



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104010664 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201280058005. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 09. 26

A61K 48/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

11182700. 2 2011. 09. 26 EP

61/573, 200 2011. 09. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/068954 2012. 09. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/045488 EN 2013. 04. 04

(71) 申请人 苏黎世大学数学和自然科学部

地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 C·德雷施 B·戴安德雷德佩雷拉

M·阿克曼 C·法拉艾费尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陈建芳 阎斌斌

权利要求书2页 说明书11页

序列表34页 附图9页

(54) 发明名称

用于治疗多发性硬化的 APC 介导的耐受诱导

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗多发性硬化的转基因表达构建体、特别是自失活慢病毒载体,其包含树突细胞特异性启动子,所述启动子控制自身抗原蛋白质、即髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白的表达。

1. 一种核酸分子,其包含
具有编码多肽的开放阅读框的序列,所述多肽包含含于选自以下的组的人类蛋白质中的至少 9 个氨基酸的连续序列:
 - i. 髓磷脂碱性蛋白质;
 - ii. 蛋白脂质蛋白质;和
 - iii. 髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白;其中所述开放阅读框是在 DC-STAMP 启动子序列的转录控制之下。
2. 根据权利要求 1 所述的核酸分子,其用于预防或治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化。
3. 一种病毒,其包含根据权利要求 1 所述的核酸序列或所述核酸序列的反向互补序列。
4. 根据权利要求 3 所述的病毒,其中所述病毒是慢病毒。
5. 根据权利要求 4 所述的病毒,其中所述慢病毒是自失活 (SIN) 慢病毒载体。
6. 根据权利要求 3 到 5 中任一权利要求所述的病毒,其用于预防或治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化。
7. 一种分离的树突细胞,其包含根据权利要求 1 所述的核酸序列。
8. 一种分离的树突细胞,其已被根据权利要求 4 到 5 中任一权利要求所述的慢病毒转导。
9. 一种细胞制剂,其包含从患者获得的抗原呈递细胞,其特征在于,所述抗原呈递细胞包含根据权利要求 1 所述的核酸序列或根据权利要求 3 到 5 中至少一项所述的病毒,所述细胞制剂用于自体使用,用于预防或治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化。
10. 根据权利要求 9 所述的细胞制剂,其特征在于,所述细胞制剂包含编码选自髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白的两种或三种不同人类蛋白质的核酸序列。
11. 一种产生用于预防或治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化的细胞制剂的方法,其中向源于所述患者的抗原呈递细胞的制剂中引入根据权利要求 1 所述的核酸序列或根据权利要求 3 到 5 中至少一项所述的病毒。
12. 一种用于治疗脱髓鞘疾病的药物组合物,其包含根据权利要求 7 或 8 所述的分离的树突细胞或根据权利要求 9 或 10 所述的细胞制剂。
13. 一种药物组合物,其包含根据权利要求 7 所述的分离的树突细胞,其中所述人类蛋白质是髓磷脂碱性蛋白质;和根据权利要求 7 所述的第二分离的树突细胞,其中所述人类蛋白质是蛋白脂质蛋白质;和根据权利要求 7 所述的第三分离的树突细胞,其中所述人类蛋白质是髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白,所述药物组合物用于自体使用,用于预防或治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化。
14. 一种治疗多发性硬化的方法,其包括向有需要的患者施用根据权利要求 7 所述的分离的树突细胞的步骤。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述施用分离的树突细胞的步骤与部分清髓性疗法一起执行。
16. 一种药物组合物,其包含根据权利要求 8 所述的第一分离的树突细胞,其中所述人

类蛋白质是髓磷脂碱性蛋白质 ;和根据权利要求 8 所述的第二分离的树突细胞,其中所述人类蛋白质是蛋白脂质蛋白质 ;和根据权利要求 8 所述的第三分离的树突细胞,其中所述人类蛋白质是髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白。

17. 一种治疗多发性硬化的方法,其包括向有需要的患者施用根据权利要求 8 所述的分离的树突细胞的步骤。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述施用分离的树突细胞的步骤与部分清髓性疗法一起执行。

19. 一种治疗多发性硬化的方法,其包括向有需要的患者施用根据权利要求 3 到 5 中任一项所述的病毒的步骤。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述施用病毒的步骤与部分清髓性疗法一起执行。

21. 根据权利要求 15、18 或 20 所述的方法,其中所述部分清髓性疗法包括施用白消安。

用于治疗多发性硬化的 APC 介导的耐受诱导

背景技术

[0001] 人们对于多发性硬化 (MS 或播散性脑脊髓炎) 的原因尚不清楚并且对于导致疾病产生的致病过程也不完全了解。当前知识支持靶向髓磷脂组分或髓磷脂产生细胞的 T 细胞介导的自身免疫致病机理。MS 和其动物模型实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 的特征在于中枢神经系统 (CNS) 内的抗原呈递细胞 (APC) 和自身反应性淋巴细胞的活化和积聚。已知被自身反应性 T 细胞识别的一些髓磷脂蛋白质包括髓磷脂碱性蛋白质 (MBP)、蛋白脂质蛋白质 (PLP) 和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)。

[0002] 髓磷脂碱性蛋白质 (MBP) 是少突胶质细胞和施旺 (Schwann) 细胞的髓鞘的主要组分。其人类直系同源物 (orthologue) 的遗传数据于美国国家生物技术信息中心 (US National Centre for Biotechnology Information) (NCBI) 以基因 ID4155 公开;人类 MBP 蛋白质数据可于 UniProt 以 P02686 获取。

[0003] 蛋白脂质蛋白质 (PLP; 亲脂素) 是来自中枢神经系统的主要髓磷脂蛋白质。其在髓磷脂多层结构的形成或维持中起着重要作用。其人类直系同源物的遗传数据以 NCBI 基因 ID5354 公开;人类 MBP 蛋白质数据可于 UniProt 以 P60201 获取。

[0004] 髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 是相信在提供髓鞘的结构完整性中起作用的糖蛋白。其人类直系同源物的遗传数据以 NCBI 基因 ID4340 公开;人类 MBP 蛋白质数据可于 UniProt 以 Q16653 获取。

[0005] 对于多发性硬化的病原学尚未完全了解,并且目前没有可用的治愈性治疗。已显示去除 T 细胞的自体骨髓移植在有关多发性硬化患者的临床试验中有效并且有益。然而,因自身反应性 T 细胞重新出现所导致的疾病复发表明具体治疗应考虑永久免疫耐受的诱导。然而已经在若干研究中证明的抗髓磷脂 T- 细胞反应性模式 (抗原扩散) 的动态变化,以及通过改变基于肽配体的治疗安全地诱导耐受的困难,已经提出了关于当前策略用于多发性硬化的抗原特异性免疫疗法的有用性的问题。

[0006] 自身免疫疾病的标准治疗依赖于全身性免疫抑制。然而,即使有上述困难,重要的仍然是设计保持免疫系统对抗病原和癌症的能力的新颖抗原特异性治疗形式。例如,先前研究已经显示,利用表达 MOG 或 PLP 的标准 γ 反转录病毒载体转导的骨髓源 HSC 可保护小鼠免于 EAE。这些研究者使用了可在不同造血细胞中介导 MOG 表达的组成型启动子,这可引起不良副作用。为了克服这种局限性, Ko 等在标准 γ 反转录病毒载体的背景下使用了 cd11c 启动子来引导树突细胞 (DC) 表达 MOG。尽管这种策略延缓了疾病发作,但它并不会阻止 EAE 产生 (Ko 等, 2010, Eur. J. Immunol. 40, 3499-3509)。

[0007] Dresch 等 (J. Immunology 2008, 181; 4495-4506) 证明,利用从 DC- 特异性 DC-STAMP 启动子表达 EGFP 或卵白蛋白 (OVA) 的自失活 (SIN) 慢病毒载体转导造血干细胞 (HSC) 导致转基因表达对 DC 的转录靶向和免疫耐受的抗原特异性诱导。

[0008] 本发明的目标是提供允许诱导对 MS 中自身抗原反应性免疫过程的耐受的手段和方法,由此逆转多发性硬化的已建立的自身免疫过程、缓解其症状并终止其进展。

发明内容

[0009] 根据本发明的第一方面,提供核酸序列。此核酸序列包含受表达序列,所述受表达序列编码包含含于选自以下的组的人类蛋白质中的至少 9 个氨基酸的连续序列(contiguous sequence)的多肽:髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白。所述受表达序列是在 DC-STAMP 启动子序列的转录控制之下。

[0010] 根据本发明的第二方面,提供慢病毒,所述慢病毒包含核酸序列,所述核酸序列包含受表达序列,其在 DC-STAMP 启动子序列的转录控制之下、编码包含含于选自以下的组的人类蛋白质中的至少 9 个氨基酸的连续序列的多肽:髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白。

[0011] 根据本发明的第三方面,提供分离的树突细胞,所述分离的树突细胞包含受表达核酸序列,其在 DC-STAMP 启动子序列的转录控制之下、编码包含含于选自以下的组的人类蛋白质中的至少 9 个氨基酸的连续序列的多肽:髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白。

[0012] 根据本发明的第四方面,提供用于治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化的药物组合物。所述药物组合物包含分离的树突细胞,所述分离的树突细胞包含受表达核酸序列,其在 DC-STAMP 启动子序列的转录控制之下、编码包含含于选自以下的组的人类蛋白质中的至少 9 个氨基酸的连续序列的多肽:髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白。

[0013] 根据本发明的又一方面,提供治疗多发性硬化的方法,其包括向有需要的患者提供根据本发明的分离的树突细胞。

[0014] 此外,本发明涉及产生用于治疗患者的多发性硬化的细胞制剂的方法,所述方法包括以下步骤:向源于所述患者的抗原呈递细胞(APC)的制剂中引入根据本发明的受表达核酸序列。

[0015] 如本文中所使用,“APC 制剂”可指富集 APC 的任何制剂。这些制剂为本领域内众所周知,并且其制造方法被视为常规方法。示例性非限制性类型的制剂是骨髓源造血干细胞(BM-HSC)制剂。制备 BM-HSC 制剂的方法众所周知并且是常规方法,且在本文中尤其进行了例证。

具体实施方式

[0016] 本发明是基于以下惊人发现:由树突细胞特异性的启动子序列驱使的、编码自身抗原的转基因在树突细胞中的表达不仅可预防自身免疫疾病发作,而且也能够逆转已建立的自身免疫过程并且终止脱髓鞘疾病的发展。

[0017] 本发明证明,用从树突细胞特异性启动子表达参与 MS 的抗原的载体对造血干细胞(HSC)进行离体改造诱导了永久的抗原特异性耐受。

[0018] 根据本发明,提供在树突细胞特异性启动子的转录控制之下的编码人类自身抗原的受表达核酸序列。

[0019] 在本发明的背景下,DC-特异性启动子序列是在人类不成熟树突细胞中在其控制之下组成型地表达编码序列的核酸序列。优选的 DC-特异性启动子序列是 DC-STAMP 启动子序列或 DC-STAMP 基因的 5' 未翻译区(参见 Hartgers 等, Eur. J. Immunol. 2000 ;

30, 3585-90)。特别优选的 DC- 特异性启动子序列是 SEQ ID02 的序列。可选的优选的 DC- 特异性启动子序列是 SEQ ID19 的序列 (GenBank 登记号 AF305068)。其它所关注的 DC-STAMP 启动子区可通过 PCR 使用如 Dresch 等 (出处同上) 中描述的合适引物从总基因组 DNA 容易地扩增。

[0020] 根据一个实施方案,所述受表达序列在 DC- 特异性启动子序列的转录控制之下、编码选自以下的组的人类自身抗原:髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白或其一部分。

[0021] 根据一个实施方案,所述受表达序列编码髓磷脂碱性蛋白质异型体 1 (SEQ ID05 和 20) 或其片段。根据另一实施方案,所述受表达序列编码髓磷脂碱性蛋白质异型体 2 (SEQ ID35)、异型体 3 (SEQ ID36)、异型体 4 (SEQ ID06)、异型体 5 (SEQ ID37)、异型体 6 (SEQ ID38) 或异型体 7 (SEQ ID39) 或其片段。根据另一实施方案,所述受表达序列编码髓磷脂蛋白脂质蛋白质异型体 1 (SEQ ID07) 或其片段。根据另一实施方案,所述受表达序列编码髓磷脂蛋白脂质蛋白质异型体 DM-20 (SEQ ID08) 或其片段。根据另一实施方案,所述受表达序列编码髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白异型体 1 (SEQ ID09)、异型体 2 (SEQ ID10)、异型体 3 (SEQ ID11)、异型体 4 (SEQ ID12)、异型体 5 (SEQ ID13)、异型体 6 (SEQ ID14)、异型体 7 (SEQ ID15)、异型体 8 (SEQ ID16)、异型体 9 (SEQ ID17) 或异型体 10 (SEQ ID18) ;或其片段。

[0022] 根据一个实施方案,所述受表达核酸序列仅编码人类自身抗原的多肽部分。在一个实施方案中,所述多肽部分代表所述自身抗原的共同 HLA I 表位。在另一实施方案中,所述多肽部分代表所述自身抗原的主要 HLA I 表位。在一个实施方案中,所述多肽部分代表所述自身抗原的共同 HLA II 表位。在另一实施方案中,所述多肽部分代表所述自身抗原的主要 HLA II 表位。预测表位的方法为本领域内已知并且尤其在 H. G. Rammensee、J. Bachmann 和 S. Stevanovic 的著作“MHC Ligands and Peptide Motifs”中进行了描述。

[0023] 可用于本发明中的示例性非限制性 MBP HLA I 表位包括:MBP84-102,更具体地 MBP85-99 (ENPVVHFFKNIVTPR;SEQ ID21) (Hansen BE 等, Tissue Antigens. 2011 年 3 月; 77(3):229-34);MBP154-172 (Martin R 等, J Immunol. 1990 年 7 月 15 日;145(2):540-8); hMBP64-78 (ARTAHYGLPQKSHG;SEQ ID22);hMBP82-100 (DENPVVHFFKNIVTPRTPP;SEQ ID23); hMBP111-129 (LSRFSWGAEGQRPGFGYGG;SEQ ID24) 和 hMBP138-151 (HKGFKGVDAQGTL;SEQ ID25) (Kawamura K 等, J Immunol. 2008 年 9 月 1 日;181(5):3202-11)。在一些实施方案中,用于本发明中的多核苷酸序列表达含于上述 MBP HLA I 表位之一的至少 9 个氨基酸的连续序列。在其它实施方案中,用于本发明中的多核苷酸序列表达一个或多个上述 MBP HLA I 表位。

[0024] 可用于本发明中的示例性非限制性 PLP HLA I 表位包括:人类 PLP31-70 (CGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLINVIHAFQYVI;SEQ ID26) (Mangalam AK 等, Eur J Immunol. 2004 年 1 月;34(1):280-90),更具体地 40-60 (GTEKLIETYFSKNYQDYEYLI;SEQ ID27) (Pelfrey CM 等, J Neuroimmunol. 1993 年 7 月;46(1-2):33-42);91-120 (YTTGAVRQIFGDYKTTICGKLSATVTGGQ;SEQ ID28) 和 178-228 (NTWTTCQSIAPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVCNSLLS ICK;SEQ ID29)。在一些实施方案中,用于本发明中的多核苷酸序列表达含于上述 PLP HLA I 表位之一的至少 9 个氨基酸的连续序列。在其它实施方案中,用于本发明中的多核苷酸序列表达一个或多个上述 PLP HLA I 表位。

[0025] 可用于本发明中的示例性非限制性 MOG 表位包括：小鼠 MOG 表位 1-21、35-55、67-87、104-117 和 202-218(Mendel I 等, Eur J Immunol. 1995 年 7 月;25(7):1951-9); 和 人类 MOG 表位 99-107(FFRDHSYQE;SEQ ID30);15-23(LVGDEVELP;SEQ ID31);83-91(LRIRNVRFSS;SEQ ID32);120-128(YWVSPGVLV;SEQ ID33); 和 40-48(YRPPFSRVV;SEQ ID34)(Forsthuber TG 等, Journal of Immunology, 2001, 167:7119-7125)。在一些实施方案中,用于本发明中的多核苷酸序列表达含于上述 MOG HLA I 表位之一中的至少 9 个氨基酸的连续序列。在其它实施方案中,用于本发明中的多核苷酸序列表达一个或多个上述 MOG HLA I 表位。

[0026] 在另一实施方案中,编码含有髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白中每一种的多个 HLA I 表位中的一个的多肽。在另一实施方案中,存在来自这三种蛋白质中每一种的多个主要 HLA I 表位中的一个。

[0027] 根据一个实施方案,所述多肽部分是长度为至少 9 个、12 个、15 个、18 个、21 个、14 个、17 个、30 个、40 个、50 个、60 个、70 个、80 个、90 个、100 个、125 个、150 个、175 个或至少 200 个氨基酸的连续氨基酸序列。

[0028] 根据一个实施方案,受表达核酸序列是作为分离的 DNA 序列提供。作为非限制性示例,所述分离的 DNA 序列可作为质粒、粘粒或微型染色体提供。

[0029] 根据另一实施方案,受表达核酸是作为病毒载体提供。作为非限制性示例,所述病毒载体可为腺病毒、疱疹病毒、腺病毒相关病毒或反转录病毒。

[0030] 根据一个实施方案,提供慢病毒,其包含在 DC- 特异性启动子序列的转录控制之下、编码选自以下的组的人类自身抗原的受表达核酸序列:髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白,或所述受表达核酸序列的反向互补序列。

[0031] 优选的慢病毒是如由 Lois 等 (Science2002, 295, 868-872) 所描述的自失活 (SIN) 慢病毒。SIN 慢病毒载体介导的转基因在 HSC 中的基因组整合支持表达抗原的“稳定态”树突细胞的恒定供应。在非炎症性病况中,这些细胞在胸腺和外周中的稳定抗原呈递可能使自身反应性 T 细胞耐受,并且因此阻止疾病产生或进展。示例性非限制性类型的 SIN 慢病毒含有 3' LTR 的 U3 区中的缺失,包括 TATA 框,从而导致原病毒中的 LTR 在受感染细胞中的转录失活 (Myoshi H 等, J Virol. 1998 年 10 月;72(10):8150-7)。

[0032] 本发明的另一方面涉及包含根据本发明的受表达核酸序列的分离的树突细胞。

[0033] 在一个实施方案中,树突细胞包含在 DC-STAMP 启动子序列的转录控制之下、编码选自以下的组的人类自身抗原的受表达核酸序列:髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白。

[0034] 本发明进一步涵盖包含从患者获得的抗原呈递细胞的细胞制剂,特征在于,所述抗原呈递细胞包含根据本发明的核酸序列或根据本发明的病毒。提供所述细胞制剂用于自体使用,用于预防或治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化。

[0035] 在一个实施方案中,所述细胞制剂包含编码两种或三种不同的人体蛋白质的核酸序列,所述人体蛋白质选自髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白。

[0036] 用于治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化的药物组合物也在本发明范围内。所述组合物包含分离的树突细胞,所述分离的树突细胞包含在 DC-STAMP 启动子序列的转录控

制之下、编码多肽的受表达核酸序列,所述多肽包含含于选自以下的组的人类自身抗原中的至少 9 个氨基酸的连续序列:髓磷脂碱性蛋白质、蛋白脂质蛋白质和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白。

[0037] 根据本发明的又一方面,提供用于治疗脱髓鞘疾病、特别是多发性硬化的给药方案,其中本发明的细胞制剂是结合用于部分清髓性 (myeloablative) 疗法的药物施用。

[0038] 根据本发明的又一方面,提供治疗多发性硬化的方法,其包括向有需要的患者提供根据本发明的分离的树突细胞。

[0039] 根据本发明的又一方面,提供治疗多发性硬化的方法,其包括向有需要的患者提供根据本发明的病毒。

[0040] 在某些实施方案中,本发明的方法是结合部分清髓性疗法来执行。在其它实施方案中,本发明的药物组合物被指示用于结合部分清髓性疗法施用。类似地,在一些实施方案中,本发明的离体方法可产生被指示用于结合部分清髓性疗法施用的药物组合物。术语“结合部分清髓性疗法”既包括同时施用药物组合物和部分清髓性疗法,又包括在时间上接近地施用药物组合物和部分清髓性疗法。通常,药物组合物和部分清髓性疗法将彼此在 48 小时内施用。

[0041] 上述部分清髓性疗法可优选包括施用部分清髓剂,例如白消安 (busulfan)。在其它实施方案中,施用以下药剂中的一种或多种:烷基化剂(例如,氮芥类[例如二氯甲基二乙胺]、环磷酰胺、美法仑 (melphalan) 和苯丁酸氮芥)、烷基磺酸盐(例如,白消安 (busulphan))、亚硝基脲类(例如,卡莫司汀 (carmustine)、洛莫司汀 (lomustine)、司莫司汀 (semustine) 和链脲霉素 (streptozocine))、三氮烯类(例如,达卡巴嗪 (dacarbazine))、抗代谢物类(例如,叶酸类似物,例如甲氨蝶呤 (methotrexate))、嘧啶类似物(例如氟尿嘧啶和阿糖胞苷 (cytarabine))、嘌呤类似物(例如,氟达拉滨 (fludarabine)、伊达比星 (idarubicin)、胞嘧啶阿拉伯糖苷 (cytosine arabinoside)、巯基嘌呤和硫鸟嘌呤)、长春花生物碱类 (vinca alkaloids) (例如,长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine) 和长春地辛 (vindesine))、表鬼臼毒素类(例如,依托泊苷 (etoposide) 和替尼泊苷 (teniposide))、抗生素类(例如,更生霉素 (dactinomycin)、道诺红霉素 (daunorubicin)、多柔比星 (doxorubicin)、博莱霉素 (bleomycin)、普卡霉素 (plicamycin) 和丝裂霉素 (mitomycin))、二溴甘露醇、脱氧精肌菌素、二甲基马利兰 (dimethyl myleran) 和噻替派 (thiotepa)。

[0042] 在某些更特定的实施方案中,可使用低剂量白消安。在更特定的实施方案中,可每天使用 9mg/kg 或更少;更优选 1-9mg/kg/天。在其它实施方案中,白消安是以 0.8mg/kg/天或更少、更优选 0.1-0.8mg/kg/天施用。

[0043] 此处所呈现的策略对于临床应用特别有前景,因为从患者骨髓分离的造血干细胞被改造用于永久且连续的输出遗传改造的耐受性“稳定态”树突细胞。

[0044] 以下实施例证明了这种策略在 EAE 中诱导髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)- 特异性耐受的有效性。接受经表达 MOG 的慢病毒载体 (DC-MOG) 转导的 HSC 的所有小鼠在免疫后均免患 EAE (临床评分 0),而接受经对照载体转导的 HSC 的所有小鼠均产生 EAE。组织学分析显示,患病小鼠的脑、脊髓和视神经中出现脱髓鞘和广泛炎症,而在受治疗小鼠中则没有。炎性细胞因子(包括 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-17) 几乎不存在于耐受化小鼠中,而它们

以高水平存在于患病小鼠中。这些结果也显示,接受经 DC-MOG 转导的 BM-HSC 的小鼠展示出 MOG 特异性 T 细胞的有效缺失和 Foxp3+ 调控性 T 细胞的产生。最重要的是,在预先建立 EAE 的小鼠中,在部分髓髓性条件下转移 DC-MOG 载体转导的 HSC 可导致所述疾病的持久临床改善。

[0045] 将针对单一特征(例如所靶向的特异性人类自身抗原、其所表达的多肽的长度等)的替代方案在本文中列举为“实施方案”,应当理解这些替代方案可自由组合而形成本文所提供的方法或医学指征的离散实施方案。

[0046] 提供可引出其它实施方案和优点的下文附图和实施例来说明本发明,但其并不以任何方式限制本发明。

附图说明

[0047] 图 1 显示(A:)从树突细胞特异性启动子(DC-STAMP)表达全长小鼠髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的自失活(SIN)慢病毒载体 DC-MOG 的示意图。LTR,长末端重复; Ψ ,包装信号,和(B:)来自 5-氟尿嘧啶治疗的 C57BL/6 供体小鼠的 BM-HSC 的细胞计数,所述 BM-HSC 经 DC-EGFP 转导且被注射到致死辐照的同基因受体小鼠中。显示了 6 周时从嵌合体的脾脏分离的 cd11c+ 和 cd11c- 细胞群体中的 EGFP 阳性细胞的百分比(左)和平均荧光强度(MFI,右)(x-轴:荧光,对数标度)。所述图显示两个独立实验中的一个。每个实验是利用至少 3 只小鼠/组执行。柱形代表平均值+SD。

[0048] 图 2 显示(A:)被 MOG 免疫的 C57BL/6 小鼠的临床评分(平均值+/-SD),所述小鼠移植有经 DC-MOG 或 DC-OVA 载体转导的 BM-HSC。所示图代表利用 5 只小鼠/组进行的 3 个独立实验中的 1 个;B:)骨髓 DCS 是在移植后 13 周时由 DC-MOG 嵌合体制备。对于 DC-OVA 组来说,BM-DC 是在动物达到 EAE 评分为 3 后将其杀死时制备。在培养 3 天后,通过流式细胞术来测定增殖性 2D2T 细胞的百分比。CFSE 的稀释度指示 T 细胞的增殖。所示直方图是来自个别小鼠,但数据代表从两个不同组的每一组分析的至少 3 只动物。

[0049] 图 3 显示 DC-MOG 和 DC-OVA 嵌合体的 CNS 中的 % CD4T 细胞。柱形分别代表利用 5 只小鼠/组和 3 只小鼠/组进行的 2 个独立实验中的 1 个的平均值+SD。

[0050] 图 4(A)脾细胞是在动物达到 EAE 评分为 3 后或对于受保护小鼠来说在 EAE 诱导后 14 天时从 DC-MOG 和 DC-OVA 嵌合体分离,并且利用 MOG35-55 肽对其进行活体外再刺激。在 12h、24h、36h 和 48h 后测量所示细胞因子的浓度。还在利用 PMA 进行非特异性刺激后测定 IFN- γ 浓度。(B)CNS 均质物中所示细胞因子的浓度。数据代表利用至少 3 只小鼠/组进行的 2 个独立实验中的 1 个的平均值+SD。

[0051] 图 5 显示由 DC-MOG 载体或 DC-OVA 载体转导的 BM-HSC 进行的抗原特异性耐受诱导。利用 MOG 或 OVA 肽刺激从同时免疫 MOG 和 OVA 肽的嵌合体分离的脾细胞,并且测量 IFN- γ 浓度。柱形代表 MOG 肽刺激的脾细胞中的 IFN- γ 浓度除以 OVA 肽刺激的脾细胞中的 IFN- γ 浓度的平均比率+SD(MOG/OVA,左图)或反之亦然(OVA/MOG,右图)。所示数据代表每个独立实验利用 4 只小鼠进行的 2 个独立实验中的 1 个。

[0052] 图 6 显示 DC-MOG 嵌合体中的 MOG35-55 特异性 T 细胞的中央和外周缺失。向致死辐照的 C57BL/6 细胞中移植来自 2D2 小鼠的 DC-MOG 或 DC-OVA 载体转导的 BM-HSC。在 6-8 周后,通过流式细胞术定量 CD4T 细胞和对 CD4T 细胞进行门控的 2D2T 细胞(Va3.2+ 和

Vb11+)。A. 指示脾脏中的 CD4T 细胞的百分比 +SD (左图) 和 2D2T 细胞 (右图) 并且其代表利用 6 小鼠 / 组进行的 3 个独立实验中的 1 个。直方图代表个别动物。B. 脾脏和胸腺中的 CD4T 细胞 (上图) 和 2D2T 细胞 (下图) 的绝对数目。柱形代表利用 6 只小鼠 / 组进行的 3 个独立实验中的 1 个的值 +SD。

[0053] 图 7 显示 2D2T 细胞的活化 / 调控状态。A. 通过流式细胞术对来自 DC-MOG 嵌合体 (空心直方图) 和 DC-OVA 嵌合体 (阴影直方图) 的脾脏的 2D2T 细胞分析 CD25、CD69、CD44 和 CD62L。直方图显示来自个别小鼠的代表数据。B 和 C. 还分析了来自 DC-MOG 嵌合体和 DC-OVA 嵌合体的 2D2T 细胞的调控性 T 细胞表型 (CTLA-4+ 和 Foxp3+)。B 中所示的 CTLA-4 和 Foxp3 阳性细胞 (Tregs) 的百分比 +SD 代表利用 6 只小鼠 / 组进行的 2 个独立实验中的 1 个。直方图代表个别动物。脾脏和胸腺中的 Tregs+SD 的绝对数目示于 C 中。

[0054] 图 8 显示基因疗法对预先建立的 EAE 的发展的作用 (治愈性方案)。对未处理的 C57BL/6 小鼠免疫 MOG 肽。在已产生 EAE 的最初症状后第 4 天和第 5 天, 利用白消安 (B) 对动物进行适应化, 并且在 2 天后, 在部分清髓性条件下对其移植来自同基因小鼠的 DC-MOG 或 DC-OVA 转导的 BM-HSC。所述图代表 2 个独立实验中的 1 个并且显示来自至少 4 只小鼠 / 组的临床评分 +SD。

[0055] 实施例

[0056] 材料和方法

[0057] 小鼠

[0058] 将 C57BL/6 (CD45.1 和 CD45.2) 和 2D2 (CD45.2) 小鼠维持并饲养在苏黎世大学病毒研究所的动物设施 (animal facility of the Institute of Virology, University of Zurich)。2D2 小鼠具有对髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白肽 (MOG)₃₅₋₅₅ 特异的转基因 V α 3.2 / V β 11TCR。

[0059] SIN 慢病毒载体

[0060] 先前已经描述了分别表达融合到人类转铁蛋白受体 (htfr) 的跨膜域的 EGFP (DC-EGFP) 或 卵白蛋白 (OVA, DC-OVA) 的 SIN 慢病毒载体 (Dresch 等, J. Immunology 2008, 181 ; 4495-4506)。SIN 慢病毒载体 DC-MOG 在 DC-STAMP 启动子 (参见序列方案 : SEQ ID02) 的控制下表达全长小鼠 MOG ORF (参见序列方案 : SEQ ID01) 并且被如下构建 : 通过 PCR 利用引物 38 (5' gtaccgggtgccaccatggcctgtttgtggagctt3', SEQ ID03) 和 39 (5' aggaattccaggaagacacaaccatcac3' SEQ ID04) 从含有小鼠 MOG cDNA 的质粒 (pFLC1, ImaGenes GmbH, Berlin, Germany) 扩增 MOG 序列。将 PCR 产物用 AgeI 和 EcoRI 消化并且插入 DC-EGFP 的 AgeI 与 EcoRI 位点之间。产生载体库, 并如 Dresch 等, 2008 中所述测定效价。

[0061] 骨髓嵌合体

[0062] 在静脉内注射 5 氟尿嘧啶 (150mg/kg 体重) 后 4 天收获至少 6 周龄雌性 C57BL/6 或 2D2 小鼠的骨髓 (BM) 细胞。将所述细胞于补充有青霉素 - 链霉素以及含有人类 IL-6 (25ng/ml)、鼠类 IL-3 (10ng/ml) 和鼠类干细胞因子 (50ng/ml) 的生长因子混合物的无血清造血干细胞扩增培养基 (Stemline, Sigma-Aldrich) 中预先刺激 2 天。通过在硫酸鱼精蛋白 (4 μ g/ml) 的存在下利用无细胞的 SIN 慢病毒载体库 (感染复数 MOI = 45) 进行旋转感染 (spin infection) (300 $\times$ g ; 2h ; 32 $^{\circ}$ C) 来转导细胞。在转导后, 将 1-3 $\times$ 10⁶ 个细胞 / 小鼠经静脉

内注射于致死辐照的 (11Gy) C57BL/6 受体中。在移植后利用新霉素 (neomycin) 将嵌合体处理 3 周。

[0063] EAE 的诱导

[0064] 预防模型. 在移植后 8 周, 对骨髓嵌合体皮下注射总体积为 200 μ l 的 0.1mg 在补充有 5mg/ml 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant) 中乳化的 MOG 肽 (ProSpec, Rehovot, Israel; 目录 IDPRO-371)。随后对动物腹腔内注射 300ng 百日咳毒素; 48h 后重复此注射。每天监测小鼠的 EAE 神经病学体征并且评分如下: 0, 无临床体征; 1, 跛行尾; 1.5, 跛行尾和后肢无力; 2.0, 单侧部分后肢麻痹; 2.5, 双侧部分后肢麻痹; 3.0, 完全双侧后肢麻痹 (于此阶段将动物处死)。

[0065] 治愈性模型. 如上文所述在未处理的 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠中诱导 EAE。每天对动物的疾病体征进行评分并且在产生初始症状后第 4 天和第 5 天利用 20mg/kg 白消安进行适应化。在第二次白消安处理后 2 天静脉内注射载体转导的 BM-HSC ($1-3 \times 10^6$ 个细胞/小鼠)。

[0066] CNS 组织病理学

[0067] 将脑和视神经固定于 4% 甲醛中并且包埋于石蜡中。脊髓留在脊椎中并且在固定后, 在石蜡包埋前利用 25% EDTA 脱钙 2 周。对于组织化学和免疫组织化学染色来说, 利用二甲苯和醇将 3mm 厚载玻片脱蜡并且利用苏木精和伊红进行染色或处理如下: 对于评价脱髓鞘来说, 将载玻片于勒克司坚牢蓝 (luxol fast blue) 中进行孵育并且利用结晶紫进行复染。对于免疫组织化学染色来说, 利用以下抗体对载玻片染色: 大鼠抗 - 小鼠抗 - Mac3 (巨噬细胞; 1:10; BD Pharmingen)、小鼠抗 - SMI32 (神经丝; 1:400; Abcam, Cambridge, UK) 或兔抗 - 小鼠 CD3 (T- 细胞; 1:100; Ventana Medical Systems 公司, Tucson, AZ, USA)。

[0068] 骨髓源树突细胞和活体外 T 细胞增殖测定

[0069] 在 EAE 诱导后 6-8 周从股骨和胫骨提取来自嵌合体的骨髓细胞。然后于 37°C 在 6 孔板中的补充有 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青霉素 - 链霉素、0.1mM Hepes 和 DC 分化因子 GMC-SF 的 RPMI1640 培养基中培养所述细胞。第 6 天, 将用 2.5 μ M CFSE (羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯) 标记的 2D2T 细胞添加到 BM 培养物, 并且在 3 天后通过流式细胞术分析增殖。

[0070] 细胞因子分析

[0071] 通过活体外脾细胞刺激来测量细胞因子。为此, 在 6 孔板 (1×10^7 个细胞/孔) 中的补充有 10% FBS、1% 青霉素 - 链霉素、0.1mM Hepes、2mM L- 谷氨酰胺、0.01mM 非必需氨基酸的 DMEM 中培养脾细胞。利用 MOG₃₅₋₅₅ 肽 (5 μ g/ml, 溶于 PBS 中; PROSPEC, Israel) 刺激脾细胞。对于阳性对照来说, 利用 5 μ g/ml PMA 刺激脾细胞; 对于阴性对照来说, 在不利用肽的情况下培养脾细胞。在刺激后 12h、24h、48h 和 72h 收集上清液并且将其储存于 -80°C。通过流式细胞术利用 FlowCytomix Mouse Th1/Th210plex 试剂盒 (Bender MedSystems, Vienna, Austria) 根据制造商提供的方案来测量上清液中的细胞因子 (GM-CSF、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-17、TNF- α)。还测量了 CNS 上清液中的细胞因子。为此, 将脑和脊髓以 1mg/ μ l 的最终体积均质化, 以 1' 200rpm 离心 5min, 并且直接分析上清液或将其储存于 -80°C 用于后续分析。

[0072] 由 DC-MOG 或 DC-OVA 载体转导的 BM-HSC 进行的抗原特异性耐受诱导。

[0073] 为了测定抗原特异性,如上文所述来测量细胞因子反应,除了从嵌合体分离脾细胞,在移植载体转导的BM-HSC后8周,如下对所述嵌合体同时免疫MOG和OVA抗原:将0.1mg MOG肽(ProSpec)和0.1mg OVA蛋白质(NeoMPS, Strasbourg, France)在总体积为200 μ l/小鼠的补充有5mg/ml结核分枝杆菌的完全弗氏佐剂中乳化并且进行皮下注射。随后对动物腹腔内注射300ng百日咳毒素(Sigma Aldrich);在48h后重复此注射。当动物达到评分3或对于受保护小鼠来说,在分析最后一只患病动物后14天,分离脾细胞。

[0074] 从脑分离CD4T细胞

[0075] 为了分析CD4T细胞在脑中的频率,将器官在DMEM中均质化并且在室温下以1' 200rpm离心10min。将沉淀物悬浮于5ml于PBS中的37% percoll(细胞分离液)中,并且小心地添加2.5ml于PBS中的70% percoll。将试样在室温下以600g离心20min,并收获界面中的白细胞,用PBS洗涤若干次并且通过流式细胞术进行分析。

[0076] FACS分析

[0077] 在移植后6-8周分别使用APC缀合的抗-CD45.1(A20;BD Biosciences)和PE缀合的抗-CD45.2(104;eBioscience)对胸腺中的CD45.1对CD45.2进行细胞计数分析来评价供体植入和嵌合率。使用以下抗体来分析DC和EGFP转基因表达的DC特异性:生物素缀合的抗-CD3(145-2C11;BD Biosciences)、PE缀合的抗-CD11b(M1/70;BD Biosciences)、PerCP缀合的抗-CD45(RA3-6120.1;BD Biosciences)、PE缀合的抗-I-A[b]、(AF6-120.1;BD Biosciences)、生物素缀合的抗-Ly-6G/Ly-6C(Gr-1;RB6-8C5, BD Biosciences)、FITC缀合的抗-CD3(145-2C11, BD Biosciences)、APC缀合的抗-CD11c(N418, BD Biosciences)、PerCP缀合的抗-CD11c(N418, BD Biosciences)、PerCP缀合的抗-CD8(53-6.7, BD Biosciences)、PE缀合的抗-CD19(6D5, BD Biosciences)、PerCP/Cy5.5缀合的抗-CD103(2E7, BD Biosciences)、PerCP缀合的抗-F4/80(BM8, BD Biosciences)、PE缀合的链霉亲和素(BD Biosciences)、PE/Cy7缀合的抗-CD4(GK1.5, eBioscience)、PE/Cy5缀合的抗-NK1.1(PK136, eBioscience)和APC缀合的抗-NK(Dx5, eBioscience)。利用以下抗体来分析包含Tregs和2D2T细胞在内的T细胞:FITC缀合的抗-V α 3.2(RR3/16, BD Biosciences)、PE缀合的抗-V β 11(KT11, BioLegend)、APC缀合的抗-CD4(RM4-5, BD Biosciences)、PE缀合的抗-CD152(UC10-4B9, BioLegend)、APC缀合的抗-Foxp3+(APC抗小鼠/大鼠Foxp3染色试剂盒, eBioscience)、APC缀合的抗-CD25(PC61.5, eBioscience)、APC缀合的抗-CD69(H1.2F3, BD Biosciences)、APC缀合的抗-CD44(IM7, eBioscience)、APC缀合的抗-CD62L(MEL-14, eBioscience)、FITC缀合的抗-CD3(145-2C11, BD Biosciences)、APC缀合的抗-CD4(RM4-5, BD Biosciences)、PerCP缀合的抗-CD8(53-6.7, BD Biosciences)。

[0078] 统计学分析

[0079] 通过单尾t-检验(图5,左图)或双尾(所有其它统计学分析)t-检验利用GraphPad Prism5.02版软件执行统计学分析。除非另有说明,否则将数据呈现为平均值 $\pm$ SD。当p值低于0.05时,将差异视为显著。

[0080] 结果

[0081] 实施例1:SIN慢病毒载体介导的DC-特异性抗原表达

[0082] 从DC-特异性STAMP启动子构建表达全长鼠类MOG的SIN慢病毒载体(DC-MOG;图

1A)。先前已经描述了从 DC-STAMP 启动子表达 EGFP(DC-EGFP) 或膜靶向 OVA(DC-OVA) 的对照载体(Dresch 等 2008)。通过载体转导的骨髓源 DC(BM-DC) 的免疫荧光分析证明了载体介导的 MOG 表达(未显示)。载体编码的 MOG 具有功能,如通过载体转导的 BM-DC 和从 2D2 小鼠分离的 CD4⁺T 细胞进行的 T 细胞增殖测定所示,所述小鼠对于识别 MOG₃₅₋₅₅ 肽的 T 细胞受体(V α 3.2 和 V β 11 链)而言是转基因的(未显示)。

[0083] 先前已经证明了由 DC-STAMP 启动子所赋予的转录特异性(Dresch 等,2008)并且在此处确认如下:利用 DC-EGFP 转导来自 C57BL/6 供体小鼠的骨髓源造血干细胞(BM-HSC)并且然后将其移植到致死辐照的同基因受体小鼠中。在移植 DC-EGFP 转导的 BM-HSC 后 6 周,在超过 35%的 cd11c⁺ 细胞中检测到 EGFP 荧光,而小于 5%的 cd11c⁻ 细胞为 EGFP 阳性。此外,5% cd11c⁻ 细胞中的平均荧光强度(MFI)显著低于 EGFP 阳性 cd11c⁺ 细胞中的平均荧光强度(图 1B)。脾脏中的嵌合率为至少 96%(未显示)。

[0084] 实施例 2:DC-MOG 载体转导的 BM-HSC 的移植保护小鼠免患 EAE 疾病

[0085] 接下来,对致死辐照的 C57BL/6 小鼠移植来自同基因供体的 DC-MOG 或对照载体(DC-EGFP 或 DC-OVA) 转导的 BM-HSC。8 周后,诱导了 EAE,并且每天两次评价疾病的临床体征。图 2A 显示对照小鼠在诱导后大约第 10 天开始产生 EAE(平均发作为 10.5 $\pm$ 1.3),并且所有动物均在疾病发作后不到 1 周内达到临床评分 3。重要的是,接受 DC-MOG 转导的 BM-HSC 的小鼠均未发生任何神经病学症状(临床评分 0)。DC-MOG 嵌合体在诱导后至少 5 周内未产生 EAE 并且在免疫系统重构后持续产生表达 MOG 的 DC 至少 13 周,如通过在从这些动物分离的 BM-DC 存在下 2D2T 细胞的增殖所证明(图 2B)。在三个独立实验中,DC-MOG 嵌合体均未产生临床症状的任何体征,而接受对照载体转导的 BM-HSC 的所有嵌合体均进展到临床评分 3,此时将它们处死。

[0086] 对耐受化动物的组织学分析并未揭示出任何的 CNS 病理学迹象。相比之下,接受对照载体转导的 BM-HSC 的嵌合体在脑(未显示)、视神经和脊髓中显示出广泛的多病灶炎症浸润和脱髓鞘。在受影响组织中观察到中度到严重的脱髓鞘和轴突损伤,如分别通过髓磷脂和神经丝的染色所确定。炎症过程涉及巨噬细胞和 T 细胞的大量浸润。CD4⁺T 细胞在患病动物的 CNS 中的频率是在受保护小鼠中的 7 倍以上(图 3)。在脑中,主要累及脑膜和白质,很少累及到灰质(未显示)。在脊髓中,脱髓鞘和炎症过程的强度增加到尾侧部(未显示)。

[0087] 对患病和受保护小鼠的脾脏和 CNS 中的细胞因子产生模式进行分析。如图 4A 中所示,患病的 DC-OVA 对照载体转导的 BM-HSC 嵌合体的脾脏中的 Th2 细胞因子(IL4、IL-5、IL-6)和炎症性细胞因子(IL-17、TNF- α 、GM-CSF 和 IFN- γ) 的浓度远高于受保护 DC-MOG 嵌合体中的那些。可排除受保护小鼠中的细胞因子产生的广泛损伤,因为在利用 PMA 进行非特异性刺激后来自患病小鼠和受保护小鼠的脾细胞中的 IFN- γ 产生是相当的(图 4A)。在 CNS 中观察到的细胞因子模式与脾脏中的相当,只是在此组织中,在受保护(DC-MOG) 动物和患病(DC-OVA) 动物中都检测不到 IL-17(图 4B)。

[0088] 耐受特异性是通过 DC-MOG 或 DC-OVA 载体转导的 BM-HSC 嵌合体同时免疫 OVA 和 MOG 肽并且测量脾细胞的 IFN- γ 产生来证明。如所预计,DC-MOG 耐受化嵌合体中,在利用 OVA 肽刺激后,检测到 IFN- γ 应答,但在利用 MOG 肽刺激后没有检测到所述反应,而在 DC-OVA 耐受化嵌合体中,利用 MOG 肽刺激后,获得了细胞因子应答,但在利用 OVA 肽刺激后

没有获得所述应答（图 5）。

[0089] DC-MOG 载体转导的 BM-HSC 的移植导致 MOG- 特异性 T 细胞的去除和调控性 T 细胞的诱导

[0090] 为了研究耐受诱导的可能机理,对致死辐照的 C57BL/6 小鼠移植从 2D2 供体分离的 DC-MOG 或 DC-OVA 载体转导的 BM-HSC,并且在 6-8 周后对来自嵌合体的 MOG- 特异性 2D2T 细胞进行定量。结果示于图 6 中并且可概述如下:与接受对照载体 (DC-OVA) 转导的 BM-HSC 的动物相比,接受 DC-MOG 载体转导的 BM-HSC 的嵌合体中,2D2T 细胞在很大程度上被去除了。在 DC-MOG 治疗小鼠中,脾脏中仅有约 4% 的 CD4⁺T 细胞含有 V α 3.2/V β 11TCR,而约 55% 的 DC-OVA 对照载体治疗小鼠含有此 MOG₃₅₋₅₅ 特异性 TCR (图 6A)。受保护小鼠的脾脏中 2D2T 细胞的总数也远低于在患病小鼠中 (图 6B)。在受保护小鼠中,胸腺中 2D2T 细胞的去除显著性小于脾脏,但仍然是显著的 (图 6B)。对脾脏中剩余 2D2T 细胞的进一步分析揭示了 DC-MOG 嵌合体中的抗原经历的 (antigen-experienced) 表型,特征在于 CD25、CD44 和 CD69 的上调和 CD62L 的轻微下调 (图 7A)。我们还分析了剩余 2D2T 细胞的调控性 T 细胞 (T_{reg}) 表型并且发现在 DC-MOG 治疗小鼠的脾脏中剩余 2D2T 细胞中有 50% 以上是 CTLA-4 和 Foxp3 阳性;从 DC-OVA 治疗小鼠分离的 2D2T 细胞中不到 1% 显示 T_{reg} 表型 (图 7B)。DC-MOG 和 DC-OVA 嵌合体的胸腺和脾脏中的 T_{reg}2D2T 细胞的绝对数目示于图 7C 中。

[0091] DC-MOG 载体转导的 BM-HSC 的移植改善已建立的 EAE

[0092] 我们研究了移植产生表达 MOG 的 DC 的 SIN- 慢病毒载体转导的 BM-HSC 的策略是否也可在治疗已建立的 EAE 中有效。对于此治愈性方案,完全如针对预防方案所描述通过免疫 MOG 肽在未处理小鼠中建立 EAE。在观察到初始症状后第 4 天和第 5 天,如材料和方法中所述利用低剂量白消安对动物进行适应化并且移植 DC-MOG 或 DC-OVA 转导的 BM-HSC。在两个独立实验中,在 DC-MOG 组的所有动物中均观察到临床改进并且在整个实验时期都维持所述临床改进 (图 8)。相比之下,在对照组 (DC-OVA) 中没有观察到临床改进,当在移植后两天以上都维持临床评分 3 时,将动物杀死。

[0093] 这些结果表明,移植经 DC-MOG 转导的自身 BM-HSC 是用以治疗 EAE/MS 的有前景的方法。此策略可潜在地用于治疗其它自身免疫疾病,其中已知与所述病状发生有关的自身抗原。

[0001]

序列表

<110> 苏黎世大学

<120> 用于治疗多发性硬化的 APC 介导的耐受诱导

<130> uz126wo

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 748

<212> DNA

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 1

atggcctggt tgtggagcct ctcttggccc agctgcttcc tctcccttct cctcctcctt	60
ctcctccagt tgtcatgcag ctatgcagga caattcagag tgataggacc aggggtatccc	120
atcegggctt tagttgggga tgaagcagag ctgccgtgcc gcctctctcc tgggaaaaat	180
gccacgggca tggaggtggg ttggtaccgt tctcccttct caagagtggg tcacctctac	240
cgaaatggca aggaccaaga tgcagagcaa gcacctgaat accggggacg cacagagctt	300
ctgaaagaga ctatcagtga gggaaagggt acccttagga ttcagaacgt gagattctca	360
gatgaaggag gctacacctg cttcttcaga gacctctt accaagaaga ggcagcaatg	420
gagttgaaag tggaagatcc ctctatttgg gtcaaccccg gtgtgctgac tctcatcgca	480
cttgtgccta cgatcctcct gcaggctctt gtaggccttg tattcctctt cctgcagcac	540
agactgagag gaaaacttgc tgcagaagta gagaatctcc atcggacttt tgatcctcac	600
ttcctgaggg tgccctgctg gaagataaca ctgtttgtta ttgtgctgt tcttggaccc	660
ctggttgctt tgatcatctg ctacaactgg ctgcaccgaa gactggcagg acagtttctt	720
gaagagctaa gaaaccctt ttgagtga	748

[0002]

<210>	2		
<211>	1756		
<212>	DNA		
<213>	智人 (homo sapiens)		
<400>	2		
gcacgtttct	gtgttgtctc	tgtctgacgt ggttctgtat tgtctgaaaa tagcggcctg	60
cctctaagga	agaaataatt	ctgcatagaa atcacttgtg accttgggct ccaaagtcaa	120
ctctttcctg	gacccataat	ctatcatttc tgtctcatag cttcaacttg ccctcaacag	180
attaaattgc	atttaactga	atcaaaatga ataaaactcc caaaatttca atgaagaaaa	240
aaatttgtga	tgcagatttt	ggaattacaa atctacaact gaatgaacca attcattaaa	300
cttgccttgc	cttcaaaaat	tgtgtatgca tgtatataa aatagatata tatatgagtg	360
tatataatata	tatgtgcgtg	tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tagacatata tatttgtttc	420
tcttataaat	tacaagtctt	ttaaaatcag aatttggaaat tttatttggg ttttacatct	480
cctcagtgtc	aagcatttta	aagaatttca acaaatacct gttgatctat cagttatttc	540
caaatgaata	cttccaaaat	tttagggaga caggaaaact gttggcattg ttgaagagtc	600
cagacagcac	atatgaaata	aataaaagaa acattttgag aagagagaat atcgataatt	660
taatcaggag	attaattgta	aatgtcactt cttaatgtgt aggtgtgtct ttgaaattct	720
gacaagcttg	caaatgcata	tgggtaataa ttttgaaaat atgacttgat accttgacat	780
ttctatagct	tctcactcag	tcatatgac aaaattgtta ttagtaataa tatttaaggc	840
aacatccttc	ttagagacat	ttgaatttgc ctagaaattg taaatttttt tgetttttaa	900
tttttttctt	attagatatt	ttcttcattt acatttcaaa tgetatcccc aaagtccctt	960
atacctctc	ccagacctgc	tctccaaccc acccactccc gcttcttggc cctggcgctc	1020
ccctgtacta	gagcgtatga	tcttcgcgag accaagggcc tctcctccca atgatggcgg	1080
actaagccat	ttaacataaa	aactttcaca gactgatga ctggctttat acaaagtttt	1140

[0003]

tgagacttgt ctacatcttt tgaagaacaa tggctctttc agccagagaa gtaaaacttet	1200
aagctgataa gtactatgtg tgcgttggaa tcacctagta gcttcagagc tatgggctca	1260
tccagaaatc tgacttttca gctgtgggtg gggcctgagg gcaagaccaa tctgccctcc	1320
ccatggctgg ggtgagcagg gaggaaaaag ggaaggaaga gaatgggggg gggtcctcat	1380
tctacaact cattgttttg aaaatatect attatgttat ttcctagggt taatgtctaa	1440
ggaaagtgct ggaatgaaac ctgtggctcc tttttccagt ttttaccctt gatgacatta	1500
aataacttcg tcactttgtg gaggaaatga gaagattgat tcagggtgat gtggcccacc	1560
tacettctca tgtccagttc ccttttcctt gacctatatt aagcctacga gcttcagaa	1620
gggtgtgctt tgtgcttgtg gaggaacctt agcggaactt gtaagtaaac tticaaatat	1680
aatcttgcct ctaaaattgc ttttaaaaga atccaggaat ccaggaatcc aggaatccag	1740
ccccaggacc agagag	1756

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 3

gtaccggtgc caccatggcc tgtttgtgga gctt	34
---------------------------------------	----

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 4

aggaattecc aggaagacac aaccatcac	29
---------------------------------	----

<210> 5

<211> 300

[0004]

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 5

Met Gly Asn His Ala Gly Lys Arg Glu Leu Asn Ala Glu Lys Ala Ser
1 5 10 15

Thr Asn Ser Glu Thr Asn Arg Gly Glu Ser Glu Lys Lys Arg Asn Leu
20 25 30

Gly Glu Leu Ser Arg Thr Thr Ser Glu Asp Asn Glu Val Phe Gly Glu
35 40 45

Ala Asp Ala Asn Gln Asn Asn Gly Thr Ser Ser Gln Asp Thr Ala Val
50 55 60

Thr Asp Ser Lys Arg Thr Ala Asp Pro Lys Asn Ala Trp Gln Asp Ala
65 70 75 80

His Pro Ala Asp Pro Gly Ser Arg Pro His Leu Ile Arg Leu Phe Ser
85 90 95

Arg Asp Ala Pro Gly Arg Glu Asp Asn Thr Phe Lys Asp Arg Pro Ser
100 105 110

Glu Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Ser Ala Ala Thr Ser
115 120 125

Glu Ser Leu Asp Val Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His
130 135 140

Gly Ser Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His
145 150 155 160

[0005]

Gly Phe Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly
165 170 175

Arg Phe Phe Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys
180 185 190

Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln
195 200 205

Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe
210 215 220

Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly
225 230 235 240

Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg
245 250 255

Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His
260 265 270

Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe
275 280 285

Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro
290 295 300

<210> 6
<211> 186
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 6

[0006]

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu
65 70 75 80

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr
85 90 95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro
100 105 110

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Gln Gly Lys Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly
130 135 140

Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val
145 150 155 160

Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp
165 170 175

[0007]

Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
180 185

<210> 7

<211> 277

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 7

Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
1 5 10 15

Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
20 25 30

Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
35 40 45

Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
50 55 60

Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala
85 90 95

Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly
100 105 110

Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly
115 120 125

Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys

[0008]

130	135	140
Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr		
145	150	155 160
Val Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile		
	165	170 175
Tyr Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys		
	180	185 190
Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly		
	195	200 205
Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu		
	210	215 220
Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe		
225	230	235 240
Ile Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr		
	245	250 255
Phe Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly		
	260	265 270
Arg Gly Thr Lys Phe		
	275	
<210>	8	
<211>	242	
<212>	PRT	
<213>	智人 (homo sapiens)	

[0009]

<400> 8

Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
1 5 10 15

Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
20 25 30

Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
35 40 45

Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
50 55 60

Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala
85 90 95

Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly
100 105 110

Leu Ser Ala Thr Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr Val Val Trp
115 120 125

Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile Tyr Phe Asn
130 135 140

Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala
145 150 155 160

Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val Leu Pro
165 170 175

[0010]

Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu Ser Ile
 180 185 190

Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile Ala Ala
 195 200 205

Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr Phe Met Ile
 210 215 220

Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg Gly Thr
 225 230 235 240

Lys Phe

<210> 9

<211> 247

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 9

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
 20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
 35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
 50 55 60

[0011]

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
115 120 125

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu
165 170 175

Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn
180 185 190

Leu His Arg Thr Phe Asp Pro His Phe Leu Arg Val Pro Cys Trp Lys
195 200 205

Ile Thr Leu Phe Val Ile Val Pro Val Leu Gly Pro Leu Val Ala Leu
210 215 220

Ile Ile Cys Tyr Asn Trp Leu His Arg Arg Leu Ala Gly Gln Phe Leu
225 230 235 240

[0012]

Glu Glu Leu Arg Asn Pro Phe
245

<210> 10
<211> 208
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 10

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
115 120 125

[0013]

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu
165 170 175

Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn
180 185 190

Leu His Arg Thr Phe Gly Gln Phe Leu Glu Glu Leu Arg Asn Pro Phe
195 200 205

<210> 11

<211> 224

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 11

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr

[0014]

65	70	75	80
Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly			
85	90	95	
Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu			
100	105	110	
Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe			
115	120	125	
Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val			
130	135	140	
Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala			
145	150	155	160
Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu			
165	170	175	
Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn			
180	185	190	
Leu His Arg Thr Phe Glu Ser Phe Gly Val Leu Gly Pro Gln Val Lys			
195	200	205	
Glu Pro Lys Lys Thr Gly Gln Phe Leu Glu Glu Leu Arg Asn Pro Phe			
210	215	220	
<210> 12			
<211> 131			
<212> PRT			
<213> 智人 (homo sapiens)			

[0015]

<400> 12

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Asp Pro Phe
20 25 30

Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala Val Leu Pro Val
35 40 45

Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu Cys Leu Gln Tyr
50 55 60

Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn Leu His Arg Thr
65 70 75 80

Phe Asp Pro His Phe Leu Arg Val Pro Cys Trp Lys Ile Thr Leu Phe
85 90 95

Val Ile Val Pro Val Leu Gly Pro Leu Val Ala Leu Ile Ile Cys Tyr
100 105 110

Asn Trp Leu His Arg Arg Leu Ala Gly Gln Phe Leu Glu Glu Leu Arg
115 120 125

Asn Pro Phe
130

<210> 13

<211> 131

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 13

[0016]

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Asp Pro Phe
20 25 30

Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala Val Leu Pro Val
35 40 45

Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu Cys Leu Gln Tyr
50 55 60

Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn Leu His Arg Thr
65 70 75 80

Phe Asp Pro His Phe Leu Arg Val Pro Cys Trp Lys Ile Thr Leu Phe
85 90 95

Val Ile Val Pro Val Leu Gly Pro Leu Val Ala Leu Ile Ile Cys Tyr
100 105 110

Asn Trp Leu His Arg Arg Leu Ala Gly Gln Phe Leu Glu Glu Leu Arg
115 120 125

Asn Pro Phe
130

<210> 14
<211> 213
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 14

[0017]

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
115 120 125

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu
165 170 175

[0018]

Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn
180 185 190

Leu His Arg Thr Phe Gly Gln Phe Leu Glu Glu Leu Leu Phe His Leu
195 200 205

Glu Ala Leu Ser Gly
210

<210> 15
<211> 229
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 15

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu

[0019]

	100	105	110
Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe			
	115	120	125
Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val			
	130	135	140
Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala			
	145	150	155 160
Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu			
	165	170	175
Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn			
	180	185	190
Leu His Arg Thr Phe Glu Ser Phe Gly Val Leu Gly Pro Gln Val Lys			
	195	200	205
Glu Pro Lys Lys Thr Gly Gln Phe Leu Glu Glu Leu Leu Phe His Leu			
	210	215	220
Glu Ala Leu Ser Gly			
	225		
<210> 16			
<211> 206			
<212> PRT			
<213> 智人 (homo sapiens)			
<400> 16			
Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe			
	1	5	10 15

[0020]

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
115 120 125

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu
165 170 175

Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn
180 185 190

[0021]

Leu His Arg Thr Phe Leu Phe His Leu Glu Ala Leu Ser Gly
195 200 205

<210> 17
<211> 203
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 17

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
115 120 125

[0022]

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu
165 170 175

Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn
180 185 190

Leu His Arg Thr Phe Gly Lys Phe Arg His Val
195 200

<210> 18
<211> 171
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 18

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

[0023]

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
115 120 125

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Val Ser His Ser Val Thr Gln Asp Trp Leu Gln Trp His Asp His
145 150 155 160

Gly Ser Leu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Leu Lys
165 170

<210> 19

<211> 51

<212> DNA

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 19

tggcattttct gcatttgaag aagaatctga gagaaacctg acgcaggag c

51

<210> 20

<211> 197

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 20

[0024]

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu
65 70 75 80

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr
85 90 95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro
100 105 110

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly
130 135 140

Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp
145 150 155 160

Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr
165 170 175

[0025]

Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser
180 185 190

Pro Met Ala Arg Arg
195

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 21

Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 22

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly
1 5 10 15

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 23

Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg
1 5 10 15

Thr Pro Pro

[0026]

<210> 24
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 24

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

Tyr Gly Gly

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 25

His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 40
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 26

Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
1 5 10 15

Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
20 25 30

Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile
35 40

[0027]

<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 27

Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp
1 5 10 15

Tyr Glu Tyr Leu Ile
20

<210> 28
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 28

Tyr Thr Thr Gly Ala Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr
1 5 10 15

Ile Cys Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln
20 25 30

<210> 29
<211> 51
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 29

Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val Leu

[0028]

20

25

30

Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu Ser
35 40 45

Ile Cys Lys
50

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 30

Phe Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 31

Leu Val Gly Asp Glu Val Glu Leu Pro
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 32

Leu Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser
1 5

[0029]

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 33

Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 34

Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val
1 5

<210> 35
<211> 197
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 35

Met Gly Asn His Ala Gly Lys Arg Glu Leu Asn Ala Glu Lys Ala Ser
1 5 10 15

Thr Asn Ser Glu Thr Asn Arg Gly Glu Ser Glu Lys Lys Arg Asn Leu
20 25 30

Gly Glu Leu Ser Arg Thr Thr Ser Glu Asp Asn Glu Val Phe Gly Glu
35 40 45

Ala Asp Ala Asn Gln Asn Asn Gly Thr Ser Ser Gln Asp Thr Ala Val
50 55 60

[0030]

Thr Asp Ser Lys Arg Thr Ala Asp Pro Lys Asn Ala Trp Gln Asp Ala
65 70 75 80

His Pro Ala Asp Pro Gly Ser Arg Pro His Leu Ile Arg Leu Phe Ser
85 90 95

Arg Asp Ala Pro Gly Arg Glu Asp Asn Thr Phe Lys Asp Arg Pro Ser
100 105 110

Glu Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Ser Ala Ala Thr Ser
115 120 125

Glu Ser Leu Asp Val Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His
130 135 140

Gly Ser Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His
145 150 155 160

Gly Phe Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly
165 170 175

Arg Phe Phe Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys
180 185 190

Val Ser Ser Glu Glu
195

<210> 36
<211> 197
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 36

[0031]

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu
65 70 75 80

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr
85 90 95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro
100 105 110

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly
130 135 140

Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp
145 150 155 160

Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr
165 170 175

[0032]

Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser
180 185 190

Pro Met Ala Arg Arg
195

<210> 37
<211> 171
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 37

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro
50 55 60

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg
65 70 75 80

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr
85 90 95

Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu
100 105 110

Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr

[0033]

115	120	125
Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly		
130	135	140
Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg		
145	150	155 160
Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg		
165	170	
<210> 38		
<211> 160		
<212> PRT		
<213> 智人 (homo sapiens)		
<400> 38		
Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu		
1 5 10 15		
Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg		
20 25 30		
His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly		
35 40 45		
Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro		
50 55 60		
Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg		
65 70 75 80		
Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr		
85 90 95		

[0034]

Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Ala Glu Gly Gln Arg
100 105 110

Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His
115 120 125

Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe
130 135 140

Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
145 150 155 160

<210> 39

<211> 74

<212> PRT

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 39

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Ser Leu Pro Gln
20 25 30

Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe
35 40 45

Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly
50 55 60

Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp
65 70

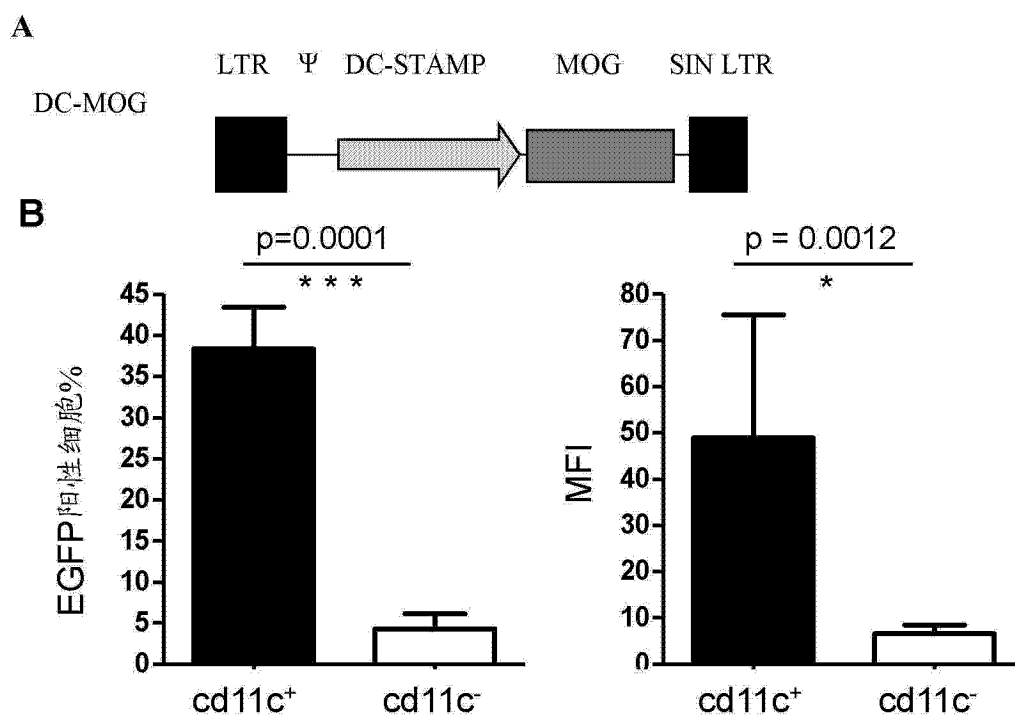


图 1

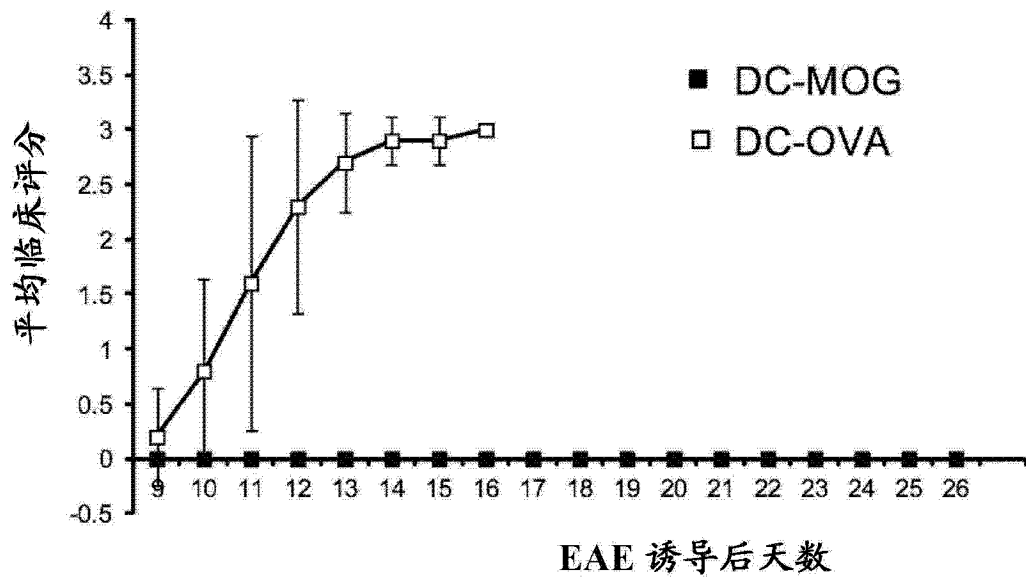
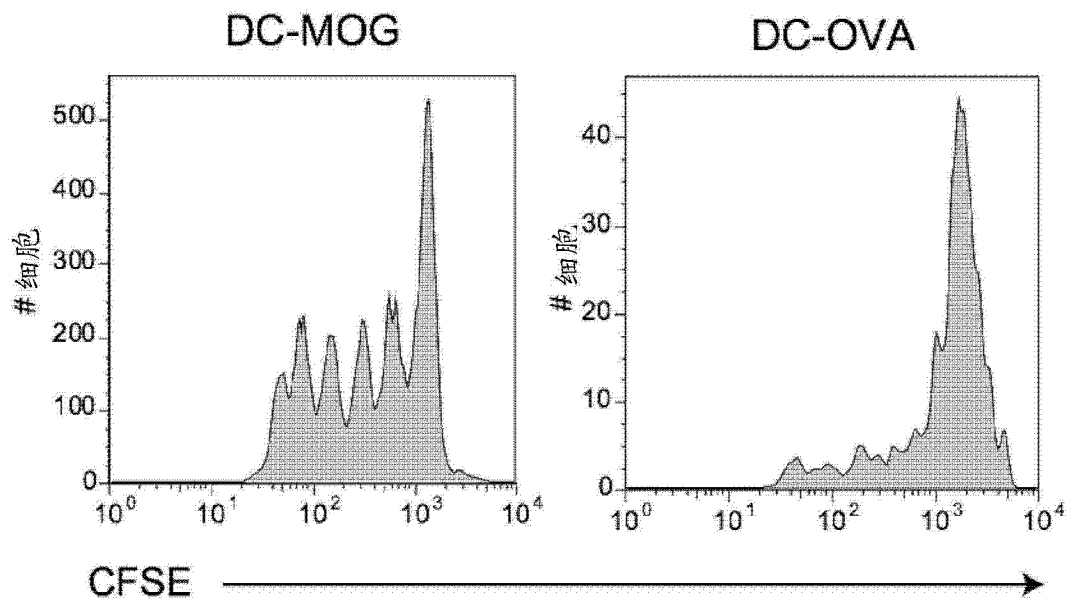
A**B**

图 2

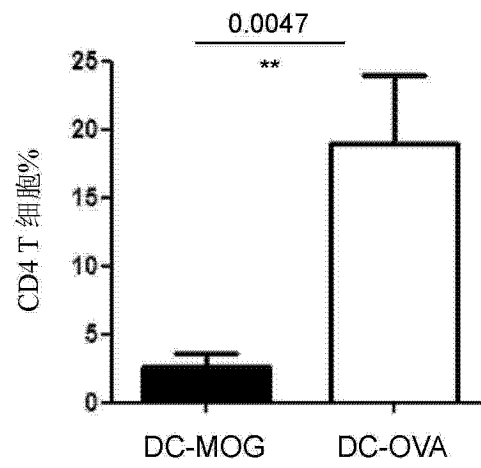


图 3

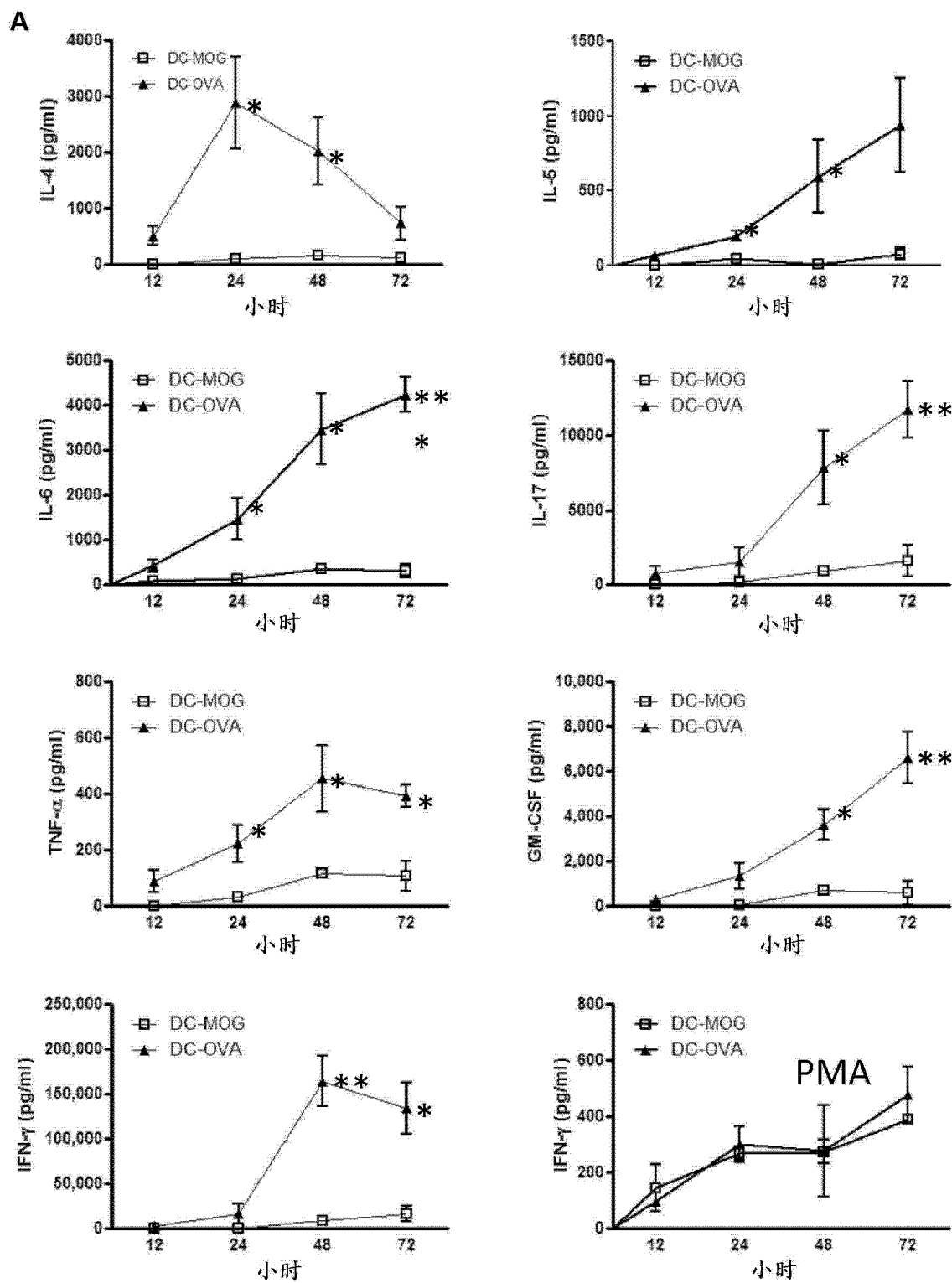


图 4

B

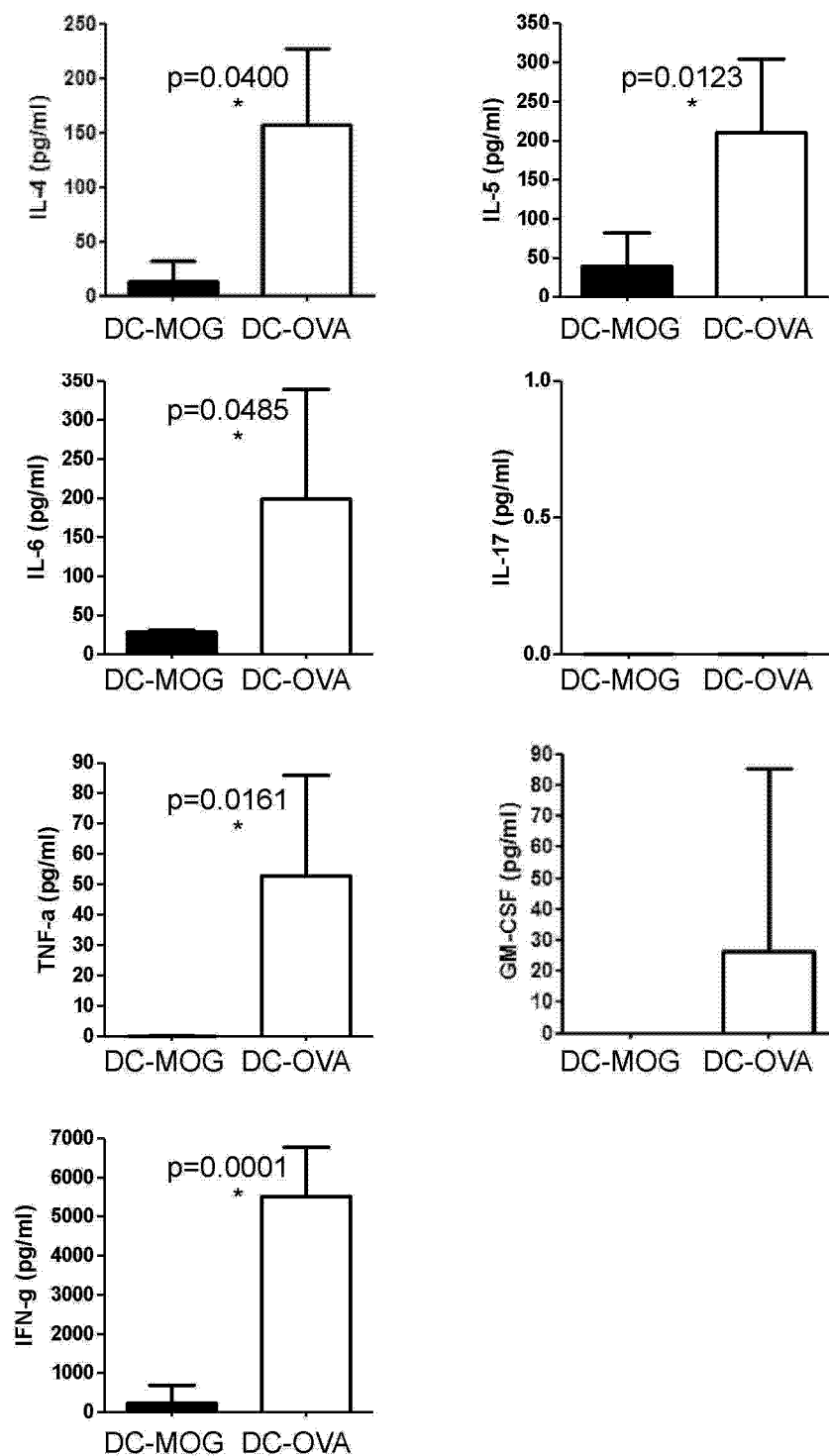


图 4

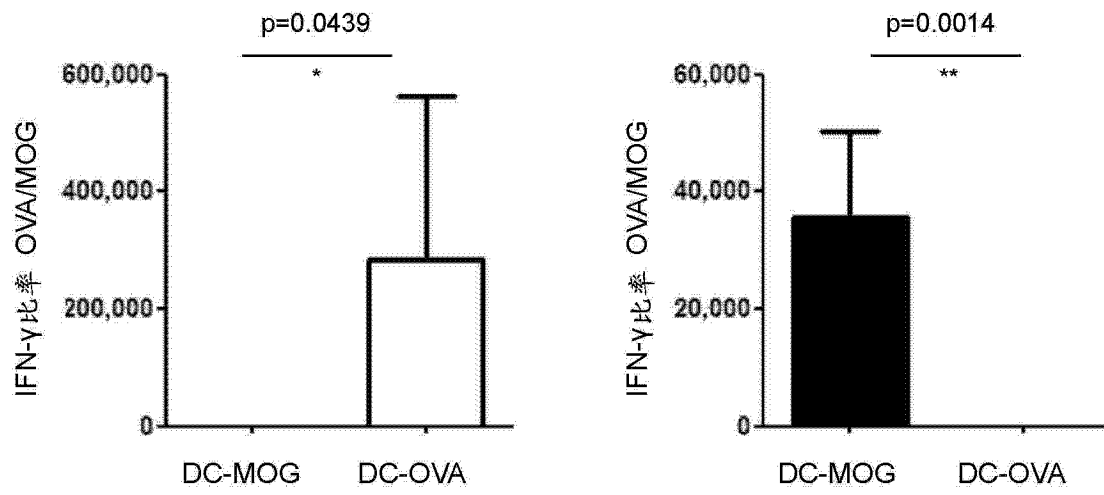


图 5

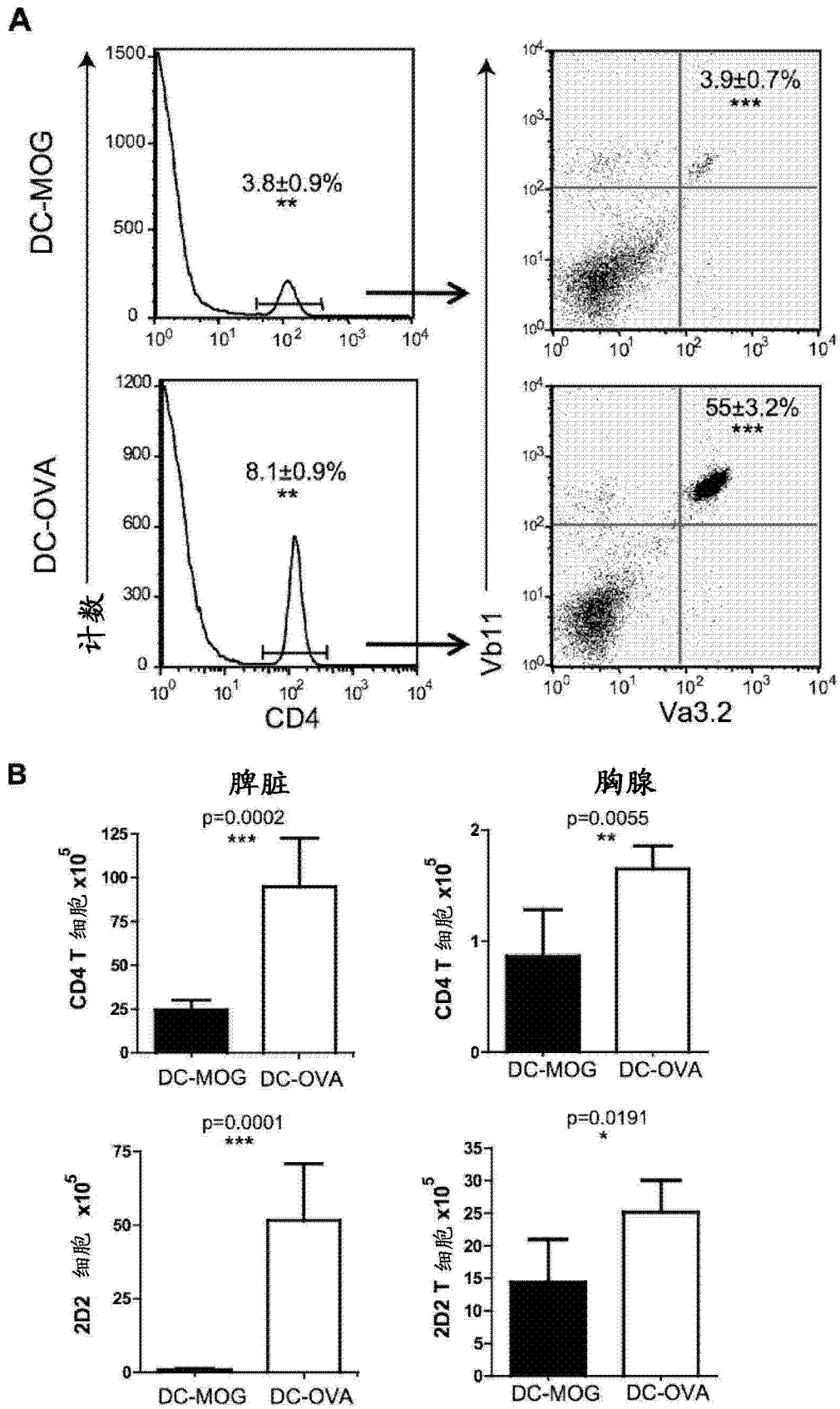


图 6

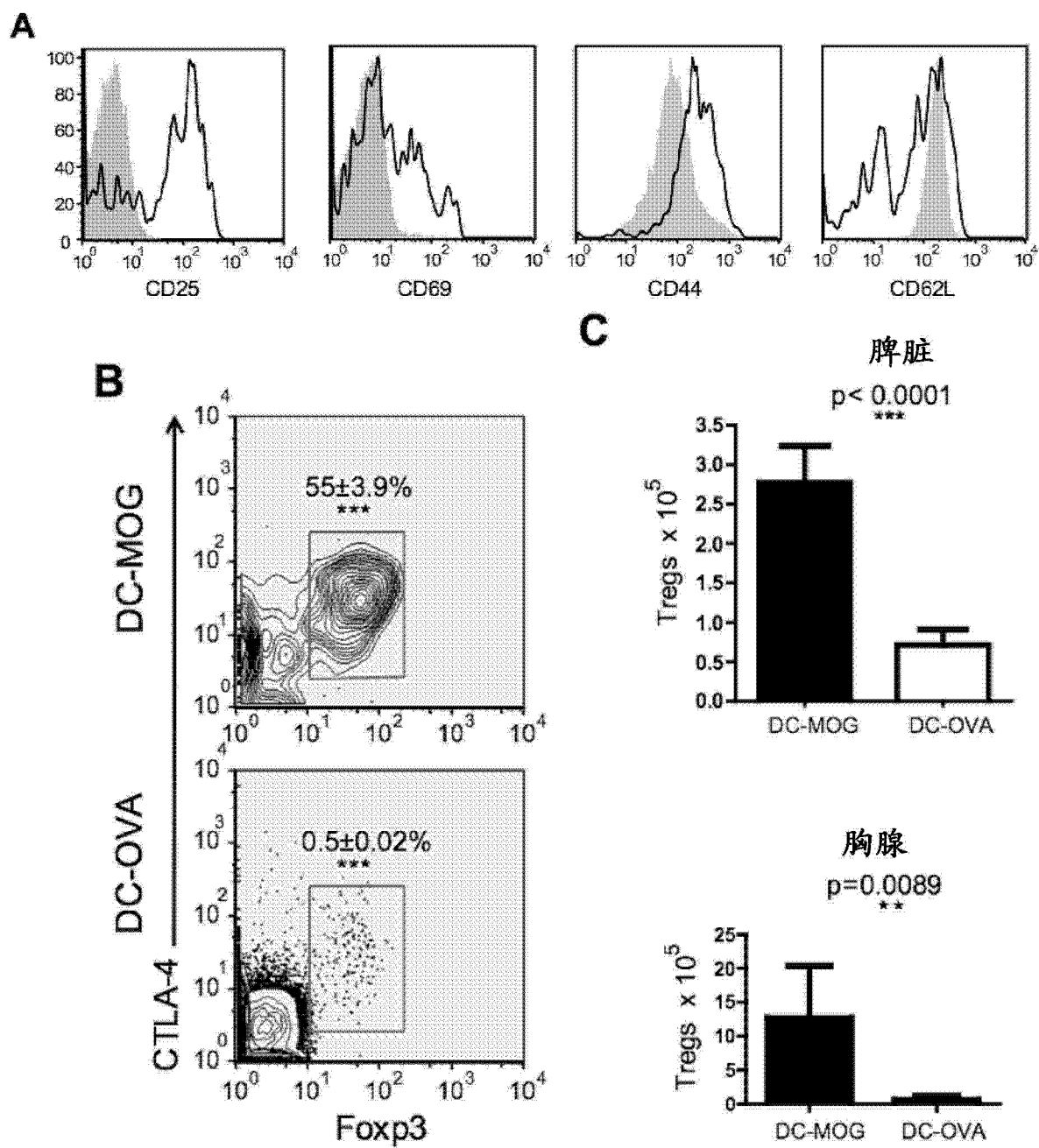


图 7

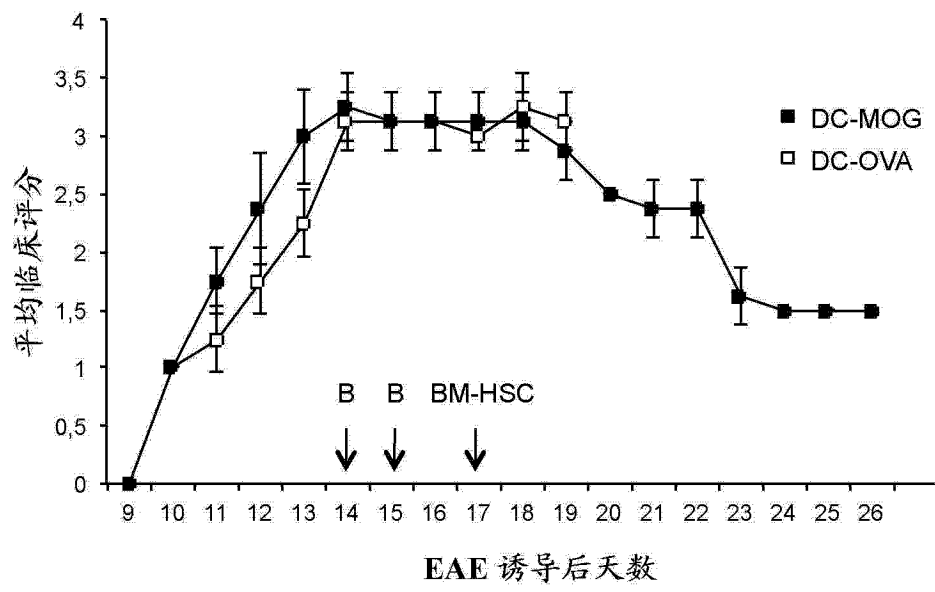


图 8