



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104321077 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201380022126. 2

G01N 33/543 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 03. 25

(30) 优先权数据

61/615, 743 2012. 03. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/052352 2013. 03. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/144811 EN 2013. 10. 03

(71) 申请人 UTI 有限合伙公司

地址 加拿大艾尔伯特省

(72) 发明人 佩德罗·圣塔马尼亚

(74) 专利代理机构 广东德而赛律师事务所

44322

代理人 孙德丰

(51) Int. Cl.

A61K 39/02 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书33页 附图26页

(54) 发明名称

治疗炎症的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了治疗性组合物和方法,用于在有需要的患者的胃肠道中诱导抗炎响应和/或治疗炎症和/或累积肠微生物抗原特异性抗炎T细胞。

1. 一种包含抗原-MHC复合物的纳米颗粒,其中所述复合物包含复合至抗原的MHC蛋白,所述抗原来源于胃肠道的微生物,或所述抗原是一种GI关联抗原。
2. 根据权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒的直径选自:约1 nm至约100 nm;约5 nm至约5 nm;或约5至约15 nm。
3. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述抗原-MHC复合物比纳米颗粒的比率为约10:1至约1000:1。
4. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述抗原-MHC复合物是共价连接或非共价连接至所述纳米颗粒的。
5. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述抗原-MHC复合物是通过尺寸小于5 kD的接头共价连接至所述纳米颗粒的。
6. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述抗原来自于以下微生物的一种:拟杆菌、梭菌、梭杆菌、真细菌、瘤胃球菌、消化球菌、消化链球菌或双歧杆菌,或者所述抗原是来源于选自卵清蛋白、酵母甘露聚糖或麦醇溶蛋白的蛋白质的GI关联抗原。
7. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述抗原来源于拟杆菌或来源于拟杆菌的蛋白质。
8. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述抗原来源于整合酶。
9. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述抗原包含与SEQ ID No. 1、4、5、6、7或8的肽序列具有至少80%一致性的肽。
10. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒是生物相容性的或生物可吸收的。
11. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述MHC包含I类MHC或II类MHC。
12. 根据前述任一项权利要求所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒是非脂质体的。
13. 一种组合物,其包含权利要求1-12任一项所述的纳米颗粒,以及载体。
14. 一种制备或获得权利要求1-12任一项所述的纳米颗粒的方法,所述方法包括将所述抗原-MHC复合物复合至所述纳米颗粒。
15. 一种分离的且纯化的多肽,包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID No. 1、4、5、6、7或8,或与SEQ ID No. 1、4、5、6、7或8具有至少约80%序列一致性的多肽,或由下述多核苷酸编码的多肽,所述多核苷酸在中等至高严格性条件下与编码SEQ ID No. 1、4、5、6、7或8的多核苷酸杂交,或与编码与SEQ ID No. 1、4、5、6、7或8具有至少约80%序列一致性的多肽的多核苷酸杂交,或与上述多核苷酸的互补序列杂交。
16. 一种编码权利要求15所述的多肽的分离的且纯化的多核苷酸,或等价物,或在严格条件下与所述多核苷酸、其等价物或其互补序列杂交的多核苷酸,其中所述严格条件包括约25℃至约37℃的温育温度、约6x SSC至约10x SSC的杂交缓冲液浓度、约0%至约25%的甲酰胺浓度、以及约4x SSC至约8x SSC的洗涤溶液。
17. 一种组合物,其包含权利要求15所述的多肽,以及载体。
18. 一种组合物,其包含权利要求16所述的多核苷酸,以及载体。
19. 一种在细胞或组织中诱导抗炎响应的方法,所述方法包括将所述细胞或组织与有效量的权利要求1-12的任一项所述的纳米颗粒接触。

20. 一种治疗有需要的患者的炎症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的权利要求 1-12 的任一项所述的纳米颗粒复合物,从而治疗炎症。

21. 一种在有需要的患者的 GI 道中累积抗炎 T 细胞核 / 或抗炎细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的权利要求 1-12 的任一项所述的纳米颗粒,从而治疗所述患者。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的方法,其中所述患者患有选自以下疾病的胃肠道疾病:炎症性肠病、结肠炎、Crohn 氏病、胃肠道的过敏性炎症、或乳糜泻。

23. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述细胞或组织是所述 GI 道的细胞或组织。

24. 根据权利要求 21-22 的任一项所述的方法,其中所述 T 细胞是 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞。

25. 根据权利要求 21-22 或 24 的任一项所述的方法,其中所述 T 细胞分泌 IL-10 或 TGF β 。

26. 根据权利要求 19 或 23 所述的方法,其中所述抗炎响应在所述胃肠道中被诱导。

27. 根据权利要求 20 所述的方法,其中胃肠道的炎症被治疗。

29. 一种在有需要的患者中转移靶定肠细菌表位的细胞毒性 T 淋巴细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的权利要求 1-12 的任一项所述的抗原-MHC-纳米颗粒复合物。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述细胞毒性 T 淋巴细胞以低亲合力识别所述肠细菌表位。

治疗炎症的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请根据 35 U.S.C. § 119(e) 要求 2012 年 3 月 26 日提交的美国临时申请 61/615,743 号的优先权,通过引用将其以整体形式合并至本文中。

发明领域

[0002] 本发明涉及关于免疫疗法和药物的组合物和方法。特别地,本发明涉及治疗炎症(例如是胃肠道炎症)的疗法。

[0003] 背景

炎症性肠病(IBM)是导致肠变得发炎(红肿)的一群疾病的总称。每年有超过 600000 美国人患有某种类型的炎症性肠病。这类疾病通常在性质上是慢性的,并且伴随一些症状,例如腹痛、呕吐、腹泻、直肠出血、骨盆区域的严重内部绞痛/肌肉痉挛、以及体重减轻。IBM 相关的症状可能限制生活质量并每天影响受害者。

[0004] IBM 的治疗形式主要包括降低患者的总体免疫力的免疫抑制法。这种治疗是有风险的,经常将患者置于由于免疫受损导致的感染和疾病的风险中。

[0005] 本领域需要治疗该疾病但不损害患者总体免疫力的目标疗法。本发明满足了这种需求并提供相关的优点。

[0006] 概述

为响应现有技术的需求,本发明公开了的是治疗方法和组合物,其激活并扩大了现存的致力于抑制慢性炎症反应的内源性机制。在一个方面,本发明提供用于治疗胃肠道的炎症的组合物和方法。

[0007] 一个方面涉及通过施用有效量的抗原-MHC-纳米颗粒复合物来诱导细胞或组织中的抗炎反应的方法;其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。本发明还提供了用于诱导细胞或组织中的抗炎反应的抗原-MHC-纳米颗粒,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。本发明还提供了抗原-MHC-纳米颗粒在制备用于诱导细胞或组织的抗炎反应的药物中的应用,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。

[0008] 在另一个方面,本发明提供一种通过施用有效量的抗炎-MHC-纳米颗粒复合物治疗有需要的患者中的炎症的方法;其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。本发明还提供了用于治疗有需要的患者中的炎症的抗原-MHC-纳米颗粒,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。本发明还提供了抗原-MHC-纳米颗粒在制备用于治疗有需要的患者中的胃肠道炎症的药物中的应用,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。

[0009] 在另一个方面,本发明提供一种通过施用有效量的抗炎-MHC-纳米颗粒复合物来在有需要的患者中积累抗炎 T 细胞的方法;其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠

道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。本发明还提供了用于在有需要的患者中积累抗炎 T 细胞的抗原-MHC- 纳米颗粒,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。本发明还提供了抗原-MHC- 纳米颗粒在制备用于在有需要的患者中积累抗炎 T 细胞的药物中的应用,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。

[0010] 其他方面涉及一种复合物,其包含以下组分、或实质上由以下组分组成、或由以下组分组成:纳米颗粒、MHC 蛋白、以及抗原,所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。本发明还提供了一种组合物,其包含以下组分、或实质上由以下组分组成、或由以下组分组成:如本文所述的抗原-MHC- 纳米颗粒,以及载体。

[0011] 本发明还提供一种试剂盒,其包含以下组分、或实质上由以下组分组成、或由以下组分组成:如本文所述的组合物,以及使用所述组合物用于它们的预期目的的说明。

附图说明

[0012] 附图构成说明书的一部分并且用来进一步说明本发明的某些方面。本发明可通过参考这些附图中的一个或多个并结合所呈现的具体实施方式的详细描述而被更好地理解。

[0013] 图 1A-1C 证实了 BacIYL 以高亲和性结合至 H-2K^d,所产生的 pMHC 复合物结合至 IGRP₂₀₆₋₂₁₄- 特异性 T 细胞。A, K^d 分子在 RMA-SK^d 细胞上的肽诱导的稳定化。TUM 是阳性对照, Gp33 是阴性(Db- 结合)对照。B 和 C,虽然比 NRP-V7/K^d 四聚体具有较低的亲和性,但 BacIYL/K^d 四聚体特异性结合至 8.3-CD8⁺T 细胞。

[0014] 图 2A-2D 显示了 BacIYL 在分离中起到拮抗剂的作用,但在存在 LPS 的情况下起到部分激动剂的作用,其供体蛋白是有效的且由树突细胞交叉提供(cross-presented)。A,在存在 BacIYL、IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (阳性对照)或 TUM (阴性对照)的情况下培养的 8.3-CD8⁺ T 细胞中的 CD44 和 CD69 的表达。B,拮抗实验。TUM 用作阴性对照。注意 BacIYL (而非 TUM,一种结合 K^d 的阴性对照)的逐渐增加的浓度如何拮抗 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 诱导的 8.3-CD8⁺ T 细胞响应(IFN γ 分泌,顶部;增殖,底部)。C,BacIYL 在存在 LPS 的情况下起激动剂的作用。NTG,非转基因的(CD8⁺ T 细胞)。D,DC 可处理来自重组野生型整合酶或重组突变整合酶(其中 BacIYL 表位突变成编码 IGRP₂₀₆₋₂₁₄)的 BacIYL 或 BAC_{IGRP206-214} 样表位。

[0015] 图 3A-3D 显示 BacIYL 表位在体外诱导记忆 CD8⁺ T 细胞形成。A 和 B,在存在肽脉冲(10 或 0.001 μ g/ml)的 DC 的情况下培养 28 后的 8.3-CD8⁺ T 细胞的表型。17.6-CD8⁺ T 细胞是非常低亲和性的 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 特异性 CD8⁺ T 细胞;如所预期的,它们在与 BacIYL 培养 28 天后仍保持原样。C,应对肽应激(peptide challenge)时细胞内 IFN γ 含量变化。作为对 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 刺激响应,BacIYL 培养的 8.3-CD8⁺ T 细胞快速产生 IFN γ 。D,作为对肽应激的响应,分泌出 IFN γ ,并且记忆样 8.3-CD8⁺ T 细胞增殖(由 BacIYL 诱导)。

[0016] 图 4A-4H 显示 BacIYL₃₆₋₄₄ 反应性 CD8⁺ T 细胞响应提供了免患 DSS 诱导的结肠炎的保护。A 和 B 显示了 DSS 处理和未处理的 8.3-NOD, 17.6-NOD 小鼠的体重曲线(A)和疾病活动分值(B)。图 C 和 D 显示了 DSS 处理后 8.3-NOD 及 Itg β 7^{-/-} 8.3-NOD 小鼠的体重曲线(C)和疾病活动分值(D)。图 E 和 F 显示了在 A-D 中研究的小鼠的生存曲线。图 G 证实了 IGRP₂₀₆₋₂₁₄^{-/-} NOD (而非 NOD)小鼠在 4% DSS 诱导的结肠炎时可抵抗体重减轻。图 H 显示与非 CTL 输入的副本相比,BacIYL₃₆₋₄₄ 交叉反应性 CD8⁺ CTL 向 IGRP₂₀₆₋₂₁₄^{-/-} NOD 小鼠的过

继性转移导致疾病活动分值的显著降低。

[0017] 图 5A-5B 显示 BacIYL₃₆₋₄₄ 反应性 CD8⁺ CTL 保护 17.6-NOD 小鼠免患 DSS 诱导的结肠炎。图 5A 显示了体重曲线,图 5B 显示了 17.6-NOD 小鼠在 DSS 处理 +8.3-CTL 转移、单独 DSS 处理、以及没有任何处理时的疾病活动分值。注意 BacIYL₃₆₋₄₄ 交叉反应性 CD8⁺ CTL 向 17.6-NOD 小鼠的过继性转移,在响应 DSS 处理时,与它们的非 CTL 输入的副本相比,是如何显著地降低疾病活动分值和体重减轻的。

[0018] 图 6 证实了在 IGRP₄₋₂₂/I-A^{g7}-NP 处理的 NOD 小鼠中, Tr1 样自动调节 CD4⁺ T 细胞向肠相关淋巴组织的征募。图中显示了两只小鼠的数据。

[0019] 图 7 显示了 pMT/V5 中的 BacInt₄₀₋₅₄-I-Ab-C-Jun 图。DNA 构建体的 Nco I (854) 至 Xho I (1738) 位点之间的部分编码 HA-BacInt₄₀₋₅₄-I-Abeta (b)-C-Jun 融合蛋白 (293 a. a.)。该融合蛋白包括 15 a. a HA 前导序列,之后为 BacInt₄₀₋₅₄ (TNV) 肽 (15 a. a.)。编码肽的 DNA 序列经 16 a. a GS 接头被连接至 I-Abeta (b) (199 a. a.)。I-Abeta (b) 的 C 末端经 8 a. a GS 接头被连接至 C-Jun 序列 (40 a. a.)。a. a. = 氨基酸。

[0020] 图 8 显示了 BacInt₄₀₋₅₄-I-Abeta (b)-C-Jun 构建体的蛋白质序列和 DNA 序列。该融合蛋白中的单个成分的序列是 HA 前导序列 (带下划线),之后为 BacInt₄₀₋₅₄ 肽序列 (双下划线)、I-Abeta (b) (虚线下划线) 和 C-Jun 序列。GS 接头未突出显示。

[0021] 图 9 显示了 pMT/V5 中的 I-Aalpha (b)-C-Fos-BirA-His6 图。编码 HA 先导序列-I-Aalpha (b)-C-Fos-BirA-His X 6 融合蛋白 (284 a. a) 的 DNA 构建体被克隆到 pMT/V5 苍蝇细胞表达载体的 Nco I (854) 到 Xba I (1711) 位点之间。该融合蛋白包括 I-Aalpha (d) (195 a. a.),之后经 GS 接头 (6 a. a.) 连接有 C-Fos,再后为 BirA 序列和 6 X His。

[0022] 图 10 显示 I-Aalpha (b)-C-Fos 构建体的蛋白质序列和 DNA 序列。该融合蛋白的单个成分的序列为 HA 先导序列 (下划线),之后为 I-Aalpha (b) (双下划线)、C-Fos (虚线下划线)、BirA (阴影) 和 6 X His 序列。GS 接头未突出显示。

[0023] 图 11 显示了 pMT/V5 中的 BacInt₈₁₋₉₅-I-Ab-C-Jun 图。Nco I (854) 到 Xho I (1738) 位点之间的 DNA 构建体编码 HA-BacInt₈₁₋₉₅-I-Abeta (b)-C-Jun 融合蛋白 (293 a. a.)。该融合蛋白包括 15 a. a HA 先导序列,之后为 BacInt₈₁₋₉₅ (LGY) 肽 (15 a. a.)。编码肽的 DNA 序列经 16 a. a GS 接头连接至 I-Abeta (b) (199 a. a.)。I-Abeta (b) 的 C 末端经 8 a. a GS 接头连接至 C-Jun 序列 (40 a. a.)。

[0024] 图 12 显示了 BacInt₈₁₋₉₅-I-Abeta (b)-C-Jun 构建体的蛋白质序列和 DNA 序列。该融合蛋白的单个成分的序列为 HA 先导序列 (下划线),之后为 BacInt₈₁₋₉₅ 肽序列 (双下划线)、I-Abeta (b) (虚线下划线) 和 C-Jun (阴影) 序列。GS 接头未突出显示。

[0025] 图 13 显示了 pMT/V5 中 BacInt₃₆₅₋₃₇₉-I-Ab-C-Jun 的图。Nco I (854) 到 Xho I (1738) 位点之间的 DNA 构建体编码 HA-BacInt₃₆₅₋₃₇₉-I-Abeta (b)-C-Jun 融合蛋白 (293 a. a.)。该融合蛋白包括 15 a. a HA 先导序列,之后为 BacInt₃₆₅₋₃₇₉ (TQI) 肽 (15 a. a.)。编码肽的 DNA 序列经 16 a. a GS 接头连接至 I-Abeta (b) (199 a. a.)。I-Abeta (b) 的 C 末端经 8 a. a GS 接头连接至 C-Jun 序列 (40 a. a.)。

[0026] 图 14 显示了 BacInt₃₆₅₋₃₇₉-I-Abeta (b)-C-Jun 构建体的蛋白质序列和 DNA 序列。该融合蛋白质中的单个成分的序列为 HA 先导序列 (下划线),之后为 BacInt₃₆₅₋₃₇₉ 肽序列 (双下划线)、I-Abeta (b) (虚线下划线) 和 C-Jun (阴影) 序列。GS 接头未突出显示。

[0027] 图 15 显示了 pMT/V5 中的 BacInt₅₇₋₇₁-I-Ab-C-Jun 的图。Nco I (854) 至 Xho I (1738) 位点之间的 DNA 构建体编码 HA-BacInt₅₇₋₇₁-I-Abeta (b)-C-Jun 融合蛋白 (293 a. a.)。该融合蛋白包括 15 a. a HA 先导序列,之后为 BacInt₅₇₋₇₁ (INH) 肽 (15 a. a.)。编码肽的 DNA 序列经 16 a. a GS 接头连接至 I-Abeta (b) (199 a. a.)。I-Abeta (b) 的 C 末端经 8 a. a GS 接头连接至 C-Jun 序列 (40 a. a.)。

[0028] 图 16 显示了 BacInt₅₇₋₇₁-I-Abeta (b)-C-Jun 构建体的蛋白质序列和 DNA 序列。该融合蛋白的单个成分的序列为 HA 先导序列 (下划线),之后为 BacInt₅₇₋₇₁ 肽序列 (双下划线)、I-Abeta (b) (虚线下划线) 和 C-Jun (阴影) 序列。GS 接头未突出显示。

[0029] 图 17 显示了 pMT/V5 中 BacInt₈₈₋₁₀₂-I-Ab-C-Jun 的图。Nco I (854) 至 Xho I (1738) 位点之间的 DNA 构建体编码 HA-BacInt₈₈₋₁₀₂-I-Abeta (b)-C-Jun 融合蛋白 (293 a. a.)。该融合蛋白包括 15 a. a HA 先导序列,之后为 BacInt₈₈₋₁₀₂ (IPA) 肽 (15 a. a.)。编码肽的 DNA 序列经 16 a. a GS 接头连接至 I-Abeta (b) (199 a. a.)。I-Abeta (b) 的 C 末端经 8 a. a GS 接头连接至 C-Jun 序列 (40 a. a.)。

[0030] 图 18 显示了 BacInt₈₈₋₁₀₂-I-Abeta (b)-C-Jun 构建体的蛋白质序列和 DNA 序列。该融合蛋白的单个成分的序列为 HA 先导序列 (下划线),之后为 BacInt₈₈₋₁₀₂ 肽序列 (双下划线)、I-Abeta (b) (虚线下划线) 和 C-Jun (阴影) 序列。GS 接头未突出显示。

[0031] 图 19 显示了以高密度 ($\sim 5 \times 10^{13}$ /ml) 浓缩且单分散的 pMHC 涂布的金 NP (~ 14 nm) 的代表性 TEM 图像。放大:50,000X。

[0032] 图 20 显示了 pMHC (GNP) 剂量和 pMHC 效价对 pMHC 涂布的 GNP 的激动性质的作用。图中比较了同源 8.3-CD8⁺ T 细胞在应对两种不同 pMHC-GNP 样品时分泌的 IFN γ 的量(两者均由直径为 14 nm 的 $\sim 2 \times 10^{13}$ GNP/ml 组成)。Au-022410 和 Au-21910 分别携带 ~ 250 和 ~ 120 pMHC/GNP。Au-011810-C 携带 ~ 120 对照 pMHC/GNP。

[0033] 图 21 证实了 8.3-CD8⁺ T 细胞的 pMHC-NP 诱导的 IFN γ 分泌随着 pMHC 效价而变化。8.3-CD8⁺ T 细胞 (2.5×10^5 个细胞/ml) 与逐渐增加数量的涂布了三种不同 IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d 效价的 NP 一起培养。

[0034] 图 22 显示 pMHC-NP 的较低激动活性可通过增加 pMHC-NP 密度来补偿,但仅高于 pMHC 效价的阈值。图表比较了三种不同 pMHC-NP 制剂(携带三种不同效价的 pMHC)在一系列 NP 密度时的激动活性。注意携带 8 pMHC 的 NP 与携带 11 pMHC 的 NP 不同,前者即使在高 pMHC-NP 密度的情况下,与携带 54 pMHC 的 NP 相比,也不能充分地引发分泌。

[0035] 图 23 显示了 pMHC 效价阈值对 pMHC-NP 的激动性质的作用随着总 pMHC 输入量而变化。

[0036] 图 24 显示 pMHC 效价对以较大氧化铁 NP 核产生的 pMHC-NP 的激动性质的作用。

[0037] 图 25 显示了尺寸对激动活性的作用。Au-0224-15 是涂布了相对低的 pMHC 效价但以高密度制备的 14 nm GNP;Au-0323-40 是涂布了高 pMHC 效价但以低密度制备的 40 nm GNP。Au-0224-15 比 Au-0323-40 样品具有更好的激动活性。

[0038] 图 26 显示了保护性 PEG 对 pMHC-GNP 的功能的作用。Au-021910 由 $\sim 2 \times 10^{13}$ 个直径 14 nm 的 GNP/ml 组成,通过 2 kD 巯基-PEG 保护,并以 ~ 120 pMHC/GNP 涂布。Au-012810 GNP(也由 $\sim 2 \times 10^{13}$ 14 nm GNPs/ml 组成)通过 5 kD 巯基-PEG 保护,并以 ~ 175 pMHC/GNP 涂布。样品 Au-021910 具有更好的激动活性。

[0039] 图 27 显示了 NRP-V7/Kd 涂布的金 NP 实现的 NRP-V7 反应性 CD8+ T 细胞的有效扩增。施用了携带 25 μg 的 pMHC(150 pMHC/NP) 的 3×10^{12} NP (尺寸为 ~ 10 nm)。以 NRP-V7/kd 涂布的金 NP 每周注射前驱糖尿病 10 周大 NOD 小鼠两次,持续 5 周。TUM/Kd 四聚体为阴性对照。每个柱图对应一个不同的小鼠。

[0040] 图 28 显示了以 pMHC 涂布的 NP 处理的小鼠中同源 CD8+ T 细胞的大量表达。使用了携带 25 μg 的 pMHC(150 pMHC/NP) 的 3×10^{12} IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d-NP (尺寸为 ~ 10 nm)。上图:给药 4 次后的小鼠的曲线。下图:注射 10 次后两只不同小鼠的曲线(仅用血液;提交此申请时仍存活)。

[0041] 详细描述

要理解的是,本发明并不限于所描述的特定实施方式,因为这些实施方式肯定可以变化。还要理解的是,本文所使用的术语仅为描述特定实施方式的目的而使用,并非意在限制,因为本发明的范围仅由所附权利要求来限定。

[0042] 必须注意的是,本文和权利要求中所使用的单数形式“一个”和“该”,除非文中有明确说明,否则都包括复数个指代。因此,例如,当提到“赋形剂”时,其包括多种赋形剂。

[0043] I. 定义

除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常所理解的含义。如本文所使用的,以下术语具有下述含义。

[0044] 如本文所使用的,术语“包括”是指该组合物和方法包括所引述的内容,但不排除其他内容。当用来定义组合物和方法时,“实质上由...组成”意味着排除对于该组合物或方法具有任何实质性意义的其他内容。因此,如本文所定义的,实质上由该元素组成的组合物不会排除不会实质性影响所要求保护的发明的基本的和新颖的特性的材料或步骤,该特性例如是治疗有此需要的对象中的炎症性肠病的能力和/或诱导抗炎反应。“由...组成”意味着排除高于痕量的其他组分和实质性的方法步骤。由每个这些过渡术语定义的实施方式都在本发明的范围内。

[0045] “生物相容性的”是指递送系统的成分不会导致组织损伤或对人类生物系统造成损伤。为赋予生物相容性,会优先使用已在人体中有安全使用记录或具有 GRAS (Generally Accepted As Safe) 状态的聚合物和赋形剂。生物相容性是指用在组合物中的组分和赋形剂最终会被“生物吸收”或被身体清除而不会对身体产生不利作用。一种组合物要成为生物相容的,并且被认为是无毒的,其必须不能对细胞造成毒性。类似地,术语“生物可吸收的”是指由在一段时间内在体内经历生物吸收的材料制成的纳米颗粒,因而可避免在患者体内形成该材料的长期累积。在优选的实施方式中,该生物相容性纳米颗粒在少于 2 年的时间段内被生物吸收,优选少于 1 年,更优选少于 6 个月。生物吸收率与颗粒的尺寸、所使用的材料、以及本领域技术人员普遍意识到的其他因素相关。生物可吸收的生物相容性材料的混合物可被用来形成本发明中使用的纳米颗粒。在一个实施方式中,可将氧化铁和生物相容性的生物可吸收的聚合物混合。例如,可将氧化铁与 PGLA 混合以形成纳米颗粒。

[0046] 抗原-MHC-纳米球复合物是指在表面上(例如生物相容性生物可降解纳米球上)的抗原分子或蛋白质的肽、碳水化合物、脂质或其他抗原节段、片段或表位的表现形式(即,自身肽或自身抗原)。如本文所使用的,“抗原”是指可在对象中诱导免疫响应或抗病原性细胞的扩增的分子的全部、部分、片段或节段。

[0047] 当用在数字表示(例如温度、时间、量和浓度)之前时(包括范围值),术语“约”表示近似值,其可上(+)下(-)改变 10 %、5 % 或 1 %。

[0048] “模拟物”是特定配体或肽的类似物,其中该类似物与该配体实质上相似。“实质上相似”是指该类似物的结合属性与该配体类似,但该模拟物具有一个或多个功能基团或修饰位点,它们共同占据该配体的分子量的少于约 50%、少于约 40%、少于约 30%、少于约 20%、少于约 10%、或少于约 5%。

[0049] 术语“免疫细胞”是指免疫系统的细胞。免疫系统的细胞包括例如成人脾细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和来源于骨髓的细胞,例如哺乳动物的抗原提呈细胞,其对该免疫细胞所来源的器官具有活性。还包括先天免疫系统的细胞,例如自然杀伤细胞、肥大细胞、嗜酸性细胞、嗜碱性细胞和吞噬细胞(例如巨噬细胞、嗜中性细胞和树突细胞)。

[0050] 术语“抗炎 T 细胞”是指促进抗炎响应的 T 细胞。T 细胞的抗炎功能可通过抗炎蛋白质、细胞因子、趋化因子等的生成和 / 或分泌而实现。抗炎蛋白质也包括抑制免疫响应的抗增殖性信号蛋白。抗炎蛋白质包括 IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α 、TGF- β 、IL-1ra、G-CSF 以及 TNF 和 IL-6 的可溶性受体。还包括具有炎症表型但杀死抗原提呈细胞或安排特定自身免疫响应的抗炎细胞。在某些实施方式中,这些细胞生成 IFN γ 和 TNF α 以及其他细胞因子。在某些实施方式中,抗炎 T 细胞以低亲和性识别肠细菌表位。在另外的实施方式中,抗炎 T 细胞是细胞毒性 T 细胞。

[0051] 术语“IL-10”或“白介素 -10”是指由 IL-10 基因编码的细胞因子。IL-1- 序列可通过 GenBank 登录号 NM_000572.2 (mRNA) 和 NP_000563.1 (蛋白质) 获得。

[0052] 术语“TGF- β ”或“转化生长因子 β ”是指可具有抗炎作用的蛋白质。TGF- β 是以至少三种同种型存在的分泌蛋白,分别为 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3。它也是 TGF- β 1 的原名,其是该家族的创始成员。TGF- β 家族转化生长因子 β 超家族的一部分,其包括抑制素类、激活素、抗中肾旁管激素、骨形态生成蛋白、decapentaplegic 蛋白和 Vg-1。

[0053] 术语“胃肠道”是指上胃肠道和下胃肠道。上胃肠道由食道、胃和十二指肠构成。下胃肠道包括小肠和大肠。

[0054] 术语“微生物”是指单细胞微观生物体。微生物包括例如细菌、真菌、古生菌和原生生物。

[0055] “有效量”是足以实现预期目的的量,预期目的的非限制性的例子包括:启动免疫响应、调节免疫响应、抑制炎症响应和调节 T 细胞活性或 T 细胞群。在一个方面,有效量是指实现所提及的治疗目的的量,例如治疗有效量。如本文所详细描述,有效量或剂量取决于目的和组合物、成分,并且可根据本发明公开的内容来确定。

[0056] 词语“一个”或“一种”与术语“包括”在权利要求和 / 或说明书中结合使用时,其可能意味着“一个”,但也可指“一个或多个”、“至少一个”以及“一个或多个”。

[0057] 术语“整合酶”是指一种在拟杆菌中表达的蛋白质。对应整合酶序列的 GenBank 登录号是 YP_001300081.1。该序列以 SEQ ID No. 2 表示。SEQ ID No. 3 代表整合酶的编码 DNA 序列。SEQ ID No. 1 对应于整合酶蛋白质中的一个表位。该表位是 IYLKTNVYL (SEQ ID No. 1)。已知具有 IYLKTNVYL (SEQ ID No. 1) 表位的拟杆菌菌株包括例如拟杆菌种 9_1_42FAA、拟杆菌种 D4、拟杆菌种 3_1_33FAA、拟杆菌 dorei 5_1_36/D4、拟杆菌 dorei DSM 17855、普通拟杆菌 ATCC 8482、拟杆菌种 4_3_47FAA、普通拟杆菌 PC510。

[0058] “纳米球”、“NP”或“纳米颗粒”在本文是指以单个或多个形式适当施用给对象、细胞或组织的小的离散颗粒。在某些实施方式中，纳米球的形状是实质上球形的。如本文所使用的，术语“实质上球形的”是指颗粒的形状不偏离球状超过约 10%。在某些实施方式中，纳米颗粒不是脂质体或病毒颗粒。在另外的实施方式中，纳米颗粒是固体。本发明的各种已知抗原或肽复合物可被施用至这种颗粒。本发明的纳米球的尺寸为约 1 nm 至约 1 μm ，并且优选地为约 10 nm 至约 1 μm ，并且在某些方面，当指代多个纳米球时，是指多个纳米球的平均直径或中间值。较小的纳米尺寸的颗粒可通过例如分离工艺获得，从而允许较大的颗粒沉淀在水性溶液中。该溶液的上部随后通过本领域已知的方法回收。该上部富集了较小尺寸的颗粒。该工艺可被重复直到生成期望的平均尺寸。

[0059] 权利要求中使用的术语“或”，除非另有明确说明仅指择一方案或这些替代方案相互排斥之外，是指“和 / 或”，即使公开的内容支持指代择一方案和“和 / 或”的定义。

[0060] 如本文所使用的，术语“免疫响应”或其等同体“免疫学响应”是指针对胃肠道微生物特异性抗原或对胃肠道的微生物特异的抗原的相关表位产生的细胞街道的响应（由抗原特异性 T 细胞或它们的分泌产物介导）的进展。细胞免疫响应是通过将多肽表位与 I 类或 II 类 MHC 分子相关联而提呈来诱导，从而激活抗原特异性 CD4^+ T 辅助细胞和 / 或 CD8^+ 细胞毒性 T 细胞。这些响应有可能涉及其他成分的激活。

[0061] 本文使用的术语“炎症反应”和“发炎”表示个体的血管组织对有害刺激（例如病原体、受损细胞或刺激物）的复杂的生物学响应，包括分泌细胞因子，更具体地是促炎性细胞因子，即，主要是由活化的免疫细胞产生并且涉及炎症反应的扩大的细胞因子。促炎性细胞因子的例子包括但不限于，IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-17、IL21、IL23 和 TGF- β 。示例性的发炎包括急性发炎和慢性发炎。急性发炎表示短期过程，特点在于由于血浆和白细胞对组织的浸润导致的典型的发炎症状（肿胀、发红、疼痛、发热和功能丧失）。急性发炎通常只要存在损伤刺激即出现，并且一旦刺激被除去、分解或通过形成瘢痕而隔离（纤维化）即停止。慢性发炎表示一种状态，其特点是并发活性炎症、组织破坏并且尝试修复。慢性发炎没有以上列出的急性发炎的那些典型症状。相反，慢性发炎组织的特点是单核免疫细胞（单细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞）的浸润、组织破坏，并尝试愈合（包括血管生成和纤维化）。在本发明的意义上，发炎可通过影响，特别是抑制形成个体内炎症相关的复杂生物学响应的任何一个事件来抑制。

[0062] 术语“表位”和“抗原决定簇”可互换使用，并且是指抗原上 B 细胞和 / 或 T 细胞所响应或识别的位点。B 细胞表位可由连续氨基酸形成或通过蛋白质的三次折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时仍保留，但由三次折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时会丢失。表位通常包括至少 3 个、更常见为至少 5 个或 8-10 个以独特空间构象存在的氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如 x 射线晶体分析法和 2 维核磁共振法。参见例如 Glenn E. Morris, *Epitope Mapping Protocols* (1996)。T 细胞识别 CD8 细胞的约 9 个氨基酸的连续表位，或 CD4 细胞的约 13-15 个氨基酸的表位。识别该表位的 T 细胞可通过测定抗原依赖性增殖的体外实验来识别，该测定可通过 ^3H - 胸腺嘧啶加入、通过已接触抗原的 T 细胞对表位的响应 (Burke et al., *J. Inf. Dis.*, 170:1110-1119, 1994)、通过抗原依赖性杀伤 (细胞毒性 T 淋巴细胞实验, Tigges et al., *J. Immunol.*, 156(10):3901-3910, 1996)、或通过细胞因子分泌来确定。细胞介导

的免疫响应的存在可通过增殖实验 ($CD4^+$ T 细胞) 或 CTL 实验 (细胞毒性 T 淋巴细胞) 来确定。

[0063] 任选地, 抗原 (优选是抗原的表位) 可化学地结合至, 或表达为, 与其他蛋白融合的融合蛋白, 所述其他蛋白例如是 MHC 和 MHC 相关蛋白。

[0064] 如本文所使用的, 术语“患者”和“对象”可意思相近, 并且是指哺乳动物。在一些实施方式中, 患者是人。在其他实施方式中, 患者或对象是通常用在实验室中的哺乳动物, 例如是小鼠、大鼠、猴、狗、猫、牛、马或羊。

[0065] 如本申请中所使用的, 术语“多核苷酸”是指一种核酸分子, 其可为重组的, 或是分离的且不含全基因组核酸。术语“多核苷酸”包括寡核苷酸 (长度为 100 个残基或更少的核酸)、重组载体 (包括例如质粒、粘粒、噬菌体、病毒等)。在某些方面, 多核苷酸包括调节序列, 它们被分离得实质上远离它们的天然基因或蛋白质编码序列。多核苷酸可为 RNA、DNA、其类似物、或它们的组合。编码多肽的全部或部分的核酸可含有编码该多肽的全部或一部分的连续核酸序列, 并具有以下长度: 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000、或更多个核苷酸、核苷或碱基对。还预期的是, 来自特定物种的特定多肽可由含有天然变体的核酸编码, 所述天然变体具有稍微不同的核酸序列但编码相同或实质性相似的蛋白质、多肽或肽。

[0066] 多核苷酸是由特定序列的四种核苷酸碱基构成的: 腺嘌呤 (A); 胞嘧啶 (C); 鸟嘌呤 (G); 胸腺嘧啶 (T); 以及如果多核苷酸是 RNA 时替代胸腺嘧啶的尿嘧啶 (U)。因此, 术语“多核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母表现形式。该字母表现形式可被输入到具有中央处理单元的计算机的数据库中, 并且可用于生物信息学应用, 例如功能基因组学和同源性检索。

[0067] 如本文关于核酸 (例如 DNA 或 RNA) 所使用的, 术语“分离的”或“重组的”是指分离自其它 DNA 或 RNA 的分子, 分别为存在于大分子以及多肽的天然来源中的分子。术语“分离的或重组的核酸”包括不是天然地作为片段存在并且在自然状态下找不到的核酸片段。术语“分离的”在本文中也用来指分离自其他细胞蛋白质的多核苷酸、多肽和蛋白质, 并且意在包括纯化的和重组的多肽。在其他实施方式中, 术语“分离的或重组的”是指分离自成分、细胞, 其中细胞、组织、多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段在天然状态下通常是联合在一起的。例如, 一个分离的细胞是指分离自不相似表型或基因型的组织或细胞的一个细胞。分离的多核苷酸是分离自 3' 和 5' 连续核苷酸, 该分离的多核苷酸在其天然或自然环境中 (例如在染色体上) 通常是与 3' 和 5' 连续核苷酸相连的。对于本领域技术人员明显的是, 非天然的核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要进行“分离”从而预期天然副本相区别。

[0068] 多核苷酸或多核苷酸区域 (或多肽或多肽区域) 与另一序列具有特定百分数 (例如, 80%、85%、90% 或 95%) 的“序列一致性”是指, 在比较着两个序列时, 当比对时, 该百分

数的碱基(或氨基酸)是相同的。该比对以及同源性或序列一致性百分比可利用本领域已知的软件来确定,例如在 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, 7.7.18 部分,表格 7.7.1 中描述的那些软件。优选地,比对时使用默认参数。优选的比对程序是 BLAST,使用默认参数。特别地,优选的程序为 BLASTN 和 BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码 = 标准;过滤器 = 无;链 = 两种;切断 = 60;预期 = 10;Matrix = BLOSUM62;描述 = 50 个序列;分类 = HIGH SCORE;数据库 = 非冗余 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 翻译 + SwissProtein + SPupdate + PIR。这些程序的详细信息可在以下网址找到 ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0069] 不用明确说明即可推测得出,除非另有说明,否则当本发明涉及到多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,其等价物或生物学等价物也在本发明的保护范围之内。如本文所使用的,当提到参考蛋白、抗体、片段、多肽或核酸时,术语“其生物学等价物”与“其等价物”同义,并且是指具有最小同源性但仍保持期望的结构或功能性的蛋白、抗体、片段、多肽或核酸。除非本文另有特别说明,否则预期的是,任何本文提及的多核苷酸、多肽或蛋白质也包括其等价物。在一个方面,等价多核苷酸是在严格条件下与本文所述用于所描述的方法的多核苷酸或其互补序列杂交的多核苷酸。在另一个方面,等价抗体或抗原结合多肽是指以至少 70%、或至少 75%、或至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 95% 的亲合性或更高的亲合性结合至参考抗体或抗原结合片段的抗体或多肽。在另一个方面,其等价物在竞争性 ELISA 实验中与该抗体或抗原结合片段竞争结合至其抗原。在另一个方面,等价物具有至少约 80% 同源性或一致性,或者至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 98% 的同源性或一致性,并且表现出与参考蛋白、多肽或核酸实质上等同的生物学活性。

[0070] “杂交”是指一个或多个多核苷酸发生反应以形成复合物的反应过程,该复合物通过核苷酸残基的碱基之间的氢键结合而稳定化。氢键结合可为 Watson-Crick 碱基配对、Hoogsteen 结合或任何其他序列特异性方式结合。该复合物可包括形成双链结构的两个链、形成多链复合物的三个或更多个链、单个自身杂交的链、或这些的任何组合。杂交反应可以为更广泛过程中的一个步骤,例如是 PC 反应的起始步骤,或多核苷酸核酶催化中的酶促裂解步骤。

[0071] 严格杂交条件的例子包括:温育温度为约 25°C 至约 37°C;杂交缓冲液浓度为约 6x SSC 至约 10x SSC;甲酰胺浓度为约 0% 至约 25%;并且洗涤溶液为约 4x SSC 至约 8x SSC。中等杂交条件的例子包括:温育温度为约 40°C 至约 50°C;缓冲液浓度为约 9x SSC 至约 2x SSC;甲酰胺浓度为约 30% 至约 50%;并且洗涤溶液为约 5x SSC 至约 2x SSC。高严格杂交条件的例子包括:温育温度为约 55°C 至约 68°C;缓冲液浓度为约 1x SSC 至约 0.1x SSC;甲酰胺浓度为约 55% 至约 75%;并且洗涤溶液为约 1x SSC、0.1x SSC、或去离子水。一般而言,杂交温育时间为 5 分钟至 24 小时,具有 1、2 或更多个洗涤步骤,并且洗涤温育时间为约 1、2、或 15 分钟。SSC 是 0.15 M NaCl 和 15 mM 柠檬酸盐缓冲液。要理解的是,可使用利用其它缓冲系统的 SSC 等价物。

[0072] “同源性”或“一致性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可通过比较每个序列中的一个位置来确定,这些序列可被对齐从而进行比较。当被比序列中的一个位置被相同碱基或氨基酸占据时,那么这些分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度与序列共享的匹配或同源位置的数量有关。“不相关的”或“非同源

的”序列与本发明的序列中的一个共享少于 40% 的一致性,或少于 25% 的一致性。

[0073] “同源性”或“一致性”或“相似性”也可以指在严格条件下杂交的两个核酸分子。

[0074] 如本文所使用的,术语“治疗”是指获得期望的药理学和 / 或生理学效果。该效果可为预防性的,表现为完全地或部分地阻止疾病或其迹象或症状,和 / 或可为治疗性的,表现为部分地或完全地治愈疾病和 / 或由该疾病造成的负面作用。在一个方面,治疗表示患者的炎症的减少。测定的方法包括,但不限于,血管舒张、炎症标记物的产生和白细胞浸润停止。炎症标记物包括例如 IL-6、IL-8、IL-18、TNF- α 和 CRP。本领域已知测量和监控这些标记物的任何合适的方法。

[0075] 本发明的意图在于在体外或体内阻止倾向于患有疾病或具有作用的系统或对象中出现该疾病或作用。

[0076] “组合物”是指活性试剂 和 惰性(例如可检测试剂或标记物)或活性的另一种化合物或组合物(例如佐剂)的组合。

[0077] “药物组合物”包括活性试剂与惰性或活性载体的组合,所述载体使得该组合物适于体外、体内或间接体内的诊断或治疗用途。

[0078] 术语“功能上等同的密码子”是指编码相同氨基酸的密码子,例如精氨酸或丝氨酸的 6 个密码子,并且也指编码生物学等价氨基酸的密码子(见下表)。

[0079] 密码子表

氨基酸			密码子
丙氨酸	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
光氨酸	Cys	C	UGC UGU
天冬氨酸	Asp	D	GAC GAU
谷氨酸	Glu	E	GAA GAG
苯丙氨酸	Phe	F	UUC UUU
甘氨酸	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
组氨酸	His	H	CAC CAU
异亮氨酸	Ile	I	AUA AUC AUU
赖氨酸	Lys	K	AAA AAG
亮氨酸	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
蛋氨酸	Met	M	AUG
天冬酰胺	Asn	N	AAC AAU
脯氨酸	Pro	P	CCA CCG CCG CCU
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA CAG
精氨酸	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
丝氨酸	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
苏氨酸	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
缬氨酸	Val	V	GUA GUC GUG GUU
色氨酸	Trp	W	UGG
酪氨酸	Tyr	Y	UAC UAU

如本文所使用的,“蛋白质”或“多肽”或“肽”是指包含至少五个氨基酸残基的分子。

[0080] 本发明的其他目的、特点和优点将从以下详细描述中明显看出。但是,要理解的是,详细的描述和具体的例子虽然表示了本发明的具体实施方式,但仅为了解释的目的而给出,因为对于本领域技术人员明显的是,可根据该详细的描述,在本发明的范围内做出各种改变和修饰。

[0081] 描述性实施方式

来自胃肠道共生菌的抗原肽可在被专业的抗原提呈细胞(APC,例如树突细胞或DC)处理后被内源性宿主T细胞特异地识别,并且这种同源T细胞和APC之间的抗原驱动的相互作用可以抑制IBD,这是之前所未知的。不受理论的约束,申请人认为,位于胃肠道中或感染胃肠道的细菌的蛋白质经蛋白酶体处理或在核内体中被处理,所产生的肽被转移到内质网上以结合至内源性I类或III类MHC分子,其随后被运输至APC的质膜,从而激活同源T细胞。

[0082] 申请人认为,本发明是第一次公开了胃肠道相关细菌的抗原被处理并提呈至同源的内源性T细胞,并且具有抑制炎症性肠病的能力,因此,申请人认为这些抗原可被用作靶标,从而例如向炎症性肠病的肠中招募和累积自身调节性(抗炎)T细胞。抗原-MHC-纳米颗粒复合物之前已显示出在其他疾病中扩增T细胞的治疗种群(参见例如US专利公开号2009/0155292),但是该技术可以抑制例如胃肠道中的炎症或治疗炎症性肠病是未知的。本发明描述的组合物和方法可用于抑制炎症并且可用于治疗与炎症相关的疾病。

[0083] II. 方法

本发明所述的方法包括以下步骤、或实质上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:向细胞、组织或对象施用有效量的抗原-MHC-纳米颗粒复合物,从而实现以下目的中的一个或多个:(1)在细胞或组织中诱导抗炎响应;(2)治疗或降低有需要的患者的发炎;(3)在有需要的患者中累积自身调节性抗炎T细胞,和/或(4)在有需要的患者中转移靶定肠细菌表位的细胞毒性T淋巴细胞。在一个实施方式中,该细胞毒性T淋巴细胞以低亲和力识别肠细菌表位。

[0084] 在一个实施方式中,胃肠道的发炎并减轻或治疗。确定和监控疗法的方法在本领域是已知的,并在本文简要描述。当在体外递送时,施用通过将组合物与组织或细胞以任何适当方法接触而进行,例如,通过施用至细胞或组织培养基,并且用作筛选器以确定该疗法是否适合某个个体或者用以筛选出替代性疗法,从而作为所公开的组合物的替代或与其结合。当在体内递送时,施用通过全身或局部施用进行。在体内,所述方法可在人体施用之前在非人动物上实施,以筛选出替代性疗法,从而作为所公开的组合物的替代或与其结合。在人或非人哺乳动物中,它们对于治疗疾病或病症也是有用的。

[0085] 在某些实施方式中,要用本发明的方法治疗的患者患有胃肠道疾病,该疾病的症状或状态是GI组织发炎。胃肠道疾病的非限制性的例子包括炎症性肠病、结肠炎、克罗恩氏病、胃肠道过敏反应、食物过敏、胃肠道系统中的嗜曙红疾病、肠道易激综合症、乳糜泻以及胃出血。在一个实施方式中,所述疾病选自炎症性肠病、结肠炎、克罗恩氏病、胃肠道过敏反应和乳糜泻。在相关的实施方式中,所述疾病是炎症性肠病。

[0086] 本发明所描述的方法可用于在细胞或组织中诱导抗炎响应。在一个实施方式中,该细胞是胃肠道的细胞或组织。上胃肠道由食道、胃和十二指肠组成。“上”和“下”之间的准确的分界可能不同。一旦粗略分界后,十二指肠可作为统一的器官,但其通常基于功能、

动脉供血或胚胎学被分为两个部分。下胃肠道包括小肠和大肠。小肠具有三个部分：十二指肠、空肠和回肠。在十二指肠中，来自胰腺和胆囊(胆汁)的消化酶混合在一起。消化酶分界蛋白质，胆汁将脂肪乳化微团。十二指肠含有布伦纳氏腺，其产生碳酸氢盐以及含有碳酸氢盐的胰液，以中和胃部的盐酸。空肠是小肠的中部，连接十二指肠和回肠。它含有环形皱襞以及绒毛从而增加GI道的该部分的表面积。回肠具有绒毛，在这里所有可溶性分子被吸收至血液中(毛细血管和乳糜管)。大肠具有三个部分：盲肠、结肠和直肠。阑尾附着于盲肠。结肠包括升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠。结肠的主要功能在于吸收水分，但它也含有产生有益维生素的细菌。

[0087] 在另一个实施方式中，抗炎响应在免疫细胞或含有免疫细胞的组织中被诱导。免疫细胞包括，例如，成人脾细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞和来源于骨髓的细胞(例如哺乳动物的缺陷型抗原提呈细胞，该细胞对免疫细胞所来源的生物体有活性)。

[0088] 抗原-MHC-纳米颗粒复合物的MHC可为MHC I、MHC II或非经典MHC。MHC蛋白在本文中有描述。在一个实施方式中，抗原-MHC-纳米颗粒复合物的MHC是I类MHC。在另一个实施方式中，该MHC是II类MHC。在其他实施方式中，抗原-MHC-纳米颗粒复合物的MHC成分是II类MHC或如本文所述的非经典MHC分子。

[0089] 在方法的一个方面，本发明提供一种在有需要的患者中累积抗炎(肠微生物特异性或胃肠道微生物特异性)T细胞的方法。在一个实施方式中，该T细胞累积于患者的胃肠道中。在另一个实施方式中，该T细胞是识别任何胃肠道微生物抗原的常规CD8⁺T细胞。在另一个实施方式中，该T细胞是记忆样自身调节性CD8⁺T细胞。在另一个实施方式中，该T细胞是CD4⁺T细胞。在相关的实施方式中，该T细胞分泌IL-10或TGF β 。

[0090] 有关体外和体内的施用模式的细节在本文有描述。

[0091] III. 抗原-MHC-纳米颗粒复合物

某些方面涉及产生肠抗原特异性抗IBD药物的方法，该药物特异性地针对肠发炎而不会损害全身免疫力。实施例2描述了抗原-MHC-纳米颗粒复合物的生产过程。用于本发明的抗原-MHC-纳米颗粒复合物包含来源于胃肠道微生物的抗原。预期的是，向患者施用涂布了肠特异性抗原-MHC复合物的纳米颗粒会导致循环性肠抗原特异性T细胞的扩增，其扩增为从总循环性T细胞的约0.5%到约90%、或从约1%到约80%、或从约5%到约80%、或从约10%到约80%、或从约10%到约50%、或从约50%到约90%、或从约20%到约50%、或从约30%到约60%、或从约35%到约65%、或从约40%到约70%、或从约45%到约75%、或从约50%到约80%、或从约25%到约55%、或从约0.5%到约1%、或从约1%到约2.5%、或从约2.5%到约5%、或从约0.1%到约5%、或从约1%到约5%、或从约0.1%到约10%。

[0092] A. 多肽和多核苷酸

另一些方面涉及分离和或纯化的多肽，其包含以下组分、或实质上由以下组分构成、或由以下组分构成：SEQ ID No. 1的氨基酸序列，或与SEQ ID No. 1具有至少约80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少98%的序列一致性的多肽。本发明还提供了分离的和纯化的多核苷酸，其编码对应于SEQ ID No. 1的多肽、与SEQ ID No. 1至少约80%序列一致性的多肽、或与SEQ ID No. 1至少约85%、或至少90%、或至少95%、或至少98%序列一致性的多肽或等价物，或者是在严格条件下与所述多核苷酸、其等价物或其互补序列杂交的多核苷酸，并且提供了由这些多核苷酸编码的分离且纯化的多肽。

[0094] 序列表

SEQ ID No. 2:整合酶蛋白(普通拟杆菌)

SEQ ID No. 3:整合酶DNA序列(普通拟杆菌)

SEQ ID No. 4 :BacInt₄₀₋₅₄ 肽序列 :TNVYLKPECWSREGA

SEQ ID No. 5 :BacInt₈₁₋₉₅ 肽序列 :LGYWKRGIPATLSLL

SEQ ID No. 6 :BacInt₃₆₅₋₃₇₉ 肽序列 :TQIYSEVLSSTIVRD

SEQ ID No. 7 :BacInt₅₇₋₇₁ 肽序列 :INHPQSNELNAMLVE

SEQ ID No. 8 :BacInt₈₈₋₁₀₂ 肽序列 :IPATLSLLKDAVKKK

来自抗原物种(antigenic species)的抗原(包括区段、片段和其他分子),包括但不限于,由本发明的经典和非经典 MHC 分子提呈的肽、碳水化合物、脂质或其他分子,通常被复合或可操作地连接至 MHC 分子或其衍生物。T 淋巴细胞的抗原识别受限于主要组织相容性复合物(MHC)。特定的 T 淋巴细胞仅在其被结合至特定的 MHC 分子时才识别抗原。一般而言, T 淋巴细胞仅在有自身 MHC 分子的情况下被刺激,并且当抗原的片段结合至自身 MHC 分子时抗原被识别。MHC 限制作用确定出了 T 淋巴细胞特异性,表现在所识别的抗原以及结合其抗原片段的 MHC 分子方面。在特定的方面,某些抗原可与某些 MHC 分子或由其衍生的多肽配对。

[0095] 本文使用的术语“可操作地连接”或“涂布”是指单个多肽(例如 MHC)和抗原(例如肽)成分被结合从而在结合于靶定位点(例如免疫细胞)之前形成活性复合物的情况。这包括单个多肽复合物成分被合成或重组表达并随后被分离和组合以在施用至对象之前在体外形成复合物的情况;嵌合或融合多肽(即复合物的每个离散的蛋白质成分被包含在单个多肽链中)被合成或重组表达为完整复合物的情况。通常,多肽复合物被添加至纳米颗粒以产生具有被吸附的或链接的多肽复合物的纳米颗粒,其中分子的数量:纳米颗粒的数量的比率为从约、至少约、或至多约 0.1、0.5、1、3、5、7、10、15、20、25、30、35、40、50、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500 或更多:1,更常见地为 0.1:1、1:1 至 50:1 或 300:1。在一个具体实施方式中,抗原-MHC 分子的数量:纳米颗粒的数量的比率为从约 10:1 到约 1000:1。纳米颗粒的多肽含量可利用标准技术来确定。

[0096] 本文所描述的多肽和蛋白质也可用于常规方法中以治疗胃肠道的发炎。因此,某些方面涉及在细胞或组织中诱导抗炎响应的方法,该方法包括将细胞或组织与有效量的抗原接触,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道(GI)细胞或组织的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。另一个方面涉及治疗有需要的患者的发炎的方法,包括向该患者施用有效量的抗原,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道(GI)细胞或组织的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。另一个方面涉及在有需要的患者的 GI 道中累积抗炎 T 细胞的方法,包括向该患者施用有效量的抗原,其中所述抗原是来自于在胃肠道内或感染胃肠道(GI)细胞或组织的微生物的抗原,或是 GI 关联抗原。例如,所述抗原是对应于具有与 SEQ ID No. 1、2、4、5、6、7 或 8 的肽序列至少 80% 一致性的肽的抗原。在某些实施方式中,所述抗原在施用之前与 MHC 分子复合。在其他实施方式中,所述抗原与佐剂一起施用。合适的佐剂的例子包括,但不限于, Freund 完全佐剂和不完全佐剂、矿物盐和多核苷酸。合适的佐剂的其他非限制性例子包括单磷酸脂质 A (MPL)、大肠杆菌不耐热肠毒素的突变衍生物、霍乱毒素的突变衍生物、CPG 寡核苷酸以及来源于鲨烯的佐剂。

[0097] B. MHC 分子

细胞内抗原和细胞外抗原对免疫系统的作用在识别和适当响应方面有很大区别。抗原向 T 细胞的提呈通过两种不同种类的分子来介导,即 I 类 MHC(MHC-I)和 II 类 MHC(MHC-II),它们施用不同的抗原加工途径。来源于细胞内抗原的肽由 I 类 MHC 分子提呈至 CD8⁺T 细胞, I 类 MHC 分子几乎在所有细胞上都表达,而细胞外抗原来源的肽由 MHC-II 分子提呈至 CD4⁺T 细胞。但是,这种二分法也有例外。多项研究显示,由胞饮颗粒生成的多肽或可溶性蛋白

质在巨噬细胞以及树突细胞中被提呈在 MHC-I 分子上。在本发明的某些实施方式中,特定的抗原在合适 MHC I 类或 II 类多肽的情况下被识别并被提呈在抗原-MHC- 纳米颗粒复合物中。在某些方面,对象的基因组成可被评估从而确定哪种 MHC 多肽要被用于特定的患者以及特定一组的肽。

[0098] 预期非经典 MHC 分子也可用在本发明的 MHC 复合物中。非经典 MHC 分子是非多态性的,在物种之间是保守的,并且具有狭窄、深的、疏水的配体结合袋。这些结合袋能够将糖脂和磷脂提呈至自然杀伤 T (NKT) 细胞或特定亚型的 CD8+ T 细胞(例如 Qa1 或 HLA-E- 限制的 CD8+ T 细胞)。NKT 细胞是独特的淋巴细胞群,其共表达 NK 细胞标记物和半不变(semi-invariant) T 细胞受体(TCR)。它们参与了与许多疾病相关的免疫响应的调节。

[0099] C. 抗原成分

本发明的某些方法包括关于抗原成分的方法和组合物,所述抗原成分包括多肽的区段、片段或表位、肽、核酸、碳水化合物、脂质和其他引起或诱导抗原响应的分子(统称为抗原)。具体而言,抗原决定簇的抗原区段或片段,经自身免疫响应导致细胞破坏,其可以被识别并用于制造本文所述的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物。本发明的实施方式包括用于调节身体的细胞或组织中的免疫响应的组合物和方法。

[0100] 本发明的多肽和肽可通过各种氨基酸缺失、插入和 / 或取代而被修饰。在特定实施方式中,经修饰的多肽和 / 或肽能够调节对象中的免疫响应。在一些实施方式中,使用了野生型的蛋白质或肽,但在本发明的许多实施方式中,使用了经修饰的蛋白质或多肽以生成抗原-MHC- 纳米颗粒复合物。抗原-MHC- 纳米颗粒复合物可被用来产生抗炎免疫响应,从而改变免疫系统的 T 细胞群(即,改造免疫系统),和 / 或为特定组织(例如胃肠道的组织)招募和累积抗炎 T 细胞。以上所述术语可在本文中被互换使用。“经修饰的蛋白质”或“经修饰的多肽”或“经修饰的肽”是指相对于野生型蛋白质或多肽化学结构(特别是其氨基酸序列)被改变了的蛋白质或多肽。在一些实施方式中,经修饰的蛋白质或多肽或肽具有至少一种经改变的活性或功能(要意识到蛋白质或多肽或肽可具有多种活性或功能)。特别预期的是,经修饰的蛋白质或多肽或肽的一种活性或功能可被改变,但另一方面可保留一种野生型活性或功能,例如免疫原性或在 MHC- 纳米颗粒复合物的情况下的与免疫系统的其他细胞相互作用的能力。

[0101] 本发明的抗原包括来源于胃肠道常见微生物的蛋白质的抗原。胃肠道常见微生物包括,例如,无色杆菌属、发酵氨基酸球菌、醋酸钙不动杆菌、放线菌属、粘放线菌、内氏放线菌、单胞菌属、伴放线聚生杆菌、Alistipes 拟杆菌、*Anaerotruncus colihominis*、厌氧螺菌属、粪产碱杆菌、丙酸蛛菌、芽孢杆菌、拟杆菌属、粪拟杆菌、多毛拟杆菌、*dorei* 拟杆菌、埃氏拟杆菌、赭拟杆菌、*finegoldii* 拟杆菌、脆弱拟杆菌、中间型拟杆菌、肠源性拟杆菌、产黑色素拟杆菌、卵形拟杆菌、嗜果胶拟杆菌、侵肺拟杆菌、粪便拟杆菌、多形拟杆菌、单形拟杆菌、普通拟杆菌、*xylanisolvens* 拟杆菌、*matruchotii* 拟杆菌、*Blautia hansenii*、马氏棒状杆菌、双歧杆菌属、蛭虫内共生菌、穗状丁酸弧菌、*fibrosolvens* 丁酸弧菌、弯曲杆菌属、大肠弯曲杆菌、生痰弯曲菌、乌普萨拉弯曲杆菌、白色念珠菌、噬二氧化碳菌属、梭菌属、弗氏柠檬酸杆菌、*asparagi forme* 梭状芽胞杆菌、艰难梭状芽胞杆菌、柔嫩梭菌、系结梭菌、*scindens* 梭状芽胞杆菌、索氏梭菌、产气柯林斯菌、陪伴粪球菌、一致粪球菌、棒状杆菌、产甲酸 *Dorea* 菌、侵蚀艾肯菌、阴沟肠杆菌、肠球菌属、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠杆菌、真杆菌

属、伤寒真杆菌、直肠真杆菌、惰性真杆菌、凸腹真杆菌、柔嫩梭菌群、黄杆菌属、梭杆菌属、具核梭杆菌、大头菌属、流感嗜血杆菌、副嗜泡沫嗜血杆菌、丝状霍尔德曼氏菌、乳酸杆菌属、口腔纤毛菌、摩氏摩根菌、分枝杆菌属、支原体属、微球菌属、支原体属、龟分枝杆菌、奈瑟氏菌属、干燥奈瑟菌、狄氏普氏拟杆菌、约翰普氏拟杆菌、尿普氏拟杆菌、消化球菌属、消化链球菌属、类志贺邻单胞菌、牙龈卟啉单胞菌、丙酸菌属、疮疱丙酸菌、普罗威登菌属、绿脓假单胞菌、肠罗氏菌、布氏瘤胃球菌、活泼瘤胃球菌、扭链瘤胃球菌、酸奶瘤胃球菌、卵形瘤胃球菌、齧齿罗氏菌、瘤胃球菌属、八叠球菌属、金黄色酿脓葡萄球菌、表皮葡萄球菌、咽峡炎链球菌、变异链球菌、口腔链球菌、肺炎链球菌、远缘链球菌、嗜热链球菌、绿色链球菌、*Subdoligranulum variabile*、光滑球拟酵母、齿垢密螺旋体、屈折密螺旋体、韦荣球菌属、弧菌属、痰弧菌、产琥珀酸沃廉菌和小肠结肠炎耶尔森菌。Qin et al., (2010) Nature, Vol. 464:4 描述了胃肠道中的常见细菌。在某些实施方式中,抗原来源于术语以下属的细菌:拟杆菌属、梭状芽孢杆菌属、*Dorea* 属、梭菌属、真杆菌属、瘤胃球菌属、消化球菌属、消化链球菌属和双歧杆菌属。在相关的实施方式中,抗原来源于拟杆菌。在另外的实施方式中,抗原来源于拟杆菌的蛋白质。在另一个实施方式中,抗原来源于整合酶蛋白。在进一步的实施方式中,抗原对应于具有与 SEQ ID No. 1 至少 80% 一致性或至少约 80% 序列一致性的肽,或具有与 SEQ ID No. 1 的肽序列至少 85%、或至少 90%、或至少 95%、或至少 98% 序列一致性的肽。在其他实施方式中,所述抗原对应于具有与 SEQ ID No. 4-8 的肽序列至少 80% 一致性的肽。其他有用的抗原包括诱导可与肠微生物的抗原交叉反应的 T 细胞的抗原。例如,IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 表位(由胰岛 β 细胞表达)和 NRP-V7 或 NRP-A7 (IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 模拟物)可被用来诱导可与 BacIYL 序列交叉反应的 8.3-样 CD8⁺ T 细胞。

[0102] 本发明的抗原也包括 GI 关联抗原,例如已知的炎症性肠病相关抗原(例如卵白蛋白)、饮食性抗原(例如酵母甘露聚糖、麦醇溶蛋白)以及已知的乳糜泻相关抗原(例如来自麸质的麦醇溶蛋白)。

[0103] 在某些实施方式中,蛋白质或多肽(野生型或经修饰)(包括感兴趣的蛋白质或肽的任何复合物,特别是 MHC-肽融合体)的尺寸可包含,但不限于,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500 个氨基酸分子或更多,包括延伸出的任何范围或值,以及它们的衍生物。在某些方面,5、6、7、8、9、10 或更多个连续的氨基酸(包括其衍生物)和抗原的片段(例如本文所公开和引用的那些氨基酸序列)可被用作抗原。预期的是,多肽可通过截断而突变,使得它们短于它们相应的野生型形式,但它们也可能通过融合或结合具有特定功能(例如为实现以蛋白质复合物形式呈现,或为实现增强的免疫原性等等)的异源蛋白质序列而被改变。

[0104] 蛋白质组合物可通过本领域技术人员已知的任何技术来制备,包括(i)通过标准化分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽,(ii)从自然来源中分离蛋白质化合物,或(iii)

化学合成蛋白质物质。各种基因的核苷酸以及蛋白质、多肽和肽序列之前已公开,并且可在公认的计算机数据库中找到。一种这样的数据库是美国国家生物技术信息中心的 GenBank 和 GenPept 数据库(网址 ncbi.nlm.nih.gov/)。这些基因的全部或部分编码区可利用本文公开的技术或本领域技术人员已知的技术来扩增和 / 或表达。

[0105] 这些组合物的自身抗原表位和其他多肽的氨基酸序列变化可以是取代变化、插入变化或缺失变化。本发明的多肽的修饰,与野生型相比,可能影响肽或多肽的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500 个或更多个非连续或连续的氨基酸。

[0106] 缺失改变通过缺乏了天然或野生型氨基酸序列的一个或多个残基。可能缺失单个残基,或者缺失多个连续的氨基酸。终止密码子可被引入(通过取代或插入)到编码核酸序列中,以产生截短蛋白。插入突变通常涉及在多肽的非末端位点添加物质。这可包括插入一个或多个残基。也可以进行末端添加,产生所谓的融合蛋白。

[0107] 取代变化通常包含在蛋白质内的一个或多个位点处的一个氨基酸与另一个氨基酸的替换,并且可被设计用来调节多肽的一种或多种性质,并伴随其他功能或性质的保留或丧失。取代可以是保守性的,即,一个氨基酸被具有相似形状和电荷的氨基酸替代。保守

性取代在本领域是熟知的,包括例如以下改变:丙氨酸到丝氨酸;精氨酸到赖氨酸;天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸到谷氨酸;半胱氨酸到丝氨酸;谷氨酰胺到天冬酰胺;谷氨酸到天冬氨酸;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸到天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸到精氨酸;蛋氨酸到亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或蛋氨酸;丝氨酸到苏氨酸;苏氨酸到丝氨酸;色氨酸到酪氨酸;酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。可替换地,取代可以是非保守的,因而多肽或肽的功能或活性受到影响,例如对细胞受体的亲和力或亲和性受到影响。非保守性变化通常涉及以化学上不相似的残基来取代一个残基,例如极性或带电荷的氨基酸对非极性或不带电荷的氨基酸的取代,以及相反的情况。

[0108] 本发明的蛋白质可以是重组的,或在体外合成的。作为选择,重组蛋白可从细菌或其它宿主细胞中分离出来。

[0109] 还要理解的是,氨基酸和核酸序列可包括额外的残基,例如分别是额外的 N- 或 C- 末端氨基酸,或 5' 或 3' 的核酸序列,但仍然基本上是如本文所公开的其中一个序列的序列,只要该序列符合如上所述的条件,包括生物学蛋白活性(例如免疫原性)的维持。添加末端序列特别适用于核酸序列,其可包括例如在 5' 或 3' 编码区的侧翼的各种非编码序列。

[0110] 预期的是,在本发明的组合物中,每 ml 含有约 0.001 mg 至约 10 mg 的总蛋白质。因此,组合物中的蛋白质的浓度可为约、至少约或至多约 0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 或 mg/ml 或更高(或由此衍生的任何范围值)。其中,约、至少约或至多约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100% 可以是抗原-MHC- 纳米颗粒复合物。

[0111] 本发明预期,施用抗原-MHC- 纳米颗粒复合物实现了对于胃肠道发炎相关的疾病或病症的治疗。

[0112] 另外,美国专利 4,554,101 号 (Hopp) 教导了表位的识别以及基于亲水性由主要氨基酸序列制备表位,该专利通过引用合并至本文中。通过 Hopp 公开的方法,本领域技术人员能够从氨基酸序列中识别出潜在的表位,并确认它们的免疫原性。许多科技文献也涉及到二级结构的预测以及根据氨基酸序列的分析来识别表位 (Chou & Fasman, *Adv. Enzymol.*, 47:45-148, 1978; Chou and Fasman, *Annu. Rev. Biochem.*, 47:251-276, 1978, Chou and Fasman, *Biochemistry*, 13(2):211-222, 1974; Chou and Fasman, *Biochemistry*, 13(2):222-245, 1974, Chou and Fasman, *Biophys. J.*, 26(3):385-399, 1979)。如果期望的话,任何这些文献都可被用来补充 Hopp 在美国专利 4,554,101 号中的教导。

[0113] 非肽分子可作为抗原或抗原片段而与 MHC 分子复合,这样的分子包括,但不限于,碳水化合物、脂质、小分子等。碳水化合物是多种细胞的外表面的主要成分。某些碳水化合物是不同分化阶段的特征,并且很多时候这些碳水化合物被特异性抗体识别。独特的碳水化合物的表达可被限制至特定的细胞类型。

[0114] D. 底物 / 纳米颗粒

在某些方面,抗原 / MHC 复合物被可操作地连接至基底。基底可以是纳米颗粒的形式,其任选地包括生物相容性的、生物可吸收材料。因此,在一个实施方式中,所述纳米颗粒是生物相容性的和 / 或生物可吸收的。基底也可以是例如那些在美国专利公开 2009/0155292 号中所述的纳米颗粒的形式,该专利文献在此通过引用以其整体并入本文中。纳米颗粒的结构尺寸可变,已知的有纳米球、纳米颗粒或生物相容性的生物可降解的纳米球或生物相容性的生物可降解的纳米颗粒。含有抗原 / MHC 复合物的这种粒状制剂可通过该复合物与纳米颗粒的共价或非共价结合而形成。

[0115] 纳米颗粒通常由实质上球形的核构成,并且任选地包含一个或多个层。该核的尺寸和成分可变化。除了核之外,纳米颗粒可具有一个或多个层以提供适合应用目的的功能性。如果存在层的话,层的厚度可根据具体的应用需要而变化。例如,层可赋予有用的光学性质。

[0116] 层也可赋予化学或生物学功能性,在本文这称为化学活性层或生物学活性层,并且对于这些功能性而言,该层或这些层通常的厚度为约 0.001 微米(1 纳米)至约 10 微米或更大(取决于期望的纳米颗粒直径),这些层通常被施用在纳米颗粒的外表面。

[0117] 核和层的成分可不同。颗粒或核的核酸材料包括,但不限于,聚合物、陶瓷材料、玻璃、矿物质等。例子包括,但不限于,标准和特种玻璃、二氧化硅、聚苯乙烯、聚酯、聚碳酸酯、丙烯酸聚合物、聚丙烯酰胺、聚丙烯腈、聚酰胺、含氟聚合物、有机硅、纤维素、硅、金属(例如,铁、金、银)、矿物质(例如红宝石)、纳米颗粒(例如,金纳米颗粒、胶体粒子、金属氧化物、金属硫化物、金属硒化物和磁性材料(如铁的氧化物)),以及它们的复合材料。核可以为同质成分,或根据期望的性质可为两种或更多种材料的复合材料。在某些方面,会使用金属纳米颗粒。这些金属颗粒或纳米颗粒可由 Au、Pt、Pd、Cu、Ag、Co、Fe、Ni、Mn、Sm、Nd、Pr、Gd、Ti、Zr、Si、和 In、前体、它们的二元合金、它们的三元合金以及它们的金属间化合物形成。参见美国专利 6,712,997 号,通过引用将其整体合并至本文中。在某些实施方式中,如果纳米颗粒是生物相容性的和生物可吸收的,核和层的成分可不同。核可为同质成分,或根据期望的性质可为两种或更多种材料的复合材料。在某些方面,会使用金属纳米球。这些金属纳米颗粒可由 Fe、Ca、Ga 等形成。

[0118] 如前所述,纳米颗粒除包括核之外还可包括一个或多个层。纳米颗粒可包括由生物可降解糖或其他聚合物构成的层。生物可降解层的例子包括但不限于葡聚糖;聚(乙二醇);聚(环氧乙烷);甘露醇;基于聚丙交酯(PLA)、聚乙交酯(PGA)、聚己内酯(PCL)的聚酯;PHB-PHV 类的聚羟基链烷酸酯;和其它改性的聚糖,例如淀粉、纤维素和壳聚糖。此外,纳米颗粒可包括具有用于附接化学功能性以实现化学键合或结合位点的合适表面的层。

[0119] 层可通过本领域技术人员已知的多种方式产生于纳米颗粒上。例子包括溶胶-凝胶化学技术,例如 Iler, *Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, 1979; Brinker and Scherer, *Sol-gel Science*, Academic Press, (1990) 所描述的。其他在纳米颗粒上产生层的途径包括表面化学和包封技术,例如在 Partch and Brown, *J. Adhesion*, 67:259-276, 1998; Pekarek et al., *Nature*, 367:258, (1994); Hanprasopwattana, *Langmuir*, 12:3173-3179, (1996); Davies, *Advanced Materials*, 10:1264-1270, (1998) 以及其中所引用的文献中所描述的。也可以使用蒸汽沉积技术,参见例如 Golman

and Shinohara, Trends Chem. Engin., 6:1-6, (2000); 和美国专利 6,387,498 号。其他途径包括逐层自组装技术,例如在 Sukhorukov et al., Polymers Adv. Tech., 9(10-11):759-767, (1998); Caruso et al., Macromolecules, 32(7):2317-2328, (1998); Caruso et al., J. Amer. Chem. Soc., 121(25):6039-6046, (1999); 美国专利 6,103,379 号以及其中所引用的文献中所描述的。

[0120] 如在美国专利 4,589,330 号或 4,818,542 号中所教导的,纳米颗粒可通过接触含有抗原/MHC/共刺激分子复合物的水相、聚合物和非水相,随后蒸发非水相以导致颗粒从水相聚结而形成。用于此制备的优选聚合物是选自以下物质的天然的或合成的共聚物或聚合物:明胶琼脂、淀粉、阿拉伯半乳聚糖、白蛋白、胶原蛋白、聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)-丙交酯聚(ϵ -己内酯)、聚(ϵ -己内酯-共聚-乳酸)、聚(ϵ -己内酯-共聚-乙醇酸)、聚(β -羟基丁酸)、聚环氧乙烷、聚乙烯、聚(烷基-2-氰基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚酰胺、聚(氨基酸)、聚(2-羟乙基 DL 天冬酰胺)、聚(酯脲)、聚(L-苯丙氨酸/乙二醇/1,6-二异氰酸酯)和聚(甲基丙烯酸甲酯)。特别优选的聚合物是聚酯,如聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)-丙交酯聚(ϵ -己内酯)、聚(ϵ -己内酯-共聚-乳酸)和聚(ϵ -己内酯-共聚-乙醇酸)。用于溶解聚合物的溶剂包括:水、六氟异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、己烷、苯或六氟丙酮倍半水合物。

[0121] 纳米颗粒的尺寸可在约 1 nm 至约 1 μ m 之间变化。在某些实施方式中,纳米颗粒小于约 1 μ m。在其他实施方式中,纳米颗粒小于约 500 nm、小于约 400 nm、小于约 300 nm、小于约 200 nm、小于约 100 nm、或小于约 50 nm。在另外的实施方式中,纳米颗粒为约 1 nm 至约 15 nm 或至约 30 nm、50 nm、75 nm 或 100 nm。在另外的实施方式中,纳米颗粒为约 5 nm 至约 50 nm。在相关的实施方式中,纳米颗粒的直径为约 5 nm 至约 15 nm。

[0122] E. 抗原-MHC 复合物与纳米颗粒的结合

为了将底物或纳米球结合至抗原-MHC 复合物,可使用以下技术。

[0123] 该结合可通过化学改性底物或纳米颗粒而实现,改性通常涉及在表面上生成“功能基团”,所述功能基团能够结合至抗原-MHC 复合物,和/或将底物或纳米颗粒的可选的化学改性的表面与共价或非共价键合的所谓“连接分子”连接,随后使抗原-MHC 复合物与所获得的纳米颗粒反应。

[0124] 术语“连接分子”是指能够与底物或纳米颗粒连接并且能够连接至抗原-MHC 复合物的物质。

[0125] 本文使用的术语“功能基团”并不限于形成共价键的反应性化学基团,而且包括导致与抗原-MHC 复合物形成离子相互作用或氢键的化学基团。而且,要注意的是,无法严格区别在表面上生成的“功能基团”以及含有“功能基团”的连接分子,因为有些时候表面的改性需要较小的连接分子(例如乙二醇)与纳米球表面反应。

[0126] 功能基团或含有功能基团的连接分子可选自氨基、碳酸基、硫醇、硫醚、二硫化物、胍基、羟基、胺基、邻二醇、醛、 α -卤代乙酰基、汞官能(mercury organyles)、酯基、酰基卤、酸硫酸酯、酸酐、异氰酸酯、异硫氰酸酯、磺酸卤化物、亚氨酸酯、重氮乙酸酯、重氮盐、1,2-二酮、膦酸、磷酸酯、磺酸、唑化物、咪唑、吡啶、N-马来酰亚胺、 α - β -羰基化合物、芳基卤化物或其衍生物。

[0127] 其他具有较高分子量的连接分子的非限制性例子是核酸分子、聚合物、共聚物、可

聚合连接剂、二氧化硅、蛋白质和相对于底物或纳米颗粒具有相反极性的表面的链样分子。核酸虽然对于连接分子来说具有互补序列,但其可为含有自身核酸分子的亲和分子提供连接。

[0128] 共价连接物的具体例子包括聚乙二醇(PEG)。PEG 连接物可为巯基-PEG-NH₂ 连接物。

[0129] 在某些实施方式中,本文所述的连接物具有确定的尺寸。在一些实施方式中,连接物小于约 10 kD、小于约 5 kD、小于约 4.5 kD、小于约 4 kD、小于约 3.5 kD、小于约 3 kD、小于约 2.5 kD、小于约 2 kD、或小于约 1 kD。在另外的实施方式中,连接物为约 0.5 kD 至约 5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5 或 1 kD。在另外的实施方式中,连接物为约 1 kD 至约 4.5、4、3.5、3、2.5、2 或 1.5 kD。

[0130] 可聚合连接剂的例子可为丁二炔、苯乙烯丁二烯、乙酸乙烯酯、丙烯酸酯、丙烯酰胺、乙烯基化合物、苯乙烯、氧化硅、氧化硼、磷氧化物、硼酸酯、吡咯、聚吡咯和磷酸酯。

[0131] 底物或纳米颗粒的表面可被化学修饰,例如通过结合具有功能性反应基团的磷酸衍生物而改性。这些磷酸或磷酸酯衍生物的一个例子是亚氨基-二(亚甲基膦羧基)碳酸,其可通过“Mannich-Moedritzer”反应合成。这种结合反应可与直接从制备工艺获得的或经预处理(例如用三甲基溴硅烷预处理)的底物或纳米球进行。在第一种情况下,磷酸(酯)衍生物可例如置换仍结合至表面的反应介质的成分。这种置换可在较高温度下被增强。另一方面,三甲基溴硅烷被认为用来对含烷基的、基于磷酸的偶联剂进行脱烷基化,从而为磷酸(酯)衍生物产生新的结合位点。磷酸(酯)衍生物或结合至其上的连接分子可表现出与以上给出的相同的功能基团。底物或纳米球的表面处理的另一个例子涉及在二元醇(例如乙二醇)中加热。应注意的是,如果合成已在二元醇中进行的话,那么这种处理是多余的。在这些情况下,直接获得的合成产物可能显示出所需要的功能基团。但是,这种处理适用于在含 N- 或 P- 偶联剂中产生的底物或纳米颗粒。如果这样的底物或颗粒经受使用乙二醇的后处理,那么仍结合至底物的反应介质(例如偶联剂)的成分可被该二元醇取代和 / 或被脱烷基化。

[0132] 还可以通过具有第二功能基团的伯胺衍生物来取代仍结合至颗粒表面的含 N 偶联剂。底物或纳米颗粒的表面也可涂布有二氧化硅。二氧化硅可实现相对简单的有机分子的化学结合,因为二氧化硅容易与有机连接物(例如三乙氧基硅烷或氯硅烷)反应。纳米颗粒表面也可涂布有均聚物或共聚物。可聚合偶联剂的例子是 N-(3-氨基丙基)-3-巯基苯甲胺、3-(三甲氧基甲硅烷基)丙基酰肼和 3-三甲氧基甲硅烷基)丙基马来酰亚胺。可聚合偶联剂的其他非限制性例子在本文有提及。这些偶联剂可单独使用或组合使用,这取决于要生成为涂层的共聚物的类型。

[0133] 另一种可用于含有氧化过渡金属化合物的底物或纳米颗粒的表面改性技术是通过氯气或有机氯化剂将氧化过渡金属化合物转化成相应的氧氯化物。这些氧氯化物能够与亲核试剂反应,例如通常在生物分子中找到的羟基或氨基基团。这种技术使得产生于蛋白质的直接结合(例如通过赖氨酸侧链的氨基基团而结合)。在用氧氯化物进行表面改性后与蛋白质的结合也可利用双功能连接物(例如马来酰亚胺基丙基酰肼)来实现。

[0134] 对于非共价连接技术,特别合适的是具有与底物或纳米球表面的极性或电荷相反极性或电荷的链型分子。可被非共价地连接至核 / 壳纳米球的连接分子的例子包括阴离

子、阳离子或两性离子表面活性剂、酸性或碱性蛋白质、聚胺、聚酰胺、聚砜或聚羧酸。底物或纳米球与具有功能性反应基团的两亲性试剂之间的输水相互作用可产生所需的连接。特别地,具有两亲性特征的链型分子(例如磷脂或可相互交联的衍生多糖)是有用的。这些分子在表面上的吸附可通过共培养来实现。亲和分子和底物或纳米颗粒之间的结合也可基于非共价自组装键来实现。其一个例子包括作为连接分子的具有生物素的简单探针和连接有抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的分子。

[0135] 功能基团与生物学分子的偶联反应的方案可在文献中找到,例如“Bioconjugate Techniques”(Greg T. Hermanson, Academic Press 1996)。生物学分子(例如 MHC 分子或其衍生物)可根据有机化学的标准程序共价地或非共价地偶联至连接分子,这些标准程序例如是氧化、卤化、烷基化、酰化、添加、取代或酰胺化。偶联所述共价地或非共价地结合的连接分子的这些方法可在将连接分子偶联至底物或纳米球之前或之后进行。而且,通过温育可影响分子向相应的预处理的底物或纳米颗粒(例如通过三甲基溴硅烷预处理)的直接结合,由于该预处理其表现出改性的表面(例如更高的电荷或极性的表面)。

[0136] F. 蛋白质生产

本发明描述了用于本发明的各种实施方式的多肽、肽和蛋白质。例如,特定的肽和它们的复合物被分析了它们的引起或调节免疫响应的能力。在特定的实施方式中,本发明的肽或蛋白质的全部或部分也可根据常规技术在溶液中合成或在固体载体上合成。各种自动合成仪在商业上是可获得的,并且可根据已知的方案使用。参见例如 Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd. Ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, (1983); Merrifield, *Science*, 232(4748):341-347, (1986); 以及 Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meinhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, (1979),通过引用将各篇合并至本文中。作为选择,重组 DNA 技术可被使用,其中编码本发明的肽的核苷酸序列被插入到表达载体中,并被转化或转染至合适的宿主细胞,并在适合表达的条件下培养。

[0137] 本发明的一个实施方式包括使用向细胞(包括微生物)的基因转移,从而生产蛋白质。感兴趣的蛋白质的基因可被转移至合适的宿主细胞,随后在合适条件下培养细胞。编码几乎任何多肽的核酸都可被使用。重组表达载体的产生以及其中包括的元件对于本领域技术人员来说是已知的,并在本文简要描述。哺乳动物宿主细胞系的例子包括,但不限于, Vero 细胞核 HeLa 细胞,其他 B 细胞系和 T 细胞系(例如 CEM、721. 221、H9、Jurkat、Raji)以及中国仓鼠卵巢细胞系、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、3T3、RIN 和 MDCK 细胞。此外,可选择调节被插入序列的表达或以期望的方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这种修饰(例如糖基化)和加工(例如剪切)对于蛋白质的功能是重要的。不同的宿主细胞具有特征性的和特定的蛋白质翻译后加工和修饰机制。可选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白的正确的修饰和加工。

[0138] 许多选择系统可被施用,包括但不限于,HSV 胸苷激酶基因、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因和腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因,分别在 tk 细胞、hgprt 细胞或 aprt 细胞中。而且,抗代谢物耐药性可被用作选择的基础:对于 dhfr,其赋予甲氧苄氨嘧啶和氨甲蝶呤耐药性;gpt,其赋予霉酚酸耐药性;neo,其赋予氨基糖苷 G418 耐药性;和 hygromycin,其赋予潮霉素耐药性。

[0139] G. 核酸

本发明可包括编码本发明的蛋白质、多肽、肽的重组多核苷酸,例如 SEQ ID No. 1、2 或 3。示例性抗原以及提呈抗原的 MHC 分子的核酸分子也包括在内,并且可用来制备抗原-MHC 复合物。

[0140] 在特别的实施方式中,本发明涉及分离的核酸片段以及含有编码自身抗原和 / 或 MHC 分子的核酸序列的重组载体。术语“重组”可与多肽或具体多肽的名称结合施用,它通常是指由核酸分子产生的多肽,该核酸分子在体外被操作或者是这种分子的复制产物。

[0141] 用在本发明中的核酸片段,无论编码序列本身的长度如何,都可与其他核酸序列结合,因而它们的总体长度可有很大变化,所述其他核酸序列例如是启动子、多腺苷酸化信号、其他限制酶切位点、多克隆位点、其他编码片段等。因此,本发明预期可使用几乎任何长度的核酸片段,总长度优选受限于制备的容易程度以及在预期重组核酸方案中的用途。在一些情况下,核酸序列可与其他异源编码序列一起编码多肽,从而例如可纯化出多肽、运输、分泌、翻译后修饰,或用于实现治疗利益(例如靶定或功效)。标签或其他异源多肽可被添加至经改性的多肽编码序列,其中“异源的”是指不与经改性的多肽相同的多肽。

[0142] IV. 药物组合物和施用

本发明提供过来用于治疗疾病的药物组合物。

[0143] A. 药物组合物

本发明的组合物可通过注射而不经肠道地常规施用,例如静脉内、皮下或肌肉注射。适合其他施用模式的其他制剂包括口服制剂。口服制剂包括那些通常使用的赋形剂,例如药学等级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物的形式有溶液、悬浮液、片剂、药片、胶囊、缓释制剂或粉末,并且含有约 10% 至约 95% 的活性组分,优选为约 25% 至约 70%。含有改变对象的免疫状态的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物的水性组合物的制备,根据本发明公开的内容,对于本领域技术人员将是熟知的。在某些实施方式中,组合物可被吸入(例如,美国专利 6,651,655 号,通过引用将其全部内容合并至本文中)。在一个实施方式中,抗原-MHC- 纳米颗粒复合物被全身性施用。

[0144] 通常,本发明的组合物以与给药制剂相容的方式施用,并且施用的量使得是治疗上有效的和免疫上改变的。施用的量取决于要被治疗的对象。需要施用的活性组分的精确的量取决于操作者的判断。但是,合适的剂量范围是每次施用给予十至几百纳克或微克的级别的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物。合适的初始施用和加强方案也是变化的,但是典型的是先进行初始施用,接下来进行后续施用。

[0145] 在许多情况下,期望的是多次施用肽-MHC- 纳米颗粒复合物,约、至多约或至少约 3、4、5、6、7、8、9、10 或更多次。施用间隔时间通常为 2 天至十二周,更常见的是一至两周间隔。间隔 0.5-5 年(通常 2 年)的周期性加强对于维持免疫系统的状态是合乎需要的。施用过程之后可进行发炎免疫响应实验和 / 或自身调节抗炎 T 细胞活性实验。

[0146] 在一些实施方式中,药物组合物被施用至对象。本发明的不同方面涉及向对象施用有效量的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物组合物。此外,这种组合物可与免疫系统的调节剂结合施用。这种组合物通常被溶解于或分散于药学上可接受的载体或水性介质中。

[0147] 术语“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”是指当施用至动物或人时不会产生负面的、过敏性的或其他不良反应的分子实体和成分。如本文所使用的,“药学上可接

受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这些介质和试剂用于药学上有活性的物质的用途在本领域是熟知的。除非任何常规介质或试剂不与活性成分相容,预期其可用于免疫原性组合物和治疗性组合物中。

[0148] 合适注射应用的药物形式包括无菌水溶液或分散体;制剂,包括芝麻油、花生油或水性丙二醇;以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。无论如何,该药物形式都必须是无菌的,并且必须是流体从而它能够容易注射。它还应当在制造和存储条件下是稳定的,并且被保存得不受微生物(例如细菌和真菌)的污染。

[0149] 组合物可被配制成中性形式或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基酸一起形成),它们是用无机酸形成的,无机酸例如是盐酸、磷酸,或是用有机酸形成,例如是乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等。以游离羧酸基形成的盐也可衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,或衍生自有机碱,例如是异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0150] 载体可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、乙二醇和液态聚乙二醇等)、它们的合适的混合物以及植物油的溶剂或分散介质。例如,可利用涂层(例如卵磷脂)、如果是分散体的情况下通过维持所需的颗粒尺寸、以及通过利用表面活性剂,可维持合适的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂来防止微生物的作用,例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。使用试剂延迟吸收成分,例如单硬脂酸铝和明胶,可为注射组合物带来延长的吸收效果。

[0151] 无菌注射溶液通过将所需量的活性化合物加入具有各种其他以上所列成分(按需要)的合适溶剂中,随后灭菌而制备。溶液的灭菌方式不应减少抗原-MHC-纳米颗粒复合物的治疗性质。通常,分散体通过将各种灭菌的活性组分加入到无菌载体中而制备,所述无菌载体含有碱性分散介质以及所需的来自以上列出的其他组分。如果是利用无菌粉末来制备无菌注射液,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生了活性组分的以及来自之前灭菌溶液的任何额外的期望组分的粉末。溶液灭菌的一种这样的方法是无菌过滤,但是,本发明意在包括不显著降低抗原-MHC-纳米颗粒复合物的治疗性质的任何灭菌方法。涉及高热高压的灭菌方法(例如高压蒸汽灭菌法)可能会损害复合物的三级结构,因而显著降低抗原-MHC-纳米颗粒复合物的治疗性质。

[0152] 治疗组合物的有效量是基于预期的目的而确定的。术语“单位剂量”或“剂量”是指适合用于对象的物理上分散的单元,每个单元含有预定量的组合物,该预定量被计算出来以产生以上关于其施用所述的期望响应,即,合适的施用途径和方案。施用的量(根据治疗次数和单位剂量)取决于期望的结果和/或保护。组合物的精确的量还取决于医师的判断并且对于每个个体都是特有的。意向剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用途径、预期的治疗目的(减轻症状或治愈)以及特定组合物的效力、稳定性和毒性。配制后,溶液将以与剂量制剂相容的方式施用,并且施用的量使得其是治疗上或预防上有效的。制剂可容易以各种剂量形式施用,例如上述的注射液的类型。

[0153] B. 联合疗法

本发明的组合物和相关方法(特别是抗原-MHC-纳米颗粒复合物的施用)也可与传统疗法的施用结合进行。传统疗法包括,但不限于,抗炎药物(例如柳氮磺吡啶)、类固醇(例如强的松)和免疫系统抑制剂(例如咪唑硫嘌呤和巯嘌呤)。抗生素(例如甲硝唑)对于杀死肠

道中的细菌也有帮助。

[0154] 为辅助治疗症状,医生可推荐止泻药、轻泻剂、镇痛药或其他非处方(OTC)药物。类固醇通常用于具有更严重形式的 Crohn 氏病的人群。在更具侵袭性的疾病中,类固醇可与免疫抑制剂或较新的药物(英利昔单抗)结合使用。

[0155] 当使用联合疗法时,可使用各种组合,例如抗原-MHC- 纳米颗粒复合物施用是“A”,其他试剂是“B”:

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/B/B	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B	A/A/B/B	A/B/A/B	A/B/B/A/	B/B/A/A		
B/A/B/A	B/A/A/B	A/A/A/B	B/A/A/A	A/B/A/A	A/A/B/A		

本发明的肽-MHC- 复合物组合物向患者 / 对象的施用,会根据这类化合物的一般性施用方案进行,并考虑毒性(如有)。预期的是,如果需要的话,会重复治疗循环。还预期的是,各种标准疗法(例如水合)可与所述疗法结合施用。

[0156] C. 体外或间接体内施用

本文使用的术语体外施用是指在从患者移出或在患者体外的细胞上进行的操作,包括但不限于培养物中的细胞。术语间接体内施用是指已在体外被操作并随后施用给对象的细胞。术语体内施用包括所有在对象体内进行的操作(包括施用)。

[0157] 在本发明的某些方面,所述组合物可被体外、间接体内或体内施用。在某些体外实施方式中,自体 T 细胞被与本发明的组合物一起培养。该细胞或组织随后可被用于体外分析或间接体内施用。

[0158] V. 实施例

以下实施例是为解释本发明的各种实施方式而给出,并不以任何方式限制本发明。本领域技术人员会容易意识到,本发明易于被改造而实现所提及的目的并获得所提及的优势,以及可从本文隐含得到的其他目的和优势。这些实施例以及所述方法是实施方式的当前代表,并且是示例性的,并不用于限制本发明的范围。对于本领域技术人员来说,可对这些实施例做出变化并且可将其用于其他用途,但这些都属于权利要求的范围定义出的本发明的实质。

[0159] 实施例 1

拟杆菌整合酶作为记忆样自身调节 T 细胞的抗原靶标

本发明研究了拟杆菌整合酶的新型表位(BacIYL: SEQ ID No. 1),与UM (阳性对照)、IGRP₂₀₆₋₂₁₄、LCMV- 编码的 Gp33 (a D^b- 结合阴性对照) 相比,是否可在一系列浓度范围内结合 NOD 小鼠主要组织相容性复合物 I 类分子 H-2K^d。如图 1A 所示,BacIYL 序列 (SEQ ID No. 1) 与 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 和 TUM 一样有效地结合至位于抗原加工相关转运体(TAP) 缺陷型 RMA-SK^d 细胞的表面上的 K^d 分子。

[0160] 为确定 BacIYL/K^d 肽-MHC (pMHC) 复合物是否可被 IGRP₂₀₆₋₂₁₄- 反应性 CD8⁺ T 细胞识别,使用结合有荧光染料的 TUM/K^d (阴性对照)、NRP-V7/K^d (阳性对照) 和 BacIYL/K^d pMHC 四聚体对来自 8.3-TCR 转基因 NOD 小鼠(8.3-NOD) 的天然脾 CD8⁺ T 细胞进行染色。如图 1B 所示,8.3-CD8⁺ T 细胞与 IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d 四聚体一样有效地结合 Bac-IYL/Kd 四聚体,但平均荧光强度(mfi) 较低,表明 8.3-TCR 以低亲和性结合此 pMHC 复合物。这通过在平衡时进行四聚体结合的 Scatchard 曲线分析得到确认。如图 1C 所示,Bac-IYL/Kd 四聚体以 ~2 倍较低亲合力结合 8.3-CD8⁺ T 细胞。

[0161] 为研究Bac-IYL序列是否对天然8.3-CD8⁺ T细胞具有激动作用,将天然8.3-CD8⁺ T细胞与TUM(阴性对照)、IGRP₂₀₆₋₂₁₄(阳性对照)和Bac-IYL一起培养24 h。不同于IGRP₂₀₆₋₂₁₄,其引起CD44和CD69的上调,Bac-IYL仅能够诱导CD69上调(图2A)。这表明,Bac-IYL具有部分激动作用,这与图1C中所见的相应四聚体的低结合亲和力一致。因为分化的8.3细胞毒性T淋巴细胞(8.3-CTL)不会杀死Bac-IYL脉冲的靶标或编码整合酶的cDNA转染的HEK293-K^d细胞,这些数据显示Bac-IYL可以结合并“轻触”8.3-TCR,而不会驱动TCR下游的大多数T细胞激活程序。

[0162] 因为某些低亲和力TCR结合配体具有拮抗性质(除在较高配体密度时具有部分激动活性外),本发明研究了Bac-IYL是否能够拮抗IGRP₂₀₆₋₂₁₄诱导的8.3-CD8⁺ T细胞响应。如图2B所示,Bac-IYL(而非TUM,一种不被8.3-TCR识别的K^d-结合肽)能够在一系列浓度内(大于1 μM)拮抗IGRP₂₀₆₋₂₁₄诱导的8.3-CD8⁺ T细胞响应(IFN γ分泌和增殖)。因此,当被孤立地提呈至8.3-CD8⁺ T细胞时,Bac-IYL以低亲和力结合至8.3-样TCR,在相对低的配体密度时拮抗激动剂诱导的响应,并在高的配体密度时诱导部分激动响应。

[0163] 不受理论约束,发明人认为在体内,在主要肠细菌菌株中编码的Bac-IYL不会被孤立地提呈,而是与细菌Toll样受体配体(例如LPS)一起被提呈。这又可能消除Bac-IYL的拮抗性质,并赋予其激动活性。与此假设一致的是,在存在LPS的情况下,天然8.3-CD8⁺ T细胞对Bac-IYL产生了高效的IFN γ和增殖响应(图2C)。

[0164] 在细菌中编码的抗原肽必须由专业的抗原提呈细胞(APC,例如树突细胞DC)由供体全程蛋白质来加工。在Bac-IYL肽的情况下,其供体蛋白(拟杆菌整合酶)将必须由蛋白酶体来加工,所产生的肽被运输至ER以结合内源性MHC(Kd)分子,其之后被运输至APC的质膜以暴露于T细胞。为研究DC是否加工拟杆菌整合酶蛋白并产生能够诱导8.3-CD8⁺ T细胞激活的Bac-IYL/K^d复合物,产生并纯化出了编码野生型Bac-IYL序列或与IGRP₂₀₆₋₂₁₄相同的突变Bac-IYL表位的重组GST融合的整合酶制剂。DC随后被加入到重组蛋白质中(在存在LPS的情况下)和8.3-CD8⁺ T细胞中,以测定8.3-CD8⁺ T细胞的活化。如图2D所示,两种类型的重组整合酶制剂都诱导了8.3-CD8⁺ T细胞的活化,并且如所预期的,编码的IGRP₂₀₆₋₂₁₄的制剂更是如此。因此,DC可以加工拟杆菌整合酶并生成能够活化同源T细胞的表位。

[0165] 因为低亲和力自身反应性T细胞倾向于在慢性自身抗原刺激下分化成记忆样无活力(非增殖性、但分泌细胞因子)自身调节性(自身免疫疾病抑制性)T细胞,所以预期Bac-IYL可能能够在体外诱导记忆样8.3-CD8⁺ T细胞。如图3A所示,在存在Bac-IYL肽的情况下培养了28天的8.3-CD8⁺ T细胞(而非低亲和力IGRP₂₀₆₋₂₁₄-反应性17.6-CD8⁺ T细胞)表达了迟T细胞活化标记物CD44和低水平的天然T细胞标记物CD62L。此外,这些细胞表达了早期活化标记物CD69和CD122(一种记忆T细胞标记物)(图3B)。在功能上,这些细胞的行为类似于记忆T细胞。因此,在激动剂(IGRP₂₀₆₋₂₁₄)-脉冲的DC的刺激下,它们快速地产生IFNγ(图3C和D)。但是,不同于常规记忆样CD8⁺ T细胞,而类似于自身调节CD8⁺ T细胞,与天然8.3-CD8⁺ T细胞相比,它们显示出增殖性无响应性(无活力)(图3D)。因此,这些Bac-IYL活化的CD8⁺ T细胞具有自身调节CD8⁺ T细胞在体内响应慢性自身抗原刺激而自发产生的所有特点。

[0166] 已有文献报道,TCRα^{-/-}小鼠可发展出自发IBD(参见例如Mombaerts, P., et

al. (1993) *Cell* 75:274-282)或 DSS 诱导的 IBD (参见例如 Mahler, M., et al. (1998) *Am J Physiol* 274:G544-551), 并且 NOD 品种也易患 DSS 诱导的 IBD (参见例如 Mahler, M., et al. (1998) *Am J Physiol* 274:G544-551)。虽然对机制的了解很少, 但是造成 IBD 的启动、进展和调节的因素已知有多种, 例如肠微生物群的基因、环境组成、肠上皮层的结构以及先天和适应性免疫系统的元素。IBD 被定义为肠壁的黏膜和上皮层之下的发炎 (参见例如 Nell, S., et al. *Nat Rev Microbiol* 8:564-577; Maloy, K. J., et al. *Nature* 474:298-306; Khor, B., et al. *Nature* 474:307-317; 和 Kaser, A., et al. (2010) *Annu Rev Immunol* 28:573-621)。为研究同源 CD8⁺ T 细胞对 BacIYL₃₆₋₄₄ 的识别在 IBD 中的生物学意义, 申请人比较了 8.3⁻ vs. 17.6-TCR 转基因 NOD. IGRP₂₀₆₋₂₁₄^{-/-} 小鼠 (分别为携带能够或不能识别 BacIYL₃₆₋₄₄ 的 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 特异性 CD8⁺ T 细胞) 的易感性。小鼠被暴露于饮用水中的 2% DSS 1 周, 以损害肠上皮完整性并将肠微生物区暴露于肠相关淋巴组织 (GALT), 但不诱导出现明显的疾病 (出血或体重减轻)。在 0% DSS 1 周后, 这些小鼠被暴露于 3 个循环的 3.5% DSS (第 1 周)/0% DSS (第 2 和第 3 周)。如图 4A、4B 和 4E 所示, 与 17.6-NOD 小鼠相比, 8.3-NOD 小鼠表现出对结肠炎的显著抗性和零死亡率, 表明 Bac-IYL₃₆₋₄₄ 表位对 8.3-CD8⁺ 细胞的体内活化使得宿主抵抗结肠炎。而且, 缺乏整合素的 8.3-NOD 小鼠对于结肠炎高度易感 (图 4C、4D 和 4F)。这些结果支持了 8.3-CD8⁺ T 细胞的抗结肠炎作用需要招募至 GALT 的想法。

[0167] 以上数据预测出, NOD. IGRP₂₀₆₋₂₁₄^{-/-} 小鼠, 其向周围输出增加数量的高亲合力 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 反应性 (BacIYL₃₆₋₄₄ 交叉反应性) CD8⁺ 细胞, 应当相对于野生型 NOD 小鼠表现出对 DSS 诱导的结肠炎的相对抗性, 在野生型 NOD 小鼠中, 这些较高亲合力的 CD8⁺ T 细胞的很大一部分缺失了。相反, 如图 4G 所示, 不同于 NOD 小鼠, NOD. IGRP₂₀₆₋₂₁₄^{-/-} 小鼠对于由 4% DSS 引起的体重减轻具有抗性。为直接研究细胞毒性 CD8⁺ T 细胞对 BacIYL₃₆₋₄₄ 负载的 APC 的响应在结肠炎抗性中的作用, 向 NOD. IGRP₂₀₆₋₂₁₄^{-/-} 宿主中加入 4% DSS 并静脉内注射体外分化的 8.3-CTL (细胞毒性 T 淋巴细胞)。如图 4H 所示, 8.3-CTL 输入的宿主比非输入小鼠具有较低疾病活动分值。

[0168] 为进一步证实这些结果, 申请人确认了 8.3-CTL 的保护 17.6-NOD 小鼠 (对于 DSS 诱导的结肠炎高度易感) 不患病的能力。如图 5A 所示, 转移了 8.3-CTL 的 17.6-NOD 小鼠 (每周转移一个 CTL) 在 35 天的随访中, 与非 CTL 转移的 17.6-NOD 小鼠相比, 没有显著的体重减轻。而且, 8.3-CTL 转移显著降低了这些动物中的疾病活动分值 (图 5B)。总言之, 这些数据支持了 CTL 对肠细菌表位的响应提供了对结肠炎的抗性的想法。因此, 能够诱导肠微生物区特异性 CTL 的体内活化和扩增的方法应当在 IBD 中具有治疗意义。

[0169] 本文所描述的数据结论性地证实, 拟杆菌整合酶是在肠相关淋巴组织中的抗 IBD 细胞的真实抗原靶标。因此, 该抗原可被用作靶标来向炎症性肠病的肠中招募和累积自身调节 (抗炎) T 细胞。在一个实施方式中, 使用涂布了肽 -I 类 MHC 复合物的纳米颗粒对对象进行全身性治疗诱导了抗原特异性 CD8⁺ T 细胞 (常规的和记忆样自身调节 8.3-样 CD8⁺ T 细胞)。在另一个实施方式中, 使用涂布了肽 -II 类 MHC 复合物的纳米颗粒对对象进行全身性治疗诱导了抗原特异性 T 调节 -1 (产生 IL-10/TGF β 的) CD4⁺ T 细胞。实际上, 由涂布了 NOD 小鼠 II 类 MHC 分子 I-A^{g7} (提供了 IGRP- 衍生的自身抗原表位) 的纳米颗粒扩增的 Tr1 样 CD4⁺ T 细胞在肠相关淋巴组织 (包括派伊尔结和上皮内淋巴细胞聚集体) 中累积。图 6

显示了来自用 IGRP₄₋₂₂/I-A^{g7} 涂布的纳米颗粒治愈了糖尿病的两只小鼠的数据,这两者小鼠在 50 周龄时被分析;GPI/I-A^{g7} 四聚体是阴性对照四聚体。

[0170] 因此,涂布了 MHC I 类和 /II 类分子的纳米颗粒(提供来自拟杆菌整合酶的表位)诱导了整合酶特异性 CD8+ 或 Tr1- 样 CD4+ T 细胞的扩增,大多数这些细胞会累积于肠中,帮助感染了 IBD 的个体恢复免疫稳态。因此,本发明的组合物也提供了这种治疗方法。

[0171] 实施例 2

制造抗原-MHC-纳米颗粒复合物的过程

无机纳米颗粒(氧化铁=IONP;金=GNP)具有期望的尺寸。IONP 由热分解产生。这样合成的 IONP 是生物相容性的,并且可被 PEG 基化,以用于蛋白质结合。为在 IONP 上涂布 pMHC 和 / 或其他蛋白质,将表面活性剂涂布的 NP 与具有合适长度的官能化的 PEG 连接物反应。该连接物经 HPLC 纯化,并且用 ¹H-NMR、MALDI/GPC 和 GPC 表征,以确认化学密度、纯度、分子量和多分散度。相似的连接物和方案可被用来涂布 GNP,只是连接物在其 NP 结合末端要具有巯基(SH)。

[0172] 实施例 3

pMHC 涂布的纳米颗粒的尺寸、密度和暴露量

I. 含金 pMHC 涂布的 NP 的合成和表征

合成了具有特定尺寸的金纳米颗粒(GNP)。利用分光光度法、透射电镜(TEM)和动态光散射法来测定 GNP 制备物的尺寸、密度、表面电荷和单分散性。GNP 样品随后被浓缩并利用以下所述的不同方法而与单特异性 pMHC 复合物结合。申请人已开发出定量每个 GNP 的 pMHC 效价的方法,以及以高密度($\sim 10^{14}$ /ml)浓缩不同尺寸的 pMHC 涂布的 GNP 制备物而不损害单分散性的方法(图 19)。

[0173] II. GNP 的 pMHC 结合能力的表征

利用两种不同的方法将 pMHC 复合物涂布到不同尺寸的 GNP 上:(i)通过静电相互作用使 pMHC 随机结合至 GNP 表面;和(ii)经巯基-PEG-NH₂ 接头定向结合(此时,使用作为 GNP 稳定剂的额外的巯基-PEG 接头以防止聚集)。申请人认为第一种方法会产生很高的配体密度(每个 GNP 的 pMHC),但会损害 pMHC 结合的方向性(即,可能仅一部分分子可用于同源 T 淋巴细胞的识别)。第二种方法的目的在于产生携带较低密度的 pMHC 但通过它们的 C 末端定向地结合的 pMHC 涂布的 GNP。两种方法都在具有不同直径(约 14 至 40 nm)的 GNP 上进行了测试。经确认,对于两种方法,GNP 的 pMHC 结合能力随尺寸变化,更具体地说,是虽表面积变化(较大 NP 上具有较高数量的 pMHC)。令人惊讶的是,PEG 介导的结合不仅确保了结合的方向性,而且增强了单个 GNP 的结合能力(这与初始预期的相反)。下表 1 概况了这些数据。

[0174] 表 1. GNP 的 pMHC 结合能力

直径(nm)	表面积 ($\times 10^2 \text{ nm}^2$)	pMHCs/GNP (吸附)	pMHCs/GNP (接头)
14	7		212
20	12		3,750
30	28	335	
40	50	2,850	5,250

III. 激动活性 vs pMHC 含量

测试了 pMHC 效价、GNP 尺寸、GNP 密度和涂布策略对 pMHC 涂布的 GNP 在体外的功能(激动)活性的作用。比较了各种 IGRP₂₀₆₋₂₁₄-K^d-GNP 制剂对活化来源于 T 细胞受体(TCR)转基因 NOD 小鼠(或 8.3-NOD 小鼠)的同源(IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 特异性)天然 CD8⁺ T 细胞(此处称为“8.3-CD8⁺ T 细胞”)的能力。第一组实验的目的在于比较 IGRP₂₀₆₋₂₁₄-K^d (pMHC) 效价在培养物中在一系列 GNP 密度时的作用。结合了对照(非同源) pMHC 复合物(Tum-K^d)的 GNP 被用作阴性对照。如所预期的, IGRP₂₀₆₋₂₁₄-K^d 涂布的(而非 Tum-K^d 涂布的)GNP 活化了这些 T 细胞(根据 IFN γ 产生而测定), 并且它们以 GNP 剂量(因而是 pMHC 剂量)依赖性方式活化。图 20 显示了利用不同的 pMHC 分子数量 /GNP 涂布的 ~ 14 nm GNP 的实验, 该实验施用接头法。图 20 比较了针对两种不同 pMHC-GNP 样品(均由 $\sim 2 \times 10^{13}$ 个直径 14 nm 的 GNP /ml 构成)同源 8.3-CD8⁺ T 细胞分泌的 IFN γ 的量。Au-022410 和 Au-21910 分别携带 ~ 250 和 ~ 120 个 pMHC/GNP。Au-011810-C 携带 ~ 120 个对照 pMHC/GNP。用 ~ 2 倍高数量的 pMHC 复合物 /GNP 涂布的 GNP 具有较高的激动活性。因此, pMHC 涂布的 GNP 的激动活性随总 pMHC (GNP) 含量而变化。这些结果是与直觉相反的, 因为本领域的状态表明, 在 NP 上缺少共刺激分子时, 增加单个 NP 上的 pMHC 数量也会增加亲合力, 并且应当促进消除(细胞死亡), 而不是增殖以及来自同源 T 细胞的细胞因子分泌。这对于低亲合力和高亲合力 T 细胞都是这样。例如, 申请人的前期工作(Han et al., Nature Medicine, 2005)以及其他人的工作表明, 以高亲合力识别的肽, 或以低亲合力识别但具有高浓度的肽, 具有增加的消除体内同源 T 细胞的能力。因此, 在治疗性地静脉内递送抗原-MHC 涂布的纳米颗粒或可溶性肽时, 同源 T 细胞会以肽亲和性和剂量依赖性方式经历消除。图 20 所示的数据未能支持这种预期。

[0175] IV. 肽-MHC-纳米颗粒复合物的激动活性中的效价阈值

为进一步研究肽-MHC (pMHC) 效价在结合了 pMHC 的纳米颗粒(pMHC-NP)的激动性质中的作用, 比较了共价结合有逐渐增加数量的 IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d pMHC 单体的 8 nm 直径的氧化铁(Fe₃O₄) NP 引发同源(IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d-特异性) CD8⁺ T 细胞(此处称为 8.3-CD8⁺ T 细胞)在体外分泌 IFN-伽马(IFN γ)的能力。如表 2 所示, 当在存在用每个 NP 8 个 pMHC 单体涂布的 NP 的情况下培养时, 8.3-CD8⁺ T 细胞产生可忽略量的 IFN γ , 但对于以较高 pMHC 效价(即使低至 11 个 pMHC 单体 /NP)涂布的 NP 产生实质性较高量的 IFN γ , 并且呈剂量-响应方式产生。

[0176] 表 2 8.3-CD8⁺ T 细胞响应结合逐渐增加的 pMHC 效价 (5×10^{11} NP/mL) 的 NP 而分泌 IFN γ

纳米颗粒 (NP)	核性质	核尺寸 (nm)	pMHC 效价	IFN γ 响应 (ng/mL)
IGRP-SFPM-110512	Fe ₃ O ₄	8	8	0.03
IGRP-SFP-102912	Fe ₃ O ₄	8	11	0.4
IGRP-SFP-012011	Fe ₃ O ₄	8	14	0.2
IGRP-SFP-031511	Fe ₃ O ₄	8	15	0.15
IGRP-SFP-051211	Fe ₃ O ₄	8	31	0.7
IGRP-SFP-100711	Fe ₃ O ₄	8	39	0.9
IGRP-SFP-011411	Fe ₃ O ₄	8	54	2.3

pMHC 效价对 pMHC-NP 的激动活性的这种正面作用在一系列 pMHC-NP 密度范围内维持(图 21)。但是, 显著的是, 虽然携带 11 个 pMHC/NP 的 25×10^{11} NP (每 ml) 与携带 54 个 pMHC/NP 的 5×10^{11} NP (每 ml) 具有相似的激动活性, 但增加携带 8 个 pMHC/NP 的 NP 的数量至高

达 40×10^{11} NP/ml 的值具有很小的效果(图 22)。总言之,这些结果显示,存在 pMHC 效价的阈值,其介于 9 至 11 个 pMHC/NP 之间,低于该阈值时, NP 数量的相对小的增加(即 5 倍)不能克服以低效价涂布的 pMHC-NP 的低激动活性(要注意的是,在这些体外实验中使用 $>50 \times 10^{11}$ NP 是无益的,因为高 NP 密度会导致细胞毒性)。

[0177] 这种 pMHC 效价阈值作用被进一步图示于图 23 中,其中 IFN γ 分泌数据被标准化至培养物中由被涂布的 NP 递送的总 pMHC 的浓度。携带 11 个 pMHC/NP 的 NP,比携带 8 个 pMHC/NP 的 NP,在一系列 pMHC 浓度范围上,引起显著较高的 r IFN γ 响应。而且,这两种 NP 制剂的激动性质的差别随着总 pMHC 含量的增加而实质性地增大。也就是说,由八聚体和单十聚体形式的 NP 递送的 $2.4 \mu\text{g/ml}$ 的 pMHC 的激动性质的差别,显著大于在总 pMHC 的浓度低 10 倍时相同制剂的激动性质的差别。

[0178] 图 24 显示了 pMHC 效价对 pMHC-NP 的激动性质的深刻作用也可在于较低 NP 密度(以标准化培养物中的总氧化铁含量)时使用较大 NP(可接受比图 21-23 中所研究的 8 nm NP 高得多的 pMHC 效价)时看出。虽然携带 <10 pMHC/NP 的 18 nm 直径的 NP 直至 4×10^{11} NP/ml 之前基本没有生物学活性,但携带较高 pMHC 效价的 18 nm 直径 NP 的激动活性随着 NP 密度线性地增加。图 23 和 24 的比较进一步显示递送 61 个 pMHC/NP 的 2×10^{11} 18nm NP 与递送相似数量(54)的 pMHC/NP 的 2×10^{11} 8nm NP 具有相似的激动活性,表明 pMHC 效价的作用不受 NP 量的显著影响。

[0179] 总言之,这些数据证实, pMHC 涂布的 NP 在特定 pMHC 效价阈值(介于 9 至 11 个 pMHC/NP)之上获得强有力的激动活性。pMHC 效价或 NP 密度的增加都可增强携带“阈值”或“超阈值”pMHC 效价的 pMHC-NP 的激动性质,但无法增强携带“阈值下”pMHC 效价 NP 的激动性质。

[0180] V. 激动活性 vs NP 尺寸和密度

进一步的分析显示,总 pMHC 含量不是影响 pMHC-NP 在体外的激动活性的唯一因素,并且 NP 尺寸也起到的重要的独立作用。这是通过将不同尺寸(直径分别为 14 和 40 nm)和不同 pMHC 效价但在相似总 pMHC 含量的条件下的两种 pMHC-GNP 样品的激动活性而研究的。在图 25 所示的实验中,使用了携带 ~ 200 pMHC 分子/GNP 的 GNP 和携带 $\sim 5,000$ pMHC/GNP 的 GNP。这两种样品的 GNP 密度被调整(分别至 3×10^{13} 和 10^{12} GNP/mL)以调节每个样品中的总 pMHC 含量至 $\sim 450 \mu\text{g/ml}$ 。值得注意的是,与 40 nm pMHC/GNP 化合物相比,在一系列总 pMHC 含量范围内,8.3-CD8+ T 细胞对 14 nm pMHC/GNP 化合物的响应要显著更好,尽管 40 nm pMHC/GNP 化合物比后者具有显著更多的 pMHC 复合物。这表明,GNP 密度(更多 GNP/同源 T 细胞)是关键。换句话说,携带 1000 pMHC/GNP 的 4×40 nm NP (4000 pMHC) 没有携带 100 pMHC/GNP 的 40×10 nm NP (4000 pMHC) 合乎需要。因此,总体来说,这些数据表明,最佳的 pMHC-GNP 制剂是那些由以高 pMHC 密度使用的小 GNP 构成的制剂。增加这些小的 NP 上的 pMHC 效价会进一步增加它们的令人惊讶的且意想不到的激动性质。

[0181] VI. 激动性质 vs pMHC 暴露量

如上所述,pMHC 涂布的 GNP 样品是通过将 GNP 共涂布 3.4 kD 巯基-PEG-NH₂ 接头(作为 pMHC 羧基端的受体)和作为 GNP 稳定剂的巯基-PEG 接头而产生的。为研究起稳定作用的巯基-PEG 接头的长度是否影响其 GNP 抗聚集性质,比较了巯基-PEG-NH₂ 接头结合 pMHC 分子的能力和 / 或 pMHC 涂布的 GNP、利用不同尺寸(2 kD 和 5 kD,分别短于和长于 pMHC 受体接

头)的稳定接头制备的 pMHC 涂布的 GNP 的激动性质。申请人发现,两种接头具有相似的抗聚集性质,并且 5 kD 接头不会抑制 pMHC 向较短的 3.4 kD 巯基-PEG-NH₂ 接头的结合。但是,值得注意的是,由较短的 (2 kD) 巯基-PEG 保护的 pMHC-GNP 比用较长的 (5 kD) 巯基-PEG 共涂布的 pMHC-GNP 具有更好的体外激动活性(图 26)。这表明,长的保护性巯基-PEG 接头遮蔽了结合至受体接头的 pMHC 分子对于同源 T 细胞的暴露。

[0182] VII. 共价结合至高密度 pMHC 的小 NP 在体内提供最大的自身调节 T 细胞扩增

根据本文所述的方法制备了平均直径约 10 nm 并结合至 NRP-V7/K^d (也称作 IGRP₂₀₆₋₂₁₄-K^d) 或 TUM/K^d (对照) 的纳米颗粒,并测试了它们在体内诱导同源自身调节 CD8⁺ T 细胞的扩增的能力。图 27 显示了试验结果,其中抗原-MHC-GNP 被静脉内注射到 10 周龄野生型 NOD 小鼠,每周两次,连续 5 周注射。通过用荧光标记的抗原-MHC 四聚体(同源的以及不相关的对照四聚体)染色细胞悬液来评价对应于疗法时同源 T 细胞群在循环中和不同淋巴组织中的大小变化。以比之前在本领域已显示过(参见例如 Tsai et al., Immunity, 2010, 其中测试了涂布有 1-8 个 pMHC 的纳米颗粒)的 GNP 数量少 10-100 的 GNP 但涂布有 150 个抗原-MHC/GNP 来施用,导致实质性更高的扩增(图 27)。它们使体内 CD8⁺ T 细胞扩增至比通常以效价为约 8 的 pMHC 涂布的纳米颗粒可获得的值((血液中的 1-2% 细胞;参见例如 Tsai et al., Immunity, 2010, 图 1C)高几倍的水平(高达 44% 的所有循环 CD8⁺ T 细胞)。上述数据表明,以高抗原-MHC 效价涂布的小纳米颗粒提供最大的 T 细胞扩增效果。这些结果是出人意料的。因此,不是 pMHC-NP-T 细胞相互作用的总亲和力促成了治疗效果,而是产生在 pMHC-NP 疗法中扩增的 T 细胞的前体种群的亲和力促成了治疗效果。这种解释与本文所描述的数据一致,并且暗示 NP 上的 pMHC 效价会增加 pMHC-NP 的治疗功效。

[0183] 实施例 4

通过以较高 pMHC 效价涂布的 pMHC-GNP 实现同源 CD8⁺ T 细胞的大量扩增

接下来确定 pMHC-NP 是否具有诱导同源 T 细胞体内大量扩增的能力。这是通过多次注射携带 25 ug 的总 pMHC 的 3×10^{12} 10-14 nm NP (~ 150 IGRP₂₀₆₋₂₁₄/Kd 分子/NP) 来处理小鼠而完成的。如图 28 所示,治疗了 10 次(每周两次,持续 10 周)的小鼠,与它们未受治疗的副本相比,显示出在外周血中的同源 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (NRP-V7)-反应性 CD8⁺ T 细胞的大量扩增(从 <0.4 到 >17 货 47% CD8⁺ T 细胞)(下图)。这种扩增已在给予 4 次剂量的 pMHC-NP 后杀死的小鼠中发现(上图)。这些 pMHC-NP 扩增的细胞特异性地结合同源的(而不是非同源的) pMHC 四聚体(分别为 NRP-V7/K^d vs. TUM/K^d)。

[0184] 实施例 5

pMHC 结合的金纳米颗粒的制备

pMHC 结合的金纳米颗粒制备(pMHC-GNP, 12 和 30 nm)

GNP 的制备。GNP 通过在球瓶中在硅油浴中加热 D. D. 水 (200 mL) 直至沸腾而制备。随后向沸腾的水中加入 1% HAuCl₄ (4 mL) 的溶液。溶液被搅拌 10 min, 随后加入 1% 柠檬酸钠溶液。对于 12 nm GNP, 加入 12 mL 柠檬酸钠溶液。对于 30 nm GNP, 加入 12 mL 柠檬酸钠溶液。在添加柠檬酸钠溶液后立即出现了红酒色。为完成反应,再搅拌 GNP 溶液 30 分钟。这是对 Levy, R. 等 (“Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles.” J Am Chem Soc 126, 10076-84 (2004)) 的方法的改进,通过引用将其合并至本文中。

[0185] GNP 的表面改性。向 GNP 溶液中加入 25 mM 巯基-PEG-NH₂ (M.W. 3,400) 和 50 mM 巯基-PEG (M.W. 2,000, PEG/GNP 比率为 10,000:1) 以使 GNP PEG 基化。该溶液在室温下搅拌 5 小时。PEG 基化的 GNP 随后用 3 X 30 mL 无菌 D.D. 水洗涤,以除去过量的 PEG,并重悬于 40 mL 的 100 mM MES (C₆H₁₃NO₄S·xH₂O) 溶液中(pH 5.5)。

[0186] pMHC 结合。向 PEG 基化的 GNP 溶液中加入 pMHC (IGRP₂₀₆₋₂₁₄/Kd, 4 mg),逐滴加入,并在室温下温和搅拌。混合物再搅拌一小时,随后加入 20 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)。该混合物再搅拌 4 小时。pMHC-GNP 结合物随后用 40 mL 磷酸缓冲盐水(PBS, PH 7.2-7.4)洗涤 3 次,并重悬于 8 mL PBS 中。

[0187] 实施例 6

pMHC 结合的金纳米颗粒的制备

pMHC 结合的 GNP 的制备(pMHC-GNP, 2-10 nm)。GNP 的制备(2-5 nm)。2-5 nm 的 GNP 通过将 250 mg (对于 2 nm GNP) 或 50 mg (对于 4 nm GNP) 的十二胺溶解于 10 mL 的 DDAB 溶液(在甲苯中的 100 mM 双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB))中而制备。其次,将 100 mg 四丁基硼氢化铵(TBAB)溶解于 4 mL 的 DDAB 溶液中。十二胺溶液和 TBAB 溶液随后混合于 50 mL 的三颈瓶中,并在氮气环境下搅拌。将 34 mgAuCl₃ 溶解于 4.5 mL DDAB 溶液中,并快速注射到 TBAB 和十二胺溶液的混合物中。溶液立刻变为深红色,表明形成了 GNP。持续搅拌混合物 30 分钟,并向混合物中加入 15 mL 的乙醇。混合物随后以 4,100 x g 离心 12 min,以沉淀 GNP。

[0188] 制备 GNP(6-10 nm)。为制备 6-10 nm 的 GNP,首先将癸酸(172 mg)溶解于 10 mL 甲苯中,随后与不同量的 TBAB 溶液(对于 6 和 10 nm GNP 分别使用 4 和 1 mL)混合于 50 mL 三颈瓶中,并在氮气缓解下搅拌。将 34 mgAuCl₃ 溶解于 4.5 mL DDAB 溶液中,并快速注射到 TBAB 和十二胺溶液的混合物中,溶液立刻变为深红色,表明形成 GNP。持续搅拌混合物 30 分钟,并向混合物中加入 15 mL 的乙醇。混合物随后以 4,100 x g 离心 12 min,以沉淀 GNP。

[0189] GNP 的表面改性。将 GNP 重悬于 20 mL 的在甲醇中的 0.1 M 的巯基丙酸(MPA)(pH 10),并在室温下搅拌一小时。随后加入 10 mL 乙酸乙酯。该混合物随后以 4,100 x g 离心 15 min。沉淀出的 GNP 随后用 30 mL 无菌 D.D. 水洗涤 3 次,并重悬于 20 mL 100 mM MES (C₆H₁₃NO₄S·xH₂O) 缓冲液(pH 5.5)中。向该混合物中加入 0.5 M 聚氧化乙烯双胺溶液(以 10,000:1 PEG/GNP 的比率)和 0.1 M 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)溶液(EDC 终浓度为 2 mM)。该混合物随后被搅拌 4 小时。用 3 X 30 mL 无菌 D.D. 水洗涤 PEG 化的 GNP 以除去过量的 PEG 和 EDC。

[0190] pMHC 结合。PEG 化的 GNP 重悬于 20 mL 100 mM MES (C₆H₁₃NO₄S·xH₂O) 缓冲液中, pH 5.5。随后逐滴加入 pMHC (5 mg/mL, 共 10-30 mg) 以重悬 GNP(500:1 pMHC/GNP 的比率),并在室温下搅拌 1 小时,随后再加入 0.1M 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC) (EDC 终浓度为 2 mM)。该混合物随后被搅拌 4 小时。pMHC-GNP 结合物随后用 40 mL 磷酸缓冲盐水(PBS, PH 7.2-7.4)洗涤 3 次,并重悬于 10-20 mL PBS 中。

[0191] 要理解的是,虽然本发明已通过优选实施方式和任选的特征进行具体公开,但本领域技术人员可想象到对所具体描述的发明做出修改、改进和变化,并且这些修改、改进和变化被认为是在本发明的范围之内。本文提供的材料、方法和实施例是优选实施方式的代

表,是示例性的,并且并非意在限制本发明的范围。

[0192] 本发明已通过本文进行宽泛和概括性地描述。落入所公开的上位概念的较窄的种类和下位群体也构成本发明的一部分。这包括对本发明进行一般性描述,但设定前提或消极限制以从种类物中移除任何主题内容,而不论陪排除的内容是否明确地在本文提及。

[0193] 此外,当以马库什群组的形式描述本发明的特征或方面时,本领域技术人员会意识到,本发明也据此以该马库什群组的任何单个成员或成员的子群组的形式描述。

[0194] 所有本文提及的公开文献、专利申请、专利和其他文献都明确地通过引用以其整体合并至本文中,如同每个都单独通过引用合并到本文中一样。如果存在冲突,则以本发明的说明书(包括定义)为准。

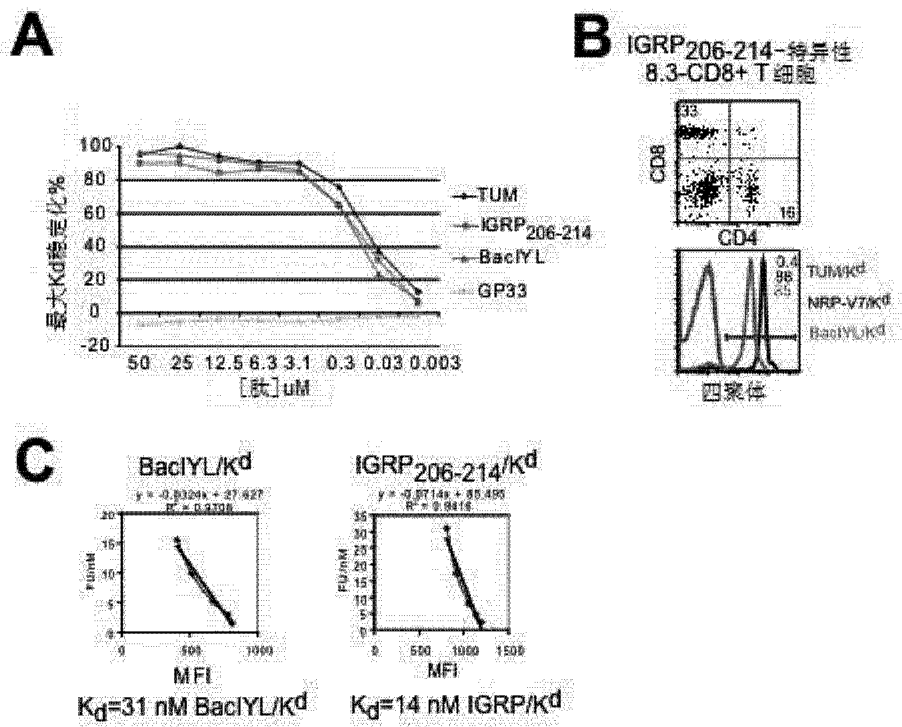


图 1A-C

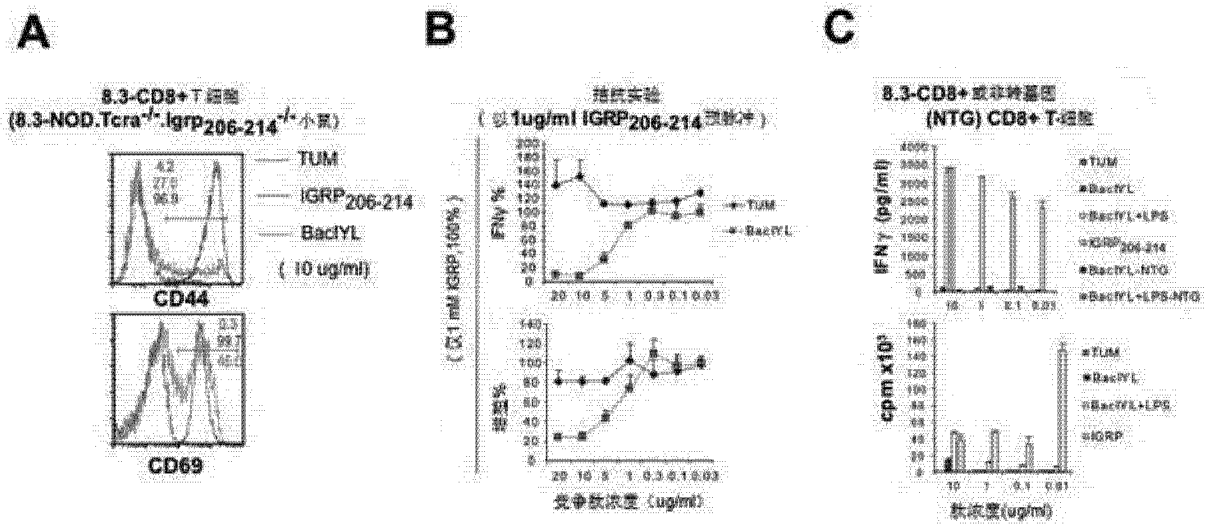


图 2A-C

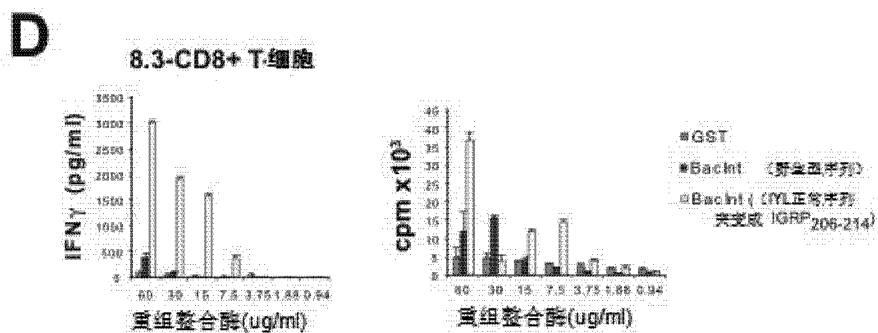


图 2D

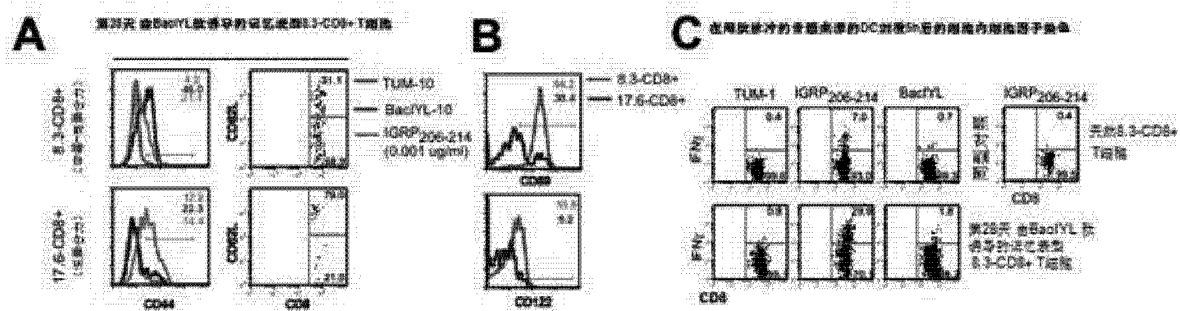


图 3A-C

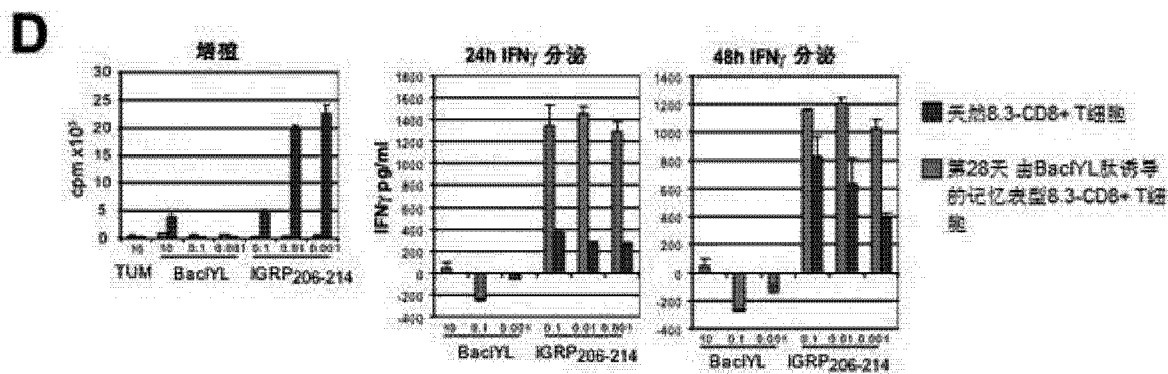


图 3D

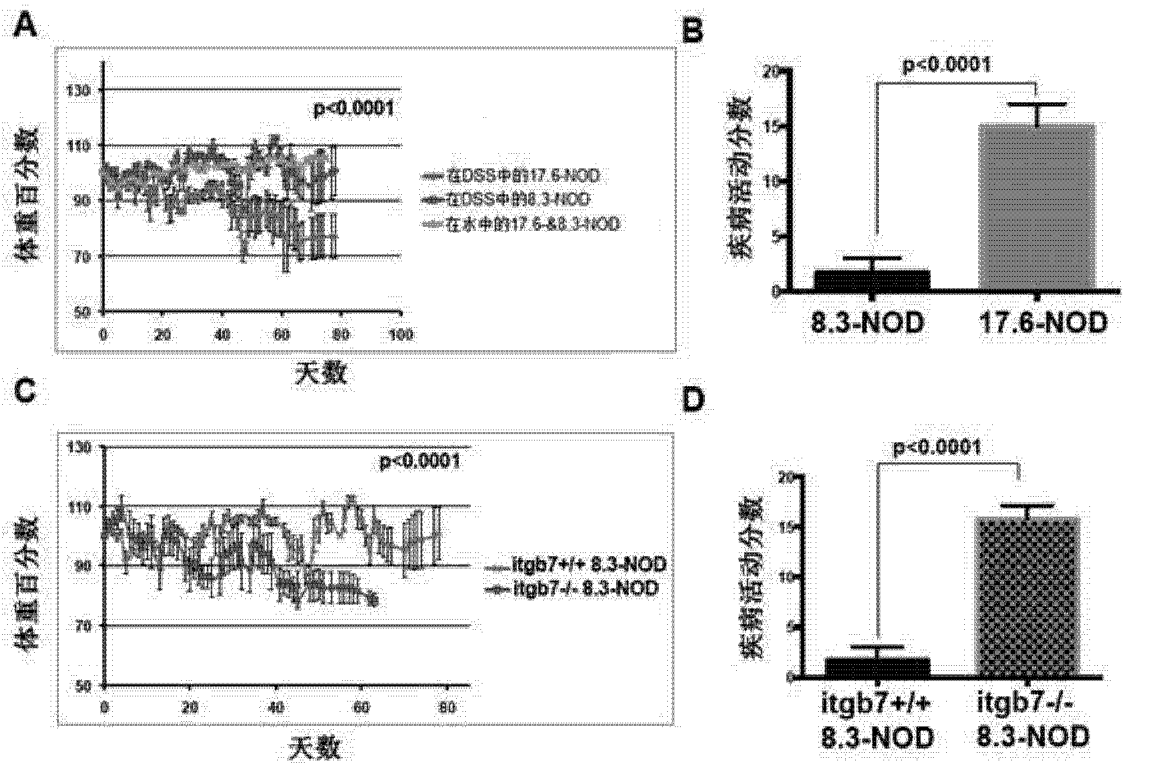


图 4A-D

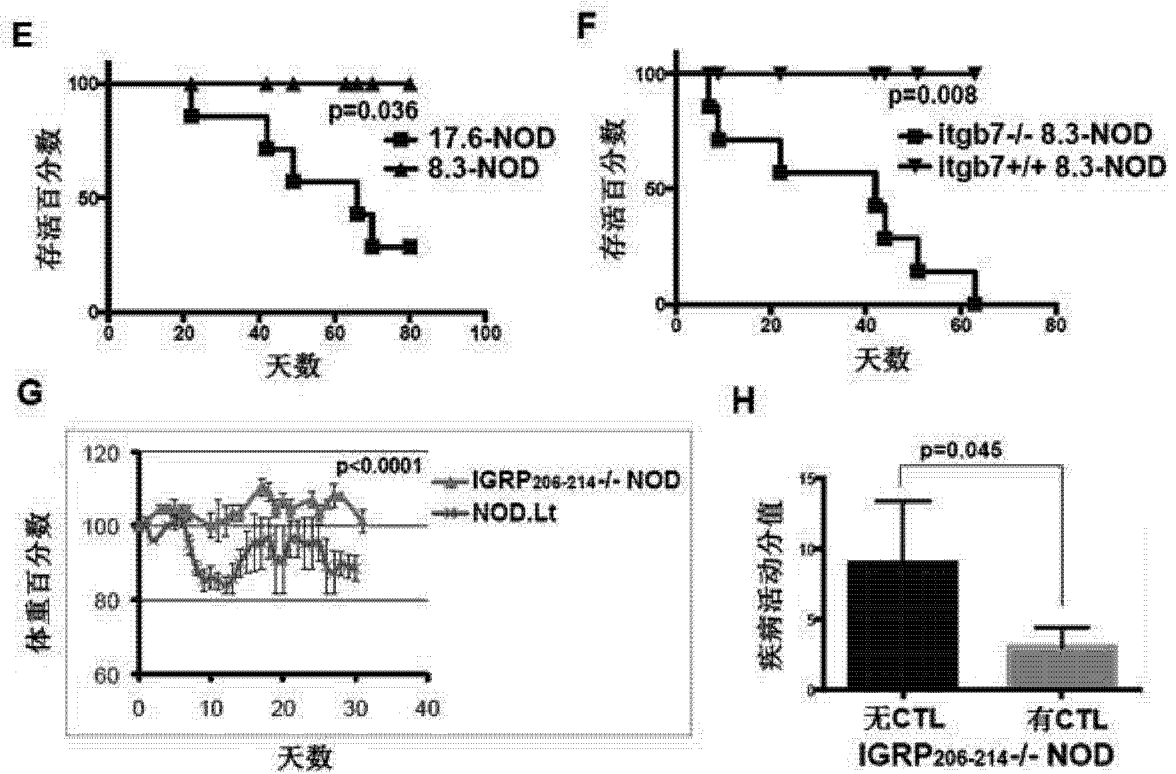


图 4E-H

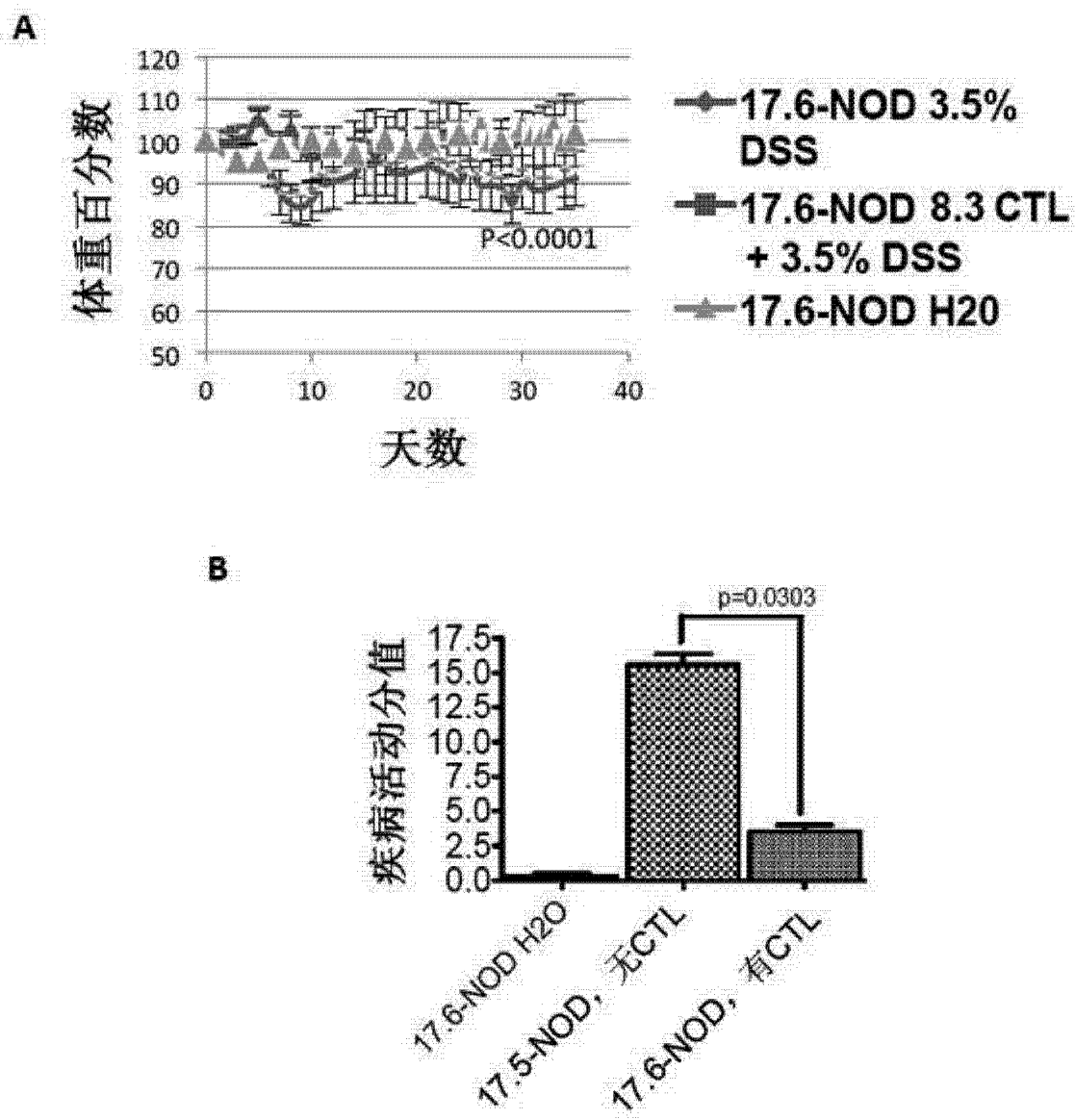
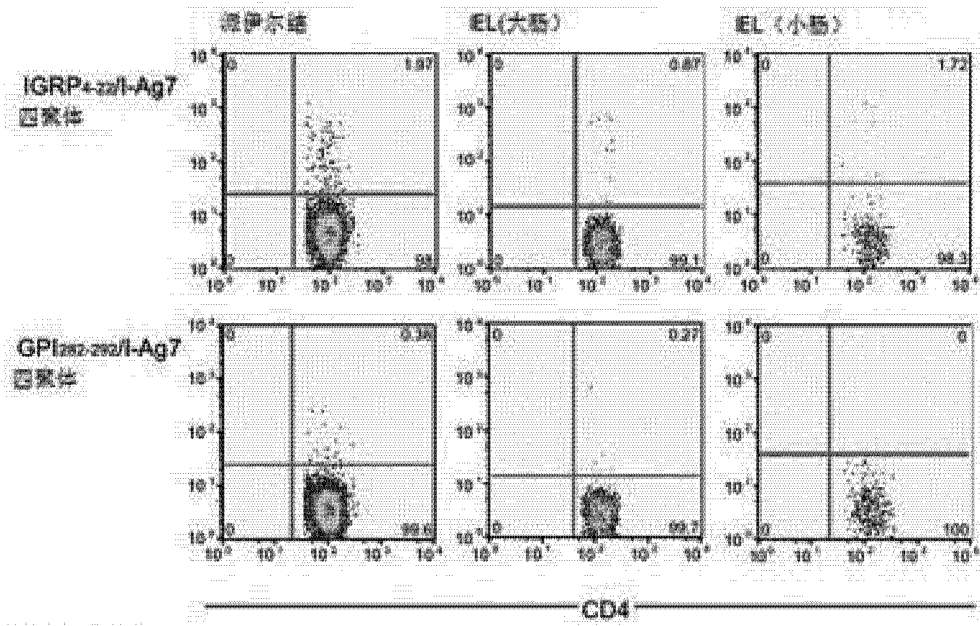


图 5A-B

小鼠 13B4



小鼠 11A5

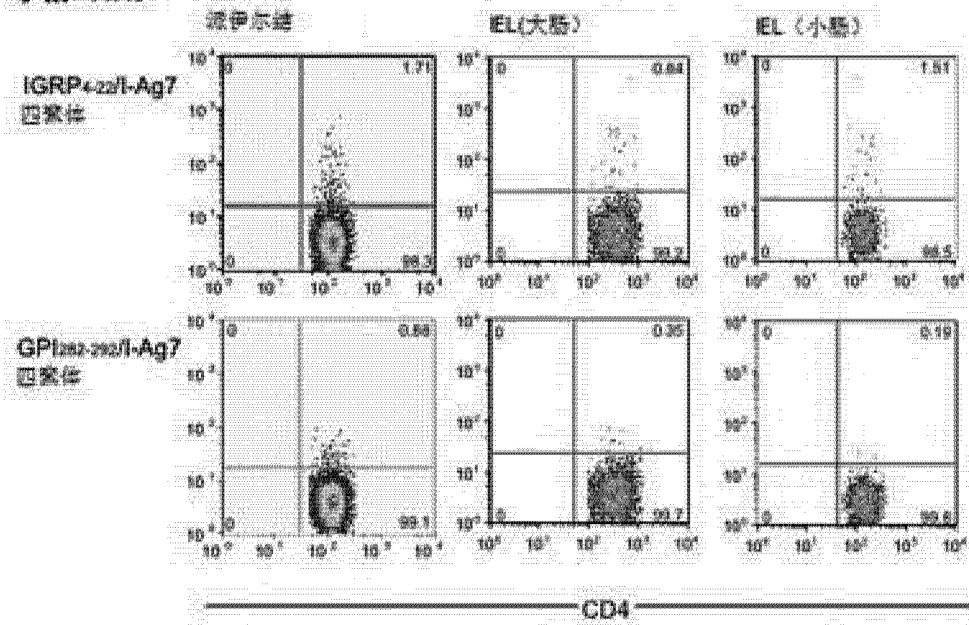


图 6

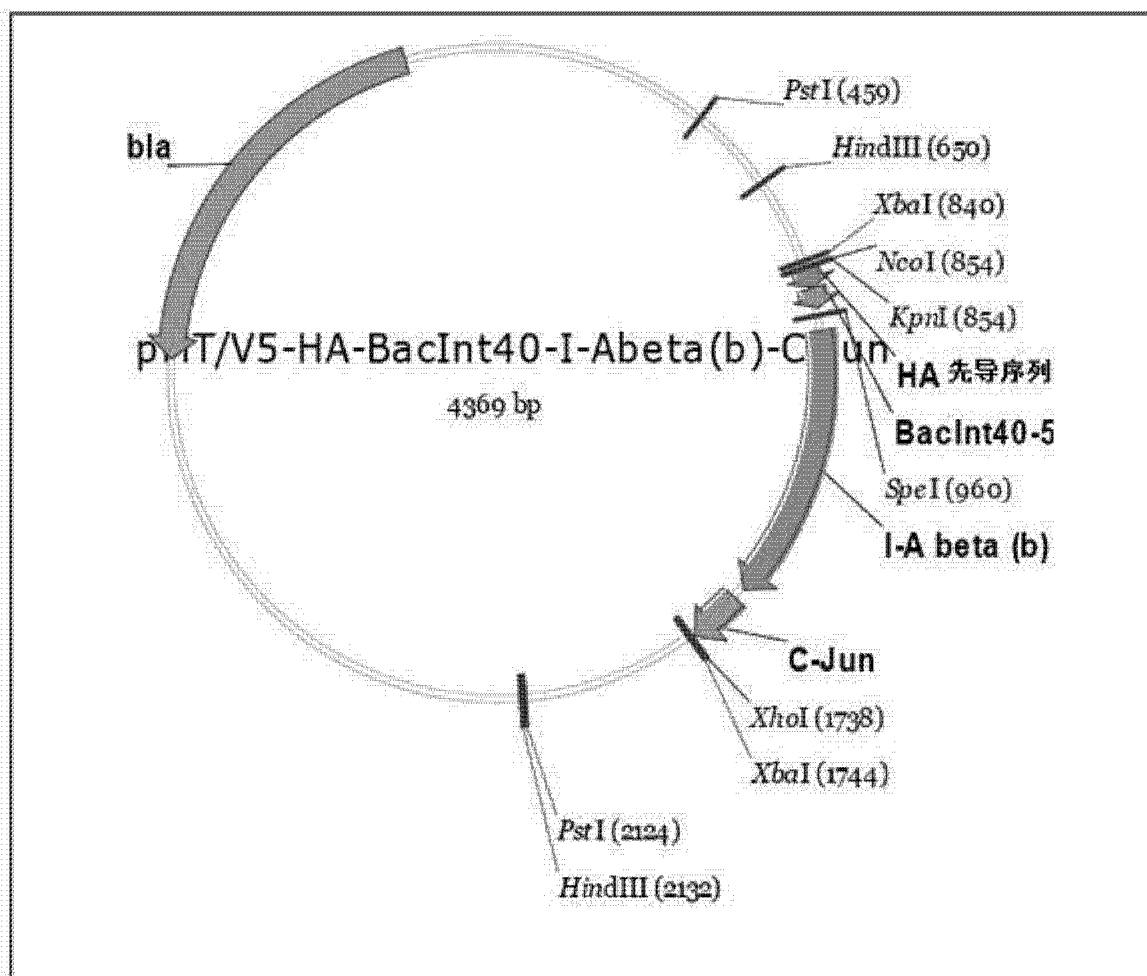


图 7

```

      NcoI
      -----
      M A I I Y L I L L F T A V R G T
541 ATGGCT ATCAGCTACC TCATCTCTCT GTTACCCCT GTCCGGGCA
      TACCGA TAGTAGATGG ATATAGAGGA CAATGGGCA CAGCCGCCCT
      SpeI
      -----
      N V Y L K P E C H S R E Q A G G G G S L
561 CCAATGTTA CCGCAAGCG GATGCTGGA GCGGTAGGG GGCAGGAGT GAGGGCTAC
      GGTACAAAT GAGTTTGGG CTGAGGAGCT CCGAGCTGG CCGTCTGCA CTTGGGAGT
      SpeI
      -----
      V P R G S G G G G S G D S E R H F V Y Q
581 TATGCGCGG AGGCTCTGA GGTGGAGCT CTGGAGAGT CCAAGGAGT TTGCTGTAC
      ATCAGGGGG TCGGAGAGT CAGCTCGGA GAGCTTGAG GTTTCTGTA AAGACATGG
      -----
      F M G E C Y F T N G T Q R I R Y V T R Y
1001 AGTCATGGG CAGCTCTAC TTCAAGAGG GAGCGAGGG CATACGATAT GTGACGAGT
      TCAATAGCG GTCAAGATG AATGCTTGG CCGCTGCGG GTATCTATA CACTGCTCA
      -----
      I Y N R E E Y V R Y D S D V Q E H R A V
1081 ACATATACA CCGGAGGAG TACGTGCTT AGGAGAGGA CTTGGGGAG CAGCGGCGG
      TGTATATTT GCGCTCTCT ATCAGCGGA TGTCTGCTT CAGCCGCTC GTGGCGCGG
      -----
      T E L G R P D A E Y W H S Q P E I L E R
1141 TGAGGAGCT GCGCGGCGA CAGCGGAGT ACTGAGAGG CAGCGGAGG ATCCTGAGC
      ACTGCTGGA CCGCGCGCT CTGCGCTCA TGAGTTTTC GTTGGGCTC TAGGAGCTG
      -----
      T R A E L D T V C R H N Y E G P E T H T
1201 GAGCGGCGG CAGCTGAGC AGCTTGTCA GACAACTA CAGCGGCGG CAGCGGCGA
      CTTGCGCGG GTTGGAGCTG TGCAGAGT GTGTGTTAT CTTGCGGCGG CTCTGGGTG
      -----
      S L R R L E Q P H V V I S L E R T E A L
1241 GTTCTGCGG GCGCTTGAA CAGCGGAGT TGTCTCTC CTTGCTGAG AGAGGCGG
      GAGGAGCGG CCGGAGCTT GTGCGTTAC AGCAAGAGG GAGAGGCTC TGTCTGCGG
      -----
      M H H N T L V C S V T D F Y P A K I K V
1301 TCAACAGCA CAGCACTCA GTCTCTCAG TCAGGATTT CTAGCGAGG AGATCAAG
      AGTTGCTGT GTTGTGAGC CAGAGAGCT ACTGCTAAA GATGCGTGG TTCTATTT
      -----
      R N F R H G Q E E T V G V S S T O L I R
1381 TGCTGTGTT CCGAATGGC CAGGAGAGA CCGTGGGAT CTATCGACA CAGCTTATTA
      ACGGAGCAA GCGTTAGCG GTCTCTCTT GCGCGGCGA GATAGGTTT GTCAATAT
      -----
      N G D N T F Q V L V M L E M T P R R G E
1441 GGAATGGGA CTGAGCTTC CAGTCTCTG TCATCTGGA GATGAGGCT CCGCGGAGG
      CTTAGGCTT GAGTGAAG GTCCAGAGC ATAGAGCTT CTCTGAGGA GCGCGCTC

```

图 8

```
      V Y T C H V E H P S L K S P I T V E W R
1501 AGGTCTACAC CTGTCACGTG GAGCATCCCA GCCTGAAGAG CCCCATCACT GTGGAGTGGG
      TCCAGATGTG GACAGTGCAC CTCGTAGGGT CGGACTTCTC GGGGTAGTGA CACCTCACCT

      A Q S E S A W S K G G G G G G G G R I A
1561 GGGCACAGTC TGAGTCTGCC TGGAGCAAGG GAGGCGGAGG CGGTGGCGGA GGACGGATCG
      CCCGTGTCAG ACTCAGACGG ACCTCGTTCC CTCGCGCTCC GCCACCGCCT CCTGCCTAGC

      R L E E K V K T L K A Q N S E L A S T A
1621 CTCGGCTAGA GGAAAAAGTG AAAACCTTGA AAGCGCAAAA CTCGAGCTG GCGTCCACGG
      GAGCCGATCT CCTTTTTTAC TTTTGGA ACT TTCGCGTTTT GAGGCTCGAC CGCAGGTGCC

                                                                 XhoI
                                                                 ~~~~
      N M L R E Q V A Q L K Q K V M N H *
1681 CCAACATGCT CAGGGAACAG GTGGCACAGC TTAAGCAGAA AGTCATGAAC CACTGACTCG
      GGTGTGACGA GTCCCTTGTC CACCGTGTG AATTCGTCTT TCAGTACTTG GTGACTGAGC

      XbaI
      ~~~~~
1741 AGTCTAGA
      TCAGATCT
```

图 8(续)

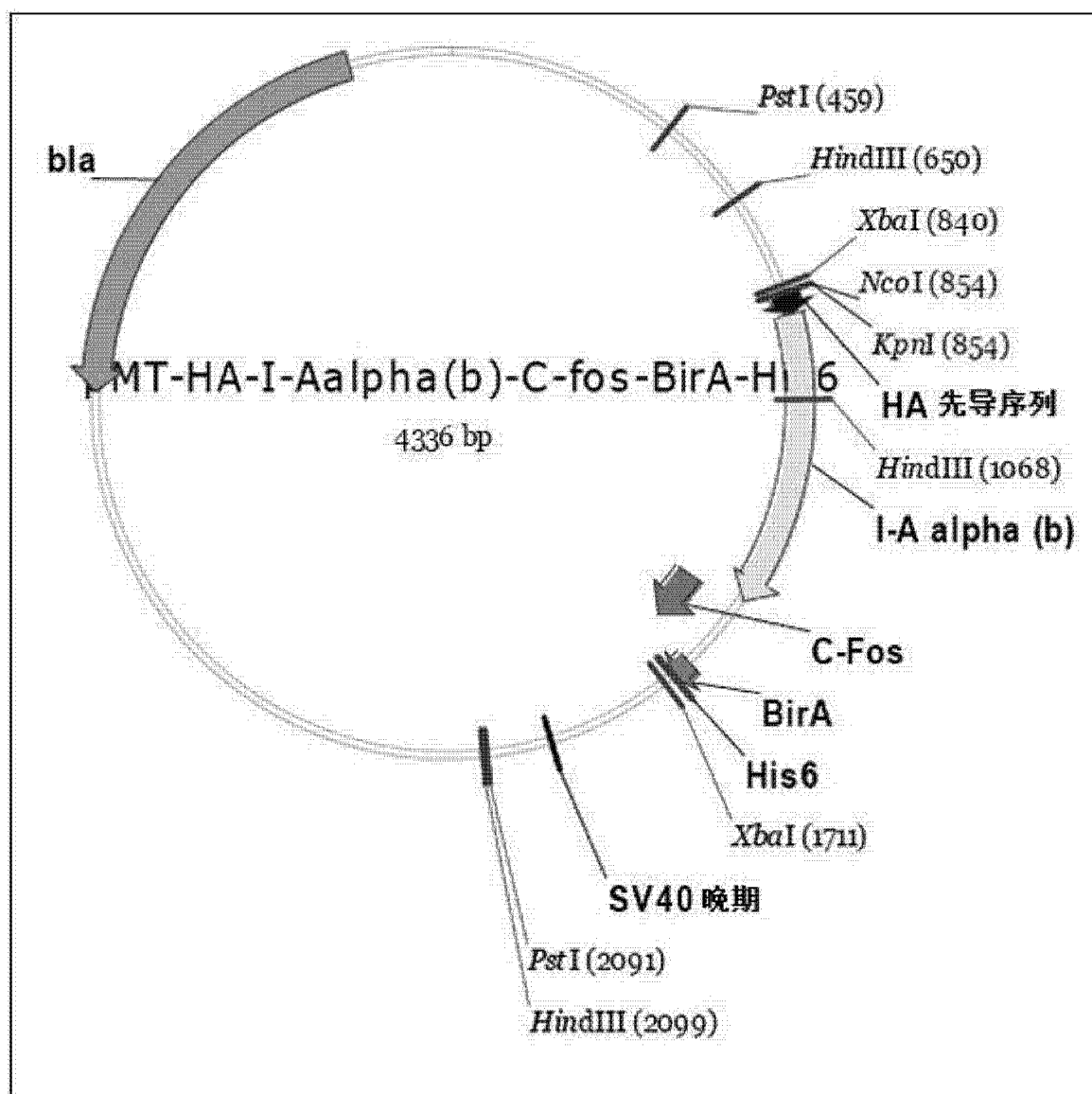


图 9

```

      8000
      8000
      M A I I Y L I L L F T A V R Q E
841  ATGGCT ATCATTTAGC TCATGCTGCT GTTCACCGCT GTGCGGCGCG
      TACGCA TATTAATGCG ATTAGGAGCA CAGTGGGCA CAGCGCGCGC

      D D I E A D H V G T Y G I S V Y Q S F G
861  AAGAGACAT TGAAGCGAC CAGTATGCA GGTATGATAT AAGTATATAT CAGTCTGCTG
      TTGCTGTA AGTGGCGCTG GTGATCGCT GATACCATTA TTCACATATA GTCAGAGGAC

      D I G Q Y T F E F D G D E L F Y V D L D
881  GAGACATG GCAATACAA TTGAATTTG ATGCTGATGA GTTGTCTTAT GTGAGCTGG
      CCTGTAGC GGTATGCT AAATTAAG TACATCTACT CACAAATATA CAGCTTAAGC

      81000
      81000
      K K E T V M H L P E F G Q L A S F D P Q
1021 ATAGAGGCA GACTGTGCG ATGCTGCTG ATTTGCGCA ATTGGCAGC TTGAGCGCG
      TATCTTCT GTACAGAGC TACAGAGC TCAACCGCT TACGCTGCG AAGTGGCG

      G G L Q M I A V V K H H L Q V L T K E S
1061 AAGTGGAGT GCAAAACATA GGTATATTA AACAGACTT GGAATGCTG ACTAGAGGT
      TTGAGCTGA GGTGTGAT CAGATATT TTGTGTA GGTGAGAG TGATTTGCA

      N E T P A T N E A P Q A T V F F K E R V
1141 GAAATTCAG CCAATGAGC ATAGAGCTG GTCAGAGC TTGTGCGC AAGTGGCTG
      GTTATAGTG GGTGAGTG TTACTGAG GATGCTG AGCAAGGG TTGAGGAGC

      L L Q Q M T L I C F V D N I F P R V I
1201 TGTGCTGCG TGAAGCGAC AGCTGATCT GTTGTGGA CAGATCTG CTTGCTGTA
      AGAGAGCG AGTGGCTG TGAGATGA GAAACACT GTTATAGAG GAGAGACT

      N I T M L P H K E V A D G V Y E T S F
1261 TCACATGAG ATGCTGAGA AATAGAGT CAGTGGAGA GGTGTGAT GAGAGACT
      AGTGTATG TACAGAGT TTATGTTA GTAGAGCT GCAAGATA GTGTGTA

      F Y N R D Y S F E L S Y L I F I P S D
1301 TTGTGTA GGTGATAT TTGTGAGA AGTGTGTA TTGAGCTG ATGCTGCTG
      AGAGAGCT GGTGATAT AGAGAGT TACAGAGT AGTGGAG TACAGAGC

      D D I Y D C E V E N M O L E E F V L K H
1381 AGATACAT TTATGCTG AGTGTAGC AGTGGCTG GAGAGAGC GTTGTAGC
      TTATGTA ATATGAGC TTGAGCTG TACAGAGC GTGCTGCG CAGAGCTG

      W E P E I F A F H E L T E S Q G G G G
1441 ATGAGAGC TGAATGCA GGTGATGT CAGAGTAC AGTGTGCA GGTGAGCTG
      TACGCTG AGTATAGT GGTGTATA GTTGTGCTG TTGAGCTG GGTGCTG

```

图 10

```

      L T D T L Q A E T D Q L E D E K S A L Q
1501 GACTGACAGA TAACTCCAA GCGGAGACAG ATCAACTTGA AGACGAGAAG TCTGCGTTGC
      CTGACTGTCT ATGTGAGGTT CGCCTCTGTC TAGTTGAACT TCTGCTCTTC AGACGCAACG

      T E I A N L L K E K E K L E F I L A A H
1561 AGACCGAGAT TGCCAATCTA CTGAAAGAGA AGGAAAAACT GGAGTTTATT TTGGCAGCCC
      TCTGGCTCTA ACGGTTAGAT GACTTTCTCT TCCTTTTGA CCTCAATAA AACCGTCGGG

      G S G S G S G S L G G I F E A M K M E L
1621 ACGGTAGTGG TAGTGGTAGT GGATCTCTGG GTGGTATCTT CGAGGCTATG AAGATGGAGC
      TGCCATCACC ATCACCATCA CCTAGAGACC CACCATAGAA GCTCCGATAC TTCTACCTCG

      XbaI
      ~~~~~
      R D H H H H H H *
1681 TGCGCGATCA TCACCATCAC CATCACTGAT CTAGA
      ACGCGCTAGT AGTGGTAGTG GTAGTGACTA GATCT

```

图 10(续)

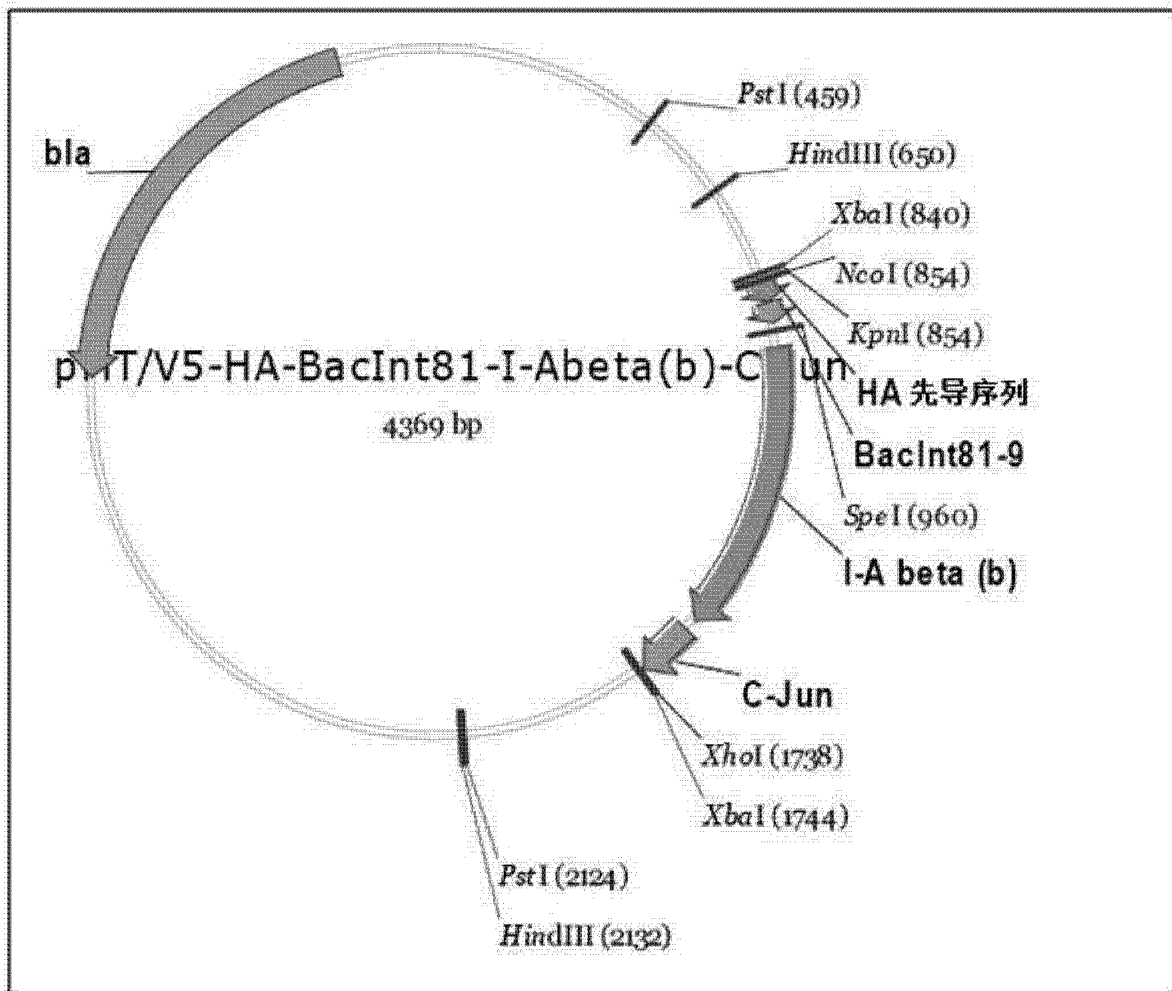


图 11

```

      NcoI
      -----
      M A I I Y L I L L F T A V R G L
341 ATGGCT ATCATGTACC TCATCTCTCT GTTCACGGCT GTGCGGGGCT
      TACCGA TATGATGAG AGTAGAGGGA CAAGTGGCGA CACGCGCGGA
      SpeI
      -----
      G Y W K R G I F A T L S L L G G G G S L
501 TGGGTATTG GAGCGCGGGA ATACTGCGC CACTCTCACT ACTGGAGAGT GAGAGCTCAC
      ACCCGATAAC CTTCGGGGCT TATGGAGGGT GTGAGAGTGA TGACCGCTCA GTTCGAGATG
      SpeI
      -----
      V P R G S G G G S G D E E R H F V Y Q
561 TASTGCGCG AGGCTCTGGA GGTGGAGGCT CTGAGAGATC CGAAGGCGAT TTGCTGTACC
      ATACGGGGG TCGGAGAGCT CGAGCTCGCA GAGCTCTGAG GCTTTCGTA AAGCAGATGG
      -----
      F M G E C Y F T H G T Q R I R Y V T R Y
1021 AATTGATGG CGAGTGTAC TTCACCAAG CGAGCGAGGG CATACGATAT GTGAGCGAT
      TCAAGTACCG GCTCAGGATG AAGTGGTTC GCTGCTGCG GTATGCTATA CACTGTCTA
      -----
      I Y N R E E Y V R Y D S D V G E N R A V
1081 ACATGTACCA CGGCGAGGAG TACGTGCGT ACACAGCGA CGTGGCGGAG CACCGCGCG
      TGTAGATGTT GCGGCTCTTC ATGCAGCGGA TGTGTGTGCT GCAGCGGCTC GTGGCGGCGC
      -----
      T E L G R P D A E Y W N S Q P E I L E R
1141 TACCGAGCT GGGCGGGCA GAGCGGAGT ACTGACAGAG CGAGCGGAG ATCTGAGAG
      ACTGCTCGA CCGCGCGGT CTGCGCTCA TGAGCTTTC GGTGAGGCTC TACGAGCTG
      -----
      T R A E L D T V C R H N Y E G P E T H T
1201 GAGCGGCGC CGAGCTGAG AGGTGTGCA GACACACTA CGAGGGGCG GAGAGCTACA
      CTGCGGCGCG GCTCGAGCTG TGGCAGAGT CTGTGTGAT GTGCGCGCGC CTGTGGGTGT
      -----
      S L R R L E Q P H V V I S L E E T E A L
1261 GCTGCTGCG GCGCTTGAA CAGCGCAATG TGTGATCTC GCTGTGAGG AGGAGGCGC
      GAGGGAGCG CCGCGAGCTI GTGGGTTC AGCAATAGAG GACAGGTCG TGTGCGGG
      -----
      N H H N T L V C S V T D F Y P A K I K V
1321 TCAACCACA CACACTCTG GTCTGCTCAG TCACAGATT CTACCGAGCG AGATCAAG
      AGTTGATGT GTTGTGAGC CAGACAGTC ACTGTCTAA GATGGGTGCG TTCTAGTTC
      -----
      R N F R H G Q E E T V G V E E T Q L I R
1381 TGCGTGGTT CGGAATGGC CAGAGGAGA CGGTGGGGT GTCATCGACA CAGCTTATTA
      ACGAGACCA GCGCTTACCG GTCTCTCTC GCGACCGCA GATAGGTTT GTCGAATAAT

```

图 12

```

      N G D W T F Q V L V M L E M T P R R G E
1441 GGAATGGGGA CTGGACCTTC CAGGTCTTGG TCATGCTGGA GATGACCCCT CGGCGGGGAG
      CTTTACCCCT GACCTGGAAG GTCCAGGACC AGTACGACCT CTACTGGGGA GCGGCCCCTC

      V Y T C H V E H F S L K S P I T V E W R
1501 AGGTCTAGAC CTGTCACGTG GAGCATGCCA GCCTGAAGAG CCCCATCACT GTGGAGTGEA
      TCCAGATGTG GACAGTGCAC CTCGTAGGGT CGGACTTCTC GGGGTAGTGA CACCTCACT

      A Q S E S A W S K G G G G G G G R I A
1561 GGGCACAGTC TGACTCTGCC TGGAGCAAGG GAGGCGGAGG CGGTGGCGGA GGACGGATCG
      CCGGTGTGAG ACTCAGACGG ACCTCGTTCC CTCGGCTCC GCCACCGCCT CCTGCCTAGC

      R L E E K V K T L K A Q N S E L A S T A
1621 CTGGGCTAGA GGAAAAAGTG AAAACCTTGA AAGCGCAAAA CTCGAGCTG GCGTCCACGG
      GAGCCGATCT CTTTTTCAC TTTTGAACT TTCGCGTTTT GAGGCTCGAC CGCAGGTGCC

                                                                 XhoI
                                                                 ----

      N M L R E Q V A Q L K Q K V M N H *
1681 CCAACATGCT CAGGGACAG GTGGCACAGC TTAGGCAGAA AGTCATGAAC CACTGACTCG
      GGTGTGACGA GTCCCTTGTG CACCGTGTGG AATTGCTCTT TCAGTACTTG GTGACTGAGC

      XbaI
      Tgg Tgg Tgg Tgg Tgg
1741 AGTCTAGA
      TCAGATCT

```

图 12(续)

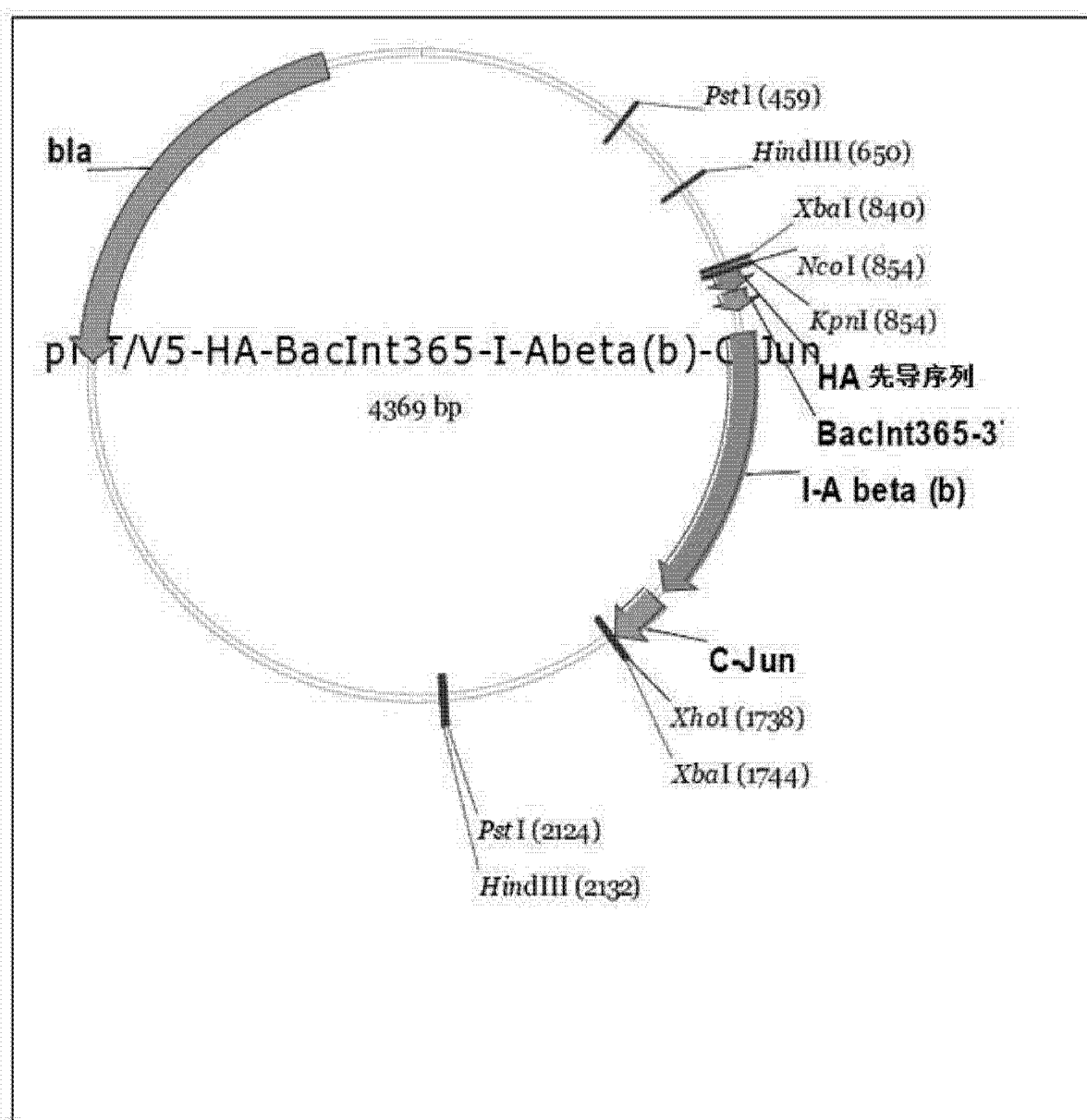


图 13

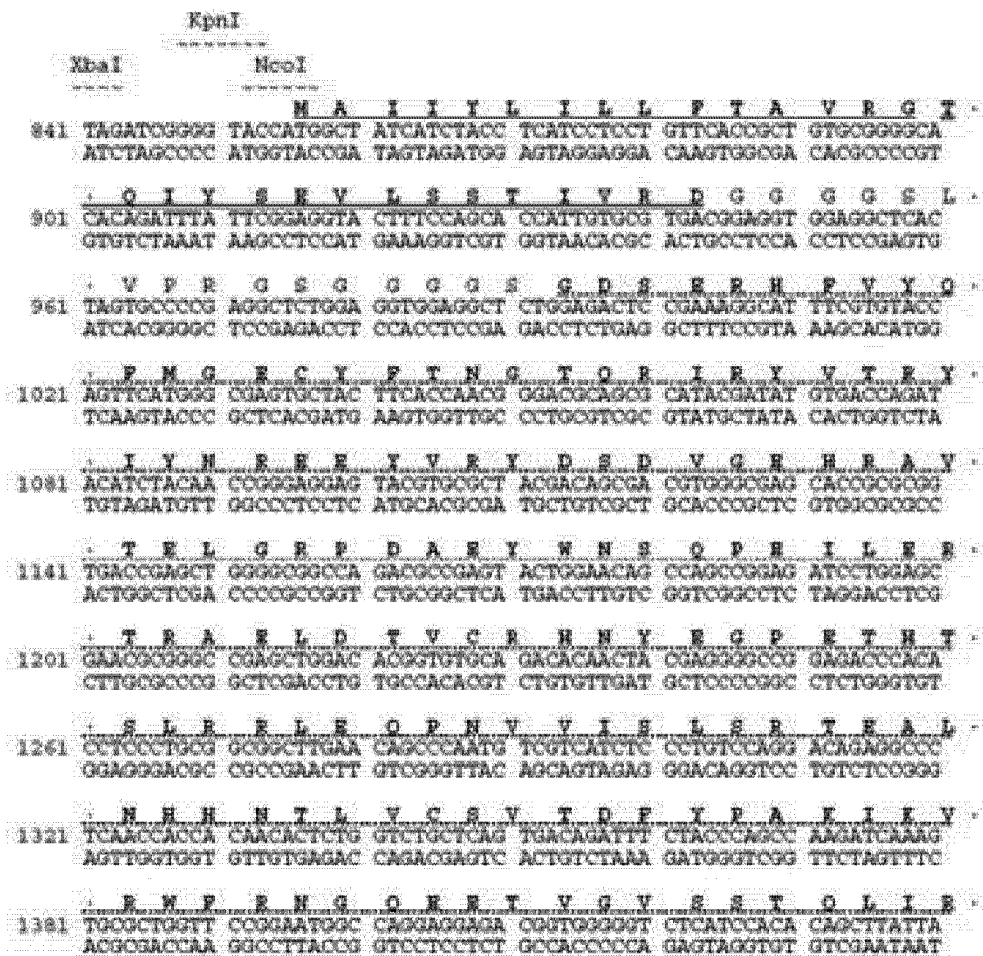


图 14

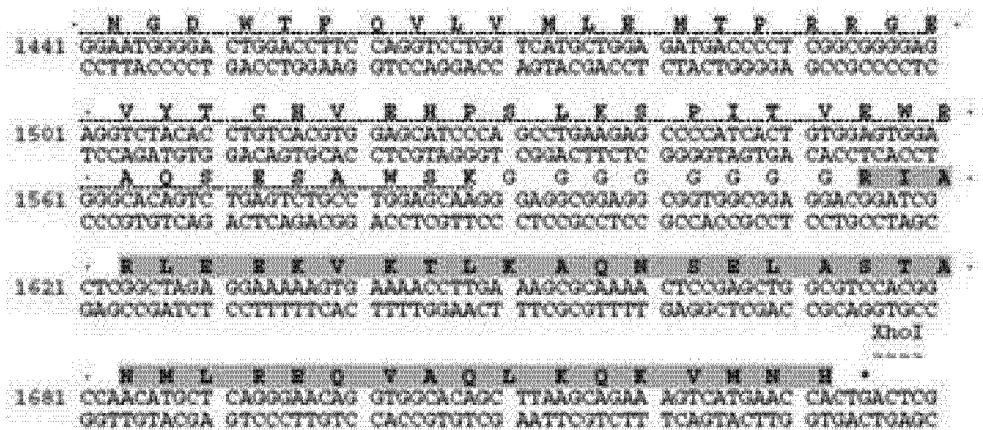


图 14(续)

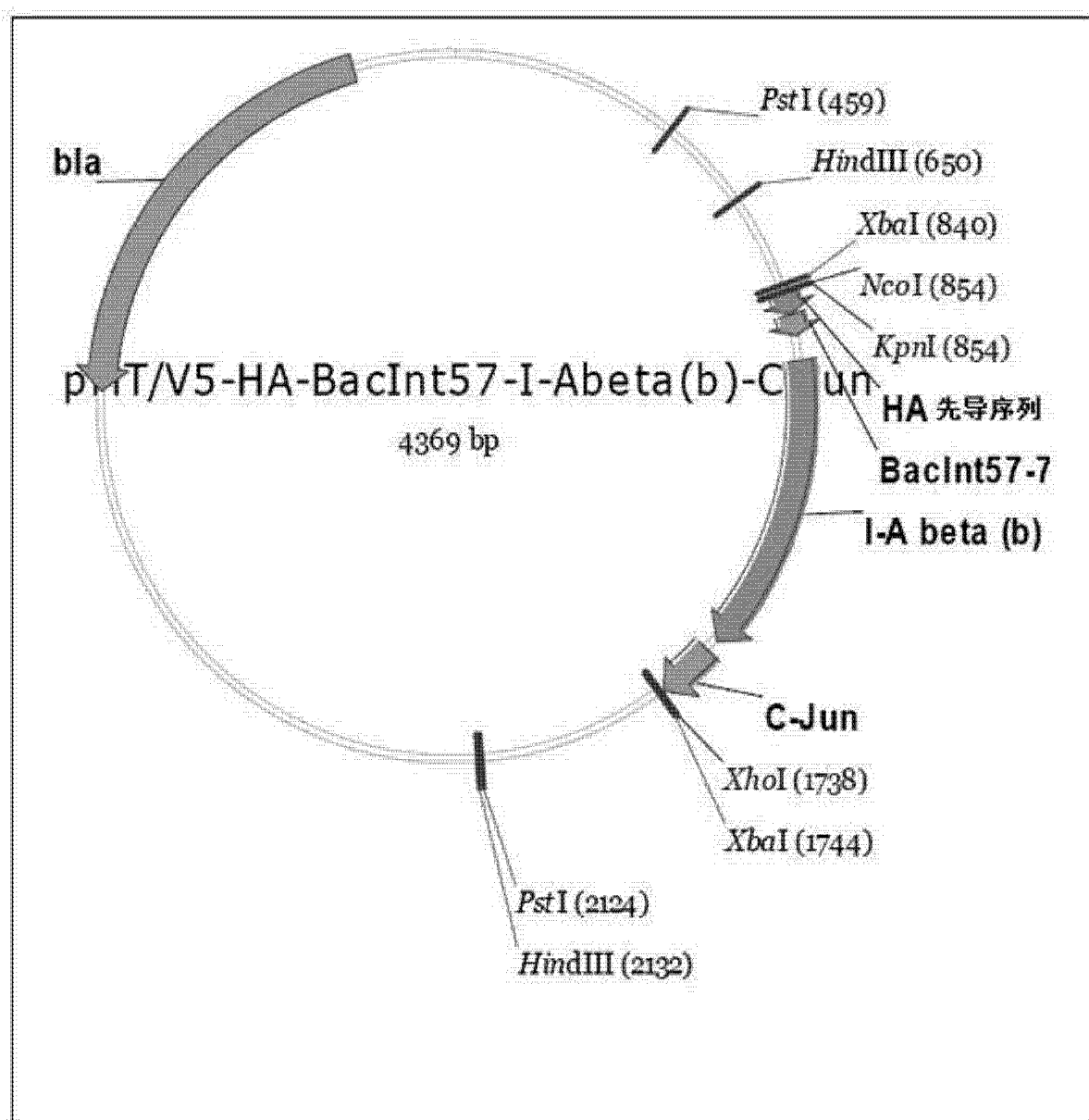


图 15

KpnI
 XbaI NdeI
 M A I I Y L I L L F T A V R G I
 841 TAGATCGGGG TAGCATGGCT ATGATCTAGG TCATCTGCT GTTACGGCT GTGGGGGGA
 ATCTAGGGG ATGATACCGA TATGATGAG AGTAGGAGGA CAAGTGGGGA CAGGCGCGCT
 N H F Q S N E L N A M L Y E G G G S L
 901 TTAACGACCG CCAATCTAAC GAACTCAAGG CAATCTCTA TAAAGGAGT GAGGCTCAG
 AATTGGTGGG GTTAGATG CTGAGTTGG GTTACAGAT ACTTCTCGA CCTCGAGTG
 V F R G S G G G G S G D S E R H F V Y Q
 941 TAGTGGCGCG AGGCTGTGGA GGTGGAGCT GTGAGACTG CGAAGGAGT TTGCTGTAC
 ATCAGCGGGC TCGAGAGCT CAGCTCGGA GAGCTGTAG GCTTCTCTA AAGCATGG
 F M G E C Y F T N G T O R I R Y V T R Y
 1021 AGTTCATGGG CCAATCTAAC TTGCTCAAGG GAGGCGAGG CATAGGATAT GTGAGCAGT
 TCAAGTACCG GCTCAGGATG AAGTGTGGG CTGAGTGGG GTATCTATA CACTGCTCTA
 I Y N R E E Y V R Y D S D V G E H R A V
 1081 ACATCTACAA CCGGAGGAG TAGTGGCTT AGGACAGGA CGTGGGGGAG CAGCGCGCGG
 TGTAGATGTT GCGCTCTCTC ATGACAGGA TGTGTGTCT GAGCGGCTC GTGGCGCGCT
 T E L G R P D A E Y W N S Q P E I L E R
 1141 TGACCGAGCT GGGCGGGGCA GAGCGGAGT ACTGAGAGG CAGCGGAGG ATCTGSGAGC
 ACTGCTGGA CCGCGCGCT CTGCGGCTA TCACTTCTC GGTGCGCTC TAGGAGCTG
 T R A E L D T V C R H N Y E G P E T N T
 1201 GAGCGGAGG CCACTGAGG AGTGTGTGA GAGCAGCTA CAGCGGGGCG GAGCGGAGG
 CTGCGGCGG GCTGAGCTG TCGCAGAGT CTGTGTTGAT GCTCGCGGCG CTGTGAGTGT
 S L R R L E Q P N V V I S L S R T E A L
 1241 CTTCTCTGGG GCGCTTGA AAGCGGAGT TCTCTCTC GGTGCGAGG AGAGGCGCG
 GAGGAGAGG CCGCGAGCTT GTCGAGTTC AGCAGTAGG GAGAGGCTC TGTCTCGGG
 N H H N T L V C S V T D F Y P A K I E V
 1321 TCAACGACCA CAGCTCTCTG GTCTCTCAG TCAAGATTT CTACCGAGG AGATCAAG
 AATTGTGTGT GTGTGAGAG CAGAGAGCT ACTGTCTAA GATGAGTGG TTCTAGTTT
 R W F R M G Q E E T V G V S S T Q L I R
 1381 TCGCTGTGTT CCGAATGAG CAGAGGAGA CGTGGGGGT CTCATCCACA CAGCTTATTA
 AGCGAGGGA GCGCTTACCG GTCTCTCTT GCGCGGCGCA GATAGGTTT GCGAATAT
 N G D W T F Q V L V M L E M T F R R G E
 1441 GGAATGGGGA CTGAGCTTC CAGCTCTCG TCATCTGGA GATGAGGCT CAGCGGGGAG
 GCTTACCGCT GAGCTGAGG GTGAGGAGC AGTACAGCT CTAGTGGGA GCGCGGCTC

图 16

```

      V Y T C H V E H P S L K S P I T V E W R
1501 AGGTCTACAC CTGTCACGTG GAGCATCCCA GCCTGAAGAG CCCCATCACT GTGGAGTGGA
      TCCAGATGTG GACAGTGCAC CTCGTAGGGT CGGACTTCTC GGGGTAGTGA CACCTCACCT

      A Q S E S A W S K G G G G G G G G R I A
1561 GGGCACAGTC TGAGTCTGCC TGGAGCAAGG GAGGCGGAGG CGGTGGCGGA GGACGGATCG
      CCCGTGTCAG ACTCAGACGG AACTCGTTCC CTCGCGCTCC GCCACCGCCT CCTGCCTAGC

      R L E E K V K T L K A Q N S E L A S T A
1621 CTCGGCTAGA GGAAAAAGTG AAAACCTTGA AAGCGCAAAA CTCCGAGCTG GCGTCCACGG
      GAGCCGATCT CCTTTTTCAC TTTTGGAAGT TTCGCGTTTT GAGGCTCGAC CGCAGGTGCC
                                          XhoI
      N M L R E Q V A Q L K Q K V M N H *
1681 CCAACATGCT CAGGGAACAG GTGGCACAGC TTAAGCAGAA AGTCATGAAC CACTGACTCG
      GGTTGTACGA GTCCCTTGTC CACCGTGTGG AATTGCTCTT TCAGTACTTG GTGACTGAGC

```

图 16(续)

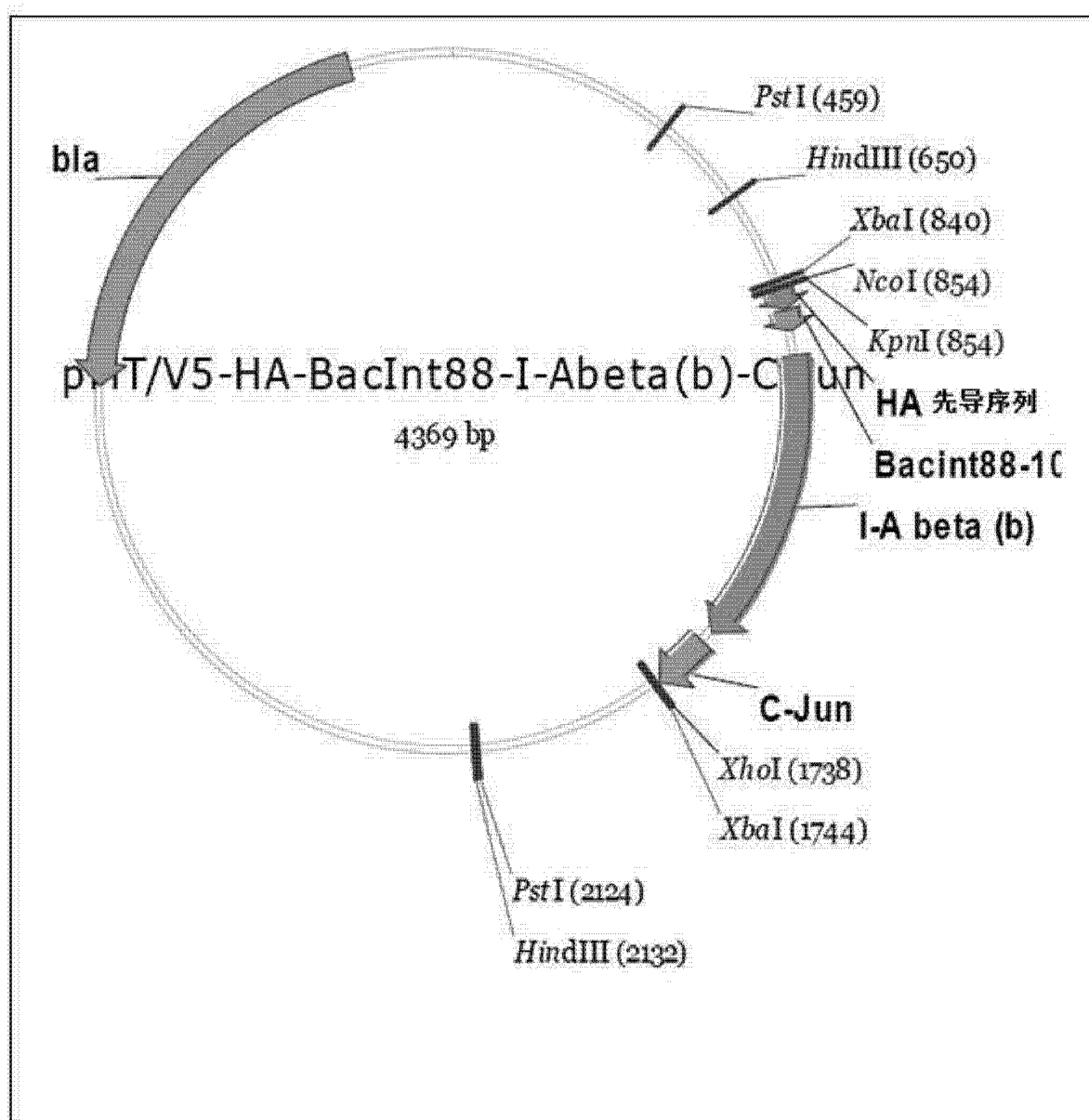


图 17

图 18

56

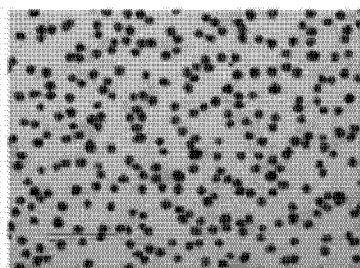


图 19

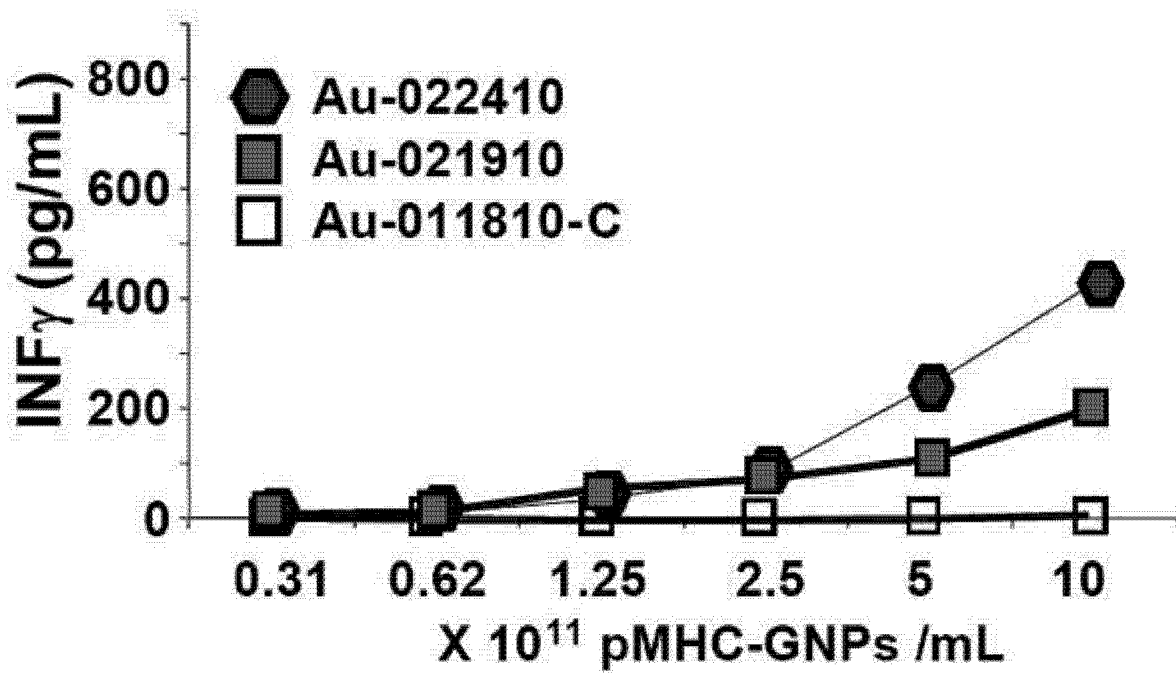


图 20

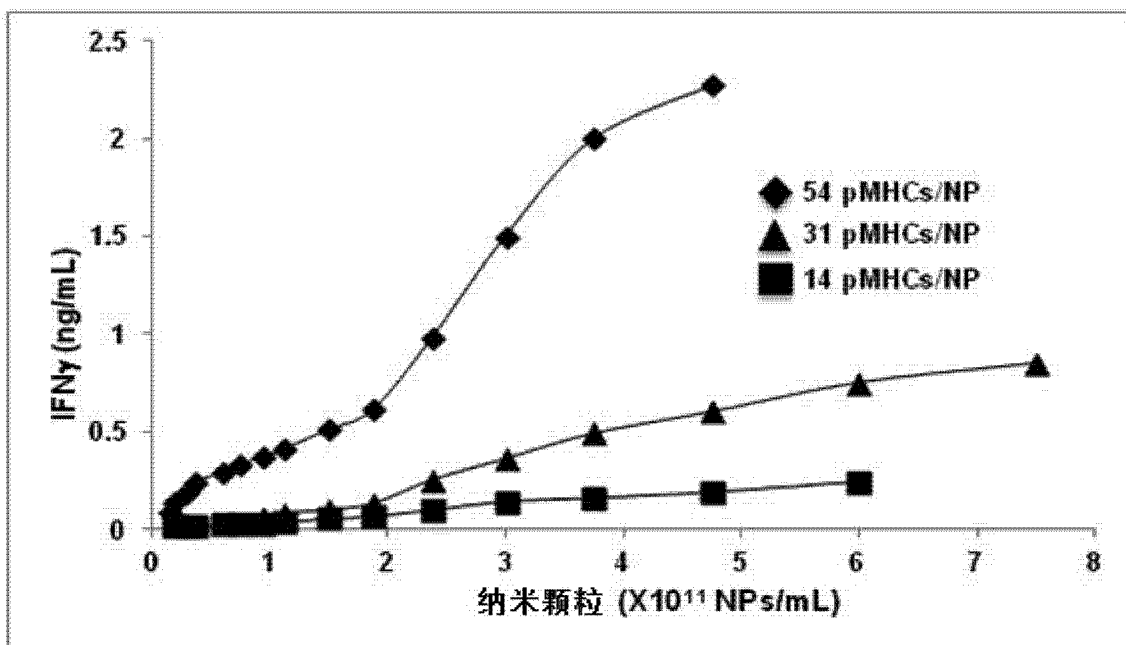


图 21

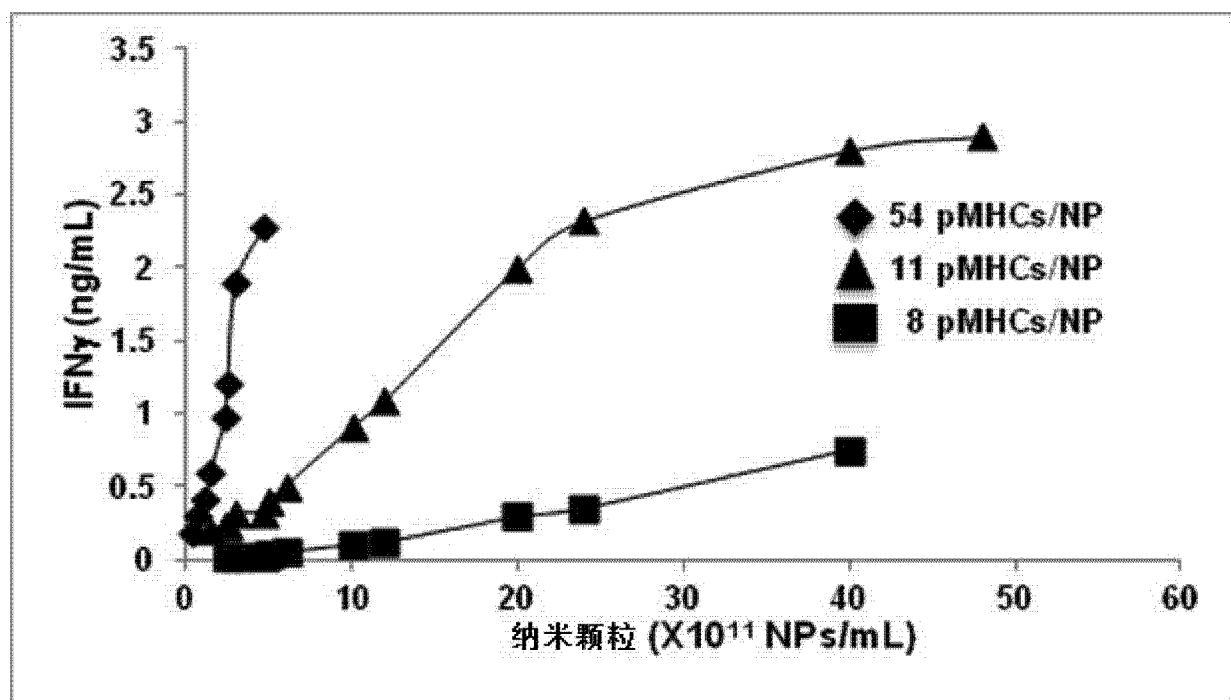


图 22

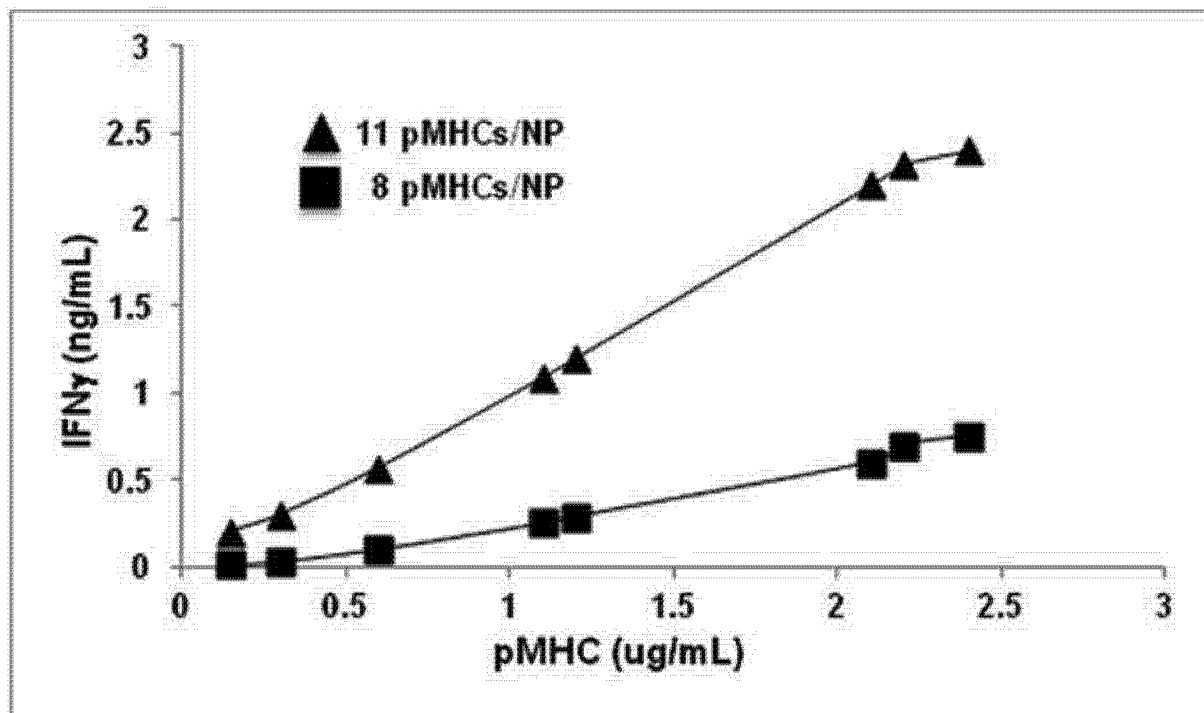


图 23

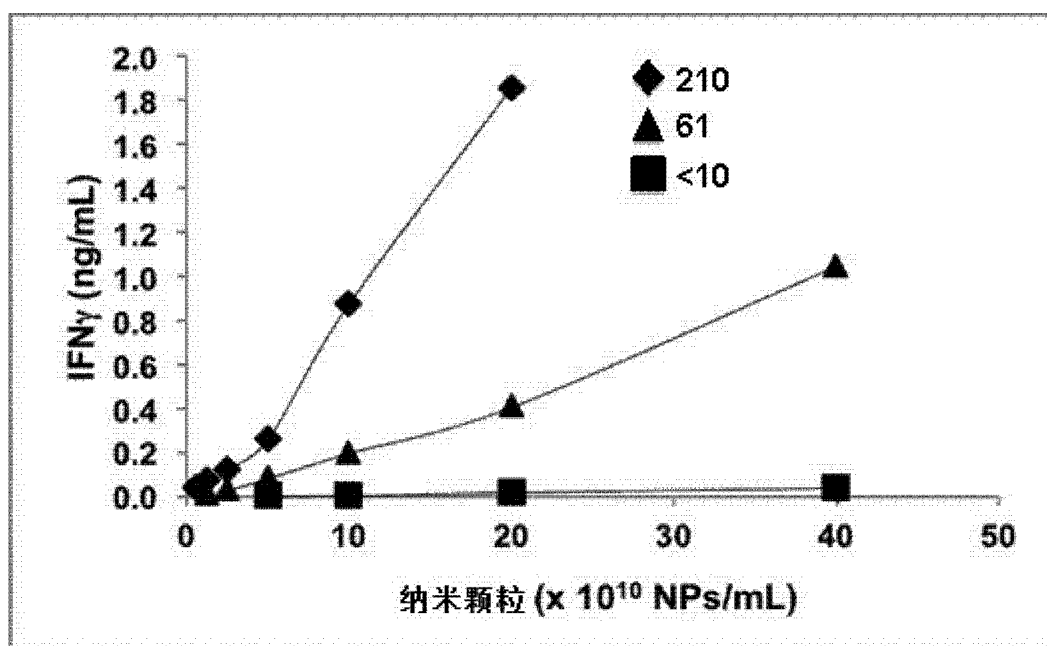


图 24

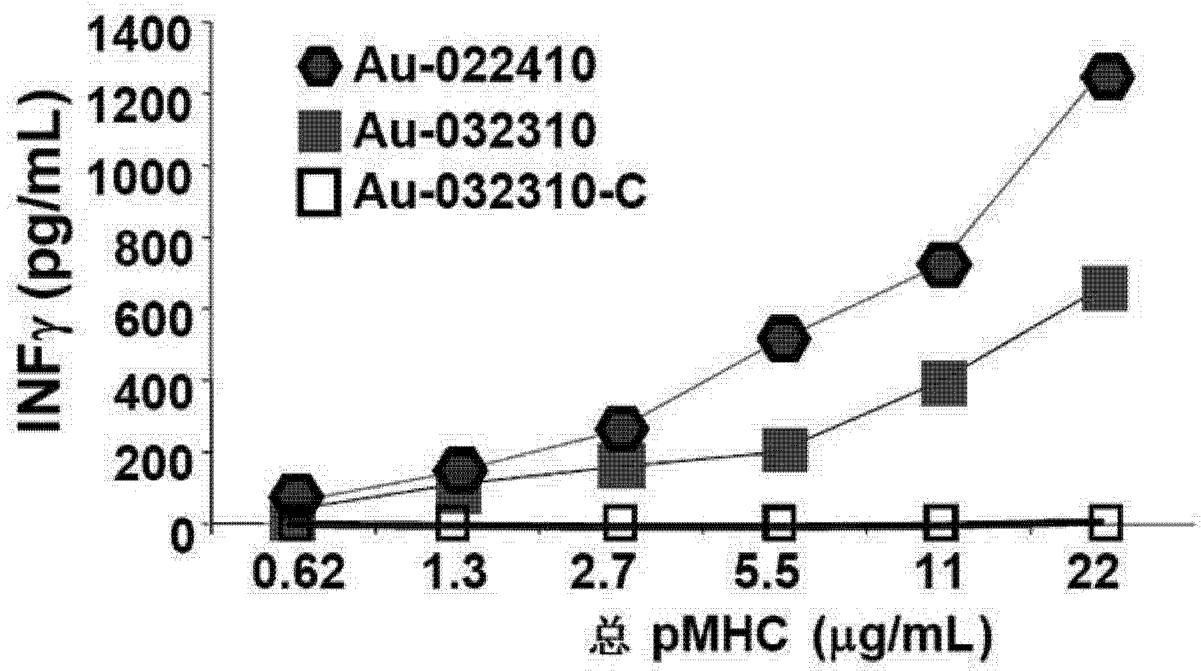


图 25

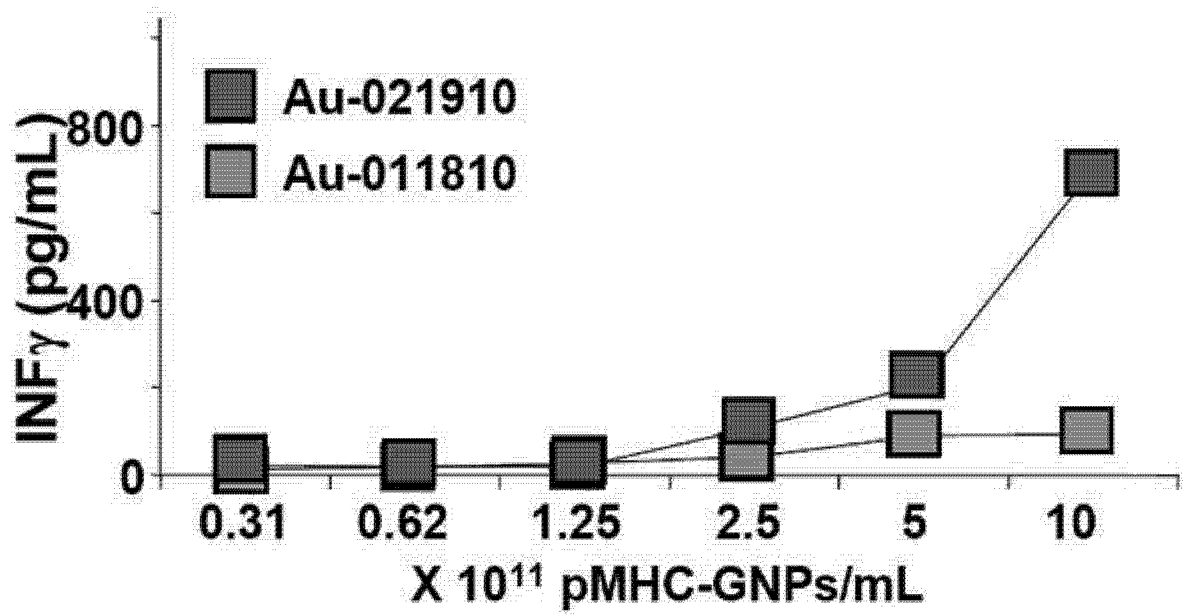


图 26

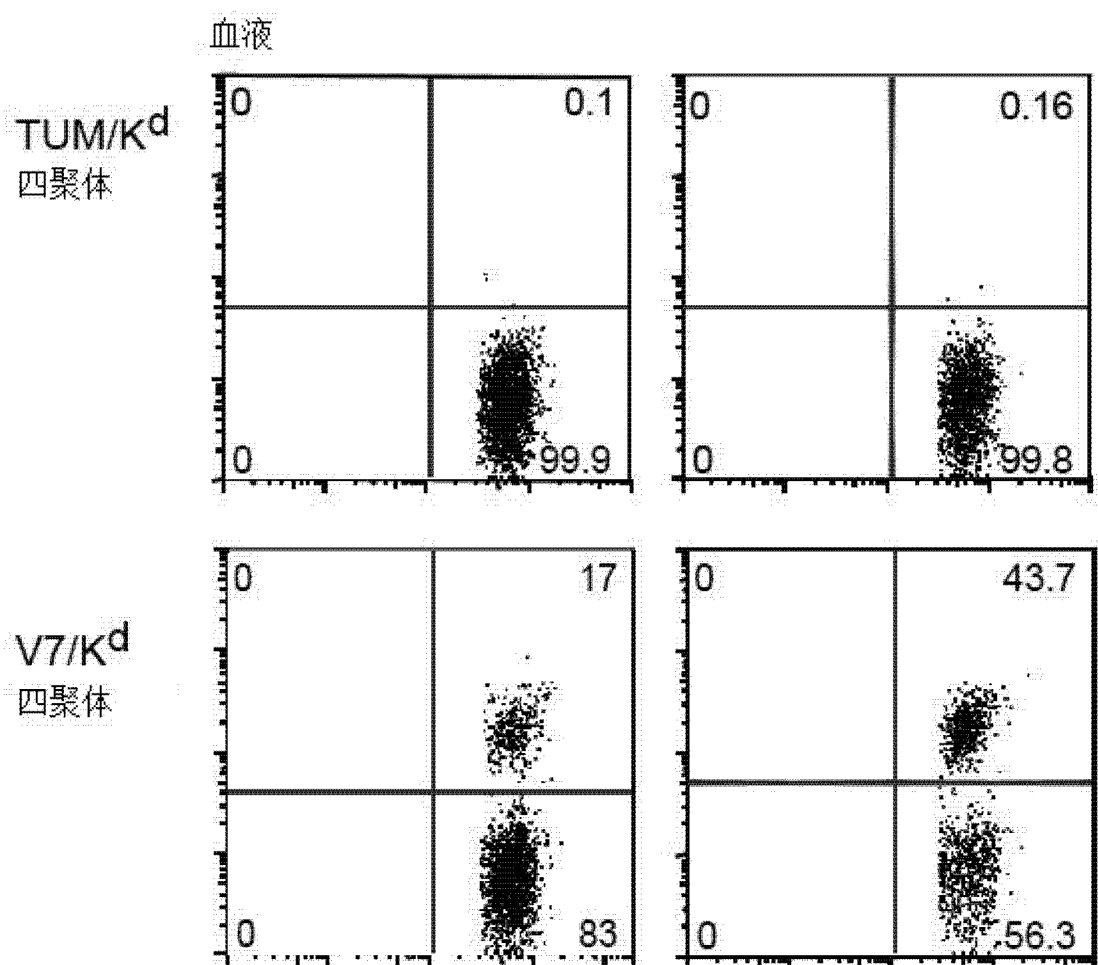


图 27

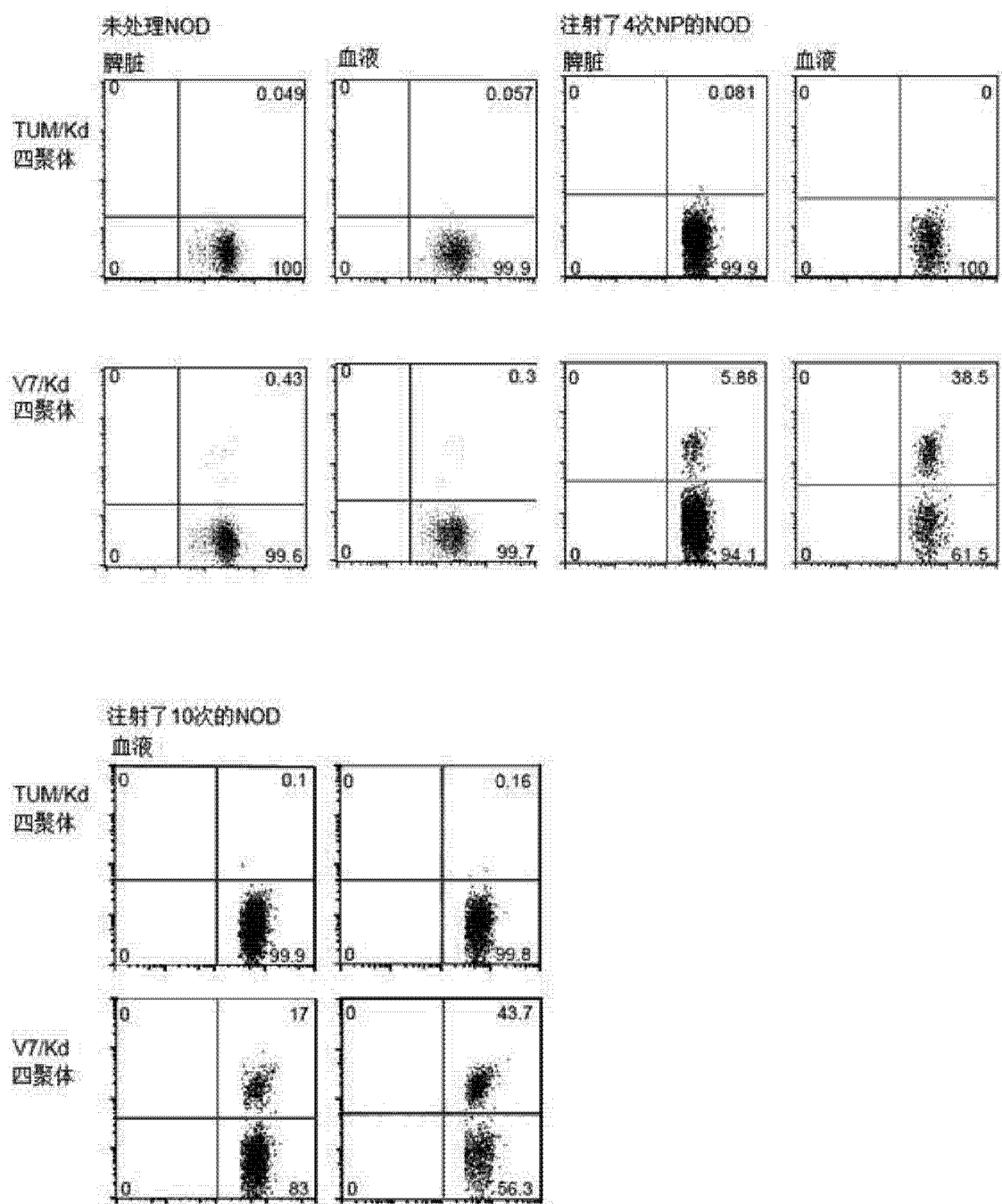


图 28