(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103826653 A
(43)申请公布日 2014.05.28

(21)申请号 201280041815.3
(22)申请日 2012.07.23
(30)优先权数据
11006031.6 2011.07.22 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.02.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/064445 2012.07.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/014134 EN 2013.01.31
(71)申请人 苏黎世大学
地址 瑞士苏黎世
(72)发明人 I·耶尔契奇 R·马丁 S·席佩凌 M·佐斯佩拉 S·约瑟夫
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 张琤
(51)Int.Cl.
A61K 38/04(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
C07K 14/025(2006.01)

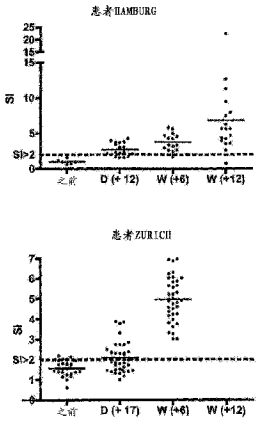
权利要求书2页 说明书28页
序列表16页 附图10页

(54)发明名称

免疫接种和诊断应用中的多瘤病毒JC肽和蛋白质

(57)摘要

本发明涉及免疫接种或免疫领域，特别是治疗性免疫接种和诊断。公开了能够引发抗瘤病毒JC(JCV)的保护性免疫应答的药物组合物和试剂盒，其可用于例如治疗或预防进行性多病灶脑白质病(PML)和/或进行性多病灶脑白质病-免疫重构炎性综合征(PML-IRIS)。处于此种PML或PML-IRIS的危险中的个体可以例如为免疫受损或被免疫抑制的患者或具有适格进行免疫抑制治疗的自身免疫性疾病的患者。本发明还涉及包含JCV蛋白的至少一个CD4+表位的组合物以及其治疗性、预防性和诊断性用途。



CN 103826653 A

1. 包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽，其中所述表位选自包含 SEQ ID NO :1-92 的组。

2. 权利要求 1 的蛋白质或肽，其中所述表位选自包含 SEQ ID NO:1-3,7-9,11,23,37-38,43-45 和 69-71 的组。

3. 权利要求 1 或 2 的蛋白质，其中所述包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质包括 VP1 或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质。

4. 权利要求 3 的蛋白质，其中所述 VP1 或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质还包含至少一个选自包含 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :46-76 的组的表位。

5. 权利要求 3-4 的任一项的蛋白质，其中所述包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质以病毒样颗粒的形式存在。

6. 权利要求 1-5 的任一项的蛋白质或肽，其用于诊断 JCV 感染和 / 或用于诊断 PML 的方法中。

7. 权利要求 1-5 的任一项的蛋白质或肽，其用于治疗受试者中的 PML 的方法中。

8. 权利要求 7 的蛋白质或肽，其中所述 PML 治疗包括施用能够扩增和维持 T 细胞的细胞因子。

9. 权利要求 8 的蛋白质或肽，其中所述细胞因子选自 IL-7,IL-2,IL-15 和 IL-21。

10. 权利要求 7-9 的任一项的蛋白质或肽，其中所述 PML 治疗包括佐剂的施用。

11. 权利要求 10 的蛋白质或肽，其中所述佐剂选自 MF59、氢氧化铝、磷酸钙凝胶、脂多糖、咪唑并 - 喹啉 (例如咪喹莫特 ,S-28463)、具有 CpG 基序的寡核苷酸序列、硬脂酰酪氨酸、DTP-GDP、DTP-DPP、苏氨酰 -MDP、7- 烯丙基 -8- 氧鸟苷、糖脂 bay R1005、多抗原肽系统、聚合的半抗原肽、细菌提取物、TLR-7 激动剂、TLR-8 激动剂和 vit-A。

12. 权利要求 1-5 的任一项的蛋白质或肽，其用于预防处于发生 PML 的风险中的受试者的 PML 和 / 或 PML-IRIS 的方法中。

13. 权利要求 12 的蛋白质或肽，其中所述受试者被 JCV 感染。

14. 权利要求 7-13 的任一项的蛋白质或肽，其中所述受试者选自 :

a) 具有先天性免疫缺陷例如特发性 CD4+ 淋巴细胞减少或 Hyper-IgE- 综合征的患者，

b) 具有由疾病或病理学病况如 AIDS、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或者乙型或丙型肝炎病毒感染引起的获得性免疫缺陷的受试者，和

c) 具有由治疗性干预例如化学疗法、放射或免疫抑制治疗引起的获得性免疫缺陷的受试者。

15. 权利要求 14 的蛋白质或肽，其中所述免疫抑制治疗包括用免疫抑制抗体进行的治疗。

16. 权利要求 15 的蛋白质或肽，其中所述免疫抑制抗体选自那他珠单抗，依法珠单抗，利妥昔单抗，奥瑞珠单抗和阿仑珠单抗。

17. 权利要求 14-16 的任一项的蛋白质或肽，其中所述受试者患有自身免疫性疾病。

18. 权利要求 17 的蛋白质或肽，其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化。

19. 权利要求 18 的蛋白质或肽，其中所述受试者将用抗体那他珠单抗来治疗。

20. 一种药物试剂盒，其包括含有至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽以及佐剂，其中所述表位选自包含 SEQ ID NO :1-92 的组，所述佐剂优选选自包含 TLR-7 激动剂和

/ 或 TLR-8 激动剂的组。

21. 权利要求 20 的药物试剂盒，其中所述佐剂是 TLR-7 激动剂，优选地，咪喹莫特。

22. 权利要求 20 或 21 的药物试剂盒，其中所述包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质包括 VP1 或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质。

23. 权利要求 22 的药物试剂盒，其中所述 VP1 或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质为还包含至少一个选自包含 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :46-76 的组的表位的融合蛋白。

24. 权利要求 20-23 的任一项的药物试剂盒，其中所述包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质以病毒样颗粒的形式存在。

25. 权利要求 20-24 的任一项的药物试剂盒，其中所述试剂盒还包括 IL-7。

26. 权利要求 20-25 的任一项的药物试剂盒，其中将皮下施用所述包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽。

27. 权利要求 20-26 的任一项的药物试剂盒，其中将经皮肤施用所述佐剂。

28. 权利要求 20-27 的任一项的药物试剂盒，其中将给选自经诊断患有 PML 的受试者或处于发生 PML 的风险中的受试者的受试者施用所述试剂盒的组分，和

其中所述受试者任选地被诊断为 JCV 携带者。

29. 权利要求 20-28 的任一项的药物试剂盒，其中将给选自下组的受试者施用所述试剂盒的组分：

a) 免疫受损或免疫缺陷的受试者，例如 HIV 携带者，具有免疫抑制治疗的受试者或先天性免疫缺陷患者例如具有特发性 CD4+ 淋巴细胞减少或 Hyper-IgE- 综合征的患者；

b) 适格进行免疫抑制治疗的受试者。

30. 权利要求 20-29 的任一项的药物试剂盒，用于治疗 PML。

31. 权利要求 20-30 的任一项的药物试剂盒，其用于在选自下组的受试者中预防 PML 和 / 或 PML-IRIS：

a) 免疫受损或免疫缺陷的受试者，例如 HIV 携带者，具有免疫抑制治疗的受试者或先天性免疫缺陷患者例如具有特发性 CD4+ 淋巴细胞减少或 Hyper-IgE- 综合征的患者；和

b) 适格进行免疫抑制治疗的受试者，

其中所述免疫抑制治疗优选选自包含利用那他珠单抗，依法珠单抗，利妥昔单抗，奥瑞珠单抗和阿仑珠单抗的治疗的组。

32. 权利要求 29 或 31 的任一项的药物试剂盒，其中所述免疫抑制治疗是对被诊断患有自身免疫性疾病的受试者或移植患者的治疗，其中在免疫抑制治疗之前、之后或期间给所述患者施用试剂盒的组分，其中所述免疫抑制治疗优选选自包含利用那他珠单抗，依法珠单抗，利妥昔单抗，奥瑞珠单抗和阿仑珠单抗的治疗的组。

免疫接种和诊断应用中的多瘤病毒 JC 肽和蛋白质

[0001] 本发明涉及免疫接种或免疫的领域，特别是治疗性免疫接种和诊断。公开了能够引发抗多瘤病毒 JC(JCV) 保护性免疫应答的药物组合物和试剂盒，所述药物组合物和试剂盒可用于例如治疗或预防进行性多病灶脑白质病 (PML) 和 / 或进行性多病灶脑白质病 - 免疫重构炎性综合征 (PML-IRIS)。处于此种 PML 或 PML-IRIS 的危险中的个体可以例如是免疫受损或被免疫抑制的患者或具有适格接受免疫抑制治疗的自身免疫疾病的患者。本发明还涉及包含 JCV 蛋白的至少一个 CD4+ 表位的组合物及其治疗性、预防性和诊断性用途。

[0002] 进行性多病灶脑白质病和进行性多病灶脑白质病 - 免疫重构炎性综合征由多瘤病毒 JC(JCV) 对中枢神经系统的感染引起。这两种疾病最近都显现为多发性硬化和其它自身免疫性疾病的单克隆抗体疗法的并发症。

[0003] 进行性多病灶脑白质病 (PML) 最早被描述于 1958 年。1971 年，多瘤病毒 JC(JCV) 被鉴定为 PML 的致病剂。PML 是机会性的并且通常为致命的感染，其在免疫受损的状态例如 HIV 感染、癌症、器官移植、免疫缺陷或罕见地在自身免疫性疾病的过程中发生。在 AIDS 患者中，PML 是最严重的并发症之一，尽管其发生率在引入抗病毒疗法后降低 (Cinque 等人，2001)。JCV 感染在健康成人中是高度普遍的，60% 或更多的群体携带潜伏性 / 持久性感染 (Egli 等人，2009)。近年来，PML 已显露为自身免疫性疾病 (特别是多发性硬化 (MS)) 的单克隆抗体疗法和利用那他珠单抗 (抗 -VLA-4) 的治疗中的日益普遍的严重不利事件 (Kleinschmidt-DeMasters 和 Tyler，2005)(Langer-Gould 等人，2005)(Jilek 等人)(Anonymous，2011)。其它单克隆抗体例如利妥昔单抗 (抗 -CD20)、英夫利昔单抗 (抗 - 肿瘤坏死因子 (TNF)- α) 和用于治疗类风湿关节炎 (RA) 的 IgG1-TNF 受体 2 融合蛋白依那西普也与 PML 相关联。依法珠单抗 (抗 - 白细胞功能相关抗原 -1) 已被撤市 (Pugashetti 和 Koo，2009)。由于在接受那他珠单抗的 MS 患者中报导了超过 120 例 PML 病例，因此 PML 发病率为 1:500 至 1:1000，而危及该高度有效的治疗的用途 (佚名，2011)。

[0004] PML 的发病机制的特征在于在显著的免疫应答不存在的情况下髓磷脂形成性少突胶质细胞的裂解性感染和星形细胞的顿挫性感染。然而，其它 CNS 细胞例如小脑颗粒神经元也可被 JCV 感染 (Du Pasquier 等人，2003a)。尽管控制 JCV 感染的机制还不完全清楚，但 JCV 感染的潜伏期可能受到健康个体中有效体液和 / 或细胞免疫应答的控制 (Du Pasquier 等人，2001)(Du Pasquier 等人，2004a)(Weber 等人，1997)。因此，已将 JCV- 特异性 CD8+ 细胞毒性 T 细胞的存在与从 PML 的恢复相联系，而这些细胞在具有致命结果的 PML 病例中不存在 (Du Pasquier 等人，2004a ;Du Pasquier 等人，2006 ;Koralnik 等人，2002)。另外，PML 还优先在减少的 CD4+T 细胞数目或受损的 CD4+ 细胞功能的情形 (例如 AIDS 和特发性 CD4+ 淋巴细胞减少) 中发生 (Stoner 等人，1986)(Gillespie 等人，1991 ;Zonios 等人，2008)。与 CD8+JCV- 特异性 T 细胞的作用相当，PML 的消退在 CD4+ 数目和功能恢复之后，这表明 CD4+ 和 CD8+ 病毒特异性 T 细胞对于宿主的保护是至关重要的。

[0005] 与 AIDS 中显著的免疫抑制相反，在非何杰金氏淋巴瘤和白血病中，基于单克隆抗体的疗法抑制特定的免疫功能例如在抗 -VLA-4/ 那他珠单抗疗法中穿过内皮屏障的细胞迁移，或在利妥昔单抗的情形中消除某些免疫细胞例如 CD20 表达性 B 细胞 (Lutterotti 和

Martin,2008)。在抗-VLA-4疗法的情境中,目前的假说假定PML由CNS的受损的免疫监督引起,因为活化的T细胞和CD209+不成熟的树突细胞不能穿过血脑屏障(BBB)和进入脑(del Pilar Martin等人,2008;Stuve等人,2006;Yednock等人,1992)。因此,局部抗原呈递在CNS中受损(del Pilar Martin等人,2008)。

[0006] 备选地,已认为VLA-4/血管细胞粘着分子-1(VCAM-1)相互作用(所述相互作用作为骨髓中造血前体细胞的保持信号)的抑制导致JCV从其天然小生境之一释放(Tan等人,2009a)、增加的病毒复制和具有对CNS细胞的向性的JCV变体的出现(Houff等人,1988;Ransohoff,2005)。

[0007] PML中利用这些单克隆抗体的疗法的停止重新建立CNS中经JCV感染的细胞的免疫监督,并导致该隔室(compartment)的临床上明显的炎性反应。炎症因BBB的开放以及T细胞和单核细胞/巨噬细胞的流入而可在磁共振成像(MRI)上通过对比增强性损伤可视化。PML的后一种表现被称为免疫PML-重构炎性综合征(PML-IRIS)(Koralnik,2006;Tan等人,2009b)。在约30%至50%的病例中,PML-IRIS可导致患者的临床状态的快速恶化和死亡(Tan等人,2009b)。其细胞和分子发病机制,即牵涉哪些T细胞亚型、抗体或细胞因子目前不甚了解。

[0008] 进行性多病灶脑白质病-免疫重构炎性综合征可使进行性多病灶脑白质病的诊断变得模糊,并导致具有严重临床失能和可能地死亡的显著的免疫发病机制。与进行性多病灶脑白质病(其中脱髓鞘由在感染位点不存在免疫应答的情况下JC病毒造成的少突胶质细胞裂解引起)不同,进行性多病灶脑白质病-免疫重构炎性综合征中的组织破坏是由抗JC病毒感染的少突胶质细胞和星形细胞的强烈免疫应答以及脑的炎性肿胀引起的。当免疫能力被重新建立时(例如在利用高度活性的逆转录病毒疗法治疗的AIDS患者中或在利用抗-VLA-4单克隆抗体那他珠单抗治疗并且洗去抗体后的MS患者中),PML-IRIS开始。在PML-IRIS过程中,免疫细胞进入脑并且消除JCV-感染的星形细胞和少突胶质细胞。在现有技术水上对参与进行性多病灶脑白质病-免疫重构炎性综合征的细胞和介导者了解甚少。

[0009] 尽可能早地诊断PML和PML-IRIS以及基于潜在的疾病机制鉴定有效的疗法不仅在MS中而且在许多其它自身免疫性疾病中,在获得性免疫缺陷过程中,在恶性肿瘤过程中和在移植医学中是非常重要的目标。用于诊断JVC的方法是已知的。例如,有可能通过PCR检测病毒。备选的方式是检测针对JCV的抗体,例如通过ELISA。在Goldmann等人,1999或DE19543553中教导了用于诊断JCV感染的示例性方法,例如使用针对JCV核心蛋白VP1的ELISA。

[0010] 到目前为止对疾病的治疗方法研究较少。Goldmann等人,1999或DE19543553建议利用VP1蛋白的免疫接种,该蛋白可被装配成病毒样颗粒。已教导,利用弗氏完全佐剂(FCA)的免疫接种诱发免疫应答,而不利用佐剂的免疫接种不是免疫原性的。然而,弗氏完全佐剂因其毒性而不能用于人。

[0011] 鉴于病原性免疫应答的危险(如在PML-IRIS中是普遍的),开发允许治疗PML和预防PML及PML-IRIS的免疫接种是特别的挑战。

[0012] 该问题被本发明、特别是被权利要求的主题解决了。

[0013] 本发明在第一方面提供了包含至少一个源自JCV的CD4+表位的蛋白质或肽,其中所述表位选自包含SEQ ID NO:1-92的组。在第二方面,本发明提供了包括含有至少一个源

自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽和佐剂的药物试剂盒，其中所述表位选自包含 SEQ ID NO：1-92 的组。优选地，所述佐剂选自包含 TLR-7 激动剂和 / 或 TLR-8 激动剂的组。

[0014] 发明人令人惊讶地显示了 CD4+ 反应在控制 JCV 感染和预防 PML 中的生物学相关性。先前认为 CD8+ 细胞和细胞免疫应答起控制 JCV 的主要作用。

[0015] 发明人鉴定了许多 CD4+ 表位，特别是来自 JVC 的 VP1 蛋白的表位，所述表位适合用于治疗性和预防性疫苗。例如，用于这类疫苗中的肽或蛋白质可包含来自本文中公开的一种或多种 JCV 蛋白的一个或多个表位序列。本发明的蛋白质或肽可以例如包含 VP1 蛋白或与 VP1 蛋白具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质的氨基酸序列。根据优选的方面，本发明提及利用 VP1 蛋白或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质的免疫接种。VP1 蛋白或其变体可以以五聚体(即以 JCV 衣壳体的形式)存在于疫苗中。然而，优选地，VP1 蛋白或其变体以病毒样颗粒 (VLP) 的形式存在。VLP 可由 VP1 组成或其还可包含其它 JCV 蛋白例如 VP2 和 / 或 VP3。本发明的药物试剂盒从而可包含抗原（即包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽，包括 VP1 或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质）作为一个组分。

[0016] 蛋白质和肽在本申请的上下文中基本上彼此互换地使用。通常地，蛋白质比肽更长，且例如包含超过 100 个氨基酸，而肽具有 5 至 100 个氨基酸。

[0017] CD4+ 表位是在 MHC II 类分子的情境中能够被 CD4+T 细胞的 T 细胞受体识别的肽。发明人已鉴定了 CD4+T 细胞表位，其被健康对照和 PML/PML-IRIS 患者的 CD4+T 细胞识别。这类肽公开于下面的表 1 中 (SEQ ID NO:1-92) 中。这些表位中的数个不能被使用外周 T 细胞的经典方法鉴定，而仅被鉴定为与从 PML-IRIS 患者的脑活检组织分离的 T 细胞反应。由于该患者在脑和 CSF 中显示低的至不存在的 JCV 病毒载荷，因此 JCV- 特异性大脑内 CD4+ 介导的免疫应答似乎已将病毒感染从脑清除或几乎清除，因而所进行的实验确保鉴定的 CD4+T 细胞表位、特别是被鉴定为被源自脑的 T 细胞识别的那些表位的高度生物关联性。被源自脑的 T 细胞鉴定的 T 细胞表位显示在 SEQ ID NO:1-3,7-9,11,23,37-38,43-45 和 69-71 中，包含这些表位的肽和蛋白质对于本文中描述的预防性和治疗性免疫接种方法是特别优选的。在优选实施方案中，本发明的蛋白质或肽包含至少一个选自包含 SEQ ID NO:1-3,7-9,11,23,37-38,43-45 和 69-71 的组的 CD4+ 表位。

[0018] VP1 是 JCV 的主要衣壳蛋白，且包含高比例的所鉴定的免疫显性表位。野生型 VP1 的序列公开于例如 DE19543553 中。然而，VP1 也可被突变，例如在位置 55、269 和其它位置上。已显示超过 50% 的体内存在的 VP1 突变是在这些位置上。对应于来自突变的 VP1 蛋白的肽的表位也可用于本发明的情境中。表 1 中的一些肽对应于突变的 VP1 片段。包含本发明的 CD4+ 表位的蛋白质或肽由 SEQ ID NO:1-92 的肽组成，或它们可以更长，例如具有 12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35 或更多个，40 或更多个，50 或更多个，75 或更多个，100 或更多个，125 或更多个，150 或更多个或 200 或更多个氨基酸的长度。它们可由野生型或天然存在的突变的 VP1 或其它 JCV 蛋白的氨基酸组成，或包含不同的序列，例如非源自相同病毒蛋白或不为其天然排列的序列。例如，它们可以是包含选自包含 SEQ ID NO:1-92 的组的 2,3,4,5,6,7,8,9,10 或更多个表位的融合蛋白。

[0019] 在一个实施方案中，蛋白质与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性。优选地，其包含

至少一个选自包含 SEQ ID NO :1-92 的组的表位。与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质可以是还包含至少一个选自包含SEQ ID NO :1 和SEQ ID NO :46-76 的组的表位的融合蛋白。优选地，蛋白质包含至少一个 SEQ ID NO:1-3,7-9,11,23,37-38,43-45, 和 69-71 中所示的表位。

[0020] 在一个实施方案中，包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质以病毒样颗粒的形式存在。VP1 蛋白或其衍生物(例如突变体或片段，其包含与野生型 VP1 的至少 70% 的氨基酸序列同一性，如 DE19543553 中所描述的)或其融合蛋白可装配成病毒样颗粒，这也被描述于 DE19543553 中。

[0021] 当然，本发明的试剂盒还可包含两种或更多种包含至少一个选自 SEQ ID NO:1-92 的源自 JCV 的 CD4+ 表位的肽或蛋白质，优选地在一种组合物中。优选地，试剂盒包含两种或更多种具有选自 SEQ ID NO :1-3,7-9,11,23,37-38,43-45 和 69-71 的来自 JCV 的 CD4+ 表位的肽或蛋白质。由于 CD4+ 表位和 CD8+ 表位都似乎与有效的抗 JCV 免疫应答相关，如果本发明的肽或蛋白质包含至少一个 CD4+ 表位和一个 CD8+ 表位，将是特别有利的。

[0022] 如本发明的实施例中所显示的，本发明的肽和蛋白质可用于给患有 PML 的受试者施用以诱导或增强抗 JCV 的特异性大脑内 CD4+- 介导的免疫应答。因此，根据本发明的一个方面，包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽用于治疗受试者中 PML 的方法中。已患有 PML 和 / 或 PML-IRIS 的受试者的治疗在本文中被称为治疗性免疫接种。在优选的实施方案中，包含 VP1 蛋白的氨基酸序列或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质的氨基酸序列的蛋白质被用于治疗 PML。在另一个优选实施方案中，用于治疗 PML 的肽或蛋白质包含选自 SEQ ID NO:1-3,7-9,11,23,37-38,43-45 和 69-71 的表位或由所述表位组成。

[0023] 当治疗发展了 PML 的受试者时，已发现基于施用本发明的肽或蛋白质的治疗可通过施用能够扩增和维持 T 细胞的细胞因子而被进一步改善。在本发明的过程中已发现共施用这样的细胞因子为重要免疫功能的重构提供了刺激物。可使用数种细胞因子，例如 IL-7,IL-2,IL-15 和 IL-21。使用 IL-7 或 IL-7 的衍生物是特别优选的。

[0024] 在其它实施方案中，通过治疗性免疫接种进行的 PML 治疗还包括佐剂的施用。所述佐剂可以是适合于给人受试者施用并且引起 T 细胞活化和 / 或抗原在施用部位的呈递的任何佐剂。例如，待用于本发明的方法和试剂盒的佐剂可选自 MF59、氢氧化铝、磷酸钙凝胶、脂多糖、咪唑并 - 喹啉 (例如咪喹莫特，S-28463)、具有 CpG 基序的寡核苷酸序列、硬脂酰酪氨酸、DTP-GDP、DTP-DPP、苏氨酰 -MDP、7- 烯丙基 -8- 氧鸟苷、糖脂 bay R1005、多抗原肽系统、聚合的半抗原肽、细菌提取物、TLR-7 激动剂、TLR-8 激动剂、vit-A 等。

[0025] 优选地，待用于实施本发明的佐剂是 TLR-7 激动剂或 TLR-8 激动剂。数种 TLR-7 激动剂是已知的并且是商业上可得的，例如来自 Invivogen,San Diego。实例是腺嘌呤类似物 CL264、鸟苷类似物洛索立宾或优选地，咪唑并喹啉化合物例如瑞喹莫德、Gardiquimod 或咪喹莫德 (4- 氨基 -1- 异丁基 -1H- 咪唑 [4,5-c] 喹啉)。已知 TLR-8 激动剂具有与 TLR-7 激动剂相似的生物学效应，从而也可，或备选地被使用。TLR-8 激动剂的实例是单链 RNA 或大肠杆菌 (E.coli)RNA。示例性的 TLR-7/8 配体是噻唑并喹啉化合物 CL075、咪唑并喹啉化合物 R848 或水溶性 R848 咪唑并喹啉化合物 CL097、胸苷同聚物硫代磷酸酯 ODN(Poly(dT)。

[0026] 用于本发明的优选佐剂是咪喹莫特。在本发明的情境中可使用超过一种佐剂 (优

选选自包含 TLR-7 激动剂和 / 或 TLR-8 激动剂的组），如果需要的话，可使用刺激免疫应答的其它方式，例如如下文中描述的。

[0027] 根据优选的实施方案，治疗性免疫接种包括 VP1（或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质）与佐剂（例如咪喹莫特）和细胞因子例如（IL-7）的组合施用。VP1 蛋白或其变体可以作为五聚体（即以 JCV 衣壳体的形式）存在于该组合中。然而，优选地，VP1 蛋白或其变体以病毒样颗粒 (VLP) 的形式存在。VLP 可由 VP1 组成或其还可包含其它 JCV 蛋白，例如 VP2 和 / 或 VP3。特别优选地，将由 VP1 或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质组成的 VLP 与佐剂和细胞因子组合施用。最优选地，将由 VP1 组成的 VLP 与咪喹莫特和 IL-7 组合施用以进行治疗性免疫接种。

[0028] 在一个实施方案中，例如，试剂盒还可包含 IL-7。IL-7 优选用于这样的情况，在所述情况中患有 PML 的受试者被治疗（即在治疗性免疫接种中）并且在无进一步刺激的情况下预期没有充分的免疫应答，例如，当患者是免疫缺陷型时。发明人显示了 IL-7 与试剂盒的其它组分的施用能够诱导先天性免疫缺陷个体中的保护性免疫应答。IL-7 还可用于接受免疫抑制药物的受试者或因 HIV 感染而免疫受损的患者。

[0029] 优选地，皮下施用包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的本发明的蛋白质或肽。也可选择其它施用模式，例如经皮肤、肌内、静脉内、经肺或口服施用。

[0030] 优选地以适合于诱导针对本发明的蛋白质或肽的免疫应答的方式给受试者施用佐剂。例如，可以以与施用本发明的蛋白质或肽相同的方式和在施用所述蛋白质或肽的同时施用佐剂，且两者可在一种组合物中，例如包含在一个小瓶中。在一个实施方案中，包含 CD4+ 表位的蛋白质或肽和佐剂均用于皮下施用。备选地，以允许刺激针对表位的免疫应答的方式施用它们，例如，抗原被皮下施用，而佐剂被局部或经皮肤施用，特别地，其可在抗原的注射位点例如以乳膏或洗剂的形式被施用。经皮肤施用佐剂（例如咪喹莫特）的方式在现有技术中是已知的。例如，可将包含有效浓度的佐剂的乳膏施用至皮下注射附近、约 5cm x5cm 区域的皮肤上。

[0031] 优选地同时或在短时间间隔内连续施用佐剂和抗原。例如，可在皮下注射后直接经皮肤施用咪喹莫特乳膏。可将乳膏覆盖以防止进一步扩散，并且在约 4-12 小时，例如 8 小时后擦掉。

[0032] 在第一次施用包含至少一个 CD4+ 表位的蛋白质或肽和佐剂后，可进行进一步的施用过程以加强免疫应答，例如 2、3 或 4 个施用过程。所述过程之间的时间可以为约 1 至约 4 周，优选地约 2 至约 3 周，例如 10 天。在一个实施方案中，第一次施用后 2 周进行加强免疫，以及第一次施用后 6 周进行另一次加强免疫。在免疫缺陷型或免疫受损的受试者中，施用抗原和佐剂二者以进行加强是有利的。在非免疫缺乏型或免疫受损的受试者，还可能仅使用佐剂进行第一次或第一和第二次免疫接种，即仅使用抗原进行以后的免疫接种。

[0033] 除了用于治疗已发生 PML 的受试者外，本发明的蛋白质或肽还可有效地用于预防尚未发生 PML 但处于发生该疾病的危险中的受试者的 PML 和 / 或 PML-IRIS。该方法在本文中称为预防性免疫接种。待通过预防性免疫接种治疗的受试者可以是尚未感染 JVC 的受试者，这意指预防性免疫接种用于预防受试者的感染。然而，优选地，待通过预防性免疫接种治疗的受试者是已感染了 JCV 的受试者。预防性免疫接种不需要包括佐剂的施用。优选地预防性免疫接种既不包括佐剂的施用也不包括细胞因子（例如 IL-7）的施用。然而，预防性

免疫接种法还可包括将给各受试者施用这些化合物。

[0034] 根据优选的方面，预防性免疫接种包括施用 VP1 蛋白或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质。VP1 蛋白或其变体可作为五聚体(即以 JCV 衣壳体的形式)存在于预防性疫苗中。然而，优选地，VP1 蛋白或其变体以病毒样颗粒 (VLP) 的形式存在于预防性疫苗中。VLP 可由 VP1 组成或其还可包含其它 JCV 蛋白例如 VP2 和 / 或 VP3。

[0035] 以治疗性或预防性免疫接种方案对其施用本发明的蛋白质或肽的受试者具有遗传或获得性免疫缺陷，这意味着适应性或先天性免疫功能的几个方面是功能失调的或受损的。所述免疫缺陷可由遗传性功能障碍例如特发性 CD4+ 淋巴细胞减少或 Hyper-IgE- 综合征引起，或归因于由疾病或病理学病况 (如 AIDS、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或乙型或丙型肝炎病毒感染) 引起的获得性免疫缺陷。受试者还可以是因治疗干预而造成的免疫受损的。例如，癌症治疗通常涉及导致免疫系统的某些功能障碍的化学治疗或辐射过程。另外，通常用于移植医学以及还用于治疗自身免疫性疾病的免疫抑制治疗可促成待根据本发明治疗的受试者的免疫缺陷。

[0036] 根据优选的实施方案，待利用本发明的肽或蛋白质治疗(通过预防性或治疗性治疗)的受试者正在经历免疫抑制治疗或将经历免疫抑制治疗。这意味着一旦主治医生决定患者将通过施用免疫抑制剂治疗，就将可能给所述受试者施用一种或多种本发明的肽或蛋白质以防止 PML 和 / 或 PML/IRIS 的发展。这对于例如将接受器官移植的患者是特别有用的。

[0037] 备选地，经历或适格进行免疫抑制治疗的受试者可以是患有自身免疫性疾病(优选特征在于 T 细胞起发病机理的作用或为免疫抑制的靶标的自身免疫性疾病)的患者。如本文中所用，自身免疫性疾病包括例如急性播散性脑脊髓炎 (ADEM)、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性心肌病、自身免疫性心肌病 (autoimmune cardiomyopathy)、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴组织增生综合征、自身免疫性外周神经病、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺病综合征、自体免疫性黄体酮皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、白赛病、乳糜泻、克罗恩病、皮肌炎、1 型糖尿病、嗜酸性筋膜炎、胃肠道类天疱疮、古德帕斯彻氏综合症、格雷夫斯病、格林－巴利综合征 (GBS)、桥本脑病、桥本氏甲状腺炎、红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、复发性多软骨炎、类风湿关节炎、干燥综合症、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、脉管炎和韦格纳肉芽肿。优选地，自身免疫性疾病是多发性硬化。在除 MS 外的自身免疫性疾病当中，其中

[0038] 本发明的试剂盒的组分从而可用于给选自包含被诊断患有 PML 的受试者或处于发生 PML 的风险中的受试者的组的受试者施用。

[0039] 处于发生 PML 的风险中的受试者在现有技术中是熟知的。这些受试者可用本发明的蛋白质和肽来预防性治疗。如上文所概述的，实例是免疫缺陷或免疫受损 (例如，因 HIV 感染或 AIDS 而引起的或因肿瘤而引起的) 患者。这样的患者还可具有先天性免疫缺陷，例如特发性 CD4+ 淋巴细胞减少或 Hyper-IgE- 综合征患者。备选地，免疫系统可因目前正在进行的或计划进行的免疫抑制治疗而受损。患者可以适格进行免疫抑制治疗，例如他们具有自身免疫性疾病例如多发性硬化、类风湿关节炎、红斑狼疮、克罗恩病或银屑病，或当他们是移植患者(即已接受移植物或将要接受移植物的患者)时。具有获得性或先天性减弱的

免疫状态（尤其是受损的 CD4+T 细胞数目和功能）的任何患者潜在地处于发生 PML 以及随后的 PML-IRIS 的风险中，如果要矫正所基于的免疫受损的话。

[0040] 在本发明的情境中，免疫抑制治疗可以是例如利用环孢素或 FK506 结合蛋白，利用细胞毒性药物（例如环磷酰胺、米托蒽醌、白消安以及许多在血液学肿瘤或实体瘤的治疗中标准地用作单一药物疗法或组合疗法的其它药物）或利用免疫抑制或免疫调节性抗体例如选自包含那他珠单抗，依法珠单抗，利妥昔单抗，奥瑞珠单抗和阿仑珠单抗的组的单克隆抗体的治疗。免疫抑制治疗还可以是放射或化学疗法。

[0041] 免疫抑制治疗优选包括利用一种或多种免疫抑制抗体，更优选一种或多种单克隆抗体或其它生物学、细胞疗法或基于小分子的治疗来治疗受试者。已显示免疫抑制治疗可导致 PML 和 / 或 PML-IRIS，所述免疫抑制治疗为例如利用数种主要的用于癌症和自身免疫性疾病的单克隆抗体，包括那他珠单抗（抗 -VLA-4）、依法珠单抗（抗 - 白细胞功能相关抗原 -1）（已从市场撤回）、利妥昔单抗（抗 -CD20）、奥瑞珠单抗（抗 -CD20）、阿仑珠单抗（抗 -CD52）或英夫利昔单抗（抗 - 肿瘤坏死因子 (TNF)- α）或利用 IgG1-TNF 受体 2 融合蛋白依那西普的免疫抑制治疗。该风险可介由本发明被预防或减小。预期使某些免疫功能受损的其它生物制品或小分子（例如磷酸鞘氨醇受体 1 激动剂，芬戈莫德）可导致增加的发生 PML/PML-IRIS 的风险，所述免疫功能为例如活化的免疫细胞至 CNS 的迁移（在 CNS 免疫监督中）（如在那他珠单抗的情形中），或将细胞捕捉在二级淋巴器官中（如在芬戈莫德的情形中）以及其它具有类似效果的。因此，优选的是待利用本发明的肽和蛋白质治疗（通过预防性或治疗性治疗）的受试者是目前利用一种或多种选自那他珠单抗，依法珠单抗，利妥昔单抗，奥瑞珠单抗和阿仑珠单抗的单克隆抗体或另一种免疫抑制剂（参见上文）治疗的受试者，或计划对其进行此种治疗的受试者。优选地，利用抗体那他珠单抗或其衍生物治疗所述受试者。

[0042] 在优选的实施方案中，本发明涉及预防性或治疗性免疫接种，其包括给接受一种或多种上述免疫抑制抗体（优选地那他珠单抗）的受试者施用 VP1 蛋白或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质，例如以五聚体的形式或以包含 VP1 或 VP1 变体或由 VP1 或 VP1 变体组成的 VLP 的形式。

[0043] 利用本发明的试剂盒治疗受试者对于已被诊断为 JCV 的携带者的受试者可以是特别有利的。然而，对于新近感染 JCV 的受试者也有显著地风险，例如在免疫抑制治疗过程中。因此如果未进行 JCV 感染的诊断或如果对 JCV 的测试是阴性的，则通过本发明的试剂盒对受试者进行抗 JCV 的免疫接种也是有利的。

[0044] 优选地，给选自下组的受试者施用试剂盒或本发明的组分：

[0045] a) 免疫受损或免疫缺陷受试者，例如 HIV 携带者，具有免疫抑制治疗的受试者或先天性免疫缺陷患者例如特发性 CD4+ 淋巴细胞减少或 Hyper-IgE- 综合征患者；

[0046] b) 适格进行免疫抑制治疗的受试者。

[0047] 在一个方面，本发明涉及本文中描述的用于治疗 PML（即用于治疗被诊断患有 PML）的受试者的药物试剂盒。如由发明人令人惊讶地显示的，可介由本发明诱导对 JCV 的免疫，可从脑消除 JCV 并且可治愈（减少或消除）PML 的症状。

[0048] 本发明还涉及本文中描述的用于预防受试者的 PML 和 / 或 PML-IRIS 的药物试剂盒，所述受试者选自：

[0049] a) 免疫受损或免疫缺陷受试者，例如 HIV 携带者，具有免疫抑制治疗的受试者或先天性免疫缺陷患者例如特发性 CD4+ 淋巴细胞减少或 Hyper-IgE- 综合征患者；和

[0050] b) 适格进行免疫抑制治疗的受试者。

[0051] 免疫抑制治疗可以例如是被诊断患有自身免疫性疾病的受试者或移植患者的治疗。可在免疫抑制治疗之前、之后或期间给所述患者施用试剂盒的组分。特别地，如果免疫抑制治疗的开始不紧迫，在开始免疫抑制治疗之前介由本发明开始或加强针对 JCV 的免疫应答可以是有利的。然而，发明人已显示也可能获得足以治疗免疫受损个体的 PML 的对 JCV 的免疫应答。这是与经历免疫抑制治疗的受试者相似的情形。

[0052] 在一些情况下，在本发明的免疫接种后的前几天或前几周（例如 2 天、5 天、7 天、14 天或 28 天）或直至显示 JCV 从脑清除或 PML 的症状被治愈，减少或中断免疫抑制治疗可以是有利的。这可由医师根据患者的免疫状态和减少或中断患者的免疫抑制治疗的风险来决定。备选地或另外，可给受试者施用免疫刺激性治疗例如利用 IL-7 的治疗。

[0053] 本发明还涉及治疗 PML 的方法和预防 PML 和 / 或 PML-IRIS 的方法，其中

[0054] a) 给患者施用包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽，其中所述表位选自包含 SEQ ID NO：1-92 的组，和

[0055] b) 任选地，给患者施用选自包含 TLR-7 激动剂和 / 或 TLR-8 激动剂的组的佐剂。

[0056] 本发明还涉及包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽，其中所述表位选自包含 SEQ ID NO：1-92 的组。所述蛋白质或肽是适合用于本文中描述的本发明的试剂盒，从而合适用于制备所述试剂盒、添加佐剂的一个组分。

[0057] 当前的发明人已显示公开的 CD4+ 表位的生物关联性，并且第一个分离了由这些表位组成的肽。在本发明的情境中，表位可在 MHC II 的情境中被呈递（被抗原呈递细胞进一步加工或不加工），即术语表位涉及 SEQ ID NO：1-92 中公开的氨基酸序列，发明人已显示其能够诱导 CD4+T 细胞应答，并且不一定涉及可从 MHC II 分离的肽。

[0058] 包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽（其中表位选自包含 SEQ ID NO：1-92 的组）可以是 VP1 或与 VP1 具有至少 70% 的氨基酸同一性的蛋白质的融合蛋白，其还包含至少一个选自包含 SEQ ID NO：1 和 SEQ ID NO：46-76 的组的表位。本发明的蛋白质或肽从而可包含来自超过一种天然 JCV 蛋白，例如来自 2、3 或 4 种 JCV 蛋白的表位。

[0059] 如上所述，包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽（其中表位选自包含 SEQ ID NO：1-92 的组）可用于制备本发明的试剂盒，即用于对受试者进行抗 JCV 的免疫接种，例如用于治疗或预防 PML 或 PML-IRIS。备选地，包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽（其中表位选自包含 SEQ ID NO：1-92 的组）可用于诊断 JCV 感染。特别地，其可被用于诊断 PML，优选在利用其它方法例如症状分析和 / 或脑的 MRI 情境中。

[0060] 本文中描述的蛋白质或肽非常适合用于诊断 JCV 感染和 / 或用于诊断 PML 的方法。本发明因此还涉及用于诊断 JCV 感染或用于诊断 PML 的方法，所述方法包括使来自受试者的样品与包含至少一个源自 JCV 的 CD4+ 表位的蛋白质或肽接触，其中所述表位选自包含 SEQ ID NO：1-92 的组。

[0061] 在一个实施方案中，在适合于来自样品的抗体与所述蛋白质或肽结合的条件下进行所述用于诊断感染的方法。如果检测到了抗体对样品的结合（例如通过 ELISA），则受试者感染了 JCV 或已感染了 JCV。

[0062] 在优选的实施方案中，利用了本发明的蛋白质或肽包含 CD4+ 表位的特征。可在适合用于检测样品中的 CD4+T 细胞对表位的存在的反应的条件下进行用于诊断感染的方法。例如，可使用用于 T 细胞的增殖测定（其可以例如测量 3H- 胸苷掺入、溴代 -2'- 脱氧尿苷 (BrdU) 的掺入），或用于活化标志物（例如 CD25 或一种或多种细胞因子）的表达的测定。可使用 ELISPOT 测定，但 ELISA 测定、闪烁测定或者细胞外或细胞内 FACS 也可以是适合的。用于通过包含所公开的表位的蛋白质或肽的 CD4+ 活化的测定可提供关于 JCV 感染或受试者的免疫状态（当与 PCR 测试和 / 或针对 JCV 的抗体在来自患者的样品中的存在的测试组合时）的额外信息，或其可被用于替代现有技术中先前已知的此种测试。

[0063] 在一个实施方案中，测试了 CD4+ T 细胞活化，并分析了 CD4+T 细胞的表型，例如测定了 Th1、Th2 或 Th1/2 表型。这可基于现有技术中已知的细胞因子的表达和 / 或基于其它分化标志物例如转录因子的表达来进行。

[0064] 在本发明的情境中，待分析的（和通过该分析转化的）样品优选是血液样品、脑组织样品例如来自脑实质的样品或脑脊髓液 (CSF) 的样品（例如来自脑活组织检查或穿刺，或从其产生的）。例如，如果要分析 T 细胞活性，可通过本领域已知的方法从血液或 CSF 分离 PBMC 或 T 细胞。然而，发明人已显示优选分析来自脑组织例如脑实质的 T 细胞的 T 细胞活性。如果要分析抗体，可使用血清。

[0065] 在本发明的优选实施方案中，受试者或患者是人。备选地，受试者或患者也可以是人源化动物例如在实验系统中对 JCV 易感的人源化小鼠。当受试者 / 患者是人时，本申请中提及的蛋白质，如果未另外特别提及，也优选是人或人来源的。例如，IL-7 应当是人 IL-7 或能够结合 IL-7 受体并且介导其信号转导的其衍生物。其可以是重组 IL-7 例如以融合蛋白的形式。TLR 也是人 TLR。

[0066] 认识到 CD4+ 应答在对 JCV 的免疫应答中和从脑清除病毒中的重要性的发明人确定了多瘤病毒 JC 的免疫原性表位的位置。鉴定了来自 JCV 的 3 个开放阅读框的免疫显性肽。测试了一组覆盖 JCV 的所有开放阅读框的重叠肽中的肽，包括主要衣壳蛋白中的重要变体。所鉴定的 CD4+T 细胞表位可被用于诊断性检查 JCV 感染状态，但也可用于免疫接种患者 / 对照，例如具有弱的抗 JCV 的免疫应答（组成型地或因疾病（例如 AIDS，组成型免疫缺陷例如特发性 CD4+ 淋巴细胞减少）或治疗（癌症治疗、单克隆抗体疗法，例如 MS 中的那他珠单抗，以及其它疗法）而引起的）和处于发生 PML 的风险中或已发生 PML 的受试者。

[0067] 发明人已确定了所有 JCV 蛋白的 CD4+T 细胞表位的精细特异性的图谱。检查了来自 PML 和 PML- 免疫重构炎性综合征 (PML-IRIS) 患者的脑活检组织的 T 细胞培养物和 T 细胞克隆。由于该免疫应答在其靶向病毒的最重要表位并且导致其（包括感染）消除的意义上具有保护性，因此来自测试健康对照和多发性硬化 (MS) 患者的外周血淋巴细胞的作图数据（但特别是来自表征 PML-IRIS 过程中脑浸润 T 细胞的抗原精细特异性的数据）支持用于诊断和免疫接种 / 治疗目的生物关联性和有用性。

[0068] 此外，在本发明的过程中，于在 64 岁时发生 PML 的特发性 CD4+ 淋巴细胞减少（一种罕见的组成型免疫缺陷）患者中进行了个体治愈尝试。在该患者中，发明人测试了利用完整主要衣壳蛋白 VP1 的免疫接种是否可在某些条件下使不充分的抗 JCV 免疫应答加强至可从脑消除 JCV 的情况。发明人通过皮下注射重组 VP1 蛋白与经皮肤施用的 TLR7 激动剂（咪喹莫特，Aldara）以及重组静脉内注射 (i.v.) IL-7(Cytheris) 的组合来免疫接种患者。

患者不仅在仅 2 次免疫接种后显示抗 JCV VP1 的体外增殖反应，而且还使血清 JCV 病毒载荷减少至 0，开始显示微小的对比增强（通过脑 MRI 成像）和略微升高的 CSF 细胞计数，以及最后临床上的逐渐改善，这全都支持免疫接种在体内是有效的。

[0069] 下列实例意欲举例说明本发明，但不限定其范围。本文中引用的所有出版物为了所有目的整体并入本文。

[0070] 图例

[0071] 图 1 :a) 针对 JCV VP1/VLP 蛋白和破伤风类毒素蛋白 (TTx) 测试了来自脑活检组织（左图框）、CSF（左二图框）和 PBMC（左三图框）以及未处理的 PBMC（右图框）的 PHA 扩增的大的单核细胞群体。结果显示平均 SI ± SEM。注意 y- 轴的不同标度。b) 离体定量来自脑活检组织（左图框）、CSF（左二图框）、PBMC（左三图框）和未处理的 PBMC（右图框）的 PHA- 扩增的 $CD4^+$T 细胞中的 Th1-、Th2-、Th17- 和 Th1-2 细胞。数字代表阳性细胞的百分比。Th1 被鉴定为 $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+IL\text{-}17A^-/IL\text{-}4^-$;Th17 细胞被鉴定为 $CD4^+IL\text{-}17A^+IFN\text{-}\gamma^-$; Th2 被鉴定为 $CD4^+IL\text{-}4^+IFN\text{-}\gamma^-$，以及 Th1-2 被鉴定为 $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+IL\text{-}4^+$。

[0072] 图 2 :a) 源自脑的 PHA- 扩增的细胞抗 204 个重叠 15 元肽的增殖反应，所述肽覆盖 JCV 的所有开放阅读框（涵盖 Agno, VP1, VP2, VP3, 大 -T 和小 -T 蛋白并且被组织在各 5 个肽的 41 个库。结果显示平均 SI ± SEM。条形的不同模式对应于不同开放阅读框。JCV 基因组中的 5 个开放阅读框的图示（右手上方的图）。b) 源自脑的大的单核细胞群体抗单个 JCV 肽的增殖反应。结果显示平均 SI ± SEM。注意图框 a 和 b 中 y- 轴的不同标度。c) 特异于诱导来自脑活检组织的 PHA- 扩增的细胞中最强增殖反应的 5 个 JCV 肽的 T 细胞的前体频率。d) 结合 HLA-A*02:01-$VP1_{36}$ 四聚体（中图）和 HLA-A*02:01-$VP1_{100}$ 四聚体（下图）的 CD8+T 细胞的百分比。

[0073] 图 3 :a) 显示脑活检组织中每一种个体 TCC 的频率的圆环图。b) 抗 64 个个体 VP1 肽的 TCC 的增殖反应。结果显示平均 SI ± SEM。c) 对于脑来源的大群体（上图，显示平均 SI ± SEM) 和对于不同 TCC（下图，不同模式对应于不同 TCC 并且每一个单个细胞生长培养物用方块来表示）鉴定的免疫显性肽的图示。

[0074] 图 4 :a)Th1-2（上图）和 Th1（下图）VP1/VLP- 特异性 $CD4^+$T 细胞克隆的细胞内 IFN-γ 和 IL-4 产生的代表性流式细胞术分析。b) 点图表示通过细胞内细胞因子染色显示的具有 Th1-2 和 Th1 表型的 VP1- 特异性脑来源的单细胞培养物的百分比。每一个点对应于 21 个所分析的单细胞培养物之一。圆环图表示每一个 TCC 的功能表型。c) 在用 PHA 刺激后 72h, Th1-2 TCC(n=5, 黑色条形）和 Th1 TCC(n=6, 白色条形）的培养上清液中 IFN-γ 和 IL-4 产生的 ELISA 检测。结果显示平均值 ± SEM。d)Th1-2 TCC(n=5, 黑色条形）和 Th1 TCC(n=6, 白色条形）的转录因子 Gata3 和 t-bet 的 RT-PCR 分析。值是相较于脑来源 PHA- 扩增的细胞（校准物 =1) 的相对表达。结果显示平均值 ± SEM。

[0075] 图 5 :利用 VP1 免疫接种免疫受损的受试者的治疗方案。M= 月，D= 天，W= 周，MRI= 磁共振成像。在 VP1 施用后直接施用佐剂（咪喹莫特）。

[0076] 图 6 :治疗过程中 VP1 免疫应答的发展。VLP1= 由 VP1 蛋白构成的病毒样颗粒 1，TT= 破伤风类毒素。

[0077] 图 7 :治疗过程。图 7A 显示 VP1 刺激后的病毒载荷和平均 SI，图 7B 显示 CSF 中的白细胞计数。IL-7 和 VP1 的施用时间点相同并且对应于图 5 中显示的安排。

[0078] 图 8 :VP1- 特异性 T- 细胞的表征。仅 CD4+ 细胞在 VP1 刺激后（免疫接种后 6 周）增殖。

[0079] 图 9 :增殖的 CD4 细胞是活化的记忆细胞。

[0080] 图 10 :VP1 活化的 CD4+T 细胞表达高背景的 IL-4 并且在 VP1 刺激后产生 IFN- γ 。在第 0 天用抗原刺激 CD4+ T 细胞。在第 6 天，用抗原再刺激它们，1 小时后，用布雷菲德菌素 A 阻断分泌，15h 后，进行细胞内细胞因子染色并且通过 FACS 进行分析。

[0081] 图 11 :3H- 胸苷掺入测定。在所示的时间点上，从患者获得外周血单核细胞 (PBMC)，将其与抗原 (VP1/VLP) 一起新鲜地接种 (1x10e5 个细胞 / 孔）。在 7 天的温育后，测量 3H- 胸苷掺入。大于 2 的刺激指数被认为是阳性反应。SI 示于图的 y- 轴上。

[0082] 实施例 1 免疫显性 CD4+ 表位的鉴定

[0083] 材料和方法

[0084] 患者

[0085] HLA- 类 II 型 :DRB1*13:01,-*16:01 ;DRB3*02:02 ;DRB5*02:02 ;DQA1*01:02,-*01:03 ;DQB1*05:02,-*06:03（患者 1）；和 DRB1*11:03,-*15:01 ;DRB3*02:02 ;DRB5*01:01 ;DQA1*01:02,-*05:XX(X 表示未分类至确切亚型）;DQB1*03:01,-*06:02（患者 2)。

[0086] 神经病理学

[0087] 通过打开活检获得总体积约 0.1ml 的小的组织碎片。在于缓冲的福尔马林中固定 2 小时后，将组织包埋在石蜡中。用苏木精 - 伊红 (H&E)、van Gieson 氏三色染色、PAS、Turnbull's 染色（针对 siderin 和 Luxol) 对 4μm 的切片机切片进行染色。按照制造商的说明书，使用下列抗体在自动化 Ventana HX IHC 系统，benchmark(Ventana-Roche Medical systems,Tucson,AZ,USA) 上进行免疫组织化学染色 :抗 -CD45/LCA(DAKO,Glostrup, 丹麦 ;M701)、抗 -CD3(DAKO ;M1580)、抗 -CD45RO(DAKO ;M0742)、抗 -CD20(DAKO ;M0755)、抗 -CD79a(DAKO ;M7050)、抗 -CD68(Immunotech/Beckmann-Coulter,Krefeld, 德国，2164)、抗 -HLA-DR(DAKO ;M775)、抗 -NF(Zymed/Invitrogen,Darmstadt, 德国 ,80742971)、抗 -GFAP(DAKO ;Z334) 和抗 -p53(DAKO ;M7001)。

[0088] 脑组织处理和脑来源、CSF 来源的和外周血单核细胞的扩增

[0089] 将约 0.033ml 的活检组织切成小块 2，通过在 37℃水浴中于包含 1mg/ml 胶原酶 A(Roche Diagnostics,Penzberg, 德国）和 0.1mg/mlDNA 酶 I(Roche) 的溶液中温育 45 分钟来进行破裂。将所产生的细胞悬浮物洗涤 3 次，使用 Percoll 密度梯度离心 (GE Healthcare,Munich, 德国）分离脑来源的单核细胞。将细胞重悬浮于 30% 的 Percoll 溶液中，利用 78%Percoll 溶液来小心地进行底层化。离心后，从梯度的界面收集脑来源的单核细胞。

[0090] CSF- 来源的单核细胞直接从诊断性脊椎穿刺术获得，外周血单核细胞通过 Ficoll 密度梯度离心 (PAA,Pasching, 澳大利亚）来分离。

[0091] 通过以每孔 2000 个细胞与 $2x10^5$ 个受辐射的非自体 PBMC(3,000rad) 和 1μg/ml 的 PHA-L(Sigma,St Louis,MO) 一起接种来在 96 孔 U 形底微量滴定板中来扩增脑 -、CSF- 和外周血 - 来源的单核细胞。培养基由含有 100U/ml 青霉素 / 链霉素 (PAA)、50μg/ml 庆大霉素 (BioWhittaker,Cambrex)、2mM L- 谷氨酰胺 (GIBCO,Invitrogen) 和 5% 热去补体的

人血清 (PAA) 的 RPMI(PAA) 组成。24h 后，添加 20U/ml 人重组 IL-2(hrIL-2,Tecin,Roche Diagnostics)，且每 3-4 天添加额外的 hrIL2。两周后，将细胞混合，进行分析，冷藏保存或再次用 1μg/ml PHA,20U/ml hrIL-2 和异体被辐射的 PBMC 再刺激。

[0092] 脑来源的单核细胞的流式细胞术分析

[0093] 用下列抗体对直接来自脑消化的脑来源单核细胞的表面标志物进行染色：CD45(AmCyan,2D1,BD Pharmingen,San Diego,USA)、CD56(Alexa488,B159,BD Pharmingen)、CD3(PeCy7,UCHT1,eBioscience,San Diego,USA)、CD4(APC,RPA-T4,eBioscience)、CD8(PB,DK25,Dako,Glostrup, 丹麦)、CD45RO(FITC,UCHL1,eBioscience)、CD19(FITC,HIB19,BD Pharmingen)、CD38(APC,HIT2,BD Pharmingen) 和 CD27(APC-Alexa750,CLB-27/1,Invitrogen)。 在 a3LSRII(BD Biosciences,Heidelberg, 德国) 流式细胞仪上进行分析。

[0094] 蛋白质和肽

[0095] 为了鉴定 JCV- 特异性 T 细胞，应用了 204 个涵盖整个 JC 病毒蛋白质组的 (13-16 元) 肽。由 pe(肽和象 GmbH,Potsdam, 德国) 合成和提供肽。这 204 个肽以 5 个氨基酸重叠并且包括 35 个常见单氨基酸突变。为了说明在不同 JCV 基因型和株系中发生的氨基酸变异，将来自可在 GenBank(到 2008 年 3 月为止) 获得的全部 479 个 JCV 基因组序列的每一个 JCV 编码的蛋白质 (包括 Agno,VP1,VP2,VP3, 大 T 抗原和小 t 抗原) 的氨基酸序列进行比对，将在超过 1% 的所有获取的序列中普遍存在的那些多态型被定义为常见突变。

[0096] 为了确定哪个个体肽被 CNS- 来源的 T 细胞识别，使用二维接种方案。将肽排列在一组 82 个库中，其中每一个库包含 5 种不同的肽。通过不同的肽根据矩阵在每个孔中的组合以及每一个个体肽出现在正好两个库中 (所述库中其余的肽不同)，可在阳性库的交集处鉴定免疫原性候选肽。

[0097] JCV VP1 蛋白形成病毒样 (VLP) 颗粒，因此 VP1 和 VLP 用作可互换的术语。如先前所述 (Goldmann 等人，1999)，由 Life Science Inkubator,Bonn, 德国产生形成 VLP(VP1/VLP) 的 VP1 蛋白。由 PEPScreen,Custom Peptide Libraries,SIGMA 合成和提供具有 10 个氨基酸的重叠并且覆盖 MBP(16 个肽)、MOG(25 个肽) 和 PLP(27 个肽) 的 20 元鞘磷脂肽。破伤风类毒素蛋白 (TTx)(Novartis Behring,Marburg, 德国) 被用作阳性对照。

[0098] 增殖测定

[0099] 通过将每孔 2-2.5x10^4 个脑来源、CSF 来源或外周血来源的 PHA- 扩增的细胞和 1x10^5 个受辐射的自体 PBMC 与肽一起或不与肽一起，以一式二份接种在 96 孔 U 形底微量滴定板中进行 72 小时来测试 JCV 肽、VP1/VLP 和 TTx 的识别。在 7 天的原代增殖 (primary proliferation) 中以 2x10^5 个细胞 / 孔测试未处理的 PBMC。除了 TTx 以外，还添加 PHA-L 刺激作为阳性对照。以 2μM/ 肽的终浓度 (对于库中的肽) 和以 10μM 的浓度 (对于个体肽) 在库中或作为个体肽来测试所有 JCV 肽。以 2μg/ml 测试 VP1/VLP，以 5μg/ml 测试破伤风类毒素蛋白 (TTx)，以 1μg/ml 测试 PHA。在 β 闪烁计数器 (Wallac1450,PerkinElmer,Rodgau-Jürgesheim, 德国) 中通过 ^{3}H- 胸苷 (Hartmann Analytic,Braunschweig, 德国) 掺入测量增殖。刺激指数 (SI) 计算为 SI= 平均 cpm(每分钟计数)(肽)/ 平均 cpm(背景)。当 SI>3,cpm>1000 并且高于平均背景 cpm 至少 3 个标准差 (SD) 时，反应被认为是阳性的。

[0100] 如上所述，以 5μM 作为个体肽测试了髓磷脂肽。

[0101] 脑来源的 VP1/VLP- 特异性 T 细胞克隆的产生

[0102] 将 $2.5x10^4$ 个脑来源的 PHA- 扩增的细胞和 $1x10^5$ 个受辐射的自体 PBMC 与 VP1/VLP 蛋白一起或不与所述蛋白一起接种在 96 孔 U 形底微量滴定板中。在 48 小时的培养后，将板分成母板和子板。通过甲基 $-^3H-$ 胸苷掺入检测子板中的增殖。在母板中鉴定 VP1/VLP- 反应性培养物，每 3-4 天添加 IL-2 直至第 12 天。通过在有限稀释条件下以 0.3 和 1 个细胞 / 孔将来自 VP1/VLP- 反应性细胞的细胞接种在 96 孔 U 形底微量滴定板中，和添加 $2x10^5$ 个受辐射的异体 PBMC 和 1μg/ml 的完全 RPMI 中的 PHA-L 来从阳性培养物建立 T 细胞克隆 (TCC)。24h 后，添加 20U/ml 的人重组 IL-2。随后通过将 $2.5x10^4$ 个来自正在生长的集落的细胞与受辐射的自体 PBMC 一起在 VP1/VLP 蛋白存在或不存在的情况下接种，进行 72h 来确认 VP1/VLP 特异性。利用 1μg/ml PHA-L、20U/ml hrIL-2 和受辐射的异体 PBMC 每 2 周再刺激特定培养物，每 3-4 天添加 hrIL2。

[0103] TCR 分析

[0104] 通过 22 种抗 TCRBV 单克隆抗体 (Immunotech, Marseille, France, (Muraro 等人，2000)) 与 CD4(APC, eBioscience) 和 CD8(PB, PB, DakoCytomation, 丹麦) 的组合来评价 PHA- 扩增的细胞和 T 细胞克隆的 TCR Vβ 链表达。

[0105] CNS 来源单核细胞中前体频率的测定

[0106] 通过有限稀释测定 VP1/VLP- 特异性细胞的频率。将 20、200、2000 或 20000 个脑来源 PHA- 扩增的细胞与 $1x10^5$ 个受辐射的自体 PBMC 在 VP1/VLP 蛋白存在或不存在的情况下以一式四份接种在 96 孔 U 形底微量滴定板中。72 小时后，通过甲基 $-^3H-$ 胸苷掺入测量增殖。如先前所述 (Taswell, 1981) 计算频率。观察到的数据是 :r，阴性反应培养物或每一个剂量 i 的孔的数目 ;n，每剂量 i 的孔的总数，和 λ，剂量 i 中的细胞数目。计算的数据是 : pi=ri/ni，每一个剂量 i 的阴性反应物培养的分数。使用下列公式计算频率 :f=-(ln pi)/λi。

[0107] 细胞因子的产生

[0108] 对于细胞内细胞因子染色，在最后一次再刺激后 12 天分析 PHA- 扩增的细胞和 TCC。在布雷菲德菌素 A(10μg/ml, eBioscience) 存在的情况下利用 PMA(50ng/ml, Sigma) 和离子霉素 (1μg/ml, Sigma) 刺激细胞，进行 5h。随后，用 LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain 试剂盒 (AmCyan, Molecular Probes, Invitrogen) 对细胞进行染色，将其固定，并用相应的缓冲液 (eBioscience) 进行渗透化，在室温下对 CD3(PE, DakoCytomation, 丹 麦)、CD8(PB, DakoCytomation, 丹 麦)、IFNγ (FITC, BDPharmingen)、IL-4(PE-Cy7, eBioscience) 和 IL-17A(Alexa Fluor®-647, eBioscience) 进行染色。IFN-γ-、IL-4- 和 IL-2 水平还可按照制造商的方案 (Biosource, Camarillo, California) 通过 ELISA 在用 PHA 或 VP1/VLP 再刺激后 72 小时、在 PHA- 扩增的细胞的培养上清液中以及 TCC 中进行测定。

[0109] 通过 RT-PCR 定量 mRNA 表达水平

[0110] 对于 mRNA 基因表达测定，引物和探针组 (Tbet, Hs00203436_m1 和 Gata3, Hs00231122_m1) 购自 Applied Biosystems(Foster City, CA)。18S rRNA 用作内源

性对照，相对基因表达使用脑来源 PHA- 扩增的细胞作为校准物，通过△△ Ct 法来计算。

[0111] VP1/VLP- 特异性抗体的 ELISA

[0112] 如先前所述 (Weber 等人，1997) 测定来自两个 IRIS-PML 患者的 CSF 和血清的 VP1/VPL- 特异性免疫球蛋白 G 抗体的滴度。简而言之，用 100ml VP1-VLP(1mg/ml) 涂覆 ELISA 板，利用 CSF 或血清的系列稀释物温育所述板。通过缀合有生物素的抗 - 人 Fc 抗体 (eBioscience) 捕获人 IgG，并通过抗生物素蛋白辣根过氧化物酶 (eBioscience) 进行检测。针对特定隔室中的 IgG 的总量调整 CSF 以及血清中的抗体滴度。结果表示为任意单位，使用总是相同的人血清作为标准对其进行标准化。

[0113] HLA-A*0201/JCV $VP1_{36}$ 和 $VP1_{100}$ 四聚体以及四聚体染色

[0114] 如先前所述合成 HLA-A*02:01 四聚体复合物。简而言之，使 HLA-A*02:01、β 2 微球蛋白和表位肽重折叠，使用尺寸排阻层析分离所述蛋白。通过将 BirA 靶序列添加至 HLA-A*0201 分子的最后一个 C 末端胞外结构域来实现位点 - 特异性生物素化。使用 Extravidin-PE(Sigma) 产生四聚体复合物。使用抗 -CD2/CD3/CD28MAC 珠粒 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 刺激 PHA- 扩增的脑浸润性细胞，刺激后第 5 天，洗涤细胞，将其重悬浮至 $5x10^6$ 个细胞 /ml 的浓度。利用 3μl PE 偶联的四聚体 HLA-A*02:01/JCV $VP1_{36}$ 或 HLA-A*02:01/JCV$VP1_{100}$ 对 100μl 进行染色。在 37℃温育 30 分钟后，洗涤细胞，用抗 -CD3(PB, eBiolegend, San Diego, CA) 和抗 -CD8(FITC, Dako) 在冰上再染色 30 分钟。随后洗涤细胞，用 0.5% 多聚甲醛固定，随后利用流式细胞术进行分析。

[0115] 结果

[0116] 那他珠单抗 - 相关 PML-IRIS 的两个病例

[0117] 分别在 2009 年 7 月和 2010 年 1 月提供的具有复发 - 缓和 MS(RR-MS) 的两名 41 和 43 岁的男性患者在分别进行 28 和 40 个月的那他珠单抗治疗后具有临床迹象 (患者 1，视场缺损 ；患者 2，单肢轻瘫) 和怀疑为 PML 的影像学表现。立即停止那他珠单抗，进行数轮血浆去除术。两名患者随后都发生了在 MRI 上具有对比增强的斑状或带状区域的 PML-IRIS(图 1a) 和恶化的临床表现 (患者 1 的视力的完全丧失，患者 2 发生偏瘫、偏盲和神经心理学恶化)。关于诊断性检查，基于 CSF JCV 病毒载荷 (虽然其是低的) 患者 1 立即被诊断为 PML。患者 2 的诊断更为复杂，其有 CSF JCV 病毒载荷的反复阴性 PCR 结果，直至第三次测试才为正好高于阈值水平的阳性 ；12 个拷贝 (NIH 参照实验中阈值为 10 个拷贝)。与低或临界 JCV CSF 病毒载荷相反，在本研究中建立的血清和 CSF 中 JCV 主要衣壳蛋白 (VP1/VLP)- 特异性抗体的抗体测试显示强鞘内抗体反应，在将总的 IgG 浓度调整至相同水平后 CSF 中的 VP1/VLP- 特异性抗体滴度与血清中的相比为 95-180 倍更高。因此，与病毒 DNA 的 PCR 测试不同，鞘内抗体反应使得患 PML-IRIS 时 CNS 被 JCV 感染没有疑问。患者 2 的 IgG 亚类分析显示鞘内抗体主要是 IgG1 和 IgG3。这些数据显示出局限于 CNS 隔室并且主要针对主要结构 JCV 蛋白 VP1/VLP 的强 JCV- 特异性体液免疫应答。抗体反应的小的组分是否靶向其它 JCV 蛋白仍待研究。

[0118] 由于诊断 PML 的上述困难，患者 2 经历了诊断性脑活组织检查来确认或否定 PML。神经病理学检查未显示 PML 的典型迹象，即染色深的少突胶质细胞中的核包涵体和奇形怪状的星形细胞，而非 CNS 细胞的缺少和大量血管周和实质淋巴单核细胞浸润 , 与星状星形细胞的反应性胶质增生和泡沫状巨噬细胞的弥散性和破坏性实质浸润的突出。大部分细胞

染色呈 HLA-DR 阳性，这通常仅在活化的小神经胶质细胞中见到并且不存在于正常脑组织中。T 细胞和 B 细胞存在于浸润中，高比例的后者染色呈浆细胞标志物 CD138 阳性。处理部分活检组织，也通过流式细胞术表征 CNS 来源的单核细胞。96.5% 的细胞表达泛造血细胞标志物 CD45（未显示），并且其中有 42.4% 表达泛 T 细胞标志物 $CD3^+$。这些当中有 24.1% 是 $CD8^+$，且 70.4% 是 $CD4^+$T 细胞。几乎所有这些细胞都表达记忆标志物 CD45RO。29% 的 $CD45^+$CNS 浸润性细胞表达 B 细胞标志物 CD19，在这些当中有 86.1% 是 CD27/CD38 阳性的，即它们是记忆 B 细胞 / 浆细胞。因此，诊断为炎性脱髓鞘病而非 PML。对于 JCV 的随后免疫组织化学分析是阴性的，但通过原位杂交的第二次尝试发现了 JCV DNA 的零星核信号（数据未显示），这与低 JCV 病毒载荷和强鞘内抗体反应一起确认了 PML 的最初怀疑并且指向 IRIS 而非基于的脱髓鞘病促成神经病理学发现。

[0119] 脑浸润性 T 细胞的抗原特异性

[0120] 随后表征了脑浸润性 T 细胞的抗原特异性和频率。首先通过无偏刺激 (PHA) 将脑来源单核细胞扩增为大群体。虽然我们的培养条件相较于 $CD8^+$T 细胞更有利于 $CD4^+$ 的表达，但 $CD4^+$T 细胞的相对组成保持稳定，如通过利用针对 T 细胞受体 (TCR) 可变链 Vβ1-Vβ22 的单克隆抗体的染色所显示的。由于脑活组织检查时记忆 $CD4^+$ 几乎超过 $CD8^+$T 细胞 3 倍，因此我们将注意力集中在 CD4+T 细胞上，并且评价它们针对 JCV 的特异性。为了该目的，在增殖测定中针对重组 JCV 衣壳蛋白 VP1/VLP 和针对破伤风毒素蛋白 (TTx) 测试扩增的脑 T 细胞。我们直接将脑来源的与 CSF- 或外周血 - 来源的 T 细胞以及与未处理的外周血单核细胞进行比较。如图 1a 中显示的，脑来源的 T 细胞针对 VP1/VLP 蛋白以大于 600 的刺激指数 (SI) 作出反应，而对针对 TTx 无反应。CSF 中针对 VP1/VLP 和 TTx 的 SI 分别为 7 和 14，在 PHA- 扩增的 PBMC 中，针对 VP1/VLP 和 TTx 的反应分别是阴性的和中度阳性的 (SI 为 6.5)。未处理的 PBMC 在 7 天的原代增殖测定中显示对 TTx 的反应显著强于对 VP1/VLP 的反应。

[0121] 脑浸润性 $CD4^+$T 细胞的功能表型

[0122] 发明人随后基于它们的细胞因子分泌模式检查大脑内 $CD4^+$T 细胞是否属于主要 T 帮助细胞 (Th) 亚型 Th1、Th2 或 Th17 细胞之一。通过针对 Th1-、Th2- 和 Th17 细胞的标志细胞因子 IFN-γ、IL-4 和 IL-17 的细胞内细胞因子染色检查了来自脑、CSF 和 PBMC 以及未处理的 OBMC 的扩增的大的 T 细胞群体。IL-17 产生性细胞几乎不可检测（图 1b），而 IFN-γ 分泌性细胞构成 46.1 至 53.2% 的来自脑和 CSF 的细胞（图 1b）。当结合 IFN-γ 和 IL-4 的细胞内染色时，情况显著不同。在脑和 CSF 来源的群体中，Th1-、Th2- 和双功能 Th1-2 细胞（分泌 IL-4 和 IFN-γ 二者）在频率上相似（图 1b），而 Th2 细胞在外周血来源的 PHA- 扩增的细胞中占据优势（图 1b）。32.7% 的脑来源 $CD4^+$T 细胞具有双功能 Th1-2 表型。

[0123] 脑浸润性 T 细胞的精细特异性

[0124] 为了确定哪个特异性 JCV 肽被脑浸润性 T 细胞识别，合成 204 个淘选所有 JCV 蛋白 (Agno, VP1, VP2, VP3, 大 -T 和小 -T) 的 15 元肽，将其分配在一组 82 个库中，其中每一个肽出现 2 次，但在两个不同的库中（参见方法）。脑来源的 T 细胞对多个库有响应（图 2a；库 1-41）。发明人鉴定了 15 个免疫原性候选肽，随后单个地测试所述候选肽，使得鉴定出 11 个刺激性肽 (SI 大于 10 的肽)（图 4b）。反应是针对肽 4($Agno_{25}$，数字表示 15 元肽的第 1 个氨基酸 (aa))、20($VP1_{34}$)、23($VP1_{54}$)、27-29($VP1_{74}$)（所有 $VP1_{74}$ 肽；28 和 29 是具有单氨基酸突变的肽 27 的变体）、72($VP1_{310}$)、73($VP1_{319}$)、76($VP1_{335}$)、191($LTAg_{668}$) 和

195($sTAg_{82}$)(对具有大于 25 的 SI 的肽加以粗体)的。因此,脑来源的 T 细胞对数种 JCV 蛋白 (Agno, VP1, LTAg, sTAg) 有响应,然而,针对 VP1(6 个肽)的反应迄今最强。所述 VP1 是主靶获得了下述的支持:针对完整 VP1/VLP 蛋白(图 1a)的反应甚至更强并且当与响应于 $Agno_{25}$(1/14492) 和 $LTAg_{668}$(1/1449) 的细胞相比较时以更高的 VP1- 特异性 T 细胞的前体频率反应(响应于肽 $VP1_{34}$、$VP1_{319}$ 和 $VP1_{74}$ 的 T 细胞的 1/294 至 1/714) (图 2c)。当发明人检查 PHA- 扩增的 CSF- 和外周血来源的 T 细胞时,CSF 仅产生弱的针对库 39 和该库中包含的肽 $LTAg_{668}$ 的反应,PBMC 是阴性的。显著地,肽 $VP1_{34}$(在 SI(图 2b) 和前体频率(图 2c) 方面引发最强反应的肽)包含 JCV 表位 $VP1_{36}$ (其是与 $VP1_{100}$ 一起在 HLA-A*02:01 的情境中被 HLA- 类 I- 限制的 $CD8^+$T 细胞识别的两个表位之一) (Du Pasquier 等人, 2003b)。PML-IRIS 患者 2 是 HLA-A*02:01$^+$(在方法下, HLA- 类 I 和 - 类 II 型),因此,发明人通过四聚体染色测定了 PHA- 扩增的脑浸润性 CD8+T 细胞中对于这两个 HLA-A*02:01JCV 表位是特异性的 CD8+T 细胞的频率。0.8% 的 PHA- 扩增的脑浸润性 CD8+T 对于 $VP1_{36}$ 是特异性, 0.6% 对于 $VP1_{100}$ 是特异性的(图 4d)。关于 HLA- 类 II, 患者 2 表达 MS 相关 HLA-DR 单体型 DRB1*15:01 和 DRB5*01:01。当 VP1/VLP 蛋白被来自 DRB1*15:01/B5*01:01 纯合供体的 APC 呈递时, JCV- 特异性 $CD4^+$T 细胞应答受到 DRB1*15:01/B5*01:01 的很大限制(未显示)。这些数据显示,与鞘内抗体相似,$CD4^+$T 细胞反应主要针对主要结构 JCV 蛋白 VP1, 并且肽 $VP1_{34}$ 包含针对病毒特异性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞二者的表位。先前已对流感核蛋白肽显示了 CD4+ 和 CD8+T 细胞对相同免疫显性表位的这种集中性 (Carreno 等人, 1992)。

[0125] 表 1 显示由发明人鉴定的免疫显性 CD4+T 细胞表位。

[0126] 由于 PML 的特征在于少突胶质细胞裂解和鞘磷脂的释放以及由于患者患有 MS, 因此有趣地检查脑来源 T 细胞是否响应于鞘磷脂蛋白。针对覆盖主要鞘磷脂蛋白、鞘磷脂碱性蛋白 (MBP)、含蛋白脂蛋白 (PLP) 和鞘磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 的重叠肽测试了 PHA- 扩增的脑来源 T 细胞,但尽管存在针对 JCV VP1/VLP 蛋白的强反应,没有一种髓磷脂肽被识别。

[0127] 表 1 :免疫显性 JCV 表位的列表。显示了 JCV 肽的氨基酸序列和长度。各肽的位置与参照 JCV 基因组 NC_001699 的相应蛋白质相关。具有氨基酸突变的肽被称为变体 (V1、V2 等)。仅被从脑分离的 T 细胞克隆识别的肽通过粗体来标记。其它肽被外周 T 细胞克隆识别。

[0128]

肽编号	名称(位置)	序列	长度	SEQ ID NO
4	***Agno (25-39)***	***AQRILIFLLEFLLDF***	***15***	***1***
20	***VP1 (34-48)***	***VDSITEVECFLTPEM***	***15***	***2***
23	***VP1 (54-68)***	***HLRGFSKSISISDTF***	***15***	***3***
24	VP1 (64-78) V1	ISDTFESDSPNRDML	15	4
25	VP1 (64-78) V2	ISDTFESDSPNFDML	15	5
26	VP1 (64-78) V3	ISDTFESDSPNKDML	15	6
27	***VP1 (74-88) V1***	***NRDMLPCYSVARIPL***	***15***	***7***
28	***VP1 (74-88) V2***	***NFDMLPCYSVARIPL***	***15***	***8***

[0129]

29	***VP1 (74-88) V3***	***NKDMLPCYSVARIPL***	***15***	***9***
30	VP1 (81-95)	YSVARIPLPNLNEDL	15	10
31	***VP1 (91-105)***	***LNEDLTCGNILMWEA***	***15***	***11***
32	VP1 (101-115)	LMWEAVTLKTEVIGV	15	12
33	VP1 (108-122) V1	LKTEVIGVTSLMNVH	15	13
34	VP1 (108-122) V2	LKTEVIGVTTLMNVH	15	14
35	VP1 (108-122) V3	LKTEVIGVTALMNVH	15	15
36	VP1 (118-129) V1	LMNVHSNGQATH	12	16
37	VP1 (118-129) V2	LMNVHSNGQAAH	12	17
38	VP1 (118-129) V3	LMNVHSNGQASH	12	18
39	VP1 (123-137) V1	SNGQATHDNGAGKPV	15	19
40	VP1 (123-137) V2	SNGQAAHDNGAGKPV	15	20
41	VP1 (123-137) V3	SNGQASHDNGAGKPV	15	21
42	VP1 (133-147)	AGKPVQGTSFHFFSV	15	22
43	***VP1 (143-157)***	***HFFSVGGEALELQGV***	***15***	***23***
44	VP1 (151-165) V1	ALELQGVLFNYRTKY	15	24
45	VP1 (151-165) V2	ALELQGVLFNYRTTY	15	25
46	VP1 (161-175) V1	YRTKYPDGTIFPKNA	15	26
47	VP1 (161-175) V2	YRTTYPDGTIFPKNA	15	27
48	VP1 (161-175) V3	YRTTYPHGTIFPKNA	15	28
49	VP1 (171-186)	FPKNATVQSQVMNTEH	16	29
50	VP1 (182-196)	MNTEHKAYLDKNKAY	15	30
51	VP1 (193-208)	KNKAYPVECWVPDPTR	16	31
52	VP1 (203-217)	PDPTRNENTRYFGTL	15	32
53	VP1 (210-224)	NTRYFGTLTGGENVP	15	33
54	VP1 (220-234) V1	GENVPPVLHITNTAT	15	34
55	VP1 (220-234) V2	GENVPSVLHITNTAT	15	35
56	VP1 (220-234) V3	GENVPPVLHITKTAT	15	36
57	***VP1 (229-243) V1***	***ITNTATTVLLDEFGV***	***15***	***37***
58	***VP1 (229-243) V2***	***ITKTATTVLLDEFGV***	***15***	***38***
59	VP1 (239-253) V1	DEFGVGPLCKGDNLY	15	39
60	VP1 (239-253) V2	DEFGVRPLCKGDNLY	15	40
61	VP1 (249-263)	GDNLYLSAVDVCGMF	15	41
62	VP1 (259-273) V1	VCGMFTNRSGSQQWR	15	42
72	***VP1 (310-321)***	***RVDDGQPMYGMDAQV***	***15***	***43***
73	***VP1 (319-331)***	***MAQVEEVRVFEGTE***	***14***	***44***
76	***VP1 (335-349)***	***GDPDMMRYVDKYGQL***	***15***	***45***
78	VP2 (1-15)	MGAALALLGDLVATV	15	46

[0130]

79	VP2(11-24)	LVATVSEAAAATGF	14	47
80	VP2(20-34)	AATGFSVAEIAAGEA	15	48
81	VP2(30-43)	AAGEAAATIVEIA	14	49
82	VP2(39-51)	EVEIASLATVEGI	13	50
83	VP2(47-61)	TVEGITSTSEAIAAI	15	51
84	VP2(57-71)	AIAAIGLTPETYAVI	15	52
85	VP2(67-81)	TYAVITGAPGAVAGF	15	53
86	VP2(77-88)	AVAGFAALVQTV	12	54
87	VP2(84-97)	LVQTVTGGSAIAQL	14	55
153	LTAg(328-342)	FADSKNQKSICQQAV	15	56
154	LTAg(338-351)	CQQAVDTVAAKQRV	14	57
155	LTAg(347-361)	AKQRVDSIHMTREEM	15	58
156	LTAg(357-370)	TREEMLVERFNFLL	14	59
158	LTAg(376-390)	IFGAHGNAVLEQYMA	15	60
159	LTAg(386-399)	EQYMAGVAWIHCLL	14	61
161	LTAg(405-419)	VIYDFLKCIVLNIPK	15	62
162	LTAg(415-429)	LNIPKKRYWLFKGPI	15	63
168	LTAg(472-486)	VFEDVKGTGAESRDL	15	64
169	LTAg(482-495)	ESRDLPSGHGISNL	14	65
170	LTAg(491-506)	GISNLDCLRDYLDGSV	16	66
171	LTAg(500-514)	DYLDGSVKVNLERKH	15	67
172	LTAg(508-522)	VNLERKHQNKRTQVF	15	68
191	***LTAg(668-681)***	***CTFHICKGFQCFKK***	***14***	***69***
195	***StAg(82-96)V1***	***VGCDFPPNSDTLYCK***	***15***	***70***
196	***StAg(82-96)V2***	***VSCDFPPNSDTLYCK***	***15***	***71***
200	StAg(123-137)	RKFLRSSPLVWIDCY	15	72
201	StAg(133-146)	WIDCYCFDCFRQWF	14	73
202	StAg(142-156)	FRQWFGCDLTQEALH	15	74
203	StAg(149-162)	DLTQEALHCWEKVL	14	75
204	StAg(158-172)	WEKVLGDTPYRDLKL	15	76
271	VP1 L55F(54-68)	HFRGFSKSISISDTF	15	77
272	VP1 S269Y(259-273)	VCGMFTNRSGYQQWR	15	78
273	VP1 K60N(54-68)	HLRGFSNSISISDTF	15	79
274	VP1 D66H(54-68)	HLRGFSKSISISHTF	15	80
275	VP1 D66H(64-78)	ISHTFESDSPNRDML	15	81
276	VP1 V223I(220-234)	GENIPPVLHITNTAT	15	82
277	VP1 N265D(259-273)	VCGMFTDRSGSQQWR	15	83
278	VP1 S267F(259-273)	VCGMFTNRFGSQQWR	15	84

[0131]

279	VP1 Q271H(259-273)	VCGMFTNRSGSQHWR	15	85
280	VP1 S61L(54-68)	HLRGFSKLISISDTF	15	86
281	VP1 K60E(54-68)	HLRGFSESISISDTF	15	87
282	VP1 N265H(259-273)	VCGMFTHRSGSQQWR	15	88
283	VP1 N265T(259-273)	VCGMFTTRSGSQQWR	15	89
284	VP1 S267Y(259-273)	VCGMFTNRYGSQQWR	15	90
285	VP1 S267L(259-273)	VCGMFTNRLGSQQWR	15	91
286	VP1 S269C(259-273)	VCGMFTNRSGCQQWR	15	92

[0132] JCV- 特异性 $CD4^+$T 细胞克隆的精细特异性和功能表型

[0133] 先前的数据已显示基于某些转录因子的表达，CD4+ 分化成某些 T 帮助细胞表型例如 Th1 细胞 (IFN- γ 产生者)、分泌 IL-17 的 Th17 细胞、表达标志细胞因子 IL-4 的 Th2 细胞或 T 调节性细胞 (Zhu 等人，2010)。成为 Th1 或 Th2 细胞的分比被认为是相互排斥的并且受转录因子 T-bet(Th1) 和 Gata-3(Th2) 控制 (Zhu 等人，2010)。基于这些数据，我们发现具有双功能 (Th1-2) 表型的定型记忆细胞是高度出人预料的，我们因此建立了 VP1/VLP- 特异性 T 细胞克隆来在克隆水平上检查这点。如材料和方法中所述产生了 VP1/VLP- 特异性 TCC。最初，通过有限稀释产生 21 个 VP1/VLP- 特异性单细胞来源的培养物，就 TCRV β 表达、功能表型和精细特异性而言对其进行表征 (表 2)。该表征允许鉴定 11 种假定的不同的 TCC。对应于每一个 TCC 的单细胞生长培养物的数目提供了关于每一种 TCC 在脑浸润性中的频率 (图 3a)。TCC-4 是最丰富的，并且由 5 个从单个生长孔出现的集落代表，其次是 TCC-2(具有 3 个单细胞生长培养物)、TCC-1、-8、-9 和 -10(具有 2 个单细胞生长培养物) 和最后是 TCC-3、-5、-6、-7 和 -11(仅具有 1 个单细胞生长培养物)。11 种 TCC 的精细特异性概述于图 5b 中。针对 64 个覆盖 VP1 蛋白的 15 元肽测试每一种 TCC，使得鉴定了下列刺激性肽 :$VP1_{34}$(被 TCC-1 和 -2 识别)、$VP1_{54}$(被 TCC-3 识别)、$VP1_{74}$(所有 $VP1_{74}$ 肽、被 TCC-4 识别)、$VP1_{91}$(被 TCC-5 识别)、$VP1_{143}$(被 TCC-6 识别)、$VP1_{229}$(被 TCC-7 识别)、$VP1_{319}$(被 TCC-8 和 -9 识别) 和 $VP1_{335}$(被 TCC-10 和 -11 识别)。考虑到识别特定肽的不同 TCC 的数目以及每一种 TCC 在脑浸润中的频率，被 VP1 特异性脑浸润性 TCC 识别的免疫显性肽是 $VP1_{34}$、$VP1_{74}$、$VP1_{319}$ 和 $VP1_{335}$，这确认了使用脑来源的大的细胞群体获得的精细特异性 (图 3c)。这些 TCC 的细胞内细胞因子染色揭示了 Th1-2 和 Th1 表型 (图 4a)。代表 57% 的脑来源 VP1 特异性单细胞生长培养物的 5 种 TCC 显示 Th1-2 表型，而代表 43% 的脑来源 VP1- 特异性单细胞生长培养物的 6 种 TCC 显示 Th1 表型 (图 4b)。特异性与功能表型不相关。对于免疫显性肽中的三个肽 ($VP1_{34}$、$VP1_{319}$ 和 $VP1_{335}$)，我们发现具有两种表型的 TCC。Th1-2 和 Th1TCC 的 T 帮助细胞表型通过利用 ELISA 测量 IL-4 和 IFN- γ 蛋白分泌以及通过测定转录因子 Gata3 和 T-bet 的 mRNA 的表达来确认。Th1-2TCC(n=5)，除 IFN- γ 外还分泌 IL-4，而 IL-4 分泌在 Th1TCC 中几乎不可检测到 (n=6)(图 6c)。细胞因子分泌特征谱不是因 PHA 的刺激导致的，因为在用 VP1/VLP 蛋白特异性刺激后，通过细胞内细胞因子染色或来自培养上清液的 ELISA 测量，观察到了相同的稳定模式。转录因子表达确认了 TCC 的表型。Th1-2TCC(n=5) 表达 Gata3 和 T-bet 的 mRNA，而 Th1TCC(n=6) 仅表达 t-bet(图 6d)。

[0134] 讨论

[0135] PML 的病毒病因学几乎在 40 年前就已显示，但关于控制 JCV 感染的免疫机制仍然了解相对少。$CD8^+$JCV- 特异性细胞毒性 T 细胞被与从 PML 的恢复相关联 (Du Pasquier 等人，2004a ;Koralnik 等人，2002)，并且已在 HLA-A*02:01- 阳性个体中鉴定了两个病毒表位 (Du Pasquier 等人，2004a ;Du Pasquier 等人，2004b)。相反地，关于 PML 中的 JCV- 特异性 $CD4^+$T 细胞的精细特异性和特征可获得的信息有限，对于 PML-IRIS 可获得的所述信息甚至更少 (Jilek 等人)。感染位点 (即 CNS 实质) 处的病毒特异性 T 细胞反应根本未被检查。

[0136] 发明人的数据给本主题提供了新的洞察，并且引导他们提出下列在那他珠单抗治疗下的 PML-IRIS 过程中的发病机制事件。抗 -VLA-4 抗体在免疫豁免位点例如脑通过阻断细胞迁移 (Stuve 等人，2006) 和 CNS 中的局部抗原呈递 (del Pilar Martin 等人，2008) 来抑制 JCV 感染的免疫监督。因此，病理性向神经 JCV 变体可因仍未明了的原因在少数 (1/500-1/1000) 被治疗的 MS 患者中导致 PML(Major, 2010 ;Ransohoff, 2005)。一旦 PML 被怀疑并且那他珠单抗被终止或通过血浆交换术主动除去，那么具有完全功能性和活化的 T 细胞区域重获向 CNS 隔室的进入，引发对于 PML-IRIS 来说是非常典型的强炎症并且通过许多机制 (包括 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞以及抗体形成性浆细胞) 有效地消除病毒感染的细胞。

[0137] 表 2VP1 特异性脑浸润性 T 细胞克隆 (TCC) 的表征

[0138]

TCC #	孔 #	Th 表型	TCR V β	精细特异性
TCC-1	17A	Th0	Vß2	$VP1_{34}$
	18A	Th0	Vß2	$VP1_{34}$
TCC-2	16A	Th1	Vß2	$VP1_{34}$
	28A	Th1	Vß2	$VP1_{34}$
	18B	Th1	Vß2	$VP1_{34}$
TCC-3	29A	Th1	Vb18	$VP1_{54}$
TCC-4	10A	Th0	Vß5.1	$VP1_{74\text{-}1}$, $VP1_{74\text{-}2}$, $VP1_{74\text{-}3}$
	14A	Th0	Vß5.1	$VP1_{74\text{-}1}$, $VP1_{74\text{-}2}$, $VP1_{74\text{-}3}$
	27A	Th0	Vß5.1	$VP1_{74\text{-}1}$, $VP1_{74\text{-}2}$, $VP1_{74\text{-}3}$
	30A	Th0	Vß5.1	$VP1_{74\text{-}1}$, $VP1_{74\text{-}2}$, $VP1_{74\text{-}3}$
	19B	Th0	Vß5.1	$VP1_{74\text{-}1}$, $VP1_{74\text{-}2}$, $VP1_{74\text{-}3}$
TCC-5	3A	Th1	Vß -	$VP1_{91}$
TCC-6	11B	Th1	Vß -	$VP1_{143}$
TCC-7	12B	Th0	Vß2	$VP1_{229}$
TCC-8	21A	Th0	Vß -	$VP1_{319}$
	25A	Th0	Vß -	$VP1_{319}$
TCC-9	36A	Th1	Vß -	$VP1_{319}$
	1B	Th1	Vß -	$VP1_{319}$
TCC-10	19A	Th0	Vß5.3	$VP1_{335}$
	3B	Th0	Vß5.3	$VP1_{335}$
TCC-11	24A	Th1	Vß -	$VP1_{335}$

[0139] 在 CNS- 浸润性 T- 和 B 细胞当中，具有 Th1- 或上述双功能 Th1-2 表型的 $CD4^+$T 细胞基于下列发现可能是最关键的元素。它们的 Th1-(IFN- γ) 和 Th2(IL-4) 细胞因子的平行分泌有可能解释 HLA- 类 II 分子不仅在居留细胞例如病毒感染的星形细胞和小神经胶质细胞上而且还在浸润性免疫细胞上的表达，因为 IFN- γ 是 HLA- 类 II 的最强诱导者。虽然因材料的缺乏而不能进行 HLA-DR 与星形细胞标志物例如 GFAP 的共定位研究，但 HLA-DR 的广泛表达强力表明这些也是阳性的。与 MS 及其动物模型实验性自身免疫性脑炎 (EAE)（其中已显示了迁移 T 细胞的局部再活化）类似，JCV- 特异性 Th1-2 以及还有 Th1 细胞可能通过识别经 JCV- 感染的 HLA- 类 II 阳性星形细胞、小神经胶质细胞 / 巨噬细胞或招募的树突细胞 (DC) 上的 JCV 肽被局部再活化。此外，大量 IL-4 的分泌导致 CNS 隔室中记忆 B 细胞 / 成浆细胞的活化和扩增，结果是病毒特异性抗体的分泌。局部产生的 JCV 衣壳蛋白 (VP1)- 特异性 IgG 抗体可识别被病毒感染的少突胶质细胞，随后所述细胞可通过补体或抗体介导的细胞的细胞毒性被裂解。CSF 中 IgG1 和 IgG3 抗体（其以高亲和力结合补体并且已在其它病毒感染的情境中被描述）的相对增加支持该想法。由于被感染的少突胶质细胞不表达 HLA- 类 II，但有效地表达 HLA- 类 I，因此可预期 JCV- 特异性、HLA-A2- 限制的 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞 (Koralnik 等人，2001)(Koralnik 等人，2002) 也通过杀死 JCV- 感染的少

突胶质细胞和 / 或星形细胞起作用。具有 PML 的 AIDS 患者的外周血中的这些先前描述的细胞也可能参与脑中 JCV 的局部消除得到了我们对特异于 JCV $VP1_{36}$ 和 JCV VP_{100}（如通过肽加载的 HLA-A*02:01 四聚体定义的）的 CD8+T 细胞的观察的支持。感染的星形细胞可以不仅用作 $CD4^+$ 病毒特异性 T 细胞的局部抗原呈递细胞，而且还可被 Th1-2 溶细胞性细胞杀死 (Hemmer 等人，1997)，而这与星形细胞的 DR 表达的问题一起需要进一步研究。

[0140] 上述发病机制方案解释了 IFN-γ- 和 IL-4 的作用，即 HLA- 类 II 分子在脑中的广泛表达以及抗 JCV 的强鞘内抗体反应，然而，仍然令人困惑的是大部分脑浸润性细胞显示 Th1-2 表型。先前，这些细胞被称为 Th0 细胞，并且被认为是幼稚细胞发育成定型为 Th1 或 Th2 谱系的记忆细胞之前的中间分化步骤 (Mosmann 和 Coffman, 1989)。然而，基于下列单个克隆的细胞因子模式，该想法很早就受到争议 (Kelso, 1995)。今天，Th1- 和 Th2 细胞被理解为相互排斥的命运 (Ansel 等人，2006)。然而，具有双重细胞因子分泌的个体 TCC 已在麻疹病毒感染中被描述为 Th0 细胞 (Howe 等人，2005) 和在 MS 的基于改变的肽配体的疗法过程中被描述为在恶化疾病自体反应 T 细胞之中 (Bielekova 等人，2000)。发明人当前基于细胞内细胞因子染色、细胞因子分泌和转录因子表达的稳定的 Th1-2 克隆的观察，指向 CNS 中确定的 T 帮助细胞亚群体而非中间或短暂的分化阶段。由于 Th0 细胞的上述不清楚的作用和关于它们作为终末分化细胞存在的先前争论，我们在此处提出将 IFN-γ / IL-4T 帮助细胞称为双功能 Th1-2 细胞。导致该 Th1-2 分化的情境和信号需要进一步研究。在最近公开的病毒感染模型的研究中，作者显示非保护性 Th2 可通过抗原 - 特异性 TCR 信号、I 型和 II 型干扰素和 IL-12 的协调作用被转化成稳定地表达 IFN-γ /IL-4 的保护性 CD4+ 细胞 (Hegazy 等人，2010)(Zhu 和 Paul, 2010)。发明人的发现是在人中体内存在稳定的 GATA-3+T-bet+ 和 IL-4+IFN-γ +Th2+1 表型的第一个证据。可以想象这些细胞在脑中被重编程，并且它们可很好地解释 PML-IRIS 的异常强的免疫应答和暴发过程。

[0141] 关于脑浸润性 T 细胞的精细特异性，发明人的数据在数个方面是有趣的。JCV- 特异性 T 细胞反应总体上是广泛的，因为来自几乎所有 JCV 蛋白的肽被识别，这与发明人的确定 JCV 的针对健康供体和 MS 患者的外周血来源的 $CD4^+$T 细胞的免疫显性表位的图谱的努力一致。然而，超过 50% 的被脑来源 $CD4^+$T 细胞识别的肽是主要结构蛋白 VP1 的部分。此外，VP1- 特异性 T 细胞在增殖的强度和前体频率方面占优势。特别吸引人的是 $VP1_{34-48}$ 不仅包含针对细胞毒性 HLA-A*02:01- 限制的 $CD8^+$T 细胞的主要表位 (Du Pasquier 等人，2003b)（发明人也通过四聚体染色在 PML-IRIS 患者的脑中发现了所述表位），而且还包含针对 HLA-DRB1*15:01/DRB5*01:01- 限制的 $CD4^+$T 细胞的主要表位。此外，肽 $VP1_{74}$ 和具有单个氨基酸置换的其两个变体的识别表明，该表位的识别可与在持续的 JCV 感染过程中保护宿主免于免疫逃避相关。这已在先前对于人免疫缺陷 -(Borrow 等人，1997) 和淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒感染 (Ciurea 等人，2001) 被显示。强劲的抗 VP1 的鞘内抗体反应进一步强调了该结构蛋白的作用。因此，发明人的发现显示 VP1 对于抗 JCV 感染的脑细胞的保护性免疫应答是重要的，并且这些是由抗体、$CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞介导的。该反应的强度可能部分由患者 2 的 HLA 型决定，所述患者表达主要 MS 风险等位基因 DRB1*15:01/DRB5*01:01 和 A*02:01，其将相同的 VP1 表位呈递给 $CD4^+$ 和 $CD8^+$T 细胞。他因此可能已经历了特别明显的脑的 T 细胞介导的免疫应答，其免疫病理学后果是重大的 PML-IRIS、脑肿胀和神经学上的恶化。如已由其他人指出的 (Cinque 等人，2003)，JCV- 特异性免疫应答是双刃剑。在无功能性免疫应

答的情况下，脑细胞被未抵抗的病毒感染裂解。在另一方面，如果不受约束，在PML-IRIS过程中强劲的JCV-特异性反应引起脑炎症和水肿，同时其有效地从CNS消除JCV，如果不被免疫抑制至少暂时地减弱，其可导致患者死亡（Tan等人，2009b）。

[0142] 在PML-IRIS过程中脑中的细胞和体液JCV-特异性免疫应答不仅使治疗复杂化，而且还可首先使PML的诊断模糊化。与依赖于CSF JCV病毒载荷并且如果进行活组织检查，分别依赖于针对JCV抗原和DNA的免疫组织化学和原位杂交的目前的常规不同，抗VP1的鞘内抗体反应似乎更强劲并且应当进行检查。在本研究的两名PML-IRIS患者中，鞘内VP1-特异性抗体滴度极高，尽管JCV DNA几乎不能被PCR和原位杂交检测到。JCV抗体测试的重要作用不仅得到具有PML的AIDS患者中高抗体滴度的先前观察（Weber等人，1997）的支持，而且还得了到那他珠单抗-治疗的MS患者中的最近数据（Gorelik等人，2010）的支持。

[0143] 本研究的另一个重要的且出人预料的观察是，与JCV-特异性抗体反应不同，发病机制相关T细胞被限制于CNS实质本身中，并且CSF对于研究T细胞特异性和功能几乎无作用。该发现可能不仅与PML-IRIS而且还与MS高度相关，其中出于明显的原因，即因为CNS组织对于研究者是很少能获得，大多数研究集中在CSF上作为CNS内的反应的替代者。因此进一步的研究应当尽可能试图检查活检组织或尸体剖检组织，如果其可获得的话。当研究该具有PML-IRIS的MS患者的脑浸润性CD4+T细胞时，发明人进一步吃惊地看到来自3个主要鞘磷脂蛋白的肽都不被识别，这表明在重大脑炎症过程中髓磷脂-特异性T细胞的旁观者活化或-招募未发生，但该细胞精细地特异于致病剂。

[0144] 实施例2 针对JCV的免疫接种

[0145] 在具有特发性CD4+淋巴细胞减少（罕见的组成型免疫缺陷）的患者中进行了个体愈合尝试，所述患者在64岁时发生PML（在图11中称为“患者Hamburg”）。此男性患者曾是健康的，即在他的生命过程中未经历罕见或常见的感染，并且在2010年2月因未明来源的脑炎的迹象而住院。他被彻底检查，并且作出了疑似EBV相关脑炎的诊断。在抗病毒疗法过程中在短暂的改善后，他进一步（尽管缓慢地）恶化了。在2010中，进行了两次脑活组织检查，在2010年末进行的第二次检查中，基于CSF中阳性JCV病毒载荷以及脑中JCV-感染的少突胶质细胞和星形细胞的显示作出了进行性多病灶脑白质病（PML）的诊断。平行地，发明人发现低CD4+T细胞计数（约300/微升）以及0.5或更小的CD4+/CD8+比率，这两者都与特发性CD4+淋巴细胞减少的诊断相一致。此外，实验室中的体外实验记录了在外周血单核细胞中不存在针对JCV病毒VP1的T细胞反应，以及几乎完全不存在幼稚CD4+T细胞。根据这些观察，发明人基于预先存在的和可能遗传上决定的低CD4+数目推理出患者可能已发生PML，这进一步因在50岁以上开始并且增强的完全生理免疫退化而得以加强。

[0146] 发明人想测试利用VP1的免疫接种以及在该CD4+淋巴细胞减少的情况下，优选与重组IL-7组合的免疫接种是否将增加患者必须具有的JCV-特异性T细胞的数目，因为他是JCV阳性的。此外，如果这将发生，那么发明人希望疫苗诱导的或加强的JCV VP1-特异性T细胞反应将引起这些细胞迁移至CNS并且从CNS隔室消除病毒和病毒感染的细胞。发明人因此申请了“个体愈合尝试”，与患者讨论该选择及其潜在风险并且获得了他的同意。IL-7(Cytheris)的使用在另一例CD4+淋巴细胞减少（Patel等人，2010）中得到最近出版物的进一步支持，在所述患者重组IL-7与抗病毒药一起产生患者的显著改善，然而在该患

者中，未进行免疫学研究，从而关于抗原特异性免疫应答的改善一无所知。

[0147] 上述患者的免疫接种方法包括下列步骤（关于免疫接种和测试的时间安排参见下面的方案）：利用与经皮肤施用的 TLR7 激动剂（咪喹莫特，Aldara；商购可得的）和静脉内施用的重组 IL-7(Cytheris) 组合的完整重组主要衣壳蛋白 VP1（由 Life Science Inkubator, Bonn 提供的）的皮下注射。将 VP1 蛋白以病毒样颗粒 (VLP) 的形式施用，如在本文中使用的条件下与此种颗粒相关的重组表达的 VP1 蛋白。如下文中所显示的，患者在仅两次免疫接种后不仅显示抗 JCV VP1 的体外增殖反应，而且还将 JCV 病毒载荷减少至 0，并且最终开始显示 PML 损伤周围略微的对比增强（通过脑 MRI 成像），这全都支持免疫接种在体内起作用。他还显示在发生 JCV- 特异性免疫应答后具有略向延迟的临床改善。此外，由于发明人的来自实施例 1 中描述的 PML-IRIS 患者的脑浸润性 T 细胞的数据表明，具有 T 帮助细胞 1-2 表型的 JCV- 特异性 CD4+T 细胞可能对于从脑消除 JCV 病毒是关键的，发明人还对患者的脑脊髓液中的 Th1-2CD4+T 细胞进行染色，并且可显示这些细胞确实存在。

[0148] 在具有乳腺癌的患者中进行了另一个个体愈合尝试，所述患者接受化学疗法并且作为化学疗法的副作用发生急性髓性白血病 (AML)。该患者随后接受自体和异体造血干细胞移植作为 AML 的治疗，随后发生急性移植物抗宿主病 (IV 级）。作为这些治疗的后果获得的免疫缺陷导致 PML。该病例在图 11 中称为“患者 Zurich”。这两名患者都利用重组 IL-7（皮下 (s.c.)) 来进行治疗。2 天后，施用了第一剂 VP1(s.c. 1mg, 将咪喹莫特乳膏使用在皮肤上）。在第一剂 VP1 后 2 天，给予第二剂 rIL-7。在第一 IL-7 剂后第 12 天，患者接受利用 VP1s.c. 加上咪喹莫特的第二次免疫接种，在该情况下同时施用 rIL-7。在第 6 周，施用第三剂的 VP1/ 咪喹莫特和第四剂的 rIL-7。图 11 显示来自利用获自两名患者的外周血单核细胞 (PBMC) 在图中指定的时间点进行的下文中描述的增殖测定的结果。大于 2 的刺激指数被认为是阳性反应。可看到两名患者在免疫接种后都显示抗 JCV 的阳性免疫应答。

[0149] 材料和方法

[0150] 血液和 CSF 样品

[0151] 在书面知情同意后获得了生物样品。通过 Ficoll(PAA, Pasching, 澳大利亚）密度梯度离心从 EDTA- 血液分离了外周血单核细胞 (PBMC)。

[0152] 通过接种 2000 个细胞 / 孔加上 $2x10^5$ 个受辐射的 (45Gy) 异体饲养细胞来扩增脑脊髓液 (CSF)- 来源的单核细胞。添加了 1μg/ml PHA-L(Sigma-Aldrich, Munich, 德国）和 500IU/ml IL-2（由 Federica Sallusto, Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, CH 友好地提供）。每 3-4 天重复 IL-2 的添加直至第 14 天。

[0153] 增殖测定

[0154] 通过将 $2x10^5$ 个细胞接种在 96 孔 U 形微量滴定板中来测试 PBMC 对 VP1（由 Viktorya Demina, Life Science Inkubator, Bonn, 德国友好地提供）和破伤风类毒素蛋白 (TTx, Novartis, Marburg, 德国）的增殖反应。以 2μg/ml 使用 VP1，以 5μg/ml 使用 TTx。在 7 天的温育后，测量 ^3H- 胸苷 (Hartmann Analytic, Braunschweig, 德国）的掺入。通过将孔 + 抗原的平均 CPM（每分钟计数）除以孔（无抗原）的平均 CPM 来计算刺激指数 (SI)。

[0155] 为了利用流式细胞术测量对 VP1 和 TTx 的增殖反应，使用 CellTrace™ CFSE 细胞增殖试剂盒 (Invitrogen, Darmstadt, 德国）。因此，如上所述接种细胞，并且 6 天后用抗原再刺激，按照制造商的说明书利用 CFSE 进行处理。5 天后，通过流式细胞术分析细胞。

[0156] 流式细胞术分析

[0157] 通过将50μl体积的适当的抗体混合物添加至100μl血液中来进行全血染色。将混合物在室温下温育30分钟，随后用FACS裂解液(BD Phar Mingen)裂解红血细胞10分钟。洗涤后，在LSR II(BD)中通过流式细胞术分析细胞。使用了下列抗体:CD4(APC,RPA-T4,eBioscience)、CD8(PB,DK25,Dako,Glostrup,丹麦)、CD45RO(FITC,UCHL1,eBioscience)、CD25(PE-Cy7,eBioscience)、CD3(PE,DakoCytomation,丹麦)、CD8(PB,DakoCytomation,丹麦)、IFN-γ(FITC,BDPharmingen)、IL-4(PE-Cy7,eBioscience)。

[0158] 参考资料

[0159] 佚名

[0160] http://tysabri.de/index.php?inhalt=tysabri.pmlinzidenz2011.

[0161] Astrom KE,Mancall EL,Richardson EP,Jr.Progressive multifocal leuko-encephalopathy;a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease.Brain1958;81:93-111.

[0162] Carreno BM,Turner RV,Biddison WE,Coligan JE.Overlapping epitopes that are recognized by CD8+HLA class I-restricted and CD4+class II-restricted cytotoxic T lymphocytes are contained within an influenza nucleoprotein peptide.J Immunol 1992;148:894-9.

[0163] Cavacini LA,Kuhrt D,Duval M,Mayer K,Posner MR.Binding and neutralization activity of human IgG1and IgG3from serum of HIV-infected individuals.AIDS Res Hum Retroviruses2003;19:785-92.

[0164] Cinque P,Bossolasco S,Brambilla AM,Boschini A,Mussini C,Pierotti C,et al.The effect of highly active antiretroviral therapy-induced immune reconstitution on development and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy:study of43cases with review of the literature.J Neurovirol2003;9Suppl1:73-80.

[0165] Du Pasquier RA,Clark KW,Smith PS,Joseph JT,Mazullo JM,De Girolami U,et al.JCV-specific cellular immune response correlates with a favorable clinical outcome in HIV-infected individuals with progressive multifocal leukoencephalopathy.J Neurovirol2001;7:318-22.

[0166] Du Pasquier RA,Corey S,Margolin DH,Williams K,Pfister LA,De Girolami U,et al.Productive infection of cerebellar granule cell neurons by JC virus in an HIV+individual.Neurology2003a;61:775-82.

[0167] Du Pasquier RA,Kuroda MJ,Schmitz JE,Zheng Y,Martin K,Peyerl FW,et al.Low frequency of cytotoxic T lymphocytes against the novel HLA-A*0201-restricted JC virus epitope VP1(p36)in patients with proven or possible progressive multifocal leukoencephalopathy.J Virol2003b;77:11918-26.

[0168] Du Pasquier RA,Kuroda MJ,Zheng Y,Jean-Jacques J,Letvin NL,Koralnik IJ.A prospective study demonstrates an association between JC virus-specific

cytotoxic T lymphocytes and the early control of progressive multifocal leukoencephalopathy. Brain2004a;127:1970-8.

[0169] Du Pasquier RA, Schmitz JE, Jean-Jacques J, Zheng Y, Gordon J, Khalili K, et al. Detection of JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in healthy individuals. J Virol2004b;78:10206-10.

[0170] Du Pasquier RA, Stein MC, Lima MA, Dang X, Jean-Jacques J, Zheng Y, et al. JC virus induces a vigorous CD8+cytotoxic T cell response in multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol 2006;176:181-6.

[0171] Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in400healthy blood donors. J Infect Dis2009;199:837-46.

[0172] Gillespie SM, Chang Y, Lemp G, Arthur R, Buchbinder S, Steimle A, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. Ann Neurol1991;30:597-604.

[0173] Goldmann C, Petry H, Frye S, Ast O, Ebitsch S, Jentsch KD, et al. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus:formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. J Virol1999;73:4465-9.

[0174] Hegazy AN, Peine M, Helmstetter C, Panse I, Frohlich A, Bergthaler A, et al. Interferons direct Th2cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+)cell subset with combined Th2and Th1cell functions. Immunity2010;32:116-28.

[0175] Houff SA, Major EO, Katz DA, Kufta CV, Sever JL, Pittaluga S, et al. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. N Engl J Med1988;318:301-5.

[0176] Jilek S, Jaquiery E, Hirsch HH, Lysandropoulos A, Canales M, Guignard L, et al. Immune responses to JC virus in patients with multiple sclerosis treated with natalizumab:a cross-sectional and longitudinal study. Lancet Neurol2010;9:264-72.

[0177] Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. N Engl J Med2005;353:369-74.

[0178] Koralnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy revisited:Has the disease outgrown its name?Ann Neurol2006;60:162-73.

[0179] Koralnik IJ, Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Dang X, Zheng Y, et al. Association of prolonged survival in HLA-A2+progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. J Immunol2002;168:499-504.

[0180] Koralnik IJ,Du Pasquier RA,Letvin NL.JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in individuals with progressive multifocal leukoencephalopathy.J Virol2001;75:3483-7.

[0181] Langer-Gould A,Atlas SW,Green AJ,Bollen AW,Pelletier D.Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab.N Engl J Med2005;353:375-81.

[0182] Major EO.Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies.Annu Rev Med2010;61:35-47.

[0183] Ogg GS,Jin X,Bonhoeffer S,Dunbar PR,Nowak MA,Monard S,et al.Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA.Science1998;279:2103-6.

[0184] Padgett BL,Walker DL,ZuRhein GM,Eckroade RJ,Dessel BH.Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy.Lancet1971;1:1257-60.

[0185] Patel A,Patel J,Ikwuagwu J.A case of progressive multifocal leukoencephalopathy and idiopathic CD4+lymphocytopenia.J.Antimicrob.Chemother.2010;65:2489.

[0186] Ransohoff RM.Natalizumab and PML.Nat Neurosci2005;8:1275.

[0187] Stoner GL,Ryschkewitsch CF,Walker DL,Webster HD.JC papovavirus large tumor(T)-antigen expression in brain tissue of acquired immune deficiency syndrome(AIDS)and non-AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy.Proc Natl Acad Sci U S A1986;83:2271-5.

[0188] Stuve O,Marra CM,Jerome KR,Cook L,Cravens PD,Cepok S,et al.Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab.Ann Neurol2006;59:743-7.

[0189] Tan CS,Dezube BJ,Bhargava P,Autissier P,Wuthrich C,Miller J,et al.Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients:implications for viral latency and neurotropic transformation.J Infect Dis2009a;199:881-8.

[0190] Tan K,Roda R,Ostrow L,McArthur J,Nath A.PML-IRIS in patients with HIV infection:clinical manifestations and treatment with steroids.Neurology2009b;72:1458-64.

[0191] Weber T,Trebst C,Frye S,Cinque P,Vago L,Sindic CJ,et al.Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy.J Infect Dis1997;176:250-4.

[0192] Zhu J,Paul WE.CD4+T cell plasticity-Th2cells join the crowd.Immunity2010;32:11-3.

[0193] Zhu J,Yamane H,Paul WE.Differentiation of effector CD4T cell populations(*).Annu Rev Immunol2010;28:445-89.

[0194] Zonios DI,Falloon J,Bennett JE,Shaw PA,Chaitt D,Baseler MW,et al.Idiopathic CD4+lymphocytopenia:natural history and prognostic factors. Blood2008;112:287-94.

[0195] Zurhein G,Chou SM.Particles Resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease.Science1965;148:1477-9.

[0196] DE19543553

[0197] Goldmann et al.,1999,Journal of Virology73,p.4465-4469

[0001]

序列表

<110> Universitatsklinikum Hamburg-Eppendorf等

<120> 免疫接种和诊断应用中的多瘤病毒JC肽和蛋白质

<130> P88874

<140> 11006031.6
<141> 2011-07-22

<160> 92

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 1

Ala Gln Arg Ile Leu Ile Phe Leu Leu Glu Phe Leu Leu Asp Phe
1 5 10 15

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 2

Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 3

His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe
1 5 10 15

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 4

Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Arg Asp Met Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 5

Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Phe Asp Met Leu
1 5 10 15

[0002]

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 6

Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 7

Asn Arg Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu
1 5 10 15

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 8

Asn Phe Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu
1 5 10 15

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 9

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

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 10

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

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 11

Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala
1 5 10 15

[0003]

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 12

Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 13

Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Ser Leu Met Asn Val His
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 14

Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
1 5 10 15

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 15

Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Ala Leu Met Asn Val His
1 5 10 15

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 16

Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr His
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 17

[0004]

Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ala His
1 5 10

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 18

Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ser His
1 5 10

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 19

Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val
1 5 10 15

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 20

Ser Asn Gly Gln Ala Ala His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val
1 5 10 15

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 21

Ser Asn Gly Gln Ala Ser His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 22

Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val
1 5 10 15

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

[0005]

<400> 23

His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val
1 5 10 15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 24

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

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 25

Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Leu Phe Asn Tyr Arg Thr Thr Tyr
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 26

Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala
1 5 10 15

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 27

Tyr Arg Thr Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala
1 5 10 15

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 28

Tyr Arg Thr Thr Tyr Pro His Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala
1 5 10 15

[0006]

<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 29

Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
1 5 10 15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 30

Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 31

Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg
1 5 10 15

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 32

Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu
1 5 10 15

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 33

Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
1 5 10 15

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 34

Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

[0007]

<400> 35

Gly Glu Asn Val Pro Ser Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 36

Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Lys Thr Ala Thr
1 5 10 15

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 37

Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val
1 5 10 15

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 38

Ile Thr Lys Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val
1 5 10 15

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 39

Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 40

Asp Glu Phe Gly Val Arg Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr
1 5 10 15

[0008]

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 41

Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe
1 5 10 15

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 42

Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 43

Arg Val Asp Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln Val
1 5 10 15

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 44

Met Ala Gln Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu
1 5 10

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 45

Gly Asp Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Lys Tyr Gly Gln Leu
1 5 10 15

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 46

Met Gly Ala Ala Leu Ala Leu Leu Gly Asp Leu Val Ala Thr Val
1 5 10 15

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 47

[0009]

Leu Val Ala Thr Val Ser Glu Ala Ala Ala Ala Thr Gly Phe
1 5 10

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 48

Ala Ala Thr Gly Phe Ser Val Ala Glu Ile Ala Ala Gly Glu Ala
1 5 10 15

<210> 49
<211> 13
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 49

Ala Ala Gly Glu Ala Ala Ala Thr Ile Val Glu Ile Ala
1 5 10

<210> 50
<211> 13
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 50

Glu Val Glu Ile Ala Ser Leu Ala Thr Val Glu Gly Ile
1 5 10

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 51

Thr Val Glu Gly Ile Thr Ser Thr Ser Glu Ala Ile Ala Ala Ile
1 5 10 15

<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 52

Ala Ile Ala Ala Ile Gly Leu Thr Pro Glu Thr Tyr Ala Val Ile
1 5 10 15

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 53

Thr Tyr Ala Val Ile Thr Gly Ala Pro Gly Ala Val Ala Gly Phe
1 5 10 15

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> JC病毒

[0010]

<400> 54

Ala Val Ala Gly Phe Ala Ala Leu Val Gln Thr Val
1 5 10

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 55

Leu Val Gln Thr Val Thr Gly Gly Ser Ala Ile Ala Gln Leu
1 5 10

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 56

Phe Ala Asp Ser Lys Asn Gln Lys Ser Ile Cys Gln Gln Ala Val
1 5 10 15

<210> 57
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 57

Cys Gln Gln Ala Val Asp Thr Val Ala Ala Lys Gln Arg Val
1 5 10

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 58

Ala Lys Gln Arg Val Asp Ser Ile His Met Thr Arg Glu Glu Met
1 5 10 15

<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 59

Thr Arg Glu Glu Met Leu Val Glu Arg Phe Asn Phe Leu Leu
1 5 10

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 60

Ile Phe Gly Ala His Gly Asn Ala Val Leu Glu Gln Tyr Met Ala
1 5 10 15

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

[0011]

<400> 61

Glu Gln Tyr Met Ala Gly Val Ala Trp Ile His Cys Leu Leu
1 5 10

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 62

Val Ile Tyr Asp Phe Leu Lys Cys Ile Val Leu Asn Ile Pro Lys
1 5 10 15

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 63

Leu Asn Ile Pro Lys Lys Arg Tyr Trp Leu Phe Lys Gly Pro Ile
1 5 10 15

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 64

Val Phe Glu Asp Val Lys Gly Thr Gly Ala Glu Ser Arg Asp Leu
1 5 10 15

<210> 65
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 65

Glu Ser Arg Asp Leu Pro Ser Gly His Gly Ile Ser Asn Leu
1 5 10

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 66

Gly Ile Ser Asn Leu Asp Cys Leu Arg Asp Tyr Leu Asp Gly Ser Val
1 5 10 15

<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 67

Asp Tyr Leu Asp Gly Ser Val Lys Val Asn Leu Glu Arg Lys His
1 5 10 15

<210> 68
<211> 15
<212> PRT

[0012]

<213> JC病毒

<400> 68

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

<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 69

Cys Thr Phe His Ile Cys Lys Gly Phe Gln Cys Phe Lys Lys
1 5 10

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 70

Val Gly Cys Asp Phe Pro Pro Asn Ser Asp Thr Leu Tyr Cys Lys
1 5 10 15

<210> 71
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 71

Val Ser Cys Asp Phe Pro Pro Asn Ser Asp Thr Leu Tyr Cys Lys
1 5 10 15

<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 72

Arg Lys Phe Leu Arg Ser Ser Pro Leu Val Trp Ile Asp Cys Tyr
1 5 10 15

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 73

Trp Ile Asp Cys Tyr Cys Phe Asp Cys Phe Arg Gln Trp Phe
1 5 10

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 74

[0013]

Phe Arg Gln Trp Phe Gly Cys Asp Leu Thr Gln Glu Ala Leu His
1 5 10 15

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 75

Asp Leu Thr Gln Glu Ala Leu His Cys Trp Glu Lys Val Leu
1 5 10

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> JC病毒

<400> 76

Trp Glu Lys Val Leu Gly Asp Thr Pro Tyr Arg Asp Leu Lys Leu
1 5 10 15

<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 77

His Phe Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe
1 5 10 15

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 78

Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Tyr Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 79

His Leu Arg Gly Phe Ser Asn Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe
1 5 10 15

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

[0014]

<400> 80

His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser His Thr Phe
1 5 10 15

<210> 81
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 81

Ile Ser His Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Arg Asp Met Leu
1 5 10 15

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 82

Gly Glu Asn Ile Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

<210> 83
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 83

Val Cys Gly Met Phe Thr Asp Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

<210> 84
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 84

Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Phe Gly Ser Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 85

Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln His Trp Arg
1 5 10 15

[0015]

<210> 86
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 86

His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Leu Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe
1 5 10 15

<210> 87
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 87

His Leu Arg Gly Phe Ser Glu Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe
1 5 10 15

<210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 88

Val Cys Gly Met Phe Thr His Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 89

Val Cys Gly Met Phe Thr Thr Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

<210> 90
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 90

Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Tyr Gly Ser Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

<210> 91
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>

[0016]

<223> JCV肽的变体

<400> 91

Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Leu Gly Ser Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

<210> 92
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> JCV肽的变体

<400> 92

Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Cys Gln Gln Trp Arg
1 5 10 15

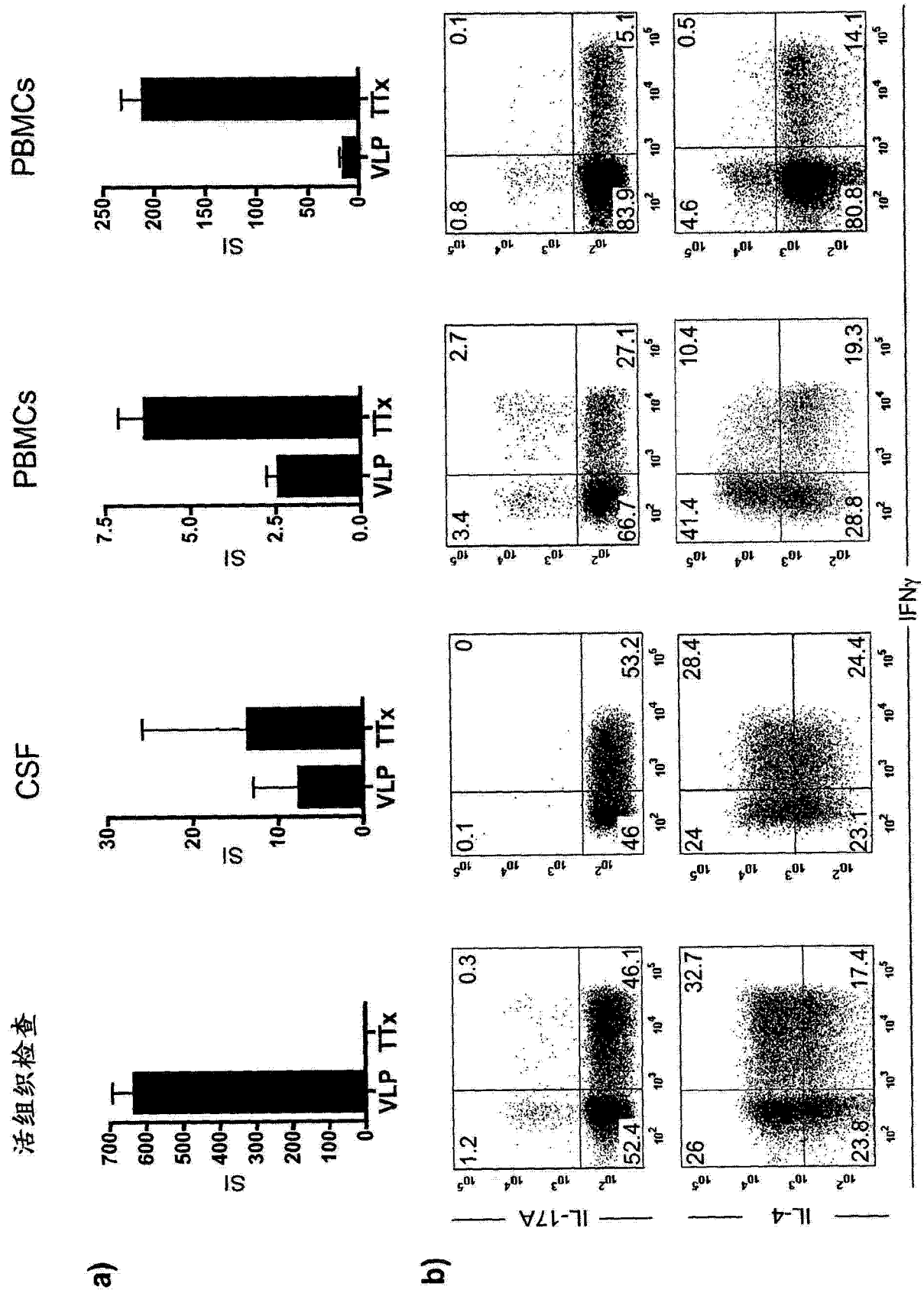


图 1

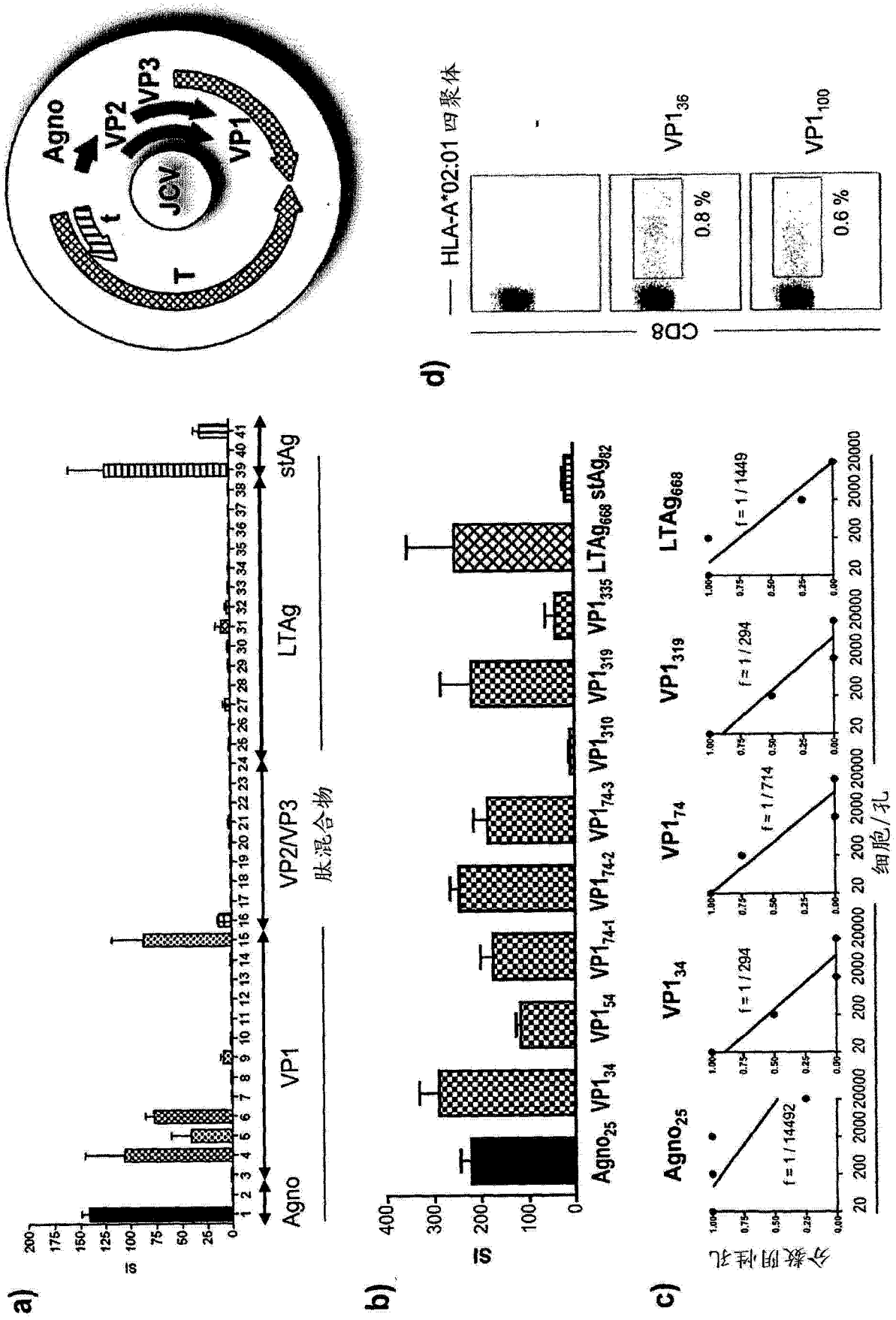

Agno
VP2
VP3
VP1
JCV
t
T
d)
HLA-A*02:01 四聚体
CD8
VP1$_{36}$
VP1$_{100}$
0.8 %
0.6 %
a)
SI
Agno
VP1
VP2/VP3
LTAg
stAg
肽混合物
b)
SI
Agno$_{25}$ VP1$_{34}$ VP1$_{54}$ VP1$_{74-1}$ VP1$_{74-2}$ VP1$_{74-3}$ VP1$_{310}$ VP1$_{319}$ VP1$_{335}$ LTAg$_{668}$ stAg$_{82}$
c)
分泌阴性孔
Agno$_{25}$
VP1$_{34}$
VP1$_{74}$
VP1$_{319}$
LTAg$_{668}$
f = 1 / 14492
f = 1 / 294
f = 1 / 714
f = 1 / 294
f = 1 / 1449
细胞/孔

图 2

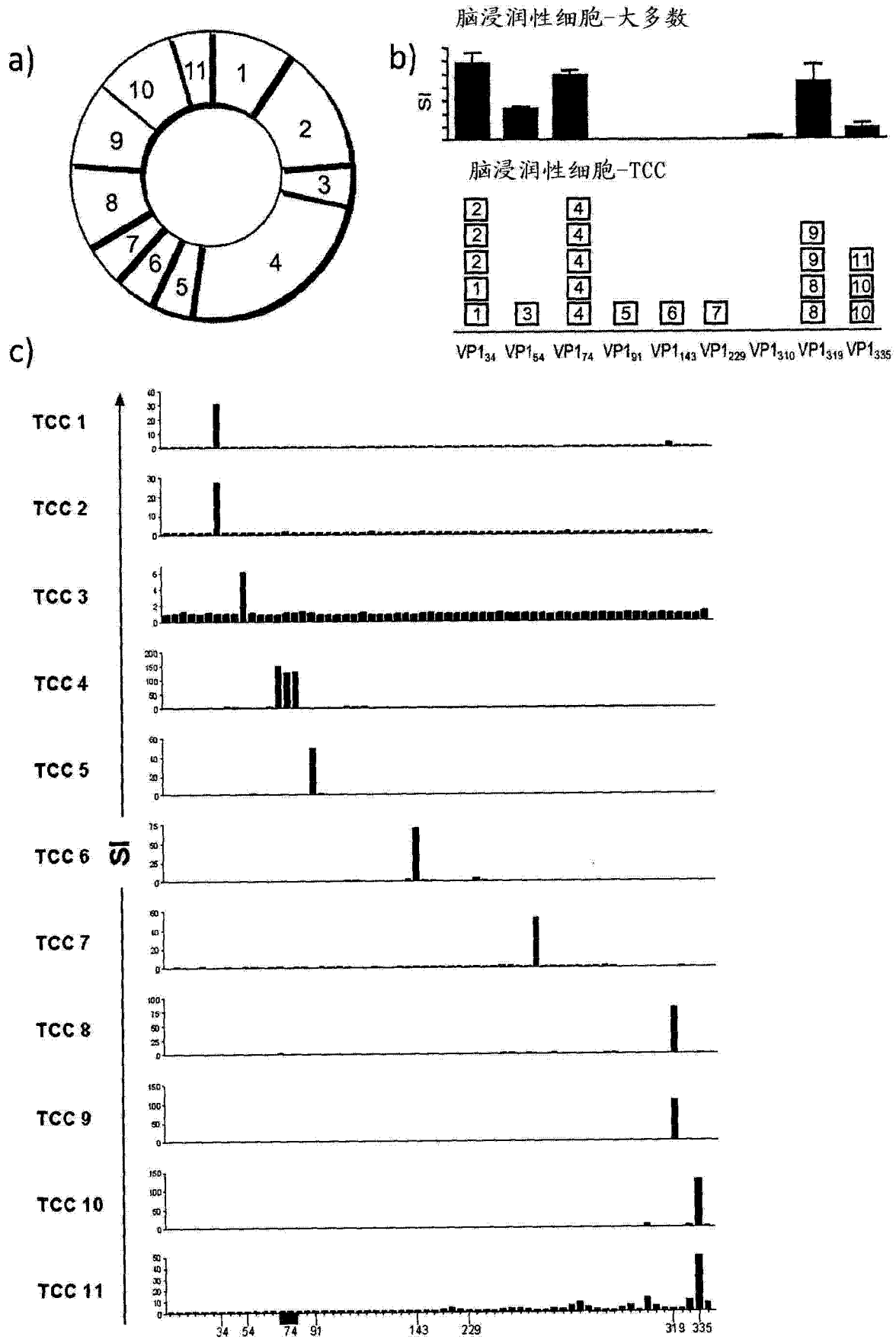

a)
11
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
b)
脑浸润性细胞-大多数
SI
脑浸润性细胞-TCC
VP1$_{34}$ VP1$_{54}$ VP1$_{74}$ VP1$_{91}$ VP1$_{143}$ VP1$_{229}$ VP1$_{310}$ VP1$_{319}$ VP1$_{335}$
c)
TCC 1
TCC 2
TCC 3
TCC 4
TCC 5
TCC 6
TCC 7
TCC 8
TCC 9
TCC 10
TCC 11
SI
34 54 74 91 143 229 319 335

图 3

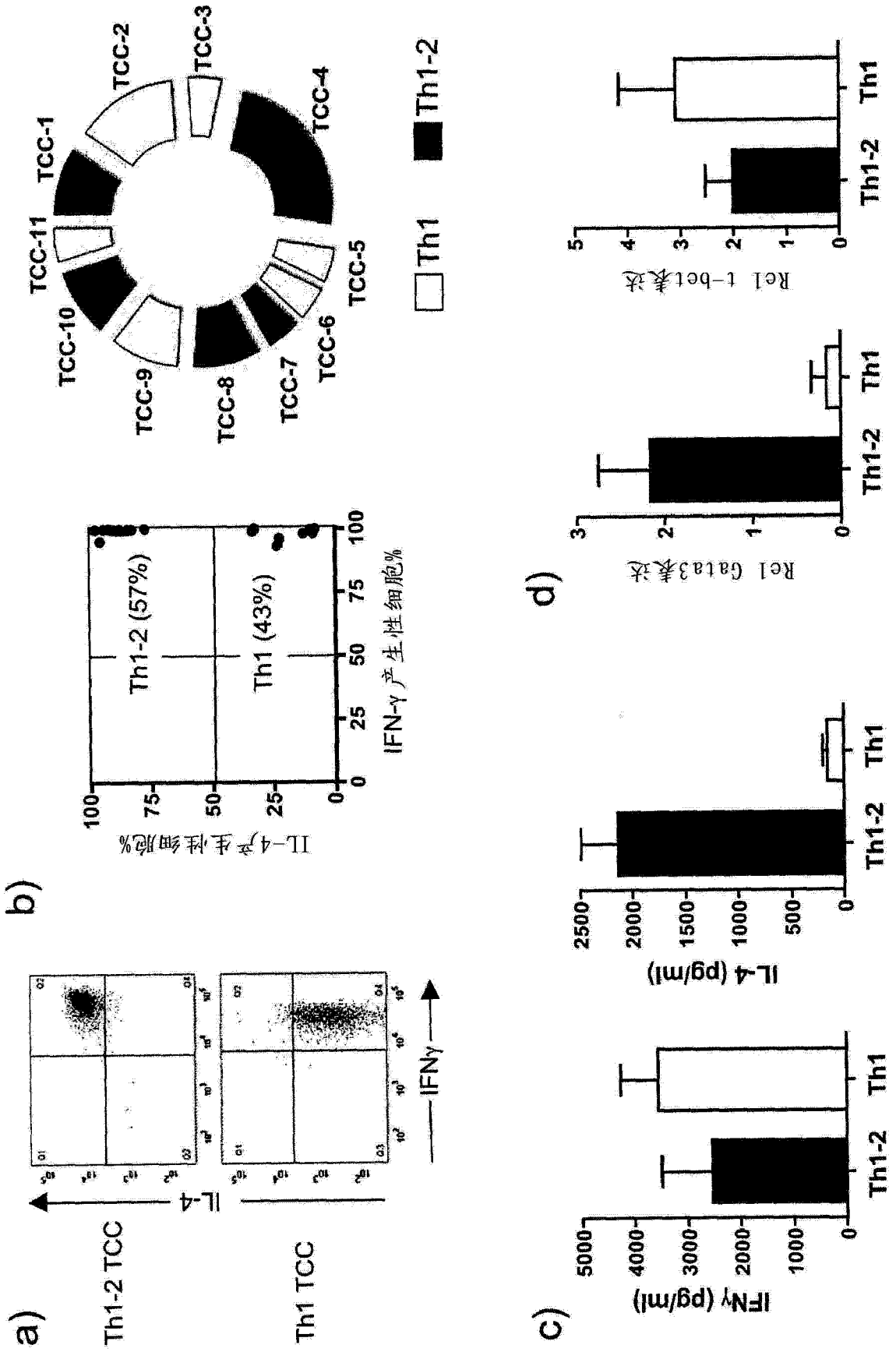

a)
Th1-2 TCC
Th1 TCC
IL-4
IFNγ
b)
Th1-2 (57%)
Th1 (43%)
IL-4产生性细胞%
IFN-γ产生性细胞%
TCC-1
TCC-2
TCC-3
TCC-4
TCC-5
TCC-6
TCC-7
TCC-8
TCC-9
TCC-10
TCC-11
Th1
Th1-2
c)
IFNγ (pg/ml)
IL-4 (pg/ml)
d)
Rel Gata3表达
Rel t-bet表达

图 4

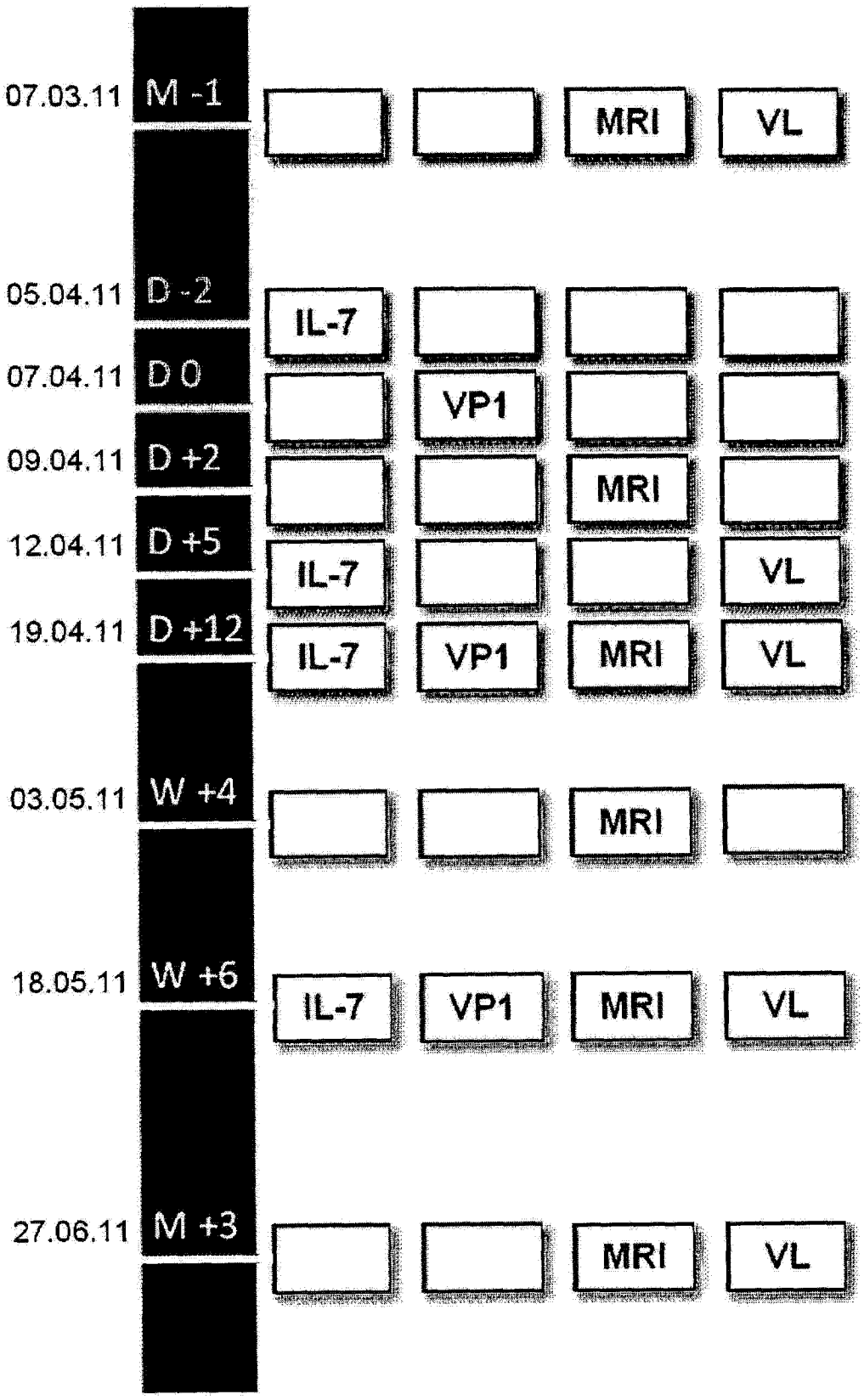

07.03.11
M -1
MRI
VL
05.04.11
D -2
IL-7
07.04.11
D 0
VP1
09.04.11
D +2
MRI
12.04.11
D +5
IL-7
VL
19.04.11
D +12
IL-7
VP1
MRI
VL
03.05.11
W +4
MRI
18.05.11
W +6
IL-7
VP1
MRI
VL
27.06.11
M +3
MRI
VL

图 5

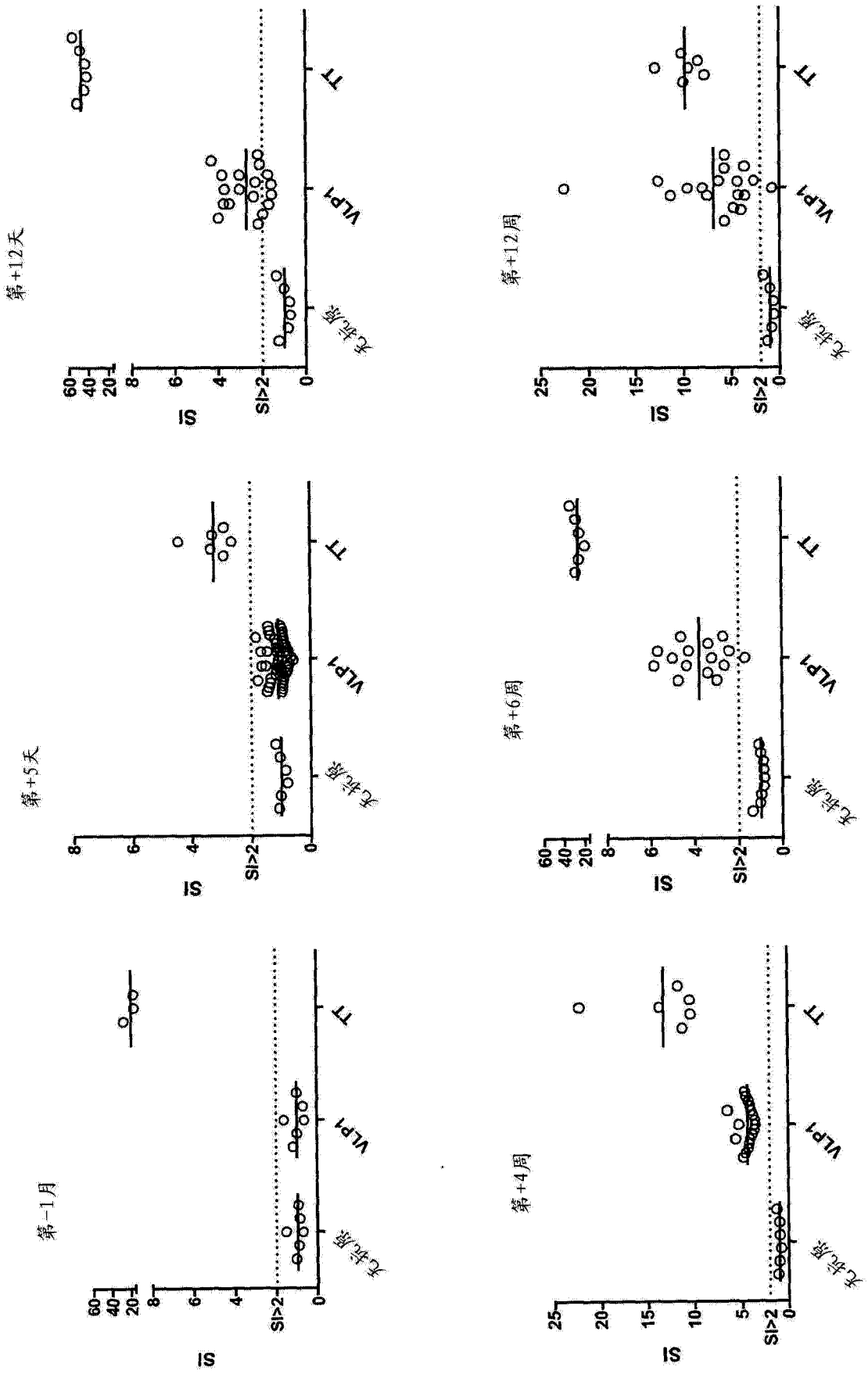


图 6

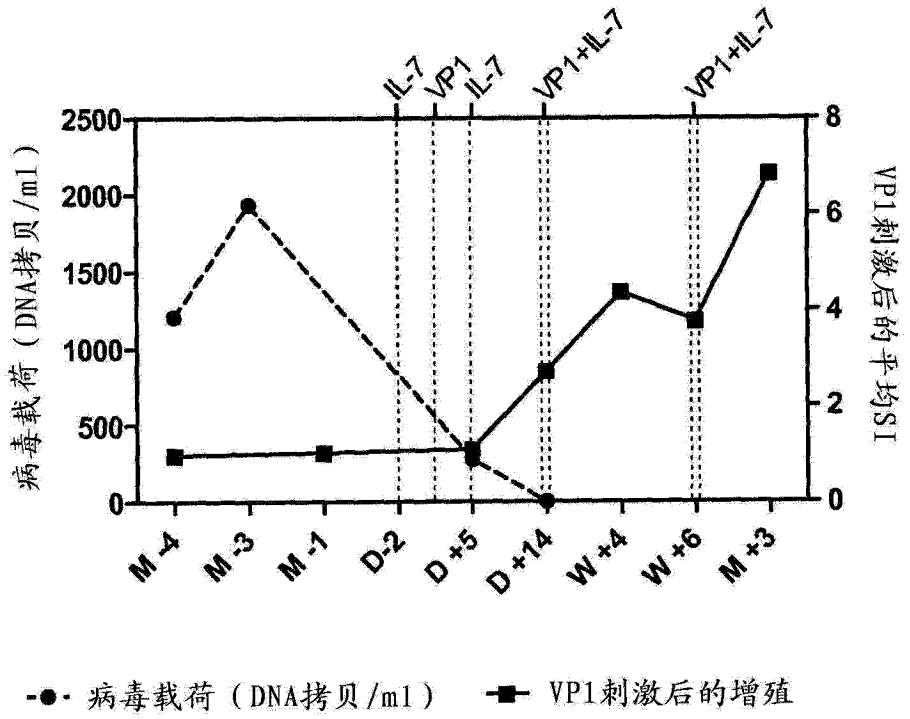

IL-7
VP1
IL-7
VP1+IL-7
VP1+IL-7
病毒载荷（DNA拷贝/ml）
VP1刺激后的平均SI
2500
2000
1500
1000
500
0
8
6
4
2
0
M-4
M-3
M-1
D-2
D+5
D+14
W+4
W+6
M+3
病毒载荷（DNA拷贝/ml）
VP1刺激后的增殖

图 7A

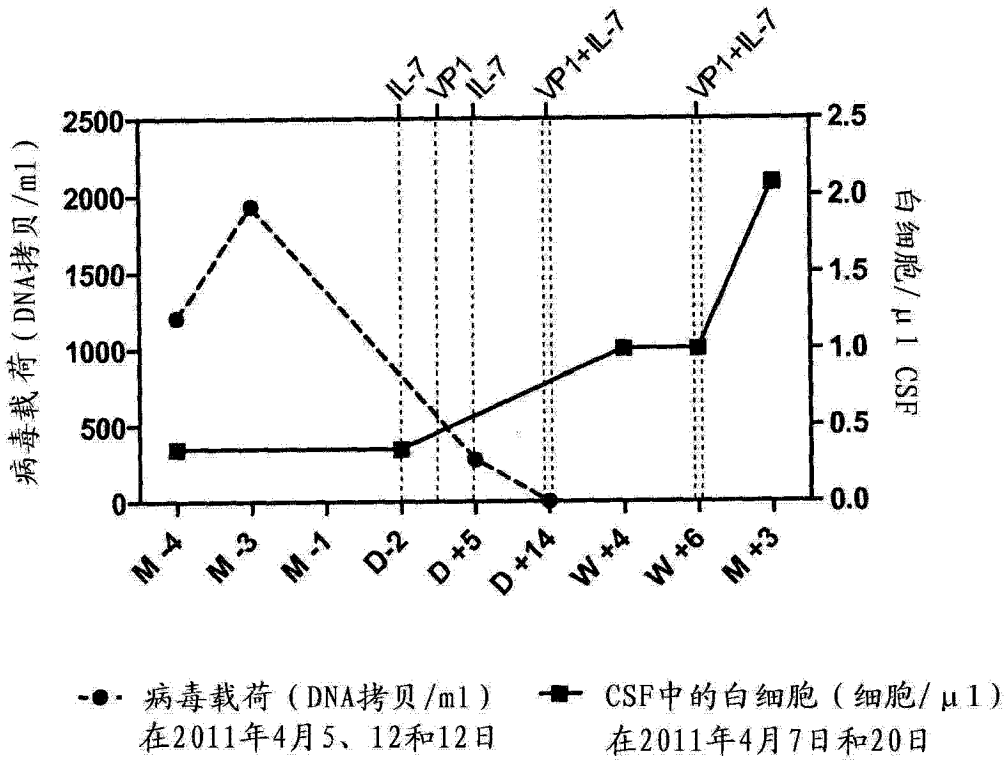

IL-7
VP1
IL-7
VP1+IL-7
VP1+IL-7
病毒载荷（DNA拷贝/ml）
白细胞/μl CSF
2500
2000
1500
1000
500
0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
M-4
M-3
M-1
D-2
D+5
D+14
W+4
W+6
M+3
病毒载荷（DNA拷贝/ml）
在2011年4月5、12和12日
CSF中的白细胞（细胞/μl）
在2011年4月7日和20日

图 7B

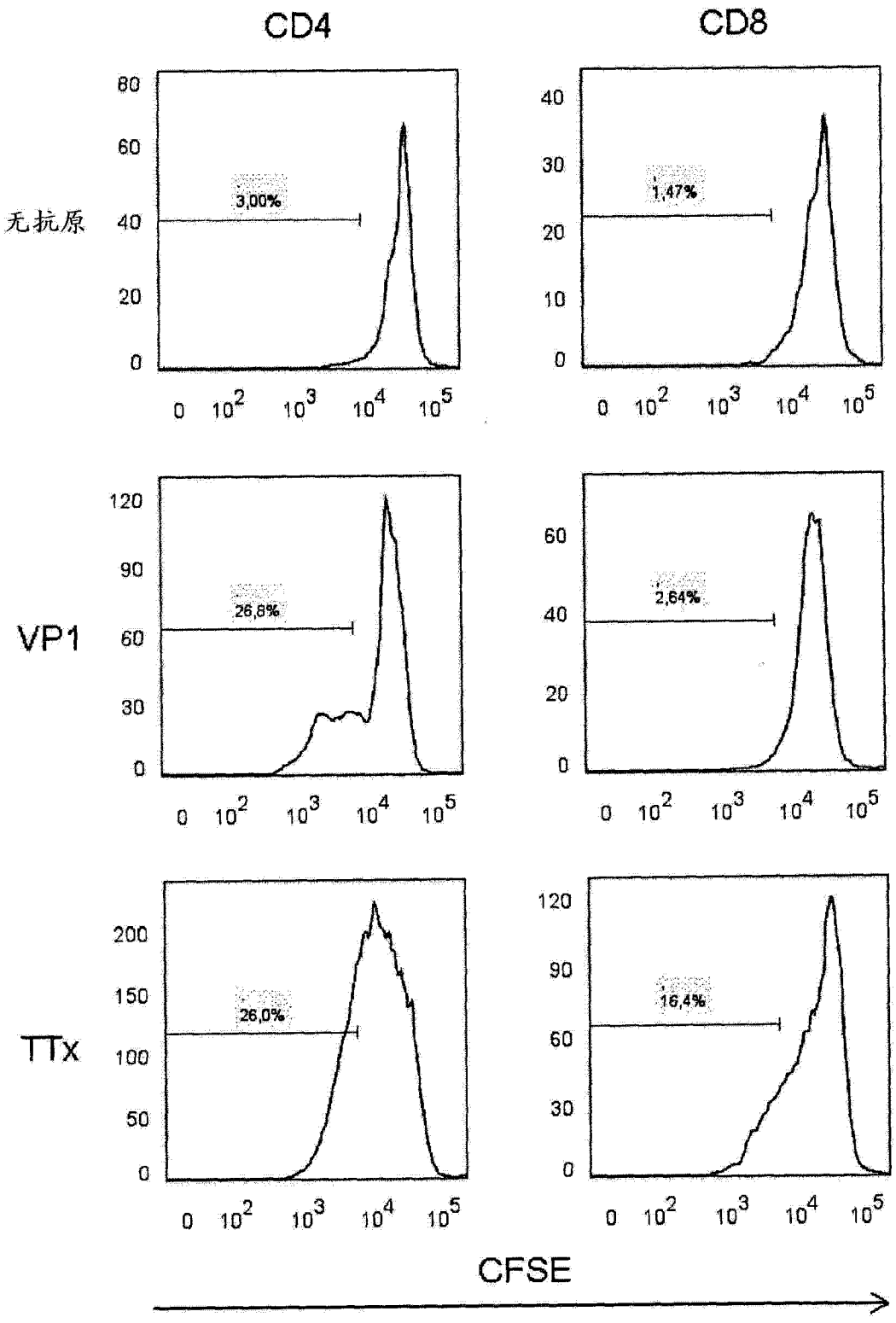


图 8

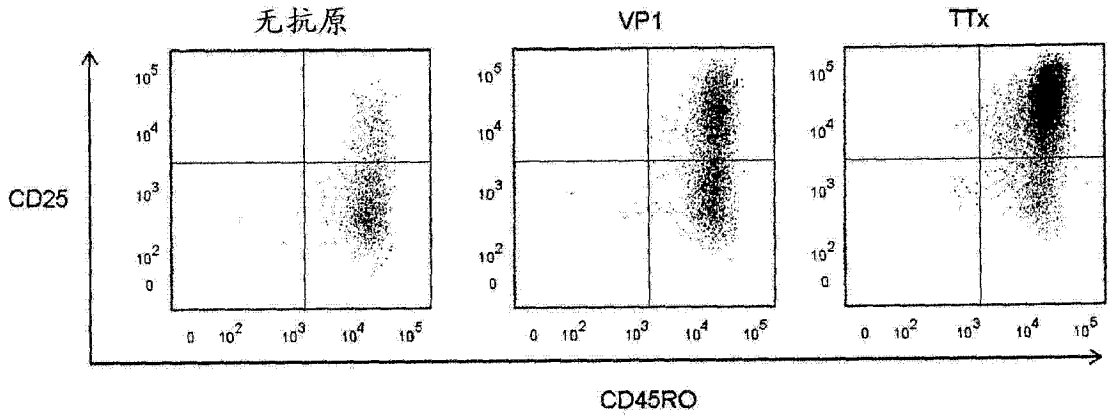

无抗原
VP1
TTx
CD25
CD45RO

图 9

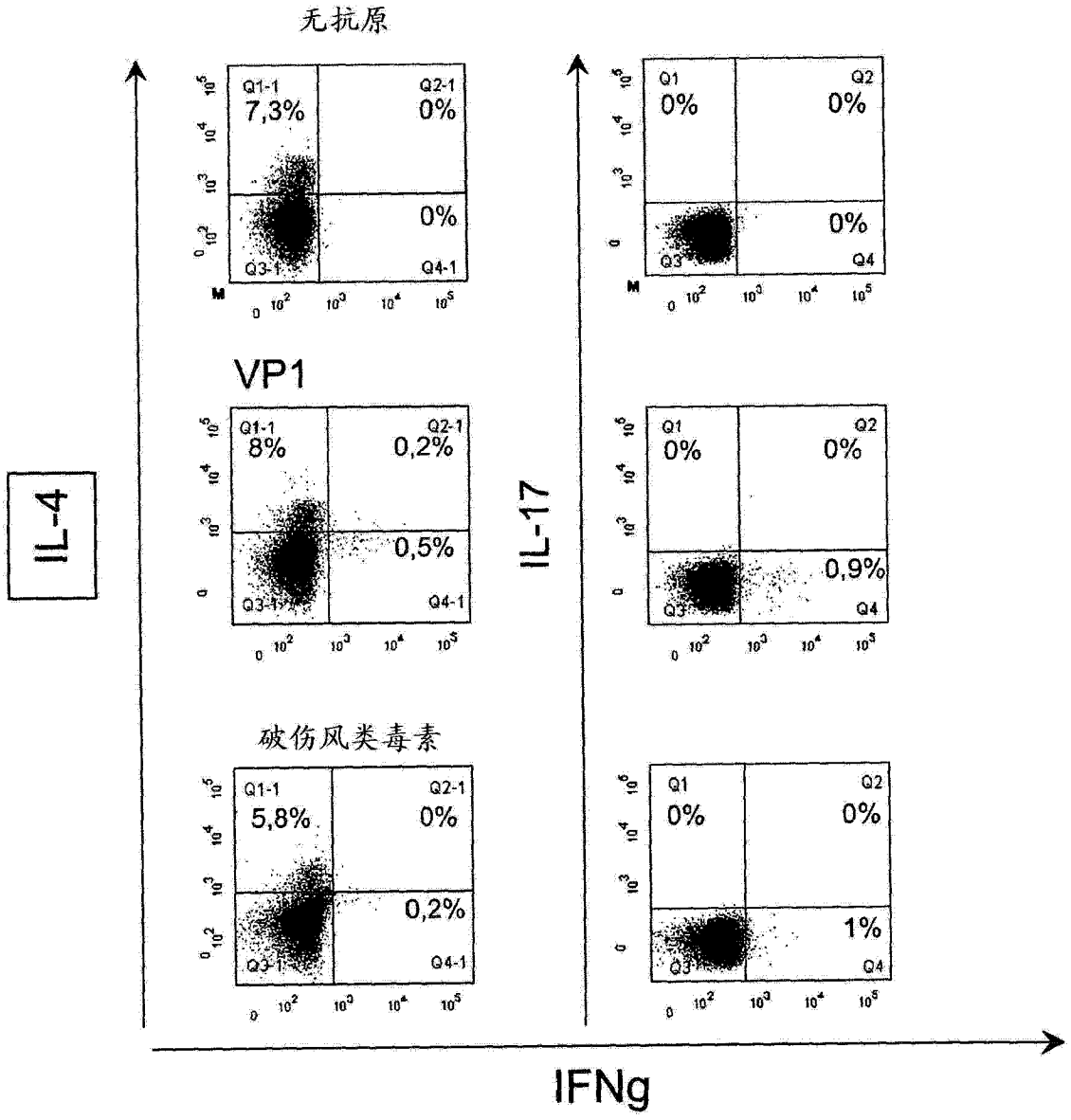

无抗原
VP1
破伤风类毒素
IL-4
IL-17
IFNg
Q1-1
7,3%
Q2-1
0%
0%
Q3-1
Q4-1
Q1
0%
Q2
0%
0%
Q3
Q4
8%
0,2%
0,5%
0,9%
5,8%
0,2%
1%

图 10

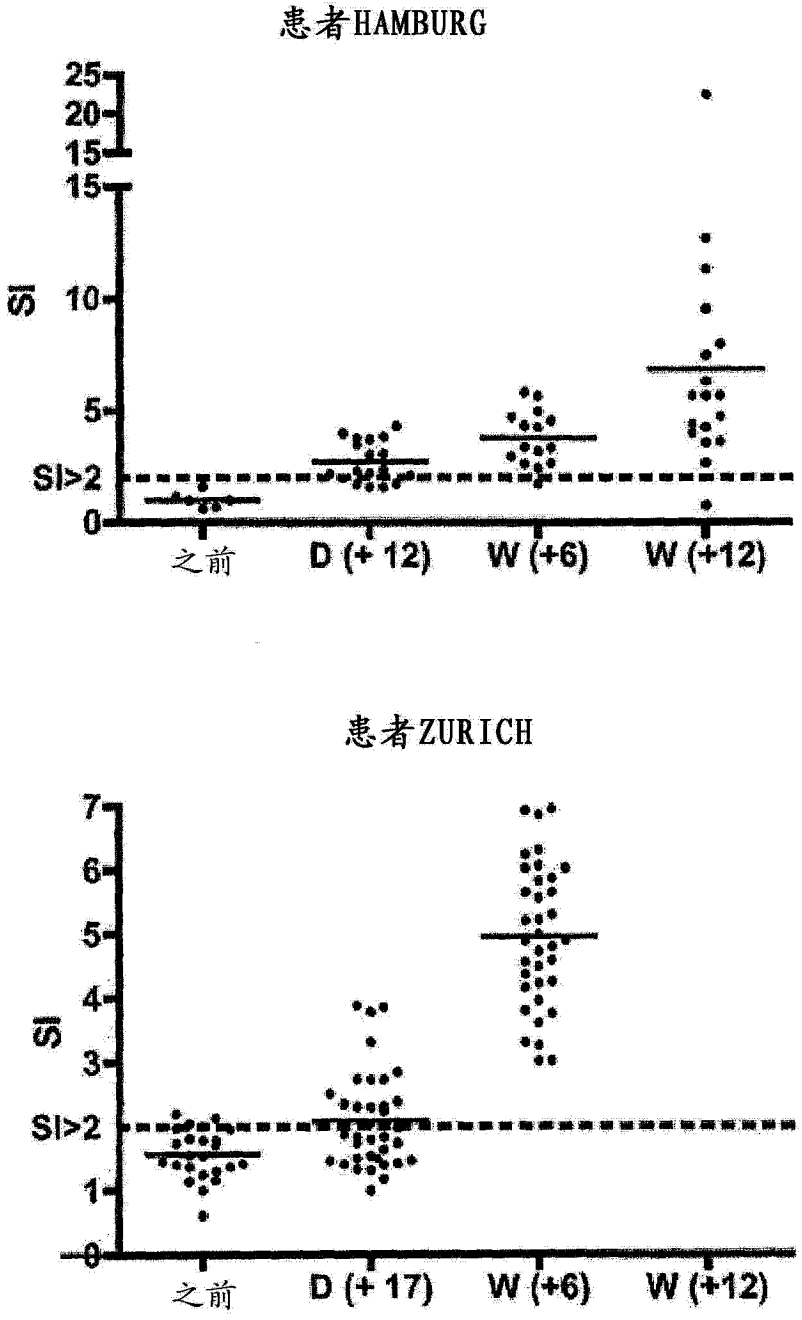

患者HAMBURG
25
20
15
15
10
5
SI>2
0
SI
之前
D (+ 12)
W (+6)
W (+12)
患者ZURICH
7
6
5
4
3
SI>2
1
0
SI
之前
D (+ 17)
W (+6)
W (+12)

图 11