

ÖZET

PEPTİT

Bir MHC molekülüne in vitro bağlanabilen ve antijen prosesi (diğer bir deyişle bir apitop) olmaksızın bir T hücre sine sunulabilen bir peptit sağlanır, bu peptit, aşağıdaki proteolipit protein (PLP) peptitlerinden tümünü veya bunun bir bölümünü içerir: PLP 36-61: HE ALTGTEKLIET YF SKN YQD YEYLI (SEQ ID NO. 1) PLP 179-206: TW TTCQSI AFPSKTSASIGSLCADARMY (SEQ ID NO. 2) PLP 207-234: GVL PWNAFPGKVCGSNLLSICKTAEFQM (SEQ ID NO. 3). Aynı zamanda, bu tür bir peptitin, bir farmasötik bileşim içinde kullanımı ve bu tür bir peptit kullanılarak bir hastalığın tedavi edilmesine ve/veya önlenmesine yönelik bir yöntem sağlanır.

İSTEMLER

1. Bir peptit olup, özelliği bir MHC molekülüne *in vitro* bağlanabilmesi ve antijen
prosesi olmaksızın bir T hücresine sunulabilmesi ve aşağıdaki proteolipit protein
(PLP) peptitlerinden seçilmesidir:
PLP 39-53: LTGTEKLIETYFSKN (SEQ ID NO. 7)
PLP 42-56: TEKLIETYFSKNYQD (SEQ ID NO. 8) ve
PLP 43-57: EKLIETYFSKNYQDY (SEQ ID NO. 9).
2. İstem 1'e göre bir peptit olup, özelliği bir demiyelinizan hastalığın tedavisinde
ve/veya önlenmesinde kullanıma yönelik olmasıdır.
3. İstem 2'ye göre kullanıma yönelik peptit olup, özelliği hastalığın multipl skleroz
olmasıdır.
4. Bir farmasötik bileşim olup, özelliği istem 1'e göre bir veya daha fazla peptit
içermesidir.

TARİFNAME

PEPTİT

5 Mevcut buluş proteolipit proteinden (PLP) peptitler ile ilgilidir. Özellikle, buluş bir MHC molekülüne bağlanabilen ve antijen prosesi olmaksızın bir T-hücresine *in vitro* sunulabilen PLP'nin hidrofilik bölgelerinden birinden türetilen peptitler ile ilgilidir. Buluş aynı zamanda bir hastalığın tedavisinde ve/veya bunun önlenmesinde bu tür peptitlerin kullanımı ile ilgilidir.

10 ALTYAPI

Multipl skleroz (MS) sinir aksonlarının demiyelinizasyonu ile karakterize edilen, merkezi sinir sistemini etkileyen kronik dejeneratif bir hastalıktır. MS, çok sayıda fiziksel ve mental semptomlara yol açabilir ve sık şekilde fiziksel ve bilişsel bozukluklara ilerler. 15 Hastalığın başlaması genellikle genç yetişkinlerde (20-40 yaş) meydana gelir, kadınlarda daha yaygındır ve dünya çapında 1 milyondan fazla kişiyi etkiler.

MS'in hastalık süreci değişkendir ve uykuda bekleyebilir veya zaman içinde istikrarlı bir şekilde ilerleyebilir. MS'in birçok alt türü, ilerlemenin modellerine bağlı olarak 20 açıklanmıştır. MS sahibi bir insan, hassasiyet kaybı veya karıncalanma, iğnelenme veya uyuşma (hipoestezi ve paraestezi), kas zayıflıkları, klonüs, kas spazmları veya harekette zorlanma gibi his değişiklikleri; koordinasyon ve denge (ataksi) ile zorluklar; konuşmada (disartri) veya yutmada (disfaji) problemler, görsel problemler (nistagmus, fosfenler dahil olmak üzere optik nörit veya diplopi), yorgunluk, akut veya kronik ağrı ve 25 mesane ve bağırsak zorlukları dahil olmak üzere tüm nörolojik semptom veya işaretlerden şikayetçi olabilir.

MS'in mevcut durumda, içinde vücudun kendi immün sisteminin miyeline saldırdığı ve buna hasar verdiği immüne aracılı bir bozukluk olduğuna inanılır.

30

MS'e yönelik bilinen hiçbir çare yoktur. Mevcut birçok terapinin, bir ataktan (nüks) sonra fonksiyonun eski haline getirilmesi, yeni atakların (nükslerin) derece veya sıklığının önlenmesi veya azaltılması veya bozukluğun kapsamının önlenmesi veya azaltılmasında yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, mevcut birkaç MS 35 terapisi, yan etkiler ile ilişkilendirilmiştir veya zayıf şekilde tolere edilir. Dolayısıyla,

MS'e yönelik, MS'in tedavi edilmesinde ve MS'in semptomlarının hafifletilmesi veya azaltılmasında etkili olan alternatif terapilere yönelik bir ihtiyaç bulunur.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

5

Mevcut buluşçular, hücrelere sahip sabit antijen tarafından T-hücrelerine sunulabilen proteolipit proteininden (PLP) türetilen birkaç peptit tanımlamıştır. Bu peptitler, multipl skleroz gibi demiyelinizan hastalıkların önlenmesinde ve/veya tedavi edilmesinde kullanışlı olabilir.

10

Bir birinci açıda, bu nedenle mevcut buluş bir MHC molekülüne *in vitro* bağlanabilen ve antijen prosesi olmaksızın bir T hücresine sunulabilen ve aşağıdaki PLP peptitlerinden seçilen bir peptit sağlar:

PLP 39-53: LTGTEKLIETYFSKN (SEQ ID NO. 7)

15

PLP 42-56: TEKLIETYFSKNYQD (SEQ ID NO. 8) ve

PLP 43-57: EKLIETYFSKNYQDY (SEQ ID NO. 9).

Bir ikinci açıda, bir demiyelinizan hastalığın tedavi edilmesi ve/veya önlenmesinde kullanıma yönelik buluşun birinci açısına göre bir peptit sağlanır.

20

Bir üçüncü açıda, mevcut buluş, buluşun birinci açısına göre bir veya daha fazla peptit(ler) içeren bir farmasötik bileşimi sağlar.

25

Burada açıklanan, özneye buluşun birinci açısına göre bir peptitin uygulanmasına yönelik adımı içeren, aynısına ihtiyacı olan bir özneye bir demiyelinizan hastalığın tedavi edilmesine ve/veya önlenmesine yönelik bir yöntemdir.

30

Burada açıklanan, bir demiyelinizan hastalığın önlenmesi ve/veya tedavi edilmesinde kullanıma yönelik bir ilacın imalatında buluşun birinci açısına göre bir peptitin kullanımıdır.

Buluşun ikinci açısı ile bağlantılı olarak, hastalık multipl skleroz olabilir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

35

- Şekil 1 - **Şekil 1:** Üç PLP peptit bölgesi, *in vitro* ve *in vivo* yanıt verir ve yanıt, DR2 bağlama tahminine ilişkilendirilir. A, geniş çerçevede *in silico* (IEDB ve NetMHCII yöntemleri) HLA-DRB1*1501'e PLP peptitlerin bağlama tahminini ve bu peptitlerin, bu farelerdeki proliferatif bir yanıtını indüklemek üzere kabiliyetini temsil eder. B ve C, bu uzun peptitlerin 4'ünün, EAE'yi (2 ayrı deney) indüklemek üzere kabiliyetini temsil eder.
- Şekil 2 - HEAL-26 içinde apitopların tanımlanması
- Şekil 3 - TWTT-28 içinde apitopların tanımlanması
- Şekil 4 - GVLP-28 içinde apitopların tanımlanması
- Şekil 5 - Tolerizasyon protokolü
- Şekil 6 - HEAL-26 veya POP-4 ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, HEAL-26 veya POP-4 apitopu ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin timidin kaynaşmasının +/- ortalama standart hatasının (SEM) ortalamasını temsil eder.
- Şekil 7 - HEAL-26 veya POP-4 ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, HEAL-26 veya POP-4 apitop ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.
- Şekil 8 - TWTT-28 ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, TWTT-28 apitop ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.
- Şekil 9 - TWTT-28 ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, TWTT-28 apitop ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.
- Şekil 10 - POP-15 ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, POP-15 apitop ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.
- Şekil 11 - POP-15 ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, POP-15 apitop ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.
- Şekil 12 - POP-22 ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, POP-22 apitop ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.
- Şekil 13 - POP-22 ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin proliferasyonudur. A, POP-22 apitop ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.

Şekil 14 - POP-22 veya GVLP-28 ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, POP-22 (sol panel) veya GVLP-28 (sağ panel) apitop ile önceden muamele edilen farelerden LNC'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.

5 Şekil 15 - POP-22 ve GVLP-28 ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin proliferasyonu ve sitokin üretimidir. A, POP-22 veya GVLP-28 apitop ile önceden muamele edilen farelerden SPL'nin timidin kaynaşmasının +/- SEM temsil eder.

10 Şekiller 6 ila 15'in her birine yönelik, B, timidin kaynaşmasının stimülasyon indeksini gösterir. C, kültür üst fazında salgılanan sitokin miktarını temsil eder. B ve C'de, doz başına her bir nokta, ayrı bir fareyi temsil eder ve bar, medyanı temsil eder. p Mann-Whitney testi kullanılarak hesaplanmıştır. Sadece düşük p değerleri gösterilir. Bir <.05 p değeri önemli olarak düşünülür.

15

DETAYLI AÇIKLAMA

Bir birinci açıda, mevcut buluş bir peptit ile ilgilidir.

20 **Peptitler**

“Peptit” terimi, bitişik amino asitlerin α -amino ile karboksil grupları arasındaki peptit bağlar tarafından tipik olarak birbirine bağlanmış, bir dizi kalıntı, tipik olarak L-amino asitler anlamına gelmek üzere normal anlamında kullanılır. Terim, modifiye edilmiş

25 peptitler ve sentetik peptit analogları içerir.

Mevcut buluşun bir peptiti, bir majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I veya II molekülüne *in vitro* bağlanabilen ve antijen prosesi olmaksızın bir T hücresine sunulabilen bir uzunluğa sahiptir. Diğer bir deyişle, peptitler bir veya her iki uçta

30 herhangi bir kırpma gerektirmeksizin MHC molekülünün peptit bağlama oluğu içine doğrudan bağlanabilir.

MHC sınıf I moleküllere bağlanan peptitler, tipik olarak 7 ila 13, daha genel olarak 8 ila 10 amino asit boyundadır. Peptitin bağlanması, peptitin ana zincirindeki atomlar ile tüm

35 MHC sınıf I moleküllerinin peptit-bağlama oluğundaki değişmez yerler arasındaki

temaslar yoluyla iki ucunda stabilize edilir. Peptitin amino ve karboksi terminusu bağlayan oluğun her iki ucunda değişmez yerler bulunur. Peptit boyunda değişkenler, sıklıkla gerekli esnekliğe olanak sağlayan prolin veya glisin kalıntılarında, peptit belkemiğinde bir kıvrımlama tarafından barındırılır.

5

MHC sınıf II moleküllerine bağlayan peptitler, tipik olarak 8 ile 20 arasında amino asit boyuna, daha genel olarak 10 ile 17 arasında amino asit boyuna sahiptir ve daha uzun olabilir. Bu peptitler, (MHC sınıf I peptit bağlama oluğunun aksine) her iki uçta açık olan MHC II peptit bağlama oluğu boyunca uzatılmış bir uyuşumda uzanır. Peptit, peptit bağlama oluğunu kaplayan korunan kalıntılar ile başlıca ana zincir atom temasları tarafından yerinde tutulur.

Mevcut buluşun peptiti, kimyasal yöntemler (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.) kullanılarak yapılabilir. Örneğin, katı faz teknikleri (Roberge JY et al (1995) Science 269: 202-204) ile sentezlenebilir, reçineden ayrılabilir ve hazırlayıcı yüksek performans likit kromatografisi (örneğin, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY) ile saflaştırılabilir. Otomatikleştirilmiş sentez, örneğin imalatçı tarafından sağlanan talimatlar ile uyumlu olarak ABI 431 A Peptit Sentezleyici (Perkin Elmer) kullanılarak elde edilebilir.

Peptit alternatif olarak, rekombinant araçlar ile veya daha uzun bir polipeptitten klevaj ile yapılabilir. Örneğin, peptit miyelin proteolipit proteininden klevaj ile elde edilebilir. Bir peptitin bileşimi, amino asit analizi veya dizilemesi (örneğin, Edman bozunum prosedürü) ile doğrulanabilir.

Miyelin proteolipit proteini (PLP)

Miyelin, genel olarak bir nöronun sadece aksonu etrafında, bir katman, miyelin kılıfı oluşturan bir dielektrik (elektrik olarak izole edici) materyaldir. Bu, sinir sisteminin uygun şekilde işleyişine yönelik oldukça önemlidir. Miyelin oluşturan proteinlerden bazıları, miyelin temel proteini (MBP), miyelin oligodendrosit glikoproteini (MOG) ve proteolipit proteini (PLP).

30

PLP 39-53: LTGTEKLIETYFSKN (SEQ ID NO. 7)

PLP 42-56: TEKLIETYFSKNYQD (SEQ ID NO. 8) ve

PLP 43-57: EKLIETYFSKNYQDY (SEQ ID NO. 9).

Apitoplar

5

Adapte edilebilen bir immün yanıtında, T lenfositleri, bir protein antijenin iç epitoplarını tanıyabilir. Antijen sunan hücreler (APC), protein antijenleri toplar ve bunları kısa peptit parçalara bozar. Bir peptit, hücre içinde bir majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I veya II molekülüne bağlanabilir ve hücre yüzeyine taşınabilir. Bir MHC molekülü ile bağlantılı olarak hücre yüzeyinde sunulduğunda, peptit bir T hücresi tarafından (T hücre reseptörü (TCR) vasıtasıyla) tanınabilir, bu durumda, peptit, bir T hücre epitopudur.

10

15

T-hücre epitopları, öz veya yabancı, herhangi bir antijene, adapte edilebilen immün yanıtında merkezi bir görev görür. Hipersensitivite hastalıklarda (alerji, otoimmün hastalıkları ve transplant reddi içerir) T hücre epitopları tarafından görülen merkezi görev, deney modellerinin kullanımı vasıtasıyla gösterilmiştir. Adjuvan ile kombinasyon halinde sentetik peptitlerin (T hücre epitoplarının yapısına bağlı olarak) enjeksiyonu ile indükleyici veya alerjik hastalıkların indüklenmesi mümkündür.

20

Bunun aksine, çözünebilir formda peptit epitopların uygulanması yoluyla özel peptit epitoplara karşı immünolojik toleransın indüklenmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir.

25

30

Çözünebilir peptit antijenlerinin uygulanması, deneysel otoimmün ensefalomyelitinde (EAE - multipl skleroza (MS) yönelik bir model) (Metzler and Wraith (1993) Int. Immunol. 5:1159-1165; Liu and Wraith (1995) Int. Immunol. 7:1255-1263; Anderton and Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251-1261); ve artrit, diyabet ve uveoretinit deneysel modellerinde (yukarıda olduğu üzere Anderton and Wraith (1998)'de incelenmiştir) hastalığın inhibe edilmesine yönelik etkili bir araç olarak gösterilmiştir. Bu aynı zamanda, EAE'de (yukarıda olduğu üzere Anderton and Wraith (1998)) devam eden bir hastalığın tedavi edilmesine yönelik bir araç olarak gösterilmiştir.

35

Tolerojenik peptitlerin hastalığı tedavi etmek veya önlemek üzere kullanımı, önemli ölçüde ilgi çekmiştir. Buna yönelik bir neden, bazı tolerojenik epitopların, aynı doku içinde ayrı antijenlere yönelik T hücrelerini azaltarak regüle edebildiğinin

gösterilmesidir. “Seyirci supresyonu” olarak bilinen bu fenomen, verilen bir antijen içinde birden fazla epitopa (tercih edildiği üzere tüm epitoplar) ve verilen bir hastalığa yönelik birden fazla antijene, özel bir tolerojenik peptit (yukarıda olduğu üzere Anderton and Wraith (1998)) kullanılarak tolerans indüklemenin mümkün olması gerektiği anlamına gelir. Bu, özel bir hastalık içindeki patojenik antijenlerinin tümünün tanımlanmasına yönelik ihtiyacı gereksiz kılar.

Peptitler aynı zamanda, nispeten düşük maliyetleri ve peptit analoglarının değiştirilmiş immünolojik özellikler ile üretilmesinden dolayı terapiye yönelik faydalı bir seçenektir. Peptitler dolayısıyla, MHC veya TCR ile etkileşimlerini değiştirmek üzere modifiye edilebilir.

Bu yaklaşım ile olası bir problem, T hücre epitopları olarak görev gören tüm peptitlerin tolerans indükleyemediğinin gösterilmesidir. Miyelin temel protein (MBP) peptiti (89-101), immünizasyondan sonra bir immünodominant antijendir ve aynı zamanda T hücre reaktivitesi ve EAE'nin indüksiyonuna yönelik hazırlama ile ilgili olarak oldukça etkili bir immünojeniktir. Bununla birlikte, bu peptitin solüsyonda uygulanması durumunda tolerans indüklemeye etkisiz olduğu gösterilmiştir (yukarıda olduğu üzere Anderton and Wraith (1998)).

Toleransı indüklemek üzere T hücre epitoplarının kabiliyetinde gözlemlenen hiyerarşiye yönelik birçok açıklama sunulmuştur (yukarıda olduğu üzere Anderton and Wraith (1998)'de incelenmiştir). Özellikle, MHC'ye yönelik peptitin afinitesi ile tolerojenisite arasında bir korelasyon bulunduğu (yukarıda olduğu üzere Liu and Wraith (1995)), ancak bunun gözlemlenmelerden bazıları ile uymadığı sunulmuştur. Örneğin, tolerojenik olmayan MBP [89-101], nispeten yüksek afinite ile I-A^Se bağlanır. Dolayısıyla, hangi peptitlerin toleransı indükleyeceğini öngörmek kolay değildir.

Mevcut buluşçular, bir peptit epitopunun antijen prosesi olmaksızın immatür APC tarafından sunulacak uygun bir boyuta sahip olması halinde, bu, immünolojik toleransı indükleyebilir (Uluslararası patent başvuru numarası PCT/GB01/03702). Bazı T hücre epitoplarının tolerojenik olduğu ve diğerlerinin tolerans indükleyemediğine dair gözlemler, bu nedenle bazı epitopların, bir MHC molekülü tarafından sunulabilmelerinden önce antijen proses gerektirmesi ile açıklanabilir. Ayrıca proses gerektiren bu epitoplar, adjuvan ile kombinasyon halinde enjekte edildiğinde hastalığı

indüklemek üzere kapasitelerine rağmen, çözünebilir bir formda uygulandığında tolerans indüklemeyebilir.

Ayrıca proses gerektirmeyen epitoplar, tolerans indükleyebilir ve buluşçular tarafından “apitoplar” (Antijen Prosesine Bağımsız epiTOPLAR) olarak belirlenmiştir.

5

Antijen prosese Bağımsız Sunum Sistemleri (APIPS)

Mevcut buluşun peptitleri bir MHC moleküle *in vitro* bağlanabilir ve antijen prosesi olmaksızın bir T hücreye sunulabilir.

10

Bir peptitin, bir “proses içermeyen” sistem kullanılarak bir MHC moleküle antijen prosesi olmaksızın bağlanabilip bağlanamadığını test etmek mümkündür. Bu tür bir sistem, T hücrelerine MHC molekülleri vasıtasıyla antijen sunabilmelidir, ancak antijeni işleyememelidir. Dolayısıyla peptitler, bir antijen prosese bağımsız sunum sistemi (APIPS) kullanılarak bir MHC moleküle *in vitro* bağlanabilme ve antijen prosesi olmaksızın bir T hücreye sunulabilme kapasitelerine yönelik test edilebilir.

15

APIPS örnekleri, aşağıdaki unsurları içerir:

- a) sabit APC (CD28'e antikorlar ile veya bunlar olmaksızın);
- 20 b) Sınıf I veya II MHC molekülleri içeren lipit membranları (CD28'e antikorlar ile veya bunlar olmaksızın); ve
- c) plaka-bağ formunda saflaştırılmış doğal veya rekombinant MHC (CD28'e antikorlar ile veya bunlar olmaksızın).

- 25 T hücre yanıtlarını araştırmak üzere, örneğin bir polipeptit içinde minimal epitopu araştırmak üzere çalışmalarda, kesilmiş peptitlere yanıtları ölçerek, sabit APC'nin kullanılması bilinir (Fairchild *et al* (1996) Int. Immunol. **8**:1035-1043). APC, örneğin formaldehit (genel olarak paraformaldehit) veya glutaraldehit kullanılarak sabitlenebilir.

- 30 Lipit membranlar (düzlemsel membranlar veya lipozomlar olabilir), yapay lipitler kullanılarak hazırlanabilir veya APC'den plazma membran/mikrosomal fraksiyonlar olabilir.

- 35 Kullanımda, APIPS bir doku kültür plakasının gözlerine uygulanabilir. Peptit antijenleri akabinde eklenir ve APIPS'in MHC parçasına peptitin bağlanması, seçilen T hücre

hatları veya klonlarının eklenmesi yoluyla saptanır. T hücre hattı veya klonunun aktivasyonu, teknikte bilinen yöntemlerden herhangi biri yoluyla, örneğin ^3H -timidin kaynaşması veya sitokin salgılaması vasıtasıyla ölçülebilir.

- 5 Bir peptitin, bir AIPS tarafından bir T hücreye sunulabilmesi halinde, akabinde bu, antijen prosesi olmaksızın MHC molekülüne bağlanabilir ve bir apitoptur.

Tolerans

- 10 Mevcut buluşun peptitleri, proteolipit proteine toleransı indükleyebilir.

Burada kullanıldığı üzere, "tolerojenik", toleransı indükleyebilme anlamına gelir.

- 15 Tolerans, bir antijene yanıt vermedeki başarısızlıktır. Öz antijenlere tolerans, immün sisteminin oldukça önemli bir özelliğidir, bunun kaybedilmesi durumunda, otoimmün hastalıklar ortaya çıkabilir. Adapte edilebilen immün sistemi, kendi dokuları içinde bulunan öz antijenlerin otoimmün atakları önlenirken, oldukça çok çeşitli bulaşıcı ajanlara yanıt verme kapasitesini sürdürmelidir. Bu, timüs (merkezi tolerans) içinde apoptotik hücre ölümüne immatür T lenfositlerin hassasiyeti tarafından geniş kapsamda
- 20 kontrol edilir. Bununla birlikte, timüs içinde tüm öz antijenler saptanmamıştır, böylece kendiliğinden reaktif timositlerin ölümü, tamamlanmamış halde kalır. Dolayısıyla aynı zamanda bu ile toleransın, periferel dokular (periferel tolerans) içinde matür kendiliğinden reaktif T lenfositleri tarafından elde edilebildiği mekanizmalar bulunur. Merkezi ve periferel toleransın mekanizmalarının bir incelemesi, Anderton *et al* (1999)
- 25 (*Immunological Reviews* **169**:123-137)'de verilir.

- Tolerans, CD4+ T hücrelerinin en az bir parçasında anerjinin indüksiyonundan ortaya çıkabilir veya bu ile karakterize edilebilir. Bir T hücreyi aktive etmek amacıyla, bir peptitin T hücrelere iki sinyal dağıtabilen bir "profesyonel" APC ile ilişkilmesi
- 30 gereklidir. Birinci sinyal (sinyal (1)), APC'nin hücre yüzeyi üzerinde MHC-peptit kompleksi ile dağıtılır ve TCR vasıtasıyla T hücre tarafından alınır. İkinci sinyal (sinyal (2)) CD80 ve CD86 gibi APC'nin yüzeyi üzerindeki kostimülatör moleküller ile dağıtılır ve T hücrenin yüzeyi üzerinde CD28 tarafından alınır. Bir T hücrenin, sinyalin (2) yokluğunda sinyali (1) alması durumunda, aktive edilmediği ve anerjik hale geldiği
- 35 düşünülür. Anerjik T hücreleri, sonraki antijenik yüklemeye dayanıklıdır ve diğer immün

yanıtları bastırabilir. Anergik T hücrelerinin, T hücre toleransına aracılık etmek ile ilgisi olduğuna inanılır.

5 MHC moleküller ile bağlantılı olarak sunulabilmelerinden önce proses gerektiren peptitler, matür antijen sunan hücreler tarafından idare edilmelerinin gerekli olmasından dolayı tolerans indüklemeyebilir. Matür antijen sunan hücreler (makrofajlar, B hücreler ve dendritik hücreler gibi), antijeni işleyebilir, ancak aynı zamanda T hücre aktivasyonuna yol açaran bir T hücreye sinyalleri ((1) ve (2)) dağıtabilir. Apitoplar diğer yandan immatür APC üzerinde sınıf II MHC'yi bağlayabilecektir. Dolayısıyla, bunlar, T hücre 10 anejisi ve toleransına yol açarak, kostimülasyon olmaksızın T hücrelerine sunulacaktır.

Apitoplar aynı zamanda matür APC'nin hücre yüzeyinde MHC molekülleri bağlayabilir. Bununla birlikte, immün sistemi, matür APC'den oldukça daha çok immatür içerir (dendritik hücrelerin %10'dan azının aktive edildiği önerilmiştir, Summers et al. (2001) 15 Am. J. Pathol. **159**: 285-295). Bir apitopa varsayılan pozisyon bu nedenle aktivasyon yerine, anejisi/tolerans olacaktır.

Tolerans indüklendiğinde, antijen spesifik CD4+ T hücrelerinin hızla çoğalma kapasitesinin azaltıldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, bu hücreler tarafından IL-2, IFN-γ 20 ve IL-4 üretimi azaltılarak regüle edilir, ancak IL-10 üretimi artırılır. Peptit indüklü tolerans halinde farelerdeki IL-10 nötralizasyonu, hastalığa yönelik duyarlılığı tamamen eski haline getirdiği gösterilmiştir. Regülatör hücrelerin popülasyonunun, IL-10 üreten ve immün regülasyona aracılık eden toleranslı halde devam ettiği önerilmiştir (Burkhart et al (1999) Int. Immunol. **11**:1625-1634).

25

Toleransın indüksiyonu bu nedenle, aşağıdakiler dahil olmak üzere çeşitli teknikler yoluyla izlenebilir:

- (a) buna yönelik peptidin *in vivo* bir hedef epitopu olduğu hastalığa temas etmek üzere azaltılmış duyarlılık;
- 30 (b) CD4+ T hücrelerinde anejinin indüksiyonu (antijen ile sonraki yükleme ile *in vitro* saptanabilir olmalıdır);
- (c) aşağıdakiler dahil olmak üzere, CD4+ T hücre popülasyonunda değişimler
 - (i) poliferasyonda indirgeme;
 - (ii) örneğin, IL-2, IFN-γ ve IL-4 üretiminde azalarak regülasyon; ve
 - 35 (iii) IL-10 üretiminde artıştır..

Hedef hastalıklar

Buluşun peptiti bir hastalığın tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanılabilir.

- 5 Hastalık, adrenolökodistrofi, kaybolan ak madde hatsalığı veya multipl skleroz (MS) gibi bir demiyelinizan hastalık olabilir.

- 10 Mevcut buluşun peptiti özellikle multipl sklerozun (MS) tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanışlıdır. Multipl skleroz (MS) CNS ak madde boyunca yayılan ve çeşitli yerlerde ve zamanlarda meydana gelen multipl demiyelinizan lezyonlar ile karakterize edilen kronik bir inflamatuvar hastalıktır (McFarlin and McFarland, 1982 New England J. Medicine 307:1183-1188 and 1246-1251). MS'in otoreaktif T hücreler ile aracılık edildiği düşünülür.

15 Farmasötik bileşim

Bir ikinci açıda, mevcut buluş, buluşun birinci açısının bir veya daha fazla peptit(ler) içeren bir farmasötik bileşimi ile ilgilidir.

- 20 Mevcut buluşçular, “seyirci bastırmaya” rağmen, toleransın etkili bir şekilde indüklenmesi amacıyla birçok farklı T hücre klonunun hedeflenmesi gerekli olabilir. Dolayısıyla, birçok peptit, bir hastalığı önlemek veya tedavi etmek amacıyla bir bireye uygulanabilir.
- 25 Farmasötik bileşim, örneğin 1 ile 20 arasında apitop, örneğin 1 ila 15, 2 ila 8 veya 4 ila 6 apitop içerebilir.

- İki veya daha fazla apitop bulunduğunda, farmasötik bileşim bir kit formunda olabilir, burada apitopların bazıları veya her biri, eş zamanlı, ayrı veya dizisel uygulamaya yönelik ayrı olarak sağlanır.
- 30

Alternatif olarak (veya ilave olarak) farmasötik bileşimin (veya bunun herhangi bir bölümünün) çoklu dozda uygulanacak olması halinde, her bir doz ayrı olarak paketlenilebilir.

Farmasötik bileşim apitopun veya bunun her birinin terapötik olarak veya profilaktik olarak etkili bir miktarını ve isteğe bağlı olarak farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, seyrelti veya ekşiyan içerebilir.

- 5 Aynı zamanda, mevcut buluşun farmasötik bileşiminde, apitop veya bunun her biri, herhangi bir uygun bağlayıcı(lar), yağlayıcı(lar), süspanse ajanı(ları), kaplama ajanı(ları) veya çözünme ajanı(ları) ile karıştırılabilir.

Uygulama

10

Peptit, adjuvanın yokluğunda çözünebilir formda uygulanabilir.

Peptit, bir mukozal, subkütanöz veya intradermal yol ile intranazal olarak uygulanabilir.

- 15 Çalışmalar, intraperitoneal olarak (i.p.), intravenöz olarak (i.v.) veya intranazal olarak (i.n.) veya oral olarak çözünebilir formda verildiğinde peptitin, T hücre toleransı indükleyebildiğini göstermiştir (Anderton and Wraith (1998); yukarıda olduğu üzere Liu and Wraith (1995); Metzler and Wraith (1999) Immunology 97:257-263).
- 20 Farelerdeki çalışmalar, tolerans indüklemek üzere gerekli olan peptit uygulamasının süresinin, alıcıdaki T hücrelerin öncül frekansına bağlı olduğunu göstermiştir (yukarıda olduğu üzere Burkhart et al (1999)). Birçok deney çalışmasında, peptitin tekrarlanan dozlarının, toleransı indüklemek üzere gerekli olduğu gösterilmiştir (yukarıda olduğu üzere Burkhart et al (1999)). Peptitin tam dozu ve dozlarının sayısı bu nedenle bireye
- 25 bağlı olacaktır; bununla birlikte, tercih edilen bir düzenleme, birçok doz uygulanır.

- 30 Birçok peptitin eş zamanlı olarak uygulanması halinde, bunlar, tekli veya çoklu dozlarda uygulamaya yönelik uygun olan bir "kokteyl" formunda olabilir. Alternatif olarak, çoklu dozların verilmesi ancak dozlar arasındaki peptitlerin nispi konsantrasyonlarının değiştirilmesi tercih edilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, bir "doz eskalasyonu" protokolüne uygulanabilir, burada birçok doz, asendan konsantrasyonlarda hastaya verilir. Bu tür bir yaklaşım, örneğin bal zehiri alerjisine karşı immünoterapötik uygulamalarda fosfolipaz A2 peptitlere yönelik

kullanılmıştır (Müller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 ve Akdis et al (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

ÖRNEKLER

5

Aşağıdaki örnekler, mevcut buluşu göstermek üzere işlev görür, ancak bunun bir sınırlandırılması olarak yorumlanmamalıdır. Buluş özel olarak, bu örneklerde açıklanan spesifik düzenlemeler ile ilgilidir

10 ÖRNEK 1 - Proteolipit protein (PLP) dizisinin hidrofilik kısımlarının araştırması

Materyaller ve Yöntemler

Antijenler

15

PLP'nin geniş ölçüde bir hidrofobik protein olmasından dolayı, dizinin hidrofilik kısımlarının kullanılması gerekli olmuştur. Bu amaca yönelik, hidropatisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve sekiz peptit, aşağıdaki gibi, PLP molekülünün hidrofilik domenlerinden sentezlenmiştir:

- 20 36-61 (26mer): **HEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLI-NH₂**
 88-119 (32mer): **EGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSATVTGG-NH₂**
 104-135 (32mer): **KTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSLE-NH₂**
 119-150 (32mer): **GQKGRGSRGQHQAHSLE RVCHCLGKWLGHPDK-NH₂**
 179-206 (28mer): **TWTT CQSI AFPSKTSASIGSLCADARMY-NH₂**
 25 192-219 (28mer): **TSASIGSLCADARMYGVLPWNAFP GKVC-NH₂**
 207-234 (28mer): **GVLPWNAFP GKVC GSNLLSICKTAEFQM-NH₂**
 260-276 (17mer): **ATYNFAVLKLMGRGTKF-NH₂**

Her bir peptite yönelik, *in silico* çalışmalar DR2 (HLA-DRB1*1501) bağlama kapasitesini tahmin etmek üzere gerçekleştirilmiştir ve *in vitro* (proliferasyon deneyi) ve *in vivo* (EAE indüksiyonu) çalışmaları, yanıtı araştırmak üzere gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 1'de gösterilir.

Üç peptit *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda yanıt verdiği gösterilmiştir ve bu, DR2 bağlama tahmini ile ilişkilendirilmiştir. Bu peptitler, HEAL-26, TWTT-28 ve GVLP-28'dir (peptiti

35

tanımlamak üzere yukarıdaki dizilerde koyu olarak gösterilen ilk dört amino asit kullanılmıştır).

Örnek 2 - HEAL-26 içinde Apitopların Tanımlanması

5

HEAL-26'yı kapsayan 15-mer örtüşen peptitlerin bir paneli, standart F-moc kimyası kullanılarak sentezlenmiştir. Her bir peptit, aşağıdaki gösterildiği üzere, 1 amino asit ile yerinden çıkarılmıştır.

HEAL-26 peptit	Dizi
POP-1	HEAL T GTEKLIET Y F
POP-2	EAL T GTEKLIET Y FS
POP-3	AL T GTEKLIET Y FSK
POP-4	LT G TEKLIET Y FSKN
POP-5	T G TEKLIET Y FSKN Y
POP-6	G T EKLIET Y FSKN Y Q
POP-7	TE K LIET Y FSKN Y QD
POP-8	E K LIET Y FSKN Y QD Y
POP-9	K L IET Y FSKN Y QD Y E
POP-10	L I ET Y FSKN Y QD Y E Y
POP-11	I E TYFSKN Y QD Y E Y L
POP-12	E T YFSKN Y QD Y E Y L I

10

Peptitler, DR2 farelerinden HEAL-26 spesifik hibridomlar kullanılarak analiz edilmiştir. Bu peptitlerden, POP-4, POP-7 ve POP-8 apitop olarak tanımlanmıştır.

Örnek 3 - TWTT-28 içinde Apitopların Tanımlanması

15

TWTT-28'yı kapsayan 15-mer örtüşen peptitlerin bir paneli, standart F-moc kimyası kullanılarak sentezlenmiştir. Her bir peptit, 1 amino asit ile yerinden çıkarılmıştır. Peptitler, DR2 farelerinden TWTT-28 spesifik hibridomlar kullanılarak analiz edilmiştir.

Aşağıdaki diziye sahip olan, POP-14 ila POP-18 peptitler, apitop olarak tanımlanmıştır:

TWTT-28 peptitler	Dizi
POP-14	WTTCQSIAFPSKTS
POP-15	TTCQSIAFPSKTSAS
POP-16	TCQSIAFPSKTSASI
POP-17	CQSIAFPSKTSASIG
POP-18	QSIAFPSKTSASIGS

5 Örnek 4 - GVLP-28 içinde Apitopların Tanımlanması

GVLP-28'yi kapsayan 15-mer örtüşen peptitlerin bir paneli, standart F-moc kimyası kullanılarak sentezlenmiştir. Her bir peptit, 1 amino asit ile yerinden çıkarılmıştır. Peptitler, DR2 farelerinden TWTT-28 spesifik hibridomlar kullanılarak analiz edilmiştir.

10

Aşağıdaki diziye sahip, peptit POP-22 bir apitop olarak tanımlanmıştır: VLPWNAFPKGVCGSN.

ÖRNEK 5 - *Ex vivo* tolerans deneyi

15

Toleransı indüklemek üzere apitopların kabiliyetini değerlendirmek amacıyla, buluşçular ilk olarak bir immün yanıtını *ex vivo* indüklemek üzere bu apitopların kabiliyetini belirlemiştir. Bu amaca yönelik, HLA-DRB1*1501 fareleri, ayrı bir apitopun bir doz eskalasyonu ile önceden muamele edilmiştir ve akabinde karşılık gelen uzun peptit ile hazırlanmıştır. Hazırlamadan 10 gün sonra, splenositler (SPL) ve lenf düğüm hücreleri (LNC) kültürlenmiştir ve ³H-timidin kaynaşması ile bunların proliferasyonunu ve multipleks sitokin profil sistemleri ile sitokin üretimini değerlendirmek üzere 3 gün boyunca karşılık gelen uzun peptit ile stimüle edilmiştir (Şekil 5).

20

25

Tolerizasyon çalışması, POP-4 ön muamelesinin, lenf düğümü (Şekil 6) ve dalakta (Şekil 7) T hücre proliferasyonunun inhibisyonunu ve Th1/Th17 sitokin üretiminin bastırılmasını (IFN- γ , TNF- α ve IL-17'nin önemli düşüşü) indüklediğini gösterir. HEAL-

26 (Şekil 6 ve 7) poliferasyonu düşürür ve SPL ve LNC'de IL-17 üretimini düşürür. Ancak, fareler HEAL-26 ile önceden muamele edildiğinde Th1/Th17 sitokinden Th2 sitokine bir değişim gösteren IL-5'te bir artış aynı zamanda gözlemlenir.

- 5 POP-15 ve TWTT-28, SPL ve LNC'nin proliferasyonunu ve sitokin üretimini oldukça iyi şekilde inhibe eder. POP-15'e yönelik, splenositlere yönelik proliferasyonda sıfır farklılık bulunur, ancak sitokin üretiminde az miktarda değişiklikler bulunur. POP-15 ile muamele edilen fareler, daha az IFN- γ (statik olarak önemli), daha az GM-CSF ve daha az IL-17 üretir. İlâveten, fareler POP-15 ile muamele edildiğinde, LNC içinde
- 10 proliferasyon ve sitokinlerin (IFN- γ , GM-CSF ve IL-17) önemli bir inhibisyonu bulunur.

- POP-22'e yönelik, sonuçlar, PBS farelerin oldukça düşük bir yanıtından dolayı, daha az belirgindir. Bununla birlikte, POP-22 ve GVLP-28 ile bir ön muamelenin bir etkisinin gözlemlenmesi mümkündür. Stimülasyon indeksi, POP-22 (Şekil 12 ve 14) ve GVLP-
- 15 28 (Şekil 14) ile LNC proliferasyonunda bir düşüş gösterir. Bu hücreler ile IL-17 üretiminin önemli bir inhibisyonu, fareler Pop-22 veya GVLP-28 ile önceden muamele edildiğinde aynı zamanda gözlemlenir.

Materyal ve Yöntemler

20

Fareler

- HLA-DRB1*1501 fareleri (DR2 fareleri) Lars Fugger (LS Madsen *et al.* A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. Nature genet
- 25 1999. 23, 343-347) tarafından elde edilmiştir ve Ab⁰ farelere melezlenmiştir. Ortaya çıkan DR2 fareleri, HLA-DRB1*1501 molekülü ifade eder ancak fare MHC molekülünü etmez.

Peptitler

30

Uzun peptitler ve 15-mer peptitleri GL Biochem Ltd (Şangay, Çin) tarafından sentezlenmiştir ve -80°C'de dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) içinde depolanmıştır.

- 35 **HLA-DRB1*1501'e bağlanan peptitlerin araştırması**

NetMHCII 2.2 Sunucusu

NetMHCII 2.2 sunucusu, yapay nöron ağları kullanılarak peptitlerin HLA-DRB1*1501'e bağlanmasını tahmin eder. Tahmin değerleri, nM IC50 değerlerinde verilir. Güçlü ve zayıf bağlama peptitleri, çıktıda belirtilir. Yüksek afinite bağlama peptitleri, 50 nM'den az bir IC50 değerine sahiptir ve zayıf bağlama peptitleri, 500 nM'den az bir IC50 değerine sahiptir. Sonuç, bu şekilde hesaplanan tahmin skoru olarak gösterilir: $1 - \log_{10}(\text{IC}_{50})$. Web sitesi adresi: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII>.

10 İmmün Epitop Veritabanı (IEDB): konsensüs yöntemi

Her bir peptite yönelik, dört yöntemin (ARB, kombinatorial kütüphane, SMM_align ve Sturniolo) her birine yönelik bir sınıflama yüzdesi, peptitin skorunun, SWISSPROT veritabanından seçilen beş milyon rastgele 15 merin skorları ile kıyaslanarak oluşturulmuştur. Küçük sayılı bir sınıflama yüzdesi, yüksek afiniteyi belirtir. Dört yöntemin medyan sınıflama yüzdesi akabinde konsensüs yöntemine yönelik sınıflamayı oluşturmak üzere kullanılmıştır. Web sitesi adresi: http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html.

20 Uzun peptitlerin immünojenisitesinin belirlenmesi

Hazırlama ve EAE (Deneysel otoimmün ensefalomyelit)

HLA-DRB1*1501 transjenik fareler, kuyruğun tabanında sunkütanöz olarak PBS (Lonza, Verviers, Belçika) içinde 100 µg uzun peptit veya sadece PBS içeren 100 µl ile ve 4 mg/ml Mikobakterium tüberküloz (MTb, BD Difco, Oxford, BK) ile Tam Freund Adjuvan (CFA; BD Difco, Oxford, BK) ile enjekte edilmiştir. EAE çalışmasına yönelik, fareler hazırlama ile aynı zamanda ve 2 gün sonra 200ng boğmaca toksini ile enjekte edilmiştir. Fareler akabinde, her gün hastalığa yönelik takip edilmiştir, tartılmıştır ve skorlanmıştır.

Hücre kültürü

10. günde, drenaj lenfi düğümü ve dalak çıkarılmıştır ve splenositler ve lenf düğümü hücreleri izole edilmiştir ve 96 gözlü düz tabanlı plakalarda X-vivo 15 ortamında

(glutamin, penisilin ve steptomisin ile takviyelendirilmiştir; Lonza, Verviers, Belçika) kültürlenmiştir. 200 µl/göz içinde 0.5×10^6 hücre/göz profilasyon deneyine yönelik farklı peptit konsantrasyonları ile kültürlenmiştir.

5 ***Proliferasyon deneyi ve sitokin analizi***

Kültür içinde 3 günden sonra, 60 µl üst faz hasat edilmiştir (hücreleri bozmaksızın) ve dondurulmuştur. 20 µCi/ml ön seyreltinin (5 mCi stoğu; PerkinElmer, Waltham, MA) 25 µl/göz tridiye timidini, 0.5 µCi/gözlük bir nihai konsantrasyon için hücrelere eklenmiştir.

- 10 Hücreler, 37°C'de inkübe edilmiştir. 18 saatten sonra, plakalar dondurulmuştur. Akabinde erimiş plakalar hasat edilmiştir ve β-sayaç ile okunmuştur (Wallac 1450 MicroBeta TriLux Sıvı Sintilasyon Sayacı). Üst faz akabinde Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex (Bender) fare ile analiz edilmiştir.

15 **T hücre klonlarının oluşumu**

Hazırlama ve T hücre hattı kurulumu:

0. günde, beş HLA-DRB1*1501 transjenik fare, kuyruk tabanında 4 mg/ml
- 20 Mikobakterium tüberküloz ile CFA'da 100 µg uzun peptit ile enjekte edilmiştir. Bir PBS hazırlanmış kontrol grubu, hazırlamaya yönelik kontrol olarak kullanılmıştır. 10. günde, drenaj lenf düğümleri ve dalaklar çıkarılmıştır ve splenositler ve lenf düğüm hücreleri izole edilmiştir. Splenositler ve lenf düğüm hücreleri karıştırılmıştır ve CD4 T hücreleri, negatif saflaştırma kiti (dokunulmamış CD4 T hücreleri; Miltenyi, Bergisch Gladbach,
- 25 Almanya) kullanılarak saflaştırılmıştır. CD4 T hücreleri akabinde yaklaşık olarak 5×10^6 hücre/ml'de 1:1'lik bir oranda HLA-DRB1*1501 farelerinden APC (Antijen sunan hücreler) olarak ışına maruz kalmış splenositler (3000 rad) ile ve bir 6 gözlü plaka içinde 10 µg/ml'de bir uzun peptit ile yeniden stimüle edilmiştir. Stimülasyon, fetal buzağı serumuna (FCS) yönelik spesifik hücrelerin aktive edilmesini önlemek üzere X-
- 30 vivo 15 ortamında yapılmıştır. 4. günde, 20 U/ml rekombinant insan IL-2 (R&D, Mineapolis, MN), hücrelere eklenmiştir. 7. günde, tüm hücreler hasat edilmiştir ve ölü hücreler Ficoll yoğunluk gradyan ayırma (Histopaque 1083, Sigma-Aldrich, St Louis, MA) yoluyla elimine edilmiştir. Hücreler akabinde, 2:1'de APC:CD4 T hücrelerinin bir oranı ile DR2 farelerden ışına maruz kalmış splenositler ile yeniden stimüle edilmiştir.
- 35 Uzun peptit, 10 µg/ml'de kültüre eklenmiştir. Bu defa, RPMI-%5 FCS (Biosera,

Ringmer, BK; hepes, penisilin, streptomisin, glutamin: Lonza; ve β -merkaptotanol: gibco ile takviyelendirilmiştir) kullanılmıştır. 7. günde, hücreler hasat edilmiştir, fikle edilmiştir ve kaynaştırılmıştır.

5 **Kaynaştırma:**

1x10⁷ BW5147 hücreler (Sağlık Koruma Ajansı Kültür Koleksiyonları, Salisbury, BK) ve 1x10⁶ CD4 T hücre hattı birlikte karıştırılmıştır ve sert bir pelete yönelik santrifüj üzerindeki en yüksek kırma ayarı kullanılarak bir 50 ml içinde serum içermeyen ortamda 37°C'de yıkanmıştır. Üst faz dökülmüştür ve fazlalık, bir pipet ile çıkarılmıştır. Hücreler geri kalan ortamın düşmesi amacıyla 5 dakika boyunca bir su banyosu içinde bırakılmıştır ve akabinde bir pipet ile çıkarılmıştır. Hücre peleti yavaş ancak derinlemesine şekilde yeniden süspanse edilmiştir. Akabinde, 1 ml 37°C PEG (polietilen glikol, %40-50 solüsyon, Sigma-Aldrich, St Louis, MA), hücreler kapak içindeki bir mini su banyosu içinde tutularak 45 saniye boyunca eklenmiştir. Hücreler, 45 saniye boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. 1 ml 37°C serum içermeyen ortam, tüp girdap yapılarak döndürülürken, 30 saniye boyunca eklenmiştir, akabinde 2 ml aynı şekilde eklenmiştir ve akabinde 3, 4, 10 ve 30 ml ayrıca yukarıda olduğu üzere eklenmiştir. Tüp oldukça yavaş şekilde ters çevrilmiştir ve 5 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler, akabinde ara verilmeksizin, oda sıcaklığında (RT) 1300 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Üst faz dikkatli şekilde bir pipet ile çıkarılmıştır (yaklaşık olarak 1 ml pelet üzerinde bırakılmıştır). 50 ml oda sıcaklığında serum içermeyen ortam, hücre peleti yerinden oynatılmaksızın eklenmiştir. Hücreler yukarıda olduğu üzere santrifüjlenmiştir ve yıkama, tam ortam ile tekrar edilmiştir. Akabinde hücreler 50 ml oda sıcaklığında tam ortam %10-FCS içinde yeniden süspanse edilmiştir ve dört 96 gözlü düz tabanlı plakalar (100 μ l /göz) içinde kaplanmıştır. 38 ml tam RPMI-%10 FCS akabinde tüpe eklenmiştir ve önceki adım, 37°C'de inkübe edilmiş 3 dizi seyrelti (toplamda 12 plaka) ile iki defa sonuna kadar tekrar edilmiştir. 48 saatten sonra, 100 μ l 2x HAT (Hipoksantin-aminopterin-timidin, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) ortamı her bir göze eklenmiştir. 6. gün ile hibridomlar görünmeye başlamıştır. Klonlar, stabil olana kadar HAT 1X ortamında muhafaza edilmiştir, akabinde 2-3 hafta boyunca HT (Hipoksantin-timidin Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) ortamı içine ve akabinde tam RPMI içine çekilmiştir. Klonlar, dengesiz (%90 FCS+%10DMSO) hale dönüşebilmelerinden dolayı düzenli olarak dondurulmuştur.

Klonların antijen-spesifikliğinin değerlendirilmesi

100 µl hibridom hücreleri düz tabanlı bir 96 göz plakanın gözleri içinde 5×10^4 MGAR hücreleri (HLA-DRB1*1501 ifade eden insan hücre hattı, Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, BK) ile kültürlenmiştir. 10 µg/ml'de bir uzun peptit içeren 50 µl tam RPMI-%10FCS veya DMSO'nun (peptitin seyreltisi) aynı hacmi gözlerle eklenmiştir. 48 saatten sonra, 120 µl üst faz çıkarılmıştır ve bir IL-2 ELISA (Enzyme bağlı immünosorbent analiz) fare gerçekleştirilmiştir. IL-2 oluşturan klonlar kullanılan antijeni tanımıştır. Geri kalan üst fazlar -20°C'de dondurulmuştur.

IL-2 ELISA

96 gözlü plakalar (Immunosorb 96 göz, Nunc, Roskilde, Danimarka) 50µl/göz saflaştırılmış sıçan anti-fare IL-2 yakalama Ab (BD Biosciences, Oxford, BK) ile kaplanmıştır, karbonat tamponu içinde 1:250 (3.56g Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA), 8.4g NaHCO₃ (Fisher Scientific, Loughborough, BK), 1L elgastat suyu; pH 9.5) seyreltilmiştir ve 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. PBS-Tween (1L 10x PBS, 9L distile su, 0.5 ml Tween (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA)) içinde 2 yıkamadan sonra, 200µl/göz PBS-%10 FCS eklenmiştir ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS-Tween içinde 3 yıkamadan sonra, 50 µl üst faz veya IL-2 standart (BD Biosciences, Oxford, BK) seyreltiler (PBS-%10 FCS içinde) gözler içine eklenmiştir ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS-Tween (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) içinde 4 yıkamadan sonra, %10 FCS/PBS içinde 1:1000 seyreltilmiş 50µl/göz biyotin sıçan anti-fare IL2 (BD Biosciences, Oxford, BK) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. 4 yıkamadan sonra, PBS içinde 1:1000 seyreltilmiş 50µl/göz ekstravidin peroksidaz (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA) eklenmiştir ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 4 yıkamadan sonra, 50µl/göz sübstrat solüsyonu* eklenmiştir ve belirgin bir renk değişimi görülene kadar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Reaksiyon 50µl/göz 2M H₂SO₄ (BDH, Poole, BK) kullanılarak durdurulmuştur ve plakalar bir ELISA okuyucu (SpectraMax Pro, Moleküler Cihaz, Sunnyvale, CA) ile 450 nm'de (referans 550nm) okunmuştur. *Sübstrat solüsyonu: 10 ml fosfat-sitrat tamponu 0.1M (5.14 ml 0.2M Na₂HPO₄ (BDH, Poole, BK), 4.86 ml 0.1M sitrat (Sigma), 10 ml elgastat suyu), 0.1 ml TMB (10mg/ml'de DMSO içinde ergime 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA), 6 µl hidrojen peroksit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA).

Antijen prosese bağımsız sunum sistemi

Spesifik klonlar akabinde, sabit veya sabit olmayan MGAR hücreleri ile 15-mer peptitlere (POP-1 ila POP-12) yanıtlarına yönelik test edilmiştir. Bu amaca yönelik, ayrı klonlardan 1×10^5 hücreler 96 gözlü düz tabanlı bir plaka içinde 5×10^4 sabit veya taze MGAR hücreler ile kültürlenir. MGAR hücre sabitlenmesine yönelik, 20×10^6 MGAR hücreler oda sıcaklığında 6 ml Paraformaldehit (PFA, BDH, Poole, BK) %0.5 (pH7) ile 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir ve akabinde 0.4M'de 6 ml Glisin (Fisher Scientific, Loughborough, BK) reaksiyonu durdurmak üzere eklenmiştir. Hücreler akabinde yıkanmıştır ve RPMI-%10FCS içinde yeniden süspanse edilmiştir. RPMI-%10FCS içinde seyreltmiş her bir 15-mer peptitin $10 \mu\text{g/ml}$ 'si ayrı gözlere eklenmiştir. Peptit yerine DMSO içeren bir göz, bir negatif kontrol olarak her bir klona yönelik kullanılmıştır ve uzun peptit içeren bir göz, bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kültür içinde 48 saatten sonra, $120 \mu\text{l}$ üst faz hasat edilmiştir ve IL-2 üretimini değerlendirmek üzere ELISA yoluyla analiz edilmiştir.

Apitop muamelesi ile tolerans indüksiyonu

HLA-DRB1*1501 transjenik fareler -15, -13, -11, -8, -6, -4. günde, apitopun bir doz eskalasyonu (0.1, 1, 10 ve 3 defa $100 \mu\text{g}$) veya $100 \mu\text{l}$ PBS ile önceden muamele edilmiştir. 0. günde, fareler, kuyruk tabanında 4 mg/ml Mikobakterium tüberküloz ile CFA'da $100 \mu\text{g}$ uzun peptit ile hazırlanmıştır. 10 günden sonra, inguinal lenf düğümleri ve dalak hasat edilmiştir. LNC ile proliferasyon ve sitokin üretimi ve splenositler akabinde yukarıda açıklandığı üzere analiz edilmiştir.

Buluşun açıklanan yöntemleri ve sisteminin çeşitli modifikasyonları ve varyasyonları, teknikte uzman kişiler tarafından anlaşılabacaktır.

Buluşun tercih edilen spesifik düzenlemeler ile bağlantılı olarak açıklanmış olmasına rağmen, belirtildiği gibi buluşun aşırı derecede bu tür spesifik düzenlemelere sınırlandırılmaması gerektiği anlaşılmalıdır. Kimya veya moleküler biyoloji veya ilgili alanlarda uzman kişilere açık şekilde olan buluşu gerçekleştirmeye yönelik açıklanan modların çeşitli modifikasyonları, mevcut buluş tarafından kapsanmak üzere amaçlanır.

Dizi Listesi

<110> APITOPE INTERNATIONAL NV MERCK SERONO S.A.
 <120> PEPTİT
 5 <130> P044820PCT1
 <150> GB1300683.8
 < 151> 2013-01-15
 <160> 33
 <170> PatentIn versiyon 3.5
 10 <210> 1
 < 211> 26
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 1
 His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser
 1 5 10 15
 Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile
 15 20 25
 <210> 2
 < 211> 28
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 20 <400> 2
 Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr
 20 25
 <210> 3
 < 211> 28
 < 212> PRT
 25 < 213> Homo sapiens
 <400> 3
 Gly Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met
 20 25
 <210> 4

< 211> 19

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 4

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

5 Gln Asp Tyr

<210> 5

< 211> 19

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10 <400> 5

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

Ile Gly Ser

<210> 6

< 211> 15

< 212> PRT

15 < 213> Homo sapiens

<400> 6

Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn
1 5 10 15

<210> 7

< 211> 15

20 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8

25 < 211> 15

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 8

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

30 <210> 9

< 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 9
 5 Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 10
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 10 <400> 10
 Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala
 1 5 10 15
 <210> 11
 < 211> 15
 < 212> PRT
 15 < 213> Homo sapiens
 <400> 11
 Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 12
 < 211> 15
 20 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 12
 Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile
 1 5 10 15
 <210> 13
 25 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 13
 Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 30 <210> 14
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15

< 211> 15

5

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 15

Val	Leu	Pro	Trp	Asn	Ala	Phe	Pro	Gly	Lys	Val	Cys	Gly	Ser	Asn
1				5					10					15

<210> 16

10

< 211> 276

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

His	Gln	Ala	His	Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Cys	His	Cys	Leu	Gly	Lys	Trp
130						135					140				

Leu	Gly	His	Pro	Asp	Lys	Phe	Val	Gly	Ile	Thr	Tyr	Ala	Leu	Thr	Val
145					150				155						160

Val	Trp	Leu	Leu	Val	Phe	Ala	Cys	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Tyr	Ile	Tyr
				165					170					175	

Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr
180 185 190

Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val
195 200 205

Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu
210 215 220

Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile
225 230 235 240

Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr Phe
245 250 255

Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg
260 265 270

Gly Thr Lys Phe
275

<210> 17

< 211> 26

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 17

His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser
1 5 10 15

Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile
20 25

<210> 18

< 211> 32

10 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

<210> 19

15 < 211> 32

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly
1 5 10 15

Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu
20 25 30

<210> 20

< 211> 32

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 20

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

Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys
20 25 30

<210> 21

< 211> 28

10 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 21

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

Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr
20 25

<210> 22

15 < 211> 28

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly
1 5 10 15

Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys
20 25

20 <210> 23

< 211> 28

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 23

Gly Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn

1 5 10 15

Leu Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met
20 25

<210> 24

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

Phe

10 <210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 26

Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

30 <212> PRT

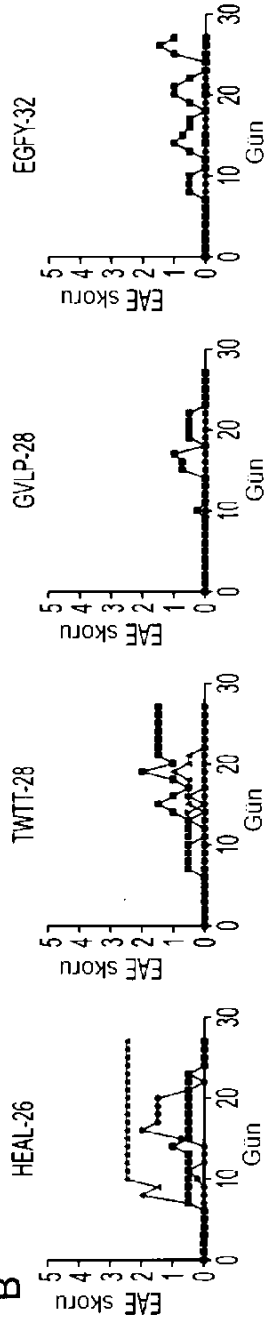
< 213> Homo sapiens
 <400> 28
 Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr
 5 1 5 10 15
 <210> 29
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 10 <400> 29
 Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln
 1 5 10 15
 <210> 30
 < 211> 15
 < 212> PRT
 15 < 213> Homo sapiens
 <400> 30
 Lys Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu
 1 5 10 15
 <210> 31
 < 211> 15
 20 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 31
 Leu Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr
 1 5 10 15
 <210> 32
 25 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 32
 Ile Glu Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu
 1 5 10 15
 30 <210> 33
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens
 <400> 33

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

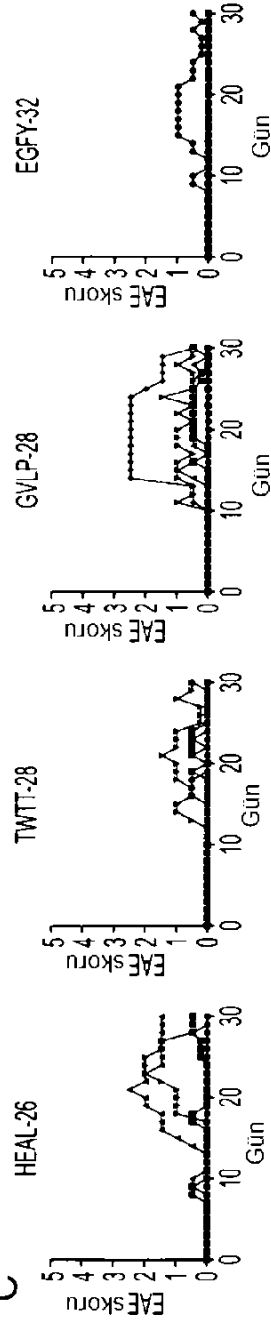
A

	HEAL-26	EGFY-32	KTTI-32	GOKG-32	TWTT-28	TSASI-28	GVLP-28	ATYN-17
NetMHC	+	•	•	+	-	-	-	+
DR2 bağlanma tahmini								
IED8	+	-	-	-	-	-	+	+
DR2 bağlanma tahmini								
Proliferasyon induksiyonu	++++	++	-	•	+++	•	+++	+++

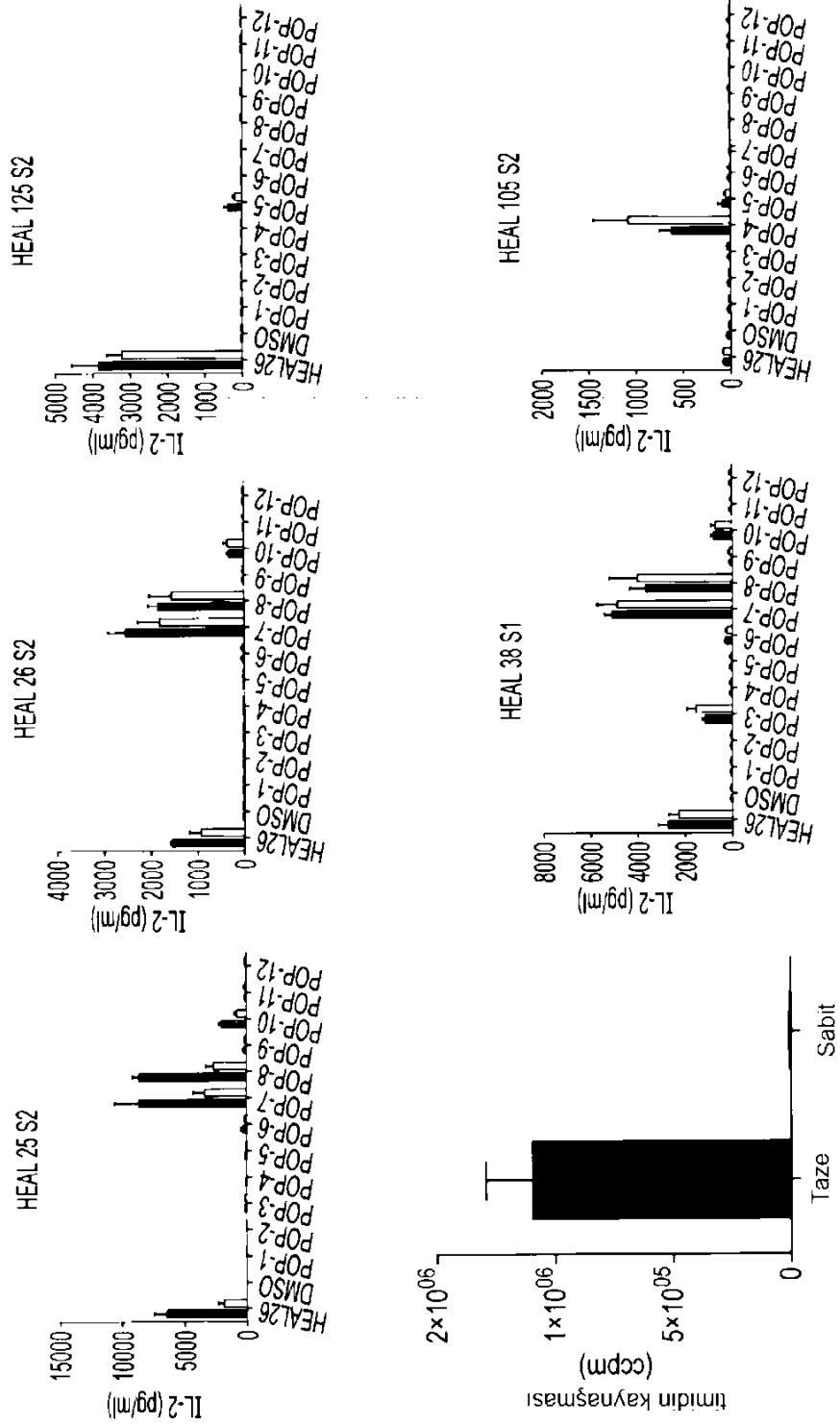
B

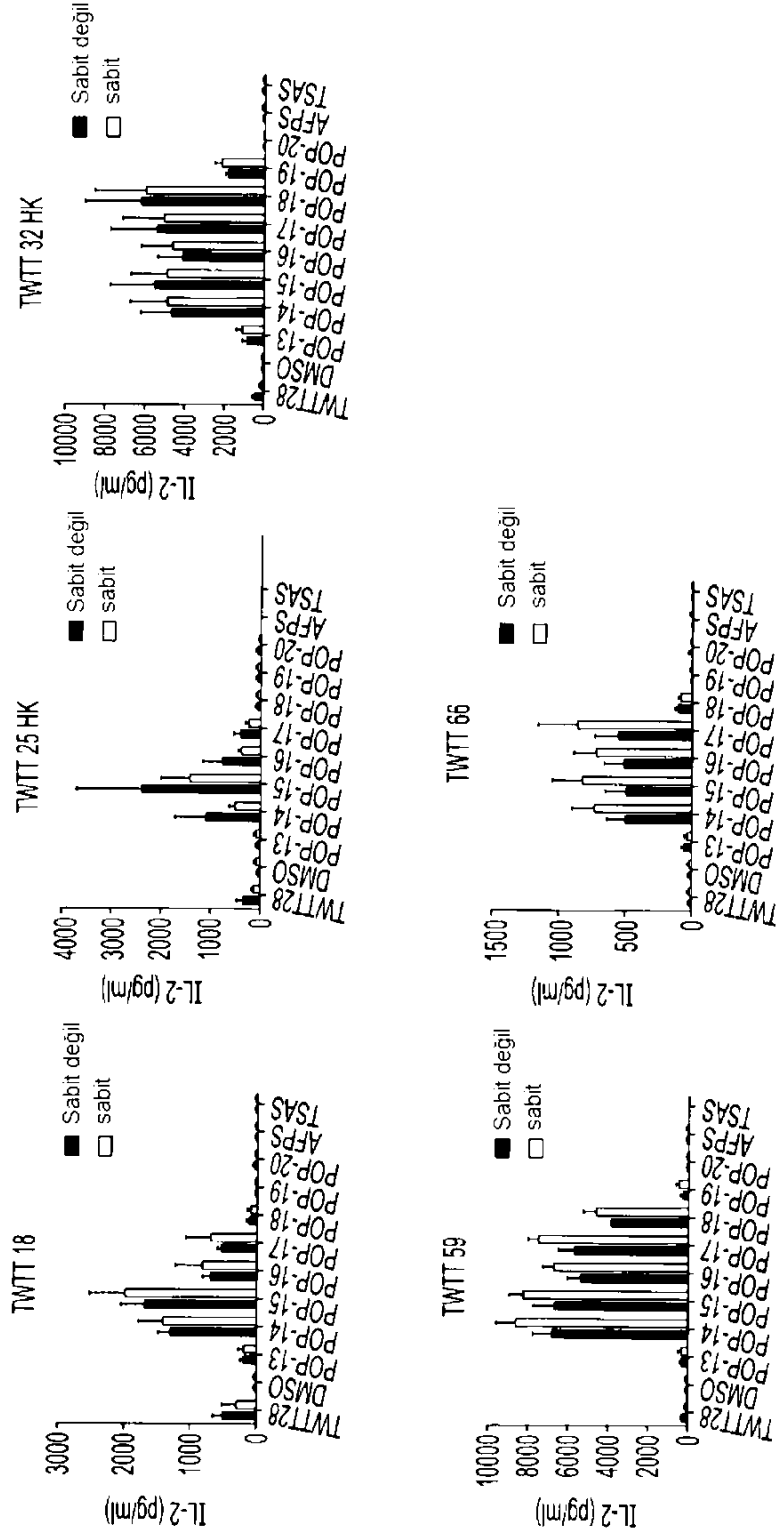


C

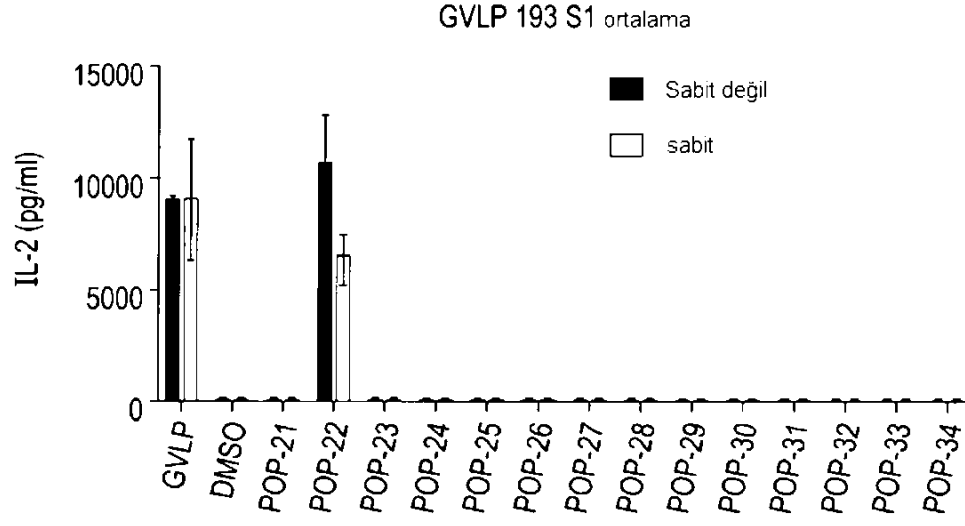


ŞEKİL 1

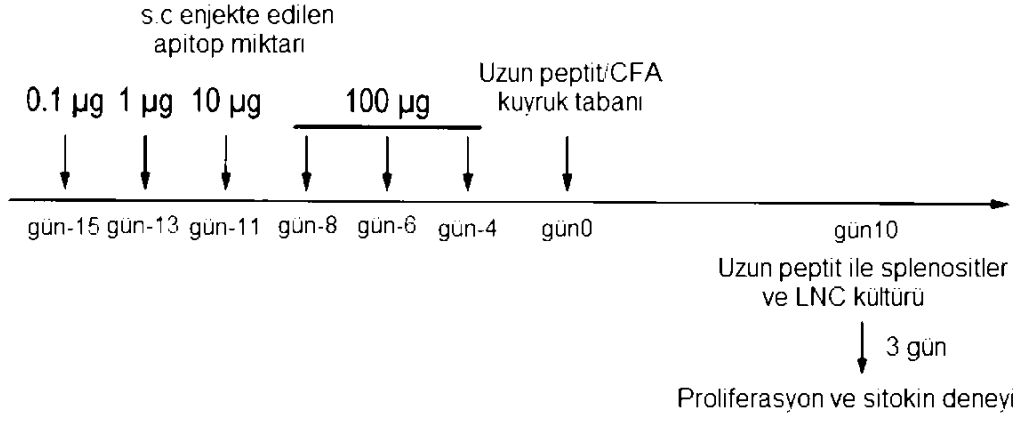




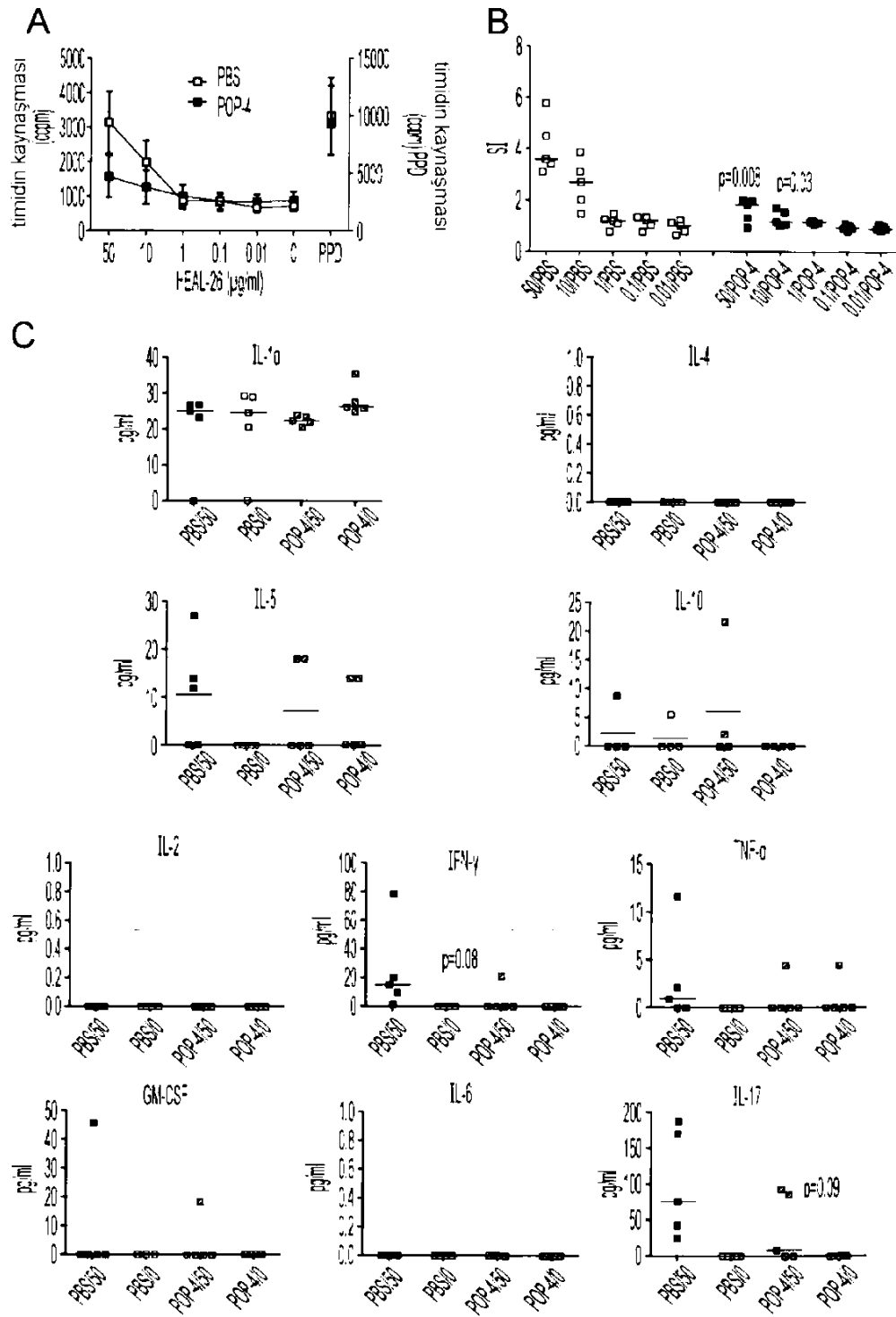
ŞEKİL 3



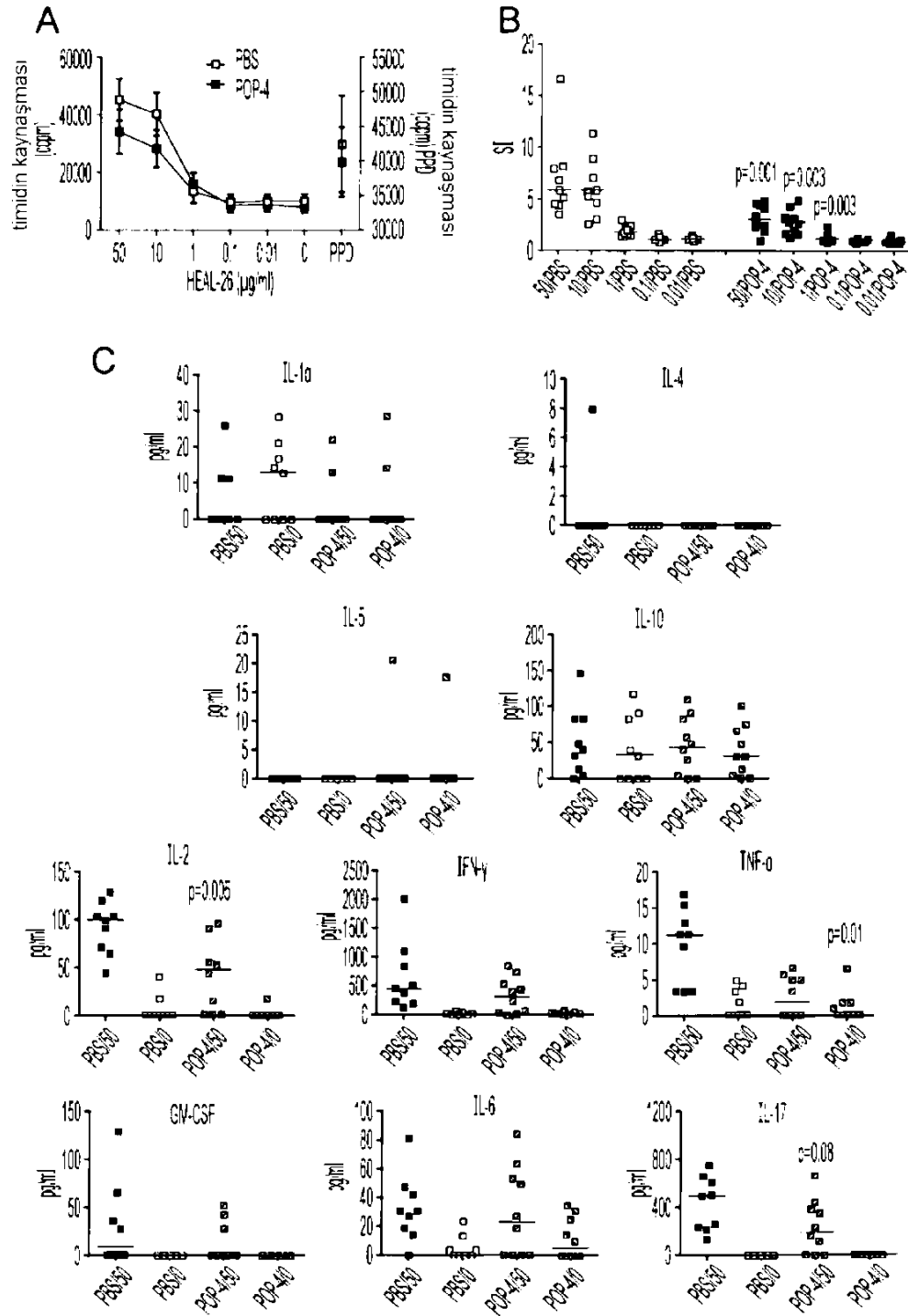
ŞEKİL 4



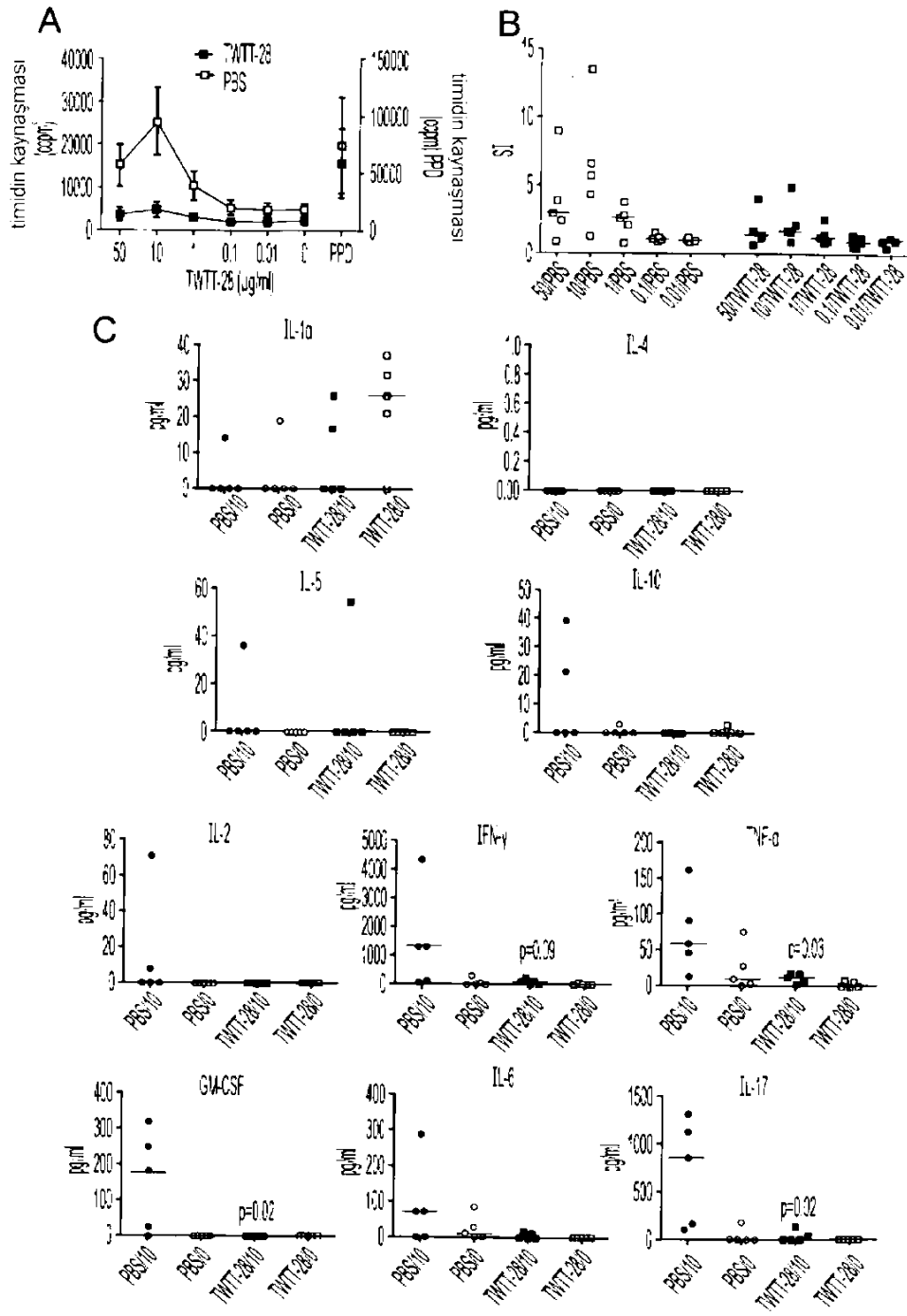
ŞEKİL 5



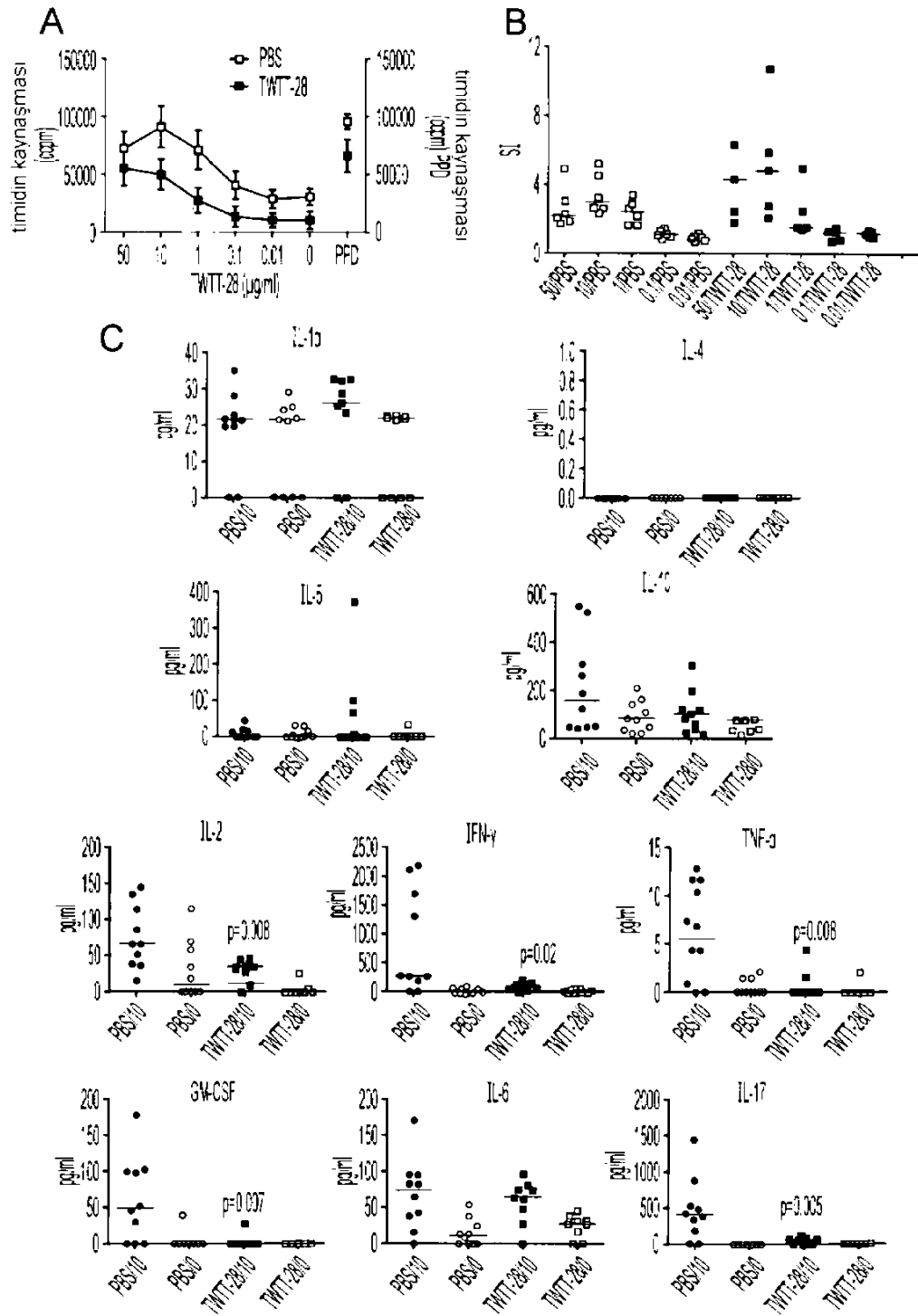
ŞEKİL 6



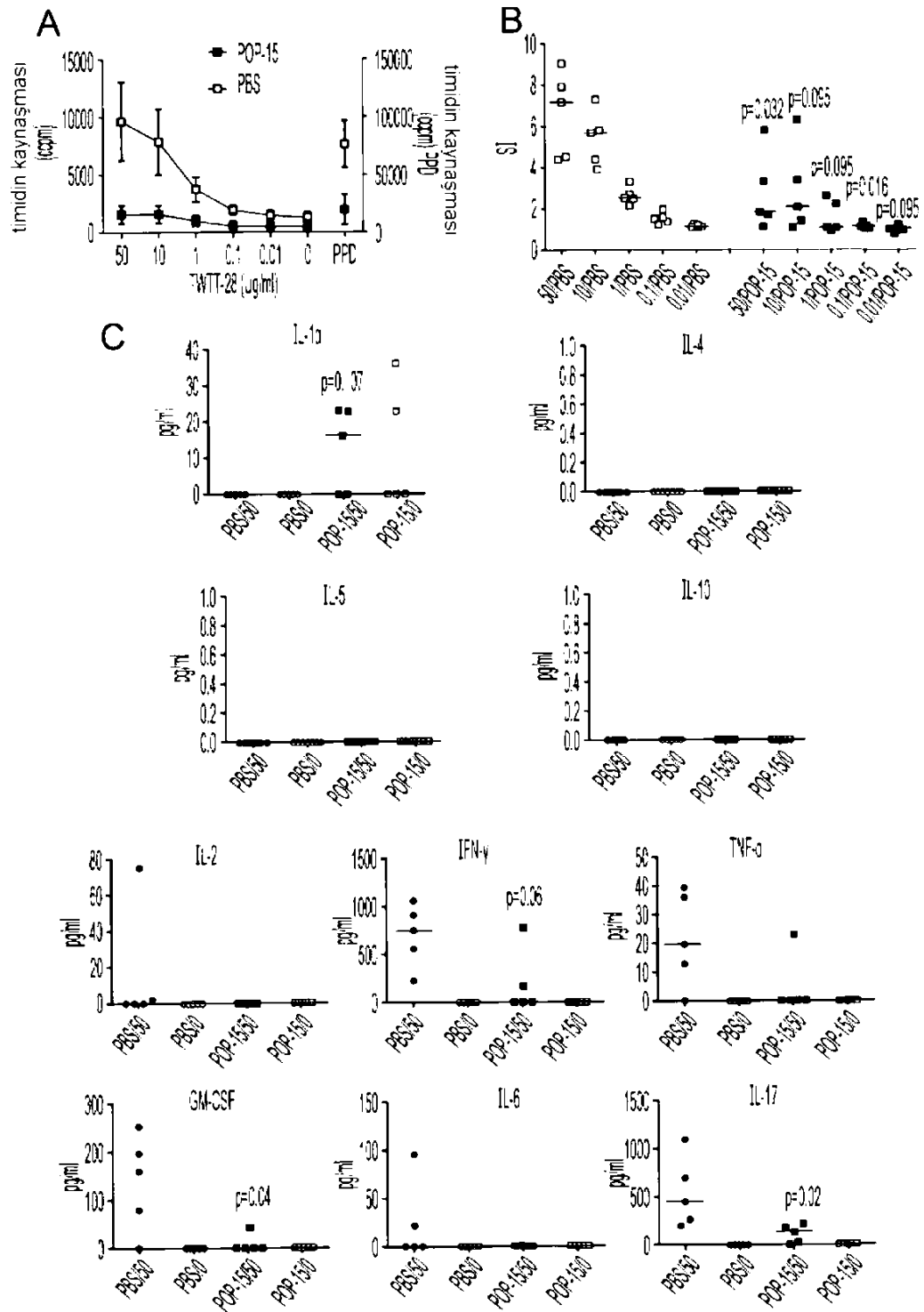
ŞEKİL 7



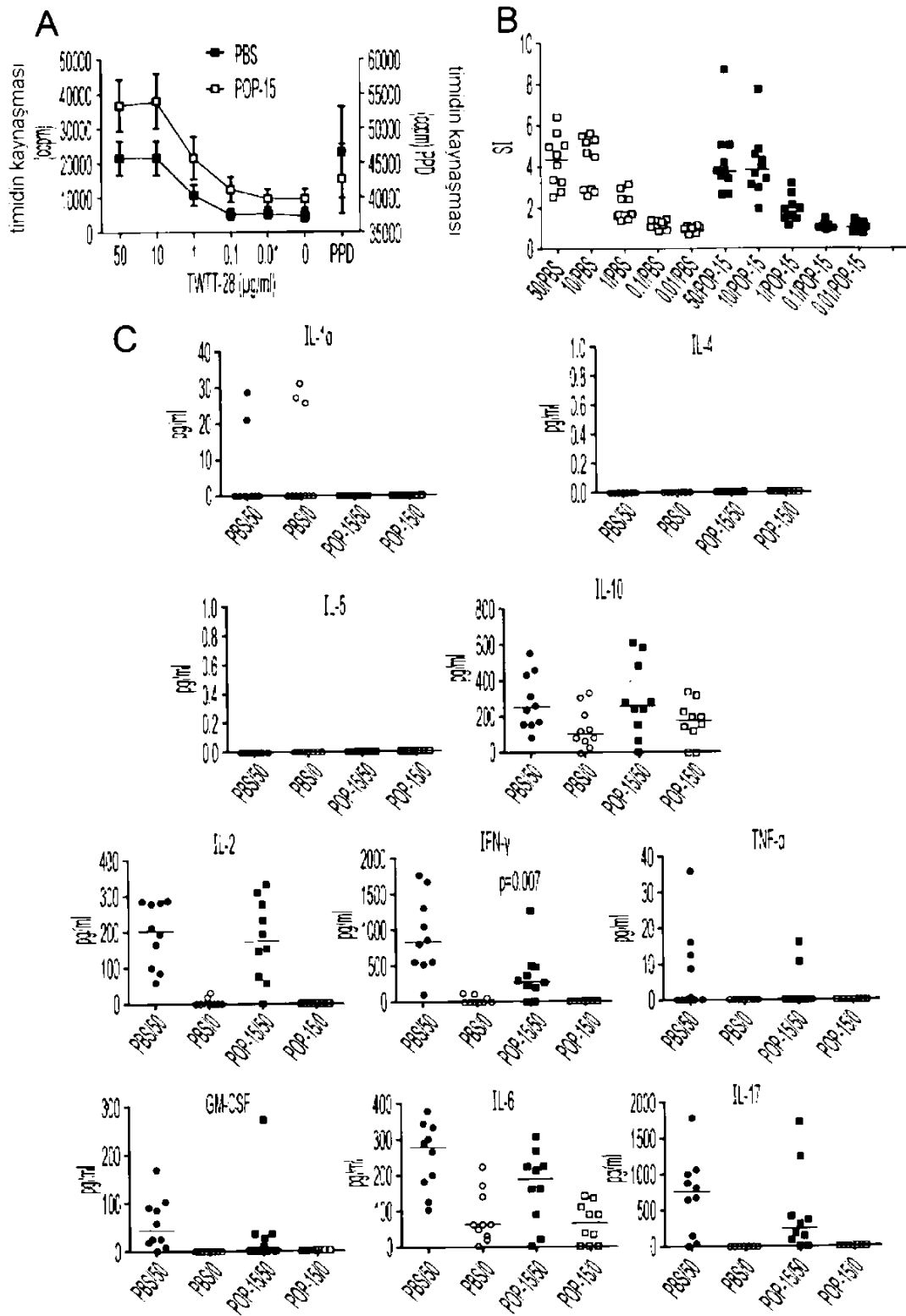
ŞEKİL 8



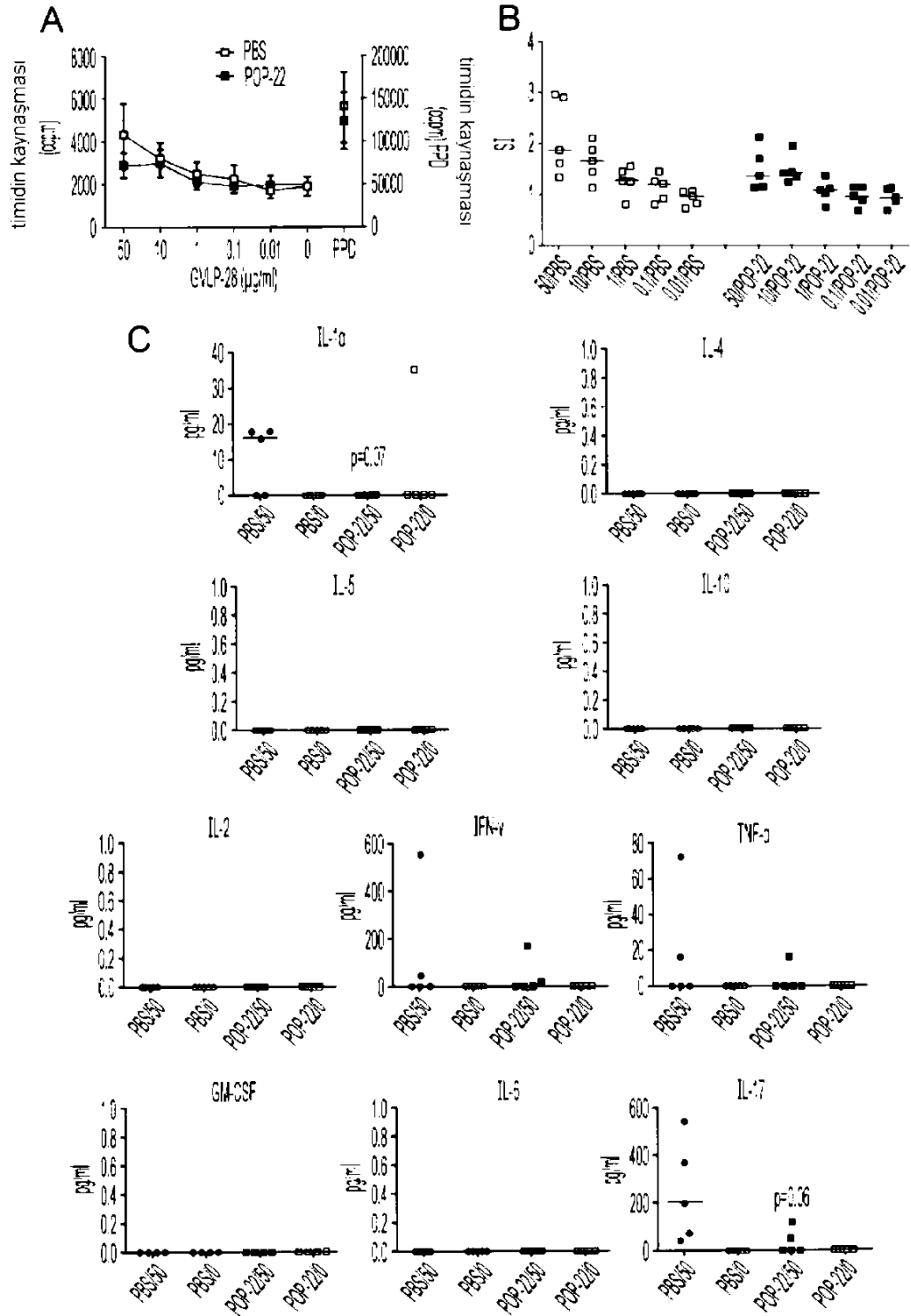
ŞEKİL 9



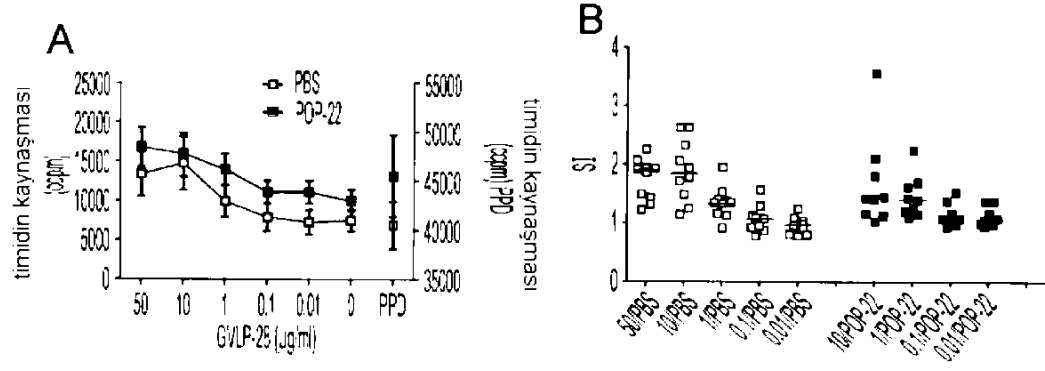
ŞEKİL 10



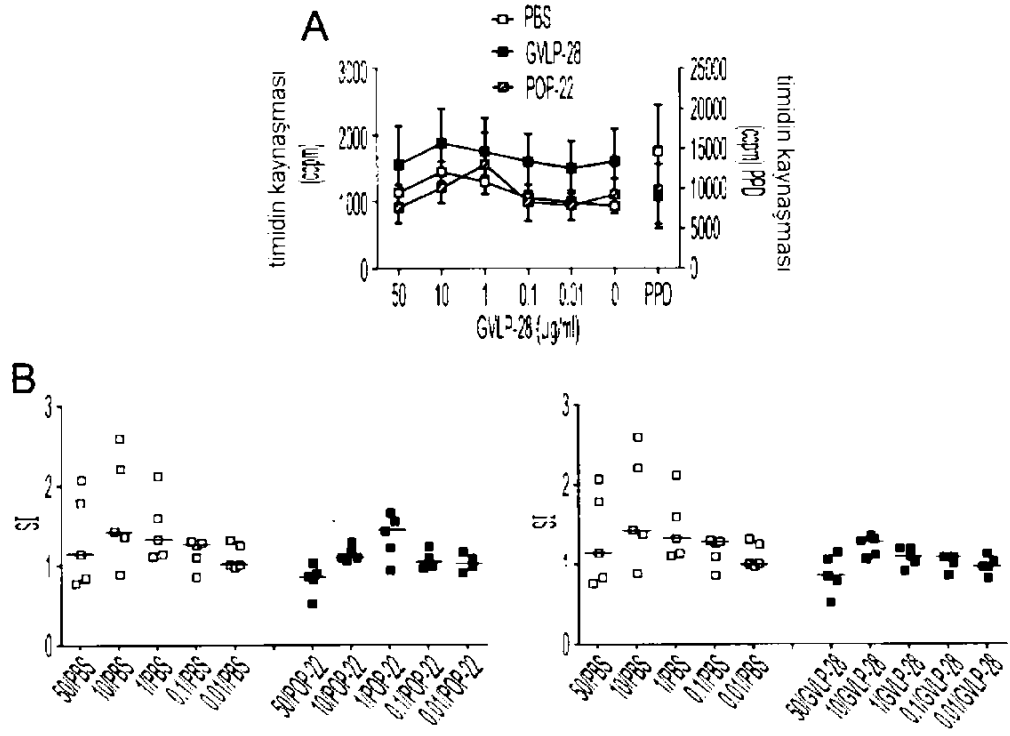
ŞEKİL 11



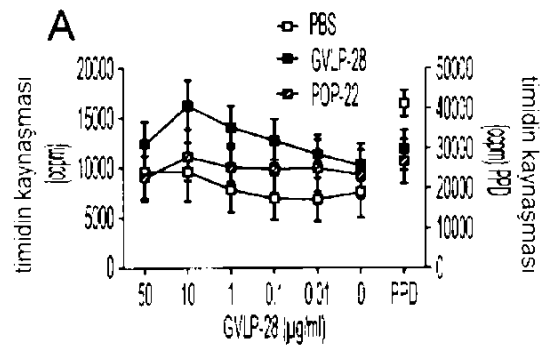
ŞEKİL 12



ŞEKİL 13



ŞEKİL 14



ŞEKİL 15

