



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104884465 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 02

- (21) 申请号 201380058773. 9 A61P 21/00(2006. 01)
- (22) 申请日 2013. 10. 11 A61P 25/28(2006. 01)
- (30) 优先权数据 A61P 37/04(2006. 01)
 - 61/712, 733 2012. 10. 11 US C07K 14/74(2006. 01)
 - 13/830, 521 2013. 03. 14 US C07K 17/00(2006. 01)
- (85) PCT国际申请进入国家阶段日 C07K 7/06(2006. 01)
 - 2015. 05. 11 C07K 7/08(2006. 01)
- (86) PCT国际申请的申请数据
- PCT/IB2013/003033 2013. 10. 11
- (87) PCT国际申请的公布数据
- W02014/080286 EN 2014. 05. 30
- (71) 申请人 乌第有限合伙公司
- 地址 加拿大艾伯塔
- (72) 发明人 佩德罗·圣玛丽亚
- (74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
- 代理人 郑斌 彭鲲鹏
- (51) Int. Cl.
- C07K 14/47(2006. 01)
- A61K 39/00(2006. 01)
- A61K 9/14(2006. 01)

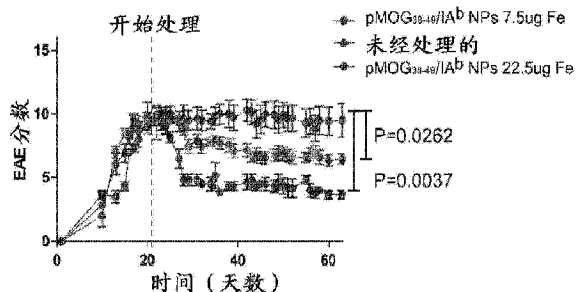
权利要求书3页 说明书30页 附图17页

(54) 发明名称

用于治疗多发性硬化及相关病症的方法和组合物

(57) 摘要

本公开内容提供了用于在有此需要的对象中治疗多发性硬化或多发性硬化相关病症的治疗组合物和方法,其包括向所述对象施用有效量的抗原-MHC-纳米颗粒复合物,其中所述抗原是多发性硬化相关抗原。



1. 复合物,其包含:纳米颗粒、MHC 蛋白和多发性硬化相关抗原,所述复合物用于在患有多发性硬化或多发性硬化相关病症的对象中扩增和/或产生抗病原体的自身反应性 T 细胞群,其中所述纳米颗粒的直径选自:约 1nm 至约 100nm 的直径;约 1nm 至约 50nm 的直径或者约 1nm 至约 20nm 的直径或约 5nm 至约 20nm 的直径,并且抗原-MHC 复合物与纳米颗粒的数目比为约 10 : 1 至约 1000 : 1。

2. 根据权利要求 1 所述的复合物,其中所述复合物的 MHC 密度为约 0.005pMHC/100nm² 至约 25pMHC/100nm²。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的复合物,其中所述抗原是衍生自选自以下蛋白质的抗原:髓鞘碱性蛋白、髓鞘相关糖蛋白、髓鞘少突胶质细胞蛋白、蛋白脂质蛋白、少突胶质细胞髓鞘寡聚蛋白、髓鞘相关少突胶质细胞碱性蛋白、少突胶质细胞特异性蛋白、热休克蛋白、少突胶质细胞特异性蛋白 NOGO A、糖蛋白 Po、外周髓鞘蛋白 22 和 2' 3' - 环核苷酸 3' - 磷酸二酯酶以及髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG);或者是对应于以下的抗原:与包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :4 至 17 序列的肽具有至少 80% 同一性的肽,或者在中度至高度严格条件下由与编码 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :4 至 17 序列之多核苷酸或其各自的互补序列杂交的多核苷酸所编码的多肽(其中高度严格条件包括约 55°C 至约 68°C 的孵育温度;约 1×SSC 至约 0.1×SSC 的缓冲液浓度;约 55% 至约 75% 的甲酰胺浓度;以及约 1×SSC、0.1×SSC 或去离子水的洗涤溶液)或者与 SEQ ID NO :1 的序列具有至少约 80% 序列同一性的多肽。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的复合物,其中所述纳米颗粒不是脂质体。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的复合物,其中所述抗原-MHC 复合物与所述纳米颗粒共价地或非共价地连接。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的复合物,其中所述抗原-MHC 复合物与所述纳米颗粒通过尺寸小于 5kD 的接头共价地连接。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的复合物,其中所述纳米颗粒是生物可吸收的和/或生物可降解的。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的复合物,其中抗原-MHC- 纳米颗粒复合物的所述 MHC 是 I 类或 II 类 MHC。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的复合物,其中所述抗原-MHC 复合物与纳米颗粒的数目比为约 10 : 1 至约 1000 : 1。

10. 根据权利要求 5 所述的复合物,其中所述接头包括聚乙二醇。

11. 包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 之氨基酸序列的分离和纯化的多肽,或者与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 具有至少约 80% 序列同一性的多肽,或者由在中度到高度严格条件下与编码 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 之多核苷酸杂交的多核苷酸所编码的多肽,或者与编码和 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 具有至少约 80% 序列同一性的多肽之多核苷酸杂交的多核苷酸所编码的多肽,或者与其多核苷酸各自的互补序列杂交之多核苷酸所编码的多肽;并且

其中中度杂交条件包括:约 40°C 至约 50°C 的孵育温度;约 9×SSC 至约 2×SSC 的缓冲液浓度;约 30% 至约 50% 的甲酰胺浓度;以及约 5×SSC 至约 2×SSC 的洗涤溶液;

其中高度严格条件包括:约 55°C 至约 68°C 的孵育温度;约 1×SSC 至约 0.1×SSC 的缓

冲液浓度 ;约 55%至约 75%的甲酰胺浓度 ;以及约 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\times\text{SSC}$ 或去离子水的洗涤溶液。

12. 编码权利要求 11 所述多肽的分离和纯化的多核苷酸或其等同物,或者在中度或高度严格的条件下与所述多核苷酸、其等同物或其互补序列杂交的多核苷酸。

13. 复合物,其包含 :权利要求 11 的分离的多肽,其中所述多肽包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列、MHC 蛋白和多发性硬化相关抗原。

14. 复合物,其包含 :纳米颗粒、MHC 蛋白和多发性硬化相关抗原,其中所述纳米颗粒的直径选自 :约 1nm 至约 100nm 的直径 ;约 1nm 至约 50nm 的直径或者约 1nm 至约 20nm 的直径或约 5nm 至约 20nm 的直径,并且抗原 -MHC 复合物与纳米颗粒的数目比为约 10 : 1 至约 1000 : 1。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的复合物,其中所述复合物的 MHC 密度为约 $0.005\text{pMHC}/100\text{nm}^2$ 至约 $25\text{pMHC}/100\text{nm}^2$ 。

16. 根据权利要求 13 所述的复合物,其中所述抗原是衍生自选自以下蛋白质的抗原 :髓鞘碱性蛋白、髓鞘相关糖蛋白、髓鞘少突胶质细胞蛋白、蛋白脂质蛋白、少突胶质细胞髓鞘寡聚蛋白、髓鞘相关少突胶质细胞碱性蛋白、少突胶质细胞特异性蛋白、热休克蛋白、少突胶质细胞特异性蛋白 NOGO A、糖蛋白 P0、外周髓鞘蛋白 22 和 2' 3' - 环核苷酸 3' - 磷酸二酯酶以及髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) ;或者是对应于以下的抗原 :SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :4 至 17,与包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :4 至 17 序列的肽具有至少 80% 同一性的肽,或者在中度至高度严格条件下与编码 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :4 至 17 序列之多核苷酸或其各自的互补序列杂交的多核苷酸所编码的多肽 (其中高度严格条件包括约 55°C 至约 68°C 的孵育温度 ;约 $1\times\text{SSC}$ 至约 $0.1\times\text{SSC}$ 的缓冲液浓度 ;约 55% 至约 75% 的甲酰胺浓度 ;以及约 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\times\text{SSC}$ 或去离子水的洗涤溶液) 或者与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :4 至 17 的序列具有至少约 80% 序列同一性的多肽。

17. 根据权利要求 13 或 16 所述的复合物,其中所述纳米颗粒不是脂质体。

18. 根据权利要求 13 或 16 所述的复合物,其中所述抗原 -MHC 复合物与所述纳米颗粒共价地或非共价地连接。

19. 权利要求 13 或 16 所述的复合物,其中所述抗原 -MHC 复合物与所述纳米颗粒通过尺寸小于 5kD 的接头共价地连接。

20. 根据权利要求 13 或 16 所述的复合物,其中所述纳米颗粒是生物可吸收的和 / 或生物可降解的。

21. 根据权利要求 13 或 16 所述的复合物,其中抗原 -MHC- 纳米颗粒复合物的所述 MHC 是 I 类或 II 类 MHC。

22. 根据权利要求 13 或 16 所述的复合物,其中所述抗原 -MHC 复合物与纳米颗粒的数目比为约 10 : 1 至约 1000 : 1。

23. 根据权利要求 19 所述的复合物,其中所述接头包括聚乙二醇。

24. 组合物,其包含载体和治疗有效量的根据权利要求 13 或 16 所述的复合物。

25. 组合物,其包含载体和有效量的根据权利要求 11 所述的多肽。

26. 组合物,其包含载体和有效量的根据权利要求 25 所述的多核苷酸。

27. 用于制造、制备或获得根据权利要求 1 或 13 所述的复合物的方法,其包括将抗

原-MHC 复合物包被到或复合到纳米颗粒上。

28. 用于在患有多发性硬化或多发性硬化相关病症的对象中扩增和 / 或产生抗病原体的自身反应性 T 细胞群的方法, 其包括向所述对象施用有效量的根据权利要求 1 或 13 所述的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物。

29. 用于在有此需要的对象中治疗多发性硬化或多发性硬化相关病症的方法, 其包括向所述对象施用有效量的根据权利要求 1 或 13 所述的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物。

30. 根据权利要求 28 或 29 所述的方法, 其中所述多发性硬化相关病症选自: 视神经脊髓炎 (NMO)、葡萄膜炎和神经性疼痛。

31. 药盒, 其包含权利要求 1 或 13 所述的复合物及使用说明。

用于治疗多发性硬化及相关病症的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 依据美国法典第 35 卷第 119(e) 条,本申请要求于 2012 年 10 月 11 日提交的美国临时申请 No. 61/712,733 和于 2013 年 3 月 14 日提交的美国序列号:13/830,521 的权益和优先权,其各自的内容通过引用以其整体并入本公开内容。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及与免疫治疗和医药相关的组合物和方法。特别地,本公开内容涉及用于治疗多发性硬化及相关病症的疗法。

背景技术

[0004] 多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是一种潜在的致虚弱的疾病,其中身体的免疫系统破坏了覆盖神经的保护性鞘。这干扰了大脑与身体其余部分之间的通信。最终,这可能导致神经本身的退化,这个过程是不可逆的。

[0005] 统计显示在美国大约 250,000 至 350,000 的人被诊断出患有这种疾病。取决于损伤的量以及受影响的神经,症状广泛地变化。多发性硬化的重病患者可能会失去行走或说话的能力。MS 的症状包括手臂或腿的麻木、疼痛、视力丧失、肌无力或震颤、麻痹、眩晕、疲劳、讲话困难、膀胱功能障碍、抑郁、听力丧失和瘙痒。

[0006] 尚无治愈 MS 的方法,但已经发现某些药物可以减轻 MS 的攻击并可能延缓疾病。治疗试图恢复攻击后的功能、预防新的攻击并预防残疾。MS 药物可能具有副作用或耐受性差。因此,在本领域中需要对于 MS 更好耐受性的、更有效的疗法。

发明内容

[0007] 为了响应本领域的需要,本文描述了用于治疗或预防多发性硬化或多发性硬化相关病症的治疗方法和组合物。本公开内容的一个方面涉及用于在患有多发性硬化或多发性硬化相关病症的对象中扩增和 / 或产生抗病原体的自身反应性 T 细胞群的方法,所述方法包括向该对象施用抗原 -MHC- 纳米颗粒复合物,所述方法基本上由向该对象施用抗原 -MHC- 纳米颗粒复合物组成,或者所述方法进一步由向所述对象施用抗原 -MHC- 纳米颗粒复合物组成,其中所述抗原是多发性硬化相关抗原。

[0008] 另一个方面涉及用于在有此需要的对象中治疗多发性硬化或多发性硬化相关病症的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的抗原 -MHC- 纳米颗粒复合物,所述方法基本上由向所述对象施用抗原 -MHC- 纳米颗粒复合物组成,或者所述方法进一步由向所述对象施用抗原 -MHC- 纳米颗粒复合物组成,其中所述抗原是多发性硬化相关抗原。还提供了抗原 -MHC- 纳米颗粒复合物在制备用于治疗多发性硬化或用于扩增和 / 或产生抗病原体的自身反应性 T 细胞群之药物中的用途,其中所述抗原是多发性硬化相关抗原。

[0009] 另一些方面涉及复合物,其包含纳米颗粒、MHC 蛋白质和多发性硬化相关抗原,基本上由纳米颗粒、MHC 蛋白质和多发性硬化相关抗原组成,或者进一步由纳米颗粒、MHC 蛋

白质和多发性硬化相关抗原组成。还提供了组合物,其包含本文所述的抗原-MHC-纳米颗粒和载体,基本上由本文所述的抗原-MHC-纳米颗粒和载体组成,或者进一步由本文所述的抗原-MHC-纳米颗粒和载体组成。另一些方面涉及药盒,其包含本文所述的抗原-MHC-纳米颗粒组合物和使用说明,基本上由本文所述的抗原-MHC-纳米颗粒组合物和使用说明组成,或者进一步由本文所述的抗原-MHC-纳米颗粒组合物和使用说明组成。

附图说明

[0010] 以下附图构成了本说明书的一部分并包括在内以进一步证明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文所提出的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0011] 图 1 示出 pMHC II 类-NP 疗法降低了在 C57BL/6 小鼠中建立的 EAE 的严重性。用 CFA 中的 pMOG₃₅₋₅₅ 免疫 B6 小鼠并用静脉注射 (i. v.) 百日咳毒素进行处理。使用已建立的标准以 15 分量表对小鼠的 EAE 的体征进行评分。在免疫后 21 天开始每周两次用 7.5-22.5 μg 剂量的 pMOG₃₈₋₄₉/IA^b 包被的 NP 处理受影响的小鼠。

[0012] 图 2 证明用 pMHC II 类-NP 疗法 (pMOG₃₈₋₄₉/IA^b 包被的 NP) 处理患有慢性 EAE 的小鼠相比于未经处理的 EAE 小鼠重量增加。

[0013] 图 3 为患有 EAE 的经处理和未经处理小鼠的照片。经处理的小鼠 (NAVACIM) 看起来比未经处理的小鼠更健康。

[0014] 图 4 示出了在 EAE 影响的 C57BL/6 小鼠中,通过 pMOG₃₈₋₄₉/IA^b 包被的 NP 的同源自身调节性 CD4⁺T 细胞的系统性扩增。在这个模型中的扩增幅度比得上在用 1 型糖尿病相关的 pMHC II 类包被 NP 处理的 NOD 小鼠中所见到的 (参见,例如美国专利 No :8,354,110,其通过引用以其整体并入本文)。

[0015] 图 5 描绘了未经处理之小鼠的脊髓。未经处理的小鼠表现出白质显著的脱髓鞘和致密的单核细胞浸润。

[0016] 图 6 描绘了经 pMOG₃₈₋₄₉/IA^b-NP 处理的小鼠的脊髓。pMHC-NP 处理的小鼠具有显著更少的脱髓鞘和单核细胞浸润。

[0017] 图 7 示出 2 只未经处理的 EAE 小鼠脊髓边缘的代表性实例。

[0018] 图 8 示出了 2 只经 pMOG₃₈₋₄₉/IA^b-NP 处理的 EAE 小鼠脊髓边缘的代表性实例。pMHC-NP 处理的小鼠具有显著更少的脱髓鞘以及更低的单核细胞浸润。

[0019] 图 9 示出了 pMOG₃₆₋₅₅-I-A β (b)-C-Jun 构建体 (SEQ ID NO :2) 的蛋白质和 DNA 序列。在融合蛋白中,序列的各组件是 HA 前导序列 (下划线),接着是 **pMOG₃₈₋₄₉ 肽序列** (双下划线), **I-Aβ (b)** (虚线下划线) 和 C-Jun (阴影) 序列。未突出显示 GS 接头。

[0020] 图 10 是含有抗原的载体的 DNA 图谱 (DNA map)。将编码 HA 前导序列-I-A α (b)-C-Fos-BirA-His×6 融合蛋白 (284 个氨基酸) 的 DNA 构建体位点克隆到 pMT/V5 苍蝇细胞表达载体的 NcoI (854) 至 XbaI (1711) 之间。所述融合蛋白包含 I-A α (d) (195 个氨基酸),接着是 C-Fos, GS 接头 (6 个氨基酸),然后是 BirA 序列和 6×His。

[0021] 图 11 示出了以高密度 (约 5×10¹³/mL) 浓缩的和单分散之 pMHC 包被的金 NP (约 14nm) 的代表性 TEM 图像。放大率 :50,000×。

[0022] 图 12 示出了 pMHC(GNP) 剂量和 pMHC 效价 (valency) 对 pMHC- 包被的 NP 的激动性质的作用。该图比较了通过响应两种不同的 pMHC-NP 样品 (两者均由直径 14nm 的约 2×10^{13} 个 NP/mL 组成) 之同源的 8.3-CD8+T 细胞分泌的 IFN γ 的量。Au-022410 和 Au-21910 分别携带约 250 个 pMHC/NP 和约 120 个 pMHC/NP。Au-011810-C 携带约 120 个对照的 pMHC/NP。

[0023] 图 13 证明了作为 pMHC 效价之函数的 8.3-CD8+T 细胞的 pMHC-NP 诱导的 IFN γ 分泌。用逐渐增加数目的以三种不同 IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d 效价包被的 NP 培养 8.3-CD8+T 细胞 (2.5×10^5 个细胞 /ml)。IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 包含抗原肽 VYLKTNVFL。

[0024] 图 14 示出 pMHC-NP 较低的激动活性可通过增加 pMHC-NP 的密度进行补偿,但仅在 pMHC 效价的阈值以上。图以一系列的 NP 密度比较了三种不同的 pMHC-NP 制备物 (携带三种不同效价的 pMHC) 的激动活性。需要注意的是,携带 8 个 pMHC 的 NP,不同于携带 11 个 pMHC 的那些,与每个 NP 携带 11 个和 54 个 pMHC 的 NP 相比,即使在高 pMHC-NP 密度下也不能充分地触发 IFN γ 的分泌。

[0025] 图 15 示出了作为总 pMHC 输入之函数的 pMHC 效价阈值对 pMHC-NP 的激动性质的作用。

[0026] 图 16 示出了 pMHC 效价对以较大氧化铁 NP 芯产生的 pMHC-NP 之激动活性的作用。

[0027] 图 17 示出了尺寸对激动活性的作用。Au-0224-15 是包被有相对低 pMHC 效价但以高密度制备的 14nmGNP ;Au-0323-40 是包被有高 pMHC 效价但以低密度制备的 40nmGNP。Au-0224-15 比 Au-0323-40 样品具有更优良的激动活性。

[0028] 图 18 示出了保护性 PEG 对 pMHC-GNP 功能的作用。Au-021910 由以 2kD 的巯基 -PEG 保护的约 2×10^{13} 个直径 14nmGNP/mL 组成并包被有约 120pMHC/GNP。Au-012810GNP (也是约 2×10^{13} 个 14nm GNP/mL) 由 5kD 的巯基 -PEG 保护并包被有约 175pMHC/GNP。样品 Au-021910 具有更优良的激动活性。

[0029] 图 19 示出了 NRP-V7/Kd 包被的金 NP 对 NRP-V7 反应性的 CD8+T 细胞的有效扩增。使用携带 25 μ g pMHC (150pMHC/NP) 的 3×10^{12} NP (约 10nm 大小)。一周两次注射 NRP-V7/Kd 包被的金 NP 持续 5 周来处理糖尿病前期之 10 周龄的 NOD 小鼠。TUM/Kd 四聚体是阴性对照。图中每一列对应于一只不同的小鼠。

[0030] 图 20 描绘了用 pMHC 包被的 NP 处理之小鼠中同源 CD8+T 细胞的大量扩增。使用携带 25 μ g pMHC (150pMHC/NP) 的 3×10^{12} IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d-NP (约 10nm 大小)。上图 :4 次给药后处死之小鼠的图。下图 :10 次注射后两种不同小鼠的图 (仅血液)。

[0031] 图 21 证明 pMHC I 类 -NP 复合物的相同原理适用于 pMHC II 类包被的 NP (参见图 18)。需要注意的是,包被有 17 个 pMHC 的 pMHC II 类 pMHC-NP (BDC 2.5mi 包被的 6-8nm 纳米颗粒 (SFPZ)) 比每个 NP 包被有 53 个 pMHC 的 PFM (20-25nm) 颗粒具有更高的激动活性。这证实了对于 I 类 -pMHC-NP 和 II 类 -pMHC-NP 二者,重要的不是 pMHC 的绝对效价而是 pMHC 的密度。正如通过作为 pMHC 密度之函数的 pMHC-NP 诱导的 CD4+T 细胞的 IFN γ 分泌的增加所证明的那样。

[0032] 发明详述

[0033] 应当理解的是,本发明并不限于所述的具体实施方案,因为其当然可以变化。还应当理解的是,本文所用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,而并不旨在进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书来限定。

[0034] 必须注意的是,除非上下文另有明确说明,否则如本文和在所附权利要求书中所使用的没有数词限定的表述包括复数形式。因此,例如,提及“一个 / 种赋形剂”包括多个 / 种赋形剂。

[0035] I. 定义

[0036] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属技术领域普通技术人员通常所理解的具有相同的含义。如本文所用的下列术语具有如下含义。

[0037] 如本文所用的术语“包括”或“包含”意指组合物和方法包括所列举的要素但不排除其他要素。为了陈述的目的,当使用“基本上由 组成”来限定组合物和方法时,应指排除了对组合物有任何本质重要性的其他要素。因此,基本上由如本文所限定的要素组成的组合物将并不排除对所要求保护的发明的基本特征和新特征不具有实质性影响的其他材料或步骤,例如用于治疗或预防多发性硬化的组合物。“由 组成”应指排除多于痕量元素的其他成分和基本方法步骤。由这些过渡术语中每个所定义的实施方案都在本发明的范围之内。

[0038] “生物相容的”意指递送系统的组分将不会导致组织损伤或对入生物学系统的损伤。为了赋予生物相容性,将优先使用在人类中具有安全使用历史的或具有 GRAS (Generally Accepted As Safe, 一般认为是安全的) 状态的聚合物和赋形剂。生物相容性意指在组合物中使用的成分和赋形剂最终将是“生物可吸收的”或被身体清除而对身体无副作用。对于生物相容的且被视为无毒的组合物,其一定不会引起对细胞的毒性。类似地,“生物可吸收的”指的是由在体内经过一段时间进行生物吸收的材料制成的纳米颗粒,使得在患者中避免了材料的长期积累。在一个优选的实施方案中,生物相容的纳米颗粒是经过少于 2 年,优选少于 1 年和甚至更优选少于 6 个月的一段时间而被生物吸收。生物吸收的速率与颗粒的尺寸、所使用的材料以及本领域技术人员认识到的其他因素有关。可使用可生物可吸收、生物相容材料的混合物以形成本发明中使用的纳米颗粒。在一个实施方案中,可将氧化铁和生物相容的生物可吸收的聚合物相组合。例如,可将氧化铁和 PGLA 组合以形成纳米颗粒。

[0039] 抗原-MHC-纳米颗粒复合物指的是在表面(例如生物相容的生物可降解的纳米球)上呈递肽、碳水化合物、脂质或者抗原分子或蛋白质(即,自身肽或自身抗原)的其他抗原区段、片段或表位。本文使用的“抗原”指的是在对象中可诱导免疫应答或扩增抗病原体的细胞之分子的全部、部分、片段或区段。

[0040] 当在数值名称(例如温度、时间、数量和浓度,包括范围)之前使用术语“约”时,表示可在(+)或(-)10%、5%或1%变化的近似值。

[0041] “模拟物”是给定的配体或肽的类似物,其中所述类似物基本上类似于所述配体。“基本上类似”意指除了模拟物具有一个或更多个官能团或修饰(其共同占小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%或小于约5%的配体分子量)之外,所述类似物具有类似于配体的结合谱。

[0042] 多发性硬化(MS)也被称为“播散性硬化”、“播散性脑脊髓炎”或“变态性脑脊髓炎”。MS是一种炎性疾病,其中围绕脑和脊髓的轴突的脂肪髓鞘被破坏从而导致脱髓鞘和形成疤痕以及广谱的体征和症状。多发性硬化相关病症包括例如视神经脊髓炎(NMO)、葡萄膜炎、神经性疼痛(neuropathic pain)等。

[0043] “髓鞘少突胶质细胞糖蛋白”(MOG) 是一种被认为在中枢神经系统 (CNS) 中神经髓鞘形成的过程中重要的糖蛋白。在人类中, 该蛋白质是由 MOG 基因编码的。推测其作为必要的“粘附分子”为髓鞘提供结构完整性并且已知在少突胶质细胞的后期产生。GenBank 登录号 NM_001008228. 2 和 NP_001008229. 1 分别代表了 MOG 基因的 mRNA 和蛋白质序列。与这些 GenBank 登录号中每一个相关的序列通过引用并入用于所有目的。

[0044] 术语“抗病原体的自身反应性 T 细胞”指的是具有抗病原体性质的 T 细胞 (即对抗 MS 的 T 细胞)。这些 T 细胞可包括抗炎性 T 细胞、效应 T 细胞、记忆 T 细胞、低亲和力 T 细胞、辅助性 T 细胞、自身调节性 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、自然杀伤 T 细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞等。

[0045] 术语“抗炎性 T 细胞”指的是促进抗炎应答的 T 细胞。T 细胞的抗炎功能可通过抗炎蛋白、细胞因子、趋化因子等的产生和 / 或分泌来实现。抗炎蛋白还意在涵盖抑制免疫应答的抗增殖信号。抗炎蛋白包括 IL-4、IL-10、IL-13、IFN- α 、TGF- β 、IL-1ra、G-CSF 以及 TNF 和 IL-6 的可溶性受体。在某些实施方案中, 施用抗原-MHC 纳米颗粒复合物导致有效治疗多发性硬化之抗炎性 T 细胞的扩增和 / 或诱导增加。因此, 本公开内容的多个方面涉及用于在患者中治疗与 MS 相关炎症的方法, 所述方法包括向该患者施用抗原-MHC- 纳米颗粒复合物, 所述方法基本上由向该对象施用抗原-MHC- 纳米颗粒复合物组成, 或进一步所述方法由向该对象施用抗原-MHC- 纳米颗粒复合物组成, 其中所述抗原是多发性硬化相关抗原。

[0046] 术语“IL-10”或“白介素-10”指的是由 IL-10 基因所编码的细胞因子。所述 IL-10 序列由 GenBank 登录号: NM_000572. 2 (mRNA) 和 NP_000563. 1 (蛋白) 所表示。

[0047] 术语“TGF- β ”或“转化生长因子 β ”指的是可具有抗炎作用的蛋白质。TGF- β 是一种分泌蛋白, 其存在被称为 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 的至少三种同工型。这也是 TGF- β 1 的原名, 其是这个家族的创始成员 (founding member)。TGF- β 家族是被称为转化生长因子 β 超家族的蛋白质超家族的一部分, 其包括抑制素、激活素、抗苗勒管激素 (anti-müllerian hormone)、骨形态发生蛋白、生物皮肤生长因子 (decapentaplegic) 和 Vg-1。

[0048] “有效量”是足以达到预期目的的量, 所述预期目的的非限制性实例包括: 免疫应答的起始、免疫应答的调节、炎症反应的抑制和 T 细胞活性或 T 细胞群的调节。在一个方面, 有效量是作用以实现所述治疗目的的量, 例如, 治疗有效量。如本文详细描述, 有效量或剂量取决于目的、组合物和组分, 并且可根据本公开内容来确定。

[0049] 当在权利要求书和 / 或说明书中与术语“包括”一起使用时, 词“一种”或“一个”的使用可意指“一个 / 种”, 但其也与“一个 / 种或更多个 / 种”、“至少一个 / 种”和“一个 / 种或多于一个 / 种”相一致。

[0050] 本文的“纳米球”、“NP”或“纳米颗粒”意指适当时, 向对象、细胞样品或组织样品单个或多个施用的小离散颗粒。在某些实施方案中, 纳米颗粒基本上为球形。在某些实施方案中, 所述纳米颗粒不是脂质体或病毒颗粒。在另一些实施方案中, 纳米颗粒是固体。如本文所用的术语“基本上为球形”意指该颗粒的形状不偏离球体超过约 10%。本发明多种已知的抗原或肽复合物可应用于所述颗粒。本发明的纳米颗粒的尺寸为约 1nm 至约 1 μ m, 且优选地, 约 1nm 至约 100nm, 并且在一些方面, 当意指多个纳米颗粒时, 指的是多个纳米颗

粒的平均直径或中值直径。例如,可通过分馏过程(由此使得较大的颗粒沉降在水性溶液中)从而获得较小的纳米尺寸颗粒。然后,通过本领域技术人员已知的方法回收溶液的上面部分。此上面部分被富集在较小尺寸的颗粒中。可重复该过程直到产生所期望的平均尺寸。

[0051] 在权利要求书中使用术语“或”用于指“和/或”,除非明确说明仅指替代方案或者替代方案是互相排斥的,尽管公开内容支持所指的仅仅是替代方案以及“和/或”的定义。

[0052] 如本文所用的短语“免疫应答”或其等同表达“免疫学应答”指的是细胞介导的应答(由抗原特异性 T 细胞或其分泌产物介导)的产生。通过呈递与 I 类或 II 类 MHC 分子缔合的多肽表位以激活抗原特异性 CD4⁺辅助 T 细胞和/或 CD8⁺细胞毒性 T 细胞而引起细胞免疫应答。所述应答还可包括激活其他组分。

[0053] 如本文所使用的术语“炎性应答”和“炎症”表示个体血管组织对有害刺激(例如病原体、受损细胞或刺激物)的复杂的生物应答,并包括分泌细胞因子,更特别为促炎性细胞因子,即由激活的免疫细胞主要产生并参与炎症反应放大的细胞因子。示例性的促炎性细胞因子包括但不限于:IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-17、IL21、IL23 和 TGF- β 。示例性的炎症包括急性炎症和慢性炎症。急性炎症表示以由于通过血浆和白细胞的组织浸润引起的炎症的经典体征(肿胀、发红、疼痛、发热和功能丧失)为特征的短期过程。只要存在损伤刺激通常就会发生急性炎症,并且一旦所述刺激被移除、破坏或由瘢痕(纤维化)隔开(wall of)时则停止。慢性炎症表示以并发的活跃性炎症、组织破坏并且试图修复为特征的病症。慢性炎症并不以上面列出的急性炎症的经典体征为特征。相反地,慢性发炎的组织以单核免疫细胞(单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞)的浸润、组织破坏和试图愈合(其包括血管发生和纤维化)为特征。从在本公开内容的意义上说,可通过影响,具体地是抑制形成个体中炎症相关的复杂生物响应之事件的任意一项来抑制炎症。

[0054] 术语“表位”和“抗原决定簇”可互换使用以指抗原上 B 和/或 T 细胞应答或识别的位点。B 细胞表位可以由蛋白质的连续氨基酸或通过蛋白质之三级折叠并列的不连续氨基酸二者形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保留,然而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理后丧失。在一个独特的空间构象中,表位一般包含至少 3 个氨基酸,更通常地,至少包含 5 个或 8-10 个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括,例如,x-射线晶体学和 2 维核磁共振。参见,例如 Glenn E. Morris, Epitope Mapping Protocols (1996)。T 细胞识别 CD8 细胞的约 9 个氨基酸的连续表位或 CD4 细胞的约 13-15 个氨基酸的连续表位。识别表位的 T 细胞可通过测量抗原依赖性增殖的体外测定法来鉴定,如通过由应答表位的 T 细胞致敏的³H-胸苷的掺入(Burke 等, J. Inf. Dis., 170:1110-1119, 1994),通过抗原依赖性杀伤(细胞毒性 T 淋巴细胞测定, Tigges 等, J. Immunol., 156(10):3901-3910, 1996)或通过细胞因子的分泌来确定。可通过增殖测定(CD4⁺T 细胞)或 CTL(细胞毒性 T 淋巴细胞)测定来确定细胞介导的免疫应答的存在。

[0055] 任选地,抗原或优选抗原的表位可以化学缀合为或表达为与其他蛋白(例如 MHC 和 MHC 相关蛋白)的融合蛋白。

[0056] 如本文所使用的术语“患者”和“对象”用作同义词并且指的是哺乳动物。在一些实施方案中,患者是人。在另一些实施方案中,患者是实验室常用的哺乳动物,例如小鼠、大鼠、猴、犬、猫、牛、马或绵羊。

[0057] 如在本申请中使用的术语“多核苷酸”指的是重组的或已从总基因组核酸中分离出的核酸分子。包括在术语“多核苷酸”中的是：寡核苷酸（长度为 100 个残基或更少的核酸），重组载体包括例如质粒、黏粒、噬菌体、病毒等。在某些方面，多核苷酸包括基本上从其天然存在的基因或蛋白编码序列分离出的调控序列。多核苷酸可以是 RNA、DNA、其类似物或其组合。编码多肽的全部或一部分的核酸可包含以下长度的编码该多肽的全部或一部分的连续核酸序列：10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000 或更多个核苷酸、核苷或碱基对。还可预期的是，来自给定物种的特定多肽可由包含天然变体的核酸来编码，所述天然变体具有略微不同的核酸序列，但是，尽管如此，其编码相同的或基本上相似的蛋白质、多肽或肽。

[0058] 多核苷酸由四种核苷酸碱基的特定序列构成：腺嘌呤 (A)；胞嘧啶 (C)；鸟嘌呤 (G)；胸腺嘧啶 (T)；并且当多核苷酸是 RNA 时，胸腺嘧啶为尿嘧啶 (U)。因此，术语“多核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母表示。这种字母表示可被输入到具有中央处理单元的计算机数据库中，并用于生物信息学应用，例如功能基因组学和同源性检索。

[0059] 本文关于核酸（例如 DNA 或 RNA）所使用的术语“分离的”或“重组的”指的是分别从存在于大分子以及多肽之天然来源中的其他 DNA 或 RNA 分离的分子。术语“分离的或重组的核酸”意指包括不作为天然片段存在和在自然状态下找不到的核酸片段。术语“分离的”在本文也用于指从其他细胞蛋白分离的多核苷酸、多肽和蛋白质，并且意指涵盖纯化的和重组的多肽二者。在另一些实施方案中，术语“分离的或重组的”意指从组分、细胞等分离，其中细胞、组织、多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段在自然状态通常相关联。例如，分离的细胞是从不同表型或基因型的组织或细胞分离的细胞。分离的多核苷酸是从 3' 和 5' 连续核苷酸分离的，其通常与其自然或天然环境（例如在染色体上）相关联。对于本领域技术人员明显的是，非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段，不需要“分离”以使它与其自然存在的对应物区别。

[0060] 多核苷酸或多核苷酸区（或者多肽或多肽区）与另一序列具有一定百分比（例如 80%、85%、90% 或 95%）的“序列同一性”意指当比对时，在比较这两个序列时，所述百分比的碱基（或氨基酸）是相同的。可使用本领域中已知的软件程序来确定比对和百分比同源性或序列同一性，例如在 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 等，编辑 1987) 增刊 30, 7.7.18 部分，表 7.7.1 中所述的那些。优选地，使用默认参数进行比对。一种优选的比对程序是 BLAST，使用默认参数。特别地，优选的程序是 BLASTN 和 BLASTP，使用以下默认参数：遗传密码 = 标准；过滤 = 无；链 = 两者；截断 = 60；预期 = 10；矩阵 = BLOSUM62；说明 = 50 个序列；排序方式 = 高分；数据库 = 非冗余，GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详细信息可在以下互联网址获得：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0061] 无需明确叙述将可推断出,除非另有意图,否则当本发明涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,这些物质的等同物或生物学等同物均意在本发明的范围之内。当指参照蛋白质、抗体、片段、多肽或核酸时,如本文所用的术语“其生物学等同物”意在与“其等同物”同义,意指具有最低的同源性但同时仍保持有所需结构或功能的那些。除非在本文中有明确叙述,否则可预期的是,本文提及的任何多核苷酸、多肽或蛋白质包括其等同物。在一个方面,等同的多核苷酸是指在严格条件下与用于本文所述方法的所述多核苷酸或多核苷酸的互补序列杂交的多核苷酸。在另一方面,等同的抗体或抗原结合多肽意指与参照抗体或抗原结合片段以至少 70%、或者至少 75%、或者至少 80%、或者至少 85%、或者至少 90%、或者至少 95% 的亲合力或更高的亲合力结合的抗体或抗原结合多肽。在另一个方面,其等同物在竞争性 ELISA 测定中与抗体或抗原结合片段竞争性结合到其抗原。在另一方面,等同物意指与参照蛋白质、多肽或核酸具有至少约 80% 的同源性或同一性,或者至少约 85%、或者至少约 90%,或者至少约 95%、或者 98% 百分比的同源性或同一性,并显示出基本上等同的生物学活性。

[0062] “杂交”指的是其中一个或更多个多核苷酸反应以形成通过核苷酸残基碱基之间的氢键合稳定之复合物的反应。可通过 Watson-Crick 碱基配对、Hoogsteen 结合或任何其他序列特异性的方式发生氢键合。所述复合物可包括形成双链体结构的双链,形成多链复合物的三链或更多条链,单个的自杂交链,或者这些的任意组合。杂交反应可构成更广泛过程中的一步,例如 PC 反应的起始,或者通过核酶的多核苷酸酶促切割。

[0063] 严格的杂交条件的实例包括:约 25°C 至约 37°C 的孵育温度;约 6×SSC 至约 10×SSC 的杂交缓冲液浓度;约 0% 至约 25% 的甲酰胺浓度;以及约 4×SSC 至约 8×SSC 的洗涤溶液。中度杂交条件的实例包括:约 40°C 至约 50°C 的孵育温度;约 9×SSC 至约 2×SSC 的缓冲液浓度;约 30% 至约 50% 的甲酰胺浓度;以及约 5×SSC 至约 2×SSC 的洗涤溶液。高度严格条件的实例包括:约 55°C 至约 68°C 的孵育温度;约 1×SSC 至约 0.1×SSC 的缓冲液浓度;约 55% 至约 75% 的甲酰胺浓度;以及约 1×SSC、0.1×SSC 或去离子水的洗涤溶液。一般而言,杂交孵育时间是 5 分钟至 24 小时,具有 1、2 或多个洗涤步骤并且洗涤孵育时间为约 1、2 或 15 分钟。SSC 是 0.15M 的 NaCl 和 15mM 的柠檬酸盐缓冲液。可以理解的是可采用使用其它缓冲系统之 SSC 的等同物。

[0064] “同源性”或“同一性”或“相似性”指的是两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可通过比较各序列的一个位置来确定,为了比较的目的,可对其进行比对。当比较序列中的一个位置由相同的碱基或氨基酸占据时,则该分子在该位置上是同源的。序列之间的同源性程度是序列共有的匹配数目和同源位置数的函数。“无关的”或“非同源的”序列与本发明的序列之一共有小于 40% 的同一性,或者小于 25% 的同一性。

[0065] “同源性”或“同一性”或“相似性”也可指在严格条件下杂交的两个核酸分子。

[0066] 如本文所用的术语“治疗”等在本文用来指获得所需的药理学和 / 或生理学效果。所述效果可以是在病症和 / 或由病症引起的副作用的部分或完全治愈方面的治疗。在一个方面,治疗表示使用已建立之标准的疾病体征的减少。

[0067] 如本文所用的术语“多发性硬化相关病症”意指与 MS 的易感性或与 MS 共同呈现出的病症。这样的非限制性实例包括视神经脊髓炎 (NMO)、葡萄膜炎、神经性疼痛硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、硬化播散系统性硬化 (sclerosis disseminate systemic sclerosis)、

脊髓视觉 MS (spino-optical MS)、原发性进行性 MS (PPMS) 和复发缓解型 MS (RRMS)、进行性系统性硬化和共济失调硬化。

[0068] 最近鉴定由基因 (位于染色体 2q28-32 上, 其重叠了 T1D 易感位点, IDDM7 (2q31)) 编码的 IGRP 为与人 T1D 潜在相关的 β 细胞自身抗原。人 IGRP 的两种 HLA-A * 0201 结合表位 (hIGRP₂₂₈₋₂₃₆ 和 hIGRP₂₆₅₋₂₇₃) 是由来自鼠类表达 HLA-A * 0201 转基因的 MHC I 类 - 缺陷 NOD 小鼠之胰岛相关的 CD8+ 细胞所识别。IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 包含抗原肽 VYLKTNVFL。

[0069] 预防意指在易患病症或易受影响的系统或对象中体内或体外预防所述病症或影响。

[0070] “组合物”意指活性剂与其他化合物或组合物 (惰性的 (例如, 可检测的试剂或标记) 或活性的 (例如佐剂)) 的组合。在某些实施方案中, 组合物不包含佐剂。

[0071] “药物组合物”意在包括活性剂与惰性或活性的载体的组合, 使得组合物适合于体外、体内或离体的诊断或治疗用途。

[0072] 本文中使用的术语“功能上等价的密码子”指的是编码相同氨基酸的密码子, 例如精氨酸或丝氨酸的 6 个密码子, 并且也指编码生物学上等价之氨基酸的密码子 (参见下表)。

[0073] 密码子表

[0074]

氨基酸			密码子
丙氨酸	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
半胱氨酸	Cys	C	UGC UGU
天冬氨酸	Asp	D	GAC GAU
谷氨酸	Glu	E	GAA GAG
苯丙氨酸	Phe	F	UUC UUU
甘氨酸	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
组氨酸	His	H	CAC CAU
异亮氨酸	Ile	I	AUA AUC AUU
赖氨酸	Lys	K	AAA AAG
亮氨酸	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
甲硫氨酸	Met	M	AUG
天冬酰胺	Asn	N	AAC AAU
脯氨酸	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA CAG
精氨酸	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
丝氨酸	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
苏氨酸	Thr	T	ACA ACC ACG ACI
缬氨酸	Val	V	GUA GUC GUG GUU
色氨酸	Trp	W	UGG
酪氨酸	Tyr	Y	UAC UAU

[0075] 如本文所使用的“蛋白质”或“多肽”或“肽”指的是包含至少 5 个氨基酸残基的分子。

[0076] 下面的详细描述将使得发明的其他目的、特征和优点变得明显。然而, 应当理解的

是,详细描述和具体实施例虽然说明了本发明的一些具体实施方案,但仅通过举例说明的方式给出,因为从该详细描述中,在本发明的精神和范围内所做出的多种变化和修改对于领域的技术人员是显而易见的。

[0077] 描述性实施方案

[0078] 本公开内容是基于偶联在 MS- 相关抗原-MHC 复合物上的纳米颗粒减少 MS 或脑脊髓炎 (EAE) 之症状的发现 (实施例 1)。

[0079] II. 方法

[0080] 如本文所述的方法包括向细胞、组织或对象施用有效量的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物,或者基本上由向细胞、组织或对象施用有效量的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物组成,或者进一步由向细胞、组织或对象施用有效量的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物组成,以用于以下目的:(1) 抗病原体(或抗-MS)的自身反应性 T 细胞群的扩增和/或产生;和/或(2) 在患有多发性硬化或多发性硬化相关病症的患者中或者易患多发性硬化或多发性硬化相关病症的患者中,治疗或预防多发性硬化或多发性硬化相关病症,而在一个方面不损害全身免疫。在复合物中使用的抗原是多发性硬化相关抗原。确定和监测治疗的方法是本领域已知的并在本文中做了简要描述。当体外递送时,通过任何适当的方法(例如通过施用至细胞或组织培养基)而使组合物与组织或细胞相接触来进行施用,并且这可用作筛选确定疗法是否适合于个人或筛选用作替换或与所公开的组合物组合使用的替代疗法。当体内施用时,通过全身或局部施用进行施用。在体内,在向人施用之前,可将所述方法在非人动物上进行实践以筛选用作替换或与所公开的组合物组合使用的替代疗法。在人或非人哺乳动物中,它们在治疗疾病或病症中也是有用的。

[0081] 所述方法需要施用有效量的复合物,所述复合物包含纳米颗粒、MHC 蛋白和多发性硬化相关抗原,所述复合物基本上由纳米颗粒、MHC 蛋白和多发性硬化相关抗原组成,或者所述复合物进一步由纳米颗粒、MHC 蛋白和多发性硬化相关抗原组成。

[0082] 抗原-MHC- 纳米颗粒复合物的 MHC 可以是 MHC I、MHC II 或非典型性 MHC。MHC 蛋白是本文中所述的。在一个实施方案中,抗原-MHC- 纳米颗粒复合物的 MHC 是 I 类 MHC。在另一个实施方案中,MHC 是 II 类 MHC。在另一些实施方案中,抗原-MHC- 纳米颗粒复合物的 MHC 组分是如本文所述的 II 类 MHC 或非典型 MHC 分子。在一个方面,所述抗原包含多肽 GWYRSPFSRVVH(SEQ ID NO:1) 或 SEQ ID NO:1 的等同物,或者所述抗原基本上由多肽 GWYRSPFSRVVH(SEQ ID NO:1) 或 SEQ ID NO:1 的等同物组成,或者所述抗原进一步由多肽 GWYRSPFSRVVH(SEQ ID NO:1) 或 SEQ ID NO:1 的等同物组成。可用于本发明的另一些抗原包括多肽,所述多肽包含以下多肽、或者基本上由以下多肽组成,或者进一步由以下多肽组成:MOG₃₅₋₅₅,MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK(SEQ ID No:4);MOG₃₆₋₅₅,EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK(SEQ ID No:5);MAG₂₈₇₋₂₉₅,SLLLELEEVEV(SEQ ID No:6);MAG₅₀₉₋₅₁₇,LMWAKIGPV(SEQ ID No:7);MAG₅₅₆₋₅₆₄,VLFSSDFRI(SEQ ID No:8);MBPI₁₁₀₋₁₁₈,SLSRFSWGA(SEQ ID No:9);MOG₁₁₄₋₁₂₂,KVEDPFYVW(SEQ ID No:10);MOG₁₆₆₋₁₇₅,RTFDPHFRLRV(SEQ ID No:11);MOG₁₇₂₋₁₈₀,FLRVPCKWI(SEQ ID No:12);MOG₁₇₉₋₁₈₈,KITLFIIVPV(SEQ ID No:13);MOG₁₈₈₋₁₉₆,VLGPLVALI(SEQ ID No:14);MOG₁₈₁₋₁₈₉,TLFVIVPVL(SEQ ID No:15);MOG₂₀₅₋₂₁₄,RLAGQFLEEL(SEQ ID No:16);PLP₈₀₋₈₈,FLYGALLLA(SEQ ID No:17),或其各自的等同物或其组合。

[0083] 纳米颗粒的尺寸可以是约 1nm 到约 1 μm 。在某些实施方案中,纳米颗粒的直径小于约 1 μm 。在另一些实施方案中,纳米颗粒的直径小于约 500nm、小于约 400nm、小于约 300nm、小于约 200nm、小于约 100nm 或小于约 50nm。在另一些实施方案中,纳米颗粒的直径是约 1nm 至约 10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、40nm、50nm、75nm 或 100nm。在一些具体的实施方案中,纳米颗粒为约 1nm 至约 100nm、约 1nm 至约 50nm、约 1nm 至约 20nm 或约 5nm 至约 20nm。

[0084] 复合物的尺寸可以是约 5nm 至约 1 μm 。在某些实施方案中,复合物的直径小于约 1 μm 或者小于 100nm。在另一些实施方案中,复合物的直径小于约 500nm、小于约 400nm、小于约 300nm、小于约 200nm、小于约 100nm 或小于约 50nm。在另一些实施方案中,复合物为约 10nm 至约 50nm、或约 20nm 至约 75nm、或约 25nm 至约 60nm、或约 30nm 至约 60nm 或在在一个方面为约 55nm。

[0085] 申请人已经发现,纳米颗粒上的抗原-MHC 复合物的密度产生了治疗益处。因此,如本文所公开的抗原-MHC 纳米颗粒复合物可将密度限定在纳米颗粒的每 100nm² 的面积上约 0.05 个 MHC 分子的范围内,假定至少为 2 个 MHC、或者至少为 8 个、或者至少为 9 个、或者至少为 10 个、或者至少为 11 个、或者至少为 12 个 MHC 复合至纳米颗粒。在一个方面,复合物具有的 MHC 密度为每 100nm² 约 0.01 个 MHC (0.05MHC/100nm²) 至约 30 个 MHC/100nm², 或者 0.1 个 MHC/100nm² 至约 25 个 MHC/100nm², 或者约 0.3 个 MHC/100nm² 至约 25 个 MHC/100nm², 或者约 0.4 个 MHC/100nm² 至约 25 个 MHC/100nm², 或者约 0.5 个 MHC/100nm² 至约 20 个 MHC/100nm², 或者约, 或者约 0.6 个 MHC/100nm² 至约 20 个 MHC/100nm², 或者约 1.0 个 MHC/100nm² 至约 20 个 MHC/100nm², 或者约 5.0 个 MHC/100nm² 至约 20 个 MHC/100nm², 或者为约 10.0 个 MHC/100nm² 至约 20 个 MHC/100nm², 或者为约 15 个 MHC/100nm² 至约 20 个 MHC/100nm², 或者为至少约 0.5 个 MHC/100nm², 或者至少约 1.0 个 MHC/100nm², 或者至少约 5.0 个 MHC/100nm², 或者至少约 10.0 个 MHC/100nm², 或者至少约 15.0 个 MHC/100nm²。在一方面,当 9 个或至少 9 个 MHC 复合至纳米颗粒时,密度范围为约 0.3 个 MHC/100nm² 至约 20 个 MHC/100nm²。

[0086] 在其方法的一个方面,提供了用于在有此需要的患者中积累抗炎性 T 细胞的方法。在另一个实施方案中,T 细胞是 CD4+ 或 CD8+T 细胞。在一个相关实施方案中,T 细胞分泌 IL-10 或 TGF β 。所述方法包括向有此需要的患者施用有效量的如本文所述的抗原-MHC 纳米颗粒复合物,所述方法基本上由向有此需要的患者施用有效量的如本文所述的抗原-MHC 纳米颗粒复合物组成,或者所述方法进一步由向有此需要的患者施用有效量的如本文所述的抗原-MHC 纳米颗粒复合物组成。

[0087] 在一个实施方案中,本文所述的方法用于治疗多发性硬化相关病症。所述方法包括向有此需要的患者施用有效量的如本文所述的抗原-MHC 纳米颗粒复合物,所述方法基本上由向有此需要的患者施用有效量的如本文所述的抗原-MHC 纳米颗粒复合物组成,或者所述方法进一步由向有此需要的患者施用有效量的如本文所述的抗原-MHC 纳米颗粒复合物组成。在一个相关的实施方案中,多发性硬化相关病症选自视神经脊髓炎 (NMO)、葡萄膜炎以及神经性疼痛。

[0088] 这里描述了关于体外和体内施用模式的细节。

[0089] III. 抗原-MHC- 纳米颗粒复合物

[0090] 某些方面涉及用于生产特异性治疗 MS 而不损害全身免疫之 MS 抗原特异性药物的方法。实施例 2 描述了抗原-MHC-纳米颗粒复合物的产生。用于本发明的抗原-MHC-纳米颗粒复合物包含 MS 相关抗原。

[0091] A. 多肽和多核苷酸

[0092] 另一些方面涉及包含以下、或者基本上由以下组成或者进一步由以下组成之分离的或纯化的多肽:SEQ ID No. 1 的氨基酸序列,或者与 SEQ ID No. 1 具有至少约 80%序列同一性、或者至少 85%、或者至少 90%、或者至少 95%、或者至少 98%序列同一性的多肽,或者由与编码 SEQ ID No. 1 的多核苷酸或其互补序列具有约 80%序列同一性、或者至少 85%、或者至少 90%、或者至少 95%、或者至少 98%序列同一性的多核苷酸所编码的多肽,或者在中度至高度严格的条件下与编码 SEQ ID No. 1 的多核苷酸或其互补序列杂交的多核苷酸所编码的多肽。还提供了编码以下多肽的分离的和纯化的多核苷酸:对应于 SEQ ID No. 1 的多肽,与 SEQ ID No. 1 具有至少约 80%序列同一性,或者与 SEQ ID No. 1 或其等同物具有至少 85%、或者至少 90%、或者 95%、或者至少 98%序列同一性的多肽,或者在严格条件下与所述多核苷酸、其等同物或其互补序列杂交的多核苷酸以及由这些多核苷酸编码的分离的或纯化的多肽。所述多肽和多核苷酸可与和自然界无关的非天然存在的物质相组合,例如,本领域已知的并如本文所述的载体(carrier)、可药用载体、载体(vector)和 MHC 分子、纳米颗粒。

[0093] 抗原包括来源于抗原物种的区段、片段和其他分子,包括但不限于:肽、碳水化合物、脂质或通过本发明的典型和非典型 MHC 分子呈递的其他分子,其通常复合至或有效地偶联至 MHC 分子或其衍生物。由 T 淋巴细胞识别的抗原是主要组织相容性复合体(MHC)限制的。只有当给定的 T 淋巴细胞与特定的 MHC 分子结合时,其才识别抗原。一般而言,仅在自身-MHC 分子存在下刺激 T 淋巴细胞而且当抗原的片段与自身 MHC 分子结合时,抗原才被识别。MHC 限制性限定了 T 淋巴细胞在抗原识别和 MHC 分子与其抗原片段结合方面的特异性。在一些具体的方面,某些抗原将与其衍生的某些 MHC 分子或多肽进行配对。

[0094] 如本文所使用的术语“有效地偶联”或“包被的”指的是这种情况,其中在靶位点与例如免疫细胞结合之前,单个多肽(例如 MHC)和抗原(例如肽)组分组合以形成活性复合物。这包括以下情况,其中向对象施用之前,体外合成单个多肽复合物组分或将其重组表达并随后分离并组合以形成复合物;其中合成嵌合的或融合的多肽(即,复合物每个分离的蛋白质组分都包含在单个多肽链中)或将其重组表达为完整的复合物的情况。通常,将多肽复合物添加至纳米颗粒以产生具有吸附的或偶联的多肽复合物的纳米颗粒,其分子的数目与纳米颗粒的数目比为约、至少约或至多约 0.1 : 1、0.5 : 1、1 : 1、3 : 1、5 : 1、7 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1、50 : 1、100 : 1、125 : 1、150 : 1、175 : 1、200 : 1、225 : 1、250 : 1、275 : 1、300 : 1、325 : 1、350 : 1、375 : 1、400 : 1、425 : 1、450 : 1、475 : 1、500 : 1、600 : 1、700 : 1、800 : 1、900 : 1、1000 : 1、1500 : 1 或更多:1,更典型地为 0.1 : 1、1 : 1 至 50 : 1 或 300 : 1。可以使用标准技术确定纳米颗粒的多肽含量。

[0095] B. MHC 分子

[0096] 在识别和适当的应答两方面,细胞内和细胞外的抗原对免疫系统呈现出相当不同的挑战。抗原向 T 细胞的呈递是由两类利用不同抗原加工途径的不同类分子 I 类

MHC(MHC-I) 和 II 类 MHC(MHC-II) (在此也被认定为“pMHC”) 所介导的。衍生自细胞内抗原的肽由 MHC I 类分子呈递至 CD8⁺T 细胞,其几乎在所有细胞上表达,而衍生自细胞外抗原的肽由 MHC-II 分子呈递至 CD4⁺T 细胞。然而,这种二分法也有一些例外。许多研究已经表明,胞吞颗粒或可溶性蛋白产生的肽在巨噬细胞以及在树突细胞中都是在 MHC-I 分子上呈递的。在本发明的某些实施方案中,在适当的 MHC I 类或 II 类多肽的情况下,特定的抗原在抗原-MHC-纳米颗粒复合物中被鉴定和呈递。在某些方面,可评估对象的遗传组成以确定哪个 MHC 多肽要用于特定患者和特定的一组肽。在某些实施方案中,MHC I 类组分包括 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G 或 CD-1 分子的全部或部分。在其中 MHC 组分是 MHC II 类组分的一些实施方案中,MHC II 类组分可包括 HLA-DR、HLA-DQ 或 HLA-DP 的全部或部分。

[0097] 也可考虑将非典型的 MHC 分子用于本发明的 MHC 复合物。非典型的 MHC 分子是非多态性的物种间保守的并且具有窄、深、疏水性的配体结合袋 (ligand binding pocket)。这些结合袋能够向天然杀伤 T(NKT) 细胞或某些 CD8⁺T 细胞的亚群 (例如 Qa1 或 HLA-E 限制性的 CD8⁺T 细胞) 呈递糖脂和磷脂。NKT 细胞代表共表达 NK 细胞标志物和半不变量 T 细胞受体 (TCR) 之独特的淋巴细胞群。它们与广泛疾病相关的免疫应答调节有关。

[0098] C. 抗原组分

[0099] 本发明的某些方面包括涉及抗原组合物 (通常被称为抗原) 的方法和组合物,所述抗原组合物包括引起或诱导抗原应答的多肽、肽、核酸、碳水化合物、脂质和其他分子的区段、片段或表位。具体地,抗原决定簇的抗原区段或片段,通过自身免疫应答而导致细胞的破坏,其可以被鉴定并用于制备本文所述的抗原-MHC-纳米颗粒复合物。本发明的一些实施方案包括用于调节身体的细胞或组织中之免疫应答的组合物和方法。

[0100] 本发明的多肽和肽可通过多种氨基酸的缺失、插入和 / 或替换来修饰。在一些具体的实施方案中,修饰的多肽和 / 或肽能够调节对象中的免疫应答。在一些实施方案中,采用蛋白质或肽的野生型形式,然而,在本发明的许多实施方案中,采用经修饰的蛋白质或多肽来产生抗原-MHC-纳米颗粒复合物。抗原-MHC-纳米颗粒复合物可用于产生抗炎性免疫应答以修饰免疫系统的 T 细胞群 (即,再教育 (re-educate) 免疫系统) 和 / 或促进抗炎性 T 细胞向特定的组织的募集和积累。本文中可互换使用上述术语。“经修饰的蛋白质”或“经修饰的多肽”或“经修饰的肽”指的是其化学结构 (特别是其氨基酸序列) 相对于野生型蛋白质或多肽被改变的蛋白质或多肽。在一些实施方案中,经修饰的蛋白质或多肽或肽具有至少一种经修饰的活性或功能 (认识到蛋白质或多肽或肽可具有多种活性或功能)。在 MHC-纳米颗粒复合物的情况下,特别考虑到经修饰的蛋白质或多肽或肽在一种活性或功能方面改变而在其他方面保留野生型活性或功能,例如免疫原性,或与免疫系统的其他细胞相互作用的能力。

[0101] 本发明的抗原包括与多发性硬化相关的抗原。这样的抗原包括,例如在美国专利申请 No :2012-0077686 中公开的那些和衍生自以下的抗原:髓鞘碱性蛋白、髓鞘相关糖蛋白、髓鞘少突胶质细胞蛋白、蛋白脂质蛋白、少突胶质细胞髓鞘寡聚蛋白、髓鞘相关少突胶质细胞碱性蛋白、少突胶质细胞特异性蛋白、热休克蛋白、少突胶质细胞特异性蛋白 NOGO A、糖蛋白 Po、外周髓鞘蛋白 22 和 2' 3' - 环核苷酸 3' - 磷酸二酯酶。在某些实施方案中,抗原衍生自髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)。在一个相关的实施方案中,抗原对应于与

包含 SEQ ID NO :1 序列的肽具有至少 80% 同一性的肽, 或者对应于由在中度至高度严格的条件下与编码 SEQ ID NO :1 序列或与 SEQ ID NO :1 序列具有至少约 80% 序列同一性的肽的多核苷酸或其互补序列杂交的多核苷酸所编码的多肽。

[0102] 在某些实施方案中, 包括任何目的蛋白质或肽的复合物, 并且特别是 MHC 肽融合物之蛋白质或多肽 (野生型或经修饰) 的尺寸, 可包括但并不限于 :5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500 个氨基分子或更多, 包括来源于其中的任何范围或值或其衍生。在某些方面, 5、6、7、8、9、10 或更多个连续的氨基酸 (包括其衍生物和抗原的片段, 例如本文所公开和参考的那些氨基酸序列) 可用作抗原。可以预期, 多肽可通过截短进行突变使得它们比其对应的野生型形式更短, 而且它们可通过与具有特定功能 (例如, 作为蛋白质复合物用于呈递, 用于增强免疫原性等) 的异源蛋白质序列融合或缀合而改变。

[0103] 可通过本领域技术人员已知的任何技术制备蛋白质的组合物, 包括 : (i) 通过标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽, (ii) 从天然来源分离蛋白质的化合物, 或者 (iii) 化学合成蛋白质物质。之前已经公开了多种基因的核苷酸以及蛋白质、多肽和肽序列, 并可在公认的计算机数据库中找到。一个这样的数据库是国家生物技术信息中心的 GenBank 和 GenPept 数据库 (万维网上的网址 ncbi.nlm.nih.gov/)。可使用本文所公开的技术或本领域普通技术人员已知的技术来扩增和 / 或表达这些基因的全部或部分的编码区。

[0104] 这些组合物的自身抗原表位以及其他多肽的氨基酸序列变体可以是替换、插入或缺失变体。本发明多肽中的修饰与野生型相比可影响肽或多肽的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、

270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500 或更多个不连续或连续的氨基酸。

[0105] 缺失变体通常缺少天然的或野生型氨基酸序列的一个或更多个残基。可缺失个别残基或可缺失若干个连续的氨基酸。可将终止密码子引入（通过取代或插入）编码核酸序列中以产生截短的蛋白质。插入突变体通常包括在多肽的非末端位点添加物质。这可能包括插入一个或更多个残基。也可以产生末端的添加，称为融合蛋白。

[0106] 替换变体通常包含在蛋白质内的一个或更多个位点上一个氨基酸交换另一个氨基酸，并且可被设计来调节多肽的一种或更多种性质，可丧失或不丧失其他的功能或性质。替换可以是保守的，即用类似形状和电荷的一个氨基酸来替换一个氨基酸。保守替换是本领域公知的，并且包括，例如以下变化：丙氨酸到丝氨酸；精氨酸到赖氨酸；天冬酰胺到谷氨酰胺或组氨酸；天冬氨酸到谷氨酸；半胱氨酸到丝氨酸；谷氨酰胺到天冬酰胺；谷氨酸到天门冬氨酸；甘氨酸到脯氨酸；组氨酸到天冬酰胺或谷氨酰胺；异亮氨酸到亮氨酸或缬氨酸；亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸；赖氨酸到精氨酸；甲硫氨酸到亮氨酸或异亮氨酸；苯丙氨酸到酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸；丝氨酸到苏氨酸；苏氨酸到丝氨酸；色氨酸到酪氨酸；酪氨酸到色氨酸或苯丙氨酸；以及缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。或者，替换可以是非保守的，使得多肽或肽的功能或活性受到影响，例如细胞受体的亲和性或亲和力。非保守性变化通常涉及用化学上不同的残基进行替换，例如极性 or 带电荷的氨基酸取代非极性或不带电荷的氨基酸，反之亦然。

[0107] 本发明的蛋白质可以是体外重组或合成的。或者，重组蛋白可从细菌或其它宿主细胞分离。

[0108] 还应当理解的是，氨基酸和核酸序列可包含另外的残基，例如分别为另外的 N- 或 C- 末端氨基酸或者 5' 或 3' 核酸序列，但仍然基本上如本文中所公开的序列之一所示，只要所述序列符合如上所述的标准，包括维持生物学蛋白质活性（例如，免疫原性）。末端序列的添加特别适用于例如这样的核酸序列，其可包含多种非编码序列，所述非编码序列位于编码区 5' 或 3' 部分任一的侧翼。

[0109] 可以预期，在本发明的组合中，每毫升有约 0.001mg 至约 10mg 的总蛋白。因此，组合中蛋白质的浓度可以为约，至少约或至多约 0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、

7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 或 mg/ml 或更大（或来源于其中的任何范围）。这当中，约，至少约或至多约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100% 可以是抗原-MHC-纳米颗粒复合物。

[0110] 本发明考虑施用抗原-MHC-纳米颗粒复合物以实现针对 MS 或和 / 或与 MS 相关炎症的治疗。

[0111] 此外，通过引用并入本文的美国专利 No. 4, 554, 101 (Hopp) 教导了在亲水性的基础上，从初级氨基酸序列鉴定和制备表位。通过在 Hopp 中所公开的方法，本领域技术人员将能够鉴定来自氨基酸序列内的潜在表位并确认它们的免疫原性。许多科学出版物也已致力于从氨基酸序列的分析中预测二级结构并鉴定表位 (Chou 和 Fasman, *Adv. Enzymol.*, 47 : 45-148, 1978 ; Chou 和 Fasman, *Annu. Rev. Biochem.*, 47 : 251-276, 1978, Chou 和 Fasman, *Biochemistry*, 13(2) : 211-222, 1974 ; Chau 和 Fasman, *Biochemistry*, 13(2) : 222-245, 1974, Chou 和 Fasman, *Biophys. J.*, 26(3) : 385-399, 1979)。如果需要的话，可使用任何这些以补充 Hopp 在美国专利 No. 4, 554, 101 中的教导。

[0112] 在具有 MHC 分子的复合物中，除了肽之外，分子也可被用作抗原或抗原片段，这样的分子包括但不限于：碳水化合物、脂质、小分子等。碳水化合物是多种细胞外表面的主要组分。某些碳水化合物是分化之不同阶段的特征而且往往这些碳水化合物被特异性抗体所识别。不同碳水化合物的表达可以被限制于特定的细胞类型。

[0113] D. 基材 (substrate) / 纳米颗粒

[0114] 在某些方面，抗原 / MHC 复合物有效地偶联至基材，其可以共价地或非共价地与所述基材结合。基材可以是任选地包括生物相容和 / 或生物可吸收材料的纳米颗粒形式。因此，在一个实施方案中，所述纳米颗粒是生物相容的和 / 或生物可吸收的。基材还可以是例如之前在通过引用以其整体并入本文的美国专利公开 No. 2009/0155292 中所述的那些纳米颗粒形式，在一方面其不是脂质体。纳米颗粒可具有可变尺寸的结构并且被称为多种名称：纳米球、纳米颗粒或生物相容的生物可降解纳米球或生物相容的生物可降解纳米颗粒。这种包含抗原 / MHC 复合物的颗粒制备物可通过共价地或非共价地将复合物与纳米颗粒偶联而形成。

[0115] 纳米颗粒通常基本上由球芯和任选的一个或更多个层组成。所述芯的尺寸和组成可变。除了芯之外，纳米颗粒可具有一个或更多个层以提供适合于目的应用的功能。层（如果存在的话）的厚度可根据具体应用的需要而有所不同。例如，层可赋予有用的光学性质。

[0116] 层还可以赋予化学或生物学功能，在本文中称为化学活性层或生物学活性层并且对于这些功能，层的厚度通常为约 0.001 μm (1nm) 至约 10 μm 或更厚（根据所需纳米颗粒的直径），这些层通常被施加至所述纳米颗粒的外表面。

[0117] 芯和层的组成可以变化。用于颗粒或芯的合适材料包括但不限于：聚合物、陶瓷、

玻璃、矿物等。实例包括但不限于：标准玻璃和特种玻璃、二氧化硅、聚苯乙烯、聚酯、聚碳酸酯、丙烯酸聚合物、聚丙烯酰胺、聚丙烯腈、聚酰胺、氟聚合物、硅氧烷、纤维素、硅、金属（例如铁、金、银）、矿物（例如红宝石）、纳米颗粒（例如金纳米颗粒、胶体颗粒、金属氧化物、金属硫化物、金属硒化物和磁性材料（例如氧化铁））以及其复合物。根据所需性质，芯可以是均匀的组合物或者两种或更多种类材料的复合物。在某些方面，将使用金属纳米颗粒。这些金属颗粒或纳米颗粒可由 Au、Pt、Pd、Cu、Ag、Co、Fe、Ni、Mn、Sm、Nd、Pr、Gd、Ti、Zr、Si 和 In、前体、其二元合金、其三元合金和其金属间化合物来形成。参见美国专利 6,712,997，其通过引用以其整体并入本文。在某些实施方案中，只要纳米颗粒是生物相容的和生物可吸收的，芯和层的组成可以变化。根据所需性质，芯可以是均匀的组合物或者两种或更多种类材料的复合物。在某些方面，将使用金属纳米球。这些金属纳米颗粒可以由 Fe、Ca、Ga 等来形成。在某些实施方案中，纳米颗粒包含含有金属或金属氧化物的芯。

[0118] 如前所述，除了芯之外，纳米颗粒可以包含一个或更多个层。纳米颗粒可包含由生物可降解的糖或其他聚合物组成的层。生物可降解的层的实例包括但不限于：葡聚糖、聚（乙二醇）、聚（环氧乙烷）、甘露醇、基于聚交酯（PLA）的聚（酯）、聚乙醇酸交酯（PGA）、聚己酸内酯（PCL）、PHB-PHV 类的聚（羟基链烷酸酯）和其他修饰的聚（糖类），例如淀粉、纤维素和壳聚糖。此外，纳米颗粒可包含具有用于向化学结合位点或偶联位点附着化学官能度之合适表面的层。

[0119] 可以以本领域技术人员已知的多种方式在纳米颗粒上来产生层。实例包括例如在 Iler, *Chemistry of Silica*, John Wiley&Sons, 1979; Brinker 和 Scherer, *Sol-gel Science*, Academic Press, (1990) 所述的溶胶-凝胶化学技术。在纳米颗粒上产生层的其他方法包括如在 Partch 和 Brown, *J. Adhesion*, 67:259-276, 1998; Pekarek 等, *Nature*, 367:258, (1994); Hanprasopwattana, *Langmuir*, 12:3173-3179, (1996); Davies, *Advanced Materials*, 10:1264-1270, (1998) 和其中参考文献所述的表面化学和封装技术。也可使用气相淀积技术；参见例如 Golman 和 Shinohara, *Trends Chem. Engin.*, 6:1-6, (2000) 和美国专利 No. 6,387,498。还有其他的的方法包括如 Sukhorukov 等, *Polymers Adv. Tech.*, 9(10-11):759-767, (1998); Caruso 等, *Macromolecules*, 32(7):2317-2328, (1998); Caruso 等, *J. Amer. Chem. Soc.*, 121(25):6039-6046, (1999); 美国专利 No. 6,103,379 和其中引用的参考文献所述的逐层自组装技术。

[0120] 如美国专利 No. 4,589,330 或 4,818,542 所教导的，可通过使包含抗原/MHC/共刺激分子复合物和聚合物的水相与非水相接触，随后使非水相蒸发以造成来自水相的颗粒聚结以形成纳米颗粒。用于这类制备物的优选的聚合物是选自以下的天然或合成共聚物或聚合物：明胶琼脂、淀粉、阿拉伯半乳聚糖、白蛋白、胶原、聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)丙交酯聚（ ϵ -己内酯）、聚（ ϵ -己内酯-共-乳酸）、聚（ ϵ -己内酯-共-乙醇酸）、聚（ β -羟基丁酸）、聚（环氧乙烷）、聚乙烯、聚（烷基-2-氰基丙烯酸酯）、聚（甲基丙烯酸羟乙酯）、聚酰胺、聚（氨基酸）、聚（2-羟乙基 DL-天冬酰胺）、聚（酯脲）、聚（L-苯丙氨酸/乙二醇/1,6-己二异氰酸酯）和聚（甲基丙烯酸甲酯）。特别优选的聚合物是聚酯，例如聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)丙交酯聚（ ϵ -己内酯）、聚（ ϵ -己内酯-共-乳酸）和聚（ ϵ -己内酯-共-乙醇酸）。用于溶解聚合物的溶剂包括：水、六氟异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、己烷、苯或六氟丙酮倍半水合物。

[0121] 纳米颗粒的尺寸可以是约 1nm 至约 1 μm 。在某些实施方案中,纳米颗粒的直径小于约 1 μm 。在另一些实施方案中,纳米颗粒的直径小于约 500nm、小于约 400nm、小于约 300nm、小于约 200nm、小于约 100nm 或小于约 50nm。在另一些实施方案中,纳米颗粒的直径为约 1nm 至约 10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、40nm、50nm、75nm 或者 100nm。在一些具体的实施方案中,纳米颗粒为约 1nm 至约 100nm、约 1nm 至约 50nm、约 1nm 至约 20nm、或者约 5nm 至约 20nm。

[0122] 复合物的尺寸可以为约 5nm 至约 1 μm 。在某些实施方案中,复合物的直径小于约 1 μm 或者小于 100nm。在另一些实施方案中,复合物的直径小于约 500nm、小于约 400nm、小于约 300nm、小于约 200nm、小于约 100nm、或小于约 50nm。在另一些实施方案中,复合物为约 10nm 至约 50nm、或约 20nm 至约 75nm、或约 25nm 至约 60nm、或约 30nm 至约 60nm 或在—个方面为约 55nm。

[0123] E. 偶联抗原-MHC 复合物与纳米颗粒

[0124] 为了将基材或纳米球偶联到抗原-MHC 复合物,可应用以下的技术。

[0125] 可通过化学修饰基材或纳米颗粒来产生结合,其通常涉及在表面上产生“官能团”,所述官能团能够结合抗原-MHC 复合物,和/或使基材或纳米颗粒的任选经化学修饰的表面与所谓的“连接分子”共价地或非共价键合地连接,之后使抗原-MHC 复合物与得到的纳米颗粒进行反应。

[0126] 术语“连接分子”意指能够连接基材或纳米颗粒并且也能连接至抗原-MHC 复合物的物质。在某些实施方案中,通过接头将抗原-MHC 复合物偶联至纳米颗粒。合适接头的非限制性实例包括多巴胺(DPA)-聚乙二醇(PEG)接头,例如 DPA-PEG-NHS 酯、DPA-PEG-邻-二硫吡啶(OPSS)和/或 DPA-PEG-叠氮化物。其他的接头包括肽接头、乙二醇、生物素和链霉亲和素(streptavidin)。

[0127] 如本文之前所使用的术语“官能团”不限于形成共价键的反应性化学基团,而且还包括导致与抗原-MHC 复合物离子相互作用的化学基团或氢键。此外,应该注意的是,严格区分在表面产生的“官能团”和连接分子具有的“官能团”是不可能的,因为有时表面的修饰需要较小的连接分子(例如乙二醇)与纳米球表面进行反应。

[0128] 官能团或具有它们的连接分子可选自氨基、碳酸基团、硫醇、硫醚、二硫化物、胍基、羟基、胺基、邻二醇、醛、 α -卤代乙酰基、汞有机物(mercury organyles)、酯基、酸性卤化物、酸硫酯(acid thioester)、酸酐、异氰酸酯/盐、异硫氰酸酯/盐、磺酸卤化物、亚氨酸酯、重氨基乙酸酯/盐、重氮盐、1,2-二酮、膦酸、磷酸酯、磺酸、偶氮杂环(azolide)、咪唑、吡啶、N-马来酰亚胺、 α - β -不饱和羰基化合物、芳基卤化物或其衍生物。

[0129] 其他具有高分子量的连接分子的非限制性实例是相对于基材或纳米颗粒具有相反极性表面的核酸分子、聚合物、共聚物、可聚合偶联剂、二氧化硅、蛋白质和链样分子。核酸可以对本身含有核酸分子的亲和性分子提供连接,但是具有相对于连接分子的互补序列。

[0130] 共价接头的—个具体实例包括聚(乙烯)乙二醇(PEG)。PEG 接头可以是巯基-PEG-NH₂接头。

[0131] 在某些实施方案中,如本文所述的接头具有限定的尺寸。在一些实施方案中,接头小于约 10kD、小于约 5kD、小于约 4.5kD、小于约 4kD 的、小于约 3.5kD、小于约 3kD、小于约

2.5kD、小于约 2kD、或小于约 1kD。在另一些实施方案中,接头为约 0.5kD 至约 5kD、4.5kD、4kD、3.5kD、3kD、2.5kD、2kD、1.5kD 或 1kD。在另一些实施方案中,接头为约 1kD 至约 4.5kD、4kD、3.5kD、3kD、2.5kD、2kD 或 1.5kD。

[0132] 作为可聚合偶联剂的实例,可列举丁二炔、苯乙烯丁二烯、乙酸乙烯酯、丙烯酸酯 / 盐、丙烯酰胺、乙烯基化合物、苯乙烯、氧化硅 (silicone oxide)、氧化硼、磷氧化物、硼酸盐、吡咯、聚吡咯和磷酸酯 / 盐。

[0133] 基材或纳米颗粒的表面可以进行化学修饰,例如通过结合具有官能反应性基团的磷酸衍生物。这些磷酸或磷酸酯衍生物的一个实例是亚氨基双(亚甲基膦酰基)碳酸,其可根据“Mannich-Moedritzer”反应来合成。可用直接从制备过程或预处理(例如用三甲基甲硅烷基溴)后得到的基材或纳米球来进行这种结合反应。在第一种情况下,磷酸(酯)衍生物可以例如替代仍结合于表面的反应介质的组分。这种替代可在较高温度下得到增强。在另一方面,三甲基甲硅烷基溴被认为是基于含磷络合剂的脱烷基化烷基,从而产生磷酸(酯)衍生物的新结合位点。磷酸(酯)衍生物或与其结合的连接分子可显示如上给出的相同官能团。基材或纳米球之表面处理的另一个实例包括在二醇(例如乙二醇)中加热。应当注意的是,如果在二醇中已经进行了合成,这种处理可能是多余的。在这些情况下,直接获得的合成产物有可能示出必须的官能团。然而,这种处理适用于在含 N- 或 P- 的络合剂中产生的基材或纳米颗粒。如果用乙二醇对这种基材或颗粒进行后处理,那么仍结合于表面的反应介质(例如络合剂)的成分可由二醇进行替代和 / 或可以被脱烷基化。

[0134] 也可通过具有第二官能团的伯胺衍生物替代仍结合于颗粒表面的含 N 络合剂。基材或纳米颗粒的表面还可包被有二氧化硅。二氧化硅使得有机分子可相对简单地化学缀合,因为二氧化硅容易与有机接头(例如三乙氧基硅烷或氯硅烷)进行反应。纳米颗粒表面还可通过均聚物或共聚物包被。可聚合偶联剂的实例是 N-(3-氨基丙基)-3-巯基苄脒、3-(三甲氧基甲硅烷基)丙基酰肼和 3-(三甲氧基甲硅烷基)丙基马来酰亚胺。在本文中提及了可聚合偶联剂的另一一些非限制性实例。这些偶联剂可单独使用或组合使用,这取决于待产生以作为包衣的共聚物的类型。

[0135] 可用于含有氧化的过渡金属化合物的基材或纳米颗粒的另一种表面改性技术是通过氯气或有机氯化剂将氧化的过渡金属化合物转化为相应的氯化物。这些氯化物能够与亲核体(例如在生物分子中经常存在的羟基或氨基)反应。这种技术使得产生与蛋白质的直接缀合,例如通过赖氨酸侧链的氨基。在用氯化物进行表面改性后,可通过使用双功能接头(例如马来酰亚胺丙酸酰肼)实现与蛋白质的缀合。

[0136] 对于非共价的连接技术,具有与基材或纳米球表面相反的极性或电荷的链型分子特别适合。可非共价地连接至芯 / 壳纳米球的连接分子的实例包括阴离子、阳离子或两性离子表面活性剂、酸性或碱性蛋白质、聚胺、聚酰胺、聚砜或聚羧酸。基材或纳米球与具有官能反应基团的两亲试剂之间的疏水性相互作用可产生必须的连接。特别地,具有可相互交联的两亲特性的链型分子(例如磷脂或衍生的多糖)是有用的。可通过共孵育来实现表面上这些分子的吸收。亲和分子与基材或纳米颗粒之间的结合也可基于非共价的自组织键。其一个实例包括简单的检测探针,其中生物素作为连接分子和抗生物素蛋白或链霉亲和素偶联的分子。

[0137] 可在文献例如“Bioconjugate Techniques”(Greg T. Hermanson, Academic Press

1996) 中找到官能团与生物分子的偶联反应方案。可根据有机化学的标准方法(例如氧化、卤化、烷基化、酰化、加成、取代或酰胺化)将生物分子(例如 MHC 分子或其衍生物)共价地或非共价地偶联到连接分子。这些用于共价地或非共价结合连接分子的偶联方法可在连接分子与基材或纳米球偶联之前或之后使用。此外,通过孵育的手段有可能实现分子与相应预处理的基材或纳米颗粒的直接结合(例如通过三甲基甲硅烷基溴),由于这种预处理其显示出改性的表面(例如较高的电荷或极性的表面)。

[0138] E 蛋白质产生

[0139] 本发明描述了用于本发明多种实施方案的多肽、肽和蛋白质。例如,测定了特定的肽和其复合物引发或调节免疫应答的能力。在一些具体的实施方案中,也可根据常规的技术在溶液中或在固体支持物上合成本发明肽或蛋白质的全部或一部分。多种自动合成仪是市售的并且可根据已知的方案来使用。参见,例如 Stewart 和 Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第 2 版, Pierce Chemical Co. 1, (1984); Tam 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 105:6442, (1983); Merrifield, *Science*, 232(4748):341-347, (1986); 以及 Barany 和 Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meinhofer (编辑), Academic Press, NY, 1-284, (1979), 各自通过引用并入本文。或者,可采用重组 DNA 技术,其中编码本发明肽的核苷酸序列被插入到表达载体中,转化或转染到合适的宿主细胞中并在适于表达的条件下培养。

[0140] 本发明的一个实施方案包括将基因转移到细胞(包括微生物)以用于产生蛋白质的用途。目的蛋白质的基因可被转移至合适的宿主细胞中,随后在适当的条件下培养细胞。可采用编码几乎任何多肽的核酸。重组表达载体以及包含在其中的元件的产生是本领域技术人员已知的,并在本文简要地进行了讨论。哺乳动物宿主细胞系的实例包括但不限于 Vero 和 HeLa 细胞,其他 B- 细胞系和 T- 细胞系,例如 CEM、721. 221、H9、Jurkat、Raji 以及中国仓鼠卵巢细胞系、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、3T3、RIN 和 MDCK 细胞。此外,可选择调节插入序列之表达的、或以所需方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这些修饰(例如糖基化)和加工(例如切割)对于蛋白质的功能可能是重要的。对于蛋白质的翻译后加工和修饰,不同的宿主细胞具有特征性和特定的机制。可选择适当的细胞系或宿主系统以确保所表达之外来蛋白质的正确修饰和加工。

[0141] 可使用许多选择系统,包括但不限于:分别在 tk⁻、hgprt⁻ 或 aprt⁻ 细胞中的 HSV 胸苷激酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶和腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因。此外,抗代谢物抗性可用作选择的基础:对于 dhfr, 其赋予对甲氧苄啶和甲氨蝶呤的抗性;gpt, 其赋予对霉酚酸的抗性;neo, 其赋予对氨基糖苷 G418 的抗性;以及 hygro, 其赋予对潮霉素的抗性。

[0142] G. 核酸

[0143] 本发明可包括编码本发明蛋白质、多肽、肽(例如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2)的重组多核苷酸。

[0144] 在一些具体实施方案中,本发明涉及分离的核酸区段和并入了编码自身抗原和/或 MHC 分子之核酸序列的重组载体。术语“重组”可与多肽或特定多肽的名称组合使用,这通常指的是从核酸分子产生的多肽,所述核酸分子已在体外进行操作或者说是这样分子的复制产物。

[0145] 用于本发明的核酸区段,无论其编码序列自身的长度如何,均可与其他的核酸序

列（例如启动子、多腺苷酸化信号、另外的限制性酶位点、多克隆位点、其他编码区段等）组合使得它们的总长度可以有很大的变化。因此，可以预期的是，可采用几乎任何长度的核酸片段，其总长度优选受制备的方便性和在预期的重组核酸方案中的应用的限制。在一些情况下，核酸序列可编码具有另外异源编码序列的多肽序列，例如以使得用于多肽的纯化、运输、分泌、翻译后修饰或用于治疗益处（例如靶向或功效）。可将标签或其他异源多肽添加到经修饰的多肽编码序列，其中“异源”指的是与修饰的多肽不一样的多肽。

[0146] IV. 药物组合物和施用

[0147] 本文提供是对治疗疾病有用的药物组合物。

[0148] A. 药物组合物

[0149] 抗原-MHC 纳米颗粒复合物可单独施用或者与载体（例如组合物中的可药用载体）组合施用。本发明的组合物可常规地通过注射肠胃外施用，例如静脉内、皮下或肌内。适合于其他施用方式的另外的制剂包括经口制剂。经口制剂包括这样的通常采用的赋形剂，例如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采用溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂或散剂的形式并含有约 10% 至约 95%，优选地约 25% 至约 70% 的活性成分。根据本公开内容，本领域技术人员可知，包含抗原-MHC- 纳米颗粒复合物的水性组合物的制剂可改变对象的免疫状况。在某些实施方案中，组合物可被吸入（例如美国专利 No. 6, 651, 655，其特别通过引用以其整体并入）。在一个实施方案中，抗原-MHC- 纳米颗粒复合物为全身性施用。

[0150] 通常，本发明的组合物以与剂型相容的方式施用并且以治疗有效的和免疫可调节的量施用。待施用的量取决于待治疗的对象。所需待施用的活性成分的精确量取决于医师的判断。然而，合适的剂量范围是每次施用十至给几百纳克或微克量级的抗原-MHC- 纳米颗粒复合物。用于最初施用和加强的合适方案也是不同的，但通常是在最初施用之后接着随后的施用。

[0151] 在许多情况下，期望多次施用肽-MHC- 纳米颗粒复合物，约、至多约或至少约 3、4、5、6、7、8、9、10 或更多次。施用通常为 2 天到十二周的间隔，更通常为一到两周的间隔。周期性加强是 0.5-5 年的间隔，一般为两年，可期望维持免疫系统的状况。施用的过程之后可测定炎症免疫应答和 / 或自身调节的 T 细胞活性。

[0152] 在一些实施方案中，将药物组合物施用于对象。本发明的不同方面包括向对象施用有效量的抗原-MHC- 纳米颗粒复合组合物。此外，这些组合物可与免疫系统的调节剂组合施用。这样的组合物通常将溶解或分散在可药用载体或水性介质中。

[0153] 短语“可药用”或“药理学上可接受的”指的是当施用于动物或人时不产生不利的、变态的或其他不良反应的分子实体和组合物。如本文所用的“可药用载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。用于药物活性物质的这些介质和试剂的使用是本领域中公知的。除了如任何常规的介质或试剂与活性成分不相容的范围内，还考虑了其在免疫原性和治疗性组合物中的用途。

[0154] 适合于注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散体；制剂包括芝麻油、花生油或水性丙二醇；以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下，剂型必须是无菌的并且必须是达到可容易注射的流动程度。在制造和储存的条件下它也应该是稳定的，并且必须防止微生物（例如细菌和真菌）的污染作用。

[0155] 组合物可配制成中性的或盐的形式。可药用盐包括酸加成盐（与蛋白质的游离氨基形成）以及与无机酸（例如，盐酸或磷酸）或者与有机酸（例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等）形成的盐。与游离羧基形成的盐也可衍生自无机碱，例如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物以及有机碱，例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0156] 载体可以是溶剂或分散介质，包括例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和液态聚（乙二醇）等）、其合适的混合物和植物油。例如通过使用包衣（如卵磷脂），在分散体的情况下通过维持所需的颗粒尺寸以及通过使用表面活性剂可保持适当的流动性。通过多种抗菌剂和抗真菌剂（例如，对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒（thimerosal）等）可带来对微生物作用的预防。在许多情况下，优选包括等渗剂，例如糖类或氯化钠。可通过在组合物中使用吸收延迟剂（例如单硬脂酸铝和明胶）带来延长注射组合物的吸收。

[0157] 通过在具有上面列举的多种其他成分的合适溶剂中根据需要并入所需量的活性化合物，接着通过灭菌来制备无菌注射溶液。溶液的灭菌将以这样的方式来完成以使得不减弱抗原-MHC-纳米颗粒复合物的治疗特性。一般而言，通过将多种灭菌的活性成分并入包含基本分散介质和来自上述列举的所需的其他成分的无菌载剂中来制备分散体。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，其从其先前的无菌溶液产生活性成分的粉末以及任何另外所需的成分。一种这样的溶液灭菌方法是无菌过滤，但是，本发明意在包括不显著降低抗原-MHC-纳米颗粒复合物治疗性质的任何灭菌方法。涉及强热和加压的灭菌方法（例如高压灭菌）可能会损害复合物的三级结构，从而显著降低抗原-MHC-纳米颗粒复合物的治疗特性。

[0158] 治疗组合物的有效量是根据预期目标而确定的。术语“单位剂量”或“剂量”指的是适于在对象中使用的物理上离散的单位，每个单位包含计算以产生以上讨论的所需应答之预定量的组合物，每个单位与其施用（即适用的途径和方案）相关。根据治疗和单位剂量数目两者的待施用量取决于所需的结果和/或保护。组合物的精确量还取决于医师的判断并且对于每个个体而言都是特殊的。影响剂量的因素包括对象的身体和临床状态、施用途径、治疗的预期目标（症状的减轻与治愈）和特定组合物的效力、稳定性以及毒性。配制后，将以与剂型相容的方式以及以治疗或预防有效的量来施用溶液。制剂易于以多种剂型施用，例如上述的注射溶液的类型。

[0159] B. 联合治疗

[0160] 本发明的组合物和相关的方法，特别是抗原-MHC-纳米颗粒复合物的施用，也可以与传统疗法的施用组合使用。这些包括但不限于：Avonex（干扰素 β -1a）、Betaseron（干扰素 β -1b）、Copaxone（醋酸格拉太咪尔）、Novantrone（米托蒽醌）、Rebif（干扰素 β -1a）、Tysabri（那他珠单抗）、Gilenya（芬戈莫德）、格拉太咪尔、类固醇、Cytosan、硫唑嘌呤、Baclofen、脑深部刺激、Ampyra（达伐吡啶）、针灸和物理疗法。

[0161] 当使用组合治疗时，可采用多种组合，例如抗原-MHC-纳米颗粒复合物的施用为“A”而其他的活性剂为“B”：

[0162] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0163] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A/ B/B/A/A

[0164] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A。

[0165] 向患者 / 对象施用本发明的肽-MHC 复合物将遵循施用这些化合物的一般方案,也考虑毒性(如果有的话)。可以预料根据需要重复治疗周期。也可考虑多种标准疗法(例如水合作用)也可以与所述疗法组合应用。

[0166] C. 体外或离体施用

[0167] 如本文所用的术语体外施用指的是对从对象移出的细胞或对象外的细胞进行的操作,包括但不限于培养的细胞。术语离体施用指的是已在体外进行操作的细胞并且随后施用于对象。术语体内施用包括在对象内进行的所有操作,包括施用。

[0168] 在本发明的某些方面,组合物可体外、离体或体内施用。在某些体外的实施方案中,将自体 T 细胞与本发明的组合物进行孵育。然后,细胞或组织可用于体外分析或者用于离体施用。

[0169] V. 实施例

[0170] 以下实施例是出于说明本发明的多种实施方案的目的而给出的,并且不意味着以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易理解的是,本发明非常适合于实现所述目的并获得上述的结果和优点以及本文固有的那些目的、结果和优点。这些实施例连同本文所述的方法是当前实施方案的代表并且是示例性的,并不旨在对本发明的范围进行限制。本领域技术人员将想到,涵盖在本发明精神之中的变化和其他用途由权利要求书的范围所限定。

[0171] 实施例 1

[0172] 慢性 EAE 自身免疫病模型中的 pMHC II 类-NP

[0173] 这个实施例描述了包被有 MS 相关抗原-MHC 复合物的纳米颗粒在 EAE 小鼠模型中治疗 EAE 的用途。这种新的治疗方法可用于全身性递送包被有单一 MS 相关肽 MHC 复合物 (pMHC) (即每种疾病具有 1 种 pMHC 复合物) 的纳米颗粒。该发现使得能够合理设计能钝化自身免疫而不损害全身性免疫的疾病特异性“纳米疫苗 (nanovaccine)”,这是这些病症的治疗中长期寻求的目标。图 1 示出单特异性、MS- 相关的 II 类 pMHC 包被的纳米疫苗可逆转在两只 C57BL/6 小鼠中建立的实验性变态性脑脊髓炎 (experimental allergic encephalomyelitis, EAE)。这种方法也适用于已知在 MS 患者中由自身反应性 CD4+T 细胞靶向的人 pMHC 复合物。在这些临床前模型中的临床功效的证明将为人类中的临床试验和治愈 MS 的潜在发展铺平道路。

[0174] EAE 需要产生自身反应性 CD4+ 细胞并且破坏血脑屏障,这使得致脑炎细胞募集至 CNS。用补充有 10 μ g/mL 的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的 CFA 中的 pMOG₃₆₋₅₅ (200 μ g) 皮下注射 (s. c.) (在尾的基部) 以及用 300ng 的百日咳毒素腹膜内注射 (i. p.) 免疫 C57BL/6 (B6) 小鼠,接着在第 2 天注射另一剂量的百日咳毒素,在所有生病的动物 (在我们的群体中约 70%) 中诱导了一种形式的慢性 EAE (> 60 天)。

[0175] 如图 1 所示,pMHC II 类-NP 疗法 (pMOG₃₈₋₄₉/1A^b包被的 NP) 降低了 C57BL/6 小鼠中已建立的 EAE 的严重性。用 CFA 中的 pMOG₃₅₋₅₅ 免疫 B6 小鼠并用百日咳毒素静脉注射 (i. v.) 处理小鼠。使用已建立的标准以 15 分量表对 EAE 小鼠的体征进行评分。在免疫后的 21 天开始用 7.5-22.5 μ g 剂量的 pMOG₃₈₋₄₉ 包被的 NP 每周两次处理患病的小鼠。重要的是,这种作用与同源自身反应性 T 细胞的系统性扩增相关 (图 4)。此外,尽管未经处理小鼠的脊髓的白质有显著的脱髓鞘和致密单核细胞浸润 (图 5), pMHC-NP 处理的小鼠具有显著更少的

脱髓鞘和单核细胞浸润（图 6）。图 7 和 8 示出了脊髓边缘的代表性实例（各 2 只小鼠）。这里，同样，pMHC-NP 处理的小鼠具有显著更少的脱髓鞘以及更低的单核细胞浸润。因此，在不同的疾病（T1D、EAE）、动物模型和遗传背景（NOD、C57BL/6）中，pMHC-NP 治疗方法诱导了显著的临床应答。

[0176] 这些研究提供了剂量依赖性功效和使用 MS- 抗原-MHC- 纳米颗粒复合物治疗 MS 的可行性的证据。

[0177] 实施例 2

[0178] 用于制备抗原-MHC- 纳米颗粒复合物的方法

[0179] 期望尺寸的无机纳米颗粒（氧化铁 = IONP；金 = GNP）。通过热分解产生 IONP。这样合成的 IONP 是生物相容的并且可 PEG 化以用于蛋白质缀合。为了将 pMHC 和 / 或其他蛋白质包被在 IONP 上，使表面活性剂包被的 NP 与合适长度的官能化 PEG 接头反应。所述接头通过 HPLC 纯化并通过 ¹H-NMR、MALDI/GPC 和 GPC 表征以确认化学特性、纯度、分子量和多分散性。类似的接头和方法可用于包被 GNP，不同之处在于接头在其 NP- 结合端将具有巯基 (SH) 基团。

[0180] 实施例 3

[0181] pMHC 包被的纳米颗粒的尺寸、密度以及暴露

[0182] I. 基于金之 pMHC 包被的 NP 的合成和表征

[0183] 合成特定尺寸的金纳米颗粒 (GNP)。使用分光光度法，透射电子显微术 (TEM) 和动态光散射测量 GNP 制备物的尺寸、密度、表面电荷和单分散性。然后将 GNP 样品浓缩并使用如下所述的不同方法将其与单特异性的 pMHC 复合物缀合。申请人已开发了定量每个 GNP 的 pMHC 效价并在高密度（约 10¹⁴/mL）时浓缩不同尺寸之 pMHC 包被的 GNP 制备物而不损害单分散性的方法（图 11）。

[0184] II. GNP 之 pMHC 结合能力的表征

[0185] 使用两种不同的方法将 pMHC 复合物包被到不同尺寸的 GNP 上：(i) 通过静电相互作用使 pMHC 与 GNP 的表面随机结合；和 (ii) 通过巯基-PEG-NH₂ 接头定向结合（在这种情况下，使用另外的巯基-PEG 接头作为 GNP 稳定剂来防止聚集）。认为第一种方法将能够得到非常高的配体密度（每个 GNP 的 pMHC）但是损害 pMHC 结合的方向性（即仅分子的一部分可变得被同源 T 淋巴细胞识别）。第二种方法的目的在于产生携带较低密度但是通过其 C 末端定向结合之 pMHC 的 pMHC 包被的 GNP。这两种方法都对 14nm 至 40nm 不同直径的 GNP 进行了测试。可以确认的是，对于这两种方法，GNP 的 pMHC 结合能力是尺寸且更具体是表面积（在更大 NP 上更高数目的 pMHC）的函数。出乎意料地，发现 PEG 介导的结合不仅保证了单个 GNP 结合的方向性而且增强了结合能力（与最初的预期相反）。下面的表 1 总结了这些数据。

[0186] 表 1. GNP 的 pMHC 结合能力

[0187]

直径 (nm)	表面积: ($\times 10^2 \text{ nm}^2$)	pMHC/GNP (吸收)	pMHC/GNP (接头)
14	7		212
20	12		3,750
30	28	335	
40	50	2,850	5,250

[0188] III. 激动活性对比于 pMHC 含量

[0189] 体外测试了 pMHC 效价、GNP 尺寸、GNP 密度和包被策略对 pMHC 包被的 GNP 的功能（激动）活性的影响。比较了多种 IGRP₂₀₆₋₂₁₄-K^d-GNP 制备物激活来自 T 细胞受体 (TCR) 转基因 NOD 小鼠（或 8.3-NOD 小鼠）的同源 (IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 特异性) 稚 CD8+T 细胞（本文称为‘8.3-CD8+T 细胞’）的能力。第一组实验旨在在培养物中一定的 GNP 密度范围内比较 IGRP₂₀₆₋₂₁₄-K^d(pMHC) 效价的影响。将与对照（非同源的）pMHC 复合物 (Tum-K^d) 缀合的 GNP 用作阴性对照。正如所预期的，IGRP₂₀₆₋₂₁₄-K^d-包被（而不是 Tum-K^d-包被）的 GNP 激活了这些 T 细胞（由 IFN γ 的产生进行测量）并且它们以 GNP 剂量（因而是 pMHC 剂量）依赖的方式这样做。图 12 示出了使用接头的方法使用包被有不同数目的 pMHC 分子 /GNP 之约 14nm GNP 的一个实验。图 12 比较了由同源 8.3-CD8+T 细胞响应两种不同的 pMHC-GNP 样品（都由约 2×10^{13} 个直径 14nm 的 GNP/ml 组成）而分泌的 IFN γ 的量。Au-022410 和 Au-21910 分别携带约 250 个 pMHC/GNP 和约 120 个 pMHC/GNP。Au-011810-C 携带约 120 个对照 pMHC/GNP。包被有约 2 倍以上数目的 pMHC 复合物 /GNP 的 GNP 具有优异的激动活性。因此，pMHC 包被的 GNP 的激动活性是总 pMHC(GNP) 含量的函数。这些结果是违背直觉的，如本领域的状态表明当不存在对 NP 的共刺激分子的情况时，增加单个 NP 上的 pMHC 数目也将增加亲和力并应促进缺失（细胞死亡），而不是来自同源 T 细胞的增殖和细胞因子分泌。这对于低亲和力和高亲和力的 T 细胞来说都是真实的。例如，申请人 (Han 等, (2005) Nature Medicine 11 (6) :645-652) 和其他人之前的工作指明了以高亲和力识别的肽或以低亲和力识别但给定高浓度的肽增加了体内缺失同源 T 细胞的能力。因此，在静脉内抗原-MHC 包被的纳米颗粒或可溶性肽的治疗性递送的情况下，同源 T 细胞应以肽的亲和力和剂量依赖性的方式进行缺失。图 12 中示出的数据没有达到这种期望。

[0190] IV. 肽-MHC-纳米颗粒复合物之激动活性中的效价阈值

[0191] 为了进一步研究肽-MHC(pMHC) 效价对 pMHC 缀合的纳米颗粒 (pMHC-NP) 之激动性质的作用，体外比较了 8nm 直径的铁氧化物 (Fe₃O₄)NP 与逐渐增长数目的 IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d pMHC 单体共价地偶连以引发通过同源 (IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^d-特异性) CD8+T 细胞（本文中称为 8.3-CD8+T 细胞）分泌 IFN- γ (IFN γ) 的能力。如表 2 中所示，当在每个 NP 包被有 8 个 pMHC 单体的 NP 存在下培养时，8.3-CD8+T 细胞产生可忽略量的 IFN γ ，但响应于包被有更高 pMHC 效价的 NP 时，即使低至 11 个 pMHC 单体 /NP，以剂量-反应的方式实质上产生更高量的 IFN γ 。

[0192] 表 2. 由响应于与逐渐增加之 pMHC 效价（在 5×10^{11} NP/mL）缀合的 NP 之 8.3-CD8+T

细胞分泌的 IFN γ

[0193]

纳米颗粒 (NP)	芯性质	芯尺寸 (nm)	pMHC效价	IFN γ 响应 (ng/mL)
IGRP-SFPM-110512	Fe ₃ O ₄	8	8	0.03
IGRP-SFP-102912	Fe ₃ O ₄	8	11	0.4
IGRP-SFP-012011	Fe ₃ O ₄	8	14	0.2
IGRP-SFP-031511	Fe ₃ O ₄	8	15	0.15
IGRP-SFP-051211	Fe ₃ O ₄	8	31	0.7
IGRP-SFP-100711	Fe ₃ O ₄	8	39	0.9
IGRP-SFP-011411	Fe ₃ O ₄	8	54	2.3

[0194] 在一定的 pMHC-NP 密度范围内保持了 pMHC 效价对 pMHC-NP 激动活性的积极作用 (图 13)。然而,显然,携带 11 个 pMHC/NP 的 25×10^{11} NP (每 ml) 与携带 54 个 pMHC/NP 的 5×10^{11} NP (每 ml) 具有相似的激动活性,增加携带 8 个 pMHC/NP 的 NP 数目至高达 40×10^{11} NP/ml 的值具有最低的效果 (图 14)。总之,这些结果表明 pMHC 效价的阈值存在于 9 至 11 个 pMHC/NP 之间,低于该值的 NP 数目相对大量的增加 (即 5 倍) 无法克服以低效价包被的 pMHC-NP 之低的激动活性 (应该注意的是,由于高的 NP 密度导致细胞毒性,在这些体外实验中使用 $> 50 \times 10^{11}$ NP 是无信息的)。

[0195] 在图 15 中还说明了该 pMHC 效价阈值的效应,其中 IFN γ 分泌数据被归一化为在培养物中由包被的 NP 递送的总 pMHC 浓度。在一定的 pMHC 浓度范围内,携带 11 个 pMHC/NP 的 NP 比携带 8 个 pMHC/NP 的 NP 引发了显著更高的 IFN γ 响应。此外,这两种 NP 制备物的激动性质的差异基本上随着总的 pMHC 含量而增加。即,由 NP 递送的 $2.4 \mu\text{g/ml}$ pMHC 作为八聚体相对于单十聚体 (monodecamer) 的激动性质的差异比在低 10 倍浓度下总 pMHC 之相同的制剂的激动性质的差异高得多。

[0196] 图 16 示出了以较低 NP 密度使用 (归一化培养物中的总氧化铁含量),当使用较大的 NP (其可接受比在图 13-15 中研究的 8nm NP 高得多的 pMHC 效价) 时也可以看出 pMHC 效价对 pMHC-NP 的激动性质的这些深刻影响。然而,携带 < 10 pMHC/NP 之 18nm 直径的 NP 几乎没有达 4×10^{11} NP/ml 的生物学活性,而携带更高 pMHC 效价的 18nm 直径 NP 的激动活性随着 NP 的密度而线性增加。图 15 和图 16 的比较进一步示出了递送 61 个 pMHC/NP 的 2×10^{11} 18nm NP 与递送类似 pMHC/NP 数目 (54) 的 2×10^{11} 8nm NP 具有相似的激动活性,表明 pMHC 效价的作用未受 NP 体积的显著影响。

[0197] 总之,这些数据证明在高于一定的 pMHC 效价阈值 (介于 9 至 11 pMHC/NP 之间) 时, pMHC 包被的 NP 获得了强大的激动活性。pMHC 效价或 NP 密度的增加均可增强携带“阈值”或“阈上” pMHC- 效价之 pMHC-NP 的激动性质,但不增强携带“阈下” pMHC- 效价之 NP 的激动性质。

[0198] V. 激动活性对比于 NP 尺寸和密度

[0199] 进一步的分析表明总 pMHC 含量并不是影响 pMHC-NP 体外激动活性的唯一因素, NP 尺寸也起着重要的独立作用。这是通过比较两个不同尺寸(直径分别为 14nm 和 40nm) 和不同 pMHC 效价的 pMHC-GNP 样品在相似的总 pMHC 含量条件下的激动活性来研究的。在图 17 示出的实验中, 使用了携带约 200 个 pMHC 分子 /GNP 的 14nm GNP 和携带约 5,000 个 pMHC/GNP 的 40nm GNP。调节这两个样品的 GNP 密度(分别至 3×10^{13} GNP/mL 和 3×10^{12} GNP/mL) 以调节各样品中总的 pMHC 含量至约 450 μ g/ml。值得注意的是, 在一定的总 pMHC 含量范围内, 8.3-CD8+T 细胞对 14nm pMHC/GNP 化合物的响应显著好于 40nm 的 pMHC/GNP 化合物, 尽管事实上后者比前者装饰有显著更多的 pMHC 复合物。这表明 GNP 密度(更多的 GNP/同源 T 细胞) 是关键。换言之, 携带 1000 个 pMHC/GNP 的 4×40 nm 的 NP (4000pMHC) 不如携带 100 个 pMHC/GNP 的 40×10 nm 的 NP (4000pMHC) 理想。因此, 综合考虑这些数据表明, 最佳的 pMHC-GNP 制备物是在高 pMHC 密度下使用由小的 GNP 构成的那些。增加这些小 NP 上的 pMHC 效价可进一步提高它们惊人的和出乎意料的激动性质。

[0200] VI. 激动活性对比于 pMHC 的暴露

[0201] 如上所述, pMHC 包被的 GNP 样品是通过用 3.4kD 巯基 -PEG-NH₂ 接头(作为 pMHC 羧基末端(carboxitermini) 的受体) 和巯基 -PEG 接头共包被 GNP 产生的, 所述巯基 -PEG 接头功能为 GNP 稳定剂。为了研究稳定化巯基 -PEG 连头的长度是否影响其 GNP 的抗聚集性质、巯基 -PEG-NH₂ 接头与 pMHC 分子的结合能力和 / 或 pMHC 包被的 GNP 的激动性质, 比较使用不同尺寸的稳定化接头(为 2kD 和 5kD, 分别比 pMHC 受体接头更短和更长) 制备的 pMHC 包被的 GNP。发现, 这两种接头都具有相似的抗聚集性质, 并且 5kD 的接头不抑制 pMHC 与较短的 3.4kD 巯基 -PEG-NH₂ 接头的结合。然而, 值得注意的是, 由较短的 (2kD) 巯基 -PEG 保护的 pMHC-GNP 比共包被有较长的 (5kD) 巯基 -PEG 的那些具有更优异的体外激动活性(图 18)。这表明长的保护性巯基 -PEG 接头遮蔽(shield)pMHC 分子与受体接头的结合, 避免暴露于同源 T 细胞。

[0202] VII. 体内小 NP 共价地偶联到高密度的 pMHC 提供最大的自身调节性 T 细胞扩增效应

[0203] 根据本文所述的方法制造具有约 10nm 平均直径并偶联至 NRP-V7/K^d(也被称为 IGRP₂₀₆₋₂₁₄-K^d) 或 TUM/K^d(对照) 的纳米颗粒, 并且测试它们体内诱导同源自身调节性 CD8+T 细胞扩增的能力。图 19 示出了其中两周一次, 连续 5 周将抗原 -MHC-GNP 静脉内注射到 10 周龄野生型 NOD 小鼠中的实验结果。通过用荧光标记的抗原 -MHC 四聚体(同源的以及无关对照四聚体两者) 染色细胞混悬液评估了在响应治疗时, 同源 T 细胞群在循环系统和不同的淋巴样组织中之大小的变化。施用比先前在本领域中示出的少 10-100 的 GNP(参见, 例如 Tsai 等(2010 年) Immunity 32(4):568-580), 其中测试了包被有 1-8 个 pMHC 的纳米颗粒) 但每个 GNP 包被有 150 个抗原 -MHC 导致了明显更高的扩增(图 19)。它们在体内使得 CD8+T 细胞扩增至比通常用包被有约 8 效价之 pMHC 的纳米颗粒获得的那些(血液中 1-2% 细胞; 参见, 例如 Tsai 等, Immunity, 2010, 图 1C) 高几倍的水平(达所有循环 CD8+T 细胞的 44%)。上述数据表明包被有高抗原 -MHC 效价的小纳米颗粒提供最大的 T 细胞扩增效应。这些结果是出乎意料的。因此, 治疗效果的原因不是 pMHC-NP-T 细胞相互作用的整体亲和力, 而是产生响应 pMHC-NP 治疗而扩增之 T 细胞的前体群的亲和力。这种解释是

与本文所述的数据一致的,意味着 NP 上 pMHC 的效价应增加 pMHC-NP 的治疗效力。

[0204] 实施例 4

[0205] 通过以较高 pMHC 效价包被 pMHC-GNP 之同源 CD8+T 细胞的大量扩增。接下来确定体内 pMHC-NP 是否具有诱导同源 T 细胞大量扩增的潜力。这是通过用携带 25 μ g 总 pMHC (每个 NP 约 150 个 IGRP₂₀₆₋₂₁₄/Kd 分子) 的 3×10^{12} 10-14nm NP 注射几次来处理小鼠而完成的。如图 20 所示,用 10 次剂量 (每周两次,持续 10 周) 处理的小鼠与它们未经处理的对应相比,显示出在外周血中同源 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ (NRP-V7) - 反应性 CD8+T 细胞的大量扩增 (从 < 0.4 至 > 17 或 47% 的 CD8+T 细胞) (下图)。这种扩增在 4 次剂量的 pMHC-NP 后处死的一只小鼠中已经存在 (上图)。pMHC-NP- 扩增的细胞特异性结合同源的 pMHC 四聚体,但不结合非同源的 pMHC 四聚体 (分别为 NRP-V7/K^d 与 TUM/K^d)。

[0206] 实施例 5

[0207] 制备 pMHC 缀合的金纳米颗粒

[0208] 制备 pMHC 缀合的金纳米颗粒 (pMHC-GNP, 12 和 30nm)。制备 GNP。通过以下方法制备 GNP: 于球状烧瓶中在硅油浴中加热 D. D. 水 (200mL) 直至沸腾。然后将 1% 的 HAuCl₄ (4mL) 溶液添加至沸腾的水。将所述溶液搅拌 10 分钟,之后添加 1% 的柠檬酸钠溶液。对于 12nm 的 GNP, 添加 12mL 的柠檬酸钠溶液。对于 30nm 的 GNP, 添加 12mL 的柠檬酸钠溶液。在添加柠檬酸钠液之后,立即呈现葡萄酒的颜色 (wine color)。为了完成反应,将 GNP 溶液搅拌 30 分钟以上。这是 Levy, R 等所述方法 (“Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles.” J Am Chem Soc 126, 10076-84 (2004)) 的改进,其通过引用并入本文。

[0209] GNP 的表面改性。通过添加 25mM 的巯基 -PEG-NH₂ (分子量 3400) 和 50mM 的巯基 -PEG (分子量 2000, PEG/GNP 比 10000 : 1) 到 GNP 溶液使 GNP peg 化。在室温下将所述溶液搅拌 5 小时。然后用 3×30 mL 灭菌的 D. D. 水洗涤 peg 化的 GNP 以除去过量的 PEG 并重悬于 40mL 的 100mM MES (C₆H₁₃NO₄S · xH₂O) 缓冲液中, pH 5.5。

[0210] pMHC 的缀合。在室温下将 pMHC (IGRP₂₀₆₋₂₁₄/Kd, 4mg) 添加至 peg 化的 GNP 溶液, 滴逐添加并温和搅拌。将混合物搅拌一小时之后, 添加 20mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC)。将混合物再搅拌 4 个小时。然后用 40mL 磷酸盐缓冲盐水 (PBS, PH 7.2-7.4) 洗涤 pMHC-GNP 缀合物三次, 并重悬于 8mL 的 PBS 中。

[0211] 实施例 6

[0212] 制备 pMHC 缀合的金纳米颗粒

[0213] 制备 pMHC 缀合的 GNP (pMHC-GNP, 2-10nm)。制备 GNP (2-5nm)。通过以下方法制备 2-5nm 的 GNP: 将 250mg (对于 2nm 的 GNP) 或 50mg (对于 4nm 的 GNP) 的十二烷胺溶解在 10mL 的 DDAB 溶液中 (在甲苯中的 100mM 双十二烷基二甲基溴化铵 (DDAB))。其次, 将 100mg 的四丁基氢硼化铵 (TBAB) 溶解于 4mL 的 DDAB 溶液中。然后在 50mL 的三颈烧瓶中混合十二烷胺和 TBAB 的溶液, 在氮气下搅拌。将 34mg 的 AuCl₃ 溶解于 4.5mL DDAB 溶液中并快速注射入 TBAB 和十二烷胺溶液的混合物中。溶液立即变为深红色, 表明形成了 GNP。将混合物持续搅拌 30 分钟并将 15mL 的乙醇添加至所述混合物。然后将所述混合物在 4, 100 × g 下旋转 12 分钟以沉淀 GNP。

[0214] 制备 GNP (6-10nm)。为了制备 6-10nm 的 GNP, 首先将癸酸 (172mg) 溶解于 10mL 的

甲苯中,然后,在 50mL 的三颈烧瓶中,当在氮气下搅拌时,使其与不同量的 TBAB 溶液(对于 6nm 和 10nm 的 GNP,分别为 4 和 1mL)混合。然后将 AuCl_3 (34mg 溶解于 4.5mL 的 DDAB 原液中)快速注射入 TBAB 和癸酸溶液的混合物中。溶液立刻变为深红色。将混合物持续搅拌 30 分钟并将 15mL 的乙醇添加至所述混合物。然后将所述混合物在 $4, 100 \times g$ 下旋转 12 分钟以沉淀 GNP。

[0215] GNP 的表面改性。将 GNP 重悬于甲醇中的 20mL 0.1M 巯基丙酸 (MPA) 中, pH 为 10, 并在室温下搅拌 1 小时。然后添加 10mL 的乙酸乙酯。然后将混合物在 $4, 100 \times g$ 下旋转 15 分钟。然后将沉淀的 GNP 用 30mL 灭菌的 D. D. 水洗涤 3 次并重悬于 20mL 的 100mM MES ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 缓冲液中, pH 值 5.5。向该混合物添加 0.5M 的聚氧乙烯双(胺)(10,000 : 1 的 PEG/GNP 的比)和 0.1M 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) 溶液(最终的 EDC 浓度为 2mM)。然后将混合物搅拌 4 个小时。用 $3 \times 30\text{mL}$ 灭菌的 D. D. 水洗涤 peg 化的 GNP 以除去过量的 PEG 和 EDC。

[0216] pMHC 的缀合。将 peg 化的 GNP 重悬于 20mL 100mM 的 MES ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 缓冲液中, pH 值 5.5。然后将 pMHC (5mg/mL, 共 10-30mg) 逐滴添加到重悬的 GNP (500 : 1 的 pMHC/GNP 比)中, 并在室温下搅拌 1 小时, 之后添加 0.1M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC) (最终的 EDC 浓度为 2mM)。将混合物搅拌 4 小时以上。将 pMHC-GNP 缀合物用 40mL 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS, PH 7.2-7.4) 洗涤 3 次, 然后重悬于 10-20mL 的 PBS 中。

[0217] pMHC 的优化。最优的 pMHC-NP 设计由在最高可能的密度包被有 pMHC 单体的小颗粒组成, 其产生 3-4nm 分离的 pMHC 复合物。遵循这些原则设计的 pMHC-NP 具有最佳的效能(在较低剂量的总 pMHC 下最大的激动活性和调节性 T 细胞 (Treg) 的扩增性质)。实验已经证实 I 类 pMHC-NP 的结果对于 pMHC II 类包被的 NP 也是正确的。当以最优密度和剂量使用 pMHC 时, 包被有 I 类 pMHC 和 II 类 pMHC 两者的 NP 都可以扩增同源自身调节性 T 细胞。因此, 理想的 pMHC-NP 设计涉及向 NP 递送致密包装之 pMHC 的能力。

[0218] 通过两个实验的观察支持这一点: (1) 包被有相似数目 pMHC 之较大的 NP 比其较小的对应物(特别是在阈值效价值下(即 10 个 pMHC/NP)), 有显著更少的激动性, 不依赖总的 pMHC 输入, 阈值间隔在 10nm 的单个 pMHC 需要 60 个 pMHC/NP 和 > 120 个 pMHC 以达到 3-4nm 的间隔距离; 以及 (2) 在非常高 pMHC 密度下包被的小 NP 具有最高的激动活性, 也不依赖总的 pMHC 输入。因此, 通过增加 pMHC 密度减小 pMHC 的距离(即从 10nm 阈值距离至 2-4nm) 增加了 pMHC-NP-T 细胞相互作用的总亲和力和 TCR 信号转导的能力。因此, 激动活性的阈值是通过在 NP 表面的 pMHC 分子密度(pMHC 分子间距离)而不是通过 pMHC 分子数目来限定的。

[0219] 总的来说, 这为 pMHC-NP 制剂的优化设计奠定了基础, 其旨在在自身免疫病的治疗中体内扩增自身抗原特异性调节 T 细胞。申请人已经示出, 在极低剂量的 pMHC-NP 下, 最优制剂可以在频率高达 1/2 的循环性 CD8+ 或 CD4+T 细胞中产生自身抗原特异性调节 T 细胞的大量体内扩增。由于治疗水平显著低于诱导了这些大量的扩增的那些, 因此这种方法的好处是使得治疗侵袭性自身免疫病具有大的安全性和有效性范围。

[0220] 应当理解的是, 尽管已通过优选的实施方案和任选的特征具体公开了本发明, 但是本领域技术人员可以对本文公开的呈现在本文中的本发明进行修改、改进和变化, 而且这样的修改、改进和变化被认为在本发明的范围之内。本文提供的材料、方法和实施例代表

了一些优选的实施方案,是示例性的并且不旨在对本发明范围进行限制。

[0221] 本文已经对本发明进行了广泛地和一般性地描述。落入一般性公开范围内的每个较窄的种类和亚组也形成本发明的一部分。这包括对本发明的一般性描述,带有从该类属除去任何主题的附带条件或否定限制,而不管去除的材料是否被本文具体的叙述。

[0222] 此外,当以马库什组的方式描述本发明的特征或方面时,本领域技术人员将认识到,本发明也因此可以以马库什组中的任何单个成员或成员的亚组的形式进行描述。

[0223] 贯穿于本公开内容,多种出版物、专利和公开的专利说明书通过标识引用作为参考。所有的出版物、专利申请、专利和本文提及的其它参考文献都通过引用以其整体明确地并入本文,其整体引用的程度与如果通过单独引用各自并入的程度相同。在冲突的情况下,以包括定义的本说明书为准。

[0224] 序列表

[0225] SEQ ID No. 1 :pMOG₃₈₋₄₉抗原 :GWYRSPFSRVVH。

[0226] SEQ ID No. 2 :包含 pMOG₃₈₋₄₉抗原的载体的蛋白质序列 (图 9)。

[0227] SEQ ID No. 3 :包含 pMOG₃₈₋₄₉抗原的载体的 DNA 序列 (图 9)。

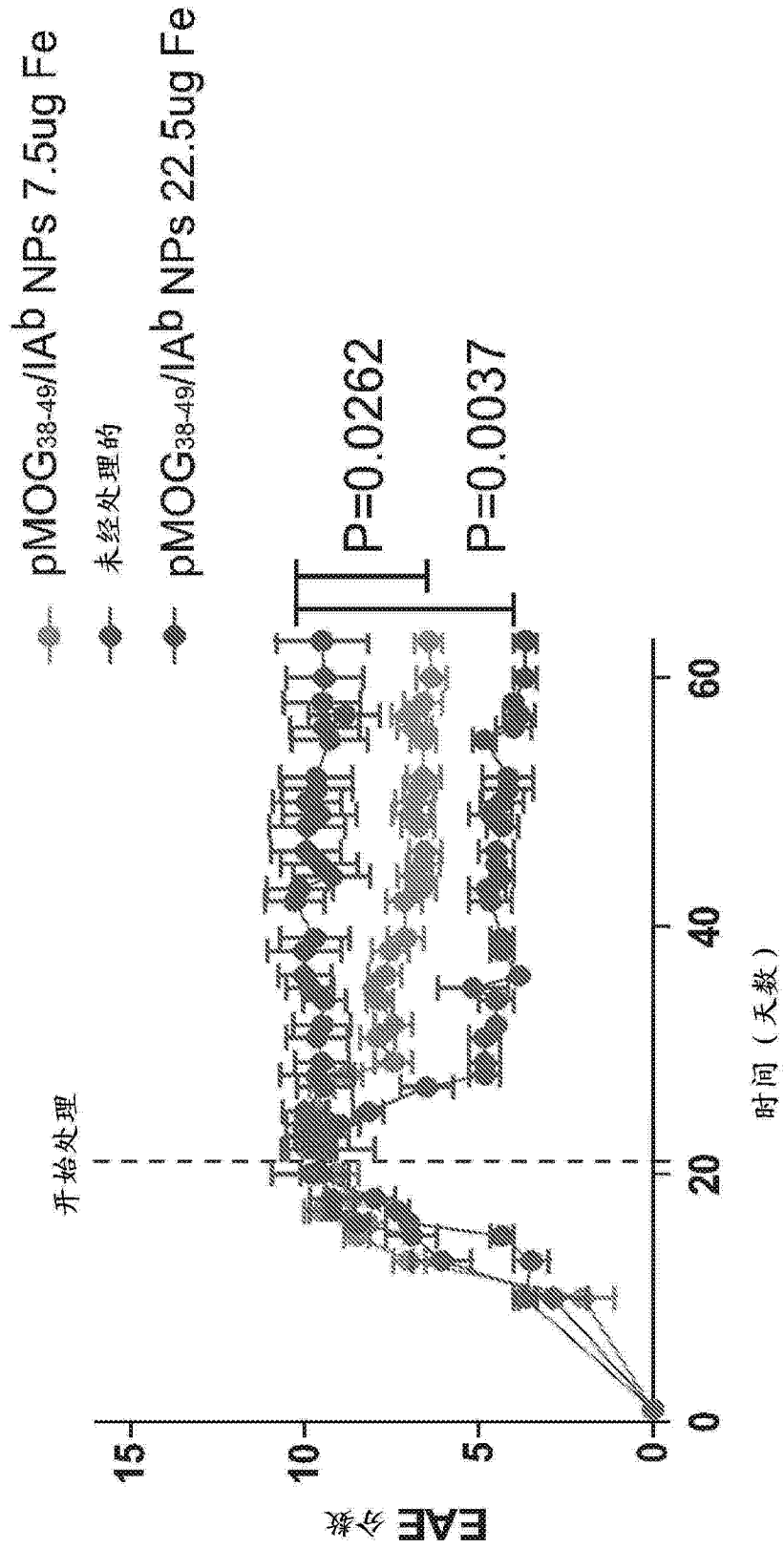


图 1

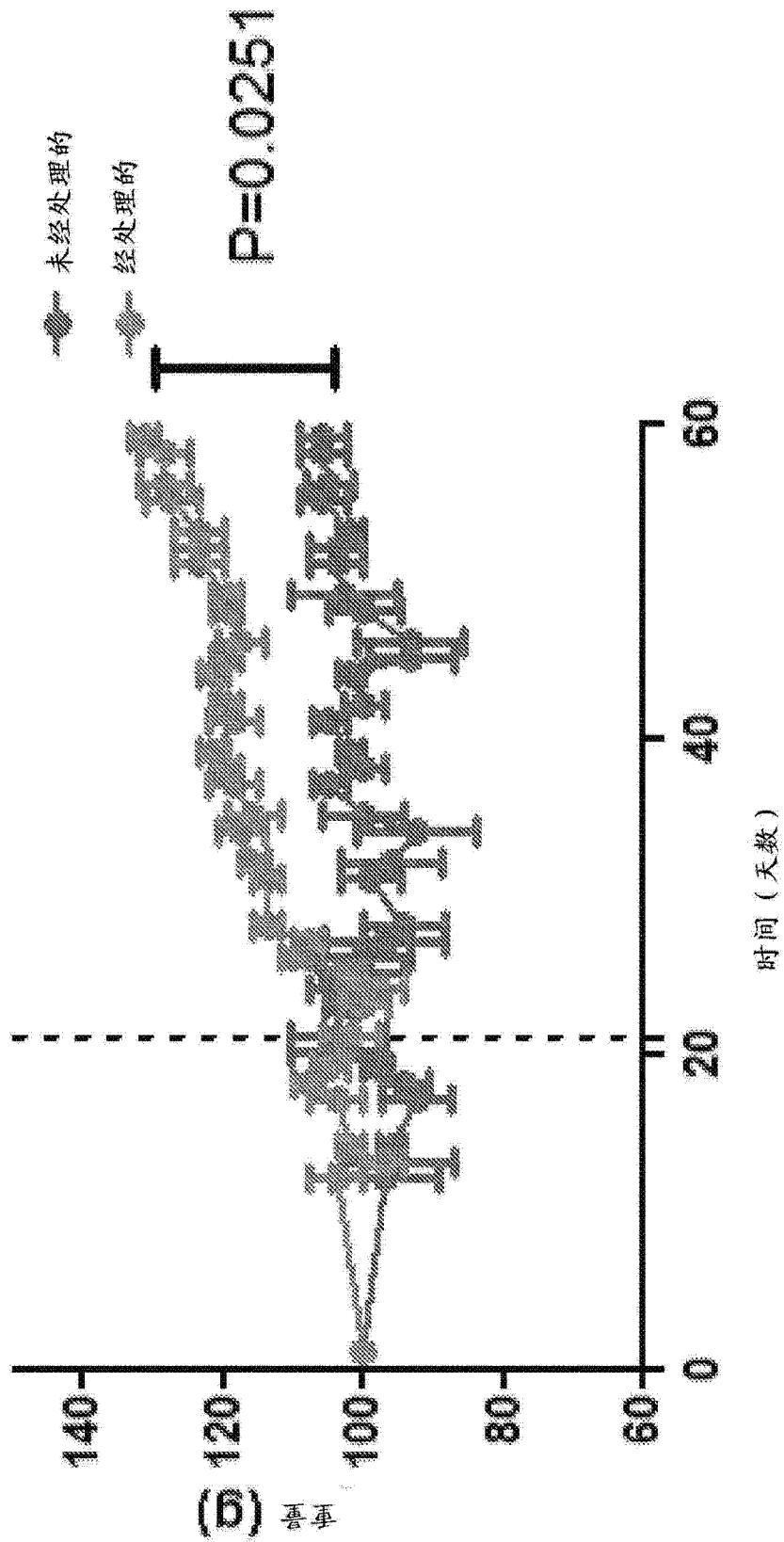


图 2

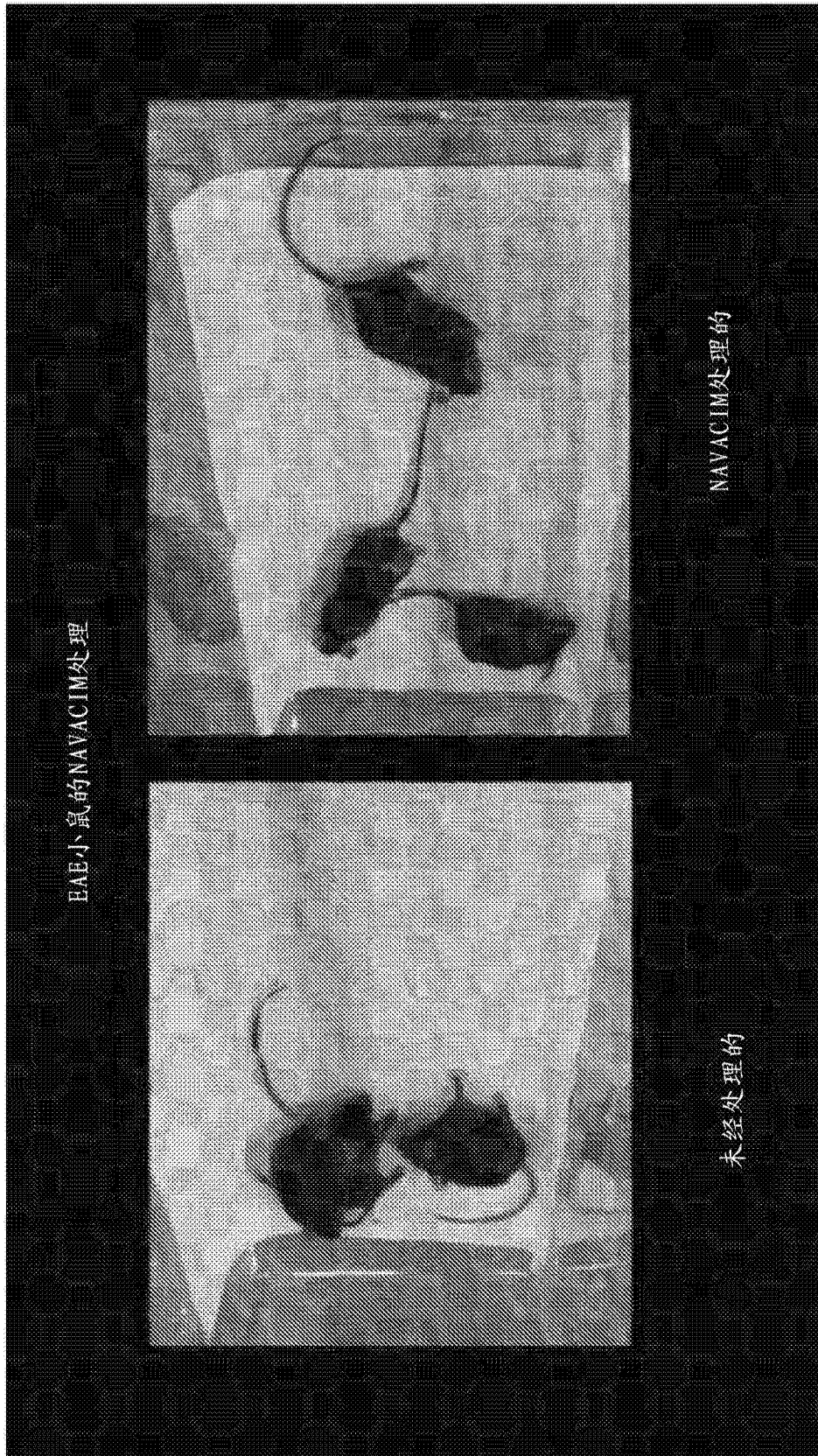


图 3

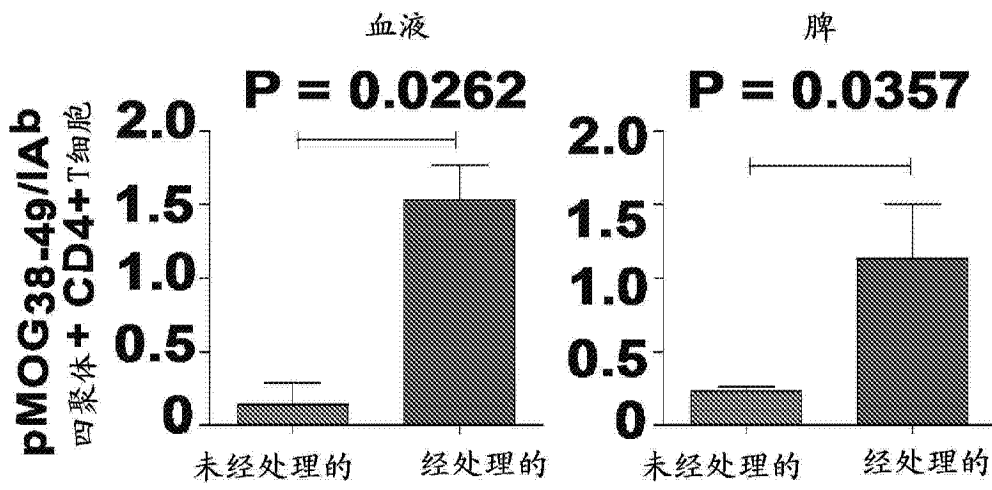
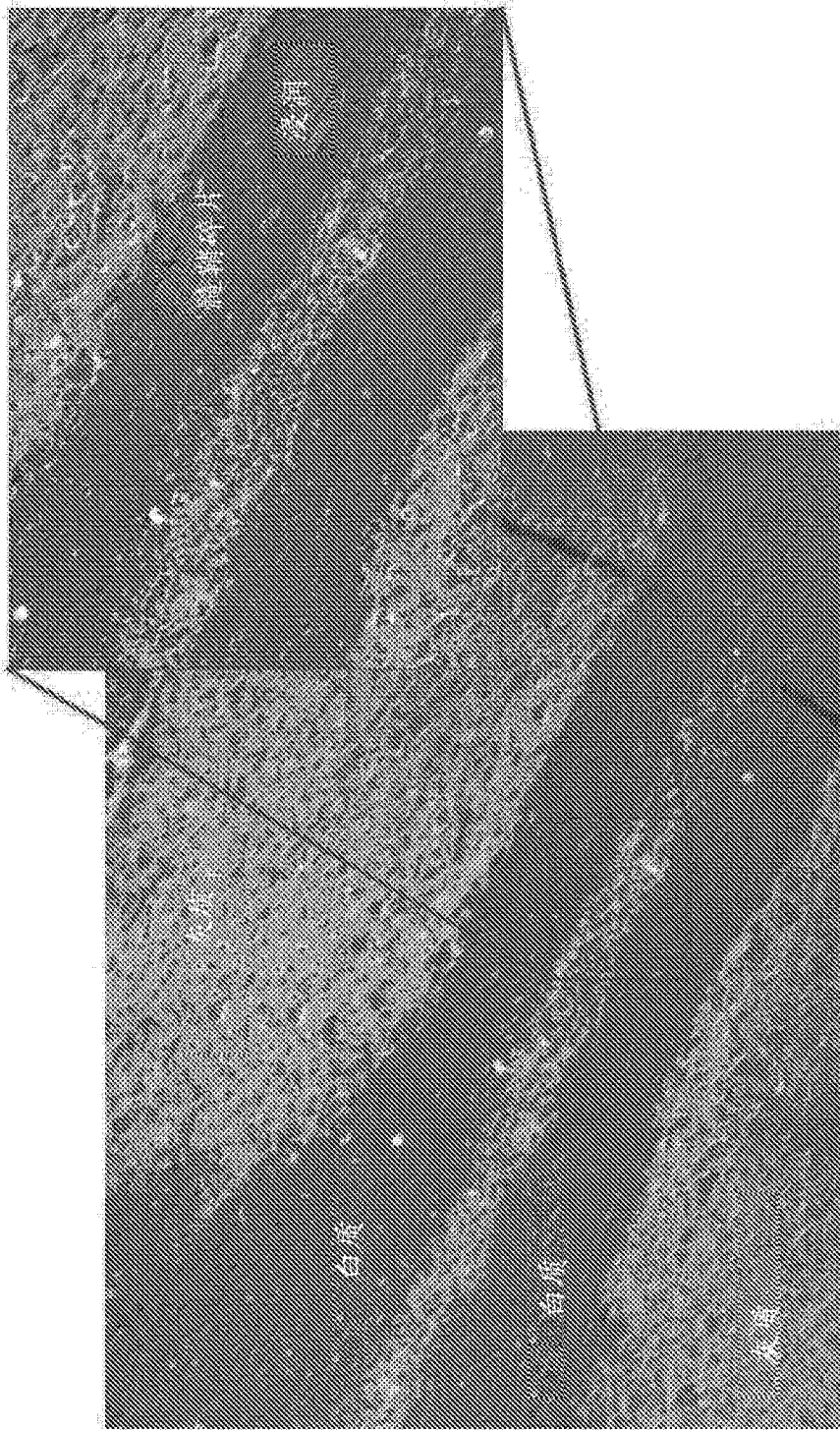


图 4



脊髓
未经处理的小鼠

图 5

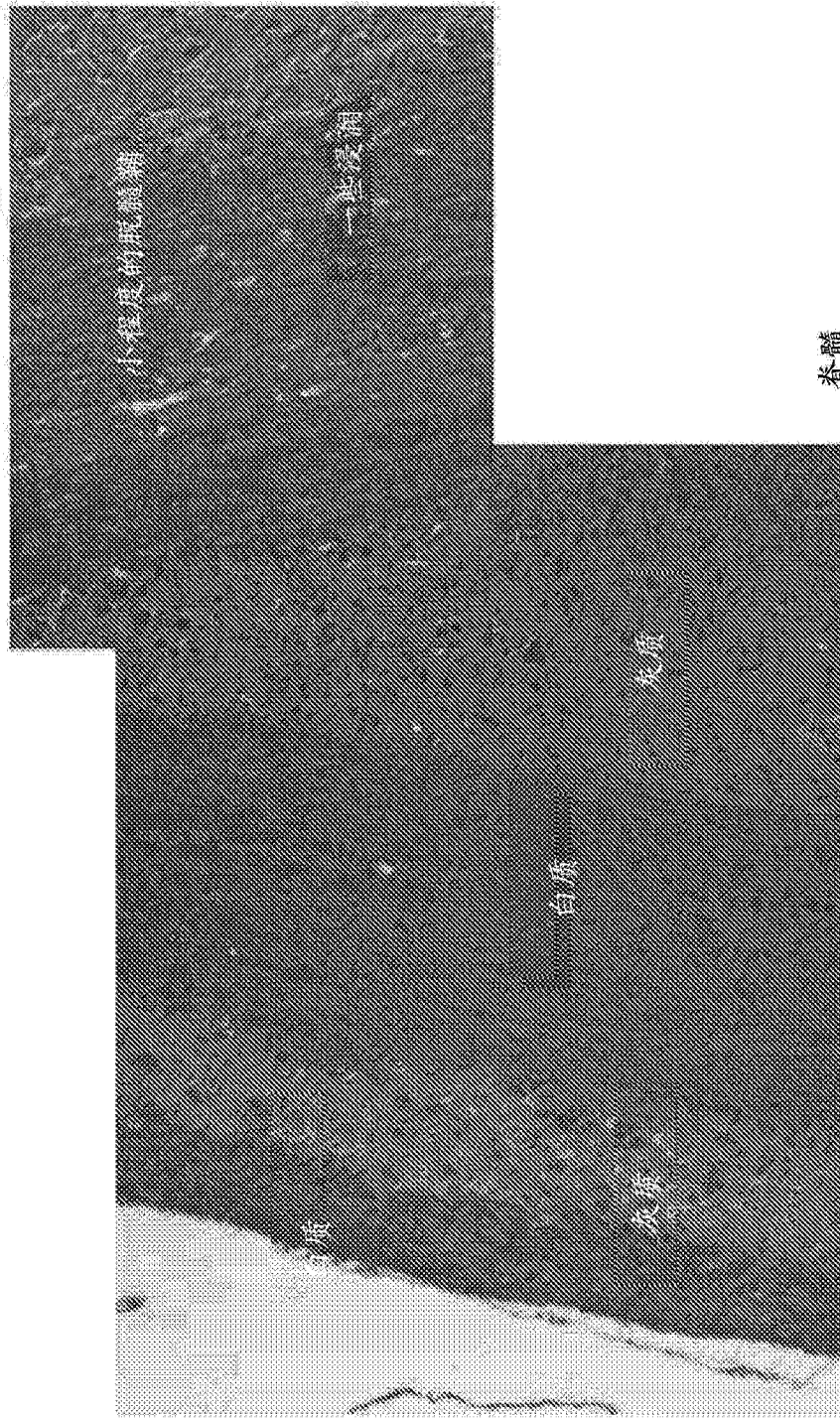


图 6

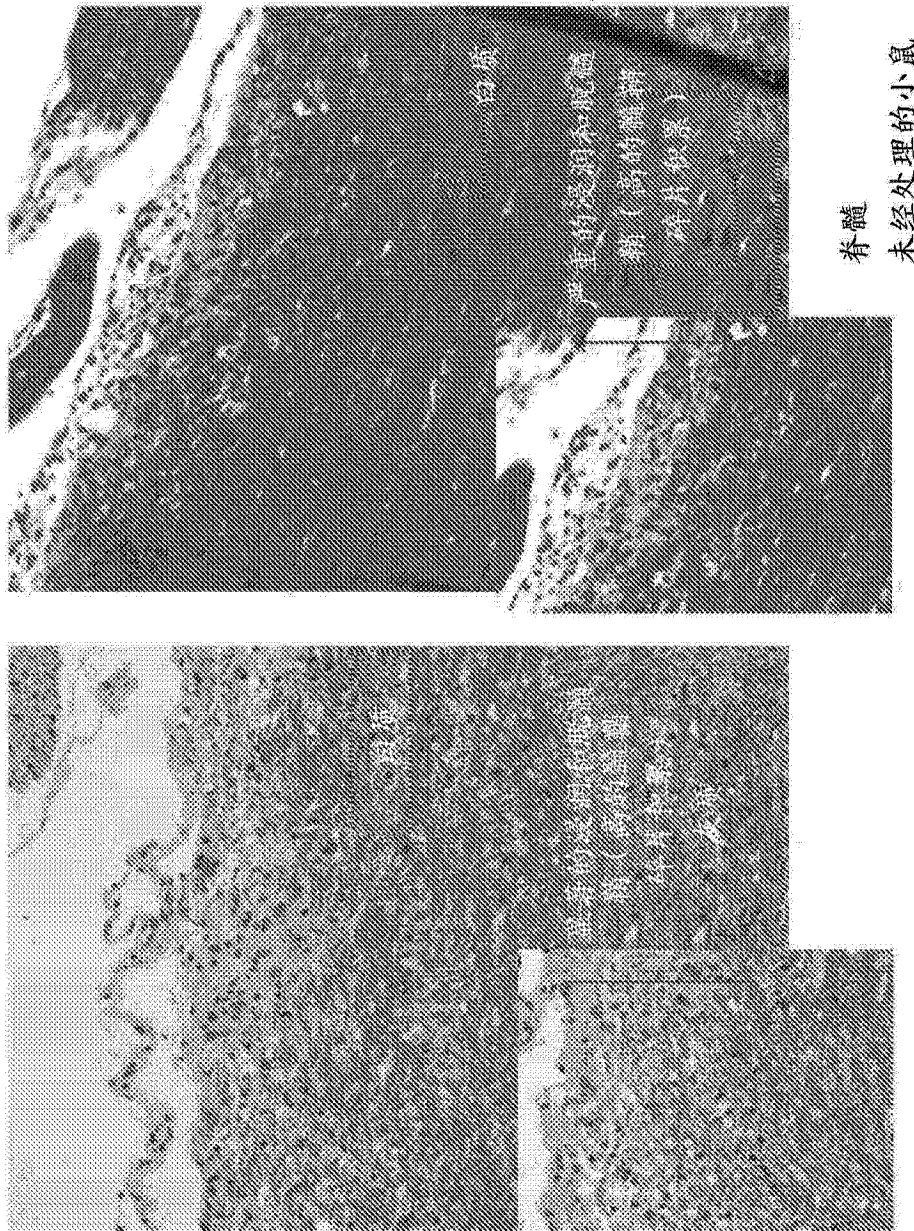


图 7

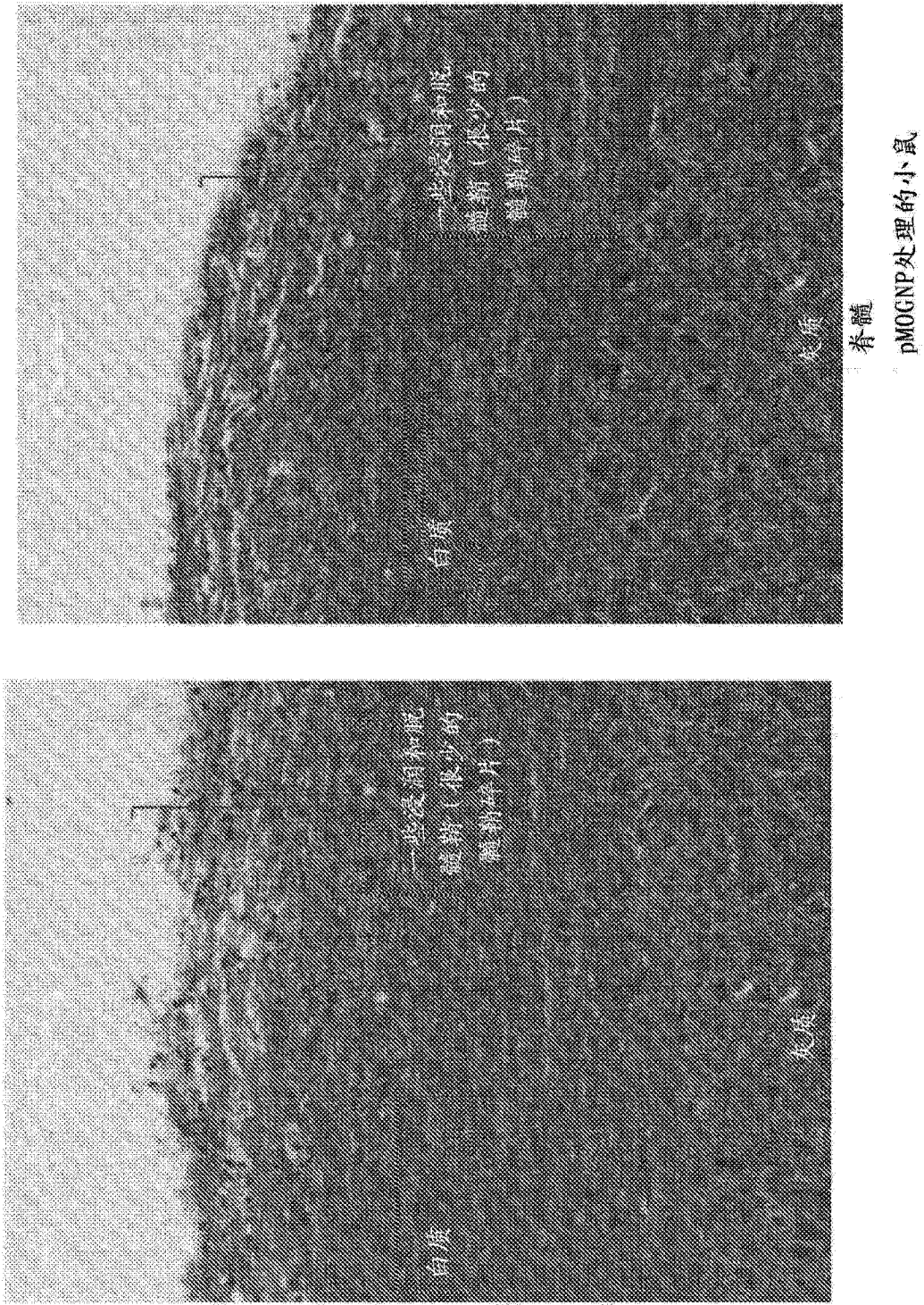


图 8

KpnI
 ~~~~~  
 NcoI  
 ~~~~~  
 M A I I Y L I L L E T A V R G G
 841 GG TACCATGGCT ATCATCTACC TCATCCTCCT GTTCACCGCT GTGCGGGGCG
 CC ATGGTACCGA TAGTAGATGG AGTAGGAGGA CAAGTGGCGA CACGCCCGCG
 ~~~~~ NcoI ~~~~~ SpeI ~~~~~  
 W Y R S P F S R V V H G G G G S L V P R  
 901 GCTGGTATAG AAGTCCATTT AGCCGTGTTG TCCATGGAGG TGGAGGCTCA CTAGTGCCCC  
 CGACCATATC TTCAGGTAA TCGGCACAAC AGGTACCTCC ACCTCCGAGT GATCACGGGG  
 G S G G G S G D S E R H F V Y Q F M G  
 961 GAGGCTCTGG AGGTGGAGGC TCTGGAGACT CCGAAAGGCA TTTCGGTAC CAGTTCATGG  
 CTCCGAGACC TCCACCTCCG AGACCTCTGA GGCCTTCCGT AAAGCACATG GTCAAGTACC  
 E C Y F T N G T Q R I R Y V T R Y I Y N  
 1021 GCGAGTGCTA CTTACCAAC GGGACGCAGC GCATACGATA TGTGACCAGA TACATCTACA  
 CGCTCACGAT GAAGTGGTTG CCCTGCGTCC CGTATGCTAT AACTGGTCT ATGTAGATGT  
 R E E Y V R Y D S D V G E H R A V T E L  
 1081 ACCGGGAGGA GTACGTGCGC TAGGACAGCG ACGTGGGCGA GCACCGCGCG GTGACCGAGC  
 TGGCCCTCCT CATGCACGCG ATGCTGTGGC TGCACCCGCT CGTGGCGCGC CACTGGCTCG

图 9

G R P D A E Y W N S O P E I L E R T R A  
 1141 TGGGGCGGCC AGACGCCGAG TACTGGAACA GCCAGCCGGA GATCCTGGAG CGAACGCCGG  
 ACCCCGCCGG TGTGCGGCTC ATGACCTTGT CGGTGGGCTT CTAGGACCTC GCTTGGCGCC  
 E L D T V C R H N Y E G P E T H T S L R  
 1201 CCGAGCTGGA CACGGTGTGC AGACACAAC ACGAGGGGCC GGAGACCCAC ACCTCCCTGC  
 GGCTCGACCT GTGCCACAG TCTGTGTFGA TGCTCCCCGG CCTGTGGGTG TGGAGGGAGC  
 R L E Q P N V V I S L S R T E A L N H H  
 1261 GGCGGCTTGA ACAGCCCAAT GTCGTCTAT CCTGTCCAG GACAGAGGCC CTCAACCACC  
 CCGCCGAAC TGTCCGGTTA CAGCAGTAGA GGGACAGGTC CTGTCTCCGG GAGTTGGTGG  
 N T L V C S V T D F Y P A K I K V R W F  
 1321 ACAACACTCT GGTCTGCTCA GTGACAGATT TCTACCCAGC CAAGATCAAA GTGCGCTGGT  
 TGTPTGTGAGA CCAGACGAGT CACTGTCTAA AGATGGGTGG GTTCTAGTTT CACGCGACCA  
 R N G Q E E T V G V S S T Q L I R N G D  
 1381 TCCGGAAATGG CCAGGAGGAG ACGGTGGGGG TCTCATCCAC ACAGCTTATT AGGAATGGGG  
 AGGCCTTACC GGTCCCTCCTC TGCCACCCCC AGAGTAGGTG TGTGGAATAA TCCTTACCCC  
 W T F Q V L V M L E M T P R R G E V Y T  
 1441 ACTGGACCTT CCAGGTCTTG GTCATGCTGG AGATGACCCC TCGGCGGGGA GAGGTCTACA  
 TGACCTGGAA GGTCCAGGAC CAGTACGACC TCTACTGGGG AGCCGCCCTT CTCCAGATGT

图 9(续)

```

      C H V E H P S L K S P I F V E W R A Q S
1501 CCTGTCAAGT GGAGCATCCC AGCCTGAAGA GCCCATCAC TGTGGAGTGG AGGGCACAGT
      GGACAGTGCA CCTCGTAGGG TGGACTTCT CGGGGTAGTG ACACCTCAC TCCCGTGTCA

      E S A W S K G G G G G G G G G R I A R L E
1561 CTGAGTCTGC CTGGAGCAAG GGAGGCGGAG GCGGTGGCGG AGGACGGATC GCTCGGCTAG
      GACTCAGACG GACCTCGTTC CCTCCGCCTC CGCCACCGCC TCCTGCCTAG CGAGCCGATC

      S K V K T L R A Q N S E L A S T A N M I
1621 AGGAAAAAGT GAAAACCTTG AAAGCGCAA ACTCCGAGCT GGCCTCCACG GCCAACATGC
      TCCTTTTTC CTTTGGAAC TTTCGCTTT TGAGGCTCGA CCGCAGGTGC CGTTGTAGC
      XhoI
      ~~~~~
 XbaI
      ~~~~~

      E E Q V A Q L K Q E V M N E *
1681 TCAGGGAACA GGTGGCACAG CTTAAGCAGA AAGTCATGAA CCACTGAGCTAGAG
      AGTCCCTTGT CCACCGTGTG GAATTCGTCT TTCAGTACTT GGTGACTCGATCTC
    
```

图9(续)

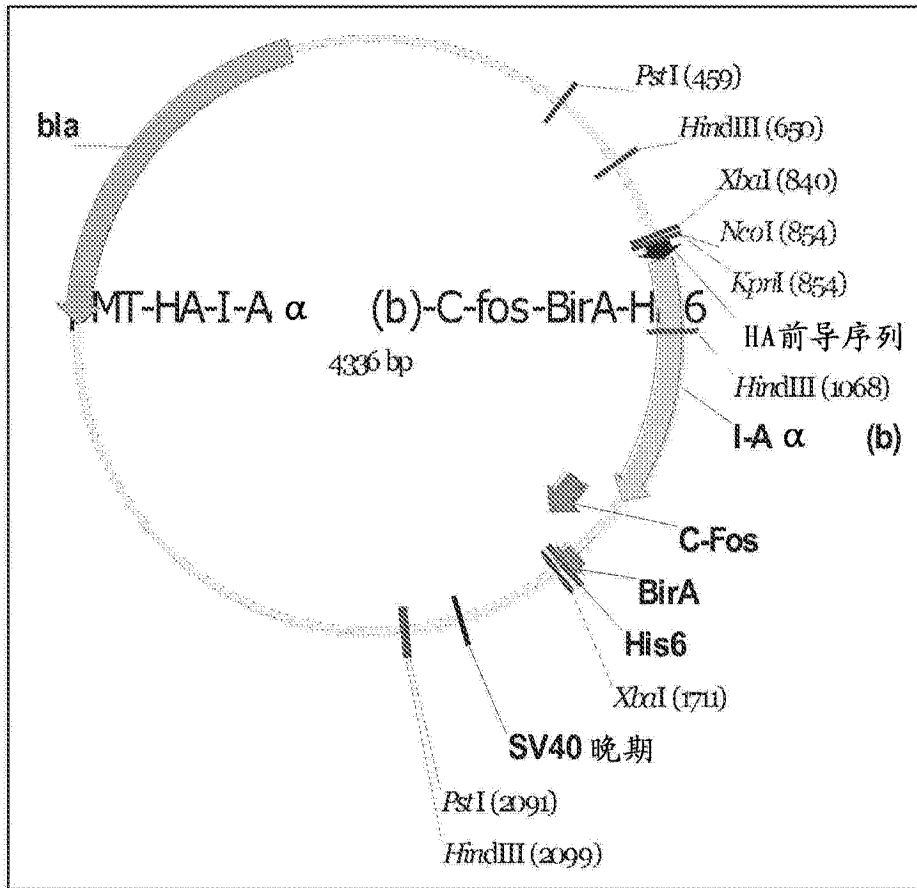


图10

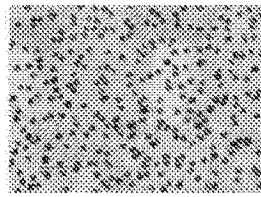


图 11

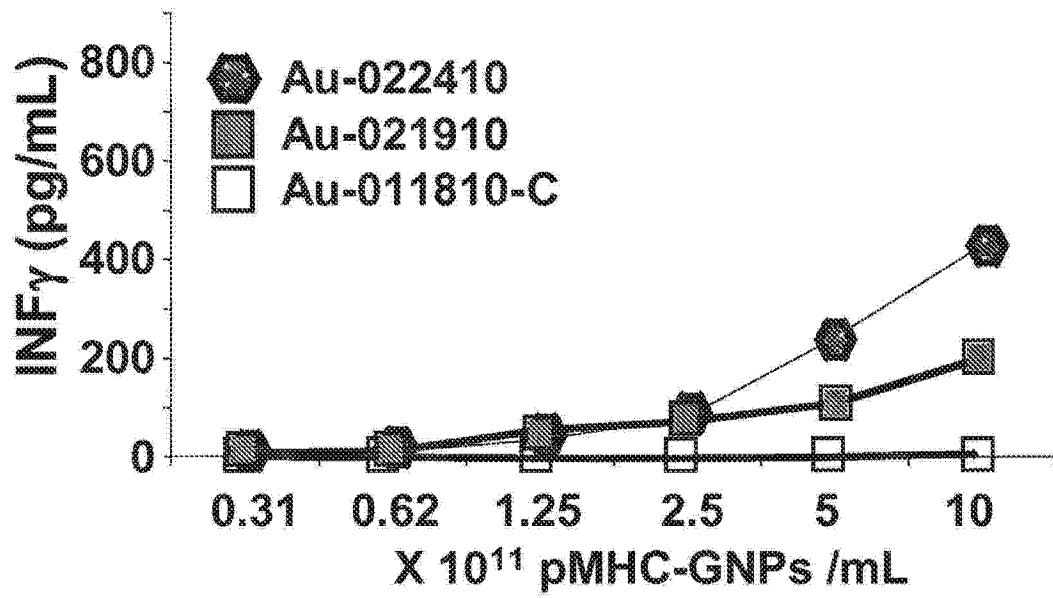


图 12

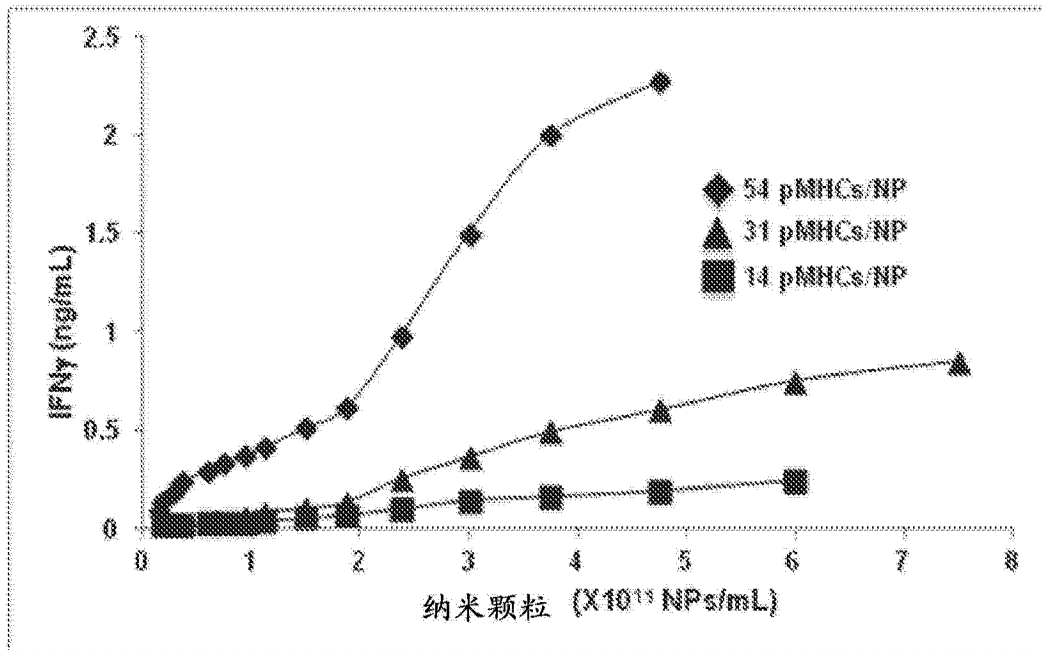


图 13

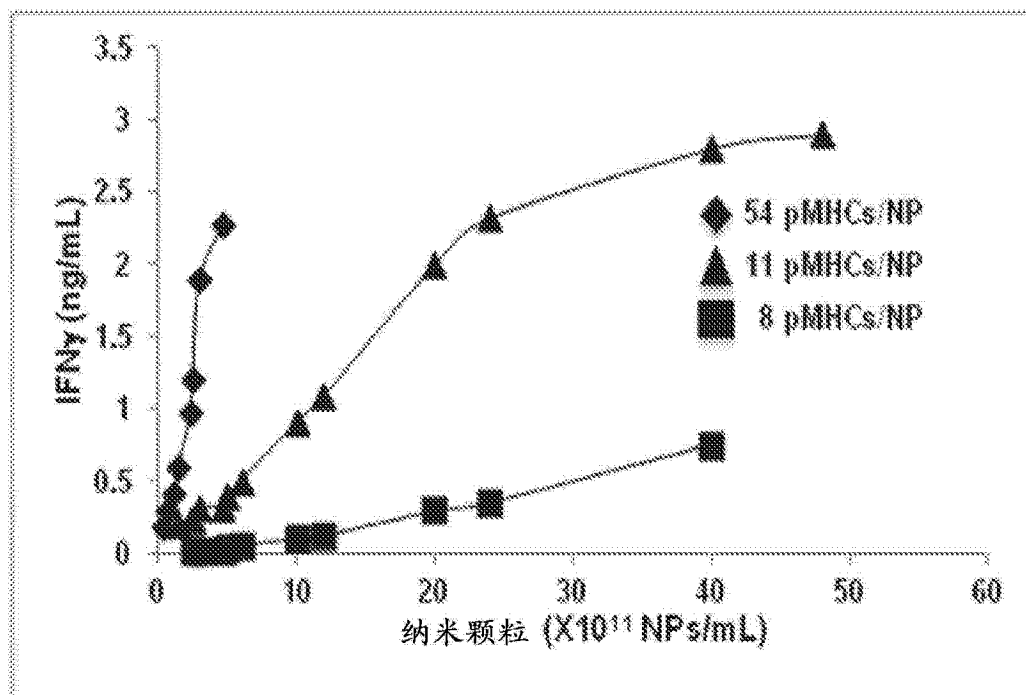


图 14

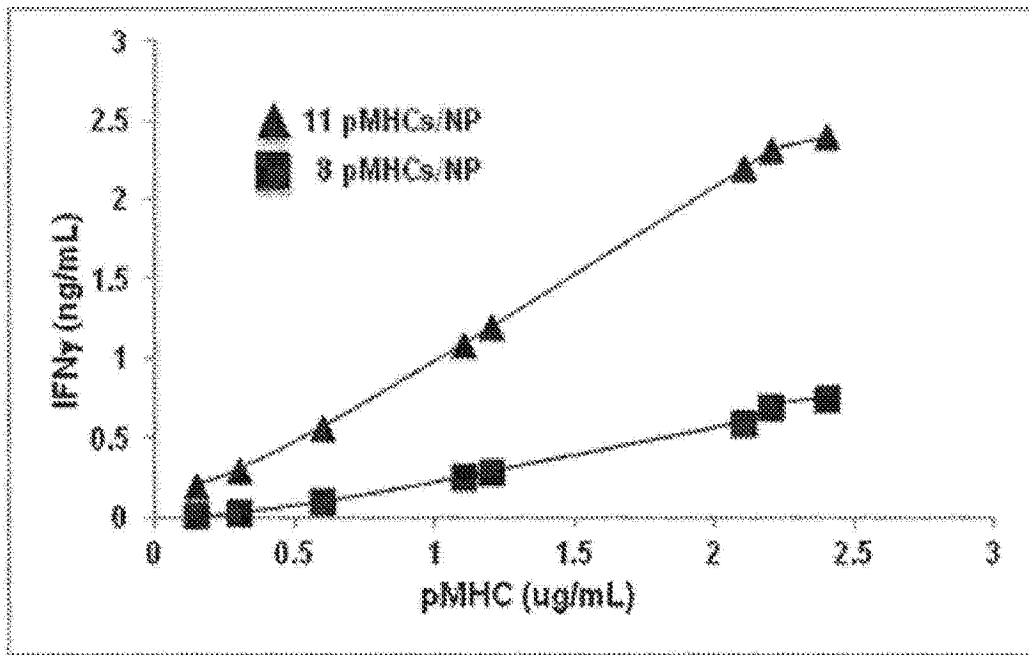


图 15

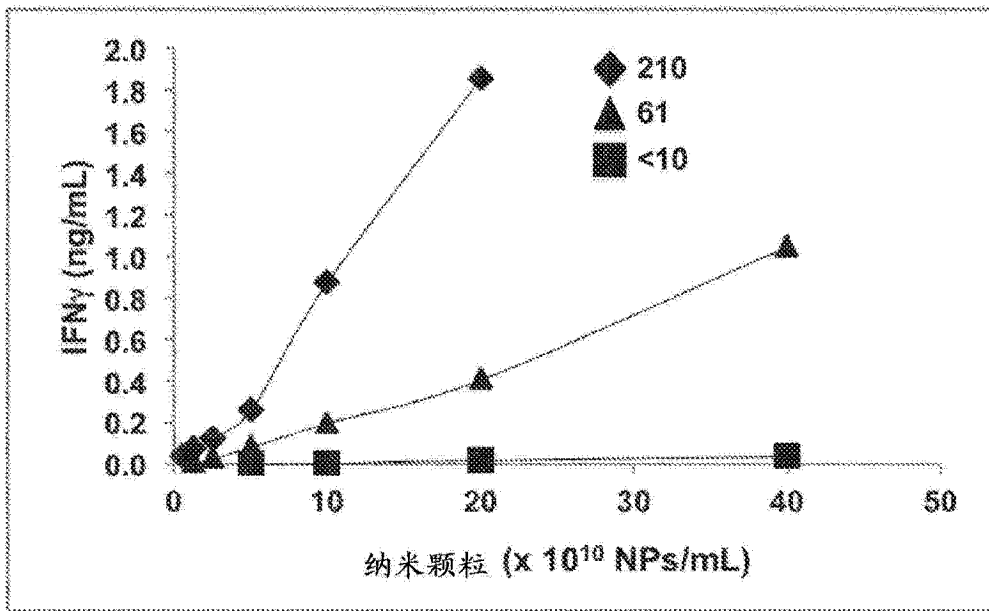


图 16

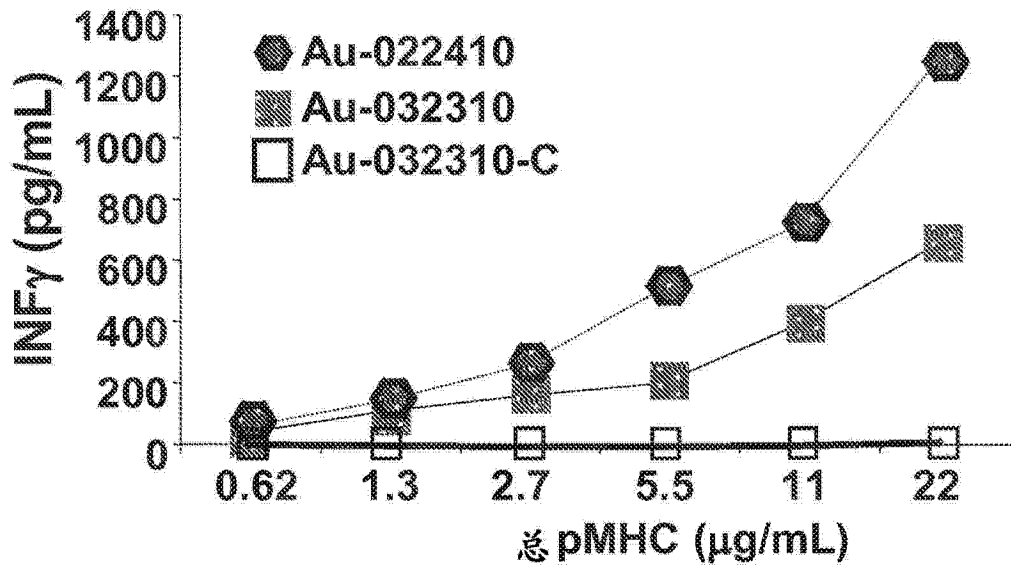


图 17

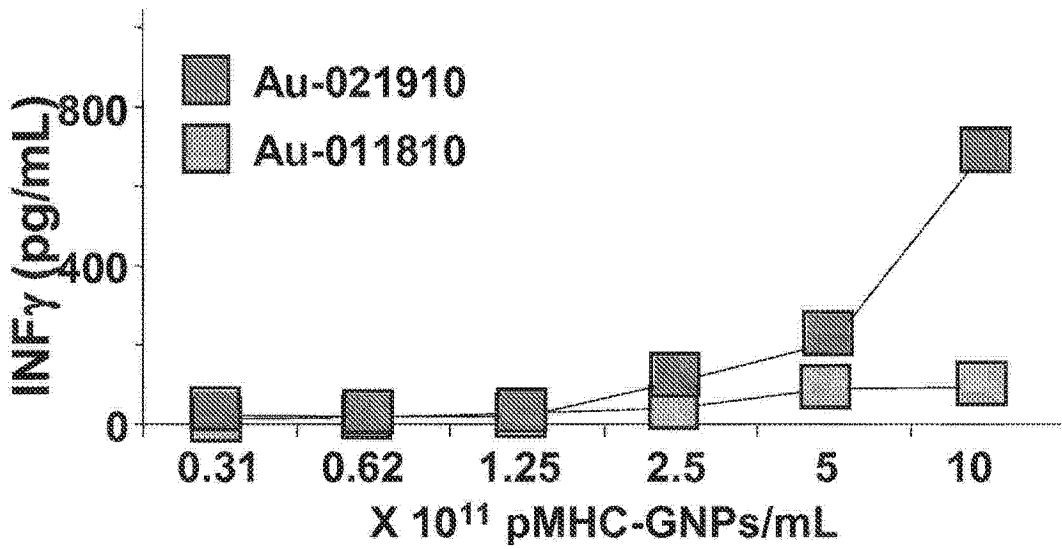


图 18



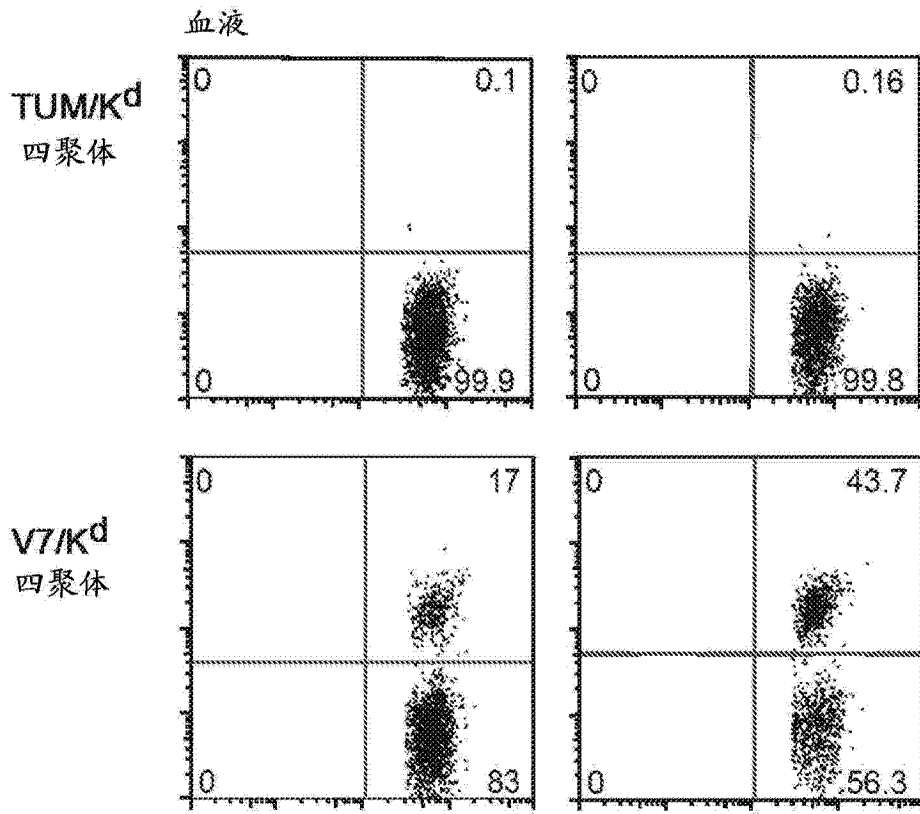


图 19

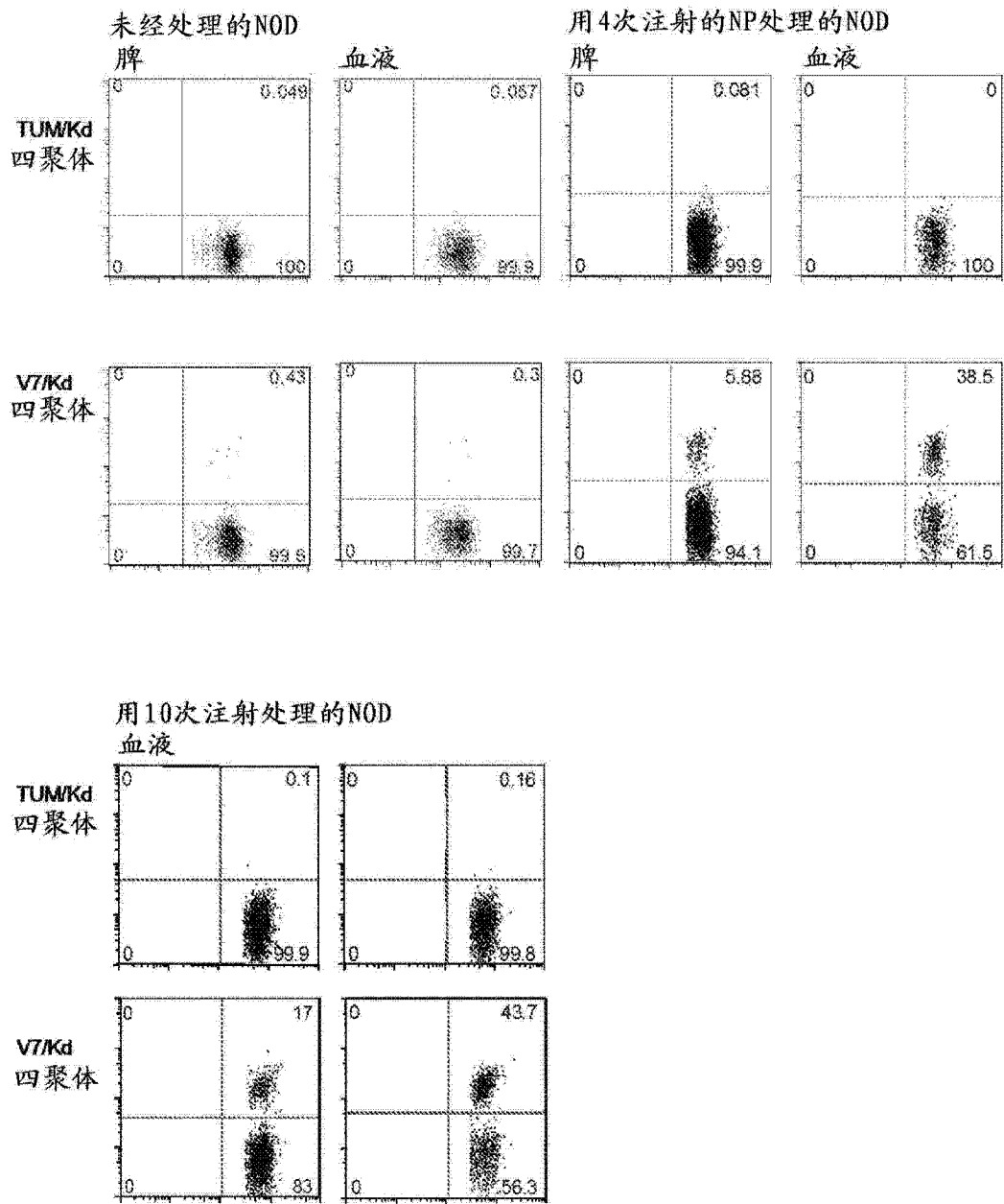


图 20

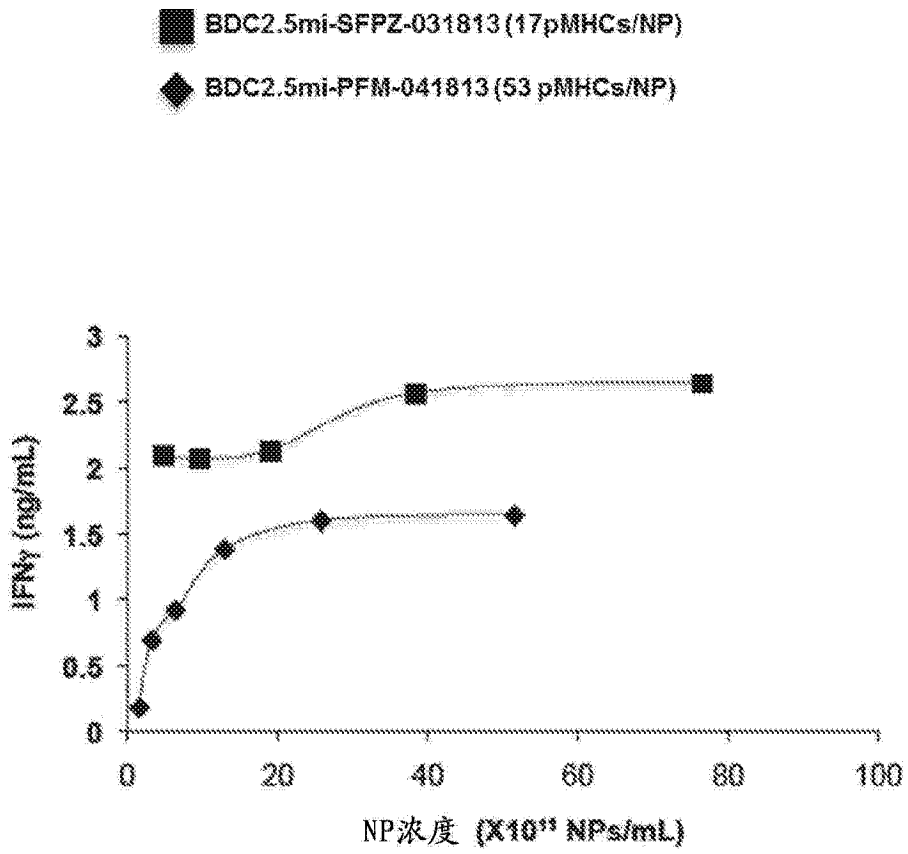


图 21