



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 308611

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 K 14/725

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19923778	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.03.29, PCT/US91/02218
(22) Inng. dag	1992.09.29	(85) Videreføringsdag	1992.09.29
(24) Løpedag	1991.03.29	(30) Prioritet	1990.03.30, US, 502559
(41) Alm. tilgj.	1992.11.16		
(45) Meddelet dato	2000.10.02		

(71) Patenthaver	Brigham and Women's Hospital, 75 Francis Street, Boston, MA 02175, US Autoimmune Inc, 1041 Third Avenue, New York, NY 10021, US
(72) Oppfinner	Kai W. Wucherpfenning, Boston, MA, US Howard L. Weiner, Brookline, MA, US David Allen Hafler, West Newton, MA, US
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo

(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt peptid**

(56) **Anførte publikasjoner** WO 8606413
Biddison et al., Res. in Immunology, vol. 140, no. 2, 1989, s. 212-215
Vandenbark et al., Nature, vol. 341, 1989, s. 541-544
Howell et al., Science, vol. 246, 1989, s. 668-670

(57) **Sammendrag** Terapeutiske midler omfattende peptider som omfatter en del av T-celle manifestert i multippel sklerose, er beskrevet. Her inngår peptider, vaksiner, reseptorer og hele (attenuerte) T-celler. Fremgangsmåter for anvendelse av midlene for å undertrykke immunresponsen mot myelinbasisk protein og/eller undertrykke T-celler som gjenkjenner en immundominant epitope av human myelinbasisk protein samt diagnostiske metoder og kit for diagnostiske metoder og kit for diagnostisering av multippel sklerose, er også beskrevet.

Foreliggende søknad er en CIP av PCT internasjonal søknad nr. U.S. 88/02139, inngitt 24. juni 1988.

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt peptid med sekvensen SLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPSQQGKGRGLS og som omfatter den immundominante epitopen DENPVVHFFKNIIVTPRTPP eller sekvensen RPFQGYGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLISKIFKLGGRD og som omfatter den immundominante epitopen FKGVDAQGTLISKIFKLGGRD og som reagerer med T-cellene isolert fra humane multiple sklerose pasienter, 10 kjennetegnet ved at den omfatter:

- (a) syntetisering av nevnte peptid på en fast fase;
- (b) separering av nevnte peptid fra nevnte faste fase;
- (c) rensing av nevnte peptid.

15

Multipel sklerose (MS) er en kronisk betennelsessykdom i "white matter" av sentralnervesystemet til mennesker, og antas å være av autoimmun etiologi. Sykdommen er karakterisert ved betydelige T-celler og makrofaginfiltrater, demyelinering og neurologisk feilfunksjon. Myelinbasisk protein (MBP) er blitt omfattende studert som et potensielt autoantigen i sykdommen, på grunn av at dets rolle som et induserende middel i den viktigste dyremodellen til MS, eksperimentell allergisk encefalomyelitis (EAE), samt gir 20 dets rolle i den humane sykdommen postviral encefalomyelitis. 25

Den viktigste hypotesen med hensyn på patogenesen til MS, er at T-celler som er reaktive med myelinbasisk protein i "white matter" av CNS, initierer den inflammatoriske prosessen. 30 Demonstrering av at aktive T-celler spesifikke for myelinbasisk protein (MBP), kan bli isolert fra MS-pasienter (Allegretta, M., et al., Science: 247: 778, 1990) impliserer MBP-reaktive T-celler i patogenesen av sykdommen.

35 Eksperimentell allergisk encefalomyelitis (EAE) er den viktigste dyremodellen for MS. EAE kan lett bli indusert i små dyr ved immunisering med myelinbasisk protein (MBP) i en

hensiktsmessig adjuvant eller ved passiv overføring av CD4+, MBP-reaktive T-celler (Alvord Jr. E.C., et al. eds. i *Experimental Allergic Encephalomyelitis: A Useful Model for Multiple Sclerosis*, A.R. Liss, N.Y., 1984; Makhtarian, D.E., et al. *Nature* 309: 356, 1984; Ben-Nun, A. et al. *J. Immunol.* 129-303, 1982). T-celler som induserer EAE i både mus og rotter gjenkjenner spesifikt peptider som tilsvarer species-spesifikke immundominante regioner av MBP, presentert på antigenpresenterende celler av unike hovedhistokompatibilitetskompleks (MHC) klasse II molekyler.

T-celle-reseptorene består av to bestemte kjeder av proteinmateriale. Visse T-celle-reseptorer (TCR), bestående av V-beta (VB) kjeder og V-alfa (VA) kjeder, er kjent for å gjenkjenne MBP. I SJL/PL mus, gjenkjenner encefalitogene (dvs. sykdomsinduserende når administrert til mus) T-celler som har disse reseptorene et N-terminalt MBP-peptid fra mus (residie 1-9) presentert av et MHC-molekyl (Zamvil, S.S. et al., *Nature* 324: 258, 1986) som blir kodet av genet H-2 fra mus. De fleste T-celle-reseptorene som gjenkjenner dette peptidet, presentert i sammenheng med MHC, blir kodet av TCR-genene fra mus VB8.2 og VA2 eller VA4. I Lewis-rotter er TCR-gensegmentene som er homologe med VB8.2 og TCR VA2-genene fra mus, blitt funnet i encefalitogene T-celler som gjenkjenner MBP-residiene 68-88 i sammenheng med Lewis-rotte MHC (Burns, F.r., et al., *J.Exp. Med.* 169; 27, 1989). Administrering av et VB8.2-spesifikt monoklonalt antistoff (dvs. et antistoff som gjenkjenner produktet VB8.2 uttrykt av det tilsvarende genet) til mus, er blitt vist å være effektiv når det gjelder behandling av murin EAE. Immunisering med peptider som spesifikt tilsvarer TCR VB8.2 aminosyresekvensen, lindrer EAE i Lewis-rottene (Vanderbark, A.A., et al., *Nature* 341: 541-544, 1989; Howell, M.D. et al., *Science*: 246, 668; 1989). Regionene av et autoantigen (så som MBP) som oppfører seg som immundominante regioner, er species spesifikke. Det er ikke før blitt bestemt om felles V-gen-anvendelse i TCR V-gener eksisterer i mennesker blant T-celler som gjenkjenner

immundominante MBP-regioner, og disse immundominante regionene har heller ikke blitt positivt identifisert i MS-pasientene.

5 Gjeldende behandlinger for MS involverer administrering av medikamenter som virker på en uspesifikk måte, for å undertrykke immunresponsen til individet. Eksempler på slike medikamenter er cyklofosamid, Imuran (azatioprin) og cyklosporin A. Steroidforbindelser så som prednison og
10 metylprednisolon blir også i mange tilfeller anvendt. Disse medikamentene har begrenset effektivitet overfor MS. Anvendelse av slike medikamenter er begrenset av toksisitet og ved det faktum at de induserer "global" immunsuppresjon ved forlenget behandling, dvs. de regulerer ned den normale,
15 beskyttende immunresponsen til patogene mikroorganismer for derved å øke risikoen for infeksjon. En ytterligere ulempe er den økte risikoen for at maligne tilstander vil utvikle i pasienter som mottar forlenget global immunsuppresjon.

20 Andre terapier er blitt utviklet for behandling av autoimmune sykdommer generel, og MS spesielt. U.S. patentsøknad serie nr. 65.794, inngitt 24. juni 1987 (nå falt) og den løpende internasjonale patentsøknaden PCT/US88/02139, inngitt 24.
25 juni 1988, beskriver at oral eller enteral administrering av myelinbasisk protein og sykdomsinduserende og ikke-induserende fragmenter og analoger derav, er effektive for undertrykking av akutt monofasisk EAE og er nyttige for understreking av MS-symptomene når de likeledes blir administrert.

30 U.S. patentsøknad serie nr. 454.806, inngitt 20. desember 1989, beskriver aerosoladministrering av autoantigener, sykdomsundertrykkende fragmenter av nevnte autoantigener og analoger derav, som en effektiv behandling av T-celle-
35 formidlet autoimmune sykdommer så som MS.

En U.S. patentsøknad inngitt 3. mars 1990, med tittel "Enhancement of the Down Regulation of Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens", beskriver synergister (forsterkere) for anvendelse med oral administrering av autoantigener, sykdoms-undertrykkende fragmenter og analoger derav som effektive behandlinger for T-celle-formidlet autoimmune sykdommer.

Med hensyn på forsøk og mål som blir yttrykt i disse tidligere søknadene, dvs. konstruksjon av effektive, spesifikt terapeutiske behandlinger for MS, er det nødvendig innenfor dette fagområdet å bestemme om felles V-gen-anvendelse assosiert med hoved-histokompatibilitets-kompleks-antigener eksisterer i mennesker som lider av MS. Det er med andre ord nødvendig å bestemme om encefalitogene T-celler isolert fra human MS pasienter anvender hemmede TCR VB-gener som observert i gnagere, og om denne funksjonen kan bli anvendt for å overvinne symptomene ved sykdommene. Det er i tillegg nødvendig å bestemme den viktigste immundominante epitopedomenen tilstede på human MBP, ved å utforske alle eller deler av slike domener for terapi.

Peptidet som nevnt over kan være nyttig for administrering til mennesker, for å forhindre eller svekke manifisteringen (dvs. kliniske symptomer) av autoimmune sykdommer med symptomer på MS (en annen hensikt ifølge oppfinnelsen er å tilveiebringe reagenser nyttige for diagnostikk av MS (eller annen sykdom med samme symptomer). (For eksempel TCR-baserte peptider eller peptider basert på den immundominante domenen til human MBP kan utgjøre slike diagnostiske reagenser.)

Figur 1 er en autoradiograf som viser PCR amplifikasjon av cDNA fra 18 T-cellelinjer som ble dannet fra fem MS pasienter og som var reaktive med MBP-residiene 84-102.

35

Figur 2 er en autoradiograf av en Southern blot analyse av

TCR VB og JB gen anvendelse for MBP-reaktive T-cellelinjer dannet fra perifert blod til en MS-pasient.

Figur 3 er en kolonnegraf som viser frekvensen av MBP reaktive T-celler overfor forskjellige humane MBP-peptider isolert fra MS-pasienter og kontroller.

Figur 4 er en serie kolonnegrafer som viser reaktiviteten til T-celler isolert fra MS-pasienter og kontroller overfor forskjellige regioner av det humane MBP-polypeptidet i forhold til om disse pasientene har visse MHC-antigener.

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot analogifremgangsmåte for fremstilling av peptid som omfatter en del av T-celle-reseptoren for et antigen involvert i immunresponsen av den typen som blir manifestert i multippel sklerose.

Alle patentsøknader, patenter og litteratur sitert i denne beskrivelsen, er herved inkorporert i sin helhet som referanse.

Anvendt heri betyr "behandling" både profylaktisk behandling for å forhindre en autoimmun sykdom ved symptomer på MS (eller manifesteringen av kliniske symptomer derav) samt den terapeutiske behandlingen, dvs. undertrykkingen eller en hvilken som helst målbar lindring av en eller flere symptomer etter begynnelsen av en sykdom med symptomer på MS.

Betegnelsen "autoantigen" er definert som en hvilken som helst forbindelse som normalt blir funnet i et pattedyr som i en unormal situasjon ikke lenger blir gjenkjent som en del av selve pattedyret av lymfocytter eller antistoffer til det pattedyret, og som derfor blir angrepet av det immunregulatoriske systemet som om det var en fremmed forbindelse. Eksempler er MBP og proteolipidpeptid (PLP).

"Immundominant epitope" til et autoantigen (så som MBP) betyr en antigen determinant gjenkjent av de fleste (til tross for ikke nødvendigvis alle) T-cellene til en følsom art der slike T-celler vil danne, eller hjelpe med å danne, en immunrespon-
5 s.

"Immundominante regioner" eller "immundominante domener" til et autoantigen (MBP) er definert heri som de regionene av autoantigenet som inneholder en immundominant epitope.
10 Strukturene (og/eller beliggenheten innenfor MBP-molekylet) til immundominante epitoper (og regioner) av MBP, kan variere mellom arter, og er derfor species-spesifikke.

"Autoimmune undertrykkende midler" definert heri som peptider som har aminosyresekvensene til (eller innbefattet i) VB17 og/eller VB12 av T-cellerreseptoren eller analoger derav samt andre midler (så som attenuerte VB17- eller VB12-inneholdende T-celler), som når administrert til et pattedyr som lider av en sykdom med symptomene på MS, vil undertrykke en eller
15 flere av disse symptomene. (Den minimale sekvenslengden til de aktive peptidene er omtrent 20 aminosyrer. Det er ikke noe bestemt maksimum dersom aktiviteten blir bevart. For eksempel kan hele TCR eller hele T-celler bli anvendt).
20

"MHC" eller "hoved-histokompatibilitets-kompleks" er definert som en kompleks serie av pattedyr-celleoverflate-proteiner tilstede på overflaten av aktiverte T-celler, makrofager og andre immunsystemceller. MHC spiller en sentral rolle i mange aspekter ved immunitet og omfatter både ved presentering av
25 histokompatibilitet (eller transplantasjon) antigener og ved regulering av immunresponsen overfor konvensjonelle (fremmede) antigener. Det er to typer MHC proteinmolekyler, klasse I og klasse II. De humane MHC-genene er beliggende på det humane kromosomet 6 og MHC-genene fra mus er beliggende i H-
30 2-genetisk locus på kromosom 17 fra mus.

"Klasse II MHC-molekyler" er membranglykoproteiner som danner en del av MHC. Klasse II MHC-molekylene finnes hovedsakelig på cellene av immunsystemet inkludert B-celler, makrofager, hjerneastrocytter, epidermale Langerhanske celler, dendri-
5 tiske celler, tymisk epitel og hjelpe-T-celler. Klasse II MHC-molekyler er involvert i regulering av immunresponsen i løpet av vevs-graft-frastøtning, stimulering av antistoffproduksjon, graft-versus-vertsreaksjoner og ved gjenkjenning av "selv" (eller autologe) antigener, blant andre fenomener. I
10 beskrivelsen nedenfor skal MHC bli anvendt om hverandre med "Class II MHC". MHC-genene vil bli referert til som "MHC-gener".

"T-celler" eller "T-lymfocytter" blir definert som immunsystemceller som er avledet fra stamceller beliggende innenfor
15 hematopoietiske (dvs. bloddannende) vev. Det er tre hovedkategorier av T-celler: Hjelpere, suppressorer og cytotoksiske. T-celler uttrykker enten CD4-antigenet (og blir da betegnet CD4+ T-celler) eller CD8 antigenet (blir da betegnet CD8+ T-celler) på deres celleoverflate. Ekspresjonen av CD4 eller
20 CD8 antigener av perifere (sirkulerende) T-celler, korrelerer med funksjonen og spesifisiteten til T-cellene. "Hjelper T-celler" som er CD4+ gjenkjente antigener og klasse II MHC-molekyler og utfører hjelper eller regulatoriske funksjoner.
25 "Cytotoksisk" og "Suppressor" T-celler (som er CD8+) gjenkjenner antigener og klasse I MHC molekyler utfører suppressor og cytotoksiske funksjoner.

"T-celle-reseptor" eller "TCR" er definert heri som den
30 antigengjenkjennende reseptoren tilstede på overflaten av T-celler. TCR er derfor reseptoren som binder et molekyl som immunsystemet gjenkjenner - og presenterer - som et antigen (dersom molekylet er fremmed eller autolog, sistnevnte er tilfelle i en autoimmunsykdom). De fleste T-cellene uttrykker
35 en TCR bestående av et disulfidbundet heterodimerprotein inneholdende en alfa (A) og en beta (B) kjede, mens et mindretall T-celler uttrykker to forskjellige kjeder (gamma

og delta). TCR består av en A og en B kjede, og hver av disse omfatter en variabel og en konstant region. (Tilinghast, J.P. et al., Science 233: 879, 1986; Concannon, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 83: 6589, 1986, Kimura, N. et al., J. Exp. Med. 164: 739, 1986; Toyonaga, B. et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 82: 8624, 1985). Den variable regionen omfatter et "variabelt", et "diversitets" og "koblende" segment. Grensen blant det variable, diversitetssegmentet og koblingssegmentet antas å være det stedet hvor T-cellen gjenkjenner antigenene.

10

T-celler initierer immunresponsen når antigenpresenterende celler (APC), så som mononukleære fagocytter (makrofager, monocytter), langerhanske celler og follikulære dendritiske celler, opprinnelig tar opp, bearbeider (fordøyer) og presenterer antigene fragmenter av polypeptider på deres celleoverflate (i sammenheng med deres MHC). CD4+ T-celler gjenkjenner antigenmolekylene eksklusivt når proteinet blir prosessert og peptidfragmentene derav er presentert av APC som uttrykker klasse II MHC-molekylene.

20

T-celle-gjenkjenning av et antigen reflekterer en trimolekylær interaksjon mellom TCR, MHC molekylene og peptidene prosessert av APC via et hakk eller lomme i den tredimensjonale strukturen til klasse II MHC-molekylet. (Bjorkman, P.J., et al., 1987, Nature, 329:506 og 329:512).

25

Det er identifisert en immundominant region av MBP beliggende innenfor en del av MBP aminosyresekvensen (residiene 82-104) og to T-celle-reseptorgen-segmenter som korresponderer med VB17 og VB12. Som vist i eksempel 2 nedenfor, er de humane MBP aminosyreresidiene 84-102 som grunnlag for en immundominant domene av MBP gjenkjent av de fleste perifere T-celler isolert fra pasienter som lider av MS, identifisert. Det er i tillegg bestemt at T-celler som reagerer med den immundominante epitopen MBP ofte også har MHC klasse II haplotype DR2-genet. Det tilsvarende MHC antigenet til slike T-celler binder MBP innenfor den immundominante domenen

35

bestående av residiene 82-104 i assosiasjon med DR2 fenoty-
pen. På grunn av at DR2 er mest vanlig i pasienter med MS,
kan disse cellene bli isolert, identifisert og anvendt ikke
bare for diagnostikk, men også for å behandle pasienter med
5 MS (som vil bli forklart nedenfor).

I dyremodellen (EAE) er T-cellerreseptorer omfattende en del
av VB8.2 sekvensen fra dyr blitt anvendt for å behandle
sykdommen og blitt vist å virke ved eliminering av sykdomsin-
10 duserende T-celler. I dyremodellen er peptider omfattende
sekvensene Thr-Leu-Cys-Ala-Ser-Ser og Thr-Leu-Cys-Ala-Ser-Arg
som kan tilsvare utsatte (overflate) deler av muse og rotte
VB8.2 blitt bestemt (i muse og rottemodeller) for å bekjempe
den autoimmune sykdomsmodellen ved eliminering av hjelpe-T-
15 celler.

Peptid fremstilt ved foreliggende oppfinnelse kan med fordel
bli anvendt for konstruering av spesifikke terapeutiske
midler nyttige for behandling av et menneske som lider av en
20 sykdom med MS-symptomer. For eksempel, som vist i eksemplene
1 og 2 nedenfor, kan peptider omfattende sekvensene til human
VB17 og VB12 bli konstruert, for eksempel aminosyresekvensene
Asp Thr Asp Lys Gly Glu Val Tyr Asp Gly (fra VB12) og Phe Gln
Lys Gly Asp Ile Ala Glu Gly Tyr (fra VB17) og anvendt for
25 terapeutisk bruk. Andre aktive peptider er de som omfatter
sekvensen JYYSQIVNDFQKGDIAEGYS. Ytterligere aktive peptider
kan bli konstruert basert på aminosyresekvensene til hele
human VB17 og VB12 eller fragmenter eller analoger derav.

30 Aminosyresekvensen for human VB12 (og en av de mulige
nukleinsyrene som koder for dette) er angitt nedenfor:

LeuArgCysHisGlnThrGluAsnHisArgTyrMetTyrArgGlnAspProGlyHisGly
CTGAGATGTCACCAGACTGAGAACCACCGCTATATGTACCGACAAGACCCGGGCATGGG
LeuArgLeuIleHisTyrSerTyrGlyValLysAspThrAspLysGlyGluValSerAsp
35 CTGAGGCTGATCCATTACTCATATGGTGTTAAAGATACTGACAAAGGAGAAGTCTCAGAT
GlyTrySerValSerArgSerLysThrGluAspPheLeuLeuThrLeuGluSerAlaThr
GGCTATAGTGTCTCTAGATCAAAGACAGAGGATTTCTCCTCACTCTGGAGTCCGCTACC
SerSerGlnThrSerValTyrPheCysAlaAsn
AGCTCCAGACATCTGTGTACTIONTCTGTGCCAAT

Aminosyresekvensen for human VB17 (og en av de mulige nukleinsyrene som koder for denne) er angitt nedenfor:

5 AspGlyGlyIleThrGlnSerProLysTyrLeuPheArgLysGluGlyGlnAsnValThr
GATGGTGGAAATCACTCAGTCCCCAAAGTACCTGTTTCAGAAAGGAAGGACAGAATGTGACC

LeuSerCysGluGlnAsnLeuAsnHisAspAlaMetTyrTrpTyrArgGlnAspProGly
CTGAGTTGTGAACAGAATTTGAACCACGATGCCATGTACTGGTACCGACAGGACCCAGGG

GlnGlyLeuArgLeuIleTyrTyrSerGlnIleValAsnAspPheGlnLysGlyAspIle
CAAGGGCTGAGATTGATCTACTACTCACAGATAGTAAATGACTTTTCAGAAAGGAGATATA

10 AlaGluGlyTrySerValSerArgGluLysLysGluSerPheProLeuThrValThrSer
GCTGAAGGGTACAGCGTCTCTCGGGAGAAGAAGGAATCCTTTCCTCTCACTGTGACATCG

AlaGlnLysAsnProThrAlaPheTyrLeuCysAlaSerSer
GCCCAAAGAACCCGACAGCTTCTATCTCTGTGCCAGTAGT

15

(Til tross for identiteten mellom peptidet TKCASS fra mus og C-terminalt humant VB17, er det ikke ventet at peptider som innehar denne aminosyresekvensen er aktive i mennesker på grunn av at denne sekvensen er en ganske vanlig terminal sekvens i humane VB-kjeder, og vil derfor ikke ha en så spesialisert funksjon som er nødvendig for aktivitet ved undertrykking av MS-symptomene).

20

Uten å ville være bundet av noen teori, antas det at administrering av VB17 eller VB12-baserte peptider, spesielt de som inkorporerer fragmentene tidligere identifisert ovenfor eller aktive analoger derav til pasienter som lider av MS, vil blokkere TCR eller drepe T-celler som uttrykker TCR og derved blokkere induksjonen eller aktivering av hjelpe-T-celler som er involvert i å utløse en immunrespons overfor myelinlaget til det sentrale nervesystemet (CNS) i pasienter som lider av MS. Denne mekanismen kan involvere produksjonen av anti.VB (12 eller 17) antistoffer, dvs. native antistoffer som vil gjenkjenne VB12 og/eller VB17 og derfor bli bundet til TCR. Uansett virkningsmekanismen ventes det at disse VB12- og VB17-baserte peptidene er effektive for 30
35
attenuering eller eliminering av symptomene på MS eller av en

sykdom med de samme symptomene, og ventes derfor å være nyttige terapeutiske midler eller tillegg til MS-terapi. (For eksempel kan parenteral administrering av slike peptider supplementere eller bli supplementert av oral og/eller aerosol administrering av MBP eller fragmenter eller analoger av MBP som beskrevet for eksempel i U.S.patent søknad med serie nr. 487.732, inngitt 2. mars 1990, og med tittel "Enhancement of the Down-Regulation of Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens", og serie nr. 454.806 inngitt 20. desember 1989.

I tillegg kan friske individer mottagelige for MS (dvs. individer med DR2 haplotype) og som uttrykker VB17 eller VB12 TCR på deres T-celler, og derfor ha T-celler som prolifererer (eller som kan bli induert til å proliferere) i respons til presenteringen av den immundominante regionen til human MBP kan også dra nytte av den profylaktiske administreringen av peptidet. Eksempel 2 nedenfor, VB17, var betraktelig mindre tilstede (bare i omtrent 9,4% av den oppsamlede cellepopulasjonen) på T-celler isolert fra et normalt individ i forhold til det som var tilstede på T-cellelinjer reaktive med humane MBP-aminosyreresidier 84-102 (53,9%) isolert fra fem MS-pasienter. I tillegg ble VB12 identifisert på 35% (7/20) av T-cellelinjene reaktive med MBP aminosyreresidier 84-102 isolert fra 4 MS pasienter (i forhold til 15% T-celler fra normale kontroller). Disse resultatene viser at VB17 og VB12 TCR-peptidene er selektivt involvert i gjenkjenning av den immundominante (mulige encefalitogene) human MBP-regionen. Det antas derfor at disse peptidene eller fragmentene eller analogene derav vil tilveiebringe trygge, effektive terapeutiske midler for behandling eller profylakse av mennesker overfor MS symptomer.

Peptider basert på sekvensene VB17 eller VB12 for anvendelse, kan bli syntetisert ved anvendelse av velkjente fastfasemetoder (Merrifield, R.B. Fed. Proc. Am. Soc. Ex. Biol. 21: 412, 1962 og J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963; Mitchel, A.R. et

al, J. Am. Chem. Soc. 98: 1976;: Tam, J. et al., J. Am. Chem. Soc. 105; 6442, 1983). Alternativt kan slike peptider bli syntetisert ved rekombinante DNA-teknikker som er velkjente innenfor fagområdet (Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1982, se s. 51-54 og 412-30). For eksempel kan disse peptidene bli oppnådd som ekspresjonsprodukter etter inkorporering av DNA-sekvensene som koder for VB12 eller VB17 (eller fragmenter eller analoger derav) inn i ekspresjonsvektorer og introduksjon av slike vektorer inn i egnede eukaryote eller prokaryote verter som vil uttrykke de ønskede peptidene individuelt eller som del av fusjonspeptidene eller proteinene.

Peptidanalogene kan bli konstruert ved anvendelse av de kjente aminosyresekvensene som blir kodet fra VB17 eller VB12-genene som beskrevet nedenfor ved anvendelse av de syntetiske eller rekombinante teknikkene beskrevet ovenfor og fremgangsmåtene ifølge f.eks. Eylér, E.H., i Advances in Experimental Medicine and Biology 98: 259-281, 1978. Et peptid med en sekvens basert på aminosyresekvensen til VB12 eller VB17, kan for eksempel bli syntetisert kjemisk ved anvendelse av ovennevnte teknikker. Peptidet kan bli testet for sykdomsundertrykkende aktivitet når det blir administrert til et pattedyr ved for eksempel anvendelse av den eksperimentelle protokollen til Howell, M.D. et al., Science, 246; 668, 1989 eller Vanderbark, A.A. et al., Nature, 341: 541, 1989.

I tillegg kan T-celler som er VB17+ eller VB12+ bli isolert fra pasienter som lider av MS og identifisert ved anvendelse av teknikkene beskrevet i eksemplene 1 og 2 nedenfor. Disse isolerte VB17+ eller VB12+ T-cellene kan bli utvidet, klonet, attenuerte (som beskrevet av Lider, O., et al., 1986, Ann. N.Y. Acad. Sci., s. 267-273 og av Weiner, H.L., et al. (abstr.) Neurology (Suppl. 1) 69:172, 1989) og anvendt som spesifikke terapeutiske midler/immunogener for å behandle

pasienter som lider av MS (fortrinnsvis de samme pasientene hvor T-cellene ble opprinnelig isolert fra). T-celle-attenuering kan bli oppnådd for eksempel ved å utsette T-cellene for 0,1% glutaraldehyd i 15 min. ved romtemperatur.

5 T-cellekloner dyrket til 50 millioner celler in vitro og attenuert (som beskrevet) kan bli lagret i fosfatbuffersaltvann (PBS). En dosering på 50 millioner på denne måten behandlede VB17+ og/eller VB12+ celler kan bli injisert f.eks. subkutant.

10 Det er også tilveiebragt et kit inneholdende isolerte nukleinsyrer (RNA eller DNA) med sekvensen 5'GATACTGACAAAGGA-GAAGTCTCAGATGGC3' og/eller 5'TTTCAGAAAGGAGATATAGCTGAAGGGTAC3' eller analoger derav kodende for alle eller en del av

15 henholdsvis VB12 og VB17, og sekvenser som hybridiserer med disse sekvensene under stringente hybridiseringsbetingelser (som de som er beskrevet nedenfor i eksempel 1) kan bli anvendt for å diagnostisere MS og mottagelighet for MS, og registrere progresjonen av sykdommen. T-cellene kan bli

20 isolert fra pasienter, klonet, formert og probet for tilstedeværelse av VB12 og/eller VB17 ved anvendelse av for eksempel teknikkene beskrevet nedenfor i eksemplene 1 og 2, eller andre analyseteknikker som er velkjente innenfor dette fagområdet.

25 Det er også tilveiebragt farmasøytiske formuleringer og doseringsformer for anvendelse for behandling av pattedyr som lider av sykdommer med symptomer på MS. Generelt inneholder slike doseringsformer en eller flere autoimmune

30 sykdomsundertrykkende midler omfattende peptider som igjen omfatter (i) sekvensen til human VB12 og/eller VB17 og (ii) sykdomsundertrykkende fragmenter og analoger derav, i en mengde som er effektiv for å behandle eller forhindre en eller flere kliniske symptomer på MS.

35 De autoimmune sykdomsundertrykkende midlene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan også omfatte aminosyrer i sekvenser

før eller etter VB17 eller VB12 baserte sekvenser dersom disse ytterligere sekvensene ikke undertrykker den sykdomsundertrykkende funksjonen til slike midler. Testing av slike konstruksjoner for sykdomsundertrykkende aktivitet, kan lett bli utført ved anvendelse av for eksempel en eller flere av metodene beskrevet nedenfor.

Enhetsinnholdet av det aktive ingredienset, eller ingrediensene, innbefattet i en individuell dose av hver doseringsform, behøver ikke i seg selv utgjøre en effektiv mengde for behandling av MS, på grunn av at den nødvendige, effektive mengden kan nåes ved administrering av en mengde doseringenheter.

Farmasøytiske formuleringer kan omfatte ingredienser, farmasøytisk akseptable bærere, fortynningsmidler, oppløsende eller emulgerende midler og salter av den typen som er velkjent innenfor dette området. Ikke-begrensede eksempler på slike forbindelser omfatter 0,5N saltvann i destillert vann for parenteralt bruk, lyofilisert T-celle-reseptor eller peptid fortynnet i laktose for oral anvendelse, adjuvanter så som alum eller tenanus toksoid eller MAPS (beskrevet i J.R. Tam et al., J. Exp. Med. 171:299-306, 1990; og Tam, J.R. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5409, 1988) for vaksineringspeptider til tross for at større peptidkonstruksjoner så som hele TCR ikke behøver å trenge et adjuvant.

Administreringsveien av de undertrykkende midlene kan være i en parenteral form innbefattende intraperitoneale, intravenøse, intradermale og fortrinnsvis subkutane administreringsveier. Farmasøytiske formuleringer kan for eksempel omfatte formuleringer inneholdende mellom omtrent 0,3 mg og omtrent 200 mg av en eller flere midler som er spesifikke for MS.

Generelt blir det VB12- eller VB17-baserte peptidet eller analogen introdusert til et pattedyr i en mengde som fortrinnsvis varierer mellom omtrent 0,3 mg pr. kg. kropps-

vekt av nevnte pattedyr, og omtrent 200 mg pr. kg. kroppsvekt av nevnte pattedyr fortrinnsvis administrert én gang hver 3. måned, og kan bli administrert i en enkel doseringsform eller multiple doseringsformer. Den nøyaktige mengden og frekvensen av administreringen til en pasient er utsatt for optimalisering, og kan variere avhengig av stadium, frekvens av manifestering og alvorligheten av pasientens sykdom og den fysiske tilstanden til pasienten som kjent innenfor dette området. En slik optimalisering blir fortrinnsvis oppnådd på et tilfelle-til-tilfelle grunnlag. Behovsprøvet terapi er vanlig for MS pasienter, og optimalisering av doseringene utgjør derfor ordinær eksperimentering. En fremgangsmåte for optimalisering av dosen kan være: T-celler blir oppnådd fra en pasient og dyrket, kulturen blir formert og T-celle DNA oppsamlet.

Teknikkene beskrevet nedenfor i eksemplene 1-3 kan bli anvendt for å registrere effektiviteten ved fremgangsmåten og optimalisere mengden og frekvensen av administreringen av sykdomsuttrykkende midler.

T-celler kan bli isolert fra pasientens perifere blod, amplifisert og klonet som beskrevet i eksemplene 1-3 nedenfor og probet for tilstedeværelse av VB12+ og/eller VB17+ T-celler ved anvendelse av PCR amplifikasjon med de spesifikke VB primerne vist i tabell 2 nedenfor. En reduksjon eller eliminering av VB12+ eller VB17+ T-celler etter behandling med VB12 og/eller VB17 baserte peptider, vil tilveiebringe en objektiv måling på en pasients sykdomsstatus. Den nøyaktige mengden og frekvensen av administreringen av midlene kan bli optimalisert.

Alternativt kan antistoffene (enten polyklonale eller monoklonale) bli oppnådd direkte og overfor VB12 og/eller VB17 polypeptidene (ved anvendelse av konvensjonelle teknikker som er velkjente og anvendt innenfor dette området) for å analysere for tilstedeværelse av VB12+ og/eller VB17+

T-celler i en pasients perifere blod før og/eller etter behandlingen.

5 Når isolert, blir attenuerte VB17+ eller VB+ T-celler administrert til en pasient, enten profylaktisk eller ved behandling av aktiv sykdom, idet effektive mengder lett kan bli bestemt for eksempel som følger: En mengde av slike T-celler, f.eks. 50 millioner, blir administrert til en pasient. To uker senere blir T-cellene samlet fra pasienten
10 og probet for tilstedeværelse av T-celler som uttrykker VB12 eller VB17. Dersom slike T-celler er blitt betraktelig redusert, er doseringen effektiv. Administreringsveien for denne formen kan være parenteral, og helst subkutan.

15 Som vist i eksemplene nedenfor, er reaktivitet med MBP-residiene 84-102 assosiert med DR2-genet. TCR VB-genet anvendt i friske DR2+ individer, ble undersøkt (kontroller 1-3, tabell 3). 5/5 cellelinjer fra et normalt DR2+ individ var VB17+, mens en av de to cellelinjene fra en annen normal DR2+
20 var VB12+. Disse data viser at VB17 og VB12 er TCR-gjenkjenningselementer for denne immundominante regionen i MS-pasienter og i friske DR2+ individer.

EKSEMPEL 1: TEKNIKKER

25 MBP ble ekstrahert fra humant hjernevev og rensert på en CM-52-kolonne ved anvendelse av den høyeste molekylvektstoppen (18kD) som beskrevet (Chou, F.C.-H. et al J. Biol. Chem. 251: 2671, 1976). MBP-peptider ble syntetisert ved anvendelse av en fastfasemetode som ble oppnådd fra et kommersielt
30 laboratorium (Biosearch Lab Inc., San Raphael, CA) og ble rensert ved høytrykkskromatografi. MBP-fragmentene anvendt er angitt nedenfor i tabell 1.

TABELL 1

	<u>MBP</u> <u>Aminosyre-</u> <u>residier</u>	<u>Sekvens</u>	<u>MBP</u> <u>Aminosyre-</u> <u>residier</u>	<u>Sekvens</u>
5	1-20:	ASQKRPSQRHGSKYLATAST	11-30:	GSKYLATASTMDHARHGFLP
	21-40:	MDHARHGFLPRHRDTGILDS	31-50:	RHRDTGILDSIGRFFGGDRG
	41-60:	IGRFFGGDRGAPKRGSGKDS	51-70:	APKRGSGKDSHHPARTAHYG
	61-82:	HHPARTAHYGSLPQKSHGRT	71-92:	SLPQKSHGRTQDENPVVHFF
	84-102:	DENPVVHFFKNIVTPRTPP	93-112:	KNIVTPRTPPPSQGKGRGLS
10	113-132:	LSRFSWGAEGQRPFGYGGGR	124-142:	RPFGYGGGRASDYKSAHKG
	143-168:	FKGVDAQGTLISKIFKLGGRD		

T-celle-reseptor TCR VB-gen-anvendelsen ble bestemt ved
 15 polymerasekjedereaksjon (PCR) amplifikasjon ved anvendelse av
 et panel TCR VB-primere etterfulgt av Southern blotting. T-
 cellelinjene ble oppnådd fra perifere blod-mononukleære
 celler ved to runder stimulering med MBP etterfulgt av
 stimulering med et immundominant humant MBP-peptid (amino-
 20 syrerresidiene 84-102), der immundominansen var blitt bestemt
 ved proliferasjonsanalyser (som beskrevet i eksempel 2) ved
 anvendelse av tabell 1 panelet av 13 overlappende MBP-
 peptider. Etter en tredje stimuleringsrunde med deres
 spesifikke MBP-peptid, ble RNA ekstrahert fra MBP-reaktive T-
 25 cellekulturpelletene (20.000-50.000 celler) ved ekstrahering
 med guanidinium-isotiocyanat/fenol-kloroform og isopropanol-
 presipitering i nærvær av bærer tRNA. Enkelt-trådet cDNA ble
 syntetisert ved anvendelse av oligo-dT og AMV-revers
 transkriptase (begge tilgjengelig kommersielt fra Bethesda
 30 Research Laboratories, Gaithersburg, MD). PCR (polymerasekje-
 dereaksjon med nr. 4.800.159, godkjent 24. januar 1989;
 4.683.195, godkjent 28. juli 1987 og 4.683.202, godkjent 28.
 juli 28, 1987) amplifikasjonen ble utført ved anvendelse av
 et panel bestående av 19 oligonukleotider (spesifikke for
 35 publiserte TCR VB familier -- VB 1-20, tabell 2) som
 tilsvarer CDR2-regionen til TCR B-kjeden og en CB (konstant
 region av B-kjeden) primer (tabell 2) (som beskrevet i
 Tilinghast, J.P. et al., Science 233: 879, 1986; Concannon,

P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 6598, 1986; Kimura, N. et al., J. Exp. Med. 164: 739, 1986; Toyonaga, B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8624, 1985; Kimura, N. et al., E. et al., Eur. J. Immunol. 17: 375, 1987). Amplifikasjoner ble utført i tre-dve sykluser (94°C 1 min., 55°C 2 min., 72°C 3 min.) ved anvendelse av 1 mikrogram av hver primer i 50 mikroliter reaksjoner. Amplifiserte produkter ble separert i 1% agarosegeler, overført til nitrocellulose og Southern blotter ble hybridisert med en indre oligonukletid TCR-CB-probe (tabell 2). Probene ble endemerket med ³²P gamma-ATP og T4 polynukleotidkinase (Bethesda Research Labs.) til en spesifikk aktivitet på 10⁸cpm/μg og hybridierst i 6xSSC/5x-Denhardt's/0,05% pyrofosfat/100 μg/ml denaturert DNA/0,5% SDS i 18 timer ved 37°C. Blottene ble vasket ved en endelig stringenthet på 6xSSC/70°C og autoradiografert i 2-18 timer. T-cellelinjene som var positive i mer enn to VB-segmenter ble betraktet ikke å være avledet fra en enkel MBP reaktiv T-celle og ble derfor ekskludert fra analysen.

For sekvensering ble amplifikasjoner av cDNA utført med en VB17 primer (tabell 2) som er spesifikk for ledersegmentet inneholdende et indre Pst I restriksjonssete. Amplifiserte DNA ble behandlet med proteinase K, fenol/kloroformekstrahert, etanolpresipitert og spaltet med restriksjons-endonukleasene Bgl II og Pst I (kommersielt tilgjengelig, f.eks. fra Bethesda Research Labs., supra). Gel-renset DNA ble ligert inn i M13 mp18 og enkelt-trådet DNA ble sekvensert ved dideokso-metoden (Sanger, F., et al., 1977, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 74:5463). Negative kontroller ble innført i løpet av prosedyren for å teste for mulig kontaminasjon av RNA-prøvene eller reagensene anvendt for cDNA-syntese og amplifikasjon. VB, CB og JB2.1 primersekvensene anvendt, er angitt nedenfor i tabell 2.

Amplifiserte og ikke-amplifiserte prøver ble håndtert separat, reagensene ble aliquotert og testet for tilstedeværelse av aplifisert materiale og negative kontroller ble

tilført for forskjellige eksperimentelle trinn (RNA-isolering, cDNA-syntese, PCR-amplifikasjon).

TABELL 2

5

10

15

20

25

30

VB1	5' AAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTTGAAC 3'
VB2	5' GCTCCAAGGCCACATACGAGCAAGGCGTCG 3'
VB3	5' AAAATGAAAGAAAAGGAGATATTCCTGAG 3'
VB4	5' CTGAGGCCACATATGAGAGTGGATTTGTCA 3'
VB5	5' CAGAGAAACAAAGGAAACTTCCCTGGTCGA 3'
VB6	5' GGGTGCGGCAGATGACTCAGGGCTGCCCAA 3'
VB7	5' ATAAATGAAAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCA 3'
VB8	5' AACGTTCCGATAGATGATTCAGGGATGCCC 3'
VB9	5' CATTATAAATGAAACAGTTCCAAATCGCTT 3'
VB10	5' CTTATTCAGAAAGCAGAAATAATCAATGAG 3'
VB11	5' TCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAG 3'
VB12	5' GATACTGACAAAGGAGAAGTCTCAGATGGC 3'
VB14	5' GTGACTGATAAGGGAGATGTTCTGAAGGG 3'
VB15	5' GATATAAACAAAGGAGAGATCTCTGATGGA 3'
VB16	5' CATGATAATCTTTATCGACGTGTTATGGGA 3'
VB17	5' TTTCAGAAAGGAGATATAGCTGAAGGGTAC 3'
VB18	5' GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAACGATTT 3'
VB19	5' CAAGAAACGGAGATGCACAAGAAGCGATTC 3'
VB20	5' ACCGACAGGCTGCAGGCAGGGGCCTCCAGC 3'
CB	5' GGCAGACAGGACCCTTGCTGGTAGGACAC 3'
C-probe	5' TTCTGATGGCTCAAACACAGCGACCTCGGG 3'
VB17-leader	5' AGCAACCAGGTGCTCTGCAGTGTGGTCCTT 3'
JB2.1	5' CCCTGGCCCCGAAGAACTGCTCATTGTAGGA 3'

EKSEMPEL 2: IDENTIFIKASJON AV VB-GEN-ANVENDELSE I T-CELLER ISOLERT FRA MS-PASIENTER

To serier av eksperimenter ble utført for å teste gyldigheten av ovennevnte tilnærming. Det ble først demonstrert at alle primerne i tabell 2, med unntagelse av VB20 kunne amplifisere cDNA fra perifere blod-T-celler (figur 1). For

det andre, ble spesifisiteten til PCR-amplifikasjonene undersøkt ved analyse ved VB-gen-anvendelsen i 69 uavhengige T-celle-kloner, på forhånd bestemt ved kloning av enkeltcelle med mitogen (så som fytohemagglutin, -- "PHA" -- og interleukin-2). På grunn av den høye effektiviteten ved kloningen som ble oppnådd, tilveiebragte disse klonene en representativ analyse av VB-genbruket blant perifere blod-T-celler. TCR VB-genbruket kunne bli bestemt for 65/69 (94,2%) av disse T-celleklonene som indikerer en stor andel av TCR VB-repertoiret ble dekket av VB-primerne. 58 av disse klonene (84%) var positive for en enkel VB, var 7 kloner (10,1%) dobbelt-positive, muligens på grunn av tilstedeværelse av to rearrangerte og uttrykte TCR VB-gener.

TCR VB-gen-bruket ble deretter analysert i sekstifem MBP-spesifikke T-cellelinjer etablert fra fem pasienter med kliniske-definert gjentatt-tilbakevendende MS. Representative Southern blotter fra MBP reaktive T-cellelinjer er vist i figur 1 og VB gen-bruket for alle cellelinjene ble analysert og angitt i tabell 3 nedenfor.

25

30

35

TABELL 3
MBP PEPTID 84-102 REAKTIVE T-cellelinjer
MULTIPPEL SKLEROSE

5	CELLELINJE	TCR	VB	CELLELINJE	TCR	VB	CELLELINJE	TCR	VB
	<u>Pasient 1 (DR2, DR7)</u>			HY.2C12	VB17, VB1		Cy.2C2	VB12	
	HY.1B12		VB17	Hy.2E2	VB17, VB1		Cy.3F6	VB12	
	Hy.1G9		VB17	Hy.2E11	VB17, VB2		Cy.4C1	VB12	
	Hy.1H7		VB17	Hy.3A11	VB17, VB2		<u>Pasient 3 (DR2, DR4)</u>		
	Hy.2C9		VB17	Hy.2C8	VB17, VB11		Ns.2A5	VB1	
10	Hy.2E4		VB17	Hy.3B7	VB4		Ns.2C10	VB3, VB14	
	Hy.2E6		VB17	Hy.3C3	VB4		Ns.2D11	VB5, VB7	
	Hy.2F10		VB17	Hy.3C6	VB4		Ns.1G11	VB12, VB17	
	Hy.2G5		VB17	Hy.2F11	VB7		Ns.2E2	VB12, VB17	
	Hy.2G11		VB17	Hy.3B12	VB7		<u>Pasient 4 (DR2, DR7)</u>		
	Hy.3A8		VB17	Hy.1H3	VB14		Fn.1M7	VB4	
	Hy.3A10		VB17	Hy.2B2	VB14		Fn.3E17	VB3, VB5	
15	Hy.3B9		VB17	Hy.2H9	VB14		Fn.1E6	VB6, VB8	
	Hy.3C7		VB17				Fn.1G6	VB17	
	Hy.3G10		VB17	<u>Pasient 2 (DR2, DRw11)</u>			<u>Pasient 5 (DR3, DR4)</u>		
	Hy.3F6		VB17	Cy.2H11	VB1, VB7		Tw.1B11	VB12	
	Hy.3F7		VB17	Cy.3D2	VB1, VB7		Tw.2F3	VB12, VB17	
	Hy.3F10		VB17	Cy.2C6	VB2		Tw.E10	VB17	
	Hy.1A8		VB17	Cy.2G5	VB17		Tw.2E2	VB14	

20 TABELL 3 (forts.)

25 **KONTROLLER**

30	CELLELINJE	TCR	VB	CELLELINJE	TCR	VB	CELLELINJE	TCR	VB
	<u>Kontroll 1 (DR2, DR4)</u>			<u>Kontroll 2 (DR2)</u>			<u>Kontroll 4 (DR7, DRw11)</u>		
	Rt.1A9		VB17	Hr.1B7		VB12	An.3E1		VB1, VB8
	Rt.3C1		VB17	Hr.1C9		VB5	An.3H3		VB8
	Rt.3G11		VB17	<u>Kontroll 3 (DR2)</u>			An.3C12		VB2
	Rt.3A3		VB17, VB14	Md.2A4		VB6, VB8	<u>Kontroll 5 (DR1, DR9)</u>		
	Rt.3F1		VB17, VB14	Md.2F1		VB8, VB18	Cr.1B12		VB17, VB12

MBP PEPTID 143-168 REAKTIVE T-cellelinjer
MULTIPPEL SKLEROSE

	CELLELINJE	TCR	VB	CELLELINJE	TCR	VB
5	<u>Pasient 2 (DR2, DRw11)</u>			<u>Pasient 3 (DR2, DR4)</u>		
	Cy.1E6		VB14	Ns.2D6		VB3
	Cy.2B12		VB14	<u>Pasient 4 (DR2, DR7)</u>		
	Cy.2E2		VB14	Fn.1H5		VB4
	Cy.3G10		VB14	Fn.2A10		VB4
	Cy.3H10		VB14,VB8	Fn.2A5		VB2
	Cy.4C10		VB14,VB17	<u>Pasient 5 (DR3, DR4)</u>		
10	Cy.1C12		VB12	Tw.2C9		VB12
	Cy.1E9		VB7			
	Cy.3F9		VB1			

KONTROLLER

	CELLELINJE	TCR	VB	CELLELINJE	TCR	VB
15	<u>Kontroll 3 (DR2)</u>			<u>Kontroll 6 (DR1, DR7)</u>		
	Hr.2E10		VB3, VB5	En.2G1		VB12 /
	Hr.3E9		VB7	En.3D6		VB12
				En.3C10		VB5,VB8

51 av disse linjene reagerte med MBP-residiene 84-102, mens 14 T-cellelinjer var spesifikke for MBP-residiene 143-168. 31 MBP T-cellelinjer reaktive overfor MBP aminosyreresidiene 84-102 ble analysert fra MS pasient Hy (pasient 1, tabell 3). 23 av disse T-cellelinjene (74) ble funnet å anvende VB17 gen-segmentet, mens 8 andre cellelinjer var hemmet av enten VB2, VB7 eller VB14 gen-segmentene. Disse resultatene indikerer at VB17 er hovedgjenkjenningselementet i T-cellelinjer fra disse MS pasientene reaktive med MBP-residiene 84-102. VB17-bruket ble også funnet blant 6/20 T-cellelinjer undersøkt fra fire andre pasienter (pasientene 2-5, tabell 3). Den andre TCR VB som ble anvendt av T-cellelinjene blant disse fire pasientene, var VB12 som ble funnet i 7/20 T-cellelinjer reaktive med MBP-residiene 84-102 (tabell 3, figur 1). Denne VB ser ut til å være homolog med muse VB8.2 som er det viktigste TCR anvendt blant encefalittogene T-celler i mus og rotter (Burns, F.R. et al., J. Exp. Med. 169; 27, 1989).

MS pasient Cy uttrykte både DR2 og DRw11-antigenene, og hadde derfor T-celler som gjenkjente enten den immundominante MBP-regionen (84-102-residier) eller MBP 143-168 residier. Dette ga muligheten for å sammenligne TCR VB-bruket blant T-cellene som reagerer overfor forskjellige MBP-determinanter (figur 1). Av 7 linjer som prolifererer til MBP-residiene 84-102, uttrykte tre VB 12 og én uttrykte VB17 (tabell 3). I kontrast til dette, brukte 6/9 T-cellelinjer som gjenkjenner MBP-residiene 143-168 VB14 og bare én linje hver anvendte TCR VB12 og VB17 TCR-genene (tabell 3). Southern blott-analyser av fem T-cellelinjer reaktive med MBP-residiene 84-102 (VB12: Cy.2C2, Cy.3F6) eller MBP-residiene 143-168 (VB14: Cy.1E6, Cy.2B12, Cy.2E2) er vist i figur 1.

Idet VB12/VB13 er relativt vanlig blant normale, perifere blod-T-celler (omtrent 18%), er VB17 betraktelig mindre hyppig (omtrent 3%), vurdert ifølge kvantitativ PCR. I kontrast til dette, ble VB17 funnet i 34/63 (53,9%) av T-cellelinjene reaktive med MBP-residiene 84-102, mens det bare var tilstede i 3/32 (9,4%) av TCR VB-genene i tilfeldige mitogene avledete T-celle-kloner oppnådd ved enkel-cellekloning fra et normal individ (Moretta, A. et al., J. Epp. Med. 157: 743, 1983; Hafler, D.A., et al., J. Exp. Med. 167: 1313, 1988). Disse data tyder på at VB17 TCR er selektivt involvert i gjenkjenning av den immundominante MBP 84-102-regionen.

For å vise at TCR-gen-segmentet identifisert ved PCR var det VB-kodende genet anvendt for å gjenkjenne MBP-peptidet, ble to VB17 positive T-cellelinjer (Hy.2H9 og Hy.2G5) klonet ved begrensende fortykning (Moretta, supra.). 11/11 individuelle kloner som ble etablert fra disse to cellelinjene, som var reaktive med både MBP og MBP-residiene 84-102, var VB17+. Tre av disse klonene ble ytterligere analysert ved anvendelse av det fullstendige panel av VB-primere og ble også funnet å være negative for andre VB-segmenter.

VB-sekvensene for fire T-cellelinjer fra pasienten Hy, ble funnet å være 100% homologe med den publiserte VB17-sekvensen (som beskrevet i Kimura, N., et al., Eur. J. Immunol. 17: 375, 1987). Denne sekvensanalysen bekrefter at spesifikke VB-segmenter ble amplifisert ved anvendelse av denne tilnærmelsen. Analyse av VDJ (diversitets-grense) sekvensen indikerte at alle fire av disse T-cellene anvendte det samme grense-JB2.1-segmentet og at 3/4 av dem hadde den samme VDJ-sekvens (tabell 2). For å bestemme hvor ofte JB2.1 gen-segmentet ble anvendt av VB17+ T-celler, ble DNA fra 20 cellelinjer fra MS pasient Hy amplifisert ved anvendelse av VB17 primer-kombinasjon med en CB-primer eller en JB2.1-primer (figur 2). Alle disse linjene ble funnet å være positive for VB17 samt JB2.1-gensegmentene, mens de negative kontrollene (RNA ekstrahert fra alle cellelinjer og ikke omdannet til cDNA, og reagenser anvendt for cDNA-syntese og amplifikasjon) var negative ifølge PCR og Southern blotting. Disse data viser en sterk seleksjon for VB17-JB2.1-sekvens-elementene i med MBP-residiene 84-102 reaktive T-cellelinjer avledet fra pasienten Hy.

To andre T-cellelinjer ved anvendelse av VB17 TCR identifisert ved PCR-analyse og gjenkjenning av MBP-residiene 84-102 fra MS-pasientene Fn og Ns ble sekvensert og sammenlignet med sekvensene til TCR VB fra MS pasient Hy (tabell 3). Mens VB17 gensegmentsekvensen var identisk blant T-celler reaktive MBP-residiene 84-102 fra de tre pasientene, ble forskjellige JB-sekvenser funnet. Tre resultater viser en felles VB-gen-bruk i T-celler som gjenkjenner et immundominant MBP-peptid mellom forskjellige individer. I kontrast, ble felles JB-gen-segmentbruk funnet blant T-celler avledet fra samme individ, men ikke mellom forskjellige individer.

Fire av de fem pasientene som ble studert, var positive for det sykdom-assosierte DR2-allelet, mens pasient Tw var HLA-DR3, DR4. Til tross for dette, var tre VB12/VB17 hemmede cellelinjer tilstede blant fire linjer analysert fra denne

MS-pasienten (tabell 3), som tyder på at felles MHC klasse II-antigener ikke kan være nødvendig for delt TCR VB-gen-bruk med hensyn på gjenkjenning av MBP-peptid 84-102.

5 EKSEMPEL 3: IDENTIFIKASJON AV DEN VIKTIGSTE
IMMUNDOMINANTE REGIONEN TIL HUMAN MBP

En hurtig T-celle-kloningsteknikk ble anvendt for å undersøke om det var immundominante epitoper på human MBP reaktiv med klasse II MHC fenotyper og frekvensen av slik reaktivitet. Totalt 15.824 korttids T-cellelinjer ble dannet fra 51
10 individer ved dyrking av perifere blodmononukleære celler (PMN) med rensset MBP (oppnådd som i eksempel 1 ovenfor) etterfulgt 3 dager senere, og deretter hver 3-4. dag, og tilsetning av Interleukin-2 (IL-2) og Interleukin-4 (IL-4)
15 (Genzyme, Boston, MA). På den 13. dyrkingsdagen ble en aliquot fra hver linje testet for reaktivitet overfor MBP. Linjer reaktive overfor MBP ble deretter testet for reaktivitet overfor overlappende oligopeptid 20-merer omfattende den humane MBP-sekvensen som vist i tabell 1 ovenfor. For MHC-
20 restriksjons-eksperimenter, ble linjer reaktive overfor et MBP-peptid restimulert i to ytterligere sykluser, først med MBP og deretter med det spesifikke MBP-fragmentet som ble gjenkjent av den linjen. I en undergruppe av pasienter ble frekvensen av T-celler som gjenkjenner proteolipidproteinet (PLP), som er et annet hovedencefalitogenisk sentralnervesystem-antigen, undersøkt.
25

MBP og PLP frekvensanalysene ble utført på pasienter med definitiv, "relapsing-remitting" MS (som diagnostisert ved
30 Magnetisk resonansbilledannelse -- "MRI" -- og klinisk undersøkning), samt på individer med andre neurologiske sykdommer og normale individer (alle aldre og kjønn passet til MS-pasientene).

35 Resultatene er vist i tabell 3A nedenfor.

TABELL 3A

	ALDER	KJØNN(%) (M/F)	MHC(%)				# Ag REAKTIVE LINJER/ TOTAL # LINJER		GJENNOMSNI- TIG FREKVENSTIL Ag-REAKTIVE LINJER (%)	
			DR2	DR4	DRw11	DRw1	MBP	PLP	MBP	PLP
MULTIPPEL SKLEROSE (n=23)	34.2±1.4	35/65	60.9	26.1	13.0	78.2	554/7746	20/432	7.18±2.38	3.34±1.56
ANNEN NEUROLOGISK SYKDOM (n=10)	38.7±3.2	43/57	14.3	0.0	42.9	85.7	118/2880	3/384	4.10±1.04	0.90±0.62
NORMAL (n=6)	30.3±1.5	50/50	16.7	0.0	50.0	66.6	73/1742	ND	4.70±1.58	ND
DR2+ KONTROLLER (n=6)	32.0±2.9	50/50	100	16.7	0.0	100	53/1728	ND	3.08±2.06	ND

15

Pasientene med MS var europeere og hadde godt karakterisert tilbakefallende remitterende sykdom med minst to akutte forverringer i løpet av de tidligere 24 månedene og positive lesjoner ifølge magnetisk resonans-billedannelse (MRI) når blodet ble tappet. Individuer med andre sentralnervesystem-sykdommer hadde følgende diagnoser: 1-3 uker etter enten cerebrovaskulær ulykke [4] eller hjerne-traume med CNS-blødning [4]; metastatisk hjernetumor [2]. Det totale antallet T-cellelinjer reaktive med enten MBP eller PLP og det totale antallet T-cellelinjer som ble dannet, er vist i tabell 3A ("Ag" betyr "antigen"). I tillegg ble frekvensene av MBP- og PLP-reaktive linjer beregnet separat for hvert individ ved å dele antallet MBP-reaktive linjer med det totale antallet linjer som ble dannet og gjennomsnittlig verdi ± SEM er gitt.

Idet frekvensen av MBP-reaktive linjer var noe høyere i individer med MS, sammenlignet med andre individer, var ikke dette statistisk signifikant. Det var mer reaktivitet overfor PLP i pasienter med MS sammenlignet med individer med andre neurologiske sykdommer, men dette nådde heller ikke statistisk signifikans.

Av totalt 302 cellelinjer fra pasienter med MS, som kunne bli dyrket og bekreftet og reagere med MBP på gjentatte analyser, reagerte 140 (46,4%) med MBP-residiene 84-102. I kontrollgruppene gjenkjente 11 av totalt 100 MBP reaktive T-cellelinjer 11,0%) dette MBP-peptidet. Den virkelige frekvensen av T-celler avledet fra det perifere blodet som reagerte med hvert MBP-peptid fra hvert individ, ble beregnet. Gjennomsnittsverdiene for pasienter med MS og kontrollindividene, er vist i den ved siden av kolonnen til høyre i tabell 3A.

50.0000 T-linjeceller ble sådd ut i triplikate med 50.000 bestrålte ADC, MNC (mononukleære celler) (Hafler, D.A., et al., J. Exp. Med. 167: 1313, 1988) i 72 timer i rundbundede 96-brønn mikrotiterskåler, og brønnene ble pulset med [³H]-tymidin i de siste 18 dyrkningstimene. APC MNC ble enten dyrket alene, pulset med 100 µg/ml syntetisk MBP-peptid 84-102, (bestemt å være den optimale konsentrasjonen av peptidet for å indusere proliferasjon), eller pulset med 100 µg/ml MBP. Gjennomsnittlige tellinger pr. minutt (CPM) verdiene for triplikate brønner, er vist i tabell 4. DR og DQw haplotyper er angitt og haplotyper felles med pasienten (øverste linje) som var positive for DR2, DR7, DQw1, DQw3, er understreket.

Proliferasjon av T-cellelinjer ved anvendelse av et panel av forskjellige mononukleære celler (MNC) som antigen-presenterende celler (APC) er vist. Fem T-cellelinjer reaktive overfor MBP aminosyreresidiene 84-102 fra individ Hy, ble utvidet ved gjentatte sykluser av stimulering med autolog bestrålt MNC, pulset med syntetisk MBP-peptid 84-102 og undersøkt for gjenkjenning av denne regionen av MBP.

For disse studiene, ble panelet på fem T-cellelinjer reaktive med MBP-residiene 84-102 sådd ut med autoautolog APC MNC som ovenfor, i nærvar av monoklonale antistoffer (mAbs) (slutt-konsentrasjon 1:100) som gjenkjenner forskjellige MHC, klasse II genprodukter. (Nomenklaturen anvendt for antistoffene er fra the Tenth International Histocompatibility

Workshop; og deres spesifisitet er også angitt). Resultatene er angitt i tabell 5 nedenfor.

5

10

15

20

25

30

35

TABELL 4

T-cellelinjer fra pasient Hv

MHC av	fenotype APC	1A8			2C9			2E11			2H9			3A10		
		APC	MEP	peptid 84-102	APC	MEP	peptid 84-102	APC	MEP	peptid 84-102	APC	MEP	peptid 84-102	APC	MEP	peptid 84-102
2.7	1.3	32	21.192	10.747	83	3.263	14.991	148	18.593	30.368	169	2.797	10.444	139	6.887	24.411
2	1	83	56	32	82	78	112	217	52.939	49.399	636	327	658	23	28	26
4.7	2.3	32	26	53	45	55	142	37	167	81	226	258	263	306	719	915
3	2	46	32	52	43	44	110	101	98	349	769	402	1.973	23	31	100
3.10	1.2	35	30.737	49.144	158	25	80	36	58	42	49	54	46	42	22.823	31.121
2.7	1.2	38	40	47	43	39	43	78	53.441	32.357	261	190	289	33	19	36
7.w11	2.7	44	39	54	57	124	259/	34	25	33	51	58	97	967	1.214	2.744

Frekvensen av peptidspesifikke cellelinjer fra normale individer og andre neurologiske sykdomskontroller var nesten identiske, og ble derfor kombinert for analyse. Gjennomsnittssekvensen til T-cellelinjene fra individer med MS som var selektivt reaktive overfor MBP-residiene 84-102, var høyere sammenlignet med kontrollene (figur 3). Signifikant men mindre økninger i reaktivitet overfor MBP-residiene 61-82 og 124-142, ble også observert i MS pasienter, mens både MS og kontrollindividene viste høye frekvenser av T-cellelinjene reaktive med MBP-residiene 143-168. DR2, DQw1 haplotypen var meget lite tilstedeværende i kontrollindividene, og mere vanlig i pasienter med MS (tabell 4). En assosiasjon ble observert mellom DR2 fenotypen og både proporsjonen eller frekvensen av T-cellelinjene reaktive overfor MBP-residiene 84-102 (figur 4).

For å bestemme om T-celle-reaktiviteten overfor MBP-residiene 84-102 var assosiert med DR2, DQw1 ekspresjon i ikke-MS individer, ble ytterligere 6 normale individer med DR2, DQw1 fenotype undersøkt. Resultatene er vist i figur 4.

En DR2-assosiasjon ble også observert blant kontroller med hensyn på proporsjonen av T-cellelinjer reaktive med MBP-residiene 84-102 (DR2+ kontroller, $31.0 \pm 10.8\%$; DR2-, $10.1 \pm 0.4\%$, til tross for at den totale frekvensen av linjer som var reaktive med denne region av MBP var mindre enn den i pasienter med MS (figur 4). Til tross for at DQw1 er i bindings-dissosiasjon med DR2 og også med DR1 og DRw10, viste uavhengig analyse av reaktiviteten til peptidet ingen assosiasjon med fenotype-ekspresjonen til DQw1.

DRw11 fenotypen var mer vanlig i kontroller enn i individer med MS (tabell 3A). DRw11 var positivt assosiert med frekvensen til linjer reaktive overfor MBP-residiene 142-168 i pasienter med MS og kontroller, men ikke med frekvensen av linjer reaktive med MBP-residiene 84-102 (figur 2). Reaktivitet overfor MBP-residiene 31-50, som hovedsakelig ble

observert i kontrollindivider, var assosiert med DRw11. Andre MHC-assosiasjoner ble ikke observert.

5

MHC assosiasjon med residiene med T-cellelinjene reaktive med en immundominant MBP-epitope, ble bestemt. Resultatene er angitt i tabell 5 nedenfor. Det ble bestemt om MHC haplotypene ble anvendt for å presentere antigen i T-cellelinjer reaktive med en immundominant MBP-epitope.

10

15

20

25

30

35

TABELL 5

T-cellelinjer fra pasient Hv

	1A8	2C9	2E11	2H9	3A10
APC alene	32	83	39	50	139
ingen mAb	10,747	14,991	3,325	8,659	24,411
mAb spesifisitet	11,375	15,322	4,131	8,156	27,363
kontroll mAb					
anti-DR					
PL8	11,051	41	31	142	25,016
L.243	16,792	586	22/	36	21,148
65P4.1	19,119	405	46	92	26,412
anti-DQ					
1A3	4,851	11,444	2,102	5,446	15,714
Tu22	1,189	13,442	1,073	7,661	13,488
Leu10	1,128	14,924	2,255	7,678	13,090
anti-DP	7,917	15,922	2,337	6,689	23,452
anti-DR+DP	13,606	75	21	42	27,104

Studier av monoklonal antistoffblokkering av fem T-cellelinjer reaktive med MBP-residiene 84-102, tydet på at både DR og DQ molekyllene kunne virke som hemmende elementer. Blant klonene blokkert av anti-DR mAb, prolifererte klon 2E11 i respons til MBP-residiene 84-102 med panelet til DR2+ APC mens 2C9 og 2H9 prolifererte bare med autolog APC (tabell 5). Gjenkjenning av peptidet ved klonene 1A8 og 3A10, som var delvis blokkerte av anti-DQ mAbs, var begrenset til APC fra det som responderte, og én av to APC-donor-individer som uttrykker DQw1.

For å undersøke videre forholdet mellom MHC-ekspresjon og frekvensen av T-celle-reaktivitet overfor immundominante MBP-epitoper, ble en familie med et påvirket søsken som uttrykker både DR2 og DRw11-fenotypene, studert.

Familiemedlemmene til en MS-pasient som uttrykker DR2, DQw1; DRw11, DRw52, DQw1 klasse II MHC haplotyper, ble undersøkt for frekvensen av T-cellelinjer reaktive med MBP-residiene 84-102 og 143-168.

Totalt 1,728 individuelle T-cellelinjer ble dannet fra både foreldre og 4 søsken, og antall linjer reaktive med enten MBP-peptidet 84-102 eller 143-168 ble bestemt.

2×10^5 MNC i hver av 288 brønner (tre rundbunnede skåler med 96 brønner) ble dyrket med MBP (10 $\mu\text{g/ml}$) som beskrevet ovenfor for hvert individ. På dag 16 ble hver T-cellelinje analysert for reaktivitet overfor syntetiske peptider som tilsvarer MBP-residiene 84-102 og 143-168. Antall linjer som var reaktive med hvert peptid (stimuleringsindeks $\text{SI} \geq 3$, delta $\text{CPM} \geq 500$) dannet pr. individ, er vist. De virkelige stimuleringsstallene var generelt ≥ 20 . P1 og P2=foreldre; S1-S3=søsken. Resultatene er anvist i tabell 6 nedenfor.

TABELL 6

5	PASIENT	<u>P1</u>	<u>P2</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>	<u>S3</u>	
		DR4		DR4	DR4		
	DR2	DRw53	DR2	DRw53	DRw53	DR2	
	DQw1	DQw3	DQw1	DQw3	DQw3	DQw1	

10	DRw11	DRw11	DRw6	DRw6	DRw6	DRw4	
	DRw52	DRw52	DRw52	DRw52	DRw52	DRw53	
	DQw1	DQw1	DQw1	DQw1	DQw1	DQw3	

	MBP peptid						
15	84-102	<u>49</u>	1	<u>4</u>	<u>6</u>	1	<u>7</u>
	143-168	<u>41</u>	<u>14</u>	0	3	2	2

20 DR2+, DRw11+ pasienten hadde en høy frekvens av T-cellelinjer reaktive overfor både MBP-residiene 84-102 og 143-168. DRw11+ foreldren gjenkjente fortrinnsvis MBP-residiene 143-168, mens DR2+ foreldren gjenkjente fortrinnsvis MBP residiene 84-102. Frekvensen av MBP peptid reaktive linjer, var derimot lavere enn de til pasienten. Et søsken var DR2+ og gjenkjente fortrinnsvis MBP-residiene 84-102. En av to HLA identiske søsken med DR4, DQw3/DRw6, DQw1, reagerte en overfor MBP-peptid 84-102, mens den andre ikke gjorde. Til tross for at DQw1 kan hemme gjenkjenningen av MBP-residiene 84-102, kan andre faktorer så som arvet TCR-polymorfisme ha innvirkning på T-celle-reaktiviteten overfor MBP autoantigenet i ett av DR4, DQw3/DRw6, DQw1 søsknene. Denne analysen av familiebinding, tyder på at optimal gjenkjenning av immundominate MBP-epitoper krever spesifikke klasse II MHC-alleler både i pasientene med MS og i kontrollene. Disse studiene viser totalt at til tross for at kontrollindividene som uttrykker DR2 ser ut til å fortrinnsvis gjenkjenne den samme MBP-determinanten sammenlignet med DR2+ MS-pasientene, er deres frekvens i blodet mindre enn det i pasienter med MS.

EKSEMPEL 4: SEKVENSERING AV VB17 TCR

T-celle-reseptor VB17+ PCR-produkter fra seks klonede T-cellelinjer, ble sekvensert ved dideoksymetoden som beskrevet reaktivt med MBP-residiene 84-102 (Pasientene Hy, Fr og Ns) i eksempel 1. DNA ble amplifisert ved anvendelse av PCR-primere for VB17-ledersekvensen og TCR CB-regionen beskrevet ovenfor i eksempel 1. Amplifisert DNA ble klonet inn i M13 og sekvensert ved anvendelse av den velkjente dideoksymetoden (3 M13 plaques pr. T-cellelinje). Resultatene er angitt i tabell 7 nedenfor.

TABELL 7

	VB	DB /	JB	
Hy. 1A8	TyrLeuCysAlaSerSer TATCTCTGTGCCAGTAGT	ThrAspTrpSer ACTGACTGGAGC	SerTyrAsnGluGlnPhe TCCTACAATGAGCAGTTC	VB17-JB2.1
Hy. 2C9	TyrLeuCysAlaSerSer TATCTCTGTGCCAGTAGT	ThrAspTrpSer ACTGACTGGAGC	SerTyrAsnGluGlnPhe TCCTACAATGAGCAGTTC	VB17-JB2.1
Hy. 3A10	TyrLeuCysAlaSerSer TATCTCTGTGCCAGTAGT	ThrAspTrpSer ACTGACTGGAGC	SerTyrAspGluGlnPhe TCCTACAATGAGCAGTTC	VB17-JB2.1
Hy. 2C8	TyrLeuCysAlaSerArg TATCTCTGTGCCAGTAGG	ThrSerGly ACTAGCCGGC	SerTyrAsnGluGlnPhe TCCTACAACGAGCAGTTC	VB17-JB2.1
Fn. 1G6	TyrLeuCysAlaSerSer TATCTCTGTGCCAGTAGT	IleProPro ATCCCTCCA	SerTyrGluGlnTyrPhe TCCTACGAGCAGTACTTC	VB17-JB2.7
Ns. 1G11	TyrLeuCysAlaSerSer TATCTETGTGCCAGTAGT	AlaAspArg GEGGACAGG	AspGlnProGlnHisPhe GATCAGCCCCAGCATTTT	VB17-JB1.5

Det er å bemerke ovenfor at VB17-sekvensen til alle 4 T-cellelinjer etablert fra MS-pasient Hy var 100% homologe med den publiserte VB17-sekvensen.

Det følgende er en sammenligning mellom 3-bokstav og 1-

bokstav kodene til aminosyrene. Dette er vist for gjøre det mer hensiktsmessig.

5

Asparaginsyre
(Asp, D)

Glutaminsyre
(Glu, E)

10

Lysin
(Lys, K)

Arginin
(Arg, R)

15

Histidin
(His, H)

Tyrosin
(Tyr, Y)

Cystein
(Cys, C)

20

Asparagin
(Asn, N)

Glutamin
(Gln, Q)

25

Serin
(Ser, S)

Treonin
(Thr, T)

Glycin
(gly, G)

30

Alanin
(Ala, A)

Valin
(Val, V)

35

Leucin
(Leu, L)

Isoleucin
(Ile, I)

Metionin
(Met, M)

Prolin
(Pro, P)

5

Fenylalanin
(Phe, F)

Tryptofan
(Trp, W)

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

5 1.

Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt peptid med sekvensen SLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPS-QGKGRGLS og som omfatter den immundominante epitopen DENPVV-HFFKNIIVTPRTPP eller sekvensen RPFYGYGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTL-
10 SKIFKLGGRD og som omfatter den immundominante epitopen FKGV-DAQGTL SKIFKLGGRD og som reagerer med T-cellene isolert fra humane multiple sklerose pasienter, k a r a k t e r i-
s e r t v e d at den omfatter:

- (a) syntetisering av nevnte peptid på en fast fase;
- 15 (b) separering av nevnte peptid fra nevnte faste fase;
- (c) rensing av nevnte peptid.

2.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 1, hvor nevnte peptid har
20 sekvensen DENPVVHFFKNIIVTPRTPP, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det anvendes samme substituerte utgangs-
materialer.

25

30

35



FIG. 1

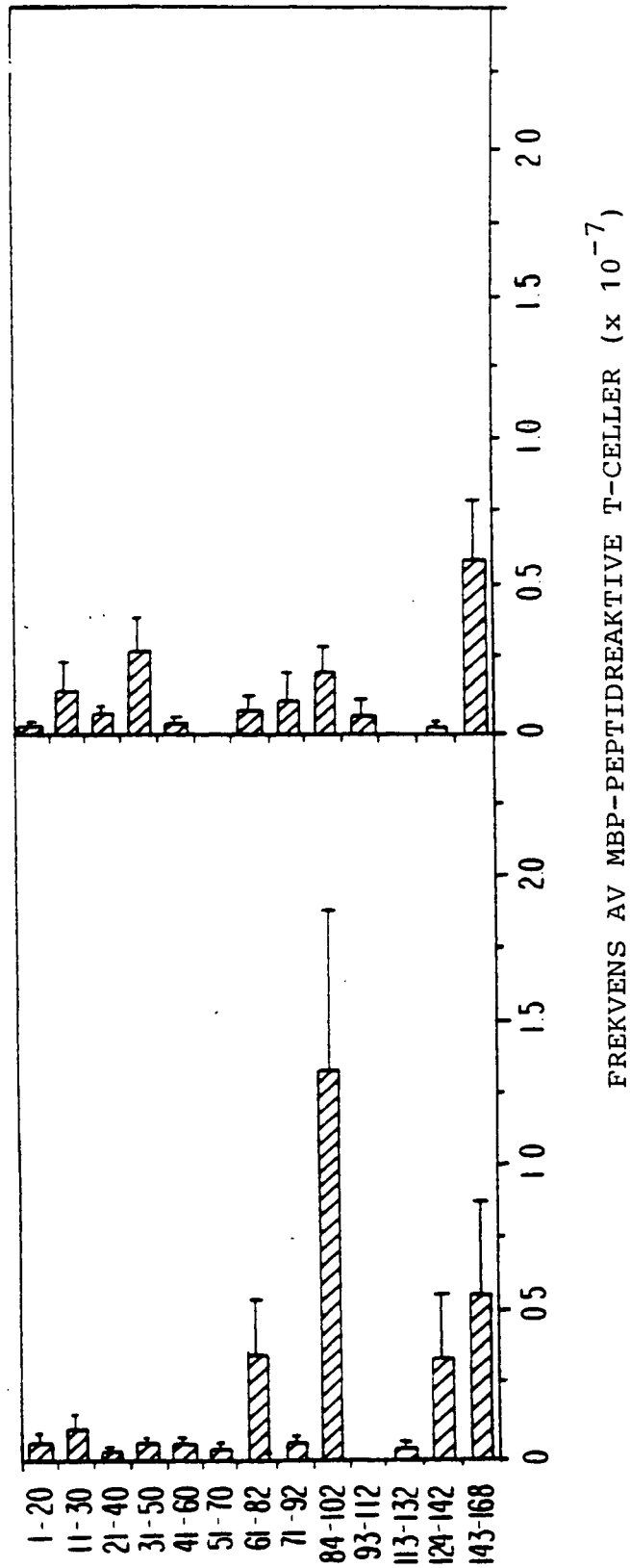


FIG. 3

1988-11-15

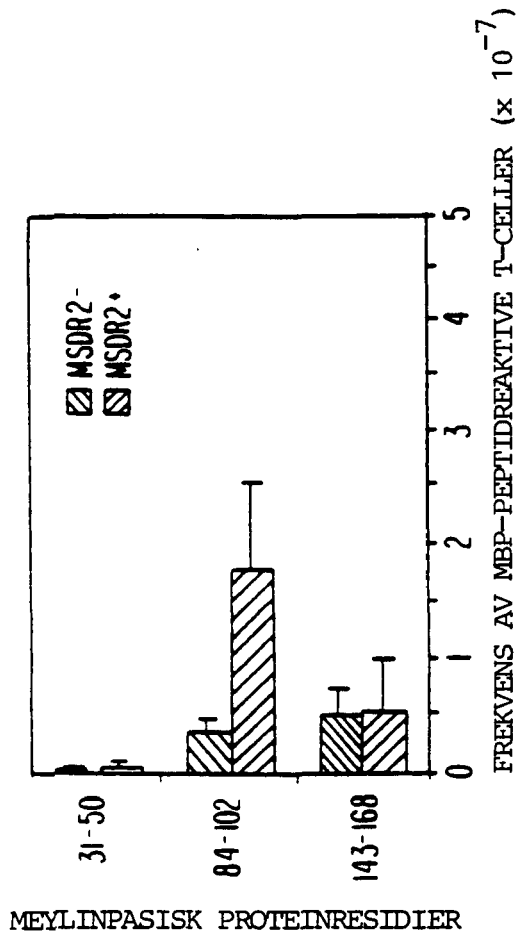


FIG. 4A

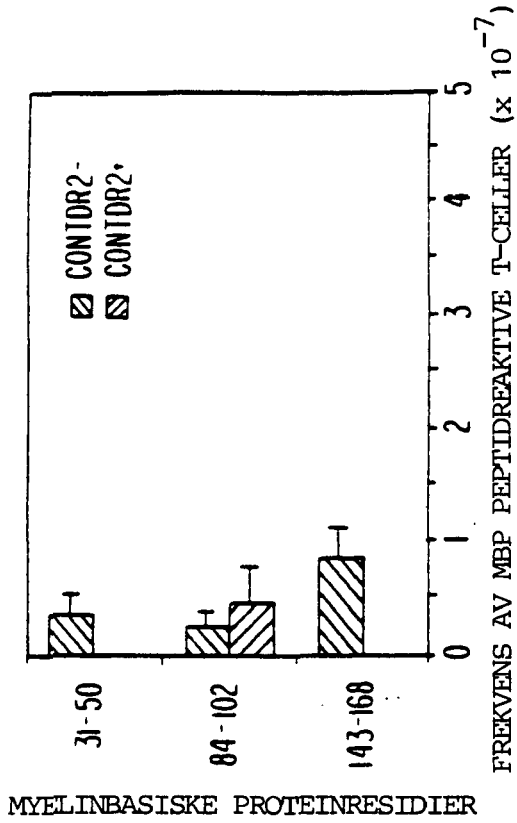


FIG. 4B

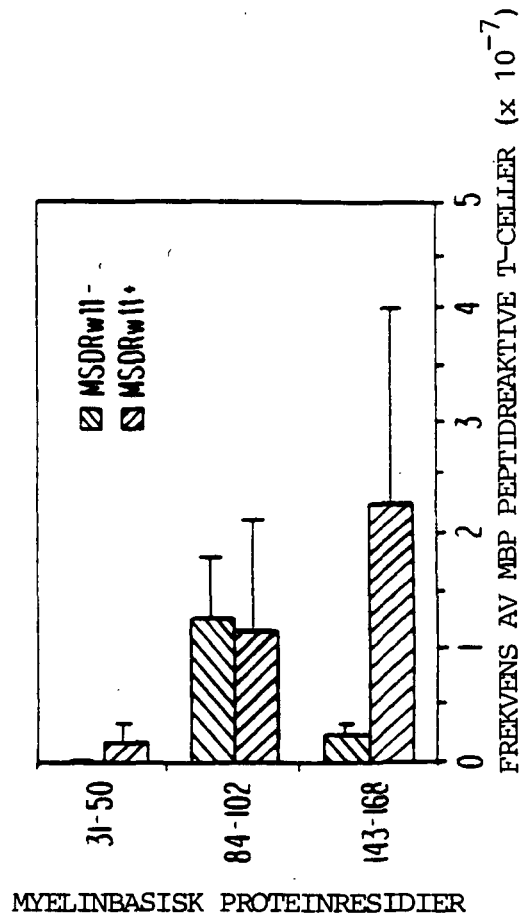


FIG. 4C

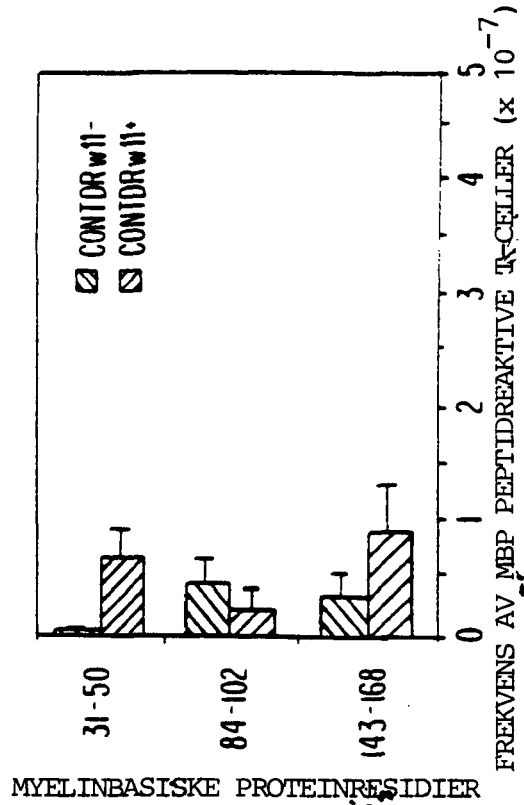


FIG. 4D