

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/53
G01N 33/548
G01N 33/564
G01N 33/569
C07K 5/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02810069.7

[43] 公开日 2005 年 3 月 30 日

[11] 公开号 CN 1602425A

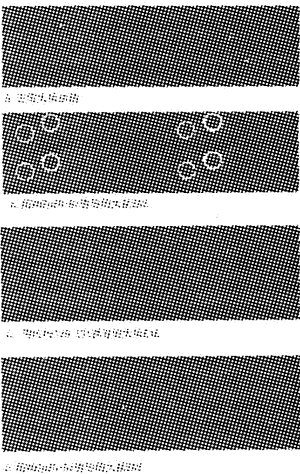
[22] 申请日 2002.4.10 [21] 申请号 02810069.7
[30] 优先权
[32] 2001. 4. 10 [33] US [31] 60/283,090
[86] 国际申请 PCT/US2002/011356 2002.4.10
[87] 国际公布 WO2002/084249 英 2002.10.24
[85] 进入国家阶段日期 2003.11.17
[71] 申请人 利兰·斯坦福青年大学托管委员会
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 W·H·鲁滨逊 D·L·希施贝格
L·斯坦曼 P·J·鲁伊斯
P·J·乌茨 H·加伦

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 周承泽

权利要求书 4 页 说明书 31 页 附图 6 页

[54] 发明名称 抗体特异性分布的治疗和诊断使用
[57] 摘要

本发明提供了确定个人中抗体特异性分布的方法。此特异性分布揭示了个人对自身抗原、过敏原、移植抗原等的多抗原和/或表位的免疫应答。抗体特异性分布通过结合病人样品到阵列上来确定，病人样品包括抗体。阵列克包含抗原和表位。发明也提供了确定抗原和/或表位特异性分布的方式和方法，特异性分布可用于诊断和治疗一般和个人免疫相关疾病，包括自身免疫疾病、过敏和移植排斥。



ISSN 1008-4274

1. 一种确定免疫相关疾病病人中抗体特异性分布的方法，其特征在于，所述方法包括：
 - 5 (a) 制备包括至少两种疾病相关抗原原件的抗原阵列，其中各抗原元件进一步包括至少一种免疫表位；
 - (b) 使来自步骤(a)的抗原阵列物理接触含有抗体的病人样品；
 - (c) 鉴定阵列内结合抗体的疾病相关抗原，抗体在来自步骤(b)的病人样品中；
 - (d) 将步骤(c)中与疾病相关抗原结合的抗体和(1)结合步骤(a)的阵列内疾病
 - 10 相关抗原的抗体，其中已知抗体与疾病关联；以及(2)结合步骤(a)的阵列内疾病相关抗原的抗体，其中抗体不与疾病关联，进行比较。
- 条件是所述疾病不是胰岛素依赖的糖尿病。
2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述免疫相关疾病是自身免疫疾病。
3. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述免疫相关疾病是过敏。
- 15 4. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述免疫相关疾病是移植排斥。
5. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述病人没有发展临床症状。
6. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述病人有临床症状。
7. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，所述自身免疫疾病是风湿性关节炎。
8. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，所述自身免疫疾病是多发性硬化。
- 20 9. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述抗原选自蛋白质、多肽、肽、DNA、RNA、脂质、糖基化分子、磷酸化修饰的多肽、瓜氨酸修饰的多肽、多糖或其它分子。
10. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述抗原阵列是微阵列。
11. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述抗原阵列有可寻址元件。
- 25 12. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述抗原阵列是低密度阵列。
13. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述抗原阵列是高密度阵列。
14. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述病人样品是血液样品。
15. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述病人样品是脑脊液样品。
16. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述病人样品是滑液样品。
- 30 17. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述病人样品取自自身免疫疾病损伤。
18. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述方法进一步包括通过施用含一种或更多抗原的治疗剂来治疗病人的步骤，抗原被包括抗体特异性组的抗体结合。

19. 一种确定免疫相关疾病病人中抗体特异性分布的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

- (a) 制备包括至少一种表位元件的表位阵列;
- (b) 使来自步骤(a)的表位阵列物理接触含有抗体的病人样品;
- 5 (c) 鉴定阵列内结合来自步骤(b)病人样品中抗体的疾病相关表位;
- (d) 将步骤(c)中与疾病相关抗原结合的抗体和(1)结合步骤(a)的阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中已知抗体与疾病关联; 以及(2)结合步骤(a)的阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中抗体不与疾病关联, 进行比较。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述阵列是微阵列。

- 10 21. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述免疫相关疾病是自身免疫疾病。
- 22. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述免疫相关疾病是过敏。
- 23. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述免疫相关疾病是移植排斥。
- 24. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述病人没有发展临床症状。
- 25. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述病人有临床症状。

15 26. 一种治疗自身免疫疾病的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

(a) 确定病人抗原特异性分布, 包括以下步骤:

- (1) 制备包括至少两种疾病相关抗原的抗原阵列, 其中各抗原元件进一步包括至少一种免疫表位; (2) 使来自步骤(1)的抗原阵列物理接触含有抗体的病人样品; (3) 鉴定阵列内结合来自步骤(2)病人样品中抗体的疾病相关抗原; (4) 将步骤(3)中与疾病相关抗原结合的抗体和(i)结合步骤(1)的阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中已知抗体与疾病关联; 以及
- 20 (ii) 结合步骤(1)的阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中抗体不与疾病关联, 进行比较。

(b) 在步骤(a)的抗原特异性分布基础上设计病人特异治疗方案, 包括步骤: (1) 确定病人样品中被抗体结合的抗原; 和(2)给病人施用一种或更多抗原。

- 25 27. 如权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 施用给病人的抗原选自蛋白质、多肽、肽、DNA、RNA、脂质、糖基化分子、磷酸化修饰的多肽、瓜氨酸修饰的多肽、多糖或其它分子。
- 28. 如权利要求 26 所述的方法, 其特征在于, 施用给病人的抗原是编码所述抗原的核酸。
- 30 29. 如权利要求 28 所述的方法, 其特征在于, 所述核酸是 DNA。
- 30. 一种治疗自身免疫疾病的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

(a) 确定病人抗原表位异性分布, 包括以下步骤:

- 5 (1) 制备表位阵列; (2) 使来自步骤(1)的表位阵列物理接触含有抗体的病人样品; (3) 鉴定阵列内结合来自步骤(2)病人样品中抗体的疾病相关表位; (4) 将步骤(3)中与疾病相关抗原结合的抗体和(i)结合步骤(1)的阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中已知抗体与疾病关联; 以及(ii)结合步骤(1)的阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中抗体不与疾病关联, 进行比较。

(b) 在步骤(a)的表位特异性分布基础上设计病人特异治疗方案, 包括步骤: (1) 确定病人样品中由抗体结合的表位; 和(2)施用一种或更多表位给病人。

- 10 31. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 施用给病人的表位选自蛋白质、多肽、肽、DNA、RNA、脂质、糖基化分子、磷酸化修饰的多肽、瓜氨酸修饰的多肽、多糖或其它分子。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其特征在于, 施用给病人的表位是以编码所述抗原的核酸形式。

- 15 33. 如权利要求 33 所述的方法, 其特征在于, 所述核酸是 DNA。

34. 一种确定胰岛素依赖性糖尿病(IDDM, 自身免疫糖尿病)病人中抗体特异性分布的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

(a) 制备包括至少四种 IDDM-相关抗原的抗原阵列, 其中各抗原元件进一步包括至少一种免疫表位;

- 20 (b) 使来自步骤(a)的 IDDM 抗原阵列物理接触含有抗体的病人样品;

(c) 鉴定阵列内结合抗体的 IDDM-相关抗原, 抗体在来自步骤(b)的病人样品中;

- (d) 比较结合步骤(c)中疾病相关抗原的抗体和(1)结合步骤(a)的阵列内 IDDM 相关抗原的抗体, 其中已知抗体与疾病关联; (2) 结合步骤(a)的阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中抗体不与 IDDM 相联。
- 25

35. 一种确定胰岛素-依赖性糖尿病(IDDM, 自身免疫糖尿病)病人中抗体特异性分布的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

(a) 制备包括至少四种 IDDM-相关表位的表位阵列;

(b) 使来自步骤(a)的表位阵列物理接触含有抗体的病人样品;

- 30 (c) 鉴定阵列内结合抗体的 IDDM-相关表位, 抗体在来自步骤(b)的病人样品中;

(d) 比较结合步骤(c)中 IDDM-相关表位的抗体和(1)结合步骤(a)的阵列内疾

病相关表位的抗体，其中抗体不与 IDDM 相联。

36. 一种治疗胰岛素-依赖性糖尿病(IDDM, 自身免疫糖尿病)的方法，其特征在于，所述方法包括：

5 (a)确定病人抗原特异性分布，包括以下步骤：(1)制备包括至少四种 IDDM-相关抗原的抗原阵列，其中各抗原元件进一步包括至少一种免疫表位；(2)使来自步骤(1)的抗原阵列物理接触含有抗体的病人样品；(3)鉴定阵列内结合抗体的 IDDM 相关抗原，抗体在来自步骤(2)的病人样品中；(4)比较结合步骤(3)中 IDDM-相关抗原的抗体和(i)结合步骤(1)的阵列内 IDDM 相关抗原的抗体，其中已知抗体与 IDDM 相联；(ii)结合步骤(1)的阵列内
10 IDDM 相关抗原的抗体，其中抗体不与 IDDM 相联。

(b)在步骤(a)的抗原特异性分布基础上设计病人特异治疗方案，包括步骤：(1)确定病人样品中由抗体结合的抗原；和(2)施用一种或更多抗原给病人。

37. 一种治疗胰岛素-依赖性糖尿病(IDDM, 自身免疫糖尿病)的方法，其特征在于，所述方法包括：

15 (a)确定病人表位特异性分布，包括以下步骤：(1)制备包括至少四种 IDDM-相关表位的表位阵列；(2)使来自步骤(1)的表位阵列物理接触含有抗体的病人样品；(3)鉴定阵列内结合抗体的 IDDM 相关表位，抗体在来自步骤(2)的病人样品中；(4)比较结合步骤(3)中 IDDM-相关表位的抗体和(i)结合步骤(1)的阵列内 IDDM 相关表位的抗体，其中已知抗体与 IDDM 相联；(ii)
20 结合步骤(1)的阵列内 IDDM 相关表位的抗体，其中抗体不与 IDDM 相联。

(b)在步骤(a)的表位特异性分布基础上设计病人特异治疗方案，包括步骤：(1)确定病人样品中由抗体结合的表位；和(2)施用一种或更多表位给病人。

抗体特异性分布的治疗和诊断使用

发明的背景

免疫系统令人惊讶的复杂性是其最强力量。 10^{12} – 10^{14} 种可能的抗体特异性、多种调节和效应细胞间精密的相互作用、根据 MHC 抗原的 T 细胞应答的限制；所有这些使宿主能与传染剂和其它视作外来的抗原有效反应。但此多样性有它的缺点。错误发生：应答的目标也许成为正常自身蛋白质；炎症反应被错调节；正常应答不需要地针对嫁接和移植细胞。在这些情况下，系统的复杂性使诊断和治疗非常困难。

对于大部分自身免疫疾病、遗传性过敏状态和不需要的免疫应答，存在有效的诊断血液测试或治疗剂。例如，当前的治疗策略通常以广泛系统免疫抑制为基础。由于此治疗不是抗原特异，结果是免疫功能的整体降低，导致对感染和疾病敏感。因此，临床上非常需要抗原特异诊断和耐受治疗，它们会特异地去除不需要的免疫应答，但使免疫系统的其它部分完整。然而，为了提供抗原特异治疗，需要确定反应细胞的抗原特异性。

在自身免疫疾病中确定抗原靶的重要性一部分是涉及这些疾病的进展。例如，神经退化疾病如多发性硬化 (MS) 和实验自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 可针对一种或更多髓鞘蛋白，例如髓鞘碱性蛋白、髓鞘少突胶质糖蛋白、蛋白脂质蛋白和多种其它髓鞘抗原。随着疾病发展，对初始抗原的反应消失，产生有序和可定义的新免疫反应。随着时间流逝，抗原-特异自身免疫应答可扩散至一种蛋白质上不同的表位，称为“分子内表位扩散”，或者扩散至其它结构蛋白的表位，称为“分子间表位扩散”。在由对一种表位免疫起始的 EAE 过程中，分子内和分子间表位扩散使自身免疫应答发展到包括可检测的 T 细胞对其它初始抗原上表位和其它髓鞘抗原的应答 (参见 Steinman (1999) *J. Exp. Med.* 189:1021-1024)。

如 Touhy 等 (1999) *J. Exp. Med.* 189:1033-1042 所述，病人失去对在初次免疫应答中识别的髓鞘表位的反应，并发展出对其它髓鞘表位的 T 细胞免疫应答。随着疾病进入临床发展并随后慢性占主导的阶段，在自身免疫中对初始自身抗原的免疫应答可最终消失。然而，关键的免疫表位仍可在慢性疾病状态发现，这些提供了抗原特异治疗的关键。

在可提供抗原特异治疗前，需要一种更精确和高通量的诊断方法以及传递特异免疫抑制剂的方式。在强 T 细胞是自身免疫疾病组成的地方得到诊断特别困难，这

是由于 T 细胞受体仅当结合适当主要组织相容性蛋白时识别抗原。

尽管精确鉴定 T 细胞关联抗原仍具挑战性(参见 Altman 等(1996) Science 274(5284):94-6), 存在按血清型分类抗体特异性的技术。许多分析在本领域已知并使用以检测有具体特异性的抗体, 包括 ELISA、RIA、竞争性和非竞争性夹心分析、固相免疫测定如多孔载体上(参见美国专利号 5, 486, 452)等。例如, Atassi 等(1996)美国专利号 5, 578, 496 用重叠肽通过固相放射免疫测定来确定自身抗体的优良特异性, 重叠肽获得自靶抗原。类似的, Harley(1997) 美国专利号 5, 637, 454 进行了固相抗肽试验来确定 SSA 蛋白自身抗体的特异性。

针对抗原特异反应的治疗正在发展中。在一些情况中, 肽以诱导对抗原耐受性的方式传递给宿主。例如, 阶段 II 临床试验在进行之中以治疗有髓鞘碱性蛋白改变肽的 MS。临床试验的结果描述于 Kappos 等, (2000) Nature Medicine 6:1176-1182; Bielekova 等, (2000) Nat. Med 6:1167-1175。作为改变肽配体的微生物肽描述于 Ruiz 等, (1999) J. Exp. Med 189:1275-1283。传递纯化的自身免疫应答靶向的髓鞘蛋白也证明了治疗 EAE 的效果(Critchfield 等, (1994) Science 263:1139-43)。编码自身抗原的 DNA 序列也用于促进抗原-特异免疫抑制。Ruiz 等, (1999) J. Immunol, 162:3336-3341 用编码髓鞘蛋白脂质蛋白主导表位的小基因接种, 并证明对免于疾病的保护。Garren 等(2001)用编码 4 种抗原的小基因混合物接种, 证明了保护和治疗活性疾病的提高。

对准确和迅速进行自身抗原诊断的方法的需求还未满足, 这些自身抗原在临床疾病状态中由免疫细胞识别, 并且将此知识转化成具体治疗形式的需求也未满足。本发明针对此问题。

发明概述

本发明的目的通过一种确定患免疫相关疾病的病人中抗体特异性分布的新方法达到, 方法包括: (a) 制备包括至少两种疾病相关抗原的抗原阵列, 其中所述抗原进一步包括一种或更多免疫表位; (b) 使来自步骤(a)的抗原阵列物理接触含有抗体的病人样品; (c) 鉴定微阵列内结合来自步骤(b)病人样品中抗体的疾病相关抗原; (d) 比较结合步骤(c)中疾病相关抗原的抗体和(1)结合步骤(a)的微阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中已知抗体与疾病关联; (2)结合步骤(a)的微阵列内疾病相关抗原的抗体, 其中抗体不与疾病关联。本发明的目的也通过在有免疫-相关疾病的病人中确定抗体特异性分布的新方法完成, 方法包括: (a) 制备包括一种或更多疾病相关表位的表位阵列; (b) 使来自步骤(a)的表位阵列物理接触含有抗体的病人样

品；(c) 鉴定微阵列内结合来自步骤(b)病人样品中抗体的疾病相关表位；(d) 比较结合步骤(c)中疾病相关表位的抗体和(1)结合步骤(a)的微阵列内疾病相关表位的抗体，其中已知抗体与疾病关联；(2)结合步骤(a)的微阵列内疾病相关表位的抗体，其中抗体不与疾病关联。确定抗体特异性分布的新方法也根据具体情况而定，提供普通技术人员抗原分布或表位分布。此发明的方法和组合物用于诊断和设计和选择免疫-相关疾病的具体治疗。更具体的是与确定抗体特异性分布相关的方法和组合物可用于自身免疫疾病，包括免疫相关疾病如多发性硬化(MS)、风湿性关节炎(RA)、自身免疫性糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、肌炎、硬皮病、银屑病关节炎、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、重症肌无力(MG)、多软骨炎和组织移植排斥。此外，确定抗体特异性分布的方法也用于过敏症。在一个实施方案中，高通量确定通过这些抗体的详细结合分析由病人血清中存在的疾病相关抗体的光谱构成。抗体特异性分布揭示个体对一种或更多抗原的复杂免疫应答，抗原有一种或更多表位。

发明提供确定抗体特异性分布的方法用于鉴定很可能发展免疫相关疾病但还没有明显症状的病人。

发明也提供一种方法用于鉴定很可能发展更严重形式疾病的病人，能在病人抗体特异性分布的基础上选择更具进攻性的治疗。

发明也提供用于设计治疗方案的方法，包括抗原-特异和非抗原-特异治疗。在一个实施方案中，抗原-特异治疗在抗体特异性分布的基础上选择。病人抗体特异性分布提供关于B细胞和T细胞调节应答的信息。个人抗原特异治疗的混合物可在病人特异性分布的基础上制定。在另一个实施方案中，鉴定患相同免疫疾病的病人间共同抗体特异性分布的统一，鉴定提供一般抗原-特异治疗制剂以治疗患此疾病的病人。

而在发明的另一方面，有确定抗体特异性分布的方法用于监控接收免疫相关疾病治疗的病人中的治疗反应。治疗反应在抗体特异性分布改变的基础上评估，改变包括抗体靶标的变化(即抗原或表位分布)、抗体滴度的变化、同种抗体的变化、和抗体识别大规模模式的变化。在另一个实施方案中，抗体特异性分布可用于预测各病人不利的结果，从而能选择另外的治疗。

另一方面，抗体特异性分布能鉴定疾病相关的新抗原和疾病相关的新的表位。

附图概述

图 1A 到 1D 显示的抗体特异性分布包括大鼠 EAE 中自身抗体反应的髓鞘肽-特异性抗原阵列描述(抗原阵列分布)。抗原阵列通过点样免疫显性髓鞘肽表位并纯化。

天然髓鞘碱性蛋白来产生(列于表 1)。A-D 描绘的扫描图像来自正常对照大鼠(A)和 3 只 Lewis 大鼠, Lewis 大鼠用在完全弗氏佐剂(B-D)中的不同髓鞘蛋白肽诱导发展 EAE, 接着用 Cy-3 标记的抗-大鼠 Ig 二次抗体。结果通过 ELISA 确定。扫描图像的定量计算机分析示于表 1。报道的数字显示 SLE 识别的抗原相对对照血清的荧光强度比率, 对照血清调节背景血清使大于或小于 1 的比率(1=没有区别)代表有 >95%置信区间的统计显性差异。抗原阵列有力地鉴定 EAE 中自身抗体的肽特异性。

图 2 显示的抗体特异性分布包括 8 种不同人类自身免疫疾病中自身抗体特异性的抗原阵列鉴定和描述(抗原阵列分布)。有序自身抗原阵列通过用机器微阵列仪点样 4 批 192 种不同推定自身抗原以建立一个 1152-特征风湿病自身抗原阵列。点样的抗原包括: 36 种重组或纯化的蛋白质, 包括 Ro52、La、组氨酰-tRNA 合成酶(Jo-1)、SR 蛋白、组蛋白 H2A(H2A)、Sm-B/B'、U1 小核内核糖核蛋白复合体的 70kDa 和 C 成分(U1-70kDa、U1snRNP-C)、Sm-B/B'、hnRNP-B1、Sm/RNP 复合体、拓扑异构酶 I(topo I)、着丝粒蛋白 B(CENP B)、丙酮酸脱氢酶(PDH); 6 种以核酸为基础的推定抗原, 包括一些形式的哺乳动物双链 DNA(dsDNA)和合成单链 DNA(ssDNA); 154 种表达 SnRNP 蛋白、Sm 蛋白、组蛋白 H1、H2A、H3 和 H4 的肽。此外, 我们点样人 IgG 和 IgM 特异的抗体(α -IgG 和 α -IgM); 流感 A 和肺炎球菌(Pneumovax)的疫苗; 用 Cy-3-和 Cy-5 预标记抗体的混合物以作为标记点来确定阵列方向(黄色特征)。自身抗原阵列培养用的稀释病人血清样品来自(a)没有检测到特异自身抗体反应的健康人(正常); (b)表现抗 Ro52 和 La 自身抗体反应的斯耶格伦综合征; (c)表现抗 DNA、组蛋白 H2A、U1-70kDa 和 SR 蛋白反应的 SLE; (d)表现抗 Jo-1 和 Ro52 反应的 PM; (e)表现抗 DNA、H2A、Ro52 和 U1-70kDa 反应的 MCTD; (f)表现抗 PDH 反应的 PBC; (g)表现抗 topo I 反应的 sclero-D; (h)表现抗 CENP B 反应的 sclero-L; 和(i)表现抗 hnRNP-B1 反应的 RA。用于探针的自身免疫疾病血清沿图顶部表示, 灰色盒子中所含的各列切下和粘贴抗原特征是来来自单个阵列的典型抗原特征。阵列上由来自啮齿动物血清中自身抗体识别的髓鞘碱性蛋白肽作为典型负对照(MBP 68-86)包括, 啮齿动物有实验自身免疫脑脊髓炎。结合的抗体扫描前用 Cy-3-缀合山羊-抗-人 IgM/IgG 检测。

图 3 显示的抗体特异性分布包括来自人多发性硬化病人脑脊液中自身抗体反应的抗原阵列描述(抗原阵列分布)。通过用机器微阵列仪点样推定髓鞘抗原(文中所述)来产生 2400-点‘髓鞘蛋白(myelin proteome)’阵列, 探针用脑脊液, 接着用 Cy-3-标记的抗-人 Ig 二次抗体, 用 GenePix 扫描仪扫描, 用 GenePix 软件分析图像以确定结合各点的自身抗体的水平。这些阵列包含 400 种不同髓鞘蛋白和肽表

位, 包括 MBP、蛋白脂质蛋白 (PLP)、髓鞘少突细胞蛋白 (MOG)、表达这些蛋白的重叠肽、和表达来自另外包括环核苷磷酸二酯酶 (CNP 酶) 的髓鞘自身抗原显性表位的肽、髓鞘-相联糖蛋白 (MAG)、和髓鞘-相联少突细胞碱性蛋白 (MBOP)。在对照病人中, 尽管检测到共同和普遍人病原体的特异抗体, 病原体包括流感病毒和肺炎链球菌, 没有检测到髓鞘蛋白的特异抗体。在 MS 病人 1 中, 抗原阵列检测完整髓鞘碱性蛋白 (MBP)、完整髓鞘少突细胞蛋白 (MOG) 的特异自身抗体以及识别 MOG 肽 35-55、MBP 肽 1-20 和 MBP 肽 68-86 的自身抗体。相反, 在 MS 病人 2 中, 检测到抗 MOG 蛋白和 MOG 肽 25-42 的自身抗体。在 MS 病人 3 中, 鉴定了蛋白脂质蛋白 (PLP) 肽 139-151 的特异抗体。

图 4A 到 4C 显示的抗体特异性分布包括小鼠中自身抗体反应多样性和类似性的抗原阵列描述(抗原阵列分布), 小鼠有实验自身免疫脑脊髓炎 (EAE)。通过用机器微阵列仪点样推定髓鞘抗原来产生 2400-点 ‘髓鞘蛋白组’ 阵列, 探针用 EAE 小鼠血清, 接着用 Cy-3-标记的抗-小鼠 Ig 二次抗体, 用 GenePix 扫描仪扫描, 用 GenePix 软件分析图像以确定结合各点的自身抗体的水平。A-C 表示的阵列扫描图像的探针所用血清来自对照小鼠 (A) 和 2 只 SJL 小鼠, SJL 小鼠用 PLPp139-151 诱导 EAE 后 87 天疾病复发 (B&C)。2 只 EAE 小鼠中抗诱导肽 PLPp139-151 的自身抗体反应相对对照显著强烈, 小鼠-2 中观察到抗邻近分子内表位 PLPp89-106 的自身抗体反应但小鼠-1 或对照没有观察到, EAE 小鼠中都观察到抗分子间蛋白和表位的自身抗体反应但对照没有, 分子间蛋白和表位包括 MOG 蛋白、MOGp66-78、CNP 酶 p343-373、和 MBPp1-20。结果用 ELISA 确认且代表另外小鼠中观察到的自身抗体反应。因此, 用 PLP 肽 139-151 诱导的 SJL 小鼠经历它们自身免疫反应扩展至邻近 PLP 上的肽表位以及 3 种另外髓鞘蛋白上的肽表位, 3 种髓鞘蛋白上包括 MBP、MOG 和 CNP 酶。这些结果证明自身抗体反应靶向具体自身抗原的阵列鉴定。抗原-特异 DNA 耐受性疫苗 (Tolerizing vaccine) 编码更大数量自身抗体反应的抗原阵列-鉴定靶, 此疫苗防止和治疗 EAE 的效率比编码单个自身抗体靶或非靶向髓鞘抗原的疫苗更高。

图 5A 和 5B 显示的抗体特异性分布包括有胶原-诱导关节炎 (CIA) 的小鼠中自身抗体反应的抗原阵列描述(抗原阵列分布)。抗原阵列用机器毛细管阵列仪产生以点样 RA 中推定滑液肽和蛋白自身抗原到聚-L-赖氨酸-覆盖显微镜载物片上的有序阵列中。点样抗原包括胶原种类 I、II 和 III、CIIp257-270、Ro52、La、组氨酰-tRNA 合成酶 (Jo-1)、U1 小核内核糖核蛋白复合体的 70kDa 和 C 成分 (U1-70kDa、U1snRNP-C)、hnRNP-B1、和 GP-39 的重叠肽。我们点样用 Cy-3 预标记的抗体作为 ‘标记特征’ 来确定阵列方向 (绿色特征的绝大部分)。阵列培养用 (a) 正常

DBA/1LacJ 血清或(b)从 DBA/1LacJ 小鼠中在疾病开始(29 天)时获得的血清,小鼠用 CFA 中的鸡 CII 诱导发展 CIA。结合的抗体用 Cy-3-缀合驴-抗-小鼠 IgM/IgG 检测。CII 和 CIIp257-270 特异抗体仅在 CIA 血清样品中检测到。

图 6 提供的串列分析证明 DNA 耐受性治疗编码来自抗原阵列鉴定的 EAE 中自身抗原的多表位,此治疗降低临床疾病活性并减少自身免疫反应的扩展。各小鼠列于 X 轴上,肽和蛋白抗原示于 Y 轴上的‘髓鞘蛋白组’阵列。绿色表示缺少活性,红色表示自身抗体活性。以抗原阵列类似性为基础的串列分析算法组小鼠确定它们自身抗体反应的特异性。此图像表示全部串列的小部分。正常小鼠(NMS)串列和绿色占优势表明缺少自身抗体对所列抗原的反应。慢性复发 EAE 的 SJL 小鼠用对照载体或缓冲(B 和 C)串列处理并有显著自身抗体反应,相对多种髓鞘抗原用红色表示。在这些小鼠中观察到的自身抗体反应的扩展与它们更严重的疾病过程相关,87 天时间段平均有 2.4-3.5 次复发。瘫痪(复发)临床恶化的平均数字示于图顶部,通过表示相关小鼠组的柱上的数字表示。相反,小鼠用髓鞘蛋白混合物 DNA 耐受性疫苗串列处理(含大量抗原阵列鉴定的自身免疫反应靶,显示处理 EAE[表 4]中的最大效率)且如绿色相对其它组增加所示,它们自身免疫反应的扩展显著减少。自身免疫反应扩展的减少与它们严重程度较低的临床过程相关,87 天时间段平均有 1.5 次复发。

实施方案的详细说明

在一个实施方案中,高通量确定由病人血清中存在的疾病相关抗体构成,这是通过这些抗体的详细结合分析。抗体特异性分布揭示了个人对自身抗原、过敏源、移植抗原等的多种表位的免疫应答。这种抗体或抗原特异性分布用于发展诊断和治疗个人免疫相关疾病,包括自身免疫疾病、过敏和移植排斥。通过追踪表位扩展、抗原特异性和定量结合数据,可确定疾病的阶段和进展。

发现自身抗体反应的特异性可与自身反应的 T 细胞应答相关。在一些人自身免疫疾病中,自身免疫 T 和 B 细胞应答识别相同的免疫显性表位。在那些情况中 B 和 T 细胞应答在自身免疫疾病中的优良特异性不一致,鉴定人体自身反应的特异自身蛋白的能力足够以研究自身免疫应答的特异性和进化并选择适当抗原-特异治疗。关于各病人中自身抗体反应特异性的知识可促进早期诊断,作为预测指示,并有助于指导适当抗原-特异耐受性治疗的发展和选择。

对于一些自身免疫疾病包括自身免疫性糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、和格雷夫斯病,检测抗体对一种或两种自身-蛋白的反应有诊断功效。也

证明一些抗体反应有预测功效。例如，直接抗 DNA 的自身抗体在一些 SLE 模式中是致病的，一般与肾参与相联，且它们的滴度常常与疾病活性相关。在多肌炎中，Jo-1 自身抗体经常预测几个月到几年的临床疾病，预测肺间隙疾病的发展和不良预报。

人自身免疫疾病在它的临床表现上非常不同。例如，SLE 病人临床疾病的谱各病人间不同。一些病人疾病主要涉及他们的皮肤和关节表现，另一些的疾病引起滑液积聚在心脏和肺(浆膜炎)，另外的疾病主要影响肾和脑。在多肌炎中，一些病人患的复发-缓解病(relapsing-remitting disease)有一个没有残疾的良性过程，另一些开始患的复发-缓和病发展成引起瘫痪和残疾的慢性发展疾病，还有一些组从一开始就发生了慢性发展疾病。可能各种这些疾病的临床形式代表疾病的不同类型，其中自身免疫反应直接抗不同抗原并对具体治疗有不同应答。

在发明的一个实施方案中，通过来自病人样品的抗体结合包括阵列的抗原来确定抗体特异性分布，在阵列中肽相应于抗原可能的表位。少量样品足够筛选大量的不同肽。阵列可包括蛋白复合体、完整蛋白质和/或蛋白片段的单独的点，其中片断可以是包括完整蛋白的重叠肽或蛋白的部分表达，蛋白可包含已知的免疫显性肽。阵列也可包括其它分子的点，分子包含单链 DNA、双链 DNA、寡核苷酸、RNA、脂质、碳水化合物或其它分子。在自身免疫疾病的情况中，抗体特异性分布提供了监控和/或预测抗体对抗原-特异疫苗或治疗的反应的方法，疫苗或治疗可以 DNA 为基础、以肽为基础、以蛋白质为基础或以其它分子为基础。抗体反应分布可指示是否传送给病人有效的治疗。

从抗体特异性分布中获得的信息用于监控治疗、修饰治疗方法、并进一步最优化治疗剂的选择。用这种方法，治疗和/或诊断方法可根据治疗过程中不同时间获得的具体数据个人化和相应改变，从而提供适合个人的方法。此外，病人样品可在治疗过程中任何时间获得用于分析。

提供分析样品的哺乳动物种包括犬科；猫科；马；牛；绵羊等和灵长类，具体是人。动物模型具体是小型哺乳动物，如鼠科、兔类等，可用于实验性研究。感兴趣的动物模型包括那些用于自身免疫、移植排斥等的模型。

抗体、自身抗体和 T 细胞受体：免疫系统的抗原特异性通过已知为抗体(免疫球蛋白)和 T 细胞受体的蛋白组来提供。各个以许多种类、亚类和同种产生，它们在本领域中熟知并包括于此定义中用于本发明的目的。在一些体细胞突变的情况中，通过遗传重组过程，不同蛋白序列很大一部分产生于这些蛋白的可变区域。这些可变区域的非共价结合相互作用使免疫系统能结合抗原，抗原是如多糖、多肽、多核苷等的分子。因此抗体或 T 细胞受体的“特异性”指可变区域高亲和性结合抗

原的能力。

抗体结合位置通常用多个非共价相互作用来获得高亲和性结合。当抗原的一些接触残基非常接近结合袋时，也可需要抗原分子其它部分维持允许结合的构型。抗原被抗体结合的部分称为表位。如本文所用，表位是抗原足够高亲和性结合的部分。当抗原是蛋白质时，一般线性表位至少约 7 个氨基酸长度，且不超过约 15 到 22 个氨基酸长度。然而，抗体也可识别由抗原上非-邻近残基形成的构型决定簇，因此表位可需要存在更大抗原片断用于结合，如蛋白或核蛋白复合体区域、蛋白结构域或几乎所有蛋白序列。在其它例子中如半抗原，表位可以是很小的分子如地高辛、地高辛配基等。也建立自身抗体以结合系统性红斑狼疮和其它自身免疫疾病中的蛋白、脂质、核酸复合体、或核蛋白质复合体。此外，自身抗体可直接抗翻译后修饰自身蛋白。本文所用自身蛋白是生物体产生的基因组内编码蛋白质。翻译后修饰的例子包括磷酸化和瓜氨酸-修饰的氨基酸以及糖基化中的不同，检测到抗这些翻译后修饰的自身抗体。

认为是“特异”的抗体结合亲和性水平部分通过抗体种类确定，如 IgM 种类的抗原特异抗体比例如 IgG 种类的抗体亲和性低。如本文所用，为了认为抗体相互反应是“特异”的，对感兴趣表位的亲和性至少约为 10^{-7}M ，通常约 10^{-8} 到 10^{-9}M ，可直至 10^{-11} 或更高。本领域技术人员所理解的术语“特异性”是指这种高亲和性结合，但不意味抗体也不能结合其它分子。可发现不同表位的交叉反应是由于如抗原序列或结构的相互关系，或由于抗体结合袋本身的结构。表现这种交叉反应的抗体仍被认为对本发明的目的特异。

T 细胞受体比抗体识别更复杂的结构，且需要主要组织相容性蛋白结合袋和抗原肽存在。T 细胞受体的结合亲和性比抗体低，通常至少约 10^{-4}M ，更常见的至少约 10^{-5}M 。

自身反应抗体或自身抗体、和 T 细胞受体是高亲和性结合宿主中存在分子的抗原受体，通常分子正常存在于宿主中，如在一些癌症中的自身免疫疾病或肿瘤抗原。来自移植或外来组织的抗原一般不认为是自身抗原。初始免疫原可以是自身抗原，或可以是与自身抗原交叉反应的分子。

所示方法部分以自身抗体特异性与自身反应辅助 T 细胞应答特异性间的相互关系为基础。在一些人自身免疫中，自身免疫 T 和 B 细胞应答识别相同的免疫显性表位。免疫显性髓鞘碱性蛋白 (MBP) 表位由 MS 中自身反应 T 和 B 细胞识别。即使在那些 B 和 T 细胞应答优良特异性不一致的情况中，鉴定特异自身蛋白的能力足以指导选择抗原-特异耐受性治疗，个人自身反应抗特异自身蛋白。

阵列：阵列是可寻址元件的集合。这种元件可空间寻找，如包含在微量滴定板中或打印在平面上的阵列，其中各元件以不同 X 和 Y 轴表示。另外，元件可在标记、珠、微粒或物理性质的基础上寻找。微阵列可根据普通技术人员已知的方法制备（参见例如美国专利 5,807,522；Robinson 等(2002)*Nature Medicine* 8:295-301；Robinson 等(2002)46:885-93）。本文所用阵列是指任何有多种可寻址元件的生物分析。在一个实施方案中，可寻址元件是表位。微阵列是阵列的小型化形式。如本文所用，元件指可由抗体结合的任何抗原。本文所用抗原指任何可特异结合抗体的分子。分子可以是但不限于蛋白质、多肽、肽、RNA、DNA、脂质、糖基化分子、碳水化合物、磷酸化修饰的多肽、和有瓜氨酸修饰、aptamers、氧化分子、其它分子的多肽、以及其它分子。

寻址：对于本文所述元件，寻址指能鉴定元件的定位、位置、标记、可裂开的标记和记号、标识物、光谱性质、电泳性质或其它物理性质。寻址也认为是编码的一个例子是空间寻址，其中分子的位置固定，此位置与标识相关。此空间阵列种类一般是合成或点样到平面上，产生例如微阵列，其中大量不同分子浓密地覆盖在小区域中，如包括至少约 400 种不同序列每 cm^2 ，可以是 1000 序列每 cm^2 或多达 5000 序列每 cm^2 或更多。密集程度较低的阵列如可在 ELISA 或 RIA 板中发现的，其中板中各孔包含不同抗原，这种阵列可包括从约 96 种序列每板至约 100 种序列每 cm^2 直至微阵列的密度。其它空间阵列使用光学纤维，其中不同抗原结合纤维，纤维可形成束用于结合和分析。生产和使用多肽空间阵列的方法在本领域中已知。最近的文章包括 Joos 等(2000)*Electrophoresis* 21(13):2641-50 描述了含一系列稀释抗原的以微阵列为基础的免疫分析；Roda 等(2000)*Biotechniques* 28(3):492-6 描述了通过改变商业墨水-喷射打印机获得的系统并用于在纤维素纸上产生含蛋白点的一和二维阵列；Ge(2000)*Nucleic Acids Res* 28(2):e3 描述了定量检测蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA、蛋白质-RNA、蛋白质-配体相互作用的通用蛋白质阵列系统。也参见 Mendoza 等(1999)“高通量以微阵列为基础的酶联免疫吸附测定(ELISA)”*Biotechniques* 27:778-780；和 Lueking 等(1999)“用于基因表达和抗体筛选的蛋白质微阵列”*Anal. Biochem.* 270:103-111。

除了此种空间编码阵列，另一种是使用“标记”分子，其中靶抗原或表位粘附于提供抗原或表位序列编码信息的可检测标注或标记。在一些情况中，这些标记可从元件上分开并随后检测以鉴定元件。在另一个实施方案中，一批抗原或表位可合成或附于一批编码珠，各个珠与不同抗原或表位相连且珠本身以可鉴定所附抗原或表位的形式编码。通过流式细胞仪分析临床样品的多路微球设置的使用描述于国际

专利申请号 97/24028; 和 Fulton 等(1997)Chlinical Chemistry. **43**:1749-1756)。也可能使用其它可寻址颗粒或标记 (Robinson 等 (2002)Arthritis Rheumatism. **46**:885-93 综述)。

在此种“标记阵列”中, 抗原结合珠或微球, 可用流式细胞仪检测结合。例如, 有荧光编码的微球在本领域中描述, 其中荧光颜色和水平分辨具体微球。因此抗原共价粘附“颜色编码”的物体。标记的抗体可用流式细胞仪检测, 且微球上的标码用于鉴别结合抗原。

抗原阵列: 阵列的一个实施方案是抗原阵列。本文所用的抗原阵列指空间分离的能结合抗体的不同分子实体, 抗体以可鉴定包含在病人样品中抗体的方式排列。换句话说, 一批靶抗原有不同序列、三位形状或分子结构, 其中编码各靶抗原用于鉴别。阵列可包括一种或更多蛋白质、多肽、肽、RNA、DNA、脂质、糖基化分子、磷酸化修饰的多肽、和有瓜氨酸修饰、aptamers、其它分子的多肽、以及其它分子, 其中不同种类的分子可组合在阵列中。

抗原: 抗原包括的分子如核酸、脂质、核蛋白复合体、蛋白复合体、蛋白质、多肽、肽和这些分子天然发生的修饰, 可产生抗它们的包括 T 和 B 淋巴细胞的免疫应答。对各个抗原, 存在一组表现此抗原免疫决定簇的表位。抗原包括任何可由所有或部分抗体或 T 细胞受体识别的分子。如本文所用, 包括自身免疫疾病、过敏或组织移植排斥相联的抗原。关于自身免疫疾病, 本文的抗原通常指自身抗原。关于过敏疾病, 本文的抗原通常指过敏原。抗原包括免疫表位。

表位: 表位是由 B 淋巴细胞识别的部分抗原, 具体是 B 细胞分泌并在细胞表面表达的抗体。表位也可由 T 淋巴细胞上的特异受体识别。单个抗原通常包含多种表位, 尽管有抗原包含单个表位的例子。在本发明的一个实施方案中, 来自完整蛋白抗原的肽片断用于表现 B 细胞产生抗体靶向的各表位。在另一个实施方案中, 表达翻译后修饰的分子部分、碳水化合物、脂质和其它分子可用于表现各表位。表位表达的的形状由免疫 B 和 T 细胞识别, 也可被非抗原获得肽和其它分子表达, 这些分子有与天然抗原中存在的相同表位形状。有表位形状的元素例子是 aptamer。Aptamer 是提供可模仿免疫表位形状 of 的分子。用 aptamer 集合可产生表位形状库。

为了发明的目的, 自身抗原和来自自身抗原的表位的阵列可用于确定病人抗体特异性分布用于鉴定或确定: 1. 可能发展疾病的病人; 2. 可能发展或多或少严重疾病的病人; 3. 可能对具体治疗有反应的病人, 或有与具体治疗相关的反作用的病人; 4. 病人-特异治疗; 和 5. 具体治疗干涉是成功、不成功还是有害。自身抗原阵列包括多种已知与疾病关联、怀疑与具体疾病或潜在自身抗原库相联的自身抗原。在一

个例子中,自身抗原阵列可包括对具体疾病最优化的自身抗原,而在另一个例子中可包括未知抗原库以鉴定患病病人中抗体反应的靶。由自身抗原组组成的自身抗原阵列可用于筛选目的,其中组反映与具体疾病关联的不同表位。感兴趣的表位组包括对感兴趣的特定疾病最优化的组,可包括一种或更多完整蛋白、肽和这些蛋白序列中的重叠肽、表现显性表位的肽。如本文所用,术语多肽定义为任何蛋白和肽。当使用短肽时,优选肽至少约7个氨基酸长度,可至少约15个氨基酸长度并多达22个氨基酸长度。肽可重叠7-10个氨基酸,并可包括感兴趣蛋白质的全序列。肽也可模仿天然肽形状,例如环肽、核酸 aptamer、或可以是另一种分子、药物或模仿由抗体或T细胞受体分子识别的3维形状的有机分子。

免疫表位:免疫表位是任何肽、多肽、蛋白质、脂质、碳水化合物或其它由抗体或T细胞受体分子识别的分子部分。

自身抗原:是生物体产生的任何可成为免疫应答靶的分子。一方面,这种分子是生物体基因组内编码的肽、多肽、和蛋白质。另一方面,这种分子是这些肽、多肽、和蛋白质翻译后产生的修饰,如分裂、磷酸化、deimination 精氨酸成瓜氨酸、和其它通过生理和非生理细胞过程产生的修饰。而另外一方面,这种分子包括生物体产生的碳水化合物、脂质和其它分子。本文所用的自身抗原的例子包括内源蛋白质或其引起致病免疫应答的片断。具体感兴趣的是诱导T细胞调节致病应答的自身抗原。特征是T细胞参与的自身免疫疾病包括多发性硬化、实验性自身免疫脑炎、风湿性关节炎、胰岛素依赖性糖尿病等。

为了发明的目的,自身抗原或自身抗原表位的组可用于筛选目的,其中组反映与具体疾病相连的不同表位。感兴趣的表位组包括对感兴趣的特定疾病最优化的组,可包括一种或更多完整蛋白、肽和这些蛋白序列中的重叠肽、表现显性表位的肽。如本文所用,术语多肽定义为任何蛋白和肽。当使用短肽时,优选肽至少约7个氨基酸长度,可至少约15个氨基酸长度并多达22个氨基酸长度。肽可重叠7-10个氨基酸,并可包括感兴趣蛋白质的全序列。

抗原阵列包含的抗原组表达由自身免疫疾病或组织移植排斥中异常免疫应答靶向的自身蛋白、这些自身蛋白的修饰、存在于组织中的其它分子。

通常一组或一系列抗原包括一种或更多不同抗原分子,即蛋白质、脂质、多糖、多核苷分子,常常包括两种或更多不同抗原,更常见的是三种或更多抗原,并可包括多达五到十种不同抗原或更多。各抗原可由一种或更多不同表位表现,通常三种或更多表位,更常见的是五种或更多,并可包括多达十到二十种不同表位。

用于具体疾病的阵列例子是:用于脱髓鞘疾病的抗原组或阵列,如多发性硬化。

和 EAE, 且可包括的抗原和/或表位来自蛋白脂质蛋白 (PLP); 髓鞘碱性蛋白 (MBP); 髓鞘少突细胞蛋白 (MOG); 环核苷酸二酯酶 (CNP 酶); 髓鞘-相联糖蛋白 (MAG); 和髓鞘-相联少突细胞碱性蛋白 (MBOP); α -B-晶体蛋白 (一种热激蛋白); 病毒和细菌模仿肽如流感、疱疹病毒、乙肝病毒等; OSP (少突细胞特异蛋白); 瓜氨酸-修饰 MBP (MBP 的 C8 异构体, 其中 6 个精氨酸 de-immunated 成瓜氨酸) 等。整合膜蛋白 PLP 是髓鞘质的显性自身抗原。PLP 抗原性的决定簇在一些小鼠品系中鉴定, 包括残基 139-151、103-116、215-232、43-64 和 178-191。至少报道了 26 种 MBP 表位 (Meinl 等 (1993) *J. Clin. Invest.* **92**:2633-2643)。值得注意的是残基 1-11、59-76 和 87-99。在一些小鼠品系中鉴定的免疫显性 MOG 表位包括残基 1-22、35-55、64-96。

组或阵列可特异于疾病如多发性硬化、关节炎、SLE 等, 特异于一类疾病如移植相关疾病、过敏疾病等, 或可以是用于多种疾病的有广泛基础的抗原组。

疾病相关抗原。疾病相关抗原是已知与免疫相关疾病关联、或目前不知相联但最终显示相联的抗原。自身免疫疾病相关抗原的例子如下所述。用于脱髓鞘疾病如多发性硬化和 EAE 的抗原组或阵列可包括的抗原和/或表位来自蛋白脂质蛋白 (PLP); 髓鞘碱性蛋白 (MBP); 髓鞘少突细胞蛋白 (MOG); 环核苷酸二酯酶 (CNP 酶); 髓鞘-相联糖蛋白 (MAG); 和髓鞘-相联少突细胞碱性蛋白 (MBOP); α -B-晶体蛋白 (一种热激蛋白); 病毒和细菌模仿肽如流感、疱疹病毒、乙肝病毒等; OSP (少突细胞特异蛋白); 瓜氨酸-修饰 MBP (MBP 的 C8 异构体, 其中 6 个精氨酸 de-immunated 成瓜氨酸) 等。整合膜蛋白 PLP 是髓鞘质的显性自身抗原。PLP 抗原性的决定簇在一些小鼠品系中鉴定, 包括残基 139-151、103-116、215-232、43-64 和 178-191。至少报道了 26 种 MBP 表位 (Meinl 等 (1993) *J. Clin. Invest.* **92**:2633-2643)。值得注意的是残基 1-11、59-76 和 87-99。在一些小鼠品系中鉴定的免疫显性 MOG 表位包括残基 1-22、35-55、64-96。

用于胰岛素依赖性糖尿病的抗原组或阵列可包括的抗原和表位来自 IA-2; IA-2 β ; GAD; 胰岛素; 胰岛素原; HSP; glima 38; ICA69; 和 p52。

用于风湿性关节炎的组或阵列可包括的抗原来自 II 类胶原、hnRNP; A2/RA33; Sa; filaggrin; 角蛋白; 瓜氨酸; 包括 gp39 的软骨蛋白; 胶原类型 I、III、IV、V、IX、XI; HSP-65/60; IgM; RNA 聚合酶; 心磷脂; 醛缩酶 A; 瓜氨酸-修饰 filaggrin 和纤维蛋白等。识别含修饰精氨酸残基 (deimmunated 形成瓜氨酸) 的 filaggrin 肽的自身抗体在大部分 RA 病人血清中鉴定。自身反应 T 和 B 细胞应答在一些病人中都直接抗相同的免疫显性 II 类胶原 (CII) 肽 257-270。

用于系统性红斑狼疮 (SLE) 的抗原组或阵列可包括 DNA; 磷脂; 核抗原; Ro;

La; U1 核蛋白; Ro60(SS-A); Ro52(SS-A); La(SS-B); 钙网蛋白; Grp78; Sc1-70; 组蛋白; Sm 蛋白; 和染色质等。

用于眼色素层炎的抗原组或阵列可包括 S-抗原、和光感受器间类维生素 A 结合蛋白(IRBP)等。

用于重症肌无力的抗原组或阵列可包括有乙酰胆碱受体的表位。用于格雷夫斯病的表位可包括 Na⁺/I⁻同向转运; 促甲状腺素受体; Tg; 和 TP0。Sjogren 综合征组可包括 SSA(Ro); SSB(La); 和胞影蛋白。用于寻常性天疱疮的组可包括桥粒芯蛋白-3。用于肌炎的组可包括 tRNA 合成酶(如苏氨酰、组氨酰、丙氨酰、异亮氨酰、和甘氨酰); Ku; PM/Sc1; SSA; U1 sn-核糖核酸蛋白; Mi-1; Jo-1; Ku; 和 SRP。用于硬皮病的组可包括 Sc1-70; 着丝粒蛋白; U1 核糖核酸蛋白; 和纤维蛋白。用于原发性胆汁性肝硬化的组可包括丙酮酸脱氢酶 E2 和 α -酮戊二酸脱氢酶成分。用于恶性贫血的组可包括内因子; 和胃 H/K ATP 酶的糖蛋白 β 亚基。

自身抗体: 自身抗体是任何识别或结合自身抗原或自身表位的抗体。自身抗原或自身表位包括多肽、蛋白质、肽、脂质、多糖和这些基因组内编码或生物体产生的自身抗原的修饰。

过敏原是在易得病的人中引起增强的 Th2-型 T 细胞应答和 IgE B 细胞应答的免疫原性化合物, 包括过敏原相联哮喘。感兴趣的过敏原包括食物中发现的过敏原, 如草莓、花生、牛奶蛋白、蛋白等。其它感兴趣的过敏原包括多种空气传播抗原, 如青草花粉、动物头垢、家螨粪便等。分子克隆的过敏原包括 *Dermatophagoides pteronyssinus*(一种嗜皮螨)(Der P1); 来自黑麦春季花粉的 Lol pl-V; 一些昆虫毒液, 包括来自跳跃蚂蚁 *Myrmecia pilosula* 的毒液; 产蜜蜜蜂(*Apis mellifera*) 蜂毒磷脂酶 A2(PLA₂ 和抗原 5S; 来自小黄蜂 *Vespula maculifrons* 和白面大黄蜂 *Dolichovespula maculata* 的磷脂酶; 大量花粉蛋白, 包括桦树花粉、豚草花粉、*Parol*(*Parietaria officinalis* 的主要过敏原)和交叉反应过敏原 *Parj1*(来自 *Parietaria judaica*), 和其它空气花粉包括油橄榄(*Olea europaea*)、艾属、禾本科等。其它感兴趣的过敏原是那些引起过敏性皮炎的过敏原, 过敏性皮炎由吸血节肢动物导致, 如双翅目包括蚊子(疟蚊属、伊蚊属、*Culiseta* 属、库蚊属); 苍蝇(白蛉属、*Culicoides* 属)具体是黑蝇、鹿蝇和咀嚼蚊(biting midges); 扁虱(*Dermacenter* 属、*Ornithodoros* 属); 跳蚤如 order *Siphonaptera*, 包括 *Xenopsylla*、*Pulex* 和 *Ctenocephalides felis felis*。具体过敏原可以是多糖、脂肪酸部分、蛋白质等。

特异性分析的方法

免疫相关疾病包括：1. 自身免疫疾病，其中免疫应答异常地攻击自身抗原，自身免疫疾病的例子包括但不限于多发性硬化(MS)、风湿性关节炎(RA)、I型自身免疫糖尿病(IDDM)、和系统性红斑狼疮(SLE)；2. 过敏性疾病，其中免疫系统异常地攻击分子如花粉、粉尘螨(dust mite)抗原、蜂毒、花生油和其它食物等；和3. 组织移植排斥，其中免疫系统异常地攻击嫁接或移植组织中表达或包含的抗原，组织如血液、骨髓细胞、或包括心脏、肺、肾和肝脏的固体器官。样品获得自临床症状指示免疫相关疾病或更高可能性发展这种疾病的病人，这种可能性是以家族历史或遗传试验为基础。

人类病人取样的形式包括跟踪疾病进展的过程、在类似疾病阶段比较不同病人，如早期开始、急性阶段、恢复阶段等；追踪病人对治疗的应答过程，包括药物治疗、疫苗等。可汇编和分析来自动物的数据以提供详述疾病过程的数据库、参与疾病的抗原等，动物如小鼠、大鼠、兔、猴等。可从中收集病人抗体的生物样品包括血液和衍生物，如血清、血浆、血浆部分等。其它样品来源是体液如滑液、淋巴、脑脊液、支气管吸气，并可进一步包括唾液、牛脑、尿等。抗体和T细胞受体也都可获得自适当淋巴细胞，淋巴细胞收集自血液、组织如脾、胸腺、淋巴结、胎儿肝脏、自身免疫损伤位置上的组织如胰腺、关节、肾、脑脊液等。淋巴细胞可完整分析，或可制备溶解产物用于分析。病人样品包含抗体，且抗原阵列用于表现这些抗体分布。

在一个典型分析中，含抗体的病人样品与抗原阵列物理接触，接触在允许高亲和性结合的条件下但最小化非特异相互作用。在一个实施方案中，病人样品加到阵列上或含可寻址元件的空间中。冲洗阵列到没有非结合物质，检测结合抗体的存在，并与同源抗原相联。

在阵列内鉴定疾病相关抗原的方式使用本领域已知的检测方法，抗原结合病人样品中的抗体。那些鉴定方法可包括直接或间接预标记样品；加入结合抗体或间接标记的第二阶段抗体，如标记的山羊抗人-血清、大鼠抗-小鼠等。其它鉴定方法包括分析可寻址元件如珠、微粒、标记、可分裂标记和其它阵列内元件具有或赋予的物理性质。可存在单个表位的不同浓度以促进结合抗体的定量。

有用的标记包括荧光染料如 Cy2, Cy3, Cy5、荧光素异硫氰酸(FITC)、若丹明、德克萨斯红、藻红蛋白、别藻蓝蛋白、6-羧基荧光素(6-FAM)、2', 7'-二甲氧-2', 4', 7', 4', 7', -六氯荧光素(HEX)、5-羧基荧光素(5-FAM)或 N, N, N', N', - 四甲基-6-羧基若丹明(TAMRA))。间接标记包括半抗原如地高辛和地高辛配基、生物素等，

其中第二阶段结合伴侣如抗生物素蛋白、抗-地高辛抗体等可用酶标记，如山葵过氧化物酶、荧光染料、放射性标记等。优选的是当包括对照样品时，用于标记对照序列的荧光报道基因在激发和/或发射波长发出荧光信号，与用于标记测试序列的荧光报道基因发出的信号有可检测的不同。

检测也可用不要求标记的方法进行。例子包括检测结合的自身抗原的电荷或质量变化，检测用的方法或装置如单电子晶体管、应用于碳小管或小管网的蛋白质、表面胞质基因共振、原子力显微镜、和其它本领域技术人员已知的方法。

一般如在本领域已知，分析包括多种负和正对照。这些可包括有已知自身抗体的“针刺状”样品的正对照、患已知疾病的病人等。负对照包括来自正常病人、动物血清等的样品。

含样品的抗体与抗原阵列的结合根据本领域熟知的方法获得。结合条件和洗优先在仅允许高亲和性结合伴侣保留的条件下进行。

两种颜色标记不同抗体可用于结合相同或不同阵列，这是为了分析病人样品中相较对照样品的结合水平。对任何具体阵列元件，从一种颜色和另一种的比例可确定在两个样品中有具体特异性抗体的相对丰度。此外，比较两种样品的结合提供分析的内部对照。竞争性分析在本领域熟知，其中有已知特异性的竞争抗体或含分子的表位可包括在结合反应中。

可扫描阵列以检测抗体结合，如用描述于 Shalon 等, *Genome Res.* 6:639 (1996) 的扫描激光显微镜。用适当激发线路对各使用的荧光团进行分别扫描。随后结合扫描产生的数字图象用于后续分析。对任何具体阵列元件，来自一种样品的信号比例与来自另一种样品的荧光信号相比并确定相对丰度。

使用多种方法确定病人样品的抗体特异性分布。开始确定单个病人的抗体特异性分布，抗体特异性分布如本文所用是指抗原或表位被来自病人样品的抗体结合。比较获得自病人样品的结合模式和获得自对照或参考的结合模式，样品通过使用合适的推论方法(deduction protocol)、AI 系统、统计比较、识别模式算法等来完成。当数据矩阵各点与来自具体阵列或抗原或表位读数相应时，通常产生数据矩阵。来自参考模式的信息可用于分析方法以确定抗原或表位扩展、相对丰度、随着时间的变化、产生同种抗体的变化、和其它相关变化。

抗原或表位读数可以是测量相关的平均数、均值、中值或方差或其它统计或数学-所得值。抗原或表位读数信息可进一步通过与相应参考或对照模式直接比较来改进。结合模式可在一些点上评估：以确定数据矩阵中任何点上是否有统计上的显著变化；表位结合的变化是增加或减少；变化是否特异于一种或更多生理状态等。

在相同条件下获得的各表位的绝对值表现活生物系统中固有的差异并也反映各抗体差异以及个体间固有的差异。

鉴定参考模式的分类规则从几批训练数据(即数据矩阵)中建立,数据获得自多种重复实验。当分类规则正确鉴定重复参考模式并成功分辨不同参考模式时,分类规则被选择。分类规则-学习算法可包括决策树方法、统计方法、原始(naïve)贝叶斯算法等。

为有效鉴定和分类新试验模式,知识数据库肯定有足够复杂性。这可通过一些产生分类模式充分覆盖的方法和足够有力区分它们的数学/统计方法来完成。

在一个实施方案中,获得自血清和其它病理组织样品分析的信息用于改进和建立抗体特异性分布的数据库。例如,鉴定特异结合部分可用于跟踪疾病和发展治疗。

病人抗体特异性分布:如本文所用,抗体特异性分布指抗原或表位的抗原或表位阵列-确定光谱,抗原或表位由来自病人样品的抗体识别。

一旦鉴定具体样品特异性的亚型,数据用于发展新的诊断剂并选择对个人最适当的治疗。通过在个人基础上分析自身抗体特异性,确定存在于疾病状态中的特异表位靶。接着可选择一种或更多对单个病人和疾病有最佳特异性的治疗剂。

分析和治疗的条件

风湿性关节炎(RA)是影响8%世界人口的慢性自身免疫炎症关节膜炎。当前RA的治疗使用非特异性抑制或调节免疫功能的治疗剂。这种治疗包括最近发展的TNF α 拮抗物,不能根本上治愈,且疾病活性在治疗中止后迅速回复。临床上非常需要不引起全身免疫抑制或调节的从根本上治愈的治疗。

退化关节疾病可以是与血清反应阴性椎关节病一起的炎症,如僵硬脊椎炎和反应关节炎;风湿性关节炎;痛风;和系统性红斑狼疮。退化关节疾病共同的特征是关节软骨被侵蚀,最终暴露骨头表面。软骨破坏开始于蛋白多糖降解,由酶如基质溶素和胶原酶调节,导致抵抗压力的能力损失。接着粘合分子如CD44(Swissprot P22511)、ICAM-1(Swissprot P05362)以及细胞外基质蛋白如纤连蛋白和腱生蛋白表达变化。最后纤维胶原被金属蛋白酶攻击,当失去胶原微骨架时再生修复是不可能的。

在发炎关节炎过程中滑膜中有显著的免疫活性。早期阶段治疗是需要的,后期阶段中疾病的不利症状可至少由治疗缓解。关节炎严重性的临床指标包括疼痛、肿胀、疲劳和早晨僵硬,并可通过Pannus标准定量监控。动物模型中的疾病进展可通过测量受影响关节炎炎症来追踪。治疗发炎关节炎可结合试验者治疗和传统NSAID治疗。一般,试验者治疗不结合这种疾病修饰药物如环孢霉素A、氨甲蝶呤等。

能分泌 IFN- γ 的髓鞘质-自身反应 T 细胞的定量增加与 MS 和 EAE 发病相联,说明 MS 病人外周血液中的自身免疫诱导物/辅助 T 淋巴细胞可起始和/或调节 MS 病人中脱髓鞘过程。明显的疾病与肌肉虚弱、腹壁反射损失、表观缺陷和感觉异常相联。在感觉异常阶段中有白细胞渗透入脑脊液、炎症和脱髓鞘。家族历史和存在 HLA 单模标本 DRB1*1501、DQA1*0102、DQB1*0602 指示对疾病的敏感。可监控疾病进展的标记是脑脊液中抗体的存在、脑电图仪所示视皮层和脑干的“诱发潜能”、和 MR1 或计算机化 X 线断层摄影术发现存在的脊髓缺陷。疾病早期阶段中的治疗减慢或抑制进一步神经功能的损失。

人 IDDM 是导致胰岛素-分泌 β 细胞破坏和明显的高血糖症的细胞调节自身免疫疾病。T 淋巴细胞侵入胰岛并特异地破坏胰岛素-产生 β 细胞。缺乏 β 细胞导致没有能力调节血液中葡萄糖水平。当血液中葡萄糖水平上升到具体水平之上,通常约 250mg/dl, 发生明显的糖尿病。在人中,糖尿病开始前有一段长时间的症状出现前阶段。在此阶段中胰腺 β 细胞功能逐步损失。在通过家族历史和遗传分析诊断为易得病的人中,可监控疾病进展。最重要的遗传效果用主要组织相容性基因座 (IDDM1) 的基因了解,尽管其它基因座包括胰岛素基因区域 (IDDM2) 也显示与疾病相关(参见 Davies 等,同上和 Kennedy 等, (1995) *Nature Genetics* 9:293-298)。

在症状出现前阶段可评估的标记是胰腺中胰岛炎的存在、岛细胞抗体的水平和频率、岛细胞表面抗体、II 型 MHC 分子在胰腺 β 细胞上的异常表达、血液中的葡萄糖浓度、和胰岛素的血浆浓度。胰腺中 T 淋巴细胞、岛细胞抗体和血液葡萄糖数量的增加指示疾病,胰岛素浓度下降也如此。明显的糖尿病开始后,有剩余 β 细胞功能的病人也可从试验者实验中受益以防止功能进一步损失,病人的剩余 β 细胞功能通过胰岛素 C-肽的血浆持续性证明。

过敏或遗传性过敏症是对 IgE 为基础的敏感性倾向增加,导致产生特异 IgE 抗体给免疫原,具体是普通的环境过敏原如昆虫毒液、房屋粉尘小虫、花粉、孢子或动物头垢。过敏反应是抗原特异的。对抗原的免疫应答进一步以 Th2-型细胞因子如 IL-4、IL-5 和 IL-10 的过量产生和应答 T 细胞为特征。遗传诱病的人暴露于低浓度过敏原后发生过敏;香烟烟雾和病毒感染可协助过敏过程。

患遗传性过敏症的病人组包括有哮喘相联过敏的人。约 40%人群患遗传性过敏症,此组约半数发展临床疾病,范围从普通鼻炎到威胁生命的哮喘。过敏后,连续暴露于过敏原导致哮喘流行显著增加。患哮喘的 90%孩子和 80%成人是遗传性过敏。一旦发生过敏,再暴露于过敏原对哮喘恶化是一个风险因素。有效处理过敏哮喘包括药物治疗和避免过敏原。哮喘相联过敏的具体生理效果包括空中炎症、嗜曙红细

胞过多和产生粘液、产生抗原特异 IgE 和 IL-4。

除了影响人群的过敏，非人的哺乳动物也已知忍受过敏情况。跳蚤，*Ctenocephalides felis felis* 和其它，现在认为是引起哺乳动物生理疾病的主要原因。这些昆虫是攻击狗、猫和人的外寄生虫。一些种类(即狗和猫)和这些种中的个体比其它的对蚤咬更敏感，导致称为跳蚤过敏皮炎(FAD)或蚤咬超敏性的临床疾病。FAD 的特点是强烈的瘙痒症(痒)不仅在蚤咬位置而且以不同的、全身性的分布。过敏反应是对口分泌物中多种蛋白物质的全身反应，当跳蚤咬时将这些蛋白物质注射到皮内。慢性 FAD 导致疤痕和永久的光秃点并常与皮脂溢相联，使狗有会遍及家里的肮脏气味。跳蚤过敏也被认为引起称为丘疹风疹的人普通皮炎。

抗原特异治疗方法

如上所述，由病人样品中存在的抗体识别的抗原或表位可用于发展和选择抗原或表位特异治疗，治疗包括施用抗原或表位特异治疗剂，其中试剂通过结合病人抗体到阵列上可寻址元件来定义。病人抗体特异性分布可用于发展、选择和监控对抗原或表位特异治疗方法的应答，治疗方法包括：(1)口头施用特异-抗原，称为‘口头耐受’(Annu Rev Immunol. 12:809-37)；(2)施用天然肽(Science 258: 1491-4; J Neurol Sci. 152:31-8)；(3)施用改变的肽配体(Nature 379:343-5)；(4)施用完整蛋白质(Science 263: 1139)；施用融合蛋白或肽；施用其它分子如 DNA 或包括花粉、粉尘小虫、猫唾液抗原的过敏原(J. Rheumatology 28:257-65)；施用编码靶向自身蛋白或过敏原的多核苷序列(J. Immunol 162:3336-41; Curr. Dir. Autoimmun. 2:203-16)。对于所有这些治疗，用于免疫抑制目的的施用抗原(或以 DNA 编码)可包括所有或部分抗体鉴别的表位。在一个实施方案中，施用一个或更多这样鉴别的表位，常常两个或更多，更常见的是三个或更多，并可包括多达十个或更多不同表位。可施用各个肽或编码肽的 DNA。另外，可施用完整蛋白质或编码所有或几乎所有抗原蛋白的 DNA。因此可施用一个或更多，常常两个或更多，并可多达三个或更多不同表位。本文所用抗原特异治疗是指由本发明新方法确定的在抗原特异性分布基础上的治疗方案。

在发明的另一个实施方案中，上述以知识为基础的方法用于鉴定疾病模式，其中可描绘具体病人样品成疾病进展模式。在这些情况中，抑制性表位可不仅包括现在抗体识别的表位，而且可预期疾病进展和用药可能在疾病后期与疾病关联的肽，从而防止在许多自身免疫中观察到的表位扩展。

在一个实施方案中，治疗包括通过用药注入宿主组织的 DNA 表达盒来诱导抗原-特异、抑制性 T 细胞应答，例如肌肉或皮肤，如 PCT 应用 US00/0623 中所述例子。

载体包括编码至少部分自身抗原、移植抗原等的 DNA 序列。对此疫苗反应，引起抑制性应答。抗原-特异 T 细胞扩增被抑制且 Th1 细胞因子产生减少。

防止涉及靶抗原的自身免疫疾病通过在明显疾病发展前施用疫苗来完成。具体感兴趣的是治疗正发生的疾病，其中接种抑制性疫苗使病人临床症状稳定或改进。这种治疗需要在受影响组织功能完全丧失前进行。

编码所有、几乎所有或部分抗原、编码至少一个完整表位的 DNA 表达盒被引入受体的组织，DNA 表达盒通常作为载体的一部分。基因或小基因在组织中表达，编码的多肽作为免疫原或抗原。可假设由“非专业”细胞表达的抗原序列刺激抑制性 T 细胞应答，这种表达缺少共刺激分子如 CD80 和 CD86。

DNA 表达盒包括大部分或所有编码抗原片段的序列。编码序列可截去 5' 或 3' 末端并可以是完整多肽序列片断。在发明的一个实施方案中，序列编码已知呈递给致病 T 细胞的肽片断，例如由宿主 II 型 MHC 分子呈递的肽。这种肽在文献中描述，通常有约 8 到约 30 个氨基酸长度。在另一个实施方案中，序列编码完整抗原蛋白或几乎所有抗原蛋白。而在另一个实施方案中，序列编码自身蛋白，其中如果注入会有害或降低耐受效力的部分自身蛋白被去除。

疫苗可用一个表位或表位序列混合物制成。在一些情况中包括多种序列是需要的，其中各个编码一个不同表位。例如，参见 Leadbetter 等 (1998) *J. Immunol.* 161:504-512。包括多种不同表位编码序列的制剂可用于诱导更有力和/或持久的抑制性应答。通过特异靶向多种自身反应 T 细胞人群，这种制剂可减缓或防止自身抗原抗性的发展。

除了自身抗原的特异表位和多肽，免疫应答可通过包含如 Krieg 等 (1998) *Trends Microbiol.* 6:23-27 描述的 CpG 序列和 King 等 (1998) *Nat. Med.* 4:1281-1286 的辅助序列来增强。当注入动物时，DNA 基序像未甲基化 CpG 二核苷酸的生物效果可调节先天免疫应答，CpG 二核苷酸具体是碱基含量 (CpG-S 基序)。

抗原序列插入适当表达盒中。表达构建以常规方式制备。盒有助于在受体细胞中表达序列的适当转录和翻译调节序列。盒一般是载体的一部分，在引入受体前载体包含合适复制起点和编码可选择标记的基因，这些基因也许是载体生长、扩增和操作所需的。适当载体包括质粒、YACs、BACs、噬菌体、反转录病毒、腺病毒等。方便的表达载体是质粒。在引入受体前，盒可通过分裂、扩增等本领域已知方式从载体序列分离。对于注射，DNA 可以是超螺旋或线性，超螺旋优选。盒可在宿主细胞中维持较长的时间或可以是瞬时，一般是瞬时。稳定维持通过包含提供整合和/或维持的序列来获得，如反转录病毒、EBV 载体等。

表达盒一般使用外源转录起始区域,即除了在正常发生染色体中与T细胞受体相联启动子外的启动子。启动子在宿主细胞中有功能,具体是盒靶向的宿主细胞。启动子可通过体外重组方法或作为适当宿主细胞序列同源整合的结果来引入。启动子可操作地连接于抗原编码序列以产生可翻译 mRNA 转录本。表达载体方便地具有位于启动子附近的限制性酶切位点以促进抗原序列的插入。

制备的表达盒包括可以是组成型或可诱导的转录起始区域、编码抗原序列的基因、和转录终止区域。表达盒可引入多种载体中。感兴趣的启动子可以是可诱导的或组成型,通常是组成型,并提供受体细胞中的转录。启动子可仅在受体细胞类型中活化,或在许多不同细胞类型中广泛活化。许多哺乳动物细胞的强启动子在本领域中已知,包括 β -肌动蛋白启动子、SV40 早期和晚期启动子、免疫球蛋白启动子、人细胞巨化病毒、反转录病毒 LTRs 等。启动子可与或不与增强子相联,其中增强子可与具体启动子天然相联或一个不同启动子相联。

终止区域提供 3' 给编码区域,其中终止区域可与可变区域天然相联或获得自不同来源。可使用多种终止区域而没有不利地影响表达。

可在自身抗原序列末端插入少量核苷,通常不超过 20 个,更常见的是不超过 15 个。核苷缺失或插入通常是构建需要的结果,提供方便的限制性酶切位点、加入处理信号、加入统一的 Kozak 序列、使操作容易、提高表达水平等。此外,可为了类似原因用不同的氨基酸替换一个或更多氨基酸,通常在区域中不替换超过约 5 个氨基酸。

DNA 载体悬浮于生理可接受缓冲液,一般是水溶液如正常盐水、磷酸缓冲盐水、水等。稳定剂、润湿剂和乳化剂、盐和皮肤穿透增强子可作为佐剂,盐用于改变渗透压或缓冲液以保证合适 pH 值。DNA 通常以至少约 1ng/ml 和不超过约 10mg/ml 的浓度存在,常约从 100 μ g 到 1mg/ml。

DNA 耐受性治疗可分成两个或更多剂量,至少约 1 μ g,更常见的是至少约 100 μ g,优选的是至少约 1 mg 每剂量,用药从约 4 天到一周。在发明的一些实施方案中,个人试验一系列疫苗以产生充分、广泛的免疫应答。根据此方法,至少两次和优选的四次注射在一段时间中给予。注射间的时间段可包括注射间分开从 24 小时到两周或更长,分开一周优选。另外,至少两至四次单独注射同时在身体不同部分给予。

DNA 治疗剂皮下、皮内、静脉内、口头注入肌肉或其它组织或者直接注入脊髓或滑液。具体感兴趣的是进入骨骼肌的注射。遗传治疗剂可直接用药待免疫的个人或活体外给予取出的个人细胞,这些细胞是在用药后再输入的。通过任一途径,引

入遗传物质到个人身体中存在的细胞。另外，遗传治疗剂可通过多种方式引入从个人中取出的细胞。这种方式包括例如转染、电穿孔和微粒轰击。遗传构建为细胞吸收后，它们再移植入人中。另外有本文所包含遗传构建的非-免疫原性细胞可取自一个人并移植入另一个人。

布比卡因或有类似功能的化合物可在使用疫苗前或同时用药。布比卡因是马比佛卡因同源物并与利多卡因相关。它提供对钠挑战敏感的肌肉组织电压并影响细胞中的离子浓度。除了布比卡因、马比佛卡因、利多卡因和其它类似作用化合物，其它预期细胞刺激试剂包括外源凝集素、生长因子、细胞因子和淋巴因子，如血小板衍生生长因子(PDGF)、gCSF、gMCSF、表皮生长因子(EGF)和 IL-4。

另外或除了 DNA 耐受性，特异肽、修饰肽或蛋白质可治疗用药以诱导治疗自身免疫的抗原-特异耐受。可传递自身免疫应答靶向的天然肽以诱导抗原-特异耐受(Science 258:1491-4)。天然肽在静脉内传递以诱导免疫耐受(J Neurol Sci. 152:31-8)。

传递改变自天然肽的肽也在本领域已知。有关键残基选择性变化的天然肽修饰(修饰肽配体或“APL”)可诱导无感应性或改变抗原-特异自身反应 T 细胞的感应性。

“肽类似物”至少七个氨基酸长度且包含至少一种类似物和天然抗原肽间的氨基酸序列不同。来自天然肽的 L-氨基酸可改变成任何其它 20 种 L-氨基酸中一种，这 20 种 L-氨基酸普遍发现于蛋白质、任何一种相应 D-氨基酸、稀有氨基酸如 4-羟脯氨酸和羟赖氨酸、或非-蛋白质氨基酸如 β -丙氨酸和高丝氨酸。也包括在本发明范围内的是通过化学方法修饰的氨基酸，化学方法如甲基化(如 α -甲基缬氨酸)、通过烷基胺如乙胺、乙醇胺和乙二胺来酰胺化 C-末端氨基酸、酰化或甲基化氨基酸侧链功能(如酰化赖氨酸 ϵ 氨基)、deimination 精氨酸成瓜氨酸、异天冬氨酸化(isoaspartylation)、或磷酸化丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或组氨酸残基。

修饰肽配体如何有效的作用机制可包括不完全动员 T 细胞受体(TCR)。有一些 APL 可诱导的可能功能改变，这些包括：简单拮抗物，其中 APL 可竞争 MHC 结合抗原呈递细胞上的天然肽且不允许完全 T 细胞活化。这意味着没有信号由 APL 通过 T 细胞受体传输。能量，其中 APL 诱导 T 细胞中完全无感应性状态从而 T 细胞不应答天然肽。表型转换，其中 APL 可诱导 T 细胞中功能转换从而减少促炎细胞因子产生和/或增加非发炎细胞因子如 IL-4 或 IL-10 的产生。

肽和肽类似物可通过标准化学技术合成，包括由自动化过程合成。一般，肽类似物通过固相肽合成方法制备，固相肽合成方法包括偶联各受保护氨基酸残基于树脂支持体，4-甲基二苯甲基胺树脂优选，用二环己基碳二亚胺活化以产生有 C-末

端酰胺的肽。另外，氯甲基树脂(Merrifield 树脂)可用于产生 C-末端有自由羧酸的肽。附上最后的残基后，受保护肽-树脂用氟化氢处理以从树脂分开肽以及脱保护侧链功能基团。粗产物可用凝胶过滤、HPLC、分配层析或离子交换层析进一步纯化。

候选肽类似物可筛选它们治疗疾病的能力，筛选是通过测量竞争性结合 MHC 的分析和测量 T 细胞增殖的分析。那些抑制天然肽结合且不刺激自身反应 T 细胞增殖的类似物是有用的治疗剂。进一步试验候选肽类似物刺激或抑制 T 细胞增殖的性质，试验是通过测量类似物以直接方式引起 T 细胞增殖的能力或测量肽类似物抑制天然肽诱导的 T 细胞增殖的能力。

肽作为一种或不同表位混合物施用，通过一种途径例如静脉内或皮下提供免疫应答的抑制。APL 和天然肽都以 0.5-100mg/剂量的剂量在双周到一个月的基础上 IV 和皮下输递。

在另一个实施方案中，可传递自身免疫应答靶向的完整蛋白抗原以恢复免疫耐受来治疗自身免疫(Science 263:1139)。

过敏原免疫治疗或消除过敏是定期肠胃外用药作为抗原的过敏提取物，通常以增加的剂量规模直到作为维持治疗保持的剂量。免疫治疗的指示由上述抗体特异性诊断确定。过敏原免疫治疗通过提供定期注射过敏原到过敏试验者来进行，目的是减少症状和过敏反应迹象或防止未来抗如昆虫毒液、青霉素等抗原的过敏性反应。通常开始用低剂量，在几周时间中逐步增加剂量。

免疫治疗特异于注入的抗原。它导致下列免疫变化：T 细胞应答随着细胞因子产生的相应变化从 Th-2 型应答转换成 Th-1 型应答、降低的过敏原-特异 IgE 产生、增加的过敏原-特异 IgG 产生、减少的发炎细胞、减少的炎症介质和减少的组胺-释放因子。这些变化导致靶器官中过敏原反应降低。

待注入过敏原的量可根据经验获得且取决于受体大小，通常至少约 100ng 过敏原/千克体重且不超过约 1mg 过敏原/千克体重。剂量经常在注射过程中增加多达约十到一百万倍。注射时间表随着各病人变化。例如，Allpyral 制备每 1-2 周施用。应再强调的是免疫治疗时间表个人化且不推荐固定的时间表。过敏原注射很少“永久”但常在病人没有发生过敏症状后停止，当使用维持时间表时不要求 18-24 个月连续药物治疗。病人治疗平均持续时间是 3 到 5 年但在一些临床情况中可更长。如果症状在间断免疫治疗之后 6 到 12 个月观察段后复发，批准再评估。

过敏原免疫治疗对下列指示是适当的：严重、季节性(持续 2 年或更长)或终年、IgE-依赖鼻过敏结膜炎，其中最佳过敏原避免和药物治疗在控制症状中不充分有

效。IgE-调节过敏哮喘；具体是在其中暴露于过敏原和哮喘迹象及症状间有清楚的暂时联系，和那些连续几年在两个或更多过敏季节中发生症状的。房屋粉尘小虫或豚草花粉引起的 IgE-调节哮喘可用过敏原免疫治疗处理。IgE-调节过敏性反应针对昆虫刺。用来自小黄蜂、大黄蜂、白面大黄蜂、黄蜂和蜜蜂以及 fire 蚂蚁整体提取物的免疫治疗有有效的。

组织移植排斥 组织移植的免疫排斥由移植受体中直接抗移植器官的免疫应答来调节，组织移植包括肺、心脏、肝脏、肾、胰腺和其它器官和组织。当与移植受体氨基酸序列相比时，异源移植的器官包含氨基酸序列有变化的蛋白质。因为移植器官的氨基酸序列不同于移植受体的，它们常在受体中引起抗移植器官的免疫应答。抗移植器官的排斥是组织移植的主要复杂因素和限制，并可引起受体中抗移植器官的失败。由排斥产生的慢性炎症导致移植器官中功能异常。移植受体目前用多种免疫抑制剂处理以防止和抑制排斥。这些试剂包括糖皮质激素、环孢霉素 A、Cellcept、FK-506、和 OKT3。

要理解的是此发明不限于所述具体方法、操作、细胞系、动物种或属、和试剂，因为这些可变化。也要理解的是本文所用术语仅为了描述具体实施方案的目的，不想限制本发明范围，本发明范围仅由所附权利要求书限制。

如本文所用，除非另有明确说明，单数形式包括复数指示物。除非另有明确说明，所有本文所用技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员一般理解相同含义。

提出下列实施例是为了提供本领域普通技术人员关于如何制造和使用此主题发明的完整揭示和描述，并不想限制认为是发明的范围。努力确保所用数字(如量、温度、浓度等)的精确性但应允许一些实验误差和偏差。除非另有说明，部分是重量部分、分子量是平均分子量、温度是摄氏度；压力是或接近大气压。

本说明书中所有引用的出版物和专利申请纳入本文参考文献，各单独出版和专利申请特定或单独指示纳入参考文献。

实验

实施例 1

大鼠和小鼠 EAE 中自身抗体反应特异性的抗原阵列描述

为确定 EAE 动物血清中自身抗体特异性分布，进行测试血清抗体结合蛋白质微阵列的试验。

如表 1 所列，抗原阵列通过点样免疫显性髓鞘肽表位产生并纯化天然髓鞘碱性

蛋白。图 1A-D 是用来自正常对照大鼠(A)和 3 只 Lewis 大鼠作探针阵列的扫描图像, Lewis 大鼠被诱导在完全弗氏佐剂中发展有不同髓鞘蛋白肽的 EAE, 接着用 Cy-3 标记的抗大鼠 Ig 二级抗体。

扫描图像的定量计算机分析示于表 1。所报道的数字代表来自 EAE 动物血清识别的抗原相对对照血清的荧光强度, 对照血清调节背景水平使大于或小于 1(1=没有区别)的比例代表有>95%置信区间的统计差异。结果用 ELISA 确认。这些结果证明抗原阵列有力地鉴定 EAE 自身抗体反应的肽-特异性。

表 1. lewis 大鼠中 EAE 自身抗体反应特异性的抗原阵列描述

	大鼠 EAE-1 MBP 68-86	大鼠 EAE-2 PLP 139-151	大鼠 EAE-3 MOG 35-55
MBP 68-86	117.7	1.0	1.0
PLP 139-151	1.0	67.6	1.0
GP MBP	25.4	1.0	1.0
MOG 35-55	1.0	1.0	15.6
MBP Ac 1-11	1.0	4.0	1.0
绿色/红色	2.3	0.8	2.1
绿色	1.8	0.7	2.5
碱性磷酸酶	1.0	1.0	1.0
流感 A/B	1.0	1.0	1.0
BSA	1.0	1.0	1.0
空白	1.0	1.0	1.0
标记	1.0	1.0	1.0
对照 pep-127	1.0	1.0	1.0
对照 pep-128	1.0	1.0	1.0
对照 pep-129	1.0	1.0	1.0
对照 pep-130	1.0	1.0	1.0
对照 pep-131	1.0	1.0	1.0

实施例 2

自身免疫风湿性疾病中病人抗体特异性分布的确定

自身抗原阵列鉴别 8 种不同人类自身免疫风湿性疾病的自身抗体分布特征。超

过 50 种特征高度表现的自身免疫血清样品的自身抗原阵列分析的代表性例子被提出(图 2)。

有序自身抗原阵列通过用机器微阵列仪点样 4 批 192 种不同推定自身抗原以建立一个 1152-特征风湿病自身抗原阵列。点样的抗原包括: 36 种重组或纯化的蛋白质, 包括 Ro52、La、组氨酰-tRNA 合成酶(Jo-1)、SR 蛋白、组蛋白 H2A(H2A)、Sm-B/B'、U1 小核内核糖核蛋白复合体的 70kDa 和 C 成分(U1-70kDa、U1snRNP-C)、Sm-B/B'、hnRNP-B1、Sm/RNP 复合体、拓扑异构酶 I(topo I)、着丝粒蛋白 B(CENP B)、丙酮酸脱氢酶(PDH); 6 种以核酸为基础的推定抗原, 包括一些形式的哺乳动物双链 DNA(dsDNA)和合成单链 DNA(ssDNA); 154 种表达 SnRNP 蛋白、Sm 蛋白、组蛋白 H1、H2A、H3 和 H4 的肽。此外, 我们点样人 IgG 和 IgM 特异的抗体(α -IgG 和 α -IgM); 流感 A 和肺炎球菌(Pneumovax)的疫苗; 用 Cy-3-和 Cy-5 预标记抗体的混合物以作为标记点来确定阵列方向(黄色特征)。自身抗原阵列培养用的稀释病人血清样品来自(a)没有检测到特异自身抗体反应的健康人(正常); (b)表现抗 Ro52 和 La 自身抗体反应的斯耶格伦综合征; (c)表现抗 DNA、组蛋白 H2A、U1-70kDa 和 SR 蛋白反应的 SLE; (d)表现抗 Jo-1 和 Ro52 反应的 PM; (e)表现抗 DNA、组蛋白 H2A、Ro52 和 U1-70kDa 反应的 MCTD; (f)表现抗 PDH 反应的 PBC; (g)表现抗 topo I 反应的 sclero-D; (h)表现抗 CENP B 反应的 sclero-L; 和(i)表现抗 hnRNP-B1 反应的 RA。用于探针的自身免疫疾病血清沿图顶部表示, 灰色盒子中所含的各列切下和粘贴抗原特征是来自主个阵列的典型抗原特征。阵列上由来自啮齿动物血清中自身抗体识别的髓鞘碱性蛋白肽作为典型负对照(MBP 68-86)包括, 啮齿动物有实验自身免疫脑脊髓炎。结合的抗体扫描前用 Cy-3-缀合山羊-抗-人 IgM/IgG 检测。

如出版物所示, 高度特征表现的血清样品获得自患斯耶格伦综合征、SLE、PM、混合性结缔组织病(MCTD)、PBC、扩散和限制性硬皮病(sclero-D 和 sclero-L)、和风湿性关节炎(RA)的病人, 血清样品鉴别不同和诊断自身抗体特异性模式。例如, 检测到直接抗 DNA 和组蛋白的 SLE-特异自身抗体(图 2c)。DNA-特异自身抗体在一些模式中是病原, 且它们的滴度常与疾病活性相关。Jo-1 自身抗体(图 2d)常预测几个月到几年的临床 PM, 并预测肺间隙疾病的发展和不良预报。来自扩散或限制性硬皮病病人的自身抗体分别独特靶向 topo I 和 CENP B(图 2g 和 h)。CENP B 自身抗体与低概率肺间隙和肾病相联, 而拓扑异构酶自身抗体与肺纤维化风险提高和存活降低相关。当来自 10 个健康人的血清作为探针时, 没有观察到自身抗原反应, 尽管可重复检测到肺炎球菌和流感的抗体(图 2a)。这些阵列分布与前述常规试验的结果精确相关。

这些结果证明抗原阵列检测特异于蛋白质、肽、核酸、翻译后修饰抗原、和蛋白复合体的自身抗体。这种信息可用于诊断、预测、监控对治疗的反应，并发展和选择抗原-特异治疗。

实施例 3

确定来自人多发性硬化病人脑脊液的自身抗体特异性分布

含髓鞘蛋白和肽的抗原阵列用于表现来自多发性硬化病人脑脊液样品中自身抗体的特异性(图 3)。图 3 中的阵列证明检测到的脑脊液自身抗体特异于完整髓鞘碱性蛋白(MBP)、MBP 肽 1-20(相应于 MBP 氨基酸 1-20)、MBP 肽 68-86、完整髓鞘少突细胞蛋白(MOG)、MOG 肽 35-55、和蛋白脂质蛋白(PLP)肽 139-151。如实施例 2，这种信息可用于诊断、发展、监控和选择特异治疗。

通过用机器微阵列仪点样这些推定髓鞘抗原来产生 2400-点‘髓鞘蛋白组’阵列，探针用脑脊液，接着用 Cy-3-标记的抗-人 Ig 二次抗体，用 GenePix 扫描仪扫描，用 GenePix 软件分析图像以确定结合各点的自身抗体的水平。这些阵列包含 400 种不同髓鞘蛋白和肽表位，包括 MBP、蛋白脂质蛋白(PLP)、髓鞘少突细胞蛋白(MOG)、表达这些蛋白的重叠肽、和表达来自另外包括环核苷酸二酯酶(CNP 酶)的髓鞘自身抗原显性表位的肽、髓鞘-相联糖蛋白(MAG)、和髓鞘-相联少突细胞碱性蛋白(MBOP)。

在对照病人中，尽管检测到共同和普遍人病原体的特异抗体，病原体包括流感病毒和肺炎链球菌，没有检测到髓鞘蛋白和肽的特异抗体。在 MS 病人 1 中，抗原阵列检测到完整髓鞘碱性蛋白(MBP)、完整髓鞘少突细胞蛋白(MOG)的特异自身抗体以及识别 MOG 肽 35-55、MBP 肽 1-20 和 MBP 肽 68-86 的自身抗体。相反，在 MS 病人 2 中，检测到抗 MOG 蛋白和 MOG 肽 25-42 的自身抗体。在 MS 病人 3 中，鉴定了蛋白脂质蛋白(PLP)肽 139-151 的特异抗体。

实施例 4

使用病人抗体特异性分布来指导选择治疗风湿性关节炎的抗原特异治疗

风湿性关节炎、胶原-诱导关节炎(CIA)动物模型中自身抗体反应的抗原阵列分析。图 5 显示含约 450 种不同滑液关节蛋白和肽的 RA/CIA 阵列图像，蛋白和肽包括 II 型胶原(CII)、胶原种类 I、III、IV、V、IX 和 XI、GP-39、免疫球蛋白、Sa、钙蛋白酶抑制蛋白、RA33、醛缩酶 A、热激蛋白-60 和-65、葡萄糖-6-磷酸异构酶、分子伴侣 BiP、瓜氨酸-修饰纤维蛋白和 filaggrin 肽和蛋白。

图 5 使用来自滑液关节的抗原和表位阵列显示抗体特异性分布以确定 CIA 中自身抗体反应的特异性。通过用机器微阵列仪点样推定滑液关节抗原来产生 2000-点 ‘滑液蛋白组’ 阵列，探针用 CIA 小鼠血清，接着用 Cy-3-标记的抗-小鼠 Ig 二次抗体，用 GenePix 扫描仪扫描，用 GenePix 软件分析图像以确定结合各点的自身抗体的水平。A-B 显示用来自对照 DBA/1LacJ 小鼠 (A) 和有 CIA 的 DBA/1LacJ 小鼠 (B) 血清作为探针的阵列扫描图像。观察到抗 II 型胶原和免疫显性 II 型胶原肽 257-270 的自身抗体反应。结果用 ELISA 确定且代表另外小鼠中观察到的自身抗体反应。为了诊断和治疗目的，确定自身抗体反应特异性也可用常规方法完成，常规方法包括放射性免疫测定、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、以荧光为基础的自身抗体试验和/或蛋白质印迹分析。

用编码抗原阵列的抗原-特异 DNA 耐受性处理治疗 CIA 鉴定了 CIA 中自身抗体反应的靶。DNA 耐受治疗在表位特异性分布的基础上设计，此特异性分布根据发明在图 5 中确定。用 DNA 耐受防止或治疗 CIA，DNA 耐受编码 II 型胶原 (CII)、CIIp257-270 的表位，这些表位用图 5 所示范抗原阵列鉴定为自身抗体反应的靶。此外，编码完整 II 型胶原的耐受 DNA 也用图 5 所示抗原阵列鉴定为 CIA 中自身免疫反应的靶，它也有效防止和治疗 CIA。表 5 列出代表性实验的数据。

表 5. 耐受 DNA 治疗组	CIA 概率	净 CIA 值
pTarget+ (仅 DNA 载体、对照)	0. 53	22
ptarget+IL-4 (DNA 载体+IL-4、对照)	0. 4	32
小基因 (编码 CIIp257-270 的 DNA)	0. 13	4
小基因+IL-4	0	4
CII (编码完整 CII 的 DNA)	0. 13	8
CII+IL-4	0. 06	4

在用完全弗氏佐剂中乳化的 CII 诱导 CIA 前，编码 II 型胶原 (CII) 的 DNA 肌肉内用药于 DBA/1LacJ 小鼠，以每周一次 100 μ g 剂量各 DNA 质粒为基础共两次。用不完全弗氏佐剂中的 CII 的动物在第 20 天上升。每天用公开示分系统获得各小鼠关节炎的分数。

实施例 5

使用抗体特异性分布指导治疗多发性硬化的抗原特异治疗的发展和选择

多发性硬化、EAE 动物模型中自身抗体反应的抗原阵列分析。图 4 显示含约 400 种不同髓鞘蛋白和肽表位的 2400-点 MS/EAE 阵列，髓鞘蛋白和肽表位包括 MBP、蛋白脂质蛋白 (PLP)、髓鞘少突细胞蛋白 (MOG)、表达这些蛋白的重叠肽、和表达来自另外包括环核苷磷酸二酯酶 (CNP 酶) 的髓鞘自身抗原显性表位的肽、髓鞘-相联糖蛋白 (MAG)、和髓鞘-相联少突细胞碱性蛋白 (MBOP)。

图 4 示范使用此含髓鞘抗原和表位的阵列以研究 EAE 中自身抗体反应的特异性。通过用机器微阵列仪点样推定髓鞘抗原来产生 2400-点 ‘髓鞘蛋白组’ 阵列，探针用 EAE 小鼠血清，接着用 Cy-3-标记的抗-小鼠 Ig 二次抗体，用 GenePix 扫描仪扫描，用 GenePix 软件分析图像以确定结合各点的自身抗体的水平。A-C 显示阵列扫描图像的探针所用血清来自对照小鼠 (A) 和 2 只 SJL 小鼠，SJL 小鼠用 PLPp139-151 诱导 EAE 后 87 天疾病复发 (B&C)。2 只 EAE 小鼠中抗诱导肽 PLPp139-151 的自身抗体反应相对对照显著强烈，小鼠-2 中观察到抗邻近分子内表位 PLPp89-106 的自身抗体反应但小鼠-1 或对照没有观察到，EAE 小鼠中都观察到抗分子间蛋白和表位的自身抗体反应但对照没有，分子间蛋白和表位包括 MOG 蛋白、MOGp66-78、CNP 酶 p343-373、和 MBPp1-20。结果用 ELISA 确认且代表另外小鼠中观察到的自身抗体反应。

SJL 小鼠用完全弗氏佐剂 (CFA) 中的 PLPp139-151 诱导 EAE 发展，诱导的 SJL 小鼠经历它们自身免疫反应在分子内和分子间扩展至邻近 PLP 上的肽表位以及 3 种另外髓鞘蛋白上的肽表位，3 种髓鞘蛋白上包括 MBP、MOG 和 CNP 酶 (图 4B 和 C)。在有 EAE 的 SJL 小鼠中，临床复发较少的小鼠自身抗体反应扩散显著较少 (图 5)。发现自身抗体的表位扩散增加与复发和更严重疾病关联，自身抗体应答另外的髓鞘抗原，此发现提供证据表明使用抗原阵列的自身抗体特异性分布可用于预测各动物中的临床结果。并行的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 分析鉴定并证实抗原阵列确定的自身抗体反应特异性。以前没有描述自身抗体反应扩散和它与 EAE 中更严重疾病的相互关系、T 细胞调节疾病且它们证明了确定自身抗体特异性分布的诊断和预测效用。

抗原-特异 DNA 耐受治疗剂作为抗原-特异治疗的例子。慢性复发 EAE 可通过引入编码 PLP 表位的 DNA 质粒小基因来防止和治疗 (*J. Immunol* 162:3336-41; *Curr. Dir. Autoimmun.* 2:203-16; 表 2)。编码一些完整髓鞘蛋白的 DNA 疫苗在治疗 EAE 上更有效 (表 2 和 3)。传递与 IL-4 结合的 DNA 疫苗进一步提高保护效果，DNA 疫苗编码所有髓鞘抗原 (表 3)。

表 2. 治疗慢性复发 EAE 的抗原-特异 DNA 耐受治疗剂, 它编码用抗体特异性分布鉴定的抗原

DNA	n	平均复发比率	与混合物相比的 p 值
载体	17	2.94	0.0064
仅载体	16	3.875	<0.0001
混合物	16	1.563	

¹ 施用混合物治疗的小鼠每星期一次肌肉内治疗, 治疗以 50 μ g 四种主要髓鞘质粒 MBP、MOG、MAG、和 PLP 的剂量。混合物由编码这四种髓鞘抗原的 DNA 组成。治疗在从 EAE 最初急性发生中恢复后立即开始。当小鼠在第 87 天牺牲后, 收集血清并在髓鞘蛋白阵列上使用。每天为各小鼠打分且列出各组小鼠 87 天中临床瘫痪恶化(复发)的平均数字。p 值用斯氏两端不成对 t 检验 (Student's two-tailed unpaired t test) 来计算。

表 3. 治疗慢性复发 EAE 的抗原-特异 DNA 耐受性治疗剂, 它编码用抗体特异性分布鉴定的抗原, 包含编码 IL-4 的 DNA 质粒以加强此效果

DNA	n	平均复发比率	与混合物/ IL-4 相比的 p 值
载体	20	2.45	0.0018
IL4	14	2.93	0.0003
PLP139-151/ IL-4	17	1.94	0.0158
混合物	18	1.44	0.1714
混合物/ IL-4	17	0.941	

¹ 施用混合物的小鼠每星期一次肌肉内治疗, 治疗以 25 μ g 四种主要髓鞘质粒 MBP、MOG、MAG、和 PLP 的剂量。混合物由编码这四种髓鞘抗原的 DNA 组成。所有其它 DNA 以 50 μ g 质粒每只动物的剂量一周一次。治疗在从 EAE 最初急性发生中恢复后立即开始。每天为各小鼠打分且列出各组小鼠 81 天中临床瘫痪恶化(复发)的平均数字。p 值用斯氏两端不成对 t 检验来计算。

用对所选抗原-特异 DNA 耐受性治疗应答的自身抗体特异性来更有效治疗 EAE。我们用编码多种髓鞘抗原的 DNA 质粒治疗 SJL 小鼠中的慢性复发 EAE, 髓鞘抗原通过抗原阵列确定的抗体特异性分布鉴定。表 4 显示来自多种使用抗原-特异 DNA 耐受性治疗剂实验的累积结果, 治疗剂用于(1)防止 EAE 诱导, (2)治疗建立的 EAE。表 4 证明编码更大数量蛋白阵列鉴定自身抗原的抗原-特异 DNA 质粒相较仅编码一种靶向自身抗原(或编码非靶向髓鞘蛋白)的质粒在治疗 EAE 中有更高效率, 自身抗原由自身免疫过程靶向。在抗原阵列确定的抗原特异性分布基础上选择和发展的抗原-特异治疗使用导致更有效的治疗。

表 4 用抗原-特异 DNA 耐受性治疗剂防止和治疗 EAE 的累积结果

耐受性 DNA 制剂	EAE 疾病减少	
	无 IL-4	有 IL-4
仅载体	-	-
MOG	-/+	++
PLPp139-151	+	++
混合物:MBP、MOG、MAG、PLP	+++	++++

实施例 6

使用抗体特异性分布来监控对治疗的反应

用 DNA 质粒保护动物抗 EAE 或治疗 EAE 的分析在蛋白质阵列分析上证明自身抗体反应的表位扩散减少(图 6)。各小鼠列于 X 轴,肽和蛋白抗原示于 Y 轴上的‘髓鞘蛋白组’阵列。绿色表示缺少活性,红色表示自身抗体活性。以抗原阵列类似性为基础的串列分析算法组小鼠确定它们自身抗体反应的特异性。此图像表示全部串列的一小部分。正常小鼠(NMS)串列和绿色占优势表明缺少自身抗体对所列抗原的反应。慢性复发 EAE 的 SJL 小鼠用对照载体或缓冲(B 和 C)串列处理并有显著自身抗体反应,相对多种髓鞘抗原用红色表示。在这些小鼠中观察到的自身抗体反应的扩展与它们更严重的疾病过程相关,87 天时间段平均有 2.4-3.5 次复发。瘫痪(复发)临床恶化的平均数字示于图顶部,通过表示相关小鼠组的柱上的数字表示。相反,小鼠用髓鞘蛋白混合物 DNA 耐受性治疗剂(含大量抗原阵列鉴定的自身免疫反应靶,显示处理 EAE[表 4]中的最大效率)串列处理且如绿色相对其它组增加所示,它们自身免疫反应的扩展显著减少。自身免疫反应扩展的减少与它们严重程度较低的临床过程相关,87 天时间段平均有 1.5 次复发。

图 6 显示来自 EAE 小鼠抗原阵列的串列分析,EAE 小鼠用抗原-特异 DNA 耐受性治疗剂处理。编码 4 种髓鞘抗原的髓鞘蛋白混合物 DNA 耐受性有力地减少 B 细胞表位扩散,髓鞘抗原通过自身抗体反应靶向的抗原阵列鉴定(图 6)。这与它显著降低由复发速度测量的疾病活性相关(表 2 和 3,图 6)。因此以抗原阵列为基础的自身抗体分布除了在指导选择抗原-特异治疗中 useful,也可用于监控对抗原特异治疗的反应。尽管没有显示,结合阵列上各抗原特征的同种抗体分析可更详细地分析且预测治疗反应。例如,在人自身免疫疾病中治疗效果可通过抗原阵列鉴定同种抗体亚型的转换来指示,同种抗体亚型在自身免疫疾病中从与组织损伤相连的 Th1 同种亚型 IgG1 和 IgG3 到与抗组织损伤保护相连的 Th2 同种亚型 IgG2 和 IgG4。使用自

身抗体反应的特异性选择来抗原-特异治疗通过抑制自身免疫反应的扩散在根本上治疗自身免疫过程，且这与疾病活性降低相关。

实施例 7

以病人抗体特异性分布为基础的用于组织移植的治疗

组织移植的一个主要限制是受体免疫系统对移植组织的排斥。组织移植包含移植血液和血液-获得细胞以及移植固体器官，固体器官包括心脏、肺、肾、肝脏和其它器官。免疫排斥由识别组织移植蛋白中等位基因变异的受体免疫系统调节。组织移植排斥由受体在组织移植中抗 MHC I 和 II 类蛋白和抗其它组织相容性和与另外抗原的免疫反应调节，另外抗原在组织移植中与受体相比有等位基因变异。当移植受体的免疫系统对移植物反应时，它产生结合移植物内抗原的抗体。

在 Balb/c (H-2^d) 和 Balb/k (H-2^k) 小鼠间使用组织移植，含抗原的抗原阵列和表达 H-2^d I 和 II 类 MHC 分子的表位用于确定抗体分布。使用标准操作，心脏从 H-2^d 小鼠移植入 H-2^k 小鼠中的异位腹部位置(异位移植能通过简单触诊紧密监控移植的心脏)。来自受体小鼠的血清用所述抗原阵列分析以鉴定抗供体 MHC 分子的抗体反应。抗体分布的鉴定能鉴别排斥移植心脏的受体动物。抗体分布也能评估排斥的严重性用于预测，并指导非-特异治疗的选择。抗体特异性分布也可用于发展和选择抗原-特异治疗来处理组织移植排斥以防止移植组织的死亡。在此例子中，移植存活通过触诊移植的心脏来监控。

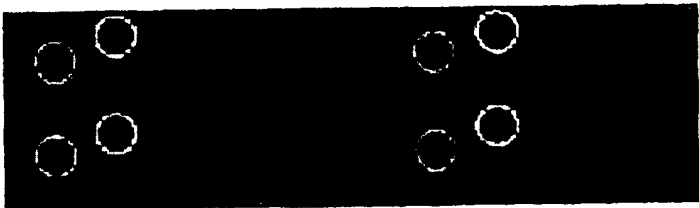
实施例 8

以抗体特异性分布为基础的用于过敏性病的治疗

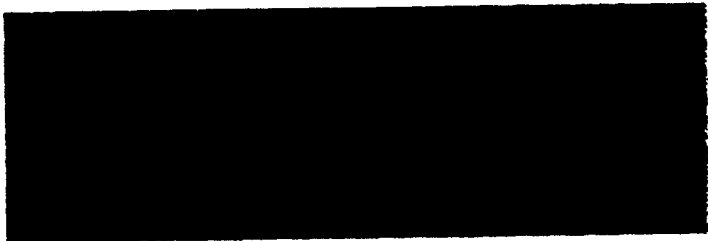
过敏性病由直接抗外源过敏原的异常免疫应答来调节，病人暴露于外源过敏中。例子包括的过敏反应针对花粉、房屋粉尘小虫抗原、蜂毒、花生油和其它存在于环境中的分子。在过敏反应中病人产生直接抗入侵过敏原的抗体。产生含过敏原的阵列、表达过敏原的免疫表位并用于确定病人直接抗过敏原的抗体特异性分布。病人抗体特异性可进一步用于发展和选择使用适当过敏原以耐受病人。耐受病人包括以关闭病人异常过敏免疫反应的方式施用入侵过敏原，过敏免疫反应直接抗入侵过敏原。病人抗体特异性分布也可用于监控病人对过敏原耐受治疗的反应，以改变抗-过敏原抗体反应、过敏原抗体滴度和/或使用抗-过敏原抗体同种亚型为基础。



A. 正常大鼠血清



B. 用MBPp68-86诱导的大鼠EAE

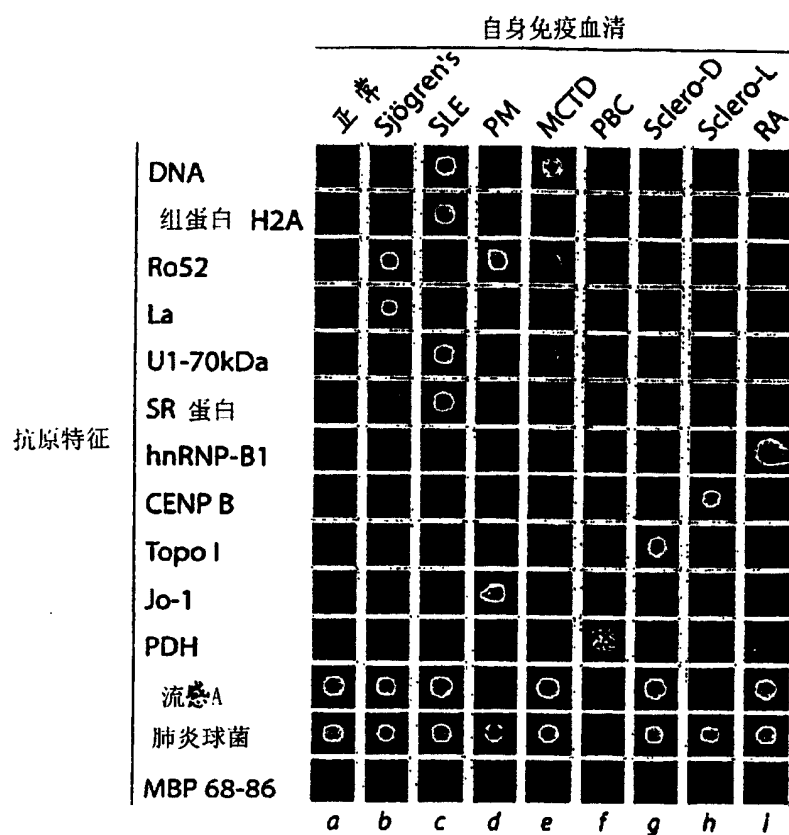


C. 用PLPp139-151诱导的大鼠EAE



D. 用MOGp35-55诱导的大鼠EAE

图 1



j. 定量分析

Ag特征	正常	Sjögren	SLE	PM	MCTD	PBC	Sclero-D	Sclero-L	RA
DNA	78	352	16,905	0	5,001	1	314	37	26
组蛋白 II-A	93	44	3,009	0	918	1	100	60	0
Ro52	374	20,934	196	17,396	1,818	93	280	121	143
La	108	8,102	564	0	0	1	119	6	0
U1-70kDa	190	135	6,825	31	2,315	159	274	77	153
SR 蛋白	262	629	8,745	112	135	342	237	182	0
hnRNP B1	379	269	1,416	428	978	381	458	317	713
CENP B	12	33	435	21	0	262	11	11,947	0
Topo I	91	113	551	0	11	1	10,095	27	0
Jo-1	24	97	334	28,753	0	1	485	0	3
PDH	190	40	377	40	75	6,609	222	526	279
流感	15,065	19,809	13,521	1,266	18,686	1	11,641	475	9,134
肺炎球菌	15,580	8,153	29,669	2,779	30,473	1	20,509	5,729	18,374
MBP 68-86	99	13	314	8	0	7	46	40	0

图 2

来自对照和多发性硬化病人的脑脊液中自身抗体反应特异性的抗原阵列分析。

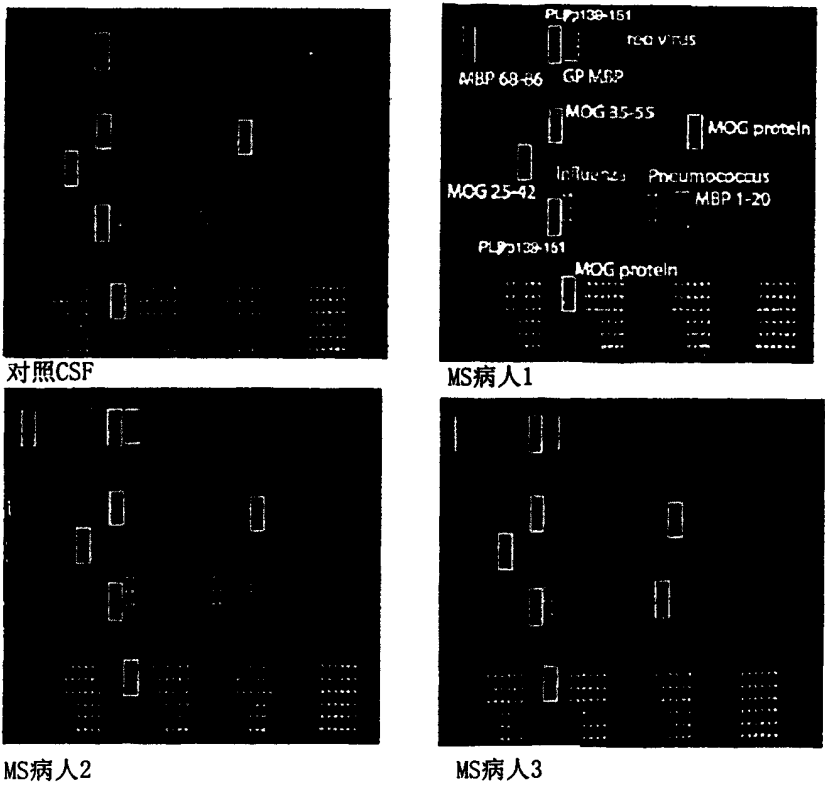
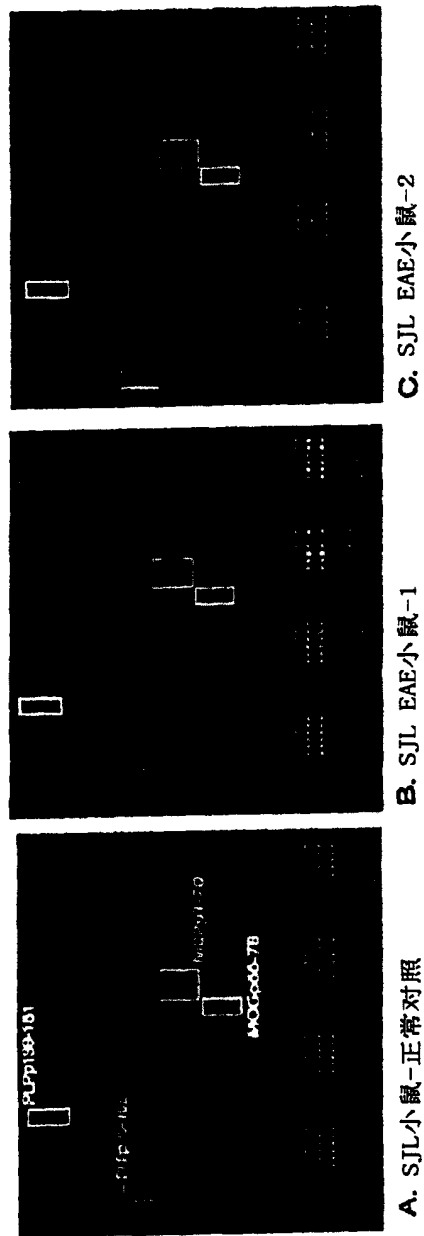
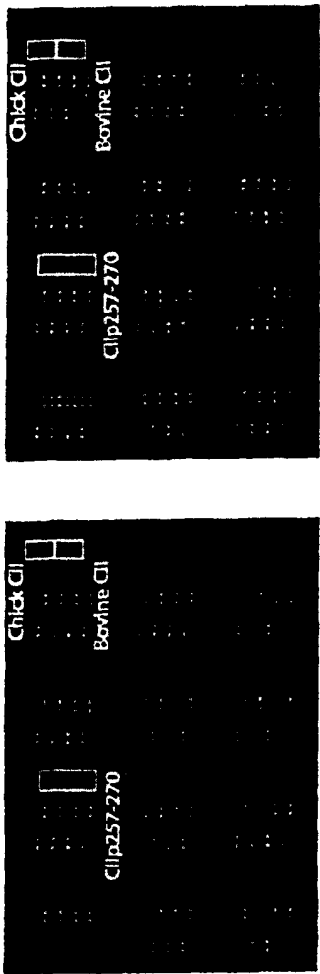


图 3



EAE小鼠中自身抗体反应特异性的抗原阵列描述

图 4



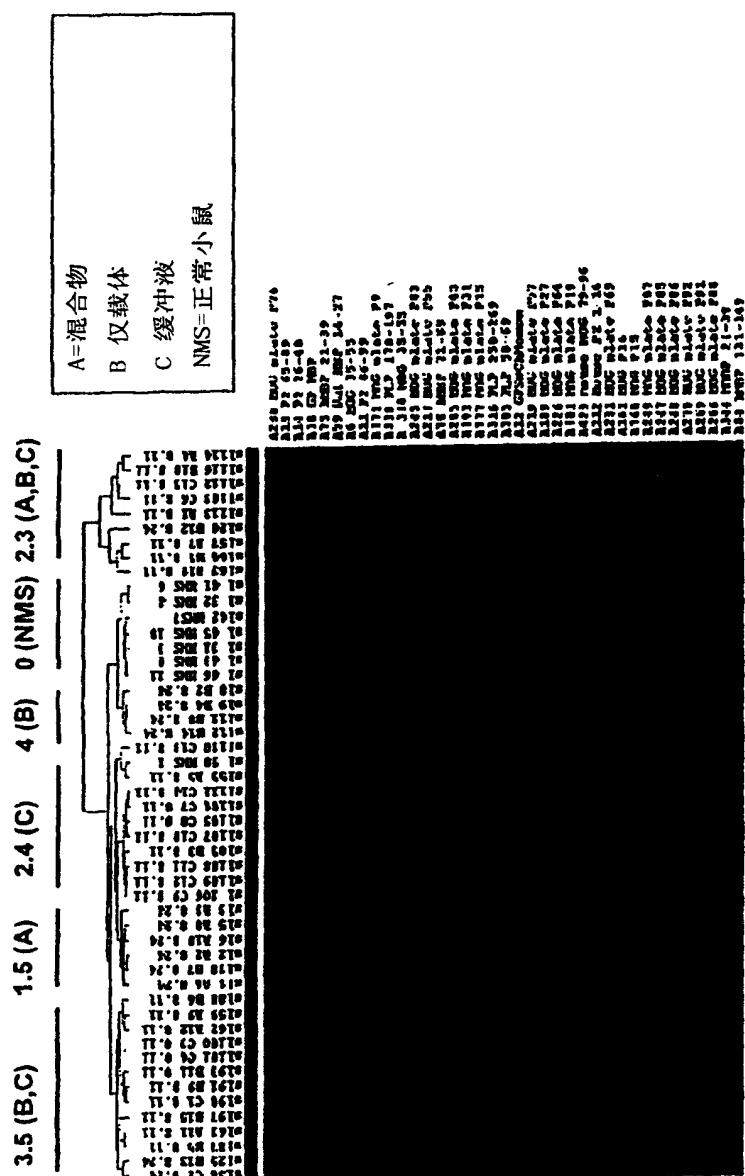
B. 胶原-诱导关节炎小鼠血清

A. 正常对照小鼠血清

用于RA的鼠CIA模型中自身抗体反应的滑液蛋白组分析

5





串联分析证明DNA耐受性疫苗治疗减少EAE复发中自身抗体反应的抗原表位扩散

6
[A]