



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109069875 B

(45) 授权公告日 2021.12.24

(21) 申请号 201780015637.X

A61P 37/06 (2006.01)

(22) 申请日 2017.01.05

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109069875 A

WO 2007/043050 A2,2007.04.19

WO 2007/043050 A2,2007.04.19

CN 103002915 A,2013.03.27

(43) 申请公布日 2018.12.21

US 9,125,883 B2,2015.09.08

CN 105611937 A,2016.05.25

(30) 优先权数据

62/275,827 2016.01.07 US

Inbar Freeman.The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinitybinding.《Biomaterials》.2009,第30卷(第11期),第2122-2131页.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.06

N. Zhang.Inhibition of Angiogenesis Is Associated With Reduced Islet.

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2017/050013 2017.01.05

《INHIBITION OF ANGIOGENESIS》.2005,第37卷(第10期),第4452-4457页.

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2017/118979 EN 2017.07.13

Nina Yin.VEGF-conjugated alginate hydrogel prompt angiogenesis and improve.《Materials Science and Engineering C》.2015,第59卷第958-964页.

(73) 专利权人 位于本-古里安大学之内盖夫技术有限公司
地址 以色列比尔谢瓦

Jeffrey M.H.Liu.Transforming growth

(72) 发明人 S·科恩 A·蒙索尼克

factor-beta 1 delivery from microporous scaffolds decreases inflammation post-implant and enhances function of transplanted islets.《Biomaterials》.2015,第80卷第11-19页.

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

审查员 袁建新

代理人 区斌

权利要求书2页 说明书21页
序列表1页 附图49页

(51) Int.Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

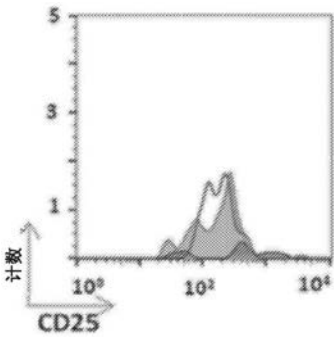
A61K 38/18 (2006.01)

(54) 发明名称

产生免疫耐受反应的组合物和方法

(57) 摘要

本发明一般涉及用于在对象中产生免疫耐受反应的组合物和方法。具体而言,本发明涉及用于产生免疫耐受反应的包含硫酸酯化多糖和生物活性多肽的组合物。



1. 藻酸硫酸酯和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 在制备用于在对象中诱导免疫耐受反应的组合物中的用途, 其中所述TGF- $\beta 1$ 与所述藻酸硫酸酯的硫酸酯基团非共价相连, 并且其中所述免疫耐受反应包括外周免疫耐受和在所述组合物施用的区域的局部免疫耐受。

2. 权利要求1的用途, 其中所述免疫耐受反应包括同种异体移植成功的提高、对同种异体细胞移植的免疫反应的抑制、同种异体细胞凋亡的抑制、同种异体细胞存活的增加、同种异体细胞移植物的血管形成的刺激、或其组合。

3. 权利要求1的用途, 其中所述免疫耐受反应包括所述TGF- $\beta 1$ 的延长的呈递、炎症信号传导的抑制、树突状细胞成熟的抑制、CD8+T细胞细胞毒性反应的抑制、调节性T细胞分化的刺激、或其组合。

4. 权利要求1的用途, 其中所述组合物进一步包括至少一种生物活性多肽, 其中所述至少一种生物活性多肽与所述藻酸硫酸酯的硫酸酯基团非共价相连。

5. 权利要求4的用途, 其中所述至少一种生物活性多肽包括带正电荷的多肽、肝素结合多肽、呈现血管生成活性的多肽、自身抗原、或其组合。

6. 权利要求4的用途, 其中所述至少一种生物活性多肽包括抗凝血酶III (AT III), 血小板生成素 (TPO), 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (SLP1), C1酯酶抑制剂 (C1 INH), 痘苗病毒补体控制蛋白 (VCP), 成纤维细胞生长因子 (FGF), FGF受体, 血管内皮生长因子 (VEGF), 肝细胞生长因子 (HGF), 胰岛素样生长因子 (IGF), 血小板衍生生长因子 (PDGF), 骨形态发生蛋白 (BMP), 表皮生长因子 (EGF), CXCL4趋化因子配体4 (CXCL4), 基质细胞衍生因子-1 (SDF-1), 白介素-6 (IL-6), 白介素-8 (IL-8), 活化调节的正常T表达和分泌的因子 (RANTES), 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), 巨噬细胞炎症蛋白-1 (MIP-1), 淋巴细胞趋化因子, fractalkine, 膜联蛋白, 载脂蛋白E (ApoE), 免疫缺陷病毒1型 (HIV-1) 外壳蛋白gp120, 亲环蛋白A (CypA), Tat蛋白, 单纯疱疹病毒 (HSV) 的病毒外壳糖蛋白gC、gB或gD, 登革病毒的包膜蛋白, 恶性疟原虫的环孢子 (CS) 蛋白, 细菌表面粘附蛋白OpaA, I-选择蛋白, P-选择蛋白, 肝素结合生长相关分子 (HB-GAM), 血小板反应蛋白I型重复 (TSR), 淀粉样蛋白P (AP), PDGF-AA, BMP-2, BMP-4, 或BMP-7。

7. 权利要求5的用途, 其中所述呈现血管生成活性的多肽是VEGF、bFGF、aFGF、PDGF- $\beta\beta$ 、IGF、HGF、BMP、或其组合。

8. 权利要求7的用途, 其中所述呈现血管生成活性的多肽包括VEGF和PDGF- $\beta\beta$ 两者。

9. 权利要求5的用途, 其中所述自身抗原包括髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)。

10. 权利要求1的用途, 其中所述组合物进一步包括支持基质。

11. 权利要求10的用途, 其中所述支持基质是选自以下组成的组的聚合物: 多糖、蛋白质、细胞外基质组分、合成聚合物、及其混合物。

12. 权利要求11的用途, 其中所述多糖包括藻酸和硫酸酯化藻酸的组合。

13. 藻酸硫酸酯和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 在制备用于在对象中治疗或抑制自身免疫疾病或病症的组合物中的用途, 其中所述TGF- $\beta 1$ 与所述藻酸硫酸酯的硫酸酯基团非共价相连。

14. 权利要求13的用途, 其中所述自身免疫疾病或病症包括多发性硬化、银屑病、或I型糖尿病。

15. 权利要求14的用途, 其中当所述自身免疫疾病或病症为I型糖尿病时, 所述组合物

进一步包括胰腺 β 细胞,或其中当所述自身免疫疾病或疾病为多发性硬化时,所述组合物进一步包括髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白(MOG)。

16.藻酸硫酸酯和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)在制备用于在对象中减少或预防同种异体移植排斥的组合物中的用途,其中所述TGF- β 1与所述藻酸硫酸酯的硫酸酯基团非共价相连。

产生免疫耐受反应的组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明一般涉及用于在对象中产生免疫耐受反应的组合物和方法。具体而言,本发明涉及用于产生免疫耐受反应的包含硫酸酯化多糖和生物活性多肽的组合物。

背景技术

[0002] 预防细胞同种异体移植排斥是当前细胞治疗策略中的主要挑战。这种排斥是由同种异体移植物反应性效应CD4和CD8 T细胞介导。用免疫抑制药物进行终身治疗减弱同种异体反应和移植排斥,但这与感染和恶性肿瘤的风险增加相关。近年来,已经开发了几种用于预防同种异体细胞移植的免疫排斥的基于生物材料的策略,依赖于细胞包裹在可透过营养物和废产物的膜囊内;然而,所述囊还防止细胞进入和血管形成,因此限制所述装置的尺寸至200 μ m的氧扩散距离。

[0003] 理想的细胞移植装置应该能够使其整个体积的血管形成以维持所移植细胞的活力,并且应该促进宿主内的移植物整合。然而,由于经由血液循环的白细胞的大量浸润,装置血管形成通常与同种异体移植排斥的风险增加有关。

[0004] 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是免疫调节细胞因子,其能增强免疫耐受微环境的产生,因为它表现出抑制炎症过程,例如自身免疫性疾病和癌症中明显的炎症过程。在TGF- β 富集的环境中,摄取抗原的树突状细胞(DC)变成致耐受性并介导CD4+T细胞分化成抗炎调节性T细胞,其不仅抑制效应CD4+T细胞的产生,而且抑制细胞毒性CD8+T细胞的活化和增殖。

[0005] 因此,存在用于产生局部免疫耐受微环境同时避免不期望的全身性影响的改进的组合物和方法的需求。

[0006] 发明简述

[0007] 一方面,本发明涉及在对象中诱导免疫耐受反应的方法,所述方法包括向所述对象施用包含硫酸酯化多糖和生物活性多肽的组合物,并且其中所述生物活性多肽与所述硫酸酯化多糖的硫酸酯基团非共价相连。在一个实施方案中,所述生物活性多肽是转化生长因子 β 1(TGF- β 1)。

[0008] 另一方面,本发明涉及在对象中减少或预防同种异体移植排斥的方法,所述方法包括向所述对象施用包含硫酸酯化多糖和生物活性多肽的组合物,并且其中所述生物活性多肽与硫酸酯化多糖的硫酸酯基团非共价相连,从而在所述对象中减少或预防同种异体移植排斥。在一个实施方案中,所述生物活性多肽是转化生长因子 β 1(TGF- β 1)。

[0009] 本发明进一步涉及在对象中治疗自身免疫疾病或病症的方法,所述方法包括向所述对象施用包括硫酸酯化多糖、第一生物活性多肽和第二生物活性多肽的组合物,其中第一和第二生物活性多肽各自与硫酸酯化多糖的硫酸酯基团非共价相连,并且所述组合物还包含支持基质,其中所述支持基质是选自由多糖、蛋白质、细胞外基质组分、合成聚合物及其混合物组成的组的聚合物。在一个实施方案中,所述第一生物活性多肽是TGF- β 1。在一个实施方案中,所述第二生物活性多肽是髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白(MOG)。

附图说明

[0010] 图1A显示藻酸-硫酸酯/藻酸支架的装配方法。通过使用钙离子交联90%藻酸(alginate)和10%藻酸-硫酸酯(alginate-sulfate)的混合物。然后将混合物倒在96孔板上并且冷冻干燥以形成大孔支架。TGF- β 和血管生成因子与支架中的藻酸-硫酸酯亲和结合。

[0011] 图1B显示当与藻酸-硫酸酯/藻酸支架亲和结合相较于与原始支架吸附,测量保留的TGF- β 百分比的图。通过ELISA检测,在7天的时间内从总输入TGF- β 计算所述百分比。

[0012] 图1C显示使用暴露于0.5ng/ml的TGF- β 后40分钟NIH-3T3成纤维细胞系培养物的裂解物的p-SMAD2和p-SMAD3的蛋白质印迹图。

[0013] 图1D显示阐释P-SMAD2/肌动蛋白的蛋白质印迹的分析的图。泳道为:1:培养基,无TGF- β ;2:培养基+TGF- β ;3:随时间从支架上释放的TGF- β ;4:从具有酸性pH的Alg/AlgS支架解离后的afTGF- β ;和5:用EDTA溶解藻酸-硫酸酯/藻酸支架后的afTGF- β 。数据代表三次重复的平均值和标准差。

[0014] 图2A显示体外实验的时间线:接种OTII脾细胞在含或不含afTGF- β (50ng/支架)的支架内。接种后2小时,向培养基加入OVA肽(20 μ g/ml)以活化脾细胞,并然后测量细胞因子。

[0015] 图2B显示测量与-TGF-OVA对照组相比,细胞因子分泌中IL-17 (72小时)的倍数变化的图。

[0016] 图2C显示测量与-TGF-OVA对照组相比,细胞因子分泌中IL-10 (48小时)的倍数变化的图。

[0017] 图2D显示测量与-TGF-OVA对照组相比,细胞因子分泌中IL-2 (24小时)的倍数变化的图。

[0018] 图2E显示测量与-TGF-OVA对照组相比,细胞因子分泌中IFN- γ (48小时)的倍数变化的图。

[0019] 图3显示活化后3天,表明淋巴细胞的FACS图和CD4T细胞门控的代表性FACS图。

[0020] 图4A显示活化后3天,表达CD25和Foxp3的CD4+T细胞的代表性FACS图。

[0021] 图4B显示与TGF- β 缺乏构建体的代表性FACS直方图相比,表明afTGF- β 构建体内Treg的增加频率的FACS直方图。

[0022] 图4C显示与-TGF-OVA对照相比,测量在含与不含afTGF- β 时来自总CD4+T细胞的Treg百分比的图。红色:afTGF- β ;蓝色:TGF- β 缺乏;黑色:对照。数据表示三次重复的平均值和三次独立实验的SEM。通过未配对的t-检验比较结果,**p<0.01。

[0023] 图5A显示接种后3天,表达CD25和Foxp3的CD4+T细胞的代表性FACS图。在afTGF- β 构建体和TGF- β 缺乏构建体中培养并在抗-IL-10 (1ng/ml) 存在下用OVA刺激脾细胞。红色:afTGF- β ;蓝色:TGF- β 缺乏;黑色:对照。

[0024] 图5B显示代表性FACS直方图表明afTGF- β 构建体和TGF- β 缺乏构建体之间的Treg频率无差异。红色:afTGF- β ;蓝色:TGF- β 缺乏;黑色:对照。

[0025] 图5C显示与-TGF-OVA对照组相比,在含与不含afTGF- β 时来自总CD4+T细胞的Tregs百分比。

[0026] 图5D显示与-TGF-OVA对照相比,在含或不含afTGF- β 时分泌IL-2的倍数改变。

[0027] 图5E显示与-TGF-OVA对照相比,在含或不含afTGF- β 时分泌IFN- γ 的倍数改变。

[0028] 图5F显示与-TGF-OVA对照相比,在含或不含afTGF- β 时分泌IL-17的倍数改变。

[0029] 图5G显示共培养后3天,表达CD25和Foxp3的CD4⁺T细胞的代表性FACS图。OVA T细胞与来自afHGF- β 构建体和TGF- β 缺乏构建体内的CDHc^{dnr}Tg小鼠的脾细胞共培养。红色:afTGF- β ;蓝色:TGF- β 缺乏;黑色:对照。

[0030] 图5H显示代表性FACS直方图表明afTGF- β 构建体和TGF- β 缺乏构建体内的Treg群体无差异。红色:afTGF- β ;蓝色:TGF- β 缺乏;黑色:对照。

[0031] 图6A显示与-TGF-OVA对照组相比,测量在含或不含afTGF- β 时来自总CD4⁺T细胞的Treg百分比的图。

[0032] 图6B显示与-TGF-OVA对照组相比,测量在含或不含afTGF- β 时分泌IL-2的倍数变化的图。

[0033] 图6C显示与-TGF-OVA对照组相比,测量在含或不含afTGF- β 时分泌IFN- γ 的倍数变化的图。

[0034] 图6D显示与-TGF-OVA对照组相比,测量在含或不含afTGF- β 时分泌IL-17的倍数变化的图。

[0035] 图6E显示与-TGF-OVA对照组相比,测量在含或不含afTGF- β 时分泌IL-10的倍数变化的图。

[0036] 图7A显示移植后10天含有成纤维细胞的回收装置的PECAM (CD31) 染色的冷冻切片,表现出宿主内皮细胞对支架的细胞透过性。

[0037] 图7B显示移植后15天,在含有同种异体成纤维细胞(绿色)的TGF- β 缺乏构建体内形成的血管(红色)共聚焦成像。

[0038] 图7C显示移植后15天,在含有同种异体成纤维细胞(绿色)的afTGF- β 构建体内形成的血管(红色)共聚焦成像。

[0039] 图8显示计算为PECAM染色占据面积除以切片总面积的百分比的血管密度图。数据采集自15个不同的,从PECAM-免疫染色的横截面载玻片中随机选择的视野。 $n=5$;通过未配对的t-检验来比较结果, $p<0.05$ 。

[0040] 图9A显示细胞透过到不含有afTGF- β 的构建体,代表性FACS图表明CD11c⁺细胞的门控。

[0041] 图9B显示表明与afTGF- β 构建体相比,TGF- β 缺乏构建体中成熟CD11c⁺CD86⁺DC增加的水平的FACS图。

[0042] 图9C显示表明在TGF- β 缺乏构建体中,来自总CD11c⁺细胞的CD11c⁺CD86⁺细胞群的百分比显著更高的图。

[0043] 图9D显示表明透过TGF- β 缺乏构建体的CD4⁺T细胞门控的FACS图。

[0044] 图9E显示FACS图,表明在afTGF- β 构建体和TGF- β 缺乏构建体中门控的总透过性CD4⁺T细胞中的Treg百分比。

[0045] 图9F显示表明在移植后10天,来自透过afTGF- β 构建体中的装置的总CD4⁺T细胞中的显著更大的Treg群体的图。

[0046] 图9G显示FACS图,表明TGF- β 缺乏构建体中透过性淋巴细胞的门控。

[0047] 图9H显示表明含有和不含afTGF- β 构建体中的CD8⁺透过性T细胞的FACS图。

[0048] 图9I显示表明在afTGF- β 构建体和TGF- β 缺乏构建体中的总透过性淋巴细胞中透

过性CD8⁺群体的百分比的图。

[0049] 图9J显示表明在TGF- β 缺乏构建体中透过性CD8⁺T细胞的门控的FACS图。

[0050] 图9K显示表明含有和不含afTGF- β 构建体中活性CD8⁺CD69⁺透过性T细胞的FACS图。

[0051] 图9L显示表明含有afTGF- β 时总CD8⁺透过性T细胞中活性CD8⁺CD69⁺T细胞的百分比低于TGF- β 缺乏构建体的图。

[0052] 图10A显示FACS图,表明在移植后15天,afTGF- β 构建体中门控的GFP⁺成纤维细胞群。

[0053] 图10B显示表明在移植后3天,剩余成纤维细胞中GFP⁺成纤维细胞的百分比的图。

[0054] 图10C显示测量保留在构建体内的膜联蛋白V和PI染色的GFP⁺细胞的FACS图。

[0055] 图10D显示表明在含有afTGF- β 的装置中,存活的成纤维细胞(GFP⁺膜联蛋白V-PI⁻)的百分比显著更高的图。

[0056] 图10E显示表明在TGF- β 缺乏构建体中,凋亡的成纤维细胞(GFP⁺膜联蛋白V+PI⁻)的百分比显著更高的图。

[0057] 图10F显示表明在TGF- β 缺乏构建体中,死亡的成纤维细胞(GFP⁺膜联蛋白V+PI⁺)的百分比显著更高的图。 $n=12$,在每个时间点通过非配对t检验比较结果,* $p<0.05$ 。

[0058] 图11A显示测量与野生型(WT)小鼠对照组相比,由分离自移植后15和30天小鼠,使用同种异体成纤维细胞裂解物培养和活化的脾细胞分泌IL-17(72小时)的倍数变化的图。

[0059] 图11B显示测量与野生型(WT)小鼠对照组相比,由分离自移植后15和30天小鼠,使用同种异体成纤维细胞裂解物培养和活化的脾细胞所分泌IL-2(24小时)的倍数变化的图。

[0060] 图11C显示测量与野生型(WT)小鼠对照组相比,由分离自移植后15和30天小鼠,使用同种异体成纤维细胞裂解物培养和活化的脾细胞所分泌IFN- γ (48小时)的倍数变化的图。

[0061] 图11D显示测量与野生型(WT)小鼠对照组相比,由分离自移植后15和30天小鼠,使用同种异体成纤维细胞裂解物培养和活化的脾细胞所分泌IL-10(48小时)的倍数变化的图。

[0062] 图11E显示在细胞毒性测定期间拍摄的在体外与同种异体成纤维细胞形成突触的细胞毒性CD8(粒酶B染色的CD8⁺,蓝色)T细胞的代表性共聚焦图像,其中CD8⁺T细胞在移植后15和30天,从有或无TGF- β 移植的宿主和WT小鼠全脾细胞中磁性分离,随后以1:4的比例与同种异体成纤维细胞共培养。

[0063] 图11F显示在细胞毒性测定中,与成纤维细胞共培养的CD8⁺CD107⁺细胞的代表性FACS图。

[0064] 图12A显示表明与afTGF- β 构建体和WT小鼠相比,当从移植TGF- β 缺乏构建体的宿主产生时,总CD8⁺细胞中细胞毒性CD8⁺CD107⁺T细胞的百分比显著更高的图。

[0065] 图12B显示表明与afTGF- β 构建体和WT小鼠相比,当从移植TGF- β 缺乏构建体的宿主产生时,总CD8⁺细胞中细胞毒性CD8⁺CD107⁺T细胞的百分比显著更高的FACS图。

[0066] 图12C显示测量在细胞毒性测定后总的共培养成纤维细胞中凋亡GFP⁺膜联蛋白V+PI⁻成纤维细胞的百分比的图。结果表示3次重复的平均值和2次独立实验的SEM,通过双因素ANOVA进行比较。进行Tukey事后检验法以确定处理之间的差异。* $p<0.05$ 。

[0067] 图13A显示从OTII小鼠的脾中分离并且在接种在藻酸盐支架内,含有或不含OVA肽(肽终浓度:20 μ g/ml),活化后72小时的脾细胞的共聚焦图像。

[0068] 图13B显示在接种日和活化后3天的淋巴细胞的代表性FACS图。

[0069] 图14在上排FACS图显示接种前和接种后3天(有或没有活化)发现的CD4⁺T细胞群,表明在维持培养物中的CD4⁺T细胞上,OVA活化是有效的。下排显示在接种前和接种后3天(有或没有活化)时CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg群体的FACS图,表明其通过OVA肽支持CD4⁺活化。

[0070] 图15A显示测量来自在藻酸盐支架内与藻酸盐支架内的骨髓DC有或无afTGF- β (50ng/支架)共培养(0.5 $\times 10^6$ 总细胞/培养基)的CD4⁺T细胞(从OTII小鼠磁性分离)IL-2的分泌水平的图,示出通过OVA肽活化T细胞。

[0071] 图15B显示测量来自在藻酸盐支架内与藻酸盐支架内的骨髓DC有或无afTGF- β (50ng/支架)共培养(0.5 $\times 10^6$ 总细胞/培养基)的CD4⁺T细胞(从OTII小鼠磁性分离)IFN- γ 的分泌水平的图,示出通过OVA肽活化T细胞。

[0072] 图15C显示测量来自在藻酸盐支架内与藻酸盐支架内的骨髓DC有或无afTGF- β (50ng/支架)共培养(0.5 $\times 10^6$ 总细胞/培养基)的CD4⁺T细胞(从OTII小鼠磁性分离)IL-17的分泌水平的图,示出通过OVA肽活化T细胞。在afTGF- β 存在下IFN- γ 和IL-17水平的显著降低,示出afTGF- β 的免疫调节。

[0073] 图15D显示测量来自在藻酸盐支架内与藻酸盐支架内的骨髓DC有或无afTGF- β (50ng/支架)共培养(0.5 $\times 10^6$ 总细胞/培养基)的CD4⁺T细胞(从OTII小鼠磁性分离)IL-10的分泌水平的图,示出通过OVA肽活化T细胞。

[0074] 图15E显示测量CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg水平的图,表明在afTGF- β 处理的培养物中,Treg水平明显增加的趋势。结果代表三次重复的平均值和SD,并通过双因素ANOVA进行比较,Tukey事后检验用于确定治疗之间的差异。* $p < 0.05$ 。

[0075] 图16A显示从OTII小鼠分离的,在以100ng/ml的终浓度加入培养物中(对应于在0.5ml培养基中,浓度为50ng/支架的afTGF- β)的可溶性TGF- β 存在下培养,并在2D培养皿中用OVA肽(终浓度:20 μ g/ml)活化的全部脾细胞与不含TGF- β 和不含OVA的对照组相比的IL-2分泌的倍数变化,表明OVA肽导致脾细胞的活化。

[0076] 图16B显示从OTII小鼠分离的,在以100ng/ml的终浓度加入培养物中(对应于在0.5ml培养基中,浓度为50ng/支架的afTGF- β)的可溶性TGF- β 存在下培养,并在2D培养皿中用OVA肽(终浓度:20 μ g/ml)活化的全部脾细胞与不含TGF- β 和不含OVA的对照组相比的IFN- γ 分泌的倍数变化,表明TGF- β 的免疫调节作用。在含或不含TGF- β 的培养物之间IL-10(d)分泌的变化没有差异,并且与CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg群体无差异相符。

[0077] 图16C显示从OTII小鼠分离的,在以100ng/ml的终浓度加入培养物中(对应于在0.5ml培养基中,浓度为50ng/支架的afTGF- β)的可溶性TGF- β 存在下培养,并在2D培养皿中用OVA肽(终浓度:20 μ g/ml)活化的全部脾细胞与不含TGF- β 和不含OVA的对照组相比的IL-17分泌的倍数变化,示出TGF- β 的免疫调节作用。在含或不含TGF- β 的培养物之间IL-10(d)分泌的变化没有差异,并且与CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg群体无差异相符。

[0078] 图16D显示从OTII小鼠分离的,在以100ng/ml的终浓度加入培养物中(对应于在0.5ml培养基中,浓度为50ng/支架的afTGF- β)的可溶性TGF- β 存在下培养,并在2D培养皿中用OVA肽(终浓度:20 μ g/ml)活化全部脾细胞与不含TGF- β 和不含OVA的对照组相比的IL-10

分泌的倍数变化,示出TGF- β 的免疫调节作用。在含或不含TGF- β 的培养物之间IL-10(d)分泌的变化没有差异,并且与CD4+CD25+Foxp3+Treg群体无差异相符。

[0079] 图16E显示在2D培养物中接种后3天,CD4+T细胞的CD25和Foxp3表达的代表性FACS图。

[0080] 图17A显示代表性FACS直方图,表明在可溶性TGF- β 存在下Treg没有增加。红色:TGF- β ,蓝色:无TGF- β ,黑色:对照组(未检测到Treg)。

[0081] 图17B显示测量与不含TGF- β 和不含OVA的对照组相比,有或无afTGF- β 时总CD4+T细胞的CD4+CD25+Foxp3+百分比的变化。条形代表三次重复的平均值和3次独立实验的SEM,并且用非配对t检验比较。 $*p<0.05$ 。

[0082] 图17C显示从具有亲和力结合的VEGF和PDGF- $\beta\beta$ (各自为200ng/支架)以及含有或不含afTGF- β (100ng/支架)的支架上分离的,并且最初以GFP+同种异体成纤维细胞(0.5×10^6 细胞/支架)接种的GFP+细胞的FACS图。构建体移植在小鼠的肾囊下,并在移植后3天取出。

[0083] 图17D显示表明移植后3天,在总接种细胞的GFP+细胞的百分比中,在TGF- β 构建体和TGF- β 缺乏构建体之间没有发现显著差异($p>0.05$)。 $n=5$,使用非配对t检验比较结果。

[0084] 图17E显示CD8+细胞的FACS图,其从移植有afTGF- β 构建体或TGF- β 缺乏构建体的宿主的脾细胞中磁性分离,并与同种异体成纤维细胞共培养用于CD8+细胞毒性测定。磁性分离导致表达CD8的细胞纯度高于93%。

[0085] 图18显示通过成纤维细胞和CD8+T细胞之间的比例分别为1:4,共培养成纤维细胞和从移植有afTGF- β 构建体或TGF- β 缺乏构建体的宿主小鼠的脾中分离的CD8+T细胞进行的CD8+细胞毒性的活体成像。对照组是未经历移植的野生型小鼠分离的CD8+T细胞。

[0086] 发明详述

[0087] 在以下详细描述中,阐述了许多具体细节以便提供对本发明的透彻理解。但是,本领域的技术人员将理解到,可以在没有这些具体细节的情况下实践本发明。在其他情况下,没有详细描述众所周知的方法、过程和元件,以免使本发明难于理解。

[0088] 在一方面,本发明涉及在对象中产生免疫耐受反应的方法,所述方法包括向所述对象施用包含硫酸酯化多糖和生物活性多肽的组合物,并且其中所述生物活性多肽与硫酸酯化多糖的硫酸酯基团非共价相连。在一个实施方案中,生物活性多肽是转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)。

[0089] 在一方面,本发明涉及在对象中产生免疫耐受反应的方法,包括向所述对象施用包含硫酸酯化多糖和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)的组合物。这种组合物向哺乳动物(在一个实施方案中,人类)施用,有益于TGF- $\beta 1$ 的局部释放,从而实现免疫反应的高度局部抑制,包含自身免疫反应。在另一方面,免疫抑制是经几种TGF- $\beta 1$ 介导的作用实现的,包括抑制树突状细胞(DC)成熟、增加Treg的频率、以IL-10依赖性方式降低CD4和CD8细胞毒性T细胞的效应子功能、以及降低促炎细胞因子的水平。在另一方面,afTGF- β 的局部免疫调节作用发生于脾脏,导致同种异体成纤维细胞特异性的CD4和CD8 T细胞的效应子功能显著降低。在另一方面,施用的组合物包含额外的生物活性多肽,其发挥进一步的高度局部化作用。该方法具有避免经传统途径的全身给药导致的大规模副作用的优点。

[0090] 还有一方面,本发明涉及一种用于在对象中改善同种异体移植的成功的方法,所

述方法包括向所述对象施用包含硫酸酯化多糖和生物活性多肽的组合物,并且其中所述生物活性多肽与硫酸酯化多糖的硫酸酯基团非共价相连,从而改善所述同种异体移植在所述对象中的成功。在一个实施方案中,所述生物活性多肽是转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)。

[0091] 本发明进一步涉及通过局部抑制对同种异体细胞移植的宿主免疫反应来改善同种异体移植成功,或减少或预防同种异体移植排斥的方法。所述免疫反应是移植物血管形成的结果,这对于与宿主的移植物整合也是至关重要的。下文实施例表明TGF $\beta 1$ (一种免疫调节细胞因子)的局部释放创造免疫调节微环境,其局部抑制炎症信号传导(如通过IL-17A),否则这些会最终导致抗同种异体移植物的细胞毒性。

[0092] 本发明另外描述了通过抑制同种异体细胞凋亡和增加同种异体细胞存活来改善同种异体移植成功,或减少或预防同种异体移植排斥的方法。如下所示,即使在长时间植入之后,TGF $\beta 1$ 支架令人惊讶地和意料之外地导致凋亡同种异体细胞的较低的比率和同种异体细胞存活的较高的比率。

[0093] 在一个实施方案中,本发明提供了用于在对象中减少或预防同种异体移植排斥的方法,所述方法包括向所述对象施用包含硫酸酯化多糖和生物活性多肽的组合物,其中所述生物活性多肽是转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$),并且其中所述TGF- $\beta 1$ 与所述硫酸酯化多糖的硫酸酯基团非共价相连。

[0094] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于在对象中减少或预防同种异体移植排斥的方法,所述方法包括给所述对象施用包含PDGF- $\beta\beta$ -藻酸硫酸酯、VEGF-藻酸硫酸酯和TGF- $\beta 1$ -藻酸硫酸酯的组合物,所述组合物还包含支持基质,其中支持基质是选自以下的聚合物:多糖、蛋白质、细胞外基质组分、合成聚合物及其混合物。

[0095] 在另一个实施方案中,本发明涉及通过刺激同种异体细胞移植物的血管形成来促进同种异体移植物与宿主整合而不伴随宿主的抗同种异体移植物免疫反应的方法。因此,本发明提供了一种通过血管生成因子与TGF β -1同时的局部释放来刺激同种异体移植物内血管形成的方法。例如,向动物施用包含硫酸酯化藻酸以及TGF β 和血管生成因子VEGF和PDGF- β 的混合物的生物缀合物,促进因子的持续释放,并导致血管形成和成熟血管的形成。

[0096] 本发明还涉及通过抑制树突状细胞成熟产生免疫耐受反应的方法。如下所示,在一些实施方案中,TGF $\beta 1$ 的释放导致透入支架的保持未成熟的树突状细胞有更高的比例,从而增加Treg的频率,并抑制细胞毒性CD8⁺ T细胞的活化。

[0097] 本发明进一步提供了生物活性多肽的延长的呈递,所述生物活性多肽包含但不限于TGF $\beta 1$ 。如下文更详细的描述,本发明的组合物与带正电荷的多肽和/或肝素结合多肽(例如TGF $\beta 1$)可逆地和特异性地相互作用。这种可逆结合导致所述多肽的逐渐释放,其持续延长的时间段。本发明考虑在给药后约10天的时期中维持多肽的持续释放。在另一个实施方案中,持续释放期约为15天。在又一个实施方案中,持续释放期约为30天。在进一步的实施方案中,持续释放期约为60天。在又进一步的实施方案中,持续释放期超过60天。在另一实施方案中,持续释放期为施用后约10天至约15天、或10至15天、或约15天至约30天、或15天至30天、或约30天至约60天、或30天至60天、或10、15、30、60天,或其之间的任何整数天。本发明还进一步考虑不超过10天的多肽的持续释放。在另一个实施方案中,持续释放期不超过15天。在又一个实施方案中,持续释放期不超过30天。在进一步的实施方案中,持续释放期不超过60天。在又进一步的实施方案中,持续释放期不超过90天。在更多的实施方案中,

持续释放期不超过120天。在一个实施方案中,本发明的组合物和方法促进多肽的全身释放(如至对象的血液)。在另一个实施方案中,本发明的组合物和方法促进多肽的局部释放。

[0098] 在一个实施方案中,本发明提供在对象中治疗自身免疫疾病或病症的方法,所述方法包括向所述对象施用包含硫酸酯化多糖和生物活性多肽的组合物,其中所述生物活性多肽是转化生长因子 β 1 (TGF- β 1),并且其中所述TGF- β 1与所述硫酸酯化多糖的硫酸酯基团非共价相连。

[0099] 本发明进一步涉及在对象中治疗自身免疫疾病或病症的方法,所述方法包括向所述对象施用包含硫酸酯化多糖、第一生物活性多肽和第二生物活性多肽的组合物,其中所述第一和第二生物活性多肽各自与所述硫酸酯化多糖的硫酸酯基团非共价相连,并且所述组合物进一步包含支持基质,其中所述支持基质是选自以下的聚合物:多糖、蛋白质、细胞外基质组分、合成聚合物及其混合物。在一个实施方案中,所述第一生物活性多肽是TGF- β 1。在一个实施方案中,所述第二生物活性多肽是髓磷脂少突神经胶质细胞糖蛋白(MOG)。

[0100] 本发明进一步涉及在对象中抑制或治疗自身免疫疾病或病症,同时避免全身性免疫抑制副作用的方法。因此,本发明提供生物活性多肽的局部释放,所述生物活性多肽包括但不限于TGF β -1,其干扰自身免疫信号传导来导致其局部抑制。本发明考虑的自身免疫性疾病和病症,包括但不限于多发性硬化、I型糖尿病、和银屑病。

[0101] 另一方面,本发明涉及自身免疫疾病的抑制,其中所述自身免疫疾病选自由多发性硬化、银屑病、和I型糖尿病组成的组。

[0102] 因此,本发明在一方面提供在多发性硬化(MS)自身抗原特异性CD4+T细胞中诱导免疫耐受的方法,所述自身抗原包括但不限于髓磷脂碱性蛋白(MBP)、蛋白脂质蛋白(PLP)和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)。在一个实施方案中,本发明提供通过施用包括硫酸酯化多糖、TGF β 1和MOG或其自身免疫原性片段的生物缀合物,在对MOG或其自身免疫原性片段特异的CD4+T细胞中诱导免疫致耐受性作用的方法。本领域已知若干自身免疫原性MOG片段,包含对应于小鼠MOG氨基酸1-22、35-55和64-96的肽(参见如,美国专利公开2009/0053249,通过引用以其整体并入本文)。在一个实施方案中,MOG自身免疫原性片段是肽MEVGWYRSPFSRV-VHLYRNGK(小鼠MOG35-55;SEQ ID NO:1)。

[0103] 在其他方面,本发明提供通过在胰腺 β 细胞特异性的CD4+T细胞中诱导免疫耐受,预防胰腺 β 细胞(在一个实施方案中,其为I型糖尿病的基础)自身免疫破坏的方法。在一个实施方案中,本发明提供通过施用包含硫酸酯化多糖、TGF β 1和异基因(allogeneic)或同基因(syngeneic)的 β 细胞的生物缀合物,在胰腺 β 细胞特异性的CD4+T细胞中诱导免疫致耐受性作用的方法。

[0104] 在又一个方面,本发明提供通过在皮肤(dermal)CD4+T细胞中诱导免疫耐受来抑制与异常角质形成细胞生长(其为银屑病的基础)相关的自身免疫炎症信号传导的方法。在一个实施方案中,本发明提供了经皮内施用包含硫酸多糖、TGF β 1和细胞制备物或代表组织的分子制备物(例如从皮肤活组织检查获得的材料)的生物缀合物,在皮肤CD4+T细胞中诱导免疫致耐受性作用的方法。

[0105] 本文所用术语“生物活性多肽”是指在体内表现出多种药理活性的多肽,并且包括但不限于生长因子、细胞因子、趋化因子、血管生成因子、免疫调节剂、激素等。在本申请中,术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用。所述至少一种生物活性多肽可以是带正电荷的多肽

和/或肝素结合多肽。

[0106] 在一个实施方案中,所述生物活性多肽是TGF β 。本发明包括所有已知的TGF同工型(isoform)(TGF β 1至TGF β 5;哺乳动物的TGF β 1-3,在鸡中发现的TGF β 4;和青蛙中发现的TGF β 5),以及它们的片段、突变体、同源物、类似物和等位基因变体。在一个实施方案中,TGF β 是哺乳动物TGF β 。在一个实施方案中,TGF β 是TGF β 1。在另一实施方案中,TGF β 是TGF β 2。在另一实施方案中,TGF β 是TGF β 3。在另一实施方案中,TGF β 是人类TGF β 1(Genbank登录号X02812)或小鼠TGF β 1(Genbank登录号AJ00986)。

[0107] 在一个实施方案中,术语“带正电荷的多肽”是指在约为pH=7.5的生理pH时具有正净电荷的多肽/蛋白质。带正电荷的蛋白质的例子包含但不限于胰岛素、醋酸格拉替雷(也称为Copolymer 1或Cop 1)、抗凝血酶III、干扰素(IFN)- γ (也称为肝素结合蛋白)、IGF、生长抑素(somatostatin)、促红细胞生成素(erythropoietin)、黄体生成激素-释放激素(LH-RH)和白介素例如IL-2和IL-6。

[0108] 在一个实施方案中,术语“肝素结合蛋白或多肽”是指具有带正电荷的碱性氨基酸的簇并和肝素链上特定带负电荷的磺基或羧基形成离子对的蛋白(见Capila和Linhardt, 2002)。肝素结合蛋白的例子包含但不限于血小板生成素(TPO);蛋白酶/酯酶例如抗凝血酶III(AT III)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(SLP1)、C1酯酶抑制剂(C1INH)和痘苗病毒补体控制蛋白(VCP);生长因子,例如成纤维细胞生长因子(FGF、aFGF、bFGF)、FGF受体、血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、肝细胞生长因子(HGF)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、血小板衍生生长因子(PDGF、PDGF- α 和PDGF- β)、表皮生长因子(EGF)和骨形态发生蛋白(BMP)例如BMP-2、4和7;趋化因子例如血小板因子4(PF-4,现称为CXC趋化因子配体4或CXCL4)、基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、IL-6、IL-8、RANTES(活化调节、正常T表达和分泌)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、巨噬细胞炎性肽-1(MIP-1)、淋巴细胞趋化因子(lymphotactin)和fractalkine;脂质或膜结合蛋白例如膜联蛋白(annexin)、载脂蛋白E(ApoE);病原体蛋白例如人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)外壳蛋白如HIV-1 gpl20,亲环蛋白A(CypA),Tat蛋白,单纯疱疹病毒(HSV)的病毒外壳糖蛋白gC、gB或gD,登革病毒的包膜蛋白,恶性疟原虫的环孢子(circumsporozoite,CS)蛋白、细菌表面粘附蛋白OpaA;以及粘附蛋白,例如1-和P-选择蛋白、肝素结合生长相关分子(HB-GAM)、血小板反应蛋白I型重复(TSR)、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和淀粉样蛋白P(AP)。

[0109] 因此,在一个实施方案中,本发明组合和方法的任何生物活性多肽,无论是所述第一生物活性多肽还是额外的生物活性多肽,还是第二或第三生物活性多肽,为AT III、TPO、SLP1、C1INH、VCP、FGF、FGF受体、VEGF、HGF、IGF、PDGF、BMP、EGF、CXCL4、SDF-1、IL-6、IL-8、RANTES、MCP-1、MIP-1、淋巴细胞趋化因子、fractalkine、膜联蛋白、ApoE、HIV-1外壳蛋白gpl20、CypA、Tat蛋白、单纯疱疹病毒HSV的病毒外壳糖蛋白gC、gB或gD、登革病毒的包膜蛋白、恶性疟原虫的CS蛋白、细菌表面粘附蛋白OpaA、1-选择蛋白、P-选择蛋白、HB-GAM、TSR、MOG或AP,或其组合。

[0110] 在另一个实施方案中,所述生物活性多肽是PDGF-BB、PDGF-AA、bFGF、aFGF、VEGF、IL-6、TPO、SDF-1、HGF、EGF、MOG、BMP-2、BMP-4、BMP-7、IGF或其组合。另一个实施方案中,用于本发明方法中的组合包括TGF- β 、VEGF和PDGF- $\beta\beta$ 作为生物活性多肽。

[0111] 在本发明的一些实施方案中,所述至少一种肝素结合多肽选自PDGF- β 、PDGF- α 、

bFGF、aFGF、VEGF、TGF β 1、IL-6、TPO、SDF-I、HGF、EGF、BMP、或IGF。在本发明的其它实施方案中,所述至少一种生物活性多肽是血管生成生长因子或呈现血管生成活性的生长因子,例如TGF- β 1、VEGF、bFGF、aFGF、PDGF- β 、IGF及其组合。

[0112] 在本发明的一个实施方案中,所述至少一种血管生成因子是VEGF、PDGF- β ,或是VEGF、PDGF-BB和TGF- β 1的组合。

[0113] 在一个实施方案中,本发明组合物和方法中的所述生物活性多肽是细胞因子。在一个实施方案中,所述生物活性多肽是TGF- β 。在另一个实施方案中,所述生物活性多肽是白介素(IL)-10。在另一个实施方案中,所述生物活性多肽是IL-4。在另一个实施方案中,所述生物活性多肽是IL-5。在另一个实施方案中,所述生物活性多肽是IL-13。在另一个实施方案中,所述生物活性多肽是趋化因子。在一个实施方案中,所述趋化因子是(C-X-C基序)配体(CXCL)12。在另一实施方案中,所述趋化因子是CXCL11。

[0114] 根据本发明,形成所述生物缀合物的所述硫酸酯化多糖可以包含不同的重复单糖单元,可以是不同的长度,并且可以具有连接所述单元的不同类型的键。所述硫酸酯化多糖是线性的例如硫酸酯化纤维素、分支的例如硫酸酯化糖原、并且长度可以变化;例如,其可以小到硫酸酯化四糖或三糖。合适的硫酸酯化多糖是同多糖,包含但不限于淀粉、糖原、纤维素、壳聚糖或壳多糖,或者是杂多糖,包含但不限于藻酸盐(alginic acid(alginate) salts)和透明质酸。

[0115] 根据本发明和实施方式,所述硫酸酯化多糖包括糖醛酸残基,例如D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸、L-艾杜糖醛酸、和L-古罗糖醛酸。包括糖醛酸残基的多糖的实例包含但不限于藻酸盐(在一个实施方案中,藻酸钠)、果胶、树胶和来自植物源的粘质;和来自动物源的粘多糖(GAG),包括透明质酸(hyaluronic acid或hyaluronan)。所述包含糖醛酸的硫酸酯化多糖可以是化学硫酸酯化的或者可以是天然硫酸酯化的多糖。

[0116] 在一个实施方案中,所述硫酸酯化多糖是藻酸硫酸酯。在另一实施方案中,所述硫酸酯化多糖是透明质酸硫酸酯。

[0117] 藻酸是一种获自褐藻和海藻的线性多糖,并且由 β -1,4-连接的葡萄糖醛酸和甘露糖醛酸单元组成。如本文所用,术语“藻酸”是指来源于海藻(如海带(Laminaria hyperborea)、L.掌状海带(L.digitata)、兴红藻(Ecklonia maxima)、巨藻(Macrocystis pyrifera)、淡黑巨海藻(Lessonia nigrescens)、泡叶藻(Ascophyllum nodosum)、(L.japonica)、海茸(Durvillaea antarctica)、和海洋巨藻(D.potatorum))的聚阴离子多糖共聚物,并且其包括不同比例的 β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古罗糖醛酸(G)残基。

[0118] 合适用于本发明的藻酸,在一个实施方案中,具有范围在1:1到3:1之间的 α -L-古罗糖醛酸与 β -D-甘露糖醛酸之间的比例,在一个实施方案中,在1.5:1和2.5:1之间,在一个实施方案中,约为2,且具有范围在1到300kDa之间的分子量,在一个实施方案中,在5到200kDa之间,在一个实施方案中,在10到100kDa之间,在一个实施方案中,在20到50kDa之间。

[0119] 藻酸在二价阳离子例如Ca²⁺和Ba²⁺的存在下发生凝胶化。在制药/医药领域,其被成功地用作封装材料,主要用于细胞(细菌、植物和哺乳动物细胞)。对于分子来说,其效果差得多,并且甚至250kDa大小的大分子快速从藻酸水凝胶系统中释放出来。特别是,感兴趣的生物分子,例如细胞因子、生长因子,其大小在5到100kDa之间,被迅速释放。

[0120] 透明质酸包含葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基葡萄糖的重复二聚体单元,并形成细胞外基质中发现的核心复合蛋白多糖聚集体。

[0121] 先前已经表明,硫酸酯化多糖,赋予它们能够结合和控制释放重要信号蛋白如各种细胞因子和生长因子的特性。当形成生物缀合物时,藻酸硫酸酯和透明质酸硫酸酯均被发现模拟硫酸乙酰肝素和肝素的生物学特性(参见例如W02007/043050,其全部内容通过引用并入本文)。

[0122] 本领域技术人员所理解的,所述生物活性多肽和所述硫酸酯化多糖之间的所述结合选自可逆的非共价相连,包括离子键、静电相互作用、疏水相互作用、氢键或范德华力。

[0123] 应该理解,通过具有正电荷,所述生物活性多肽可以可逆地和非共价地结合到所述硫酸酯化多糖上,所述硫酸酯化多糖由于其硫基而带有负电荷。

[0124] 因此,本发明还提供用于至少一种生物活性多肽的持续局部释放的方法。

[0125] 根据本发明的方法,生物缀合物可以注射至或植入人体的任何部位,并用作所述生物活性多肽的递送系统。在一个实施方案中,本发明的所述生物缀合物可以是可流动凝胶的形式。在另一个实施方案中,生物缀合物可以预先配为刚性可植入支架。在又一实施方案中,所述可植入支架可以进一步含有支持基质。

[0126] 所述基质用作生物缀合物的支持物或载体,并可以由颗粒或多孔材料制成。所述基质材料可以是柔性的并且可以适当地固定防止其迁移到非预期的位置。所述聚合物基质材料可以是天然的或合成的,并且包含但不限于合成聚合物,例如聚乙二醇(聚氧化乙烯)、聚乙烯醇、聚乳酸、聚乙醇酸和聚羟基丁酸酯,或者天然聚合物,如胶原蛋白、纤维蛋白和明胶,或者多糖,例如壳聚糖和藻酸。

[0127] 所述基质可以是适于递送模式的任何形式,例如水凝胶、珠、微球(微珠)、水凝胶微囊、海绵、支架、泡沫、胶体分散体、纳米颗粒、悬浮液等。因此,基于硫酸酯化多糖和生物活性肽的生物缀合物的缓释剂型可以被做成液体、网状物、海绵、纤维和水凝胶的形式。

[0128] 本文使用的术语“水凝胶”是指能够含水的天然或合成亲水聚合物链的网络。能够形成这种网络的化合物的例子是藻酸、部分钙交联的藻酸溶液、壳聚糖和粘性透明质酸。

[0129] 本文使用的术语“生物缀合物”是指共价或非共价结合到生物活性多肽上的硫酸酯化多糖。非共价结合的例子是涉及离子键、静电相互作用、疏水相互作用、氢键或范德华力的结合。

[0130] 术语“支架”是指包含空隙的任何合成或有机结构。这种支架的非限制性例子是模具(mold)、铸模(cast)和哺乳动物的受损组织中的空隙。

[0131] 本发明的组合物可以通过任何合适的方法施用,例如但不限于,肝内、皮内、透皮(如在缓释制剂中)、肌肉内、腹膜内、静脉内、冠状动脉内、皮下、口服、硬膜外、外用、和鼻内途径。施用还包括手术施用、植入、插入、或注射植入物(或其部分)至对象中。所述植入物(或部分)位于皮下、肌肉内,或者位于允许植入物实现其预期功能的另一身体位置。通常,植入物(或部分)在包含但不限于对象上臂、背部或腹部的部位通过皮下植入施用。医学专业人员容易地确定其它合适的施用部位。施用多个植入物或部分以实现用于治疗的预期的剂量。也能使用其它治疗有效途径施用,施用还包括对对象全身施用或局部施用本文所述的组合物。

[0132] 术语“对象”包含但不限于人类。在另一个实施方案中,所述对象是鼠,在一个实施

方案中是小鼠,在另一个实施方案中是大鼠。在另一个实施方案中,所述对象是狗、猫、牛、绵羊或猪。在另一个实施方案中,所述对象是哺乳动物。

[0133] 制备硫酸酯化多糖生物缀合物的方法是众所周知的(参见如美国专利公开号2015/0051148,其全部内容通过引用并入本文),并且在下文中进一步详述。

[0134] 本发明考虑硫酸酯化和未硫酸酯化多糖的混合物,例如藻酸和藻酸硫酸酯。根据本发明,硫酸酯化多糖的比例范围可以是总多糖以重量计的约1%至约40%,在一个实施方案中,为总多糖以重量计的约3%至约30%,在一个实施方案中,为总多糖以重量计的约4%至约20%,在一个实施方案中,为总多糖以重量计的约5%至约10%。可选地,上述比例代表质量百分比。在一个可选的实施方案中,这些生物缀合物的结合和释放通过多糖硫酸酯化程度和并入递送系统的硫酸酯化多糖硫酸酯的范围来控制。

[0135] 本发明进一步考虑向所述硫酸酯化多糖-生物活性多肽的生物缀合物中加入药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”是指递送活性成分至预计靶标并且不会对人类或其他接受体生物体造成伤害的运载工具。如本文所用,“药物”应理解为包括人类和兽医药物。有益的载体包括,例如,水、丙酮、乙醇、乙二醇、丙二醇、丁烷-1,3-二醇、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、矿物油和由化学物质组成的聚合物(像聚乙醇酸或聚羟基丁酸酯)或天然聚合物(像胶原蛋白、纤维蛋白或多糖像壳聚糖和藻酸)。所述载体是适于递送方式的任何形式,例如溶液、胶体分散体、乳液(水包油或油包水)、悬浮液、霜剂、洗剂、凝胶、泡沫、摩丝、喷雾剂等。用于配制药物组合物的方法和组分是众所周知的,能在现有技术中找到,例如Remington的Pharmaceutical Sciences, Eighteenth Edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co. Easton Pa., 1990。在本发明的一个实施方案中,载体是水性缓冲液。在另一个实施方案中,载体是多糖,并且在一个实施方案中是藻酸水凝胶,或者在另一个实施方案中是透明质酸。

[0136] 免疫耐受反应的例子包括但不限于,同种异体移植成功、同种异体移植排斥的缺乏、自身免疫病症的抑制、对同种异体细胞移植的免疫反应的抑制、同种异体细胞凋亡的抑制、同种异体细胞存活的增加、同种异体细胞移植物的血管形成的刺激、所述生物活性多肽的延长呈递、炎症信号传导的抑制、树突状细胞成熟的抑制、CD8⁺T细胞细胞毒性反应的抑制、和调节性T细胞分化的刺激。

[0137] 通过本发明的组合物治疗的疾病或病症的实例包括但不限于同种异体移植排斥、多发性硬化、牛皮癣、I型糖尿病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、重症肌无力、桥本甲状腺炎、原发性胆汁性肝硬化、活动性慢性肝炎、肾上腺素性/阿狄森氏病、多发性肌炎、皮炎、自身免疫性溶血性贫血、心肌炎、肌心包炎、硬皮病、葡萄膜炎(包含晶状体眼炎和交感性眼炎)、天疱疮、恶性贫血、自身免疫性萎缩性胃炎、克罗恩病、和溃疡性结肠炎。

[0138] 本文引用的所有专利、专利申请和科学出版物均通过引用整体并入本文。

[0139] 现以一些非限制性实施例作为参考描述本发明。

实施例

[0140] 原料和方法

[0141] 化学品

[0142] 藻酸钠(>65%古洛糖醛酸单体含量;M.W 30kDa的VLVG和100kDa的LVG)购买自

FMCBioPolymer的NovaMatrix (Drammen, Norway)。细胞培养基包括Iscove's Modeified Dulbecoo's Medium (IMDM) (骨髓衍生树突状细胞 (Bone marrow derived dendritic cell, bmDC) 培养基) 或Dulbecoo's Modified Eagle Medium (DMEM) (克隆培养基), 购自Gibco (CA, 美国), 补充10%胎牛血清 (FBS, HyClone™)、2mm L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素、1μg/mL链霉素 (青霉素/链霉素)、2.5U/mL制霉菌素 (全部来自Biological Industries, Kibbutz Beth HaEmek, 以色列) 和50μmβ-巯基乙醇 (Sigma-Aldrich, Rehovot, 以色列)。Hank平衡盐溶液 (HBSS) 和磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 也是购自Biological Industries。氯化铵-钾 (ACK) 裂解缓冲液购自BioWhittaker (Walkersville, MD, 美国)。异氟烷购自Minrad (NY, 美国)。CD4+和CD8+T细胞纯化试剂盒购自STEMCELL™Technologies (Vancouver, 加拿大)。除非另有说明, 用于ELISA、FACS、蛋白质印迹和IHC的所有抗体都是购自Bio Legend (CA, 美国)。血管内皮生长因子 (VEGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF-ββ)、和转化生长因子β1 (TGF-β) 购自PeproTech (NJ, 美国)。用于蛋白质印迹的磷酸酶抑制剂和硝酸纤维素膜购自Santa Cruz Biotech (TX, 美国)。Tissue-Tek O.C.T. 化合物购自Sakura (CA, 美国)。除非另有说明, 其他所有的化学品都是购自Sigma-Aldrich。卵清蛋白 (OVA) 肽购自GenScript (NJ, 美国)。

[0143] 动物和细胞系

[0144] C57/B16小鼠和CD11cdnR转基因小鼠购自Jackson Laboratory (Maine, 美国)。Ben-Gurion大学 (Negev, 以色列) 的Eli Lewis博士慷慨捐赠OVA特异性、MHC类II-限制性αβ T细胞受体 (OTII) 转基因小鼠。所有的小鼠都被安置和饲养在Ben-Gurion大学医学中心 (Negev, 以色列) 的动物设施中, 并将其维持被在具有中有高压灭菌的寝具、食物和水的高压灭菌笼中。

[0145] Ben-Gurion大学 (Negev, 以色列) 的Eli Lewis博士还慷慨捐赠了NIH/3T3成纤维细胞系 (ATCC®CRL1658™)。

[0146] 藻酸基质的制备

[0147] 如上所述, 合成具有共价结合的粘附肽G4RGDY和肝素结合肽G4SPRRRARVTY (RGD/HBP) 的藻酸, 并根据Freeman等人2009 (Biomaterials.2009;30 (2122-31)) 和Freeman等人2008 (Biomaterials.2008;29 (3260-8)) 合成藻酸-硫酸酯, 通过冷冻干燥技术装配大孔支架。简而言之, 1.2% (w/v) 藻酸钠溶液与1.32% (w/v) D-葡萄糖酸/半钙盐通过均质化溶液而交联, 以获得均匀的钙离子分布。藻酸和交联剂在交联溶液中的最终组分浓度分别为1.0%和0.22% (w/v)。96-孔板的每个孔中倒入50微升交联的藻酸溶液, 冷却至4℃, 在(-20)℃冷冻24小时, 并在0.08bar和(-57)℃下冷冻干燥48小时。支架的灭菌是通过在生物罩中暴露于紫外线 (UV) 下1小时实现。

[0148] TGF-β生物活性的体外释放研究与评价

[0149] 在两组支架上试验afTGF-β的释放研究: 一种是原始藻酸支架, 一种是藻酸/藻酸-硫酸酯 (Alg/AlgS) 支架 (也就是, 90%纯藻酸和10%藻酸硫酸酯)。载有TGF-β的支架在500μL培养基中 (高糖DMEM补充100U/mL青霉素、0.1mg/mL链霉素、0.1mg/mL新霉素、和0.1%牛血清白蛋白 (BSA) (w/v)) 在无菌条件下, 在旋转振荡器上的48孔板中, 在37℃下7天。根据制造商说明书, 在支架负载TGF-β后的0、1、3和7天收集培养基样品, 并用抗人重组TGF-βELISA试剂盒分析释放的TGF-β。为了定量在上述时间点残留的afTGF-β, 取支架样品, 并在乙二胺四

乙酸(EDTA)中溶解支架。使溶液pH=3以将afTGF- β 从藻酸链上解离,并离心以实现相分离。在ELISA之前,使溶液的pH值恢复到pH=7。在每个时间点计算afTGF- β 的百分比为(TGF- β 7/初始输入TGF- β 量的量) $\times 100$ 。

[0150] 总脾细胞的分离和培养

[0151] 处死动物,并取出其脾脏,匀浆,经70 μ m筛网过滤,以获得单细胞悬浮液。用300 μ l ACK缓冲液裂解红细胞,并计数剩余细胞。细胞在克隆培养基(补充有10%胎牛血清、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠、10mM非必需氨基酸、1%青霉素/链霉素和50 μ M β -巯基乙醇的DMEM)中培养。

[0152] CD4+和CD8+T细胞的磁性分离

[0153] 根据制造商说明书,接受全脾细胞的单细胞悬浮液后,使用EasySepTMMagnet (STEMCELL Technologies, Vancouver, 加拿大),通过磁珠阴性选择试剂盒分离CD4+T细胞或CD8+T细胞。纯化的T细胞被针对CD4或CD8染色,用于如下描述的流式细胞术,并通过流式细胞术来分析以评估纯化。

[0154] 骨髓衍生的树突状细胞的纯化和培养

[0155] 树突状细胞(DC)是根据从以前的研究中经过几处修改的方法,通过用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)培养骨髓衍生的前体而产生的。第0天,4-12周龄C57/B16小鼠的股骨和胫骨用纱布垫从周围组织中取出并纯化。此后,骨头放入冷PBS中,用剪刀去除它们的尖端,并通过用27G针头以冷PBS冲洗骨髓。所得悬浮液通过70 μ m筛网过滤,并用100 μ l ACK缓冲液裂解红细胞1分钟。以HBSS洗涤所述细胞悬浮液两次,在6 $^{\circ}$ C以150g离心6分钟,并再悬浮于DC培养基中[补充有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、青霉素(100U/ml)、链霉素(1 μ g/ml)、制霉菌素(2.5U/ml)、50 μ M β -巯基乙醇、和20%来自J554细胞的GM-CSF上清液的IMDM(如下详述)]。细胞以 5×10^6 细胞/皿于10ml培养基中接种于细菌90mm培养皿上,并培养8天。以5%CO₂在37 $^{\circ}$ C的加湿培养箱内培养细胞。DC培养基和GM-CSF在第3天和第5天被替换,并准备在第8天用于进一步的实验。

[0156] 含有GM-CSF的上清液的制备

[0157] Angel Porgador教授(Ben-Gurion大学(Negev,以色列))捐赠用鼠类GM-CSF构建体转染的J558细胞。通过在1mg/ml G-418存在下培养两周来选择转染的细胞,并在组织培养瓶中以 $\sim 2 \times 10^5$ 细胞/ml的密度接种。然后细胞在培养基中每2-3天稀释1:5,持续3周。上清液用0.2 μ m过滤器过滤并储存在(-80 $^{\circ}$ C)下。

[0158] 基质内细胞的接种和活化:体外培养

[0159] 通过将14 μ l细胞悬浮液(有或没有TGF- β)滴到干燥的藻酸/藻酸-硫酸酯基质上来接种细胞(0.5×10^6 总细胞/基质)。然后细胞构建体以500rpm离心30s,并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下培养10分钟,以在基质中使得细胞分布。然后,逐渐加入额外的200 μ l培养基,并孵育细胞装置2小时。

[0160] 为了细胞活化,细胞构建体转移到48孔板中,并补充1ml培养基(加入或不加入OVA多肽(最终肽浓度:20mg/rnl))。在37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的加湿培养箱中进行细胞培养。

[0161] IL-10抑制

[0162] 纯化的抗小鼠IL-10(Biolegend;目录号505012)作为IL-10抑制剂以最终浓度为1ng/ml(比培养物中IL-10的最大浓度高一个数量级)加入。夹心ELISA显示培养物中没有

IL-10的痕迹。

[0163] NIH 3T3成纤维细胞的逆转录病毒感染

[0164] PLAT-E细胞维持在含有10%FBS和0.5%青霉素、链霉素、杀稻瘟菌素、和嘌呤霉素

的DMEM中。PLAT-E包装细胞以每100mm培养皿 8×10^6 个细胞铺板并孵育过夜。第二天,以PolyJet体外转染试剂(SignaGen,MD,美国)以pMX-IRES-GFP载体转染细胞。转染后24小时,培养基以新培养基替换并转染后24小时和48小时收集。

[0165] 在转导前1天接种3T3/NIH成纤维细胞,每12孔板接种 10^5 个细胞。含病毒的上清液(24小时后收集)补充2 μ g/ml硫酸鱼精蛋白,转移到成纤维细胞培养皿中,并培养过夜。转染后24小时,以48小时上清液替换含病毒培养基。成纤维细胞经历三个转染周期。

[0166] 在基质中接种NIH/3T3成纤维细胞:体内

[0167] 感染表达GFP的NIH/3T3成纤维细胞(如上所述)通过30 μ L细胞悬浮液(也就是,补充或不补充200ng TGF- β 的DMEM中的细胞)滴到干燥的共价结合的RGD/HBP藻酸/藻酸-硫酸酯基质上接种(0.5×10^6 总细胞/基质)。我们发现30 μ L的细胞悬浮液是润湿整个支架而不留下进入液的合适体积,因此确保所有生长因子最大限度地结合到支架上。在移植构建体之前,基质在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育5分钟以使得细胞在支架内分布。

[0168] 移植装置

[0169] 将细胞接种到基质后,立即将细胞移植装置移植到C57/B16野生型小鼠的左肾囊下,用异氟烷麻醉机麻醉。在移植后不同的天数(10、15或30天),细胞移植装置随着周围的纤维化一起被手术切除。免疫组织化学分析了它们的血管形成,流式细胞术分析了透过的淋巴细胞的数量和成纤维细胞的存活情况。在移植后的第15天和第30天,脾脏也被切除用于全淋巴细胞培养和CD8+细胞毒性测定。

[0170] 成纤维细胞裂解物

[0171] NIH/3T3成纤维细胞(10^7 个细胞)经历五个循环的冻融、离心,并用Bio-Rad蛋白检测法(Bio-Rad,以色列)测定其总蛋白浓度。

[0172] 用成纤维细胞裂解物对总脾细胞活化

[0173] 移植后15天和30天,总脾细胞在96孔U平板中培养(每孔 2×10^4 个细胞),并以成纤维细胞裂解物活化(最终蛋白质浓度:10mg/ml)。

[0174] CD8+细胞毒性检测

[0175] 如上所述,CD8+T细胞在移植后15天和30天从整个脾细胞中磁性分离。CD8+T细胞和NIH3T3成纤维细胞以4:1的比例共同培养。共同培养2小时和12小时后,以FACS分析CD8+T细胞的细胞毒性和成纤维细胞的活力。

[0176] 蛋白质印迹

[0177] 以5ng/ml TGF- β 处理NIH/3T3成纤维细胞40分钟,并通过使用补充有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀分析(RIP A)缓冲液[150mM NaCl、1mM EGTA、50mM Tris-HCl (pH=7.5)、1%NP-40]获得细胞裂解物。细胞以RIPA在冰上孵育30分钟,并然后以13,000rpm离心。收集上清液,以Bio-Rad蛋白测定法测定蛋白质浓度,并将30 μ g/孔蛋白用于SDS-PAGE,并然后转移到硝酸纤维素膜上。在室温下,以补充有0.5%聚山梨醇酯20(TWEEN20)(TBST)的Tris缓冲盐水中的5%BSA(MP Biochemicals,Santa Ana,CA)或5%牛奶封闭膜1小时,并然后在4 $^{\circ}$ C与一抗在室温孵育过夜。通过使用以下一抗检测蛋白质:兔

抗-磷酸-SMAD2,兔抗-SMAD2/3(均来自Cell Signaling,Danvers,MA)、和小鼠抗-肌动蛋白(MP Biochemicals,Santa Ana,CA)。辣根过氧化物酶(HRP)缀合二抗是山羊抗小鼠IgG(Jackson labs,Sacramento,CA)和驴抗兔IgG(Amersham,GE healthcare,英国)。使用Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate试剂盒(Thermo Scientific,Waltham,MA)诱导化学发光,然后对其以ImageQuant LAS4000软件(GE Healthcare Life Sciences,英国)检测。以ImageJ软件量化谱带强度。

[0178] 流式细胞术分析

[0179] 对于体外研究后的基质分析,首先溶解基质,并然后通过离心获得细胞,用HBSS洗涤,再次离心,并悬浮在FACS缓冲液(PBS中2%的FBS)中。为了分析体内移植后的细胞移植装置,均质化基质和周围纤维化并经70 μ m筛网过滤以获得单细胞悬浮液,并离心细胞并重悬于FACS缓冲液(PBS中2%的FBS)。

[0180] 获得单细胞悬浮液后,加入Fc-阻断剂5分钟以防止非特异性抗原结合。此后,根据制造商说明,加入荧光抗体,并在冰上孵育平板15分钟。然后以FACS缓冲液洗涤样品,并在6 $^{\circ}$ C下在420g下离心两次3分钟。

[0181] 对于细胞内FACS染色(Foxp3),首先以荧光抗体染色细胞,然后在固定缓冲液中孵育20分钟,洗涤两次,并在透化缓冲液中孵育15分钟。此后,用FACS缓冲液洗涤细胞,并以细胞内抗体孵育30分钟,离心,并悬浮在FACS缓冲液中。使用利用FlowJo软件的GalliosTMFlow Cytometer(BeckmanCoulter,Inc.,Brea,CA)用于流式细胞术分析。

[0182] 本研究中使用的所有抗体都是发光团缀合的抗体,并包括APC-Cy7缀合的抗CD4(Biolegend;目录号100414)、PerCP-缀合的抗-CD8(Biolegend;目录号100732)、PE-缀合的抗CD25(Biolegend;目录号101904)、PE-Cy7-缀合的抗-CD69(Biolegend;目录号104512)、APC-缀合的抗-CD107a(Biolegend;目录号121614)、FITC-缀合的抗-FoxP3(Biolegend;目录号137214)、PE/Dazzle-缀合的抗-CD11c(Biolegend;目录号117348)、抗-CD86Brilliant Violet(Biolegend;目录号305431)、APC-缀合的Annexin V(Biolegend;目录号640920)、和PI(Biolegend;目录号421301)。

[0183] 用ELISA分析细胞因子分泌

[0184] 通过使用OVA多肽或成纤维细胞裂解物活化后,从体外和离体研究中获得无细胞上清液。对于IL-2测量,在细胞活化后24小时收集上清液。对于IFN- γ 和对于IL-10和IL-17A测量,细胞活化后分别48小时和72小时收集上清液。根据制造商说明,执行夹心ELISA用于测量上清液中细胞因子的浓度。

[0185] 免疫组织化学和共聚焦成像分析

[0186] 对于体内血管生成分析,从动物体内取出细胞移植装置和周围的纤维化,并在4%多聚甲醛(PFA)中固定24小时,并然后在蔗糖溶液(30%)中固定48小时。然后,在最佳切割温度化合物(OCT)中包埋这些装置,并储存在(-80) $^{\circ}$ C。用低温恒温器(Lecia CM3050S)切割水平横截面(20 μ m厚)并在使用前保持在(-80) $^{\circ}$ C下。在PBS/TWEEN(0.05%v/v)中洗涤横截面。染色前,使用第一抗体稀释缓冲液阻断非特异性结合。然后切片与第一单克隆抗小鼠CD31抗体一起孵育(Bio legend;目录号910003),并以Alexa Flour 633-缀合的抗大鼠IgG(Biolegend;目录号405416)染色。

[0187] 以NikonC1si激光扫描共聚焦显微镜进行切片的共聚焦成像。血管密度计算为血

小板内皮细胞粘附分子 (PECAM) 的百分比、总图像面积中 CD31 占据面积的百分比, 并通过使用 Imaris 软件 (Bitplane scientific solutions, South Windsor, CT) 从 PECAM 免疫染色的横截面切片中随机选择的 15 个不同视野中确定。

[0188] 对于 CD8⁺ 细胞毒性成像, 在与 NIH/3T3 成纤维细胞共培养之前, 按照制造商说明, 用 SNARF1 (Invitrogen, CA, 美国) 染色 CD8⁺ T 细胞。共培养 12 小时后, 用 4% PFA 固定孔中细胞。粒酶 B 染色前, 用原抗体稀释缓冲液阻断非特异性结合, 并随后细胞经历渗透。然后, 以荧光缀合第一单克隆抗小鼠粒酶 B (美国 Biolegend; 目录号 515405) 孵育细胞过夜。以 Nikon C1si 激光扫描共聚焦显微镜完成对进行 CD8⁺ 细胞毒性试验的切片和孔的共焦成像。

[0189] 对于激活成像后 72 小时支架内的体外脾细胞培养, 收集支架, 并在 DMEM 缓冲液中用 4% PFA 固定 20 分钟, 之后在蔗糖溶液中孵育 24h。固定后, 在 O.C.T 中包埋装置, 并储存在 (-80) °C。以低温恒温器 (Lecia CM3050S) 切割水平横截面 (30 μm 厚), 并在使用前保持在 (-80) °C。在 DMEM 缓冲液中洗涤横截面。染色前, 用 DMEM 缓冲液中的 2% BSA 阻断非特异性结合。然后以第一单克隆抗小鼠 CD11c 抗体 (Biolegend, 目录号 117302) 和以第一单克隆抗小鼠 CD4 抗体 (Biolegend, 目录号 100402) 孵育切片, 并且以 AlexaFluor 488 缀合的抗鼠 IgG 抗体 (Biolegend, 目录号 405418) 和以 Alexa Fluor 546 抗亚美尼亚仓鼠 IgG 抗体 (Biolegend, 目录号 405423) 染色。

[0190] 统计学

[0191] 使用 GraphPad Prism version 5.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) 完成所有的统计分析。所有变量表示为均值 ± SEM。体外研究通过双侧不配对 t 检验 ($p < 0.05$ = 比较。所有来自体外的实验通过单因素 ANOVA 用 Tukey 事后检验进行比较。

[0192] 研究方案核准

[0193] 所有外科手术和实验程序通过 Ben-Gurion 大学 (Negev, 以色列) 的动物护理和使用机构委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 审查和批准。

[0194] 实施例 1

[0195] 细胞移植装置的构建及免疫调节特性

[0196] 细胞移植装置是由于其大孔结构, 在移植后已显示有效的血管形成的藻酸支架 (平均孔径为 80 μm)。为加强血管形成, 所述藻酸支架补充亲和结合血管内皮生长因子 (VEGF) 和血小板源生长因子 (PDGF-ββ)。所述生长因子与藻酸基质的亲和结合是通过它们与构成所述支架干重的 10% 的藻酸-硫酸酯的相互作用介导的。我们之前表明, 肝素结合蛋白家族的生长因子, 例如 VEGF、PDGF-ββ 和 TGF-β, 以类似于它们与肝素/硫酸乙酰肝素的天然相互作用的方式与藻酸-硫酸酯相互作用 (图 1A)。因此, 我们期望所述生长因子与所述藻酸支架基质的所述亲和结合将改善其生物学功能。

[0197] 在此期望基础上, 我们通过亲和结合 TGF-β 到藻酸硫酸酯或藻酸支架上产生免疫耐受微环境 (图 1A, 详见材料和方法)。与当 TGF-β 非特异性吸附于原始藻酸支架相比, 该过程延长 TGF-β 的呈递。TGF-β ELISA 揭示, 在含藻酸硫酸酯支架中 7 天后, 30.2% ± 0.8% 的初始负载 afTGF-β 仍呈递在基质中, 然而仅 5.2% ± 0.3% 保留在原始支架中 (图 1B)。重要的是, 在培养基中发现的释放的 TGF-β 和与藻酸或硫酸酯化藻酸基质 (afTGF-β) 亲和结合的 TGF-β 相似地激活成纤维细胞单层中的 SMAD2 磷酸化 (图 1C, D)。值得注意的是, afTGF-β 在其仍与基质亲和结合时和与支架解离后显示出相似的活性, 指示细胞与 TGF-β 在其亲和结合

形态和其释放时都相互作用。

[0198] 接下来,我们检查藻酸-硫酸酯或藻酸支架 (afTGF- β 构建体) 中afTGF- β 的空间呈递是否会产生免疫调节微环境。我们进行初步研究以测试总脾细胞白细胞能否在支架内培养、维持存活、和诱出抗原特异性T细胞反应。为此,在作为T细胞激活肽的OVA存在或不存在时,从OTII OVA-TCR Tg小鼠 (其淋巴细胞是OVA特异性的) 中分离出剔除红细胞的脾白细胞并在支架中接种 (图2A)。图13A显示典型的构建体,在细胞接种后3天,具有彻底分布支架的白细胞并具有紧密邻近的DC和CD4T细胞,允许细胞-细胞相互作用。验证OVA诱导的T细胞增殖,揭示32%和6%的T细胞分别在OVA激活和未激活的情况下存活 (图13B)。在OVA激活的构建体中大约有20%的存活淋巴细胞是CD4+CD25+ (图14A,B)。

[0199] afTGF- β 的免疫调节作用表现为细胞因子谱和脾细胞中CD4+CD25+Foxp3+调节性T细胞 (Treg) 的出现 (图2B-E), 以及在在afTGF- β 构建体内接种的纯化DC中 (图15A-E) 显现。如图15B-E所示,afTGF- β 显著抑制促炎细胞因子IL-17A的分泌,显著增加调节性细胞因子IL-10,并且不影响分泌的IL-2或IFN- γ 的水平。重要的是,所述装置中afTGF- β 的存在导致CD4+CD25+Foxp3+T细胞在CD4+T-细胞群体中的频率增加2.88倍 (含有或不含有OVA的总T细胞群体的分别30.6% \pm 3.4%及11.8% \pm 3.1%; $p=0.008$,图3,图4A-C)。总之,这一发现表明,afTGF- β 促进所述细胞移植装置内的抗炎环境。值得注意的是,在抗IL-10存在时 (图5A-F) 或在CD11c启动子下使用来自CD11c^{dnr}Tg小鼠脾细胞表达人类TGF- β 受体II基因的显性阴性形式 (图5G-H,图6A-6E) 时,未观察到在afTGF- β 构建体中观察到的降低的分泌的IL-17水平和增加的Treg频率。

[0200] 总的来说,我们的数据指出借助DC中的afTGF- β 信号转导诱导IL-10上调的机制,其然后促成Treg分化,并减弱CD4T细胞的效应子功能。这种机制在移植装置的三维 (3D) 微环境中似乎比补充可溶性TGF- β 的2D细胞单层时明显更为突出 (图16A-E,图17A-B)。

[0201] 实施例2

[0202] 装置的体内血管形成

[0203] 移植后细胞移植装置的血管形成对支持移植的同种异体细胞的存活能力和功能至关重要,特别是在高密度接种的细胞装置中。为增强血管形成,我们的装置补充以VEGF和PDGF- $\beta\beta$ 。为了了解afTGF- β 构建体中细胞行为和存活能力的差异 (与TGF- β 缺乏构建体相比) 是由于血管形成程度的不同的可能性,我们比较afTGF- β 构建体和TGF- β 缺乏构建体的血管形成程度;两种构建体以被感染以表达GFP瑞士鼠源同基因的NIH或3T3成纤维细胞接种 (5x10⁵细胞或支架)。

[0204] 图7A显示,在肾包膜下移植后10天内,两种细胞接种的装置上均产生PECAM+ (CD31) 内皮细胞的群体,形成散布在GFP成纤维细胞中的毛细血管。第15天,在移植的构建体中观察到清晰的毛细管 (图7B,C),占据含有和不含TGF- β 的细胞装置的3-4% (图8)。

[0205] 实施例3

[0206] 体内局部免疫调节与同种异体成纤维细胞移植存活

[0207] 接下来的一系列实验证实,在体内,在afTGF- β 支架中局部免疫调节微环境的建立。此外,鉴于所述装置广泛的血管形成,检查这种潜在的移植装置维持移植的同种异体成纤维细胞的存活能力和功能的功效。

[0208] 移植后10天和15天取回的构建体的FACS分析揭示,相比TGF- β 缺乏构建体,在

afTGF- β 构建体中,表达共刺激分子CD86的成熟CD11c+DC的比例显著更低(图9A-C),且CD4+CD25+Foxp3+Treg的比例显著更高(图9D-F, $p<0.05$)。Treg的增加仅在移植后第10天才明显。因此,在移植后第10天,与缺乏TGF- β 的构建体相比,afTGF- β 构建体中CD8+T细胞的百分比显著更低(分别是 $2.1\% \pm 0.4\%$ 对比 $5.5\% \pm 0.9\%$, $p=0.019$) (图9G-I)。此外,在移植后10天(分别是 $13.4\% \pm 3.5\%$ 对比 $22.9\% \pm 9.3\%$, $p=0.015$)和15天(分别是 $4\% \pm 0.8\%$ 对比 $12.0\% \pm 2.5\%$, $p=0.0001$),与缺乏TGF- β 的构建体相比,afTGF- β 构建体中观察到表达活化标记物CD69的CD8 T细胞比例显著减少(图9J-L)。

[0209] 为了确定免疫耐受环境是否影响同种异体成纤维细胞的存活,我们确定存活同种异体成纤维细胞的数量和经历凋亡的细胞的频率。移植后3天从装置中取回的GFP+细胞计算为来自装置中存在的总GFP+细胞的GFP+细胞百分比(图17C、D)。选择这一基准以消除与T细胞介导的细胞毒性无关的细胞死亡。移植后15天取回的同种异体成纤维细胞百分比在afTGF- β 和TGF- β 缺乏构建体中分别为 $50.4\% \pm 2\%$ 和 $44.6\% \pm 0.7\%$ ($p<0.05$, 图10A、B),伴随在移植后30天观察到从afTGF- β 装置回收的成纤维细胞的更高比例的趋势。通过以AnnexinV和PI标记的GFP细胞的FACS分析,进一步验证存活同种异体成纤维细胞的存活能力(图10C)。在移植后15天,afTGF- β 构建体中存活同种异体成纤维细胞的比例(GFP+Annexin-PI-)显著高于TGF- β 缺乏的构建体(分别为 $38.5\% \pm 3.5\%$ 及 $23.2\% \pm 5.0\%$, $p=0.038$, 图10D)。因此,在移植后15天和30天,在afTGF- β 构建体中来自GFP+同种异体成纤维细胞的总数的GFP+AnnexinV+PI-凋亡细胞和GFP+AnnexinV+PI+细胞的百分比明显低于在TGF- β 缺乏的构建体中(图10E、F)。这些数据指示,构建体中afTGF- β 的局部呈递在DC未成熟状态下维持其浸润,从而增加Treg的频率并抑制细胞毒性CD8 T细胞的活性。

[0210] 实施例4

[0211] 亲和结合的TGF- β 抑制同种异体细胞特异性外周T细胞的活化

[0212] 细胞或组织移植中一个主要障碍在于免疫抑制性药物不是抗原特异性的,并因此损害宿主的防御机制。此外,停药通常导致免疫反应的反弹,最终导致移植物排斥。通过诱导同种异体移植物特异性T细胞耐受,实现在不损害宿主免疫下移植物的长期存活。为了确定血管形成的afTGF- β 构建体能否诱导同种异体成纤维细胞特异性的外周耐受,在移植后第15天和第30天从小鼠分离脾细胞,并检查同种异体成纤维细胞特异性T-辅助因子和T-细胞毒性反应。与TGF- β 缺乏构建体的移植相比,在第15天,切自afTGF- β 构建体移植的小鼠的脾细胞具有显著降低的同种异体成纤维细胞特异性Th17效应子功能(图11A;分泌的IL-17为与切自以TGF- β 缺乏构建体移植的小鼠的脾细胞相比的 55.5% , $p<0.05$)。值得注意的是,这些脾细胞在移植后第30天也显示减弱的Th1和/或CD8 T细胞效应子功能(图11B-C;分泌的IL-2和IFN- γ 分别为与切自以TGF- β 缺乏构建体移植的小鼠的脾细胞相比的 45.2% 和 20.9% , $p<0.05$)。各组间IL-10分泌水平无显著性差异(图11D)。

[0213] 接下来,我们确定以afTGF- β 构建体移植的小鼠中同种异体特异性CD8 T细胞细胞毒性反应是否也被抑制。因此从移植的小鼠和从野生型小鼠中分离脾细胞,并然后分离CD8 T细胞(如“方法”和图17E所述),分别以1:4的细胞比例与同种异体成纤维细胞共培养。共聚焦成像显示,从以TGF- β 缺乏构建体移植的小鼠分离的CD8+T细胞与同种异体成纤维细胞形成免疫突触并发挥细胞毒性(图17E和图18)。

[0214] CD8 T细胞与同种异体成纤维细胞共培养2小时和12小时后表达CD107的细胞毒性

CD8⁺ T细胞的频率的FACS评估指示,在两个时间点,细胞毒性CD8⁺CD107⁺ T细胞的百分比在来自移植afTGF- β 构建体的小鼠的脾细胞中显著低于在来自移植TGF- β 缺乏构建体的小鼠的脾细胞中。

[0215] 此外,与以TGF- β 缺乏构建体移植的小鼠相比,与从以afTGF- β 构建体移植的小鼠分离的脾衍生CD8⁺ T细胞共培养时的经历凋亡的同种异体成纤维显著减少(分别为35.5% \pm 5.1%对比7.2% \pm 0.9%,第15天;图12B,C)。值得注意的是,获自以afTGF- β 移植的小鼠的活化CD8⁺ T细胞的频率和细胞毒性与野生小鼠的相似,指示在TGF- β 构建体的条件下的同种异体成纤维细胞的移植引起很轻微的细胞毒性反应。

[0216] 我们检验在细胞移植装置中与基质亲和结合的TGF- β 的局部呈递促进免疫调节微环境,其保护细胞移植物不被排斥的假设。我们显示,afTGF- β 通过维持DC在不成熟的表型以及通过增加Treg的频率和以IL-10依赖的方式降低CD4和CD8细胞毒性T细胞的效应子功能来发挥其调节功能。重要的是,我们显示afTGF- β 的局部免疫调节作用投射到脾脏,其显示同种异体成纤维细胞特异性CD4和CD8⁺ T细胞的显著降低的效应子功能。

[0217] TGF- β 是一种重要的免疫调节细胞因子,其依赖于相邻的细胞因子环境驱动抗炎和促炎反应两者。当与藻酸支架亲和结合时,呈递的TGF- β 能否调节活化的效应T细胞尚不清楚。我们的体外结果指示,afTGF- β 当DC或当总脾细胞用作抗原呈递细胞(APC)时(后者至更大程度地),抑制CD4⁺ T细胞的活化,并且其增加分泌的IL-10的水平和Treg的频率。以抗IL-10或以CD11c-DNR脾细胞体外完成阻断实验,暗示afTGF- β 在两种途径中具有调节功能:(1)增强对DC的IL-10信号转导和维持其不成熟表型。因此,不成熟的DC降低T细胞的效应子功能并增加CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg的频率,如在以前的研究中也有观察;及(2)它直接向效应T细胞信号传导,并减弱其效应子功能。

[0218] 值得注意的是,在2D培养中,afTGF- β 比可溶性TGF- β 更有效。这种现象可能缘于亲和结合在基质上的TGF- β 对细胞的局部呈递,由此增强信号转导。此外,与其吸附在原始支架时的快速释放相比,TGF- β 的亲合结合导致延长的活性细胞因子的持续释放。这两种机制都有助于免疫调节环境的成功产生。TGF- β -控释系统曾用于体外和体内诱导和扩展Treg的群体。然而,这些系统都没有开发细胞因子的亲和力结合或试图探索该策略,以创造一个将促使其作为同种异体细胞移植装置使用的3D免疫调节环境。

[0219] 作为移植装置,藻酸支架补充有血管生成因子VEGF和PDGF- β ,其广泛地增强支架血管形成。这种细胞移植装置的一个潜在分支是,虽然促进血管形成以使能够去往和来自移植的细胞的有效物质输送,但增强的白细胞浸润会促进同种异体移植排斥。我们的数据显示在体外和体内观察到,afTGF- β 发挥相似的调节作用。与TGF- β 缺乏构建体相比,移植后10天和15天取回的带有afTGF- β 的构建体显示显著降低的成熟DC的频率、增加的Treg的频率、和降低的细胞毒性T细胞的频率。此外,以afTGF- β 移植的小鼠也会引起外周耐受,因为脾细胞衍生的同种异体成纤维细胞反应性CD4和CD8⁺ T细胞呈现出显著降低的促炎细胞因子水平,和几乎完全消失的细胞毒性活性。

[0220] 因此,只要TGF- β 在支架中局部呈递,移植装置的血管形成不仅提高移植物的存活,而且减弱响应移植细胞引起的外周免疫反应。

[0221] 我们提出一个两阶段模型来解释afTGF- β 构建体相对于TGF- β 缺乏构建体的独特性质。第一阶段,afTGF- β 在其吞噬移植细胞的同时,向浸润APC信号传导并维持其在不成熟

状态。毛细管在移植后几天内形成,APC通过其迁移到引流淋巴结,并然后促进幼稚的同种异体成纤维细胞反应性CD4和CD8 T细胞的失能或轻度激活。第二阶段,afTGF- β 信号转导到支架浸润的T细胞,和未成熟DC的存在一起,进一步减弱DC的激活,并促进Treg的分化和/或扩展。在移植afTGF- β 构建体后15天和30天观察,这些过程总体上导致了显著降低的同种异体成纤维细胞的细胞毒性。

[0222] 随着藻酸支架在宿主中侵蚀,TGF- β 富含的环境扩展局部抗原特异性免疫调节至全身性和抗原特异性免疫耐受是十分重要的。例如,在1型糖尿病的情况下,响应移植的 β 细胞引起的这种外周耐受允许阻断胰腺内的免疫攻击,并可能预防胰岛再生。类似的策略能用于治疗其他组织特异性自身免疫疾病,同时避免损害宿主对病原体的防御,例如免疫抑制药物的情况。

[0223] 实施例5

[0224] 亲和结合至藻酸或硫酸酯化藻酸基质的TGF- β (afTGF- β) 用于治疗多发性硬化(MS)

[0225] 实验用自身免疫性脑脊髓炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) 用作MS模型。以髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 残基35-55免疫C57BL6小鼠。7~10天后,由进行临床评分,小鼠出现尾、肢麻痹。该疾病通过白细胞浸润到脊髓中形成典型的MS病变特征显现。所述疾病经常以复发缓解方式出现。在免疫前后的不同时间点(如发病前第5天,临床评分出峰的第15天或缓解后的第20天)植入携带或缺乏TGF- β 和MOG35-55肽的藻酸或硫酸酯化藻酸支架,并检查EAE临床评分(正如如Miller等“Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse.”Curr Protoc Immunol.2007年5月:CHAPTER:Unit-15.1所述,通过参考文献在此引入),连同MOG特异性CD4T细胞的表型(细胞因子谱及活化标记物)及脊髓组织病理学检查,即浸润白细胞与脱髓鞘。

[0226] 结果显示MOG特异性T细胞是耐受的,并从而预防或缓解急性的和慢性的疾病过程,包含在接受携带TGF- β 和MOG35-55支架的动物体内EAE临床评分的降低、淋巴细胞浸润和减少的MS损伤数量。

[0227] 在临床试验中,TGF β 支架携带若干依赖于患有MS的对象中的特定HLA等位基因的免疫显性表位。

[0228] 实施例6

[0229] afTGF- β 用于治疗I型糖尿病

[0230] 在其中白细胞破坏胰腺中 β 细胞的I型糖尿病小鼠模型(例如NOD小鼠)中,在发病前后(大约10周)移植表达TGFP的同种异体的或同系的胰腺 β 细胞,并检测小鼠中胰岛素和葡萄糖水平,连同支架中和胰腺中的免疫浸润、病理生理和 β 细胞存活。

[0231] 结果显示, β 细胞特异性淋巴细胞是耐受的,并从而预防或缓解急性的和慢性的疾病过程,包含接受表达TGF β 的胰岛 β 细胞的动物中的 β 细胞死亡的减少、胰岛素水平的增加和血糖水平的减少。

[0232] 虽然本发明的某些特征已在这里加以说明和描述,但对本领域中具有普通技能的人将出现许多修改、替代、改变和等同的情况。因此,需要理解的是,所附的权利要求意在涵盖属于本发明真正精神范围内的所有此类修改和更改。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 位于本-古里安大学之内盖夫技术与应用有限公司
[0003]	S • 科恩
[0004]	A • 蒙索尼克
[0005]	<120> 产生免疫耐受反应的组合物和方法
[0006]	<130> P-79598-PC
[0007]	<150> 62/275,827
[0008]	<151> 2016-01-07
[0009]	<160> 1
[0010]	<170> PatentIn 版本 3.5
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 21
[0013]	<212> PRT
[0014]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[0015]	<400> 1
[0016]	Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
[0017]	1 5 10 15
[0018]	Tyr Arg Asn Gly Lys
[0019]	20

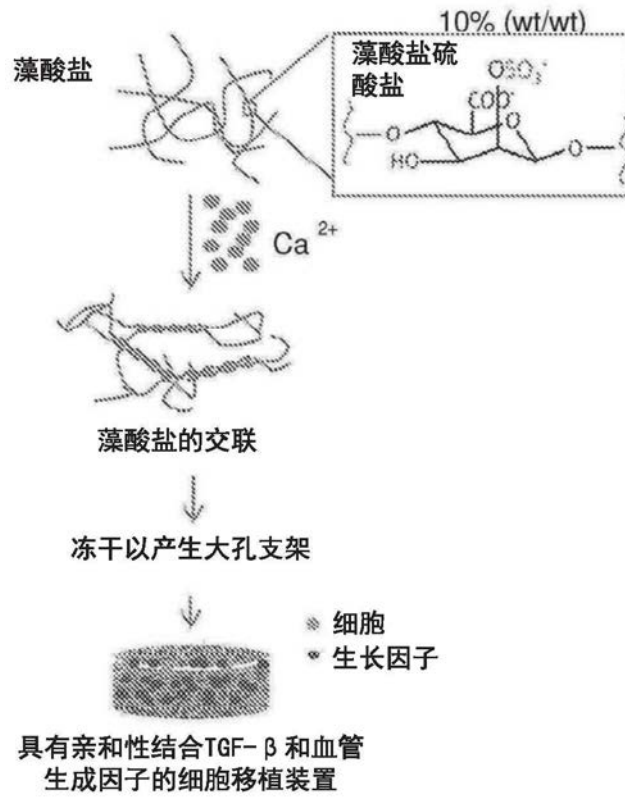


图1A

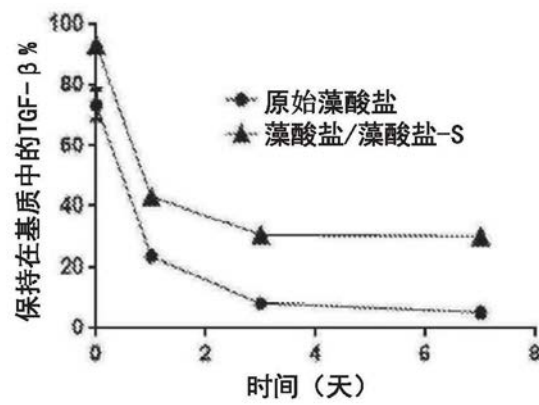


图1B

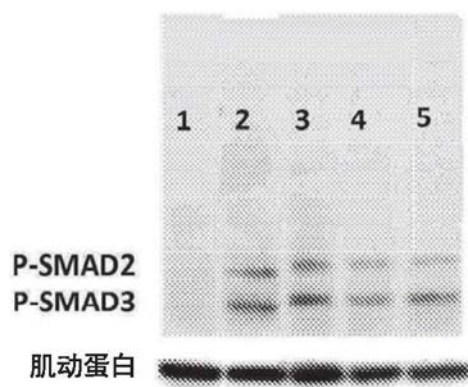


图1C

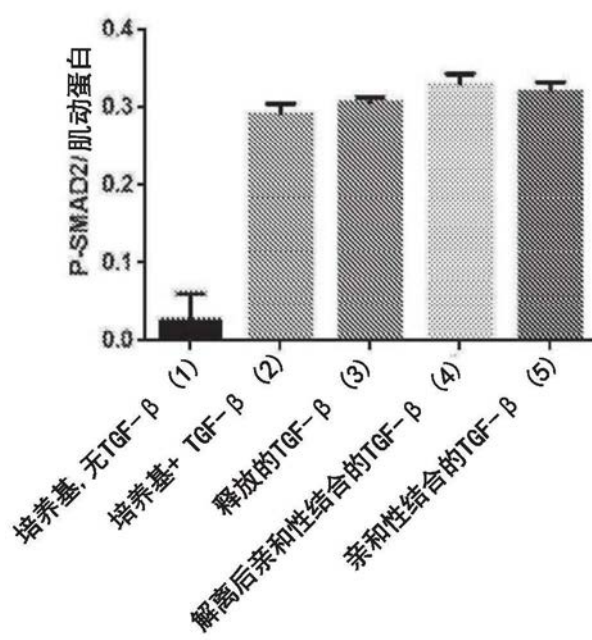


图1D

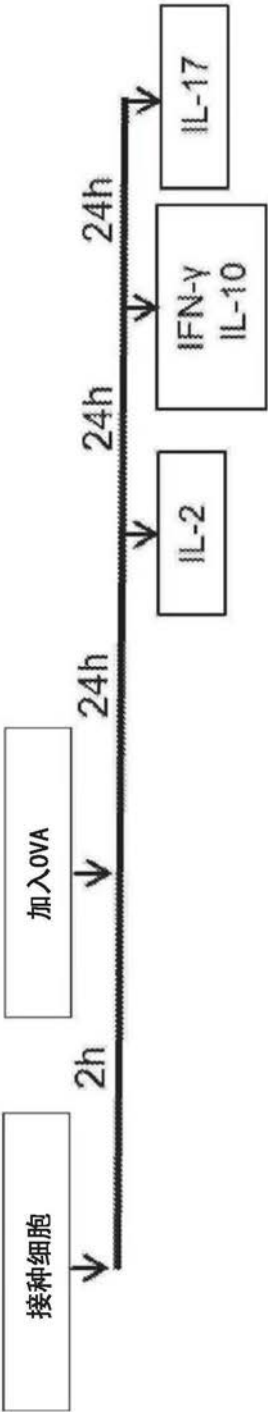


图2A

IL-17

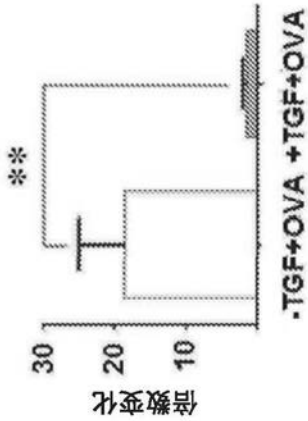


图2B

IL-10

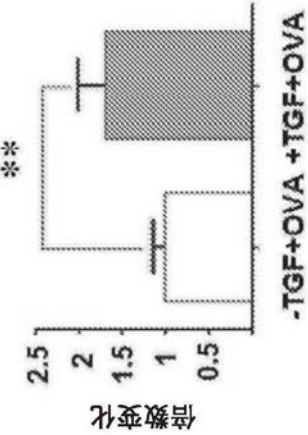


图2C

IL-2

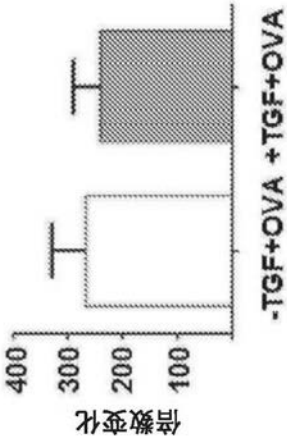


图2D

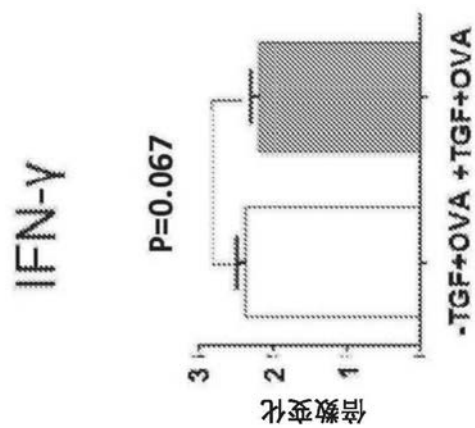


图2E

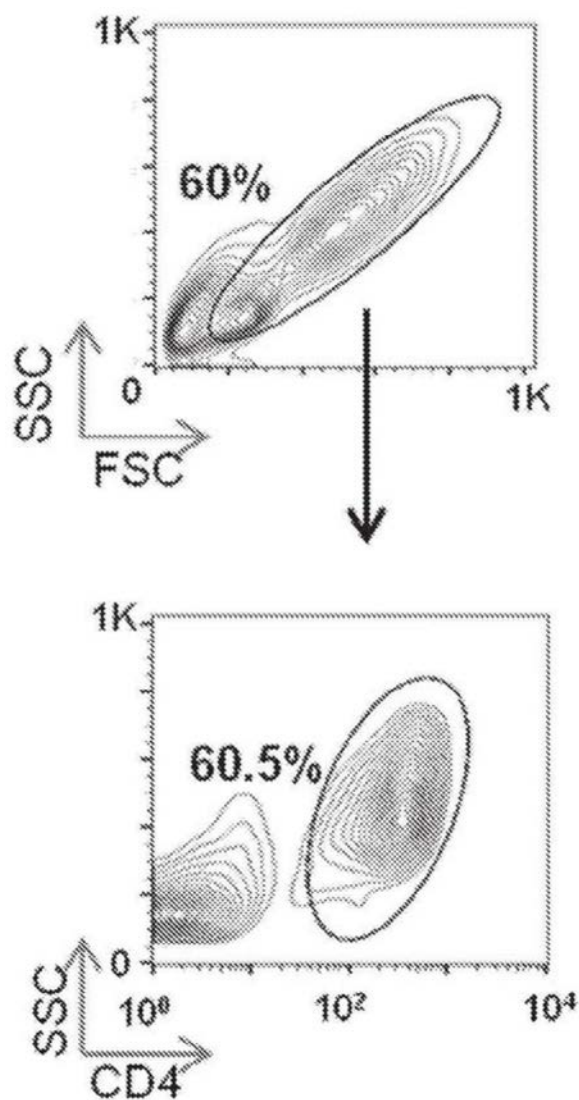


图3

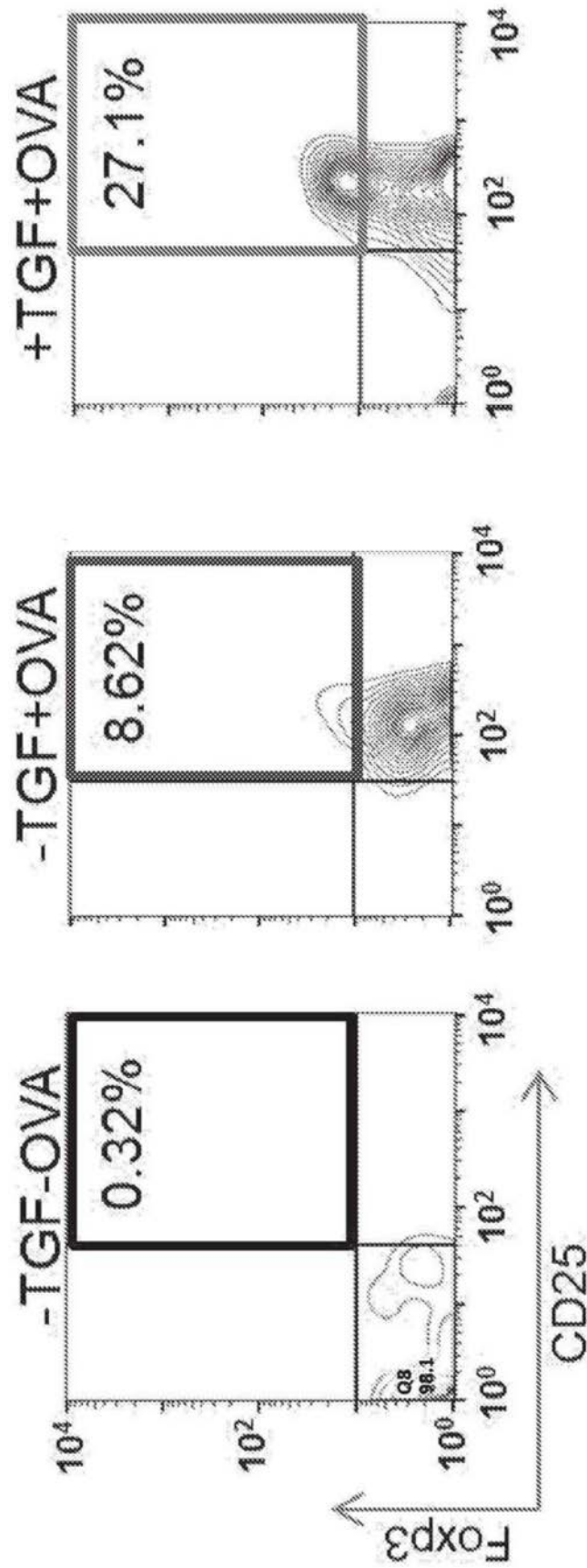


图4A

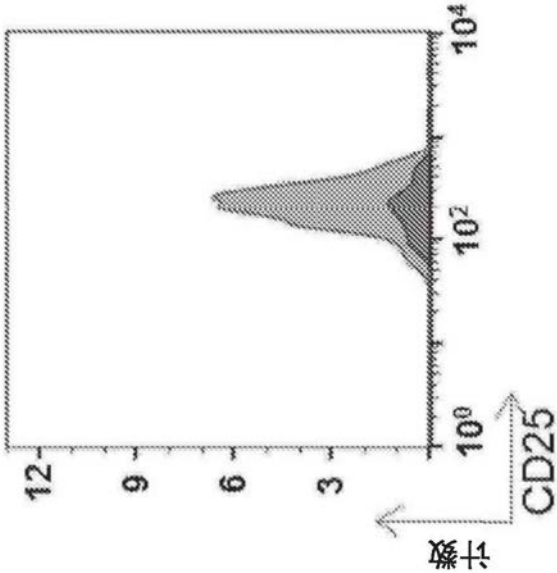


图4B

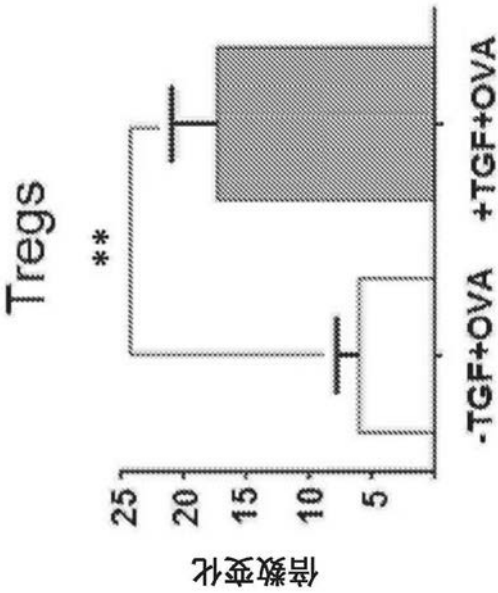


图4C

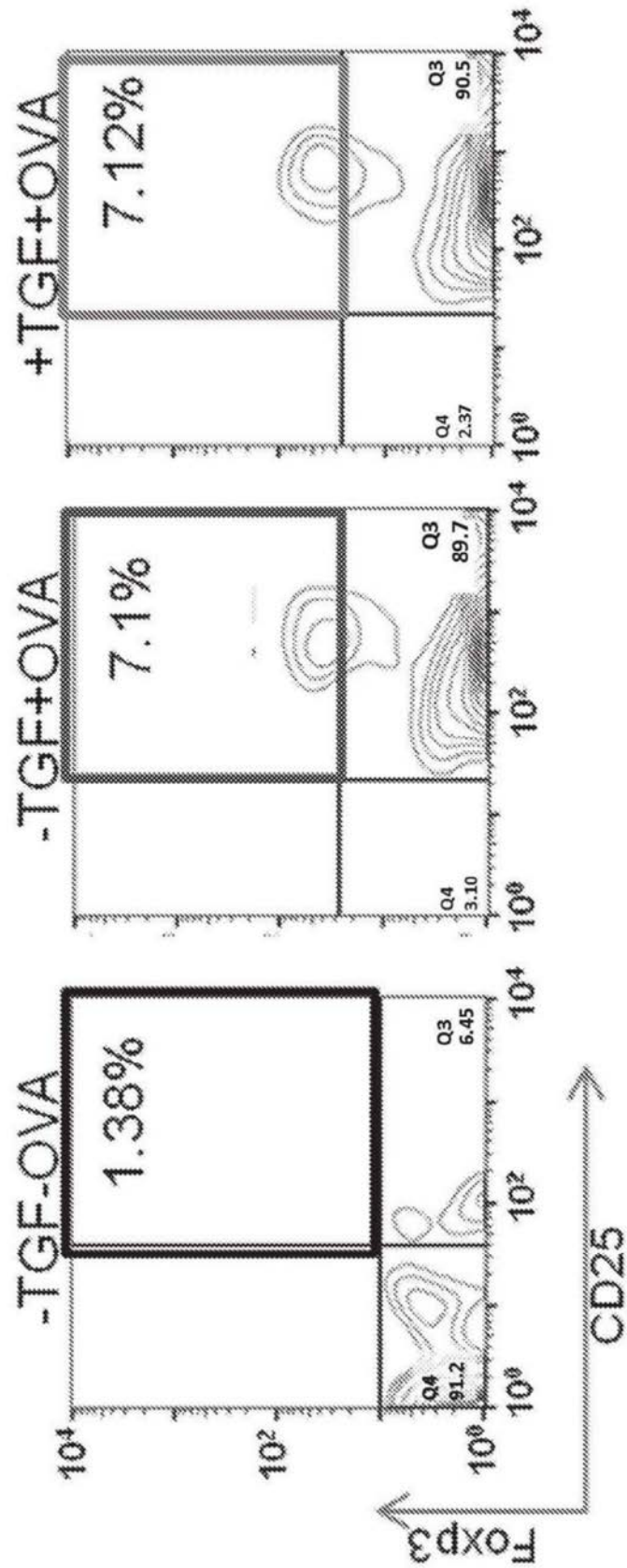


图5A

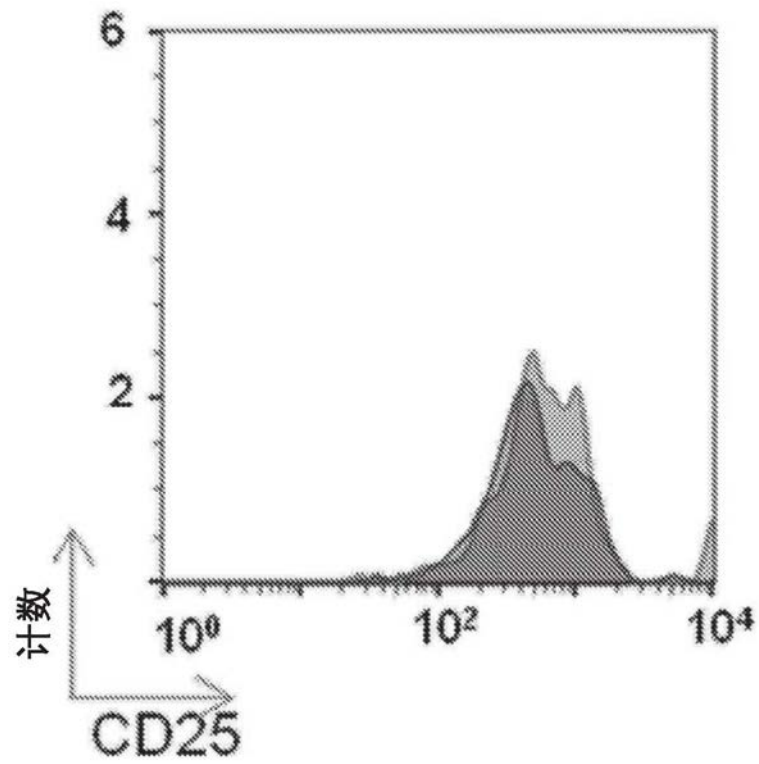


图5B

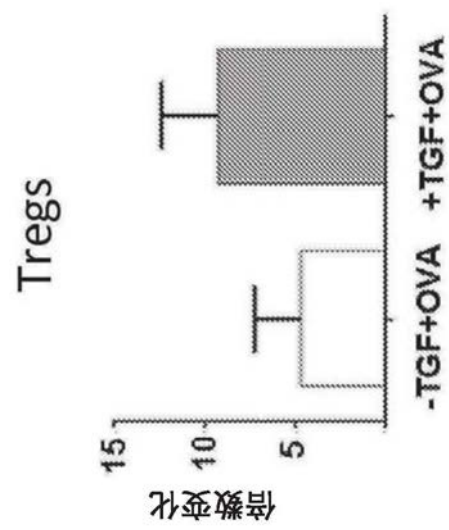


图5C

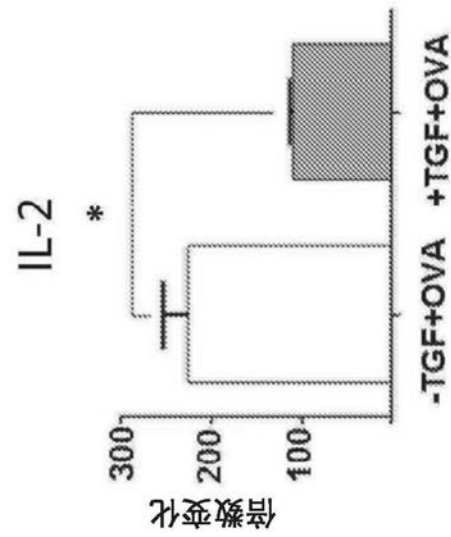


图5D

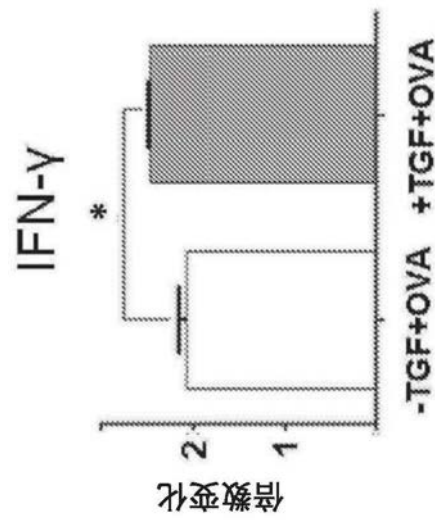


图5E

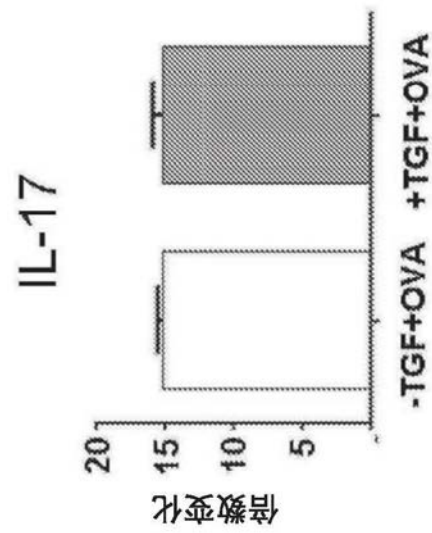


图5F

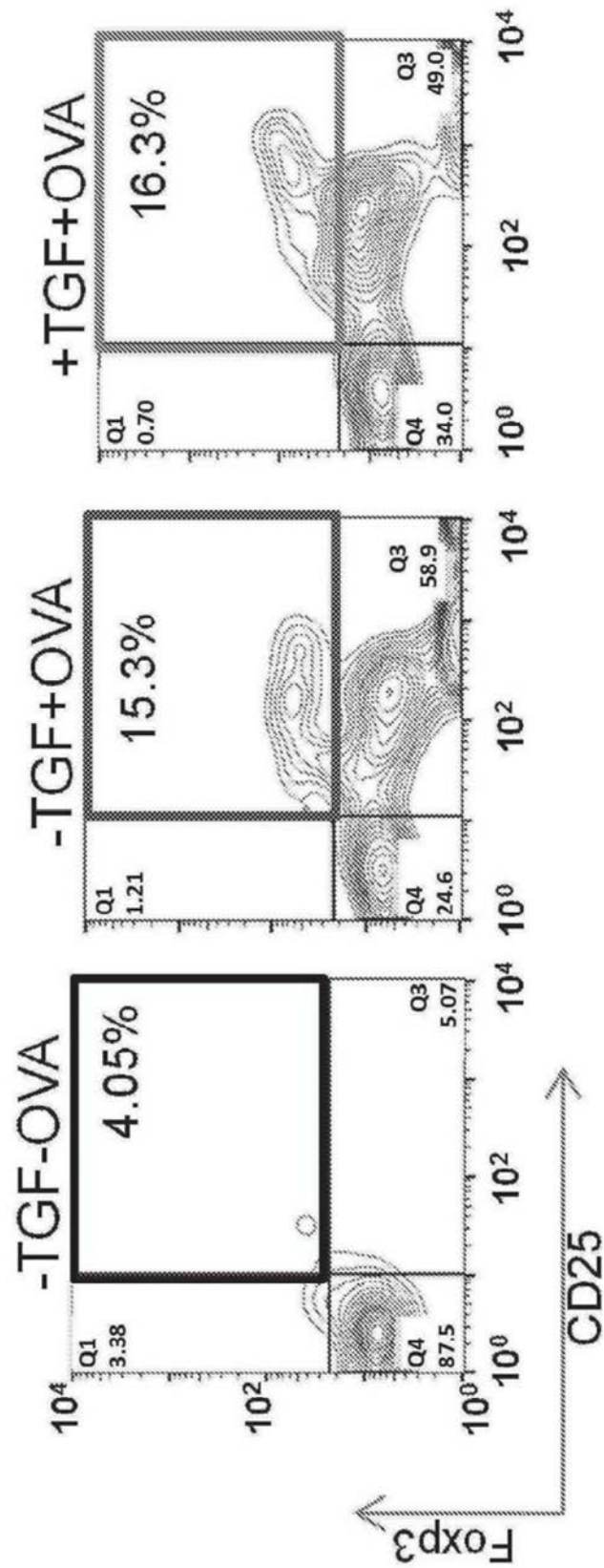


图5G

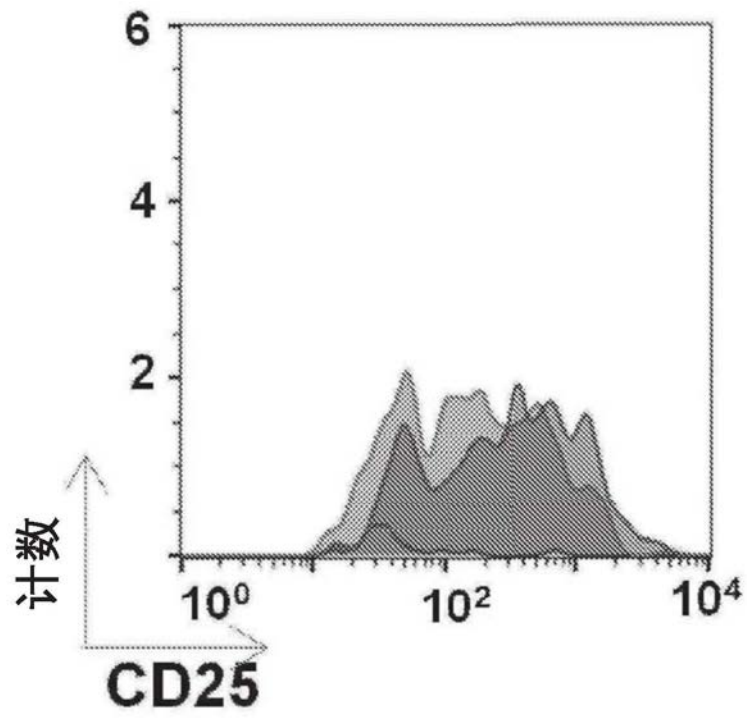


图5H

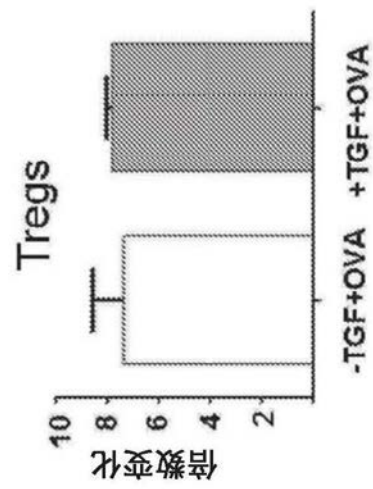


图6A

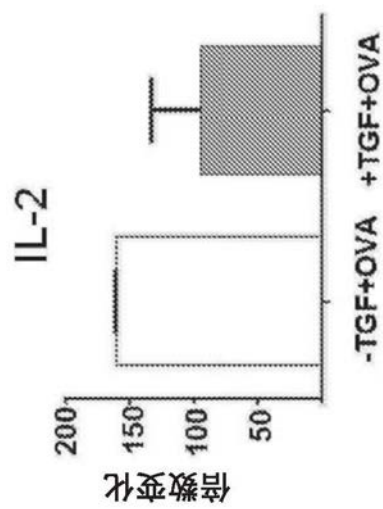


图6B

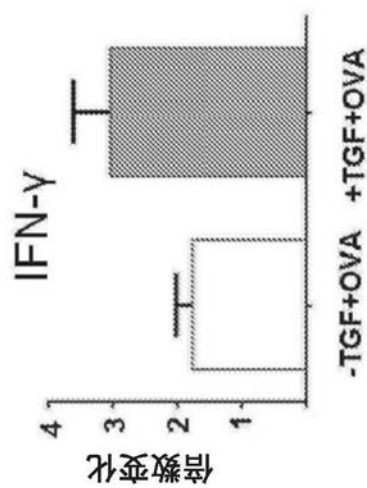


图6C

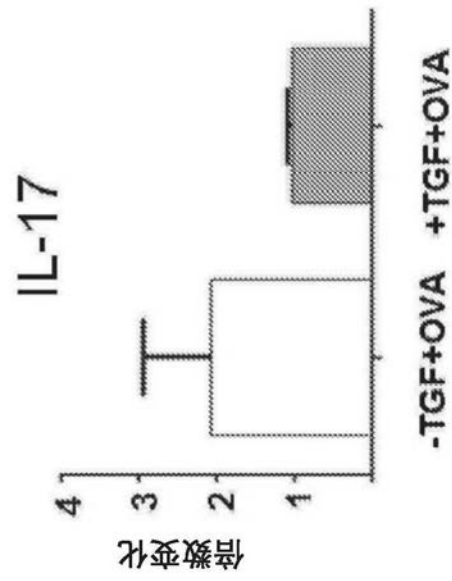


图6D

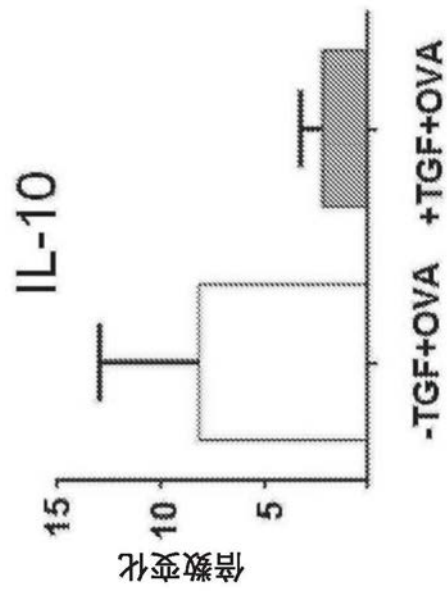


图6E

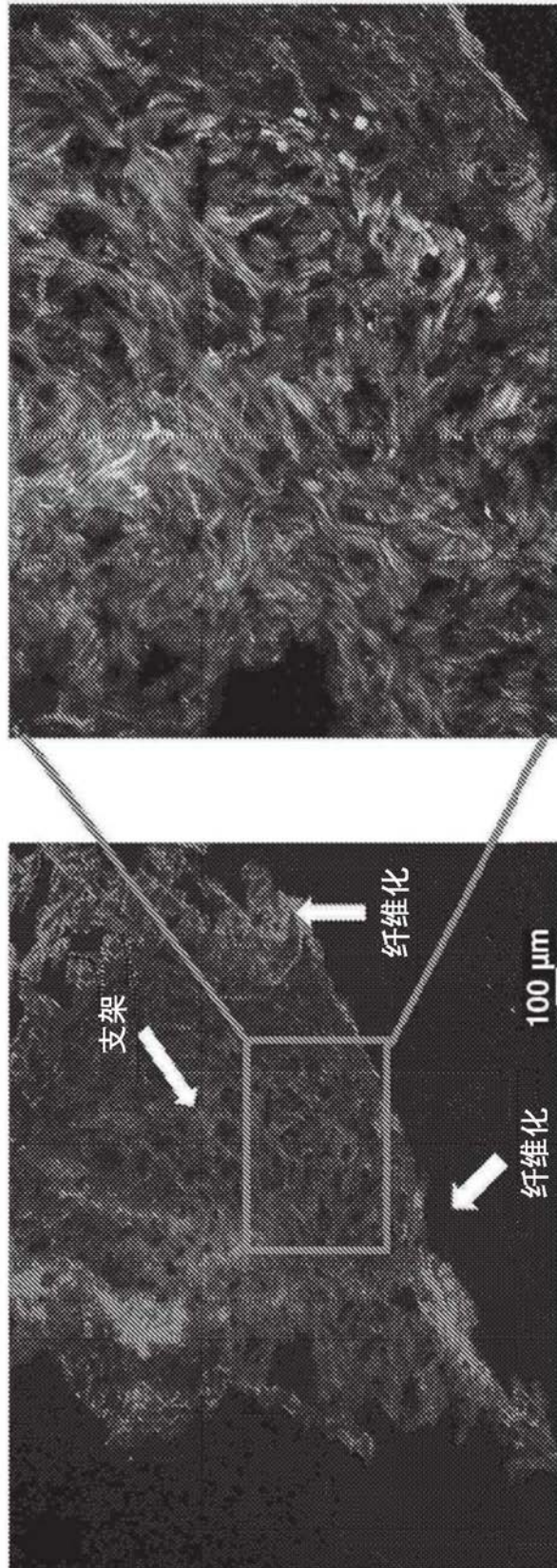


图7A

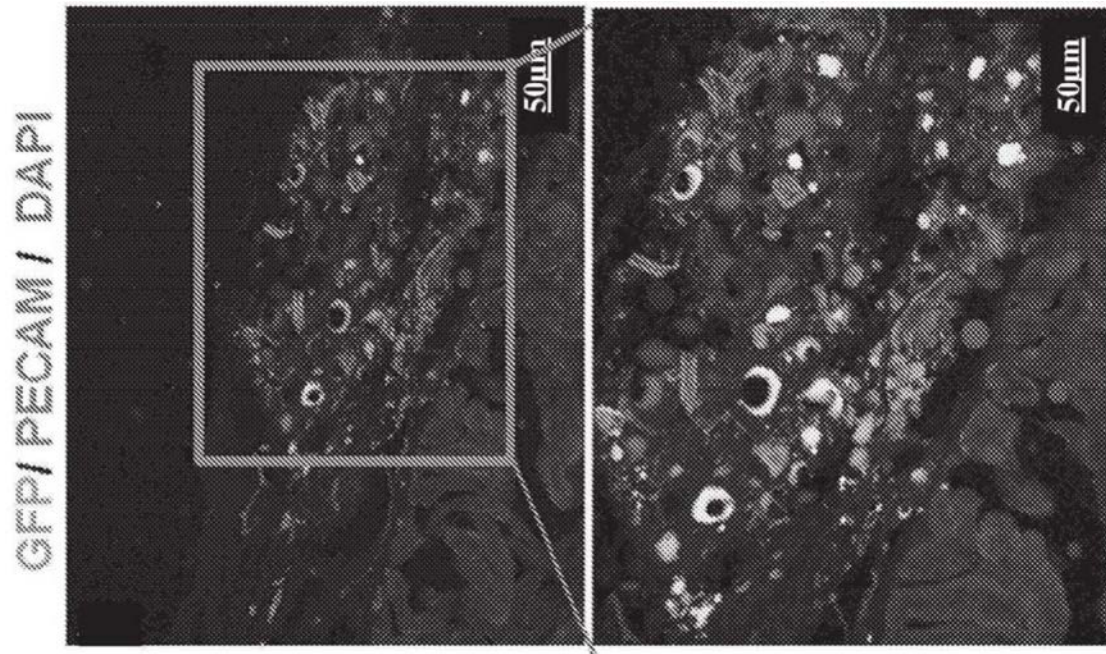


图7B

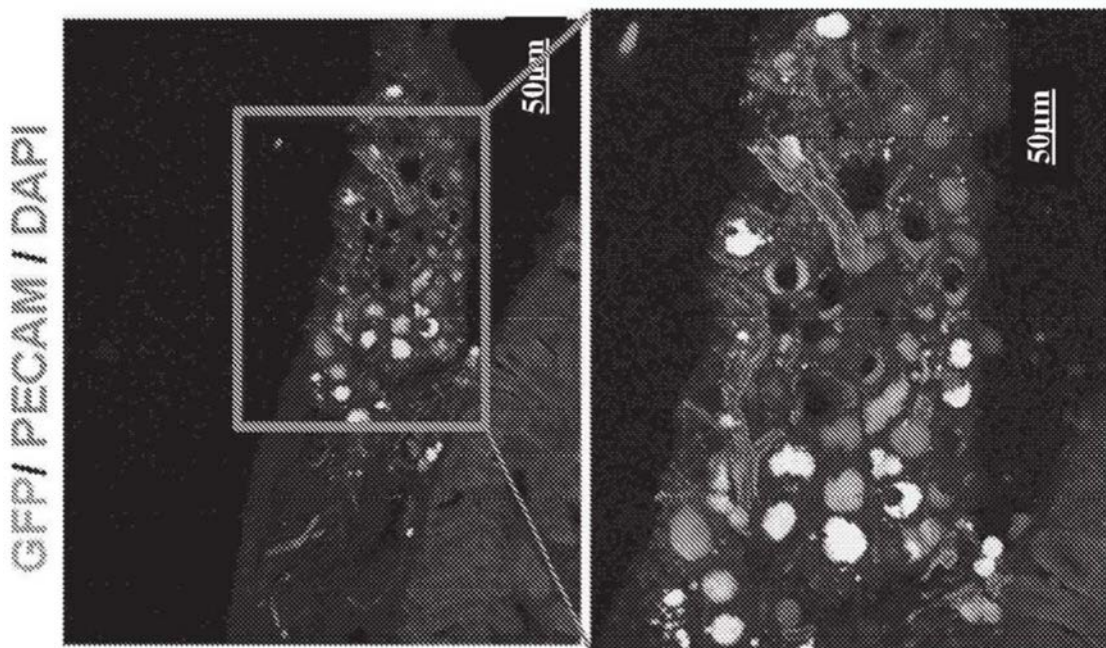


图7C

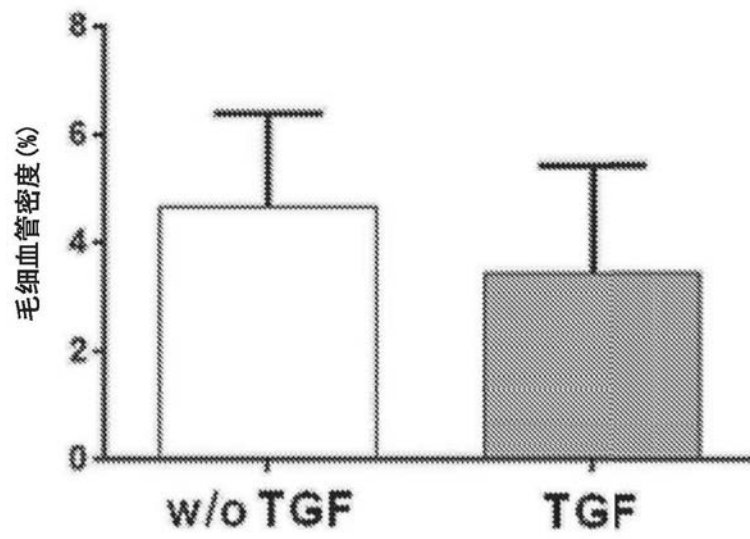


图8

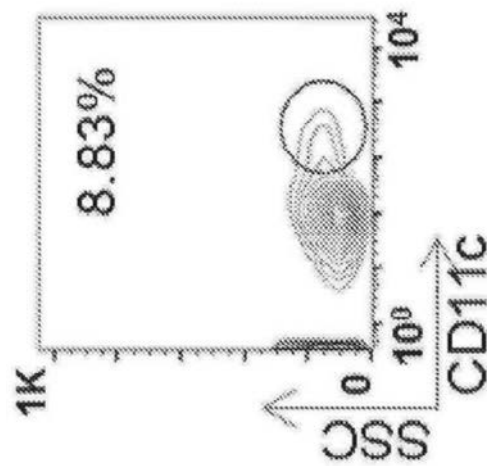


图9A

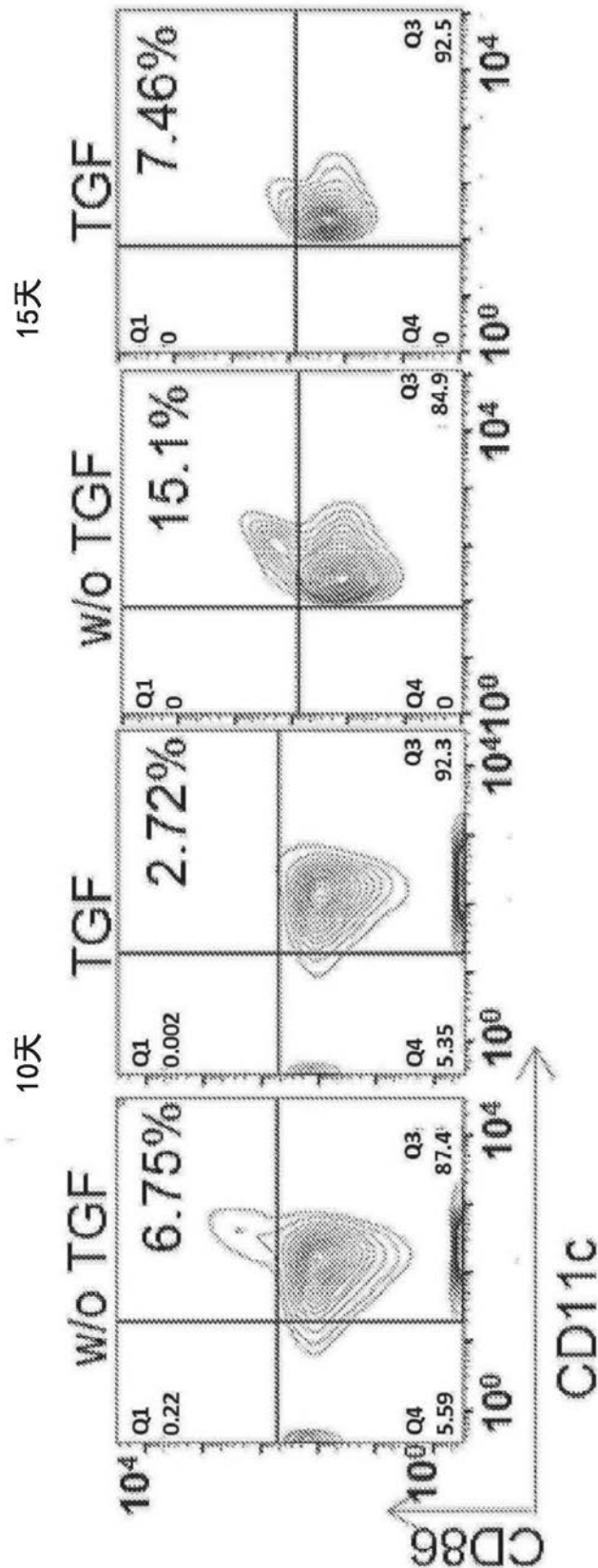


图9B

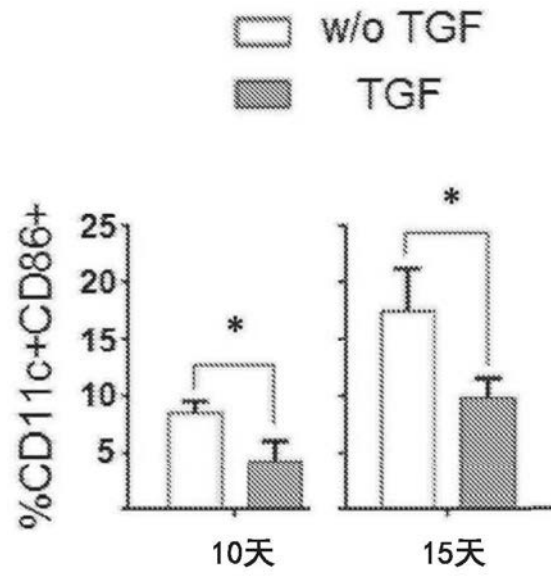


图9C

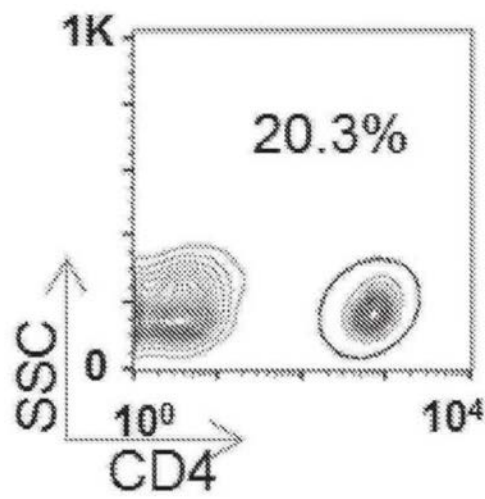


图9D

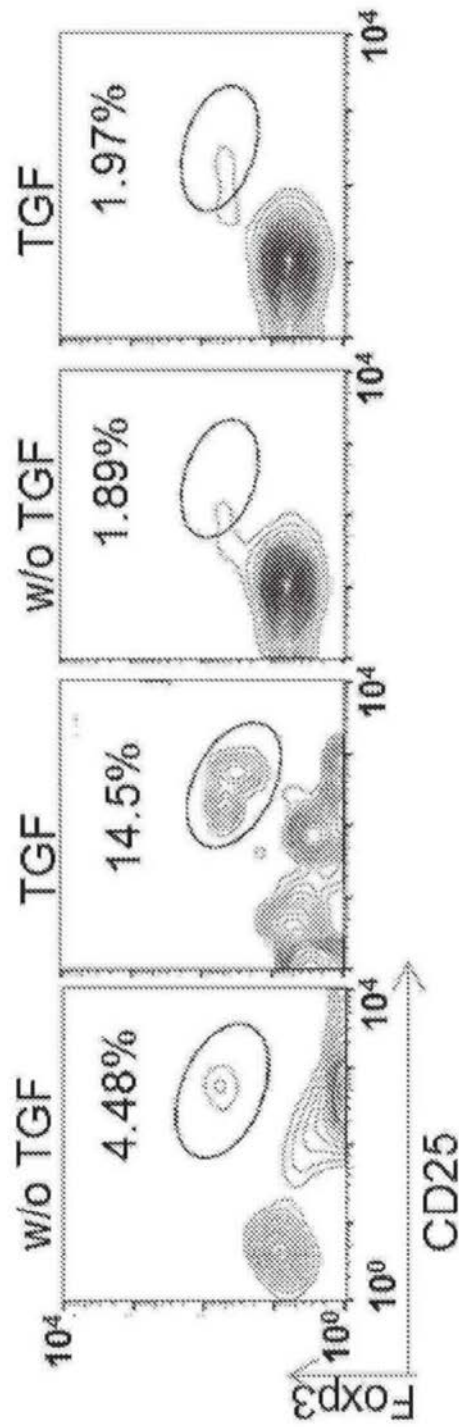


图9E

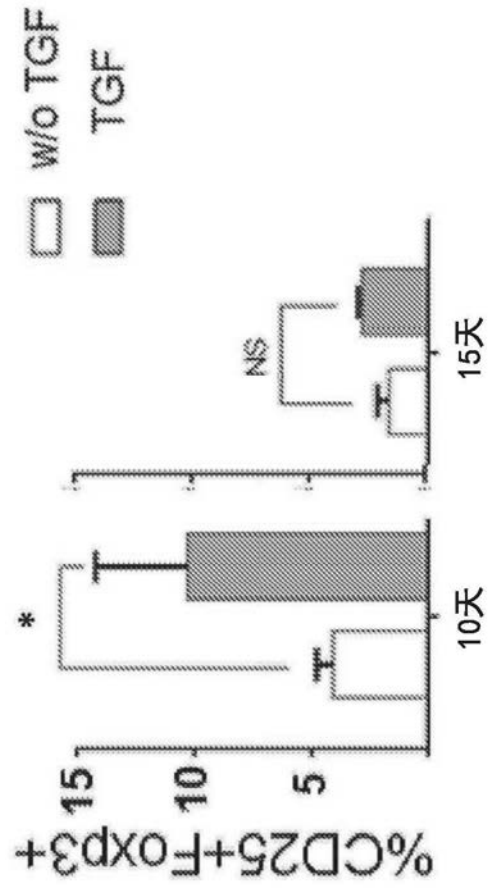


图9F

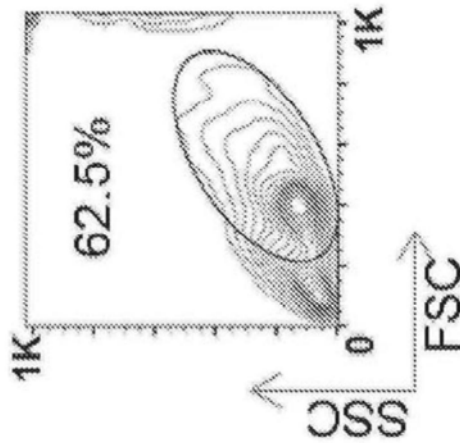


图9G

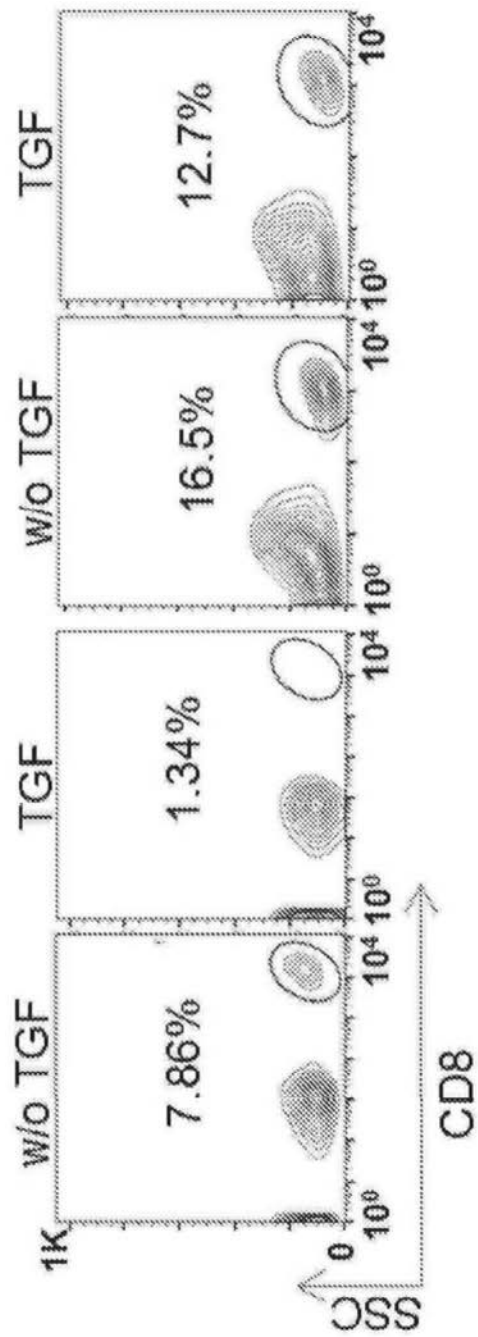


图9H

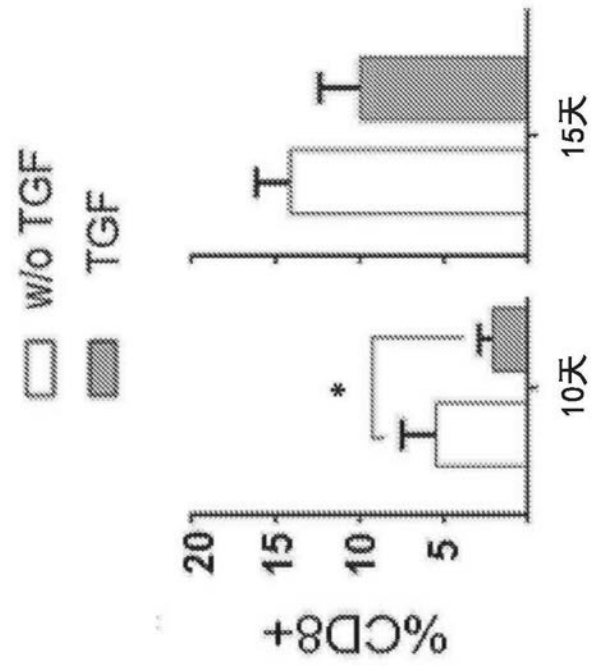


图9I

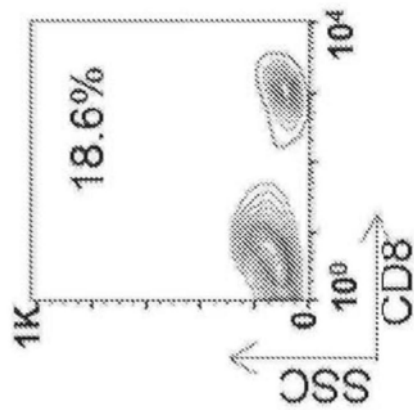


图9J

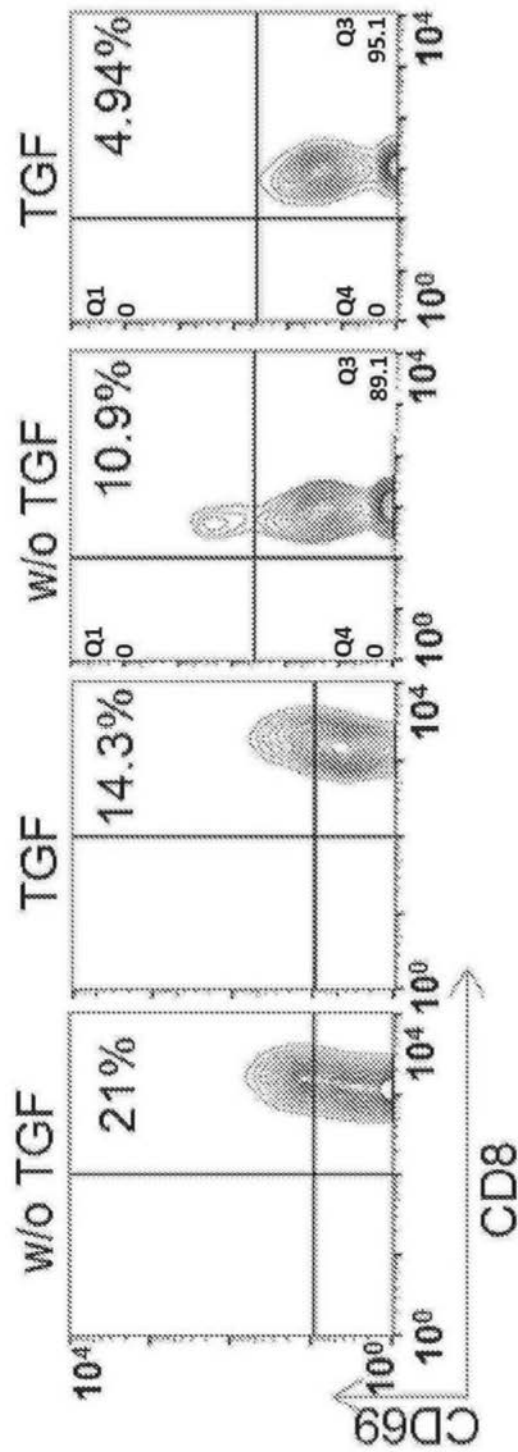


图9K

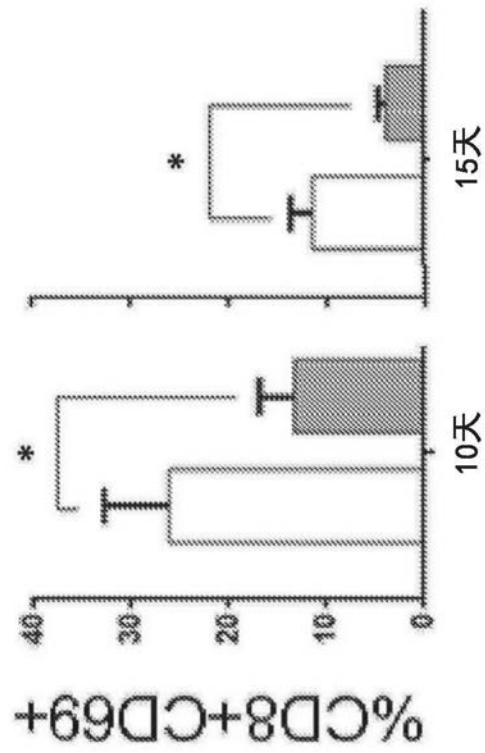


图9L

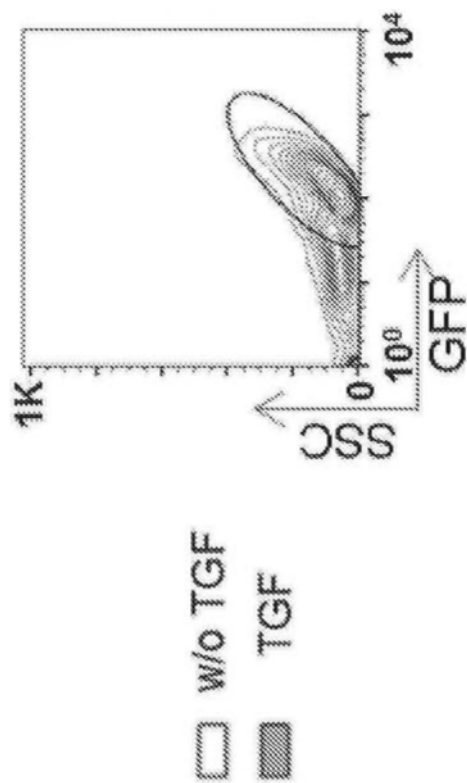


图10A

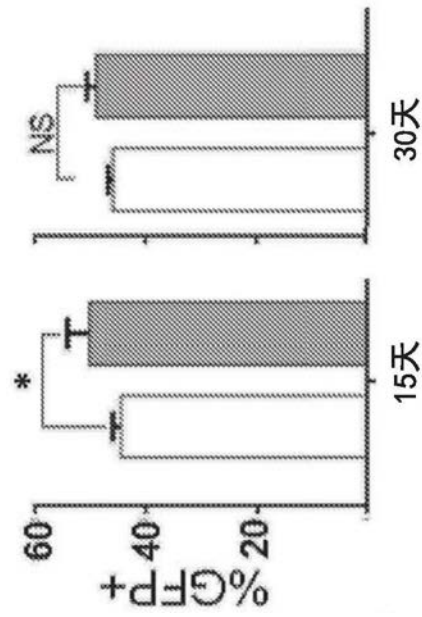


图10B

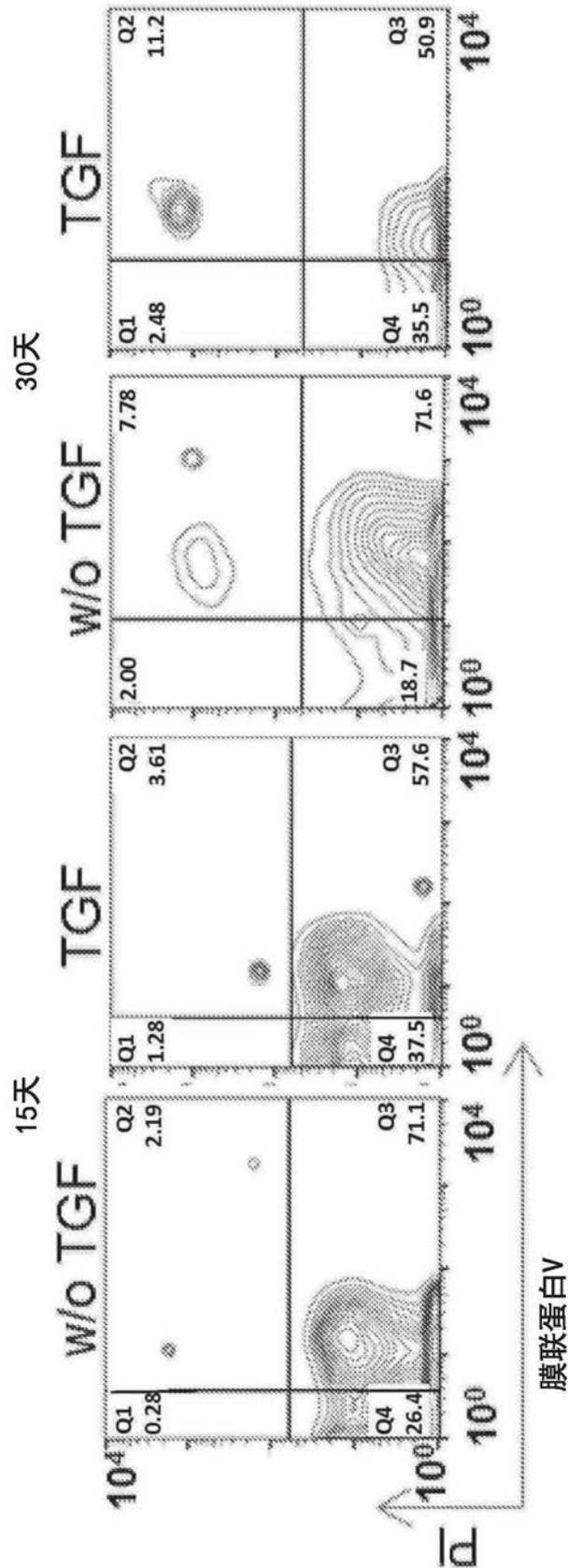


图10C

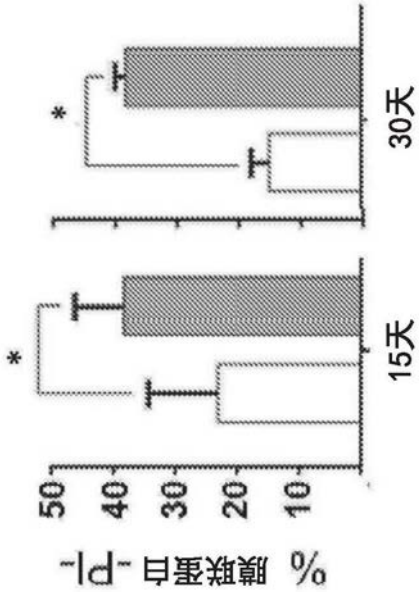


图10D

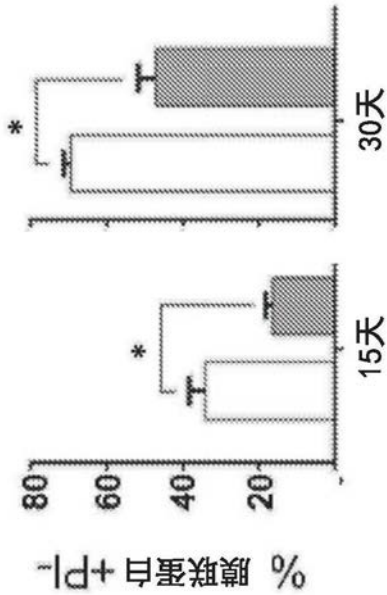


图10E

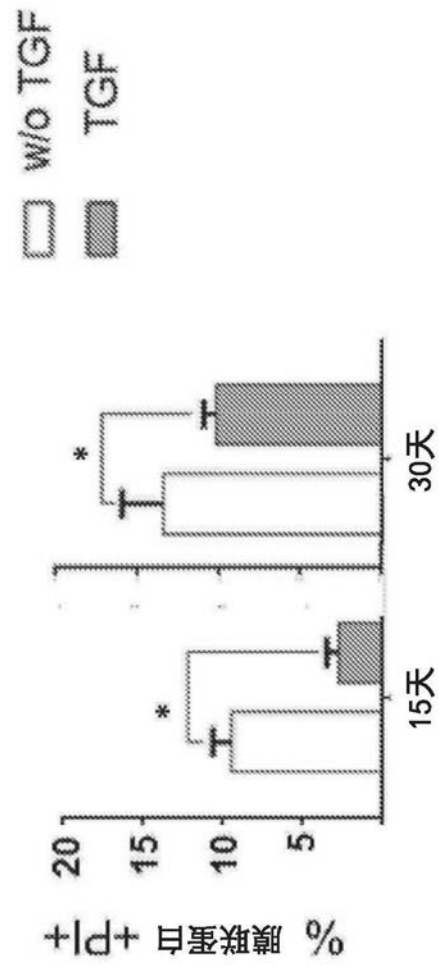


图10F

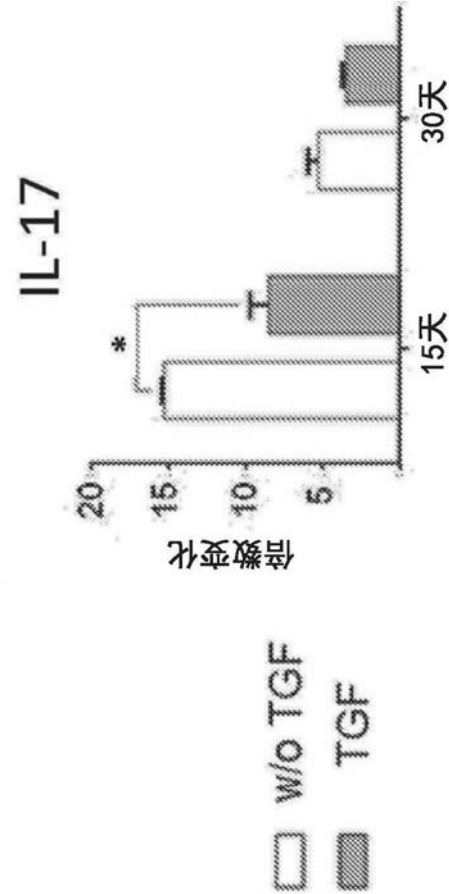


图11A

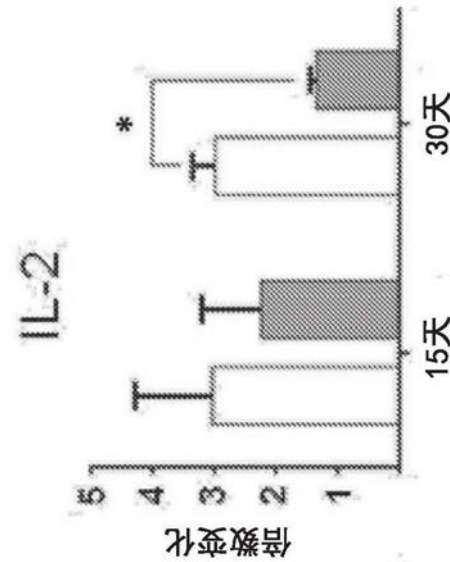


图11B

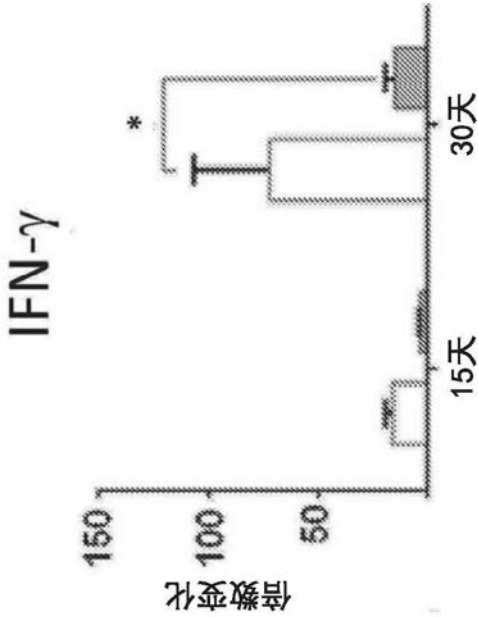


图11C

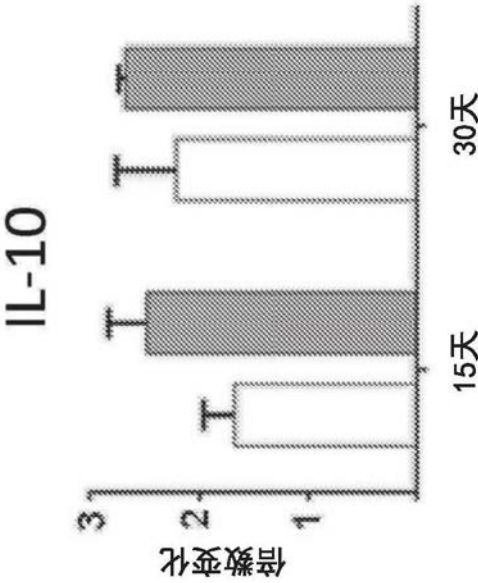


图11D

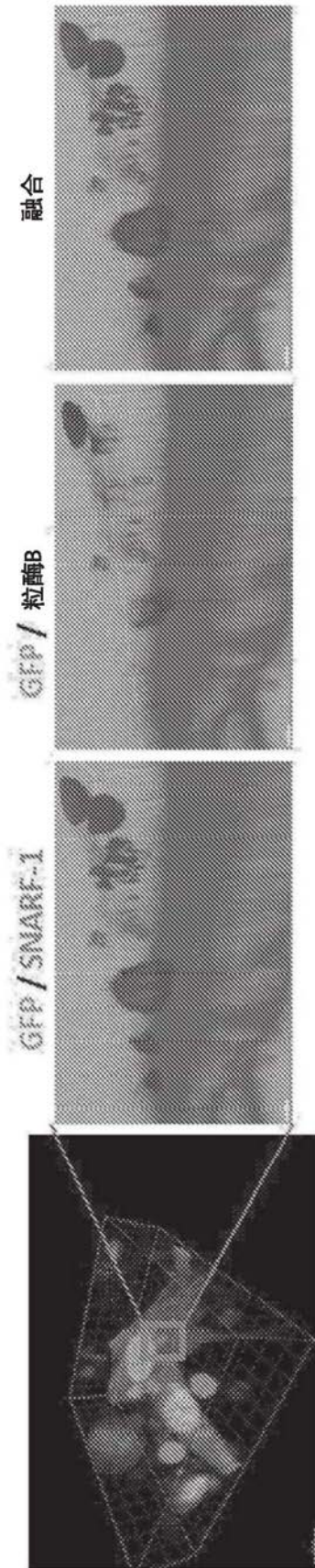


图11E

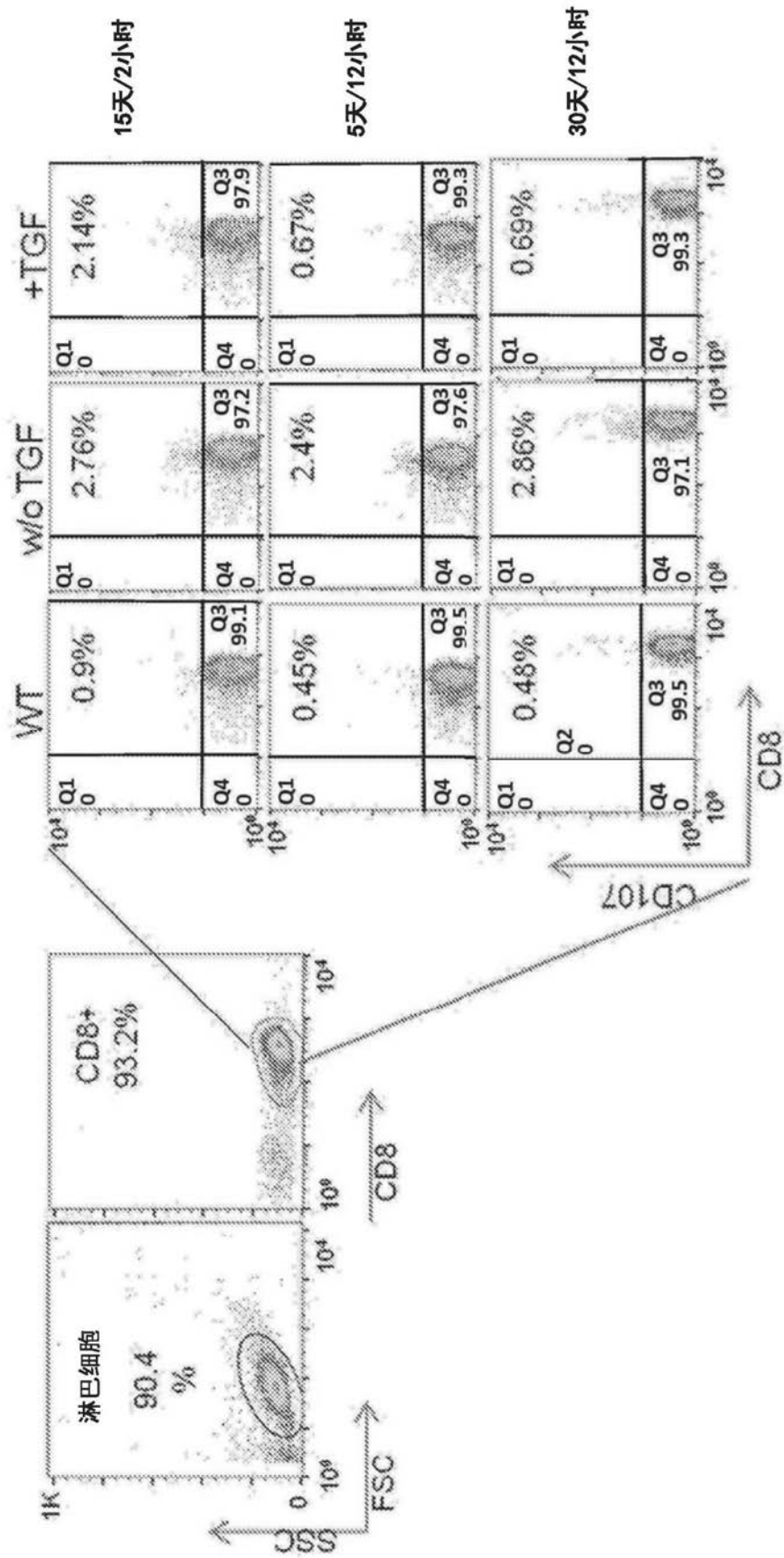


图11F

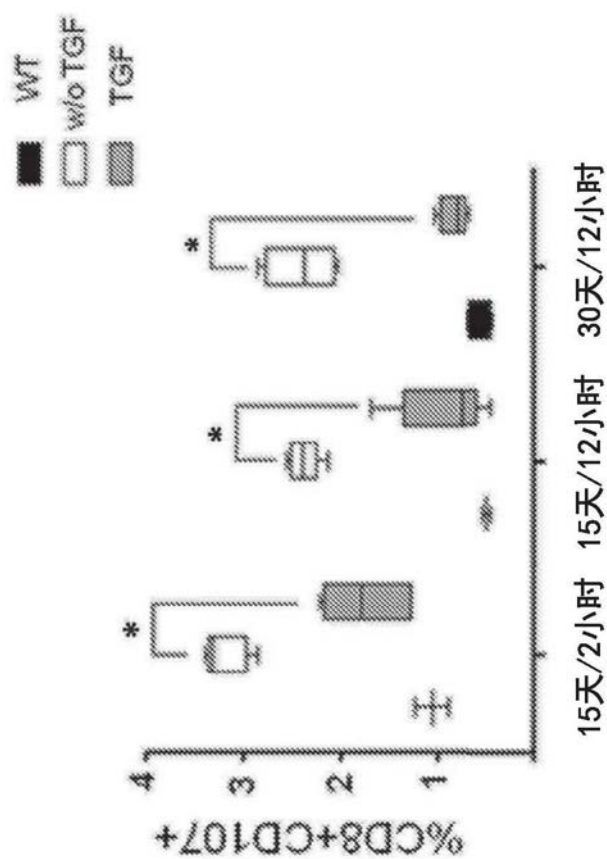


图12A

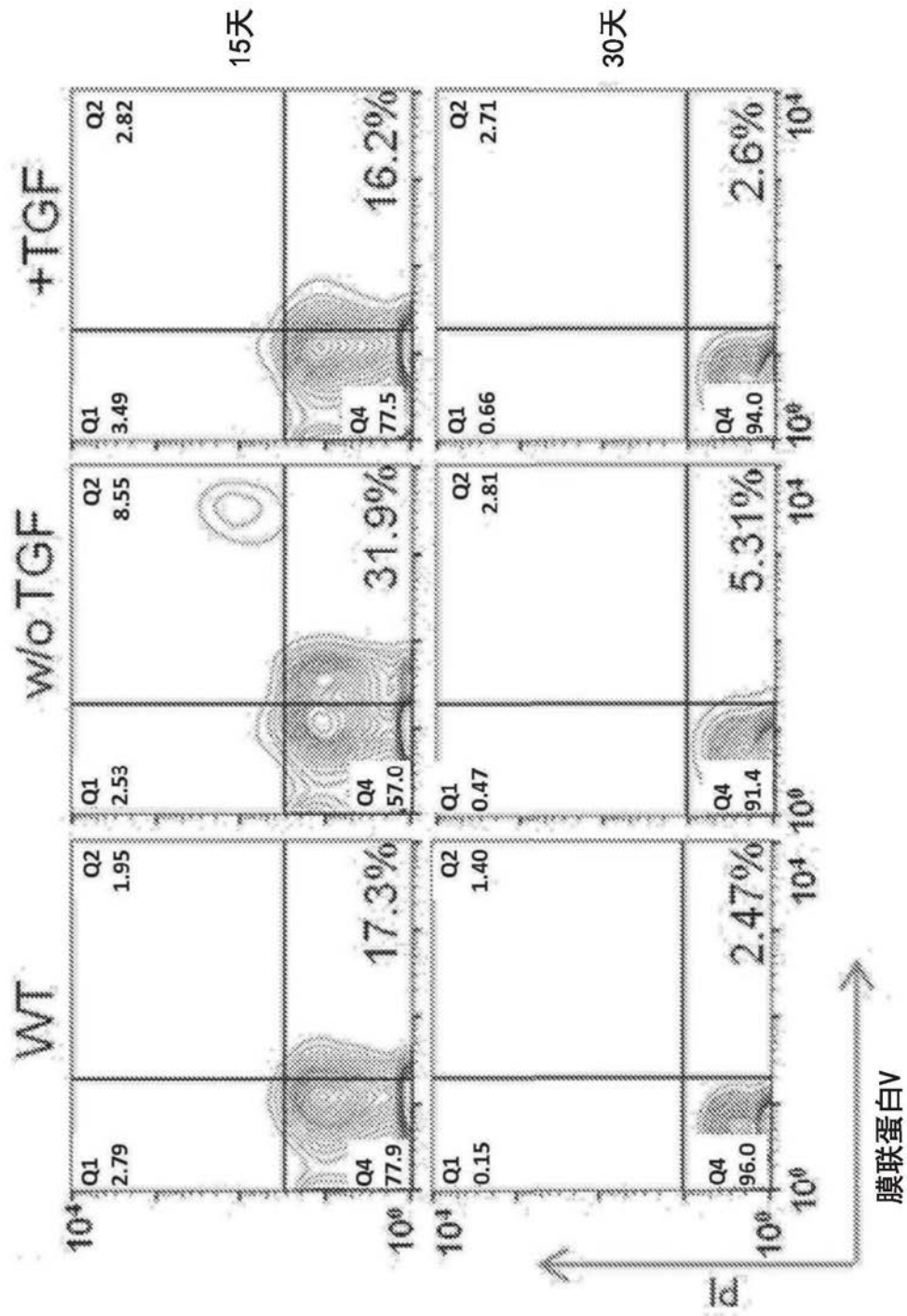


图12B

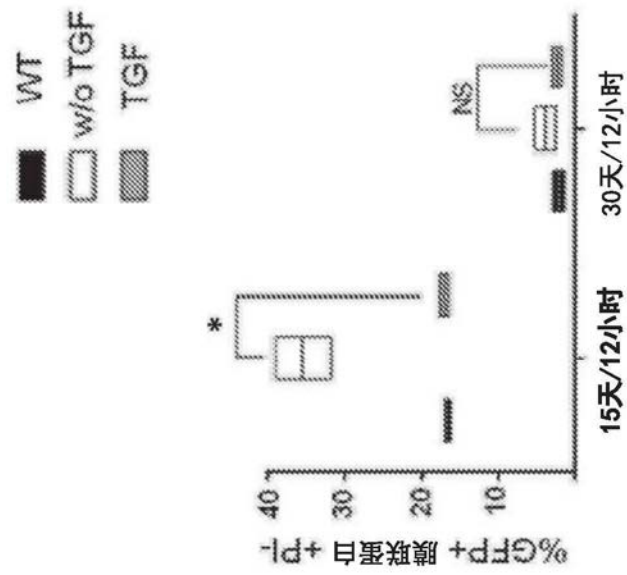


图12C

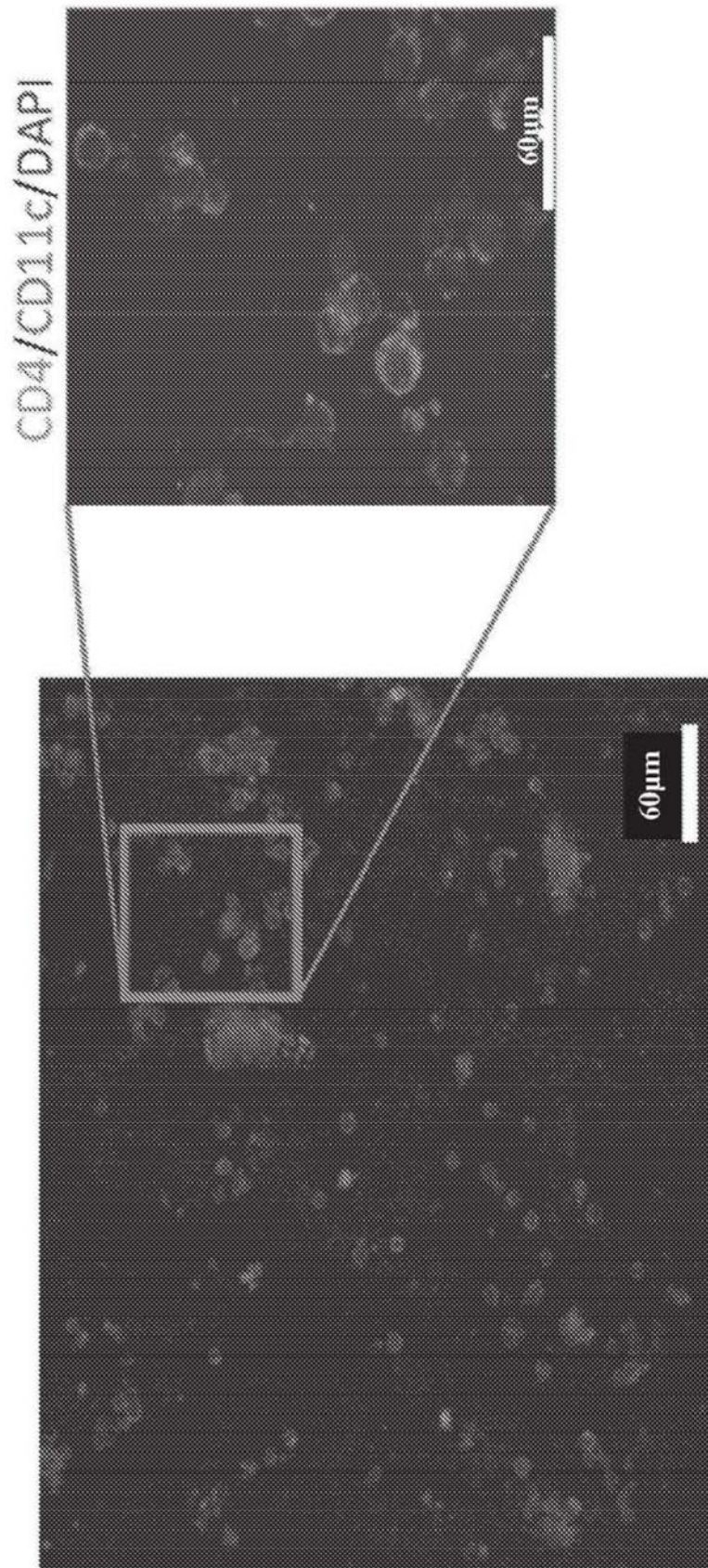


图13A

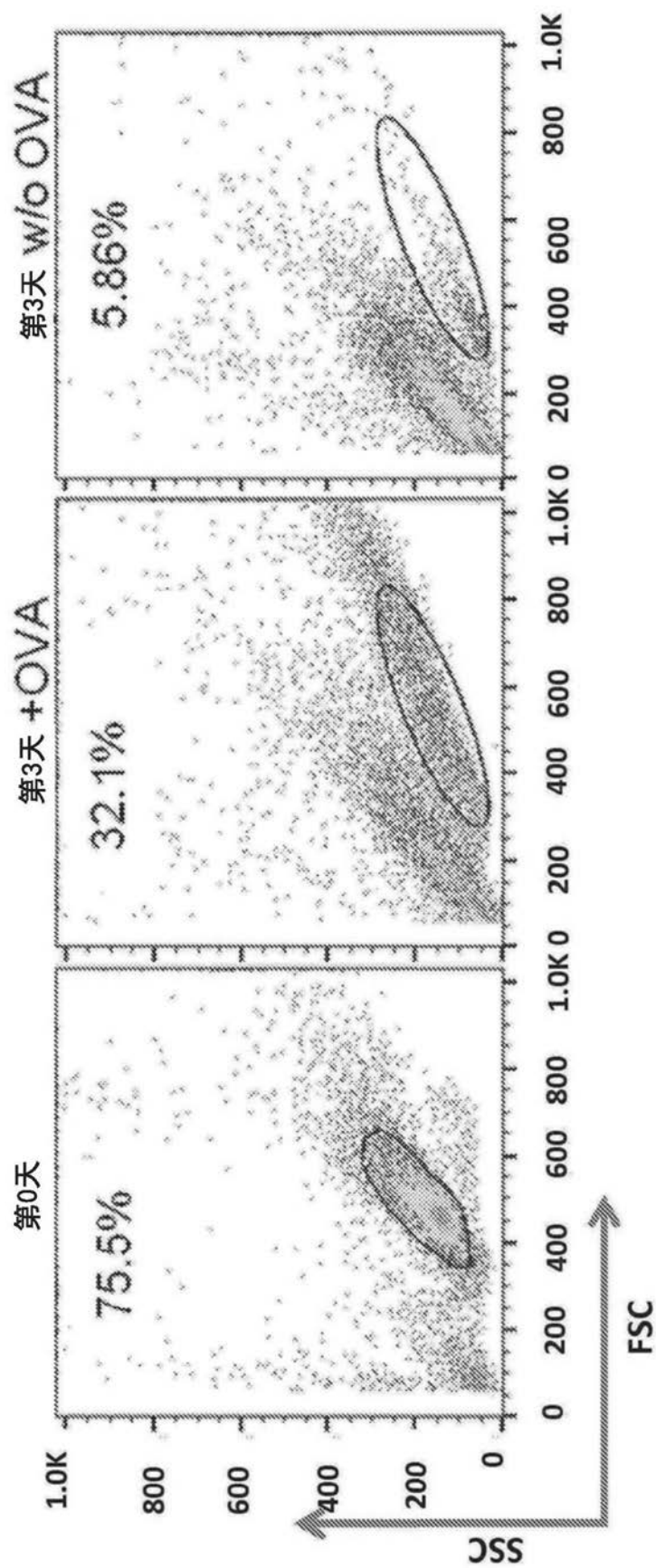
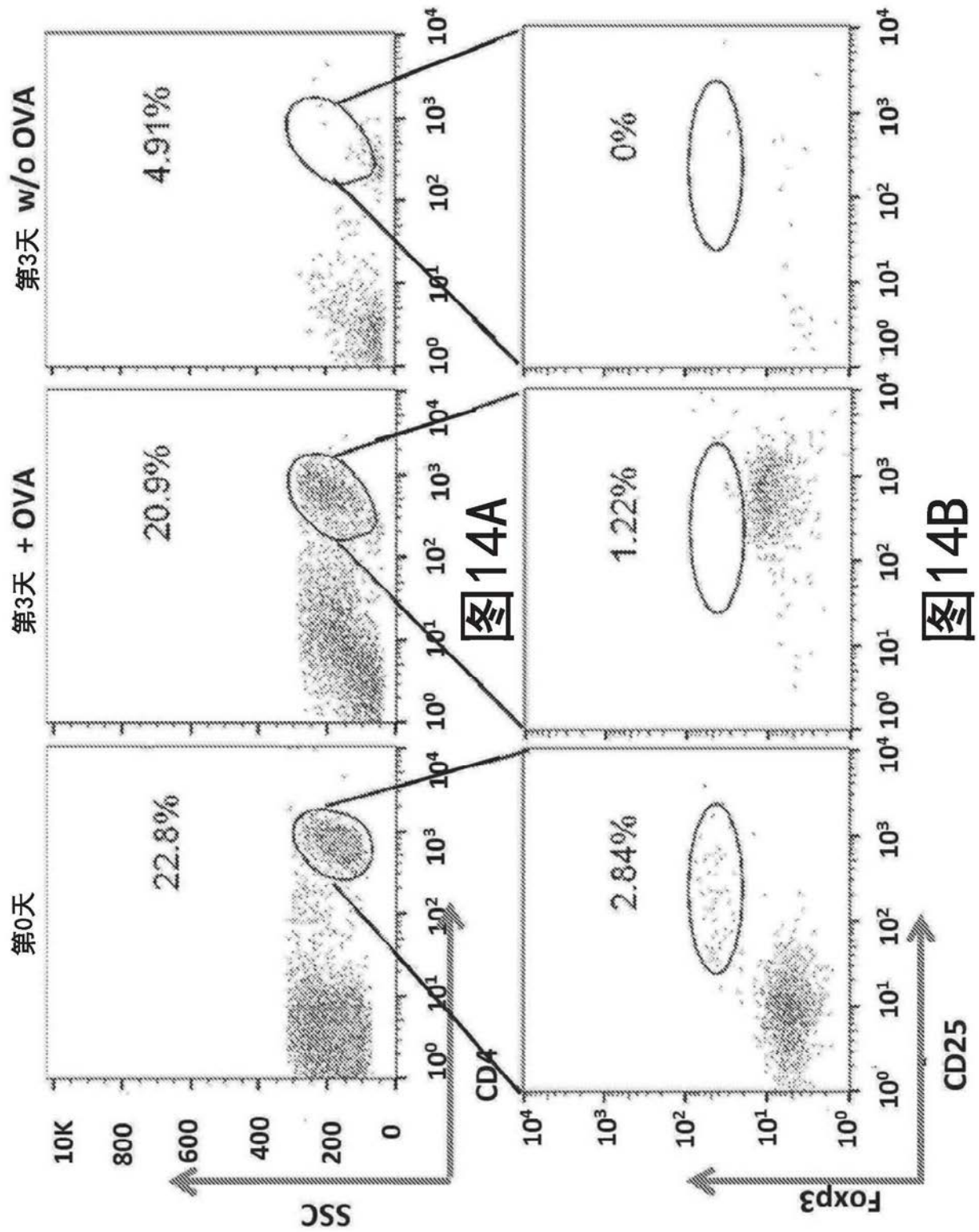


图13B



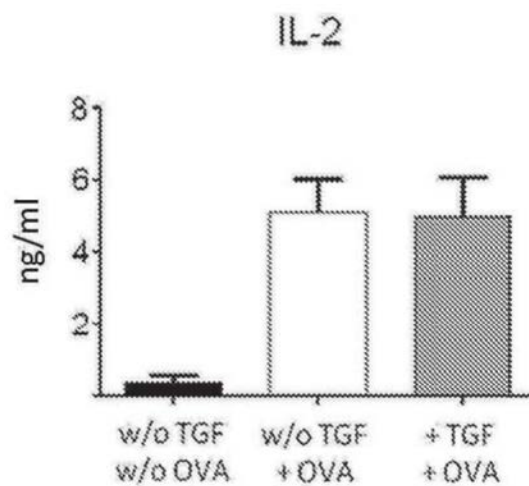


图15A

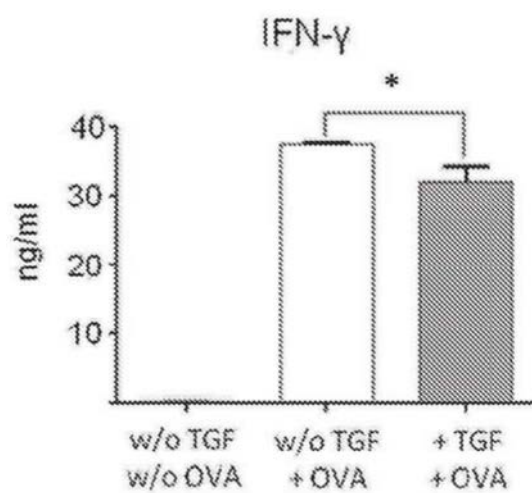


图15B

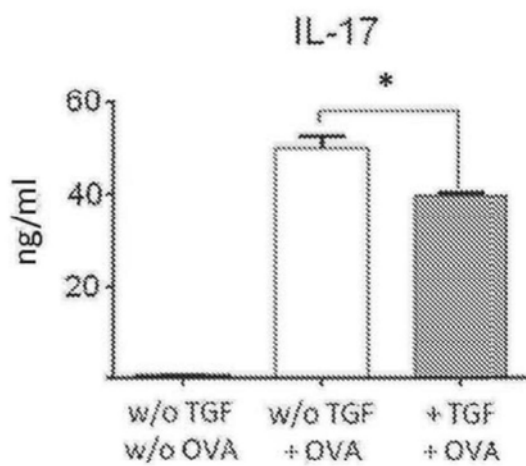


图15C

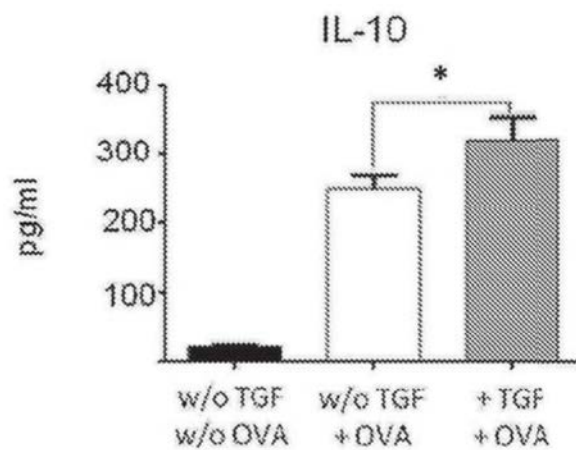


图15D

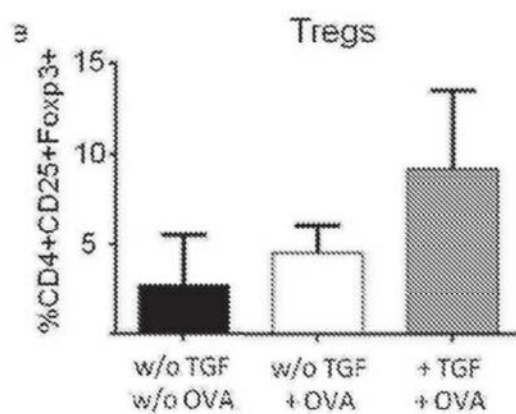


图15E

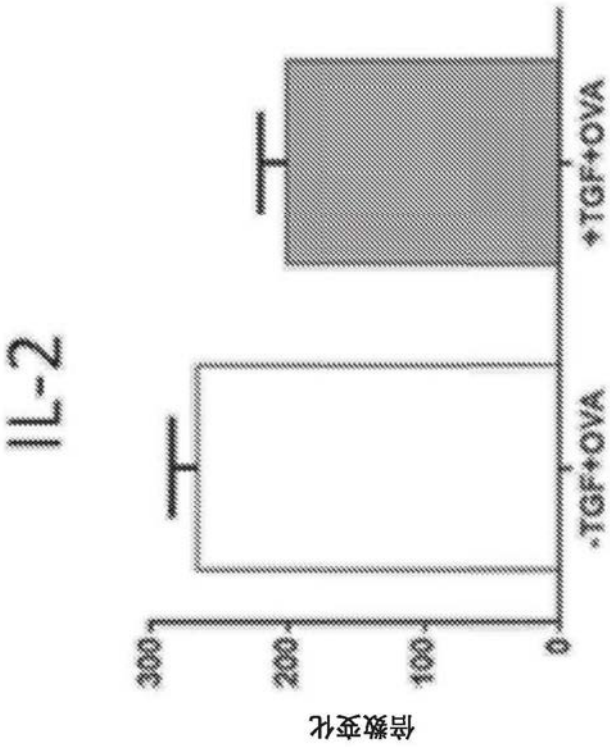


图16A

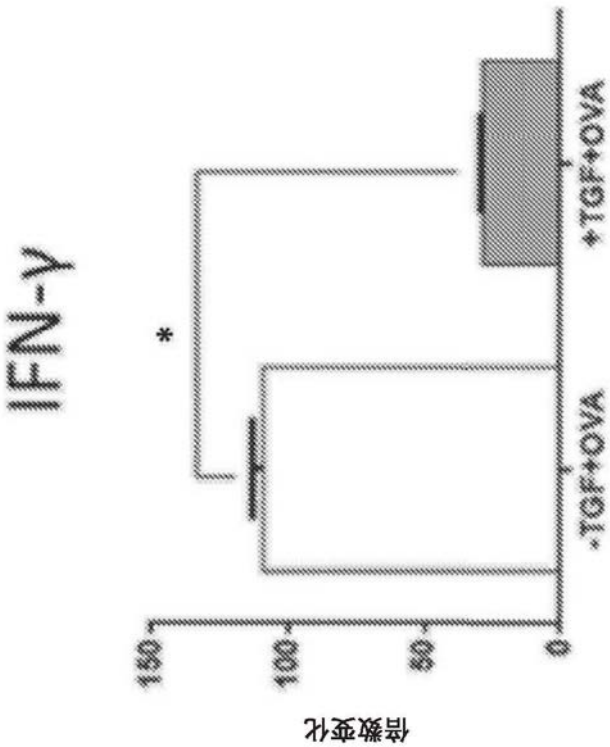


图16B

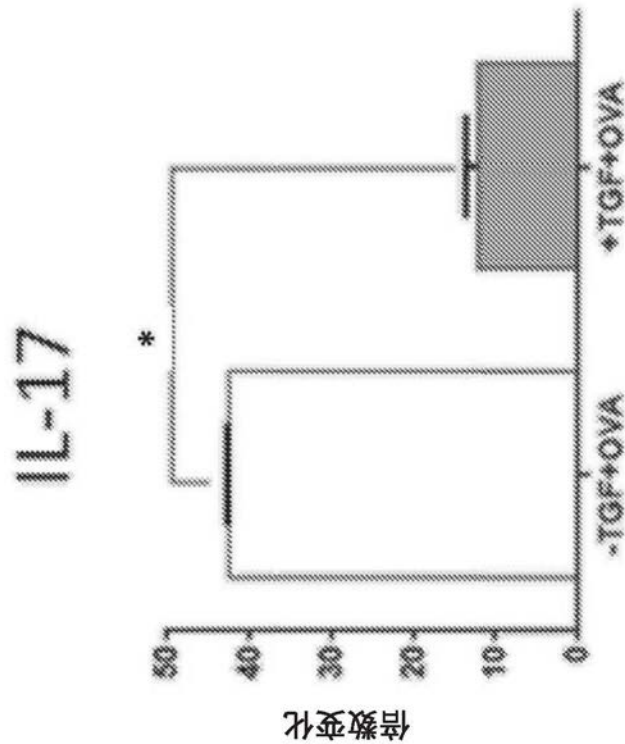


图16C

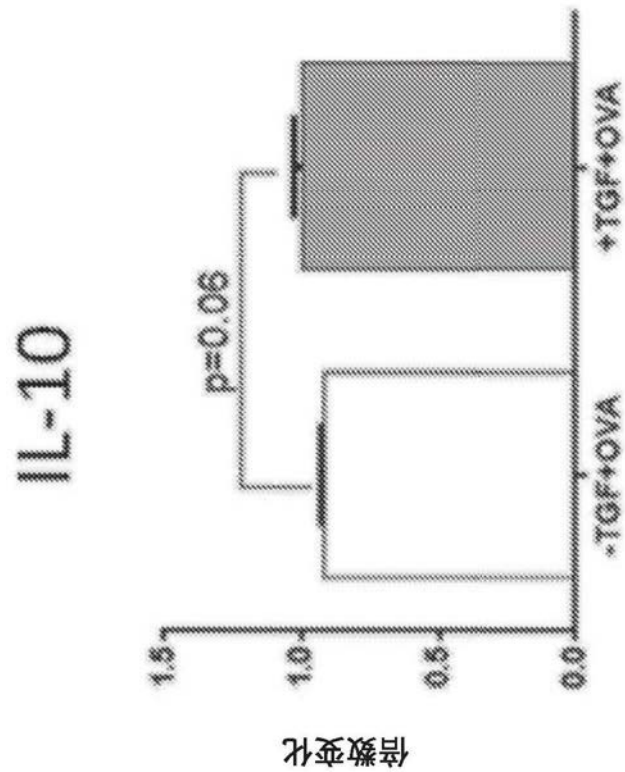


图16D

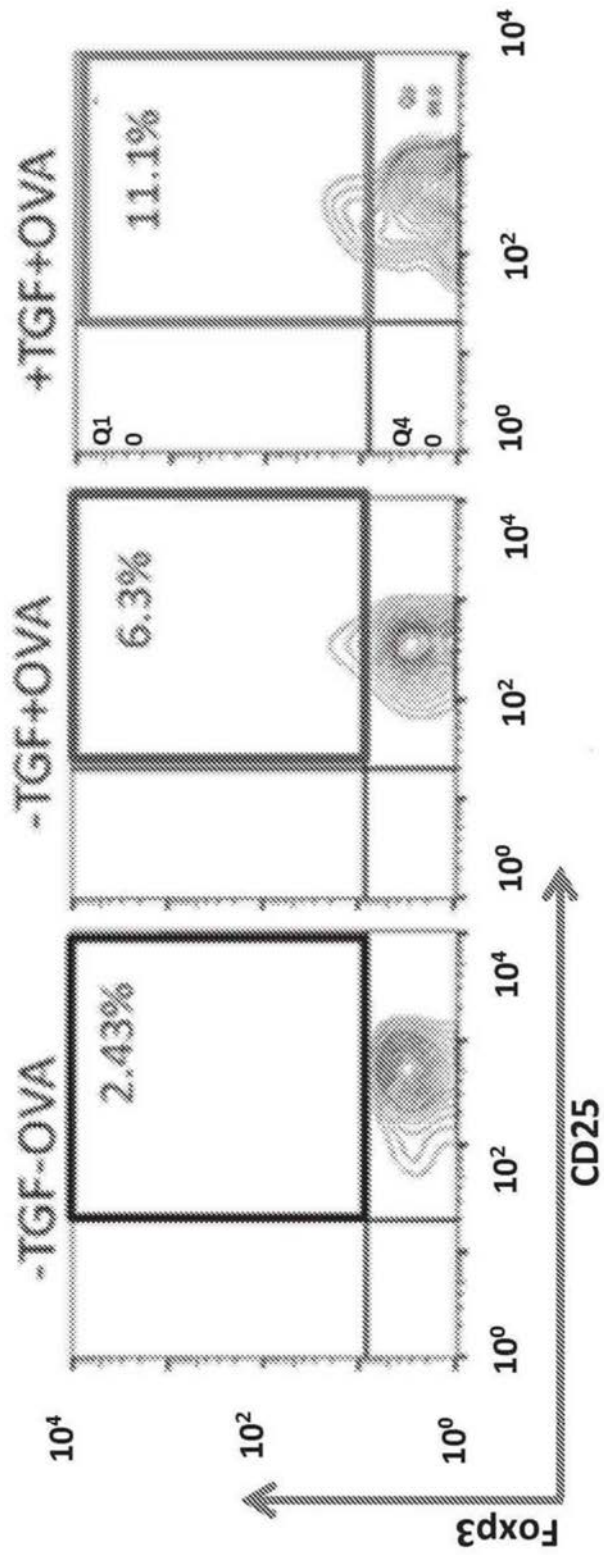


图16E

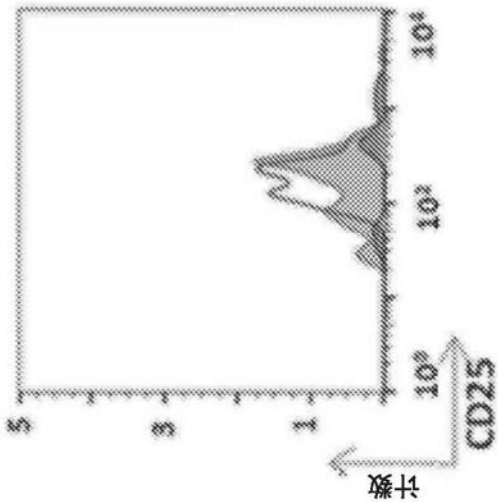


图17A

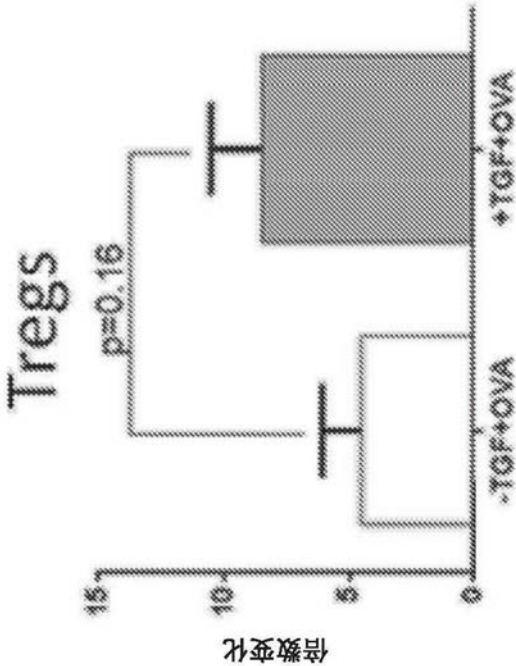


图17B

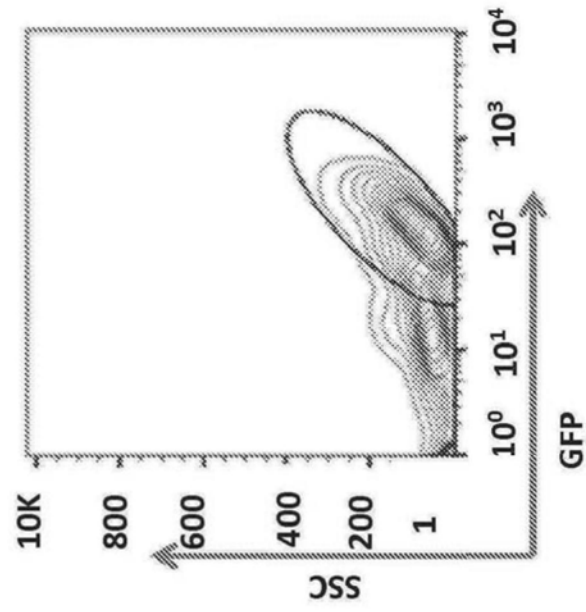


图17C

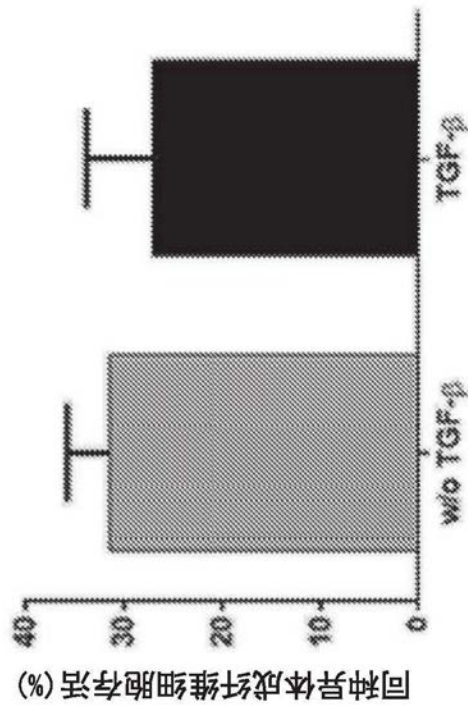


图17D

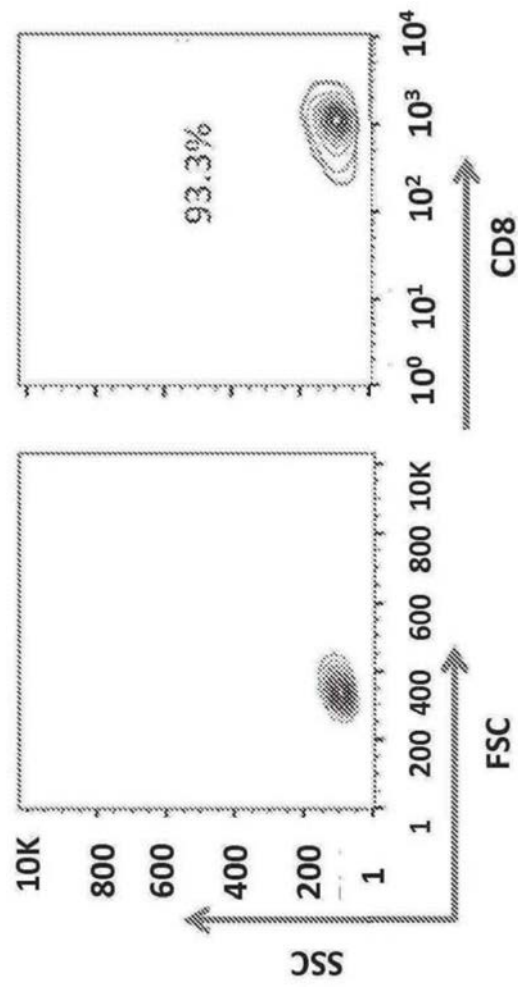


图17E

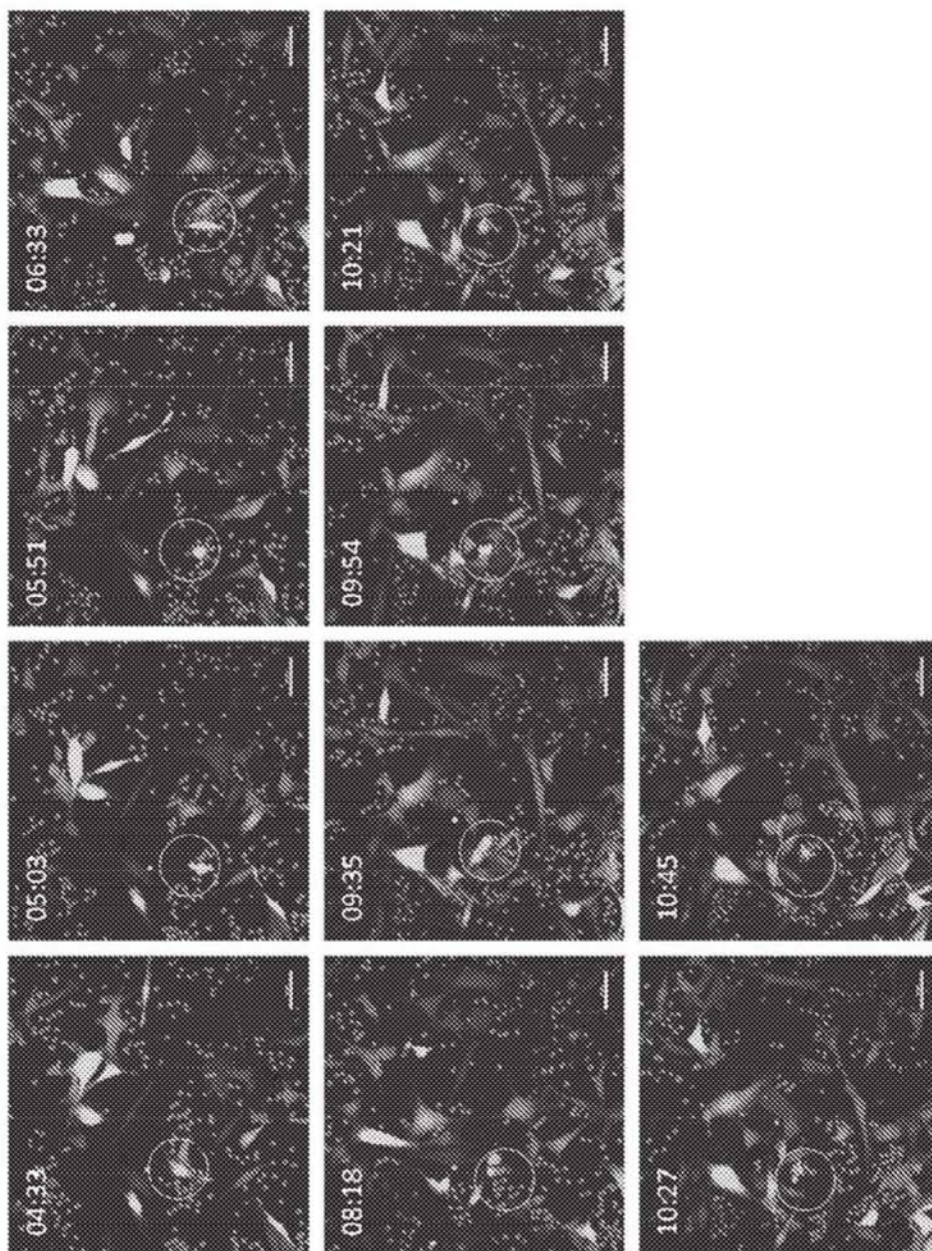


图18