



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105168146 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510351313. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007. 08. 06

A61K 9/16(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/711(2006. 01)

60/835, 742 2006. 08. 04 US

A61K 48/00(2006. 01)

60/864, 914 2006. 11. 08 US

A61P 3/10(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200780028951. 8 2007. 08. 06

(71) 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯特医疗保健股份有限公司

高等教育联邦体系所属匹兹堡大学

(72) 发明人 拉里·R·布朗

尼克·吉安努卡基斯

金伯利·A·吉利斯

(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

权利要求书1页 说明书9页

序列表1页 附图16页

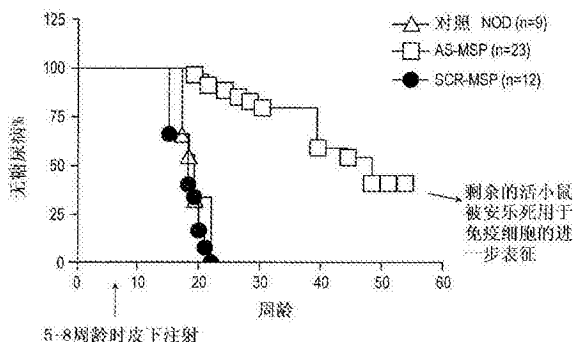
(54) 发明名称

预防和 / 或逆转新发自身免疫糖尿病的基于微球的组合物

(57) 摘要

本发明涉及预防和 / 或逆转新发自身免疫糖尿病的基于微球的组合物。具体地, 本发明采用微球形式投送 AS- 寡核苷酸以诱导树突状细胞耐受, 特别是在非肥胖型糖尿病 (NOD) 小鼠模型中。微球结合了反义 (AS) 寡核苷酸。方法包括使用反义方法在 NOD 小鼠中体内逆转自身免疫糖尿病病症。寡核苷酸被定向结合于初级转录物 CD40、CD80、CD86 以及它们的组合。

1次MSP注射治疗的NOD小鼠的存活



1. 含有寡核苷酸的微球在制备用于逆转哺乳动物 1 型糖尿病的药物中的应用, 所述哺乳动物显示糖尿病症状, 其中所述寡核苷酸与选自 CD40、CD80 和 CD86 初级转录物的初级转录物及其组合是反义的并与它们定向结合, 其中所述药物每周施用两次。

2. 权利要求 1 的应用, 其中所述寡核苷酸选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 及其组合。

3. 权利要求 1 的应用, 其中所述药物使得所述哺乳动物的血糖水平与所述哺乳动物在施用所述组合物前的血糖水平相比正常化。

4. 权利要求 1 的应用, 其中所述微球含有与 CD40、CD80 和 CD86 初级转录物是反义的并与它们定向结合的寡核苷酸。

5. 权利要求 1 的应用, 其中所述药物的施用引起所述哺乳动物的 β 细胞群的再生。

6. 权利要求 1 的应用, 其中所述药物为可注射的组合物。

7. 权利要求 1 的应用, 其中所述药物与胰岛素组合施用。

8. 权利要求 7 的应用, 其中所述胰岛素在所述药物施用之前、同时或之后施用。

9. 权利要求 1 的应用, 其中所述微球的 70% w/w 或更多是寡核苷酸。

10. 权利要求 9 的应用, 其中所述微球药物中反义 CD40: 反义 CD80: 反义 CD86 的比率是 1:1:1。

预防和 / 或逆转新发自身免疫糖尿病的基于微球的组合物

[0001] 本申请是国际申请日 2007 年 8 月 6 日、国际申请号 PCT/US2007/075292 于 2009 年 2 月 3 日进入中国国家阶段、申请号 200780028951.8、发明名称“预防和 / 或逆转新发自身免疫糖尿病的基于微球的组合物”的申请的分案申请。

[0002] 发明描述

[0003] 本申请要求 2006 年 8 月 4 日提交的美国临时申请 No. 60/835,742 和 2006 年 11 月 8 日提交的美国临时申请 No. 60/864,914 的优先权。上述各申请的全部内容在此引入作为参考。

[0004] 发明背景

[0005] 总的来说,本公开涉及在 NOD 小鼠中预防和 / 或逆转自身免疫糖尿病病症的反义方法。这包括通过注射微球投送 AS- 寡核苷酸以获得引起负调节活性的治疗效果,具体是在非肥胖型糖尿病 (NOD) 小鼠模型中。微球使用完全水性的条件制造,该微球中结合有一种或多种反义 (AS) 寡核苷酸。

[0006] 微粒、微球和微囊是固体或半固体的颗粒,其直径小于 1 毫米,也可以小于 100 微米,它们可以由各种不同的材料形成,包括合成聚合物、蛋白和多糖。微球已经被用于许多不同的应用中,主要是分离、诊断和药物投送。

[0007] 有许多不同的技术可用于从合成聚合物、天然聚合物、蛋白和多糖制造这些颗粒,包括相分离、溶剂蒸发、乳化和喷雾干燥。一般来说,聚合物形成这些微球的支撑结构,而目标药物结合在聚合物结构中。用于形成微球的示例性聚合物包括在 Ruiz 等的美国专利 No. 5,213,812、Reid 等的美国专利 No. 5,417,986、Tice 等的美国专利 No. 4,530,840、Tice 等的美国专利 No. 4,897,268、Tice 等的美国专利 No. 5,075,109、Singh 等的美国专利 No. 5,102,872、Boyes 等的美国专利 No. 5,384,133、Tice 等的美国专利 No. 5,360,610、以及南方研究所 (Southern Research Institute) 的欧洲专利申请公布 No. 248,531 中描述的乳酸和乙醇酸的均聚物或共聚物 (PLGA); 在 Illum 的美国专利 No. 4,904,479 中描述的嵌段共聚物例如 Tetronic® 908 和泊洛沙姆 (poloxamer) 407; 以及在 Cohen 等的美国专利 No. 5,149,543 中描述的聚磷腈。使用例如这些聚合物生产的微球表现出荷载效率差,通常仅能在聚合物结构中结合少量百分比的目标药物。因此,为了获得疗效,通常必须施用相当大量的这些类型的微球。此外,这些聚合物一般是疏水性的,对目标药物的溶解有负性影响。在这种情况下使用的典型聚合物包括聚乳酸乙醇酸 (PLGA)。

[0008] 医疗团体的目标是将核酸投送到动物细胞中以治疗各种疾病,包括糖尿病。在许多方法中,通过加入转染剂,能够相对有效地将核酸投送到培养细胞中 (体外)。此外,在体内,当给动物投送核酸时,内源核酸酶的存在将导致核酸高速降解。

[0009] 除了保护核酸免受核酸酶消化之外,核酸投送载体还必需表现出低毒性,必须被细胞有效摄取,并且具有定义明确的、容易制造的配方。临床试验中显示,用于投送的病毒载体在体内能导致严重的不利、甚至是致命的免疫应答。此外,这种方法有可能在体内有致突变效应。通过将核酸复合在不同配方的脂质复合物 (例如脂质体或阳离子脂质复合物)

中进行投送,可能具有有毒的效应。核酸与各种聚合物或与肽的复合物显示出不一致的结果,并且这些配方的毒性还没有解决。核酸还已经被包裹在聚合物基质中进行投送,但是在这些情况下颗粒的粒度范围广,并且治疗性应用的有效性还没有被证实。这些早先的方法能产生与这里所希望的目标相反的效果,包括免疫系统的刺激。例如,当 PLGA 被掺入到颗粒中时,PLGA 的存在刺激了免疫系统。

[0010] 因此,对于解决核酸投送中的问题存在着需求,对于微球的开发和制造微球的新方法有正在发展的需求。关于微球的详细情况,特别是关于它们的制备和性质的详细情况,可以在 Scott 等的美国专利 No. 6, 458, 387, Woiszwilllo 等的美国专利 No. 6, 268, 053、No. 6, 090, 925、No. 5, 981, 719 和 No. 5, 599, 719, Woiszwilllo 的美国专利 No. 5, 578, 709 以及 Brown 等的美国申请公布 No. 2006/0024240 中找到。这些以及所有在本文中指明的参考文献在此引为参考。

[0011] 发明简述

[0012] 按照本公开,寡核苷酸作为微球投送。据信这样的投送方法阻止了核酸酶接近微球内的核酸。进行反义 (AS) 寡核苷酸的微球投送以诱导树突状细胞耐受,特别是在 NOD 小鼠模型中。使用水性条件制造微球,使得反义 (AS) 寡核苷酸被结合。这些微球用于抑制基因表达,并用于在 NOD 小鼠中体内预防和 / 或逆转自身免疫糖尿病病症。

[0013] 在本公开的一个方面,合成了靶向 CD40、CD80 和 CD86 转录物的三种 AS- 寡核苷酸,制备了寡核苷酸混合物的水溶液,并与水性聚合物溶液合并。形成含有寡核苷酸的微球,通过注射将它们投送到 NOD 小鼠中。

[0014] 在本公开的一个方面,提供了用于在哺乳动物中逆转 1 型糖尿病的方法,包括施用微球组合物,其中组合物中的微球含有与选自 CD40、CD80 和 CD86 初级转录物的初级转录物及其组合是反义的并与它们定向结合的寡核苷酸。该寡核苷酸选自 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3,或事实上可以是任何其它以 CD40、CD80 和 CD86 为靶标的寡核苷酸。

[0015] 本公开的另一个方面涉及保护哺乳动物胰腺 β 细胞免于自身免疫破坏的方法,包括在哺乳动物中注射微球组合物,其中组合物中的微球含有与选自 CD40、CD80 和 CD86 初级转录物的初级转录物及其组合是反义的并与它们定向结合的寡核苷酸。

[0016] 另一个方面是在哺乳动物中减少 T 细胞介导的胰腺炎症和 / 或胰腺 β 细胞死亡的方法,包括给哺乳动物施用微球组合物,其中组合物中的微球含有与选自 CD40、CD80 和 CD86 初级转录物的初级转录物及其组合是反义的并与它们定向结合的寡核苷酸,其中组合物以在哺乳动物中有效缓解 1 型糖尿病症状的量施用。在更加限定的方面,该组合物在 1 型糖尿病临床发作之后施用。在备选的方面,该组合物在 1 型糖尿病临床发作之前施用。在这些治疗性方面,与施用前哺乳动物的血糖水平相比,组合物的施用使哺乳动物中的血糖水平归于正常。

[0017] 施用组合物可以再生哺乳动物的 β 细胞群,或终止 β 细胞种的进一步恶化,或这二者。

[0018] 组合物可以以任何形式施用,在某些示例性方面,以注射形式施用。在特定方面,组合物与胰岛素一起组合施用。在使用组合疗法时,可以在施用微球组合物之前、同时或之后施用胰岛素。

[0019] 其它方面还涉及在患有新发作或临床前期自身免疫糖尿病的对象中保护剩余的

β 细胞团的方法,包括给对象施用含有微球的组合物,该微球中含有与 CD40、CD80 和 CD86 初级转录物是反义的并与它们定向结合的寡核苷酸,其中组合物的施用将哺乳动物的 β 细胞团维持在糖尿病发作前存在的细胞团的至少 15%。对象可以是人类对象。对象可以是人类儿童。治疗方法可以包括重复施用组合物,并且重复施用增加了哺乳动物的 β 细胞团。

[0020] 在具体定义的方法中,微球的 30% 以及多达 70% w/w 是寡核苷酸。这样的组合物通常可以在微球组合物中含有比例为 1:1:1 的反义 CD40: 反义 CD80: 反义 CD86。

[0021] 通过下面的具体说明,本发明的这些以及其它的方面、目标、特点和优点,包括其各种组合,将得到明显和清楚的理解。

[0022] 附图简述

[0023] 在本说明的过程中,将对附图进行参考,其中:

[0024] 图 1a 和 1b 是 AS-寡核苷酸和聚 L-赖氨酸聚阳离子微球的扫描电镜照片。

[0025] 图 2a 和 2b 是显示本公开的微球制剂性质的图。图 2a 是显示微球制剂大小的图。图 2b 是显示微球制剂的表面电荷的图。

[0026] 图 3 是微球分解 (deformulation) 后寡核苷酸的 RP-HPLC 色谱图。

[0027] 图 4 是显示了与用错义 (scrambled) 寡核苷酸微球或只用 PBS 载体治疗的动物相比,在用本发明的反义寡核苷酸微球 (AS-MSP) 治疗多次的 NOD 小鼠中对糖尿病的防止的绘图。

[0028] 图 5 是显示了与用错义寡核苷酸微球或只用 PBS 载体治疗的动物相比,在用本公开的 AS-MSP 治疗一次的 NOD 小鼠中对糖尿病的防止。

[0029] 图 6a-6d 是用苏木精和曙红染色 (图 6a 和 c ;H+E) 或对胰岛素进行染色 (图 6b 和 6d) 的对照 NOD 小鼠胰腺组织切片的光学显微镜照片。

[0030] 图 7a-7d 是用苏木精和曙红染色 (图 7a 和 c ;H+E) 或对胰岛素进行染色 (图 7b 和 7d) 的 AS-MSP 治疗的 NOD 小鼠胰腺组织切片的光学显微镜照片。

[0031] 图 8 显示了从本公开的 AS-MSP 治疗的小鼠或对照动物获得的 T 细胞的 FACS 分析。

[0032] 图 9 显示了相对荧光强度 (RFI) 图,证实了来自以本公开的 AS-MSP 治疗的动物并与脾细胞一起培养的 T 细胞的增殖。

[0033] 图 10 显示了 RFI 图,证实了来自 AS-MSP 治疗的无糖尿病 NOD 小鼠的 T 细胞在同系的被辐照脾细胞和卵清蛋白的存在下的体外增殖。

[0034] 图 11 显示了 RFI 图,证实了来自 AS-MSP 治疗的无糖尿病 NOD 小鼠的 T 细胞在同系胰岛裂解物的存在下体外增殖受抑制。

[0035] 图 12 是新发作糖尿病小鼠用含有反义或错义寡核苷酸的微球治疗的血糖水平图。

[0036] 图 13A 显示了用患有新发作糖尿病的小鼠进行实验的时间线,图 13B 和 13C 是用 AS-MSP 或对照进行治疗的新发作糖尿病小鼠的平均血糖水平图。

[0037] 图 14A-C 显示了 NOD 小鼠中 1 型糖尿病表型的逆转。这些图显示了在施用 AS-MSP 后,哺乳动物的血糖水平在 15 天内回复到正常 (正常水平用虚线显示,大约为 200mg/dL),并且甚至在停止 AS-MSP 的施用后 (第 30 天) 仍维持正常。

[0038] 图 15 描绘了自身免疫糖尿病的治疗性逆转的模式。

[0039] 说明性实施方案的描述

[0040] 按照需要,在这里公开了本公开的详细实施方案;但是,应该理解,公开的实施方案仅仅是本公开的示例,它可以以各种形式体现。因此,本文公开的具体细节不应该被解释为是限制性的,而仅仅是作为权利要求书的基础,以及作为给本领域专业人员讲授的代表性基础,以便以实际上任何适合的方式多样性运用本发明。

[0041] I型糖尿病是一种自身免疫疾病,其中胰腺,具体来说是产生胰岛素的内分泌 β 细胞,存在着进展性炎症。在发病前,炎症首先使内分泌 β 细胞功能障碍。在人类自身免疫(1型)糖尿病的非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠模型中,单次注射微球制剂明显延迟了疾病的发作。尽管不希望受到任何具体理论的束缚,但据信在疾病发作前,微球被注射位点的驻留性和迁移性树突状细胞摄取,然后移动到邻近的淋巴结中。还认为在被治疗的受体中,发生了靶向推定 β 细胞抗原的T细胞的体外增殖降低。在免疫缺陷的NOD-SCID小鼠中,通过用同系T细胞和树突状细胞重建然后再施用微球,可以发生CD4+CD25+推定的调节T细胞优势增加。因此,基于微球的治疗性组合物可以调节树突状细胞活性并动员调控网络进行预防。

[0042] 能够防止糖尿病发作的治疗方法是合乎需要的。当临床发病后显著数量的 β 细胞已经被破坏时,能够遏制或逆转疾病的治疗性组合物也是合乎需要的。在新发作糖尿病的小鼠中重复用药使高血糖归于正常,并逆转了疾病。逆转一般表示使个体,例如人类或其它哺乳动物,表现出接近正常的血糖水平。不受任何具体理论的束缚,据信在“逆转”期间,疾病诱导的T细胞炎症和细胞死亡被抵制了。

[0043] 一个实施方案通过配制和注射本文描述的、以CD40、CD80和CD86转录物为靶标的反义(AS)寡核苷酸微球,逆转了自身免疫胰岛素依赖性糖尿病。针对转录物的反义寡核苷酸的具体例子公开在本文的实施例中。应该理解,也可以设计其它与CD40、CD80和CD86转录物有效结合的反义寡核苷酸,以获得本文描述的效果。还应该理解,这样的寡核苷酸可以结合本领域已知的修饰,包括但不限于巯基化(thioation)、甲基化和甲氧乙基化,并且这些修饰的位置和数量可以被改变,以获得最优效果。这些寡核苷酸被设计用于诱导免疫耐受,这样导致在NOD小鼠模型中产生胰岛素的 β 细胞的破坏被逆转。

[0044] 在NOD小鼠以及人类中,1型糖尿病被证实是由于产生胰岛素的胰腺 β 细胞被自身免疫破坏。在临床发病时,人类通常具有10-20%以下的残留 β 细胞团。散在的任何该残留细胞团可以产生足以调节葡萄糖水平的残余胰岛素水平。此外,逆转 β 细胞破坏可以导致 β 细胞群的部分再生。提供本公开的含有寡核苷酸的微粒是为了干扰 β 细胞的自身免疫破坏。

[0045] 应该认识到,能够被激活的树突状细胞(DC)是在所有组织中发现的强抗原呈递细胞,它们存在于皮肤下。这些抗原呈递树突状细胞的功能是通过活化T细胞作为免疫应答、包括自身免疫应答的引发物,特别是在淋巴结中。尽管不希望受到理论的束缚,但据信CD40、CD80和CD86对于自身免疫应答是重要的,这些分子的下调被认为促进了自身免疫的低应答性。此外,某些细胞因子例如干扰素和白介素,因为低应答性而降低。

[0046] 在制备用于在小鼠中治疗自身免疫性糖尿病的微球中,可以将一种、两种或三种AS-寡核苷酸溶解在水性溶液中,并与水溶性聚合物和聚阳离子合并。溶液通常在大约60-70°C温育,冷却到大约23°C,并除去过量的聚合物。

[0047] 核酸通常占微球的大约 30 到大约 100 重量%，平均粒度不超过大约 50 微米，通常不超过大约 20 微米，并可以不超过大约 10 微米。它们通常如下制备。制备寡核苷酸的水溶液。在要制备含有三种寡核苷酸的微球时，将三种寡核苷酸溶液等份合并。每种溶液含有这三种寡核苷酸类型的一种。含有寡核苷酸的终溶液通常含有大约 10mg/ml 寡核苷酸。

[0048] 在特定的实施例中，微球制剂含有 65%、70%、75%、80%、85%、90% w/w 或更多的寡核苷酸载量。在这样的实施方案中，组合物具有 6-10% w/w 的聚 L- 赖氨酸含量。此外，微球的水分含量是变化的，可以为大约 4%。寡核苷酸以 1:1:1 的反义 CD40: 反义 CD80: 反义 CD86 的比率存在。

[0049] 将它们与 10mg/ml 聚阳离子储存液的等份合并。聚阳离子的例子是聚赖氨酸和聚鸟氨酸。其它包括聚乙烯亚胺 (PEI)、谷醇溶蛋白、鱼精蛋白、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚精氨酸、乙烯胺、以及带正电荷多糖的衍生物例如带正电荷壳聚糖，及其组合。聚阳离子溶液中聚阳离子: 寡核苷酸的体积比可以从大约 1:1 到大约 4:1。常用的聚阳离子包括聚 L- 赖氨酸·HBr (最高达 70,000 道尔顿, 可以从 Bachem 获得) 和聚 L- 鸟氨酸·HBr (例如 11,900 道尔顿, 可以从 Sigma 获得)。

[0050] 还制备了聚合物溶液。它们可以用作相分离增强剂。适合的聚合物的例子包括线性或分支的聚合物、共聚物和嵌段共聚物。这些聚合物可以是水溶的、半水溶的、与水混溶的或可溶于与水混溶的溶剂中的。聚合物的例子包括可药用添加剂, 例如各种不同分子量的聚乙二醇 (PEG), 如 PEG 200、PEG 300、PEG 3350、PEG 8000、PEG 10000、PEG 20000 等, 以及各种不同分子量的泊洛沙姆例如泊洛沙姆 188 和 Pluronic FI27 或 Pluronic F68。常用的聚合物是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。另一种聚合物是羟乙基淀粉。其它的两亲性聚合物也可以单独或组合使用。相分离增强剂也可以是非聚合物, 例如丙二醇和乙醇的混合物。

[0051] 在典型的实施方案中, 可以制备聚乙烯吡咯烷酮和 / 或聚乙二醇的聚合物溶液, 并与其它溶液合并。加热、冷却、离心和清洗多次提供水性悬浮液, 通常被冷冻和冻干, 以形成含有寡核苷酸和聚阳离子的微球的干粉。

[0052] 微球适合通过注射途径体内投送, 例如静脉内、肌内、皮下、腹膜内、鞘内、硬膜外、动脉内、关节内等。其它可以实施的投送途径包括例如局部、口、直肠、鼻、肺、阴道、颊、舌下、经皮、经粘膜、耳或眼内。

[0053] 不受任何具体理论的束缚, 据信含有本文例举的反义寡核苷酸的微球下调细胞表面分子 CD40、CD80 和 CD86。注射微球, 据信树突状细胞主动摄取寡核苷酸微球。这些寡核苷酸抑制了树突状细胞中细胞表面细胞分子 CD40、CD80 和 CD86 的表达。在 NOD 小鼠中, 施用这些开发后的反义寡核苷酸微球, 有效地逆转了糖尿病。

[0054] 下面的实施例说明了本公开的某些特点和优点, 以对本公开进行进一步的说明。实施例不应该被视为限制或局限了本发明。

[0055] 实施例 1

[0056] 合成了三种靶向 CD40、CD80 和 CD86 初级转录物的 AS- 寡核苷酸。在本实施例中施用的 AS- 寡核苷酸序列显示如下, 其中星号表示骨架中巯基化的位点:

[0057] Seq ID 1: CD 40-AS:5' -C*AC*AG*C C*GA*GG*C*AA*AGA*C*AC*C A*T*G C*AG*GG*C*A-3'

[0058] Seq ID 2: CD80-AS:5' -G*GG*AA*A G*CC*AG*G A*AT*CT*A

[0059] G*AG*CC*A A*TG G*A-3'

[0060] Seq ID 3:CD86-AS:5'-T*GG*GT*G C*TT*CC*G T*AA*GT*T C*TG*GA*A C*AC*G*T*C_3'

[0061] 通过将各含有一种类型寡核苷酸的三种寡核苷酸溶液等份合并,制备寡核苷酸混合物的水性溶液,形成三种类型寡核苷酸的 10mg/ml 溶液。在去离子水中制备了 10mg/ml 的聚 L-赖氨酸·HBr 溶液(聚 L-赖氨酸·HBr 最高为 70,000 道尔顿, Bachem, King of Prussia, PA)。将聚 L-赖氨酸·HBr 以 1:1 的体积比加入到寡核苷酸溶液中。将混合物轻柔涡旋。以 2:1 的体积比加入在 pH5.5 的 1M 乙酸钠(Spectrum, Gardena, CA)中含有 12.5% PVP(聚乙烯吡咯烷酮, 40,000 道尔顿, Spectrum Chemicals, Gardena, CA)和 12.5% PEG(聚乙二醇, 3,350 道尔顿, Spectrum Chemicals, Gardena, CA)的 25% 聚合物溶液,如下:0.75ml AS-寡核苷酸, 0.75ml 聚 L-赖氨酸·HBr, 3.0ml PEG/PVP, 总体积为 4.50ml。

[0062] 将批料在 70°C 温育 30 分钟,然后冷却到 23°C。冷却后,溶液变得浑浊,微球形成。然后将悬浮液离心,除去过量的 PEG/PVP。通过将沉淀重新悬浮在去离子水中来清洗得到的沉淀,然后离心并除去上清液。清洗步骤重复三次。将水性悬浮液冷冻并冻干,以形成含有寡核苷酸和聚 L-赖氨酸的微球的干粉。

[0063] 图 1a 和 b 显示了两种不同放大倍数的 1:1 比例的聚 L-赖氨酸:寡核苷酸微球的代表性扫描电镜照片(SEM)。制造了 0.5-4 μm 大小、平均粒度大约 2.5 μm 的微球。图 2a 显示了通过激光散射揭示的按照本公开制造的一种微球制剂的大小分布。图 2b 显示了通过光散射测定的微球制剂表面电荷(ζ 电势)。图 3 显示了在微球分解后用于定量反义寡核苷酸组分的载量和评估其完整性的反相(RP)HPLC 方法。使用 CD86、CD40、CD80 寡核苷酸和聚 L-赖氨酸(PLL; MW 30-70kD)来配制微球。然后使用聚 L-天冬氨酸(PAA)对 PLL 的竞争性置换 DNA 寡核苷酸来使微球分解。PAA 被选作在 260nm 处没有吸收并且不干扰在 260nm 处对寡核苷酸定量的聚氨基酸试剂。在 RP-HPLC 图谱,如图 3 中,每个峰下的面积与微球中荷载的每种寡核苷酸的量成比例。如图 3 中所示,峰的高度表明在微球中每种寡核苷酸大致相等的载量。微球中寡核苷酸的载量经计算为重量的大约 65% 到大约 80%。图 3 还显示了寡核苷酸的完整性没有受到微球配制过程的影响,这由分解后峰的狭窄分布表明。

[0064] 实施例 2

[0065] 在本实施例中,显示了覆盖本公开的预防方面的试验结果。如图 4 所示,在 5-8 周龄的 NOD 小鼠中单次施用 AS-MSP 延迟了糖尿病发作。对两组雌性 NOD 小鼠(5-8 周龄)单次皮下注射配制成本公开的微球的反义寡核苷酸(AS-MSP)。制剂以被认为含有每种反义寡核苷酸(抗 CD40、抗 CD80 和抗 CD86)的 1:1:1 混合物 50 μg 的量进行注射。其它组的小鼠注射错义序列的微球(SCR-MSP)或 PBS 介质(对照 NOD)。每周通过尾部静脉穿刺测量血糖。在两次连续读数 >280-300mg/dL 后,证实糖尿病。图 4 显示了两个独立治疗组群的累计存活率。

[0066] 图 5 显示在 5-8 周龄的 NOD 小鼠中多次施用 AS-MSP 防止了糖尿病发作。对 NOD 雌性小鼠(5-8 周龄)连续 8 次单剂皮下注射(每周一次)配制成本公开的微球的反义寡核苷酸。注射(每种反义寡核苷酸的 1:1:1 的混合物或错义寡核苷酸 50 μg)每周给予一次,为期 8 周,在第 13 周停止。其它组的小鼠注射错义序列的微球(SCR-MSP)或 PBS 介质

(对照 NOD)。图 5 显示了治疗的动物的累计存活率。

[0067] 图 6a 和 6b 显示了没有接受治疗、因此自发发展成自身免疫性的小鼠（糖尿病 NOD 小鼠）的胰腺组织切片，用苏木精和曙红染色 (H+E；图 6a) 或对胰岛素进行染色（图 6b）。图 6c 和 6d 显示了用 SCR-MSP 制剂治疗的小鼠（与用特异性 AS-MSP 治疗的组平行开始注射）的胰腺组织的切片。这些切片也用苏木精和曙红染色 (H+E；图 6c) 或对胰岛素进行染色（图 6d）。SCR-MSP 小鼠都发展出糖尿病。

[0068] 图 7a 和 7b 显示了在不到 8 周龄时治疗（预防模型）和用本公开的反义微球治疗的小鼠的胰腺组织切片，用苏木精和曙红染色 (H+E；图 7a) 或对胰岛素进行染色（图 7b）。

[0069] 图 8 中显示，来自 AS-MSP 治疗的 NOD 小鼠的 T 细胞表现出 Foxp3+CD25+ 推定的 T_{reg} 细胞的优势增加。图 8A 显示用于 FACS 分析的门 (gating)。图 8B 显示从脾脏富集的 Foxp3+CD25+T 细胞的百分率，图 8C 显示来自集合淋巴结的百分率，所述淋巴结来自 AS-MSP 无糖尿病组群随机选择的 AS-MSP 治疗的无糖尿病小鼠或来自用错义序列微球 (SCR-MSP) 治疗的或用 PBS 介质治疗的动物。

[0070] 图 9 显示了来自 AS-MSP 治疗的无糖尿病 NOD 小鼠的 T 细胞在与同系脾细胞共培养时的增殖。来自 AS-MSP 治疗的无糖尿病 NOD 小鼠的 T 细胞通过富集柱获得，并与来自于 Balb/c、C57BL6 或同系无糖尿病 NOD 小鼠（10 周龄）的 γ 射线辐照过的脾细胞共培养。在四天后使用 Cyquant 试剂测量增殖。SpI 是指同系的辐照过的脾细胞。

[0071] 图 10 显示了来自 AS-MSP 治疗的、无糖尿病 NOD 小鼠的 T 细胞在同系的辐照过的脾细胞和卵清蛋白的存在下的体外增殖。T 细胞从在 AS-MSP 无糖尿病组群中随机选择的 AS-MSP 治疗的无糖尿病小鼠的脾脏或集合淋巴结富集。

[0072] 图 11 显示了来自 AS-MSP 治疗的、无糖尿病 NOD 小鼠的 T 细胞，在同系的胰岛裂解物的存在下在体外表现出增殖抑制。T 细胞从图 4 描述的 AS-MSP 无糖尿病组中随机选择的 AS-MSP 治疗的无糖尿病小鼠的脾脏或集合淋巴结富集。辐照过的 NOD 脾细胞（来自 10 周龄的无糖尿病 NOD 小鼠）被用作抗原呈递细胞，平行培养物用 NIT-1 裂解物 (1 μ g/孔)（或 PBS 介质）脉冲。

[0073] 对于人类试验中糖尿病抑制疗法的最终结果 (translation) 的主要顾虑是治疗方法的抗原特异性（以及因此的细胞特异性），以及治疗是否造成全面的非特异性抑制。为了解决这些问题，将从图 4 显示的组群中随机选择的无糖尿病小鼠处以安乐死，以确定脾脏和淋巴结 T 细胞对同种异体抗原、规定 (nominal) 抗原（以完整的卵清蛋白的形式）和来自 NOD 衍生的胰岛瘤细胞系 NIT-1 的细胞裂解物形式的同系 β 细胞衍生抗原的增殖。尽管胰岛素和谷氨酸脱羧酶 (GAD) 是在机理和目的上有牵连的候选自身抗原，但启动自身抗原的本质仍然不清楚。然而，可以合理地认为它应该是 β 细胞驻留性的。因此，源自于 NOD 胰岛瘤的 NIT-1 细胞系被用作 β 细胞抗原的来源，与来自 AS-MSP 治疗的无糖尿病 NOD 小鼠的 T 细胞共培养，以确定抗原特异性低应答性的可能性。从这些研究可以看到，对规定的和同种异体抗原的 T 细胞增殖得到了维持，而在与 NIT-1 细胞裂解物共培养中存在 T 细胞低增殖。

[0074] 此外，为了确定共培养上清液中的细胞因子，我们观察到来自 AS-MSP 治疗的无糖尿病 NOD 小鼠的 T 细胞，即使在 NIT-1 裂解物的存在下，也明显减少 TNF α 的产生。尽管在 AS-MSP 治疗的小鼠的 T 细胞的共培养物中，IFN γ 的生产略有减少，但它与在 NIT-1 裂解物

存在下、与 PBS 治疗小鼠的 T 细胞的共培养物没有统计学上的可区别性。最后,该分析不能检测到上清液中 IL-4、IL-10 或 TGF β 的存在。

[0075] 实施例 3

[0076] 还测试了反义寡核苷酸微球在早期发作 NOD 小鼠中逆转糖尿病症状的能力。这些实验的时间线显示在图 13A 中。通过测试血糖水平并鉴定血糖水平大于 400mg/dL 的动物,选择了具有早期发作的 NOD 小鼠。给选出的动物胰岛素粒,使血糖水平正常,低于 300mg/dL 的正常水平。撤销胰岛素,开始进行一系列肠胃外微球注射。6 只动物每周两次注射含有 CD40、CD80 和 CD86 反义寡核苷酸的微球。另外 10 只动物注射含有不针对 CD40、CD80 和 / 或 CD86 的错义序列的寡核苷酸混合物的微球。对于这两组动物来说,每次注射都在 100 微升注射液的微球中含有 50 μ g 寡核苷酸。错义组动物中的两只由于身体状况差在实验结束前被安乐死。在开始进行注射方案后,血糖水平每周取样两次。在实验过程中动物不禁食。结果在图 12 中作图,其中指示符 (1) 表示开始用胰岛素颗粒,指示符 (2) 表示除去胰岛素颗粒并开始每周两次 MSP 注射。应该注意在图 12 中报道的最高血糖值是 700mg/dL,这对应于所用测量计的最大读数,应该理解为 700mg/dL 数据点表示血糖读数为 700mg/dL 以上。接受含有 CD40、CD80 和 CD86 反义寡核苷酸混合物微球的组中所有的动物 (ASMSP1 到 ASMSP6) 与接受带有错义寡核苷酸的微球的动物 (SCRMSP1 到 SCRMSP10) 相比,显示出明显较低的葡萄糖水平。此外,该 ASMSP 组的 6 只动物中 4 只显示出血糖水平低于 400mg/dL,这一般被认为是糖尿病发作的阈指标。

[0077] 在图 13A 中显示了实验的时间线。对每组的平均非空腹血糖 (图 13B) 和平均空腹血糖水平 (图 13C) 进行了作图 (+/-SEM)。在某些小鼠中,如图 13A 所示撤销了 ASMSP 的施用。如图 13B 和 13C 所示,在新发作糖尿病的 NOD 雌性小鼠中施用多轮 AS-MSP,相对于未治疗动物 (对照)、用 PBS 治疗的动物或用错义寡核苷酸 (SCR-MSP) 微球治疗的动物来说,改善了血糖水平并产生稳定的空腹血糖正常,即使是在撤去 AS-MSP 后。

[0078] 图 7c 和 7d 显示了在糖尿病发作后用反义制剂治疗的 NOD 小鼠的胰腺组织切片,并显示了疾病的逆转。切片用苏木精和曙红染色 (H+E;图 7c) 或对胰岛素染色 (图 7d)。

[0079] 三种不同的 AS-寡核苷酸可以被结合在 PROMAXX 微球中,这样的微球可以用作组合物,通过诱导免疫调节性树突状细胞预防和 / 或逆转新发作的自身免疫糖尿病。事实上,单次注射组合物延迟了疾病发作,而在新发作糖尿病的小鼠中重复用药使高血糖归于正常,表明了疾病的逆转。在这些研究中,每日施用胰岛素,直到血糖低于 300mg/dL。然后在皮下施用 AS-MSP 下停用胰岛素。在示例性给药方案中,动物每周两次施用每公斤体重 2mg AS-MSP,为期 3-4 周。对无糖尿病的 NOD 小鼠进行监测。

[0080] 在图 14A-C 中,证实了给 NOD 小鼠施用 AS-MSP 使所述小鼠的血糖水平恢复到正常水平,并且所述血糖水平的正常化维持一段较长的时期。如图 14B 和 14C 所示,在停止施用胰岛素后 0 到 30 天之间施用 AS-MSP。在停用胰岛素后第 15 天,血糖水平恢复到正常,并保持正常水平直到监测期结束 (第 55 天)。

[0081] 在图 15 中显示了自身免疫糖尿病的治疗性逆转的影响的图示。如果 P 在图 15 中显示的新发作“蜜月”期施加 ROMAXX 治疗的话,预计将会保留 10-20% 的仍具有功能的 β 细胞,从而导致对糖尿病的控制并减少患者对胰岛素的依赖。

[0082] 应该理解,已经描述的本公开的实施方案是说明本公开的原理的某些应用。对于

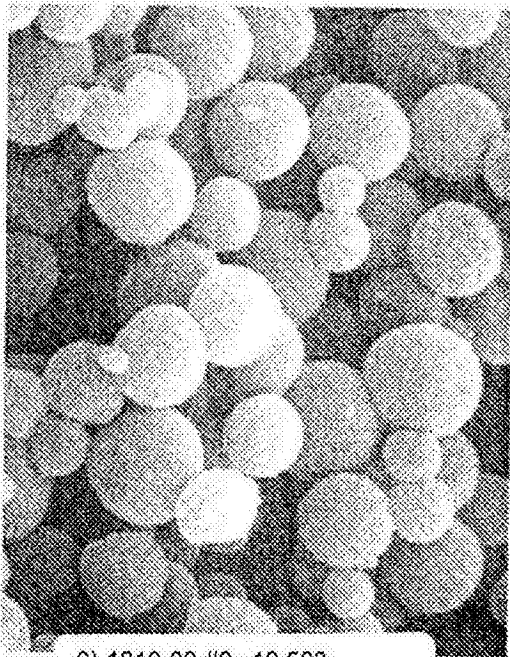
本领域的专业人员来说,可以在不背离本公开的真实精神和范围下进行大量的修改。本文描述的各种特点可以以任何组合使用,而限于在本文具体概括的明确组合。

[0001]

序列表

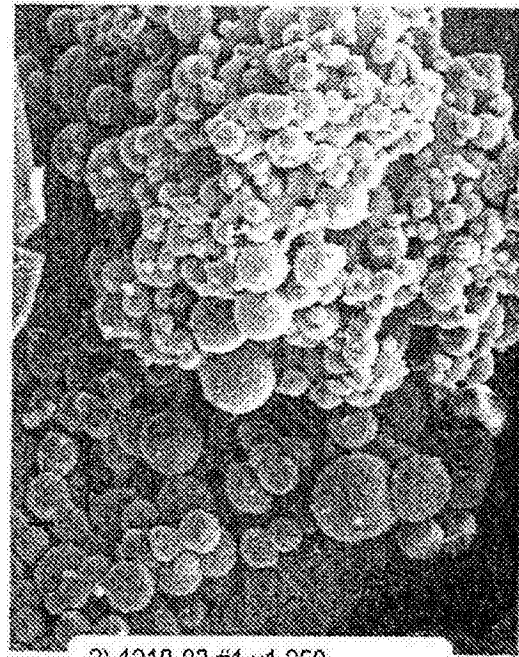
- <110> 巴克斯特国际公司
 巴克斯特医疗保健股份有限公司
 高等教育联邦体系所属匹兹堡大学
- <120> 预防和/或逆转新发作为自身免疫糖尿病的基于微球的组合物
- <130> SPI153260-81
- <150> US 60/835,742
 <151> 2006-08-04
- <150> US 60/861,914
 <151> 2006-11-08
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
- <400> 1
 cacagccgag gcaaagacac catgcaggge a 31
- <210> 2
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
- <400> 2
 gggaaagcca ggaatctaga gccaatgga 29
- <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
- <400> 3
 tgggtgcttc cgtaagtctt ggaacacgctc 30

[0002] 1



6) 1010-03 #2 x12,500
Epic Therapeutics: Oligo 2
含有 L/N 1007-02-VBL
EM Center, NU 10/23/03
SEM, 10KV 1 μm

图 1A



2) 1218-03 #1 x1,250
Epic Therapeutics: VBON-1215-01
EM Center, NU 12/29/03
SEM, 10KV 10 μm

图 1B

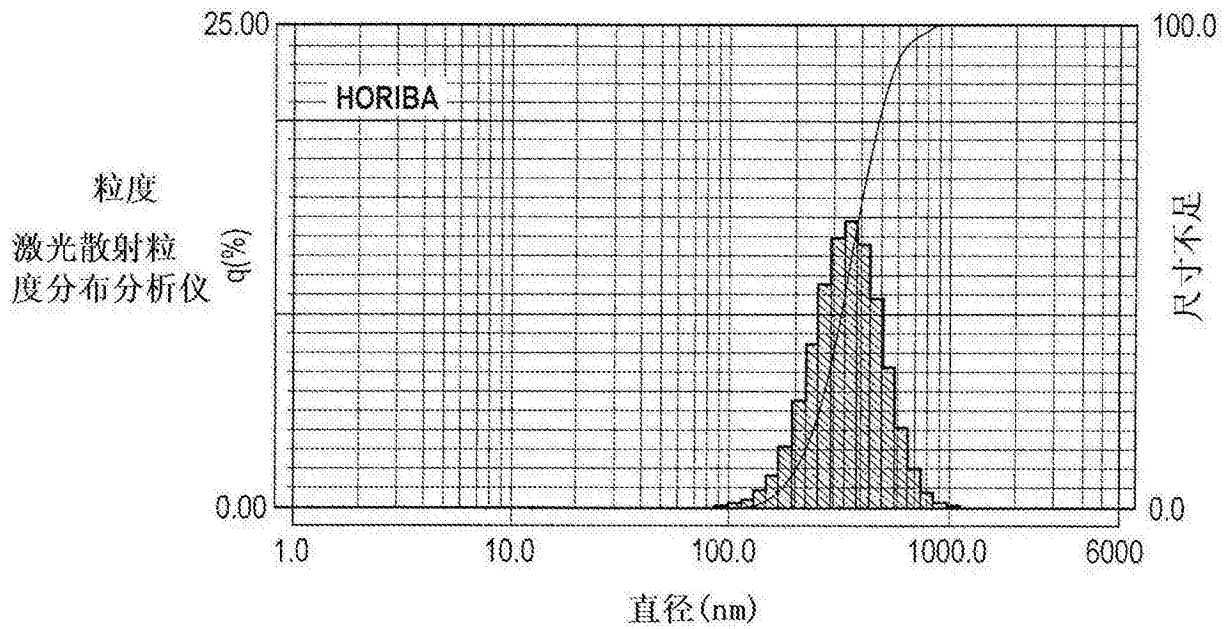


图 2A

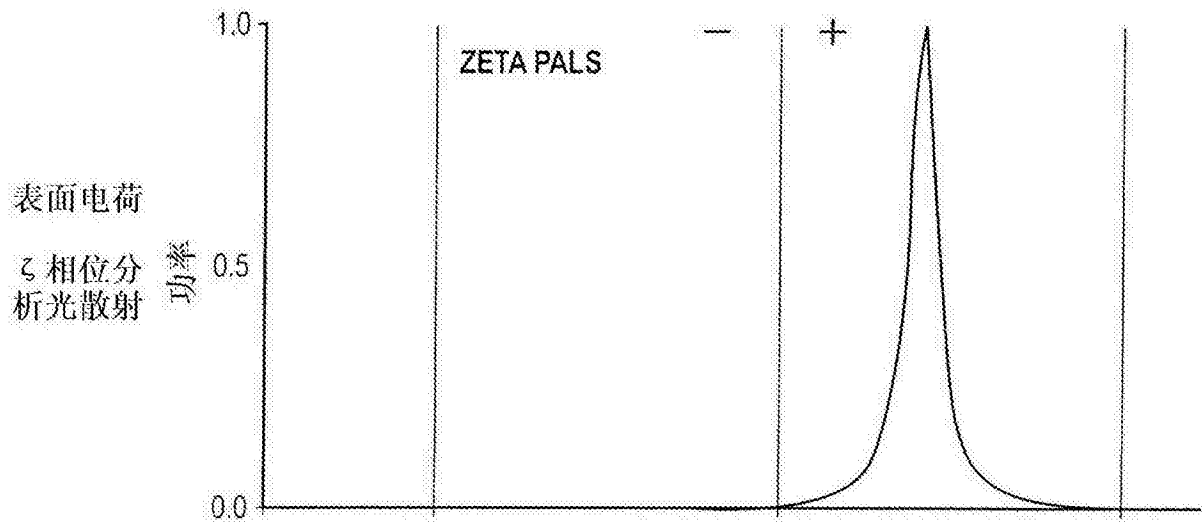


图 2B

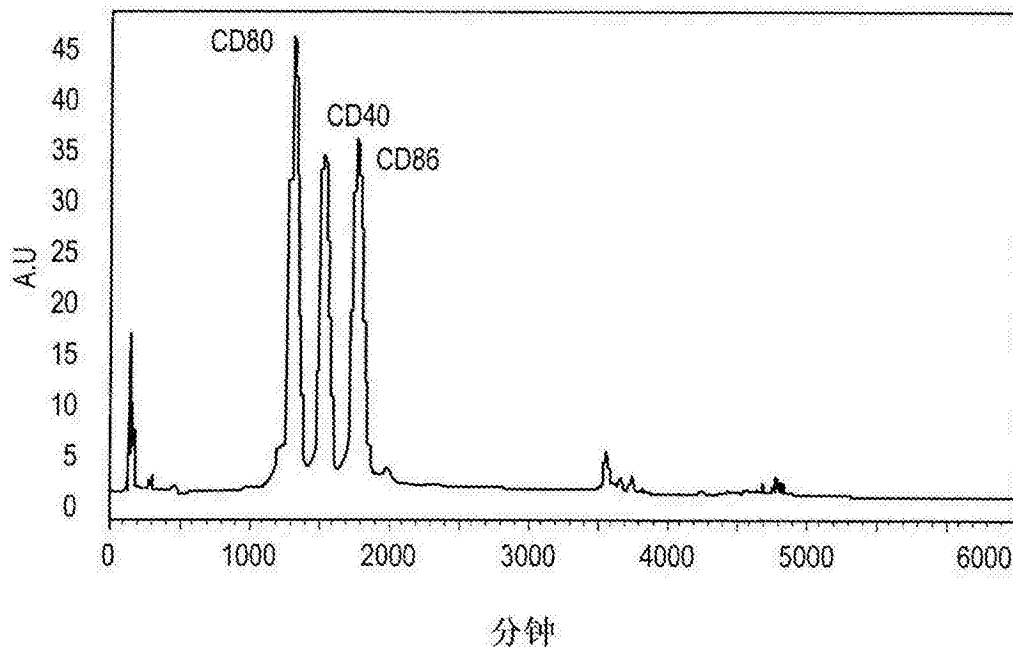


图 3

1次MSP注射治疗的NOD小鼠的存活

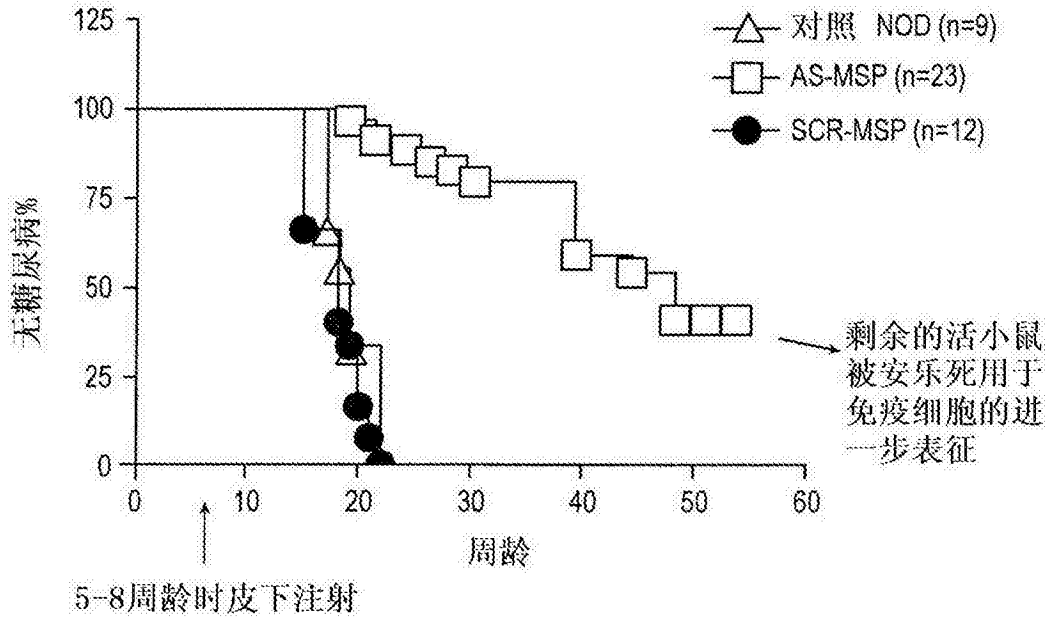


图 4

8次MSP注射治疗的NOD小鼠的存活

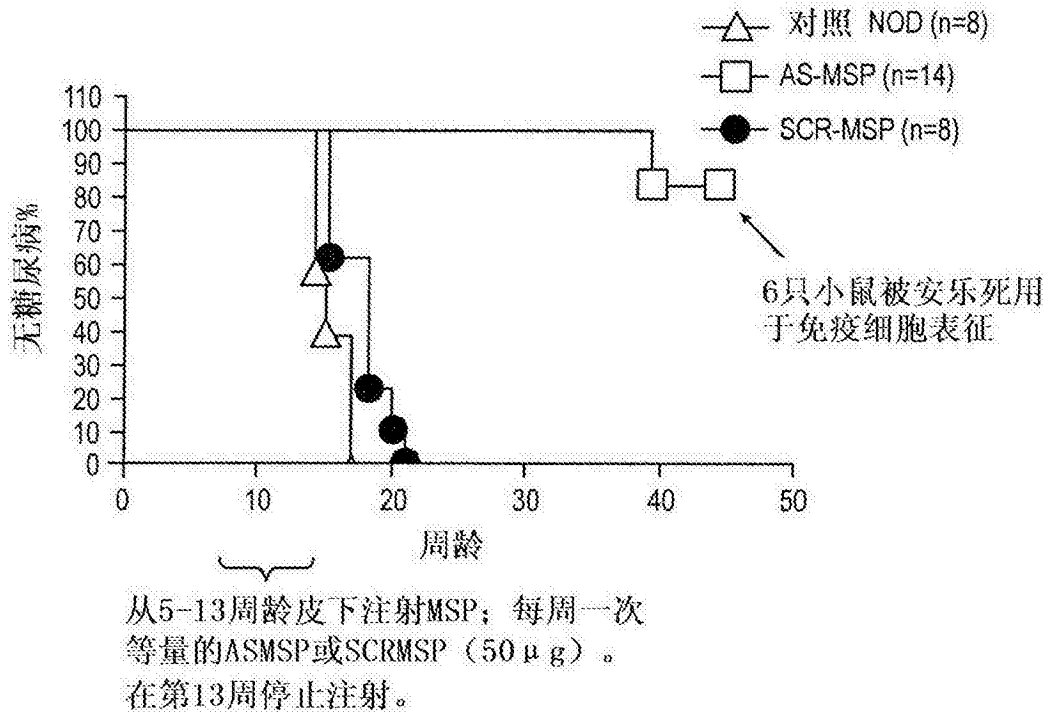


图 5

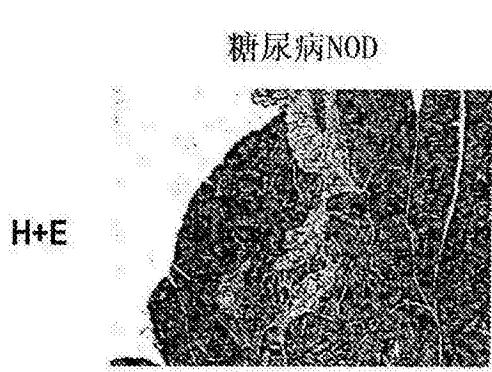


图6A

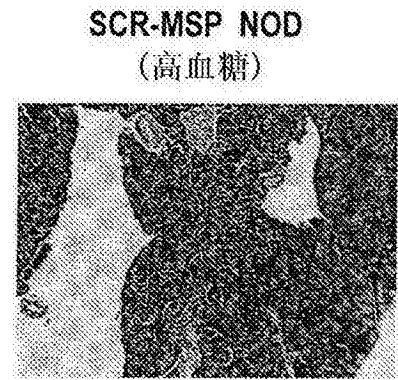
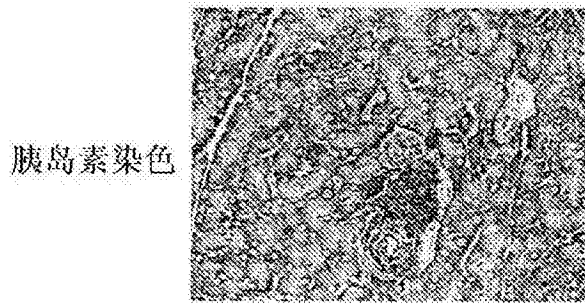
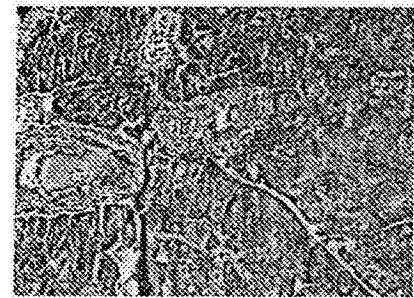


图6C



糖尿病NOD

图6B



SCR-MSP NOD
(高血糖)

图6D

ASMSP治疗的无糖尿病NOD小鼠
(在8周龄前治疗)

H+E

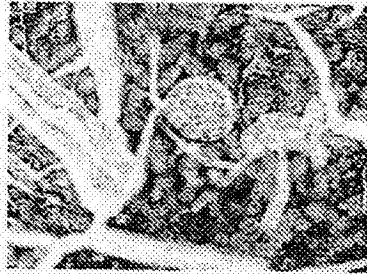


图7A

胰岛素

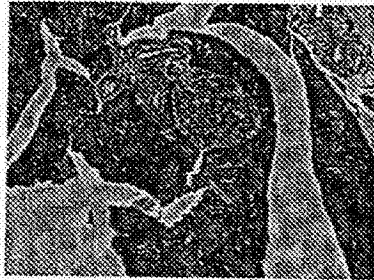


图7B

AS-ODN DC-治疗的无糖尿病NOD小鼠
(在糖尿病发作后治疗10次)

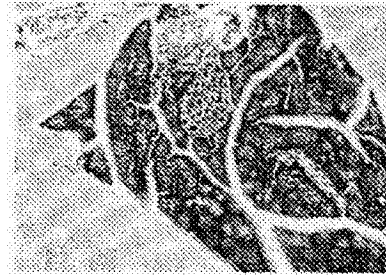


图7C

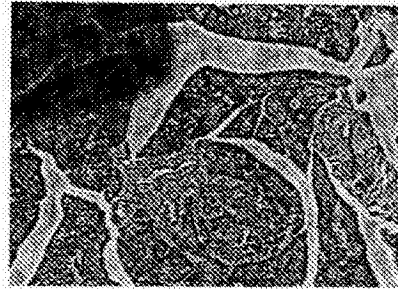


图7D

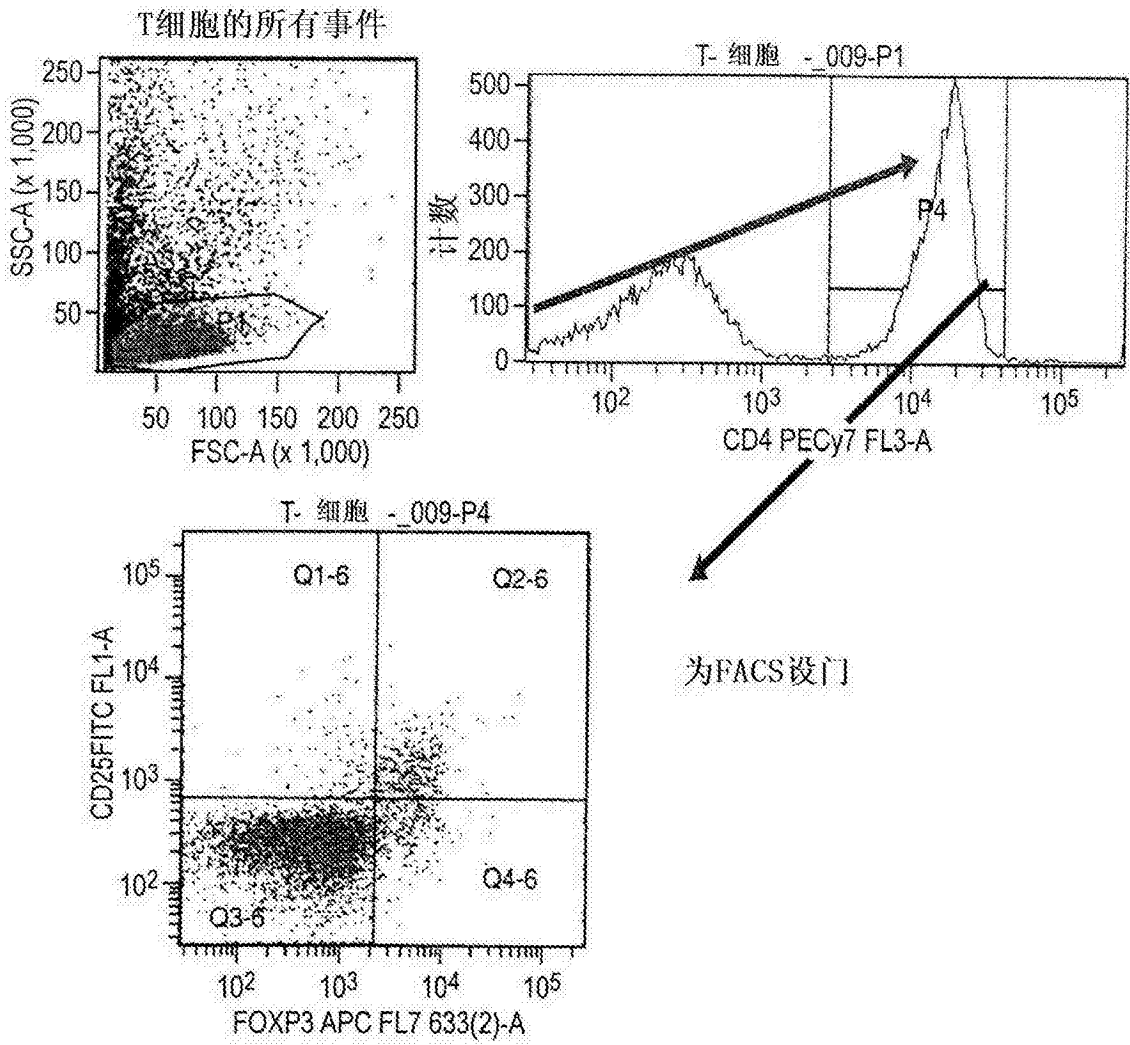


图 8A

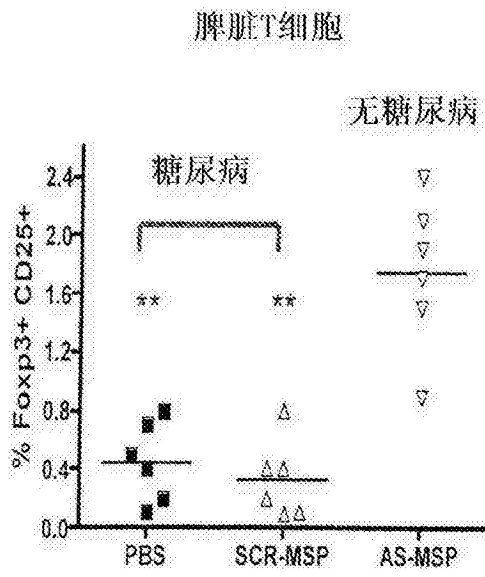


图 8B

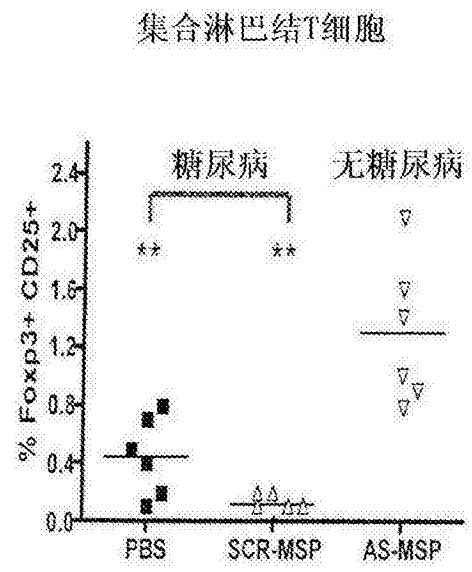


图 8C

脾脏来源的T细胞

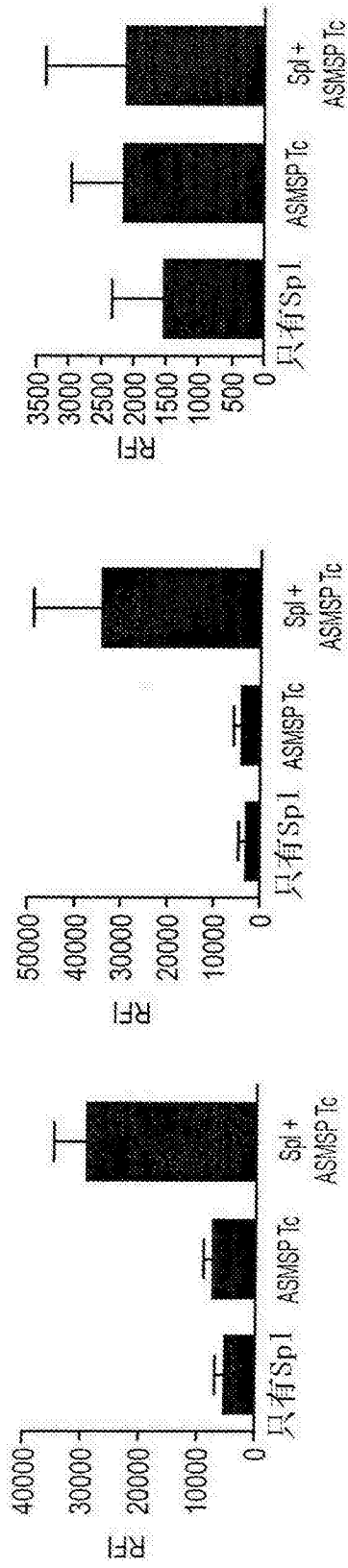


图 9A

集合淋巴结来源的T细胞

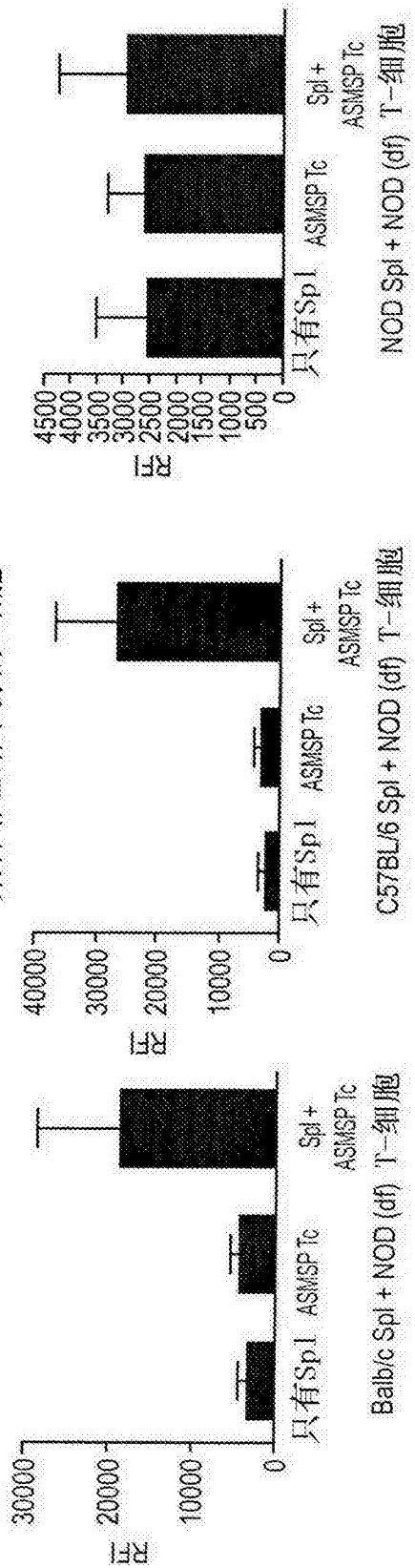


图 9B

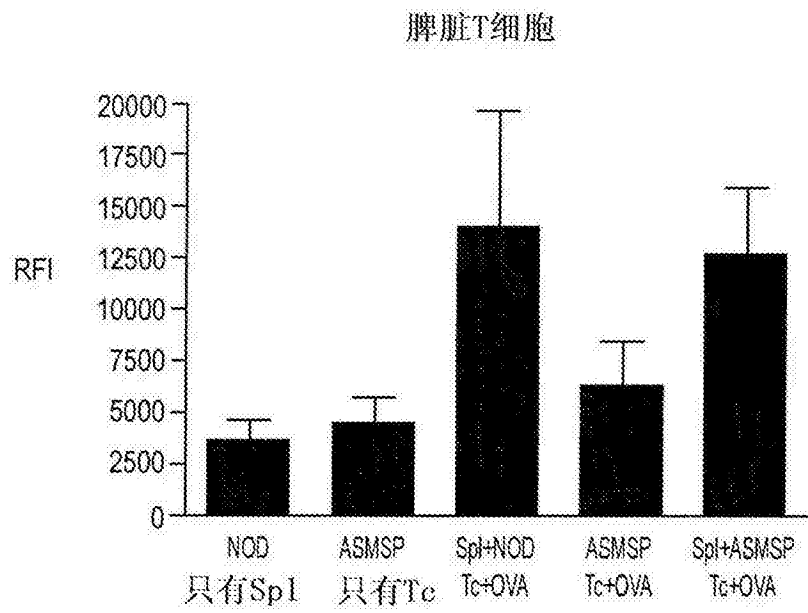


图 10A

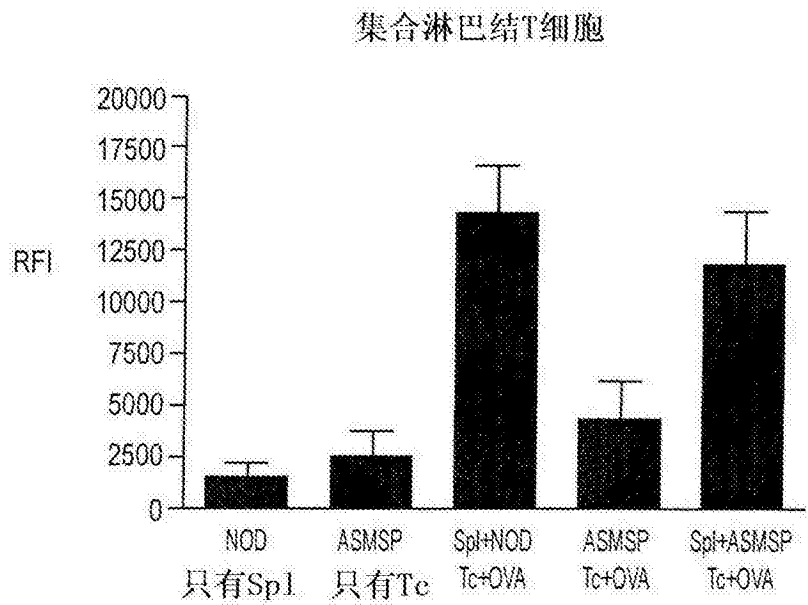


图 10B

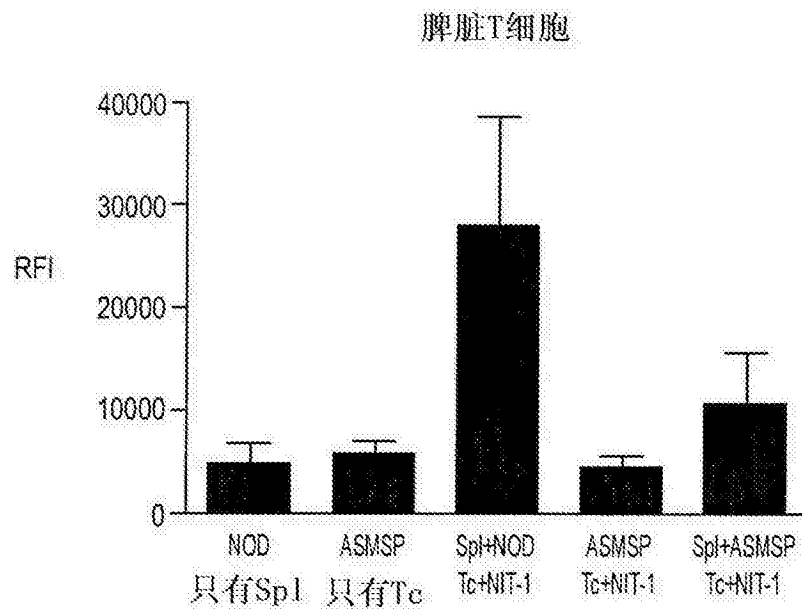


图 11A

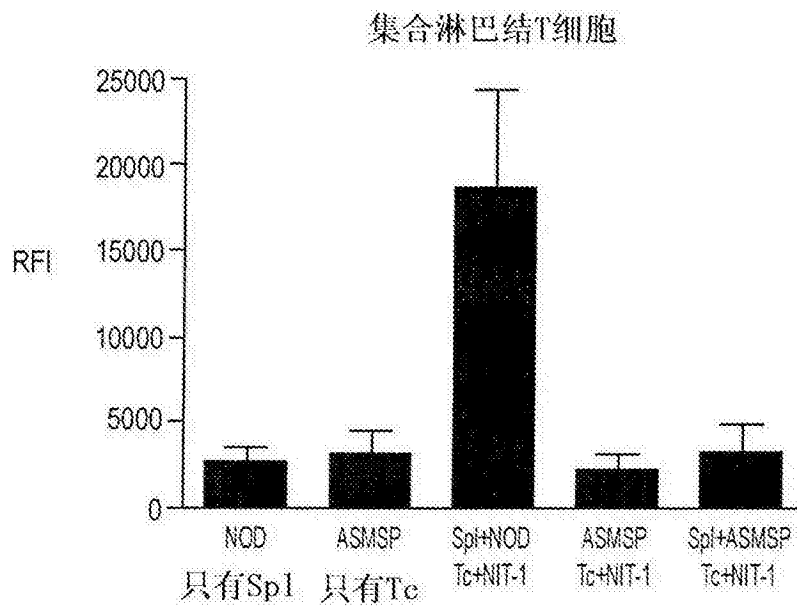


图 11B

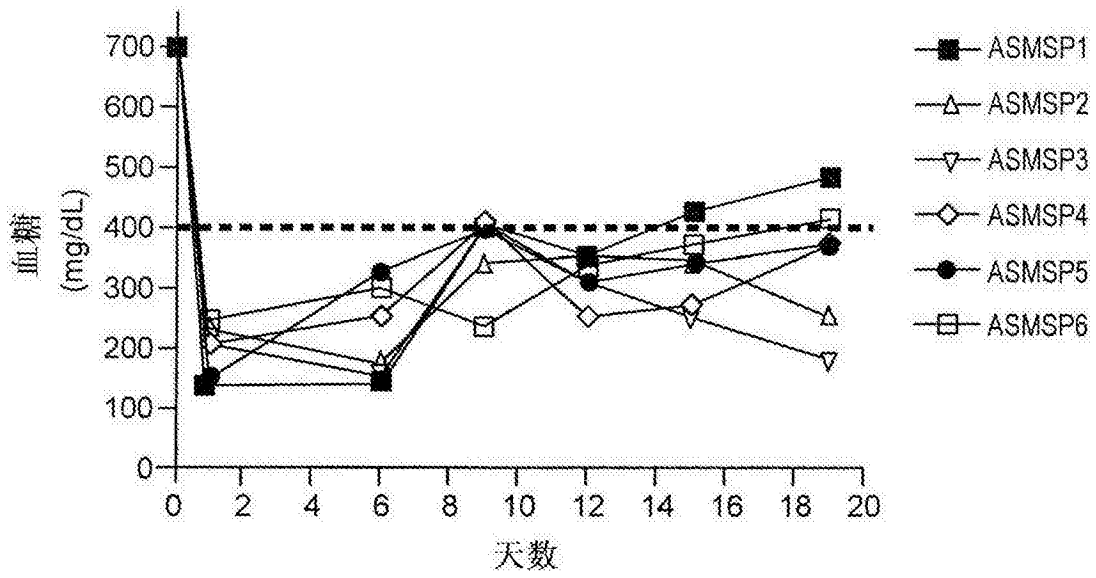


图 12A

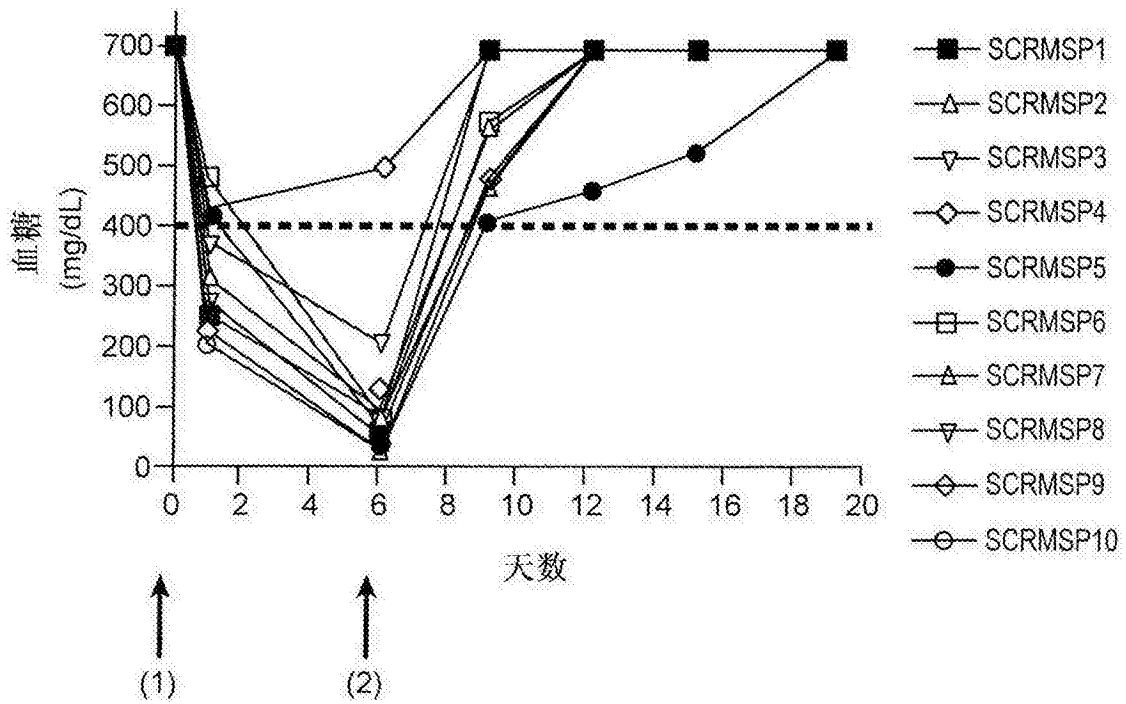


图 12B

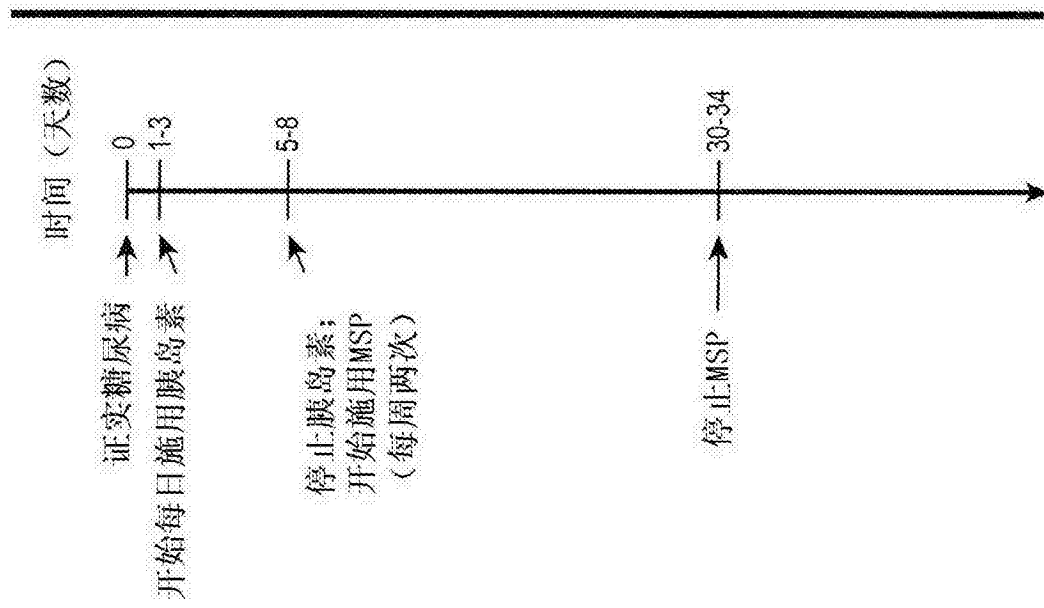


图 13A

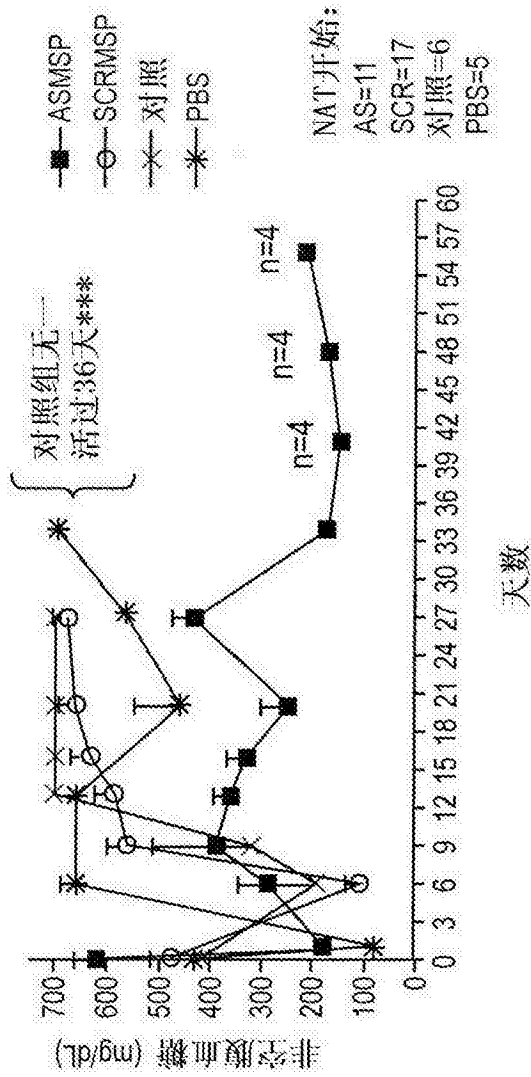


图 13B

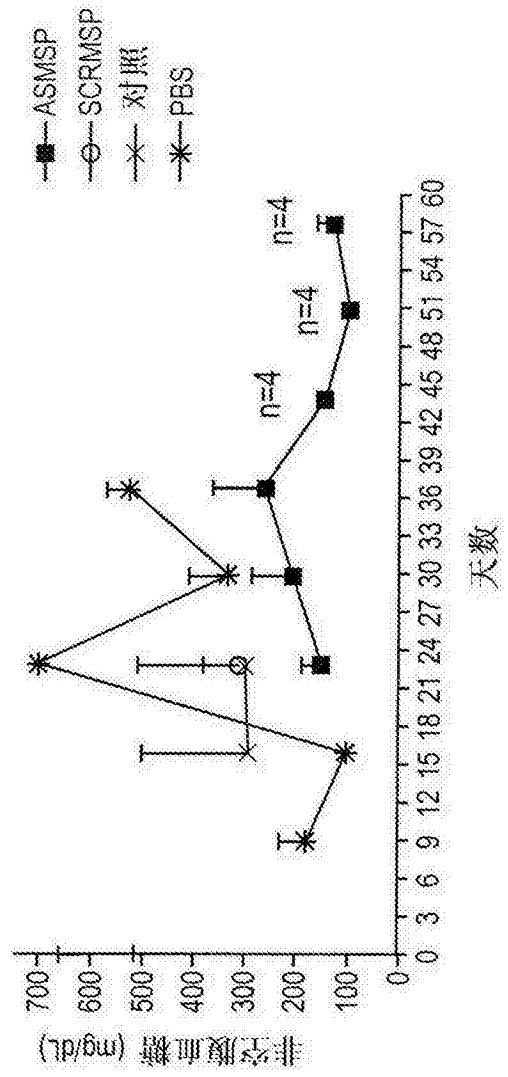


图 13C

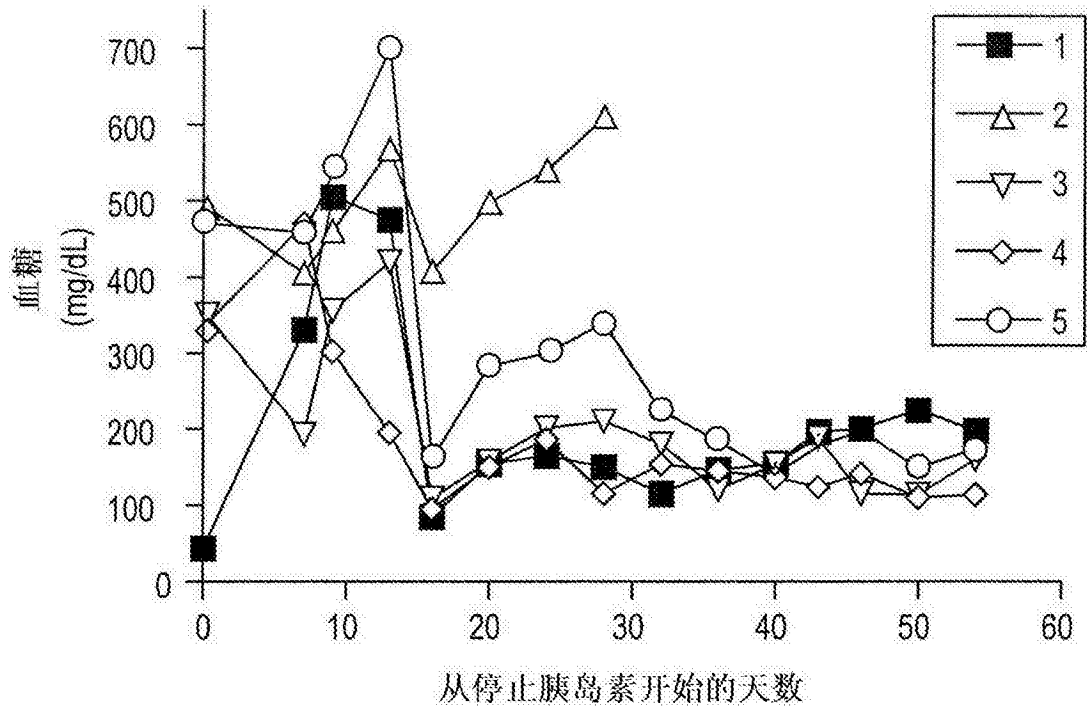


图 14A

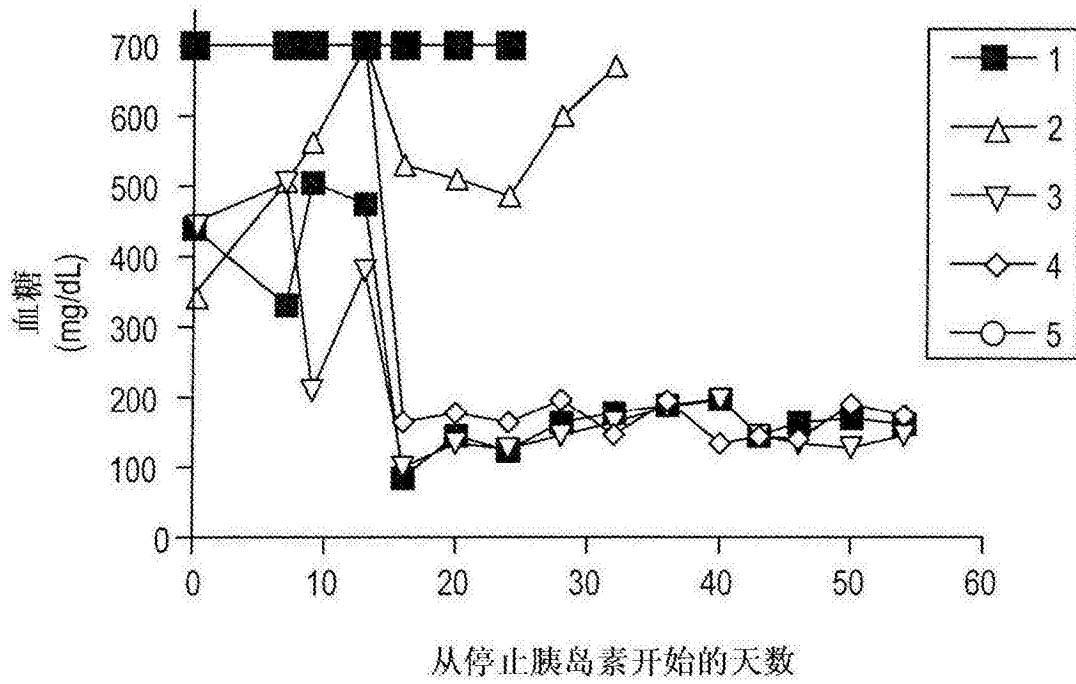


图 14B

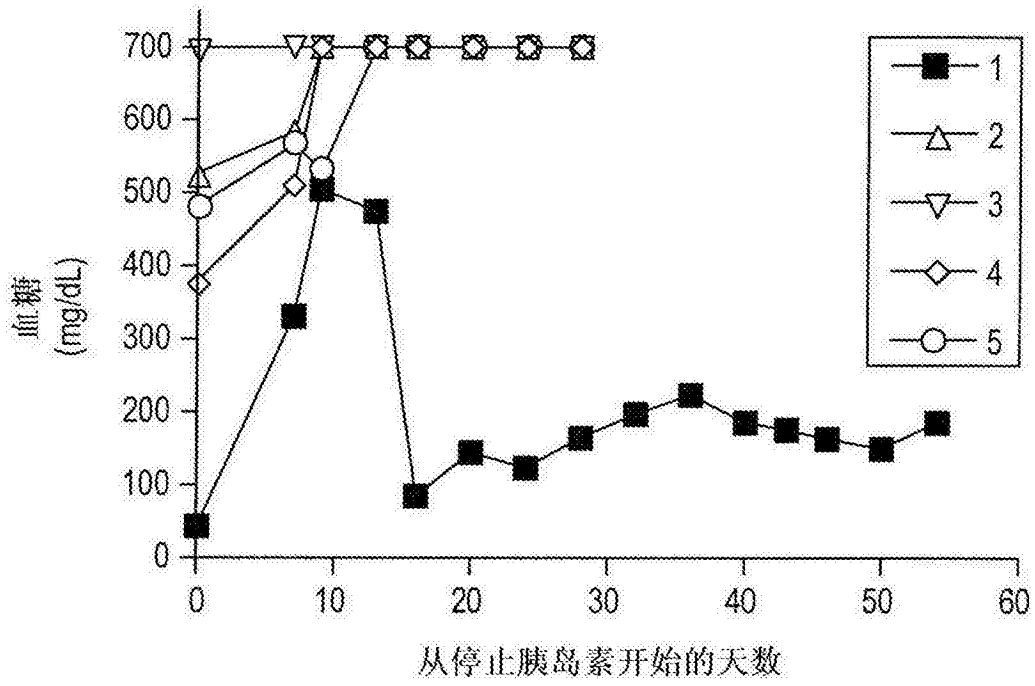


图 14C

自身免疫糖尿病的治疗性逆转

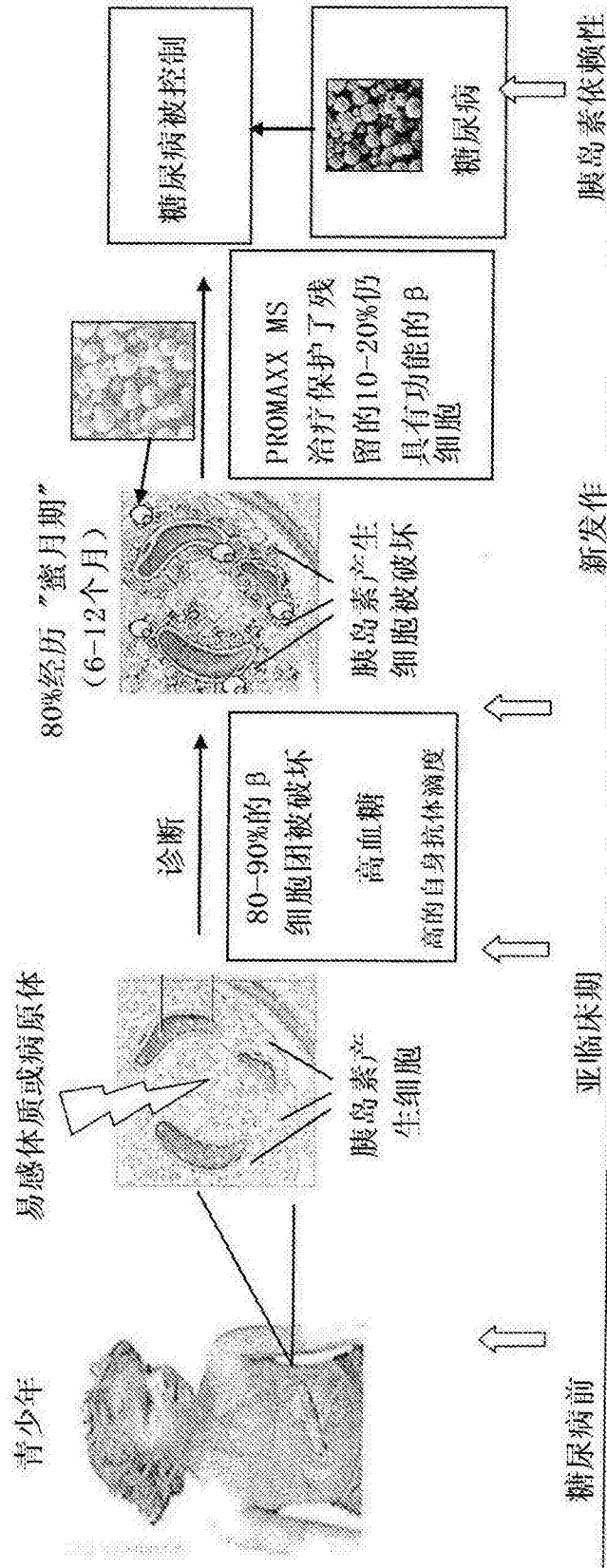


图 15