

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-534213

(P2004-534213A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/53

A 6 1 K 39/00

A 6 1 K 39/35

A 6 1 P 1/18

A 6 1 P 3/10

F I

G 0 1 N 33/53

A 6 1 K 39/00

A 6 1 K 39/35

A 6 1 P 1/18

A 6 1 P 3/10

テーマコード (参考)

4 B 0 2 4

4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 98 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-581953 (P2002-581953)
 (86) (22) 出願日 平成14年4月10日 (2002.4.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年10月10日 (2003.10.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/011356
 (87) 国際公開番号 W02002/084249
 (87) 国際公開日 平成14年10月24日 (2002.10.24)
 (31) 優先権主張番号 60/283,090
 (32) 優先日 平成13年4月10日 (2001.4.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

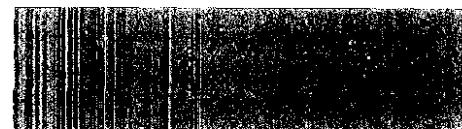
(71) 出願人 503174475
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
 ザ リーランド スタンフォード ジュ
 ニア ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ
 アルト エル カミノ リアル 170
 5
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体特異的プロファイルの治療および診断的使用方法

(57) 【要約】

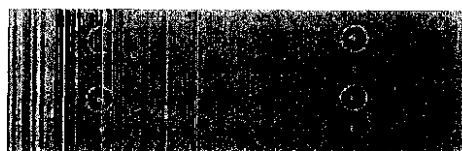
本発明は、個体において抗体特異的プロファイルを決定する方法を提供する。この特異的プロファイルは、自己抗原、アレルゲン、移植片抗原などの複数の抗原および/またはエピトープに対する個体の免疫反応を明らかにしている。抗体特異的プロファイルは、抗体を含有する患者試料のアレイへの結合により決定される。このアレイは、抗原およびエピトープを含むことができる。本発明は更に、自己免疫疾患、アレルギーおよび移植片拒絶反応を含む免疫関連疾患の、遺伝子によるまたは個体化された診断および治療のいずれかの開発において使用することができる、抗原またはエピトープ特異的プロファイルを決定する手段および方法を提供する。



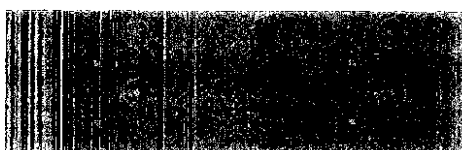
A. Normal Rat Serum



B. Rat EAE induced with MBPp68-86



C. Rat EAE induced with PLPp139-151



D. Rat EAE induced with MOGp88-89

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疾患がインスリン依存型糖尿病でない、免疫関連疾患患者における抗体特異的プロファイルを決定する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)少なくとも2種の疾患関連抗原エレメントを含む抗原アレイを調製する段階であり、各抗原エレメントが少なくとも1種の免疫学的エピトープを更に含む段階；

(b)段階(a)の抗原アレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階；

(c)段階(b)の患者試料中の抗体に結合しているアレイ内の疾患関連抗原を同定する段階；
ならびに

(d)段階(c)の疾患関連抗原に結合した抗体を、(1)段階(a)のアレイ内の疾患関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体が疾患に関連することがわかっている段階、および、(2)段階(a)のアレイ内の疾患関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体が疾患に関連しない段階。 10

【請求項 2】

免疫関連疾患が、自己免疫疾患である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

免疫関連疾患が、アレルギーである、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

免疫関連疾患が、移植片拒絶反応である、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

患者が、臨床症状を発症していない、請求項1記載の方法。 20

【請求項 6】

患者が、臨床症状を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

自己免疫疾患が、慢性関節リウマチである、請求項2記載の方法。

【請求項 8】

自己免疫疾患が、多発性硬化症である、請求項2記載の方法。

【請求項 9】

抗原が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、DNA、RNA、脂質、グリコシル化された分子、リン酸化修飾を伴うポリペプチド、シトルリン修飾を伴うポリペプチド、多糖または他の分子からなる群より選択される、請求項1記載の方法。 30

【請求項 10】

抗原アレイが、マイクロアレイである、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

抗原アレイが、アドレス指定可能なエレメントを有する、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

抗原アレイが、低密度アレイである、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

抗原アレイが、高密度アレイである、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

患者試料が、血液試料である、請求項1記載の方法。 40

【請求項 15】

患者試料が、脳脊髄液試料である、請求項1記載の方法。

【請求項 16】

患者試料が、滑液試料である、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

患者試料が、自己免疫疾患病変から採取される、請求項1記載の方法。

【請求項 18】

抗体特異的パネルを含む、抗体に結合された抗原を1種または複数含有する治療的物質を投与することにより、患者を治療する段階を更に含む、請求項1記載の方法。 50

【請求項 19】

免疫関連疾患患者における抗体特異的プロファイルを決定する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)少なくとも1種のエピトープエレメントを含むエピトープエレメントアレイを調製する段階；

(b)段階(a)のエピトープアレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階；

(c)段階(b)の患者試料中の抗体に結合しているアレイ内の疾患関連エピトープを同定する段階；ならびに

(d)段階(c)の疾患関連エピトープに結合した抗体を、(1)段階(a)のアレイ内の疾患関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体が疾患に関連することがわかっている段階、および(2)段階(a)のアレイ内の疾患関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体が疾患に関連しないような段階。

10

【請求項 20】

アレイが、マイクロアレイである、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

免疫関連疾患が、自己免疫疾患である、請求項19記載の方法。

【請求項 22】

免疫関連疾患が、アレルギーである、請求項19記載の方法。

【請求項 23】

免疫関連疾患が、移植片拒絶反応である、請求項19記載の方法。

20

【請求項 24】

患者が、臨床症状を発症していない、請求項19記載の方法。

【請求項 25】

患者が、臨床症状を有する、請求項19記載の方法。

【請求項 26】

自己免疫疾患の治療法であって、以下の段階を含む方法：

(a)(1)少なくとも2種の疾患関連抗原を含む抗原アレイを調製する段階であり、ここで各抗原エレメントが少なくとも1種の免疫学的エピトープを更に含む段階、(2)段階(1)の抗原アレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階、(3)段階(2)の患者試料内の抗体に結合するアレイ内の疾患関連抗原を同定する段階、(4)段階(3)の疾患関連抗原に結合した抗体を、(i)段階(1)のアレイ内の疾患関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体が疾患に関連することがわかっている段階、および、(ii)段階(1)のアレイ内の疾患関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体が疾患に関連しない段階

30

を含む、患者の抗原特異的プロファイルを決定する段階；

(b)段階(a)の抗原特異的プロファイルを基に、患者に特異的な治療法を設計する段階であり、(1)患者試料中の抗体に結合された抗原を決定する段階、および(2)1種または複数の抗原を患者に投与する段階。

【請求項 27】

患者に投与される抗原が、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、DNA、RNA、脂質、グリコシル化された分子、リン酸化修飾を伴うポリペプチド、シトルリン修飾を伴うポリペプチド、多糖または他の分子からなる群より選択される、請求項26記載の方法。

40

【請求項 28】

患者に投与される抗原が、前記抗原をコードする核酸である、請求項26記載の方法。

【請求項 29】

核酸がDNAである、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

自己免疫疾患を治療する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)(1)エピトープアレイを調製する段階、(2)段階(1)のエピトープアレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階、(3)段階(2)の患者試料中の抗体に結合するアレ

50

イ内の疾患関連エピトープを同定する段階、(4)段階(3)の疾患関連エピトープに結合した抗体を、(i)段階(1)のアレイ内の疾患関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体が疾患に関連することがわかっている段階、および、(ii)段階(1)のアレイ内の疾患関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体が疾患に関連しない段階

を含む、患者のエピトープ特異的プロファイルを決定する段階；

(b)段階(a)のエピトープ特異的プロファイルを基に、患者に特異的な治療法を設計する段階であり(1)患者試料中の抗体に結合されたエピトープを決定する段階、および(2)1種または複数のエピトープを患者に投与する段階。

【請求項 3 1】

患者に投与されるエピトープが、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、DNA、RNA、脂質、グリコシル化された分子、リン酸化修飾を伴うポリペプチド、シトルリン修飾を伴うポリペプチド、多糖または他の分子からなる群より選択される、請求項31記載の方法。

【請求項 3 2】

患者に投与されるエピトープが、抗原をコードする核酸の形態である、請求項31記載の方法。

【請求項 3 3】

核酸がDNAである、請求項33記載の方法。

【請求項 3 4】

インスリン依存型糖尿病(IDDM、自己免疫性糖尿病)患者において抗体特異的プロファイル
を決定する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)少なくとも4種のIDDM関連抗原を含む抗原アレイを調製する段階であり、各抗原エレメントが少なくとも1種の免疫学的エピトープを更に含む段階；

(b)段階(a)のIDDM抗原アレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階；

(c)段階(b)の患者試料中の抗体に結合するアレイ内のIDDM関連抗原を同定する段階；

(d)段階(c)の疾患関連抗原に結合した抗体を、(1)段階(a)のアレイ内のIDDM関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体がIDDMに関連することがわかっている段階、および(2)段階(a)のアレイ内の疾患関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体がIDDMに関連しない段階。

【請求項 3 5】

インスリン依存型糖尿病(IDDM、自己免疫性糖尿病)患者において抗体特異的プロファイル
を決定する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)少なくとも4種のIDDM関連エピトープエレメントを含むエピトープアレイを調製する段階；

(b)段階(a)のエピトープアレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階；

(c)段階(b)の患者試料中の抗体に結合するアレイ内のIDDM関連エピトープを同定する段階；

(d)段階(c)のIDDM関連エピトープに結合した抗体を、(1)段階(a)のアレイ内の疾患関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体がIDDMに関連しない段階。

【請求項 3 6】

インスリン依存型糖尿病(IDDM、自己免疫糖尿病)を治療する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)(1)少なくとも4種のIDDM関連抗原を含む抗原アレイを調製する段階であり、各抗原エレメントが少なくとも1種の免疫学的抗原を更に含む段階、(2)段階(1)の抗原アレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階、(3)段階(2)の患者試料中の抗体に結合するアレイ内のIDDM関連抗原を同定する段階、(4)段階(3)のIDDM関連抗原に結合した抗体を、(i)段階(1)のアレイ内のIDDM関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体がIDDMに関連することがわかっている段階、および(ii)段階(1)のアレイ内のIDDM関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体がIDDMに関連しない段階

を含む、患者の抗原特異的プロファイルを決定する段階；

10

20

30

40

50

(b)段階(a)の抗原特異的プロファイルを基に、患者に特異的な治療法を設計する段階であり、(1)患者試料中の抗体に結合された抗原を決定する段階、および(2)1種または複数の抗原を患者に投与する段階。

【請求項37】

インスリン依存型糖尿病(IDDM、自己免疫糖尿病)を治療する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)(1)少なくとも4種のIDDM関連エピトープエレメントを含むエピトープアレイを調製する段階、(2)段階(1)のエピトープアレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階、(3)段階(2)の患者試料中の抗体に結合するアレイ内のIDDM関連エピトープを同定する段階、(4)段階(3)のIDDM関連エピトープに結合した抗体を、(i)段階(1)のアレイ内のIDDM関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体がIDDMに関連することがわかっている段階、および(ii)段階(1)のアレイ内のIDDM関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体がIDDMに関連しない段階

10

を含む、患者のエピトープ特異的プロファイルを決定する段階；

(b)段階(a)のエピトープ特異的プロファイルを基に、患者に特異的な治療法を設計する段階であり、(1)患者試料中の抗体に結合されたエピトープを決定する段階、および(2)1種または複数のエピトープを患者に投与する段階。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

20

発明の背景

免疫系の驚くべき複雑さは、その最大の強みである。 $10^{12} \sim 10^{14}$ 種の可能性のある抗体特異性、様々な調節細胞とエフェクター細胞の間の精巧な相互作用、MHC抗原によるT細胞反応の拘束；これらは全て、異物として認識された感染性物質および他の抗原に対し効果的に反応する宿主の能力に寄与している。しかしこの多様性には欠点がある。誤りが生じ；反応の標的が、正常な自己タンパク質となり；炎症反応が誤って調節され；かつ、望ましくないことに、正常な反応が移植片および移植された細胞に対し向けられることがある。これらの状況下において、このシステムの複雑性は、診断および治療を極めて困難なものとしている。

【0002】

30

ほとんどの自己免疫疾患、アトピー症状および望ましくない免疫応答について、有効な診断的血液検査または治療薬は存在しない。例えば、現在の治療戦略は、全身に及ぶ免疫抑制を基本とすることが多い。この治療は抗原特異性ではないので、結果的には、免疫機能が全般的に低下し、感染症および疾患に罹患しやすくなる。従って、抗原特異的な診断および特に望ましくない免疫反応は停止するが、残りの免疫系は無傷のまま残す寛容療法の臨床的必要性は極めて大きい。しかし抗原特異的療法を提供するには、反応性細胞の抗原特異性を定義する必要がある。

【0003】

自己免疫疾患における抗原性標的を定義することの重要性は、一部これらの疾患の進行に関連する。例えば、多発性硬化症(MS)および実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)のような神経変性疾患における免疫反応は、例えばミエリン塩基性タンパク質、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質、プロテオリピドタンパク質、および様々な他のミエリン抗原のような、1種または複数のミエリン鞘タンパク質に対して方向づけられる。この疾患が進行するにつれて、開始抗原に対する反応性は消失し、かつ新たな免疫反応性の整然としかつ定義可能なセットが生じる。時間経過と共に、抗原特異的自己免疫反応が、「分子内エピトープ伸展」と称されるようなひとつのタンパク質上の様々なエピトープへと拡大するか、または「分子間エピトープ伸展」と称されるような別の構造タンパク質の別のエピトープへと拡大することができる。ひとつのエピトープに対する免疫化により開始されたEAEの経過の間、分子内および分子間の両エピトープ伸展が、自己免疫反応を、開始抗原上の他のエピトープに対するおよび他のミエリン抗原に対する検出可能なT細胞反応を包含するように

40

50

発展させる(Steinman、J. Exp. Med.、189:1021-1024(1999)参照)。

【0004】

Touhyらにより説明されたように(J. Exp. Med.、189:1033-1042(1999))、患者は、初期免疫反応時に認識されたミエリンエピトープに対する反応性を失い、かつ他のミエリンエピトープに対するT細胞免疫反応性を示した。その疾患は、臨床的に進行し、かつその後慢性化する段階に侵入するので、自己免疫における開始自己抗原に対する免疫反応は、結局は消失する。しかし重要な免疫原性エピトープは、依然慢性疾患状態において認められ、かつこれらは抗原特異的療法の手掛かりを提供する。

【0005】

抗原特異的療法が提供される前に、より正確でハイスループットの診断法に加え、特異的免疫抑制剤を送達する手段が必要とされる。T細胞受容体は適当な主要組織適合性タンパク質に結合した場合のみ抗原を認識するために、自己免疫疾患に対する強力なT細胞成分が存在するような場合の診断の実現は、特に困難である。

【0006】

T細胞の同源抗原の正確な同定は依然難問であるが(Altmanら、Science、274(5284):94-6(1996)参照)、抗体特異的な血清型分類のための技術は存在する。特定の特異性を伴う抗体の検出に関して、当技術分野において多くのアッセイ法が公知でありかつ使用されており、これはELISA、RIA、競合的および非競合的サンドイッチアッセイ法、例えば多孔質支持体上の固相イムノアッセイ法(米国特許第5,486,452号参照)などを含む。例えば、Atassiらの米国特許第5,578,496号(1996)は、標的抗原由来の重複するペプチドを使用する固相放射免疫アッセイ法により、自己抗体の細かい特異性を定義している。同様にHarleyの米国特許第5,637,454号(1997)により、SSAタンパク質に対する自己抗体の特異性を決定するための、固相抗ペプチドアッセイ法が行われた。

【0007】

抗原特異的反応を目的とした療法が開発されている。場合によっては、ペプチドは、その抗原に対する寛容を誘導する方法で宿主へ送達される。例えばミエリン塩基性タンパク質を改変したペプチドによるMSの治療に関する第II相臨床試験が実施されている。この臨床試験の結果は、Kapposらの論文(Nature Medicine、6:1176-1182(2000))；および、Bielekovaらの論文(Nat. Med.、6:1167-1175(2000))に説明されている。変更されたペプチドリガンドとして作用する微生物ペプチドは、Ruizらの論文(J. Exo. Med.、189:1275-1283(1999))に説明されている。自己免疫反応により標的化された精製ミエリンタンパク質の送達も、EAE治療における効能を明らかにしている(Critchfieldら、Science、263:1139-43(1994))。自己抗原をコードするDNA配列は、抗原特異的免疫抑制を促進するために使用することもできる。Ruizら(J. Immunol.、162:3336-3341(1999))は、ミエリンプロテオリピドタンパク質の優位なエピトープをコードするミニ遺伝子でワクチン処置し、疾患を予防することを明らかにしている。Garrenら(2001)は、4種の抗原をコードするミニ遺伝子のカクテルでワクチン処置し、活動期の疾患の予防および治療を増強することを明らかにしている。

【0008】

臨床的病態において免疫細胞により認識されている自己抗原レパートリーの正確かつ迅速に診断を行う方法、およびこの知識の特定の治療理学療法への解釈については、まだ満たされていない必要性が存在する。本発明はこの問題点に対処している。

【発明の開示】

【0009】

発明の概要

本発明の目的は、以下の段階を含む、免疫関連疾患患者における抗体特異的プロファイルを決定する新規方法により達成される：(a)少なくとも2種の疾患関連抗原を含む抗原アレイを調製する段階であり、抗原は、1種または複数の免疫学的エピトープを更に含む段階；(b)段階(a)の抗原アレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階；(c)段階(b)の患者試料中の抗体に結合するマイクロアレイ内の疾患関連抗原を同定する段階

；(d)段階(c)の疾患関連抗原に結合した抗体を、(1)段階(a)のマイクロアレイ内の疾患関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体は疾患に関連することがわかっている段階、および(2)段階(a)のマイクロアレイ内の疾患関連抗原に結合している抗体と比較する段階であり、抗体は疾患に関連しない段階。本発明の目的は、以下の段階を含む、免疫関連疾患の患者における抗体特異的プロファイルを決定する新規方法により達成される：(a)1種または複数の疾患関連エピトープを含むエピトープアレイを調製する段階；(b)段階(a)のエピトープアレイを、抗体を含有する患者試料と物理的に接触させる段階；(c)段階(b)の患者試料中の抗体に結合するマイクロアレイ内の疾患関連エピトープを同定する段階；(d)段階(c)の疾患関連エピトープに結合した抗体を、(1)段階(a)のマイクロアレイ内の疾患関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体は疾患に関連することがわかっている段階、および(2)段階(a)のマイクロアレイ内の疾患関連エピトープに結合している抗体と比較する段階であり、抗体は疾患に関連しない段階。抗体特異的プロファイルを決定する新規方法は更に、当業者に、場合に応じ、抗原プロファイルまたはエピトーププロファイルも提供する。本発明の方法および組成物は、免疫関連疾患の診断ならびに特異的療法の設計および選択のために使用される。より詳細に述べると、抗体特異的プロファイルを決定することに関連した方法および組成物は、多発性硬化症 (MS)、慢性関節リウマチ (RA)、自己免疫糖尿病、全身性エリスマトーデス (SLE)、筋炎、強皮症、乾癬性関節炎、原発性胆汁性肝硬変 (PBC)、重症筋無力症 (MG)、多発性軟骨炎、および組織移植片拒絶反応などの免疫関連疾患を含む、自己免疫疾患のために使用することができる。更に抗体特異的プロファイルを決定する方法は、アレルギーにおいて使用される。ひとつの態様において、ハイスループット決定は、これらの抗体の詳細な結合分析による、患者血清中に存在する疾患関連抗体のスペクトルの作成である。この抗体特異的プロファイルは、1種または複数のエピトープを有する1種または複数の抗原に向けられた、個人の複合免疫反応を明らかにする。

【0010】

本発明は、免疫関連障害を発症している可能性が高いがまだ症状が顕在化していない患者を同定するために、抗体特異的プロファイルを決定する方法を提供する。

【0011】

同じく本発明は、疾患のより重症な形を発症する可能性が高い患者を同定し、患者の抗体特異的プロファイルを基により攻撃的療法の選択を可能にする方法を提供する。

【0012】

本発明は更に、抗原特異的療法および抗原非特異的療法を含む、治療法を設計する方法も提供する。ひとつの態様において、抗原特異的療法は、抗体特異的プロファイルを基に選択される。患者の抗体特異的プロファイルは、B細胞およびT細胞の両方が媒介した反応に関する情報を提供する。抗原特異的療法の個々に合わせられたカクテルは、患者の特異的プロファイルを基に製剤化することができる。別の態様において、同じ免疫障害を有する患者間の共通の抗体特異的プロファイル一致の同定は、その疾患を持つ患者を治療するための一般的抗原特異的療法の製剤を提供する。

【0013】

更に別の本発明の局面においては、免疫関連障害に関する治療を受けている患者において治療的反応をモニタリングするための抗体特異的プロファイルを決定する方法がある。治療的反応は、抗体標的における変化(すなわち、抗原またはエピトーププロファイル)、抗体力価の変化、抗体アイソタイプの変化、および抗体認識の大規模パターンの変化を含む、抗体特異的プロファイルの変更を基に評価される。別の態様において、抗体特異的プロファイルは、個々の患者における有害な結果を予測し、これにより代替療法の選択を可能にするために使用することができる。

【0014】

別の局面において、抗体特異的プロファイルは、疾患に関連した新規抗原および疾患に関連した新規エピトープを同定することが可能である。

【0015】

態様の詳細な説明

ひとつの態様において、ハイスルーブット決定は、これらの抗体の詳細な結合分析により、患者血清中に存在する疾患関連抗体で行われる。この抗体特異的プロファイルは、自己抗原、アレルゲン、移植片抗原などの複数のエピトープに対する個体の免疫反応を明らかにしている。このような抗体または抗原特異的プロファイルは、自己免疫疾患、アレルギーおよび移植片拒絶反応を含む、免疫関連疾患の個別化された診断および治療の開発において用いられる。エピトープ伸展、抗原特異性、および定量的結合データを追跡することにより、疾患の病期および進行を決定することができる。

【0016】

自己抗体反応の特異性は、自己反応性T細胞反応の特異性と相関することができることはわかっている。いくつかのヒト自己免疫疾患において、自己免疫T細胞およびB細胞反応は、同じ免疫優性なエピトープを認識する。自己免疫疾患におけるB細胞およびT細胞反応の細かい特異性の間に不一致があるようなこれらの場合において、個体が自己反応するものに対する特異的自己タンパク質を同定する能力は、自己免疫反応の特異性および進化を研究し、かつ適した抗原特異的治療を選択するのに十分であることができる。個々の患者における自己抗体反応の特異性の知識は、早期診断を促進し、予後の指標として提供され、かつ適当な抗原特異的寛容療法の開発および選択を導く上での助けとなることができる。

【0017】

自己免疫糖尿病、全身性エリスマトーデス(SLE)、重症筋無力症、およびグレーブズ病を含むある種の自己免疫疾患に関して、1種または2種の自己タンパク質に対する抗体反応性の検出は、診断での実用性がある。ある種の抗体反応性は更に、予後判定での実用性があることも明らかにされた。例えば、DNAに対する自己抗体は、SLEの一部のモデルにおいて病原性であり、一般には腎の関与が関連づけられており、かつそれらの力価は頻繁に疾患活動度と相関している。多発性筋炎の場合、Jo-1自己抗体は、数ヶ月から数年にわたり臨床疾患に先行することが多く、かつ間質性肺疾患の発症および予後不良を予想する。

【0018】

ヒト自己免疫疾患は、その臨床の症状発現に関して極めて雑多である。例えば、SLE患者は、患者毎に変動する臨床疾患のスペクトルを有する。ある患者は、それらの皮膚および関節の症状発現に主に関連する疾患を有する一方で、他の患者は、心および肺に液体貯留(漿膜炎)を引き起す疾患を有し、同時に他の患者は、主に腎および脳に影響を及ぼす疾患を有する。多発性硬化症において、ある患者は、能力障害とならない良性の経過を辿る再発-寛解する(relapsing-remitting)疾患を有する一方で、別の患者は麻痺および能力障害を引き起す慢性進行性疾患に発展する再発-寛解する疾患を最初に有し、更に別の群は、開始時から慢性進行性疾患を発症する。おそらく、これらの各疾患の異なる臨床形は、個別の疾患亜型を表わし、ここで自己免疫反応は、異なる自己抗原に対して方向付けられ、かつこれは特異的療法に対して示差的に反応すると考えられる。

【0019】

本発明のひとつの態様において、抗体特異的プロファイルは、患者試料由来の抗体の、ペプチドが抗原のエピトープ候補に対応しているアレイを含む抗原への結合により決定される。少量の試料は、多数の異なるペプチドをスクリーニングするのに十分である。このアレイは、タンパク質複合体、全タンパク質および/またはタンパク質断片の個々のスポットを含むことができ、ここでこれらの断片は、完全なタンパク質、またはタンパク質の部分的代表を包含している重複するペプチドであることができ、これは公知の免疫優性なペプチドを含むことがある。このアレイは更に、一本鎖DNA、二本鎖DNA、オリゴヌクレオチド、RNA、脂質、糖質または他の分子を含む他の分子のスポットを含むことがある。自己免疫疾患の場合、抗体特異的プロファイルは、抗原特異的ワクチンまたは治療に対する抗体反応をモニタリングおよび/または予想する手段を提供し、このワクチンもしくは治療は、DNA、ペプチド、タンパク質または他の分子に基づくことができる。この抗体反応プロファイルは、有効な療法が患者に送達されているかどうかを示すことができる。

【0020】

10

20

30

40

50

抗体特異的プロファイルから得られた情報を用い、治療をモニタリングし、治療法を修飾し、かつ更に治療薬の選択を最適化する。この方法により、治療および/または診断方法は、治療の経過にわたり異なる時点で得られたこの特異的データに従い個別化およびテーラーメイドにすることができ、これにより個体に適している療法が提供される。加えて患者試料は、分析のために治療プロセスの途中のいずれかの時点で得ることができる。

【0021】

分析のための試料を提供する哺乳類種は、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジなど、ならびに霊長類、特にヒトを含む。動物モデル、特に小型哺乳類、例えばマウス、ウサギなどは、実験研究のために使用することができる。関心対象の動物モデルは、自己免疫、移植片拒絶反応などのモデルに関するものを含む。

10

【0022】

抗体、自己抗体およびT細胞受容体：

免疫系の抗原特異性は、抗体(または免疫グロブリン)およびT細胞受容体として公知のタンパク質群によりもたらされる。各々は、様々なクラス、サブクラスおよびアイソタイプにおいて産生され、これらは当技術分野において全て周知であり、かつ本発明の目的に関する定義に含まれる。遺伝子組換え法、および場合によっては体細胞変異を通じ、様々なタンパク質配列の非常に大きいレパートリーが、これらのタンパク質の可変領域において作成される。これらの可変領域の非共有結合相互作用は、免疫系が、多糖、ポリペプチド、ポリヌクレオチドなどの分子である抗原に結合することを可能にする。従って抗体またはT細胞受容体の「特異性」は、可変領域の抗原へ高親和性で結合する能力を意味する。

20

【0023】

抗体の結合部位は、典型的には複数の非共有結合相互作用を利用し、高親和性結合を実現する。抗原の数個の接触残基は、結合ポケットに非常に近接するようになり、その抗原分子の他の部分も、結合を可能にする立体配座の維持に必要とされる。抗体により結合された抗原の部分は、エピトープと称される。本明細書において使用されるように、エピトープは、高親和性結合に十分な抗原の一部である。抗原がタンパク質である場合は、一般に線状エピトープは、長さが少なくとも約7個のアミノ酸であり、約15~22個のアミノ酸長を超えないと考えられる。しかし抗体は、抗原上の非隣接残基により形成された立体配座依存決定基も認識し、その結果エピトープは、結合のために存在する抗原のより大きい断片を、例えばタンパク質またはリボ核タンパク質複合体ドメイン、タンパク質ドメイン、またはタンパク質配列の実質的に全てを必要とする。例えばハプテンのような別の場合において、エピトープは、例えばジゴキシン、ジゴキシゲニンなどの、非常に小さい分子であることができる。全身性エリスマトーデスおよび他の自己免疫疾患において、自己抗体は、タンパク質、脂質、核酸の複合体、または核タンパク複合体に結合することも良く確立されている。加えて、自己抗体は、自己タンパク質における翻訳後修飾に対して方向づけることができる。本明細書において使用される自己タンパク質は、ゲノム内にコードされかつ生物により産生されたタンパク質である。それに対して自己抗体が検出される翻訳後修飾の例は、リン酸化されたアミノ酸およびシトルリン修飾されたアミノ酸に加え、グリコシル化における差異を含む。ある疾患において、自己免疫反応は、DNA、RNA、脂質および他の分子に対し方向づけられる。

30

40

【0024】

「特異的」とであると考えられる抗体結合の親和性レベルは、一部抗体クラスにより決定され、例えば、IgMクラスの抗原特異的抗体は、例えばIgGクラスの抗体よりも低い親和性を有する可能性がある。本明細書において使用されたように、「特異的」とである抗体相互作用を考慮するためには、この親和性は、少なくとも約 10^{-7} M、通常約 10^{-8} ~ 10^{-9} Mであり、かつ関心対象のエピトープについては最大 10^{-11} またはそれよりも高くてもよい。当業者には、「特異性」という用語は、このような高親和性結合を意味し、その上抗体が更に他の分子には結合することができないことを意味することは意図されないことが理解されられる。例えば、抗原の配列または構造の関係により、もしくは抗体結合ポケットそれ自身の構造により、様々なエピトープとの交差反応性を認めることができる。このような

50

交差反応性を示している抗体は、依然として本発明の目的について特異的であると見なされる。

【0025】

T細胞受容体は、抗体よりもより複雑な構造を認識し、かつ主要組織適合性抗原結合ポケットおよび提示されるべき抗原性ペプチドを必要とする。T細胞受容体の結合親和性は、抗体のそれよりも低く、かつ一般には少なくとも約 10^{-4} M、より一般的には少なくとも約 10^{-5} Mであると考えられる。

【0026】

自己反応性抗体、または自己抗体、およびT細胞受容体は、宿主に存在する分子、一般には例えば自己免疫疾患においては宿主に通常存在する分子に、もしくはある種の癌症例においては腫瘍抗原に、高親和性で結合する抗原受容体である。外来組織の移植片由来の存在する抗原は、一般には自己抗原とは考えられない。開始免疫原は、自己抗原であることができ、もしくは自己抗原と交差反応性の分子であることができる。

10

【0027】

開示された方法は一部、自己抗体反応の特異性と、自己免疫反応を起動する自己反応性ヘルパーT細胞反応のそれとの相関関係を基にしている。いくつかのヒト自己免疫疾患において、自己免疫T細胞およびB細胞反応は、同じ免疫優性なエピトープを認識する。免疫優性なミエリン塩基性タンパク質(MBP)エピトープは、MSにおいて自己反応性T細胞およびB細胞の両方により認識される。B細胞およびT細胞反応の細かい特異性の間に不一致があるような場合においてでさえも、それに対し個体が自己反応性であるような特異的自己タンパク質を同定する能力は、抗原特異的寛容療法の選択を導くのに十分である。

20

【0028】

アレイ：

アレイは、アドレス指定可能なエレメントの集合である。このようなエレメントは、マイクロタイプレート内に含まれるか、もしくは各エレメントが個別のXおよびY座標として存在する平らな表面上にプリントされたアレイのように、空間的にアドレス指定可能である。または、エレメントは、タグ、ビーズ、ナノ粒子、または物理的特性を基にアドレス指定可能である。マイクロアレイは、当業者に公知の方法に従い調製することができる(例えば、米国特許第5,807,522号；Robinsonら、Nature Medicine、8:295-301(2002)；Robinsonら、46:885-93(2002)参照)。本明細書において使用されるアレイは、複数のアドレス指定可能なエレメントを伴ういずれかの生物学的アッセイ法を意味する。ひとつの態様において、アドレス指定可能なエレメントは抗原である。別の態様において、アドレス指定可能なエレメントはエピトープである。マイクロアレイは、アレイのミニチュア型である。本明細書において使用されるように、エレメントは、抗体により結合され得るいずれかの抗原を意味する。本明細書において使用される抗原は、特異的に抗体に結合することができる任意の分子を意味する。分子は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、RNA、DNA、脂質、グリコシル化された分子、糖質、リン酸化修飾を伴うポリペプチド、およびシトルリン修飾を伴うポリペプチド、アプタマー、酸化された分子、他の分子、およびその他の分子であることができるが、これらに限定されるものではない。

30

【0029】

アドレス指定可能性：

本明細書に説明されたエレメントに関して、アドレス指定可能性は、そのエレメントを同定することが可能である配置、位置、タグ、切断可能なタグまたはマーカー、識別子、スペクトル特性、電気泳動特性、または他の物理特性を意味する。コーディングとしても知られているアドレス指定可能性の一例は、空間のアドレス指定可能性であり、ここでは分子の位置は固定され、かつその位置は、アイデンティティと相関されている。この種の空間アレイは、一般に平らな基板上に合成されるかまたはスポットされ、例えば、多数の異なる分子が小さい領域に密に配列されている、例えば 1cm^2 当り少なくとも約400種の異なる配列を含むようなマイクロアレイを作製し、および 1cm^2 当り1000個の配列、もしくは多ければ 1cm^2 当り5000個の配列またはそれ以上であることもできる。プレート内のウェルが

40

50

各々個別の抗原を含むようなELISAまたはRIAプレートにおいて認められる、密度のより低いアレイは、1プレート当たり約96個の配列から、1cm²当たり約100個の配列まで、マイクロアレイ最大密度を含むことができる。別の空間的アレイは、光ファイバーを使用し、ここでは個別の抗原がファイバーに結合され、これはその後結合および分析のために束を形成することができる。ポリペプチドの空間的アレイの製造および使用の方法は、当技術分野において公知である。最近の論文は、抗原の連続希釈を含むマイクロアレイに基づくイムノアッセイ法を説明している、Joosらの論文(*Electrophoresis*, 21(13):2641-50(2000)) ; 市販のインクジェットプリンターの適合により得られかつセルロースペーパー上にタンパク質を含むスポットの一次元および二次元アレイを作成するために使用されるシステムを説明している、Rodaらの論文(*Biotechniques*, 28(3):492-6(2000)) ; ならびに、タンパク質-タンパク質、タンパク質-DNA、タンパク質-RNAおよびタンパク質-リガンド相互作用の定量的検出のための、万能タンパク質アレイシステムを説明している、Geの論文(*Nucleic Acids Res.*, 28(2):e3(2000))を含む。同じく、Mendozaら、「High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)」*Biotechniques*, 27:778-780(1999) ; ならびに、Luekingら、「Protein microarrays for gene expression and antibody screening」、*Anal. Biochem.*, 270:103-111(1999)も参照のこと。

10

【0030】

この種の空間的コーディングアレイの代わりに、標的抗原またはエピトープが、検出可能な標識に結合された分子「タグ」、もしくは抗原またはエピトープの配列に関するコードされた情報を提供するタグを使用する。ある場合において、これらのタグは、そのエレメントから切断され、引き続きそのエレメントを検出し同定することができる。別の態様において、抗原またはエピトープのセットは、コードされたビーズのセットに合成または結合することができ、ここで各ビーズは、個別の抗原またはエピトープに連結され、かつここでこれらのビーズはそれら自身結合した抗原またはエピトープの同定を可能にする方法でコードされている。フローサイトメトリーによる臨床試料の分析のための複合化された微粒子セットの使用は、国際特許出願番号97/14028 ; ならびに、Fultonら、*Clinical Chemistry*, 43:1749-1756(1997)に記載されている。同じく、他のアドレス指定可能な粒子またはタグの使用が可能である(Robinsonら、*Arthritis Rheumatism*, 46:885-93(2002)に概説されている)。

20

【0031】

抗原がビーズまたは微粒子に結合されているこの種の「タグアレイ」においては、結合の検出のためにフローサイトメトリーを使用することができる。例えば、蛍光コーディングを有する微粒子が、当技術分野において説明されており、ここで蛍光の色およびレベルは、特定の微粒子を独自に同定する。従って抗原は、「色コード化された」対象に共有結合することができる。標識された抗体は、フローサイトメトリーにより検出することができ、かつ微粒子上のコーディングは結合した抗原を同定するために使用される。

30

【0032】

抗原アレイ :

アレイのひとつの態様は、抗原アレイである。本明細書において使用される抗原アレイは、患者試料内に含まれた抗体の特異性の同定を可能にする方法で配列されている抗体に結合することが可能な個別の分子実体の空間的に分離されたセットを意味する。すなわち、標的抗原のセットは、個別の配列、三次元の形態、または分子構造を有し、ここで各標的抗原は同定のためにコードされている。このアレイは、1種または複数のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、RNA、DNA、脂質、グリコシル化された分子、リン酸化修飾を伴うポリペプチド、およびシトルリン修飾を伴うポリペプチド、アプタマー、他の分子、およびその他の分子を含むことができ、ここで異なる分子のクラスは、あるアレイにおいて組み合わせることができる。

40

【0033】

抗原 :

抗原は、核酸、脂質、リボ核タンパク質複合体、タンパク質複合体、タンパク質、ポリペ

50

プチド、ペプチドのような分子、ならびにそれに対するTリンパ球およびBリンパ球に関連する免疫反応を生じることができるような分子の天然の修飾を含む。各抗原に関して、その抗原の免疫学的決定基を表わしているエピトープのパネルが存在する。抗原は、抗体またはT細胞受容体により一部または全て認識することができる任意の分子を含む。本明細書において使用されるように、自己免疫疾患、アレルギーまたは組織移植片拒絶反応に関連した抗原を含む。自己免疫疾患に関して、抗原は自己抗体と称されることが多い。アレルギー疾患に関して、抗原は、アレルゲンと称されることが多い。抗原は免疫学的エピトープを含む。

【0034】

エピトープ：

エピトープは、Bリンパ球により、および特異的に細胞表面に発現されかつB細胞により分泌された抗体により、認識される抗原の一部である。エピトープは同じく、Tリンパ球上の特異的受容体により認識され得る。個々の抗原は、典型的には複数のエピトープを含むが、抗原が単独のエピトープを含むような場合がある。本発明のひとつの態様において、全タンパク質抗原由来のペプチド断片を用い、B細胞により産生された抗体により標的化された個々のエピトープを表わす。別の態様において、翻訳後修飾を示している分子、糖質、脂質および他の分子の部分は、個々のエピトープを表わすために使用することができる。エピトープは、免疫B細胞およびT細胞により認識された形態を表わしており、かつ更に天然型の抗原内に存在する同じエピトープの形態を有するペプチドおよび他の分子に由来した非抗原により提示されることもある。エピトープ形態を伴うエレメントの例は、アプタマーである。アプタマーは、免疫学的エピトープを模倣することができる形態を提供する分子である。複数のアプタマーを用い、エピトープ形態のライブラリーを作成することができる。

10

20

【0035】

本発明の目的のために、自己抗原および自己抗原由来のエピトープのアレイを用い、下記を同定または決定するために、患者の抗体特異的プロファイルを決定することができる：1.疾患を発症している可能性のある患者；2.多かれ少なかれ重度の疾患を発症している可能性のある患者；3.特定の療法に反応する、または特定の療法に関連した有害事象を有する可能性のある患者；4.患者特異的療法；ならびに、5.特定の治療的介入が、成功したか、しなかったか、または増悪するかどうか。自己抗原アレイは、疾患に関連することが分かっているか、特定の疾患に関連することが疑われるかのいずれかの様々な自己抗原、または自己抗原候補のライブラリーを含む。一例において、自己抗原アレイは、特定の疾患について最適化された自己抗原を含むことができるが、別の例においては、疾患を伴う患者における抗体反応の標的を同定するための未知の抗原のライブラリーを含むことができる。自己抗原のパネルからなる自己抗原アレイは、スクリーニング目的に使用することができ、ここでこのパネルは、特定の疾患に関連した異なるエピトープを反映している。関心対象の抗原エピトープパネルは、関心対象の特異的疾患について最適化されたパネルを含み、これは1種または複数の全タンパク質、これらのタンパク質配列内のペプチドおよび重複するペプチド、および優位エピトープを表わしているペプチドを含むことができる。本明細書において使用されるポリペプチドという用語は、いずれかのタンパク質およびペプチドを意味する。短いペプチドが使用される場合、好ましいペプチドは、長さが少なくとも約7個のアミノ酸であり、少なくとも約15個のアミノ酸長、および22個ものアミノ酸長であることができる。これらのペプチドは、7～10個のアミノ酸が重複し、かつ関心対象のタンパク質の全配列を包含することができる。このペプチドは、例えば環状ペプチド、核酸アプタマーなどの、天然のペプチド形態の擬態でもあり、もしくは抗体またはT細胞受容体分子により認識された三次元の形態を模倣している別の分子、薬物、または有機分子であることができる。

30

40

【0036】

免疫学的エピトープ：

免疫学的エピトープは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、脂質、糖質、または抗体

50

もしくはT細胞受容体により認識される他の分子である。

【0037】

自己抗原：

これは、免疫学的反応の標的であることができる生物により生成された分子である。ひとつの局面において、このような分子は、生物のゲノムにおいてコードされたペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質である。別の局面において、このような分子は、切断、リン酸化、アルギニンのシトルリンへの脱イミノ化、ならびに生理的および非生理的細胞プロセスを通して作成された他の修飾のような、これらのペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質の翻訳後修飾されたものである。更に別の局面において、このような分子は、生物により産生された糖質、脂質および他の分子を含む。本明細書において使用された自己抗原の例は、病原性免疫反応を惹起する内因性タンパク質またはそれらの断片を含む。特に興味があるのは、T細胞で媒介された病原性反応を誘導する自己抗原である。T細胞の関与により特徴付けられる自己免疫疾患は、多発性硬化症、実験的自己免疫脳脊髄炎、慢性関節リウマチ、インスリン依存型糖尿病などを含む。

10

【0038】

本発明の目的に関して、自己抗原または自己抗原エピトープのパネルを、スクリーニング目的に使用することができ、ここでこのパネルは、特定疾患に関連した異なるエピトープを反映している。関心対象の抗原エピトープパネルは、関心対象の特異的疾患の最適化されたパネルを含み、これは1種または複数の全タンパク質、これらのタンパク質の配列内のペプチドおよび重複するペプチドならびに優位エピトープを示しているペプチドを含むことができる。本明細書において使用されるポリペプチドという用語は、タンパク質およびペプチドのいずれかを意味する。短いペプチドが使用される場合、好ましいペプチドは、少なくとも約7個のアミノ酸長であり、少なくとも約15個のアミノ酸長、および22個ものアミノ酸長であることができる。これらのペプチドは、7~10個のアミノ酸により重複することができ、かつ関心対象のタンパク質の全配列を包含することができる。

20

【0039】

抗原アレイは、自己タンパク質、これらの自己タンパク質の修飾、および自己免疫疾患もしくは組織移植片拒絶反応における異常な免疫反応により標的化された組織中に存在する他の分子を提示している抗原のパネルを含む。

【0040】

一般に抗原のパネルまたはアレイは、1種または複数の異なる抗原性分子、すなわち、タンパク質、脂質、多糖、ポリヌクレオチド分子を含み、かつ一般的には2種またはそれ以上の異なる抗原を、より一般的には3種またはそれ以上の抗原を含み、かつ5~10種、またはそれ以上もの異なる抗原を含むことができる。各抗原は、1種または複数の異なるエピトープ、一般には3種またはそれ以上の、より一般的には5種またはそれ以上の異なるエピトープにより提示され、かつ10~20種もの異なるエピトープであることができる。

30

【0041】

特異的疾患のためのアレイの例は、脱髄疾患、例えば多発性硬化症およびEAEのための抗原パネルまたはアレイであり；かつ、プロテオリピドタンパク質(PLP)；ミエリン塩基性タンパク質(MBP)；ミエリン希突起膠細胞タンパク質(MOG)；環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(CNPase)；ミエリン関連糖タンパク質(MAG)、およびミエリン関連希突起膠細胞塩基性タンパク質(MBOP)；-B-クリスタリン(熱ショックタンパク質)；ウイルス性および細菌性擬態ペプチド、例えばインフルエンザ、ヘルペスウイルス、B型肝炎ウイルスなど；OSP(希突起膠細胞特異的タンパク質)；シトルリン修飾されたMBP(6位のアルギニンがシトルリンに脱イミノ化されたMBPのC8アイソフォーム)など由来の抗原および/またはエピトープを含むことができる。複合的膜タンパク質PLPは、ミエリンの優位自己抗原である。PLP抗原性の決定基は、いくつかのマウス系統において同定されており、これは残基139-151、103-116、215-232、43-64および178-191を含む。少なくとも26種のMBPエピトープが報告されている(Meinlら、*J. Clin. Invest.*、92:2633-2643(1993))。注目すべき残基は1-11、59-76および87-99である。いくつかのマウス系統において同定された免疫優

40

50

性なMOGエピトープは、残基1-22、35-55、64-96を含む。

【0042】

パネルまたはアレイは、例えば、多発性硬化症、関節炎、SLEなどの疾患について、例えば移植関連障害、アレルギー障害などの疾患の種類について特異的であることができ、もしくは複数の疾患について広範な基礎となる抗原性パネルまたはアレイであることができる。

【0043】

疾患関連抗原：

疾患関連抗原は、免疫関連疾患に関連することがわかっている抗原、または現在は関連することがわかっていないが最終的には関連することが示されている抗原である。自己免疫疾患関連抗原の例を、以下に説明する。多発性硬化症およびEAEのような脱髄疾患に関する抗原のパネルまたはアレイは、プロテオリピドタンパク質 (PLP)；ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ミエリン希突起膠細胞タンパク質 (MOG)；環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (CNPase)；ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、およびミエリン関連希突起膠細胞塩基性タンパク質 (MBOP)； α -B-クリスタリン (熱ショックタンパク質)；ウイルス性および細菌性擬態ペプチド、例えばインフルエンザ、ヘルペスウイルス、B型肝炎ウイルスなど；OSP (希突起膠細胞特異的-タンパク質)；シトルリン修飾されたMBP (6位のアルギニンがシトルリンに脱イミノ化されたMBPのC8アイソフォーム) など由来のエピトープを含むことができる。複合的膜タンパク質PLPは、ミエリンの優位自己抗原である。PLP抗原性の決定基は、いくつかのマウス系統において同定されており、これは残基139-151、103-116、215-232、43-64および178-191を含む。少なくとも26種のMBPエピトープが報告されている (Meinlら、*J. Clin. Invest.*、92:2633-2643(1993))。注目すべき残基は1-11、59-76および87-99である。いくつかのマウス系統において同定された免疫優性なMOGエピトープは、残基1-22、35-55、64-96を含む。

10

20

【0044】

インスリン依存型糖尿病に関する抗原のパネルまたはアレイは、IA-2、IA-2 β ；GAD；インスリン；プロインスリン；HSP；glia 38；ICA69；および、p52由来の抗原およびエピトープを含むことができる。

【0045】

慢性関節リウマチに関するパネルまたはアレイは、II型コラーゲン；hnRNP；A2/RA33；Sa；フィラグリン；ケラチン；シトルリン；gp39を含む軟骨タンパク質；I型、III型、IV型、V型、IX型、XI型コラーゲン；HSP-65/60；IgM (リウマチ因子)；RNAポリメラーゼ；カルジオリピン；アルドラーゼA；シトルリン修飾したフィラグリンおよびフィブリンなど由来のエピトープを含むことができる。修飾されたアルギニン残基 (脱イミノ化されシトルリン形成)を含むフィラグリンペプチドを認識する自己抗体は、高割合のRA患者の血清において同定されている。自己反応性T細胞およびB細胞反応は両方共、一部の患者において同じ免疫優性なII型コラーゲン (CII)ペプチド257-270に対して方向づけられている。

30

【0046】

全身性エリスマトーデス (SLE)に関する抗原のパネルまたはアレイは、DNA；リン脂質；核抗原；Ro；La；U1リボ核タンパク質；Ro60 (SS-A)；Ro52 (SS-A)；La (SS-B)；カルレチクリン；Grp78；Sc1-70；ヒストン；Smタンパク質；および、クロマチンなどを含むことができる。

40

【0047】

自己免疫性ブドウ膜炎に関する抗原のパネルまたはアレイは、S抗原、および光受容体内レチノド結合タンパク質 (IRBP)などを含むことができる。

【0048】

重症筋無力症に関する抗原のパネルまたはアレイは、アセチルコリン受容体を伴うエピトープを含むことができる。グレーブス病に関して、エピトープは、Na⁺/I⁻共輸送体；甲状腺刺激ホルモン受容体；Tg；および、TP0を含むことができる。シェーグレン症候群のパネルは、SSA (Ro)；SSB (La)；およびホドリンを含むことができる。尋常性天疱瘡に関する

50

パネルは、デスモグレイン-3を含むことができる。筋炎に関するパネルは、tRNAシンテターゼ(例えば、トレオニル、ヒスチジル、アラニル、イソロイシル、およびグリシル); Ku; PM/ScI; SSA; U1 sn-リボ核タンパク質; Mi-1; Mi-1; Jo-1; Ku; および、SRPを含むことができる。強皮症に関するパネルは、ScI-70; 動原体タンパク質; U1リボ核タンパク質; および、フィブリラリンを含むことができる。原発性胆汁性肝硬変のパネルは、ビルビン酸デヒドロゲナーゼE2および-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ成分を含むことができる。悪性貧血のパネルは、固有の因子; および、胃のH/K ATPaseの糖タンパク質 サブユニットを含むことができる。

【0049】

自己抗体:

自己抗体は、自己抗原または自己エピトープを認識または結合する抗体である。自己抗原または自己エピトープは、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、脂質、多糖、およびゲノム内にコードされたまたは生物において産生されたこれらの自己抗原の修飾物を含む。

【0050】

アレルゲン:

これは、易罹患性の個体において、増強されたTh2型T細胞反応およびIgE B細胞反応を引き起す免疫原性化合物であり、喘息関連アレルゲンを含む。関心対象のアレルゲンは、イチゴ、ピーナッツ、牛乳タンパク質、卵白などの食物に見出された抗原を含む。他の関心対象のアレルゲンは、植物花粉、動物のふけ、家ダニの糞などのような、様々な気中浮遊抗原を含む。分子クローニングされたアレルゲンは、ヤケヒョウヒダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*)(Der P1); ライ草花粉由来LoI p1-V; ノミ(jumper ant)ミルメシア(*Myrmecia pilosula*)の毒液; ミツバチ(*Apis mellifera*)ハチ毒ホスホリパーゼA2(PLA2および抗原5S); スズメバチ ベスプラ マチュリフロンス(*Vespula maculifrons*)およびクロスズメ バチドリクベスプラ マキュラータ(*Dolichovespula maculata*)由来のホスホリパーゼを含む、多くの昆虫毒; カバノキ花粉、ブタクサ花粉、パロル(Parol)(ヒカゲミズ(*Parietaria officinalis*)の主要アレルゲン)および交差反応性アレルゲンParj1(パリエタリア ジャダイカ(*Parietaria judaica*)由来)、および他の大気中の花粉でオリブ(*Olea europaea*)、ヨモギ(*Artemisia* sp.)、イネ(*gramineae*)などを含む、非常に多数の花タンパク質である。他の関心対象のアレルゲンは、吸血節足動物、例えば双翅目、蚊(*Anopheles*)種、シマカ(*Aedes*)種、クリセタ(*Culiseta*)種、イエカ(*Culex*)種)、ハエ(サシチョウバエ(*Phlebotomus*)、クリコキエ(*Culicoides*))、特にクロバエ、シカバエ、およびヌカカ; マダニ(カクマダニ(*Dermacentor* sp.)、ヒメダニ(*Ornithodoros* sp.)、オトビウス(*Otobius* sp.)); ノミ、例えばその他の隠翅類で、ネズミノミ(*Xenopsylla*)属、ヒトノミ(*Pulex*)属およびネコノミ(*Ctenocephalides felis felis*)を含むものにより引き起されるアレルギー性皮膚炎に寄与するものである。特異的アレルゲンは、多糖、脂肪酸部分、タンパク質などであることができる。

【0051】

特異的分析法

免疫関連疾患は、下記を含む: 1.免疫反応が異常に自己抗原を攻撃する自己免疫疾患であり、例えば、多発性硬化症(MS)、慢性関節リウマチ(RA)、I型自己免疫糖尿病(IDDM)、および全身性エリスマトーデス(SLE)を含むが、これらに限定されるものではないもの; 2.免疫系が、花粉、イエダニ抗原、ハチ毒、ピーナッツ油および他の食品などのような分子を異常に攻撃する、アレルギー性疾患; ならびに、3.免疫系が、例えば血液、骨髓細胞、または心臓、肺、腎臓および肝臓を含む固形臓器のような、生着または移植された組織内で発現されるかまたは拘束された抗原を異常に攻撃する、組織移植片拒絶反応。試料は、免疫関連疾患を示す臨床的症状を伴う患者、または家族歴もしくは遺伝子試験を基にこのような疾患の発症の増大した可能性を有する患者から得られる。

【0052】

ヒト患者試料採取に関する様式は、疾患進行を辿る時間経過、例えば発症初期、急性期、回復期など同様の病期にある異なる患者の比較; 薬物療法、ワクチン処置などを含む、療

10

20

30

40

50

法に対する反応経過期間の患者の追跡を含む。例えばマウス、ラット、ウサギ、サルなどの動物からのデータは、疾患経過、疾患に関連した抗原などを詳述するデータベースを提供するために、集計しかつ分析することができる。患者抗体が収集された生物学的試料は、血液およびそれからの誘導体、例えば血清、血漿、血漿成分などを含む。他の試料の供給源は、滑液、リンパ液、脳脊髄液、関節吸引液のような体液であり、かつ唾液、乳汁、尿などを更に含んでも良い。抗体およびT細胞受容体は両方共、血液、脾臓、胸腺、リンパ節、胎児肝のような組織、例えば脾臓、関節、腎臓、脳脊髄液などのような自己免疫病変部位の組織から収集される適当なリンパ球からも得ることができる。リンパ球は、そのまま分析するか、もしくは分析のために溶解液を調製することができる。患者試料は、抗体を含み、および抗原アレイは、これらの抗体のプロファイリングのために使用される。

10

【0053】

典型的なアッセイ法において、抗体を含有する患者試料は、抗原アレイと、高親和性結合をもたらすが非特異的相互作用は最小とするような条件下で、物理的に接触される。ひとつの態様において、患者試料は、アドレス指定可能なエレメントを含むアレイ上または空間にピペティングされる。このアレイは、未結合の材料を洗浄除去され、かつ結合した抗体の存在が検出され、同源抗原と関連づけられる。

【0054】

患者試料内の抗体に結合しているアレイ内の疾患関連抗原を同定する手段は、当技術分野において公知の検出法を使用する。これらの同定法は、試料の直接的または間接的事前標識；これらの抗体または間接標識物に結合する第二段階の抗体、例えば標識したヤギ抗ヒト血清、ラット抗マウスなどの添加を含むことができる。他の同定法は、ビーズ、ナノ粒子、タグ、切断可能なタグ、およびアレイ内のエレメントのもしくはエレメントに付与されたその他の物理的特性のようなアドレス指定可能なエレメントの分析を含む。結合した抗体の定量を促進するために、単独のエピトープが変動する濃度で存在することができる。

20

【0055】

有用な標識は、蛍光色素、例えばCy2、Cy3、Cy5、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、6-カルボキシフルオロセイン(6-FAM)、2',7'-ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオロセイン(JOE)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオロセイン(HEX)、5-カルボキシフルオロセイン(5-FAM)、またはN,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)を含む。間接的標識は、ハプテン、例えばジゴキシンおよびジゴキシゲニン、ピオチンなどを含み、ここで第二段階の結合パートナーは、例えば、アビジン、抗ジゴキシゲニン抗体などであり、酵素で標識しても良く、例として西洋ワサビペルオキシダーゼ、蛍光色素、放射標識などを含む。好ましくは、対照試料が含まれる場合、対照配列を標識するために使用される蛍光レポーターは、被験配列を標識するために使用された蛍光レポーターのものとは検出により識別できる、励起および/または発光波長で蛍光シグナルを放出する。

30

【0056】

検出は、標識を必要としない方法を用いて行うこともできる。実施例は、単電子トランジスタ、カーボンナノチューブもしくはナノチューブ網に塗布されたタンパク質、表面プラズモン共鳴、原子間力顕微鏡のような方法または装置、および当業者に公知の他の方法を用いる、結合した自己抗原の電荷または質量の変化の検出を含む。

40

【0057】

当技術分野において公知であるように、一般にアッセイ法は、様々な陰性および陽性対照を含むと考えられる。これらは、疾患がわかっている患者などの公知の自己抗体により「スパイクされた(spiked)」試料の陽性対照を含むことができる。陰性対照は、正常な患者、動物血清などからの試料を含む。

【0058】

抗体含有の試料の抗原アレイへの結合は、当技術分野において周知の方法に従い実現され

50

る。この結合条件および洗浄は、好ましくは高親和性結合パートナーのみが維持されるような条件下で行われる。

【0059】

異なる抗体の二色標識は、対照試料と比較された患者試料中の結合レベルをアッセイするために、同じアレイまたは別のアレイへの結合において使用することができる。一方の色の他方に対する比から、任意の特定のアレイエレメントについて、2種の試料中の特定の特異性を伴う抗体の相対的豊富さを決定することができる。加えて、これらの2種の試料の結合の比較は、このアッセイ法に関する内部対照を提供する。競合的アッセイ法は、当技術分野において周知であり、ここでは公知の特異性の競合抗体、またはエピトープ含有分子が、結合反応に含まれる。

10

【0060】

Shalonらの論文(Genome Res., 6:639(1996))に記されているように、アレイを走査型レーザー顕微鏡を用いてスキャンし、抗体の結合を検出することができる。適当な励起ラインを使用する別の走査が、使用される蛍光体の各々について行われる。その後この走査から形成されたデジタル画像を、引き続きの分析と組み合わせる。任意の特定のアレイエレメントに関して、ひとつの試料からのシグナル比が、他方の試料からの蛍光シグナルと比較され、かつ相対的な豊富さが決定される。

【0061】

様々な方法を用い、患者試料から抗体特異的プロファイルが決定される。抗体特異的プロファイルは、最初に個々の患者について決定され、かつこれは本明細書において使用されるように、患者試料からの抗体により結合される抗原またはエピトープを意味する。患者試料から得られた結合パターンと、対照または参照試料から得られた結合パターンとの比較は、適当な演繹プロトコル、AIシステム、統計学的比較、パターン認識アルゴリズムなどの使用により実現される。典型的にはデータマトリックスが作成され、ここではデータマトリックスの各点が、特定のアレイまたは抗原もしくはエピトープからの読取り値に対応している。参照パターンからの情報は、抗原またはエピトープ伸展、相対的豊富さ、経時的变化、生成された抗体アイソタイプの変化、および他の関連した変化を決定するための分析法において用いることができる。

20

【0062】

抗原またはエピトープの読取り値は、測定値に関連した中間値、平均値、中央値もしくは偏差、または他の統計学的もしくは数学的に得られた値であることができる。抗原またはエピトープ読取り値情報は、対応する参照または対照パターンとの直接比較により更に精緻化することができる。結合パターンは、点の数について評価することができ：データマトリックス内の任意の点について統計学的に有意な変化が存在するかどうか；その変化が、エピトープ結合の増加または減少であるかどうか；その変化が、1種または複数の生理的状态に特異的であるかどうかなどを決定する。同じ条件下で各エピトープについて得られた絶対値は、生存している生物学的システムに本来備わっており、かつ個体の抗体の変動性に加え個体間での本来備わっている変動性も反映する変動性を示すと考えられる。

30

【0063】

参照パターンを同定するための分類則は、複数回の反復実験から得られたトレーニングデータ(すなわち、データマトリックス)のセットから構築され则认为られる。分類則は、反復された参照パターンを正確に同定し、かつ別個の参照パターンをうまく識別する場合に選択され则认为られる。分類則学習アルゴリズムは、決定樹法、統計学的方法、ナীবейズアルゴリズム(naive Bayesian algorithm)などを含むことができる。

40

【0064】

新規試験パターンを効率よく同定および分類するために、知識のデータベースは十分に複雑でなければならない。これは、分類パターンを十分に包含しているセットを作成するいくつかの方法、およびそれら間を識別するのに十分に強力な数学的/統計学的方法により達成される。

【0065】

50

ひとつの態様において、血清および他の病理学的組織試料の分析から得られた情報は、抗体特異的プロファイルのデータベースを精緻化しかつ構成するために使用される。例えば、特異的結合部分の同定は、疾患を追跡しかつ治療を開発するために使用することができる。

【0066】

患者の抗体特異的プロファイル：

本明細書において使用される抗体特異的プロファイルは、患者試料由来の抗体により認識された抗原またはエピトープの抗原またはエピトープアレイで決定されたスペクトルを意味する。

【0067】

一旦特定の試料に関する特異性のサブセットが同定されたならば、このデータは、新規診断薬の開発、および個体に最も適した療法の選択に使用される。個々の基準での自己抗体特異性の分析により、病態において存在する特異的エピトープ標的が決定される。次に1種または複数の治療薬を選択し、これは個々の患者および疾患について最良の特異性を有する。

【0068】

分析および治療の条件

慢性関節リウマチ(RA)は、世界人口の0.8%が罹患している慢性の自己免疫炎症性滑膜炎である。現在のRA療法は、免疫機能を非特異的に抑制または変調する治療薬を使用する。最近開発されたTNF アンタゴニストを含むこのような療法は、根本的には治療的ではなく、かつ疾患活動度は、治療中断後迅速に回復する。全身の免疫抑制または変調を引き起こさないような根本的治療法に関する、大きい臨床上の必要性が存在する。

【0069】

変性性関節疾患は、血清陰性脊椎関節炎、例えば、強直性脊椎炎および反応性関節炎；慢性関節リウマチ；痛風；および、全身性エリスマトーデスと同様に、炎症性の場合がある。変性性関節疾患は、共通の特徴を有し、これはすなわち関節の軟骨が腐蝕されるということであり、最終的には骨表面が露出する。軟骨の破壊は、プロテオグリカンの崩壊で始まり、ストロメライシンおよびコラゲナーゼなどの酵素により媒介され、圧縮応力に抵抗する能力の喪失を招く。CD44(Swissprot P22511)、ICAM-1(Swissprot P05362)のような接着分子、ならびにフィブロネクチンおよびテネシンのような細胞外マトリックスタンパク質の発現の変化が続く。最終的に線維性コラーゲンは、メタロプロテアーゼにより攻撃され、かつ膠原性微小骨格が喪失された場合は、再生による修復は不可能である。

【0070】

炎症性関節炎の経過中に滑膜内に重要な免疫学的活性がある。初期段階での治療が望ましいが、本疾患の有害な症状は、更に後期段階での治療により、少なくとも部分的に改善される。関節炎の重症度に関する臨床的指標は、疼痛、腫脹、疲労および早朝強直を含み、かつパニス(Pannus)判定基準により定量的にモニタリングすることができる。動物モデルにおける疾患進行は、罹患した関節炎症の測定により辿ることができる。炎症性関節炎の療法は、従来型NSAID治療による主治療と組み合わせることができる。一般にこの主治療は、サイクロスポリンA、メトトレキサートなどの疾患を変更する薬物とは一緒にすることはないと考えられる。

【0071】

IFN- γ を分泌する能力を伴うミエリン自己反応性T細胞における定量的増加は、MSおよびEAの病理進行に関連づけられ、これはMS患者の末梢血中の自己免疫インデューサー/ヘルパーTリンパ球が、MS患者における脱髄過程を開始および/または調節し得ることを示している。この顕性疾患は、筋肉の衰弱、腹壁反射の喪失、視野欠損および感覚異常に関連する。前徴の期間に、脳脊髄液への白血球浸潤、炎症および脱髄が存在する。家族歴およびHLAハプロタイプDRB1*1501、DQA1*0102、DQB1*0602の存在は、本疾患の易罹患性の指標である。疾患進行をモニタリングすることができるマーカーは、脳脊髄液中の抗体の存在、視覚皮質および脳幹の脳波記録法により認められる「誘発電位」、およびMRIまたはコン

10

20

30

40

50

ピューター画像診断による脊髄欠損の存在である。本疾患の初期の治療は、更なる神経機能の喪失を遅延または抵抗性とすると考えられる。

【0072】

ヒトIDDMは、インスリン分泌する細胞の破壊および顕性の高血糖につながる、細胞媒介型自己免疫障害である。Tリンパ球は、ランゲルハンス島を侵襲し、インスリン産生細胞を特異的に破壊する。細胞の枯渇により、血糖値が調節不能になる。顕性糖尿病は、血糖値が特定のレベル、通常約250mg/dlを超える場合に生じる。ヒトにおいて、糖尿病の開始に先立ち長い前徴期間がある。この期間には、膵の細胞機能が段階的に喪失される。本疾患の進行は、家族歴および遺伝子解析により易罹患性であると診断された個体において経過観察することができる。最も重要な遺伝子作用は、主要組織適合性遺伝子座(10 IDDM1)の遺伝子において認められるが、インスリン遺伝子領域(IDDM2)を含む他の遺伝子座も、本疾患との連鎖を示している(Daviesら、前掲、およびKennedyら、Nature Genetics、9:293-298(1995))。

【0073】

前徴期間において評価することができるマーカーは、膵内のインスリン炎の存在、島細胞抗体、島細胞表面抗体のレベルおよび頻度、膵細胞上のクラスII MHC分子の異常な発現、血中の糖濃度、および血漿中インスリン濃度である。膵におけるTリンパ球数、島細胞抗体および血糖の増加は、インスリン濃度の低下同様、本疾患の指標である。顕性糖尿病の発症後、インスリンC-ペプチドの血漿中維持により証明される細胞機能が残っている患者も、機能の更なる喪失を防ぐために、本治療の恩恵を受けることができる。 20

【0074】

アレルギーまたはアトピーは、IgEに基づく感度の増加傾向であり、免疫原に対する、特に昆虫毒、イエダニ、花粉、カビまたは動物のフケのような通常的环境的アレルゲンに対する特異的IgE抗体の産生を生じる。アレルギー反応は、抗原特異性である。更に抗原に対する免疫反応は、反応性T細胞による、Th2型サイトカイン、例えばIL-4、IL-5およびIL-10の過剰産生により特徴付けられる。感作は、遺伝的素因のあるヒトにおいて、低濃度のアレルゲンへの曝露後に生じ；煙草の煙およびウイルス感染症は、この感作過程を補助する。

【0075】

喘息関連アレルギーのヒトは、アトピーに罹患している患者群に含まれる。この集団の約40%がアトピー性であり、この群のほぼ半分は、取るに足りない鼻炎から生命を脅かすような喘息までの臨床疾患を発症している。感作後、アレルゲンへの継続曝露は、喘息罹患率の顕著な増加につながる。喘息は小児の90%および成人の80%がアトピー性である。一旦感作が生じると、アレルゲンへの再曝露は、喘息増悪のリスク因子である。アレルギー性喘息の有効な管理は、薬理療法およびアレルゲン回避を含む。アレルギー関連した喘息の特異的生理的作用は、気道炎症、好酸球増加症、および粘液産生、ならびに抗原特異的IgEおよびIL-4産生を含む。 30

【0076】

アレルギーに罹患しているヒト集団に加え、非ヒト哺乳類も、アレルギー状態に罹患することがわかっている。ネコノミおよびその他のノミが、哺乳類の生理的障害の主な原因として新たに認められた。これらの昆虫は、イヌ、ネコ、およびヒトを攻撃する外部寄生生物である。一定の種(すなわちイヌおよびネコ)、ならびにこれらの種の個体は、他のものよりもノミの咬傷に対してよりアレルギー性であり、ノミアレルギー性皮膚炎(FAD)またはノミの咬傷に対する過敏症と称される臨床障害をもたらす。FADの顕著な特徴は、ノミの咬傷部位のみではなく、明確に体中にも分散するような強い掻痒(痒み)である。このアレルギー反応は、ノミが咬んだ時に皮内に注入された経口分泌物中の様々なタンパク質物質に対する全身の反応である。慢性のFADは、癬痕および永久脱毛箇所につながり、脂漏に関連することが多く、イヌの家中に充満する悪臭を生じる。ノミアレルギーは、丘疹状じんま疹として知られているヒトの一般的皮膚炎の有力な原因としても認められている。 40

【0077】

抗原特異的療法

前述のような、患者試料中に存在する抗体により認識された抗原またはエピトープは、抗原またはエピトープ特異的治療薬の投与を含む、抗原またはエピトープ特異的療法の開発および選択に使用することができ、ここでこの薬物は、患者抗体のアレイ上のアドレス指定可能なエレメントへの結合により定義される。患者の抗体特異的プロファイルは、下記を含む、抗原またはエピトープ特異的療法の開発、選択およびこれに対する反応のモニタリングに使用することができる：(1)「経口寛容」と称される、特異的抗原の経口投与(Ann Rev Immunol、12:809-37)；(2)天然型ペプチドの投与(Science、258:1491-4；J Neurol Sci、152:31-8)；(3)変更されたペプチドリガンドの投与(Nature、379:343-5)；(4)全タンパク質の投与(Science、263:1139)；融合-タンパク質またはペプチドの投与；DNA、または花粉、チリダニ、ネコの唾液の抗原を含むアレルゲンのような他の分子の投与(J Rheumatology、28:257-65)；標的化された自己タンパク質またはアレルゲンをコードするポリヌクレオチド配列の投与(J. Immunol、162:3336-41；Curr. Dir. Autoimmun、2:203-16)。これらの療法の全てについて、免疫抑制を目的として投与された(またはDNA中にコードされた)抗原は、抗体により同定されたエピトープの全てまたは一部を含み得る。ひとつの態様において、こうして同定された1種または複数のエピトープが投与され、通常2種またはそれ以上、より一般的には3種またはそれ以上が投与され、かつ10種ものまたはそれ以上の異なるエピトープを含むこともできる。個々のペプチドまたはペプチドをコードするDNAを投与することができる。または、全タンパク質、または全てもしくは実質的に全ての抗原性タンパク質をコードするDNAを、投与することもできる。従って1種または複数の、通常2種またはそれ以上の、および3種ものまたはそれよりも多い異なるタンパク質抗原を投与することができる。本明細書において使用される抗原特異的療方は、本発明の新規方法により決定された抗原特異的プロファイルを基にした治療法を意味する。

10

20

30

40

50

【0078】

別の本発明の態様において、先に説明された知識に基づく方法を使用し、疾患パターンを同定し、ここで特定の患者試料は、疾患進行のパターンにマッピングすることができる。このような場合に、抑制的エピトープは、患者抗体により現在認められたエピトープを含むのみではなく、疾患の進行を予測し、および本疾患の後期においておそらく疾患に関連するペプチドを投与することもでき、従って多くの自己免疫疾患において観察されたエピトープ伸展を防ぐことができる。

【0079】

ひとつの態様において、治療は、例えば国際特許出願番号PCT出願US00/0623号に記載されているような、例えば筋肉または皮膚のような宿主組織へ注射されたDNA発現カセットの投与による、抗原特異性、抑制性T-細胞反応を誘導することを含む。このベクターは、少なくとも一部の自己抗原、移植抗原などをコードするDNA配列を含む。このワクチン処置に対する反応において、抑制反応が惹起される。抗原特異的T細胞増殖は阻害され、かつTh1サイトカイン産生が低減される。

【0080】

標的化された抗原に関与する自己免疫疾患の予防は、顕性疾患の発症前のワクチンの投与により実現される。抑制性のワクチン処置が患者の臨床症状を安定化または改善するような、進行中の疾患の治療は、特に興味深い。このような治療は、罹患した組織の機能が完全に失われる前に行われることが望ましい。

【0081】

通常ベクターの一部として、抗原の全て、実質的に全て、または一部をコードし、少なくともひとつの完全なエピトープをコードするDNA発現カセットが、レシピエントの組織に導入される。遺伝子またはミニ遺伝子は、この組織において発現され、かつコードされたポリペプチドは、免疫原、または抗原として作用する。CD80およびCD86のような共刺激分子を欠いている、「非プロフェッショナル」細胞による抗原配列の提示は、抑制性T細胞反応を刺激すると仮定することができる。

【0082】

このDNA発現カセットは、抗原断片をコードする配列のほとんどまたは全てを含むと考えられる。このコード配列は、5'または3'末端で切断することができ、完全なポリペプチド配列の断片であることができる。本発明のひとつの態様において、配列は、例えば宿主のクラスII MHC分子により提示されたペプチドのような、病原性T細胞に対して提示されることが分かっているペプチド断片をコードする。このようなペプチドは、文献において説明されており、かつ典型的には約8～約30個のアミノ酸長である。別の態様において、この配列は、完全な抗原性タンパク質、または実質的に全ての抗原性タンパク質をコードする。更に別の態様において、この配列は、注入された場合に劣化され得るか、もしくは寛容化療法の効能を低下し得るような自己タンパク質の一部が取り除かれたような自己タンパク質をコードする。

10

【0083】

このワクチンは、1種のエピトープまたはエピトープ配列のカクテルと共に製剤化することができる。場合によっては、複数の配列を含むことが望ましく、ここで各々は、異なるエピトープをコードする。例えばLeadbetterらの論文(J. Immunol., 161:504-512(1998))を参照のこと。別個のエピトープの複数のコード配列で構成された製剤を使用し、より強力および/またはより持続した抑制反応を誘導することができる。このような製剤は、複数の自己反応性T細胞集団を特異的に標的化することにより、自己抗原抵抗性の発症を遅延または予防することができる。

【0084】

自己抗原の特異的エピトープおよびポリペプチドに加え、免疫反応は、Kriegらの論文(Tr ends Microbiol., 6:23-27(1998))に説明されたCpG配列の含有、およびKingらの論文(Nat . Med., 4:1281-1286(1998))に説明されたヘルパー配列の含有により増強することができる。メチル化されないCpGジヌクレオチドのようなDNAモチーフの生物学的作用は、特に塩基の状況において(CpG-Sモチーフ)、動物に注射された場合に先天的免疫反応を変調することができる。

20

【0085】

抗原配列は、適当な発現カセットに挿入される。この発現構築物は、通常の方法で調製される。このカセットは、レシピエント細胞におけるこの配列の発現のために適当な転写および翻訳調節配列を有すると考えられる。このカセットは、一般にベクターの一部であり、これはレシピエントへのその導入前に、ベクターの増殖、増幅および操作に必要であるような、適当な複製起点、および選択可能なマーカーをコードする遺伝子を含む。適当なベクターは、プラスミド、YAC、BAC、バクテリオファージ、レトロウイルス、アデノウイルスなどを含む。発現ベクターはプラスミドであることが好都合であると考えられる。レシピエントへの導入前に、このカセットは、当技術分野において公知であるように、切断、増幅などによりベクター配列から単離することができる。注入に関して、DNAは、スーパーコイル状または線状であることができ、好ましくはスーパーコイル状である。このカセットは、宿主細胞において延長された期間維持されるか、もしくは一過性であることができ、一般には一過性である。安定した維持は、例えばレトロウイルスベクター、EBVベクターなどの組込みおよび/または維持を提供する配列を含むことにより達成される。

30

【0086】

発現カセットは、一般に外因性転写開始領域、すなわち通常存在する染色体内でT細胞受容体に会合されるプロモーター以外のプロモーターを使用する。このプロモーターは、宿主細胞において、特にカセットにより標的化される宿主細胞において機能する。プロモーターはインビトロ組換え法により、もしくは、適当な宿主細胞による配列の、相同的組込みの結果として導入することができる。このプロモーターは、抗原のコード配列に機能的に連結されており、翻訳可能なmRNA転写産物を作製する。発現ベクターは都合の良いことに、抗原配列の挿入を促進するためにプロモーター配列の近傍に配置された制限部位を有する。

40

【0087】

発現カセットは、構成性または誘導性であることができる転写開始領域、抗原配列をコー

50

ドする遺伝子、および転写終結領域を含むように調製される。この発現カセットは、様々なベクターに導入することができる。関心対象のプロモーターは、誘導性または構成性であることができ、通常構成性であり、かつレシピエント細胞において転写を提供すると考えられる。このプロモーターは、レシピエント細胞型においてのみ活性があるか、もしくは多くの様々な細胞型において広範に活性があることができる。哺乳類細胞のための多くの強力なプロモーターが当技術分野において公知であり、これは -アクチンプロモーター、SV40初期および後期プロモーター、免疫グロブリンプロモーター、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、レトロウイルスLTRなどを含む。これらのプロモーターは、エンハンサーに会合してもしなくとも良く、ここでエンハンサーは、特定のプロモーターに自然に会合されるか、もしくは異なるプロモーターに会合され得る。

10

【0088】

終結領域は、コード領域の3'側に提供され、ここで終結領域は、可変領域ドメインに天然に会合されるか、または異なる供給源に由来することができる。多種多様な終結領域を、有害に作用する発現を伴わずに使用することができる。

【0089】

一般には20個を超えない、より一般的には15個を超えないような、少数のヌクレオチドを、自己抗原配列の末端に挿入することができる。ヌクレオチドの欠失または挿入は、通常構築の必要性の結果であり、都合の良い制限部位、プロセシングシグナルの追加、コザック共通配列の追加、操作の容易さ、発現レベルの改善などを提供すると考えられる。加えて、同様の理由のために1種または複数のアミノ酸の異なるアミノ酸との置換を望むことができ、通常はこの領域では約5個よりも多いアミノ酸は置換されない。

20

【0090】

DNAベクターは、生理的に許容される緩衝液、一般には水溶液、例えば通常の生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、水などの中に浮遊される。安定化剤、湿潤剤および乳化剤、浸透圧を変動するための塩、または至適pH値を確実にするための緩衝液、および皮膚浸透増強剤を、補助剤として使用することができる。DNAは通常、濃度が少なくとも約1ng/mlであり、約10mg/mlを超えないように存在し、通常約100 μ g~1mg/mlである。

【0091】

DNA寛容療法は、2回またはそれよりも多い投与量に分けることができ、1回の投与量につき少なくとも約1 μ g、より一般的には少なくとも約100 μ g、および好ましくは少なくとも約1mgであり、約4日から1週間空けて投与される。本発明の一部の態様において、個体には、完全で広範な免疫反応を生じるために、一連のワクチン処置が施される。本方法に従い、少なくとも2回および好ましくは4回の注射が、時間をかけて行われる。注射の間の時間は、24時間間隔から2週間またはそれよりも長い注射の間隔を含むことができ、好ましくは1週間間隔である。または、少なくとも2回から最大4回の別個の注射を、体の異なる部位に同時に与えられる。

30

【0092】

DNA治療薬は、筋肉または他の組織に皮下、皮内、静脈内、経口によりまたは髄液もしくは滑液へ直接注入される。特に関心があるのは、骨格筋への注射である。遺伝子治療薬は、直接免疫処置される個体へ、または投与後再移植される個体から取り出された細胞にエクスピボで投与することができる。いずれの経路によっても、遺伝的物質は、個体の体内に存在する細胞へ導入される。または、遺伝子治療薬は、個体から取り出された細胞へ様々な手段により導入することができる。このような手段は、例えば、トランスフェクション、電気穿孔および微量射出可能な遺伝子銃を含む。遺伝子構築物を細胞から取り出した後、これらは個体へ再移植される。さもなければその中に組込まれた遺伝子構築物を有する非免疫原性細胞が、1つの個体から採取され、かつ別の個体へ移植される。

40

【0093】

ブピバカインまたは機能的類似性を有する化合物は、ワクチンの前にまたはこれと同時に投与することができる。ブピバカインは、メピバカインの相同体であり、リドカインに関連する。これは筋肉組織電位を、ナトリウムチャレンジに対して感受性とし、細胞内イオ

50

ン濃度に作用する。ブピバカイン、メピバカイン、リドカインおよび他の同様に作用する化合物に加え、他の企図された細胞を刺激する物質は、レクチン、増殖因子、サイトカインおよびリンホカイン、例えば血小板由来増殖因子(PDGF)、gCSF、gMCSF、表皮増殖因子(EGF)およびIL-4がある。

【0094】

DNA寛容化の代替として、またはこれに加えて、特異的ペプチド、変更されたペプチド、またはタンパク質が、自己免疫を治療するための抗原特異的寛容を誘導するために、治療的に投与される。自己免疫反応により標的化された天然型ペプチドは、抗原特異的寛容を誘導するために送達することができる(Science、258:1491-4)。天然型ペプチドは、静脈内に送達され、免疫寛容を誘導する(J Neurol Sci.、152:31-8)。

10

【0095】

天然型ペプチドから変更されたペプチドの送達も、当技術分野において公知である。天然型ペプチドの重要な残基の選択的变化による変更(変更されたペプチドリガンドまたは「APL」)は、抗原特異的自己反応性T細胞の不応答または応答の変化を誘導することができる。

【0096】

「ペプチド類似体」は、長さが少なくとも7個のアミノ酸であり、かつ類似体と天然型抗原性ペプチドの間にアミノ酸配列における少なくとも1個の違いを含む。天然型ペプチド由来のL-アミノ酸は、タンパク質において通常認められる20個のL-アミノ酸のいずれか他のひとつ、対応するD-アミノ酸のいずれかひとつ、稀なアミノ酸、例えば4-ヒドロキシプロリン、およびヒドロキシリシン、または非タンパク質アミノ酸、例えば γ -アラニンおよびホモセリンに変更することができる。メチル化(例えば、 γ -メチルバリン)、エチルアミン、エタノールアミン、およびエチレンジアミンなどのアルキルアミンによるC-末端アミノ酸のアミド化、ならびにアミノ酸側鎖機能のアシル化またはメチル化(例えば、リシンの ϵ -アミノ基のアシル化)、アルギニンからシトルリンへの脱イミノ化、イソアスパルチル化、またはセリン、トレオニン、チロシンもしくはヒスチジン残基のリン酸化などの化学的手段により変更されているアミノ酸も、本発明の範囲内に含まれる。

20

【0097】

どのように変更されたペプチドリガンドが有効であるかという作用の機序は、T細胞受容体(TCR)の不完全な動員に關与し得る。APLが誘導することができるいくつかの可能性がある機能的変更があり、これは以下を含む：簡単なアンタゴニスト、ここでAPLは、MHC結合について抗原提示細胞上の天然型ペプチドと競合し、かつ完全なT細胞活性化をもたらさない。これは、APLによりT細胞受容体を介してシグナル伝達されないことを暗示している。アネルギー、ここでAPLはT細胞における完全な不応答の状態を誘導し、その結果T細胞は天然型ペプチドに反応しない。表現型スイッチング、ここでAPLがT細胞における機能的スイッチを誘導し、その結果これは、前炎症性サイトカインの産生を減少し、および/またはIL-4またはIL-10のような非炎症性サイトカインの産生を増加する。

30

【0098】

ペプチドおよびペプチド類似体は、自動化された手法による合成を含む、標準の化学技術により、合成することができる。一般にペプチド類似体は、C-末端アミドを伴うペプチドを得るためのジシクロヘキシルカルボジイミドによる活性化による、保護されたアミノ酸残基の各々の、好ましくは4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂である樹脂支持体へのカップリングを含む固相ペプチド合成法により調製される。または、クロロメチル樹脂(メリフィールド樹脂)を用い、C-末端に遊離カルボン酸を伴うペプチドを得ることができる。最後の残基が結合された後、保護されたペプチド樹脂は、フッ化水素で処理され、ペプチドを樹脂から切断し、更に側鎖官能基を脱保護する。粗生成物は更に、ゲルろ過、HPLC、分配クロマトグラフィー、またはイオン交換クロマトグラフィーにより精製することができる。

40

【0099】

候補ペプチド類似体は、MHCへの競合的結合を測定するアッセイ法、およびT細胞増殖を測

50

定するアッセイ法により、疾患を治療するそれらの能力に関してスクリーニングすることができる。天然型ペプチドの結合を阻害しかつ自己反応性T細胞の増殖を刺激しないこれらの類似体は、有用な治療薬である。候補ペプチド類似体は更に、直接的様式でこの類似体がT細胞増殖を引き起す能力を測定するか、またはペプチド類似体が天然型ペプチドにより誘導されたT細胞増殖を阻害する能力を測定することにより、T細胞増殖を刺激または阻害するそれらの特性について試験される。

【0100】

これらのペプチドは、1種のまたは異なるエピトープのカクテルとして、例えば静脈内または皮下の経路により、患者へ投与され、免疫反応の抑制を提供する。APLおよび天然型ペプチドは、用量0.5~100mg/投与で二週間毎から毎月を基本に静脈内および皮下の両方

10

【0101】

別の態様において、自己免疫反応により標的化された全タンパク質抗原は、自己免疫の治療に対する免疫寛容を回復するために送達することができる(Science、263:1139)。

【0102】

アレルゲン免疫療法、または減感作は、通常維持療法として維持される用量までの漸増用量範囲で、一定間隔毎の、抗原としてのアレルゲン抽出物の非経口投与である。免疫療法の適応は、前述のような抗体特異性の診断により決定される。アレルゲン免疫療法は、アレルギー反応の症状および徴候の低減、または昆虫毒、ペニシリンなどのような抗原に対する将来のアナフィラキシーの予防を目標とし、アレルギー患者へアレルゲンの注射を規則的に提供することにより行われる。これは、通常最初に低用量で行われ、用量は1週間かけて漸増される。

20

【0103】

免疫療法は、注射されたアレルゲンに対し特異的である。これは、下記の免疫学的変化を生じる：サイトカイン産生における対応する変化を伴うTh2型反応からTh1型反応へのT細胞反応のシフト、低下したアレルゲン特異的IgE産生、増加したアレルゲン特異的IgG産生、減少した炎症細胞、減少した炎症メディエーターおよび減少したヒスタミン放出因子。これらの変化は、標的臓器におけるアレルゲンに対する反応性の低下を生じる。

【0104】

注射されるアレルゲンの量は、経験に由来し、かつレシピエントのサイズによって決まり、一般に体重1kg当たり少なくとも約100ngのアレルゲンであり、体重1kg当たり約1mgのアレルゲンを超えることはない。頻りに用量は、注射の経過を通じて、約10倍から1,000,000倍までも増大される。注射のスケジュールは、個々の患者で変動する。例えばアルピラル(Allpyral)調製物は、維持量に達するまでは、1~2週間毎に投与される。維持注射は、2~4週間毎に投与される。免疫療法スケジュールは個別化され、かつ固定されたスケジュールは推奨されないことは再度強調されるべきである。アレルギー注射は、「永久」に継続されることは稀であり、通常は患者がアレルギー症状を経験せず、かつ維持スケジュールの期間に連続18~24ヶ月間投薬を必要なくなった後に、終了することができる。平均的患者の治療期間は、3~5年であるが、ある種の臨床状況においてはより長いことがある。免疫療法中断後6~12ヶ月間の経過観察期間の後に症状が再発した場合は、再評価が望まれる。

30

40

【0105】

アレルゲン免疫療法は、下記の適応症に適している：最適なアレルゲン回避および投薬が症状の制御に十分有効ではない、重症の季節性(2年またはそれ以上続く)または1年中のIgE依存型アレルギー性鼻結膜炎；IgE媒介型アレルギー性喘息；特に、アレルゲン曝露と喘息の徴候および症状の間に明らかな時間的關係があるもの、ならびに症状が毎年ふたつまたはそれよりも多いアレルギーの季節に生じるもの。チリダニまたはブタクサ花粉により惹起されたIgE媒介型喘息は、アレルゲン免疫療法により治療することができる。IgE媒介型アナフィラキシーは、昆虫の刺創に対して反応する。スズメバチ、キイロスズメバチ、クロスズメバチ、ジガバチおよびミツバチの毒、フシアリの全身の抽出物による免疫療法

50

は有効である。

【0106】

組織移植片拒絶反応

肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、ならびに他の臓器および組織を含む組織移植片の免疫拒絶反応は、移植された臓器に対する移植レシピエントにおける免疫反応により媒介される。同種移植した臓器は、移植レシピエントのアミノ酸配列と比較した場合に、アミノ酸配列の変化を伴うタンパク質を含む。移植された臓器のアミノ酸配列は、移植レシピエントのものとは異なるので、これらは頻繁にレシピエントにおいて移植された臓器に対する免疫反応を惹起する。移植された臓器の拒絶反応は、大きい合併症であり、組織移植の制限であり、レシピエントにおいては移植臓器の機能不全を引き起し得る。拒絶反応の結果である慢性の炎症は、移植された臓器の機能障害につながるものが頻繁である。移植レシピエントは現在、拒絶反応を防止および抑制するために、様々な免疫抑制剤で処置されている。これらの物質は、糖質コルチコイド、サイクロスポリンA、Cellcept、FK-506、および0KT3を含む。

10

【0107】

本発明は、特定の方法、プロトコール、細胞株、動物種または属、ならびに説明された試薬に限定されず、これらは変動することができることは理解されるはずである。本明細書において使用される用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、本発明の範囲を制限することは意図しておらず、これは添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることも理解されるはずである。

20

【0108】

本明細書において使用される単数形(「a」、「an」、「the」)は、本文で別に明確に記さない限りは、複数の意味も含む。本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、特に別に明確に記さない限りは、本発明が属する技術分野の業者により通常理解されるものと同じ意味を有する。

【0109】

下記の実施例は、当業者にいかにして本発明を作製しかつ使用するかという完全な開示および説明を提供するために示しており、本発明とみなされるものの範囲を制限することは意図されていない。使用した数字(例えば、量、温度、濃度など)に関する精度を確実にするために努力が払われているが、若干の実験誤差および偏差は、許されるべきである。別に特に記さない限りは、部は質量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏であり、かつ圧力は大気圧またはその近傍である。

30

【0110】

本明細書に引用された全ての刊行物および特許出願は、各々個々の刊行物および特許出願が具体的かつ個別に参照として組入れられていることが示されるのと同様に、参照として組入れられている。

【0111】

実験例

実施例1

ラットおよびマウスのEAEにおける自己抗体反応の特異性の抗原アレイ特徴決定

40

EAE動物の血清中の自己抗体特異的プロファイルを決定するために、血清抗体のタンパク質マイクロアレイへの結合を試験するアッセイ法を行った。

【0112】

表1に列記したような、免疫優性なミエリンペプチドエピトープおよび精製した天然型ミエリン塩基性タンパク質をスポットすることにより抗原アレイを作成した。図1A-Dは、正常な対照ラット(A)、および完全フロイントアジュバント中の異なるミエリンタンパク質ペプチドによりEAEを発症するように誘導した3匹のルイス(Lewis)ラット(B-D)の血清で、その後Cy-3標識した抗ラットIg二次抗体によりプローブしたアレイの走査し画像化したものである。

【0113】

50

走査した画像の定量的コンピュータ解析を、表1に示した。報告された数値は、バックグラウンドレベルについて調節し、対照血清に対するEAE動物由来の血清により認識された抗原の蛍光強度の比で表わし、その結果1より大きいまたは小さい比は(1=差なし)は、>95%信頼区間での統計学的有意差を示している。結果は、ELISAにより確認した。これらの結果は、抗原アレイがEAEにおける自己抗体反応のペプチド特異性を強力に同定することを明らかにしている。

【0114】

(表1) ルイスラットにおけるEAEの自己抗体反応の特異性の抗原アレイ特徴決定

	ラット EAE-1 MBP 68-86	ラット EAE-2 PLP 139-151	ラット EAE-3 MOG 35-55
MBP 68-86	117.7	1.0	1.0
PLP 139-151	1.0	67.6	1.0
GP MBP	25.4	1.0	1.0
MOG 35-55	1.0	1.0	15.6
MBP Ac 1-11	1.0	4.0	1.0
緑/赤	2.3	0.8	2.1
緑	1.8	0.7	2.5
アルカリホスファターゼ	1.0	1.0	1.0
インフルエンザA/B	1.0	1.0	1.0
BSA	1.0	1.0	1.0
ブランク	1.0	1.0	1.0
フラッグ	1.0	1.0	1.0
対照 pep-127	1.0	1.0	1.0
対照 pep-128	1.0	1.0	1.0
対照 pep-129	1.0	1.0	1.0
対照 pep-130	1.0	1.0	1.0
対照 pep-131	1.0	1.0	1.0

10

20

30

【0115】

実施例2

自己免疫リウマチ疾患における患者の抗体特異的プロファイルの決定

自己抗原アレイは、8種の別個のヒト自己免疫リウマチ疾患の自己抗体プロファイル特性を同定する

50種を超える高度に特徴決定された自己免疫血清試料の自己抗原アレイ分析の代表的実施例を示す(図2)。

40

【0116】

整列された自己抗原アレイを、ロボット型マイクロアレイ装置を用いる4つ組のセットにおいて192種の別個の推定自己抗原をスポットすることにより作製し、1152種の特性的リウマチ疾患自己抗原アレイを作製した。スポットした抗原は、以下を含む：36種の組換えまたは精製したタンパク質、Ro52、La、ヒスチジル-tRNAシンテターゼ(Jo-1)、SRタンパク質、ヒストンH2A(H2A)、Sm-B/B'、U1小核リボ核タンパク質複合体の70kDaおよびC成分(U1-70kDa、U1snRNP-C)、Sm-B/B'、hnRNP-B1、Sm/RNP複合体、トポイソメラーゼI(topo I)、動原体タンパク質B(CENP B)、およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)；数種類の型の哺乳類二本鎖DNA(dsDNA)および合成一本鎖DNA(ssDNA)を含む、6種の核酸に基づく推定抗原；ならびに、snRNPタンパク質、Smタンパク質、およびヒストンH1、H2A、H3およびH4が

50

代表例である154種のペプチド。加えて、本発明者らは、ヒトIgGおよびIgM(-IgGおよび -IgM)；インフルエンザAおよび肺炎球菌(ニューモバックス(Pneumovax))に対するワクチン；ならびに、アレイを方向付けるためにマーカースポットとして使用するためのCy-3およびCy-5で予め標識した抗体混合物(黄色特徴)に関する抗体特異性をスポットした。自己抗原アレイは、(a)特異的自己抗体反応性が検出されなかった健常個体(正常)；(b)Ro52およびLaに対する自己抗体反応性を示している、シェーグレン症候群；(c)DNA、ヒストンH2A、U1-70kDa、およびSRタンパク質に対する反応性を示しているSLE；(d)Jo-1およびRo52に対する反応性を示しているPM；(e)DNA、ヒストンH2A、Ro52、およびU1-70kDaに対する反応性を示しているMCTD；(f)PDHに対する反応性を示しているPBC；(g)topo Iに対する反応性を示しているsclero-D；(h)CENP Bに対する反応性を示しているsclero-L；ならびに、(i)hnRNP-B1に対する反応性を示しているRA由来の希釈した患者血清試料と共にインキュベーションした。各アレイのプロービングに使用した自己免疫疾患血清は、図の上側に示し、かつ灰色ボックス中に含まれた抗原特性を切貼りした各行は、単独のアレイからの代表的抗原特性である。実験的自己免疫脳脊髄炎の齧歯類由来の血清中の自己抗体によりアレイ上で認識されたミエリン塩基性タンパク質ペプチドを、代表的陰性対照(MBP 68-86)として含んだ。結合した抗体は、Cy-3標識ヤギ抗ヒトIgM/IgGを用いて検出し、その後走査した。

10

【0117】

公開されたように、シェーグレン症候群、SLE、PM、混合結合組織病(MCTD)、PBC、びまん性および限局性強皮症(sclero-Dおよびsclero-L)、および慢性関節リウマチ(RA)の患者由来の高度に特徴付けられた血清試料は、識別できかつ診断的な自己抗体特異的パターンを同定している。例えば、DNAおよびヒストンに対するSLE特異的自己抗体が検出された(図2c)。DNA特異的自己抗体は、一部のモデルにおいては病原性であり、かつそれらの力価は、疾患活動度と相関することが多い。Jo-1自己抗体(図2d)は、臨床上的PMに数ヶ月から数年先行することが多く、間質性肺疾患の発症および予後不良を予測する。びまん性および限局性のいずれかの強皮症患者由来の自己抗体は、各々、topo IおよびCENP Bを独自に標的としている(図2gおよびh)。CENP B自己抗体は、間質性肺疾患および腎疾患の低い発生率と関連づけられる一方、トポイソメラーゼ自己抗体の存在は、肺線維症のリスク上昇および生存率低下と相関している。自己抗原反応性は、10名の健常個人由来の血清がプローブとして使用される場合には認められなかったにも関わらず、肺炎球菌およびインフルエンザに対する抗体は再現性を伴い検出された(図2a)。これらのアレイプロファイルは、先に説明された従来型のアッセイ法の結果と正確に相関していた。

20

30

【0118】

これらの結果は、抗原アレイは、タンパク質、ペプチド、核酸、翻訳後修飾された抗原、およびタンパク質複合体に特異的である自己抗体を検出することを明らかにしている。このような情報は、診断、予後判定、治療に対する反応のモニタリング、ならびに抗原特異的療法の開発および選択に使用することができる。

【0119】

実施例3

ヒト多発性硬化症患者の脳脊髄液からの自己抗体特異的プロファイルの決定

40

ミエリンタンパク質およびペプチドを含む抗原アレイを用い、多発性硬化症のヒト患者由来の脳脊髄液試料中の自己抗体反応の特異性を特徴決定した(図3)。図3のアレイは、全ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、MBPペプチド1-20(MBPのアミノ酸1-20に相当)、MBPペプチド68-86、全ミエリン希突起膠細胞タンパク質(MOG)、MOGペプチド35-55、およびプロテオリピドタンパク質(PLP)ペプチド139-151に特異的である脳脊髄液自己抗体の検出を明らかにしている。実施例2のように、このような情報は、診断、ならびに特異的療法の開発、モニタリングおよび選択に使用することができる。

【0120】

2400スポットの「ミエリンプロテオーム」アレイを、ロボット型マイクロアレイ装置を用いこれらの推定ミエリン抗原をスポットすることにより作製し、脳脊髄液で、引き続きCy

50

-3標識した抗ヒトIg二次抗体でプローブし、ジーンピックス (GenePix) スキャナーを用い走査し、かつジーンピックスソフトウェアを用いて画像解析し、各スポットに結合している自己抗体のレベルを決定した。これらのアレイは、MBP、プロテオリピドタンパク質 (PLP)、ミエリン希突起膠細胞タンパク質 (MOG)、これらのタンパク質を表わしている重複しているペプチド、ならびに環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (CNPase)、ミエリン関連糖タンパク質 (MAO)、およびミエリン関連希突起膠細胞塩基性タンパク質 (MBOP) を含む追加のミエリン自己抗原から優位エピトープを表わしているペプチドを含んでいる、400種の異なるミエリンタンパク質およびペプチドエピトープを含む。

【0121】

対照患者において、インフルエンザウイルスおよび肺炎連鎖球菌 (Streptococcus pneumonia) を含む共通かつ遍在的なヒト病原体に対し特異的な抗体は、検出されるが、ミエリンタンパク質およびペプチドに特異的な抗体は、検出されない。MS患者1において、抗原アレイは、全ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、全ミエリン希突起膠細胞タンパク質 (MOG) に特異的な自己抗体に加え、MOGペプチド35-55、MBPペプチド1-20、ならびにMBPペプチド68-86を認識する自己抗体を検出する。対照的に、MS患者2において、自己抗体は、MOGタンパク質およびMOGペプチド25-42に対して検出される。MS患者3において、自己抗体は、プロテオリピドタンパク質 (PLP) ペプチド139-151に対して特異性である抗体は同定される。

【0122】

実施例4

慢性関節リウマチ治療のための抗原特異的療法の選択指針のための患者自己抗体特異的プロファイルの使用

慢性関節リウマチ、コラーゲン誘導型関節炎 (CIA) の動物モデルにおける自己抗体反応の抗原アレイ分析

図5は、II型コラーゲン (CII)、I型、III型、IV型、V型、IX型およびXI型コラーゲン、GP-39、免疫グロブリン、Sa、カルパスタチン、RA33、アルドラーゼA、熱ショックタンパク質60および65、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、分子シャペロンBiP、ならびにシトルリン修飾したフィブリンおよびフィラグリンペプチドおよびタンパク質を含む、およそ450種の異なる関節タンパク質およびペプチドを備えたRA/CIAアレイの画像を表わしている。

【0123】

図5は、CIAにおける自己抗体反応の特異性を決定するために、関節由来の抗原およびエピトープのアレイを用い抗体特異的プロファイルを示している。2000スポットの「滑膜プロテオーム」アレイを、ロボット型マイクロアレイ装置を用い推定関節抗原をスポットし、CIAマウス血清で、引き続きCy-3標識した抗マウスIg二次抗体でプローブすることにより作製し、ジーンピックススキャナーを用い走査し、かつジーンピックスソフトウェアを用い画像解析し、各スポットに結合している自己抗体のレベルを決定した。A-Bは、対照DBA/1LacJマウス (A) およびCIAのDBA/1LacJマウス (B) 由来の血清でプローブしたアレイの走査画像を示している。II型コラーゲンおよび免疫優性なII型コラーゲンペプチド257-270に対する自己抗体反応性を観察する。結果は、ELISAにより確認し、かつ追加のマウスで認められた自己抗体反応性を代表している。診断および治療を目的とし、放射免疫アッセイ法、酵素結合免疫吸着アッセイ法 (ELISA)、蛍光に基づく自己抗体試験、および/またはウェスタンブロット分析を含む、通常の方法を用い、自己抗体反応の特異性の決定も行うことができる。

【0124】

同定された抗原アレイをコードするDNAの抗原特異的DNA寛容治療によるCIAの治療はCIAにおいて自己抗体反応を標的とする

DNA寛容治療は、本発明に従い図5において決定されたエピトープ特異的プロファイルを基に設計した。CIAは、図5に示された抗原アレイを用い、自己抗体反応により標的化されるものとして同定されたII型コラーゲン (CII)、CIIp257-270エピトープをコードするDNA寛

10

20

30

40

50

容治療を用い、予防または治療した。加えて、図5に示した抗原アレイを使用しCIAにおける自己免疫反応の標的としても同定されている全II型コラーゲンをコードするDNAの寛容化は、同じくCIAを効果的に予防および治療した。表5は、代表的実験のデータを示している。

【0125】

(表5)

DNA寛容治療群	CIA発生率	正味のCIAスコア
p標的(DNAベクターのみ、対照)	0.53	22
p標的+IL-4(DNAベクター+IL-4、対照)	0.4	32
ミニ遺伝子(CIIp257-270をコードするDNA)	0.13	4
ミニ遺伝子+IL-4	0	4
CII(全CIIをコードするDNA)	0.13	8
CII+IL-4	0.06	4

10

DBA/1LacJマウスに、完全フロイントアジュバント中に乳化したCIIによるCIAの誘導前に、II型コラーゲン(CII)をコードするDNAを、1週間に1回、各DNAプラスミド用量100 μ gで、2回に分けて筋肉内投与した。動物は、20日目に、不完全フロイントアジュバント中のCIIで追加免疫した。各マウスは、肉眼によるスコアリングシステムを用い、関節炎について毎日スコア化した。

20

【0126】

実施例5

多発性硬化症治療のための抗原特異的療法の開発および選択の指針となる抗体特異的プロファイルの使用

多発性硬化症、EAEの動物モデルにおける自己抗体反応の抗原アレイ分析

図4は、MBP、プロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン希突起膠細胞タンパク質(MOG)、これらのタンパク質を表わしている重複しているペプチド、および環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(CNPase)、ミエリン関連糖タンパク質(MAG)、およびミエリン関連希突起膠細胞塩基性タンパク質(MBOP)を含む追加のミエリン自己抗原由来の優位エピトープを表わしているペプチドを含む、およそ400種の異なるミエリンタンパク質およびペプチドエピトープを備える2400スポットのMS/EAEアレイの画像を表わしている。

30

【0127】

図4は、EAEにおける自己抗体反応の特異性を研究するために、ミエリン抗原およびエピトープのスペクトルを含むこのアレイの使用を示している。2400スポットの「ミエリンプロテオーム」アレイを、ロボット型マイクロアレイ装置を用い推定ミエリン抗原をスポットすることにより作製し、EAEマウス血清で、引き続きCy-3標識した抗マウスIg二次抗体でプローブし、ジーンピックスキャナーを用い走査し、かつジーンピックスソフトウェアを用い画像解析し、各スポットに結合している自己抗体のレベルを決定した。A-Cは、対照マウス(A)、および再発性疾患を発症したPLPp139-151によるEAE誘導後87日目の2匹のSJLマウス(BおよびC)由来の血清でプローブしたアレイの走査した画像を表わしている。誘導ペプチドPLPp139-151に対する自己抗体反応性は、対照と比べ2匹のEAEマウスにおいて有意に強力であり、隣接分子内エピトープPLPp89-106に対する自己抗体反応性は、マウス-2において認められたが、マウス-1または対照においては認められず、かつMOGタンパク質、MOGp66-78、CNPase p343-373、およびMBPp1-20を含む分子間タンパク質およびエピトープに対する自己抗体反応性は、両方のEAEマウスにおいて認められたが、対照においては認められない。結果は、ELISAにより確認し、かつ追加のマウスで認められた自己抗体反応性の典型とした。

40

【0128】

完全フロイントアジュバント(CFA)中のPLPp139-151でEAEを発症するよう誘導されたSJLマ

50

ウスは、PLP上の隣接エピトープに対する、ならびにMBP、MOGおよびCNPaseを含む3種の追加のミエリンタンパク質上のエピトープに対する、それらの自己抗体反応の分子間および分子内の伸展を受ける(図4BおよびC)。EAEのSJLマウスにおいて、より少ない臨床的再発を伴うマウスは、自己抗体反応の有意に少ない伸展を有する(図5)。追加のミエリン抗原に対する自己抗体反応の増大したエピトープ伸展は、再発およびより重症の疾患に関連するというこの知見は、抗原アレイを用いる自己抗体特異的プロファイリングで、個々の動物における臨床結果を推定することができることの更なる証拠を提供する。並行して、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)分析で同定されかつ確認された抗原アレイは、自己抗体反応の特異性を決定した。自己抗体反応の伸展およびそのEAE、T細胞媒介型疾患におけるより重症な疾患との相関関係は、先に説明されており、かつ自己抗体特異的プロファイル決定の診断的および予後判定的実用性が明らかにされている。診断および治療を目的として、自己抗体特異的プロファイルの決定は、放射免疫アッセイ法、酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)、蛍光に基づく自己抗体試験、および/またはウェスタンブロット分析を含む、通常の方法を用い実行することもできる。

10

【0129】

抗原特異的療法の例としての抗原特異的DNA寛容治療

慢性的に再発するEAEは、PLPのエピトープをコードするDNAプラスミドミニ遺伝子の導入により予防および治療することができる(J. Immunol、162:3336-41; Curr. Dir. Autoimmun、2:203-16; 表2)。全ミエリンタンパク質をコードするDNAワクチンは、EAE治療において更により効果的であった(表2および3)。両ミエリン抗原をコードするDNAワクチンのIL-4と組合わせた送達は、予防的作用を更に増強した(表3)。

20

【0130】

(表2) 慢性再発性EAEを治療するための抗体特異的プロファイルを用いる同定された抗原をコードする抗原特異的DNA寛容療法

DNA	n	平均再発率	カクテルと比較したp値
溶媒剤	17	2.94	0.0064
ベクターのみ	16	3.875	<0.0001
カクテル	16	1.563	

30

¹ カクテル療法を投与されたマウスは、1週間に1回、4種の主要ミエリンプラスミド、MBP、MOG、MAGおよびPLPの各々について用量50 μ gで、筋肉内に投与した。カクテルは、これら4種のミエリン抗原をコードするDNAからなる。治療は、EAEの初期急性発症から回復直後に開始した。マウスを87日目に屠殺した時点で、血清を収集し、かつミエリンタンパク質アレイ上で使用した。各マウスを、87日間臨床麻痺(再発)の増悪について毎日スコア化しかつこれの平均数を、各マウス群について示している。p値は、両側独立スチューデントt検定を用いて計算した。

【0131】

(表3) 慢性再発性EAEを治療するための抗体特異的プロファイルを用いる同定された抗原をコードする抗原特異的DNA寛容療法、IL-4をコードするDNAプラスミドの封入はこの作用を増強する

40

DNA	n	平均再発率	カクテル/IL-4と比較したp値
溶媒剤	20	2.45	0.0018
IL4	14	2.93	0.0003
PLP139-151/IL-4	17	1.94	0.0158
カクテル	18	1.44	0.1714
カクテル/IL-4	17	0.941	

¹ カクテルを投与されたマウスは、1週間に1回、4種の主要ミエリンプラスミド、MBP、M 10
OG、MAGおよびPLPの各々について用量25 μ gで、筋肉内に投与した。このカクテルは、こ
れら4種のミエリン抗原をコードするDNAからなる。全ての他のDNAは、1週間に1回、動物1
匹当りプラスミド50 μ gの用量で投与した。治療は、EAEの初期急性発症から回復直後に開
始した。各マウスを、81日間臨床麻痺(再発)の増悪について毎日スコア化しかつこの平
均数を、各マウス群について示している。p値は、両側独立スチューデントt検定を用いて
計算した。

【0132】

EAEのより効率的治療のための選択された抗原特異的寛容療法に対する自己抗体反応の特 10
異性の使用

本発明者らは、抗原アレイで決定された抗体特異的プロファイルにより同定された様々な 20
ミエリン抗原をコードするDNAプラスミドを用い、SJLマウスにおいて慢性再発性EAEを治
療した。表4は、(1)EAEの誘導を防ぐため、および(2)確立されたEAEを治療するために、
抗原特異的DNA寛容療法を用いる複数回の実験からの最終的結果を表わしている。表4は、
多数のタンパク質アレイをコードする抗原特異的DNAプラスミドが自己免疫過程により標
的化された自己抗原を同定し、EAE治療において、標的化された自己抗原のひとつをコー
ドする(または、標的化されないミエリンタンパク質をコードする)プラスミド単独と比べ
優れた効能を有することを表わしている。決定された抗原特異的プロファイルで決定され
た抗原アレイを基に開発されかつ選択された抗原特異的療法の使用は、より効能のある療
法をもたらす。

【0133】

(表4) 抗原特異的DNA寛容療法によるEAEの予防および治療の最終結果 30

寛容化DNA製剤	EAE疾患の軽減	
	IL-4なし	IL-4あり
ベクター単独	-	-
MOG	-/+	++
PLPp139-151	+	++
カクテル: MBP, MOG, MAG, PLP	+++	++++

【0134】

実施例6

療法に対する反応をモニタリングするための抗体特異的プロファイルの使用

DNAプラスミドによりEAEに対して予防または治療された動物の分析は、タンパク質アレイ 50
分析における自己抗体反応の低下したエピトープ伸展を表わす(図6)。個々のマウスをX軸
に列記し、かつ「ミエリンプロテオーム」アレイ上のペプチドおよびタンパク質抗原をY
軸上に表わす。緑は、反応性の欠損を表わし、赤は自己抗体反応性を示す。抗原アレイ上
の類似性を基にしたマウス群のクラスター解析アルゴリズムは、それらの自己抗体反応の

特異性を決定した。この画像は、全クラスターの小領域を表わしている。正常マウス(NMS)クラスターおよび緑の支配性は、列記された抗原に対する自己抗体反応性の欠如を示している。慢性再発性EAEを伴うSJLマウスは、対照ベクターまたは緩衝液(BおよびC)クラスターで治療し、かつ赤で示した様々なミエリン抗原に対する有意な自己抗体反応性を有している。これらのマウスにおける自己抗体反応のこの観察された伸展は、それらのより重症の疾患経過に相関し、87日間に平均2.4~3.5回再発している。麻痺(再発)の臨床的増悪の平均回数は、図の一番上にマウス関連群を示す線上の数値で表わす。対照的に、ミエリンタンパク質カクテルDNA寛容療法(自己免疫反応の標的を同定した多数の抗原アレイを含み、かつEAE治療における最大の効能を示している[表4])により治療したマウスをクラスター化し、かつ他の群と比較して増大した緑で示されるように、それらの自己抗体反応の伸展の有意な低下を有する。この自己免疫反応の伸展の低下は、それらの臨床重症度の低い臨床経過に相関しており、87日間について平均1.5回再発した。

10

【0135】

図6は、抗原特異的DNA寛容療法で治療したEAEマウスからの結果の抗原アレイのクラスター分析を示している。自己抗体反応により標的化された抗原アレイにより同定された4種のミエリン抗原をコードするミエリンタンパク質カクテルDNA寛容化療法は、B細胞エピソード伸展を強力に低下した(図6)。これは、再発率で測定した疾患活動度の有意な低下と相関している(表2および3、図6)。従って、抗原アレイに基づく自己抗体プロファイリングは、抗原特異的療法の選択の指針において利用性があることに加え、抗原特異的療法に対する反応のモニタリングにも使用することができる。示してはいないが、アレイ上の個々の抗原特性に結合している抗体のアイソタイプ分析は、治療反応のより詳細な分析および予測を可能にすると考えられる。例えば、ヒト自己免疫疾患療法において、効能を、組織損傷に関連したTh1アイソタイプサブクラスIgG1およびIgG3から、自己免疫疾患の組織損傷に対する保護に関連したTh2アイソタイプサブクラスIgG2およびIgG4までの、抗体アイソタイプサブクラスにおけるシフトの抗原アレイ同定により示すことができる。抗原特異的療法を選択するための自己抗体反応の特異性の利用は、自己免疫反応の伸展を抑制することにより、自己免疫プロセスを根本的に治療し、かつこれは疾患活動度の低下に相関している。

20

【0136】

実施例7

30

組織移植のための患者の抗体特異的プロファイルに基づく療法

組織移植の大きい制限は、レシピエント免疫系による組織移植片の拒絶反応である。組織移植片は、心臓、肺、腎臓、肝臓および他の臓器を含む、固形臓器に加え、血液および血液由来の細胞の移植を含む。免疫拒絶反応は、組織移植片タンパク質内の対立遺伝子変異を認識するレシピエントの免疫系により媒介される。組織移植片拒絶反応は、組織移植片内のMHCクラスIおよびIIタンパク質に対する、ならびに他の組織適合性およびレシピエントに比べ組織移植片内の対立遺伝子変異を伴う追加の抗原に対する、レシピエント免疫反応により媒介される。移植片レシピエントの免疫系が移植片に対して反応する場合、これは、移植片内の抗原に結合する抗体を産生する。

【0137】

40

Balb/c(H-2^d)およびBalb/k(H-2^k)マウスの間の組織移植を用い、H-2^dクラスIおよびクラスII MHC分子を示している抗原およびエピトープを含む抗原アレイを用い、抗体プロファイルを決する。標準のプロトコールを使用し、心臓を、H-2^dマウスからH-2^kマウスの異所的な腹部位置に移植する(異所性移植は、簡単な触診による移植された心臓の密なモニタリングを可能にする)。レシピエントマウス由来の血清を、説明された抗原アレイを用い分析し、ドナーMHC分子に対する抗体反応性を同定する。抗体プロファイルの同定は、移植された心臓に対して拒絶するレシピエント動物を同定することを可能にする。抗体プロファイルは更に、予後判定のための拒絶反応の重症度の評価も可能にし、かつ非特異的療法の選択の指針となる。抗体特異的プロファイルは、移植された組織の消滅を防ぐための組織移植片拒絶反応の治療用の、抗原特異的療法の開発および選択に使用することでも

50

きる。この例において、移植片の生存は、移植した心臓の触診によりモニタリングされる。

【0138】

実施例8

アレルギー疾患の抗体特異的プロファイルに基づく療法

アレルギー疾患は、患者が曝される外因性アレルゲンに対して方向づけられた異常な免疫反応により媒介される。実施例として、花粉、イエダニ抗原、ハチ毒、ピーナッツ油、および外界に存在する他の分子に対するアレルギー反応を含む。アレルギー反応において、患者は、攻撃するアレルゲンに対し方向づけられた抗体を産生する。アレルゲン、および免疫エピトープ提示するアレルゲンを含むアレイを作製し、かつアレルゲンに対する抗体特異性の患者プロファイルの決定に使用する。患者の抗体プロファイルの同定は、アレルギー性疾患の診断および患者が反応しているアレルゲンの同定を促進すると考えられる。患者抗体特異性は更に、患者の寛容化のために使用する適当なアレルゲンの開発および選択に使用することができる。患者の寛容化は、不快なアレルゲンに対する患者の異常なアレルギー性免疫反応を停止する方法で、このアレルゲンを投与することを含む。患者の抗体特異的プロファイルは、抗アレルゲン抗体の反応性の変化、抗アレルゲン抗体の力価、および/または抗アレルゲン抗体のアイソタイプサブクラスの使用を基にした、アレルゲン寛容療法に対する患者の反応のモニタリングにも使用することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0139】

20

【図1】ラットにおけるEAEの自己抗体反応のミエリンペプチド特異性の抗原アレイ特徴決定(抗原アレイプロファイル)を含む抗体特異的プロファイルを示す。抗原アレイは、免疫優性なミエリンペプチドエピトープおよび精製された天然型ミエリン塩基性タンパク質をスポットすることにより作製した(表1に列記)。A-Dは、正常対照ラット(A)、および完全フロイントアジュバント中の異なるミエリンタンパク質ペプチドによりEAE発症を誘導した3匹のルイスラット(B-D)からの血清で、引き続きCy-3標識した抗ラットIg二次抗体によりプローブしたアレイの走査した画像(imaged)を表わしている。結果は、ELISAにより確認した。走査した画像の定量的コンピュータ解析は、表1に示した。報告された数値は、バックグラウンドレベルについて調節し、対照血清に対する、SLEにより認識された抗原の蛍光強度の比を表わし、その結果1より大きいまたは小さい比(1=差なし)は、>95%信頼区間での統計学的有意差を表わしている。抗原アレイは、EAEにおける自己抗体反応のペプチド特異性を強力に同定する。

30

【図2】8種の異なるヒト自己免疫疾患における自己抗体特異性の抗原アレイの同定および特徴決定(抗原アレイプロファイル)を含む、抗体特異的プロファイルを示している。整列された自己抗原アレイを、ロボット型マイクロアレイ装置を用い、4つ組セットでの192種の個別の推定自己抗原のスポットにより作製し、1152種の特性のリウマチ疾患自己抗原アレイを作製した。スポットした抗原は、以下を含む：36種の組換えまたは精製したタンパク質、Ro52、La、ヒスチジル-tRNAシンテターゼ(Jo-1)、SRタンパク質、ヒストンH2A(H2A)、Sm-B/B'、U1小核リボ核タンパク質複合体の70kDaおよびC成分(U1-70kDa、U1snRNP-C)、Sm-B/B'、hnRNP-B1、Sm/RNP複合体、トポイソメラーゼI(topoI)、動原体タンパク質B(CENP B)、およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)；数種類の型の哺乳類二本鎖DNA(dsDNA)および合成一本鎖DNA(ssDNA)を含む、6種の核酸に基づく推定抗原；ならびに、snRNPタンパク質、Smタンパク質、およびヒストンH1、H2A、H3およびH4を表わしている、154種のペプチド。加えて本発明者らは、下記に対して特異的な抗体をスポットした：ヒトIgGおよびIgM(-IgGおよび-IgM)；インフルエンザAおよび肺炎球菌(ニューモバックス)のワクチン；ならびに、アレイを方向付けるためのマーカースポットとして使用するためのCy-3-およびCy-5で予め標識した抗体の混合物(黄色特徴)。自己抗原アレイを、(a)特異的自己抗体反応性が検出されなかった健常個体(正常)；(b)Ro52およびLaに対する自己抗体反応性を示しているシェーグレン症候群；(c)DNA、ヒストンH2A、U1-70kDa、およびSRタンパク質に対する反応性を示しているSLE；(d)Jo-1およびRo52に対する反応性を示している

40

50

PM ; (e)DNA、ヒストンH2A、Ro52、およびU1-70kDaに対する反応性を示しているMCTD ; (f) PDHに対する反応性を示しているPBC ; (g)topoIに対する反応性を示しているsclero-D ; (h)CENP Bに対する反応性を示しているsclero-L ; ならびに、(i)hnRNP-B1に対する反応性を示しているRA由来の、希釈した患者血清試料とインキュベーションした。各アレイをプローブするために使用した自己免疫疾患血清は、図の上側に示し、ならびに灰色ボックス内に含まれた抗原特性を切貼りした各行は、単独のアレイからの代表的抗原特性である。実験的自己免疫脳脊髄炎の齧歯類由来の血清中の自己抗体によりアレイ上で認識されたミエリン塩基性タンパク質ペプチドを、代表的陰性対照として含んだ(MBP 68-86)。結合した抗体は、Cy-3標識ヤギ抗ヒトIgM/IgGを用い、走査前に検出した。

【図3】ヒト多発性硬化症患者からの脳脊髄液中の自己抗体反応の抗原アレイ特徴決定(抗原アレイプロファイル)を含む、抗体特異的プロファイルを示す。2400スポットの「ミエリンプロテオーム」アレイを、ロボット型マイクロアレイ装置を用い推定ミエリン抗原(本文中で説明)をスポットすることにより作製し、脳脊髄液で、引き続きCy-3標識した抗ヒトIg二次抗体でプローブし、ジーンピックスキャナーを用い走査し、かつジーンピックスソフトウェアにより画像解析し、各スポットに結合している自己抗体のレベルを決定した。これらのアレイは、MBP、プロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン希突起膠細胞タンパク質(MOG)、これらのタンパク質を示す重複しているペプチド、ならびに環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(CNPase)、ミエリン関連糖タンパク質(MAG)、およびミエリン関連希突起膠細胞塩基性タンパク質(MBOP)を含む追加のミエリン自己抗原からの優位エピトープを表わすペプチドを含む、400種の異なるミエリンタンパク質およびペプチドエピトープを含んでいる。対照患者において、インフルエンザウイルスおよび肺炎連鎖球菌を含む共通かつ偏在性のヒト病原体に特異的な抗体は検出されているが、ミエリンタンパク質およびペプチドに特異的な抗体は検出されていない。MS患者1において、抗原アレイは、全ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、全ミエリン希突起膠細胞タンパク質(MOG)に特異的な自己抗体、更にはMOGペプチド35-55、MBPペプチド1-20、およびMBPペプチド68-86を認識する自己抗体を検出している。対照的に、MS患者2において、自己抗体は、MOGタンパク質およびMOGペプチド25-42に対して検出される。MS患者3において、プロテオリピドタンパク質(PLP)ペプチド139-151に特異的な自己抗体が同定される。

【図4】実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)のマウスにおける自己抗体反応の多様性および類似性の抗原アレイ特徴決定(抗原アレイプロファイル)を含む抗体特異的プロファイルを示す。2400スポットの「ミエリンプロテオーム」アレイを、ロボット型マイクロアレイ装置を用い、推定ミエリン抗原をスポットすることにより作製し、EAEマウス血清で、引き続きCy-3標識した抗マウスIg二次抗体でプローブし、ジーンピックスキャナーを用い走査し、かつジーンピックスソフトウェアにより画像解析し、各スポットに結合している自己抗体のレベルを決定した。図4A-Cは、対照マウス由来の血清(A)、および再発疾患を発症したPLPp139-151によるEAE誘導後87日目の2匹のSJLマウス由来の血清(BおよびC)でプローブしたアレイの走査した画像を示している。誘導ペプチドPLPp139-151に対する自己抗体反応性は、EAEの2匹のマウスにおいて、対照と比べ有意に強力であり、隣接する分子内エピトープPLPp89-106に対する自己抗体反応性が、マウス-2において認められたが、マウス-1または対照においては認められず、かつMOGタンパク質、MOGp66-78、CNPase p343-373、およびMBPp1-20を含む分子間タンパク質およびエピトープに対する自己抗体反応性は、EAEの両マウスにおいて認められたが、対照においては認められなかった。結果は、ELISAにより確認し、かつ追加のマウスにおいて認められた自己抗体反応性の典型である。従って、PLPペプチド139-151で誘導したSJLマウスは、それらの自己免疫反応の、PLP上の隣接ペプチドエピトープに加え、MBP、MOGおよびCNPaseを含む3種の追加のミエリンタンパク質のエピトープへの伸展を受ける。これらの結果は、自己抗体反応により標的化された特異的自己抗原の抗原アレイの同定を明らかにしている。自己抗体反応のより多い数の抗原アレイ同定した標的をコードする抗原特異的DNA寛容ワクチンは、自己抗体標的単独または標的化されないミエリン抗原をコードするワクチンよりも、EAEの予防および治療に関してより大きい効能を有した。

10

20

30

40

50

【図5】コラーゲン誘導型関節炎(CIA)のマウスにおける自己抗体反応の抗原アレイ特徴決定(抗原アレイプロファイル)を含む抗体特異的プロファイルを示す。抗原アレイは、ロボット型キャピラリーアレイ装置を用いて作製し、ポリ-L-リシン-被覆した顕微鏡スライド上の整列されたアレイにRA中の推定滑液ペプチドおよびタンパク質自己抗原を、スポットした。スポットした抗原は、I、IIおよびIII型コラーゲン、CIIp257-270、Ro52、La、ヒスチジル-tRNAシンテターゼ(Jo-1)、U1小核リボ核タンパク質複合体の70kDaおよびC成分(U1-70kDa、U1snRNP-C)、hnRNP-B1、およびGP39の重複しているペプチドを含む。本発明者らは、これらのアレイを方向づけるために、「マーカー特徴」としてCy-3で予め標識した抗体をスポットした(緑の特徴の巨大な大部分)。アレイは、(a)正常なDBA/1LacJ血清、または(b)CFAにおけるチックCIIによりCIAを発症するように誘導したDBA/1LacJマウスから疾患開始時(29日目)に得た血清と共にインキュベーションした。結合した抗体は、Cy-3標識したロバ抗マウスIgM/IgGを用い検出した。CIIおよびCIIp257-270の自己抗体特異性は、CIA血清試料中のみで検出される。

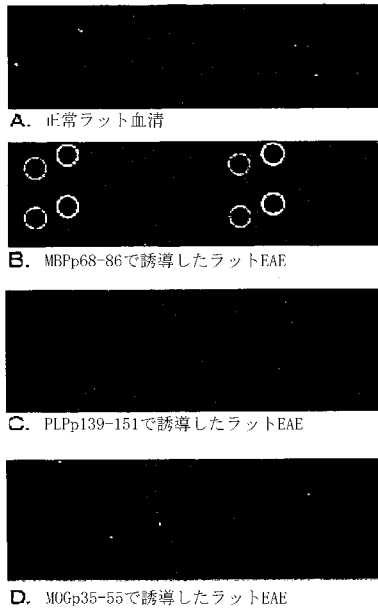
【図6】EAE中で自己抗原を同定された抗原アレイからの複数のエピトープをコードするDNA寛容療法は、臨床疾患活性を低下し、かつ自己免疫反応の伸展を低下することを明らかにしているクラスター解析を提供する。個々のマウスはX軸上に列記し、ならびに「ミエリンプロテオーム」アレイ上のペプチドおよびタンパク質抗原は、Y軸上に表わした。緑は、反応性の欠損を表わし、および赤は、自己抗体反応性を示している。抗原アレイの類似性を基にしたマウス群のクラスター解析アルゴリズムは、それらの自己抗体反応の特異性を決定した。この画像は、全クラスターの小領域を表わしている。正常マウス(NMS)クラスターおよび緑の支配性は、列記された抗原に対する自己抗体反応性の欠如を示している。慢性再発性EAEを伴うSJLマウスは、対照ベクターまたは緩衝液(BおよびC)クラスターで治療し、かつ赤で示した、様々なミエリン抗原に対する顕著な自己抗体反応性を有する。これらのマウスにおける自己抗体反応のこの観察された伸展は、それらのより重症な疾患経過に相関し、87日間に平均2.4~3.5回再発する。麻痺(再発)の臨床増悪の平均回数は、図の一番上に、マウスの関連群を示す線の上の数字で表わしている。対照的に、ミエリンタンパク質カクテルDNA寛容化ワクチン(多数の自己免疫反応の標的を同定された抗原アレイを含み、かつEAE治療における最大の効能を示している[表4])により治療したマウスを、クラスター化し、かつ他の群と比較して増大した緑により示されるような、それらの自己抗体反応の伸展の有意な低下を有する。この自己免疫反応の伸展の低下は、それらのより重症度の低い臨床経過と相関し、87日間に平均1.5回再発する。

10

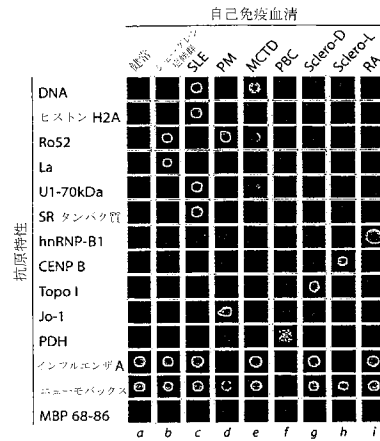
20

30

【図 1】



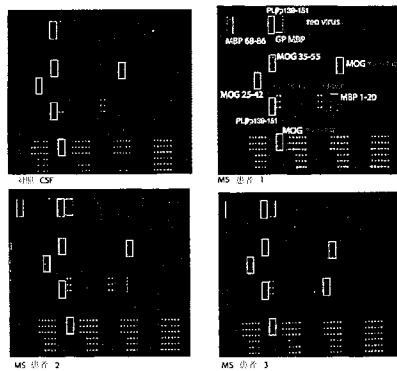
【図 2】



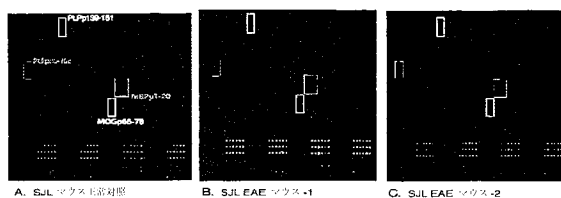
抗原特性	健康	自己免疫血清	SLE	PM	MCTD	PBC	Sclero-D	Sclero-L	RA
DNA	78	352	16,805	0	5,001	1	314	37	26
ヒストン H2A	93	44	3,009	0	918	1	100	60	0
Ro52	374	20,934	196	17,395	1,818	93	280	121	143
La	108	8,102	564	0	0	1	119	6	0
U1-70kDa	190	135	6,825	31	2,315	159	274	77	153
SR タンパク質	262	629	8,745	112	135	342	237	182	0
hnRNP B1	379	269	1,416	428	978	381	458	317	713
CENP B	12	33	435	21	0	262	11	11,947	0
Topo I	91	113	551	0	11	1	10,095	27	0
Jo-1	24	97	334	28,753	0	1	485	0	3
PDH	190	40	377	40	75	6,609	222	526	279
インフルエンザ	15,085	19,809	13,521	1,266	18,686	1	11,641	475	9,134
肺炎球菌	15,580	8,153	29,669	2,779	30,473	1	20,509	5,729	18,374
MBP 68-86	99	13	314	8	0	7	46	40	0

【図 3】

対照および多発性硬化症患者由来の脳脊髄液中の自己抗体反応特異性の抗原アレイ分析

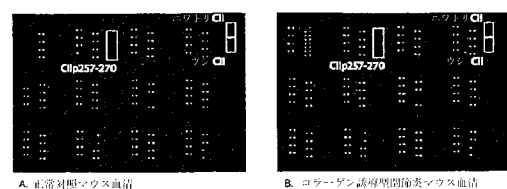


【図 4】



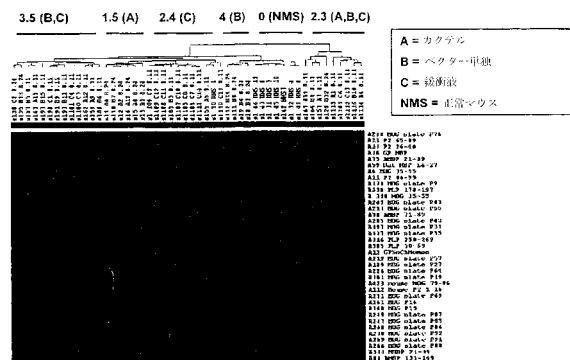
EAEマウスにおける自己抗体反応特異性の抗原アレイ特徴決定

【図 5】



RAに関するCIAマウスモデルにおける自己抗体反応の「潜波プロファイル」アレイ分析

【図 6】



DNAワクチン寛容療法は再発性RAにおいて自己抗体反応の伸張を低下することを明らかにしているクラスター解析

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/084249 A2

- (51) International Patent Classification: **G01N** Park, CA 94025 (US); **HIRSCHBERG, David, L.** [US/US]; 919 Fremont Place, Menlo Park, CA 94025 (US); **STEINMAN, Lawrence** [US/US]; 1704 Oak Creek Drive, Palo Alto, CA 94304 (US); **RUIZ, Pedro, Jose** [CO/US]; 1 Miller Court, Redwood City, CA 94061 (US); **UTZ, Paul, J.** [US/US]; 300 Pasteur Drive, CCSR Building, Room 2215-A, Stanford, CA 94035-5166 (US); **GARREN, Hideki** [US/US]; Beckman Center, Room B002, Stanford, CA 94305-5429 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/11356
- (22) International Filing Date: 10 April 2002 (10.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/283,090 10 April 2001 (10.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY** [US/US]; 900 Welch Road, Suite 350, Palo Alto, CA 94304 (US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): **ROBINSON, William, H.** [US/US]; 880 Robie Avenue, No. 2, Menlo Park, CA 94025 (US).
- (74) Agent: **SHERWOOD, Pamela, J.**, Bozicevic, Field & Francis, L.L.P., 200 Middlefield Road, Suite 200, Menlo Park, CA 94025 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GT, HK, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SN, SR, ST, SV, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VE, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC USES OF ANTIBODY SPECIFICITY PROFILES



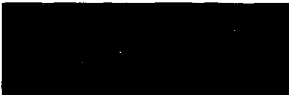
A. Normal Rat Serum



B. Rat EAE induced with MBPp68-86



C. Rat EAE induced with PLPp139-151



D. Rat EAE induced with MOGp55-55

(57) Abstract: This invention provides a method for determining the antibody specificity profile in an individual. This specificity profile reveals the individual's immune response to multiple antigens and/or epitopes of autoantigens, allergens, graft antigens, etc. The antibody specificity profile is determined through the binding of patient samples comprising antibodies to the arrays. The array can comprise antigens and epitopes. The invention also provides the means and methods for determining antigen or epitope specificity profiles that can be used in the development of either generic and individualized diagnosis and treatment for immune related diseases, including autoimmune disease, allergy and graft rejection.

WO 02/084249 A2

WO 02/084249 A2 

SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(84) **Designated States** (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BI, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/084249

PCT/US02/11356

THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC USES OF ANTIBODY
SPECIFICITY PROFILES

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 The astonishing complexity of the immune system is its greatest strength. The
10¹²-10¹⁴ possible antibody specificities, the delicate interplay between the various
regulatory and effector cells, the restriction of T cell responses according to MHC antigens;
all these contribute to the ability of the host to effectively react against infectious agents and
other antigens perceived as foreign. But this diversity has its drawbacks. Mistakes happen:
10 the target of a response may turn out to be a normal self protein; inflammatory responses
are misregulated; and normal responses are undesirably directed against grafts and
transplanted cells. Under these circumstances, the complexity of the system makes
diagnosis and therapy extremely difficult.

For most autoimmune diseases, atopic states and undesired immune responses, no
15 effective diagnostic blood tests or therapeutic agents exist. For example, current
therapeutic strategies are often based on system-wide immune suppression. Since this
treatment is not antigen specific, the result is a global decrease in immune function,
resulting in susceptibility to infection and disease. Therefore, there is a tremendous clinical
need for antigen-specific diagnosis and tolerizing therapies, which will specifically turn off
20 undesired immune responses, but will leave the remainder of the immune system intact.
However, in order to provide antigen specific therapy, the antigen specificity of reactive cells
needs to be defined.

The importance of defining antigenic targets in autoimmune disease is in part related
to the progression of these diseases. For example, immune responses in the
25 neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis (MS) and experimental autoimmune
encephalomyelitis (EAE) may be directed against one or more myelin sheath proteins, for
example myelin basic protein, myelin oligodendroglial glycoprotein, proteolipid protein, and
various other myelin antigens. As the disease progresses, reactivity to the initiating antigen
diminishes, and an orderly and definable set of new immune reactivities arises. Over time,
30 antigen-specific autoimmune responses can spread to different epitopes on one protein,
termed "intramolecular epitope spreading", or to other epitopes on other structural proteins,
termed "intermolecular epitope spreading". During the course of EAE initiated by
immunization to one epitope, both intramolecular and intermolecular epitope spreading
allow the autoimmune response to evolve to encompass detectable T cell responses to
35 other epitopes on the initiating antigen and to other myelin antigens (see Steinman (1999) J.
Exp. Med. **189**:1021-1024).

As described by Touhy *et al.* (1999) J. Exp. Med. **189**:1033-1042, patients lose

WO 02/084249

PCT/US02/11356

reactivity to the myelin epitopes that were recognized during the initial immune response, and develop T cell immune reactivity to other myelin epitopes. The immune response to the initiating self-antigen in autoimmunity can eventually disappear, as the disease enters the stage where clinical progression and then chronicity prevail. However, critical immunogenic epitopes can still be found in chronic disease states, and these provide a key to antigen specific therapy.

Before antigen specific therapies can be provided, a more precise and high throughput method of diagnosis is required, as well as a means of delivering specific immunosuppressive agents. Achieving diagnosis is particularly difficult where there is a strong T cell component to the autoimmune disease, due to the T cell receptor recognition of antigen only when bound to an appropriate major histocompatibility protein.

Although precise identification of the cognate antigen for T cells remains challenging (see Altman *et al.* (1996) Science 274(5284):94-6), techniques exist for serotyping of antibody specificities. Many assays are known and used in the art for detection of antibodies with a particular specificity, including ELISA, RIA, competitive and non-competitive sandwich assays, solid phase immunoassays, e.g. on porous supports (see U.S. Patent no. 5,486,452), and the like. For example, Atassi *et al.* (1996) U.S. Patent no. 5,578,496 define the fine specificity of autoantibodies by solid-phase radioimmunoassay using overlapping peptides derived from a target antigen. Similarly, Harley (1997) U.S. Patent no. 5,637,454 performed solid phase anti-peptide assays to determine the specificity of autoantibodies against the SSA protein.

Therapies aimed at antigen specific responses are being developed. In some instances, peptides are being delivered to the host in a manner that induces tolerance to the antigen. For example, phase II clinical trials are underway for the treatment of MS with myelin basic protein altered peptides. The results of clinical trials are described in Kappos *et al.* (2000) Nature Medicine 6:1176-1182; and Bielekova *et al.* (2000) Nat. Med. 6:1167-1175. Microbial peptides that act as altered peptide ligands are described by Ruiz *et al.* (1999) J. Exp. Med. 189:1275-1283. Delivery of purified myelin proteins targeted by the autoimmune response have also demonstrated efficacy in treating EAE (Critchfield *et al.* (1994) Science 263:1139-43). DNA sequences encoding autoantigens have also been used to promote antigen-specific immunosuppression. Ruiz *et al.* (1999) J. Immunol. 162:3336-3341 vaccinate with a minigene encoding a dominant epitope of myelin proteolipid protein, and demonstrate protection from disease. Garren *et al.* (2001) vaccinate with a cocktail of minigenes encoding 4 antigens, demonstrating enhanced protection and treatment of active disease.

There is an unmet need for methods of accurately and quickly performing diagnosis of the autoantigen repertoire being recognized by immune cells in clinical disease states,

WO 02/084249

PCT/US02/11356

and for the translation of this knowledge into specific therapeutic modalities. The present invention addresses this issue.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 Objects of the present invention are accomplished by a novel method of determining an antibody specificity profile in a patient with an immune-related disease comprising: (a) preparing an antigen array comprising at least two disease associated antigens wherein said antigens further comprise one or more immunologic epitope(s); (b) physically contacting the antigen array from step (a) with a patient sample comprising antibodies; (c) 10 identifying the disease associated antigens within the microarray that bind to antibodies within the patient sample from step (b); (d) comparing the antibodies bound to the disease associated antigens in step (c) with (1) antibodies binding to the disease associated antigens within the microarray of step (a) wherein the antibodies are known to be associated with the disease; and, (2) antibodies binding to the disease associated antigens 15 within the microarray of step (a) wherein the antibodies are not associated with the disease. Objects of the present invention are also accomplished by a novel method of determining an antibody specificity profile in a patient with an immune-related disease comprising: (a) preparing an epitope array comprising one or more disease associated epitope(s); (b) 20 physically contacting the epitope array from step (a) with a patient sample comprising antibodies; (c) identifying the disease associated epitope(s) within the microarray that bind to antibodies within the patient sample from step (b); (d) comparing the antibodies bound to the disease associated epitope(s) in step (c) with (1) antibodies binding to the disease associated epitope(s) within the microarray of step (a) wherein the antibodies are known to be associated with the disease; and, (2) antibodies binding to the disease associated 25 epitope(s) within the microarray of step (a) wherein the antibodies are not associated with the disease. The novel method of determining an antibody specificity profile also provides the ordinarily skilled artisan with an antigen profile or an epitope profile, as the case may be. The methods and compositions of this invention are used for diagnosis and for design and selection of specific therapies for immune-related diseases. More specifically the methods 30 and compositions related to determining an antibody specificity profile can be used for autoimmune disease, including immune related disorders such as multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), autoimmune diabetes, systemic lupus erythematosus (SLE), myositis, scleroderma, psoriatic arthritis, primary biliary cirrhosis (PBC), myasthenia gravis (MG), polychondritis, and tissue transplant rejection. Further, the method for determining 35 an antibody specificity profile is used in allergy. In one embodiment, a high throughput determination is made of the spectrum of disease relevant antibodies present in patient serum by detailed binding analyses of these antibodies. The antibody specificity profile

WO 02/084249

PCT/US02/11356

reveals the individual's complex immune response directed to one or more antigens having one or more epitopes.

The invention provides a method for determining the antibody specificity profile to identify those patients likely to develop an immune-related disorder, but who have not yet
5 manifested symptoms.

The invention also provides a method for the identification of patients likely to develop a more severe form of disease, enabling selection of more aggressive therapy based on a patient's antibody specificity profile.

The invention also provides a method for the design of treatment regimens, including
10 antigen-specific and non-antigen specific therapies. In one embodiment, antigen-specific therapies are selected based on the antibody-specificity profile. The patient antibody specificity profile provides information about both B cell and T cell mediated responses. Individualized cocktails of antigen specific treatments can be formulated based on the patient's specificity profile. In another embodiment, identification of a consensus of
15 common antibody specificity profiles between patients with the same immune disorder provides for formulation of a generic antigen-specific therapy to treat patients with that disease.

In yet another aspect of the invention, there are methods for determining the antibody specificity profile for monitoring therapeutic response in patient receiving treatment
20 for immune-related disorders. Therapeutic responses are assessed based on alterations in the antibody specificity profile including changes in antibody targets (i.e. the antigen or epitope profile), changes in antibody titers, changes in antibody isotypes, and changes in large-scale patterns of antibody recognition. In another embodiment, antibody specificity profiles can be utilized to predict adverse outcomes in individual patients, thereby enabling
25 selection of alternative therapies.

In another aspect, the antibody specificity profile enables identification of novel antigens associated with the disease and novel epitopes associated with the disease.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

30 Figures 1A to 1D shows an antibody specificity profile including an antigen array characterization (antigen array profile) of the myelin peptide-specificity of the autoantibody response in EAE in rats. Antigen arrays were generated by spotting the immunodominant myelin peptide epitopes and purified native myelin basic protein (listed in Table 1). A-D represent scanned images of arrays probed with serum from a normal control rat (A) and 3
35 Lewis rats induced to develop EAE with different myelin protein peptides in complete Freund's adjuvant (B-D), followed by Cy-3 labeled anti-rat Ig secondary antibody. Results were confirmed by ELISA. Quantitative computer analysis of the scanned images is

WO 02/084249

PCT/US02/11356

presented in Table 1. The reported numbers represent the ratio of the fluorescence intensity of antigens recognized by SLE relative to control serum adjusting for background levels such that ratios greater or less than 1 (1 = no difference) represent a statistically significant difference with a >95% confidence interval. Antigen arrays powerfully identify the peptide-specificity of the autoantibody response in EAE.

Figure 2 shows an antibody specificity profile including an antigen array identification and characterization (antigen array profile) of the autoantibody specificity in 8 different human autoimmune diseases. Ordered autoantigen arrays were generated by spotting 192 distinct putative autoantigens in quadruplicate sets using a robotic microarrayer to create a 1152-feature rheumatic disease autoantigen array. Spotted antigens include: 36 recombinant or purified proteins including Ro52, La, histidyl-tRNA synthetase (Jo-1), SR proteins, histone H2A (H2A), Sm-B/B', the 70 kDa and C component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex (U1-70kDa, U1snRNP-C), Sm-B/B', hnRNP-B1, Sm/RNP complex, topoisomerase I (topo I), centromere protein B (CENP B), and pyruvate dehydrogenase (PDH); six nucleic acid-based putative antigens including several forms of mammalian double-stranded DNA (dsDNA) and synthetic single-stranded DNA (ssDNA); and 154 peptides representing snRNP proteins, Sm proteins, and histones H1, H2A, H3 and H4. In addition, we spotted antibodies specific for human IgG and IgM (α -IgG and α -IgM); the vaccines for influenza A and pneumococcus (Pneumovax); and a mixture of antibodies pre-labeled with Cy-3- and Cy-5 to serve as marker spots to orient the arrays (the yellow features). Autoantigen arrays were incubated with diluted patient serum samples from (a) a healthy individual (normal) for which no specific autoantibody reactivities were detected; (b) Sjögren's syndrome demonstrating autoantibody reactivity against Ro52 and La; (c) SLE demonstrating reactivity against DNA, histone H2A, U1-70kDa, and SR protein; (d) PM demonstrating reactivity against Jo-1 and Ro52; (e) MCTD demonstrating reactivity against DNA, histone H2A, Ro52, and U1-70kDa; (f) PBC demonstrated reactivity against PDH; (g) sclero-D demonstrating reactivity against topo I; (h) sclero-L demonstrating reactivity against CENP B; and (i) RA demonstrating reactivity against hnRNP-B1. The autoimmune disease serum used to probe each array is indicated along the top of the figure, and each column of cut and pasted antigen features contained within a gray box are representative antigen features from a single array. A myelin basic protein peptide recognized on arrays by autoantibodies in serum from rodents with experimental autoimmune encephalomyelitis was included as a representative negative control (MBP 68-86). Bound antibodies were detected using Cy-3-conjugated goat-anti-human IgM/IgG prior to scanning.

Figure 3 shows an antibody specificity profile including an antigen array characterization (antigen array profile) of the autoantibody response in cerebral spinal fluid from human multiple sclerosis patients. 2400-spot 'myelin proteome' arrays were produced by spotting putative myelin antigens (described in text) using a robotic microarrayer, probed

WO 02/084249

PCT/US02/11356

with cerebral spinal fluid followed by Cy-3-labeled anti-human Ig secondary antibody, scanned using a GenePix scanner, and images analyzed using GenePix software to determine levels of autoantibody binding to each spot. These arrays contain 400 different myelin protein and peptide epitopes including MBP, proteolipid protein (PLP), myelin oligodendrocyte protein (MOG), overlapping peptides representing these proteins, and peptides representing dominant epitopes from additional myelin autoantigens including cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNPase), myelin-associated glycoprotein (MAG), and myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MBOP). In the control patient, although antibodies specific for common and ubiquitous human pathogens including influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* are detected, no antibodies specific for myelin proteins and peptides are detected. In MS patient 1, antigen arrays detect autoantibodies specific for whole myelin basic protein (MBP), whole myelin oligodendrocyte protein (MOG), as well as autoantibodies recognizing MOG peptide 35-55, MBP peptide 1-20, and MBP peptide 68-86. In contrast, in MS patient 2 autoantibodies are detected against MOG protein and MOG peptide 25-42. In MS patient 3, autoantibodies specific for proteolipid protein (PLP) peptide 139-151 are identified.

Figures 4A to 4C shows an antibody specificity profile including an antigen array characterization (antigen array profile) of the diversity and similarities of the autoantibody response in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). 2400-spot 'myelin proteome' arrays were produced by spotting putative myelin antigens using a robotic microarrayer, probed with EAE mouse serum followed by Cy-3-labeled anti-mouse Ig secondary antibody, scanned using a GenePix scanner, and images analyzed using GenePix software to determine levels of autoantibody binding to each spot. A-C represent scanned images of arrays probed with serum from a control mouse (A) and 2 SJL mice 87 days post-EAE induction with PLPp139-151 that developed relapsing disease (B & C). Autoantibody reactivity against the inducing peptide PLPp139-151 is significantly stronger in the 2 mice with EAE relative to the control, autoantibody reactivity against an adjacent intra-molecular epitope PLPp89-106 is observed in mouse-2 but not mouse-1 or the control, and autoantibody reactivity against inter-molecular proteins and epitopes including MOG protein, MOGp66-78, CNPase p343-373, and MBPp1-20 are observed in both mice with EAE but not the control. Results were confirmed by ELISA and are representative of autoantibody reactivity observed in additional mice. Thus, SJL mice induced with PLP peptide 139-151 undergo spreading of their autoimmune response to adjacent peptide epitopes on PLP as well as to epitopes on 3 additional myelin proteins including MBP, MOG, and CNPase. These results demonstrate antigen array identification of the specific autoantigens targeted by the autoantibody response. Antigen-specific DNA tolerizing vaccines encoding a greater number of the antigen array-identified targets of the autoantibody response had greater efficacy for preventing and treating EAE than vaccines encoding a single of the autoantibody targets or non-targeted myelin antigens.

Figure 5A and 5B shows an antibody specificity profile including an antigen array

WO 02/084249

PCT/US02/11356

characterization (antigen array profile) of the autoantibody response in mice with collagen-induced arthritis (CIA). Antigen arrays were generated using a robotic capillary arrayer to spot putative synovial peptide and protein autoantigens in RA into ordered arrays on poly-L-lysine-coated microscope slides. Spotted antigens include collagens type I, II, and III, CIIp257-270, Ro52, La, histidyl-tRNA synthetase (Jo-1), the 70 kDa and C component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex (U1-70kDa, U1snRNP-C), hnRNP-B1, and overlapping peptides for GP-39. We spotted antibodies pre-labeled with Cy-3 as 'marker features' to orient the arrays (the vast majority of the green features). Arrays were incubated with (a) normal DBA/1LacJ serum or (b) serum obtained at disease onset (day 29) from a DBA/1LacJ mouse induced to develop CIA with chick CII in CFA. Bound antibodies were detected using Cy-3-conjugated donkey-anti-mouse IgM/IgG. Autoantibodies specific for CII and CIIp257-270 are detected only in the CIA serum sample.

Figure 6 provides cluster analysis demonstrating that DNA tolerizing therapy encoding multiple epitopes from the antigen array identified autoantigens in EAE reduces clinical disease activity and reduces spreading of the autoimmune response. Individual mice are listed on the X axis, and peptide and protein antigens present on the 'myelin proteome' array on the Y axis. Green indicates lack of reactivity, and red indicates autoantibody reactivity. The cluster analysis algorithm groups mice based on similarities in the antigen array determined specificity of their autoantibody responses. This image represents a small region of the overall cluster. Normal mice (NMS) cluster and the predominance of green indicates lack of autoantibody reactivity to the listed antigens. SJL mice with chronic relapsing EAE treated with control vector or buffer (B and C) cluster and have significant autoantibody reactivity, indicated by red, against various myelin antigens. This observed spreading of the autoantibody response in these mice correlates with their more severe disease course, with an average of 2.4-3.5 relapses over the 87 day period. The average number of clinical exacerbations of paralysis (relapses) are presented at the top of the figure by the numbers over the bars indicating the relevant group of mice. In contrast, mice treated with the myelin protein cocktail DNA tolerizing vaccine (containing a large number of the antigen array identified targets of the autoimmune response, and demonstrating the greatest efficacy in treating EAE [Table 4]) cluster and have a significant reduction in the spreading of their autoantibody response as indicated by the increased green relative to the other groups. This reduction in spreading of the autoimmune response correlated with their less-severe clinical course with an average of 1.5 relapses over the 87 day period.

DETAILED DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS

In one embodiment, high throughput determination is made of disease relevant antibodies present in patient serum by detailed binding analyses of these antibodies. The

WO 02/084249

PCT/US02/11356

antibody specificity profile reveals the individual's immune response to multiple epitopes of autoantigens, allergens, graft antigens, *etc.* Such antibody or antigen specificity profiles are used in the development of individualized diagnosis and treatment of immune associated disease, including autoimmune diseases, allergies and graft rejection. By tracking epitope spreading, antigen specificity, and quantitative binding data the staging and progression of disease can be determined.

It has been found that the specificity of the autoantibody response can correlate with that of the autoreactive T cell response. In several human autoimmune diseases the autoimmune T and B cell responses recognize the same immunodominant epitopes. In those cases where there is discordance between the fine specificity of the B and T cell responses in an autoimmune disease, the ability to identify the specific self-protein(s) against which an individual is autoreacting can be sufficient to study the specificity and evolution of the autoimmune response and to select appropriate antigen-specific treatment. Knowledge of the specificity of the autoantibody response in individual patients can facilitate early diagnosis, serve as a prognostic indicator, and help guide development and selection of the appropriate antigen-specific tolerizing therapy.

For certain autoimmune diseases, including autoimmune diabetes, systemic lupus erythematosus (SLE), myasthenia gravis, and Grave's disease, the detection of antibody reactivity against one or two self-proteins has diagnostic utility. Certain antibody reactivities have also been demonstrated to have prognostic utility. For example, autoantibodies directed against DNA are pathogenic in some models of SLE, are generally associated with renal involvement, and their titers frequently correlate with disease activity. In polymyositis, Jo-1 autoantibodies frequently predate clinical disease by months to years, and predict development of interstitial lung disease and a poor prognosis.

Human autoimmune disease is extremely heterogenous in terms of its clinical manifestations. For example, patients with SLE have a spectrum of clinical disease that varies from patient to patient. Certain patients have disease that primarily involves their skin and joint manifestations, while others have disease that causes fluid accumulation on the heart and lungs (serositis), while others have disease that primarily affects the kidneys and brain. In multiple sclerosis, certain patient have relapsing-remitting disease that follows a benign course with no disability, others initially have relapsing-remitting disease that evolves to chronic progressive disease causing paralysis and disability, while yet another groups develops chronic-progressive disease from the onset. It is likely that the different clinical forms of each of these diseases represent distinct subtypes of disease, in which the autoimmune response is directed against different autoantigens and which will differentially respond to specific therapies.

WO 02/084249

PCT/US02/11356

In one embodiment of the invention, the antibody specificity profiles are determined through the binding of antibodies from a patient sample to antigen(s) comprising an array, where the peptides correspond to potential epitopes of antigens. Small amounts of the sample are sufficient to screen a large number of different peptides. The array may
5 comprise individual spots of protein complexes, whole proteins and/or fragments of proteins, where the fragments may be overlapping peptides that encompass the complete protein, or a partial representation of the protein, which may include known immunodominant peptides. The array may also comprise spots of other molecules including single stranded DNA, double stranded DNA, oligonucleotides, RNA, lipids, carbohydrates,
10 or other molecules. In the case of autoimmune disease the antibody specificity profile provides a means of monitoring and/or predicting the antibody response to antigen-specific vaccines or treatments, which vaccines or treatments may be DNA-based, peptide -based, protein -based, or based on other molecules. The antibody response profile can indicate whether efficacious therapy has been delivered to the patient.

15 The information obtained from the antibody specificity profile is used to monitor treatment, modify therapeutic regimens, and to further optimize the selection of therapeutic agents. With this approach, therapeutic and/or diagnostic regimens can be individualized and tailored according to the specificity data obtained at different times over the course of treatment, thereby providing a regimen that is individually appropriate. In addition, patient
20 samples can be obtained at any point during the treatment process for analysis.

Mammalian species that provide samples for analysis include canines; felines; equines; bovines; ovines; *etc.* and primates, particularly humans. Animal models, particularly small mammals, *e.g.* murine, lagomorpha, *etc.* may be used for experimental investigations. Animal models of interest include those for models of autoimmunity, graft
25 rejection, and the like.

Antibodies, Autoantibodies and T Cell Receptors: The antigenic specificity of the immune system is provided by the group of proteins known as antibodies (or immunoglobulins) and T cell receptors. Each is produced in a variety of classes,
30 subclasses and isotypes, which are all well known in the art and are included in this definition for the purposes of the invention. Through processes of genetic recombination, and in some cases somatic mutation, a very large repertoire of different protein sequences is generated in the variable regions of these proteins. The non-covalent binding interaction of these variable regions enables the immune system to bind to antigens, which are
35 molecules such as polysaccharides, polypeptides, polynucleotides, *etc.* The "specificity" of an antibody or T cell receptor therefore refers to the ability of the variable region to bind with high affinity to an antigen.

WO 02/084249

PCT/US02/11356

The binding site of antibodies typically utilizes multiple non-covalent interactions to achieve high affinity binding. While a few contact residues of the antigen may be brought into close proximity to the binding pocket, other parts of the antigen molecule can also be required for maintaining a conformation that permits binding. The portion of the antigen bound by the antibody is referred to as an epitope. As used herein, an epitope is that portion of the antigen which is sufficient for high affinity binding. Where the antigen is a protein, generally a linear epitope will be at least about 7 amino acids in length, and not more than about 15 to 22 amino acids in length. However, antibodies may also recognize conformational determinants formed by non-contiguous residues on an antigen, and an epitope can therefore require a larger fragment of the antigen to be present for binding, *e.g.* a protein or ribonucleoprotein complex domain, a protein domain, or substantially all of a protein sequence. In other instances, *e.g.* haptens, the epitope can be a very small molecule, *e.g.* digoxin, digoxigenin, *etc.* Autoantibodies are also well established to bind complexes of proteins, lipids, nucleic acids, or nucleoprotein complexes in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. In addition, autoantibodies can be directed against post-translational-modifications on self proteins. Self protein as used herein are proteins encoded within the genome and produced by the organism. . Examples of post-translational modifications against which autoantibodies have been detected include phosphorylated and citrulline-modified amino acids as well as differences in glycosylation. In certain diseases autoimmune responses are directed against DNA, RNA, lipid and other molecules.

The level of affinity of antibody binding that is considered to be "specific" will be determined in part by the class of antibody, *e.g.* antigen specific antibodies of the IgM class may have a lower affinity than antibodies of, for example, the IgG classes. As used herein, in order to consider an antibody interaction to be "specific", the affinity will be at least about 10^{-7} M, usually about 10^{-8} to 10^{-9} M, and may be up to 10^{-11} or higher for the epitope of interest. It will be understood by those of skill in the art that the term "specificity" refers to such a high affinity binding, and is not intended to mean that the antibody cannot bind to other molecules as well. One may find cross-reactivity with different epitopes, due, *e.g.* to a relatedness of antigen sequence or structure, or to the structure of the antibody binding pocket itself. Antibodies demonstrating such cross-reactivity are still considered specific for the purposes of the present invention.

The T cell receptor recognizes a more complex structure than antibodies, and requires both a major histocompatibility antigen binding pocket and an antigenic peptide to be present. The binding affinity of T cell receptors is lower than that of antibodies, and will usually be at least about 10^{-4} M, more usually at least about 10^{-6} M.

WO 02/084249

PCT/US02/11356

Autoreactive antibodies, or autoantibodies, and T cell receptors are those antigen receptors that bind with high affinity to molecules present in the host, usually molecules that are normally present in the host, *e.g. in autoimmune disease* or tumor antigens in the case of certain cancers. Antigens present from grafts of foreign tissue are generally not considered to be autoantigens. The initiating immunogen may be the autoantigen, or may be a cross-reactive molecule with the autoantigen.

The disclosed method is in part based on the correlation of the specificity of the autoantibody response with that of the autoreactive helper T cell response, which drives autoimmune responses. In several human autoimmune diseases the autoimmune T and B cell responses recognize the same immunodominant epitopes. The immunodominant myelin basic protein (MBP) epitope is recognized by both autoreactive T and B cells in MS. Even in those cases where there is a discordance between the fine specificity of the B and T cell responses, the ability to identify the specific self-protein(s) against which an individual is autoreacting is sufficient to guide selection of antigen-specific tolerizing therapy.

Arrays: An array is a collection of addressable elements. Such elements can be spatially addressable, such as arrays contained within microtiter plates or printed on planar surfaces where each element is present at distinct X and Y coordinates. Alternatively, elements can be addressable based on tags, beads, nanoparticles, or physical properties. The microarrays can be prepared according to the methods known to the ordinarily skilled artisan (See for example, US Patent 5,807,522; Robinson *et al.* (2002) *Nature Medicine* 8:295-301; Robinson *et al.* (2002) 46:885-93). Arrays as used herein refers to any biologic assay with multiple addressable elements. In one embodiment the addressable elements are antigens. In another embodiment the addressable elements are epitopes. A microarray is a miniaturized form of an array. As used herein, elements refer to any antigen that can be bound by an antibody. Antigen as used herein refer to any molecule that can bind specifically to an antibody. Molecules can be, but are not limited to, proteins, polypeptides, peptides, RNA, DNA, lipids, glycosylated molecules, carbohydrates, polypeptides with phosphorylation modifications, and polypeptides with citrulline modifications, aptamers, oxidated molecules, other molecules, and other molecules.

Addressability: For the elements described herein, addressability refers to the location, position, tags, cleavable tags or markers, identifiers, spectral properties, electrophoretic properties, or other physical properties that enable identification of the element. One example of addressability, also known as coding, is spatial addressability, where the position of the molecule is fixed, and that position is correlated with the identity. This type of spatial array is generally synthesized or spotted onto a planar substrate, producing, for example, microarrays, where a large number of different molecules are densely laid out in a small area, *e.g.* comprising at least about 400 different sequences per

WO 02/084249

PCT/US02/11356

cm², and may be 1000 sequences per cm², or as many as 5000 sequences per cm², or more. Less dense arrays, such as may be found in ELISA or RIA plates where wells in a plate each contain a distinct antigen, may comprise from about 96 sequences per plate, up to about 100 sequences per cm², up to the density of a microarray. Other spatial arrays
 5 utilize fiber optics, where distinct antigens are bound to fibers, which can then be formed into a bundle for binding and analysis. Methods for the manufacture and use of spatial arrays of polypeptides are known in the art. Recent articles include Joos *et al.* (2000) Electrophoresis **21**(13):2641-50 describing a microarray-based immunoassay containing serial dilutions of antigens; Roda *et al.* (2000) Biotechniques **28**(3):492-6 describing a system obtained by adapting a commercial ink-jet printer and used to produce mono- and
 10 bidimensional arrays of spots containing protein on cellulose paper; and Ge (2000) Nucleic Acids Res **28**(2):e3 describing a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions. See also, Mendoza *et al.* (1999) "High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)" Biotechniques **27**:778-780; and Lueking *et al.* (1999) "Protein microarrays for gene expression and antibody screening" Anal. Biochem. **270**:103-111.

An alternative to this type of spatial coding array is the use of molecular "tags," where the target antigens or epitopes are attached to a detectable label, or tag, which provides coded information about the sequence of the antigen or epitope. In certain cases
 20 these tags can be cleaved from the element, and subsequently detected to identify the element. In another embodiment, a set of antigens or epitopes may be synthesized or attached to a set of coded beads, where each bead is linked to a distinct antigen or epitope, and where the beads are themselves coded in a manner that allows identification of the attached antigen or epitope. The use of a multiplexed microsphere set for analysis of
 25 clinical samples by flow cytometry is described in International Patent application no. 97/14028; and Fulton *et al.* (1997) Clinical Chemistry **43**:1749-1756). It is also possible to use other addressable particles or tags (reviewed in Robinson *et al.* (2002) Arthritis Rheumatism **46**:885-93).

In this type of "tag array," where the antigen is bound to beads or microspheres, one
 30 may utilize flow cytometry for detection of binding. For example, microspheres having fluorescence coding have been described in the art, where the color and level of fluorescence uniquely identifies a particular microsphere. The antigen is thus covalently attached to a "color coded" object. A labeled antibody can be detected by flow cytometry, and the coding on the microsphere used to identify the bound antigen.

35 *Antigen Array:* One embodiment of an array is an antigen array. An antigen array as used herein, refers to a spatially separated set of discrete molecular entities capable of binding to antibodies which are arranged in a manner that allows identification of the

WO 02/084249

PCT/US02/11356

specificity of the antibodies contained within the patient sample. In other words, a set of target antigens having distinct sequences, three dimensional shapes, or molecular structures, where each target antigen is coded for identification. The array may comprise one or more of proteins, polypeptides, peptides, RNA, DNA, lipid, glycosylated molecules, polypeptides with phosphorylation modifications, and polypeptides with citrulline modifications, aptamers, other molecules, and other molecules, where different classes of molecules may be combined in an array.

Antigens: Antigens include molecules such as nucleic acids, lipids, ribonucleoprotein complexes, protein complexes, proteins, polypeptides, peptides and naturally occurring modifications of such molecules against which an immune response involving T and B lymphocytes can be generated. For each antigen, there exists a panel of epitopes that represent the immunologic determinants of that antigen. Antigens include any molecule that can be recognized, all or in part, by an antibody or T cell receptor. As used herein include antigens associated with autoimmune disease, allergy or tissue transplant rejection. With regard to autoimmune disease, the antigens herein are often referred to as autoantigens. With regard to allergic disease the antigens herein are often referred to as allergens. Antigens comprise immunologic epitopes.

Epitopes: Epitopes are portions of antigens that are recognized by B lymphocytes, and specifically by the antibodies expressed on the cell surface and secreted by B cells. Epitopes can also be recognized by specific receptors on T lymphocytes. An individual antigen typically contains multiple epitopes, although there are instances in which an antigen contains a single epitope. In one embodiment of this invention, peptide fragments derived from a whole protein antigen are used to represent individual epitope(s) targeted by the antibodies produced by B cells. In another embodiment, portions of molecules representing post-translational modifications, carbohydrates, lipids and other molecules can be used to represent individual epitopes. Epitopes represent shapes recognized by immune B and T cells, and can also be represented by non-antigen derived peptides and other molecules that possess the same epitope shape that is present within the native antigen. An example of an element with an epitope shape is an aptamer. An aptamer is a molecule that provides a shape that can mimic an immunologic epitope. Using a plurality of aptamers a library of epitope shapes can be generated.

For the purposes of the invention, arrays of autoantigens and autoantigen-derived epitopes can be used to determine a patient's antibody specificity profile for the identification or determination of: 1. patients likely to develop disease; 2. patients likely to develop more or less severe disease; 3. patients likely to respond to a particular therapy, or to have an adverse event related to a particular therapy; 4. patient-specific therapy; and, 5. whether a

WO 02/084249

PCT/US02/11356

particular therapeutic intervention has been successful, unsuccessful, or detrimental. An autoantigen array comprises the various autoantigens either known to be associated with disease, suspected to be associated with a particular disease, or a library of potential autoantigens. An autoantigen array, in one instance may include autoantigens optimized for a particular disease, while in another instance may include a library of unknown antigens to identify targets of the antibody response in patients with a disease. An autoantigen array consisting of panels of autoantigens may be used for screening purposes, where the panel reflects the different epitopes associated with a particular disease. Antigen epitope panels of interest include panels optimized for specific diseases of interest, which may include one or more whole proteins, peptide and overlapping peptides within the sequence of these proteins, and peptides representing dominant epitopes. The term polypeptide, as used herein, designates any of proteins and peptides. Where short peptides are used, preferred peptides are at least about 7 amino acids in length, may be at least about 15 amino acids in length, and as many as 22 amino acids in length. The peptides may be overlapping by 7-10 amino acids, and can encompass the whole sequence of the protein of interest. The peptide can also be a mimic of a native peptide shape, for example a cyclic peptide, nucleic acid aptamer, or can be another molecule, drug, or organic molecule that mimics the 3 dimensional shape recognized by the antibody or T cell receptor.molecule

Immunologic epitope: Immunologic epitope is the portion of any peptide, polypeptide, protein, lipid, carbohydrate or other molecule that is recognized by an antibody or T cell receptor.

Autoantigens: are any molecule produced by the organism that can be the target of an immunologic response. In one aspect, such molecule are peptides, polypeptides, and proteins encoded within the genome of the organism. In another aspect, such molecule are post-translationally-generated modifications of these peptides, polypeptides, and proteins, such as cleavage, phosphorylation, deimination of arginine to citrulline, and other modifications generated through physiologic and non-physiologic cellular processes. In yet another aspect, such molecules include carbohydrates, lipids and other molecules produced by the organism. Examples of autoantigens as used herein, include endogenous proteins or fragments thereof that elicit a pathogenic immune response. Of particular interest are autoantigens that induce a T cell mediated pathogenic response. Autoimmune diseases characterized by the involvement of T cells include multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalitis, rheumatoid arthritis, insulin dependent diabetes mellitus, etc.

For the purposes of the invention, panels of autoantigens or autoantigen epitopes may be used for screening purposes, where the panel reflects the different epitopes associated with a particular disease. Antigen epitope panels of interest include panels optimized for specific diseases of interest, which may include one or more of whole

WO 02/084249

PCT/US02/11356

proteins, peptide and overlapping peptides within the sequence of these proteins, and peptides representing dominant epitopes. The term polypeptide, as used herein, designates any of proteins and peptides. Where short peptides are used, preferred peptides are at least about 7 amino acids in length, may be at least about 15 amino acids in length, and as many as 22 amino acids in length. The peptides may be overlapping by 7-10 amino acids, and can encompass the whole sequence of the protein of interest.

Antigen arrays contain panel(s) of antigens representing self-proteins, modifications of these self-proteins, and other molecules present in tissues targeted by autoimmune diseases or the aberrant immune response in tissue transplant rejection.

Usually a panel or an array of antigens will comprise one or more different antigenic molecules, *i.e.* a protein, lipid, polysaccharide, polynucleotide molecule, and will usually comprise two or more different antigens, more usually three or more antigens, and may comprise as many as five to ten different antigens, or more. Each antigen may be represented by one or more different epitopes, usually three or more different epitopes, more usually five or more, and may be as many as ten to twenty different epitopes.

Examples of arrays for specific diseases are; antigen panels or arrays for demyelinating diseases, such as multiple sclerosis and EAE, and may comprise antigens and/or epitopes from proteolipid protein (PLP); myelin basic protein (MBP); myelin oligodendrocyte protein (MOG); cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNPase); myelin-associated glycoprotein (MAG), and myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MBOP); alpha-B-crystallin (a heat shock protein); viral and bacterial mimicry peptides, *e.g.* influenza, herpes viruses, hepatitis B virus, *etc.*; OSP (oligodendrocyte specific-protein); citrulline-modified MBP (the C8 isoform of MBP in which 6 arginines have been de-immunized to citrulline), *etc.* The integral membrane protein PLP is a dominant autoantigen of myelin. Determinants of PLP antigenicity have been identified in several mouse strains, and include residues 139-151, 103-116, 215-232, 43-64 and 178-191. At least 26 MBP epitopes have been reported (Meinl *et al.* (1993) *J. Clin. Invest.* 92:2633-2643). Notable are residues 1-11, 59-76 and 87-99. Immunodominant MOG epitopes that have been identified in several mouse strains include residues 1-22, 35-55, 64-96.

Panels or arrays may be specific for a disease, *e.g.* multiple sclerosis, arthritis, SLE, *etc.*, for a class of diseases, *e.g.* transplant related disorders, allergic disorders, *etc.*, or may be a broad based antigenic panel or array for multiple diseases.

Disease associated antigens. Disease-associated antigens, are antigens known to be associated with, or are not currently known to be associated with but ultimately shown to be associated with, an immune-related disease. Examples of autoimmune disease associated antigens are described below. Antigen panels or arrays for demyelinating

WO 02/084249

PCT/US02/11356

diseases, such as multiple sclerosis and EAE, may comprise epitopes from proteolipid protein (PLP); myelin basic protein (MBP); myelin oligodendrocyte protein (MOG); cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNPase); myelin-associated glycoprotein (MAG), and myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MBOP); alpha-B-crystallin (a heat shock protein); viral and bacterial mimicry peptides, *e.g.* influenza, herpes viruses, hepatitis B virus, *etc.*; OSP (oligodendrocyte specific-protein); citrulline-modified MBP (the C8 isoform of MBP in which 6 arginines have been de-immunized to citrulline), *etc.* The integral membrane protein PLP is a dominant autoantigen of myelin. Determinants of PLP antigenicity have been identified in several mouse strains, and include residues 139-151, 103-116, 215-232, 43-64 and 178-191. At least 26 MBP epitopes have been reported (Meinl *et al.* (1993) *J. Clin. Invest.* 92:2633-2643). Notable are residues 1-11, 59-76 and 87-99. Immunodominant MOG epitopes that have been identified in several mouse strains include residues 1-22, 35-55, 64-96.

Antigen panels or arrays for insulin dependent diabetes mellitus may comprise the antigens and epitopes derived from IA-2; IA-2beta; GAD; insulin; proinsulin; HSP; glima 38; ICA69; and p52.

Panels or arrays for rheumatoid arthritis may comprise epitopes from type II collagen; hnRNP; A2/RA33; Sa; filaggrin; keratin; citrulline; cartilage proteins including gp39; collagens type I, III, IV, V, IX, XI; HSP-65/60; IgM (rheumatoid factor); RNA polymerase; cardiolipin; aldolase A; citrulline-modified filaggrin and fibrin, *etc.* Autoantibodies that recognize filaggrin peptides containing a modified arginine residue (deimmunized to form citrulline) have been identified in the serum of a high proportion of RA patients. Autoreactive T and B cell responses are both directed against the same immunodominant type II collagen (CII) peptide 257-270 in some patients.

Antigen panels or arrays for systemic lupus erythematosus (SLE) may include DNA; phospholipids; nuclear antigens; Ro; La; U1 ribonucleoprotein; Ro60 (SS-A); Ro52 (SS-A); La (SS-B); calreticulin; Grp78; Scl-70; histone; Sm protein; and chromatin, *etc.*

Antigen panels or arrays for autoimmune uveitis may include S-antigen, and interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP), *etc.*

Antigen panels or arrays for myasthenia gravis may include epitopes with the acetylcholine receptor. For Grave's disease epitopes may include the Na⁺/I⁻ symporter; thyrotropin receptor; Tg; and TPO. Sjogren's syndrome panels may include SSA (Ro); SSB (La); and fodrin. Panels for pemphigus vulgaris may include desmoglein-3. Panels for myositis may include tRNA synthetases (*e.g.*, threonyl, histidyl, alanyl, isoleucyl, and glycyl); Ku; PM/ScI; SSA; U1 sn-ribonuclear protein; Mi-1; Jo-1; Ku; and SRP. Panels for scleroderma may include Scl-70; centromere proteins; U1 ribonuclear proteins; and fibrillarin. Panels for primary biliary cirrhosis may include pyruvate dehydrogenase E2 and

WO 02/084249

PCT/US02/11356

alpha-ketoglutarate dehydrogenase components. Panels for pernicious anemia may include intrinsic factor; and glycoprotein beta subunit of gastric H/K ATPase.

Autoantibodies: Autoantibodies are any antibody that recognizes or binds a self-antigen or self-epitope. Self-antigens or self-epitopes include polypeptides, proteins, peptides, lipids, polysaccharides, and modifications of these self-antigens that are encoded within the genome or produced within an organism.

Allergens are immunogenic compounds that cause an enhanced Th2-type T cell response and IgE B cell response in a susceptible individual, including asthma associated allergens. Allergens of interest include antigens found in food, such as strawberries, peanuts, milk proteins, egg whites, etc. Other allergens of interest include various airborne antigens, such as grass pollens, animal danders, house mite feces, etc. Molecularly cloned allergens include *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der P1); Lol pl-V from rye grass pollen; a number of insect venoms, including venom from jumper ant *Myrmecia pilosula*; *Apis mellifera* bee venom phospholipase A2 (PLA₂) and antigen 5S; phospholipases from the yellow jacket *Vespula maculifrons* and white faced hornet *Dolichovespula maculata*; a large number of pollen proteins, including birch pollen, ragweed pollen, Parol (the major allergen of *Parietaria officinalis*) and the cross-reactive allergen Parj1 (from *Parietaria judaica*), and other atmospheric pollens including *Olea europaea*, *Artemisia* sp., *gramineae*, etc. Other allergens of interest are those responsible for allergic dermatitis caused by blood sucking arthropods, e.g. *Diptera*, including mosquitos (*Anopheles* sp., *Aedes* sp., *Culiseta* sp., *Culex* sp.); flies (*Phlebotomus* sp., *Culicoides* sp.) particularly black flies, deer flies and biting midges; ticks (*Dermacentor* sp., *Ornithodoros* sp., *Otobius* sp.); fleas, e.g. the order *Siphonaptera*, including the genera *Xenopsylla*, *Pulex* and *Ctenocephalides felis felis*. The specific allergen may be a polysaccharide, fatty acid moiety, protein, etc.

Methods of Specificity Analysis

Immune related diseases include: 1. autoimmune diseases in which the immune response aberrantly attacks self-antigens, examples of which include but are not limited to multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), type I autoimmune diabetes (IDDM), and systemic lupus erythematosus (SLE); 2. allergic diseases in which the immune system aberrantly attacks molecules such as pollen, dust mite antigens, bee venom, peanut oil and other foods, etc.; and 3. tissue transplant rejection in which the immune system aberrantly attacks antigens expressed or contained within a grafted or transplanted tissue, such as blood, bone marrow cells, or solid organs including hearts, lungs, kidneys and livers. Samples are obtained from patients with clinical symptoms suggestive of an immune-related disease or with an increased likelihood for developing such a disease based on

WO 02/084249

PCT/US02/11356

family history or genetic testing.

Formats for human patient sampling include time courses that follow the progression of disease, comparisons of different patients at similar disease stages, *e.g.* early onset, acute stages, recovery stages, *etc.*; tracking a patient during the course of response to therapy, including drug therapy, vaccination and the like. Data from animals, *e.g.* mouse, rat, rabbit, monkey, *etc.* may be compiled and analyzed in order to provide databases detailing the course of disease, antigens involved in diseases, *etc.* Biological samples from which patient antibodies may be collected include blood and derivatives therefrom, *e.g.* serum, plasma, fractions of plasma, *etc.* Other sources of samples are body fluids such as synovial fluid, lymph, cerebrospinal fluid, bronchial aspirates, and may further include saliva, milk, urine, and the like. Both antibodies and T cell receptors may also be obtained from the appropriate lymphocytes, which may be collected from blood, tissues such as spleen, thymus, lymph nodes, fetal liver, tissues at the site of autoimmune lesions, *e.g.* pancreas, joints, kidneys, cerebrospinal fluid, *etc.* The lymphocytes may be analyzed intact, or lysates may be prepared for analysis. Patient samples contain antibodies, and antigen arrays are used to profile these antibodies.

In a typical assay, a patient sample containing antibodies is physically contacted with the antigen array, under conditions that permit high affinity binding, but that minimize non-specific interactions. In one embodiment, patient samples are pipetted onto the array or into a space containing the addressable elements. The array is washed free of unbound material, and the presence of bound antibodies is detected, and correlated with the cognate antigen.

The means for identifying the disease-associated antigens within the array that bind to the antibodies within the patient sample utilize methods for detection that are known in the art. Those methods of identification may include pre-labeling the sample directly or indirectly; adding a second stage antibody that binds to the antibodies or to an indirect label, *e.g.* labeled goat anti-human serum, rat anti-mouse, and the like. Other methods of identification include analysis of addressable elements such as beads, nanoparticles, tags, cleavable tags and other physical properties of or conferred upon the elements within the array. Varying concentrations of a single epitope may be present in order to facilitate quantitation of the bound antibody.

Useful labels include fluorochromes, *e.g.* Cy2, Cy3, Cy5, fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine, Texas Red, phycoerythrin, allophycocyanin, 6-carboxyfluorescein (6-FAM), 2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxyfluorescein (JOE), 6-carboxy-X-rhodamine (ROX), 6-carboxy-2',4',7',4',7-hexachlorofluorescein (HEX), 5-carboxyfluorescein (5-FAM) or N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA)). Indirect labels include haptens, such

WO 02/084249

PCT/US02/11356

as digoxin and digoxigenin, biotin, *etc.*, where a second stage binding partner, e.g. avidin, anti-digoxin antibody, *etc.*, may be labeled with an enzyme, e.g. horseradish peroxidase, fluorochrome, radioactive label, *etc.* Preferably, where a control sample is included, the fluorescent reporter used to label the control sequences emits a fluorescent signal at an
5 excitation and/or emission wavelength detectably distinct from that of the fluorescent reporter used to label the test sequence.

Detection may also occur using methods that do not require labeling. Examples include detection of changes in charge or mass of the bound self-antigen using methods or devices such as single electron transistors, proteins applied to carbon nanotubes or meshworks of nanotubes, surface plasmon resonance, atomic force microscopy, and other
10 methods known to those skilled in the art.

Generally assays will include various negative and positive controls, as known in the art. These may include positive controls of "spiked" samples with known autoantibodies, patients with known disease, and the like. Negative controls include samples from normal
15 patients, animal serum, and the like.

Binding of the antibody containing sample to an antigen array is accomplished according to methods well known in the art. The binding conditions and washes are preferably carried out under conditions that allow only high affinity binding partners to be retained.

Two-color labeling of different antibodies can be utilized in binding to the same or to separate arrays, in order to assay the level of binding in a patient sample compared to a control sample. From the ratio of one color to the other, for any particular array element, the relative abundance of antibodies with a particular specificity in the two samples can be determined. In addition, comparison of the binding of the two samples provides an internal
20 control for the assay. Competitive assays are well known in the art, where a competing antibody of known specificity, or an epitope containing molecule, may be included in the binding reaction.

Arrays can be scanned to detect binding of antibodies, e.g. using a scanning laser microscope as described in Shalon *et al.*, *Genome Res.* 6:639 (1996). A separate scan,
30 using the appropriate excitation line, is performed for each of the fluorophores used. The digital images generated from the scan are then combined for subsequent analysis. For any particular array element, the ratio of the signal from one sample is compared to the fluorescent signal from the other sample, and the relative abundance determined.

Various methods are used to determine the antibody specificity profile from a patient
35 sample. An antibody specificity profile is initially determined for an individual patient, and as used herein is means the antigens or epitopes that are bound by the antibodies from a patient sample. The comparison of a binding pattern obtained from a patient sample and a

WO 02/084249

PCT/US02/11356

binding pattern obtained from a control, or reference, sample is accomplished by the use of suitable deduction protocols, AI systems, statistical comparisons, pattern recognition algorithms, etc. Typically a data matrix is generated, where each point of the data matrix corresponds to a readout from specific array or antigens or epitopes. The information from reference patterns can be used in analytical methods to determine antigen or epitope spreading, relative abundance, changes over time, changes in antibody isotype produced, and other related changes.

The antigen or epitope readout may be a mean, average, median or the variance or other statistically or mathematically-derived value associated with the measurement. The antigen or epitope readout information may be further refined by direct comparison with the corresponding reference or control pattern. A binding pattern may be evaluated on a number of points: to determine if there is a statistically significant change at any point in the data matrix; whether the change is an increase or decrease in the epitope binding; whether the change is specific for one or more physiological states, and the like. The absolute values obtained for each epitope under identical conditions will display a variability that is inherent in live biological systems and also reflects individual antibody variability as well as the variability inherent between individuals.

Classification rules for identifying reference patterns will be constructed from sets of training data (i.e. data matrices) obtained from multiple repeated experiments. Classification rules will be selected when they correctly identify repeated reference patterns and successfully distinguish distinct reference patterns. Classification rule-learning algorithms may include decision tree methods, statistical methods, naive Bayesian algorithms and the like.

In order for novel test patterns to be effectively identified and classified, the knowledge database must be of sufficient complexity. This can be accomplished by several approaches for generating a sufficiently encompassing set of classification patterns, and sufficiently powerful mathematical/statistical methods for discriminating between them.

In one embodiment, the information obtained from analysis of serum and other pathologic tissue samples is used to refine and build a database of antibody specificity profiles. For example, the identification of specific binding moieties may be used to track disease and develop therapeutics.

Patient antibody specificity profile: Antibody specificity profile as used herein refers to the antigen or epitope array-determined spectrum of antigens or epitopes recognized by the antibodies derived from a patient sample.

Once the subset of specificities for a particular sample are identified, the data is used in developing new diagnostic agents, and in selecting the most appropriate therapy for

WO 02/084249

PCT/US02/11356

an individual. By analysis of autoantibody specificity on an individual basis, the specific epitope targets that are present in the disease state are determined. One or more therapeutic agents can then be selected, which have the best specificity for the individual patient and disease.

5

Conditions for Analysis and Therapy

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune inflammatory synovitis affecting 0.8% of the world population. Current therapy for RA utilizes therapeutic agents that non-specifically suppress or modulate immune function. Such therapeutics, including the recently developed TNF α antagonists, are not fundamentally curative, and disease activity rapidly returns following discontinuation of therapy. Tremendous clinical need exists for fundamentally curative therapies that do not cause systemic immune suppression or modulation.

Degenerative joint diseases may be inflammatory, as with seronegative spondylarthropathies, e.g. ankylosing spondylitis and reactive arthritis; rheumatoid arthritis; gout; and systemic lupus erythematosus. The degenerative joint diseases have a common feature, in that the cartilage of the joint is eroded, eventually exposing the bone surface. Destruction of cartilage begins with the degradation of proteoglycan, mediated by enzymes such as stromelysin and collagenase, resulting in the loss of the ability to resist compressive stress. Alterations in the expression of adhesion molecules, such as CD44 (Swissprot P22511), ICAM-1 (Swissprot P05362), and extracellular matrix protein, such as fibronectin and tenascin, follow. Eventually fibrous collagens are attacked by metalloproteases, and when the collagenous microskelton is lost, repair by regeneration is impossible.

There is significant immunological activity within the synovium during the course of inflammatory arthritis. While treatment during early stages is desirable, the adverse symptoms of the disease may be at least partially alleviated by treatment during later stages. Clinical indices for the severity of arthritis include pain, swelling, fatigue and morning stiffness, and may be quantitatively monitored by Pannus criteria. Disease progression in animal models may be followed by measurement of affected joint inflammation. Therapy for inflammatory arthritis may combine the subject treatment with conventional NSAID treatment. Generally, the subject treatment will not be combined with such disease modifying drugs as cyclosporin A, methotrexate, and the like.

A quantitative increase in myelin-autoreactive T cells with the capacity to secrete IFN-gamma is associated with the pathogenesis of MS and EAE, suggesting that autoimmune inducer/helper T lymphocytes in the peripheral blood of MS patients may initiate and/or regulate the demyelination process in patients with MS. The overt disease is

WO 02/084249

PCT/US02/11356

associated with muscle weakness, loss of abdominal reflexes, visual defects and paresthesias. During the presymptomatic period there is infiltration of leukocytes into the cerebrospinal fluid, inflammation and demyelination. Family histories and the presence of the HLA haplotype DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602 are indicative of a susceptibility to the disease. Markers that may be monitored for disease progression are the presence of antibodies in the cerebrospinal fluid, "evoked potentials" seen by electroencephalography in the visual cortex and brainstem, and the presence of spinal cord defects by MRI or computerized tomography. Treatment during the early stages of the disease will slow down or arrest the further loss of neural function.

Human IDDM is a cell-mediated autoimmune disorder leading to destruction of insulin-secreting beta cells and overt hyperglycemia. T lymphocytes invade the islets of Langerhans, and specifically destroy insulin-producing β -cells. The depletion of β cells results in an inability to regulate levels of glucose in the blood. Overt diabetes occurs when the level of glucose in the blood rises above a specific level, usually about 250 mg/dl. In humans a long presymptomatic period precedes the onset of diabetes. During this period there is a gradual loss of pancreatic beta cell function. The disease progression may be monitored in individuals diagnosed by family history and genetic analysis as being susceptible. The most important genetic effect is seen with genes of the major histocompatibility locus (*IDDM1*), although other loci, including the insulin gene region (*IDDM2*) also show linkage to the disease (see Davies *et al. supra* and Kennedy *et al.* (1995) *Nature Genetics* 9:293-298).

Markers that may be evaluated during the presymptomatic stage are the presence of insulinitis in the pancreas, the level and frequency of islet cell antibodies, islet cell surface antibodies, aberrant expression of Class II MHC molecules on pancreatic beta cells, glucose concentration in the blood, and the plasma concentration of insulin. An increase in the number of T lymphocytes in the pancreas, islet cell antibodies and blood glucose is indicative of the disease, as is a decrease in insulin concentration. After the onset of overt diabetes, patients with residual beta cell function, evidenced by the plasma persistence of insulin C-peptide, may also benefit from the subject treatment, to prevent further loss of function.

Allergy, or atopy is an increased tendency to IgE-based sensitivity resulting in production of specific IgE antibody to an immunogen, particularly to common environmental allergens such as insect venom, house dust mite, pollens, molds or animal danders. Allergic responses are antigen specific. The immune response to the antigen is further characterized by the over-production of Th2-type cytokines, e.g. IL-4, IL-5 and IL-10, by the responding T cells. The sensitization occurs in genetically predisposed people after

WO 02/084249

PCT/US02/11356

exposure to low concentrations of allergen; cigarette smoke and viral infections may assist in the sensitization process.

Included in the group of patients suffering from atopy are those with asthma-associated allergies. About 40% of the population is atopic, and about half of this group develop clinical disease ranging from trivial rhinitis to life-threatening asthma. After sensitization, continuing exposure to allergens leads to a significant increase in the prevalence of asthma. Ninety per cent of children and 80% of adults with asthma are atopic. Once sensitization has occurred, re-exposure to allergen is a risk factor for exacerbations of asthma. Effective management of allergic asthma includes pharmacological therapy and allergen avoidance. The specific physiological effects of asthma associated allergies include airway inflammation, eosinophilia and mucus production, and antigen-specific IgE and IL-4 production.

In addition to allergies affecting human populations, non-human mammals are also known to suffer from allergic conditions. Fleas, *Ctenocephalides felis felis* and others, are now recognized as a major cause of physiological disorders among mammals. These insects are ectoparasites that attack dogs, cats, and humans. Certain species (*i.e.*, dogs and cats), and individuals of these species are more allergic to fleabites than others, resulting in a clinical disorder called flea allergy dermatitis (FAD) or flea bite hypersensitivity. The hallmark of FAD is intense pruritis (itching) not only at the site of the flea bite but in a distinctive, body-wide distribution. This allergic reaction is a systemic response to a variety of protein substances in the oral secretions which the flea injects intradermally when it bites. Chronic FAD leads to scarring and permanent bald spots and is often associated with seborrhea, giving the dog a foul odor which pervades the household. Flea allergy also is recognized as a contributory cause of the common dermatitis of man known as papular urticaria.

Antigen Specific Therapeutic methods

The antigens or epitopes recognized by the antibodies present in a patient sample, as described above, can be utilized to develop and select antigen or epitope specific therapies which comprise administration of an antigen or epitope specific therapeutic agent, where the agent is defined by binding of patient antibodies to the addressable elements on the array. The patient antibody specificity profile can be utilized to develop, select, and monitor responses to antigen or epitope specific therapeutic methods including: (1) oral administration of specific-antigens, termed 'oral tolerance' (Annu Rev Immunol. 12:809-37); (2) administration of native peptides (Science 258:1491-4; J Neurol Sci. 152:31-8); (3) administration of altered peptide ligands (Nature 379:343-5); (4) administration of whole proteins (Science 263:1139); administration of fusion-proteins or peptides; administration of

WO 02/084249

PCT/US02/11356

other molecules, such as DNA or allergens including pollen, dust mites, cat salivary antigen (*J. Rheumatology* 28:257-65); administration of polynucleotide sequences encoding the targeted self-proteins or allergens (*J. Immunol* 162:3336-41; *Curr. Dir. Autoimmun.* 2:203-16). For all of these therapies, the antigens administered (or encoded in DNA) for purposes of immune suppression may comprise all or a portion of the epitopes identified by antibody. In one embodiment, one or more of the epitopes thus identified are administered, usually two or more, more usually three or more, and may comprise as many as ten or more different epitopes. Individual peptides or DNA encoding peptides may be administered. Alternatively, whole proteins, or DNA encoding all or substantially all of the antigenic protein may be administered. One or more, usually two or more, and as many as three or more different protein antigens may be thus administered. Antigen-specific therapy as used herein refers to a therapeutic regimen based upon an antigen specificity profile determined by the novel method of this invention.

In another embodiment of the invention, the knowledge based methods described above are used to identify patterns of disease, where a particular patient sample can be mapped to a pattern of disease progression. In such cases the suppressive epitopes may comprise not only epitopes currently recognized by patient antibodies, but may anticipate the progression of the disease and administer peptides that are likely to be disease-associated in a later stage of the disease, thus preventing the epitope spread observed in many autoimmune diseases.

In one embodiment, treatment comprises the induction of an antigen-specific, suppressive T-cell response by administration of a DNA expression cassette injected into host tissue, for example muscle or skin, for example as described in PCT application US00/0623. The vector comprises a DNA sequence encoding at least a portion of an autoantigen, transplant antigen, *etc.* In response to this vaccination, a suppressive response is evoked. Antigen-specific T cell proliferation is inhibited and Th1 cytokine production is reduced.

The prevention of autoimmune disease involving the targeted antigen, is accomplished by administration of the vaccine prior to development of overt disease. The treatment of ongoing disease, where the suppressive vaccination stabilizes or improves the clinical symptoms of the patient, is of particular interest. Such treatment is desirably performed prior to complete loss of function in the affected tissues.

A DNA expression cassette encoding all, substantially all, or a portion of an antigen, encoding at least one complete epitope, usually as part of a vector, is introduced into tissue of the recipient. The gene, or minigene, is expressed in the tissue, and the encoded polypeptide acts as an immunogen, or antigen. It may be hypothesized that the

WO 02/084249

PCT/US02/11356

presentation of the antigen sequence by a "non-professional" cell, lacking co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86, stimulates a suppressive T cell response.

The DNA expression cassette will comprise most or all of the sequence encoding an antigen fragment. The coding sequence may be truncated at the 5' or 3' terminus and may be a fragment of the complete polypeptide sequence. In one embodiment of the invention, the sequence encodes a peptide fragment that is known to be presented to pathogenic T cells, for example peptides presented by Class II MHC molecules of the host. Such peptides have been described in the literature, and are typically of about 8 to about 30 amino acids in length. In another embodiment, the sequence encodes the complete antigenic protein, or substantially all of the antigenic protein. In yet another embodiment, the sequence encodes a self protein in which portions of the self protein that may be deleterious if injected, or that may reduce the effectiveness of the tolerizing regimen, are removed.

The vaccine may be formulated with one epitope or a cocktail of epitope sequences. It may be desirable in some cases to include multiple sequences, where each encodes a different epitope. For example, see Leadbetter et al. (1998) *J. Immunol.* 161:504-512. A formulation comprised of multiple coding sequences of distinct epitopes may be used to induce a more potent and/or sustained suppressive response. By specifically targeting multiple autoreactive T cell populations, such a formulation may slow or prevent the development of autoantigen resistance.

In addition to the specific epitopes and polypeptides of autoantigens, the immune response may be enhanced by the inclusion of CpG sequences, as described by Krieg *et al.* (1998) *Trends Microbiol.* 6:23-27, and helper sequence, King *et al.* (1998) *Nat. Med.* 4:1281-1286. Biological effects of DNA motifs like unmethylated CpG dinucleotides, in particular base contexts (CpG-S motifs), may modulate innate immune responses when injected into animals.

The antigen sequences are inserted into an appropriate expression cassette. The expression construct is prepared in conventional ways. The cassette will have the appropriate transcriptional and translational regulatory sequences for expression of the sequence in the recipient cells. The cassette will generally be a part of a vector, which contains a suitable origin of replication, and such genes encoding selectable markers as may be required for growth, amplification and manipulation of the vector, prior to its introduction into the recipient. Suitable vectors include plasmids, YACs, BACs, bacteriophage, retrovirus, adenovirus, and the like. Conveniently, the expression vector will be a plasmid. Prior to introduction into the recipient, the cassette may be isolated from vector sequences by cleavage, amplification, *etc.* as known in the art. For injection, the DNA may be supercoiled or linear, preferably supercoiled. The cassette may be maintained

WO 02/084249

PCT/US02/11356

in the host cell for extended periods of time, or may be transient, generally transient. Stable maintenance is achieved by the inclusion of sequences that provide for integration and/or maintenance, *e.g.* retroviral vectors, EBV vectors and the like.

The expression cassette will generally employ an exogenous transcriptional initiation region, *i.e.* a promoter other than the promoter which is associated with the T cell receptor in the normally occurring chromosome. The promoter is functional in host cells, particularly host cells targeted by the cassette. The promoter may be introduced by recombinant methods *in vitro*, or as the result of homologous integration of the sequence by a suitable host cell. The promoter is operably linked to the coding sequence of the antigen to produce a translatable mRNA transcript. Expression vectors conveniently will have restriction sites located near the promoter sequence to facilitate the insertion of antigen sequences.

Expression cassettes are prepared comprising a transcription initiation region, which may be constitutive or inducible, the gene encoding the antigen sequence, and a transcriptional termination region. The expression cassettes may be introduced into a variety of vectors. Promoters of interest may be inducible or constitutive, usually constitutive, and will provide for transcription in the recipient cells. The promoter may be active only in the recipient cell type, or may be broadly active in many different cell types. Many strong promoters for mammalian cells are known in the art, including the β -actin promoter, SV40 early and late promoters, immunoglobulin promoter, human cytomegalovirus promoter, retroviral LTRs, *etc.* The promoters may or may not be associated with enhancers, where the enhancers may be naturally associated with the particular promoter or associated with a different promoter.

A termination region is provided 3' to the coding region, where the termination region may be naturally associated with the variable region domain or may be derived from a different source. A wide variety of termination regions may be employed without adversely affecting expression.

A small number of nucleotides may be inserted at the terminus of the autoantigen sequence, usually not more than 20, more usually not more than 15. The deletion or insertion of nucleotides will usually be as a result of the needs of the construction, providing for convenient restriction sites, addition of processing signals, addition of a consensus Kozak sequence, ease of manipulation, improvement in levels of expression, or the like. In addition, one may wish to substitute one or more amino acids with a different amino acid for similar reasons, usually not substituting more than about five amino acids in the region.

The DNA vectors are suspended in a physiologically acceptable buffer, generally an aqueous solution *e.g.* normal saline, phosphate buffered saline, water, *etc.* Stabilizing agents, wetting and emulsifying agents, salts for varying the osmotic pressure or buffers for securing an adequate pH value, and skin penetration enhancers can be used as auxiliary

WO 02/084249

PCT/US02/11356

agents. The DNA will usually be present at a concentration of at least about 1 ng/ml and not more than about 10 mg/ml, usually at about from 100 µg to 1 mg/ml.

The DNA tolerizing therapeutic may be fractionated into two or more doses, of at least about 1 µg, more usually at least about 100 µg, and preferably at least about 1 mg per dose, administered from about 4 days to one week apart. In some embodiments of the invention, the individual is subject to a series of vaccinations to produce a full, broad immune response. According to this method, at least two and preferably four injections are given over a period of time. The period of time between injections may include from 24 hours apart to two weeks or longer between injections, preferably one week apart.

Alternatively, at least two and up to four separate injections are given simultaneously at different parts of the body.

The DNA therapeutic is injected into muscle or other tissue subcutaneously, intradermally, intravenously, orally or directly into the spinal or synovial fluid. Of particular interest is injection into skeletal muscle. The genetic therapeutic may be administered directly into the individual to be immunized or *ex vivo* into removed cells of the individual which are reimplanted after administration. By either route, the genetic material is introduced into cells which are present in the body of the individual. Alternatively, the genetic therapeutic may be introduced by various means into cells that are removed from the individual. Such means include, for example, transfection, electroporation and microprojectile bombardment. After the genetic construct is taken up by the cells, they are reimplanted into the individual. Otherwise non-immunogenic cells that have genetic constructs incorporated therein can be taken from one individual and implanted into another.

Bupivacaine or compounds having a functional similarity may be administered prior to or contemporaneously with the vaccine. Bupivacaine is a homologue of mepivacaine and related to lidocaine. It renders muscle tissue voltage sensitive to sodium challenge and effects ion concentration within the cells. In addition to bupivacaine, mepivacaine, lidocaine and other similarly acting compounds, other contemplated cell stimulating agents include lectins, growth factors, cytokines and lymphokines such as platelet derived growth factor (PDGF), gCSF, gmCSF, epidermal growth factor (EGF) and IL-4.

As an alternative, or in addition to DNA tolerization, specific peptides, altered peptides, or proteins may be administered therapeutically to induce antigen-specific tolerance to treat autoimmunity. Native peptides targeted by the autoimmune response can be delivered to induce antigen-specific tolerance (Science 258:1491-4). Native peptides have been delivered intravenously to induce immune tolerance (J Neurol Sci. 152:31-8).

Delivery of peptides that are altered from the native peptide, is also known in the art. Alteration of native peptides with selective changes of crucial residues (altered peptide

WO 02/084249

PCT/US02/11356

ligands or "APL") can induce unresponsiveness or change the responsiveness of antigen-specific autoreactive T cells.

"Peptide analogs" are at least seven amino acids in length and contain at least one difference in amino acid sequence between the analog and native antigenic peptide. An L-amino acid from the native peptide may be altered to any other one of the 20 L-amino acids commonly found in proteins, any one of the corresponding D-amino acids, rare amino acids, such as 4-hydroxyproline, and hydroxylysine, or a non-protein amino acid, such as β -alanine and homoserine. Also included with the scope of the present invention are amino acids that have been altered by chemical means such as methylation (e.g., α -methylvaline), amidation of the C-terminal amino acid by an alkylamine such as ethylamine, ethanolamine, and ethylene diamine, and acylation or methylation of an amino acid side chain function (e.g., acylation of the epsilon amino group of lysine), deimination of arginine to citrulline, isoaspartylation, or phosphorylation on serine, threonine, tyrosine or histidine residues.

The mechanism of action of how altered peptide ligands are efficacious may involve incomplete mobilization of the T cell receptor (TCR). There are several possible functional alterations that the APL can induce and these include: Simple antagonist, where the APL may compete for MHC binding with the native peptide on the antigen presenting cell and not allow for complete T cell activation. This implies that there is no signal transmitted through the T cell receptor by the APL. Anergy, where the APL induces a state of complete nonresponsiveness in the T cell such that the T cell does not respond to the native peptide. Phenotypic switching, where the APL may induce a functional switch in the T cell such that it decreases the production of proinflammatory cytokines and/or increase the production of noninflammatory cytokines such as IL-4 or IL-10.

Peptides and peptide analogs may be synthesized by standard chemistry techniques, including synthesis by automated procedure. In general, peptide analogs are prepared by solid-phase peptide synthesis methodology which involves coupling each protected amino acid residue to a resin support, preferably a 4-methylbenzhydrylamine resin, by activation with dicyclohexylcarbodiimide to yield a peptide with a C-terminal amide. Alternatively, a chloromethyl resin (Merrifield resin) may be used to yield a peptide with a free carboxylic acid at the C-terminus. After the last residue has been attached, the protected peptide-resin is treated with hydrogen fluoride to cleave the peptide from the resin, as well as deprotect the side chain functional groups. Crude product can be further purified by gel filtration, HPLC, partition chromatography, or ion-exchange chromatography.

Candidate peptide analogs may be screened for their ability to treat disease by an assay measuring competitive binding to MHC, and an assay measuring T cell proliferation. Those analogs that inhibit binding of the native peptides and do not stimulate proliferation of auto-reactive T cells are useful therapeutics. Candidate peptide analogs are further tested

WO 02/084249

PCT/US02/11356

for their property of stimulating or inhibiting proliferation of T cells, by measuring the ability of the analog to cause proliferation of T cells in a direct fashion, or measuring the ability of the peptide analog to inhibit proliferation of T cells induced by a native peptide.

5 The peptides are administered to the patient as one or a cocktail of different epitopes, through a route, for example intravenous or subcutaneous, that provides for suppression of the immune response. APL and native peptides have been delivered both IV and subcutaneously in doses of 0.5-100 mg/dose on a bi-weekly to monthly basis.

10 In another embodiment, whole protein antigens targeted by the autoimmune response can be delivered to restore immune tolerance to treat autoimmunity (Science 263:1139).

Allergen immunotherapy, or hyposensitization is the parenteral administration of allergenic extracts as antigens at periodic intervals, usually on an increasing dosage scale to a dosage that is maintained as maintenance therapy. Indications for immunotherapy are determined by diagnosis of antibody specificity as described above. Allergen immunotherapy is performed by providing injections of the allergen to the allergic subject on 15 a regular basis, with the goal of reducing the symptoms and signs of an allergic reaction or prevention of future anaphylaxis against antigens such as insect venom, penicillin, etc. This is usually done initially with low doses, with gradual dosage increases over a period of weeks.

20 Immunotherapy is specific to the allergen injected. It results in the following immunologic changes: a shift in T cell response from a Th2-type response to a Th1-type response with corresponding changes in cytokine production, decreased allergen-specific IgE production, increased allergen-specific IgG production, decreased inflammatory cells, decreased mediators of inflammation and decreased histamine-releasing factors. These changes result in decreased reactivity to the allergen in the target organ.

The amount of allergen to be injected may be empirically derived, and will depend on the size of the recipient, usually at least about 100 ng allergen/kilogram of body weight, and not more than about 1 mg allergen/kilogram body weight. Frequently the dose will be increased through the course of injections by as much as about ten to one million fold. 30 Injection schedules vary with individual patients. For example, Allpyral preparations are administered every 1-2 weeks until a maintenance dose is reached. Maintenance injections are administered every 2-4 weeks. It should be re-emphasized that immunotherapy schedules are individualized and fixed schedules are not recommended. Allergy injections rarely go on "forever" but can usually be stopped after a patient has experienced no allergic symptoms and has required no medication for 18 -24 consecutive months while on the 35 maintenance schedule. Duration of treatment for the average patient is 3 to 5 years but

WO 02/084249

PCT/US02/11356

could be longer in certain clinical settings. If symptoms recur after a 6 to 12 months observation period following discontinuation of immunotherapy, re-evaluation is warranted.

Allergen immunotherapy is appropriate for the following indications: Severe, seasonal (lasting 2 or more years) or perennial, IgE-dependent allergic rhinoconjunctivitis
5 in which optimal allergen avoidance and medication have not been sufficiently effective in controlling symptoms. IgE-mediated allergic asthma; particularly where there is a clear temporal association between exposure to the allergen and signs and symptoms of asthma, and those in which symptoms have occurred during two or more allergy seasons in successive years. IgE-mediated asthma caused by house dust mites or ragweed pollen
10 may be treated with allergen immunotherapy. IgE-mediated anaphylactic reactions to insect stings. Immunotherapy with venom from yellow jackets, yellow hornets, white-faced hornets, wasps and honey-bees, and with whole-body extracts of fire-ants, is effective.

Tissue Transplant Rejection Immune rejection of tissue transplants, including lung, heart, liver, kidney, pancreas, and other organs and tissues, is mediated by immune
15 responses in the transplant recipient directed against the transplanted organ. Allogeneic transplanted organs contain proteins with variations in their amino acid sequences when compared to the amino acid sequences of the transplant recipient. Because the amino acid sequences of the transplanted organ differ from those of the transplant recipient they frequently elicit an immune response in the recipient against the transplanted organ.
20 Rejection of transplanted organs is a major complication and limitation of tissue transplant, and can cause failure of the transplanted organ in the recipient. The chronic inflammation that results from rejection frequently leads to dysfunction in the transplanted organ. Transplant recipients are currently treated with a variety of immunosuppressive agents to prevent and suppress rejection. These agents include glucocorticoids, cyclosporin A,
25 Cellcept, FK-506, and OKT3.

It is to be understood that this invention is not limited to the particular methodology, protocols, cell lines, animal species or genera, and reagents described, as such may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing
30 particular embodiments only, and is not intended to limit the scope of the present invention which will be limited only by the appended claims.

As used herein the singular forms "a", "and", and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. All technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood to one of ordinary skill in the art to which
35 this invention belongs unless clearly indicated otherwise.

The following examples are put forth so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make and use the subject invention,

WO 02/084249

PCT/US02/11356

and are not intended to limit the scope of what is regarded as the invention. Efforts have been made to ensure accuracy with respect to the numbers used (*e.g.* amounts, temperature, concentrations, *etc.*) but some experimental errors and deviations should be allowed for. Unless otherwise indicated, parts are parts by weight, molecular weight is
5 average molecular weight, temperature is in degrees centigrade; and pressure is at or near atmospheric.

All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

10

WO 02/084249

PCT/US02/11356

EXPERIMENTAL

Example 1Antigen Array Characterization of the Specificity of the Autoantibody Response in EAE in Rats and Mice

To determine the autoantibody specificity profile in the serum of animals with EAE, an assay was performed testing the binding of serum antibodies to a protein microarray.

Antigen arrays were generated by spotting the immunodominant myelin peptide epitopes and purified native myelin basic protein, as listed in Table 1. Figures 1A-D are scanned images of arrays probed with serum from a normal control rat (A) and 3 Lewis rats induced to develop EAE with different myelin protein peptides in complete Freund's adjuvant (B-D), followed by Cy-3 labeled anti-rat Ig secondary antibody.

Quantitative computer analysis of the scanned images is presented in Table 1. The reported numbers represent the ratio of the fluorescence intensity of antigens recognized by serum derived from animals with EAE relative to control serum adjusting for background levels such that ratios greater or less than 1 (1 = no difference) represent a statistically significant difference with a >95% confidence interval. Results were confirmed by ELISA. These results demonstrate that antigen arrays powerfully identify the peptide-specificity of the autoantibody response in EAE.

TABLE 1. Antigen array characterization of the specificity of the autoantibody response in EAE in lewis rats.

	Rat EAE-1 MBP 68-86	Rat EAE-2 PLP 139-151	Rat EAE-3 MOG 35-55
MBP 68-86	117.7	1.0	1.0
PLP 139-151	1.0	67.6	1.0
GP MBP	25.4	1.0	1.0
MOG 35-55	1.0	1.0	15.6
MBP Ac 1-11	1.0	4.0	1.0
Green/Red	2.3	0.8	2.1
Green	1.8	0.7	2.5
alkaline phosphatase	1.0	1.0	1.0
influenza A/B	1.0	1.0	1.0
BSA	1.0	1.0	1.0
blank	1.0	1.0	1.0
flag	1.0	1.0	1.0
Control pep-127	1.0	1.0	1.0

WO 02/084249

PCT/US02/11356

Control pep-128	1.0	1.0	1.0
Control pep-129	1.0	1.0	1.0
Control pep-130	1.0	1.0	1.0
Control pep-131	1.0	1.0	1.0

Example 2**Determination of the Patient Antibody Specificity Profile in Autoimmune Rheumatic Diseases**

Autoantigen arrays identify autoantibody profiles characteristic of eight distinct human autoimmune rheumatic diseases. Representative examples of autoantigen array analysis of over 50 highly-characterized autoimmune serum samples are presented (Figure 2).

Ordered autoantigen arrays were generated by spotting 192 distinct putative autoantigens in quadruplicate sets using a robotic microarrayer to create a 1152-feature rheumatic disease autoantigen array. Spotted antigens include: 36 recombinant or purified proteins including Ro52, La, histidyl-tRNA synthetase (Jo-1), SR proteins, histone H2A (H2A), Sm-B/B', the 70 kDa and C component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex (U1-70kDa, U1snRNP-C), Sm-B/B', hnRNP-B1, Sm/RNP complex, topoisomerase I (topo I), centromere protein B (CENP B), and pyruvate dehydrogenase (PDH); six nucleic acid-based putative antigens including several forms of mammalian double-stranded DNA (dsDNA) and synthetic single-stranded DNA (ssDNA); and 154 peptides representing snRNP proteins, Sm proteins, and histones H1, H2A, H3 and H4. In addition, we spotted antibodies specific for human IgG and IgM (α -IgG and α -IgM); the vaccines for influenza A and pneumococcus (Pneumovax); and a mixture of antibodies pre-labeled with Cy-3- and Cy-5 to serve as marker spots to orient the arrays (the yellow features). Autoantigen arrays were incubated with diluted patient serum samples from (a) a healthy individual (normal) for which no specific autoantibody reactivities were detected; (b) Sjögren's syndrome demonstrating autoantibody reactivity against Ro52 and La; (c) SLE demonstrating reactivity against DNA, histone H2A, U1-70kDa, and SR protein; (d) PM demonstrating reactivity against Jo-1 and Ro52; (e) MCTD demonstrating reactivity against DNA, histone H2A, Ro52, and U1-70kDa; (f) PBC demonstrated reactivity against PDH; (g) sclero-D demonstrating reactivity against topo I; (h) sclero-L demonstrating reactivity against CENP B; and (i) RA demonstrating reactivity against hnRNP-B1. The autoimmune disease serum used to probe each array is indicated along the top of the figure, and each column of cut and pasted antigen features contained within a gray box are representative antigen features from a single array. A myelin basic protein peptide recognized on arrays by autoantibodies in serum from rodents with experimental autoimmune encephalomyelitis was included as a

WO 02/084249

PCT/US02/11356

representative negative control (MBP 68-86). Bound antibodies were detected using Cy-3-conjugated goat-anti-human IgM/IgG prior to scanning.

Shown are published, highly characterized serum samples derived from patients with Sjögren's syndrome, SLE, PM, mixed connective tissue disease (MCTD), PBC, diffuse and limited scleroderma (sclero-D and sclero-L), and rheumatoid arthritis (RA), identifying distinct and diagnostic autoantibody specificity patterns. For example, SLE-specific autoantibodies directed against DNA and histone were detected (Figure 2c). DNA-specific autoantibodies are pathogenic in some models, and their titers frequently correlate with disease activity. Jo-1 autoantibodies (Figure 2d) frequently predate clinical PM by months to years, and predict development of interstitial lung disease and a poor prognosis. Autoantibodies derived from patients with either diffuse or limited scleroderma uniquely target topo I and CENP B, respectively (Figure 2g and h). CENP B autoantibodies are associated with a low incidence of interstitial pulmonary and renal disease, while the presence of topoisomerase autoantibodies correlates with heightened risk of pulmonary fibrosis and reduced survival. Autoantigen reactivity was not observed when sera from 10 healthy individuals were employed as probes, despite reproducible detection of antibodies to pneumococcus and influenza (Figure 2a). These array profiles correlated precisely with previously described results of conventional assays.

These results demonstrate that antigen arrays detect autoantibodies specific for proteins, peptides, nucleic acids, posttranslationally modified antigens, and protein complexes. Such information can be used for diagnosis, prognostication, monitoring response to therapy, and to develop and select antigen-specific therapies.

Example 3

Determination of the Autoantibody Specificity Profile from the Cerebral Spinal Fluid from Human Multiple Sclerosis Patients

Antigen arrays containing myelin proteins and peptides were used to characterize the specificity of the autoantibody response in cerebral spinal fluid samples derived from human patients with multiple sclerosis (Figure 3). The arrays in Figure 3 demonstrate detection of cerebral spinal fluid autoantibodies specific for whole myelin basic protein (MBP), MBP peptide 1-20 (corresponding to amino acids 1-20 of MBP), MBP peptide 68-86, whole myelin oligodendrocyte protein (MOG), MOG peptide 35-55, and proteolipid protein (PLP) peptide 139-151. As in Example 2, such information can be used for diagnosis and to develop, monitor and select specific therapy.

2400-spot 'myelin proteome' arrays were produced by spotting these putative myelin antigens using a robotic microarrayer, probed with cerebral spinal fluid followed by Cy-3-

WO 02/084249

PCT/US02/11356

labeled anti-human Ig secondary antibody, scanned using a GenePix scanner, and images analyzed using GenePix software to determine levels of autoantibody binding to each spot. These arrays contain 400 different myelin protein and peptide epitopes including MBP, proteolipid protein (PLP), myelin oligodendrocyte protein (MOG), overlapping peptides representing these proteins, and peptides representing dominant epitopes from additional myelin autoantigens including cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNPase), myelin-associated glycoprotein (MAG), and myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MBOP).

In the control patient, although antibodies specific for common and ubiquitous human pathogens including influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* are detected, no antibodies specific for myelin proteins and peptides are detected. In MS patient 1, antigen arrays detect autoantibodies specific for whole myelin basic protein (MBP), whole myelin oligodendrocyte protein (MOG), as well as autoantibodies recognizing MOG peptide 35-55, MBP peptide 1-20, and MBP peptide 68-86. In contrast, in MS patient 2 autoantibodies are detected against MOG protein and MOG peptide 25-42. In MS patient 3, autoantibodies specific for proteolipid protein (PLP) peptide 139-151 are identified.

Example 4

Use of Patient Autoantibody Specificity Profiles to Guide Selection of Antigen Specific

Therapies to Treat Rheumatoid Arthritis

Antigen array analysis of the autoantibody response in an animal model for rheumatoid arthritis, collagen-induced arthritis (CIA). Figure 5 presents images of the RA/CIA array containing approximately 450 different synovial joint proteins and peptides, including type II collagen (CII), collagen types I, III, IV, V, IX, and XI, GP-39, immunoglobulin, Sa, calpastatin, RA33, Aldolase A, heat shock protein-60 and -65, glucose-6-phosphate isomerase, the molecular chaperone BiP, and citrulline-modified fibrin and filaggrin peptides and proteins.

Figure 5 shows an antibody specificity profile using an array of antigens and epitopes derived from synovial joints to determine the specificity of the autoantibody response in CIA. 2000-spot 'synovial proteome' arrays were produced by spotting putative synovial joint antigens using a robotic microarrayer, probed with CIA mouse serum followed by Cy-3-labeled anti-mouse Ig secondary antibody, scanned using a GenePix scanner, and images analyzed using GenePix software to determine levels of autoantibody binding to each spot. A-B represent scanned images of arrays probed with serum from a control DBA/1LacJ mouse (A) and a DBA/1LacJ mouse with CIA (B). Autoantibody reactivity against type II collagen and the immunodominant type II collagen peptide 257-270 is observed. Results were confirmed by ELISA and are representative of autoantibody

WO 02/084249

PCT/US02/11356

reactivity observed in additional mice. For the purposes of diagnosis and treatment determination of the specificity of the autoantibody response can also be accomplished using conventional methods including radioimmunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), fluorescent-based autoantibody tests, and/or Western blot analysis.

5 *Treatment of CIA with antigen-specific tolerizing DNA treatment encoding the antigen array identified targets of the autoantibody response in CIA.* A DNA tolerizing treatment was designed based on the epitope specificity profile determined in Figure 5 according to this invention. CIA was prevented or treated using the DNA tolerizing treatment encoding the epitope of type II collagen (CII), CIIp257-270, identified as being
10 targeted by the autoantibody response using antigen arrays as demonstrated in Figure 5. Additionally, tolerizing DNA encoding whole type II collagen, which is also identified as a target of the autoimmune response in CIA using antigen arrays as demonstrated in Figure 5, also effectively prevented and treated CIA. Table 5 presents data from a representative experiment.

15

Table 5. Tolerizing DNA Treatment Group	Incidence of CIA	Net CIA Score
pTarget (DNA vector only, control)	0.53	22
pTarget + IL-4 (DNA vector plus IL-4, control)	0.4	32
Minigene (DNA encoding CIIp257-270)	0.13	4
Minigene + IL-4	0	4
CII (DNA encoding whole CII)	0.13	8
CII + IL-4	0.06	4

20 The DNA encoding type II collagen (CII) was administered to DBA/1LacJ mice intramuscularly on a once per week basis at a dose of 100 µg of each DNA plasmid twice before induction of CIA with CII emulsified in Complete Freund's Adjuvant. Animals were boosted with CII in Incomplete Freund's Adjuvant at day 20. Each mouse was scored daily for arthritis using the visual scoring system.

25

WO 02/084249

PCT/US02/11356

Example 5Use of Antibody Specificity Profiles to Guide Development and Selection of AntigenSpecific Therapies to Treat Multiple Sclerosis

Antigen array analysis of the autoantibody response in an animal model for multiple sclerosis, EAE. Figure 4 presents images of the 2400-spot MS/EAE array containing approximately 400 different myelin protein and peptide epitopes including MBP, proteolipid protein (PLP), myelin oligodendrocyte protein (MOG), overlapping peptides representing these proteins, and peptides representing dominant epitopes from additional myelin autoantigens including cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNase), myelin-associated glycoprotein (MAG), and myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MBOP).

Figure 4 demonstrates use of this array containing a spectrum of myelin antigens and epitopes to study the specificity of the autoantibody response in EAE. 2400-spot 'myelin proteome' arrays were produced by spotting putative myelin antigens using a robotic microarrayer, probed with EAE mouse serum followed by Cy-3-labeled anti-mouse Ig secondary antibody, scanned using a GenePix scanner, and images analyzed using GenePix software to determine levels of autoantibody binding to each spot. A-C represent scanned images of arrays probed with serum from a control mouse (A) and 2 SJL mice 87 days post-EAE induction with PLPp139-151 that developed relapsing disease (B & C). Autoantibody reactivity against the inducing peptide PLPp139-151 is significantly stronger in the 2 mice with EAE relative to the control, autoantibody reactivity against an adjacent intra-molecular epitope PLPp89-106 is observed in mouse-2 but not mouse-1 or the control, and autoantibody reactivity against inter-molecular proteins and epitopes including MOG protein, MOGp66-78, CNase p343-373, and MBPp1-20 are observed in both mice with EAE but not the control. Results were confirmed by ELISA and are representative of autoantibody reactivity observed in additional mice.

SJL mice induced to develop EAE with PLPp139-151 in Complete Freund's Adjuvant (CFA) undergo intra- and inter-molecular spreading of their autoantibody response to adjacent epitopes on PLP, and to epitopes on 3 additional myelin proteins including MBP, MOG, and CNase (Figure 4B and C). In SJL mice with EAE, mice with fewer clinical relapses have significantly less spreading of the autoantibody response (Figure 5). This observation that increased epitope spreading of the autoantibody response to additional myelin antigens is associated with relapsing and more severe disease provides further evidence that autoantibody specificity profiling using antigen arrays can be used to predict clinical outcomes in individual animals. Side-by-side enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis identified and confirmed the antigen array determined specificity of the autoantibody response. Spreading of the autoantibody response and its correlation with more severe disease in EAE, a T cell-mediated disease, has not been previously described

WO 02/084249

PCT/US02/11356

- and demonstrates diagnostic and prognostic utility of determination of autoantibody specificity profiles. For the purposes of diagnosis and treatment determination of autoantibody specificity profiles can also be accomplished using conventional methods including radioimmunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), fluorescent-based autoantibody tests, and/or Western blot analysis.

- Antigen-specific DNA tolerizing therapeutics as an example of antigen-specific therapies.* Chronic relapsing EAE can be prevented and treated by introduction of DNA plasmid minigenes encoding epitopes of PLP (J. Immunol 162:3336-41; Curr. Dir. Autoimmun. 2:203-16; Table 2). DNA vaccines encoding several whole myelin proteins were even more effective at treating EAE (Tables 2 and 3). Delivery of DNA vaccines encoding both myelin antigens in combination with IL-4 further enhanced the protective effects (Table 3).

- Table 2.** Antigen-specific DNA tolerizing therapeutics encoding antigen identified using the antibody specificity profile to treat chronic relapsing EAE.

DNA	n	mean relapse rate	p value compared to cocktail
vehicle	17	2.94	0.0064
vector only	16	3.875	<0.0001
cocktail	16	1.563	

- ¹Mice that were administered cocktail therapy were treated intramuscularly on a once per week basis at a dose of 50 µg of each the four major myelin plasmids, MBP, MOG, MAG, and PLP. The cocktail consists of DNA encoding these four myelin antigens. Treatment was begun immediately after recovery from the initial acute onset of EAE. Sera were collected when the mice were sacrificed at day 87 and used on the myelin protein arrays. Each mouse was scored daily for and the mean number of exacerbations of clinical paralysis (relapses) over 87 days is presented for each group of mice. p value calculated using the Student's two-tailed unpaired t test.

- Table 3.** Antigen-specific DNA tolerizing therapeutics encoding antigen identified using the antibody specificity profile to treat chronic relapsing EAE, inclusion of a DNA plasmid encoding IL-4 potentiates this effect.

DNA	n	mean relapse rate	p value compared to cocktail/IL-4
vehicle	20	2.45	0.0018
IL4	14	2.93	0.0003
PLP139-151/IL-4	17	1.94	0.0158
cocktail	18	1.44	0.1714
cocktail/IL-4	17	0.941	

- ¹Mice that were administered cocktail were treated intramuscularly on a once per week basis at a dose of 25 µg of each the four major myelin plasmids, MBP, MOG, MAG, and PLP. The cocktail consists of DNA

WO 02/084249

PCT/US02/11356

encoding these four myelin antigens. All other DNA was given at a dose of 50 µg of plasmid per animal on a once weekly basis. Treatment was begun immediately after recovery from the initial acute onset of EAE. Each mouse was scored daily for and the mean number of exacerbations of clinical paralysis (relapses) over 81 days is presented for each group of mice. p value calculated using the Student's two-tailed unpaired t test.

Use of the specificity of the autoantibody response to selected antigen-specific tolerizing therapy for more efficacious treatment of EAE. We treated chronic relapsing EAE in SJL mice with DNA plasmids encoding various myelin antigens identified by the antigen array determined antibody specificity profile. Table 4 presents the culminated results from multiple experiments using antigen-specific DNA tolerizing therapeutics to: (1) prevent induction of EAE, and (2) to treat established EAE. Table 4 demonstrates that antigen-specific DNA plasmids encoding a greater number of the protein array identified autoantigens targeted by the autoimmune process have superior efficacy in treating EAE compared to plasmids only encoding one of the targeted autoantigens (or encoding non-targeted myelin proteins). Use of antigen-specific therapies developed and selected based on the antigen array determined antigen specificity profile results in more efficacious therapies.

TABLE 4. Cumulative Results for Prevention and Treatment of EAE with Antigen-Specific DNA Tolerizing Therapeutics.

Tolerizing DNA Formulation	EAE Disease Reduction	
	Without IL-4	With IL-4
Vector alone	-	-
MOG	+/+	++
PLPp139-151	+	++
Cocktail: MBP, MOG, MAG, PLP	+++	++++

WO 02/084249

PCT/US02/11356

EXAMPLE 6Use of Antibody Specificity Profiles to Monitor Response to Therapy

Analysis of animals protected against or treated for EAE with DNA plasmids demonstrated reduced epitope spreading of the autoantibody response on protein array analysis (Figure 6). Individual mice are listed on the X axis, and peptide and protein antigens present on the 'myelin proteome' array on the Y axis. Green indicates lack of reactivity, and red indicates autoantibody reactivity. The cluster analysis algorithm groups mice based on similarities in the antigen array determined specificity of their autoantibody responses. This image represents a small region of the overall cluster. Normal mice (NMS) cluster and the predominance of green indicates lack of autoantibody reactivity to the listed antigens. SJL mice with chronic relapsing EAE treated with control vector or buffer (B and C) cluster and have significant autoantibody reactivity, indicated by red, against various myelin antigens. This observed spreading of the autoantibody response in these mice correlates with their more severe disease course, with an average of 2.4-3.5 relapses over the 87 day period. The average number of clinical exacerbations of paralysis (relapses) are presented at the top of the figure by the numbers over the bars indicating the relevant group of mice. In contrast, mice treated with the myelin protein cocktail DNA tolerizing therapeutic (containing a large number of the antigen array identified targets of the autoimmune response, and demonstrating the greatest efficacy in treating EAE [Table 4]) cluster and have a significant reduction in the spreading of their autoantibody response as indicated by the increased green relative to the other groups. This reduction in spreading of the autoimmune response correlated with their less-severe clinical course with an average of 1.5 relapses over the 87 day period.

Figure 6 presents cluster analysis of the antigen array results from mice with EAE treated with antigen-specific DNA tolerizing therapeutics. The myelin protein cocktail DNA tolerizing regimen encoding 4 of the myelin antigens identified by antigen arrays as targeted by the autoantibody response powerfully reduced B cell epitope spreading (Figure 6). This correlated with its significant reduction of disease activity as measured by relapse rate (Tables 2 and 3, Figure 6). Thus, antigen array-based autoantibody profiling, in addition to having utility in guiding the selection of antigen-specific therapy, can also be utilized to monitor responses to antigen specific therapy. Although not shown, isotype analysis of antibodies binding to individual antigen features on the array will allow even more detailed analysis and prediction of therapeutic response. For example, in human autoimmune disease therapeutic efficacy may be indicated by antigen array identification of a shift in the antibody isotype subclasses from the Th1 isotype subclasses IgG1 and IgG3 associated with tissue injury to the Th2 isotype subclasses IgG2 and IgG4 associated with protection

WO 02/084249

PCT/US02/11356

against tissue injury in autoimmune disease. Use of the specificity of the autoantibody response to select antigen-specific therapy fundamentally treats the autoimmune process by suppressing the spreading of the autoimmune response and this correlates with reduction of disease activity.

5

Example 7

Patient Antibody Specificity Profile-Based Therapy for Tissue Transplant

A major limitation of tissue transplant is the rejection of tissue transplants by the recipient's immune system. Tissue transplants include transplant of blood and blood-derived cells, as well as transplant of solid organs including heart, lung, kidneys, liver and other organs. Immune rejection is mediated by the recipients' immune system which recognizes allelic variations in the tissue transplant proteins. Tissue transplant rejection is mediated by recipient immune responses against the MHC class I and II proteins in the tissue transplant, and against other histocompatibility and additional antigens with allelic variation in the tissue transplant as compared to the recipient. When the transplant recipient's immune system reacts against the transplant it produces antibodies that bind antigens within the transplant.

Using tissue transplants between Balb/c (H-2^d) and Balb/k (H-2^k) mice, antigen arrays containing antigens and epitopes representing the H-2^d class I and Class II MHC molecules are used to determine antibody profiles. Using standard protocols, hearts are transplanted from H-2^d mice into ectopic abdominal locations in H-2^k mice (ectopic transplantation enables close monitoring of the transplanted heart by simple palpation). Serum derived from recipient mice are analyzed using the described antigen arrays to identify antibody reactivity against the donor MHC molecules. Identification of antibody profiles enables identification of recipient animals rejecting the transplanted heart. Antibody profiles also enable assessment of the severity of rejection for prognostication, and guiding selection of non-specific therapy. Antibody specificity profiles can also be used to develop and select antigen-specific therapy to treat tissue transplant rejection to prevent demise of the transplanted tissue. In this example, graft survival is monitored by palpation of the transplanted heart.

30

Example 8

Antibody Specificity Profile-Based Therapy for Allergic Disease

WO 02/084249

PCT/US02/11356

Allergic diseases are mediated by aberrant immune responses directed against exogenous allergens to which a patient is exposed. Examples include allergic reactions to pollens, house dust mite antigens, bee venom, peanut oil, and other molecules existing in the environment. In allergic responses patients generate antibodies directed against the offending allergen(s). Arrays containing allergens, and immune epitopes representing allergens, are generated and used to determine a patient's profile of antibody specificities directed against allergens. Identification of a patient's antibody profile will facilitate diagnosis of the allergic disease and identification of the allergen against which the patient is reacting. The patient antibody specificity can be further used to develop and select the appropriate allergens to use to tolerize the patient. Tolerizing the patient involves administration of the offending allergen in a manner that turns off the patient's aberrant allergic immune response directed against it. The patient antibody specificity profile can also be used to monitor the patient's response to allergen tolerizing therapy, based on alterations in the anti-allergen antibody reactivity, titers of anti-allergen antibodies, and/or the isotype subclass use of anti-allergen antibodies.

WO 02/084249

PCT/US02/11356

What is claimed is:

1. A method for determining an antibody specificity profile in a patient with an immune-related disease comprising:
 - 5 (a) preparing an antigen array comprising at least two disease associated antigen elements wherein each antigen element further comprises at least one immunologic epitope(s);
 - (b) physically contacting the antigen array from step (a) with a patient sample comprising antibodies;
 - 10 (c) identifying the disease associated antigens within the array that bind to antibodies within the patient sample from step (b);
 - (d) comparing the antibodies bound to the disease associated antigens in step (c) with (1) antibodies binding to the disease associated antigens within the array of step (a) wherein the antibodies are known to be associated with the disease; and, (2) antibodies binding to the disease associated antigens
 - 15 within the array of step (a) wherein the antibodies are not associated with the disease;

provided the disease is not insulin dependent diabetes mellitus.
- 20 2. The method of claim 1 wherein the immune-related disease is an autoimmune disease.
3. The method of claim 1 wherein the immune-related disease is an allergy.
- 25 4. The method of claim 1 wherein the immune-related disease is transplant rejection.
5. The method of claim 1 wherein the patient has not developed clinical symptoms.
6. The method of claim 1 wherein the patient has clinical symptoms.
- 30 7. The method of claim 2 wherein the autoimmune disease is rheumatoid arthritis.
8. The method of claim 2 wherein the autoimmune disease is multiple sclerosis.
- 35 9. The method of claim 1 wherein the antigens are selected from the group consisting of protein, polypeptide, peptide, DNA, RNA, lipid, glycosylated molecules, polypeptides with

WO 02/084249

PCT/US02/11356

phosphorylation modifications, polypeptides with citrulline modifications, polysaccharides or other molecules.

10. The method of claim 1 wherein the antigen array is a microarray.
- 5 11. The method of claim 1 wherein the antigen array has addressable elements.
12. The method of claim 1 wherein the antigen array is a low density array.
- 10 13. The method of claim 1 wherein the antigen array is a high density array.
14. The method of claim 1 wherein the patient sample is a blood sample.
- 15 15. The method of claim 1 wherein the patient sample is a cerebrospinal fluid sample.
16. The method of claim 1 wherein the patient sample is a synovial fluid sample.
17. The method of claim 1 wherein the patient sample is taken from an autoimmune disease lesion.
- 20 18. The method of claim 1 further comprising the step of treating the patient by administration of a therapeutic agent comprising one or more of the antigens bound by antibodies comprising the antibody specificity panel.
- 25 19. A method for determining an antibody specificity profile in a patient with an immune-related disease comprising:
(a) preparing an epitope element array comprising at least one epitope element;(b)
physically contacting the epitope array from step (a) with a patient sample
comprising antibodies;
30 (c) identifying the disease associated epitopes within the array that bind to antibodies within the patient sample from step (b); (d) comparing the antibodies bound to the disease associated epitopes in step (c) with (1) antibodies binding to the disease associated epitopes within the array of step (a) wherein the antibodies are known to be associated with the disease; and, (2) antibodies binding to the disease associated epitopes within the array
35 of step (a) wherein the antibodies are not associated with the disease.
20. The method of claim 19 wherein the array is a microarray.

WO 02/084249

PCT/US02/11356

21. The method of claim 19 wherein the immune-related disease is an autoimmune disease.
- 5 22. The method of claim 19 wherein the immune-related disease is an allergy.
23. The method of claim 19 wherein the immune-related disease is transplant rejection.
24. The method of claim 19 wherein the patient has not developed clinical symptoms.
- 10 25. The method of claim 19 wherein the patient has clinical symptoms.
26. A method for treating autoimmune disease comprising:
- 15 (a) determining the antigen specificity profile of a patient comprising the steps of:
- (1) preparing an antigen array comprising at least two disease associated antigens wherein each antigen element further comprises at least one immunologic epitope(s); (2) physically contacting the antigen array from step (1) with a patient sample comprising antibodies; (3) identifying the disease associated antigens within the array that bind to antibodies within the patient sample from step (2); (4) comparing the antibodies bound to the disease associated antigens in step (3) with (i) antibodies binding to the disease associated antigens within the array of step (1) wherein the antibodies are known to be associated with the disease; and, (ii) antibodies binding to the disease associated antigens within the array of step (1) wherein the antibodies are not associated with the disease;
- 20 25 (b) designing a patient specific treatment regimen based upon the antigen specificity profile of step (a) comprising the steps of: (1) determining the antigens bound by the antibodies in the patient sample; and, (2) administering one or more antigens to the patient.
- 30 27. The method of claim 26 wherein the antigens administered to the patient are selected from the group consisting of proteins, polypeptides, peptides, DNA, RNA, lipid, glycosylated molecules, polypeptides with phosphorylation modifications, polypeptides with citrulline modifications, polysaccharides or other molecules.
- 35 28. The method of claim 26 wherein the antigens administered to the patient is a nucleic acid encoding said antigen.

WO 02/084249

PCT/US02/11356

29. The method of claim 28 wherein the nucleic acid is DNA.

5 30. A method for treating autoimmune disease comprising
 (a) determining the epitope specificity profile of a patient comprising the steps of: (1)
 preparing an epitope array; (2) physically contacting the epitope array from
 step (1) with a patient sample comprising antibodies; (3) identifying the
 10 disease associated epitopes within the array that bind to antibodies within the
 patient sample from step (2); (4) comparing the antibodies bound to the
 disease associated epitopes in step (3) with (i) antibodies binding to the
 disease associated epitopes within the array of step (1) wherein the
 antibodies are known to be associated with the disease; and, (ii) antibodies
 15 binding to the disease associated epitopes within the array of step (1) wherein
 the antibodies are not associated with the disease;;(b) designing a patient
 specific treatment regimen based upon the epitope specificity profile of step
 (a) comprising the steps of: (1) determining the epitopes bound by the
 antibodies in the patient sample; and, (2) administering one or more epitopes
 to the patient.

20 31. The method of claim 31 wherein the epitopes administered to the patient are selected
 from the group consisting of proteins, polypeptides, peptides, DNA, RNA, lipid, glycosylated
 molecules, polypeptides with phosphorylation modifications, polypeptides with citrulline
 modifications, polysaccharides or other molecules.

25 32. The method of claim 31 wherein the epitopes administered to the patient is in the form
 of a nucleic acid, encoding said antigen.

33. The method of claim 33 wherein the nucleic acid is DNA.

30 34. A method for determining an antibody specificity profile in a patient with insulin-
 dependent diabetes mellitus (IDDM, autoimmune diabetes) comprising:
 (a) preparing an antigen array comprising at least four IDDM-associated
 antigens wherein each antigen element further comprises at least one
 immunologic epitope(s);
 35 (b) physically contacting the IDDM antigen array from step (a) with a patient
 sample comprising antibodies;
 (c) identifying the IDDM-associated antigens within the array that bind to

WO 02/084249

PCT/US02/11356

- antibodies within the patient sample from step (b);
- (d) comparing the antibodies bound to the disease associated antigens in step (c) with (1) antibodies binding to the IDDM associated antigens within the array of step (a) wherein the antibodies are known to be associated with the IDDM; and, (2) antibodies binding to the disease associated antigens within the array of step (a) wherein the antibodies are not associated with IDDM.
35. A method for determining an antibody specificity profile in a patient with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM, autoimmune diabetes) comprising:
- (a) preparing an epitope array comprising at least four IDDM-associated epitope elements;
- (b) physically contacting the epitope array from step (a) with a patient sample comprising antibodies;
- (c) identifying the IDDM-associated epitopes within the array that bind to antibodies within the patient sample from step (b);
- (d) comparing the antibodies bound to the IDDM-associated epitopes in step (c) with (1) antibodies binding to the disease associated epitopes within the array of step (a) wherein the antibodies are not associated with IDDM.
36. A method for treating insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM, autoimmune diabetes) comprising:
- (a) determining the antigen specificity profile of a patient comprising the steps of:
- (1) preparing an antigen array comprising at least four IDDM-associated antigens wherein each antigen element further comprises at least one immunologic epitope(s); (2) physically contacting the antigen array from step (1) with a patient sample comprising antibodies; (3) identifying the IDDM-associated antigens within the array that bind to antibodies within the patient sample from step (2); (4) comparing the antibodies bound to the IDDM associated antigens in step (3) with (i) antibodies binding to the IDDM associated antigens within the array of step (1) wherein the antibodies are known to be associated with IDDM; and, (ii) antibodies binding to the IDDM associated antigens within the array of step (1) wherein the antibodies are not associated with the IDDM;
- (b) designing a patient-specific treatment regimen based upon the antigen specificity profile of step (a) comprising the steps of: (1) determining the antigens bound by the antibodies in the patient sample; and, (2) administering one or more antigens to the patient.

WO 02/084249

PCT/US02/11356

37. A method for treating insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM, autoimmune diabetes) comprising:
- 5 (a) determining the epitope specificity profile of a patient comprising the steps of: (1) preparing an epitope array comprising at least four IDDM-associated epitope elements; (2) physically contacting the epitope array from step (1) with a patient sample comprising antibodies; (3) identifying the IDDM-associated epitopes within the array that bind to antibodies within the patient sample from step (2);
- 10 (4) comparing the antibodies bound to the IDDM-associated epitopes in step (3) with (i) antibodies binding to the IDDM associated epitopes within the array of step (1) wherein the antibodies are known to be associated with IDDM; and, (ii) antibodies binding to the IDDM-associated epitopes within the array of step (1) wherein the antibodies are not associated with IDDM;
- 15 (b) designing a patient specific treatment regimen based upon the epitope specificity profile of step (a) comprising the steps of: (1) determining the epitopes bound by the antibodies in the patient sample; and, (2) administering one or more epitopes to the patient.

WO 02/084249

1/6

PCT/US02/11356

Figure 1.



A. Normal Rat Serum



B. Rat EAE induced with MBPp68-86



C. Rat EAE induced with PLPp139-151



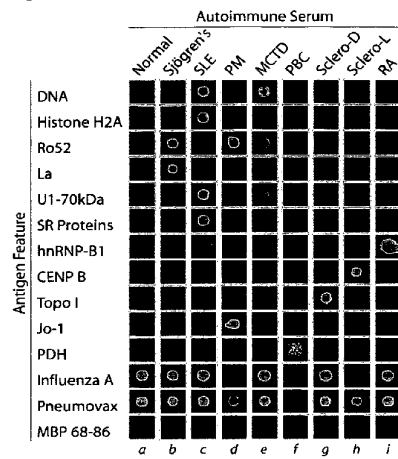
D. Rat EAE induced with MOGp55-55

WO 02/084249

2/6

PCT/US02/11356

Figure 2.



j. Quantitative Analysis

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

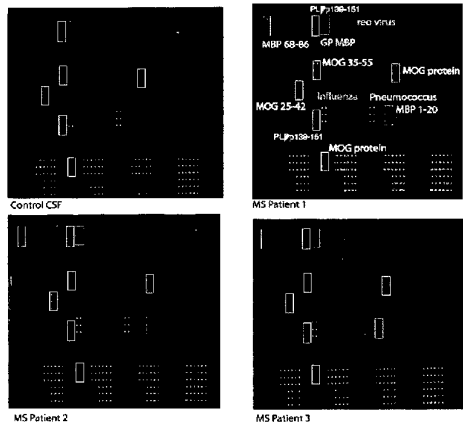
WO 02/084249

3/6

PCT/US02/11356

Figure 3.

Antigen array analysis of the specificity of the autoantibody response in cerebral spinal fluid from control and multiple sclerosis patients.

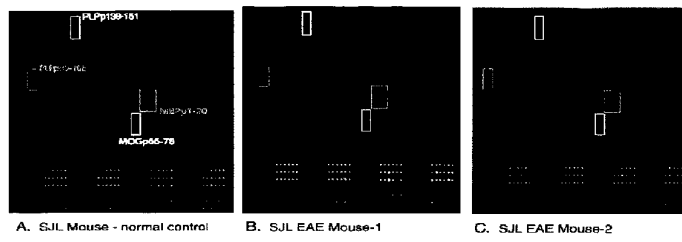


WO 02/084249

4/6

PCT/US02/11356

Figure 4.



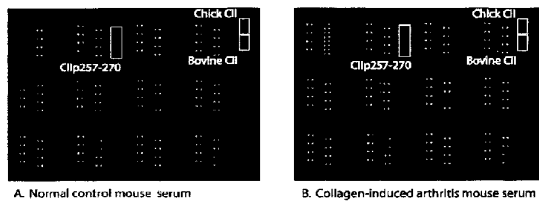
Antigen array characterization of the specificity of the autoantibody response in mice with EAE.

WO 02/084249

5/6

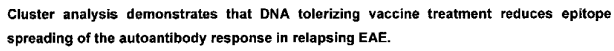
PCT/US02/11356

Figure 5.



'Synovial proteome' array analysis of the autoantibody response in the murine CIA model for RA.

3.5 (B,C) 1.5 (A) 2.4 (C) 4 (B) 0 (NMS) 2.3 (A,B,C)



Cluster analysis demonstrates that DNA tolerizing vaccine treatment reduces epitope spreading of the autoantibody response in relapsing EAE.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/084249 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/53,
33/548, 33/564, 33/569, C07K 5/00

(21) International Application Number: PCT/US02/11356

(22) International Filing Date: 10 April 2002 (10.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/283,090 10 April 2001 (10.04.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STAN-
FORD JUNIOR UNIVERSITY [US/US]; 900 Welch
Road, Suite 350, Palo Alto, CA 94304 (US).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ROBINSON,William, H. [US/US]; 880 Roble Avenue, No. 2, Menlo
Park, CA 94025 (US); HIRSCHBERG, David, L.
[US/US]; 919 Fremont Place, Menlo Park, CA 94025
(US); STEINMAN, Lawrence [US/US]; 1704 Oak Creek
Drive, Palo Alto, CA 94304 (US); RUIZ, Pedro, Jose
[CO/US]; 1 Miller Court, Redwood City, CA 94061
(US); UTZ, Paul, J. [US/US]; 300 Pasteur Drive, CCSR
Building, Room 2215-A, Stanford, CA 94035-5166 (US);
GARREN, Hideki [US/US]; Beckman Center, Room
B002, Stanford, CA 94305-5429 (US).(74) Agent: SHERWOOD, Pamela, J.; Bozicevic, Field &
Francis, L.L.P. 200 Middlefield Road, Suite 200, Menlo
Park, CA 94025 (US).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

[Continued on next page]

(54) Title: THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC USES OF ANTIBODY SPECIFICITY PROFILES



A. Normal Rat Serum



B. Rat EAE induced with MSFP66-8F



C. Rat EAE induced with PLPp139-151



D. Rat EAE induced with MOGp85-92

(57) Abstract: This invention provides a method for determining the antibody specificity profile in an individual. This specificity profile reveals the individual's immune response to multiple antigens and/or epitopes of autoantigens, allergens, graft antigens, etc. The antibody specificity profile is determined through the binding of patient samples comprising antibodies to the arrays. The array can comprise antigens and epitopes. The invention also provides the means and methods for determining antigen or epitope specificity profiles that can be used in the development of either generic and individualized diagnosis and treatment for immune related diseases, including autoimmune disease, allergy and graft rejection.

WO 02/084249 A3

WO 02/084249 A3



MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:
— with international search report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PL, PT, SI, TR), OAPI patent (BH, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
3 July 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/11356
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 33/53, 33/548, 33/564, 33/569; C07K 5/00 US CL : 436/506, 507, 518; 435/5, 7.1, 7.92 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/506, 507, 518; 435/5, 7.1, 7.92		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,378,496 A (ATASSI et al.) 26 November 1996 (26.11.1996), entire document	1-25
Y	US 5,486,452 A (GORDON et al.) 23 January 1996 (23.01.1996), entire document	1-25
Y	US 5,637,454 A (HARLEY) 10 June 1997 (10.06.1997), entire document	1-25
Y	US 4,865,970 A (BROT et al.) 12 September 1989 (12.09.1989), entire document	1-17
Y	US 5,354,691 A (VAN EDEN et al.) 11 October 1994 (11.10.1994), entire document	1-17
Y, P	US 6,232,088 B1 (FRANKLIN et al.) 15 May 2001 (15.05.2001), entire document	18
Y	US 6,207,645 B1 (HOWELL et al.) 27 March 2001 (27.03.2001), entire document	19-25
Y, P	US 6,241,985 B1 (MADIYALAKAN et al.) 5 June 2001 (05.06.2001), entire document	19-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 June 2002 (26.06.2002)		Date of mailing of the international search report 05 NOV 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer My-Chau T. Tran Telephone No. 703-308-0166

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/11356
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-25
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/11356

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-25, drawn to a method for determining an antibody specificity profile in a patient with immunerelated disease.

Group II, claim(s) 26-33, drawn to a method for treating autoimmune disease.

Group III, claim(s) 34-35, drawn to a method for determining an antibody specificity profile in a patient with autoimmune diabetes.

Group IV, claim(s) 36-37, drawn to a method for treating insulin-dependent diabetes mellitus.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, pursuant to 37 CFR 1.475(d), the ISA/US considers that where multiple processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group I) comprises the first recited method, a method for determining an antibody specificity profile in a patient with immunerelated disease. Further pursuant to 37 CFR 1.475(d), the ISA/US considers that any feature which the subsequently recited methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such methods accordingly defines a separate invention.

The special technical feature of Group I is considered to be preparing an antigen array comprising two disease associated antigen elements provided the disease is not insulin dependent diabetes mellitus.

The special technical feature of Group II is considered to be designing a patient specific treatment regimen based upon the antigen specificity profile.

The special technical feature of Group III is considered to be preparing an antigen array comprising four insulin-dependent diabetes mellitus-associated antigens.

Since the technical feature of Group I is not present in Groups II-IV claims and the technical feature of Groups II-IV inventions is not present in Group I claims, unity of invention is lacking. Since the technical feature of Group II is not present in Groups III-IV claims and the technical feature of Groups III-IV inventions is not present in Group II claims, unity of invention is lacking. Since the technical feature of Group III is not present in Groups IV claims and the technical feature of Groups IV invention is not present in Group III claims, unity of invention is lacking.

It is noted that claim 33 is an improper dependent claim because it depend upon itself.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/564	G 0 1 N 33/564	B
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/564	Z
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ロビンソン ウィリアム エイチ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 メンロ パーク ナンバー 2 ロブレ アベニュー 880
- (72)発明者 ヒルシュベルグ デイビッド エル.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 メンロ パーク フリーモント プレイス 919
- (72)発明者 ステインマン ローレンス
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ アルト オーク クリーク ドライブ 1704
- (72)発明者 ルイス ペドロ ジョセ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッドウッド シティ ミラー コート 1
- (72)発明者 ウッツ パウル ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 スタンフォード ルーム 2215 - エイ シーシーエスアール ビルディング パスツール ドライブ 300
- (72)発明者 ガーレン ヒデキ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 スタンフォード ルーム ビー002 ベックマン センター

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 EA04 HA11 HA17
4C085 AA03 AA04 BB03 BB11 BB23 EE01 EE03

专利名称(译)	抗体特异性谱的治疗和诊断用途的方法		
公开(公告)号	JP2004534213A	公开(公告)日	2004-11-11
申请号	JP2002581953	申请日	2002-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	在利兰·斯坦福初级大学董事会		
[标]发明人	ロビンソンウィリアムエイチ ヒルシュベルグデイビッドエル ステインマンローレンス ルイスペドロジョセ ウツパウルジェイ ガーレンヒデキ		
发明人	ロビンソン ウィリアム エイチ. ヒルシュベルグ デイビッド エル. ステインマン ローレンス ルイス ペドロ ジョセ ウツ パウル ジェイ. ガーレン ヒデキ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/35 A61P1/18 A61P3/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C12N15/09 G01N33/564 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	A61K39/0008 A61P1/18 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 G01N33/564 G01N33/6854 G01N2800/102 G01N2800/24 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D A61K39/00.H A61K39/35 A61P1/18 A61P3/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.111 G01N33/564.B G01N33/564.Z G01N37/00.102 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/EA04 4B024/HA11 4B024/HA17 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/BB03 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/EE01 4C085/EE03		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/283090 2001-04-10 US		
其他公开文献	JP2004534213A5 JP4594588B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

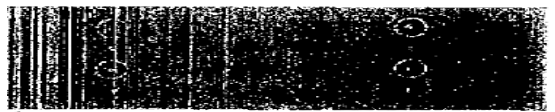
本发明提供了用于确定个体中抗体特异性谱的方法。该特定谱揭示了个体对多种抗原和/或表位的免疫应答，例如自身抗原，过敏原，移植抗原。通过将抗体样品与一系列患者样品结合来确定抗体特异性谱。阵列可包括抗原和表位。本发明进一步涉及抗原或表位特异性谱，其可用于开发遗传或个体化诊断和治疗免疫相关疾病，包括自身免疫疾病，过敏和移植排斥。以及其方法。



A. Normal Rat Serum



B. Rat EAE induced with MBPp48-98



C. Rat EAE induced with PLPp139-151



D. Rat EAE induced with MBPp48-98