(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103372214 B
(45)授权公告日 2017.09.29

(21)申请号 201210108159.6

(22)申请日 2012.04.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103372214 A

(43)申请公布日 2013.10.30

(73)专利权人 北京艾棣维欣生物技术有限公司
地址 100085 北京市海淀区西二旗西路2号B区36楼102

(72)发明人 王宾 郑国兴 耿爽 王意忠 俞庆龄

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 关畅 任凤华

(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 1652814 A,2005.08.10,
CN 101921325 A,2010.12.22,

审查员 张溪

权利要求书1页 说明书16页
序列表4页 附图7页

(54)发明名称

治疗和/或预防I型糖尿病的药物组合物及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于治疗和/或预防I型糖尿病的组合物及其应用。该组合物的活性成分为如下1)或2)或3)：1)I型糖尿病蛋白抗原和免疫抑制剂；2)所述I型糖尿病蛋白抗原的表位多肽和所述免疫抑制剂；3)所述I型糖尿病蛋白抗原、所述I型糖尿病蛋白抗原的表位多肽和所述免疫抑制剂；所述I型糖尿病蛋白抗原为胰岛素、谷氨酸脱羧酶和胰岛淀粉样多肽中至少一种；所述免疫抑制剂为地塞米松，环孢素A，他克莫司，骁悉，硫唑嘌呤，强的松，早基强的松龙，抗CD4单抗和抗CD3单抗中至少一种。该组合物能促进Treg增殖；促进IL-10和TGF-β分泌；控制血糖水平；抑制自身免疫反应性CD8T细胞杀伤作用；抑制DC细胞成熟；诱导免疫抑制产生，有效治疗I型糖尿病。

CN 103372214 B

1.组合物,其活性成分为如下1)或2):

1)由胰岛素和免疫抑制剂按照1:1至10:1的质量比组成的混合物;

2)由所述胰岛素的表位多肽和所述免疫抑制剂按照1:1的质量比组成的混合物;

所述免疫抑制剂为地塞米松,环孢素A,他克莫司中的至少一种。

2.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于:所述表位多肽为单一抗原表位的多肽或多个抗原表位组合而成的多肽。

3.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于:所述胰岛素为人胰岛素。

4.根据权利要求3所述的组合物,其特征在于:所述人胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列1所示。

5.根据权利要求1-4中任一所述的组合物,其特征在于:所述组合物具有如下功能:

1)治疗和/或预防I型糖尿病;

2)提高$CD4^+CD25^+$调节性T细胞增殖水平;

3)提高$CD4^+CD25^+$调节性T细胞与$CD4^+$T细胞的比例;

4)提高T细胞对IL-10的分泌水平;

5)抑制自身免疫反应性CD8T细胞的杀伤作用

6)控制I型糖尿病患者血糖水平;

7)提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中IL-10和/或TGF-β的转录水平;

8)抑制DC细胞成熟。

6.权利要求1-5中任一所述的组合物在制备治疗和/或预防I型糖尿病的产品中的应用。

7.权利要求1-5中任一所述的组合物在制备具有如下a)-h)中至少一种功能的产品中的应用:

a)提高$CD4^+CD25^+$调节性T细胞占$CD4^+$T细胞的比例;

b)提高$CD4^+CD25^+$调节性T细胞增殖水平;

c)提高T细胞对IL-10的分泌水平;

d)控制I型糖尿病患者的血糖水平;

e)抑制自身免疫反应性CD8T细胞所起的杀伤作用;

f)提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中IL-10和/或TGF-β的转录水平;

g)抑制DC细胞成熟;

h)降低DC细胞分泌CD40、CD80、CD83和CD86中的至少一种。

治疗和/或预防I型糖尿病的药物组合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于治疗和/或预防I型糖尿病的组合物及其应用。

背景技术

[0002] 世界卫生组织(WHO)的专家预测，糖尿病将是21世纪主要的健康危机，尤其在亚洲，它的威胁比禽流感和艾滋病更加严重。WHO估计全球的糖尿病患者到2010年将增加到两亿人，到2025年将超过3.3亿人。而从目前的情况分析，在未来10年时间里，全球所有病例中有60％都将出现在亚洲。据透露，西太平洋地区(包括中国)和东南亚地区(包括印度)是世界上糖尿病患者最多的地区。在世界糖尿病患者最多的五个国家里，四个在亚洲。

[0003] 我国在向小康社会发展过程中，人们对脂肪与糖类的摄取量未能得到合理的控制，在老龄化及多方位应激因素影响下，糖尿病的发生率已逐年上升，与20世纪90年代中期相比，国内许多地区平均每年以千分之一的速度递增，我国专家预测糖尿病发病率在近10余年间将呈迅速上升趋势，较WHO的预测更为严峻。据我国国内的调查显示，全国20岁以上的糖尿病患者达2500万人以上，糖耐量异常者不低于3500万人，总计在6000万人以上。其中，富裕地区的发病率显著高于贫困地区，城市发病率普遍高于农村，肥胖者高于正常体重者，高龄者高于低龄者，而且发病年龄也日益趋于年轻化。40岁以下人群新发病例增多，40岁以上的平均患病率约占糖尿病总数87％，患者高峰年龄在50岁～70岁。由于我国人口老龄化逐渐加剧，使糖尿病药物市场潜力进一步加大。

[0004] I型糖尿病是以$CD4^+$T细胞，$CD8^+$T细胞和巨噬细胞浸润胰岛而造成胰岛中产生胰岛素的细胞被破坏为特征的一类自身免疫疾病。它约占所有糖尿病患者的5-10％(ADA [American Diabetes Association].1997.Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.Diabetes Care 20:1183-1197;Atkinson MA,Leiter EH.1999.The NOD mouse model of type 1 diabetes:As good as it gets?Nature 5:601-604)。主要发病机理是自身反应的T淋巴细胞破坏了胰腺中产生胰岛素的细胞引起的，以$CD4^+$T细胞，$CD8^+$T细胞和巨噬细胞浸润胰岛而造成胰岛中产生胰岛素的细胞被破坏为特征(Atkinson MA,Maclaren NK.1994.The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.N Engl J Med 331:1428-1436;Benoist C,Mathis D.1997.Autoimmune diabetes:Retrovirus as trigger,precipitator or marker?Nature 388:833-834;Bjork S.2001.The cost of diabetes and diabetes care.Diabetes Res Clin Pract 54(Suppl 1):13-18)。

[0005] 人们已经发现I型糖尿病胰岛炎现象，即淋巴细胞浸润胰岛，以后相继在I型糖尿病患者中发现了抗胰岛细胞自身抗体(ICA)，对胰岛素、羧肽酶、热休克蛋白产生自主反应的T细胞。

[0006] 实验证明胰岛素B链肽9-23可以结合到II类组织相容性复合体(MHC)等位基因叫I-Ag7。1型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病，是一种T细胞介导性疾病，导致高血糖的胰腺β细胞的自身免疫性破坏的结果。这胰岛B肽可能是一种自身抗原可能引发的疾病的候选

(Devendra,D.et al.Diabetes 54,2549,2005;Starwalt,S.et al.Protein Eng.16,147(2003);Lee,L.et al.PNAS 102,15995,2005)。进一步实验还证明胰岛素B链15至23氨基酸片段可以被T细胞识别。它在糖尿病病人体内可以被检测到表达干扰素-β和IL-17的$CD4^+$或$CD8^+$ T细胞的生产。这种肽可以与B链胰岛素CTL克隆反应,但不会与脾CD8 T细胞反应(Hu,C.et al.J.Clin.Invest.117,3857,2007;Amrani,A.et al.Nature406,739,2000)。实验证明胰岛素C链肽也是一个一起自身免疫反应的抗原(Arif,T.I.Tree,T.P.Astill et al.Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health.The Journal of Clinical Investigation,vol.113,no.3,pp.451-463,2004)。

[0007] 至1990年Beakkeskov证明I型糖尿病患者血清中存在的64K抗体就是谷氨酸脱羧酶(GAD)自身抗体和自主反应的T细胞,认为GAD是I型糖尿病自身免疫反应的关键抗原(Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus.Itamar Raz1,Roy Eldor2 and Yaakov Naparstek.TRENDS in Biotechnology 23:128,2005;Enee,E.et al.J Immunol180,5430,2008;龙秀荣,杜文斌,苏钟浦,魏庆琤.儿童糖尿病的谷氨酸脱羧酶抗体检测.中华儿科杂志.1998年第10期)。

[0008] 另外,有大量的报道发现胰岛淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide,IAPP)所形成的淀粉样蛋白沉积,具有破坏胰岛beta细胞膜结构、诱导beta细胞凋亡和损伤beta细胞功能、及激活免疫细胞攻击beta细胞的作用,被认为是糖尿病的重要致病原因之一。最新研究也表明抑制IAPP的聚集可有效减少beta细胞的凋亡,提高胰岛移植的成功率。同时,因此,IAPP已成为糖尿病治疗中一个具有良好前景的靶点。

[0009] 在目前,T1D的治疗主要以外源性胰岛素替代治疗为主,患者需每日注射胰岛素。此方法不仅每天给患者带来极大不方便,而且易发生注射感染或过敏反应;且此治疗方案只能缓解高血糖等临床症状,但常有血糖波动和低血糖发生,也无法改变自体病理性T细胞攻击胰腺的状况,更加无法恢复受损胰腺功能,也就不能控制远期并发症。即使目前最为有效的胰岛素强化治疗方案,也仅能减少并发症发生率的35%～90%,同时患者难免遭受着注射所带来的不便和痛苦。因此,寻求调节和抑制自主免疫反应,改善甚至恢复胰腺正常功能,成为从根本上治疗T1D,解除患者痛苦,提高患者尤其 是青少年患者生活质量的必经之路。

[0010] 由于I型糖尿病是T细胞引起的自身免疫性疾病,所以在临床上也使用的免疫抑制剂来抑制此类疾病,如:地塞米松(DMS),普乐可复(FK506),环孢素A(CsA),骁悉(MMF),硫唑嘌呤(Aza),强的松(Pred),早基强的松龙(MP);或利用抗体如:抗淋巴细胞球蛋白(ALG),抗CD4单克隆抗体(OKT4),每年治疗费用在几十亿元。由于这些药物是非特异性免疫抑制,所以疗效不想理,而且大剂量使用免疫抑制剂都有其毒副作用,若使用不当,一方面可因过度抑制机体免疫反应性而引发多种并发症,更有导致抑制器官功能衰竭风险。所以,急需一种毒性低,具有特异性疗效的药物。

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种组合物。

[0012] 本发明所提供的组合物的活性成分为如下1)或2)或3):

[0013] 1)I型糖尿病的蛋白抗原和免疫抑制剂的混合物；

[0014] 2)所述I型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽和所述免疫抑制剂的混合物；

[0015] 3)所述I型糖尿病的蛋白抗原、所述I型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽和所述免疫抑制剂的混合物；

[0016] 上述组合物中的活性成分，即I型糖尿病的蛋白抗原、I型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽和免疫抑制剂可以独立包装，也可以混合在一起后整体包装。

[0017] 所述I型糖尿病的蛋白抗原为胰岛素、谷氨酸脱羧酶和胰岛淀粉样多肽中的至少一种。所述免疫抑制剂为地塞米松，环孢素A，他克莫司(普乐可复)，骁悉，硫唑嘌呤，强的松，早基强的松龙，抗CD4单克隆抗体和抗CD3单克隆抗体中的至少一种。。所述表位多肽为单一抗原表位的多肽或多个抗原表位组合而成的多肽。

[0018] 其中，所述胰岛素可来源于人、狗、猫，也可以来自于重组基因表达的产物。人的胰岛素可以用于狗和猫的I型糖尿病治疗。人、狗、猫和鼠的基因序列非常相似。在核酸序列水平上，鼠与人胰岛素相似性为95％，猫与人的相似性为84％，狗与人的相似性为89％。

[0019] 所述谷氨酸脱羧酶可来源于人、狗、猫，也可以来自于重组基因表达的产物。人的谷氨酸脱羧酶也用于小鼠I型糖尿病治疗。在核酸序列水平上，两者的序列相似度为90％。

[0020] 所述胰岛淀粉样多肽可来源于人、狗、猫，也可以来自于重组基因表达的产物。

[0021] 所述表位多肽可来源于人、狗、猫序列，并可以进行化学合成得到。

[0022] 所述I型糖尿病的蛋白抗原具体可为人胰岛素(Insulin)。所述人胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列1(该多肽的名称为B9-23)，或序列2(该多肽的名称为B15-23)，或序列3(该多肽的名称为C肽)，或序列12(该多肽的名称为 B23-39)，或序列13(该多肽的名称为B10-C5)所示。

[0023] 所述I型糖尿病的蛋白抗原具体可为狗胰岛素。所述狗胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列4(该多肽的名称为B9-23)，或序列5(该多肽的名称为B15-23)，或序列12(该多肽的名称为B23-39)，或序列13(该多肽的名称为B10-C5)所示。

[0024] 所述I型糖尿病的蛋白抗原具体可为猫胰岛素。所述猫胰岛素的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列6(该多肽的名称为B9-23)，或序列7(该多肽的名称为B15-23)，或序列12(该多肽的名称为B23-39)，或序列13(该多肽的名称为B10-C5)所示。

[0025] 所述I型糖尿病的蛋白抗原具体可为人谷氨酸脱羧酶-65(GAD65)。所述人谷氨酸脱羧酶-65的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中序列8(该多肽的名称为G114-123)所示。

[0026] 所述I型糖尿病的蛋白抗原具体可为人胰岛淀粉样多肽islet amyloid polypeptide(IAPP)。所述人胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中的序列9(该多肽的名称为1-36)所示。

[0027] 所述I型糖尿病的蛋白抗原具体可为狗胰岛淀粉样多肽。所述狗胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中的序列10(该多肽的名称为1-36)所示。

[0028] 所述I型糖尿病的蛋白抗原具体可为猫胰岛淀粉样多肽。所述猫胰岛淀粉样多肽的所述表位多肽的氨基酸序列如序列表中的序列11(该多肽的名称为1-36)所示。

[0029] 其中，序列1由15个氨基酸组成；序列2由9个氨基酸组成；序列3由31个氨基酸组成；序列4由15个氨基酸组成；序列5由9个氨基酸组成；序列6由15个氨基酸组成；序列7由9

个氨基酸组成;序列8由10个氨基酸组成;序列9由37个氨基酸组成;序列10由37个氨基酸组成;序列11由37个氨基酸组成;序列12由17个氨基酸组成;序列13由27个氨基酸组成。

[0030] 上述1)中所述I型糖尿病的蛋白抗原与所述免疫抑制剂的使用配比(质量比)为1∶20到20∶1,如1∶1到10∶1。在本发明中,所述I型糖尿病的蛋白抗原与所述免疫抑制剂的使用配比(质量比)具体为1∶1(10μg蛋白抗原+10μg免疫抑制剂),或10∶1(10μg蛋白抗原+1μg免疫抑制剂)。

[0031] 上述2)中所述表位多肽与所述免疫抑制剂的使用配比为1g∶1g。

[0032] 本发明所提供的组合物具有如下功能:

[0033] (1)治疗和/或预防脊椎动物I型糖尿病;

[0034] (2)提高哺乳动物动物$CD4^+CD25^+$调节性T细胞增殖水平;

[0035] (3)提高哺乳动物$CD4^+CD25^+$调节性T细胞与$CD4^+$T细胞的比例;

[0036] (4)提高哺乳动物T细胞对IL-10的分泌水平;

[0037] (5)抑制哺乳动物自身免疫反应性CD8 T细胞的杀伤作用;在本发明的实施例中,所述抑制自主免疫CD8 T细胞的杀伤作用具体为对胰岛细胞和/或脾脏细胞的杀伤作用。

[0038] (6)控制I型糖尿病患者(哺乳动物)血糖水平;

[0039] (7)提高哺乳动物外周血单核细胞和/或脾脏细胞中IL-10和/或TGF-β的转录水平;

[0040] (8)抑制哺乳动物DC细胞成熟;所述抑制DC细胞成熟体现为降低DC分泌CD40、CD80、CD83和CD86中的至少一种。

[0041] 所述脊椎动物为哺乳动物,具体可为小鼠、家兔、狗或人。

[0042] 本发明所提供的组合物在制备治疗和/或预防I型糖尿病的产品中的应用也属于本发明的保护范围。

[0043] 本发明所提供的组合物在制备具有如下a)-h)中至少一种功能的产品中的应用也属于本发明的保护范围:

[0044] a)提高哺乳动物$CD4^+CD25^+$调节性T细胞占$CD4^+$T细胞的比例;

[0045] b)提高哺乳动物$CD4^+CD25^+$调节性T细胞增殖水平;

[0046] c)提高哺乳动物T细胞对IL-10的分泌水平;

[0047] d)控制患I型糖尿病的哺乳动物血糖水平;

[0048] e)抑制自身免疫反应性CD8 T细胞所起的杀伤作用;

[0049] f)提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中IL-10和/或TGF-β的转录水平;

[0050] g)抑制哺乳动物DC细胞成熟;

[0051] h)降低哺乳动物DC细胞分泌CD40、CD80、CD83和CD86中的至少一种.

[0052] 所述脊椎动物为哺乳动物,具体可为小鼠、家兔、狗或人。

[0053] 本发明所提供的药物组合物在治疗和/或预防I型糖尿病中应用也属于本发明的保护范围。

[0054] 本发明所提供的药物组合物经过注射机体,体内可以产生$CD4^+CD25^+$调节性T细胞,从而抑制I型糖尿病发生。

[0055] 本发明所提供的药物组合物,在使用过程中:1)作为I型糖尿病的蛋白抗原的胰岛素浓度为0.01～1IU/Kg体重,如0.15～0.25IU/Kg体重,免疫抑制剂地塞米松的浓度为0.01

～600μg/Kg体重，如1～5μg/Kg体重；

[0056] 2)作为I型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽B23-39浓度为0.05～1μg/Kg体重，如0.1～0.5μg/Kg体重，免疫抑制剂地塞米松的浓度为0.01～1μg/Kg体重，如0.05～0.2μg/Kg体重；

[0057] 3)作为I型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽B10-C5浓度为0.05～1μg/Kg体重，如0.1～0.5μg/Kg体重，免疫抑制剂地塞米松的浓度为0.01～1μg/Kg体重，如0.05～0.2μg/Kg体重；

[0058] 4)作为I型糖尿病的蛋白抗原的谷氨酸脱羧酶浓度为0.05～1μg/Kg体重，如0.1～0.5μg/Kg体重，免疫抑制剂地塞米松的浓度为0.01～1μg/Kg体重，如0.05～0.2μg/Kg体重；

[0059] 5)作为I型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽G114-123浓度为0.05～1μg/Kg体重，如0.1～0.5μg/Kg体重，免疫抑制剂地塞米松的浓度为0.01～1μg/Kg体重，如0.05～0.2μg/Kg体重。

[0060] 本发明所提供的治疗和/或预防I型糖尿病的药物组合物可通过注射、喷射、滴鼻、滴眼、渗透、吸收、物理或化学介导的方法导入机体，如肌肉、皮内、皮下、静脉、粘膜组织；或是被其他物质混合或包裹后导入机体。

[0061] 所述药物组合物每3-30天给药一次，一般共需4-8次。

[0062] 实验证明，本发明所提供的治疗和/或预防I型糖尿病的药物组合物能够提高免疫动物$CD4^+CD25^+$调节性T细胞占$CD4^+$T细胞的比例；促进$CD4^+CD25^+$调节性T细胞增殖；促进T细胞分泌IL-10；控制I型糖尿病患者的血糖水平；抑制自身免疫反应性CD8 T细胞所起的杀伤作用；提高外周血单核细胞和/或脾脏细胞中IL-10和/或TGF-β的转录水平；抑制DC细胞的成熟；从而诱导免疫抑制的产生，进而达到有效地治疗I型糖尿病的目的。

附图说明

[0063] 图1为确定Treg量效关系的结果，即人胰岛素(诺和灵R)与地塞米松不同剂量免疫NOD小鼠后，检测脾脏$CD4^+CD25^+$调节性T细胞的比例。其中，A为流式细胞检测结果；B为对A流式细胞检测结果的统计比较结果。A和B中，1均代表第1组(10+10组)，即注射10微克人胰岛素(诺和灵R)混合10微克地塞米松；2均代表第2组(100+100组)，即注射100微克人胰岛素(诺和灵R)混合100微克地塞米松；3均代表第3组(500+100组)，即注射500微克人胰岛素(诺和灵R)混合100微克地塞米松；4均代表未经免疫的NOD小鼠对照组。

[0064] 图2为确定Treg增殖量效关系的结果，即人胰岛素(诺和灵R)与地塞米松不同剂量免疫NOD小鼠后，纯化脾脏$CD4^+CD25^+$调节性T细胞，标记CFSE，体外用抗原人胰岛素(诺和灵R)或人胰岛素表位多肽B9-23重新刺激后，检测Treg的增殖情况。其中，A为流式细胞检测结果；B为对A流式细胞检测结果的统计比较结果。A和B中，1均代表阳性对照Anti-CD3；2均代表无关抗原对照OVA323-339；3均代表未刺激阴性对照；(1、2、3均为未经免疫的NOD小鼠)；4均代表10微克人胰岛素 (诺和灵R)混合10微克地塞米松刺激组；5均代表100微克人胰岛素(诺和灵R)混合100微克地塞米松刺激组；6均代表500微克人胰岛素(诺和灵R)混合100微克地塞米松刺激组；7均代表10微克人胰岛素表位多肽B9-23混合10微克地塞米松刺激组；8均代表100微克人胰岛素表位多肽B9-23混合100微克地塞米松刺激组；9均代表500微克人胰岛素表位多肽B9-23混合100微克地塞米松刺激组。

[0065] 图3为确定IL-10量效关系的结果，即胰岛素抗原与地塞米松不同剂量免疫NOD小鼠后，纯化脾脏$CD4^+CD25^+$调节性T细胞，体外用抗原人胰岛素（诺和灵R）或人胰岛素表位多肽B9-23重新刺激后，检测上清中IL-10表达（皮克每毫升）。1代表阳性对照Anti-CD3；2代表无关抗原对照OVA323-339；3代表未刺激阴性对照；（1、2、3均为未经免疫的NOD小鼠）；4代表10微克人胰岛素（诺和灵R）混合10微克地塞米松刺激组；5代表100微克人胰岛素（诺和灵R）混合100微克地塞米松刺激组；6代表500微克人胰岛素（诺和灵R）混合100微克地塞米松刺激组；7代表10微克人胰岛素表位多肽B9-23混合10微克地塞米松刺激组；8代表100微克人胰岛素表位多肽B9-23混合100微克地塞米松刺激组；9代表500微克人胰岛素表位多肽B9-23混合100微克地塞米松刺激组。

[0066] 图4为即发I型糖尿病治疗效果的血糖检测结果，即STZ诱导NOD小鼠I型糖尿病发病后，分别用高剂量组（人胰岛素（诺和灵R）100μg+地塞米松100μg）和低剂量组（人胰岛素（诺和灵R）10μg+地塞米松10μg）治疗，观察血糖变化（毫摩）。其中，空心圆实线代表发病不治疗组；实心圆实线代表低剂量治疗组（10+10）；空心圆虚线代表高剂量治疗组（100+100）。

[0067] 图5为即发I型糖尿病治疗效果的CTL（细胞杀伤）检测结果，即STZ诱导NOD小鼠I型糖尿病发病后，分别用高剂量组（人胰岛素（诺和灵R）100μg+地塞米松100μg）和低剂量组（人胰岛素（诺和灵R）10μg+地塞米松10μg）治疗，将与Insulin10-18CD8T细胞表位孵育的细胞标记CFSE，转移到治疗后的小鼠体内，12h后检测CTL杀伤。其中，A为流式细胞检测结果；B为对A流式细胞检测结果的统计比较结果。A和B中，1均代表第1组（发病组）小鼠的CTL检测结果；2均代表第2组（10+10组），即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组小鼠的CTL检测结果；3均代表第3组（100+100组），即注射人胰岛素100μg混合地塞米松100μg组小鼠的CTL检测结果；4均代表第3组（100+100组）小鼠事先注射anti-CD8抗体，敲除CD8细胞后的CTL检测结果。

[0068] 图6为即发I型糖尿病治疗后血糖与自主免疫CTL的相关性结果。每个点代表一只小鼠。

[0069] 图7为即发I型糖尿病治疗效果的调节性T细胞（$Foxp3^+CD4^+$）检测结果，即 STZ诱导NOD小鼠I型糖尿病发病后，分别用高剂量组（人胰岛素（诺和灵R）100μg+地塞米松100μg）和低剂量组（人胰岛素（诺和灵R）10μg+地塞米松10μg）治疗，检测治疗后小鼠的调节性T细胞（$Foxp3^+CD4^+$）占$CD4^+$ T细胞的百分含量。其中，1代表对照组，即未经免疫且未致病的NOD小鼠的调节性T细胞（$Foxp3^+CD4^+$）检测结果；2代表第1组（发病组）小鼠的调节性T细胞（$Foxp3^+CD4^+$）检测结果；3代表第2组（10+10组），即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组小鼠的调节性T细胞（$Foxp3^+CD4^+$）检测结果；4代表第3组（100+100组），即注射人胰岛素100μg混合地塞米松100μg组小鼠的调节性T细胞（$Foxp3^+CD4^+$）检测结果。

[0070] 图8为长期I型糖尿病治疗效果的生存曲线，即NOD小鼠I型糖尿病发病后，以低剂量组（人胰岛素（诺和灵R）10μg+地塞米松10μg）治疗，定时统计小鼠的存活率。其中，空心圆实线代表第1组（发病组）；实心圆实线代表第2组（治疗组）。

[0071] 图9为长期I型糖尿病治疗效果的血糖变化检测结果，即STZ诱导NOD小鼠I型糖尿病发病后，用低剂量组（人胰岛素（诺和灵R）10μg+地塞米松10μg）治疗，观察血糖变化。其中，空心圆实线代表第1组（发病组）；实心圆实线代表第2组（治疗组）。

[0072] 图10为长期T1D治疗效果的Insulin10-18 CTL检测结果，即STZ诱导NOD小鼠I型糖

尿病发病后，用低剂量组(人胰岛素(诺和灵R)10μg+地塞米松10μg)治疗，将与Insulin10-18CD8 T细胞表位孵育的细胞标记CFSE，转移到治疗后的小鼠体内，12h后检测CTL杀伤。其中，1代表第1组(发病组)小鼠的CTL检测结果；2代表第2组(治疗组)，即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组小鼠的CTL检测结果；3代表Anti-CD8单抗阻断发病组小鼠CTL的结果。

[0073] 图11为长期I型糖尿病治疗效果的胰岛细胞CTL检测结果，即STZ诱导NOD小鼠I型糖尿病发病后，用低剂量组(人胰岛素(诺和灵R)10μg+地塞米松10μg)治疗，将胰腺细胞标记CFSE，转移到治疗后的小鼠体内，12h后检测CTL杀伤。其中1代表第1组(发病组)小鼠的CTL检测结果；2代表第2组(治疗组)，即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组小鼠的CTL检测结果。

[0074] 图12为家兔IL-10和TGF-β量效关系，即抗原人胰岛素(诺和灵R)与地塞米松不同剂量免疫家兔后，分离脾脏细胞，体外用人胰岛素(诺和灵R)重新刺激后，RT-PCR检测IL-10和TGF-β表达。其中，A为PBMC中IL-10和TGF-β的RT-PCR电泳图。具体的，泳道1表示第1组(100+100组)，即注射100微克人胰岛素混合100微克地塞米松组，泳道2表示第2组(10+10组)，即注射10微克人胰岛素混合10微克地塞米松组，泳道3表示第3组(10+1组)，即注射10微克人胰岛素混合1微克地塞米松组，泳道4表示第4组(DEX100组)，即注射100微克地塞米松组，泳道5表示第5 组(Ins100组)，即注射10微克人胰岛素组，泳道6表示第6组(阴性对照组)，即注射PBS 100微升组。B为RT-PCR检测PBMC和脾脏中IL-10和TGF-β表达的柱形图。具体的，B1-1为PBMC分泌IL-10的RT-PCR检测结果，B1-2为PBMC分泌TGF-β的RT-PCR检测结果，B2-1为脾细胞分泌IL-10的RT-PCR检测结果，B2-2为脾细胞分泌TGF-β的RT-PCR检测结果。B1-1、B1-2、B2-1和B2-2中，1均代表第1组(100+100组)，即注射100微克人胰岛素混合100微克地塞米松组，2均代表第2组(10+10组)，即注射10微克人胰岛素混合10微克地塞米松组，3均代表第3组(10+1组)，即注射10微克人胰岛素混合1微克地塞米松组，4均代表第4组(DEX100组)，即注射100微克地塞米松组，5均代表第5组(Ins100组)，即注射10微克人胰岛素组。

[0075] 图13狗IL-10和TGF-β量效关系，即抗原人胰岛素(诺和灵R)与地塞米松不同剂量免疫T1D狗后，在第-3，0，8，20，28天分离脾脏细胞，体外用人胰岛素(诺和灵R)重新刺激后，RT-PCR检测IL-10和TGF-β表达。其中，A为IL-10表达的检测结果；B为TGF-β表达的检测结果。A和B中的1，2，3，4，5均分别代表第-3，0，8，20，28天的检测结果。

[0076] 图14为狗即发I型糖尿病治疗效果的Treg检测结果，即Alloxan诱导狗T1D发病后，用胰岛素+地塞米松治疗，检测治疗后狗胰腺的Treg占CD4 T细胞和占所有细胞的百分比。其中，A为Treg占CD4 T细胞的百分比；B为Treg占所有细胞的百分比。A和B中，1均表示发病组，2均表示100+1.5治疗组。

[0077] 图15为人PMBC转化DC受刺激后的CD40和IL-10表达，即分离正常人和T1D病人的外周血单核细胞(PBMC)，在GMCSF和IL-4作用下诱导$CD1a^+$ DC，用胰岛素和地塞米松刺激后，检测CD40和IL-10的表达。其中，A为CD40的表达检测结果；B为IL-10的表达检测结果。A和B中的1-1和1-2均为2份I型糖尿病患者血样检测结果；2-1、2-2和2-3均为3份正常人血样检测结果；1-1、1-2、2-1、2-2和2-3中的1均表示阴性对照组，2均表示终浓度为10μg/ml的人胰岛素(诺和灵R)组；3均表示终浓度为10μg/ml的地塞米松组；4均表示人胰岛素(诺和灵R)混合地塞米松(两者终浓度均为10μg/ml)组。

[0078] 图16为药物组合物的抑制剂筛选大量样本结果，即人PBMC在胰岛素加抑制剂影响下的免疫DC细胞分子CD40，CD80，CD83和CD86的变化。其中，1表示阴性对照组；2表示终浓度为10μg/ml的人胰岛素（诺和灵R）组；3表示人胰岛素（诺和灵R）混合地塞米松（两者终浓度均为10μg/ml）组；4表示人胰岛素（诺和灵R）混合雷帕霉素（两者终浓度均为10μg/ml）组；5表示人胰岛素（诺和灵R）混合环孢素A（两者终浓度均为10μg/ml）组；6表示人胰岛素（诺和灵R）混合普乐可复（两者终浓度均为10μg/ml）组。每个点代表一个病人血样。

具体实施方式

[0079] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

[0080] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0081] 药物来源和混合：本发明中，所用的I型糖尿病的蛋白抗原具体为人胰岛素（诺和灵R）（丹麦诺和诺德公司Novo Nordisk A/S）；所用的I型糖尿病的蛋白抗原的表位多肽为氨基酸序列是序列表中序列1的多肽，该多肽为人胰岛素中B链上的第9-23位氨基酸组成的，将其命名为B9-23（由北京aoke公司合成）；所用的免疫抑制剂可为地塞米松（DEX）（国药准字H34023626），雷帕霉素（Rap）（产品号SR039501），普乐可复（FK506）（国药准字H20080457），或环孢素A（CsA）（国药准字H10940045），均为临床用药，购自国药集团。注射前混合胰岛素和免疫抑制剂。

[0082] 实施例1、NOD小鼠药物量效实验

[0083] 一、NOD小鼠免疫

[0084] 1、免疫由人胰岛素（诺和灵R）和地塞米松组成的药物组合物

[0085] 将NOD小鼠均分为4组，每组3只。在第1，4，7天，腹部皮下注射药物组合物：第1组（10+10组）每只小鼠分别注射含10微克人胰岛素（诺和灵R）混合10微克地塞米松的PBS 100微升，第2组（100+100组）每只分别注射100微克胰岛素混合100微克地塞米松的PBS 100微升，第3组（500+100组）每只分别注射含500微克胰岛素混合100微克地塞米松的PBS 100微升。

[0086] 2、免疫由人胰岛素表位多肽B9-23和地塞米松组成的药物组合物

[0087] 将NOD小鼠均分为4组，每组3只。在第1，4，7天，腹部皮下注射药物组合物：第1组（10+10组）每只小鼠分别注射含10微克人胰岛素表位多肽B9-23混合10微克地塞米松的PBS 100微升，第2组（100+100组）每只分别注射100微克B9-23混合100微克地塞米松的PBS 100微升，第3组（500+100组）每只分别注射含500微克B9-23混合100微克地塞米松的PBS 100微升。

[0088] 二、检测调节性T细胞的比例、增殖及分泌IL-10的情况确定药物量效关系

[0089] 1、检测调节性T细胞的比例确定药物量效关系

[0090] 上述步骤一免疫小鼠后第8天进行检测，利用调节T细胞比例，反映药物（由人胰岛素（诺和灵R）和地塞米松组成的药物组合物）注射产生的抑制效果。

[0091] 具体方法如下：(1)脱臼处死小鼠，用70％乙醇浸泡15分钟；(2)在提前紫外灯灭菌20分钟的超净工作台中，无菌条件下取出小鼠脾脏于提前加有2ml RPMI 1640培养液的细胞培养皿中；(3)将铜网灼烧后降温放入平皿中，利用无菌注射器将脾脏磨碎，制成细胞悬浮液，并过滤到13ml细胞离心管内；(4)将离心管口用封口膜封好，2000rpm离心10分钟；(5)

弃上层培养液，加2～3ml红细胞裂解液，悬浮细胞，裂 解2分钟后，加等体积RPMI1640培养基(或胎牛血清)中止反应，将离心管口用封口膜封好，离心2000rpm离心10分钟；(6)弃上层培养液，加3～4ml的RPMI1640(含2%胎牛血清)培养基悬浮细胞；(7)用玻璃棉37℃滤过细胞，保证细胞充分和玻璃棉结合以除去B细胞，得到淋巴细胞；(8)用血球计数板细胞计数；(9)用PBS洗掉培养基，并最终用PBS溶液1ml悬浮2×10^7个细胞；(10)将淋巴细胞染色CD4和CD25：取10^6个细胞，参照抗体说明书用量，加入0.2μl PE-anti-CD4和0.2μl APC-anti-CD25(eBioscience 12-0041，17-0251)，室温避光染色10min，清洗两次，分析$CD4^+CD25^{+调}$节性T细胞(简称Treg)占$CD4^+$T细胞的百分比。同时设置未经免疫的NOD小鼠作为对照组。

[0092] 结果如图1所示，与对照组相比，第1组(10+10组)，即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组，Treg明显上升至16%，而其他组则维持在10%-12%。

[0093] 2、检测调节性T细胞的增殖确定药物量效关系

[0094] 上述步骤一免疫小鼠后第8天进行检测，利用T细胞增殖试验，CFSE染色，流式细胞仪检测，用来反映Treg细胞针对胰岛素(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)和B9-23(由人胰岛素表位多肽B9-23和地塞米松组成的药物组合物)的增殖能力。

[0095] 具体方法如下：(1)-(9)同上述步骤1的(1)-(9)；(10)加入3μM CFSE储备液至终浓度为1.5μM，室温下轻轻振荡8分钟；(11)加入等体积胎牛血清终止反应，将细胞放入水浴10分钟，2000rpm 5分钟离心，弃上清，悬浮细胞，并用1mlPBS溶液洗细胞，离心弃上清，重复3次；(12)将每组细胞悬液分4份加入96孔培养板中(每个孔中加入2×10^5个细胞)。其中一份作为阳性对照加入100μl Anti-CD3抗体(AbDSerotec MCA500GA)至终浓度为1μg/ml，一份作为无关抗原对照加入OVA323-339(氨基酸序列：ISQAVHAAHAEINEAGR)作为刺激物至终浓度为5μg/ml，一份作为阴性对照不加刺激物，一份加入特异抗原人胰岛素至终浓度为10μg/ml，一份加入特异抗原人胰岛素表位多肽B9-23至终浓度为10μg/ml。同时设有不加刺激物和不用CFSE染色的细胞对照；(13)将细胞放入细胞培养箱，37℃，5%CO_2培养，3天后用流式细胞仪检测调节性T细胞的增殖情况。同时设置未经免疫的NOD小鼠作为对照组。

[0096] 结果如图2所示，与对照组相比，对于由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物，第1组(10+10组)，即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组，Treg增殖明显，而其他组则不增殖；对于由人胰岛素表位多肽B9-23和地塞米松组成的药物组合物，第1组(10+10组)，即注射人胰岛素表位多肽B9-23 10μg混合地塞米松10μg组，Treg增殖明显，而其他组则不增殖。

[0097] 3、检测调节性T细胞分泌IL-10的情况确定药物量效关系

[0098] 上述步骤一免疫小鼠后第8天进行检测，利用体外抗原刺激，检测上清中IL-10表达，用来反映Treg细胞针对胰岛素(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)和B9-23(由人胰岛素表位多肽B9-23和地塞米松组成的药物组合物)分泌抑制型细胞因子IL-10的能力。

[0099] 具体方法如下：(1)-(9)同上述步骤1的(1)-(9)；(10)将每组细胞悬液分4份加入96孔培养板中(每个孔中加入2×10^5个细胞)。其中一份作为阳性对照加入100μlAnti-CD3抗体至终浓度为1μg/ml，一份作为无关抗原阴性对照加入OVA323-339作为刺激物至终浓度为5μg/ml，一份作为阴性对照不加刺激物，一份加入特异抗原胰岛素至终浓度为10μg/ml，一份加入特异抗原胰岛素B9-23表位至终浓度为10μg/ml。(11)将细胞放入细胞培养箱，37

℃，5%CO_2培养，24小时后，收集上清，将30μl上清与30μl PBS(含0.1μl FlexSet微球，为美国BD公司产品，558300)孵育30分钟，再加入30μl PBS(含0.1μl PE抗体，为美国BD公司产品，558300)孵育30分钟，清洗后，检测上清中IL-10，流式细胞仪分析。同时设置未经免疫的NOD小鼠作为对照组。

[0100] 结果如图3所示，对于由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物，第1组(10+10组)，即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组，IL-10分泌明显上升；对于由人胰岛素表位多肽B9-23和地塞米松组成的药物组合物，第1组(10+10组)，即注射人胰岛素表位多肽B9-2310μg混合地塞米松10μg组，IL-10分泌明显上升。

[0101] 综上所述，本实施例的结果表明，人胰岛素混合地塞米松可以增强NOD小鼠的Treg产生，并且Treg针对人胰岛素和人胰岛素表位多肽B9-23起增殖反应和分泌抑制型细胞因子IL-10，且最佳剂量为人胰岛素(或人胰岛素表位多肽B9-23)10μg混合地塞米松10μg。

[0102] 实施例2、NOD小鼠即发I型糖尿病的治疗效果试验

[0103] 一、NOD小鼠的致病及免疫

[0104] 在实施例1确定药物量效关系后，利用NOD小鼠诱导I型糖尿病，判定为高血糖(＞12mmol)后，进行腹腔注射药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)。具体操作如下：

[0105] 18只NOD小鼠，连续5天腹腔注射链脲佐菌素(STZ)(Sigma Aldrige，S0130)40mg/kg，诱导I型糖尿病。判定为高血糖(＞12m mol)，(首次注射STZ记为第1天，约10天后，即得到NOD小鼠即发I型糖尿病模型)后均分为3组，每组6只，第1组(发病组)不进行治疗，第2组(10+10组)每只分别注射10微克人胰岛素混合10 微克地塞米松的PBS 100微升作为治疗组，第3组(100+100组)每只分别注射含100微克胰岛素混合100微克地塞米松的PBS 100微升作为治疗对照组。在将NOD小鼠判定为高血糖后的第1，4，7天各进行一次腹部皮下注射。

[0106] 二、小鼠血糖变化、CTL及调节性T细胞比例的检测

[0107] 1、小鼠血糖变化检测

[0108] 不同时间点(以首次注射STZ为第1天计算，第5、7、11、17、19、24、28、32、37天)。检测各组小鼠的血糖变化，反映药物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)注射产生的治疗效果。

[0109] 具体方法如下：(1)准备血糖试纸和测试仪；(2)小鼠眼眶采血10μl滴于血糖试纸；(3)读数。

[0110] 结果如图4所示，第2组(10+10组)，即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg的治疗组，血糖明显得到控制，稳定在10-12mmol，而治疗对照组，即注射人胰岛素100μg混合地塞米松100μg的第3组(100+100组)，则在产生一定效果后血糖又继续升高，最终和发病组一样高。

[0111] 2、小鼠CTL检测

[0112] 在以首次注射STZ为第1天计算，第37天，利用体内杀伤性T细胞裂解试验，来反映Treg细胞抑制功能对自身免疫反应性CD8 T细胞的控制作用。

[0113] 具体方法如下：(1)事先给上述步骤一免疫后的100+100组小鼠注射(以首次注射STZ为第1天计算，第35，36天)Anti-CD8单抗(eBioscience，克隆53-6.7)，清除体内CD8 T细胞作为对照；(2)将正常的NOD小鼠脾脏细胞分离计数，同实施例一二步骤1中的(1)-(9)；

(3)等分后分别加入5μM和20μM CFSE室温染色8分钟，各自加入等体积胎牛血清终止反应并用含有血清的PBS溶液洗细胞，离心弃上清，重复3次；(4)将20μM CFSE细胞孵育50μg/ml Insulin10-18CD8 T细胞表位(氨基酸序列：HLVEALYLV)，37℃，5%CO_2培养30min后清洗；(5)将5μM对照细胞(上述步骤(3)中的5μM CFSE室温染色的细胞)和20μM靶细胞(上述步骤(4)中的20μM CFSE细胞孵育50μg/ml Insulin10-18CD8 T细胞表位得到的细胞)1∶1混合，尾静脉注射入(注射Anti-CD8单抗后的第1天)上述步骤一免疫后的NOD小鼠体内；(6)12小时后处死小鼠，分离脾脏细胞，用流式细胞仪检测CFSE信号，按照公式：1-靶细胞数/对照细胞数×100%，计算靶细胞相对对照细胞的杀伤比例。

[0114] 结果如图5所示，第2组(10+10组)，即注射人胰岛素10μg混合地塞米松10μg组，病鼠的自身免疫反应性CD8T细胞所起的杀伤作用得到明显控制，而治疗对照组，即注射人胰岛素100μg混合地塞米松100μg组则仍然很高。且这种杀伤作用可以被CD8的抗体阻断。并且，分析血糖水平和杀伤功能相关性后，发现两者正相关(如图 6所示)，也证明治疗改善了自身免疫反应性从而控制血糖。

[0115] 3、小鼠调节性T细胞比例的检测

[0116] 上述步骤一免疫小鼠(以首次注射STZ为第1天计算，第37天)进行检测，利用调节T细胞比例，反映药物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)注射产生Treg。

[0117] 具体方法同实施例1步骤二1所述方法。同时设置未经免疫且未致病的NOD小鼠作为对照组。

[0118] 结果如图7所示，与发病组及对照组小鼠相比，第2组(10+10组)，即注射胰岛素10μg混合地塞米松10μg组，Treg明显上升至15%，而其他组则维持在8%-10%。

[0119] 综上所述，本实施例的结果表明，人胰岛素混合地塞米松可以在NOD小鼠上治疗I型糖尿病。这种治疗效果是由于药物注射后引起的Treg产生，抑制了自身免疫反应性的CD8T 细胞对胰岛细胞的杀伤。

[0120] 实施例3、NOD小鼠长期I型糖尿病的治疗效果试验

[0121] 在实施例2证明药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)对即发I型糖尿病具有治疗效果后，对长期I型糖尿病的治疗效果进行治疗评价，具体如下：

[0122] 一、NOD小鼠的致病及免疫

[0123] 16只NOD小鼠，连续5天腹腔注射STZ 40mg/kg，诱导I型糖尿病，发病2个月后，进行注射治疗。均分为2组，每组8只，第1组(发病组)不进行治疗，第2组(治疗组)每只分别注射10微克人胰岛素混合10微克地塞米松的PBS 100微升作为治疗组。在第1，4，7天各进行一次腹部皮下注射，为1个疗程，中间间隔2周，再进行一个疗程。

[0124] 二、小鼠生存曲线、血糖变化及CTL检测

[0125] 1、小鼠生存曲线的检测

[0126] 对经上述步骤一免疫的小鼠进行生存曲线的检测，反映治疗对病鼠的生活质量的提高。具体如下：自上述步骤一对发病小鼠进行注射治疗时起，定期对各组小鼠进行存活率统计，至100天。

[0127] 结果如图8所示，第1组(发病组)小鼠在60-80天全部死亡，而第2组(治疗组)小鼠在100天仍然有约60%的小鼠存活，证明由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合

物可以提高I型糖尿病的生存质量。

[0128] 2、小鼠血糖变化的检测

[0129] 不同时间点(以首次注射STZ前一天为第0天计算,第0、40、53、60、69、72、73、80、85、87、90、93、97、100天)。检测各组小鼠的血糖变化,反映药物(由人 胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)注射产生的治疗效果。

[0130] 具体方法如下:(1)准备血糖试纸和测试仪;(2)小鼠眼眶采血10μl滴于血糖试纸;(3)读数。

[0131] 结果如图9所示,第2组(治疗组)小鼠经过两个疗程治疗,血糖明显得到控制,稳定在10-15mmol,而第1组(发病组)小鼠的血糖一直较高。

[0132] 3、小鼠CTL检测

[0133] 在步骤一末次免疫小鼠后(以首次注射STZ前一天为第0天计算,第60天检测发病组,第100天检测治疗组),利用体内杀伤性T细胞裂解试验,来反映Treg细胞抑制功能对自身免疫反应性CD8 T细胞的控制作用。

[0134] 具体方法同实施例2二中步骤2所述方法。

[0135] 另外,还针对胰岛细胞的杀伤作用做了检测,即正常NOD小鼠胰腺细胞分离计数后,作为靶细胞检测CTL。具体步骤为:(1)在无菌条件下,处死NOD小鼠,做腹部切口暴露肝脏和胰腺;(2)结扎胰腺入肠的外分泌管,沿胆道向胰腺内注入10ml含有1mg/ml Collagenase P(罗氏Roche,Cat.No.11213857001)的PBS,分离胰腺,37度消化1h;(3)250×g离心1分钟弃上清,PBS清洗两次,弃尽上清;(4)将沉淀重悬于3ml 25%的Ficoll溶液中(Roche),在上层依次加入23%(2ml)、20%(2ml)和11%(2ml)的Ficoll溶液,800×g离心10min,取交界处胰岛层,PBS清洗两次去除Ficoll;(5)将胰岛用0.25%胰酶Trypsin(Sigma)37度消化10分钟,制备单细胞(胰岛细胞)悬液;(6)将步骤(5)所得胰岛细胞染色20uM CFSE,作为靶细胞,加入5uM CFSE染色的效应细胞杀伤。

[0136] 结果表明,经2个疗程治疗后,病鼠的自身免疫反应性CD8T细胞针对Insulin10-18表位所起的杀伤作用得到明显控制(第2组(治疗组))。且这种杀伤作用可以被CD8的抗体(Anti-CD8单抗)阻断(图10);同样,针对胰岛细胞的杀伤作用也被治疗控制(图11)。

[0137] 实施例4、家兔药物量效试验

[0138] 在实施例1-3证明药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)对NOD小鼠I型糖尿病具有治疗效果后,进一步对家兔上药物的剂量和效果进行评价。

[0139] 一、家兔的免疫

[0140] 18只家兔(新西兰白兔),在第1,4,7天,腹部皮下注射药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)作为一个疗程:均分为6组,每组3只,第1组(100+100组)每只分别注射含100微克人胰岛素混合100微克地塞米松的PBS 100微升,第2组(10+10组)每只分别注射10微克人胰岛素混合10微克地 塞米松的PBS 100微升,第3组(10+1组)每只分别注射含10微克人胰岛素混合1微克地塞米松的PBS 100微升,第4组(DEX100组)每只分别注射含100微克地塞米松的PBS 100微升,第5组(Ins100组)每只分别注射10微克人胰岛素的PBS 100微升,第6组(阴性对照组)每只分别注射PBS 100微升。两周后,再次注射一个疗程(第21,24,27天)。

[0141] 二、检测抑制型细胞因子IL-10和TGF-β的分泌

[0142] 在上述步骤一末次免疫后第2天(即第28天)检测家兔PBMC细胞和脾细胞分泌抑制型细胞因子IL-10和TGF-β的情况,反映药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)的效果。

[0143] 具体方法如下:(1)收集家兔的外周血,Ficoll分离外周血单核细胞(PBMC),在15ml离心管中加入4ml Ficoll400(Sigma),在上层加入8ml PBS稀释后的家兔外周血,1500rpm离心15分钟,取交界处的白膜层,清洗后计数培养,加入10μg/ml的人胰岛素(诺和灵R)刺激;(2)收集家兔脾脏,研磨制备单细胞悬液,裂解红细胞,加入2ml红细胞裂解液(碧云天),室温裂解2分钟,2ml血清终止,PBS清洗后计数培养,加入10μg/ml的人胰岛素(诺和灵R)刺激;(3)刺激24h,分别收集步骤(1)和步骤(2)的细胞,各按10^7 cell/ml加入Trizol;(4)氯仿抽提RNA,利用ToyoboReverTraAce试剂盒,按照说明书将RNA反转录为cDNA;(5)设计合成兔HPRT,IL-10,TGF-β引物:

[0144] HPRT上游:5'-CCATCACATTGTAGCCCTCTGT-3'

[0145] HPRT下游:5'-CTTGCGACCTTGACCATCTTT-3'

[0146] IL-10上游:5'-TATGTTGCCTGGTCTTCCTGG5-3'

[0147] IL-10下游:5'-CTCCACTGCCTTGCTCTTGT-3'

[0148] TGF-β上游:5'-AACAAGAGCAGAAGGCGAATG-3'

[0149] TGF-β下游:5'-ACAGCAAGGAGAAGCGGATG-3'

[0150] 以步骤(4)所得cDNA为模板,以HPRT上游和HPRT下游为引物,进行PCR扩增,通过电泳将各组的HPRT条带亮度调整一致;(6)以步骤(4)所得cDNA为模板,以IL-10上游和IL-10下游为引物PCR扩增IL-10;以TGF-β上游和TGF-β下游为引物PCR扩增TGF-β,用1%琼脂糖凝胶电泳区分目的条带,EB染色1分钟后拍照,用Gelpro软件分析细胞因子转录强度。

[0151] 结果如图12所示,在PBMC和脾脏中,IL-10和TGF-β转录在第3组(10+1组),即注射10微克人胰岛素混合1微克地塞米松组均最高或次高(脾脏中TGF-β转录在第3组(10+1组),即注射10微克人胰岛素混合1微克地塞米松组次高)。

[0152] 实施例5、狗的药物量效试验

[0153] 在实施例4摸索药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)在家兔上的量效关系后,进一步对狗的药物剂量和效果进行评价。

[0154] 一、狗的免疫

[0155] 9只狗(狼犬),体重15-20kg,在第-3天用60mg/kg体重的Alloxan(Sigma)诱导T1D,跟踪血糖,在连续两天血糖值高于12mM后判定为T1D发病,记为第0天。在第1,4,7天,腹部皮下注射混合药物作为一个疗程:均分为3组,每组3只,第1组(100+15组)每只分别注射含100微克人胰岛素(0.15IU/kg)混合15微克地塞米松(1μg/kg)的PBS 100微升,第2组(100+1.5组)每只分别注射100微克人胰岛素混合1.5微克地塞米松(0.1μg/kg)的PBS 100微升,第3组(发病组)每只分别注射PBS100微升。两周后,再次注射一个疗程(第21,24,27天)。

[0156] 二、狗抑制型细胞因子IL-10和TGF-β分泌,以及调节性T细胞比例的检测

[0157] 1、狗抑制型细胞因子IL-10和TGF-β分泌的检测

[0158] 在第-3,0,8,20和28天(对应于上述步骤一的天数),检测抑制型细胞因子IL-10和TGF-β的分泌,反映药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)的效果。

[0159] 具体方法如下：(1)收集狗的外周血，Ficoll分离外周血单核细胞(PBMC)，在15ml离心管中加入4ml Ficoll400(Sigma)，在上层加入8ml PBS稀释后的狗外周血，1500rpm离心15分钟，取交界处的白膜层，清洗后计数培养，加入10μg/ml人胰岛素(诺和灵R)刺激；(2)刺激24h，收集上述步骤(1)的细胞，按10^7个细胞/ml加入Trizol；(3)氯仿抽提RNA，利用ToyoboReverTraAce试剂盒，按照说明书将RNA反转录为cDNA；(4)设计合成狗HPRT，IL-10，TGF-β引物：

[0160] HPRT上游：5'-AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC-3'

[0161] HPRT下游：5'-TTATAGTCAAGGGCATATCC-3'

[0162] IL-10上游：5'-ATGCATGGCTCAGCACCGCT-3'

[0163] IL-10下游：5'-TGTTCTCCAGCACGTTTCAGA-3'

[0164] TGF-β上游：5'-TGGAACTGGTGAAGCGGAAG-3'

[0165] TGF-β下游：5'-TTGCGGAAGTCAATGTAGAGC-3'

[0166] 以步骤(3)所得cDNA为模板，以HPRT上游和HPRT下游为引物，进行PCR扩增，通过电泳将各组的HPRT条带亮度调整一致；(5)以步骤(3)所得cDNA为模板，以IL-10上游和IL-10下游为引物PCR扩增IL-10；以TGF-β上游和TGF-β下游为引物PCR扩增TGF-β，用1%琼脂糖凝胶电泳区分目的条带，EB染色1分钟后拍照，用Gelpro软件分析细胞因子转录强度。同时设置未经免疫，且未致病的狗对照。

[0167] 结果如图13所示，在PBMC中，IL-10和TGF-β转录水平在治疗组(第1组和第 2组)均有升高，剂量依赖不明显。(图13)。

[0168] 2、狗调节性T细胞比例的检测

[0169] 在上述步骤一末次免疫后第2天(即第28天)检测，利用调节T细胞比例，反映药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)注射产生Treg。

[0170] 上述步骤一末次免疫后第2天(即第28天)处死动物，收集胰腺，制备单细胞悬液。具体步骤为：(1)结扎胰腺入肠的外分泌管，沿胆道向胰腺内注入100ml含有1mg/mlCollagenase P(罗氏Roche，Cat.No.11213857001)的PBS，分离胰腺，37度消化1h；(2)250g离心1分钟，弃上清，PBS清洗两次，弃尽上清；(3)将沉淀重悬于15ml25%的Ficoll溶液中(Roche)，在上层依次加入23%(9ml)、20%(6ml)和11%(6ml)的Ficoll溶液，800×g离心10min，取交界处胰岛层，PBS清洗两次去除Ficoll；(4)将胰岛用0.25%胰酶Trypsin(Sigma)37度消化10分钟，制备单细胞悬液；(5)表面染色CD4(FITC-anti-CD4，eBioscience11-5040)，胞内染色Foxp3(PE-anti-Foxp3，eBioscience 12-5773)，流式检测调节性T细胞($Foxp3^+$)的比例。

[0171] 结果如图14所示，第2组(100+1.5组)的调节性T细胞($Foxp3^+$)占CD4细胞比例有所上升，而且调节性T细胞($Foxp3^+$)占所有细胞比例明显上升。

[0172] 实施例6、人PBMC诱导DC的药物效果试验

[0173] 在实施例5摸索药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)在狗体内的量效关系后，进一步对人外周血单核细胞(PBMC)诱导树突状细胞(DC)的药物效果进行评价。

[0174] 一、人血样的采集及处理

[0175] 正常人血样3份，I型糖尿病患者血样2份，10ml每份。对正常人和I型糖尿病患者共

5份血样，采用Ficoll分离PBMC，在15ml离心管中加入4ml Ficoll400(Sigma)，在上层加入8ml PBS稀释后的人外周血，1500rpm离心15分钟，取交界处的白膜层，清洗后，在rhGMCSF(R&D System公司产品)和rhIL-4(R&D System公司产品)刺激3天后诱导出树突状细胞，换培养液后进行细胞计数，将细胞均分为4孔，每孔2×10^6个细胞，其中1个孔不加入刺激物，作为阴性对照组，另外3个孔依次分别加入1)抗原人胰岛素(诺和灵R)至其终浓度为10μg/ml；2)地塞米松至其终浓度为10μg/ml；3)人胰岛素(诺和灵R)混合地塞米松，两者终浓度均为10μg/ml。

[0176] 二、树突状细胞相关标记分子，及抑制型细胞因子IL-10分泌的检测

[0177] 1、树突状细胞的CD40，CD80，CD83，CD86，MHCII的检测

[0178] 在上述步骤一刺激的第3天，检测树突状细胞的CD40，CD80，CD83，CD86，MHCII，反映药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)对DC成熟的抑制效果。

[0179] 具体方法如下：(1)收集细胞，表面双染CD1a-FITC(eBioscience，11-0019)和CD40-PE(eBioscience，12-0409)，CD1a-FITC(eBioscience，11-0019)和CD80-PE(eBioscience，12-0809)，CD1a-FITC(eBioscience，11-0019)和CD83-PE(Biolegend，305322)，CD1a-FITC(eBioscience，11-0019)和CD86-PE(eBioscience，12-0869)，或CD1a-FITC(eBioscience，11-0019)和MHC-II-PE；按照0.25μl每10^6个细胞的比例加入上述抗体；(2)染色室温避光10分钟，清洗细胞，流式检测。

[0180] 结果如图15中A所示，无论正常人还是I型糖尿病患者，在PBMC诱导DC中，CD40都在混合药物作用下降低，指示DC在混合药物作用下较少成熟，减少了对自主免疫的协助。

[0181] 2、抑制型细胞因子IL-10分泌的检测

[0182] 在上述步骤一刺激的第3天，检测抑制型细胞因子IL-10的分泌，反映药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)的抑制效果。

[0183] 具体方法如下：(1)收集培养上清，用FlexSet检测IL-10的表达量，将30μl上清与30μl PBS(含0.1μl FlexSet微球)孵育30分钟，再加入30μl PBS(含0.1μl PE抗体)孵育30分钟，清洗后；(2)流式检测。

[0184] 结果如图15中B所示，药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)对IL-10有明显的增强作用，指示在体外具有抑制自主免疫的效果。

[0185] 实施例7、人PBMC诱导DC的免疫抑制剂筛选试验

[0186] 在实施例6摸索药物组合物(由人胰岛素(诺和灵R)和地塞米松组成的药物组合物)在人PBMC诱导DC的抑制效果后，进一步对免疫抑制剂筛选以提高药物效果。

[0187] 本实施例所涉及的免疫抑制剂为地塞米松(DEX)，雷帕霉素(Rap)，环孢素A(CsA)和他克莫司(普乐可复，FK506)。

[0188] 试验材料：I型糖尿病患者血样25份，10ml每份。Ficoll分离PBMC，在15ml离心管中加入4ml Ficoll400(Sigma)，在上层加入8ml PBS稀释后的人外周血，1500rpm离心15分钟，取交界处的白膜层，清洗后，在rhGMCSF和rhIL-4刺激3天后诱导出树突状细胞，换培养液后进行细胞计数，将细胞均分为6孔，每孔2×10^6个细胞，其中1个孔不加入刺激物，作为阴性对照组，另外5个孔依次分别加入1)抗原人胰岛素(诺和灵R)至其终浓度为10μg/ml；2)人胰岛素(诺和灵R)混合地塞米松，两者终浓度均为10μg/ml；3)人胰岛素(诺和灵R)混合雷帕霉

素，两者终浓度均为10μg/ml；4)人胰岛素(诺和灵R)混合环孢素A，两者终浓度均为10μg/ml；5)人胰岛素(诺和灵R)混合普乐可复，两者终浓度均为10μg/ml。

[0189] 二、树突状细胞相关标记分子，及抑制型细胞因子IL-10分泌的检测

[0190] 1、树突状细胞的CD40，CD80，CD83，CD86，MHCII的检测

[0191] 在上述步骤一刺激的第3天，检测树突状细胞的CD40，CD80，CD83，CD86，MHCII，反映上述各药物组合物对DC成熟的抑制效果。

[0192] 具体方法如下：(1)收集细胞，表面双染CD1a-FITC和CD40-PE，CD1a和CD80-PE，CD1a-FITC和CD83-PE，CD1a-FITC和CD86-PE，或CD1a-FITC和MHC-II-PE；按照0.25μl每10^6细胞的比例加入上述抗体；(2)染色室温避光10分钟，清洗细胞，流式检测。

[0193] 结果显示，在PBMC诱导DC中，CD40，CD80，CD83和CD86都在混合药物作用下有所降低。且地塞米松和环孢素A的抑制效果较明显。(图16)

序 列 表

<110> 北京艾棣维欣生物技术有限公司
<120> 治疗和/或预防Ⅰ型糖尿病的药物组合物及其应用
<130> CGGNARI122365
<160> 13
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 1
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
1 5 10 15

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
[0001] <400> 2
Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
1 5

<210> 3
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 3
Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ser Gly Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln
20 25 30

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 4
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly

1 5 10 15

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 5
Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
1 5

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 6
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
1 5 10 15

[0002]
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 7
Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 8
Val Met Asn Ile Leu Leu Gln Tyr Val Val
1 5 10

<210> 9
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>
<400> 9
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15
Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
20 25 30
Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 10
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 10
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15
Val Arg Thr Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
20 25 30
Gly Ser Asn Thr Tyr
35

[0003]

<210> 11
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 11
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15
Ile Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
20 25 30
Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 12
Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln

1 5 10 15
Val

<210> 13
<211> 27
<212> PRT
[0004] <213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 13
His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
1 5 10 15
Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp
20 25

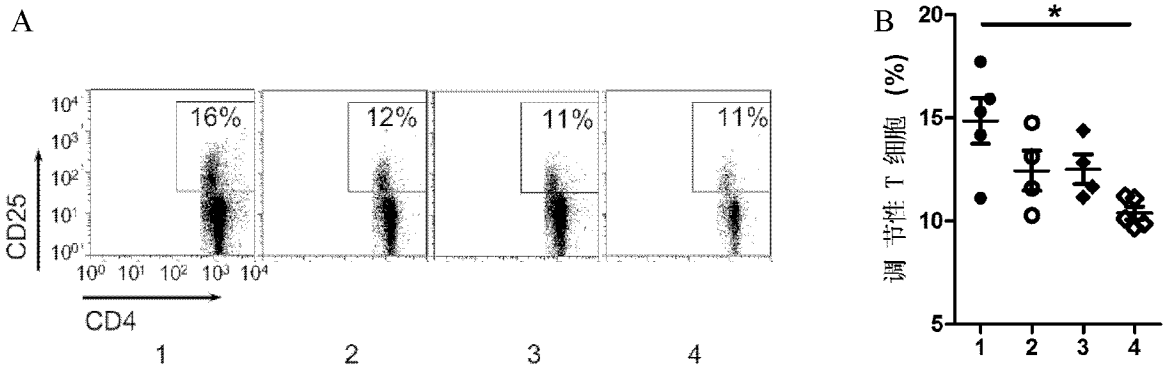

A
16%
12%
11%
11%
CD25
CD4
1
2
3
4
B
调节性T细胞 (%)
*

图1

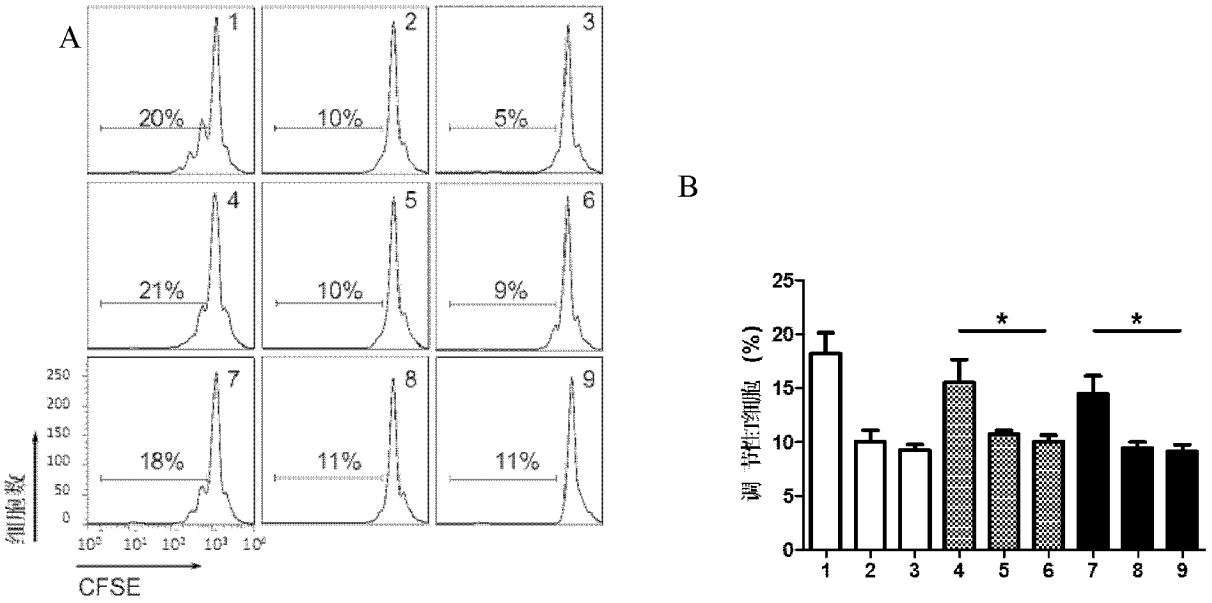

A
20%
10%
5%
21%
10%
9%
18%
11%
11%
细胞数
CFSE
B
调节性细胞 (%)
*
*

图2

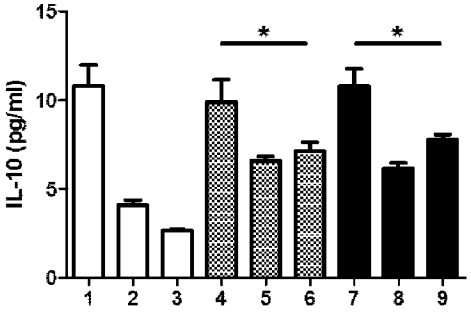

IL-10 (pg/ml)
*
*

图3

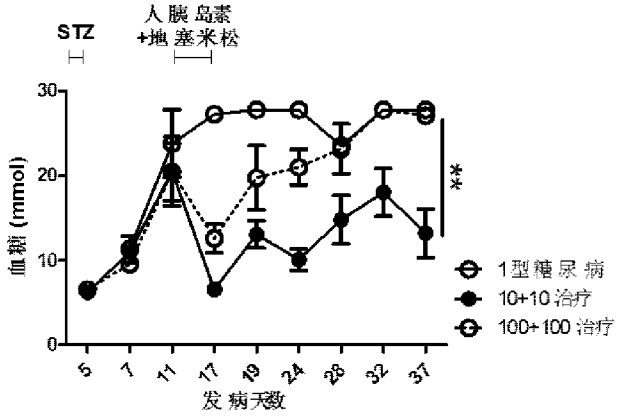

STZ
人胰岛素
+地塞米松
血糖 (mmol)
30
20
10
0
**
1型糖尿病
10+10治疗
100+100治疗
5
7
11
17
19
24
28
32
37
发病天数

图4

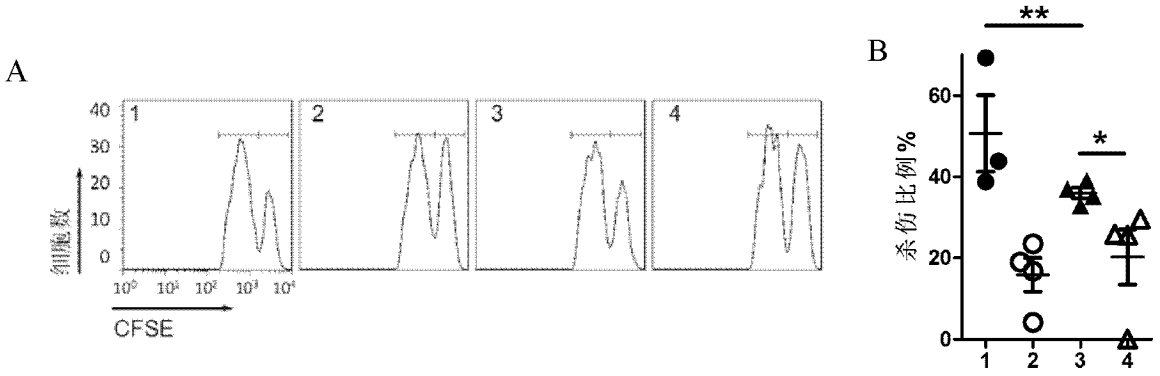

A
B
1
2
3
4
细胞数
CFSE
杀伤比例%
**
*

图5

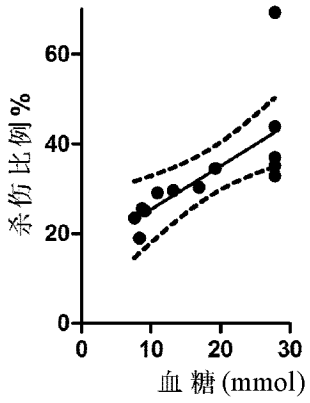

杀伤比例%
血糖 (mmol)
0
10
20
30
40
60

图6

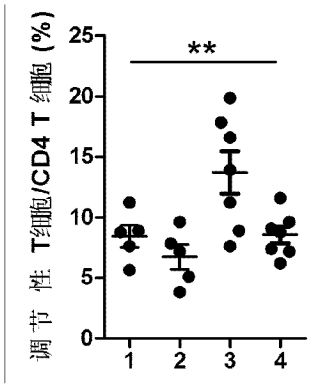

调节性T细胞/CD4 T细胞(%)
25
20
15
10
5
0
**
1
2
3
4

图7

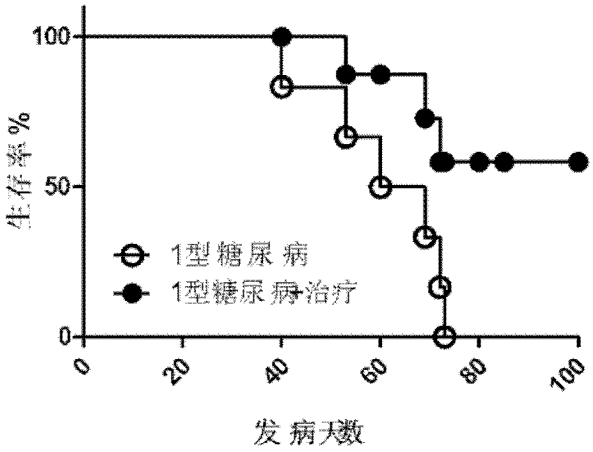

生存率%
100
50
0
1型糖尿病
1型糖尿病+治疗
0
20
40
60
80
100
发病天数

图8

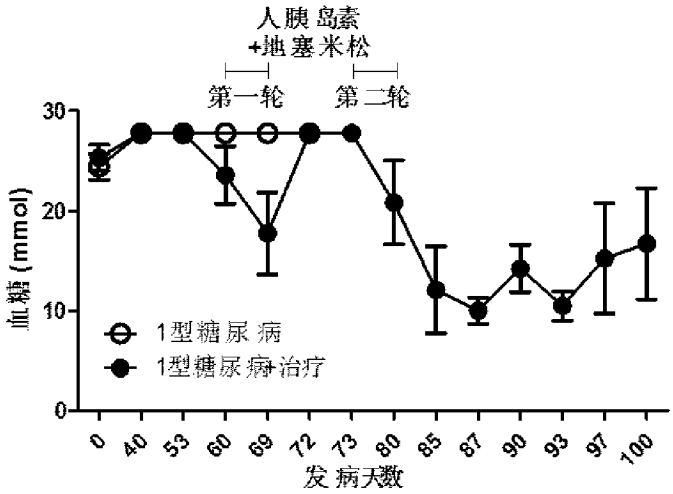

人胰岛素
+地塞米松
第一轮
第二轮
血糖(mmol)
30
20
10
0
1型糖尿病
1型糖尿病+治疗
0
40
53
60
69
72
73
80
85
87
90
93
97
100
发病天数

图9

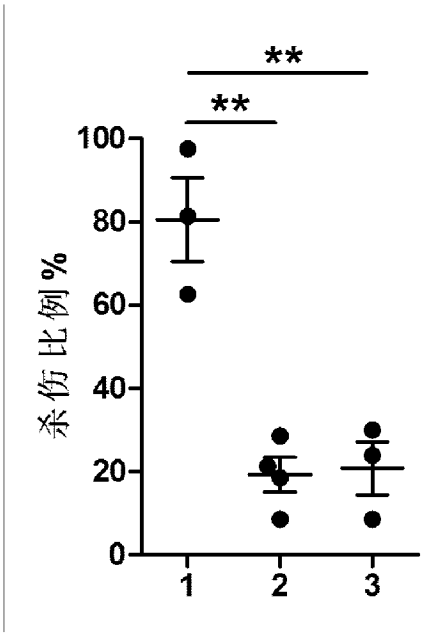


图10

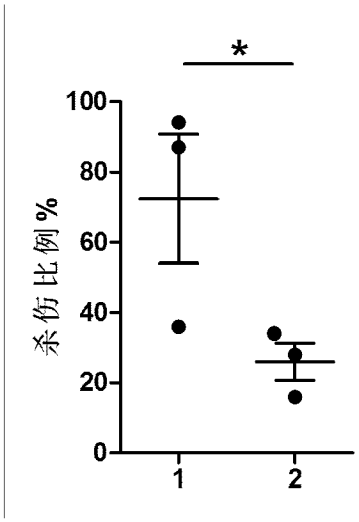
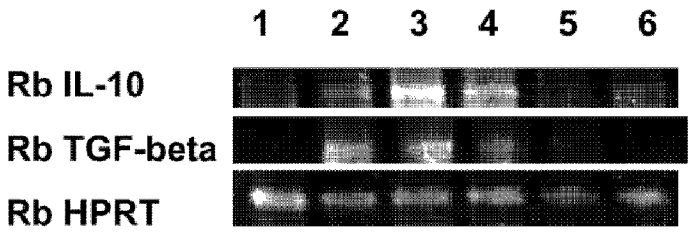
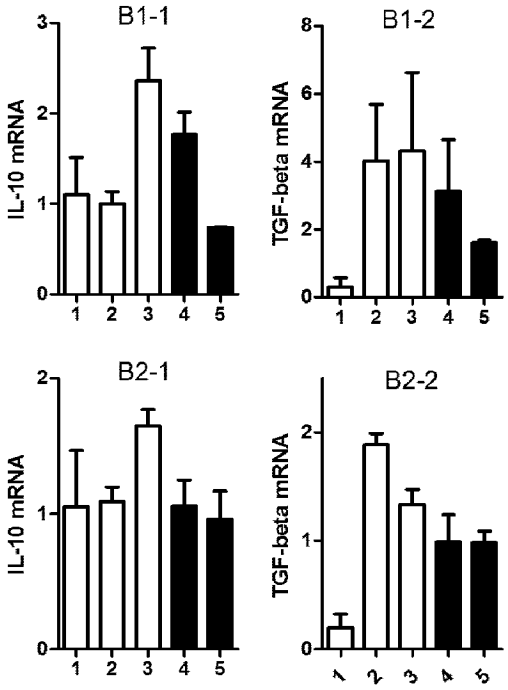


图11


1 2 3 4 5 6
Rb IL-10
Rb TGF-beta
Rb HPRT

A


B1-1
IL-10 mRNA
B1-2
TGF-beta mRNA
B2-1
IL-10 mRNA
B2-2
TGF-beta mRNA

B

图12

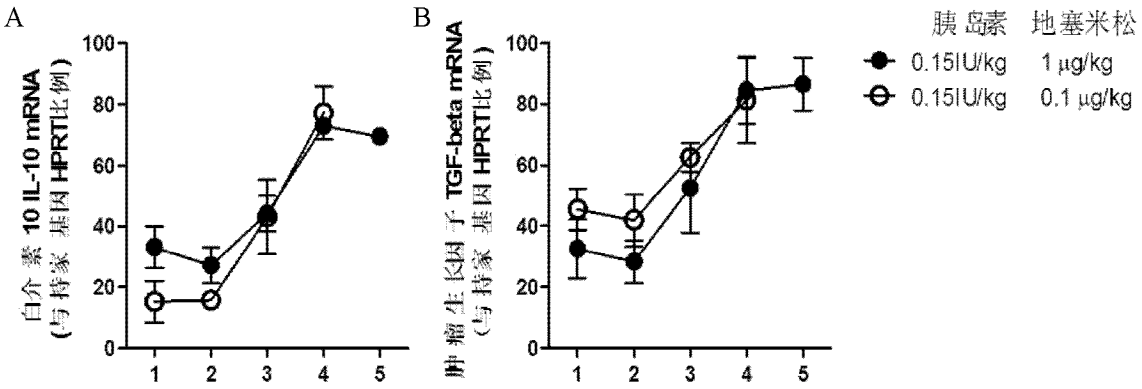

A
白介素 10 IL-10 mRNA
(与持家基因 HPRT比例)
B
肿瘤生长因子 TGF-beta mRNA
(与持家基因 HPRT比例)
胰岛素 地塞米松
0.15IU/kg 1 μg/kg
0.15IU/kg 0.1 μg/kg

图13

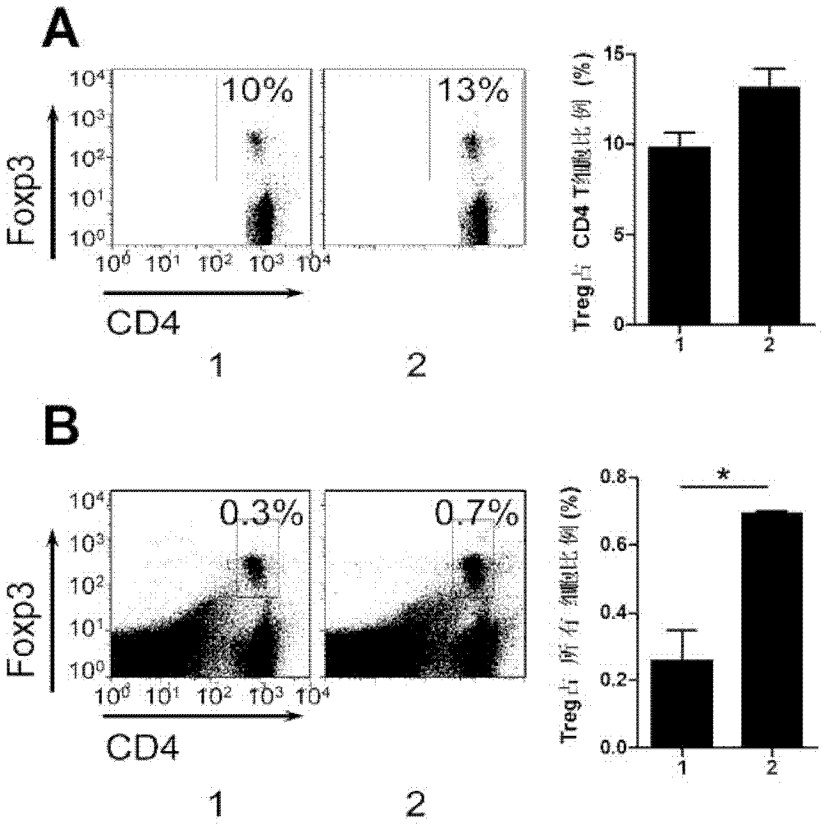

A
10%
13%
Foxp3
CD4
1
2
Treg占CD4 T细胞比例 (%)
B
0.3%
0.7%
Foxp3
CD4
1
2
Treg占所有细胞比例 (%)
*

图14

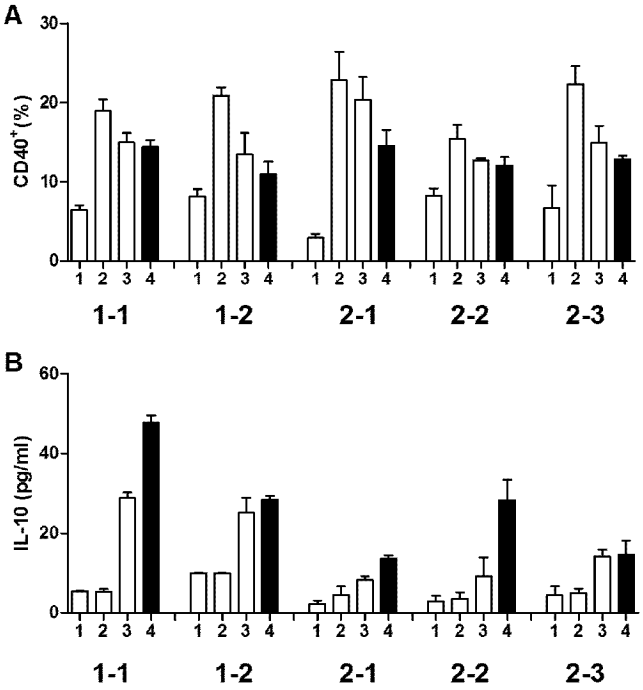

A
CD40+ (%)
1-1
1-2
2-1
2-2
2-3
B
IL-10 (pg/ml)
1-1
1-2
2-1
2-2
2-3

图15

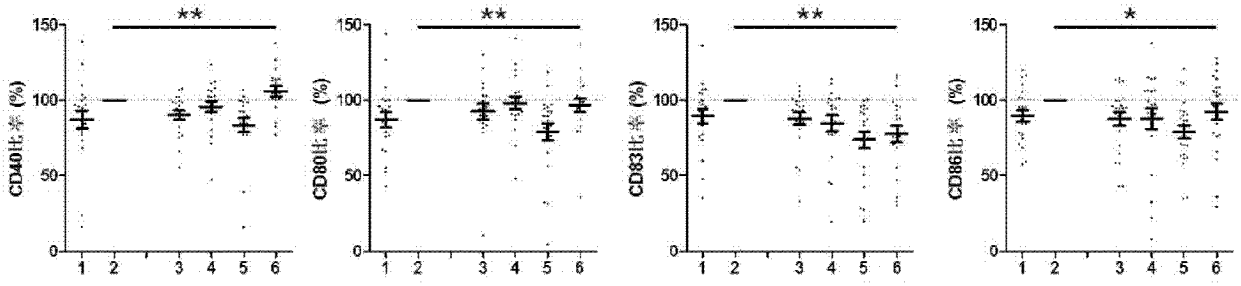


图16