



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101663047 B

(45) 授权公告日 2014.07.09

(21) 申请号 200880012520.7
 (22) 申请日 2008.02.22
 (30) 优先权数据
 60/903,070 2007.02.23 US
 61/004,358 2007.11.26 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2009.10.19
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2008/002391 2008.02.22
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02008/103471 EN 2008.08.28
 (73) 专利权人 纽约哥伦比亚大学理事会
 地址 美国纽约
 (72) 发明人 宏·江 雷奥纳多·查斯
 (74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240
 代理人 余刚 张英
 (51) Int. Cl.
 A61K 38/40 (2006.01)
 A61K 38/08 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 1555272 A, 2004.12.15,
 JAKOB MICHAELSSON ET AL. A Signal
 Peptide Derived from hsp60 Binds HLA-E and
 Interferes with CD94/NKG2A Recognition. 《THE
 JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE》. 2002,
 PANOUTSAKOPOULOU V ET AL. Suppression
 of autoimmune disease after vaccination

with autoreactive T cells that express Qa-1
 peptide complexes. 《JOURNAL OF CLINICAL
 INVESTIGATION》. 2004,
 XIAOLEI TANG ET AL. Regulation of
 Immunity by a Novel Population of
 Qa-1-Restricted CD8alpha alpha TCRalpha
 beta+ T Cells. 《JOURNAL OF IMMUNOLOGY》. 2006,
 Hong Jiang et al. HLA-E - restricted
 regulatory CD8+ T cells are involved in
 development and control of human autoimmune
 type 1 diabetes. 《The Journal of Clinical
 Investigation》. 2010,
 HONG JIANG. The Qa-1 Dependent CD8+ T
 Cell Mediated Regulatory Pathway. 《CELLULAR
 & MOLECULAR IMMUNOLOGY》. 2005,
 WELLING CHEN ET AL. Perceiving
 the avidity of T cell activation can
 be translated into peripheral T cell
 regulation. 《PNAS》. 2007,
 JIANFENG LI ET AL. Induction of TCR
 V Beta-Specific CD8+ CTLs by TCR V
 Beta-Derived Peptides Bound to HLA-E.
 《JOURNAL OF IMMUNOLOGY》. 2001,
 DEEPANI K TENNAKOON ET AL. Therapeutic
 Induction of Regulatory, Cytotoxic CD8 + T
 Cells in Multiple Sclerosis. 《JOURNAL OF
 IMMUNOLOGY》. 2006,
 ADRIAN DAVIES ET AL. A Peptide from Heat
 (续)

审查员 赵鹏

权利要求书1页 说明书59页 附图15页

(54) 发明名称
 通过激活或阻断 HLA-E/Qa-1 限制性 CD8⁺T 细
 胞调控途径来治疗免疫疾病的方法

(57) 摘要
 提供了抑制或提高由 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细
 胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的方法,包
 括使 HLA-E⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞分别与抑制或提
 高 (i) CD8⁺T 细胞的表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和

(ii) HLA-E⁺T 细胞的表面上的由 HLA-E 提呈的自
 身肽之间的结合的试剂相接触,从而分别抑制或
 提高抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调。提供分别包
 含抑制或提高 (i) CD8⁺T 细胞的表面上的 T 细胞受
 体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞的表面上的由 HLA-E
 提呈的自身肽之间的结合的试剂的组合物以及鉴
 别这些试剂的检测方法。

CN 101663047 B

[接上页]

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

Shock Protein 60 Is the Dominant Peptide Bound To Qa-1 in the Absence of the MHC Class Ia Leader Sequence Peptide Qdm. 《JOURNAL OF IMMUNOLOGY》.2003,

1. 下述试剂 (i) 负载有 Hsp60sp 肽的树突状细胞, 或 (ii) 其上结合有 Hsp60sp 肽的、膜结合的 HLA-E 在制备用于增强 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的药物中的用途, 其中所述试剂增强 (i) CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 递呈的 Hsp60sp 肽之间的结合。

2. 权利要求 1 的用途, 其中 HLA-E⁺T 细胞为 CD4⁺/HLA-E⁺T 细胞。

3. 权利要求 1 的用途, 其中 HLA-E⁺T 细胞为 CD8⁺/HLA-E⁺T 细胞。

4. 下述试剂 (i) 负载有 Hsp60sp 肽的树突状细胞, 或 (ii) 其上结合有 Hsp60sp 肽的、膜结合的 HLA-E 在制备用于在人类主体中治疗自身免疫疾病的药物的用途, 其中所述试剂增强 (i) 由 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 递呈的 Hsp60sp 肽之间的结合。

5. 下述试剂 (i) 负载有 Hsp60sp 肽的树突状细胞, 或 (ii) 其上结合有 Hsp60sp 肽的、膜结合的 HLA-E 在制备用于在人类主体中抑制自身免疫疾病的发作的药物中的用途, 其中所述试剂增强 (i) 由 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 递呈的 Hsp60sp 肽之间的结合。

6. 权利要求 4 或 5 的用途, 其中自身免疫疾病为 1 型糖尿病、类风湿性关节炎、多发性硬化、斑秃、关节强硬性脊椎炎、抗磷脂综合征、自体免疫性爱迪生氏病、自体免疫性溶血性贫血、自体免疫性肝炎、自体免疫性内耳病、自体免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS)、自体免疫性血小板减少性紫癜 (ATP)、白塞病、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻皮炎、慢性疲劳综合征免疫缺乏综合征 (CFIDS)、慢性炎脱髓鞘多神经病、瘢痕性类天疱疮、冷乳脂球蛋白血症、纤维肌痛肌炎、Grave 氏病、吉兰 - 巴雷、乔本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、先天性血小板减少紫癜 (ITP)、IGA 肾病、幼年型关节炎、美尼尔氏病、混合结缔组织病、重症肌无力、慢性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、复发性多软骨炎、多腺综合症、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、原发性中丙球蛋白贫乏、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺氏症、莱特尔氏病、风湿热、类肉瘤病、硬皮病、修格连综合症、全身肌强直综合症、大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、眼色素层炎、脉管炎、白癫风或韦格纳肉芽肿。

通过激活或阻断 HLA-E/Qa-1 限制性 CD8+T 细胞调控途径来 治疗免疫疾病的方法

[0001] 本文所披露的内容是在美国政府支持下完成的（美国国立卫生研究院批准号为 R29AI39630 ;R01AI44927 ;P01AI39675 ;R01AI065609 和 U19AI46132）。因此美国政府也对该发明享有一定的权利。

[0002] 该申请中所引用的各种出版物用数字在括号中注明。这些参考文献的出处可在本说明书末尾、权利要求书之前找到。这些出版物的公开内容通过引用全部结合于本申请中，以便能更全面的说明该发明所涉及的技术发展水平。

[0003] 背景

[0004] 通过区分自我与非我并控制免疫反应的幅度和等级，免疫系统能使用有效免疫来抵抗几乎任何外来抗原，并能避免对自我的有害免疫反应（26 和 27）。由于上述任一过程的失败，因此经常出现与免疫学有关的临床问题。

[0005] 免疫系统如何实现自我 / 非我辨别仍然是免疫学中的一个中心问题。了解自我 / 非我辨别的外周机理是解决当代生物学问题的关键所在，即如何有选择地关闭不合需要的免疫反应，并保持正常的正在进行的免疫反应的完整。

[0006] 免疫系统部分通过使用细胞表面的识别分子来完成该任务，当识别分子被非我配体激活后，可细化炎症分子和 / 或使相邻细胞死亡。例如，先天免疫系统的细胞（NK 细胞、巨噬细胞、树状突细胞和粒细胞）使用了种系编码的受体群，该受体群可识别在微生物和其它非我病原体和颗粒中主要发现的保守性分子模式。因此，识别补体调节蛋白和 Toll 样或病原体有关的分子模式识别分子（PAMP），是免疫系统实现自我非我辨别的一种方法，其通过先天受体定义了外来病原体和自我细胞之间的精确区别（28-30）。

[0007] 相反，适应性免疫系统主要对体感诱发抗原受体起作用，其无性系地分布在 T 和 B 细胞中。这些抗原受体是通过随机过程生成的，且适应性免疫系统的一般设计是以淋巴细胞克隆选择为基础的，其通过特殊的抗原特性表达受体。尽管 T 或 B 细胞中的抗原受体几乎能区别无穷多的不同自身和外来抗原，但是它们无法确定应该响应哪个抗原，不应该响应哪个抗原。因此，适应性免疫系统无法通过使用抗原受体来实现自我非我辨别进而识别自身和外来抗原之间的结构差异。事实上，抗原受体是随机生成的（31 和 32），并不知哪个是自身受体，哪个是外来受体，也无需从非我中辨别自我。若适应性免疫系统在个体发育过程中出现偏差，其将进行自我识别。

[0008] 在胸腺中，生长 T 细胞所获得的唯一肽是自身肽，且从一开始在主要组织相容性复合体（MHC）/ 自身肽复合体上阳性和阴性选择地选择 T 细胞。这种选择不是以自身和外来抗原之间的区别为基础的，而是基于在生长胸腺细胞上的 T 细胞受体和胸腺抗原介绍细胞表达的 MHC/ 自身肽分子的相互作用的亲和力。因此，表达 MHC/ 自身肽复合体的具有高亲和力的 T 细胞受体（TCR）的胸腺细胞经历了细胞凋亡，并在胸腺阴性选择期间被淘汰（33-35）。免疫逃逸了胸腺选择的 T 细胞对自我有低或中等亲和力，但含有能对大量外来抗原进行反应、并可能具有低、中等或高亲和力的细胞。

[0009] 基于“可调激活极限假设”（TAT 假设），再发生的相互作用可能更改 T 细胞对周围

信号的灵敏度,因此可防止休眠的淋巴细胞被激活,并防止该淋巴细胞与效应细胞之间出现分化(36和37)。尽管胸腺逃逸体会“忽视”不断在外周出现的内源性自身配体,但是其功能会被快速增加的自身配体激活,例如在主动侵染或损伤过程中生成的“危险信号”(38和39)。能够导致自身免疫病的致病性自反应T细胞可能包含在中等亲和力T细胞池中(40和41)。

[0010] Burnet 和 Medawar 证实了在新生儿期间给动物引入外来抗原将诱导外来抗原的免疫耐受性,且该动物在成年期将不会做出拒绝同一抗原的免疫反应(44,45)。因此了解自身免疫耐受性的机理已成为免疫学中生物医学研究的主要关注点。

[0011] 胸腺阴性选择消除了致病性自身免疫外周的“迫切危险”,是自身免疫耐受性的主要机理,在胸腺阴性选择过程中,表达MHC/自身肽复合体的具有高亲和力的T细胞受体(TCR)的胸腺细胞被淘汰(33-35)。然而,胸腺阴性选择同样允许一些具有中等亲和力的自反应T细胞被释放到外周(40,45和46)。当遇到大量的自身肽出现在外周时,这些中等亲和力的自反应T细胞能够进行自身肽驱动的增殖,且一些可能分为化致病性效应细胞(40,41)。为确保自身免疫耐受性,外周调控机理已演变为微调自反应TCR基因谱型,并抑制自反应克隆体的克隆扩充,且TCR的亲和力不足以高到可以在胸腺内被消除,且足以诱导致病性自身免疫。因此,在正常情况下,尽管外周有足够多的自反应克隆体,但临床自身免疫通常可以很好地得以控制。

[0012] 外围调控机理涉及T细胞抗原激活和分化的内在机理,包括抗原激活诱导细胞死亡(48)和共刺激分子(包括CD40L,CD28和CTLA-4)的抗原诱导表达,其可以命令是否继续进行免疫或免疫无能(49-52)。此外,CD4⁺T细胞的功能激活和分化也同样作为内在调控机理的一个重要方面,其中该细胞变为Th1和Th2亚群(53-55)或Tr1和Tr3亚群(56-58)的分化部分是通过独特细胞因子的细分来进行显型识别。内在机理通常是由特异性抗原诱导的,但可对免疫反应产生特异性或非特异性影响。一般而言,通过避免因过多反应产生的间接损伤,内在机理已演化为控制免疫反应的幅度和等级,从而确保对外来抗原进行最佳免疫反应。但是,这种抑制所有免疫反应的内在机理可能还对致病性自身免疫的非特异性改善起着至关重要的作用(27,59)。

[0013] 自平衡调控内在机理上叠加是由调节性NKT、CD4⁺和CD8⁺T细胞的不同T亚群介导的外在调控机理,其可通过控制免疫反应的幅度和等级或辨别自我和非我(27,59)来抑制潜在致病性自反应T细胞增生。这种自我/非我辨别和免疫反应幅度和等级的控制必须同时发生作用,确保免疫系统发挥最佳功能。

[0014] 在生物学系统层面上如何调控外周免疫反应已成为一个核心问题,该等调控能够使免疫系统辨别非我和自我,从而维持自身免疫耐受性,而不会损害对外来病原体入侵进行反应的能力。就这点而言,目前还没有统一的概念框架来描述胸腺阴性选择和外周免疫调控之间的精确关系,而这种关系是了解自我/非我辨别的基础。由于缺乏统一的概念框架,因此常在理论和实践上在免疫调控领域产生混淆。例如,目前在免疫调控领域占主导、且对该领域的一般思维产生深渊影响的盛行理论是特定调节性T细胞(Treg)的作用。特定调节性T细胞的特点最初由CD25分子(60-62)表达,近来由转录因子Foxp3(63-65)表达,用以调控T细胞激活和特定细胞因子(66,67)表达。调节性T细胞被假定为自然发生、系特异性T细胞亚群,具有与常规的CD4⁺T细胞(68,69)相似的多变TCR基因谱型。通过

胸腺中基质细胞表达的特定自身抗原而进行的细胞选择已被提为 Treg 发育机理 (68-71)。所述自身肽的确切性质尚未说明。

[0015] 特定调节性 T 细胞已被视为通过抑制来介导自身免疫耐受性的关键机理 (69, 72-74)。然而, 尽管特定调节性 T 细胞能被自身和外来抗原激活和诱导, 但抑制特异性仍未清楚, 且靶细胞以及靶细胞和调节性 T 细胞之间的分子相互作用仍然未清楚 (26, 27)。事实上, 已普遍用于监控由特定调节性 T 细胞介导的抑制效应期的体外测定似乎没有涉及 T 细胞受体或受 MHC 限制 (75, 76), 尽管它已证明体内抑制为抗原指定因子 (65, 71, 77)。

[0016] 在效应期, 至少部分抑制是细胞接触依赖性的, 但是参与细胞接触的表面分子仍不确定的 (76)。此外, 参与内在抑制机理的 IL-10 和 TGF- β 也通过特定调节性 T 细胞参与抑制。更为重要的是, 从生物系统层面看, 这些细胞在抑制自身免疫的同时, 还被发现抑制对外来抗原的免疫反应, 包括传染病中的抗菌、防毒、防真菌和防寄生虫 (69, 78, 79), 以及器官移植中的防异物反应 (69, 80-82)。因此, 抑制出现是全局性的, 涵盖了对自身和外来抗原进行免疫反应的所有谱型。

[0017] 这些观察清楚表明特定调节性 T 细胞不可能通过自我非我辨别来控制自身免疫。但是证据显示, 特定调节性 T 细胞可以通过控制免疫反应的幅度和等级来改善致病性自身免疫, 这与常规 Th1 和 Th2 或 Tr1 和 Tr3 细胞介导的调控非常相似 (26, 27)。目前, 仍未清楚这些细胞是否处于一个稳定的系中, 或调节性显型是否处于更加可塑和可逆状态 (68, 83), 尽管目前研究已显示原初 CD4⁺T 细胞可以在特定状况下转化为由外来抗原触发的抗原特异性 Treg (40)。而概念上的难题是这种特定调节性 T 细胞是否为系特异性 T 细胞亚群, 怎么去定义它? 当调节性 T 细胞本身是一种可诱导基因时 (在效应 T 细胞细分 66, 67, 84, 85 期间这种可诱导基因能被动态调控, 且只能与特定 T 细胞的功能期相联系), 作为系特异性标志的 Foxp3 功能是否能定义调节性 T 细胞 (63-65)。若特定调节性 T 细胞不是系特异性 T 细胞亚群, 则发挥了调控功能 (包括 Th1 和 Th2 或 Tr1 和 Tr3 细胞) 的特定调节性 T 细胞和常规 T 细胞之间有何区别。总的来说, 统一解释体内特定调节性 T 细胞生物功能的概念框架仍然是进展中的一项工作 (62, 86-88)。

[0018] 根据自我 / 非我辨别或对免疫反应幅度和等级的控制, 对现有外周调控机理的划分不仅在概念上显得重要, 而且与解决因免疫机理不同而导致的临床问题所采用的精密和安全治疗方法的发展有直接联系。

[0019] 外周 T 细胞免疫调节的“亲和力模型”

[0020] 在过去几年期间, 外周 T 细胞免疫调节的“亲和力模型”已被提出和测定, 这可能会提供一个统一概念框架来理解如何调控对自身和外来抗原的外周免疫反应 (42, 43)。亲和力模式的概念首先产生于这个观察结果, 即 CD8⁺T 细胞可通过选择性地下调某些 (不是所有) 自身肽 1-9Nac MBP (髓鞘碱性蛋白) 反应性 T 细胞, 改善实验性变应性脑脊髓炎 (EAE), 这种反应性 T 细胞富含具有较高生长成 MBP 势能的致脑炎克隆体 (40, 89)。该亚群调节性 CD8⁺T 细胞最初被发现包含于在第一段疾病 (89, 90) 期间引起的对 EAE 的抵抗。稍后表明 CD8⁺T 细胞和目标 T 细胞之间的相互作用受限于 MHC Class 1b 分子 Qa-1 (66-68)。更严重的 EAE 症状以更加不可控制的方式在暴露于髓磷脂相关肽的缺少分子设计 CD8 或 Qa-1 的老鼠中发展 (90, 94)。直接导致亲和力模式形成的实验是关于当它用作 HEL 转基因 (TG) 老鼠中的自身抗原时, 发现 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞抑制对常规抗原溶菌酶 (HEL) 的免

疫反应,但是当它用作野生型 (WT) 老鼠中的外来抗原时,促进对相同抗原的免疫反应的进一步观察 (18)。因此,Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞涉及到对自身抗原的周边耐受性的维护和对外来抗原的 T 细胞反应的优化。

[0021] 通过使用具有不同亲和力的 HEL 特异性 CD4⁺T 细胞克隆库,可证明靶 T 细胞对 CD8⁺T 细胞下调的易感性决定于相互作用的亲和力,其可激活 T 细胞克隆。在各种激活 T 细胞克隆用的抗原剂量中,Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞可以选择性地下调具有中等亲和力(而非高或低亲和力)的 HEL 特异性克隆,不管这些克隆是否源于 WT 或 HEL TG 老鼠 (43)。通过研究可得出,Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞完成体内任务所用的方法是选择性地下调针对自身和外来抗原的具有中等亲和力的激活 T 细胞。因此,激活 T 细胞对 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞下调的易感性是通过在初始 T 细胞激活期间的相互作用的亲和力确定的 (43)。可以想象这种调控途径是由一系列的连续细胞事件组成的,如图 1 所示。

[0022] 尽管细胞靶的识别被 mAbs 到 Qa-1、CD8 和 TCR 阳断 (43,91-93),但是由 CD8⁺T 细胞 TCR 识别的实际靶结构仍未清楚。

[0023] 本文所示的普通靶结构识别以及所披露的新方法允许对自身免疫病进行控制和/或改善,而无需了解所述自身免疫病所涉及的特殊自身抗原。

[0024] 发明概述

[0025] 本发明中,对由 CD8⁺T 细胞的 TCR 识别的抗原激活的 Qa-1⁺/HLA-E⁺T 细胞的靶结构进行的识别仅允许采用自身免疫所涉及的通用机理。

[0026] 因此,本发明所披露的新方法允许对自身免疫病进行控制和/或改善,而无需了解所述自身免疫病所涉及的具体自身抗原。

[0027] 一种增强由 HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的方法,包括使 HLA-E⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞与一试剂接触,该试剂能增强 (i)CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii)HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合,因而增强了抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调。

[0028] 一种增强由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞下调的方法,包括使 Qa-1⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞与一试剂接触,该试剂能增强 (i)CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii)Qa-1⁺T 细胞表面上由 Qa-1 提呈的 B 型自身肽之间的结合,因而增强了抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调。

[0029] 一种治疗患有自身免疫病、嫁接移植排异和细菌感染中一种疾病的人体的方法,包括给予人体治疗有效量的试剂,该试剂能增强 (i)HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii)HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合,因此能有效对人体进行治疗。

[0030] 一种抑制患有自身免疫病、嫁接移植排异和细菌感染中一种疾病的人体的方法,包括给予人体预防疾病有效量的试剂,该试剂能增强 (i)HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii)HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合,因此能有效对人体进行治疗。

[0031] 提供了一种衍生自树突细胞、负载有自身肽的 Qa-1 携带性胞外体。提供了一种衍生自树突细胞、负载有自身肽的 HLA-E 携带性胞外体。提供了一种包含 Qa-1 和 B 型自身肽的膜包覆组合物。提供了一种包含 HLA-E 和 B 型自身肽的膜包覆组合物。

[0032] 膜包覆组合物可能源于质膜,或能被合成,如脂质体。

[0033] 一种抑制由 HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的方法,包括使 HLA-E⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞与一试剂接触,该试剂能抑制 (i) CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合,因而抑制了抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调。

[0034] 一种抑制由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞下调的方法,包括使 Qa-1⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞与一试剂接触,该试剂能抑制 (i) CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) Qa-1⁺T 细胞表面上由 Qa-1 提呈的 B 型自身肽之间的结合,因而抑制了抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调。

[0035] 一种治疗患有特征为过多 CD8⁺T 细胞介导的免疫抑制的疾病的人体的方法,包括给予人体治疗有效量的试剂,该试剂能抑制 (i) HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合,从而能有效对人体进行治疗。

[0036] 提供了一种专门结合到包含 B 型自身肽和 Qa-1 的复合体的离体抗体。提供了一种专门结合到包含 B 型自身肽和 HLA-E 的复合体的离体抗体。

[0037] 一种分离含有 T 细胞的样品中 HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞的方法,包括:

[0038] (a) 在允许 B 型自身肽与样品中的 HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞结合的条件下,使样品与固定化的 HLA-E 提呈的 B 型自身肽接触;

[0039] (b) 移走未结合的 T 细胞;以及

[0040] (c) 从固定化的 B 型自身肽中分离出所有结合的 HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞,因而将 HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞从样品中分离出来。

[0041] 一种鉴定试剂为由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的中等亲和力 Qa-1⁺T 细胞下调的增强剂的方法,所述方法包括:

[0042] a) 提供抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞和 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞;

[0043] b) 使所述抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞与 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞接触;

[0044] c) 将抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调定量化;

[0045] d) 在存在该试剂的情况下重复步骤 b) 和 c); 以及

[0046] e) 将步骤 d) 中所定量的下调与步骤 c) 中所定量的下调相比较,

[0047] 其中,步骤 d) 中所定量的下调大于步骤 c) 中所定量的下调,则表明该试剂是由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的中等亲和力 Qa-1⁺T 细胞下调的增强剂。

[0048] 一种鉴定试剂为由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的中等亲和力 Qa-1⁺T 细胞下调的抑制剂的方法,所述方法包括:

[0049] a) 提供激活的 Qa-1⁺T 细胞和 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞;

[0050] b) 使所述激活的 Qa-1⁺T 细胞与 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞接触;

[0051] c) 将激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调定量化;

[0052] d) 在存在该试剂的情况下重复步骤 b) 和 c); 以及

[0053] e) 将步骤 d) 中所定量的下调与步骤 c) 中所定量的下调相比较;

[0054] 其中步骤 d) 中所定量的下调小于步骤 c) 中所定量的下调,则表明该试剂是由

Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的激活的中等亲和力 Qa-1⁺T 细胞下调的抑制剂。

[0055] 一种抑制由 HLA-E 限制性或 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的方法,包括向 HLA-E⁺T 细胞或 CD8⁺T 细胞内引入一核酸,以抑制 (i) CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合,因而抑制了抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调。

[0056] 一种抑制抗原激活 HLA-E⁺T 细胞的方法,包括使 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞与能激活 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞的试剂接触,从而抑制 HLA-E⁺T 细胞。

[0057] 一种制备用于治疗自身免疫疾病的药物的方法,包括:

[0058] a) 鉴定能增强 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞和抗原-激活 HLA-E⁺T 细胞之间结合的试剂;和

[0059] b) 将在步骤 a) 中鉴定的试剂与药学上可接受的载体混合,从而制备所述药物。

[0060] 一种具有 SEQ ID NO:2 中所述序列的离体肽。

[0061] 一种疫苗组合物,所述组合物包含 HLA-E/B 型自身肽四聚体。

[0062] 附图简述

[0063] 图 1:Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞介导途径的细胞事件,首先由初次免疫反应期间的原初 T 细胞激活发起,其中 T 细胞的 TCR 与常规 APC 提呈的 MHC/ 抗原肽复合体相互作用。初始 T 细胞激活的结果之一是特异性“靶抗原”的差异表达,包括在靶 T 细胞表面的“Qa-1/ 自身肽复合体”。更重要的是,“靶抗原”表达是由调节性 T 细胞上的 TCR 识别的,决定于由 T 细胞激活的亲合性相互作用,不管靶 T 细胞是由哪个抗原触发。从这方面讲, T 细胞不是专职 APC, 专职 APC 如树突细胞可能是招募的,并能在调节性 T 细胞的诱导阶段提供共刺激信号。特定激活 T 细胞表达的“靶抗原”可触发调节性 T 细胞,并分化为效应细胞,其反过来在二次免疫反应期间下调表达同一靶抗原的任何激活 T 细胞。

[0064] 图 2:中等亲和力 T 细胞克隆中的 H/M/Qa-1 基因指数明显比高和低亲和力克隆中的基因指数要高。T 细胞克隆被所述的特异性抗原 HEL 的 10 μ M 激活 60 小时后,开始执行实时 PCR(1)。该图概述了三个独立实验。H/M/Qa-1 基因指数的计算如下:[Hsp60 基因表达指数 /MHC Class Ia(H-2D^d) 基因表达指数]×Qa-1 基因表达指数,其代表了 Hsp60 与规范化到基因表达水平的 Qa-1 的 MHC Class Ia(H-2Dd) 的比值。基因表达指数:相同细胞中给定基因与 β -actin 之间基因表达的比值。T 细胞克隆的 ED50(μ M) 为:9E4 和 19F6 < 1 μ M; 10H9, 3 μ M;13C7, 10 μ M;12D7, 13F2 和 44H7 > 20 μ M。

[0065] 图 3:通过蛋白质印迹测定获得的 H/M/Qa-1 蛋白质指数。在中等亲和力 T 细胞克隆中的 H/M/Qa-1 蛋白质指数明显比高和低亲和力克隆中的 H/M/Qa-1 蛋白质高。T 细胞克隆被所述的特异性抗原 HEL 的 10 μ M 激活 72 小时后,开始执行蛋白质印迹测定(1)。该图概述了三个独立实验。H/M/Qa-1 蛋白质指数的计算如下:[Hsp60 蛋白表达指数 /MHC Class Ia(H-2D^d) 蛋白表达指数]×Qa-1 蛋白表达指数,其代表了 Hsp60 与规范化到基因表达水平的 Qa-1 的 MHC Class Ia(H-2Dd) 的比值。蛋白表达指数:相同细胞中给定基因与 β -actin 之间基因表达的比值。

[0066] 图 4:蛋白质印迹测定中不同 HEL 克隆中表达的 Hsp60、MHC Class Ia 和 Qa-1 蛋白质水平。该图是图 3 中所做三个独立实验的代表图。

[0067] 图 5:在 T 细胞克隆的 H/M/Qa-1 蛋白质指数之间无明显差别,其具有由 1 μ M 到

50 μ M 的不同剂量的抗原 HEL 激活的 ED50。该图概述了三个独立实验。当比较用三种剂量 (1, 10 和 50 μ M) 激活的各种 T 细胞克隆的 H/M/Qa-1 蛋白质指数时, 所测试的各克隆之间没有明显区别 ($P > 0.05$), 然而在中等和高低亲和力群之间在三种剂量上有明显区别 ($P < 0.001$)。

[0068] ▲●◆ : 代表在三次独立实验中的 T 细胞克隆的 H/M/Qa-1 蛋白质指数 ;

[0069] ▲▲▲ : 代表在各实验中用不同 HEL 剂量 (1 μ M, 10 μ M and 50 μ M) 激活的 T 细胞克隆的 H/M/Qa-1 蛋白质指数。

[0070] 图 6 : Hsp60sp 肽是 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 的特异性靶。Hsp60sp 肽能够与 Qa-1 结合。3F4 细胞与 Hsp60sp、Qdm 和对照肽在 26°C 和 37°C 的温度下孵育 18 小时, 并染上由羊抗小鼠 PE 显示的抗 Qa-1a 血浆并用本方法所述的 FACS 分析。阴影曲线代表负载有肽的样品在 37°C 下的 Qa-1 染色, 浅色曲线代表负载有肽的样品在 26°C 下 Qa-1 染色。

[0071] 图 7 : Hsp60sp 肽与 Qa-1 结合时, 不能抑制 NK 杀伤, 表明 Qa-1/Hsp60sp 不能与 NK 细胞上的 CD94/NKG2A 受体相互作用。带有 Hsp60sp, Qdm 和对照肽的 3F4 细胞在本方法所述的标准 NK 测定中被用作肽提呈细胞。该图是四个独立实验的代表图。

[0072] 图 8 : Hsp60sp 能够在与 Qa-1 的结合方面与 Qdm 竞争。在 26°C 下将 Hsp60 和对照肽以及 Qdm (20 μ M) 负载到 3F4 细胞中 18 小时, 并在本方法所述的标准 NK 测定 (E/T 比率为 2 : 1) 下进行测试。Hsp60sp 肽 (不是对照肽) 通过 Qdm 以剂量依赖性方式消除了 3F4 的杀伤抑制, 表明 Hsp60sp 能够在与 Qa-1 的结合方面与 Qdm 竞争。该图是四个独立实验的代表图。

[0073] 图 9 : Hsp60sp 肽着色于 Qa-1 表达细胞, 该细胞易受由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的下调的影响。带有 p60sp、Qdm 和对照肽的 3F4 细胞在本方法所述的标准 CD8⁺T 细胞抑制测定中被用作肽提呈细胞。中等亲和力 1-9NacMBP 特异性致脑炎克隆 1AE10 和低亲和力 1-9NacMBP 特异性非致脑炎克隆 4D10 被用作对照体。将 CD8⁺T 细胞与 EAE 保护性 B10PL 鼠分离, 且首次用作实验的小鼠的 CD8⁺T 细胞被用作所述的对照体 (1)。我们之前和目前进行的研究已证明, 从首次用作实验的小鼠分离的 CD8⁺T 细胞对克隆 1AE10 和带有 Hsp60sp 肽的 3F4 细胞没有影响。该图是四个独立实验的代表图。

[0074] 图 10 : 在免疫反应演化期间, 由 CD8⁺T 引起的中等亲和力 T 细胞选择性下调确定了自身和外来抗原的外周 T 细胞谱型。由于自身和外来抗原的原初外周 TCR 谱型因胸腺阴性选择而各不相同, 因此中等亲和力 T 细胞的选择性下调的生物结果也各不相同。高亲和力自反应 T 细胞在胸腺内的淘汰可生成截断外周自反应谱型, 与外来反应谱型相比, 该谱型仅由中等和低亲和力 (非高亲和力) 克隆组成。因此, 中等亲和力 T 细胞群体的选择性下调提供了一种专门控制免疫性疾病的机理, 而不会损害有效的抗感染免疫, 该抗感染免疫大部分是由针对感染性病原体的高亲和力 T 细胞所介导的。

[0075] 图 11 : 在胸腺消极选择期间进行细胞凋亡的胸腺细胞激活状态假定极限。Y 轴代表 TCR 亲和力, 该亲和力是由 TCR 结构和各胸腺细胞表达的 TCR 密度支配的亲和力决定的。X 轴代表存在于胸腺中的自身抗原水平, 是由 APC 表面表达的 MHC/自身肽复合体的数量和亲和力以及 APC 表达能力决定的。激活状态超出极限的胸腺细胞要经过细胞凋亡, 而激活状态低于激活极限的胸腺细胞是在细胞凋亡中剩下的, 且被释放到外周。

[0076] 图 12 : Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞进行的周边 T 细胞调节的功能窗。它包含由提供的

各种不同的抗原水平激活的中级亲和力 T 细胞,尤其当提供的抗原水平从低级到中级或从中级到中高级时。被排除在调节窗之外的小的尾部区域代表由于在通过临床疗法进行 T 细胞激活的过程中有效的共同刺激而可能发生的一些极少的极端情况。

[0077] 图 13 :外周中在胸腺中死亡的胸腺细胞的激活状态的低边界与存在于周边的周边下调的 T 细胞激活状态的高边界之间的亲和力重叠区域。在胸腺阴性选择期间经历细胞死亡的胸腺细胞的低边界比周边 T 细胞调节的 T 细胞激活状态的高边界低。这在允许中级亲和力 T 细胞逃入周边的胸腺中死亡的胸腺细胞的激活状态的低边界与下调的 T 细胞激活状态的高边界之间的周边中产生重叠区域。该重叠区域提供安全防护,以维持周边的自身耐受性。每个点代表一个对 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的下调具有敏感性的实际 HEL 克隆。

[0078] 图 14 :EAE 和 T1D 自身免疫性疾病模型中的“交叉保护”现象。动物受到具有不同的抗原肽的疫苗接种的保护。

[0079] 图 15A-15D :用自身肽 I-9NacMBP 或 P277 疫苗接种“交叉保护”B10PL 老鼠免受 EAE 和保护 NOD 老鼠免受 T1D,该保护依赖于 CD8⁺T 细胞。

[0080] 15A、用 I-9Nac MBP 或 P277 肽疫苗接种同样“交叉保护”B10PL 老鼠免受随后诱发的 EAE。该图代表对 4-5 只老鼠 / 组进行的四个独立实验。

[0081] 15B、用 I-9Nac MBP 或 P277 肽疫苗接种同样“交叉保护”NOD 老鼠免受自然产生 T1D。该图代表对 4-5 只老鼠 / 组进行的四个独立实验。

[0082] 15C、从 I-9NacMBP 或 P277 肽疫苗接种保护的 EAE 老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞在继承性转移时进一步保护首次用作实验的 B10PL 老鼠免于遭受随后诱发的 EAE。对照 :在没有 CD8⁺T 细胞转移的情况下,老鼠被诱导产生 EAE。CD8T/ 首次用作实验的 :在来自首次用作实验的老鼠的 CD8⁺T 细胞继承转移之后,老鼠被诱导产生 EAE。CD8T/MBP :老鼠被诱导产生 EAE,但在来自 I-9NacMBP 疫苗接种保护的 EAE 老鼠的 CD8⁺T 细胞继承转移时,受到保护。CD8T/p277 :老鼠被诱导产生 EAE,但在来自 p277 疫苗接种保护的 EAE 老鼠的 CD8⁺T 细胞继承转移时,受到保护。该图代表对 4-5 只老鼠 / 组进行的四个独立实验。

[0083] 15D、从 I-9NacMBP 或 P277 肽疫苗接种保护的 T1D 老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞在继承性转移时进一步保护首次用作实验的 NOD 老鼠免于遭受随后产生的 T1D。对照 :在没有 CD8⁺T 细胞转移的情况下,老鼠自发产生 T1D。CD8T/ 首次用作实验的 :在来自首次用作实验的老鼠的 CD8⁺T 细胞继承转移之后,老鼠自发产生 T1D。CD8T/MBP :当来自 I-9NacMBP 疫苗接种保护的 T1D 老鼠的 CD8⁺T 细胞继承转移时,老鼠没有遭受到 T1D。CD8T/p277 :当来自 p277 疫苗接种保护的 T1D 老鼠的 CD8⁺T 细胞继承转移时,老鼠没有遭受到 T1D。该图代表对 4-5 只老鼠 / 组进行的四个独立实验。

[0084] 图 16 :I-9Nac MBP 特殊中级亲和力克隆 IAE10 和低亲和力克隆 4D10 以及 p277 特殊中级亲和力克隆 15A6 和低亲和力克隆 13C4 的 H/M/Qa-1 蛋白质指数。该图概括了三次独立的实验。H/M/Qa-1 蛋白质指数按照 H/M 蛋白表达比乘以 Qa-1 的蛋白表达指数进行计算,其代表被规范到蛋白表达水平的 Qa-1 的 Hsp60 与 MHC Class 1a 的比率;蛋白表达指数是指相同细胞中给定蛋白质与 β -actin 之间蛋白表达的比率,H/M 蛋白表达比是指 Hsp60 与 MHC Class1a 之间蛋白表达指数的比率。

[0085] 图 17A-17B :17A、从 I-9NacMBP 或 p277 肽疫苗接种保护的 EAE 老鼠分离出的 CD8⁺T

细胞选择性抑制致脑炎的中级亲和力 1-9NacMBP 特殊 T 细胞克隆 1AE10 或载有 Hsp60sp 的转染子 3F4, 但不控制低亲和力克隆 4D10 或载有 Qdm 和对照肽的转染子 3F4。Xxx/m 代表对从 MBP 肽疫苗接种保护的老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞进行分析的实验, xxx/p 代表对从 p277 肽疫苗接种保护的 B10PL 老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞进行分析的实验。该图代表在 B10PL 老鼠中进行的四个独立实验。

[0086] 17B、从 1-9NacMBP 或 p277 肽疫苗接种保护的 T1D 老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞选择性抑制中级亲和力 p277 特殊 T 细胞克隆 15A6 或载有 Hsp60sp 但没有对照低亲和力克隆 13C4 的转染子 3F4 或载有 Qdm 和对照肽的转染子 3F4。Xxx/m 代表对从 MBP 肽疫苗接种保护的 B10PL 老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞进行分析的实验, xxx/p 代表对从 p277 肽疫苗接种保护的 B10PL 老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞进行分析的实验。该图代表在 NOD 老鼠中进行的四个独立实验。

[0087] 图 18A-18B :18A、继承转移时,从 1-9NacMBP 或 p277 疫苗接种保护的 B10PL 老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞在受体老鼠的体外初次反应中抑制对致病性自身抗原 1-9NacMBP, 而非非常规外来抗原 HEL 的整体免疫反应。在体内抗原激发一周之后在标准的 T 细胞增殖分析中对来自引流淋巴结的 T 细胞的体外初次反应进行测试。CD8T/ 首次用作实验的 /HEL :在免疫接种 HEL 和进行 HEL 反应测试之前,老鼠接受来自首次用作实验的 B10PL 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/MBP/HEL :在免疫接种 HEL 和进行 HEL 反应测试之前,老鼠接受来自接种 1-9NacMBP 的 B10PL 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/p277/HEL :在免疫接种 HEL 和进行 HEL 反应测试之前,老鼠接受来自接种 p277 的 B10PL 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/ 首次用作实验的 /MBP :在免疫接种 MBP 和进行 MBP 反应测试之前,老鼠接受来自首次用作实验的 B10PL 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/MBP/MBP :在免疫接种 MBP 和进行 MBP 反应测试之前,老鼠接受来自接种 1-9NacMBP 的 B10PL 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/p277/MBP :在免疫接种 MBP 和进行 MBP 反应测试之前,老鼠接受来自接种 p277 的 B10PL 老鼠的 CD8⁺T 细胞。该图代表四个独立实验。

[0088] 18B、继承转移时,从 1-9NacMBP 或 p277 疫苗接种保护的 NOD 老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞在受体老鼠中的体外初次反应中抑制对致病性自身抗原 B :9-23, 而非非常规外来抗原 HEL 的整体免疫反应。在体内抗原激发一周之后在标准的 T 细胞增殖分析中对来自引流淋巴结的 T 细胞的体外初次反应进行测试。CD8T/ 首次用作实验的 /HEL :在免疫接种 HEL 和进行 HEL 反应测试之前,老鼠接受来自首次用作实验的 NOD 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/MBP/HEL :在免疫接种 HEL 和进行 HEL 反应测试之前,老鼠接受来自接种 1-9NacMBP 的 NOD 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/p277/HEL :在免疫接种 HEL 和进行 HEL 反应测试之前,老鼠接受来自接种 p277 的 NOD 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/ 首次用作实验的 /B :9 :在免疫接种 B :9-23 和进行 B :9-23 反应测试之前,老鼠接受来自首次用作实验的 NOD 老鼠的 CD8⁺T 细胞。CD8T/MBP/B :9 :在免疫接种 B :9-23 和进行 B :9-23 反应测试之前,老鼠接受来自接种 1-9NacMBP 的 NOD 老鼠的 CD8⁺T 细胞。该图代表四个独立实验。

[0089] 图 19 :由 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞介导的交叉保护细胞活动。Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞介导途径的诱导和效应期之间的连接是主要在具有中级亲和力的诱导和目标 T 细胞上表达的通常代理目标结构如 Qa-1/Hsp60sp, 无论这些 T 细胞被哪种抗原触发。

[0090] 发明详述

[0091] 如本发明中所使用的,“预防有效的”数量是指可有效防止或延迟待给药主体中的给定病理情况发作的物质数量。

[0092] 如本发明中所使用的,“治疗有效的”数量是指可有效治疗、改善或减轻待给药主体所遭受的给定病理情况的症状或原因的物质数量。

[0093] 在一个实施例中,治疗或预防有效量为每剂量大约 1mg 试剂 / 主体到大约 1g 试剂 / 主体。在另一个实施例中,治疗或预防有效量为大约 10mg 试剂 / 主体到 500mg 试剂 / 主体。在另一实施例中,治疗或预防有效量为大约 50mg 试剂 / 主体到 200mg 试剂 / 主体。在另一实施例中,治疗或预防有效量大约是 100mg 试剂 / 主体。在另一实施例中,治疗或预防有效量选自 50mg 试剂 / 主体、100mg 试剂 / 主体、150mg 试剂 / 主体、200mg 试剂 / 主体、250mg 试剂 / 主体、300mg 试剂 / 主体、400mg 试剂 / 主体和 500mg 试剂 / 主体。

[0094] 如本发明中所使用的,“B 型肽”或“B 型自身肽”是与 Qa-1 结合的或与 HLA-E 结合的肽(视情况而定),其(i)当分别与 Qa-1 或 HLA-E 结合时,不通过结合 CD94/NKG2A 抑制 NK 细胞,(ii)当分别与 Qa-1 或 HLA-E 结合时,通过调节性 CD8⁺T 细胞识别,以及(iii)可以与与 QA-1/HLA-E 结合的 A 型肽,如 Qdm 或 B7sp 竞争,来分别与 Qa-1 或 HLA-E 结合。优选,B 型肽是单体。

[0095] 如本发明中所使用的,“HLA-E”具有该领域中使用的普遍含义,即人类白细胞抗原系统 E。

[0096] 如本发明中所使用的,“受限于 Qa-1 或 HLA-E 的 CD8⁺T 细胞”是指识别在免疫系统抗原呈递细胞(APC)上分别由 Qa-1 或 HLA-E 分子提供的肽的调节性 CD8⁺T 细胞。此处包含的受限于 Qa-1/HLA-E 的 CD8⁺T 细胞的 APC 是中级亲和力 T 细胞,也是这些 CD8⁺T 细胞的特殊目标。

[0097] “供给”试剂可以通过使用那些熟练的技术人员知道的各种方法和传送系统中的任一种实现或执行。例如,可以通过静脉注射、口服、鼻腔滴入、经由脑脊髓液、经由植入管、经粘膜、经皮、肌肉注射和皮下注射等方式进行供给。以下使用许多广泛应用的药学上可接受的载体的传送系统只代表为按照本方法供给组合物设想的许多实施方案。

[0098] 可注射的药物传送系统包括溶液、悬浮液、凝胶、微球体和聚合的可注射剂,并且可包含赋形剂,如可更改变溶解度的试剂(如乙醇、丙二醇和蔗糖)和聚合物(如聚己酸内酯和 PLGA)。可植入系统包括条材和片材,并且可包含赋形剂,如 PLGA 和聚己酸内酯。

[0099] 口腔传送系统包括药片和胶囊。这些可包含赋形剂,如粘合剂(如羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone)、其它纤维素材料和淀粉)、稀释液(如乳糖和其他糖类、淀粉、磷酸二钙和纤维素材料)、分裂剂(如淀粉聚合物和纤维素材料)和润滑剂(如硬脂酸盐和滑石粉)。

[0100] 粘膜传送系统包括碎片、药片、栓剂、阴道栓剂、凝胶剂和乳膏,并且可包含赋形剂,如增溶剂和强化剂(如丙二醇、胆汁盐和氨基酸)和其他赋形剂(如丙二醇、脂肪酸酯和衍生物、以及亲水聚合物,如羟丙基甲基纤维素和透明质酸)。

[0101] 皮肤传送系统包括,如水凝胶和非水凝胶、乳膏、复合乳剂、微型乳剂、脂质体、药膏、含水和非水溶液、洗剂、气溶胶、碳氢化合物基质和粉末,并且可包含赋形剂,如增溶剂、渗透强化剂(如脂肪酸、脂肪酸脂、脂肪醇和氨基酸)和亲水聚合物(如聚卡波菲(polycarbophil)和聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone))。在一个实施例中,药学上可接受的载体是脂质体或透皮促进剂。

[0102] 可再组传送系统的溶液、悬浮液和粉末包括悬浮剂(如树胶、黄原胶、纤维素材料

和蔗糖)、湿润剂(如山梨醇)、增溶剂(如乙醇、水、PEG和丙二醇)、表面活性剂(如月桂基磺酸钠、司盘类、吐温类和十六烷基吡啶)、保存剂和抗氧化剂(如苯甲酸脂类、维生素E和C、和抗坏血酸)、抗结块剂、涂层剂和螯合剂(如EDTA)等赋形剂。

[0103] 如本发明中所使用的,“药学上可接受的载体”是指用于将本发明化合物传送给动物或人类的药学上可接受的溶剂、悬浮剂或赋形剂。该载体可能是液体、气雾剂、凝胶或固体并且根据规划的供给方式进行选择。

[0104] “试剂”应该指的是任何化学实体,包括但不限于,糖酸聚合物(glycomer)、蛋白质、抗体、血凝素、核酸、小分子、及其任何组合物,以及生物体,如胞外体或脂质体。可能的试剂的实例包括但不限于,单克隆抗体、脱氧核酶和小干扰RNA(siRNA)分子。

[0105] “小干扰RNA”应该指的是小型干扰核糖核酸。设计和生产小干扰RNA以减少目标蛋白质的表达的方法在该领域中众所周知。

[0106] 关于Hsp60sp的“结构上相关的肽”指的是具有与SEQ ID NO:2中说明的序列有70%至99%的序列相似性的肽。

[0107] “肿瘤”包括癌性和非癌性肿瘤。癌性肿瘤包括但不限于,胆道癌、脑癌(包括成胶质细胞瘤和成神经管细胞瘤)、乳腺癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、血液神经瘤(包括急性淋巴细胞和髓细胞性白血病)、多发性骨髓瘤、与AIDS相关的白血病和成人T细胞白血病淋巴瘤、上皮内瘤(包括鲍文病和佩吉特氏病)、肝癌、肺癌、淋巴瘤(包括霍奇金氏病和淋巴细胞性淋巴瘤)、成神经细胞瘤、口腔癌(包括扁平上皮癌)、卵巢癌(包括上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间质细胞引起的那些癌症)、胰腺癌、结肠直肠癌、肉瘤(包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤)、皮肤癌(包括黑色素瘤、卡波济氏肉瘤、嗜碱性细胞癌和鳞状细胞癌)、睾丸癌(包括胚组织瘤(精原细胞瘤、非精原细胞瘤[畸胎瘤、绒毛膜瘤]、间质瘤和胚组织瘤)、甲状腺瘤(包括甲状腺腺癌和髓质癌)和肾癌(包括腺癌和维尔姆斯瘤)。

[0108] 如本发明中所使用的,“抗原激活HLA-E⁺T细胞”包含自身反应性T细胞,视情况而定,即,当“抗原”是本身时。相应地,在此处描述的叙述抗原激活HLA-E⁺T细胞的各种方法的实施例中,该细胞是自身抗原激活的HLA-E⁺T细胞。

[0109] 提供了一种增强或激活由HLA-E依赖性或HLA-E限制性CD8⁺T细胞引起的抗原激活的HLA-E⁺T细胞下调的方法,包括使HLA-E⁺T细胞和CD8⁺T细胞与增强或激活(i)CD8⁺T细胞表面上的T细胞受体(TCR)与(ii)在HLA-E⁺T细胞表面上由HLA-E提呈的B型自身肽之间的结合的试剂接触,从而增强或激活抗原激活HLA-E⁺T细胞的下调。

[0110] 在实施例中,HLA-E⁺T细胞是CD4⁺/HLA-E⁺T细胞,HLA-E⁺T细胞是CD8⁺/HLA-E⁺T细胞,B型自身肽是Hsp60sp肽。在另一实施例中,Hsp60sp肽包含具有SEQ ID NO:2中所示序列的连续氨基酸。在另一实施例中,肽的序列为Xaa-Met/Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Leu(SEQ ID NO:15)。在另一实施例中,肽是与HLA-E结合的单体。在另一实施例中,肽没有与CD94/NKG2A受体结合。在另一实施例中,当与HLA-E结合时,通过调节性CD8⁺T细胞识别肽。在另一实施例中,肽可以与B7sp竞争来与HLA-E结合。

[0111] 在实施例中,试剂来源于树突细胞的、负载有B型自身肽的HLA-E携带性胞外体,试剂是来源于树突细胞的、负载有Hsp60sp肽的HLA-E携带性胞外体,试剂是HLA-E/IgG融合蛋白质,试剂是HLA-E四聚物或HLA-E/Hsp60sp四聚物。融合蛋白质在美国专

利 5, 116, 954 和 5, 336, 603 中描述, 所述专利通过引用结合于本文中。HLA-E 四聚物在例如 Braud 等,《自然》,1998 年 2 月 19 日;391(6669):740-1,743(Nature. 1998 Feb 19;391(6669):740-1,743);和 Garcia 等,《欧洲免疫学杂志》,2002 年 4 月;32(4):936-44(Eur. J. Immunol. 2002 Apr;32(4):936-44) 中描述, 所述文献通过引用结合于本文中。HLA-E 蛋白质序列由 NCB1 登记号 CAA05527、CAA40172、BAB63328 和 BAF31260 描述。

[0112] 提供了一种促进或激活由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活 Qa-1⁺T 细胞下调的方法, 包括使 Qa-1⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞与促进或激活 (i) CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCR) 与 (ii) 在 Qa-1⁺T 细胞表面上由 Qa-1 提呈的 B 型自身肽之间的结合的试剂接触, 从而促进或激活抗原激活 Qa-1⁺T 细胞的下调。在另一实施例中, 肽具有序列 Xaa-Met/Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Leu (SEQ ID NO:15)。在另一实施例中, 肽是与 Qa-1 结合的单体。在另一实施例中, 肽没有与 CD94/NKG2A 受体结合。在另一实施例中, 当与 Qa-1 结合时, 通过调节性 CD8⁺T 细胞识别肽。在另一实施例中, 肽可以与 Qdm 竞争来与 Qa-1 结合。

[0113] 在实施例中, Qa-1⁺T 细胞是 CD4⁺/Qa-1⁺T 细胞, Qa-1⁺T 细胞是 CD8⁺/Qa-1⁺T 细胞, B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含连续的氨基酸, 具有 SEQ ID NO:2 中所示序列。在实施例中, 试剂是树突细胞衍生的、载有 B 型自身肽的 Qa-1 携带性胞外体;试剂为树突细胞衍生的、载有 Hsp60sp 肽的 Qa-1 携带性胞外体。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 中所示序列的连续氨基酸。

[0114] 在实施例中, 试剂为 Qa-1/IgG 融合蛋白, 试剂为 Qa-1 四聚物或 Qa-1/Hsp60sp 四聚物。Qa-1 四聚物在 Salcedo 等人编写的欧洲免疫学杂志 30(4):1094-101(2000 年 4 月)(Salcedo et al., Eur. J. Immunol. 2000 Apr;30(4):1094-101) 中有详细的描述, 所述文献通过引用结合于本文中。

[0115] 提供一种增强或激活人体中由 HLA-E 依赖性 or HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的方法, 包括给药给人体有效量的试剂, 所述试剂增强或激活 (i) HLA-E 限制性 or HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞表面的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合, 从而增强或激活人体中抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调。

[0116] 在实施例中, HLA-E⁺T 细胞是 CD4⁺/HLA-E⁺T 细胞, HLA-E⁺T 细胞是 CD8⁺/HLA-E⁺T 细胞, B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 中所示序列的连续氨基酸。在实施例中, 试剂为 (i) 树突细胞衍生的、载有 B 型自身肽的 HLA-E 携带性胞外体, 或 (ii) 载有 B 型自身肽的 HLA-E 携带性膜包覆组合物;试剂为 (i) 树突细胞衍生的、载有 Hsp60sp 肽的 HLA-E 携带性胞外体, 或 (ii) 载有 Hsp60sp 肽的 HLA-E 携带性膜包覆组合物。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 中所示序列的连续氨基酸。在实施例中, 试剂为 Qa-1/IgG 融合蛋白, 试剂为 Qa-1/Hsp60sp 四聚物, 试剂采用静脉注射、肌肉注射或口服。

[0117] 提供一种增强或激活非人体中由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞下调的方法, 包括给药给非人体有效量的试剂, 所述试剂增强或激活 (i) Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞表面的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) Qa-1⁺T 细胞表面上由 Qa-1 提呈的 B 型自身肽之间的结合, 因而增强或激活主体中抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调。

[0118] 在实施例中, Qa-1⁺T 细胞是 CD4⁺/Qa-1⁺T 细胞, Qa-1⁺T 细胞是 CD8⁺/Qa-1⁺T 细胞, B

型自身肽是 Hsp60sp 肽。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 中所示序列的连续氨基酸。在实施例中, 试剂为树突细胞衍生的、载有 B 型自身肽的 Qa-1 携带性胞外体, 或载有 B 型自身肽的 Qa-1 携带性膜包覆组合物; 试剂为树突细胞衍生的、载有 Hsp60sp 肽的 Qa-1 携带性胞外体, 或载有 Hsp60sp 肽的 Qa-1 携带性膜包覆组合物。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 中所示序列的连续氨基酸。在实施例中, 试剂采用静脉注射、肌肉注射或口服。

[0119] 提供一种治疗患有自身免疫病、嫁接移植排异和细菌感染中一种疾病的人体的方法, 包括给药给人体有效量的试剂, 所述试剂增强 (i) HLA-E 依赖性 or HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞表面的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合, 因此能有效对人体进行治疗。

[0120] 在实施例中, HLA-E⁺T 细胞是 CD4⁺/HLA-E⁺T 细胞, HLA-E⁺T 细胞是 CD8⁺/HLA-E⁺T 细胞, B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 中所示序列的连续氨基酸。在实施例中, 自身免疫病是指风湿性关节炎、多发性硬化和 1 型糖尿病、牛皮癣、硬皮病、全身性红斑狼疮。在实施例中, 自身免疫病是指斑形脱发、脊椎炎、抗磷脂综合症、自身免疫性爱迪生氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴细胞增生性综合症 (ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜 (ATP)、白塞病、大疱性类天疱疮、心肌病、腹腔炎、慢性疲劳症候群免疫缺陷综合症 (CFIDS)、慢性脱髓鞘多发性神经病、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、肢端硬皮综合征、克隆氏症、Dego 疾病、皮炎、青少年皮炎、盘状红斑狼疮、冷球蛋白血症、纤维性肌痛 - 纤维肌炎、Gravel 疾病、吉兰 - 巴雷综合征、桥本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、先天性血小板减少性紫癜 (ITP)、肾病变、胰岛素依赖型糖尿病 (1 型)、青年类风湿性关节炎、狼疮、美尼尔氏病、混合结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、慢性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多内分泌腺综合症、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、血中丙球蛋白贫乏、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺氏现象、莱特尔氏综合征、风湿热、风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合症、全身肌强直综合征、大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风、韦格纳肉芽肿。

[0121] 在实施例中, 试剂为树突细胞衍生的、载有 B 型自身肽的 HLA-E 携带性胞外体, 或载有 B 型自身肽的 HLA-E 携带性膜包覆组合物。在实施例中, 试剂为树突细胞衍生的、载有 Hsp60sp 肽的 HLA-E 携带性胞外体, 或载有 Hsp60sp 肽的 HLA-E 携带性膜包覆组合物。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 中所示序列的连续氨基酸。在实施例中, 试剂为 HLA-E/IgG 融合蛋白, 试剂为 HLA-E/Hsp60sp 四聚物, 试剂采用静脉注射、肌肉注射或口服。

[0122] 提供一种抑制患有自身免疫病、嫁接移植排异和细菌感染中一种疾病的人体的方法, 包括给药给人体预防疾病有效量的试剂, 所述试剂增强 (i) HLA-E 依赖性 or HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞表面的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身之间的结合, 因此能有效对人体进行治疗。

[0123] 在实施例中, HLA-E⁺T 细胞是 CD4⁺/HLA-E⁺T 细胞, HLA-E⁺T 细胞是 CD8⁺/HLA-E⁺T 细胞, B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在实施例中, 自身免疫病选自风湿性关节炎、多发性硬化和 1 类糖尿病。在实施例中, 试剂为树突细胞衍生的 HLA-E 携带性胞外体, 载有 B 型自身肽, 或

HLA-E 携带性膜包覆组合物, 载有 B 型自身肽。在实施例中, 试剂为 (i) 树突细胞衍生的、载有 Hsp60sp 肽的 HLA-E 携带性胞外体, 或 (ii) 载有 Hsp60sp 肽的 HLA-E 携带性膜包覆组合物。在实施例中, 试剂为 HLA-E/IgG 融合蛋白, 试剂为 HLA-E/Hsp60sp 四聚物。

[0124] 实施例中, 试剂采用静脉注射、肌肉注射或口服。

[0125] 提供树突细胞衍生的、载有自身肽的 Qa-1 携带性胞外体。在实施例中, 树突细胞衍生的 Qa-1 携带性胞外体包含自身肽。在实施例中, Qa-1 在胞外体的表面表达或提呈。

[0126] 在实施例中, 胞外体载有 B 型自身肽, 胞外体载有 Hsp60sp 肽。

[0127] 提供树突细胞衍生的、载有自身肽的 HLA-E 携带性胞外体。在实施例中, 树突细胞衍生的 HLA-E 携带性胞外体包含自身肽。在实施例中, HLA-E 在胞外体的表面表达或呈现。

[0128] 在实施例中, 胞外体载有 B 型自身肽。胞外体载有 Hsp60sp 肽。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 中所示序列的连续氨基酸。

[0129] 提供携带 Qa-1 并包含 B 型自身肽的膜包覆组合物。在实施例中, B 型自身肽为 Hsp60sp 肽。

[0130] 提供携带 HLA-E 并包含 B 型自身肽的膜包覆组合物。在实施例中, B 型自身肽为 Hsp60sp 肽。

[0131] 提供一种抑制由 HLA-E 依赖性 or HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的方法, 包括使 HLA-E⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞与一试剂接触, 该试剂能抑制 (i) CD8⁺T 细胞表面的 T 细胞受体 (TCR) 和 (ii) HLA-E⁺T 细胞表面上由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽之间的结合, 从而抑制抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调。

[0132] 在实施例中, HLA-E⁺T 细胞是 CD4⁺/HLA-E⁺T 细胞, HLA-E⁺T 细胞是 CD8⁺/HLA-E⁺T 细胞, B 型自身肽是热休克蛋白 60 的引导序列 (Hsp60sp 肽)。在另一个实施例中, Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 中所示序列的连续氨基酸。在实施例中, 试剂为专门结合到包含 B 型自身肽和 HLA-E 的复合体的抗体, 试剂为专门结合到包含 Hsp60sp 肽和 HLA-E 的复合体的抗体。

[0133] 在此处描述的抗体的实施例中, 抗体是单克隆抗体, 抗体为人源化抗体。

[0134] 抗体包括但不限于免疫球蛋白分子, 免疫球蛋白分子包含两条重链和两条轻链, 其能识别抗原。免疫球蛋白分子可能来源于常见的内别中的任何一种, 包括但不限于免疫球蛋白 A、分泌性免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 G 和免疫球蛋白 M。免疫球蛋白 G 也为行内人士所熟知, 包括但不限于人体免疫球蛋白 G1、人体免疫球蛋白 G2、人体免疫球蛋白 G3、人体免疫球蛋白 G4。“抗体”包括例如自然产生的和非自然产生的抗体; 单克隆和多克隆抗体; 嵌合抗体和化抗体; 人体抗体和非人体抗体; 完全人工合成的抗体和单链抗体。非人体抗体可以通过重组的方法, 降低其在人体的致免疫性来实现人源化。本领域技术人员熟知人化抗体的方法。“抗体”也包括但不限于上述任何免疫球蛋白分子之一的一个片段或部分, 包括单价和二价的片段和部分。抗体片段包括, 如 Fc 片段和抗原结合片段 (Fab)。

[0135] “单克隆体抗体”, 也写成 mAb, 是抗体分子, 这些分子的一级序列本质上是相同的, 表现出相同的抗原特性。单克隆体抗体可以通过融合杂交、重组, 转基因或本领域中技术人员已知的其它技术制备。

[0136] 当在 CDR 区域之外的某些或是所有的氨基酸被相应的来源于人体免疫球蛋白分子的氨基酸取代时, 这些氨基酸所在的抗体就是一个“人源化”的抗体。在抗体的人源化形

式的一个具体例子中,在 CDR 区域之外的某些或是所有的氨基酸已经被相应的来源于人体免疫球蛋白分子的氨基酸取代,而在一个或多个 CDR 区域之内的一些、大部或全部的氨基酸未发生变化。允许小幅增加、缺失、插入、替代或是更改氨基酸,前提是这些增加、缺失、插入、替代或是更改不能抵消抗体粘合一给定的抗原的能力。适宜的人体免疫球蛋白分子包括人体免疫球蛋白 G1 分子、人体免疫球蛋白 G2 分子、人体免疫球蛋白 G3 分子、人体免疫球蛋白 G4 分子、人体免疫球蛋白 A 分子、人体免疫球蛋白 E 分子和人体免疫球蛋白 M 分子。“人源化”的抗体含有与原抗体类似的特性。

[0137] 本领域中技术人员知道怎样制备本发明主题的人源化抗体。各种的出版物也描述了怎样制造人源化的抗体,其中的若干通过引用纳入到本申请书中。例如,美国专利 4,816,567 阐述的方法包括制造有一个抗体可变区和另一个抗体恒定区的嵌入抗体。

[0138] 美国专利 5,225,539 阐述了另一种制造人源化抗体的方法。该专利描述了一种用 NDA 重组技术生产人源化抗体的方法,其中,一个免疫球蛋白可变区域中的 CDR 被具有不同特性的免疫球蛋白中的 CDR 取代,这样,人源化的抗体就将识别预期的目标但不会被人体免疫系统显著地识别。具体来说,就是使用位置定向诱导来把 CDR 嫁接到框架中。

[0139] 美国专利 5,585,089 (73) 和 5,693,761 (74) 及 WO 90/07861 描述了制备人源化抗体的其它方法,这些文件描述制造人源化免疫球蛋白的方法。这些免疫球蛋白有一个或多个 CDR 和可能额外加上的来自给体免疫球蛋白的氨基酸和接受人体免疫球蛋白的构架区。这些专利描述了提高抗体对所需抗原的亲和力。选一些构架区中氨基酸,这些氨基酸与给体中的而不是受体中的氨基酸一致。具体来说,这些专利中描述了通过结合老鼠的单克隆抗体的 CDR 来制备与受体粘合一的人源化抗体。老鼠的单克隆抗体有人体免疫球蛋白构架和恒定区。人体构架区可以用来识别在构架区中的氨基酸。该构架区可能会与 CDR 或特定抗体发生反应。这样,老鼠的氨基酸可以用来在这些位置产生人源化的抗体。

[0140] 上述专利 5,585,089 和 5,693,761 及 WO90/07861 (75) 也提出了四个可能的标准,用以设计人源化抗体。提出的第一个标准是,对于对于受体来说,用一个来自特定区域的人体免疫球蛋白,这个免疫球蛋白通常与要被人源化的受体免疫球蛋白同源,或是用多个人体抗体的共有构架。提出的第二个标准是,如果在人体免疫球蛋白的构架中的一个氨基酸出现异常,处于该位置的给体氨基酸对于人体序列而言是典型表现,那么将选用给体氨基酸而不是受体氨基酸。提出的第三的标准是,在人源化的免疫球蛋白链中紧靠 3CDR 区域的位置,将选用给体氨基酸而不是受体氨基酸。提出的四个标准是,使用处于构架位置上的氨基酸,在此位置上,预计氨基酸在 CDR 的 3A 之内,在抗体的三维模型上有一个支链原子,能够与 CDR 发生反应。以上方法只是对本领域技术人员制造人源化的抗体时可能用的方法做一下简单的说明。使用如 Wu 等人 (1999) J. Mol. Biol. 284 :151 (Wu et al. (1999) J. Mol. Biol. 284 :151) 和及美国专利 6,165,793、6,365,408 和 6,413,774 所描述的方法可提高人源化抗体的亲和性或黏着的特性。

[0141] 提供了一种抑制由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞下调的方法,此方法包括使 Qa-1⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞与试剂接触,此试剂能抑制 (i) 在 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCP) 与 (ii) 在 Qa-1⁺T 细胞表面上由 Qa-1 提呈的 B 型自身肽之间的结合,这样就抑制了抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调。

[0142] 在实施例中, Qa-1⁺T 细胞是一个 CD4⁺/Qa-1⁺T 细胞, B 型自身肽是 Hsp60sp 肽,试

剂是,该抗体专门结合到包含 B 型自身肽和 Qa-1 的复合体的抗体,试剂是专门结合到包含 Hsp60sp 肽和 Qa-1 的复合体的抗体。

[0143] 提供了一种抑制人体中由 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的方法,此方法包括向人体提供有效量的试剂,该试剂能够抑制 (i) 在 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCP) 与 (ii) 在 Qa-1⁺T 细胞表面上由 HLA-E 呈现的 B 型自身肽之间的结合,这样就抑制了抗原激活的 HLA-ET 细胞的下调。

[0144] 在实施例中,HLA-ET 细胞是 CD4⁺/HLA-E⁺T 细胞,HLA-E⁺T 细胞是 CD8⁺/HLA-E⁺T 细胞,B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在另一实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 中所示序列的连续氨基酸。在实施例中,试剂是专门结合到包含 Hsp60sp 肽和 HLA-E 的复合体的抗体。该试剂可以静脉注射,肌肉注射,也可口服。

[0145] 提供一种治疗患有特征为 CD8⁺T 细胞介导的免疫抑制的疾病的人体的方法,该方法包括提供主体有效量的试剂,该试剂抑制 (i) 在 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCP) 与 (ii) 在 Qa-1⁺T 细胞表面上由 HLA-E 呈现的 B 型自身肽之间的结合,这样就治疗人体。

[0146] 在实施例中,HLA-ET 细胞是 CD4⁺/HLA-E⁺T 细胞,HLA-E⁺T 细胞是 CD8⁺/HLA-E⁺T 细胞,B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。试剂是专门结合到包含 Hsp60sp 肽和 HLA-E 的复合体的抗体。在实施例中,人体患有艾滋病,人体长有肿瘤,或是先前接种了肿瘤疫苗或是自体 T 细胞的治疗。在实施例中,该试剂可以静脉注射,肌肉注射也可口服。

[0147] 提供了一种专门结合到由 Qa-1 提呈的 B 型自身肽的离体抗体。在实施例中,该抗体专门结合到由 Qa-1 提呈的 Hsp60sp 肽。在另一实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 所示序列的连续氨基酸。在实施例中,抗体是一个单克隆抗体。

[0148] 提供了一种专门结合到包含 B 型自身肽和 Qa-1 的复合体的离体抗体。在实施例中,B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。

[0149] 提供了一种专门结合到由 HLA-E 提呈的 B 型自身肽的离体抗体。在实施例中,该抗体专门结合到由 HLA-E 提呈的 Hsp60sp 肽。在另一实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 所示序列的连续氨基酸。在实施例中,抗体是一个单克隆抗体。

[0150] 提供了一种专门结合到包含 B 型自身肽和 HLA-E 的复合体的离体抗体。在实施例中,B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。

[0151] 提供了一种离体抗体,该离体抗体结合到 HLA-E/B 型肽复合体,以提高或激活 (i) 在 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCP) 与 (ii) 在 Qa-1⁺T 细胞表面上由 HLA-E 呈现的 B 型自身肽之间的结合,这样就抑制了抗原激活的 HLA-ET 细胞的下调。

[0152] 提供了一种组合物,该组合物主要由膜包覆的或是脂溶后的 HLA-E 和附着其上的 B 型自身肽组成。在实施例中 B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在另一实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 所示序列的连续氨基酸。

[0153] 提供了一种组合物,该组合物主要由如下组成:(i) 膜包覆的或脂溶后的 HLA-E 和附着其上的 B 型自身肽,和 (ii) 药学上可以接受的载体。

[0154] 提供了一种组合物,该组合物主要由膜包覆的或脂溶后的 HLA-E 和附着其上的 B 型自身肽组成。在实施例中,B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在另一实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO :2 所示序列的连续氨基酸。

[0155] 提供了一种组合物,该组合物主要由如下组成:(i)膜包覆的或脂溶后的 Qa-1 和附着其上的自身肽组成,和(ii)药学上可以接受的载体。提供了一种组合物,该组合物包含医药上可接受的载体和专门结合到由 HLA-E 呈现的 B 型自身肽的抗体。在实施例中,B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在另一实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 所示序列的连续氨基酸。

[0156] 提供了一种含有所描述的胞外体和医药上可接受的载体的组合物。提供了一种含有所描述的胞外体和医药上可接受的载体的组合物。

[0157] 提供了一种检测 CD8⁺T 细胞是否是 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞的方法,包括用由 Qa-1 呈现出来的 B 型自身肽来接触 CD8⁺T 细胞,并检测 CD8⁺T 细胞和 B 型自身肽是否结合,这样,如果结合就意味着 CD8⁺T 细胞就是 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞。

[0158] 在实施例中,B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 所示序列的连续氨基酸。在实施例中,B 型自身肽是由(i)从树突细胞衍生的 Qa-1 携带性胞外体或(ii)Qa-1 携带性膜包覆组合物上的 Qa-1 呈现。

[0159] 提供了一种检测 CD8⁺T 细胞是否是 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞的方法,包括用由 HLA-E 呈现出来的 B 型自身肽来接触 CD8⁺T 细胞,并检测 CD8⁺T 细胞和 B 型自身肽是否结合,这样,如果结合就意味着 CD8⁺T 细胞是 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞。

[0160] 在实施例中,B 型自身肽是 Hsp60sp 肽。在实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 所示序列的连续氨基酸。

[0161] 在实施例中,B 型自身肽是由(i)从轴突细胞衍生的 HLA-E 携带性胞外体或(ii)HLA-E 携带性膜包覆组合物上的 HLA-E 呈现。

[0162] 提供了一种分离含有 T 细胞的样品中存在的 CD8⁺T 细胞的方法,包括:

[0163] (a) 在允许 B 型自身肽与 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞结合的条件下,使样品与固定化的由 Qa-1 呈现的 B 型自身肽接触;

[0164] (b) 移走未结合的 T 细胞;以及

[0165] (c) 从固定化的 B 型自身肽中分离所有结合的 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞,从而从样品中分离出 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞。

[0166] 在实施例中,B 型自身肽包含 SEQ ID NO:2 所示的热休克蛋白 60 的信号肽。

[0167] 提供了一种分离含有 T 细胞的样品中存在的 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞的方法,包括:

[0168] (a) 在允许 B 型自身肽与 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞结合的条件下,使样品与固定化的由 HLA-E 呈现的 B 型自身肽接触;

[0169] (b) 移走未结合的 T 细胞;以及

[0170] (c) 从固定化的 B 型自身肽中分离所有结合的 HLA-E 依赖性的 CD8⁺T 细胞,从而从样品中分离出 HLA-E 依赖性的 CD8⁺T 细胞。

[0171] 在实施例中,B 型自身肽包含 SEQ ID NO:2 所示的热休克蛋白 $\beta 0$ 的前导序列。

[0172] 在上述描述 Hsp60sp 的几个实施例中,能用结构上相关的肽替代 Hsp60sp。

[0173] 提供了一种识别试剂为由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的中介亲和 Qa-I⁺T 细胞下调的增强剂的方法,包括:

[0174] a) 提供了抗原激活的 Qa-I⁺T 细胞和 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞;

[0175] b) 使抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞与 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞接触；

[0176] c) 量化由抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调；

[0177] d) 在试剂存在的条件下重复步骤 b) 和 c)；

[0178] e) 比较经过步骤 d) 和 c) 的量的下调,如果经步骤 d) 量化后的下调比经步骤 c) 量化后的下调大,就说明这种试剂是由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的中介亲和 Qa-1⁺T 细胞下调的增强剂。

[0179] 提供了一种识别试剂为由 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的中介亲和 Qa-1⁺T 细胞下调的增强剂的方法,包括：

[0180] a) 提供了抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞和 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞；

[0181] b) 使由抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞与 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞接触；

[0182] c) 量化由抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调；

[0183] d) 在试剂存在的条件下重复步骤 b) 和 c)；

[0184] e) 比较经过步骤 d) 和 c) 的量的下调,如果经步骤 d) 量化后的下调比经步骤 c) 量化后的下调大,就说明这种试剂是通过 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞下调由抗原激活的中介亲和 HLA-E⁺T 细胞的增强剂。

[0185] 提供了一种识别试剂为由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的中介亲和 Qa-1⁺T 细胞下调的抑制剂的方法,包括：

[0186] a) 提供了由抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞和 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞；

[0187] b) 使由抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞与 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞接触；

[0188] c) 量化由抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调；

[0189] d) 在试剂存在的条件下重复步骤 b) 和 c)；

[0190] e) 比较经过步骤 d) 和 c) 的量的下调,如果经步骤 d) 量化后的向下调节作用比经步骤 c) 量化后的下调小,就说明这种试剂是通过 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞下调由抗原激活的中介亲和 Qa-1⁺T 细胞的抑制剂。

[0191] 提供了一种识别试剂为由 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的中介亲和 HLA-E⁺T 细胞下调的抑制剂的方法,包括：

[0192] a) 提供了由抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞和 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞；

[0193] b) 使抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞与 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞接触；

[0194] c) 量化由抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调；

[0195] d) 在试剂存在的条件下重复步骤 b) 和 c)；

[0196] e) 比较经过步骤 d) 和 c) 的量的下调,如果经步骤 d) 量化后的向下调节作用比经步骤 c) 量化后的向下调节作用小,就说明这种试剂是通过 HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞下调由抗原激活的中介亲和 HLA-E⁺T 细胞的抑制剂。

[0197] 在实施例中,HLA-E⁺T 细胞是人体 HLA-E⁺T 细胞。在实施例中,HLA-E⁺T 细胞是人体 HLA-E⁺T 细胞。在实施例中,试剂是单体肽。在实施例中,单体肽有位于 P2 处的蛋氨酸或亮氨酸和位于 P9 处的亮氨酸。

[0198] 本发明还提供了一种抑制由 HLA-E⁺T 依赖性 CD8⁺T 细胞引起的抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的方法,包括向 HLA-E⁺T 细胞或 CD8⁺T 细胞引入核酸,以抑制 (i) 在 HLA-E⁺ 依赖性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCP) 与 (ii) 在 HLA-E⁺T 细胞表面上通过

HLA-E 呈现的 B 型自身肽之间的结合,这样就抑制了抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调。在实施例中,核酸是 siRNA。在另一个实施例中,siRNA 是单股的发夹式的 siRNA。在另一个实施例中,siRNA 是双股的 siRNA。在实施例中,核酸是 DNA 酶。在另一个实施例中,核酸是核酶。在实施例中,核酸是反义分子。在实施例中,核酸抑制了 HLA-E 的表达。在另一个实施例中,核酸抑制 T 细胞受体的表达。在另一个实施例中,核酸抑制 B 型自身肽的表达。

[0199] 本发明也提供了一种抑制由 Qa-1 依赖性 T 细胞引起的抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞下调的方法,包括向 Qa-1⁺T 细胞或 CD8⁺T 细胞引入核酸,以抑制 (i) 在 HLA-E⁺ 依赖性 CD8⁺T 细胞表面上的 T 细胞受体 (TCP) 与 (ii) 在 Qa-1⁺T 细胞表面上通过 Qa-1 呈现的 B 型自身肽之间的结合,这样就抑制了由抗原激活的 Qa-1⁺T 细胞的下调。在实施例中,核酸是 siRNA。在另一个实施例中,siRNA 是单股的发夹式的 siRNA。在另一个实施例中,siRNA 是双股的 siRNA。在实施例中,核酸是 DNA 酶。在另一个实施例中,核酸是核酶。在实施例中,核酸是反义分子。在实施例中,核酸抑制了 Qa-1 的表达。在另一个实施例中,核酸抑制 T 细胞受体的表达。在另一个实施例中,核酸抑制 B 型自身肽的表达。

[0200] 在实施例中,所描述的 siRNA 包含了一条有义链和一条反义链。RNA 干扰 (以下简称 RNAi) 是一种后转录基因调节法,该调节法存在于很多真核有机物。通过存在于细胞中的短的(例如,小于 30 个核苷 RNAi) 双链 RNA(缩写“dsRNA”) 分子来诱导 RNAi(Fire, A. et al. (1998), Nature 391 :806-811)。这些短的 dsRNA 分子称为“短的干扰性 RNA”或“siRNA”造成信使核糖核酸(缩写为“mRNA”) 的损害,在一个核苷分解内,信使核糖核酸与 siRNA 具有序列同向性(Elbashir, S. M. 等人 (2001), Genes Dev, 15 :188-200)。我们认为, siRNA 和目标 mRNA 结合到“RNA 诱导的噪声抑制复合体”或简称“RISC”,该复合体可以分裂目标 mRNA。显然, siRNA 很像一个多转角的酶一样循环旋转,一个 siRNA 分子可以诱导大约 1000mRNA 分子的分裂。因此, mRNA 的 siRNA 介导 RNAi 分解比用现有技术抑制目标基因的表达更为有效。

[0201] Elbashir, S. M. 等. (2001), 同上表明,长度为 21 和 22 个核苷酸,有三条突臂的合成 siRNA 能够诱导果蝇细胞裂解液中的目标 mRNA 的 RNAi。也可以看到培养的哺乳动物细胞的合成 siRNA 的 RNAi 的分解(Elbashir, S. M. 等. (2001) Nature, 411 :494-498), 在活鼠身上近来也可以看到由合成 siRNA 诱导的 RNAi 的分解(McCaffrey, A. P. 等. (2002), Nature, 418 :38-39 :Xia, H. 等. (2002), Nat. Biotech., 20 :1006-1010)。由 siRNA 诱导的 RNAi 的分解的疗效潜力在最近几个体外研究中突显,包括 HIV-I 感染的 siRNA 指向抑制(Novina, C. D. 等. (2002), Nat. Med. 8 :681-686) 和神经中毒多谷氨酰胺疾病蛋白表达的减少(Xia, H. 等. (2002), 同上)。一个实施方案中, siRNA 的长度为 21 或 22 个核苷酸。用于基因沉默技术的方法和组合物已在美国专利 6, 573, 099、6, 506, 599、7, 109, 165、7, 022, 828、6, 995, 259、6, 617, 438、6, 673, 611、6, 849, 726 和 6, 818, 447 中, 所述专利通过引用结合于本文中。

[0202] 提供了一种选择性地激活 HLA-E 抑制的调节性 CD8⁺T 细胞的方法,包括使 HLA-E 抑制的调节性 CD8⁺T 细胞与 HLA-E/Hsp60sp 四聚物或 HLA-e/IgG 融合蛋白接触以便选择性地激活 HLA-E 抑制的调节性 CD8⁺T 细胞。

[0203] 在实施例中, HLA-E 抑制性 CD8⁺T 细胞与 HLA-E/Hsp60sp 四聚物接触。在实施例中, HLA-E 抑制性 CD8⁺T 细胞与 HLA-e/IgG 融合蛋白接触。

[0204] 提供了一种抑制抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞的方法,包括用 HLA-E/Hsp60sp 四聚物或 HLA-e/IgG 融合蛋白来接触 HLA-E 抑制性的 CD8⁺T 细胞以激活 HLA-E 抑制性 CD8⁺T 细胞,从而抑制 HLA-E⁺T 细胞。

[0205] 在实施例中,HLA-E 抑制性 CD8⁺T 细胞与 HLA-E/Hsp60sp 四聚物接触。在实施例中,HLA-E 抑制性的 CD8⁺T 细胞与 HLA-e/IgG 融合蛋白接触。

[0206] 提供了一种治疗主体自身免疫性疾病的方法,包括供给人体有效量的试剂,以激活 HLA-E 抑制性 CD8⁺T 细胞,以此抑制体内已激活的 HLA-E⁺T 细胞,达到治疗自身免疫性疾病的目的。

[0207] 在实施例中,试剂为 HLA-E/Hsp60sp 四聚物或 HLA-e/IgG 融合蛋白。

[0208] 提供了一种检测自身免疫性疾病治疗效果的方法,包括:

[0209] a) 在治疗前,从人体中取出第一个样品,量化样品中已经激活的 HLA-E⁺T 细胞;

[0210] b) 用自身免疫性疾病治疗方法治疗病人;

[0211] c) 在治疗后,从人体中取出第二个样品,量化样品中已经激活的 HLA-E⁺T 细胞;

[0212] d) 比较经步骤 a) 和步骤 c) 量化的已激活的 HLA-E⁺T 细胞的水平,如果步骤 c) 的比步骤 a) 的水平低,则说明自身免疫性疾病的治疗是有效的。

[0213] 实施例中,自身免疫疾病为类风湿性关节炎、多发性硬化、1 型糖尿病、斑形脱发、关节强硬性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫艾迪生氏病、自身免疫溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜 (ATP)、白塞病、大水疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎、慢性疲乏免疫缺陷综合征 (CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、肢端硬皮综合征、克罗恩氏病、棘皮瘤疾病、皮炎、幼年型皮炎、盘状红斑、冷球蛋白血症、纤维肌痛肌炎、Grave 病、吉兰 - 巴雷综合征、乔本氏甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、膜性肾病变、幼年型关节炎、狼疮、美尼尔氏病、混合性结缔组织病、假麻痹性重症肌无力、慢性天疱疮、恶性贫血、结节性动脉周围炎、多软骨炎、多腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肤肌炎、初期血中丙球蛋白贫乏、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺氏现象、赖特尔综合征、风湿热、肉状瘤病、硬皮病、干燥症候群、全身肌强直综合征、大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、眼色素层炎、脉管炎、白癜风或韦格纳肉芽肿。

[0214] 实施例中,通过样品与 HLA-E/Hsp60sp 四聚物或 HLA-E/IgG 融合蛋白的接触以及将 HLA-E⁺T 细胞结合到 HLA-E/Hsp60sp 四聚物或 HLA-E/IgG 融合蛋白进行定量,来对激活的 HLA-E⁺T 细胞进行定量。实施例中,可固定化 HLA-E/Hsp60sp 四聚物或 HLA-E/IgG。实施例中,样品来源于病患血液或来源于病患淋巴。

[0215] 上文所述的采用抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞和 / 或 HLA-E- 抑制的 CD8⁺T 细胞的所有方法的实施例中,细胞为人体细胞。上文所述的方法的实施例中,病患为人类。

[0216] 在此披露的方法允许对自身免疫性疾病的控制和 / 或改善,由于常用的标靶结构,可在不受给定自身免疫性疾病涉及的特殊自身抗原知识约束的情况下,实现对该疾病的控制和 / 或改善。因此,甚至可在不对自身免疫性疾病标靶抗原进行识别的情况下,对疾病进行治疗。

[0217] 提供一种用于自身免疫性疾病治疗的药品的制备方法,包括:

[0218] c) 识别可加强 HLA-E 抑制性 CD8⁺T 细胞和抗原 - 激活的 HLA-E⁺T 细胞之间的结合

的试剂;和

[0219] d) 将步骤 a) 中识别的试剂与药学上可接受的载体混合在一起,以制备所述药品。

[0220] 所述方法的一个实施方案中,在步骤 a) 中,通过如下步骤识别试剂为结合增强剂:i) 提供抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞和 HLA-E⁻ 抑制 CD8⁺T 细胞;ii) 使激活的 HLA-E⁺T 细胞和 HLA-E 抑制性 CD8⁺T 细胞接触;iii) 定量激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调;iv) 在试剂存在的情况下重复第 ii) 和第 iii) 步;v) 比较第 iv) 步中定量的下调和第 iii) 步中定量的下调,其中,第 iv) 步中定量的下调比第 iii) 步中定量的下调大,确定该试剂为由 HLA-E 抑制性 CD8⁺T 细胞引起的抗原-激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的增强剂。

[0221] 提供一种用于加强中等亲和力抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞介导的免疫反应的药品的制备方法,包括:

[0222] e) 识别可抑制 HLA-E⁻ 抑制 CD8⁺T 细胞和抗原-激活的 HLA-E⁺T 细胞之间的结合的试剂;和

[0223] f) 将步骤 a) 中识别的试剂与药学上可接受的载体混合在一起,以制备药品。

[0224] 所述方法的一个实施方案中,在步骤 a) 中,通过如下步骤识别试剂为结合抑制剂:i) 提供抗原激活的 HLA-E⁺T 细胞和 HLA-E⁻ 抑制 CD8⁺T 细胞;ii) 使激活的 HLA-E⁺T 细胞和 HLA-E⁻ 抑制 CD8⁺T 细胞接触;iii) 定量激活的 HLA-E⁺T 细胞的下调;iv) 在试剂存在的情况下重复第 ii) 和第 iii) 步;v) 比较第 iv) 步中定量的下调和第 iii) 步中定量的下调,其中,第 iv) 步中定量的下调比第 iii) 步中定量的下调小,确定该试剂为由 HLA-E⁻ 抑制 CD8⁺T 细胞引起的抗原-激活的 HLA-E⁺T 细胞下调的抑制剂。

[0225] 提供一种疫苗组合物,包含膜包覆的 HLA-E 或溶有油脂的 HLA-E 以及结合在其上的 B 型自身肽。在一个实施例中,B 型自身肽具体为 Hsp60sp 肽或具有相关结构的肽。另一实施例中,Hsp60sp 肽包含序列如 SEQ ID NO:2 中所示的连续氨基酸。一个实施例中,B 型自身肽的序列如 SEQ ID NO:15 中所示,其中处于位置 1 和 3-8 的 Xaa 为独立为任何氨基酸。

[0226] 提供一种疫苗组合物,包含 i) 膜包覆的 HLA-E 或溶有油脂的 HLA-E 和结合在其上的 B 型自身肽,以及 ii) 药学上可接受的载体。一个实施例中,B 型自身肽为 Hsp60sp 肽或具有相关结构的肽。另一实施例中,Hsp60sp 肽包含具有 SEQ ID NO:2 中所示序列的连续氨基酸。一个实施例中,B 型自身肽具有 SEQ ID NO:15 中所示的序列。

[0227] 应该理解:上述方法的步骤可通过其它人进行,也可能在不同位置实施。

[0228] 在上文描述的这些方法、组成物中,可用 HLA-E/b 型自身肽四聚物替代 HLA-E/Hsp60sp 四聚物。一个实施例中,b 型自身肽的序列如 SEQ ID NO:15 中所示。

[0229] Hsp60sp 具有序列 QMRPVSRAL (SEQ ID NO:2)。

[0230] 此处所述的方法、组合物中的各种元素的所有组合都在本发明的范围之内。

[0231] 通过参考所遵循的实验细节可以更好地理解本发明,但是熟悉该工艺的人员可充分意识到具体的实验细节仅为对本发明进行说明,在下文的权利要求书中将对其进行更全面完整的描述。

[0232] 实验细节

[0233] 大家都知道,结合到 Qa-1 的主要肽为 Qdm,即来源于 MHClass Ia 分子 (95-98) 的引导序列中的疏水性肽。该肽 (AMAPRTLLL) (SEQ ID NO:1) 与高亲合能结合在一起,并占与

Qa-1 相联系的肽的大部分,其络合到 NK 细胞上的 CD94/NKG2A,并抑制 NK 细胞的活性 (98、99)。所有 Ga-1/HLA-E 结合肽都为单体。将 Qdm 肽和相似于 Qdm 的肽定义为 A 型肽。然而, Qa-1 同样可结合其他自身肽,包括那些来源于热休克蛋白 (100) 以及前胰岛素原引导序列 (101) 的肽。将没有与 CD94/NKG2A (77) 结合的 Qa-1 结合肽归类到 B 型肽之中。

[0234] 特此披露来自于热休克蛋白 60 (Hsp60sp) 引导次序、由 MHC 等级 1b 分子、Qa-1 表示的信号肽为替代靶结构,优先在中等亲和力 T 细胞上以更高水平表示并通过 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞专门识别。因此,作为独一无二的机理,可将 T 细胞激活的亲合力的感知翻译成为在活体内对外围 T 细胞的调节,提供一个新概念去理解怎样维护外围的自体耐受性。本概念的生物学意义在于通过装载有 Hsp60sp 的相关树突状细胞 (DC) 的能力诱发介导的 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞,有效防止实验性过敏性脑脊髓炎 (EAE) 模型内的自身免疫脑病。

[0235] 最初,将 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞鉴定为调节器,其可调节对由首发性疾病诱发的自身免疫实验性过敏性脑脊髓炎 (EAE) 的耐受性 (3 和 4)。人们已经注意到在 CD8^{-/-} (4) 内的 EAE 复发期间或再次诱发 Qa-1^{-/-} 小鼠 (5) 内的 EAE 期间,EAE 症状发展得越严重,可控制性就越小,这表明这些 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞在维护外围的自体耐受性方面起着非常重要的作用。

[0236] 与大部分自身抗原产生反应的高亲和力 T 细胞克隆的胸腺缺失可生成截断的外围自身反应指令表,与外部反应指令表 (6) 相比,该指令表仅包含中等亲和力 T 细胞克隆和低亲和力 T 细胞克隆,而没有高亲和力 T 细胞克隆。潜在的致病自身反应 T 细胞包括在中等亲和力胸腺逃逸细胞池之内,其具有的亲和力比胸腺内缺失的细胞的亲和力低,但是涵盖了范围广泛的亲和力,从高端到胸腺阴性选择的阈值到低端,在下限之下,可在外围激活胸腺逃逸细胞以开始自身免疫性疾病 (7 和 8)。

[0237] 外围 T 细胞指令表独特的合成成份可自我对抗外来抗原,为免疫系统提供极其难得的机会,通过有选择地将亲和力 T 细胞下调自身抗原和外来抗原来区别外围中的自身免疫和非自身免疫。中等亲和力 T 细胞人群的选择性下调,包含潜在的致病的自身反应 T 细胞,使免疫系统能够在不损害正在实施的抗感染免疫的情况下,特殊控制自身免疫性疾病,针对外来病原体的高亲和力 T 细胞可对其进行大量调节。

[0238] 假定用于解释说明这样的操作的分子和细胞机制是通过特殊的 Qa-1/自身肽复合物的调节性 CD8⁺T 细胞专门识别,所述复合物在靶细胞上以中等亲和力 T 细胞的激活的函数表达 (1 和 2)。

[0239] 为了测试该假设,识别可提供激活的 T 细胞的 Qa-1 结合肽是决定性的,该激活 T 细胞对由 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞进行的下调敏感。据了解,结合到 MHC 等级 1b 分子 Qa-1 的主要肽为 Qdm,即为来源于 MHCC1ass Ia 分子 (9 和 10) 的引导序列的疏水性肽。该肽与高亲合能相结合,并占 Qa-1 相关联的肽的大部分。Qa-1/Qdm 与 NK 细胞上的 CD94/NKG2A 相互作用,并可抑制 NK 细胞的活性 (11)。将 Qdm 肽或类似于 Qdm 的肽归类到“A 型”肽之中。

[0240] 结合到 Qa-1 或 HLA-E 时,A 型肽可与 CD94/NKG2A 相互作用并可抑制 NK 细胞的活性。Qa-1 同样可与其他自身肽相箱结合。然而,包括那些来源于热休克蛋白 (12) 和前胰岛素原引导序列 (13) 的肽。关于此事,人类研究显示来源于应激蛋白 Hsp60 (Hsp60sp) 的引导序列的信号肽能够与 B7sp 肽、Qdm 的人体相似部分互相竞争,以占有利用 HLA-E,即 Qa-1

的人体配对物 (14)。合成的 HLA-E/Hsp60sp 复合体不会与 CD94/NKG2A 相互作用,因此不能抑制 NK 的活性。

[0241] 当不会与 CD94/NKG2A 相互作用的 Qa-1 结合肽与 Qa-1 耦合时,可将其归类为“B 型”肽。假定一些 B 型 Qa-1- 结合肽能够与 Qdm 相互竞争,以与 Qa-1 相结合,可优先使用中等亲和力 T 细胞对其进行表示,且其用作 Qa-1 依赖调节性 CD8⁺T 细胞的特异性标靶。

[0242] 可对 T 细胞克隆中的 mRNA 水平和蛋白水平进行对照,以表达 Qa-1 以及 Hsp60 和 MHCClass Ia(H-2Dd) 分子。这些分子可在 T 细胞激活期间分别生成 Hsp60sp 和 Qdm(15) 肽。可使用一组预先识别的 (1) 建立于 Qa-1b 应变 Balb/c 鼠疫的 HEL- 指定 T 细胞克隆。如 2 和图 3 以及表 1 和表 2 列出了七种精选于 28HEL 特异性克隆的具有代表性的 T 细胞克隆,以代表从亲和力到 HEL 的范围。根据先前的报告,克隆对 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞 (1) 进行的下调的感受性不同。

[0243] 表 1 显示了实验结果,预防接种装载有 Hsp60sp 而不是 Qdm 的树突状细胞的老鼠明显受到保护,预防了接下来的 EAE 诱发。对照:在没有接种疫苗的情况下诱发 EAE 的老鼠。在实验 3 和实验 4 中,在 EAE 诱发之前,老鼠同样接受了对照老鼠 1g 治疗,作为抗 CD8mAb53-6.72 对照。DC w/Hsp60sp:在 EAE 诱发之前,注射装载有 Hsp60sp 肽的 DC 的老鼠。DCw/Qdm:在 EAE 诱发之前,注射装载有 Qdm 肽的 DCs 的老鼠。CD8-/DC w/Hsp60sp:如方法的描述,接种 DC 疫苗之后一周以及 EAE 诱发之前三天,老鼠的 CD8⁺T 细胞通过给老鼠注射抗 CD8mAb 53-6.72 而衰竭。

[0244] 表 1 在实时 PCR 化验分析中 HEL 特异性克隆中的基因表达比较

[0245]

T 细胞克隆	亲和力	ED ₅₀ (μ M)	基因表达指数*			Hsp60 / MHC Class Ia (H/M)	
			Qa-1	Hsp60	MHC Class Ia(H-2D ^d)	H/M 基因表达比 ∞	H/M/ Qa-1 指数 \diamond
9E4	高	< 1	0.35	0.60	0.44	1.36	0.48
19F6	高	< 1	0.50	0.53	0.51	1.04	0.52
10H9	中	3	0.45	1.43	0.31	4.61	2.08
13C7	中	10	0.40	2.10	0.29	7.24	2.89
12D7	低	> 20	0.42	0.46	0.56	0.82	0.35
13F2	低	> 20	0.45	0.25	0.45	0.56	0.25
44H7	低	> 20	0.46	0.35	0.61	0.57	0.26

[0246] 在实时 PCR 化验分析中对比 HEL 特异性克隆中的基因表达。

[0247] 根据描述 (1) 使用 10 μ M 特殊抗原 HEL 激活 T 细胞克隆 60 小时之后进行实时 PCR。该表表现了三个独立实验之一。

[0248] * 基因表达指数:在相同细胞内的给定基因和 β -actin 之间的基因表达比。

[0249] ∞ H/M 基因表达比为 Hsp60 和 MHC Class Ia(H-2D^d) 之间的基因表达指数比。

[0250] \diamond H/M/Qa-1 基因指数比计算为 H/M 基因表达比乘以 Qa-1 基因表达指数,其表示了 Hsp60 与标准化到 Qa-1 基因表达水平的 MHC Class Ia(H-2D^d) 之比。

[0251] 表 2 在免疫印迹化验分析中 HEL 特异性克隆中的蛋白表达比较

[0252]

T 细胞 克隆	亲和 力	ED ₅₀ (μ M)	蛋白表达指数*			Hsp60 / MHC Class Ia (H/M)	
			Qa-1	Hsp60	MHC Class Ia(H-2D ^d)	H/M 蛋白表达比 ∞	H/M/ Qa-1 指数◇
9E4	高	< 1	0.54	0.68	0.58	1.17	0.63
19F6	高	< 1	0.53	0.75	0.66	1.14	0.60
10H9	中	3	0.57	1.07	0.45	2.34	1.35
13C7	中	10	0.54	1.18	0.37	3.19	1.72
12D7	低	> 20	0.57	0.43	0.71	0.61	0.35
13F2	低	> 20	0.54	0.44	0.57	0.77	0.42
44H7	低	> 20	0.60	0.52	0.67	0.78	0.47

[0253] 在免疫印迹化验分析中, HEL 特异性克隆中的蛋白表达的比较。

[0254] 根据描述 (1) 使用 10μ M 特殊抗原 HEL 激活 T 细胞克隆 72 小时之后进行免疫印迹化验分析。该表表现了三个独立实验之一。

[0255] * 蛋白表达指数: 在相同细胞内的给定蛋白质和 β -actin 之间的蛋白表达比。

[0256] ∞ H/M 蛋白表达比为 Hsp60 和 MHC Class Ia(H-2D^d) 之间的蛋白表达指数比。

[0257] ◇ H/M/Qa-1 蛋白质指数计算为 H/M 蛋白表达比乘以 Qa-1 蛋白表达指数, 其表示了 Hsp60 与标准化到 Qa-1 蛋白表达水平的 MHC Class Ia(H-2D^d) 之比。

[0258] 依据 Qa-1 表达是 T 细胞激活亲和力的函数, 可对 Hsp60 与 MHC Class Ia 之间的表达比进行测量, 并可计算 H/M/Qa-1 基因或蛋白质指数以反映每个测试 T 细胞克隆中的 Qa-1/Hsp60sp 与 Qa-1/Qdm 之间的相对表达。

[0259] 在实时 PCR 化验分析中, 与两个高亲和力克隆 9E4 和 19F6 ($P < 0.001$) 以及三个低亲和力克隆 12D7、13F2 和 44H7 ($P < 0.001$) 相比, 两个中等亲和力克隆 10H9 和 13C7 中的 H/M/Qa-1 基因指数明显较高 (图 2 和表 1)。相似地, 免疫印迹化验分析中, 在蛋白表达水平上, H/M/Qa-1 蛋白质指数在中等活性克隆中比在高和低的亲和力克隆中高出许多 (图 3, 4 和表 2)。这组结果与在以往的在体内和体外研究观察中得出的具体 T 型细胞调节有关, 而这种研究展示了 Qa-1 依赖性 CD⁺T 细胞选择性地下调了中等活性 T 细胞, 而不是高或低活性的 T 细胞 (1)。重要的是, 当用 1μ M- 5μ M 的不同剂量抗原来激活相同的克隆时, 所获得的 H/M/Qa-1 蛋白质指数间没有明显的不同 (图 5)。总之, 这些观察结果支持这个假设: T 细胞中的 Qa-1/Hsp60sp 和 Qa-1/Qdm 之间的高表达比是 T 细胞激活中的中等亲和力激活的函数, 这种函数可能决定 T 细胞对 Qa-1 依赖性 CD⁺T 细胞引起的下调的敏感性。

[0260] 为了进一步证实这个假设, 接下来将测定 Qa-1/Hsp60sp 是否真的是由 EAE 中敏感的 Qa-1a 菌系 B10PL 的调节性 CD⁺T 细胞识别的特殊目标结构, 以更好地在分子水平上了解自身免疫疾病模型中 Qa-1 依赖性 CD⁺T 的生物学。我们知道在 Qa-1a 和 Qa-1b 间的大多数不同位于结合槽的外围, 这种结合槽使两个分子能与结构上相似的肽结合 (16)。Qdm (AMAPRTLLL) (SEQ ID NO:1) 用来作为研究中的“A 型”肽, 用来评估 B10PL 老鼠中的“A 型”肽和 Hsp60sp 的关系和作用。通过鼠科的 Qa-1a cDNA 的重组细胞转染人类 B 细胞系的 C1R 来组建 Qa-1a 表达细胞。通过 RT-PCR 检测到的 Qa-1a 的一个阳性转染子 3F4, 在 26C

下,当细胞用外源 Qa-1 结合肽被动致敏时,能表达表面的 Qa-1a(图 6)。因此选择 3F4 作为 Qa-1 结合肽提呈细胞,用来测试是否 Hsp60sp(QMRPVSRAL)(SEQ ID NO:2) 是 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞的特异性目标。

[0261] 肽结合到 Qa-1 的能力首先通过其稳定 3F4 细胞上的 Qa-1 表面表达的能力来评估。3F4 细胞是在 26°C 的温度下,采用 Hsp60sp 或 Qdm 肽并采用 Qa-1 非结合肽 HEL 74-96 作为对照肽经过大约 18 小时培养出来的(12, 14 和 17)。如图 6 所示,通过 FASC 的分析,在 26°C 下,外源肽的结合促使 Qa-1a 表面失色的强度漂移。结果表明,不仅 Qdm 还有其他的肽如 Hsp60sp 肽也能与 Qa-1 结合。

[0262] 因为大量鼠科的 CD8⁺T 细胞表达 CD94/NKG2A,因此在功能性 NK 分析中研究了产生于激活的鼠科 T 细胞中的 Qa-1/Hsp60sp 是否能与 CD94/NKG2A 相互作用。如图 7 所示,载有对照 Qa-1 非结合肽的 3F4 细胞是 NK 杀伤的敏感目标。相反,载有 Qdm 而不是 Hsp60sp 的 3F4 细胞能抵制 NK 杀伤,这与以前 Qa-1/Qdm(11) 而不是 Qa-1/Hsp60sp(14) 与 CD94/NKG2A 相互作用来抑制 NK 活性的报告相符合。这也与两种类型的 Qa-1/HLA-E 结合肽能通过它们在人(14) 和鼠中与 CD94/NKG2A 相互作用的能力来区分彼此的观点是相符的。

[0263] 在功能性 NK 分析中进一步对 Hsp60sp 与 Qdm 竞争来结合 Qa-1 的能力进行测试。如图 8 所示,Hsp60sp 肽而不是对照肽通过 Qdm 以依赖于剂量的方式消除了对 3F4 的 NK 杀伤的保护,表明 Hsp60sp 在结合 Qa-1 中能与 Qdm 对抗。此结果符合人体研究的观察结果,所述人体研究的观察结果是人体 Hsp60sp 能与 HLA Class Ia 前导序列 B7sp 的信号肽竞争来结合 HLA-E(14)。

[0264] 接下来测试 Qa-1/Hsp60sp 是否是调节性 CD8⁺T 细胞的目标。关于这一点,以前已证实了 CD8⁺T 细胞能选择性地下调中等活亲和力 T 细胞克隆(1) 且在各种实验性设置中,通过 CD8⁺T 细胞介导的抑制是 Qa-1 限制性的(1, 5, 8, 18 和 19)。Qa-1 表达的 3F4 细胞用作 Qa-1 肽呈递细胞,来测试 Hsp60sp 是否能在 CD8⁺T 细胞抑制试验中被调节性 CD8⁺T 优先识别出来。1-9NacMBP(髓鞘碱性蛋白) 特异性、中等亲和力克隆 1AE10,能诱导体内(8, 19) 的 EAE,作为阳性对照,非致脑炎、低亲和力克隆 4D10 和载有对照的非 Qa-1 结合肽或 Qdm 的 3F4,作为阴性对照。1AE10 克隆,而非 4D10,被来自从 EAE 复原的鼠中分离出来的 CD8⁺T 细胞有效地下调(图 9)。我们知道,这些老鼠抵抗 EAE 的再诱导,并显示出拥有 Qa-1 依赖调节性 CD8⁺T 细胞(3 和 8)。有趣的是,仅载有 Hsp60sp 的 3F4 细胞,而不是 Qdm 或对照肽,提供对 CD8⁺T 细胞引起的下调敏感的 3F4 细胞。因此,当由 Qa-1 表达时,Hsp60sp 的确是 CD8⁺T 细胞识别出来的特定目标。

[0265] 为了直接测试 Hsp60sp 是否参与体内 CD8⁺T 细胞介导的调节,对 Hsp60sp 作为一种疫苗来激活 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞以保护动物免受 EAE 伤害的潜在用途进行评估。在诱发 EAE 前的至少一周内,向首次用于实验的 B10PL 鼠注入载有 Hsp60sp 的骨髓衍生树突细胞(DC)。用于其表面免疫表达 Qa-1 的 DC 而不表达 CD8。与对照的未免疫组相比,采用载有 Hsp60sp,而不是 Qdm 的 DC 进行免疫明显地保护动物免受 EAE 的伤害(表 3 和 4)。

[0266] 表 3 接种了载有 Hsp60sp 而不是 Qdm 的树突细胞的老鼠明显免于遭受 EAE 随后的诱导

[0267]

组	发病率	严重度		平均天数	
		平均	最大	发作	最长时间
实验 1					
对照	4/4	2.0	4	27	23
DC w/Hsp60sp	0/4	0	0	60	0
DC w/Qdm	2/4	1.5	3	39	22
实验 2					
对照	4/4	2.5	4	24	22
DC w/Hsp60sp	2/5	1.2	3	45	5
DC w/Qdm	4/4	3.0	4	22	15
实验 3					
对照	3/4	2.5	4	28	22
DC w/Hsp60sp	0/4	0	0	60	0
DC w/Qdm	3/4	1.5	4	39	12
CD8-/DCw/Hsp60sp	4/8	1.7	4	34	15
实验 4					
对照	4/4	3.5	4	20	16
DC w/Hsp60sp	2/5	1.2	2	48	5
DC w/Qdm	4/4	3.0	4	26	19
CD8-/DCw/Hsp60sp	6/8	2.6	5	30	17
汇总					
	发病率	平均严重度	平均天数		
			发作	最长时间	
对照	15/16 (94%)	2.6+/-0.63	25+/-3.6	21+/-3.2	
DC w/Hsp60sp	4/18 (22%)	0.6+/-0.66	53+/-7.9	3+/-2.9	
DC w/Qdm	13/16 (81%)	2.3+/-0.87	32+/-8.8	17+/-4.4	
CD8-/DCw/Hsp60sp	10/16 (63%)	2.1+/-0.59	32+/-2.6	16+/-1.6	

[0268] 表 4 接种了载有 DC 的 w/Hsp60sp 肽的组中诱导的 EVE 和不同对照组中诱导的 EAE 的主要参数的统计分析 (student t 检测)

[0269]

比较的组	发病率	平均严重度	平均天数	
			发作	最长时间
DC w/Hsp 与对照	P<0.003	P<0.001	P<0.001	P<0.001
DC w/Hsp 与 DC w/Qd	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.002
DC w/Hsp 与 CD8-/DC	P<0.02	P<0.01	P<0.002	P<0.002

[0270] 重要的是,保护是 CD8⁺T 细胞依赖性的,因为活体内 CD8⁺T 细胞消耗取消了保护。因此,能够下调 1-9NacMBP 反应性致脑炎 CD4⁺T 细胞的 Qa-1 依赖性 CD4⁺T 细胞 (3 和 8),能够通过载有 Hsp60sp 的 DC 在活体中诱导,从而达到使动物免受病毒侵害的目的。人们正在单独的研究中调查介入 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞的 DC 的精确细胞和分子机制。

[0271] 在此提出,在所描述的亲抗力模型中, Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞通过感知 T 细胞激活的亲合力的结果来支配它们在活体 (1 和 2) 中的调节性功能。这里提供了分子和细胞机制,并提出通过 Qa-1 依赖性引起的中等亲和力 T 细胞的选择性下调作用可通过由 CD8⁺T 细胞表达于中等亲和力 T 细胞上的 Qa-1/Hsp60sp 的特殊识别来完成。Hsp60 蛋白的表达和含 Qdm 的 MHC Class Ia 蛋白之间的一个显著的较高比优选主要出现在被中等亲和力相互作用激活的 T 细胞克隆中。由于 Hsp60 相对 MHC Class Ia 的较高表达, Qa-1/Hsp60sp (调节性 CD8⁺T 细胞的特异性目标) 是有或没有 Qa-1/Qdm 共同表达的情况下主要表达于中等亲和力 T 细胞表面上。这里所揭露的调查结果证明激活的中等亲和力 T 细胞表面上由调节性 T 细胞识别的个别代理目标结构如 Qa-1/Hsp60sp,能使免疫系统通过感知 T 细胞激活的亲合力调节外围免疫。该内容的生物意义由 EVE 模型中载有 Hsp60sp 的相关 DC 诱导 CD8⁺T 细胞介导的自身免疫脑病保护的能力所证实。

[0272] 已知除了 Hsp60sp 外,三种潜在 Qa-1/HLA-E 结合肽可通过 Hsp60 蛋白质产生 (14 和 20)。众所周知,这三种肽或者不有效的结合到 Qa-1/HLA-E (Hsp60. 2 和 3 肽) (14),或者不能与 Qdm 竞争来占有 Qa-1 (Hsp60. 4 肽) (21)。因此,这些肽干扰 Qa-1/Hsp60sp 在激活的中等亲和力 T 细胞上的显著表达的全面生物结果的可能性不大。在这点上, Hsp60sp 肽可代表 B 型 Qa-1 结合肽的一个例子,该结合肽能够与 Qdm 或跟 Qdm 相似的 A 型肽竞争来占有 Qa-1 率,并可用于具体目标结构。这里所提供的研究不排除其它与 Hsp60sp 相似的肽存在的可能,与 Hsp60sp 相似的肽作为 Qa-1 调节性 CD8⁺T 细胞。

[0273] 遵守以下标准来识别其他相关 Qa-1/HLA-E 结合单体序列:

[0274] 1) 肽必须包含显著的锚定残基,该锚定残基在 P9 上含有白细胞 (Leu),并在 P2 上有一个白细胞或蛋氨酸 (Met)。据了解,这些锚定对 Qa-1/HLA-E 结合 (158, 159) 起至关重要的作用;和

[0275] 2) 在真核蛋白酶体的三个主要催化活性的基础上,肽必须能够由蛋白酶体复合体通过解肽作用产生 (160)。

[0276] 功能性确定和表征提供对 CD8⁺T 细胞下调敏感的激活的 T 细胞的 Qa-1/HLA-E 结合肽的分析系统的步骤如下:

[0277] 1) 肽结合到 Qa-1/HLA-E 的能力通过测试用于稳定 Qa-1 转染子上的 Qa-1/HLA-E 表面表达的 Qa-1/HLA-E 结合肽来确定;

[0278] 2) 肽不能与 CD94/NKG2A 受体结合,从而在标准 NK 分析中抑制 NK 活性。

[0279] 3) B 型 Qa-1 结合肽通过肽竞争与 Qdm 或与 Qdm 相似的 A 型肽竞争 Qa-1 结合或与 B7sp 竞争 HLA-E 结合的能力,例如,在一个标准的 NK 分析中;

[0280] 4) 在 CD8⁺T 细胞抑制试验中确定提供对 CD8⁺T 细胞下调敏感的 Qa-1⁺ 细胞的肽。

[0281] 候选 Qa-1/HLA-E B 型肽应满足以上两个结构要求以及四个功能要求之一或者两者。

[0282] 在最近的研究中,还观察到:当在标准 T 细胞培养条件下用 1 μM-50 μM 的不同剂

量抗原 HEL 激活同样的克隆时, H/M/Qa-1 蛋白指数之间并没有显著差别 (图 5)。该观察结果表明: 在提供相对恒定联合刺激的环境中, 采用各种不同的抗原剂量激活 T 细胞, T 细胞活性的生物结果和 Qa-1/Hsp60sp 相对 Qa-1/Qdm 的差异表达显著依赖于 T 细胞上 TCR 的亲合力。在所提供抗原的生物学范围之内, 激活的 T 细胞上由 TCR 亲合力决定的外围 T 细胞活性结果的变体在活体中可能非常有限, 因为在外围 TCR 布置胸腺挑选过程中身体变高很罕见 (22)。然而, 非常高和非常低剂量的抗原和联合刺激强度和期限的突然改变到达何种程度时, 才会影响带固定 TCR 抗体亲抗原性的 T 细胞活性的特殊生物学结果 (表达在每个 T 细胞上的集中度和密度) 未知。

[0283] 该目标结构的处理可成为特别强化或阻碍活体内 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞介导调节的治疗介入的依据。在这方面, 对人体使用该类介入是以 Qa-1 的人体同源物 HLA-E 可作为人体调节性 CD8⁺T 细胞的限制元素这个证据为基础的。

[0284] 因为 Qa-1/HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞的轨迹中心地涉及到免疫反应的调节, 加强或抑制该轨迹的方法可用来治疗或预防自身免疫疾病、过敏和移植物排异, 也可用来增强有效的抗感染的免疫。由于本文中已经鉴别了负责提供对 CD8⁺T 细胞引起的下调敏感的被激活的 T 细胞, 载有 Qa-1 结合肽、Qa-1 或 HLA-E 携带性胞外体可用来激活活体中的该轨迹 (161)。在这点上, 人们注意到由树突细胞派生的胞外体可用作肽基疫苗, 这些胞外体含有可以装载合成肽的功能 MHC 的一级和二级分子。或者由 Qa-1/ 自身肽或 HLA-E/ 自身肽构成的分子设计的复合体也可用作专门激活 Qa-1/HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞的抗原。在这点上, 众所周知, MHC 多聚体可作为免疫反应中抗原特异性 T 细胞的刺激和分析的重要工具。免疫反应为合成抗原呈递细胞中的一部分 (162-167)。

[0285] 另一方面, 在肿瘤生成过程中, Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞介导路径也可能会对引起抗药性起主要作用。因此, 对某些肿瘤病人, 通过阻碍 CD8⁺T 细胞介导调节路径来解救中等亲和性 / 亲合力抗肿瘤 T 细胞, 和其它治疗方法一起, 可能会是必须的抗肿瘤的治疗方法。同样, 在这里, 也包含阻碍 HLA-E 路径。另外, 在对某些艾滋病病人的 AIDS 病毒进行有效控制之后, CD4⁺T 细胞的量也会减少。一个解释是: Qa-1/HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞介导路径, 一个在普通个体内会自动地减少以控制的致病的自身免疫路径, 在这些艾滋病病人中可能起主要作用。若此路径不可抵抗地作用于某些艾滋病病人, 调整的 CD8⁺T 细胞可能会持续地杀死新生成的 CD4⁺T 细胞, 而不管这些 CD4⁺T 细胞是否被 HIV 感染。因此, 这可能会通过特定的阻塞 Qa-1/HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞介导路径来提供一个治疗的渠道。阻碍 CD8⁺T 细胞介导调整路径可能对有效控制 HIV 感染后预防某些艾滋病病人的 CD4⁺T 细胞持续减少也是必要的。

[0286] 在这点上, 特定的目标结构例如 Qa-1/Hsp60sp, 在某些肿瘤病人身上的抗肿瘤的 T 细胞或调节的 CD8⁺T 细胞上的 TCR 明确辨别的某些艾滋病病人的新生成的 CD4⁺T 细胞的表现可能会有差别。因此, 可以使用能明确识别目标 T 细胞表现的目标结构单株抗体 (mAb) 如 HSP60sp 复合体来阻碍活体内的调节路径。

[0287] 将 mAb-Qa-1a/Hsp60sp 复合体或 HLA-E 对应物可作为生成此种类型的 mAb 的实例来使用。在技术层面上, 一个稳定的 Qa-1a 转染子 J2 已建立, 此转染子在被动地承载着 Qa-1 结合肽 Qdm 或 Hsp60sp 时, 显示出一个相对较高的 Qa-1 水平。已经证实在人类研究中, 联合将 Hsp60sp 编码序列转移到 HLA-E 转染子中会产生稳定的 HLA-E 表面表达 (168)。

为了确保 Qa-1 表面表达的高水平以及作为“免疫原”对动物进行免疫的更加有效的作用,我们计划建立一个额外的 Qa-1 (HLA-E) 转染子,此转染子可共同表达 Qa-1 和 Hsp60 信号肽 (J2a)。此转染子可用于对老鼠进行免疫,以生成可以鉴定与 Hsp60sp 结合在一起的细胞表面表达的 Qa-1 抗血清。编码重新结合的 Qa-1a/Hsp60sp 分子的构造通过 PRC 方法用编码 HSP-60sp 核苷酸序列的核苷酸肽序列 (5' -catctagaggatggttgcttcaaatgcgcccggtcagccg cgctctcagcgcca-3') (SEQ ID NO :3) 替换 Qa-1a 分子的 +10 到 +36 的前导核苷酸序列来生成 (169)。在用 Xba I 和 EcoR V 消解后,将生成的核苷酸序列亚克隆到 Prk-5-C-GFP 哺乳动物的表达载体。在由 DNA 序列确认后,此结构将会转染成 C1R 细胞株。如所述,Qa-1a 复合体的表面表达将采用描述的 Qa-1a 特定抗血清通过 FACS 检测。另外,如所述,J2 细胞将用 pEGFP-N3 表达载体中 Hsp60sp 的 DNA 编码序列转染 (168)。

[0288] 为了生成抗 Qa-1a 抗血清,将以 2×10^6 / 老鼠静脉注射 J2a (Qa-1/Hsp60sp) 细胞来接种 Ba1b/C 老鼠。然后老鼠会通过每两个周一次的 2×10^6 J2 细胞 IP 注射刺激 4 次。对血清的承载 Hsp60sp 的着色 J2 或 Qa-1/Hsp60sp 表达 J2a 转染子和 / 或 Qa-1a 表达鼠科的 T 细胞克隆 AE10 进行测试。抗 Qa-1a 血清将会通过用 Qa-1 转染子共同表达的 Hsp60sp 免疫动物生成。然后,从高级别老鼠身上提取的脾脏细胞将会用于与融合伙伴 SP2/0 细胞核融合并在成功融合之后在 96 孔板内限稀释克隆。

[0289] 从每个孔板中提取的上清液将会通过带有上清液的着色 J2a 和 C1R 细胞差异筛选,然后进行 ELISA 化验 (170)。简而言之, 5×10^4 J2a 转染子和 C1R 细胞将会涂到平底 96 孔板中,而在加入上清液以阻断由 J2a 转染子上的不包括 Qa-1a/Hsp60sp 的 C1R 和 J2a 细胞表达的抗原决定簇之前,将兔子的抗 C1R 抗血清 (Pocono Rabbit Farm and Laboratory INC. Canadensis, PA) 添加到每个孔板中。孔板将会被清洗干净,然后往孔内加入上清液,接着加入 HRP 标记的兔子抗老鼠 IgG。往每个孔板中加入 TMB 基质,培养 10-15 分钟,通过加入 $2N H_2SO_4$ 停止反应。通过使用 96 孔板光吸收检测仪 (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 来确定吸收率。

[0290] 着色的阳性对照将会成为抗 Qa-1a 血清。装有仅对 J2a 而不是 C1R 阳性的上清液的孔板将会被选择用于进一步的亚克隆。我实验室已在之前成功采用了生产这些 mAb 的通用方法对 mAb、CD40L 和 VLA-1 进行识别 (171、172)。

[0291] 材料和方法

[0292] 实时 PCR

[0293] 使用 RNEasy 系统 (Promega) 分离 RNA。使用 AMV 逆转录酶 (Promega) 和 LightCyclerFaststar™ DNA Master SYBR Green I 系统在 Roche Light Cycler (Roche, Indianapolis, IN) 上进行逆转录和实时 PCR。循环参数为 $95^\circ C, 10min$ 变性; $55-61^\circ C$ (H-2D^d 为 $55^\circ C$, Qa-1b 为 $59^\circ C$, Hsp60 为 $61^\circ C$) 时, $95^\circ C, 10s$; $72^\circ C$ 时, $8sec$; $13s$ 到 $20s$ (Hsp 60 和 Qa-1b 为 $13s$, H-2D^d 为 $20s$) $\times 40$ 个周期。PCR 引物: Qa-1b 正向, CCCAGAGTAGCCCACACTCGCTGCGGT (SEQ ID NO :5), 反向, CCCGAGGCTCCATCCTCGGATTT (SEQ ID NO :6), mHsp60 正向, GGGATGGCACCACACTGCCACTGTT (SEQ ID NO :7), 反向, TCCATGGTGCTAGCCATATGC (SEQ ID NO :8), H-2Dd 正向, GGGCGATGGCTCCGCGCAGCTGCTCCTGCTCCTGCT (SEQ ID NO :9), 反向, CCGTGTGTCCACGTAGCCGACTTCCATGT (SEQ ID NO :10)。

[0294] SDS-PAGE 以及免疫印迹分析

[0295] 按照标准程序进行 SDS-PAGE 和免疫印迹法。使用的 Ab :抗 actin、抗 Hsp60、抗 MHCClass Ia(H-2D^d) 和抗 Qa-1b,以及二类 Ab 兔抗小鼠或兔抗小鼠 HRP。使用 ECL 检测试剂 (Amersham Biosciences) 检测目标蛋白质。使用 ChemiDoc XRS 成像器数量 1-4.50. 软件 (Bio-rad) 从密度上将所有印迹量化。

[0296] Qa-1a 转染子和 T 细胞克隆

[0297] 通过使用以下引物 :正向,

[0298] CATGGTGAGGATGTTGCTTTTTGCCCACTTGCTCCAGCTGCTGGTCAGCG (SEQ ID NO :10), 和反向, AGAACATGAGCATAGCATCCTT (SEQ ID NO :11), 逆转录聚合酶链反应, 将 cDNA 编码全长 Qa-1a 与 B10PL 小鼠的 T 细胞分离开。将 Qa-1a cDNA 亚克隆为哺乳动物的表达载体 pCDNA3.1 (Invitrogen), 并且通过电穿孔 (Gene-PuIserTM, Biorad) 转录为人类 B 细胞系 C1R, 随后根据 G418 选择 (Invitrogen Life Technologies), 通过限制稀释将稳定转染的克隆分离开。

[0299] Qa-1 结合测定

[0300] 利用已知的 Qa-1 结合肽装载后, 测定通过 RT-PCR 检测的选定 Qa-1a-PcDNA31 正转染子的 Qa-1 表面表达。简言之, 在 26°C 下, 将 Qa-1a 转染子和 Hsp60sp 或 Qdm 肽一起培养大约 18 小时 (10, 12 和 17)。通过依次利用抗 Qa-1a 血浆、Phycoerythorine (PE) 羊抗小鼠 Ig 染色测定 Qa-1a 的表面表达, 在 FACScan 流动血细胞计数器和 CellQuestTM 软件 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 上进行分析。所有肽使用 50 μ M, 除非另有特殊规定。

[0301] NK 测定

[0302] 按常规从 B10PL 小鼠建立 NK 细胞系 (24)。利用测试肽在 26°C 下装载没有标记的 3F4 细胞整夜, 并且与相同数量的不易被小鼠 NK 细胞杀伤的 CFSE 标记的人类 EBV 转化 LCL 细胞混合。将分级数的鼠 NK 细胞加入 3F4 与 LCL 的混合物并且在 37°C 温度下进一步孵化 2 小时。没有使用肽装载或使用非 Qa-1 结合肽装载的 3F4 细胞作为对照。然后用抗小鼠 H-2UmAb 3-8-3P-PE 对细胞混合物进行染色, 以便区别 NK 细胞和目标细胞。通过 FACS (1) 检测存在或缺少 NK 细胞下每组中的 3F4 和 LCL 细胞之比的变化反映出特异性 NK 杀伤 : % 特异性杀伤 = { [对照孔 (无 NK) 中的杀伤率 - 实验孔 (有 NK) 中的杀伤率] / 对照孔的杀伤率 } × 100%。

[0303] 肽竞争测定

[0304] 肽卸载的 3F4 细胞显示出对 NK 杀伤的高敏感度 (E/T 比为 2 : 1), 并且用作肽竞争测定的阳性对照组。利用对 NK 杀伤有抵抗作用的 Qd (20 μ M) 装载的 3F4 细胞, 用作竞争的目标。在 26°C 条件下, 将 50, 100, 200 μ M 的竞争肽 (Hsp60sp 或对照非 Qa-1 结合肽) 与 20 μ M Qdm 一同加入 3F4 细胞, 维持 18 小时。将相同数量的 CFSE 标记的 LCL 细胞与 3F4 细胞混合, 然后, 将 NK 细胞增加到加载肽的 3F4 细胞和 LCL 细胞的肽混合物中。估算 3F4 细胞的 NK 杀伤百分数。在可以有效地与 Qdm 竞争占用 Qa-1 但不与 CD94/NKG2A 相互作用的肽存在下, 在 Qdm 存在下被 NK 细胞取消 3F4 目标细胞溶解的抑制用作有效竞争的功能参数。

[0305] CD8⁺T 细胞抑制测定

[0306] 利用 CD8MACS 磁珠 (Miltenyibiotec, Inc. Auburn CA) 净化 CD8⁺T 细胞 (1)。26°C 下将 3F4 细胞被动加载肽。将等量载有肽的未标记 3F4 细胞和未载有肽的 CFSE 标记的 3F4

细胞混合,并加入分级数的 CD8⁺T 细胞加到目标中。来自幼鼠的 CD8⁺T 细胞用作对照组并且确认这些这些 CD8⁺T 细胞对激活的目标 T 细胞没有影响。四天后,利用抗小鼠 CD8-PE mAb 对细胞混合物染色,以便区别 CD8⁺T 细胞和目标细胞。将存在 CD8⁺T 细胞下装载肽的(非 CFSE 标记的)3F4 细胞和未负载的(CFSE 标记的)肽之比为特异性抑制%:[控制组(没有 CD8⁺T 细胞)中负载的与未负载之比-实验组(有 CD8⁺T 细胞)]中的比例/控制组中的比例}×100%(1)。

[0307] 在 EAE 模型中用载有 Qa-1 结合肽的树突细胞 (DC) 接种动物

[0308] 按照 (25) 所述,衍生自骨髓的 DC 来自于 B10PL 小鼠。在第 6 天,通过细胞表面染色评估,这些 DC 常规地表达在其表面上的 Qa-1,但是为 CD8 阴性的。第 6 天,在 37℃ 温度下,用 50 μM 的 Hsp60sp 或 Qdm 装载 DC 2 小时。然后用 50ml PBS 冲洗细胞一次,并且在 EAE 诱导至少一周之前,通过静脉注射,按照 1×10⁶ 细胞/小鼠将细胞注入首次用作实验 B10PL 小鼠。

[0309] 讨论

[0310] 自我/非自我的辨别能力的亲和力模型

[0311] 本文中提出的结果支持自我/非自我的辨别能力的“亲和力模型”,其可以通过中心胸腺选择和外周免疫调节得到。连接这两个事件的概念框架是:理解在胸腺和外周中 T 细胞的生存或灭亡取决于 T 细胞上的 TCR(具体到任何抗原)和由 APC 表达的 MHC/抗原肽之间的亲和力。

[0312] 设想在适应性免疫阶段,不是通过确认自体抗原和异体抗原之间的结构差异,而是通过感应 T 细胞激活的亲和力,免疫系统获得自我/非自我辨别能力的目的。高亲和力自我反应 T 细胞克隆的胸腺内清除可以产生仅由中低级亲和力克隆组成的截短的外周自我反应谱,但是与还包含高亲和力克隆的异体反应谱相比,缺乏高亲和力克隆。

[0313] 外周存在中级亲和力自我反应 T 细胞表示每个个体中致病的自身免疫的潜在危险,因为潜在的致病自我反应 T 细胞包括在一组中级亲和力 T 细胞中,并且通常可以通过“危险信号”激活功能,引出自身免疫病。自体抗原和异体抗原的外周 T 细胞谱的独特成分为免疫系统提供了难得的机会,通过选择性下调自体抗原和异体抗原的中级亲和力 T 细胞数量,区分外周细胞中的自体抗原和异体抗原。包含潜在的致病自我反应 T 细胞的中级亲和力 T 细胞数量的选择性下调,提供了在不损害有效防感染免疫的情况下,其在很大程度上通过感染病原菌独有的高亲和力 T 细胞介导,专门控制自身免疫病的机理。在这方面,最新显示调整性 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞选择性地下调中级亲和力 T 细胞,对于自体抗原和异体抗原而言,并且因此,专门使自身免疫衰减但仍然可以优化对异体抗原的免疫反应。通过的 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞上的 TCR 对具体 Qa-1/自身肽复合体的独特识别来实现,所述 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞对于所有抗原而言,用作在激活的中级亲和力 T 细胞上表达的标记,从而专门作文下调的目标。

[0314] 因此,为了维持,该调节路径代表免疫系统进化以完成通过胸腺阴性选择有缺陷地得到的自我/非自我识别从而来维持自身耐受性的外周机理的一个例子。

[0315] 本文中描述的“亲和力模型”结合了胸腺阴性选择的概念,“可调激活阈值假设”以及“危险模型”来了解在适应性免疫期间,免疫系统是怎样获得自我/非自我识别的。提供了统一且简单的规范解释免疫紊乱遗传存在的各种看似无关的、不能通过任何现存的规范

进行统一解释的生物医学问题。

[0316] 在我们对外周 T 细胞调节的了解上的亲和力模型的概念框架含意

[0317] 1. “亲和力模型”提出调节特性并不处于激活目标 T 细胞的抗原水平上。特性处于识别或感应 T 细胞激活的一般后果, 不管目标 T 细胞是由哪个抗原激活的。因此, 它与“特应模型”(103) 不同, 其用于通过识别从 T 细胞受体或者激活的 T 或 B 细胞产生的免疫球蛋白的 V 区域派生的无数特应肽, 来区分每个个体抗原的免疫反应 (104-106)。与此相反, “亲和力模型”的用于通过识别并区分 T 细胞上任何抗原特有的 TCR 与由 APC (42, 43) 表达的 MHC/ 抗原肽之间亲和力相互作用确定的免疫反应的两类结果, 来区别免疫反应。从概念上讲, “亲和力模型”具有“ergotypic 调节”的某些元素, 在于两种类型的调节都可以识别 T 细胞激活的结果。但是, 它也与“ergotypic 调节”不同, 因为“ergotypic 调节”没有考虑激活 T 细胞相互作用的亲和力 (107-108)。因此, “亲和力模型”代表了使免疫系统可以利用足够特性但是没有要求调节 T 细胞的大量谱来控制外周免疫性的一般供选方法。比如, 在 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞路径中, CD8⁺T 识别的实际目标结构很有可能是由 Qa-1 表达, 在目标 T 细胞上由于 T 细胞激活而表达不同的某种自身肽。由于而自身肽结合通过负责提供对 CD8⁺T 细胞引起的下调敏感的 Qa-1 的多样性有限, 模型可以使免疫系统调节免疫反应, 以有效且简单的方式无限放大不同的自体 and 异体抗原。

[0318] 2. 模型预测出免疫系统采用统一的抑制机制调节对自体 and 异体抗原的外周免疫反应, 看来似乎具有相反效果: 对“自体抗原”具有耐受性从而促进对“异体抗原”的 T 细胞亲和力成熟。因为由于胸腺阴性选择, 自体 and 异体抗原的原初外周 TCR 谱的成分不同, 对自体 and 异体抗原的中级亲和力 T 细胞的选择性下调的生物学结果同样不同 (42, 43) (见图 10)。这就形成了新规范的概念结构, 以在生物系统水平上, 解释不必在 T 细胞调节水平上区分外周中自我和非自我的情况下, 免疫系统是怎样在适应性免疫期间达到自我 / 非自我识别的目的。

[0319] 3. “亲和力模型”的概念框架同样可以适用于其他外周调节路径, 比如“专门的 CD4⁺Treg”。这些 CD4⁺Treg 可以通过非特定调节自身免疫反应的程度和级别 (26, 27) 或通过识别自我和非自我, 来控制外周致病自身免疫。可以想象至少某一子集的 CD4⁺Treg 可以像 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞那样, 通过下调已激活的中级亲和力 T 细胞进行自我 / 非自我识别, 但是采用不同的识别和效应机理。

[0320] 在胸腺阴性选择期间得到的自我 / 非自我识别确定了在外周如何调节适应性免疫以便维持自身耐受性。

[0321] a. 免疫系统可以通过感应不同亲和力 T 细胞激活的结果, 而不是识别自我和非自我识别之间的结构差异, 来区分自我和非自我。

[0322] 不像免疫系统在先天免疫期间为区分自我和非自我而采用的机理那样 (28-30), 免疫系统似乎利用完全不同的方法在适应性免疫期间在胸腺和外周进行自我和非自我区分。基本问题就是“免疫系统是否能够通过区分什么是自我识别以及什么是非自我识别来区分自我和非自我? ”。可以想象由于在胎儿期间出现的异体抗原被视为自体抗原 (44, 45), 免疫系统在胸腺阴性选择期间之间并不“知道”自体抗原和异体抗原的独特结构的差异。

[0323] 而且, 免疫系统并不“知道”在外周 T 细胞调节水平上自体抗原和异体抗原对 T 细

胞免疫反应之间的差异。比如, Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞通过选择性下调中级亲和力的激活的 T 细胞来调节对自体抗原和异体抗原的外周免疫响应, 不管目标 T 细胞是由哪个抗原激活的 (43)。

[0324] 看来, 免疫系统用于达到自我 / 非自我识别的一个主要机理就是在发展的不同阶段, 区别感知对胸腺和外周内的响应任何抗原的 T 细胞相互作用的亲和力。在胸腺中, 通过消除高亲和力 T 细胞免疫系统负向选择中级和低级亲和力 T 细胞 (33-35), 然而, 在外周中, 通过消除中级亲和力 T 细胞负向选择高级和低级亲和力 T 细胞 (42, 43)。通过允许这些细胞在胸腺和外周负向选择中存活, 低级亲和力自我反应的 T 细胞的保存在生物学上十分重要。不只是因为对自我 MHC 的低级亲和力是通过胸腺正向选择得到 T 细胞反应的 MHC 限制的重要要求, 而且取决于由于他们的 TCR (111) 的充足可塑性, 这些低级亲和力自我反应 T 细胞可能对异体抗原 (47, 109, 110) 的高级或中级亲和力的事实。这些低级亲和力自我反应 T 细胞被视为外周中 (43) 异体谱的实验群。

[0325] b. 中级亲和力自我反应 T 细胞为什么会逃出胸腺负向选择, 并且是怎样逃出胸腺负向选择的?

[0326] 胸腺中胸腺细胞的激活状态对胸腺选择十分重要, 其由两个主要参数决定: TCR 的亲和力以及存在的自体抗原 (36, 37, 112) 的水平。胸腺细胞的亲和力由通过 VDJ 重组产生的结构以及表示的 TCR 的密度决定的 TCR 的亲和力确定。胸腺中存在的自体抗原的水平由 APC (113) 表面上表达的 MHC / 自我肽复合物的数量和亲和力确定, 可能受到循环中细胞外抗原的浓度、胸腺 APC 中细胞内抗原的表达以及 APC 处理并表达自体抗原的能力的影响。总之, 抗原的高水平表达有助于具有覆盖整个高级和中级范围的大部分的宽亲和力频谱的激活胸腺细胞。相反, 抗原的低水平表达会仅激活高亲和力的胸腺细胞。抗原的中级水平表达可能激活具有高级和中级亲和力的一部分的胸腺细胞 (37, 114-116) (见图 11)。

[0327] 必须在胸腺中阴性选择每个个体胸腺细胞, 确保免疫系统对实际上所有异体抗原做出响应但避免对外周中自体抗原的有害响应。原则上, 可以通过识别可以代表胸腺 (118, 119) 中所有外周自体抗原的一个或一组“一般”肽, 或者通过“察看”胸腺中表达的实际外周、组织限制性或年龄依赖性自体抗原, 或者通过两者结合, 完成胸腺细胞的教育过程。自身免疫调节 (自身免疫调节因子) 基因 (120, 121) 的发现为后者假设提供第一个直接证据。因此, 自身免疫调节因子, 作为转录因子, 从胸腺 (122, 123) 中的骨髓上皮细胞内的一套特殊的器官促进外周限制组织的抗原的异位表达, 并且同样可以强化这些细胞 (124) 的抗原表达能力。不清楚“自身免疫调节因子”是否是独立的唯一事件或者是否可以代表控制胸腺内所有可表达的外周自体抗原表达和呈现的一类基因的例子。尽管如此, 自身免疫因子的发现可以预测, 在自身免疫因子或类似基因的其他尚未确认的自身免疫因子的控制下, 胸腺 APC 表达并呈现在胸腺阴性选择期间胸腺细胞不能接近的整组外周组织限制性或年龄依赖性自体抗原。

[0328] 不管是怎样通过胸腺细胞“查看”外周自体抗原的, 胸腺负向选择已经进化到删除所有在外周中可能被功能性激活的自身反应性 T 细胞, 以消除致病自身免疫的任何“紧急危险”。这可以通过胸腺中比外周 (125) 中更高水平的自体抗原水平或者通过胸腺中死亡的胸腺细胞比外周 (35) 中这些细胞的激活功能更低或更少的“紧急的”激活状态的阈值来获得。因此, 可以通过外周中内源性自体抗原功能性地激活的自身反应性 T 细胞可以确保

在胸腺中激活以进行调亡或者被删除。由于自体抗原呈现不充分而没有在胸腺中得到充分激活并逃离胸腺阴性选择的自身反应性 T 细胞可能出于同样的原因可能没有通过内源性自体抗原在外周中被功能性地激活。另外,“可调激活阈值机制”可以使胸腺逃逸“忽视”重复并且连续呈现在外周中的内源性自身配合基 (36,37)。所以,在生物科学的正常环境下,外周中可能没有致病自身免疫,除非系统受到诸如主动浸染或受伤期间产生的“危险信号”(38,39) 的干扰。

[0329] 另一方面,胸腺阴性选择同样得到进化,提供具有足够尺寸且灵活性最大的外周 T 细胞库,从而能够对外来抗原进行有效的响应。因此,必须在胸腺阴性选择过程中建立胸腺细胞的激活阈值,从而确定激活等级,容许发生调亡性细胞死亡的现象。免疫系统采用自身抗原作为建立此阈值的标准。总之,必须去除以任何水平出现的自身抗原所特有的高亲和性胸腺细胞,并保留能够在基线或极低水平激活的,以任何水平出现的自身抗原所特有的低亲和性胸腺细胞。弹性区将为中级亲和性的自身反应性胸腺细胞。因此,将去除以高水平出现的自身抗原所特有的中亲和性胸腺细胞,而保留低级别自身抗原所特有的中亲和性胸腺细胞。图 11 中,低 TCR 亲和性高端与存在抗原最高生物水平的交叉点与高 TCR 亲和性低端与存在抗原最低水平的交叉点之间的画线代表激活状态的假设阈值。超过此阈值后的激活状态的胸腺细胞经历细胞调亡,低于阈值的激活状态下的胸腺细胞免于调亡。因此,逃过胸腺阴性选择是所有的低亲和性胸腺细胞,和至少半数的中亲和性胸腺细胞,这是中到高级范围内的低水平自身抗原所特有的。

[0330] 在这一点上必须考虑的第三参数为共刺激分子、细胞因子、趋化因子、整联蛋白及在 T 细胞激活中所涉及的各自受体带来的影响 (126,127)。当前并无可用信息对胸腺细胞以及相对应的周围内的分子之间的功能关系进行评定。关于此点,我们的基本观点遵循同一主题。原则上讲,涉及激活的分子间互作用,例如 CTLA-4/B7 和 CD40/CD40L,在胸腺细胞中可能较周围高或至少与之相当,而涉及失活的分子间相互作用,如 CTLA-4/B7 在胸腺细胞中可能较周围低或与之相同。将这些分子定义为影响胸腺细胞激活状态的独立参数的基本原理是基于考虑到控制这些信号要比控制周围免疫反应过程中 TCR 亲和性以及存在抗原级别更可行。已知前者通过 TCR VDJ 的重新调整 (128-131) 相对固定,而后者通常为引起免疫性疾病的主要原因。因此此类第三参数为实际提高或阻碍用于治疗目的的某种周围免疫反应提供了潜在的窗口,但代价将是此类疗法对常规现有免疫反应的非特异性影响。

[0331] 总体而言,认为自我 / 非自我辨别是一个涉及胸腺阴性选择以及外周免疫调节的连续过程的观点需要弄清这两个一般事件是如何相联系的。“亲和力模型”为理解胸腺阴性选择与周围免疫调之间联系的生理需要提供了统一的概念框架。这两个事件之间的物理连接在于释放到周围的中亲和性自身反应性 T 细胞释放到外周的事实,其可能含有致病自身反应性 T 细胞 (40,41) 的事实,属于胸腺阴性选择的生物性结果,必须采用外周调节机制处理。

[0332] c. 从胸腺阴性选择中释放,并在周围激活的中亲和性自身反应性 T 细胞是否能够提高亲和性从而逃过外周下调呢?

[0333] 针对自身以及外来抗原的周围 T 细胞库特殊程度为免疫系统提供了一个独特的机会,通过对中亲和性 T 细胞有选择性地下调区别自身及外来抗原,从而区别外周内的自我 / 非自我。

[0334] 对含有潜在致病性自身反应性 T 细胞的中亲和性 T 细胞群进行选择性地下调是免疫系统专门为控制自身免疫疾病,避免损坏有效的抗感染免疫力的机制,而这很大程度上是通过针对感染性病原体的高亲和性 T 细胞进行调节的。Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞途径代表此类型的一种机制。此类机制需要解决的问题在于其是否能够对中亲和性 T 细胞(可能在周围激活后增加亲和性,并能够逃避周围下调)引起的致病性自体免疫进行强有力的控制。关于此点,Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞途径已经显示出固有的足够灵活性,以专门解决当在外周中被激活时中亲和性 T 细胞可能增加亲和性的问题。

[0335] 首先显示出 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞对大范围抗原剂量(43)激活的中亲和性 T 细胞进行了下调。因此提出调节窗口可能覆盖抗原呈递的生理学相关级别范围内激活的中亲和性 T 细胞,特别是当抗原呈递等级由低移向中级,或从中级至中高级时(图 12)。而关于此点一个重要的控制因素是在 TCRs 后胸腺选择中不存在体细胞高频突变,其在自身反应性 T 细胞可在外周中激活时有效地限制自反应 T 细胞亲和性提高的程度(128-130)。变量将是自体抗原的浓度以及 APC 表达自体抗原的能力,其主要受所涉共刺激分子的功能阶段影响。可能存在小尾区,被原本亲和性相对较低,且只能被表达高级抗原功能激活并推出调节窗口的 T 细胞所占据。由于落入小尾区的 T 细胞只能由高水平(接近最高生物限制)抗原表达功能激活,抗原表达水平向更高范围移动的空间很小。因此,将尾区推出调节窗口的因素仅在特列环境中出现,或很少出现,例如在免疫治疗过程中引起的极强效的共刺激(见下文)。原则上,在感染或受伤过程中所需增加的中亲和性 T 细胞亲和性将不会将此类 T 细胞推出外周调节窗口。

[0336] 第二,胸腺中凋亡细胞的胸腺细胞激活状态的下限与外周下调的 T 细胞激活状态上限之间存在重叠区,能对自体耐受性进行保护。在分析 HELTG 以及 WT 型鼠体内的 HEL- 反应细胞库时观察到,带有常规标准 TCRV β 基序 GTGQ 的 HEL 反应克隆容易受到周围 CD8⁺T 细胞(43)下调的影响。有趣的是尽管 GTGQ 基序频繁出现在 WT 型鼠的 HEL- 反应细胞库(HEL 用作外来抗原(43))内,但此基序从未在 HEL 作为自身抗原时在 HEL TG 鼠体内的 HEL- 反应细胞库内发现(未发表的观察)。这一观察显示带有 GTGQ 基序的克隆为自反应,且在胸腺阴性选择中被去除。由于 ED50 测得的,带有 GTGQ 基序的实际 T 细胞的亲和性为 3 μ M(43),则将在胸腺内去除的 HEL 反映胸腺细胞激活状态的亲和性下限可能至少是 3 μ M 或更低。另一方面,已经证明通过 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞进行的 HEL 反应性克隆的外周下调的亲和性上限高于 1 μ M(43)。因此,这些观察表明胸腺细胞在胸腺阴性选择过程中凋亡的亲和性下限可能远远低于外周 T 细胞调节时 T 细胞激活状态的亲和性上限。这在外周造成了胸腺细胞内凋亡(容许中亲和性 T 细胞逃逸进入外周)时胸腺细胞激活状态的下限与下调时 T 细胞激活状态的上限之间的重叠区(图 13)。此类重合区的存在对理解胸腺选择与外周调节之间的功能关系来说很重要。例如,如果在胸腺阴性选择中逃逸的中亲和性自身反应性 T 细胞在外周激活,则尽管这些克隆可能会增加亲和性,但也不可能通过重叠区域逃过外周下调。因此,重叠区在上述调节窗口的充分弹性基础上复提供第二级别保护来保持周围自身免疫耐受性。但可能存在例外情况,如自身反应性 T 细胞不仅推出调节窗口,同时也因为极强的共刺激使得这些克隆逃避外周下调进而超过重叠区的上限。这些情况在免疫疗法(如肿瘤疫苗疗法中的防 CTLA-4 疗法)过程中可能出现以控制共刺激途径,并为肿瘤控制与器官特异性致病自体免疫增加的趋势的反向关系提供了可能的解释(132-134)。总之,重

叠调节区内的 T 细胞克隆将主要为体外反应的,且在胸腺细胞阴性选择过程中亲和性原本接近于下限,但在外周偶然激活时亲和性增加的自身反应性克隆很少。

[0337] d. 自我 / 非自我的辨别以及自身免疫疾病

[0338] 基于“亲和力模型”概念框架,处于中心或周围等级的自我 / 非自我辨别会引起周围特性鲜明的致病自身免疫。

[0339] 中心胸腺选择失败时形成自身免疫疾病

[0340] 胸腺中主要涉及胸腺阴性选择的基因或控制一般稳态的基因的缺陷会导致多器官中表现的一系列自身抗原特有的高亲和性自反应 T 细胞从胸腺内释放。这些高亲和性自身反应性 T 细胞功能可以被以任何水平存在的,且在外围具有生物可用性的内源性抗原激活。不同程度的极中性以及全局性自身免疫作为周围高亲和性自身反应性 T 细胞的直接结果产生,例如 1 型自身免疫多腺综合症 (APECED) 中的症状 (95) 或自身免疫调节因子缺失的老鼠 (121, 135)。总之,由于胸腺阴性选择 (通常无基因缺陷) 失败引起的致病自身免疫在早期自然发展,并揭示出影响多个器官的非常完整的扩散性自身免疫。

[0341] 由于释放高亲和性自身反应性 T 细胞引起的胸腺隐形选择失败的一个结果是形成自身反应性 T 细胞库,其成分与外来反应细胞库不可区分。细胞库调节机制不可能为解决此类罕见的基因缺陷而进行进化,因为这需要对自身和外来抗原特有的高亲和性 T 细胞进行辨别的机制,并且当前并没有对解决此类问题进行假设。然而,控制免疫反应大小和级别的内在机制如 Th1 以及 Th2 或 Tr1、Tr3 细胞可能在克服胸腺阴性选择 (27) 引起的整体致病性自身免疫进行非特异改进时扮演重要的角色。

[0342] “危险信号”及外周调节在器官特异性自身免疫疾病的发展及控制方面起着重要作用

[0343] 另一方面,由于胸腺阴性选择,周围 T 细胞库由中、低亲和性自身反应性 T 细胞组成。如上所述,低亲和性自身反应性 T 细胞是无害的,并构成针对外来抗原的初周围 T 细胞库的主要部分。关于中亲和性自身反应性 T 细胞属于自然形成周围 T 细胞库的一部分的事实具有重要的生物学意义,因为它代表着每个人本身固有的致病自身免疫潜在危险。总之,不能在胸腺中进行足够激活的中亲和性自反应 T 细胞由于自身抗原呈现不足将同样不能在周围进行功能激活 (36, 37),除非遇到专业 APC 以足够高的水平呈现的自身肽。自身肽的足够呈现可能在感染源及自身抗原 (136, 137) 之间的分子模拟引起特定感染时或由不相关的感染或伤害引起大量自身抗原,一种“危险信号”从发炎处受损细胞释放时在周围产生。另外,由于释放某种细胞激素引起的专业 APC 上的共刺激或 MHC 分子的表现增加,如来自感染处的 γ -INF 同样在中粘合性自反应 T 细胞的意外激活中起着重要作用。由于感染或受损通常限制在感染器官的内部,因此由此类损伤所引起的,来自于生物常规周围 T 细胞库的自体免疫很可能是器官所特有的。

[0344] 由于潜在致病自反应 T 细胞包含在中亲和性自反应 T 细胞 (40, 41) 中,在感染或受损过程中致病自体免疫的可能性很大。对中亲和性 T 细胞进行选择性地下调属于一种系统为特别为解决此类生物性遗传问题而确保不伤害常规抗感染免疫 (33) 而进化产生的机制。因此在缺少适当周围调节的情况下,“危险自体”在感染和受损 (38, 39) 时产生的“危险信号”在器官特有的致病自体免疫力中起着重要作用。

[0345] 总的来说,“亲和力模型”提供了一种分子基础的统一概念框架,以便对致病自体

免疫的生成和控制进行理解。由于免疫系统的进化使生物可用的自体抗原不能够在周围足够的级别进行提呈从而激活任何自反应 T 细胞（逃避胸腺阴性选择）的功能，周围自身免疫耐受性是由胸腺阴性选择所建立，由“可调激活阈值机制”增强 (36, 37)。然而周围调节机制已同样得到进化，通过对胸腺阴性选择引而释放的，且在环境伤害中（如感染或损伤）激活功能的中亲和性自反应 T 细胞进行选择性的下调以维持周围自身免疫耐受性。在这个问题上，“危险模型”的概念框架 (38, 39) 提供了一种解决方式，用于回答逃逸中亲和性自反应 T 细胞如何能在周围进行功能激活并探测出自体免疫疾病这一中心问题。因此提出对中亲和性 T 细胞进行选择性的下调的周围调节机制在控制器官特有的自体免疫疾病方面，包括多发性硬化、常规糖尿病以及风湿性关节炎等通常由感染或损伤 (38, 39) 中产生的“危险信号”所引起的疾病控制方面起着重要作用。

[0346] 自我 / 非自我的辨别的“亲和力模型”以及免疫学相关的临床问题

[0347] “亲和力模型”代表用于免疫系统的“系统生物性假设”的实例，能够提供一种统一且简单的概念框架来理解自我 / 非自我的辨别的程序以及能使此概念用于新型临床应用的理论性基础，采用 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 细胞介导的调节途径作为示例，“亲和力模型”对免疫学相关临床问题的潜在影响在下文中进行了阐明。在此方面，此类途径在未来应用于人类是建立在人类的 Qa-1, HLA-E 同源物可以作为人类调节性 CD8⁺T 细胞的一个限制性因素这一证据的基础上的 (138, 139)。

[0348] a. 自体免疫疾病

[0349] 如前文所讨论，器官特有的常见自体免疫疾病很可能是周围自体免疫力反常所引起的。此类疾病可以通过激活周围调节机制进行治疗，如通过 Qa-1/HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞调节途径对中亲和性 T 细胞群进行选择性的抑制。由于调节特性并非位于激活目标 T 细胞的抗原级别，此方法为防治和预防自体免疫疾病提供了理论基础，而不必依赖于对任何给定自身免疫疾病中涉及的具体自身抗原的了解，这些自身抗原在目前基本上未确定。由于感染在周围调节缺失的情况下对器官特有的自体免疫疾病起着中心作用，因此在考虑免疫疗法时控制此类患者的感染应作为主要疗法。

[0350] b. 感染、自体免疫疾病以及过敏

[0351] 本调节途径的临床影响依赖于以下事实：此途径可以通过中亲和性 T 细胞引起、由任何抗原激活从而对致病自体免疫疾病进行控制作为其首要任务，然而它增强或者至少不会损害抗感染免疫力。因此“亲和力模型”提供了一个独特的窗口，用于对自体免疫以及抗感染免疫之间的关系作出预想，并为不同的假设、已经确立的“卫生假设”现象提供了更简单的答案。在高度发达的工业化国家，自体免疫疾病、过敏症的增加往往同抗生素、疫苗或改善的健康环境以及社会经济条件而引起感染性疾病的减少这一现象有关 (140)。根据“亲和力模型”，幼年时的自然感染可能激活中级、高级亲和性 T 细胞来诱导调节途径，而这反过来将对由任何自体抗原激活的中级亲和性 T 细胞产生抑制，以确保成年时期周围自体免疫耐受性。在 Th2 细胞导致的过敏中，体外研究已经证实改变 TCR 信号强度（亲和性交互作用）可能严重影响 T 辅助细胞在原初 T 细胞群中的极化 (141-143)。使用低亲和性 TCR 配体进行刺激后，激活 Tec kinase, Itk。通过对 T-bet mRNA 表达进行阴性调节促进 Th2 差分，这对 Th1 差分是重要的 (144)。低亲和性响应与 Th2 显型之间的关系，高亲和性响应与 Th1 显型之间的关系以及过敏反应通常与优先粘膜抗原有关，并引起了对基于“亲和力

模型”的过敏的假设。尽管过敏源属于外来抗原,对过敏源的免疫反应可能由过敏 T 细胞上的 TCR 与 MHC/ 过敏源肽化合物(通过粘膜环境中的局部 APC 呈现)之间的中亲和性互动所激活的 Th2 细胞控制。因此,过敏通常可以通过对中亲和性 T 细胞进行选择性的下调的周围调节机制进行控制,此机制在控制致病自体免疫疾病中起着主要作用。

[0352] 一致观察表明在无病原体环境中饲养的易受细菌感染的动物比在传统环境中饲养的动物更早感染自身免疫疾病,并且比例更高,这些进一步突出了感染与自身免疫和过敏症相比较的相反关系(140)。除此之外,使用抗感染试剂,比如分枝杆菌或病毒治疗易受感染动物不仅使动物免受各种免疫疾病包括 T1D(145),实验性自身免疫性脑脊髓炎 EAE(146,147) 以及狼疮(148、149),同样对哮喘(150-152) 也有疗效。

[0353] c. 器官移植

[0354] 移植时的免疫排斥为健康免疫系统排除外来抗原的一种正常功能。不可避免的棘手问题是如何在不长期使用非特定的抑制免疫反应药物时,从生物学的角度上将外部移植抗原转化成自身的抗原。在这个方面,“亲和力模型”在过继性免疫过程中提供了与外来抗原相比较的自身抗原免疫学定义,此定义并不是由抗原自身进行定义,而是由与外来抗原相比较的自身周边 TCR 系统的区别性组成成分来进行定义。与外部系统的不同之处在于自身系统仅仅由被用于定义自身抗原的中级以及低亲和性自身反应 T 细胞组成。因此“亲和力模型”为将外来抗原转换成自身抗原的创新处理方法提供了理论基础,其不仅仅在于操作控制抗原,还在于根据与移植特有的紧密反应 T 细胞对宿主 TCR 系统进行修改。目前在强烈排斥期利用的免疫响应非特异性抑制的临床操作,通过消灭极具活性的并且很可能具有高度亲和性的克隆细胞,有可能改造 T 细胞系统使其结合。这可能使经过移植的结合处于与免疫系统有关的外来抗原以及自身抗原之间的特有位置。因此,在依据排他性 T 细胞的亲和性对宿主 TCR 系统进行监控移植之后,如果在不同阶段对移植结合的免疫学性质进行评估,有可能使免疫系统将此结合以自身抗原的形式进行对待。比如,通过使用免疫抑制药物,结合可能度过强烈排斥,以下的慢性排斥可能主要通过具有中等亲和性,并且不断由活体内已经接受了的结合所激活的残留紧密反应 T 细胞来进行调节。调节这些细胞的一种有效措施为重新激活 Qa-1/HLA-E 依赖性 CD8+T 细胞调节通路,此调节通路有可能被强烈排斥阶段的预先反排斥治疗所损坏。

[0355] d. 肿瘤免疫学

[0356] 肿瘤免疫学的中心问题是是否免疫系统对肿瘤细胞的识别会引起激活(比如,免疫监视)或者耐受性,此取决于肿瘤抗原的性质(153)。“亲和力模型”的概念框架可能为理解肿瘤的发展和治理提供一种不同的方法。如果肿瘤抗原具有同外来抗原相似的行为,能够诱发由高度以及中度亲和性抗肿瘤 T 细胞组成的有效抗肿瘤免疫系统,肿瘤将会由抵制肿瘤的免疫监视而消除。然而,如果肿瘤抗原有着与自身抗原相似的作用,肿瘤要么不能激活,要么只能激活具有中度亲和性的 T 细胞。这种情况发生在由于胸腺阴性选择删除了特定自身抗原的高度亲和性 T 细胞时。或者,特定的肿瘤抗原可能会诱发“不良”免疫反应,此种反应代表了由于肿瘤抗原(154-157)的不充分呈现导致的中低度亲和性抗肿瘤反应。在肿瘤发生时可以忽略诱导肿瘤抗原中度亲和性的生物学意义,原因在于,这样的免疫是为了依据“亲和力模型”的概念框架来诱导耐受性。因此,中度亲和性抗肿瘤 T 细胞可能由正常的周边调节机制所限制,此调节机制演变成调节潜在的致病性自动免疫。比如,在孩童

时期的某些感染中自然诱发的 Qa-1/HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞调节通路,可能调节由抗原激活(包括肿瘤抗原以及自身抗原)的中度亲和性 T 细胞。引起耐受状态的正常调节机制可能限制这些患者的抗肿瘤免疫系统。具有中度亲和性的抗肿瘤 T 细胞可能是某些肿瘤患者体内唯一的抗肿瘤免疫系统,封锁调节通路,比如 Qa-1/HLA-E 依赖性 CD8⁺T 细胞,以营救这些抗肿瘤 T 细胞,在同其它方法相结合的情况之下,可能会是潜在的必要治疗方法。然而,发生特定器官自动免疫疾病的可能性逐渐增大可能是这种疗法的潜在并发症,这些疾病只有由显示特定自身抗原的某些肿瘤感染或者肿瘤疫苗接种引发。

[0357] 与此预测相一致的是,除了明显的临床抗肿瘤效果,使用排他性的 B16(恶性)黑素瘤 GM-CSF 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子疫苗以及抗 CTLA-4 对老鼠进行治疗,导致白癫风,一种受限于黑素细胞的自体免疫反应。类似的,接受前列腺癌 GM-CSF 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子疫苗以及抗 CTLA-4 的老鼠会引发前列腺炎,但不会出现全局性自身免疫的症状(132-134)。根据“亲和力模型”的概念框架,抗 CTLA-4 通过强烈的提升抗肿瘤 T 细胞的亲和性可能使其摆脱周边细胞的调节,这些细胞最初由疫苗肿瘤细胞展示的特定的足够水平的“自身抗原”所激活(见图 12 和图 13)。存在支持这些假设的证据。该假设认为,展示在周边的生物上可得的自身抗原,从功能上讲,并不能够激活从要求更高水平的抗原诱发的胸腺阴性选择中释放出的自身反应 T 细胞。否则,在这种情形之下,对 CTLA-4 自身通路的封锁可能诱发非特定组织的全局性范围的致病性自动免疫。

[0358] 综合考虑,“亲和力模型”的概念框架允许利用新颖的临床干扰措施来治疗自身免疫疾病和过敏症或者控制器官移植排斥,这是通过选择性地抑制任何抗原的中度亲和性细胞,而不损坏正常的抗感染以及抗肿瘤免疫,而这是目前使用的免疫疗法药物的主要副作用。

[0359] 自身免疫疾病中的交叉保护作用

[0360] 下面的研究描述了有助于了解在“亲和力模型”概念框架的背景之下的 T 细胞调节特性,这是通过调查两种典型自身免疫疾病模型即实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)以及一号糖尿病(T1D)中的抗原肽疫苗接种引发型“交叉保护作用”现象机制,来实现的。此处显示,Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞是通过使用不同的肽对动物使用疫苗接种来诱发的,交叉保护动物免于实验性自身免疫性脑脊髓炎 EAE 或者一号糖尿病 T1D 而不抑制对外来抗原总的免疫反应。这是通过 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞完成的,Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞选择性地下调中度亲和细胞组中包括的潜在的致病性自身反应 T 细胞,它们能够优先表达其表面上的常见替代目标结构从而能够明确下调而不依赖于其抗原特性。因此,这些研究提供了实验证据,在周边,没有必要区分自身以及非自身,免疫系统区别非自身与自身以便于明确的控制潜在致病性自身免疫,并且维护自身耐受性,这是通过选择性地下调自身抗原以及外来抗原的中度亲和 T 细胞来实现的。

[0361] 在实验性自身免疫性脑脊髓炎 EAE 以及 T1D 之间进行的“交叉保护”是由 CD8⁺T 细胞介导

[0362] 对表达于中度亲和性 T 细胞上并被 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞识别的替代目标结构 Qa-1/Hsp60sp 的确认(在上文和 172 中进行描述)能预测由 CD8⁺T 细胞的调节特性不在激活目标 T 细胞的抗原水平上。此特性所处的水平为通过识别表达的常见替代目标结构,而不考虑目标 T 细胞是由哪些抗原引发的,来识别中度亲和性 T 细胞激活的特定生物结果。

[0363] 为了在致病性自身免疫环境之下检测此预测,设计出一种实验方法来研究 Qa-1a 菌株中的两种自身免疫模型 (B10PL 老鼠中的实验性自身免疫性脑脊髓炎 EAE 以及 NOD 老鼠中的一型糖尿病 T1D) 中由 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞介导的交叉保护。B10PL 老鼠或者 NOD 老鼠使用 1-9Nac MBP (肽 X), 或者 p277 (肽 Y) 的任一种进行疫苗接种, 接下来通过对 B10PL 老鼠使用 1-9Nac MBP 进行实验性自身免疫性脑脊髓炎 EAE 诱导或者对 NOD 老鼠自发研制 T1D, 这由包括来自胰岛素 (肽 Z) (173) 的肽 B:9-23 在内的几种自身抗原引发。如果这种预测是正确的, 由肽 X 或者肽 Y 激活的中度亲和性 T 细胞引发的 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞应该能够抑制由肽 X 或者肽 Z 激活的中度亲和性的 T 细胞, 从而使动物免于由自身肽 -X 或者肽 -Z 引发的自身免疫病 (图 14)。

[0364] B10PL 老鼠可使用 1-9NacMBP (一种来自于 MBP 的 MHC Class II 结合肽 (binding peptide)) 或者 p277 (来自于 Hsp60 的一种 MHC Class II 结合肽) 接种。在这点上, 众所周知, 1-9NacMBP 是 B10PL 老鼠中的一种致病性肽, 并且 p277 可能涉及某些老鼠病菌株 (174) 中的 T1D 致病原因, 但是却与 EAE 无关。正如图 15a 所示, 同单独使用不完整的弗氏佐剂 (IFA) 进行疫苗接种的对照老鼠相比较, 使用 1-9Nac MBP 或者 p277 实施疫苗接种能够同样高效的保护动物免于 EAE。因此, 即使对 B10PL 老鼠接种不相关的肽, 其也能有效的受到保护, 免于 EAE 的伤害, 这很可能时因为 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞的诱导, 其能够交叉下调 1-9Mac MBP 激活的 CD4⁺T 细胞, 此细胞导致了临床 EAE (如下所示)。

[0365] 随后对 NOD 老鼠中的 T1D 模型进行了调查。关于这一点, 众所周知, 当 p277 用作疫苗时, 能够有效的保护 NOD 老鼠免受 T1D 伤害, 这或许是由于从 Th1d 到 TH2 响应再到特定自身抗原的诱发转变造成的 (175)。使用经过 IFA 免疫荧光化验法乳化的 p277 肽对 NOD 老鼠进行预防接种, 同对老鼠只实施 IFA 免疫荧光化验法进行预防接种调节相比较而言, 这种方法完全的保护老鼠在 35 周时免于自发感染上 T1D。相反的, NOD 老鼠也同样实施经过 IFA 免疫荧光化验法乳化的 1-9Nac MBP 预防接种, 这能有效的保护 NOD 老鼠免受自发形成的 T1D (图 15b)。1-9NacMBP 以及 p277 两者在保护 EAE 或者 T1D 疾病模型的有效性在此处定义为交叉保护。

[0366] 为了检测体内调节性 CD8⁺T 细胞的诱发是否对在 B10PL 老鼠内实施的 MBP 或者 p277 预防接种产生的 EAE 交叉保护起作用, 将使用 1-9Nac MBP 或者 p277 预防接种的 B10PL 老鼠中分离的 CD8⁺T 细胞转移入首次用作实验的 B10PL 小鼠体内, 然后进行 EAE 诱导。正如图 15c 所示, 从 1-9Nac MBP 或者 p277 疫苗接种而不是对照幼鼠分离的 CD8⁺T, 在实施转移时, 能够保护老鼠免于随后诱发的 EAE。当将从使用 p277 或者 1-9Nac MBP 进行疫苗接种的 NOD 老鼠 (图 15d) 中分离出的 CD8⁺T 细胞转移入未试验过的 NOD 老鼠体内时, 可以同样保护免于自发形成的 T1D (图 15d)。因此, 在受保护的老鼠中使用不同的肽进行预防接种的过程中时, 不论使用哪一种肽对供体老鼠进行疫苗接种, CD8⁺T 细胞都能够进一步阻止动物随后感染上活体中的 EAE 或者 T1D。

[0367] 在此方面, 用外来抗原 HEL 或者 HEL 肽 (在 IFA 免疫荧光化验中) 接种 B10PL 或 NOD 老鼠, 同样也诱发免受 EAE 或者 T1D 的 CD8⁺T 细胞依赖性保护, 其有效性程度就如同用 1-9Nac MBP 或者 p277 接种一样 (未显示数据)。只用 IFA 对对照动物进行免疫不会诱导保护动物免于疾病的调节性 CD8 细胞。这些观察同“亲和力模型”的构思范围相一致。

[0368] Qa-1/Hsp60sp 是由从交叉保护的 EAE 以及 TIP 老鼠中分离出的 CD8⁺T 细胞所识别

的常见目标结构

[0369] 观察到的“交叉保护”表明调节性 CD8⁺T 细胞能够识别由易受感染目标 T 细胞表达的某些常见目标结构,目标 T 细胞导致了活体内的 EAE 以及 T1D。据认为, Qa-1/Hsp60sp, 优先表达于中度亲和 T 细胞以及由 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞明确识别的,可代表由介导“交叉保护”的 CD8⁺T 细胞识别的目标结构。为了测试这种假设,将 Qa-1a 表达的细胞 3F4 作为肽-呈现细胞,以便于决定从经过 1-9Nac MBP 或 p277 疫苗接种保护的 B10PL 和 NOD 老鼠中分离的 CD8⁺T 细胞的特性。

[0370] 通过用鼠科重组细胞 Qa-1a cDNA 将人类 B 细胞株 C1R 同转染 (176,177) 形成 3F4,并且已经成功将其用作 Qa-1 结合肽呈现细胞以便于检测在本实验先前实施的研究中 Hsp60sp 是否为 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞的特定目标。生理学目标 T 细胞,来自 B10PL 老鼠的中度亲和性 1-9Nac MBP 特有克隆 Ae10 以及来自 NOD 老鼠的 p277 特有克隆 15A6,在评估 CD8⁺T 细胞的功能和特性时,起到阳性对照的作用,而低亲和度的 BMP 特有克隆 4D10 以及 p277 特有克隆 13C4 起到阴性对照的作用。值得注意的是,在 Qa-1/Hsp60sp 对 Qa-1/Qdm 的“定量”但不是“定性”的区别为 T 细胞亲和度的函数,其决定了它们对易受 CD8⁺T 引起的下调的易感性。

[0371] 由 M/H/Qa-1 蛋白质指数反映的中度亲和力 T 细胞中 Qa-1/Hsp60s 比 Qa-1/Qdm 具有显著的更高比例,这是中度亲和力 T 细胞对 Qa-1 依赖性 CD8⁺T 引起的下调的分子依据。

[0372] 如图 16 所显示,在目前的研究中,显著的更高的 M/H/Qa-1 蛋白质指数由两种中度亲和性 IAE10 以及 15A6 所表达,与两种低亲和度的克隆 4D10 和 13C4 相比较,其与它们对 CD8⁺T 细胞引起的下调的易受性一致。正如显示,从经过 1-9Nac MBP 或 p277 进行的疫苗接种保护的 B10PL 老鼠中分离的 CD8⁺T 细胞,其限制了阳性对照克隆 IAE10,而不会限制阴性对照克隆 4D10,同样有效地下调了由 Hsp60sp 而不是 Qdm 或者对照的不相关的肽激活的 3F4 细胞 (图 17a)。

[0373] 类似的,从经过 p277 或者 1-9Nac MBP 进行的疫苗接种保护的 NOD 老鼠分离的 CD8⁺T 细胞,限制了阳性对照克隆 15A6,而不限制阴性对照克隆 13C4,同样有效地下调由 Hsp60sp 而不是 Qdm 或者对照的不相关肽激活的 3F4 细胞 (图 17b)。从首次用作实验的 B10PL 或者 NOD 小鼠中分离的 CD8⁺T 细胞对目标细胞不会具有任何作用 (未显示数据)。

[0374] 本组实验明确表明 Qa-1/Hsp60sp 代表普通的靶结构,此结构可由在采用不同抗原肽对老鼠疫苗接种过程中诱导的 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞进行明确识别。因此,细胞表面所显示的 Qa-1/Hsp60sp 可能刺激且受制于对 EAE 与 T1D 生物体内改善起作用的 CD8⁺T 细胞。这些结果与 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞可直接由载有 Hsp60sp 的 DC 进行诱导的观察一致,载有 Hsp60sp 的 DC 保护动物免受随后诱导的 EAE。

[0375] CD8⁺T 细胞抑制了对自身而非外来抗原的总免疫反应

[0376] 确定“交叉保护”EAE 与 T1D 的 CD8⁺T 细胞是否能够区分周围的自身与非自身更为可取。这对了解 T 细胞调控特性与自身非自身区别间的关系很重要。这里针对肽疫苗接种过程中诱导的 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞引起的下调是否为非特定抑制对自身和外来抗原的总免疫反应的内在机制,或者其是否特别抑制自身免疫,而不损害对外来抗原的持续免疫反应 (178)。

[0377] CD8⁺T 细胞对对自身与对外来抗原的总免疫反应的影响通过 T 细胞继承性转移实

验进行评估。选用于评估生物体内自身免疫反应的两类自身肽为 B10PL 鼠中 EAE 的病原肽 1-9NacMBP, 以及取自胰岛素、为 NOD 鼠 (173) 中 T1D 发病原因之一的 B :9-23。因此, 从接种 1-9NacMBP 或 p277 疫苗的鼠分离的 CD8⁺T 细胞继承转移至首次用于实验的老鼠内, 之后老鼠体内受到自身或外来抗原挑战。转移的 CD8⁺T 细胞对免疫对自身与对外来抗原的反应通过在生物体外的分析进行评估与对比。

[0378] 如所示, 来源于老鼠、用来自 1-9NacMBP 或 p277 疫苗接种的老鼠中 CD8⁺T 细胞进行转染的 T 细胞在标准生物体外 T 细胞增殖分析中显示了对自身抗原的抑制总反应。这可以通过与接受到对照 CD8⁺T 细胞的老鼠相比较、对 B10PL 鼠中自身肽 1-9NacMBP (图 18a) 和 NOD 鼠中的 B :9-23 (图 18b) 的较低的 T 细胞增殖幅度以及由较高 ED50 反映的总亲和力下降看出。来自 1-9NacMBP 或 p277 疫苗接种保护的鼠的继承性转染的 CD8⁺T 细胞对病原自身肽 1-9Nac MBP 和 B :9-23 的抑制的体内 T 细胞响应与观察到疾病的生物体内交叉保护相一致。

[0379] 与此相反, 相同的调节性 CD8⁺T 细胞在继承性转染时, 增强了 B10PL 鼠 (图 18a) 与 NOD 鼠 (图 18b) 对普通外来抗原 HEL 的总体初次免疫反应, 可从较高的 T 细胞增殖幅度与增加的总体亲和力看出, 通过与接受对照 CD8⁺T 细胞的老鼠相比较低的 ED50 反映出。因此, “交叉保护” 中所观察到抑制的总体抑制效应, 由 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞介导, 选择性地限制在对自身并非外来抗原的免疫反应内。

[0380] 人体研究

[0381] 从人体研究中获得的数据为使用小鼠进行的研究中建构的观念提供了支持。据研究发现 :HLA-E/Hsp60sp 也是能够被 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞所识别的特异性靶。数据显示 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞可以通过在试管中使用 Hsp60sp (实验例) 或载有 B7sp (对照) 的树突状细胞、CD8 (H) 或 CD8 (B) 活化提纯的 CD8⁺T 细胞, 在试管内生成。据发现, CD8 (H) 而不是 CD8 (B) 将专门对负载有 Hsp60sp 而不是 B7sp 的 HLA-E 转染克隆体进行抑制。

[0382] 讨论

[0383] 这些研究针对自身免疫性疾病控制中外周免疫调节特异性与自我辨别和非我辨别之间的关系问题。这些研究中描述的体内“交叉保护” 中的一个令人感兴趣的特性便是 : 使用相同的抗原肽进行疫苗接种, 可以保护动物免患两种显著的自身免疫性疾病这一观测结果, 其中造成疾病的病原自体抗原互不相同且, 同样, 受到自体免疫性过程进攻的靶器官也不相同。同样有意思的是, 我们还观测到, 不管肽疫苗是否是造成某一特定的自体免疫性疾病的原因, 用不同抗原肽疫苗对动物进行接种, 可以有效地保护动物免受相同的自身免疫性疾病的危害。此外, 对交叉保护现象进行介导的抑制仅仅被限制在对自体抗原的总免疫反应内, 而不损害对外源抗原的正常持续免疫反应。

[0384] 交叉保护现象主要是针对通过 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞, 对潜在致病自反应 T 细胞上的常用靶结构进行识别, 在自身免疫过程中是通过 T 细胞的激活这一结果表示的, 并对观测到的活体内自身免疫疾病的有效好转进行了解释。考虑到潜在致病自反应 T 细胞被包括在了中等亲和力自反应 T 细胞池中这一实验证据, 在上文中便指出了 Qa-1/Hsp60sp 对某些活化 T 细胞的优先表达是它们的 TCR- 配体亲和力相互作用的一项功能。本研究还进一步证明了, Qa-1/Hsp60sp 实际上代表一种可以被从交叉保护 EAE 或 T1D 小鼠 (图 17a 与 17b) 相分离的 HLA-E 限制性 CD8⁺T 细胞所识别的一种常用靶结构。“交叉保护” 的出现是

由于：属于中等亲和力 T 细胞池中的潜在致病自反应 T 细胞一旦被活化，便可以在其表面优先表达 Qa-1/Hsp60sp，并且无论靶 T 细胞是被那种自体抗原所激活的，潜在致病自反应 T 细胞将因此而成为 CD8⁺T 细胞下调的对象。

[0385] 常用靶结构例如 Qa-1/Hsp60sp 在任何自体抗原活化的中等亲和力 T 细胞上的优先表达，为交叉保护设立了分子和细胞基础，所述自体抗原可能在体内引起某一特定自身免疫性疾病。我们预计，一旦进行自身肽疫苗接种，形成的常用靶结构对由调节性 CD8⁺T 细胞表达的常用靶结构：特殊 TCR 的激活，以差分成活体中的效应细胞发挥着至关重要的作用（诱导阶段）。随后，活化的 CD8⁺T 细胞将通过由于任何自体抗原引起的中等亲和力 T 细胞活化而造成的普通靶结构优先表达的识别，反过来对潜在致病自反应 T 细胞进行下调（效应阶段）。因此，动物便可收到保护，从而使其免受由这些 CD8⁺T 细胞引起的任何特定自身免疫性疾病形成的危害。因此，在初期响应期间由被肽疫苗活化了了的中等亲和力 T 细胞所激活的调节 CD8⁺T 细胞将在后期的免疫阶段选择性地下调由任何不同组的自体抗原活化的、在体内引起某一特定的自身免疫性疾病的中等亲和力 T 细胞（图 19）。

[0386] 由于 T 细胞不是专职的抗原递呈细胞（APC），因此例如树突状细胞等专职 APC 可以被募集并执行在途径诱导阶段提供活化调节性 CD8⁺T 细胞的共刺激信号的功能。此外，调节性 CD8⁺T 细胞同样可以直接被相关的 Qa-1 表达树突状细胞（DC）活化，这些 DC 可以通过吞噬和加工在由感染或受伤引起的初次免疫反应中的受损细胞中释放出来的 Hsp60 蛋白质来对常用靶结构例如 Qa-1/Hsp60sp 进行交叉呈递。在上述另一项研究中显示，调节性 CD8⁺T 细胞可以直接被活体内负载有 Hsp60sp 的 Qa-1 表达 DC 直接诱导以保护动物免患随后诱发的 EAE。DC 在活化 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞途径中的精确功能有待进一步的调查。

[0387] 在本文所示的研究中，作为有效疫苗的两种自身肽均为可在 B10PL 和非肥胖糖尿病（NOD）小鼠诱发有效 MHC II 类反应的 MHC II 类结合肽。尽管 I-9NacMBP 为一种在 B10PL 小鼠（179）中引起致病自身免疫性 EAE 的自身肽并且 p277 可以在某些小鼠品系（174）中诱发 T1D，因此可能会与 NOD 小鼠中的 T1D 有关，但是尚无 p277 可以在 B10PL 小鼠中诱发 EAE 或 I-9NacMBP 可以在 NOD 小鼠中诱发 T1D 的证据。然而有趣的是，两种肽在预防疫苗接种动物患 EAE 或 T1D 的作用是等效的。这一关键观测表明：在不考虑肽疫苗是否对导致某一特定的自身免疫性疾病的情况下，只要肽疫苗能够启动可以提供常用靶结构例如 Qa-1/Hsp60sp 的免疫响应以活化 Qa-1 限制性 CD8⁺T，它们便能够进行交叉保护（图 19）。因此，通过常用靶结构的专门识别，交叉保护是通过选择性地下调由在体内引起某一特定自身免疫疾病的特殊自体抗原所活化的相关致病自反应 T 细胞完成的，无论该特定的自身免疫疾病是否与肽疫苗相关。

[0388] 要强调的是，从理论上讲，“亲和力模型”中描述的中等亲和力 T 细胞代表了一个相当大的胸腺逃逸体池，这些逃逸体的亲和力比从胸腺中摘除的细胞低，但是其所涵盖的亲和力和库范围却要宽泛得多。其可以在一个接近胸腺阴性选择下边界阈值的上端与一个可能接近胸腺阳性选择上边界阈值的下端的范围内变化。“中等亲和力”的准确生物阈值尚未被识别，因为在不同的实验系统中，该值将发生一定程度的变化。从这方面来讲，一些研究的结果表明，假定位于所述中等亲和力下端的某些具有“低亲和力”的自反应 T 细胞可以在外周活化从而诱发自身免疫性疾病，例如：B10PL 小鼠中的特殊致脑炎克隆体 I-9NacMBP。从另一方面来看，在某些自身免疫性疾病中，致病自反应 T 细胞似乎对自体抗原具有非常高

的亲合力,其应该位于中等亲合力范围的上端,例如 NOD 小鼠 (14) 中的某些致病性糖尿病克隆体。本研究观测结果:Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞可以保护动物免患 EAE 和 T1D 与选择性地下调在外围在一个较宽的亲合力范围中所涵盖的中等亲合力自反应 T 细胞这一调控途径理念是一致的。

[0389] 特异性自身免疫疾病之间的“交叉保护”为 T 细胞亲合力活化的感知可以被转化为外周 T 细胞调节,从而在独立于受调节 T 细胞特异性抗原的外周对自我和非我进行辨别这一假设提供了生物学证明。从这方面来看,无论目标 T 细胞是被何种抗原活化的,由于这两种类型的调节均对 T 细胞活化的顺序进行了识别,因此“亲合力模型”包括“ergotypic 调节”这一重要的概念成分。然而,由于“ergotypic 调节”未考虑 T 细胞活化的亲合力,因此“亲合力模型”与“ergotypic 调节”是不相同的 (180,181)。

[0390] 在无高亲合力 T 细胞的胸腺阴性选择中形成的自反应细胞库是可以通过一个对自体和外源抗体中等亲合力 T 细胞进行选择性地下调的简单而统一的机制在外围实现自我和非我辨别这一观念的生物学基础。通过对优先在中等亲合力 T 细胞而不是高亲合力 T 细胞上表达的常用替代靶结构进行特殊识别,得出了由任何自体或外源抗原活化的中等亲合力 T 细胞不仅可以诱导而且还可以成为下调的目标,然而被任何外源抗体活化的高亲合力 T 细胞却可以避免被下调 (图 19)。这就对为什么在当前试验中会观测到构成体内交叉保护的 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞同样会对自体抗原 1-9NacMBP 和 B :9-23 整个免疫反应进行特别抑制,而不会对外源抗体单克隆抗体 (HEL) 进行抑制这一情况的原因进行了解释 (图 18)。本组数据与之前观测到的 Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞在 HEL 转基因 (TG) 小鼠自体抗原生物演化关系中会对 HEL 整个免疫反应进行限制,但是却增强了野生型 (WT) 小鼠在生物演化关系外源抗体中对相同抗原的免疫反应这一情况一致。因此,本研究一致地反应了:中等亲合力 T 细胞的统一的选择性地下调机制与对自体与外源抗体免疫反应的总体效果是相反的:在优化的同时维持自身耐受,或者至少不会损坏其对外源抗体的免疫响应这样一种辨别自我和非我的功能状态。这是由于在被外源抗体活化的 T 细胞中,仅有那些具有中等亲和力的 T 细胞被 CD8⁺T 细胞下调了,然而对外源抗体具有高亲和力的 T 细胞不仅没有被下调,而且还能够被间接地上调并生长,这可能是由于对空间和营养物质的竞争减少造成的。另一方面,由于自反应库主要包括中等和低亲合力 T 细胞而没有高亲合力 T 细胞,因此在自体抗原环境中,下调中等亲合力 T 细胞的整体效应是完全抑制自身免疫的结果。

[0391] 综合进行考虑,自体和外源抗体原初 T 细胞库的特异性结构,决定了选择性地下调自体抗体中等亲合力 T 细胞的整个生物顺序与选择性地下调外源抗体中等亲合力 T 细胞的整个生物顺序相反。这便是在生物系统水平形成的一种有待新范式对其概念框架进行解释的“亲合力模型”的核心价值观,即在 T 细胞调节水平时,没有必要对外围中的自我和非我进行辨别的情况下,免疫系统是如何在适应性免疫期间实现自我和非我辨别的。因此,在适应性免疫过程中,免疫系统对自我和非我的辨别不是通过对自体和外源抗体的结构区别进行识别的,而是通过感知 T 细胞亲合力进行辨别的。一般说来,在一个没有高亲合力 T 细胞的筛选库的情况下,任何抗原特有的中等亲合力 T 细胞的选择性地下调,均为一个免疫系统将实现外周自身耐受的生物学途径。然而,在一个包含高亲合力 T 细胞的完整库中,对任何抗原具有特殊中等亲和力的 T 细胞的选择性地下调这一相同的机制将会促进高亲合力 T 细胞显性度的增加,从而增强某些特殊的免疫响应。此外,另一种必须了解的情况是:由外

周中等亲和力 T 细胞选择性下调所实现的自我 / 非我辨别仅能被通过胸腺阴性选择而形成的一个自反应筛选库和一个完整外源反应库的特异性组成所维持。

[0392] 总而言之,“感知”T 细胞激活的亲和力可以被转化为外周 T 细胞调节这一理念是提供了对胸腺阴性选择的结果决定了在外周对适应性免疫进行调节的以完成自我 / 非我辨别的方式这一生物必然性进行理解的概念框架的“亲和力模型”的关键所在。胸腺阴性选择与外周免疫调节之间的物理连接为:将中等亲和力自反应 T 细胞释放到包含潜在致病自反应 T 细胞的外周中是胸腺阴性选择的一种生物结果这一事实,因此必须使用外周调节机制进行特别处理。Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞介导调控途径代表了外周机制的一个范例:即免疫系统为了维持自体耐受,通过胸腺阴性选择,不完备地不断进化完善已实现的自我 / 非我辨别。这些调节机制与控制免疫反应强度与等级的内在机制不同,例如抗原活化诱发细胞死亡或共刺激分子的表达,或者功能活化并将 CD4⁺T 细胞分化为 Th1 和 Th2 或 Tr1 和 Tr3 调节细胞 (178)。它们在对自体和外源抗体整个免疫反应进行阴性控制的“自然产生 CD25+Foxp3+Treg”方面也不相同 (182)。

[0393] 值得注意的是,由于调节的特异性没有处于活化目标 T 细胞的抗原水平,因此可以在没有与任何特定的自身免疫性疾病相关的特别的自体抗原知识的情况下,实现自身免疫性疾病的控制。

[0394] 交叉保护研究的材料与方法

[0395] 动物

[0396] 使用的所有老鼠 (Jackson labs, 杰克逊实验室) 都安放于哥伦比亚大学比较医学系 (the Columbia University Department of Comparative Medicine) 的无病原体动物设施内。所有动物研究获得哥伦比亚大学动物保护和利用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee at Columbia University) 批准。

[0397] 试剂:

[0398] 抗 Qa-1a 抗血清为来自 D. 阿克塞罗德公共健康协会 (D. Axelrod Institute for Public Health) 的洛伦·弗拉哈迪博士的友好赠送。染色试剂、荧光素 (F1) 53-6.72 (抗鼠 CD8)、藻红蛋白 (PE)-GK1.5 (抗鼠 CD4) 购自 Pharmingen。藻红蛋白 (PE)-羊抗小鼠购自杰克逊免疫学研究实验室 (Jackson ImmunoResearch Laboratory)。肽 Hsp60sp (QMRPVSRAL) ((SEQ ID NO :2)、B :9-23 (SHLVEALYLVCGERG) ((SEQ ID NO :12) 由 GeneScript 公司合成。肽 Qdm (AMAPRTLLL), p277 ((SEQ ID NO :1)、(VLGGVALLRVIPALDSLTPANED) ((SEQ ID NO :13) 以及 1-9NacMBP (AcASGLAPSGA) ((SEQ ID NO :14) 通过蛋白质核心设施在哥伦比亚大学合成。

[0399] SDS-PAGE 及免疫印迹法分析

[0400] SDS-PAGE 及免疫印迹法根据标准程序执行。1-9Nac MBP 或 p277 特殊 CD4⁺ 不同亲和力和克隆采用放射脾细胞 (APC) 及抗原肽 (1-50uM) 刺激 72 小时。采用的 Ab 为:抗 actin、抗 Hsp β 、抗 MHC 级 Ia M1/42 和抗 Qa-1a 血清,接着采用二抗兔子抗鼠 HRP 或兔子抗鼠 HRP 进行孵育。采用 ECL 检测箱 (Amersham Biosciences, 阿玛西亚公司) 对目标蛋白质进行检测。所有印迹密度采用 ChemiDoc XRS 成像仪 Quantity one-4.5.0 软件 (Bio-rad) 测定数量。CD8⁺T 细胞抑制测验

[0401] CD8⁺T 细胞采用 CD8MACS 磁性磁珠 (Miltenyibiotec, Inc. Auburn CA) 净化。3F4

细胞在 260C 被被动地负载肽整夜。混合相同数量的未标记的装入肽的 3F4 细胞与有 CFSE 标记的未装入肽的 3F4 细胞混合,并将分级数量的 CD8⁺T 细胞加入目标。首次用作实验的鼠中的 CD8⁺T 细胞用作对照物,且我们确定,这些 CD8⁺T 细胞对激活的目标 T 细胞无任何影响。在功能化验中,实际的 1-9Nac MBP 特殊中级亲和力 T 细胞克隆 1AE10, Qa-1 限制性 CD8⁺T 细胞的生理目标和低亲和力克隆 4D10 作为正对照物和负对照物形成于 B10PL 鼠中,而 p277 特殊中级亲和力 T 细胞克隆 15A6 与低亲和力克隆 13C4 形成于 NOD 鼠中。此外,所有化验中,测试的 CD8⁺T 细胞对 Hsp60sp 或 Qdm 脉冲的 C1R 细胞无任何影响。四天之后,细胞混合物用抗鼠 CD8-PE mAb 染色以区别 CD8⁺T 细胞与目标细胞,在分析中计算两种类型的目标之间的比率时,分出 CD8⁺T 细胞。存在 CD8⁺T 细胞时,加入肽的(非 CFSE 标记的)3F4 细胞与未加入肽的(CFSE 标记的)3F4 细胞之间的比率确定为特殊抑制的百分比: {[对照培养物(无 CD8⁺T 细胞)中加入与未加入肽的 3F4 细胞的比率 - 实验培养物(有 CD8⁺T 细胞)中的比率]/ 控制培养物中的比率} × 100%。

[0402] EAE 与 T1D 模型中 CD8⁺T 细胞的肽疫苗接种与继承转移

[0403] 本研究中采用的标准试验方案中,按照描述采用以 100uM/ 鼠 IFA 乳化的 1-9Nac MBP 或 p277 对雌性的 8-10 周大的 B10PL 或 3-4 周大的 NOD 鼠进行皮下免疫。在多肽接种至少一星期后诱发 EAE。通过 CD8MACS 磁珠 (Miltenyibiotec, Inc. Auburn CA) 阳性选择从肽接种保护的 EAE/B10PL 小鼠或 T1D/NOD 小鼠的脾脏和引流淋巴结中纯化 CD8⁺T 细胞。CD8⁺T 细胞的纯度通常 > 95%。将 2-5 × 10⁶ CD8⁺T 细胞通过静脉注射继承性地转移到首次用作实验的 NOD 鼠或 B10PL 鼠,随后导致其在一周后产生 EAE。

[0404] CD8⁺T 细胞的肽疫苗接种与继承转移的效果通过评定受体鼠的临床 EAE (181) 或 T1D 来进行评估。自发发展的 T1D 每隔一天通过测量葡萄糖的血清浓度水平进行评定。两项测量的葡萄糖水平都超过 250mg/ml 的老鼠视为患糖尿病。

[0405] 评定 CD8⁺T 细胞对自身抗原和外来抗原的免疫反应的影响的体外分析

[0406] 用从 1-9NacMBP 或 p277 疫苗接种保护的老鼠分离出的 CD8⁺T 细胞以 2-5 × 10⁶ 细胞 / 老鼠继承转移的 B10PL 或 NOD 鼠在细胞转移一天之后,受到自身抗原 (B10PL 鼠中的 1-9MacMBP 或 NOD 鼠中的 B :9-23) 或者外来抗原 (HEL) 的挑战。在第 7-9 天,在引流淋巴结中制备单细胞悬浮液,1 × 10⁶ LNC 或 0.25 × 10⁶ 净化的 CD4⁺T 细胞与 1 × 10⁶ 放射脾脏细胞涂在补加 1mM L- 谷氨酸的无 IM-V 血清淋巴细胞介质 (GIBCO) 中的平底 96 孔板中。加入抗原浓度范围为 0.03-300uM。四天培养的最后 18 个小时期间,加入 3H 胸苷 (1uCi/ 孔) 并通过液体闪烁计数测量标记的结合。将细胞增殖 (按每分钟计数) 与抗原浓度作图, ED50 值通过计算产生一半最大增殖的抗原浓度截距获得 (183, 184)。

[0407] 参考文献

[0408] 1. H. Jiang, Y. Wu, B. Liang et al., J Clin Invest 115(2), 302(2005).

[0409] 2. H. Jiang and L. Chess, Annu. Rev. Immunol. 18, 185(2000).

[0410] 3. H. Jiang, S. I. Zhang, and B. Pernis, Science 256(5060), 1213(1992).

[0411] 4. Dow-Rhoun Koh, Wai-Ping Fung-Leung, Alexandra Ho et al., Science 256, 1210(1992).

[0412] 5. D. Hu, K. Ikizawa, L. Lu et al., Nat Immunol 5(5), 516(2004).

[0413] 6. J. W. Kappler, N. Roehm, and P. Marrack, Cell 49(2), 273(1987);

- H. Hengartner, B. Odermatt, R. Schneider et al., *Nature* 336(6197),388(1988) ;
H. Pircher, U. H. Rohrer, D. Moskophidis et al., *Nature* 351(6326),482(1991).
- [0414] 7. S. M. Anderton, C. G. Radu, P. A. Lowrey et al., *J Exp Med* 193(1),1(2001) ;
B. Han, P. Serra, J. Yamanouchi et al., *J Clin Invest* 115(7),1879(2005) ;D. Zehn and
M. J. Bevan, *Immunity* 25(2),261(2006).
- [0415] 8. H. Jiang, S. Curran, E. Ruiz-Vazquez et al., *Proc Natl Acad Sci USA*
100(14),8378(2003).
- [0416] 9. C. J. Aldrich, R. Waltrip, E. Hermel et al., *J Immunol* 149(12),3773(1992).
- [0417] 10. L. C. Lowen, C. J. Aldrich, and J. Forman, *J Immunol* 151(11),6155(1993).
- [0418] 11. L. A. Cotterill, H. J. Stauss, M. M. Millrain et al., *Eur J Immunol* 27(9),
2123(1997) ;Z. Kurepa, C. A. Hasemann, and J. Forman, *J Exp Med* 188(5),973(1998).
- [0419] 12. F. Imani and M. J. Soloski, *Proc Natl Acad Sci USA* 88(23),10475(1991).
- [0420] 13. T. Chun, C. J. Aldrich, M. E. Baldeon et al., *Immunology* 94(1),64(1998).
- [0421] 14. J. Michaelsson, C. Teixeira de Matos, A. Achour et al., *J Exp Med*
196(11),1403(2002).
- [0422] 15. BT Sher, R Nairn, J E Coligan et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 82(4),
1175(1985).
- [0423] 16. D. J. Connolly, L. A. Cotterill, R. A. Hederer et al., *J Immunol* 151(11),
6089(1993).
- [0424] 17. W. F. Lo, H. Ong, E. S. Metcalf et al., *J Immunol* 162(9),5398(1999).
- [0425] 18. H. Jiang, R. Ware, A. Stall et al., *Immunity* 2(2),185(1995).
- [0426] 19. H. Jiang, N. S. Braunstein, B. Yu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 98(11),
6301(2001).
- [0427] 20. A. Davies, S. KaIb, B. Liang et al., *J Immunol* 170(10),5027(2003).
- [0428] 21. F. Gays, K. P. Fraser, J. A. Toomey et al., *J Immunol* 166(3),1601(2001).
- [0429] 22. J. Hackett, Jr., C. Stebbins, B. Rogerson et al., *J Exp Med* 176(1),
225(1992) ;C. J. Jolly, S. D. Wagner, C. Rada et al., *Semin Immunol* 8(3),159(1996) ;
S. D. Wagner and M. S. Neuberger, *Annu Rev Immunol* 14,441(1996) ;M. K. Slifka and
J. L. Whitton, *Nat Immunol* 2(8),711(2001).
- [0430] 23. R. Ware, H. Jiang, N. Braunstein et al., *Immunity* 2(2),177(1995) ;J. Li,
I. Goldstein, E. Glickman-Nir et al., *J Immunol* 167(7),3800(2001).
- [0431] 24. T. Takai, M. Li, D. Sylvestre et al., *Cell* 76(3),519(1994).
- [0432] 25. S. Basu, R. J. Binder, T. Ramalingam et al., *Immunity* 14(3),303(2001).
- [0433] 26. Conn M. 2004. Whither T-suppressors :if they didn' t exist would we
have to invent them ? *Cell Immunol* 227 :81-92
- [0434] 27. Jiang H, Chess L. 2006. Regulation of immune responses by T cells. *N
Engl J Med* 354 :1166-76
- [0435] 28. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. 2002. Decoding the patterns of self and
nonself by the innate immune system. *Science* 296 :298-300

- [0436] 29. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20 :197-216
- [0437] 30. Medzhitov R, Janeway C, Jr. 2000. Innate immunity. *N Engl J Med* 343 : 338-44
- [0438] 31. Litman GW, Anderson MK, Rast JP. 1999. Evolution of antigen binding receptors. *Annu Rev Immunol* 17 :109-47
- [0439] 32. Davis MM. 2004. The evolutionary and structural ' logic ' of antigen receptor diversity. *Semin Immunol* 16 :239-43
- [0440] 33. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49 :273-80
- [0441] 34. Hengartner H, Odermatt B, Schneider R, Schreyer M, Walle G, MacDonald HR, Zinkernagel RM. 1988. Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. *Nature* 336 :388-90
- [0442] 35. Pircher H, Rohrer UH, Moskophidis D, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1991. Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* 351 :482-5
- [0443] 36. Grossman Z, Paul WE. 2001. Autoreactivity, dynamic tuning and selectivity. *Curr Opin Immunol* 13 :687-98
- [0444] 37. Grossman Z, Min B, Meier-Schellersheim M, Paul WE. 2004. Concomitant regulation of T-cell activation and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 4 :387-95
- [0445] 38. Matzinger P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12 :991-1045
- [0446] 39. Matzinger P. 2002. The danger model : a renewed sense of self. *Science* 296 :301-5
- [0447] 40. Jiang H, Curran S, Ruiz-Vazquez E, Liang B, Winchester R, Chess L. 2003. Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 :8378-83. Epub 2003 Jun 24.
- [0448] 41. Han B, Serra P, Yamanouchi J, Amrani A, Elliott JF, Dickie P, Di Lorenzo TP, Santamaria P. 2005. Developmental control of CD8 T cell-avidity maturation in autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 115 :1879-87
- [0449] 42. Jiang H, Chess L. 2000. The Specific Regulation of Immune Responses by CD8+ T Cells Restricted by the MHC Class IB Molecule, QA-1. *Annu. Rev. Immunol.* 18 : 185-216
- [0450] 43. Jiang H, Wu Y, Liang B, Zheng Z, Tang G, Kanellopoulos J, Soloski M, Winchester R, Goldstein I, Chess L. 2005. An affinity/avidity model of peripheral T cell regulation. *J Clin Invest* 115 :302-12
- [0451] 44. Burnet M, Fenner F. 1949. *Production of Antibodies*. Melbourne :McMillan
- [0452] 45. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. 1953. Actively acquired tolerance

of foreign cells. *Nature* 172 :603-6

[0453] 46. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13 :829-40

[0454] 47. Sandberg JK, Franksson L, Sundback J, Michaelsson J, Petersson M, Achour A, Wallin RP, Sherman NE, Bergman T, Jornvall H, Hunt DF, Kiessling R, Karre K. 2000. T cell tolerance based on avidity thresholds rather than complete deletion allows maintenance of maximal repertoire diversity. *J Immunol* 165 :25-33

[0455] 48. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment [In Process Citation]. *Annu Rev Immunol* 17 : 221-53

[0456] 49. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. 1994. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. [Review]. *Immunology Today* 15 :406-11

[0457] 50. Klaus SJ, Pinchuk LM, Ochs HD, Law C L, Fanslow WC, Arraitage RJ, Clark EA. 1994. Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction. *J Immunol* 152 :5643-52

[0458] 51. Koulova L, Clark EA, Shu G, Dupont B. 1991. The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells. *J Exp Med* 173 : 759-62

[0459] 52. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14 :233-58

[0460] 53. Coffman RL, Mosmann TR. 1991. CD4+ T-cell subsets: regulation of differentiation and function. [Review] [14 refs]. *Res Immunol* 142 :7-9

[0461] 54. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136 :2348-57

[0462] 55. Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7 :145-73

[0463] 56. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389 :737-42

[0464] 57. Levings MK, Roncarolo MG. 2000. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 106 : S109-12.

[0465] 58. Roncarolo MG, Levings MK. 2000. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 12 :676-83.

- [0466] 59. Jiang H, Chess L. 2004. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 114:1198-208
- [0467] 60. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161:72-87.
- [0468] 61. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-64.
- [0469] 62. Shevach EM. 2001. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 193:F41-6.
- [0470] 63. Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-42.
- [0471] 64. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-6.
- [0472] 65. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6:1219-27
- [0473] 66. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. 2001. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 276:37672-9.
- [0474] 67. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepker B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
- [0475] 68. von Boehmer H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, Apostolou I, Jaeckel E, Grassi F, Klein L. 2003. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev* 191:62-78
- [0476] 69. Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4+regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-62
- [0477] 70. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756-63.
- [0478] 71. Kronenberg M, Rudensky A. 2005. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 435:598-604
- [0479] 72. Sakaguchi S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-52

- [0480] 73. Fontenot JD, Rudensky AY. 2005. A well adapted regulatory contrivance : regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6 :331-7
- [0481] 74. Jaeckel E, Kretschmer K, Apostolou I, von Boehmer H. 2006. Instruction of Treg commitment in peripheral T cells is suited to reverse autoimmunity. *Semin Immunol* 18 :89-92
- [0482] 75. Thornton AM, Shevach EM. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164 :183-90.
- [0483] 76. Shevach EM. 2002. CD4+CD25+suppressor T cells :more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2 :389-400.
- [0484] 77. Apostolou I, von Boehmer H. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199 :1401-8
- [0485] 78. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. 2002. CD25+CD4+regulatory T cells suppress CD4+T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol* 32 :1282-91
- [0486] 79. Sakaguchi S. 2003. Control of immune responses by naturally arising CD4+regulatory T cells that express toll-like receptors. *J Exp Med* 197 :397-401
- [0487] 80. Wood KJ, Sakaguchi S. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3 :199-210.
- [0488] 81. Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. 1999. What is the role of regulatory T cells in transplantation tolerance ? *Curr Opin Immunol* 11 :497-503.
- [0489] 82. Waldmann H, Cobbold S. 2001. Regulating the immune response to transplants, a role for CD4+regulatory cells ? *Immunity* 14 :399-406
- [0490] 83. Bluestone JA, Abbas AK. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3 :253-7
- [0491] 84. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198 :1875-86.
- [0492] 85. Kasprowicz DJ, Droin N, Soper DM, Ramsdell F, Green DR, Ziegler SF. 2005. Dynamic regulation of FoxP3 expression controls the balance between CD4(+)T cell activation and cell death. *Eur J Immunol* 35 :3424-32
- [0493] 86. Sakaguchi S. 2000. Regulatory T cells :key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101 :455-8.
- [0494] 87. von Herrath MG, Harrison LC. 2003. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 3 :223-32
- [0495] 88. Bach JF. 2003. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3 :189-98

- [0496] 89. Jiang H, Zhang SI, Pernis B. 1992. Role of CD8+T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256 :1213-5
- [0497] 90. Koh D-R, Fung-Leung W-P, Ho A, Gray D, Acha-Orbea H, MakT-W. 1992. Less Mortality but More Relapses in Experimental Allergic Encephalomyelitis in CD8-/-Mice. *Science* 256 :1210-3
- [0498] 91. Jiang H, Ware R, Stall A, Flaherty L, Chess L, Pernis B. 1995. Murine CD8+T cells that specifically delete autologous CD4+T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity* 2 :185-94
- [0499] 92. Jiang H, Kashleva H, Xu LX, Forman J, Flaherty L, Pernis B, Braunstein NS, Chess L. 1998. T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+)T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 :4533-7
- [0500] 93. Jiang H, Braunstein NS, Yu B, Winchester R, Chess L. 2001. CD8+T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+T cells in EAE mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 :6301-6.
- [0501] 94. Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. 2004. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 5 :516-23
- [0502] 95. Aldrich CJ, Rodgers JR, Rich RR. 1988. Regulation of Qa-1 expression and determinant modification by an H-2D-linked gene, Qdm. *Immunogenetics* 28 :334-44
- [0503] 96. Aldrich CJ, Waltrip R, Hermel E, Attaya M, Lindahl KF, Monaco JJ, Forman J. 1992. T cell recognition of QA-1b antigens on cells lacking a functional Tap-2 transporter. *J Immunol* 149 :3773-7
- [0504] 97. Lowen LC, Aldrich CJ, Forman J. 1993. Analysis of T cell receptors specific for recognition of class IB antigens. *J Immunol* 151 :6155-65
- [0505] 98. Kurepa Z, Hasemann CA, Forman J. 1998. Qa-1b binds conserved class I leader peptides derived from several mammalian species. *J Exp Med* 188 :973-8
- [0506] 99. Cotterill LA, Stauss HJ, Millrain MM, Pappin DJ, Rahman D, Canas B, Chandler P, Stackpoole A, Simpson E, Robinson PJ, Dyson PJ. 1997. Qa-1 interaction and T cell recognition of the Qa-1 determinant modifier peptide. *Eur J Immunol* 27 :2123-32
- [0507] 100. Imani F, Soloski MJ. 1991. Heat shock proteins can regulate expression of the Tl region-encoded class Ib molecule Qa-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 :10475-9
- [0508] 101. Chun T, Aldrich CJ, Baldeon ME, Kawczynski LV, Soloski MJ, Gaskins HR. 1998. Constitutive and regulated expression of the class IB molecule Qa-1 in pancreatic beta cells. *Immunology* 94 :64-71
- [0509] 102. Michaelsson J, Teixeira de Matos C, Achour A, Lanier LL, Karre K, Soderstrom K. 2002. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med* 196 :1403-14.
- [0510] 103. Jerne NK. 1974. The immune system: a web of V-domains. *Harvey Lect* 70 :

93-110.

[0511] 104. Dorf ME, Benacerraf B. 1984. Suppressor Cells and Immunoregulation. *Ann. Rev. Immunol.* 2 :127-58

[0512] 105. Batchelor JR, Lombardi G, Lechler RI. 1989. Speculations on the specificity of suppression. *Immunol Today* 10 :37-40

[0513] 106. Gammon G, Sercarz E. 1990. Does the presence of self-reactive T cells indicate the breakdown of tolerance? *Clin Immunol Immunopathol* 56 :287-97

[0514] 107. Lohse AW, Mor F, Karin N, Cohen IR. 1989. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells. *Science* 244 :820-2

[0515] 108. Cohen IR, Quintana FJ, Mimran A. 2004. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest* 114 :1227-32

[0516] 109. Kawai K, Ohashi PS. 1995. Immunological function of a defined T-cell population tolerized to low-affinity self antigens [published erratum appears in *Nature* 1995 Nov 23/378(6555) :419]. *Nature* 314 :68-9

[0517] 110. Goldrath AW, Bevan MJ. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402 :255-62

[0518] 111. Garcia KC, Degano M, Pease LR, Huang M, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA. 1998. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 279 :1166-72

[0519] 112. Anderton SM, Wraith DC. 2002. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2 :487-98

[0520] 113. Peterson DA, DiPaolo RJ, Kanagawa O, Unanue ER. 1999. Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. *Immunity* 11 :453-62

[0521] 114. Cook JR, Wormstall EM, Hornell T, Russell J, Connolly JM, Hansen TH. 1997. Quantitation of the cell surface level of Ld resulting in positive versus negative selection of the 2C transgenic T cell receptor in vivo. *Immunity* 7 :233-41

[0522] 115. Chidgey A, Boyd R. 1997. Agonist peptide modulates T cell selection thresholds through qualitative and quantitative shifts in CD8 co-receptor expression. *Int Immunol* 9 :1527-36

[0523] 116. Wang R, Nelson A, Kimachi K, Grey HM, Farr AG. 1998. The role of peptides in thymic positive selection of class II major histocompatibility complex-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 :3804-9

[0524] 117. Rees W, Bender J, Teague TK, Kedl RM, Crawford F, Marrack P, Kappler J. 1999. An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 :9781-6.

- [0525] 118. Nossal GJ. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76 :229-39
- [0526] 119. Ignatowicz L, Kappler J, Marrack P. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84 :521-9
- [0527] 120. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioi MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17 :393-8
- [0528] 121. Mittaz L, Rossier C, Heino M, Peterson P, Krohn KJ, Gos A, Morris MA, Kudoh J, Shimizu N, Antonarakis SE, Scott HS. 1999. Isolation and characterization of the mouse Aire gene. *Biochem Biophys Res Commun* 255 :483-90
- [0529] 122. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the Aire protein. *Science* 298 :1395-401
- [0530] 123. Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE, Scott HS, Boyd RL, Peltonen L, Goodnow CC. 2004. Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med* 200 :1015-26
- [0531] 124. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. 2005. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 23 :227-39
- [0532] 125. Yagi J, Janeway CA, Jr. 1990. Ligand thresholds at different stages of T cell development. *Int Immunol* 2 :83-9
- [0533] 126. Buhlmann JE, Elkin SK, Sharpe AH. 2003. A role for the B7-1/B7-2 :CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol* 170 :5421-8
- [0534] 127. Foy TM, Page DM, Waldschmidt TJ, Schoneveld A, Laman JD, Masters SR, Tygrett L, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Xu JC, Flavell RA, Oehen S, Hedrick SM, Noelle RJ. 1995. A essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J Exp Med* 182 :1377-88
- [0535] 128. Hackett J, Jr., Stebbins C, Rogerson B, Davis MM, Storb U. 1992. Analysis of a T cell receptor gene as a target of the somatic hypermutation mechanism. *J Exp Med* 176 :225-31
- [0536] 129. Jolly CJ, Wagner SD, Rada C, Klis N, Milstein C, Neuberger MS. 1996. The targeting of somatic hypermutation. *Semin Immunol* 8 :159-68
- [0537] 130. Wagner SD, Neuberger MS. 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* 14 :441-57
- [0538] 131. Slifka MK, Whitton JL. 2001. Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR. *Nat Immunol* 2 :711-7
- [0539] 132. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. 1999. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines

induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190 :355-66

[0540] 133. Hurwitz AA, Foster BA, Kwon ED, Truong T, Choi EM, Greenberg NM, Burg MB, Allison JP. 2000. Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic mouse model using CTLA-4 blockade. *Cancer Res* 60 :2444-8

[0541] 134. Hernandez J, Ko A, Sherman LA. 2001. CTLA-4 blockade enhances the CTL response to the p53 self-tumor antigen. *J Immunol* 166 :3908-14

[0542] 135. Chen Z, Benoist C, Mathis D. 2005. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 :14735-40

[0543] 136. Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer PA, Cantor H. 1998. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* 279 :1344-7.

[0544] 137. Benoist C, Mathis D. 2001. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2 :797-801

[0545] 138. Ware R, Jiang H, Braunstein N, Kent J, Wiener E, Pernis B, Chess L. 1995. Human CD8+ T lymphocyte clones specific for T cell receptor V beta families expressed on autologous CD4+ T cells. *Immunity* 2 :177-84

[0546] 139. Li J, Goldstein I, Glickman-Nir E, Jiang H, Chess L. 2001. Induction of TCR Vbeta-specific CD8+ CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol* 167 :3800-8.

[0547] 140. Bach JF. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347 :911-20

[0548] 141. Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. 1997. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *J Immunol* 159 :5956-63

[0549] 142. Leitenberg D, Bottomly K. 1999. Regulation of naive T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Semin Immunol* 11 :283-92

[0550] 143. Brogdon JL, Leitenberg D, Bottomly K. 2002. The potency of TCR signaling differentially regulates NFATc/p activity and early IL-4 transcription in naive CD4+ T cells. *J Immunol* 168 :3825-32

[0551] 144. Miller AT, Wilcox HM, Lai Z, Berg LJ. 2004. Signaling through Itk promotes T helper 2 differentiation via negative regulation of T-bet. *Immunity* 21 :67-80

[0552] 145. Martins TC, Aguas AP. 1999. A role for CD45^{RB} low CD38+ T cells and costimulatory pathways of T-cell activation in protection of non-obese diabetic (NOD) mice from diabetes. *Immunology* 96 :600-5.

[0553] 146. Lehmann D, Ben-Nun A. 1992. Bacterial agents protect against

autoimmune disease. I. Mice pre-exposed to *Bordetella pertussis* or *Mycobacterium tuberculosis* are highly refractory to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 5 :675-90

[0554] 147. Hempel K, Freitag A, Freitag B, Endres B, Mai B, Liebaldt G. 1985. Unresponsiveness to experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats pretreated with complete Freund's adjuvant. *Jnt Arch Allergy Appl Immunol* 76 : 193-9

[0555] 148. Greenwood BM, Herrick EM, Voller A. 1970. Suppression of autoimmune disease in NZB and (NZBxNZW)F1 hybrid mice by infection with malaria. *Nature* 226 : 266-7

[0556] 149. Oldstone MB, Dixon FJ. 1972. Inhibition of antibodies to nuclear antigen and to DNA in New Zealand mice infected with lactate dehydrogenase virus. *Science* 175 :784-6

[0557] 150. Hansen G, Yeung V P, Berry G, Umetsu DT, DeKruyff RH. 2000. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8+ T cells and IL-18. *J Immunol* 164 :223-30

[0558] 151. Zuany-Amorim C, Manlius C, Trifilieff A, Brunet LR, Rook G, Bowen G, Pay G, Walker C. 2002. Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in a murine model of allergic pulmonary inflammation. *J Immunol* 169 :1492-9

[0559] 152. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook G, Walker C. 2002. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med* 8 : 625-9

[0560] 153. Pardoll D. 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21 :807-39

[0561] 154. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt D F, Slingluff CL, Jr. 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264 : 716-9

[0562] 155. Slingluff C L, Jr., Hunt DF, Engelhard V H. 1994. Direct analysis of tumor-associated peptide antigens. *Curr Opin Immunol* 6 :733-40

[0563] 156. Gervois N, Guilloux Y, Diez E, Jotereau F. 1996. Suboptimal activation of melanoma-infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J Exp Med* 183 :2403-7

[0564] 157. Slansky JE, Rattis FM, Boyd LF, Fahmy T, Jaffee EM, Schneck JP, Margulies DH, Pardoll DM. 2000. Enhanced antigen-specific antitumor immunity with altered peptide ligands that stabilize the MHC-peptide-TCR complex.

JiTi r π u π i t y 13 :529-38

[0565] 158. Braud, V. , E. Y. Jones, and A. McMichael. 1997. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 27 : 1164.

[0566] 159. Kraft, J. R. , R. E. Vance, J. Pohl, A. M. Martin, D. H. Raulet, and P. E. Jensen. 2000. Analysis of Qa-1(b) peptide binding specificity and the capacity of CD94/NKG2A to discriminate between Qa-1-peptide complexes. *J Exp Med* 192 :613.

[0567] 160. Bond, J. S. , and P. E. Butler. 1987. Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem* 56 :333.

[0568] 161. Chaput, N. , N. E. Scharz, F. Andre, J. Taieb, S. Novault, P. Bonnaventure, N. Aubert, J. Bernard, F. Lemonnier, M. Merad, G. Adema, M. Adams, M. Ferrantini, A. F. Carpentier, B. Escudier, T. Tursz, E. Angevin, and L. Zitvogel. 2004. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive TcI lymphocytes leading to tumor rejection. *J Immunol* 172 :2137.

[0569] 162. Dal Porto, J. , T. E. Johansen, B. Catipovic, D. J. Parfiit, D. Tuveson, U. Gether, S. Kozlowski, D. T. Fearon, and J. P. Schneck. 1993. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 :6671.

[0570] 163. Oelke, M. , and J. P. Schneck. 2004. HLA-Ig-based artificial antigen-presenting cells: setting the terms of engagement. *Clin Immunol* 110 :243.

[0571] 164. Casares, S. , C. A. Bona, and T. D. Brumeanu. 1997. Engineering and characterization of murine MHC class II-immunoglobulin chimera expressing an immunodominant CD4T viral epitope. *Protein Eng* 10 :1295.

[0572] 165. Malherbe, L. , C. Filippi, V. Julia, G. Foucras, M. Moro, H. Appel, K. Wucherpfennig, J. C. Guery, and N. Glaichenhaus. 2000. Selective activation and expansion of high-affinity CD4+T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity* 13 :771.

[0573] 166. Casares, S. , C. A. Bona, and T. D. Brumeanu. 2001. Enzymatically mediated engineering of multivalent MHC class II-peptide chimeras. *Protein Eng* 14 :195.

[0574] 167. Altman, J. D. , P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274 :94.

[0575] 168. Michaelsson, J. , C. Teixeira de Matos, A. Achour, L. L. Lanier, K. Karre, and K. Soderstrom. 2002. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med* 196 :1403.

[0576] 169. Sanderson, S. , and N. Shastri. 1994. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *International Immunology* 6 :369.

[0577] 170. Bank, I. , M. Hemler, M. B. Brenner, D. Cohen, V. Levy, J. Belko, C. Crouse, and

L. Chess. 1989. A novel monoclonal antibody, 1B3.1, binds to a new epitope of the VLA-I molecule. *Cell Immunol* 122:416.

[0578] 171. Lederman, S., M. J. Yellin, A. Krichevsky, J. Belko, J. J. Lee, and L. Chess. 1992. Identification of a novel surface protein on activated CD4+T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med* 175:1091.

[0579] 172. Chen, W., Zhang, L., Liang, B., Saenger, Y., Li, J., Ches, L., and Jiang, H. 2007. Perceiving the Avidity of T Cell Activation Can Be Translated into Peripheral T Cell Regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20472-20477.

[0580] 173. Liu, E., Moriyama, H., Abiru, N., Paronen, J., Devendra, D., Finkelman, F. D., and Eisenbarth, G. S. 2004. Preventing peptide-induced anaphylaxis: addition of C-terminal aminoacids to produce a neutral isoelectric point. *J Allergy Clin Immunol* 114:607-613.

[0581] 174. Elias, D., Marcus, H., Reshef, T., Ablamunits, V., and Cohen, I. R. 1995. Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein. *Eur J Immunol* 25:2851-2857.

[0582] 175. Elias, D., Meilin, A., Ablamunits, V., Birk, O. S., Carmi, P., Konen-Waisman, S., and Cohen, I. R. 1997. Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various beta-cell antigens. *Diabetes* 46:758-764.

[0583] 176. Aldrich, C. J., DeClouse, A., Woods, A. S., Cotter, R. J., Woloski, M. J., and Forman, J. 1994. Identification of a TAP-dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a Class I-b antigen. *Cell* 79:649-659.

[0584] 177. Gays, F., Fraser, K. P., Toomey, J. A., Diamond, A. G., Millrain, M. M., Dyson, P. J., and Brooks, C. G. 2001. Functional analysis of the molecular factors controlling Qa1-mediated protection of target cells from NK lysis. *J Immunol* 166:1601-1610.

[0585] 178. Conn, M. 2004. Whither T-suppressors: if they didn't exist would we have to invent them? *Cell Immunol* 227:81-92.

[0586] 179. Jiang, H., Zhang, S. I., and Pernis, B. 1992. Role of CD8+T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256:1213-1215.

[0587] 180. Lohse, A. W., Mor, F., Karin, N., and Cohen, I. R. 1989. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells. *Science* 244:820-822.

[0588] 181. Cohen, I. R., Quintana, F. J., and Mimran, A. 2004. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest* 114:1227-1232.

[0589] 182. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev*

Immunol 22 :531-562.

[0590] 183. Fasso, M. , Anandasabapathy, N. , Crawford, F. , Kappler, J. , Fathman, CG. , and Ridgway, W.M. 2000. T cell receptor (TCR)-mediated repertoire selection and loss of TCR vbeta diversity during the initiation of a CD4(+) T cell response in vivo. J Exp Med 192 :1719-1730.

[0591] 184. Targoni, O. S. , and Lehmann, P. V. 1998. Endogenous myelin basic protein inactivates the high avidity T cell repertoire. J Exp Med 187 :2055-2063.

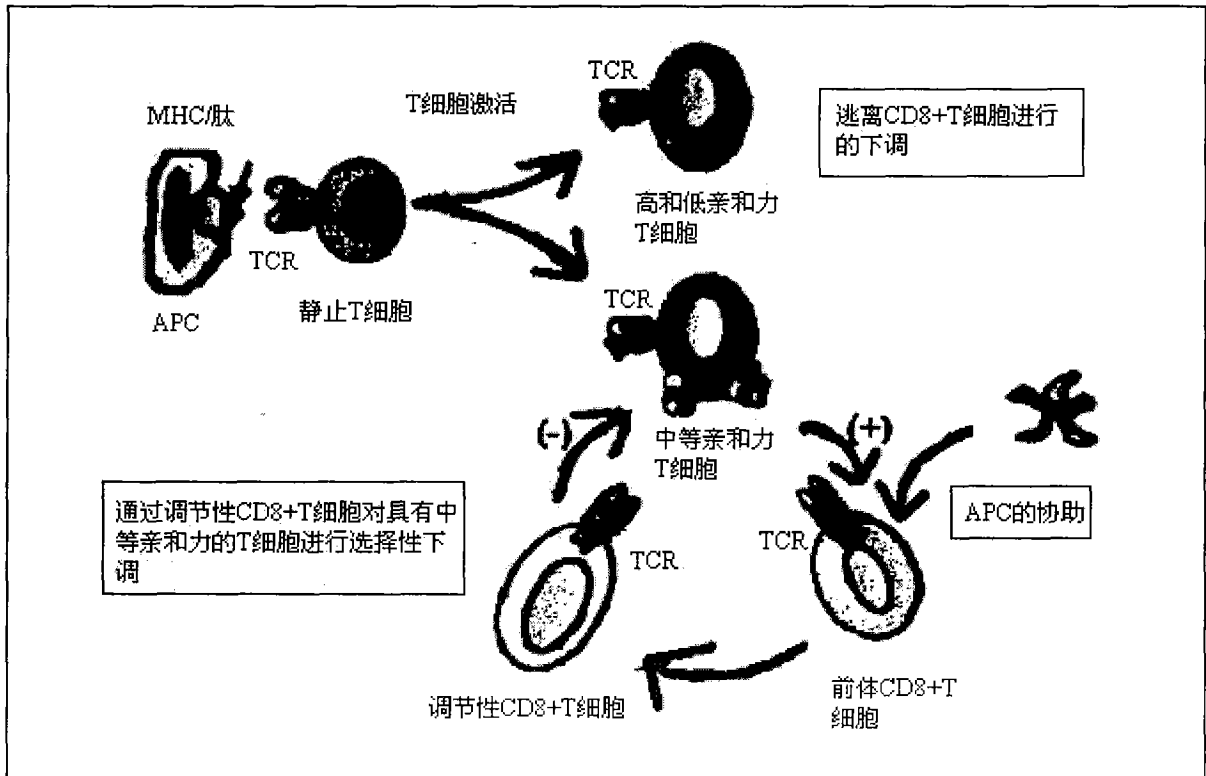


图 1

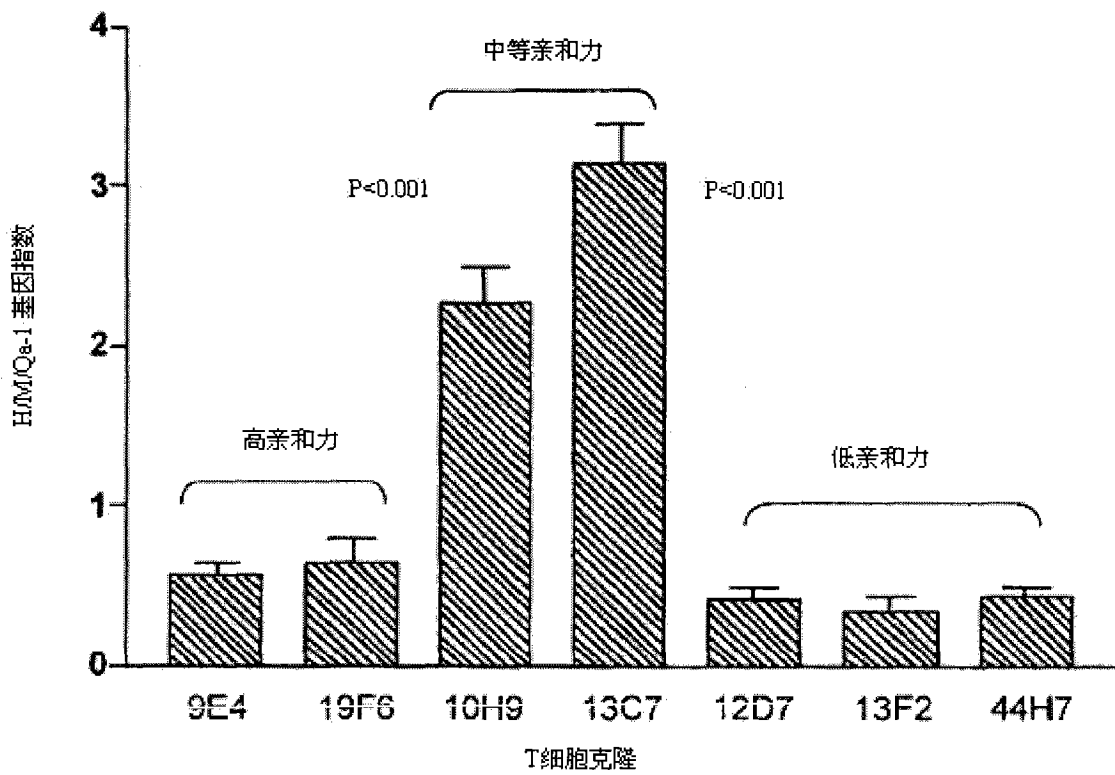


图 2

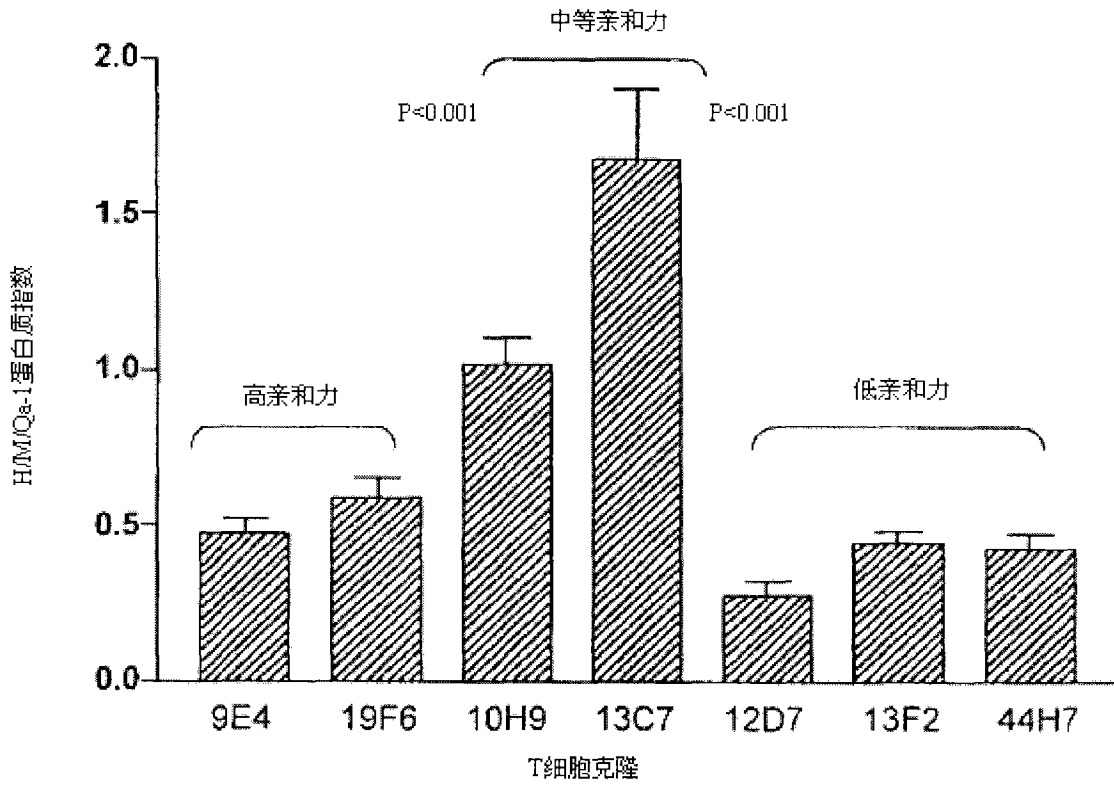


图 3

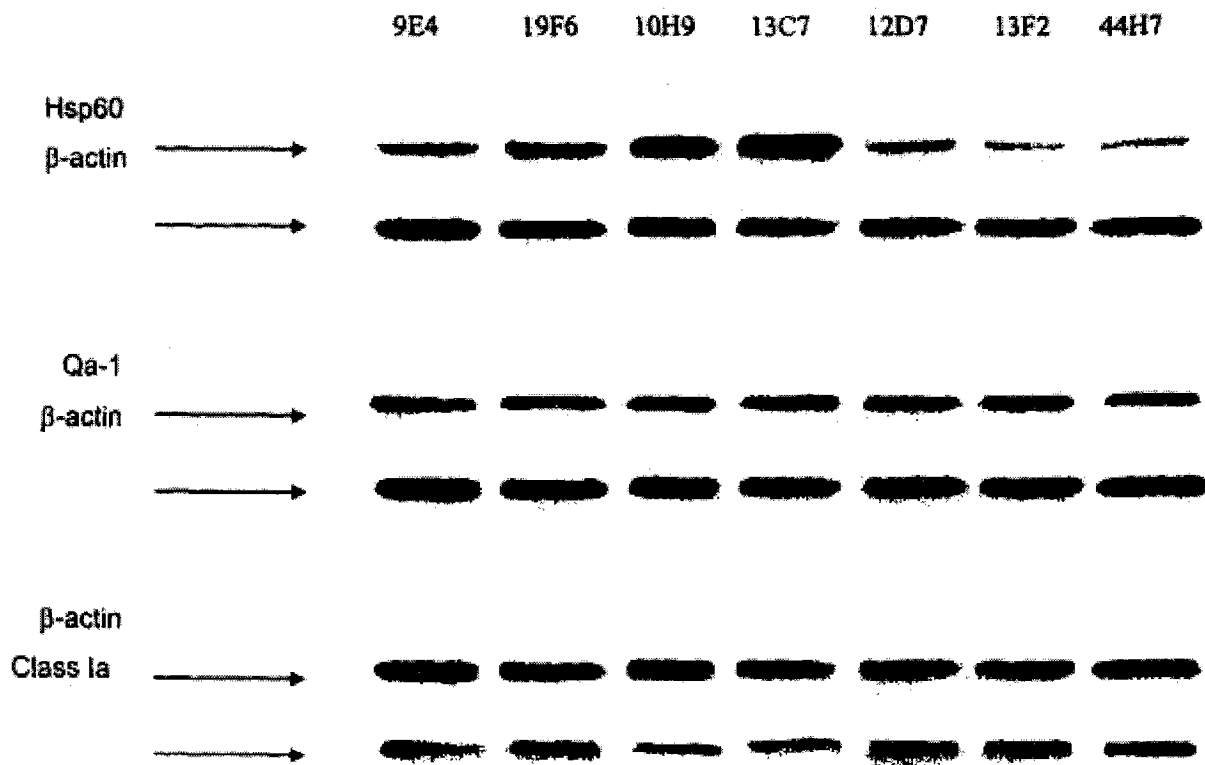


图 4

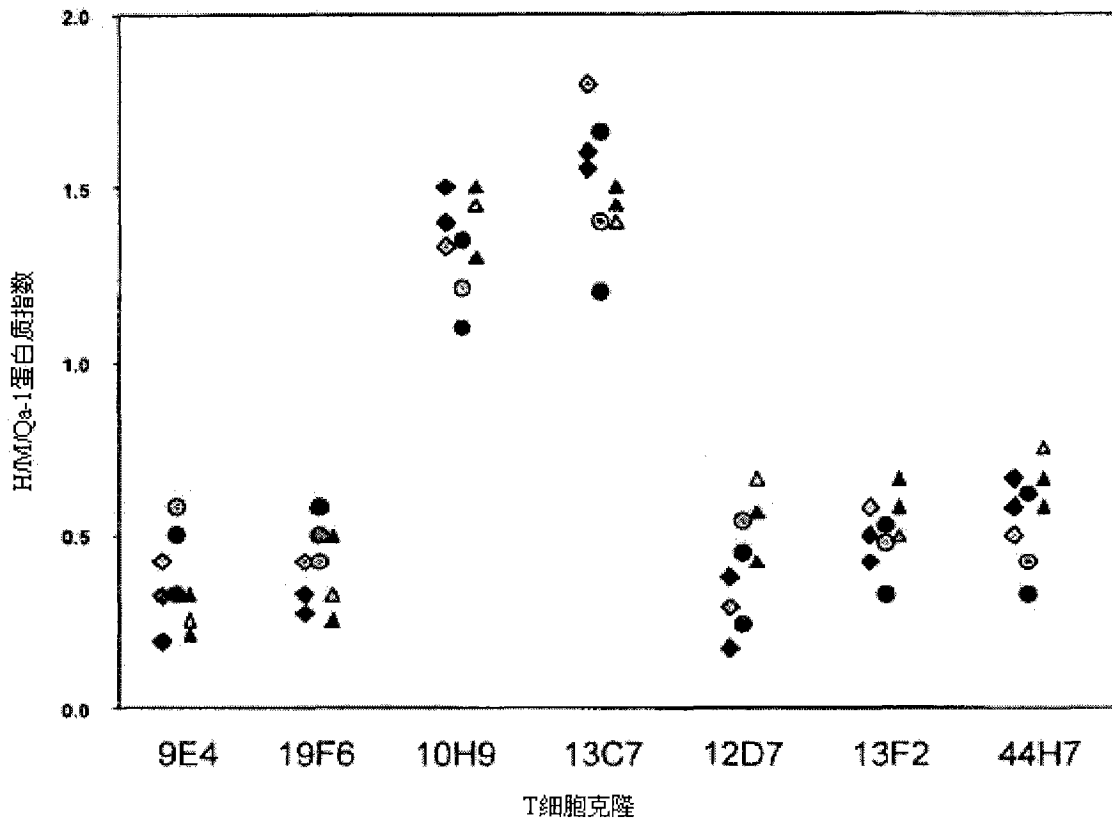


图 5

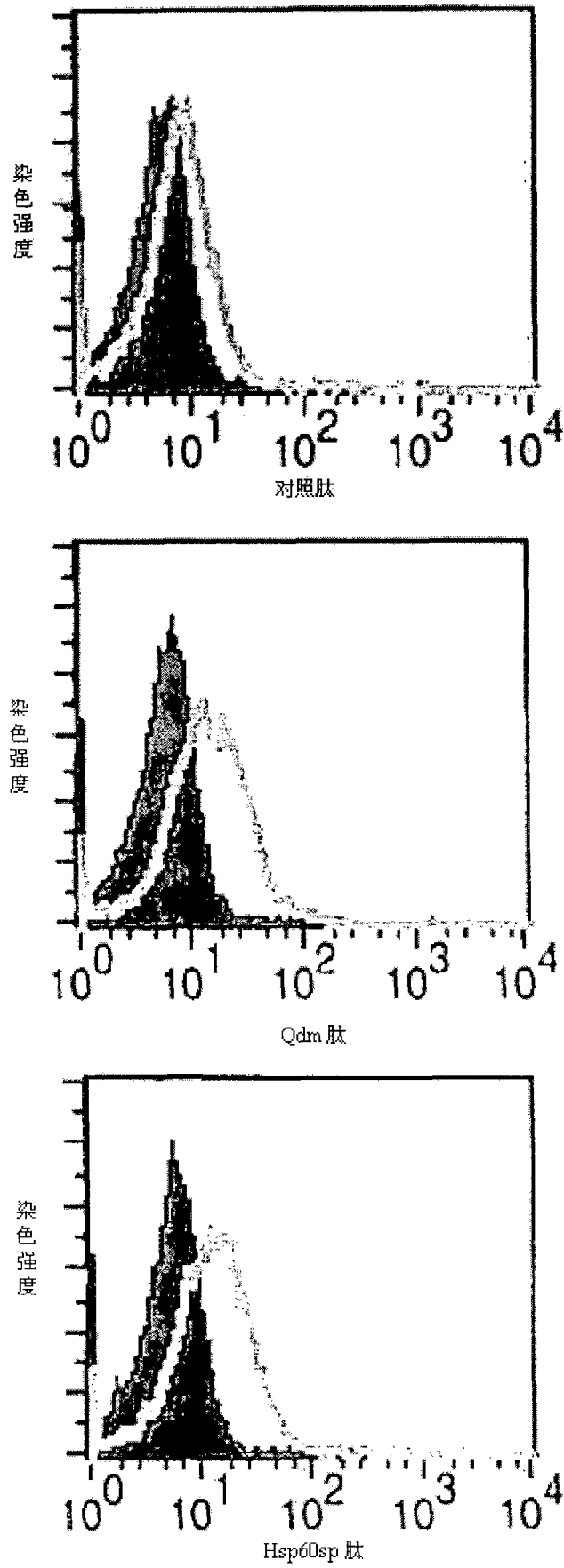


图 6

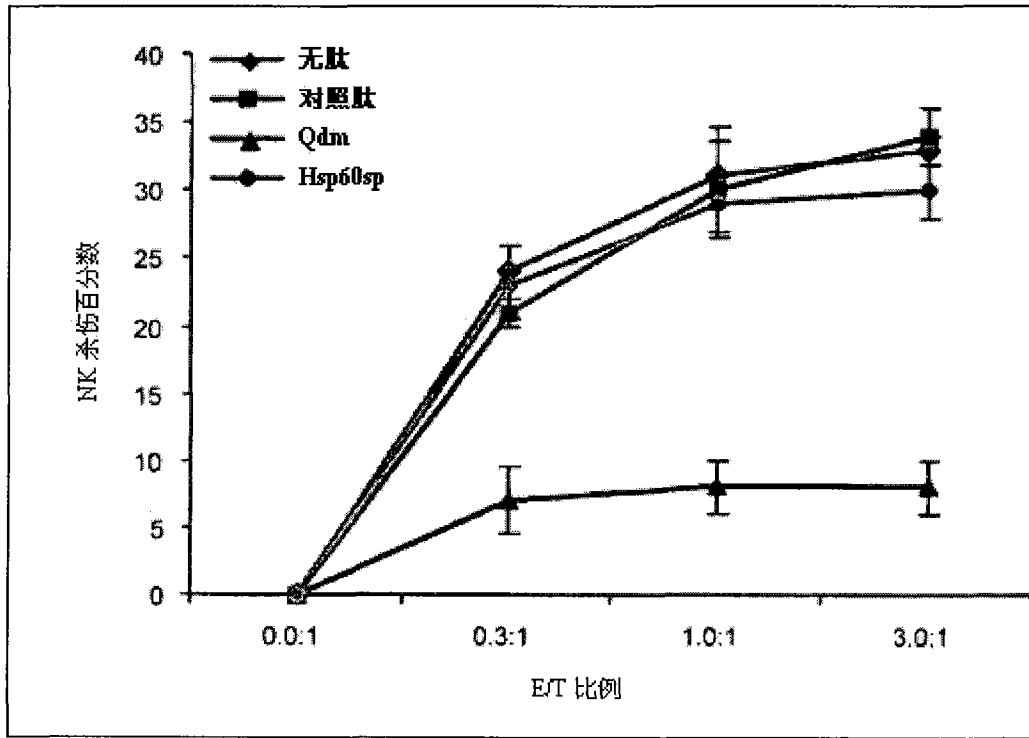


图 7

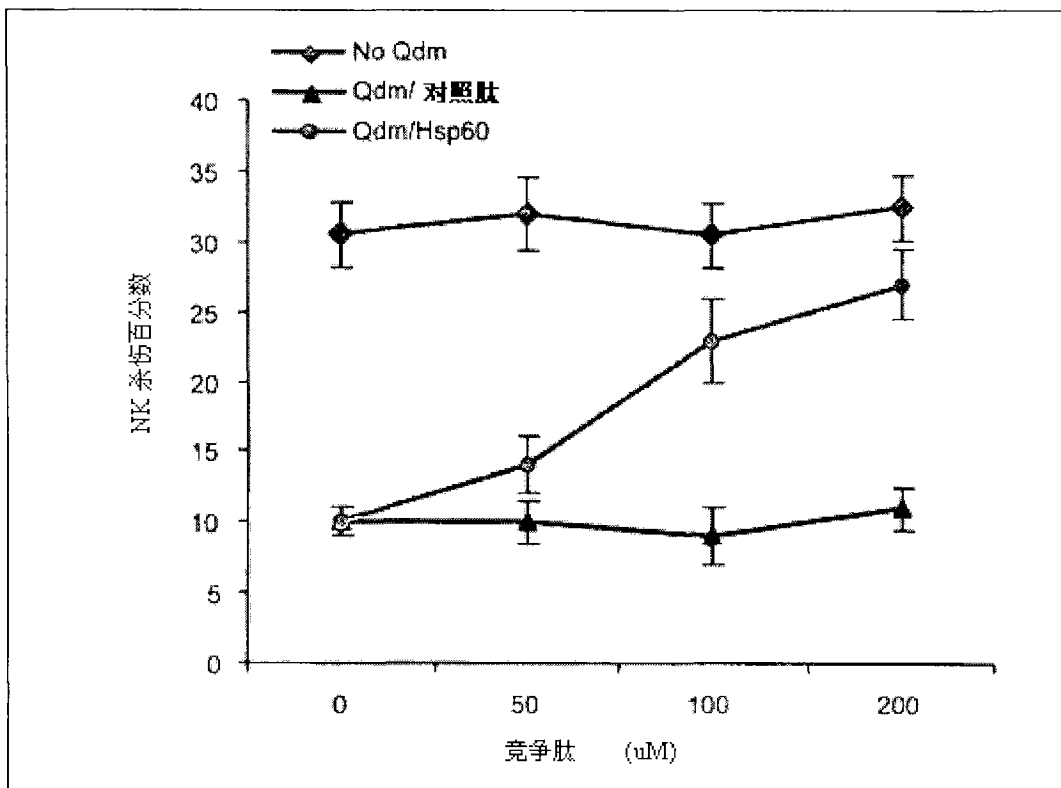


图 8

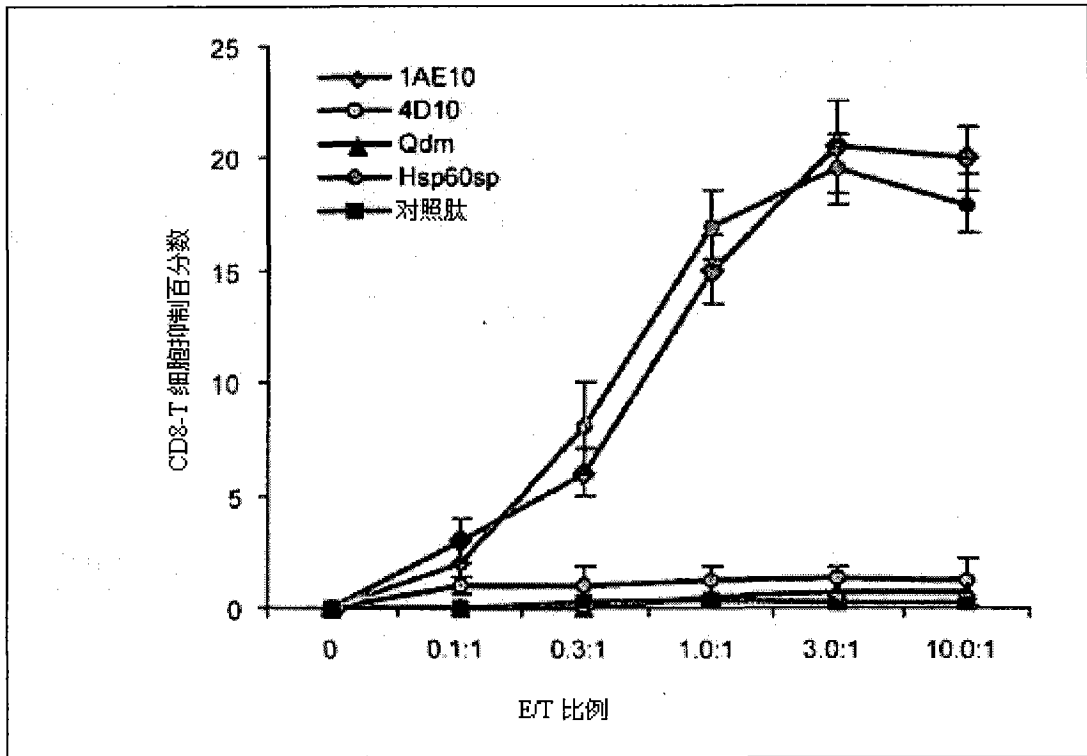


图 9

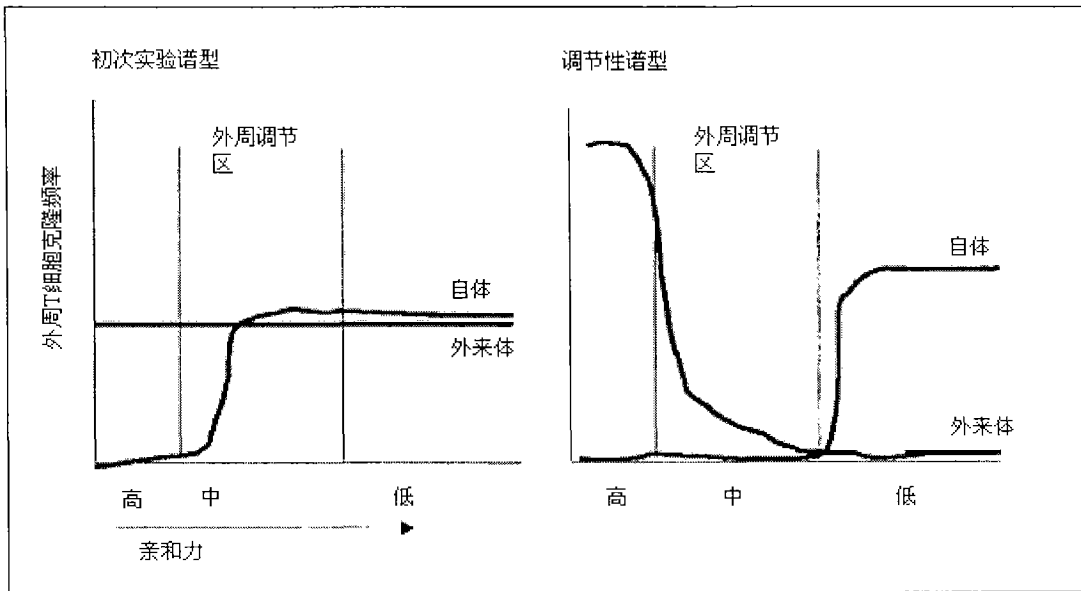


图 10

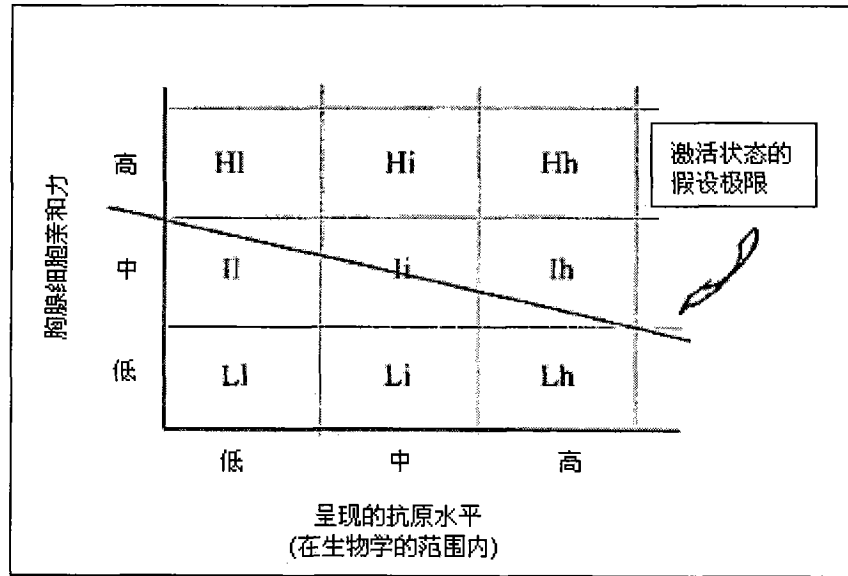


图 11

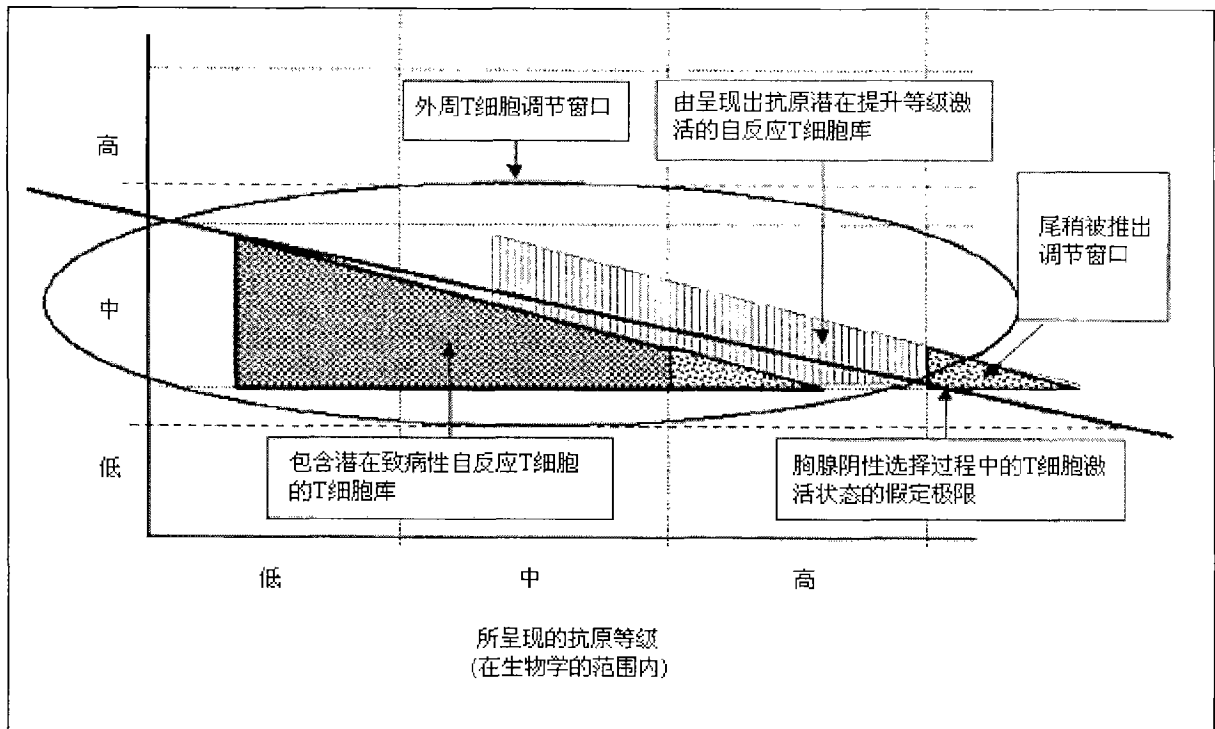


图 12

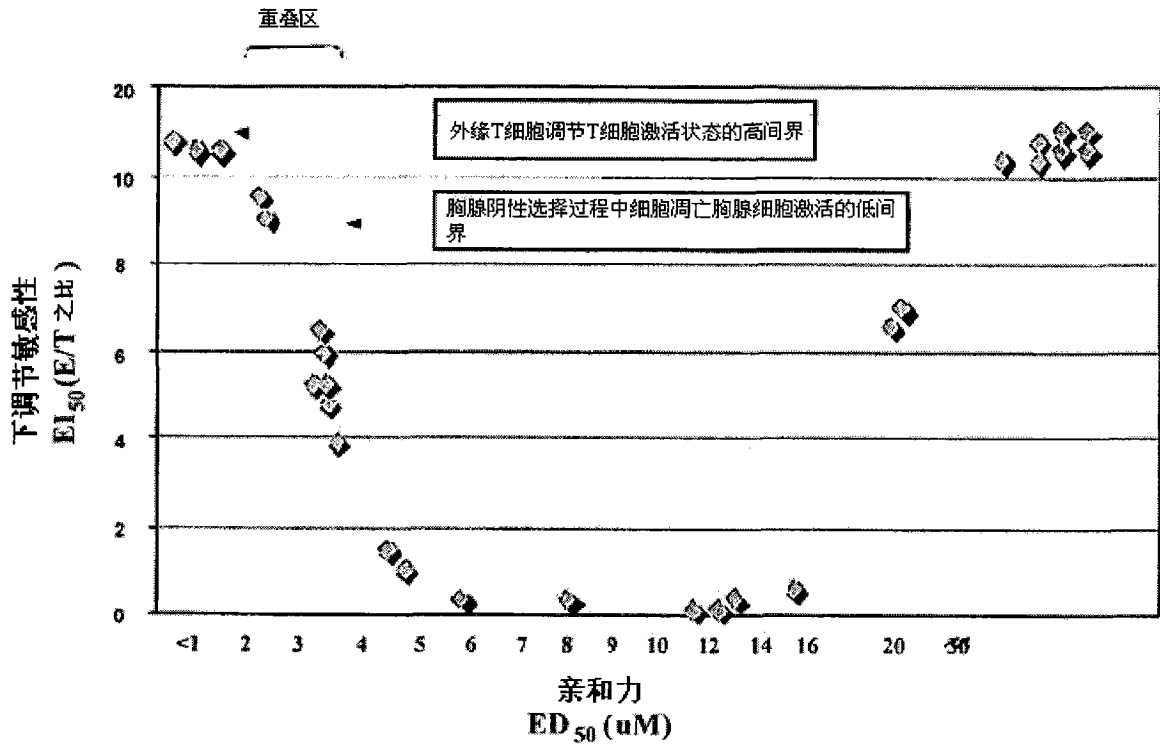


图 13

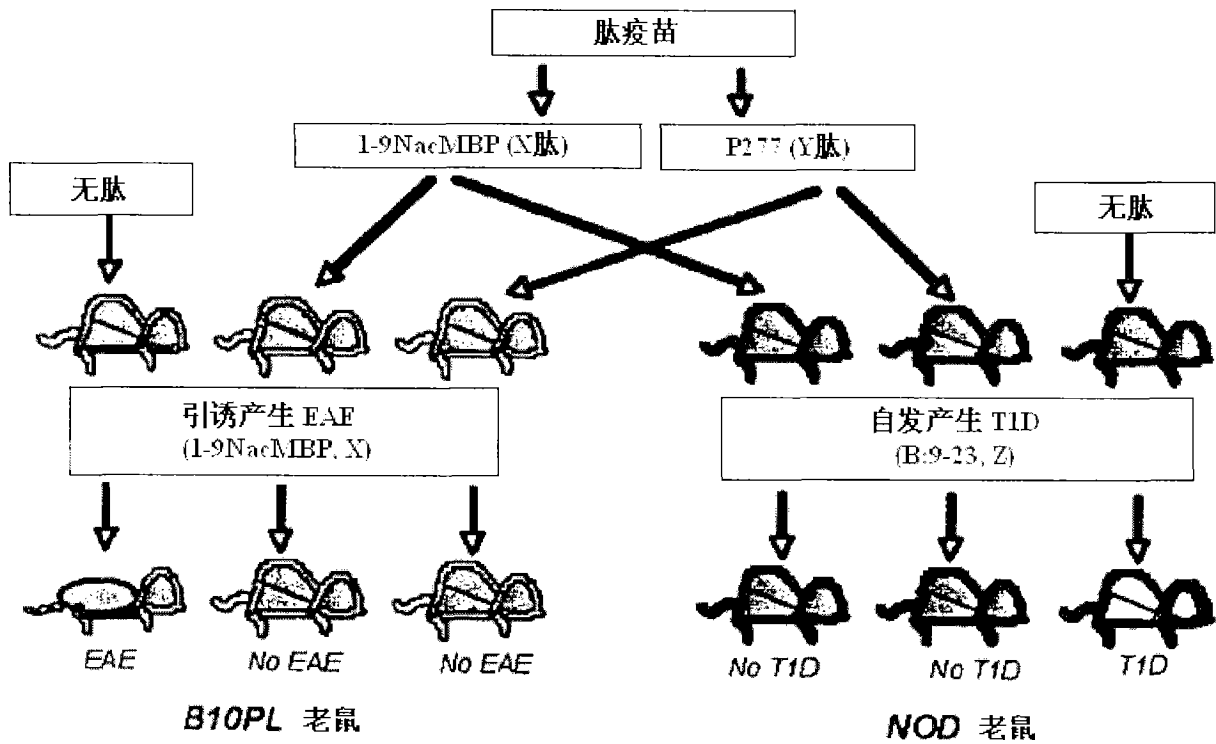


图 14

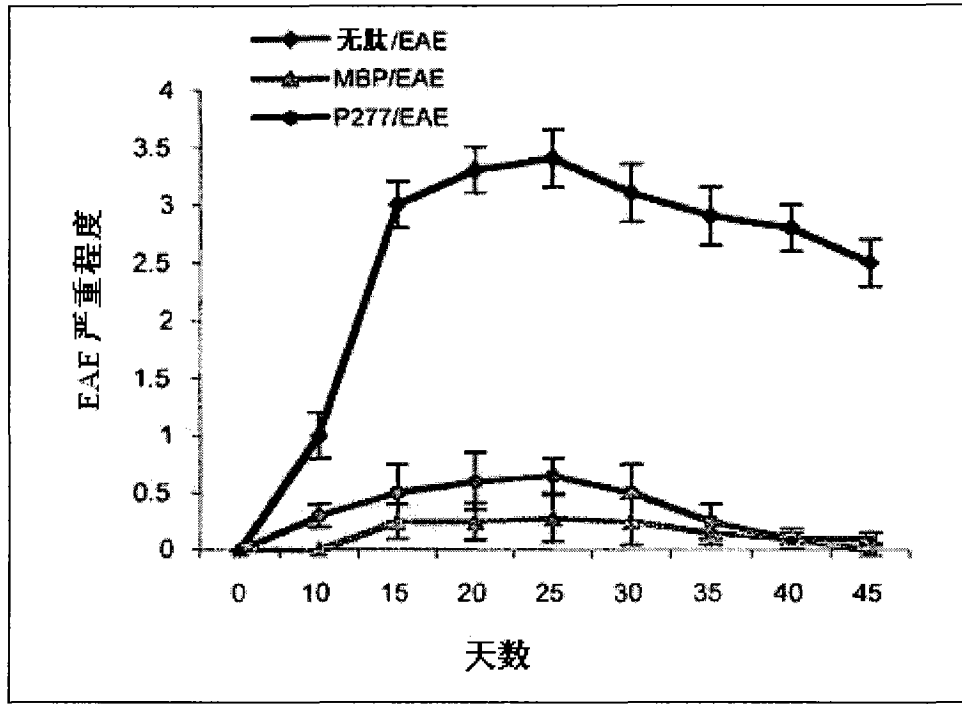


图 15-A

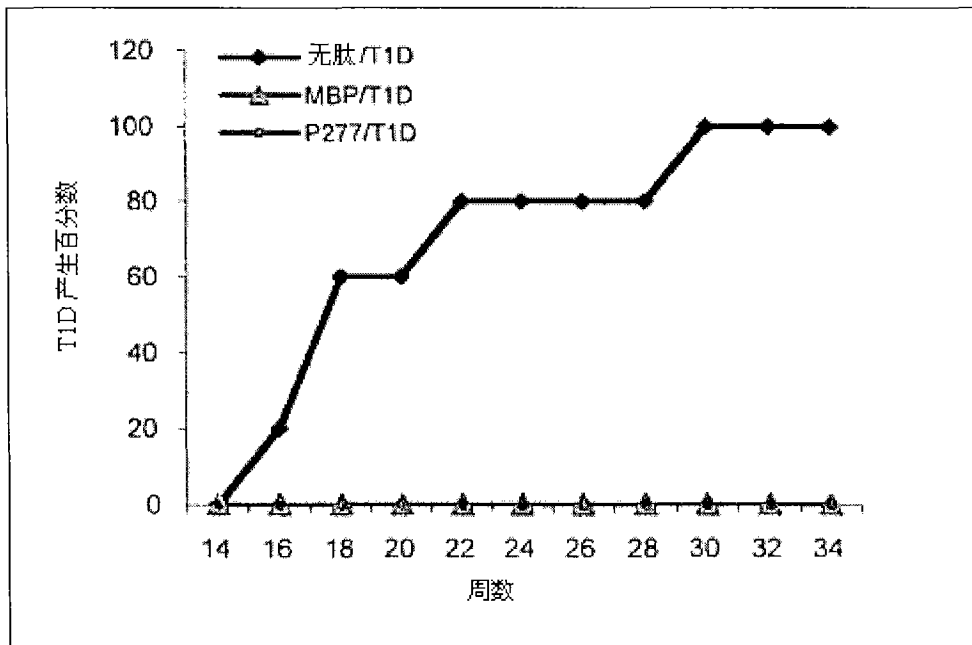


图 15-B

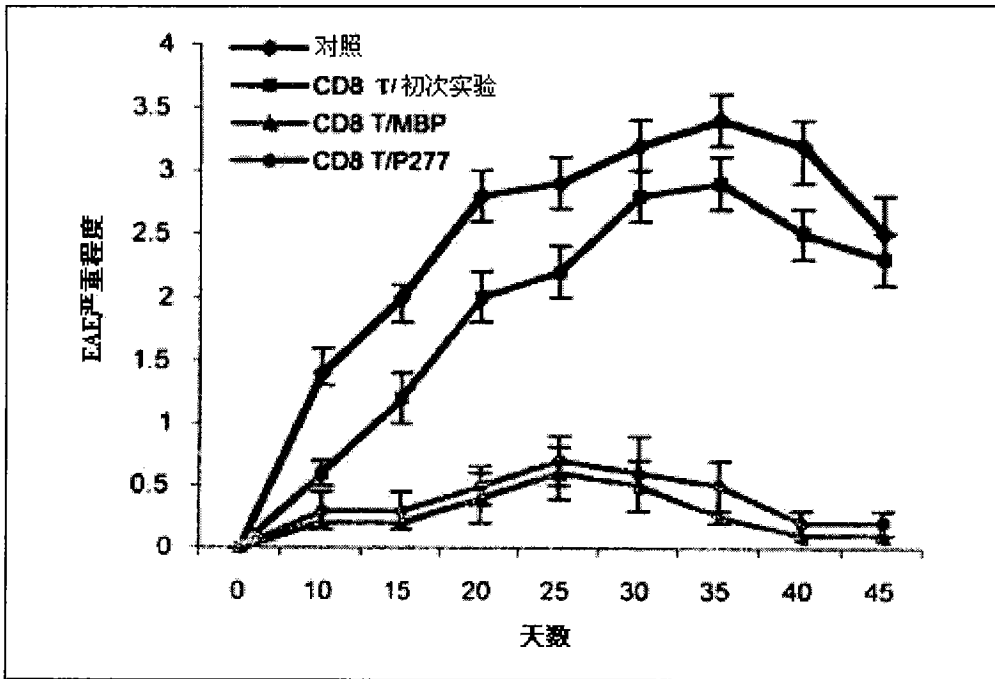


图 15-C

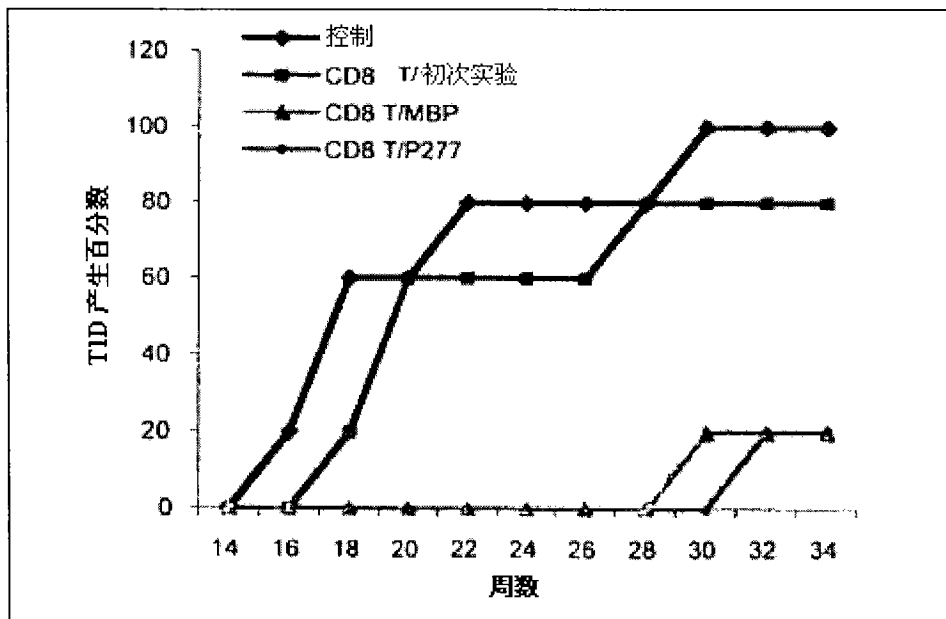


图 15-D

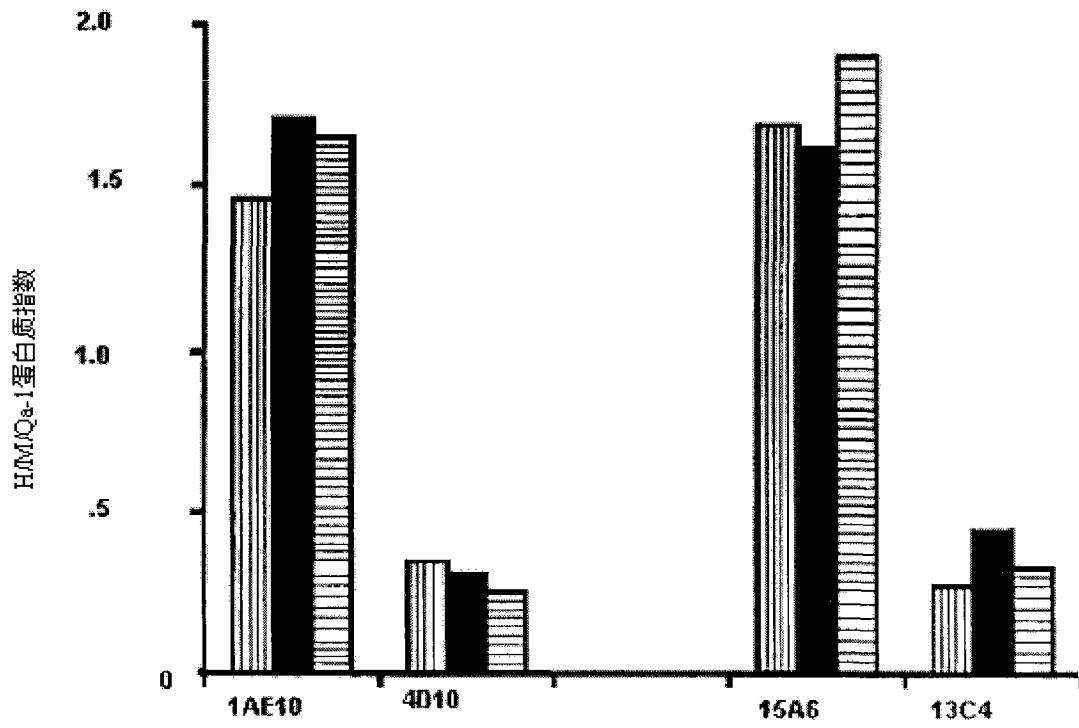


图 16

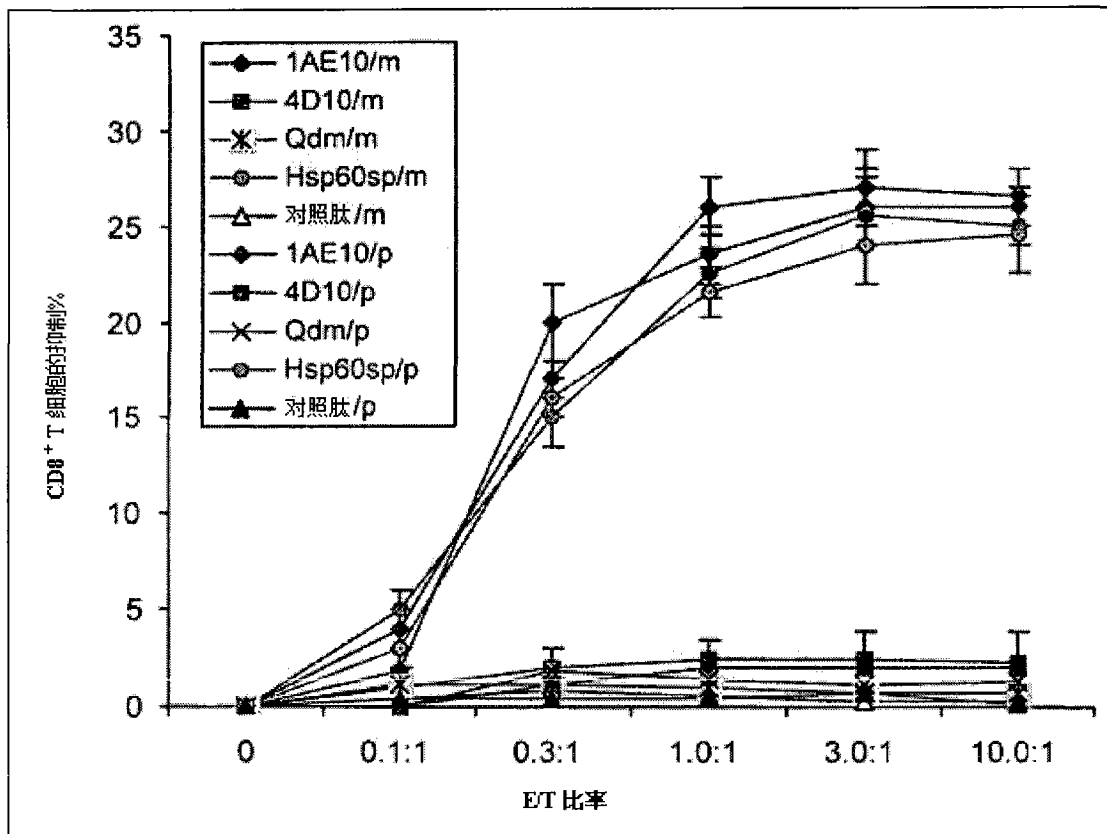


图 17-A

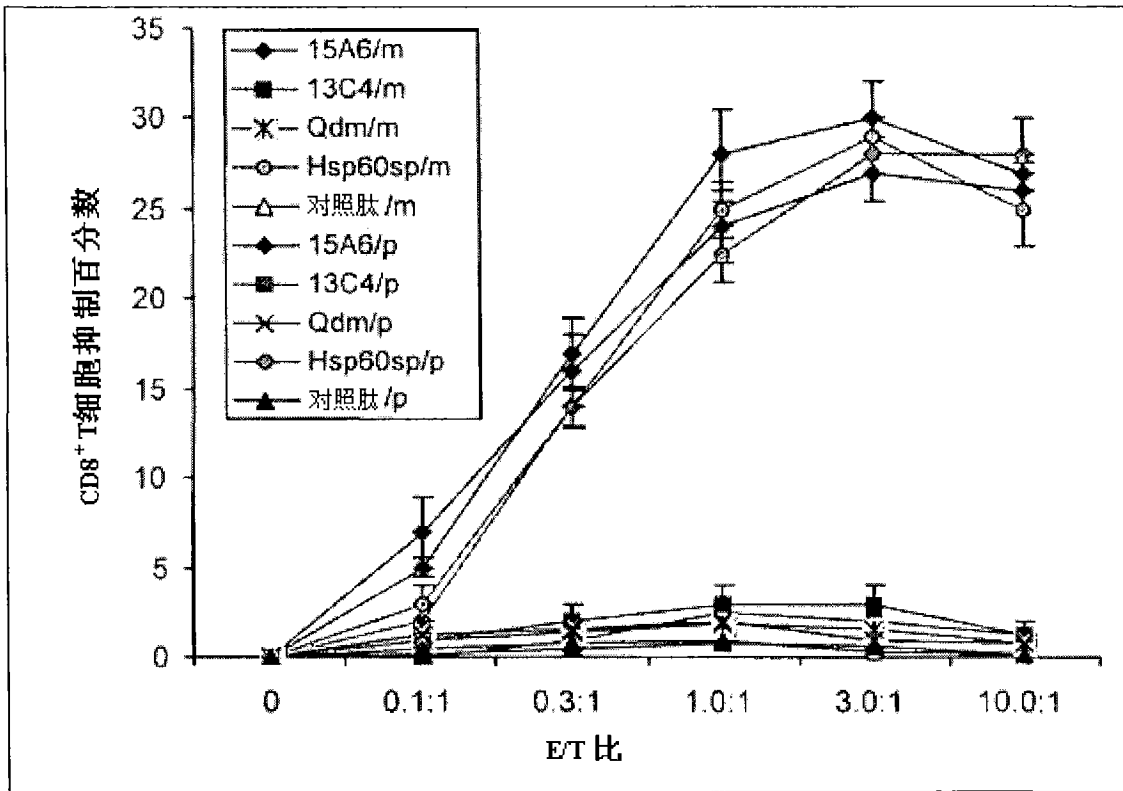


图 17-B

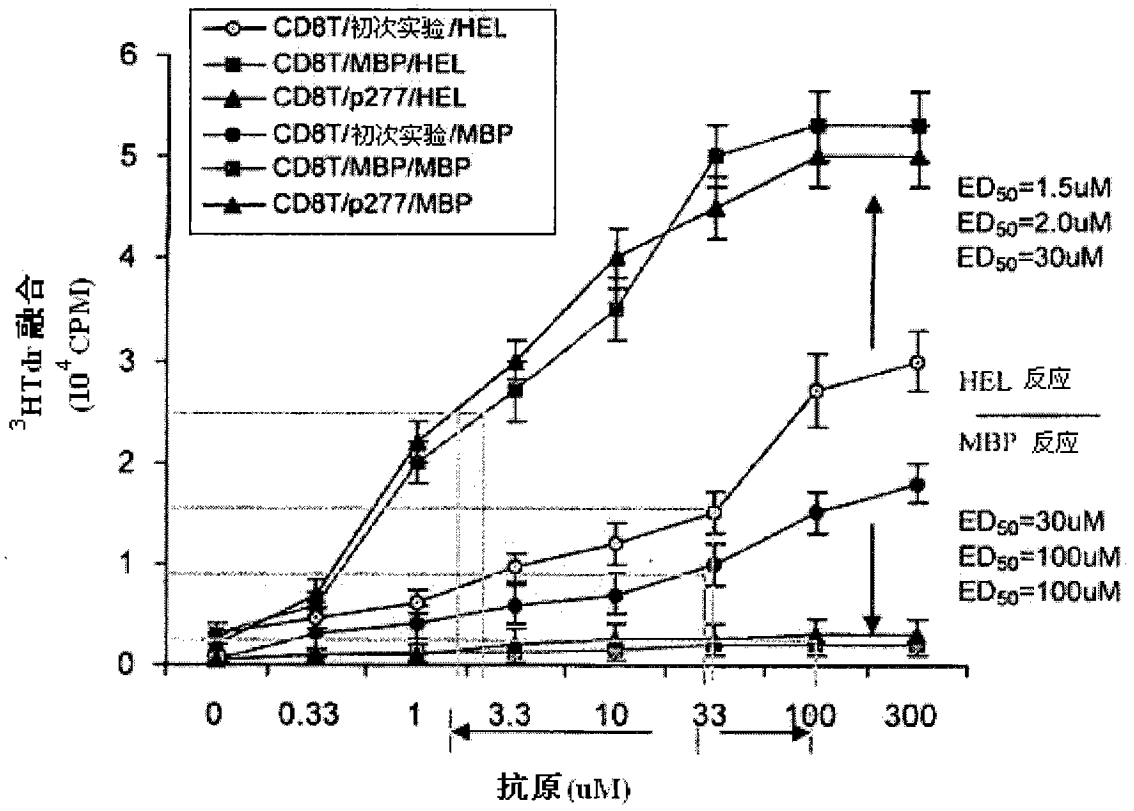


图 18-A

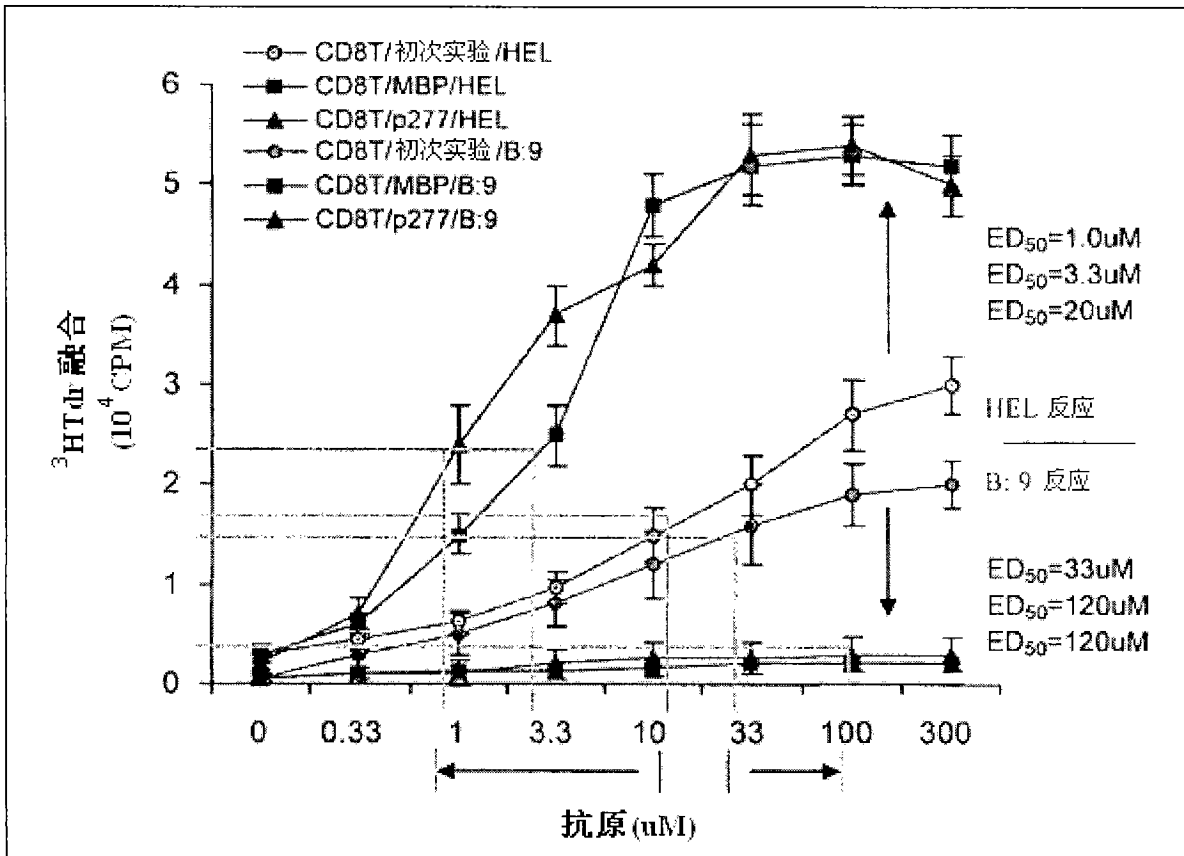


图 18-B

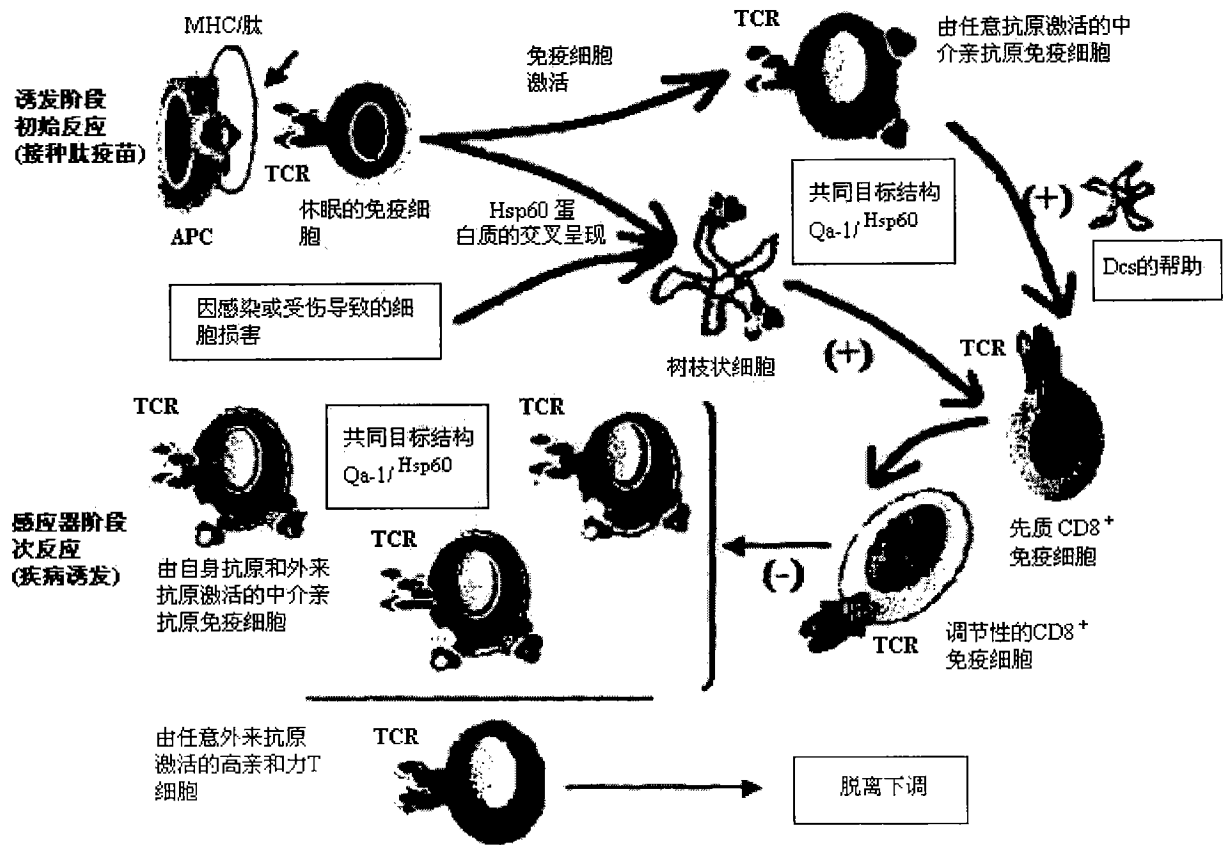


图 19

专利名称(译)	通过激活或阻断HLA-E/Qa-1限制性CD8+T细胞调控途径来治疗免疫疾病的方法		
公开(公告)号	CN101663047B	公开(公告)日	2014-07-09
申请号	CN200880012520.7	申请日	2008-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学理事会		
申请(专利权)人(译)	纽约哥伦比亚大学理事会		
当前申请(专利权)人(译)	纽约哥伦比亚大学理事会		
[标]发明人	宏江 雷奥纳多查斯		
发明人	宏·江 雷奥纳多·查斯		
IPC分类号	A61K38/40 A61K38/08 A61K39/00 A61K39/385 C12N1/20 C12N5/02 C07K14/00 C07K16/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/6043 A61K2039/5158 A61K39/00 A61K2039/57 A61K39/0008 A61P1/04 A61P3/10 A61P7/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/2833 C07K2317/24 C07K2317/76		
代理人(译)	余刚 张英		
审查员(译)	赵鹏		
优先权	60/903070 2007-02-23 US 61/004358 2007-11-26 US		
其他公开文献	CN101663047A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了抑制或提高由HLA-E-限制性CD8+T细胞引起的抗原激活的HLA-E+T细胞下调的方法，包括使HLA-E+T细胞和CD8+T细胞分别与抑制或提高(i)CD8+T细胞的表面上的T细胞受体(TCR)和(ii)HLA-E+T细胞的表面上的由HLA-E提呈的自身肽之间的结合的试剂相接触，从而分别抑制或提高抗原激活的HLA-E+T细胞的下调。提供分别包含抑制或提高(i)CD8+T细胞的表面上的T细胞受体(TCR)和(ii)HLA-E+T细胞的表面上的由HLA-E提呈的自身肽之间的结合的试剂的组合物以及鉴别这些试剂的检测方法。

T细胞克隆	亲和力	ED ₅₀ (μ M)	基因表达指数*			Hsp60 / MHC Class Ia (H/M)	
			Qa-1	Hsp60	MHC Class Ia(H-2D ^b)	H/M 基因表达比 ∞	H/M/ Qa-1 指数 \diamond
9E4	高	<1	0.35	0.60	0.44	1.36	0.48
19F6	高	<1	0.50	0.53	0.51	1.04	0.52
10H9	中	3	0.45	1.43	0.31	4.61	2.08
13C7	中	10	0.40	2.10	0.29	7.24	2.89
12D7	低	>20	0.42	0.46	0.56	0.82	0.35
13F2	低	>20	0.45	0.25	0.45	0.56	0.25
44H7	低	>20	0.46	0.35	0.61	0.57	0.26