.13	25
	1.27	20
患者4	-0.82	27
	2.95	5
	1.96	20
	-1.22	10
患者5	4.78	46
	-4.53	32
	0.98	22
	-0.18	4
	3.94	1
	-0.93	3
	-0.78	3
患者6	2.82	3
	9.9	45
	0.5	65
	-9.78	5
	2.28	3

 PD1<-5%或速度<-10cm/s
 PD1为-5%至0%或速度为-10 cm/s至0 cm/s
 PD1为0%至5%或速度为0 cm/s至10 cm/s
 PD1>5%或速度>10cm/s

部分的统计：PD-1%变化>5%导致平均TCD变化为71.6%，而PD-1%变化<5%导致平均TCD变化%为24.0% (p=0.003)

图3D

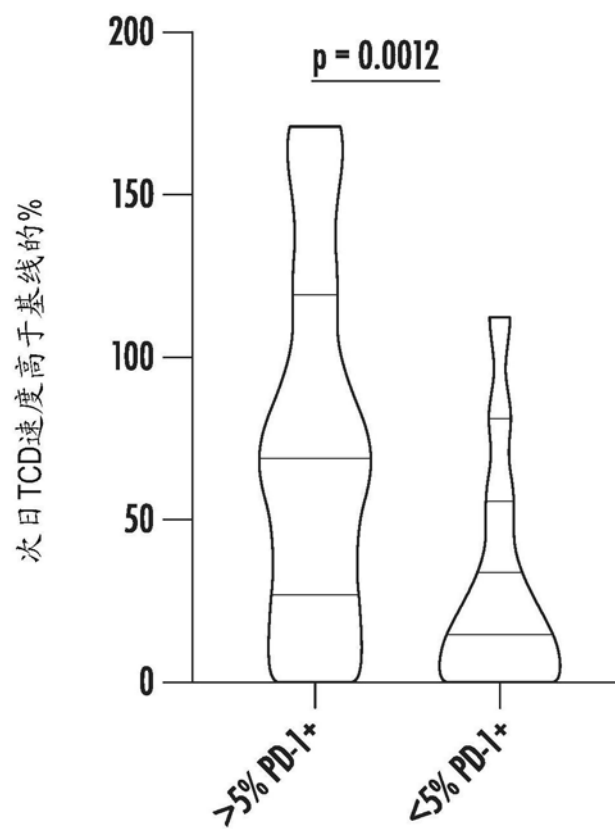


图3E

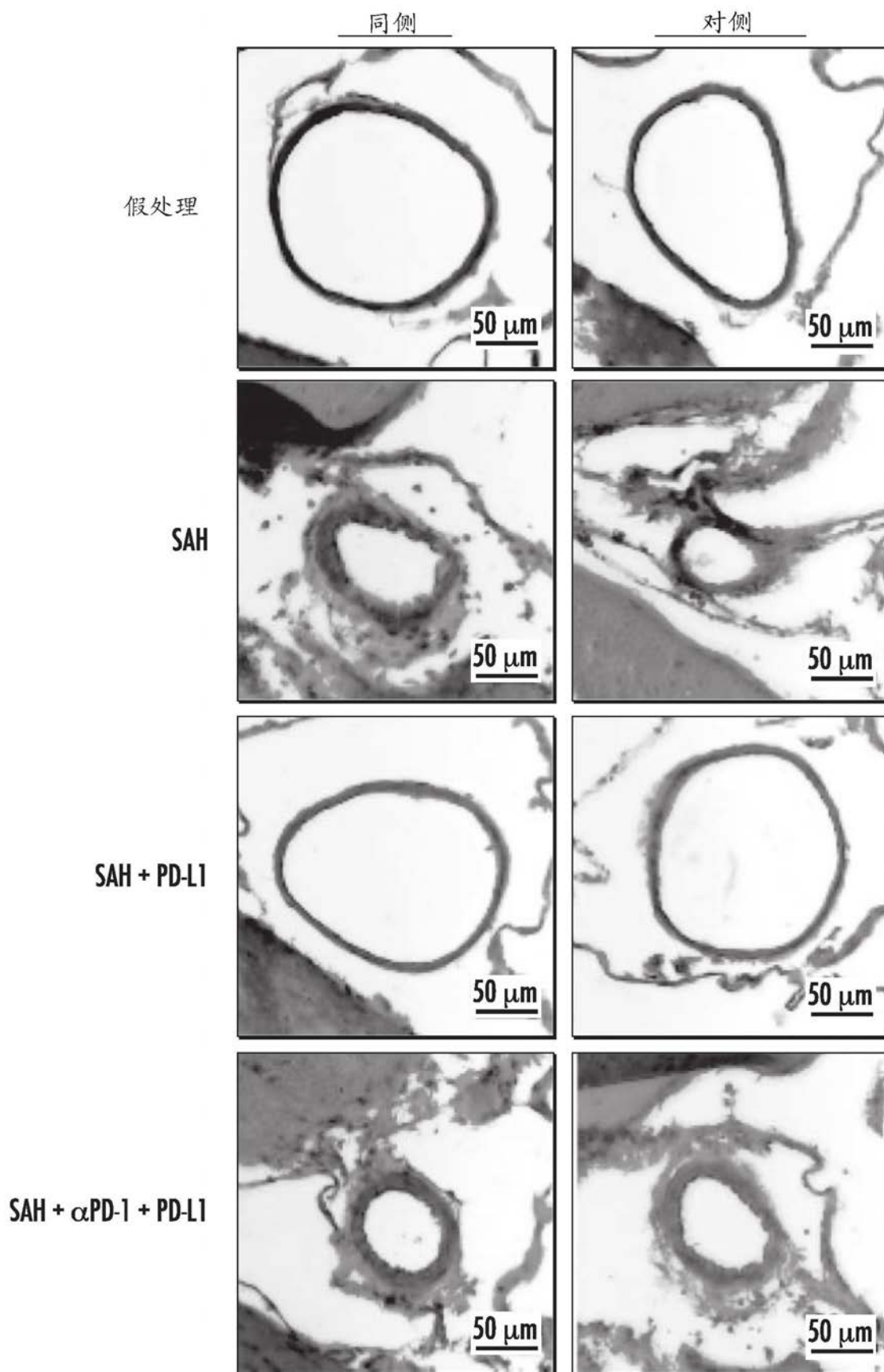


图4A

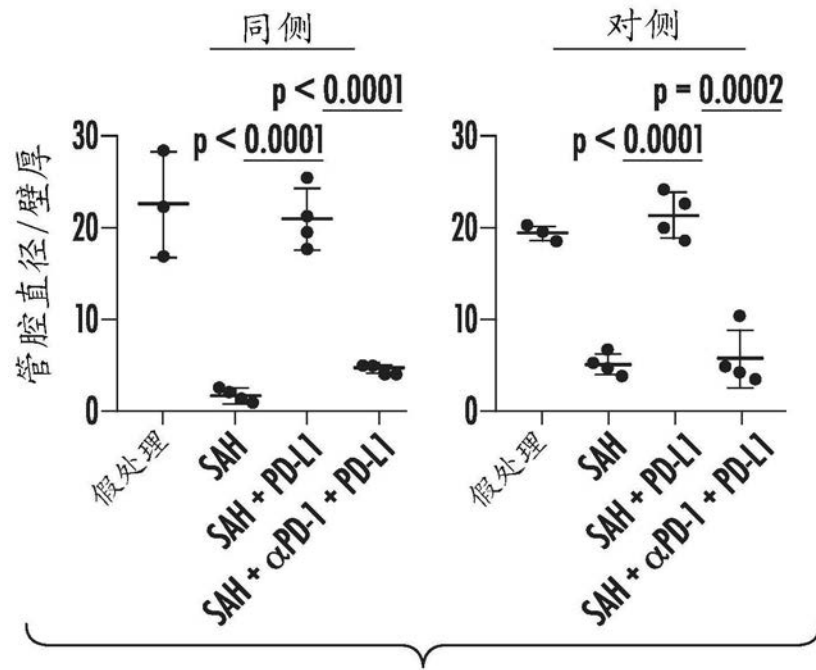


图 4B

图4B

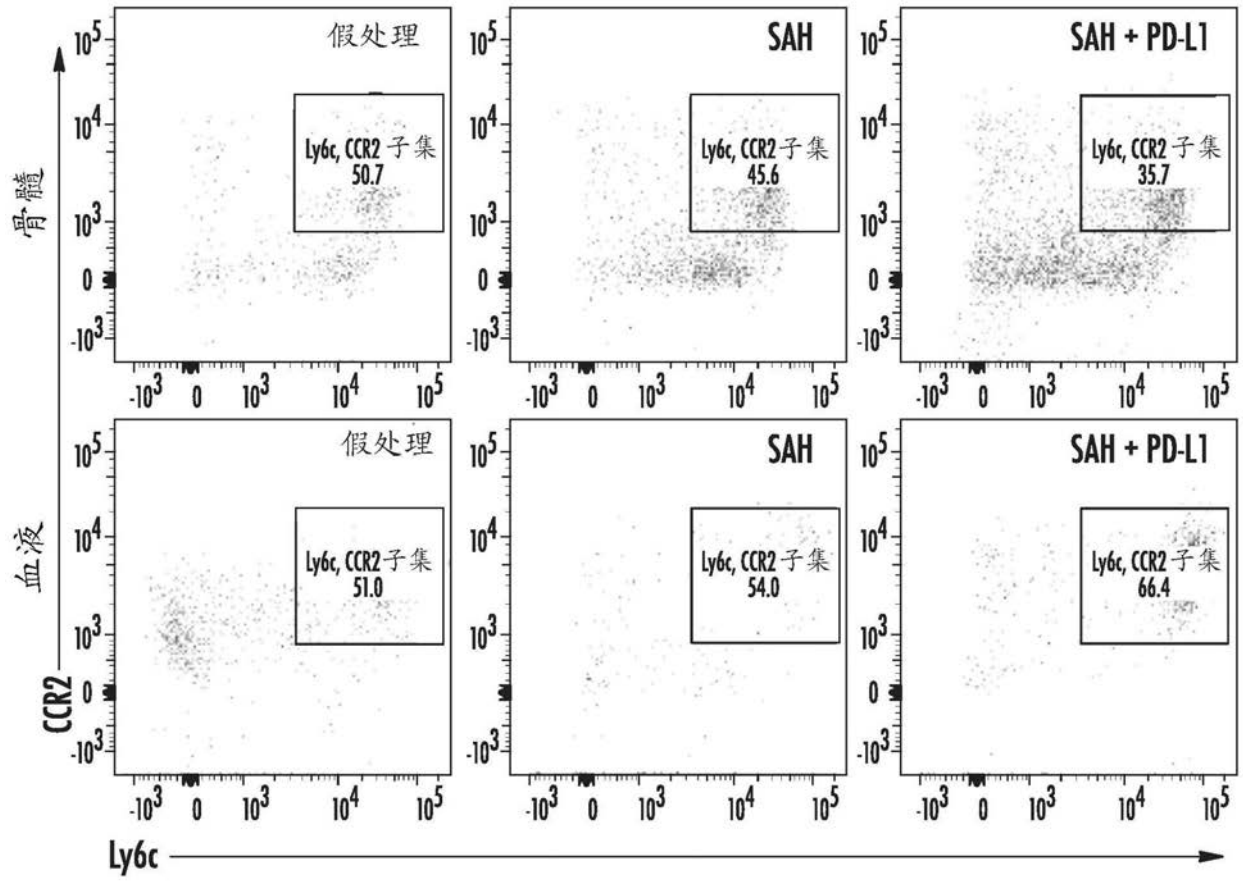


图4C

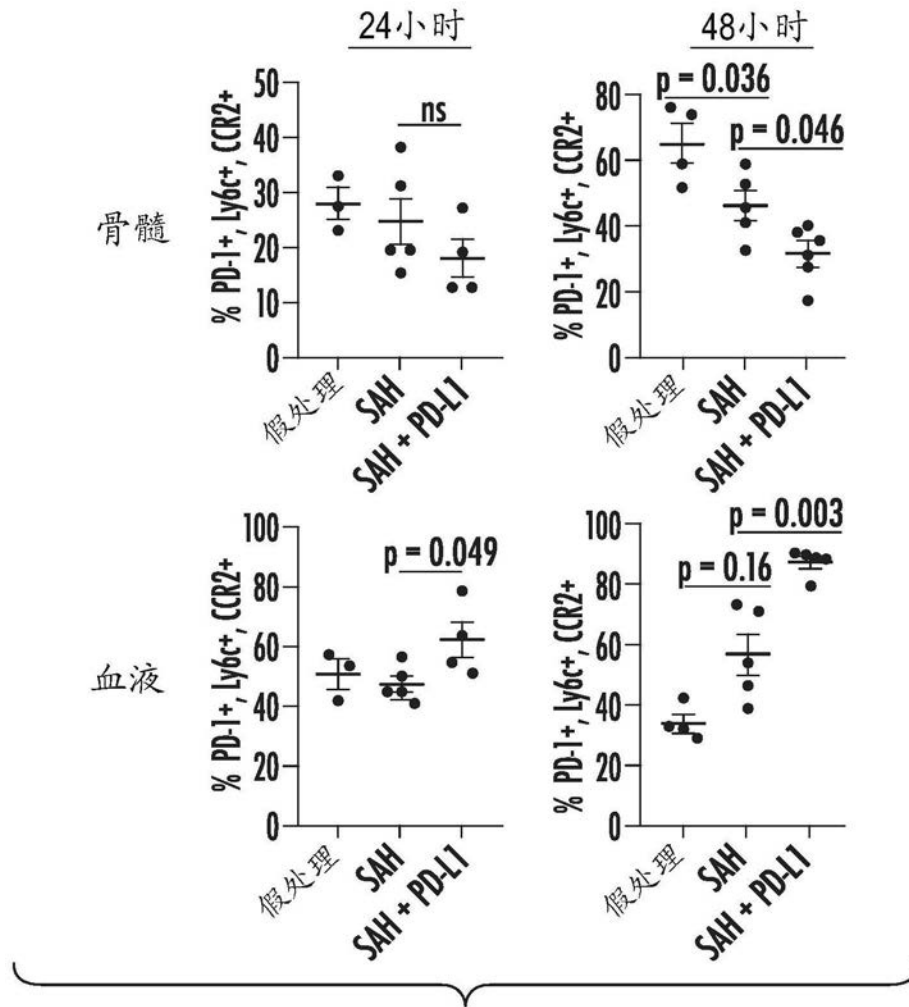


图 4D

图4D

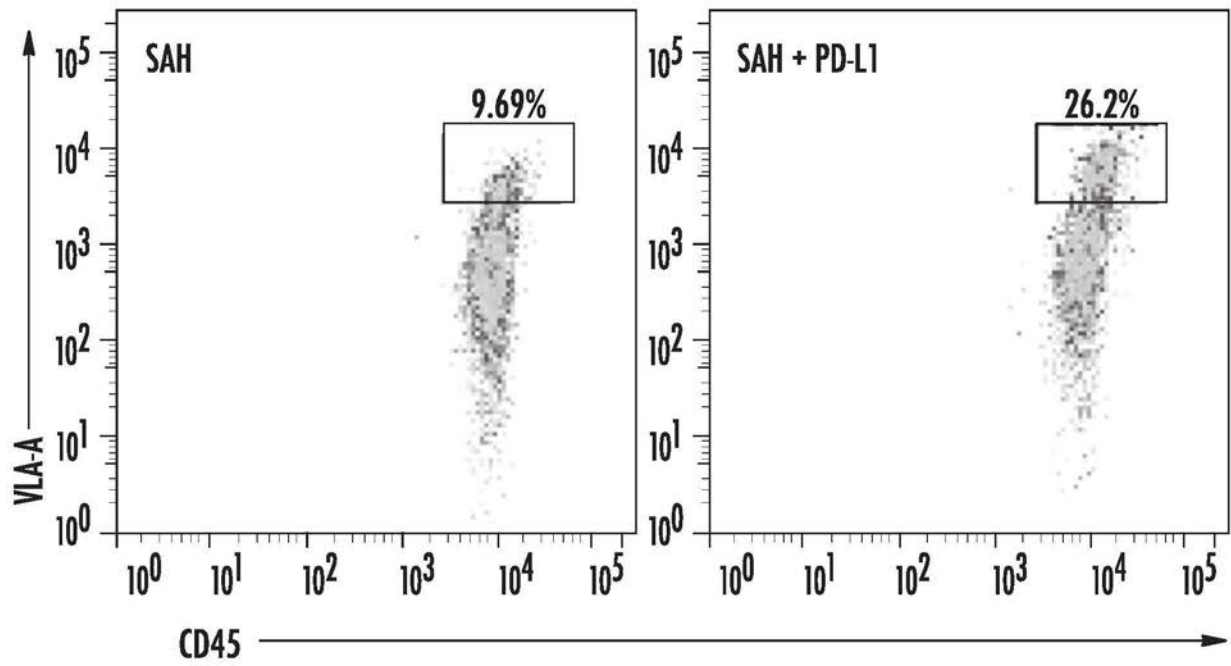


图4E

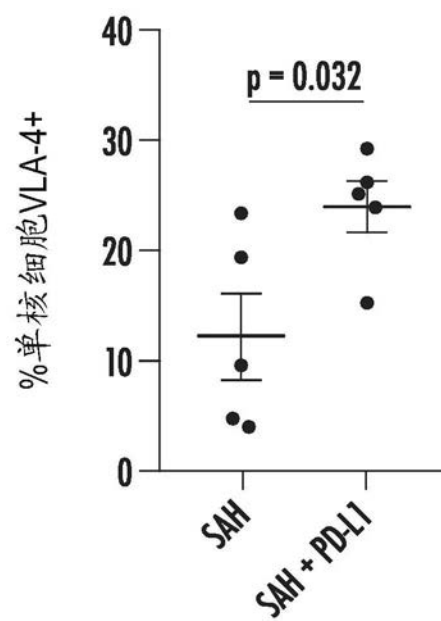


图4F

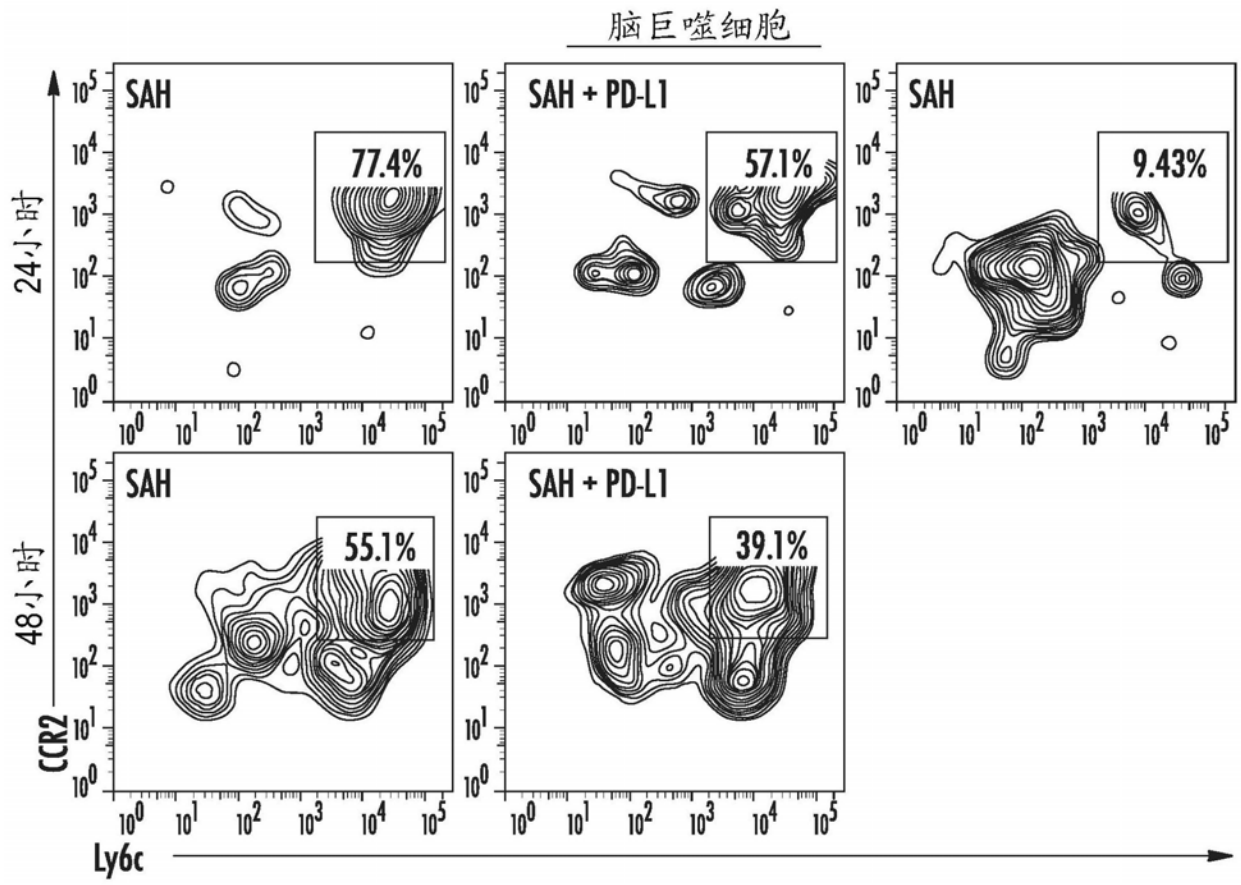


图4G

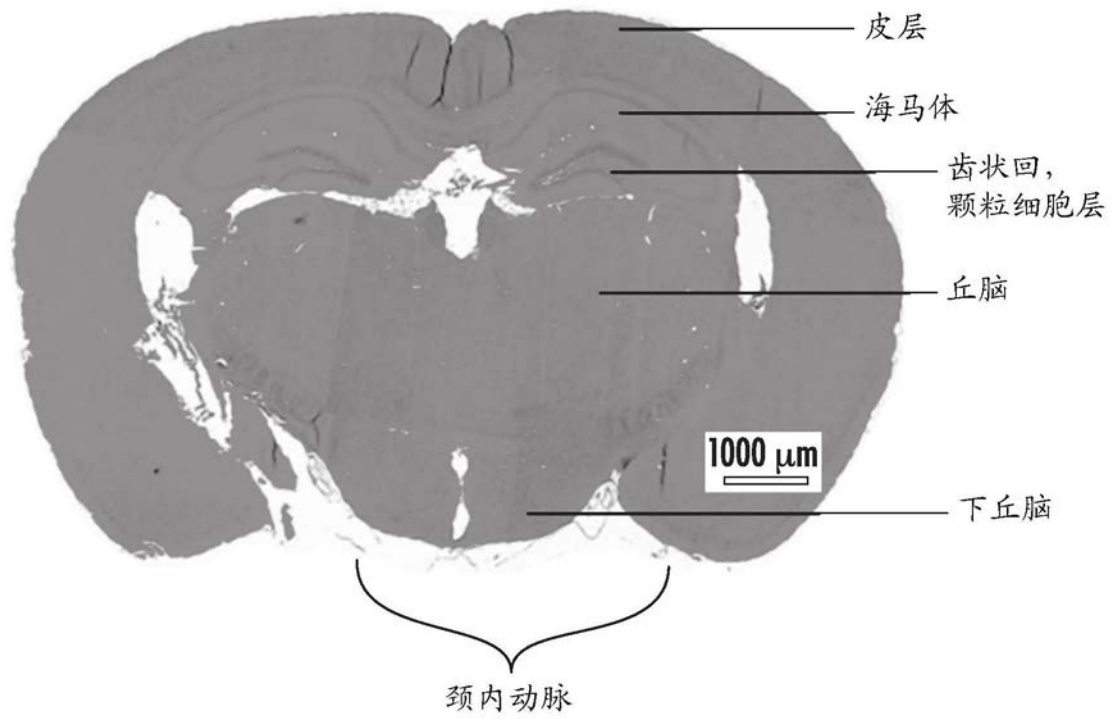


图5

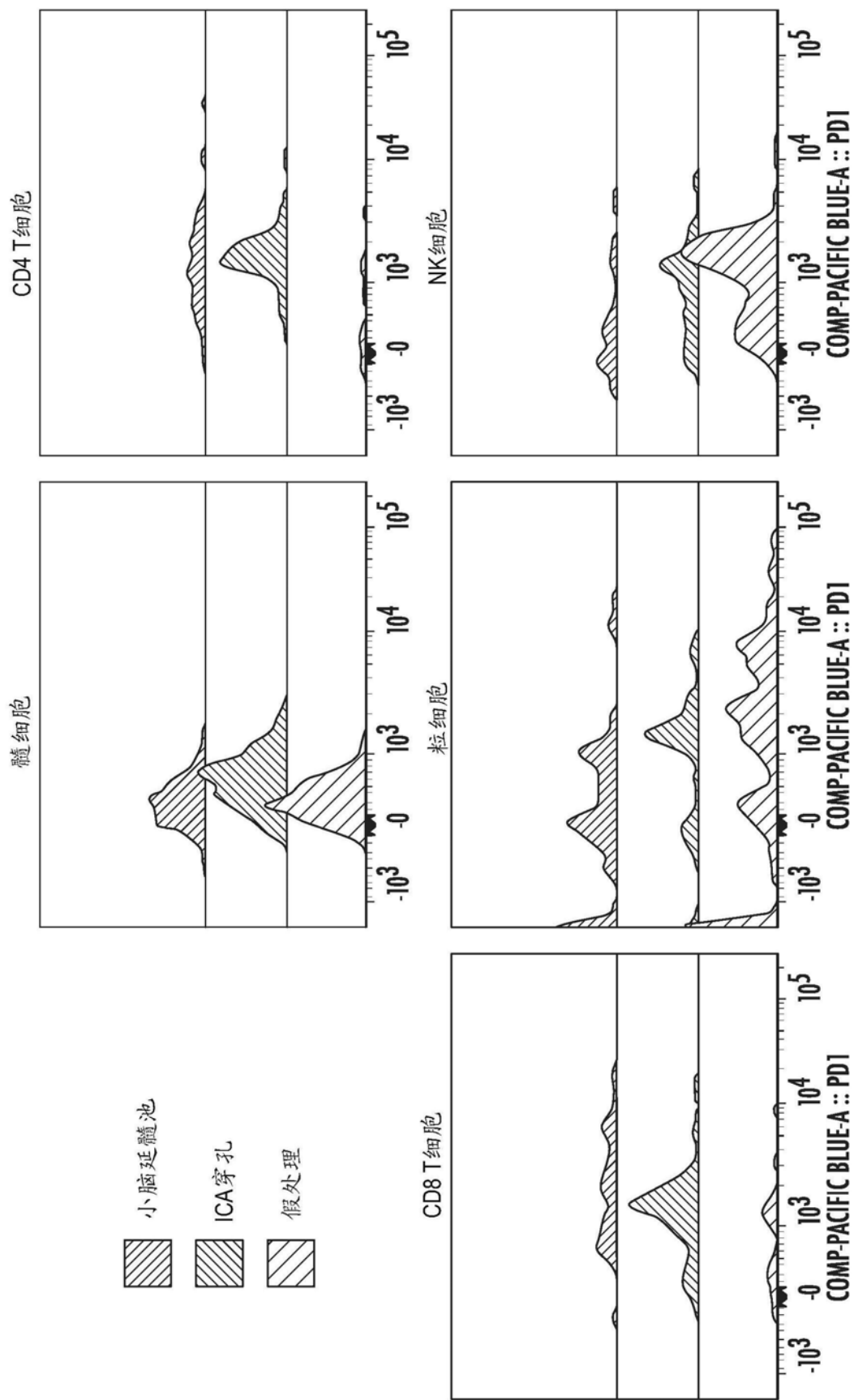


图6A

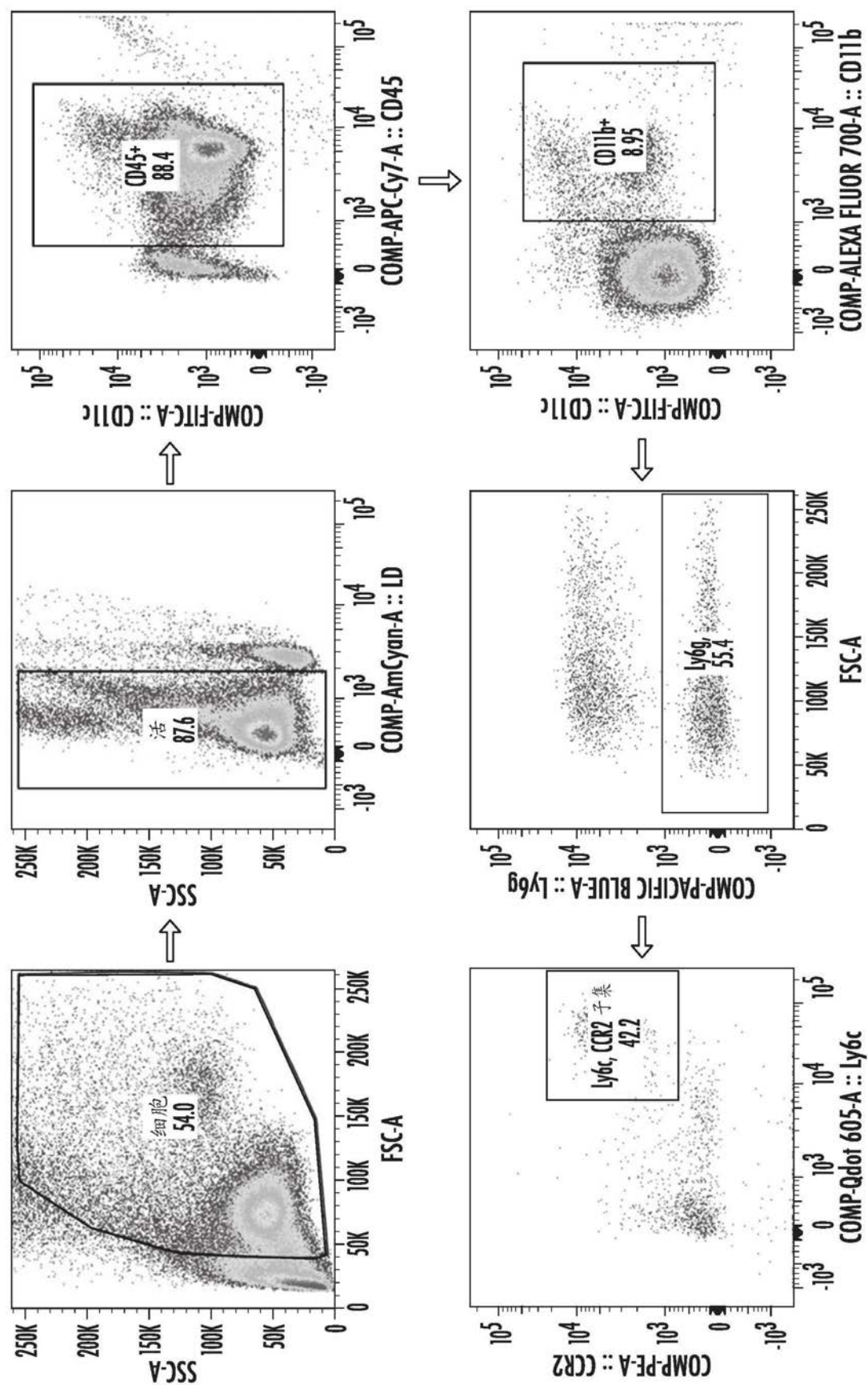


图6B

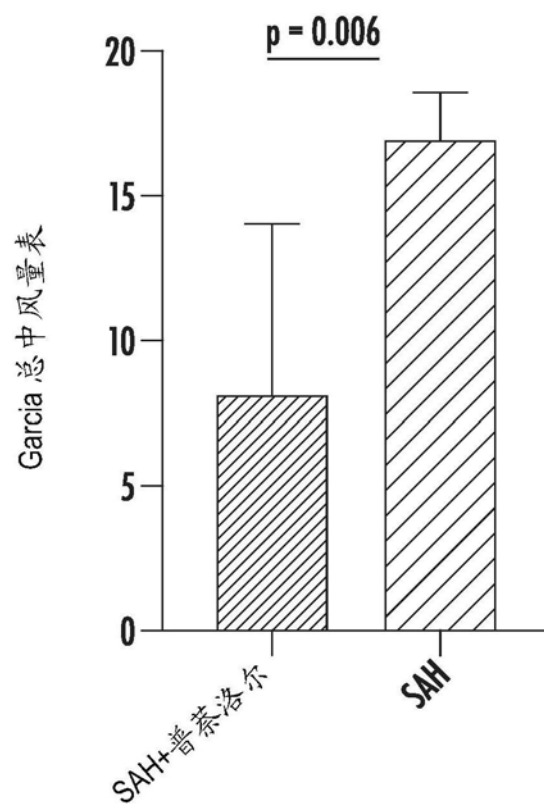


图7

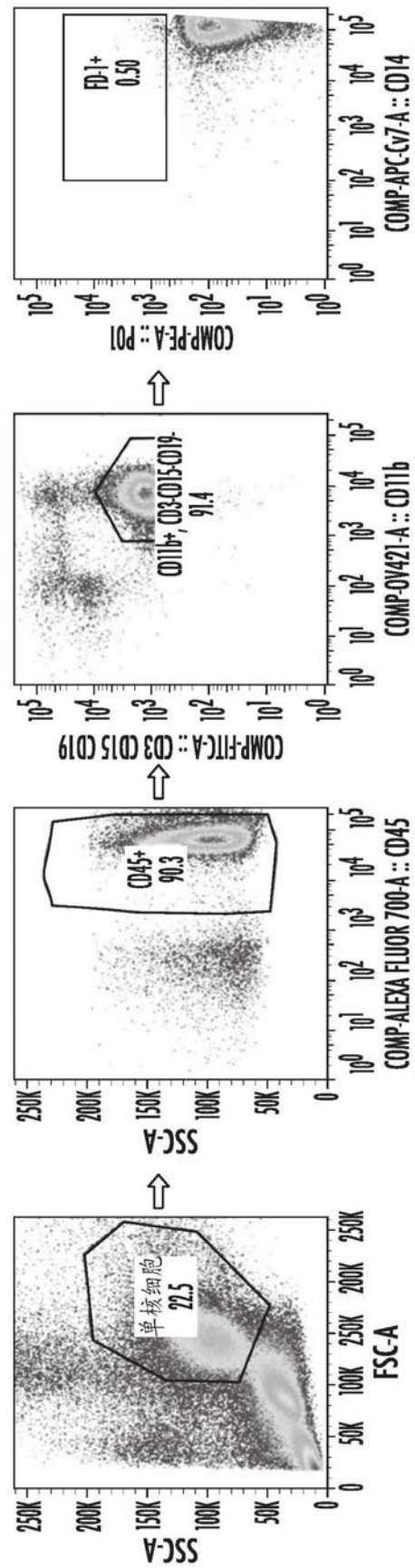


图8

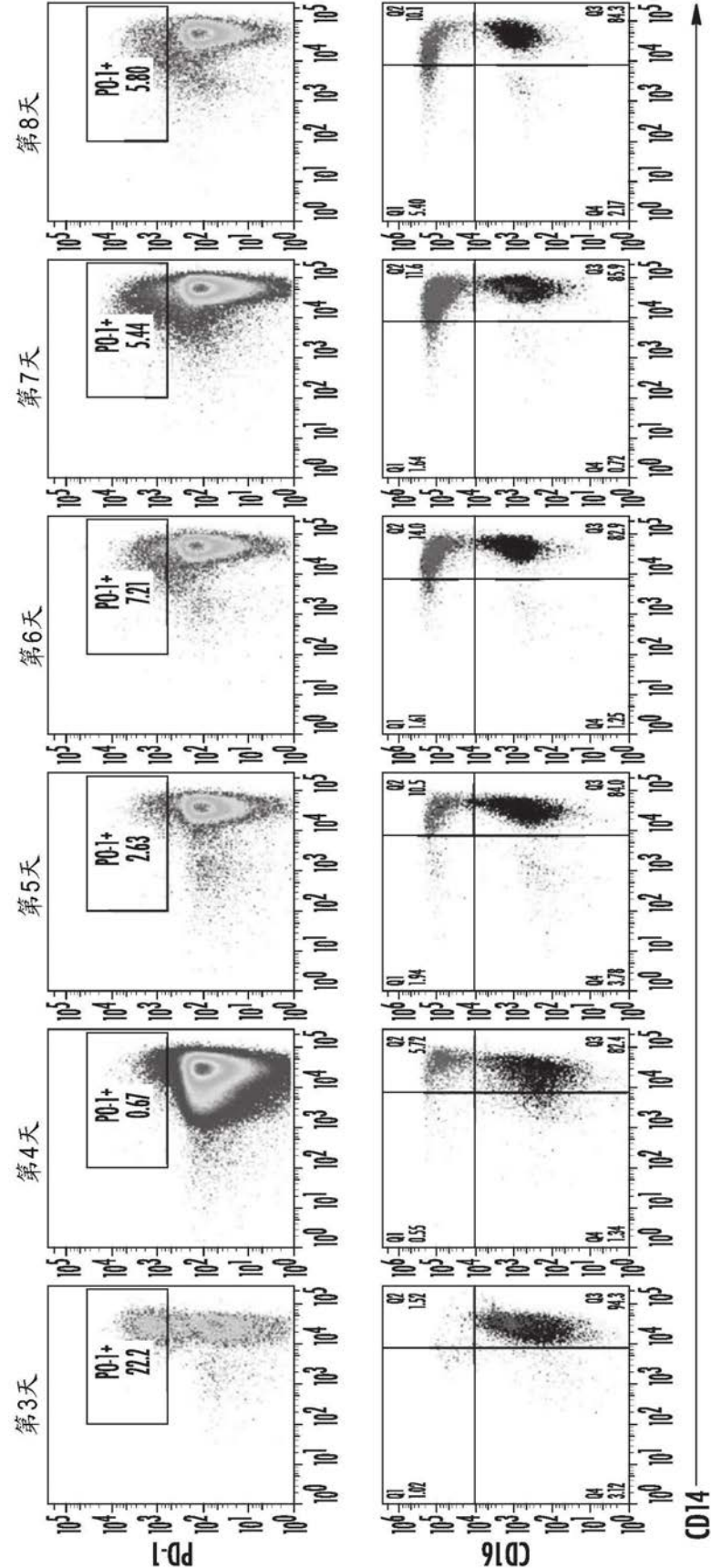


图9

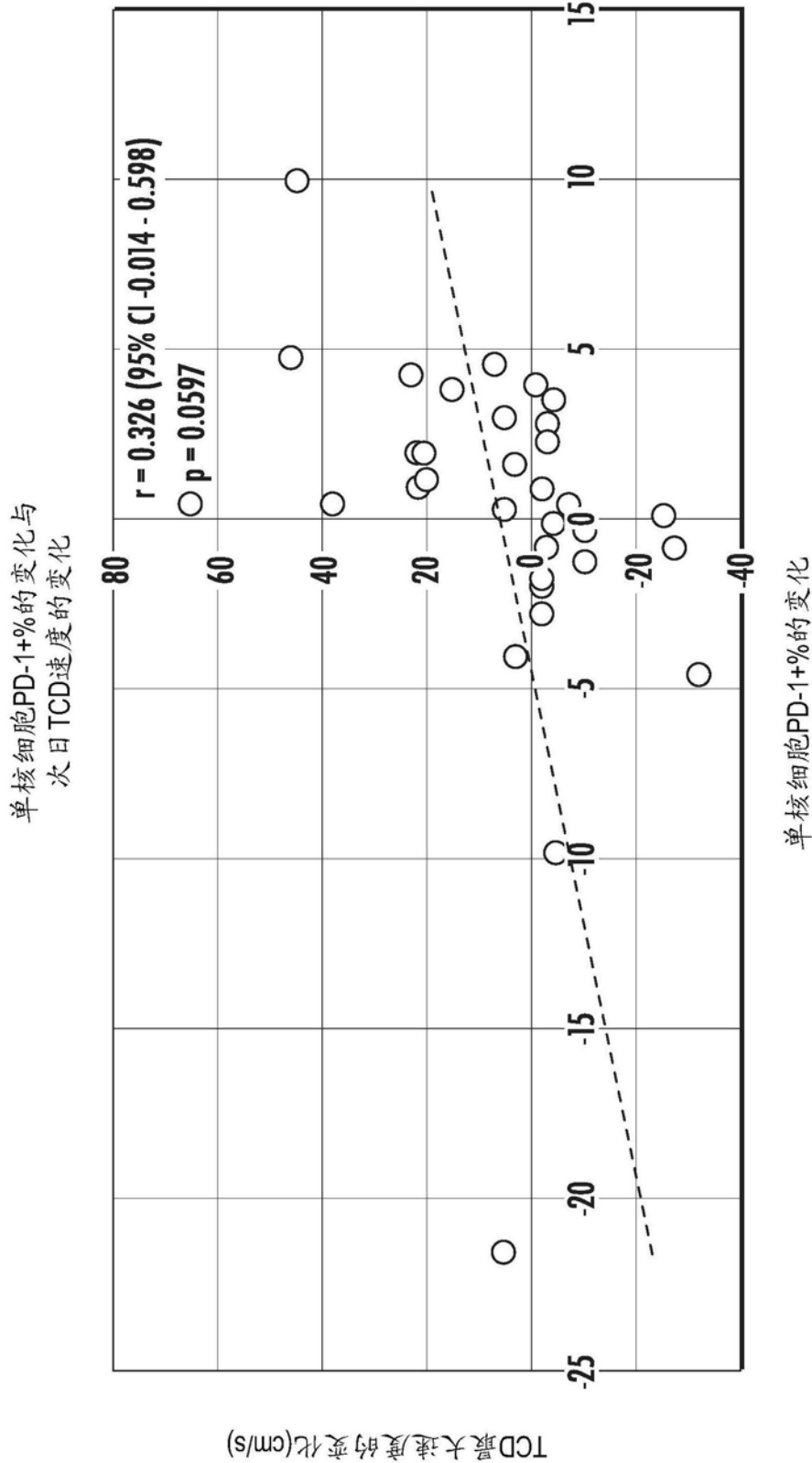


图10

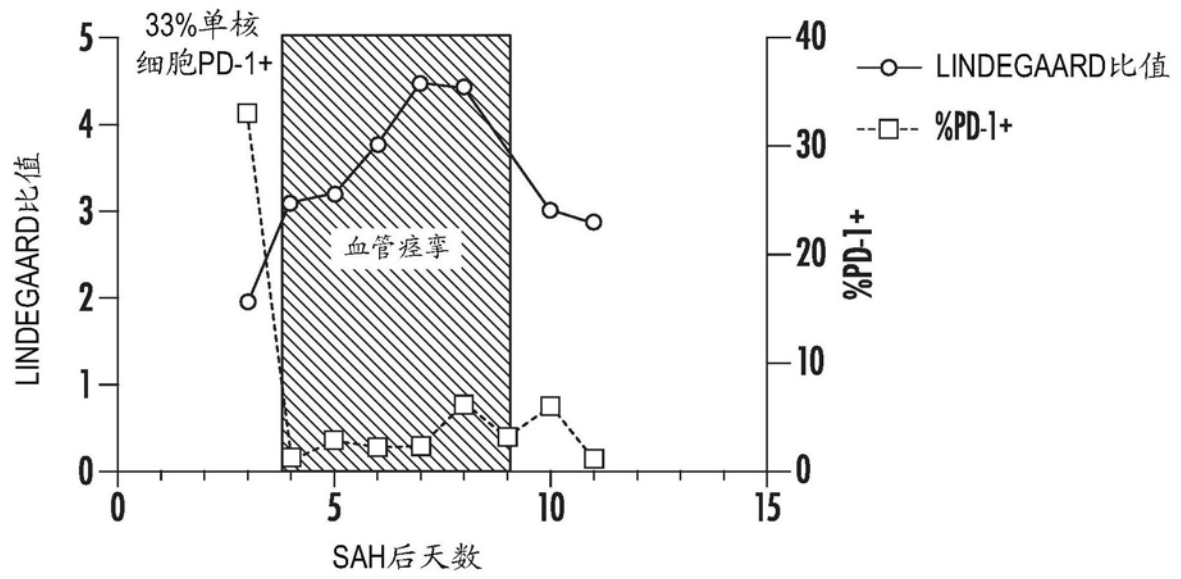


图11

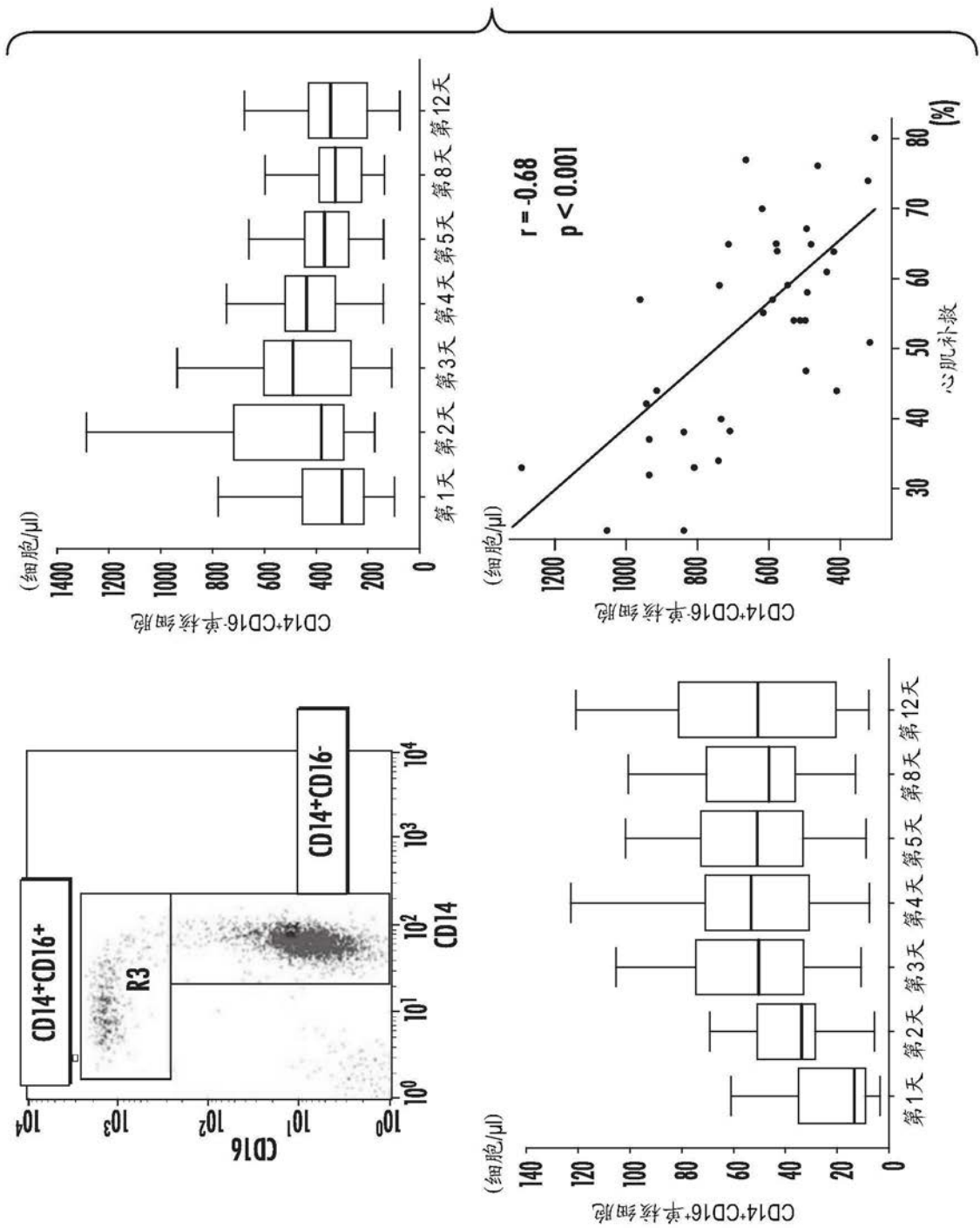


图12