(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102580069 B
(45)授权公告日 2015.09.30

(21)申请号 201110438909.1
(22)申请日 2004.01.06
(30)优先权数据
60/438310 2003.01.07 US
(62)分案原申请数据
200480006229.0 2004.01.06
(73)专利权人 耶达研究及发展有限公司
地址 以色列雷霍沃特邮箱 95 号
(72)发明人 M·埃森巴奇 - 施瓦茨 S·巴卡拉斯 V·富加
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 权陆军 刘健
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61P 1/14(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 5/06(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 25/02(2006.01)
A61P 25/08(2006.01)
A61P 25/14(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)
A61P 25/18(2006.01)
A61P 25/22(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/36(2006.01)
A61P 27/06(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 39/02(2006.01)

(56)对比文件
US 2002037848 A1,2002.03.28, 说明书的“治疗用途”和“制药和给药”部分,图 1-11.

审查员 樊颖

权利要求书1页 说明书16页
序列表11页 附图5页

(54)发明名称

用于治疗性免疫接种的含共聚物 1 的滴眼用疫苗

(57)摘要

本发明提供了用于治疗性免疫接种哺乳动物的滴眼用疫苗,该疫苗含有共聚物 1,共聚物 1 相关肽或共聚物 1 相关多肽,用于治疗因中枢神经系统 (CNS) 或外周神经系统 (PNS) 中的损伤、疾病、失调或状况导致的神经元变性,预防或抑制可能在 CNS 中的原发性损伤后另外发生的神经元继发性变性,促进 CNS 或 PNS 中在损伤或疾病、失调或状况后的神经再生,或保护 CNS 和 PNS 细胞免受谷氨酸盐毒性。

CN 102580069 B

1.共聚物 1在制备用于治疗性免疫接种哺乳动物的滴眼用疫苗中的用途，其中所述滴眼用疫苗赋予系统性神经保护作用。

2.权利要求 1的用途，其中所述滴眼用疫苗用于治疗因中枢神经系统或外周神经系统中的损伤、疾病、失调或状况导致的神经元变性，预防或抑制可能在中枢神经系统中的原发性损伤后另外发生的神经元继发性变性，促进中枢神经系统或外周神经系统中在损伤或疾病、失调或状况后的神经再生，或保护中枢神经系统和外周神经系统细胞免受谷氨酸盐毒性。

3.权利要求 2的用途，其中所述损伤为脊髓损伤、钝伤、穿透性创伤、脑外伤或对侧外伤、出血性卒中或缺血性卒中。

4.权利要求 2的用途，其中所述疾病为阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、面神经麻痹、亨廷顿舞蹈病、肌萎缩性脊髓侧索硬化、克－雅病、阿尔珀病、Batten病、科凯恩综合征、路易体病、癫痫持续状态、腕管综合征、椎间盘突出、维生素 B缺乏、癫痫、遗忘症、焦虑、痛觉过敏、精神病、氧化应激、阿片制剂耐受和依赖、自身免疫病、或外周神经病、多种药物和毒素的并发症、Charcot-Marie-Tooth病、共济失调毛细血管扩张、遗传性共济失调、肾上腺髓质神经病、巨轴突神经病、雷夫叙姆病、法布里病、脂蛋白血症、非动脉视神经病、与年龄有关的黄斑变性、视网膜病或与眼内压异常升高有关的疾病。

5.权利要求 4的用途，其中所述外周神经病与选自如下的疾病相关：淀粉样蛋白多神经病、糖尿病性神经病、尿毒症神经病、卟啉症多神经病、低血糖、斯－拉综合征、急性感觉神经病、慢性共济失调神经病、胆汁性肝硬变、原发性淀粉样变性、阻塞性肺病、肢端肥大症、吸收不良综合征、真性红细胞增多、IgA和 IgGγ 球蛋白病。

6.权利要求 4的用途，其中所述药物选自呋喃妥因、甲硝哒唑、异烟肼和所述毒素选自酒精或有机磷酸盐。

7.权利要求 4的用途，其中所述视网膜病为视网膜变性。

8.权利要求 4的用途，其中所述与眼内压异常升高有关的疾病为青光眼。

9.权利要求 4的用途，其中所述自身免疫病为多发性硬化。

10.权利要求 1的用途，其中所述滴眼用疫苗包括无佐剂的共聚物 1。

11.权利要求 1的用途，其中所述滴眼用疫苗包括共聚物 1和可溶性佐剂。

12.权利要求 11的用途，其中所述可溶性佐剂为细胞因子。

13.权利要求 12的用途，其中所述细胞因子为 IL-2、IL-12、IFN-γ 或 GM-CSF。

14.权利要求 1的用途，其中所述滴眼用疫苗用于以至少每天 1次或每隔一天 1次的频率施用于多发性硬化患者。

15.权利要求 1的用途，其中所述滴眼用疫苗用于以至少每 7天 1次，到至少每月 1次，到至少每 2-3月 1次的频率定期施用于非多发性硬化患者。

16.权利要求 15的用途，施用于青光眼患者。

用于治疗性免疫接种的含共聚物 1 的滴眼用疫苗

[0001] 本申请是国际申请日为 2004 年 1 月 6 日的国际申请 PCT/IL2004/000006 进入中国、申请号为 200480006229.0 的题为“用于治疗性免疫接种的含共聚物 1 的滴眼用疫苗”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于免疫学领域，涉及一种滴眼用疫苗，该疫苗含有作为活性剂的无规共聚物，尤其是共聚物 1(Copolymer 1)、共聚物 1 相关肽或共聚物 1 相关多肽，本发明还涉及治疗性免疫接种哺乳动物的方法，尤其适用于在损伤、疾病、失调或状况后，在中枢神经系统 (CNS) 或外周神经系统 (PNS) 中实现神经保护，或者适用于保护 CNS 和 PNS 细胞免受谷氨酸盐毒性。

[0003] 缩写 :BSA :牛血清白蛋白 ;CFA :完全弗氏佐剂 ;CNS :中枢神经系统 ;Cop 1 :共聚物 1，即 glatiramer acetate ;FCS :胎牛血清 ;IFA :不完全弗氏佐剂 ;IOP :眼内压 ;MBP :髓鞘碱性蛋白 ;NS :神经系统 ;PBS :磷酸缓冲盐溶液 ;PNS :外周神经系统 ;RGC :视网膜神经节细胞。

背景技术

[0004] 神经系统包括中枢和外周神经系统。中枢神经系统 (CNS) 由脑和脊髓组成 ;外周神经系统 (PNS) 则包括其它所有的神经元件，即脑和脊髓外部的神经和神经节。

[0005] 对神经系统的损伤可能是创伤性损伤造成的，诸如穿透性创伤或钝伤，或者是由包括，但不限于阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿病、肌萎缩性脊髓侧索硬化、糖尿病性神经病、青光眼、老年性痴呆和局部缺血的疾病、失调或状况造成的。

[0006] 神经变性疾病通常与 CNS 中正在进行的神经元损失有关。在原发性危险因子导致的神经元丧失之后，另外的 (“继发性”) 神经元丧失是由超过生理浓度的自身化合物，诸如谷氨酸盐、氧化氮或反应性氧类介导的。这些化合物参与了多种类型的神经系统失调和急性 CNS 损伤。应当指出的是，神经变性性疾病共有的破坏性组分也已被发现存在于诸如多发性硬化的自身免疫病中 ;在该疾病中，CNS 中的髓鞘损伤伴随着继发的神经元丧失。

[0007] 青光眼是在老年人群中具有高发病率 (约为 1％) 的慢性进行性视神经病。直到最近，该病均与高的眼内压 (IOP) 有关，因此，对该病的研究曾集中于通过利用抗高血压药物使该病的进展减缓。但随时间而逐渐明显的是，青光眼是一个疾病家族，并不都与压力有关。但日渐清楚的是即使该病与压力有关，后者可能被降低至正常，甚至低于正常值，而变性仍然可能继续。正在临床医生之间进行的讨论探究了在具有正常 IOP 值的青光眼患者中仍然存在的连续变性是否反映了除压力之外的其它危险因子的存在，或者反映了残留神经元和纤维的易损性的提高，以及因此对降低 IOP，使其低于正常值的需要。

[0008] 我们已于 1996 年提出，在青光眼的情况中，视力进行性丧失的潜在机制与在神经系统的任何急性损伤中发生的机制，或在 CNS 的任何神经变性性疾病中发生的机制类似 (Schwartz et al.,1996)。根据该提议，除了原发性危险因子，例如压力之外，还存在进行

中的变性过程，该变性过程可影响那些避过原发性事件的神经元 (Schwartz et al.，1996；Schwartz and Yoles，2000a and 2000b)。该过程受因原发性事件而出现的化合物介导，或者由原发性危险因子所造成的缺陷介导，这些情况均可造成对邻近原发性损伤的神经元而言的敌对环境。

[0009] 最近，我们进一步观察到，在由机械（神经细胞轴索显微外科术）或生化（谷氨酸盐、氧化应激）损伤造成的神经变性条件下，免疫系统发挥了关键性作用。因此，业已发现可识别神经系统 (NS) 抗原的活化 T 细胞可促进神经再生或赋予神经保护性，如 PCT 公开号 WO99/60021 中所述。更具体而言，对髓鞘碱性蛋白 (MBP) 具有反应性的 T 细胞被证实在视神经部分挤压损伤 (Moalem et al.，1999) 和脊髓损伤 (Hauben et al.，2000) 的大鼠模型中具有神经保护性。直至最近，人们仍然认为免疫系统没有让免疫细胞参与神经系统的修复。相当令人惊讶的发现是，NS- 特异性活化 T 细胞可被用于促进神经再生或保护神经系统组织，使其避免可能在 CNS 或 PNS 的损伤或疾病导致的损害之后发生的继发性变性。

[0010] 本发明的发明者进一步观察到，CNS 中的应激状况利用了适应性免疫反应以对抗该应激，且该反应受遗传控制。因此，在视神经受到挤压损伤或玻璃体内注射毒性剂量的谷氨酸盐之后，对成年小鼠或大鼠视网膜神经节细胞 (RGCs) 的存活率的观察显示，对 CNS 自身免疫病具有抗性的品系的 RGCs 存活率比易感性品系的 RGCs 存活率高 2 倍。该差异被发现可归因于有利的自身免疫 T 细胞反应，该反应是在抗性品系，而不是易感性品系中，于 CNS 损伤之后自然地被诱发的。因此，只要直接针对自身的 T 细胞反应被良好调节，则其被诱发时，这种损伤导致的神经元存活率较高。换言之，业已证实，诱发保护性自身免疫反应以对抗上述刺激性条件，可使动物免于损伤后果。业已进一步观察到，在调节这种反应的能力受损的动物体内，或在缺乏成熟 T 细胞（出生时接受过胸腺切除术导致的结果）的动物体内，对抗该刺激性条件的能力被降低了。因此，与具有用于装配保护性自身免疫 T 细胞介导反应的有效机制的动物相比，上述动物体内 CNS 损伤后的神经元存活率显著地较低 (Kipnis et al.，2001)。

[0011] 我们实验室更近的研究显示自身免疫性神经保护是当 CNS 损伤发生时被唤醒的机体生理防御机制 (Kipnis et al.，2001；Yoles et al.，2001)。我们证实，各品系针对升高的 IOP 的抗性之间存在差异 (Bakalash et al.，2002)，且该差异与利用具有有利后果的自身免疫反应的能力有关联。我们进一步证实，在缺乏成熟 T 细胞的情况下（经过新生期胸腺切除术），对 IOP 升高的相对抗性则丧失了其有利的特性，反之亦然，当将抗性品系来源的脾细胞被动转移至 MHC- 匹配的易感性品系中时，神经保护作用便被恢复了 (Bakalash et al.，2002)。我们的研究小组进一步证实，在诸如部分视神经挤压伤或脊髓挫伤的急性损伤中，采用 T 细胞被动接种也是有效的方法 (Kipnis et al.，2001；Moalem et al.，1999)。

[0012] 对加强这种抗自身反应，作为使神经元避免损伤条件的方法的尝试已表明接种抗原应来源于损伤部位中存在的化合物。因此，利用眼内最富含的肽，即光感受器间结合蛋白 (IRBP) 来源的自身抗原 (Bakalash et al.，2002；Mizrahi et al.，2002)，可在易感性和抗性两种品系内产生 RGC 保护。与之相反，利用与视神经相连的髓鞘中存在的化合物来源的肽，对遭受 IOP 升高损伤的视网膜神经节细胞而言没有益处。

[0013] 为了针对青光眼设计一种可加强免疫系统，且无诱发自身免疫病的危险的接种疫苗方法，我们的选择集中在共聚物 1 上，并已证实共聚物 1 与佐剂一起施用时对青光眼具有

神经保护性 (Bakalash et al.,2002 ;Schori et al.,2001 ;Schwartz and Kipnis,2002 ; WO 01/52878 ;WO 01/93893)。Cop-1 可与广泛多种自身反应性 T 细胞发生免疫学交叉反应。相应地,其活性是由于改变了的肽配体,即已被改变并因而丧失致病性的自身肽的活性 (WO 02/055010 ;Kipnis and Schwartz,2002)。

[0014] 共聚物 1 也被称为 Cop 1 或 glatiramer acetate,是由平均摩尔分数分别为 0.141、0.338、0.427 和 0.095 的四种氨基酸 :L-Glu、L-Lys、L-Ala 和 L-Tyr 组成的非致病性合成无规共聚物,其平均分子量为 4,700-11,000。glatiramer acetate 的商标名为 **COPAXONE®** (Teva Pharmaceutical Industries Ltd.,Petach Tikva,Israel 的商标),是目前在许多国家被批准用于治疗多发性硬化的药物。该药的耐受性极好,仅具有较少的不利反应。虽然 US 6,214,791 公开了通过摄入或吸入施用 Copl 进行治疗的方法,但对多发性硬化患者施用 Copl 的唯一途径仍然是每日皮下注射。

[0015] 最近,业已发现,在动物模型中,Copl 对其它若干种失调发挥了有利的作用。因此,在骨髓移植的情况中,Copl 可抑制移植物抗宿主疾病 (GVHD) 中显著的免疫排斥 (Schlegel et al.,1996 ;US5,858,964),也可抑制实体器官移植情况中出现的移植物排斥 (Aharoni et al.,2001)。WO 00/05250 已公开了用于治疗自身免疫病的 Copl 和 Copl- 相关共聚物和肽。

[0016] 本发明申请人的 WO 01/52878 和 WO 01/93893 公开的是 Cop 1、Cop-1 相关肽和多肽和由其活化的 T 细胞可使 CNS 细胞避免谷氨酸盐毒性,并预防或抑制神经元变性或促进 CNS 和 PNS 中的神经再生。WO01/93828 公开的是 Copl 可被用于治疗 CNS 失调。这些出版物均未公开过通过施用含 Copl 的滴眼剂实现的免疫接种。

[0017] 已有报导描述了可作为滴眼剂施用,并含有活病毒或编码传染物来源的免疫原性蛋白的重组 DNA 的家禽疫苗,用于预防禽类动物中的病毒病 (Mukibi-Muka et al.,1984 ; Sharma,1999 ;Russell and Mackie,2001)。

[0018] 在本章节或本申请书其它任意部分中,任何参考文献的引用或鉴定均不应被解读为认同这些参考文献是在本发明之前出现的技术。

发明内容

[0019] 目前,根据本发明,业已发现,共聚物 1 被作为滴眼用疫苗施用时,可在 CNS 或 PNS 中诱发神经保护作用所需的系统性 T 细胞依赖型免疫反应,例如保护了视网膜神经节细胞 (RGCs),使其避免了因急性或慢性眼内压 (IOP) 升高导致的死亡。

[0020] 因此,本发明的一个方面涉及一种滴眼用疫苗,该疫苗含有选自共聚物 1、共聚物 1 相关肽和共聚物 1 相关多肽的活性剂。

[0021] 另一个方面,本发明涉及选自共聚物 1、共聚物 1 相关肽和共聚物 1 相关多肽的活性剂在生产滴眼用疫苗方面的用途。

[0022] 本发明的滴眼用疫苗尤其有助于对哺乳动物,尤其是人类的治疗性免疫接种,以实现神经保护,治疗因中枢神经系统 (CNS) 或外周神经系统 (PNS) 中的损伤、疾病、失调或状况导致的神经元变性,预防或抑制可能在 CNS 中的原发性损伤后另外发生的神经元继发性变性,促进 CNS 或 PNS 中在损伤或疾病、失调或状况后的神经再生,或保护 CNS 和 PNS 细胞免受谷氨酸盐毒性。

[0023] 在一个进一步的方面中，本发明提供了一种治疗性免疫接种的方法，用于治疗因中枢神经系统 (CNS) 或外周神经系统 (PNS) 中的损伤、疾病、失调或状况导致的神经元变性，预防或抑制可能在 CNS 中的原发性损伤后另外发生的神经元继发性变性，促进 CNS 或 PNS 中在损伤或疾病、失调或状况后的神经再生，或保护 CNS 和 PNS 细胞免受谷氨酸盐毒性，该方法包括采用含有选自共聚物 1、共聚物 1 相关肽和共聚物 1 相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗使需要该治疗的个体免疫，该疫苗所含活性剂的量可有效治疗、预防或抑制因该个体体内的上述损伤、疾病、失调或状况导致的神经元变性。

[0024] 本发明滴眼用疫苗中的活性剂可无需连同任何佐剂一起被施用，例如在盐溶液或磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS) 中，或者可连同可溶性佐剂，诸如例如 IL-2、IL-12、GM-CSF 或 IFN-γ 等的细胞因子一起被施用。

[0025] 在最优选的实施方案中，本发明滴眼用疫苗中的活性剂为共聚物 1。

附图说明

[0026] 图 1 所示为在慢性模型中保护 RGCs 使其避免 IOP- 诱导的死亡方面具有长期作用的共聚物 1(Cop-1)。

[0027] 图 2A-2B 所示为在慢性模型中，采用 500 μ gCop-1，而无需连同佐剂 (2A) 在首次激光切除后第 7 天 (2B) 进行的免疫接种保护了 RGCs，使其避免了 IOP- 诱导的 RGC 死亡。

[0028] 图 3A-3B 所示为 Cop-1 的作用为 T 细胞依赖型。采用 Cop-1 对未经胸腺切除术的动物体内升高的 IOP 的治疗比在经过胸腺切除术的动物体内实施的相同治疗更有效 (3A)，也比青光眼药物溴莫尼定更有效 (3B)。

[0029] 图 4A-4B 所示为在慢性模型中，应用在滴眼剂中的 Cop-1 可保护 RGC，使其避免 IOP- 诱导的 RGC 死亡。在慢性 IOP 升高模型中，IOP 升高后立即 (4A) 或 7 天 (4B)，以 5 分钟为间隔，施用 5 滴 Cop-1，每次的施用量为 1mg。3 周后切除视网膜。

[0030] 图 5A-5B 所示为当以皮下注射 (5A) 或作为滴眼剂 (5B) 施用时，Cop-1 可保护 RGCs，使其避免急性短暂 IOP 升高。

具体实施方式

[0031] 此处所用术语“共聚物 1”、“Cop1”、“Cop-1”和“glatiramer acetate”均可互换应用。

[0032] 对本发明而言，“Cop1 或 Cop 1 相关肽或多肽”意指包括了任何肽或多肽，包括与髓鞘碱性蛋白 (MBP) 功能性交叉反应，并可在抗原呈递中与 II 类 MHC 上的 MBP 竞争的无规共聚物。

[0033] 作为活性剂应用于本发明滴眼用疫苗中的共聚物可以是无规共聚物，该共聚物含有合适量的带正电荷的氨基酸，诸如赖氨酸 (K) 或精氨酸 (R)，并组合带负电荷的氨基酸 (优选较少量)，诸如谷氨酸 (E) 或天冬氨酸 (D)，任选地组合含有可充当填充物的无电荷的中性氨基酸，诸如丙氨酸 (A) 或甘氨酸 (G)，并任选地含有可赋予该共聚物免疫原性特性的氨基酸，诸如芳族氨基酸，例如酪氨酸 (Y) 或色氨酸 (W)。

[0034] 应用于本发明的共聚物可由 L- 或 D- 氨基酸或这两种氨基酸的混合组成。正如本领域技术人员已知的，L- 氨基酸存在于大部分天然蛋白质中。而 D- 氨基酸可通过商业渠

道获得，并可替代被用于制备本发明所用共聚物的一部分或全部氨基酸。本发明设想了利用同时含有 D- 和 L- 氨基酸的共聚物，以及基本上由 L- 或 D- 氨基酸组成的共聚物。

[0035] 在一种实施方案中，适用于本发明的活性剂包括至少一种由 3 或 4 种氨基酸构成的无规共聚物，该共聚物含有选自下列 4 组中每一组的各 1 个氨基酸：(a) 赖氨酸 (K) 和精氨酸 (R)；(b) 谷氨酸 (E) 和天冬氨酸 (D)；(c) 丙氨酸 (A) 和甘氨酸 (G)；和 (d) 酪氨酸 (Y) 和色氨酸 (W)。

[0036] 在一种优选实施方案中，所述共聚物含有酪氨酸、谷氨酸、丙氨酸和赖氨酸的氨基酸组合，在此文中被命名为聚 -YEAK，总体上带净正电荷，最优选地为共聚物 1，含有摩尔比如下的氨基酸：大约 0.14 的谷氨酸、大约 0.43 的丙氨酸、大约 0.10 的酪氨酸和大约 0.34 的赖氨酸。该共聚物可能是低分子量或高分子量共聚物，是长度为大约 15 到大约 100 个氨基酸，优选地为大约 40 到大约 80 个氨基酸的多肽。该共聚物的平均分子量为大约 2,000-40,000Da，优选大约 2,000-13,000Da，更优选的是大约 4,700-13,000Da，最优选的是大约 5,000-9,000Da，和最优选的大约 6,000-8,000Da。该优选共聚物，即 Cop1 最优选的是乙酸盐形式，其通用名名为 glatiramer acetate。美国专利 No.5,800,808 描述了优选的分子量范围和制备优选形式的 Cop1 的方法，其全部内容被完整引入此处作为参考，就象被完全公开在此文中一样。

[0037] 应当清楚的是，该实施方案是仅通过举例提供的，可改变所述活性剂的组分和这些组分的相对比例，从而获得与 Cop1 不同的聚 -YEAK 共聚物。

[0038] 在另一种实施方案中，本发明滴眼用疫苗的活性剂为 Cop 1 相关多肽，是含有 4 种不同氨基酸的无规共聚物，这 4 种氨基酸分别选自上述 (a)-(d) 组中的不同组，但不包括 Cop 1。当对所述共聚物的氨基酸组成进行下述一种或多种取代时，预期将保留共聚物 1 表现的活性：天冬氨酸 (D) 取代谷氨酸 (E)、甘氨酸 (G) 取代丙氨酸 (A)、精氨酸 (R) 取代赖氨酸 (K) 和色氨酸 (W) 取代酪氨酸 (Y)。

[0039] 因此，在另一种实施方案中，本发明的 Cop 1 相关多肽可能包括 WO 00/05250 公开的任意一种共聚物，其全部内容均被完整引入此处作为参考，就象被完全公开在此文中一样，且其它合成氨基酸共聚物，诸如 Fridkis-Hareli 等人 (2002) 所描述的可作为治疗多发性硬化的候选药物，并由 4 种氨基酸组成的无规共聚物，即含有苯丙氨酸、谷氨酸、丙氨酸和赖氨酸 (聚 -FEAK)，或酪氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸和赖氨酸 (聚 -YFAK) 的共聚物 (14-、35- 和 50- 聚体)，及其它任何被发现可被认为是与 Cop1 类似的通用抗原的类似共聚物。

[0040] 在另一种实施方案中，本发明的 Cop1 相关多肽是含有 3 种不同氨基酸的组合的共聚物，这 3 种氨基酸分别选自 (a)-(d) 中 3 组氨基酸中的不同组。这些共聚物在此文中指三元共聚物。在更优选的实施方案中，该三元共聚物中各氨基酸的摩尔份数将是对共聚物 1 而言优选的摩尔份数。

[0041] 在一种实施方案中，适用于本发明的三元共聚物含有酪氨酸 (Y)、丙氨酸 (A) 和赖氨酸 (K)，下文将其称为聚 -YAK。这种三元共聚物中各氨基酸的平均摩尔份数可以改变。例如，酪氨酸的摩尔份数可为大约 0.005-0.250；丙氨酸的摩尔份数可为大约 0.3-0.6；赖氨酸的摩尔份数则可为大约 0.1-0.5，但酪氨酸、丙氨酸和赖氨酸的摩尔比优选地为大约 0.1 到大约 0.54 到大约 0.35。聚 -YAK 的平均分子量为大约 2,000-40,000Da，优选的是大约 3,000-35,000Da，更优选的是大约 5,000-25,000Da。以精氨酸 (R) 取代赖氨酸 (K)、甘氨酸

(G) 取代丙氨酸 (A) 和 / 或色氨酸 (W) 取代酪氨酸 (Y) 是可能的。

[0042] 在另一种实施方案中，适用于本发明的三元共聚物含有酪氨酸 (Y)、谷氨酸 (E) 和赖氨酸 (K)，下文将其称为聚 -YEK。这种三元共聚物中各氨基酸的平均摩尔份数可以改变：谷氨酸的摩尔份数可为大约 0.005-0.300；酪氨酸的摩尔份数可为大约 0.005-0.250，赖氨酸的摩尔份数则可为大约 0.3-0.7，但谷氨酸、酪氨酸和赖氨酸的摩尔比优选地为大约 0.26 到大约 0.16 到大约 0.58。聚 -YEK 的平均分子量为大约 2,000-40,000Da，优选地为大约 3,000-35,000Da，更优选地为大约 5,000-25,000Da。以精氨酸 (R) 取代赖氨酸 (K)、天冬氨酸 (D) 取代谷氨酸 (E) 和 / 或色氨酸 (W) 取代酪氨酸 (Y) 是可能的。

[0043] 在一种进一步的实施方案中，适用于本发明的三元共聚物含有赖氨酸 (K)、谷氨酸 (E) 和丙氨酸 (A)，下文将其称为聚 -KEA。这种三元共聚物中各氨基酸的平均摩尔份数也可改变。例如，谷氨酸的摩尔份数可为大约 0.005-0.300；丙氨酸的摩尔份数可为大约 0.005-0.600，赖氨酸的摩尔份数则可为大约 0.2-0.7，但谷氨酸、丙氨酸和赖氨酸的摩尔比优选地为大约 0.15 到大约 0.48 到大约 0.36。YEK 的平均分子量为大约 2,000-40,000Da，优选地为大约 3,000-35,000Da，更优选地为大约 5,000-25,000Da。以精氨酸 (R) 取代赖氨酸 (K)、天冬氨酸 (D) 取代谷氨酸 (E) 和 / 或甘氨酸 (G) 取代丙氨酸 (A) 是可能的。

[0044] 在另一种实施方案中，适用于本发明的三元共聚物含有酪氨酸 (Y)、谷氨酸 (E) 和丙氨酸 (A)，下文将其称为聚 -YEA。这种三元共聚物中各氨基酸的平均摩尔份数也可改变。例如，酪氨酸的摩尔份数可为大约 0.005-0.250，谷氨酸的摩尔份数可为大约 0.005-0.300，丙氨酸的摩尔份数则可为大约 0.005-0.800，但谷氨酸、丙氨酸和酪氨酸的摩尔比率优选地为大约 0.21 到大约 0.65 到大约 0.14。聚 -YEA 的平均分子量为大约 2,000-40,000Da，优选地为大约 3,000-35,000Da，更优选地为大约 5,000-25,000Da。以色氨酸 (W) 取代酪氨酸 (Y)、天冬氨酸 (D) 取代谷氨酸 (E) 和 / 或甘氨酸 (G) 取代丙氨酸 (A) 是可能的。

[0045] 上述三元共聚物可通过本领域技术人员可利用的任何方法制备，例如上文提到的 WO 01/52878 和 WO 01/93893 所描述的方法。

[0046] 由于 Cop1 与 MS- 相关 HLA-DR 分子的结合基序是已知的，因而可以方便地制备固定序列的多肽，并如 Fridkis-Hareli et al.，(1999) 所述，测定其与 HLA-DR 分子的肽结合沟的结合。这种肽的实例是 WO005249 公开的那些肽，其全部内容均被完整引入此文作为参考，就象被完全公开在此文中一样。在该申请书特定公开的肽中，有 32 种如下表 I 所示 (SEQ ID NO:1-NO:32)。这些肽均为 15- 聚体肽，含有 4 种氨基酸，即丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸和酪氨酸 (肽 2、3、5-32) 或仅含 3 种氨基酸，即丙氨酸、赖氨酸和酪氨酸 (肽 1、4)。这些肽及其它类似的肽均应被认为具有与 Cop1 类似的活性，并被包括在本发明的 Cop 1 相关肽或多肽的定义范围内。

[0047] 表 1

[0048]

SEQ ID NO.	肽序列
1	AAAYAAAAAAKAAAA
2	AEKYAAAAAAKAAAA
3	AKEYAAAAAAKAAAA
4	AKKYAAAAAAKAAAA
5	AEAYAAAAAAKAAAA
6	KEAYAAAAAAKAAAA
7	AEEYAAAAAAKAAAA
8	AAEYAAAAAAKAAAA
9	EKAYAAAAAAKAAAA
10	AAKYEAAAAAKAAAA
11	AAKYAEAAAAKAAAA
12	EAAYAAAAAAKAAAA
13	EKKYAAAAAAKAAAA
14	EAKYAAAAAAKAAAA
15	AEKYAAAAAAAAAAA
16	AKEYAAAAAAAAAAA
17	AKKYEAAAAAAAAAA
18	AKKYAEAAAAAAAAA
19	AEAYKAAAAAAAAAA
20	KEAYAAAAAAAAAAA
21	AEEYKAAAAAAAAAA
22	AAEYKAAAAAAAAAA
23	EKAYAAAAAAAAAAA
24	AAKYEAAAAAAAAAA
25	AAKYAEAAAAAAAAA
26	EKKYAAAAAAAAAAA
27	EAKYAAAAAAAAAAA
28	AEYAKAAAAAAAAAA
29	AEKAYAAAAAAAAAA
30	EKYAAAAAAAAAAAA
31	AYKAEAAAAAAAAAA
32	AKYAEAAAAAAAAAA

[0049] 本发明在一个方面涉及含有选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗。

[0050] 在另一个方面，本发明涉及选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂在生产滴眼用疫苗方面的用途。

[0051] 在一种实施方案中，所述滴眼用疫苗含有被溶解在任意合适载体，诸如盐溶液或PBS中的上述活性剂，而无需任何佐剂。

[0052] 在另一种实施方案中，该滴眼用疫苗含有上述活性剂，连同合适的可溶性佐剂，诸如可溶性细胞因子，例如但不限于细胞因子IL-2、IL-12、GM-CSF或IFN-γ。

[0053] 本发明进一步涉及治疗性免疫接种以实现神经保护作用的方法，该方法包括采用

含有选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗使需要该治疗的个体免疫，其中该疫苗所含活性剂的量可有效地对该个体提供神经保护作用。

[0054] 在一种实施方案中，本发明提供了一种治疗性免疫接种以治疗因CNS或PNS中的损伤导致的神经元变性的方法，该方法包括采用含有选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗免疫需要该治疗的个体，其中该疫苗所含活性剂的量可有效地治疗该个体中因损伤导致的神经元变性。

[0055] 在另一种实施方案中，本发明提供了一种治疗性免疫接种以预防或抑制可能在CNS中的原发性损伤之后另外发生的神经元继发性变性的方法，该方法包括采用含有选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗免疫需要该治疗的个体，其中该疫苗所含活性剂的量可有效地预防或抑制可能在该个体CNS中的原发性损伤之后出现的神经元变性。

[0056] 在一种进一步的实施方案中，本发明提供了一种治疗性免疫接种以促进损伤之后CNS或PNS中的神经再生的方法，该方法包括采用含有选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗免疫需要该治疗的个体，其中该疫苗所含活性剂的量可有效地促进该个体的CNS或PNS在损伤后的神经再生。

[0057] CNS或PNS中的任何损伤均可根据本发明治疗，诸如，但不限于脊髓损伤、钝伤、穿透性创伤、脑外伤或对侧外伤、出血性卒中和缺血性卒中。

[0058] 在另一种实施方案中，本发明涉及一种治疗性免疫接种以治疗因CNS或PNS中的疾病、失调或状况导致的神经元变性的方法，该方法包括采用含有选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗免疫需要该治疗的个体，其中该疫苗所含活性剂的量可有效地治疗因该个体的CNS或PNS中的疾病、失调或状况导致的神经元变性。

[0059] 在另一种进一步的实施方案中，本发明涉及一种治疗性免疫接种以促进疾病、失调或状况之后CNS或PNS中的神经再生的方法，该方法包括采用含有选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗免疫需要该治疗的个体，其中该疫苗所含活性剂的量可有效地促进该个体的CNS或PNS在疾病、失调或状况之后所需的神经再生。

[0060] 在另一种进一步的实施方案中，本发明涉及一种治疗性免疫接种以保护CNS和PNS细胞免受谷氨酸盐毒性的方法，该方法包括采用含有选自共聚物1、共聚物1相关肽和共聚物1相关多肽的活性剂的滴眼用疫苗免疫需要该治疗的个体，其中该疫苗所含活性剂的量可有效地保护该个体的CNS或PNS细胞免受谷氨酸盐毒性。

[0061] 在可根据本发明治疗的疾病、失调和状况中，且不限于，老年性痴呆包括阿尔茨海默氏病、帕金森综合征，包括帕金森氏病、面神经(Bell's)麻痹、亨廷顿舞蹈病、运动神经元病，包括肌萎缩性脊髓侧索硬化、朊病毒病，包括克-雅病、阿尔珀病、Batten病、科凯恩综合征、路易体病、癫痫持续状态、腕管综合征、椎间盘突出、诸如维生素B缺乏的维生素缺乏、发作性失常，诸如癫痫、精神病失常，诸如精神分裂症和焦虑、遗忘症、痛觉过敏、氧化应激、阿片制剂耐受和依赖、自身免疫病、与诸如淀粉样蛋白多神经病的疾病相关的外周神经病、糖尿病性神经病、尿毒症神经病、卟啉症多神经病、低血糖、斯-拉综合征、急性感觉神经病、慢性共济失调神经病、胆汁性肝硬变、原发性淀粉样变性、阻塞性肺病、肢端肥大症、

吸收不良综合征、真性红细胞增多、IgA 和 IgGγ 球蛋白病、多种药物，诸如呋喃妥因、甲硝哒唑、异烟肼和诸如酒精或有机磷酸盐的毒素的并发症、Charcot-Marie-Tooth 病、共济失调毛细血管扩张、遗传性共济失调、肾上腺髓质神经病、巨轴突神经病、雷夫叙姆病、法布里病、脂蛋白血症、非动脉视神经病、与年龄有关的黄斑变性、视网膜病，诸如视网膜变性、或与眼内压异常升高有关的疾病，诸如青光眼。

[0062] 如本发明背景部分所述，我们于 1996 年提出，与神经系统的任何急性损伤或 CNS 的任何神经变性疾病的情况相似，在青光眼中可能存在一个正在进行中的变性过程，该过程可影响那些避过了原发性事件，例如压力升高的神经元 (Schwartz et al.,1996)。该过程受因原发性事件而出现的化合物介导，或者由原发性危险因子所造成的缺陷而介导，这些情况均可造成对邻近原发性损伤的神经元而言的敌对环境 (Schwartz et al.,1996 ; Schwartz and Yoles,2000a and 2000b)。对该过程可能发生在青光眼中的认识促使我们研究相应的疗法，该疗法在任何时候施用均可终止变性的进展。

[0063] 实际上，从 1996 年开始，鉴定毒性的递质以发现可阻断、避开或除去这些递质的途径，或发现可使残留神经元对已变性神经元造成的敌对环境具有更高耐受性的途径的尝试是世界范围的。

[0064] 大约 4 年前，我们的研究小组发现，受损的视神经或受损的视网膜可将应力信号呈递给全身免疫系统，并通过诱发直接针对应激部位存在的大量抗原的 T 细胞反应，以募集该全身免疫系统的帮助。该免疫反应的特异性是将 T 细胞送至损伤部位的一个途径。一旦被活化，这些 T 细胞便充当了可局部影响小胶质细胞、星形胶质细胞，甚至可能是神经元的细胞因子和神经营养因子的来源。在我们的研究过程中，我们认识到这种免疫反应基本上是帮助机体对抗有害状况所必需的，并且在疾病情况，例如外伤情况中，需要被加强 (Moalem et al.,1999 ;Schori et al.,2001 and 2002 ;Kipnis et al.,2000)。

[0065] 我们已发现若干种方法，可成功地加强为保护受损神经，使其避免其敌对环境所需的 T 细胞依赖型免疫反应。通过利用可与广谱自身抗原以弱亲和力交叉反应的化合物，发现了一种无风险的保护方法。一种这样的化合物是共聚物 1 或 glatiramer acetate。该化合物具有极大的优势，即它是被批准用于多发性硬化患者的药物，并因而不具有可导致自身免疫病的危险 (Schori et al.,2001 and 2002 ;Kipniset al.,2000)。

[0066] 正如我们之前的申请 WO 01/52878 和 WO 01/93893 所述，在慢性 IOP 升高模型中，乳化在佐剂中的共聚物 1 被发现对 RGCs 具有保护性，可使其免受 IOP 升高的影响。我们发现，在 IOP 的急性和慢性两种模型中，Cop-1 足够有效，并因而可以激发强烈的免疫反应，该反应可起有效的保护作用，以避免 IOP 的后果。有趣的是，当采用治疗慢性 MS 病所用的方式，即每日重复注射，施用 Cop-1 时，便消除了单次注射的益处，从而证实了一个论点，即自身免疫病的要求与神经变性疾病的要求不同 (Schwartz and Kipnis.2000 ;Kipnis and Schwartz,2002)。虽然前者需要抑制，而后者需要免疫活化，但如果人们采用免疫调节的方法，则这两种要求可能同时满足。

[0067] 在本发明的实验中逐渐清楚的另一个特征是，在与慢性高 I OP 有关的 RGC 损失的情况中，干涉在任何时候均可有效终止疾病的进展。事实是，在慢性 IOP 模型中，相互作用在第 7 天比在第 0 天更有效，说明 RGC 损失并非在压力升高后立即开始的，与在急性模型中的情况不同，急性模型中 IOP 升高到非常高的地步，从而使死亡更早发生。

[0068] 通过采用 Cop-1 进行疫苗接种实现的保护并非由药物 Cop-1 本身介导，而是由其诱发的免疫反应介导，该结论在缺乏 T 细胞的动物体内未观察到任何效果时得到了证实。这解释了无需每日施用该药物以实现神经保护的原因，而每日施用药物的方式通常是采用药理学化合物时的情况，因为药理学化合物可快速从机体清除，因而需要补充该药物。不过，这种化合物的施用必须是定期的，以维持为实现保护以避免进行中的变性所需的 T 细胞的最佳水平。

[0069] Cop-1 在青光眼中实现保护性所采用的方式是激发 T 细胞反应。被激发的 T 细胞返回至眼部，其中它们遇到了可呈递眼中存在的相同自身抗原的小胶质细胞，这些 T 细胞可与这些自身抗原交叉反应。活化的 T 细胞是实现保护所需的细胞因子和神经营养因子的来源。我们的体外研究指出活化的 T 细胞可上调小胶质细胞中可对抗应激的基因簇，以及与它们的缓冲活性有关的基因。

[0070] 有其它研究表明可中和眼内有毒化合物的化合物有可能被开发为治疗青光眼的方法。这些化合物包括 NMDA 拮抗剂、NO 合成酶抑制剂。由于青光眼与其它任何神经变性性疾病一样，不是单一化合物疾病，说明为了获得全面的保护，人们不得不将若干种药物组合应用。本发明疫苗接种的优势在于，它可以刺激机体自身除去应激的途径，并诱发免疫细胞的活性，该活性是位点特异性，而非损伤特异性，从而可以实现保护，以避免广泛的威胁。

[0071] 根据本发明，在急性和慢性青光眼大鼠模型中发现，采用 Copl 滴眼剂进行的单一治疗是保护 RGCs，使它们避免 IOP- 诱导的 RGC 损失的有效疗法。由于本发明者以前的出版物显示的是将 Copl 注射给动物时所实现的神经保护效应，因此，将 Copl 作为滴眼剂施用可赋予系统性神经保护作用的发现令人非常意外。

[0072] 在本发明的一种优选实施方案中，含有共聚物 1、共聚物 1 相关肽或共聚物 1 相关多肽的滴眼用疫苗被用于治疗青光眼，即阻止该病的进展，这是一种视神经的神经变性性疾病。如上所述，眼内压 (IOP) 的升高通常与慢性或急性青光眼有关。不过，非常常见的是，降低压力不足以阻止疾病的进展。自我破坏的要素被发现与该病的进展有关。在这里，我们证实采用 Copl 进行单次疫苗接种，即以滴眼剂方式施用（或皮下注射方式，作为对比）足以挽救 RGCs，使它们避免 IOP- 诱导的损失。不过，我们也发现，在该病的慢性模型中，延迟的治疗 (7 天）与即时治疗在慢性 IOP 模型中一样有效。证据在于采用滴眼剂或系统性施用方式进行的治疗均不是直接见效，而是由免疫介导。在缺乏 T 细胞的动物体内没有获得任何效果，不过，当以对侧方式将滴眼剂施用在眼内压升高一侧时，便获得了该滴眼剂的效果。这些结果和免疫接种的途径均可被立即实施用于临床研发。

[0073] 根据本发明，可作为本发明的活性剂应用的优选共聚物是 Copl，最优选的是其乙酸盐形式，类名为 glatiramer acetate。Copl 的施用剂量应由医师根据患者的年龄和疾病的阶段确定，可选范围是 0.1-1,000mg，优选的范围是 10-80mg，更优选的范围是 20-60mg，但本发明也包括其它任何合适的剂量。

[0074] 对多发性硬化患者而言，可每日以单剂或多剂方式给药，优选的是每日施用 1-3 剂，共计 0.1-1,000mg，优选地在 10-80mg 的范围内，更优选的是 20-60mg，或者是隔日施用，但本发明也可根据患者的情况拟定其它任何合适剂量。对非多发性硬化患者而言，Copl 的剂量如上所述，但以定期方式施用，例如至少一周一次，到至少一月一次或至少每 2 或 3 个月一次，或更低的频次，但本发明也可根据患者的情况拟定每次免疫接种之间的其它任何

合适的间隔时间。

[0075] 下列实施例例证了本发明的特征，但对本发明的范畴不构成限制。

[0076] 实施例

[0077] 材料与方法

[0078] (i) 动物。近交的成年雄性 Lewis 和 Sprague-Dawley(SPD) 大鼠 (8 周 ;平均重量 300g) 由 Weizmann Institute of Science(Rehovot,Israel) 的动物育种中心提供。将这些大鼠饲养在照明和温度受控的室内，并在各组实验进行前，根据年龄和重量配对。根据 IACUC(国际动物管理与使用委员会)) 制订的规则处理所有动物。

[0079] (ii) 慢性高眼内压 (IOP) 的诱导。阻断房水流出可使 IOP 升高，进而导致 RGC 死亡 (Bakalash et al.,2002 ;Schori et al.,2001 ;Jia et al.,2000a ;Levkovitch-Verbin et al.,2002)。如下所述，在大鼠右眼内获得升高的 IOP。通过肌内注射盐酸氯胺酮 (50mg/kg) 和盐酸甲苯噻嗪 (0.5mg/kg)，使大鼠深度麻醉。将可发射蓝 - 绿氩激光照射的裂隙灯 (Haag-Streit,**Köniz,** Switzerland) 用于处理已麻醉大鼠的右眼，采用 80-120 次应用对准大鼠 4 条巩膜上静脉中的 3 条，并与角膜缘丛成 270° 。应用的激光束功率为 1W，持续 0.2 秒，在巩膜上静脉造成的光点直径为 100μm，在角膜缘丛上造成的光点直径为 50μm。1 周后进行第二次激光操作，采用相同的参数，只是所有应用中的光点直径均为 100μm。照射对准全部 4 条巩膜上静脉，并与角膜缘丛成 360° (Schori et al.,2001)。

[0080] (iii) 急性高眼内压的诱导。通过插入与聚乙烯管相连的 30 号针，并输注一袋生理盐水 (0.9％)，在深度麻醉 (盐酸氯胺酮 50mg/kg，盐酸甲苯噻嗪 0.5mg/kg，肌内注射) 大鼠的右眼内获得升高的 IOP。将输注袋置于大鼠头顶 1 米高处，形成封闭环路。诱导产生高 IOP 正好 1 小时后，从眼部取出针，针孔自动封闭。

[0081] (iv) 眼内压的测定。大部分麻醉剂均可使 IOP 降低 (Jia et al.,2000b)，从而妨碍可靠的测定。为了在大鼠尚处于麻醉状态时实现准确的压力测定，我们通过腹膜内 (i.p.) 注射方式对大鼠施用 10mg/ml 乙酰丙嗪，这是一种不会降低 IOP 的镇静药，并在对角膜施用 Localin 后，利用眼压计 (Tono-Pen XL ;Automated Ophthalmics, Ellicott City, MD,USA) 测定 5 分钟后双眼内的压力。因为据报导，麻醉剂对 Tono-Pen 测定的 IOP 有影响 (Jia et al.,2000b)，所以总是在注射乙酰丙嗪后的同一时间测定压力，记录从各眼获得的 10 次测定结果的平均值。测定以不同时间间隔进行 (每 2 天进行一次，持续 3 周)，但均在一天的同一时间。以未经处理的对侧眼作为对照。

[0082] (v) 对 IOP 升高导致的视网膜损伤的解剖学评估。将亲水性的神经示踪染料葡聚糖四甲基罗丹明 (Rhodamine Dextran ;(Molecular Probes,Eugene,OR,USA)) 直接应用在视神经的眼眶内部分。只有可经受住高 IOP 并与活细胞体一起保留功能的轴突可吸收该染料，证实了已标记 RGCs 的存在。24 小时后杀死大鼠，将它们的视网膜切除，完全地封固并保存在 4％的低聚甲醛中。利用荧光显微镜 (Carl Zeiss,Oberkochen,Germany)，在 ×800 放大倍数下对 RGCs 进行计数。对每个视网膜的 4 个区域进行计数，这 4 个区域具有相同直径 (0.076mm^2)，且距视神经盘的距离相同 (Kipnis et al.,2001 ;Yoles et al.,2001)。以未经处理的大鼠来源的眼作为对照。RGCs 的个数是由不了解视网膜状况的观察者计数的。

[0083] (vi) 采用 Copl 和佐剂进行的主动免疫接种。采用在 2.5mg/ml CFA 中乳化且总体积为 100μl 的 Copl(100μg)(Kipnis et al.,2000) 使经由激光诱导导致 IOP 升高的大

鼠或存在急性 IOP 升高情况的大鼠免疫 (Teva Pharmaceutical Industries Ltd.,Petach Tikva,Israel)。每只动物均通过尾根处的皮下注射接种疫苗。

[0084] (vii) 采用无佐剂的 Cop 1 进行的自动免疫接种。在通过皮下造成原发性损伤后的不同时间点施用经由 PBS 稀释至不同浓度的 Cop-1。Cop-1 的体表施用是在将该物质浸入 PBS 中,直至 20mg/ml 浓度后进行的。由于每一滴均为 50μl,我们每 5 分钟施用 1 滴,在 25 分钟内共施用 5 滴。

[0085] 实施例 1。在无载体条件下施用时进行的 Cop-1 疫苗接种可保护 RGCs,使其避免 IOP 诱导的死亡

[0086] 之前已有研究显示,乳化在佐剂中的 Cop1 对 RGC 具有保护作用,可使其避免 IOP 诱导的死亡。在这里,我们检验该作用是否在慢性模型中长期存在。

[0087] 使动物的 IOP 单侧升高,并在激光处理当天进行免疫 (以诱导 IOP 升高)。在第一次激光照射的当天,使大鼠的 IOP 缓慢升高。将动物分为 4 组 :2 组接受乳化在 CFA 中的 Cop-1,2 组接受溶解中 CFA 中的 PBS。3 周后,将其中一组经由 Cop-1 处理的动物的视网膜切除,另一组则在 2、6 和 9 周后接受 Cop-1。该组在第一次激光照射后 12 周切除视网膜。在经由 PBS-CFA 处理的 2 组中,其中一组是在第一次激光照射后 3 周被分析 RGC 的存活情况,另一组则在此次激光照射后 2、6 和 9 周另外接受 PBS-CFA,并在此次激光照射后 12 周切除视网膜。结果如图 1 所示。对 3 和 12 周后存活的 RGCs 数量的评估表明,在对照大鼠与经由 Cop-1 免疫和 PBS 免疫的大鼠之间存在显著差异,甚至在 IOP 升高开始后 12 周也是如此。Cop-1 的有益效果 (被表达为 RGC 死亡的百分数 %) 可见于 3 周时 (12.6±5 对比 45.7±8,n = 7) 和 12 周时 (33.7±1.4 对比 57.2±6.3,分别地,n = 5 和 4)。因此,在第一次激光照射后 12 周,RGCs 损失的情况与第 3 周时的损失进了一步 (从第 3 周时的 45.7% 到第 12 周时的 57.20%)。但疫苗接种将第一次激光照射后 12 周时的损失降低至 33.7%。一部分损失似乎是不可避免的,而另有一部分损失则可以被影响,从而获得甚至可以在 IOP 第一次升高后持续 12 周的保护。

[0088] 实施例 2。无佐剂条件下进行的 Cop-1 免疫接种

[0089] 由于 Cop-1 是具有多个表位的高分子量化合物,我们甚至考虑了其在无佐剂条件下可能具有免疫原性的可能。

[0090] 在第一个实验中,使大鼠的 IOP 升高,并在激光处理的第一天接受皮下注射不同剂量的无佐剂 Cop-1(100、250、500 和 1000μg) ;对照动物则接受 PBS。结果如图 2A 所示,对大鼠皮下注射 500μgCop-1 可获得最佳效果 ;较高或较低剂量的效果均较差。经由 500μgCop-1 处理的实验组显示的最大效果为 :RGC 死亡率为 26.6±10%,经由 100μgCop-1 处理的实验组的 RGC 死亡率则为 44±6%,经由 250μgCop-1 处理的实验组的 RGC 死亡率则为 50.5±8%。所有组均包括 4-6 只动物。

[0091] 在另一个实验中,我们还检验了时机和频率,发现在 IOP 升高后第 7 天注射的效果比第 0 天注射的效果好,而每隔一周或每日进行的重复注射的效果则较差。使大鼠经受 IOP,并在第一次激光照射后立即 (0),或一周后 (7) 或在第 0 和 7 天 (0、7) 或从第 0 天开始连续 7 天每日 (0-7) 接受 500μg 的无佐剂 Cop-1。对照组接受 PBS。3 周后切除视网膜。结果如图 2B 所示,第 7 天接受单次注射的实验组的 RGC 死亡率最低,而接受连续 7 天的每日注射的实验组的死亡率最高 (19.1±4.7 对比 41.4±6,p < 0.01)。

[0092] 还测试了施用无佐剂Cop-1在IOP首次升高后6周的效果。发现两次注射----一次在第0天，第二次在3周后----比3周后进行的单次注射更有效，说明该疫苗接种应当与死亡动力学同步，否则效果则较差。由于死亡开始得比IOP首次升高后3周早，所以在IOP首次升高后3周进行第一次注射的效果较差。

[0093] 实施例3。Cop-1作用是T-细胞依赖型的

[0094] 为检验Cop-1的作用的确是免疫介导的，并且没有充当局部药物，我们对已失去T细胞且IOP升高的动物施用Cop-1。

[0095] 在第一个实验中，使正常的成年大鼠和已失去T细胞的成年大鼠（出生时接受胸腺切除术的后果）的IOP升高。在IOP升高后即刻，使动物接受单次注射Cop-1，或PBS或每日注射溴莫尼定。3周后切除视网膜，并对RGCs计数。未切除胸腺的动物在IOP升高后的RGCs死亡百分数低于已切除胸腺的动物（34±3对比50.2±3，$p < 0.001$，分别地，$n = 6$和5）。如图3A和3B所示，在已切除胸腺并经由α2-肾上腺素受体激动剂青光眼药物溴莫尼定处理的动物体内，RGCs的损失少于已切除胸腺但未经由该药物处理的动物或已切除胸腺并经由Cop-1处理的大鼠[38±7($n = 6$)对比55±5.2($n = 5$)，$p = 0.001$]。溴莫尼定和Cop-1在未切除胸腺且IOP升高的动物体内的作用如图3B所示。在未切除胸腺的动物中采用Cop-1进行的治疗比采用溴莫尼定进行的治疗更有效(23.5±5.7对比34.5±3.51，$p < 0.05$)。未经处理的对照组的死亡百分数为47.9±7.5。两种处理之间的协同作用不明显。

[0096] 因此，与预期一样，已失去T细胞的动物的RGC损失比正常动物的高(50％对比30％)。其次，Cop-1在已失去T细胞动物体内未减少IOP-诱导的RGC损失(55％对比50％)。与之相比，以α2-肾上腺素受体激动剂作为阳性对照，甚至在已切除胸腺的动物体内也可避免RGC损失（图3A)。我们还测试了在正常动物体内，α2-肾上腺素受体激动剂溴莫尼定与Cop-1在保护RGCs，使其避免IOP诱导的死亡方面是否存在协同作用。图3B所示为，就皮下施用所实现的RGC保护的程度而言，这两种化合物之间不存在加成或协同作用。因此，这些结果表明Cop-1是强免疫原，可在IOP升高后7天进行的单次注射后保护RGCs，使其避免IOP诱导的死亡。

[0097] 实施例4。Cop-1滴眼剂在慢性IOP模型中可保护RGCs

[0098] 由于Cop-1疗法为T细胞介导型，并且我们已在上文中显示在无佐剂的条件下进行的单次注射足以发挥保护作用，目前，我们探索了以Cop-1作为滴眼剂而无需佐剂的可能性。假设有大约10％的滴眼剂进入血液，我们应用的滴眼剂相当于5mg Cop-1(是皮下施用时被发现有效的最佳剂量500μg的10倍)。在慢性模型中IOP升高后即刻（图4A)或第7天（图4B)施用该Cop-1滴眼剂。在压力升高后3周进行评估时发现，以滴眼剂形式实现的Cop-1保护与皮下施用时一样有效($p < 10^{-5}$;103RGCs对比150RGCs)。

[0099] 实施例5。Cop-1滴眼剂在急性IOP(升高)模型中可保护RGCs，使它们避免IOP-诱导的死亡

[0100] 慢性IOP(升高）的结果促使我们检验Cop-1是否可以在急性青光眼模型中保护RGCs，使其避免IOP诱导的损失。

[0101] 我们之前已建立了一个经过良好标准化的IOP短暂升高的模型(1小时升至40mm/Hg)，IOP的短暂升高导致2周后RGCs的损失率约为50％。在该急性IOP升高模型中应用

无佐剂的 Cop-1，导致 2 周后的损失率仅为 20％。

[0102] 利用平均 IOP 为 54.75±11mmHg 的 Lewis 大鼠的急性 IOP 升高模型，我们通过皮下（图 5A）或体表（滴眼剂；图 5B）两种方式接种 Cop-1 或载体 (PBS)。在 IOP 升高 1 小时后立即开始的 25 分钟时程内，对每只动物施用共计 5mg 的 Cop-1。对照组在 IOP 升高后 2 周的平均死亡率为 58.58％ ±7.42(n ＝ 4)，Cop-1 接种组的平均死亡率则为 31.12％ ±3.22(n ＝ 4)(p ＜ 0.001)。

[0103] 由 IOP 升高后 2 周的评估结果看来，两种施用途径在保护 RGCs 方面的效果类似。为证明所述滴眼剂提供了一种免疫接种途径，而并非局部药物应用方式，我们使一只眼的压力升高，并将滴眼剂形式的 Cop-1 施用于对侧眼。获得了与同侧施用时相同的效果。

[0104] 参考文献

[0105] Aharoni R.，Teitelbaum D.，Arnon R.，Sela M.Copolymer 1 inhibits manifestation of graft rejection.Transplantation 27,598(2001)

[0106] Bakalash，S.，Kipnis，J.，Yoles，E.& Schwartz，M.Resistance of retinal ganglion cells to an increase in intraocular pressure is immune-dependent. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.43,2648-2653(2002)

[0107] Fridkis-Hareli M,Neveu JM,Robinson RA,Lane WS,Gauthier L,Wucherpfennig KW,Sela M,Strominger JL.Binding motifs of copolymer 1 to multiple sclerosis-and rheumatoid arthritis-associated HLA-DR molecules.J Immunol.162(8)：4697-4704(1999)

[0108] Fridkis-Hareli M,Santambrogio L,Stern JN,Fugger L,Brosnan C,Strominger JL.Novel synthetic amino acid copolymers that inhibit autoantigen-specific T cell responses and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis.J Clin Invest 109(12)：1635-1643(2002)

[0109] Hauben，E.，Nevo，U.，Yoles，E.，Moalem，G.，Agranov，E.，Mor，F.，Akselrod，S.，Neeman，M.，Cohen，I.R.，and Schwartz，M.Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury.Lancet 355：286-287(2000)

[0110] Jia,L.,Cepurna,W.O.,Johnson,E.C.& Morrison,J.C.Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outfiow obstruction in rats.Invest. Ophthalmol.Vis.Sci.41,1380-1385(2000a)

[0111] Jia，L.，Cepurna，W.O.，Johnson，E.C.&Morrison，J.C.Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.41,3415-3419.(2000b)

[0112] Kipnis，J.& Schwartz，M.Dual Action of Glatiramer Acetate(Cop-1)as aTreatment for Autoimmune Diseases and a Vaccine for Protective Autoimmunity after CNS Injury.Trends Mol.Med.8,319-323(2002)

[0113] Kipnis J,Yoles E,Porat Z,Cohen A,Mor F,Sela M,Cohen IR,Schwartz M.T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve：possible therapy for optic neuropathies.Proc.Natl.Acad.Sci.U S A 97, 7446-7451.(2000)

[0114] Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, Schwartz M. Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. J. Neurosci. 21, 4564-4571. (2001)

[0115] Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43, 402-410. (2002)

[0116] Mizrahi, T., Hauben, E. & Schwartz, M. The tissue-specific self-pathogen is the protective self-antigen: The case of uveitis. J. Immunol. 169, 5971-5977 (2002)

[0117] Moalem, G., Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. Nat. Med. 5, 49-55 (1999)

[0118] Mukibi-Muka G, Jones RC, Kibenge FS. Serological response and virus shedding of chickens inoculated with reovirus via different routes. Res Vet Sci 37(2): 227-9 (1984)

[0119] Russell PH, Mackie A. Eye-drop DNA can induce IgA in the tears and bile of chickens. Vet Immunol Immunopathol 80(3-4): 327-32 (2001)

[0120] Schlegel PG, Aharoni R, et al. A synthetic random copolymer with promiscuous binding to class II MHC molecules inhibits T-cell proliferative response to major and minor histocompatibility antigens in vitro and confers the capacity to prevent murine graft-versus-host disease in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 5061 (1996)

[0121] Schori, H., J. Kipnis, E. Yoles, E. WoldeMussie, G. Ruiz, L. A. Wheeler, and M. Schwartz. Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 98, 3398-3403. (2001)

[0122] Schori, H., Lantner, F., Shachar, I. & Schwartz, M. Severe immunodeficiency has opposite effects on neuronal survival in glutamate-susceptible and-resistant mice: Adverse effect of B cells. J. Immunol. 169, 2861-2865 (2002)

[0123] Schwartz, M., Belkin, M., Yoles, E. & Solomon, A. Potential treatment modalities for glaucomatous neuropathy: neuroprotection and neuroregeneration. J. Glaucoma 5, 427-432 (1996)

[0124] Schwartz, M. &Kipnis, J. Multiple sclerosis as a by-product of the failure to sustain protective autoimmunity: A paradigm shift. The Neuroscientist 8, 405-413 (2002)

[0125] Schwartz, M. &Yoles, E. Neuroprotection: a new treatment modality for glaucoma? Curr. Opin. Ophthalmol. 11, 107-111 (2000a)

[0126] Schwartz, M. &Yoles, E. Self-destructive and self-protective processes in the damaged optic nerve: implications for glaucoma. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41, 349-351 (2000b)

[0127] Sharma JM. Introduction to poultry vaccines and immunity. Adv. Vet. Med. 41, 481-94 (1999)

[0128] Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothil f A, Cohen A, Kuchroo V, Cohen IR, Weiner H, Schwartz M. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. J. Neurosci. 21, 3740-3748. (2001)

[0001]

序列表

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
EISENBACH-SHWARTZ, Michal
BAKALASH, Sharon
FULGA, Valentin

<120> 用于治疗性免疫接种的含共聚物 1 的滴眼用疫苗

<130> PRON-026 CN

<150> US 60/438,310
<151> 2003-01-07

<150> PCT/IL2004/000006
<151> 2004-01-06

<160> 32

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 1

Ala Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 2

[0002]

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 3

Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 4

Ala Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 5

Ala Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala

[0003]

1 5 10 15

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 6

Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 7

Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 8

Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

[0004]

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 9

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 10

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 11

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 12

[0005]

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 12

Glu Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 13

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 14

Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

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

[0006]

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 15

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 16

Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 17

Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

[0007]

<220>
<223> 合成肽

<400> 18

Ala Lys Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 19

Ala Glu Ala Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 20

Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0008]

<400> 21

Ala Glu Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 22

Ala Ala Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 23

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 24

[0009]

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 25

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 26

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 27

Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

[0010]

1 5 10 15

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 28

Ala Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 29

Ala Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 30

Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

[0011]

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 31

Ala Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 32

Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

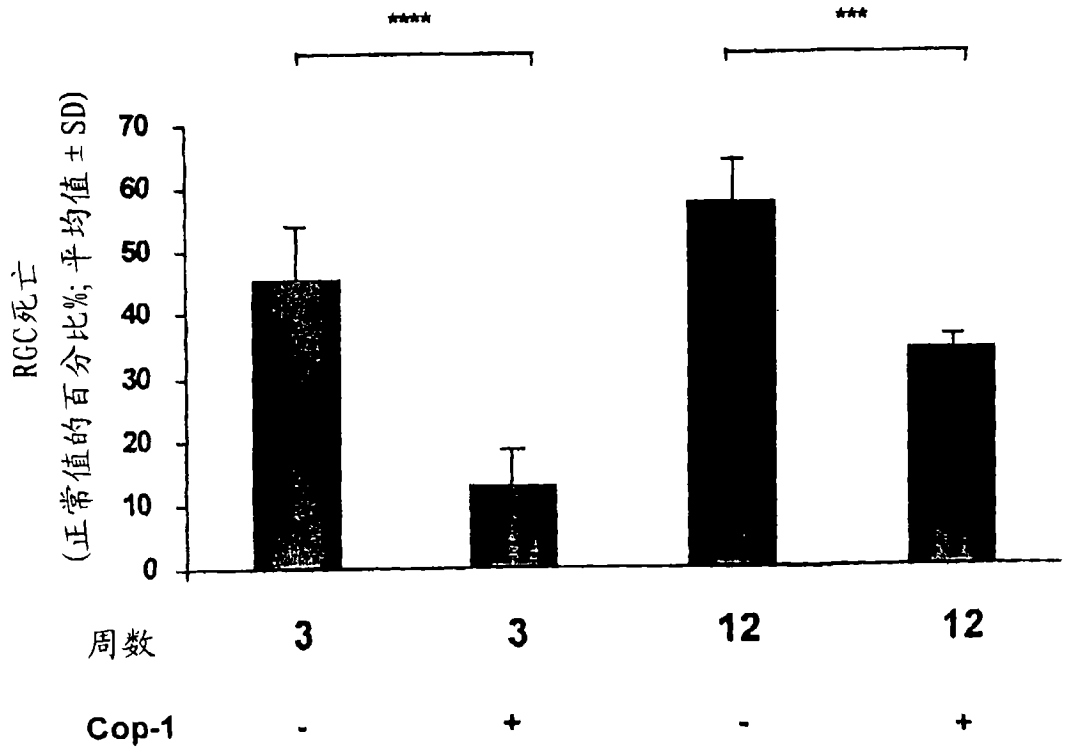

****
***
RGC死亡
(正常值的百分比%; 平均值 ± SD)
70
60
50
40
30
20
10
0
周数
3
3
12
12
Cop-1
-
+
-
+

图 1

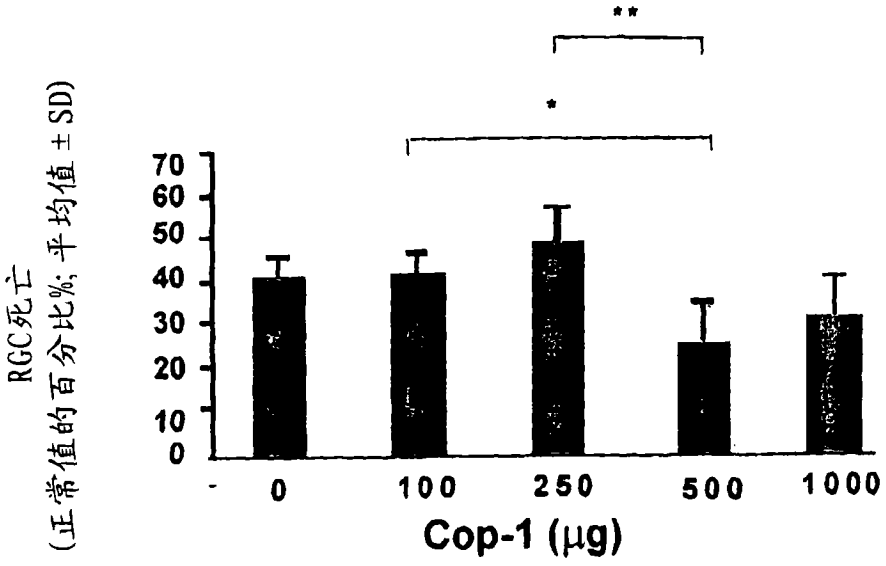

**
*
RGC死亡
(正常值的百分比%; 平均值 ± SD)
70
60
50
40
30
20
10
0
-
0
100
250
500
1000
Cop-1 (μg)

图 2A

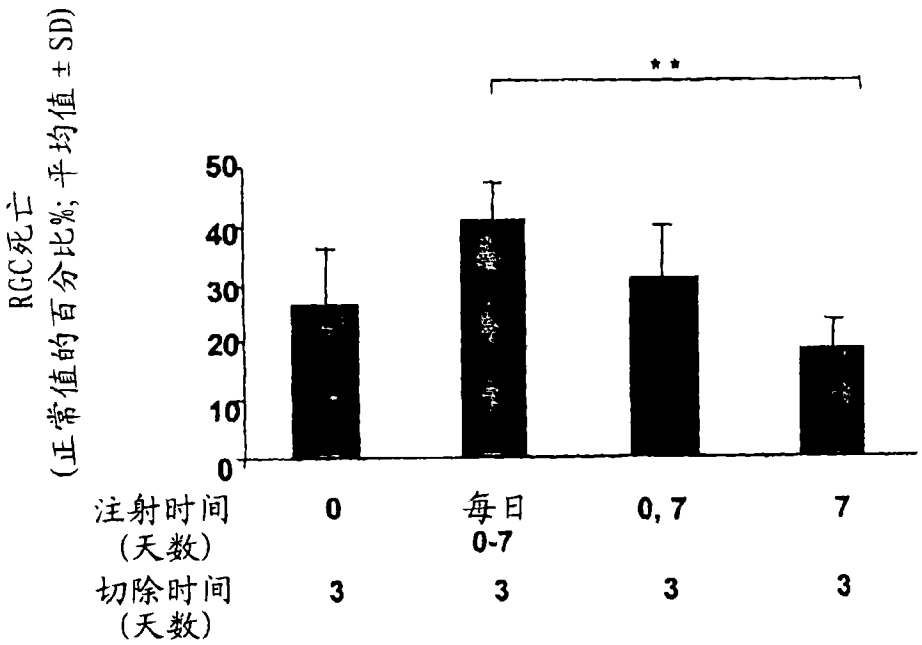

RGC死亡
(正常值的百分比%; 平均值 ± SD)
**
50
40
30
20
10
0
注射时间 (天数)
0
每日 0-7
0, 7
7
切除时间 (天数)
3
3
3
3

图 2B

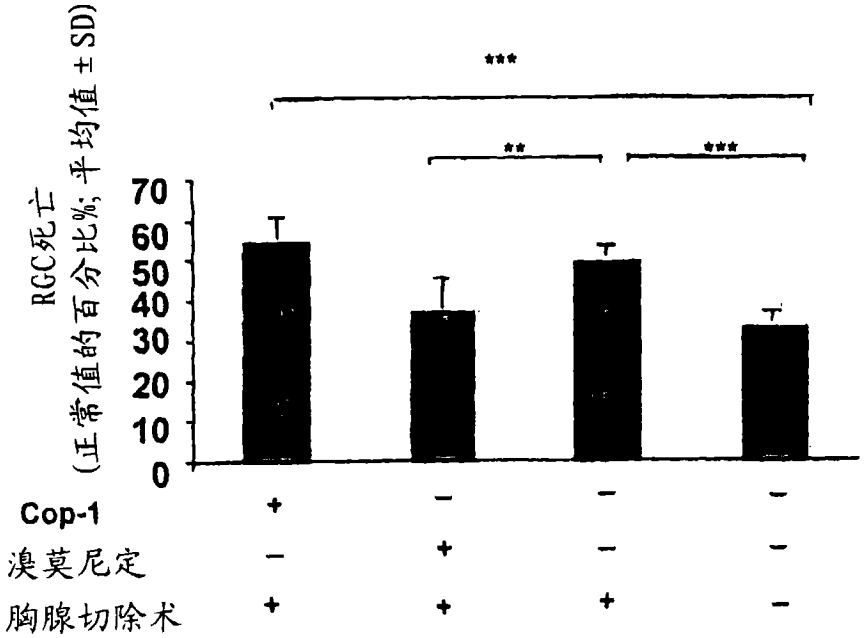

RGC死亡
(正常值的百分比%; 平均值 ± SD)
***
**
***
70
60
50
40
30
20
10
0
Cop-1
+
−
−
−
溴莫尼定
−
+
−
−
胸腺切除术
+
+
+
−

图 3A

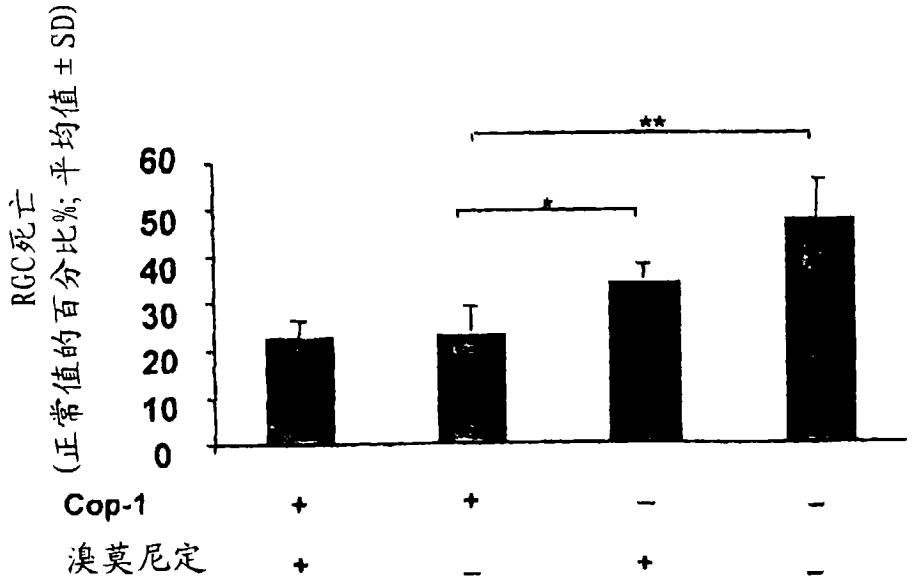

RGC死亡
(正常值的百分比%; 平均值 ± SD)
60
50
40
30
20
10
0
**
*
Cop-1 + + − −
澳莫尼定 + − + −

图 3B

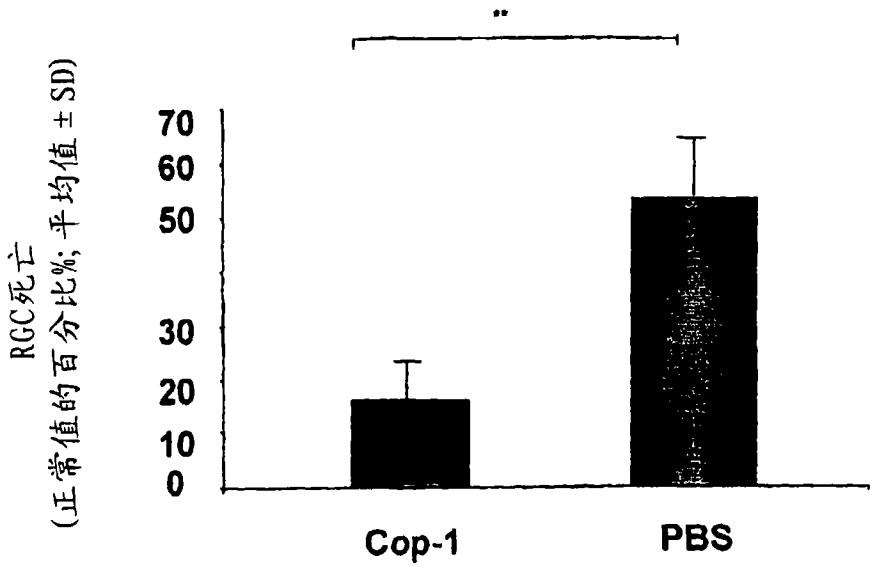

RGC死亡
(正常值的百分比%; 平均值 ± SD)
70
60
50
30
20
10
0
**
Cop-1
PBS

图 4A

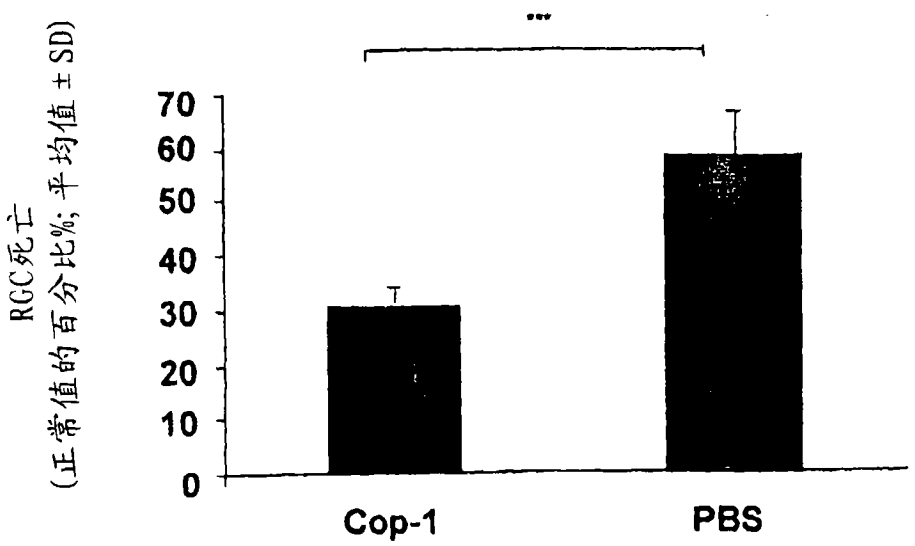

***
RGC死亡
(正常值的百分比%; 平均值 ± SD)
70
60
50
40
30
20
10
0
Cop-1
PBS

图 4B

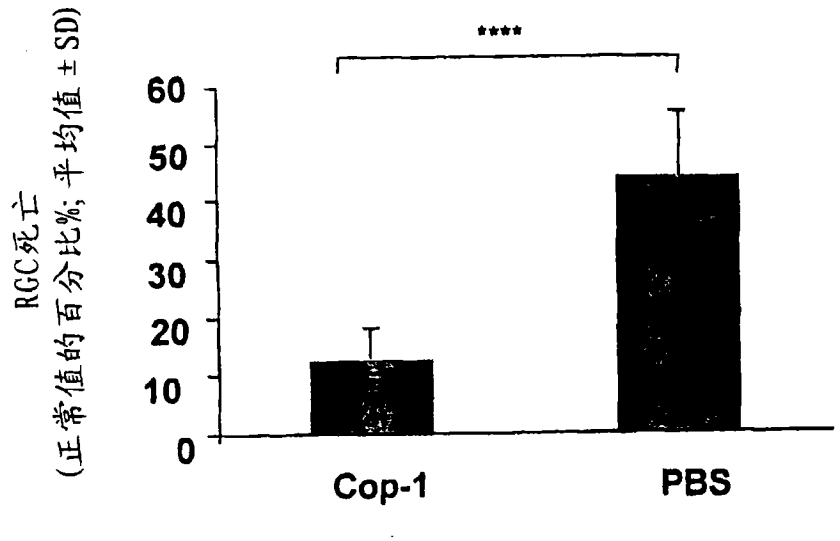

****
RGC死亡
(正常值的百分比%; 平均值 ± SD)
60
50
40
30
20
10
0
Cop-1
PBS

图 5A

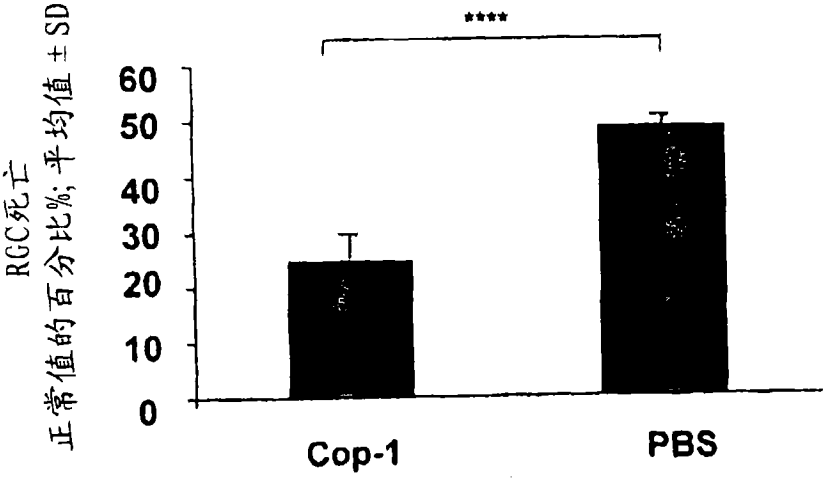


图 5B