(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110064049 B
(45)授权公告日 2024.02.09

(21)申请号 201910226407.9

(22)申请日 2013.06.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110064049 A

(43)申请公布日 2019.07.30

(30)优先权数据
61/662,687 2012.06.21 US

(62)分案原申请数据
201380041634.5 2013.06.21

(73)专利权人 西北大学
地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 L.D.谢伊 S.D.米勒 J.W.T.亚普 D.R.盖茨 D.麦卡锡

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 易方方

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 39/35(2006.01)
A61K 39/385(2006.01)
A61K 9/127(2006.01)
A61K 47/69(2017.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)

(56)对比文件
CN 1599746 A,2005.03.23
CN 101918028 A,2010.12.15
WO 2011133617 A1,2011.10.27
US 2008124350 A1,2008.05.29
WO 2007100699 A2,2007.09.07
么山山.口服包裹磷酸胆碱的PLG微球在小鼠中具有粘膜免疫原性.《国外医学 预防 诊断治疗用生物制品分册》.1998,
Getts DR, et al..Microparticles bearing encephalitogenic peptides induce T-cell tolerance and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis.《Nat Biotechnol》.2012,第30卷(第12期),
Rafati H, et al..The immune response to a model antigen associated with PLG microparticles prepared using different surfactants.《Vaccine》.1997,第15卷(第17-18期),

审查员 王也

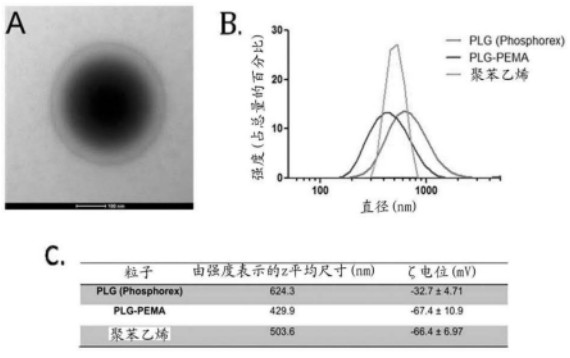
权利要求书1页 说明书40页
序列表1页 附图28页

(54)发明名称

肽缀合粒子

(57)摘要

本发明提供包含肽偶联可生物降解的乙交酯丙交酯共聚物(PLG)粒子的组合物具体地说,PLG粒子是表面官能化的以允许肽分子偶联至所述粒子的表面(例如,用于引发免疫耐受的诱导)。



CN 110064049 B

1.一种组合物,其包含:偶联至包含聚乙醇酸聚合物(PGA)、聚乳酸聚合物(PLA)或聚乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)聚合物的具有-100 mV至0 mV之间的负ζ电位的羧酸酯表面官能化的粒子的抗原,其中所述抗原封装于所述粒子内,其中所述粒子不含额外的治疗剂,且其中所述抗原是注射的物质、吸入的物质、酶替代疗法或病毒蛋白。

2.如权利要求1所述的组合物,其中所述粒子的ζ电位为约-100 mV至约-30 mV。

3.如权利要求2所述的组合物,其中所述粒子的ζ电位为约-50 mV至约-40 mV。

4.如权利要求1所述的组合物,其中所述粒子是聚乳酸乙醇酸共聚物粒子。

5.如权利要求1所述的组合物,其中所述粒子的直径为约0.1 μm至约10 μm。

6.如权利要求5所述的组合物,其中所述粒子的直径为约0.3 μm至约5 μm。

7.如权利要求6所述的组合物,其中所述粒子的直径为约0.5 μm至约3 μm。

8.如权利要求7所述的组合物,其中所述粒子的直径为约0.5 μm至约1 μm。

9.如权利要求8所述的组合物,其中所述粒子的直径为约0.5 μm。

10.如权利要求1所述的组合物,其中所述抗原包含选自以下的蛋白质的至少一部分:毛囊抗原、百喜草花粉(BaGP)、桃过敏原Pru p3、α s 1-酪蛋白奶过敏原、Apig1芹菜过敏原、Bere1巴西坚果过敏原、B-乳球蛋白奶过敏原、牛血清白蛋白、Cor a 1.04榛子过敏原或卵清蛋白蛋过敏原。

11.如权利要求1所述的组合物,其中所述抗原包括毛囊抗原、人原肌球蛋白同种型5、百喜草花粉(BaGP)、桃过敏原Pru p3、α s 1-酪蛋白奶过敏原、Apig1芹菜过敏原、Bere1巴西坚果过敏原、B-乳球蛋白奶过敏原、牛血清白蛋白、Cor a 1.04榛子过敏原或卵清蛋白蛋过敏原。

12.如权利要求1所述的组合物,其中所述粒子是可生物降解的。

13.如权利要求1至12中任一项所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体。

14.如权利要求1至13中任一项所述的组合物用于制备诱导受试者中的抗原特异性耐受的药物中的用途,其中所述粒子具有负ζ电位。

15.如权利要求14所述的用途,其中施用所述药物以治疗或预防疾病或病状,所述疾病或病状选自:食物过敏、环境过敏以及由所述受试者中的所述抗原引起以降低对所述抗原的过度反应的病状。

16.如权利要求14所述的用途,其中所述组合物是静脉内施用。

肽缀合粒子

[0001] 本发明是基于申请日为2013年6月21日,申请号为“201380041634.5”(国际申请号为PCT/US2013/047079),发明名称为“肽缀合粒子”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的声明

[0003] 本申请要求于2012年6月21日提交的美国临时专利申请号61/662,687的权益,所述申请以全文引用的方式并入本文中。

[0004] 联邦政府的支持

[0005] 本发明是根据国家卫生研究院颁发的R01 EB013198在政府支持下进行的。政府享有本发明中的某些权利。

[0006] 发明背景

[0007] 炎症性疾病和病症是其中异常或以其它方式失调的炎症性反应有助于疾病的病因或严重性的病状。实例包括自身免疫性疾病,诸如1型糖尿病和乳糜泻。

[0008] 这些疾病中许多疾病的特征在于在组织损伤或其它损害的部位处的单核细胞浸润。在这些浸润中已观测到的单核细胞的实例包括淋巴细胞,尤其是T淋巴细胞;以及单核吞噬细胞系统的细胞(MPS细胞),诸如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、小胶质细胞等。

[0009] 在单核细胞浸润物中所观测到的细胞中许多被怀疑在这些异常炎症性反应中具有作用。举例来说,在诸如多发性硬化的疾病中,$CD4^+$T细胞已知在病理性自身免疫反应中发挥关键作用。在T细胞活化的早期时间点,树突细胞和其它MPS细胞可负责$CD4^+$T细胞的活化。MPS细胞也可通过吞噬促成炎症,不过在至少一些炎症性疾病中,不清楚在不存在$CD4^+$T细胞的情况下所述细胞是否能够如此。

[0010] 外周血单核细胞可根据是否表达特定细胞表面分子归类为两个群组中的一种。具体来说,人“定居型单核细胞”或“成熟单核细胞”理解为具有$CD14^{lo}CD16^+$表型(小鼠对应细胞是$CX^3CR1^{hi}CCR2^-Gr1^-$)。细胞的另一个群组,“炎症性单核细胞”或“未成熟单核细胞”理解为具有$CD14^+CD16^-$表型(小鼠对应细胞是$CX^3CR1^{lo}CCR2^+Gr1^+$)。(Geissmann F.等2003 Immunity 19:71-82)

[0011] 重要的是,当后者在其被观测到从骨髓衍生的外周血细胞迁移到发炎组织中的意义上被理解为“炎症性”时,这些细胞尚未显示直接或通过其它细胞的作用引起炎症。此外,当这些细胞分化时可形成的各种MPS细胞也尚未显示引起炎症。

[0012] 与不期望的免疫反应相关的病症中的一般长期免疫抑制的常规临床策略基于长期施用广泛作用的免疫抑制药物,例如信号1阻滞剂,诸如环孢菌素A(CsA)、FK506(他克莫司(tacrolimus))以及皮质类固醇。长期使用高剂量的这些药物可具有毒性副作用。此外,即使是在那些能够耐受这些药物的患者中,对终生免疫抑制药物疗法的需要带来严重副作用的重大风险,包括肿瘤、严重感染、肾毒性以及代谢紊乱。

[0013] 已开发出诱导抗原特异性耐受的方法,其包括抗原或肽的细胞偶联(cell coupling)。举例来说,在一种方法中,肽诱导的细胞偶联耐受涉及用疾病特异性的自体抗原和乙烯碳二亚胺(ECDI)偶联剂在无菌条件下收集、分离以及处理外周血细胞,并且随后再注入供体/患者体内。这一过程是昂贵的,并且必须由熟练从业者在严密监控条件下进

行,并且受到可进行该程序的中心的数目的限制。红血细胞用作供体细胞类型使得潜在来源扩展到包括同种异体供体,因此显著增加了源细胞的供应并且潜在地将这种疗法的递送扩展到核准输血的任何环境。这些方法在源细胞供应和组织类型匹配以使对供体细胞的免疫反应最小化的必要性方面具有明显的限制。此外,局部处理细胞以经由EDCI偶联自体抗原提出了重要的质量控制问题。此外,这些方法还需要至少一些关于寻求免疫耐受的病理抗原的知识。

[0014] 最近,已描述了肽偶联粒子,其消除对源细胞供应的需求并且规避了现有方法的组织分型要求,参见WO 2010/085509,其以全文引用的方式并入本文中。然而,这些方法仍然依赖于抗原特异性免疫耐受。

[0015] 抗原特异性免疫耐受通常是不理想的,因为特异性抗原/表位通常在人类疾病中未知。此外,为使抗原特异性方法是有效的,受试者之间的抗原可不同,因此,将需要确定各个患者将识别哪些抗原,或者它需要在施用之前使可能的肽库与粒子偶联。这些肽的合成和各个偶联既费时又昂贵。因此,需要一种解决这两个问题的疗法,从而消除对组织匹配细胞来源的需要,并且同时消除对合成和偶联大量肽的需要。

[0016] 发明概述

[0017] 在一些实施方案中,本发明提供组合物(例如,用于诱导抗原特异性耐受),其包含与抗原性肽连接的载体粒子(例如,PLG粒子)。在某些实施方案中,载体粒子是乙交酯丙交酯共聚物(PLG)粒子。

[0018] 在一些实施方案中,本发明提供组合物,其包含:偶联至具有负ζ电位的载体粒子的抗原。在一些实施方案中,粒子的ζ电位为约-100mV至约0mV。在一些实施方案中,粒子的ζ电位为约-50mV至约-40mV。在一些实施方案中,粒子是摩尔比为约80:20至约100:0的的共聚物。在一些实施方案中,共聚物比率可以是但不限于聚苯乙烯:聚(羧酸乙烯酯)/80:20、聚苯乙烯:聚(羧酸乙烯酯)/90:10、聚(羧酸乙烯酯):聚苯乙烯/80:20、聚(羧酸乙烯酯):聚苯乙烯/90:10、聚乳酸:聚乙醇酸/80:20或聚乳酸:聚乙醇酸/90:10。然而,在其它实施方案中,粒子是聚苯乙烯粒子、羧化聚苯乙烯(polysterene)粒子或聚乳酸乙醇酸共聚物粒子。在一些实施方案中,粒子是聚乳酸乙醇酸共聚物粒子。

[0019] 在一些实施方案中,粒子的直径介于约0.1μm至约10μm之间。在一些实施方案中,粒子的直径介于约0.3μm至约5μm之间。在一些实施方案中,粒子的直径介于约0.5μm至约3μm之间。在一些实施方案中,粒子的直径介于约0.5μm至约1μm之间。在一些实施方案中,粒子的直径为约0.5μm。

[0020] 在其它实施方案中,抗原包含自身免疫性抗原、在要移植到受试者中的组织上表达的抗原或过敏原的至少一部分。在一些实施方案中,抗原包含髓磷脂碱性蛋白、乙酰胆碱受体、内源性抗原、髓磷脂少突细胞糖蛋白、胰β-细胞抗原、胰岛素、谷氨酸脱羧酶(GAD)、11型胶原蛋白、人软骨gp39、fp130-RAPS、蛋白脂质蛋白,纤维蛋白(fibrillarin)、小核仁蛋白、甲状腺刺激因子受体、组蛋白、糖蛋白gp70、丙酮酸脱氢酶脱氢硫辛酰胺乙酰转移酶(PCD-E2)、毛囊抗原、A-麦胶蛋白(A-gliaden)以及人原肌球蛋白同种型5、百喜草花粉(BaGP)、桃过敏原Pru p 3、αs 1-酪蛋白奶过敏原(Caein Milk allergen)、Apig1芹菜过敏原、Bere1巴西坚果过敏原、B-乳球蛋白奶过敏原、牛血清白蛋白、Cor a 1.04榛子过敏原或卵清蛋白蛋过敏原的至少一部分。

[0021] 在其它实施方案中,抗原包括自身免疫性抗原、在要移植到受试者中的组织上表达的抗原或过敏原。在非限制性实施方案中,抗原包括例如髓磷脂碱性蛋白、乙酰胆碱受体、内源性抗原、髓磷脂少突细胞糖蛋白、胰β-细胞抗原、胰岛素、谷氨酸脱羧酶(GAD)、11型胶原蛋白、人软骨gp39、fp130-RAPS、蛋白脂质蛋白,纤维蛋白、小核仁蛋白、甲状腺刺激因子受体、组蛋白、糖蛋白gp70、丙酮酸脱氢酶脱氢硫辛酰胺乙酰转移酶(PCD-E2)、毛囊抗原、A-麦胶蛋白或人原肌球蛋白同种型5、百喜草花粉(BaGP)、桃过敏原Pru p 3、αs 1-酪蛋白奶过敏原、Apig1芹菜过敏原、Bere1巴西坚果过敏原、B-乳球蛋白奶过敏原、牛血清白蛋白、Cor a 1.04榛子过敏原或卵清蛋白蛋过敏原。

[0022] 在一些实施方案中,抗原通过缀合物分子偶联至所述粒子。在一些实施方案中,抗原通过接头偶联至所述粒子。在一些实施方案中,缀合物分子是乙烯碳二亚胺(ECDI)。在一些实施方案中,抗原偶联至具有负ζ电位的粒子的外部。在一些实施方案中,抗原封装于具有负表面ζ电位的粒子中。

[0023] 在一些实施方案中,粒子是可生物降解的。在一些实施方案中,粒子是表面官能化的。在一些实施方案中,粒子是羧酸酯表面官能化的。

[0024] 在一些实施方案中,本发明提供诱导受试者中的抗原特异性耐受的方法,其包括:向所述受试者施用有效量的包含抗原偶联粒子的组合物,其中所述粒子具有负ζ电位,并且其中所述粒子和抗原诱导所述抗原在所述受试者中的耐受。在一些实施方案中,进行施用以治疗或预防疾病或病状。在一些实施方案中,施用是在由所述抗原引起的疾病或病状发作之前或之后进行。在一些实施方案中,疾病或病状选自:自身免疫性疾病、炎症性疾病、过敏、移植排斥以及超免疫反应。在一些实施方案中,疾病或病状选自:多发性硬化、1型糖尿病、哮喘、食物过敏、环境过敏、乳糜泻以及由所述受试者中的所述抗原引起以降低对所述抗原的过度反应的病状。在一些实施方案中,方法进一步包括重复向所述受试者施用所述组合物。

[0025] 在一些实施方案中,组合物是静脉内施用。

[0026] 在一些实施方案中,本发明进一步提供一种用于制备具有负ζ电位的免疫修饰粒子的方法,所述方法包括:在有效形成具有负ζ电位的免疫修饰粒子的条件下,使免疫修饰粒子前体与缓冲溶液接触。在一些实施方案中,免疫修饰粒子前体通过共聚合形成。在一些实施方案中,缓冲溶液具有碱性pH。在一些实施方案中,缓冲溶液是碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸氢锂、磷酸二氢钾、磷酸二氢钠或磷酸二氢锂。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供一种组合物,其包含封装于表面官能化脂质体的核心内的抗原。在另一个实施方案中,脂质体是由30:30:40比率的磷脂酰胆碱:磷脂酰甘油:胆固醇组成。在另一个实施方案中,所述抗原包括自身免疫性抗原、在要移植到受试者中的组织上表达的抗原或过敏原。

[0028] 附图简述

[0029] 图1示出了示出了(A)乙交酯丙交酯共聚物(PLG)粒子的显微照片。B和C示出了通过动态光散射分析对表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以2.5×10^5次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体每批次变化5-15%,但通常Z均直径是567nm、峰值直径是670nm并且多分散

指数是0.209。

[0030] 图2显示PLG纳米粒子诱导抗原特异性耐受。使用免疫优势蛋白脂质蛋白$PLP_{139-151}$表位(PLG-$PLP_{139-151}$)诱导耐受性以预防复发性实验性自身免疫性脑炎(R-EAE)。在相对于免疫时间(第0天)的第-7天用$PLP_{139-151}$-PLGA(N＝5)、$OVA_{323-339}$-PLGA(N＝5)或未缀合PLGA(N＝5)处理小鼠。通常在约第12天至第14天观测到疾病高峰期,并且对小鼠关于临床疾病进行评分。不具有肽或用对照肽$OVA_{323-339}$修饰的粒子不预防疾病诱导。然而,用$PLP_{139-151}$修饰的PLGA粒子产生的临床得分是0(无疾病),除了在第20天与第30天之间展现低于1的低临床得分。

[0031] 图3显示所施用的粒子的类型对小鼠模型中EAE的发生有影响。A)示出了平均临床得分,并且B)示出了EAE动物的平均累积得分。在相对于免疫时间(第0天)的第-7天用$OVA_{323-339}$-PLS(N＝5)、$OVA_{323-339}$-PLGAPHOSPOREX(N＝5)、$OVA_{323-339}$-PLGAPEMA(N＝5)、$PLP_{139-151}$-PLA(N＝5)、$PLP_{139-151}$-PLGAPHOSPOREX(N＝5)或$PLP_{139-151}$-PLGPEMA(N＝5)处理小鼠。通常在约第12天至第14天观测到疾病高峰期,并且对小鼠关于临床疾病进行评分。用对照肽$OVA_{323-339}$修饰的任何组合物的粒子不预防疾病诱导。然而,$PLP_{139-151}$偶联PLG珠粒比$PLP_{139-151}$偶联商业(phosphorex)PLG或聚苯乙烯更有效下调对R-EAE的诱导。

[0032] 图4显示与那些用OVA-PLG粒子处理的动物相比,那些在第28天用可溶性OVA处理的小鼠展现温度降低。在递送粒子1小时内未观测到体温降低。

[0033] 图5显示在缓解期间施用PLP-PLG不引起任何过敏反应相关的死亡。在六至八周龄雌性SJL/J小鼠中通过皮下注射CFA中的$PLP_{139-151}$诱导EAE,并且监测并记录临床疾病的发生(B)。在相对于疾病诱导的第21天,给小鼠静脉内注射可溶性$PLP_{139-151}$(空心方形)、可溶性$OVA_{323-339}$(空心圆形)或偶联至PLG纳米粒子的相同肽(实心)。在注射之后,每10分钟监测并记录动物的温度持续1小时(A)

[0034] 图6示出了在疾病诱导之前七天静脉内施用$PLP_{139-151}$-PLG的最佳给药。临床疾病的发生是相较于用$OVA_{323-339}$-PLG处理的SJL/J小鼠测量的(A)。给六至八周龄雌性SJL/J小鼠静脉内注射$PLP_{139-151}$(方形)-或$OVA_{323-339}$(圆形)偶联的PLG纳米粒子。7天(B)、25天(C)或50天(D)后通过皮下注射CFA中的$PLP_{139-151}$诱导EAE。跟踪图B的动物的临床疾病持续100天。在相对于疾病诱导的第8天,在图B中所示的小鼠子组中进行迟发型超敏(DTH)反应(E)。将来自图B中$PLP_{139-151}$/CFA初免组($OVA_{323-339}$-PLG和$PLP_{139-151}$-PLG)的所选代表性动物用初免$PLP_{139-151}$表位和$OVA_{323-339}$对照肽进行耳部激发。24小时后测定作为DTH的量度的耳肿胀并且扣除激发之前的反应。给六至八周龄雌性SJL/J小鼠静脉注射$PLP_{178-191}$(三角形)-、$OVA_{323-339}$(圆形)、或$PLP_{139-151}$(方形)偶联的PLG纳米粒子或单独的未偶联粒子(空心圆形)(F)。7天后通过皮下注射CFA中的$PLP_{178-191}$诱导EAE,并且在所示时间点监测疾病。

[0035] 图7A-D显示静脉内或腹膜内施用PLG-$PLP_{139-151}$粒子时预防性耐受最有效。用静脉内施用的$PLP_{139-151}$-PLG处理的动物未发生疾病并且在大多数时间点平均临床得分是0。

[0036] 图8A-F显示施用$OVA_{323-339}$-PLG粒子抑制所处理动物中的Th1和Th17反应。

[0037] 图9A-C显示在用$PLP_{139-151}$-PLG处理的动物的脊髓内的免疫细胞浸润减少,并且其与天然组织的类似性高于$OVA_{323-339}$-PLG处理的动物的组织。$OVA_{323-339}$-PLG处理的动物针对CD45、CD4以及CD11b具有阳性染色;而$PLP_{139-151}$-PLG处理的动物针对这些因子具有最少染色。

[0038] 图10A-C显示施用$PLP_{139-151}$-PLG粒子抑制所处理小鼠脊髓中的血脑屏障(BBB)破裂和巨噬细胞活化。将动物用完全弗氏佐剂(CFA)、$OVA_{323-339}$PLG粒子或$PLP_{139-151}$-PLG粒子处理。测定了EAE的临床得分和发生率百分比(B)并且经由体内成像(A和C)观测了脊髓。

[0039] 图11A和B示出了经由体内成像的所处理小鼠的脊髓。C-F是显示图像数据的量化的图。

[0040] 图12显示施用其中已封装$PLP_{139-151}$的PLG粒子抑制小鼠中R-EAE的诱导。封装自体抗原的能力允许使用蛋白质的复杂混合物或甚至在表面结合情况下不可能的器官匀浆,从而允许更高抗原覆盖度并且因此更有效地应对表位扩展。

[0041] 图13显示用$PLP_{139-151}$-PLG粒子和抗CD25抗体处理的动物有时展示比用$PLP_{139-151}$-PLG粒子和对照IgG抗体处理的动物高的平均临床得分。

[0042] 图14显示由$PLP_{139-151}$-PLG粒子诱导的在反应性和过继性EAE中的治疗性耐受。在六至八周龄雌性SJL/J小鼠中通过过继转移2.5×106个$PLP_{139-151}$活化母细胞来诱导过继性EAE。在疾病诱导之后2天(A)或14天(C),给小鼠静脉内注射偶联至500nm PLG纳米粒子的$PLP_{139-151}$(方形)或$OVA_{323-339}$(圆形)肽。将临床疾病得分与用抗原偶联的脾细胞处理之后的临床疾病得分相比较(A)。在第42天从$PLP_{139-151}$或$OVA_{323-339}$耐受化的小鼠收集脑和脊髓用于组织学分析。将来自图A的小鼠的切片针对PLP蛋白和CD45进行染色(B)。将来自图C的小鼠的脊髓切片用勒克司坚牢蓝(Luxol Fast Blue)染色(D)。脱髓鞘和细胞浸润的区域由箭头指示。

[0043] 图15示出了描绘在用缀合至$OVA_{323-339}$或$PLP_{139-151}$的SP或PLG粒子处理之后具有反应性EAE和过继性EAE的小鼠的平均临床得分的图。在疾病诱导之后10天(A)或2天(B)给小鼠静脉内注射偶联至500nm纳米粒子的$PLP_{139-151}$-SP、$PLP_{139-151}$-PLG或$OVA_{323-339}$-SP或$OVA_{323-339}$-PLG肽,并且确定平均临床得分。在两种情况下,施用$PLP_{139-151}$-PLG粒子均在小鼠中诱导耐受。

[0044] 图16显示在PLP-PLG耐受化小鼠中中枢神经系统免疫细胞的浸润也显著减少。在通过过继转移进行EAE诱导之后2天给SJL/J小鼠静脉内注射与$PLP_{139-151}$(方形)或$OVA_{323-339}$(圆形)偶联的500nm PLG纳米粒子。在疾病高峰期(第14天),将脑和脊髓去除并且通过流式细胞术计算淋巴细胞(B)、APC(C)、小胶质细胞(D)、外周树突细胞(E)、髓样树突细胞(F)以及巨噬细胞(G)的数目。这些群体的设门策略描绘于(A)中。将CNS细胞制备物用PMA和离子霉素刺激5小时,然后针对IL-17A和IFN-γ进行细胞内染色(H)。

[0045] 图17显示施用封装于PLG粒子中的$PLP_{139-151}$肽在粒子与PBS一起施用时诱导耐受。然而,施用抗PD-1抗体使此耐受降低。

[0046] 图18显示施用封装于PLG粒子中的$PLP_{139-151}$肽在粒子与PBS一起施用时诱导耐受。施用抗CD40抗体使此耐受降低,但通过添加抗IL-12抗体可使此耐受降低得以逆转。

[0047] 图19A-G显示预防性施用OVA-PLG使IL-4、IL-5、IL-13以及IL-10的分泌减少,并且使肺中血清OVAIgE和嗜酸性粒细胞的水平降低。

[0048] 图20显示封装于PLG粒子中的OVA预防性地抑制纵隔淋巴结的OVA特异性体外回忆反应(recall response)。在那些用OVA-PLG处理的动物中,在用25μg OVA再刺激之后所观测到的淋巴结增殖减少(A)。此外,用OVA-PLG处理使在用OVA再刺激之后细胞因子的释放减少。在用OVA-PLG处理的小鼠中IL-4、IL-5、IL-13以及IL-10的水平降低(B)。

[0049] 图21显示治疗性施用OVA-PLG使IL-4、IL-5、IL-13以及IL-10的分泌减少,并且使肺中血清OVA IgE和嗜酸性粒细胞的水平降低。

[0050] 图22显示封装于PLG粒子中的OVA治疗性下调BAL流体中的OVA特异性Th2细胞因子优于OVA偶联的PLG粒子。在第0天和第14天将小鼠用OVA/明矾以10μg/小鼠的剂量进行腹膜内处理。在第28天和第42天将小鼠静脉内施用偶联至PLG粒子的OVA或封装于PLG粒子中的OVA。在第56天至第58天之间,用雾化OVA处理小鼠三次。这些图描绘了用偶联至PLG粒子的OVA(A)或封装于PLG粒子内的OVA(B)处理动物时的细胞因子分泌。

[0051] 图23示出了在用p31-PLG粒子处理之后1型糖尿病动物的血糖水平。施用p31肽偶联的PLG粒子产生与在施用MOG35-55肽偶联的粒子之后可见的血糖水平相比更低的血糖水平(A和B)。在p31-PLG处理的小鼠中,与MOG35-55肽-PLG处理的小鼠相比在动物中所观测到的IFNγ分泌细胞的百分比也降低(C)。

[0052] 图24A-B显示p31-PLG诱导的耐受需要Treg。通过过继转移在小鼠中诱导1型糖尿病。在活化细胞转移至NOD.SCID小鼠中之后两小时,将小鼠用p31-PLG或MOG_{35-55}PLG粒子耐受化。Treg耗竭消除通过施用p31-PLG粒子诱导的耐受。

[0053] 图25显示施用胰岛素偶联的PLG粒子显著增加在300天内未发生糖尿病的小鼠的百分比(69.6%相较于22.7%;p=0.0027)。经由在6周、8周以及10周龄静脉内施用将NOD小鼠用BSA(N=22)或胰岛素(N=23)偶联的PLG粒子进行处理。然后分析小鼠的糖尿病的发生。

[0054] 图26示出了在接受者小鼠中观测到的CD45.1供体细胞的百分比。在第-7天将雌性CD45.2小鼠用OVA-PLG或Dby-PLG耐受化。在第-1天,将小鼠以200拉德进行照射并且然后在第0天移植来自雄性CD45.1小鼠的1×106、5×106或1×107个骨髓细胞。然后在第1天将接受者小鼠用OVA-PLG、Dby-SP或Dby-PLG耐受化并且收获血液用于关于嵌合性的FACS分析。

[0055] 图27示出了在第1天用OVA-PLG、Dby-SP或Dby-PLG耐受化之后接受者小鼠中的供体CD45.1细胞的百分比。一只阳性对照小鼠不展示显著植入(约10%)。所有阴性对照小鼠均未植入供体细胞。一只Dby-SP小鼠不展示显著植入(约10%)。两只OVA-PLG小鼠植入了供体细胞(约10%):一只到第16周完全排斥。一只Dby-PLG小鼠在第12周开始排斥并且到第16周为10%。到第16周Dby-PLG组在10%-56%植入范围内。OVA-PLG小鼠展示:1)自发植入,2)OVA323与Dby之间的序列同源性,或3)粒子的致耐受性。Dby-PLG允许比Dby-SP和OVA-PLG更多的植入。

[0056] 图28显示定时耐受对接受者小鼠中CD45.1细胞的百分比有影响。阳性对照显示植入(约4%)少于预期(约10%)。一只阴性对照小鼠具有5%植入。在所有3个OVA-PLG组中,在第-7天、第+1天组中的一只小鼠显示植入(12%)。在第1天的耐受比在第-7天的耐受更具临床相关性。

[0057] 图29显示在施用后3小时可检测的偶联至抗原或不含抗原的香豆素-6PLGA粒子,但在施用后24小时不可检测。在施用后3小时粒子可检测,但在施用后24小时不可检测。初次接受试验的未注射小鼠(顶部行)与静脉内荧光PLGA/PEMA微粒注射的小鼠脾(左侧列)、肝(中间列)以及肺(左侧列)切片(注射后3小时(中间行)和注射后24小时(底部行),用DAPI复染)相比较。

[0058] 图30显示在6小时和15小时后与肝中的F4/80+细胞共定位的PLGA粒子。

[0059] 图31显示在静脉内输注后24小时边缘区域巨噬细胞主要摄取TAMRA标记的$PLP_{139-151}$偶联粒子。最高百分比的$PLP_{139-151}$+细胞是边缘区域巨噬细胞。

[0060] 图32描绘了相对于$PLP_{139-151}$/CFA初免天数的日平均临床得分。在SJL/J小鼠中通过使用核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子来诱导免疫耐受抑制了$PLP_{139-151}$/CFA诱导的R-EAE。

[0061] 图33显示用封装型OVA-PLG处理的小鼠显示最大的嗜酸性粒细胞累积降低。

[0062] 图34显示与未处理或对照处理的动物相比用封装型OVA-PLG处理的小鼠显示最大的血清IgE水平降低。

[0063] 图35示出了通过动态光散射分析对核心内含有可溶性PLP139-151的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以1.792×10^5次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的Z平均直径是584nm、峰值直径是679nm并且多分散指数是0.162。这些结果代表遵循上述方案进行的6个批次的合成。

[0064] 图36示出了通过ζ电位测量对核心内含有可溶性PLP139-151的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以6.67×104次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的峰值ζ电位是-48.9mV并且ζ偏差是5.14mV。这些结果代表遵循上述方案进行的6个批次的合成。

[0065] 图37示出了通过动态光散射分析对核心内含有可溶性卵清蛋白的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以1.822×105次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的Z平均直径是569.7nm、峰值直径是700.3nm并且多分散指数是0.230。这些结果代表遵循上述方案进行的3个批次的合成。

[0066] 图38示出了通过ζ电位测量对核心内含有可溶性卵清蛋白的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以2.67×104次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的峰值ζ电位是-52.2mV并且ζ偏差是5.38mV。这些结果代表遵循上述方案进行的3个批次的合成。

[0067] 图39示出了证实核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$肽的表面官能化脂质体在多发性硬化小鼠模型中诱导免疫耐受的图。将动物用核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$肽的表面官能化脂质体(圆形)或含有可溶性$OVA_{323-339}$肽(方形)的表面官能化脂质体进行处理。那些接受$PLP_{139-151}$肽脂质体的动物的平均临床得分低于接受$OVA_{323-339}$肽脂质体的动物。

[0068] 发明详述

[0069] 本发明人已发现偶联至抗原的纳米粒子可诱导对自身免疫性疾病的耐受并且降低免疫反应。这些粒子可诱导耐受,不管它们是否结合到粒子的表面上或封装于粒子内。因此,这些粒子可用于治疗以过度炎症性免疫反应为特征的任何疾病或病状,诸如自身免疫性疾病。

[0070] 如本文所用的“粒子”是指任何非组织衍生的物质组合物,其可以是球或球状实体、珠粒或脂质体。术语“粒子”、术语“免疫修饰粒子”、术语“载体粒子”以及术语“珠粒”可根据上下文互换使用。另外,术语“粒子”可用于涵盖珠粒和球。

[0071] 如本文所用的“带负电荷的粒子”是指已被修饰成具有小于零的净表面电荷的粒子。

[0072] “羧化粒子”或“羧化珠粒”或“羧化球”包括已被修饰成在其表面含有羧基的任何粒子。在一些实施方案中,添加羧基例如通过与诸如MARCO的清除剂受体相互作用增强吞噬细胞/单核细胞从循环中对粒子的摄取。可使用添加羧基的包括但不限于聚(乙烯-马来酸酐)(PEMA)的任何化合物来实现粒子的羧化。

[0073] 如本文所用的“抗原性部分”是指由宿主免疫系统识别的例如肽等任何部分。抗原性部分的实例包括但不限于自体抗原和/或细菌或病毒蛋白、肽或组件。在不受理论束缚的情况下,当羧化珠粒本身可由免疫系统识别时,没有连接别的部分的羧化珠粒不视为用于本发明目的的“抗原性部分”。

[0074] 如本文所用的“裸珠粒”或“裸粒子”或“裸球”是指尚未羧化的珠粒、粒子或球。

[0075] 如本文所用“促炎性介导物”或“促炎性多肽”是指诱导、维持或延长受试者的炎症的多肽或其片段。促炎性介导物的实例包括但不限于细胞因子和趋化因子。

[0076] 粒子可具有任何粒子形状或构象。然而,在一些实施方案中,优选使用较不可能在体内聚集的粒子。这些实施方案中的粒子的实例是具有球形形状的粒子。

[0077] 本发明的另一个方面涉及一种组合物,其包含具有负ζ电位并且无抗原性部分的免疫修饰粒子。在另一个实施方案中,本发明提供包含具有负ζ电位并且偶联至抗原的免疫修饰粒子的组合物。在另一个实施方案中,抗原偶联至粒子的外部。在另一个实施方案中,抗原封装于粒子内部。

[0078] 本发明的另一个方面涉及一种用于制备具有ζ电位并且无抗原性部分的免疫修饰粒子的方法。所述方法涉及在有效形成具有负ζ电位的免疫修饰粒子的条件下,使免疫修饰粒子前体与缓冲溶液接触。在本发明的一些实施方案中,免疫修饰粒子前体是经由共聚合形成的。粒子微结构可取决于共聚合的方法。

[0079] 在一些实施方案中,抗原性肽分子通过缀合物分子和/或接头基团偶联至载体粒子(例如免疫修饰粒子)。在一些实施方案中,使抗原性肽和/或细胞凋亡信号传导分子偶联至载体(例如PLG粒子)包括一种或多种共价和/或非共价相互作用。在一些实施方案中,抗原性肽连接至具有负ζ电位的载体粒子的表面。在一些实施方案中,抗原性肽封装于具有负ζ电位的载体粒子内。

[0080] 在一个实施方案中,接触免疫修饰粒子的缓冲溶液可具有碱性pH值。适合于碱性溶液的碱性pH值包括7.1、7.5、8.0、8.5、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0以及13.5。缓冲溶液还可以由任何合适的碱和其缀合物制成。在本发明的一些实施方案中,缓冲溶液可包括但不限于碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸氢锂、磷酸二氢钾、磷酸二氢钠或磷酸二氢锂和其共轭物。

[0081] 在本发明的一个实施方案中,免疫修饰粒子含有共聚物。这些共聚物可具有不同摩尔比。本发明免疫修饰粒子的合适的共聚物比率可以是80:20、81:19、82:18、83:17、84:16、85:15、86:14、87:13、88:12、89:11、90:10、91;:9、92:8、93:7、94:6、95:5、96:4、97:3、

98:2、99:1或100:0。在另一个实施方案中,共聚物可以是周期共聚物、统计共聚物、线性共聚物、支化共聚物(包括星形、刷状或梳状共聚物)。在一些实施方案中,共聚物比率可以是但不限于聚苯乙烯:聚(羧酸乙烯酯)/80:20、聚苯乙烯:聚(羧酸乙烯酯)/90:10、聚(羧酸乙烯酯):聚苯乙烯/80:20、聚(羧酸乙烯酯):聚苯乙烯/90:10、聚乳酸:聚乙醇酸/80:20或聚乳酸:聚乙醇酸/90:10。

[0082] 在一个实施方案中,粒子是脂质体。在另一个实施方案中,粒子是由以下脂质按以下摩尔比组成的脂质体-30:30:40磷脂酰胆碱:磷脂酰甘油:胆固醇。在另一个实施方案中,粒子封装于脂质体内。

[0083] 各粒子的尺寸未必均匀,不过粒子的尺寸通常必须足以在抗原呈递细胞或其它MPS细胞中引发吞噬作用。优选地,粒子的尺寸是微观或纳米观的,以提高溶解性、避免由体内聚集引起的可能的并发症并且促进胞饮作用。粒径可以是从间隙空间摄取至淋巴细胞成熟区域中的一个因素。直径是约0.1μm至约10μm的粒子能够引发吞噬作用。因此,在一个实施方案中,粒子的直径在这些限制以内。在另一个实施方案中,粒子的直径是约0.3μm至约5μm。在另一个实施方案中,粒子的直径是约0.5μm至约3μm。在另一个实施方案中,粒子的尺寸是约0.1μm或约0.2μm或约0.3μm或约0.4μm或约0.5μm或约1.0μm或约1.5μm或约2.0μm或约2.5μm或约3.0μm或约3.5μm或约4.0μm或约4.5μm或约5.0μm。在一个特定实施方案中,粒子的尺寸是约0.5μm。在一些实施方案中,粒子的总重量小于约10,000kDa,小于约5,000kDa,或小于约1,000kDa、500kDa、400kDa、300kDa、200kDa、100kDa、50kDa、20kDa、10kDa。组合物中的粒子不必具有均一直径。举例来说,药物制剂可含有多个粒子,其中一些是约0.5μm,而其它是约1.0μm。这些给定的范围内的粒径的任何混合物均将是适用的。

[0084] 本发明的粒子可具有特定ζ电位。在某些实施方案中,ζ电位是负的。在一个实施方案中,ζ电位小于约-100mV。在一个实施方案中,ζ电位小于约-50mV。在某些实施方案中,粒子具有介于-100mV与0mV之间的ζ电位。在另一个实施方案中,粒子具有介于-75mV与0mV之间的ζ电位。在另一个实施方案中,粒子具有介于-60mV与0mV之间的ζ电位。在另一个实施方案中,粒子具有介于-50mV与0mV之间的ζ电位。在另一个实施方案中,粒子具有介于-40mV与0mV之间的ζ电位。在另一个实施方案中,粒子具有介于-30mV与0mV之间的ζ电位。在另一个实施方案中,粒子具有介于-20mV与+0mV之间的ζ电位。在另一个实施方案中,粒子具有介于-10mV与-0mV之间的ζ电位。在一个特定实施方案中,粒子具有介于-50mV与-40mV之间的ζ电位。

[0085] 在一些实施方案中,选择载体(例如正、负、中性)的电荷以赋予应用特异性益处(例如生理相容性、有益的表面肽相互作用等)。在一些实施方案中,载体具有净中性或负电荷(例如以减少非特异性结合于通常具有净负电荷的细胞表面)。在某些实施方案中,载体能够直接或间接缀合至需要耐受性的抗原(本文中也称为抗原特异性肽、抗原性肽、自体抗原、诱导抗原或耐受化抗原)。在一些情况下,载体具有暴露于表面上的多个结合位点(例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个……20个……50个……100个或更多个),以具有抗原特异性肽的多个拷贝,或多个不同的肽(例如为增加耐受反应的可能性)。在一些实施方案中,载体展现单一类型的抗原性肽。在一些实施方案中,载体在表面上展现多种不同的抗原性肽。在一些实施方案中,载体表面展现用于共价连接选定部分(例如,抗原性肽)的官能团。在一些实施方案中,载体表面官能团提供用于与选定部分(例如,抗原性肽)非共价相

互作用的位点。在一些实施方案中,载体具有可在不形成化学键的情况下吸附缀合部分的表面。

[0086] 在一些实施方案中,粒子是非金属的。在这些实施方案中,粒子可以是由聚合物形成的。在一个优选实施方案中,粒子是在个体中可生物降解的。在此实施方案中,粒子可以多次剂量提供于个体中,而不会在个体中存在粒子累积。合适的粒子的实例包括聚苯乙烯粒子、PLGA粒子以及金刚石粒子。

[0087] 优选地,粒子表面是由使非特异性或不需要的生物相互作用最小化的材料组成。粒子表面与间质之间的相互作用可以是在淋巴摄取中发挥作用的一个因素。粒子表面可涂有用于防止或减少非特异性相互作用的材料。通过用亲水层(诸如聚(乙二醇)(PEG)和其共聚物,诸如PLURONICS(包括聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇)的共聚物))涂布粒子进行的空间稳定化可减少与间质的蛋白质的非特异性相互作用,如由皮下注射后改善的淋巴摄取所证实。所有这些事实均指向粒子的物理性质在淋巴摄取方面的重要性。可生物降解的聚合物可用于制备全部或一些聚合物和/或粒子和/或层。可生物降解的聚合物可例如通过官能团与溶液中的水反应的结果经历降解。如本文所用的术语"降解"是指通过减小分子量或通过将疏水性基团转化成亲水性基团变得可溶。具有酯基的聚合物通常经受自发水解,例如聚交酯和聚乙交酯。

[0088] 本发明的粒子还可以含有其它组分。举例来说,载体可具有并入或缀合至载体的成像剂。目前市售的具有成像剂的载体纳米球的实例是Kodak X-sight纳米球。无机量子束缚发光纳米晶体(称为量子点(QD))已成为FRET应用中的理想供体:其高量子产率和可调尺寸依赖性斯托克斯位移(Stokes Shift)允许不同尺寸在以单一紫外线波长激发时发射蓝光到红外光。(Bruchez等,Science,1998,281,2013;Niemeyer,C.M Angew.Chem.Int.编著2003,42,5796;Waggoner,A.Methods Enzymol.1995,246,362;Brus,L.E.J.Chem.Phys.1993,79,5566)。诸如基于一类称为树枝状聚合物的聚合物的杂化有机/无机量子点的量子点可用于生物标记、成像以及光学生物传感系统中。(Lemon等,J.Am.Chem.Soc.2000,122,12886)。不同于无机量子点的传统合成,这些杂化量子点纳米粒子的合成不需要高温或高毒性、不稳定试剂。(Etienne等,Appl.Phys.Lett.87,181913,2005)。

[0089] 粒子可由广泛范围的材料形成。粒子优选由适合用于生物用途的材料组成。举例来说,粒子可以由玻璃、硅石、羟基羧酸的聚酯、二羧酸的聚酐或羟基羧酸与二羧酸的共聚物组成。更通常,载体粒子可由直链或支链、取代或未取代、饱和或不饱和、线性或交联的烷基、卤烷基、硫烷基、氨基烷基、芳基、芳烷基、烯基、芳烯基、杂芳基或烷氧基羟基酸的聚酯;或直链或支链、取代或未取代、饱和或不饱和、线性或交联的烷基、卤烷基、硫烷基、氨基烷基、芳基、芳烷基、烯基、芳烯基、杂芳基或烷氧基二羧酸的聚酐组成。另外,载体粒子可以是量子点或由量子点组成,诸如量子点聚苯乙烯粒子(Joumaa等(2006)Langmuir 22:1810-6)。还可使用包括酯与酸酐键的混合物(例如,乙醇酸和癸二酸的共聚物)的载体粒子。举例来说,载体粒子可包含包括以下的材料:聚乙醇酸聚合物(PGA)、聚乳酸聚合物(PLA)、聚癸二酸聚合物(PSA)、聚乳酸乙醇酸共聚物共聚物(PLGA或PLG;术语可互换)、[rho]聚乳酸癸二酸共聚物(PLSA)、聚乙醇酸癸二酸共聚物(PGSA)等。适用于本发明的其它生物相容、可生物降解的聚合物包括己内酯、碳酸酯、酰胺、氨基酸、原酸酯、缩醛、氰基丙烯酸酯和可降解

氨基甲酸乙酯的聚合物或共聚物,以及这些物质与直链或支链、取代或未取代的烷基、卤烷基、硫烷基、氨基烷基、烯基或芳族羟基酸或二羧酸的共聚物。此外,具有反应性侧链基团的生物学上重要的氨基酸(诸如赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸以及半胱氨酸)或其对映异构体可包括于共聚物中,其中上述材料中的任何材料提供反应性基团用于缀合至抗原肽和蛋白质或缀合部分。适合于本发明的可生物降解材料包括金刚石、PLA、PGA以及PLGA聚合物。生物相容但非生物降解材料也可用于本发明的载体粒子中。举例来说,还可以使用非可生物降解聚合物丙烯酸酯、乙烯-乙酸乙烯酯、酰基取代的乙酸纤维素、非可降解聚氨基甲酸乙酯、苯乙烯、氯乙烯、氟乙烯、乙烯基咪唑、氯磺化烯烃、环氧乙烷、乙烯醇、TEFLON® (DuPont,Wilmington,Del.)以及尼龙(nylon)。

[0090] 目前市售的合适的珠粒包括聚苯乙烯珠粒,诸如FluoSpheres(Molecular Probes,Eugene,Oreg.)。

[0091] 在一些实施方案中,本发明提供的系统包括:(a)被配置成用于向受试者递送化学和/或生物试剂的递送支架;以及(b)用于诱导抗原特异性耐受的抗原偶联的乙交酯丙交酯共聚物粒子。在一些实施方案中,所述递送支架的至少一部分是多微孔的。在一些实施方案中,抗原偶联乙交酯丙交酯共聚物粒子封装于所述支架内。在一些实施方案中,化学和/或生物试剂选自:蛋白质、肽、小分子、核酸、细胞以及粒子。在一些实施方案中,化学和/或生物试剂包括细胞,并且所述细胞包括胰岛细胞。

[0092] 物理性质也与在摄取和保留于具有未成熟淋巴细胞的区域中后纳米粒子的有用性有关。这些性质包括机械性质,诸如刚性或橡胶性。如在最近开发并且对系统性的(但非靶向性或免疫)递送进行表征的PPS-PEG系统中,一些实施方案是基于橡胶性核心(例如聚(硫化丙烯)(PPS)核心)加上覆盖层(例如亲水性覆盖层,如在PEG中)。橡胶性核心是相对于基本上刚性的核心,如在聚苯乙烯或金属纳米粒子系统中。术语橡胶性是指除天然或合成橡胶外的某些弹性材料,并且橡胶性是类似于聚合物领域中的那些的术语。举例来说,交联的PPS可用于形成疏水性橡胶性核心。PPS是在氧化条件下降解成聚亚砜并且最后降解成聚砜,从而从疏水性橡胶转变为亲水性、水溶性聚合物的聚合物。其它硫化物聚合物可适合于使用,其中术语硫化物聚合物是指在聚合物骨架中具有硫的聚合物。可使用的其它橡胶性聚合物是在水合条件下玻璃化转变温度小于约37℃的聚酯。疏水核心可有利地与亲水性覆盖层一起使用,因为核心和覆盖层将不倾向于混杂,使得覆盖层倾向于在空间上远离核心扩展。核心是指上面具有层的粒子。层是指至少覆盖核心的一部分的材料。层可被吸附或共价结合。粒子或核心可以是实心或空心的。橡胶性疏水核心优于刚性疏水核心,诸如晶体或玻璃态(如在聚苯乙烯的情况下)核心,因为可通过具有橡胶性疏水性核心的粒子运送更高加载量的疏水性药物。

[0093] 另一种物理性质是表面的亲水性。亲水性材料当其未交联时在水中的溶解度可以是至少1克/升。用亲水性聚合物对粒子进行空间稳定化可通过降低非特异性相互作用来改善从间质的摄取;然而,粒子的增加的隐密性质(stealth nature)也可减少具有未成熟淋巴细胞的区域中吞噬细胞的内化。已经面临着平衡这些竞争性特征的挑战,然而,本申请记载了用于向淋巴结中的DC及其它APC进行有效淋巴递送的纳米粒子的形成。一些实施方案包括亲水组分,例如亲水材料层。适合的亲水材料的实例是聚亚烷基氧化物、聚环氧乙烷、多糖、聚丙烯酸以及聚醚中的一种或多种。可调节层中的聚合物的分子量以在体内提供适

用程度的空间位阻,例如约1,000至约100,000或更高;技术人员将即刻理解,涵盖所明确陈述的范围内的所有范围和值,例如介于10,000与50,000之间。

[0094] 纳米粒子可并有官能团以便进一步反应。用于进一步反应的官能团包括亲电子体或亲核体;这些便于与其它分子反应。亲核体的实例是伯胺、硫醇以及羟基。亲电子试剂的实例是琥珀酰亚胺酯、醛、异氰酸酯以及马来酰亚胺。

[0095] 本领域中熟知的多种手段均可用于将抗原性肽和蛋白质缀合至载体。这些方法包括不破坏或严格限制抗原肽和蛋白质的生物活性并且允许将充足数量的抗原肽和蛋白质以允许抗原肽或蛋白质与同源T细胞受体相互作用的取向缀合至载体的任何标准化学方法。通常,将抗原肽或蛋白质的C末端区域或抗原肽或蛋白质融合蛋白的C末端区域缀合至载体的方法是优选的。当然,精确的化学方法将取决于获得者材料的性质、抗原肽或蛋白质的C末端融合的存在或不存在以及/或者缀合部分的存在或不存在。

[0096] 官能团可根据利用度的需要定位于粒子上。一种位置可以是作为核心聚合物上的侧基或末端,其为核心或以其它方式拴系至粒子上的聚合物上的层。举例来说,本文包括描述PEG稳定化可轻易官能化用于特定细胞靶向或蛋白质和肽药物递送的纳米粒子的实例。

[0097] 诸如乙烯碳二亚胺(ECDI)、六亚甲基二异氰酸酯、含有2个环氧残基的聚丙二醇缩水甘油醚以及表氯醇的缀合物可用于将肽或蛋白质固定至载体表面。在不受理论束缚的情况下,ECDI被怀疑执行两个主要功能用于诱导耐受:(a)其经由游离氨基与游离羧基之间肽键形成的催化作用将蛋白质/肽化学偶联至细胞表面;以及(b)其诱导载体模拟凋亡性细胞死亡,使得它们被脾中的宿主抗原呈递细胞摄取并且诱导耐受。正是这种以非免疫性方式呈递至宿主T细胞导致自体反应性细胞中无反应性的直接诱导。此外,ECDI充当强效刺激物用于诱导特定调节性T细胞。

[0098] 在一个系列的实施方案中,抗原肽和蛋白质经由共价化学键结合于载体。举例来说,靠近抗原C末端的反应性基团或部分(例如C末端羧基或来自氨基酸侧链的羟基、硫醇或胺基)可通过直接化学反应直接缀合至载体表面上的反应性基团或部分(例如,PLA或PGA聚合物的羟基或羧基、树状聚合物的末端胺或羧基或磷脂的羟基、羧基或磷酸酯基团)。或者,可存在共价缀合至抗原肽和蛋白质与载体两者的缀合部分,从而使得它们连接在一起。

[0099] 载体的表面上的反应性羧基可使用通过使其与例如1-乙基-3-[3,9-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)或N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)反应而连接于抗原肽或蛋白质上的游离胺(例如,来自Lys残基)。类似地,相同化学方法可用于使载体表面上的游离胺缀合至抗原肽或蛋白质上的游离羧基(例如,来自C末端,或来自Asp或Glu残基)。或者,载体表面上的游离胺基可使用磺基-SIAB化学方法共价结合于抗原肽和蛋白质或抗原肽或蛋白质融合蛋白,大体上如Arano等,(1991)Chem.2:71-6所描述。

[0100] 在另一个实施方案中,结合于抗原肽或蛋白质的配体与连接至载体的反配体之间的非共价键可使抗原缀合于载体。举例来说,可将生物素连接酶识别序列标签连接至抗原肽或蛋白质的C末端,并且此标签可由生物素连接酶生物素化。然后生物素可充当配体以使抗原肽或蛋白质非共价缀合至作为反配体吸附或以其它方式结合至载体表面的抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。或者,如果抗原肽和蛋白质如上文所描述融合至携带Fc区域的免疫球蛋白结构域,那么Fc结构域可充当配体,并且共价或非共价结合至载体表面的蛋白A可充当反配体以使抗原肽或蛋白质非共价缀合至载体。可用于使抗原肽和蛋白质非共价缀合

至载体的其它手段是本领域熟知的,包括金属离子螯合技术(例如,在抗原肽或蛋白质或者抗原肽或蛋白质融合蛋白的C末端使用聚-His标签,以及Ni+涂布的载体),并且这些方法可替代在此所描述的方法。

[0101] 核酸部分缀合至平台分子可以任何数目的方式来实现,通常涉及一种或多种交联剂以及核酸部分和平台分子上的官能团。使用标准合成化学技术将连接基团添加至平台中。可使用标准合成技术将连接基团添加至核酸部分中。关于本发明组合中所用的抗原从业者有许多选择。存在于组合中诱导抗原促成所诱导的致耐受性反应的特异性。它可与靶抗原相同或不相同,所述靶抗原是存在于或置于所要治疗的受试者中的抗原,其为不需要的免疫反应的靶标,并且需要针对其的耐受。

[0102] 本发明的诱导抗原可以是多肽、多核苷酸、碳水化合物、糖脂或分离自生物来源的其它分子,或者它可以是化学合成的小分子、聚合物或生物材料的衍生物,前提条件是它在与粘膜结合组分组合时具有根据本说明书的诱导耐受的能力。

[0103] 在一些实施方案中,本发明提供一种偶联至一种或多种肽、多肽以及/或者蛋白质的载体(例如免疫修饰粒子)。在一些实施方案中,诸如本文所描述的载体等载体(例如,PLG载体)有效诱导抗原特异性耐受并且/或者预防免疫相关疾病(诸如小鼠模型中的EAE)的发作并且/或者减轻预先存在的免疫相关疾病的严重程度。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法可引起T细胞发生与T细胞活化相关的早期事件,但不允许T细胞获得效应功能。举例来说,施用本发明组合物可产生具有准活化表型的T细胞,诸如CD69和/或CD44上调,但不显示效应功能,诸如由缺乏IFN-γ或IL-17合成所指示。在一些实施方案中,施用本发明组合物产生具有准活化表型的T细胞,但不使得天然抗原特异性T细胞转化至调节性表型,诸如具有CD25+/Foxp3+表型的那些。

[0104] 在一些实施方案中,载体(例如粒子)的表面包含允许抗原性肽和/或其它功能元件连接(例如共价、非共价)至载体的化学部分和/或官能团。在一些实施方案中,载体(例如粒子)上的化学部分和/或官能团的数目、取向、间距等根据载体化学、所要的应用等而变化。

[0105] 在一些实施方案中,载体包含一种或多种生物或化学试剂,其附着至载体、吸附于载体上、封装于载体内以及/或者含于整个载体中。在一些实施方案中,化学或生物试剂封装于粒子内和/或含于整个粒子中。本发明不受化学或生物试剂的性质的限制。所述试剂包括但不限于蛋白质、核酸分子、小分子药物、脂质、碳水化合物、细胞、细胞组分等。在一些实施方案中,载体上或载体内包括两种或更多种(例如3种、4种、5种)不同的化学或生物试剂。在一些实施方案中,试剂被配置成具有特定释放速率。在一些实施方案中,多种不同试剂被配置成具有不同释放速率。举例来说,第一试剂可释放数小时的时间,而第二试剂释放更长的时间(例如数天、数周、数月等)。在一些实施方案中,载体或其一部分被配置成缓慢释放生物或化学试剂。在一些实施方案中,缓慢释放使得生物活性量的试剂的释放历时至少30天(例如,40天、50天、60天、70天、80天、90天、100天、180天等)。在一些实施方案中,载体或其一部分被配置成具有足以允许细胞向内生长进入孔中的多孔性。可针对所关注的特定细胞类型和/或所需向内生长量选择孔的尺寸。

[0106] 已惊奇地发现,抗原、生物和/或化学试剂封装于本发明的粒子中诱导免疫耐受并且具有若干优点。第一,封装型粒子具有更慢的细胞因子反应。第二,当使用多种抗原、生物

和/或化学试剂时,封装消除了这些不同分子之间的竞争,如果试剂连接至粒子的表面那么可能发生这种竞争。第三,封装允许更多种抗原、生物和/或化学试剂并入粒子。第四,封装允许更容易地使用复杂的蛋白抗原或器官匀浆(例如关于1型糖尿病的胰匀浆或花生过敏中的花生提取物)。最后,将抗原、生物和/或化学试剂封装于粒子内替代缀合至粒子的表面使在粒子表面上的净负电荷得以维持。

[0107] 在某些实施方案中,本发明提供上面(或内部)具有细胞或其它生物或化学试剂的载体。在采用细胞的情况下,载体不限于特定类型的细胞。在一些实施方案中,载体上面具有胰岛细胞。在一些实施方案中,微孔载体上面另外具有ECM蛋白和/或艾塞那肽-4(exendin-4)。载体不限于特定类型。在一些实施方案中,载体具有不同孔隙率(例如,不同孔径、孔深度以及/或者孔密度)的区域。在一些实施方案中,载体上面(或内部)具有药剂、DNA、RNA、细胞外基质蛋白、艾塞那肽-4等。在某些实施方案中,本发明提供用于用所述载体移植胰岛细胞的方法。在本发明的某些实施方案中,诱导抗原是单一分离的或重组产生的分子。对于使靶抗原散发至宿主中的各种位置的处理条件,通常需要诱导抗原与靶抗原相同或免疫相关。此类抗原的实例是大多数核苷酸抗原和一些碳水化合物抗原(诸如血型抗原)。

[0108] 任何合适的抗原均可用于本发明的范围内。在一些实施方案中,诱导抗原促成所诱导的致耐受性反应的特异性。诱导抗原可与靶抗原相同或不相同,所述靶抗原是存在于或置于所要治疗的受试者中的抗原,其为不需要的免疫反应的靶标,并且需要针对其的耐受。

[0109] 在靶抗原优先在特定器官、细胞或组织类型上表达的情况中,从业者再次可选择使用与靶抗原相同或免疫相关的诱导抗原。然而,也存在另外的选择,即使用对于靶标而言是旁观者(bystander)的抗原。这是一种与靶抗原可能不免疫相关的抗原,但其优先在表达靶抗原的组织中表达。关于旁观者抑制的有效性的工作原理是抑制是活性细胞介导的过程,其下调靶细胞处的免疫反应的效应臂(effector arm)。抑制细胞由粘膜表面的诱导抗原特异性地刺激,并回归到旁观者抗原优先表达的组织位点。通过相互作用或细胞因子介导机制,局部的抑制细胞然后下调附近的效应细胞(或效应细胞的诱导物),不管它们对什么具有反应性。如果效应细胞对不同于诱导抗原的靶标具特异性,那么结果是旁观者效应。关于对旁观者反应的进一步详细说明和具有此效应的一系列致耐受性肽,读者可参考国际专利公布WO 93/16724。旁观者理论的含义是,为实践本发明,一般技术人员不需要鉴定或分离针对其需要获得耐受的特定靶抗原。实施者仅需要能够获得至少一种优先在靶位点表达的分子来用作诱导抗原。

[0110] 在本发明的某些实施方案中,诱导抗原的形式与在所治疗个体中表达的形式不相同,而是其片段或衍生物。本发明的诱导抗原包括基于具有适当特异性的分子、但通过断裂、残基取代、标记、缀合以及/或者与具有其它功能性质的肽融合而适应的肽。这种适应可出于任何所需目的而进行,包括但不限于消除任何不需要的性质,诸如毒性或免疫原性;或增强任何所需性质,诸如粘膜结合、粘膜渗透或对免疫反应的致耐受性臂的刺激。如本文所用术语诸如胰岛素肽、胶原蛋白肽以及髓磷脂碱性蛋白肽不仅指完整的亚基,而且指异型和合成变体、片段、融合肽、缀合物以及其它衍生物,所述衍生物含有与作为衍生物的类似物的相应分子的至少10个并且优选地20个连续氨基酸同源(优选地在氨基酸水平上70%同

一性、更优选地80％同一性并且甚至更优选90％同一性)的区域,其中衍生物的同源区域与各自的母体分子共有诱导对靶抗原的耐受的能力。

[0111] 已经认识到,诱导抗原的致耐受性区域经常不同于用于刺激抗体反应的免疫优势表位。致耐受性区域通常是可存在于涉及T细胞的特定细胞相互作用中的区域。致耐受性区域可存在,并且能够在呈递完整抗原时诱导耐受。一些抗原含有隐蔽的致耐受性区域,因为天然抗原的加工和呈递通常不引起耐受。对隐蔽抗原和其鉴定的详细描述可见于国际专利公布WO 94/27634中。

[0112] 在本发明的某些实施方案中,使用两种、三种或更多种诱导抗原。当存在多种靶抗原时,可能需要实施这些实施方案,或为靶标提供多种旁观者。举例来说,在治疗糖尿病时,胰岛素与胰高血糖素两者均可与粘膜结合组分混合。可能还需要提供抗原的混合物以覆盖若干可能的替代靶标。举例来说,组织相容性抗原片段的混合物可用于使预期将来用未知表型的同种异体移植物移植的受试者耐受化。人白细胞抗原的同种异体变体区域是本领域中已知的:例如Immunogenetics 29:231,1989。在另一个实例中,过敏原的混合物可充当用于治疗特应症的诱导抗原。

[0113] 诱导抗原可通过本领域中已知的许多技术来制备,这取决于分子性质。多核苷酸、多肽以及碳水化合物抗原可从富含其的所要治疗的物种的细胞中分离。短肽通过氨基酸合成方便地制备。具有已知序列的更长的蛋白可通过合成编码序列或从天然来源或载体PCR扩增编码序列并且然后在合适的细菌或真核生物宿主细胞中表达编码序列来制备。

[0114] 在本发明的某些实施方案中,所述组合包含从细胞或组织获得的抗原的复杂混合物,其中的一种或多种起诱导抗原的作用。抗原可呈全细胞形式,其为完整的或用固定剂诸如甲醛、戊二醛或醇处理。抗原可呈细胞裂解液形式,其通过将细胞或组织经历洗涤剂增溶或机械破碎随后净化而产生。抗原还可以通过亚细胞分级获得,特别是通过诸如差速离心的技术进行质膜富集,任选地随后进行洗涤剂增溶和透析。其它分离技术也是合适的,诸如溶解的膜蛋白的亲和力或离子交换色谱法。

[0115] 在一个实施方案中,抗原性肽或蛋白质是自体抗原、同种异体抗原或移植抗原。在另一个特定实施方案中,自体抗原选自髓磷脂碱性蛋白、胶原蛋白或其片段、DNA、核和核仁蛋白、线粒体蛋白以及胰β-细胞蛋白。

[0116] 本发明提供自体抗原的耐受诱导,以用于通过施用针对其需要获得耐受的抗原治疗自身免疫性疾病。举例来说,在患有多发性硬化的患者中观测到针对髓磷脂碱性蛋白(MBP)的自体抗体,并且因此,MBP抗原性肽或蛋白质可用于在本发明中使用本发明组合物递送,从而治疗和预防多发性硬化。

[0117] 另举一个非限制性实例,作为来自异卵双胞胎的移植物的候选人的个体可经历对植入细胞、组织或器官的排斥,因为植入的抗原对接受者而言是外来的。对意欲移植的接受者个体的在先耐受使后来的排斥消除或减少。通过实践本发明可实现减少或消除长期抗排斥治疗。在另一个实例中,许多自身免疫性疾病的特征在于对内源性或自身抗原的细胞免疫反应。免疫系统对内源性抗原的耐受是控制疾病所需要的。

[0118] 在另一个的实例中,个体对工业污染物或诸如可能在工作中遭遇的化学制品的致敏带来了免疫反应的危险。个体的免疫系统对尤其呈与个体的内源性蛋白质反应的化学制品形式的化学制品的在先耐受可能是预防免疫反应的后期职业性发生所需要的。

[0119] 过敏原是也需要获得对其的免疫反应耐受的其它抗原。在一个实施方案中,抗原是麦胶蛋白。在另一个实施方案中,抗原是A-麦胶蛋白。

[0120] 值得注意的是,即使在病原性自体抗原未知的疾病中,也可使用存在于解剖位置附近的抗原诱导旁观者抑制。举例来说,在类风湿性关节炎中观测到胶原蛋白的自体抗体,因此,胶原蛋白编码基因可用作抗原表达基因模块以治疗类风湿性关节炎(参见例如Choy(2000)Curr Opin Investig Drugs 1:58-62)。此外,对β细胞自体抗原的耐受可用于预防1型糖尿病的发生(参见例如Bach和Chatenoud(2001)Ann Rev Immunol 19:131-161)。

[0121] 作为另一个实例,在自身免疫性脑脊髓炎和许多其它CNS疾病以及多发性硬化中观测到针对抗髓磷脂少突细胞糖蛋白(MOG)的自体抗体(参见例如Iglesias等(2001)Glia 36:22-34)。因此,在本发明中使用MOG抗原表达构建体允许治疗多发性硬化以及中枢神经系统的相关自身免疫性病症。

[0122] 用于治疗自身免疫性疾病的候选自体抗原的其它实例包括:用于治疗胰岛素依赖型糖尿病的胰β-细胞抗原、胰岛素以及GAD;用于治疗类风湿性关节炎的11型胶原蛋白、人软骨gp 39(HCgp39)以及gp130-RAPS;用于治疗多发性硬化的髓磷脂碱性蛋白(MBP)、蛋白脂质蛋白(PLP)以及髓磷脂少突细胞糖蛋白(MOG,参见上文);用于治疗硬皮病的纤维蛋白和小核仁蛋白(snoRNP);用于治疗格雷夫斯病(Graves'disease)的甲状腺刺激因子受体(TSH-R);用于治疗系统性红斑狼疮的核抗原、组蛋白、糖蛋白gp70以及核糖体蛋白;用于治疗原发性胆汁性肝硬化的丙酮酸脱氢酶脱氢硫辛酰胺乙酰转移酶(PCD-E2);用于治疗斑秃的毛囊抗原;以及用于治疗溃疡性结肠炎的人原肌球蛋白同种型5(hTM5)。

[0123] 通过使用分离的细胞或动物模型进行实验可测试组合促进耐受的能力。

[0124] 在一些实施方案中,本发明的耐受诱导组合物含有细胞凋亡信号传导分子(例如,除抗原性肽或其它抗原性分子外)。在一些实施方案中,细胞凋亡信号传导分子与载体的表面偶联和/或缔合。在一些实施方案中,细胞凋亡信号传导分子允许载体被宿主的抗原呈递细胞(诸如宿主网状内皮系统的细胞)感知为凋亡体(apoptotic body);这允许相关肽表位以耐受诱导方式呈递。在不受理论束缚的情况下,假设这阻止涉及免疫细胞刺激的分子(例如I/II类MHC)和共刺激分子的上调。这些细胞凋亡信号传导分子还可以充当吞噬细胞标记物。举例来说,适合用于本发明的细胞凋亡信号传导分子已描述于美国专利申请号20050113297中,该专利申请以全文引用的方式并入本文中。适合用于本发明的分子包括靶向吞噬细胞的分子,其包括巨噬细胞、树突细胞、单核细胞以及嗜中性粒细胞。

[0125] 在一些实施方案中,适合作为细胞凋亡信号传导分子的分子发挥提高相关肽的耐受的作用。另外,与细胞凋亡信号传导分子结合的载体可在凋亡细胞识别中被C1q结合(Paidassi等,(2008)J.Immunol.180:2329-2338;其以全文引用的方式并入本文中)。举例来说,可用作细胞凋亡信号传导分子的分子包括磷脂酰丝氨酸、膜联蛋白-1、膜联蛋白-5、乳脂球-EGF-因子8(MFG-E8)或凝血栓蛋白家族(例如凝血栓蛋白-1(TSP-1))。适合在本发明情况下用作凋亡信号分子的各种分子论述于例如美国专利申请2012/0076831中;其以全文引用的方式并入本文中)。

[0126] 在一些实施方案中,细胞凋亡信号传导分子可缀合至抗原特异性肽。在一些情况下,细胞凋亡信号传导分子和抗原特异性肽是通过形成融合蛋白而缀合。举例来说,融合蛋白可包含至少一种抗原特异性肽(或其片段或变体),其偶联至细胞凋亡信号传导分子的至

少一个分子(或其片段或变体)。关于融合蛋白的形成,术语"融合蛋白"、"融合肽"、"融合多肽"以及"嵌合肽"可互换使用。抗原特异性肽的合适的片段包括全长肽中保留产生本发明所需的抗原特异性耐受功能的功能的任何片段。融合蛋白可通过本领域中所了解的各种手段(例如基因融合、化学缀合等)来形成。所述两种蛋白质可直接或经由氨基酸接头融合。形成融合蛋白的多肽通常使C末端连接至N末端,不过它们还可以使C末端连接至C末端、N端连接至N末端或N末端连接至C末端。融合蛋白的多肽可以呈任何顺序。肽接头序列可用于使第一和第二多肽组分隔开足以确保各多肽折叠成其二级和三级结构的距离。可有效地用作接头的氨基酸序列包括公开于以下文献中的那些氨基酸序列:Maratea等,Gene 40:39-46(1985);Murphy等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8258-8262(1986);美国专利号4,935,233以及美国专利号4,751,180;所述文献以全文引用的方式并入本文中。接头序列的长度通常可以是1至约50个氨基酸。在一些实施方案中,例如当第一和第二多肽具有可用于分隔功能结构域并且防止空间干扰的非必需N末端氨基酸区域时,接头序列不需要和/或利用。

[0127] 致耐受性活性的替代性质是完整抗原或片段刺激靶位点处产生适当的细胞因子的能力。在目靶位点处由T抑制细胞释放的免疫调节细胞因子被视为TGF-β(Miller等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:421,1992)。耐受期间可产生的其它因子是细胞因子IL4和IL-10以及介导物PGE。相比之下,组织中进行活性免疫破坏的淋巴细胞分泌细胞因子,诸如IL-1、IL-2、IL-6以及γ-IFN。因此,候选诱导抗原的功效可通过测量其刺激适当类型的细胞因子的能力进行评估。

[0128] 考虑到这一点,可使用同基因动物作为用于体外细胞测定的供体来进行关于诱导抗原的致耐受性表位、有效粘膜结合组分、有效组合或有效模式和粘膜施用的时间表的快速筛选测试。将动物在粘膜表面用测试组合物进行处理,并且有时以肠胃外施用含靶抗原的完全弗氏佐剂进行激发。分离脾细胞,并且在浓度是约50μg/mL的靶抗原存在下体外培养。可用候选蛋白或亚片段代替靶抗原来描绘致耐受性表位的位置。细胞因子分泌至培养基中可通过标准免疫测定来定量。

[0129] 细胞抑制其它细胞的活性的能力可使用从用靶抗原免疫的动物分离的细胞或通过形成对靶抗原有反应的细胞系来测定(Ben-Nun等,Eur.J.Immunol.11:195,1981,其以全文引用的方式并入本文中)。在此实验的一种变化形式中,温和照射(约1000至1250拉德)抑制细胞群以阻止增殖,将抑制细胞与反应细胞共培养,并且然后使用氚化胸腺嘧啶脱氧核苷掺入(或MTT)定量反应细胞的增殖活性。在另一种变化形式中,抑制细胞群和反应细胞群在更高和更低水平的双腔transwell培养系统(Costar,Cambridge Mass.)中培养,其允许所述群体在彼此的1mm内共孵育,由聚碳酸酯膜分隔(WO 93/16724)。在此方法中,抑制细胞群的照射是不必要的,因为反应细胞的增殖活性可单独测量。

[0130] 在靶抗原已经存在于个体中的本发明实施方案中,不需要分离抗原或将其与粘膜结合组分预组合。举例来说,抗原可以由病理性病状(例如炎症性肠病或乳糜泻)造成的特定方式或通过食物过敏原的消化在个体中表达。通过以一种或多种剂量或制剂给予粘膜结合组分并测定其原位促进对抗原的耐受化的能力来进行测试。

[0131] 还可以在相应动物疾病模型中详述组合物和施用模式对于治疗特定疾病的效果。进行治疗以减轻或延迟疾病的症状的能力是在对所使用的模型适当的疾病的循环生化和免疫学标志、受影响组织的免疫组织学以及总体临床特征的水平下进行监测。可用于测试

的动物模型的非限制性实例包括于以下部分中。

[0132] 本发明预期通过调节TH1反应、TH2反应、TH17反应或这些反应的组合来调节耐受。调节TH1反应涵盖改变例如干扰素-γ的表达。调节TH2反应涵盖改变例如IL-4、IL-5、IL-10以及IL-13的任何组合的表达。通常,TH2反应的增加(减少)将包括IL-4、IL-5、IL-10或IL-13中的至少一种的表达的增加(减少);更通常,TH2反应的增加(降低)将包括IL-4、IL-5、IL-10或IL-13中的至少两种的表达的增加,最通常,TH2反应的增加(减少)将包括DL-4、IL-5、IL-10或IL-13中的至少三种的增加,而理想的是,TH2反应的增加(减少)将包括IL-4、IL-5、IL-10或IL-13所有的表达的增加(减少)。调节TH17涵盖改变例如TGF-β、IL-6、IL-21以及IL23的表达,并且影响IL-17、IL-21以及IL-22的水平。

[0133] 其它适合用于评估本发明的组合物和方法的有效性的方法是本领域中已了解的,如例如美国专利申请2012/0076831(其以全文引用的方式并入本文中)中所论述。

[0134] 本发明的某些实施方案涉及在未通过治疗干预事先耐受化的个体中引发免疫耐受。这些实施方案通常涉及多次施用抗原与粘膜结合组分的组合。通常,在初免过程中进行至少三次施用、经常地至少四次施用并且有时至少六次施用以实现长期的结果,不过受试者可在治疗过程的早期显示耐受的表现。最经常的是,以丸剂施用的方式给予各剂量,但是能够粘膜释放的持续制剂也是合适的。在进行多次施用的情况下,各施用之间的时间通常介于1天与3周之间,并且通常介于约3天与2周之间。通常,相同抗原和粘膜结合组分以相同浓度存在,并且施用是给予相同粘膜表面,但治疗过程期间任何这些变量的变化形成均可适应。

[0135] 本发明的其它实施方案涉及加强或延长事先建立的免疫耐受的持久性。这些实施方案通常涉及在所建立的耐受衰退或处于衰退风险中时进行一次施用或一次的短期治疗过程。加强通常在初免或事先加强后1个月至1年,并且通常2至6个月进行。本发明还包括涉及根据半周、每周、双周发生一次的施用时间表或根据任何其它定期时间表定期维持耐受的实施方案。

[0136] 本发明的粒子可在有效抑制有需要的受试者的炎症性免疫反应或治疗有需要的受试者的细菌或病毒感染的任何剂量来给予。在某些实施方案中,向个体提供约102个至约1020个粒子。在另一个实施方案中,提供介于约103个至约1015个之间的粒子。在另一个实施方案中,提供介于约106个至约1012个之间的粒子。在另一个实施方案中,提供介于约108个至约1010个之间的粒子。在一个优选的实施方案中,优选剂量是0.1%固体/ml。因此,对于0.5μm珠粒,优选剂量是约4×109个珠粒,对于0.05μm珠粒,优选剂量是约4×1012个珠粒,对于3μm珠粒,优选剂量是2×107个珠粒。然而,本发明涵盖有效治疗所要治疗的特定病状的任何剂量。

[0137] 本发明适用于治疗免疫相关病症,诸如自身免疫性疾病、移植排斥以及过敏反应。用于诱导免疫耐受的合成生物相容粒子系统的替换可产生制造容易性、治疗剂的广泛可用性、样品之间的增加的均匀性、增加的潜在治疗位点数目以及显著降低的对载体细胞的过敏反应的可能性。

[0138] 如本文所用,术语“免疫反应”包括T细胞介导和/或B细胞介导的免疫反应。示例性免疫反应包括T细胞反应,例如细胞因子产生和细胞毒性。此外,术语免疫反应包括间接受T细胞活化影响的免疫反应,例如,抗体产生(体液反应)和细胞因子反应性细胞(例如巨噬细

胞)的活化。参与免疫反应的免疫细胞包括淋巴细胞,诸如B细胞和T细胞(CD4+、CD8+、Th1以及Th2细胞);抗原呈递细胞(例如,专职性抗原呈递细胞,诸如树突细胞、巨噬细胞、B淋巴细胞、郎格罕氏细胞(Langerhans cell);以及非专职性抗原呈递细胞,诸如角化细胞、内皮细胞、星形细胞、成纤维细胞、少突细胞);天然杀伤细胞;骨髓细胞,诸如巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱细胞以及粒细胞。在一些实施方案中,本发明的修饰粒子有效减少炎症细胞运输至炎症部位。

[0139] 如本文所用,术语"无反应性"、"耐受"或"抗原特异性耐受"是指T细胞对T细胞受体介导的刺激的不敏感性。所述不敏感性通常是抗原特异性的并且持续到已停止暴露于抗原性肽之后。举例来说,T细胞的无反应性的特征在于缺乏细胞因子产生(例如IL-2)。当T细胞暴露于抗原并且在不存在第二信号(共刺激信号)的情况下接收第一信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时发生T细胞无反应性。在这些条件下,细胞再暴露于相同抗原(即使在存在共刺激分子的情况下也发生再暴露)导致不能产生细胞因子并且随后不能增殖。因此,不能产生细胞因子阻止了增殖。然而,如果与细胞因子(例如,IL-2)一起培养,那么无反应性T细胞可增殖。举例来说,如通过ELISA或通过使用指示细胞系的增殖测定所测量,T淋巴细胞缺乏IL-2产生也可观测到T细胞无反应性。或者,可使用报告基因构建体。举例来说,无反应性T细胞不能启动由在5'IL-2基因增强子的控制下的异质启动子或由可在增强子内发现的API序列的多聚体诱导的DL-2基因转录(Kang等1992Science.257:1134)。

[0140] 如本文所用,术语"免疫耐受"是指与未处理的受试者相比,对一定比例处理的受试者进行的方法,其中:a)特异性免疫反应(被认为至少部分由抗原特异性效应T淋巴细胞、B淋巴细胞、抗体或其等价物介导)的水平降低;b)特异性免疫反应的发作或发展延迟;或c)特异性免疫反应的发作或发展的风险降低。当与其它抗原相比优先针对特定抗原引起免疫耐受时,发生"特异性"免疫耐受。当不加区别地针对导致炎症性免疫反应的抗原引起免疫耐受时,发生"非特异性"免疫耐受。当半加区别地针对导致病原性免疫反应的抗原但对导致保护性免疫反应的其他抗原不引起免疫耐受时,发生"准特异性"免疫耐受。

[0141] 对自体抗原和自身免疫性疾病的耐受是通过包括以下的多种机制来实现:胸腺中自体反应性T细胞的负性选择,以及避免胸腺缺失并且在外周发现的那些自体反应性T细胞的外周耐受机制。提供外周T细胞耐受的机制的实例包括自身抗原的"无知"、对自体抗原无反应性或非反应性、细胞因子免疫偏差以及自体反应性T细胞的活化诱导型细胞死亡。此外,调节性T细胞已显示参与介导外周耐受。参见例如Walker等(2002)Nat.Rev.Immunol.2:11-19;Shevach等(2001)Immunol.Rev.182:58-67。在一些情况下,对自体抗原的外周耐受丧失(或破坏),并且继而发生自身免疫反应。举例来说,在EAE动物模型中,抗原呈递细胞(APC)通过TLR先天免疫受体活化显示破坏自体耐受并且导致诱导EAE(Waldner等(2004)J.Clin.Invest.113:990-997)。

[0142] 因此,在一些实施方案中,本发明提供用于增加抗原呈递同时抑制或减少TLR7/8、TLR9以及/或者TLR7/8/9依赖性细胞刺激的方法。如本文所描述,施用特定修饰型粒子导致DC或APC的抗原呈递同时抑制与免疫刺激性多核苷酸相关的TLR7/8、TLR9以及/或者TLR7/8/9依赖性细胞反应。所述抑制可包括一种或多种TLR相关细胞因子的水平降低。

[0143] 如上文所论述,本发明提供具有适用于治疗Mac-1和LFA-1介导的病症的生物性质的新型化合物。

[0144] 因此,在本发明的另一个方面中,提供药物组合物,其包含免疫修饰粒子,并且任选地包含药学上可接受的载体。在某些实施方案中,这些组合物任选地进一步包含一种或多种其它治疗剂。或者,可与施用一种或多种其它治疗剂组合向有需要的患者施用本发明的修饰型粒子。举例来说,用于与本发明的化合物联合施用或包括于药物组合物中的其它治疗剂可以是经批准的抗炎剂,或者它可以是食品和药物管理局(Food and Drug Administration)正在审批并且最终获得批准用于治疗以不受控制的炎症性免疫反应或细菌或病毒感染为特征的任何病症的许多药剂中的任一种。还应当理解的是,本发明的某些改性粒子可以游离形式或(在适当情况下)以其药学上可接受的衍生物形式存在以用于治疗。

[0145] 本发明的药物组合物另外包含药学上可接受的载体,其如本文所用包括对所需特定剂型适合的任何和所有的溶剂、稀释剂或其它液体媒介物、分散液或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington's Pharmaceutical Sciences,第十六版,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980)公开了用于配制药物组合物的各种载体和用于其制备的已知技术。除非在任何常规载体介质与本发明的化合物不相容时,诸如通过产生任何不合需要的生物学效应或以有害的方式与医药组合物的任何其它组分相互作用,否则其使用涵盖于本发明的范围内。根据配制者的判断,可充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包括但不限于糖,诸如乳糖、葡萄糖以及蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素以及乙酸纤维素;粉末状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油以及大豆油;二醇,诸如丙二醇;酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及其它无毒相容润滑剂,诸如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,并且着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂以及抗氧化剂也可存在于组合物中。

[0146] 用于经口施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆以及酏剂。除活性化合物外,液体剂型还可含有本领域中常用的惰性稀释剂,诸如水或其它溶剂;增溶剂和乳化剂,诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油以及芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇以及脱水山梨糖醇的脂肪酸酯以及其混合物。除惰性稀释剂外,经口组合物还可包括佐剂,诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂以及芳香剂。

[0147] 本发明的粒子可经口、经鼻、静脉内、肌肉内、经眼、经皮、腹膜内或皮下施用。在一个实施方案中,本发明的粒子是静脉内施用。

[0148] 本发明用于调节免疫反应的施用的有效量和方法可基于个体、要治疗什么病状以及对本领域技术人员显而易见的其它因素而变化。所要考虑的因素包括施用途径和施用的剂量数。所述因素是本领域中已知的,并且本领域技术人员无需过度实验即可很好地作出所述决定。合适的剂量范围是提供所需免疫调节的剂量范围。以所递送载体的量给出的载体的适用剂量范围可以是例如大致以下中的任一种:0.5至10mg/kg、1至9mg/kg、2至8mg/kg、3至7mg/kg、4至6mg/kg、5mg/kg、1至10mg/kg、5至10mg/kg。或者,剂量可以基于粒子的数

目进行施用。举例来说,以所递送载体的量给出的载体的适用剂量可以是例如每剂量约106、107、108、109、1010或更大数目的粒子。给予各患者的绝对量取决于药理学性质,诸如生物利用度、清除率以及施用途径。药学上可接受的载体、稀释剂和赋形剂以及制备药物组合物和制剂的方法的细节提供于Remmingtons Pharmaceutical Sciences第18版,1990,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,USA.中,其以全文引用方式并入本文中。

[0149] 特定载体制剂的有效量和施用方法可基于个别患者、所需结果和/或疾病类型、疾病阶段以及其它对本领域技术人员显而易见的因素而变化。用于特定应用的施用途径对本领域技术人员而言是显而易见的。施用途径包括但不限于局部、皮肤、经皮、经粘膜、表皮、肠胃外、胃肠道以及鼻咽和肺部施用,包括经支气管和经肺泡(transalveolar)施用。合适的剂量范围是提供足够的含IRP组合物以获得如由血液水平所测量的约1-50μM的组织浓度的剂量范围。给予各患者的绝对量取决于药理学性质,诸如生物利用度、清除率以及施用途径。

[0150] 本发明提供适合用于局部应用的载体制剂,包括但不限于生理学上可接受的植入物、软膏、乳膏、洗剂以及凝胶。示例性皮肤施用途径是侵入性最小的皮肤施用途径,诸如经皮输送、表皮施用以及皮下注射。

[0151] 经皮施用是通过涂覆能够允许载体渗透皮肤并且进入血流的乳膏、洗剂、凝胶等来完成。适合用于经皮施用的组合物包括但不限于直接涂覆于皮肤或并入诸如经皮装置(所谓的“贴片”)等保护性载体中的药学上可接受的悬浮液、油、乳膏以及软膏。合适的乳膏、软膏等的实例可见于例如Physician’s Desk Reference中。经皮输送还可例如使用连续递送其产物穿过未破损的皮肤持续几天或更久的市售贴片通过离子电渗来完成。使用此方法允许药物组合物以相对高的浓度进行控制输送,允许组合药物输注并且允许同时使用吸收促进剂。

[0152] 肠胃外施用途径包括但不限于电(离子电渗)或直接注射,诸如直接注入中央静脉管、静脉内、肌肉内、腹膜内、皮内或皮下注射。适合用于肠胃外施用的载体制剂通常在USP水或注射用水中配制,并且可进一步包含PH缓冲剂、盐增容剂、防腐剂以及其它药学上可接受的赋形剂。用于肠胃外注射的免疫调节多核苷酸可配制成药学上可接受的无菌等渗溶液,诸如注射用盐水和磷酸盐缓冲盐水。

[0153] 胃肠施用途径包括但不限于吞服和直肠途径,并且可包括使用例如药学上可接受的用于吞服的粉末、药丸或液体以及用于直肠施用的栓剂。

[0154] 鼻咽和肺部施用包括通过吸入来完成,并且包括诸如鼻内、经支气管以及经肺泡途径的递送途径。本发明包括适合用于通过吸入施用的载体制剂,包括但不限于用于形成气溶胶的液体悬浮液以及用于干粉吸入递送系统的粉末形式。适合用于通过吸入施用载体制剂的装置包括但不限于雾化器、蒸发器、喷雾器以及干粉吸入递送装置。

[0155] 可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性悬浮液,可根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制。无菌可注射制剂还可以是含于无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液或乳液,例如如1,3-丁二醇中的溶液。在可使用的可接受媒介物和溶剂之中有水、林格氏溶液、U.S.P.以及等渗氯化钠溶液。此外,常规地使用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。出于此目的,可使用任何温和固定油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外,诸如油酸的脂肪酸用于制备可注射制剂。

[0156] 可注射制剂可例如进行灭菌,通过经细菌截留过滤器过滤或通过并入呈无菌固体组合物形式的灭菌剂来进行,所述无菌固体组合物可在使用前溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中。

[0157] 为延长药物的作用,经常需要使皮下或肌肉内注射的药物的吸收减缓。这可通过使用具有不良水溶性的结晶或非晶形物质的液体悬浮液来完成。药物的吸收速率则取决于它的溶解速率,所述溶解速率又可取决于晶体尺寸和结晶形式。或者,通过将药物溶解或悬浮于油媒介物中来完成肠胃外施用的药物形式的延迟吸收。可注射储库形式是通过在诸如聚丙交酯-聚乙交酯等的可生物降解聚合物中形成药物的微胶囊基质来制备。根据药物与聚合物的比率和所使用的特定聚合物的性质,可控制药物释放的速率。其它可生物降解聚合物的实例包括(聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还通过将药物包埋于与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备储库式可注射制剂。

[0158] 在一些实施方案中,本发明的合成可生物降解粒子提供制造容易性、治疗剂的广泛可用性以及增加的治疗位点。在特定实施方案中,使用表面活性剂聚(乙烯-交替-马来酸酐)合成的具有高密度的表面羧酸酯基的表面官能化可生物降解乙交酯丙交酯共聚物粒子提供一种载体,所述载体提供许多优于其它载体粒子和/或表面的优点。本发明的实施方案的开发过程中进行的实验证实肽(例如PLP139-151肽)缀合于这些粒子。所述肽偶联粒子已显示其有效预防疾病的发展并且诱导免疫耐受(例如在SJL/J PLP139-151/CFA诱导的R-EAE多发性硬化鼠模型中)。本发明的肽偶联载体提供许多优于其它耐受诱导结构的优点。在一些实施方案中,粒子是可生物降解的,并且因此将不在体内持续很长时间。完全降解的时间可控制。在一些实施方案中,将粒子官能化以促进无细胞活化的情况下的内化(例如,加载至PLG微球中的磷脂酰丝氨酸)。在一些实施方案中,粒子并有特定细胞群的靶向配体。在一些实施方案中,诸如IL-10和TGF-β的抗炎性细胞因子包括在粒子上或粒子内,以限制正内化粒子的细胞类型活化,并且促进经由能量和/或缺失以及调节性T细胞的活化诱导耐受。

[0159] 用于经口施用的固体剂型包括胶囊、片剂、药丸、粉末以及颗粒剂。在所述固体剂型中,修饰型粒子与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载体(诸如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或以下物质混合:a)填充剂或增量剂,诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇以及硅酸,b)粘合剂,诸如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖以及阿拉伯胶,c)湿润剂,诸如甘油,d)崩解剂,诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐以及碳酸钠,e)溶液阻滞剂,诸如石蜡,f)吸收促进剂,诸如季铵化合物,g)润湿剂,诸如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,h)吸附剂,诸如高岭土和膨润土,以及i)润滑剂,诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠以及其混合物。在胶囊、片剂以及药丸的情况下,剂型还可包括缓冲剂。

[0160] 在使用诸如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂的软填充和硬填充明胶胶囊中也可使用类似类型的固体组合物作为填充剂。可制备具有诸如肠溶包衣和药物配制领域中熟知的其它包衣的包衣和外壳的片剂、糖衣丸、胶囊、药丸以及颗粒剂的固体剂型。它们可任选地含有乳浊剂,并且还可具有使其在肠道的某一部分中任选地以延迟方式仅仅或优先释放活性成分的组成。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。在使用诸如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂的软

填充和硬填充明胶胶囊中也可使用类似类型的固体组合物作为填充剂。

[0161] 修饰型粒子还可呈具有如上所述的一种或多种赋形剂的微封装形式。可制备具有诸如肠溶包衣和药物配制领域中熟知的其它包衣的包衣和外壳的片剂、糖衣丸、胶囊、药丸以及颗粒剂的固体剂型。在所述固体剂型中,活性化合物可与至少一种诸如蔗糖、乳糖或淀粉的惰性稀释剂混合。如在一般实践中那样,所述剂型还可包含除惰性稀释剂之外的其它物质,例如压片润滑剂以及诸如硬脂酸镁和微晶纤维素的其它压片助剂。在胶囊、片剂以及药丸的情况下,剂型还可包括缓冲剂。它们可任选地含有乳浊剂并且还可具有使其在肠道的某一部分中任选地以延迟方式仅仅或优先释放修饰型粒子的组成。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。

[0162] 本发明涵盖本发明的修饰型粒子的药学上可接受的局部制剂。如本文所用的术语“药学上可接受的局部制剂”意指药学上可接受用于通过向表皮涂覆制剂来进行本发明的修饰型微粒的皮内施用的任何制剂。在本发明的某些实施方案中,局部制剂包含载体系统。药学上有效的载体包括但不限于溶剂(例如醇、聚醇、水)、乳膏、洗剂、软膏、油、药膏、脂质体、粉末、乳液、微乳液以及缓冲溶液(例如,低渗或缓冲盐水)或本领域中已知用于局部施用药物的任何其它载体。本领域已知的载体的更完整的列表由作为本领域的标准的参考文本提供,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,1980和第17版,1985,二者均由Mack Publishing Company,Easton,Pa.出版,其公开内容以全文引用的方式并入本文中。在某些其它实施方案中,本发明的局部制剂可包含赋形剂。本领域中已知的任何药学上可接受的赋形剂均可用于制备本发明的药学上可接受的局部制剂。可包括在本发明的局部制剂中的赋形剂的实例包括但不限于防腐剂、抗氧化剂、保湿剂、软化剂、缓冲剂、增溶剂、其它渗透剂、皮肤防护剂、表面活性剂和推进剂以及/或者与修饰型粒子组合使用的其它治疗剂。合适的防腐剂包括但不限于醇、季胺、有机酸、对羟基苯甲酸酯以及酚。合适的抗氧化剂包括但不限于抗坏血酸及其酯、亚硫酸氢钠、丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚、生育酚以及如EDTA和柠檬酸的螯合剂。合适的保湿剂包括但不限于甘油、山梨醇、聚乙二醇、尿素以及丙二醇。适合用于本发明的缓冲剂包括但不限于柠檬酸、盐酸以及乳酸缓冲剂。合适的增溶剂包括但不限于季铵氯化物、环糊精、苯甲酸苯甲酯、卵磷脂以及聚山梨醇酯。可用于本发明的局部制剂中的合适的皮肤保护剂包括但不限于维生素E油、尿囊素、二甲硅油、甘油、矿脂以及氧化锌。

[0163] 在某些实施方案中,本发明的药学上可接受的局部制剂至少包含本发明的修饰型粒子和渗透增强剂。局部制剂的选择将取决于若干因素,包括所要治疗的病状、本发明化合物和所存在的其它赋形剂的理化性质、其在配制中的稳定性、可用的制造设备以及费用限制。如本文所用的术语“渗透增强剂”意指能够运输药理活性化合物穿过角质层并且优选地在很少或没有系统性吸收的情况下进入表皮或真皮的试剂。已经对多种化合物关于其在使药物渗透穿过皮肤的速率增加方面的有效性进行了评估。参见例如Percutaneous Penetration Enhancers,Maibach H.I.和Smith H.E.(编著),CRC Press,Inc.,Boca Raton,Fla.(1995),其考察了各种皮肤渗透增强剂的使用和测试;以及Buyuktimkin等,Chemical Means of Transdermal Drug Permeation Enhancement in Transdermal and Topical Drug Delivery Systems,Gosh T.K.,Pfister W.R.,Yum S.I.(编著),Interpharm Press Inc.,Buffalo Grove,Ill.(1997)。在某些示例性实施方案中,用于本

发明的渗透剂包括但不限于甘油三酯(例如大豆油)、芦荟组合物(例如,库拉索芦荟凝胶(aloe-vera gel))、乙醇、异丙醇、辛基苯基聚乙二醇、油酸、聚乙二醇400、丙二醇、N-癸基甲基亚砜、脂肪酸酯(例如,肉豆蔻酸异丙酯、月桂酸甲酯、甘油单油酸酯和丙二醇单油酸酯)以及N-甲基吡咯烷酮。

[0164] 在某些实施方案中,组合物可呈软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、粉末、溶液、喷雾、吸入剂或贴片的形式。在某些示例性实施方案中,根据本发明的组合物的制剂是乳膏,其可进一步含有饱和或不饱和脂肪酸,诸如硬脂酸、棕榈酸、油酸、棕榈油酸、鲸蜡醇或油醇,硬脂酸是特别优选的。本发明的乳膏还可含有非离子型表面活性剂,例如聚氧-40-硬脂酸酯(polyoxy-40-stearate)。在某些实施方案中,如可能需要的,活性组分在无菌条件下与药学上可接受的载体和任何所需防腐剂或缓冲剂混合。眼用制剂、滴耳剂以及滴眼剂也涵盖于本发明的范围内。另外,本发明涵盖使用经皮贴片,其具有增加的优点,即向身体控制递送化合物所述剂型还可通过将化合物溶解或分配于适当的介质中来制备。如上文所论述,还可使用渗透增强剂来增加化合物穿过皮肤的通量。可通过提供速率控制膜或通过将化合物分散于聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0165] 修饰型粒子可通过气溶胶来施用。这是通过制备含有修饰型粒子的水性气溶胶、脂质体制剂或固体粒子来完成。可使用非水性(例如,氟碳推进剂)悬浮液。

[0166] 通常,通过配制药剂与常规药学上可接受的载体和稳定剂的水溶液或悬浮液来制备水性气溶胶。载体和稳定剂因特定化合物的要求而不同,但通常包括非离子型表面活性剂(吐温(Tween)、普朗尼克(Pluronic)或聚乙二醇)、无害蛋白质(如血清白蛋白)、脱水山梨糖醇酯、油酸、卵磷脂、氨基酸(诸如甘氨酸)、缓冲剂、盐、糖或糖醇。一般从等渗溶液制备气溶胶。

[0167] 还应当理解的是,可配制本发明的修饰型粒子和药物组合物并且用于组合法疗中,也就是说,化合物和药物组合物可与一种或多种其它所需治疗剂一起配制或与一种或多种其它所需医疗程序同时、在其之前或在其之后施用。用于以组合方案使用的治疗(治疗剂或程序)的特定组合将考虑到所需治疗剂和/或程序和要实现的所需治疗效果的可相容性。还应当理解的是,所用的疗法可针对相同病症实现所需效果(例如本发明化合物可与另一种抗炎剂同时施用),或者它们可实现不同效果(例如,控制任何不利效果)。

[0168] 在某些实施方案中,含有本发明的修饰型粒子的药物组合物另外包含一种或多种其它治疗活性成分(例如,抗炎和/或缓和剂)。出于本发明的目的,术语“缓和性”是指集中于缓解疾病的症状和/或治疗方案的副作用但不能治愈的治疗。举例来说,缓和性性治疗涵盖止痛药、止吐药以及抗疾病药物。

[0169] 本发明提供调节个体、优选哺乳动物、更优选人的免疫反应的方法,所述方法包括向个体施用本文中所描述的修饰型粒子。由本发明提供的免疫调节方法包括抑制和/或阻止先天免疫反应或后天免疫反应(包括但不限于由免疫刺激性多肽或病毒或细菌组分刺激的免疫反应)的方法。

[0170] 修饰型粒子是以足以调节免疫反应的量施用。如本文所描述,免疫反应的调节可以是体液的和/或细胞的,并且使用本领域中和如本文所描述的标准技术来测量。

[0171] 在一些实施方案中,本文所描述的组合物是与植入物(例如装置)和/或移植物(例如,组织、细胞、器官)一起(例如,与其同时、在其之前或在其之后)施用,以介导、取消、调节

以及/或者降低与其相关的免疫反应。

[0172] 在某些实施方案中,个体患有与不需要的免疫激活相关的病症,诸如过敏性疾病或病症、过敏症以及哮喘。患有过敏性疾病或哮喘的个体是具有现有过敏性疾病或哮喘的可识别症状的个体。在所述个体中,耐受可例如由与引起过敏反应的特定食物(例如,花生蛋白等)、注射的物质(例如蜂毒蛋白等)或吸入的物质(例如豚草花粉蛋白、宠物皮屑蛋白等)复合的粒子诱导。

[0173] 在某些实施方案中,个体患有与不需要的免疫激活相关的病症,诸如自身免疫性疾病和炎症性疾病。患有自身免疫性疾病或炎症性疾病的个体是具有现有自身免疫性疾病或炎症性疾病的可识别症状的个体。在所述个体中,耐受可例如由与驱使特定自身免疫性疾病的相关自体抗原复合的粒子诱导。

[0174] 在某些实施方案中,个体患有与酶替代治疗相关的病症。在所述个体中,耐受可例如由与基因缺陷患者不能产生的酶复合的粒子诱导,从而防止其对为治疗其特定缺陷而施用的重组产生的酶形成中和抗体反应,例如针对因在制造因子VIII的能力方面的基因缺陷而造成的血友病患者中的人因子VIII的耐受。

[0175] 在某些实施方案中,个体患有与疾病治疗相关的病症。在重组抗体的情况下,耐受是例如针对在治疗性情形下使用以防止患者针对抗体治疗剂形成中和抗体的人源化抗体进行诱导,例如针对用作对自身免疫性疾病的治疗的人源化免疫子组消耗性抗体或抗细胞因子抗体的耐受。

[0176] 自身免疫性疾病可分成两大类:器官特异性和系统性。自身免疫性疾病包括但不限于类风湿性关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、I型糖尿病、II型糖尿病、多发性硬化(MS)、免疫介导的不育症(诸如卵巢早衰)、硬皮病、舍格伦氏病(Sjogren's disease)、白癜风、秃头症(秃顶)、多腺体衰竭、格雷夫斯病、甲状腺功能减退、多肌炎、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、炎症性肠病(包括克罗恩氏病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎)、自身免疫性肝炎(包括与乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)相关的自身免疫性肝炎)、垂体功能减退、移植物抗宿主病(GvHD)、心肌炎、爱迪生氏病(Addison's disease)、自身免疫性皮肤病、葡萄膜炎、恶性贫血、乳糜泻以及甲状旁腺机能减退。

[0177] 自身免疫性疾病还可包括但不限于桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、I型和II型自身免疫性多腺综合症、副肿瘤性天疱疮、水疱性类天疱疮、疱疹样皮炎、线性IgA病、获得性大疱性表皮松解症、结节红斑、妊娠性类天疱疮、瘢痕性类天疱疮、混合型原发性冷球蛋白血症、儿童期慢性大疱性疾病、溶血性贫血、血小板减少性紫癜、古德帕斯丘氏综合症(Goodpasture's syndrome)、自身免疫性嗜中性白血球减少症、重症肌无力、伊顿-兰伯特肌无力综合症(Eaton-Lambert myasthenic syndrome)、僵人综合症、急性播散性脑脊髓炎、格林-巴利综合症(Guillain-Barre syndrome)、慢性炎症性脱髓鞘性多神经根神经病、多灶性运动神经病伴传导阻滞、慢性神经病伴单克隆丙种球蛋白病、眼阵挛-肌阵挛综合症、小脑变性、脑脊髓炎、视网膜病变、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、谷蛋白敏感性肠病、强直性脊柱炎、反应性关节炎疹、多肌炎/皮肌炎、混合型结缔组织病、白塞氏综合症(Bechet's syndrome)、牛皮癣、结节性多动脉炎、过敏性血管炎(allergic anguitis)和肉芽肿病(许尔-斯特劳斯病(Churg-Strauss disease)、多血管炎重叠综合症、超敏性血管炎、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、颞动脉炎、高安氏动脉

炎(Takayasu's arteritis)、川崎氏病(Kawasaki's disease)、孤立性中枢神经系统血管炎、闭塞性动脉硬化、肉状瘤病、血管球性肾炎以及寒冷病。这些病状是医学领域中熟知的,并且描述于例如Harrison's Principles of Internal Medicine,第14版,Fauci AS等编著,New York:McGraw-Hill,1998中。

[0178] 用于研究自身免疫性疾病的动物模型是本领域中已知的。举例来说,看起来与人自身免疫性疾病最相似的动物模型包括自发产生特定疾病的高发病率的动物品系。所述模型的实例包括但不限于非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠(其发生类似于1型糖尿病的疾病)以及有狼疮样疾病倾向的动物,诸如新西兰杂种、MRL-Faslpr以及BXSB小鼠。已诱导自身免疫性疾病的动物模型包括但不限于实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE),其是多发性硬化的模型;胶原蛋白诱导的关节炎(CIA),其是类风湿性关节炎的模型;以及实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU),其是葡萄膜炎的模型。自身免疫性疾病的动物模型也已通过基因操纵产生,并且包括例如炎症性肠病的IL-2/IL-10敲除小鼠、SLE的Fas或Fas配体敲除和类风湿性关节炎的IL-I受体拮抗物敲除。

[0179] 在某些实施方案中,个体患有细菌或病毒感染。具有细菌或病毒感染的个体是具有现有细菌或病毒感染的可识别的症状的个体。

[0180] 可用本发明的修饰型粒子治疗的病毒感染的非限制性列表包括疱疹病毒感染、肝炎病毒感染、西尼罗河病毒感染、黄病毒感染、流感病毒感染、鼻病毒感染、乳头瘤病毒感染、副粘病毒感染、副流感病毒感染以及逆转录病毒感染。优选病毒是感染受试者的中枢神经系统的那些病毒。最优选病毒是导致脑炎或脑膜炎的那些病毒。

[0181] 可用本发明的修饰型粒子治疗的细菌感染的非限制性列表包括葡萄球菌感染、链球菌感染、分枝杆菌感染、芽孢杆菌感染、沙门氏菌感染、弧菌感染、螺旋体感染以及奈瑟氏菌感染。优选的是感染受试者的中枢神经系统的细菌。最优选的是导致脑炎或脑膜炎的细菌。

[0182] 在一些实施方案中,本发明涉及在疾病发作之前使用本发明的组合物。在一些实施方案中,本发明涉及使用本发明的组合物以抑制疾病持续。在一些实施方案中,本发明涉及减轻受试者的疾病。减轻受试者的疾病是指包括治疗、预防或抑制受试者的疾病。

[0183] 在一些实施方案中,本发明涉及预防疾病的复发。举例来说,不需要的免疫反应可发生在肽的一个区域(诸如抗原决定区)。与不需要的免疫反应相关的疾病的复发可通过在肽的不同区域具有免疫反应攻击来发生。因为本发明的免疫修饰粒子不含所连接的肽或抗原性部分,所以粒子将有效对抗多种表位。在包括MS和其它ThI/17介导的自身免疫性疾病的一些免疫反应病症中,T细胞反应可以是动态的并且在复发-缓和和/或慢性进行性疾病的过程中逐步形成。T细胞库的动态性质具有对某些疾病的治疗的暗示,因为目标可能随疾病进展而变化。以前,反应模式的预先存在的知识是预测疾病进展所必须的。本发明提供可防止动态变化的疾病的影响(即"表位扩展"功能)的组合物。已知的复发模型是作为多发性硬化(MS)模型的对蛋白脂质蛋白(PLP)的免疫反应。初始免疫反应可通过对PLP139-151的反应而发生,。后续疾病发作可通过对PLP[pi]s-iβi的复发免疫反应而发生。

[0184] 本发明的其它实施方案涉及移植。这是指将来自供体个体的组织样品或移植物转移到受体个体,并且经常对需要所述组织的人受体进行以恢复由所述组织提供的生理功能。移植的组织包括(但不限于)整个器官,诸如肾、肝、心脏、肺;器官组件,诸如皮肤移植物

和眼角膜;以及细胞悬浮液,诸如骨髓细胞和从骨髓或循环血中选择并且扩增的细胞培养物;以及全血输注。

[0185] 任何移植的严重潜在并发症均由宿主接受者与移植的组织之间的抗原性差异产生。取决于差异的性质和程度,可能存在宿主对移植物或移植物对宿主或两者的免疫攻击的风险。风险程度是通过遵循具有类似表型的类似治疗受试者群体的反应模式并且根据良好接受的临床程序将各种可能的起作用因素相关联来确定。免疫攻击可能是预先存在的免疫反应的结果(诸如预形成抗体),或是大致在移植时引发的免疫反应的结果(诸如TH细胞的产生)。抗体、TH细胞或Tc细胞可涉及彼此之间和与各种效应分子和细胞的任何组合。然而,参与免疫反应的抗原通常不为人所知,因此在设计抗原特异性疗法或诱导抗原特异性耐受中构成困难。

[0186] 本发明的某些实施例涉及降低导致接受者排斥组织移植物的宿主抗移植物疾病的风险。可进行所述治疗以阻止或减少超急性、急性或慢性排斥反应的影响。优先在移植之前的足够长时间开始治疗,使得当移植物植入时已经具有耐受;但是在这不可能的情况下,可在移植的同时或之后开始治疗。不管开始的时间,治疗通常将以规律时间间隔在移植后持续至少第一个月。如果发生移植物的充分适应,则可不需要后续剂量,但如果移植物有任何排斥或炎症的迹象,则可恢复后续剂量。当然,本发明的耐受化程序可与其它形式的免疫抑制组合以实现甚至更低水平的风险。

[0187] 在一些实施方案中,本发明的组合物(例如,偶联至抗原分子的PLG载体)可与一个或多个支架、基质以及/或者递送系统一起使用(参见,例如美国专利申请2009/0238879;美国专利号7,846,466;美国专利号7,427,602;美国专利号7,029,697;美国专利号6,890,556;美国专利号6,797,738;美国专利号6,281,256;其以全文引用的方式并入本文中)。在一些实施方案中,粒子(例如,抗原偶联PLG粒子)与支架、基质以及/或者递送系统(例如,用于递送化学/生物材料、细胞、组织以及/或者器官至受试者)相连接、吸附于其上、嵌入其内、缀合至其上等。在一些实施方案中,支架、基质以及/或者递送系统(例如,用于递送化学/生物材料、细胞、组织以及/或者器官至受试者)包含本文所描述的材料和/或由本文所描述的材料(例如,缀合至一种或多种抗原性肽的PLG)制成。

[0188] 在一些实施方案中,提供微孔支架(例如,用于移植生物材料(例如细胞、组织等)至受试者中)。在一些实施方案中,所提供的微孔支架上面具有试剂(例如,细胞外基质蛋白、艾塞那肽-4)和生物材料(例如,胰岛细胞)。在一些实施方案中,在疾病(例如,1型糖尿病)的治疗和相关方法(例如,诊断方法、研究方法、药物筛选)中使用支架。在一些实施方案中,支架具有位于支架上和/或其内部的本文所描述的抗原缀合载体。在一些实施方案中,支架是由抗原缀合材料(例如,抗原缀合PLG)制造。

[0189] 在一些实施方案中,支架和/或递送系统包含一个或多个层和/或具有一种或多种化学和/或生物实体/试剂(例如,蛋白质、肽缀合粒子、小分子、细胞、组织等),参见例如美国专利申请2009/0238879;其以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,抗原偶联粒子与支架递送系统共施用以引起对针对支架和相关材料的免疫耐受的诱导。在一些实施方案中,将微孔支架与位于支架上和/或其内部的本文所描述的粒子一起向受试者施用。在一些实施方案中,抗原偶联粒子偶联至支架递送系统。在一些实施方案中,支架递送系统包含抗原偶联粒子。

[0190] 所描述特征和实施方案的各种修改、重组以及变化对于本领域技术人员而言将显而易见,而不背离本发明的范围和精神。尽管已描述具体实施方案,但是应了解,所要求保护的本发明不应不适当地限于所述具体实施方案。实际上,对于相关领域技术人员而言显而易见的对所描述模式和实施方案的各种修改意欲在以下权利要求书的范围内。举例来说,美国专利申请2012/0076831、2002/0045672、2005/0090008、2006/0002978以及2009/0238879(所述专利申请各自以全文引用的方式并入本文中)和美国专利号7,846,466;7,427,602;7,029,697;6,890,556;6,797,738;以及6,281,256(所述专利各自以全文引用的方式并入本文中)提供在本文所描述的各种实施方案中使用的细节、修改以及变化。

[0191] 本申请所提到和/或下文所列举的所有出版物和专利均以全文引用的方式并入本文中。

实施例

[0192] 提供以下实施例以进一步说明本发明的优点和特点,但是不意在限制本公开的范围。

[0193] 材料和方法

[0194] 嵌合小鼠的产生

[0195] 将六至八周龄B6.SJL-PtprcaPep3b/BoyJ(CD45.1)小鼠用一次剂量950拉德进行照射。12小时后,将小鼠用107个来自C57BL/6-7.2fms-EGFP供体的骨髓细胞进行重建。在照射后,对小鼠给予含磺胺甲噁唑(Sigma Aldrich)和甲氧苄啶(Sigma Aldrich)的饮用水持续10天。在如上文所描述的照射后六周,使小鼠感染WNV。使用流式细胞术检查嵌合性,并且如先前所证实一律发现96-99%的供体来源(Getts等,J Neurochem.103:1019,2007)。

[0196] 免疫组织学

[0197] 将小鼠麻醉并且灌注50mL无菌PBS。除心脏被加工成石蜡块(Getts等,J.Neurochem 103:10919-1030,2007)外,将所有器官分离并且在最佳切割温度化合物(OCT;Tissue-Tek,Tokyo,Japan)中进行快速冷冻。在恒冷切片机上切割八微米组织切片,风干过夜,并且然后储存在-80℃下直至被需要。经冷冻切片解冻并且进行组织学(标准苏木精和伊红染色)或免疫组织化学分析(Getts等,J.Exp Med 205:2319-2337,2008)。如所指示使用针对MARCO、SIGN-R1和SIGLEC-1(R&D Systems,MN,USA)、CD68(Abcam,MA,USA)以及Ki67(Abcam)的抗体。使用DP-70相机和DP manager 2.2.1软件(Olympus,Tokyo,Japan)在Olympus BX-51显微镜上采集图像。

[0198] 显微镜和图像采集

[0199] 使用DP-70相机和DP manager 2.2.1软件(Olympus)在Olympus BX-51显微镜(Olympus,Japan)上采集图像。

[0200] 从脑和肝分离白细胞

[0201] 如先前所描述(Getts等,J Exp Med.29:2319,2007),通过将脑在37℃下在PBS中用脱氧核糖核酸酶(0.005g/ml;Sigma Aldrich)和胶原酶IV(0.05g/ml;Sigma Aldrich)消化60分钟从PBS灌注小鼠的脑获得白细胞。用10%FCS停止消化,并且使匀浆穿过70μm尼龙细胞滤网(Becton Dickinson,NJ,USA)。将以340xg进行10分钟离心后获得的沉淀再悬浮于30%Percoll(Amersham,Norway)中并且在80%Percoll上成层。在室温下以1140xg离心25

分钟后从30％/80％界面处收集白细胞。也可使用相同方案从肝脏获得白细胞,并且在加工之前将组织称重。

[0202] 从脾、血液以及骨髓分离白细胞

[0203] 对于流式细胞仪分析,解剖出右股骨并且使用装有PBS的注射器冲洗出骨髓细胞。对于骨髓前体分离,使用来自至少4只小鼠的股骨和胫骨。将冲洗后所取得的细胞悬浮液通过70μm细胞滤网过滤,并且以340g离心5分钟。将所得沉淀中的红血细胞溶解于基于NH4Cl的红细胞溶解缓冲液(BD Pharm LyseTM;BD Pharmingen)中,然后以340xg离心5分钟。在外周血的情况下,经由心脏穿刺收集血液,并且立即转移到柠檬酸盐缓冲液(mMol,Sigma Alrich)中。使所得悬浮液在70％Percoll上成层,并且在室温下在松开制动的情况下以1140xg离心20分钟。收集界面,并且将细胞在PBS中洗涤一次,以340xg离心。对于脾白细胞的分离,使脾穿过7070μm细胞滤网并且以340g离心5分钟。将所得沉淀中的红血细胞溶解于基于NH4Cl的红细胞溶解缓冲液(BD Pharm LyseTM;BD Pharmingen)中,然后以340xg离心5分钟。

[0204] 流式细胞术

[0205] 将从脑、肝、血液以及骨髓收集(如上文所描述)的细胞在PBS中洗涤,并且用抗CD16/CD32抗体(Biolegend)阻断。使用台盼蓝(trypan blue)排除法对活细胞进行计数,其常规地显示>95％细胞活力。

[0206] 测量细胞表面分子表达,并且在配备有氩离子和HeNe激光器的FACS ARIA(Becton Dickinson)上进行细胞分选。通过前向和侧向散射对活群体进行设门,并且识别其后由前向设门确定的荧光群体。使用鉴定所关注群体的特定荧光和散射参数进行分选。对于骨髓群体,根据纯度的分选严格程度设定为实现>98％纯度。

[0207] 使用流式细胞术程序Flow Jo(FlowJo,Ashland,OR,USA)分析所采集的FACS数据文件。所关注的细胞群的定量是根据在各器官的分析和绝对细胞计数下的流式细胞术百分比进行计算。

[0208] 过继转移

[0209] 在开展本发明的实施方案期间进行实验以研究称为过继转移的反应性疾病的第二模型。不是用肽免疫动物,而是将来自反应性疾病小鼠的脾的淋巴细胞转移至接受者中,所述接受者随后发生疾病。在开展本发明的实施方案期间进行实验以表征PLG纳米粒子使过继转移的活化效应细胞失活的能力。用对照肽偶联的粒子或脾细胞处理的小鼠的临床得分在第4天开始增加。在第2天用PLG-PLP139-151粒子处理的小鼠的平均临床得分在第40天里除两个时间点外的所有时间点均是0,而那些其它时间点的平均临床得分是0.25。

[0210] 多重ELISA

[0211] 根据制造商说明(Quansys Biosciences,Logan,Utah,USA)进行多重板ELISA。简要地说,将脑、脾以及肝组织在PBS中形成匀浆,通过1000xg旋转使其澄清,并且储存于-20℃,直到进行测定。还使用血清样品。将解冻样品和标准物在所提供的缓冲液中稀释,并且在含有16个含有特定可溶性蛋白质的捕获抗体斑点的各孔中各自涂铺30μl。然后,将板在定轨振荡器上在120r.p.m.下孵育1小时。将板洗涤3次,并且添加30μl检测抗体至各孔中,并且再孵育1小时。洗涤3次后,添加链霉亲和素-HRP,并且再孵育15分钟。然后将板洗涤6次,并且添加底物混合物。立即将板在CCD成像器(Kodak,Rochester NY,USA)上读取。使用

Quansys Q-View软件(Quansys Biosciences)对板图像进行分析。

[0212] 实验性自身免疫性脑炎(EAE)的诱导和评估

[0213] 用含有0.1mg MOG肽(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK(SEQ ID NO:1);Auspep,Parkville,Victoria,Australia;>95％HPLC纯化)和含有2mg/mL的结核分枝杆菌(Sigma Aldrich公司)的完全弗氏佐剂的乳液对小鼠进行皮下注射。两天后,将小鼠腹膜内施用500μl百日咳毒素(Sigma Aldrich)。监测小鼠的疾病进展,并且按以下尺度进行分级:1,尾巴无力和/或后肢虚弱;2,超过一条肢体虚弱,步态失常;3,1条肢体瘫痪;4,超过一条肢体瘫痪,失禁;5,濒临消亡。

[0214] 统计学

[0215] 作图并且分别在GraphPad Prism和InStat(两个软件均来自GraphPad software,San Diego,CA,USA)中进行计算机化统计分析。根据数据,进行非配对双尾学生t检验或单因素ANOVA加上杜克-克莱默事后检验(Tukey-Kramer post test),其中$P<0.05$视为显著的。

[0216] 对于诸如重量损失、浸润以及病毒滴度的参数之间的相关分析,使用第二阶多项式(Y＝A+B*X+C*X^2)情况下的非线性回归(曲线拟合)。

[0217] 实施例1

[0218] 带负电荷的免疫修饰粒子(IMP)的制备

[0219] 向聚(乙烯-马来酸酐)(PEMA)于D_2O中的溶液(4mL,1％w/v)中逐滴添加聚(丙交酯-共-乙醇酸)(PLG)于二氯甲烷(DCM)中的溶液(2mL,20％w/v)。使混合物使用VC 30超声波处理器在冰上在16瓦下超声处理30秒。然后将所得均质化粗物质倒入D_2O的溶液(200mL,含有0.5％w/v PEMA)中。使用Bellco Glass,Inc.,Bellstir Multi-stir 9磁力搅拌器使均质化浆液在3.5的速度设定下搅拌过夜(10W,10s;16W,10s;16W,30s)。

[0220] 结果

[0221] 搅拌3小时后,使用动态光散射在一次性聚苯乙烯比色皿中进行粒径分析

[0222] a.10W,10s-Z平均＝499.9nm-PdI＝0.23,峰值＝634.5nm

[0223] b.16W,10s-Z平均＝528.9nm-PdI＝0.227,峰值＝657.5nm

[0224] c.16W,30s-Z平均＝471.6nm-PdI＝0.228,峰值＝580.5nm

[0225] d.16W,60s-Z平均＝491.1nm-PdI＝0.275,峰值＝600.8nm

[0226] 在反应完成后,然后将所得粗悬浮液纯化。

[0227] 纯化

[0228] 将新鲜D_2O和10倍碳酸氢钠缓冲液冷冻过夜达到4℃。使用40μm细胞滤网,将来自各批次的36mL粒子悬浮液过滤到含有4mL冷冻10倍碳酸氢钠缓冲液的适当标记的50mL离心管中。每个烧杯得到约6个所述管。将所有管在4℃下以7000g离心约15分钟,并且将上清液吸出。使用上文所提到的程序重复悬浮液的制备并且尽可能多得将粒子沉淀悬浮于1mL冷冻D_2O中。

[0229] 将再悬浮的粒子转移到具有4mL冷冻10倍碳酸氢钠缓冲液的新的管中。(步骤1)

[0230] 重复粒子的再悬浮,直到整个粒子沉淀已成功再悬浮。(步骤2)

[0231] 然后,将6个离心管组合到一个离心管(50mL管)中并且将管的剩余体积用冷冻的D_2O填充至40mL(洗涤1)。

[0232] 将管在4℃下以7000g离心20分钟,并且将上清液吸出。

[0233] 每次步骤1和2以及所得粒子的洗涤1重复至少两次以上。最后,然后使所得粒子沉淀在液氮中进行快速冷冻并且在歧管中冻干至干燥,获得负IMP。

[0234] 图1示出了示出了通过动态光散射分析对表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以2.5×105次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的Z平均直径是567nm,峰值直径是670nm并且多分散指数是0.209。

[0235] 表1示出了表面官能化PLG-PEMA粒子的测量。表中的数据是代表性的,因为各批次略有不同。不过表中的数字是以将粒子的若干批次组合为基础。双乳液粒子的测量类似于表1中的测量。

[0236] 表1-表面官能化PLG-PEMA粒子的测量

[0237]

粒子	由强度表示的Z平均粒径(nm)	ζ电位(mV)
PLG (Phosphorex)	624.3	-32.7 ± 4.71
PLG-PEMA	429.9	-67.4 ± 10.9

[0238] 实施例2

[0239] 施用抗原偶联PLGA珠粒预防复发性实验性自身免疫性脑炎

[0240] 用免疫优势蛋白脂质蛋白$PLP_{139-151}$表位(PLG-$PLP_{139-151}$)研究PLG纳米粒子来诱导耐受以预防复发性实验性自身免疫性脑炎(R-EAE)。如上文所描述产生R-EAE小鼠。

[0241] 将向动物施用的肽偶联至平均直径为500nm的粒子。在相对于免疫时间(第0天)的第-7天用$PLP_{139-151}$-PLGA(N=5)、$OVA_{323-339}$-PLGA(N=5)或未缀合PLGA(N=5)处理小鼠。通常在约第12天至第14天观测到疾病高峰期,并且对小鼠关于临床疾病进行评分。不具有肽或用对照肽OVA323-339修饰的粒子不预防疾病诱导。然而,用$PLP_{139-151}$修饰的PLGA粒子产生的临床得分是0(无疾病),除了在第20天与第30天之间展现低于1的低临床得分(图2)。使用未修饰的PLG或使用聚苯乙烯粒子的先前研究未产生这种有效疾病减轻,其中聚苯乙烯结合粒子通常引发过敏反应。

[0242] 此外,由缺乏针对两种免疫$PLP_{139-151}$表位的迟发型超敏反应(DTH)证实髓鞘特异性CD4+T细胞的特异性失活。总之,在第-7天用PLG-$PLP_{139-151}$预防性处理特异性地预防EAE发生,并且反映出粒子预防疾病的能力提高。用粒子产生的得分与用抗原偶联的脾细胞产生的得分一样好,并且后者可能更好。

[0243] 所施用粒子的类型也对小鼠模型中EAE的发生有影响。在相对于免疫时间(第0天)的第-7天用$OVA_{323-339}$-PLS(N=5)、$OVA_{323-339}$-PLGAPHOSPOREX(N=5)、$OVA_{323-339}$-PLGAPEMA(N=5)、$PLP_{139-151}$-PLA(N=5)、$PLP_{139-151}$-PLGAPHOSPOREX(N=5)或$PLP_{139-151}$-PLGPEMA(N=5)处理小鼠。通常在约第12天至第14天观测到疾病高峰期,并且对小鼠关于临床疾病进行评分。用对照肽$OVA_{323-339}$修饰的任何组合物的粒子不预防疾病诱导。然而,$PLP_{139-151}$偶联PLG珠粒在下调对R-EAE的诱导中比$PLP_{139-151}$偶联商业(Phosphorex)pLG或聚苯乙烯更有效(图3A和

3B)。

[0244] 实施例3

[0245] 静脉内输注抗原偶联PLG粒子不诱导在OVA/明矾预敏化动物中的过敏反应诱导的温度降低

[0246] 由于反应性疾病的存在,对抗原的过敏反应是所关注的,其可能导致立即死亡,并且在聚苯乙烯结合粒子情况下已有描述。过敏反应与体温显著下降相关。为测试OVA-PLG的静脉内施用是否诱导在预致敏动物中的过敏反应诱导的温度下降,在第0天将小鼠经由腹膜内注射用10μg OVA/明矾进行免疫。在第14天,经由腹膜内注射用10μgOVA/明矾将小鼠再次免疫,并且然后在第21天用静脉内施用的OVA-PLG进行耐受化。然后,在第28天,经由静脉内施用用OVA-PLG粒子或OVA将小鼠耐受化。

[0247] 如图4中所示,那些在第28天用可溶性OVA处理的小鼠与那些用OVA-PLG粒子处理的动物相比展现温度降低。在递送粒子1小时内未观测到体温降低。

[0248] 图5显示在缓解期间施用PLP-PLG不引起任何过敏反应相关的死亡。在六至八周龄雌性SJL/J小鼠中通过皮下注射$PLP_{139-151}$/CFA诱导EAE,并且监测并记录临床疾病的发生(图5B)。在相对于疾病诱导的第21天,给小鼠静脉内注射可溶性$PLP_{139-151}$(空心方形)、可溶性$OVA_{323-339}$(空心圆形)或偶联至PLG纳米粒子的相同肽(实心)。在注射之后,每10分钟监测并记录动物的温度持续1小时(图5A)。

[0249] 实施例4

[0250] 用PLP-PLG粒子预防性处理诱导长期抗原特异性耐受

[0251] 通过在疾病诱导之前七天静脉内施用增加浓度的$PLP_{139-151}$-PLG来确定最佳给药,并且监测相较于用$OVA_{323-339}$-PLG处理的SJL/J小鼠的临床疾病的发生(图6A)。给六至八周龄雌性SJL/J小鼠静脉内注射PLP139-151(方形)或$OVA_{323-339}$(圆形)偶联的PLG纳米粒子。通过在7天(图6B)、25天(图6C)或50天(图6D)后皮下注射CFA中的$PLP_{139-151}$来诱导EAE。跟踪图B的动物的临床疾病持续100天。图6E显示在相对于疾病诱导的第8天,在图B中所示的小鼠的亚组中执行迟发型超敏反应(DTH)。将来自图B中$PLP_{139-151}$/CFA初免组($OVA_{323-339}$-PLG和$PLP_{139-151}$-PLG)的所选代表性动物用初免$PLP_{139-151}$表位和$OVA_{323-339}$对照肽进行耳部激发。24小时后测定作为DTH的量度的耳肿胀并且扣除激发之前的反应。图6F显示给六至八周龄雌性SJL/J小鼠静脉内注射$PLP_{178-191}$(三角形)、$OVA_{323-339}$(圆形)或$PLP_{139-151}$(方形)偶联的PLG纳米粒子或单独的未偶联粒子(空心圆形)。7天后通过皮下注射CFA中的$PLP_{178-191}$诱导EAE,并且在所示时间点监测疾病。

[0252] 实施例5

[0253] 用抗原偶联粒子治疗复发性实验性自身免疫性脑炎

[0254] 在开展本发明的实施方案期间进行实验以研究PLG-$PLP_{139-151}$粒子治疗疾病而非预防疾病的能力,并且确定施用途径是否影响疾病发生。在第0天用$PLP_{139-151}$和佐剂免疫小鼠。小鼠通常在第12-14天具有最大临床得分。在此模型中,在第10天经由静脉内(iv)施用、腹膜内(ip)施用、皮下(sc)施用或口服将小鼠用PLG-$PLP_{139-151}$粒子或用对照PLG-$OVA_{323-339}$粒子处理。如图7中所示,当静脉内或腹膜内施用PLG-$PLP_{139-151}$粒子时预防性耐受最有效。用静脉内施用的$PLP_{139-151}$-PLG处理的动物未发生疾病并且在大多数时间点平均临床得分是0。这是与用$PLP_{139-151}$聚苯乙烯粒子处理的动物形成对比,其中观测到死亡的动物中>

70％是死于过敏反应。

[0255] 实施例6

[0256] 抗原偶联粒子耐受抑制在反应性复发性实验性自身免疫性脑炎中抗原特异性Th1和Th17反应的诱导

[0257] 为确定施用抗原偶联粒子是否抑制T辅助细胞的诱导,在第-7天向BALB/c小鼠静脉内施用MOG_{35-55}-PLG或$OVA_{323-339}$-PLG粒子。在第0天,向小鼠皮下施用$OVA_{323-339}$-PLG粒子和完全弗氏佐剂(CFA)。在第10天将动物用MOG_{35-55}-PLG或$OVA_{323-339}$-PLG粒子再刺激并且将染色淋巴结细胞分离。在第10天测量CPM和IL-17、GM-CSF、IFN-γ、IL-10以及IL-4的水平。如图8中所示,施用$OVA_{323-339}$-PLG粒子抑制所处理动物中的Th1和Th17反应。

[0258] 实施例7

[0259] 由$PLP_{139-151}$-偶联的PLGA粒子诱导耐受

[0260] 通过递送$PLP_{139-151}$-PLG或$OVA_{323-339}$PLG至小鼠来进行另一种治疗性耐受策略。组织学分析显示施用$PLP_{139-151}$-PLG粒子抑制颈脊髓炎症和脱髓鞘。将小鼠用PLP-PLG或$OVA_{323-339}$-PLG处理并且在第40天取回组织。分离颈脊髓并且切片以研究CNS内的免疫反应,其构成R-EAE和多发性硬化的病理的基础。图9显示在用$PLP_{139-151}$-PLG处理的动物的脊髓内的免疫细胞浸润减少,并且其与天然组织的类似性高于$OVA_{323-339}$-PLG处理的动物的组织。$OVA_{323-339}$-PLG处理的动物针对CD45、CD4以及CD11b具有阳性染色;而$PLP_{139-151}$-PLG处理的动物针对这些因子具有最少染色。

[0261] 施用$PLP_{139-151}$-PLG粒子还抑制所处理小鼠的脊髓中的血脑屏障(BBB)破裂和巨噬细胞活化。将动物用完全弗氏佐剂(CFA)、$OVA_{323-339}$PLG粒子或$PLP_{139-151}$-PLG粒子处理。测定了EAE的临床得分和发生率百分比(图10B)并且经由体内成像观测了脊髓(图10A和11)。Angiosense测量了CNS中的血管渗漏并且prosense报告了活化巨噬细胞(组织蛋白酶活化裂解报告蛋白,从而展现荧光信号)。条形图为脑和SC扫描中所示的信号强度给出数值。

[0262] 也可由其中已封装抗原的粒子诱导耐受。图12显示施用其中已封装$PLP_{139-151}$的PLG粒子抑制小鼠中R-EAE的诱导。封装自体抗原的能力允许使用蛋白质的复杂混合物或甚至器官匀浆以实现更高抗原覆盖度并且因此更有效地应对表位扩展。

[0263] 实施例8

[0264] 由$PLP_{139-151}$-偶联的PLGA粒子诱导的耐受部分依赖于调节性T细胞的扩增/活化

[0265] 将SJL/J小鼠在第-9天用抗CD25抗体(调节性T细胞的常见标记物)处理,并且然后在第-7天用$OVA_{323-339}$PLG粒子和抗CD25抗体、$OVA_{323-339}$PLG粒子和对照IgG抗体、$PLP_{139-151}$-PLG粒子和抗CD25抗体或$PLP_{139-151}$-PLG粒子和对照IgG抗体处理。如图13中所示,用$PLP_{139-151}$-PLG粒子和抗CD25抗体处理的动物有时比那些用$PLP_{139-151}$-PLG粒子和对照IgG抗体处理的动物展示更大平均临床得分。这证实了Treg或至少表达CD25的T细胞在引发耐受中发挥作用。

[0266] 实施例9

[0267] 在反应性和过继性EAE中由$PLP_{139-151}$-PLG粒子诱导治疗性耐受

[0268] 在反应性和过继性EAE中比较由$PLP_{139-151}$-PLG粒子诱导的治疗性耐受。在六至八周龄雌性SJL/J小鼠中通过过继转移2.5×10^6个$PLP_{139-151}$活化母细胞来诱导过继性EAE。在疾病诱导之后2天(图14A)或14天(图14C),给小鼠静脉内注射偶联至500nm PLG纳米粒子的

$PLP_{139-151}$(方形)或$OVA_{323-339}$(圆形)肽。将临床疾病得分与用抗原偶联的脾细胞处理之后的临床疾病得分进行比较(图14A)。在第42天从$PLP_{139-151}$或$OVA_{323-339}$耐受化的小鼠收集脑和脊髓用于组织学分析。将来自图A的小鼠的切片针对PLP蛋白和CD45进行染色(图14B)。将来自图C的小鼠的脊髓切片用勒克司坚牢蓝染色(图14D)。脱髓鞘和细胞浸润的区域由箭头指示。结果显示在具有过继性EAE的小鼠中耐受是由$PLP_{139-151}$-PLG粒子诱导。

[0269] 图15示出了描绘在用缀合至$OVA_{323-339}$或$PLP_{139-151}$的SP或PLG粒子处理之后具有反应性EAE和过继性EAE的小鼠的平均临床得分的图。在疾病诱导之后10天(图15A)或2天(图15B),给小鼠静脉内注射$PLP_{139-151}$-SP、$PLP_{139-151}$-PLG或偶联至500nm纳米粒子的$OVA_{323-339}$-SP或OVA323-339-PLG肽,并且确定平均临床得分。在两种情况下,施用$PLP_{139-151}$-PLG粒子减轻疾病,指示耐受诱导。

[0270] 在PLP-PLG耐受化小鼠中中枢神经系统免疫细胞的浸润也显著减少。在通过过继转移进行EAE诱导之后2天给SJL/J小鼠静脉内注射与$PLP_{139-151}$(方形)或$OVA_{323-339}$(圆形)偶联的500nm PLG纳米粒子。在疾病高峰期(第14天),将脑和脊髓去除并且通过流式细胞术计算淋巴细胞(图16B)、APC(图16C)、小胶质细胞(图16D)、外周树突细胞(图16E)、髓样树突细胞(图16F)以及巨噬细胞(图16G)的数目。这些群体的设门策略描绘于(图16A)中。将CNS细胞制备物用PMA和离子霉素刺激5小时,然后针对IL-17A和IFN-γ进行细胞内染色(图16H)。

[0271] 实施例10

[0272] 用抗PD-1单克隆抗体处理消除在过继转移EAE中在封装PLP139-151的PLG纳米粒子情况下的耐受诱导

[0273] 为测试在具有过继性EAE的小鼠中用抗PD-1抗体处理对$PLP_{139-151}$诱导的耐受的影响,在第0天,小鼠经由静脉内施用接受3×10^6个$PLP_{139-151}$活化的T细胞母细胞。在第2天,它们经由与PBS或抗PD-1抗体一起静脉内施用接受封装于PLG粒子中的$PLP_{139-151}$或$OVA_{323-339}$。在第4天、第6天、第8天、第10天以及第12天,所有动物均接受250μg抗PD-1抗体或PBS。

[0274] 如图17中所示,施用封装于PLG粒子中的$PLP_{139-151}$肽在粒子与PBS一起施用时诱导耐受。然而,施用抗PD-1抗体使此耐受降低。

[0275] 实施例11

[0276] 用拮抗性抗CD40单克隆抗体处理以IL-12依赖性方式消除在过继转移EAE中在封装$PLP_{139-151}$的PLG纳米粒子情况下的耐受诱导

[0277] 为测试在具有过继性EAE的小鼠中用拮抗性抗CD40抗体处理对$PLP_{139-151}$诱导的耐受的影响,在第0天,小鼠经由静脉内施用接受3×10^6个$PLP_{139-151}$活化T细胞母细胞。在第2天,小鼠经由静脉内施用接受封装于PLG粒子中的$PLP_{139-151}$或$OVA_{323-339}$。在第3天,动物接受对照IgG2a抗体、抗CD40抗体或抗CD40抗体以及抗I1-12抗体。

[0278] 如图18中所示,施用封装于PLG粒子中的$PLP_{139-151}$肽在粒子与PBS一起施用时诱导耐受。施用拮抗性CD40抗体使此耐受降低,但通过添加抗IL-12抗体此耐受降低得以逆转。

[0279] 实施例12

[0280] 封装于PLG粒子中的OVA预防性抑制过敏性气道炎症和体内OVA特异性Th2反应

[0281] 为测试封装于PLG粒子中的OVA对气道炎症的预防作用,在第-7天将小鼠用OVA-PLG静脉内处理。在第0天,小鼠以10μg/小鼠的剂量接受OVA/明矾腹膜内注射。在第7天,将小鼠再次用OVA-PLG静脉内处理并且在第14天再接受10μg/小鼠的OVA/明矾腹膜内注射。在

第28天与第30天之间,将小鼠用雾化OVA处理三次。

[0282] 如图19中所示,预防性施用OVA-PLG使IL-4、IL-5、IL-13以及IL-10的分泌减少,并且使肺中血清OVA IgE和嗜酸性粒细胞的水平降低。

[0283] 封装于PLG粒子中的OVA预防性抑制纵隔淋巴结的OVA特异性体外回忆反应。如图20A中所示,在用25μg OVA再刺激之后所观测到的淋巴结增殖在那些用OVA-PLG处理的动物中得以减少。此外,用OVA-PLG处理使在用OVA再刺激之后细胞因子的释放减少。图20B显示在用OVA-PLG处理的小鼠中IL-4、IL-5、IL-13以及IL-10的水平降低。

[0284] 实施例13

[0285] 封装于PLG粒子中的OVA治疗性抑制过敏性气道炎症和体内OVA特异性Th2反应

[0286] 为测试封装于PLG粒子中的OVA对气道炎症的治疗作用,在第0天和第14天将小鼠用OVA/明矾以10μg/小鼠的剂量进行腹膜内处理。在第28天和第42天向小鼠静脉内施用OVA-PLG。在第56天至第58天之间,用雾化OVA处理小鼠三次。

[0287] 如图21中所示,治疗性施用OVA-PLG使IL-4、IL-5、IL-13以及IL-10的分泌减少,并且使肺中血清OVA IgE和嗜酸性粒细胞的水平降低。

[0288] 图22显示封装于PLG粒子中的OVA治疗性下调BAL流体中的OVA特异性Th2细胞因子优于OVA偶联的PLG粒子。将动物如上文所描述进行处理,除了在第28天和第42天,将小鼠用封装于PLG粒子中的OVA或偶联至PLG粒子的OVA处理。出人意料的是,封装型OVA对Th2细胞因子的分泌的抑制大于偶联至PLG粒子的表面的OVA肽。

[0289] 实施例14

[0290] 由嗜铬素A p31肽-PLG粒子诱导的耐受抑制1型糖尿病

[0291] 在3周时通过从小鼠分离脾、腋窝、上臂、腹股沟以及胰淋巴结细胞在BDC2.5小鼠中诱导1型糖尿病。将分离的细胞进行培养,并且通过将2×106个细胞/mL与0.5μM p31肽孵育96小时进行体外活化。在时间0时经由静脉内施用将5×10^{6}个细胞转移至NOD.SCID小鼠(6-8周)。2小时至3天后经由静脉内施用偶联至SP或PLG的p31或MOG_{35-55}肽使小鼠耐受化。

[0292] 图23A和23B示出了处理后动物的血糖水平。施用p31肽偶联的PLG产生与在施用MOG_{35-55}肽偶联粒子后所见的血糖水平相比更低的血糖水平。图23C显示与MOG_{35-55}肽-PLG处理的小鼠相比,在p31-PLG处理的小鼠中在动物中观测到的IFNγ分泌细胞的百分比也降低。

[0293] p31-PLG诱导的耐受需要Treg。如上文所描述在小鼠中诱导1型糖尿病,并且在2小时后将活化细胞转移至NOD.SCID小鼠,用p31-PLG或MOG_{35-55}PLG粒子使小鼠耐受化。如图24中所示,Treg耗竭消除通过施用p31-PLG粒子诱导的耐受。

[0294] 实施例15

[0295] 由胰岛素偶联PLG粒子诱导的耐受抑制NOD小鼠中自发型1型糖尿病的发生

[0296] 经由在6周、8周以及10周龄静脉内施用将NOD小鼠用BSA(N=22)或胰岛素(N=23)偶联的PLG粒子进行处理。然后分析小鼠的糖尿病发生,所述糖尿病发生定义为血糖>250mg/dL。如图25中所示,施用胰岛素偶联的PLG粒子使在300天内未发生糖尿病的小鼠的百分比显著增加(69.6%,相较于22.7%;p=0.0027)。

[0297] 实施例16

[0298] 植入动力学

[0299] 在第-7天将雌性CD45.2小鼠用OVA-PLG或对照肽Dby-PLG(由雄性C57BL/6小鼠表达的主要H-Y抗原)耐受化。在第-1天,将小鼠以200拉德进行照射并且然后在第0天移植来自雄性CD45.1小鼠的1×10^6、5×10^6或1×10^7个骨髓细胞。然后在第1天将接受者小鼠用OVA-PLG、Dby-SP或Dby-PLG耐受化并且收获血液用于关于嵌合性的FACS分析。图26示出了在接受者小鼠中观测到的CD45.1供体细胞的百分比。

[0300] 图27示出了在第1天用OVA-PLG、Dby-SP或Dby-PLG耐受化之后接受者小鼠中的供体CD45.1细胞的百分比。一只阳性对照小鼠不展示显著植入(约10%)。所有阴性对照小鼠均未植入供体细胞。一只Dby-SP小鼠不展示显著植入(约10%)。两只OVA-PLG小鼠植入了供体细胞(约10%):一只到第16周完全排斥。一只Dby-PLG小鼠在第12周开始排斥并且到第16周为10%。到第16周Dby-PLG组在10%-56%植入范围内。OVA-PLG小鼠展示:1)自发植入,2)OVA323与Dby之间的序列同源性,或3)粒子的致耐受性。Dby-PLG允许比Dby-SP和OVA-PLG更多的植入。

[0301] 图28显示定时耐受对接受者小鼠中CD45.1细胞的百分比有影响。阳性对照显示植入(约4%)少于预期(约10%)。一只阴性对照小鼠具有5%植入。在所有3个OVA-PLG组中,在第-7天、第+1天组中的一只小鼠显示植入(12%)。在第1天的耐受比在第-7天的耐受更具临床相关性。

[0302] 实施例17

[0303] 施用后24小时香豆素-6PLGA粒子不可检测

[0304] 将小鼠用偶联至抗原或不含抗原的香豆素-6PLGA粒子处理。如图29中所示,在施用后3小时粒子可检测,但在施用后24小时不可检测。初次接受试验的未注射小鼠(顶部行)与静脉内荧光PLGA/PEMA微粒注射的小鼠脾(左侧列)、肝(中间列)以及肺(左侧列)切片(注射后3小时(中间行)和注射后24小时(底部行),用DAPI复染)相比较。

[0305] 实施例18

[0306] 纳米粒子在体内与巨噬细胞相关联

[0307] 施用后6小时和15小时的肝分析显示PLGA粒子与肝中的$F4/80^+$细胞(图30)共定位。

[0308] 在静脉输注后24小时边缘区域巨噬细胞主要摄取TAMRA标记的$PLP_{139-151}$偶联粒子。如图31中所示,最高百分比的$PLP_{139-151}$+细胞是边缘区域巨噬细胞。

[0309] 实施例19

[0310] 使用核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子抑制SJL/J小鼠的R-EAE

[0311] 在相对于在第0天用$PLP_{139-151}$/CFA初免之前的第-7天和第-1天,给各组SJL/J小鼠静脉内注射2.5mg核心内具有可溶性$PLP_{139-151}$肽的500nm-700nm表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子。在第0天将对照小鼠初免但在第-7天或第-1天不接受粒子处理。再观察小鼠的R-EAE临床征象20天。

[0312] 描绘于图32中的结果描绘了相对于$PLP_{139-151}$/CFA初免天数的日平均临床得分。在SJL/J小鼠中通过使用核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子来诱导免疫耐受抑制了$PLP_{139-151}$/CFA诱导的R-EAE。

[0313] 实施例20

[0314] 通过含有可溶性卵清蛋白的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子抑制过敏性气道炎症

[0315] 在小鼠中诱导过敏性气道炎症(AIA)。在第0天和第+14天用卵清蛋白/alum初免之前第-7天和第+7天,给各组Balb/c小鼠静脉内注射2.5mg核心内具有可溶性卵清蛋白或可溶性牛血清白蛋白(对照)的500nm-700nm表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子。在第+28-30天将小鼠用雾化卵清蛋白激发。然后处死小鼠并且获得支气管肺泡灌洗液。也对卵清蛋白特异性IgE的血清水平进行测量。

[0316] 支气管肺泡灌洗液内的嗜酸性粒细胞计数指示AAI的严重性-更高的计数指示更糟糕的疾病。IgE的血清水平指示AAI的严重性-更高的水平指示更糟糕的疾病。

[0317] 图33显示用封装型OVA-PLG处理的小鼠显示最大的嗜酸性粒细胞累积降低。图34显示与未处理或对照处理的动物相比用封装型OVA-PLG处理的小鼠显示最大的血清IgE水平降低。

[0318] 通过使用核心内含有可溶性卵清蛋白的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子诱导免疫耐受抑制了Balb/c小鼠中卵清蛋白/明矾诱导的过敏性气道炎症。

[0319] 实施例21

[0320] 封装抗原的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的合成

[0321] 本实施例详细介绍了可生物降解的乙交酯丙交酯共聚物粒子的配制和部分表征,所述可生物降解的乙交酯丙交酯共聚物粒子已以高密度的羧酸酯基表面官能化并且在其由乙交酯丙交酯共聚物外壳包围的核心内含有可溶性抗原,用于自身免疫性疾病中的耐受诱导并且用于治疗过敏。

[0322] 高密度的羧酸酯基是通过使用聚(乙烯-交替-马来酸酐(PEMA))(具有并入骨架的羧酸酯基的聚合物)作为乳化过程的表面活性剂而实现。

[0323] 如上文所描述,核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$并且以高密度羧酸酯基表面官能化的可生物降解的乙交酯丙交酯共聚物粒子有效诱导SJL/J$PLP_{139-151}$/CFA诱导的R-EAE多发性硬化小鼠模型中的免疫耐受。此外,核心内含有可溶性卵清蛋白并且以高密度羧酸酯基表面官能化的可生物降解的乙交酯丙交酯共聚物粒子有效诱导Balb/c卵清蛋白/明矾诱导的AAI过敏性哮喘小鼠模型中的免疫耐受。

[0324] 核心内含有可溶性卵清蛋白或牛血清白蛋白并且以高密度羧酸酯基表面官能化的乙交酯丙交酯共聚物粒子是使用双乳液-溶剂蒸发方法如下合成:

[0325] 1.将150μL含200mg/mL卵清蛋白或牛血清白蛋白的不含内毒素的水逐滴添加至位于20mL闪烁小瓶中的2mL含20%w/v乙交酯丙交酯共聚物的二氯甲烷中。

[0326] 2.将所得混合物放置于冰上并且在10瓦下使用探针超声波仪超声处理30秒。

[0327] 3.添加10mL含1%w/v聚(乙烯-交替-马来酸酐)的水。

[0328] 4.将所得混合物放置于冰上并且在16瓦下使用探针超声波仪超声处理30秒。

[0329] 5.将所得乳液倒入600mL烧杯中的200mL 0.5%w/v聚(乙烯-交替-马来酸酐)并且搅拌过夜,以允许粒子硬化。

[0330] 6.然后将硬化的粒子通过离心纯化,并且用碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)洗涤3次。

[0331] 7.将纯化的粒子再悬浮于含4%w/v蔗糖和3%w/v D-甘露糖醇的水中,在液氮中快速冷冻并且冻干至干燥。

[0332] 图35示出了通过动态光散射分析对核心内含有可溶性PLP139-151的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以1.792×10^5次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的Z平均直径是584nm、峰值直径是679nm并且多分散指数是0.162。这些结果代表遵循上述方案进行的6个批次的合成。

[0333] 图36示出了通过ζ电位测量对核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以6.67×10^4次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的峰值ζ电位是-48.9mV并且ζ偏差是5.14mV。这些结果代表遵循上述方案进行的6个批次的合成。

[0334] 图37示出了通过动态光散射分析对核心内含有可溶性卵清蛋白的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以1.822×10^5次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的Z平均直径是569.7nm、峰值直径是700.3nm并且多分散指数是0.230。这些结果代表遵循上述方案进行的3个批次的合成。

[0335] 图38示出了通过ζ电位测量对核心内含有可溶性卵清蛋白的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的表征。将表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子在Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments,Westborough,MA)上在18.2MΩ水中以2.67×10^4次计数/秒的计数速率进行分析。表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的群体的峰值ζ电位是-52.2mV并且ζ偏差是5.38mV。这些结果代表遵循上述方案进行的3个批次的合成。

[0336] 实施例22

[0337] 核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$的表面官能化脂质体在鼠R-EAE多发性硬化模型中诱导免疫耐受

[0338] 本发明人还已发现,已用高密度的带负电荷的基团表面官能化并且核心内含有可溶性抗原的可生物降解的脂质体递送媒介物在鼠R-EAE多发性硬化模型中诱导免疫耐受。

[0339] 此研究中所用的脂质体由以下脂质按以下摩尔比组成-30:30:40磷脂酰胆碱:磷脂酰甘油:胆固醇。在相对于在第0天用$PLP_{139-151}$/CFA初免的第-7天,将各组SJL/J小鼠静脉内注射核心内具有可溶性$PLP_{139-151}$肽的200nm nm表面官能化脂质体(10μmol总脂质/小鼠)。在第0天将对照小鼠初免并且在第-7天接受核心内具有可溶性$OVA_{323-339}$肽的500nm-700nm表面官能化脂质体(10μmol总脂质/小鼠)。再观察小鼠的R-EAE临床征象17天。

[0340] 所述结果描绘了相对于$PLP_{139-151}$/CFA初免天数的日平均临床得分。如图39中所示,与那些用含有可溶性$OVA_{323-339}$肽的表面官能化脂质体处理的动物相比,用核心内具有可溶性$PLP_{139-151}$肽的表面官能化脂质体处理的动物具有更低临床得分。

[0341] 此研究的结果证实,核心内含有可溶性$PLP_{139-151}$并且用高密度的带负电荷的基团表面官能化的可生物降解的脂质体在SJL/J $PLP_{139-151}$/CFA诱导的鼠R-EAE多发性硬化模型中有效诱导免疫耐受。

[0342] 由抗原偶联或抗原封装型粒子诱导的耐受具抗原特异性、剂量依赖性以及长效性

(>150天)。通过静脉内施用直径介于500nm与1μm之间并且ζ电位<-5-mV的偶联型粒子诱导耐受最佳。耐受的诱导依赖于聚阴离子表面上可见的MARCO清除剂受体对粒子的摄取(例如羧化PS/PLG粒子)。通过无反应性(由抗PD-1和拮抗性CD40抗体部分逆转)与iTreg(由抗CD25抗体部分逆转)的组合来诱导并且维持耐受。本发明的粒子主要积聚在肝和脾边缘区域巨噬细胞($CD11b^{hi}$ $CD11c^{lo}MARCO^{+}Sign\text{-}R1^{+}Siglec\text{-}1^{-}$)中。

[0343] 与使用抗原冲击或抗原定向未成熟致耐受性树突细胞或工程改造的抗原特异性Treg相比,使用抗原偶联粒子治疗自身免疫性疾病存在许多优点。使用GMP可制造的现成通用致耐受性载体进行耐受原制备和诱导快速并且简单;不需要对未成熟树突细胞或Treg进行离体分离和扩增;不需要担心未成熟树突细胞在离体操纵时活化并且变得起刺激作用而非致耐受性或担心Treg在转移后转化成Th1/17;因为宿主未成熟边缘区域APC以致耐受性方式加工并且呈递抗原,所以宿主APC可从封装完整自体抗原的PLG粒子或组织提取物选择相关免疫优势自身表位(例如OVA封装PLG粒子预防OVA/明矾诱导的AAD);并且所述方案具抗原特异性而没有旁观者抑制,完全,高效,并且可诱导涉及表位扩展的效应T细胞(Th1、Th2、Th17以及CD8)与初次接受试验的T细胞两者的不反应性。

[0344] 合成的可生物降解的粒子和脂质体可产生容易制造性、治疗剂的广泛可用性以及增加的潜在治疗位点数目。为此目的,我们已专门使用表面活性剂聚(乙烯-交替-马来酸酐)以高密度的表面羧酸酯基工程改造了表面官能化可生物降解聚(丙交酯共-乙交酯)粒子。

[0345] 我们还已经使用30:30:40比率的磷脂酰胆碱:磷脂酰甘油:胆固醇开发了表面官能化的脂质体。

[0346] 我们已将这些粒子进一步工程改造成核心内含有可溶性卵清蛋白,从而避开了围绕肽或蛋白质的表面缀合的化学污染和纯度问题。这些核心内含有可溶性卵清蛋白的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子有效防止疾病发生并且因此在Balb/c卵清蛋白/明矾诱导的鼠AAI过敏性哮喘模型中诱导免疫耐受。使用EDC缀合至羧酸酯官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的肽或蛋白质是以不加区别的方式连接,从而产生难以表征并且纯化成均一群体的抗原聚集体和粒子-抗原-粒子聚集体。

[0347] 我们已经产生核心内含有可溶性卵清蛋白的表面官能化乙交酯丙交酯共聚物粒子的均一群体,其不需要抗原的表面缀合。

[0348] 我们已进一步证实,核心内含有可溶性$PLP_{139\text{-}151}$并且用高密度的带负电荷的基团表面官能化的可生物降解脂质体在SJL/J PLP139-151/CFA诱导的鼠R-EAE多发性硬化模型中有效诱导免疫耐受。

[0349] 本发明的脂质体和乙交酯丙交酯共聚物粒子提供许多优点。所述优点包括:

[0350] 1)可生物降解粒子将不在体内持续很长时间,并且完全降解的时间可控制。

[0351] 2)粒子和脂质体可官能化以在无细胞活化的情况下促进内化。为此目标,我们已经将磷脂酰丝氨酸加载至PLG微球中。

[0352] 3)粒子和脂质体还可设计成并有特定细胞群体的靶向配体。

[0353] 4)还可包括诸如IL-10和TGF-β的抗炎性细胞因子,以限制使粒子内化的细胞类型的活化并且促进对经由无反应性和/或缺失以及调节性T细胞的活化引起的耐受的诱导。

[0354] 从多个角度来看,粒子或脂质体的这种组合功能均可以耐受诱导为目标,因此相

对于聚苯乙烯粒子设计者粒子是明显先进的。此宽容诱导技术的潜在临床应用包括：

[0355] (1)T细胞和抗体介导的自身免疫性疾病(诸如多发性硬化、1型糖尿病、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等)-将用与驱使特定自身免疫性疾病的相关自体抗原复合的粒子来诱导耐受

[0356] (2)食物和肺部过敏、皮肤过敏以及哮喘-将用与引起过敏反应的特定食物(例如花生蛋白等)、注射的物质(蜂毒蛋白等)或吸入的物质(例如豚草花粉蛋白质、宠物皮屑蛋白等)复合的粒子来诱导耐受

[0357] (3)移植排斥-将在器官移植之前针对供体器官或细胞上的移植抗原诱导耐受以预防接受者排斥

[0358] (4)酶替代疗法-将针对具有基因缺陷的患者不能产生的酶诱导耐受,以防止其对为治疗其特定缺陷而施用的重组产生的酶形成中和抗体反应

[0359] 虽然已描述和说明了本发明的特定实施方案,但是所述实施方案应视为仅说明本发明,而非如根据所附权利要求书所理解那样限制本发明。

[0360] 本文所引用的所有专利、申请以及其它参考文献以全文引用的方式并入本文中。

[0001] 序列表

[0002] <110> Cour pharmaceuticals

[0003] <120> 肽缀合粒子

[0004] <130> COUR-002/01WO

[0005] <150> 61/662,687

[0006] <151> 2012-06-21

[0007] <160> 1

[0008] <170> PatentIn 3.5 版

[0009] <210> 1

[0010] <211> 21

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 小家鼠

[0013] <220>

[0014] <221> 肽

[0015] <222> (1)..(21)

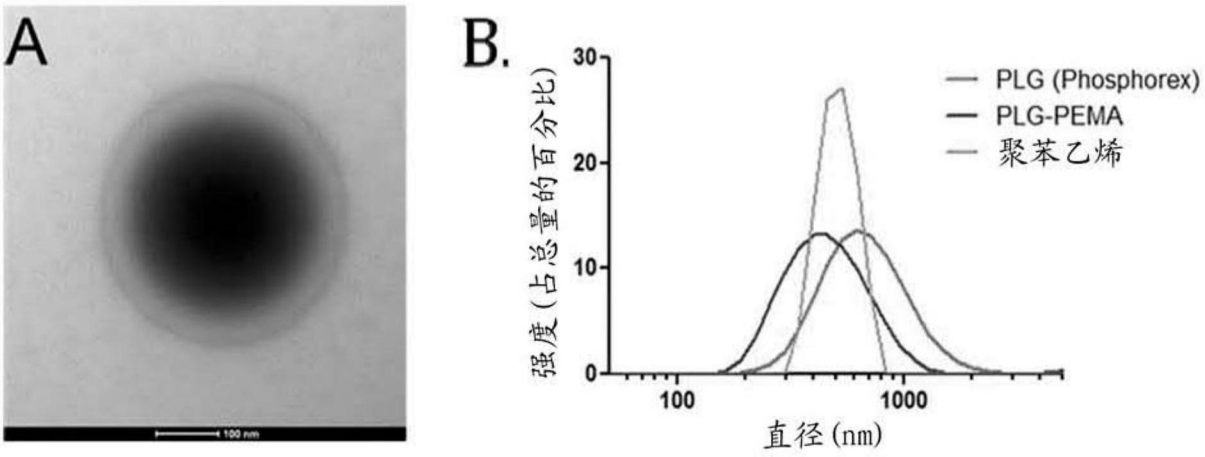
[0016] <400> 1

[0017] Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu

[0018] 1 5 10 15

[0019] Tyr Arg Asn Gly Lys

[0020] 20



C.

粒子	由强度表示的z平均尺寸(nm)	ζ电位(mV)
PLG (Phosphorex)	624.3	-32.7 ± 4.71
PLG-PEMA	429.9	-67.4 ± 10.9
聚苯乙烯	503.6	-66.4 ± 6.97

图1

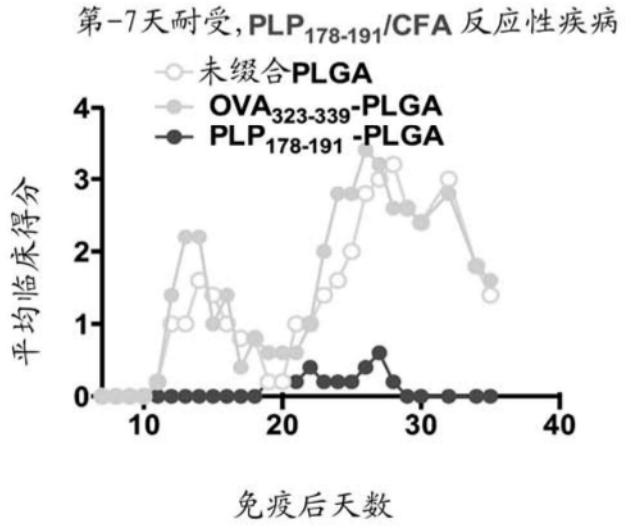


图2

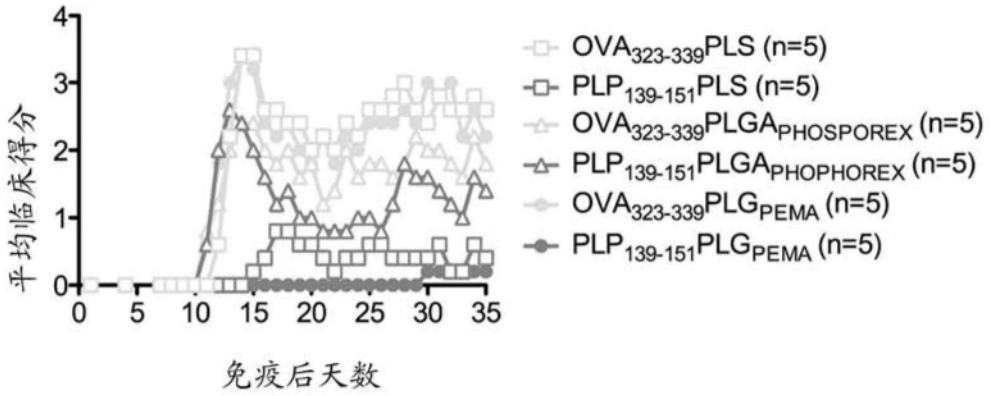

平均临床得分
免疫后天数
OVA323-339PLS (n=5)
PLP139-151PLS (n=5)
OVA323-339PLGAPHOSPOREX (n=5)
PLP139-151PLGAPHOPHOREX (n=5)
OVA323-339PLGPEMA (n=5)
PLP139-151PLGPEMA (n=5)

图3A

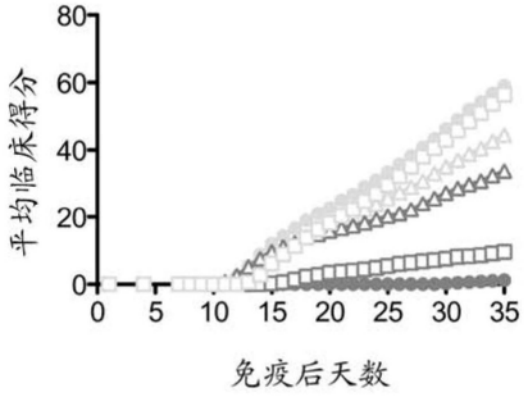

平均临床得分
免疫后天数

图3B

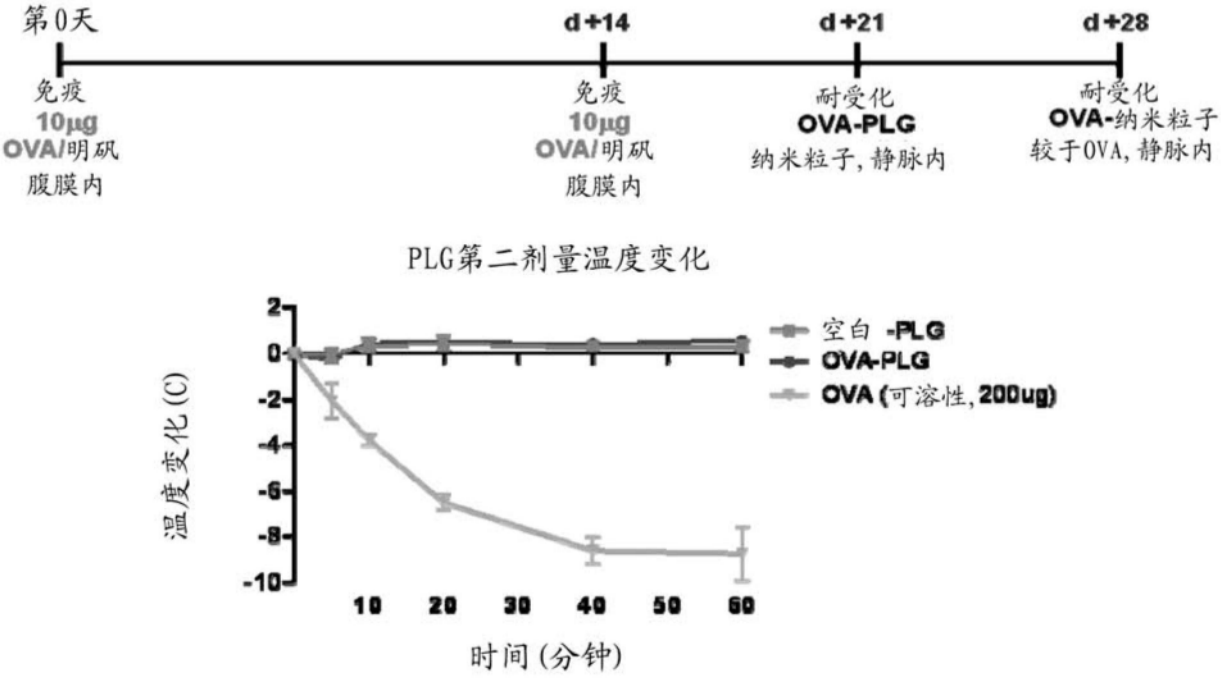
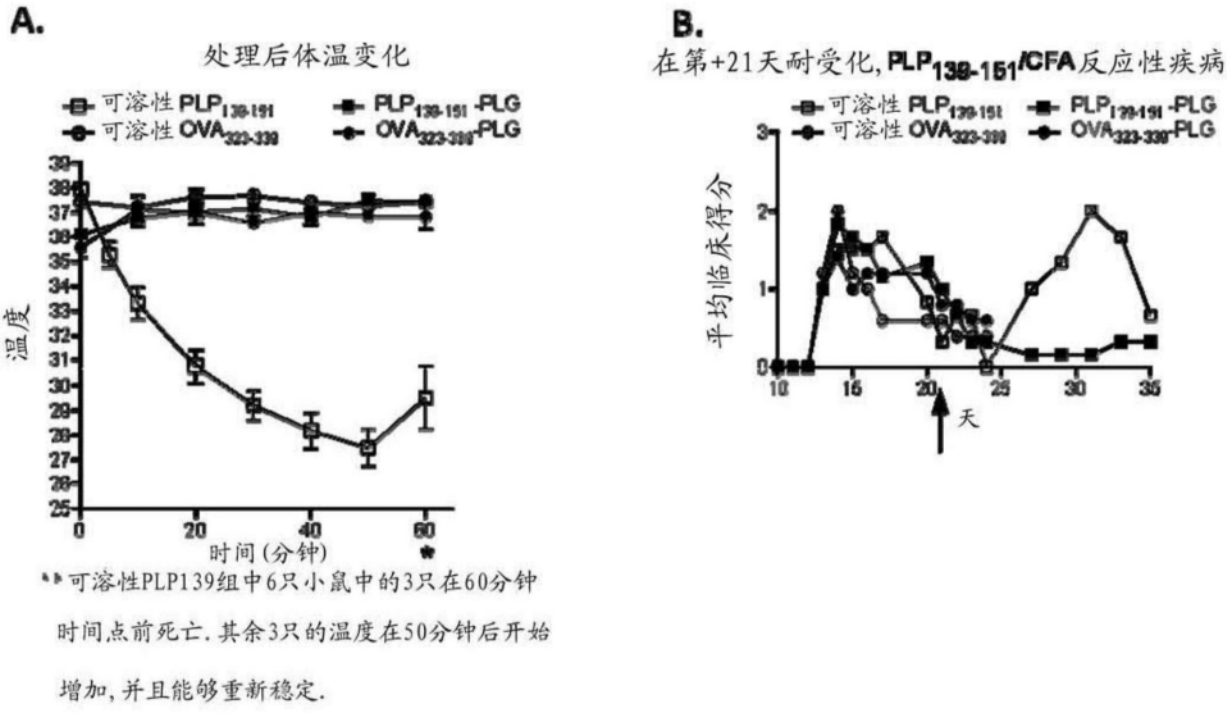


图4



**可溶性PLP139组中6只小鼠中的3只在60分钟时间点前死亡.其余3只的温度在50分钟后开始增加,并且能够重新稳定.

图5

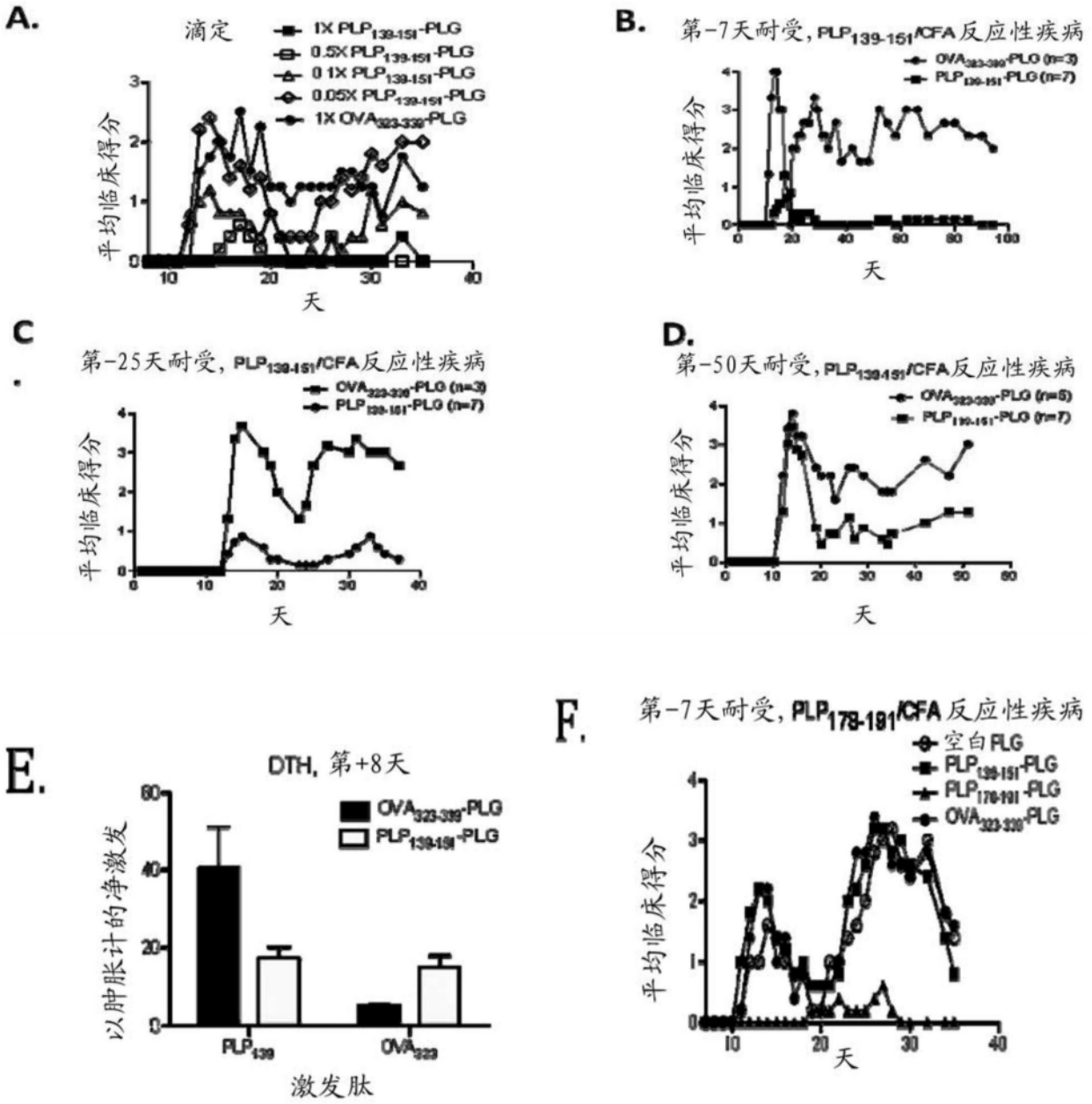

A.
滴定
1X PLP139-151-PLG
0.5X PLP139-151-PLG
0.1X PLP139-151-PLG
0.05X PLP139-151-PLG
1X OVA323-339-PLG
平均临床得分
天
B.
第-7天耐受，PLP139-151/CFA反应性疾病
OVA323-339-PLG (n=3)
PLP139-151-PLG (n=7)
平均临床得分
天
C.
第-25天耐受，PLP139-151/CFA反应性疾病
OVA323-339-PLG (n=3)
PLP139-151-PLG (n=7)
平均临床得分
天
D.
第-50天耐受，PLP139-151/CFA反应性疾病
OVA323-339-PLG (n=5)
PLP139-151-PLG (n=7)
平均临床得分
天
E.
DTH，第+8天
OVA323-339-PLG
PLP139-151-PLG
以肿胀计的净激发
PLP139
OVA323
激发肽
F.
第-7天耐受，PLP178-191/CFA反应性疾病
空白PLG
PLP139-151-PLG
PLP178-191-PLG
OVA323-339-PLG
平均临床得分
天

图6

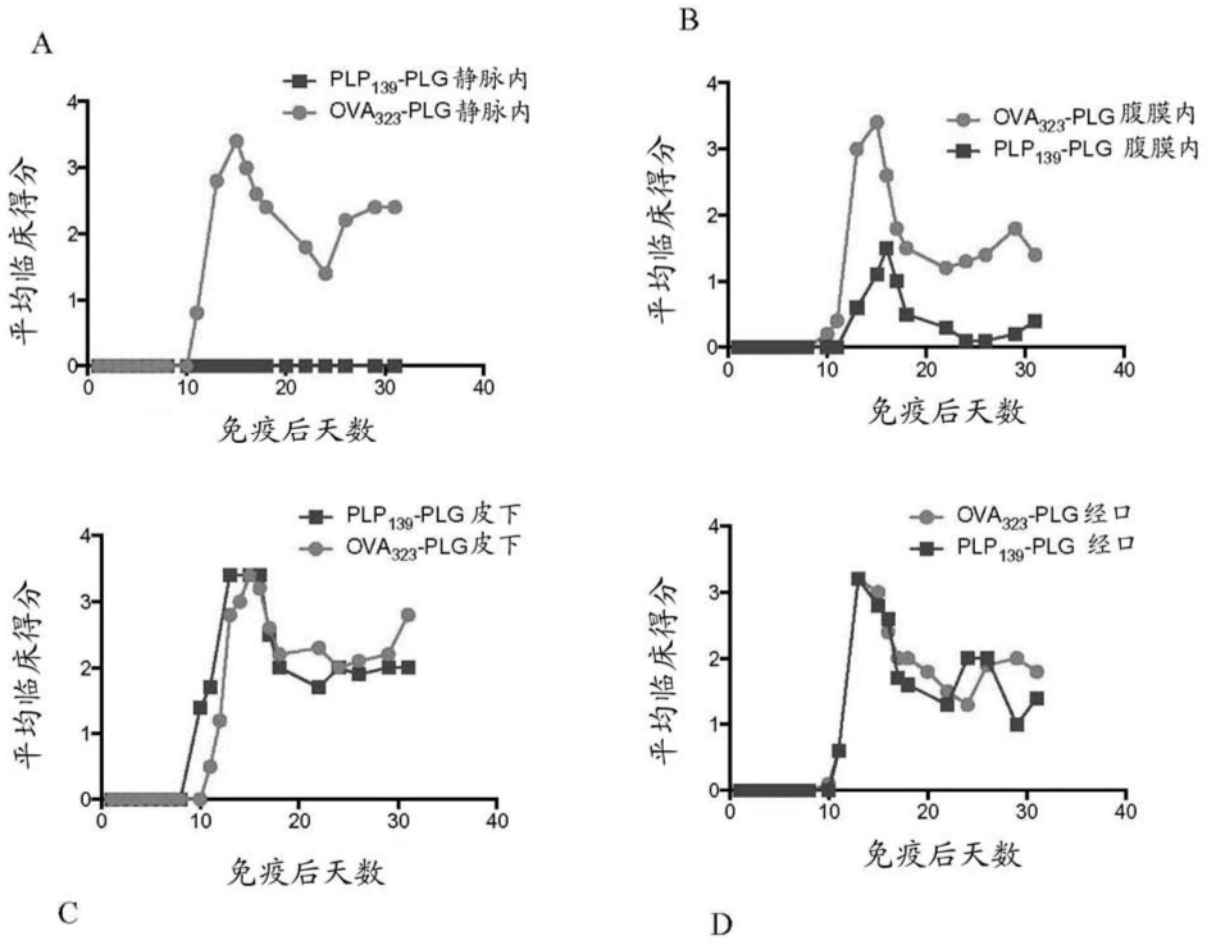

A
PLP139-PLG静脉内
OVA323-PLG静脉内
平均临床得分
免疫后天数
B
OVA323-PLG腹膜内
PLP139-PLG 腹膜内
平均临床得分
免疫后天数
C
PLP139-PLG皮下
OVA323-PLG皮下
平均临床得分
免疫后天数
D
OVA323-PLG经口
PLP139-PLG 经口
平均临床得分
免疫后天数

图7

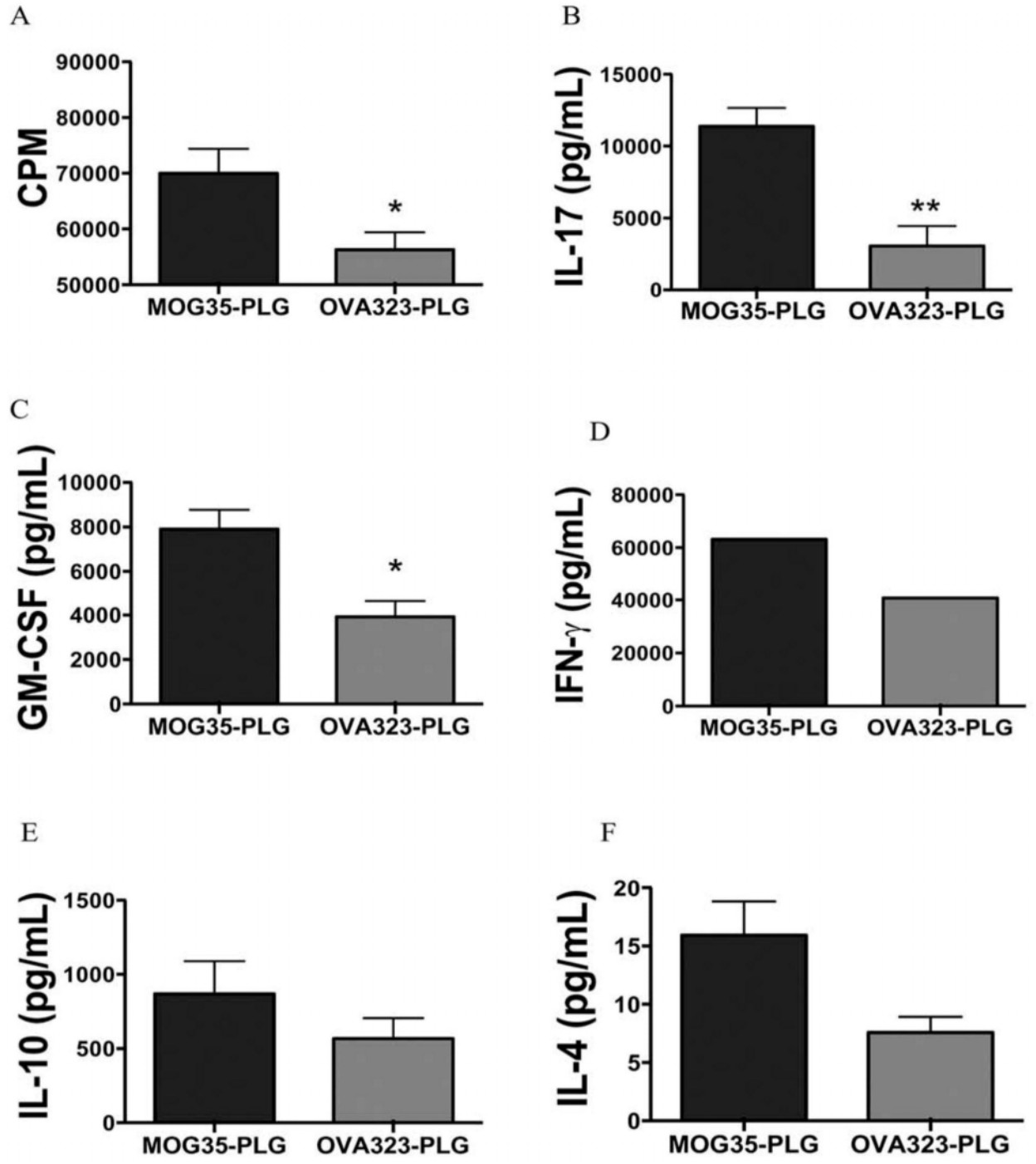

A
CPM
90000
80000
70000
60000
50000
*
MOG35-PLG
OVA323-PLG
B
IL-17 (pg/mL)
15000
10000
5000
0
**
MOG35-PLG
OVA323-PLG
C
GM-CSF (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
MOG35-PLG
OVA323-PLG
D
IFN-γ (pg/mL)
80000
60000
40000
20000
0
MOG35-PLG
OVA323-PLG
E
IL-10 (pg/mL)
1500
1000
500
0
MOG35-PLG
OVA323-PLG
F
IL-4 (pg/mL)
20
15
10
5
0
MOG35-PLG
OVA323-PLG

图8

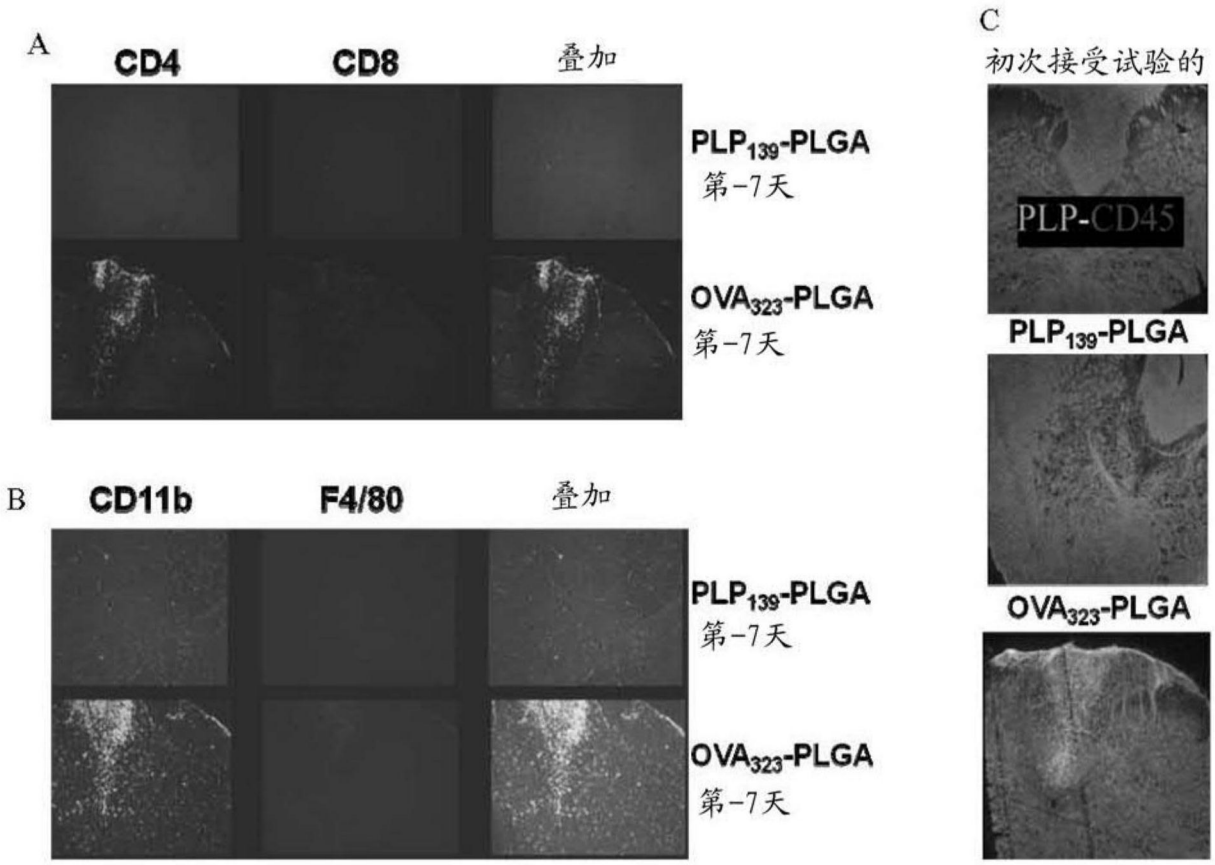

A
CD4
CD8
叠加
PLP139-PLGA
第-7天
OVA323-PLGA
第-7天
B
CD11b
F4/80
叠加
PLP139-PLGA
第-7天
OVA323-PLGA
第-7天
C
初次接受试验的
PLP-CD45
PLP139-PLGA
OVA323-PLGA

图9

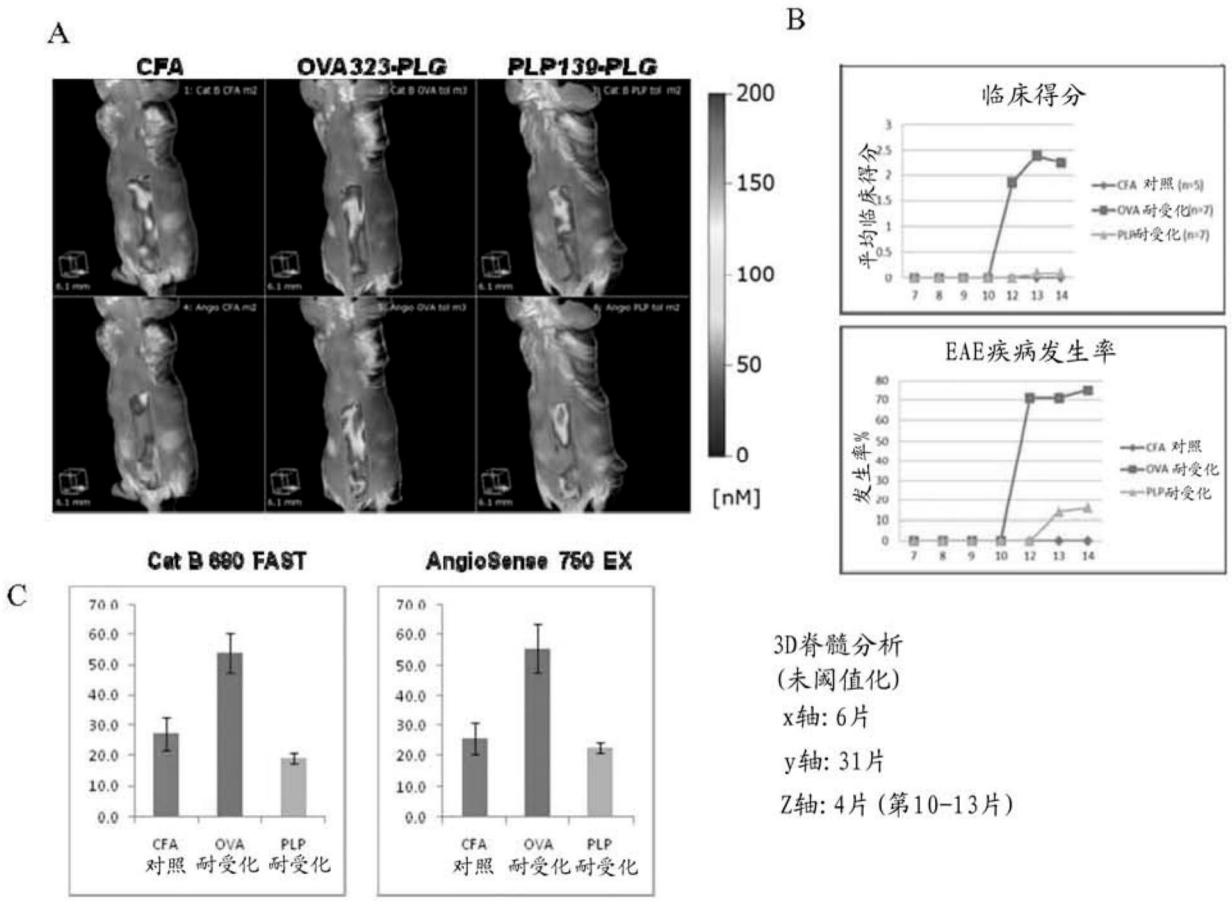
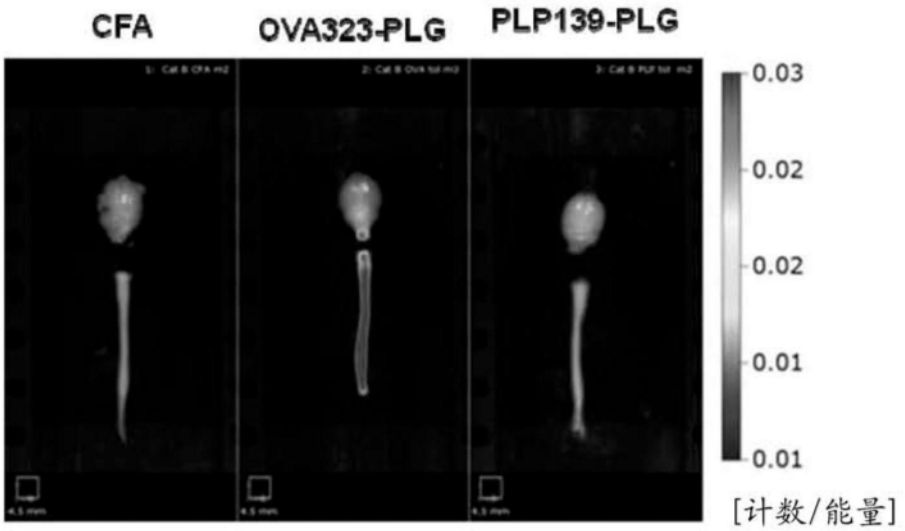
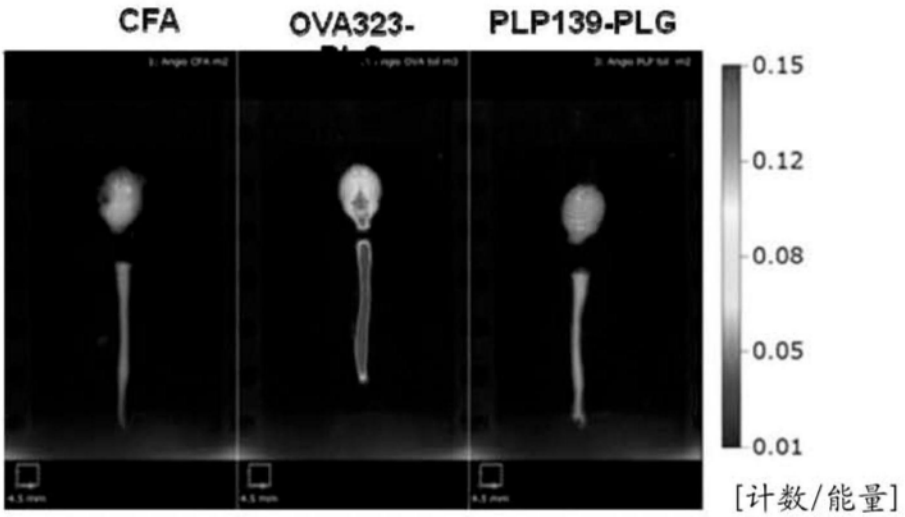

A
CFA
OVA323-PLG
PLP139-PLG
200
150
100
50
0
[nM]
B
临床得分
平均临床得分
CFA 对照 (n=5)
OVA耐受化(n=7)
PLP耐受化(n=7)
EAE疾病发生率
发生率%
CFA 对照
OVA 耐受化
PLP耐受化
C
Cat B 680 FAST
AngioSense 750 EX
CFA 对照
OVA 耐受化
PLP 耐受化
3D脊髓分析
(未阈值化)
x轴: 6片
y轴: 31片
Z轴: 4片 (第10-13片)

图10


CFA
OVA323-PLG
PLP139-PLG
0.03
0.02
0.02
0.01
0.01
[计数/能量]

A


CFA
OVA323-
PLP139-PLG
0.15
0.12
0.08
0.05
0.01
[计数/能量]

B

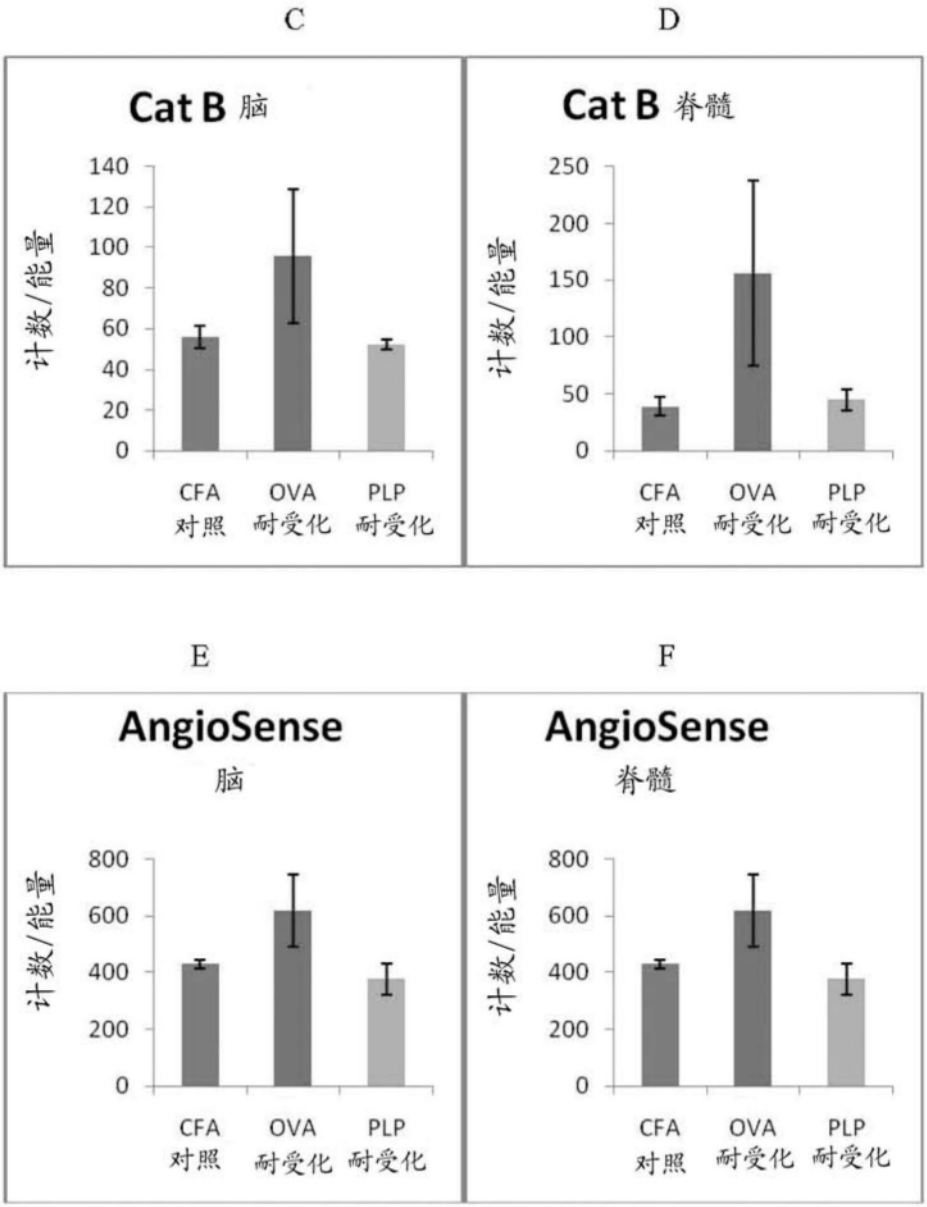

C
D
Cat B 脑
Cat B 脊髓
计数/能量
140
120
100
80
60
40
20
0
250
200
150
100
50
CFA 对照
OVA 耐受化
PLP 耐受化
E
F
AngioSense
脑
AngioSense
脊髓
800
600
400
200

图11

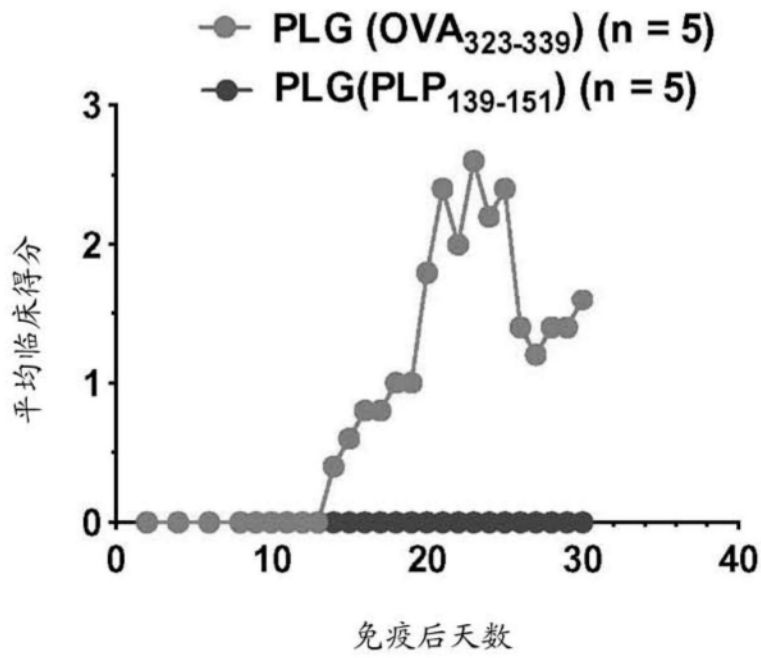

PLG (OVA323-339) (n = 5)
PLG(PLP139-151) (n = 5)
平均临床得分
0
1
2
3
0
10
20
30
40
免疫后天数

图12

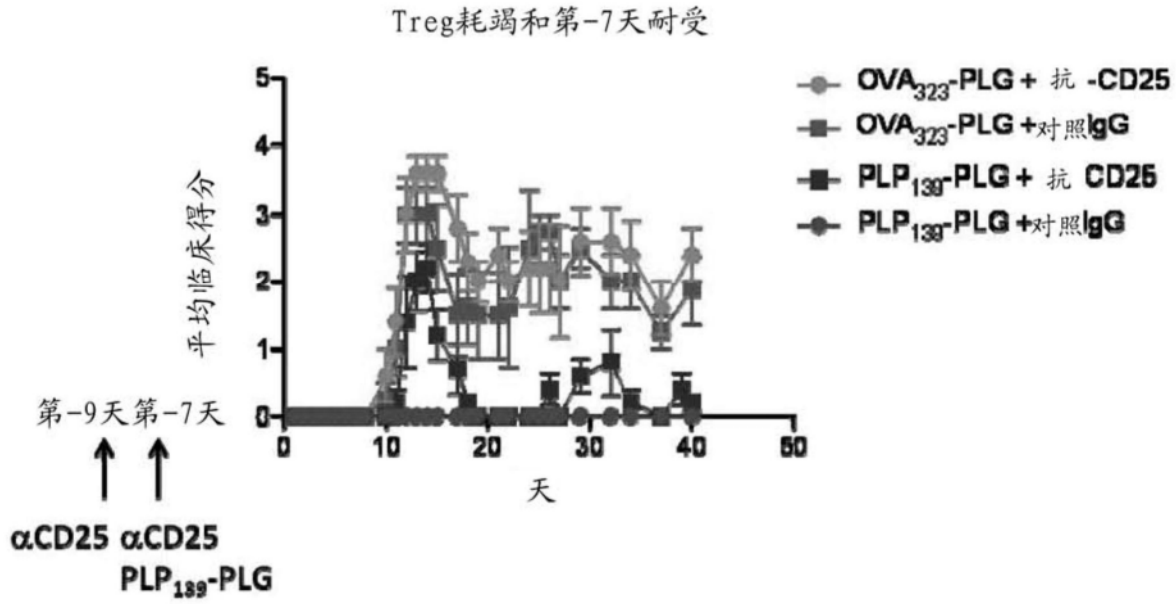

Treg耗竭和第-7天耐受
OVA323-PLG + 抗 -CD25
OVA323-PLG +对照IgG
PLP139-PLG + 抗 CD25
PLP139-PLG +对照IgG
平均临床得分
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
天
第-9天第-7天
αCD25 αCD25
PLP139-PLG

图13

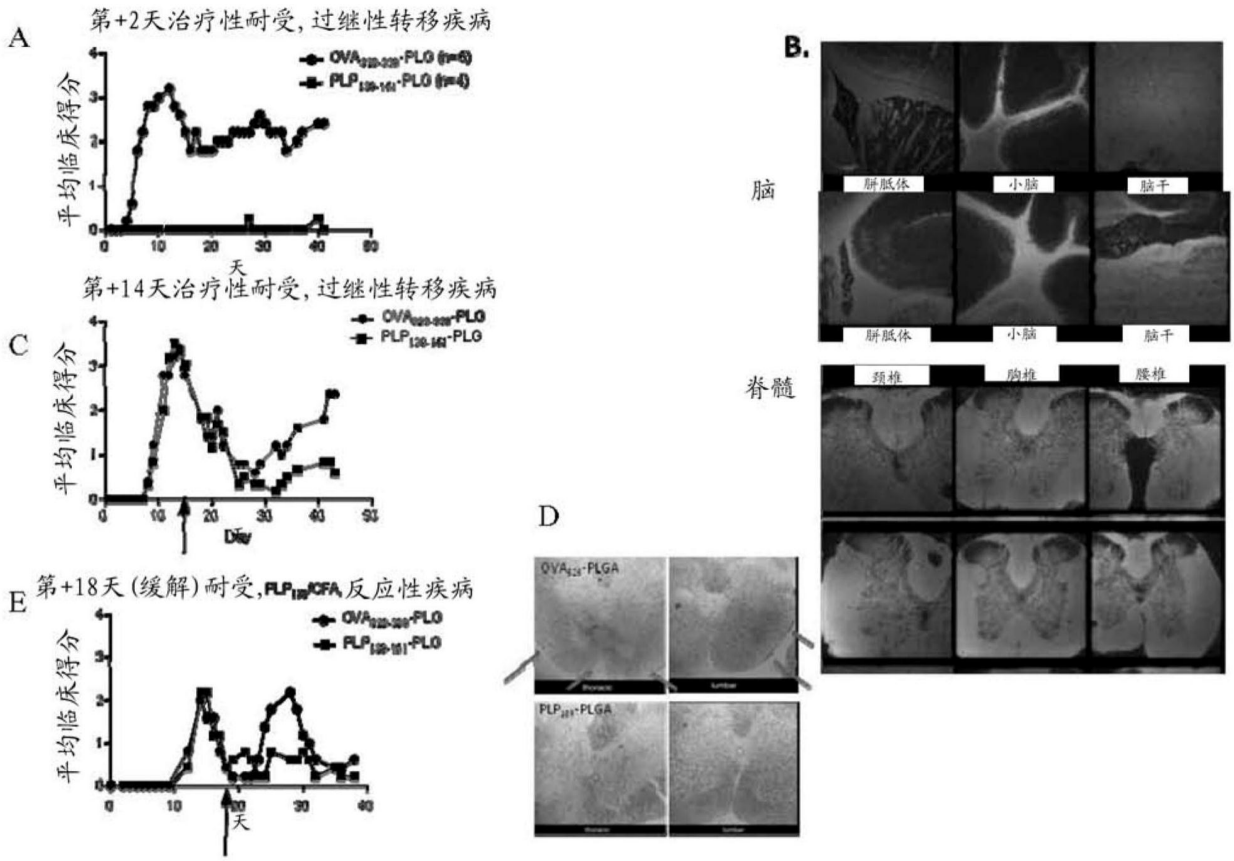

A
第+2天治疗性耐受，过继性转移疾病
平均临床得分
天
C
第+14天治疗性耐受，过继性转移疾病
平均临床得分
Day
E
第+18天（缓解）耐受，PLP139/CFA反应性疾病
平均临床得分
天
B.
脑
脾脏体
小脑
脑干
脊髓
颈椎
胸椎
腰椎
D

图14

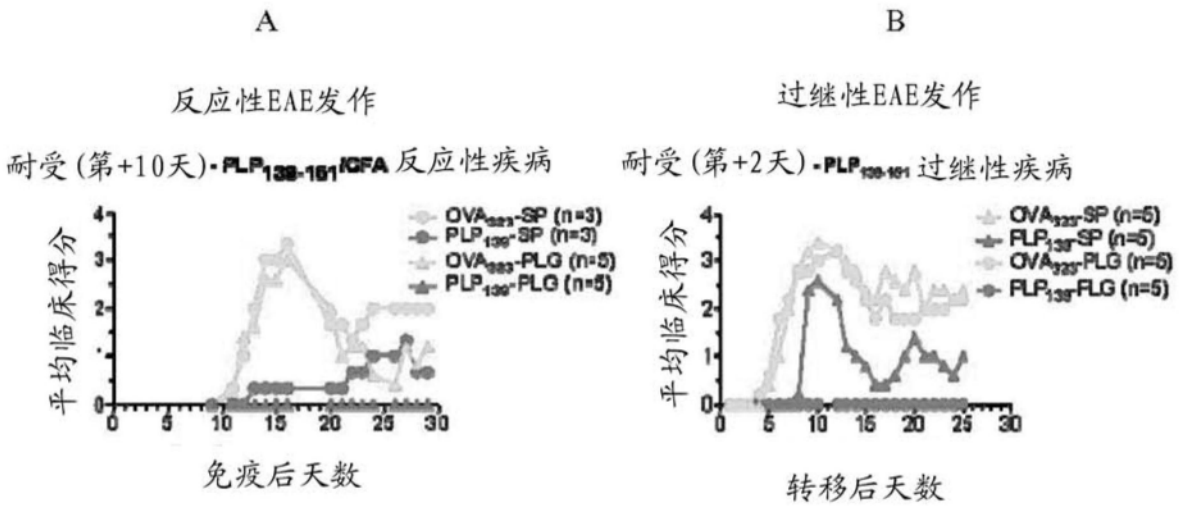

A
反应性EAE发作
耐受（第+10天）- PLP139-161/CFA 反应性疾病
OVA323-SP (n=3)
PLP139-SP (n=3)
OVA323-PLG (n=5)
PLP139-PLG (n=5)
平均临床得分
免疫后天数
B
过继性EAE发作
耐受（第+2天）- PLP139-161 过继性疾病
OVA323-SP (n=5)
PLP139-SP (n=5)
OVA323-PLG (n=5)
PLP139-PLG (n=5)
平均临床得分
转移后天数

图15

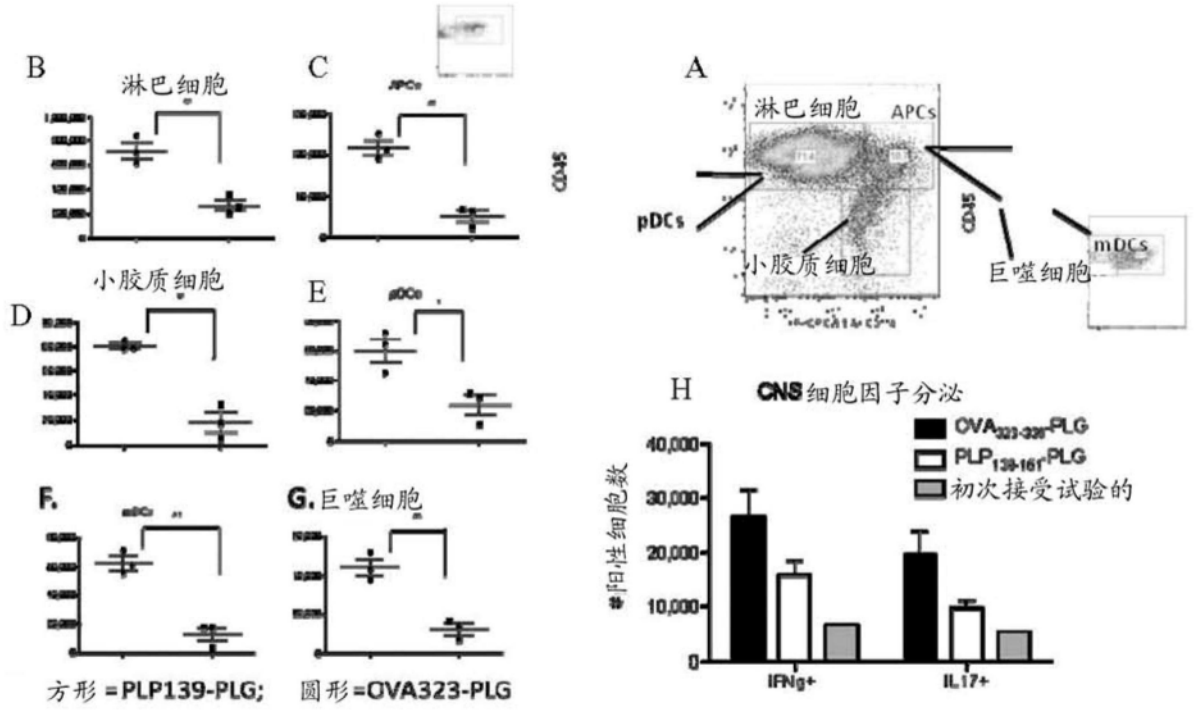

B
淋巴细胞
C
CD45
小胶质细胞
D
E
F.
G.巨噬细胞
方形 =PLP139-PLG;
圆形 =OVA323-PLG
A
淋巴细胞
APCs
pDCs
小胶质细胞
CD45
巨噬细胞
mDCs
H
CNS细胞因子分泌
OVA323-339-PLG
PLP139-161-PLG
初次接受试验的
#阳性细胞数
40,000
30,000
20,000
10,000
0
IFNg+
IL17+

图16

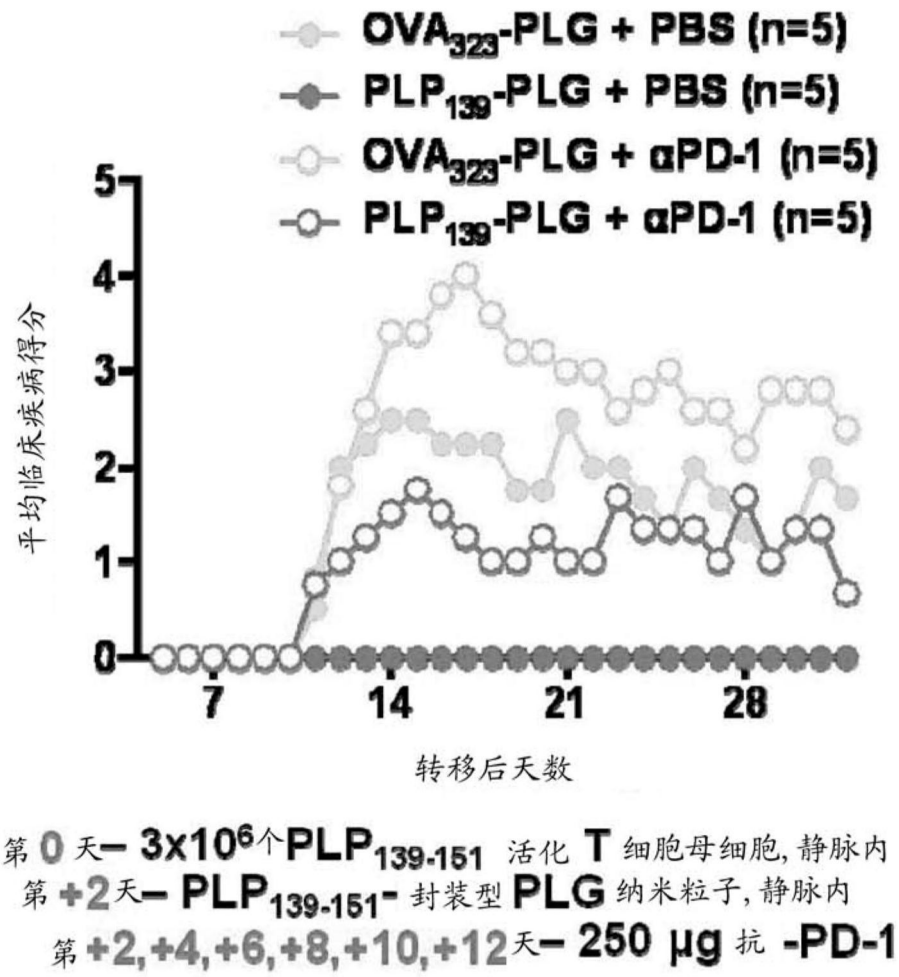

OVA323-PLG + PBS (n=5)
PLP139-PLG + PBS (n=5)
OVA323-PLG + αPD-1 (n=5)
PLP139-PLG + αPD-1 (n=5)
平均临床疾病得分
0
1
2
3
4
5
7
14
21
28
转移后天数
第 0 天– 3x10^6个PLP139-151 活化 T 细胞母细胞,静脉内
第 +2天– PLP139-151- 封装型 PLG 纳米粒子,静脉内
第 +2,+4,+6,+8,+10,+12天– 250 μg 抗 -PD-1

图17

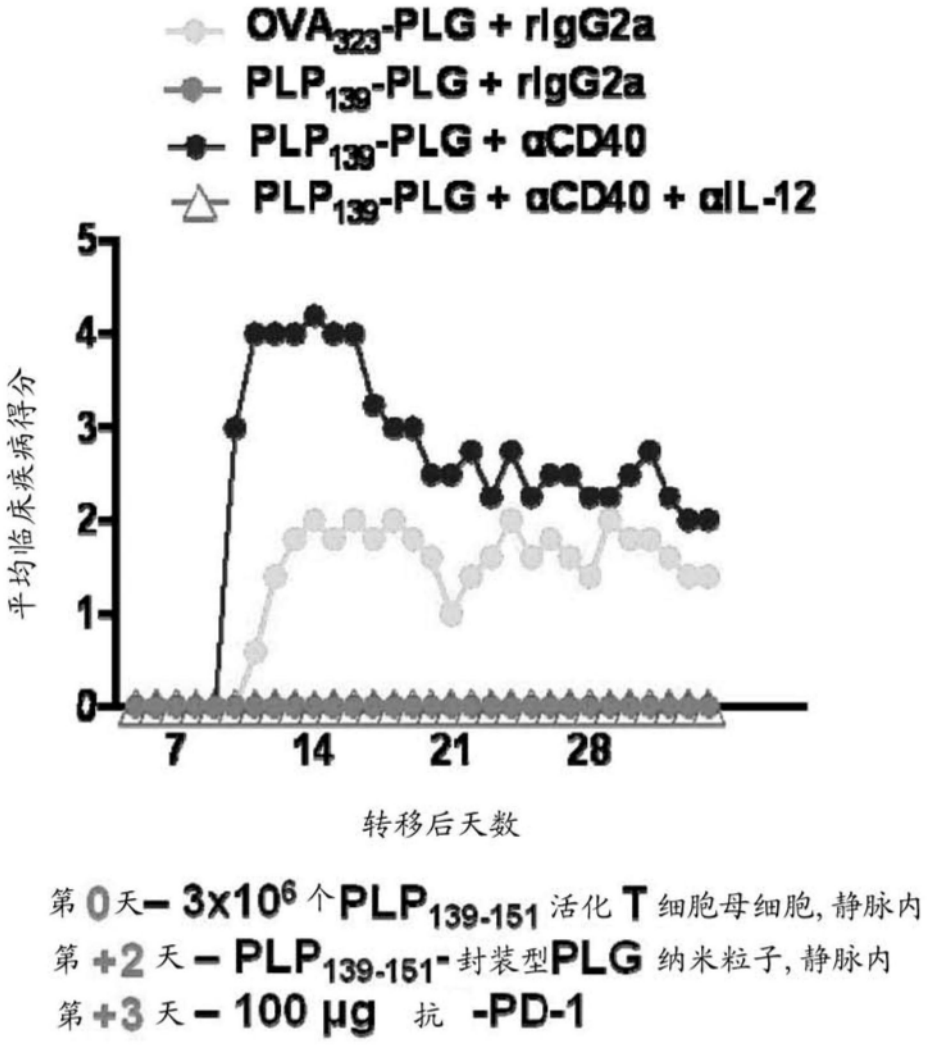

OVA323-PLG + rIgG2a
PLP139-PLG + rIgG2a
PLP139-PLG + αCD40
PLP139-PLG + αCD40 + αIL-12
平均临床疾病得分
0
1
2
3
4
5
7
14
21
28
转移后天数
第 0 天– 3x10^6 个 PLP139-151 活化 T 细胞母细胞, 静脉内
第 +2 天 – PLP139-151- 封装型 PLG 纳米粒子, 静脉内
第 +3 天 – 100 µg 抗 -PD-1

图18

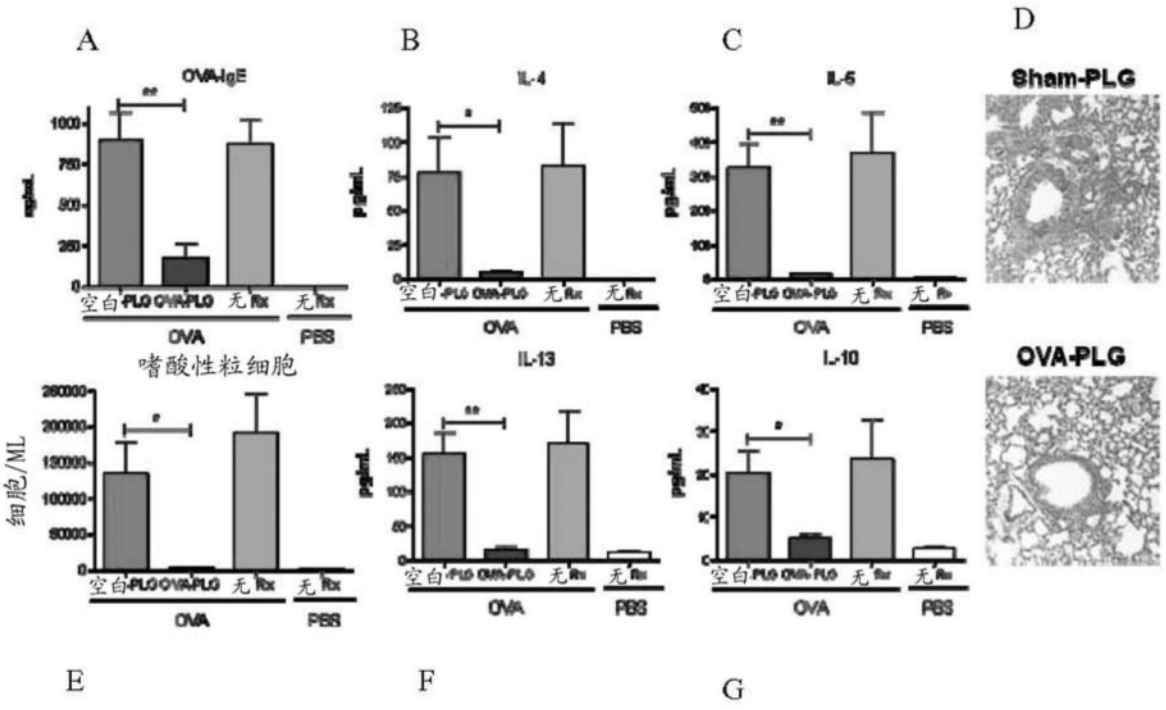

A
OVA-IgE
B
IL-4
C
IL-5
D
Sham-PLG
嗜酸性粒细胞
IL-13
IL-10
OVA-PLG
E
F
G
空白
PLG
OVA-PLG
无
Rx
OVA
PBS

图19

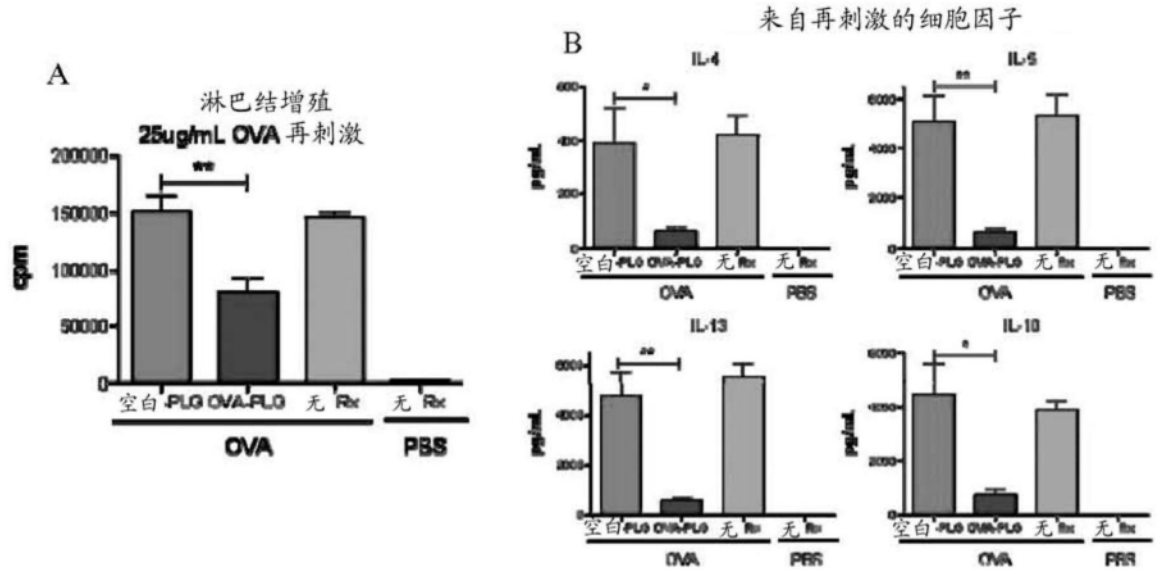

A
淋巴结增殖
25ug/mL OVA 再刺激
cpm
B
来自再刺激的细胞因子
IL-4
IL-5
IL-13
IL-10
pg/mL
空白
PLG
OVA-PLG
无
Rx
OVA
PBS

图20

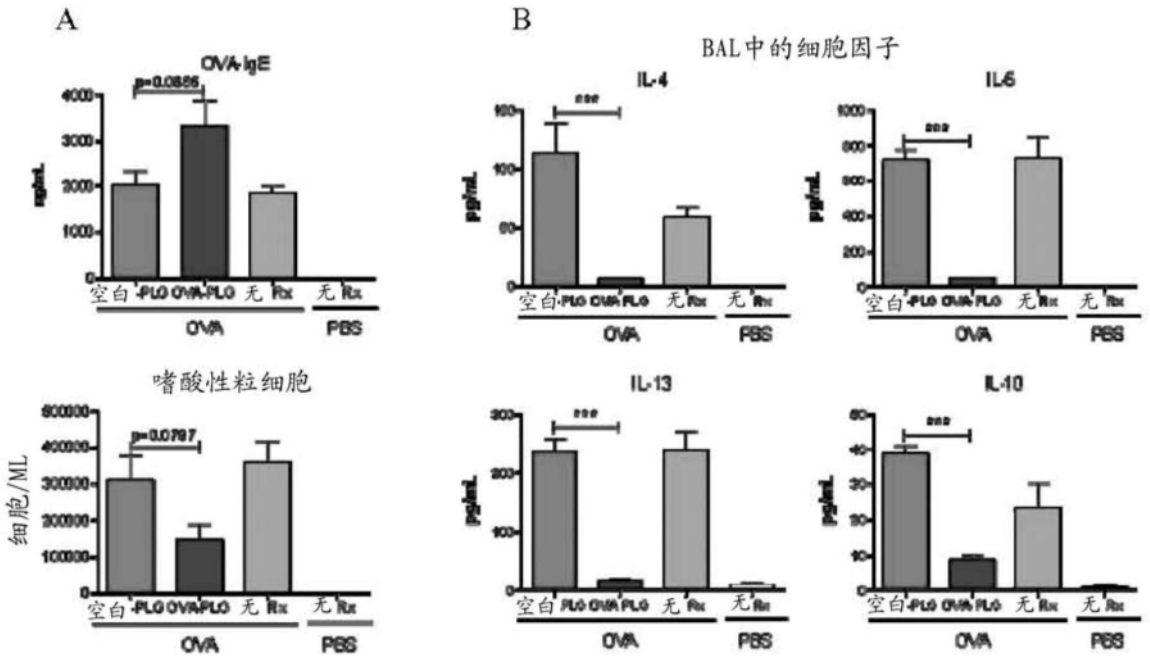

A
OVA-IgE
B
BAL中的细胞因子
IL-4
IL-5
嗜酸性粒细胞
细胞/ML
IL-13
IL-10
空白
PLG
OVA-PLG
无
Rx
OVA
PBS

图21

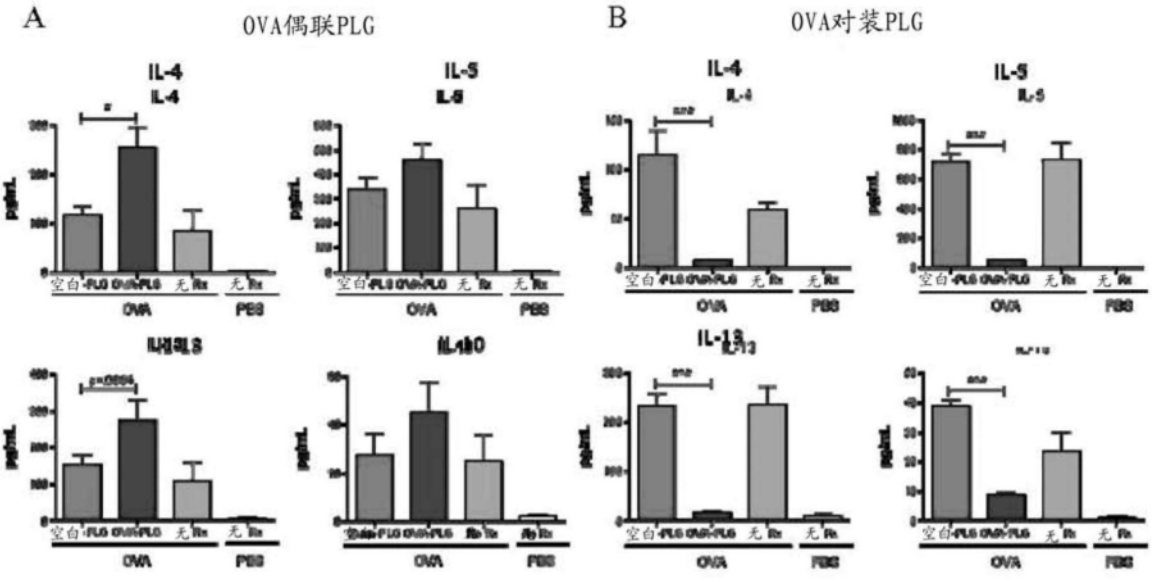
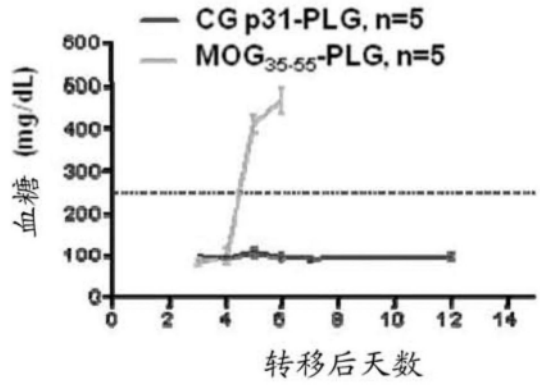
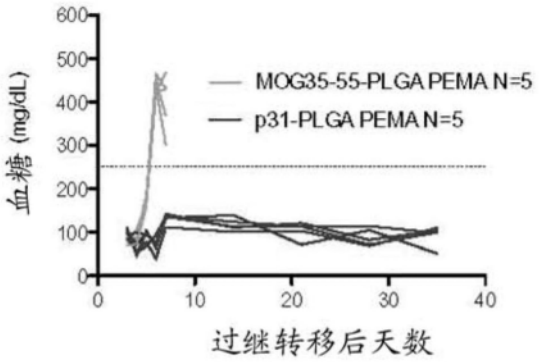

A
OVA偶联PLG
B
OVA对装PLG
IL-4
IL-5
IL-13
IL-10
空白
PLG
OVA-PLG
无
Rx
OVA
PBS

图22

A


CG p31-PLG, n=5
MOG35-55-PLG, n=5
血糖 (mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
0 2 4 6 8 10 12 14
转移后天数

B


MOG35-55-PLGA PEMA N=5
p31-PLGA PEMA N=5
血糖 (mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
0 10 20 30 40
过继转移后天数

C

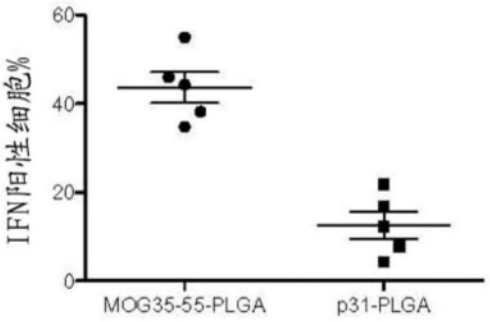
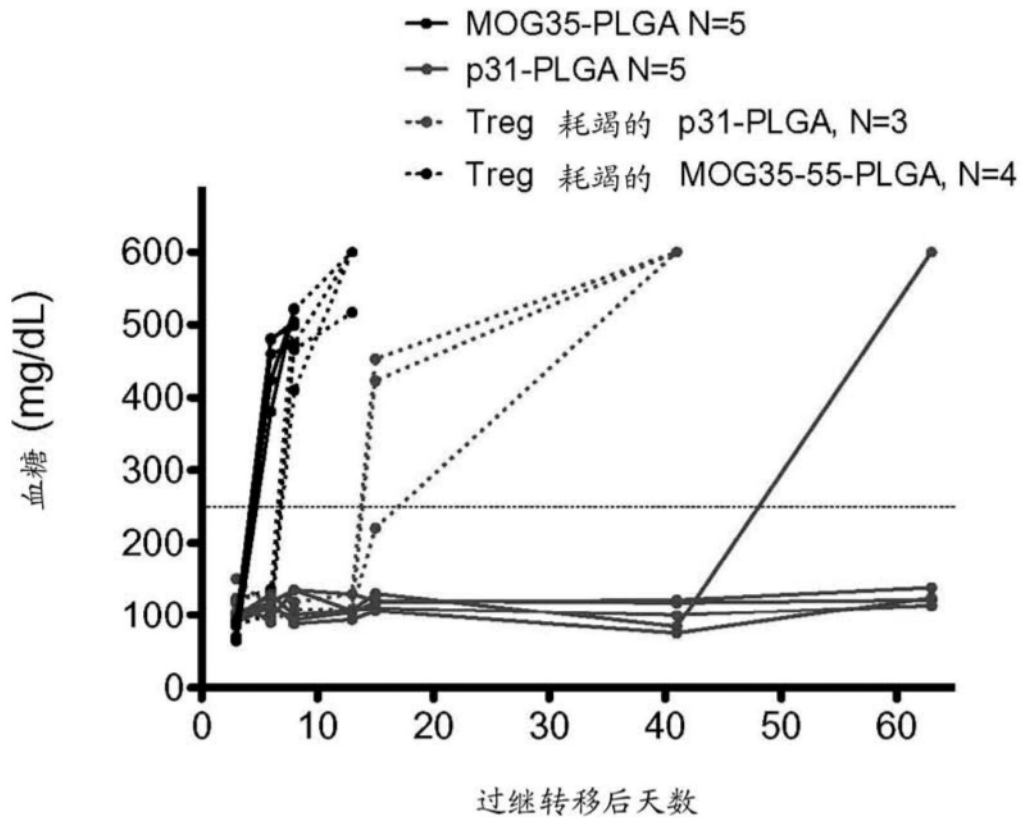

IFN阳性细胞%
60
40
20
0
MOG35-55-PLGA
p31-PLGA

图23

A


MOG35-PLGA N=5
p31-PLGA N=5
Treg 耗竭的 p31-PLGA, N=3
Treg 耗竭的 MOG35-55-PLGA, N=4
血糖 (mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
过继转移后天数

B

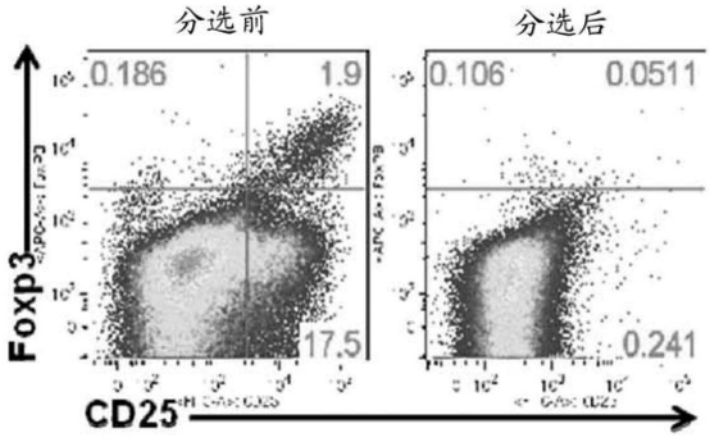

分选前
分选后
0.186
1.9
17.5
0.106
0.0511
0.241
Foxp3
CD25

图24

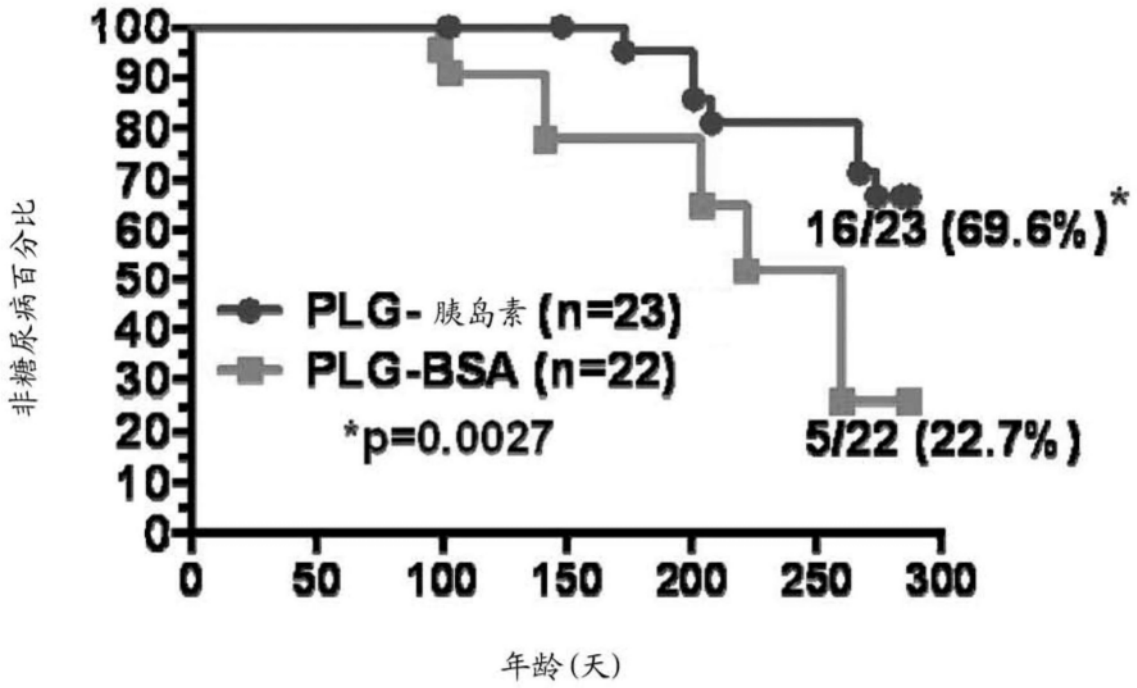

非糖尿病百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
250
300
年龄(天)
PLG-胰岛素 (n=23)
PLG-BSA (n=22)
*p=0.0027
16/23 (69.6%)*
5/22 (22.7%)

图25

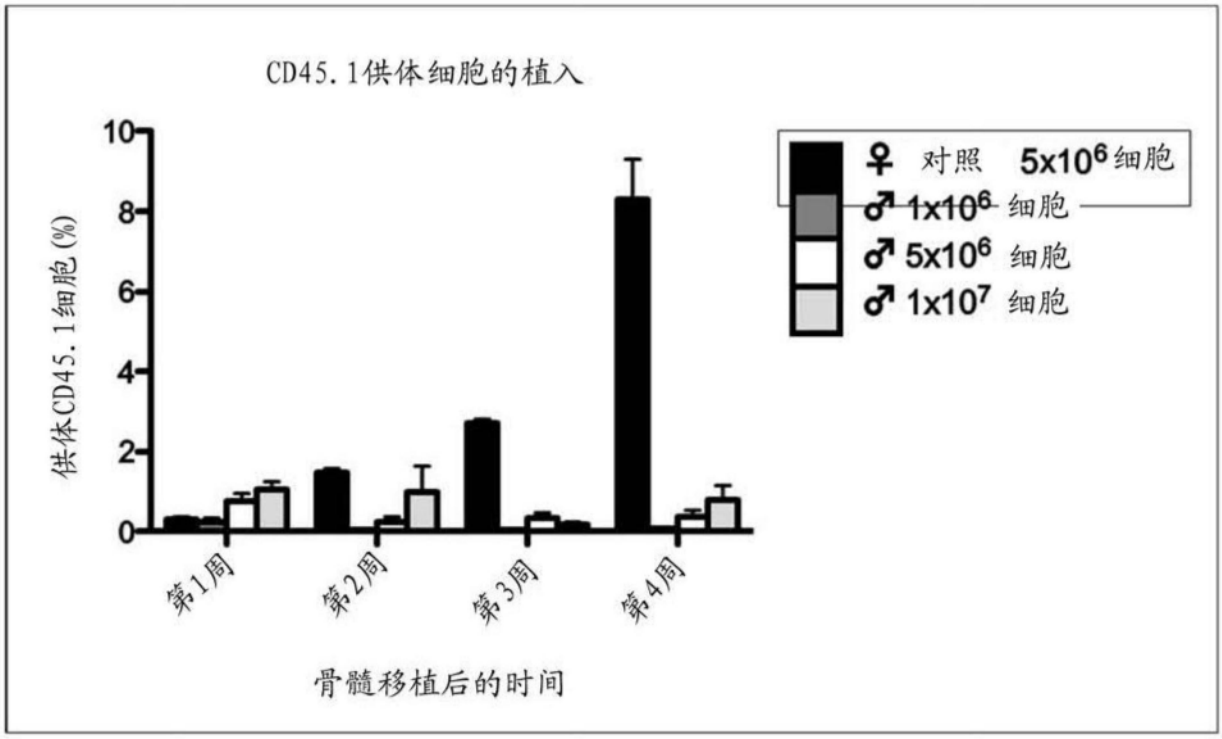

CD45.1供体细胞的植入
供体CD45.1细胞(%)
10
8
6
4
2
0
第1周
第2周
第3周
第4周
骨髓移植后的时间
♀ 对照 5x10⁶细胞
♂ 1x10⁶ 细胞
♂ 5x10⁶ 细胞
♂ 1x10⁷ 细胞

图26

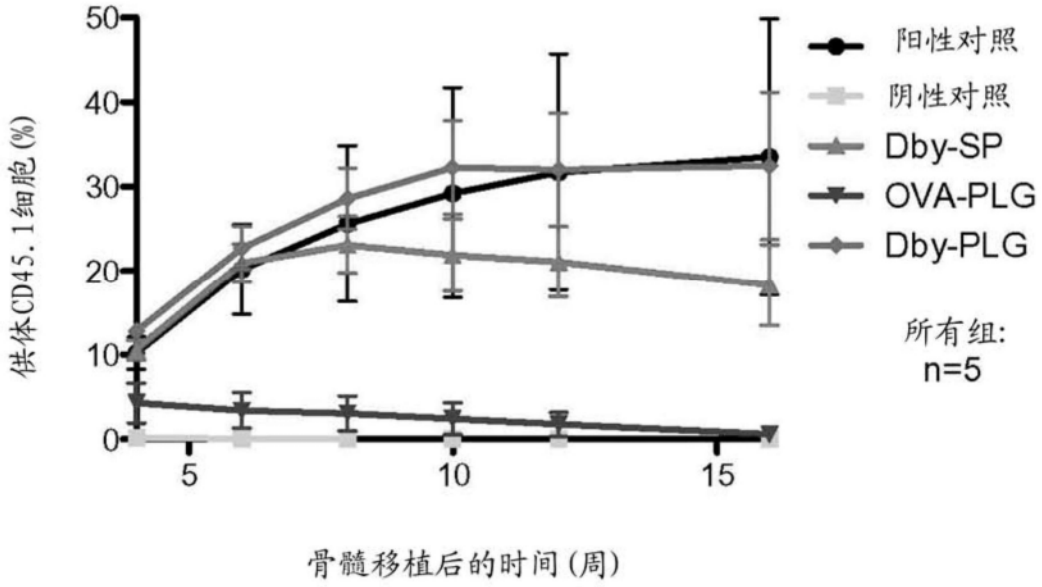

50
40
30
20
10
0
5
10
15
供体CD45.1细胞(%)
骨髓移植后的时间(周)
阳性对照
阴性对照
Dby-SP
OVA-PLG
Dby-PLG
所有组:
n=5

图27

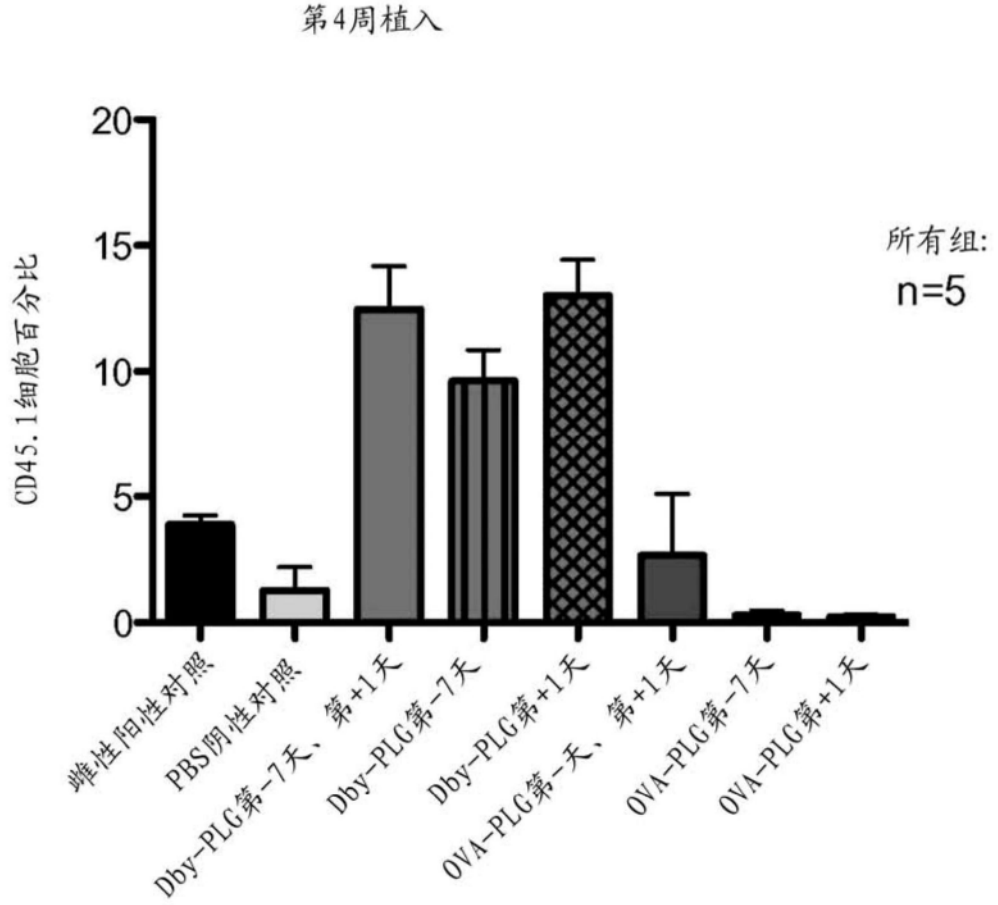

第4周植入
20
15
10
5
0
CD45.1细胞百分比
所有组:
n=5
雌性阳性对照
PBS阴性对照
Dby-PLG第-7天、第+1天
Dby-PLG第-7天
Dby-PLG第+1天
OVA-PLG第-天、第+1天
OVA-PLG第-7天
OVA-PLG第+1天

图28

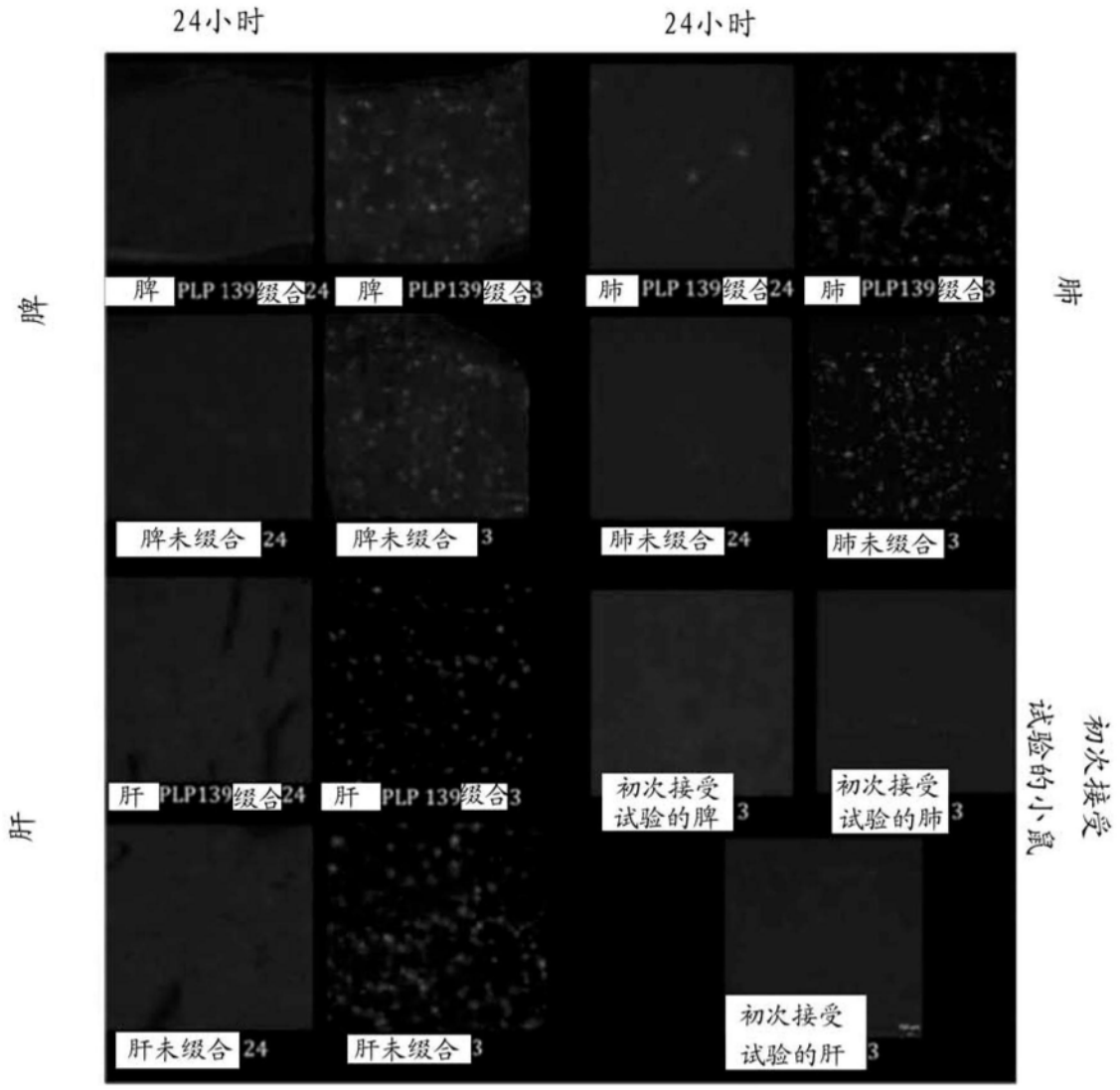

24小时
24小时
脾
肺
肝
初次接受试验的小鼠
脾 PLP 139缀合24
脾 PLP139缀合3
肺 PLP 139缀合24
肺 PLP139缀合3
脾未缀合 24
脾未缀合 3
肺未缀合 24
肺未缀合 3
肝 PLP139缀合24
肝 PLP 139缀合3
初次接受试验的脾 3
初次接受试验的肺 3
肝未缀合 24
肝未缀合 3
初次接受试验的肝 3

图29

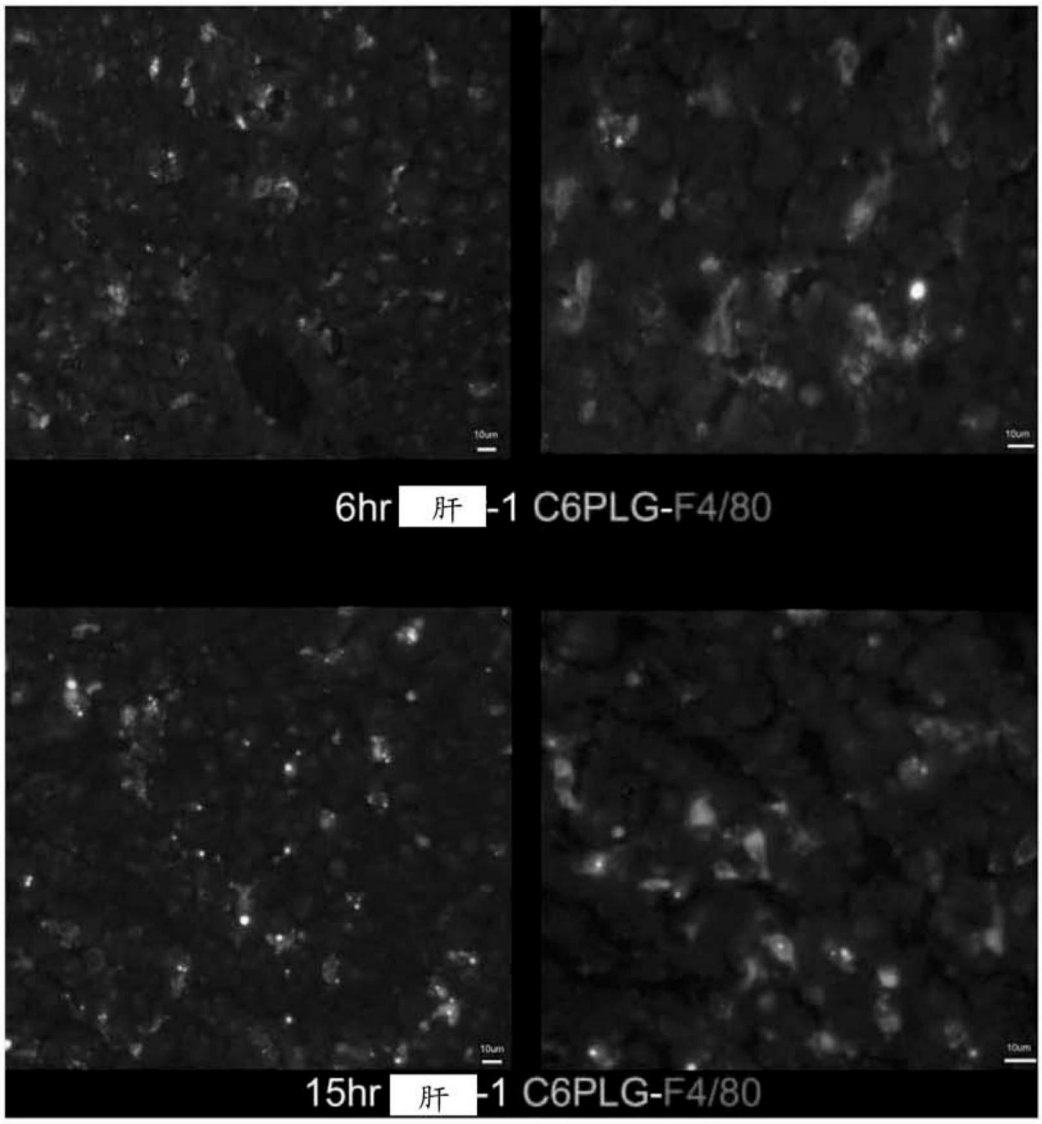


图30

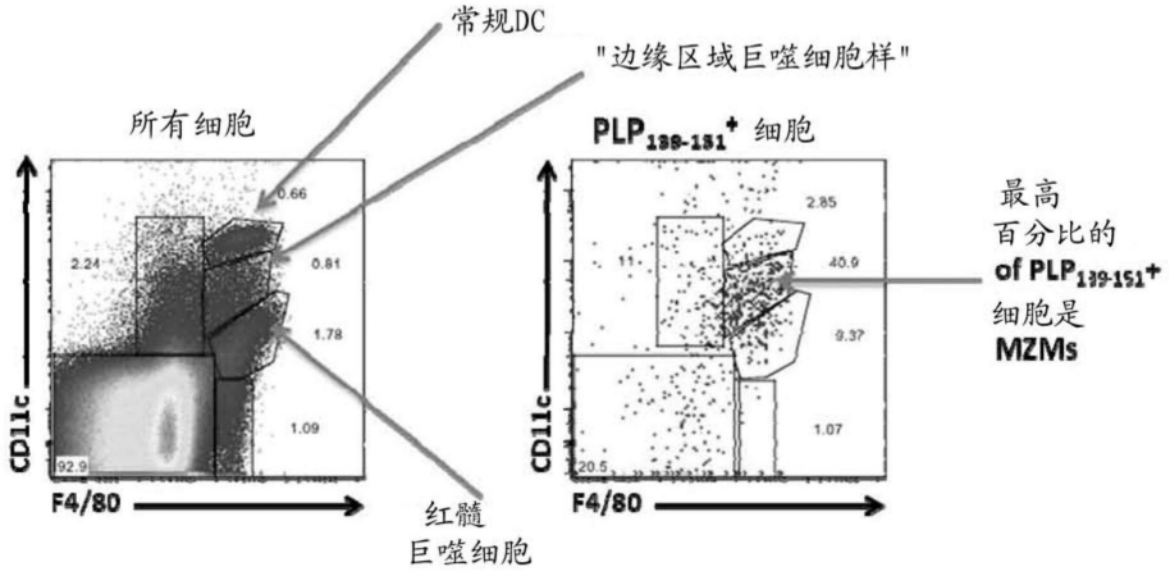

常规DC
"边缘区域巨噬细胞样"
所有细胞
PLP139-151+ 细胞
0.66
2.24
0.81
1.78
1.09
92.9
CD11c
F4/80
2.85
11
40.9
9.37
1.07
20.5
CD11c
F4/80
最高
百分比的
of PLP139-151+
细胞是
MZMs
红髓
巨噬细胞

图31

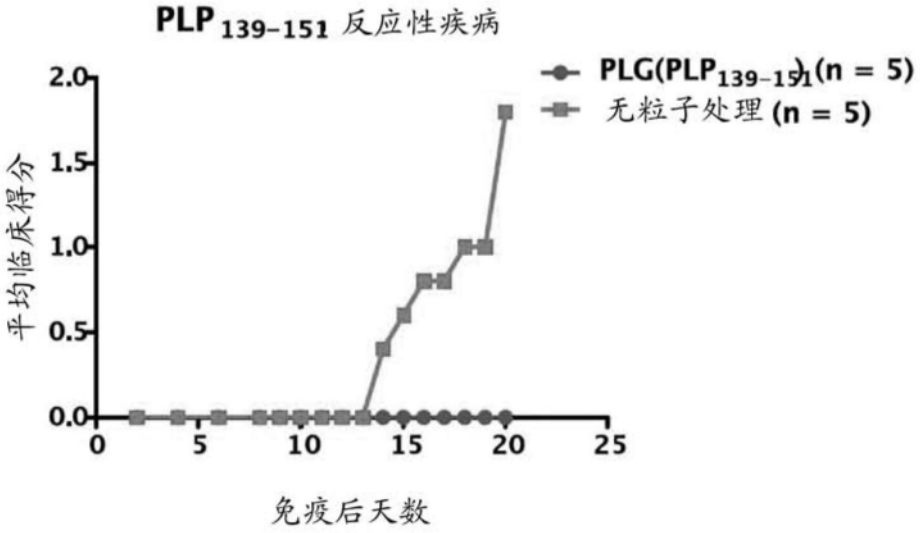

PLP 139-151 反应性疾病
PLG(PLP139-151)(n = 5)
无粒子处理 (n = 5)
平均临床得分
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5
10
15
20
25
免疫后天数

图32

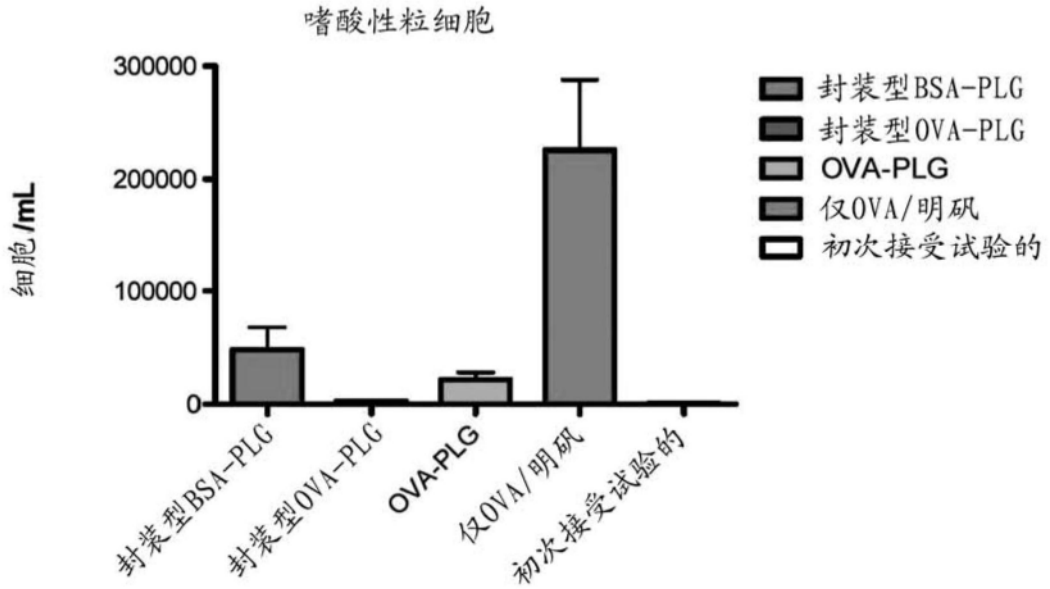

嗜酸性粒细胞
细胞/mL
300000
200000
100000
0
封装型BSA-PLG
封装型OVA-PLG
OVA-PLG
仅OVA/明矾
初次接受试验的
封装型BSA-PLG
封装型OVA-PLG
OVA-PLG
仅OVA/明矾
初次接受试验的

图33

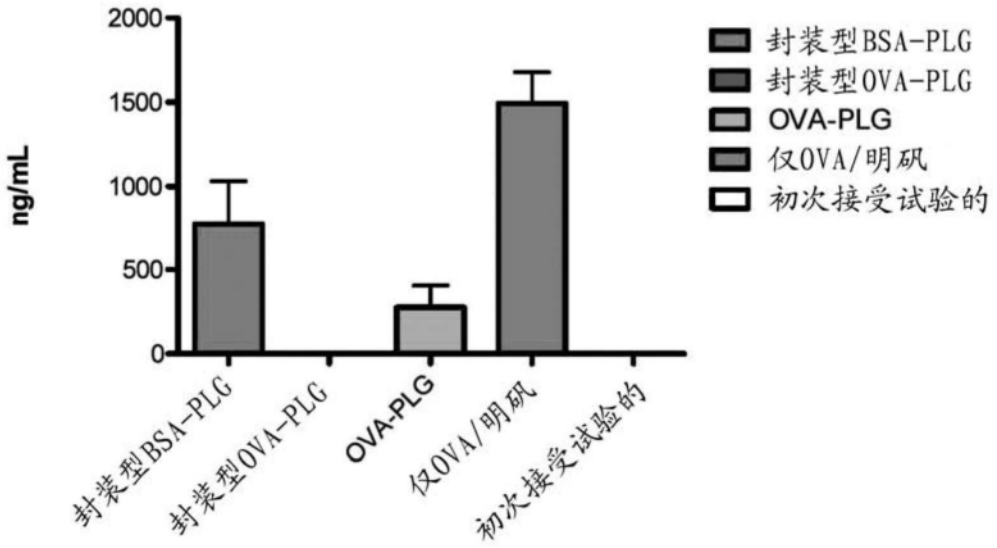

ng/mL
2000
1500
1000
500
0
封装型BSA-PLG
封装型OVA-PLG
OVA-PLG
仅OVA/明矾
初次接受试验的
封装型BSA-PLG
封装型OVA-PLG
OVA-PLG
仅OVA/明矾
初次接受试验的

图34

		尺寸(d.nm):	强度%:	标准偏差(d.nm):
Z平均(d.nm): 584.1	峰值1:	679.0	100.0	202.7
PdI: 0.162	峰值2:	0.000	0.0	0.000
截距: 0.967	峰值3:	0.000	0.0	0.000

结果质量: 良好

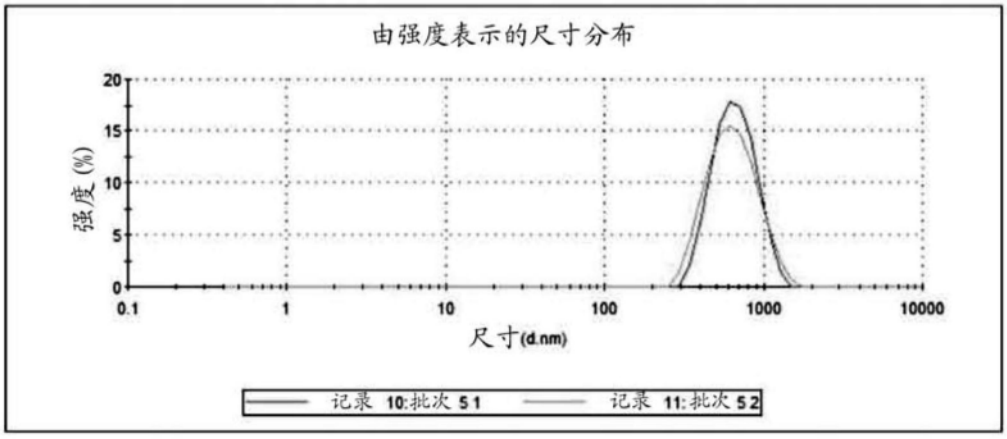


图35

		平均值 (mV)	面积 (%)	标准偏差(mV)
ζ电位 (mV): -48.9	峰值1:	-48.9	100.0	5.14
ζ偏差 (mV): 5.14	峰值2:	0.00	0.0	0.00
电导率 (mS/cm): 0.103	峰值3:	0.00	0.0	0.00

结果质量: 良好

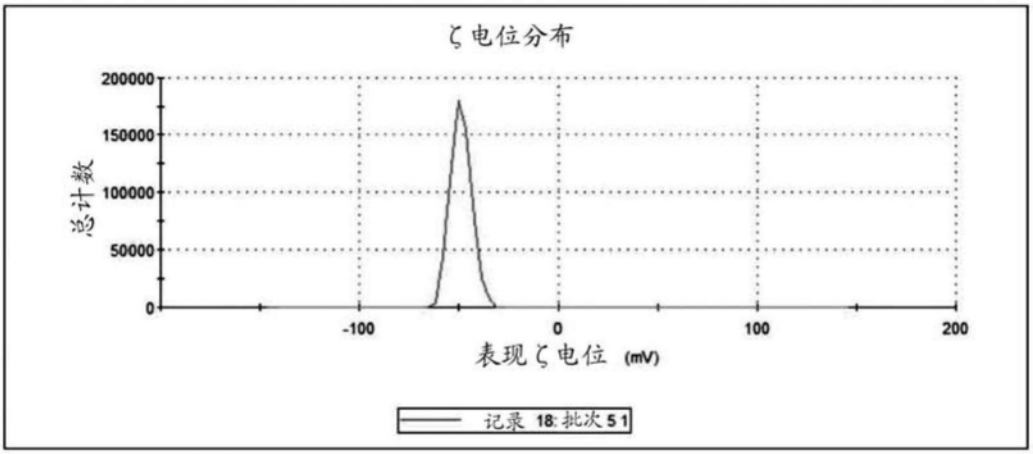


图36

		尺寸(d.nm):	强度%:	标准偏差(d.nm):
Z平均 (d.nm): 569.7	峰值1:	700.3	100.0	301.2
PdI: 0.230	峰值2:	0.000	0.0	0.000
截距: 0.961	峰值3:	0.000	0.0	0.000

结果质量: 良好

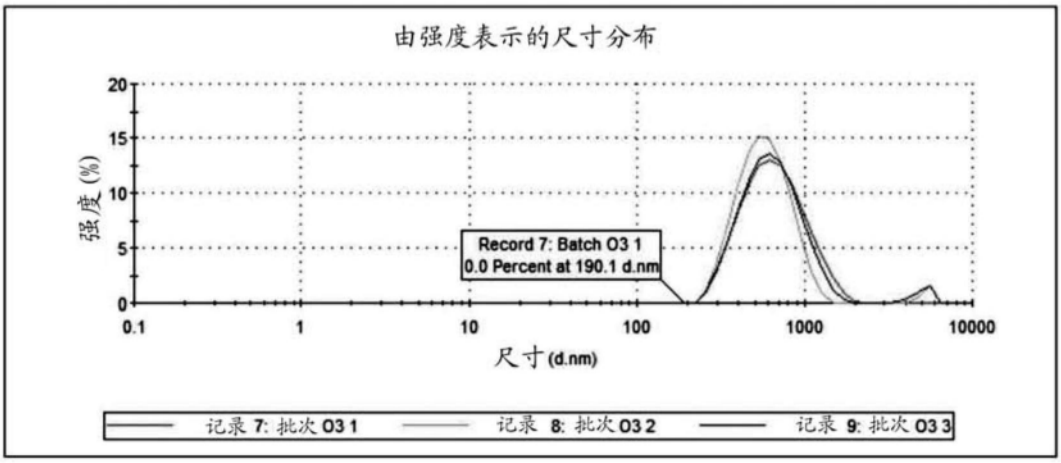


图37

		平均值 (mV)	面积 (%)	标准偏差 (mV)
ζ电位 (mV): -52.2	峰值1:	-52.2	100.0	5.38
ζ偏差 (mV): 5.38	峰值2:	0.00	0.0	0.00
电导率 (mS/cm): 0.0937	峰值3:	0.00	0.0	0.00

结果质量: 良好

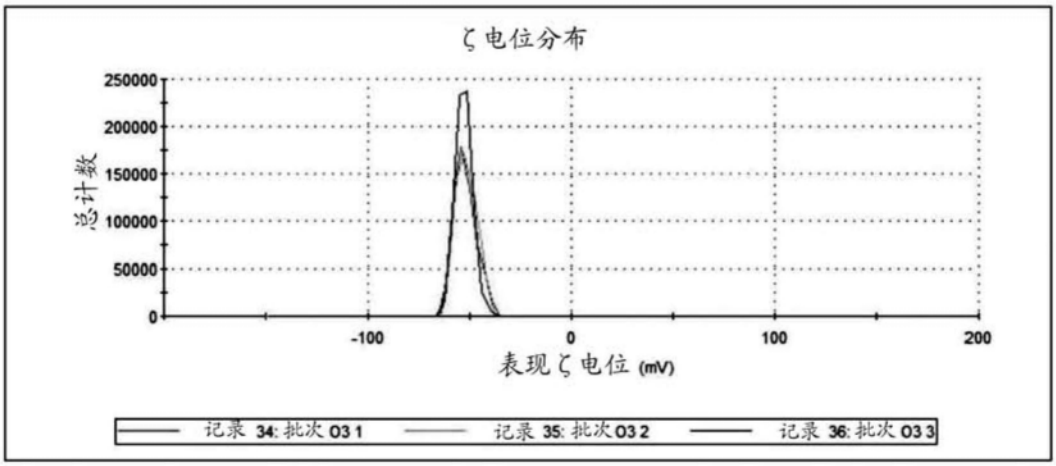


图38

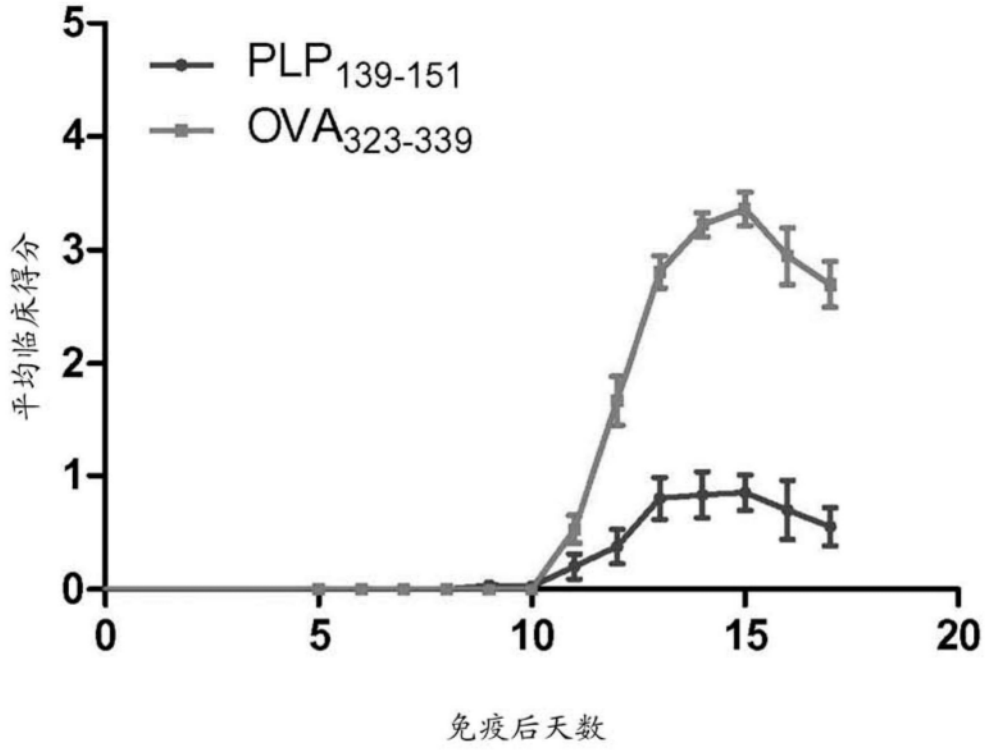


图39