

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[21] 申请号 200480019000.0

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101410130A

[22] 申请日 2004.5.14

[21] 申请号 200480019000.0

[30] 优先权

[32] 2003.5.15 [33] US [31] 60/470,593

[86] 国际申请 PCT/US2004/015387 2004.5.14

[87] 国际公布 WO2004/110353 英 2004.12.23

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.4

[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

共同申请人 贝希尔治疗学股份有限公司

[72] 发明人 L·斯坦曼 H·加伦 P·冯杜拉

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范征

权利要求书2页 说明书21页 附图6页

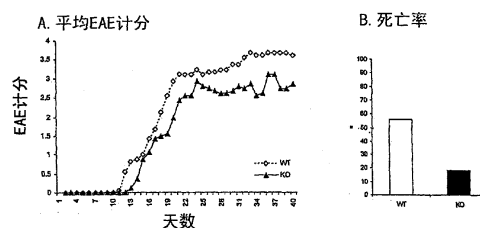
[54] 发明名称

新颖的免疫调节肽

[57] 摘要

包括 Nogo 45-66 在内的 Nogo 表位片段引发强烈的特异性 T 细胞应答和 B 细胞应答。针对 Nogo 抗原的反应性 T 细胞能缓解由其它抗原诱导的正在发生中的疾病。本发明提供用于治疗免疫相关疾病的 Nogo 表位片段的鉴定和使用的组合物和方法。

Nogo^{-/-}小鼠的实验性自身免疫脑炎



- 1.一种治疗自身免疫疾病的方法，所述方法包括：
向患者施用有效剂量的 Nogo 表位；
其中所述 Nogo 表位可引发保护性免疫应答。
- 2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 Nogo 表位含有 Nogo-45-66 氨基酸序列中的序列。
- 3.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述 Nogo 表位是多肽。
- 4.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述 Nogo 表位与野生型 Nogo 序列相比含有至少一个氨基酸取代。
- 5.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 Nogo 表位是编码 Nogo-45-66 氨基酸序列中的序列的多核苷酸。
- 6.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 Nogo 表位与第二种免疫调节剂联合施用。
- 7.如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述第二种免疫调节剂是抗原特异性的。
- 8.如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述抗原特异性免疫调节剂是含有编码自身免疫疾病相关自身多肽的多核苷酸的自身载体。
- 9.如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述抗原特异性免疫调节剂是多肽。
- 10.如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述肽是与该疾病相关的自身多肽的自身抗原性表位。
- 11.如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述肽含有有序的氨基酸基序 $[^1E^2Y^3Y^4K]_n$ ，其中 n 是 2 到 6。
- 12.如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述第二种免疫调节剂是非抗原特异性的。
- 13.如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述非抗原特异性免疫调节剂是免疫调节序列。
- 14.如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述免疫调节序列含有 5'-嘧

呤-嘧啶-[X]-[Y]-嘧啶-嘧啶-3'或5'-嘌呤-嘌呤-[X]-[Y]-嘧啶-嘧啶-3',其中X和Y是任何一种天然存在的或合成的核苷酸,但X和Y不是胞嘧啶-鸟嘌呤。

15.如权利要求12所述的方法,其特征在于,所述非抗原特异性免疫调节剂是抑制素。

16.一种测定自身免疫疾病的抗原特异性的方法,所述方法包括:

使含有疾病相关抗原特异性免疫制剂的患者样品与至少一种Nogo表位结合;

比较所述患者样品与对照样品的免疫反应性;

其中,相比所述对照呈阳性免疫反应性表明所述Nogo表位与所述免疫相关疾病有关。

18.一种含有Nogo表位多肽或肽的药物组合物。

19.如权利要求18所述的药物组合物,其特征在于,所述Nogo表位多肽或肽是Nogo45-66。

20.如权利要求19所述的药物组合物,其特征在于,所述Nogo45-66具有序列VNSTIKELRRLFLVDDLVDLSK。

21.如权利要求19所述的药物组合物,其特征在于,所述Nogo45-66具有序列VNCTIKELRRLFLVDDLVDLSK。

22.如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述Nogo-45-66具有序列VNSTIKELRRLFLVDDLVDLSK。

23.如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述Nogo-45-66具有序列VNCTIKELRRLFLVDDLVDLSK。

新颖的免疫调节肽

免疫应答错误靶向机体的健康细胞和/或组织导致自身免疫疾病。自身免疫疾病的特征在于 T 和 B 淋巴细胞与自身分子(包括多肽、核酸、小的核颗粒等)反应。自身免疫疾病包括影响特定组织的疾病以及影响多种组织的疾病,这部分取决于自身抗原的分布。

Nogo 蛋白质是 Reticulon {RTN} 家族的一员,而 Reticulon {RTN} 家族是近年被鉴定为中枢神经系统(CNS)髓鞘特异性的主要髓鞘结合的轴突再生长抑制剂(Chen 2000, GrandPré 2000)。Nogo-A 是 nogo 基因产生的三种交替转录物中最长的,其具有 1,163 个氨基酸残基并对 CNS 特异。所有这三种同种型在它们的 C-末端含有赋予其大部分抑制能力的预计的 66 个氨基酸的胞外环。这个称为 Nogo-66 的胞外环通过与 Nogo 受体和 p75 辅助受体相互作用而发挥作用并通过拮抗经由 RhoA 和 Rac1 的胞内信号传导来介导轴突生长抑制(Fournier 2001, Brittis 2001, Wang 2002a, Niederost 2002)。

其它也涉及轴突再生长抑制的髓鞘蛋白,例如髓鞘结合糖蛋白(MAG)和少突胶质细胞-髓鞘糖蛋白,也经由 Nogo 受体系统的信号传导而起作用(Liu 2002, Wang 2002b)。

几种以改善轴突再生为目的的治疗方案试图阻断 Nogo-Nogo 受体系统的相互作用(Karim 2001)。这些方案包括使用能识别 Nogo-A 的重组单克隆抗体 IN-1(Merkler 2000, Brosamle 2000)、Nogo 受体拮抗肽 NEP1-40(GrandPré 2002)和截短的可溶性 Nogo 受体(Fournier 2002)。近来,研究者创立了不同的 Nogo 敲除小鼠模型,这些模型在增加轴突再生能力上的结果互相矛盾 (Simonen 2003, Zheng 2003, Kim 2003)。其它小组寻找通过诱导抗髓鞘结合的轴突生长抑制剂(Huang 1999)或特异性抗 Nogo-A 衍生的肽 472(Hauben 2001)的免疫应答来提高轴突再生长,该项研究由于产生了抗尚未阐明髓鞘成分的抗体应答或抗 p472 的 T-细胞特异性应答而取得适度的成功。

实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)是一种被深入研究的动物模型,该模型已

成为了解人类疾病-多发性硬化症(MS)的病理生理学和治疗资料的来源(Steinman 2002, Steinman 1999)。EAE 主要由协调针对 CNS 的免疫攻击的髓鞘-抗原特异性的 T 细胞应答所介导(Steinman 和 Zamvil 1990)。虽然靶向髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的抗体被认为在 EAE 和 MS 中是致病性的并且检测到其它抗髓鞘抗体(Genain 1999, Steinman 1996), 但 B 细胞应答在 EAE 和 MS 中的作用还不清楚。诱发活动性 EAE 后发生 B 细胞应答的表位扩散并且与慢性疾病模型中复发率相关。近些年, 轴突病理学认为 MS 中神经缺陷是主要决定因素(Trapp 1998), 这导致一种观点, 即通过阻断轴突再生抑制剂的作用也可能对该疾病有益处。

本发明的一个目的是提供一种治疗或防止脱髓鞘疾病的方法。本发明的另一个目的是提供一种治疗或防止自身免疫疾病但总体上不损害免疫系统的特异性方法。本发明的这些和其它目的可从整个说明书中得到了解。

发明概述

本发明提供了在诊断和治疗自身免疫疾病中使用 Nogo 表位片段(特别是 Nogo 多肽)的组合物和方法。本发明发现施用 Nogo 表位片段(特别是 Nogo 肽 45-66)可调节脱髓鞘性自身免疫疾病中免疫应答。Nogo 表位片段可用于治疗炎性中枢神经系统疾病产生保护性免疫应答。Nogo 表位可作为肽。DNA 疫苗等施用。提供保护性免疫应答的 Nogo 片段是特别感兴趣的, 包括(不限于)存在于 Nogo-A 蛋白质的胞外 66 个氨基酸环中的肽。

附图简述

图 1A.与野生型 C57BL/6 对照相比, 疾病严重性上具有非统计学显著地下降的 Nogo KO 小鼠。图 1B.死亡率降低的 Nogo KO 小鼠(图 1B)。

图 2.针对免疫抗原的 T 细胞增殖应答的评价。

图 3A 和 3B.用 Nogo-66 肽免疫接种后的结果。图 3C.对其它髓鞘肽和蛋白质的抗体应答的分子内和分子间扩散。

图 4.Nogo 免疫接种产生了对其它髓鞘自身抗原不显示交叉反应性的特异性 T 细胞应答。

图 5A-5B.在用 Nogo 免疫的动物和用其它髓鞘抗原免疫的动物之间,T 细胞中的 CD25、CD18、CD40L、CD62、CD69、CD28 和 TLA4e 或树突状细胞中的 CD80、CD86、CD40 的细胞表面表达没有区别。

图 6A.用 Nogo 表位片段,特别是 Nogo 肽、pNogo1-22 或 pNogo45-66 免疫动物,建立了用于过继性转移的抗原特异性 T 细胞系(TCL)。接受 Nogo-反应性 TCL 的 SJL 小鼠不诱发 EAE。图 6B.在 SJL/J 小鼠中用 PLP139-151 免疫接种诱发 EAE。在第二次复发的高峰期,动物通过静脉内注射接受 PBS、抗-p-Nogo1-22 或抗-pNogo45-66 反应性 T 细胞。接受 Nogo-反应性 T 细胞的动物在临床得分上表现出统计学显著降低,特别是那些接受抗-pNogo45-66 TCL 的动物。体外增殖试验表明存在 PLP139-151 和 Nogo 反应性 T 细胞。图 6C.体外细胞因子产生试验检测到的抗-Nogo TCL 的表型。在体外、有同系经射线照射过的抗原呈递细胞时用其特异性抗原激活抗 i-Nogo1-22 和抗-Nogo45-66 TCL。收集上清液用 ELISA 测定细胞因子的产生。抗-pNogo45-66 TCL 出现了 Th2 表型,产生了大量 IL-4 和 IL-10,而抗-pNogo1-22 TCL 表现出 IFN γ 产生增加。

实施方案详述

可产生针对 Nogo 肽的特异性且强烈 T 细胞应答和 B 细胞应答,该应答反应不与其它髓鞘抗原交叉反应。Nogo 抗原的反应性 T 细胞能减轻可由其它抗原诱导的正在发生的疾病。本发明提供在治疗免疫相关疾病中鉴定和使用 Nogo 表位片段的组合物与方法。感兴趣的疾病包括炎性中枢神经系统疾病,例如 EAE、多发性硬化症(MS)等。

在本发明的一个方面,通过使含有抗原特异的免疫制剂的患者样品与 Nogo 或其衍生的 Nogo 表位片段接触,鉴定 Nogo 或 Nogo 表位片段与该免疫制剂之间是否存在结合或反应性而得到了自身免疫疾病患者的自身抗原特异性分布。在本发明的一个实施方案中,使患者样品与含有 Nogo 或 Nogo 表位片段的自身抗原阵列接触,该阵列还可含有其它的自身抗原,特别是其它的髓鞘抗原,例如髓鞘结合糖蛋白(MAG)、蛋白脂质蛋白(PLP)、髓鞘-碱性蛋白(MBP)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、少突胶质细胞-特异的糖蛋白(OSP)、2',3'-环状核苷酸 3'-磷酸二酯酶(CPN 酶)和 α -B 晶体蛋白(crystallin)。在另一个实施方案中,自身抗原或自身

抗原阵列以含有 MHC-抗原复合物的多聚体形式提供，该多聚体与 T 细胞的结合具有足够的亲和力从而可特异性地与同源 T 细胞抗原受体结合。患者样品所含自身抗体可作为上述免疫制剂。或者，患者样品所含的 T 细胞可作为免疫制剂。在一个实施方案中，通过详细的结合分析对患者血清中的疾病相关抗体的谱系进行了高通量测定。

在本发明的另一个实施方案中，Nogo 或从其衍生的 Nogo 表位片段用于免疫或治疗罹患炎性中枢神经系统疾病或具有患病风险的患者。Nogo 表位片段可以肽、改变的肽、编码肽的核酸等提供。Nogo 表位片段可与第二种免疫调节剂联合施用。

在本发明特定的实施方案中，所述第二种免疫调节剂是抗原特异性的。在一个实施方案中，该抗原特异性免疫调节剂是含有编码自身免疫疾病相关自身多肽的多核苷酸的自身载体。该多核苷酸编码的自身多肽可是，例如蛋白质或多肽。在特定的实施方案中，含有多核苷酸的自身载体编码一种自身多肽。

在另一个实施方案中，抗原特异性免疫调节剂是多肽。该多肽可是，例如蛋白质或肽。此外，该多肽可含有与疾病相关的自身多肽或含有对应于疾病相关自身多肽的自身抗原表位的氨基酸。在其中的多肽含有对应于自身抗原表位的氨基酸的实施方案中，这些氨基酸可随机形成随机共聚物或是有序的，这样该多肽含有有序的氨基酸基序。在一个自身免疫疾病是脱髓鞘自身免疫病的实施方案中，该有序的氨基酸基序是 $[^1E^2Y^3Y^4K]_n$ ，其中 n 是 2 到 6。

在其它实施方案中，第二种免疫调节剂是非抗原特异性的。在一个实施方案中，该非抗原特异性的免疫调节剂是骨桥蛋白或含有编码骨桥蛋白的多核苷酸的自身载体。在其它的实施方案中，该非抗原特异性免疫调节剂是一种免疫调节序列。该免疫调节序列可是，例如 5'-嘌呤-嘧啶-[X]-[Y]-嘧啶-嘧啶-3'或 5'-嘌呤-嘌呤-[X]-[Y]-嘧啶-嘧啶-3'，其中 X 和 Y 是任何天然存在或合成的核苷酸，但 X 和 Y 不能是胞嘧啶-鸟嘌呤。

在其它的实施方案中，非抗原特异性免疫调节剂是在自身免疫疾病最初发生后施用的一种抑制素。所述的抑制素是，例如，罗苏伐他汀、美伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀或西立伐他汀。

不受本发明方法操作所依赖机理的限制，据信 Nogo 表位片段反应性 T 细胞能

迁移至发炎部位通过采取有利的 Th2 表型交叉调节其它髓鞘反应性细胞。

Nogo-A 是网硬(reticulon)蛋白质家族的一员。其基因序列和氨基酸序列可在 Genbank 中找到, 登录号为 AF148537。Nogo 具有两个抑制结构域, 一个称为 Nogo-66 的细胞表面结构域(见 GrandPré 等., (2000) *Nature* 403:439)和长氨基末端区域。Nogo-66 结构域能与 NgR 结合。在本发明的方法中, 可使用 Nogo 表位片段, 例如 Nogo 多肽或其肽片段或编码这种多肽或其肽片段的多核苷酸。

在本说明书和权利要求中, 术语“多肽片段”、“Nogo 多肽片段”、“肽片段”、“Nogo 肽片段”或“多肽或肽片段”或其变化形式表示具有至少 2 个氨基酸残基和至多 10 个氨基酸残基的短肽, 长度为至少 11 个氨基酸残基、20 个氨基酸残基、50 个氨基酸残基和约 100 个氨基酸残基的寡肽, 以及约 200 个氨基酸残基的寡肽。

术语基本纯的短肽或肽片段指含有最多 5 重量%的天然相关的其它多肽或肽物质的多肽或肽制剂, 优选重量百分比更低的, 例如, 最多 4%、最多 3%、最多 2%、最多 1%、最多 0.5%的其它肽。基本纯的多肽或肽优选至少 96%纯, 即该多肽或肽至少占该制剂中多肽或肽物质的总重量的 96%, 优选所占百分比更高, 例如至少 97%、至少 98%、至少 99%、至少 99.25%、至少 99.5%和至少 99.75%。基本上不含与其天然相关的任何其它抗原的多肽或肽片段是特别优选的。这可通过重组方法来制备该多肽或肽片段, 或通过熟知的固相或液相肽合成方法来合成该多肽或肽片段而实现, 例如 Merrifield 描述的方法或其变化形式。

文中提供的 Nogo 抗原或 Nogo 片段(例如 Nogo 表位多肽或肽)包括由与一种或多种文中具体引用的 DNA 序列基本上同源的 DNA 序列编码的变体, 例如具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%序列相同性的变体。

在本发明优选的实施方案中, 所述多肽或肽片段可提供或含有一个表位。抗体的结合位点一般利用多种非共价相互作用来实现高亲和力结合。尽管只有抗原的少数接触残基可紧密进入结合袋, 但维持结合构型也需要抗原分子的其它部分。抗原与抗体结合的部分称为表位。如文中所用的, 表位是能足够高亲和力结合的抗原一部分。在多肽或肽抗原中, 线形表位的长度一般为至少约 7

个氨基酸，也可是至少 8 个、至少 9、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 14 个、至少 16 个、至少 18 个、至少 20 个、至少 22 个、至少 24 个或至少 30 个氨基酸残基。然而，抗体也可识别抗原上由非连续残基形成的构型决定簇，因此一个表位可能需要抗原的较大的片段来提供结合位置(例如结构域)或需要几乎基本上整个蛋白质序列。总之，虽然有一个抗原只含有一个表位的例子，但每个抗原存在代表该抗原免疫决定簇的多个表位。

可认为抗体结合“特异性”的亲合力水平部分取决于抗体的类型，例如 IgM 类抗原特异抗体的亲合力比 IgG 类抗体的低。如文中所用，抗体的相互作用要认为是“特异的”，对感兴趣的表位的亲合力应是至少约 10^{-7} M、一般约是 10^{-8} - 10^{-9} M，可至 10^{-11} 或更高。本领域的技术人员应理解，术语“特异性”指这种高亲和力的结合，不意味着该抗体不能与其它分子结合。发现可与不同的表位发生交叉反应性，这是由于，例如抗原序列或结构之间具有相关性或抗体结合袋自身的结构。就本发明的目的而言，显示有这种交叉反应性的抗体仍可认为是特异性。

多肽或肽序列包括重组方法产生的类似物和变体，其中这种核酸和多肽或肽序列通过该核酸序列中一个或多个核苷酸的取代、插入、添加和/或删除导致重组多肽中一个或多个氨基酸残基的取代、插入、添加和/或删除。

可治疗性施用本发明具体的多肽或肽和其类似物以诱导耐受性或保护性 T 细胞应答来治疗自身免疫病。可递送作为自身免疫应答靶子的本发明天然多肽或肽来诱导耐受性或保护性 T 细胞应答。也可递送所述天然肽经改变得到的多肽或肽。含有选择性变化残基(改变的肽配体或“APL”)的天然多肽或肽的改变形式可诱导无反应性或可改变抗原特异性自身反应性 T 细胞的反应性。

“肽类似物”的长度至少为 7 个氨基酸，并且类似物与天然抗原性多肽之间在氨基酸序列上至少有一处不同。天然肽的 L-氨基酸可变为任何一种通常在蛋白质中发现的其它的 20 种 L-氨基酸、任何一种对应的 D-氨基酸、稀有氨基酸(例如 4-羟脯氨酸和羟基赖氨酸)、或非蛋白质氨基酸(例如 β -丙氨酸和高丝氨酸)。通过化学方法改变的氨基酸也包括于本发明的范围内，例如甲基化(α -甲基缬氨酸)、脱酰胺作用、通过烷基胺(例如乙胺、乙醇胺和乙二胺)进行 C-末端氨基酸的酰胺化、氨基酸侧链官能团的酰化或甲基化(例如赖氨酸的 ϵ 氨基的酰

化)、精氨酸脱氨基(deimination)为瓜氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或组氨酸残基上的异天冬氨酰化或磷酸化。

改变的肽配体如何能够有效起作用的机理可能涉及 T 细胞受体(TCR)的不完全活动。APL 可诱导几种可能的功能性改变。第一种是作为简单的拮抗剂,其中 APL 可与抗原呈递细胞上的天然多肽竞争性与 MHC 结合而不会完全激活 T 细胞。这表明 APL 不通过 T 细胞受体传递信号。第二种是通过无反应性,其中 APL 诱导 T 细胞的完全无反应性状态,如 T 细胞对天然肽无应答。第三种是通过表型转换,其中 APL 可诱导 T 细胞功能转换,如可降低促炎性细胞因子的产生和/或增加非炎性细胞因子的产生。

可通过测定与 MHC 竞争性结合试验和测定 T 细胞增殖试验来筛选候选的多肽或肽类似物治疗疾病的能力。那些能抑制天然多肽或肽结合但不刺激自身反应性 T 细胞增殖的类似物是有用的疗剂。通过测定类似物以直接方式导致 T 细胞增殖的能力以及测定所诱导的 T 细胞应答的模式(即测定 T 细胞是否具有抑制或促炎性模式)来进一步测试候选多肽或肽类似物刺激或抑制 T 细胞增殖的性能。

感兴趣的 Nogo 表位片段包括(不限于)Nogo 1-22、Nogo 23-44 和 Nogo 45-66;特别是 Nogo 45-66 或其一部分,其中所述的一部分应足够诱导保护性免疫应答。在本发明中,C-末端的胞外 66 个氨基酸的环编号从 1 到 66。本领域的普通技术人员能鉴定 Genebank 所列 Nogo 蛋白质的三种同种型的胞外 66 氨基酸环对应的编号。本发明的一种 Nogo 表位肽是具有以下序列的 Nogo45-66: VNSTIKELRRLFLVDDLVDLSLK。本发明的另一个 Nogo 表位肽是具有以下序列的 Nogo45-66: VNCTIKELRRLFLVDDLVDLSLK。

患者反应性的特异性分析. 在本发明的一个方面,通过使含有抗原特异性免疫制剂的患者样品与至少一种 Nogo 多肽或肽或从衍生的表位片段接触,并且鉴定 Nogo 表位片段与免疫制剂之间发生的结合或反应性,而产生自身免疫疾病患者自身抗原特异性分布图。在本发明的一个实施方案中,使患者样品与含有至少一种 Nogo 多肽或肽的自身抗原阵列接触。在另一个实施方案中,自身抗原或自身抗原阵列以含有 MHC-抗原复合物的多聚体形式提供,其中多聚体与 T 细胞的结合的亲和力足够高从而可特异性结合同源 T 细胞抗原受体。患

者样品所含自身抗体可作为免疫制剂。此外，患者样品所含的 T 细胞可作为免疫制剂。在一个实施方案中，通过详细的结合分析对患者血清中疾病相关抗体的谱系进行了高通量测定。

病人取样的方式包括按照疾病发展的时间取样，比较处于相同疾病阶段(例如发病早期、急性期、恢复期等)的不同患者；追踪治疗期间患者对治疗的反应情况，包括药物治疗、免疫接种等。可编辑和分析得自动物(例如小鼠、大鼠、兔、猴等)的数据以提供详细说明疾病的过程、涉及疾病的抗原的数据库。

可从中收集患者抗体的生物样品包括血液及其衍生物，例如血清、血浆、血浆组分等。样品的其它来源是体液，例如关节液、淋巴液、脑脊髓液、支气管吸出物，还可包括唾液、乳汁、尿液等。抗体和 T 细胞受体也可得自合适的淋巴细胞，这些淋巴细胞可收集自血液、组织(例如脾脏、胸腺、淋巴结、胎儿的肝脏)、自身免疫病损处的组织(例如胰腺、关节、肾脏、脑脊髓液等)。可分析整个淋巴细胞，或者可分析其裂解物。可利用患者样品所含抗体与 Nogo 的结合于描述这些抗体的特性。

在典型的试验中，使含有抗体和 T 细胞的患者样品与所述抗原物理性接触，该试验在允许高亲和力结合、但使非特异性结合最小的条件下进行。鉴定疾病相关的、与患者样品中的抗体结合的抗原的方法可采用本领域熟知的测定方法。那些鉴定方法可包括直接或间接地预先标记样品；加入能与该抗体或间接标记物结合的第二抗体，例如标记的山羊抗-人血清、大鼠抗-小鼠抗体等。其它鉴定方法包括对阵列上可寻址元件的分析，例如珠子、纳米颗粒、标签、可切割标签和这些元件上的其它物理特性或赋予的特性。为有助于定量测定结合的抗体，可提供浓度不同的单一表位。

有用的标记物包括荧光染料，例如 Cy2、Cy3、Cy5、异硫氰酸荧光酯(FITC)、罗丹明、德克萨斯红、藻红蛋白、别藻蓝蛋白、6-羧基荧光素(6-FAM)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基-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-羧基罗丹明(TAMRA)。间接标记物包括半抗原、例如地高辛、地高辛配基、生物素等，其中第二阶段结合伙伴(例如亲和素、抗-地高辛抗体等)可用酶标记，例如辣根过氧化物酶、荧光染料、放射性标记等。当包括对照样品时，用于标记

对照序列的荧光指示剂优选发在激发时能发射荧光信号和/或发射的荧光波长与用于标记测试序列的荧光指示剂的波长不同。

也可使用无需标记的方法进行测量。例子包括使用诸如单电子晶体管、可用于碳纳米管或纳米试管筛网的蛋白质、表面质子共振、原子力显微镜等方法和装置以及其它本领域技术人员已知的方法来测定结合的自身抗原的电荷或质量的变化。

如本领域已知的，这些试验通常包括各种阴性和阳性对照。这些对照可包括含有已知的自身抗体的“突起”样品的阳性对照，患有已知疾病的患者的阳性对照等。阴性对照包括得自正常人、动物血清等的样品。

使含有所述抗体的样品与抗原结合可按照本领域熟知的方法进行。结合条件以及洗涤优选在仅允许保留高亲和力结合伙伴的条件下进行。

为测定与对照样品比较的患者样品中的结合水平，可采用双色标记的不同抗体来结合相同或不同样品。两个样品中含有的对某抗原的具体特异性抗体的相对丰度可从已知颜色与另一种的比例来确定。此外，比较两种样品的结合情况为该试验提供了一种内部控制(标准)。竞争性试验是本领域熟知的，该结合反应中可包括特异性已知的竞争性抗体或含有表位的分子。

各种方法可用于测定患者样品中的自身抗原特异性分布。首先测定各患者的自身抗原特异性分布，而文中是指可被患者样品中的抗体和/或 T 细胞结合的自身抗原或表位。通过使用合适的演绎方案、A1 系统、统计学比较、模式识别算法等比较得自患者样品的结合模式与得自对照或参考样品的结合模式。来自参考样品的信息可用于分析方法中来测定诱导、抗原或表位的散布、相对丰度、随时间的变化、产生抗体同种型的变化和其它相关的变化。

一旦鉴定到具体样品中含有的特异性亚类，该数据就可用于开发新的诊断试剂和为个体选择最合适的治疗方案。通过以个体为基础的自身抗体特异性分析，确定了存在于疾病阶段的特异性靶表位。然后可选择一种或多种对于该个体患者和疾病具有最佳特异性的治疗性制剂。

治疗方法. 术语“治疗方法”或“治疗”指对哺乳动物疾病的任何治疗方法，包括人和动物的自身免疫疾病。治疗方法包括防治疾病，即在病发之前通过施用 Nogo 表位片段组合物导致疾病的临床症状不发生；抑制疾病，即在病

发之后临床表现或疾病再现之前通过施用 Nogo 表位片段组合物导致疾病的临床症状不发生；阻断疾病，即在疾病初现临床症状后通过施用 Nogo 表位片段组合物使临床症状发展停滞；和/或缓解疾病，即在疾病初现临床症状后通过施用 Nogo 表位片段组合物使临床症状消退。

应理解在人类医学中，既然最终的发病情况或结果可能是未知的、疾病潜伏或者除非病发才能确定患者，那就不总能区分“防治”和“抑制”的差别。因此，常使用不同于“治疗”的术语“预防”来包括文中定义的“防治”和“抑制”。文中使用的术语“治疗”意味着包括“预防”。

术语“有效量”指足以为正在治疗的疾病阶段提供治疗的剂量。这取决于患者、疾病和实施的治疗方法。可通过在模拟病人状况的动物模型中测试对照组和治疗组的异常 B 和 T 细胞功能来证实体内活性。人的临床效果可使用本领域技术人员已知方法在临床试验中得到证实。

可使用各种方法给药。含有 Nogo 表位片段的治疗制剂的剂量可有很大不同，这取决于疾病的性质、施用的频率、施用的方式、施用的目的、Nogo 表位片段从宿主中的清除等。施用的剂量取决于已知的因素而不同，例如具体的 Nogo 表位片段的药代动力学特性、施用的方式与途径、接受者的年龄、健康状况和体重、症状的性质和程度、协同治疗方法、治疗频率和所需的疗效。该剂量可以每周、每两周或每月不频繁地施用或可分成较小剂量每天或每半周等施用来维持有效剂量水平。活性 Nogo 表位片段每天的剂量通常约为 0.01-100mg/kg 体重。适合于内服的剂型通常每单位含有约 0.1mg-500mg 的活性 Nogo 表位片段。以组合物的总重量计，活性 Nogo 表位片段的重量可在 0.5-95%之间变化。

Nogo 表位片段或其变体可用于开发和选择抗原或表位的特异性疗法，该疗法包括施用 Nogo 表位片段和抗原或表位特异性治疗制剂。治疗方法包括(但不限于)：特异抗原的口服施用，称为“口服耐受”(Annu Rev Immunol. 12:809-37)；施用天然肽(Science 258:1491-4; J Neurol Sci. 152:31-8)；施用改变的肽配体(Nature 379:343-5)；施用完整的蛋白(Science 263:1139)；施用融合蛋白或肽；施用编码作为靶子的自身蛋白或过敏原的多核苷酸序列(J.Immunol 162:3336-41; Curr.Dir.Autoimmun. 2:203-16)。就所有这些疗法而言，用于免疫

抑制目的施用抗原(或编码的 DNA)可含有被抗体或 T 细胞受体识别的所有表位或其一部分。在一个实施方案中,施用了一种或多种经鉴定的表位,通常两种或多种,更常见的是三种或多种,可含有多达十种或更多种不同的表位。可施用各个肽或编码肽的 DNA。或者,可施用完整的蛋白、或编码所有或基本上所有抗原蛋白的 DNA。所以,可施用一种或多种、通常两种或多种,可多达三种或更多种不同的蛋白质抗原。文中使用的抗原特异性疗法指根据用本发明的新颖方法确定的抗原特异性分布的一种治疗方案。

在一个实施方案中,治疗方法包括 Nogo 表位片段联合 DNA 表达盒施用注射入宿主组织,例如肌肉或皮肤,或施用肽来诱导抗原特异性、抑制性 T 细胞应答,例如 PCT 申请 US 00/0623、US 02/37686 和 WO 02/084249 中所述,这些文献纳入作为参考。所述载体含有编码自身抗原、移植抗原等的至少一部分的 DNA 序列。在对于这种疫苗接种的反应应答中,引发抑制性应答。抗原特异性的 T 细胞增殖得到抑制并且降低了 Th1 细胞因子的产生。含有 Nogo 表位片段的治疗性组合物可与编码一种表位的 DNA 或表位序列的混合物一起配制。在一些情况中,可能需要多条序列,其中每条编码不同的表位。例如,见 Leadbetter 等. (1998) J.Immunol. 161:504-512。由编码不同表位的多条序列组成的制剂可用于诱导更强和/或持久的抑制性应答。通过特异性靶向多种自身反应性 T 细胞群,这种制剂可减缓或阻止自身抗原耐受性的发展。

涉及靶抗原的自身免疫疾病的防治可通过在疾病的明显发病前施用 Nogo 表位片段来实现。治疗正在发生的疾病(其中 Nogo 表位片段能稳定或改善患者的临床症状)是特别感兴趣的。这种治疗方法需要在受影响的组织完全丧失功能之前进行。

实验

实施例 1

在 Nogo A/B/C 突变体小鼠中诱生 EAE

为研究 Nogo-A 蛋白质在 EAE 模型中对轴突再生的可能作用,我们对 Nogo-A/B/C 敲除小鼠(以 129S 为背景的 C57BL/6)皮下注射 100 μ g 用弗氏佐剂(CFA)乳化的 MOG35-55 肽并静脉内注射百日咳毒素来诱导疾病,该小鼠通过在含有 Nogo-66 的共同 C-末端区域定点诱变而产生的(Zheng 2003)。随访诱导

后动物的疾病表型 6 周。如图 1A 所示, Nogo KO 小鼠在疾病严重性上与野生型 C57BL/6 对照相比无差异(无统计学意义), 主要在死亡率降低上(图 1B)。实验结束时用标准髓鞘染色进行组织学评价在病损类型或严重性上, 或通过轴突染色显示存在轴突病变上未表现出明显的差异。Nogo-66 作为调节性自身抗原具有能修饰 EAE 疾病过程的特殊作用。

在易敏小鼠品系中用 Nogo-66 肽诱导 EAE 和 T 细胞应答

为确认 Nogo-A 作为自身免疫脱髓鞘的自身靶抗原的潜力, 我们注意力选择集中在胞外的 66 个氨基酸的环 Nogo-66 上, 因为这是最倾向于和免疫细胞相互作用的区域。给年龄合适的 EAE 易敏的 SJL/J 和 C57BL/6 雌性小鼠皮下注射 CFA 配制的、浓度为 200 μ g-1000 μ g 的 Nogo-66 衍生肽进行免疫接种, 同时静脉注射百日咳毒素。

合成的三种不同任意选择的肽包含了其整个序列(肽 1-22、23-44 和 45-66)。所选的 Nogo-免疫动物的大脑和脊髓的组织学评价表明在脑膜和脑实质中有炎症。为评价产生的针对免疫抗原的 T 细胞增殖反应, 我们在实验结束时收集了引流淋巴结并建立了针对 Nogo 和相关肽的全淋巴结细胞增殖试验。我们发现 SJL/J 动物中有强而特异性的抗 pNogo1-22 和 pNogo45-66 的增殖应答, 而在 C57BL/6 小鼠中抗 pNogo1-22 和 pNogo23-44 应答的程度较低(图 2)。因此, T 细胞表位在这两种动物品系之间表现出轻微差异。

Nogo-66 肽免疫接种诱导具有相应表位的 B 细胞应答扩散至其它髓鞘抗原为追踪所诱导的对免疫用 Nogo 肽的特异性抗体应答有可能扩散到其它髓鞘抗原, 我们使用本实验室开发的含有 293 个不同抗原的 2304 个特征性的点样肽阵列, 该阵列包括代表所有主要的 EAE 相关靶表位的蛋白质和几组重叠肽, 以及几个 Nogo-66 重叠肽与 p472(Robinson, 2001)。在用所有三种 Nogo 肽诱导 EAE 后在不同时间点获得几个免疫动物的血清, 并按照我们的方案与蛋白质组阵列杂交。结果显示用每种 Nogo-66 肽免疫后, 在两种动物品系中都产生了针对免疫用抗原的强特异性 B 细胞应答(图 3A 和 3B)。

对几组动物的阵列数据的统计学和簇分析也表明对其它髓鞘肽和蛋白质的抗体应答有显著的分子内或分子间表位扩散, 这些髓鞘肽或蛋白质例如有: MAG(p193-208, p313-328)、PLP(p1-19, p10-29, p103-116, p139-151, p150-169)、

MBP(p85-99, p121-139, p131-149, p139-151, p151-170, VP16-MBP)、MOG(p1-26, p35-55, p162-178)、OSP(p32-51, p172-191)、 α -B 晶体蛋白(p121-140)、CNP 酶(p343-373)和 Nogo(p31-52, p11-30)(图 3C)。这是此两种动物品系中用 pNogo45-66 免疫和 C57BL/6 小鼠用 pNogo23-44 免疫接种后特别相关的现象。B 细胞应答的扩散证明了每种动物品系中每种免疫用抗原具有其特异模式, 这些模式之间极少重叠。B 细胞应答主要从 pNogo1-22 扩散至 MBP 肽、从 pNg23-44 扩散至 MOG 和 MBP 肽(特别是在 C57BL/6 动物中), 从 pNogo45-66 扩散至 MAG、MBP、PLP、OSP 和 α -B 晶体蛋白(图 3C)。因此, 我们的结果表明 pNogo45-66 是比其它两种合成肽的任何一种要强得多的 B 细胞抗原。

针对 Nogo-66 肽的 T 细胞应答是特异性的不与其它髓鞘抗原交叉反应

我们通过评价 Nogo 肽和已知的髓鞘自身抗原 PLP139-151 或 MOG35-55 之间的交叉反应性, 测试了 T 细胞应答的特异性。为进行这样的测试, 我们用这些肽免疫 SJL/J 小鼠建立了抗-pNogo1-22、抗-pNogo45-66 和抗-PLP13-151 特异性 T 细胞系, 研究了它们对几种髓鞘抗原的体外增殖反应。如图 4 所示, PLP139-151 特异性 T 细胞系对其同源抗原具有活跃增殖, 但对所有三种 Nogo-66 肽未表现出反应性。Nogo-肽产生的 T 细胞系也显示仅对其特异性多肽表现出反应性, 对 PLP139-151、MBP85-99 或 MOG35-55 不增殖。因此, 我们的结论是: Nogo 免疫产生的特异性 T 细胞应答不与其它髓鞘自身抗原发生交叉反应。既然 Nogo 蛋白质的二级结构现在还未知, 我们使用计算机模拟和熟知的一级结构亲水性(Kyte 和 Doolittle)、极性(Zimmerman)、识别因素和堆集性评分比较了 Nogo 肽与 PLP139-151 和 MOG35-55 任何一种的一级结构。使用这些测量手段, 我们在 Nogo-66 肽和其它研究的髓鞘抗原之间没有发现任何相关的可比之处(图 4)。根据上述的一级结构评分, 对全长 Nogo-66 序列的潜在免疫原性结构域作了分析, 表明我们实验中任选用于免疫的每条肽的序列中存在可能性较高的区域。

Nogo 肽反应性 T 细胞表现出正常的活化表型

我们从 PLP139-151、pNogo1-22 和 pNogo45-66 免疫后 10 天的雌性 SJL/J 动物中纯化得到整个淋巴结的细胞, 通过荧光激活细胞扫描(FACScan)分析观

察了几种活化标记与协同刺激分子的表达。总体而言，我们对 T 细胞的 CD25、CD18、CD40L、CD62、CD69、CD28 和 CTLA4e 或树突状细胞的 CD80、CD86、CD40 细胞表面表达未发现任何区别(图 5A 和 5B)。Nogo-肽能通过 APC 正常呈递，其免疫接种导致 T 细胞正常活化。

抗-Nogo 反应性 T 细胞系的过继转移改善了 SJL/J 小鼠的 EAE。

接下来，我们试图通过抗-Nogo T 细胞系的过继转移在 SJL/J 雌性小鼠中诱导 EAE。为了这样做，用 CFA 乳化的 pNogo1-22 或 pNogo45-66 免疫天然小鼠并在 10 天后收集引流排泄淋巴结，纯化整个淋巴结细胞培养物并在体外用 Nogo 肽再刺激。通过这些步骤，我们建立了用于过继转移和细胞因子分泌分布评价的抗原特异性 T 细胞系(TCL)。

我们将五千万个针对 pNogo1-22 或 pNogo45-66 反应性 TCL 通过静脉内注射转移给源初 SJL 小鼠，跟踪观察小鼠疾病的临床症状。在一个实验中，动物接受了一千万 TCL 并在 15 天后增加了 100 μ g 用 CFA 配制的 Nogo 肽乳剂加强免疫并静脉内注射百日咳毒素。虽然通过体外增殖应答我们在两个月后过继转移动物中证实存在 Nogo 反应性 T 细胞，但这些动物从未表现出该疾病的临床症状(图 6A)。鉴于 Nogo-66 是髓鞘的较小组分可能是隐藏的自身抗原，可通过将 Nogo-反应性细胞转移入已患病的动物来克服疾病诱导的低效率，在患病这些动物中可利用 Nogo-66 将其呈递至急性脱髓鞘病灶中的 T 细胞。

我们用 CFA 配制的 100 μ g PLP139-151 肽进行免疫接种在 SJL/J 小鼠中诱导 EAE 并追踪这些动物的疾病过程。在第二次复发的高峰期(31 天)，将动物随机分为三组每周通过静脉内施用 PBS、PBS 配制的抗-pNogo1-22 或抗-pNogo45-66 反应性 T 细胞(评价一千五百万个细胞)，共进行三周。TCL 转移 4 天后，接受 Nogo-反应性 TCL 的动物的临床得分表现出统计学显著性降低(Mann-Whitney $p < 0.05$)，特别是接受抗-pNogo45-66 TCL 的动物(图 6B)。就这些动物而言，这种改善持续至该实验后来的 45 天，即在最后一次施用 TCL 后的 30 天。就抗-pNogo1-22 而言，效果较短暂，在最后一次施用后临床得分恶化，但未到 PBS 对照的水平。该实验结束时，我们通过体外增殖试验仍证实了存在 PLP139-151 和 Nogo 反应性 T 细胞(图 6B)。事实上，针对 pNogo45-66 的增殖反应远强于针对 EAE 诱导用抗原的反应，这表明这些 PLP 反应性 T 细胞

可能有交叉抑制。

为证实过继转移的 Nogo-反应性 T 细胞能穿入患 EAE 动物的 CNS，我们用 Nogo 肽或 PLP139-151 免疫 Thy1.1a SJL/J 雌性小鼠，10 天后收集引流淋巴结在体外用免疫用抗原再刺激所有淋巴细胞。然后，将一千万个 Thy1.1a T 细胞通过静脉内施用于已诱生了 EAE 且处于疾病高峰期的野生型(Thy1.2)SJL/J 雌性小鼠。三天后，我们收集这些动物的 CNS 并通过免疫组织化学观察 CNS 中是否存在 Thy1.1a 细胞。我们可证实在患 EAE 动物的 CNS 中有几处部位(血管、血管周围浸润处和脑实质中)存在过继转移的抗-PLP 和抗-Nogo 细胞(图 6B)。从该结果，我们可得出结论，Nogo-反应性 T 细胞能迁移进入患有活动性 EAE 的动物的 CNS 中，并且它们可局部调节疾病，这与外周情况相反。

最后，我们通过体外细胞因子产生试验检测了抗-Nogo TCL 的表型。简言之，抗-Nogop1-22 和抗-pNogo45-66 TCL 在存在经射线照射过的同系抗原呈递细胞时于体外用其特异性抗原刺激。48 小时后收集上清液并用 ELISA 测定产生的细胞因子。结果表明，抗-pNogo 自发性发展成 Th2 表型，产生了大量的 IL-4 和 IL-10，而 pNogo1-22 TCL 显示产生的 IFN γ 增加(图 6C)。

基于这些结果，过继转移的 Nogo-反应性细胞通过迁移进活动性脱髓鞘病灶调节正在发病的 EAE，当这些细胞在病灶中碰到其特异性抗原时分化为潜在的有益的表型并能调节自身免疫应答。

以上数据表明 Nogo-66 序列至少含有三个重要的、能在 EAE 易敏小鼠品系中诱导脱髓鞘自身免疫应答的抗原性结构域。这些结构域表现出动物品系特异性。SJL/J(H-2s)动物表现出仅对肽 Ng1-22 和 Ng45-66 的 T 细胞反应，而 C57BL/6(H-2b)动物表现出仅对 Ng1-22 和 Ng23-44 的 T 细胞反应。我们能证实存在强烈的、特异性且不与其它已知的自身抗原发生交叉反应的 T 细胞应答，和同样也是特异性但表现为显著的表位扩散至几种其它髓鞘抗原的 B 细胞应答。最后，我们证明对 Nogo 抗原的反应性 T 细胞，推测能通过采用有益的 Th2 表型迁移到炎症部位后交叉调节其它髓鞘反应性细胞而缓解由其它抗原诱导的正在发病的 EAE。

因此，就此意义而言，对这些动物品系 Nogo 抗原的表现与其它已知髓鞘 EAE 抗原非常相似，例如 PLP139-151 和 MOG35-55，或较小的决定簇

MBP85-99、MOBP、OSP 和 CNP 酶。然而，与这些抗原不同的是，除 MAG 和 OMgp 之外，这些其它的髓鞘蛋白中没有一种已知能在轴突再生中起作用，因此认识到 Nogo-66 对 CNS 自身免疫脱髓鞘可能的作用是倍加重要。首先，作为 EAE 抗原，假设 Nogo-66 可能在该疾病和 MS 中有关的轴突病理中起重要作用。既然调节针对 Nogo-66 的免疫应答看来能缓解 EAE，可设计几种抗原特异性治疗方案利用这种现象来治疗人自身免疫脱髓鞘疾病。第二，既然用 Nogo 肽免疫接种能产生针对其它髓鞘抗原(包括 MAG)的广泛性 B 细胞应答，用这些抗原进行疫苗接种改善 CNS 创伤模型(例如脊髓损伤)的轴突再生中具有有用的作用。用髓鞘抗原免疫后 B 细胞应答的表位扩散现象可能意味着在本文中，即使用一种髓鞘抗原接种疫苗也能获得治疗性重要的对抗几种其它潜在重要的轴突生长抑制剂(例如 MAG)的抗体应答。

材料与方法

小鼠.

5 周龄的雌性 SJL/J 和 C57BL/6 小鼠得自 Jackson 实验室(Maine)。实验开始时小鼠为 6 到 8 周龄。如 Zheng 等(Zheng 2003)所述得到 Nogo-A/B/C 敲除小鼠。SJLJ Thy1.1a 同类小鼠由 Harley Tse(Tse 等 1998)友情提供。

肽.

Nogo1-22(RIYKGVIIQAIQKSDEGHPFRAY)、Nogo23-44(LESEVAISEE LVQKYSNSALGH)、Nogo45-66(VNSTIKELRRLFLVDDLVDLTK)PLP139-1 51、MBP85-99 和 MOG35-55；在我们自己的设施中通过标准的 9-芴甲氧羰基化学试剂合成这些肽、HPLC 纯化并悬浮于 PBS 中至浓度 2mg/ml。

组织学.

通过过量的 CO₂ 杀死动物并用 4%福尔马林灌注，然后切取大脑和脊髓并保存。就标准的组织学技术而言，将样品在切片与染色之前包埋在石蜡中。按照标准方法，用苏木精-曙红、Luxol 速蓝和 Bielschowsky 染料进行染色。为进行 Thy1.1a 免疫组织化学分析，将 CNS 部分浸于液氮后在 Tissue Tek(OCT)中快速冷冻(snap-frozen)。为了染色，用生物素化的抗-Thy1.1a 抗体偶连物(Pharmingen)染色 8 μ m 的冰冻切片。

免疫接种.

为免疫接种 Nogo，用 CFA 配制的 Nogo-肽乳剂对 SJL/J 和 C57BL/6 雌性

小鼠进行皮下注射(每次注射浓度为 100 μ g 到 500 μ g), CFA 由 IFA(Difco)和 1mg/ml 热灭活结核分枝杆菌(菌株 H37RA; Difco 实验室, 底特律, MI)组成。动物每周一次在不同的部位(侧面和腹股沟)接受两次皮下注射, 第二次免疫接种时以及 48 小时后, 用 PBS 配制的博代百日咳毒素(List 实验室)以 500ng/动物对小鼠进行静脉内注射。用 CFA 配制的 100 μ g MOG35-55 肽乳剂对 Nogo-A/B/C 敲除小鼠进行皮下注射并在免疫接种时和 48 小时后接受两次 300ng 博代百日咳毒素静脉内注射。通过皮下注射 CFA 配制的 100mg PLP139-151 肽乳剂在 SJL/J 小鼠中诱导慢性 EAE。按照以下标准对动物进行临床评分: 0-正常; 1-尾部瘫痪; 2-后肢轻瘫; 3-后肢完全瘫痪; 4-前肢轻瘫或瘫痪; 5-死亡。

增殖试验.

将全部淋巴结细胞以 0.5×10^6 细胞/孔培养在 96-孔微滴定板上、培养基由补加了以下成分的 RPMI 1640 组成: L-谷氨酰胺(2mM)、丙酮酸钠(1mM)、非必需氨基酸(0.1mM)、青霉素(100U/ml)、链霉素(0.1mg/ml)、2-ME(5×10^{-5} M)和 10% 胎牛血清。在培养的最后 16 个小时用 1μ Ci [3 H]TdR 对孔进行脉冲, 用 β 板式闪烁计数器测量掺入的放射性。

参考文献

Fournier AE, GrandPré T, Strittmatter SM. 鉴定介导轴突再生的 Nogo-66 抑制的一种受体(Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration). *Nature* 2001; 409:341-346。

Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillman AA, Christ F, Schwab ME. Nogo-A 是髓鞘结合的轴突增生抑制剂和单克隆抗体 IN-1 的抗原(Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1). *Nature* 2000; 403:434-439。

GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. 鉴定作为 Reticulon 蛋白的轴突再生 Nogo 抑制剂(Identification of the Nogo inhibitor of axonal regeneration as a Reticulon protein). *Nature* 2000; 403:439-444。

Brosamie C, Huber AB, Fiedler M, Skerra A, Schwab ME. 通过重组的人源化抗体 IN-1 片段在成年大鼠中诱导受损皮质脊髓通道纤维再生(Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment). *J Neurosci* 2000; 20(21):8061-8068。

Brittis PA, Flanagan JG. Nogo 结构域和一种 Nogo 受体: 涉及轴突再生 (Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration). *Neuron*, 2001 April; 30:11-14。

Karim F, Volker D, Schwab ME. 通过中和髓鞘相关抑制剂来改善实验性脊髓损伤轴突的生长和功能恢复 (Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors). *Brain Res Rev* 2001; 36:204-212。

Hauben E, Ibarra A, Mizrahi T, Barouch R, Agranov E, Schwartz M. 与其它髓鞘抗原相比, 不完全脊髓损伤后用 Nogo-A-衍生肽进行疫苗接种促进了 T-细胞介导的神经保护性应答的恢复 (Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens). *PNAS* 2001 Dec 18; 98(26):15173-15178。

Merkler D, Metz GAS, Raineteau O, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. 用中和髓鞘结合的轴突生长抑制剂 Nogo-A 的抗体治疗的脊髓受伤大鼠的运动器官恢复 (Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A). *J Neurosci* 2001 May 15; 21(10):3665-3673。

Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S. 刺激成年哺乳动物脊髓轴突再生的一种治疗性疫苗方法 (A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord). *Neuron* 1999 Nov; 34:639-647。

Zamvil SS, Steinman L. 实验性过敏性脑脊髓炎中的 T 淋巴细胞 (The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis). *Annu Rev Immunol* 1990; 8:579-621。

Liu BP, Fournier A, GrandPré T, Strittmatter SM. 作为 Nogo-66 受体的功能性配体的髓鞘相关糖蛋白 (Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor). *Science* 2002 Aug 16; 297:1190-1193。

Morris-Downes MM, McCormack K, Baker D, Sivaprasad D, Natkuranajah

J, Amor S. 在 ABH 和 SJL 小鼠中的致脑炎和潜在免疫原性的髓鞘相关糖蛋白 (MAG)、少突胶质细胞特异性糖蛋白(OSP)和 2',3'-环状核苷酸 3'-磷酸二酯酶 (CPN 酶)(Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein(MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein(OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase(CPNase) in ABH and SJL mice). *J Neuroimmunol* 2002; 122:20-33。

Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, 作为 Nogo、MAG 和 OMgp 辅助受体的 He Z.P75 与 Nogo 受体相互作用(He Z.P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp). *Nature* 2002 Oct 20。

Fournier AE, Gould GC, Liu BP, Strittmatter SM. 截短的可溶性 Nogo 受体与 Nogo-66 结合并通过髓鞘阻断对轴突生长的抑制(Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin). *J Neurosci* 2002 Oct 15; 22(20):8876- 8883。

Robinson WH, Steinman L, Utz PJ.自身免疫疾病的蛋白质和肽治疗分析 (Protein and peptide array analysis of autoimmune disease). *Biotechniques* 2002 Dec; Suppl:66-9。

Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, Fournel S, Fong D, Genovese MC, de Vegvar HE, Skriner K, Hirschberg DL, Morris RI, Muller S, Pruijn GJ, van Venrooij WJ, Smolen JS, Brown PO, Steinman L, Utz PJ. 用于自身抗体应答的多样性的微阵列(Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses). *Nat Med* 2002 Mar; 8(3):295-301。

Steinman L. 多发性硬化症：一种两阶段疾病(Multiple sclerosis:a two-stage disease). *Nat Immunol* 2001 Sep; 2(9):762-4。

Steinman L. 在设计理性治疗中对用于 MS 和脱髓鞘疾病的动物模型的评价(Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy). *Neuron* 1999 Nov; 24(3):511-4。

Ellezam B, Bertrand J, Dergham P, McKerracher L. 疫苗接种在成年人视觉神经中刺激视网膜神经节细胞再生(Vaccination stimulates retinal ganglion cell

regeneration in the adult optic nerve). *Neurobiol Dis* 2003 Feb; 12(1):1-10.

Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M. 在 nogo-缺陷型小鼠中缺乏脊髓再生的改善(Lack of enhanced spinal regeneration in nogo-deficient mice). *Neuron* 2003 Apr 24; 38(2):213-24.

Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M. 髓鞘质相关糖蛋白与 Nogo-66 受体相互作用抑制轴突增生(Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth). *Neuron* 2002 Jul 18; 35(2):283-90.

Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE. Nogo-A 和髓鞘相关糖蛋白通过拮抗性调节 RhoA 和 Rac1 介导轴突生长抑制(Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1). *J Neurosci* 2002 Dec 1; 22(23):10368-76.

Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z. 少突胶质细胞-髓鞘糖蛋白是抑制轴突增生的 Nogo 受体配体(He Z. Oligodendrocyte -myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth). *Nature* 2002 Jun 27; 417(6892):941-4.

GrandPré T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 受体拮抗剂肽促进轴突再生(Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration). *Nature* 2002 May 30; 417(6888):547-51.

Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. 多发性硬化症: 对其致病机理更深的理解揭示了新的治疗靶位(Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy). *Annu Rev Neurosci* 2002; 25:491-505.

Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. 鉴定多发性硬化症中与髓鞘损坏相关的自身抗体(Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis). *Nat Med* 1999 Feb; 5(2):170-5.

Steinman L. 多发性硬化症: 针对中枢神经系统中的髓鞘的协同免疫攻击(Multiple Sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the

central nervous system). Cell. 1996; 85:299-302。

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. 多发性硬化症病灶的轴突横截面(Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis). N Engl J Med. 1998 Jan 29; 338(5):278-85。

Chang TT, Jabs C, Sobel RA, Kuchroo VK, Sharpe AH. B7-缺陷型小鼠中的研究揭示了在实验性自身免疫脑脊髓炎的诱导和效应阶段中 B7-共同刺激的关键作用(Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis). J Exp Med. 1999 Sep 6; 190(5):733-40。

应理解的是，本发明不限于所述的具体方法、方案和试剂，因为这些是可变化的。也应该理解，文中使用的术语仅是为了描述具体的实施方案，而不限制本发明的范围，本发明的范围仅受限于附带的权利要求。

除非文中另有明确指示，文中使用的单数形式“一个”、“和”与“该”包括其复数形式。所以，例如提到“一种试剂”包括多个这类试剂，而提到“该试剂”包括一个或多个试剂以及本领域技术人员已知的其等价物等等。除非另有明确指示，所有文中使用的技术和科学术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的具有相同的意义。

出于描述和披露的目的，文中提到的所有出版物均纳入作为参考，例如与本发明相关的在这些出版物中述及的方法。提供以上和全文中所述的出版物仅是因为其内容早于本申请的提交日期。文中没什么可被认为由于在先的发明而使本发明不具有优先于这些内容的资格。

提供以下的实施例是为了向本领域普通技术人员完全地披露和描述如何制造和使用本发明的主题内容，并不是要限制本发明的相关范围。我们努力确保所用数字的精确性(例如，数量、温度、浓度等)，但一些错误和偏差是应该允许的。除非另有明确指示，部分与部分的比例是重量比，分子量是平均分子量，温度是摄氏温度，压力是大气压或接近大气压。

Nogo^{-/-}小鼠的实验性自身免疫脑炎

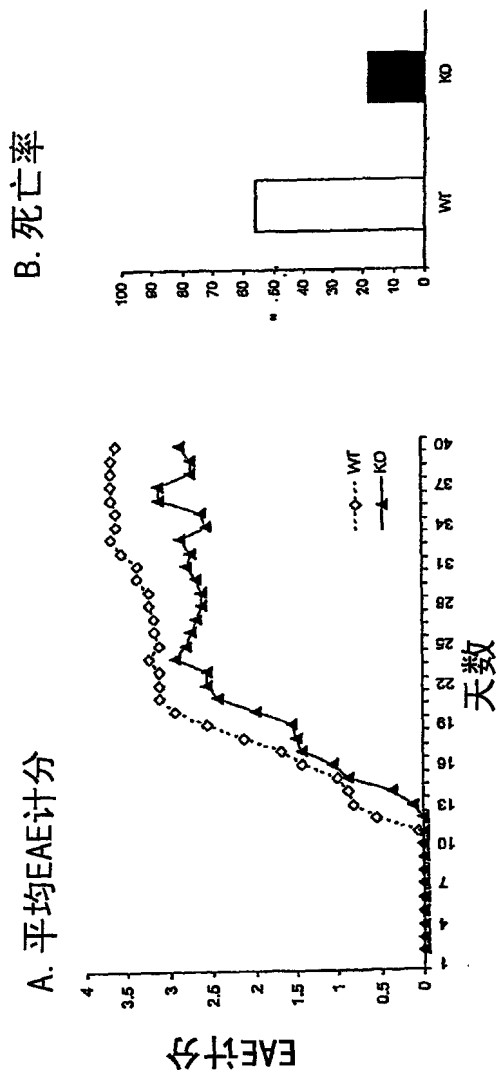
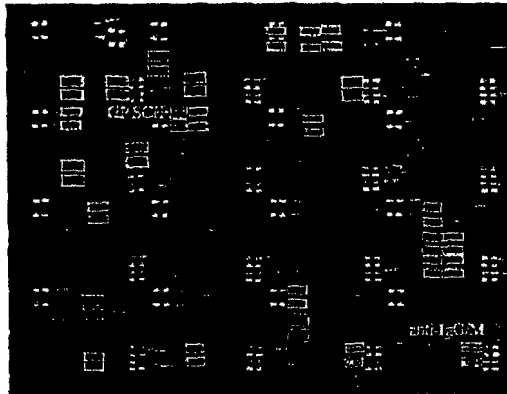


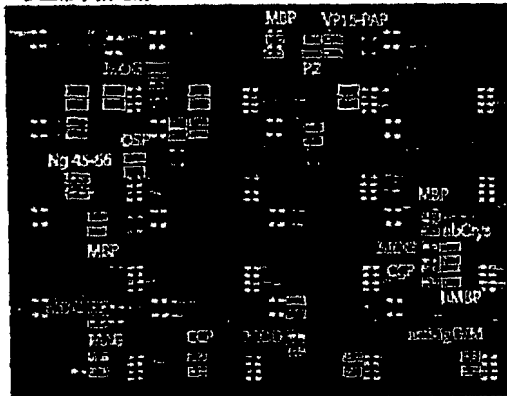
图 1

用Nogo肽诱导EAE后针对髓鞘抗原的抗体应答

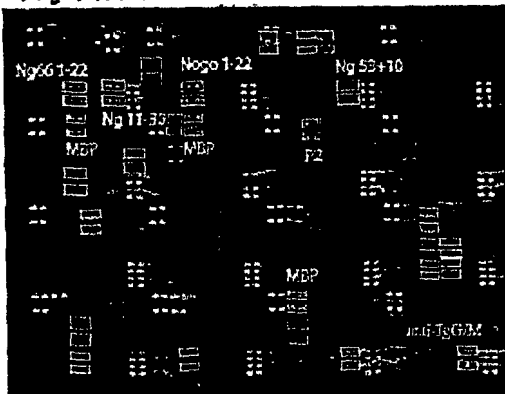
A. 血清抗体的髓鞘微阵列



a 正常小鼠血清

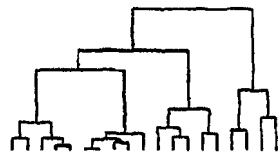


b Ng 45-66 诱导



c Ng 1-22 诱导

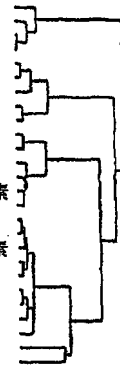
B. 簇分析



2
51
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000



PLP 210-228
PLP 138-151
PLP 139-51
PLP 139-151
Nogo 11-30
Nogo88 1-22
MBP 87-99
Nogo 1-22
MBP 87-99A
MBP 24-37
GP MBP
PLP 139-151
MOG 35-66
BI PLP 139-151 生物素
PLP 200-218
MBP 85-99
Nogo 45-66
BI-MOG 35-65 生物素
CCP cys Ala-8
MOG 35-55F
CCP In 0116-35
hMBP 121-138
mMAG 313-328
mMAG 183-208
Flaggrin E12D
CCP cys 0112-15



C. 从Nogo的表位扩散

	a. 正常	b. Nogo 45-66	c. Nogo 1-22
抗小鼠 IgG/M	50000	50000	50000
CCP cys 0112-15	181	226	41
CCP In 0116-35	69	2068	43
mMAG 183-208	89	2978	57
mMAG 313-328	33	9974	49
MBP 87-99	37	19	4018
MBP88-101 91A/a	180	133	4890
hMBP 121-138	26	3937	-28
HS VP16-MBP	44	2591	150
MOG 35-65	179	74	367
BI MOG35-65 生物素	5	2	-21
MOG 35-55 F	105	2	33
Nogo 1-22	-14	44	5401
Nogo 11-30	8	61	3379
Nogo 45-66	-10	25658	-22
Ng 53-66 +10	30	211	537
mOSP 32-51	-95	22	-82
小鼠 P2 79-98	42	253	253
P2 99-120	127	563	563
HS VP16-PAP7	147	2	391

图 3

抗Nogo反应性T细胞系显示正常的激活标记

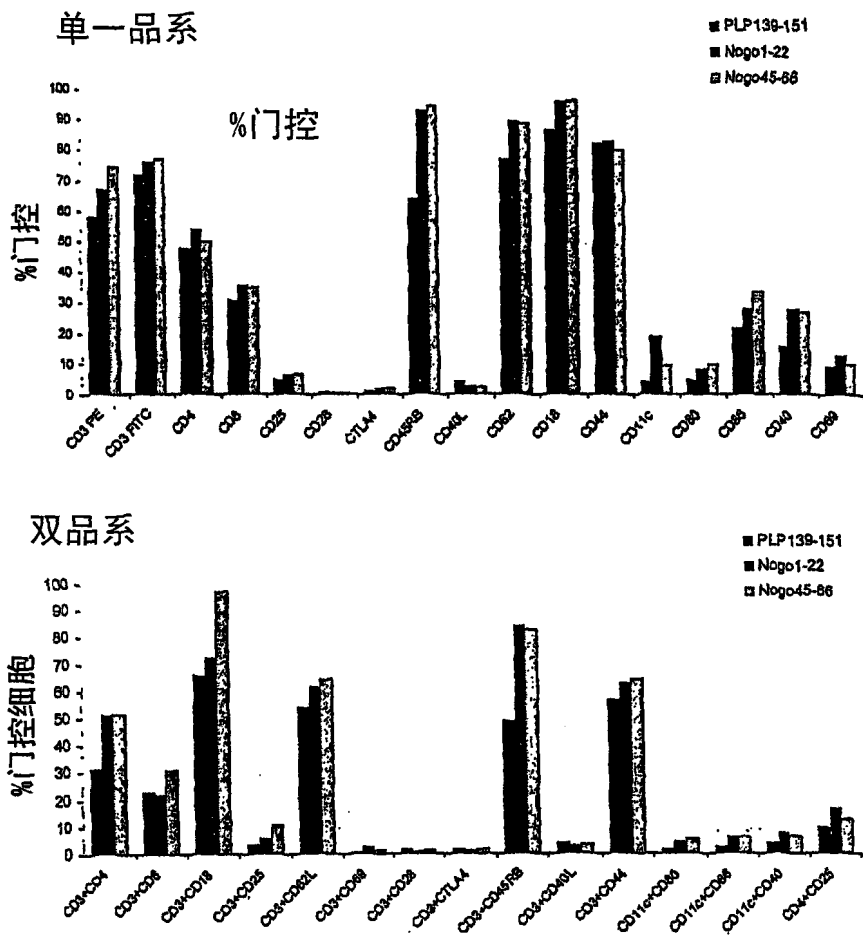
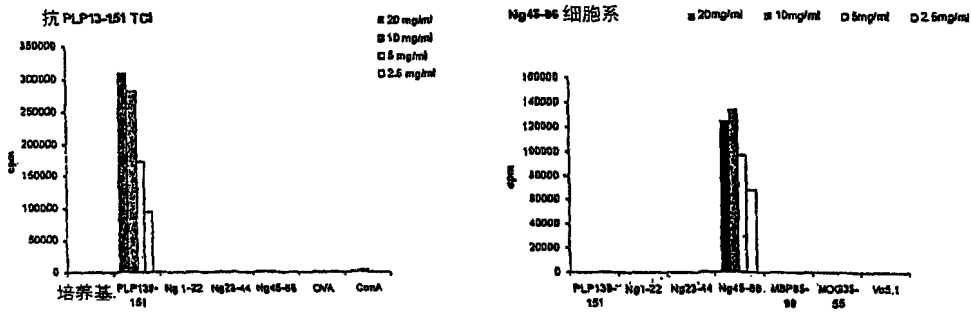


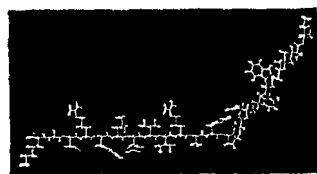
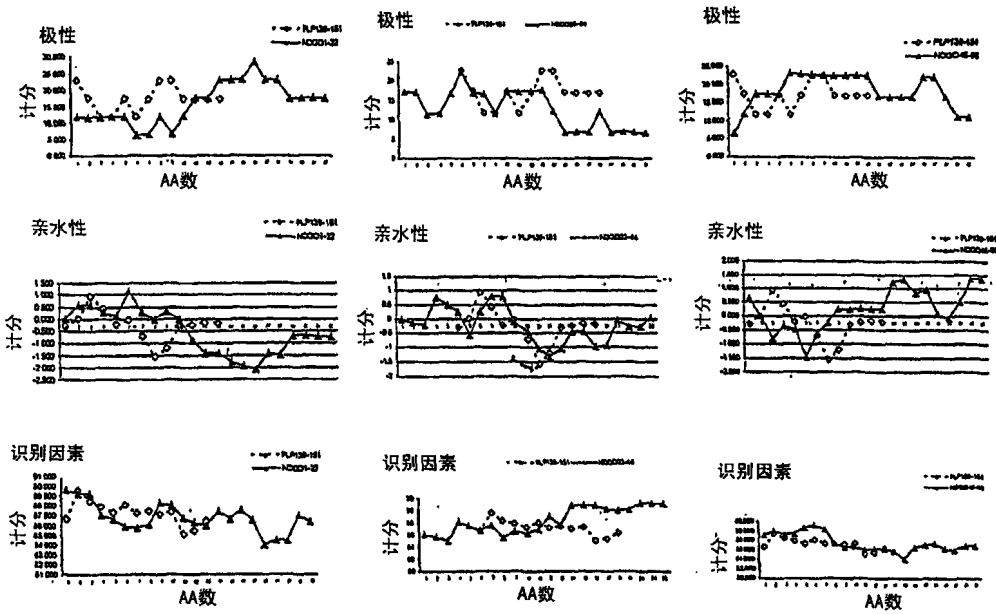
图 4

Nogo肽不与其它髓鞘抗原发生交叉反应

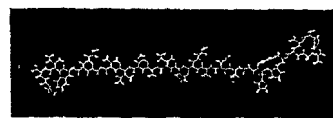
A. PLP139-151 T 细胞系和Nogo特异性T细胞系不发生交叉反应



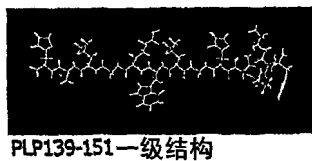
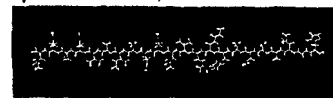
B. PLP139-151, MOG35-55和Nogo66肽的一级结构比较



Nogo1-22 一级结构



Nogo23-44 一级结构



Nogo45-66 一级结构

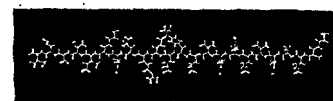
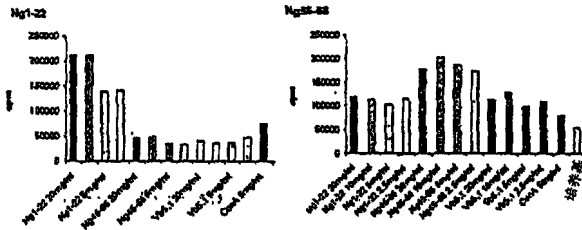


图 5

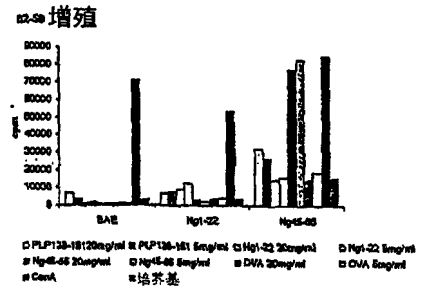
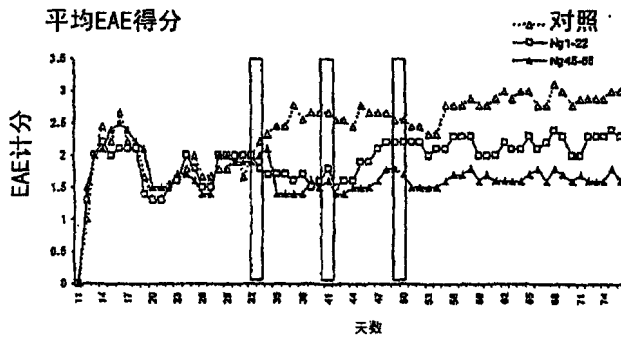
抗-Nogo反应性T细胞系的过继转移缓解了SJL/J小鼠的EAE

A. 抗-Nogo反应性T细胞系的过继转移不诱导EAE

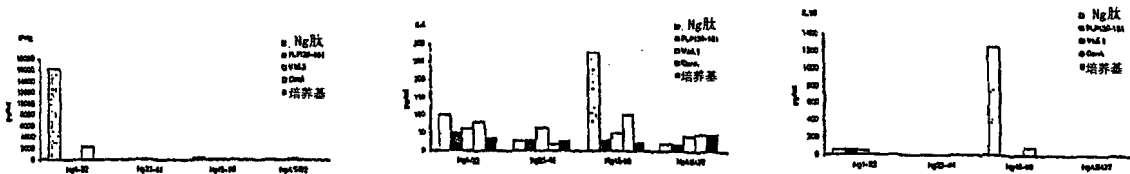


T细胞系	细胞数	发病率
Nögo1-22	5x10 ⁶	0/5
Nögo45-66	5x10 ⁶	0/5

B. 抗-Nogo反应性T细胞系的过继转移缓解了EAE



C. 抗-Nogo反应性T细胞能表现出保护性T辅助表型



专利名称(译)	新颖的免疫调节肽		
公开(公告)号	CN101410130A	公开(公告)日	2009-04-15
申请号	CN200480019000.0	申请日	2004-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	利兰·斯坦福青年大学托管委员会 贝希尔治疗学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	利兰·斯坦福青年大学托管委员会 贝希尔治疗学股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	利兰·斯坦福青年大学托管委员会 贝希尔治疗学股份有限公司		
[标]发明人	L·斯坦曼 H·加伦 P·冯杜拉		
发明人	L·斯坦曼 H·加伦 P·冯杜拉		
IPC分类号	A61K38/17 A61P9/10 A61P37/02 G01N33/53 A61K A61K38/00		
CPC分类号	A61K45/06 A61K31/00 G01N33/564 A61K38/1709 A61P25/00 A61P29/00 A61K2300/00		
代理人(译)	范征		
优先权	60/470593 2003-05-15 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

包括Nogo 45-66在内的Nogo表位片段引发强烈的特异性T细胞应答和B细胞应答。针对Nogo抗原的反应性T细胞能缓解由其它抗原诱导的正在发生中的疾病。本发明提供用于治疗免疫相关疾病的Nogo表位片段的鉴定和使用的组合物和方法。

A. 平均EAE计分

