



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201712027 A

(43) 公開日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 01 日

(21) 申請案號：105118185

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 08 日

(51) Int. Cl.：

*C07K7/00 (2006.01)**C07K14/00 (2006.01)**A61K38/08 (2006.01)**A61K38/16 (2006.01)**A61P3/10 (2006.01)*

(30) 優先權：2015/06/10 英國

1510056.3

(71) 申請人：倫敦國王學院 (英國) KING'S COLLEGE LONDON (GB)

英國

(72) 發明人：皮克曼 馬克 PEAKMAN, MARK (GB)

(74) 代理人：惲軼群；劉法正

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：6 共 31 頁

(54) 名稱

多肽組合物

MULTI-PEPTIDE COMPOSITION

(57) 摘要

本發明係關於一種特異性肽組合。該肽組合可存在於醫藥學上可接受之組合物中。該肽組合可用於治療或預防第 1 型糖尿病 (T1D)。本發明亦關於一種診斷或確定治療功效之方法，該方法利用該特異性肽組合。

The invention relates to a specific peptide combination. The peptide combination may be present in a pharmaceutically acceptable composition. The peptide combination can be used in the therapy or prevention of Type 1 Diabetes (T1D). The invention also relates to a method of diagnosing or determining treatment efficacy, the method utilising the specific peptide combination.

發明摘要

※ 申請案號：105118185

※ 申請日：105.06.08

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

多肽組合物

MULTI-PEPTIDE COMPOSITION

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

【中文】

本發明係關於一種特異性肽組合。該肽組合可存在於醫藥學上可接受之組合物中。該肽組合可用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)。本發明亦關於一種診斷或確定治療功效之方法，該方法利用該特異性肽組合。

【英文】

The invention relates to a specific peptide combination. The peptide combination may be present in a pharmaceutically acceptable composition. The peptide combination can be used in the therapy or prevention of Type 1 Diabetes (T1D). The invention also relates to a method of diagnosing or determining treatment efficacy, the method utilising the specific peptide combination.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

多肽組合物

MULTI-PEPTIDE COMPOSITION

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種肽組合，其可用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)。

【先前技術】

【0002】 第 1 型糖尿病(T1D)為自身免疫疾病，其特徵為代謝功能障礙、最為顯著地葡萄糖代謝失調，伴有特徵性長期血管及神經併發症。T1D 為最常見的自身免疫疾病之一，影響美國的 250 名個體中之一名，在美國每年報導約 10,000 至 15,000 個新病例，且發病率上升。T1D 之最高患病率見於北歐。

【0003】 T1D 特徵為絕對胰島素缺乏，使得患者依賴於外源性胰島素而生存。在具有高血糖症之症狀的 T1D 急性臨床發作之前，存在長久無症狀臨床前時期，在該時期期間產生胰島素之 β 細胞進行性地毀壞。

【0004】 β 細胞自身抗原、巨噬細胞、樹枝狀細胞、B 淋巴細胞及 T 淋巴細胞已經顯示牽涉於自身免疫糖尿病之發病機理中。 β 細胞自身抗原視為自 β 細胞釋放且由抗原呈遞細胞加工及呈遞給 T 輔助細胞(CD4+細胞)。原始 CD4+ T 細胞可藉由自抗原呈遞細胞釋放之白介素(IL)-12 激活。 β 細胞抗原特異性 CD8+ T 細胞藉由由激活 CD4+ T 細胞產生之 IL-2 激活，分化至細胞毒性 T 細胞中，且募集至胰島中。此等激活 TH1 CD4+ T 細胞及 CD8+ 細胞毒性 T 細胞牽涉於 β 細胞之毀滅中。IL-2 亦激活 B 淋巴細胞以分泌胰島細胞自身抗體。

【0005】 近年來，已鑑別胰島細胞自身抗體所針對之若干自身抗原。此等自身抗原包括酪胺酸磷酸酶相關島抗原 2 (IA-2)及胰島素、胰島素原(PI)及前胰島素原。

【0006】 一旦開始，即需要終身藉由注射合成胰島素來治療，因為 β

細胞無法再生。一旦確定，則糖尿病對患者、患者家庭及社會為重大負擔。儘管胰島素之現代配藥、製劑及遞送系統可將血糖維持在合理界限內，但經過若干年，疾病之併發症不可避免地出現。糖尿病之最常見嚴重併發症為腎衰竭、失明及神經功能喪失。糖尿病患者之壽命減少平均 10 歲。鑒於此背景，重要的為考慮治療或預防 T1D 之新方式。T 細胞 IA-2 抗原決定基已鑑別於 Honeyman M 等人(Honeyman M 等人 Molecular Medicine 1998; 4: 231-239)；Lohmann T 等人(Lohmann T 等人 Exp Clin Endocrinol Diabetes 1999; 107 (3): 166-71)；McLaughlin KA 等人(McLaughlin KA 等人 J Immunol 2014; 193: 4448-56)；及 Weenink SM 等人(Weenink SM 等人, J Autoimmun 2009; 33:147-54)中。PI 及/或 IA-2 肽亦揭示於 US7049292、WO2005/073248、WO00/63702 及 WO2009/004315 中。然而，本發明利用來自 PI 及 IA-2 兩者之關鍵抗原決定基之一種新穎組合；及/或一種特定投藥方案，其展現抗原特異性免疫療法之優越效能以便限制為 T1D 之特徵的 PI/IA-2 自身免疫性。

【發明內容】

【0007】 在本發明之第一態樣中，提供一種肽組合，其包含：

- 具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列之肽；
- 具有 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列之肽；
- 具有 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列之肽；
- 具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之肽；
- 具有 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之肽；及
- 具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列之肽。

【0008】 SEQ ID NO: 1 為 IA-2 之片段，其包含殘基 718-736。

【0009】 SEQ ID NO: 2 為 IA-2 之片段，其包含殘基 752-775。

【0010】 SEQ ID NO: 3 為 IA-2 之片段，其包含殘基 855-867。

【0011】 SEQ ID NO: 4 為 PI 之片段，其包含殘基 C13-C32。

【0012】 SEQ ID NO: 5 為 PI 之片段，其包含殘基 C19-A3。

【0013】 SEQ ID NO: 6 為 PI 之片段，其包含殘基 C22-A5。

【0014】 本發明人已令人驚訝地發現，與更小數目之肽及替代性肽組

合相比，此肽組合在限制抗 PI 及抗 IA-2 自身免疫性方面為優越的。令人驚訝地，亦已證明，IA-2 肽之不同組合在限制 PI 自身免疫性方面提供不同作用。當與其他肽組合相比時，本發明主張之肽組合具有優越效能。特定言之，本發明之肽組合展現跨抗原連鎖性抑制，其在治療利用時對於患者可具有顯著益處。其使得來自有限數目之自身抗原的有限數目之肽可用以靶向多種不同自身免疫響應，該等響應在 T1D 中起一定作用。

【0015】 如本文所述，術語「肽」係指包含藉由肽鍵或經修飾之肽鍵(亦即，肽等排體)連接至彼此的胺基酸之任何肽。肽通常將含有天然存在之胺基酸，但可包括藉由天然過程(諸如轉譯後加工)或藉由此項技術中熟知的化學修飾技術而修飾之胺基酸序列。該等修飾充分描述於基本文本中。修飾可存在於肽中之任何地方，包括肽主鏈、胺基酸側鏈及胺基或羧基端。應瞭解，同一類型之修飾可以相同或不同程度存在於既定肽中之若干位點。此外，既定肽可含有許多類型之修飾。

【0016】 在一較佳實施例中，肽組合不包含來自 IA-2 或 PI 之其他肽。

【0017】 較佳，所主張之肽組合包含本發明之確切序列且不包含 IA-2 或 PI 之較長片段或全長 IA-2 或 PI。

【0018】 對熟習此項技術者將顯而易見，本發明之肽組合可包含非肽組分，諸如如下文進一步論述之賦形劑，但其可能不包含任何額外肽、尤其來自 IA-2 或 PI 之肽。

【0019】 較佳，補足肽組合之肽為經分離肽。術語「經分離」意謂肽係自其初始環境移出。舉例而言，存在於活動物中之肽未經分離，但自天然系統中之一些或全部共存物質分離的相同肽或該種肽之片段經分離。該等肽可為載體之一部分及/或肽可為組合物之一部分，且仍經分離，因為該載體或組合物不為其天然環境之一部分。

【0020】 在一較佳實施例中，肽組合由以下各者組成：

具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列之肽；

具有 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列之肽；

具有 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列之肽；

具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之肽；

具有 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之肽；及

具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列之肽。

【0021】 在此較佳實施例中，肽組合僅包含具有特定所敘述序列之所敘述肽。

【0022】 本發明之第二態樣係關於一種醫藥學上可接受之組合物，其包含本發明之肽組合及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

【0023】 較佳，醫藥組合物包含半胱胺酸。組合物內游離半胱胺酸之存在穩定化肽組合之肽形成鏈間二硫鍵且因此沈澱的任何趨勢。醫藥組合物可包含 1 至 5 mg L-半胱胺酸/2 mg 肽組合，較佳 2 至 4 mg L-半胱胺酸/2 mg 肽組合，且最佳 2.5 mg L-半胱胺酸/2 mg 肽組合。

【0024】 醫藥組合物可用於人類或動物用途用於人類及獸醫藥物中且典型地將包含一或多種適合的賦形劑。用於治療用途之可接受賦形劑為醫藥技術中所熟知，且描述於例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro 編 1985)中。醫藥賦形劑之選擇可關於預期投藥途徑及標準醫藥實踐來選擇。作為賦形劑或除賦形劑之外，醫藥組合物可包含任何適合的黏合劑、潤滑劑、懸浮劑、包衣劑或增溶劑。

【0025】 防腐劑、穩定劑及染料可提供於醫藥組合物中。防腐劑之實例包括苯甲酸鈉、山梨酸及對羥基苯甲酸之酯。亦可使用抗氧化劑及懸浮劑。

【0026】 可存在取決於不同遞送系統之不同組合物/調配物需求。舉例而言，本發明之醫藥組合物可經調配以非經腸遞送，其中組合物以可注射形式調配，以用於藉由例如靜脈內、皮內、肌肉內、皮下或腹膜內途徑遞送。對於非經腸投藥，組合物可最佳以無菌水溶液之形式使用，該無菌水溶液可含有其他物質，例如充足的鹽或單醣以使溶液與血液等張。組合物亦可經調配以藉由經口或局部途徑投與，該等途徑包括經鼻、經口或經透皮地。較佳，組合物經調配以藉由皮內途徑遞送。

【0027】 皮內投藥途徑包括任何皮膚進入方式，例如使用基於微針之注射及輸注系統(或準確靶向皮內空間之其他方式)；將液體或散劑無針或不用針彈道注射至皮內空間中；芒圖型皮內注射；經由微型裝置之增強電離

子透入法；及使液體、固體或其他給藥形式直接沈積至皮膚中，包括使用貼片以將組合物沈積至皮膚上。

【0028】 典型地，醫師將確定將最適用於個別個體之實際劑量，且其將隨特定患者之疾病、年齡、體重及響應而變化。對於人類適當之劑量可由熟習此項技術者例如使用體表面積(BSA)標準化確定。舉例而言，醫藥組合物可包含約 0.1 μg 至 15 mg 總肽/單次劑量、較佳 1 μg 至 12 mg 總肽/單次劑量。在一個較佳實施例中，投與 240 μg (針對 60 kg 成年人類 BSA 標準化之 1 μg 劑量)總肽/單次劑量，肽以等莫耳比率存在。在另一較佳實施例中，投與 12 mg 總肽/單次劑量，肽以等莫耳比率存在。

【0029】 在一較佳實施例中，包含本發明之肽組合之組合物至少每月一次、較佳每 1 至 4 週一次投與，持續四次投藥。

【0030】 在一個實施例中，包含本發明之肽組合之組合物至少每月一次、較佳每 2 至 4 週一次投與，持續四次投藥。

【0031】 在另一實施例中，包含本發明之肽組合之組合物至少每月一次、較佳每週一次投與，持續四週。

【0032】 醫藥組合物亦可包含促進耐受性之佐劑及/或促進耐受性之細胞。促進耐受性之佐劑包括 IL-10、重組霍亂毒素 B 亞單位(rCTB)、Toll 樣受體 2 之配位體以及調節免疫響應之生物製劑及單株抗體，諸如抗 CD3 及共刺激阻斷劑，其可與肽組合共同投與。促進耐受性之細胞包括不成熟的樹枝狀細胞及用維生素 D3 (1 α ,25-二羥基維生素 D3)或其類似物處理之樹枝狀細胞。較佳，本發明之肽組合中的一或多種肽結合至用維生素 D3 或其類似物處理的樹枝狀細胞之表面。較佳，本發明之肽組合中的全部肽結合至用維生素 D3 或其類似物處理的樹枝狀細胞之表面。

【0033】 本發明之第三態樣係關於本發明之醫藥學上可接受之組合物，其用於治療。

【0034】 本發明之第四態樣係關於本發明之醫藥學上可接受之組合物，其用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)。

【0035】 當 T1D「經治療」時，此意謂 T1D 之一或多種臨床表現得到改善。其不意謂 T1D 之症狀得到完全治療以使其不再存在於患者中，但

在一些方法中，可能為此情況。「治療」導致 T1D 之一或多種症狀比在治療之前嚴重程度更小。

【0036】 本發明之第五態樣係關於本發明之醫藥學上可接受之組合物，其用於製造用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)之藥劑。

【0037】 本發明之第六態樣係關於一種治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)之方法，其中向 T1D 患者或鑑別為處於 T1D 高風險下之非糖尿病個體投與本發明之醫藥學上可接受之組合物。

【0038】 較佳，向具有 β 細胞質量剩餘之患者投與本發明之醫藥學上可接受之組合物。

【0039】 本發明之第七態樣係關於一種用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)之套組，其包含本發明之肽組合。

【0040】 本發明之第八態樣係關於一種診斷或確定治療功效之方法，其包括：(a) 提供來自疑似患有或易患 T1D 之個體之 CD4 淋巴細胞；(b) 提供抗原呈遞細胞(APC)群體，其在其表面上攜有具有與由該個體表現者一致的對偶基因之 II 類 MHC 分子，該 APC 群體已與本發明之肽組合接觸，且該 II 類 MHC 分子結合至本發明之肽組合中的一或多種肽；或(c) 提供可溶肽-HLA 多聚體試劑，其包含具有與由該個體表現者一致的對偶基因之 II 類 MHC 分子，該等 MHC 分子已結合至本發明之該肽組合中的一或多種肽；(d) 使(b)之該 APC 群體或(c)之該肽-HLA 多聚體與(a)之該等 CD4 淋巴細胞接觸；及(e) 確定該等 CD4 淋巴細胞是否識別該 II 類 MHC 結合肽，作為該個體患有或易患 T1D 之指示。

【0041】 該 APC 可為 B 淋巴細胞、單核細胞、巨噬細胞或樹枝狀細胞或全周邊血液單核細胞(PBMC)。APC 亦可為衍生自 B 淋巴細胞、單核細胞、巨噬細胞或樹枝狀細胞之永生化細胞系。在個體為人類時，APC 亦可為 T 細胞，因為人類 T 細胞能夠表現 II 類 MHC 分子。該方法進一步包括若該等 CD4 淋巴細胞識別該 II 類 MHC 結合肽，則向該個體投與本發明之肽組合。

【0042】 本發明之第九態樣係關於一種肽組合，其包含：
具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之肽；

具有 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之肽；及

具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列之肽

其用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)，其中該組合用於至少每月一次、較佳每 1 至 4 週一次投藥，持續四次投藥。

【0043】 在一個實施例中，包含本發明之肽組合之組合物至少每月一次、較佳每 2 至 4 週一次投與，持續四次投藥。

【0044】 在另一實施例中，包含本發明之肽組合之組合物至少每月一次、較佳每週一次投與，持續四週。

【0045】 「其中該組合物用於投藥」意謂投與該組合。較佳，該肽組合用於以 240 μ g 或 12 mg 總肽之劑量投藥，肽以等莫耳比率存在。

【0046】 較佳，該肽組合經調配為包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥學上可接受之組合物。較佳，該組合物經調配以藉由非經腸、經口或局部途徑遞送，該等途徑包括靜脈內、皮內、肌肉內、皮下、腹膜內、經鼻、經口或透皮途徑，且更佳，該組合物經調配以藉由皮內途徑遞送。

【0047】 本發明之第十態樣係關於一種治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)之方法，其中至少每月一次、較佳每 1 至 4 週一次向 T1D 患者或鑑別為處於 T1D 高風險下之非糖尿病個體投與包含以下各者之肽組合：

具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之肽；

具有 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之肽；及

具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列之肽

持續四次投藥。

【0048】 在一個實施例中，包含本發明之肽組合之組合物至少每月一次、較佳每 2 至 4 週一次投與，持續四次投藥。

【0049】 在另一實施例中，包含本發明之肽組合之組合物至少每月一次、較佳每週一次投與，持續四週。

【0050】 較佳，該組合以 240 μ g 或 12 mg 總肽之劑量投與，肽以等莫耳比率存在。

【0051】 較佳，該肽組合經調配為包含一或多種醫藥學上可接受之賦

形劑的醫藥學上可接受之組合物。較佳，該組合物經調配以藉由非經腸、經口或局部途徑遞送，該等途徑包括靜脈內、皮內、肌肉內、皮下、腹膜內、經鼻、經口或透皮途徑，且更佳，該組合物經調配以藉由皮內途徑遞送。

【0052】 熟練人員將瞭解，本發明之全部態樣，不論其係關於例如肽組合物、其用途、醫藥學上可接受之組合物抑或治療方法，同等地適用於本發明之全部其他態樣。特定言之，肽組合之態樣例如可能比在本發明之其他態樣(例如肽組合之用途)中更詳細描述。然而，熟練人員將瞭解，在已關於本發明之特定態樣給出更詳細資訊時，此資訊通常同等地適用於本發明之其他態樣。

【圖式簡單說明】

【0053】 本發明現將參考圖式僅以實例的方式詳細描述，其中：

圖 1 展示 3 種親代序列之結果，其以交叉影綫展示且與較短巢式序列肽相比，以展示使用干擾素- γ 之產生作為讀出、藉由酶聯免疫墨點偵測的 T1D 患者響應之百分比。

圖 2 展示在用多肽組合物免疫以衍生糖尿病相關自身免疫性之臨床前模型之後 T 細胞增殖作為 PI 及 IA-2 特異性自身免疫性之讀出的結果。

圖 3 展示在用多肽組合物治療自身免疫 HLA-DR4 Tg 小鼠之後 T 細胞增殖作為 PI 及 IA-2 自身免疫性之讀出的結果。

圖 4 展示，用 3 種 PI 肽之組合治療小鼠比用單一 PI 肽治療更有效。簡言之，小鼠中對胰島素原之耐受性藉由用 100 μ g 於 CFA 中乳化之胰島素原蛋白質皮下免疫及在免疫之後即刻及 1 天用腹膜內百日咳毒素治療而破壞。小鼠隨後接受 4 次每週一次的 10 μ g 對照-PI 或胰島素原單/多 PI (C13-32 (SEQ ID NO: 4) ; C19-A3 (SEQ ID NO: 5) ; C22-A5 (SEQ ID NO:6))皮內治療，隨後用 100 μ g 於 IFA 中乳化之胰島素原蛋白質皮下免疫以加強不間斷的自身免疫響應(A)。7 天後收集淋巴結(LN)，且將 LN 細胞懸浮液在有或無胰島素原蛋白質或肽(C13-32 ; C19-A3 ; C22-A5)下活體外培養 48 小時。藉由 CFSE 稀釋度在 96 小時(B)及藉由 ELISA 在 48 小時(C)分析，響應於用 50 μ g/mL 胰島素原蛋白質及 10 μ g/mL 肽(C13-32 ; C19-A3 ; C22-A5)之活體

外刺激， $CD4^+$ T 細胞之增殖及 $IFN-\gamma$ 產生。在第 42 天量測胰島素原特異性 IgG1 之血清水準(D)。在第 42 天藉由流式細胞術於 LN 培養物中量測增殖之 $CD3^+CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ Treg 之百分比(E)。資料代表三個獨立實驗。 $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ ；藉由單因子 ANOVA 或斯圖登氏 t 檢定 (Student's t test) 確定統計顯著性。B 及 C 中每組有 15 只小鼠；D-F 每組有 5 只小鼠。

圖 5 展示，增加頻率之低劑量多 PI 比更高劑量或更少治療對反轉對全胰島素原之耐受性的破壞更有效。小鼠中對胰島素原之耐受性藉由用 100 μ g 於 CFA 中乳化之胰島素原蛋白質皮下免疫及在免疫之後即刻及 1 天用腹膜內百日咳毒素治療而破壞。小鼠隨後接受 4 次或 2 次每週一次的 10 μ g 或 1 μ g 由 3 種胰島素原肽(C13-32；C19-A3；C22-A5)組成或對照 HA 肽之皮內治療，隨後用 100 μ g 於 IFA 中乳化之胰島素原蛋白質皮下免疫以加強不間斷的自身免疫響應(A)。在第 42 天收集 LN，且將 LN 細胞在有或無胰島素原蛋白質或肽(C13-32；C19-A3；C22-A5)下活體外培養 48 小時。藉由胸苷併入及 ELISA 分析響應於 50 μ g/mL 胰島素原之增殖及細胞因子產生及平均值 $\pm$ SEM 增殖(B)，及響應於 50 μ g/mL 胰島素原之 $IFN-\gamma$ 產生(C)，或在 DLN 培養物中展示 10 μ g/mL 胰島素原肽。在第 42 天藉由流式細胞術於 LN 培養物中量測增殖之 $CD3^+CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ Treg 之百分比(E)。在第 42 天量測胰島素原特異性 IgG1 之血清水準(F)。資料代表至少兩個獨立實驗。 $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ ；藉由單因子 ANOVA 或斯圖登氏 t 檢定確定統計顯著性。每組有 6 只小鼠。

圖 6 展示，用 3 種 PI 肽治療增強抗原特異性調節。與對照-PI 治療之小鼠相比，來自用胰島素原多 PI 治療之小鼠的 Treg 具有增強之胰島素原特異性抑制因子活性。小鼠中對胰島素原之耐受性藉由用 100 μ g 於 CFA 中乳化之胰島素原蛋白質皮下免疫及在免疫之後即刻及 1 天用腹膜內百日咳毒素治療而破壞。小鼠隨後接受 4 次每週一次的 1 μ g 由 3 種胰島素原肽(C13-32；C19-A3；C22-A5)組成之 PI 或對照 HA 肽之皮內治療，隨後用 100 μ g 於 IFA 中乳化之胰島素原蛋白質皮下免疫以加強不間斷的自身免疫響應(A)。在第 42 天收集 LN，且將 $CD4^+CD25^{high}$ Treg 分離且以不同濃度與來自用胰島素原

/CFA 免疫之小鼠的 CFSE 標記之響應 T 細胞共培養。將細胞在 α CD3 α CD28 動力珠子(B)或胰島素原蛋白質(C)存在下共培養，且在 96 小時藉由流式細胞術藉由量測 CFSE 稀釋度計算響應 CD4⁺ T 細胞之增殖。CFSE 標記之響應細胞在來自 HA 或胰島素原-PIT 治療小鼠的降低濃度之 CD4⁺CD25^高Treg 存在下響應於 50 μ g/mL 胰島素原之平均值 $\pm$ SEM 增殖(D)。藉由單因子 ANOVA 或斯圖登氏 t 檢定確定統計顯著性。 $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ，每組有 15 只小鼠(彙集之淋巴結)。

【實施方式】

實例 1

經由誘導胰島素原特異性/IA-2 特異性自身反應性產生糖尿病相關自身免疫性之小鼠模型

【0054】 B6.129S2-*H2-Ab1*^{tm1Gru} Tg (HLA-DRA/H2-Ea,HLA-DRB1*0401/H2-Eb) 1Kito 小鼠(HLA-DR4-Tg) (1)自 Taconic, USA 進口，且用於全部實驗中。全部動物均為不含規定病原體的且在 King's College London Biological Services Unit 根據 Home Office Regulations 維持在標準條件下。

【0055】 在尾巴基部用於完全弗氏佐劑 (Complete Freund's Adjuvant, CFA, Sigma-Aldrich)中乳化之 100 μ g 全重組人類胰島素原蛋白質(Biommm, Brazil)及/或重組人類胰島素瘤相關抗原-2 (IA-2; Proteogenix)皮下攻擊小鼠。在免疫時及 1 天後用經由腹膜內腔遞送之 200 ng 百日咳毒素 (PTX, Sigma-Aldrich)治療小鼠。當測試肽免疫療法時，在末次肽療法治療之後 7 天，在尾巴基部用 100 μ g 於不完全弗氏佐劑(IFA, Sigma-Aldrich) 中乳化之自身抗原(胰島素原及/或 IA-2)皮下地進一步加強自身免疫響應。藉由測試對胰島素原或 IA-2 之回憶響應，獲得胰島素原及 IA-2 特異性自身免疫性之誘導的證據，以展現 T 細胞增殖及 T 細胞炎性細胞因子產生。

【0056】 圖 2 之圖形展示在用於具有百日咳毒素(PTX)佐劑之 CFA 中的此等自身抗原使人類化小鼠(HLA-DR4 Tg：關於人類肽呈遞分子 HLA-DR4 轉殖基因之小鼠)免疫之後，針對自身抗原胰島素原(PI)及 IA-2 之促炎性細胞因子產生(分別為圖 A 及 B)及 T 細胞增殖(分別為圖 C 及 D)。充分確定，響應於此等自身抗原的藉由 T 細胞之增殖及促炎性細胞因子產

生爲人類第 1 型糖尿病之特徵。因此，此等資料表明，如所示操縱之 HLA-DR4 Tg 小鼠可重演人類疾病之自身免疫特徵。

實例 2

量測小鼠中胰島素原及 IA-2 特異性 T 細胞增殖、炎性細胞因子產生及增殖之調節 T 細胞(Treg)之誘導

【0057】 使用 BD 細胞株(70 μ m)使引流淋巴結(DLN)均質化。將細胞於 RPMI 中洗滌，且以 2.5×10^6 個細胞/ml 再懸浮於含有 0.5% 自體同源小鼠血清之 RPMI 中。添加 2.5×10^5 個細胞至 U 底盤之各孔中。用單獨培養基、 α -CD3/ α -CD28 動力珠子(Invitrogen)作爲陽性對照刺激物或用胰島素原蛋白質或 IA-2 再刺激細胞。在 48 小時，移出上清液以用於細胞因子分析，且添加 0.5 mCi/孔氚化胸苷 [3 H]。18 小時後使用 MicroBeta Trilux 機器(Perkin Elmer)收集細胞。使用現成 SET-Go 套組(ebiosciences)根據製造商之指南量測在 48 小時獲取的培養物上清液中之 IFN- γ 及 IL-10 水準。

【0058】 根據標準方案進行流式細胞術。以 1:100 之稀釋度添加抗體 (Ab) (抗 CD4-PerCP、抗 FoxP3-APC、抗 CD3-PE、抗 CD25-FITC、抗 ki67-Pacific Blue (均來自 eBioscience, UK)、抗 CD11c-PE Cy7、抗 PDL1-PE、抗 CD86-FITC、抗 HLA-APC (均來自 BD bioscience))至各樣品中。使用標準套組且根據製造商之指南(Biolegend)進行細胞內染色。使用配備有 405 nm 紫雷射、488 nm 氬雷射及 635 nm 紅色二極體雷射(BD Bioscience)之 FACSCanto III 流式細胞儀及 FlowJo 軟體分析樣品。首先使用前向及側向散射參數根據大小及顆粒度鑑別淋巴細胞。隨後基於 CD3 及 CD4 表現鑑別 CD4⁺ T 細胞。基於高 CD25 表現及 FoxP3 表現表徵調節 T 細胞。最終，基於核蛋白 Ki67 之上調，鑑別增殖之調節 CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺CD25^高 T 細胞。

實例 3

胰島素原特異性調節

【0059】 小鼠中對胰島素原之耐受性如先前所描述而破壞。小鼠隨後接受 4 次每週一次的 1 μ g 對照-PI 或胰島素原多 PI (包含等莫耳量之 C13-22、C19-A3 及 C22-A5)之皮內治療，隨後藉由皮下注射胰島素原/IFA 加強對胰島素原之不間斷的自身免疫響應。移出淋巴結，且使用 CD4 T 細

胞分離套組(Miltenyi Biotec, Germany)藉由陰性選擇分離 CD4⁺ T 細胞。隨後用抗 CD25-FITC (ebioscience)對細胞染色，且藉由螢光激活細胞分選(FACS)使用 BD FACSAria 分離 CD4⁺ CD25^高抑制 T 細胞。將來自胰島素原/CFA 免疫小鼠之響應細胞如先前所描述用 CFSE 標記，且與 CD4⁺ CD25^高 T 細胞一起在單獨培養基、α-CD3α-CD28 動力珠子或胰島素原蛋白質下共培養 96 小時。藉由流式細胞術量測響應細胞之增殖(對應於 CFSE 損失)。藉由下式計算抑制%：

$$\frac{\text{Tresp 之 CFSE 稀釋度} - \text{Tresp:Treg 之 CFSE 稀釋度}}{\text{Tresp 之 CFSE 稀釋度}} \times 100$$

實例 4

鑑別人類 T1D 患者中之最佳 IA-2 序列

【0060】 使用酶聯免疫墨點(ELISPOT)分析進行響應於肽刺激藉由 CD4⁺ T 細胞產生之干擾素(IFN)-γ 之偵測，該分析如先前所描述在盲法熟練測試中對第 1 型糖尿病具有顯著識別能力(Arif, S.等人 J Clin Invest 2004; 113: 451-463 及 Herold, K. C.等人 Diabetes 2009; 58: 2588-2595)。資料表示為每一式三份之平均墨點數，且與在單獨稀釋劑存在下之平均墨點數相比(刺激指數；SI)。當使用利用如先前所描述之受試者工作特徵圖(receiver-operator characteristic plot)確定之截止值，SI ≥ 3 時，響應視為陽性的(Arif, S.等人 J Clin Invest 2004; 113: 451-463)。

【0061】 圖 1 展示對吾人藉由溶離鑑別之巢嵌於特異性肽系列內之抗原決定基的第 1 型糖尿病患者響應之比例(呈%形式)(參見 Peakman M 等人 J Clin Invest 1999; 104:1449-57)。展示 3 種親代序列之結果(交叉影綫)，且將其與較短巢式序列肽相比較。如使用酶聯免疫墨點分析偵測，響應代表藉由與各肽一起培養的周邊血液單核細胞之 IFN-γ 產生。

【0062】 圖 1 說明 709 系列(718-36)及 853 系列(855-67)內之優先序列。752 系列之巢式肽中無一者明顯優越。

實例 5

肽組合

【0063】 若干胰島素原(PI)及 IA-2 肽組合經選擇用於評估為在誘導

免疫調節方面最佳。參見下表 1。

表 1 - 肽免疫療法治療中所用之肽混合物

對照	組 1	組 2	組 3	組 4
經過濾無菌水	IA2 718-36 (SEQ ID NO: 1)	IA2 718-30 (SEQ ID NO: 7)	IA2 709-32 (SEQ ID NO: 9)	IA2 709-36 (SEQ ID NO: 11)
	IA2 752-75 (SEQ ID NO: 2)	IA2 752-75	IA2 752-75	IA2 752-75
	IA2 855-67 (SEQ ID NO: 3)	IA2 855-69 (SEQ ID NO: 8)	IA2 856-70 (SEQ ID NO: 10)	IA2 853-72 (SEQ ID NO: 12)
	PI C13-32 (SEQ ID NO: 4)	PI C13-32	PI C13-32	PI C13-32
	PI C19-A3 (SEQ ID NO: 5)	PI C19-A3	PI C19-A3	PI C19-A3
	PI C22-A5 (SEQ ID NO: 6)	PI C22-A5	PI C22-A5	PI C22-A5

【0064】 SEQ ID NO: 7 為 IA-2 之片段，其包含殘基 718-730。

【0065】 SEQ ID NO: 8 為 IA-2 之片段，其包含殘基 855-869。

【0066】 SEQ ID NO: 9 為 IA-2 之片段，其包含殘基 709-732。

【0067】 SEQ ID NO: 10 為 IA-2 之片段，其包含殘基 856-870。

【0068】 SEQ ID NO: 11 為 IA-2 之片段，其包含殘基 709-736。

【0069】 SEQ ID NO: 12 為 IA-2 之片段，其包含殘基 853-872。

實例 6

特定六肽組合在限制胰島素原及 IA-2 自身免疫性方面比若干其他試用組合更有效

【0070】 藉由用強佐劑及 PI/IA-2 免疫化，致使 HLA-DR4 轉殖基因 (人類化) 小鼠「自身免疫」，以如上所描述誘導對 PI 及 IA-2 之炎性響應。炎性響應包括 T 細胞增殖及炎性細胞因子產生，男性自身免疫(第 1 型)糖尿病之主要標志。將小鼠分配至 5 個如表 1 中所示用肽混合物或對照之治療組。

【0071】 如以上實例 1 中所描述在 B6.129S2-H2-Ab1^{tm1Gru} Tg

(HLA-DRA/H2-Ea,HLA-DRB1*0401/H2-Eb) 1Kito 小鼠(HLA-DR4-Tg)中誘導針對 PI 及 IA-2 之自身免疫響應。為檢查以肽免疫療法形式投與的不同肽組合對誘導之自身免疫響應之作用，每週一次藉由皮內注射(10 µg 總肽含量/注射，肽呈等莫耳比率)於 100 µl 無菌 PBS 中向下腹遞送表 1 中所示之肽組合或對照(注射用水)，持續 4 週。7 天後藉由如實例 2 中所描述，檢查淋巴結細胞針對 PI 及 IA-2 之增殖及細胞因子產生，測試對 PI 及 IA-2 之自身免疫響應。

【0072】 用對照治療之小鼠將具有穩固 T 細胞增殖及炎性細胞因子響應。在療法有效時，此等響應將顯著減少。

【0073】 結果表示為平均值±平均值之標準誤差(SEM)。藉由 D'Agostino & Pearson 多項正態性測試證實高斯分佈(Gaussian distribution)，隨後藉由單因子 ANOVA 或斯圖登氏 t 檢定確定顯著性。p < 0.05 之值視為顯著。

【0074】 圖 3 表示對獲自己藉由免疫針對 PI 及 IA-2 變得自身免疫之 HLA-DR4 Tg 小鼠的淋巴結細胞之活體外 PI (圖 A)及 IA-2 (圖 B)之回憶增殖響應。隨後用表 1 中規定之對照或肽組合之一治療小鼠。圖 3 中之資料展示為來自 n = 8/組之平均值(SEM)。

【0075】 圖 3A 說明，組 1 組合為與對照相比提供 PI 自身免疫性之統計顯著上降低之唯一混合物。組 1 組合在降低自身免疫性方面比其最接近替代版本顯著更佳。組 3 及 4 不顯著降低自身免疫性。

【0076】 圖 3B 說明，組 1 組合為與對照相比提供 IA-2 自身免疫性之統計顯著上降低之唯一混合物。組 1 組合在降低自身免疫性方面比其最接近替代版本顯著更佳。組 3 及 4 不顯著降低自身免疫性。

【0077】 藉由組 1 肽實現增殖之顯著減少(亦即對 PI 及 IA-2 之自身免疫性之控制)，該等肽因此展示作為耐受原之最佳效能。值得注意的是，組 1-4 肽僅在 IA-2 組成方面不同。PI 肽在全部組中均為相同的，但組 1 肽組合在限制 PI 特異性自身免疫性方面亦為優越的。此暗示跨抗原連鎖性抑制之現象。

【0078】 上述結果證明，與替代性肽組合相比，本發明主張之新穎肽

組合在限制抗 PI 及抗 IA-2 自身免疫性方面為優越的。令人驚訝地，已證明，IA-2 肽之不同組合在限制 PI 自身免疫性方面提供不同作用。此為跨抗原連鎖性抑制之證明，該跨抗原連鎖性抑制對患者可具有顯著治療益處。來自有限數目之自身抗原的有限數目之肽可用以靶向多種不同自身抗原，該等自身抗原在 T1D 中起一定作用。

實例 7

特定 PI 三肽組合在限制胰島素原自身免疫性方面比各單獨 PI 肽更有效

【0079】 如以上實例 1 中所描述在 B6.129S2-*H2-Ab1^{tm1Gru}* Tg (HLA-DRA/H2-Ea,HLA-DRB1*0401/H2-Eb) 1Kito 小鼠(HLA-DR4-Tg)中誘導針對 PI 之自身免疫響應。

【0080】 此 PI 自身免疫性模型用以評估單及多胰島素原肽調節對胰島素原的確定自身免疫響應之能力。藉由用 4 次每週一次之單 PI 或多 PI (全部 3 種胰島素原肽之等莫耳混合物)皮內注射治療 HLA-DR4-Tg 小鼠，研究各 HLA-DR4 限制胰島素原肽之耐受原潛力。在用全胰島素原-IFA 二次攻擊，以加強不間斷的自身免疫響應之後，活體外分析回憶響應(圖 4A)。多 PI 顯著下調引流淋巴結(DLN)培養物響應於胰島素原及胰島素原肽而非卵白蛋白(OVA)之抗原特異性增殖能力(圖 4B)。另外，多 PI 顯著減少炎性介體 IFN- γ (圖 4C)、IL-17 及 IL-13 (資料未展示)之合成。有趣地，未觀測到 IL-10 之抗原特異性誘導(圖 4D)。多 PI 在下調活體內對胰島素原蛋白質之響應方面亦為有效的，如胰島素原特異性 IgG 之降低之血清水準所指示(圖 4E)。相比之下，具有個別 C13-32、C19-A3 或 C22-A5 肽之單 PI 展示較低治療效力水準(圖 4E-F)。

【0081】 關於此等作用之機制，藉由流式細胞術對 DLN 之分析證明，與對照-PI 治療之小鼠相比，在多 PI 之後淋巴結中增殖之 Treg 之比例顯著增加(圖 2F)。再次，3 種胰島素原肽之組合在誘導 Treg 增殖方面比單 PI 更有效，表明多種 PI 肽在調節確定自身免疫響應方面比單一 PI 肽更有效。

實例 8

最佳化肽劑量及投藥

【0082】 2 次或 4 次用 1 或 10 μg 多 PI 治療小鼠(圖 5A)。為確定減少之多 PI 頻率及/或劑量的作用，藉由量測 DLN 細胞懸浮液針對胰島素原蛋白質及胰島素原肽之增殖及細胞因子產生來活體外分析回憶響應(圖 5B-D)。將多 PI 治療之數目自 4 減至 2 導致治療效力實質損失。相比之下，4 次多 PI 之治療在下調對胰島素原之響應方面為有效的，且 1 μg 之減少劑量似乎與 10 μg 多 PI 一樣有效(圖 5B-D)。在二次免疫後 7 天藉由流式細胞術對 DLN 組成之分析顯示，與已接受對照-PI 之小鼠相比，已接受多 PI 之小鼠中調節 T 細胞增殖之水準增加，處理組之間未觀測到顯著差異(圖 5E)。胰島素原特異性血清 IgG 水準藉由多 PI 下調，且在已接受 4 次 10 μg 多 PI 治療之小鼠中顯著降低(圖 5F)。

實例 9

用三種 PI 肽治療增強抗原特異性調節

【0083】 藉由量測與接受活性治療之小鼠相比，用對照-PI 治療之小鼠之 Treg 區室中之胰島素原特異性抑制因子活性，來評估多 PI 對 Treg 功能之影響。將 $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ 調節 T 細胞自用對照-PI 或胰島素原多 PI 治療之小鼠分離，且以不同濃度與來自用胰島素原/CFA 免疫之小鼠的 CFSE 標記之響應 T 細胞共培養(圖 6A)。將細胞在抗 CD3/抗 CD28 免疫磁性珠子存在下共培養，以量測對照-PIT 及多 PIT Treg 抑制多株響應之能力。在兩種治療條件下產生之 Treg 展現等效抑制能力(圖 6B)。然而，在用胰島素原蛋白質刺激之共培養物中，存在不同治療相關抑制能力(圖 6C)。來自多 PI 治療小鼠之 Treg 比來自對照-PI 治療小鼠之 Treg 顯著更大程度地抑制胰島素原特異性響應(圖 6D)。

【0084】 本說明書中引用之全部專利及參考文獻以全文引用的方式併入本文中。

【符號說明】

(無)

序列表

<110> 倫敦國王學院

<120> 多肽組合物

<130> P530969GB

<160> 12

<170> 版本 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Ala Tyr Gln Ala Glu Pro Asn Thr Cys Ala Thr Ala Gln Gly Glu Gly
1 5 10 15

Asn Ile Lys

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Lys Leu Lys Val Glu Ser Ser Pro Ser Arg Ser Asp Tyr Ile Asn Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ile Ile Glu His Asp Pro
20

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Tyr Leu Lys Asn Val Gln Thr Gln Glu Thr Arg Thr Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly
1 5 10 15

Ser Leu Gln Lys
20

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly
1 5 10 15

Ile Val

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu
1 5 10 15

Gln

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

Ala Tyr Gln Ala Glu Pro Asn Thr Cys Ala Thr Ala Gln
1 5 10

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

Tyr Leu Lys Asn Val Gln Thr Gln Glu Thr Arg Thr Leu Thr Gln
1 5 10 15

<210> 9
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Leu Ala Lys Glu Trp Gln Ala Leu Cys Ala Tyr Gln Ala Glu Pro Asn
1 5 10 15

Thr Cys Ala Thr Ala Gln Gly Glu
20

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

Leu Lys Asn Val Gln Thr Gln Glu Thr Arg Thr Leu Thr Gln Phe
1 5 10 15

<210> 11
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 11

Leu Ala Lys Glu Trp Gln Ala Leu Cys Ala Tyr Gln Ala Glu Pro Asn
1 5 10 15

Thr Cys Ala Thr Ala Gln Gly Glu Gly Asn Ile Lys
20 25

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12

Ser Phe Tyr Leu Lys Asn Val Gln Thr Gln Glu Thr Arg Thr Leu Thr
1 5 10 15

Gln Phe His Phe
20

申請專利範圍

1. 一種肽組合，其包含：
具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之肽；及
具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列之肽。
2. 如申請專利範圍第 1 項之肽組合，其由以下各者組成：
具有 SEQ ID NO: 1 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之肽；及
具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列之肽。
3. 一種醫藥學上可接受之組合物，其包含如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之肽組合及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。
4. 如申請專利範圍第 3 項之醫藥學上可接受之組合物，其進一步包含半胱胺酸。
5. 如申請專利範圍第 3 項或第 4 項之醫藥學上可接受之組合物，其用於治療。
6. 如申請專利範圍第 5 項之醫藥學上可接受之組合物，其用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)。
7. 如申請專利範圍第 5 項之醫藥學上可接受之組合物，其用於製造用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)之藥劑。
8. 如申請專利範圍第 3 項至第 7 項中任一項之醫藥學上可接受之組合物，其中該組合物經調配以藉由非經腸、經口或局部途徑遞送，該等途徑包括靜脈內、皮內、肌肉內、皮下、腹膜內、經鼻、經口或透皮途徑。
9. 如申請專利範圍第 8 項之醫藥學上可接受之組合物，其中該組合物經調配以藉由皮內途徑遞送。

10. 一種治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)之方法，其中向 T1D 患者或鑑別為處於 T1D 高風險下之非糖尿病個體投與如申請專利範圍第 3 項或第 4 項之醫藥學上可接受之組合物。
11. 如申請專利範圍第 10 項之治療或預防方法，其中向具有 β 細胞質量剩餘之患者投與本發明之該醫藥學上可接受之組合物。
12. 如申請專利範圍第 10 項或第 11 項之方法，其中該醫藥學上可接受之組合物藉由非經腸、經口或局部途徑投與，該等途徑包括靜脈內、皮內、肌肉內、皮下、腹膜內、經鼻、經口或透皮途徑。
13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該醫藥學上可接受之組合物藉由皮內途徑投與。
14. 一種用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)之套組，其包含如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之肽組合。
15. 一種診斷或確定治療功效之方法，其包括：
 - (a) 提供來自疑似患有或易患 T1D 之個體之 CD4 淋巴細胞；
 - (b) 提供抗原呈遞細胞(APC)群體，其在其表面上攜有具有與由該個體表現者一致的對偶基因之 II 類 MHC 分子，該 APC 群體已與如申請專利範圍第 1 項之肽組合接觸，且該 II 類 MHC 分子結合至如申請專利範圍第 1 項之肽組合中的該等肽中之一或多者；或
 - (c) 提供可溶肽-HLA 多聚體試劑，其包含具有與由該個體表現者一致的對偶基因之 II 類 MHC 分子，該等 MHC 分子已結合至本發明之該肽組合中的一或多種肽；
 - (d) 使(b)之該 APC 群體或(c)之該肽-HLA 多聚體與(a)之該等 CD4 淋巴細胞接觸；及
 - (e) 確定該等 CD4 淋巴細胞是否識別該 II 類 MHC 結合肽，作為該個體患有或易患 T1D 之指示。
16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其進一步包括若該等 CD4 淋巴細胞識別該 II 類 MHC 結合肽，則向該個體投與如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之肽組合。
17. 一種肽組合，其包含：
 - 具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之肽；

- 具有 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之肽；及
具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列之肽，
其用於治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)，其中該組合用於至少每月一次、較佳每 1 至 4 週一次投藥，持續四次投藥。
18. 如申請專利範圍第 17 項之肽組合，其中該組合用於至少每月一次、較佳每 2 至 4 週一次投藥，持續四次投藥。
 19. 如申請專利範圍第 17 項之肽組合，其中該組合用於至少每月一次、較佳每週一次投藥，持續四週。
 20. 如申請專利範圍第 17 項至第 19 項中任一項之肽組合，其中該組合用於以 240 μg 總肽之劑量投藥。
 21. 如申請專利範圍第 17 項至第 19 項中任一項之肽組合，其中該組合用於以 12 mg 總肽之劑量投藥。
 22. 如申請專利範圍第 17 項至第 21 項中任一項之肽組合，其中該肽組合經調配為包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥學上可接受之組合物。
 23. 如申請專利範圍第 22 項之肽組合，其中該組合物經調配以藉由非經腸、經口或局部途徑遞送，該等途徑包括靜脈內、皮內、肌肉內、皮下、腹膜內、經鼻、經口或透皮途徑。
 24. 如申請專利範圍第 23 項之肽組合，其中該組合物經調配以藉由皮內途徑遞送。
 25. 一種治療或預防第 1 型糖尿病(T1D)之方法，其中至少每月一次、較佳每 1 至 4 週一次向 T1D 患者或鑑別為處於 T1D 高風險下之非糖尿病個體投與包含以下各者之肽組合：
具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列之肽；
具有 SEQ ID NO: 5 之胺基酸序列之肽；及
具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸序列之肽，
持續四次投藥。
 26. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該肽組合至少每月一次、較佳每 2 至 4 週一次投與，持續四次投藥。
 27. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該肽組合至少每月一次、較佳每

週一次投與，持續四週。

28. 如申請專利範圍第 25 項至第 27 項中任一項之方法，其中該組合以 240 μg 總肽之劑量投與。
29. 如申請專利範圍第 25 項至第 27 項中任一項之方法，其中該組合以 12 mg 總肽之劑量投與。
30. 如申請專利範圍第 25 項至第 29 項中任一項之方法，其中該肽組合經調配為包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥學上可接受之組合物。
31. 如申請專利範圍第 30 項之方法，其中該組合物經調配以藉由非經腸、經口或局部途徑遞送，該等途徑包括靜脈內、皮內、肌肉內、皮下、腹膜內、經鼻、經口或透皮途徑。
32. 如申請專利範圍第 31 項之方法，其中該組合物經調配以藉由皮內途徑遞送。

圖式

1/6

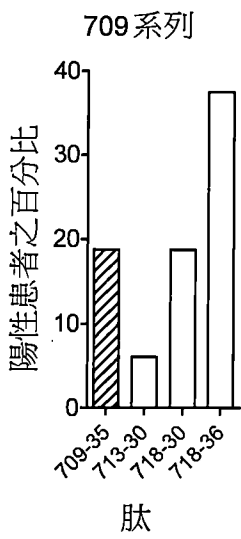


圖1A

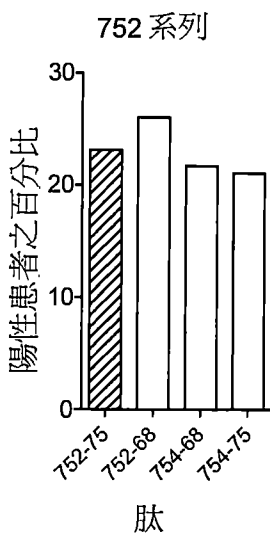


圖1B

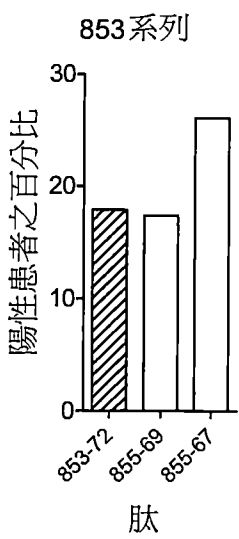


圖1C

圖1

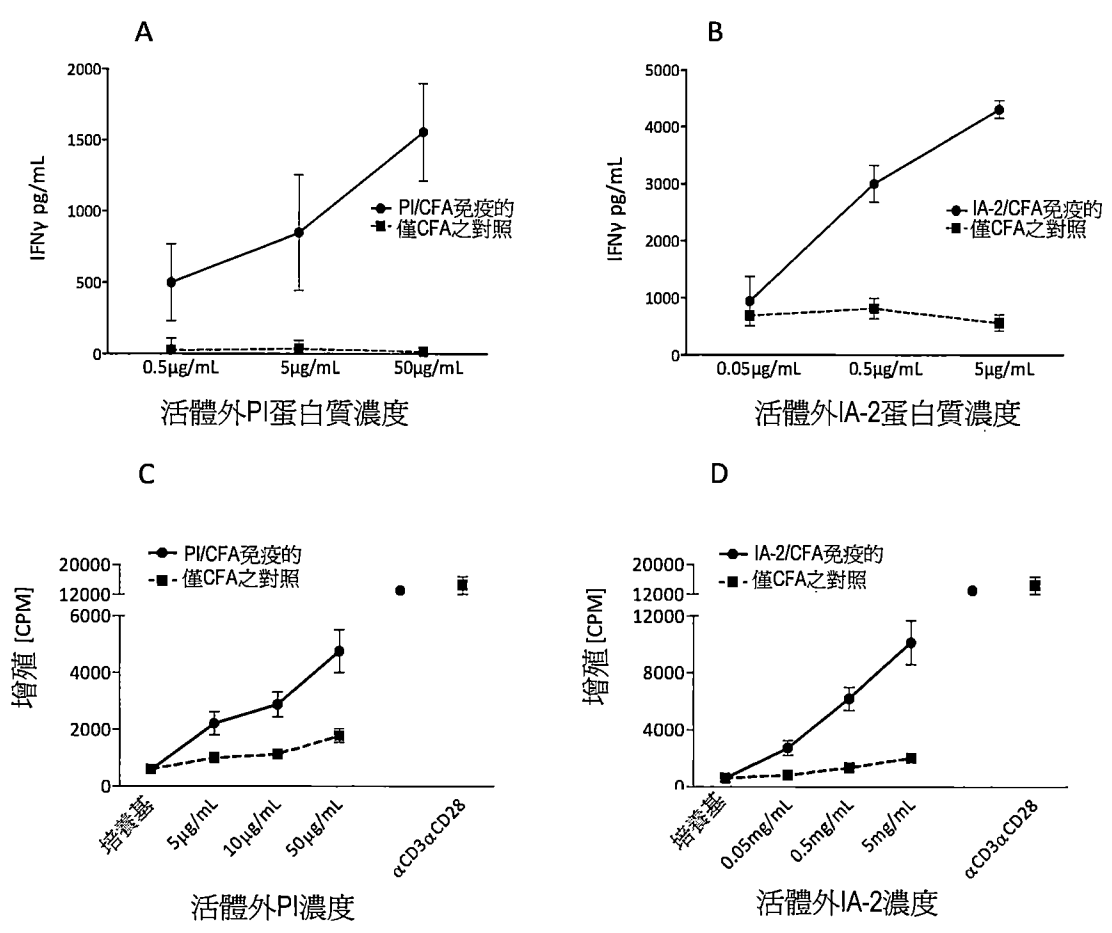


圖2

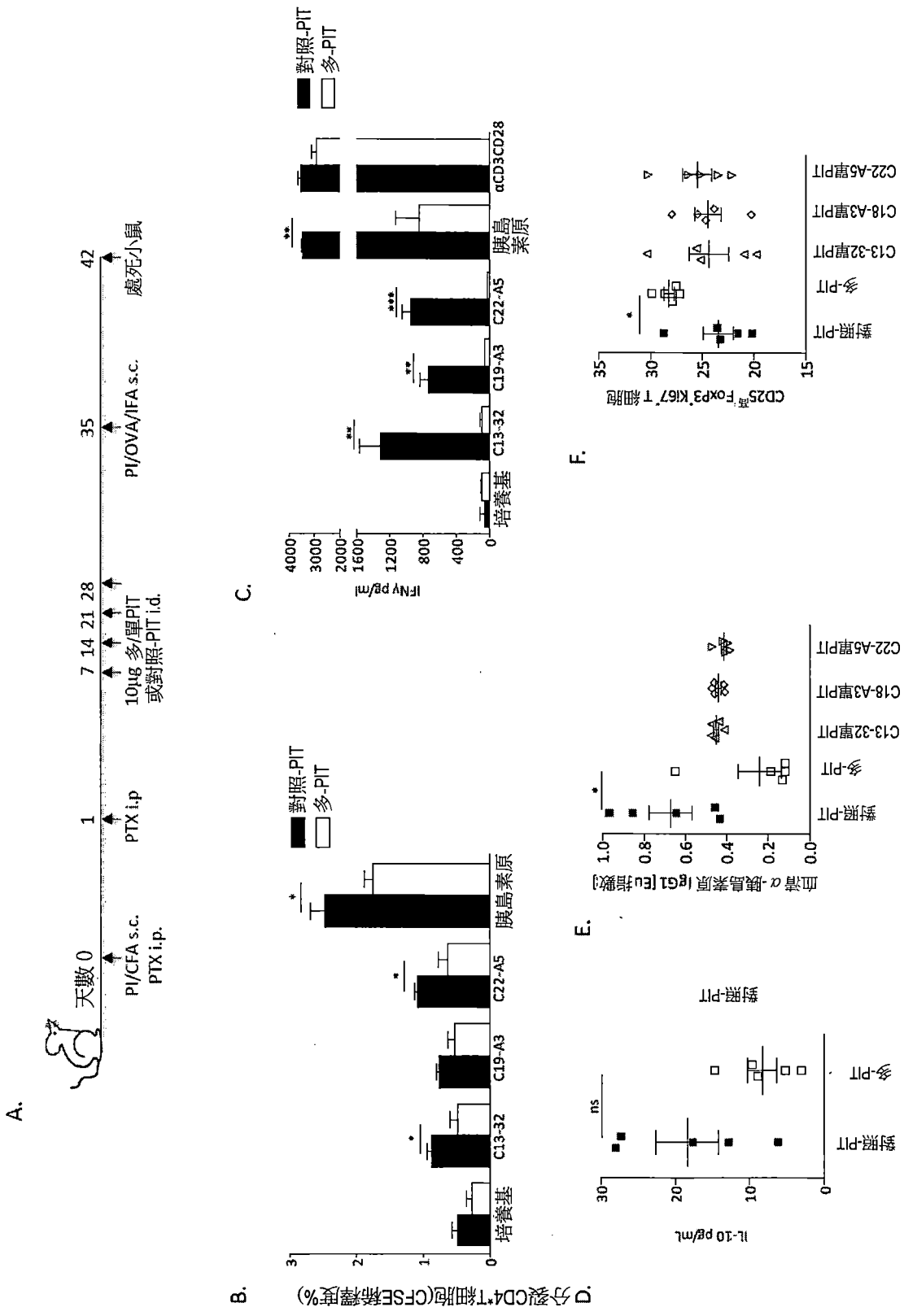


圖4

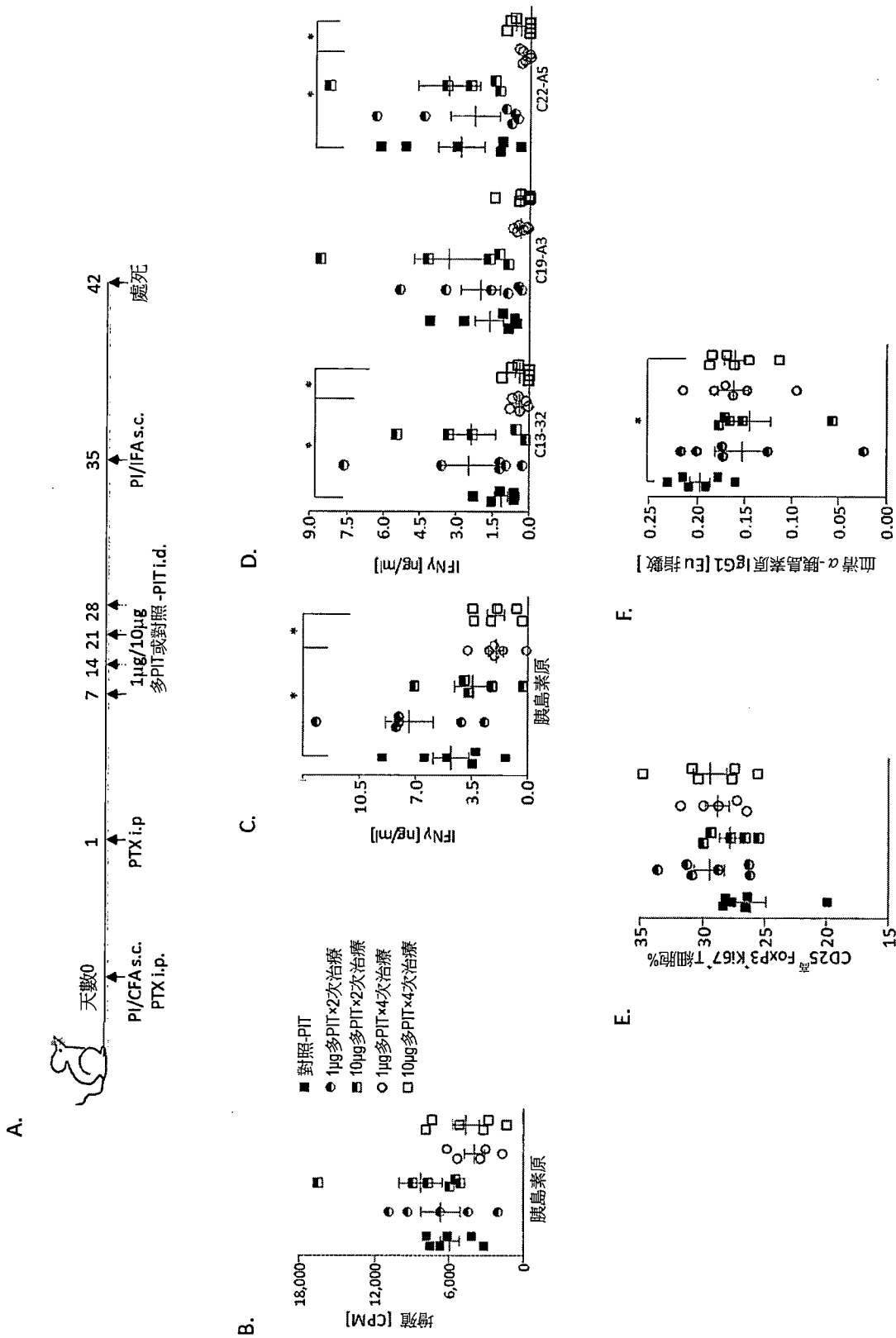


圖5

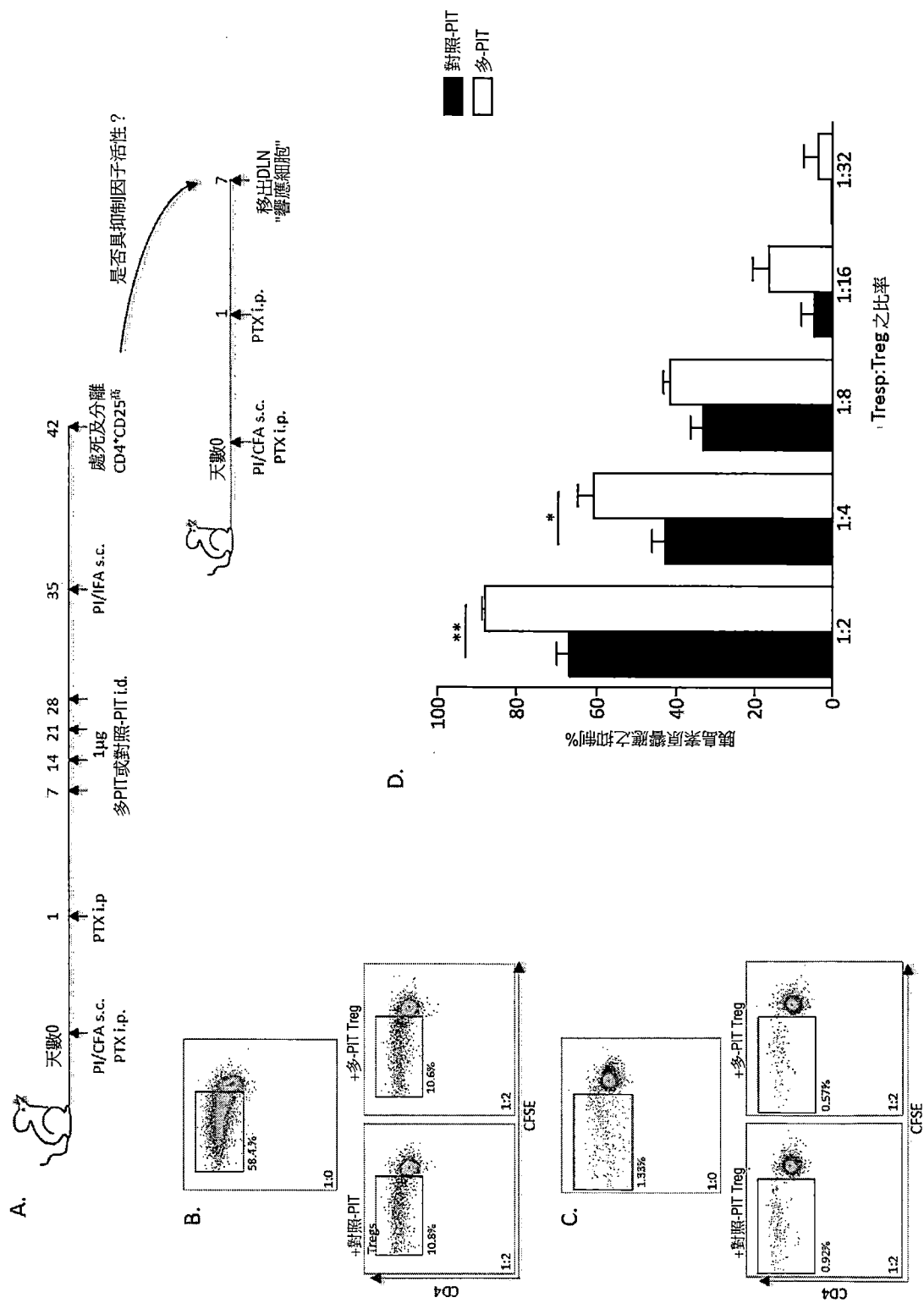


圖6