



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112386680 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 24

(21) 申请号 202010961246.0

(22) 申请日 2014.11.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112386680 A

(43) 申请公布日 2021.02.23

(30) 优先权数据
61/901,151 2013.11.07 US

(62) 分案原申请数据
201480072525.4 2014.11.07

(73) 专利权人 纪念斯隆-凯特林癌症中心
地址 美国纽约州
专利权人 亿一生物医药开发(上海)有限公司

(72) 发明人 马塞尔·范登布林克
艾伦·哈纳斯 卡洛琳·林德曼斯
汤姆·唐

(74) 专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理有限公司 11467

专利代理师 金星

(51) Int.Cl.
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2001023070 A1,2001.09.20
Alan M. Hanash等.Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immunemediated tissue damage and regulates sensitivity to graft vs. host disease.Immunity.2012,第37卷(第2期),第339-350页.

审查员 崔娟娟

权利要求书1页 说明书37页 附图48页

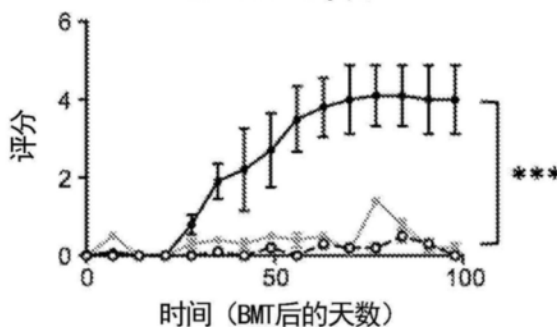
(54) 发明名称

在胃肠道移植物抗宿主病的治疗中使用IL-22的方法

(57) 摘要

本发明提供了用于使用IL-22来治疗如移植物抗宿主病的肠损伤炎症病症的方法和组合物。具体而言,IL-22可以用来增强肠干细胞(ISC)恢复,并且用于增强同种异体造血移植后的免疫重建。在特别优选的实施方式中,本发明提供了在治疗组合物中使用治疗性的IL-22,包括二聚体形式的IL-22,所述治疗组合物用来治疗在造血干细胞移植患者和在患有炎症性肠道疾病患者中的移植物抗宿主病,包括肝,胸腺,胃肠或其它移植物抗宿主病。

GVHD 评分



1. 白介素-22 (IL-22) 在制备用于治疗受试者的胃肠移植物抗宿主病 (GVHD) 的药剂中的用途,所述用途包括对受试者给药治疗有效量的IL-22并且IL-22是二聚体的形式。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述IL-22包括人IL-22。
3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中在移植前将所述治疗有效量的IL-22给药到受试者。
4. 根据权利要求1或2所述的用途,其中一旦观察到与对胃肠道伤害有关的症状,将所述治疗有效量的IL-22给药到受试者。
5. 根据权利要求1或2所述的用途,其中在移植后从一天到六个月将所述治疗有效量的IL-22给药到受试者。
6. 根据权利要求1或2所述的用途,其中在移植后从一周开始至四个月将所述治疗有效量的IL-22给药到受试者。
7. 根据权利要求1或2所述的用途,其中每天给药所述IL-22。
8. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述IL-22包括通过连接序列连接到二聚化结构域的两个IL-22结构域。
9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述二聚化结构域包括至少部分Fc片段。
10. 根据权利要求9所述的用途,其中IL-22是F-652。
11. 根据权利要求1或2所述的用途,其中IL-22是静脉给药的。
12. 根据权利要求1或2所述的用途,其中IL-22不引起免疫抑制。

在胃肠道移植物抗宿主病的治疗中使用IL-22的方法

[0001] 交叉引用相关申请

[0002] 本申请请求2013年11月7日提交的美国临时申请No.61/901,151 的优先权,该申请的全部内容全部并入本文。

[0003] 政府权利声明

[0004] 根据美国国立卫生院授予的授权号K08 KHL115355A和P01 CA023766,本发明是在美国政府支持下进行的。美国政府对本发明具有一定的权利。

技术领域

[0005] 本发明提供了使用IL-22来治疗例如移植物抗宿主病的肠道损伤病症和炎症病症的方法和组合物。具体而言,IL-22可以用来增强肠干细胞(ISC)的恢复,并且在同种异体造血移植后用于增强免疫重建。在特别优选的实施方式中,本发明提供了在治疗组合物中使用治疗性IL-22,包括二聚体形式的IL-22来治疗在造血干细胞移植患者中和在患有炎症性肠道疾病的患者中的移植物抗宿主病,包括肝,胸腺,胃肠或其它移植物抗宿主病。

背景技术

[0006] 在胃肠道移植物抗宿主病(GI-GVHD)中从免疫介导损伤调节宿主组织恢复的机制尚未完全明了。目前降低临床GVHD的策略具有限制移植后免疫功能和治疗的(有利)移植物抗白血病/淋巴瘤(GVL)反应的不良影响。特别值得关注的是在患有移植物抗宿主病(GVHD)期间肠上皮组织的维护和再生,因为GVHD导致肠道细胞病态,其干扰肠道功能。

[0007] GI GVHD是同种异体造血干/祖细胞移植后导致急性GVHD相关死亡的主要因素。

[0008] 因此,仍然需要移植后的对策用来在同种异体造血干/祖细胞移植(allo-HCT)后选择性地促进肠上皮再生以降低GVHD而不限制治疗性移植物抗白血病/淋巴瘤(GVL)的响应。

[0009] 发明简述

[0010] 本发明是基于以下观察,在同种异体骨髓移植(BMT)后在体内施用IL-22增强了肠干细胞(ISC)的恢复,减少了来自移植物抗宿主病(GVHD)的肠病态并且改善了移植后的整体存活率而不增强干细胞区(niche)的功能或改变同种异体反应(alloreactive)免疫。IL-22从免疫介导病理方面通过加速ISC池的再生增强了ISCs的恢复。IL-22直接增加了Lgr5+ISCs在体内和体外的增殖。这导致了成熟上皮的加速恢复,而不通过干细胞区增加生长因子的产生。

[0011] 因此,本发明在一个方面涉及一种用于提高肠干细胞(ISC)生长/增殖的方法,该方法包括用外源或重组白介素-22(IL-22)或二聚体、融合蛋白或其缀合物,在一定条件下接触ISC以促进ISC在体内或体外的生长。在一些实施方式中,ISC是Lgr5+细胞。

[0012] 在一个相关的方面,本发明涉及到一种在受试者的胃肠道(GI)的上皮层受到损害后用于促进胃肠上皮细胞的恢复/再生的方法,该方法包括用IL-22或二聚体,融合蛋白(例如Fc融合蛋白)或其缀合物接触受试者的肠干细胞。对胃肠道的损害可能由于炎症性

肠疾病, (例如炎性 肠病, 溃疡性结肠炎, 克罗恩病) 辐射, 肠自身免疫性疾病或移植 (GVHD)。

[0013] 在另一方面, 本发明涉及一种用于治疗移植后的受试者中GVHD的 方法, 该方法包括将治疗有效量的IL-22或二聚体, 融合蛋白或其缀合 物给药至受试者。该方法并不需要免疫抑制以达到其治疗效果。

[0014] 在一个方面, 本发明涉及一种方法, 其中本领域的技术人员一旦观 察到与肠损伤相关的症状发作, 就开始给药IL-22。在一个实施方式中, 移植后从1天开始至6个月将IL-22给药到受试者; 在一个实施方式中, 移植后从1周开始至4个月将IL-22给药到受试者。

[0015] 在另一个方面, 本发明涉及在肠上皮细胞的恢复/再生中使用的或在 GVHD的治疗或预防/抑制中使用的IL-22或二聚体, 融合蛋白或其缀合 物。

[0016] 术语

[0017] 为了便于理解本发明, 许多术语和短语定义如下:

[0018] 本文所用的术语“IL-22多肽”或“IL-22”或“IL22”或“IL-22蛋 白质”是指能够产生本文所述的生物活性的生物活性多肽。本发明的 IL-22包括但不限于人IL-22, 重组人IL-22, 小鼠IL-22和/或重组小鼠 IL-22。特定多肽序列在美国专利申请NO.US2003/0100076, 美国专利 7,226,591和美国专利6,359,117中进行了描述, 并且其全文以引证的方 式并入本文。IL-22还包括修饰IL-22, 例如聚乙二醇化的IL-22和共价 修饰IL-22蛋白质。本文所用的IL-22多肽可以从多种来源, 例如人类组 织类型或从其它来源中分离出来, 或通过重组或合成方法进行制备。例如, 抗体的制备、纯化、获得、形成的描述, 给药、组合 物、疾病的治 疗等单独涉及到本发明的每个多肽。此外, 在本发明中使用的IL-22可 以是重组方法的产物, 其中将编码DNA的IL-22给药到受试者, 例如, 乳杆菌表达IL-22。术语“IL-22多肽”还包括IL-22多肽的变体。本发 明的IL-22也可以以一种方式进行修改以形成包括彼此融合的IL-22, 异 源多肽或氨基酸序列的嵌合分子。如本文所用的术语IL-22包括单体形 式和二聚体形式的IL-22。然而, 除非本文另有规定, 在这些方法中使用rIL-22。IL-22也 被称为白介素-10相关的T细胞来源的诱导因子 (IL-TIF)。

[0019] 本文所用的术语“IL-22单体”是指一个IL-22蛋白质单元。

[0020] 本文所用的术语“IL-22二聚体”是指具有多于一个IL-22分子单元 的蛋白质, 例如, IL-22二聚体可以具有使用如短多肽, 化学键和共价键 的连接连接在一起的两个IL-22分子。在一些实施方式中, IL-22二聚体包含两个重复的IL-22分子, 在其它实施方式中, IL-22二聚体由不同的 IL-22蛋白质组成。可以发现在本发明中使用的IL-22二聚体的进一步 的 示例在美国专利申请20130171100中进行了描述, 在此其全文以引证的 方式并入本文。一种合适的IL-22二聚体是含有人白介素22 (IL-22) 并 且在由Generon (上海) 集团有限公司生产的无血清培养物中转化的中国 仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中产生的重组IL-22二聚蛋白。例如在美国专利 申请20130171100中对IL-22二聚体进行了描述, 包括序列信息, 美国 专利申请20130171100在此通过引用全部并入本文。本文所用的形成多 肽的IL-22可以从多种来源例如人组织类型或从其它来源中分离出来, 或通过重组和合成方法制备。在一些实施方式中, IL-22二聚体包括载体 蛋白, 其包括但不限于人IgG (1, 2, 3, 4) 的Fc片段或人白 蛋白。IL-22可 以位于载体蛋白的C末端或N末端。

[0021] 在一些实施方式中, 以本文所述的任何一个方法使用的IL-22二聚 体包括两个单

体单元,其中每个单体单元包括IL-22结构域和二聚化结构域。在一些实施方式中,IL-22二聚体的每个单体单元包括通过任意的连接序列连接到二聚化结构域的IL-22结构域,例如为约5至约50个氨基酸的连接序列。在一些实施方式中,二聚化结构域包括至少两个能够形成分子间二硫键的半胱氨酸。在一些实施方式中,二聚化结构域包括至少一部分Fc片段。在一些实施方式中,Fc片段包括CH2和CH3结构域。在一些实施方式中,IL-22二聚体包括两个单体单元,如美国专利申请20130171100所述,其全文以引证的方式全部并入本文。在一些实施方式中,IL-22二聚体在经脉内给药。

[0022] 本文所用的术语“移植物抗宿主”或“GVH”是指移植(供体)细胞抗宿主细胞和组织的免疫反应。

[0023] 本文所用的术语“移植物抗宿主病”或“GVHD”是指一种状态,包括急性和慢性,是由于由GVH所产生的移植(移植物)细胞对宿主细胞和组织的影响所带来的。换言之,在从干细胞发育的移植物或供体免疫细胞内输入的供体免疫细胞,可能看到患者的(宿主)细胞作为外来细胞并且由于免疫反应对抗它们。作为示例,从他人获得血液或骨髓移植的患者具有患急性GVHD的风险。甚至是与接受者HLA-匹配的供体可以引起GVHD,因为供体细胞还可以潜在地对受体的次要抗原差异做出免疫反应。急性移植物抗宿主病(GVHD)是一种特别由供体免疫细胞引起的在有同种异体骨髓或血液细胞移植患者中的病症。常受影响的组织是肠表皮和肝脏。在严重的情况下,GVHD可以引起皮肤的起泡或过度腹泻和消瘦。而且,由供体免疫细胞引起的在肝脏中的炎症可以导致引起黄疸的阻塞。其它组织例如肺和胸腺也可能受到影响。诊断通常是通过使用显微镜查看一小片皮肤,肝,胃或肠以对特定炎性特征进行观察来证实的。在严重的情况下,肝不能正常发挥功能来从体内消除废物。急性GVHD通常在移植后的前三个月开始。在某些情况下,它能够坚持,反复或在移植后三个月以上开始。强的松和/或其它免疫抑制药物用来治疗急性移植物抗宿主病。如果用强的松治疗不成功,就使用其它免疫抑制药物,即使很大比例的患者难以用免疫抑制药物治疗并且死亡。

[0024] 患有急性GVHD并且存活下来的患者具有更大的风险发展为慢性GVHD。老年患者,接受了外周血(代替骨髓)移植的患者和具有不匹配或不相关供体的患者有更大的风险患有慢性GVHD。慢性GVHD通常在移植后后期开始,并且比急性GVHD持续更长。患有慢性GVHD的患者可以呈现出各种症状。皮疹和/口腔溃疡是本病最常见的初步迹象。不像急性GVHD,慢性GVHD可能导致在眼睛中产生眼泪和在口腔中产生唾液的腺体的损伤,这会导致干眼症或口腔干燥症。患者可能患有口腔溃疡,这会在进食时引起疼痛,皮疹或肝炎。慢性GVHD也可能导致许多其它问题。其中一个问题就是在皮肤(皮肤硬化)和关节中形成疤痕组织。其它这样的问题就是对肺部中的空气通道的慢性损伤(闭塞性细支气管炎综合征)。强的松或其它类似的抗炎或免疫抑制药物用于治疗慢性移植物抗宿主病。如果用强的松进行治疗没有成功,可以使用其它免疫抑制药物。正如在急性GVHD中,大部分患者是无法治愈慢性GVHD的。

[0025] 如本文所用,术语“移植物抗白血病”或“GVL”或“移植物抗肿瘤作用”或“GVT”是指移植供体T淋巴细胞对接受者的患病骨髓和残余肿瘤细胞有益的治疗性免疫反应。

[0026] 本文所用的术语“胃肠移植物抗宿主病”和“GI-GVHD”是指由供体免疫细胞引起的对胃和小肠的宿主组织的损伤,其作为GVHD的一部分可能导致食欲不振,恶心,呕吐或

腹泻的损伤,无论是急性或慢性的。在严重的情况下,GI-GVHD可以导致腹部疼痛和胃或肠出血。

[0027] 如本文所用,术语“同种异体移植”是指从供体到宿主患者的供体 血液输注或骨髓干细胞移植。换言之,患者从组织匹配或接近匹配的供 体接受骨髓或血液的干细胞,即在主要的HLA基因位点相匹配,其可能 是亲戚或不是亲戚。同卵双胞胎同种异体移植被称为同基因移植。

[0028] 本文所用的术语“造血干细胞移植”或“HSCT”或“造血细胞移植”或“HTC”是指多能造血细胞的移植,包括干细胞,通常是来自于骨髓, 外周血或脐带血。

[0029] 本文所用的术语“同种异体HSCT”是指从一个个体到另一个个体 的多能造血干细胞的移植。这种同种异体HSCT是在患有血液或骨髓的 某些癌症患者中进行的,例如多发性骨髓瘤或白血病,先天性免疫缺陷和骨髓衰竭或其他血液疾病。在这些情况下,接受者的免疫系统通常在 移植前被辐射或化疗破坏。感染和移植物抗宿主病是HSCT的主要并 发症。

[0030] 如本文所用,术语“肠干细胞”和“ISC”是指多能干细胞,诸如 Lgr5+细胞。

[0031] 在提到肠细胞时,本文所用的术语“祖细胞”是指可能引起小肠或 大肠的细胞分化的多能细胞,例如柱状细胞和杯状细胞。

[0032] 在提到细胞时,本文所用的术语“隐窝基”是指在肠的隐窝区中发 现的多能干细胞。

[0033] 本文所用的术语“潘式细胞”或“杜夫细胞”是指在小肠和阑尾发 现的一种特殊类型的上皮细胞。潘式的细胞或潘式细胞是从肠道干细胞 衍生而来。

[0034] 在提到肠类器官时,本文所用的术语“类器官”包括从在培养基中 培养的上皮干细胞或分离的隐窝中得到的粘附有绒毛状上皮细胞的中心 腔。隐窝是指在上皮细胞基上的肠干/祖细胞区位。

[0035] 本文所用的术语“细胞”是指由半渗透细胞膜包围的核和细胞器组 成的生物体的结构单元。它并不旨在限于活的或发挥功能的细胞。

[0036] 本文所用的术语“接触”或“治疗”或“施用”化合物到细胞或组 织,例如IL-22蛋白质或IL-22蛋白质组合物或细胞因子或细胞因子组 合物等,是指将化合物放置在允许其接触细胞的位置以产生“接触”或“治 疗”细胞。所述接触可以任何合适的方法来完成。例如,在一个实施方式中,接触是通过将化合物添加至装有细胞的管来完成的。接触也可以 是通过在微量滴定板中将化合物添加至细胞来完成的。接触也可以通过将化合物添加至细胞的培养或类器官培养来完成的。它并不意味着限制 化合物如何接触细胞。在一个实施方式中,接触可以是通过在动物体内 施用化合物,例如IL-22分子组合物来完成的。

[0037] 本文所用的术语“培养基”和“细胞培养基”是指适合于支持细胞 的体外生长(即,细胞培养物)的介质。它并不意味着该术语是限于任 何特定的细胞培养基的。例如,意在定义包括生长物以及维持培养基。事实上,意在该术语包括任何适于感兴趣的细胞培养物的 生长的培养基。

[0038] 术语“样品”例如“测试样品”以其最广义使用。在一种意义上它 是指包括人细胞或组织的动物细胞或组织。在另一种意义上,它是指包 括从任何来源获得的标本或培养,特别是作为生物样品。生物样品可以 从动物(包括人)中获得,并且包括液体,固体,气体,

组织,细胞,血液骨髓和骨骼。

[0039] 如本文所用,术语“初级隔离”是指从样品中直接获得细胞的过程。因此,细胞初级隔离,例如直接从小鼠或人类分离用于流式细胞分析的细胞的初级隔离涉及从受试者去除组织的方法,例如骨髓样品或肠样品等,随后在例如分散酶的酶中消化。初级隔离可以使用固体或半固体琼脂培养基或在液体中完成。

[0040] 当提到细胞群时,本文所用的术语“部分”(如在“部分肠细胞中”或“部分骨髓细胞中”)是指至少一个细胞,这些细胞高达99%的群。例如,其中接触导致至少一“部分”的所述细胞群,应该明确的是部分是关于细胞群的。

[0041] 本文所用的术语“多肽”或“蛋白质”是指一种氨基酸,氨基酸序列,寡肽,肽或蛋白质或它们的一部分,无论天然存在的还是合成的。

[0042] 当提到蛋白质时,本文所用的术语(如“在一部分给定蛋白质中”)“部分”是指该蛋白质的片段。所述片段在大小上可以在从四个氨基酸残基到整个氨基酸序列减去一个氨基酸的范围内。

[0043] 本文所用的术语“TBI”是指如本文所述的“全身照射”。

[0044] 在提到细胞时,本文所用的术语“淋巴”是指这些淋巴谱系,例如T细胞,B细胞和NKT(天然杀伤T)细胞。

[0045] 在提到细胞时,本文所用的术语“髓系”是指髓样细胞谱系的这些细胞,例如巨噬细胞(和单核细胞),粒细胞(包括嗜中性粒细胞,嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)。

[0046] 本文所用的术语“所改变的功能”是指功能上的改变,或者是增加一种功能或者是减少一种功能,例如在细胞数量上的改变,例如总胸腺细胞,在细胞类型上的改变,例如前B细胞数量的改变,在CD8+细胞数量上的改变,在功能上的改变,例如能够分泌特定细胞因子或诱导特定细胞类型的存活或成熟的上皮细胞等。

[0047] 出于本发明的目的,“增加”或“增加的”或“上调”或“增强”或“显示增加的功能”或“增加的功能”,或相对于功能的“增强”是指相对于对照或野生型,作用或细胞类型的更高水平,例如增加数量的特定细胞类型,即成熟功能性肠细胞,成熟的功能性T细胞或一定量的化合物。增加的功能可能会增加细胞类型,例如当“潘式细胞产量增加”时或当“淋巴样细胞产量增加”时等,例如如本文所述用IL-22治疗肠细胞增加基底隐窝细胞,潘式细胞等的产量,和当在体内治疗骨髓细胞时,骨髓细胞增加的细胞功能增加淋巴样细胞,例如增加未成熟的B细胞,前B细胞等,髓样细胞类型例如粒细胞,巨噬细胞等。因此,在GVL期间从骨髓增加成熟功能性淋巴样细胞的示例增加了(增强)至少一种淋巴细胞类型的数量,例如未成熟的B细胞,前B细胞等。此外,预期增强的或增强免疫功能的示例也可以指增强免疫能力,例如方法,其中用包含促使免疫功能增加的IL-22的组合物治疗患有降低的免疫功能的免疫功能不全的患者,例如降低的T-细胞抗原受体谱,降低的细胞因子的分泌,降低的对抗原的增殖反应等。增加的免疫功能可以作为T-细胞抗原受体谱,细胞因子分泌,对抗原的增殖反应,对感染的反应能力等中的任何一项中的增加进行测定。

[0048] 出于本发明的目的,“减少”或“减少的”或“降低”或“降低的功能”或“下调”或“具有降低功能”是指相对于对照或野生型,产量的较低水平,使得“细胞具有降低的功能”例如减少的细胞分裂,减少的分化为分化的细胞类型的子代细胞的数量,例如减少的从肠干细胞和肠祖细胞等产生的潘式细胞的数量。降低功能的其它示例可以是细胞因子生产的

降低,即IL-22在敲除(KO)小鼠相对于IL-22+/+或野生型小鼠。作为其它示例,降低的功能是产生更少数量的成熟功能性胸腺细胞的胸腺上皮细胞,减少的功能是产生降低数量的成熟功能性淋巴样细胞的骨髓细胞,骨髓来源的干细胞减少了淋巴样细胞的数量。换言之,降低的功能也可以是改变的功能,例如,改变的骨髓免疫细胞的产生可能显示出骨髓来源的干细胞具有(或产生)降低的淋巴样细胞。具有降低的功能并不意味着是静态结果。在一些实施方式中,接触或施用本发明的IL-22组合物可能改变功能,例如当IL-22诱导具有降低功能的细胞以显示增加的功能时,参见实施例。

[0049] 本文所用的术语“体外测定”是指任何用于测定细胞或细胞亚型功能或数量的增加或减少的体外测定。对于类器官培养物的体外测定的读数可以包括例如肠干细胞子代的流式细胞术测量,例如基底隐窝细胞。对于免疫功能的体外测定的读数可以包括例如T细胞功能测定法,包括细胞因子产量,T细胞亚型,粒细胞,基质细胞,增殖,凋亡的程度等,参见在示例中使用的测定。

[0050] 本文所用的术语“受试者”是指任何包括但不限于人类,非人灵长类动物,啮齿类动物等的动物(例如,哺乳动物),其成为特定治疗的接受者。通常,术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,特别是相对于“人类受试者”。出于本发明的目的,受试者可以是免疫功能不全的,即不能够抵抗感染或控制异常细胞生长。免疫功能不全的受试者的示例包括具有以下任一条件的受试者,化疗,暴露于辐射,蓄意照射,人免疫缺陷病毒感染,移植等。

[0051] 术语“治疗(treatment)”,“治疗(treating)”等在本文中用来一般性意指获得所需的药理学和/或生理学效果。相对于受试者的治疗性治疗,就完全地或部分地预防疾病或其症状而言,其效果可能是预防性的,和/或就部分地或完全地治疗疾病和/或归因于该疾病的不利影响而言,其效果可能是治疗性的。因此,“治疗”是指治疗性治疗和预防性或防范性措施,其中目的是防止或减缓(减轻)靶向病态状况或病症。需要治疗的受试者包括那些已经患有病症以及那些倾向于患有病症或那些要防止疾病的受体。

[0052] 当参照本发明的方法时,本文所用的术语“治疗”涵盖在哺乳动物特别是人中的疾病的任何治疗,并且包括(a)预防疾病在受试者中发生,受试者可以是易患疾病但还尚未诊断为患病的;(b)抑制疾病,即阻止其发展;或(c)减轻疾病,即使疾病消退。本发明针对治疗具有医学病症的患者,医学病症涉及来自与例如辐射,化学疗法,免疫抑制等疾病的相关的治疗的免疫能力的损伤。因此,本发明的治疗将涉及预防,抑制或减轻任何医学病症,其中免疫活性的所需水平将通过使用本发明的IL-22化合物来实现。在某些实施方式中,治疗是指将受试者暴露于针对治疗一种疾病的治疗,例如辐射,化学疗法等。

[0053] 本文所用的术语“施用”或“给药”是指给予药物,前药,药物组合物或其它药剂或治疗性治疗(例如,本发明的组合物)到生理系统(例如,在受试者的体内,体外或离体细胞,组织和器官中)的行为。施用到人体上的可接受途径是通过眼睛(眼),口腔(口),皮肤(透皮),鼻(鼻内),肺(吸入剂),粘膜(例如,口腔粘膜或颊),直肠,耳,通过注射(例如,静脉内,皮下,瘤内,腹膜内等)等。施用“结合”一种或多种其它治疗剂包括以任何顺序同时(共同)和连续施用。

[0054] 在提到组合物时,本文所用的术语“药物”或“治疗的”是指活性剂(例如,以有效量)(例如,IL-22蛋白或IL-DNA)与惰性或活性载体的组合物,这使组合物特别适合用于在

体外、体内或离体(体外)诊断或治疗。

[0055] 本文所公开的多肽或兴奋剂或其拮抗剂的“有效量”是其量足以进行一个具体说明的目的。相对于所阐述的目的,“有效量”可以凭经验并且以常规方式来确定。在使用该药物组合物时有效量的示例,将本发明的IL-22二聚体的安全且有效的量施用到有需要的哺乳动物(例如人),在其中给药剂量是药学上可接受的有效给药剂量。作为一个示例,适用于60kg的人的给药剂量通常是0.01-300mg,在优选实施方式中给药剂量是0.5-100mg,参见例如美国专利20130171100,其全部内容以引证的方式并入本文。

[0056] 本文所用的术语“药学上可接受的载体”是指任何标准的药物载体,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液,水,乳剂(例如,如油/水或水/油乳剂),和各种类型的润湿剂,任何和所有溶剂,分散介质,包衣,月桂基硫酸钠,等渗和吸收延迟剂,崩解剂(例如,马铃薯淀粉或淀粉羟基乙酸钠)等。该组合物还可以包括稳定剂和防腐剂。载体,稳定剂和助剂的示例在本领域中进行了描述(参见例如Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975),其全部内容以引证的方式并入本文)。

[0057] 本文所用的术语“药学上可接受的”或“药理学可接受的”是指当施用到受试者时基本上不产生不良反应(例如,毒性,过敏,或免疫反应)的组合物。本发明的用于施用的IL-22的形式的示例包括油膏,粉剂,贴片,喷雾剂,和吸入剂。

[0058] 本文所用的术语“细胞因子”是指在生物体中作为信号化合物使用的蛋白或糖蛋白。它旨在包括同系物和合成版本。示例包括IL-22, IL-23, IL-21, IL-10家族, IL-7, 干扰素(IFN)家族, CC趋化因子, CXC趋化因子等。

[0059] 本文所用的术语“生物活性多肽”是指保持所需生物活性的任何多肽,如本文所述的生物IL-22活性物质,例如增加肠干细胞和肠祖细胞分裂,成熟等。

[0060] 其中本文中列举的“氨基酸序列”是指天然存在的蛋白质分子的氨基酸序列,“氨基酸序列”和类似术语,例如“多肽”和“蛋白质”并不意味着将氨基酸序列限制为与列举的蛋白质分子相关的完整的,天然氨基酸序列。如本文所用术语“重组蛋白”或“重组多肽”是指由重组DNA分子(例如,由含有表达人IL-22基因的质粒或病毒的细胞表达的人IL-22)表达的蛋白分子。

[0061] 本文所用的术语“重组DNA分子”是指包含通过分子生物学技术的方式接合在一起(例如,连接到质粒DNA序列或病毒序列的人IL-22基因)的DNA的片段的DNA分子。

[0062] 本文所用的术语“核酸分子编码”,“DNA序列编码”,和“DNA编码”是指脱氧核糖核苷酸沿着脱氧核糖核酸的链的顺序或序列。这些脱氧核糖核苷酸的顺序决定氨基酸沿着多肽(蛋白质)链的顺序。因此DNA序列编码氨基酸序列。

[0063] 术语“基因”是指一种核酸(例如,DNA)序列,其包括产生多肽或前体所需的编码序列。它意在术语包括通过全长编码序列以及编码序列的任何部分编码的多肽,只要保留全长或片段化多肽所需活性和/或功能特性(例如,IL-22活性,配体结合,酶活性等)。该术语还包括结构基因的编码区和在5'和3'端位于临近编码区在任一端为约1Kb的距离的序列,使得基因对应于全长mRNA的长度。位于编码区5'并且存在于mRNA上的序列被称为“5'非翻译序列”。位于编码区3'并且存在于mRNA上(即,“下游”)的序列被称为“3'非翻译序列”。

[0064] 术语“基因”包括cDNA和基因的基因组形式。基因克隆的基因组形式包含通过被

称为“内含子”或“插入区域”或“插入序列”的非编码序列中断的编码区。内含子是转录为核RNA (hnRNA) 的基因的片段;内含子可以包含例如增强子的调控元件。将内含子从核或最初转录物除去或“剪接掉”;因此在信使RNA (mRNA) 转录物中缺乏内含子。在翻译过程中 mRNA 发挥功能以指定在新生多肽中的氨基酸的序列或顺序。

[0065] 本文所用的术语“PCR产物”,“PCR片段”和“扩增产物”是指完成变性,退火和延伸的PCR步骤的两个或多个循环后化合物的合成混合物。这些术语包括存在一个或多个靶序列的一个或多个片段的扩增的情况。

[0066] 本文所用的术语“聚合酶链反应”(“PCR”)指的是在美国专利 4,683,195,4,683,202和4,965,188中所描述的方法,其全部内容以引证的方式并入本文,其描述了一种用于提高未经克隆或纯化的基因组DNA 的混合物中的靶序列片段浓度的方法。这个用于扩增靶序列的方法包括引入大大过量的两种寡聚核苷酸引物到含有所需靶序列的DNA混合物,随后在DNA聚合酶的存在下热循环的精确序列。两个引物与它们各自的双链靶序列的链互补。为了影响扩增,将混合物变性,然后引物退火到靶分子内的互补序列。然后退火,用聚合酶延伸引物,以便形成一对新的互补链。变性,引物退火和聚合酶延伸的步骤可以多次重复(即,变性,退火,延伸构成一个“循环”;可以有許多次“循环”)以获得高浓度的所需靶序列的扩增片段。所需靶序列的扩增片段的长度由相对于彼此的引物的相对位置来确定,并且因此,该长度是可控参数。凭借该过程的重复方面,将该方法称为“聚合酶链反应”(下文“PCR”)。因为靶序列的所需扩增片段成为混合物中的主要序列(就浓度而言),将它们称为“PCR扩增”。除了基因组DNA,可以用适当的一组引物分子扩增任何寡核苷酸或多核苷酸序列。特别地,通过PCR方法本身产生的扩增片段是它们本身,是随后的PCR扩增的有效模板。用PCR能够扩增在基因组DNA中的特定靶序列的单独拷贝到由本发明的设备和系统可检测出的水平。

[0067] 本文所用的术语“扩增试剂”是指除引物,核酸模板和扩增酶之外的扩增所需的那些试剂(脱氧核糖核苷酸三磷酸,缓冲液等)。通常情况下,扩增试剂与其它反应成分放置在一起并且包含在反应容器(试管,微孔等)中。

[0068] 本文所用的术语“反转录酶”和“RT-PCR”是指PCR的一种类型,其中起始原料是mRNA。使用反转录酶将起始mRNA酶促转化为互补DNA或“cDNA”。然后该cDNA用于“PCR”反应的“模板”。

[0069] 本文所用的术语“实时聚合酶链式反应”或“定量聚合酶链反应”或“qPCR”是指测量在用于测定组织样品中的特定的DNA或RNA序列水平的mRNA的变化。它是基于在PCR产物扩增期间检测按比例产生的荧光信号的检测。例如,实时PCR测量mRNA是通过用于使用Perkin Elmer/Applied Biosystems Division 7700序列检测仪测量mRNA的变化的定量RT-PCR的Taqman™方法来完成。

[0070] 本文所用的术语“引物”是指寡核苷酸,无论是天然存在的作为纯化的限制性消化或合成产生,当该引物处于与核酸链互补的引物扩展产物合成被诱导的条件下(即在存在核苷酸和如DNA聚合酶的诱导剂且在合适的温度和pH的情况下),其能够作为合成的起始点。引物优选为用于最大效应的扩增的单链,但是可选择双链。如果是双链,引物在用于制备延长产物之前首先会经过拆链处理。优选地,引物是脱氧寡核苷酸。引物应足够长以在诱导剂存在时引导延长产物的合成。引物的确切长度取决于很多因素包括:温度、引物

来源和使用方法。

[0071] 本文所用的术语“样品模板”是指源于被分析为用于例如肠细胞中产生的IL-22的“靶”存在的样品的核酸。与此相反，“背景模板”用来指核酸，而不是可能存在或不存在于样品中的样品模板。背景模板通常是未被注意到的。它可能是携带的结果，或者它可以是由于存在寻求纯化来远离样品的核酸污染。例如，来自类器官的核酸而不是那些待检测的核酸可能在测试样品中作为背景存在。

附图说明：

[0072] 图1. 同种异体BMT/HCT后缺乏宿主衍生的IL-22增加死亡率。A, KO受体, 轻微抗原不匹配。B, KO受体, MHC不匹配。C, 抗IL-22中和抗体, MHC不匹配。D, KO骨髓, MHC不匹配。E, KO供体T细胞, MHC不匹配。F, 造血KO受体, 轻微抗原不匹配且BMT强度减小(3个月后, 通过用IL-22KO或WT同系的CD45.1 B6骨髓修复WT B6小鼠产生造血嵌合体)。数据为代表性数据(D)或2-4个独立实验数据结合。

[0073] 图2. A, WT或IL-22KO受体LP→B6 BMT/HCT的GVHD评分。(n=4-5BM无T细胞, 且n=10BM+T小鼠/组)。B, B6→BALB/c BMT两周后小肠和大肠器官培养上清液的ELISA结果。C, B10.BR→B6 BMT两周后固有层细胞的qPCR结果。D, 未进行BMT或B6→BALB/c BMT的经亚致死性辐射2周后胸腺ELISA结果。E, 同种异体BMT后有或没有GVHD的血清IL-22。F, B6小鼠肠匀浆的ELISA结果(结合两次实验数据)。G, B6→BALB/c BMT 2周后, SI固有层中的宿主CD45⁺CD3⁻ROR γ t⁺细胞, 体外经IL-23刺激, 代表三个独立的移植实验。

[0074] 图3. A, SI隐窝示意图。B-C, IL-22R染色: 括号表示祖细胞, 绿色箭头表示ISC, 红色箭头或红色IF表示潘式细胞。B, IL-22R IHC。C, 用于IL-22R的IF(绿色), 潘式细胞溶菌酶(红色)和细胞核(蓝色)。D-G, LP→B6, BMT/HCT之后3周。D, Lgr5-LacZ受体。Lgr5标记了CBC/ISC, 且 β -半乳糖苷酶报道基因通过正常肠隐窝基底染成深色表示(右上)。染色和ISC存活在没有GVHD的情况下仍然存在(左下), 而染色和干细胞在GVHD过程中明显丢失(右中)。同时也展示了CBC计数结合的统计结果(左上)。E, 基于WT或IL-22KO的小鼠中潘式细胞之间的隐窝基底的区位, 从组织学上评价ISC。F, 在WT或IL-22KO的受体中BMT/HCT 3周后的组织学细胞凋亡。G, 对WT或IL-22KO的受体中BM+T细胞口腔灌胃后的血浆FITC-葡聚糖。FITC-葡聚糖从上皮进入血液表明屏障完整性遭到损坏。*p<.05, **p<.01, ***p<.001

[0075] 图4. 给药rIL-22降低内脏GVHD病理反应, 加强ISC恢复, 但是不影响潘式细胞恢复或发挥功能。LP→B6 BMT之后3周, 从BMT后第7天开始每天给药rIL-22。A, 给药rIL-22后降低了内脏GVHD病理反应。B, 给药rIL-22后皮肤GVHD未观察到明显变化。C, 给药rIL-22后降低了隐窝细胞凋亡。D, Lgr5-LacZ受体显示给药IL-22后LacZ⁺隐窝基底ISCs恢复增强。E, 潘式细胞在GVHD中有所减少, 并且给药IL-22后并没有增加。F-G, 小肠mRNA的qPCR结果。F, 给药IL-22后潘式细胞衍生的分子表达没有明显变化。G, IL-22处理后GVHD中先天抗菌基因增强。所有数据均为代表性数据或至少两次实验数据结合, 并且每组至少5只小鼠。**p<.01, ***p<.001。

[0076] 图5. 小肠隐窝间接体内培养类器官。隐窝从B6小肠中分离, 使用R-脊椎蛋白1, EGF和头蛋白在基质胶上培养。A, 培养第1天, 隐窝腔开始闭合。B, 培养24h后隐窝形成球体。C, 培养7天后形成有新隐窝芽的类器官。

[0077] 图6. IL-22二聚体增强ISC功能。A. 从Lgr5-GFP报道小鼠中分离的SI⁺ISCs对IL-22受体的表达, 左侧图表示GFP⁺细胞的增殖, 中间和右侧图表示IL-22R的表达。B. Ki-67的增加表明IL-22处理后患有GVHD的报道小鼠中Lgr5-GFP⁺SI⁺ISCs有所增殖。C. 体外类器官的高倍放大显示其周长踪迹, 用于测量类器官的周长和面积。D-E. 与IL-22培养一周后SI类器官尺寸变大。D. 代表性图片。E. 与鼠源IL-22培养后的类器官尺寸。F. 与F-652人源IL-22二聚体培养后的类器官尺寸。* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

[0078] 图7. IL-22和先天淋巴样细胞增强间接体内培养的肠类器官的生长。a. 在IL-22 (5ng/ml) 存在和不存在情况下ENR培养7天后的SI类器官明场显微镜图片。b. 类器官的显微镜可见踪迹以测量周长及计算表面积。c-d, 用0-5ng/ml的rmIL-22培养7天后类器官水平面的周长(μm)和面积(μm^2): c, SI; d, LI; e, IL-22增加SI(第4天)和LI(第7天)类器官的新隐窝(肉芽)形成。f-g, 在人源IL-22二聚体F-652存在下培养的SI(f)和LI(g)类器官的尺寸(周长和表面积)。h, 在SI ILCs(隐窝: ILC比率=1:3)存在或不存在的条件下, 使用ENR \pm IL-2、IL-15、IL-7和IL-23在基质胶上培养的SI类器官的尺寸。数据由至少两个独立实验数据结合或为其中代表性数据。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

[0079] 图8. GVL模型。A-B. GVL抗A20淋巴瘤。A, WT与IL-22KO供体T细胞。没有观察到供体T细胞IL-22影响GVL抗A20淋巴瘤。WT和IL-22KO供体T细胞的受体在A20肿瘤情况下存活率相同。B, WT T细胞和日常IP PBS组与riIL-22组。肿瘤生物发光证明给药IL-22组并没有干扰GVL抗荧光素酶⁺A20(A20 TGL)。C. 潜在可选择的GVL模型: MLL-相关性白血病。供体T细胞调节GVT抗由MTT-AF9融合构建子的慢病毒转导产生的AML。HCT与MLL-AF9白血病。图示为MLL-AF9白血病的B6 \rightarrow BALB/c BMT。AML为MLL-AF9构建子的BALB/cBM的转导产生, 然后转移至次级受体中进行GVL测试。

[0080] 图9. 每日使用rIL-22蛋白的IP给药。HCT后3周在受体小肠、大肠和肝中观察到GVHD病情减弱。移植3周后IL-22给药的LP \rightarrow B6 BMT GVHD组织病理学观察。 $p < .001$ 。

[0081] 图10使用rIL-22蛋白治疗的受体。HCT后3周, 在活性GVHD期间, 观察到Lgr5+ISC数量的增加, 未见免疫抑制。移植三周后给药rIL-22的Lgr5+肠干细胞。 $p < .05$ 。

[0082] 图11. 使用Rag2-GFP骨髓和WT T细胞进行FVB到BALB/c MHC不匹配移植。HCT后4周, 给药rIL-22蛋白增加了供体骨髓衍生的CD4⁺和CD8⁺胸腺输出。移植4周后, 给药rIL-22的骨髓衍生的T细胞。 $p < .01$ 。

[0083] 图12. HCT后给药IL-22。LP \rightarrow B6. (A-B) HCT后3周每天给药rIL-22 IP, 没有T细胞, BM(白色), BM+T细胞+PBS IP(黑色), BM+T细胞+IL-22(灰色): A, 肠GVHD病理反应评分。B, 肠隐窝细胞凋亡评分。C, 体外乳酸杆菌培养后IL-22的ELISA结果, 左边栏为乳酸-22s。D, 调pH(粉色)和不调pH(蓝色)情况下表面固定IL-22的乳酸杆菌的IL-22FACS和阴性对照组乳酸杆菌(绿色)。E, HCT后每天乳酸灌胃的存活情况(左)和GVHD评分(右), 没有T细胞的, BM(黑色, 圆圈), BM+T+PBS(黑色, 正方形), BM+T细胞+乳酸-WT(绿色), BM+T细胞+乳酸-22s(红色), BM+T细胞+乳酸-22a(蓝色) * $p < .05$, *** $p < .001$ 。

[0084] 图13. IL-22给药降低GVHD病理反应。LP \rightarrow B6, BMT后3周, IL-22: 从第7天开始, 每天4ug。***= $p < .001$ 。

[0085] 图14. IL-22给药降低隐窝细胞凋亡。LP \rightarrow B6, BMT后3周, IL-22: 从第7天开始, 每天4ug。***= $p < .001$ 。

[0086] 图15. IL-22给药增加先天抗菌物质的表达。LP→B6, BMT后3周。

[0087] 图16. IL-22在类器官中激活STAT-3信号并增加ISC再生。a-b, Wnt/ β -连环蛋白轴的Wnt3, β -连环蛋白, 和Axin 2基因(a)与使用0、1或5ng/ml rmIL-22培养的SI类器官中Reg3 β 和Reg3 γ 先天抗菌物质的 mRNA(b)的相对表达的qPCR结果。数据结合3个独立实验。c, ENR 条件下培养的一类器官细胞中磷酸-STAT3(Y705)的细胞内染色, 然后用浓度为20ng/ml的IL-22, 脉冲流冲洗20min, 用流式细胞仪进行评价。d, 隐窝与ENR+/-STAT3抑制剂Stattic培养4天后, SI类器官明场图像和 表面积测量。e, Lgr5-GFP+细胞中IL-22诱导的磷酸-STAT3(Y705)激活。f-g, 在存在或不存在rmIL-22(1ng/ml)情况下, SI中单个 Lgr5-GFP+ISCs被培养成类器官。f, IL-22增强类器官出芽(培养第4天)。早期萌芽的代表性照片按升序展示。*表示没有出芽的早期类器官。▲表示出芽前的极化状态, ↑表示极化部位开始出芽。g, 从单一干细胞(培养第13天)开始, IL-22能增加类器官的尺寸。h, IL-22(1ng/ml)增加掺入EdU至SI类器官隐窝。i, IL-22(1-5ng/ml)增加Lgr5-GFP高SI ISCs 的数量。j, 系列传代移植表明, 与IL-22(1ng/ml)培养可以增加类器官数量。c-j数据均为至少两个独立实验数据结合或为其中代表性数据。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

[0088] 图17. 在不大幅改变同种异体反应免疫力的情况下, IL-22可降低肠 组织的病理反应。B6受体小鼠只移植了LP T细胞耗尽的骨髓或LP骨髓 和T细胞(H-2b→H-2b)来引起GVHD, 每天通过IP注射方式给药PBS 或4ug rmIL-22。a-b, BMT后3周对肠组织进行组织病理学评价。a, 柱状图表示GVHD评分和细胞凋亡。b, PBS或IL-22处理的小鼠肠的H/E 染色代表性图片。箭头表示肠上皮的凋亡细胞。c, BMT后3周用流式 细胞法分析受体的脾细胞, 结果显示有出现供体T细胞亚群频率, 活化 标志物CD25表达和内脏室分子 $\alpha 4\beta 7$ 整合素表达。d, BMT后3周, 对 受体组织中脾脏和小肠中的炎症细胞因子的表达进行了分析。e, BMT 后3周, 给药IL-22增加了小肠中Reg3 β 和Reg3 γ mRNA的表达。数据 均为两个独立实验数据结合或为其中代表性数据, 每组至少9只小鼠。 ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

[0089] 图18. IL-22不依赖于ISC区位, 直接增加了体内的Lgr5+ISCs。a-f, LP→B6 BMT (H-2b→H-2b)+/-T细胞; BMT后第7天开始, 受体每日经 PBS或4ug rmIL-22IP处理。数据均为两个独立实验数据结合, 每组至少7只小鼠。a, LP→B6 BMT, 以Lgr5-LacZ报道小鼠为受体。BMT后 3周(每天给药PBS或rmIL-22两周后), 对小肠Lgr5+CBC ISCs进行了评估。b, LP →B6 BMT, 以Lgr5-GFP报道小鼠为受体。BMT后14 天(每天给药PBS或rmIL-22一周后), 用流式细胞法评价GFP+ISCs, 用于Ki-67的表达。c, BMT后3周, 每个小肠隐窝中的溶菌酶阳性潘式细胞的数量。d, BMT后3周患有GVHD的小鼠小肠中WNT3和EGF 的相对表达量(qPCR) 。e, 用流式细胞法评价潘式细胞中IL-22R表达和 STAT3磷酸化作用。图示为侧向散射所得潘式细胞的入口(gating)和 CD24表达情况(左图), 潘式细胞IL-22R在基线和全体辐照1200cGy5 天后的表达量(中间), 经20min的20ng/ml IL-22脉冲流后, 类器官衍 生的潘式细胞的STAT3磷酸化作用(右图)。f, BMT后3周, 患有GVHD 的小鼠小肠R-脊椎蛋白-3mRNA的相对表达量(qPCR)。g, BMT后3 周, 从患有GVHD的小鼠小肠分离的隐窝中Wnt-激活的基因 β -连环蛋白 和Axin 2的相对表达量(qPCR)。h-i, LP→B6 BMT后一周开始, 每隔 一天对小鼠皮下给药PBS或100ug/kg F-652, 连续10周。对接受移植的 小鼠进行GVHD临床症状(h)和GVHD相关死亡率(i)监测。* $p < .05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

[0090] 图19. F-652给药降低FOX3P缺失的严重程度。白喉毒素(DT)处 理(50ug/Kg)

FOX3P-DTR小鼠后T-reg缺失导致全身性自身免疫,包括胃肠自身免疫。这打乱了隐窝的体内平衡并对肠干细胞隔室造成了消极影响,这些可从小肠(SI)类器官生长的损坏得到考证。DT处理后8天收集SI隐窝。与单独DT处理(+PBS)相比,(DT处理后)每隔一天给药F-625(100ug/KG)可保护ISC隔室远离T-reg ablation,培养7天后观察到的类器官数量增加可以证明这点。每个检测,在四个独立培养中随机选择20个视场进行分析,所得数值取平均值+标准差。与对照样相比 $*p < 0.01$ (单因素方差分析)。与DT+F-652相比 $**p < 0.05$ (单因素方差分析)。DT:白喉毒素。

[0091] 图20.F652处理提高整体存活率并减少体内GVHD全身性标志。实验设计:LP→B6 MHC匹配的同种异体骨髓移植模型,1100cGy XRT分割剂量,BM+T细胞组用 5×10^6 TCD BM细胞和 4×10^6 CD5+T细胞,然后以100 μ g/kg剂量每隔一天皮下给药F-652或PBS。A-B实验为MHC匹配同种异体骨髓移植模型,每个治疗组10只小鼠,骨髓对照组5只小鼠。这些小鼠在骨髓移植后7天开始给药F-652或PBS。然后以100 μ g/kg剂量皮下注射F-652或PBS,每隔一天注射一次,共10周。A:BMT后7天开始治疗的实验组的全身GVHD评分。B:BMT后7天开始治疗的实验组整体存活率。 $*$ 表示 $p < .05$ 。C-D实验为MHC匹配同种异体骨髓移植模型,每组5只小鼠,每组小鼠仅在全身GVHD症状开始发展后(BMT后4周)进行F-652或PBS治疗。然后每隔一天对这些小鼠按100 μ g/kg剂量进行皮下注射F-652或PBS。C:小鼠表现出GVHD症状后开始治疗的实验组全身GVHD评分。D:小鼠表现出GVHD症状后开始治疗的实验组整体存活率。

[0092] 发明详述

[0093] 本发明提供了用于IL-22对肠损伤和炎症的症状的治疗的方法和组合物,症状例如移植物抗宿主疾病。具体地,IL-22可以用于加快同种异体造血移植后肠干细胞(ISC)恢复和增强免疫重建。在特定优选实施例中,本发明提供了使用治疗的组合物中的治疗的IL-22,包括IL-22二聚体形式,治疗移植物抗宿主疾病的方法,包括例如肝脏、胸腺、胃肠的受影响的细胞或其他移植物抗宿主疾病对造血干细胞移植患者以及患有肠道感染症状的患者的影响。

[0094] IL-22被报道用于治疗人体疾病,如胰腺病(如第6,551,799,号美国专利,全文以引证的方式并入本文中)和病毒性肝炎,包括促进肝细胞存活和增殖(如申请号为20130171100的美国专利,全文以引证的方式并入本文中)。然而,目前IL-22还没用于治疗人GVHD。实际上,发明人发现用供体T细胞引导IL-22产生来治疗GVHD可能引起一些不良反应,如增加皮肤GVHD。

[0095] 本发明方法中所用的IL-22不仅可以通过DNA重组技术产生,还可以通过融合异种多肽产生。其它方法描述:合成本发明方法所用IL-22的载体和宿主细胞可以从Gething等,Nature,293:620-625;Mantel等,Nature,281:40-46;EP117,060和EP117,058.中找到。重组IL-22,二聚体和融合蛋白可以用本领域技术人员已知的方法生产。更详细信息参见申请号为2013/0171100的美国专利,其内容以引证的方式并入本发明中)。

[0096] 编码IL-22二聚体或融合蛋白的DNA序列可以完全通过人工合成。或者,编码IL-22的DNA可以通过PCR扩增或合成得到,然后连接起来形成编码IL-22二聚体的DNA序列。

[0097] 简要地,合适的宿主细胞与IL-22表达载体用已知方法进行转化或转染,然后在本领域技术人员已知条件下促进生长;转染技术更具体地描述参见,如分子克隆:实验手

册第三版, J.F.Sambrook和D.W.Russell 编, Cold Spring Harbor Laboratory 2001年出版。

[0098] 适合表达IL-22的宿主细胞也为本领域已知, 包括无脊椎动物细胞, 如昆虫细胞和哺乳动物细胞。合适的哺乳动物细胞包括中国仓鼠卵巢 (CHO), COS细胞; 特别地, SV40-转化的猴肾CV1细胞株(COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚胎肾细胞株293 (Graham等, J.Gen Virol., 36:59 (1997)); CHO/-DHFR (Urlaub和Chasin, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77:4216 (1980)); 鼠科睾丸滋养细胞(TM4, Mather, Biol.Reprod., 23:243-251) (1980)); 人肺细胞(MMT 060562, ATCC CCL51); 人肝脏细胞(Hep G2, HB 8065); 鼠科乳腺癌细胞(MMT 060562, ATCC CCL51)。

[0099] 包含核苷酸序列编码IL-22的核酸可以嵌入可复制的载体中进行基因克隆或蛋白表达。很多用于蛋白质表达的载体都是本领域已知的。利用这些技术, 将编码IL-22的核酸序列嵌入一种合适的载体中, 该载体可能进一步包含以下任何物质: 一个或多个单独序列, 复制起点, 一个或多个报告基因, 增强子元件, 启动子, 及转录终止序列。

[0100] 转染真核细胞和转化原核细胞的方法均为本领域技术人员已知的, 可能包括使用氯化钙、磷酸钙沉淀、脂质体或电穿孔。本领域技术人员应当能够根据所选宿主细胞选择合适的方法。

[0101] 在一个实施方案中, 使用了从CHO细胞无血清培养中获得的包含人IL-22的重组蛋白。

[0102] 本发明方法使用的药物组合物为安全且有效剂量的IL-22或其二聚体, 融合蛋白或它们的结合体, 以及药学上可接受的赋形剂或载体。“安全且有效剂量”指的是足以显著改善有需要的病人的病情而不引起严重的副作用的复合物的剂量。一般而言, IL-22药物组合物为每剂量包含0.001-1,000mg的IL-22或其二聚物; 在一个实施例中, 药物组合物为每剂量包含0.05-300mg的IL-22或其二聚物; 另一个实施例中, 药物组合物为每剂量包含0.5-200mg的IL-22或其二聚物。

[0103] 药学上可接受的赋形剂或载体均为该领域技术人员所熟知的, 可能包括纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、醋酸纤维素等)、明胶、滑石、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等)、多元醇(如丙二醇、丙三醇、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如, 吐温RTM)、湿润剂(如十二烷基硫酸钠)、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热源水等。

[0104] IL-22、二聚体、融合蛋白或它们结合体常规的给药方式包括口服、直肠给药、胃肠外给药(静脉注射, 肌肉注射或皮下注射)和局部给药。

[0105] 同种异体淋巴细胞产生一种强烈的移植物抗白血病(GVL)效应, 但是这种有益的效应受移植物抗宿主疾病限制。T细胞缺失会丧失GVHD和GVL效应。因此, 在IL-22敲除的小鼠和辐照的小鼠模型中, IL-22由受体先天淋巴细胞产生并预期同种异体造血细胞移植(allo-HCT)实验后为上皮细胞的恢复提供信号。这些IL-22缺失的受体显示GVHD死亡率增高且在GVHD过程中有非常严重的隐窝基底肠干细胞(ISCs)丢失。自相矛盾地, 在辐照的野生型(WT)受体中, 由于抗放射性肠道细胞(ILCs)的消除, GVHD也会导致胃肠(GI)IL-22水平的降低。因此, 发明人惊喜地发现, 在allo-HCT后, 施用IL-22可取消(降低)ILC消除并进一步减少GVHD病理状况, 而不影响移植物抗白血病(GvL)响应。

[0106] 使用本发明的IL-22组合物和包括施用外源IL-22的方法的优势在于 细胞在GVHD时的预防保护及疾病的恢复,包括但不限于小肠、大肠和 肝细胞。

[0107] I. IL-22对肠上皮细胞生物学和GVHD的贡献

[0108] A. 移植后有GVHD和没有GVHD情况下,体内上皮细胞的保留情况

[0109] 移植后,无GVHD情况下ISC和潘式细胞数量都保留较好,然而在 有GVHD情况下,数量都有所减少(图3D,4E)。GVHD中ISC的丢失可能是由于它们区位的丢失所致,或者潘式细胞的丢失可能是由于其 亲代ISCs丢失所致。在正常的体内平衡情况下,小肠SI绒毛上皮细胞每3-5天更新一次,而潘式细胞存活的时间要长很多,会存活3周或更 长时间。在组织损伤及特定移植后,这些动力学都可能被改变。

[0110] 1. 在无GVHD情况下,上皮细胞从小鼠Lgr5+ISCs恢复。

[0111] 测量与ISC和潘式细胞功能相关的分子的GI表达以及上皮恢复的动 力学。所用小鼠为与MSKCC的同事合作所得的C57BL/6 (B6) 背景可诱 导的Lgr5-LacZ谱系追踪报道 (reporter) 小鼠。经它莫西芬治疗后,这 些小鼠可在Lgr5+细胞及其后代中表达 β -半乳糖 苷酶报告分子。在移植 当天,对受体小鼠进行它莫西芬治疗,可以区分从移植后Lgr5+ISCs 中 新生的隐窝和绒毛。对小鼠LI和SI中的Lgr5+细胞再生上皮的动力学进 行评价,应特别注意SI对潘式细胞恢复的动力学影响。对(a) 未经移 植而进行亚致死量(550cGy x1)和致死(550cGy x2), (b) 经同系(B6→B6) TCD BMT和(c) 经同系T细胞的BMT后5,7和10天的小鼠 进行 评价,以控制a) 条件因素b) 细胞移植和c) T细胞转移对从ISCs新生 潘式细胞动力学的影响。除了谱系追踪外,还要通过定量(q) PCR和免 疫印迹法收集肠组织,从而检测报告 ISC基因(Lgr5、BMI-1、Hopx、mTert、Lrig1),与ISC功能相关的潘式细胞基因(Wnt3,EGF)的 RNA 和蛋白质表达。

[0112] 2. 有GVHD的小鼠的上皮细胞恢复、ISC丢失和潘式细胞丢失。

[0113] GVHD情况下ISC和潘氏细胞数量减少(图3D,4E)。BMT后,隐 窝功能和潘式细胞的 恢复会由于GVHD中潘式细胞的丢失而发生改变。可以确定该丢失是由于干细胞功能损伤 或免疫介导的干细胞损失所导 致。GVHD情况下,ISC和潘式细胞损失动力学评价可以作为 鉴别ISCs 及其区位损伤的早期证据。对谱系追踪报道小鼠Lgr5-LacZ中的上皮细 胞进行 谱系追踪可以按本文描述的方法进行,然而只能在同种异体移植 的设定中进行。可以对LP →B6(H-2^b→H-2^b) miHA和B10.BR→B6(H-2^k→H-2^b) MHC移植植物不匹配的移植受体在BMT后隐 窝、绒毛和潘式细胞 恢复情况进行评价,比较TCD BMT受试者(无GVHD)与骨髓和T细 胞受 试者(有GVHD)。BMT后5天,7天和10天再进行谱系追踪,以评价从Lgr5+ISCs再生上皮的动 力学情况。可以再次检测ISC和潘式细 胞相关分子(Lgr5,BMI-1,Hopx,mTert,Lrig1,Wnt3, EGF)的表达。

[0114] 另外,通过对移植前和BMT移植1、3、5、7、10、14天后ISC和 潘氏细胞数量的时序研 究,可以确定ISC丢失和潘式细胞丢失之间存在 时间相关性。这可以通过使用Lgr5-LacZ仅 有干细胞的B6报道小鼠完成,其中该小鼠的 β -半乳糖苷酶报告分子只在Lgr5+ISCs中结 构性地表达而 不在小鼠后代中表达。因此,Lgr5+ISCs可以通过报道小鼠的使用来计 数,而 潘式细胞可以基于H&E染色后其特定的组织学外观进行计数。可以建立ISC隔室损伤的最 早直接证据,从而确定GVHD情况下ISC丢 失或潘式细胞丢失发生在另一个之前。

[0115] 按照小鼠模型标准,TBI可以作为移植前的条件作用的方法。另外,在接受非骨髓

性和消融剂量的化学治疗后,可以通过评价临床移植患者 ISC隔室的损坏来评价GI上皮的恢复。所提议的研究强调以Lgr5的表达作为ISCs的标志,ISCs的功能主要体现在Lgr5+细胞的体内和间接体内的干细胞功能。还有另一种干细胞表型分析的方法,如 CD44⁺CD166⁺CD24⁻细胞评价。潘式细胞构成了SI中的ISC区位,但是在LI中却大量缺失,LI中Wnt信号是由区位支撑的kit⁺细胞提供给ISCs。因此,这里描述了研究方法和预期实验方法,以评价GVHD情况下,SI 中潘式细胞。可以通过ckit⁺LI区位细胞的组织学评价对LI进行进一步的研究。

[0116] 3. 体外ISC功能模型中,GVHD造成的隐窝损伤。

[0117] 可以通过培养移植后小鼠肠类器官评价BMT后ISCs。使用基因的、表型的和组织学的标记物使得GVHD情况下ISCs减少(图3D-E)。可以通过干细胞体外形成肠类器官的能力对干细胞进行功能性评价。从大小肠上皮中分离隐窝然后在具有干细胞生长因子(R-spondin1、EGF、小肠noggin;R-spondin1、EGF、noggin、HGF和大肠Wnt3a)的半固体培养基中培养。由于每种隐窝包含一种有ISCs和支持型区位细胞的功能性干细胞隔室,间接体内培养隐窝生长为具有隐窝芽的类器官,包含了具有体内肠道隐窝绒毛结构和中央腔道的肠组织结构(图6)。另外,作为其ISC能力的有力证据,SI和LI的单一Lgr5+细胞按照这种方式生长可以长出自身区位细胞,并由单一细胞形成类器官^{38,39}。这里所述的 allo-BMTs可以通过分离没有GVHD(仅TCD骨髓)的移植受体和有GVHD(骨髓+T细胞)的移植受体的SI和LI隐窝进行。通过收集BMT 后1、3、5、7、10和14天的隐窝可以评价功能性干细胞/祖细胞区位损伤的动力学。另外,在功能性去除GVHD情况下干细胞区位和特异性ISCs 条件下,Lgr5-GFP报道小鼠可以用作移植受体,便于BMT后通过FACS 分离单一ISC,并进行体外培养,来评价GVHD情况下所分离的ISCs 的功能。

[0118] 4. GVH反应抗干细胞区位的体外系统模型。

[0119] 内脏GVHD表现为肠道疾病,而这显然是涉及T细胞激活和迁移的全身性疾病过程达到巅峰的表现。实际上,同种异体T细胞和移植受体 上皮细胞之间出现的直接相互作用是不为所知的。在不将本发明限制在任何特定的T细胞介导的干细胞区位损伤的机制下,为了有效检验其中的机制并将其形象化,间接体内培养下可以进行T细胞与GI上皮细胞直接相互作用的体外内脏GVHD模型实验。在初步研究中,在同种异体T 细胞存在下,降低了体外培养的隐窝生长为类器官的能力。

[0120] 因此,小鼠SI和LI隐窝在同种异体T细胞存在下可被分离并培养 成类器官。隐窝与原始T细胞、多克隆(抗CD3/抗-CD28)预活化的T 细胞和隐窝背景小鼠APCs活化的T细胞一起培养。可以评价隐窝生长 成类器官的能力。这考虑到了对预活化/抗原呈递的要求,肠上皮细胞消除自身而直接激活T细胞的能力以及CD4和CD8 T细胞功能差异进行辨别。类器官可以在光镜下计数,测量直径和面积。可通过共聚焦显微镜得到高分辨三维图像。除了培养完整的隐窝,上述实验可以通过培养 从Lgr5-GFP报道小鼠中分离的单一ISCs与同种异体T细胞以及测量类 器官形成,重复进行。可以通过GFP表达直接反映培养的一类器官中的ISC,也可以评价同种异体T细胞和ISCs之间的相互作用来确定同种异体T细胞是否可以直接消除ISCs或对其功能造成损伤。

[0121] 可选择地,基于CD44⁺CD166⁺CD24⁻表型的单一ISCs可以通过 FACS进行分离。此外,这样做的另一个好处是,可以培养具有额外背景 小鼠的细胞。

[0122] B. 评价干细胞在GVHD中的消除

[0123] 1. 评价BMT之前或之后死亡受体中ISC和区位细胞的表达。

[0124] GVHD中ISCs的缺失可能是由于其区位提供的潘式细胞的缺失,或者潘式细胞的缺失可能是由于其前体ISCs的缺失。可选择地,可能存在对由同种异体T细胞攻击ISC和区位细胞介导的ISC隔室的综合性非特异性损伤。我们假设ISCs和/或潘式细胞将表达在GVHD中其免疫介导消除所涉及的死亡受体。

[0125] 在此subaim中,我们可以通过FACS从Lgr5-GFP报道小鼠和表型的这些细胞中隔离鼠科ISCs和潘式细胞来表达在GVHD中涉及的潜在死亡受体(Fas、TNFR、IFN γ R、和DR5)。表达可在TCD BMT后、在患有GVHD的小鼠内的基线处进行比较。ISCs和潘式细胞可以通过在ISCs中GFP表达和用于潘式细胞的颗粒状(侧向散射高)CD24⁺亮表型(参见图18E)区分。我们也可以通过其MHC I型和II型的表达和其能够对细胞凋亡提供抗性的分子的表达(BCL-2、BCL-6和c-FLIP)比较ISCs和潘式细胞。

[0126] 2. T细胞的细胞毒性分子在损伤ISC隔室中的功能。

[0127] T细胞的细胞毒性途径可能涉及GVHD期间ISC隔室的损伤。我们可以测试缺乏以损坏ISCs和其体内和体外区位的细胞毒性途径的T细胞的能力。SI和LI隐窝可与来自缺乏分泌的或细胞表面死亡受体配体(FasL、TNF α 、IFN γ 、TRAIL)和穿孔素的小鼠同种异体T细胞培养并如本文所述评估类器官发育的数量和尺寸。然后通过进行带有缺陷的T细胞的同种异体BMT并组织学评价用于ISC和潘式细胞消除后的BMT在体内评估具有在体外损伤隐窝的损伤能力的T细胞。如果体外同种异体T细胞/隐窝培养体系是不可靠的,那么潜在死亡配体的影响可以在传统体内GVHD模型中进行测试。

[0128] 细胞毒性缺陷T细胞的使用主要需要使用B6小鼠作为同种异体T细胞来源,防止使用用于体内Lgr5表达读数和用于与缺陷T细胞一起培养的单个ISCs的选择的B6背景Lgr5报道小鼠。因此,中和抗体可用于阻断不管是T细胞还是使用的隐窝株的细胞毒性途径,并可能通过FACS基于CD44⁺CD166⁺CD24⁻³⁷表型和与B6背景缺陷T细胞一起培养隔离ISC。

[0129] 3. 在BMT后的患者中ISC分子和区位分子的表达

[0130] 隐窝细胞凋亡是GI GVHD的标志,而且我们已经观察到ISCs和潘式细胞在实验GVHD模型中的缺陷,以及低潘式细胞计数与在患者中增涨的非复发死亡率有关。然而,对临床GVHD中的ISC和区位细胞隔室的具体的损伤知之甚少。因此,我们可以评价BMT患者内ISC相关分子的表达。

[0131] 为了评估临床GVHD中ISCs和其区位细胞,我们可以评估需要内镜检查的患者的胃肠道中ISC相关分子的mRNA和蛋白表达来评价移植后GI症状。用于研究目的的活检标本可以在MSKCC IRB协议下从承受临床指示GI活检移植后相关症状的患者上得到。对发现患有活检证明是GI GVHD的患者和那些没有GVHD的患者之间的样品进行对比,包括已经接受TCD移植的患者。组织标本可以被评价以表达如上所述Lgr5、BMI-1、Hopx、mTert、Lrig1、Wnt3和EGF。另外,考虑到我们发现在GVHD实验中ISCs的IL-23依赖型IL-22介导型的支持,我们也可以评价活检样品中IL-22和IL-23的表达。我们还可以对这些样品进行IHC来识别别人隐窝中IL-22R的表达。最后,上述分子的GI表达可以与他们的内镜检查当天抽的外周血中的表达对比以评估内脏和全身表达之间的相关性。

[0132] 活检标本也可以通过FACS来评估以识别与上面CD44、CD166和 CD24染色一起描述的表型识别为ISCs和潘式细胞的IL-22R表达。可替代地,ISCs可以通过原位杂交或用于Lgr5的IF来识别。

[0133] 4. 对患有GVHD的患者的ISC隔室的功能损伤

[0134] 尽管ISC损伤被认为是由于GI GVHD内发现隐窝损伤而发生,且同时存在于患有GVHD小鼠ISC损失的数据,但是这种类型的损伤没有在患者中直接证明。我们考虑的是,患有GVHD的患者的可检测ISCs比未患有GVHD的患者的更少。

[0135] 为了评估患有GVHD的人类患者中ISCs的损失,SI和LI隐窝可以从经受临床指示的用于评估移植后GI症状的内镜检查 and 活检的患者中分离。从患者的活检标本中分离的隐窝然后可以在体外进行培养以如本文所述用于形成类器官,比较患有或未患有GVHD的患者的类器官子代,以及比较GVHD严重性阶段。作为替代方案,我们还可以通过进行如上所述的分离ISCs区位细胞的FACS来评估ISCs和区位细胞的损失。此外,来自MSKCC病理学系的正常GI组织因此可以被评价以作为用于对ISC隔室移植相关影响的阴性对照。

[0136] C. 治疗GVHD的ISC-支持方法

[0137] 我们已经确定了IL-22缺乏的小鼠,加剧了GVHD中的ISC损失并在此表明,外源性IL-22给药增加ISC恢复。因此,IL-22可以在体外组织体上用作ISC生长因子并在患有GVHD的小鼠内用作上皮靶向GVHD治疗。

[0138] 1. IL-22对体外类器官的影响。

[0139] 虽然IL-22在损伤后可以维持上皮完整性,但IL-22对ISC隔室的影响很大程度上是未知的。我们的初步数据表明,IL-22R在ISCs上表达(图7A),并且表明对患有GVHD的小鼠给药IL-22能增加ISCs的恢复(图4D)。此外,我们观察到,IL-22的给药增加了ISC的体外增殖(图7B),而且与1-5ng/ml rmIL-22共培养的SI和LI隐窝比没有IL-22培养的隐窝生长形成的类器官大(图7C-F)。

[0140] IL-22对ISC功能的影响可以通过在开始培养零天或两天0.1-10ng/ml rIL的存在下培养如上所述的分离的隐窝和ISCs来观察到。IL-22也可以在培养的第零天加入,然后第二天从培养基上除去。可以对类器官尺寸和数量进行评估,并且还可以通过共聚焦显微镜高分辨率图像进行评估。在识别最佳的IL-22的培养条件之后,我们可以培养来自具有IL-22的Lgr5-GFP报道小鼠的类器官,然后通过FACS评估JAK/STAT通信、增殖和抗凋亡分子的表达。我们还评估了IL-22对从移植患者分离的人隐窝的影响。

[0141] 为开始评估IL-22在调节ISC隔室中的作用,鼠小肠(SI)隐窝被分离并与EGF、头蛋白和R-脊椎蛋白-1(ENR)一起在存在或不存在重组鼠(rm)IL-22的情况下培养。隐窝与rmIL-22一起培养七天导致类器官的生长实质上比那些与ENR单独培养的大(图7A)。增加的类器官尺寸最早在培养5天之后变明显。在三维培养条件下生长的类器官二维周长追踪允许精确地测量类器官的尺寸(图7B)。与0.5-5ng/ml rmIL-22一起培养导致SI类器官的生长以浓度依赖性方式增加,这可通过周长和表面积测定(图7C)。虽然与>5ng/ml的rmIL-22一起培养也导致类器官尺寸的增加,但较高浓度的IL-22导致从培养隐窝生长的类器官数量的减少(数据未显示)。这种毒性依赖于生长信号的累加效应,随着R-脊椎蛋白-1、Wnt3和EGF的浓度增加都进一步减小IL-22作为放在培养中隐窝的百分比产生的类器官的植板率。

[0142] 除了SI类器官尺寸的增加,与IL-22一起培养导致大肠(LI)类器官周长尺寸和表面积的增加(图7D)。ISCs位于类器官发育过程中生长的隐窝芽内。IL-22培养导致在SI和LI类器官中隐窝芽的显著变大(图7A,E),表明干细胞隔室再生的结构证据。此外,重组人IL-22二聚体蛋白能够增加SI和LI类器官的尺寸(图7F,G),表明该化合物的平移潜能。

[0143] 组3ILCs是肠道细菌感染期间在肠炎中和在BMT13-16之后的GI IL-22的主要来源。为确定ILCs是否能够调节ISC隔室并增强类器官的生长,CD45+CD11b-CD11c-B220-CD3-CD90+细胞从肠固有层分类,并在具有新鲜分离SI隐窝的基质胶中培养。ENR为类器官发育提供基本信号,且包括IL-23的细胞因子混合物被包括来激活ILCs。ILC激活细胞因子单独的存在对SI类器官的生长没有影响。然而,与ILCs共培养导致类器官尺寸的增加(图7H),证明ILCs体外调节ISC隔室和上皮再生的潜能。

[0144] 我们接下来评价类器官中由IL-22激活的细胞内信号传导。虽然Wnt/ β -连环蛋白信号对ISC维护和体外类器官功能是必不可少的,但是我们发现在与IL-22一起培养的SI类器官内没有分子产生以Wnt/ β -连环蛋白途径增加的证据,包括在Wnt3、 β -连环蛋白或Axin 2方面的表达没有差异(图16A)。尽管最近发现Slit2和Robo1可调节ISC从化疗和辐射17诱导的损伤恢复,但是我们还发现与IL-22培养后,它们的表达无明显差异(未示出)。然而,与rmIL-22一起培养类器官导致用于Reg3 β 和Reg3 γ 的mRNA的增加(图16B),表达依赖于STAT3信号的固有抗菌分子。

[0145] 虽然已报道STAT3对ISC的维护是重要的,但对ISCs内JAK/STAT信号的了解较少。我们通过光子流(phosflow)评价SI类器官中STAT3信号并发现IL-22导致STAT3 Y705的磷酸化(图16C)。此外,与STAT3抑制剂Stattic一起培养显著损害SI类器官的生长(图16D)。Lgr5+ISC可以在体内和体外生成所有细胞类型的成熟肠上皮细胞。通过流式细胞术检测从Lgr5-GFP报道小鼠分离的SI隐窝细胞表明GFP+ISCs内STAT3 Y705磷酸化响应IL-22的体外刺激(图16E),从而证明在Lgr5+细胞内IL-22的通信。

[0146] 为确定在ISCs中的IL-22依赖型通信是否在功能上重要,我们通过荧光激活细胞分选分离Lgr5-GFP ISC,并在基质胶中在标准条件+/-IL-22下培养单个ISCs。仅培养4天后,IL-22导致早期类器官的芽显著变大(图16F),最终在IL-22的存在下开始培养单个ISCs之后,导致类器官尺寸增加(图16G)。因此,IL-22可对单个ISCs起作用以激活STAT3磷酸化并加速类器官的生长。

[0147] 因为IL-22导致类器官尺寸增加、隐窝出芽和STAT3活化,所以我们接下来试图确定这是否导致ISCs的膨胀。我们评估掺入与IL-22一起培养类器官的5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EDU),是因为用EdU进行一小时短孵育类器官已显示标记了快速循环CBC细胞的S-相。IL-22导致类器官EdU掺入的增加,表明类器官隐窝内的增殖增强(图16H)。此外,培养衍生自具有IL-22的Lgr5-GFP报道小鼠的类器官表明Lgr5-GFP高ISC膨胀以响应IL-22(图16I)。最后,连续传代证明与IL-22一起培养后可能产生类器官数量的增加,进一步表明功能性的ISC隔室的膨胀(图16J)。

[0148] 从半固体培养基中纯化的培养类器官的FACS可能具有高的染色背景并可能难以解释。在这种情况下,类器官生长+/-的IL-22可以通过基因表达对增殖和细胞凋亡进行评估。此外,经IL-22处理后,可以进行微阵列来全面评估隐窝基因的表达。

[0149] 2. 给药IL-22对体内GVHD的影响

[0150] 此处提到的ISC生物学发展成治疗方法以改善ISC作为用于GVHD 的上皮细胞靶向治疗的功能。之前数据表明,由于IL-22-产物ILCs的缺失,IL-22产物在GVHD受到损伤(图2),并且当通过给药rmIL-22 重新引入IL-22到患有GVHD的小鼠体内可以降低肠道的GVHD病理及 增加ISC的恢复(图4)。此外,IL-22途径似乎不显示为GVL的组件,如给药rIL-22治疗的小鼠中IL-22KO T细胞以及WT T细胞在抗A20 淋巴瘤肿瘤细胞方面表现效果和GVL相当。(图8A,B)。

[0151] 我们获得了临床级人类的IL-22二聚体,F-652(Generon(上海)有限公司),它可以和老鼠IL-22R进行交叉反应。与重组的IL-22相比使用IL-22二聚体的潜在的好处包括临床转化的应用还有增加的半衰期,如美国专利申请US2003/0100076描述,在此全文以引证的方式并入本文。我们发现,在体外培养中F-652能够促进器官的生长(图7F,G)。因此,除了进一步对类器官生长的影响,在体外培养中我们还测试了 IL-22二聚体在ISC恢复、GVHD病理和生存以及GVL等方面的效果。在一个优选实施例中,IL-22二聚体的使用是考虑具有涉及炎症性胃肠组织症状的治疗患者,该炎症性胃肠组织包括但不限于照射、放射治疗、化疗、炎症性肠病、结肠炎、克罗恩病、自身免疫疾病、传染病和移植 物抗宿主病。在另一个优选实施例中,IL-22二聚体的使用是其对手术患者预防性的治疗,其包括但不限于辐射照射、化疗、组织移植、细胞移植,包括处于涉及胃肠组织炎症的症状风险的患者,这类患者包括但不限于辐射患者、化疗患者、传染病患者、移植患者、自身免疫性疾病患者等。

[0152] Allo-BMT的表现可以如上述Lgr5 LacZ报道小鼠作为miHA和MHC 不匹配模型的受体一样。受体可以在移植前和/或移植后通过F-652人的 IL-22二聚体移植治疗,然后骨髓移植后三周将小鼠处死评价GVHD病理和ISC恢复。Allo-BMT WT受体可以用于并评估经F-652治疗后GVHD 的生存差异,而且我们可以移植患有血液恶性肿瘤的小鼠(如图8)来评价经F-652治疗后的GVL的疗效。在免疫抑制剂存在的情况下给药IL-22 可能对提高ISC的功能最有效,我们也会评价F-652与靶向抗IL-23中和 抗体一起给药的结合。描述了IL-23刺激同种异体T细胞介导GVHD的 作用以及将IL-23阻挡在GVHD的潜在优势。然而,抗IL-23中和抗体 是防止T细胞引起GVHD,我们将限制内源性IL-22的表达产物。因此,这种组合的方法可以起到限制T细胞通过阻挡IL-23介导GVHD同时也会增加由于GVHD和IL-23中和而失去的IL-22来促进ISC功能。虽然 IL-23中和反应是GVHD的潜在的治疗方式,但它不是治疗GVHD的现行标准。

[0153] 初步数据表明,IL-22可能通过直接刺激ISC增殖来减少GVHD,而不是通过靶向ISC支持潘式细胞来间接支持ISC(图4,7)。这些发现并不限制本发明为任何具体机制。因此,另一种方法是如已在结肠炎的实 验模型描述的通过将分离的ISC或完整隐窝转移到患有GVHD的小鼠中 来测试新的干细胞。

[0154] 最近描述了患有GVHD的小鼠中减少的ISC和区位细胞形成的潘式 细胞数量。IL-22治疗后给出了稳定的同种异体免疫,我们下一步直接评价了IL-22对ISC隔壁的影响。我们利用Lgr5-LacZ受体进行了LP→B6 同种异体BMT以识别移植治疗后的ISC。BMT三周后,带有T细胞的 BMT导致GVHD而且导致Lgr5+SI ISC损伤严重(图18a)。然而,rmIL-22的日常治疗导致LGR5+ISC恢复增加甚至伴随不间断的同种异 体免疫反应而没有免疫抑制(图18A)。

[0155] 为了了解IL-22如何导致患有GVHD的小鼠中ISCs的增加,我们用 LP骨髓和T细胞移植了B6 Lgr5-GFP报道小鼠。受体每天经rmIL-22或 者PBS IP处理七天,然后分离SI隐窝

并且通过流式细胞术在BMT后14天评价。与我们的体外发现的结果一致,促进细胞器的增长和EdU的掺入,rmIL-22体内治疗后Lgr5-GFP+细胞表达增加了Ki-67,这表明该治疗方法增强了ISC隔室的增殖(图18B)。

[0156] 潘式细胞通过向CBC干细胞传递Wnt和EGF信号为Lgr5+ISCs提供了良好的微环境。此外,IL-22被认为可以调节潘式细胞和天然抗菌分子的产物。因此,我们假定IL-22给药可以通过提高干细胞区位和增强潘式细胞介导的ISC支持来支持BMT后ISC的恢复。与临床GVHD和MHC不匹配的实验模型研究相一致,LP→B6最小抗原错配BMT导致移植三周后潘式细胞减少(图18C)。然而,尽管组织病理学减少(图17A),BMT后的rmIL-22给药没有促进潘式细胞的恢复(图18C)。此外,我们发现对于潘式细胞的传递分子Wnt3和EGF在SI mRNA中并没有增加,而己知Wnt3和EGF是支持Lgr5+ISCs的(图18D)。我们还发现在基线或辐射损伤后IL-22R在潘式细胞中表达的极少证据,而在其他情况下他们还可以对IL-22作出反应,在体内实验中潘式细胞响应IL-22时没有表现出STAT3磷酸化作用(图18E)。

[0157] 尽管IL-22没有提高潘式细胞的区位-支撑能力,但是IL-22在体内仍然可以间接通过增加基质介导的干细胞来促进ISC增殖。最近表明,即使在缺失潘式细胞衍生物Wnts33的情况下,基质细胞可以有助于维持ISC区位,通过Wnts和R-脊椎蛋白-3支持体内正常肠道平衡。但是,体内实验中经IL-22治疗后,我们没有发现区位衍生的Wnt信号增加的证据(图18F、G),这表明免疫介导损伤后IL-22可以诱导ISC的增值,而不通过潘式细胞和基质衍生的干细胞区位作用。

[0158] 最后,明确给出了体内实验中IL-22在促进ISC再生和上皮细胞恢复方面的效果,我们评估了IL-22给药在全身性GVHD中的影响。已经有人提出了GI损伤是主要的全身性GVHD发病机制。与最近的一篇关于IL-22被用在移植手术中的报道一致,我们发现F-652给药到MHC未匹配BMT的受体后GVHD死亡率并没有改善(未示出)。但是,我们发现MHC匹配的同种异体BMT后一周,F-652早期干预的模型可以减少GVHD的全身症状而且可以显著提高总存活数(图18H、I)。

[0159] II. IL-22+乳酸杆菌作为新型的预防和治疗临床GVHD的靶向治疗方法。

[0160] 作为IL-22的药物介入的替代方法,如外源性IL-22,我们开发了乳酸菌的益生菌的策略,可以不间断的产生IL-22,如下面和实验部分所示。因此,在一个实施例中,外源IL-22用于和益生菌结合的治疗方法。在另一个实施例中,给予患者外源性IL-22和益生菌。在初步研究中,对BMT后的小鼠施用本发明的益生菌可以减少全身性GVHD。

[0161] 因此,IL-22+乳酸杆菌被设想作为一种新型的靶向治疗方法用于预防临床GVHD和移植相关的组织损伤,而不限制基本的供体免疫功能。施用乳酸杆菌可以降低实验性的GVHD。而且,副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)是人体胃肠道菌群的正常组成部分。因此,发明人考虑使用工程副干酪乳杆菌传递外源性IL-22治疗剂量以提供额外的治疗效益。事实上,结合初步实验结果,接下来A部分介绍制备和使用IL-22表达细菌显示内源性IL-22产生的减少。在B部分详细介绍了IL-22+乳酸杆菌(包括成熟的实验)的制备和使用的材料和方法。

[0162] A. HCT降低内源性IL-22在小鼠体内的表达

[0163] HCT的IL-22-/-KO受体证实轻微(图1A)和较多(图1B)抗原不匹配的HCT后增加死亡率,如同经抗IL-22中和抗体全身性处理的野生型(WT)受体(图1C)。移植到IL-22KO受体

导致GI和肝GVHD的组织病理学证据的增加(图2A)。因此,宿主来源的IL-22会影响死亡率和移植后GVHD的病理状态。

[0164] IL-22的表达是同种异体HCT后在胃肠道(图2B)和血清(图2E)内发现的。但是,IL-22的水平在GVHD中是降低的(图2B、E)。肠的IL-23在HCT后也得到了表达,IL-23为IL-22表达的树突状细胞衍生的调节子。IL-22产物 $CD45^+CD3^-ROR\ \gamma\ t^+$ ILC是在T细胞耗尽(TCD) HCT后在固有层检测出来的(图2G)。这些ILC是宿主衍生物 $IL-7R^+CCR6^+NKp46^-$ 淋巴组织诱导物类细胞。尽管其抗辐射性,在GVHD期间IL-22生产ILC被迅速消除(图2G)。因此,来自宿主的IL-22可以降低GVHD的死亡率,但是由于宿主ILC的消除IL-22对损伤的反应在GVHD中得到了抑制。

[0165] 尽管宿主IL-22缺乏增加GVHD(图1A-C和2A),在IL-22KO受体中供体淋巴细胞肠渗透或细胞因子的分泌中并没有观察到明显的差别,这表明在GVHD的降低发生并不受同种异体反应供体的免疫调控的影响。通过荧光激活细胞分选(FACS)测试肠IL-22R的表达,发现HCT后GI上皮细胞上IL-22R的增加。

[0166] 免疫组化(IHC)和免疫荧光(IF)表明IL-22R在肠隐窝表达,ISC区位存在于肠隐窝(图3A-C)。同种异体HCT移植到Lgr5 LacZ报道小鼠,然后Lgr5下游产生 β -半乳糖苷酶来鉴别ISC。作为ISC功能的证据,单个LGR5+隐窝基底柱状细胞(CBC)能够在体外和体内生成整个隐窝结构。在GVHD中观察到了ISC的急剧减少(图3D)。此外,在非报道WT小鼠中通过IHC评价ISC区位,证实了在GVHD中CBC/ISC损失(图3E)。引人注目的是,在GVHD中,IL-22KO受体证明了CBC/ISC的最大损失(图3E)以及隐窝上皮细胞凋亡的增加(图3F),这表明IL-22保护ISC和祖细胞。最后,患有GVHD的IL-22KO小鼠证明降低IL-22调节的抗菌分子Reg3 γ a和Reg3 β 的GI表达,还能增加口服后血清非吸收性碳水化合物FITC-葡聚糖易位(图3G),这表明增加了上皮屏障的损伤。

[0167] 因此,GI损伤导致IL-23感应。IL-23反过来又可以通过ILC刺激IL-22的产生。这种内源IL-22保护上皮细胞和干/祖细胞而不受炎症组织损伤。然而,在GVHD中IL-22-产生ILC丧失了限制组织损伤的必要性。如本文所示,HCT后腹腔注射IL-22(例如,4 μ g/小鼠每日)扭转ILC枯竭效应和在肠道中IL-22在GVHD病理学中的损失并减少在ISC/祖细胞室位于的肠隐窝中细胞凋亡(图12A-B)。但是,对于临床使用全身细胞因子给药是昂贵的,并可能会有不可预期的全身反应。因此,发明人制备了两株连续生产IL-22的副干酪乳杆菌(图12C-D)。一株产生可分泌的IL-22(乳酸-22s)而另一株产生IL-22固定在细菌细胞表面(乳酸-22a)。

[0168] B. IL22+乳酸杆菌治疗GVHD

[0169] 如本文所述,发现这种IL-22缺乏可以导致GVHD的增加(图1到3),IL-22介导使GVHD减小(图12),HCT后IL-22-依赖型诱导抗菌分子,IL-22使用在此描述的本发明的lacto-22s和lacto-22a细菌在HCT后给药。两株乳酸杆菌与HCT一起给药(图12E)。小鼠接受骨髓和T细胞allo-HCT以引发GVHD。从移植第一天开始,给小鼠灌胃 10^8 - 10^9 计量的再悬浮在PBS中的野生型副干酪乳杆菌(乳酸-WT)、乳酸-22s或乳酸-22a,或单独灌胃PBS直到HCT后30天。GVHD导致灌胃PBS的小鼠大量死亡。虽然乳酸-WT有提高小鼠存活率的趋势,但由于GVHD这些小鼠的因死亡率依然很高。

[0170] 相反,接受乳酸-22s或乳酸-22a的小鼠和没有T细胞移植的小鼠相比没有明显不

同的死亡率。此外,从重量,毛皮质量,皮肤完整性,姿势和活动的评估来看接受lacto-22s的小鼠明显降低了GVHD的临床评分。而HCT后小鼠重量的改变可以作为GI GVHD的替代指标,这些研究结果的系统性表明,GI保护可能是预防全身性疾病免受GVHD的关键。

[0171] 如上所述方法,完成了T细胞耗尽的MHC匹配的allo-HCT,而且每天给小鼠灌胃乳酸-WT、乳酸-22s和乳酸-22a。另外,用于IL-22的PCR技术被考虑用在受体肠道以证实存在胃肠道内存在乳酸-22。从病人临床表现来看MHC相匹配的allo-HCT模型最符合移植,基于MHC移植供体优先被选择出来去匹配受体。另外,进行了HCT三周后将小鼠处死评估GVHD病理学和隐窝细胞凋亡的实验。为了直接测试乳酸-22对ISC的影响,如上所述Lgr5-LacZ小鼠作为受体进行移植将评价Lgr5⁺ISC的消除。施用乳酸-22比rIL-22安全而且能够减小GI疾病,降低死亡率。

[0172] 乳酸菌生产的IL-22对肠上皮细胞的影响

[0173] 经乳酸-22治疗的小鼠可以降低GVHD死亡率及相应的症状。因此完成通过ELISA检测血清中全身性IL-22含量进而确定乳酸-22对肠上皮细胞的影响的实验。通过ELISA检测组织匀浆样本中的IL-22以及通过IHC和western印记检测肠磷酸化STAT-3方法评估IL-22在组织内的后续影响。最后,如果灌胃乳酸杆菌可以渗透到上皮可以通过电镜拍照。另外,培养来自移植小鼠血液或组织匀浆的乳酸菌以确定细菌是否进入体循环。乳酸-22携带抗氯霉素基因在培养条件下可以帮助正确识别乳酸-22。

[0174] 乳酸-22对供体T细胞和受体菌群的影响

[0175] BALB/c allo-HCT中的B6 HCT小鼠每天被灌胃乳酸-WT和乳酸-22。供体骨髓来自CD45.1,且T细胞来自WT B6 (CD45.2⁺),以通过流式细胞术帮助鉴别供体T细胞。测量了脾脏、肠系膜淋巴结和肠固有层内供体T细胞的膨胀还包括效应-调节性T细胞的比率。我们也将评估活性/记忆标记的供体T细胞表达和包括Fas配体的细胞毒性效应分子。血清及细胞内细胞因子的炎症细胞因子的表达,我们将采用PCR检测上皮组织IL-22 (Reg3 γ 和Reg3 β) 诱导的天然抗菌分子的表达。IL-22作为抗菌剂后续可能对菌群有影响,而且施用的乳酸杆菌本身的存在对菌群也有深远的影响,为了评估给药乳酸-22后的微生物多样性我们将进行如我们最近发表的16S rDNA测序。

[0176] 乳酸-22对GVL的影响

[0177] 鉴于IL-22R在非造血细胞的表达的限制,乳酸-22不能抑制GVL或促进造血肿瘤的生长。实验准则对乳酸-22潜在的临床移植是很重要的。体内rIL-22治疗后IL-22KO供体T细胞或者WT T细胞的初步实验在GVL能力方面没有表现出明显差异(图8A-B)。因此,乳酸-22对GVL的影响可以通过标准的肿瘤细胞株进行T细胞充满HCT来测量(A20、EL4)。可以监测小鼠的肿瘤进展和相关的发病率/死亡率。此外,通过生物荧光监测肿瘤的生长。

[0178] 虽然实验有效,HCT与肿瘤细胞系代表一种与重新(de novo)恶性肿瘤临床移植疑似直接相关的模型。因此,我们已开发了针对混合系白血病(MLL)相关的急性髓细胞白血病(AML)的GVL实验模型(图8C)。涉及MLL基因的重排与移植的研究是非常相关的,因为它们在治疗AML相关疾病中是非常普遍的,携带一个不良临床预后,并且是allo-HCT的暗示³¹。乳酸-22灌胃后,将通过由MLL-AF9转导诱导的AML测量GVL。该高风险继发性白血病的模型比肿瘤细胞系更真实地反映临床疾病。因此可以通过移植效果和在外周血、脾脏、骨髓内GFP报道表达监测肿瘤的发展。

[0179] 实验

[0180] 提供以下实施例是为了证明并进一步说明某些优选的实施方案和本发明的各方面,这不应被解释为限制其范围。

[0181] 在下面的实验公开中,应用以下缩写:N(正常);M(摩尔的);mM(毫摩尔的); μ M(微摩尔的);mol(摩尔);mmol(毫摩尔); μ mol(微摩尔);nmol(纳摩尔);pmol(皮摩尔);g(克);mg(毫克); μ g(微克);ng(纳克);l或L(升);ml(毫升); μ l(微升);cm(厘米);mm(毫米); μ m(微米);nm(纳米);度.C.(摄氏度);Gy(戈瑞)和cGy(厘戈瑞)。

[0182] 实施例I

[0183] 此实施例描述了本文所用的材料和方法。

[0184] 材料和方法:

[0185] C57BL/6(CD45.2 B6,H-2b)、B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ(CD45.1 B6 con-genic, H-2b)、I12b-/-B6、BALB/c(H-2d)和LP(H-2b)小鼠是从Jackson实验室获得。B6和BALB/c I122-/-小鼠由Genentech提供,其是抗-IL-22中和抗体8E11。Lgr5-LacZ和Lgr5-GFP B6小鼠由H.Clevers(Barker等人,2007)提供。如先前所述(Petrovic等人,2004)进行BMT过程,BALB/c宿主接受骨髓(5×10^6)的分剂量致死辐射为850cGy,耗尽抗Thy-1.2和低-TOX-Mrabbitt补充体(Cedarlane实验室)的T细胞,或者也可以用1100cGy分剂量致死辐射接受T细胞耗尽骨髓(5×10^6)的B6宿主。供体T细胞(一般为 1×10^6 B6或 4×10^6 LP,除非另有说明),通过收集供体脾细胞并经尼龙毛通道(通常>70%的T细胞纯度)或经CD5的Miltenyi MACS纯化(通常>90%纯度)使T细胞富集来制备,用于移植。对受体小鼠的生存和临床GVHD症状进行监测并且如前所述处死受体小鼠用于盲人组织病理学和流式细胞分析(Petrovic等人,2004)。对于嵌合的实验,CD45.1 B6同类系小鼠经致死剂量照射并与野生型或IL22-/-CD45.2骨髓重组。三个月后,供体重组是通过用于CD45.1与CD45.2对比的外周血的FACS来确定,且嵌合小鼠再次被照射(900cGy,分剂量),并用LP骨髓(10×10^6)和T细胞(3×10^6)移植。

[0186] 小鼠。

[0187] C57BL/6(CD45.2 B6,H-2b)和LP(H-2b)小鼠是从Jackson实验室(美国巴港)获得。B6 Lgr5-LacZ和B6 Lgr5-gfp-ires-CreERT2(Lgr5-GFP)小鼠由H.Clevers提供。小鼠在MSKCC无病原设施中每个笼子有5个的微隔离笼中饲养,并接受标准食物和蒸压无菌饮用水。小鼠的维护和过程根据纪念斯隆凯特琳癌症中心(MSKCC)机构动物护理和使用委员会的机构协议指导完成。

[0188] 隐窝隔离和细胞分离。

[0189] 肠隐窝的隔离和用于流式细胞分析的细胞的分离很大程度上如前所述进行。简单地说,通过CO₂窒息使小鼠安乐死后,收集小肠和大肠,将器官纵向打开并清洗。小肠已经在5mM的乙二胺四乙酸(EDTA)中孵育60分钟或在10mM的乙二胺四乙酸(EDTA)中孵育25分钟(4°C)以解离隐窝;大肠在4型胶原酶(Worthington)中孵育30分钟(37°C)。收集含有隐窝的上清液。为使隐窝分解成单个细胞,隐窝沉淀物进一步在补充有0.8KU/ml DNase1(罗氏药业)的1X trypLE快速(Gibco公司,生命技术)中孵育。用于提取RNA的解离的隐窝在1ml试剂盒(英杰公司)中悬浮并在-80°C中储存。

[0190] 类器官培养。

[0191] 每孔400隐窝于4℃在液化生长因子减少的基底胶(康宁公司)(25%高级的DMEM/F12培养基(胎牛血清);75%生长因子减少的基质胶)中悬浮。然后,它们以50 μ L小肠液滴、30 μ L大肠液滴的方式在预热的 δ -表面Nunc 24孔板涂覆,每个液滴含有约100-500隐窝。基质胶液滴聚合后,500 μ l完整隐窝培养基加入到小肠隐窝培养物中(ENR-介质:先进DMEM/F12(Sigma)、2mM的L-谷氨酰胺(Sigma)、10mM HEPES (Sigma)、100U/ml青霉素/100 μ g/ml链霉素(Sigma)、1mM N-乙酰半胱氨酸(Sigma)、1 \times B27添加剂(英杰公司)、1 \times N2补充物(英杰公司)、50ng/ml mEGF(派普泰克)、100ng/ml的mNoggin(派普泰克公司制)和人源R-脊椎蛋白-1-转染的HEK293T细胞的10%人源R-脊椎蛋白-1条件培养基。在一些评估芽的实验中,hR-脊椎蛋白-1的浓度降低到1.25-5%。大肠隐窝在除了上述的蛋白质和1%牛血清白蛋白(Sigma),还含有50%的Wnt3a条件培养基的WENR-培养基中培养。对于大肠培养物,将10 μ M SB202190(Sigma,Cat.nr.S7067)和ALK5抑制剂(A83-01,Tocris)加入到WENR中。所有孔板在37℃/5%CO₂下孵育,且培养基每隔2-3天更换。对照孔板不进行处理,如果适用,处理孔板随着培养基的变化,接收不同浓度的重组鼠(rm)IL-22(金斯瑞)。隐窝在第七天用血清移液管机械地破坏它们来传代,通过在过量介质中旋下隐窝来洗掉基质胶,并在形成沉淀后在液化基质胶上使它们连接起来。我们还测试了由中国Generon(上海)股份有限公司提供的F-652的影响,F-652是重组人源IL-22二聚体分子。在一些实验中,类器官在Stattic(STAT3抑制剂化合物、6-硝基苯并[b]噻吩-1,1-二氧化物;Tocris生物科技)存在的情况下从隐窝培养。

[0192] 使用修饰的隐窝解离协议将肠干细胞从Lgr5-GFP小鼠中分离,该协议使用30mM EDTA3,4 20分钟,然后若干过滤步骤和使用TrypLE孵育5分钟并涡流0.8分钟以下以产生单细胞悬浮液。Lgr5-GFP高细胞通过荧光激活细胞分选分离。5000ILCs在30 μ L生长因子减少的基质胶液滴中涂覆并在介质中含有10 μ M rho-激酶抑制剂Y-27632、在基质胶中含有1 μ m锯齿状1凹口配体(Anaspec)和rho激酶抑制剂(10 μ m)的WENR中培养。ISC培养物在没有来自D4的Wnt的情况下培养。

[0193] 对于先天淋巴样细胞(ILC)共培养实验,肠淋巴细胞从小肠固有层分离。清洗小肠片段后,添加20ml/小鼠预热EDTA/IEL溶液(含有5%FBS的1xPBS,10mM Hepes缓冲液,1%青霉素/链霉素康宁,1%L-谷氨酰胺(Gibco),1mM EDTA和1mM DTT溶液,随后将样品置于37℃震荡培养箱中15分钟。对样品(100 μ m)进行染色并将其置于胶原酶溶液(RPMI 1640,5%FCS,10mM Hepes,1%PS,1%谷氨酰胺和1mg/ml胶原酶A(罗氏)和1 μ g/ml DNase 1(罗氏),并置于37℃震荡培养箱中10分钟。之后,将样品在1500rpm下离心五分钟,并用不含酶的RPMI溶液清洗。几次清洗后,将细胞悬浮液转移至40%Percoll溶液(RPMI包Percoll),其在80%Percoll溶液上覆盖。旋转含有固有层界面后,吸出单核细胞并在介质中清洗。然后用细胞外标记物和用于生存的Topro 3对细胞悬浮液进行染色。ILCs经挑选并分类为Topro3-、B220-、CD11b-、CD11c-、CD45+、CD3+和CD90.2+细胞。在基质胶中每孔用400隐窝涂覆1000ILCs。为了与ILCs共培养,将rmIL-2(1000 μ /ml)、rmIL-15(10ng/ml)和rmIL-7(50ng/ml)和rmIL-23(50ng/ml)添加到ENR培养基中。共培养物与在含有ENR且没有ILCs存在的细胞因子中培养的隐窝对比。

[0194] 骨髓移植。

[0195] 如先前所述进行骨髓移植(BMT)过程。使用少数组织相容性抗原-不匹配骨髓移

植模型 (LP→B6, H-2^b→H-2^b)。年龄为8到10周的雌性 B6 WT小鼠典型地用作移植受体。隔离接受1100cGy分次剂量致死照射 3-4小时的受体小鼠 (550cGy×2) 以减少胃肠道毒性。为从安乐死供体 小鼠得到LP骨髓细胞, 无菌收集股骨和胫骨并用无菌培养基洗出骨髓 管。骨髓细胞是通过使用抗Thy1.2和低-TOX-M兔子补充体 (Cedarlane 实验室) 孵育耗尽T细胞。通过剩余污染性T细胞的定量对T细胞耗尽 的骨髓进行纯度分析。T细胞的污染通常约为单轮补充体消耗后所有白细胞的0.2%和第二轮后的0.1%。通过从安乐死供体小鼠无菌收集脾细胞 来制备LP供体T细胞。使用MACS系统 (德国美天旎生物技术) 的具 有CD5磁珠的正向选择来纯化T细胞。细胞的纯度通过流式细胞术测定 并且常规大约为90%。除非另有说明, 受体在每只小鼠有或没有4×10⁶ T细胞的情况下通常经尾静脉注射接受5×10⁶骨髓细胞。

[0196] 如前所述6, 每天监测小鼠存活率并用建立的临床GVHD评分系统 (包括体重、姿势、活动、皮毛起皱和皮肤完整性) 每周检测小鼠移植 物抗宿主病 (GVHD) 的得分。最大可能得分10的临床GVHD指数然后 产生。得分5或以上的小鼠被认为是垂死的并通过CO₂窒息实施安乐死。

[0197] 细胞因子给药。

[0198] 重组鼠IL-22从GenScript购买并按生产商所描述的重组成浓度为 40μg IL-22/1000ul磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。每只小鼠每日经腹膜内注射 100μl PBS或含有4μg重组小鼠IL-22的100μL PBS处理。IL-22给药在 骨髓移植后第七天开始。此安排是基于未移植小鼠内测试的rIL-22药代 动力学的结果。对于体内F-652的给药, 小鼠在骨髓移植后第七天开始 经PBS或100μg/KGF-652隔天皮下注射10周处理。

[0199] GVHD靶器官的组织病理学分析。

[0200] 使用CO₂窒息使小鼠安乐死, 其被用于在BMT后21天进行器官分 析。对于GVHD的组织病理学分析, 小肠和大肠在福尔马林中保存、石 蜡包埋、切片、并用苏木精和曙红 (H&E) 染色。如先前所述, 由19 个不同的GVHD相关参数构成的半定量得分被计算。

[0201] 潘式细和干细胞组织染色

[0202] 对潘式细胞的染色, 从安乐死的小鼠收集肠并在福尔马林中保存、石蜡包埋、切片、并用多克隆兔抗人溶菌酶3.2.1.17 (Dakocytomaion) 染色。为评价干细胞的数量, 收集来自移植有LP骨髓 (如果适用, 还有 T细胞) 的Lgr5-LacZ受体小鼠的小肠。β半乳糖苷酶 (LacZ) 如先前 Barker等人所述进行染色。清洗的2.5厘米尺寸的小肠片段用冰冷固定液 孵育, 该固定液由1%甲醛、0.02%NP40和0.2%戊二醛构成。除去固定 液后, 器官为LacZ的存在进行染色。然后器官在福尔马林中保存、石蜡 包埋、切片并用核固红 (矢量) 复染。

[0203] 细胞因子多重测定。

[0204] 脾和小肠从安乐死的BMT受体中收集。然后将器官混匀、离心, 并 将上清液在-20℃下储存直到用于细胞因子的分析。细胞因子多重测定法 使用小鼠Th1/Th2/Th17/TH22 13倍FlowCytomix多重试剂盒 (e生物科技) 在解冻的样品上进行, 并根据制造商的方案进行。

[0205] 流式细胞术。

[0206] 为了在体内实验中评估IL-22的影响, 从安乐死小鼠中收集淋巴器 官并加工成单细胞悬液。用抗体的合适的混合物对细胞染色。为了分析 细胞内分子, e生物科技固定/透化试剂盒根据用于细胞内染色的制造商 协议来使用。彻底清洗后, 同时用细胞内和细胞外

抗体对细胞染色。用于细胞内和细胞外染色的荧光染料标记抗体购自BD Pharmingen (CD4、CD8、CD24、CD25、CD45、 α 4 β 7、Ki-67和P-STAT3 Y705)、e生物科技(Foxp3)、R&D(IL-22R)和英杰公司(GFP)。DAPI和可固定活/死细胞染色试剂盒(英杰公司)用于存活力染色。如Sato等7所述,潘式细胞可基于亮CD24染色和侧向散射粒度来识别。

[0207] 对于小肠类器官细胞的流式细胞术,ENR培养基被除去,且隐窝和基质胶在TrypLE中悬浮约8分钟。通过P200移液枪用力吸移造成机械破碎后,用10ml含有10%FBS和0.8KU/mlDNase 1的DMEM/F12培养基清洗隐窝悬浮液。然后悬浮液用于评价GFP+细胞的百分比。当适用时,将细胞直接染色或根据目标蛋白的细胞外或细胞内位置将细胞第一固定和透化。所有对活细胞的染色在没有 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} ,含有0.5%BSA的PBS中进行。5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)掺入实验,EdU在使用trypLE解离细胞之前,在完整类器官培养物的ENR培养基中进行1小时预孵育。使用用于成像和流式细胞仪(美国生命技术公司)的Click-it试剂盒对细胞染色。

[0208] 用PFA4%(10分钟37°C)固定之前用磷酸化-STAT3对类器官染色,用20ng/ml IL-22在37°C 20分钟将细胞刺激为机械破碎的隐窝(用于传代),或者刺激为单细胞(TrypLE)。在一些实验中,使用产生自新鲜分离的隐窝(非类器官)的单细胞悬浮液进行IL-22刺激。得到刺激和固定细胞的单细胞悬浮液后,过滤(40 μ m)样品并用冰冷的(-20°C)甲醇透化。固定/电烫细胞用PBS补充水份并在染色之前使用PBS充分清洗,使用抗-磷酸化-STAT3、抗GFP和/或细胞表面标记物的染色在4°C下进行30分钟。所有流式细胞术使用FACSDiva(BD生物科技)在LSR II细胞仪(BD生物科技)上进行,并且数据用FlowJo软件(Treestar)进行分析。

[0209] 类器官测量。

[0210] 每孔的类器官数目通过光镜计数以评估在培养第七天的增长效率。对于尺寸评估,使用具有5x(0.25NA DRY)和10x(0.3NA DRY)Zeiss物镜的MetaMorph广角现场成像系统显微镜拍摄二维明视野显微镜照片,呈现每个类器官的最大横截面。每个横截面的面积和周长使用MetaMorph软件测量。

[0211] qPCR

[0212] 对于定量的(q)PCR,小肠片段或分离的隐窝从安乐死的小鼠中收集并在-80°C下保存。RNA从这些组织中提取并在-20°C保存。可替代地, RNA在体外培养后从类器官中分离。逆转录-PCR使用Quanti-Tec逆转录试剂盒(QIAGEN)进行。用于实时PCR的从美国应用生物系统公司得到的特异性引物如下: β -肌动蛋白:Mm01205647_g1;HPRT:Mm00446968_m1;Reg3 β :Mm00440616_g1;Reg3 γ :Mm00441127_m1;WNT3:Mm00437336_m1和EGF:Mm00438696_m1;Rspo3:Mm00661105_m1;Axin2:Mm00443610_m1; β -连环蛋白:Mm00483039_m1。qPCR在具有TaqMan通用PCR主混合物(美国应用生物系统公司)的Step-One Plus(美国应用生物系统公司)上进行。mRNA的相对量用 β -肌动蛋白或HPRT作为管家基因通过比较的 $\Delta C(t)$ 方法来计算。

[0213] 统计数据和软件

[0214] 所有柱状图及误差柱状图代表用于各组+SEM的平均值。为比较两个组,进行t-检验或非参数U检验。方差分析用于两组以上的比较。对所有统计数据计算并使用GraphPad Prism生成显示图。所有实验用每组至少3-5小鼠进行至少两次。

[0215] GVHD靶器官的组织病理学分析。

[0216] 牺牲GVHD小鼠,且小肠、大肠和肝脏被除去、在福尔马林中保存、石蜡包埋、切片并用苏木精和曙红(H&E)染色。评分如先前所述(Petrovic 等人,2004)进行。

[0217] 组织分析和流式细胞术。来自GVHD小鼠的淋巴器官被加工成单细胞悬浮液,且固有层淋巴细胞在上皮解离和在DNase 1(罗氏)和胶原酶D(罗氏)中消化后分离。表面染色用抗体的相应混合物进行,而且e 生物科技的固定/透化试剂盒根据制造商协议用于细胞内染色。用于 IL-22R(大鼠-抗-小鼠IL-22R抗体496514,R&D系统)的FACS包括 表面和细胞内染色。使用用于IL-22表达的BD GolgiPlug (1ul/ml)和IL-23 (40ng/ml)或用于IFN-G和TNF表达的佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-醋酸酯(50ng/ml)和离子霉素(500ng/ml)重复刺激5小时后,使用抗-IL-22 (1H8PWSR,eBioscience)、抗-IFN-g(XMG1.2,BD PharMingen)或抗-TNF-a(MP6-XT22,BD PharMingen)进行细胞内细胞因子染色。IL-22 和IL-23ELISA根据制造商协议(BioLegend)在每个来自上清液上小肠 和大肠的匀浆上进行,该上清液来自在含有FBS的RPMI中在37°下过夜培养的肠。免疫组化、免疫荧光、TUNEL、LacZ和ISC组织肠从正常 小鼠中收集,在福尔马林中固定,并用大鼠-抗-小鼠IL-22R染色,其是与同型对照和/或多克隆兔抗-人溶菌酶3.2.1.17(Dakocytoma-tion)对比 的抗体496514(R&D系统)。免疫荧光二次染色使用用于IL-22R的 AF488和用于溶菌酶的AF568进行。如Gavrieli等人(1992)所述, TUNEL测定在福尔马林中固定/石蜡包埋的组织上进行。对于Lgr5-LacZ 的移植,得到2.5cm的回肠片段,且用于 β -半乳糖苷(LacZ)存在的染色按照Barker等人(2007)进行。简言之,小肠在1%甲醛、0.2%戊二 醛和0.02%NP40的PBS中固定,然后使用 β -半乳糖苷底物孵育。组织 然后再次在4%PFA的PBS中固定并石蜡包埋,且切片用核固红(矢量)复染。为了评估非报道小鼠中的ISCs,隐窝基底柱状肠干细胞如所报道 的通过其形态和其在潘式细胞之间隐窝基底处的位置识别(Barker等人,2007)。定量PCR逆转录-PCR用QuantiTect逆转录试剂盒(QIAGEN)来完成。对于实时PCR,从美国应用生物系统公司得到的特定引物和探针组如下: β -肌动蛋白:Mm01205647_g1,Reg3b:Mm00440616_g1和 REG3G:Mm00441127_m1。PCR在具有TaqMan通用PCR主混合物(美国应用生物系统公司)的ABI7500(美国应用生物系统公司)上进行。Reg3g和Reg3b mRNA的相对量通过比较直流DC(t)的方法来计算。

[0218] 统计数据。柱状图和误差柱状图分别代表各组的平均值+SEM。存活 数据用Mantel-Cox log-rank测试分析。对于非存活逐点分析,非配对t 检验用于在两个实验组之间对比,或非参数Mann-Whitney U检验用于非 高斯分布,且方差分析用于两个以上的组的比较。存活移植用每组10-38 只小鼠进行,且所有其他实验用每组至少六只小鼠进行至少两次。

[0219] 进行MHC不匹配和次要组织相容性抗原(miHA)不匹配的移植来 模拟高度侵略性GVHD和临床相关移植方案。受体小鼠受致死TBI限制,是因为高剂量化疗的药代动力学难以在实验中控制。受体然后用T细胞 耗尽(TCD)的骨髓移植,其补充有磁珠纯化的T细胞以控制GVHD的 影响。按照MSKCC IACUC监测移植后受体小鼠GVHD的临床症状(包括体重、活动、姿势、皮毛和皮肤完整性),且通常受体在移植后2-3 周之间牺牲来评价T细胞功能和GVHD病理。统计分析将使用为MSKCC BMT服务的Sean Devlin,生物统计学家来进行。在一般情况下,对每组至少五只小鼠进行移植,并且所有实验将至少重复一次。两组之间的比较

将用非参数U检验进行。两组以上的实验将通过方差分析进行评估。

[0220] 类器官培养。从来自肠上皮细胞的小肠和LI分离的隐窝并在存在干细胞生长因子(用于SI的R-脊椎蛋白1、EGF、头蛋白;用于LI的R-脊椎蛋白1、EGF、头蛋白、HGF和Wnt3a)的半固体培养基中培养。因为每个隐窝包含具有ISCs的功能性干细胞隔室和支持性区细胞,体外培养的隐窝生长形成具有含隐窝绒毛结构和中央腔的体内肠组织的隐窝芽的类器官(图6)。此外,作为它们ISC能力的证据,来自SI和LI的单Lgr5⁺细胞能够以这种方式产生自身区细胞并从单个细胞形成类器官^{38,39}。同种异体-BMTs如描述进行,SI和LI隐窝从未患有GVHD(单独TCD骨髓)的受体和患有GVHD(骨髓+T细胞)的受体中分离。隐窝将在BMT后1、3、5、7、10以及14天收集以评价对功能干/祖细胞区位的动力学损伤。此外,Lgr5-GFP报道小鼠将作为移植受体,使得单个ISCs可以通过BMT后的FACS分离并在体外培养以评价GVHD中隔离的ISCs的功能。这将提供干细胞区位和GVHD内特异性ISCs的功能性读数。

[0221] 实施例II

[0222] 宿主衍生IL-22对限制死亡率和移植后GVHD病理学是重要的。

[0223] 受体IL-22的消除增长了移植后的死亡率:鉴于报道的IL-22在GI组织损伤中起保护作用,我们开始评估BMT后IL-22的功能。

[0224] IL-22敲除(KO)受体证明在轻微(图1A)和较多(图1B)抗原不匹配BMT后死亡率增加,如同经抗-IL-22中和抗体全身性处理的野生型(WT)受体(图1C)。IL-22在供体骨髓(图1D)或T细胞(图1E)中的缺乏对结果没有可观察的影响。造血嵌合体中BMT强度的减少(低T细胞和辐射剂量)表明,IL-22缺乏限制宿主造血隔室GVHD死亡率的增加(图1F),植入IL-22KO受体导致GI GVHD组织病理学证据的增加(图2A)。

[0225] IL-22在骨髓移植后表达并在GVHD中减少:我们接下来鉴定同种异体BMT后,IL-22在胃肠道(图2B-C)、胸腺(图2D)和血清(图2E)内的表达。然而,IL-22的水平在GVHD中降低(图2B-E)。组织IL-22表达在未经BMT的全身照射(TBI)后被诱导(图2D,F),且肠IL-23,IL-22表达³¹⁻³⁴的树突状细胞衍生³⁰调节子,也在BMT后和在BMT的TBI后表达。IL-22产生CD45⁺CD3⁻ROR γ t⁺ILCs在T细胞耗尽(TCD)BMT后在固有层被检测到(图2G)。这些ILCs是宿主衍生的IL-7R⁺CCR6⁺NKp46⁻类淋巴组织诱导物类细胞,并且甚至在BMT-TCD后三个月,它们包括50%以上的固有层ILCs。其他肠道IL-22生产者未在BMT后检测到。尽管其在BMT-TCD后的抗放射性和长期持久性,生产ILCs的IL-22在GVHD中迅速消除(图2G)。这些数据表明,a)IL-22在BMT后表达,但由于宿主ILCs的消除在GVHD中减少和b)宿主衍生IL-22降低了BMT后的死亡率。

[0226] ISCs表达IL-22R:虽然宿主的IL-22缺乏使GVHD增加(图1-2A),在IL-22KO受体的供体淋巴细胞肠浸润或细胞因子分泌中没有发现可观察的差异,表明GVHD内的减少不是由于同种异体反应供体免疫的操纵。为识别IL-22的直接靶标,我们通过荧光激活细胞分选(FACS)评估肠的IL-22R表达并在BMT后的GI上皮细胞上观察IL-22R的增加。

[0227] 免疫组织化学(IHC)和免疫荧光(IF)表明在ISC区位于其中的肠隐窝中IL-22R的表达(图3A-C)。IL-22R的ISC表达通过来自Lgr5-GFP报道小鼠的纯化ISCs的FACS来确认(参见图7A)。

[0228] ISC在GVHD中消失,且IL-22的消除导致在GVHD过程中ISCs损失的增加:为确定是否ISCs可能是GVHD的目标,我们在Lgr5-LacZ报道小鼠中进行同种异体BMT,其在Lgr5下游

产生 β -半乳糖苷酶来识别ISCs⁸。作为ISC功能的证据,单个Lgr5+CBC细胞能够在体外和体内产生整个隐窝结构。与报道的研究结果一致,我们观察到GVHD过程中ISCs的显著减少(图3D)。此外,在非报道WT小鼠中通过IHC评估ISC区位确认了GVHD过程中CBC ISC的损失(图3E)。引人注目的是,IL-22KO受体证明在GVHD期间CBC ISC的巨大的损失(图3E)和隐窝上皮细胞的细胞凋亡的增加(图3F),表明IL-22保护了ISCs和祖细胞。最后,患有GVHD的IL-22小鼠证明IL-22调节的抗菌分子Reg3 γ 和Reg3 β 的GI表达的降低和口服(图3G)后不可吸收碳水化合物FITC-葡聚糖血清易位的增加,表明对GI上皮细胞屏障的损伤增加。

[0229] IL-22的给药保留了GVHD中的ISCs并降低了GVHD病理反应:考虑到GVHD中IL-22表达的减少和在IL-22缺乏的GVHD中ISCs损失的恶化,我们接下来检测IL-22给药在GVHD中的效果。我们发现BMT三周后每日给药rmIL-22(第+7天开始4ug IP)导致受体的SI、LI和肝脏中GVHD病理反应的降低(图4A);在皮肤中没有观察到病理差异(图4B)。rIL-22受体已经在肠炎症细胞因子水平没有差异的情况下降低了肠隐窝的细胞凋亡(图4C)。为了评估IL-22给药对ISC隔壁的影响,我们使用Lgr5-LacZ的ISC报道小鼠在B6同型异体BMT中进行LP。经rIL-22处理的受体证明BMT三周后在无免疫抑制的活性GVHD期间Lgr5+ISCs数量增加(图4D)。此外,我们发现在GVHD中经IL-22治疗后使用Lgr5-GFP报道因子增加了ISC增殖(见图7B)。

[0230] IL-22的给药增强了ISC功能而不改善ISC区位:考虑到我们在GVHD观察到的ISCs损失,我们试图评估在正常上皮细胞维护中构建ISC区位的潘式细胞。与在侵略性MHC不匹配的GVHD中报道的一样,我们在轻微不匹配GVHD模型中观察到潘式细胞的减少(图4E)。然而,虽然IL-22的给药增加了Lgr5+ISCs在GVHD中的恢复,但在IL-22的给药后没有观察到潘式细胞数目上的差异(图4E)。此外,在WNT3或EGF mRNA的表达无明显差异,认为IL-22的给药后,干细胞益处并不是由于在ISC区位功能的改善(图4F)。相反,IL-22的治疗导致Reg3 γ 和Reg3 β 表达的增加(图4G),表明IL-22给药的潜在抗菌的优点。

[0231] 总结:我们的初步数据表明上皮细胞和免疫系统之间的相互网络,其中胃肠组织损伤导致IL-23的诱导,其可以通过ILCs刺激IL-22生产。这种IL-22保护来自炎症组织损伤的上皮细胞和ISC隔壁。然而,必要地促进ISC功能的IL-22生产的ILCs在GVHD期间丢失。这表明,GVHD导致ISC隔壁的损伤以及其在组织损伤后调解上皮细胞再生的能力。这也表明在GVHD内通过替换丢失的IL-22用于增强ISC功能的潜在治疗方法。然而,这些研究结果的有效翻译需要详细了解移植后肠道正常稳态、直接地在ISCs上和其潘式细胞区位上的损伤、及IL-22对ISCs和其祖细胞的影响。

[0232] 实施例III

[0233] 每日IP给药rIL-22

[0234] 在具有T细胞耗尽骨髓和植入致死剂量照射小鼠的MACS纯化T细胞的C57BL/6(B6)轻微抗原不匹配模型中临床模仿LP。HCT后第七天开始受体每天通过腹腔内(IP)注射给药PBS或4ug鼠重组(r)IL-22。此安排是基于在未移植小鼠内测试的rIL-22的药物动力学的结果。

[0235] 在HCT三周后每日IP给药rIL-22导致受体小肠、大肠和肝内GVHD病理反应的降低(图9, $P < 0.001$)。在皮肤组织病理学中未观察到差异,与我们先前的发现IL-22缺乏受体证明等价皮肤GVHD一致。肠道病理反应的进一步评估表明,在肠道淋巴细胞浸润无差异的情

况下,rIL-22受体在小肠和大肠中降低了肠隐窝细胞凋亡($P<0.01$),表明GVHD中的减少是由于IL-22对上皮细胞的直接影响。此外,在脾T细胞膨胀或在GI细胞因子表达上没有观察到差异,包括炎症细胞因子的复合面。

[0236] 实施例IV

[0237] IL-22给药对肠干细胞(ISC)隔室的影响。

[0238] 使用Lgr5-LacZ的ISC报道小鼠LP到B6同种异体HCT。经rIL-22治疗的受体证明HCT三周后的没有免疫抑制的活性GVHD期间Lgr5+ISC数目的增加(图10, $P<0.05$)。用Lgr5-GFP报道小鼠的初步证据表明ISC Ki-67染色的增加,从而IL-22给药后增加了ISC增殖。IL-22治疗后小肠的qPCR证明Reg3 γ ($P<0.001$)和Reg3 β ($P<0.01$)的表达增加,表明IL-22给药潜在的抗菌益处。然而,在Wnt3和EGF的表达上不存在差异,认为IL-22给药后的干细胞益处不是由于ISC区位功能的改善。

[0239] 实施例V

[0240] IL-22给药到BALB/c中的B6肿瘤挑战受体没有限制GVL。

[0241] 在造血细胞中未发现的IL-22R表达。因此,监测荧光素酶+A20肿瘤细胞的生物发光以跟踪通过植入经rIL-22治疗的BALB/c肿瘤挑战受体体内的B6 T细胞介导的GVT效果。

[0242] 实施例VI

[0243] IL-22给药甚至在活性GVHD期间改善外周T细胞重建。

[0244] FVB MHC不匹配移植骨髓移植到具有Rag2-GFP骨髓和WT T细胞的BALB/c中。IL-22给药如本文所述,提高HCT四个周后的供体骨髓衍生的CD4和CD8+胸腺移植(图11, $P<0.01$)。

[0245] 实施例VII

[0246] 本发明的IL-22+乳酸杆菌的使用和HCT后IL-22+乳酸杆菌对GVHD和GI组织损伤的效果。

[0247] 该实施例示出GVHD中通过IL-22+乳酸杆菌给药减少GVHD组织损伤的IL-22生产的内源性损失的结果(A部分)。如下面B部分所示,乳酸杆菌给药显示能减少实验GVHD。

[0248] 副干酪乳杆菌是人类胃肠道菌群的正常组成部分。因此本发明人设想的使用副干酪乳杆菌传送治疗剂量的外源性的IL-22,用于提供额外的治疗益处。

[0249] A. 内源性的IL-22表达降低的小鼠HCT的实验结果。

[0250] HCT的IL-22-/-KO受体证明下列轻微(图1A)和较多(图1B)的抗原不匹配HCT增加了死亡率,这与全身经抗-IL-22中和抗体治疗的野生型(WT)受体一样(图1C)。植入IL-22KO受体导致胃肠和肝GVHD组织病理学证据增加(图2A)。因此,宿主衍生的IL-22影响死亡率和移植后的GVHD病理反应。

[0251] IL-22的表达在a11o-HCT后在胃肠道(图2B)和血清(图2E)中发现。然而,IL-22的水平在GVHD期间减少(图2B,C)。肠的IL-23,IL-22表达的树突细胞衍生调节因子,也在HCT后表达。产生CD45⁺CD3⁻ROR γ t⁺ ILC的IL-22在T细胞耗尽(TCD)HCT之后在固有层被识别到(图2G)。这些ILC是宿主衍生IL-7R⁺CCR6⁺NKp46⁺淋巴组织诱导物类细胞。尽管他们有抗辐射性,但产生ILC的IL-22在GVHD期间被迅速消除(图2G)。因此,宿主衍生IL-22降低了GVHD死亡率,但响应损伤的IL-22在GVHD期间由于消除宿主ILC而钝化。

[0252] 虽然宿主IL-22的缺乏增加了GVHD(图1和图2A),但在IL-22敲除受体中供体淋巴

细胞肠浸润或细胞因子的分泌中没有可观察的差异,表明GVHD中的减少不是由于同种异体反应供体免疫的操纵。肠 IL-22R表达通过荧光激活细胞分选(FACS)来测定,且在HCT后的GI 上皮细胞可观察到IL-22R的增加。

[0253] 免疫组织化学(IHC)和免疫荧光(IF)表明ISC区位位于其中的肠 隐窝中IL-22R的表达(图3A-C)。在Lgr5-LacZ报道小鼠中植入同种 异体HCT,其在Lgr5的下游产生 β -半乳糖苷酶来识别ISC。作为ISC功 能的证据,单个Lgr5⁺隐窝基底柱状细胞(CBC)能够在体外和体内产生 整个隐窝结构。可观察到GVHD期间ISC的急剧减少(图3D)。此外,在非报道WT小鼠中通过IHC评估ISC区位确认了GVHD期间CBC/ISC的损失(图3E)。引人注目的是,IL-22KO受体证明在GVHD期间 CBC/ISC的(图3E)的巨大的损失和隐窝上皮细胞凋亡的增加(图3F),表明IL-22保护了ISCs和祖细胞。最后,患有GVHD的IL-22KO小鼠证明IL-22调节的抗菌分子Reg3 γ 和Reg3 β 的GI表达的降低和口服后不 可吸收碳水化合物FITC-葡聚糖血清易位的增加(图3G),表明对上皮 细胞屏障的损害增加。

[0254] 因此,GI损伤导致IL-23的诱导。IL-23反过来又可以通过ILC刺激 IL-22的生产。这种内源性的IL-22保护来自炎性组织损伤的上皮细胞和 干/祖细胞隔室。然而,必需的限制组织损伤的生产ILC的IL-22在GVHD 期间丢失。如本文所示,HCT后rIL-22通过腹膜内注射给药(例如4ug/ 小鼠每日)在肠内逆转GVHD病理反应中ILC枯竭和IL-22的损失,并 在ISC/祖细胞隔室位于其中的肠隐窝中减少细胞凋亡(图12A,B)。然 而,对于临床使用,全身细胞因子给药是昂贵的,并且可能具有未预料到的全身效应。因此,本发明人制备结构性地生产IL-22的副干酪乳杆 菌的两种菌株(图12C,D)。一种菌株产生分泌IL-22(乳酸-22s), 而另一种产生固定于细菌细胞表面的IL-22(乳酸-22a)。

[0255] B. IL22+乳酸杆菌治疗GVHD的结果。

[0256] 如本文所述,发现IL-22缺乏导致GVHD增加(图1到3),IL-22 介导GVHD的减少(图12)以及HCT后的抗菌分子的IL-22依赖性诱 导后,用如本文所述的本发明的乳酸-22s和乳酸-22a菌在HCT后给药 IL-22。两株乳酸杆菌的给药与HCT相关(图12E)。小鼠经历具有骨髓和T细胞的同种异体HCT以导致GVHD。从移植第一天开始,给小鼠灌 胃 10^8 - 10^9 计量的再悬浮在PBS中的野生型副干酪乳杆菌(乳酸-WT)、乳酸-22s或乳酸-22a和单独灌胃PBS直到HCT后30天。GVHD导致在 用PBS灌胃的小鼠中显著的死亡率。虽然接受乳酸-WT的小鼠有提高存活率的趋势,但由于GVHD这些小鼠的死亡率依然很高。

[0257] 相反,接受乳酸-22s或乳酸-22a的小鼠和没有T细胞的移植小鼠相 比没有明显不同的死亡率。此外,从重量,毛皮质量,皮肤完整性,姿 势和活动的评估来看接受乳酸-22s的小鼠明显降低了GVHD的临床评分。而HCT后小鼠重量的改变可以作为GI GVHD的替代指标,这些研 究结果的系统性表明,GI保护可能是预防全身性疾病免受GVHD的关键。

[0258] 如上所述完成了T细胞耗尽的MHC匹配同种异体-HCT,而且每天 给小鼠灌胃乳酸-WT、乳酸-22s和乳酸-22a。

[0259] 实施例VIII

[0260] 使用临床模型LP \rightarrow C57BL/6(B6)轻微抗原不匹配HSCT(H-2^b \rightarrow H-2^b),我们发现,从移植后第7天开始每日经重组鼠(rm)的IL-22(4ug,腹膜内注射)的治疗导致GVHD减少肠病理反应而不改 变同种异体免疫。相对于PBS处理的对照组,BMT三周后在rmIL-22处 理的患有GVHD的小鼠中整体GVHD病理反应和上皮细胞凋亡评分显著变低(P<0.001)。我们观察到,

经rmIL-22(且无药理学免疫抑制)处理的小鼠具有数目增长的LGR5+ISC并显著变大的ISC增殖($P < 0.01$)。这不是由于在ISC区位中IL-22依赖性的变化,因为潘式细胞数、潘式细胞衍生生长因子(EGF、WNT3)和基质衍生的生长因子(Rspo3)均在IL-22给药后保持不变。然而,抗菌蛋白Reg3 β 和Reg3 γ 都是通过rmIL-22处理小鼠的小肠(SI)($P < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 分别地)的qPCR来上调,虽然这并没有在内脏微生物菌群中导致一致的变化。

[0261] 为评价对上皮细胞再生的直接影响,我们在IL-22存在的情况下进行肠类器官培养试验。从野生型B6小鼠SI和的大肠(LI)隐窝产生的类器官证明与IL-22培养7天后尺寸显著增加($P < 0.001$, SI, 图1A; $P < 0.05$, LI)。与先天淋巴样细胞(ILC)共培养隐窝,体内IL-22有效生产者,也导致类器官尺寸的增加。此外,与IL-22培养显著增加类器官的出芽(新隐窝形成),随着在IL-22(1ng/ml)存在的情况下连续传代导致增加的类器官膨胀,表明IL-22可以直接增加ISC膨胀。事实上,IL-22培养导致SI隐窝从Lgr5-GFP报道小鼠培养后类器官EDU掺入的增加和LGR5+ISC的膨胀($P < 0.001$, 图1B)。证明对ISC的直接影响,IL-22导致在LGR5+细胞的STAT3磷酸化特异性和导致在培养仅四天的从分离的单个SI ISC培养类器官芽的增加($P < 0.01$)。

[0262] 为调查用于人类的平移潜力,我们在小鼠肠隐窝上测试了人源IL-22二聚体分子(F-652, Generon(上海)公司制造),并发现F-652显著增加SI和LI类器官的尺寸。使用上述LP \rightarrow B6同种异体HSCT模型,我们发现用100ug/kg F-652从BMT后开始第7天隔日皮下(SQ)处理会导致临床GVHD评分($P < 0.0001$)和存活率($p < 0.05$, 图1C)的显著改善。

[0263] IL-22和先天淋巴样细胞可以通过直接在上皮干细胞作用弥补免疫功能和组织再生。IL-22和F-652疗法可能是一种新型的方法以促进患有GVHD的患者的肠道恢复而不增加移植后免疫缺陷。

[0264] 综上所述,IL-22给药被发现能够在GVHD期间减少肠道病理反应,提高ISC恢复,促进供体骨髓衍生的T细胞发育。出人意料的是,IL-22的给药不损害GVL。这些结果表明,移植后的IL-22的给药代表一种新型方法以在同种异体HCT后保护肠上皮细胞并改善免疫功能重建。

[0265] 在上述说明书中提及的所有出版物和专利在此通过引证的方式并入本文。所描述的组合物和本发明的方法的各种修改和变型对本领域技术人员是显而易见的,且不脱离本发明的范围和精神。尽管本发明已经结合具体优选的实施方案进行了描述,但是应当理解的是,本发明应当不适当地限于这些具体实施方案。实际上,用于实施本发明的所描述的方式的各种修改对在药品、诊断学、免疫学、细胞生物学、分子生物学或相关领域技术人员是显而易见的,且旨在在本发明的范围和权利要求之内。

[0266] 以下参考文献全文以引证的方式并入本文:

[0267] 1. Jenq, R.R. & van den Brink, M.R. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 213-221.

[0268] 2. CIBMTR Newsletter. 13(2007).

[0269] 3. Hill, G.R. & Ferrara, J.L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95, 2754-

2759(2000) .

[0270] 4.Wingard,J.R.et al.Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation.J Clin Oncol 29,2230-2239.

[0271] 5.Shlomchik,W.D.Graft-versus-host disease.Nat Rev Immunol 7, 340-352 (2007) .

[0272] 6.Takashima,S.et al.The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells.J Exp Med 208, 285-294(2011) .

[0273] 7.Sale,G.E.Does graft-versus-host disease attack epithelial stem cells? Mol Med Today 2,114-119(1996) .

[0274] 8.Barker,N.et al.Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5.Nature 449,1003-1007(2007) .

[0275] 9.Sato,T.et al.Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts.Nature 469,415-418(2010) .

[0276] 10.Carmon,K.S.,Lin,Q.,Gong,X.,Thomas,A.&Liu,Q.LGR5 interacts and cointernalizes with Wnt receptors to modulate Wnt/beta-catenin signaling.Mol Cell Biol 32,2054-2064(2012) .

[0277] 11.Glinka,A.et al.LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling.EMBO Rep 12,1055-1061(2011) .

[0278] 12.de Lau,W.et al.Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling.Nature 476,293-297(2011) .

[0279] 13.Simons,B.D.&Clevers,H.Stem cell self-renewal in intestinal crypt.Exp Cell Res(2011) .

[0280] 14.Barker,N.,van Oudenaarden,A.&Clevers,H.Identifying the stem cell of the intestinal crypt:strategies and pitfalls.Cell Stem Cell 11,452-460 (2012) .

[0281] 15.Eriguchi,Y.et al.Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins.Blood 120,223-231(2012) .

[0282] 16.Levine,J.E.et al.Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality.Blood 122,1505-1509(2013) .

[0283] 17.Hanash,A.M.et al.Interleukin-22 Protects Intestinal Stem Cells from Immune-Mediated Tissue Damage and Regulates Sensitivity to Graft versus Host Disease.Immunity 37,339-350(2012) .

[0284] 18.Clayburgh,D.R.,Shen,L.&Turner,J.R.A porous defense:the leaky epithelial barrier in intestinal disease.Lab Invest 84,282-291(2004) .

[0285] 19.Kappel,L.W.et al.IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease.Blood 113,945-952(2009) .

- [0286] 20.Nagalakshmi,M.L.,Rascole,A.,Zurawski,S.,Menon,S.&de Waal Malefyt, R.Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells.International Immunopharmacology 4,679-691 (2004).
- [0287] 21.Pickert,G.et al.STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing.J.Exp.Med.206,1465-1472(2009).
- [0288] 22.Zenewicz,L.A.et al.Innate and Adaptive Interleukin-22 Protects Mice from Inflammatory Bowel Disease.29,947-957(2008).
- [0289] 23.Zenewicz,L.A.et al.Interleukin-22 but Not Interleukin-17 Provides Protection to Hepatocytes during Acute Liver Inflammation.27,647-659(2007).
- [0290] 24.Witte,E.,Witte,K.,Warszawska,K.,Sabat,R.&Wolk,K. Interleukin-22:A cytokine produced by T,NK and NKT cell subsets,with importance in the innate immune defense and tissue protection.Cytokine Growth Factor Rev(2010).
- [0291] 25.Sonnenberg,G.F.,Fouser,L.A.&Artis,D.Border patrol: regulation of immunity,inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22.Nat Immunol 12,383-390.
- [0292] 26.Wolk,K.et al.IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense,cellular differentiation,and mobility in keratinocytes:a potential role in psoriasis.Eur J Immunol 36,1309-1323 (2006).
- [0293] 27.Sekikawa,A.et al.Involvement of the IL-22/REG Ialpha axis in ulcerative colitis.Lab Invest 90,496-505.
- [0294] 28.Zheng,Y.et al.Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens.Nat Med 14,282-289(2008).
- [0295] 29.Aujla,S.J.et al.IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia.Nat Med 14,275-281(2008).
- [0296] 30.Das,R.,Chen,X.,Komorowski,R.,Hessner,M.J.&Drobyski,W.R.Interleukin-23 secretion by donor antigen-presenting cells is critical for organ-specific pathology in graft-versus-host disease.Blood 113, 2352-2362(2009).
- [0297] 31.Cella,M.et al.A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity.Nature 457,722-725(2009).
- [0298] 32.Kreymborg,K.et al.IL-22 Is Expressed by Th17 Cells in an IL-23-Dependent Fashion,but Not Required for the Development of Autoimmune Encephalomyelitis.J Immunol 179,8098-8104(2007).
- [0299] 33.Sonnenberg,G.F.,Monticelli,L.A.,Elloso,M.M.,Fouser,L.A.&Artis,D.CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut.Immunity 34,122-134(2011).
- [0300] 34.Zheng,Y.et al.Interleukin-22,a TH17 cytokine,mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis.Nature 445,648-651(2007).

- [0301] 35. Medema, J.P. & Vermeulen, L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474, 318-326.
- [0302] 36. Hua, G. et al. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant. *Gastroenterology* 143, 1266-1276 (2012).
- [0303] 37. Wang, F. et al. Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay. *Gastroenterology* 145, 383-395 e381-321 (2013).
- [0304] 38. Yui, S. et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. *Nat Med* 18, 618-623 (2012).
- [0305] 39. Sato, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265 (2009).
- [0306] 40. Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Blood*. 2004; 103(11): 4365-4367.
- [0307] 41. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of experimental medicine*. 2012; 209(5): 903-911.
- [0308] 42. Dimartino JF, Cleary ML. Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol*. 1999; 106(3): 614-626.
- [0309] 43. Stubbs MC, Kim YM, Krivtsov AV, et al. MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2008; 22(1): 66-77.
- [0310] 44. Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9 [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*. 2006; 442(7104): 818-822.
- [0311] 45. Sanos, S.L. & Diefenbach, A. Innate lymphoid cells: from border protection to the initiation of inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* 91, 215-224 (2013).
- [0312] 46. Peery, A.F. et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology* 143, 1179-1187 (2012).
- [0313] 47. Metcalfe, C., Kljavin, N.M., Ybarra, R. & de Sauvage, F.J. Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. *Cell Stem Cell* 14, 149-159 (2014).
- [0314] 48. Ritsma, L. et al. Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. *Nature* 507, 362-365 (2014).
- [0315] 49. Morris, S.A. et al. Dissecting Engineered Cell Types and Enhancing

Cell Fate Conversion via CellNet.Cell 158,889-902(2014) .

[0316] 50.Sabat,R.,Ouyang,W.&Wolk,K.Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system.Nat Rev Drug Discov 13,21-38(2014) .

[0317] 51.Sawa,S.et al.ROR γ mat+innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota.Nat Immunol 12,320-326(2011) .

[0318] 52.Longman,R.S.et al.CX3CR1+mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22.J Exp Med 211,1571-1583 (2014) .

[0319] 53.Spits,H.et al.Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature.Nat Rev Immunol 13,145-149(2013) .

[0320] 54.Munneke,J.M.et al.Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease.Blood124,812-821 (2014) .

[0321] 55.Pearson,C.,Uhlig,H.H.&Powrie,F.Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut.Trends Immunol 33,289-296(2012) .

[0322] 56.Zhou,W.J.,Geng,Z.H.,Spence,J.R.&Geng,J.G.Induction of intestinal stem cells by R-spondin 1 and Slit2 augments chemoradioprotection.Nature 501,107-111(2013) .

[0323] 57.Choi,S.-M.et al.Innate Stat3-mediated induction of the antimicrobial protein Reg3 γ is required for host defense against MRSA pneumonia.J Exp Med 210,551-561(2013) .

[0324] 58.Matthews,J.R.,Sansom,O.J.&Clarke,A.R.Absolute requirement for STAT3 function in small-intestine crypt stem cell survival.Cell Death Differ 18,1934-1943(2011) .

[0325] 59.Ferrara,J.L.,Levine,J.E.,Reddy,P.&Holler,E. Graft-versus-host disease.Lancet 373,1550-1561(2009) .

[0326] 60.Blazar,B.R.,Murphy,W.J.&Abedi,M.Advances in graft-versus-host disease biology and therapy.Nat Rev Immunol 12,443-458(2012) .

[0327] 61.Schroeder,M.A.&DiPersio,J.F.Mouse models of graft-versus-host disease:advances and limitations.Dis Model Mech 4,318-333(2011) .

[0328] 62.Kolls,J.K.,McCray,P.B.,Jr.&Chan,Y.R.Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins.Nat Rev Immunol 8,829-835(2008) .

[0329] 63.Walker,C.R.et al.Intestinal intraepithelial lymphocyte-enterocyte crosstalk regulates production of bactericidal angiogenin 4 by Paneth cells upon microbial challenge.PLoS One 8,e84553 (2013) .

[0330] 64.Kabiri,Z.et al.Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts.Development 141,2206-2215(2014) .

[0331] 65.Zhao,K.et al.Interleukin-22 Aggravates Murine Acute Graft-Versus-

Host Disease by Expanding Effector T Cell and Reducing Regulatory T Cell.J
Interferon Cytokine Res 34,707-715(2014).

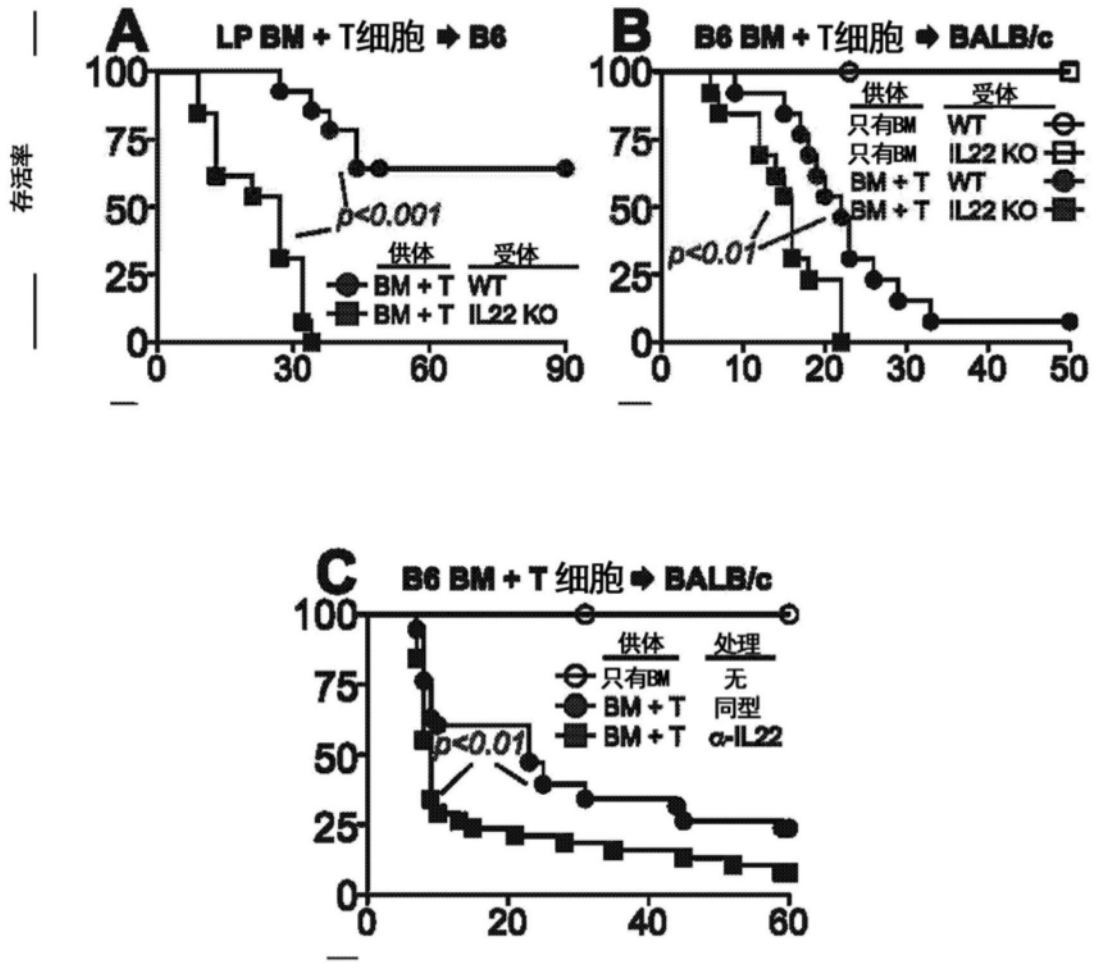


图1A-1C

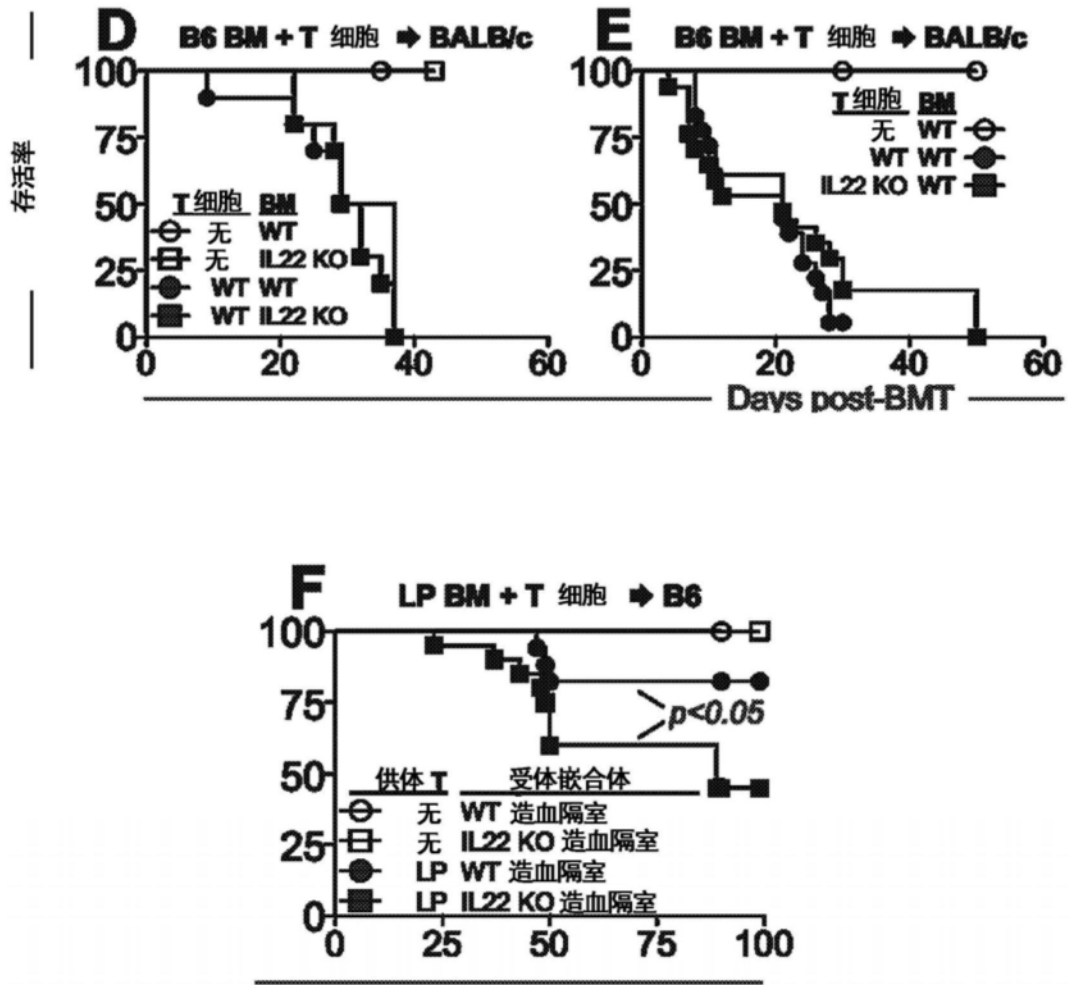


图1D-1F

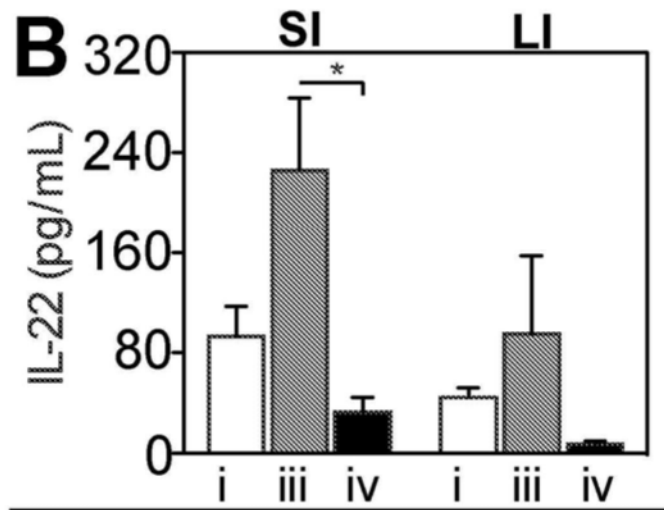
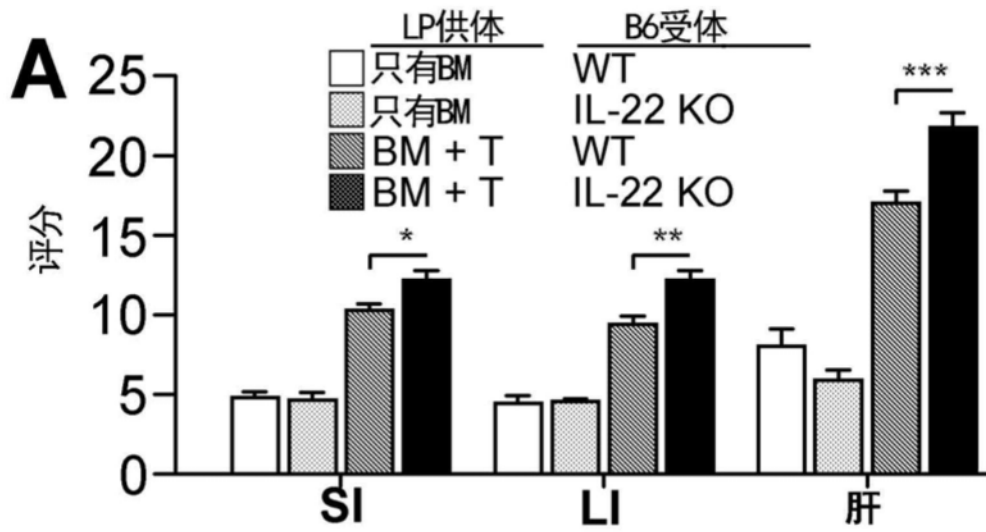


图2A-2B

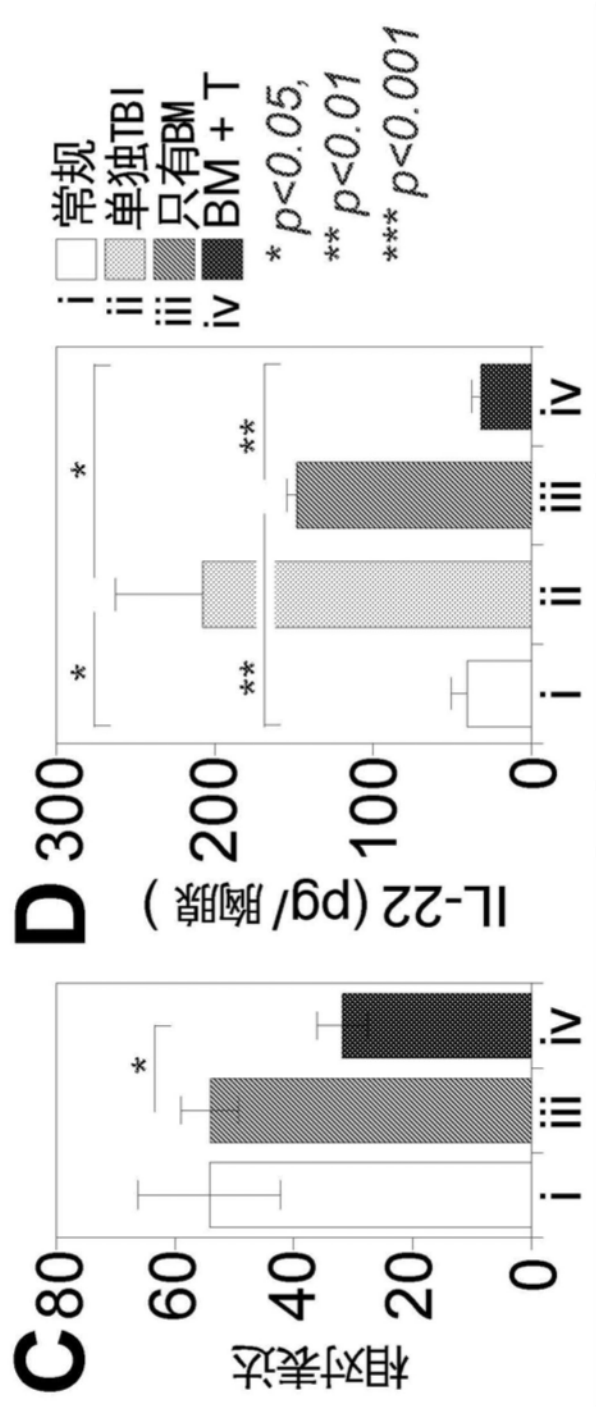


图2C-2D

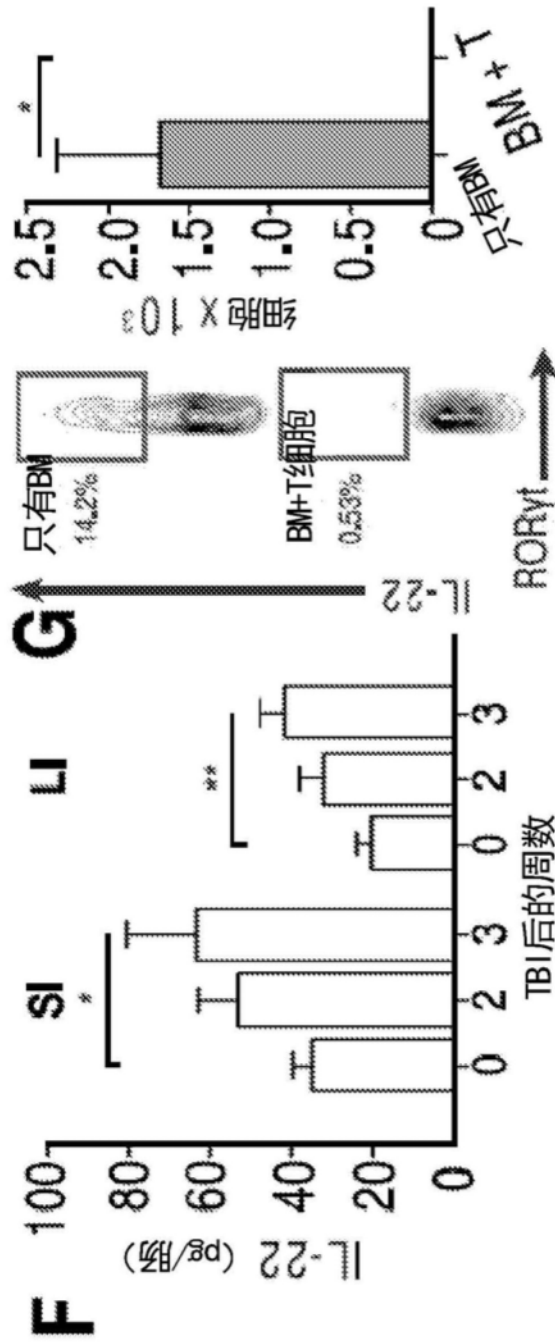


图2F-2G

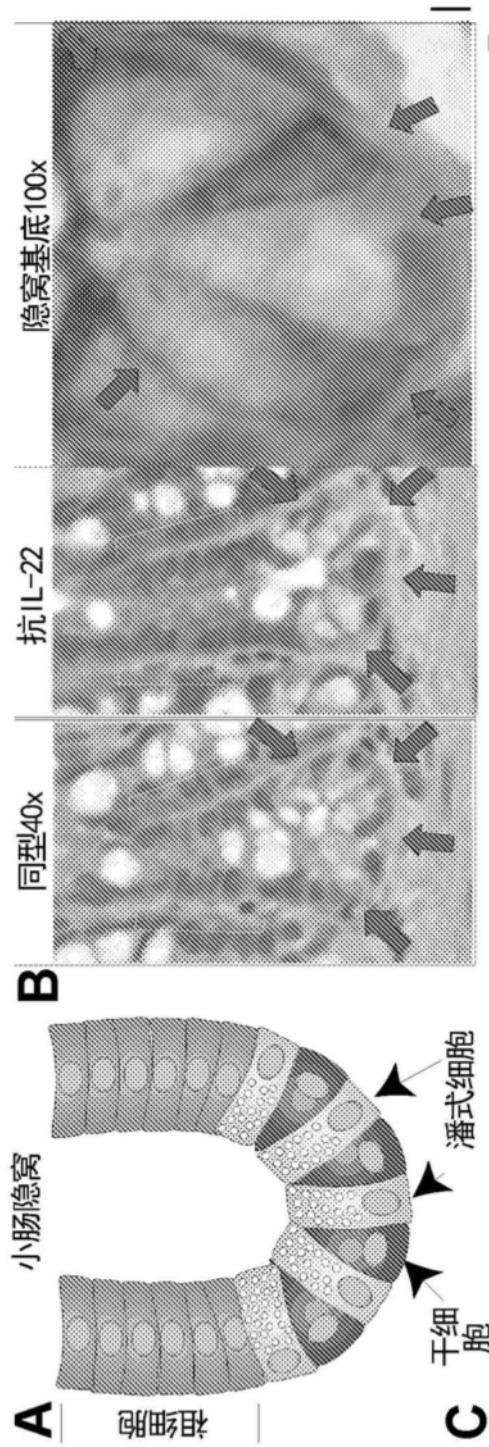


图3A-3B

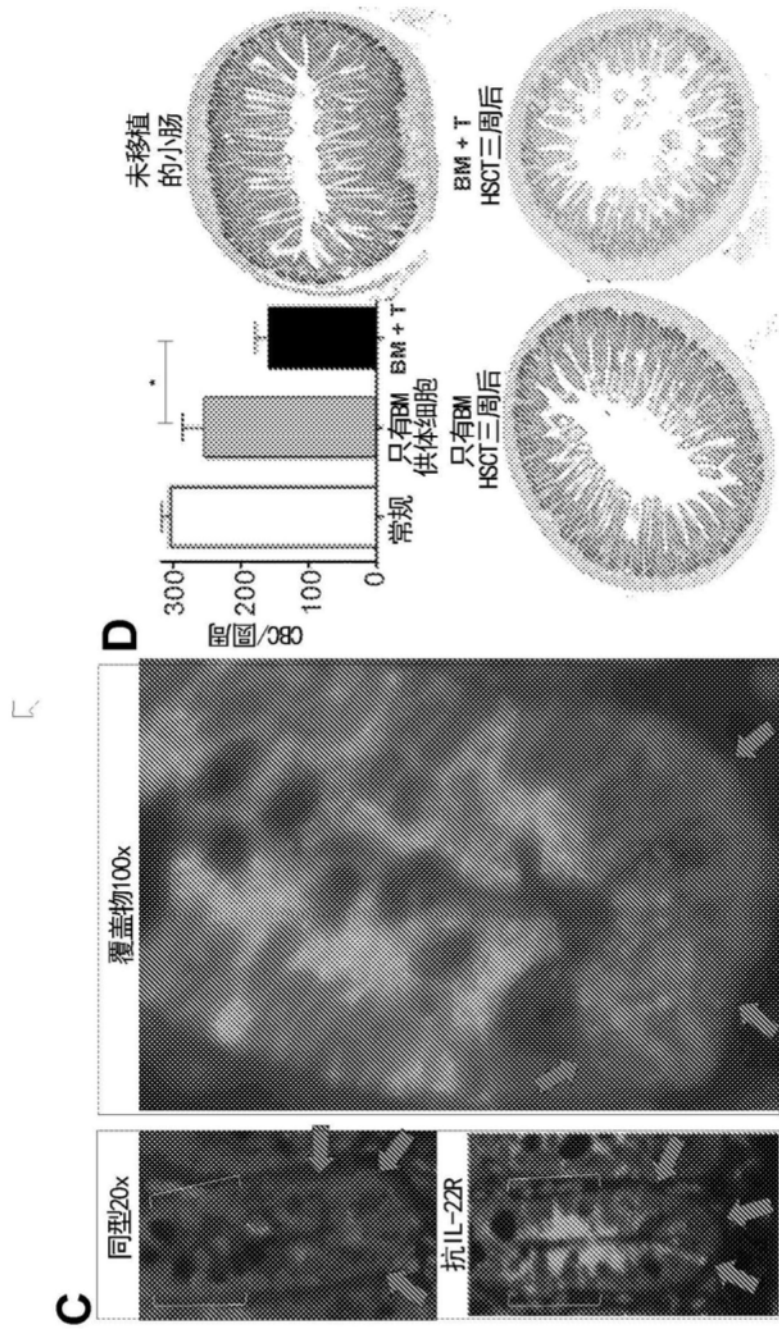


图3C-3D

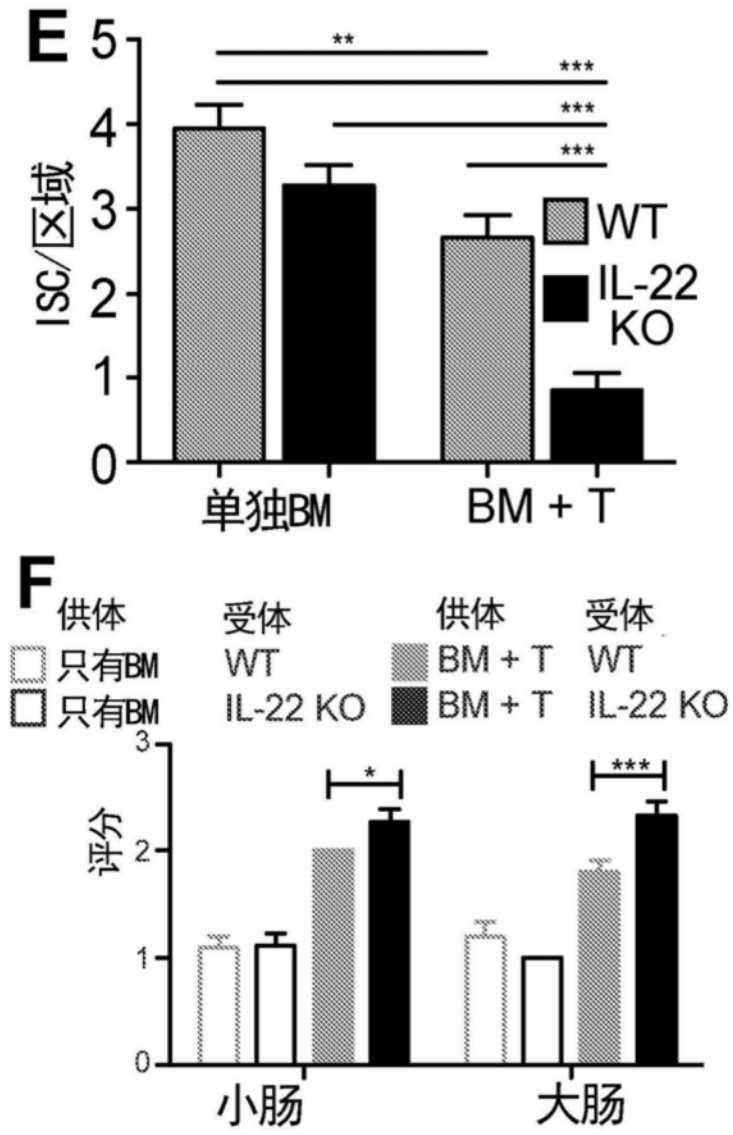


图3E-3F

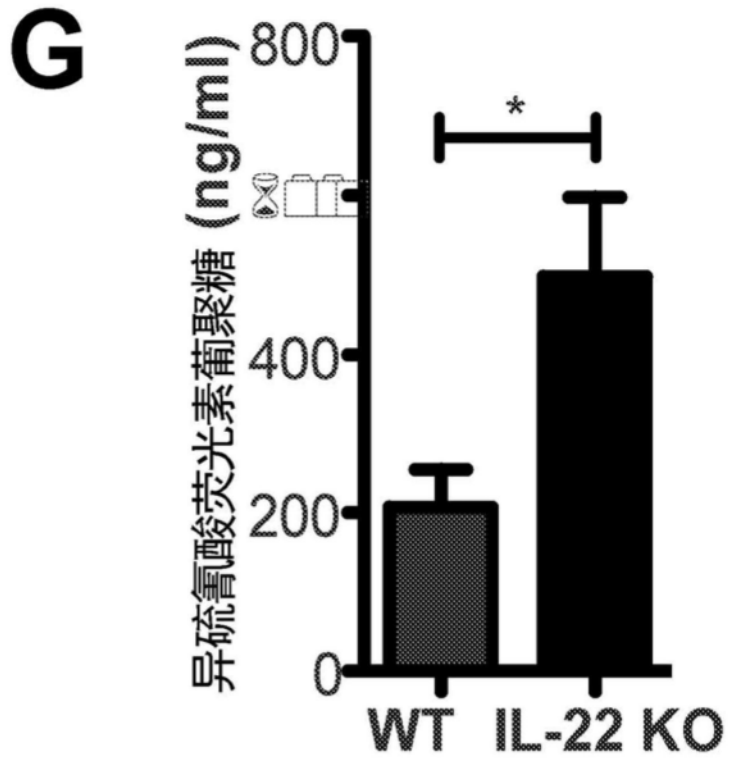


图3G

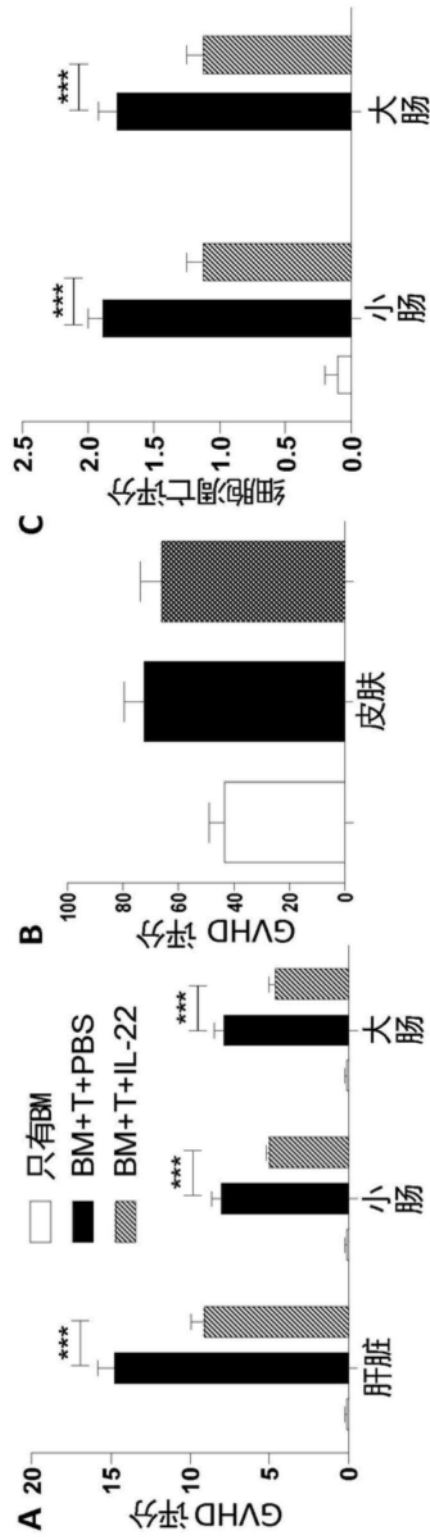


图4A-4C

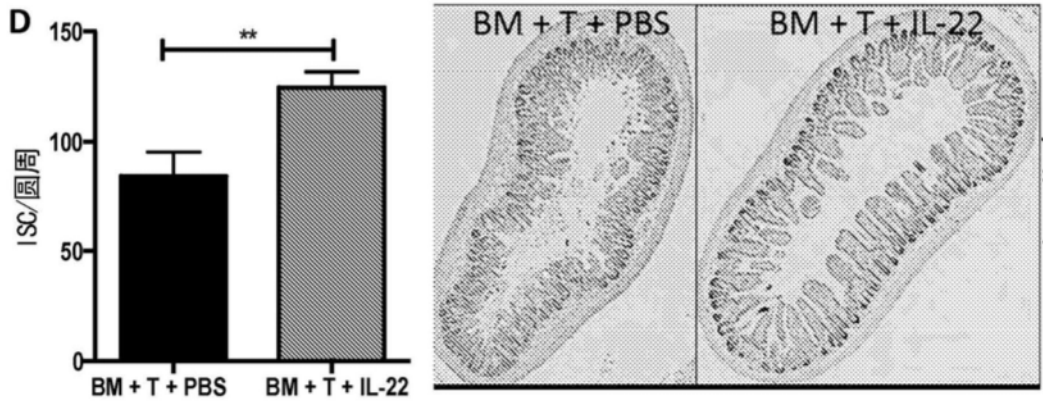


图4D

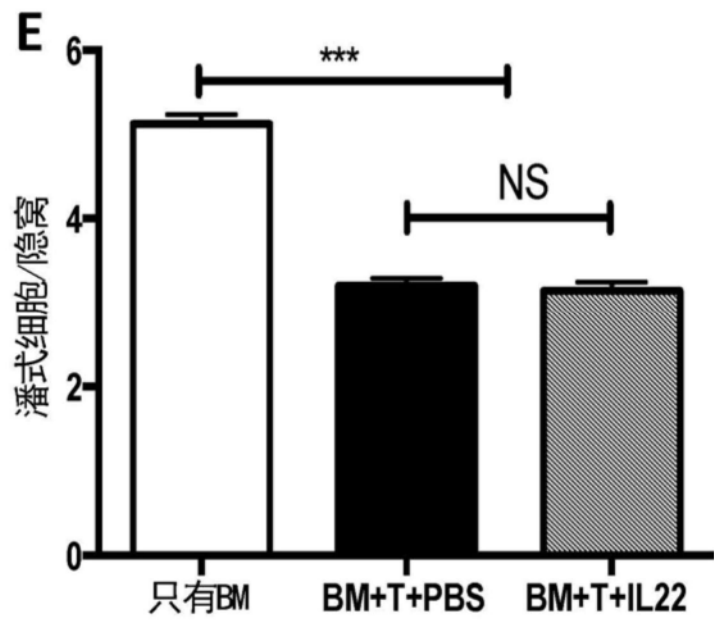


图4E

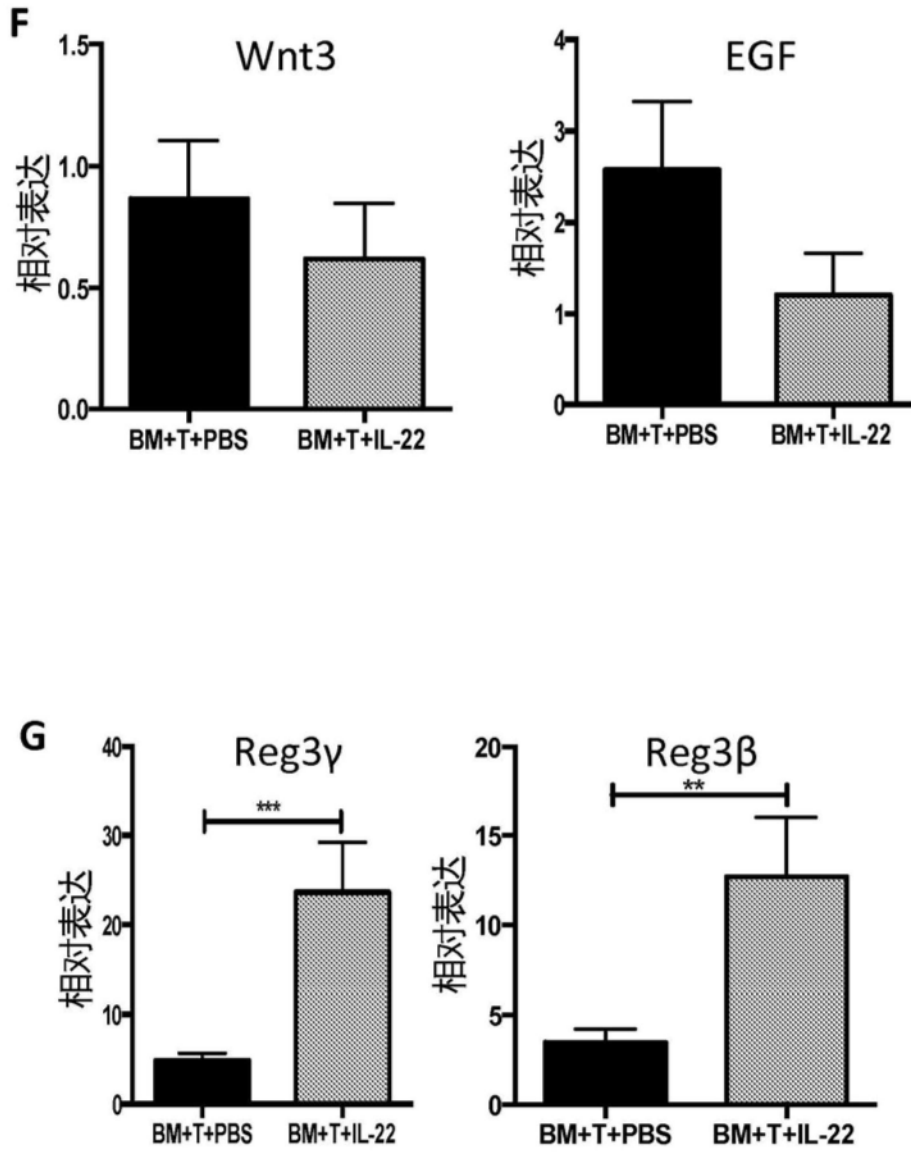


图4F-4G

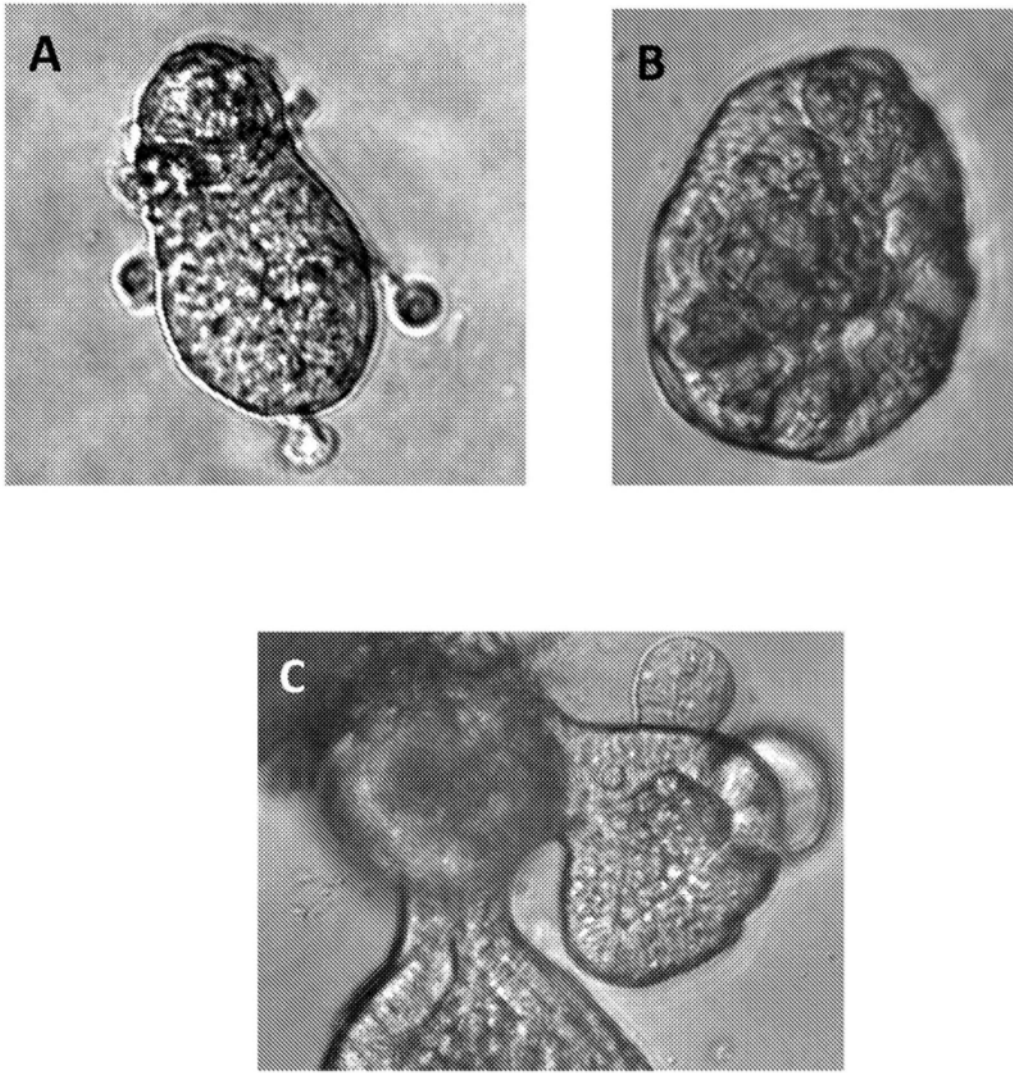


图5A-5C

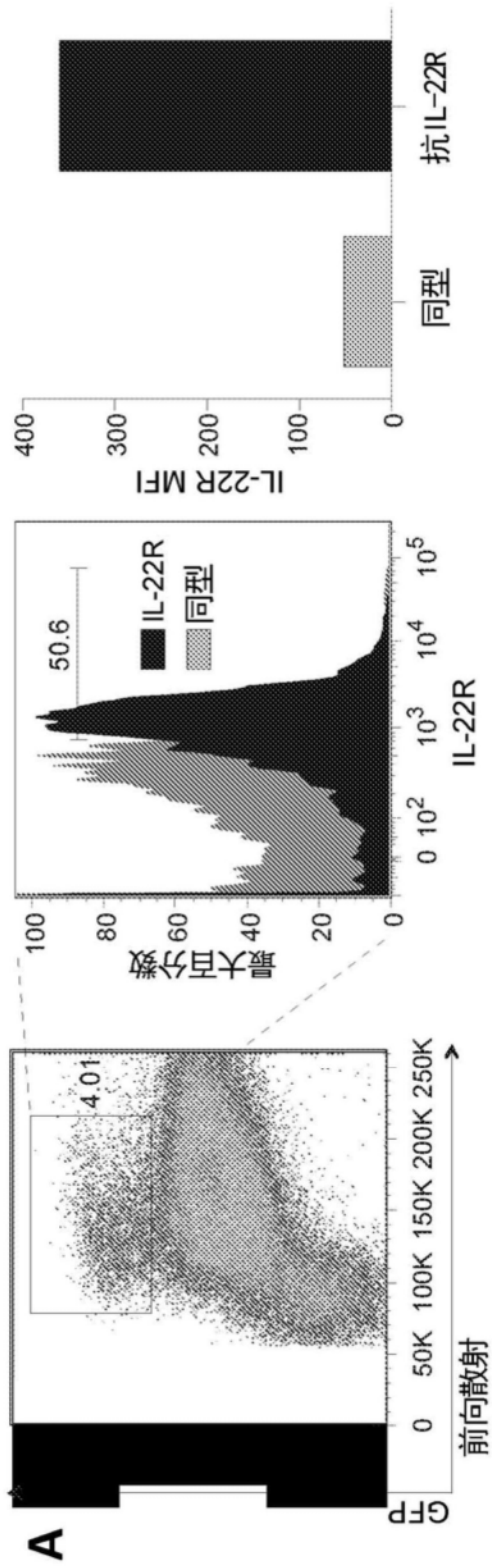


图6A

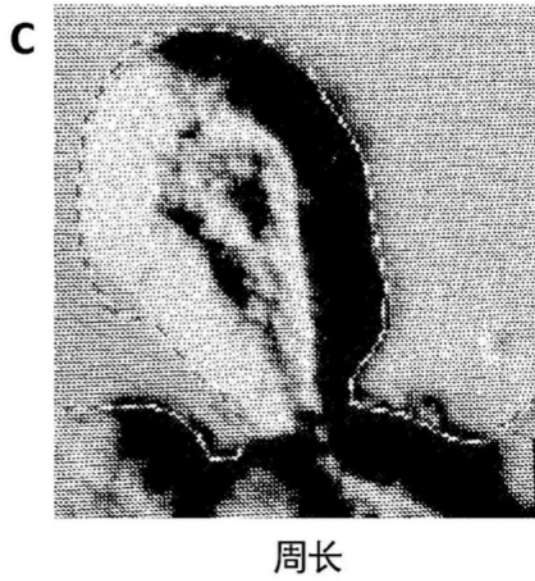
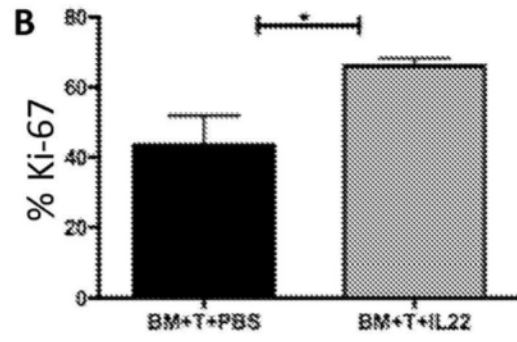


图6B-6C

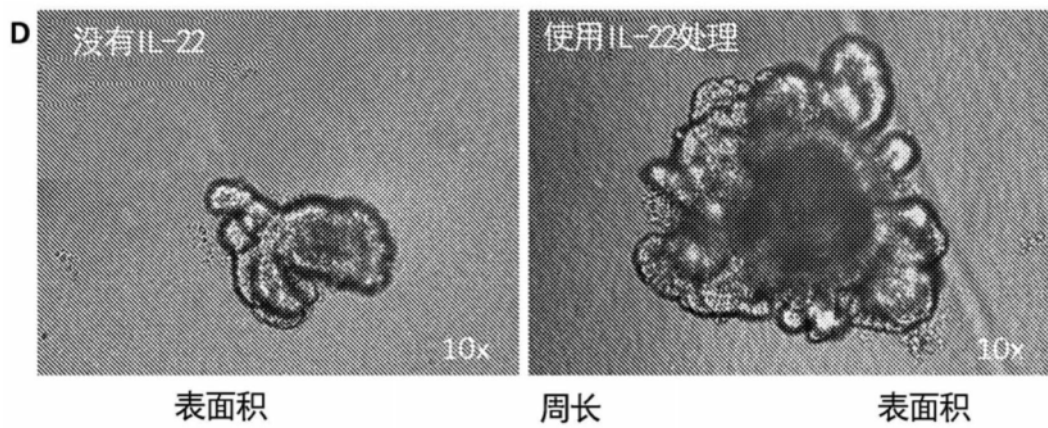


图6D

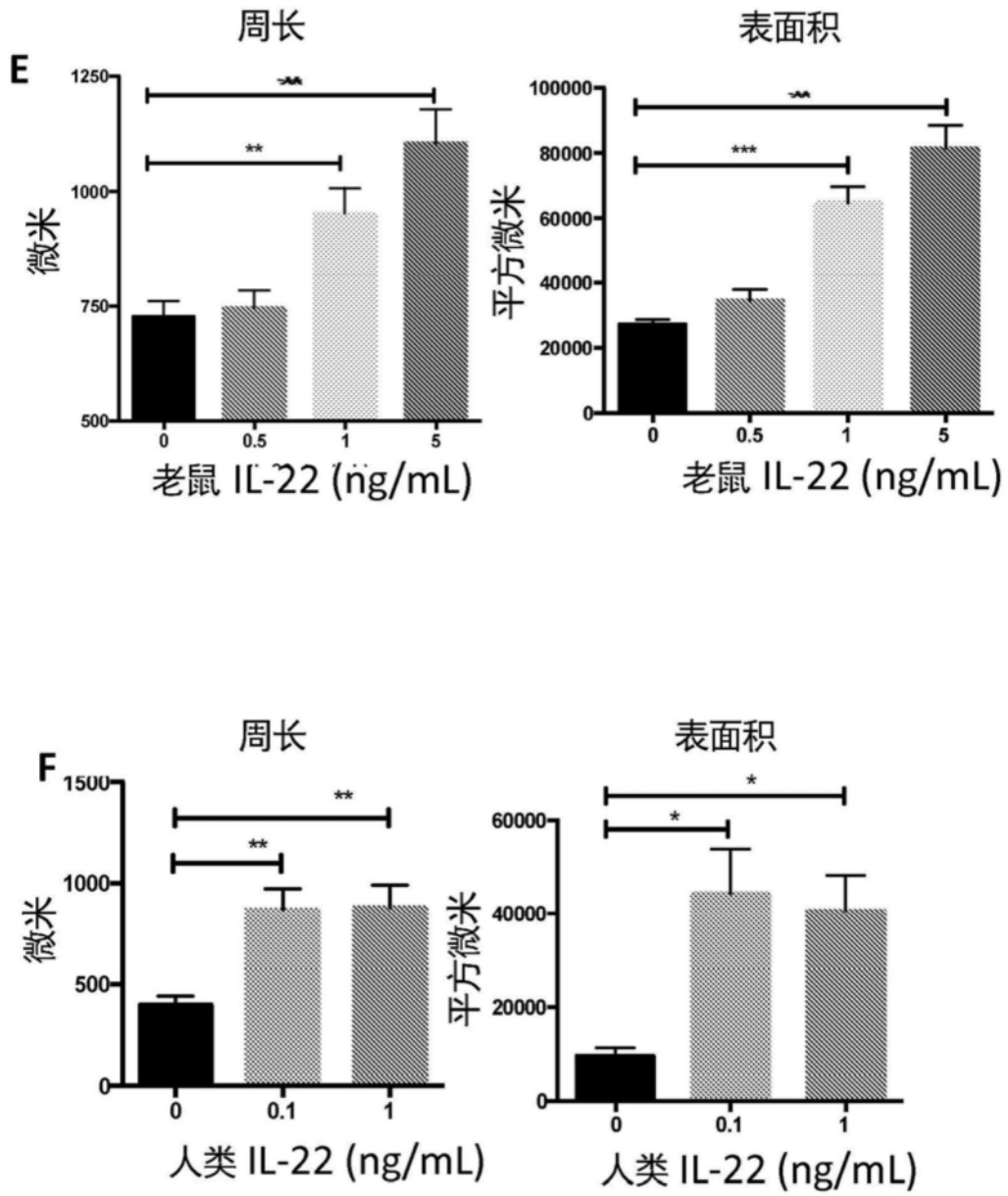


图6E-6F

A

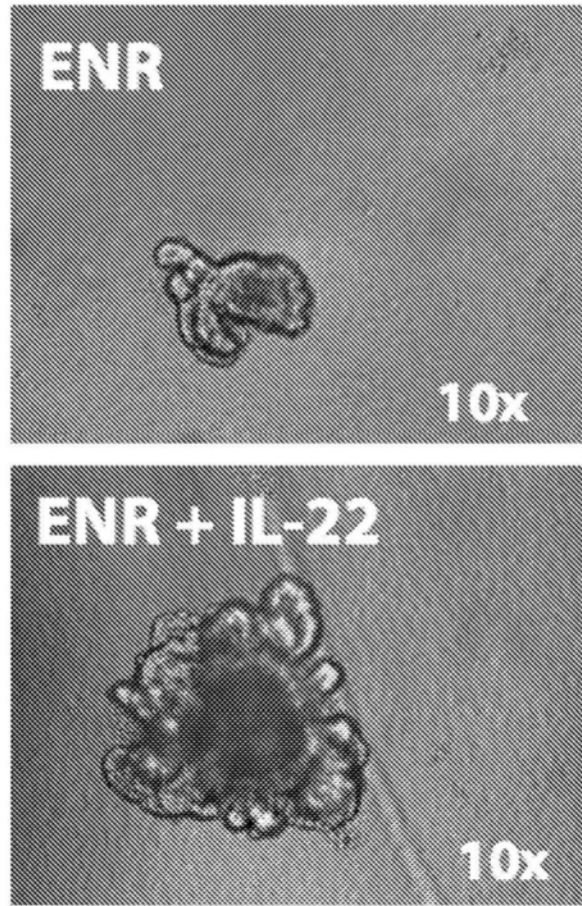


图7A

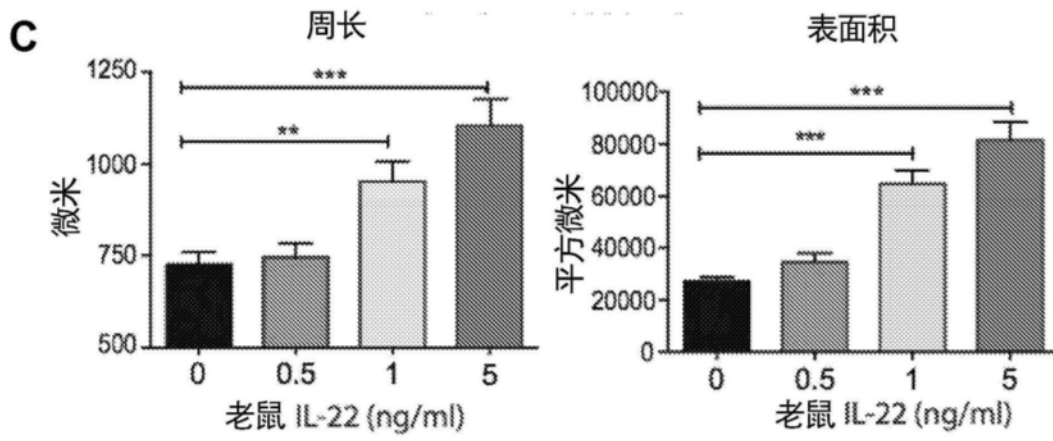


图7B-7C

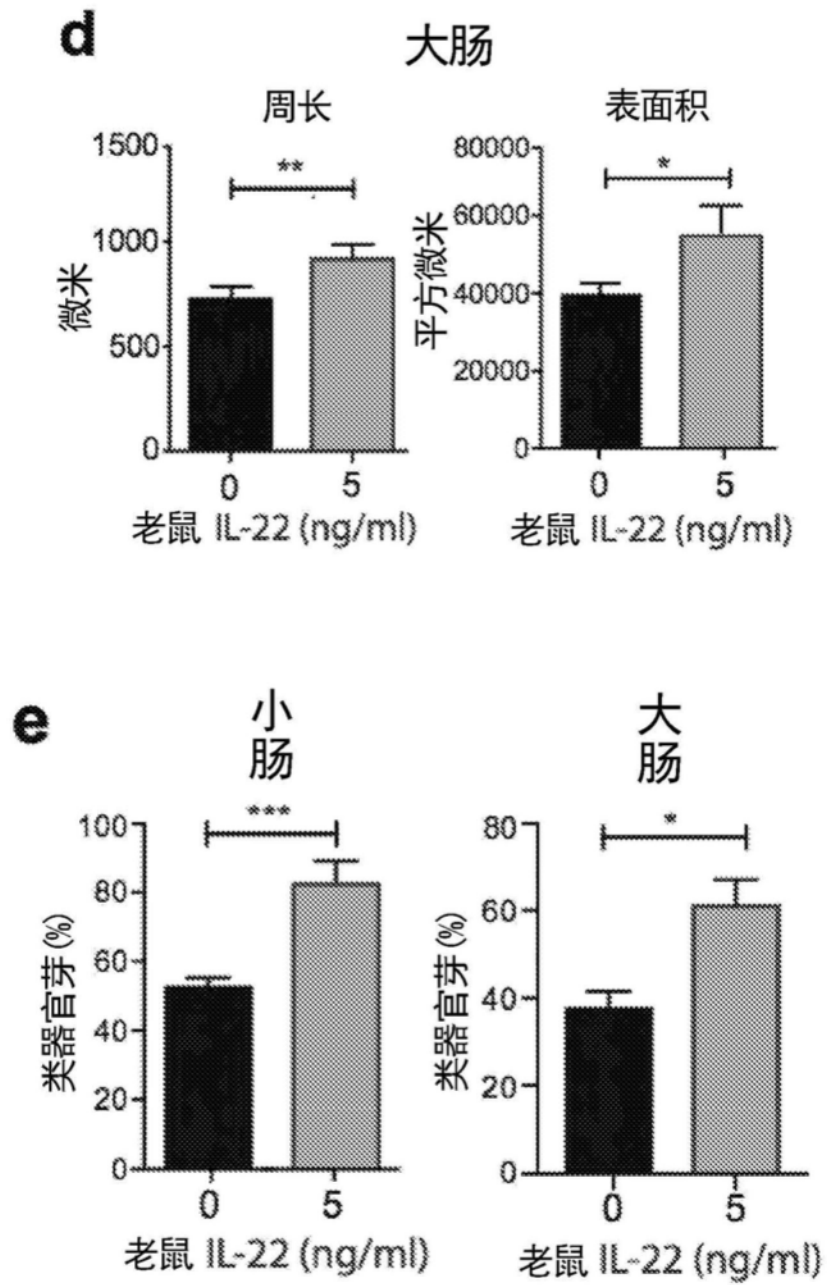


图7D-7E

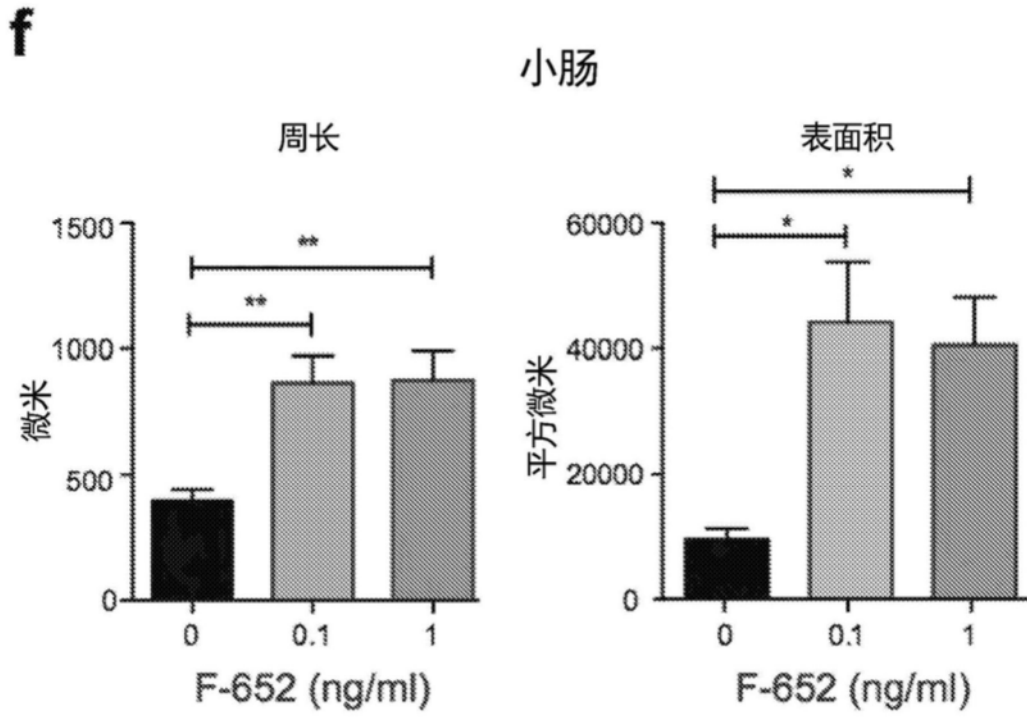


图7F

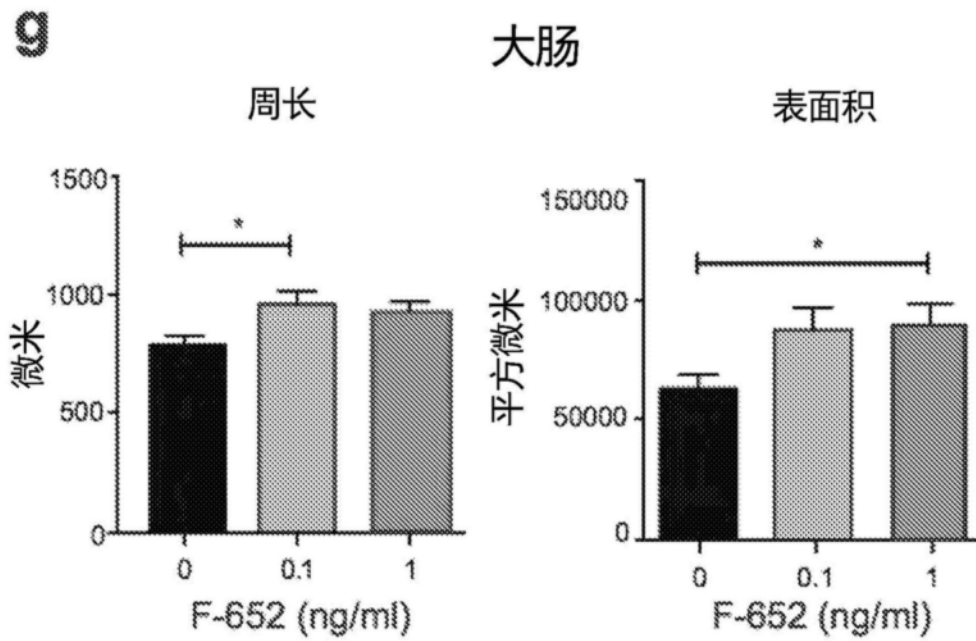


图7G

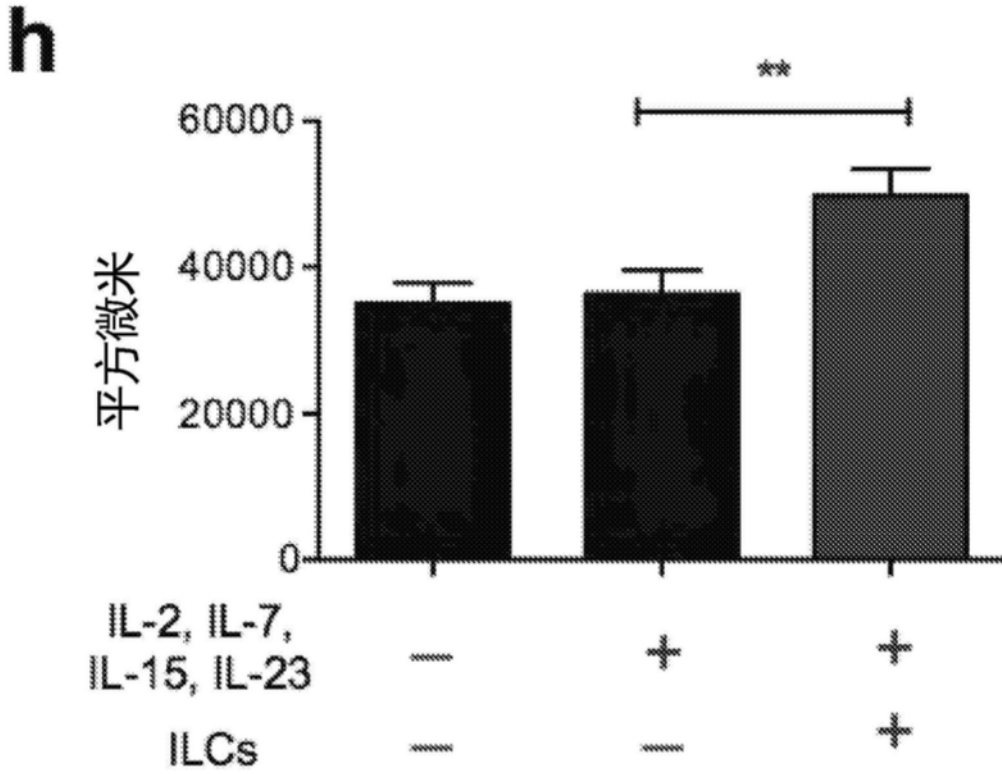


图7H

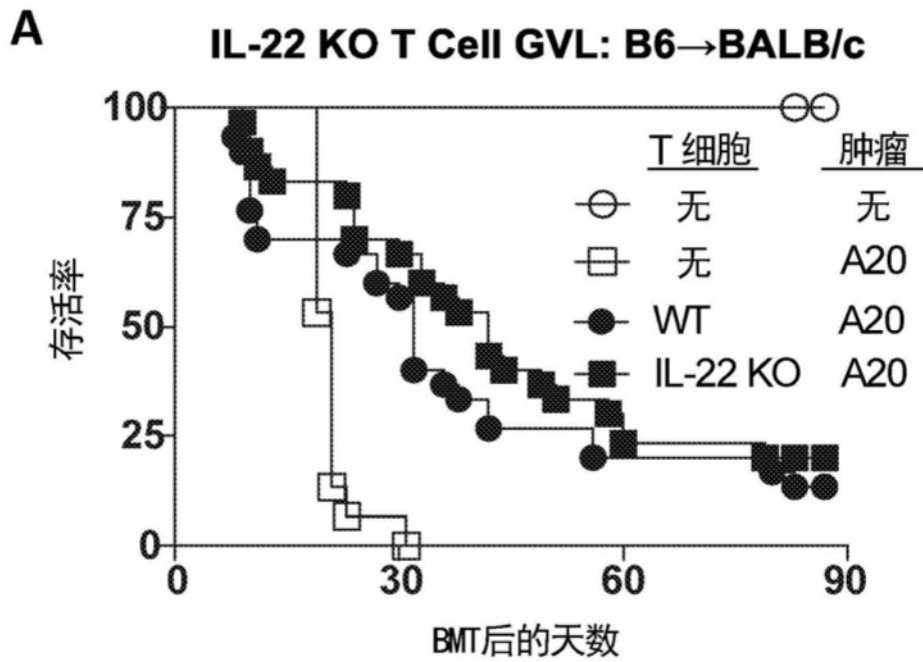


图8A

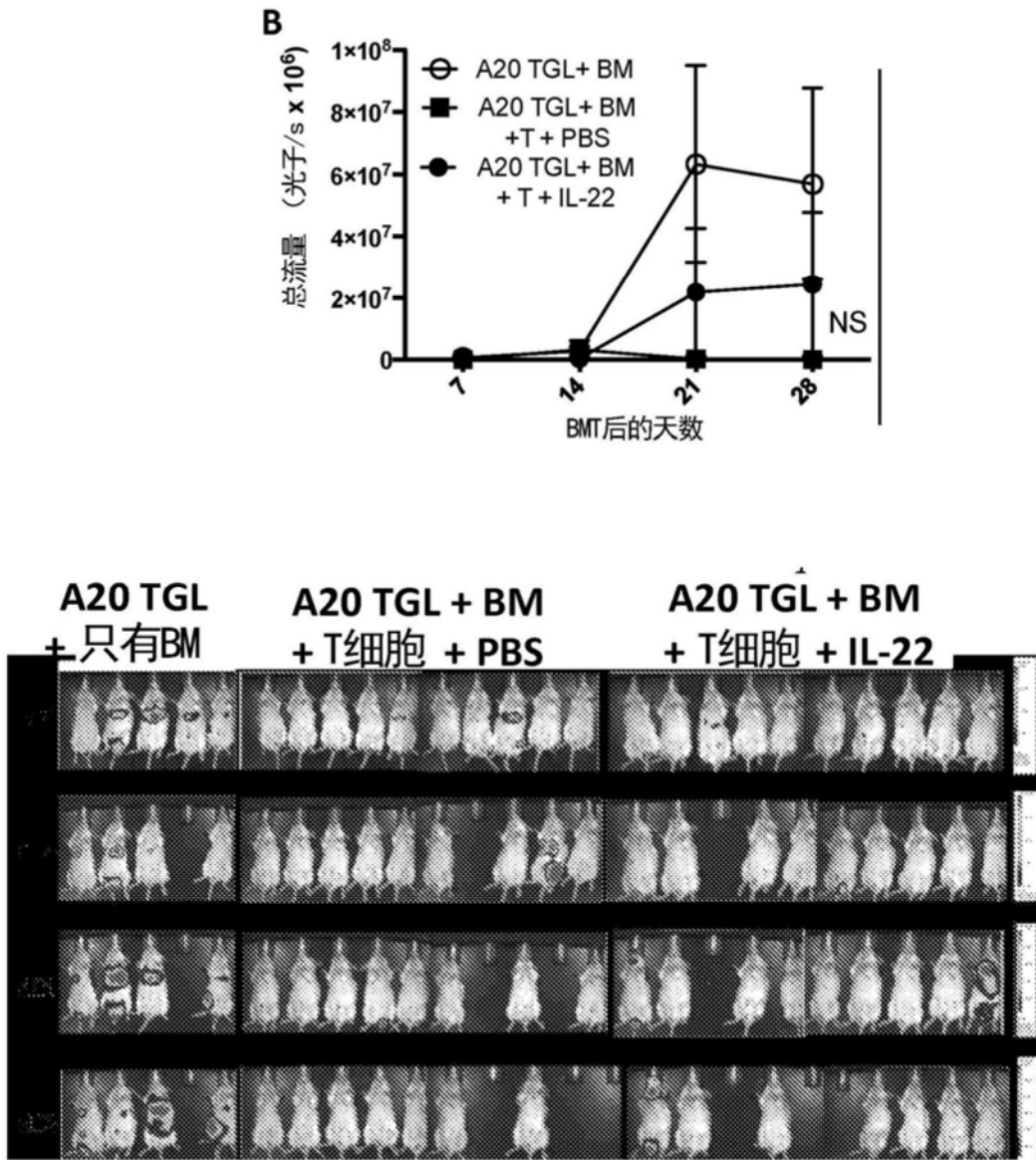


图8B

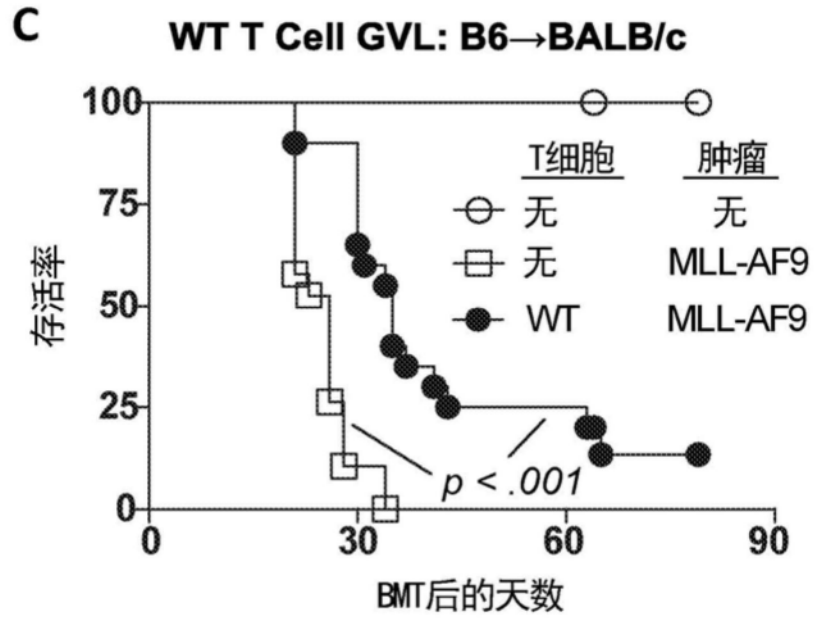


图8C

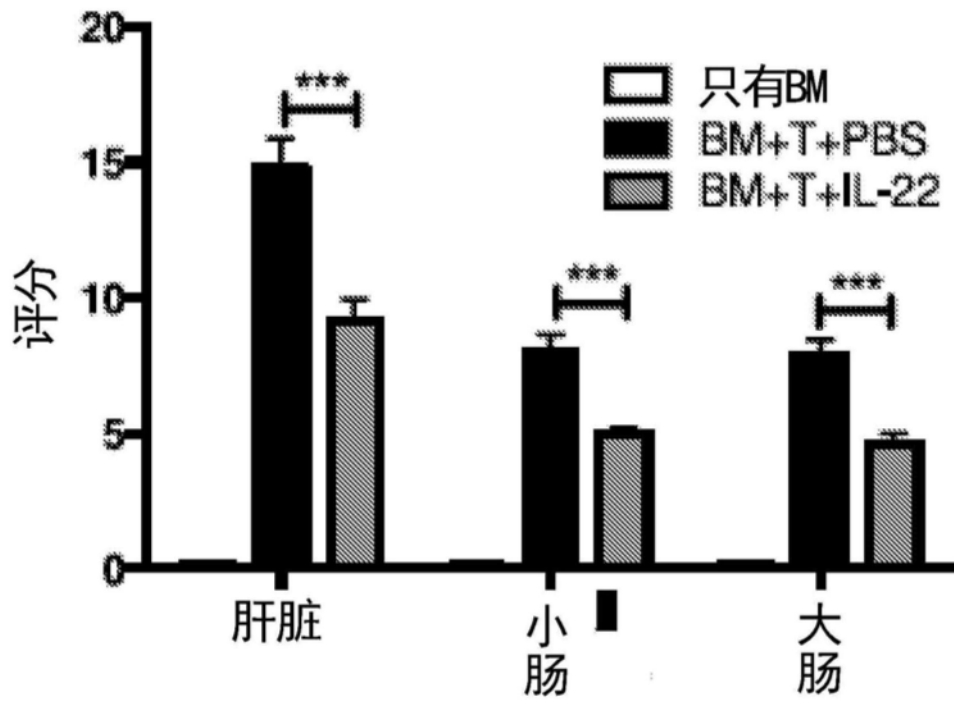


图9

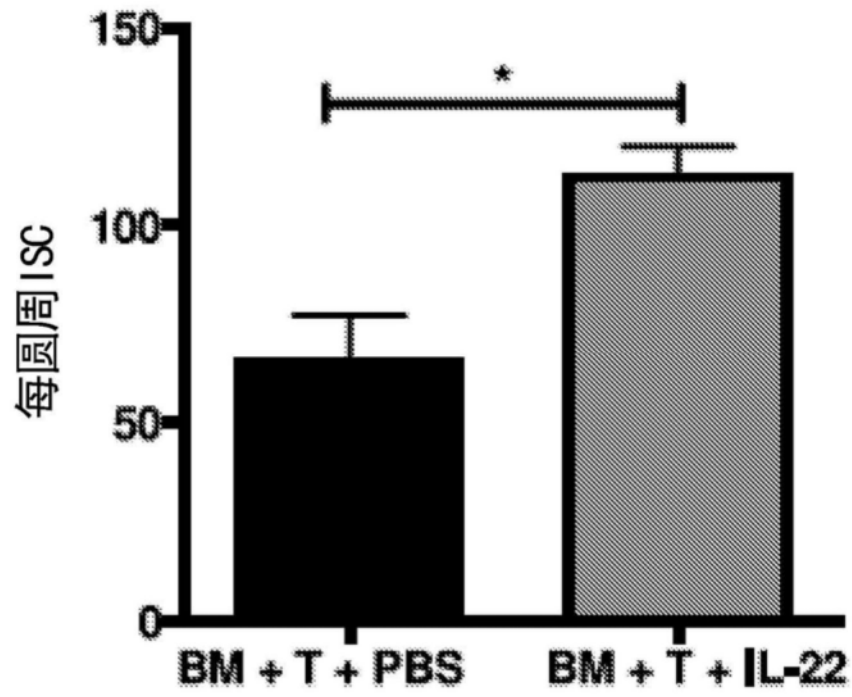


图10

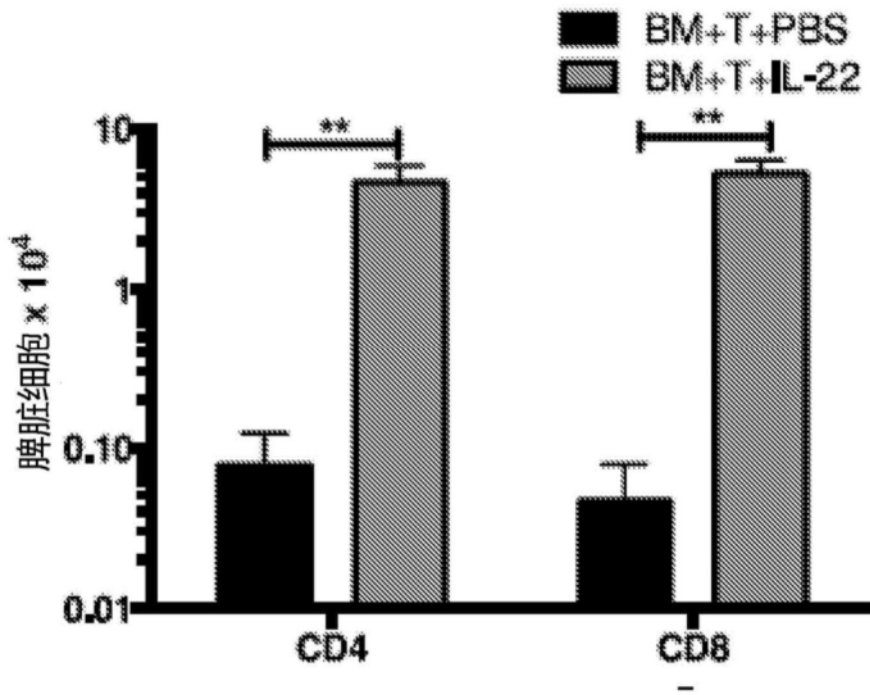


图11

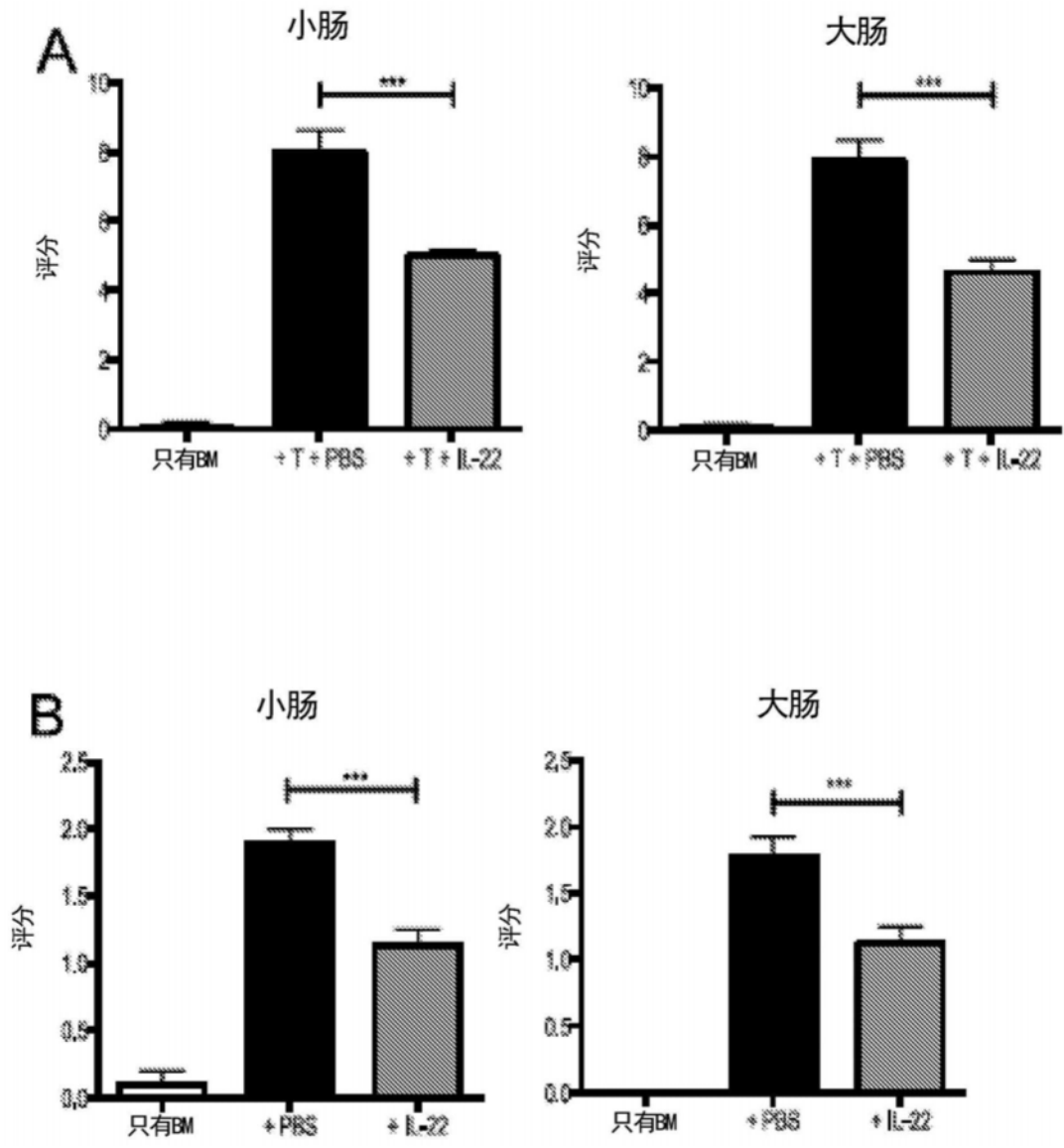


图12A-12B

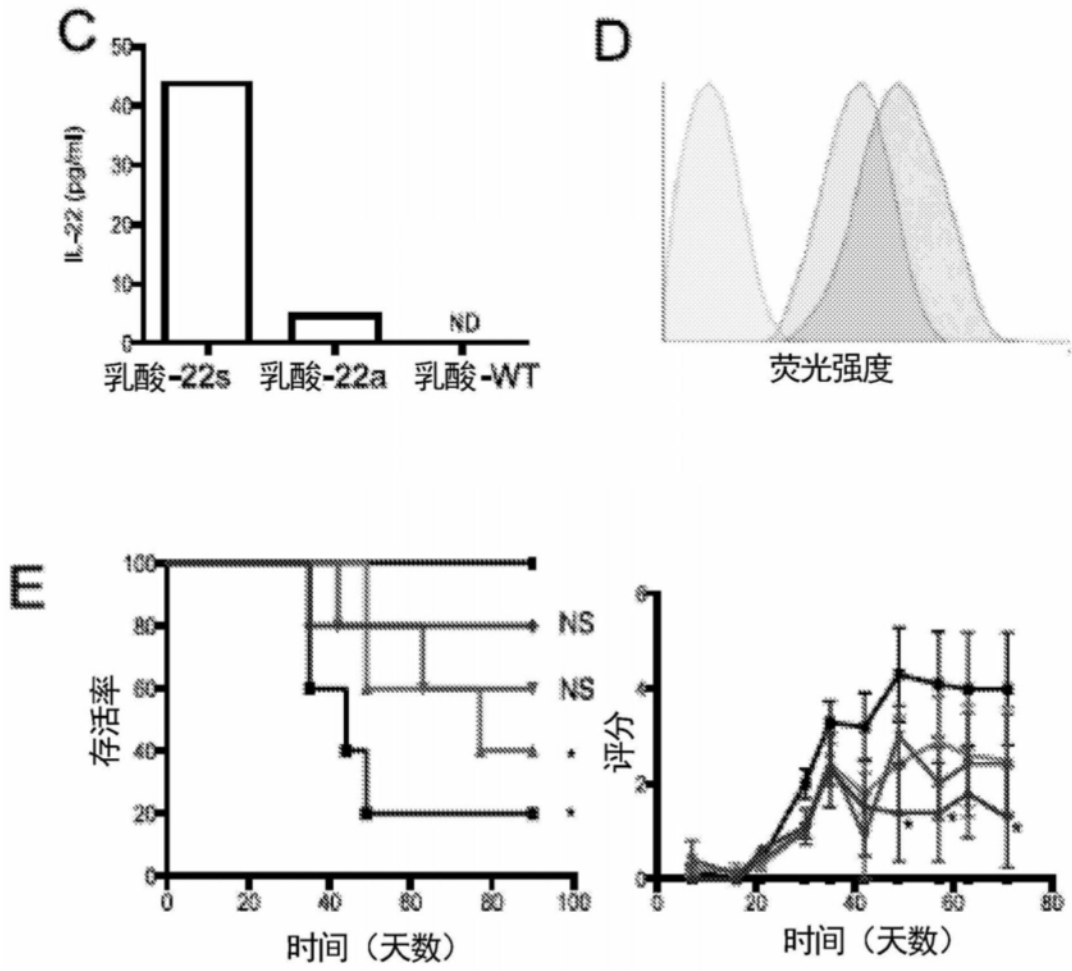


图12C-12E

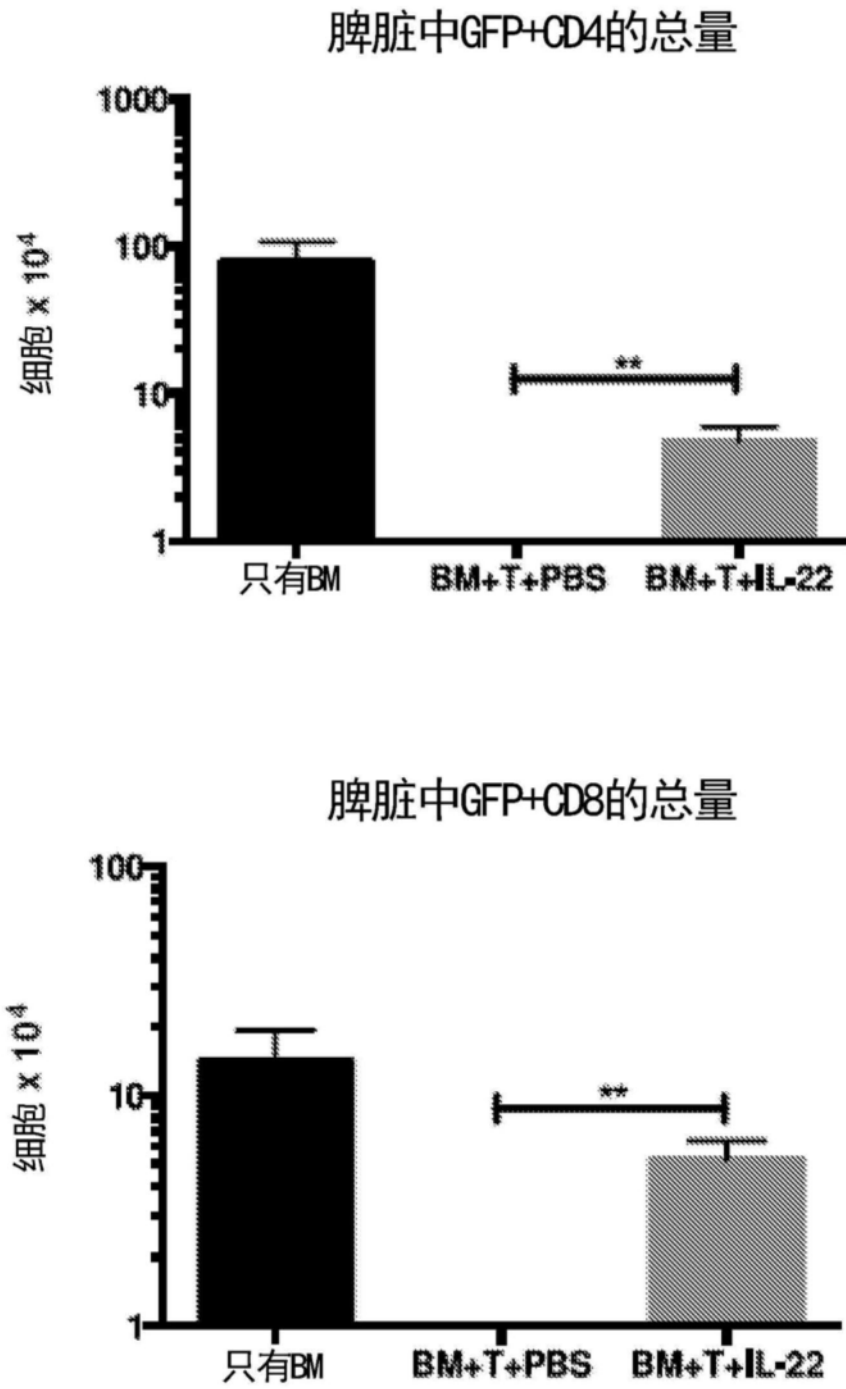


图13

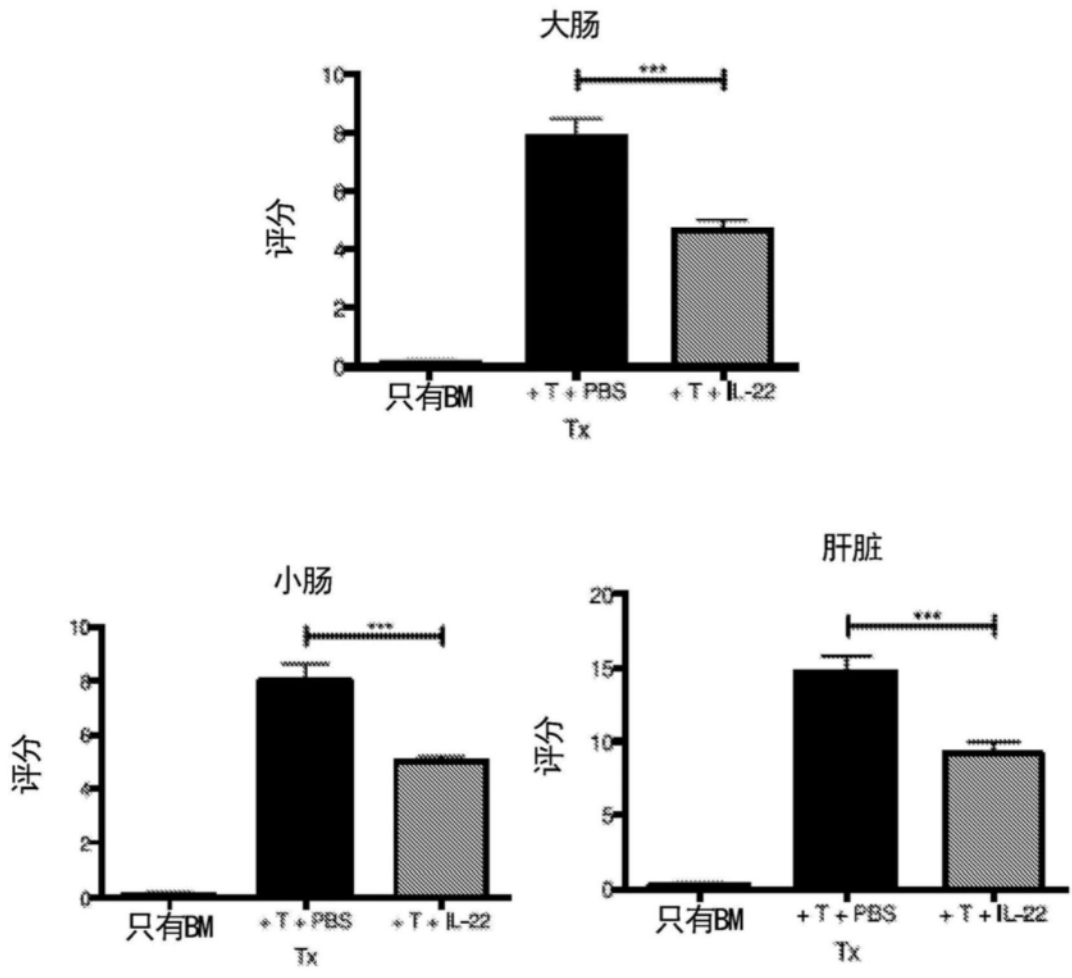


图14

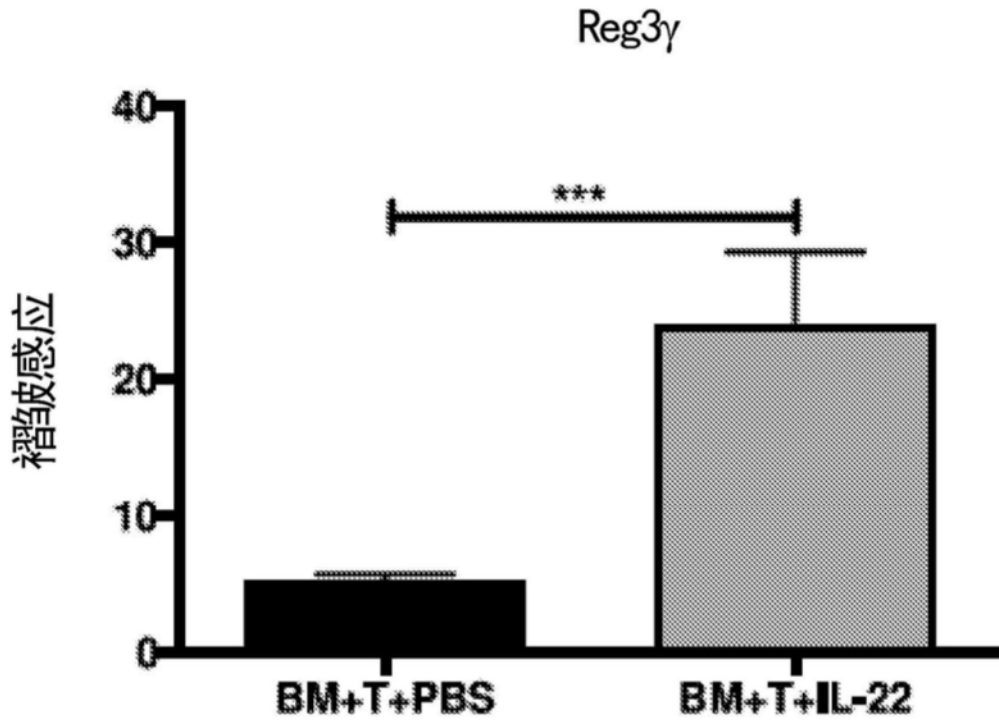


图15

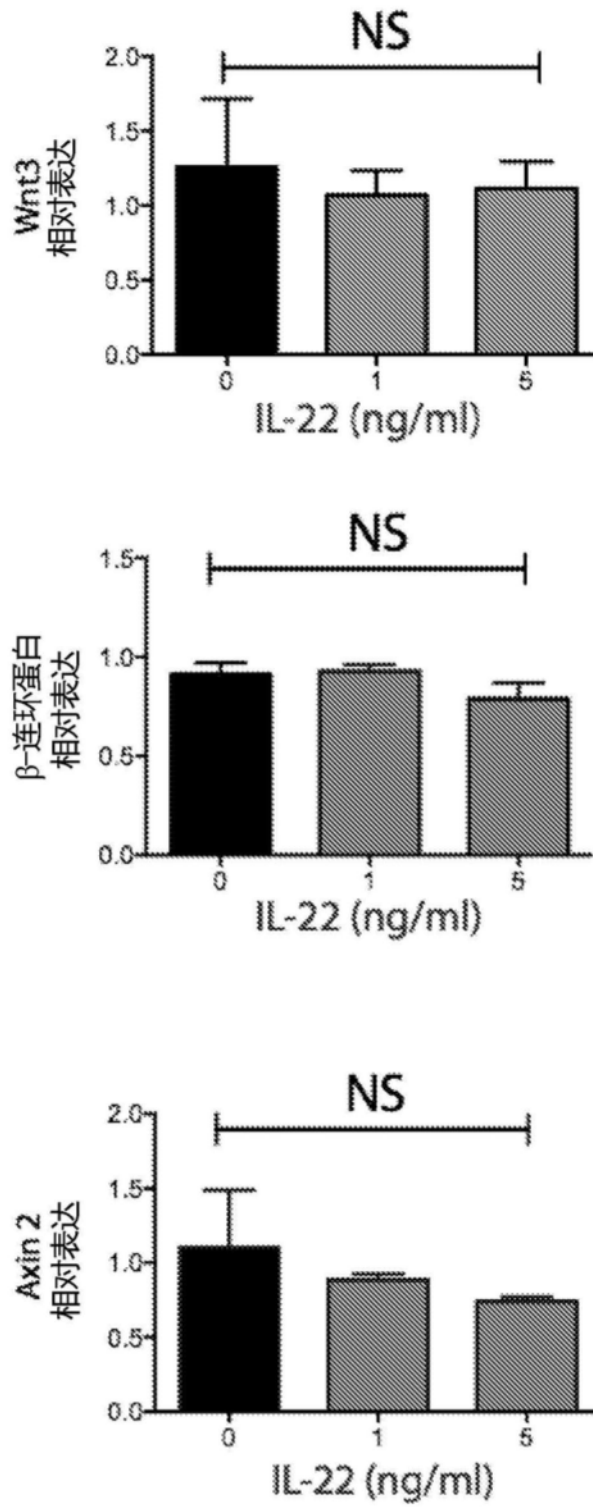


图16A

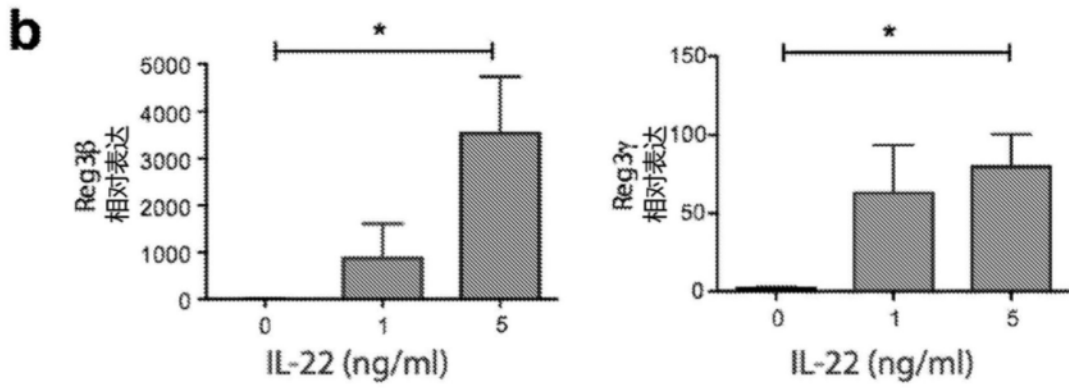


图16B

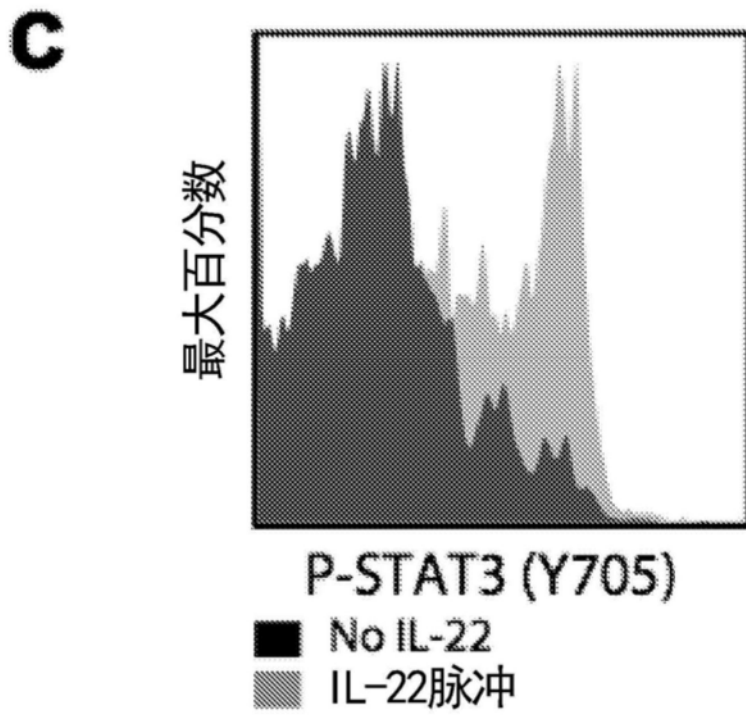


图16C

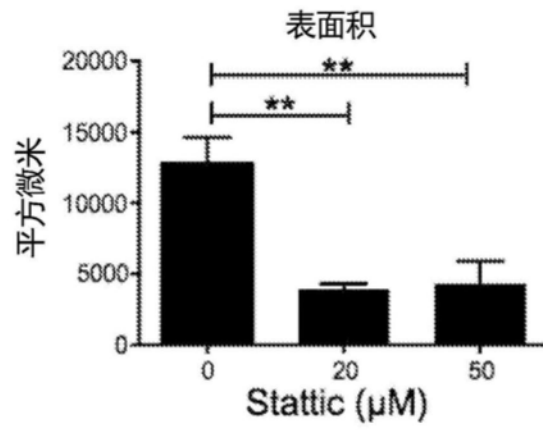
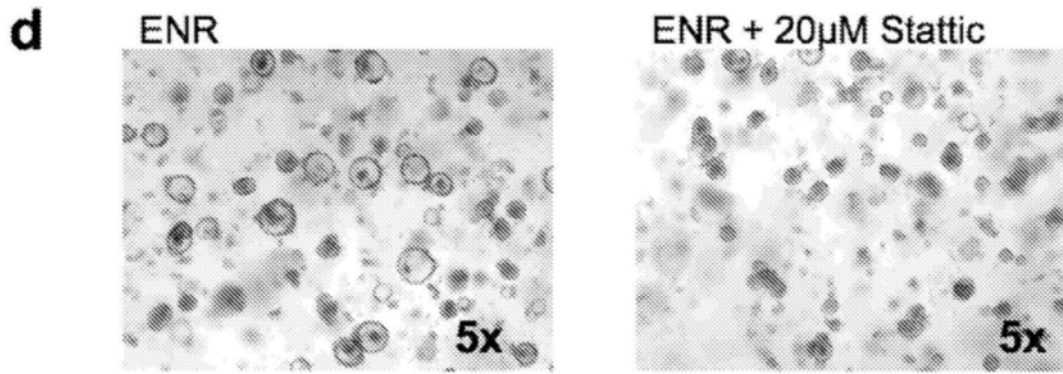


图16D

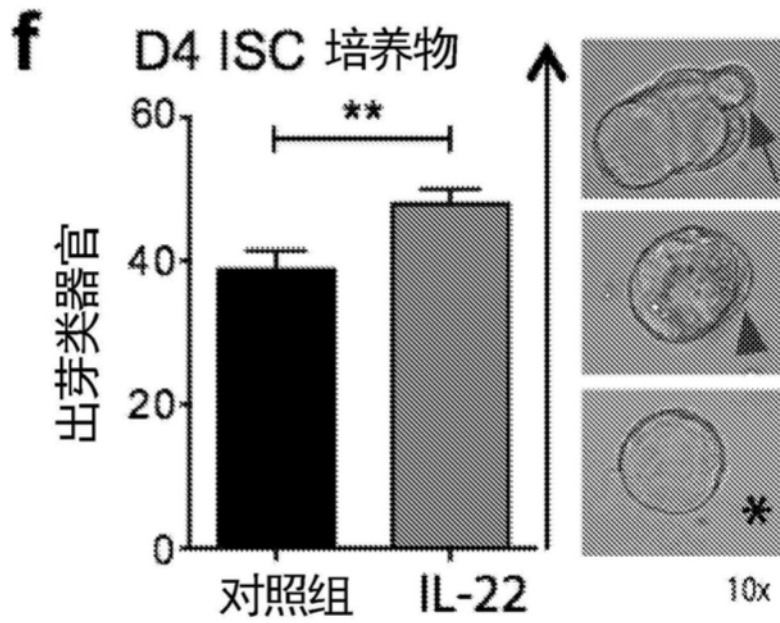
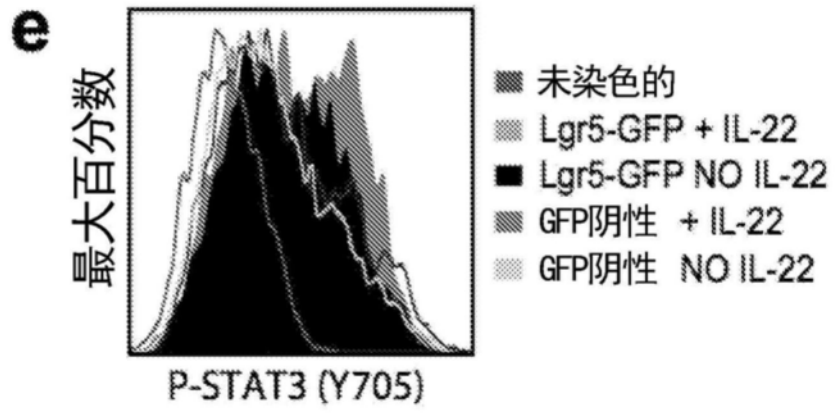


图16E-16F

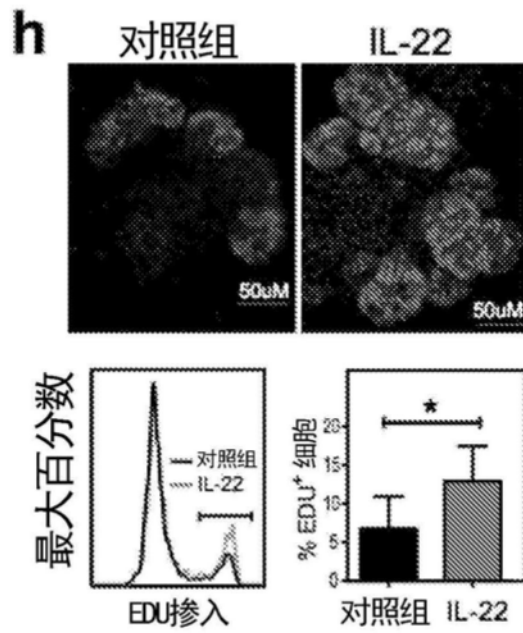
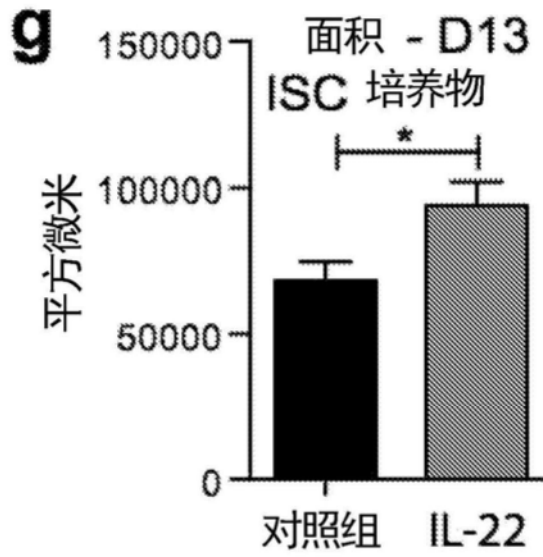


图16G-16H

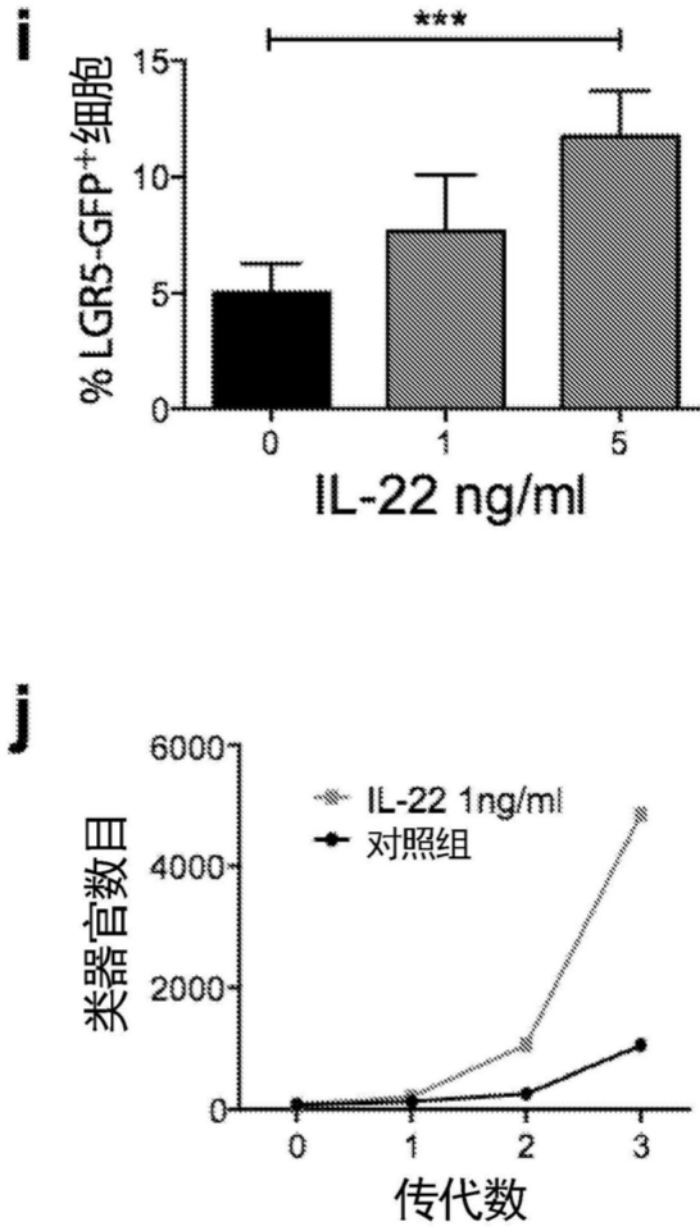


图16I-16J

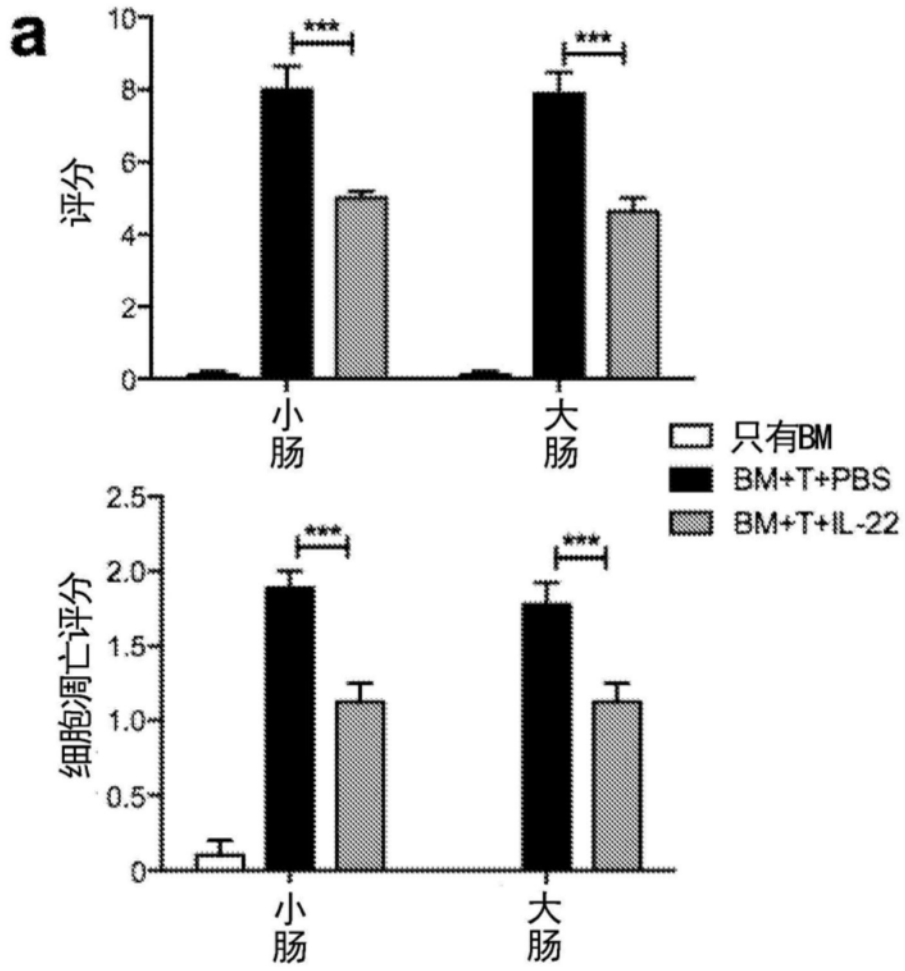


图17A

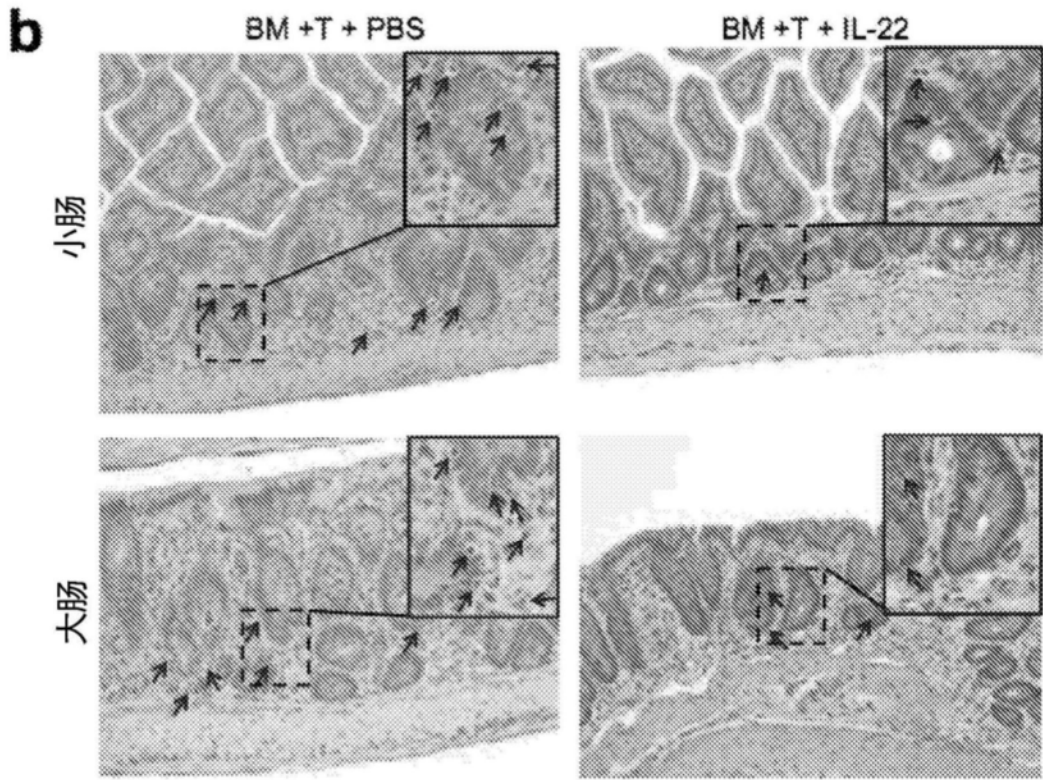


图17B

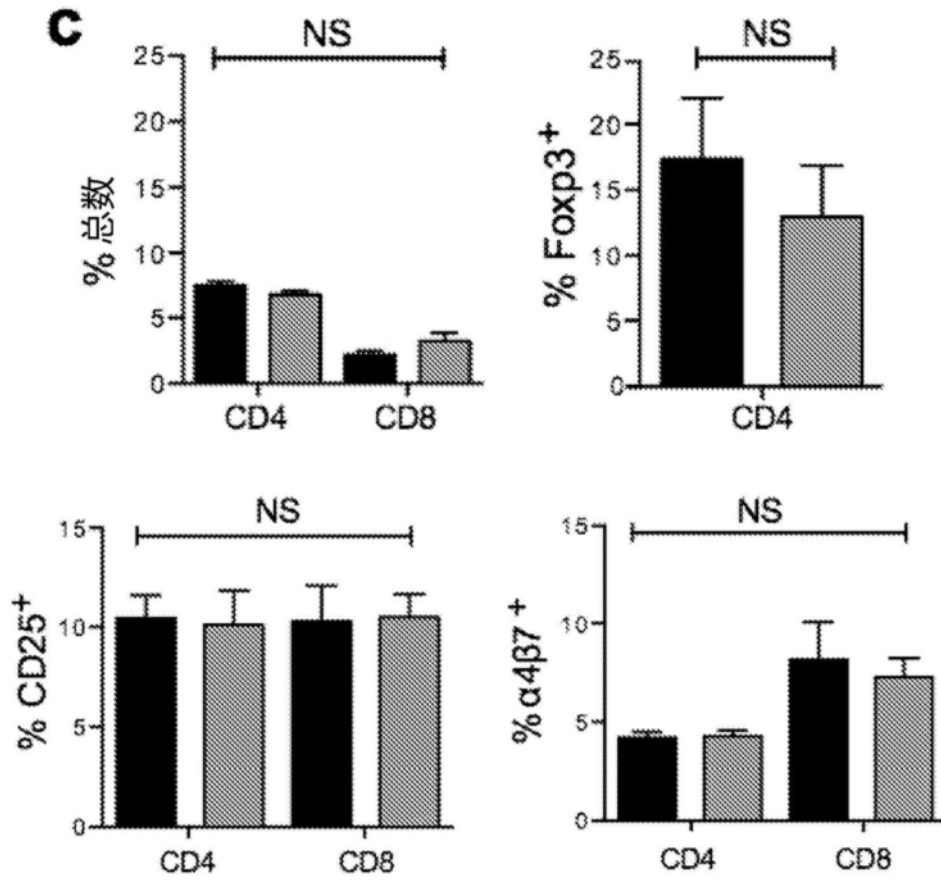


图17C

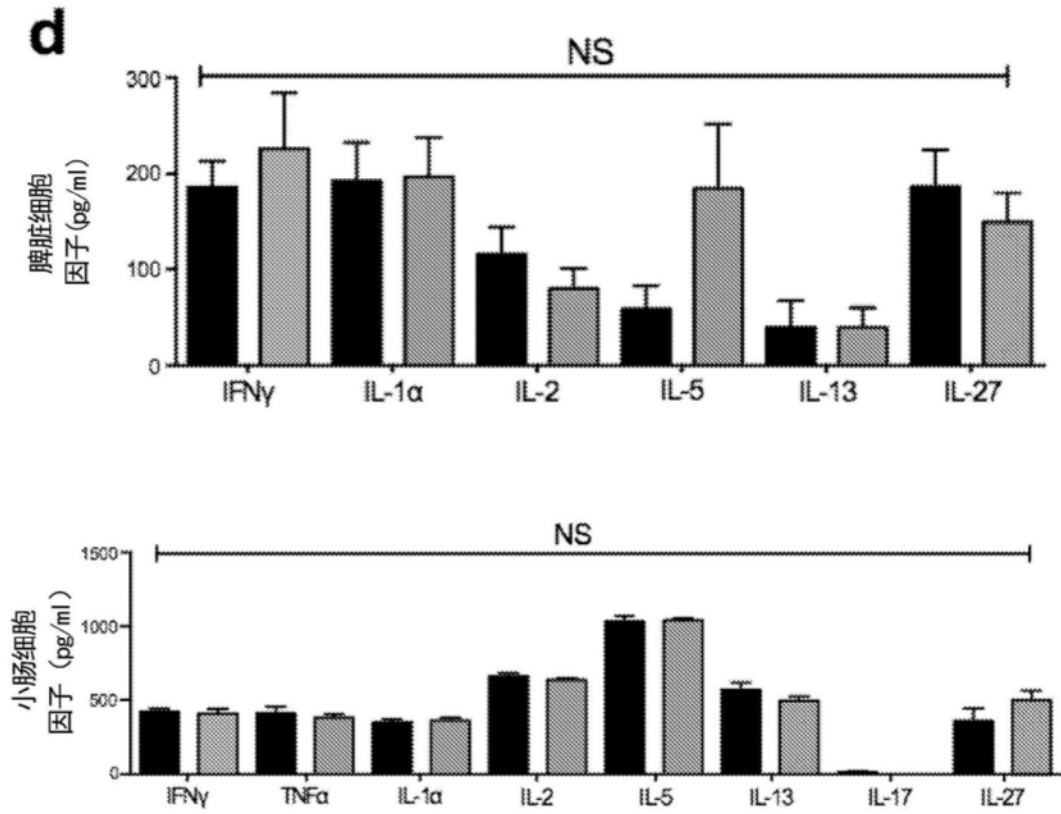


图17D

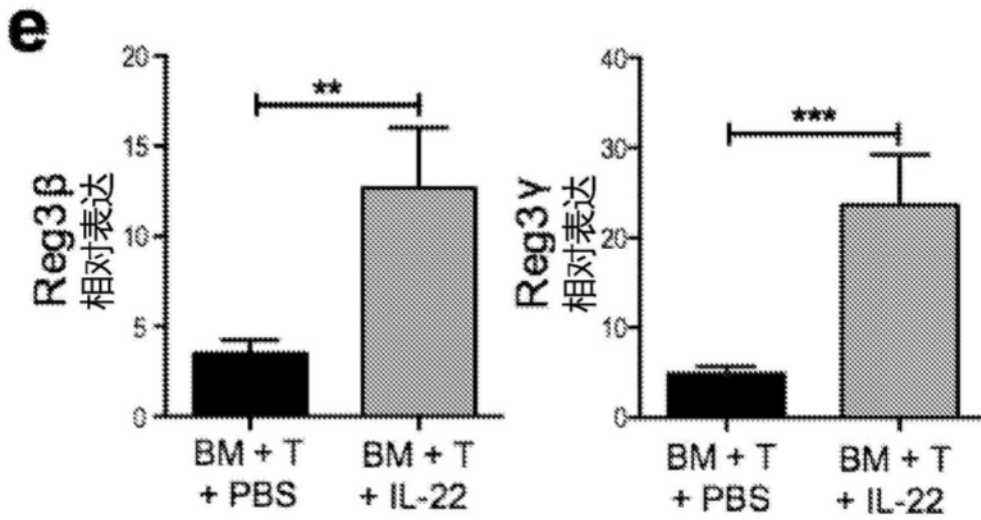


图17E

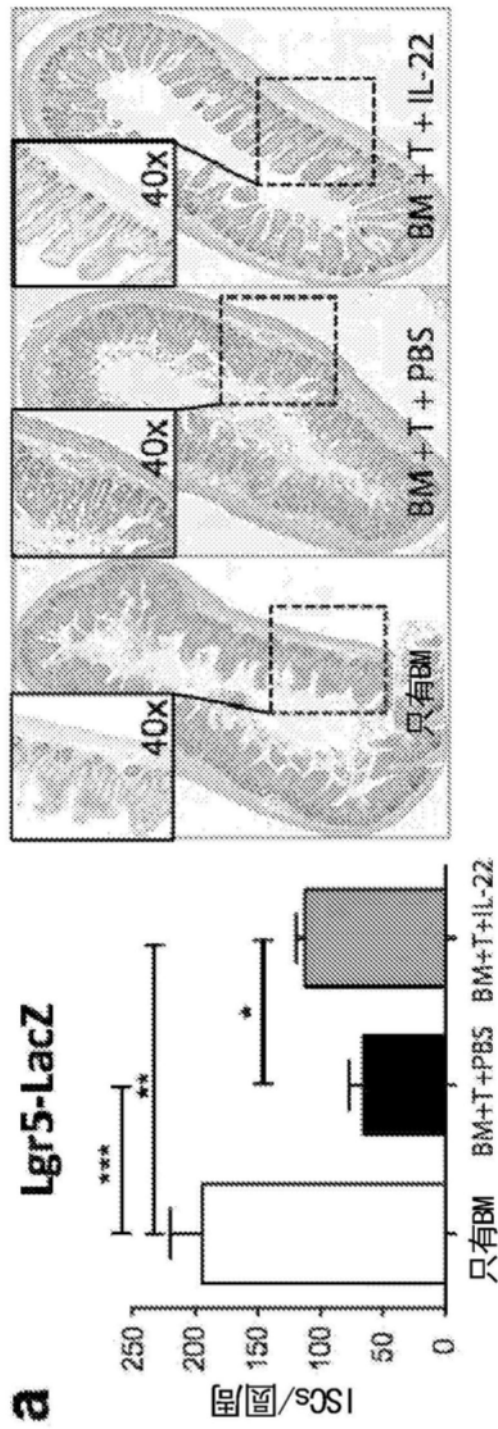


图18A

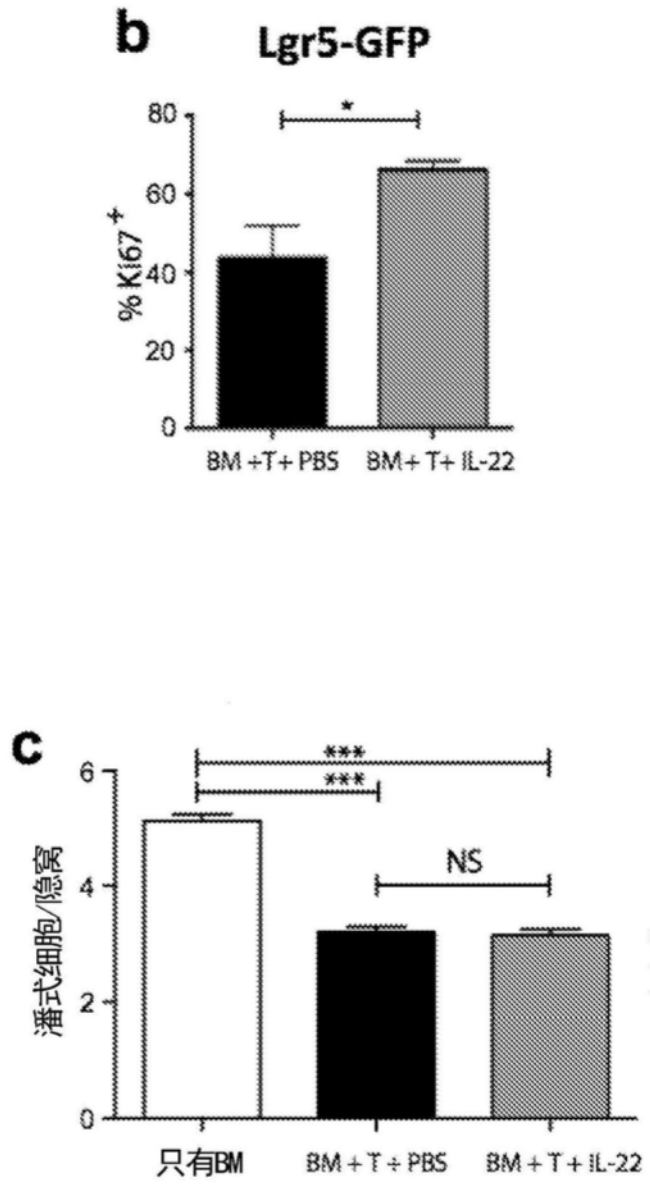


图18B-18C

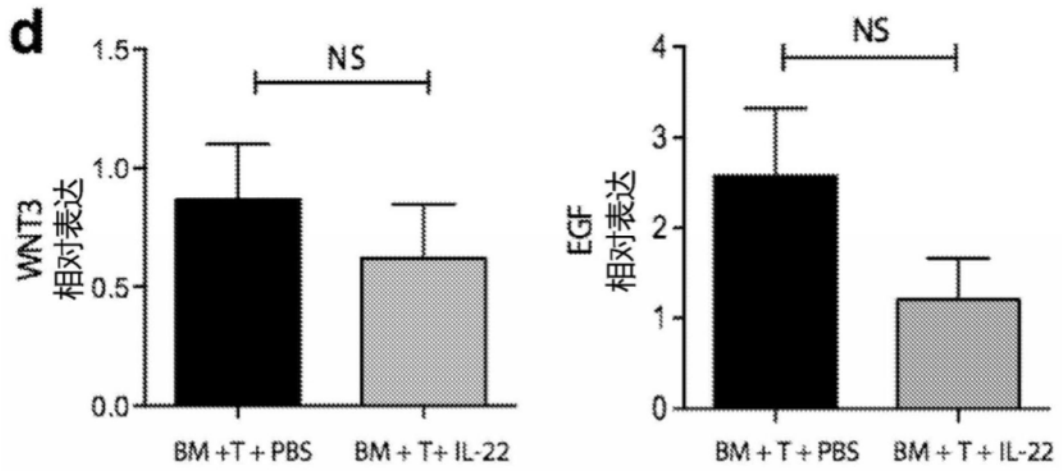


图18D

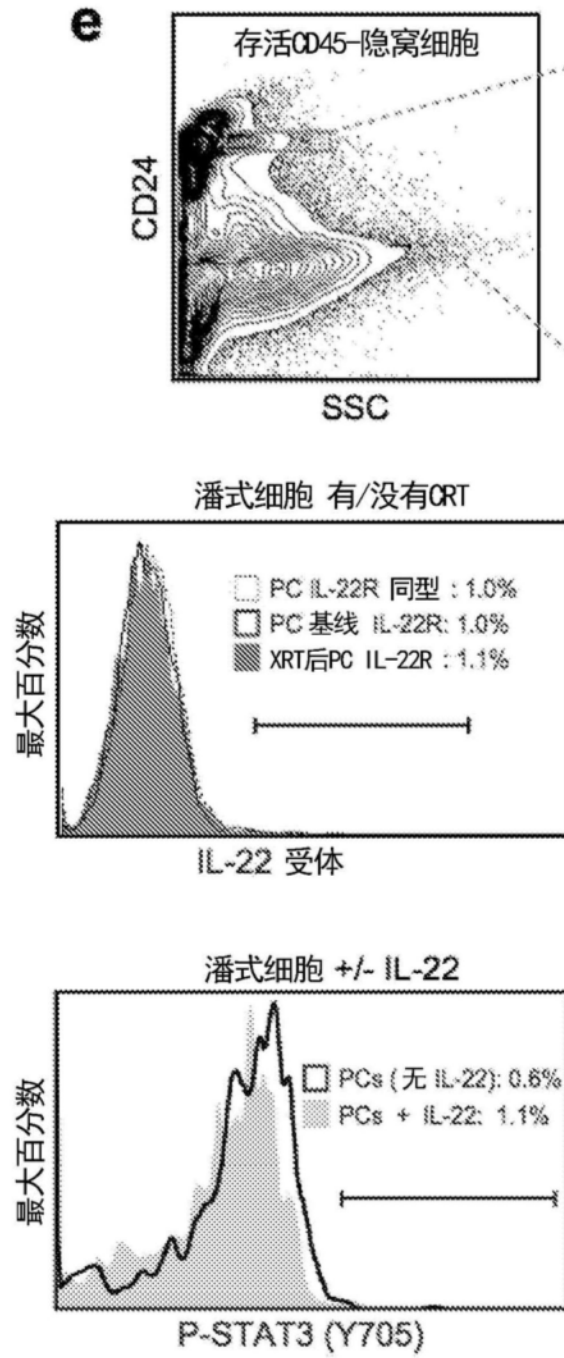


图18E

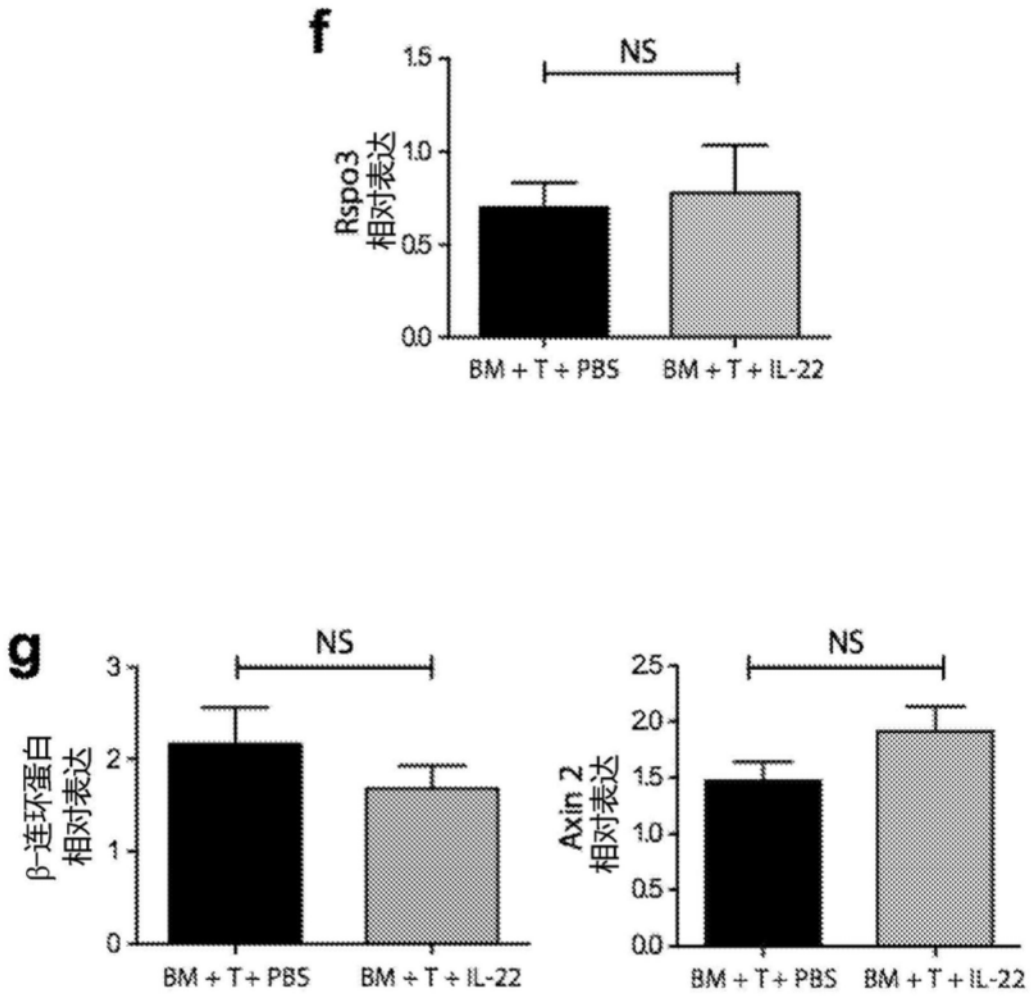


图18F-18G

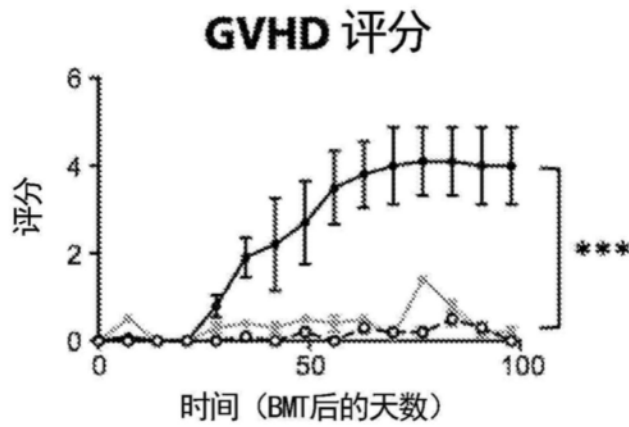


图18h

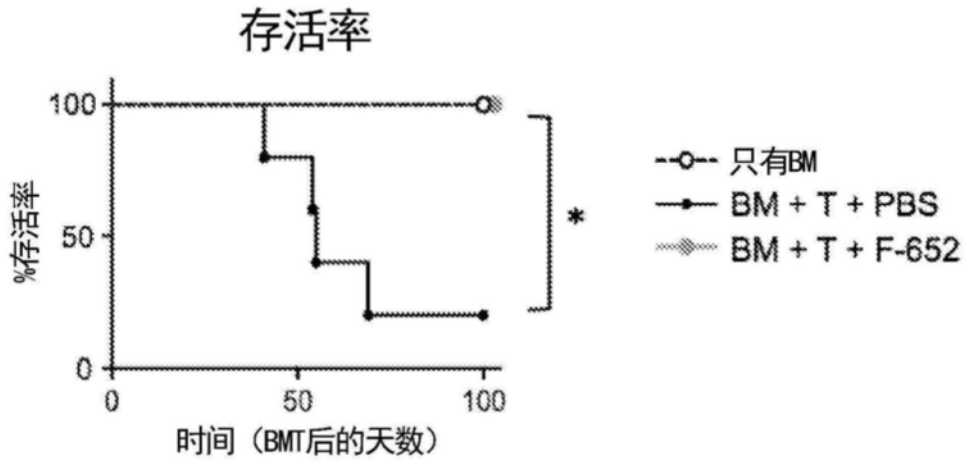


图18i

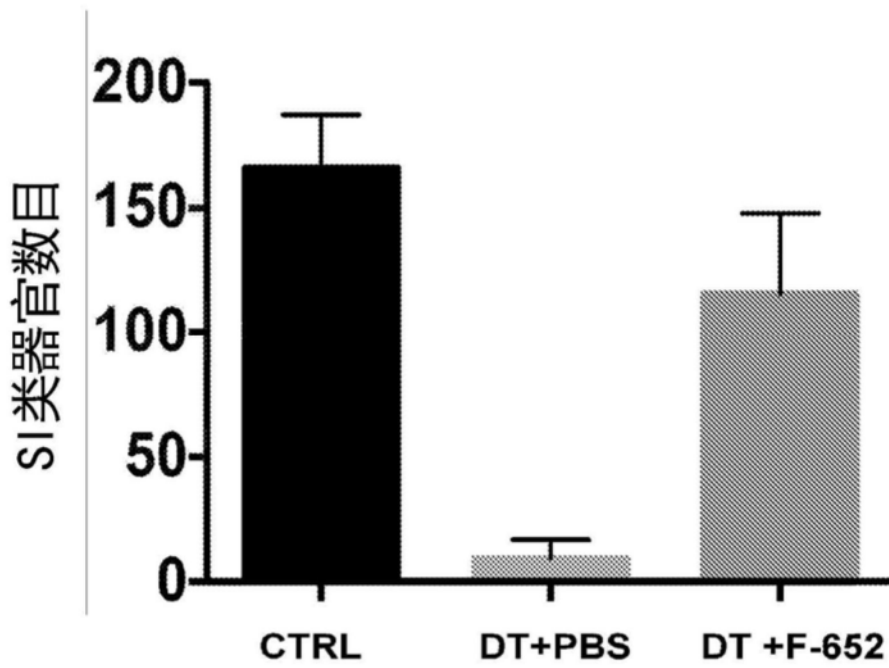


图19

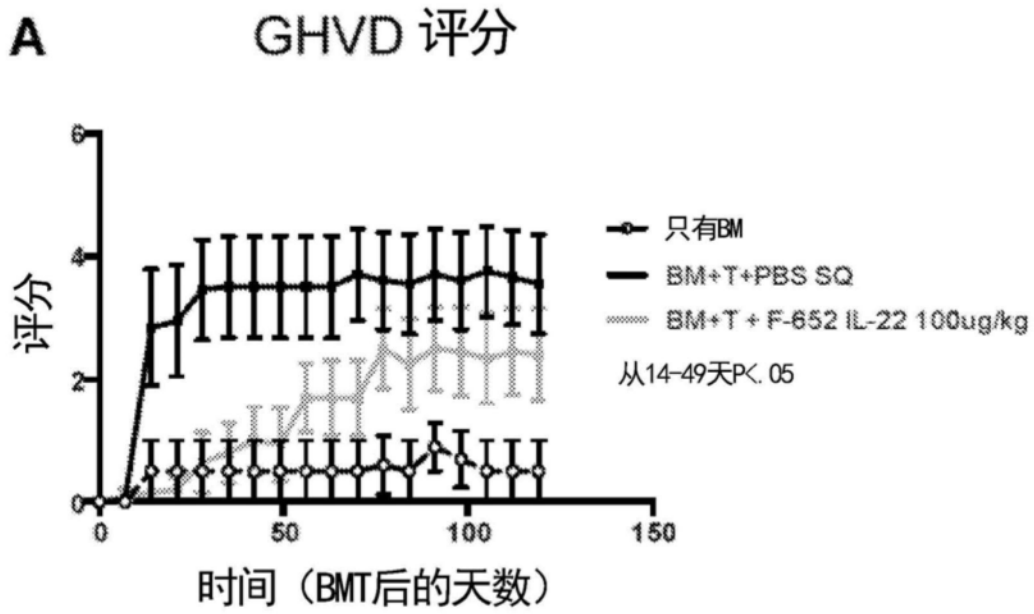


图20A

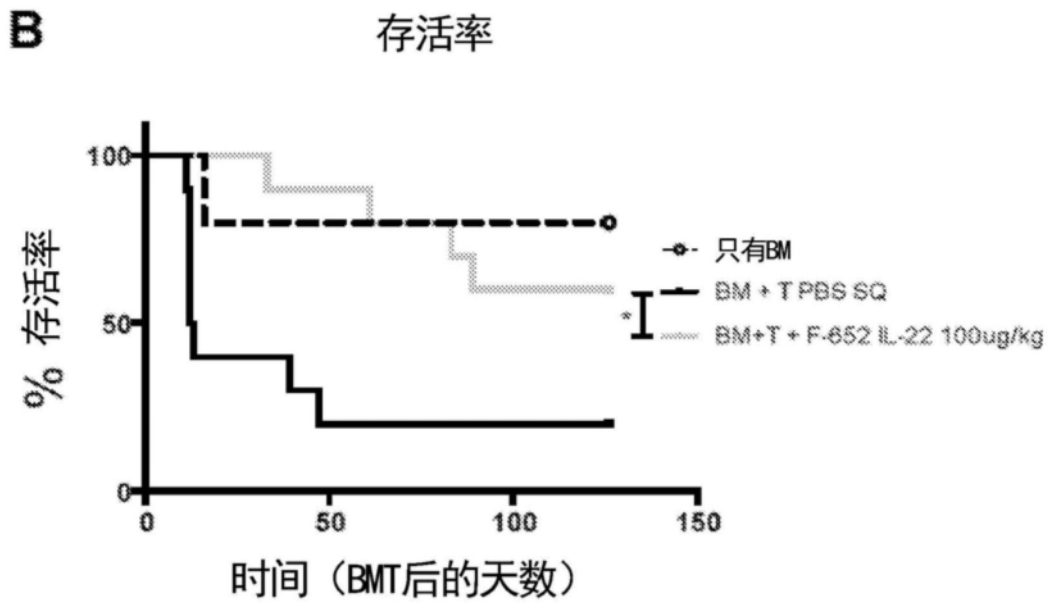


图20B

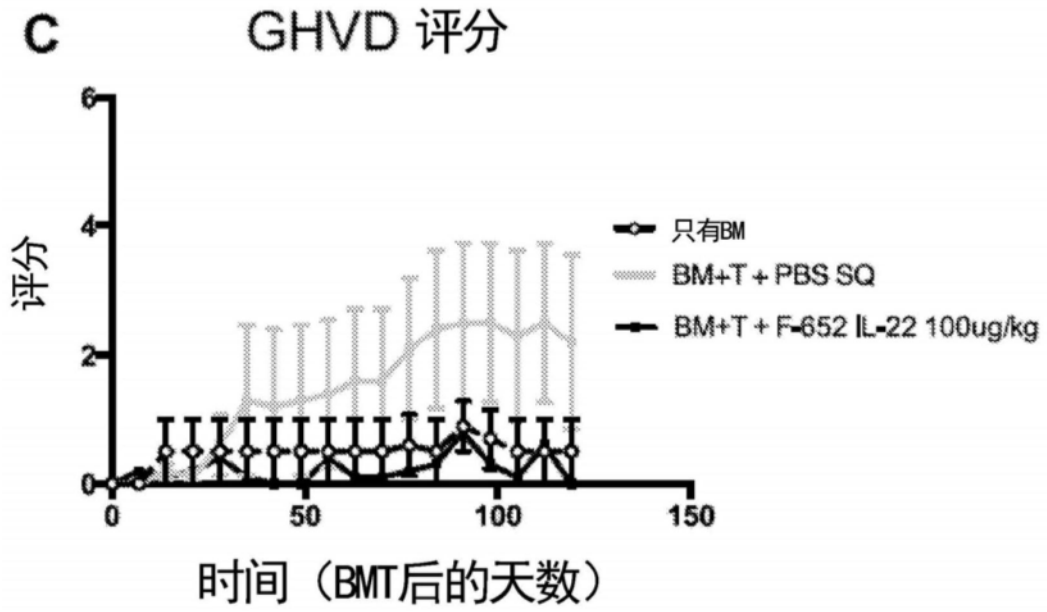


图20C

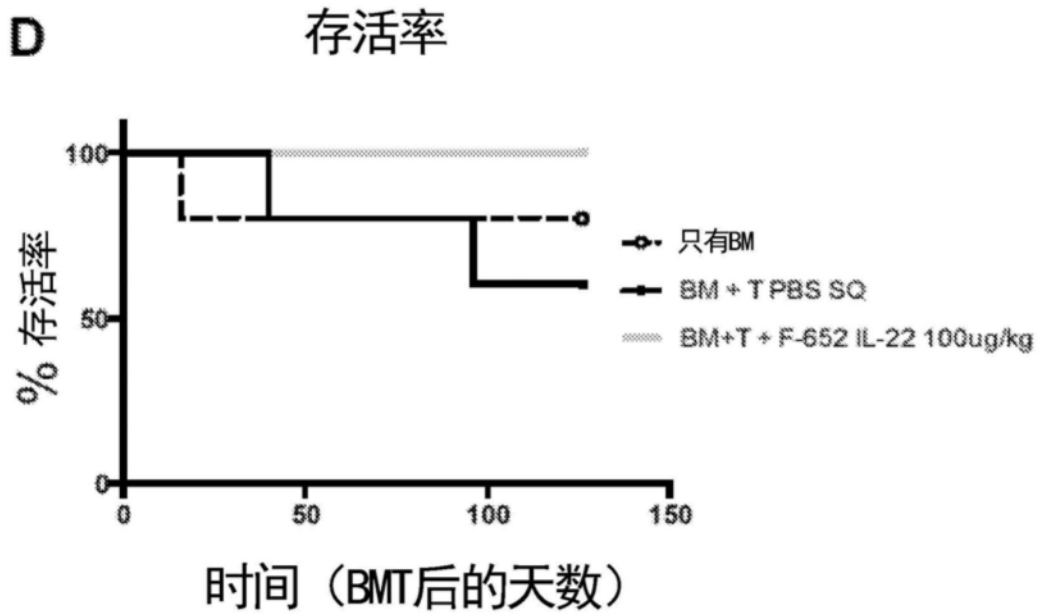


图20D