



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **330535**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20030790	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.08.17 PCT/GB2001/03702
(22)	Inng.dag	2003.02.19	(85)	Videreføringsdag	2003.02.19
(24)	Løpedag	2001.08.17	(30)	Prioritet	2000.08.21, GB, 0020618 2001.06.14, GB, 0114547
(41)	Alm.tilgj	2003.04.22			
(45)	Meddelt	2011.05.09			
(73)	Innehaver	Apitope Technology (Bristol) Ltd, c/o University of Bristol, Dep. of Pathology & Microbiology, University Walk, GB-BS81TD BRISTOL, Storbritannia			
(72)	Oppfinner	David Cameron Wraith, c/o Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, GB-BS81TD BRISTOL, Storbritannia Stephen Mark Anderton, c/o Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, GB-BS81TD BRISTOL, Storbritannia Graziella Mazza, c/o Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, GB-BS81TD BRISTOL, Storbritannia Mary Ponsford, c/o Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, England, Storbritannia Heather Barbara Streeter, c/o Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, GB-BS81TD BRISTOL, Storbritannia			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for å undersøke den tolerogene kapasitet til et peptid og fremgangsmåte for selektering av et tolerogent peptid.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0011027 A1, US 5858980 A, WO 9632957 A1, WO 9813378 A1			
(57)	Sammendrag				

Det tilveiebringes en metode for selektering av et tolerogent peptid ved å selektere et peptid som er i stand til å binde til et MHC klasse I eller II molekyl uten ytterligere behandling. Det tilveiebringes også et peptid som er selektert ved en slik metode og dets anvendelse i et farmasøytisk preparat og en metode for å behandle og/eller forebygge en sykdom.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte å undersøke den tolerogene kapasitet til et peptid og en fremgangsmåte for selektering av et tolerogent peptid. Et peptid identifisert ved en slik fremgangsmåte kan anvendes i behandling og/eller forebygging av en sykdom. Peptidet kan være del av et farmasøytisk preparat omfattende et flertall av slike tolerogene peptider.

I en adaptiv immunrespons er T lymfocytter i stand til å gjenkjenne interne epitoper i et proteinantigen. Antigenpresenterende celler (APC) tar opp proteinantigener og nedbryter dem til korte peptidfragmenter. Et peptid kan binde til et "major histocompatibility complex" (MHC) klasse I eller II molekyll inne i cellen og bæres til celleoverflaten. Når det presenteres ved celleoverflaten i forbindelse med et MHC-molekyl, kan peptidet gjenkjennes av en T-celle (via T-celle-reseptoren (TCR)), i hvilket tilfellet peptidet er en T-celle-epitop.

T-celle-epitoper spiller en sentral rolle i den adaptive immunrespons på et hvilket som helst antigen, hvorvidt det er eget eller fremmed. Den sentrale rollen som spilles av T-celle-epitoper i hypersensitivitetssykdommer (som inkluderer allergi, autoimmune sykdommer og transplantat-reaksjon) er blitt vist gjennom anvendelsen av forsøksmodeller. Det er mulig å indusere inflammatoriske eller allergiske sykdommer ved injeksjon av syntetiske peptider (basert på strukturen av T-celle-epitoper) i kombinasjon med adjuvans.

I motsetning er det blitt vist at det er mulig å indusere immunologisk toleranse mot spesielle peptidepitoper ved administrering av peptidepitoper i oppløselig form. Administrering av oppløselige peptidantigener har blitt påvist som et effektivt middel for inhibering av sykdom i eksperimentell autoimmun encefalomyelitt (EAE - en modell for multipel sklerose — (MS)) (Metzler og Wraith (1993) Int. Immunol 5:1159-1165; Liu og Wraith (1995) Int. Immunol 7:1255-1265; Anderton og Wraith (1998) Eur.J.Immunol 28:1251-1261); og forsøksmodeller for artritt, diabetes og uveoretinitt (som redegjort for i Anderton og Wraith (1998) som angitt ovenfor). Dette er også blitt påvist som et middel for behandling av pågående sykdom i EAE (Anderton og Wraith (1998) som angitt ovenfor).

Anvendelsen av tolerogene peptider til å behandle eller forebygge sykdom har vekket betydelig oppmerksomhet. En årsak til dette er at det er blitt vist at visse tolerogene epitoper kan nedregulere responser av T-celler for distinkte antigener innenfor det samme vevet. Dette fenomenet, kjent som "bystander suppression" betyr at det bør være mulig å indusere toleranse til mer enn en epitop (foretrukket alle epitoper) innenfor et gitt antigen, og til mer enn ett antigen for en gitt sykdom, ved anvendelse

av et spesielt tolerogent peptid (Anderton og Wraith (1998) som angitt ovenfor). Dette ville fjernet behovet for å identifisere alle de patogene antigener innenfor en spesiell sykdom.

- 5 Peptider er også et fordelaktig valg for terapi på grunn av deres relativt lave kostnad og det forhold at peptidanaloger kan produseres med endrede immunologisk egenskaper. Peptider kan således modifiseres til å endre deres interaksjoner med enten MHC eller TCR.
- 10 Et mulig problem med denne betraktningsmåten er at det er blitt vist at ikke alle peptider som virker som T-celle epitoper er i stand til å indusere toleranse. Myelin-basisprotein (MBP) peptid 89-101 er et immundominant antigen etter immunisering og er også et svært effektivt immunogen både hva angår priming for T-celle-reaktivitet og induksjon av EAE. Det er imidlertid blitt vist at dette peptidet er ineffektivt ved induse-
- 15 ring av toleranse når det administreres i oppløsning (Anderton og Wraith (1998), som angitt ovenfor).

Et antall forklaringer for det observerte hierarki i evnen til T-celle-epitoper til å indusere toleranse har blitt foreslått (redegjort for i Anderton og Wraith (1998) som angitt

20 ovenfor). Spesielt er det blitt foreslått at der er en korrelasjon mellom affiniteten til peptidet for MHC og tolerogeniteten (Liu og Wraith (1995) som angitt ovenfor), men dette overensstemmer ikke med enkelte av observasjonene. MBP[89-101] som ikke er tolerogent, binder f.eks. til I-A^s med relativt høy affinitet. Det er således ikke ukomplisert å forutsi hvilke peptider som vil indusere toleranse.

25

Hvis der var en rasjonell forklaring på hvorfor kun en andel av peptidepitoper er i stand til å indusere toleranse, ville dette forenkle seleksjonen av tolerogene peptider som er anvendbare i behandling og forebygging av hypersensitivitetssykdommer.

- 30 WO 00/11027 vedrører peptidanaloger av humant myelin basisprotein. Peptidanalogen har en lengde på minst 7 aminosyrer og er avledet fra rester 83-99 i humant myelin basisprotein.

- US 5 858 980 vedrører fragmenter av humant myelin basisprotein som omfatter
- 35 aminosyresekvensen ENPVVHFFKNIVTPR.

WO 96/32957 vedrører en fremgangsmåte for å forandre cytokin mønsteret til auto-reaktive T-celler fra et immunrespons-økende mønster til et immunrespons-regulerende mønster, som omfatter å eksponere T-cellene for en endret peptid ligand.

WO 98/13378 vedrører en fremgangsmåte for å øke opptak av et proteinholdig antigen eller et peptid avledet derfra ved antigenpresenterende celler som har en mannose-reseptor eller tilsvarende reseptor, hvorved antigenet eller peptidet er tilveiebrakt med minst en og foretrukket to mannosegrupper eller en funksjonell ekvivalent derav.

5

De foreliggende oppfinnere har vist at hvis en peptidepitop er av en passende størrelse til å presenteres ved umoden APC uten antigenbehandling, kan det indusere immunologisk toleranse. Den observasjon at noen T-celle-epitoper er tolerogene og andre er ute av stand til å indusere toleranse kan derfor forklares ved det forhold at noen

10 epitoper krever ytterligere behandling før de er i stand til å presenteres av et MHC molekyl. Disse epitoper som krever ytterligere behandling induserer ikke toleranse når de administreres i en oppløselig form, på tross av deres kapasitet til å indusere sykdom når de injiseres i kombinasjon med adjuvans.

15 De epitoper som ikke krever ytterligere behandling er i stand til å indusere toleranse, og er blitt betegnet "apitoper" (Antigen Processing Independent epiTOPES) av oppfinnerne.

Dette funnet tilveiebringer en regelbasert metode for seleksjon av tolerogene T-celle-

20 epitoper som fjerner behovet for å undersøke den tolerogene kapasiteten til et peptid *in vivo*. Dette er spesielt fordelaktig i utviklingen av strategier for å behandle eller forebygge sykdommer som det ikke er noen dyremodeller tilgjengelige for. Selv for sykdommer som har en dyremodell bør seleksjonsmetoden gjøre utviklingen av toleranseinduserende sammensetninger enklere og sikrere, fordi den tilveiebringer en

25 mekanisme hvorved toleranseinduksjonskapasiteten til et peptid kan testes på humane T-celler (gjenkjennelse av antigen i forbindelse med humane MHC molekyler) *in vitro*, før deres anvendelse *in vivo*.

I et første aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse derfor en fremgangsmåte

30 for å undersøke den tolerogene kapasitet til et peptid *in vitro*, som omfatter trinnet med å bestemme om peptidet kan binde et MHC klasse I eller II molekyl og presenteres for en T celle uten ytterligere antigenprosessering, hvori peptidets kapasitet til å binde MHC klasse I eller klasse II bestemmes ved:

- (i) å behandle et antigenprosesseringsuavhengig system (APIPS) med peptidet; og
- 35 (ii) å analysere binding av peptidet til MHC klasse I eller II molekyler innen APIPS.

I en foretrukket utførelsesform er peptidet i stand til å binde til et MHC klasse II molekyl uten ytterligere prosessering.

Et antall metoder er kjent i teknikken for screening med hensyn på peptider som er i stand til å virke som T-celle-epitoper for et gitt antigen. Metoden vil derfor i alminnelighet anvendes til å selektare et tolerogent peptid fra en flerhet av peptider som hver omfatter en T-celle-epitop.

5

For å undersøke hvorvidt et peptid er i stand til å binde til et MHC klasse I eller II molekyl uten ytterligere prosessering, kan man undersøke kapasiteten til peptidet til å binde MHC klasse I eller II molekyler ved anvendelse av et "antigen processing independent presentation system" (antigenprosesseringsuavhengig presentasjons-system) (APIPS). Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter derfor de følgende trinn:

10

- (i) behandling av et APIPS med et peptid,
- (ii) analysing av binding av peptidet til MHC klasse I eller II molekyler innenfor APIPS.

15

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for selektering av et tolerogent peptid, som omfatter trinnet med å undersøke den tolerogene kapasitet til et peptid ved en fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av de foregående krav, og selektare et peptid i stand til binding til et MHC klasse I eller II molekyl og presentering for en T celle uten ytterligere antigenprosessering.

20

Et peptid selektert ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse kan være anvendbart i behandlingen og/eller forebyggingen av en sykdom. Peptidet kan særlig være anvendbart i behandlingen og/eller forebyggingen av en sykdom som er mediert av autoreaktive T-celler. Hypersensitivitetsreaksjoner er særlig mottagelige for behandling/forebygging ved anvendelse av det tolerogene peptidet, f.eks. allergi, autoimmunitet og transplantat-rejeksjon.

25

De foreliggende oppfinnere har allerede identifisert et antall apitoper for myelin-basisprotein, som er et autoantigen i multipel sklerose. Peptider selektert ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse kan derfor være anvendbare i behandlingen og/eller forebyggingen av multipel sklerose.

30

Det er kjent at noen peptider er i stand til å i indusere toleranse overfor andre epitoper fra det samme antigenet, og selv andre epitoper fra et distinkt antigen (ved fenomenet kjent som "bystander suppression"). De foreliggende oppfinnere forutsier imidlertid at for å tilstrekkelig undertrykke alle de autoreaktive T-celler, ville det være fordelaktig at en kombinasjon av forskjellige apitoper administreres til pasienten for å behandle/forebygge en spesiell sykdom. Peptider selektert ved fremgangsmåten ifølge den forelig-

35

gende oppfinnelse kan være en del av et farmasøytisk preparat omfattende flere peptider, idet hvert peptid er basert på en T-celle-epitop.

En generell strategi for behandling og/eller forebygging av en sykdom i et individ kan

5 omfatte de følgende trinn:

- (i) identifisering av et antigen for sykdommen
- (ii) identifisering av en epitop for antigenet,
- (iii) administrering av epitopen til individet.

10 Figur 1 viser et typisk eksempel på den kinetiske profilen til *Mycobacterium tuberculosis* rensset proteinderivat (purified protein derivative (PPD)) og MBP i multippel sklerose (MS) pasienter og friske individer. Perifert blod-mononukleære celler (PBMC), isolert fra en MS pasient (A) og et normalt individ (B) testes med hensyn på deres evne til å proliferere i nærvær av PPD og helt MBP; den kinetiske profilen av den

15 proliferative responsen på MBP sammenlignes med den av sekundært antigen PPD.

Figur 2 er en tabell som oppsummerer PBMC responser på MBP og dets peptider i MS pasienter. Visse individer analyseres på tre separate tidspunkter, med en periode på omtrent 4 til 7 måneder mellom hvert tidspunkt.

20

Figur 3 er en tabell som oppsummerer PBMC responser på MBP og MBP-peptider i friske individer. Mellom 4 og 7 måneder forløp mellom hvert tidspunkt.

Figur 4 viser et eksempel på en MS pasient (MS 49) som responderer på multiple

25 peptider ved 2 forskjellige tidspunkter, men for hvem gjenkjennelsesprofilen i løpet av det andre tidspunktet, målt 4 måneder senere, skiller seg betydelig. PBMC ble dyrket i nærvær av MBP og et panel av peptider som spenner over den fulle lengde av MBP, og proliferasjon ble målt ved ³H-thymidin-opptak. Den brede T-celle-proliferative respons observert ved det første tidspunktet var betydelig forskjellig fra responsen målt 7

30 måneder senere (andre tidspunkt).

Figur 5 viser et eksempel på en pasient hvis brede epitoprespons (første tidspunkt) går tilbake (andre tidspunkt) og kommer til syne igjen over en tolv måneders periode (tredje tidspunkt).

35

Figur 6 viser et kart over den fine spesifisiteten av peptidregionene identifisert i den kinetiske responsanalysen som oppnås gjennom anvendelsen av TCC frembrakt fra MS pasienter og friske individer. Mesteparten av peptidene anvendt i screeningsanalyser

er 15-mer lange, noen få er imidlertid 10-mer, og 1 peptid er 17-mer. Spesifisiteten av hver TCC testes minst 2 ganger.

Figur 7a er en tabell som viser karakteriseringen av T-celle-epitoper innenfor myelin-basisprotein gjenkjent av T lymfocytter fra MS pasienter.

Figur 7b er en tabell som viser at alle T-celle-epitoper ikke nødvendigvis presenteres av fikserte APC og derfor ikke apitoper.

Figurer 8 og 9 viser presenteringen av forskjellige MBP peptider for T-celle-kloner ved levende og fiksert APC. Fig. 8A—30-44, fig. 8B—110-124, fig. 9A—130-144, fig. 9B—156-170.

Figur 10 er en tabell som viser topp-stimuleringsindeks (SI) verdier til MBP og MBP-peptider i MS pasienter oppnådd på tre separate tidspunkter. Prøver for det andre tidspunktet ble samlet 4-8 måneder etter det 1. tidspunktet, og prøver for det 3. tidspunktet ble oppnådd 35 måneder etter det andre tidspunktet. Bakgrunns-cpm ble målt for hver dag og varierte mellom 80-700 cpm; en positiv respons (halvfet skrift) ble definert i overensstemmelse med $SI > 3$ og $\delta cpm > 1000$. (Det var ikke mulig å samle prøver for alle tre tidspunktene fra pasienter MS19 og MS67).

Figur 11 er en tabell som viser topp-stimuleringsindeks (SI) verdier til MBP og MBP-peptider i friske individer. Bakgrunns-cpm ble målt for hver dag og varierte mellom 80-700 cpm; en positiv respons (halvfet skrift) ble definert i overensstemmelse med $SI > 3$ og $dcpm > 1000$.

Figur 12 viser responsen av T-celler isolert fra en DR:2MBP82-100 transgen mus på presentering av nestede MBP peptider i regionen 77-100 ved APC.

Figur 13 viser responsen av T-celle klon MS17:A3 på presentering av nestede MBP peptider i regionen 125-148 ved APC.

Figur 14 er en illustrering av T-celle epitop-gjenkjennelse innefor MBP 89-101 sekvensen. Der er tre distinkte men overlappende T-celle-epitoper innenfor sekvensen: 89-94, 92-98 og 95-101. Potensialet for spalting mellom rester 94 og 95 ved virkningen av asparaginylendopetidase (AEP) er vist.

Figur 15 viser kapasiteten til MBP peptider 87-96 (A) og 89-101 (B) til å virke som en apitop for T-celler som responderer på 89-94 epitopen.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for å undersøke den tolerogene kapasitet til et peptid og en fremgangsmåte for selektering av et tolerogent peptid.

5 Toleranse

Som anvendt heri, betyr betegnelsen "tolerogen(t)" å være i stand til å indusere toleranse.

Toleranse er den manglende evne til å respondere på et antigen. Toleranse overfor selv-antigener er et essensielt trekk ved immunsystemet, når dette tapes kan autoimmune sykdom bli resultatet. Det adaptive immunsystem må opprettholde kapasiteten til å respondere på et enormt mangfold av infeksjøs midler mens det unngår autoimmunt angrep av selv-antigenene inneholdt innenfor sine egne vev. Dette kontrolleres i stor grad ved sensitiviteten av umodne T lymfocytter overfor apoptotisk celledød i thymus (sentral toleranse). Ikke alle selv-antigener detekteres imidlertid i thymus, slik at død av selv-reaktive thymocytter forblir ufullstendig. Der er således også mekanismer hvorved toleranse kan erverves ved modne selv-reaktive T lymfocytter i de perifere vev (perifer toleranse). En oversikt over mekanismene for sentral og perifer toleranse er gitt i Anderton *et al* (1999) (Immunological Reviews 169:123-137).

Toleranse kan resultere fra eller karakteriseres ved induksjonen av anergi i minst en del av CD4+ T-celler. For å aktivere en T-celle, må et peptid assosiere med en "profesjonell" APC som er i stand til å levere to signaler til T-celler. Det første signalet (signal 1) leveres av MHC-peptid-komplekset på celleoverflaten av APC og mottas av T-cellen via TCR. Det andre signalet (signal 2) leveres av kostimulerende molekyler på overflaten av APC, slik som CD80 og CD86, og mottas av CD28 på overflaten av T-cellen. Det menes at når en T-celle mottar signal 1 i fravær av signal 2, aktiveres den ikke og blir faktisk anergisk. Anergiske T-celler er motstandsdyktige overfor etterfølgende antigen stimulering, og kan være i stand til å undertrykke andre immunrespons-er. Anergiske T-celler menes å være involvert i mediering av T-celle-toleranse.

Uten ønske om å bindes av noen teori, forutsier de foreliggende oppfinnere at peptider som krever behandling før de kan presenteres i forbindelse med MHC molekyler ikke induserer toleranse fordi de må håndteres av modne antigenpresenterende celler. Modne antigenpresenterende celler (slik som makrofager, B-celler og dendritiske celler) er i stand til antigenprosessering, men også levering av begge signaler 1 og 2 til en T-celle, hvilket fører til T-celle-aktivering. Apitoper vil på den annen side være i

stand til å binde klasse II MHC på umodne APC. De vil således presenteres overfor T-celler uten kostimulering, hvilket fører til T-celle-anergi og -toleranse.

5 Apitoper er naturligvis også i stand til å binde til MHC molekyler ved celleoverflaten av modne APC. Immunsystemet inneholder imidlertid en større rikelighet av umodne enn modne APC (det er blitt foreslått at mindre enn 10% av dendritiske celler aktiveres, Summers et al. (2001) Am. J. Pathol. 159:285-295). Standardposisjonen til en apitop vil derfor være anergi/toleranse, snarere enn aktivering.

10 Det er blitt vist at når toleranse induseres ved peptidinhalasjon, reduseres kapasiteten til antigenspesifikke CD4+ T-celler til å proliferere. Videre nedreguleres produksjonen av IL-2, IFN- γ og IL-4 i disse cellene, men produksjon av IL-10 økes. Nøytralisering av IL-10 i mus i en tilstand av peptidindusert toleranse er blitt vist og fullstendig gjen-
15 opprette mottagelighet overfor sykdom. Det har blitt foreslått at en populasjon av regulerende celler fastholder den tolerante tilstand som produserer IL-10 og medierer immunregulering (Burkhart et al (1999) Int. Immunol. 11:1625-1634).

Induksjonen av toleranse kan derfor overvåkes ved hjelp av forskjellige teknikker inkluderende:

- 20 (a) redusert mottagelighet overfor å pådra seg sykdommen for hvilket peptidet er en mål-epitop *in vivo*;
- (b) induksjonen av anergi i CD4+ T-celler (som kan detekteres ved etterfølgende stimulering med antigen *in vitro*);
- (c) forandringer i CD4+ T-celle-populasjonen, inkluderende
 - 25 (i) reduksjon i proliferasjon,
 - (ii) nedregulering i produksjonen av IL-2, IFN- γ og IL4, og
 - (iii) økning i produksjonen av IL-10.

30 "*Antigen Processing independent Epitopes*" (*Antigenprosesseringsuavhengige epitoper*) (APITOPER)

Fremgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelse omfatter trinnet med selektering av et peptid som er i stand til å binde til et MHC klasse I eller II protein uten ytterligere behandling. Slike peptider er kjent heri som "apitoper" (Antigen Processing Independent ePiTOPES).

35

Celleoverflatepresentering av peptider avledet fra et gitt antigen er ikke vilkårlig og har en tendens til å domineres av et lite antall av hyppig forekommende epitoper. Dominansen av et spesielt peptid vil avhenge av mange faktorer, slik som relativ affinitet for binding av MHC molekylet, rom/tid-frembringelsespunkt innenfor APC og resistens

overfor nedbrytning. Epitophierarkiet for et antigen kan forandre seg med progresjon av en immunrespons, som har viktige implikasjoner for selvtoleranse og autoimmunitet. Immundominerende determinante regioner er sannsynligvis gode tolerogener. Apitopen er således foretrukket basert på en dominant epitop.

5

Etter en primær immunrespons på de immundominante peptider, kan imidlertid epitop-"spredning" forekomme for sub-dominante determinanter (Lehmann *et al* (1992) Nature 358:155-157). Presentering av sub-dominante epitoper kan være viktig ved utløsning av autoimmunitet. Apitopen kan derfor være basert på en sub-dominant

10

For et hvilket som helst gitt antigen kan kryptiske epitoper også foreligge. Kryptiske epitoper er slike som kan stimulere en T-celle-respons når administrert som et peptid men som ikke greier å produsere en slik respons når administrert som et helt antigen. Det kan være at den kryptiske epitop ødelegges under behandling av antigenet til

15

peptidet i APC. De foreliggende oppfinnere har vist at peptid 92-98 er en kryptisk epitop for MBP (eksempel 2C). Det er interessant at der er et antatt spaltingssete for asparaginylendopeptidase innenfor denne peptidregionen, hvilket kan bety at under naturlig behandling blir ingen peptider inneholdende denne regionen dannet ved APC.

20

Et kryptisk epitop kan virke som en apitop *in vitro*, ved at den kan være i stand til å binde til et MHC molekyl uten ytterligere behandling, og å indusere anergi i en T-celle som gjenkjenner den kryptiske epitop. Det ville imidlertid ikke være sannsynlig at en slik apitop er terapeutisk anvendbar fordi den bør være ute av stand til å indusere

25

Epitoper for et antigen kan identifiseres ved å måle T-celle-responsen til overlappende peptider som spanner over hele antigenet (se nedenfor) når presentert av APC. Slike undersøkelser resulterer vanligvis i "nestede sett" av peptider, og den minimale epitop for en spesiell T-celle-linje/klon kan vurderes ved å måle responsen på trunkerte

30

peptider.

Det kan ikke antas at en minimal epitop av et antigen vil oppføre seg som en apitop. Det kan godt være at aminosyrer som flankerer den minimale epitop vil være nødvendig for optimal binding til MHC. Apitopen bør være utformet til å dekke den mulig-

35

het at der kan være hårfine forskjeller mellom de minimale epitoper av forskjellige T-celle-kloner.

Det skal fremheves at det ikke er sikkert at det er mulig å identifisere en apitop for alle epitoper. Der er tydelige tegn på at noen epitoper binder MHC på en måte som er avhengig av MHC-lasting i endosomer og således krever behandling (Viner et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:2214-2218). Dette er en annen årsak til at man ikke kan

5 anta at hver minimal epitop uunngåelig vil oppføre seg som en apitop.

Identifisering av peptider inneholdende T-celle epitoper

Der er et antall metoder som er kjent i teknikken for å identifisere T-celle-epitopene innefor et gitt antigen.

10

Naturlig prosesserte epitoper kan identifiseres ved masse-spektrofotometerisk analyse av peptider eluert fra antigen-lastet APC. Disse er APC som enten er blitt ansporet til å oppta antigen, eller er blitt tvunget til å produsere proteinet intracellulært ved trans-
 15 formasjon med det passende gen. APC inkuberes typisk med protein enten i oppløs-
 ning eller passende targetert til APC celleoverflaten. Etter inkubering ved 37°C lyseres cellene i detergent og klasse II proteinet renses ved f.eks. affinitetskromatografi. Behandling av det rensede MHC med et passende kjemisk medium (f.eks. sure beting-
 elser) resulterer i elueringen av peptider fra MHC. Denne oppsamlingen av peptider separeres og profilen sammenlignes med peptid fra kontroll-APC behandlet på den
 20 samme måten. Toppene som er unike for de proteinuttrykkende/tilførte celler analyseres (f.eks. ved massespektrometri) og peptidfragmentene identifiseres. Denne prosedyren frembringer vanligvis informasjon om omfanget av peptider (vanligvis funnet i "nestede sett") frembrakt fra et spesielt antigen ved antigenprosessering.

25 En annen metode for identifisering av epitoper er å screene et syntetisk bibliotek over peptider som overlapper og spenner over lengden av antigenet i en *in vitro* analyse. Det kan f.eks. anvendes peptider som er 15 aminosyrer lange og som overlapper med 5 eller 10 aminosyrer. Peptidene testes i et antigenpresenteringssystem som omfatter antigenpresenterende celler og T-celler. Antigenpresenteringssystemet kan f.eks.
 30 være en murin splenocytffremstilling, en fremstilling av humane celler fra tonsill eller PBMC. Alternativt, kan antigenpresenteringssystemet omfatte en spesiell T-celle-linje/klon og/eller en spesiell antigenpresenterende celletype.

T-celle aktivering kan måles via T-celle proliferasjon (f.eks. ved anvendelse av ³H-thymidin-innlemmelse) eller cytokinproduksjon. Aktivering av TH1-type CD4⁺ T-celler
 35 kan f.eks. detekteres via IFN γ produksjon som kan detekteres ved hjelp av standard-teknikker, slik som en ELISPOT analyse.

Undersøkelser vedrørende overlappende peptid indikerer vanligvis det området av antigenet hvori en epitop er lokalisert. Den minimale epitop for en spesiell T-celle kan deretter vurderes ved å måle responsen på trunkerte peptider. Hvis det f.eks. oppnås en respons på peptidet omfattende rester 1-15 i overlappingsbiblioteket, kan det
 5 anvendes sett som er trunkert i begge ender (dvs. 1-14, 1-13, 1-12 etc. og 2-15, 3-15, 4-15, etc.) til å identifisere den minimale epitop.

Identifiseringen av immundominerende regioner av et antigen ved anvendelse av *in vitro* analyse (spesielt slike som anvender T-celle-linjer) er av de foreliggende opp-
 10 finnere forutsagt å presentere et skjevt mønster av peptidreaktivitet. I undersøkelsen med hensyn på å identifisere MBP epitoper som er beskrevet i eksemplene, anvender de en kinetisk responsanalyse hvori proliferasjonen av PBMC fra MS pasienter og friske individer måles mot et bibliotek over overlappende peptider. Denne analysen er basert på det funnet at selv om T-celler fra normale individer og MS pasienter reponderer på
 15 lignende måte på rensset proteinantigen, så responderer de på en forskjellig måte på peptider basert på sekvensen av MBP. T-celler fra MS pasienter responderer med høyere størrelsesorden og hurtigere kinetikk på peptidantigener når sammenlignet med normale friske donorer. Dette muliggjør screening for og identifisering av epitop-
 20 en som den spesielle pasienten responderer på ved et spesielt tidspunkt. I undersøkelsen beskrevet heri har denne fremgangsmåten åpenbart et antall epitop-inneholdende regioner som ikke ble identifisert ved anvendelse av standard-teknikker. Dessuten er det vist at T-celle-gjenkjennelse utviser et cyklisk mønster som viser seg på ett tidspunkt, går tilbake, og kommer deretter til syne igjen på et senere tidspunkt.

25 Den kinetiske analysen beskrevet av oppfinnerne tilveiebringer et verdifullt verktøy fordi den åpenbarer den epitop som en pasient responderer på ved et spesielt tidspunkt. Denne informasjonen kan anvendes til å spesialtilpasse en fremgangsmåte for administrering av terapeutisk apitop for en spesiell pasient ved identifisering og administrering av en apitop for den relevante epitop (hvis der er en). Denne infor-
 30 masjonen kan også gjøre det mulig å trekke opp et generelt mønster for sykdomsprogresjon, slik at det terapeutiske preparatet kan utformes til å inkludere apitoper til epitopene som det er sannsynlig at er tilstede ved et gitt stadium under sykdommen.

"Antigen Processing Independent Presentation Systems"
 35 (*Antigenprosesseringsuavhengige presenteringssystemer*) (APIPS)

Så snart en epitop er blitt identifisert, er det neste trinnet å undersøke hvorvidt den også oppfører seg som en apitop.

En apitop må presenteres for T-celler uten behov for antigenprosessering. Når peptider inneholdende T-celle-epitoper er identifisert, kan apitoper identifiseres ved anvendelse av et behandlingsfritt system. Trunkerte peptider og peptidanaloger kan testes for aktivering ved anvendelse av et antigenprosesseringsuavhengig presenteringssystem (APIPS).

Eksempler på APIPS inkluderer:

- a) fiksert APC (med eller uten antistoffer til CD28),
- b) Lipid-membraner inneholdende klasse I eller II MHC molekyler (med eller uten antistoffer til CD28), og
- c) rensset naturlig eller rekombinant MHC i plate-bundet form (med eller uten antistoffer til CD28).

Det er kjent å anvende fiksert APC for å undersøke T-celle-responser, f.eks. i studier for å undersøke den minimale epitop innenfor et polypeptid, ved måling av responsen på trunkerte peptider (Fairchild *et al* (1996) *Int. Immunol* 8:1035-1043). APC kan fikseres ved anvendelse av f.eks. formaldehyd (vanligvis parpformaldehyd) eller glutaraldehyd.

Lipidmembraner (som kan være plane membraner eller liposomer) kan fremstilles ved anvendelse av kunstige lipider eller kan være plasmamembran/mikrosomale fraksjoner fra APC.

I bruk kan APIPS anvendes i brønnene til en vevskulturplate. Peptidantigener tilsettes deretter og binding av peptidet til MHC-delen av APIPS detekteres ved tilsetning av selekterte T-celle-linjer eller -kloner. Aktivering av T-celle-linjen eller -klonen kan måles ved hjelp av en hvilken som helst av metodene som er kjent i teknikken, f.eks. via ³H-thymidin-innlemmelse eller cytokinutskillelse.

30 *Peptider*

Betegnelsen "peptid" anvendes i den normale oppfatning til å bety en serie av rester, typisk L-aminosyrer, forbundet med hverandre typisk gjennom peptidbindinger mellom α -aminogruppene og karboksylgruppene til nabo-aminosyrer. Betegnelsen inkluderer modifiserte peptider og syntetiske peptidanaloger.

35

Et peptid selektert ved fremgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelse kan ha en hvilken som helst lengde som er i stand til å binde til et MHC klasse I eller II molekyl uten ytterligere behandling.

Peptider som binder til MHC klasse I molekyler er typisk 7 til 13, mer vanlig 8 til 10 aminosyrer lange. Bindingen av peptidet stabiliseres ved dets to ender ved kontakter mellom atomer i hovedkjeden til peptidet og invariante seter i peptidbindingsgropen til alle MHC klasse I molekyler. Der er invariante seter i begge ender av fordypningen
 5 som binder amino- og karboksy- endepunktene til peptidet. Variasjoner i peptidlengde tilpasses ved hjelp av en bukting i peptid-ryggraden, ofte ved prolin- eller glycinrester som tillater den påkrevde fleksibilitet.

Peptider som binder til MHC klasse II molekyler er typisk mellom 8 og 20 aminosyrer
 10 lange, mer vanlig mellom 10 og 17 aminosyrer lange, og kan være mye lenger. Disse peptidene ligger i en forlenget konformasjon langs MHC II peptidbindingsgropen som (til forskjell fra MHC klasse I peptidbindingsgropen) er åpen i begge ender. Peptidet holdes på plass hovedsakelig ved hovedkjedeatom-kontakter med bevarte rester som fyller peptidbindingsgropen.

15 Peptidet kan dannes ved anvendelse av kjemiske metoder (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin). Peptider kan f.eks. syntetiseres ved hjelp av fastfase-teknikker (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204), spaltes fra harpiksen, og renses ved preparativ høytrykkesvæskeskromatografi (f.eks. Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH
 20 Freeman and CO, New York NY). Automatisert syntese kan oppnås f.eks. ved å anvende ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) i overensstemmelse med instruksjonene gitt av produsenten.

25 Peptidet kan alternativt dannes ved hjelp av rekombinante metoder, eller ved spalting fra et lengre polypeptid. Peptidet kan f.eks. oppnås ved spalting fra target-antigenet. Sammensetningen av et peptid kan bekreftes ved aminosyreanalyse eller sekvensering (f.eks. Edman-nedbrytningsprosedyren).

30 Peptidet kan foretrukket avledes fra et mål-antigen. Et mål-antigen er et molekyl (f.eks. et protein eller glykoprotein) som prosesseres ved APC og gjenkjennes av T-celler under forløpet av sykdommen. Mål-antigenet vil naturligvis avhenge av målsykdommen. Peptidet kan foretrukket avledes fra et fragment av antigenet som oppstår ved naturlig prosessering av antigenet ved en APC.

35 For praktiske formål er der forskjellige andre egenskaper som peptidet bør utvise. F.eks. bør peptidet være oppløselig ved en konsentrasjon som tillater dets anvendelse *in vivo*. Peptidet bør foretrukket være oppløselig ved konsentrasjoner på opptil 0,5 mg/ml, mer foretrukket bør peptidet være oppløselig ved konsentrasjoner opptil 1

mg/ml, og mest foretrukket bør peptidet være oppløselig ved konsentrasjoner opptil 5 mg/ml.

For intranasal administrering er det maksimale volum av dose som kan tas opp ved anvendelse av aktuelle prosedyrer omtrent 200 µl pr. nesebor. Hvis peptidet er oppløselig ved 1 mg/ml, gjør en dobbelt dose til hvert nesebor det mulig å gi 800 µg til pasienten. Det er uvanlig å gi mer enn 50 mg i en hvilken som helst individuell dose.

Det er også viktig at peptidet er tilstrekkelig stabilt *in vivo* til å være terapeutisk anvendbart. De foreliggende oppfinnere har funnet at *in vivo*, 30 minutter etter administrering, faller den totale mengde av et testpeptid til omtrent 50%, 4 timer etter administrering faller mengden til omtrent 30%, men at etter 5 døgn er peptidet fremdeles detekterbart (ved omtrent 5%). Halveringstiden av peptidet *in vivo* bør være minst 10 minutter, foretrukket minst 30 minutter, mer foretrukket minst 4 timer og mest foretrukket minst 24 timer.

De foreliggende oppfinnere har funnet at etter intranasal administrering når mengden av peptid i den drenerende lymfekjertel en topp ved omtrent 4 timer etter administrering, idet peptidet imidlertid fremdeles er detekterbart (ved nivåer på omtrent 5% maksimum) etter 5 døgn. Peptidet er foretrukket tilstrekkelig stabilt til å være tilstede ved en terapeutisk aktiv konsentrasjon i den drenerende lymfekjertel lenge nok til å utøve en terapeutisk effekt.

Peptidet bør også vise god biotilgjengelighet *in vivo*. Peptidet bør opprettholde en konformasjon *in vivo* som gjør det mulig at det kan binde til et MHC molekyl ved celleoverflaten uten ventet hindring.

Målsykdommer

Et peptid selektert ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen kan være anvendbart i behandling og/eller forebygging av en sykdom.

Det er sannsynlig at en apitop for MHC klasse II er spesielt anvendbar i sykdommer som medieres av CD4+ T-celle-responser, f.eks. sykdommer som er etablert eller opprettholdt av en uhensiktsmessig eller overdreven CD4+T-celle-respons.

Det er sannsynlig at et slikt peptid er spesielt anvendbart i behandlingen av hypersensitivitetssykdommer. Hypersensitivitetssykdommer inkluderer:

- (i) allergier, som resulterer fra uhensiktsmessige responser på uskadelige fremmedsubstanser,

- (ii) autoimmune sykdommer, som resulterer fra responser på egne vevs-antigener, og
- (iii) graftreaksjon, som resulterer fra responser på et transplantat.

5 Eksempler på allergier inkluderer, men er ikke begrenset til: høyfeber, ekstrinsisk astma, insektbitt- og -stikkallergier, mat- og legemiddelallergier, allergisk rhinitt, bronkialastma, kronisk bronkitt, anafylaktiske syndrom, uricaria, angioødem, atopisk dermatitt, allergisk kontakt dermatitt, erythema nodosum, erythema multiforme, Stevens-Johnson Syndrom, rhinokonjunktivitt, konjunktivitt, kutan nekrotiserende
10 venulitt, inflammatorisk lungesykdom og bulløse hudsykdommer.

Eksempler på de autoimmune sykdommer inkluderer, men er ikke begrenset til: reumatoid artritt (RA), myasthenia gravis (MG), multiple sklerose (MS), systemisk lupus erythematosus (SLE), autoimmune tyroiditt (Hashimotos tyroiditt), Graves
15 sykdom, inflammatorisk tarmsykdom, autoimmun uveoretinitt, polymyositt og visse typer diabetes, systemisk vaskulitt, polymyositt-dermatomyositt, systemisk sklerose (skleroderma), Sjögrens Syndrom, ankyloserende spondylitt og relaterte spondyl-
artropatier, reumatisk feber, hypersensitivitets-pneumonitt, allergisk bronkopulmonal aspergillose, uorganisk støv-pneumokoniose, sarkoidose, autoimmun hemolytisk
20 anemi, immunologiske blodplatesykdommer, cryopatier slik som cryofibrinogenemi og autoimmune polyendocrinopatier.

En rekke forskjellige vev transplanteres vanligvis i klinisk medisin, inkluderende nyre, lever, hjerte, lunge, hud, hornhinne og benmarg. Alle transplantater unntatt horn-
25 hinne- og noen benmargstransplantater krever vanligvis langvarig tilstedeværelse av immunsuppresjon.

Peptidet kan anvendes i behandlingen og/eller forebyggingen av diabetes. I denne utførelsesformen kan peptidet avledes fra målantigenet IA2.

30

Peptidet kan anvendes i behandlingen og/eller forebyggingen av multippel sklerose (MS). Multippel sklerose (MS) er en kronisk inflammatorisk sykdom som kjennetegnes ved multiple demyeliniserende lesjoner som er dissiminert gjennom hele den CNS hvite substans og forekommer ved forskjellige steder og tidspunkter (McFarlin og McFarland,
35 1982 New England J. Medicine 307:1183-1188 og 1246-1251). MS menes å medieres av autoreaktive T-celler.

Peptidet kan avledes fra ett av autoantigener, særlig myelin-basisprotein (MBP) eller proteolipid-protein (PLP). MBP er muligens mer formålstjenlig enn PLP, fordi PLP er

svært hydrofobt og peptider avledet fra dette har en tendens til å klumpe seg sammen. MBP er immunogent og MBP-spesifikke T-lymfocytter har encefalitogenisk aktivitet i dyr (Segal *et al*, 1994 J. Neuroimmunol 51:7-19, Voskuhl *et al*, 1993 J. Neuroimmunol 42:187-192, Zamvil *et al*, 1985 Nature 317:355-8).

5

Peptidet kan avledes fra en av de immundominerende regioner av MBP, nemlig: 1-24, 30-54, 75-99, 90-114, 105-129, 120-144, 135-159 og 150-170.

Apitoper for MHC klasse I kan f.eks. anvendes til å modifisere anti-virale CD8+responser på en tolerogen måte.

10

Farmasøytisk preparat

De foreliggende oppfinnere forutsier at det på tross av "bystander suppresjon" kan være nødvendig å targetere et antall forskjellig T-celle-kloner for å indusere toleranse på en effektiv måte. Et flertall peptider kan således administreres til et individ for å forebygge eller behandle en sykdom.

15

Et peptid selektert ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse kan derfor være del av et farmasøytisk preparat omfattende et flertall apitoper.

20

Det farmasøytiske preparatet kan f.eks. omfatte mellom 2 og 50 apitoper, foretrukket mellom 2 og 15 apitoper. Apitopene kan være avledbare fra det (de) samme eller forskjellig(e) målantigen(er). Apitopen er foretrukket enten alle i stand til å binde til MHC klasse I, eller alle i stand til å binde MHC klasse II, uten ytterligere behandling.

25

Alle apitopene i det farmasøytiske preparatet er foretrukket enten i stand til å binde til MHC klasse I eller klasse II uten ytterligere behandling.

Det farmasøytiske preparatet kan være i form av et sett, hvori noen eller hver av apitopene er tilveiebrakt separat for samtidig, separat eller sekvensiell administrering.

30

Alternativt (eller i tillegg) hvis det farmasøytiske preparatet (eller en hvilken som helst del derav) skal administreres i multiple doser, kan hver dose være pakket separat.

Det farmasøytiske preparatet kan omfatte en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av apitopen eller av hver apitop og eventuelt en farmasøytisk akseptabel bærer, fortynningsmiddel eller eksipiens.

35

I de farmasøytiske preparatene kan apitopen eller hver apitop videre være blandet med hvilket eller hvilke som helst egnede bindemidler, smøremidler, suspensjonsmidler, belegningsmidler eller solibiliseringsmidler.

5 *Administrering*

Peptidet bør administreres i oppløselig form i fravær av adjuvans.

Peptidet administreres foretrukket ved en mukosal rute.

- 10 Studier har vist at et peptid, når det i oppløselig form gis intraperitonealt (i.p.), intravenøst (i.v.) eller intranasalt (i.n.) eller oralt, kan indusere T-celle-toleranse (Anderton og Wraith (1998) som angitt ovenfor; Liu og Wraith (1995) som angitt ovenfor, Metzler og Wraith (1999) Immunology 97:257-263).

- 15 Peptidet administreres foretrukket intranasalt.

- Studier i mus har vist at varigheten av peptidadministrering som er påkrevet for å indusere toleranse avhenger av forløperhyppigheten av T-celler i recipienten (Burkhart et al (1999) som angitt ovenfor). I mange forsøksstudier er det blitt vist at gjentatte
20 doser av peptid er påkrevet for å indusere toleranse (Burkhart et al (1999) som angitt ovenfor). Den nøyaktige dose og antall doser av peptid vil derfor avhenge av individet, idet et flertall doser imidlertid administreres i en foretrukket utførelsesform.

- Hvis et flertall peptider administreres samtidig, kan de være i form av en "cocktail"
25 som er egnet for administrering i enkle eller multiple doser. Alternativt kan det være foretrukket å gi multiple doser men variere de relative konsentrasjoner av peptidene mellom doser.

- Foretrukket kan det følges en "doseeskaleringsprosedyre", hvor flere doser gis til
30 pasienten i stigende konsentrasjoner. En slik fremgangsmåte er f.eks. blitt anvendt for fosfolipase A2 peptider i immunterapautiske anvendelser mot biegiftallergi (Müller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol 101:747-754 og Akdis et al (1998) J. Clin Invest 102:98-106).

35 EKSEMPLER

De etterfølgende eksempler tjener til å belyse den foreliggende oppfinnelse.

EKSEMPEL 1 - Identifisering av T-celle-epitoper i MBP

Materialer og metoder

Antigener

Humant MBP fremstilles fra hvit hjernesubstans som beskrevet av Deibler et al. (Deibler *et al*, 1972 Preparative Biochemistry 2:139), og dens renhet vurderes ved hjelp av SDS-PAGE. MBP og Mycobacterium tuberculosis renses ved proteinderivat (PPD, "purified protein derivative") (UK Central Veterinary Laboratory, Surrey) anvendes i proliferative analyser ved tidligere bestemte optimale konsentrasjoner; den optimale konsentrasjonen for hvert antigen er 50 µg/ml. Et panel av 15-mer overlappende peptider som spenner over hele MBP molekylet syntetiseres ved anvendelse av standard F-moc kjemi på en Abimed AMS 422 multiplert peptid syntetiseringsinnretning (Abimed, Langenfeld, Tyskland). Hvert peptid deplasseres av 5 aa og overlappes av 10 aa. Det produseres 33 peptider som skal samles i grupper på 3 og samlingene testes ved den optimale konsentrasjonen på 50 µg/ml, slik at hvert peptid *in vitro* er tilstede ved en konsentrasjon på 16,6 µg/ml.

15 Pasienter og kontrollindivider

Individene i denne undersøkelsen består av 12 pasienter med klinisk bestemt eller laboratorieunderstøttet bestemt MS (Poser *et al*, 1983), med en alder som varierer fra 29-51 år. Åtte av de 12 pasientene er involvert i et forsøk med interferon-β, ellers har alle andre MS pasienter ikke mottatt noen corticosteroidbehandling i de siste 3 månedene før igangsettelsen av undersøkelsen. Kontrollgruppen bestod av 13 friske individer med en alder som varierer fra 25-55 år, og ingen hadde mottatt immunundertrykkende terapi i minst 3 måneder før blodprøven ble tatt.

Vevskulturmedium

25 RPMI-1640 medium supplert med 20 mM HEPES (Sigma, Poole, UK), penicillin (100U/ml), streptomycinsulfat (100 mg/ml), og 4 mM L-glutamin (alle fra Life Technologies, Paisley, Scotland), anvendes som vevskulturmediet. Medium uten serum anvendes for vasking av lymfoidceller og TCL. For alle kulturbetingelser og analyser suppleres mediet med 10% varme-inaktivert autologt plasma.

30

Dyrkingsbetingelser og T-celle-proliferative analyser

Citratbehandlet perifert blod (50-100 ml) samles ved venepunktering fra hvert individ etter opplyst skriftlig samtykke var blitt anskaffet. Perifert blod-mononukleære celler (PBMC) isoleres fra blod ved densitetssentrifugering på Histopaque-1077 (Sigma, Poole, UK), og dyrkes i 1,5 ml volumer i 24-brønns vevskulturplater (Nunc International, 35 Costar, Corning Inc. New York, USA) ved en konsentrasjon på 1×10^6 celler pr. ml, inneholdende enten PPD, MBP eller peptider av MBP. Platene inkuberes ved 37°C i en fuktet atmosfære av 5% CO₂/95% luft. Mellom dagene 5 og 14 trekkes duplikate prøvemengder på 100 µl ut fra hver kultur, overføres til en 96-brønns rundbunnet

mikrotiter plate og pulseres med 0,4 μCi [^3H]-Thymidine (Amersham International, Amersham, UK). Etter 18 timer høstes cellene på glassfibermatter (LKB-Wallac, Turku, Finland) ved anvendelse av en Mach 111 høsteinnretning 96 (Tomtec, Orange, New Jersey, USA). [^3H]-Thymidine-innlemmelse bestemmes ved anvendelse av en mikro-beta væskescintillasjonsteller (LKB-Wallac). Testbrønner inneholdende antigen anses positive når $\delta\text{CPM} > 1000$ og stimuleringsindeksen (SI) > 3 , hvor $\text{SI} = \text{CPM antigen-inneholdende kultur} / \text{CPM-kultur uten antigen}$.

Frembringelse av T-celle-linjer og T-celle-kloner

MBP-spesifikke T-celle-linjer (TCL) frembringes fra 8 MS-pasienter og 2 friske kontroll-donorer. PBMC fra hvert individ separeres som beskrevet ovenfor og utplates med 1×10^6 celler/ml i 6-brønns plater i nærvær av MBP (50 $\mu\text{g/ml}$); en porsjon PBMC fra hvert individ nedfryses regelmessig og lagres for senere restimuleringer. Syv dager senere tilføres cellene friskt medium inneholdende 2% IL-2 (Lymphocult-HT; Biotest LTD., Birmingham, UK), og på dag 12 av dyrkingen restimuleres alle celler med antigen, IL-2 og bestrålte (2500 Rad) autologe PBMC som en kilde for antigenpresenterende celler (APC), ved et celleforhold på 1T-celle:5 APC. Celler ekspanderes i IL-2 hver 3-4 dag og restimuleres på dag 14 med antigen, IL-2 og PBMC, som beskrevet ovenfor. På dagen for den første restimuleringen undersøkes cellene med hensyn på spesifikk proliferasjon overfor MBP. I kortere trekk dyrkes 2×10^4 T-celler og 1×10^5 bestrålte autologe PBMC in triplo, i en 96-brønns rundbunnet plate, i nærvær av MBP. Cellene dyrkes i 2 døgn og pulseres med (^3H)-Thymidine ved 0,4 μCi /brønn under de siste 18 timene av dyrkingen. Cellene høstes deretter som beskrevet ovenfor, og en TCL anses å være MBP-spesifikk med en $\delta\text{cpm} > 1000$ og en $\text{SI} > 3$.

Etter 3 restimulerings/ekspansjonssykluser klones TCL ved anvendelse av PHA (Sigma, Poole, Dorset, UK) i nærvær av autologe bestrålte PBMC som APC. T-celler utplates under begrensende fortynningsbetingelser med 0,1 celle/brønn, 0,3 celle/brønn og 1 celle/brønn og dyrkes i Terasaki-plater (Nunc International, Costar) med 1×10^4 bestrålte PBMC, 5 $\mu\text{g/ml}$ PHA og 2% IL-2. Etter 10-12 dager ble vekstpositive brønner ekspandert på 96-brønns rundbunnede plater, ved anvendelse av 1×10^5 bestrålte PBMC, 5 $\mu\text{g/ml}$ PHA og IL-2. Tre dager senere tilføres brønnene friskt medium inneholdende IL-2, og på dag 7 ekspanderes klonene på 48-brønns plater ved anvendelse av 5×10^5 bestrålte PBMC, PHA og IL-2; på dette tidspunktet testes kloner i proliferasjonsanalyser med hensyn på spesifikke responser på MBP. MBP-spesifikke kloner ekspanderes en uke senere på 24-brønns plater, ved anvendelse av 1×10^6 bestrålte PBMC med PHA eller Dynabeads (Dynal, UK) og IL-2. Klonene opprettholdes i 24-brønns plater ved anvendelse av en 7-10 dagers restimulering/ekspansjonssyklus, i alt

vesentlig som beskrevet ovenfor. T-celle-klonenes (TCC) evne til å gjenkjenne panelet av MBP-peptider testes ved hjelp av proliferasjonsanalyser, som beskrevet ovenfor.

Resultater

5 MBP-peptid-gjenkjennelse blant MS-pasienter og friske individer

De foreliggende oppfinnere anvender en kinetisk responsanalyse hvori PBMC fra MS-pasienter og friske individer testes med hensyn på deres evne til å respondere på et panel av overlappende 15-mer syntetiske peptider som spenner over den fulle lengden av humant MBP. Den proliferative respons av PBMC fra hver kultur undersøkes ved 5
10 tidspunkter over en periode på 2 uker, og den kinetiske profilen av responsen på MBP og peptider sammenlignes med responsen på PPD, idet sistnevnte representerer et sekundært respons/hukommelse-antigen. Ingen betydelig forskjell finnes i PBMC-responsen på MBP og/eller peptider mellom pasienter som går på Interferon- β og dem som ikke går på noen behandling (data ikke vist). Responsen på MBP i både MS-
15 pasienter og friske kontroller nådde en topp senere enn responsen på PPD, og følger derved de kinetiske karakteristika av responsen på et ikke-recall antigen. Figur 1 viser et typisk eksempel på den kinetiske profilen av PPD og MBP i MS-pasienter og friske individer.

20 Som vist i figur 2, er de to peptidene som vanligst gjenkjennes ved MS-pasienter 90-114 og 75-99 (6/12 pasienter hver), etterfulgt av regioner 30-54, 135-159 og 150-170 (5/12 pasienter), og 1-24 og 105-129 (4/12 pasienter). Tre pasienter responderer på aa 15-39 og 120-144. To pasienter gjenkjenner 45-69, og ingen av MS-pasientene responderer på region 60-84.

25

I overensstemmelse med figur 10, hvor alle pasientene er HLA-DR2 positive, er de to peptidene som vanligst gjenkjennes ved MS-pasienter 90-114 og 75-99 (6/11 pasienter hver), etterfulgt av regioner 120-144, 135-159 og 150-170 (5/11 pasienter), og 1-24, 15-39, 30-54 og 105-129 (4/11 pasienter). Tre pasienter responderer på aa 45-
30 69, og igjen responderer ingen av MS-pasientene på region 60-84.

I motsetning gjenkjenner friske individer betydelig færre peptider, idet kun 2 kontroll-individer responderer på mer enn 2 peptider (C og J; figur 3). Kontrollindivider C og J er de to eneste som gjenkjenner aa 60-84, en region som ikke sees hos denne gruppen pasienter. Det er interessant at begge disse individene uttrykker DRB1* 0701
35 allelet. Regioner 45-69 og 105-129 gjenkjennes ikke av noen av de friske donorene, mens 75-99 og 150-170 gjenkjennes av 4 friske individer, 135-159 gjenkjennes av tre friske individer, 1-24, 30-54, 60-84 og 120-144 gjenkjennes av to friske individer, og 15-39 og 90-114 gjenkjennes av ett individ. Totalt er det 8/13 friske individer som

ikke responderer på noen av de overlappende peptider, mens kun 1/12 MS-pasienter (MS 19) konsistent ikke greier å gjenkjenne MBP peptider. Det bør legges merke til at denne pasienten er unik ved ikke å respondere på MBP-protein.

- 5 Figur 11 viser også responsen til friske individer på MBP- peptider. I denne under-søkelsen responderer kun 1 kontrollindivider på mer enn 2 peptider (N11). N11 er også det eneste individet som gjenkjenner aa 60-84, en region som ikke sees hos denne gruppen pasienter. Regioner 15-39, 45-69 og 105-129 gjenkjennes ikke av noen av de friske donorene, mens 120-144 og 135-159 gjenkjennes av to friske individer, og 1-24,30-54, 60-84, 75-99, 90-114 og 150-170 gjenkjennes av ett individ. Totalt respon-
- 10 derer 9/12 friske individer ikke på noen av de overlappende peptider.

Samlet, den dag hvorpå responsen på MBP og/eller peptider nådde en topp skilte seg ikke betydelig mellom friske individer og pasienter, og kinetikken i begge gruppene

15 lignet på kinetikken for en primær antigenrespons. Størrelsen av responsen på MBP og peptider er i tillegg ikke forskjellige mellom pasienter og friske individer.

Forandringer over tid av MBP-peptid-gjenkjennelse

Etter at det er etablert at pasienter med MS responderer på et bredt spektrum av MBP-

20 peptider, besluttet de foreliggende oppfinnere å undersøke hvorvidt PBMC-gjenkjennelse i de samme individene er fokusert og stabil over et forløp på omtrent 4-12 måneder. Som vist i figurene 2, 10 og 3 utviste hverken MS-pasientene eller de friske individene det samme peptid-gjenkjennelsesmønster.

- 25 Figur 4 representerer et eksempel på en MS-pasient (MS 49) som responderer på multiple peptider ved 2 forskjellige tidspunkter, men gjenkjennelsesprofilen under det andre tidspunktet, målt 4 måneder senere, avviker betydelig. Det vil si at i den andre kinetiske analysen vedvarer PBMC-responsen på aa 15-39, 30-54 og 150-170, idet responsen på 75-99 og 105-129 imidlertid går tilbake og forskyves til regioner 90-114
- 30 og 135-159.

Figur 5 (MS 60) belyser et eksempel på en pasient hvis brede epitoprespons gikk tilbake til en fokusert respons over en periode på 4 måneder. De friske individene som testes den andre gangen igjen greier ikke å respondere på noen av peptidene (figur 3).

35

Samlet viser resultatene at pasienter med MS ikke utviser faste gjenkjennelsesmønstre. Innen hver pasient kan PBMC-responsen på flere peptider vedvare, gå tilbake og forskyves til nye regioner av MBP, som det sees i pasient MS 49.

Cyklisering av peptid-gjenkjennelse

Når PBMC-responsen på peptider analyseres ved 3 eller flere forskjellige tidspunkter over en periode på 12 måneder, blir det klart at i visse pasienter viser epitop-gjenkjennelse seg å fluktuere snarere enn å forskyves irreversibelt til nye peptidregioner.

- 5 For eksempel, som vist i figurer 2 og 10, utviser pasient MS 60 et cykliserende gjenkjennelsesmønster overfor aa 120-144 og 135-159; dvs. at rester 120-144 og 135-159 er blant mange som gjenkjennes ved det første tidspunktet som testes, responsen på disse 2 regioner går tilbake ved det andre tidspunktet og kommer deretter igjen til syne ved det tredje tidspunktet målt 4 måneder senere. Den kinetiske profilen til
- 10 pasient MS 41 viser likeledes at gjenkjennelse av aa 135-159 fluktuerer over flere tidspunkter (se figurer 2 og 10).

- Blant den friske kontrollgruppen (figur 3) utviser et individ (M) en fluktuerende respons på regioner 75-99 og 135-159, et andre individ (F) gjenkjenner 75-99 ved to
- 15 av de tre tidspunktene som analyseres, mens et tredje individ (D) utviser en cyklisk respons på rest 15-39.

Fin-kartlegging av responsen på MBP

- TCC frembringes fra 8 MS-pasienter og 2 friske individer, og anvendes til å klarlegge
- 20 den fine spesifisiteten til peptidregionene identifisert i den kinetiske responsanalysen. Spesifisiteten til hver TCC testes ved dens proliferative respons på panelet av 15-mer peptider. Klon SD:A7 gjenkjente region 1-24, og innenfor denne regionen responderte denne TCC på aa 5-19. Region 30-54 gjenkjennes av 4 kloner (MS49:D3, MS49:C8, MS49:A8, MS49:B6) og epitopen innenfor denne regionen er 30-44. En klon
- 25 (MS39:D7) fra en MS-pasient gjenkjenner peptid 60-74, og det er interessant at et friskt individ responderer på denne regionen (60-84) i vår kinetiske responsanalyse. Fem kloner (MS43:A7, MS41:B6, MS41:A2, MS41:C6, N5:8) gjenkjenner aa 83-99 som er inneholdt i region 75-99. En pasient produserte TCC som er spesifikk for aa 110-124 (MS60:A2, MS60:B3), inneholdt innenfor 105-129 samlingen, og en annen
- 30 TCC fra den samme pasienten er spesifikk for 130-144 (MS60:E1), funnet innenfor 120-144 regionen. Fem individer produserer kloner som gjenkjenner epitoper innenfor regionen 135-159: MS60:F7, MS60:D1, MS59:F1 og N5:19 gjenkjenner aa 140-154, MS57:A1 er spesifikk for 140-149 og TCC MS17:A3 responderer på sekvens 130-144. Dette panelet av kloner viser klart tilstedeværelsen av minst 2 T-celle-epitoper
- 35 innenfor 135-159 regionen av MBP. Til sist gjenkjennes region 150-170 av 2 kloner som er spesifikke for aa 156-169. Spesifisiteten til alle TCC er oppsummert i figur 6.

EKSEMPEL 2 - Identifisering av apitoper i MBP

Materialer og metoder

5 Antigen-presenteringsanalyse ved anvendelse av en APIPS

Presentering av peptidene for T-celle-kloner måles ved proliferasjon. APC fikseres i 0,5% paraformaldehyd og utplates med 1×10^5 celler pr. brønn i en 96-brønns vev-kulturplate. T-celle-kloner utplates med 2×10^4 celler pr. brønn i nærvær av varierende konsentrasjoner av peptid. Etter inkubering i 48 timer ved 37°C måles proliferasjon ved [^3H] thymidin-innlemmelse over 16-20 timer. Resultatene sammenlignes med T-cellers evne til å respondere på epitopen presentert av levende APC.

Presenteringen av peptider for T-celler isolert fra DR2:MBP82-100 transgen mus var i alt vesentlig som beskrevet ovenfor unntatt at APC ble utplatet med 5×10^5 celler pr. brønn, T-celler ble utplatet med 1×10^5 celler pr. brønn, og inkubering fikk forløpe i 72 timer før tilsetning av [^3H]-thymidin.

Resultater

20 I dette forsøket blir peptider som er blitt identifisert som apitoper i det foregående eksemplet undersøkt med hensyn på deres kapasitet til å presenteres ved anvendelse av en APIPS. Resultatene er vist i figur 7b. Av de fem epitopene undersøkt så langt ble fire funnet å være apitoper (30-44, 80-94, 110-124 og 130-144) og en ble funnet å virke som en epitop men ikke en apitop (156-170).

25

Eksempel 2A - undersøkelse av MBP-peptider 30-44, 110-124, 130-144 og 156-170

For å undersøke hvorvidt forskjellige MBP-peptider er apitoper, undersøkes deres kapasitet til å presenteres for T-celler ved hjelp av fikserte APC. Levende eller forhånds-pulserte Mgar (HLA-DR2+ve) celler forhånds-pulseres med peptidet i serum, eller serum alene i 3,5 timer. Overskuddspeptid fjernes deretter fra cellene og den passende T-celle-klon tilsettes. Den T-celle-proliferative respons måles ved ^3H -thymidin-opptak.

35 Som vist i figurer 8 og 9 kan peptider 30-44 (fig. 8A), 110-124 (fig. 8B) og 130-144 (fig. 9A) presenteres ved hjelp av fikserte APC uten ytterligere behandling. Disse peptidene defineres derfor som apitoper. Peptid 156-170 krever på den annen side ytterligere behandling for presentering for T-celler (fig. 9B). Fikserte APC er ute av stand til å presentere denne epitopen for T-celler, slik at 156-170 er ikke en apitop.

Eksempel 2B - identifisering av apitoper innenfor regionene 77-100 og 125-148 av MBP

For en hvilken som helst gitt epitop kan der foreligge en eller flere apitoper, som er i stand til å presenteres for APC uten ytterligere behandling. Tilstedeværelsen av apitoper innenfor to regioner av MBP undersøkes ved å inkubere levende eller p-formaldehyd-fikserte Mgar (HLA-DR2+ve) celler med overlappende peptider i serum fra MBP-regioner 77-100 (figur 12) og 125-148 (figur 13) eller i serum alene. T-celler ble tilsatt og etter 72 timer (figur 12) eller etter 48 timer (figur 13) ble den T-celle-proliferative respons målt ved ^3H -thymidin-opptak. For MBP 77-100 er T-cellene isolert fra en DR2:MBP 82-100 transgen mus, mens for MBP 130-144 anvendes T-celle-klonen MS17:A3.

For MBP-region 77-100 er de følgende peptider definert som apitoper:

MBP 83-99 ENPVVHFFKNIVTPRTP
 MBP 80-94 TQDENPVVHFFKNIV
 MBP 81-95 QDENPVVHFFKNIVT
 MBP 82-96 DENPVVHFFKNIVTP
 MBP 83-97 ENPVVHFFKNIVTPR
 MBP 84-98 MPVVHFFKNIVTPRT

Minimum MBP-sekvensen som gjenkjennes av T-celler fra DR2 MBP 82-100 transgenus er region 85-94.

For MBP-region 125-148 er de følgende peptider definert som apitoper:

MBP 130-144 RASDYKSAHKGFKGV
 MBP 131-145 ASDYKSAHKGFKGVD
 MBP 132-146 SDYKSAHKGFKGVDA
 MBP 133-147 DYKSAHKGFKGVDAQ

Minimum MBP-sekvensen som gjenkjennes av T-celle-klon MS17:A3 er region 133-144.

Eksempel 2C - undersøkelse av region 89-101 av MBP

De foreliggende oppfinnere har tidligere vist at i motsetning til andre myelin T-celle-epitoper, så hindrer ikke administrering av peptid 89-101 i oppløselig form murin

eksperimentell autoimmun encefalomyelitt (EAE) induisert med enten helt myelin eller selve 89-101 peptidet (Anderton og Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251).

MBP 89-101 omfatter tre T-celle-epitoper

5

For å undersøke T-celle-reaktivitet overfor 81-111 regionen av MBP, blir lymfekjertel-celler fra mus primet med 81-111 stimulert med 81-111 in vitro og disse cellene testes med et panel av overlappende 10-mer peptider med to rest-forskyvninger som dekker 81-111 regionen (nemlig: 81-90, 83-92, 85-94, 87-96, 89-98, 91-100, 93-102, 95-104, 97-106, 99-108 og 101-111). Responsmønsteret på peptider som dekker 89-101 utviser stimulerende kapasitet for 5 nabo-peptider (N-terminal 87-96 til og med 95-104) som gjenspeiler tilstedeværelse av minst to (og kanskje tre) distinkte epitoper.

For å undersøke denne regionen ytterligere, frembringes tre under-linjer fra den opprinnelige 81-111-responderende T-celle-linje, og disse testes på ny med et panel av overlappende 10-mer peptider med en rest-forskyvning som dekker 84-106 regionen. Resultatene åpenbarer forekomsten av tre distinkte men overlappende T-celle-epitoper innenfor 89-101 sekvensen: 89-94, 92-98 og 95-101 (se figur 14).

20 MBP-peptid 92-98 er en kryptisk epitop

De tre epitop-spesifikke T-celle-linjer (TCL) utviser interessante forskjeller når de testes med hensyn på reaktivitet overfor 89-101 peptidet og hele det rekombinante MBP. Alle tre TCL responderer på peptidet (89-101) men kun 89-94- og 95-101-spesifikt TCT responderer på hele MBP. Dette indikerer at antigenbehandling av intakt MBP fortrinnsvis frembringer ligander for T-celler som gjenkjenner 89-94 og 95-101 men ikke dem som gjenkjenner 92-98. Dette antyder at 92-98 epitopen er kryptisk (dvs. ikke kan frembringes ved behandling av nativt antigen). Det synes som om MBP 89-101 peptidet tar del i tre distinkte interaksjoner med MHC-molekylet hvilket resulterer i peptid/MHC-ligander som gjenkjennes av tre separate T-celle-populasjoner. Prosessering av MBP frembringer imidlertid ligander for to av disse T-celle-populasjoner (se fig. 14).

Indusering av EAE krever T-celle-gjenkjennelse av autoantigene epitoper uttrykt i CNS som et resultat av nedbrytning av intakt MBP. Immunisering av mus med peptider omfattende kun en av de tre tidligere identifiserte T-celle-epitoper viser at kun dem inneholdende en naturlig behandlet epitop (89-94 eller 95-101) er i stand til å indusere EAE. Dette understøtter ytterligere det funn at 92-98 er en kryptisk epitop.

MBP-peptid 92-98 er den dominante epitop for MBP-region 89-101

Som nevnt ovenfor, inneholder regionen 89-101 tre distinkte men overlappende peptider. Av disse viser peptid 92-98 seg å være dominant for denne regionen. Når
 5 for eksempel T-celle-kloner frembringes fra mus primet med 89-101 peptidet, responderer alle seks kloner som ble frembragt på 92-98. Ved anvendelse av 89-101 analog-peptider inneholdende individuelle alanin-substitusjoner ved hver posisjon, er det blitt funnet at substitusjon av hvilken eller hvilke som helst av posisjonene 92-98 fører til en mangel på responderbarhet, hvilket viser at endring av hvilken eller hvilke som
 10 helst rester innenfor 92-98 kjernen har store effekter på gjenkjennelse av denne epitopen.

MBP-peptid 89-101 klarer ikke å indusere toleranse overfor EAE-relevante T-celler som gjenkjenner en naturlig behandlet MBP-epitop

15 For å oppsummere funnene ovenfor, har de foreliggende oppfinnere funnet at a) 89-101 sekvensen har et potensial til å frembringe 3 distinkte T-celle-epitoper; b) kun to av disse epitopene (89-94 og 95-101) frembringes ved antigenbehandling av intakt MBP (begge in vitro og in vivo); c) kun peptider inneholdende de naturlig behandlede
 20 epitoper og ikke dem inneholdende en kryptisk epitop er effektive med hensyn til å indusere EAE; d) 89-101 peptidet klarer ikke å beskytte mot EAE i peptidterapiforsøk.

Denne informasjonen tilveiebringer et grunnlag for undersøkelse av hypotesen om at peptid 89-101 ikke klarer å indusere toleranse overfor EAE gjennom en svikt med
 25 hensyn til å direkte ligere de sykdomsrelevante T-celler. For å underbygge hypotesen bør peptidet (89-101) ikke klare å indusere toleranse overfor den større encefalitogene epitop (89-94) siden den ikke vil binde direkte til MHC restriksjonselementet (I-A^s) i den passende konformasjon. Med andre ord vil ikke 89-101 virke som en epitop for T-celler som responderer på 89-94.

30 For å teste denne muligheten utføres toleranseforsøk med 89-101 og 87-96 peptider (fig. 15 A & B). 87-96 peptidet inneholder epitopen (89-94) som er mest effektiv med hensyn til å indusere EAE.

35 *Metoder*

Mus mottok 200 µg peptid i PBS eller PBS alene intraperitonealt på dager -8, -6 og -4 forut for 100 µg peptid i Freund's komplette adjuvans på dag 0. Etter 10 dager ble drenerende lymfekjertelceller (6×10^5 pr. brønn) dyrket i X-Vivo 15 medium supplert

med 5×10^{-5} M 2-merkaptoetanol og 2 M L-glutamin med eller uten antigen i 72 timer. Kulturer ble pulsert i de siste 16 timene med $0,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-thymidin}$ og innlemmelse ble målt ved anvendelse av en væskescintillasjonsteller. Resultater uttrykkes som gjennomsnittstillinger pr. minutt for triplikate kulturer.

5

Resultater

Priming med 87-96 induserte en sterk recall-respons på seg selv og en svakere respons på 89-101 (for henholdsvis fig. 15 A og B □ og ○). Dette er overensstemmende med behovet for antigenbehandling for å frembringe 89-94 fra 89-101. Anvendelsen av 87-96 som et tolerogen forut for priming med 87-96 undertrykket recall-responser på både 87-96 og 89-101 (fig. 15 A ■ og ●). Dette passer med 89-94 reaktive T-celler, så snart de er gjort ikke-responderende in vivo, som ikke klarer å respondere in vitro på 89-94 enten de er frembragt fra 89-96 eller 89-101. Det er imidlertid avgjørende at anvendelsen av 89-101 som tolerogenet forut for priming med 87-96 ikke klarte å inhibere recall-responser på hverken 87-96 eller 89-101 (fig. 15 B A ■ og ●). Disse dataene viser at administrering av peptid 89-101 i tolerogen form ikke klarer å indusere toleranse overfor den naturlig behandlede encefalitogene epitop basert på 89-94 sekvensen: 89-101 peptidet klarer ikke å oppføre seg som en apitop for 89-94 epitopen.

Uten ønske om å bindes av noen teori, mener de foreliggende oppfinnere at observasjonene kan forklares ved posisjonen av peptid 89-101 i MHC peptid-bindingssettet. Hvis peptidet fortrinnsvis binder slik at regionen 92-98 er i peptid-bindingslommen, da vil det gjenkjennes av MBP92-98-spesifikke T-celler. Dette ville forklare hvorfor, når mus er primet med MBP89-101 peptidet, alle de frembragte T-celle-kloner gjenkjenner MBP92-98 epitopen. Likeledes, når 89-101 anvendes til å indusere toleranse overfor T-celler, vil det hovedsakelig indusere toleranse overfor celler som gjenkjenner MBP92-98 epitopen. Hvis MPB92-98 er en kryptisk epitop, frembringes den ikke ved naturlig behandling av hele antigenet og T-celler som gjenkjenner denne epitopen vil sannsynligvis ikke foreligge in vivo. Selv hvis en MBP92-98-spesifikk T-celle ikke forelå in vivo, ville den ikke være relevant for sykdommen. 89-101 klarer således ikke å hindre EAE indusert med helt MBP.

35 **EKSEMPEL 3 - peptidterapi for en musemodell av MS**

De foreliggende oppfinnere har tidligere vist at en enkelt dose av peptidantigen administrert systemisk enten ved den intraperitoneale (Liu og Wraith (1995) Int

Immunol 8:1255-1263) eller intranasale (Metzler og Wraith (1993) 5:1159-1165) rute vil effektivt beskytte mus mot eksperimentell autoimmun encefalomyelitt (EAE) i opp til tre måneder (Metzler og Wraith (1999) Immunology 97:257-263). Minst 5 doser peptid var nødvendig for å indusere toleranse i den Tg4-transgene mus (Burkhart et al 5 (1999) 11:1625-1634) som uttrykker en EAE-spesifikk T-celle-reseptor (Liu et al (1995) Immunity 3:407-415). Nyere arbeider har vist at den intranasale (IN) rute er sikrere enn den intraperitoneale (IP) rute i Tg4 musen, selv om begge fremgangsmåter er like sikre i den ikke-transgene musen.

10 Peptid 83-99 av MBP testes i den Fug/D6 transgene mus som uttrykker både det passende HLA-DR2 klasse II MHC-molekyl og en TCR fra en human T-celle-klon som er spesifikk for dette peptidet. Musene behandles med peptid etter enten standarddosen anvendt for behandling av den Tg4 transgene mus (Tg4 protokoll) eller desensitiviseringsprotokollen for peptiddose-eskalering som er blitt anvendt i behandling av 15 pasienter som lider av allergi (desensitivitetsprotokoll).

Tg4 protokoll: Grupper av mus behandles ved intranasal administrering av peptid 83-99 (4 mg/ml i fosfatbufret saltoppløsning (PBS)) eller PBS alene i et totalt volum på 25 µl. Musene behandles hver 1. og 5. dag i uken i 5 uker hvilket gir totalt 10 doser. 20 Ved begynnelsen av uke 6 injiseres hver mus med peptid 83-99 i Freund's komplette adjuvans (CFA) og mottar også en IP-injeksjon av Pertussis Toxin (200 ng) på dag 1 og 3. Progresjonen av EAE overvåkes i minst 30 døgn.

Desensitiviseringsprotokoll: Grupper av mus behandles ved intranasal administrering 25 av en eskalerende dose av peptid 83-99 eller PBS alene i et totalt volum på 25 µl. Doseeskaleringen begynner ved 0,1 µg og fortsetter gjennom 1, 3, 6, 12, 50 og deretter tre ganger 100 µg. Musene behandles hver 1. og 5. dag i uken i 5 uker hvilket gir totalt 10 doser. Ved begynnelsen av uke 6 injiseres hver mus med peptid 83-99 i Freund's komplette adjuvant (CFA) og mottar også en IP-injeksjon av Pertussis 30 Toxin (200 ng) på dag 1 og 3. Progresjonen av EAE overvåkes i minst 30 døgn.

EKSEMPEL 4 - nasal administrering av en apitop-cocktail til MS-pasienter

Det lages en vaksine som omfatter MBP-peptidene 30-44, 83-99, 110-124 og 130-144 35 (dvs. noen av de epitoper av MBP som er blitt identifisert som apitoper). Vaksinen gis til trettifem pasienter i et fase Ia/Ib-forsøk. Forsøket er en enkelt krysstudie hvori pasientene forblir ubehandlet i tre måneder etterfulgt av en enkelt dose av peptid (Ia). Pasientene overvåkes deretter i tre måneder etter den enkle dosen av vaksine for å vurdere sikkerhet. Behandlingen består deretter av to ukentlige administreringer ved

intranasal avlevering. For hver pasient: klinisk aktivitet analyseres månedlig ved magnetisk resonansavbildning, immunologisk aktivitet overvåkes ved anvendelse av en kinetisk responsanalyse for proliferasjon, og cytokinproduksjon overvåkes ved anvendelse av en celle-basert ELISA.

5

Forsøket innbefatter initialt behandling av 5 pasienter som lider av kronisk progressiv (CP, chronic progressive) sykdom. Disse pasientene er valgt på grunnlag av lav MRI-aktivitet og behandles først med den høyeste dosen av peptidet. Behandlingen startes i CP-pasientgruppen fordi det er mest sannsynlig å fremvise mulige skadelige effekter som vises ved en økning i MRI-aktivitet. Behandling av remitterende pasienter som får tilbakefall begynner så snart det er klart at både enkeltdose- og multippeldose-behandling er sikker i CP-gruppen. En større gruppe av 30 remitterende pasienter som får tilbakefall rekrutteres på grunnlag av at de lider av økende MRI-lesjoner under en overvåkningsperiode på 3 måneder. Disse inndeles i tre grupper som skal behandles med en høy, middels eller lav dose av peptid.

15

20

TIDSPUNKT (MÅNEDER)	KRONISKE PROGRESSIVE (CP) PASIENTER	REMITTERENDE PASIENTER SOM FÅR TILBAKEFALL (RR)
0	Månedlig overvåking igangsettes	
3	Fase Ia (enkel dose av peptid) startes med MRI ved 1-2 uker etter behandling og månedlig overvåking	
6	Fase Ib (to ganger ukentlig dose av peptid) startes og månedlig overvåking fortsettes	Månedlig overvåking igangsettes og det rekrutteres pasienter med økte lesjoner
9		Fase Ib (to ganger ukentlig dose av peptid) og månedlig overvåking fortsettes
12	Behandling avsluttes og månedlig overvåking fortsettes i ytterligere 6 måneder	
15		Behandling avsluttes og månedlig overvåking fortsettes i ytterligere 6 måneder

25

Forkortelser: APC = antigen-presenterende celler, MHC = major histocompatibility complex, TCR = T-celle-reseptor, EAE = eksperimentell autoimmun encefalomyelitt, APITOP = antigenprosesseringsuavhengig epitop, APIPS = antigenprosesseringsuavhengig presenteringssystem, aa = aminosyre, MS = multippel sklerose, MBP = myelin-
5 basisprotein, PLP = proteolipid-protein, TCL = T-celle-linje, TCC = T-celle-klon, PBMC = perifert blod-mononukleære celler, PPD = renset proteinderivat av Mycobacterium tuberculosis, PHA = fytohemagglutinin.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å undersøke den tolerogene kapasitet til et peptid *in vitro*,
karakterisert ved at den omfatter trinnet med å bestemme om peptidet kan
5 binde et MHC klasse I eller II molekyl og presenteres for en T celle uten ytterligere
antigenprosessering, hvori peptidets kapasitet til å binde MHC klasse I eller klasse II
bestemmes ved:
 - (i) å behandle et antigenprosesseringsuavhengig system (APIPS) med peptidet; og
 - (ii) å analysere binding av peptidet til MHC klasse I eller II molekyler innen APIPS.
- 10 2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, hvori binding av peptidet til MHC klasse I eller
II molekyler analyseres ved tilsetning av T celler og måling av T celle aktivering.
3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 eller 2, hvori APIPS omfatter:
 - 15 (i) fikserte antigen presenterende celler,
 - (ii) lipidmembraner omfattende MHC klasse I eller II molekyler; eller
 - (iii) plate-bundne MHC klasse I eller II molekyler.
4. Fremgangsmåte for selektering av et tolerogent peptid,
20 karakterisert ved at den omfatter trinnet med å undersøke den tolerogene
kapasitet til et peptid ved en fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av de fore-
gående krav, og selektare et peptid i stand til binding til et MHC klasse I eller II
molekyl og presentering for en T celle uten ytterligere antigenprosessering.
- 25 5. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av de foregående krav, som omfatter
trinnet med å undersøke om peptidet er i stand til binding til et MHC klasse II molekyl
uten ytterligere antigenprosessering.
6. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvori peptidet
30 er selektert fra et flertall av peptider som hver omfatter en T celle epitop.
7. Fremgangsmåte som angitt i krav 6, hvori flertallet av peptider elueres fra MHC
klasse II molekylerne av en antigenpresenterende celle.
- 35 8. Fremgangsmåte som angitt i krav 6 eller 7, hvori hvert peptid i flertallet av
peptider er i stand til å indusere en sykdom assosiert med antigenet i et individ når
administrert til individet sammen med adjuvans.

9. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 5, hvori peptidet selekteres fra et nestet sett av trunkerte peptider.

10. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvori peptidet
5 omfatter en T celle epitop og tilstedeværelse av en T celle epitop bestemmes ved:

(i) å behandle:

en prøve av celler fra et individ som har sykdommen, og

en prøve av celler fra et individ som ikke har sykdommen med peptidet, og

(ii) å sammenligne T celle responsene mellom celleprøvene.

P9611.ST25
SEKVENSLISTE

<110> The University of Bristol

<120> PEPTIDE SELECTION METHOD

<130> P9611WO LCH

<140> PCT/GB01/03702

<141> 2001-08-17

<150> 0020618.5

<151> 2000-08-21

<150> 0114547.3

<151> 2001-06-14

<160> 11

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Pro

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

P9611.ST25

<400> 3

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

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg	Ala	Ser	Asp	Tyr	Lys	Ser	Ala	His	Lys	Gly	Phe	Lys	Gly	Val
1				5					10					15

<210> 8

<211> 15

P9611 ST25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala	Ser	Asp	Tyr	Lys	Ser	Ala	His	Lys	Gly	Phe	Lys	Gly	Val	Asp
1				5					10					15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ser	Asp	Tyr	Lys	Ser	Ala	His	Lys	Gly	Phe	Lys	Gly	Val	Asp	Ala
1				5					10					15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp	Tyr	Lys	Ser	Ala	His	Lys	Gly	Phe	Lys	Gly	Val	Asp	Ala	Gln
1				5					10					15

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 / 16

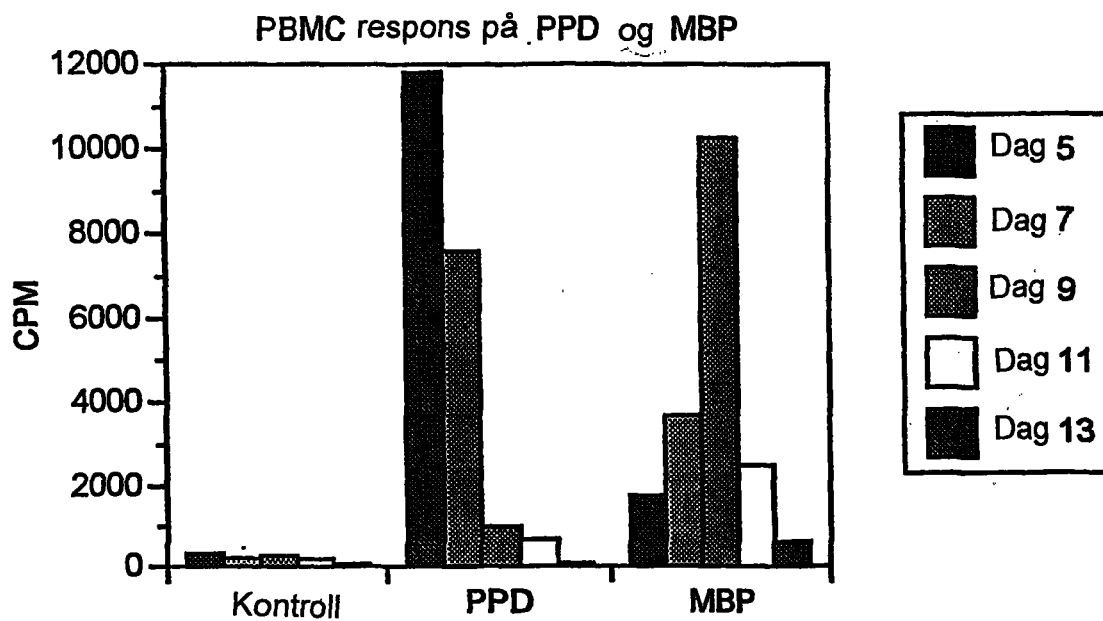


FIG. 1A

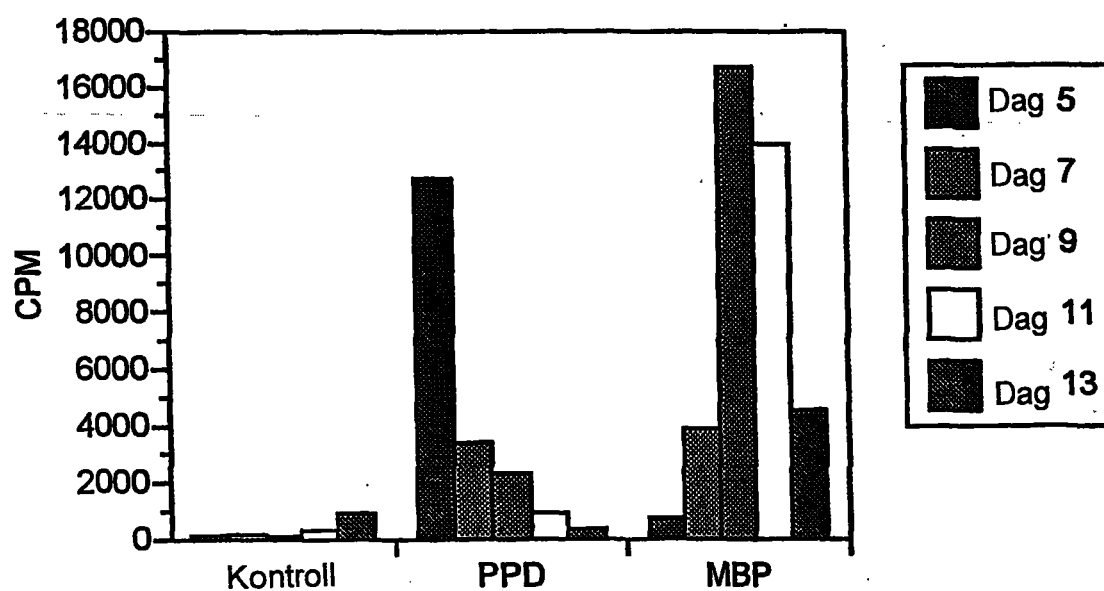


FIG. 1B

2 / 16

Respons på MBP peptider i MS pasienter: 1. tidspunkt												
MS	MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
MS 10	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
MS 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 39	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
MS 41	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MS 43	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
MS 49	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 57	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
MS 59	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
MS 60	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
MS 67	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 80	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Respons på MBP peptider i MS pasienter: 2. tidspunkt												
MS 10	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
MS 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MS 41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 49	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
MS 57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 60	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
MS 43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respons på MBP peptider i MS pasienter: 3. tidspunkt												
MS 41	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
MS 60	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
MS 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

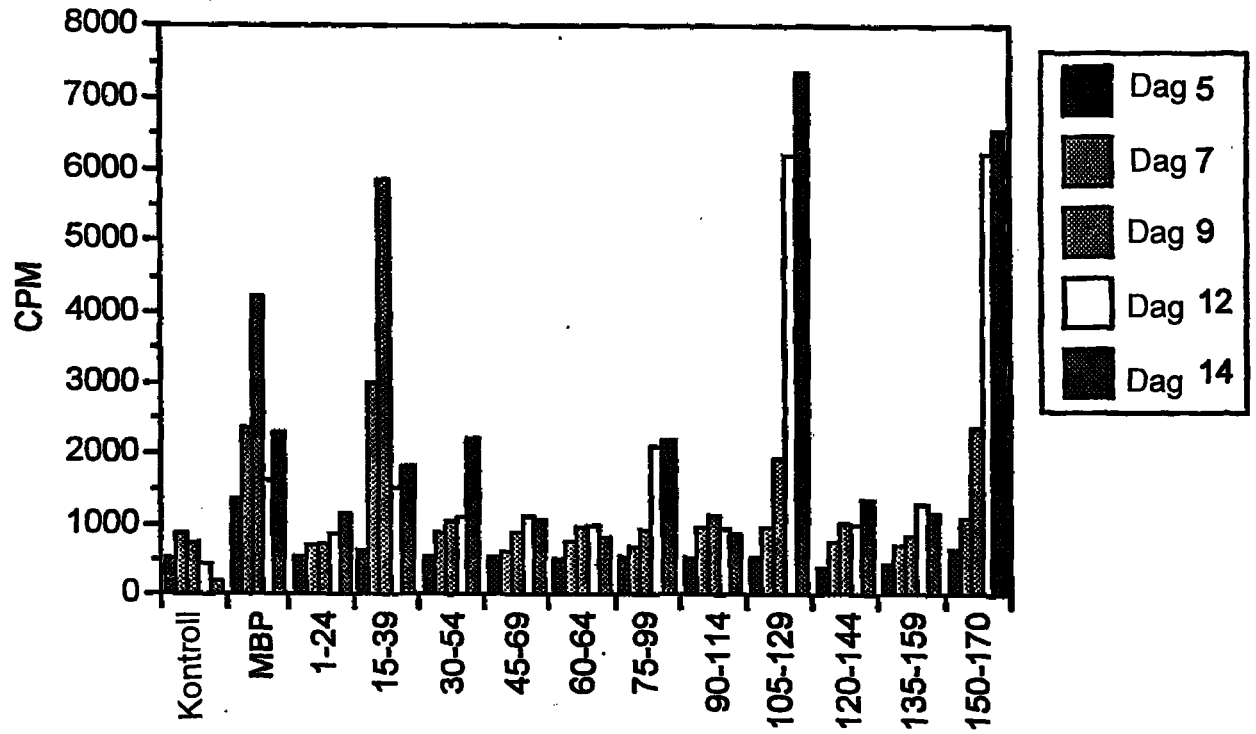
FIG. 2

Respons på MBP-peptider i friske individer: 1. tidspunkt													3 / 16				
Individ	MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-17					
A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
D	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Respons på MBP-peptider i friske individer: 2. tidspunkt																	
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Respons på MBP-peptider i friske individer: 3. tidspunkt																	
D	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 3

4 / 16

1. tidspunkt MS 49: PBMC-respons på MBP-peptider



2. tidspunkt

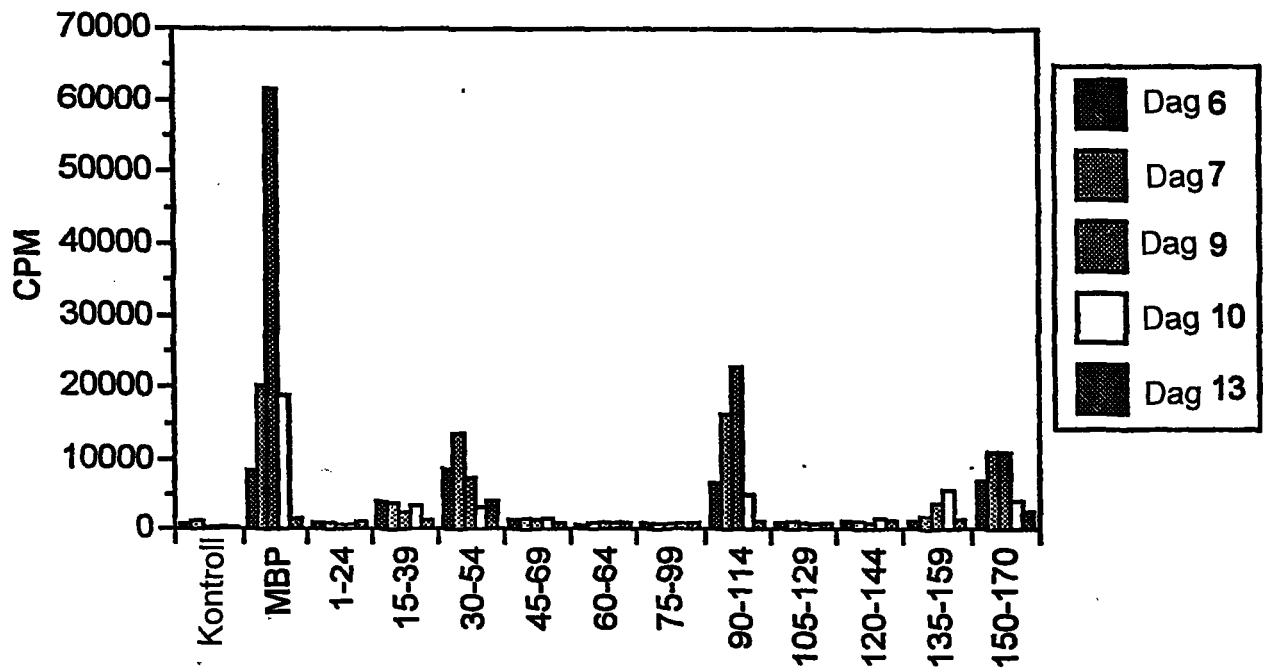


FIG. 4

5 / 16

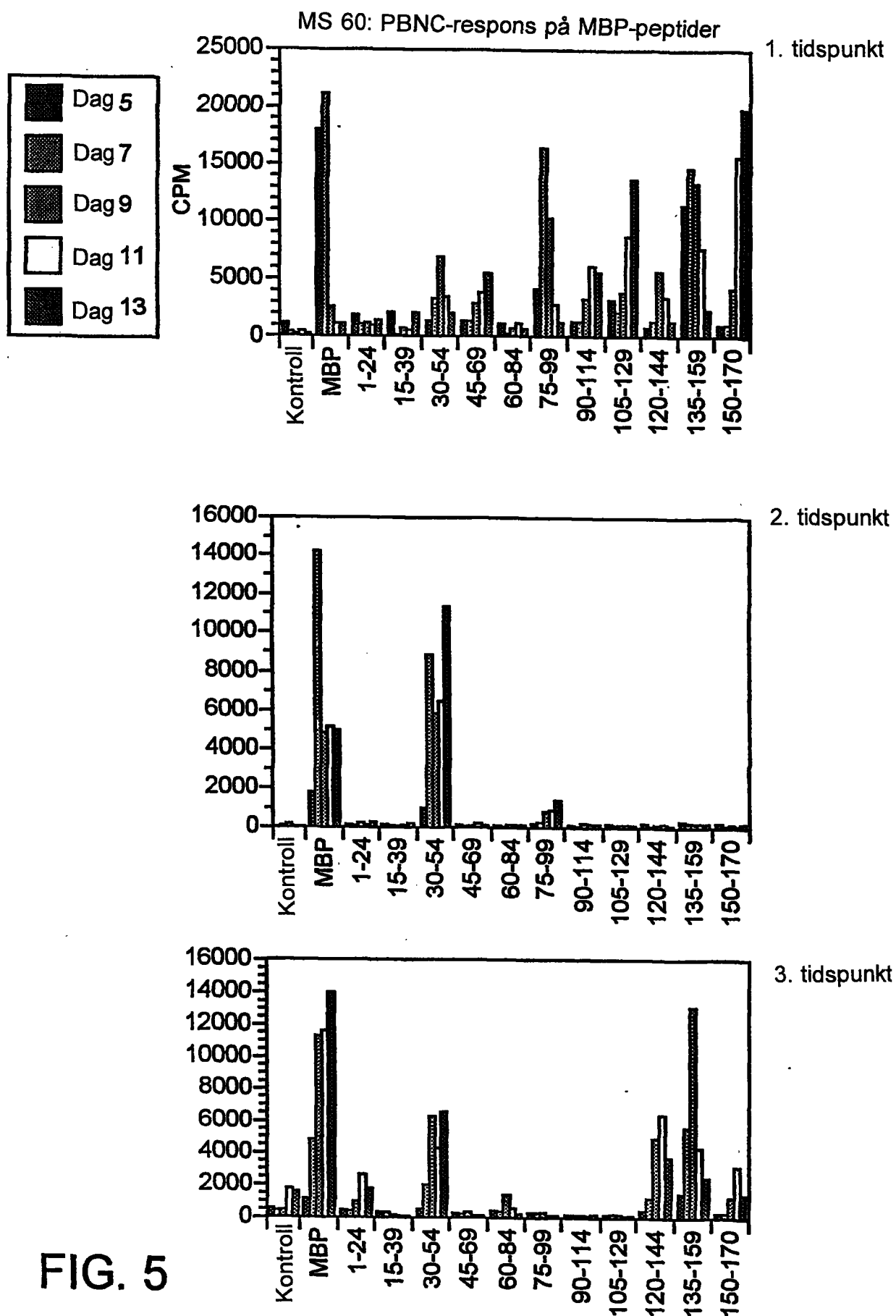


FIG. 5

6 / 16

TCC	MBP region	Spesifikt peptid
MS 39 : A7*	1-24	5-19
MS 49 : D3*	30-54	30-44
MS 49 : C8*	30-54	30-44
MS 49 : A8*	30-54	30-44
MS 48 : B6*	30-54	30-44
MS 39 : D7*	60-84	60-74
MS 43 : A7*	75-99	83-99
MS 41 : B6*	75-99	83-99
MS 41 : A2*	75-99	83-99
MS 41 : C6*	75-99	83-99
N5 : 8**	75-99	83-99
MS 60 : A2*	105-129	110-124
MS 60 : B3*	105-129	110-124
MS 60 : E1*	120-144	130-144
MS 17 : A3*	120-144	130-144
MS 60 : F7*	135-159	140-154
MS 60 : D1*	135-159	140-154
MS 57 : A1*	135-159	140-154
MS 59 : F1*	135-159	140-154
N5 : 19**	135-159	140-154
MS 43 : A3*	150-170	156-169
MS 43 : D2*	150-170	156-169

FIG. 6

7 / 16

UNDERSØKT PROTEINREGION	EPITOPER IDENTIFIERT VED ANVENDELSE AV T-CELLE-KLONER
1-24	5-19
15-39	ikke felles
30-54	30-44
45-69	ikke felles
60-84	60-74
75-99	80-94 83-99
90-114	ikke felles
105-29	110-124
120-144	130-144
135-159	130-144 140-154
150-170	150-164 156-169

FIG. 7A

UNDERSØKT EPITOP	UNDESØKT APITOP
5-19	ikke utført
30-44	++
60-74	ikke utført
80-94	++
83-99	++
110-124	++
130-144	++
140-154	ikke utført
156-170	-

FIG. 7B

8 / 16

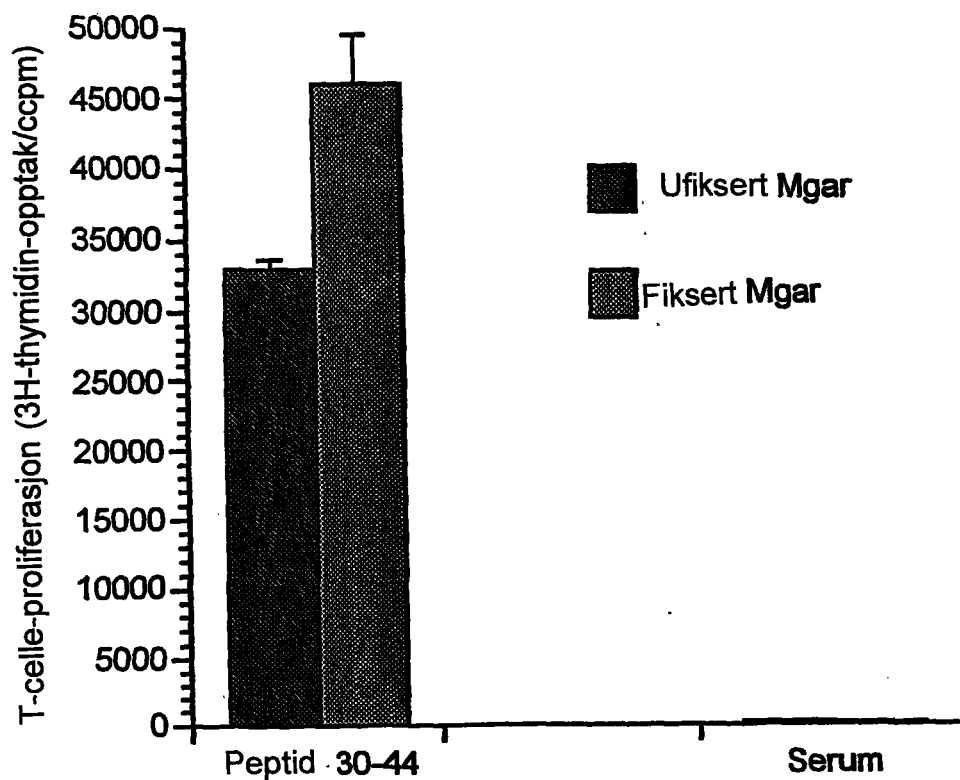


FIG. 8A

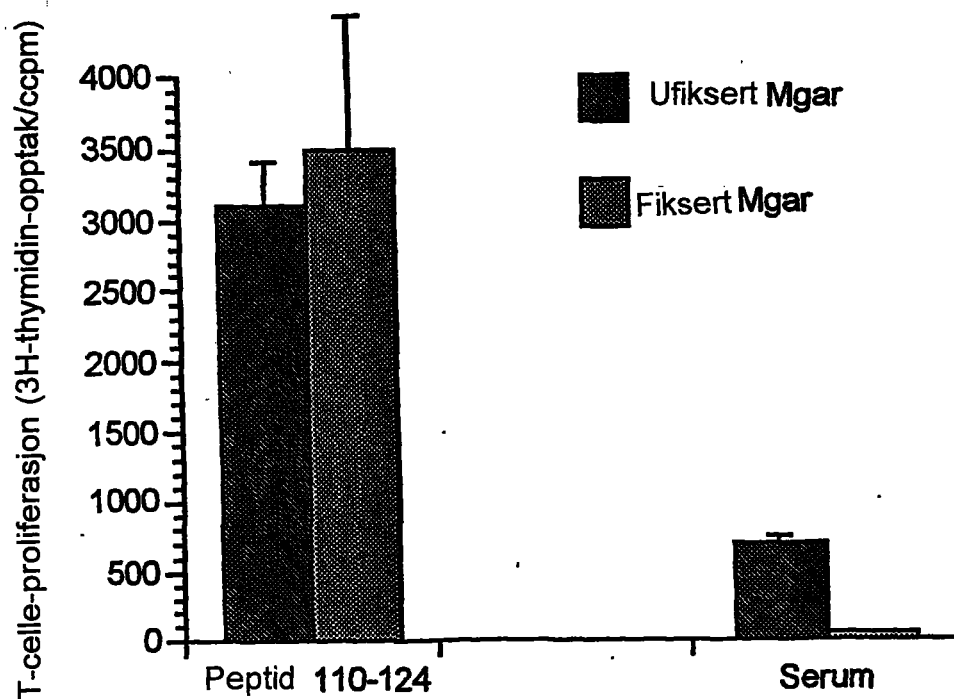


FIG. 8B

9 / 16

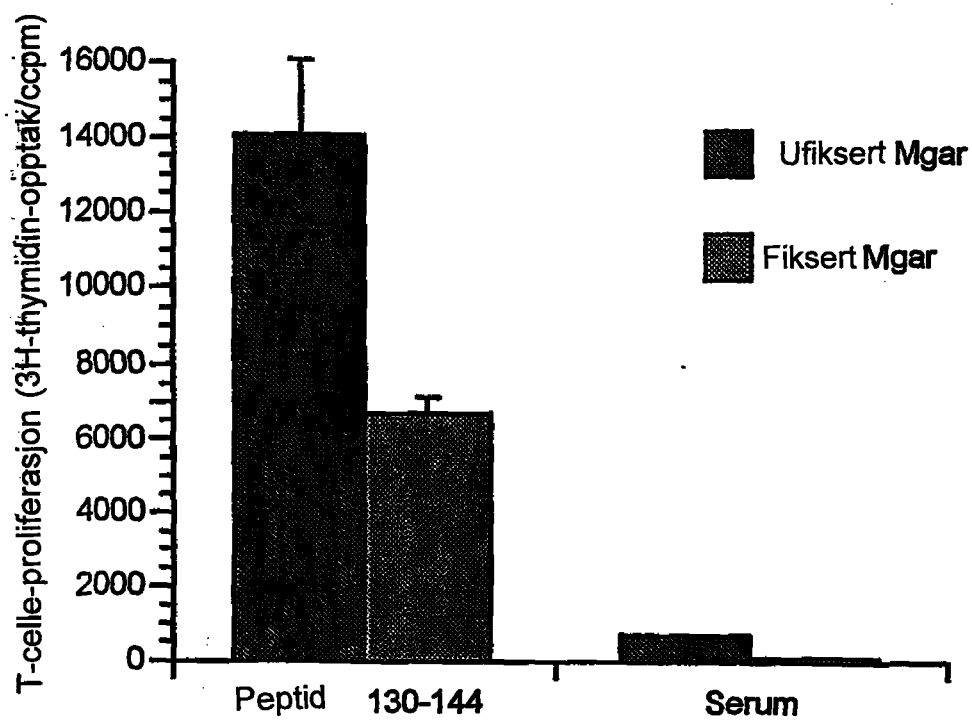


FIG. 9A

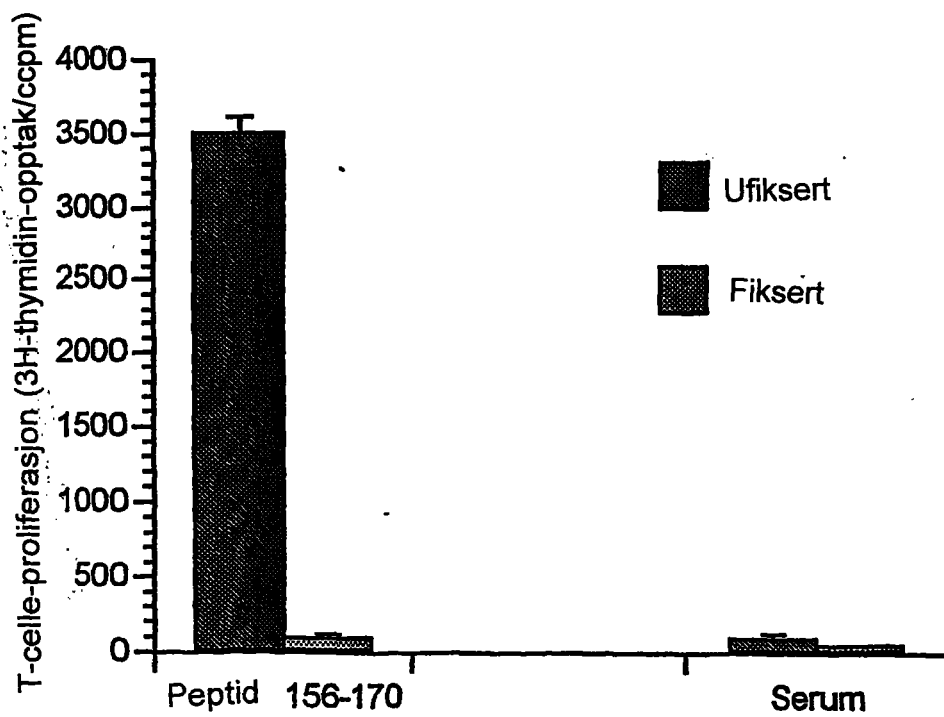


FIG. 9B

10 / 16

	Tids- punkt	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
MS 10	1	14	17	3	15	55	1	1	2	15	1	2	1
	2	4	1	<1	<1	<1	<1	9	4	1	<1	4	1
	3	8	3	1	1	1	<1	1	1	2	1	1	0
MS 17	1	29	1	1	1	1.5	2	1	<1	1	1	1.5	2
	2	51	1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	5
	3	51	1	<1	2	1	1	<1	2	1	1	1	1
MS 19	1	1	2	1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	1.5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 39	1	39	3	5	1	3	2	2	7.5	6	<1	2	2
	2	58	1	<1	<1	2	2	<1	<1	<1	1	<1	<1
	3	50	8	1	1	1	2	1	1.5	1	<1	3	<1
MS 41	1	59	2	3	2	2	1.5	1	1	2	6	7	3
	2	116	<1	1	<1	<1	<1	1	<1	1	<1	<1	<1
	3	74	2	1.5	1	2	2	8	<1	<1	<1	95	<1
MS 43	1	32	4	22	3	3	3	24	4	2	12	3	4
	2	75	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	66	2	2	1	13	2	1	2	2	2	7	1
MS 49	1	6	5	9	11	5	4	11	4	35	6	5	31
	2	202	2	8	23	4	3	2	73	2	2	11	34
	3	2	1	2	4	1	2	1	1	1	1	1	2
MS 57	1	36	8	<1	1.5	1	1	2	2	<1	<1	<1	<1
	2	7	2	2	2	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 59	1	57	2	1	65	1	1	9	37	1	1	2	14
	2	27	1	<1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	3	14	1	9	2	1	1	4	2	2	63	137	1
MS 60	1	44	3	2	19	8	2	28	9	11	16	16	12
	2	133	1	<1	83	<1	<1	20	<1	1	<1	2	<1
	3	23	2	<1	13	<1	2	<1	<1	<1	10	26	2
MS 67	1	49	2	3	2	1	2	2	1	<1	1	1	58

FIG. 10

11 / 16

	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
N1	20	<1	<1	<1	<1	0	1	<1	1	<1	<1	<1
N2	54	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
N3	14	2	2	2	1	4	6	1	1	<1	2	3
N4	6	1	1.5	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	1	<1
N5	27	<1	1.5	<1	<1	<1	1.5	1	<1	<1	1	<1
N6	29	5	1	1	3	2	5	6	<1	2	3	2
N7	100	2	<1	2	<1	<1	<1	<1	2	<1	2	2
N8	33	3	<1	1.5	<1	<1	1	1	1	1	2.5	1.5
N9	104	<1	<1	2	<1	1	1	<1	1	2	1	<1
N10	72	3	<1	1	<1	2	1.5	<1	<1	71	5	<1
N11	11	4	1	18	<1	12	5	<1	2	7	7	8
N12	89	1	<1	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	<1	<1

FIG. 11

12 / 16

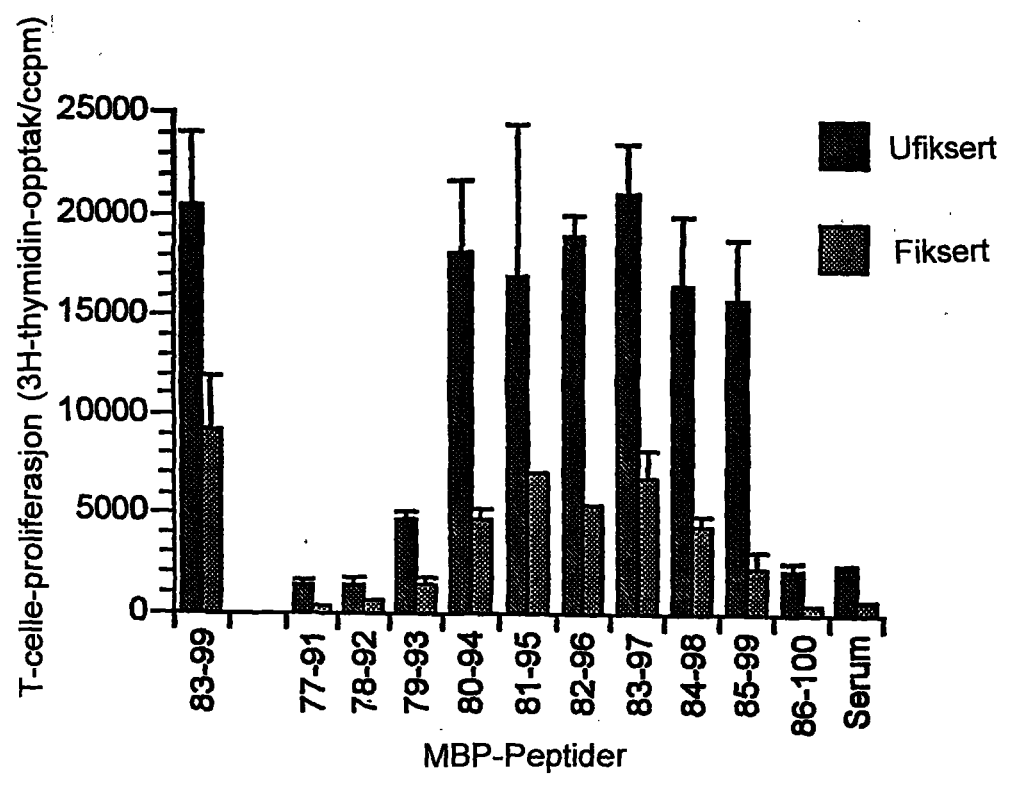


FIG. 12

13 / 16

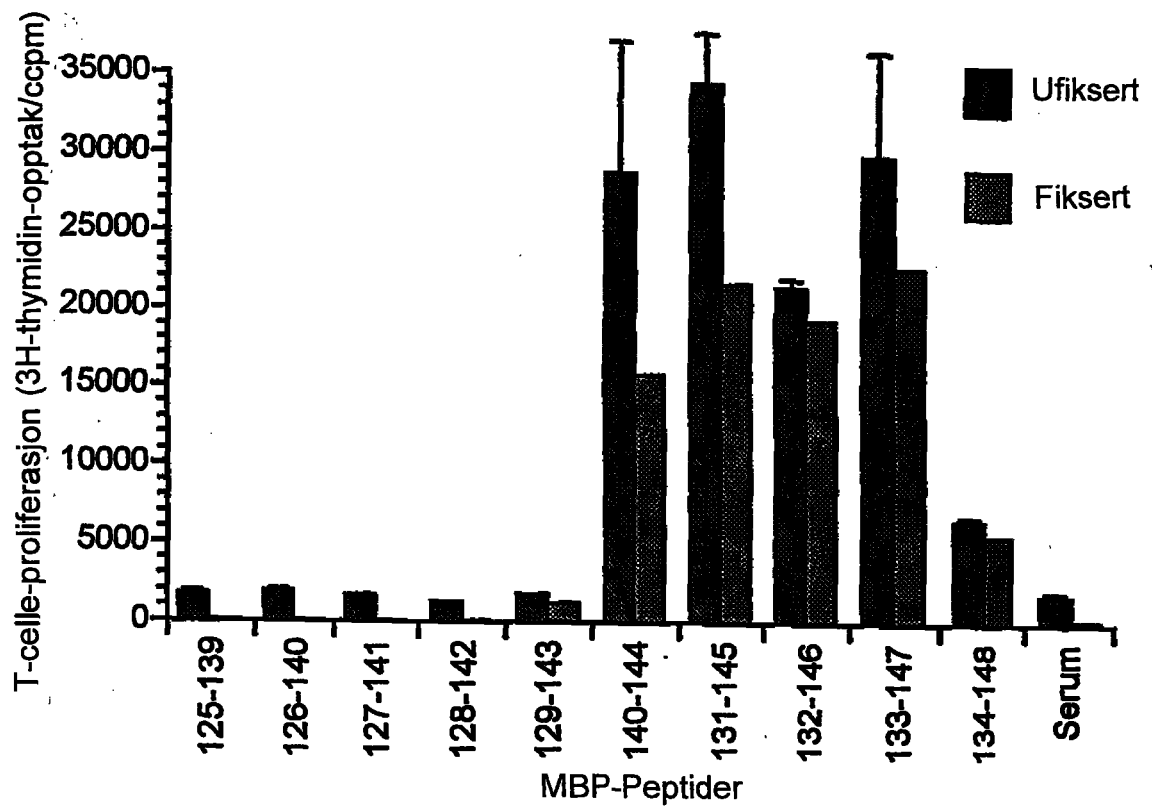


FIG. 13

14 / 16

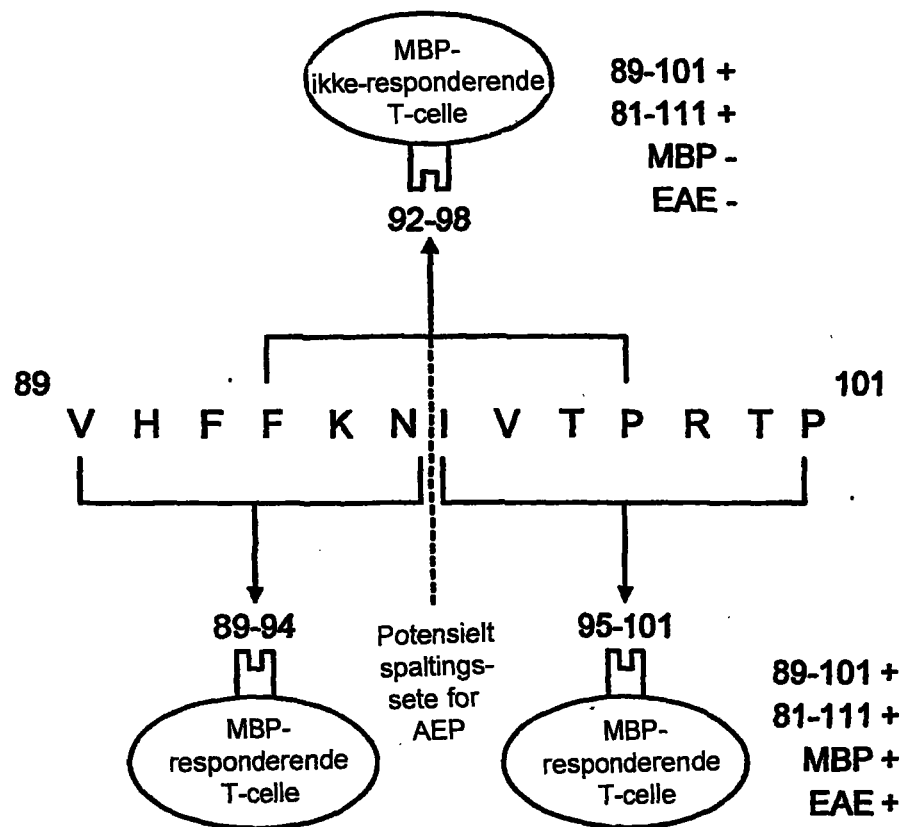


FIG. 14

Symbol	Intraperitonealt Peptid	Peptid for priming	Peptid for recall in vitro
□	None	87-96	87-96
○	None	87-96	89-101
■	87-96	87-96	87-96
●	87-96	87-96	89-101

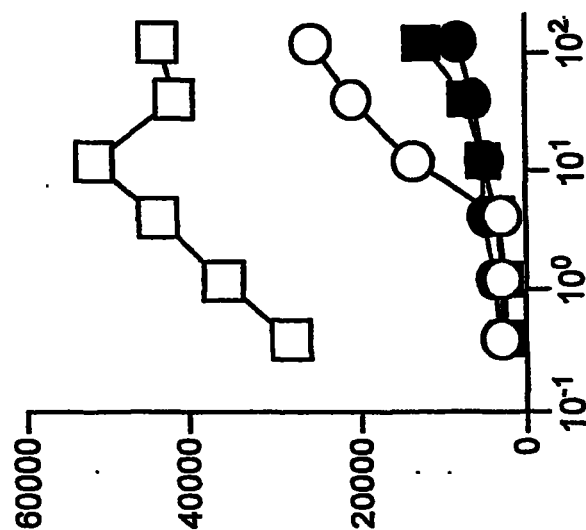


FIG. 15A

Symbol	Intraperitoneal Peptid	Peptid for priming	Peptid for recall in vitro
□	None	87-96	87-96
○	None	87-96	89-101
■	89-101	87-96	87-96
●	89-101	87-96	89-101

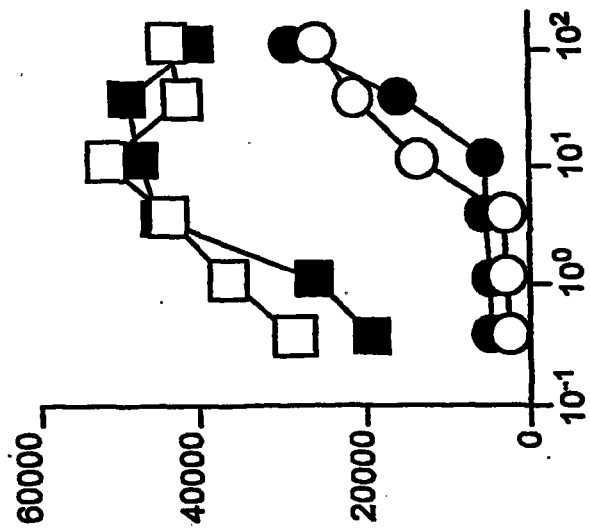


FIG. 15B