



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108024969 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201680042316.4

(22)申请日 2016.05.27

(30)优先权数据

62/167,054 2015.05.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/034765 2016.05.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/191723 EN 2016.12.01

(71)申请人 西北大学

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 保罗·J·布赖斯 凯伦·B·陈

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51)Int.Cl.

A61K 9/50(2006.01)

A61K 31/70(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 37/08(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

权利要求书2页 说明书26页

序列表3页 附图25页

(54)发明名称

用于调节免疫反应的碳水化合物修饰的粒
子和粒子制剂

(57)摘要

本发明公开了用于调节免疫反应的组合物、试剂盒和方法。所述组合物和试剂盒包括碳水化合物修饰的粒子,并且所述方法使用所述粒子,其中所述粒子在粒子表面上连接有免疫调节剂。碳水化合物修饰的粒子和包含所述碳水化合物修饰的粒子的粒子制剂可以用于调节受试者的免疫反应。

1. 碳水化合物修饰的粒子, 所述粒子包含有效平均直径为0.01-500 μ m的可生物降解的聚合物基材和共价连接在所述粒子的表面上的作为免疫调节剂的碳水化合物部分。

2. 根据权利要求1所述的粒子, 其中所述碳水化合物部分选自由以下物质组成的组: 肝素二糖I-A、肝素二糖II-A、肝素二糖III-A、肝素二糖IV-A、肝素二糖IV-S、肝素不饱和二糖I-H、肝素不饱和二糖II-H、肝素不饱和二糖II-H、肝素不饱和二糖I-P、软骨素二糖 Δ di-0S、软骨素二糖 Δ di-4S、软骨素二糖 Δ di-6S、软骨素二糖 Δ Di-diSB、软骨素二糖 Δ Di-diSE、软骨素二糖 Δ Di-triS、软骨素二糖 Δ Di-UA2S、新角叉藻十糖-41,3,5,7,9-五-O-硫酸盐、新角叉藻十六糖-41,3,5,7,9,11,13,15-八-O-硫酸盐、GalNAc β 1-4Gal (铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 菌毛的受体)、B血型2型线性三糖、P1抗原、Tn抗原、唾液酸-路易斯A、唾液酸-路易斯X、唾液酸-路易斯XB-甲基糖苷、磺基-路易斯A、磺基-路易斯X、 α 1-2-甘露二糖、 α 1-3-甘露二糖、 α 1-6-甘露二糖、甘露四糖、 α 1-3, α 1-3, α 1-6-甘露五糖、 β 1-2-N-乙酰葡萄糖胺-甘露糖、LS-四糖a (LSTa)、LS-四糖c (LSTc)、 α -D-N-乙酰半乳糖胺基1-3半乳糖、 α -D-N-乙酰半乳糖胺基1-3半乳糖 β 1-4葡萄糖、D-半乳糖-4-O-硫酸盐、甘氨酸基-乳糖 (Lac-gly)、甘氨酸基-乳糖-N-四糖 (LNT-gly)、2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-新四糖 (LNnT)、乳糖-N-四糖 (LNT)、乳糖-N-二岩藻六糖I (LNDFH I)、乳糖-N-二岩藻六糖II (LNDFH II)、乳糖-N-新六糖 (LNnH)、3'-唾液酸乳糖 (3'-SL)、6'-唾液酸乳糖 (6'-SL)、3'-唾液酸-N-乙酰乳糖胺、6'-唾液酸-N-乙酰乳糖胺 (6'-SLN)、3-岩藻糖基乳糖 (3FL)、岩藻多糖、4- β -半乳二糖、1-3半乳二糖基 β -甲基糖苷、 α 1-3, β 1-4, α 1-3半乳四糖、 β -半乳糖基1-3N-乙酰半乳糖胺甲基糖苷、 β 1-3Gal-N-乙酰半乳糖胺基- β 1-4Gal- β 1-4-Glc、 β 1-6半乳二糖、球状三糖、 β -D-N-乙酰乳糖胺基1-3半乳糖 (球状三糖的末端二糖)、1-脱氧野尻霉素 (DNJ)、D-岩藻糖、L-岩藻糖、D-塔罗糖、打碗花精A3、打碗花精B3、N-甲基顺-4-羟基甲基-L-脯氨酸、2,5-二脱氧-2,5-亚氨基-D-甘露糖醇、栗精胺、6-表-栗精胺和其组合。

3. 根据权利要求1所述的粒子, 其中所述聚合物基材包含聚乳酸 (PLA) 与聚乙醇酸 (PGA) 的共聚物 (即PLGA)。

4. 根据权利要求1所述的粒子, 其中所述碳水化合物部分通过连接基团共价连接于所述粒子的表面。

5. 根据权利要求4所述的粒子, 其中所述连接基团包含: (1) 与所述碳水化合物部分的游离羟基反应的亲电试剂; 和 (2) 与所述聚合物基材的游离羧基反应的亲核试剂。

6. 根据权利要求5所述的粒子, 其中所述碳水化合物部分通过碳化二亚胺交联共价连接于所述粒子的表面。

7. 根据权利要求1所述的粒子, 除所述碳水化合物部分以外, 所述粒子还包含其它免疫调节剂。

8. 根据权利要求1所述的粒子, 其中所述免疫调节剂诱导脱敏或耐受和/或所述免疫调节剂诱导抗炎反应。

9. 根据权利要求8所述的粒子, 其中所述其它免疫调节剂是与自身免疫性疾病或病症相关的抗原。

10. 根据权利要求9所述的粒子, 其中所述抗原是来源于胰岛素的抗原。

11. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1所述的粒子以及适合的载体、赋形剂或稀释剂。

12.一种用于治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者给药根据权利要求11所述的组合物。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述受试者患有免疫性疾病或病症或处于产生免疫性疾病或病症的风险中。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述免疫性疾病或病症是变态反应并且所述方法在所述受试者中诱导耐受。

15.根据权利要求13所述的方法,其中所述免疫性疾病或病症是自身免疫性疾病或病症。

16.根据权利要求15所述的方法,其中所述免疫性疾病或病症是1型糖尿病。

17.一种用于制备根据权利要求1所述的粒子的方法,所述方法包括以下步骤中的一个或多个:

(a)通过使碳水化合物部分的库与免疫细胞接触并且测量所述库对刺激所述免疫细胞的作用来就免疫调节剂活性对所述库进行筛选;

(b)根据碳水化合物部分对刺激所述免疫细胞的作用来选择所述碳水化合物部分;和

(c)将所述碳水化合物部分连接到由聚合物基材形成的粒子上。

18.根据权利要求17所述的方法,其中测量所述库对刺激所述免疫细胞的作用包括测量细胞因子产生。

19.根据权利要求18所述的方法,其中测量细胞因子产生包括相较于基线测量IL-10产生和相较于基线测量IL-6产生,并且根据碳水化合物部分对刺激所述免疫细胞的作用来选择所述碳水化合物部分包括选择相较于基线增加IL-10分泌同时不改变IL-6分泌或同时减少IL-6分泌的碳水化合物部分。

20.根据权利要求17所述的方法,其中连接所述碳水化合物部分是与由聚合物基材形成的粒子共价连接。

用于调节免疫反应的碳水化合物修饰的粒子和粒子制剂

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119 (e) 要求2015年5月27日提交的美国临时申请第62/167,054号的优先权,所述美国临时申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明大体上涉及用于调节免疫反应的组合物、试剂盒和方法的领域。具体地,本发明涉及用于调节免疫反应的碳水化合物修饰的粒子和粒子制剂。

背景技术

[0004] 调节免疫反应的方法对于多种疾病治疗很重要,并且已经检查了粒子载体作为用于蛋白质、药物和其它治疗的传递器件的功效。然而,这些载体本身在很大程度上是先天的,并且通常仅用作活性组分的载体。在本文中,本发明者检查了将纳米粒子载体官能化以主动改良所得免疫反应的可能性。本发明者使用确定的纳米粒子材料、聚(乳酸-共-乙醇酸)或PLGA以及用于免疫调节共信号的内部高通量筛选,开发了能够调节免疫反应的碳水化合物增强的纳米粒子(CENP)。

发明内容

[0005] 本发明公开了用于调节免疫反应的组合物、试剂盒和方法。所述组合物和试剂盒包括并且所述方法使用碳水化合物修饰的粒子和包含所述碳水化合物修饰的粒子的粒子制剂。

[0006] 本文公开的碳水化合物修饰的粒子比较小并且有效平均直径在微米级或纳米级内。具体来说,所述碳水化合物修饰的粒子可以被称为“碳水化合物增强的纳米粒子”或“CENP”。通过在粒子表面连接一个或多个碳水化合物部分来修饰粒子。优选地,通过在粒子表面共价连接一个或多个碳水化合物部分来修饰粒子。可以将所述碳水化合物部分直接或通过一个或多个连接分子连接到粒子的表面。所述碳水化合物部分优选作为免疫调节剂,例如诱导免疫耐受的调节剂起作用。

[0007] 所公开的组合物和制剂的粒子优选是可生物降解的并且由聚合物基材形成。在一些实施方式中,所述粒子包含由碳水化合物单体或预聚物形成的聚合物基材。

[0008] 除碳水化合物部分以外,公开的碳水化合物修饰的粒子还可以包括用于调节免疫反应的其它组分。具体地,公开的碳水化合物修饰的粒子可以包括抗原,例如用作抗原并被给药至受试者以使受试者对所述抗原脱敏和或在受试者中诱导耐受的肽、多肽或蛋白质。用于包括在公开的碳水化合物修饰的粒子中的适合抗原可以包括与自身免疫性疾病相关的自身抗原(例如,与自身免疫性疾病相关的肽、多肽或蛋白质)。适合的抗原可以包括与1型糖尿病(T1D)相关的自身抗原。适合的抗原还可以包括与变态反应相关的抗原(即变应原)。

[0009] 公开的粒子可以通过包括以下步骤中的一个或多个的方法来制备:(a) 通过使碳

水化合物部分的库与免疫细胞接触并且测量库对刺激免疫细胞的作用(例如,通过测量相较于基线的细胞因子产生,特别是与IL-6产生相比的IL-10、TGF β 和/或CCL4产生)来就免疫调节剂活性对所述库进行筛选;(b)根据碳水化合物部分对刺激免疫细胞的作用来选择所述碳水化合物部分;和(c)将如此选择的碳水化合物部分连接到由聚合物基材形成的粒子上,优选通过将碳水化合物部分共价连接到由可生物降解的聚合物基材形成的粒子的表面上。

[0010] 可以将公开的粒子配制成用于调节免疫反应的组合物。如此,可以将组合物给药至有需要的受试者以诱导免疫反应,所述免疫反应可以包括但不限于使受试者脱敏和/或在受试者中诱导耐受。可以给药所述组合物来治疗和/或预防与自身免疫反应相关的疾病和病症或治疗和/或预防变态反应。可以给药所述组合物来治疗和/或预防移植物排斥。

附图说明

[0011] 图1说明PLGA粒子(PP)对巨噬细胞的体外刺激(LPS)不增强IL-10,而EDC-细胞(EDC SP)增强IL-10。

[0012] 图2说明高通量筛选用于诱导巨噬细胞产生细胞因子的碳水化合物的策略。

[0013] 图3A和3B说明使用如图2所说明的高通量筛选测定的IL-10反应的上调或下调的感应热图。

[0014] 图4说明将L-岩藻糖添加到PLGA纳米粒子中的化学偶联反应。

[0015] 图5说明相较于单独的PLGA、EDC-细胞或游离的L-岩藻糖,岩藻糖基化的PLGA(F-CENP)促进更强的IL-10诱导。

[0016] 图6说明致敏和耐受的免疫学机制。

[0017] 图7说明通过脱敏和诱导耐受治疗过敏的潜在疗法。

[0018] 图8说明凋亡细胞的细胞表面上潜在的天然耐受原性信号。

[0019] 图9说明如下假设:可以通过以下方法显著增强Ag-NP传递系统用于T1D的耐受疗法的功效:(1)同时工程改造NP上用于进行CD209和Mer双重信号转导的靶向配体(LNFP111和GAS6);和(2)传递作为诱导感染性耐受的初始疾病相关自身抗原的脱酰胺形式的胰岛素(INS(Q $\rightarrow$ E))。

[0020] 图10A、10B和10C说明Ag-SP通过扩增Treg细胞、缺失AD和使Teff细胞无反应性来诱导耐受。A.在移植后第28天,Ag-SP处理和对照接受者的脾、dLN和移植物中的CD4⁺Foxp3⁺Treg细胞。B.在第-4天、第0天和第7天,Ag-SP处理和对照接受者的脾、dLN和移植物中计数的先天标记的TEa TCR转基因T细胞。C.在第一次和第二次注射Ag-SP后,检查先天标记的和CFSE标记的4C TCR转基因T细胞的体内增殖。直方图覆盖图还显示了未处理小鼠中的非增殖4C T细胞。(Kheradmand等人,J Immunol 189:804-12,2012)。

[0021] 图11:Ag-SP注射诱导Treg引导和归巢中涉及的可溶性介质和MDSC的扩增。A.在Ag-SP注射后,Ly6C^{HI}和Gr1^{HI} MDSC的数量都增加了。B.共培养Ly6C^{HI}和Gr1^{HI} MDSC与受刺激的T细胞诱导产生IL-10和CCL4。C.来自Ag-SP处理的接受者的同种异体移植物显示Foxp3⁺Treg的逐渐积累。(Bryant等人,J Immunol 192(12):6092,2014)。

[0022] 图12A、12B和12C说明Ag-SP介导的MDSC扩增取决于受体酪氨酸激酶MER。A.表达表面凝集素CD209和CD169的两个脾巨噬细胞群响应于Ag-SP处理而上调Mer表达。B.Ag-SP诱

导的Ly6C^{HI}和Gr1^{HI} MDSC扩增在MerTK^{-/-}小鼠中缺失。C. Ag-SP耐受疗法在MerTK^{-/-}小鼠中无效。这是在BALB/c→B6心脏移植模型中,其中MerTK^{+/+}(野生型)小鼠中的Ag-SP显著延长了心脏同种异体移植物存活,尽管与胰岛同种异体移植物相比不是无限期的存活。(数据未发表)。

[0023] 图13A、13B和13C说明NP可以适用于抗原传递和耐受诱导。A.可以制造具有指定尺寸(在这种情况下约500nm)和ζ电位(在这种情况下约75mV)的PLG NP。B.可以使供体脾细胞裂解物形式的供体抗原与PLG NP偶联并安全传递到接受小鼠。然而,目前的Ag-NP形式在单独给予时仅对移植的胰岛同种异体移植物提供边缘保护。当与短程低剂量雷帕霉素组合时,Ag-NP显著改善了其在胰岛同种异体移植物保护中的功效。(Bryant等人,Biomaterials 35:8887-94,2014)。

[0024] 图14A、14B和14C说明人类T1D患者和NOD小鼠中对脱酰胺胰岛素原的体液反应。A.在四个有30名成年T1D患者的群组中,通过蛋白质印迹(Western blot)检测的对脱酰胺的人类胰岛素原的抗体反应。B.上图:在从3周龄开始连续检查的雌性NOD小鼠的群组中通过蛋白质印迹检测的对脱酰胺小鼠胰岛素原1的代表性抗体反应。下图:在具有或不具有脱酰胺胰岛素原的抗体的亚组雌性NOD小鼠中的糖尿病发病率。C.来自阳性NOD B细胞杂交瘤的上清液探测的鼠科胰岛素原1和2的4×30肽阵列。

具体实施方式

[0025] 本文公开了用于诱导针对疾病的免疫反应的组合物、试剂盒和方法,其可以使用下述数种定义来描述。

[0026] 除非上下文另外规定或指示,否则不带具体数量的指称和“所述”意指“一或多”。此外,除非上下文另外规定或指示,否则单数名词如“碳水化合物”和“碳水化合物部分”应解释为分别意指“一种或多种碳水化合物”和“一个或多个碳水化合物部分”。除非上下文另外规定或指示,否则单数名词如“粒子”应解释为意指“一个或多个粒子”。

[0027] 如本文所用,“约”、“近似”、“基本上”和“显著”将被本领域普通技术人员理解,并且将在某种程度上根据使用其的上下文而变化。如果所述术语对于本领域普通技术人员来说在使用其的上下文中是不清楚的,则“约”和“近似”将意指加或减具体术语的≤10%,并且“基本上”和“显著”将意指加或减具体术语的>10%。

[0028] 如本文所用,术语“包括”具有与术语“包含”相同的意义。术语“包含”应解释为是“开放性”的过渡术语,其允许包括除权利要求书中所述的那些组分之外的其它组分。术语“由...组成”应解释为是“封闭性”的过渡术语,其不允许包括除权利要求书中所述的组分之外的其它组分。术语“基本上由...组成”应解释为部分封闭性的,并且仅允许包括不会从根本上改变要求保护的标的物的性质的其它组分。

[0029] 术语“受试者”、“患者”或“宿主”在本文中可以互换使用,并且可以指人类或非人类动物。非人类动物可以包括但不限于非人类灵长类动物、狗和猫。

[0030] 术语“受试者”、“患者”或“个体”可以用于指人类或非人类动物。受试者可以包括患有可以通过免疫调节来治疗和/或预防的疾病和/或病症或具有患所述疾病和/或病症的风险的人类,所述免疫调节可以包括脱敏和/或诱导耐受。通过免疫调节治疗和/或预防的疾病和/或病症可以包括但不限于过敏,包括食物过敏和其它类型的过敏。通过免疫调节治

疗和/或预防的疾病和/或病症可以包括自身免疫性疾病和病症,诸如心脏的自身免疫性疾病(例如心肌炎和心肌梗塞后综合症)、肾脏的自身免疫性疾病(例如抗肾小球基底膜肾炎)、肝脏的自身免疫性疾病(例如,自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化)、皮肤的自身免疫性疾病(例如斑秃、牛皮癣、系统性硬皮病(systemic scleroderma)和白癜风白斑病)、肾上腺的自身免疫性疾病(例如艾迪生氏病(Addison's disease))、胰腺的自身免疫性疾病(例如自身免疫性胰腺炎和1型糖尿病(T1D))、甲状腺的自身免疫性疾病(例如格雷夫斯氏病(Grave's disease))、唾液腺的自身免疫性疾病(例如干燥综合征(Sjogren's syndrome))、消化系统的自身免疫性疾病(例如乳糜泻、克罗恩氏病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎)、血液的自身免疫性疾病(例如自身免疫性血小板减少性紫癜、埃文斯综合征(Evans syndrome)、恶性贫血和血小板减少)、结缔组织的自身免疫性疾病(例如,强直性脊柱炎、幼年型关节炎、类风湿性关节炎、结节病和全身性红斑狼疮)、肌肉组织的自身免疫性疾病(例如纤维肌痛、重症肌无力和皮炎)和神经系统的自身免疫性疾病(例如急性播散性脑脊髓炎、格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome)、多发性硬化和特发性炎性脱髓鞘病)。

[0031] 受试者可以包括将要进行移植手术的受试者或已经经历移植手术的受试者。受试者可以包括将要进行移植手术的受试者或已经经历移植手术的受试者,其中所述受试者排斥移植物或具有排斥移植物的风险。

[0032] 本文公开了碳水化合物修饰的粒子。碳水化合物修饰的粒子相对小并且有效平均直径在微米级或纳米级内。在一些实施方式中,碳水化合物修饰的粒子的有效平均直径小于约500 μm 、200 μm 、100 μm 、50 μm 、20 μm 、10 μm 、5 μm 、2 μm 、1 μm 、0.5 μm 、0.2 μm 、0.1 μm 、0.05 μm 、0.02 μm 、0.01 μm ,或碳水化合物修饰的粒子的有效平均直径可以在用这些值中的任一个作为端点来界定的范围内,诸如0.02–1 μm 或200–1000nm。在本文中,碳水化合物修饰的粒子可以被称为“微粒”和/或“纳米粒子”。具体来说,碳水化合物修饰的粒子可以被称为“碳水化合物增强的纳米粒子”或“CENP”。

[0033] 公开的粒子典型地具有适合的 ζ 电位,例如用于将公开的粒子给药至有需要的受试者。在一些实施方式中,公开的粒子具有负 ζ 电位,例如,在由以下 ζ 电位值中的任一个界定的范围内:-10mV、-20mV、-30mV、-40mV、-50mV、-60mV、-70mV、-80mV、-90mV或-100mV,例如-50至-100mV或-60至-80mV。

[0034] 公开的粒子可以包含可生物降解的基材。如本领域中所了解,所述粒子是“可生物降解的”。术语“可生物降解”可以用于描述材料能够在生理环境中降解成较小的基本组分。优选地,所述较小的基本组分是无害的。例如,可生物降解的聚合物可降解成如下基本组分,其包括但不限于水、二氧化碳、糖、有机酸(例如三羧酸或氨基酸)和醇(例如甘油或聚乙二醇)。可以用于制备本文所考虑的粒子的可生物降解材料可以包括在如下专利中公开的材料:美国专利第7,470,283号;第7,390,333号;第7,128,755号;第7,094,260号;第6,830,747号;第6,709,452号;第6,699,272号;第6,527,801号;第5,980,551号;第5,788,979号;第5,766,710号;第5,670,161号;和第5,443,458号;以及美国公开申请第20090319041号;第20090299465号;第20090232863号;第20090192588号;第20090182415号;第20090182404号;第20090171455号;第20090149568号;第20090117039号;第20090110713号;第20090105352号;第20090082853号;第20090081270号;第20090004243号;第20080249633

号;第20080243240号;第20080233169号;第20080233168号;第20080220048号;第20080154351号;第20080152690号;第20080119927号;第20080103583号;第20080091262号;第20080071357号;第20080069858号;第20080051880号;第20080008735号;第20070298066号;第20070288088号;第20070287987号;第20070281117号;第20070275033号;第20070264307号;第20070237803号;第20070224247号;第20070224244号;第20070224234号;第20070219626号;第20070203564号;第20070196423号;第20070141100号;第20070129793号;第20070129790号;第20070123973号;第20070106371号;第20070050018号;第20070043434号;第20070043433号;第20070014831号;第20070005130号;第20060287710号;第20060286138号;第20060264531号;第20060198868号;第20060193892号;第20060147491号;第20060051394号;第20060018948号;第20060009839号;第20060002979号;第20050283224号;第20050278015号;第20050267565号;第20050232971号;第20050177246号;第20050169968号;第20050019404号;第20050010280号;第20040260386号;第20040230316号;第20030153972号;第20030153971号;第20030144730号;第20030118692号;第20030109647号;第20030105518号;第20030105245号;第20030097173号;第20030045924号;第20030027940号;第20020183830号;第20020143388号;第20020082610号;和第0020019661号;其内容以全文引用的方式并入本文中。典型地,本文公开的粒子在体内以一定降解速率降解以使得粒子在给药至受试者后约4、5、6、7或8周后通过一个或多个以下过程损失其初始质量的大于约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%;将粒子的可生物降解聚合物降解成单体;将粒子的可生物降解聚合物降解成水、二氧化碳、糖、有机酸(例如三羧酸或氨基酸)和醇(例如甘油或聚乙二醇);以及降解粒子以释放粒子的碳水化合物部分或粒子中所存在的任何免疫调节剂。

[0035] 用于制备粒子的基材的适合聚合物可以包括但不限于PLA和PGA的共聚物(即PLGA);诸如聚交酯(即PLA)的单聚物,包括聚乳酸;诸如聚乙交酯(即PGA)的单聚物,包括聚乙醇酸。其它适合的聚合物可以包括但不限于聚己酸内酯(PCL)、聚(二氧杂环己酮)(PDO)、胶原蛋白、复性胶原蛋白、明胶、复性明胶、交联明胶和其共聚物。所述粒子的聚合物被设计成通过将聚合物链水解成生物学上可接受并且逐渐变小的组分如聚交酯、聚乙交酯和其共聚物来进行降解。其最终分解成乳酸和乙醇酸,进入克雷布氏循环(Kreb's cycle),分解成二氧化碳和水并排出。

[0036] 除碳水化合物部分以外,公开的碳水化合物修饰的粒子还可以包括用于调节免疫反应的其它组分。具体地,公开的碳水化合物修饰的粒子可以包括抗原,例如被使用并给药至受试者以使受试者对抗原脱敏和或在受试者中诱导耐受的抗原。所述抗原可以共价或以其它方式连接于碳水化合物修饰的粒子的表面。适合的抗原还可以包括与变态反应相关的抗原,例如与食物过敏相关的抗原。用于包括在公开的碳水化合物修饰的粒子中的适合抗原可以包括与自身免疫性疾病相关的自身抗原,诸如与选自但不限于以下疾病的自身免疫性疾病相关的抗原:心脏的自身免疫性疾病(例如心肌炎和心肌梗塞后综合症)、肾脏的自身免疫性疾病(例如抗肾小球基底膜肾炎)、肝脏的自身免疫性疾病(例如,自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化)、皮肤的自身免疫性疾病(例如斑秃、牛皮癣、系统性硬皮病和白癜风白斑病)、肾上腺的自身免疫性疾病(例如艾迪生氏病)、胰腺的自身免疫性疾病(例如自身免疫性胰腺炎和1型糖尿病(T1D))、甲状腺的自身免疫性疾病(例如格雷夫斯氏病)、唾

液腺的自身免疫性疾病(例如干燥综合征)、消化系统的自身免疫性疾病(例如乳糜泻、克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、血液的自身免疫性疾病(例如自身免疫性血小板减少性紫癜、埃文斯综合征、恶性贫血和血小板减少)、结缔组织的自身免疫性疾病(例如,强直性脊柱炎、幼年型关节炎、类风湿性关节炎、结节病和全身性红斑狼疮)、肌肉组织的自身免疫性疾病(例如纤维肌痛、重症肌无力和皮炎)和神经系统的自身免疫性疾病(例如急性播散性脑脊髓炎、格林-巴利综合征、多发性硬化和特发性炎性脱髓鞘病)。

[0037] 在公开的碳水化合物修饰的粒子的一些实施方式中,除碳水化合物部分之外,公开的碳水化合物修饰的粒子还可以包括抗原或变应原,例如,其中可以将碳水化合物修饰的粒子给药至对所述抗原或变应原展现变态反应或具有对所述抗原或变应原产生变态反应的风险的受试者以使受试者对所述抗原或变应原脱敏和/或在受试者中诱导对所述抗原或变应原的耐受。在公开的碳水化合物修饰的粒子的其它实施方式中,除碳水化合物部分之外,公开的碳水化合物修饰的粒子还可以包括来源于胰岛素的抗原,例如,其中可以将碳水化合物修饰的粒子给药至患有1型糖尿病或具有产生1型糖尿病风险的受试者以使受试者对胰岛素脱敏和/或在受试者中诱导对胰岛素的耐受。在公开的碳水化合物修饰的粒子的另外的实施方式中,除碳水化合物部分之外,公开的碳水化合物修饰的粒子还可以包括来源于移植物的抗原以使受试者对移植物的抗原脱敏和/或在受试者中诱导对移植物抗原的耐受并治疗和/或预防移植物的排斥。

[0038] 用于包括在碳水化合物修饰的粒子中的适合抗原可以包括肽、多肽或蛋白质。如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”,在本文中可以互换地提及,是指包含氨基酸聚合物的分子。当叙述“氨基酸序列”来提及天然存在的蛋白质分子的序列时,“氨基酸序列”和类似术语并不意欲将氨基酸序列限制为与所述蛋白质分子相关的完整天然氨基酸序列。术语“氨基酸”可以指天然存在和/或非天然存在的氨基酸。

[0039] 如本文所考虑,肽、多肽和蛋白质可以用作抗原,例如共价连接于本文公开的粒子的表面的抗原。例如,SEQ ID NO:1-9提供了胰岛素或其变体(例如,Q→E脱酰胺变体)的部分的氨基酸序列,其可以用作本文考虑的抗原。示例性的肽、多肽和蛋白质可以包含SEQ ID NO:1-9中任一个的氨基酸序列,或可以包含与SEQ ID NO:1-9中任一个具有至少约80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。变体肽、多肽和蛋白质可以包括相对于参考肽、多肽和蛋白质具有一个或多个氨基酸替换、缺失、添加和/或氨基酸插入的多肽。

[0040] 本文考虑的氨基酸序列相对于参考氨基酸序列可以包括保守氨基酸替换。例如,变体胰岛素多肽相对于天然胰岛素多肽可以包括保守氨基酸替换。“保守氨基酸替换”是那些预计最少地干扰参考多肽特性的替换。换句话说,保守氨基酸替换基本上保留了参考蛋白的结构和功能。下表提供示例性保守氨基酸替换的清单。

原始残基	保守替换
Ala	Gly, Ser
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
[0041] His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

[0042] 保守氨基酸替换通常维持 (a) 替换区中多肽骨架的结构, 例如, β 折叠或 α 螺旋构象, (b) 替换位点处分子的电荷或疏水性, 和/或 (c) 侧链的体积。

[0043] “缺失”是指相对于参考序列引起一个或多个氨基酸残基或核苷酸不存在的氨基酸或核苷酸序列变化。缺失去除了至少1、2、3、4、5、10、20、50、100或200个氨基酸残基或核苷酸。缺失可以包括内部缺失或末端缺失(例如参考多肽的N端截短或C端截短或参考多核苷酸的5'端或3'端截短)。

[0044] “片段”是氨基酸序列或多核苷酸的一部分, 其序列与参考序列相同但长度较短。片段可以包含至多参考序列的整个长度减去至少一个核苷酸/氨基酸残基。例如, 片段可以分别包含参考多核苷酸或参考多肽的5至1000个连续核苷酸或连续氨基酸残基。在一些实施方式中, 片段可以分别包含参考多核苷酸或参考多肽的至少5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、250或500个连续核苷酸或连续氨基酸残基。片段可以优先选自分子的某些区域。术语“至少一个片段”涵盖全长多核苷酸或全长多肽。

[0045] “同源性”是指两个或超过两个多核苷酸序列或两个或超过两个多肽序列之间的序列类似性或可互换地序列同一性。同源性、序列类似性和序列同一性百分比可以使用本领域中和本文所述的方法测定。

[0046] 用于多肽序列的短语“同一性百分比”和“同一性%”是指使用标准化算法比对的至少两个多肽序列之间的残基匹配百分比。多肽序列比对的方法是众所周知的。一些比对方法考虑了保守氨基酸替换。上文更详细解释的这种保守替换通常保留了替换位点的电荷和疏水性, 因此保留了多肽的结构(因此保留了功能)。氨基酸序列的同一性百分比可以如本领域所了解地进行测定。(参见例如美国专利第7,396,664号, 其以全文引用的方式并入本文中)。美国国家生物技术信息中心(the National Center for Biotechnology Information; NCBI)基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool; BLAST)提供了一套常用且可免费获得的序列比较算法(Altschul, S.F. 等人, (1990)

J.Mol.Biol.215:403-410),其可从多个来源包括NCBI、Bethesda、Md等的网站获得。BLAST软件套件包括各种序列分析程序,包括用于将已知氨基酸序列与来自各种数据库的其它氨基酸序列比对的“blastp”。

[0047] 可以在完整的指定多肽序列例如由特定的SEQ ID号指定的多肽序列的长度上测量同一性百分比,或可以在较短的长度上测量,例如在从较大的指定多肽序列获得的片段的长度上,所述片段例如至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少70或至少150个连续残基的片段)。这些长度仅仅是示例性的,并且应了解,可以使用本文在表格、图式或序列表中显示的序列所支持的任何片段长度来描述可以测量同一性百分比的长度。

[0048] 将特定多肽序列的“变体”定义为如下多肽序列,使用在美国国家生物技术信息中心的网站获得的blastp以及“BLAST 2Sequences”工具,其与特定多肽序列在所述多肽序列之一的某个长度上具有至少50%序列同一性。(参见Tatiana A.Tatusova,Thomas L.Madden(1999),“Blast 2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”,FEMS Microbiol Lett.174:247-250)。这些多肽对可以在所述多肽之一的某个指定长度上显示例如至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%或大于99%的序列同一性。

[0049] 公开的多肽可以被修饰以包含氨基酸序列或修饰的氨基酸,使得公开的多肽不能被称为是天然存在的。在一些实施方式中,公开的多肽被修饰并且修饰选自以下修饰组成的组:酰化、乙酰化、甲酰化、脂酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、烷化、异戊二烯化、异戊烯化和酰胺化。公开的多肽中的氨基酸可以如此修饰,但是特别地,所述修饰可以存在于多肽的N端和/或C端(例如N端酰化或乙酰化,和/或C端酰胺化)。所述修饰可以增强多肽的稳定性和/或使多肽对蛋白质水解具有抗性。

[0050] 公开的粒子可以通过本领域已知的方法来制备,包括但不限于美国专利第8,546,371号;第8,518,450号;和第7,550,154号中公开的方法,其内容以全文引用的方式并入本文中。用于形成微粒和/或纳米粒子的方法可以包括但不限于喷雾干燥、沉淀和/或研磨基材(例如生物可降解的聚合物基材)。

[0051] 典型地,通过包括碳水化合物部分、优选作为连接(例如通过共价连接)在粒子表面的免疫调节剂的碳水化合物部分来修饰公开的粒子。适合的碳水化合物部分可以包括但不限于来自以下组的部分或其药用盐:肝素二糖I-A、肝素二糖II-A、肝素二糖III-A、肝素二糖IV-A、肝素二糖IV-S、肝素不饱和二糖I-H、肝素不饱和二糖II-H、肝素不饱和二糖II-H、肝素不饱和二糖I-P、软骨素二糖 Δ di-0S、软骨素二糖 Δ di-4S、软骨素二糖 Δ di-6S、软骨素二糖 Δ Di-diSB、软骨素二糖 Δ Di-diSE、软骨素二糖 Δ Di-triS、软骨素二糖 Δ Di-UA2S、新角叉藻十糖(Neocarradecaose)-41,3,5,7,9-五-O-硫酸盐、新角叉藻十六糖(neocarrahexadecaose)-41,3,5,7,9,11,13,15-八-O-硫酸盐、GalNAc β 1-4Gal(铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)菌毛的受体)、B血型2型线性三糖、P1抗原、Tn抗原、唾液酸-路易斯A、唾液酸-路易斯X、唾液酸-路易斯XB-甲基糖苷、磺基-路易斯A、磺基-路易斯X、 α 1-2-甘露二糖、 α 1-3-甘露二糖、 α 1-6-甘露二糖、甘露四糖、 α 1-3, α 1-3, α 1-6-甘露五糖、 β 1-2-N-乙酰葡萄糖胺-甘露糖、LS-四糖a(LSTa)、LS-四糖c(LSTc)、 α -D-N-乙酰半乳糖胺基1-3半乳糖、 α -D-N-乙酰半乳糖胺基1-3半乳糖 β 1-4葡萄糖、D-半乳糖-4-O-硫酸盐、甘氨酸

基-乳糖 (Lac-gly)、甘氨酸基-乳糖-N-四糖 (LNT-gly)、2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-新四糖 (LNnT)、乳糖-N-四糖 (LNT)、乳糖-N-二岩藻六糖 I (LNDFH I)、乳糖-N-二岩藻六糖 II (LNDFH II)、乳糖-N-新六糖 (LNnH)、3'-唾液酸乳糖 (3'-SL)、6'-唾液酸乳糖 (6'-SL)、3'-唾液酸-N-乙酰乳糖胺、6'-唾液酸-N-乙酰乳糖胺 (6'-SLN)、3-岩藻糖基乳糖 (3FL)、岩藻多糖、4-β-半乳糖、1-3半乳糖基β-甲基糖苷、α1-3,β1-4,α1-3半乳糖四糖、β-半乳糖基1-3N-乙酰半乳糖胺甲基糖苷、β1-3Gal-N-乙酰半乳糖胺基-β1-4Gal-β1-4-Glc、β1-6半乳糖二糖、球状三糖 (Globotriose)、β-D-N-乙酰乳糖胺基1-3半乳糖 (球状三糖的末端二糖)、1-脱氧野尻霉素 (Deoxynojirimycin) (DNJ)、D-岩藻糖、L-岩藻糖、D-塔罗糖、打碗花精A3、打碗花精B3、N-甲基顺-4-羟基甲基-L-脯氨酸、2,5-二脱氧-2,5-亚氨基-D-甘露糖醇、栗精胺、6-表-栗精胺和其组合。在一些实施方式中,粒子包含多个碳水化合物部分并且被调整以通过免疫调节来治疗和/或预防疾病或病症。

[0052] 公开的粒子的碳水化合物部分典型地是由碳、氢和氧原子组成的碳水化合物,并且可以具有经验式 $C_m(H_2O)_n$,其中m和n是整数并且可以相同或不同。一些碳水化合物可以包括除碳、氢和氧以外的原子,例如氮、磷和/或硫原子。然而,包括除碳、氢和氧以外的原子如氮、磷和/或硫原子的碳水化合物典型地以所述碳水化合物分子的小摩尔质量分数(例如少于10%或5%)包括这些其它原子。

[0053] 碳水化合物部分可以直接连接到粒子的表面(例如通过共价偶联)。任选地,碳水化合物部分可以例如通过一个或多个连接分子如聚乙二醇连接基团共价地间接连接到粒子的表面。所述碳水化合物部分可以通过交联方法连接到粒子表面,所述交联方法可以包括但不限于碳化二亚胺(EDC)交联。

[0054] 任选地,除碳水化合物部分以外,公开的粒子可以包含一种或多种其它免疫调节剂。其它药剂可以包括上述抗原和/或细胞因子(例如白介素和干扰素)和/或免疫调节性抗体。

[0055] 公开的粒子作为“免疫增强剂”和/或“免疫抑制剂”起作用。因此,公开的粒子可以在多种应用中给药,所述应用包括但不限于:免疫增强以改善疫苗功效;免疫增强以改善抗肿瘤免疫和癌症结果;免疫增强以改善传染病期间的结果;免疫抑制以治疗变应性疾病,诸如哮喘、食物过敏和湿疹;免疫抑制以治疗自身免疫性疾病,诸如类风湿性关节炎、多发性硬化和糖尿病;和/或免疫抑制以改善移植期间的结果。

[0056] 可以给药公开的粒子以使受试者脱敏和/或在受试者中诱导对抗原的耐受。可以使用本领域中的方法和本文公开的方法评估脱敏和/或耐受,所述方法可以包括但不限于,与诱导相较于基线的IL-6分泌相比,更好地诱导巨噬细胞相较于基线的IL-10、TGFβ或CCL4分泌。因此,可以使用比率IL-10/IL-6来评估脱敏和/或耐受,所述比率反映了相较于基线的IL-10分泌相对于相较于基线的IL-6分泌的相对变化。

[0057] 可以给药公开的粒子以调节受试者的免疫反应。因此,可以将公开的粒子配制成药物组合物。这些组合物可以以医学领域技术人员众所周知的剂量并且通过其众所周知的技术考虑诸如具体患者的年龄、性别、体重和身体状况以及给药途径的因素来配制和/或给药。

[0058] 如本领域中已知,所述组合物可以包括包含载体、稀释剂、赋形剂(例如粉末赋形剂,诸如乳糖、蔗糖和甘露糖醇)和表面活性剂(例如非离子表面活性剂)的药物溶液。此外,

所述组合物可以包括防腐剂(例如抗微生物剂或抗菌剂)。所述组合物还可以包括缓冲剂(例如,为了将组合物的pH维持在6.5至7.5之间)。

[0059] 所述药物组合物可以预防性或治疗性地给药。在预防性给药中,组合物可以以足以调节免疫反应以防止疾病或病症的量(即,“预防有效剂量”)给药至受试者。在治疗性应用中,组合物可以以足以治疗疾病或病症的量(即,“治疗有效剂量”)给药至受试者。

[0060] 本文公开的组合物可以通过各种途径传递。典型的传递途径包括肠胃外给药(例如皮内、肌肉内、腹膜内或皮下传递)。其它途径包括鼻内和肺内途径。药物组合物的制剂可以包括液体(例如溶液和乳液)、喷雾和气溶胶。具体地,组合物可以被配制成用于鼻内或肺内传递的气溶胶或喷雾。用于给药用于鼻内或肺内传递的气溶胶或喷雾的适合器件可以包括吸入器和喷雾器。

[0061] 本文公开的组合物可以与其它免疫学、抗原性或疫苗或治疗性组合物包括佐剂,或与抗原组合给予以增强所述抗原的免疫原性的化学或生物试剂共同给药或依序给药。其它治疗剂可以包括但不限于细胞因子,诸如白介素和干扰素。

[0062] 如本文所用,“激发-加强(prime-boost)疫苗接种方案”是指如下方案,其中向受试者给药第一组合物,接着在确定的时段后(例如约2、3、4、5或6周后),向受试者给药第二组合物,其可以与第一组合物相同或不同。可以给药第一组合物(和第二组合物)一次或多次。公开的方法可以包括通过给药第一组合物至少一次来用第一组合物激发受试者,允许经过预定的时间长度(例如至少约2、3、4、5或6周),接着通过给药相同组合物或第二不同组合物来加强。

[0063] 为了评估本文公开的药物组合物的功效,可以通过测量细胞介导的反应和/或抗体反应的诱导来评估免疫反应。例如,可以通过使用新鲜或培养的PBMC的四聚体染色、ELISPOT分析或通过使用功能性细胞毒性分析来测量T细胞反应,所述方法是本领域技术人员众所周知的。抗体反应可以通过本领域中已知的分析如ELISA来测量。可以使用本领域中的方法测量病原体的滴度或负荷,所述方法包括检测病原体核酸的方法。(参见例如美国专利第7,252,937号,其内容以全文引用的方式并入)。

[0064] 实施例

[0065] 以下实施例是说明性的并且不欲限制公开的标的物。

[0066] 实施例1-用于免疫调节的碳水化合物增强的纳米粒子

[0067] 引言

[0068] PLGA纳米粒子已被用于各种应用,包括药物传递、组织和细胞成像以及用于传递自身或外来蛋白质来帮助诱导免疫活化或耐受。(参见Sah等人,“Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems,”*International Journal of Medicine*,2013:8 747-765)。在本文中,我们开发了用于产生官能化PLGA粒子的技术,并确立了其用于改良免疫反应的潜力。

[0069] 实验方法、结果和讨论

[0070] 我们最初是从我们对细胞偶联的抗原耐受的研究中接触此领域的,细胞偶联的抗原耐受为治疗变应性疾病的一种治疗方法(参见Smarr等人,“Antigen-fixed leukocytes tolerize Th2responses in mouse models of allergy,”*The Journal of Immunology*, 11/2011;187(1):5090-8),其中使用EDC碳化二亚胺交联化学法将过敏蛋白连接于自体细

胞,将其注回入小鼠体内并产生耐受(即免疫无反应状态)。因为通过使用细胞将其应用于患者是复杂的,所以我们开始检查PLGA纳米粒子作为替代的潜在用途;然而,我们的发现显示,包封在PLGA纳米粒子内的抗原诱导不同的反应(脱敏,而非耐受,因此反应性在一段时间后恢复)。因为巨噬细胞是一种被认为在免疫反应(包括耐受)中很重要的免疫细胞(通过其产生称为白介素-10 (IL-10) 的关键免疫介质),所以我们开发了一种体外方法来根据对IL-10产生的作用筛选EDC-细胞相对于PLGA纳米粒子的作用。如图1所示,我们观察到EDC-细胞在刺激(脂多糖(LPS))后增强了IL-10,而PLGA粒子则没有。

[0071] 基于这个结果,我们得出结论:细胞上存在的信号不存在于PLGA粒子上,并因此开发了基于高通量的筛选(通过Evanston的Northwestern HTS核心执行)。我们检查了促炎反应(IL-6)或抗炎反应(IL-10),如图2中所概述。

[0072] 我们检查了一组70种独特的碳水化合物,这些化合物在细胞上发现,但不存在于PLGA纳米粒子上。使用图2中的策略,我们计算了在0.1、1、10和100 μ M的治疗相关剂量曲线上细胞因子产生的最大倍数变化。如图3所呈现,我们鉴别了能够调整巨噬细胞反应的多种碳水化合物,与EDC-细胞或单独刺激相比,所述巨噬细胞反应上调、下调或没有变化,表明这些碳水化合物如果与粒子偶联能够使PLGA官能化。为了进一步追踪这个设想,我们选择了一个候选者(L-岩藻糖),并使用2阶段化学方法将其与PLGA偶联。图4中显示偶联方法。

[0073] 最初,使用EDC交联反应将L-岩藻糖的衍生物(4-氨基苯基 β -L-吡喃岩藻糖苷)连接到聚(乙二醇)(PEG)连接基团上。接着使用第二EDC交联反应将其连接于羧化的PLGA纳米粒子。最终产物的表征显示未偶联粒子的球形结构丧失和粗糙的不规则粒子。为了测试岩藻糖基化的PLGA纳米粒子(称为F-CENP)的功能能力,我们检查了其对我们用于IL-10产生的体外模型的作用。如图5所示,在IL-10诱导方面,F-CENP显著优于仅接受PLGA、仅接受L-岩藻糖的细胞或甚至EDC-细胞,表明官能化的PLGA粒子甚至比EDC-细胞都有改善。

[0074] 实施例2-用于在食物过敏中诱导免疫耐受的碳水化合物增强的纳米粒子的开发

[0075] 食物过敏可以被定义为对食物的不良免疫反应,并且可以包括荨麻疹和危及生命的变态反应。反应的严重性可以取决于许多因素,包括摄取的食物量、食物的形式(例如,生的、熟的或加工的)以及风险因素,诸如年龄、致敏程度和其它共病状况。食物过敏通常被认为是IgE介导的,但生理反应和症状能够不同。(参见Sicherer和Sampson, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2010) 2月;125 (2增刊2) S116-25; Berin和Mayer, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2013) 1月;131 (1) :14-22;和Boyce等人 (NIAID Guidelines), *J. Allergy Clin. Immunol.* (2010) 12月;126 (6增刊) :S1-58)。涉及食物过敏的免疫机制包括致敏和耐受(参见Johnston等人, *J. Immunol.* (2014) 3月15日;192 (6) :2529-34,和图6),并且用于食物过敏的潜在疗法可以涉及给药抗原以脱敏(短期疗法)和/或提高耐受(长期疗法)(Berin和Mayer, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2013) 1月;131 (1) :14-22,和图7)。已经在食物过敏模型中给药包封在微粒中的抗原以诱导脱敏,并且已经显示固定有抗原的白细胞在过敏小鼠模型中耐受反应。(参见Smarr等人, *J. Immunol.* (2011) 187:5090-5098)。然而,理想的工程改造疗法应不仅提供诱导脱敏或耐受的抗原,而且同时向免疫系统提供耐受原性信号。因此,需要用于鉴别耐受原性信号的方法,所述耐受原性信号可以用于涉及脱敏和耐受的过敏疗法。鉴别后,耐受原性信号可以被配制为微粒和/或纳米粒子的一部分,其任选地包括用于诱导脱敏和/或耐受的抗原。凋亡细胞在细胞表面上包括天然的耐受原性信号。(参见

Taylor等人, *Nat. Rev. Mol. Bio.* (2008) 3月; 9 (3) : 231-41, 和图8)。细胞表面上存在的化合物包括蛋白质、脂质、糖脂和碳水化合物, 其可能参与耐受产生。

[0076] 变态反应通常涉及炎症反应, 并且LPS刺激的巨噬细胞(即“活化的巨噬细胞”)已被用作研究炎症反应偏斜的工具。例如, LPS刺激的巨噬细胞分泌促炎细胞因子如IL-6、TNF- α 和IL1 β , 并且可以使用这些炎症细胞因子分泌的调节来鉴别抑制炎症反应的化合物。已经发现在RAW 264.7巨噬细胞中抑制这种炎症反应, 且特征在于促炎细胞因子的分泌减少和IL-10/TGF β 增加的化学化合物包括: 6-脱氢姜辣二酮; 贝母碱; 腺苷; 和柴胡皂苷A。(参见Huang等人, *J. Agric. Food Chem.* (2014) 9月17日; 62 (37) : 9171-9; Yi等人, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* (2013) 10月; 35 (5) : 567-72; Zhu等人, *Exp. Ther. Med.* (2013) 5月; 5 (5) : 1345-1350; 和Koscsos等人, *J. Leukoc. Biol.* (2013) 12月; 94 (6) : 1309-15)。因此, 活化的RAW巨噬细胞可以用作筛选耐受原性信号的模型。

[0077] 我们使用活化的RAW巨噬细胞开发了鉴别耐受原性信号的高通量筛选方法。(参见图2)。在用LPS活化的巨噬细胞中和在用化学交联剂乙基碳化二亚胺处理的脾细胞(SP) (ECDI-SP) 存在下用LPS活化的巨噬细胞中, 我们根据化合物相对于基线增加IL-10分泌和/或相对于基线减少IL-6分泌的能力测试了七十(70)种化合物。可以给药与ECDI-SP表面交联的抗原来诱导抗原特异性耐受(参见Jenkins等人, *J. Exp. Med.* 165:302-319 (1987)), 因此, 我们包括在ECDI-SP存在下用LPS活化的巨噬细胞来判定用LPS活化的巨噬细胞中和在ECDI-SP存在下用LPS活化的巨噬细胞中是否展现类似的耐受原性信号。我们鉴别了许多展现耐受原性信号的碳水化合物。(参见图3A和3B)。选择岩藻糖作为展现耐受原性信号的示例性碳水化合物, 并使其与具有PLGA聚合物核心的纳米粒子偶联来产生碳水化合物增强的PLGA纳米粒子(F-CENP)。(参见图4)。如图5所示, 在IL-10诱导方面, F-CENP显著优于仅接受PLGA、仅接受L-岩藻糖的细胞或甚至EDC-细胞, 表明官能化的PLGA粒子甚至比EDC-细胞都有改善。

[0078] 总之, RAW巨噬细胞可以用作筛选系统来鉴别可能诱导耐受的潜在化合物。我们对70种化合物的初步筛选揭示了数种可用于促进IL-10分泌而不改变或降低IL-6分泌的化合物。我们的结果指示, 促耐受信号可以被并入用于给药抗原并以较高效率诱导耐受的治疗设计中。

[0079] 实施例3-用于在T1D中传递耐受的LNFPIII和GAS6信号转导纳米粒子

[0080] 背景

[0081] 1型糖尿病(T1D)是由自身反应性T细胞介导的胰腺 β 细胞破坏引起的自身免疫病症, 导致需要外源胰岛素疗法的高血糖。具有产生T1D的高风险的个体现在可以用人类白细胞抗原的基因分型与一组胰岛细胞自身抗体的血清学测试的组合来鉴别。¹在这种高风险群体中, 在临床糖尿病急性发作之前或期间, 仍可能存在大量的 β 细胞物质, 使得如果正在进行的 β 细胞引导的自身免疫能够被有效且永久地抑制, 则剩余的 β 细胞可以恢复正常血糖。^{2,3}调节性T细胞(Treg)在维持外周耐受中起重要作用, 并且其缺陷与不受控制的自身免疫包括T1D相关。⁴因此, 直接或间接扩增Treg的免疫疗法被认为是一种有前景的治疗方法。⁵⁻⁷最近的一期临床试验展示离体扩增的可行性以及T1D患者中多克隆Treg过继转移的安全性⁷; 然而这种用离体扩增的Treg进行过继免疫疗法的功效仍有待确定。另一方面, 认为抗原特异性Treg比多克隆Treg更有效地抑制T1D中的自身免疫。⁸⁻¹⁰然而, 用于人类疗法的

抗原特异性Treg的离体扩增是高度劳动密集型的并且具有显著的监管和许可负担,更不必提及的 β 细胞自身抗原是移动的目标,其在这些个体中提供公认的表位扩散。¹¹因此,旨在体内扩增内源Treg的免疫疗法可能更可行,并且更有可能实现期望的适用于给定个体中存在的特定自身抗原组的抗原特异性抑制。用于T1D中免疫疗法的最有前景的抗原候选者是胰岛素本身和其衍生物。¹²理想的是,可以使用相关的胰岛素衍生的自身抗原来诱导扩散到其它 β 细胞自身抗原的有效感染性耐受¹³。

[0082] 我们和我们的同事已经建立了有效的耐受原性疫苗来控制自身免疫和同种免疫。^{14,15}耐受原性疫苗被制造成抗原偶联的乙烯碳化二亚胺 (ECDI) 固定的脾细胞 (Ag-SP), 并通过静脉内 (i.v.) 途径给药。静脉内注射自身抗原偶联的Ag-SP已经显示在自身免疫性糖尿病¹⁶、EAE^{17,18}、变应性疾病¹⁹的小鼠模型中,并且近年来,由Luo实验室在小鼠^{20,21}和非人类灵长类动物两者的同种异体和异种移植模型 (未公开的数据) 中诱导有效和长期的抗原特异性耐受。更重要的是,我们的同事最近公开了使用髓磷脂肽偶联的自体细胞基于这个原理的多发性硬化的首个人类临床试验²²,确立了这种新耐受策略的临床可行性、安全性和有效性。有趣的是,Ag-SP介导的耐受的突出特征是内源Treg的强体内扩增^{15,19,23},最近在非人类灵长类动物中复制了这个观察结果。²⁴因此,对于T1D患者,Ag-SP是一种非常具有前景的抗原特异性耐受疗法。

[0083] 为了避免处理大量患者细胞来制造Ag-SP的需要,我们最近开始使用生物工程改造的纳米粒子 (NP) 作为传递抗原负载物的载体进行研究,并且已经公开了我们的早期研究,其展示了这些耐受原性Ag-NP疫苗的有前景的功效。²⁵⁻²⁷然而,在食物过敏和同种异体胰岛移植两者的鼠科模型中,我们观察到这种Ag-NP与Ag-SP相比具有次优的耐受功效。从这些观察结果,我们合理地认为肯定存在由Ag-SP提供的在Ag-NP上不存在的其它耐受原性信号。通过我们的初步研究,我们从Ag-NP中鉴别了两种这样的缺失的耐受原性信号,其在与宿主吞噬细胞相互作用后能够活化 (1) 凝集素CD209和 (2) 胞葬 (efferocytic) 受体酪氨酸激酶Mer (图12A、B和C)。因此,我们假设使CD209和Mer的配体与NP结合 (例如直接通过共价连接或间接通过连接基团) 将显著增强Ag-NP疫苗的耐受原性。

[0084] 在本文中,我们提出开发携带CD209和Mer双重信号转导配体的生物工程改造NP,并测试其诱导T1D的 β 细胞特异性耐受的能力。我们令人信服的初步结果、全面的实验计划和研究团队的协同专长为设计用于在T1D中传递耐受的生物工程改造的高效Ag-NP疫苗提供了独特机会。

[0085] 提出的研究

[0086] 中心假设:如图9中示意性显示,我们假设可以通过以下方法显著增强Ag-NP传递系统在T1D的耐受疗法的功效: (1) 同时工程改造NP上用于进行CD209和Mer双重信号转导的靶向配体 (LNFPIII和GAS6); 和 (2) 传递作为诱导感染性耐受的初始疾病相关自身抗原的胰岛素的脱酰胺形式 (INS (Q→E))。

[0087] 特定目标:目标1,开发包含在NP表面上存在的LNFPIII和GAS6的NP。具体来说,我们将判定LNFPIII和GAS6与NP的结合是否会在适当的鼠科吞噬细胞中引起同时靶向和信号转导,从而在这些吞噬细胞中有效地诱导耐受原性特征。我们假设LNFPIII-GAS6-NP通过CD209和Mer双重信号转导在鼠科巨噬细胞 (MF) 中有效诱导耐受原性特征。目标2,测试INS (Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP在非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠模型中的耐受功效。具体来说,我们将

在NOD小鼠中判定,与脱酰胺的小鼠胰岛素原偶联的LNFPIII-GAS6-NP的传递是否产生对 β 细胞引导的自身免疫的强耐受,因此预防和/或逆转NOD小鼠中的临床糖尿病。我们假设INS (Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP有效抑制NOD小鼠中 β 细胞引导的自身免疫。

[0088] 基本原理

[0089] 抗原特异性耐受疗法是Luo实验室的主要焦点,特别是在用于T1D的胰岛移植的背景下。¹⁴我们的主要方法是通过在羧基活化剂1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺 (ECDI) 存在下,经由酰胺键形成将所关注(供体)抗原偶联到脾细胞表面(Ag-SP)来传递所述抗原。²⁰这种方法最初是由我们的同事在自身免疫动物模型中关于耐受诱导进行实验。²⁸Luo实验室的开创性研究进一步将这种耐受方法的强大功效扩展至同种异体和异种移植,^{21,23,29}而Bryce实验室已经成功地展示了这种方法在哮喘和变应性疾病中的功效。¹⁹为了避免处理大量患者细胞来制造Ag-SP的需要,我们最近已经发表了我们使用生物工程改造的NP进行耐受原性抗原传递的开创性研究,展示了这些耐受原性Ag-NP疫苗的有前景的功效。²⁵⁻²⁷通过对临床翻译的清晰了解,在这个应用中,我们计划将研究重点集中在通过以下方法开发一种用于在T1D中进行耐受传递的高效的Ag-NP疫苗:(1)将CD209和Mer双重信号转导配体结合到NP的表面;和(2)传递脱酰胺胰岛素原作为诱导感染性耐受的初始自身抗原。

[0090] LNFPIII和GAS6介导的耐受传递的基本原理:在食物过敏和同种异体胰岛移植两者的鼠科模型中,我们观察到Ag-NP与Ag-SP相比具有次优的耐受功效。通过我们的初步研究,我们鉴别了参与Ag-SP的耐受但不参与Ag-NP的耐受的两种耐受原性信号转导受体:(1)胞葬受体酪氨酸激酶Mer(图12A、B和C);和(2)凝集素CD209。因此,我们假设将Mer和CD209的配体结合到NP表面将显著增强Ag-NP疫苗的耐受原性。受体酪氨酸激酶(RTK)家族有三个成员专用于稳态清除凋亡细胞:TYRO3、Ax1和Mer,其统称为TAM RTK,其中后两者是免疫系统中的主要TAM RTK。³⁰蛋白S和GAS6(生长停滞特异性蛋白6)是TAM RTK的两个同源配体。TAM RTK具有两个已知功能:(1)介导“胞葬”,凋亡细胞的稳态吞噬作用的过程^{31,32};和(2)传递调节先天免疫反应的调节信号。^{33,34}已知TAM信号转导缺陷引起深度自身免疫。^{30,33}外源GAS6可以刺激Mer和Ax1两者的酪氨酸自磷酸化,而蛋白S仅能够通过Mer转导信号。³⁵此外,相较于蛋白S,GAS6刺激更有效的吞噬作用³⁵,特别是在炎症的形成中。³⁶CD209是存在于MF表面上的C型凝集素受体。其在MF中的信号转导与MF的IL-10介导的抑制功能相关。³⁷乳糖-N-岩藻五糖III(LNFPIII)是含有路易斯^x三糖的天然五糖,其结合CD209并通过CD209转导信号³⁸,并且已经显示诱导免疫调节作用,^{39,40}延长同种异体移植植物存活⁴¹并促进移植植物耐受。³⁷在我们的初步研究中(图12A),我们观察到CD209标记突出的脾MF,其在Ag-SP而非Ag-NP注射后上调RTK Mer。这些特征使得GAS6和LNFPIII成为两种有吸引力的候选者来治疗性地生物工程改造到Ag-NP进行Mer和CD209双重信号转导,从而提供了增强Ag-NP耐受原性的缺失信号。

[0091] 脱酰胺胰岛素作为初始糖尿病相关自身抗原进行靶向的基本原理:由于胰岛 β 细胞在生理条件下对氧化和ER应力高度敏感,所以存在于这些细胞中的蛋白质很有可能经历各种翻译后修饰(PTM)。修饰的 β 细胞蛋白可以产生已经不能通过中枢和/或外周耐受机制自身耐受的新抗原,因此很可能触发免疫反应并产生针对这些新抗原的自身免疫。最近的三个研究⁴²⁻⁴⁴使用细胞分级分离和质谱分析显示胰岛素是由 β 细胞分泌性微粒产生的多肽

物质的丰富来源,这与展示胰岛素在介导针对 β 细胞的自身免疫中的主要作用的现有文献是一致的。^{12,45}通过对全球蛋白质组机器数据库(Global Proteome Machine Database)的详细检查,我们发现谷氨酰胺(Q)脱酰胺是胰岛素上的一种频繁PTM。Q的侧链的脱酰胺可以由脱酰胺酶催化,或当蛋白质暴露于酸性时可以自发地发生。在体内, β 细胞经历引起囊泡酸化的氧化应力,从而可以提供有利于产生大量脱酰胺胰岛素蛋白/肽的环境。引人注目的是,在我们的初步研究中,已经在T1D患者和NOD小鼠两者中检测到与对天然胰岛素相比对脱酰胺(Q $\rightarrow$ E)胰岛素原有更强的体液(图14A、B和C)和细胞(数据未显示)的反应,从而证实了我们的假设,即这种脱酰胺胰岛素具有高免疫原性。重要的是,对脱酰胺胰岛素原的这种反应与NOD小鼠中糖尿病产生的发病率显著相关(图14B),目前也正在儿童T1D风险人群中评估该现象。鉴于与天然胰岛素原相比,对脱酰胺胰岛素原的免疫反应更强,所以我们假设如果在我们的Ag-NP耐受递送方法中使用脱酰胺胰岛素原作为目标抗原,则耐受将更有效。有趣的是,从对脱酰胺胰岛素原具有阳性体液反应的NOD小鼠收集的杂交瘤克隆和探测肽阵列使我们可以绘制对C肽中单一脱酰胺谷氨酰胺残基的反应性(图14C)。C-肽的这种高度免疫原性脱酰胺序列将是我们用于靶向的初始自身抗原候选者。

[0092] 初步数据

[0093] 通过Ag-SP细胞进行抗原传递引起Treg细胞大量扩增并通过缺失和无反应性产生Teff细胞的耐受。在BALB/c $\rightarrow$ B6同种异体胰岛移植模型中,在第-7天和第+1天(相对于第0天的BALB/c胰岛移植)在B6接受者中注射ECDI固定的供体(BALB/c)脾细胞(Ag-SP)导致无限期的胰岛同种异体移植存活。²⁰Ag-SP注射使接受者的脾、引流淋巴结(dLN)和移植的同种异体移植物中的CD4⁺Foxp3⁺ Treg大量扩增(图10A)。因此,由Ag-SP诱导的耐受取决于通过Ag-SP进行的Treg扩增,因为在Ag-SP注射时的Treg的去除完全去除了其耐受功效。²⁰最近通过我们自己的研究(未发表数据)以及通过别人发表的数据已经在非人类灵长类动物胰岛同种异体移植模型中验证了通过Ag-SP进行的Treg扩增。²⁴伴随着Treg扩增,Teff细胞通过两个不同的机制而被耐受:(1)使具有间接特异性的T细胞缺失;和(2)使具有直接特异性的T细胞无反应性。²³如图10B所示,在脾和dLN中,具有间接供体特异性的T细胞(通过TEa TCR转基因T细胞的过继性转移调查⁴⁶)经历了强初始增殖(第-4天),接着迅速缩减和去除(第0天、第7天),使得到第7天,很少的这样的T细胞浸润胰岛同种异体移植物。相反,如图10C所示,与注射未处理的BALB/c SP后的增殖相比,第一Ag-SP注射使具有直接供体特异性的T细胞(通过4C TCR转基因T细胞的过继性转移调查⁴⁷)的增殖明显受损。更重要的是,剩余4C T细胞不再对供体刺激作出反应,表现为其对第二ECDI-SP注射没有反应(右点图),指示使被有效地去反应化。总的来说,这些数据表明在使Teff缺失和/或无反应性时Ag-SP使Treg强扩增。

[0094] 在Ag-SP耐受中,Treg诱导和向发炎位点的迁移取决于来源于髓系抑制性细胞(MDSC)的扩增。Ag-SP注射使脾(图11A)和移植位点(数据未显示)中的两个髓细胞群显著扩增:CD11b⁺Ly6C^{HI}Gr1^{INT}细胞(称为Ly6C^{HI}细胞)和CD11b⁺Ly6C^{LO}Gr1^{HI}细胞(称为Gr1^{HI}细胞)。这两个细胞群与髓系抑制性细胞(MDSC)具有表型相似性,并在体外抑制T细胞增殖。^{29,48}重要的是,当在抗CD3/CD28刺激下与T细胞共培养时,同种异体移植的Ly6C^{HI}和Gr1^{HI}细胞能够诱导IL-10和CCL4显著产生,IL-10和CCL4是参与Treg细胞的诱导和归巢的两种可溶性介质(图11B)。从供体Ag-SP处理的接受者回收的同种异体移植物与来自对照接受者的移植物相

比显示出Foxp3⁺细胞的逐渐增加(图11C),这支持了这种可能性。因此,Ly6C^{HI}和Gr1^{HI} MDSC的去除有效去除Ag-SP引起的耐受诱导。^{29,48}总的来说,这些数据表明MDSC的扩增是介导Ag-SP诱导的Treg诱导和迁移的关键步骤。

[0095] 通过Ag-SP进行的Ly6C^{HI}和Gr1^{HI}MDSC的扩增取决于受体酪氨酸激酶Mer。当我们在体内追踪注射的Ag-SP时,我们发现其保留在脾边缘区中,并被这个区域中的吞噬细胞内化。²³因为受体酪氨酸激酶(RTK)家族TAM(Tyro 3、Axl、Mer)参与凋亡细胞的稳态清除,所以我们首先检查其是否参与由Ag-SP诱导的耐受。如图12A所示,通过注射Ag-SP主要在表达细胞表面凝集素的两个脾MF群体上诱导Mer表达:CD169⁺过渡区亲金属MF和CD209⁺边缘区MF。为了判定吞噬细胞群上的Mer诱导是否在Ag-SP诱导的耐受中起作用,我们利用了Mer^{-/-}小鼠。如图12B所示,在Mer^{-/-}小鼠中,由Ag-SP诱导的Ly6C^{HI}和Gr1^{HI} MDSC的扩增显著减少。

[0096] 通过Ag-SP扩增Ly6C^{HI}和Gr1^{HI}MDSC取决于受体酪氨酸激酶Mer。当我们在体内追踪注射的Ag-SP时,发现其保留在脾边缘区中,并被这个区域中的吞噬细胞内化。²³因为受体酪氨酸激酶(RTK)家族TAM(Tyro 3、Axl、Mer)参与凋亡细胞的稳态清除,所以我们首先检查其是否参与由Ag-SP诱导的耐受。如图12A所示,通过注射Ag-SP主要在表达细胞表面凝集素的两个脾MF群体上诱导Mer表达:CD169⁺过渡区亲金属MF和CD209⁺边缘区MF。为了判定吞噬细胞群上的Mer诱导是否在Ag-SP诱导的耐受中起作用,我们利用了Mer^{-/-}小鼠。如图12B所示,在Mer^{-/-}小鼠中诱导抑制性单核细胞和Treg细胞扩增的情况下,Ag-SP诱导的Ly6C^{HI}和Gr1^{HI} MDSC的扩增显著减少。^{34,35,37,41}

[0097] 纳米粒子(NP)可以用于耐受原性抗原传递(Ag-NP)。为了简化和标准化抗原传递,我们和其它人已经尝试使用PLG NP作为抗原送递载体。^{25-27,49}如图13A所示,我们制造了具有尺寸和电荷规格的PLG纳米粒子,并且使用相同的ECDI-偶联化学将供体(BALB/c)脾细胞裂解物形式的供体抗原(Ag)偶联,并且相对于在第0天进行BALB/c胰岛移植,在第-7天和第+1天将Ag-NP注射到B6接受者。如图13B所示,单独注射Ag-NP(“PLG-dAg”组)仅产生边缘移植保护。因此,尽管使用Ag-NP可以大大增强这种耐受方法的临床可行性,但通过Ag-NP获得的耐受功效不如通过Ag-SP获得的强。²⁵我们假设这是由于Ag-NP缺乏关键的细胞表面碳水化合物和蛋白质配体,从而导致相互作用的吞噬细胞中的耐受原性信号转导受损。

[0098] 高通量筛选展示碳水化合物能够调节巨噬细胞的细胞因子产生库。为了支持ECDI固定的NP缺乏用于诱导耐受原性信号的信号的总体概念,我们检查了在巨噬细胞细胞系(RAW264.7)中调节细胞因子反应的能力。这个细胞系以前用于预测抗原呈递细胞对耐受的反应。使用基于384孔高通量筛选(HTS)的方法,通过该方法,通过LPS添加刺激细胞表达IL-6和IL-10,ECDI固定的SP使得IL-10产生显著增加(图1)并且IL-6减少(未显示)。与之形成鲜明对比的是,与对照相比,ECDI处理的NP无效并且实际上降低了RAW264.7细胞的IL-10产生(图1)。使用这种HTS方法,我们检查了可能由细胞而非NP提供的大量潜在信号,并且集中于天然和合成碳水化合物结构的组,因为其具有调节MF的细胞因子产生库的能力。基于同时增强IL-10和抑制IL-6产生,我们成功地鉴别了数种如此令人兴奋的碳水化合物候选者,包括路易斯^x抗原(图3A)。此外,在预试验中,连接岩藻糖足以增强细胞对NP的摄取并促进IL-10偏斜反应(图5)。

[0099] 胰岛素原Q→E脱氨基引起人和小鼠两者中的强免疫反应。我们首先合成了重组人类胰岛素原或小鼠胰岛素原1和胰岛素原2蛋白,其中其谷氨酰胺(Q)残基全部都突变为谷

氨酸盐(E)残基,并使用这些Q→E胰岛素原蛋白来探测30名已知患有T1D的成年患者(图14A)和从3周龄开始的33只幼年NOD雌性小鼠(图14B)的群组的血清。如图14A所示,30名成年T1D患者中有4名对脱酰胺胰岛素原具有抗体反应,但对天然(WT)胰岛素原没有抗体反应。类似地,如图14B上图所示,个别NOD小鼠对脱酰胺胰岛素原而非WT胰岛素原产生抗体反应(显示的是对脱酰胺的鼠科胰岛素原1的抗体反应的一个实例,但也观察到对脱酰胺的鼠科胰岛素原2或两者的反应)。重要的是,在NOD小鼠中,对脱酰胺胰岛素原的体液反应与糖尿病产生的发病率高度相关(图14B下图)。这种预测相关性目前也正在儿童T1D风险人群中进行评估。有趣的是,从对脱酰胺胰岛素原具有阳性体液反应的NOD小鼠收集的杂交瘤克隆和图14C中示例的探测肽阵列使我们可以绘制C肽中对单一脱酰胺谷氨酰胺残基的反应性的图:点Y19、20、22,与序列GGGPGAGDLET(SEQ ID NO:4)相关。

[0100] 研究设计和方法

[0101] 目标1:开发LNFPIII和GAS6修饰的NP

[0102] 目标1A:设计和制造LNFPIII-GAS6-NP:我们将首先使用Bryant等人先前描述的单一乳化技术制造直径约500nm的聚(丙交酯-共-乙交酯(1:1))(PLG)纳米粒子。²⁵用0.05或0.1M NaOH部分水解纳米粒子的表面来增加可用于官能化粒子表面和偶联抗原的羧基的密度。通过测量NP ζ 电位以及使用甲苯胺蓝定量羧基含量来监测修饰。⁵⁰使用碳化二亚胺化学法(ECDI)活化NP上的羧基,并与N-顺丁烯二酰亚胺基丙酸酐肼(BMPH)反应以在NP表面上提供顺丁烯二酰亚胺基,所述顺丁烯二酰亚胺基对“点击(click)”化学法中使用的硫醇基具有反应性。⁵¹用半胱氨酸衍生配体LNFPIII和GAS6来提供允许其与顺丁烯二酰亚胺官能化的NP共价连接的硫醇基。通过LNFPIII与Cys之间的还原胺化合成LNFPIII-Cys。⁵²通过使用His6标签进行重组DNA技术在HEK293T细胞中合成具有末端Cys的GAS6,并通过亲和色谱法用Ni-NTA珠粒进行分离,接着如前所述在HiTrap Q FF离子交换柱(GE Healthcare)上纯化。³⁶

[0103] LNFPIII-Cys和GAS6-Cys都通过点击化学法连接于PLG-NP。⁵¹如果通过RAW264.7MF分析(在下文目标1B中详细描述)确定使用点击化学未获得预期结果,则替代地通过碳化二亚胺化学法用链霉亲和素将PLG NP官能化。接着使链霉亲和素-PLG NP与生物素化的LNFPIII和GAS6反应。通过在偶联反应之前和之后定量上清液中的蛋白质和碳水化合物来测定配体的偶联效率。此外,通过对GAS6和LNFPIII具有特异性的标记抗体检测NP表面上的蛋白质和碳水化合物。

[0104] 如果通过RAW264.7MF分析(在下文目标1B中详细描述)判定使用PLG平台的活化是次优的,我们将研究使用聚(聚乙二醇柠檬酸酯-共-N-异丙基丙烯酰胺)(PPCN)作为传递平台。PPCN是开发的一种热反应性可生物降解大分子,其已被证明具有生物相容性并且能够缓慢传递蛋白质。⁵³这种大分子具有高密度的可被官能化的羧基,并且在非常温和的条件下可以容易地形成直径约200-300nm的NP。可以使用上文对于PLG NP所述的相同点击化学法使配体与PPCN结合。使用PPCN的潜在优点是,由于大分子与配体直接结合以及通过配体官能化的PPCN的自组装形成NP,而在NP表面上显示明显更高密度的配体。

[0105] 目标1B:在RAW264.7MF中通过细胞因子调节筛选LNFPIII-GAS6-NP:如图2所示,使用与RAW264.7细胞系巨噬细胞的共培养系统筛选如在目标1A中开发的LNFPIII-GAS6-NP。我们预期将依序制造出具有可变参数(结合方法(点击化学对生物素-链霉亲和素)、聚合物

材料 (PLG对PPCN)) 的LNFPIII-GAS6-NP, 因此将轮流进行测试。在LPS刺激存在下, 将LNFPIII-GAS6-NP的每种物质与RAW264.7MF共培养 (MF+LNFPIII-GAS6-NP+LPS) 72小时。通过ELISA测量所得上清液的IL-10和IL-6。对照共培养物将包括: (1) 单独的MF; (2) MF+LPS; (3) MF+未修饰的NP; (4) MF+未修饰的NP+LPS; 和 (5) MF+LNFPIII-GAS6-NP。将对照条件#2的IL-10/IL-6比率视为基线。高于基线的IL-10/IL-6比率将被视为筛选“阳性”; 而低于基线的比率将被视为筛选“阴性”。为了附带地支持从RAW264.7MF细胞系获得的结果, 筛选的“阳性”LNFPIII-GAS6-NP物质也将在类似的共培养系统中使用来源于原代鼠科骨髓的MF进行确认。

[0106] 目标1C: 负载抗原以筛选“阳性”LNFPIII-GAS6-NP: 我们将负载三种可能的 β 细胞抗原以用于目标2中提出的实验: 脱酰胺胰岛素原肽“GGPGAGDLETLALE (SEQ ID NO:2)” (图14C)、脱酰胺的全胰岛素原或整个MIN6 (β 细胞系) 细胞裂解物。我们将测试两种抗原负载方法以筛选“阳性”LNFPIII-GAS6-NP物质。第一种方法将使用我们前述的ECDI化学法将肽/蛋白质抗原偶联到纳米粒子的表面。²⁵偶联至粒子的肽/蛋白质的量将通过在偶联反应之前和之后定量上清液中的抗原来测定。如果偶联效率或其与RAW264.7MF的相互作用是次优的, 我们还将测试粒子内的抗原包封是否更有效。用包封肽形成的PLG粒子在自身免疫性脑炎模型中是有效的。⁵⁴通过双重乳化法将抗原包封在PLG或PPCN粒子中, 该双重乳化法旨在产生与单一乳化法具有类似直径和电荷的粒子 (500nm, ζ 电位 = -60mV)。将用于包封的聚合物组合物和平均分子量 (以固有粘度为特征) 进行实验, 因为这些特性将影响NP的稳定性, 从而影响包封的抗原的细胞内化和释放。⁵⁵用 ζ 尺寸仪 (zetasizer) 测量粒度分布和 ζ 电位。通过将负载抗原的NP溶解在DMSO中用于随后的用CBQCA分析进行的分析来定量包封在粒子内的肽/蛋白质的量。⁵⁶

[0107] 预期结果、潜在障碍和替代办法: 我们预期使LNFPIII和GAS6与NP结合将显著增强其与MF的耐受原性相互作用并导致有利的IL-10/IL-6产生比。我们预期使用不同的结合方法 (点击化学法对生物素-链霉亲和素)、聚合物材料 (PLG对PPCN)、抗原负载方法 (交联对包封)、 β 细胞抗原的选择 (胰岛素原肽对全蛋白对完整的 β 细胞裂解物), 将产生具有MF IL-10/IL6产生比的谱的Ag-LNFPIII-GAS6-NP物质的库。表现最优者将选用于目标2中提出的实验。如果在所有的变化中观察到次优的IL-10/IL-6产生比, 则另一个考虑是通过将磷脂酰丝氨酸 (PS) 连接至GAS6的GLA域来增强GAS6信号转导。³²这可以通过以重量比1:10 (PS: 聚合物) 添加PS的乳化法以将PS并入到PLG或PPCN粒子上来实现。⁵⁷PS具有羧酸头部基团和烷基尾部, 因此具有用于并入到聚合物粒子上并用于通过ECDI偶联或包封进行抗原负载的官能团。

[0108] 目标2: 测试INS (Q→E) -LNFPIII-GAS6-NP在NOD小鼠模型中的耐受功效

[0109] 目标2A: 通过耐受原性INS (Q→E) -LNFPIII-GAS6-NP疫苗预防和治疗NOD的糖尿病。小鼠模型: 我们将使用两种NOD模型。在第一种模型 (“预防”模型) 中, 我们将处理两个年龄组: 5周龄和9周龄雌性NOD小鼠。在两个年龄组中, 胰腺中的炎性反应已经开始, 如促炎性免疫细胞浸润的存在所展示, 但血糖水平仍然在正常范围内。因此其处于糖尿病前期 (pre-diabetic)。我们将应用INS (Q→E) -LNFPIII-GAS6-NP处理的最佳鉴别配方 (通过目标1) 来判定我们是否可以阻止这些糖尿病前期NOD小鼠发展成糖尿病。在INS (Q→E) -LNFPIII-GAS6-NP处理后监视小鼠的血糖水平直至30周龄。在第二种模型 (“治疗”模型) 中, 我们将使

用通过从12周龄开始每周两次筛选鉴别的刚刚成为高血糖的急性糖尿病(12-30周龄)NOD小鼠。我们将在高血糖急性发作的3-5天内施用INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理。在这个阶段,这些NOD小鼠中仍然存在大量的β细胞物质,因此通过免疫疗法有效控制自身免疫可以导致剩余β细胞的功能恢复并因此逆转糖尿病。⁵⁸我们将向急性糖尿病NOD小鼠施用INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理,并判定是否可以逆转这些小鼠的糖尿病。在INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理后总共60天监测小鼠的血糖水平以确定糖尿病逆转。

[0110] INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理:在与RAW264.7MF共培养后具有大的IL-10/IL-6产生比的NP物质将以治疗量被制造以负载靶向抗原用于NOD小鼠的体内处理。最初,我们将测试含有如图14C中鉴别的脱酰胺关键位点的15-aa胰岛素原肽“GGGPGAGDLETLALE”(SEQ ID NO:2)作为我们的靶向抗原。将15-aa INS(Q→E)肽连接于LNFPIII-GAS6-NP的表面(通过ECDI介导的交联⁵⁴)或包封在LNFPIII-GAS6-NP内。交联和包封之间的选择将基于在目标1C中测定的抗原负载效率来确定。向三个年龄组(5周、9周或急性糖尿病)的雌性NOD小鼠静脉内注射3mg INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP。对照小鼠是注射负载有天然胰岛素原肽(“GGGPGAGDLQTLALE”(SEQ ID NO:3))的LNFPIII-GAS6-NP、未负载的LNFPIII-GAS6-NP或未注射NP的年龄匹配的雌性NOD小鼠。这些对照组将允许我们判定:(1)裸露的LNFPIII-GAS6-NP本身是否具有任何疾病修饰作用,如在CNS感染和心脏缺血模型中所描述²⁷;和(2)靶向脱酰胺胰岛素原肽是否比靶向天然胰岛素原肽更有效。如果实验组(用INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理)展示优越的糖尿病控制,则我们还将测试每4周多次注射有效的INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP疫苗是否会具有对持续疾病控制的额外益处。为了在本次资助的时间(2年)内完成我们提出的实验,预期我们将需要轮流测试多种有前景的NP物质,因为所述物质经开发并验证可实现如上文所定义的IL-10/IL-6读数。

[0111] 作为T1D的耐受原性LNFPIII-GAS6-NP疫苗被测试的其它自身抗原。除了“GGGPGAGDLETLALE”(SEQ ID NO:2)胰岛素原肽之外,还可能包括多种自身抗原的库来获得有效的耐受^{22,59},特别是在疾病晚期,此时自身抗原性可能已经扩散到其它表位。因此,如果INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP展现疾病“突破”,特别是在老年小鼠中,我们将使用相同的LNFPIII-GAS6-NP载体传递其它可能的自身抗原。通过耐受原性LNFPIII-GAS6-NP传递进行测试的其它可能的自身抗原是:(a)脱酰胺的全胰岛素:因为天然形式的全胰岛素已经显示在NOD小鼠的耐受疗法中展示功效^{16,59},并且我们的初步结果(图14B)展示对脱酰胺的全胰岛素原的免疫反应提高,我们还将测试脱酰胺的全胰岛素(重组小鼠胰岛素原1和胰岛素原2蛋白,其中其所有谷氨酰胺(Q)残基突变为谷氨酸盐(E)残基)作为通过LNFPIII-GAS6-NP传递的自身抗原来判定与单独的“GGGPGAGDLETLALE”(SEQ ID NO:2)相比,这种具有拓宽的表位范畴的脱酰胺胰岛素原是否展现更好的耐受功效。(b)完整的β细胞裂解物:我们将来源于在β细胞中表达SV40的大T抗原的转基因小鼠的胰岛瘤细胞系MIN6制备完整的β细胞裂解物。⁶⁰完整的β细胞裂解物将通过ECDI交联(如我们之前用移植抗原的供体细胞裂解物所进行²⁵)连接于表面或包封在LNFPIII-GAS6-NP内。交联和包封之间的选择将基于在目标1C中所述的抗原负载效率来类似地确定。将β细胞裂解物-LNFPIII-GAS6-NP注射到糖尿病前期和急性糖尿病雌性NOD小鼠中,并且分别监测小鼠的糖尿病预防和糖尿病逆转。

[0112] 实验读数:对于糖尿病预防组(糖尿病前期NOD小鼠),在INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理后,每周两次检查血糖水平,直到小鼠达到30周龄。将产生糖尿病的小鼠的百

分比与对照组比较。对于糖尿病治疗组(糖尿病NOD小鼠),在INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理后,每周两次检查血糖水平持续总共60天。将恢复正常血糖的小鼠的百分比与对照组比较。在实验结束时,将NOD小鼠处死以检查胰岛尺寸、数量和结构以及炎性细胞浸润。

[0113] 目的2B:确定耐受原性INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP疫苗的保护机制。扩增MDSC:我们将检查INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP疫苗对MDSC和Treg的体内扩增和抑制Teff的作用。将检查处理和对照NOD小鼠的脾脏和胰腺中的CD11b⁺Ly6C^{HI}Gr1^{INT}(LyC^{HI})细胞和CD11b⁺Ly6C^{L0}Gr1^{HI}(Gr1^{HI})细胞的扩增。将从处理和对照NOD小鼠的脾脏和胰腺分离的Ly6C^{HI}或Gr1^{HI}细胞与由抗CD3/CD28刺激的原初NOD T细胞共培养72小时。通过CFSE稀释来测定对T细胞增殖的抑制。培养物上清液中IL-10和CCL4的产生将通过如图11B所示的ELISA来测量,并且在与Ly6C^{HI}或Gr1^{HI}共培养后,通过计数Foxp3⁺细胞来测定Treg的扩增。

[0114] 自身抗原特异性CD4⁺Foxp3⁺Treg的扩增:将检查处理和对照NOD小鼠对特异于修饰的胰岛素原肽“GGPGAGDLETLALE”(SEQ ID NO:2)的抗原特异性CD4⁺Foxp3⁺ Treg的诱导或扩增:(a)将在INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理后的连续时间点(通过FACS)检查胰腺DLN和脾的CD4⁺Foxp3⁺ Treg的总数;(b)用“GGPGAGDLETLALE”(SEQ ID NO:2)肽或不相关的OVA肽或抗CD3抗体(pan-TCR刺激)刺激来自胰腺DLN或脾的纯化的总CD4⁺ T细胞(Treg和非Treg)。刺激后,计数CD4⁺Foxp3⁺ Treg来判定Treg是否以抗原特异性方式进行扩增。(c)用相同的“GGPGAGDLETLALE”(SEQ ID NO:2)肽或不相关的OVA肽或抗CD3抗体(pan-TCR刺激)刺激来自胰腺DLN或脾的富集的CD4⁺CD25⁻ T细胞(非Treg)。刺激后,计数CD4⁺Foxp3⁺ T细胞以判定Treg的诱导是否以抗原特异性方式发生。

[0115] 自身抗原特异性效应T细胞(Teff)的抑制:将如下检查处理和对照NOD小鼠的自身抗原特异性Teff细胞功能:(a)将在INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP处理后的连续时间点(通过FACS)检查并计数胰腺DLN和脾的CD4或CD8、IFN- γ 或IL-17产生细胞;(b)用“GGPGAGDLETLALE”(SEQ ID NO:2)肽或不相关的OVA肽或抗CD3抗体(pan-TCR刺激)刺激来自胰腺DLN或脾的富集的总CD4⁺ T细胞(Treg和非Treg)。刺激后,通过CFSE稀释测定T细胞增殖,并且通过ELISA分析培养物上清液来测定来源于T细胞的促炎细胞因子,包括IFN- γ 、IL-17和IL-4;(c)用“GGPGAGDLETLALE”(SEQ ID NO:2)肽或不相关的OVA肽或抗CD3抗体(pan-TCR刺激)刺激来自胰腺DLN或脾的纯化的CD4⁺CD25⁻ T细胞(非Treg)。刺激后,测量不存在Treg的情况下的T细胞增殖和来源于T细胞的细胞因子来判定增殖和/或炎性细胞因子产生是否反弹到来自未处理小鼠的T细胞的水平。

[0116] 预期结果、潜在障碍和替代办法:我们预期糖尿病在用INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP疫苗处理的糖尿病前期NOD小鼠中将被预防并且在用INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP疫苗处理的急性糖尿病NOD小鼠中被逆转。此外,我们预期脱酰胺胰岛素原或胰岛素原肽比其未修饰的对应物更有效诱导耐受。最后,在糖尿病晚期,使用更宽抗原库诸如完整的 β 细胞裂解物获得的耐受可能比单独的单一蛋白质/肽疫苗更有效。受保护的NOD小鼠将展现维持的胰岛结构和减少的胰岛炎。我们还预期将在耐受原性INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP疫苗处理的NOD小鼠中观察到更高数量的展示自身抗原特异性的Treg。相反,在处理的小鼠中自身抗原刺激但不是非特异性抗CD3刺激的效应T细胞增殖和促炎细胞因子产生将被抑制,并且这种抑制具有Treg依赖性。我们预测耐受原性INS(Q→E)-LNFPIII-GAS6-NP疫苗通过双重诱导自身抗原特异性Treg和抑制自身抗原特异性Teff来将免疫系统再编程。预期从上

述实验研究获得的发现和知识将为把我们的方法转化为T1D患者的临床设置提供机理和实践基础。如果INS (Q→E) -LNFPIII-GAS6-NP疫苗在控制糖尿病前期和急性期的自身免疫方面展示有前途的功效,那么将在提出的两年资助期之后设计未来的研究来进一步检查:(1)晚期糖尿病,其通过使用我们以前发表的NOD同基因胰岛移植模型⁵⁸进行;(2)感染性耐受的诱导,其通过用胰岛素特异性INS (Q→E) -LNFPIII-GAS6-NP疫苗检查具有其它抗原特异性的T细胞(诸如NOD 8.3⁶¹(特异于IGRP)或NOD BDC2.5⁴⁵(特异于ChgA) T细胞)的耐受来进行。如果INS (Q→E) -LNFPIII-GAS6-NP疫苗在NOD小鼠中仅展示部分功效,我们将考虑组合疗法,诸如额外的低剂量IL-2或雷帕霉素,这可能进一步使Treg/Teff的平衡朝着调节倾斜。

[0117] 相较于可以实现我们的目标的其它方法的优点:目前针对T1D的抗原特异性免疫疗法大部分仅包含抗原,因此具有有限的效力。我们通过LNFPIII-GAS6-NP传递β细胞新自身抗原的方法将为宿主吞噬细胞提供靶向耐受原性信号,扩增内源抑制细胞群如MDSC和抗原特异性Treg,并最终增强耐受功效并仍保持Ag-NP疫苗制造的简单性。此外,其还提供了一种具有广泛应用于其它自身免疫性疾病和变应性疾病的潜力的平台技术。

[0118] 如果我们的JDRF资助建议得到资助,那么所提出的研究极有可能可以导致建立聚焦于T1D治疗产品的开发和许可的行业合作。在提出的资助期的第一年内,我们将很可能获得关于INS (Q→E) -LNFPIII-GAS6-NP耐受原性疫苗的制造和治疗效果的足够初步数据以吸引行业合作伙伴一起参与。

[0119] 参考文献

[0120] 1.Brorsson CA,Onengut S,Chen WM等人,Novel Association Between Immune-Mediated Susceptibility Loci and Persistent Autoantibody Positivity in Type 1 Diabetes.Diabetes 2015;64:3017-27.

[0121] 2.Voltarelli JC,Couri CE,Stracieri AB等人,Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus.JAMA:the journal of the American Medical Association 2007;297:1568-76.

[0122] 3.Moole H,Moole V,Mamidipalli A等人,Spontaneous complete remission of type 1 diabetes mellitus in an adult-review and case report.J Community Hosp Intern Med Perspect 2015;5:28709.

[0123] 4.Sakaguchi S.Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.Nature immunology 2005;6:345-52.

[0124] 5.Tan T,Xiang Y,Chang C,Zhou Z.Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus:a comprehensive review.Clin Rev Allergy Immunol 2014;47:234-43.

[0125] 6.Pham MN,von Herrath MG,Vela JL.Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of IL-2 in Treatment of Type 1 Diabetes.Frontiers in immunology 2015;6:651.

[0126] 7.Bluestone JA,Buckner JH,Fitch M等人,Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells.Science translational medicine 2015;7:

315ra189.

[0127] 8.Tang Q, Henriksen KJ, Bi M 等人, In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. The Journal of experimental medicine 2004;199:1455-65.

[0128] 9.Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. The Journal of experimental medicine 2004;199:1467-77.

[0129] 10. Bluestone JA, Tang Q. Therapeutic vaccination using CD4+CD25+ antigen-specific regulatory T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004;101增刊2:14622-6.

[0130] 11. Luo X, Herold KC, Miller SD. Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? Immunity 2010;32:488-99.

[0131] 12. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H 等人, Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. Nature 2005;435:220-3.

[0132] 13. Kendal AR, Waldmann H. Infectious tolerance: therapeutic potential. Current opinion in immunology 2010;22:560-5.

[0133] 14. McCarthy DP, Bryant J, Galvin JP, Miller SD, Luo X. Tempering allorecognition to induce transplant tolerance with chemically modified apoptotic donor cells. American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2015;15:1475-83.

[0134] 15. Miller SD, Turley DM, Podojil JR. Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. Nature reviews Immunology 2007;7:665-77.

[0135] 16. Fife BT, Guleria I, Gubbels Bupp M 等人, Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. The Journal of experimental medicine 2006;203:2737-47.

[0136] 17. Turley DM, Miller SD. Peripheral tolerance induction using ethylenecarbodiimide-fixed APCs uses both direct and indirect mechanisms of antigen presentation for prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2007;178:2212-20.

[0137] 18. Chen G, Sun H, Yang H 等人, The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy. Transplantation 2006;81:273-83.

[0138] 19. Smarr CB, Hsu CL, Byrne AJ, Miller SD, Bryce PJ. Antigen-fixed leukocytes tolerize Th2 responses in mouse models of allergy. J Immunol 2011;

187:5090-8.

[0139] 20.Luo X,Pothoven KL,McCarthy D等人,ECDI-fixed allogeneic splenocytes induce donor-specific tolerance for long-term survival of islet transplants via two distinct mechanisms.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105:14527-32.

[0140] 21.Wang S,Tasch J,Kheradmand T等人,Transient B-cell depletion combined with apoptotic donor splenocytes induces xeno-specific T-and B-cell tolerance to islet xenografts.Diabetes 2013;62:3143-50.

[0141] 22.Lutterotti A,Yousef S,Sputtek A等人,Antigen-specific tolerance by autologous myelin Peptide-coupled cells:a phase I trial in multiple sclerosis.Science translational medicine 2013;5:188ra75.

[0142] 23.Kheradmand T,Wang S,Bryant J等人,Ethylencarbodiimide-fixed donor splenocyte infusions differentially target direct and indirect pathways of allorecognition for induction of transplant tolerance.J Immunol 2012;189:804-12.

[0143] 24.Lei J,Kim JI,Shi S等人,Pilot Study Evaluating Regulatory T Cell-Promoting Immunosuppression and Nonimmunogenic Donor Antigen Delivery in a Nonhuman Primate Islet Allotransplantation Model.American journal of transplantation:official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2015;15:2739-49.

[0144] 25.Bryant J,Hlavaty KA,Zhang X等人,Nanoparticle delivery of donor antigens for transplant tolerance in allogeneic islet transplantation.Biomaterials 2014;35:8887-94.

[0145] 26.Getts DR,Martin AJ,McCarthy DP等人,Microparticles bearing encephalitogenic peptides induce T-cell tolerance and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis.Nature biotechnology 2013;31:565.

[0146] 27.Getts DR,Terry RL,Getts MT等人,Therapeutic inflammatory monocyte modulation using immune-modifying microparticles.Science translational medicine 2014;6:219ra7.

[0147] 28.Getts DR,McCarthy DP,Miller SD.Exploiting apoptosis for therapeutic tolerance induction.J Immunol 2013;191:5341-6.

[0148] 29.Chen G,Kheradmand T,Bryant J等人,Intragraft CD11b(+) IDO(+) cells mediate cardiac allograft tolerance by ECDI-fixed donor splenocyte infusions.American journal of transplantation:official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2012;12:2920-9.

[0149] 30.Lemke G,Rothlin CV.Immunobiology of the TAM receptors.Nature reviews Immunology 2008;8:327-36.

[0150] 31.Scott RS,McMahon EJ,Pop SM等人,Phagocytosis and clearance of

apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 2001;411:207-11.

[0151] 32. Lemke G, Burstyn-Cohen T. TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1209:23-9.

[0152] 33. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 2001;293:306-11.

[0153] 34. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007;131:1124-36.

[0154] 35. Zagorska A, Traves PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nature immunology* 2014;15:920-8.

[0155] 36. Bhattacharyya S, Zagorska A, Lew ED 等人, Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors. *Cell host & microbe* 2013;14:136-47.

[0156] 37. Conde P, Rodriguez M, van der Touw W 等人, DC-SIGN(+) Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance. *Immunity* 2015;42:1143-58.

[0157] 38. Meyer S, van Liempt E, Imberty A 等人, DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-Lewis^y glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:37349-59.

[0158] 39. Srivastava L, Tundup S, Choi BS, Norberg T, Harn D. Immunomodulatory glycan lacto-N-fucopentaose III requires clathrin-mediated endocytosis to induce alternative activation of antigen-presenting cells. *Infection and immunity* 2014;82:1891-903.

[0159] 40. Tundup S, Srivastava L, Norberg T, Watford W, Harn D. A Neoglycoconjugate Containing the Human Milk Sugar LNFPIII Drives Anti-Inflammatory Activation of Antigen Presenting Cells in a CD14 Dependent Pathway. *PloS one* 2015;10:e0137495.

[0160] 41. Dutta P, Hullett DA, Roenneburg DA 等人, Lacto-N-fucopentaose III, a pentasaccharide, prolongs heart transplant survival. *Transplantation* 2010;90:1071-8.

[0161] 42. Schvartz D, Brunner Y, Coute Y, Foti M, Wollheim CB, Sanchez JC. Improved characterization of the insulin secretory granule proteomes. *Journal of proteomics* 2012;75:4620-31.

[0162] 43. Brunner Y, Coute Y, Iezzi M 等人, Proteomics analysis of insulin secretory granules. *Molecular & cellular proteomics*: MCP 2007;6:1007-17.

[0163] 44. Hickey AJ, Bradley JW, Skea GL 等人, Proteins associated with immunopurified granules from a model pancreatic islet beta-cell system: proteomic snapshot of an endocrine secretory granule. *Journal of proteome research* 2009;8:178-86.

[0164] 45. Stadinski BD, Delong T, Reisdorph N 等人, Chromogranin A is an

autoantigen in type 1 diabetes. *Nature immunology* 2010;11:225-31.

[0165] 46. Grubin CE, Kovats S, deRoos P, Rudensky AY. Deficient positive selection of CD4 T cells in mice displaying altered repertoires of MHC class II-bound self-peptides. *Immunity* 1997;7:197-208.

[0166] 47. Brennan TV, Hoang V, Garrod KR 等人, A new T-cell receptor transgenic model of the CD4+ direct pathway: level of priming determines acute versus chronic rejection. *Transplantation* 2008;85:247-55.

[0167] 48. Bryant J, Lerret NM, Wang JJ 等人, Preemptive Donor Apoptotic Cell Infusions Induce IFN-gamma-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells for Cardiac Allograft Protection. *J Immunol* 2014;192:6092-101.

[0168] 49. Hlavaty KA, McCarthy DP, Saito E, Yap WT, Miller SD, Shea LD. Tolerance induction using nanoparticles bearing HY peptides in bone marrow transplantation. *Biomaterials* 2015;76:1-10.

[0169] 50. Hoshi RA, Van Lith R, Jen MC, Allen JB, Lapidos KA, Ameer G. The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. *Biomaterials* 2013;34:30-41.

[0170] 51. Best MD. Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry* 2009;48:6571-84.

[0171] 52. Shang J, Piskarev VE, Xia M 等人, Identifying human milk glycans that inhibit norovirus binding using surface plasmon resonance. *Glycobiology* 2013;23:1491-8.

[0172] 53. Yang J, van Lith R, Baler K, Hoshi RA, Ameer GA. A thermoresponsive biodegradable polymer with intrinsic antioxidant properties. *Biomacromolecules* 2014;15:3942-52.

[0173] 54. Hunter Z, McCarthy DP, Yap WT 等人, A biodegradable nanoparticle platform for the induction of antigen-specific immune tolerance for treatment of autoimmune disease. *ACS nano* 2014;8:2148-60.

[0174] 55. Whittlesey KJ, Shea LD. Delivery systems for small molecule drugs, proteins, and DNA: the neuroscience/biomaterial interface. *Experimental neurology* 2004;190:1-16.

[0175] 56. Yap WT, Song WK, Chauhan N 等人, Quantification of particle-conjugated or particle-encapsulated peptides on interfering reagent backgrounds. *BioTechniques* in press.

[0176] 57. Shin S, Tuinstra HM, Salvay DM, Shea LD. Phosphatidylserine immobilization of lentivirus for localized gene transfer. *Biomaterials* 2010;31:4353-9.

[0177] 58. Luo X, Yang H, Kim IS 等人, Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and

facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation* 2005;79:1091-6.

[0178] 59. Prasad S, Kohm AP, McMahon JS, Luo X, Miller SD. Pathogenesis of NOD diabetes is initiated by reactivity to the insulin B chain 9-23 epitope and involves functional epitope spreading. *Journal of autoimmunity* 2012;39:347-53.

[0179] 60. Ishihara H, Asano T, Tsukuda K 等人, Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 1993;36:1139-45.

[0180] 61. Krishnamurthy B, Mariana L, Gellert SA 等人, Autoimmunity to both proinsulin and IGRP is required for diabetes in nonobese diabetic 8.3TCR transgenic mice. *J Immunol* 2008;180:4458-64.

[0181] 对于本领域技术人员来说显而易见的是,在不脱离本发明的范畴和精神的情况下,可以对本文公开的发明进行各种替换和修改。本文中说明性适当描述的发明可以在不存在任何元素、本文中未特别公开的限制下实施。使用的术语和表达被用作描述的术语而不具有限制性,并且在使用这些术语和表达时不欲排除显示和描述的特征或其部分的任何等效物,而是承认在本发明的范畴内可以进行各种修改。因此,应了解,尽管本发明已经通过特定实施方式和任选特征来说明,但是本领域技术人员可以采用本文公开的概念的修改和/或变化,并且认为这些修改和变化属于本发明的范畴。

[0182] 本文引用了许多专利和非专利参考文献。所引用的参考文献通过引用的方式以全文并入本文中。如果本说明书中的术语的定义与引用的参考文献中的术语的定义之间存在不一致,则该术语应该基于本说明书中的定义来解释。

序列表

<110> 西北大学

保罗·J·布赖斯 (Bryce, Paul J.)

凯伦·B·陈 (Chien, Karen B.)

<120> 用于调节免疫反应的碳水化合物修饰的粒子和粒子制剂

<130> 5369-00154

<150> US 62/167,054

<151> 2015-05-27

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly	Ala	Gly	Asp	Leu	Gln	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Val	Ala	Gln	Gln
1			5					10					15	

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Asp	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu
1			5					10					15	

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Asp	Leu	Gln	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu
1			5					10					15	

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu	Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Asp	Leu	Glu	Thr
1			5					10					15	

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Glu Thr

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Pro Glu Val Ala Glu Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly

1 5 10 15

<210> 9

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Val Lys Glu His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Met Ser Arg Arg

20 25 30

Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Ala Glu Leu Glu Leu Gly Gly Gly Pro

35 40 45

Gly	Ala	Gly	Asp	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Val	Ala	Gln	Glu	Lys
50						55					60				
Arg	Gly	Ile	Val	Asp	Glu	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Glu
65						70					75				80
Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn										
						85									

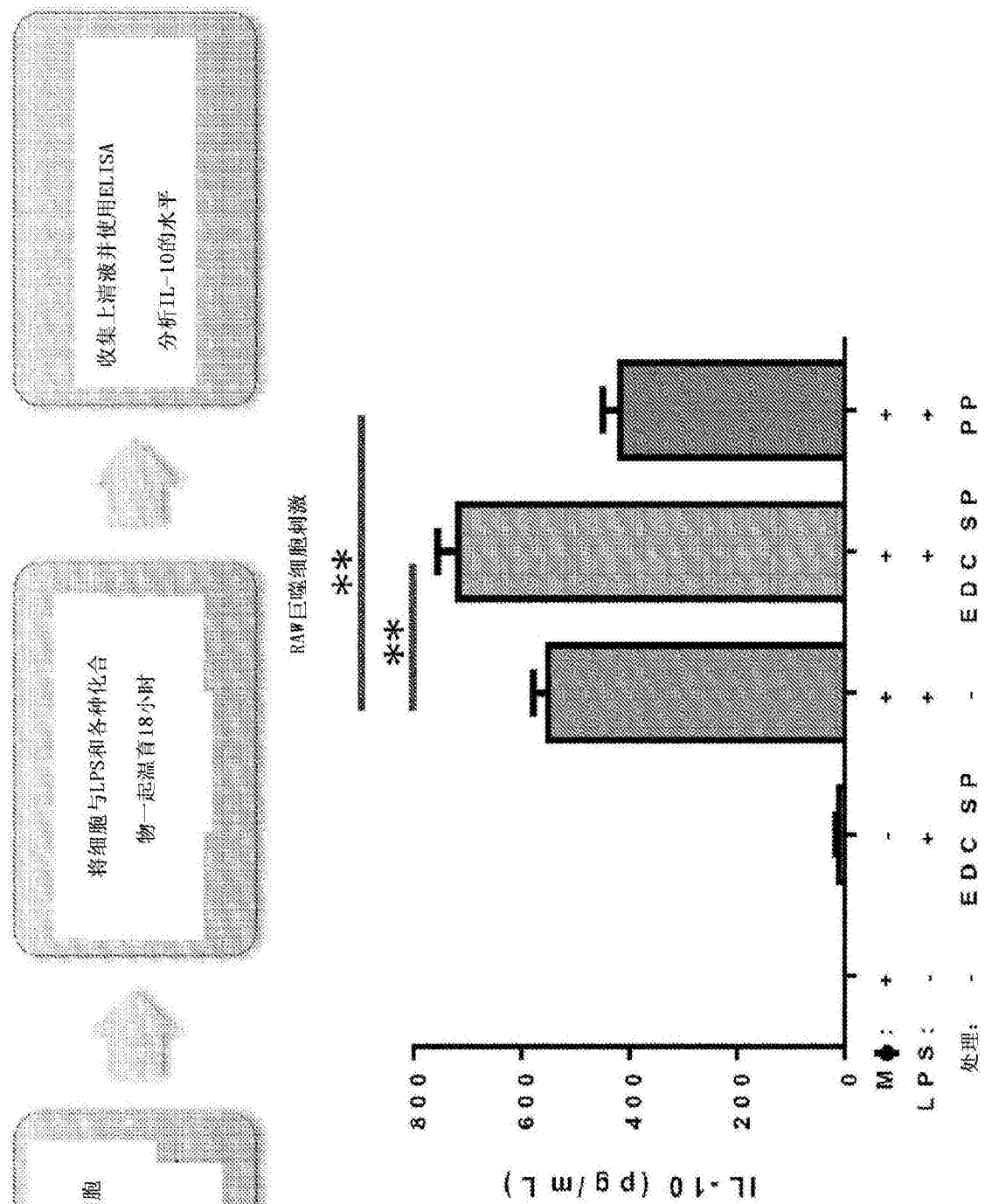
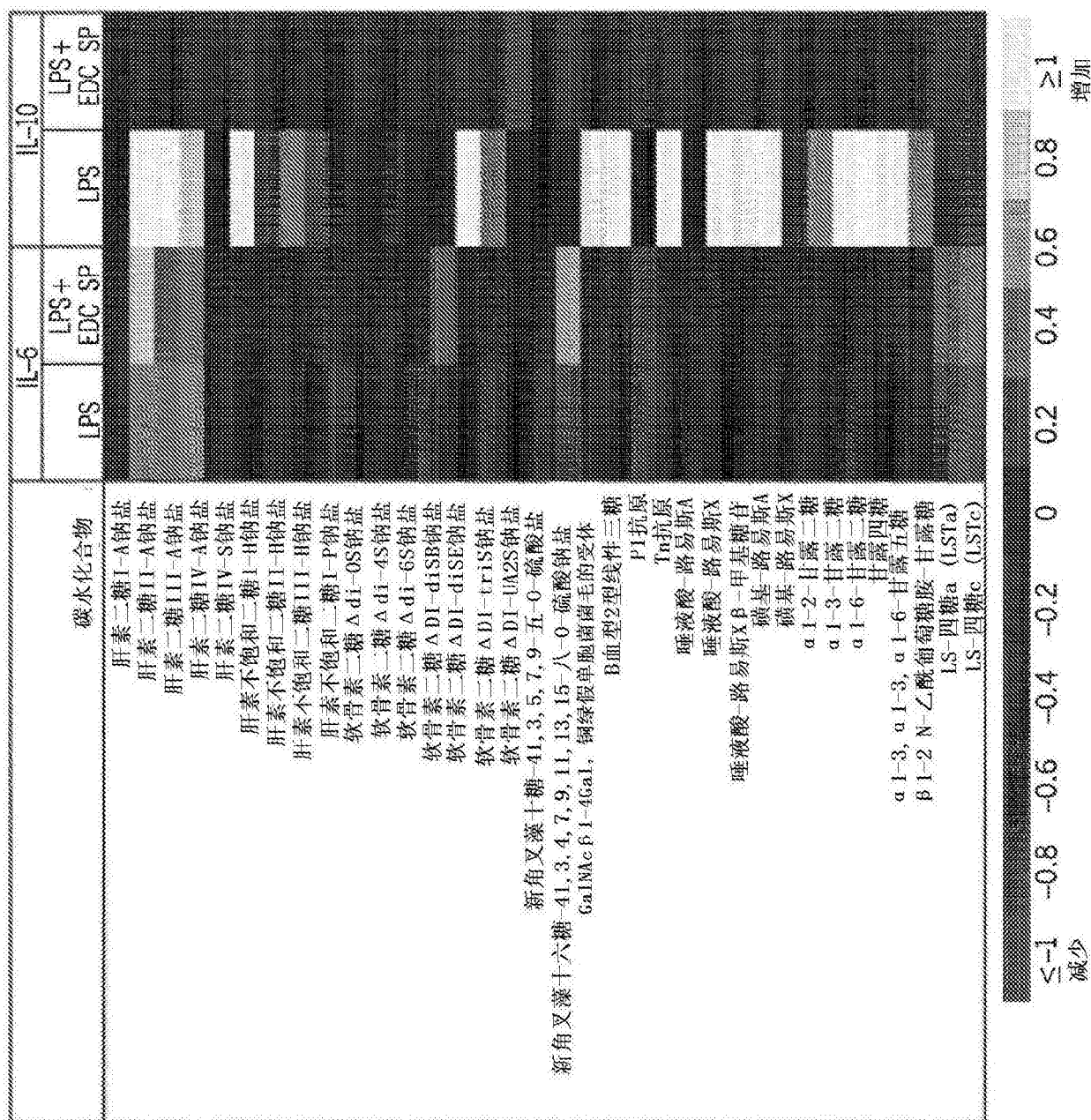


图1



图2



细胞因子从基线LPS或LPS + EDC SP刺激的倍数变化

图3A

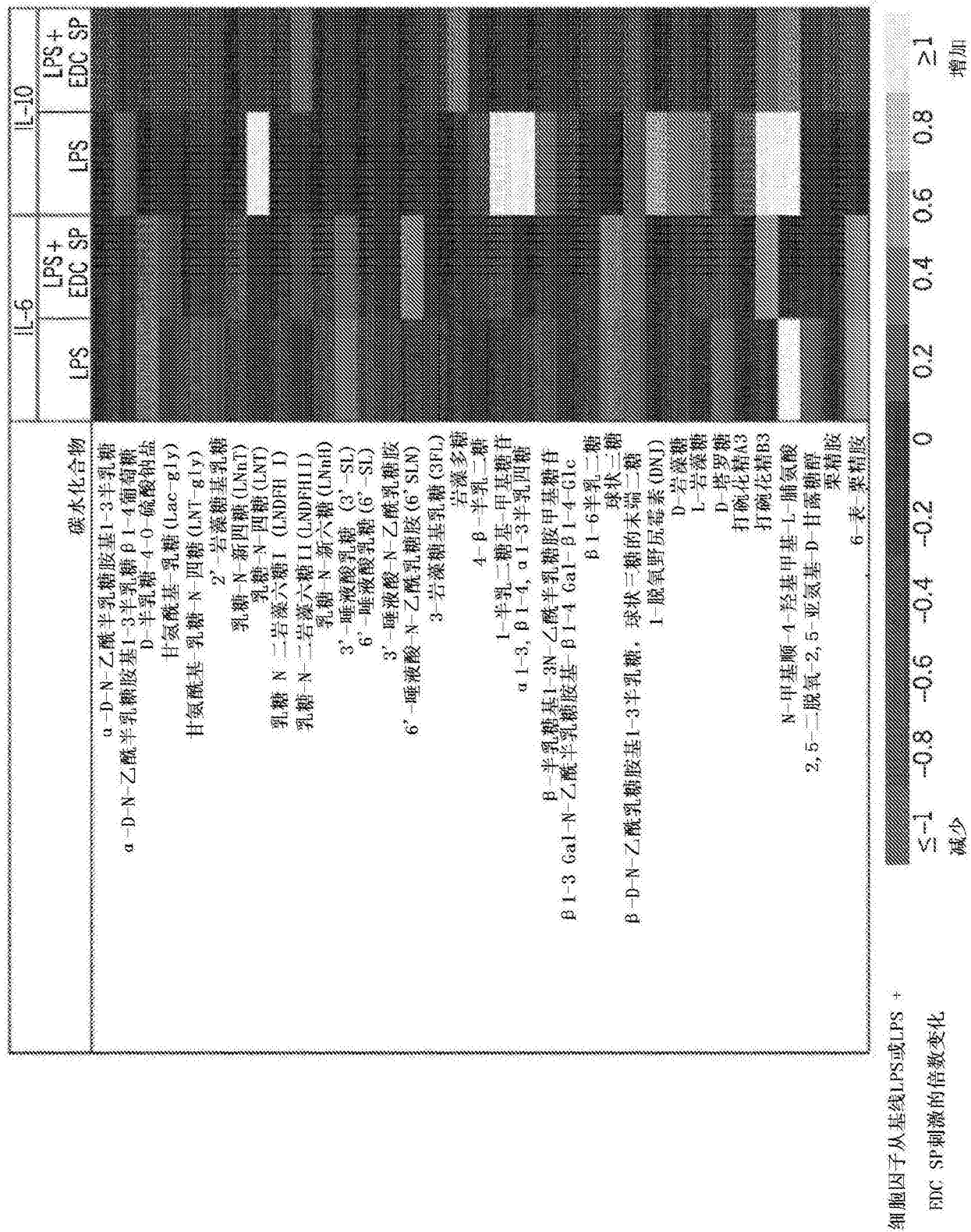


图3B

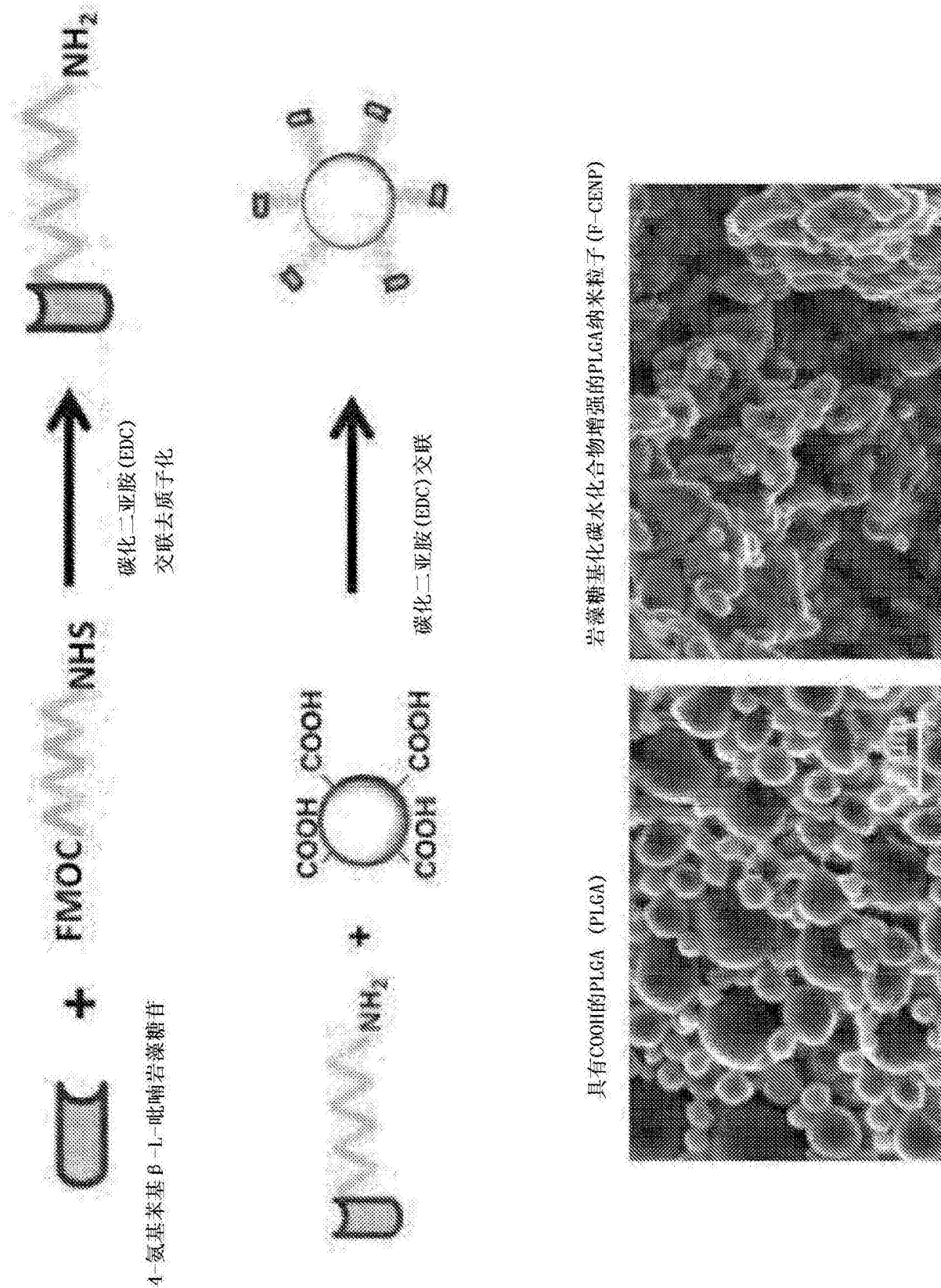


图4

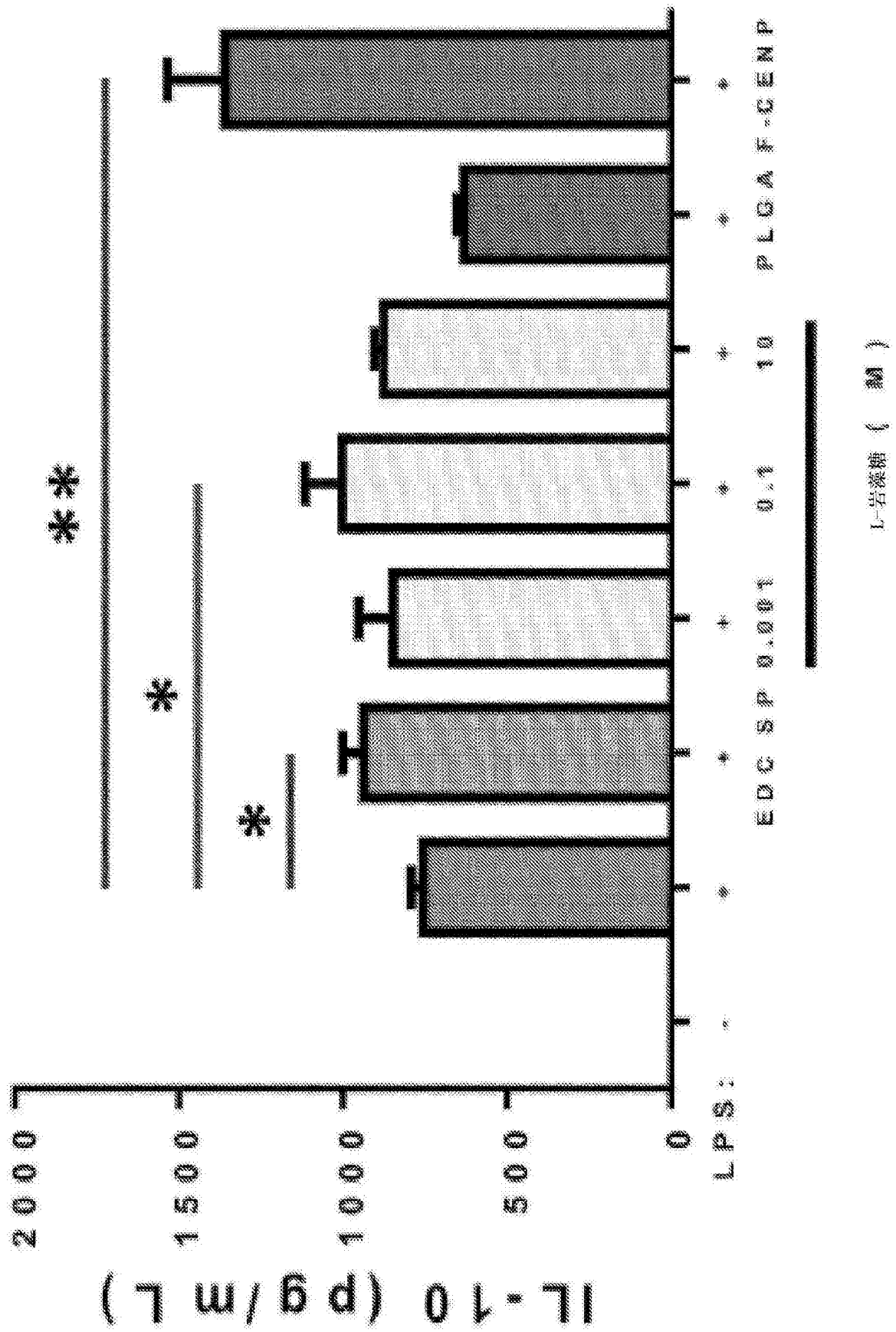


图5

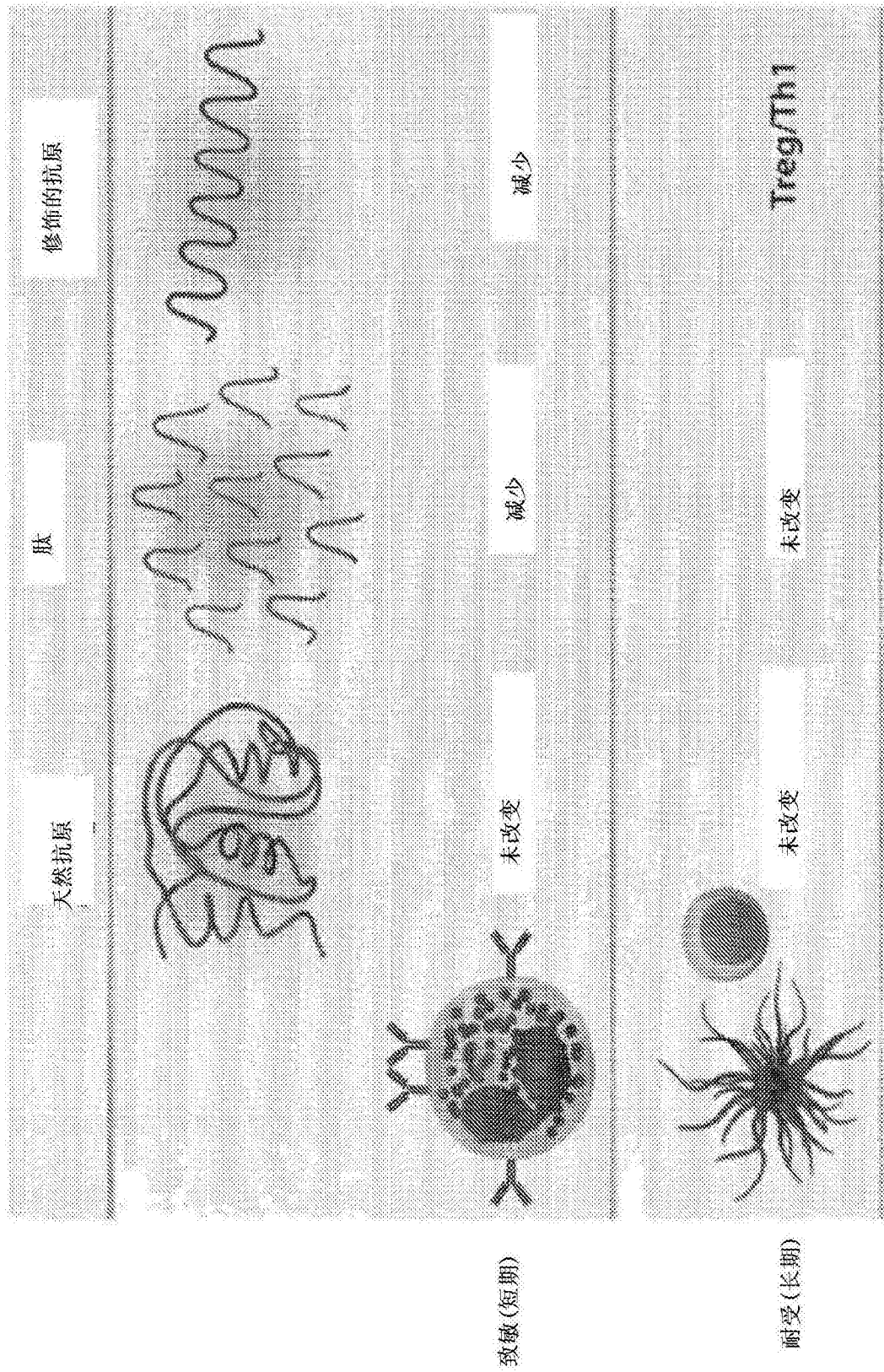


图7

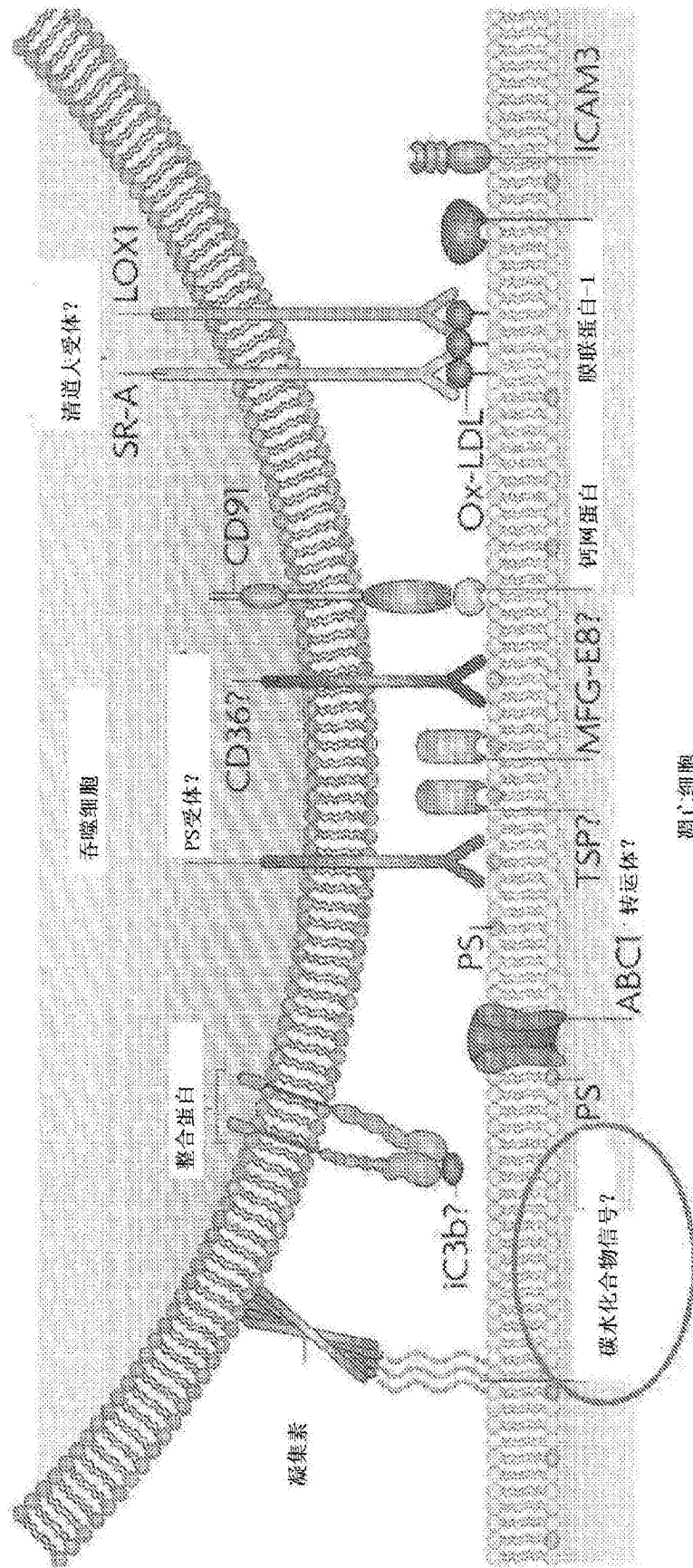


图8

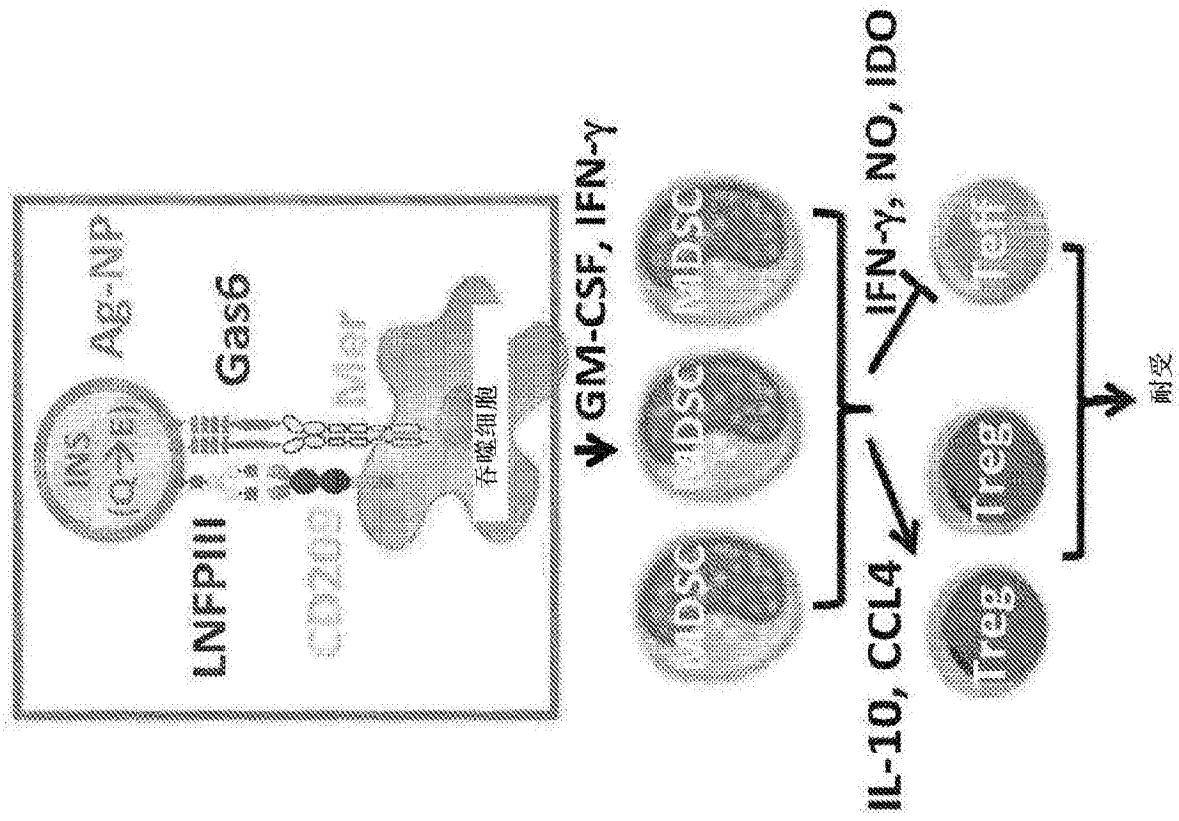


图9

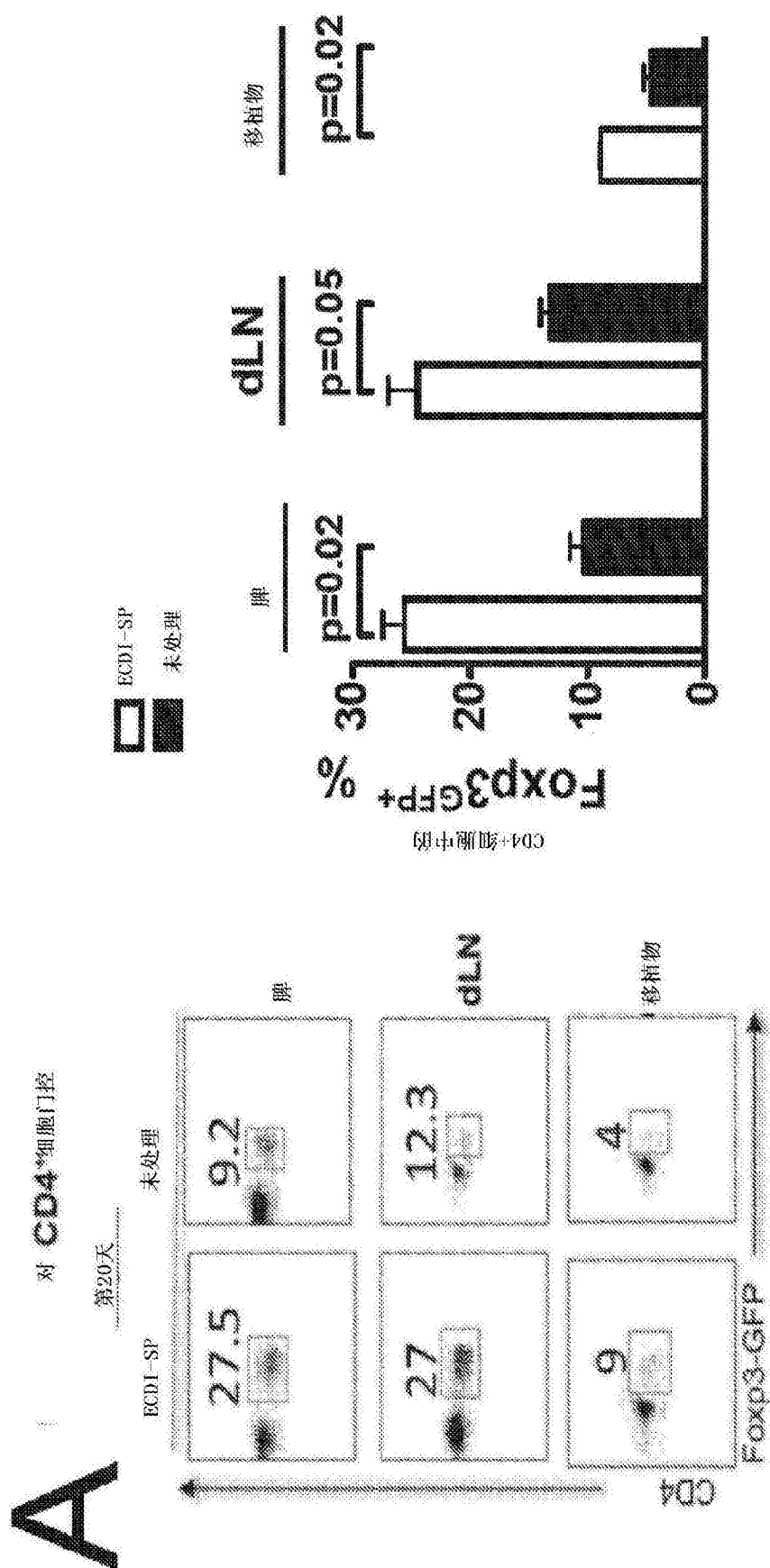


图10A

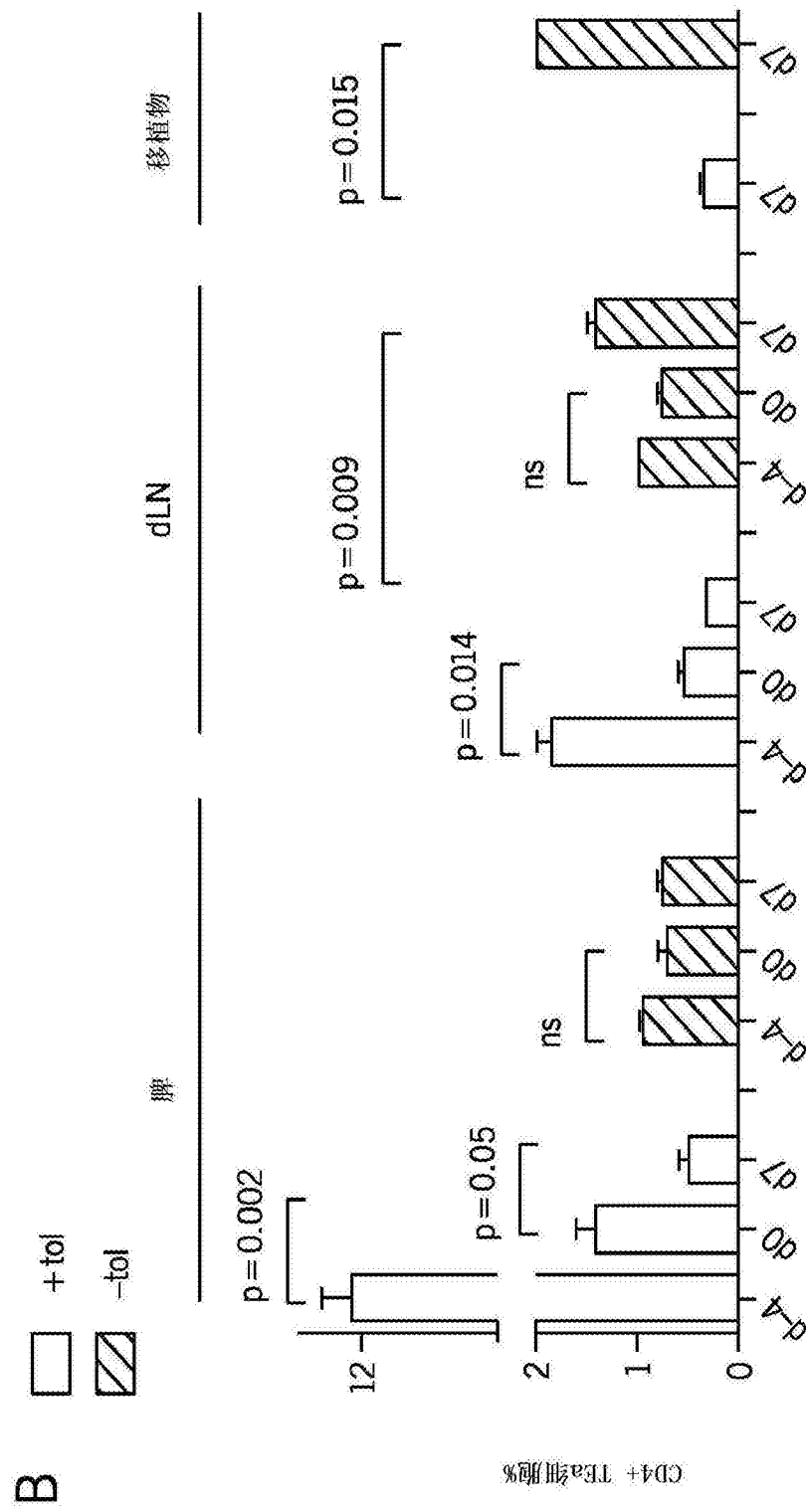


图10B

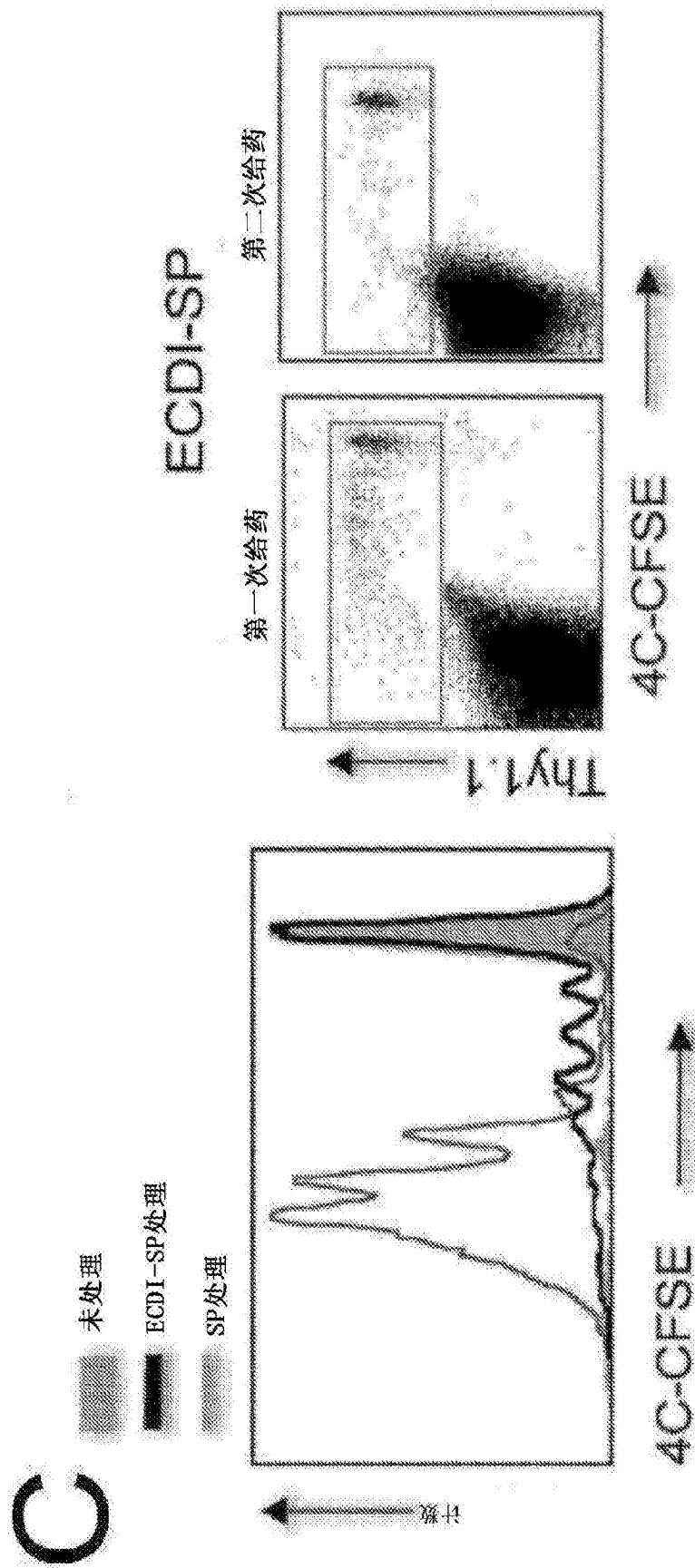


图10C

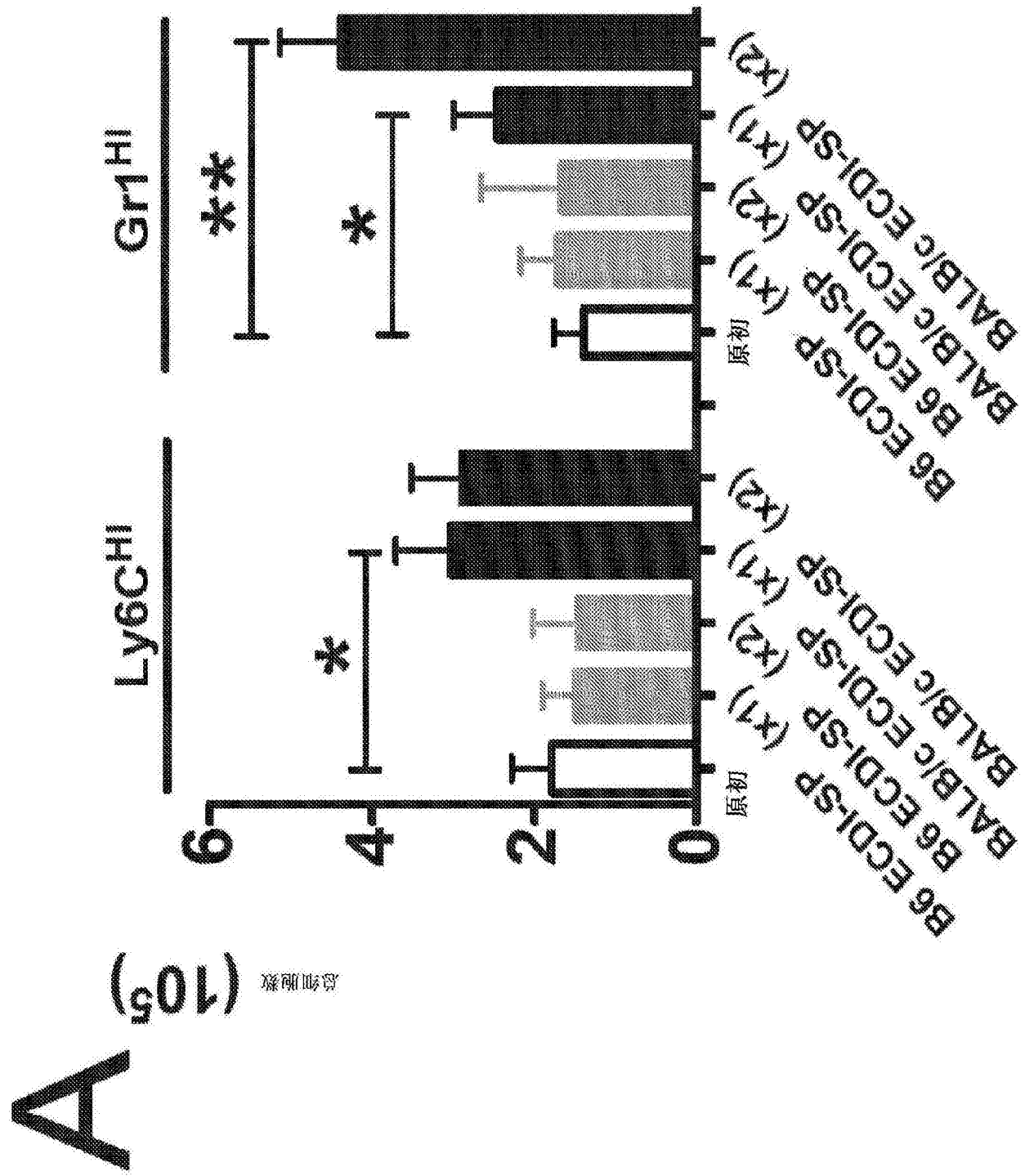


图11A

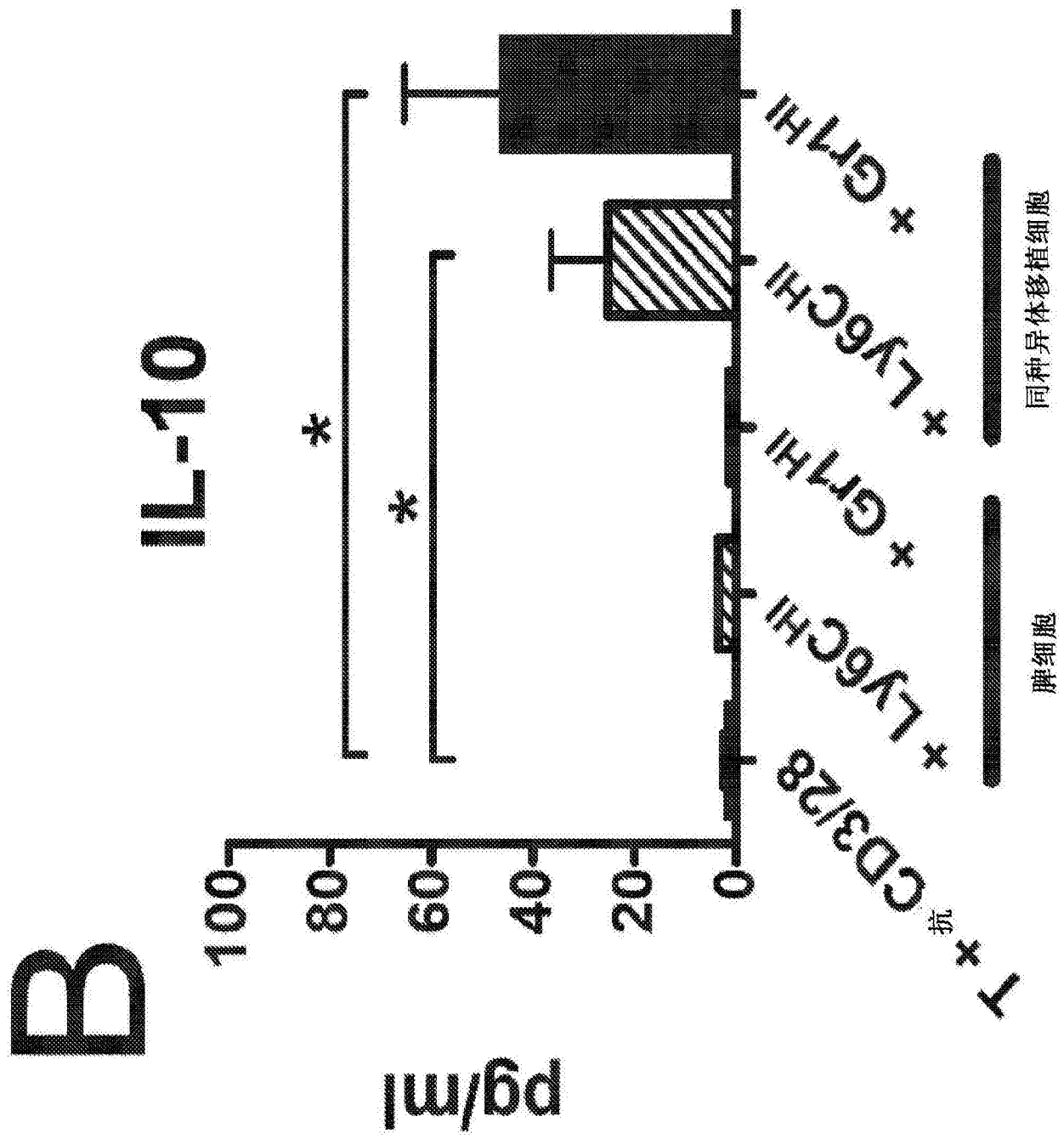


图11B

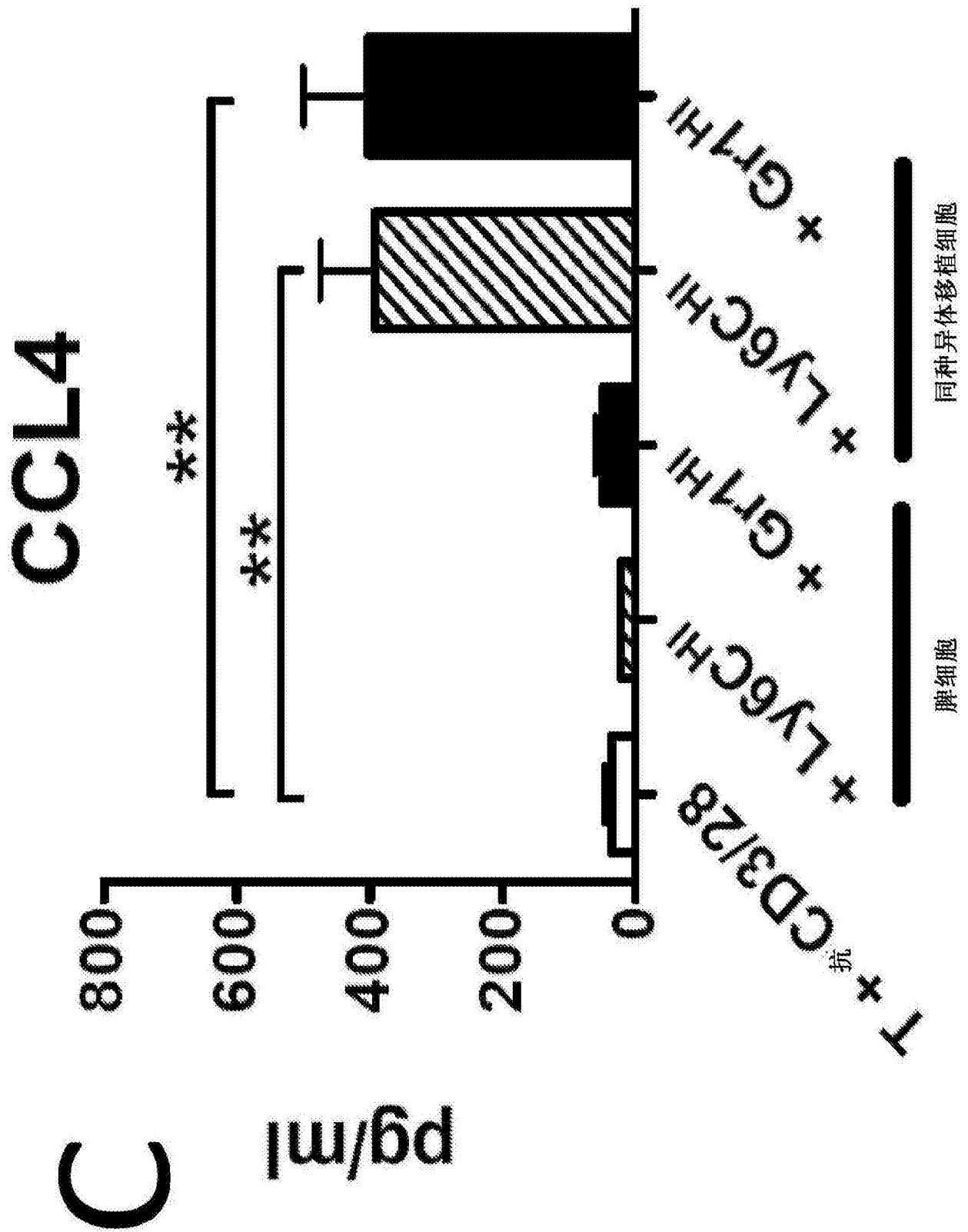


图11C

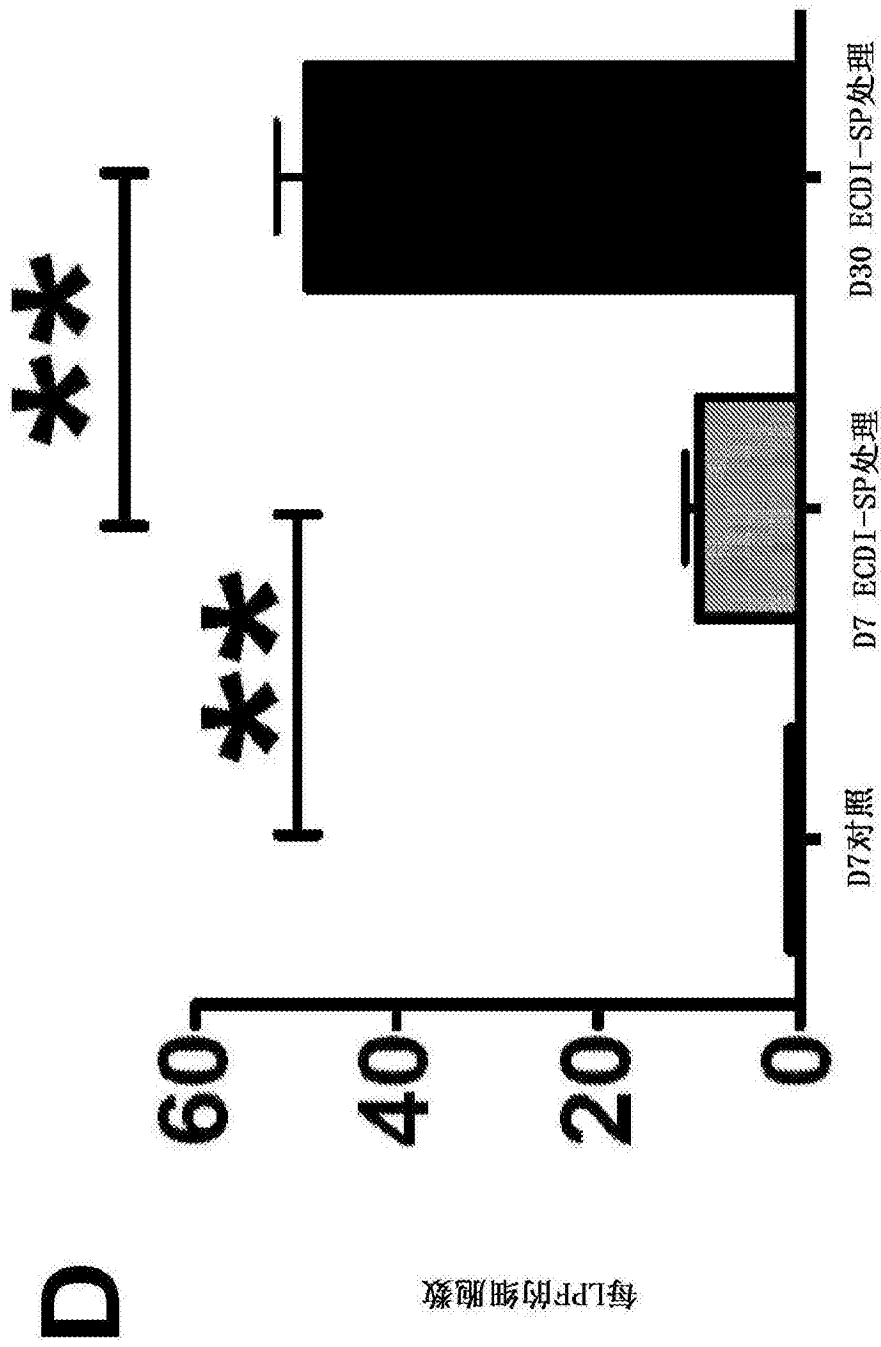


图11D

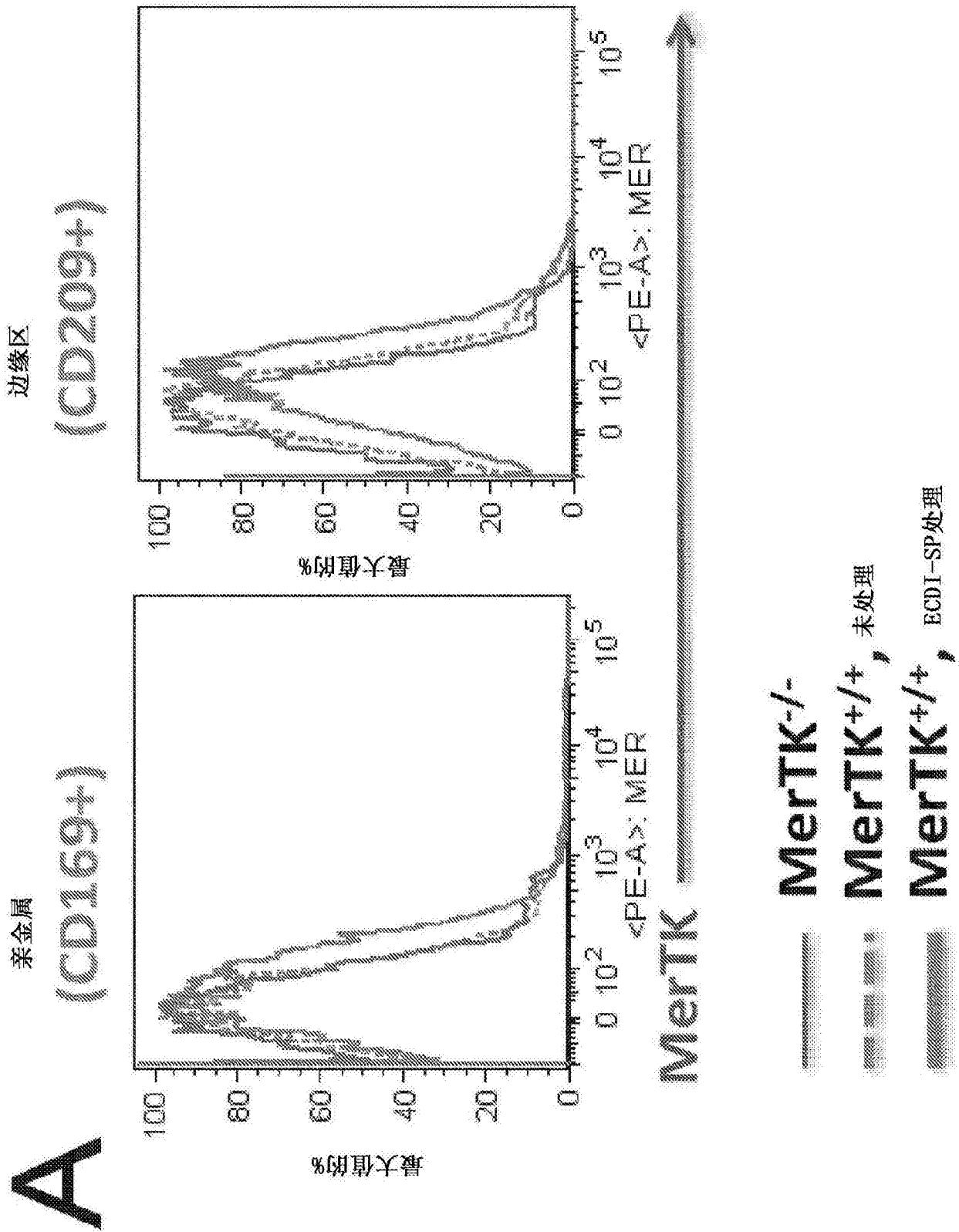


图12A

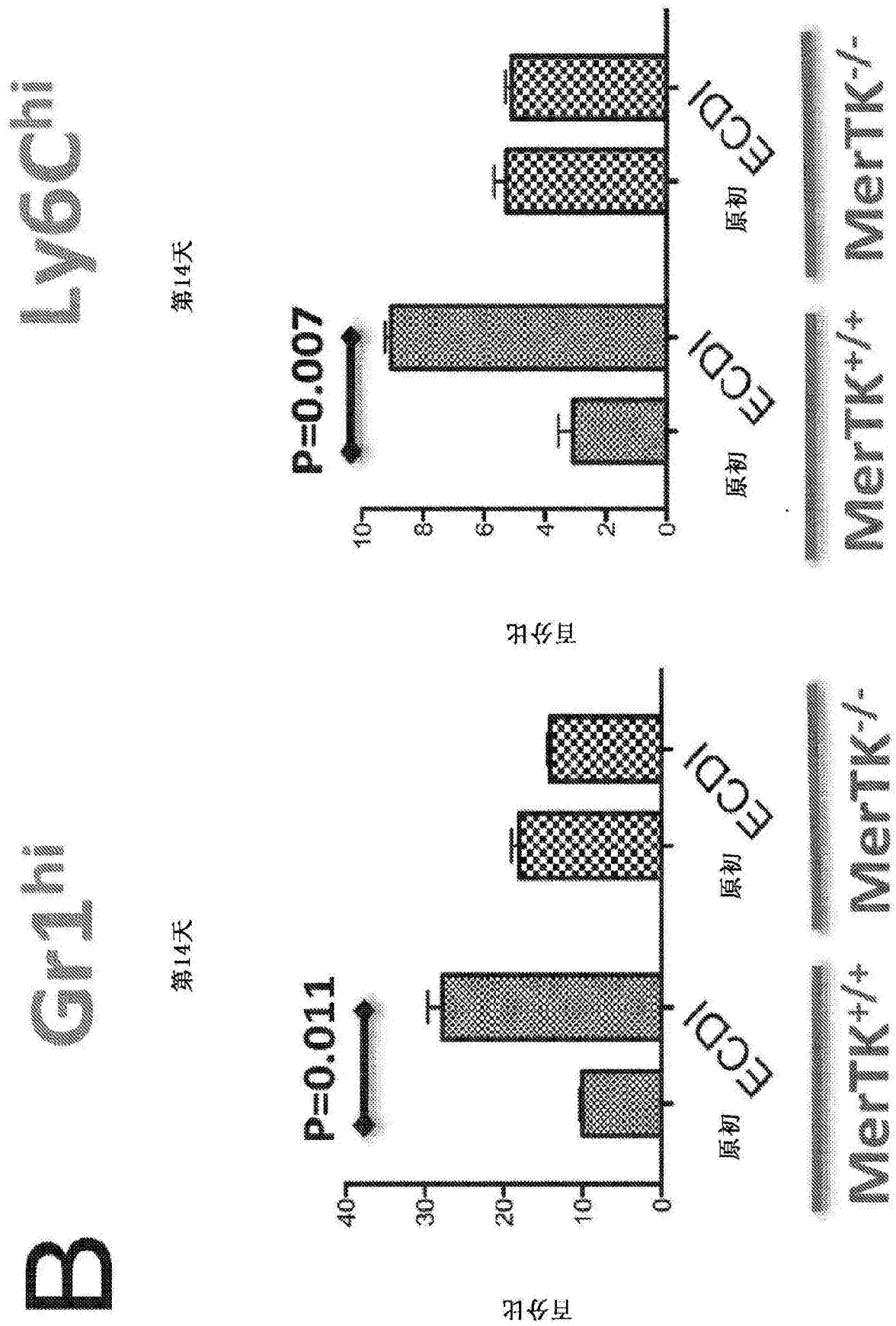


图12B

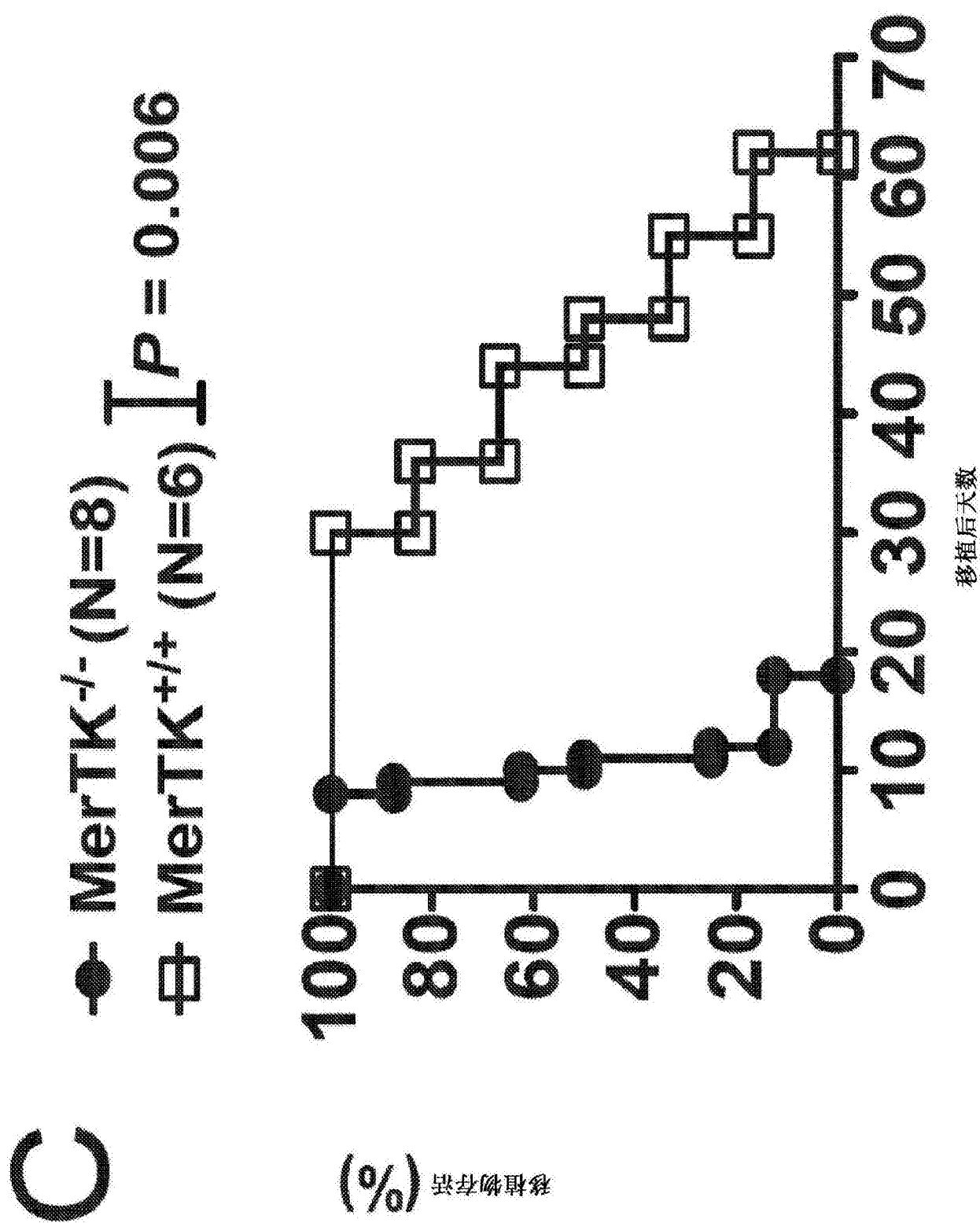


图12C

A

PLG: 聚(丙交酯-共-乙交酯)

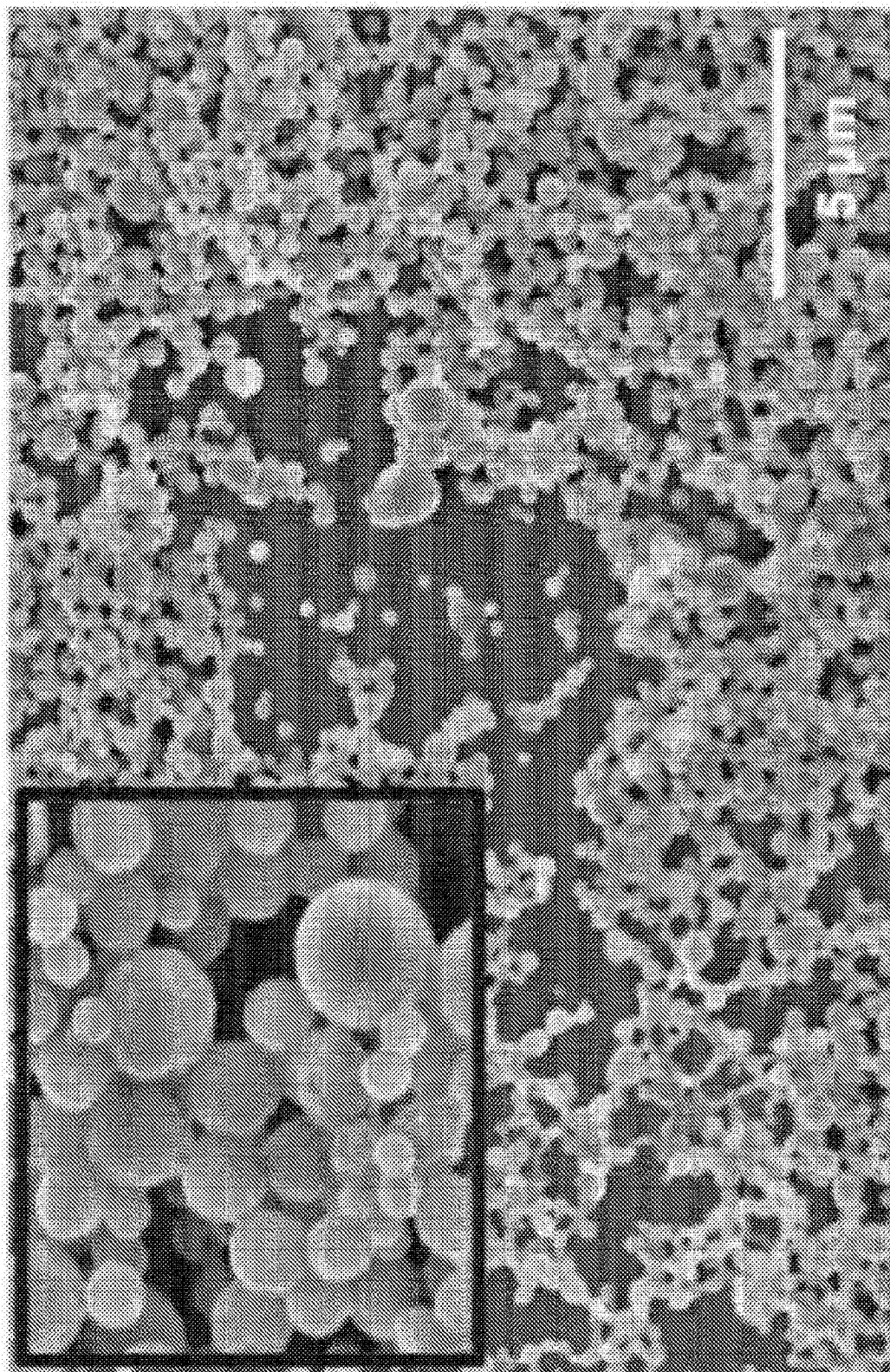


图13A

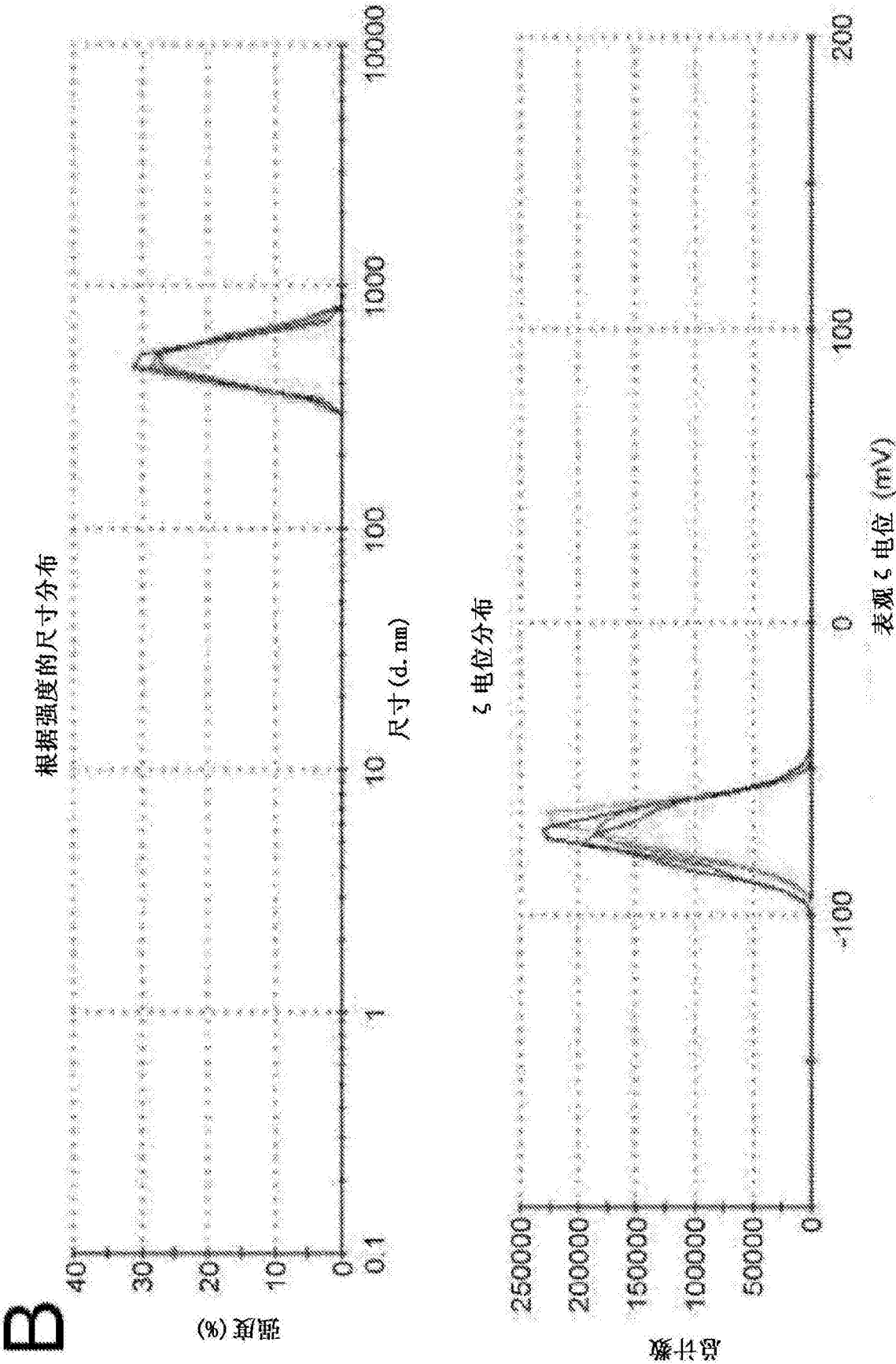


图13B

C

雷帕霉素: 0.1 mg/kg, 第-1天、第0天、第+1天、第+2天

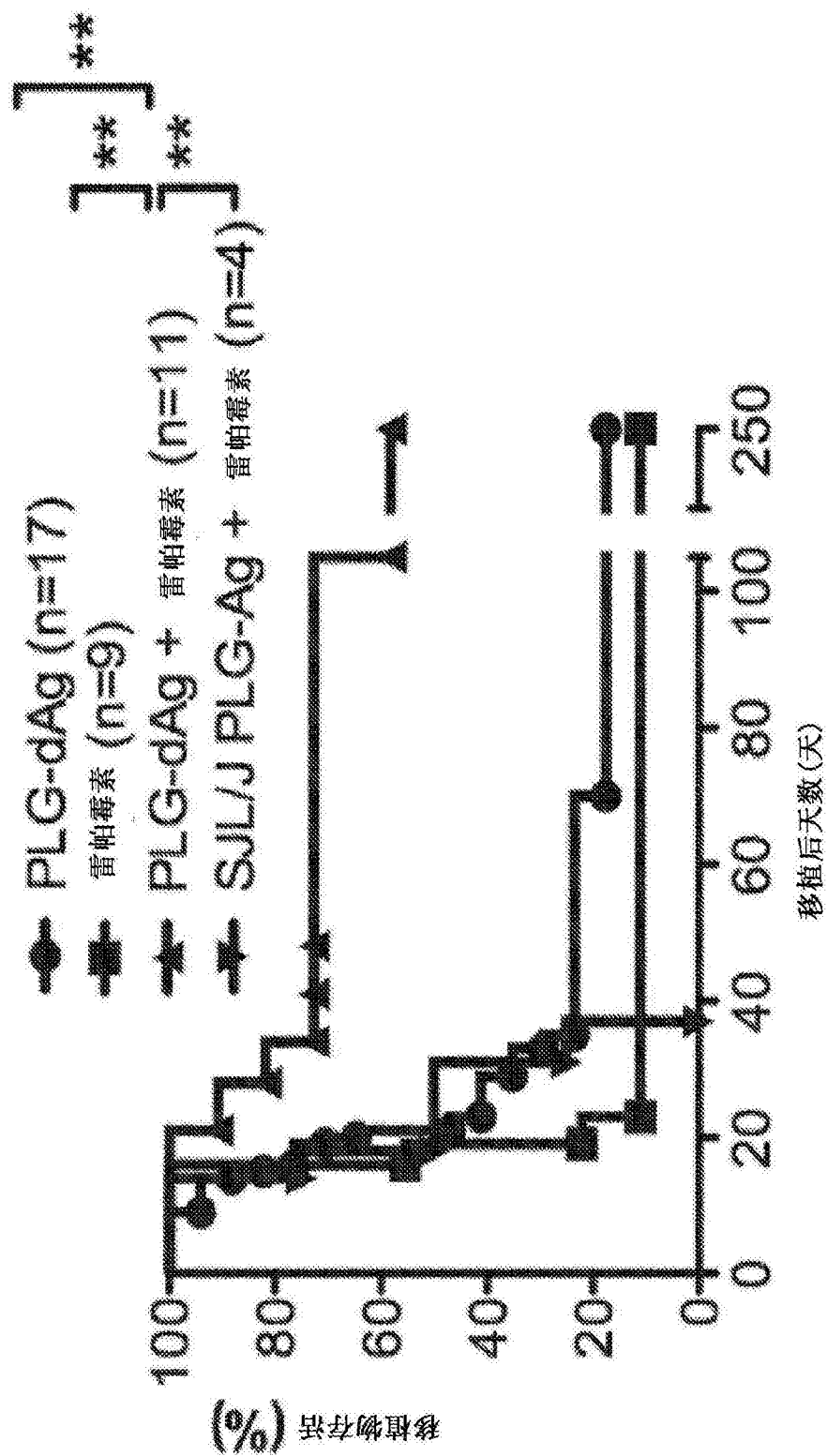


图13C

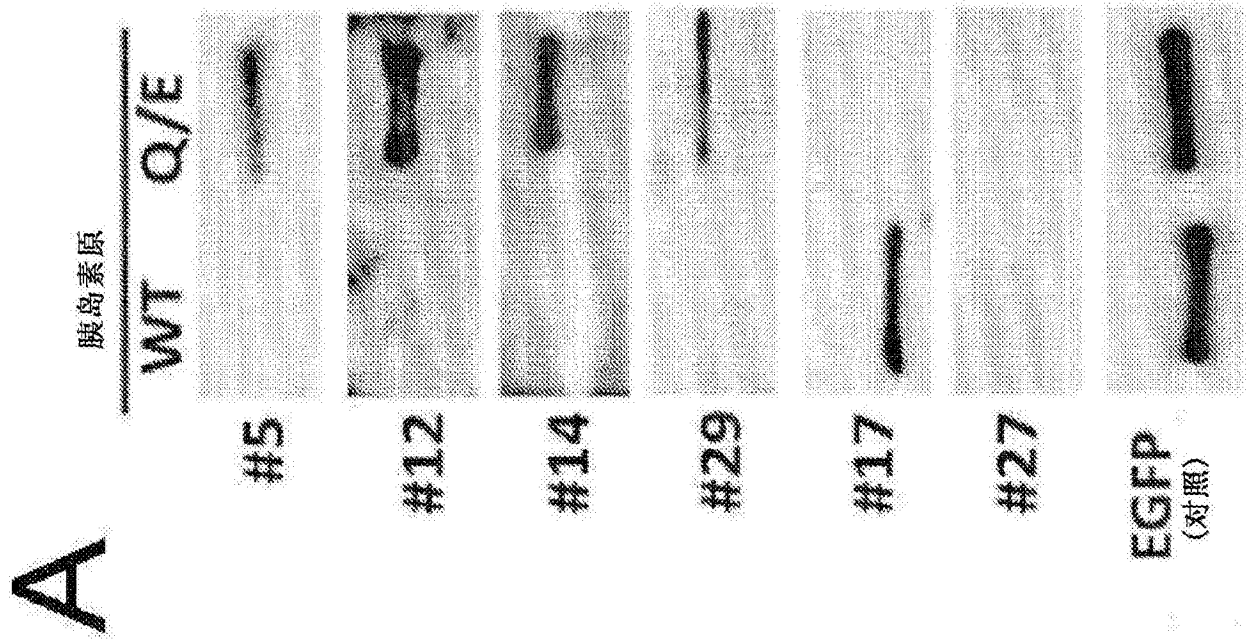


图14A

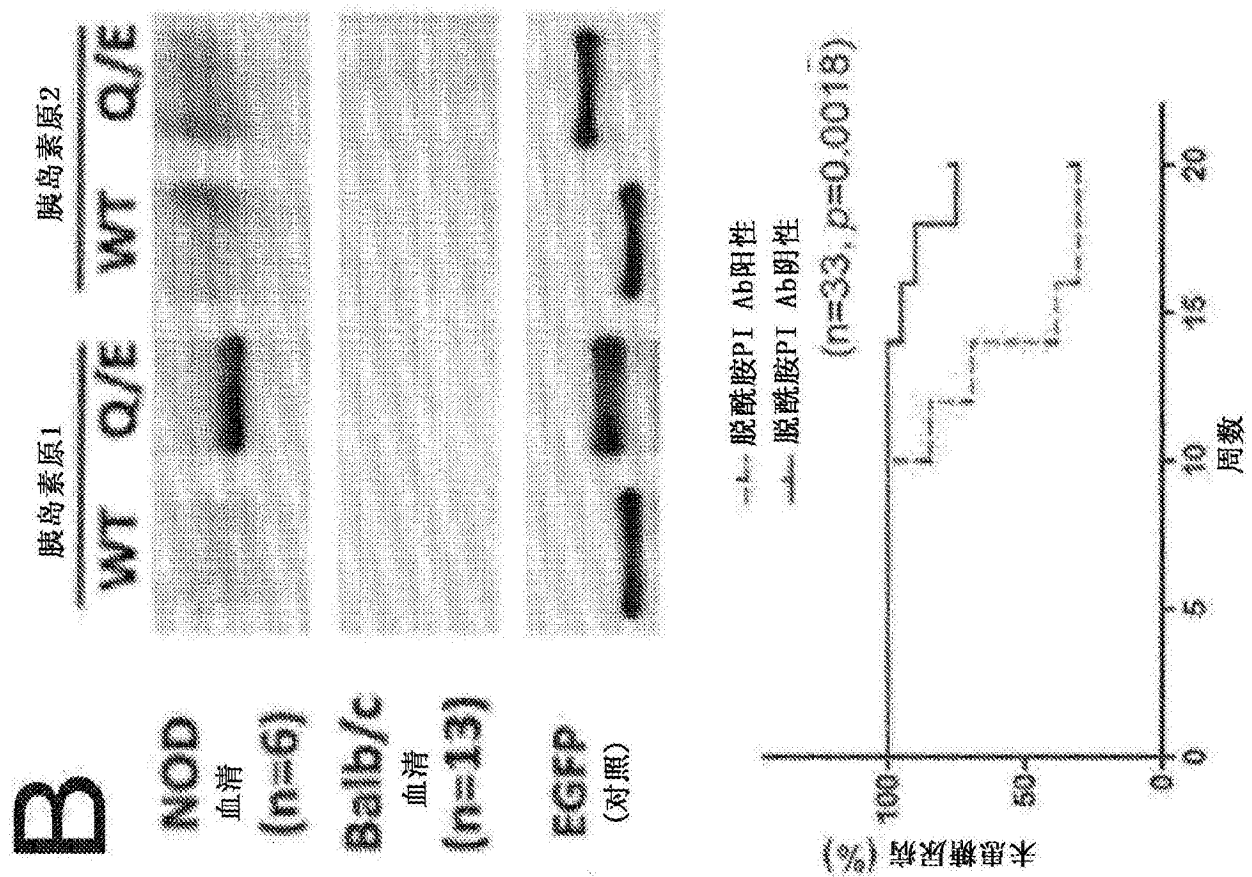


图14B

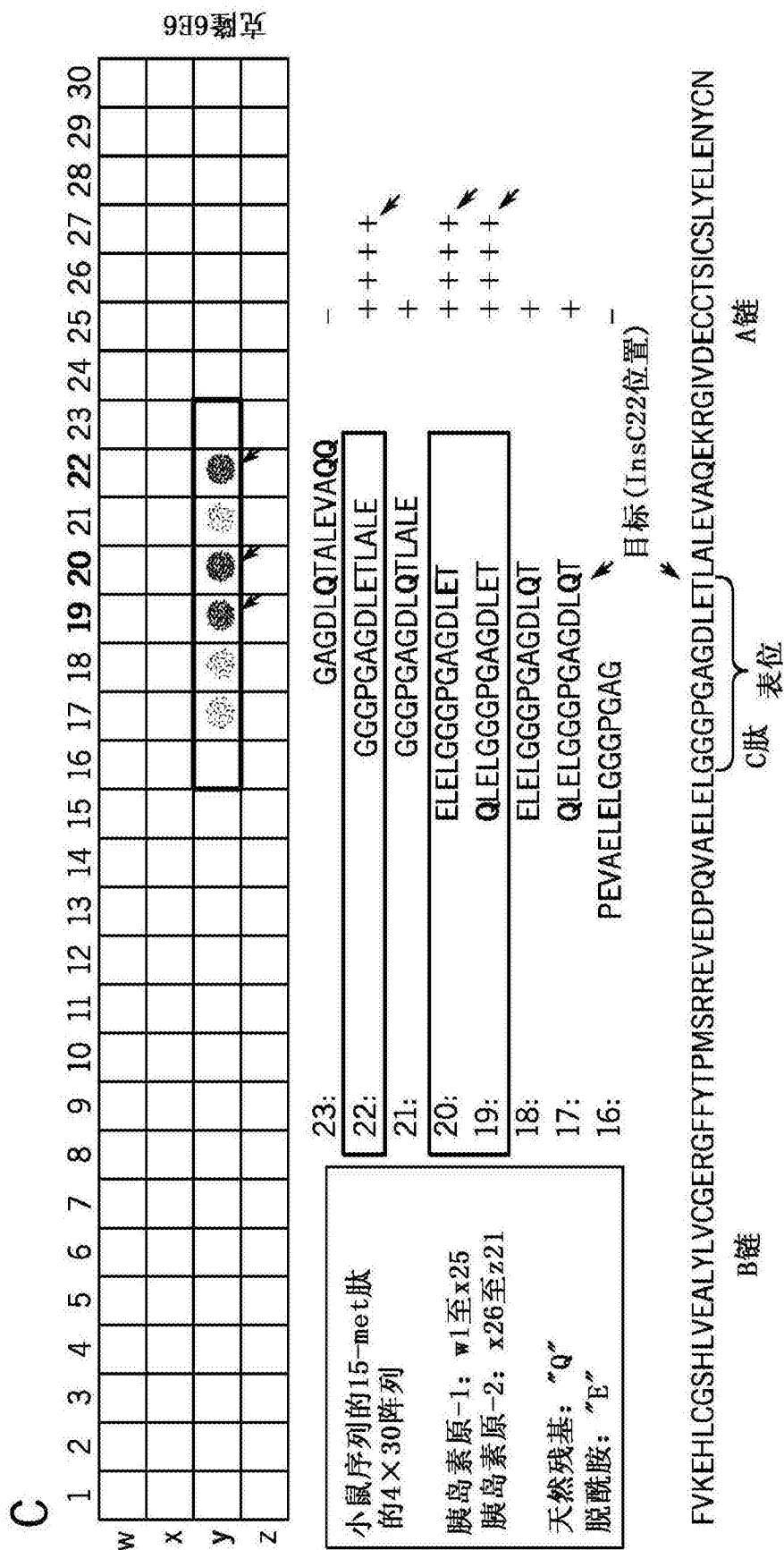


图14C