



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102784385 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201210156674. 1

(56) 对比文件

(22) 申请日 2001. 08. 17

WO 00/11027 A1 , 2000. 03. 02,

(30) 优先权数据

审查员 幸颖

0020618. 5 2000. 08. 21 GB

0114547. 3 2001. 06. 14 GB

(62) 分案原申请数据

01817682. 8 2001. 08. 17

(73) 专利权人 阿皮托普技术(布里斯托尔)有限公司

地址 英国布里斯托尔

(72) 发明人 D·C·弗赖斯 S·M·安德顿

G·马扎 M·庞斯福特

H·B·斯特雷特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 梁谋 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61K 38/10(2006. 01)

A61P 25/00(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书18页

序列表4页 附图15页

(54) 发明名称

肽选择方法

(57) 摘要

提供一种方法,用于通过选择一种无需进一步加工即能够与 I 类或 II 类 MHC 分子结合的肽的方法来选择耐受原性肽。此外还提供由该方法选择的肽,及其在药物组合物和用于治疗和 / 或预防疾病中的应用。

1. 一种耐受原性肽髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 83-99 在制备用于诱导免疫耐受性的药物组合物中的应用。

肽选择方法

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日：2001年8月17日；申请号：200910129672.1；发明名称：同上。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种用于选择耐受原性 (tolerogenic) 肽的方法、由该方法鉴定的肽，及其在疾病治疗和 / 或预防中的应用。本发明还涉及含有多种此类耐受原性肽的药物组合物。

背景技术

[0003] 在适应性免疫应答中，T 淋巴细胞能够识别蛋白抗原的内部表位。抗原呈递细胞 (APC) 摄取蛋白抗原，并将其降解成短肽段。肽与细胞内的 I 类或 II 类主要组织相容性复合体结合，并被运送到细胞表面。当该肽与 MHC 分子一同被呈递到细胞表面时能够被 T 细胞识别 (通过 T 细胞受体 (TCR))，此时，该肽可作为一种 T 细胞表位。

[0004] 在对所有自身抗原或外源抗原的适应性免疫应答中，T 细胞表位都具有主要作用。通过使用实验模型已证明了 T 细胞表位在过敏性疾病 (包括变态反应、自身免疫疾病和移植排异) 中的重要作用。用合成的肽 (根据 T 细胞表位的结构) 结合佐剂进行注射有可能引发炎性或变应性疾病。

[0005] 反之，研究表明，将可溶形式的肽表位给药有可能导致针对特定肽表位的免疫耐受性。目前已证明，可溶性肽抗原给药可作为一种抑制疾病的有效方法，用于实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE——多发性硬化症 (MS) 的一种模型) (Metzler and Wraith(1993) Int. Immunol. 5 :1159-1165 ;Liu and Wraith(1995) Int. Immunol. 7 :1255-1263 ;Anderton and Wraith(1998) Eur. J. Immunol. 28 :1251-1261) ;以及关节炎、糖尿病和色素层视网膜炎的实验模型 (见上文 Anderton and Wraith(1998) 的综述)。此外还可作为进展性 EAE 疾病的治疗手段 (上文 Anderton and Wraith(1998))。

[0006] 耐受原性肽在治疗或预防疾病中的用途已引起了相当大的关注。原因之一是已发现某些耐受原性表位能够下调 T 细胞对相同组织内不同抗原的应答。这种被称为“旁观者 (bystander) 抑制”的现象说明，利用特定的耐受原性肽有可能会诱导针对特定抗原内一种以上表位 (优选的是所有表位) 以及特定疾病中一种以上抗原的耐受性 (上文 Anderton and Wraith(1998))。这样就无需对特定疾病中的所有致病性抗原进行鉴定。

[0007] 此外，肽是用于治疗的良好选择，因为其成本相对低廉，并且能够产生免疫学性质不同的肽类似物。这样就可以对肽进行修饰，以改变其与 MHC 或 TCR 的相互作用。

[0008] 该方法可能存在的问题之一是，研究表明，并不是所有可充当 T 细胞表位的肽都能够诱导耐受性。免疫后的髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 肽 89-101 是一种免疫优势抗原，并且从引发 T 细胞活性和诱导 EAE 方面来看都是一种非常有效的免疫原。但研究表明，当以溶液形式给药时，这种肽不能诱导耐受性 (上文 Anderton and Wraith(1998))。

[0009] 在 T 细胞表位能够诱导耐受性方面，已针对观测到的分级结构提出了多种解释

(见上文 Anderton and Wraith(1998) 的综述)。具体地说,有人认为肽对 MHC 的亲合力与其耐受原性之间存在相关性(上文 Liu and Wraith(1995)),但该观点与一些观测结果不吻合。例如,MBP[89-101] 能够以相对较高的亲合力与 I-A^S结合,但不具有耐受原性。因而并不能直接预测哪些肽能够诱导耐受性。

[0010] 如果有一种合理的解释来说明只有部分肽表位能够诱导耐受性,则有助于选择那些能够有效地用于治疗 and 预防过敏性病症的耐受原性肽。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明人证明,如果一种肽表位具有不经抗原加工即可被未成熟 APC 呈递的适当大小,则这种肽表位能够诱导免疫耐受性。因此,一些 T 细胞表位具有耐受原性而其他 T 细胞表位不能诱导耐受性的观测结果可由以下事实来加以解释,即某些表位需经过进一步加工,然后才能够被 MHC 分子呈递。这些需要进一步加工的表位尽管与佐剂协同注射时能够诱导疾病,但是以可溶形式给药时不能诱导耐受性。

[0013] 不需要进一步加工的表位则能够诱导耐受性,本发明人将其命名为“apitopes”(抗原加工非依赖性表位)。

[0014] 该发现为选择耐受原性 T 细胞表位提供了一种基于规则的方法,该方法无需对肽的耐受原性能力进行体内检测。这一点在用于治疗或预防无可用动物模型的疾病的策略开发方面具有特别的优势。甚至对具有动物模型疾病而言,该选择方法也会使耐受原性成分的开发更加简单和安全,因为它提供了一种机制,用于在体内使用之前用人类 T 细胞(可识别与人类 MHC 分子结合的抗原)对肽的耐受性诱导能力进行体外测试。

[0015] 第一方面,本发明提供一种用于选择耐受原性肽的方法,该方法包括选择一种无需进一步加工即能够与 I 类或 II 类 MHC 分子结合的肽的步骤。

[0016] 在一项优选实施方案中,该肽无需进一步加工即能够与 II 类 MHC 分子结合。

[0017] 本领域有多种已知方法可用于筛选能够充当给定抗原的 T 细胞表位的肽。因此,本发明的方法通常用于从多种含有 T 细胞表位的肽中选择一种耐受原性肽。

[0018] 为了检测一种肽是否无需进一步加工即能够与 I 类或 II 类 MHC 分子结合,可以用抗原加工非依赖性呈递系统 (APIPS) 对该肽与 I 类或 II 类 MHC 分子结合的能力进行研究。因此,在一项优选实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0019] (i) 用一种肽对 APIPS 进行处理;并且

[0020] (ii) 分析 APIPS 中该肽与 I 类或 II 类 MHC 分子的结合。

[0021] 第二方面,本发明提供由本发明第一方面的方法所选择的肽。

[0022] 该肽可用于疾病的治疗和/或预防。具体地说,该肽可用于治疗和/或预防由自反应性 T 细胞介导的疾病。本发明的肽特别适用于治疗/预防过敏性反应,如变态反应、自身免疫和移植排异。

[0023] 本发明人已确定了髓磷脂碱性蛋白的多个表位,该蛋白是多发性硬化症中的一种自身抗原。因此,在一项特别优选的实施方案中,本发明的肽可用于治疗和/或预防多发性硬化症。

[0024] 已知一些肽能够诱导针对相同抗原上其他表位的耐受性,甚至可诱导针对不同抗原上其他表位的耐受性(通过被称为旁观者抑制的现象)。但本发明人预测,为了充分抑制所有自反应性 T 细胞,将多种不同的 apitopes 联合给药于患者应该有利于特定疾病的治疗

/ 预防。第三方面,本发明提供一种药物组合物,该组合物含有多种本发明第二方面所描述的肽,每种肽基于一种 T 细胞表位。

[0025] 第四方面,本发明提供一种方法,用于治疗和 / 或预防主体所患的一种疾病,该方法包括将本发明第二方面所描述的肽给药于该主体的步骤。

[0026] 治疗和 / 或预防主体所患疾病的一般策略可包括以下步骤:

[0027] (i) 确定该疾病的一种抗原;

[0028] (ii) 确定该抗原的一种 apitope; 以及

[0029] (iii) 将该 apitope 给药于该主体。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1 显示多发性硬化症 (MS) 患者和健康个体对结核分支杆菌纯化蛋白衍生物 (PPD) 和 MBP 的动力学曲线的典型实例。对分离自 MS 患者 (A) 和正常个体 (B) 的外周血单核细胞 (PBMC) 在 PPD 和全 MBP 存在情况下的增殖能力进行测试; 将反应于 MBP 的增殖动力学曲线与反应于第二抗原 PPD 的增殖动力学曲线进行比较。

[0032] 图 2 为 MS 患者中的 PBMC 对 MBP 及其肽产生应答的总结表。对某些个体是在三个独立的时间点进行分析, 每个时间点的间隔期约为 4-7 个月。

[0033] 图 3 为健康个体中的 PBMC 对 MBP 及 MBP 肽产生应答的总表。每个时间点的间隔期约为 4-7 个月。

[0034] 图 4 显示一名 MS 患者 (MS49) 的实例, 该患者在 2 个不同的时间点对多种肽产生应答, 但在 4 个月之后测量的第二时间点期间的识别曲线明显不同。在 MBP 和一组覆盖全长 MBP 的肽存在的条件下培养 PBMC, 并通过 ³H- 胸苷摄取量来测量增殖。在第一时间点观测到的广泛 T 细胞增殖应答与 7 个月后 (第二时间点) 测量的应答明显不同。

[0035] 图 5 显示一名患者的实例, 该患者的广泛表位应答 (第一时间点) 可以消退 (第二时间点), 而在 12 个月的时间后 (第三时间点) 重新出现。

[0036] 图 6 显示由动力学应答测定法确定的肽区域精确特异性图谱, 该结果是利用 MS 患者和健康个体产生的 TCC 获得。用于筛选测定的大多数肽的长度为 15 个氨基酸残基, 但有少数为 10 个氨基酸残基, 有一种肽为 17 个氨基酸残基。每种 TCC 的特异性至少测试了 2 次。

[0037] 图 7a 的表显示髓磷脂碱性蛋白中能够被 MS 患者的 T 淋巴细胞识别的 T 细胞表位的特性。

[0038] 图 7b 的表显示所有 T 细胞表位都不是必需被固定 APC 呈递, 因而不是 apitopes。

[0039] 图 8 和图 9 显示活体和固定 APC 将不同 MBP 肽呈递至 T 细胞的情况。图 8A-30-44, 图 8B-110-124, 图 9A-130-144, 图 9B-156-170。

[0040] 图 10 的表显示在 3 个独立时间点获得的 MS 患者体内对 MBP 和 MBP- 肽的刺激指数 (SI) 峰值。第二时间点的样本是在第一时间点的 4-8 个月后收集, 第三时间点的样本是在第二时间点的 3-5 个月后收集。每天测量本底 cpm, 其变化范围为 80-700cpm; 确定阳性应答 (粗体字) 的依据是 $SI > 3$ 并且 $\delta \text{cpm} > 1000$ 。(不可能在所有 3 个时间点收集 MS19 和 MS67 的样本)。

[0041] 图 11 的表显示健康个体对 MBP 和 MBP- 肽的刺激指数 (SI) 峰值。每天测量本底 cpm, 其变化范围为 80-700cpm; 确定阳性应答 (粗体字) 的依据是 $SI > 3$ 并且 $dcpm > 1000$ 。

[0042] 图 12 显示由 DR2 :MBP82-100 转基因小鼠分离的 T 细胞对 APC 呈递 77-100 区嵌套 MBP 肽的应答。

[0043] 图 13 显示 T 细胞克隆 MS17 :A3 对 APC 呈递 125-148 区嵌套 MBP 肽的应答。

[0044] 图 14 显示 MBP 89-101 序列中的 T 细胞表位识别。该序列中有 3 个不同但又重叠的 T 细胞表位 :89-92、92-98 和 95-101。图中显示第 94 和 95 位残基之间可能被天冬酰胺酰肽内切酶 (AEP) 的作用剪切的位点。

[0045] 图 15 显示 MBP 肽 87-96 (A) 和 89-101 (B) 能够充当 apitope, 用于 T 细胞对 89-94 表位产生应答。

[0046] 发明详述

[0047] 第一方面, 本发明涉及一种用于选择耐受原性肽的方法。

[0048] 耐受性

[0049] 文中使用的术语“耐受原性”是指能够诱导耐受性。

[0050] 耐受性是指不对某种抗原产生应答。对自身抗原的耐受性是免疫系统的一个基本特征, 当丧失这种耐受性时可导致自身免疫疾病。适应性免疫系统必须保持对大量不同的感染性因子产生应答的能力, 同时避免其自有组织中所含自身抗原的自身免疫攻击。这在很大程度上是由未成熟 T 淋巴细胞对胸腺中凋亡性细胞死亡的敏感性来控制 (中枢耐受性)。但是在胸腺中并不能检测到所有自身抗原, 因而只有自反应性胸腺细胞死亡还不够。因此, 还有一些机制可以使外周组织的自反应性成熟 T 淋巴细胞获得耐受性 (外周耐受性)。Anderton et al (1999) (Immunological Reviews 169 :123-137) 对中枢耐受性和外周耐受性的机制进行了综述。

[0051] 耐受性的产生或鉴定方法是至少诱导部分 CD4+T 细胞的无反应性。为了激活 T 细胞, 肽必须与能够将两种信号递送至 T 细胞的“专职”APC 相结合。第一种信号 (信号 1) 由 APC 细胞表面的 MHC- 肽复合物递送, 并通过 TCR 被 T 细胞接收。第二种信号 (信号 2) 由 APC 表面的 CD80 和 CD86 等辅助刺激分子递送, 并被 T 细胞表面的 CD28 接收。当 T 细胞在缺乏信号 2 的条件下接收信号 1 时不会被激活, 实际上是成为无反应性 T 细胞。无反应性 T 细胞对随后的抗原诱发具有不应性, 并且能抑制其他的免疫应答。无反应性 T 细胞被认为与介导 T 细胞耐受性有关。

[0052] 尽管不希望受理论的约束, 但本发明人预测, 在与 MHC 分子一同被递送之前需要加工的肽不能诱导耐受性, 因为这些肽必须经过成熟抗原呈递细胞的处理。成熟抗原呈递细胞 (如巨噬细胞、B 细胞和树突细胞) 能够对抗原进行加工, 而且能将信号 1 和信号 2 递送至 T 细胞, 从而导致 T 细胞激活。反之, apitopes 能够与未成熟 APC 上的 II 类 MHC 结合。因而无需共同刺激即能够被呈递至 T 细胞, 从而导致 T 细胞无反应性和耐受性。

[0053] 当然, apitopes 也能够与成熟 APC 细胞表面的 MHC 分子结合。但免疫系统中包含未成熟 APC 的充裕程度要高于成熟 APC (研究表明, 被激活的树突细胞还不到 10%, Summers et al. (2001) Am. J. Pathol. 159 :285-295)。因此, apitope 的默认状况是无反应性 / 耐受性, 而不是激活。

[0054] 研究表明, 当通过肽吸入来诱导耐受性时, 抗原特异性 CD4+T 细胞的增殖能力下降。此外, 这些细胞的 IL-2、IFN- γ 和 IL-4 产量被下调, 但 IL-10 的产量提高。研究表明, 在处于肽诱导耐受性状态的小鼠中, IL-10 的中和使小鼠完全恢复了对疾病的易感性。人们

认为,有一种始终处于耐受状态的调节细胞群能够产生 IL-10,并介导免疫调控 (Burkhart et al (1999) *Int. Immunol.* 11 :1625-1634)。

[0055] 因此,可通过多种技术对耐受性的诱导进行监测,其中包括:

[0056] (a) 对该肽在体内充当靶表位的疾病而言,降低接触该疾病的易感性;

[0057] (b) CD4+T 细胞无反应性的诱导(可通过随后的抗原侵袭来进行体外检测);

[0058] (c) CD4+T 细胞群的变化,包括

[0059] (i) 增殖能力降低;

[0060] (ii) IL-2、IFN- γ 和 IL-4 产量的下调;以及

[0061] (iii) IL-10 产量提高。

[0062] 抗原加工非依赖性表位 (APITOPES)

[0063] 本发明所述方法的步骤包括,选择一种无需进一步加工即能够与 I 类或 II 类 MHC 蛋白结合的肽。这些肽在文中被称为“apitopes”(抗原加工非依赖性表位)。

[0064] 对来源于给定抗原的肽的细胞表面呈递并不是随机的,并且倾向于由少量经常出现的表位占优势。特定肽的优势取决于多种因素,例如与 MHC 分子结合的相对亲和力、在 APC 内产生的时空点以及抗降解能力。抗原的表位分级结构可以随免疫应答的进行而发生改变,这为自身耐受性和自身免疫疾病提供了重要的线索。免疫优势决定区可能是良好的耐受原。因此,在一项优选实施方案中,本发明的 apitope 是基于一种优势表位。

[0065] 但是在对免疫优势肽产生初次免疫应答后,可能出现表位“扩展”至亚优势决定簇的现象 (Lehmann et al (1992) *Nature* 358 :155-157)。亚优势表位的呈递可能对触发自身免疫具有重要作用。因此,本发明的 apitope 可基于一种亚优势决定簇。

[0066] 对所有给定抗原而言,也可能存在隐蔽表位。隐蔽表位是指那些以肽的形式给药时能够刺激 T 细胞应答,但是以完整抗原的形式给药时不能产生这种应答的表位。在 APC 将抗原加工成肽的过程中,隐蔽表位可能被破坏。本发明人已证明,MBP 的肽 92-98 是一种隐蔽表位 (实施例 2C)。有趣的是,在该肽区域内推测含有一个天冬酰胺酰胺肽内切酶剪切位点,这可能意味着 APC 在天然加工过程中没有产生含有该区域的肽。

[0067] 隐蔽表位可作为一种体外 apitope,因为它无需进一步加工即能够与 MHC 分子结合,并在识别该隐蔽表位的 T 细胞中诱导无反应性。但这种表位不可能应用于治疗,因为它不能够耐受可识别该抗原的天然加工表位的 T 细胞。

[0068] 抗原表位的鉴定方法可以是,测量 T 细胞对 APC 呈递的覆盖整个抗原的重叠肽 (见下文) 的应答。这些研究通常是获得肽“嵌套组”,通过测量对截短肽的应答即可确定特定 T 细胞系 / 克隆的最小表位。

[0069] 并不能认为抗原的最小表位会具有 apitope 的作用。很可能最小表位的侧翼氨基酸是与 MHC 最佳结合所必需的。设计 apitope 时应考虑到不同 T 细胞克隆的最小表位之间存在细微差别的可能性。

[0070] 应该强调的是,可能无法确定所有表位的 apitope。一个明显的证据是,有些表位是以依赖于内体中的 MHC 负载方式与 MHC 结合,因而需要加工 (Viner et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 :2214-2218)。这也是不能认为每种最小表位都必然具有 apitope 作用的另一原因。

[0071] 鉴定含有 T 细胞表位的肽

[0072] 本领域有多种已知方法可用于鉴定给定抗原中的 T 细胞表位。

[0073] 鉴定天然加工表位的方法可以是,对来源于带有抗原的 APC 的肽进行质谱分析。这些 APC 已经过处理而促进其摄取抗原,或是已通过转化适当基因而迫使其在细胞内产生该蛋白。通常是将 APC 与溶液中的或是适当定向于 APC 细胞表面的蛋白共保温。37°C 保温之后,在去污剂中将细胞裂解,并通过诸如亲和层析法将 II 类蛋白纯化。用适当的化学介质(如酸性条件)对纯化 MHC 进行处理,从而将肽由 MHC 洗脱。分离出这种肽合并物,并将其曲线与来自相同方式处理的对照 APC 的肽进行比较。对蛋白表达/饲养细胞独特的峰进行分析(例如用质谱法),并对这些肽段进行鉴定。利用该方法一般可获得关于肽段抗原经抗原呈递而产生的肽的范围信息(通常出现在“嵌套组”中)。

[0074] 鉴定表位的另一种方法是通过体外测定对重叠并且覆盖该抗原全长的合成肽库进行筛选。例如,可以使用长度为 15 个氨基酸并且有 5 或 10 个氨基酸重叠的一些肽。用含有抗原呈递细胞和 T 细胞的抗原呈递系统对这些肽进行测试。例如,该抗原呈递系统可以是鼠脾细胞制品、人类扁桃体细胞制品或 PBMC。作为选择,该抗原呈递系统还可含有特定的 T 细胞系/克隆和/或特定类型的抗原呈递细胞。

[0075] T 细胞激活可通过 T 细胞增殖(例如用 ^3H -胸苷掺入法)或细胞因子产量来加以测定。举例来说,TH1 型 CD4+T 细胞的激活可通过 IFN γ 产量来检测,其检测可采用标准的技术,如 ELISPOT 测定法。

[0076] 对重叠肽的研究一般会指明抗原中的表位定位区域。然后可测量对截短肽的应答,以评定特定 T 细胞的最小表位。举例来说,如果对重叠库中含有第 1-15 位残基的肽产生了应答,则可以用两端截短的肽组(即 1-14、1-13、1-12 等和 2-15、3-15、4-15 等)来确定最小表位。

[0077] 本发明人认为,通过体外测定(特别是利用 T 细胞系)对抗原免疫优势区进行检测的方法会产生不对称的肽活性模式。实施例中描述的用于确定 MBP 表位的研究是采用动力学应答测定法,该方法是测量由 MS 患者和健康个体获得的 PBMC 在重叠肽库作用下的增殖。该方法的依据是,尽管由健康个体和 MS 患者获得的 T 细胞对纯化蛋白抗原的应答方式类似,但它们对基于 MBP 序列的肽的应答方式不同。与正常的健康供体相比,由 MS 患者获得的 T 细胞对肽抗原的应答具有更高的数量级和更快的动力学速度。因而能够筛选和鉴定使特定患者在特定时间产生应答的表位。在本文描述的研究中,该方法已揭示了利用常规技术未能确定的大量含有表位的区域。此外,该研究还说明,T 细胞识别可表现为一种循环模式,在某一时间点出现,消退,继而在后一时期重新出现。

[0078] 本发明人描述的动力学测定法可作为一种重要的工具,因为该方法可揭示患者在特定时间正在应答的表位。该信息可用于为特定患者量身定制一种将 apitope 给药的治疗方法,即确定相关表位的 apitope(如果存在),并将其给药。该信息还可用于拟定疾病的一般发展模式,从而可以对治疗性组合物进行设计,使其含有与可能在疾病的特定时期呈递的表位相对应的 apitope。

[0079] 抗原加工非依赖性呈递系统 (APIPS)

[0080] 一旦确定了表位,下一步是要检测其是否也具有 apitope 的作用。

[0081] apitope 必须在无需抗原加工的条件下被呈递至 T 细胞。在确定了含有 T 细胞表位的肽之后,可以用一种无加工系统来确定 apitope。可以用抗原加工非依赖性呈递系统

(APIPS) 对截短肽和肽类似物的激活作用进行测试。

[0082] APIPS 的实例包括：

[0083] a) 固定的 APC(含有或不含抗 CD28 抗体)；

[0084] b) 含有 I 类或 II 类 MHC 分子的脂质膜(含有或不含抗 CD28 抗体)；以及

[0085] c) 结合于平板的纯化的天然或重组 MHC(含有或不含抗 CD28 抗体)。

[0086] 已知可以用固定的 APC 来研究 T 细胞应答,例如在检测多肽的最小表位的研究中,可以测量对截短肽的应答(Fairchild et al(1996) Int. Immunol. 8:1035-1043)。APC 的固定可采用,例如,甲醛(通常是多聚甲醛)或戊二醛。

[0087] 脂质膜(可以是平面膜或脂质体)的制备可采用人工脂,也可以是 APC 的质膜/微粒体组分。

[0088] 在使用时,可以将 APIPS 添加到组织培养板的孔中。然后添加肽抗原,并添加选定的 T 细胞系或克隆,以检测该肽与 APIPS 的 MHC 部分的结合。T 细胞系或克隆的激活可通过本领域已知的任何方法来测定,如 ^3H - 胸苷掺入法或细胞因子分泌法。

[0089] 肽

[0090] 本发明的第二方面涉及一种肽。

[0091] 从正常意义上来说,术语“肽”是指一连串残基,通常是 L- 氨基酸,这些残基一般是通过相邻氨基酸的 α - 氨基和羧基之间的肽键相继连接。该术语还包括修饰的肽和合成的肽类似物。

[0092] 本发明的肽可以是无需进一步加工即能够与 I 类或 II 类 MHC 分子结合的任何长度。

[0093] 与 I 类 MHC 分子结合的肽的长度一般为 7-13 个氨基酸,更常见的是 8-10 个氨基酸。该肽的两个末端可通过肽主链原子与所有 I 类 MHC 分子的肽结合沟不变位点之间的接触而使其结合保持稳定。在肽结合沟的两端均有与肽氨基端和羧基端结合的不变位点。通过肽骨架的扭曲可以适应不同的肽长度,这种扭曲通常出现在能够满足所需柔性的脯氨酸残基或甘氨酸残基。

[0094] 与 II 类 MHC 分子结合的肽的长度一般为 8-20 个氨基酸,更常见的是 10-17 个氨基酸,并且还可以长得多。这些肽沿着两端开口的(与 I 类 MHC 肽结合沟不同)II 类 MHC 肽结合沟以伸展的构象存在。该肽主要是通过主链原子与沿着肽结合沟排列的保守残基的接触而保持在适当的位置。

[0095] 本发明的肽可通过化学方法来制备(《肽化学实践手册》Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin)。举例来说,肽的合成方法可以是固相技术(Roberge JY et al(1995) Science 269:202-204),从树脂上裂解,并通过制备性高效液相色谱进行纯化(如 Creighton(1983) 蛋白质结构和分子原理, WH Freeman and Co, New York NY)。还可以用,例如,ABI 431A 肽合成仪(Perkin Elmer)根据厂商提供的说明来实现自动合成。

[0096] 作为选择,还可采用重组方法或从较长多肽上剪切的方法来制备肽。例如,可采用从靶抗原上剪切的方法来获得肽。肽的成分可通过氨基酸分析或测序(如 Edman 降解法)来加以确认。

[0097] 在一项优选实施方案中,该肽来源于一种靶抗原。靶抗原是指能够在疾病过程中被 APC 加工并被 T 细胞识别的一种分子(如蛋白或糖蛋白)。当然,靶抗原应取决于目标疾

病。优选的是该肽来源于一种通过 APC 对该抗原的天然加工而产生的抗原片段。

[0098] 出于实际应用的目的,该肽还应具有其他多种特性。例如,该肽应能够以允许体内应用的浓度溶解。优选的是该肽能够以最高达 0.5mg/ml 的浓度溶解,更优选的是该肽能够以高达 1mg/ml 的浓度溶解,最优选的是该肽能够以高达 5mg/ml 的浓度溶解。

[0099] 就鼻内给药而言,可通过当前方法被吸收的最大体积剂量约为每个鼻孔 200 μ l。如果该肽能够以 1mg/ml 的浓度溶解,则每个鼻孔使用加倍剂量时,可将 800 μ g 给药于患者。在任何单一剂量中给药超过 5mg 的情况并不常见。

[0100] 该肽在体内的稳定性也很重要,这种稳定性应足以将其应用于治疗。本发明人发现,在体内条件下,给药后 30 分钟的测试肽总量降至约 50%,给药后 4 小时的量降至约 30%,但 5 天后仍能够检测到这种肽(约 5%)。该肽的体内半衰期至少应为 10 分钟,优选的是至少 30 分钟,更优选的是至少 4 小时,最优选的是至少 24 小时。

[0101] 本发明人发现,经鼻内给药后,引流淋巴结中的肽量峰值出现在给药后约 4 小时,但在 5 天后仍能够检测到该肽(水平约为最大值的 5%)。优选的是该肽具有足够的稳定性,使其在引流淋巴结中以治疗活性浓度存在的时间足以发挥其疗效。

[0102] 此外,该肽应在体内表现出良好的生物利用度。该肽还应在体内保持一种使其能够与细胞表面 MHC 分子无障碍结合的构象。

[0103] 目标疾病

[0104] 在一项实施方案中,本发明第二方面所描述的肽可用于疾病的治疗和/或预防。

[0105] II 类 MHC 的 apitope 可能特别适用于由 CD4+T 细胞应答介导的疾病。例如,由不适当的或过量的 CD4+T 细胞应答导致或维持的疾病。

[0106] 这种肽可能特别适用于过敏性病症的治疗。过敏性反应包括:

[0107] (i) 由针对无毒外源物的不适当应答导致的变态反应;

[0108] (ii) 由针对自身组织抗原的应答导致的自身免疫疾病;以及

[0109] (iii) 由针对移植物的应答导致的移植排斥。

[0110] 变态反应的实例包括,但不局限于:枯草热、外源性哮喘、昆虫咬伤及刺伤变态反应、食物及药物变态反应、变应性鼻炎、支气管哮喘、慢性支气管炎、过敏性综合征、荨麻疹、血管性水肿、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、结节性红斑、多形红斑、Stevens-Johnson 综合征、鼻结膜炎、结膜炎、皮肤坏死性微静脉炎、炎性肺病和大疱性皮肤病。

[0111] 自身免疫疾病的实例包括,但不局限于:类风湿性关节炎(RA)、重症肌无力(MG)、多发性硬化症(MS)、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)、Graves 病、炎性肠病、自身免疫性色素层视网膜炎、多发性肌炎和某些类型的糖尿病、系统性血管炎、多发性肌炎-皮肌炎、系统性硬化病(硬皮病)、Sjogren 病、强直性脊柱炎和相关的脊柱关节病、风湿热、过敏性肺炎、变应性支气管肺部曲霉病、无机灰尘致尘肺、结节病、自身免疫性溶血性贫血、免疫性血小板病症、诸如冷沉纤维蛋白原血症等寒冷病,以及自身免疫性多内分泌腺病。

[0112] 在临床医学中,通常可以对多种组织进行移植,其中包括肾、肝、心肺、皮肤、角膜和骨髓。目前,除角膜以外的所有移植以及某些骨髓移植通常都需要长期的免疫抑制。

[0113] 在本发明该方面的一项实施方案中,可以将肽用于糖尿病的治疗和/或预防。该实施方案中的这种肽可来源于靶抗原 IA2。

[0114] 在本发明该方面的另一项实施方案中,可以将肽用于多发性硬化症 (MS) 的治疗和 / 或预防。多发性硬化症 (MS) 是一种慢性炎性疾病,其特征是整个 CNS 白质中散布有多处脱髓鞘性病变,该疾病可以在不同部位和不同时间出现 (McFarlin and McFarland,1982 New England J.Medicine 307 :1183-1188 和 1246-1251)。MS 被认为是由自反应性 T 细胞介导的。

[0115] 该实施方案中的肽可来源于一种自身抗原,具体地说,是髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 或蛋白脂质蛋白 (PLP)。MBP 可能比 PLP 更合适,因为 PLP 具有强疏水性,来源于该蛋白的肽倾向于凝集在一起。MBP 具有免疫原性,并且 MBP 特异性 T 淋巴细胞在动物体内具有致脑炎活性 (Segal et al.,1994 J.Neuroimmunol.51 :7-19 ;Voskuhl et al.,1993 J.Neuroimmunol42 :187-192 ;Zamvil et al.,1985 Nature 317 :355-8)。

[0116] 在一项优选实施方案中,使用的肽来源于 MBP 的免疫优势区之一,即 :1-24、30-54、75-99、90-114、105-129、120-144、135-159 和 150-170。

[0117] 在一项特别优选的实施方案中,使用的肽选自本发明人证明可充当 apitopes 的 MBP 肽,其中包括以下的肽 :30-44、80-94、83-99、81-95、82-96、83-97、84-98、110-124、130-144、131-145、132-146 和 133-147。

[0118] I 类 MHC 的 apitopes 可用于,例如,以耐受原性方式对抗病毒性 CD8+ 应答进行修饰。

[0119] 药物组合物

[0120] 本发明人认为,尽管存在“旁观者抑制”,但为了有效地诱导耐受性,还是必需以多种不同的 T 细胞克隆为目标。因此,为了预防或治疗疾病,可以将多种肽给药于个体。

[0121] 第三方面,本发明涉及含有多种 apitopes 的一种药物组合物。

[0122] 该药物组合物可含有,例如,2-50 种 apitopes,优选的是 2-15 种 apitopes。这些 apitopes 可来源于相同或不同的靶抗原。优选的是这些 apitopes 都无需进一步加工即能够与 I 类 MHC 结合,或都无需进一步加工即能够与 II 类 MHC 结合。在一项优选实施方案中,该药物组合物中的所有 apitopes 都无需进一步加工即能够与 I 类或 II 类 MHC 结合。

[0123] 该药物组合物可采用试剂盒的形式,其中单独提供了用于同时、单独或序贯给药的一些或所有 apitopes。

[0124] 作为选择 (或除此之外),如果要以多剂量方式将该药物组合物 (或其任意部分) 给药,可以将每剂单独包装。

[0125] 该药物组合物可含有治疗有效剂量或预防有效剂量的一种或所有 apitope,并且可选择性地含有一种药学容许的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0126] 此外,在本发明的药物组合物中,可以将一种或每种 apitope 与任何适当的一种或多种粘合剂、润滑剂、悬浮剂、涂布剂或增溶剂相混合。

[0127] 给药

[0128] 在不使用佐剂的情况下,本发明的肽应以溶液形式给药。

[0129] 优选的是通过粘膜将肽给药。

[0130] 研究表明,当以溶液形式进行腹膜内 (i. p.)、静脉内 (i. v.) 或鼻内 (i. n.) 给药时,肽可以诱导 T 细胞耐受性 (上文 Anderton and Wraith(1998) ;上文 Liu and Wraith(1995) ;Metzler and Wraith(1999) Immunology 97 :257-263)。

[0131] 优选的是将肽进行鼻内给药。

[0132] 用小鼠进行的研究表明,诱导耐受性所需的肽给药持续时间取决于接受者的 T 细胞前体频率(上文 Burkhardt et al(1999))。许多实验的研究结果表明,诱导耐受性需要将肽进行重复给药(上文 Burkhardt et al(1999))。因此,肽的确切剂量和给药次数应取决于个体,但在优选实施方案中是进行多次给药。

[0133] 如果同时将多种肽给药,这些肽可采用适合于单次或多次给药的“混合物”形式。作为选择,优选的是进行多次给药,但每次给药的肽相对浓度不同。

[0134] 在一项优选实施方案中,可以采用“剂量递增”法,也就是以递增的浓度对患者进行多次给药。该方法已用于,例如,对蜂毒变态反应的免疫治疗应用中的磷脂酶 A2 肽给药(Müller et al(1998) J. Allergy Clin Immunol. 101 :747-754 和 Akdis et al(1998) J. Clin. Invest. 102 :98-106)。

实施例

[0135] 以下实施例用于对本发明进行说明,但不应被认为是本发明的限制。本发明尤其涉及这些实施例中描述的特别实施方案。

[0136] 实施例 1——确定 MBP 中的 T 细胞表位

[0137] 材料与amp;方法

[0138] 抗原

[0139] 按 Deibler et al. (Deibler et al., 1972 制备生物化学 2 :139) 的描述由脑白质制备人 MBP,并通过 SDS-PAGE 确定其纯度。增殖测定是以前人确定的最佳浓度用 MBP 和结核分支杆菌纯化蛋白衍生物(PPD)来进行(UK central Veterinary Laboratory, Surrey); 每种抗原的最佳浓度为 50 μ g/ml。利用标准的 F-moc 化学剂在 Abimed AMS422 多重肽合成仪(Abimed, Langenfeld, German)上合成一组覆盖全 MBP 分子的含 15 个残基的重叠肽。每种肽有 5 个氨基酸残基被替换,有 10 个氨基酸残基重叠。我们产生了 33 种肽,其合并成 3 组,并以 50 μ g/ml 的最佳浓度对合并物进行测试,以使每种肽的体外浓度为 16.6 μ g/ml。

[0140] 患者和对照主体

[0141] 该项研究的主体包括 12 名临床确诊或实验室确定为 MS 的患者(Poser et al., 1983),年龄为 29-51 岁。12 名患者中的 8 名参与 β -干扰素试验,而其他所有 MS 患者在该研究开始前至少 3 个月内未接受任何皮质类固醇治疗。对照组包括 13 名健康个体,年龄为 25-55 岁,并且在取血样前至少 3 个月内均未接受任何免疫抑制治疗。

[0142] 组织培养基

[0143] 使用的组织培养基为补加 20mM HEPES(Sigma, Poole, UK)、青霉素(100U/ml)、硫酸链霉素(100mg/ml)和 4mM L-谷氨酰胺(均购于 Life Technologies, Paisley, Scotland)的 RPMI-1640 培养基。淋巴样细胞和 TCL 的清洗采用无血清培养基。在所有培养条件和测定中,使用的培养基均添加 10% 热灭活的自体血浆。

[0144] 培养条件和 T 细胞增殖测定

[0145] 在获得被告知的书面同意之后,通过静脉穿刺从每个主体中收集柠檬酸化周围血(50-100ml)。通过 Histopaque-1077(Sigma, Poole, UK)上的密度离心从血液中分离周围血单核细胞(PBMC),并以 1.5ml 体积和 1×10^6 细胞/ml 的浓度培养在含有 PPD、MBP 或 MBP 肽

的 24 孔组织培养板上 (Nunc International, Costar)。在 5% CO₂/95% 空气的潮湿环境中将板 37℃ 保温。在第 5 和第 14 天之间,从每种培养物中吸取 2 份 100 μl 的试样,转移到 96 孔圆底微量滴定板中,并用 0.4 μCi 的 [³H] 胸苷 (Amersham International, Amersham, UK) 进行脉冲标记。18 小时后,用 Mach111 收集器 96 (Tomtec, Orange, New Jersey, USA) 将细胞收集在玻璃纤维垫上 (LKB-Wallac, Turku, Finland)。用 Microbeta 液体闪烁计数器 (LKB-Wallac) 进行胸苷量掺入测定。当 δ cpm > 1000, 并且刺激指数 (SI) > 3 时,含有抗原的测试孔被认为是阳性结果,其中 SI = 含抗原培养物 CPM/ 无抗原培养物 CPM。

[0146] T 细胞系和 T 细胞克隆的产生

[0147] MBP 特异性 T 细胞系 (TCL) 产生于 8 名 MS 患者和 2 名健康对照供体。按上文所述由每个主体分离 PBMC,并在 MBP 存在 (50 μg/ml) 的条件下以 1x10⁶ 细胞/ml 的浓度铺在 6 孔板中;将每个主体的部分 PBMC 进行常规冷冻和保存,用于随后的再刺激。7 天后,用含有 2% IL-2 (Lymphocult-HT; Biotest LTD., Birmingham, UK) 的新鲜培养基培养细胞,并在培养的第 12 天用抗原对所有细胞进行再刺激,抗原为 IL-2 以及作为抗原呈递细胞 (APC) 的经过照射 (2500Rad) 的自体 PBMC,细胞比率为 1T 细胞: 5APC。每 3-4 天在 IL-2 中扩增细胞,并在第 14 天如上文所述用抗原 IL-2 和 PBMC 进行再刺激。在首次再刺激时,检测细胞对 MBP 的特异性增殖。简单地说,是在 MBP 存在的条件下将 2x10⁴ 个 T 细胞和 1x10⁵ 个经过照射的自体 PBMC 培养在 96 孔圆底平板中,一式三份。将细胞培养 2 天,并用 0.4 μCi/ 孔的 [³H] 胸苷进行 18 个小时的脉冲标记。然后如上所述收集细胞,δ cpm > 1000 并且 SI > 3 的 TCL 被认为具有 MBP 特异性。

[0148] 进行 3 次再刺激/ 扩增循环之后,在作为 APC 的经过照射的自体 PBMC 存在的条件下,用 PHA (Sigma, Poole, Dorset, UK) 将 TCL 克隆。在有限稀释条件下以 0.1 细胞/ 孔、0.3 细胞/ 孔和 1 细胞/ 孔的浓度将 T 细胞铺板,并培养在含有 1x10⁴ 个经过照射的 PBMC、5 μg/ml PHA 和 2% IL-2 的 Terasaki 平板中。10-12 天后,将阳性生长细胞扩增到含有 1x10⁵ 个经过照射的 PBMC、5 μg/ml PHA 和 IL-2 的 96 孔圆底平板中。3 天后,添加含有 IL-2 的新鲜培养基,第 7 天时,将克隆扩增到含有 5x10⁵ 个经过照射的 PBMC、PHA 和 IL-2 的 48 孔板中;此时利用增殖测定法检测克隆对 MBP 的特异性应答。1 周后,用含有 PHA 或 Dynabeads (Dyna1, UK) 以及 IL-2 的 1x10⁶ 个经过照射的 PBMC 将 MBP 特异性克隆扩增到 24 孔板中。基本按上文所述用 7-10 天的再刺激/ 扩增循环将克隆维持在 24 孔板中。按上文所述用增殖测定法检测 T 细胞克隆 (TCC) 对一组 MBP 肽的识别能力。

[0149] 结果

[0150] 在 MS 患者和健康个体中的 MBP- 肽识别

[0151] 本发明人利用动力学应答测定法检测了 MS 患者及健康个体的 PBMC 对覆盖全长人 MBP 的一组含有 15 个残基的合成肽的应答能力。对来自各培养物的 PBMC 的增殖应答测定是在 2 周时间内分 5 个时间点进行,并且将 MBP 和肽的应答动力学曲线与 PPD 的应答进行比较,后者代表一种次级应答/ 记忆抗原。在 PBMC 对 MBP 和 / 或肽的应答方面,β 干扰素组患者与未处理组患者之间没有发现明显的差别 (数据未显示)。MS 患者和健康对照对 MBP 的应答峰均迟于对 PPD 的应答,因而符合非记忆抗原应答的动力学特征。图 1 显示 MS 患者和健康个体对 PPD 和 MBP 的动力学曲线的典型实例。

[0152] 如图 2 所示,能够被 MS 患者最普遍识别的两种肽为 90-114 和 75-99 (各有 6/12

患者),然后是区域 30-54、135-159 和 150-170(5/12 患者),以及 1-24 和 105-129(4/12 患者)。有 3 名患者对 aa 15-39 和 120-144 产生应答。有 2 名患者识别 45-69,没有一名患者对区域 60-84 产生应答。

[0153] 根据图 10,当所有患者都呈 HLA-DR2 阳性时,能够被 MS 患者最普遍识别的两种肽为 90-114 和 75-99(各有 6/11 患者),然后是区域 120-144、135-159 和 150-170(5/12 患者),以及 1-24、15-39、30-54 和 105-129(4/11 患者)。有 3 名患者对 aa 45-69 产生应答,并且仍没有一名 MS 患者对区域 60-84 产生应答。

[0154] 相比之下,能够被健康个体识别的肽要少得多,只有 2 名对照主体对 2 种以上的肽产生应答(C 和 J;图 3)。只有 C 和 J 这 2 名对照个体识别 aa 60-84,该区域在该组的患者中未被识别。有趣的是,这 2 名个体均表达 DRB1*0701 等位基因。所有健康供体均不能识别区域 45-69 和 105-129,而识别 75-99 和 150-170 的健康个体有 4 名;识别 135-159 的健康个体有 3 名;识别 1-24、30-54、60-84 和 120-144 的健康个体有 2 名;识别 15-39 和 90-114 的个体有 1 名。总体上,有 8/13 的健康个体对所有重叠肽均不产生应答,而始终不识别 MBP 肽的 MS 患者只有 1/12(MS19)。值得注意的是,该患者是唯一不对 MBP 肽产生应答的患者。

[0155] 图 11 也显示健康个体对 MBP 肽的应答。在该研究中,只有 1 名对照主体对 2 种以上的肽产生应答(N11)。N11 也是识别 aa 60-84 的唯一个体,该区域在该组的患者中未被识别。所有健康供体均不能识别区域 15-39、45-69 和 105-129,而识别 120-144 和 135-159 的健康个体有 2 名;识别 1-24、30-54、60-84、75-99、90-114 和 150-170 的个体有 1 名。总体上,有 9/12 的健康个体对所有重叠肽均不产生应答。

[0156] 总的来说,在对 MBP 和 / 或肽产生应答的峰值出现时间方面,健康个体与患者之间没有明显的差别,并且这两组的动力学曲线均类似于初级抗原应答。此外,在对 MBP 和肽的应答强度方面,患者和健康个体之间没有差别。

[0157] 对 MBP- 肽的识别随时间而改变

[0158] 在确定 MS 患者能够对广泛类型的 MBP 肽产生应答之后,本发明人决定检测相同个体中的 PBMC 识别是否集中在大约 4-12 个月的时间内并保持稳定。如图 2、图 10 和图 3 所示,MS 患者和健康个体均未表现出相同的肽识别模式。

[0159] 图 4 显示一名 MS 患者(MS49)的实例,该患者在 2 个不同的时间点对多种肽产生应答,但在 4 个月之后测量的第二时间点期间的识别曲线明显不同。也就是说,在第二次动力学测定中,PBMC 仍保持对 aa 15-39、30-54 和 150-170 的应答,但是对 75-99 和 105-129 的应答消退,并且改变成对 90-114 和 135-159 的应答。

[0160] 图 5(MS60) 显示一名患者的实例,该患者的主要表位应答在 4 个月的时间内消退成一种集中应答。第二次测试的健康个体未对任何肽产生应答(图 3)。

[0161] 总的来说,这些结果说明 MS 患者未能表现出固定的识别模式。如 MS49 患者所示,在每名患者中,PBMC 对几种肽的应答可以保持、消退,以及改变成对 MBP 新区域的应答。

[0162] 肽识别循环

[0163] 当在 12 个月的时间内分 3 个或更多个不同时间点分析 PBMC 对肽的应答时,可以发现某些患者中的表位识别表现为波动起伏,而不是不可逆地改变成对新肽区域的应答。举例来说,如图 2 和图 10 所示,患者 MS 60 对 aa 120-144 和 135-159 的识别表现为一种循环模式;也就是在第一测试时间点时,在众多被识别的区域中包括残基 120-144 和

135-159,在第二时间点时,对这2个区域的应答消退,而在4个月后的第三测试时间点时重新出现。与此类似,患者MS41的动力学曲线表明,对aa 135-159的识别在几个时间点的过程中表现为波动起伏(见图2和图10)。

[0164] 在健康对照组中(图3),有1名个体(M)对区域75-99和135-159的应答表现为波动起伏,另1名个体(F)在3次分析时间点中有2次表现为能够识别区域75-99,还有1名个体(D)对残基15-39的应答表现为循环模式。

[0165] MBP 应答的精确制图

[0166] 由8名MS患者和2名健康个体获得TCC,并用于阐明在动力学应答测定中确定的肽区域的精确特异性。各TCC特异性的测试方法是检测其对含有15个残基的一组肽的增殖应答。克隆SD:A7识别区域1-24,而在该区域中,该TCC对aa 5-19产生应答。识别区域30-54的有4种克隆(MS49:D3、MS49:C8、MS49:A8、MS49:B6),而该区域中的表位为30-44。有一种来自MS患者的克隆(MS39:D7)能够识别肽60-74,有趣的是,在我们的动力学应答测定中,有1名健康个体对该区域(60-84)产生应答。有5种克隆(MS43:A7、MS41:B6、MS41:A2、MS41:C6、N5:8)能够识别含有区域75-99的aa 83-99。一名患者产生了对aa 110-124具有特异性的TCC(MS60:A2、MS60:B3),该区域包含在105-129合并物中,该患者产生的另一种TCC对120-144区域中包含的130-144具有特异性(MS60:E1)。有5名个体产生了能够识别区域135-159中所含表位的克隆:MS60:F7、MS60:D1、MS59:F1和N5:19可识别aa 140-154;MS57:A1对140-149具有特异性,而TCC MS17:A3能够对序列130-144产生应答。该组克隆清楚地说明,在MBP的135-159区域中至少存在2种T细胞表位。最后,区域150-170能够被2种对aa 156-169具有特异性的克隆识别。所有TCC的特异性总结于图6。

[0167] 实施例2——确定MBP中的apitopes

[0168] 材料与amp;方法

[0169] 利用APIPS进行抗原呈递测定

[0170] 将肽呈递至T细胞克隆的检测是利用增殖方法来进行。在0.5%多聚甲醛中将APC固定,并以 1×10^5 细胞/孔的浓度铺在96孔组织培养板中。以 2×10^4 细胞/孔的浓度将T细胞克隆铺在含有含有不同浓度肽的板中。37℃培育48小时,然后利用16-20小时的 $[^3\text{H}]$ 胸苷掺入方法进行增殖测定。将结果与T细胞对或APC呈递的表位产生应答的能力进行比较。

[0171] 将肽呈递至由DR2:MBP82-100转基因小鼠分离的T细胞的测定方法基本如上文所述,只是APC的铺板浓度为 5×10^5 细胞/孔,T细胞的铺板浓度为 1×10^5 细胞/孔,并且在添加 $[^3\text{H}]$ 胸苷之前培育72小时。

[0172] 结果

[0173] 该实验可检测上述实施例中确定为表位的肽被APIPS呈递的能力。结果显示于图7b。在目前已检测的5种表位中,发现有4种是apitopes(30-44、80-94、110-124和130-144),有1种可作为表位,但不能作为apitope(156-170)。

[0174] 实施例2A——对MBP肽30-44、110-124、130-144和156-170的研究

[0175] 为了研究多种MBP肽是否为apitopes,对这些肽被固定的APC呈递至T细胞的能力进行检测。在含有肽的血清或只在血清中将活体的或预脉冲标记的Mgar(HLA-DR2+ve)

细胞进行 3.5 小时的预脉冲标记。然后将过量的肽去除,并添加适当的 T 细胞克隆。利用 [³H] 胸苷摄取方法检测 T 细胞的增殖应答。

[0176] 如图 8 和图 9 所示,肽 30-44(图 8A)、110-124(图 8B) 和 130-144(图 9A) 无需进一步加工即可被固定的 APC 呈递。因此,这些肽被确定为 apitopes。另一方面,肽 156-170 需要进一步加工才可被呈递至 T 细胞(图 9B)。固定的 APC 不能将该表位呈递至 T 细胞,因而 156-170 不是一种 apitope。

[0177] 实施例 2B——确定 MBP 区域 77-100 和 125-148 中的 apitopes

[0178] 对任何给定的表位而言,都可能存在一种或多种无需进一步加工即可被呈递至 APC 的 apitopes。对两种 MBP 区域内的 apitopes 存在情况进行检测,方法是在含有 MBP 区域 77-100(图 12) 和区域 125-148(图 13) 的重叠肽的血清或只在血清中培育活体的或多聚甲醛固定的 Mgar(HLA-DR2+ve) 细胞。培育 72 小时(图 12) 或 48 小时(图 13) 后,添加 T 细胞,并利用 [³H] 胸苷摄取方法检测 T 细胞的增殖应答。用于 MBP77-100 的 T 细胞分离自 DR2:MBP 82-100 转基因小鼠,用于 MBP130-144 的是 T 细胞克隆 MS17:A3。

[0179] 在 MBP 区域 77-100 中,以下的肽被确定为 apitopes:

[0180] MBP 83-99ENPVVHFFKNIPTPTP

[0181] MBP 80-94TQDENPVVHFFKNIV

[0182] MBP 81-95QDENPVVHFFKNIPT

[0183] MBP 82-96DENPVVHFFKNIPTP

[0184] MBP 83-97ENPVVHFFKNIPTPR

[0185] MBP 84-98MPVVHFFKNIPTPTP

[0186] 能够被来源于 DR2 MBP 82-100 转基因小鼠的 T 细胞识别的最小 MBP 序列为区域 85-94。

[0187] 在 MBP 区域 125-148 中,以下的肽被确定为 apitopes:

[0188] MBP 130-144RASDYKSAHKGFKGV

[0189] MBP 131-145ASDYKSAHKGFKGV

[0190] MBP 132-146SDYKSAHKGFKGVDA

[0191] MBP 133-147DYKSAHKGFKGVDAQ

[0192] 能够被 T 细胞克隆 MS17:A3 识别的最小 MBP 序列为区域 133-144。

[0193] 实施例 2C——对 MBP 区域 89-101 的研究

[0194] 本发明人此前发现,与其他髓磷脂 T 细胞表位不同的是,以可溶形式将肽 89-101 给药不能防止小鼠被完整髓磷脂或肽 89-101 本身诱导产生实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)(Anderton and Wraith(1998)Eur. J. Immunol. 28:1251)。

[0195] MBP 89-101 含有 3 个 T 细胞表位

[0196] 为了研究 T 细胞对 MBP 区域 81-111 的反应性,在体外用 81-111 刺激已被 81-111 致敏的小鼠淋巴结细胞,并用覆盖 81-111 区域且依次错位 2 个残基的一组含有 10 个残基的重叠肽(即:81-90、83-92、85-94、87-96、89-98、91-100、93-102、95-104、97-106、99-108 和 101-111) 对这些细胞进行测试。对覆盖 89-101 的肽的应答模式说明,有 5 种相邻的肽(N 端 87-96 至 95-104) 具有刺激能力,这表明至少存在 2 种(可能是 3 种)不同的表位。

[0197] 为了对该区域做进一步研究,由最初的 81-111 应答性 T 细胞系产生了 3 种亚细胞

系,并用覆盖 84-106 区域且依次错位 1 个残基的一组含有 10 个残基的重叠肽对这些细胞系再次进行测试。结果说明 89-101 序列中存在 3 种不同但又重叠的 T 细胞表位:89-94、92-98 和 95-101(见图 14)。

[0198] MBP 肽 92-98 是一种隐蔽表位

[0199] 当测试对 89-101 肽和整个重组 MBP 的反应性时,这 3 种表位特异性 T 细胞系 (TCL) 表现出十分有趣的差异。所有 3 种 TCL 都能够对肽 (89-101) 产生应答,但只有 89-94 特异性 TCL 和 95-101 特异性 TCL 能够对完整的 MBP 产生应答。这说明完整 MBP 的抗原加工优先产生 89-94 识别性 T 细胞和 95-101 识别性 T 细胞的配体,而不产生 92-98 识别性 T 细胞的配体。这表明 92-98 表位是隐蔽的(即不能通过天然抗原加工产生)。MBP 的 89-101 肽似乎能参与 3 种不同的与 MHC 分子的相互作用,从而产生被 3 种独立 T 细胞群识别的肽/MHC 配体。但是对 MBP 的加工只产生被其中 2 种 T 细胞群识别的配体(见图 14)。

[0200] 诱导 EAE 要求 T 细胞能够识别 CNS 中由于完整 MBP 降解而表达的自身抗原性表位。用只含有上述 3 种 T 细胞表位之一的肽对小鼠进行免疫的结果说明,只有包含天然加工表位 (89-94 或 95-101) 的肽才能够诱导 EAE。这进一步支持 92-98 为隐蔽表位的结果。

[0201] MBP 肽 92-98 是 MBP 区域 89-101 的优势表位

[0202] 如上所述,区域 89-101 含有 3 种不同但又重叠的肽。其中,肽 92-98 似乎在该区域占有优势。例如,当由 98-101 肽致敏的小鼠产生 T 细胞克隆时,产生的所有 6 种克隆都能够对 92-98 产生应答。通过使用在每个位置含有单个丙氨酸取代的 89-101 肽类似物,发现将 92-98 的任一位置取代都会导致应答性丧失,这说明 92-98 核心中任何残基的改变都会对该表位的识别产生总体上的影响。

[0203] MBP 肽 89-101 不能使识别天然加工 MBP 表位的 EAE 相关 T 细胞获得耐受性

[0204] 总之,本发明人发现 a) 89-101 序列有可能产生 3 种 T 细胞表位;b) 对完整 MBP 的抗原加工(包括体内和体外)只能产生其中的 2 种表位 (89-94 和 95-101);c) 能有效诱导 EAE 的肽只有包含天然加工表位的肽,而不是包含隐蔽表位的肽;d) 在肽治疗实验中,89-101 肽不能预防 EAE。

[0205] 这些信息可作为依据,用于研究 89-101 肽不能与疾病相关 T 细胞直接结合因而无法诱导 EAE 耐受性的假设。为了证明该假设,这种肽 (89-101) 应该不能诱导对致脑炎性表位 (89-94) 的耐受性,因为它不能与适当构象的 MHC 限制性因子 (I-A^S) 直接结合。换句话说,89-101 将不能作为对 89-94 产生应答的 T 细胞的 epitope。

[0206] 为了检测这种可能性,用 89-101 肽和 87-96 肽进行耐受性实验(图 15A & B)。87-96 肽含有诱导 EAE 最有效的表位 (89-94)。

[0207] 方法

[0208] 使小鼠在第 -8、-6 和 -4 天接受含有 200 μ g 肽的 PBS 或只接受 PBS,然后在第 0 天接受与弗氏完全佐剂混合的 100 μ g 肽。10 天后,将引流淋巴结细胞 (6×10^5 每孔) 培养在补加 5×10^{-5} M 2-巯基乙醇和 2M L-谷胺酰胺并且含有或不含抗原的 X-Vivo 15 培养基中。最后用 0.5 μ Ci [³H] 胸苷对培养物进行 16 个小时的脉冲标记,然后用液体闪烁计数器进行掺入量测定。结果表示为 3 份培养物的每分钟计数的平均值。

[0209] 结果

[0210] 用 87-96 致敏的结果是诱导了一种对其本身的强记忆应答和一种对 89-101 的较

弱应答（分别为图 15A 及 B 的□和○）。这说明需要经过抗原加工由 89-101 产生 89-94。在用 87-96 致敏之前用 87-96 作为耐受原的结果是同时抑制了对 87-96 和 89-101 的记忆应答（图 15A 的■和●）。这说明 89-94 反应性 T 细胞一旦在体内获得无反应性，将不能在体外对 89-96 或 89-101 产生的 89-94 产生应答。但重要的是，在用 87-96 致敏之前将 89-101 作为耐受原不能抑制对 87-96 和 89-101 的记忆应答（图 15B A 的■和●）。这些数据说明，将肽 89-101 以耐受原形式给药不能产生对基于 89-94 序列的天然加工致脑炎性表位的耐受性：89-101 肽不能作为 89-94 表位的 apitope。

[0211] 尽管不希望受理论的约束，但本发明人相信，这些观测结果可通过肽 89-101 在 MHC 肽结合位点中的位置来加以解释。如果该肽可优先结合，并使 92-98 区域位于肽结合袋中，则能够被 MBP 92-98 特异性 T 细胞识别。这可用于解释为何用 MBP 89-101 致敏小鼠时，产生的所有 T 细胞克隆都能够识别 MBP 92-98 表位。同样，当用 89-101 使 T 细胞获得耐受性时，主要是识别 MBP92-98 表位的 T 细胞获得耐受性。如果 MBP92-98 是一种隐蔽表位，则不能由完整抗原的天然加工过程产生，因而在体内可能不存在识别该表位的 T 细胞。即使体内确实存在 MBP92-98 特异性 T 细胞，这种 T 细胞也与该疾病无关。因此，89-101 不能预防由完整 MBP 诱导的 EAE。

[0212] 实施例 3——用于 MS 小鼠模型的肽治疗方法

[0213] 本发明人此前发现，通过腹膜内 (Liu and Wraith(1995) *Int Immunol* 8:1255-1263) 或鼻内 (Metzler and Wraith(1993) 5:1159-1165) 途径进行单剂量肽抗原全身给药的方法能够有效地保护小鼠在长达 3 个月的时间内不患实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) (Metzler and Wraith(1999) *Immunology* 97:257-263)。在表达 EAE 特异性 T 细胞受体 (Liu et al(1995) *Immunity* 3:407-415) 的 Tg4- 转基因小鼠 (Burkhart et al(1999) 11:1625-1634) 中诱导耐受性至少需要 5 剂肽。最近的工作表明，对 Tg4 小鼠而言，鼻内 (IN) 途径比腹膜内 (IP) 途径更安全，但在非转基因小鼠中，这两种方法的安全性相同。

[0214] 对 MBP 肽 83-99 的测试是在 Fug/D6 转基因小鼠中进行，这种小鼠能够同时表达适当的 HLA-DR2 II 类 MHC 分子和来源于对该肽具有特异性的人 T 细胞克隆的 TCR。根据处理 Tg4 转基因小鼠所采用的标准剂量 (Tg4 方案) 或用于治疗变态反应患者的肽剂量递增脱敏方案 (脱敏方案)，用肽对小鼠进行治疗。

[0215] Tg4 方案：对多组小鼠进行处理，方法是用总体积 25 μ l 的肽 83-99 (以 4mg/ml 的浓度溶于磷酸缓冲盐溶液 (PBS)) 或只用 PBS 进行鼻内给药。每周的第 1 和第 5 天对小鼠进行处理，持续 5 周，共 10 次给药。在第 6 周开始时，用混合于弗氏完全佐剂 (CFA) 的肽 83-99 对每只小鼠进行注射，此外还在第 1 和第 3 天用百日咳毒素 (200ng) 进行 IP 注射。

[0216] 脱敏方案：对多组小鼠进行处理，方法是用总体积 25 μ l 的递增剂量的肽 83-99 或只用 PBS 进行鼻内给药。递增剂量从 0.1 μ g 开始，再依次为 1、3、6、12、50 μ g，然后是 3 次 100 μ g。每周的第 1 和第 5 天对小鼠进行处理，持续 5 周，共 10 次给药。在第 6 周开始时，用混合于弗氏完全佐剂 (CFA) 的肽 83-99 对每只小鼠进行注射，此外还在第 1 和第 3 天用百日咳毒素 (200ng) 进行 IP 注射。对 EAE 的进展情况至少监测 30 天。

[0217] 实施例 4——将一种 apitope 混合物鼻内给药于 MS 患者

[0218] 制备一种含有 MBP 肽 30-44、83-99、110-124 和 130-144 (即已被确定为 apitopes

的某些 MBP 表位) 的疫苗。在 Phase Ia/Ib 试验中, 将该疫苗给药于 35 名患者。该试验为单交叉试验, 其中的患者保持 3 个月的非治疗状态, 然后接受单剂量的肽 (Ia)。为评定安全性, 在单剂量疫苗给药后, 对患者进行 3 个月的监测。此外, 该治疗还包括两次鼻内沉积给药, 每周一次。对每名患者: 用磁共振成像法分析临床活性, 每月一次; 用增殖动力学应答测定法监测免疫活性; 并用基于细胞的 ELISA 法监测细胞因子产量。

[0219] 该试验最初涉及对 5 名慢性进展性疾病 (CP) 患者的治疗。这些患者是根据低 MRI 活性来挑选的, 并且首先用最高剂量的肽进行处理。从 CP 患者组开始治疗的原因是, 他们最可能通过 MRI 活性的提高来表明任何可能的不良影响。在确定对 CP 组的单剂量和多剂量治疗均具有安全性之后, 即可开始对复发缓解患者的治疗。在这一较大的组中, 30 名复发缓解患者的挑选依据是他们在 3 个月的监测期内出现 MRI 病变加强。这些患者被分为 3 组, 分别用高、中或低剂量肽进行治疗。

时间 点 (月)	慢性进展性疾病 (CP) 患者	复发缓解 (RR) 患者
[0220] 0	开始每月监测	
3	治疗 1-2 周后用 MRI 开始 Ia 期 (单剂量肽), 并每月监测	
6	开始 Ib 期 (每周两次将肽给	开始每月监测, 并挑选

	药), 并持续每月监测	病变加强的患者
[0221] 9		开始 Ib 期 (每周两次将肽给药), 并持续每月监测
12	结束治疗, 并再持续为期 6 个月的每月监测	
15		结束治疗, 并再持续为期 6 个月的每月监测

[0222] 缩写: APC = 抗原呈递细胞; MHC = 主要组织相容性复合体; TCR = T 细胞受体; EAE = 实验性自身免疫性脑脊髓炎; APITOPE = 抗原加工非依赖性表位; APIPS = 抗原加工非依赖性呈递系统; aa = 氨基酸; MS = 多发性硬化症; MBP = 髓磷脂碱性蛋白; PLP = 蛋白脂质蛋白; TCL = T 细胞系; TCC = T 细胞克隆; PBMC = 外周血单核细胞; PPD = 结核分支杆菌纯化蛋白衍生物; PHA = 植物血球凝集素

[0223] 本领域的技术人员都了解, 在不脱离本发明的范围和主旨的条件下, 本发明描述的方法和系统可有多种修改和变化。尽管本发明是通过特别优选的实施方案来加以描述, 但应该了解的是, 申请专利保护的本项发明不应过度局限于这些特别的实施方案。实际上, 本发明应包括用于实施本发明的所述方式方法的不同变化, 这些变化对化学或生物或相关

领域的技术人员而言是显而易见的。在上文的说明书中提到的所有出版物均在此引入作为参考。

[0001]

说明书氨基酸及核苷酸序列表

<110> Bristol 大学

<120> 肽选择方法

<130> P9611W0 LCH

<140> PCT/GB01/03702

<141> 2001-08-17

<150> 0020618.5

<151> 2000-08-21

<150> 0114547.3

<151> 2001-06-14

<160> 11

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr

1

5

10

15

Pro

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

[0002]

<400> 2

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

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 3

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

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 4

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

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 5

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

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

[0003]

<400> 6

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

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 7

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

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 9

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

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

[0004]

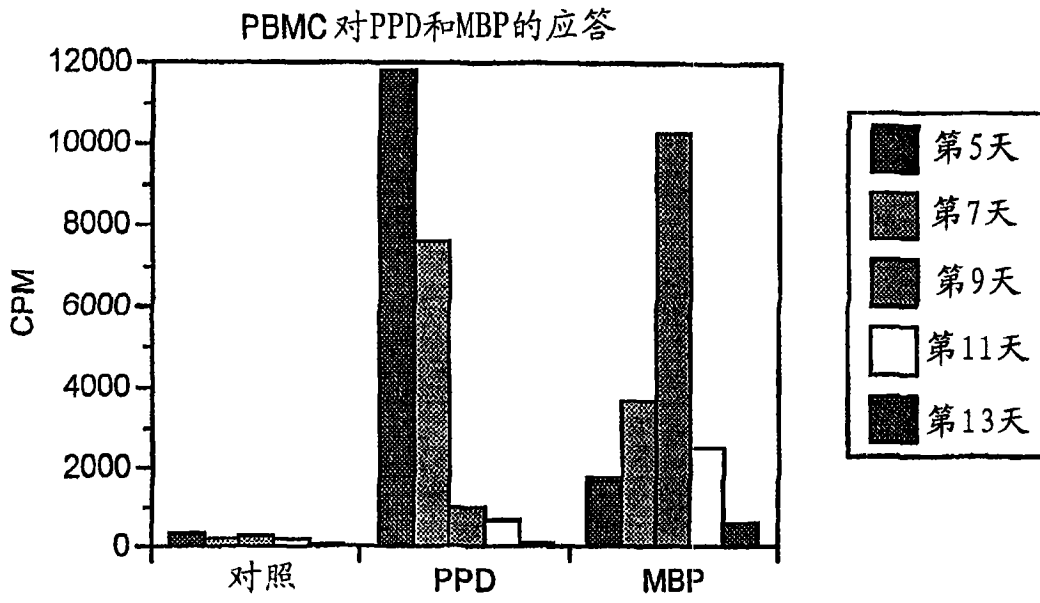


图 1A

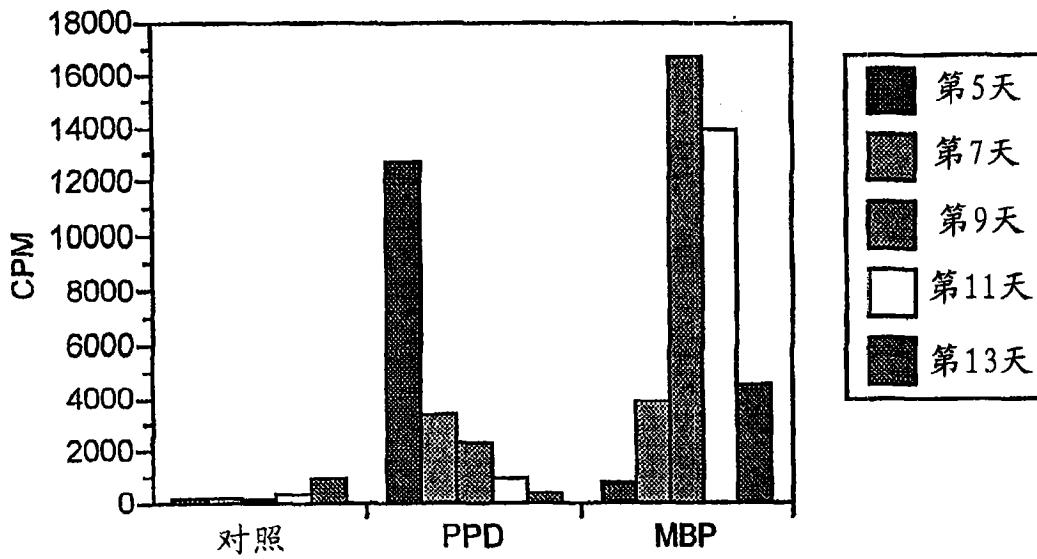


图 1B

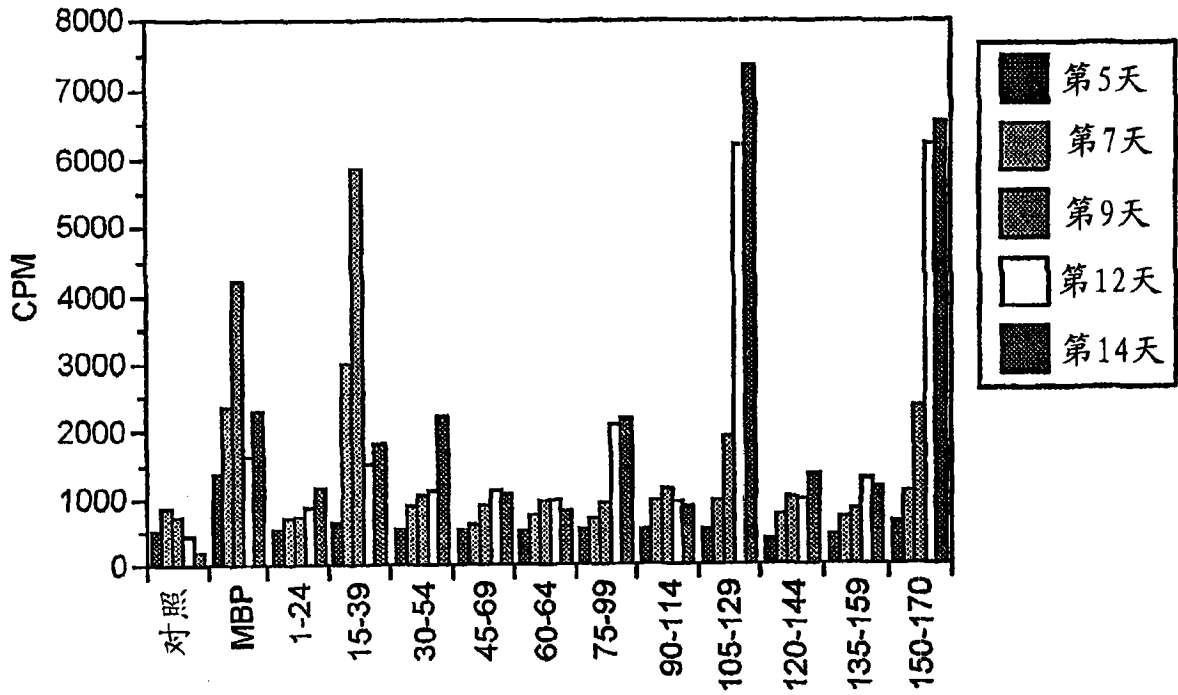
		MS患者对MBP肽的应答: 第1时间点										MS患者对MBP肽的应答: 第2时间点										MS患者对MBP肽的应答: 第3时间点																
		MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170	MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170	MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170	
MS 10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 39	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 43	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 49	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 57	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 60	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 67	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 80	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		MS患者对MBP肽的应答: 第3时间点																																				
MS 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 49	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 60	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 60	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图 2

健康个体对MBP肽的应答: 第1时间点		健康个体对MBP肽的应答: 第2时间点												健康个体对MBP肽的应答: 第3时间点			
个体	MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-17					
A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
J	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

图 3

第1时间点 MS 49: PBMC对MBP肽的应答



第2时间点

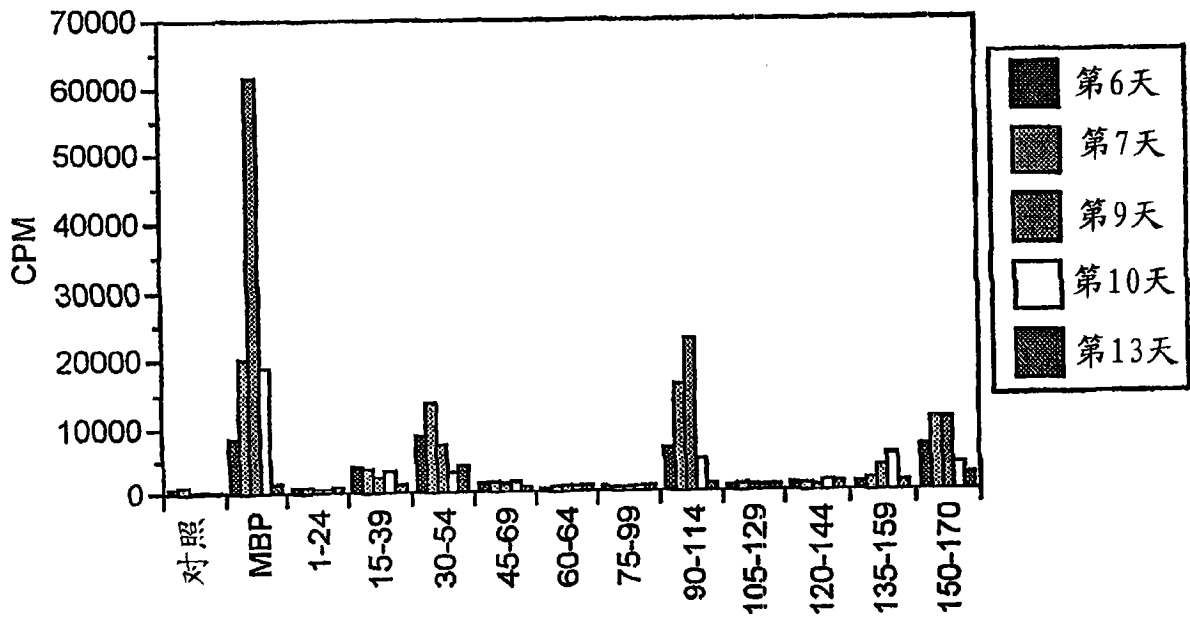


图 4

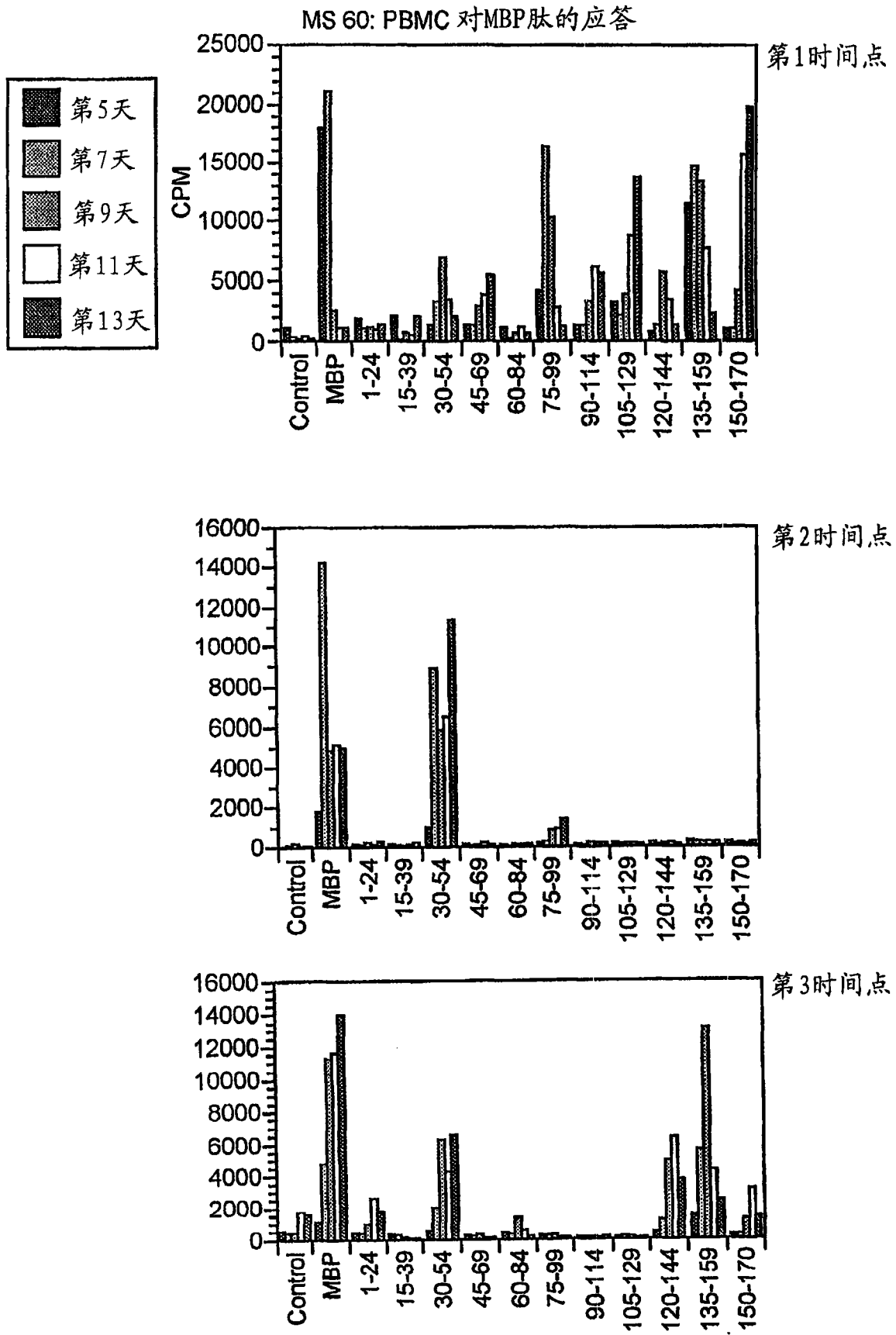


图 5

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

图 6

研究的蛋白区域	用T细胞克隆确定的表位
1-24	5-19
15-39	非常见
30-54	30-44
45-69	非常见
60-84	60-74
75-99	80-94 83-99
90-114	非常见
105-29	110-124
120-144	130-144
135-159	130-144 140-154
150-170	150-164 156-169

图 7A

研究的表位	研究的APITOPE
5-19	未进行
30-44	++
60-74	未进行
80-94	++
83-99	++
110-124	++
130-144	++
140-154	未进行
156-170	-

图 7B

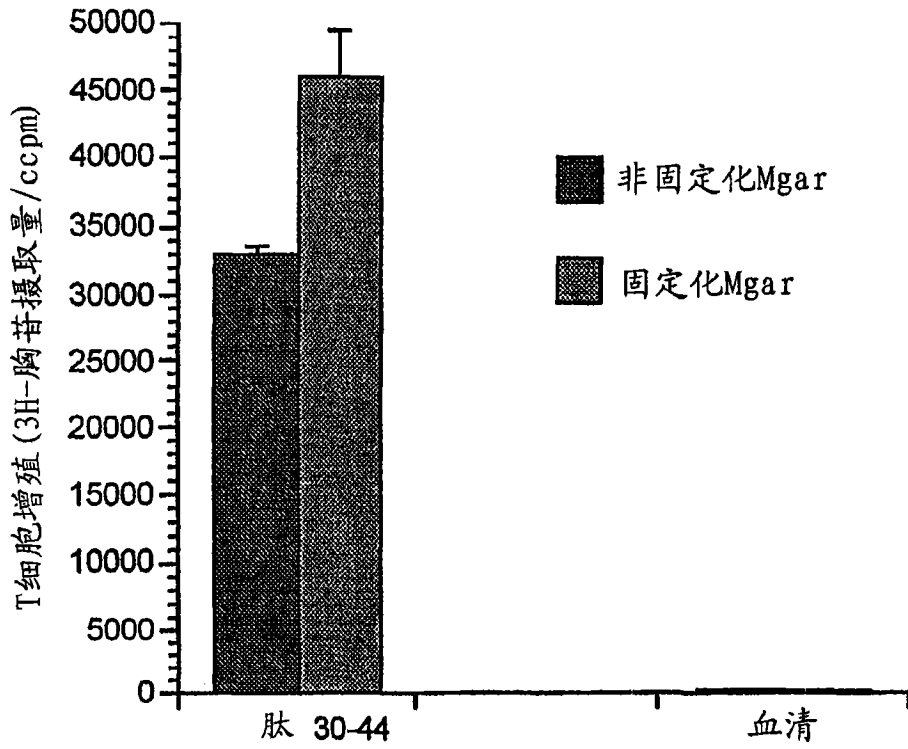


图 8A

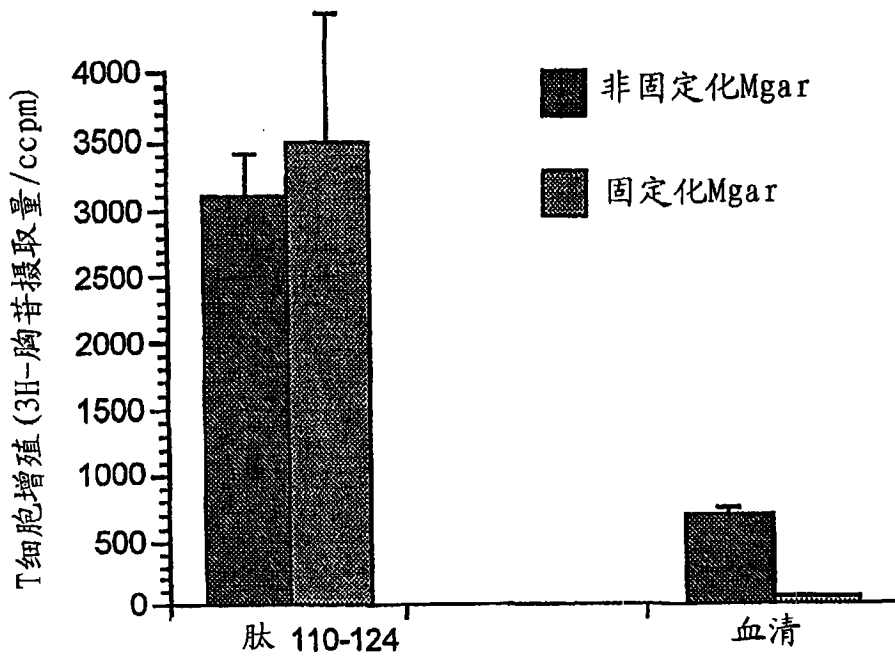


图 8B

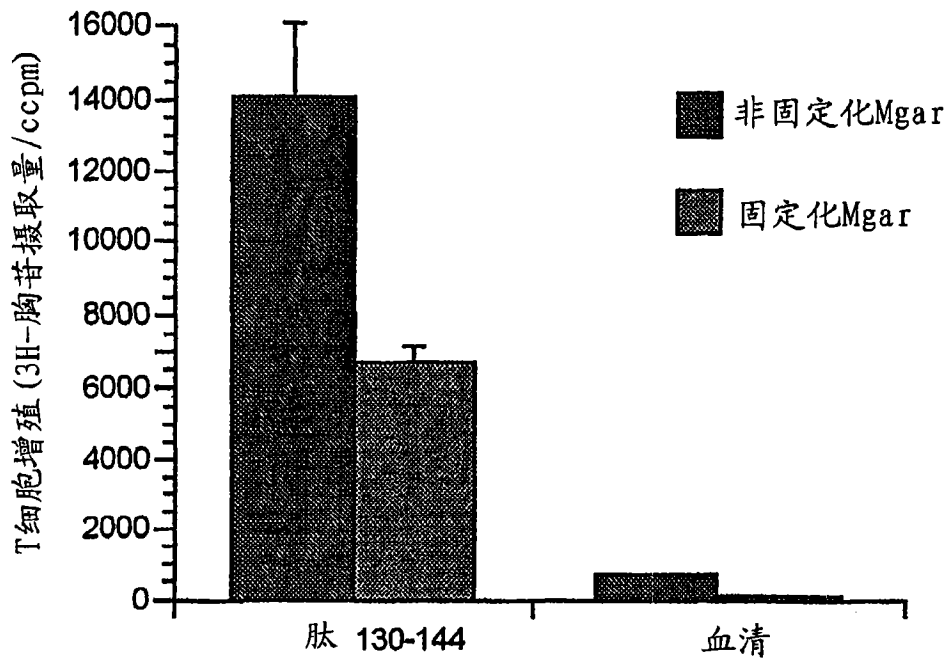


图 9A

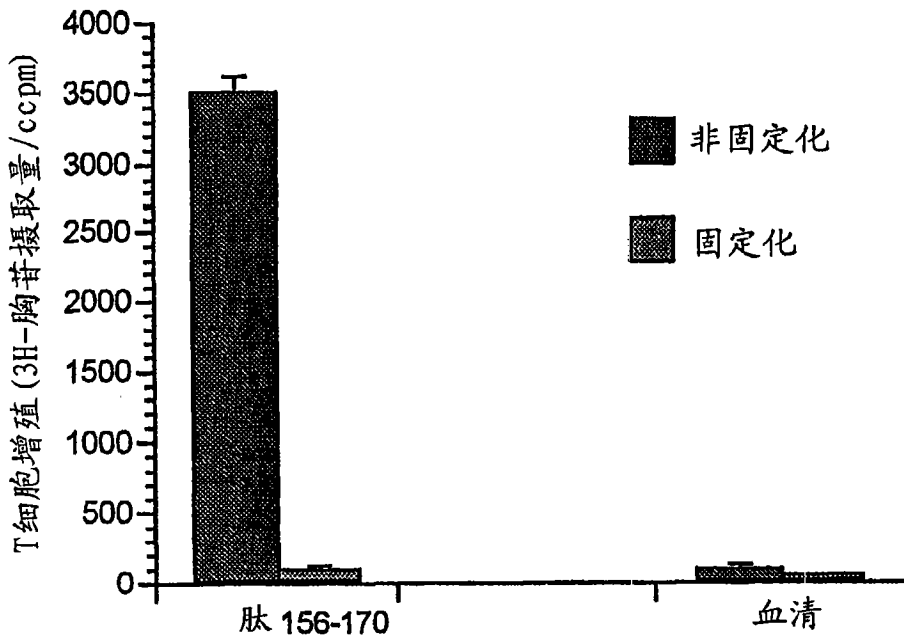


图 9B

	时间点	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
MS10	1	14	17	3	15	55	1	1	2	15	1	2	1
	2	4	1	<1	<1	<1	<1	9	4	1	<1	4	1
	3	8	3	1	1	1	<1	1	1	2	1	1	0
MS17	1	29	1	1	1	1.5	2	1	<1	1	1	1.5	2
	2	51	1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	5
	3	51	1	<1	2	1	1	<1	2	1	1	1	1
MS19	1	1	2	1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	1.5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS39	1	39	3	5	1	3	2	2	7.5	6	<1	2	2
	2	58	1	<1	<1	2	2	<1	<1	<1	1	<1	<1
	3	50	8	1	1	1	2	1	1.5	1	<1	3	<1
MS41	1	59	2	3	2	2	1.5	1	1	2	6	7	3
	2	116	<1	1	<1	<1	<1	1	<1	1	<1	<1	<1
	3	74	2	1.5	1	2	2	8	<1	<1	<1	95	<1
MS43	1	32	4	22	3	3	3	24	4	2	12	3	4
	2	76	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	66	2	2	1	2	2	1	2	2	2	7	1
MS49	1	6	5	9	11	5	4	11	4	35	6	5	31
	2	202	2	8	23	4	3	2	73	2	2	11	34
	3	2	1	2	4	1	2	1	1	1	1	1	2
MS57	1	36	8	<1	1.5	1	1	2	2	<1	<1	<1	<1
	2	7	2	2	2	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS59	1	57	2	1	65	1	1	9	37	1	1	2	14
	2	27	1	<1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	3	14	1	9	2	1	1	4	2	2	63	137	1
MS60	1	44	3	2	19	8	2	28	9	11	16	16	12
	2	133	1	<1	83	<1	<1	20	<1	1	<1	2	<1
	3	23	2	<1	13	<1	2	<1	<1	<1	10	26	2
MS67	1	49	2	2	1	2	2	1	<1	1	1	58	

图 10

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

图 11

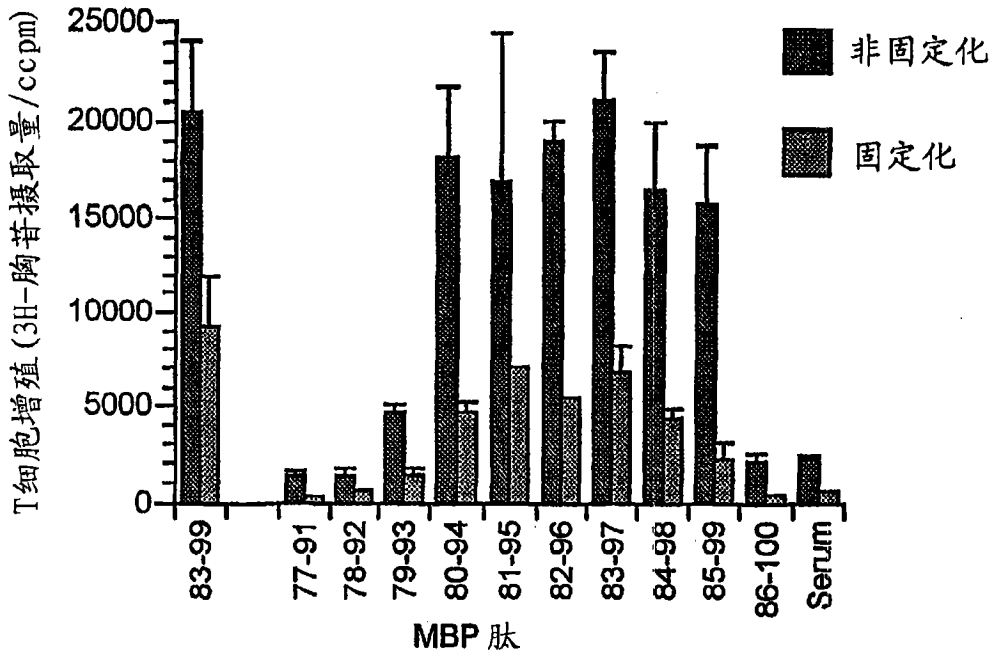


图 12

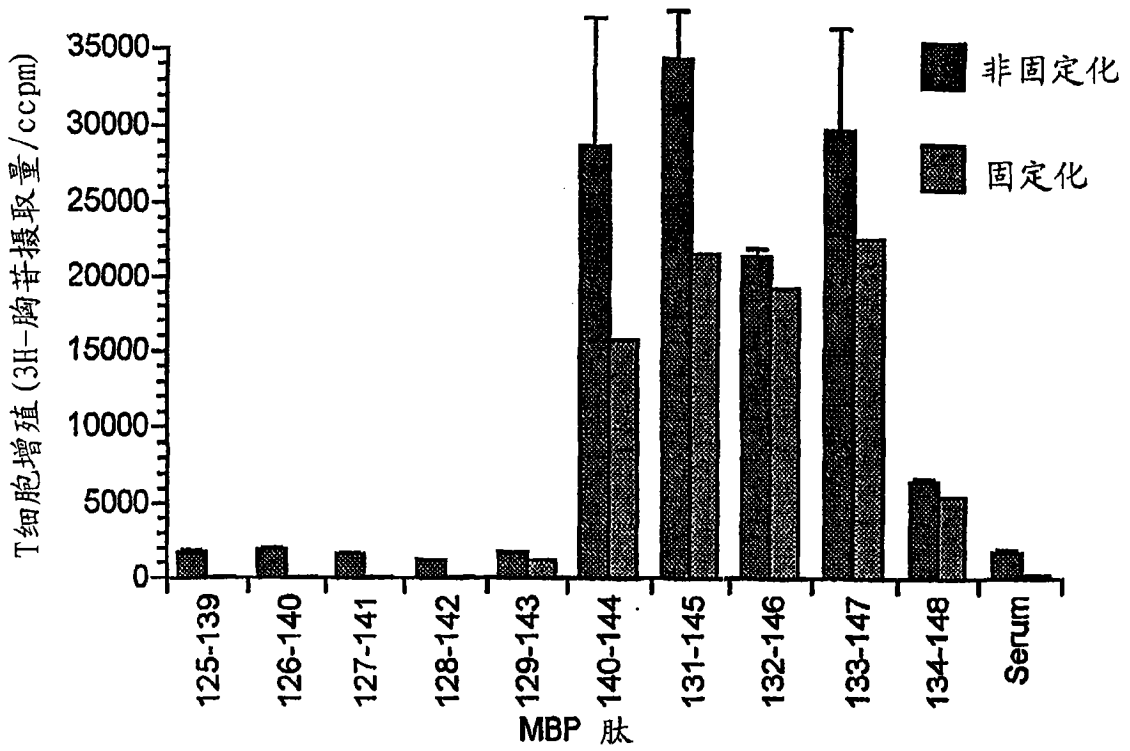


图 13

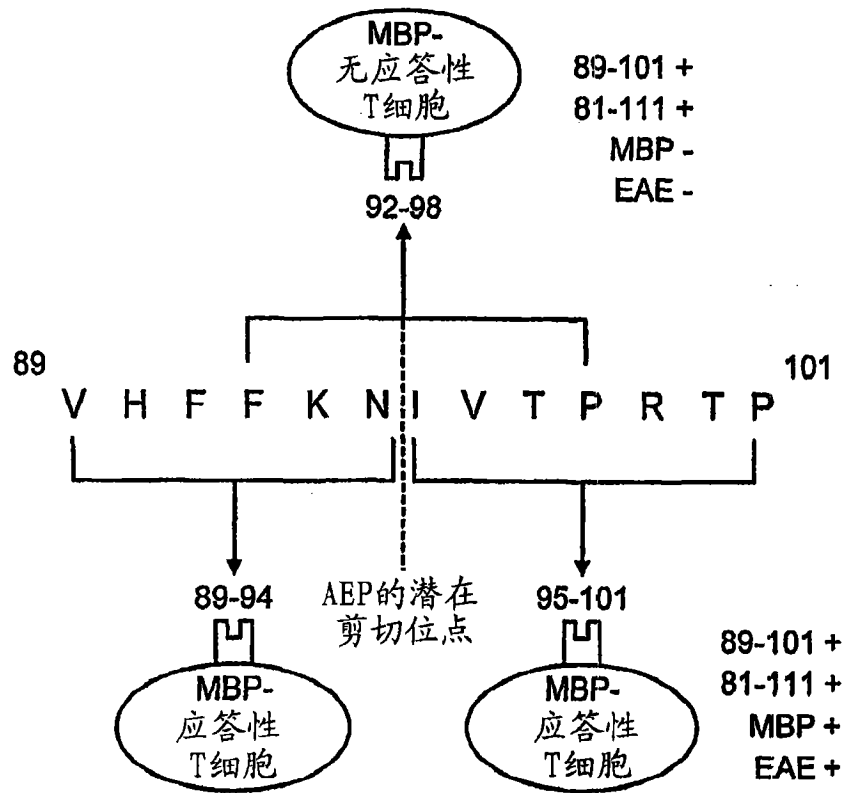


图 14

符号	腹膜内给药的肽	用于引发的肽	用于体外回忆的肽
□	None	87-96	87-96
○	None	87-96	89-101
■	87-96	87-96	87-96
●	87-96	87-96	89-101

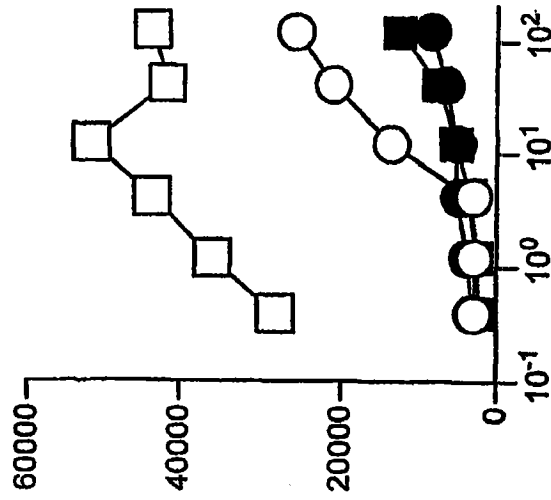


图 15A

符号	腹膜内给药 的肽	用于引发 的肽	用于体外 回忆的肽
□	None	87-96	87-96
○	None	87-96	89-101
■	89-101	87-96	87-96
●	89-101	87-96	89-101

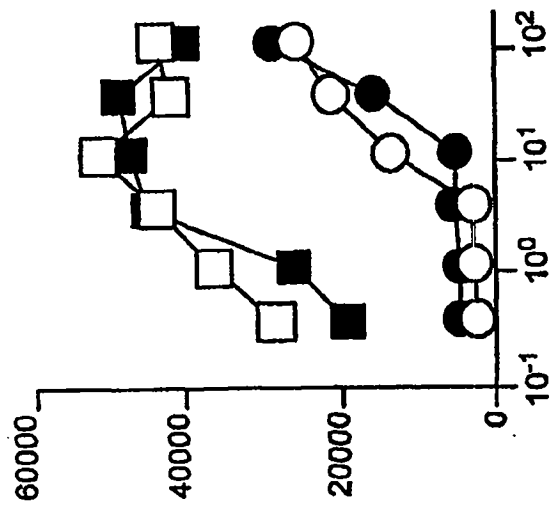


图 15B