



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103429232 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201180064803. 8

(56) 对比文件

(22) 申请日 2011. 11. 14

WO 2010085509 A1, 2010. 07. 29,

US 20030166509 A1, 2003. 09. 04,

(30) 优先权数据

61/413, 016 2010. 11. 12 US

61/413, 018 2010. 11. 12 US

审查员 宗金锐

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 07. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/060537 2011. 11. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/065153 EN 2012. 05. 18

(73) 专利权人 盖茨咨询和项目管理公司

地址 美国密歇根州

(72) 发明人 D. 盖茨 R. 特里 N. 金

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 郭杰

(51) Int. Cl.

A61K 9/54(2006. 01)

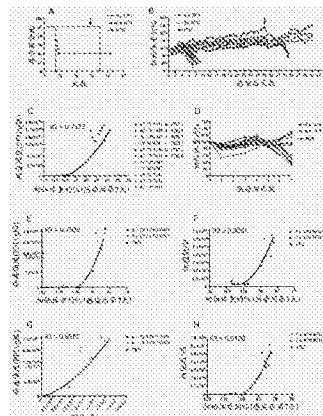
权利要求书2页 说明书24页 附图13页

(54) 发明名称

修饰的免疫调节粒子

(57) 摘要

本发明涉及一项惊人的发现, 即当对受试者施用羧化粒子如羧化的聚苯乙烯、PLGA 或金刚石粒子时, 炎症性免疫反应得到改善。此外, 本发明描述了通过施用这些上述的羧化粒子来治疗炎症性疾病的方法。



1. 一种包含羧化粒子的药物组合物,其中所述粒子没有连接的抗原部分,并且其中所述粒子是金刚石粒子或者 PLGA 粒子。
2. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述抗原部分是肽。
3. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述组合物在有需要的受试者体内诱导免疫耐受。
4. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中所述组合物改善有需要的受试者的炎症性免疫反应。
5. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述羧化粒子的直径是在约 0.1 μm 至约 10 μm 之间。
6. 如权利要求 5 所述的组合物,其中所述羧化粒子的直径是在约 0.3 μm 至约 5 μm 之间。
7. 如权利要求 6 所述的组合物,其中所述羧化粒子的直径是在约 0.5 μm 至约 3 μm 之间。
8. 如权利要求 7 所述的组合物,其中所述羧化粒子的直径是在约 0.5 μm 至约 1 μm 之间。
9. 如权利要求 8 所述的组合物,其中所述羧化粒子的直径是约 0.5 μm 。
10. 包含羧化粒子的药物组合物在制备用于减少受试者的炎症性免疫反应持续时间或严重程度的药物中的用途,其中所述粒子没有连接的肽或抗原部分,并且其中所述粒子是金刚石粒子或 PLGA 粒子。
11. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述组合物在有需要的受试者体内诱导免疫耐受。
12. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述组合物改善炎症性免疫反应。
13. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是在约 0.1 μm 至约 10 μm 之间。
14. 如权利要求 13 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是在约 0.3 μm 至约 5 μm 之间。
15. 如权利要求 14 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是在约 0.5 μm 至约 3 μm 之间。
16. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是在约 0.5 μm 至约 1 μm 之间。
17. 如权利要求 16 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是约 0.5 μm 。
18. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述受试者患有自身免疫性疾病。
19. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述受试者是移植受者。
20. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述受试者患有缺血再灌注损伤、动脉粥样硬化、或已罹患心肌梗塞。
21. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述受试者患有银屑病或皮肤炎。
22. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述受试者罹患过敏性病症。
23. 如权利要求 22 所述的用途,其中所述过敏性病症是湿疹、哮喘、过敏性鼻炎或皮肤过敏症。

24. 如权利要求 18 所述的用途,其中所述自身免疫性病症是选自由以下组成的组:多发性硬化症、硬皮病、I 型糖尿病、类风湿性关节炎、甲状腺炎、全身性红斑狼疮、雷诺氏(Reynaud's)综合征、修格兰氏(Sjorgen's)综合征、自身免疫性葡萄膜炎、自身免疫性心肌炎、以及克罗恩氏(Crohn's)病。

25. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化症。

26. 如权利要求 10 所述的用途,其中所述组合物是口服、经鼻、静脉内、肌肉内、经眼、透皮、或皮下施用。

27. 包含羧化粒子的药物组合物在制备用于治疗受试者的病毒性感染或细菌性感染的药物中的用途,其中所述粒子没有连接的肽或抗原部分,并且其中所述粒子是金刚石粒子或 PLGA 粒子。

28. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述组合物在有需要的受试者体内诱导免疫耐受。

29. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述组合物改善炎症性免疫反应。

30. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是在约 $0.1\ \mu\text{m}$ 至约 $10\ \mu\text{m}$ 之间。

31. 如权利要求 30 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是在约 $0.3\ \mu\text{m}$ 至约 $5\ \mu\text{m}$ 之间。

32. 如权利要求 31 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是在约 $0.5\ \mu\text{m}$ 至约 $3\ \mu\text{m}$ 之间。

33. 如权利要求 32 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是在约 $0.5\ \mu\text{m}$ 至约 $1\ \mu\text{m}$ 之间。

34. 如权利要求 33 所述的用途,其中所述羧化粒子的直径是约 $0.5\ \mu\text{m}$ 。

35. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述病毒性感染是选自由以下组成的组:疱疹病毒感染、肝炎病毒感染、西尼罗河病毒感染、黄病毒、流感病毒感染、鼻病毒感染、逆转录病毒感染、乳头瘤病毒感染、副粘病毒感染、以及副流感病毒感染。

36. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述病毒性感染感染所述受试者的中枢神经系统。

37. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述病毒性感染引起病毒性脑炎或病毒性脑膜炎。

38. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述细菌性感染感染所述受试者的中枢神经系统。

39. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述细菌性感染引起细菌性脑炎或细菌性脑膜炎。

40. 如权利要求 27 所述的用途,其中所述组合物是口服、经鼻、静脉内、肌肉内、经眼、透皮、或皮下施用。

修饰的免疫调节粒子

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求都在 2011 年 11 月 12 日提交的美国临时申请号 61/413,016 和 61/413,018 的优先权,并且两者都以引用的方式整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 炎症性疾病和病症是异常的或以其它方式失调的炎症性反应造成疾病的病因学或严重程度的一种病状。实例包括自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、多发性硬化症和糖尿病、感染性疾病如肺结核以及各种形式的脑膜炎和包括西尼罗河病毒性脑炎 (West Nile Virus encephalitis) 在内的脑炎、以及包括动脉粥样硬化和缺血再灌注在内的其它病症。

[0005] 很多这些疾病的特征在于组织损伤或其它损伤部位的单核细胞浸润。在这些浸润中观察到的单核细胞的实例包括淋巴细胞,特别是 T 淋巴细胞,以及如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、小神经胶质细胞和其它细胞等单核吞噬细胞系统 (MPS 细胞) 的细胞。

[0006] 在单核细胞浸润中观察到的很多细胞被怀疑在这些异常炎症性反应中起作用。例如,在如多发性硬化症等疾病中,已经知道 CD4⁺T 细胞在病理性自身免疫反应中起重要作用。在 T 细胞活化的早期时间点,树突状细胞和其它 MPS 细胞可能负责 CD4⁺T 细胞的活化。MPS 细胞还可以通过吞噬作用来促成炎症,不过在至少一些炎症性疾病中,还不清楚这些细胞在不存在 CD4⁺T 细胞的情况下是否能够如此。

[0007] 外周血液单核细胞可以根据某些细胞表面分子的表达或不表达来归类为两组之一。具体来说,已了解人“常驻单核细胞”或“成熟单核细胞”具有 CD14^{lo}CD16⁺表型(小鼠的对应表型是 CX₃CR1^{hi}CCR2⁻Gr1⁻)。已了解另一组细胞,“炎症性单核细胞”或“不成熟单核细胞”具有 CD14⁺CD16⁺表型(小鼠的对应表型是 CX₃CR1^{lo}CCR2⁺Gr1⁺)。(Geissmann F. 等, 2003Immunity19:71-82)

[0008] 重要的是,虽然后者就观察到它们从骨髓来源的外周血液细胞迁移到发炎的组织中的意义而言被理解为“炎症性”,但是这些细胞没有显示出直接或通过其它细胞的作用引起炎症。此外,这些细胞分化时可形成的各种 MPS 细胞也没有显示出引起炎症。

[0009] 在与不希望的免疫反应相关的病症中进行全面长期免疫抑制的常规临床策略是以长期施用广效免疫抑制药为基础的,例如信号 1 阻滞剂,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导致毒副作用。此外,即使是在能够耐受这些药物的那些患者中,要求终身免疫抑制药物治疗带来严重副作用的重大风险,包括肿瘤、严重感染、肾毒性以及代谢性病症。

[0010] 已发展出诱导抗原特异性耐受的方法,包括抗原或肽的细胞偶合。例如,在一种方法中,肽诱导的细胞偶合性耐受涉及收集、分离外周血液细胞并用疾病特异性自身抗原和亚乙基碳化二亚胺 (ECDI) 偶合试剂在无菌条件下处理,以及随后再输注至供体 / 患者体内。这种方法成本高,并且必须在密切监测的条件下由熟练的从业人员来执行,并且可执行所述程序的中心数量有限。使用红血球作为供体细胞类型使得潜在来源扩大至包括同种异体供体,因此增加来源细胞的供应,从而使此疗法的递送显著并潜在地扩展至任何有输血认证的配置。这些方法在来源细胞的供应以及组织配型以使对供体细胞的免疫反应减至最

少的必要性方面受到明显的限制。此外,本地处理细胞以便通过 EDCI 偶合自身抗原会带来显著的品质控制问题。此外,这些方法还需要至少在一定程度上了解所要寻求免疫耐受的病理性抗原。

[0011] 最近,已经描述了消除了对来源细胞供应的需要并且避免现有方法的组织配型的需要的肽偶合粒子,参见 W02010/085509,所述专利以引用的方式整体并入本文。然而,这些方法仍然依赖于抗原特异性免疫耐受。

[0012] 抗原特异性耐受一般并不理想,因为在人疾病中特异性抗原 / 抗原表位一般是未知的。此外,抗原可以在受试者与受试者之间变化,以便使抗原特异性方法有效,因此有必要确定每个个别患者所识别的抗原,或者要求在施用之前使可能的肽的文库与粒子偶合。这些肽的合成和个别偶合都耗时而且耗费高昂。因此,对同时解决这两个问题存在需要,由此消除对组织匹配细胞来源的需要,并同时消除对合成和偶合大量肽的需要。

发明概要

[0013] 本发明涉及一项惊人的发现,即单独的修饰粒子(即没有肽与其偶合)可有效改善有需要的患者的炎症性免疫反应。令人惊奇的是,减轻炎症性免疫反应和治疗炎症性疾病所需要的仅仅是施用羧化粒子,而不需要有肽与其偶合。

[0014] 在一个实施方案中,本发明提供一种包含羧化粒子的药物组合物。在另一个实施方案中,羧化粒子没有连接的肽或抗原部分。在一些实施方案中,羧化粒子是聚苯乙烯粒子。在其它实施方案中,羧化粒子是金刚石粒子。在其它实施方案中,羧化粒子是聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)粒子。

[0015] 在一个实施方案中,含有羧化粒子的药物组合物当施用给有需要的受试者时诱导免疫耐受。在另一个实施方案中,含有羧化粒子的药物组合物当施用给有需要的受试者时改善炎症性免疫反应。

[0016] 在一个实施方案中,构成本发明药物制剂的羧化粒子具有约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $10 \mu\text{m}$ 的直径。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.3 \mu\text{m}$ 至约 $5 \mu\text{m}$ 的直径。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.5 \mu\text{m}$ 至约 $3 \mu\text{m}$ 的直径。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.5 \mu\text{m}$ 的直径。

[0017] 在一个实施方案中,本发明提供一种减少受试者的炎症性免疫反应持续时间或严重程度方法,其包括对受试者施用包含羧化粒子的药物组合物。在另一个实施方案中,羧化粒子没有连接的肽或抗原部分。在一些实施方案中,羧化粒子是聚苯乙烯粒子。在其它实施方案中,羧化粒子是金刚石粒子。在其它实施方案中,羧化粒子是聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)粒子。

[0018] 在一个实施方案中,本发明的方法当施用给有需要的受试者时诱导免疫耐受。在另一个实施方案中,所述方法当施用给有需要的受试者时改善炎症性免疫反应。

[0019] 在一个实施方案中,本发明的方法利用羧化粒子,包含那些具有约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $10 \mu\text{m}$ 直径的粒子。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.3 \mu\text{m}$ 至约 $5 \mu\text{m}$ 的直径。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.5 \mu\text{m}$ 至约 $3 \mu\text{m}$ 的直径。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.5 \mu\text{m}$ 的直径。

[0020] 在一个实施方案中,受试者具有自身免疫性病症。在另一个实施方案中,自身免疫

性病症是多发性硬化症、硬皮病、I 型糖尿病、类风湿性关节炎、甲状腺炎、全身性红斑狼疮、雷诺氏 (Reynaud's) 综合征、修格兰氏 (Sjorgen's) 综合征、自身免疫性葡萄膜炎、自身免疫性心肌炎、或克罗恩氏 (Crohn's) 病。在一个具体实施方案中,自身免疫性疾病是多发性硬化症。

[0021] 在另一个实施方案中,受试者具有过敏性病症。在另一个实施方案中,过敏性病症是湿疹、哮喘、过敏性鼻炎或皮肤过敏症。

[0022] 在另一个实施方案中,受试者是移植受者。在另一个实施方案中,受试者已患上了心肌梗塞。在另一个实施方案中,患者患有缺血再灌注。在另一个实施方案中,患者患有动脉粥样硬化。

[0023] 在一个实施方案中,所述方法包括以任何合适的方式施用羧化粒子。在一个实施方案中,组合物是口服、经鼻、静脉内、肌肉内、经眼、透皮、或皮下施用。在一个具体实施方案中,羧化粒子是经鼻施用。在另一个实施方案中,粒子是静脉内施用。

[0024] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗受试者的细菌性或病毒性感染的方法,其包括对受试者施用包含羧化粒子的药物组合物。在另一个实施方案中,羧化粒子没有连接的肽或抗原部分。在一些实施方案中,羧化粒子是聚苯乙烯粒子。在其它实施方案中,羧化粒子是金刚石粒子。在其它实施方案中,羧化粒子是聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA) 粒子。

[0025] 在一个实施方案中,本发明的方法当施用给患有细菌性或病毒性感染的受试者时诱导免疫耐受。在另一个实施方案中,所述方法当施用给患有细菌性或病毒性感染的受试者时改善或减轻炎症性免疫反应。

[0026] 在一个实施方案中,本发明的治疗细菌性或病毒性感染的方法利用羧化粒子,包含具有约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $10 \mu\text{m}$ 直径。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.3 \mu\text{m}$ 至约 $5 \mu\text{m}$ 的直径。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.5 \mu\text{m}$ 至约 $3 \mu\text{m}$ 的直径。在另一个实施方案中,羧化粒子具有约 $0.5 \mu\text{m}$ 的直径。

[0027] 在一个实施方案中,受试者患有病毒性感染。在另一个实施方案中,病毒性感染是疱疹病毒感染、肝炎病毒感染、西尼罗河病毒感染、黄病毒、流感病毒感染、鼻病毒感染、乳头瘤病毒感染、或副流感病毒感染。在另一个实施方案中,病毒性感染感染所述受试者的中枢神经系统。在另一个实施方案中,病毒性感染引起病毒性脑炎或病毒性脑膜炎。

[0028] 在一个实施方案中,受试者患有细菌性感染。在另一个实施方案中,细菌性感染感染所述受试者的中枢神经系统。在另一个实施方案中,细菌性感染引起败血症细菌性脑炎或细菌性脑膜炎。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1 示出 (A) 用 WNV 高剂量或低剂量感染之后小鼠的存活百分比;(B) 与用 WNV 高剂量感染小鼠相关的体重减轻;(C) 在死于感染的小鼠的脑中的病毒滴度;(D) 受到高剂量和低剂量 WNV 感染的小鼠在感染后 0-7 天内的体重减轻;(E) 在受到高剂量或低剂量 WNV 感染的小鼠的脑中在感染后第 7 天的病毒滴度,以及在第 7 天时的体重减轻百分比与病毒滴度之间的相关性;(F) 在用高剂量和低剂量 WNV 感染后 7 天时,体重减轻百分比与在小鼠脑中 CD45^+ 白细胞的存在之间的相关性;(G) 在用高剂量和低剂量 WNV 感染后 7 天时,脑中的病毒滴度与在小鼠脑中 CD45^+ 白细胞的存在之间的相关性;(H) 在用高剂量和低剂量 WNV

感染后 7 天时,体重减轻百分比与在小鼠脑中 $CD45^{hi}$ 巨噬细胞的存在之间的相关性。

[0031] 图 2 示出体重减轻百分比与 (A) $CD45^{int}CD11b^{+}$ 迁移小胶质细胞 ;(C) $CD3^{+}T$ 细胞 ;(D) $CD11b^{hi} Ly6G^{+}$ 嗜中性粒细胞,以及 (E) $NK1.1^{+}CD11b^{lo/}$ 天然杀伤细胞的存在之间的相关性,而 $CD45^{lo}$ 常驻小胶质细胞的数量 (B) 在用高剂量或低剂量 WNV 感染后的 7 天之后保持不变 ;(F) 示出在低剂量 WNV 感染的小鼠时体重减轻与脑中病毒滴度之间的相关性 ;(G) 示出在用低剂量 WNV 感染的小鼠的白细胞浸润与体重减轻百分比的相关性,并且 (H) 示出在感染低剂量 WNV 后的病毒滴度与白细胞浸润之间没有相关性。

[0032] 图 3 (A) 示出在用高剂量 WNV 感染后第 6 天,用含羧化聚苯乙烯微珠的 PBS 处理的小鼠的长期存活 ;(B) 示出在感染后第 6 天开始用羧化聚苯乙烯微珠处理低剂量 WNV 感染的小鼠对于延长小鼠存活期是无效的 ;(C) 示出在感染之后第 6 天开始用羧化聚苯乙烯微珠处理低剂量 WNV 感染的小鼠对于防止小鼠的体重减轻,相比于对照小鼠来说是无效的 ;(D) 示出当对体重减轻的小鼠施用微珠时,处理低剂量 WNV 感染的小鼠有效延长小鼠存活期。(E-G) 示出直到这些小鼠感染后 20 天的体重减轻记录。

[0033] 图 4 (A-D) 是在小鼠体重减轻时用羧化聚苯乙烯微珠处理低剂量 WNV 感染的小鼠的实例,在 (A-B) 中的小鼠只要求微珠处理 5 天,并且体重保持稳定,且它们在没有进一步微珠处理的情况下继续存活,然而 (C-D) 中的小鼠当在 5 天之后停止微珠处理时开始再次出现减轻体重,因此重新开始处理直到体重再次稳定为止,(E) 示出在感染后 9 天低剂量 WNV 感染的小鼠脑中 $CD45^{+}CD11b^{+}$ 巨噬细胞的浸润,该小鼠在感染后的第 8 天体重减轻或体重未减轻并用 PBS 或羧化微珠进行处理 ;(F) 是感染后 9 天发现浸润 WNV 感染的小鼠的脑的细胞类型的图形表示,该小鼠在感染后第 8 天体重减轻或体重未减轻并用 PBS 或羧化微珠进行处理。

[0034] 图 5 示出 (A) 在用 WNV 低剂量感染后用羧化聚苯乙烯微珠、裸聚苯乙烯微珠或 PBS 处理的小鼠存活期的差异 ;(B) 示出用 WNV 低剂量感染后用羧化聚苯乙烯微珠、裸聚苯乙烯微珠或 PBS 处理的小鼠的体重减轻百分比的差异 ;(C、D) 示出用 WNV 低剂量感染后用羧化聚苯乙烯微珠处理和用裸聚苯乙烯微珠处理的小鼠之间的体重减轻百分比的差异 ;(E、O) 示出在第 0 天用高剂量 WNV 感染的小鼠在第 7 天时偶联 FITC 的羧化微珠或裸微珠,以及在第 6 天时 FITC- 羧化微珠、FITC- 裸微珠或 PBS 的定位。(E-G) 是来自 3 只分别用 PBS 处理的小鼠的血液,(H-J) 是来自 3 只分别用裸聚苯乙烯微珠处理的小鼠的血液,并且 (L-N) 是来自 3 只分别用羧化聚苯乙烯微珠处理的小鼠的血液,它们示出保留在血液中的普通微珠要比羧化微珠多。

[0035] 图 6 示出 (A-C) 在如图 E-0 所示的感染和处理的小鼠的脑中缺乏偶联 FITC 的聚苯乙烯微珠的浸润 ;(D-E) 示出如图 5 (E-O) 用羧化聚苯乙烯微珠或裸聚苯乙烯微珠处理的 WNV 感染的小鼠的脑中各种白细胞、巨噬细胞和小胶质细胞的浸润减少。

[0036] 图 7 示出 (A) 脾脏中的偶联 FITC 的聚苯乙烯羧化微珠和偶联 FITC 的裸聚苯乙烯微珠与 $CD11b^{+}$ (C、G)、 $CD11c^{+}$ (D、H) $Ly6c^{+}$ (E、I) 细胞中的 $CD45^{+}$ 白细胞 (A、B、F) 的缔合 ;(J-R) 示出摄取的偶联 FITC 的羧化微珠和偶联 FITC 的裸微珠的细胞的类型。

[0037] 图 8 示出偶联 FITC 的聚苯乙烯羧化微珠或偶联 FITC 的裸聚苯乙烯微珠被用高剂量 WNV 感染后的脾脏中的 $CD11b^{+}CD11c$ 单核细胞 (A) 和 $CD11b^{+}CD11c^{+}$ (B) 或 $CD11b^{+}CD11c^{+}$ (C) 树突状细胞摄取并增加它们的数量的能力。

[0038] 图 9 示出 (A-D) 偶联 FITC 的羧化聚苯乙烯微珠或偶联 FITC 的裸聚苯乙烯微珠被用高剂量 WNV 感染后的脾脏中的 CD19⁺B 细胞和 CD3⁺T 细胞子集摄取并增加它们的数量的能力。

[0039] 图 10 示出 (A-L) 偶联 FITC 的羧化聚苯乙烯微珠或偶联 FITC 的裸聚苯乙烯微珠被具体来说在用高剂量 WNV 感染后的肝脏中的 CD11b⁺CD11c⁺ 单核细胞 (J) 和 CD11b⁺CD11c⁺ (K) 或 CD11b⁺CD11c⁺ (L) 树突状细胞中的 CD11b⁺ (C、G)、CD11c⁺ (D、H) 和 Ly6c⁺ (E、I) 细胞摄取的能力。

[0040] 图 11 示出 (A-G) 偶联 FITC 的羧化聚苯乙烯微珠或偶联 FITC 的裸聚苯乙烯微珠被用高剂量 WNV 感染后的骨髓中的 CD11b⁺ (C、F)、CD11c⁺ 和 Ly6C⁺ (D、G) 细胞摄取的能力。

[0041] 图 12 示出 (A) 用不同尺寸的高剂量或低剂量羧化聚苯乙烯微珠处理的低剂量 WNV 感染的小鼠的存活百分比；(B) 示出用偶联 FITC 的羧化聚苯乙烯微珠、偶联 FITC 的裸微珠、羧化 PLGA 球体或裸 PLGA 球体处理的低剂量 WNV 感染的小鼠的存活百分比；(C) 示出用低剂量 WNV 感染并用羧化 FITC-微珠、羧化 FITC-PLGA 球体、或羧化纳米金刚石处理的小鼠的脑中不同单核细胞群体的浸润 / 活化。

[0042] 图 13 示出用高剂量或低剂量 WNV 感染的野生型和 T 细胞缺乏型小鼠的 (A) 存活百分比和 (B) 体重减轻；(C) 用高剂量或低剂量 WNV 感染的野生型和 T 细胞缺乏型小鼠的体重减轻与脑中病毒滴度之间的相关性；在感染后第 8 天用高剂量 WNV 感染的野生型和 T 细胞缺乏型小鼠的 (D) 体重减轻 (E) 和脑中的免疫细胞浸润；用高剂量或低剂量 WNV 感染并在显著体重减轻时用羧化微珠或 PBS 处理的野生型和 T 细胞缺乏型小鼠的 (F) 存活百分比 (G) 和体重减轻。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明人惊奇地发现，当对受试者施用羧化粒子如特定尺寸的羧化聚苯乙烯、PLGA 或金刚石粒子时炎症性免疫反应得到改善。此外，本发明人还惊奇地发现，当对患有活动性病毒性或细菌性感染的受试者，特别是那些感染中枢神经系统延长的受试者施用这些上述的羧化粒子时，可引起这些感染的症状显著降低和延长存活期。因此，这些粒子可用于治疗任何特征为过度炎症性免疫反应的疾病和病状如自身免疫性疾病，以及治疗细菌性和病毒性感染。

[0045] 本文所用的“粒子”是指非组织来源的微小的物质组合物，它可以是球体或球样实体或微珠。术语“粒子”和术语“微珠”可以互换使用。此外，术语“粒子”可用于涵盖微珠和球体。

[0046] “羧化粒子”或“羧化微珠”或“羧化球体”包括任何在其表面上被修饰而含有羧基的粒子。在一些实施方案中，添加羧基增强吞噬细胞 / 单核细胞从循环中摄取粒子，例如，通过与清道夫受体如 MARCO 的相互作用。

[0047] 本文所用的“抗原部分”是指可被主体免疫系统识别的任何部分，例如肽。抗原部分的实例包括但不限于，自身抗原和 / 或细菌或病毒蛋白质、肽或组分。不受理论的限制，虽然羧化微珠自身可被免疫系统识别，但出于本发明的目的，没有连接其它基团的羧化微珠不视为“抗原部分”。

[0048] 本文所用的“裸微珠”或“裸粒子”或“裸球体”是指没有羧化的微珠、粒子或球体。

[0049] 粒子可以具有任何粒子形状或构形。然而，在一些实施方案中，优选使用在活体内

不太可能簇集的粒子。在这些实施方案中的粒子的实例是那些有球形形状的粒子。

[0050] 每个粒子不必在尺寸上一致,但是粒子通常必须具有足够触发抗原呈递细胞或其它 MPS 细胞的吞噬作用的尺寸。优选地,粒子在尺寸上是微米级或纳米级的,以便提高溶解度、避免在活体内由聚集引起可能的并发症、以及促进胞饮作用。粒度可以是影响从组织间隙摄取到淋巴细胞成熟区内的一个因素。具有约 0.1 μm 至约 10 μm 的直径的粒子能够触发吞噬作用。因此在一个实施方案中,粒子具有在这些限度内的直径。在另一个实施方案中,粒子具有约 0.3 μm 至约 5 μm 的直径。在另一个实施方案中,粒子具有约 0.5 μm 至约 3 μm 的直径。在优选的实施方案中,粒子具有约 0.5 μm 的尺寸。在组合物中的粒子不需要具有均一的直径。作为实例,药物制剂可含有多个粒子,其中一些是约 0.5 μm ,而其它的是约 1.0 μm 。粒度在这些指定范围内的任何混合物都是适用的。

[0051] 在一些实施方案中,粒子是非金属的。在这些实施方案中,粒子可由聚合物形成。在一个优选的实施方案中,粒子在个体中是生物可降解的。在这个实施方案中,可以在多次剂量中向个体提供粒子而不会在个体中积累粒子。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。

[0052] 优选地粒子表面由使非特异性或不希望的生物学相互作用减至最少的材料构成。粒子表面和间质组织之间的相互作用可以是在淋巴摄取中起作用的一个因素。粒子表面可涂有防止或减少非特异性相互作用的材料。如由皮下注射之后提高的淋巴摄取所证明,通过对粒子涂布亲水层如聚(乙二醇)(PEG)和其共聚物如 PLURONICS(包含聚(乙二醇)-b1-聚(丙二醇)-b1-聚(乙二醇))获得的空间稳定可以减少与间质组织蛋白质的非特异性相互作用。所有的这些事实指出就淋巴摄取而言粒子的物理特性的重要性。生物可降解的聚合物可用于制造所有或一些聚合物和/或粒子和/或层。生物可降解的聚合物可以例如由于官能团与溶液中的水反应而遭受降解。本文所用的术语“降解”是指由于分子量降低或疏水性基团转变为亲水性基团而变得可溶。具有酯基的聚合物通常发生自发水解,例如聚丙交酯或聚乙交酯。

[0053] 本发明的粒子还可以包含另外的组分。例如,载体可具有与载体合并或偶联的成像剂。具有当前可购得的成像剂的载体纳米球体的一个实例是 Kodak X-sight 纳米球体。称为量子点(QD)的无机量子限制发光纳米晶体在 FRET 应用中表现为理想的供体:它们的高量子产率和可调谐的尺寸依赖性斯托克斯位移(Stokes Shifts)当在单紫外线波长下激发时,允许不同尺寸发射蓝光到红外光。(Bruchez 等, *Science*, 1998, 281, 2013; Niemeyer, C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 5796; Waggoner, A. *Methods Enzymol.* 1995, 246, 362; Brus, L. E. *J. Chem. Phys.* 1993, 79, 5566)。量子点,如基于称为树枝状聚合物的一类聚合物的混合有机/无机量子点,可用于生物标记、成像以及光学生物传感系统。(Lemon 等, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 12886)。与传统无机量子点的合成不同,这些混合量子点纳米粒子的合成不需要高温或高毒性、不稳定的试剂。(Etienne 等, *Appl. Phys. Lett.* 87, 181913, 2005)。

[0054] 粒子可以由各种各样的材料形成。粒子优选由适合于生物用途的材料构成。例如,粒子可由玻璃、硅石、羟基羧酸的聚酯、二羧酸的聚酐、或羟基羧酸和二羧酸的共聚物构成。更一般来说,载体粒子可以由以下构成:直链或支链的、取代或未取代的、饱和或不饱和的、线性或交联的烷基、卤烷基、硫烷基、氨烷基、芳基、芳烷基、烯基、芳烯基、杂芳基、或烷

氧基羧酸的聚酯,或直链或支链的、取代或未取代的、饱和或不饱和的、线性或交联的烷基、卤烷基、硫烷基、氮烷基、芳基、芳烷基、烯基、芳烯基、杂芳基、或烷氧基二羧酸的聚酐。此外,载体粒子可以是量子点、或由量子点如量子点聚苯乙烯粒子构成(Joumaa等(2006)Langmuir22:1810-6)。还可以使用包括酯和酐键的混合物(例如乙醇酸和癸二酸的共聚物)的载体粒子。例如,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-共-乙醇酸)共聚物(PLGA)、聚(乳酸-共-癸二酸)共聚物(PLSA)、聚(乙醇酸-共-癸二酸)共聚物(PGSA)等。可用于本发明的其它生物相容性、生物可降解的聚合物包括己内酮、碳酸盐、酰胺、氨基酸、原酸酯、缩醛、氰基丙烯酸酯、以及可降解聚氨酯的聚合物或共聚物,以及它们与直链或支链的、取代或未取代的烷基、卤烷基、硫烷基、氮烷基、烯基、或芳香族羧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,例如赖氨酸、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、或它们的对映异构体,可以包括在与任何上述材料的共聚物中,以便为与抗原肽和蛋白质或偶联部分的偶联提供反应性基团。适合于本发明的生物可降解材料包括金刚石、PLA、PGA、以及PLGA聚合物。生物相容但不可生物降解的材料也可以用于本发明的载体粒子中。例如,可以使用丙烯酸酯、乙烯-乙酸乙烯酯、酰基取代的乙酸纤维素、不可降解的聚氨酯、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.)、以及尼龙的不可生物降解聚合物。

[0055] 当前可购得的合适的微珠包括聚苯乙烯微珠,如FluoSpheres(Molecular Probes, Eugene, Oreg.)。

[0056] 物理特性还涉及在具有不成熟淋巴细胞的区域内摄取和保留之后的纳米粒子的适用性。它们包括机械特性如刚性或弹性。一些实施方案是基于弹性核心,例如具有覆盖层例如亲水性覆盖层的聚(丙烯硫醚)(PPS)核心,如在PEG中,如在最近发展并且表征用于全身性(但是不是靶向或免疫的)递送的PPS-PEG系统中。弹性核心与大体上刚性的核心相反,如在聚苯乙烯或金属纳米粒子系统中。术语弹性是指除天然或合成的橡胶制品之外的某些有弹性的材料,而弹性对于聚合物领域的那些技术人员来说是一个熟悉的术语。例如,交联PPS可用于形成疏水性弹性核心。PPS是一种聚合物,其在氧化条件下降解为聚亚砷以及最后形成聚砷,从疏水性橡胶转变为亲水性水溶性聚合物。其它硫化物聚合物可能适合使用,其中术语硫化物聚合物是指在基体的主链上具有硫的聚合物。其它可以使用的弹性聚合物是在水合条件下的玻璃态转化温度低于约37°C的聚酯。疏水性核心可以有利地与亲水性覆盖层一起使用,因为核心和覆盖层会倾向于不混合,因而覆盖层倾向于在空间上从核心扩张开来。核心是指其上面具有层的粒子。层是指覆盖核心的至少一部分的材料。层可以是吸附的或共价结合的。粒子或核心可以是实心或中空的。弹性疏水性核心有利地在刚性疏水性核心上方,如结晶或玻璃(如在聚苯乙烯的情况下)核心,其中具有弹性疏水性核心的粒子可以携带更高的疏水性药物负载量。

[0057] 另一个物理特性是表面的亲水性。亲水性材料当它未交联时可在水中具有至少1克每公升的溶解度。具有亲水性聚合物的粒子的空间稳定可通过减少非特异性的相互作用而提高从间质组织的摄取;然而,粒子增加的隐身性质也可以减少具有不成熟淋巴细胞的区域中吞噬细胞的内在化。然而,已经遇到了平衡这些竞争的特征的挑战,并且本申请记载了用于有效地通过淋巴递送至DC和淋巴结中的其它APC的纳米粒子的产生。一些实施方

案包括亲水性组分如亲水性材料层。合适的亲水性材料的实例是以下中的一种或多种：聚环氧烷、聚环氧乙烷、聚糖、聚丙烯酸、以及聚醚。可以调整层中的聚合物的分子量以便在活体内提供有用的位阻，例如约 1,000 至约 100,000 或甚至更多；技术人员会立即了解涵盖明确说明的范围内的范围和数值，例如在 10,000 和 50,000 之间。

[0058] 纳米粒子可以并有用于其它反应的官能团。用于其它反应的官能团包括亲电子试剂或亲核试剂；它们便于跟其它分子反应。亲核试剂的实例是伯胺、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。

[0059] 本发明的粒子可以以有效减轻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性或病毒性感染的任何剂量给予。在实施某些方案中，对个体提供约 10^2 至约 10^{20} 个粒子。在另一个实施方案中，提供约 10^3 至约 10^{15} 个之间的粒子。在另一个实施方案中，提供约 10^6 至约 10^{12} 个之间的粒子。在另一个实施方案中，提供约 10^8 至约 10^{10} 个之间的粒子。在一个实施方案中，优选的剂量是 0.1% 固含量 /ml。因此，对于 $0.5 \mu\text{m}$ 的微珠，优选的剂量是大约 4×10^9 个微珠，对于 $0.05 \mu\text{m}$ 的微珠，优选的剂量是大约 4×10^{12} 个微珠，对于 $3 \mu\text{m}$ 的微珠，优选的是 2×10^7 个微珠。然而，本发明涵盖任何有效治疗有待治疗的具体病状的剂量。

[0060] 本发明适用于治疗免疫相关性病症，如自身免疫性疾病、移植排斥、以及过敏反应。取代合成的生物相容性粒子系统以诱导免疫耐受可导致制造更容易、扩大治疗剂的可用性、增加样品之间的均一性、增加潜在治疗部位的数量、以及显著降低对载体细胞的过敏性反应的可能性。

[0061] 本文所用的术语“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，例如细胞因子的产生和细胞的细胞毒性。此外，术语免疫反应包括由 T 细胞活化所间接影响的免疫反应，例如抗体产生（体液反应）和细胞因子应答细胞例如巨噬细胞的活化。免疫反应中所涉及的免疫细胞包括淋巴细胞，如 B 细胞和 T 细胞 (CD4^+ 、 CD8^+ 、Th1 和 Th2 细胞)；抗原呈递细胞（例如专职性抗原呈递细胞，如树突状细胞、巨噬细胞、B 淋巴细胞、朗格罕氏细胞 (Langerhans cells)，以及非专职性抗原呈递细胞，如角质化细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞、少突胶质细胞)；自然杀伤细胞；骨髓细胞，如巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、以及粒细胞。在一些实施方案中，本发明的修饰的粒子有效减少转运到炎症部位的炎症性细胞。

[0062] 本文所用的术语“无反应”、“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不敏感。这种不敏感通常是抗原特异性的，并且在停止暴露于抗原肽之后仍持续。例如，T 细胞无反应的特征为缺乏细胞因子例如 IL-2 的产生。当 T 细胞暴露于抗原并在不存在第二信号（协同刺激信号）的情况下接收第一信号（T 细胞受体或 CD-3 介导的信号）时可发生 T 细胞无反应。在这些条件下，细胞重新暴露于相同的抗原（即使重新暴露是在协同刺激分子存在的情况下发生）导致不能产生细胞因子，并且随后不能增殖。因此，不能产物细胞因子防止增殖。然而，如果与细胞因子（例如 IL-2）一起培养，则无反应的 T 细胞可以增殖。例如，还可以通过使 T 淋巴细胞的 IL-2 产生缺乏而观察到 T 细胞无反应，如通过 ELISA 或通过使用指示细胞系的增殖测定所测量。或者，可以使用报告基因构建体。例如，无反应 T 细胞不能起始由异源启动子在 5' IL-2 基因增强子的控制下诱导的或者由可在增强子中发现的 API 序列多聚体诱导的 DL-2 基因转录 (Kang 等, 1992 Science. 257:1134)。

[0063] 本文所用的术语“免疫耐受”是指与未治疗的受试者相比,对一部分接受治疗的受试者执行的方法,其中:a) 特异性免疫反应(认为至少部分是由抗原特异性效应 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、抗体、或它们的等同物所介导)的水平降低;b) 特异性免疫反应的发作和发展延迟;或者 c) 特异性免疫反应发作或发展的风险降低。当与其它相比优先引发针对某些抗原的免疫耐受时,发生“特异性”免疫耐受。当针对导致炎症性免疫反应的抗原的免疫耐受的引发无差别时,发生“非特异性”免疫耐受。当针对导致致病性免疫反应的抗体而未对导致保护性免疫反应的其它抗原半区别性地引发免疫耐受时,发生“准特异性”免疫耐受。

[0064] 致耐受活性的一个代表是粒子在靶位点刺激适当细胞因子的产生的能力。由 T 抑制细胞在靶位点释放的免疫调节性细胞因子被认为是 TGF- β (Miller 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:421, 1992)。在耐受期间可以产生的其它因子是细胞因子 IL-4 和 IL-10、以及介体 PGE。相反,经历主动免疫破坏的组织中的淋巴细胞分泌如 IL-1、IL-2、IL-6 和 IFN γ 等细胞因子。因此,修饰粒子的功效可通过测量它刺激适当类型的细胞因子的能力来评价。

[0065] 有鉴于此,可以使用动物模型系统来进行用于修饰粒子、有效粘膜结合组分、有效组合、或粘膜施用的有效模式和时程的快速筛选测试。用测试粒子组合物处理动物的粘膜表面,并且有时通过施用致病性抗原或感染性病原体对动物进行激发。分离脾脏细胞,并在浓度为约 50 μ g/mL 的致病性抗原或来源于感染性病原体的抗原存在下活体外培养。可以通过标准免疫测定来定量分泌至培养基中的细胞因子。

[0066] 粒子抑制细胞活性的能力可使用从用修饰的粒子免疫的动物分离的细胞,或通过创造对致病性抗原或病毒抗原靶抗原可反应的细胞系来测定 (Ben-Nun 等, Eur. J. Immunol. 11:195, 1981)。在此实验的一个变形中,轻度照射抑制细胞群(约 1000 至 1250 拉德)以防止增殖,将抑制细胞与应答细胞一起培养,并且然后使用氘化胸苷掺入法(或 MTT)来定量应答细胞的增殖活性。在另一个变形中,在双腔 transwell 培养系统 (Costar, Cambridge Mass.) 的上层和下层中培养抑制细胞群和应答细胞群,所述培养系统允许细胞群在相互由聚碳酸酯膜隔开 1mm 内共孵育 (W093/16724)。在这种方法中,照射抑制细胞群是不必要的,因为应答细胞的增殖活性可单独测量。

[0067] 施用的用于治疗特定疾病的组合物和模式的有效性还可以在相应的动物疾病模型上进行阐述。在适合于所用的模型的疾病的循环生物化学和免疫学标志、受影响的组织的免疫组织学、以及总体临床特征的层面上监测所述治疗减弱或延迟疾病症状的能力。可用于测试的动物模型的非限制性实例包括在以下部分内。

[0068] 本发明涵盖通过调节 TH1 反应、TH2 反应、Th17 反应、或这些反应的组合来调节耐受性。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 的任意组合的表达。通常 TH2 反应的增加(减少)将包括 IL-4、IL-5、IL-10、或 IL-13 中至少一个的表达的增加(减少);更通常 TH2 反应的增加(减少)将包括 IL-4、IL-5、IL-10、或 IL-13 中至少两个的表达增加(减少),最通常 TH2 反应的增加(减少)将包括 IL-4、IL-5、IL-10、或 IL-13 中至少三个的增加,而理想地 TH2 反应的增加(减少)将包括 IL-4、IL-5、IL-10、和 IL-13 中全部的表达的增加(减少)。调节 TH17 涵盖改变例如 TGF- β 、IL-6、IL-21 和 IL-23 的表达以及 IL-17、IL-21 和 IL-22 的效应水平。

[0069] 对自身抗原和自身免疫性疾病的耐受是通过多种包括胸腺中自身反应性 T 细胞的负选择的机制,以及那些逃脱胸腺清除并在外周中发现的自身反应性 T 细胞的外周耐受的机制来达成。提供外周 T 细胞耐受的机制的实例包括自身抗原的“忽视”、对自身抗原无反应或不应答、细胞因子免疫偏离、以及活化诱导的自身反应性 T 细胞的细胞死亡。此外,调节性 T 细胞已经显示参与介导的外周耐受。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,失去(或破坏)对自身抗原的外周耐受并且接着发生自身免疫反应。例如,在 EAE 的动物模型中,显示通过 TLR 先天性免疫受体使抗原呈递细胞 (APCs) 活化会破坏自身耐受性并导致诱发 EAE (Waldner 等 (2004) *J. Clin. Invest.* 113:990-997)。

[0070] 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、和 / 或 TLR7/8/9 依赖性细胞刺激的方法。如本文所述的,施用特定修饰粒子导致 DC 或 APC 的抗原呈递,同时抑制与免疫刺激性多核苷酸有关的 TLR7/8、TLR9、和 / 或 TLR7/8/9 依赖性细胞反应。这种抑制可包括一种或多种 TLR 相关性细胞因子的水平降低。

[0071] 如上文所讨论的,本发明提供具有可用于治疗 Mac-1 和 LFA-1 介导的病症的生物特性的新颖化合物。

[0072] 因此,在本发明的另一个方面,提供了包含羧化粒子并任选地包含药学上可接受的载剂的药物组合物。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另外的治疗剂。或者,本发明的修饰粒子可与施用一种或多种其它治疗剂组合施用给有需要的患者。例如,用于联合施用或包含于具有本发明的化合物的药物组合物中的另外的治疗剂可以是已批准的消炎剂,或者它可以是在食品与药品管理局 (Food and Drug Administration) 正在进行批准的多种药剂中的任一种,这些药剂最终获得批准用于治疗任何特征为不受控制的炎症性免疫反应或细菌性或病毒性感染的病症。还应了解,本发明的某些修饰的粒子可以以游离形式存在用于治疗,或适当时以其药学上可接受的衍生物形式存在。

[0073] 本发明的药物组合物另外包含药学上可接受的载剂,本文所用的载剂包括适于所希望的特定剂型的任何及所有溶剂、稀释剂、或其它液体媒剂、分散剂或助悬剂、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) 公开了用于配制药组合物各种载剂以及其已知制备技术。除非任何常规载剂介质与本发明的化合物不相容,诸如因产生任何不希望的生物效应,或者另外以有害的方式与药物组合物的任何其它组分相互作用,否则预期其使用是在本发明的范围内。可以用作药学上可接受的载剂的材料的一些实例包括但不限于,糖如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉状黄芪胶;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂如可可油和栓剂蜡;油如花生油、棉籽油;红花油、芝麻油;橄榄油;玉米油和大豆油;二醇;如丙二醇;酯如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂如氢氧化镁和氢氧化铝;褐藻酸;无热原质水;等渗盐水;林格氏 (Ringer's) 溶液;乙醇、和磷酸盐缓冲溶液、以及其它无毒相容性润滑剂如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、释放剂、涂布剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以根据配制者的判断而存在于组合物中。

[0074] 用于口服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、糖浆和酞剂。除活性化合物之外, 液体剂型还可包含本领域中常用的惰性稀释剂, 例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1, 3- 丁二醇、二甲基甲酰胺、油 (具体来说, 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、和脱水山梨糖醇脂肪酸酯、以及其混合物。除惰性稀释剂之外, 口服组合物还可以包含佐剂, 如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂以及芳香剂。

[0075] 可注射制剂, 例如无菌注射水性或油性悬浮液可根据已知的技术使用合适的分散剂或润湿剂和助悬剂来配制。无菌可注射制剂还可以是在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, 在 1, 3- 丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的媒剂和溶剂包括水、林格氏溶液、U. S. P. 以及等渗氯化钠溶液。此外, 无菌的不挥发性油常用作溶剂或悬浮介质。出于这个目的, 可使用任何无刺激性的不挥发性油, 包括合成的单甘油酯或双甘油酯。此外, 脂肪酸如油酸可用于制备可注射剂。

[0076] 例如, 可通过截留细菌的过滤器过滤, 或通过并入灭菌剂来对可注射制剂进行灭菌, 呈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的无菌固体组合物的形式。

[0077] 为了延长药物的作用, 经常需要减慢皮下注射或肌肉内注射的药物的吸收。这可以通过使用水溶性较差的液体悬浮液或结晶性或无定型材料来实现。药物的吸收速率因此取决于它的溶解速率, 而溶解速率又可以取决于结晶尺寸和结晶形式。或者, 胃肠外施用的药物形式的延迟吸收通过将药物溶解或悬浮于油性媒剂中来实现。可注射储槽形式是通过在生物可降解聚合物如聚丙交酯 - 聚乙交酯中形成药物的微囊基质来制备。视药物与聚合物的比率和所用特定聚合物的性质而定, 可以控制药物释放的速率。其它生物可降解的聚合物的实例包括 (聚 (原酸酯) 和聚 (酸酐))。储槽可注射制剂还可以通过将药物截留于与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备。

[0078] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂以及颗粒剂。在所述固体剂型中, 将修饰的粒子与至少一种以下材料混合 : 惰性的药学上可接受的赋形剂或载剂, 如柠檬酸钠或磷酸二钙, 和 / 或 a) 填充剂或增量剂, 如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇、以及硅酸, b) 粘合剂, 如羧甲基纤维素、褐藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖以及阿拉伯胶, c) 保湿剂, 如甘油, d) 崩解剂, 如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐、以及碳酸钠, e) 溶解阻滞剂, 如石蜡, f) 吸收促进剂, 如季铵化合物, g) 润湿剂, 如十六烷醇和单硬脂酸甘油酯, h) 吸附剂, 如高岭土和膨润土, 以及 i) 润滑剂, 如滑石粉、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。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下, 剂型还可以包含缓冲剂。

[0079] 相似类型的固体组合物还可以在使用如乳糖 (lactose) 或乳糖 (milk sugar) 以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂的软或硬填充式明胶胶囊中用作填充剂。片剂、糖衣丸剂、胶囊剂、丸剂以及颗粒剂的固体剂型可以制备成具有包衣和外壳, 如肠溶包衣和药物配制领域中众所周知的其它包衣。它们可以任选地包含乳浊剂并且还可以具有使它们仅在或优先在肠道的某一部分中任选地以延迟方式释放活性成分的组成。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物和蜡。相似类型的固体组合物还可以在使用如乳糖 (lactose) 或乳糖

(milk sugar) 的赋形剂以及高分子量聚乙二醇等的软或硬填充式明胶胶囊中用作填充剂。

[0080] 修饰的粒子还可以呈具有一种或多种上文所述的赋形剂的微囊化形式。片剂、糖衣丸剂、胶囊剂、丸剂以及颗粒剂的固体剂型可以制备成具有包衣和外壳,如肠溶包衣、释放控制包衣以及药物配制领域中众所周知的其它包衣。在所述固体剂型中,可将活性化合物与至少一种惰性稀释剂如蔗糖、乳糖以及淀粉混合。所述剂型在正常实践中还可以包含除惰性稀释剂外的其它物质,例如压片润滑剂以及其它压片助剂,如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,剂型还可以包含缓冲剂。它们可以任选地包含乳浊剂,并且还可以具有使它们仅在或优先在肠道的某一部分中任选地以延迟方式释放修饰粒子的组成。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。

[0081] 本发明涵盖本发明的修饰粒子的药学上可接受的局部制剂。本文所使用的术语“药学上可接受的局部制剂”意思是对于通过将制剂涂覆到表皮上来皮内施用本发明的修饰粒子是药学上可接受的任何制剂。在本发明的某些实施方案中,局部制剂包含载剂系统。药学上有效的载剂包括但不限于,溶剂(如醇、多元醇、水)、乳膏、洗剂、软膏、油、膏药、脂质体、散剂、乳液、微乳液以及缓冲溶液(如低渗或缓冲盐水)或本领域已知用于局部施用药物的任何其它载剂。业内已知载剂的更完整清单由本领域的标准参考著作提供,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版,1980和第17版,1985,两个版本都是由Mack Publishing Company, Easton, Pa. 出版,其公开内容以引用的方式整体并入本文。在某些其它实施方案中,本发明的局部制剂可包含赋形剂。任何本领域已知的药学上可接受的赋形剂都可用于制备本发明的药学上可接受的局部制剂。可包含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、润肤剂、缓和剂、缓冲剂、增溶剂、其它渗透剂、皮肤保护剂、表面活性剂、和推进剂、和/或与修饰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、丁基化羟基茴香醚、生育酚、以及螯合剂,如EDTA和柠檬酸。合适的润肤剂包括但不限于,甘油、山梨糖醇、聚乙二醇、尿素以及丙二醇。用于本发明的合适的缓冲剂包括但不限于,柠檬酸缓冲液、盐酸缓冲液以及乳酸缓冲液。合适的增溶剂包括但不限于,季铵氯化物、环糊精、苯甲酸苄酯、卵磷脂、以及聚山梨醇酯。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、二甲基硅油、甘油、凡士林、以及氧化锌。

[0082] 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,包括待治疗的病状、本发明化合物和存在的其它赋形剂的物理化学特征、它们在制剂中的稳定性、可用的制造设备、以及成本限制。本文所用的术语“渗透增强剂”意思是能够转运药理学活性化合物穿过角质层并进入表皮或真皮而优选地几乎没有或没有全身吸收的试剂。已经评估了多种化合物在增强药物渗透穿过皮肤方面的效果。参见,例如,Percutaneous Penetration Enhancers, Maibach H. I. 和 Smith H. E. (编著), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1995), 其调查了不同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)。在某些示范性实施方案中,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(例如芦荟凝胶)、乙醇、异丙醇、辛基苯基聚乙二醇、油酸、聚乙二醇400、丙二醇、N-癸基甲基亚砷、脂肪酸酯(例如豆蔻酸异丙酯、月桂酸甲酯、单油酸甘油酯、以及丙二醇单油酸酯)以及N-甲基吡咯烷酮。

[0083] 在某些实施方案中,组合物可以呈软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、散剂、溶液、喷雾剂、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剂,该乳膏剂可进一步包含饱和或不饱和脂肪酸,如硬脂酸、棕榈酸、油酸、棕榈油酸、鲸蜡醇或油醇,硬脂酸特别优选。本发明的乳膏剂还可以包含非离子型表面活性剂,例如聚氧-40-硬脂酸酯。在某些实施方案中,活性组分在无菌条件下与药学上可接受的载剂和可能需要时任何所需要的防腐剂或缓冲剂混合。眼用制剂、滴耳剂或滴眼剂也包括在本发明的范围内。此外,本发明涵盖使用具有提供化合物向身体的控制递送的附加优势的透皮贴片。这种剂型是通过将化合物溶解或分散于适当的介质中来制备的。如上文所讨论的,渗透增强剂还可以用来增加化合物穿过皮肤的流量。可以通过提供速率控制膜或通过化合物分散于聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0084] 可通过气雾剂来施用修饰的粒子。这是通过制备包含修饰粒子的水性气雾剂、脂质体制剂或固体粒子来实现的。可以使用非水性(例如碳氟化合物推进剂)悬浮液。

[0085] 通常,水性气雾剂是通过配制药剂与药学上可接受的常规载剂或稳定剂一起的水性溶液或悬浮液而制成。载剂和稳定剂随着具体化合物的要求而变化,但通常包括非离子型表面活性剂(吐温(Tweens)、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、氨基酸如甘氨酸、缓冲剂、盐、糖或糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备。

[0086] 应了解的是,可以配制本发明的修饰粒子和药物组合物并且在组合疗法中使用,即,化合物或药物组合物可以与一种或多种其它所希望的治疗剂或医学程序一起配制或与其同时、在其之前或之后施用。用于组合方案中的疗法(治疗剂或程序)的具体组合将考虑到所希望的治疗剂和/或程序与待达成的所希望的治疗效果的相容性。还应了解的是,所用疗法对于同样的病症可以达成所希望的效果(例如,可以同时施用本发明的化合物与另一种消炎剂),或者它们可以达成不同的效果(例如控制任何不良作用)。

[0087] 在某些实施方案中,包含本发明的修饰粒子的药物组合物进一步包含一种或多种其它治疗活性成分(例如,消炎剂和/或姑息剂)。出于本发明的目的,术语“姑息剂”是指着重于减轻疾病症状和/或治疗方案的副作用但并非治愈的治疗。例如,姑息性治疗涵盖止痛药、防晕药、以及止吐药。

[0088] 本发明提供调节个体,优选为哺乳动物,更优选为人的免疫反应的方法,其包括对个体施用本文所述的修饰粒子。由本发明提供的免疫调节方法包括遏制和/抑制先天性免疫反应或适应性免疫反应的方法,所述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。

[0089] 施用足够调节免疫反应的量的修饰粒子。如本文所述,免疫反应的调节可以是体液的和/或细胞的,并且使用本领域的以及本文所述的标准技术进行测量。

[0090] 在某些实施方案中,个体罹患与不希望的免疫活化有关的病症,例如过敏性疾病或病状、过敏症和哮喘。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。

[0091] 在某些实施方案中,个体罹患与不希望的免疫活化有关的病症,如动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤、以及心肌梗塞。

[0092] 在某些实施方案中,个体罹患与不希望的免疫活化有关的病症,例如自身免疫性疾病或炎症性疾病。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。

[0093] 自身免疫性疾病可以分为两大类:器官特异性和全身性。自身免疫性疾病包括但不限于,类风湿性关节炎(RA)、全身性红斑狼疮(SLE)、I型糖尿病、II型糖尿病、多发性硬化症(MS)、免疫介导的不孕如卵巢功能早衰、硬皮病、修格兰氏(Sjogren's)病、白癜风、秃头症(脱发)、多腺体衰竭、格拉夫氏(Grave's)病、甲状腺机能减退、多肌炎、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、包括克罗恩氏(Crohn's)病和溃疡性结肠炎在内的炎症性肠病、包括与乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)相关的肝炎在内的自身免疫性肝炎、垂体机能减退、移植物抗宿主疾病(GvHD)、心肌炎、爱迪生氏(Addison's)病、自身免疫性皮肤病、葡萄膜炎、恶性贫血、以及甲状旁腺功能减退。

[0094] 自身免疫性疾病还可以包括但不限于,桥本氏(Hashimoto's)甲状腺炎、I型和II型自身免疫性多腺体综合征、副肿瘤性天疱疮、大疱性类天疱疮、疱疹样皮炎、线状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、混合型原发性冷凝球蛋白血症、儿童慢性大疱性疾病、溶血性贫血、血小板减少性紫斑、古德帕斯丘氏(Goodpasture's)综合征、自身免疫性嗜中性粒细胞减少症、重症肌无力、伊顿-兰姆伯特二氏(Eaton-Lambert)肌无力综合征、强直人综合征、急性播散性脑脊髓炎、格林-巴雷二氏(Guillain-Barre)综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多神经根神经病、有传导阻滞的多灶性运动神经病、有单克隆丙种球蛋白病的慢性神经病、眼球斜视痉挛综合征、小脑退化、脑脊髓炎、视网膜病、原发性胆汁性硬化症、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、多肌炎/皮炎、混合型结缔组织病、白塞氏(Bechet's)综合征、银屑病、结节性多动脉炎、过敏性脉管炎和肉芽肿病(许尔-施特劳斯二氏(Churg-Strauss)病)、多血管炎重叠综合征、过敏性血管炎、魏格纳氏(Wegener's)肉芽肿病、颞动脉炎、高安氏(Takayasu's)动脉炎、川崎氏(Kawasaki's)病、孤立性中枢神经系统血管炎、血栓闭塞性脉管炎、肉状瘤病、肾小球性肾炎、以及寒冷病。这些病状在医学领域是众所周知的,并且描述于例如Harrison's Principles of Internal Medicine,第14版,Fauci A S等编著,New York:McGraw-Hill,1998中。

[0095] 用于研究自身免疫性疾病的动物模型在本领域中是已知的。例如,表现出与人自身免疫性疾病最相似的动物模型包括自发地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,发生类似1型糖尿病的疾病的非肥胖糖尿病(NOD)小鼠以及易发生狼疮样疾病的动物,例如新西兰杂交种、MRL-Fas^{lpr}以及BXSb小鼠。已经诱发自免疫性疾病的动物模型包括但不限于,作为多发性硬化症的模型的实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)、作为类风湿性关节炎的模型的胶原蛋白诱发性关节炎(CIA)、以及作为葡萄膜炎的模型的实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU)。自身免疫性疾病的动物模型还已经通过遗传操作制造出来,并且包括例如用于炎症性肠病的IL-2/IL-10基因敲除小鼠、用于SLE的Fas或Fas配体基因敲除、以及用于类风湿性关节炎的IL-1受体拮抗剂基因敲除。

[0096] 在某些实施方案中,个体罹患细菌性感染或病毒性感染。患有细菌性感染或病毒

性感染的个体是具有现有细菌性感染或病毒性感染的可识别症状的个体。

[0097] 可用本发明的修饰粒子治疗的病毒性感染的非限制性清单包括疱疹病毒感染、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。优选的病毒是那些感染受试者的中枢神经系统的病毒。最优选的病毒是那些引起脑炎或脑膜炎的病毒。

[0098] 可用本发明的修饰粒子治疗的细菌性感染的非限制性清单包括葡萄球菌感染、链球菌感染、分支杆菌感染、芽孢杆菌感染、沙门氏菌感染、弧菌感染、螺旋菌感染、以及奈瑟氏球菌感染。优选的细菌是感染受试者的中枢神经系统的细菌。最优选的细菌是引起脑炎或脑膜炎的细菌。

[0099] 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。在其它实施方案中,本发明涉及使用本发明的组合物来抑制正发展的疾病。在一些实施方案中,本发明涉及改善受试者的疾病。改善受试者的疾病意思是包括治疗、预防或抑制受试者的疾病。

[0100] 在一些实施方案中,本发明涉及预防疾病的复发。例如,不希望的免疫反应可以发生在肽的一个区域(如抗原决定子)。与不希望的免疫反应相关的疾病的复发可能因在肽的不同区域具有免疫反应攻击而发生。由于本发明的羧化粒子没有连接的肽或抗原部分,因此粒子将有效针对多个表位。在一些包括MS和其它TH1/17介导的自身免疫性疾病在内的免疫反应病症中的T细胞反应可以是动态的,并且在复发缓解型和/或慢性进行性疾病的过程中进化。T细胞谱系的动态性质暗示可用于治疗某些疾病,因为靶标可以随着疾病发展而变化。在此之前,需要预先了解反应型态以便预测疾病的发展。本发明提供可以防止动态变化的疾病的作用,即“表位扩展”的功能的组合物。用于复发的已知模型是对蛋白质脂蛋白(PLP)的免疫反应作为多发性硬化症(MS)的模型。初始免疫反应可通过对PLP₁₃₉₋₁₅₁的反应而发生。随后的疾病发作可以通过对PLP₁₅₁₋₁₇₁的复发免疫反应而发生。

[0101] 本发明的某些实施方案涉及治疗与不希望的超敏反应相关的病理学病状。超敏反应可以是I、II、III以及IV型中的任一种。速发型(I型)超敏反应。施用的频率通常与过敏原暴露的时机相对应。合适的动物模型在本领域是已知的(例如,Gundel等,Am. Rev. Respir. Dis. 146:369, 1992;Wada等,J. Med. Chem. 39, 2055, 1996;以及W096/35418)。

[0102] 本发明的其它实施方案涉及移植。这是指组织样品或移植物从供体个体转移到接受个体,并且经常对需要组织以便恢复由所述组织提供的生理学功能的人接受者进行。移植的组织包括(但不限于)完整器官如肾脏、肝脏、心脏、肺;器官组分如皮肤移植物和眼角膜;以及细胞悬浮液如骨髓细胞和从骨髓或循环血液选择并扩增的细胞培养物,以及全血输血。

[0103] 任何移植的严重潜在并发症将因宿主接受者与移植组织之间的抗原性差异而发生。根据差异的性质和程度,可能存在宿主对移植物或移植物对宿主进行免疫攻击的风险,或两者都可能发生。通过追踪受过相似治疗的具有相似表型的受试者的群体中的反应型态,并且根据公认的临床程序使各种可能的贡献因素相关联来确定风险的程度。免疫攻击可能是预先存在的免疫反应(如预先形成的抗体)的结果,或者是大致在移植时起始的免疫反应(如产生TH细胞)的结果。抗体、辅助性T(TH)细胞、或细胞毒性T(Tc)细胞可能参与相互之间和与各种效应分子和细胞的任何组合。然而,免疫反应中所涉及的抗原通常并不知道,因此在设计抗原特异性疗法或诱导抗原特异性耐受方面造成困难。本发明的修

饰粒子特别适用于预防器官排斥反应,因为不需要连接的肽或抗原与修饰粒子偶联来使粒子有效诱导耐受或改善炎症性免疫反应。

[0104] 本发明的某些实施方案涉及减小宿主抗移植疾病,从而引起接受者对组织移植物的排斥反应的风险。可执行治疗来预防或减少超急性排斥反应、急性排斥反应或慢性排斥反应的影响。优选在移植之前足够长的时间开始治疗,以使得耐受性在安置移植时即就位;但是在这样不可能的情况下,可以与移植同时或在移植之后开始治疗。不管开始的时间如何,治疗通常将在移植之后定期持续至少一个月。如果出现移植物的充分适应则可能不需要后续剂量,但是如果存在移植排斥或炎症的任何迹象则可以重新开始。当然,本发明的耐受程序可与其它形式的免疫抑制组合以达成甚至更低水平的风险。

实施例

[0105] 提供以下实施例以便进一步说明本发明的优势和特征,但是不欲限制本发明的范围。

[0106] 材料和方法

[0107] 病毒增殖

[0108] 如先前所述 (Getts 等, J Neurochem. 103:1019, 2007), 西尼罗河病毒 (Sarafend 株) 来源于新生小鼠的脑并且用于以每个细胞 5 个病毒噬斑形成单位 (PFU) 的感染倍率下感染汇合的 vero 细胞单层, 将细胞与病毒一起在 37°C 下孵育 40 个小时, 随后将它们冷冻。然后将烧瓶解冻并且通过离心澄清富含病毒的上清液, 之后将等分试样在 -70°C 下储存直至使用。

[0109] 小鼠和感染

[0110] 从西澳大利亚州的动物资源中心获得八至十一周龄的雌性 C57BL/6 (CD45. 2) 和同类系的 B6. SJL-Ptprc^aPep3^b/BoyJ (CD45. 1) 小鼠。从澳大利亚昆士兰州的转基因动物资源中心获得 C57BL/6-7. 2fms-EGFP 转基因 (CD45. 2) 小鼠。所有程序都是在悉尼大学动物伦理学委员会的允许下进行的。在 hepa 过滤器的顶笼中在 II 类生物危害条件下圈养所有的动物。随意地提供食物和水。

[0111] 如先前所述用无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS; Gibco BRL, California, USA) 中的 6×10^4 PFU WNV 进行高剂量鼻内感染。对于低剂量感染, 对小鼠接种 6×10^3 PFU WNV。通过仅用无菌 PBS 接种小鼠来进行模拟感染。(Getts 等, J Neurochem. 103:1019, 2007; Wacher 等, J Virol. 81:860, 2007)。

[0112] 感染后每天两次称量小鼠。在麻醉下通过使用 40ml 的冰冷 PBS 进行心脏灌注而将小鼠处死。对于组织学来说, 可用 20ml 的在 PBS 中的 4% 多聚甲醛 (Sigma Aldrich, St Louis, USA) 进一步灌注小鼠。

[0113] 测定病毒滴度的病毒蚀斑测定

[0114] 为测定组织样品中活病毒的滴度, 可使用应用易感染病毒的 BHK 细胞 (由澳大利亚堪培拉的 John Curtin Medical School 的 Guna Kapuriah 友情捐赠) 的病毒蚀斑测定。如先前所述 (Getts 等, J Neurochem. 103:1019, 2007), 可以从动物剖离组织样品并且用功率匀浆器 (Tissue Tearor, Biospec, Bartles, OK, USA) 解离。简而言之, 在洛斯维派克纪念研究所 (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培养基 (RPMI; CSL Biosciences) 中制

备澄清的组织匀浆的五倍稀释液,并且将其用于感染 6 孔板中的汇合 BHK 细胞 (1×10^6 个细胞在 2mL 的 RPMI 中接种过夜)。

[0115] 将细胞在 37°C 下孵育 1 小时,之后通过抽吸去除接种物。用 3ml 的含 1.5%(w/v) 低胶凝度琼脂糖 II (Amresco, Solon, OH, USA) 的 2X 最低必需培养基 (MEM; GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) 将孔覆盖。将细胞在 37°C 下再孵育 3 天,之后将它们用 3ml 的 10% 福尔马林 (Co.) 固定 2 小时,随后去除琼脂糖块。使用 3% 结晶紫 (Hopkins and Williams, Essex, England) 染料于 20% 甲醇 (Fronine, Riverstone, NSW, Australia) 中的溶液对固定细胞进行染色。使用菌落计数器 (IUL S. A., Barcelona, Spain) 对病毒蚀斑进行计数,并且通过因式分解病毒蚀斑数量、接种物体积以及样品稀释度来确定最终的每克 (组织) 的 PFU。

[0116] 产生嵌合小鼠

[0117] 如先前所述 (Getts 等, J Neurochem. 103:1019, 2007), 以一次剂量的 950 拉德照射六至八周龄的 B6. SJL-Ptprc^aPep3^b/BoyJ (CD45. 1) 小鼠。十二个小时以后,用 10^7 个来自 C57BL/6-7. 2fms-EGFP 供体的骨髓细胞复原小鼠。照射后在饮用水中对小鼠给予 10 天的磺胺甲噁唑 (Sigma Aldrich) 和甲氧苄啶 (Sigma Aldrich)。如上文所述,将小鼠在照射后六周用 WNV 感染。使用流式细胞术检查嵌合现象并且始终发现 96-99% 的如先前证明的供体来源 (Getts 等, J Neurochem. 103:1019, 2007)。

[0118] 静脉内注射微珠

[0119] 从 Polyscience, NY, USA 获得 $0.5 \mu\text{m}$ 、 $0.05 \mu\text{m}$ 、以及 $3 \mu\text{m}$ FITC 或 Bright Blue (BB) Fluoresbrite 裸聚苯乙烯微珠和羧化聚苯乙烯微珠。从 Phosphorex, MA, USA 获得聚 (乳酸-共-乙醇酸) (PLGA) 裸微珠和羧化微珠。

[0120] 在无菌 PBS 中稀释微珠,并且将 $300 \mu\text{l}$ 静脉内注射到感染或模拟感染的小鼠的尾静脉中。对于高剂量存活研究 (6×10^4 PFU WNV 鼻内),从感染后的第 6 天开始,对小鼠每天给予一剂微珠。需要时,对小鼠每天再给予注射直到体重重新稳定。对于低剂量存活研究 (6×10^3 PFU WNV 鼻内),从感染后第 6 天开始,或者当记录到显著的体重减轻 (总体重的 4-6%) 时对小鼠注射微珠。对小鼠每天注射一次 $300 \mu\text{l}$ 的微珠,持续 5 天或直到体重重新稳定。对于组织收集,在感染后第 6 天或者当记录到显著的体重减轻时,对 6×10^4 或 6×10^3 注射的小鼠注射 $300 \mu\text{l}$ 微珠,并且在需要时进行淘汰。采集器官进行如下文所述的组织免疫化学、流式细胞术、病毒蚀斑测定以及细胞因子分析。

[0121] 免疫组织学

[0122] 对从 C57BL/6 和 cFMS-EGFP (在 B6. SJL-Ptprc^aPep3^b/BoyJ 中) 嵌合体收集到的脑、脾脏、肝脏、肺以及肾脏中执行荧光免疫组织化学 (IHC)。灌注后,在 4°C 下将器官在 4% 多聚甲醛中固定 4 小时,并且然后在 30% 蔗糖中浸泡过夜,随后于最佳切削温度化合物 (OCT; Tissue-Tek, Tokyo Japan) 中冷冻。在恒冷箱切片机中切割八微米组织切片并风干。在添加根据制造商说明使用的基于酪胺的放大系统 (TSA 试剂盒; Perkin Elmer, Belgium) 下,如先前所述进行荧光 IHC (Getts 等, J Exp Med. 29:2319, 2007)。用 DAPI 抗褪色剂 (Vector) 对组织切片进行复染色,随后观测。

[0123] 显微镜和图像获取

[0124] 在 Olympus BX-51 显微镜 (Olympus, Japan) 上使用 DP-70 照相机和 DP 管理 2. 2. 1

软件 (Olympus) 获取图像。

[0125] 自脑和肝脏分离白细胞

[0126] 如先前所述 (Getts 等, J Exp Med. 29:2319, 2007), 通过在 37°C 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) 将脑消化 60 分钟, 从灌注 PBS 的小鼠的脑中获取白细胞。用 10% 的 FCS 停止消化, 并且使匀浆通过 70 μ m 尼龙细胞过滤器 (Becton Dickinson, NJ, USA)。将在 340 \times g 下离心 10 分钟之后获得的集结块重新悬浮在 30% Percoll (Amersham, Norway) 中并且在 80% Percoll 上分层。在室温下以 1140 \times g 离心 25 分钟之后, 从 30%/80% 界面收集白细胞。还使用相同的方案来从肝脏获取白细胞, 其中在处理之前对组织称重。

[0127] 从脾脏、血液和骨髓分离白细胞

[0128] 对于流式细胞术分析, 剖离右股骨, 并且使用装有 PBS 的注射器洗出骨髓细胞。对于骨髓前体分离, 要用到至少 4 只小鼠的股骨和胫骨。将冲洗后得到的细胞悬浮液通过 70 μ m 细胞过滤器过滤, 并在 340g 下离心 5 分钟。使所得集结块中的红血球在基于 NH_4Cl 的红细胞溶解缓冲液 (BD Pharm Lyse™; BD Pharmingen) 中溶解, 随后在 340 \times g 下离心 5 分钟。在外周血液的情况下, 通过心脏穿刺来收集血液, 并且立即转移到柠檬酸盐缓冲液 (mMol, Sigma Aldrich) 中。所得悬浮液在 70% Percoll 上分层, 并且在解除制动下在室温下以 1140 \times g 离心 20 分钟。收集界面, 并且将细胞在 PBS 中洗涤一次, 以 340 \times g 离心。对于分离脾脏白细胞, 将脾脏通过 7070 μ m 细胞过滤器并以 340g 离心 5 分钟。使所得集结块中的红血球在基于 NH_4Cl 的红细胞溶解缓冲液 (BD Pharm Lyse™; BD Pharmingen) 中溶解, 随后在 340 \times g 下离心 5 分钟。

[0129] 流式细胞术

[0130] 将从脑、肝脏、血液以及骨髓中 (如上文所述) 收集到的细胞在 PBS 中洗涤, 并用抗 CD16/CD32 抗体 (Biolegend) 阻断。使用通常显示 >95% 细胞活力的台盼蓝排斥实验计算活细胞数。

[0131] 测量细胞表面分子的表达, 并且在装备有氩离子和氦氖激光的 FACS ARIA (Becton Dickinson) 中进行细胞分选。活细胞群由前向散射和侧向散射来闸控, 并且通过其后的前向闸控测定标识的荧光细胞群。使用鉴别相关细胞群的特定荧光和散射数据来进行分选。将分选严格性设置为纯度对于骨髓细胞群要达到 >98% 的纯度。

[0132] 使用流式细胞仪程序 Flow Jo (FlowJo, Ashland, OR, USA) 对获取的 FACS 数据文件进行分析。基于分析中的流式细胞仪百分比和来自每个器官的绝对细胞计数计算相关细胞群的定量。

[0133] 过继转移

[0134] $\text{Ly6C}^{\text{hi}}/\text{cFMS-EGFP}^+/\text{CD11b}^+$ 和 $\text{Ly6C}^{\text{lo}}/\text{Cfms-EGFP}^+/\text{CD11b}^+$ 细胞群都是从第 6 天鼻内 WNV 感染的小鼠中分选而来。将 Ly6C^{hi} BM 用 10mM 细胞示踪橙色染料 (CMTMR[5-(和 -6)-(((4-氯甲基) 苯甲酰基) 氨基) 四甲基罗丹明]-混合异构体; Invitrogen) 标记。离心分选的细胞, 并在 1ml 含有 10 μ M CMTMR 的 PBS 中培育。将细胞染色 10 分钟, 随后用 10% FCS 停止反应。将细胞在 50ml PBS 中洗涤至少三次。然后将标记的 CMTMR Ly6C^{hi} BM 细胞与 Ly6C^{lo} 细胞以 1:1 混合, 所述 Ly6C^{lo} 细胞除了添加 CMTMR 外, 还已经以类似于 Ly6C^{hi} 细胞群的方式进行了处理。将总共 2×10^6 个 BM 细胞静脉内注射到第 6.5

天 WNV 感染或模拟感染的 Ly5.1-C57BL/6 同类系小鼠体内。这之后立即静脉内注射 300ul BB 聚苯乙烯微珠。12 小时后,如上文所述采集脑、脾脏以及肝脏。使用流式细胞术来调查供体细胞的存在,两者都使用 cFMS-EGFP 和 CMTM 细胞示踪橙色染料。

[0135] 多路 ELISA

[0136] 根据制造商说明 (Quansys Biosciences, Logan, Utah, USA) 进行多路板 ELISA。简而言之,使脑、脾脏以及肝脏组织在 PBS 中均质化、通过 $1000 \times g$ 旋转使之澄清、并且在 -20°C 下储存直到进行测定。还使用血清样品。将解冻的样品和标准物在提供的缓冲液中稀释,并且将各 $30 \mu\text{l}$ 涂铺在含有 16 个点的各孔中,其中每个点含有特定可溶性蛋白质的捕捉抗体。然后将板在轨道振荡器上 120r.p.m 下孵育 1 小时。将板洗涤 3 次,并且将 $30 \mu\text{l}$ 的检测抗体添加到每个孔中并再孵育一小时。洗涤 3 次之后,添加抗生蛋白链菌素-HRP 并再孵育 15 分钟。然后将板洗涤 6 次,并添加底物混合物。立即在 CCD 成像机 (Kodak, Rochester NY, USA) 上读取各板。使用 Quansys Q-view 软件 (Quansys Biosciences) 分析板图像。

[0137] 实验性自身免疫性脑炎 (EAE) 的诱发和评估

[0138] 向 C57BL/6 小鼠皮下注射含有 0.1mg MOG 肽 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK ;Auspep, Parkville, Victoria, Australia ;>95%HPLC 纯度) 的乳液和含有 2mg/mL 肺结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) (Sigma Aldrich) 的完全弗氏佐剂。两天之后,对小鼠腹膜内施用 $500 \mu\text{l}$ 百日核毒素 (Sigma Aldrich)。监测小鼠的疾病发展并按以下量表来评级: 1,尾巴无力和/或 1 条后肢虚弱;2,一条以上肢体虚弱,步态紊乱;3,1 条肢体麻痹;4,一条以上肢体麻痹,失禁;5,垂死。

[0139] 诱发由巯基乙酸酯诱发的腹膜炎

[0140] 通过注射 1ml 溶解在 PBS 中的巯基乙酸酯 (4%(w/v) ;Sigma Alrich) 诱发腹膜炎。对通过颈脱位法处死的小鼠执行腹膜内灌洗。简而言之,将 5ml 腹膜灌洗缓冲液 (PLB ;含有 0.5mM EDTA (Fronine) 和 9.9 单位/ml 的肝素 (Sigma Aldrich) 的 PBS) 注射到腹膜中。轻柔按摩腹膜,随后将 PLB 吸入到 10ml 注射器中。重复这个过程两次。然后将灌洗液在 PLB 中增加到 50ml 并以 $340 \times g$ 旋转 5 分钟。如上文所述制备用于流式细胞术的细胞。

[0141] 统计学

[0142] 制作图表,并分别在 GraphPad Prism 和 InStat (两个程序都来自 GraphPad 软件, San Diego, CA, USA) 中进行计算机统计分析。根据数据,进行不成对双尾学生 t 检验或有 Tukey-Kramer 后检验的单因素方差分析,其中 $P < 0.05$ 视为显著。

[0143] 对于如体重减轻、浸润以及病毒滴度等参数之间的相关性分析,在二阶多项式 ($Y = A + B \cdot X + C \cdot X^2$) 的情况下使用非线性回归 (曲线拟合)。

[0144] 实施例 1

[0145] WNV 脑炎的高剂量和低剂量模型的表征

[0146] 用 6×10^4 PFU WNV 鼻内高剂量感染 C57BL/6 小鼠导致感染后第 7 天死亡率为 100% (图 1A)。我们先前已经显示是来源于循环 $\text{Ly}6\text{c}^{\text{hi}}$ 单核细胞前体 (Getts 等, J Exp Med. 29:2319, 2007) 的巨噬细胞和迁移小胶质细胞从感染后第 5 天开始浸润到 WNV 感染的脑中。T 细胞、NK 细胞和嗜中性粒细胞也从这个时间点往后进入 CNS,其中在感染后第 7 天可见到浸润峰值。(图 1F-H, 图 2A-D) 脑病毒滴度也从感染后第 5 天开始以指数方式增长,

在感染后第 7 天达到高水平（图 1C），并且感染小鼠的体重从感染后第 5 天开始显著降低，直到死亡（图 1B）。

[0147] 以少 10 倍的病毒即 6×10^3 PFU 鼻内接种小鼠产生亚致死结果。当比较独立实验时，死亡率发生一些变化，其范围在 40-60% 之间（图 1A）；然而，始终显示体重减轻百分比和病毒滴度 / 浸润之间具有强相关性（图 1B-H, 图 2A-E）。每天监测小鼠体重证明是预测个体感染结果的可靠方法，并且指示何时小鼠需要干预以便在感染中存活（图 1B）。

[0148] 在接种 6×10^3 WNV 后没有减轻体重的小鼠未死于感染，并且对随后以 6×10^4 再感染免疫（图 1A-B）。这些小鼠在初次感染或高剂量再感染时未显示包括体重减轻在内的任何疾病症状。相反地，与模拟感染对照组的正常波动相比体重量显著减轻的小鼠（通常在 24 小时的时间段内体重减轻 >4%）通常继续损失体重，通常持续 2-3 天，随后发生死亡。在脑炎的这个模型中，死于感染的大部分小鼠在感染后的第 6 天和第 11 天之间开始损失体重，并且在感染后第 16 天之前发生死亡。这些小鼠相比于第 7 天用 6×10^4 感染的小鼠，在 TOD 时在脑中显示高病毒滴度（图 1C）。

[0149] 与在 6×10^4 和 6×10^3 感染的小鼠的脑中的白细胞浸润比较的流式细胞术已经揭示，在感染后第 7 天的体重减轻百分比与总的白细胞（图 1F）、巨噬细胞（图 1H）、迁移小胶质细胞（图 2A）、T 细胞（图 2C）和 NK 细胞（图 2E）的浸润具有强相关性，并且显示体重减轻与嗜中性粒细胞迁移（2D）之间具有一定程度的相关性。不出意外，在所有小鼠中 $CD45^{10}$ 小胶质细胞的数量保持相对不变，因为这个群体主要包括脑的常驻小胶质细胞（图 2B）。

[0150] 为了进一步研究感染的低剂量模型，每天称重 6×10^3 感染的小鼠，并在第 0 天至第 14 天将其处死，并采集脑用于流式细胞术和病毒蚀斑测定。在死亡时的体重减轻百分比和病毒滴度（图 2F）或白细胞浸润（图 2G）之间显示出一定程度的相关性。然而，病毒滴度和白细胞浸润之间的比较揭示，一些小鼠具有高病毒滴度而没有显著的浸润（图 2H），并且虽然这些小鼠中的一些也损失显著量的体重，但其它小鼠并没有（图 2F）。因为必须处死小鼠来测定脑中的病毒滴度，所以尚不清楚脑中具有病毒而没有显著的体重减轻或白细胞浸润的这些小鼠是否在没有显示体重减轻或浸润的情况下清除病毒，或者所见到的高病毒滴度是否是在脑浸润 / 体重减轻之前。

[0151] 实施例 2

[0152] 羧化微珠处理显著提高了 WNV 脑炎的高剂量和低剂量模型的存活率

[0153] 在文献中经常使用荧光微珠来追踪疾病的各种活体内模型中单核细胞子集的转运。然而，这些研究忽视了这些理论上“惰性的”微珠可能对单核细胞功能所具有的潜在影响，并且因而影响到疾病的结果。

[0154] 为了试图在 WNV 感染期间追踪单核细胞，我们使用裸聚苯乙烯微珠和羧化聚苯乙烯微珠两者，并且在疾病过程中发现意料之外的改变。以下数据揭示裸聚苯乙烯微珠和羧化聚苯乙烯微珠两者都使免疫细胞对脑的浸润显著减少，并且提升了感染小鼠的长期存活率。

[0155] 在感染后第 6 天对 6×10^4 WNV 感染的小鼠静脉内注射含 4.41×10^9 $0.5 \mu m$ 羧化聚苯乙烯微珠的 $300 \mu l$ PBS 在这种疾病致死模型中得到 10% 的小鼠长期存活（图 3A）。为了解存活率结果是否可以提高，我们也在感染后第 6 天将此相同浓度的微珠注射到用 6×10^3 的较低剂量感染的小鼠体内。然而，与 PBS 处理的对照组相比，这种策略使所处理小鼠的存

活率降低(图3B)。这些结果强调了微珠需要作为治疗,即当小鼠开始显示显著的体重减轻(我们已经表明这指示了高病毒滴度和白细胞群对脑的浸润(参见图1、2))时方才施用。

[0156] 因此,我们在低剂量感染模型中采取治疗方法来施用微珠。将小鼠每天称重(图3E-G),并且如果在24小时的时间段内检测到显著的体重减轻(相比于模拟感染的对照组的正常波动,通常>4%的总体重)则施用 4.41×10^9 羧化聚苯乙烯微珠。使用这种策略,我们能够使通常继续损失体重并且在没有干预下会死亡的小鼠的存活率增加60%(在独立实验中是40-80%)(图3D)。正如所料,损失体重并用PBS处理的所有小鼠继续损失体重并在2-4天后死亡(图3E, G)。在任何时候都没有损失显著量的体重的小鼠显示与PBS感染的对照组相似的体重稳定性(图3E-F)。

[0157] 在初始检测到显著体重减轻后连续5天用羧化微珠处理小鼠。在一些小鼠中,5天的微珠处理是足够的并且体重在停止注射微珠后保持稳定,并且这些小鼠在没有进一步干预的情况下在感染中存活下来(图4A-B)。然而,一些小鼠在5天后停止微珠处理时再次开始损失体重,因此重新开始处理直到体重再次稳定,并且这些小鼠也长期存活(图4C-D)。

[0158] 在感染后第9天对 6×10^3 WNV感染的小鼠的脑进行流式细胞术,所述小鼠在感染后第8天检测到显著的体重减轻时用羧化聚苯乙烯微珠或PBS进行了处理。在第8天也对没有损失体重的小鼠进行微珠或PBS处理作为实验的对照组。如图4D-L所示,在感染后第8天没有损失体重但是以微珠(图4H-I)或PBS(图4D-E)处理的小鼠显示没有单核细胞来源的巨噬细胞或迁移小胶质细胞、T细胞、NK细胞或嗜中性粒细胞对脑的浸润,其中分离的主要细胞群是 $CD45^{lo/int} CD11b^+$ 常驻小胶质细胞。在感染后第8天体重减轻并且用PBS处理的小鼠中,在感染后第9天明显存在大量的脑浸润(图4F-G),其中主要细胞群是 $CD45^{hi}$ 炎症性单核细胞来源的巨噬细胞(图4L)。然而,在感染后第8天损失体重并用微珠处理的小鼠中,仍然存在显著的浸润,但是相比于PBS处理的小鼠大为减少(图4J-L)。需要重复对体重减轻时用微珠或PBS处理的 10^3 感染的小鼠进行流式细胞术,以显示当在感染后6-14天内对小鼠进行微珠处理时出现浸润减少。

[0159] 实施例3

[0160] 微珠的羧化对于WNV感染的小鼠的存活率的显著提高以及白细胞群的变化是关键的关键的

[0161] 在研究的这个阶段,尚不清楚微珠的羧化作用对于存活率中所见到的提高以及转运到脑中的白细胞的减少是否关键。当记录到显著的体重减轻时,对 6×10^3 WNV感染的小鼠注射含 4.41×10^9 裸微珠或羧化微珠的 $300 \mu l$ PBS或仅PBS。注射了羧化微珠的小鼠显示存活率显著提高60%,而裸微珠处理的小鼠显示低得多的25%的提高(图5A)。未损失体重的小鼠不处理,并且在没有干预下在感染中存活下来,而损失体重并用PBS处理的小鼠在感染后第14天全部死亡(图5B-D)。在这些小鼠中监测体重减轻直到感染后第20天;没有损失显著量的体重的小鼠显示与PBS感染的对照组相似的稳定型态(数据未显示),而用羧化微珠或裸微珠(图5B-C)处理的小鼠最终稳定并且存活,或继续损失体重并在2-4天后死亡。损失体重并用PBS(B, D)处理的所有小鼠继续损失体重并在2-5天后死亡。

[0162] 为了研究白细胞群的变化并确定何种细胞可能发现与羧化微珠或裸微珠缔合,对用 6×10^4 PFU WNV感染的小鼠进行流式细胞术。在感染后第6天对小鼠注射在 $300 \mu l$ PBS

中静脉内递送的 $4.41 \times 10^9 0.5 \mu\text{m}$ 羧化 FITC 微珠或裸 FITC 微珠或单独的 PBS。将小鼠在感染后第 7 天处死,并且收集血液、脑、骨髓、肝脏以及脾脏用于流式细胞术。

[0163] 可以通过流式细胞仪 (Ex/Em Max441/486nm) 检测“游离”微珠以及与 CD45^+ 白细胞缔合的微珠。正如所料,在 PBS 处理的对照组 (图 5E-G) 的血液中检测不到微珠,但是可以在裸 (图 5H-J) 和羧化 (图 L-M) 微珠处理的小鼠中见到微珠。当微珠是羧化的时它们似乎更有效地被清除,并且仍然保留在循环中的那些中的很多与 CD45^+ 白细胞缔合 (图 5O),相比之下,裸微珠 (图 5K) 主要是“游离的”。这个数据表明,羧化作用在一定程度上促进白细胞从循环中摄取微珠,相比之下,一些裸微珠在注射后 24 小时仍然在循环中保持“游离”。

[0164] 脑的流式细胞术揭示在用羧化微珠或裸微珠处理的小鼠的脑中白细胞群的减少方面存在一些显著差异。在感染后第 7 天,即处理后的第 1 天 (图 6A-C) 在脑中检测不到羧化微珠或裸微珠,这表明摄取微珠的细胞未进入感染的 CNS。在裸微珠和羧化微珠处理的小鼠的脑中白细胞的总数与 PBS 处理的对照组相比显著减少,总的巨噬细胞和小胶质细胞也一样 (图 6D)。然而,只有羧化微珠使这些小鼠脑中 T 细胞和 NK 细胞的数量减少。巨噬细胞的 Ly6c^{hi} 和 $\text{Ly6c}^{\text{lo/int}}$ 细胞群两者都因两种微珠处理而显著减少,并且 Ly6c 细胞的小细胞群中没有见到变化。对于 CD45^{int} 活化小胶质细胞, Ly6c^{hi} 子集的减少仅在羧化微珠处理的情况下见到,但是 $\text{Ly6c}^{\text{lo/int}}$ 和 Ly6c 子集的减少在两种微珠处理的情况下都能见到。在 $\text{Ly6c}^{\text{hi}} \text{CD45}^{\text{lo}}$ 静止小胶质细胞的小子集中没有见到变化,然而两种微珠处理都使 $\text{Ly6c}^{\text{lo/int}}$ 和 Ly6c 子集显著减少。

[0165] 脾脏的流式细胞术揭示在此器官中很多微珠被白细胞摄取,并且在处理之间存在细胞群的一些有趣的差异。如图 7A-I 所示,微珠 + 细胞主要是 CD11b^+ 、 CD11c^+ 和 Ly6c^+ 。

[0166] 进一步分析显示,发现三个主要的相关子集可在脾脏中摄取微珠 -- CD11b^+ 、 CD11c 单核细胞 (图 7J、M、P)、 CD11b^+ 、 CD11c^+ “髓性”树突状细胞,主要为 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ (图 7K、N、Q)、以及 CD11b^- 、 CD11c^+ 树突状细胞,主要为 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ (图 7L、O、R)。

[0167] 这 3 个细胞群的增加在羧化微珠处理的小鼠的脾脏中也是明显的。在羧化微珠处理的小鼠中发现总 CD11b^+ 、 CD11c 单核细胞、以及总 $\text{Ly6c}^{\text{int/hi}}$ 、微珠 + $\text{Ly6c}^{\text{int/hi}}$ 和微珠 $\text{Ly6c}^{\text{int/hi}}$ 子集的增加 (图 8A)。在羧化微珠处理的情况下也发现总 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 、微珠 + $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 以及微珠 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 的增加。这些数据表明由于羧化微珠处理,单核细胞可以转运至脾脏,并且不仅募集微珠 + 细胞而且也募集微珠 细胞。

[0168] 发现在脾脏中的 $\text{CD11b}^+\text{CD11c}^+$ 树突状细胞的 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 细胞群摄取两种类型的微珠 (图 8B)。然而,只有羧化微珠增加脾脏中的 $\text{CD11b}^+\text{CD11c}^+$ 树突状细胞以及这些细胞中的 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 细胞群的总数。由于微珠 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 树突状细胞没有增加,因此显然只有微珠 + $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 树突状细胞在摄取羧化微珠之后转运到脾脏。可能这些细胞实际上是来源于 Ly6c^{hi} 炎症性单核细胞,所述单核细胞摄取循环中的微珠,转移到脾脏而不是转运到脑,在脾脏中随着它们分化成树突状细胞,它们向下调节 Ly6c 表达,并且向上调节 CD11c 表达。

[0169] 在脾脏中的 $\text{CD11b}^- \text{CD11c}^+$ 树突状细胞群的 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 细胞摄取两种微珠类型 (图 8C)。用羧化微珠处理见到 $\text{CD11b}^- \text{CD11c}^+$ 树突状细胞群,更具体来说是 $\text{Ly6c}^{\text{lo/}}$ 细胞的总数增加。在这个细胞群的微珠 + 和微珠 细胞中都见到增加,表明在脾脏中不仅微珠 + 细胞增加而且微珠 细胞也增加。这个细胞群可以包含脾脏常驻 DC、从外周募集而来的非髓性 DC,

还可以潜在性地由摄取了微珠、向下调节 CD11b 和 Ly6c 表达、并且向上调节 CD11c 表达的炎症性单核细胞组成。

[0170] 还发现在脾脏中微珠与小百分比的 B 细胞缔合,然而只有羧化微珠显著地增加脾脏中 B 细胞的数量(图 9A-D)。在脾脏中见到的仅有的其它显著增加是 CD8+T 细胞,而 CD4+T 细胞、NK 细胞、以及嗜中性粒细胞保持不变。

[0171] 还可以在肝脏中检测主要与表达 CD11b、CD11c 以及 Ly6c 的细胞缔合的微珠(图 10A-I)。对于脾脏,发现 CD11b⁺CD11c 单核细胞(图 10J)、CD11b⁺CD11c⁺(图 10K)以及 CD11b CD11c⁺(图 10L) 树突状细胞在肝脏中摄取微珠。然而,肝脏的任何白细胞群没有显著的增加或减少。在骨髓的 CD11b⁺CD11c⁺Ly6c⁺白细胞小群中也检测到少量微珠(图 11A-G)。然而,在骨髓的任何白细胞群中都没有发现显著的增加或减少。

[0172] 实施例 4

[0173] 当记录到显著的体重减轻时,对 6×10^3 WNV 感染的小鼠静脉内注射含低剂量 0.1% 微珠或高剂量 0.5% 微珠的 0.5、0.05、或 $3 \mu\text{m}$ 羧化聚苯乙烯微珠的 $300 \mu\text{l}$ PBS 或仅 PBS。用低剂量的 0.5、0.05、或 $3 \mu\text{m}$ 的微珠处理的小鼠在存活率方面显示相似的大约 40-50% 的提高(图 12A)。然而,高剂量处理的小鼠似乎对存活不利,提高低得多,为 20%。用高剂量微珠处理的大量小鼠显示出非典型的疾病症状,并且可以推断在几天内在要害器官中积累这样高剂量的微珠对于小鼠是有害的。重复此时程,其中有可能包括其它较低剂量的珠粒。还将在感染后第 6 天以不同尺寸的微珠处理的 6×10^4 WNV 感染的小鼠中执行流式细胞术。

[0174] 这些数据强调了上述事实,即羧化聚苯乙烯微珠不能在活体内分解,并且因此可能具有有限的治疗适用性。因此,我们获得 $0.5 \mu\text{m}$ 生物可降解的羧化或裸聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)球体(然而裸球体也包含少量的羧基)。当检测到显著的体重减轻时,对 6×10^3 WNV 感染的小鼠注射 4.41×10^9 $0.5 \mu\text{m}$ 的裸的或羧化的聚苯乙烯微珠或 PLGA 球体。如在图 12B 中可见,迄今为止,PLGA 裸球体或羧化球体显示在存活率方面与羧化聚苯乙烯微珠具有相似的提高。

[0175] 为了解在感染后第 6 天注射羧化 PLGA 球体是否减少第 7 天 6×10^4 WNV 感染的小鼠的脑的浸润,我们比较了用静脉内递送的 4.41×10^9 个粒子对小鼠进行的 PBS、 $0.5 \mu\text{m}$ 羧化微珠、 $0.5 \mu\text{m}$ 羧化 PLGA 球体、以及 $0.5 \mu\text{m}$ 羧化金刚石粒子处理。将脑、血液、脾脏以及肝脏处理用于流式细胞术。继续分析本实验,然而这些小鼠的脑的初步分析显示出所有的三种粒子成功地减少了免疫细胞对脑的浸润(图 12C)。还观察到脾脏中总白细胞增加,与我们在羧化微珠处理的小鼠中见到的结果一致。

[0176] 实施例 5

[0177] 在 T 细胞缺乏型小鼠中的微珠处理

[0178] 将 C57BL/6 野生型(WT)和 RAG(T 细胞缺乏型)小鼠用 6×10^4 或 6×10^3 PFU WNV 感染。用 6×10^4 的高剂量感染的 WT 小鼠在感染后第 7 天显示 100% 死亡率,而用相同剂量感染的 RAG 小鼠在感染后第 8 天开始死亡,并且一些小鼠活到了感染后第 13 天。用 6×10^3 的低剂量感染的 WT 小鼠在感染后第 8 天显示出 60% 的死亡率,但是在这个时间点之后有 40% 的长期存活。用这个相同剂量感染的 RAG 小鼠在感染后第 14 天之前都没有开始死亡,然而在第 16 天所有的 RAG 小鼠都死亡(图 13A-B)。这些数据表明 T 细胞在 WNV 的免疫病理学中起到直接或间接的作用,因为 T 细胞缺乏型小鼠比 RAGs 存活时间长。然而,还强调的一

点是 T 细胞对于控制病毒感染是关键的,因为所有的用低剂量感染的 RAG 小鼠死于疾病,然而 40% 的 WT 小鼠通过免疫存活下来。

[0179] 每天记录这些小鼠的体重减轻,并且显示在 RAGS 和 WT 小鼠中体重减轻发生在死亡之前(图 13B)。然而,观察到 WT 在初始体重减轻之后最多只活 2-3 天,而 RAGS 在体重减轻开始之后可活多达 5 天。从用 6×10^4 或 6×10^3 感染的 RAG 和 WT 小鼠采集的脑的病毒蚀斑测定揭示体重减轻百分比与病毒滴度强相关(图 12C)。通常,RAG 小鼠显示与 WT 小鼠相比在死亡时体重减轻更大和病毒滴度更高。似乎这可以归因于以下实情,即它们在初始体重减轻之后能够比 WT 小鼠存活更长,并且因此病毒继续在脑中增加,而小鼠在死亡时间之前继续损失体重,与在没有 T 细胞下不能控制病毒的结果直接相反。这个假设受到其中比较第 7 天 WT 和第 7/8 天 RAG 小鼠脑的脑流式细胞术(图 13D-E)。RAG 小鼠显示巨噬细胞、小胶质细胞、T 细胞(因为它们缺乏型的)、以及嗜中性粒细胞对脑的浸润显著减少,它们在感染后第 7 天和第 8 天之间没有增加。这可以解释为什么在免疫病理学是这些动物死亡的主要原因的情况下这些动物在初始体重减轻之后比 WT 小鼠存活更长。

[0180] 还用 6×10^3 PFU WNV 感染 RAG 和 WT 小鼠,并且每天称重,以测试在 T 细胞不存在的情况下羧化微珠的功效。在显著体重减轻(在 24 小时内 >4%)时,用以 300u1 体积静脉内递送的 4.41×10^9 个羧化微珠或 PBS 来处理小鼠。微珠注射未使 RAG 小鼠的存活率显著提高(图 12F)。微珠或 PBS 注射后,RAG 小鼠继续损失体重并在 2-5 天后死亡(图 12G)。需要再次重复这个实验以确认结果。

[0181] 实施例 6

[0182] EAE 的微珠处理

[0183] 用 MOG 和 CFA 佐剂诱发 C57BL/6 小鼠。在如通过步态、姿势和其它活动的变化所确定发展疾病症状时,每 8 个小时、每 16 个小时、每天或每 48 个小时静脉内施用羧化粒子。疾病的严重程度由疾病评分的变化来确定。输注粒子将预防单核细胞迁移到脑中并且后续 T 细胞诱发使得疾病评分显著降低。

[0184] 实施例 7

[0185] 动脉粥样硬化和新生内膜平滑肌细胞增殖的微珠处理

[0186] 用高脂肪饮食喂养 APO/E 缺乏型小鼠。从 4 周龄开始,每 8 个小时、每 16 个小时、每 24 个小时、每 48 个小时、每 72 个小时、每周一次、或每个月一次静脉内施用羧化粒子。疾病的严重程度由动脉组织结构的变化来确定。输注粒子将预防单核细胞迁移到动脉壁中,并且预防对于驱动血管平滑肌增殖和内膜斑块形成关键的后续免疫后遗症。

[0187] 虽然已经描述和说明了本发明的具体实施方案,但这些实施方案应该仅仅被认为是说明本发明,而非限制本发明,本发明是根据随附权利要求书来解释。

[0188] 本文所引用的所有专利、申请以及其它参考文献以引用的方式整体并入本文。

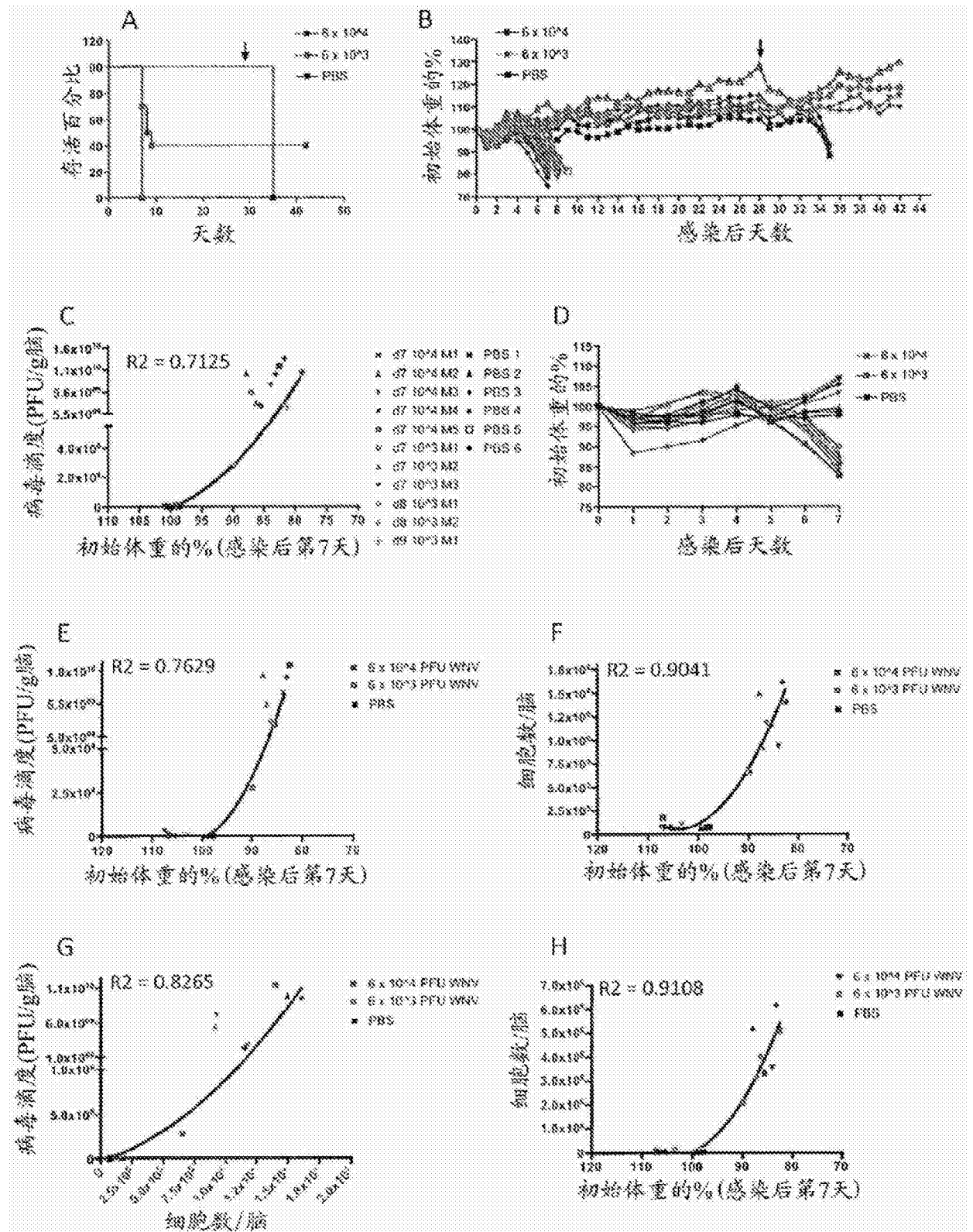


图 1

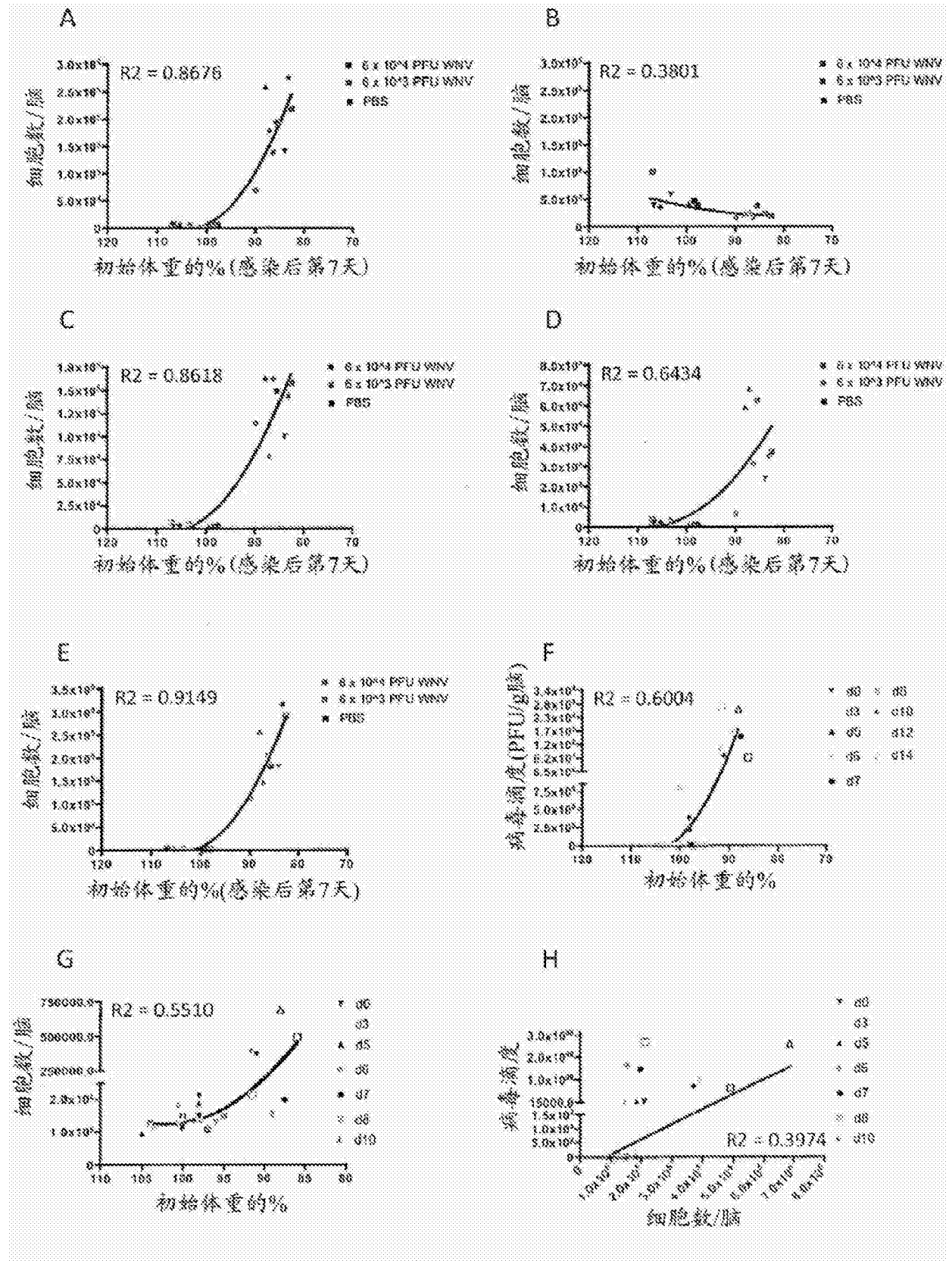


图 2

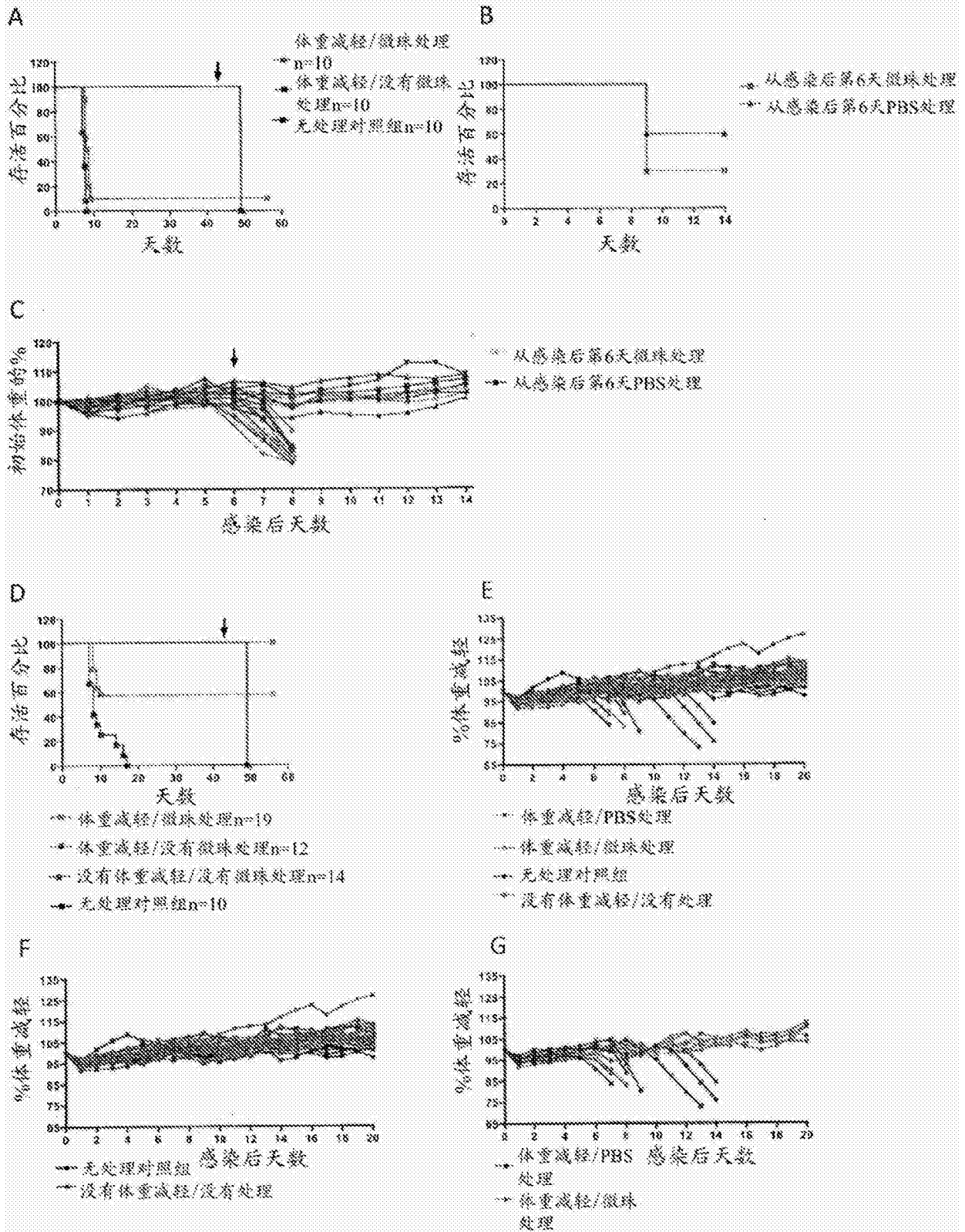


图 3

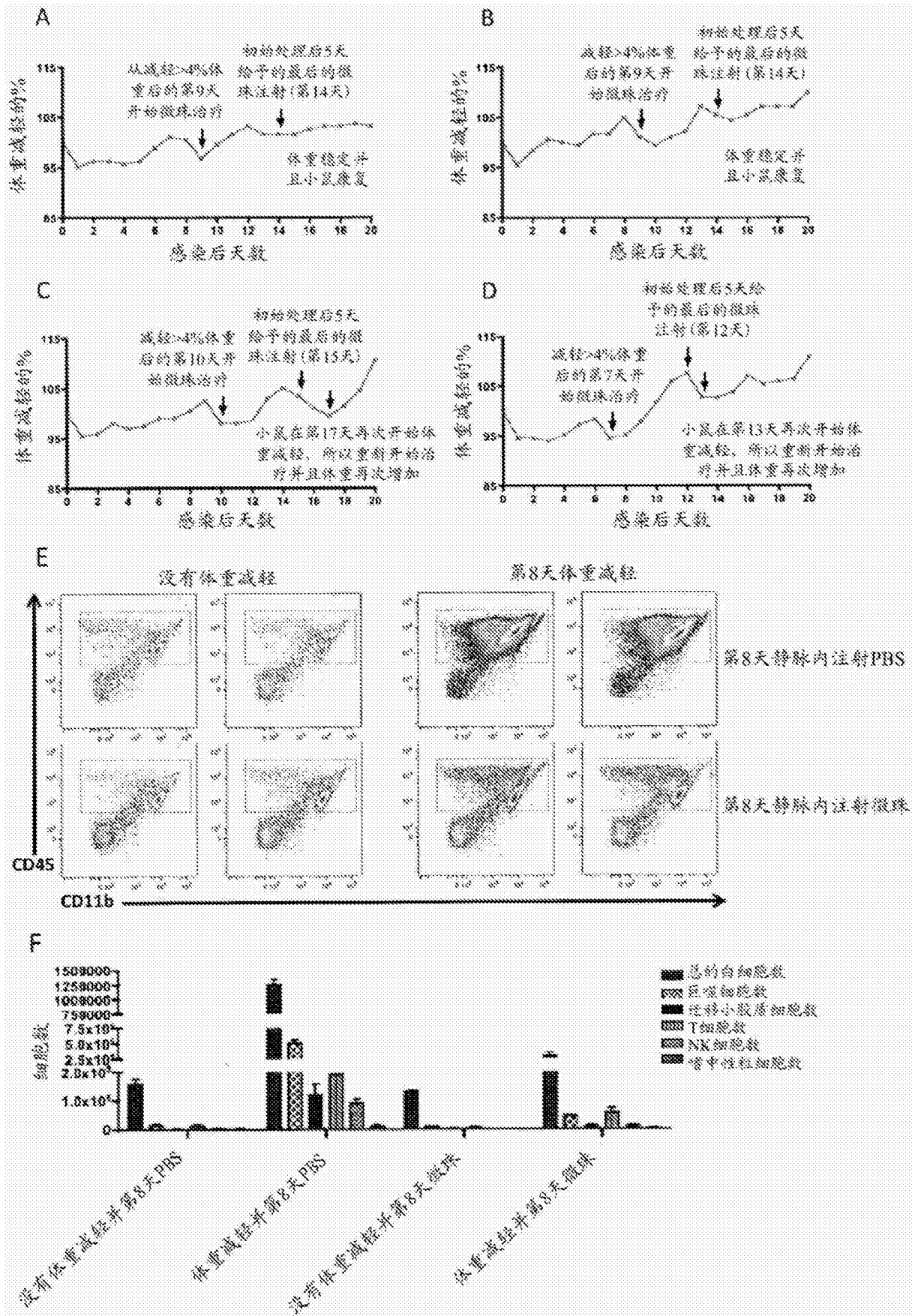


图 4

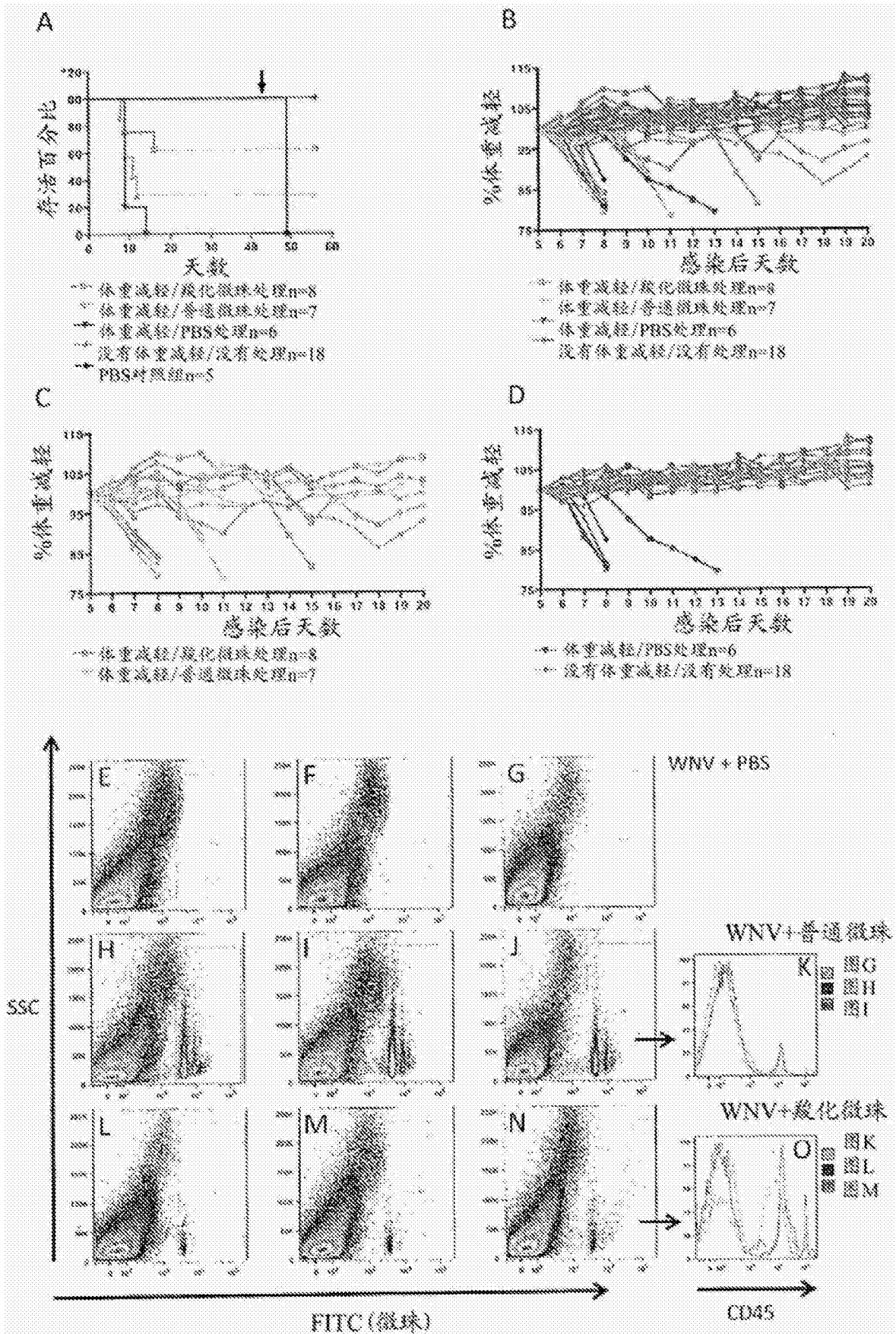


图 5

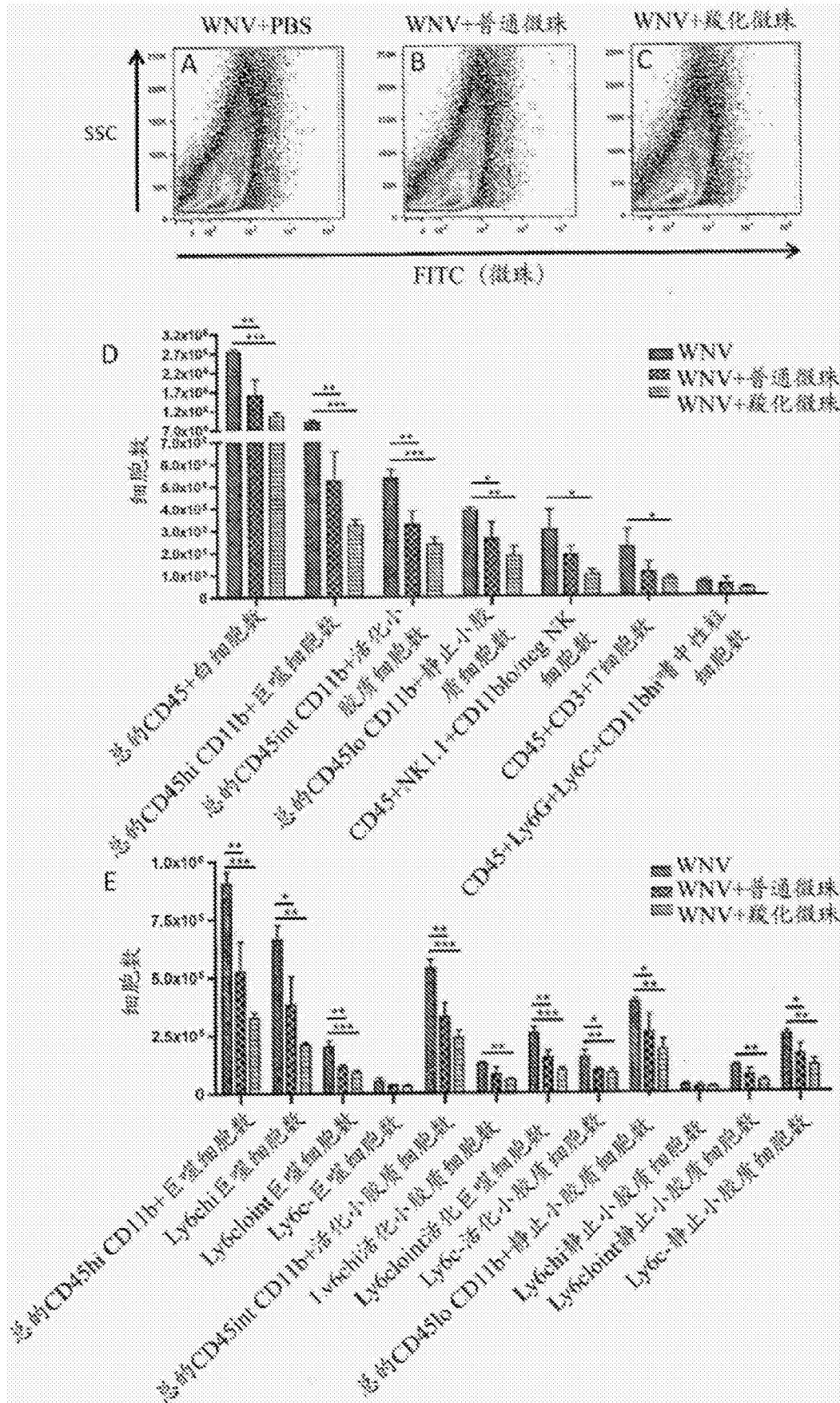


图 6

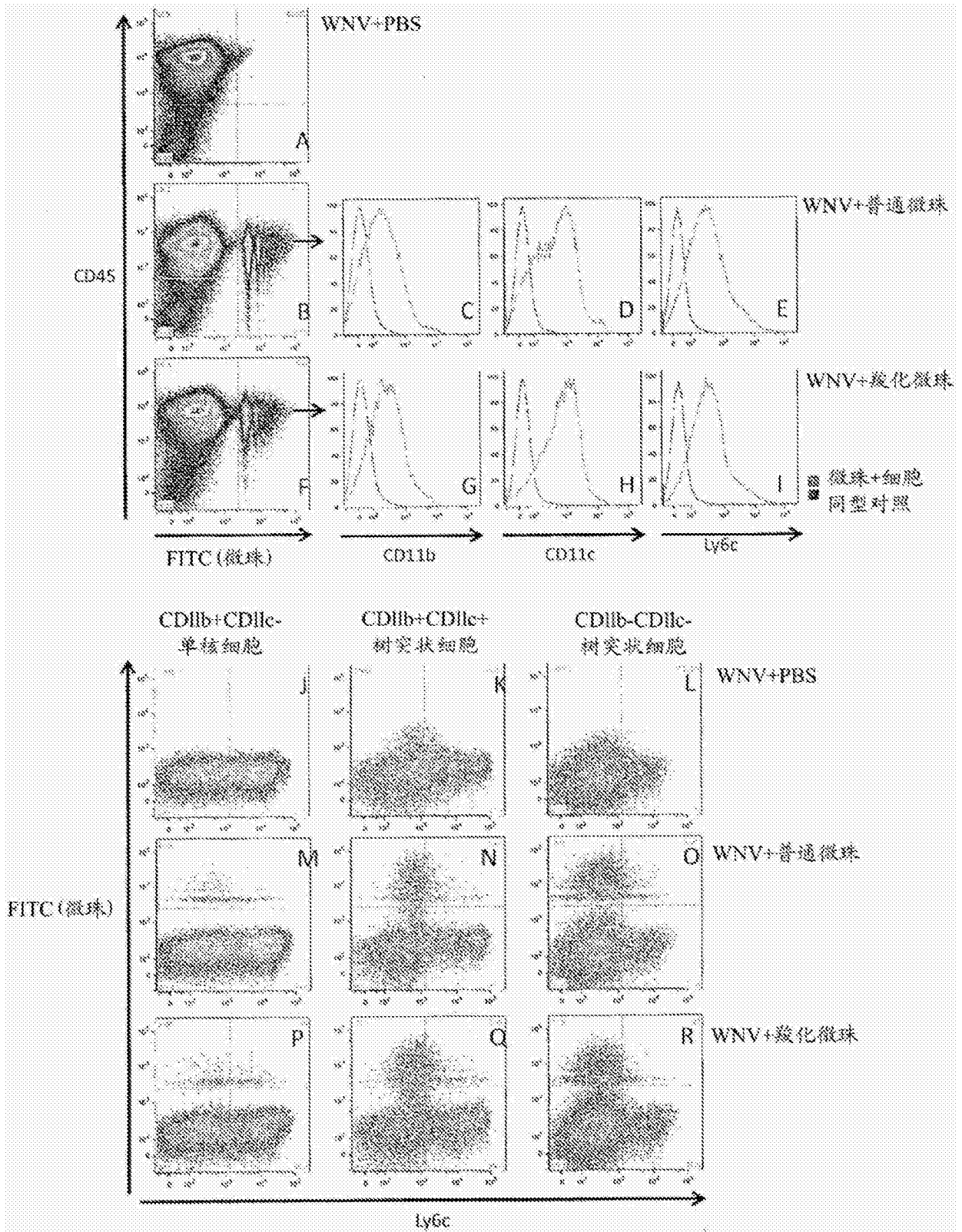


图 7

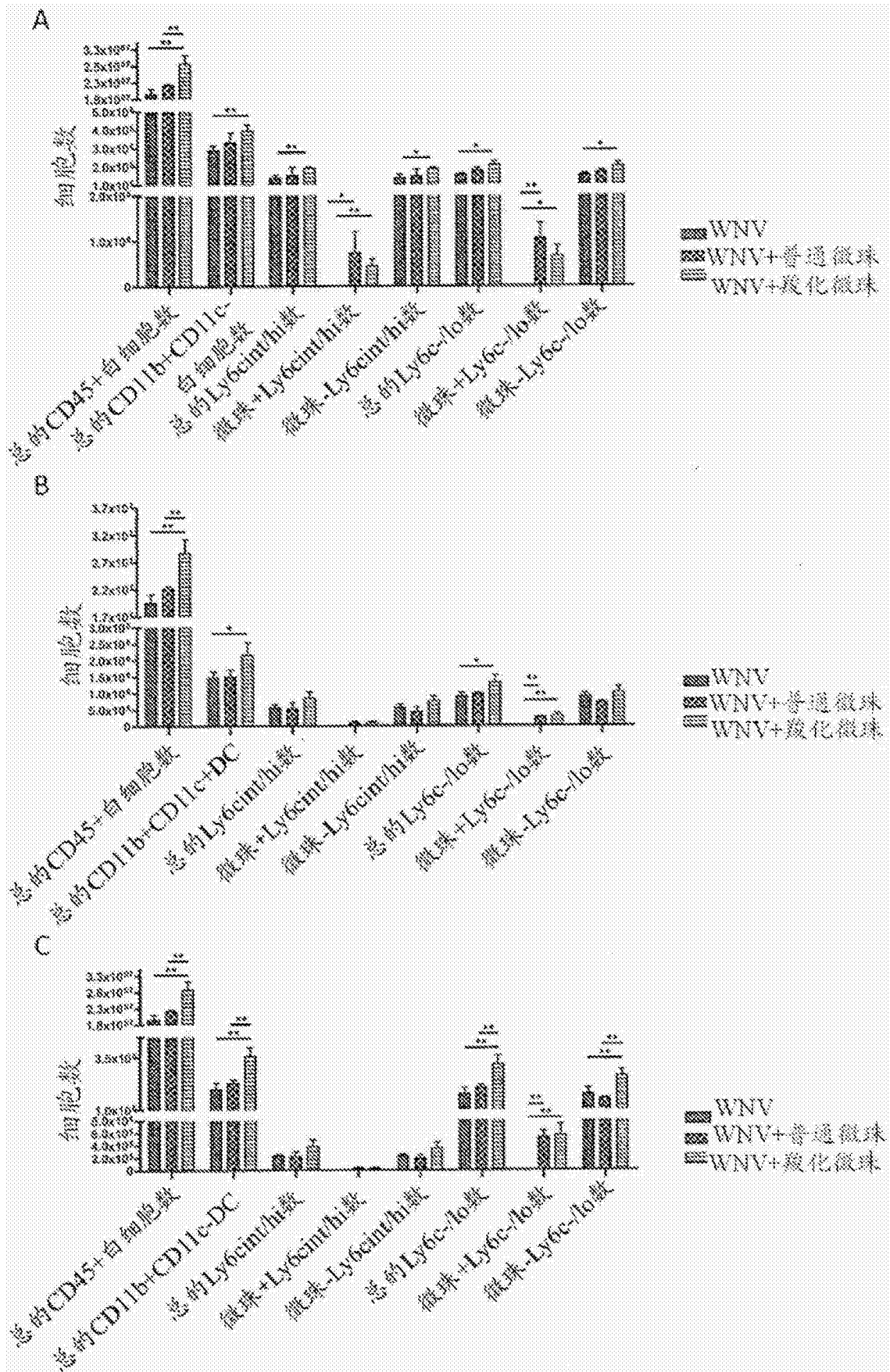


图 8

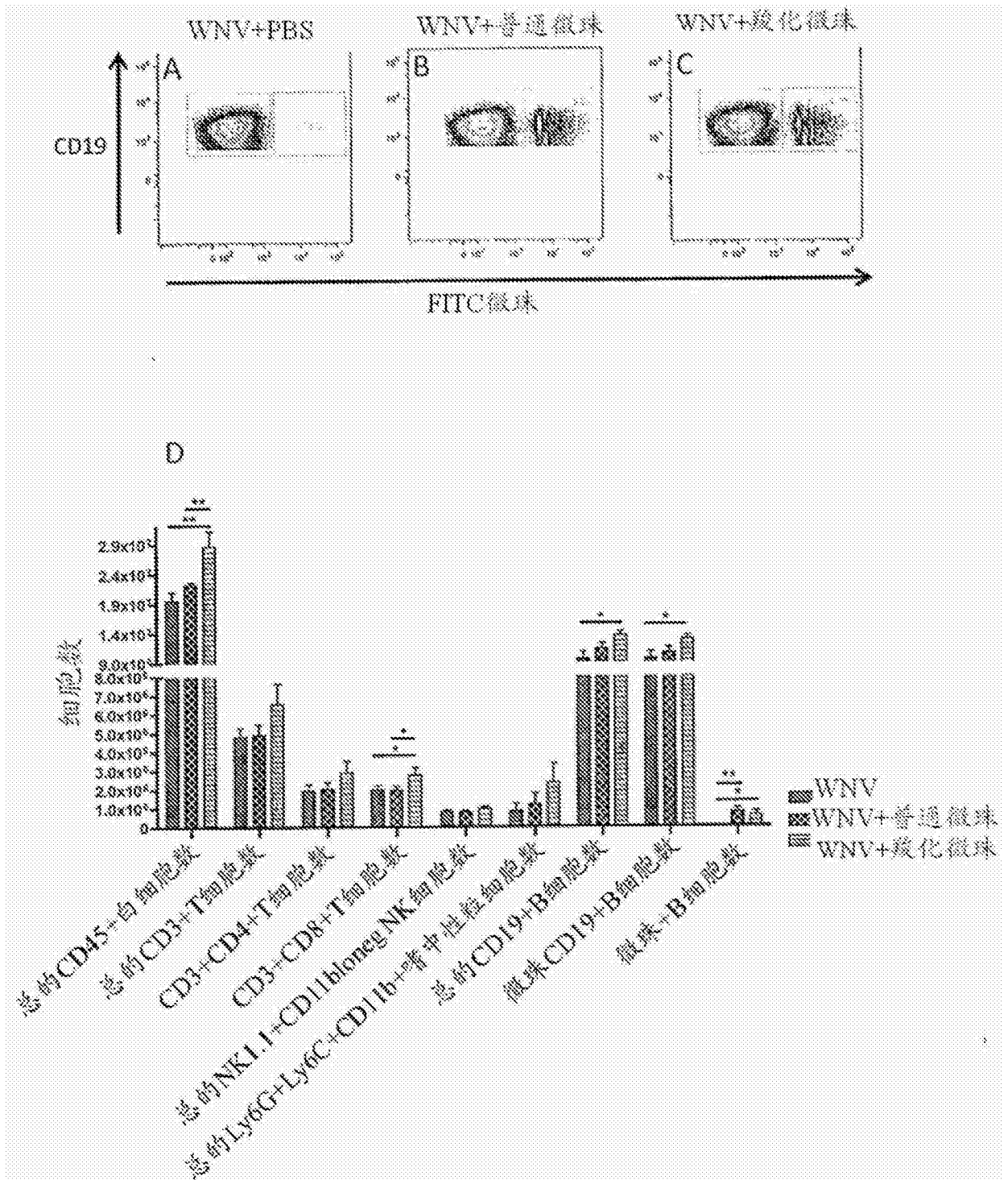


图 9

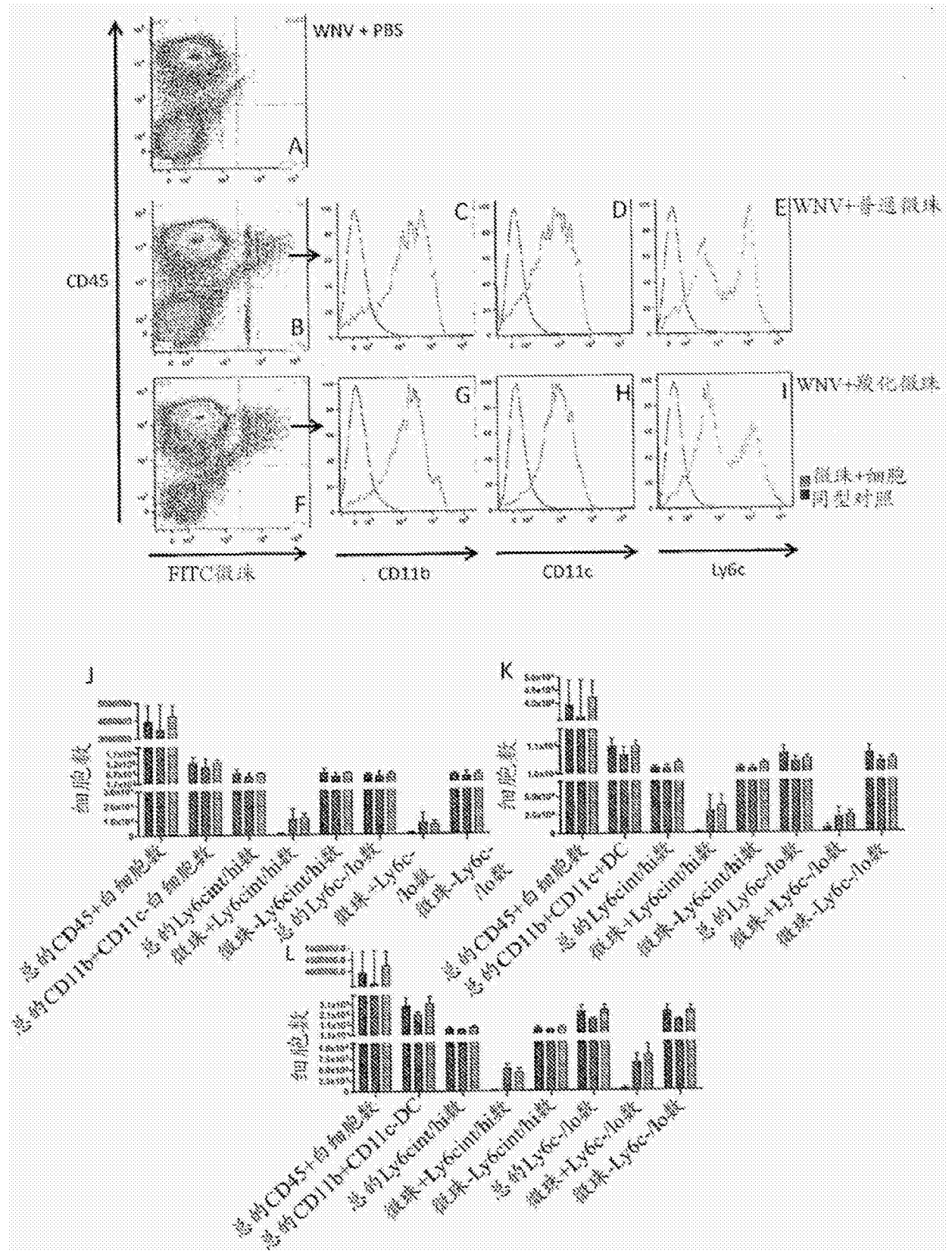


图 10

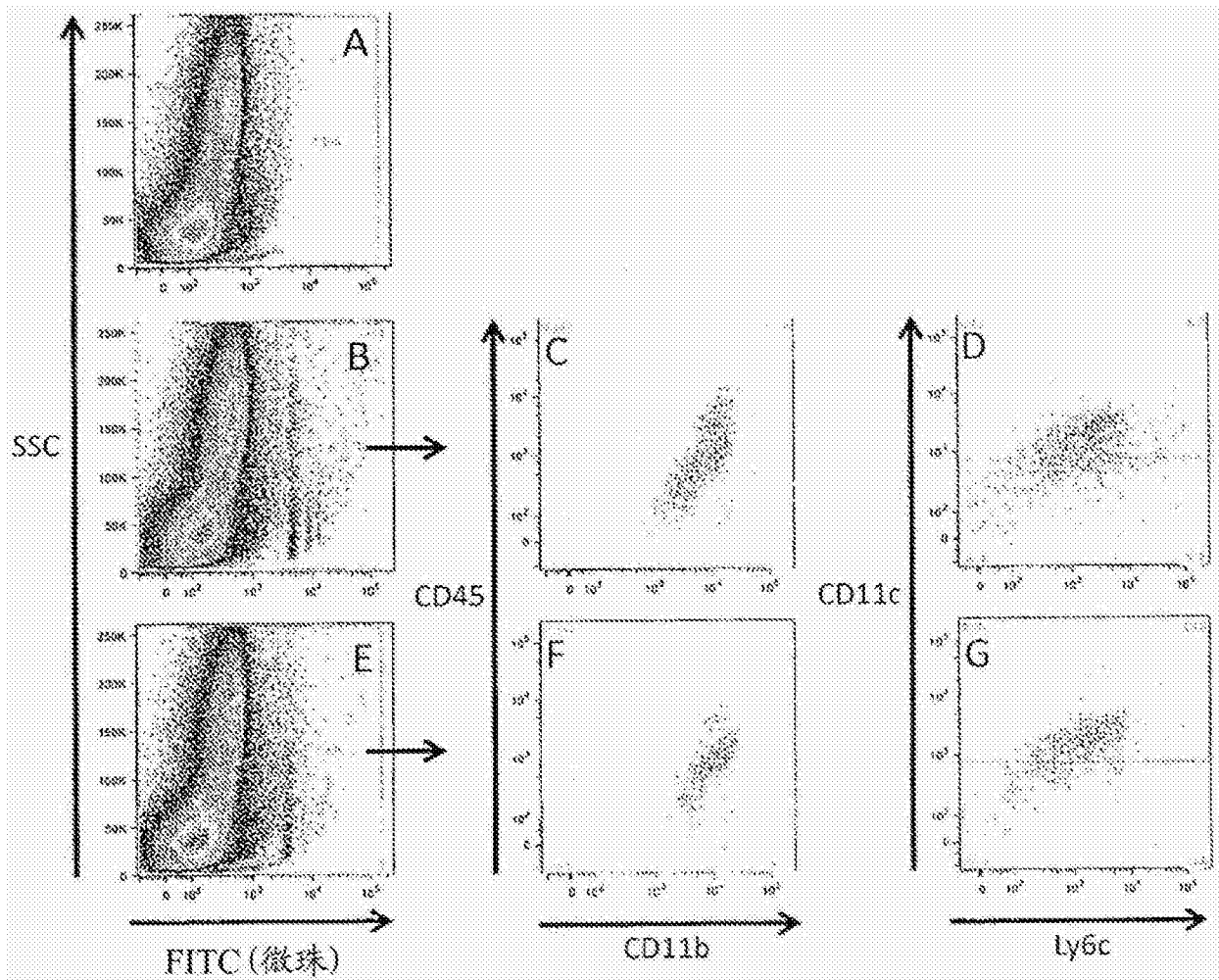


图 11

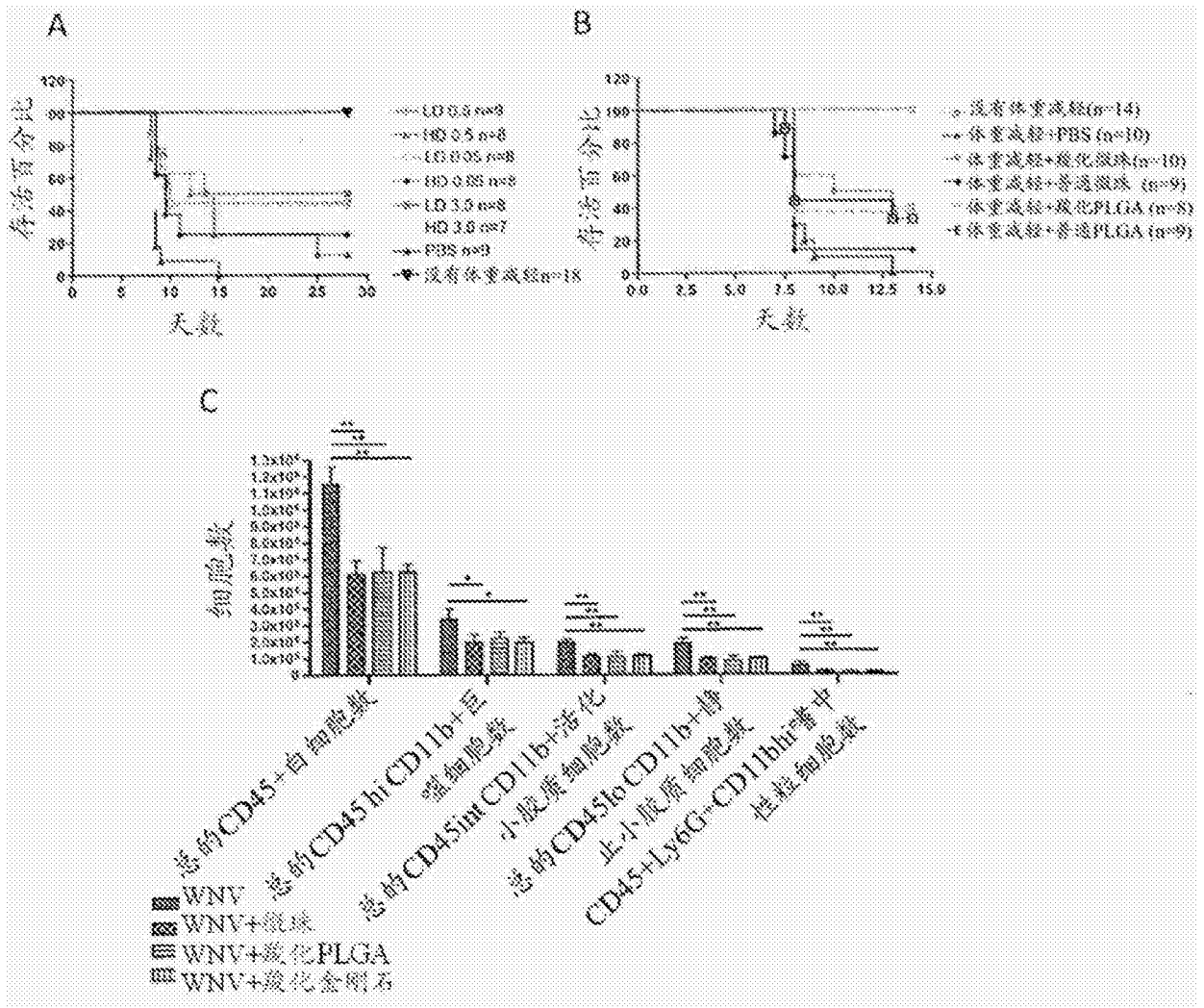


图 12

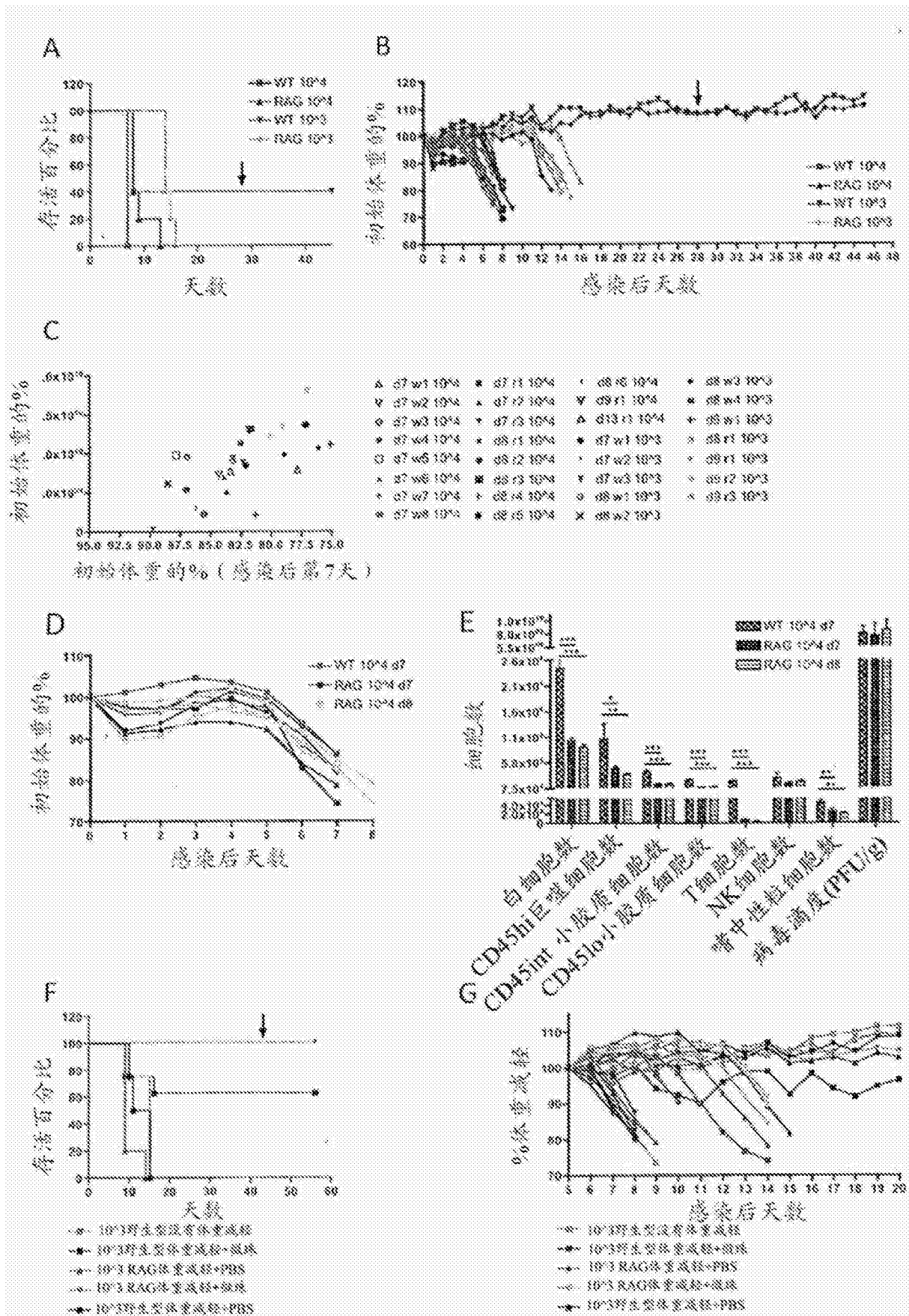


图 13