

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/00

C12Q 1/68

C07H 21/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03818631.4

[43] 公开日 2005 年 9 月 28 日

[11] 公开号 CN 1674931A

[22] 申请日 2003.6.5 [21] 申请号 03818631.4

[30] 优先权

[32] 2002. 6. 5 [33] US [31] 60/386,287

[86] 国际申请 PCT/US2003/017873 2003.6.5

[87] 国际公布 WO2003/104407 英 2003.12.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.2

[71] 申请人 贝勒医学院

地址 美国德克萨斯州

共同申请人 奥佩艾克萨药品公司

[72] 发明人 臧敬五

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李 波 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 22 页 序列表 2 页

[54] 发明名称 T 细胞受体 CDR3 序列和检测方法

[57] 摘要

本发明大体涉及自身免疫病,如多发性硬化(MS)、类风湿关节炎(RA)及其它疾病的治疗领域。本发明公开了通过利用 T 细胞受体肽治疗和监控自身免疫病的方法。本发明也公开了在 MS 患者群体中发现的 T 细胞受体的核酸和肽序列。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种寡核苷酸，长度大约为 15-30 个核苷酸，包含一个特定序列的至少 10 个连续核苷酸或其互补序列或由其衍生的序列，该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列。
- 5 2. 权利要求 1 的寡核苷酸，包含一个特定序列的至少 15 个连续核苷酸或其互补序列或由其衍生的序列，该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列。
3. 权利要求 1 的寡核苷酸，包含一个特定序列或其互补序列或由其衍生的序列，该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列。
- 10 4. 引物对，包括：
- (a) 第一引物，长度大约为 15-30 个核苷酸，包含一个特定序列的至少 10 个连续核苷酸或其互补序列或由其衍生的序列，该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列；和
- (b) 第二引物，包含一个长度大约为 15 和 30 个核苷酸的核酸，
- 15 它不包含上述第一引物的序列，并被发现位于 T 细胞中 T 细胞受体基因的 V β -C β 区，
- 其中上述第一和第二引物的序列未被发现位于 T 细胞受体基因的不同链上。
- 20 5. 权利要求 4 的引物对，其中第二引物包含选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 的序列。
6. 一种寡核苷酸探针，包括：
- (a) 寡核苷酸，长度大约为 10-30 个核苷酸，包含一个特定序列的至少 10 个连续核苷酸或其互补序列或由其衍生的序列，该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列，和
- 25 (b) 标记部分。
7. 权利要求 6 的寡核苷酸探针，其中标记部分选自 ³²P、³⁵S、生物素和洋地黄毒苷。
8. 一种检测 MBP83-99 T 细胞的方法，该 T 细胞表达选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的 T 细胞受体基序或由其衍生的序列，该方法包括：
- 30 (a) 从 MBP83-99 T 细胞中获得核酸样品；
- (i) 使该核酸样品与特定引物对接触，该引物对选自：
- (ii) 第一寡核苷酸，长度大约为 15-30 个核苷酸，包含一个特定

序列的至少 10 个连续核苷酸或其互补序列或由其衍生的序列，该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列；和

5 (iii) 第二寡核苷酸，长度大约为 15 和 30 个核苷酸，它不包含第一寡核苷酸的序列，并被发现位于 T 细胞中 T 细胞受体基因的 V β -C β 区，

其中第一和第二寡核苷酸的序列未被发现位于 T 细胞受体基因的相同链上；和

(b) 检测编码上述 T 细胞受体基序的核酸的存在。

9. 权利要求 8 的方法，其中第二引物包含选自 SEQ ID NO:7、8
10 和 9 的序列。

10. 权利要求 8 的方法，其中核酸样品的片段通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增。

11. 权利要求 10 的方法，其中检测步骤包括采用寡核苷酸探针探测，该探针包括：

15 (a) 寡核苷酸，包含一个特定序列或其互补序列或由其衍生的序列，该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列；和

(b) 标记部分。

12. 权利要求 10 的方法，其中检测步骤包括放射自显影。

13. 一种检验试剂盒，包括长度大约为 15-30 个核苷酸的第一寡核苷酸，该第一寡核苷酸包含一个特定序列的至少 10 个连续核苷酸或其
20 互补序列或由其衍生的序列，该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列。

14. 权利要求 13 的检验试剂盒，进一步包括：一个长度大约为 15
和 30 个核苷酸的第二寡核苷酸，它不包含上述第一寡核苷酸的序列，
25 并被发现位于 T 细胞中 T 细胞受体基因的 V β -C β 区，其中第一和第二寡核苷酸的序列未被发现位于 T 细胞受体基因的相同链上。

15. 权利要求 14 的检验试剂盒，其中第二引物包含选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 的序列。

16. 权利要求 13 的检验试剂盒，进一步包括一个标记部分，其中
30 该标记部分选自 ^{32}P 、 ^{35}S 、生物素和洋地黄毒苷。

17. 一种监控自身免疫病的方法，包括：

(a) 从人类中获得 MBP83-99 T 细胞；

(b) 检测编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列或由其衍生的序列的核酸的存在,

(i) 从 MBP83-99 T 细胞中获得核酸样品;

(ii) 使该核酸样品与特定引物对接触, 该引物对选自:

5 a. 第一寡核苷酸, 长度大约为 15-30 个核苷酸, 包含一个特定序列的至少 10 个连续核苷酸或其互补序列或由其衍生的序列, 该特定序列编码选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列; 和

10 b. 第二寡核苷酸, 长度大约为 15 和 30 个核苷酸, 它不包含上述第一寡核苷酸的序列, 并被发现位于 T 细胞中 T 细胞受体基因的 V β -C β 区中, 其中上述第一和第二寡核苷酸的序列未被发现位于 T 细胞受体基因的相同链上; 和

 c. 检测编码 T 细胞受体基序的核酸的存在, 并且, 如果可检测到该核酸,

(c) 定量该核酸。

15 18. 权利要求 17 的方法, 其中第二引物包含选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 的序列。

 19. 一种疫苗, 包含第一肽, 并任选包含一种药物可接受载体, 其中第一肽包含选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的序列或由其衍生的序列。

20 20. 权利要求 19 的疫苗, 进一步至少包含第二肽, 并任选包含一种药物可接受载体, 其中第二肽包含选自 SEQ ID NO:4、5、6 和 7 的序列或由其衍生的序列, 且第一与第二肽的序列不同。

 21. 一种治疗自身免疫病的方法, 包括对自身免疫病患者施用权利要求 19 或 20 任意一项的疫苗。

T 细胞受体 CDR3 序列和检测方法

发明领域

- 5 本发明大体涉及自身免疫病，如多发性硬化（MS）的治疗领域。更具体而言，本发明涉及在某些 MS 患者中发现的 T 细胞受体核酸和肽，以及检测这些序列的方法。另外，本发明涉及 T 细胞受体肽序列在治疗自身免疫病，如 MS 方面的用途。

10 发明背景

- 位于细胞毒性 T 淋巴细胞或 T 辅助细胞上、由 T 细胞受体（TCR）形成的细胞间识别复合体，和位于抗原呈递细胞（APC）上的 MHC/肽复合体是在多种类型的细胞间相互作用中的共同识别成分，它们在个体生物体内 T 细胞所有组成成分的发育期间（正选择；负选择；外周存活）和适应性免疫应答的控制（T 辅助细胞）与效应期（T 杀伤细胞）期间均可活化 TCR。

- 在适应性免疫应答中，抗原由超变分子，例如抗体或 TCR 识别，这些超变分子的表达具有充分多样的结构，因而能够识别任何抗原。抗体可结合抗原表面的任意部分。而 TCR 则仅限于通过与特定抗原来源的短肽结合，而感知该抗原的存在，其中该抗原呈递在与主要组织相容性复合体（MHC）的 I 或 II 类分子结合的 APC 表面。肽/MHC 复合体的 TCR 识别可触发 T 细胞的活化（克隆扩充）。

- TCR 是由两条链组成的异二聚体，这两条链可以是 $\alpha\beta$ (α - β) 或 $\gamma\delta$ (γ - δ)。TCR 的结构与免疫球蛋白（Ig）非常相似。每条链均含有两个胞外域，即免疫球蛋白折叠。氨基末端区域高度可变，被称为可变（V）区。最接近膜的区域是恒定（C）区。上述两个区与免疫球蛋白的两个区相似，类似 Fab 片段。每条链的 V 区均含有三个互补决定区（CDR）。各 TCR 链在邻近膜处均具有一个带半胱氨酸残基的短连接序列，在两条链之间形成了二硫键。

- 30 编码 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 异二聚体的基因仅在 T 细胞系中表达。四个 TCR 基因座（ α 、 β 、 γ 和 δ ）均具有与 Ig 的基因座非常相似的种系组构。 α 和 γ 链均为 V 和 J 片段重排的产物，而 β 和 δ 链则为 V、D 和 J 片段重排

的产物。对 TCR 链而言,除 δ 链基因片段位于 α 链的 V 和 J 基因片段之间外,其它基因片段均位于不同染色体上。 δ 链基因片段的位置具有下述意义: α 链基因片段的有效重排去除了 δ 链的 C 基因,因此在特定细胞中, $\alpha\beta$ 异二聚体不能与 $\gamma\delta$ 受体共表达。

5 小鼠体内存在大约 100 个 $V\alpha$ 和 50 个 $J\alpha$ 基因片段,并仅存在一个 $C\alpha$ 片段。 δ 链基因家族含有大约 10 个 V、2 个 D 和 2 个 J 基因片段。 β 链基因家族含有 20-30 个 V 片段和两个均含有 1 个 $D\beta$ 、6 个 $J\beta$ 和 1 个 $C\beta$ 的相同重复。最后, γ 链基因家族含有 7 个 V 和 3 个不同的 J-C 重复。人体内的该组构与小鼠类似,但片段数量不同。

10 α 和 β 链中基因片段的重排与 Ig 中的情况相似。 α 链与 Ig 的轻链相似,由 V、J 和 C 基因片段编码。 β 链则与 Ig 的重链相似,由 V、D 和 J 基因片段编码。 α 链基因片段的重排导致 VJ 连接, β 链重排则导致 VDJ 连接。重排基因转录、RNA 加工并翻译后, α 和 β 链通过 T 细胞膜中的二硫键被表达连接。

15 TCR 基因片段的侧翼为含有一个七聚体和一个九聚体的识别信号序列 (RSS), 以及一个包含 12 个核苷酸 (一个转角) 或 23 个核苷酸 (两个转角) 的间插序列。对 Ig 而言,由重组活化基因 (RAG-1 和 RAG-2) 编码的酶负责重组过程。RAG1/2 识别 RSS 并以在 Ig 重排中的相同方式连接 V-J 和 V-D-J 片段。简言之,上述酶在基因片段与 RSS
20 之间切下一条 DNA 链,并催化编码序列中形成发夹结构。信号序列随后被切除。

α 链中 V 和 J 片段与 β 链中 V、D 和 J 片段的组合连接产生了大量可能的分子,从而造成了 TCR 的多样性。通过可变连接基因片段也可在 TCR 中实现多样性。与 Ig 相比, β 和 δ 基因片段可以可变方式连接。
25 β 和 δ 基因片段中的 RSS 侧翼基因片段可在 β 链中形成 VJ 和 VDJ,在 δ 链上形成 VJ、VDJ 和 VDDJ。和在 Ig 的情况中一样,基因片段连接中的可变性也可产生多样性。

TCR 中被称为互补决定区 (CDR) 的超变环可识别由 MHC 分子与结合肽形成的复合表面。 α 和 β 的 CDR2 环仅接触 APC 表面的 MHC
30 分子,而 CDR1 和 CDR3 环则与上述肽和 MHC 分子二者均接触。与 Ig 相比,TCR 在 CDR1 和 CDR2 中的多样性更为有限。不过,TCR 中 CDR3 的多样性高于 Ig,因为 TCR 可连接多于 1 个的 D 片段,从而提

高了连接多样性。

许多自身免疫病的病理被认为是对生物体内存在的自身抗原的自身免疫 T 细胞应答的缘故。与克隆选择模式相反，胸腺中并非缺失所有自身反应性 T 细胞。这些具有适合广谱自身抗原的 TCR 的 T 细胞代表了正常 T 细胞所有组成成分的一部分，并在外周自然循环。自身反应性 T 细胞在进化期间为何可以经历胸腺中的分化，并被容纳在外周的原因尚未清楚。虽然其生理学作用尚未被充分理解，但当被活化时，这些自身反应性 T 细胞在诱导自身免疫病理方面便具有了潜在威胁。自身反应性 T 细胞也可分离自并未患有自身免疫病的正常个体中。已被证实的是其自身反应性的抗原识别不足以介导自身破坏的过程。自身反应性 T 细胞致病的前提之一是其必须被活化。

自身反应性 T 细胞被指出涉及了自身免疫病，如多发性硬化 (MS) 和类风湿关节炎 (RA) 的病理。MS 中自身反应性 T 细胞的病理通常被认为是 T 细胞应答于髓磷脂抗原，尤其是髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的缘故。与对照个体相比，MBP 反应性 T 细胞被发现经历体内活化，以较高的前体频率出现在 MS 患者体内的血液和脑脊髓液中。上述 MBP 反应性 T 细胞产生了 Th1 细胞因子，如 IL-2、TNF 和 γ -干扰素，而这些细胞因子有助于炎症细胞迁移进中枢神经系统，并加剧 MS 中的髓鞘破坏性炎症应答。

MBP 反应性 T 细胞也被证明涉及了动物体内实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 的病理，该病类似多发性硬化。通过注射乳化于佐剂中的 MBP，或被动地通过注射 MBP 反应性 T 细胞系和来源自 MBP-敏化动物的克隆，可在易感动物体内主动诱导 EAE。体外活化时，诱导 EAE 所需 MBP 反应性 T 细胞的量非常少，而具有相同反应性的静息 T 细胞即使 100 倍上述量以上仍然不能介导上述疾病。

已证实接种灭活的 MBP-反应性 T 细胞可减少 EAE 中的 MBP 反应性 T 细胞，该操作被称为 T 细胞接种，被用于预防和治疗 EAE。Ben-Nun et al., Nature 292:60-61 (1981)。虽然 T 细胞接种的潜在机制尚未被完全理解，还是有一种看法是通过与 TCR 的相互作用，以及据推测可与 T 细胞活化标记反应的所谓抗-ergotypic T 细胞应答，从而涉及独特型调节网络。独特型和抗-ergotypic 调节网络被认为是 T 细胞接种所诱导的保护性免疫的基础，因为 T 细胞接种所赋予的保护性免

疫对接种所用自身免疫 T 细胞可诱导的疾病具有特异性。另外，分离自免疫的啮齿类的抗独特型 T 细胞可特异性识别免疫 T 细胞克隆/系，而不识别表达了稀疏 TCR 结构特征的 T 细胞。抗独特型 T 细胞识别的 TCR 决定簇被认为最可能位于 CDR3 或 CDR2 内，与根据这些区域内的特征序列多样性所预测的结果相同。

在 EAE 中，致脑炎 MBP-反应性 T 细胞被限定在 MBP 上非常有限的几个表位。这些在致病 T 细胞应答多样性方面的限制允许特定免疫干扰。在预防敏化动物体内 EAE 的发展方面，人们针对 TCR 的 V β 区已相应设计了多种治疗方案。例如，已有针对 V β 基因产物的单克隆抗体，和以负责的 V β 基因的 CDR2 区为基础设计的肽疫苗。

对 EAE 的若干研究已延伸至人类自身免疫病。例如，与 TCR V β 5.2 相应的肽已被应用在治疗 MS 患者的临床试验中，V β 14 肽已被用于接种 RA 患者。美国专利 No.5,614,192 (Vandenbark) 公开了利用含有 15-30 个氨基酸，且包含至少一部分 CDR2 的免疫原性 TCR 肽治疗自身免疫病的方法。美国专利 No.6,303,314 (Zhang) 公开了利用某些免疫原性 TCR 肽，并结合免疫原性 T 细胞活化标记肽治疗自身免疫病的方法。

通过测定在自身免疫病，诸如 MS 患者的自身反应性 TCR 中发现了哪些共有基序，便可改进 TCR 肽的接种。这些共有基序既可作为肽疫苗的基础，为减少具有包含上述基序的 TCR 的 T 细胞而活化 MS 患者体内的抗独特型免疫应答，也可作为制备特定抗体所用的目标物，该抗体可发挥阻断功能或直接减少具有包含上述基序的 TCR 的 T 细胞。

因此，确定在自身免疫病患者来源的自身反应性 T 细胞的 TCR 中被特异性发现的共有基序的氨基酸序列是人们所希望的。能够方便地通过常规方法，诸如 PCR 检测患者样品中的上述基序也是人们所希望的。另外，利用与检测的基序一致或由其衍生的肽治疗自身免疫病患者也是人们所希望的。利用可特异性结合上述基序从而治疗自身免疫病患者的抗体也是人们所希望的。

美国专利 No.6,303,314 (Zhang) 公开了在一个 V β 13.1 T 细胞亚型的 TCR 中发现的一个共有基序，“LGRAGLTY 基序”，其氨基酸序列为 Leu Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (SEQ ID NO:10)，以及通过

PCR 迅速检测该基序的方法。在可识别 MBP 的氨基酸 83-99（下文参见“MBP83-99”）的若干自身反应性 T 细胞的若干 TCR 中也发现了该基序。基于该 LGRAGLTY 基序的肽可被用于接种若干患者，以治疗或预防与 V β 13.1-LGRAGLTY 相关的自身免疫病（如 MS）。

- 5 由于 LGRAGLTY 基序仅存在于某些可识别 MBP83-99 的 TCR 中，因此人们仍然需要鉴定其它 TCR 序列，更具体而言是通常由 MBP 反应性 T 细胞表达的 CDR 序列。另外，人们还需要检测其它 TCR 序列，包括通常由 MBP 反应性 T 细胞表达的 CDR 序列的方法。最后，人们还需要开发针对与其它 TCR 序列，更具体而言是与 CDR 序列相
10 关的自身免疫病的疗法。

发明详述

为帮助理解本发明，下文定义了若干术语。

- “PCR”指聚合酶链反应，例如，美国专利 No.4,683,202（1987
15 年 7 月 28 日授予 Mullis 专利权）所一般性描述的 PCR 方法，将其引入在此作为参考。PCR 是一种扩增技术，其中所选寡核苷酸或引物均可在聚合剂（如 DNA 或 RNA 聚合酶）和核苷三磷酸的存在条件下与核酸模板杂交，从而可以由该引物形成延伸产物。随后，可将上述产物变性，并作为循环反应中的模板，扩增现有核酸的数和量，而该现有核酸可能有助于对上述产物的后续检测。本领域已知多种 PCR 技
20 术，可与此处所公开的内容结合应用。

“肽”指可激发针对特定肽或多肽序列的免疫应答的肽，而无论其是天然、合成还是修饰形式。

- “引物”指可充当核苷酸合成的一个起点，并与模板分子的特定
25 核苷酸序列充分互补的寡核苷酸，而无论其是天然、合成还是修饰形式。

“探针”指可与充分互补核苷酸序列特异性结合的寡核苷酸，而无论其是天然、合成还是修饰形式。

- 在核苷酸序列情况中的“衍生自”指核苷酸序列不限于所述特定
30 序列，还包括上述序列中的变异，该变异可能包括某种程度的核苷酸添加、缺失、替代或修饰，其变异程度仍将使所述序列的变异保留与所述序列的互补链特异性结合的能力。在肽或多肽序列情况中的“衍

生自”指肽或多肽不限于所述特定序列，还包括上述序列中的变异，该变异可能包括某种程度的氨基酸添加、缺失、替代或修饰，其变异程度仍将使所述序列中的变异保留激发对所述序列的免疫应答的能力。

- 5 “免疫原性”被用于描述肽或多肽时，指肽或多肽可诱导免疫应答，或者是 T 细胞介导，或者通过抗体，或二者均存在。“抗原性”指肽或多肽可以游离形式被抗体识别，和/或在 MHC 分子环境中被抗原特异性 T 细胞识别。

- 10 “免疫相关疾病”指病理涉及免疫系统的疾病。免疫相关疾病的亚型是自身免疫病。自身免疫病包括但不限于，类风湿关节炎、重症肌无力、多发性硬化、系统性红斑性狼疮、自身免疫性甲状腺炎（桥本氏甲状腺炎）、突眼性甲状腺肿、炎性肠病、自身免疫葡萄膜视网膜炎、多肌炎和某些类型的糖尿病。根据本公开内容，本领域技术人员可容易地理解其它通过本发明的组合物和方法可治疗的自身免疫病。

15 “T 细胞介导的疾病”指 T 细胞识别正常存在于生物体内的肽而导致的疾病。

- “疗法”或“治疗”当涉及保护动物不受疾病侵袭时，指预防、抑制、阻抑或完全消除疾病。预防疾病包括在疾病发作前对动物施用本公开的组合物。抑制疾病包括在疾病被诱发后，但在出现临床表现前对动物施用本公开的组合物。阻抑疾病包括在疾病出现临床表现后对动物施用本发明合成物。

- 第一个方面中，本发明涉及长度大约为 4-20 个氨基酸的肽，该肽包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列中的至少 4 个连续氨基酸。该肽的长度也可大约为 4-12 个氨基酸，包含 (i) SEQ ID NO:4 或 6 或由其衍生的序列中的 4、5、6 或 7 个连续氨基酸，(ii) SEQ ID NO:5 或由其衍生的序列中的 4、5、6、7 或 8 个连续氨基酸。本发明肽的长度也可大约为 4-20 个氨基酸，包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。本发明肽可以是天然、合成或衍生的。

- 30 可将本发明肽作为抗原，激发针对包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列的肽或多肽的免疫应答。如下文更详细描述，可将该肽激发的免疫应答作为治疗、生成抗体、抗体纯化和诊断分析的基础。

通过多种本领域技术人员已知的方法均可共价修饰本发明肽。利用常见衍生化试剂便可修饰该肽的特定侧链或末端残基。

半胱氨酸残基可与 α -卤乙酸盐（和相应的胺），如氯乙酸或氯乙酰胺反应，从而获得羧甲基或羧基酰胺甲基衍生物。通过与溴代三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙酸、氯乙酰基磷酸、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基-2-吡啶基二硫化物、p-氯汞基苯甲酸酯、2-氯汞基-4-硝基酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑反应也可对半胱氨酸残基衍生化。

组氨酸残基可通过与 pH5.5-7.0 的组氨酸特异性试剂二乙基焦碳酸酯的反应而衍生化。对-溴苯酰基溴化物也可应用在 pH6.0、0.1M 二甲胂酸钠中。

赖氨酸和氨基末端残基可与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。采用这些试剂进行的衍生化可能具有逆转赖氨酸残基电荷的作用。用于使含 α -氨基残基衍生化的其它试剂包括亚氨酸酯，如皮考啉基亚氨酸酯；吡哆醛磷酸酯；吡哆醛；氯硼氢化物；三硝基苯磺酸；O-甲基异脲；2,4-戊二酮；和与乙醛酸进行的氨基转移酶催化反应。

精氨酸残基可通过与一种或多种常规试剂，包括苯甲酰甲醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和水合茚三酮反应而得以修饰。胍官能团的高 pK_a 值使精氨酸残基的衍生化可在碱性条件下进行。此外，上述试剂均可与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ -氨基反应。

酪氨酸残基可与芳香重氮化合物或四硝基甲烷反应。N-acetylimidizol 和四硝基甲烷可被分别用于形成 O-乙酰基酪氨酸类型和 3-硝基衍生物。利用 ^{125}I 或 ^{131}I 可碘化酪氨酸残基，从而制备出可应用于放射免疫测定的标记蛋白质。

天冬氨酸和谷氨酸的羧基侧基可通过与碳二亚胺 ($\text{R}'\text{-N-C-N-R}'$)，如 1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基))碳二亚胺或 1-乙基-3(4-氮杂-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺反应而得以修饰。此外，通过与铵离子反应，可将天冬氨酸和谷氨酸残基转化为天冬氨酸酰胺和谷氨酸酰胺残基。谷氨酸酰胺和天冬氨酸酰胺可脱去酰胺，形成相应的谷氨酸和天冬氨酸残基。可选地，上述残基可在适度酸性条件下脱去酰胺。

采用双官能试剂对本发明肽进行的衍生化有助于该肽与水不溶性载体基质或其它大分子载体的交联。常用交联剂包括但不限于 1,1-

双(重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羧基琥珀酰亚胺酯、具有 4-叠氮水杨酸的酯、高双官能酰亚氨酸酯,包括二琥珀酰亚胺酯,如 3,3'-二硫双(琥珀酰亚氨基丙酸酯),和双官能马来酰亚胺,如双-N-马来酰亚氨基-1,8-辛烷。衍生化试剂如甲基-3-[(p-叠氮苯基)二硫]丙酸酰亚胺酯可产生在光存在条件下能够交联的光活化中间产物。可选地,反应性水不溶性基质,如溴化氰活化的碳水化合物和美国专利 No.3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537 和 4,330,440 描述的反应性底物均可应用于蛋白质固定。

通过脯氨酸和赖氨酸残基的羟基化、丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链 α 氨基的甲基化 (T.E.Creighton, *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W.H.Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983))、N 末端胺的乙酰化和某些情况中 C 末端羧基的酰胺化,也可修饰本发明肽。

本发明肽的衍生化可提高该肽的溶解度、吸收、生物半衰期等特性。根据被引入在此作为参考的 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980) 所公开的内容,衍生化也可消除或削弱本发明肽和类似物的任何不良副作用。本发明肽的化学修饰在某些情况下可提供其它优越性,如提高该肽的稳定性,延长其循环时间,并提高免疫原性。有关肽化学衍生化的更多信息可参见被整体引入在此的美国专利 No.6,350,730 (Friedman)。

本发明肽的免疫原性可通过下列途径得以增强,即将该肽包括在更长的肽或多肽中,或利用标准连接技术,使该肽偶联至“免疫”载体,诸如 KLH、血清白蛋白、破伤风类毒素等载体。这些方法均是本领域已知的,例如,利用凝聚剂,如二环己基碳二亚胺或利用连接体,诸如可通过商业渠道获自 Pierce Chemical Co., Rockford, III 的那些连接体。

本发明肽也可被配制用于动脉内、腹膜内、肌内、皮下、静脉内、口、鼻、直肠、颊、脑池内、鞘内、舌下、肺部、局部、经皮或其它给药途径。

本发明肽也可被用于活化具有特定 TCR 的 T 细胞,该 TCR 可与包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列的肽或多肽特异性结合。

利用本领域已知多种方法中的任意一种均可从自身免疫病患者体内获得 T 细胞。该 T 细胞也可用于富集特定亚群，如自身反应性 T 细胞。随后，可采用本发明肽体外刺激已分离的 T 细胞，该操作可活化具有特定 TCR 的 T 细胞和/或扩充其数量，其中 TCR 可与包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 或其衍生的序列的肽或多肽特异性结合。随后，可对 T 细胞所来源的患者施用已活化和/或已扩充的 T 细胞，使其与具有特定 TCR 的自身反应性 T 细胞结合，其中该 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 或其衍生的序列，从而减少上述自身反应性 T 细胞。

第二个方面中，本发明针对可与包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或其衍生的序列的表位特异性结合的抗体。该抗体可能属于 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE 及其片段和衍生物，包括 Fab、F(ab')₂、Fd 和单链抗体 (scFv)。该抗体可能是单克隆抗体、多克隆抗体、亲和纯化抗体或以上抗体的混合物，这些抗体均对包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或其衍生的序列的表位表现出充分结合特异性。如上文本发明的第一个方面所描述，通过附着本领域已知的一种或多种化学物质、肽或多肽部分，可将本发明抗体衍生化。

利用本领域已知的技术，如被整体引入在此的美国专利 No.5,565,332 (Hoogenboom 等人)、5,858,657 (Winter 等人)、5,871,907 (Winter 等人)、5,969,108 (McCafferty 等人) 和 6,172,197 (McCafferty 等人) 所描述的噬菌体展示，可鉴定并分离本发明抗体。本发明抗体也可分离自哺乳动物，包括但不限于经由特定抗原免疫过的小鼠、大鼠、山羊、兔、绵羊、猪或牛，其中该抗原可激发针对 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或其衍生的序列的免疫应答。如被整体引入在此的美国专利 No.5,565,332 (Hoogenboom 等人)、5,858,657 (Winter 等人)、5,871,907 (Winter 等人)、5,969,108 (McCafferty 等人) 和 6,172,197 (McCafferty 等人) 所描述的内容，本发明抗体也可以是人类抗体或人源化抗体。

如下文更详细描述，本发明抗体可作为治疗或诊断分析的基础。也可将其用于富集或纯化具有特定 TCR 的自身反应性 T 细胞，其中该 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或其衍生的序列。根据被整体引入在此、共同未决的美国专利申请 No.09/952,532 (Zhang)，具有特定 TCR 的富集或已纯化自身反应性 T 细胞可被应用在用于自身

免疫病患者的 T 细胞疫苗中，其中该 TCR 包含了 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列。

第三个方面中，本发明涉及编码特定肽或多肽的寡核苷酸，该肽或多肽包括本发明第一个方面的肽或其片段。该寡核苷酸的长度大约为 15-30 个核苷酸，包含编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 的片段的至少 10 个连续核苷酸或其互补核苷酸序列或由其衍生的序列。该寡核苷酸的长度也可大约为 15-30 个核苷酸，包含 (i) 编码 SEQ ID NO:4 或 6 的片段的 11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续核苷酸或其互补核苷酸序列或由其衍生的序列，(ii) 编码 SEQ ID NO:5 的片段的 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 或 26 个连续核苷酸或其互补核苷酸序列或由其衍生的序列。该寡核苷酸的长度也可大约为 15-30 个核苷酸，包括编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 的核苷酸序列或其互补核苷酸序列或由其衍生的序列。

由于遗传密码的简并性，大量核苷酸序列均可编码本发明第一个方面的肽。例如，长度大约为 15-30 个核苷酸，包含 SEQ ID NO:1、2 或 3 中至少 10 个连续核苷酸或其互补序列或由其衍生的序列的寡核苷酸。该寡核苷酸的长度也可大约为 15-30 个核苷酸，包含 (i) SEQ ID NO:1 或 3 中的 11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续核苷酸或其互补核苷酸序列或由其衍生的序列，(ii) SEQ ID NO:2 中的 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 或 26 个连续核苷酸或其互补序列或由其衍生的序列。该寡核苷酸的长度也可大约为 15-30 个核苷酸，包含 SEQ ID NO:1、2 或 3 的一个核苷酸序列或其互补序列或由其衍生的序列。

如下文更详细描述，上述寡核苷酸可作为引物应用在 PCR 中。也可作为探针用于结合并检测 TCR 基因或其片段，包括互补核苷酸序列或其衍生核苷酸序列。该寡核苷酸也可标记有可检测部分。可检测部分的诸多实例是本领域已知的，包括但不限于 ^{32}P 、 ^{35}S 、生物素或洋地黄毒苷。

第四个方面中，本发明涉及引物对，所包括的第一引物即本发明第三个方面的寡核苷酸，第二引物即长度大约为 15 和 30 个核苷酸，且不包含第一引物序列的寡核苷酸，也是 T 细胞中 TCR 基因 V β -C β 区的一个片段或由其衍生的序列，其中第一和第二引物与 TCR 基因的

不同链特异性结合。第二引物可与 C β 区的一个序列互补，从而存在一个大约 400bp 长，且包括 TCR 基因 V β -D β -J β 区的序列，将第一与第二引物分隔开。

如下文更详细描述，上述引物对可被用于扩增编码人类 T 细胞来源 TCR 的核苷酸序列，该 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。

第五个方面中，利用本发明第二个方面的抗体进行免疫测定，可检测样品中包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列的 TCR。术语“免疫测定”包括本领域技术人员熟知的同时夹心、正向夹心和反向夹心免疫测定。

待检验其中是否存在包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列的 TCR 的样品可直接或间接地分离自表达 T 细胞受体 β 链基因的任何动物或人体组织，如外周血单核细胞 (PBMC)。

第六个方面中，通过扩增包含目标序列的 TCR 基因的片段，可检测样品中包含了特定核苷酸序列的 TCR 基因，该特定核苷酸序列编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 或其衍生的序列 (“目标序列”)，其中该扩增采用本发明第四个方面的引物对进行。

通过利用本领域已知的任何特定 PCR 技术或设备，进行聚合酶链反应 (PCR)，可扩增包含了目标序列的 TCR 基因的片段，该目标序列编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 或其衍生的序列。例如，PCR 扩增可按照下述操作进行，其中制备的反应混合物含有下列成分：5 μ L 10xPCR 缓冲液 II (100mM Tris-HCl, pH8.3、500mM KCl)、3 μ L 25mM MgCl₂、1 μ L 10mM dNTP 混合物、0.3 μ L Taq 聚合酶 (5U/ μ L) (AmpliTaq Gold, Perkin Elmer, Norwalk, Conn.)、30pmol 第一引物、30pmol 第二引物和 1 μ L 样品 DNA。上述聚合酶在至少 95 $^{\circ}$ C 的温度条件下均稳定，持续合成能力为 50-60，延伸率为每分钟延伸超过 50 个核苷酸。

该 PCR 反应可按照下述方案进行，即 95 $^{\circ}$ C 1 分钟 (变性)、56 $^{\circ}$ C 20 秒 (退火) 和 72 $^{\circ}$ C 40 秒 (延伸)，共 40 个循环。第一个循环开始之前，反应混合物可经历一次大约 5-15 分钟的初始变性。同样，最后一个循环结束后，反应混合物可经历一次大约 5-10 分钟的最终延伸。某些 PCR 反应可能进行少则 15-20 个循环，多则 50 个循环。根据特定 PCR 反应，针对扩增方案的每一步骤可采用较长或较短的温育时

间和较高或较低的温度。

待检验其中是否存在包含目标序列的 TCR 基因的样品可以是核酸，如基因组 DNA、cDNA、PCR 预先扩增的 DNA 或其它任何形式的 DNA。该样品可直接或间接地分离自表达 T 细胞受体 β 链基因的任何动物或人体组织，如外周血单核细胞 (PBMC)。基因组 DNA 可直接分离自表达 T 细胞受体 β 链基因的组织。cDNA 可间接地通过 mRNA 的逆转录而得以分离，而 mRNA 则直接分离自表达 T 细胞受体 β 链基因的组织。

通过两步 PCR 反应扩增基因组 DNA、cDNA 或其它任何形式的 DNA，间接分离样品 DNA，可增强检测是否存在 T 细胞受体基因的能力，该 T 细胞受体基因包含编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 的核苷酸序列或由其衍生的序列。例如，可进行第一 PCR 扩增反应，以扩增大于和包含特定片段的初级片段，其中第一和第二引物可选择性地结合在该特定片段的相对链上。以上述初级片段为模板，并利用上述第一和第二引物，进行第二 PCR 扩增反应，以扩增包含目标序列的片段。如果在第一 PCR 反应中采用上述第一或第二引物扩增初级片段，则第二 PCR 反应为“半嵌套式”。如果在第一 PCR 反应中未采用上述第一或第二引物以扩增初级片段，则第二 PCR 反应为“嵌套式”。

在典型的两步 PCR 反应中，通过采用可退火至 TCR 基因 V β 区的第一初级引物和可退火至 TCR 基因 C β 区的第二初级引物，进行第一 PCR 反应，以扩增从 V β 经由 V β -D β -J β 连接延伸至 C β 的初级片段，随后进行可为嵌套式或半嵌套式的第二 PCR 反应，便可扩增包含了特定核苷酸序列的 PCR 基因片段，该核苷酸序列编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列。根据本公开内容，技术人员可选择 T 细胞来源 TCR 基因片段的 PCR 扩增合适的引物和反应条件，其中 TCR 基因片段包含编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列的核苷酸序列。

对包含特定核苷酸序列的 TCR 基因片段的扩增结束后，可通过若干操作步骤检测其扩增产物，该特定核苷酸序列编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列。例如，可将等分试样的扩增产物上样在电泳凝胶上，施加电场以根据尺寸分离 DNA 分子。另一种方法中，可将等分试样的扩增产物上样在经由 SYBR 绿、溴化乙锭或其它可结合 DNA 的分子染色，并发射可检测信号的凝胶上。干凝胶可含有本发明第三

个方面的标记寡核苷酸，由此可通过将凝胶曝光于胶片获取放射自显影。

本发明的第七个方面中，检验试剂盒包括本发明第二个方面的抗体。该检验试剂盒可被用于分析样品是否存在包含 SEQ ID NO:4、5
5 或 6 的序列或由其衍生的序列的 TCR 或其衍生物。

该检验试剂盒也可包括一种或多种可与自身反应性 T 细胞上 TCR 的表位特异性结合的其它抗体。可特异性结合上述一种或多种其它抗体的 TCR 可包含或不包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。由于 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列仅存在于某些 TCR 中，因此，利用可与其它 TCR 序列，更具体而言与其它 CDR
10 序列结合的抗体可能是有利的。

该检验试剂盒也可进一步包括一种或多种可用于检测 TCR 或其衍生物的试剂，该 TCR 或其衍生物均包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。该试剂可以是缓冲剂、阳性对照、阴性对照或上述物质的组合。阳性对照可以是包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列的肽或多肽序列。阴性对照可以是包含特定序列的肽或多肽序列，该特定序列不包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。
15

本发明的第八个方面中，检验试剂盒包括第一引物，即本发明第三个方面的寡核苷酸。该检验试剂盒也可包含第一和第二引物，即本发明第四个方面的引物对。
20

本发明的检验试剂盒也可进一步包括一种或多种试剂，该试剂可被用于扩增包含特定核苷酸序列的 TCR 基因的片段，该特定核苷酸序列编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列。该试剂可以是缓冲剂、脱氧核苷三磷酸、热稳定 DNA 聚合酶、阳性对照、阴性对照或以上物质的组合。热稳定 DNA 聚合酶可以是 Taq 聚合酶。阳性对照可以是核苷酸序列，包括编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列的核苷酸序列。阴性对照可以是核苷酸序列，但不包括编码 SEQ ID NO:4、5 或 6 或由其衍生的序列的核苷酸序列。本发明检验试剂盒也可包括本
25 发明第三个方面所描述的标记寡核苷酸。可被包括在该检验试剂盒中的其它试剂是本领域技术人员已知的。

第九个方面中，通过获得来源于患者的样品，测定该样品是否存

在具有特定 TCR 的自身反应性 T 细胞,便可诊断自身免疫病患者,该特定 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。上述样品可被用于富集 T 细胞、自身反应性 T 细胞或自身反应性 MBP83-99T 细胞。上述自身免疫病可以是任何自身免疫病,其中被发现位于 T 细胞上的 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的肽序列或由其衍生的序列。

通过将具有特定 TCR 的 T 细胞水平与对照组来源的上述 T 细胞水平进行比较,可诊断上述自身免疫病,该特定 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。T 细胞水平可通过在本发明第五个方面的免疫测定中,检测是否存在包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列的 TCR 而得以确定。也可通过采用本发明第六个方面描述的方式进行 PCR,检测是否存在编码特定序列的核酸以确定上述 T 细胞水平,该特定序列包括 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。

第十个方面中,通过施用包含了免疫原性有效量本发明第一个方面的肽的疫苗,可治疗某些患者的自身免疫病,其中这些患者携带了具有特定 TCR 的自身反应性 T 细胞,该特定 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。施用疫苗可导致免疫应答,其中患者可能出现抗体,施用疫苗也可诱导特定 T 细胞应答,该应答可识别并结合包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列的 TCR,施用疫苗还可减少上述自身反应性 T 细胞。

本发明疫苗可仅包含肽,或结合免疫原性有效量的其它 TCR 肽序列,尤其是其它 CDR 序列。临床研究表明接受自身 T 细胞接种的自身免疫患者对 MBP-反应性 T 细胞的免疫性可显示逐渐下降。某些情况中,再次出现的自身反应性 T 细胞可来源于不同克隆群体,说明 MBP 反应性 T 细胞可能经历着与进行性疾病过程潜在相关的克隆转变或表位扩散。克隆转变或表位扩散可能是自身反应性 T 细胞介导的免疫病中的难题。包含多抗原肽的疫苗可避免克隆转变或表位扩散的难题,其中该多抗原肽可诱导针对多个群体的自身反应性 T 细胞上 TCR 的免疫应答。

由于包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列,以及其它 TCR 序列,尤其是 CDR 序列的 TCR 可存在于自身免疫病患者和并未患该病的正常个体体内,因此可将包含特定肽或肽组合的疫苗施用

于自身免疫病患者和正常个体，上述特定肽和肽组合能够激发针对 TCR，尤其是 CDR，最为尤其是 CDR3 上表位的免疫应答。其它肽序列可包括美国专利 No.5,614,192 (Vandenbark) 所公开的 LGRAGLTY 基序 (SEQ ID NO:7) 和 CDR 序列。

- 5 本发明疫苗可进一步包括 T 细胞活化标记肽。该 T 细胞活化标记肽可以是美国专利 No.6,303,314 (Zhang) 所描述的标记肽，将其引入在此作为参考。本发明疫苗也可进一步包括一种或多种可增强针对免疫原的免疫应答的试剂。该试剂可以是缓冲剂、佐剂或二者的组合。佐剂可以是美国专利 No.5,980,912 (Podolski) 所公开的基于脱乙酰壳多糖的佐剂，将其整体引入在此作为参考。
- 10

第十一个方面中，通过施用包含本发明第二个方面的抗体的组合物，可治疗某些具有特定 TCR 的患者的自身免疫病，该特定 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列。施用本发明组合物可使包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列的 TCR 减少。

- 15 本发明组合物可仅包括抗体，或者组合了可与其它 TCR 序列，尤其是其它 CDR 序列特异性结合的其它抗体。如上所述，自身免疫病的进展可包括自身反应性 T 细胞的克隆转变或表位扩散。包含多种抗体，其中各抗体可与多个群体自身反应性 T 细胞上的 TCR，尤其是 CDR 的不同表位特异性结合的组合物可避免克隆转变或表位扩散的难题。

- 20 由于包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列，以及其它 TCR 序列，尤其是 CDR 序列的 TCR 可存在于自身免疫病患者和并未患该病的正常个体体内，因此可将包含特定抗体或抗体组合的组合物施用于自身免疫病患者和正常个体，上述特定抗体和抗体组合可与 TCR，尤其是 CDR，最为尤其是 CDR3 上的表位特异性结合。

- 25 本发明的第十二个方面中，根据本发明的第六个方面，检测自身免疫病患者来源的样品中是否存在包含 SEQ ID NO:1、2 或 3 的序列或由其衍生的序列的 TCR 基因，并对包含 SEQ ID NO:1、2 或 3 的序列或由其衍生的序列的 TCR 基因进行定量，便可监控自身免疫病。

- 30 自身免疫病症状的严重程度可能与通过自身反应性 T 细胞的数量所检测到样品中的 DNA 量相关。另外，可将样品中检测到的 DNA 量的增加作为指标，应用于旨在使症状的严重程度最小化和/或在症状出现之前治疗疾病的治疗中。

本发明的第十三个方面中，根据本发明的第七个方面，检测自身免疫病患者来源的样品中是否存在 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列的 TCR，并对包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的序列或由其衍生的序列的 TCR 进行定量，便可监控自身免疫病。

- 5 自身免疫病症状的严重程度可能与通过自身反应性 T 细胞的数量所检测到样品中的肽或多肽量相关。另外，可将样品中检测到的肽或多肽量的增加作为指标，应用于旨在使症状的严重程度最小化和/或在症状出现之前治疗疾病的治疗中。

- 第十四个方面中，本发明涉及药物组合物，如本发明第十个方面
10 所描述的疫苗和第十一个方面所描述的抗体的制造。该药物组合物可利用本领域熟知的方法生产。

- 应用诊断和治疗方面的公认原理，技术人员可制备出在疾病或失调的治疗中可作为临床前和临床治疗的药物组合物。上述原理是本领域已知的，并在例如 Braunwald et al., eds., *Harrison's Principles of*
15 *Internal Medicine*, 11th Ed., McGraw-Hill, publisher, New York, N.Y. (1987) 中得以阐明，将其引入在此作为参考。本发明药物组合物可被施用于可能体验到该组合物的有利效果的任何动物。接受该药物组合物的动物可以是人类或其它哺乳动物。

- 本发明药物组合物可通过任何可实现其预期目的方式施用。例
20 如，可通过肠胃外、皮下、静脉内、皮内、肌内、腹膜内、经皮或颊的途径施用。可选或同时通过口服途径施用。本发明药物组合物可通过快速浓注或随时间逐渐灌注而肠胃外施用。

- 施用剂量取决于受体的年龄、性别、健康情况和体重，合并治疗的种类，若有的话，还取决于治疗频率和所期望效果的性质。该药物
25 组合物的施用剂量范围可大至足以产生预期效果，由此，例如实现可通过 DH 或抗体产量测定的针对本发明肽的免疫应答，并显著预防、抑制或治疗该自身免疫病。该剂量不可过大以致引起有害的副作用，如不需要的交叉反应、全身性免疫抑制、过敏反应等。对人类而言，该剂量范围可为大约 0.001-25mg/kg 体重。

- 30 该药物组合物可进一步包括合适的药物可接受载体，包括有助于将活性化合物加工为可药物应用的制剂的赋形剂和辅助物质。药物组合物的添加剂可包括佐剂的引入，诸如明矾、脱乙酰壳多糖或本领域

已知的其它佐剂（见例如 Warren et al., *Ann. Rev. Immunol.* 4:369-388 (1986)；Chedid, L., *Feder. Proc.* 45:2531-2560 (1986)，将其引入在此作为参考）。利用本领域已知的方法和化合物，可使本发明药物组合物进一步包括脂质体以增强送递或生物活性。

- 5 本发明药物组合物也可以片剂和胶囊形式口服施用。本发明药物组合物也可以栓剂形式直肠施用，和以溶液形式注射或口服导入。

本发明药物组合物可含有大约 0.001%-大约 99%，或大约 0.01%-大约 95%的活性化合物以及赋形剂。合适的赋形剂可以是填料，如糖类，例如乳糖或蔗糖、甘露醇或山梨醇，纤维素制剂和/或磷酸钙，例如磷酸三钙或磷酸氢钙，以及粘合剂，如淀粉糊，采用例如，玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮。

- 10 可口服施用的其它药物制剂包括由明胶制成的推入契合（push-fit）胶囊，以及由明胶和诸如甘油或山梨醇的增塑剂制成的软、密封胶囊。推入契合胶囊可含有颗粒形式的活性化合物，该活性化合物可与诸如乳糖的填料，诸如淀粉的粘合剂和/或诸如滑石或硬脂酸镁的润滑剂，以及任选的稳定剂混合。在软胶囊中，该活性化合物可溶解或悬浮于合适的液体中，诸如脂肪油或液体石蜡。另外，可添加稳定剂。

- 15 可直肠施用的药物制剂包括，例如，由一种或多种活性化合物与栓剂基质的组合构成的栓剂。合适的栓剂基质可以是，例如，天然或合成的甘油三酯或链烷烃。另外，可采用由活性化合物与基质的组合构成的明胶直肠胶囊。可能的基质材料包括，例如液体甘油三酯、聚乙二醇或链烷烃。

- 20 用于肠胃外施用的合适配方包括水溶性形式的肽或抗体的水溶液，例如水溶性盐。另外，可施用适当油性注射悬液形式的肽或抗体的悬液。合适的亲脂溶剂或载体包括脂肪油，例如芝麻油或合成的脂肪酸酯，例如油酸乙酯或甘油三酯。水性注射悬液可含有可提高悬液粘度的物质，包括例如，羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬液也可含有稳定剂。

- 25 30 采用常规药物可接受的肠胃外载体可配制肽和抗体用于注射给药。这些载体可以是无毒并具有疗效的，Remington's Pharmaceutical Sciences（如上）描述了若干制剂。赋形剂的非限制性实例为水、盐、

林格液、右旋糖溶液和 Hank's 平衡盐溶液。药物组合物也可含有较少量的添加剂，如可维持等渗性、生理 pH 和稳定性的物质。

本发明的肽和抗体可被配制成基本上不含凝聚物和其它物质的纯化形式，其浓度包括大约 1.0ng/ml-100mg/ml。

- 5 用于预防、抑制或治疗自身免疫病的肽和抗体的有效剂量范围大约为 1ng-100mg/kg 体重。该剂量范围也可大约为 10ng-10mg/kg。也可大约为 100ng-1mg/kg。

- 10 下述实施例可例证本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解的是，在遵循本发明者所发现代表性技术的实施例中公开的技术在本发明实践中的效果良好，因此可认为这些技术构成了针对其实践的优选模式。不过，本领域技术人员应根据本公开内容理解的是，可以在公开的特定实施方案中做出多种改动，仍然可获得相似或类似的结果，而不偏离本发明的精神和范畴。

15 实施例 1

MS 患者中所鉴定的 T 细胞受体 V β -D β -J β DNA 序列

- 20 从 Genbank 中挑选出 MBP 反应性 T 细胞的一组 20 个 CDR3 序列，其中该 MBP 反应性 T 细胞可识别 MBP 的 83-99 免疫显性表位。为确定 20 个序列中是否有若干序列被共同表达，基于被整体引入在此的美国专利 No.6,303,314 (Zhang) 所描述的 RT-PCR 检测方法，利用
- 两步 RT-PCR 和引物筛选 40 位 MS 患者和 15 位对照个体来源的外周血淋巴细胞标本。

- 25 简言之，利用 RNeasy 微型试剂盒 (Qiagen, Santa Clarita, CA) 从 MS 患者来源的 T 细胞中提取总 RNA。采用 V β 家族特异性引物和 C β 引物，对逆转录自总 RNA 的第一链 cDNA 进行第一个循环的 PCR 扩增，随后采用 V β -D β -J β 引物和 C β 引物，对其进行第二个循环的嵌套或半嵌套 PCR。在 1% 琼脂糖凝胶中电泳分离扩增的 PCR 产物，并利用真空印迹 (Bio-Rad, Hercules, CA) 以 5mHg 运行 90 分钟，将扩增产物转移至带正电荷的尼龙膜 (Boehringer Mannheim,
- 30 Indianapolis, IN) 上。通过暴露于 UV3 分钟而交联，将 DNA 固定在膜上，并于 68℃ 预杂交至少 1 小时。在预杂交溶液 (5xSSC、1% 封闭溶液、0.1% N-月桂酰肌氨酸、0.02% SDS) 中加入 0.1mg/ml 聚腺苷酸，

以减少探针与非目标 DNA 的非特异性结合。根据不同 CDR3-特异性探针优化杂交温度和洗涤条件，以确保严格性杂交条件。杂交在含有下列组分的缓冲液中进行，即 5xSSC、1%封闭溶液、0.1%N-月桂酰肌氨酸、0.02%SDS 和 0.3pmol/ml 特异于编码 CDR3 区的核苷酸序列的洋地黄毒苷标记探针。

DNA 杂交产物的检测是利用 Digoxigenin Luminescent Detection Kit®（洋地黄毒苷发光检测试剂盒）（Boehringer Mannheim，Indianapolis，IN），并根据生产商的说明书进行。随后室温下将膜曝光于 X 射线胶片 15-30 分钟。

在 20 个受检序列中，有 3 个 CDR3 编码的序列被检测出 MS 衍生标本的百分比高于对照标本。表 1 列出了包含上述三个已检测 CDR3-编码序列中每个序列的 TCR 基因的 Genbank 编号，以及与该序列的 CDR3 区的核苷酸和氨基酸序列。表 2 列出了 MS 衍生和对照 PBL 标本中 CDR3 编码序列的阳性检测的总百分比。

15

表 1-特异于 MBP83-99 的 CDR3 序列

Genbank编号	V基因	CDR3序列
MS2002-DH (SEQ ID NO: 7)	BV17	gcc agt agt act gac tgg agc (SEQ ID NO:1) A S S T D W S (SEQ ID NO:4)
MS2002-18 (SEQ ID NO: 8)	BV5.2	agc agc ttg agg ggg ggc cta aac att (SEQ ID NO:2) S S L R G A L N I (SEQ ID NO:5)
MSFRANSI E3 (SEQ ID NO: 9)	BV9	agc agc caa gat cgt ttt tgg (SEQ ID NO:3) A S Q D R F W (SEQ ID NO:6)

表 2-CDR3 DNA 的阳性检测的百分比

20

Genbank编号	MS患者中的%	对照的%
MS2002-DH	57.5%	33%
MS2002-18	50%	6.7%
MSFRANSI E3	80%	20%

表 2 中的结果令人惊讶，因为大量研究并不支持优先采用特定 Vβ-Dβ-Jβ 基因产物。例如，仅在某些个体中发现了美国专利 No.6,303,314（Zhang）描述的 LGARAGLT Y 基序。相反，MBP 自身反应性 T 细胞克隆则典型地显示出在个体中相对受限的 Vβ-Dβ-Jβ 基因使用的异质模式。本领域内通常认为 Vβ-Dβ-Jβ 基因使用的异质性将显著削弱采用基于肽疫苗的方法在治疗上消除致病自身反应性 T 细胞的

25

可行性。此处的结果第一次说明基于一种或多种肽的疫苗可以在消除致病自身反应性 T 细胞方面证实其效果。

实施例 2

抗 MBP-反应性 T 细胞受体单克隆抗体的制备

- 5 制备可产生抗 MBP 反应性 T 细胞受体单克隆抗体的杂交细胞系的操作包括, BALB/c 小鼠骨髓瘤细胞与采用特异性 MBP 反应性 T 细胞受体蛋白来源的肽基序所引发的 BALB/c 小鼠脾细胞融合。

1. 融合所用脾细胞的制备

- 10 特异性 MBP 反应性 T 细胞受体来源的肽基序可分离自纯化的重组 T 细胞受体, 或通过肽合成方法获得。纯化该肽基序, 使其纯度大于 95%, 将约 30ug 乳化于弗氏完全佐剂中, 通过皮下施用以免疫成年 BALB/c 或 C57B46 雄性小鼠。2 周后进一步皮下接种乳化于不完全佐剂中的肽基序, 再次免疫小鼠。继续 2-6 周后, 静脉内施用 20-40ug 的肽基序, 并于 2-4 天后处死小鼠, 并以 Gefter, et al., Somatic Cell
15 Genetics 3:231, 1977 中所描述的方式制备脾细胞悬液。将红细胞温育在 40℃ 的 NH_4Cl (0.83%) 中 15 分钟, 使其裂解。通过离心 (800xg), 并采用热灭活小牛血清洗涤如上所获的细胞悬液, 随后在无蛋白培养基 (RRMI 1640, 由 7.5mM HEPES, pH7.2 缓冲) 中离心。

2. 融合所用骨髓瘤细胞的制备

- 20 骨髓瘤细胞来源于 P3U1 系, 并如 Yelton, et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81:1-7 (1978) 所述在 HPRT (E.C2.4.2.8) 中缺乏, 将其维持在含有 10% 胎牛和 15% 马血清的 Eagle's 极限必需培养基 (MEM) 中。骨髓瘤细胞的生长受选择性次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷 (HAT) 培养基抑制。

25 3. 杂交瘤的生成

- 通过将 10^7 个 BALB/c 骨髓瘤细胞与 10^8 个脾细胞混合, 以生成杂交瘤, 其中脾细胞获得自经由肽基序免疫过的 BALB/c 或 C57B1/6 小鼠。800xg 离心细胞混合物, 并将细胞重新悬浮于经由无血清极限必需培养基 (MEM) 稀释过的 50% (w/v) 聚乙二醇 (PEG1000) 溶液中,
30 随后进行如 Gefter 等人 (1977) 描述的操作, 使细胞融合。通过 Galfre 和 Milstein Meth. Enzymol. 73:3, 1975 所描述的有限稀释, 将所获杂交瘤细胞克隆进次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷 (HAT) 中。筛选出可产生识

别本发明肽基序的抗体的杂交瘤细胞系。

4. 对生成 MBP 反应性 T 细胞受体抗体的克隆的检验

采用 50-100 μ g 肽基序或 T 细胞受体蛋白包被 Linbro (Flow Lab) 微量滴定 96 孔培养板, 并于 20 $^{\circ}$ C 温育过夜。采用含有 5% Carnation 速溶奶粉和 0.085 叠氮化钠的 0.1M Tris (pH7.5) --1% nonidet P-40 洗涤三次, 加入 0.05ml 培养上清液, 并于 40 $^{\circ}$ C 温育过夜。采用 RIA 缓冲液洗涤三次后, 弃去上清液, 并利用杂交瘤筛选试剂盒 (Bethesda Research Labs) 检测抗体。通过不加第二抗体或培养上清液将非特异性结合的对照包括在内。

10 目前已完整描述了本发明, 本领域任何一位普通技术人员均应理解的是, 可以在不偏离如下说述本发明精神或范畴的前提下对本发明进行多种改动和改进。

根据本公开内容可制备此处公开并要求保护的所有组合物, 和/或在不进行过多实验的前提下实施此处公开并要求保护的所有方法。虽然从优选实施方案方面已描述了本发明的组合物和方法, 本领域技术人员仍应理解的是, 在不偏离本发明概念、精神和范畴的前提下, 可以对此处描述的组合物和/或方法, 以及方法的步骤或步骤顺序进行改动。更具体而言, 应当理解的是可以将某些与化学和生理学相关的试剂替代此处描述的试剂, 仍然可获得相同或相似的结果。如附件权利要求所定义的内容, 本领域技术人员理解的所有上述相似替代物和改

15 20 进均被认为在本发明精神、范畴和概念内。

实施例 3

用于治疗 MS 患者的有效的基于肽的疫苗的鉴定

对该试验而言的入选标准是临床确定患有 MS 至少两年的患者, 基线扩展的残疾程度评分 (EDSS) 对 RR-MS 而言为 1.5-6.5, 对继发性进展性 MS (SP-MS) 而言则为 4.0-8.0, 并在进入缓解-复发型 MS (RR-MS) 分组研究之前的两年内至少病情恶化一次。该患者在登记该研究之前至少三个月内未服用任何免疫抑制药物, 包括类固醇。如果研究期间出现病情恶化可服用类固醇。不禁止针对疲劳、痉挛和膀胱主诉的症状疗法。患者将被检验是否存在具有特定 TCR 的自身反应性 T 细胞, 其中该 TCR 包含 SEQ ID NO:4、5、6、10 或美国专利 No.5,614,192 (Vandenbark) 所公开的 CDR 序列。

25 30

5 制备的疫苗包含免疫原性有效量的基于肽的抗原，该基于肽的抗原具有包含 SEQ ID NO:4、5、6 或 10 的序列或由其衍生的序列。共检验 15 种疫苗，如下：(i) 四种抗原中任意一种抗原（共计 4 种）；(ii) 四种抗原中任意两种抗原的组合（共计 6 种）；(iii) 四种抗原中任意三种抗原的组合（共计 4 种）；和 (iv) 四种抗原的组合（共计 1 种）。每位患者每隔两个月接受一种受检疫苗的三次皮下注射。

10 随后观察患者一段时间，直至证实残疾、EDSS、复发率和 MRI 病变活性的进展被证实开始。将结果与患者自身治疗前病程以及在 RR-MS 和 SP-MS 患者中进行的两次最近临床试验的安慰剂组相比，将其作为对 MS 自然史的一个评估(Jacobs et al., (1996), European Study Group, 1998)。通过持续至少 2 个月的 EDSS 评分，根据至少 1.0 的增量(Poser et al., 1983)确定至进展的时间。在研究中的病情恶化是通过持续至少 48 小时，并伴随神经学检查的客观变化(EDSS 评分至少恶化 0.5 分)的新神经症状的出现或预先存在的神经症状的恶化而定义。指示患者在定期的两次常规检查之间汇报情况，如果症状显示病情恶化，便由神经病学家对其进行检查。安全性评估包括副作用、生命体征和常规检查时的身体检查。采用 Wilcoxon 秩和检验分析基于肽的接种之前和之后，被研究患者体内临床变量的差异。

实施例 4

20 采用基于肽的疫苗对 MS 患者的治疗

将在实施例 3 中被鉴定为可有效延缓 MS 临床症状进展的疫苗施用于 MS 患者。接受疫苗治疗的患者可以是患有持续任意时间的 MS，并可通过任何已知标准诊断的患者。

<110> BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE
OPEXA PHARMACEUTICALS INC.
Zhang, Jingwu

<120> T 细胞受体 CDR3 序列和检测方法

<130> 05627.0007.00PC00

<140> PCT/US2003/017873

<141> 2003-06-05

<150> US 60/386,287

<151> 2002-06-05

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

gccagtagta ctgactggag c

21

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

agcagcttga ggggggcgcct aaacatt

27

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

agcagccaag atcgtttttg g

21

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Ala Ser Ser Thr Asp Trp Ser

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Ser Ser Leu Arg Gly Ala Leu Asn Ile

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Ala Ser Gln Asp Arg Phe Trp

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Leu Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr

1 5