

(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2004-506921

(P2004-506921A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 37/06	4 B O 6 3
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/08	C O 7 K 14/46	4 H O 4 5
C O 7 K 14/46	C I 2 Q 1/02	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-521505 (P2002-521505)	(71) 出願人	503070650
(86) (22) 出願日	平成13年8月17日 (2001.8.17)		アビトープ テクノロジー (ブリストル)
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月21日 (2003.2.21)		リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003702		イギリス国 B S 1 4 L Y ブリストル
(87) 国際公開番号	W02002/016410		クイーンズ スクエア 4 6 - 4 8
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)	(74) 代理人	100067736
(31) 優先権主張番号	0020618.5		弁理士 小池 晃
(32) 優先日	平成12年8月21日 (2000.8.21)	(74) 代理人	100086335
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		弁理士 田村 榮一
(31) 優先権主張番号	0114547.3	(74) 代理人	100096677
(32) 優先日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		弁理士 伊賀 誠司
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド選択方法

(57) 【要約】

【課題】過敏症疾患等の免疫系疾患の予防及び治療に有効な免疫寛容原性ペプチドの選択を容易にする。

【解決手段】促進処理することなく、MHCクラスI又はクラスII分子に結合できるペプチドを選択することによって、免疫寛容原性ペプチドを選択する方法を提供する。ここで選択されたペプチドは、免疫系疾患を治療及び予防する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

促進処理することなく MHC クラス I 又はクラス II 分子に結合可能なペプチドを選択するステップを含む免疫寛容原性ペプチドの選択方法。

【請求項 2】

ペプチドは、促進処理することなく MHC クラス II 分子に結合可能であることを特徴とする請求項 1 記載のペプチド選択方法。

【請求項 3】

ペプチドは、T 細胞エピトープからなる複数のペプチドから選択されることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のペプチド選択方法。

【請求項 4】

複数のペプチドは、抗原提示細胞の MHC クラス II 分子から溶離されることを特徴とする請求項 3 記載のペプチド選択方法。

【請求項 5】

複数のペプチドのうちの各ペプチドは、免疫助成剤を有する被験対象に投与されると被験対象内にて抗原と結合される疾患を誘発可能であることを特徴とする請求項 3 又は 4 記載のペプチド選択方法。

【請求項 6】

ペプチドは、先端が欠落したペプチドの入れ子型対から選択されることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のペプチド選択方法。

【請求項 7】

T 細胞エピトープ及び以下によって決定される T 細胞エピトープからなるペプチドである
(i) 治療：疾患をもった被験対象からの標本細胞を治療する、及び疾患をもたない被験対象からの標本細胞を治療する、

(i i) 標本細胞間の T 細胞応答を比較する

ことを特徴とする上記全請求項に記載のペプチド選択方法。

【請求項 8】

以下のステップ

(i) ペプチドを含みペプチドの提示システムから独立する抗原処理 (A P I P S) にて扱うステップと、

(i i) A P I P S 内の MHC クラス I 又はクラス II に対するペプチドの結合性を解析するステップと、

を有することを特徴とする上記全請求項に記載のペプチド選択方法。

【請求項 9】

T 細胞付加及び T 細胞活性化を測定することによってペプチドが MHC クラス I 又はクラス II に結合することが解析されることを特徴とする請求項 8 記載のペプチド選択方法。

【請求項 10】

A P I P S は、

(i) 定着された抗原提示細胞

(i i) MHC クラス I 又はクラス II 分子からなる脂質膜

(i i i) MHC クラス I 又はクラス II 分子の平面結合

を備えることを特徴とする請求項 8 記載のペプチド選択方法。

【請求項 11】

促進処理することなく MHC クラス I 又はクラス II 分子に結合されることを特徴とする上記ペプチド選択方法によって選択されるペプチド。

【請求項 12】

ペプチドは、ミエリン塩基性タンパク質：30 - 44、80 - 94、83 - 99、81 - 95、82 - 96、83 - 97、84 - 98、110 - 124、130 - 144、131 - 145、132 - 146、及び 133 - 147 から選択されることを特徴とする請求項 11 記載の上記ペプチド選択方法によって選択されるペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

上記ペプチドは、疾患の予防及び/又は治療に用いられることを特徴とする請求項 11 又は 12 記載の上記ペプチド選択方法によって選択されるペプチド。

【請求項 14】

上記疾患は、過敏症疾患であることを特徴とする請求項 13 記載の上記ペプチド選択方法によって選択されるペプチド。

【請求項 15】

請求項 11 乃至請求項 14 に関する複数のペプチドからなる製薬構造体であって、各ペプチドは、疾患に対する T 細胞エピトープを有することを特徴とする製薬構造体。

【請求項 16】

請求項 11 乃至請求項 14 に関するペプチドを投与するステップを含み被験対象における疾患の予防及び/又は治療方法。

【請求項 17】

(i) 疾患に対する抗原を同定するステップ、
 (ii) 抗原に対するエピトープを同定するステップ、
 (iii) 被験対象にエピトープを投与するステップ
 とを含むことを特徴とする請求項 16 記載の疾患の予防及び/又は治療方法。

【請求項 18】

ペプチド又はエピトープは、複合用量にて投与されることを特徴とする請求項 16 又は 17 記載の疾患の予防及び/又は治療方法。

【請求項 19】

ペプチド又はエピトープは、鼻腔投与されることを特徴とする請求項 16 乃至 18 記載の疾患の予防及び/又は治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫寛容原性ペプチドの選択方法、この方法によるペプチドの同定、及びこの方法を用いて病気を治療する及び/又は予防することに関する。本発明はまた、このような免疫寛容原性ペプチドの複数からなる薬学化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】

適応免疫反応において、T 型リンパ細胞は、タンパク質抗原の内部エピトープを認識できる。抗原細胞 (APC) は、タンパク質抗原を取り上げ (take up)、短いペプチドの断片に減成する。ペプチドは、細胞内の主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラス I 又は II 分子に結合し、細胞表面に運ばれる。MHC 分子と合接する細胞表面が存在すると、ペプチドは、T 細胞 (T 細胞受容体 (TCR) を介して) によって認識される。この場合、ペプチドが T 細胞のエピトープである。

【0003】

T 細胞エピトープは、侵入した抗原に対してであろうと、体内の抗原に対してであろうと、あらゆる抗原に対する適合免疫反応において主力 (central role) として働く。過敏症 (アレルギー、自己免疫性疾患、移植拒絶反応を含む) において、T 細胞によってなされるセントラルロールとしての役割が実験的モデルを使用することによって照明されつつある。(T 細胞エピトープの構造に基づく) 合成ペプチドをアジュバンド (補助薬) と組み合わせて投与することで、炎症やアレルギー疾患を誘発することができる。

【0004】

これとは対照に、可溶性のペプチドエピトープを投与することによって、特定のペプチドエピトープに対して免疫寛容性を誘発できることが証明されている。可溶性ペプチド抗原を投与することは、経験的な自己免疫疾患の脳脊髄炎 (EAE - 多発性硬化症 (MS) のモデル) (Metzler and Wraith (1993) Int. Immunol. 5: 1159 - 1165; Liu and Wraith (1995) Int.

10

20

30

40

50

Immunol. 7: 1255-1263; Anderton and Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28: 1251-1261)、経験的な関節炎、糖尿病、uveoretinitis(上記Anderton and Wraith (1998)に記載されている。)において疾患を抑制する効果的な手法として示されている。これはまた、進行性のEAE疾患に対する治療手法として示されている(上記Anderton and Wraith (1998))。

【0005】

免疫寛容原性ペプチドを病気の予防や治療に使用することは、大いに注目すべき点である。その理由は、特定の免疫寛容原性エピトープが同一組織内の個々の抗原に対するT細胞の応答を抑制できることが示されたことである。この現象は、「バイスタンダ抑制(bystander suppression)」として知られている。このバイスタンダ抑制とは、特定の免疫寛容原性ペプチド(上記Anderton and Wraith (1998)に示される。)を用いることによって、与えられた抗原に対して少なくとも1つ以上のエピトープ(好ましくは全てのエピトープ)、及び与えられた疾患に対して少なくとも1つ以上の抗原に寛容を誘発することができることを意味している。これは、特定の疾患において全ての病原性抗原を識別する必要性を不要にするものである。

10

【0006】

ペプチドはまた、比較的低コストである点、及びペプチド類似物から免疫学的属性を変更したものを生産することができる点で、治療の有用なオプションである。このようにペプチドは、相互作用を変化させるために、MHC(major histocompatibility complex)とTCR(T cell receptor)のどちらが変更されてもよい。

20

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

この研究において考えられる問題点の1つは、全てのペプチドが寛容を誘発できるT細胞エピトープとして作用するわけではないことが説明されていることである。ミエリン塩基性タンパク質(MBP)ペプチド89-101は、免疫化の後の優性免疫抗原であって、またT細胞の反応性を発現及びEAEの誘導に対して非常に効果的な免疫原である。ところが、このペプチドは、溶液にて投与した場合、寛容を誘導する効果がないことが証明されている(上記Anderton and Wraith (1998)に示されている)

30

【0008】

寛容を誘発するT細胞の機能に関して、観察されたヒエラルキーに基づく多くの説明がなされている(例えば、上記Anderton and Wraith (1998)に記載されている。)。特に、MHCに対するペプチドの類似性と免疫寛容原性(上記Liu and Wraith (1995)に記載されている。)との相関関係があることが説明されている。しかし、観察結果の中には、一致しないものもある。例えば、MBP[89-101]は、免疫寛容原性ではないが、比較的高い親和性をもってI-A^sに結合する。このように、ペプチドが免疫寛容原性を誘発するとは直接的に予測できない。

【0009】

仮に、一部のペプチドエピトープのみが寛容を誘発できることについて合理的な説明があれば、過敏症疾患の予防及び治療に有効な免疫寛容原性ペプチドの選択方法が容易になる。

40

【0010】

そこで、本発明に係るペプチド選択方法は、過敏症疾患等の免疫系疾患の予防及び治療に有効な免疫寛容原性ペプチドの選択を容易にすることを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、ペプチドのエピトープが抗原処理することなく未熟なAPCによって提示されるような適切なサイズであるか否かを示している。それが免疫寛容原性を誘発すること

50

ができる。T細胞エピトープが免疫寛容原性であって他は寛容を誘発できない点は、エピトープの中には、MHC分子によって提示され得る以前に促進処理が必要なものもあるという事実によって説明されるこれら促進処理が必要なエピトープは、溶液状態にて投与されたとき、寛容を誘発できないにもかかわらず、エピトープは、免疫助成剤とともに投与されると疾患を誘発することができる。

【0012】

促進処理を必要としないエピトープは、寛容を誘発することができ、これは本発明者によって「アピトープ」と表される(抗原提示独立エピトープ; APITOPES (Antigen Processing Independent epiTOPES))。

【0013】

この知見は、生体内におけるペプチドの寛容能力を検査する必要性を不要にする免疫寛容原性T細胞エピトープを規則に基づいて選択する方法を提供するものである。これは、特に、動物モデルが対応できない疾患を予防する又は治療するための方法の発展に有益である。生体内に用いられる前に試験管内にてヒトT細胞(ヒトMHC分子に結合する抗原を認識する。)を使ってペプチドの寛容誘導能がテストされメカニズムが提供されるため、動物モデルをもつ疾患があるが、その選択方法は、寛容性誘導構造を単純かつ安全に発展される。

10

【0014】

第1の見地は、本発明者は、促進処理することなくMHCクラスI又はクラスII分子に結合できるペプチドを選択するステップを含む免疫寛容原性ペプチドを選択する方法を提供する。好ましい例としては、ペプチドは、促進処理することなくMHCクラスII分子に結合できる。

20

【0015】

抗原に与えられるT細胞エピトープとして作用できるペプチドを分類する技術には、多くの方法が知られている。共通なのは、この方法がT細胞エピトープからなる複数のペプチドの中から免疫寛容原性ペプチド選択することに用いられる点である。

【0016】

ペプチドが促進処理なくしてMHCクラスI又はクラスII分子に結合できるが否かを調べるために、ペプチドのMHCクラスI又はクラスII分子に対する結合能を抗原処理独立提示システム(APIPS)を用いて調べることができる。好ましくは、(i)ペプチドを含むAPIPSを扱う。(ii)APIPS内のMHCクラスI又はクラスII分子へのペプチドの結合を解析する。

30

【0017】

第2の見地としては、本発明により、第1の見地の方法によって選択されたペプチドを供給することである。

【0018】

ペプチドは、疾患の予防及び/又は治療に有用である。特に、ペプチドは、自己反応性T細胞によって媒介される疾患の予防及び/又は治療に有用である。例えば、アレルギー、自己免疫疾患及び移植による拒絶反応のような過敏症反応に対しては、特に本発明のペプチドを用いて治療/予防するとよい。

40

【0019】

本発明者は、ミエリン塩基性タンパク質に対する多くのアピトープを既に同定した。これは、多発性硬化症における自己抗原でもある。特に好ましい例としては、本発明に係るペプチドは、多発性硬化症の予防及び/又は治療に有用である。

【0020】

幾つかのペプチドは、同一抗原由来の他のエピトープ及び異なる抗原由来の他のエピトープに対して寛容を誘発できると知られている(バイスタンダ抑制として知られている減少によって)。

【0021】

しかし、本発明者は、全ての自己反応性T細胞を十分に抑制するためには、種々のアピト

50

ープを組み合わせて疾患の治療/予防のために患者に投与することが有効であろうことを予測した。

【0022】

第3の見地としては、本発明者は、発明の第2の見地による複数のペプチドからなる製薬構造体を提供するものである。ここで、各々のペプチドは、T細胞エピトープに基づいている。

【0023】

第4の見地としては、本発明者は、発明の第2の見地に基づいて被験者にペプチドを投与するステップを含み、被験者の疾患を予防及び/又は治療する方法を提供する。

【0024】

予防及び/又は治療のための一般的な方法は、以下のステップを含む。すなわち(i)疾患に対する抗原を同定する。(ii)抗原に対するアピトープを同定する。(iii)対象にアピトープを投与する。

【0025】

【発明の実施の形態】

最初の見地として、本発明は、免疫寛容原性ペプチドを選択する方法に関する。

【0026】

・免疫寛容原性(Tolerance)

ここでは、「免疫寛容原性」を免疫寛容原性を誘発することができる、との意味として用いる。

【0027】

免疫寛容原性とは、抗原の応答できないことである。自己抗原への免疫寛容原性は、免疫系の特徴としては不可欠であって、この自己抗原が失われると自己免疫疾患が起こる。適応免疫系は、自身の組織内に含まれる自己抗原の自己免疫攻撃を避ける一方で、膨大な種類の伝染病媒介物に対する適応性を維持しなければならない。これは、胸腺(免疫寛容原性の中核(Central tolerance))でのプログラム細胞死(apoptotic cell death)への早熟なT細胞の感応性によってほとんど制御されている。ところが、全ての自己抗原が胸腺にて検出されるわけではないため、自己反応胸腺細胞の細胞死は、不完全のままである。そのため、末梢組織(末梢免疫寛容)において、成熟した自己反応T細胞によって獲得された免疫寛容原性のメカニズムがある。中核及び末梢の免疫寛容のメカニズムに関する報告がアンダーソン等により与えられている(Immunological Reviews 169:123-137)。

【0028】

免疫寛容原性は、少なくともCD4+T細胞の一部でのアネルギー誘発によって生じ、また特徴付けられる。T細胞を活性化するために、ペプチドは、T細胞に対して2つの信号を送達できる「プロフェッショナル」APCに関連付けられる。第1の信号(シグナル1)は、APC表面のMHCペプチド複合体によって送達される。第2の信号(シグナル2)は、APC表面のCD80、CD86のような共刺激分子(costimulatory molecules)によって送達され、T細胞表面のCD28によって受け取られる。T細胞がシグナル2を受けることなくシグナル1を受け取ったときT細胞は活性化されず、アネルギーな状態になる。アネルギーなT細胞は、連続的な抗原投与(antigenic challenge)に対して免疫性があり、他の免疫反応を抑制できる可能性がある。アネルギーなT細胞は、T細胞の免疫寛容原性の介在に関与していると考えられる。

【0029】

理論に縛られることなく、本願発明の発明者は、ペプチドは、成熟した抗原提示細胞によって操られるべきものであるから、ペプチドがMHC分子に結合された状態になる前に要求する処理は免疫寛容原性を誘発しないと予測している。成熟した抗原提示細胞(例えば、マクロファージ、B細胞及び樹状細胞)は、抗原処理できるが、シグナル1及びシグナル2がT細胞に送達してT細胞を活性化することはできない。一方、エピトープは、未熟

10

20

30

40

50

なAPC表面にあるクラスIIのMHCに結合することができる。このように、エピトープは、共刺激分子なしでT細胞に与えられ、アネルギーなT細胞及び免疫寛容原性を誘発する。

【0030】

エピトープはまた、成熟したAPCの細胞表面のMHC分子に結合できるが、免疫系は、成熟したAPC以上に大量の未熟なAPCを含んでいる(樹状細胞の10%以下が活性化されている点がSummersらにより示唆されている((2001) Am. J. Pathol. 159: 285-295)。)。しかし、エピトープの初期状態(default position)は、活性化というよりは、アネルギー又は寛容である。

【0031】

寛容がペプチドの吸引によって誘発されるとき、特定CD4+抗原の増殖が減少される。また、IL-2、IFN- γ の生成及びこれら細胞によるIL-4の生成は抑制されるが、IL-10の生成は増加する。ペプチド移入されて寛容状態にあるハツカネズミにおけるIL-10の中立(不顕性?)(neutralisation)は、病気に対する感受性を完全に回復することが示されている。調節細胞の個数は、IL-10及び中間免疫制御を生じる寛容状態によることが示されている(Burkhardtらによる。(1999) Int. Immunol. 11: 1625-1634)。

【0032】

寛容性の誘発は、

(a) 生体内にてペプチドがターゲットエピトープとなっている疾患を生じさせるために感受性を低下させる

(b) CD4+T細胞におけるアネルギーの誘発(体外にて抗原を連続投与することによって検出される。)

(c) 以下、i, ii, iiiによってCD4+T細胞の個数を変化させる。

(i) 培養における減数

(ii) IL-2、IFN- γ 及びIL-4の生成におけるダウンレギュレーション

(iii) IL-10産生の増加

を含む種々の手法によって観察することができる。

エピトープに依存しない抗原処理(APITOPESと記す。)

【0033】

本発明の方法は、促進処理を行うことなく、MHCのクラスI又はIIに結合することができるペプチドを選択するステップからなる。このようなペプチドは、本具体例では、「アピトープ(apitopes)」(エピトープ(epitopes)に依存しない抗原処理)として記す。

【0034】

与えられた抗原から送達されるペプチドの細胞表面提示は不規則ではなく、頻繁に生じる少量のエピトープによって支配されている傾向がある。特異なペプチドの優性は、多くの因子、例えば、MHC分子を結合するための相対親和度、APC内におけるジェネレーションの空間的・時間的位置、及び分解耐性に依存する。抗原のためのエピトープヒエラルキ-は、免疫反応の進行とともに変化し得る。そして、このエピトープヒエラルキ-の変化は、自己寛容性及び自己免疫性に対して重要な影響を及ぼす。免疫優性決定領域は、良好な免疫寛容原であると思料される。したがって、本具体例において、本発明に係るアピトープは、優性エピトープに基づいている。

【0035】

しかし、免疫優性ペプチドに対する初期免疫反応の後、エピトープの「拡散」が亜優性決定基を生じる(Lehmannらによって示されている。(1992) Nature 358: 155-157)。)。亜優性エピトープの提示は、自己免疫性のトリガとして重要である。本発明に係るアピトープは、副優性エピトープに基づいてもよい。

【0036】

与えられる如何なる抗原に対して、陰性アピトープが存在していてもよい。陰性エピト-

10

20

30

40

50

ブは、全ての抗原として管理されたときには、T細胞反応を生成することができないが、ペプチドとして管理されたときには、T細胞反応を刺激することができる。APC内のペプチド中の抗原の処理中に、陰性エピトープが分解される。本願の発明者は、ペプチド92-98がMBP(例2Cに示す。)の陰性エピトープであることを証明している。興味深いことには、このペプチド領域内にアスパラギニルエンドペプチダーゼ(*asparaginyl endopeptidase*)による推定上の分割位置があり、天然の処理中にて生じたことを示しており、この部位を含んだペプチドは、APCによって生成されない。

【0037】

陰性エピトープは、生体外にてエピトープとして働き、促進処理することなくMHC分子に結合でき、さらに陰性エピトープを認識するT細胞にアネルギーを誘発する。しかし、このようなアピトープは、天然で処理された抗原のエピトープを認識し免疫寛容性がないT細胞でなくてはならないため、治療には使用できない。

10

【0038】

抗原に対するエピトープは、APCによって提示されるとき、全抗原(下記参照。)に亘って重複するペプチドに対するT細胞反応を測定することによって確認されてもよい。この研究により、ペプチドの「入れ子型対(*nested sets*)」が明らかになる。また、特定のT細胞系及びT細胞分枝系(T細胞クローン)に対する僅かなエピトープは、先端が欠損したペプチド(*truncated peptides*)の反応を測定することによって評価できる。

20

【0039】

抗原における僅かなエピトープがアピトープのように作用するとは仮定できない。僅かなエピトープのアミノ酸側面がMHCへの最適な結合のためには必要であると思われる。アピトープは、異なるT細胞分枝系の僅かなエピトープ間に微妙な相違があってもよいように設計されている必要がある。

【0040】

全てのエピトープに対応するアピトープを認識することはできない点は、強調すべきである。エピトープの中には、エンドゾームに付加したMHCに付随する方法でMHCに結合するものもあるという明確な証拠がある。したがって、Vinerらによって示されたプロセスを必要とする((1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 : 2214-2218))。これが、僅かなエピトープの個々が必然的にアピトープのように作用すると一般的に仮定することができないもう1つの理由である。

30

【0041】

T細胞エピトープに含まれるペプチドの同定
与えられた抗原に含まれるT細胞エピトープを同定する技術には、多くの方法が知られている。

【0042】

天然にて処理されたエピトープは、抗原含有APCから溶離されたペプチドの重量分光光度分析によって同定される。APCは、特定遺伝子を転換することによって抗原を取り上げ(*take up*)ることを促進させるか、又は細胞内タンパク質を生成させる。典型的なAPCは、溶液中又はAPC細胞表面に対して十分にターゲットされたタンパク質とともに培養される(温置される)。37での温置の後、細胞を洗浄し、クラスIIタンパク質は、例えば、親和クロマトグラフィにより精製される。最適な化学的培地(例えば、酸性雰囲気下)を用いてMHCを精製操作すると、MHCからペプチドが溶出する。このペプチド給源を分離し、同様に処理されたコントロールAPC由来のペプチドと性質を比較する。タンパク質を表す又はタンパク質から与えられる(*expressing / fed*)細胞の特徴ピークを(例えば、重量分光測定により)解析し、ペプチド断片を同定する。この手法により、通常、抗原処理によって特定の抗原から得られるペプチドの部位(通常、「入れ子型対(*nested sets*)」)として確認される)についての情報が得られる。

40

50

【0043】

エピトープの他の同定方法には、試験管試験（生体外試験）にて、ペプチドの抗原鎖との重複と分布の分類を合成し測定する方法がある。例えば、ペプチド鎖内には15のアミノ酸があり、5又は10のアミノ酸が重複して使用されている。ペプチドは、抗原提示細胞及びT細胞を含む抗原提示系にてテストされる。例えば、抗原提示系は、ラットの脾細胞（murine splenocyte）から用意し、ヒト細胞はPBMC又は扁桃腺から用意する。若しくは、抗原提示系は、特定のT細胞系又はT細胞分枝系、及び/又は特定の抗原提示細胞タイプを含む。

【0044】

T細胞活性化は、T細胞培養（例えば、³H-チミジン取込）又はサイトカイン（cytokine）産生を媒介として測定される。TH1型CD4+T細胞の活性化は、例えば、ELISPOT試験のような一般的な手法によって検出されるIFN産生を介して測定される。

10

【0045】

重複するペプチドを調べることは、通常、エピトープが検出された抗原部位を示している。特定のT細胞に対する僅かなエピトープは、先端が欠損したペプチド（truncated peptides）への反応を測定することによって評価できる。例えば、重複ライブラリの中で1、15の残基を含むタンパク質が得られれば、僅かなエピトープの同定に用いることのできる両端が欠損している（例えば、1と14、1と13、1と12、2と15、3と15、4と15等）。

20

【0046】

試験管内試験により用いられた抗原の免疫優位残基の同定（特に、T細胞系を用いるもの）は、本発明によるペプチドの好反応性結果の非対称性を導くものと予測される。事例に示されたMBPエピトープを同定する実験では、MS患者由来のPBMCの培養における動的反応性を分析し、健康な固体は重複ペプチドのライブラリに対して測定される。この試験は、健康な固体を形成するT細胞及びMS患者のT細胞は精製されたタンパク質抗原に類似した種類に反応するが、異なった方法でMBP配列に基づいたペプチドとは異なる方法で反応するとの知見に基づいている。MS患者由来のT細胞は、正常で健康な被験者と比較して、かなりの量が、ペプチド抗原に対してより急激に動的に反応する。これは、特定患者が特定時期に反応するエピトープの同定及びエピトープの検出を可能たらしめる

30

。ここで示した実験では、この手法によって、基本的な手法を用いて同定されないエピトープ含有残基の数を明らかにしている。そしてまた、T細胞の認識がある時点で現れて退行し、その後再度現れるという周期的パターンを示すことが明らかになった。

【0047】

患者が特定時期に反応しているエピトープを明らかにするため、本発明者が提案する反応速度測定は、非常に貴重な手段である。この情報は、関連性のあるエピトープ（1つでもあれば。）に対するアピトープを同定し管理することによって、治療のためのアピトープ管理方法を個々の患者に適用させることに役立つ。また、この情報によれば、疾患の進行に対する一般的なパターンが作成できるため、治療合成薬は、疾患の進行段階に適合すると考えられるエピトープにアピトープを含んで調製することができる。

40

【0048】

提示系から独立した抗原処理（APIPS）
一旦エピトープが同定されれば、次の段階はこのエピトープがアピトープとして作用するか否かを調べることである。

【0049】

アピトープは、抗原処理に対する必要性をもたないT細胞に用意されていなくてはならない。アピトープは、T細胞エピトープを含む同定されたペプチドをもち、処理自由系を用いて同定されてもよい。先端が欠落したペプチド及びペプチド類似体は、提示系から独立した抗原処理（APIPS）を使って活性化がテストされる。

【0050】

50

A P I P S には、以下の例が含まれる。すなわち、

- a) 固定 A P C (C D 2 8 に対する抗体をもつもの又はもたないもの)。
- b) M H C 分子のクラス I 又は I I を含む脂質膜 (C D 2 8 に対する抗体をもつもの又はもたないもの)。
- c) 平面結合構造にある精製された天然又は組換え型の M H C (C D 2 8 に対する抗体をもつもの又はもたないもの)。

【 0 0 5 1 】

例えば、ポリペプチド内の僅かなエピトープを調査する研究 (F a i r c h i l d e t a l (1 9 9 6) I n t . I m m u n o l . 8 : 1 0 3 5 - 1 0 4 3) において、先端が欠落したペプチドへの応答を測定することによって T 細胞の応答を調べるために固定 A P C を使用することは知られている。A P C は、例えば、ホルムアルデヒド (通常パラホルムアルデヒド) 又はグルタルアルデヒドを用いて固定される。 10

【 0 0 5 2 】

脂質膜 (平面膜又はリポソーム) としては人工脂質を用いるか、又は A P C 由来の形質膜 / ミクロソーム断片を用いる。

【 0 0 5 3 】

使用に際して A P I P S は、組織培養プレートの培養床に適用されてもよい。ペプチド抗原は、選択された T 細胞系又は T 細胞分枝系の付加によって検出される A P I P S の M H C 部にペプチドを付加されるとともに結合している。T 細胞系又は T 細胞分枝系の活性化は、例えば、³ H - チミジン取込又はサイトカイン分泌を介するような、既知の如何なる方法によって測定されてもよい。 20

【 0 0 5 4 】

ペプチド

ペプチドに関する発明の第 2 の様相

「ペプチド」という語は、典型的な L - アミノ酸や、隣接するアミノ酸のカルボキシル基と - アミノ酸との間のペプチド結合によって典型的に互いに結合した一連の残基を表す通常の意味で使用されている。また、この語は、変性ペプチド及び合成ペプチド類似物を含む。

【 0 0 5 5 】

本発明に係るペプチドは、促進処理することなく M H C のクラス I 又は I I に結合できれば、如何なる長さであってもよい。 30

【 0 0 5 6 】

M H C のクラス I 又は I I 分子の分子長は、典型的には 7 ~ 1 3 のアミノ酸からなり、より一般的なものは 8 ~ 1 0 のアミノ酸からなる。ペプチド結合は、全 M H C クラス I 分子のペプチド結合溝において、ペプチド主鎖の原子と不変部位との間の接触によって両端にて安定化されている。ペプチドのカルボキシ末端とアミノ末端との結合溝の両端には不変部位がある。ペプチド長の変動は、ペプチド骨格において起こる纏れ、またしばしば要求される柔軟性を許容するプロリン又はグリシン残基にて起こる纏れによって決まる。

【 0 0 5 7 】

M H C のクラス I I 分子に結合するペプチドは、典型的には 8 ~ 2 0 個のアミノ酸長であり、より一般的なものは 1 0 及び 1 7 個のアミノ酸長であるが、これより長くもなり得る。これらのペプチドは、両端がオープンになった M H C I I ペプチド結合溝にそって伸張された構造になっている (M H C クラス I ペプチド結合溝とは異なる。) ペプチドは、主に、ペプチド結合溝に沿った保護残基に接した主鎖原子によって規制されている。 40

【 0 0 5 8 】

本発明に係るペプチドは、化学的方法を用いて生成されてもよい (P e p t i d e C h e m i s t r y , A p r a c t i c a l T e x t b o o k . M i k o s B o d a n s k y , S p r i n g e r - V e r l a g , B e r l i n .) 。例えば、ペプチドは、固相法によって合成することができ (R o b e r g e J Y e t a l (1 9 9 5) S c i e n c e 2 6 9 : 2 0 2 - 2 0 4) 、樹脂から割削され、高性能液体クロマトグ 50

ラファイによって精製できる (e. g., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, W H Freeman and Co, New York NY)。例えば、ABI 431 Aペプチド合成装置 (Perkin Elmer) を用いて製造業者から提供された指示にしたがって自動的に合成してもよい。

【0059】

また若しくは、ペプチドは、組み換えによって、またはより長鎖のポリペプチドからの分裂によって生成されるものであってもよい。例えば、ペプチドは、標的抗原からの分裂によって得られる。ペプチドの合成は、アミノ酸解析又は配列決定法により確立されている。

10

【0060】

好ましい実施の形態において、ペプチドは、標的抗原から誘導される。標的抗原は、疾患が生じている間、APCによって処理される分子 (例えば、タンパク質又は糖タンパク質) 及びT細胞によって認識される分子である。当然のことながら、標的抗原は、標的疾患に依存する。好ましくは、ペプチドは、APCによる抗原の天然処理によって生じた抗原の断片から誘導される。

【0061】

実際には、ペプチドには様々な他の特性もある。例えば、ペプチドは、生体における許容濃度で可溶でなくてはならない。好ましくは、ペプチドは、最高でも0.5mg/mlの濃度にて可溶でなくてはならない。より好ましくは、ペプチドは、最高でも1mg/mlの濃度にて可溶でなくてはならない。また、最も好ましくは、ペプチドは、最高でも5mg/mlの濃度にて可溶でなくてはならない。

20

【0062】

鼻腔投与における服用量の最大値は、最新の方法では、鼻腔あたり約200 μ lである。仮にペプチドが1mg/mlの濃度で可溶であれば、各鼻腔に2服することで800 μ gが患者に投与される。一回の服用が5mgを超えることは、例外的である。

【0063】

また、ペプチドが治療に有効であるためには、体内で十分に安定していることも重要である。本発明者は、体内で投与後30分経過して、試験ペプチドの全量が50%に低下し、投与後4時間経過して、ペプチド量が約30%に低下することが判った。しかし、5日経過後も依然として検出可能な程度含まれる (約5%) ことが判った。体内におけるペプチドの半減期は、少なくとも10分程度は必要であり、好ましくは30分、より好ましくは4時間、さらに好ましくは24時間である。

30

【0064】

本発明者は、ペプチドを鼻腔内へ投与すると流出するリンパ節が投与後約4時間経過後に最大値となるが、5日経過後もペプチドが依然として検出される (最大約5%程度のレベルで) ことを見出した。ペプチドは、流出するリンパ節に長期間に亘って治療効果を発揮できる治療活性濃度で十分に安定していることが好ましい。

【0065】

ペプチドはまた、体内で良好な生物学的利用能を示さなくてはならない。ペプチドは、体内で、障害なく細胞表面にてMHC分子に結合できる構造を保持しなくてはならない。

40

【0066】

標的疾患

一具体例において、本発明を第2の知見から見たペプチドは、疾患の予防及び/又は治療に有用である。

【0067】

MHCクラスIIに対するアピトープは、CD4+T細胞応答が介在する疾患に対して特に有用であると思われる。例えば、異常な又は過剰なCD4+T細胞応答によって引き起こされる又は継続される疾患に対して有用である。

【0068】

50

このようなペプチドは、特に過敏症疾患の治療に有用である。過敏症反応には、以下のものを含む。

- (i) 無害な体外異物に対する異常反応により生じるアレルギー
- (ii) 自己組織抗原に対する反応から生じる自己免疫疾患
- (iii) 移植に対する反応から生じる移植片拒絶反応

【0069】

アレルギーの例としては、枯草熱 (hay fever)、外因性喘息 (extrinsic asthma)、昆虫刺症及び毒針アレルギー (insect bite and stinging allergies)、食品及び薬物アレルギー (food and drug allergies)、アレルギー性鼻炎 (allergic rhinitis)、気管支喘息慢性気管支炎 (bronchial asthma chronic bronchitis)、アナフィラキシー症候群 (anaphylactic syndrome)、血管神経性浮腫 (蕁麻疹) (angioedema)、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis)、アレルギー性接触皮膚炎 (allergic contact dermatitis)、結節性紅斑 (erythema nodosum)、多形性紅斑 (erythema multiforme)、スティーブズ - ジョンソン症候群 (Stevens - Johnson Syndrome)、鼻腔性結膜炎 (rhinoconjunctivitis)、結膜炎 (conjunctivitis)、皮膚壊死性venulitis (cutaneous necrotizing venulitis)、炎症性肺疾患 (inflammatory lung disease)、水疱瘡性皮膚疾患 (bullous skin diseases) 等がある。ただし、この例に限定されない。

【0070】

自己免疫疾患の例としては、リウマチ様関節炎 (rheumatoid arthritis (RA))、重症筋無力症 (myasthenia gravis (MG))、多発性硬化症 (multiple sclerosis (MS))、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus (SLE))、自己免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis (橋本甲状腺炎) (Hashimoto's thyroiditis))、Graves' disease、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease)、自己免疫性uveoretinitis (autoimmune uveoretinitis)、多発性筋炎及び糖尿病の特定種 (polymyositis and certain types of diabetes)、全身性脈管炎 (systemic vasculitis)、多発性筋炎及び皮膚筋炎 (polymyositis - dermatomyositis)、全身性硬化症 (systemic sclerosis (強皮症) (scleroderma))、シェーグレン症候群 (Sjogren's Syndrome)、強直性脊椎炎及びspondyloarthropathies関連症 (ankylosing spondylitis and related spondyloarthropathies)、リウマチ熱 (rheumatic fever)、過敏症肺臓炎 (hypersensitivity pneumonitis)、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (allergic bronchopulmonary aspergillosis)、無機ダスト塵肺症 (inorganic dust pneumoconioses)、サルコイドーシス (sarcoidosis)、自己免疫溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia)、免疫性血小板障害 (immunological platelet disorders)、クリオフィブリノーゲン血症のような寒冷症 (cryopathies such as cryofibrinogenemia)、自己免疫多線性内分泌障害 (autoimmune polyendocrinopathies) 等がある。ただし、この例に限定されない。

【0071】

臨床医学では、腎臓、肝臓、心臓肺、皮膚、角膜、骨髄を含む種々の組織は、一般的に移

植される。現在では、角膜及び一部の骨髄を除く全ての移植片は、通常長期に亘って免疫抑制する必要がある。

【0072】

本発明をこの知見から見た一具体例では、ペプチドは、糖尿病の予防及び/又は治療に有用である。この例では、ペプチドは、標的抗原 I A 2 から誘導される。

【0073】

本発明の他の具体例として、ペプチドは、多発性硬化症 (MS) の予防及び治療に有用である。多発性硬化症 (MS) は、CNS 白質に散在的に播種された多発性脱髄性障害によって特徴付けされる慢性の炎症性疾患であって、あらゆる部位及び時点にて発症する (McFarlin and McFarland, 1982 New England J. Medicine 307: 1183 - 1188 and 1246 - 1251)。MS は、自己反応性 T 細胞によって引き起こされると考えられる。

10

【0074】

本具体例では、ペプチドは、特に、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 又はプロテオリピッドタンパク質 (PLP) のような自己抗原の 1 つから誘導される。PLP は高疎水性を有するため、MBP は、PLP 以上にペプチドを誘導することができると思われる。ペプチドは互い団塊を形成する傾向にある MBP から誘導されるため、動物において、MBP は、免疫原性であり、MBP 特性 T リンパ球は、脳炎誘発性活性をもっている (Segal et al., 1994 J. Neuroimmunol. 51: 7 - 19; Voskuhl et al., 1993 J. Neuroimmunol 42: 187 - 192; Zamvil et al., 1985 Nature 317: 355 - 8)。

20

【0075】

好ましい例としては、ペプチドは、MBP の免疫優性残基、すなわち 1 - 24、30 - 54、75 - 99、90 - 114、105 - 129、120 - 144、135 - 159、150 - 170 の中の 1 つから誘導される。

【0076】

特に好ましくは、ペプチドは、本発明者によってアピトープとして作用することが確認された MBP ペプチド、すなわち、30 - 44、80 - 94、83 - 99、81 - 95、82 - 96、83 - 97、84 - 98、110 - 124、130 - 144、131 - 145、132 - 146、33 - 47 の 1 つから選択される。

30

【0077】

MHC クラス I に対するアピトープは、例えば、免疫寛容原性型にて、抗ウイルス性 CD8 + 応答を変化させるために用いられる。

【0078】

製薬組成

本発明者は、寛容を効果的に誘導するために、「バイスタンダ抑制 (bystander suppression)」にも関わらず、多くの異なる T 細胞分枝系を標的にすることが必要であると予測した。

【0079】

第 3 の知見では、本発明は、複数のアピトープを含む製薬組成に関する。

40

【0080】

製薬組成は、例えば、2 ~ 50 のアピトープからなることが好ましい。より好ましくは、2 ~ 15 のアピトープからなる。アピトープは、同一又は異なる標的抗原から誘導されるのがよい。アピトープは、促進処理することなく、全てが MHC クラス I に結合できること、又は全てが MHC クラス II に結合できることが好ましい。好ましい例では、製薬組成中の全アピトープは、促進処理することなく MHC クラス I 又はクラス II に結合できる。

【0081】

製薬組成は、キット形式であってもよい。個々のエピトープ又はエピトープの幾つかが同

50

時に作用するように、分割又は一連の投与にて分割して供給される。

【0082】

若しくは、製薬組成（又はそのあらゆる部位）は、多回服用にて投与されるべきものであるが、各服用分は、別々にパックされていてもよい。

【0083】

製薬組成は、治療上又は予防上効果的なエピトープ量からなっているとしてもよく、また、少なくとも1つのエピトープは、選択的に、希釈液又は賦形剤等の製薬上許容できる担体に含まれている。

【0084】

また、本発明に係る製薬組成において、少なくとも1つのエピトープは、最適な結合剤、滑沢剤、懸濁剤、コーティング剤、又は可溶化剤と混合されてもよい。 10

【0085】

投与

ペプチドは、補助剤がない場合、可溶状態で投与されなくてはならない。

【0086】

ペプチドは、粘膜経由で投与されることが好ましい。

【0087】

研究は、ペプチドが可溶状態にて与えられれば、腹膜内に（i.p.）、静脈内に（i.v.）、鼻腔内に（i.n.）、又は経口にてT細胞寛容を誘導できる（Ander-ton and Wraith（1998）as above； Liu and Wraith（1995）as above； Metzler and Wraith（1999）Immunology 97： 257 - 263）ということを示している。 20

ペプチドは、鼻腔内に投与されることが好ましい。

【0088】

ハツカネズミによる研究では、寛容を誘導するために要求されるペプチドの継続投与が、受容体中のT細胞の前駆体頻度に依存することが示されている（Burkhardt et al（1999）as above）。また、多くの研究にて、ペプチドの反復投与が寛容を誘導することが証明されてきている（Burkhardt et al（1999）as above）。ペプチドの服用回数と適切な服用とは、個体個体に依存するものであるが、好ましい具体例では、多回服用にて投与されている。 30

【0089】

仮に、ペプチドの大多数が同時に投与されるのであるなら、ペプチドは、単一又は多回服用にて投与するために適切な「混合薬」の形態でなくてはならない。また、ペプチドは、多回服用にて与えられることが好ましいが、各服用間の相対的なペプチド濃度を変更してもよい。

【0090】

好ましい例として、濃度を段階的に上昇させて患者に多回服用させる「服用量の段階的増加（dose escalation）」プロトコルが挙げられる。このような用例としては、例えば、蜂毒針アレルギーに対する免疫療法用途としてホスホリパーゼA₂ペプチドが使用される（Muller et al（1998）J. Allergy Clin Immunol. 101： 747 - 754 and Akdis et al（1998）J. Clin. Invest. 102： 98 - 106）。 40

【0091】

【実施例】

以下の例は、本発明の実例を説明するのに役立つが、これらに限定されるものではない。本発明は、特にこれらの例にて説明される詳細な実施例に関連付けられる。

【0092】

例1 - MBPにおけるT細胞エピトープの同定物質及び方法

【0093】

抗原

ヒトMBPは、Deiblerらによって示された方法によって脳白質から抽出し(Deibler et al., 1972 Preparative Biochemistry 2: 139)し、この純度をSDS-PAGEによって評価する。MBP及びヒト型結核菌精製タンパク質誘導体(PPD)(UK Central Veterinary Laboratory, Surrey)は、予め決定された最適濃度での増殖定量法に使用される。すなわち、各抗原に対する最適濃度は50 pg/mlである。MBP分子全体に拡がる重複したペプチドのA panel of 15merは、Abimed AMS 422多重ペプチド合成装置(Abimed, Langenfeld, Germany)にて標準的なF-moc化学を用いて合成される。各ペプチドは、5 aa及び重複する10 aaによって置換される。発明者らは、3つのグループに分けてプールされた33個のペプチドを生成し、各プールは、50 pg/mlの最適濃度にて検査される。各ペプチドは、試験管内にて16.6 µg/mlの濃度に調製される。

10

20

30

40

50

【0094】

患者及び被験対象

この研究の被験者は、臨床的に明白若しくは研究室的にも明白にMSであると認められ(Poser et al., 1983)、29歳~51歳の年齢幅がある12人の患者からなる。12人のうち8人は、インターフェロン- β の試験中であるが、ほかのMS患者は、研究開始以前の少なくとも3ヶ月間は、コルチコステロイド治療を行っていない。また、対象群は、25歳~55歳の年齢幅のある13人の健康な個人を含んでおり、血液サンプルを得る以前の少なくとも3ヶ月間は免疫抑制療法を受けていない。

【0095】

組織培養基

20 mMのHEPES(Sigma社製, Poole, UK)を含むRPMI-1640基、ペニシリン(100 U/ml)、ストレプトマイシン硫酸エステル(100 mg/ml)、4 mMのL-グルタミン(以上は全てLife Technologies社製, Paisley, Scotland)を組織培養基として用いる。血清を除いた培養基は、リンパ系細胞及びTCLを洗浄するために使用する。培養組織の調節及び評価分析のために、培養基は、10%を熱不活性化された自己由来の血漿にて補う。

【0096】

培養組織の調製及びT細胞の増殖性評価

クエン酸塩添加血(50~100 ml)は、書面による情報開示に基づいて同意を得た後、静脈穿刺により各被験者から収集した。末梢血単核細胞(PBMC)は、Histopaque-1077(Sigma社製, Poole, UK)による密度遠心分離にて血液から分離され、24床組織培養プレート(Nunc International, Costar, Corning Inc. New York, USA)にPPD、MBP又はMBPのペプチドを含む 1×10^6 細胞/mlを1.5体積ml用いて培養される。培養床は、湿度5%、CO₂濃度95%、37°Cの温度調節装置内で培養される。5日乃至14日の間に各培養組織から100 µlの部分標本を一对ずつ回収し、96培養床あるマイクロタイプレートの底部周辺に移し、0.4 µCiにて³H-チミジン(Amersham International社製, Amersham, UK)を律動的に送り込む。18時間経過後、細胞は、Mach 111 harvester 96(Tomtec社製, Orange, New Jersey, USA)を用いたガラス繊維マツト(LKB-Wallac社製, Turku, Finland)から回収される。³H-チミジン取込は、マクロベータ液体シンチレーションカウンタ(LKB-Wallac)を用いて検出される。抗原を含む試験床は、cpm > 1000、刺激指数(SI) > 3、であれば陽性とされる。ここで、SIは、(培養組織に含まれるCPM抗原)/(抗原を除く培養組織CPM)である。

【0097】

T細胞系及びT細胞分枝系の生成

M B P 特異性 T 細胞系 (T C L) は、 8 人の M S 患者及び 2 人の健康な被験者から生成する。各被験者からの P B M C を上述のように分離し、 M B P (5 0 μ g / m l) を用意した 6 つの培養床に 1×10^6 c e l l / m l を塗布する。各被験者からの P B M C の一部は、完全に凍結され引き続き行われる再刺激 (r e s t i m u l a t i o n) のために保管される。7 日後、細胞は、 2 % の I L - 2 (L y m p h o c u l t - H T ; B i o t e s t L T D . 社製 , B i r m i n g h a m , U K) の新鮮な培地に移され、このときに全培養組織のうち 1 2 個を抗原と、抗原提示細胞 (A P C) の供給源としての I L - 2 及び放射線処理された自己由来の P M B C (2 5 0 0 R e d) とを、 T 細胞 : A P C = 1 : 5 の割合にて再刺激 (r e s t i m u l a t e) される。最初の再刺激 (r e s t i m u l a t i o n) のときに、 M B P に対する細胞の特異的な増殖を調べる。すなわち、この M B P において、 2×10^4 個の T 細胞及び 1×10^5 個の放射線処理された自己由来の P B M C は、 9 6 培養床の底部にて約 3 倍に培養される。細胞は、 2 日間培養され、培養の最後の 1 8 時間をかけて、 3 H - チミジン (A m e r s h a m I n t e r n a t i o n a l 社製 , A m e r s h a m , U K) を 0 . 4 μ C i にて律動的に送り込む。この後、細胞は、上述したように回収される。 T C L は、 c p m > 1 0 0 0 、 及び S I > 3 で M B P 特異性に対して陽性とされる。

【 0 0 9 8 】

続く、再刺激 (r e s t i m u l a t i o n) と展開の 3 サイクルにて、 T C L は、 A P C として自己由来の放射線照射処理されたこの P B M C において、 P H A (S i g m a 社製 , P o o l e , D o r s e t , U K) を用いて分枝される。 T 細胞は、 0 . 1 (細胞 / 床) (c e l l / w e l l) 、 0 . 3 c e l l / w e l l 、 及び 1 c e l l / w e l l にて希釈条件を制限され、 1×10^4 の放射線処理された P B M C 、 5 μ g / m l P H A 、 及び 2 % I L - 2 とともに寺崎プレート (N u n c I n t e r n a t i o n a l , C o s t a r) を用いて培養される。 1 0 ~ 1 2 日後、成熟陽性の床は、 1×10^5 放射線照射処理 P M B C 、 5 μ g / m l P H A 、 I L - 2 を用いて 9 6 培養床のプレート底部周辺に塗布される。 3 日経過した培養床は、 I L - 2 を含む新鮮な培地に移され、このとき、 7 つの分枝系は、 5×10^5 放射線照射処理 P M B C 、 P H A 及び I L - 2 を用いて 4 8 培養床プレートに塗布される。ここで、分枝系は、 M B P に対する特異的な応答のための増殖試験が行われる。 M B P 特異性分枝系は、 1 週間後、 P H A 又はダイナベッツ (D y n a b e a d s) (D y n a l 社製 , U K) と、 I L - 2 とともに 1×10^6 放射線照射処理 P M B C を用いて 2 4 培養床プレートに塗布される。分枝系は、 2 4 培養床プレート内にて、基本的には上述した 7 ~ 1 0 日間の再刺激 / 展開サイクルが継続して行われる。 M B P ペプチドのパネルを認識するための T 細胞分枝系 (T C C) の機能は、上述した増殖試験によって確認される。

【 0 0 9 9 】

結果

M S 患者と健康な個体との間の M B P ペプチド評価

本発明者は、ヒト M B P の最長長さで拡がっている 1 5 m e r の合成ペプチドに重複するパネルに対する応答能について調べられる健康体及び M S 患者由来の P B M C に対して動的反応性試験を行う。各培養組織から得た P B M C の増殖反応は、 2 週間の間の 5 時点にて調べられ、 M B P 及びペプチドに対する応答の動的プロファイルは、 P P D に対する応答と比較され、後者は、 2 次応答 / 記憶抗原を示している。インターフェロン - を使用している患者と使用していない患者との間には、 P B M C の M B P 及び / 又はペプチドに対する応答において、大きな相違は見受けられない (データは示さない。) 。 M S 患者と健康な被験者における M B P への応答の最大値は、 P P D に対する応答以上に遅い。以下に、非リコール抗原に対する応答の動的指標を示す。図 1 は、 M S 患者及び健康体における P P D 及び M B P の動的評価の典型例を示している。

【 0 1 0 0 】

図 2 に示すように、 M S 患者に最も一般的に認められる 2 つのペプチドが 9 0 - 1 1 4 と 7 5 - 9 9 (1 2 人の患者のうち 6 人に認められる。) であり、残基 3 0 - 5 4 、 1 3 5

- 159、150 - 170 (12人の患者のうち5人に認められる。)、1 - 24、105 - 129 (12人の患者のうち4人に認められる。)と続いている。3人の患者は、aa15 - 39と120 - 144に应答している。また、2人の患者には、45 - 69が認められる。また、残基60 - 84に应答したMS患者はいない。

【0101】

図10によれば、ここで全患者は、HLA - DR2陽性であり、MS患者に最も一般的に認められる2つのペプチドは、90 - 114と75 - 99であり(11人の患者のうち6人に認められる。)、次いで残基12 - 144、135 - 159、150 - 170(11人の患者のうち5人に認められる。)であり、次いで1 - 24、15 - 39、30 - 54、105 - 129(11人の患者のうち4人に認められる。)となっている。

10

【0102】

対照的に、健康な被験者は、僅か2人の被験者が2以上のペプチド(図3におけるCとJ)に应答している点で極僅かなペプチドに重要性が認められる。aa60 - 84が認められたのは、被験者C及びJの僅か2人であって、この患者群では残基は確認されない。興味深いことに、3人の被験者は何れも、DRB1*0701対立因子(対立遺伝子)を示している。45 - 69及び105 - 129は、どの健康な被験者にも認められないが、75 - 99及び150 - 170は、4人の健康体に認められ、135 - 159は、3人の健康体に認められ、124、30 - 54、60 - 84及び120 - 144は、2人の健康体に認められ、15 - 39及び90 - 114は、1人の健康体に認められている。全体として、13人の健康体のうち8人は、重複したペプチドの何れにも应答していないが、12

20

【0103】

図11には、健康な被験者のMBPペプチドに対する应答が示されている。この研究では、唯一1人の被験者が2つ以上のペプチドに应答している(N11)。N11はまた、この患者群によって確認されていない残基であるaa60 - 84に应答した唯一の被験者である。15 - 39、45 - 69、及び105 - 129は、何れの健康な被験者にも確認されていないが、120 - 144及び135 - 159は、2人の健康な被験者に認められている。また、1 - 24、30 - 54、60 - 84、75 - 99、90 - 144、及び150 - 170は、1人の被験者に認められる。全体として、12人の健康な被験者のうち9人は、何れの重複するペプチドにも应答していない。

30

【0104】

全体として、MBP及び/又はペプチドへの应答が最大値を迎えた日は、健康な被験者と患者との間で大きな相違はなく、両グループにおける動的反応性は、これらの初期抗原应答に類似していた。加えて、MBP及びペプチドに対する应答の度合いは、患者と健康な被験者とでは相違なかった。

【0105】

MBPペプチド認識性の時間変化

MS患者は、MBPペプチドの幅広のスペクトルに应答することが確認されているが、本発明者は、同一の被験者におけるPBM C認識性がほぼ4~12ヶ月間に集中され安定しているか否かを調べようとした。図2、図10及び図3には、MS患者と健康な被験者の何れも同一のペプチド認識パターンを呈示しないことが示されている。

40

【0106】

図4には、2つの異なる時点で複数のペプチドに应答したMS患者(MS49)の例を示しているが、2番目の時点における認識結果は、4ヶ月後に測定したものであるが、著しく異なっている。これは、2番目の動的試験において、PBM Cのaa15 - 39、30 - 54、及び150 - 170に対する应答が残存したものであるが、75 - 99及び105 - 129に対する应答が継続し、90 - 114及び135 - 159の部位にシフトしたものである。

【0107】

図5に示す(MS60)は、幅広のエピトープ应答が4ヶ月間以上に亘って应答が集中し

50

て継続した患者の例である。2巡目に検査された健康な個体では、何れのペプチドに対する応答もみられなかった(図3)。

【0108】

全体として、この結果は、MS患者が認識のセットパターンを呈示していないことを示している。各患者において、P BMCは、患者MS49の例が示すように、幾つかのペプチドに対するP BMCの応答は、残存し、退行し、MBPの新しい部位にシフトしている。

【0109】

ペプチド認識の周期性

12ヶ月間に亘って3若しくはそれ以上の異なる時点にて、ペプチドに対するP BMCの応答を解析すると、ある患者では、エピトープ応答が変動するというよりむしろ新たなペプチド部位に不可逆的にシフトしていることを表しているということが明らかになっている。例えば、図2及び10に示されるように、患者MS60は、aa120-144及び135-159の認識が周期的なパターンを示しているが、これは、残基120-144及び135-159が最初の検査時点にてほとんど認識され、これら2部位に対する応答が2番目の検査時点によって退行し、4ヶ月後に測定された3番目の検査時点で再び現れたものである。患者MS41の動的プロファイルは、aa135-159の認識が幾つかの時点で変動していることを近似的に示している(図2及び10参照)。

【0110】

健康な被験者のグループ(図3)では、ある被験者(M)は、部位75-99及び135-159に対する応答が変動していることを示しており、被験者(F)は、3つの時点のうち2時点の解析にて75-99が認められ、被験者(D)は、残基15-39に対して周期的な応答を示している。

【0111】

MBPに対する応答の最適なマッピング

TCCは、8人のMS患者及び2人の健康な被験者から生成され、動的応答性試験にて同定されたペプチド基の最適な特異性を明確にするのに用いられる。各TCCの特異性は、15merペプチドのパネルに対する増殖応答性によって調べられる。分枝系SD:A7は、1-24にて確認され、この部位内にてこのTCCは、aa5-19に対する応答を示した。部位30-54は、4つの分枝系(MS49:D3、MS49:C8、MS49:A8、MS49:B6)及び部位30-44内のエピトープによって認識される。MS患者由来の分枝系(MS39:D7)は、ペプチド60-74を認識し、興味深いことに、ある健康な被験者は、我々の動的応答性試験において、この部位60-84に対して応答している。5つの分枝系(MS43:A7、MS41:B6、MS41:A2、MS41:C6、N5:8)は、部位75-99に含まれるaa83-99を認識する。ある患者は、105-129内に含まれるaa110-124(MS60:A2、MS60:B3)、に対して特異的なTCCを生成し、同一患者由来の他のTCCは、120-144部位内の130-144(MS60:E1)に対して特異的である。5人の被験者は、部位135-159内の認識エピトープであるMS60:F7、MS60:D1、MS59:F1及びN5:19がaa140-154を認識し、MS57:A1が140-149に対して特異的であるという分枝系を生成し、MS17:A3は、130-144のシーケンスに対して応答する。この分枝系のパネルは、MBPの135-159内に少なくとも2つのT細胞エピトープが存在することを明確にしている。最後に部位150-270は、aa156-169に対して特異的な2つの分枝系によって認識される。全TCCの特異性は、図6に要約されている。

【0112】

例2 - MBP中のエピトープの同定
物質と方法

【0113】

APIPSを用いた抗原提示試験

ペプチドのT細胞分枝系に対する提示は、培養にて測定する。APCは、0.5%パラホ

10

20

30

40

50

ルムアルデヒドにて定着され、96培養床組織培養プレートの1培養床あたり 1×10^5 cell/wellにて塗布される。T細胞分枝系は、種々のペプチド濃度にて 2×10^4 cell/wellで塗布される。37にて48時間温置した後、16~20時間に亘って ^3H -チミジン取込を行い、増殖を測定する。結果は、活性なAPCによって示されるエピトープに应答するためのT細胞の機能と比較される。

【0114】

DR2:MBP82-100の遺伝子導入マウスから分離されたT細胞に対するペプチドの提示は、APCが 5×10^5 cell/wellにて塗布され、T細胞が 1×10^5 cell/wellにて塗布され、 ^3H -チミジンの添加に先立って72時間の温置が行われることを除いては、基本的には上述したように行われる。

10

【0115】

結果

この実験において、先の例にてエピトープとして同定されたペプチドは、APIPSを用いてその適応性が検査される。結果を図7bに示す。これまで検査された5つのエピトープのうち、4つのエピトープがアピトープであり(30-44、80-94、110-124、及び130-140)、1つはアピトープではないがエピトープとして作用することが明らかになった(156-170)。

【0116】

例2A-MBPペプチド30-44、110-124、130-144、及び156-170に関する調査

20

種々のMBPペプチドがアピトープであるか否かを調査するために、定着されたAPCによってT細胞に示される適応性を調査した。活性化された又は予めMgar(HLA-DR2+ve)にて前処理された細胞は、ペプチドを含む血清中又は血清単独中にて3.5時間前処理される。過剰なペプチドを細胞から取り除き、適切なT細胞分枝系を添加する。T細胞増殖应答は、 ^3H -チミジンを加えて測定する。

【0117】

図8及び図9に示されるように、ペプチド30-44(図8A)、110-124(図8B)、及び130-144(図9A)は、促進処理することなく定着されたAPCによって用意できる。したがって、これらのペプチドは、アピトープとして定義される。一方、ペプチド156-170は、T細胞に対して提示するために促進処理を必要とする(図9B)。定着されたAPCは、このエピトープをT細胞に提示することができない。それゆえ、156-170は、アピトープではない。

30

【0118】

例2B-MBPの部位77-100及び125-148内のアピトープの同定

与えられた全エピトープに対して、1又は1以上のアピトープが存在し、これらは、促進処理することなくAPCに対して提示される。MBPの2部位内のアピトープの提示は、活性の細胞又はMBP部位77-100(図12)及び125-148(図13)から得た血清中又は単独の血清中にて重複するペプチドとともに培養されパラホルムアルデヒド固定されたMgar(HLA-DR2)細胞を培養することによって調べられる。T細胞を付加し、72時間後(図12)又は48時間後(図13)にT細胞増殖应答を ^3H -チミジン取込によって調べた。MBP77-100に関して、T細胞は、DR2:MBP82-100遺伝子導入マウスから分離されるのに対して、MBP130-144については、T細胞分枝系MS17:A3が用いられる。

40

【0119】

MBP部位77-100に対して、以下のペプチドがアピトープとして定義される。

MBP 83-99 ENPVVHFFKNIVTPRTP

MBP 80-94 TQDENPVVHFFKNIV

MBP 81-95 QDENPVVHFFKNIVT

MBP 82-96 DENPVVHFFKNIVTP

MBP 83-97 ENPVVHFFKNIVTPR

50

MBP 84 - 98 MPVVHFFKNIVTPRT

DR2 MBP 82 - 100 遺伝子導入マウス由来のT細胞によって認識される最小のMBPシーケンスは、部位85 - 94である。

【0120】

MBP部位125 - 148に関して、以下のペプチドがエピトープがエピトープとして定義される。

MBP 130 - 144 RASDYKSAHKGFKGV

MBP 131 - 145 ASDYKSAHKGFKGV D

MBP 132 - 146 SDYKSAHKGFKGVDA

MBP 133 - 147 DYKSAHKGFKGVDAQ

T細胞分枝系MS17 : A3によって認識される最小のMBPシーケンスは、部位133 - 144である。

【0121】

例2C - MBP部位89 - 101の調査

本発明者は、予め、他のミエリンT細胞エピトープと比べ、溶液状態にてペプチド89 - 101を投与しても全ミエリン又は89 - 101ペプチド自体の何れかを導入してもマウス試験免疫性脳脊髄炎(EAE)を予防できない(Ander-ton and Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28: 1251)ということを示している。

【0122】

3つのT細胞エピトープを備えるMBP89 - 101

MBPの部位81 - 111に対するT細胞反応性を調べるために81 - 111を備えたマウス由来のリンパ節細胞を試験管内で81 - 111にて刺激する。これらの細胞は、81 - 111部位をカバーする2残基をもった10merペプチドのパネルにて試験される(すなわち、81 - 90、83 - 92、85 - 94、87 - 96、89 - 98、91 - 100、93 - 102、95 - 104、97 - 106、99 - 108、及び10 - 111)。89 - 101をカバーするペプチドに対する応答パターンは、エピトープとは異なる少なくとも2つ(及び3)の提示を示す5つの隣接するペプチド(87 - 96から95 - 104までのN末端)を刺激することを示している。

【0123】

さらにこの部位を調べるために、元の81 - 111反応T細胞系から3つの副系を生成し、シフトして84 - 106部位をカバーしている1つの残基をもつ重複する10merペプチドのパネルで再試験した。結果は、89 - 101シーケンスの中に、重複しない89 - 94、92 - 98、及び95 - 101の3つの異なる部位が存在することが明らかになった(図14参照)。

【0124】

MBPペプチド93 - 98は、陰性エピトープである。

3つのエピトープ特異性T細胞系(TCL)は、全組換え型MBP及び89 - 101ペプチドに対する反応性をテストしたとき、興味深い相違点を示す。89 - 94及び95 - 101特異性TCLは、全MBPに対して応答するのみであるが、3つのTCLは全てペプチド(89 - 101)に対して応答するこれは、完全なMBPの抗原処理は、92 - 98を認識しないが89 - 94及び95 - 101を認識するT細胞に対するリガンドを優先的に生成することを示唆している。これは、92 - 98のエピトープが陰性であることを示している(すなわち、天然の抗原の処理によって生成され得ない)。MBP89 - 101ペプチドが3つの分離したT細胞集団によって認識されるペプチド又はMHCリガンドに帰するMHC分子とともに3つの異なった相互作用に参与できるものと思われる。しかし、MBPの処理は、これらのT細胞集団うち2つに対してリガンドを生成するのみである(図14参照)。

【0125】

EAEの導入は、完全なMBPの減少の結果として生じるCNSにおいて現れる自己抗原

10

20

30

40

50

エピトープのT細胞認識性を要求する。上記同定された3つのT細胞エピトープのうち1つでも含んだペプチドによるマウスの免疫化は、天然に処理されたエピトープ(89-94又は95-101)を含んでいるペプチドのみがEAEを誘導できることを示している。これは、92-98が陰性エピトープであることの知見を指示するものである。MBPペプチド92-98は、MBP98-101に対して優性なエピトープである。

【0126】

部位89-101は、上述したように、3つの異なった重複しないペプチドを含んでいる。これらのうち、ペプチド92-98は、この部位に対して優性種であると思われる。例えば、T細胞分子系が89-101ペプチドにて初回抗原刺激を受けたマウスから生成されると、全6つの分子系は92-98に対して応答性をもつようになる。それぞれの位置に単一のアラニン置換体を含んだ89-101類似のペプチドを用いると、92-98位置の何れかの置換基が応答性の欠陥を導き、92-98核内の何れの残基が変更されていることがこのエピトープを認識する効果を高めることが判る。MBPペプチド89-101は、天然処理されたMBPエピトープを認識するEAEに関係したT細胞を寛容化することができない。

10

【0127】

上述した知見を要約するために、本発明者は、a)89-101シーケンスは、3つの異なるT細胞エピトープを生成する可能性をもち、b)これらのエピトープのうち2つ(89-94及び95-101)だけが(生体内及び試験管内の両方で)完全なMBPの抗原処理によって生成され、c)天然処理されたエピトープを含むペプチド及び陰性エピトープを含まないペプチドがEAEの誘導に効果的であり、d)ペプチド治療試験において89-101ペプチドは、EAEから保護することができない、ということを見出した。

20

【0128】

この情報は、T細胞と関係のある疾患を直接結紮することができないことからペプチド89-101が、EAEに対して寛容化できないという仮説を研究するための基本を与えるものである。この仮説によれば、適切な構造にてMHC抑制因子(I-A^s)に直接結合できないであろうから、ペプチド(89-101)は、主要な脳炎誘発性エピトープ(89-94)に対して寛容を誘発できない。言い換えれば、89-101は、89-94に対するT細胞のアピトープとして作用しない。

【0129】

この可能性を確かめるために、寛容性試験は、89-101及び87-96ペプチド(図15A及びB)を用いて行われる。87-96ペプチドは、EAEを誘導するに最も効果的なエピトープ(89-94)を含んでいる。

30

【0130】

方法

マウスは、0日上でフロインド完全アジュバンドであって、100pgのペプチドを投与されるに先立つこと8日、6日、4日に200pgのペプチドを含むPBS又はPBSを単独で投与された。10日後、リンパ節細胞(1床あたり 6×10^5)は、X-Vivo15培地に 5×10^{-5} Mの2メルカプトメタノール及び2MのL-グルタミンを入れ、抗原を加えたものと加えないものを用意し、72時間培養された。培養組織は、最後の16時間をかけて0.5µCiにて³H-チミジンを律動的に送り込まれた。³H-チミジン取込は、液体シンチレーションカウンタにて測定された。結果は、培養組織が3倍になるまで分毎にカウントする方法で表される。

40

【0131】

結果

87-96による準備刺激は、それ自体に対して強い想起応答を誘導し、89-101に対して弱い応答を誘導した。(図15A及びBにおける 及び の各々)これは、89-101から89-94を生成する抗原処理の必要性和関係している。87-96による準備刺激に先立って寛容原として87-96を使用することで、87-96及び89-101(図15Aにおける 及び)に対する想起応答が抑制された。この89-94による

50

活性化はT細胞に反発し、一旦体内にて反応しなくなれば、89-96又は89-101から生成されたものであっても、試験管内では89-94に対して反応できない。しかし、最終的に87-96による準備刺激に先立って寛容原として89-101を用いても、87-96又は89-101の何れに対しての想起応答をも抑制できなかった(図15A及びBにおけると)。これらの結果は、免疫寛容原性型におけるペプチド89-101の投与が89-94シーケンスに基づく天然処理された脳髄炎誘発性エピトープを寛容化できないことを示している。すなわち、89-101ペプチドは、89-94エピトープに対するアピトープとして作用することはできない。

【0132】

理論的には結合することは望めないが、本発明者は、実験結果が、MHCペプチドの結合側面におけるペプチド89-101の位置によって説明できるものと確信している。仮に、部位92-98がペプチド結合ポケット内にあるためにペプチドが優先的に結合するのであるならば、MBP92-98特異性T細胞によって認識されるはずである。これが、なぜ、マウスがMBP89-101ペプチドによる初回抗原刺激を受けると、生成される全T細胞分枝系がMBP92-98を認識するか、また同様に、89-101が寛容化T細胞として用いられると、MBP92-98エピトープを認識する細胞を主に寛容化するか、を説明している。仮に、MBP92-98が陰性エピトープであるならば、全抗原の天然処理からは生成されず、T細胞が認識するエピトープは、生体内にはおそらく存在しないことになる。たとえ、MBP92-98特異性T細胞が生体内に存在したとしても疾患に関係ない。それゆえ、89-101は、全MBPにおいてEAE起因性を防ぐことが

10

20

【0133】

例3 - MS型マウスのペプチド治療

本発明者は、腹腔経由(Liu and Wraith (1995) Int Immunol 8: 1255-1263)、又は鼻腔経由(Metzler and Wraith (1993) 5: 1159-1165)の何れかの方法にて全身に投与された1用量のペプチド抗原は、3ヶ月間は、実験的な自己免疫性脳脊髄炎(EAE)から効果的にマウスを守ることを予め示した。少なくとも5用量のペプチドは、EAE特異性T細胞受容体を(Liuらによる。(1995) Immunity 3: 407-415)表すTg4遺伝子導入マウス(Burkhardtらにより示されている。(1999) 11: 1625-1634)に寛容を誘発することが要求された最近の研究は、両投与方法は、遺伝子非導入マウスでは等しく安全であるが、Tg4マウスにおいては、鼻腔(IN)経由が腹腔(IP)経由よりも安全であることを示している。

30

【0134】

MBPの83-99ペプチドは、適切なHLA-DR2クラスIIIMHC分子及びこのペプチドに特異的なヒトT細胞分枝系由来のTCRの両方を表すFug/D6遺伝子導入マウスにて検査される。マウスは、Tg4遺伝子導入マウスの治療に用いた標準的な1用量(Tg4プロトコル)、又はアレルギー患者の治療に用いられるように投与用量を段階的に増大するペプチドの減感プロトコル(減感プロトコル)の何れかのペプチドにて治療される。

40

【0135】

Tg4プロトコル: マウス群は、ペプチド83-99(リン酸塩緩衝食塩水(PBS)中に4mg/ml混合する)又はPBS単独の合計25µlを鼻腔投与にて治療される。マウスは、5週間、週の初日から5日目まで毎日、合計10用量が与えられて治療される。週のはじめには、6匹のマウスの各々は、フロインド完全アジュバンドにてペプチド83-99を投与され、また、1日に1及び3回の百日咳毒素(200ng)IP射出を受ける。少なくとも30日間、EAEの進行を監視する。

【0136】

減感プロトコル: マウス群は、ペプチド83-99又はPBS単独の合計25µlを鼻腔投与にて段階的に投与用量を増大させて治療される。用量の段階変化は、0.1pgから始

50

めて $1\mu\text{g}$ 、 $3\mu\text{g}$ 、 $6\mu\text{g}$ 、 $12\mu\text{g}$ 、 $50\mu\text{g}$ と続けられ、 $100\mu\text{g}$ は、3回投与される。マウスは、5週間、週の初日から5日目まで毎日、合計10用量が与えられて治療される。週のはじめには、6匹のマウスの各々は、フロインド完全アジュバンドにてペプチド83-99を投与され、また、1日に1及び3回の百日咳毒素(200ng)IP射出を受ける。少なくとも30日間、EAEの進行を監視する。

【0137】

例4 - MS患者に対するアピトープ複合薬の鼻腔投与

ワクチンは、MBPペプチド30-44、83-99、110-124及び130-144(すなわち、アピトープとして同定されるMBPエピトープのうちの幾つか。)からなる。ワクチンは、フェイズIa/Ib試験において、35人の患者から得られる。試験は、患者にペプチド(Ia)を1用量投与し、3ヶ月間は何もしないシングルクロスオーバー試験である。患者は、安全性を評価するためにワクチンの1用量投与後の3ヶ月間監視される。治療は、鼻腔堆積による週2回の投与からなる。各患者に対して：臨床的な活性は、毎月磁気共鳴画像によって解析され、免疫学的活性は、増殖のために動的応答性試験を用いて監視される。また、サイトカイン産生は細胞に基づくELISAを用いて監視される。

10

【0138】

試験は、慢性進行性(CP)疾患をもつ5人の患者に対する治療を含んでいる。これらの患者は、低いMRI活性に基づいて選択され、最初に高い用量のペプチドに治療する。CP患者群は、MRI活性の増加によって顕著となる如何なる危険な影響を示しそうなため、治療はCP患者群にて開始される。回帰熱が小康状態にある患者の治療を一旦開始すれば、単一及び複合投与治療の両方ともがCP群に対して安全であるということは明らかである。回帰熱が小康状態にある患者30人からなるグループは、3ヶ月の監視期間中にMRI損傷が酷くなることに基づいて集められた。これらは、高用量のペプチド、中程度の用量のペプチド、低用量のペプチドにて治療される3つのグループに分けられる。

20

【0139】

【表1】

分析時点 (単位:月)	CP患者	RR患者
0	月毎の監視を開始	
3	フェーズIa(ペプチド 一容量の試験)開始: 治療後の1~ 2週間後におけるMRI と月毎の監視を行う	
6	フェーズIb(毎週2倍 の容量のペプチドを 摂取する試験)開始: 月毎の監視は継続	月毎の監視と症状の 悪化した患者の募集
9		フェーズIb(毎週2倍 の容量のペプチドを 摂取する試験)開始: 月毎の監視は継続
12	治療終了。月毎の監視 を6ヶ月間継続	
15		治療終了。月毎の監視 を6ヶ月間継続

10

20

30

40

50

【0140】

また、以下に略号を示す。

APC = antigen presenting cells; MHC = major histocompatibility complex; TCR = T cell receptor; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; APITOPE = antigen processing independent epitope; APIPS = antigen processing independent presentation system; aa = amino acid; MS = Multiple Sclerosis; MBP = myelin basic protein; PLP = proteolipid protein; TCL = T cell line; TCC = T cell clone; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; PPD = Mycobacterium tuberculosis purified protein derivative; PHA = phytohemagglutinin

【0141】

発明のシステム及び方法には、種々の変形例があつて、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能である。また、特に好ましい実施例に関して説明されているが、請求された発明はこの特定の実施例に過度に制限されない。発明を実現するために記述された様々な変形例は、化学、生物学、又は本発明が含まれる関連分野では熟練されたもの

であることは明白である。上記詳細な説明にて言及した全ての刊行物は、ここでは参考として全て含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、多発性硬化症 (MS) の患者及び健康な個体における結核菌精製ツベルクリン蛋白体 (PPD) 及び MBP に対する運動性のプロフィールの代表的な例を示すグラフである。MS 患者 (A) 及び正常個体 (B) から分離された末梢血液単核細胞 (PBMC) を、PPD 及び全部の MBP の存在のもとでの増殖能力に対して試験し、MBP に対する増殖反応の運動性のプロフィールを、二次性抗原 PPD のそれと比較したものである。

【図 2】図 2 は、MS 患者における MBP 及びそのペプチドに対する PBMC 反応を示す表である。特定の個体を、約 4 ~ 7 カ月の間隔で 3 回分析した。 10

【図 3】図 3 は、健康な個体における MBP 及び MBP ペプチドに対する PBMC 反応を示す表である。各分析時点は、4 ~ 7 ヶ月離れている。

【図 4】図 4 は、2 つの異なる時点における複合ペプチドに反応する MS 患者 (MS 49) の例を示すグラフであり、4 カ月後に測られた第 2 の時点間のプロフィールは、かなり異なることが認識された。PBMC は、MBP の完全長に及んでいるペプチドの MBP 及びパネルの存在のもとに培養され、増殖は、³H - チミジン取込によって測られた。第 1 の時点で観察された幅広の T 細胞増殖反応は、7 カ月後の第 2 の時点で測られた反応とかなり異なっている。

【図 5】図 5 は、エピトープ反応が広がり (第 1 の時点)、退行し (第 2 の時点)、12 20
カ月の期間経過後 (第 3 の時点) に再び現れた患者の例を示すグラフである。

【図 6】図 6 は、MS 患者及び健康な個体から生成される TCC のを使用して得られる運動性の反応分析評価で確認されたペプチド部位の微細特異性のマップを示す図である。スクリーニング分析評価で使われる殆どのペプチドは、長さが 15 - mer あるが、少しのペプチドは 10 - mer であり、1 ペプチドは、17 - mer である。各 TCC の特異性は、少なくとも 2 回試験される。

【図 7】図 7 a は、MS 患者からの T リンパ球によって認められるミエリン塩基性蛋白質内における T 細胞エピトープの特性を示す表である。図 7 b は、全ての T 細胞エピトープが凝固した APC によって必ずしも示されるというわけではなく、したがって、アピトープではない。 30

【図 8】図 8 は、活性の及び定着した APC による T 細胞分枝系に対する様々な MBP ペプチドの現れ方を示す図である。図 8 A は、ペプチドが 30 ~ 44 であり、図 8 B は、ペプチドが 110 ~ 124 である。

【図 9】図 9 は、活性の及び定着した APC による T 細胞分枝系に対する様々な MBP ペプチドの現れ方を示す図である。図 9 A は、ペプチドが 130 ~ 144 であり、図 9 B はペプチドが 156 ~ 170 である。

【図 10】図 10 は、3 つの離れた時点において得られる MS 患者の MBP 及び MBP ペプチドに対するピーク刺激指数 (SI) を示す表である。第 2 の時点のサンプルは、第 1 の時点の 4 ~ 8 ヶ月後に、第 3 の時点のサンプルは、第 2 の時点の 3 ~ 5 後に収集された。バックグラウンド cpm は、各日毎に測定され、80 ~ 700 cpm 間を変化し、SI > 3、cpm > 1000 によって陽性と定義した。(患者 MS 19 及び MS 67 から全ての 3 の時点に対するサンプルを集めることできなかった)。 40

【図 11】図 11 は、健康な個体における MBP 及び MBP ペプチドに対するピーク刺激指数 (SI) 値を示す表である。バックグラウンド cpm は、各日毎に測定され、80 ~ 7000 cpm 間を変化し、SI > 3、cpm > 1000 によって陽性と定義した。

【図 12】図 12 は、APC による部位 77 ~ 100 における入れ子型 MBP ペプチドに対する DR2 : MBP 82 ~ 100 の遺伝子導入マウスから分離された T 細胞の反応を示す図である。

【図 13】図 13 は、APC による部位 125 ~ 148 における MBP ペプチドの存在に対する T 細胞分枝系 MS 17 : A3 の反応を示す図である。 50

【図14】図14は、MBP89～101の配列内におけるT細胞エピトープ認識を示す図である。配列：89～94、92～98及び95～101内には、異なるが、重なり合った3つのT細胞エピトープがある。アスパラギニルエンドペプチダーゼ(AEP)の作用による残基94及び95間の分割に対する潜在性は示される。

【図15】図15は、89～94エピトープに反応するT細胞に対して、アピトープとして働くMBPペプチド87～96(A)及び89～101(B)の吸収力を示す図である。

。

【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
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16410 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 7/00
Barbara [GB/GB], Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB01/03702
(74) Agents: HOLLIDAY, Louise, Caroline et al.; D Young & Co., 21 New Fetter Lane, London EC4A 1DA (GB).
- (22) International Filing Date: 17 August 2001 (17.08.2001)
- (25) Filing Language: English
(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, 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, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) Publication Language: English
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Priority Data:
0020618.5 21 August 2000 (21.08.2000) GB
0114547.3 14 June 2001 (14.06.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY OF BRISTOL [GB/GB], Senate House, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WRAITH, David, Cameron [GB/GB], Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB). ANDERTON, Stephen, Mark [GB/GB], Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB). MAZZA, Graziella [IT/GB], Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB). PONSFORD, Mary [GB/GB], Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB). STREETER, Heather,
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- 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.



WO 02/16410 A2

(54) Title: PEPTIDE SELECTION METHOD

(57) Abstract: There is provided a method for selecting a tolerogenic peptide by selecting a peptide which is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing. There is also provided a peptide selected by such a method and its use in a pharmaceutical composition and a method to treat and/or prevent a disease.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

PEPTIDE SELECTION METHOD

The present invention relates to a method for selecting a tolerogenic peptide, a peptide identified by such a method and its use in the treatment and/or prevention of a disease.

- 5 The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising a plurality of such tolerogenic peptides.

BACKGROUND

- 10 In an adaptive immune response, T lymphocytes are capable of recognising internal epitopes of a protein antigen. Antigen presenting cells (APC) take up protein antigens and degrade them into short peptide fragments. A peptide may bind to a major histocompatibility complex (MHC) class I or II molecule inside the cell and be carried to the cell surface. When presented at the cell surface in conjunction with an MHC
15 molecule, the peptide may be recognised by a T cell (via the T cell receptor (TCR)), in which case the peptide is a T cell epitope.

- T cell epitopes play a central role in the adaptive immune response to any antigen, whether self or foreign. The central role played by T cell epitopes in hypersensitivity diseases
20 (which include allergy, autoimmune diseases and transplant rejection) has been demonstrated through the use of experimental models. It is possible to induce inflammatory or allergic diseases by injection of synthetic peptides (based on the structure of T cell epitopes) in combination with adjuvant.

- 25 By contrast, it has been shown to be possible to induce immunological tolerance towards particular peptide epitopes by administration of peptide epitopes in soluble form. Administration of soluble peptide antigens has been demonstrated as an effective means of inhibiting disease in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE – a model for multiple sclerosis (MS)) (Metzler and Wraith (1993) *Int. Immunol.* 5:1159-1165; Liu and
30 Wraith (1995) *Int. Immunol.* 7:1255-1263; Anderton and Wraith (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:1251-1261); and experimental models of arthritis, diabetes, and uveoretinitis (reviewed

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

in Anderton and Wraith (1998) as above). This has also been demonstrated as a means of treating an ongoing disease in EAE (Anderton and Wraith (1998) as above).

5 The use of tolerogenic peptides to treat or prevent disease has attracted considerable attention. One reason for this is that it has been shown that certain tolerogenic epitopes can down-regulate responses of T cells for distinct antigens within the same tissue. This phenomenon, known as "bystander suppression" means that it should be possible to induce tolerance to more than one epitope (preferably all epitopes) within a given antigen, and to more than one antigen for a given disease, using a particular tolerogenic peptide (Anderton and Wraith (1998) as above). This would obviate the need to identify all of the pathogenic antigens within a particular disease.

15 Peptides are also a favourable option for therapy because of their relatively low cost and the fact that peptide analogues can be produced with altered immunological properties. Peptides may thus be modified to alter their interactions with either MHC or TCR.

20 One possible problem with this approach is that it has been shown that not all peptides which act as T cell epitopes are capable of inducing tolerance. The myelin basic protein (MBP) peptide 89-101 is an immunodominant antigen after immunisation and is also a very effective immunogen both in terms of priming for T cell reactivity and induction of EAE. However, this peptide has been shown to be ineffective at inducing tolerance when administered in solution (Anderton and Wraith (1998), as above).

25 A number of explanations for the observed hierarchy in the ability of T cell epitopes to induce tolerance have been proposed (reviewed in Anderton and Wraith (1998) as above). In particular, it has been proposed that there is a correlation between the affinity of the peptide for the MHC and tolerogenicity (Liu and Wraith (1995) as above), but this does not tally with some of the observations. For example, MBP[89-101], which is not tolerogenic, binds to I-A^S with relatively high affinity. It is thus not straightforward to predict which peptides will induce tolerance.

30

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

If there were a rational explanation why only a proportion of peptide epitopes are capable of inducing tolerance, this would facilitate the selection of tolerogenic peptides useful in treating and preventing hypersensitivity disorders.

5 SUMMARY OF THE INVENTION

The present inventors have shown that if a peptide epitope is of an appropriate size to be presented by immature APC without antigen processing, it can induce immunological tolerance. The observation that some T cell epitopes are tolerogenic and others are incapable of inducing tolerance can therefore be explained by the fact that some epitopes require further processing before they are capable of being presented by an MHC molecule. These epitopes which require further processing do not induce tolerance when administered in a soluble form, despite their capacity to induce disease when injected in combination with adjuvant.

15

The epitopes which do not require further processing are capable of inducing tolerance, and have been termed "apitopes" (Antigen Processing Independent epiTOPES) by the inventors.

20 This finding provides a rule-based method for selection of tolerogenic T cell epitopes which obviates the need to examine the tolerogenic capacity of a peptide *in vivo*. This is particularly advantageous in the development of strategies to treat or prevent diseases for which no animal models are available. Even for diseases which have an animal model, the selection method should make the development of tolerance-inducing compositions simpler and safer, because it provides a mechanism whereby the tolerance induction capacity of a peptide can be tested on human T cells (recognising antigen in conjunction with human MHC molecules) *in vitro*, prior to their use *in vivo*.

25

In a first aspect, therefore, the present invention provides a method for selecting a tolerogenic peptide which comprises the step of selecting a peptide which is capable of binding to an MHC class I or class II molecule without further processing.

30

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

In a preferred embodiment, the peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further processing.

5 A number of methods are known in the art for screening for peptides which are capable of acting as T cell epitopes for a given antigen. Commonly, therefore, the method will be used to select a tolerogenic peptide from a plurality of peptides each comprising a T cell epitope.

10 In order to investigate whether a peptide is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing, one can study the capacity of the peptide to bind MHC class I or II molecules using an antigen processing independent presentation system (APIPS). In a preferred embodiment, therefore the method comprises the following steps:

- (i) treating an APIPS with a peptide; and
 - (ii) analysing binding of the peptide to MHC class I or II molecules within the
- 15 APIPS.

In a second aspect, the present invention provides peptide selected by the method of the first aspect of the invention.

20 The peptide may be useful in the treatment and/or prevention of a disease. In particular, the peptide may be useful in the treatment and/or prevention of a disease which is mediated by autoreactive T cells. Hypersensitivity reactions are particularly amenable to treatment/prevention using the peptide of the present invention, for example allergy, autoimmunity and transplant rejection.

25 The present inventors have already identified a number of epitopes for myelin basic protein, which is an autoantigen in multiple sclerosis. In an especially preferred embodiment, therefore, the peptides of the present invention are useful in the treatment and/or prevention of multiple sclerosis.

30 It is known that some peptides are capable of inducing tolerance to other epitopes from the same antigen, and even other epitopes from a distinct antigen (by the phenomenon known

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

as bystander suppression). However, the present inventors predict that in order to adequately suppress all the autoreactive T cells, it would be advantageous for a combination of various apitopes to be administered to the patient to treat/prevent a particular disease. In a third aspect, therefore, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising a plurality of peptides according to the second aspect of the invention, each peptide being based on a T cell epitope.

In a fourth aspect, the present invention provides a method for treating and/or preventing a disease in a subject which comprises the step of administering a peptide according to the second aspect of the invention to the subject.

A general strategy for treating and/or preventing a disease in a subject may comprise the following steps:

- (i) identifying an antigen for the disease
- (ii) identifying an apitope for the antigen; and
- (iii) administering the apitope to the subject.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows a typical example of the kinetic profile to Mycobacterium tuberculosis purified protein derivative (PPD) and MBP in Multiple Sclerosis (MS) patients and healthy individuals. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from an MS patient (A) and normal individual (B) are tested for their ability to proliferate in the presence of PPD and whole MBP; the kinetic profile of the proliferative response to MBP is compared with that of secondary antigen PPD.

Figure 2 is a table which summarises PBMC responses to MBP and its peptides in MS patients. Certain individuals are analysed on three separate time points, with a period of approximately 4 to 7 months between each time point.

Figure 3 is a table which summarises PBMC responses to MBP and MBP-peptides in healthy individuals. Between 4 and 7 months elapsed between each time point.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

Figure 4 shows an example of an MS patient (MS 49) who responds to multiple peptides at 2 different time points, but for whom the recognition profile during the second time point, measured 4 months later, differs significantly. PBMC were cultured in the presence of MBP and a panel of peptides spanning the full length of MBP, and proliferation was measured by ³H-thymidine uptake. The broad T-cell proliferative response observed at the first time point was significantly different to the response measured 7 months later (second time point).

Figure 5 shows an example of a patient whose broad epitope response (first time point) regresses (second time point) and reappears over a twelve-month period (third time point).

Figure 6 shows a map of the fine specificity of the peptide regions identified in the kinetic response assay which is obtained through the use of TCC generated from MS patients and healthy individuals. Most of the peptides used in screening assays are 15-mer in length, however a few are 10-mer, and 1 peptide is 17-mer. The specificity of each TCC is tested at least twice.

Figure 7a is a table showing the characterisation of T cell epitopes within myelin basic protein recognised by T lymphocytes from MS patients.

Figure 7b is a table showing that all T cell epitopes are not necessarily presented by fixed APC and therefore not apitopes.

Figures 8 and 9 show the presentation of various MBP peptides to T cell clones by live and fixed APC. Fig 8A- 30-44, Fig 8B - 110-124, Fig 9A - 130-144, Fig9B - 156-170.

Figure 10 is a table which shows peak Stimulation Index (SI) values to MBP and MBP-peptides in MS patients obtained on three separate time points. Samples for the second time point were collected 4-8 months following the 1st time point, and samples for the 3rd time point were obtained 3-5 months following the second time point. Background cpm was measured for each day and varied between 80-700 cpm; a positive response (bold)

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

was defined according to $SI > 3$ and $\delta cpm > 1000$. (It was not possible to collect samples for all three time points from patients MS19 and MS 67).

5 Figure 11 is a table which shows peak Stimulation Index (SI) values to MBP and MBP-peptides in healthy individuals. Background cpm was measured for each day and varied between 80-700 cpm; a positive response (bold) was defined according to $SI > 3$ and $\delta cpm > 1000$.

10 Figure 12 shows the response of T-cells isolated from a DR2:MBP82-100 transgenic mouse to presentation of nested MBP peptides in the region 77-100 by APC.

Figure 13 shows the response of T cell clone MS17:A3 to presentation of nested MBP peptides in the region 125-148 by APC.

15 Figure 14 is an illustration of T cell epitope recognition within the MBP 89-101 sequence. There are three distinct but overlapping T cell epitopes within the sequence: 89-94, 92-98 and 95-101. The potential for cleavage between residues 94 and 95 by the action of asparaginyl endopeptidase (AEP) is shown.

20 Figure 15 shows the capacity of MBP peptides 87-96 (A) and 89-101 (B) to act as an epitope for T cells responding to the 89-94 epitope.

25 DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION

In a first aspect, the present invention relates to a method for selecting a tolerogenic peptide.

30 *Tolerance*

As used herein, the term "tolerogenic" means capable of inducing tolerance.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

Tolerance is the failure to respond to an antigen. Tolerance to self antigens is an essential feature of the immune system, when this is lost, autoimmune disease can result. The adaptive immune system must maintain the capacity to respond to an enormous variety of infectious agents while avoiding autoimmune attack of the self antigens contained within its own tissues. This is controlled to a large extent by the sensitivity of immature T lymphocytes to apoptotic cell death in the thymus (central tolerance). However, not all self antigens are detected in the thymus, so death of self-reactive thymocytes remains incomplete. There are thus also mechanisms by which tolerance may be acquired by mature self-reactive T lymphocytes in the peripheral tissues (peripheral tolerance). A review of the mechanisms of central and peripheral tolerance is given in Anderton *et al* (1999) (*Immunological Reviews* **169**:123-137).

Tolerance may result from or be characterised by the induction of anergy in at least a portion of CD4+ T cells. In order to activate a T cell, a peptide must associate with a "professional" APC capable of delivering two signals to T cells. The first signal (signal 1) is delivered by the MHC-peptide complex on the cell surface of the APC and is received by the T cell via the TCR. The second signal (signal 2) is delivered by costimulatory molecules on the surface of the APC, such as CD80 and CD86, and received by CD28 on the surface of the T cell. It is thought that when a T cell receives signal 1 in the absence of signal 2, it is not activated and, in fact, becomes anergic. Anergic T cells are refractory to subsequent antigenic challenge, and may be capable of suppressing other immune responses. Anergic T cells are thought to be involved in mediating T cell tolerance.

Without wishing to be bound by theory, the present inventors predict that peptides which require processing before they can be presented in conjunction with MHC molecules do not induce tolerance because they have to be handled by mature antigen presenting cells. Mature antigen presenting cells (such as macrophages, B cells and dendritic cells) are capable of antigen processing, but also of delivering both signals 1 and 2 to a T cell, leading to T cell activation. Apitopes, on the other hand, will be able to bind class II MHC on immature APC. Thus they will be presented to T cells without costimulation, leading to T cell anergy and tolerance.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

Of course, apitopes are also capable of binding to MHC molecules at the cell surface of mature APC. However, the immune system contains a greater abundance of immature than mature APC (it has been suggested that less than 10% of dendritic cells are activated, Summers et al. (2001) Am. J. Pathol. **159**: 285-295). The default position to an apitope will therefore be anergy/tolerance, rather than activation.

It has been shown that, when tolerance is induced by peptide inhalation, the capacity of antigen-specific CD4+ T cells to proliferate is reduced. Also, the production of IL-2, IFN- γ and IL-4 production by these cells is down-regulated, but production of IL-10 is increased. Neutralisation of IL-10 in mice in a state of peptide-induced tolerance has been shown to restore completely susceptibility to disease. It has been proposed that a population of regulatory cells persist in the tolerant state which produce IL-10 and mediate immune regulation (Burkhart *et al* (1999) Int. Immunol. **11**:1625-1634).

The induction of tolerance can therefore be monitored by various techniques including:

- (a) reduced susceptibility to contract the disease for which the peptide is a target epitope *in vivo*;
- (b) the induction of anergy in CD4+ T cells (which can be detected by subsequent challenge with antigen *in vitro*);
- (c) changes in the CD4+ T cell population, including
 - (i) reduction in proliferation;
 - (ii) down-regulation in the production of IL-2, IFN- γ and IL-4; and
 - (iii) increase in the production of IL-10.

Antigen Processing Independent Epitopes (APITOPES)

The method of the present invention comprises the step of selecting a peptide which is capable of binding to an MHC class I or II protein without further processing. Such peptides are known herein as "apitopes" (Antigen Processing Independent epiTOPES).

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

- Cell surface presentation of peptides derived from a given antigen is not random and tends to be dominated by a small number of frequently occurring epitopes. The dominance of a particular peptide will depend on many factors, such as relative affinity for binding the MHC molecule, spatio-temporal point of generation within the APC and resistance to degradation. The epitope hierarchy for an antigen can change with progression of an immune response, which has important implications for self-tolerance and autoimmunity. Immunodominant determinant regions are likely to be good tolerogens. Hence, in a preferred embodiment, the epitope of the present invention is based on a dominant epitope.
- 10 However, after a primary immune response to the immunodominant peptides, epitope "spreading" may occur to sub-dominant determinants (Lehmann *et al* (1992) Nature 358:155-157). Presentation of sub-dominant epitopes may be important in triggering autoimmunity. The epitope of the present invention may, therefore be based on a subdominant epitope.
- 15 For any given antigen, cryptic epitopes may also exist. Cryptic epitopes are those which can stimulate a T cell response when administered as a peptide but which fail to produce such a response when administered as a whole antigen. It may be that during processing of the antigen into peptides in the APC the cryptic epitope is destroyed. The present inventors have shown that peptide 92-98 is a cryptic epitope for MBP (Example 2C). Interestingly there is a putative cleavage site for asparaginyl endopeptidase within this peptide region, which may mean that during natural processing, no peptides containing this region are generated by the APC.
- 25 A cryptic epitope may act as an epitope *in vitro*, in that it may be capable of binding to an MHC molecule without further processing, and inducing anergy in a T cell which recognises the cryptic epitope. However, such an epitope would be unlikely to be therapeutically useful because it should be incapable of tolerising T cells which recognise a naturally processed epitope of the antigen.
- 30 Epitopes for an antigen may be identified by measuring the T cell response to overlapping peptides spanning the entire antigen (see below) when presented by APC. Such studies

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

usually result in "nested sets" of peptides, and the minimal epitope for a particular T cell line/clone can be assessed by measuring the response to truncated peptides.

5 It cannot be assumed that a minimal epitope of an antigen will behave as an epitope. It may well be that amino acids flanking the minimal epitope will be required for optimal binding to the MHC. The epitope should be designed to cover the possibility that there may be subtle differences between the minimal epitopes of different T cell clones.

10 It should be emphasised that it may not be possible to identify an epitope for all epitopes. There is clear evidence that some epitopes bind MHC in a way that is dependent on MHC-loading in endosomes and hence require processing (Viner et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:2214-2218). This is another reason why one cannot assume that each minimal epitope will inevitably behave as an epitope.

15 *Identification of peptides containing T cell epitopes*

There are a number of methods known in the art to identify the T cell epitopes within a given antigen.

20 Naturally processed epitopes may be identified by mass spectrophotometric analysis of peptides eluted from antigen-loaded APC. These are APC that have either been encouraged to take up antigen, or have been forced to produce the protein intracellularly by transformation with the appropriate gene. Typically APC are incubated with protein either in solution or suitably targeted to the APC cell surface. After incubation at 37°C the
25 cells are lysed in detergent and the class II protein purified by, for example affinity chromatography. Treatment of the purified MHC with a suitable chemical medium (for example, acid conditions) results in the elution of peptides from the MHC. This pool of peptides is separated and the profile compared with peptide from control APC treated in the same way. The peaks unique to the protein expressing/fed cells are analysed (for
30 example by mass spectrometry) and the peptide fragments identified. This procedure usually generates information about the range of peptides (usually found in "nested sets") generated from a particular antigen by antigen processing.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

Another method for identifying epitopes is to screen a synthetic library of peptides which overlap and span the length of the antigen in an *in vitro* assay. For example, peptides which are 15 amino acids in length and which overlap by 5 or 10 amino acids may be used. The peptides are tested in an antigen presentation system which comprises antigen presenting cells and T cells. For example, the antigen presentation system may be a murine splenocyte preparation, a preparation of human cells from tonsil or PBMC. Alternatively, the antigen presentation system may comprise a particular T cell line/clone and/or a particular antigen presenting cell type.

T cell activation may be measured via T cell proliferation (for example using ³H-thymidine incorporation) or cytokine production. Activation of TH1-type CD4+ T cells can, for example be detected via IFN γ production which may be detected by standard techniques, such as an ELISPOT assay.

Overlapping peptide studies usually indicate the area of the antigen in which an epitope is located. The minimal epitope for a particular T cell can then be assessed by measuring the response to truncated peptides. For example if a response is obtained to the peptide comprising residues 1-15 in the overlapping library, sets which are truncated at both ends (i.e. 1-14, 1-13, 1-12 etc. and 2-15, 3-15, 4-15 etc.) can be used to identify the minimal epitope.

The identification of immunodominant regions of an antigen using *in vitro* assays (especially those using T cell lines) is predicted to present a skewed pattern of peptide reactivity by the present inventors. In the study to identify MBP epitopes which is described in the examples, they use a kinetic response assay in which the proliferation of PBMC from MS patients and healthy individuals is measured against an overlapping peptide library. This assay is based on the finding that, although T cells from normal individuals and MS patients respond in a similar fashion to purified protein antigen, they respond in a different way to peptides based on the sequence of MBP. T cells from MS patients respond with greater magnitude and more rapid kinetics to peptide antigens when compared with normal healthy donors. This enables screening for and identification of the

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

epitope to which the particular patient responds at a particular time. In the study described herein, this approach has revealed a number of epitope-containing regions that were not identified using standard techniques. Moreover it is shown that T cell recognition exhibits a cyclical pattern, appearing at one time point, regressing, and subsequently reappearing at
5 a later date.

The kinetic assay described by the inventors provides a valuable tool because it reveals the epitope to which a patient is responding at a particular time. This information may be used to tailor a therapeutic epitope-administration approach for a particular patient by
10 identifying and administering an epitope for the relevant epitope (if there is one). This information may also enable a general pattern to be drawn up for disease progression, so that the therapeutic composition can be designed to include epitopes to the epitopes which are likely to be present at a given stage during the disease.

15 *Antigen Processing Independent Presentation Systems (APIPS)*

Once an epitope has been identified, the next step is to investigate whether it also behaves as an epitope.

20 An epitope must be presented to T cells without the need for antigen processing. Having identified peptides containing T cell epitopes, epitopes may be identified using a processing free system. Truncated peptides and peptide analogues may be tested for activation using an antigen processing independent presentation system (APIPS).

25 Examples of APIPS include:

- a) fixed APC (with or without antibodies to CD28);
- b) Lipid membranes containing Class I or II MHC molecules (with or without antibodies to CD28); and
- 30 c) purified natural or recombinant MHC in plate-bound form (with or without antibodies to CD28).

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

It is known to use fixed APC to investigate T cell responses, for example in studies to investigate the minimal epitope within a polypeptide, by measuring the response to truncated peptides (Fairchild *et al* (1996) *Int. Immunol.* 8:1035-1043). APC may be fixed using, for example formaldehyde (usually paraformaldehyde) or glutaraldehyde.

5

Lipid membranes (which may be planar membranes or liposomes) may be prepared using artificial lipids or may be plasma membrane/microsomal fractions from APC.

In use, the APIS may be applied to the wells of a tissue culture plate. Peptide antigens are then added and binding of the peptide to the MHC portion of the APIS is detected by addition of selected T cell lines or clones. Activation of the T cell line or clone may be measured by any of the methods known in the art, for example via ³H-thymidine incorporation or cytokine secretion.

15 *Peptides*

The second aspect of the invention relates to a peptide.

The term "peptide" is used in the normal sense to mean a series of residues, typically L-amino acids, connected one to the other typically by peptide bonds between the α -amino and carboxyl groups of adjacent amino acids. The term includes modified peptides and synthetic peptide analogues.

A peptide of the present invention may be any length that is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing.

25

Peptides that bind to MHC class I molecules are typically 7 to 13, more usually 8 to 10 amino acids in length. The binding of the peptide is stabilised at its two ends by contacts between atoms in the main chain of the peptide and invariant sites in the peptide-binding groove of all MHC class I molecules. There are invariant sites at both ends of the groove which bind the amino and carboxy termini of the peptide. Variations in peptide length are

30

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

accommodated by a kinking in the peptide backbone, often at proline or glycine residues that allow the required flexibility.

Peptides which bind to MHC class II molecules are typically between 8 and 20 amino acids in length, more usually between 10 and 17 amino acids in length, and can be much longer. These peptides lie in an extended conformation along the MHC II peptide-binding groove which (unlike the MHC class I peptide-binding groove) is open at both ends. The peptide is held in place mainly by main-chain atom contacts with conserved residues that line the peptide-binding groove.

10 The peptide of the present invention may be made using chemical methods (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.). For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204), cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). Automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) in accordance with the instructions provided by the manufacturer.

20 The peptide may alternatively be made by recombinant means, or by cleavage from a longer polypeptide. For example, the peptide may be obtained by cleavage from the target antigen. The composition of a peptide may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure).

25 In a preferred embodiment the peptide is derivable from a target antigen. A target antigen is a molecule (for example a protein or glycoprotein) which is processed by APC and recognised by T cells during the course of the disease. The target antigen will, of course, depend on the target disease. Preferably the peptide is derivable from a fragment of the antigen which arises by natural processing of the antigen by an APC.

30 For practical purposes, there are various other characteristics which the peptide should show. For example, the peptide should be soluble at a concentration which permits its use

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

in vivo. Preferably the peptide should be soluble at concentrations of up to 0.5 mg/ml, more preferably the peptide should be soluble at concentrations of up to 1 mg/ml, most preferably the peptide should be soluble at concentrations of up to 5 mg/ml.

- 5 For intranasal administration the maximum volume of dose which can be taken up using current procedures is approximately 200 μ l per nostril. If the peptide is soluble at 1mg/ml, a double dose to each nostril enables 800 μ g to be given to the patient. It is unusual to give more than 5mg in any individual dose.
- 10 It is also important that the peptide is sufficiently stable *in vivo* to be therapeutically useful. The present inventors have found that *in vivo*, 30 minutes after administration the total amount of a test peptide drops to about 50%, 4 hours after administration the amount drops to about 30%, but that after 5 days the peptide is still detectable (at about 5%). The half-life of the peptide *in vivo* should be at least 10 minutes, preferably at least 30 minutes, more preferably at least 4 hours, most preferably at least 24 hours.

The present inventors have found that following intranasal administration, the amount of peptide in the draining lymph node peaks at about 4 hrs following administration, however peptide is still detectable (at levels of about 5% maximum) after 5 days. Preferably the

- 20 peptide is sufficiently stable to be present at a therapeutically active concentration in the draining lymph node for long enough to exert a therapeutic effect.

The peptide should also demonstrate good bioavailability *in vivo*. The peptide should maintain a conformation *in vivo* which enables it to bind to an MHC molecule at the cell surface without due hindrance.

25

Target diseases

- 30 In one embodiment, the peptide of the second aspect of the invention is for use in the treatment and/or prevention of a disease.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

An aptope for MHC class II is likely to be particularly useful in diseases which are mediated by CD4+ T cell responses. For example, diseases which are established or maintained by an inappropriate or excessive CD4+T cell response.

- 5 Such a peptide is likely to be particularly useful in the treatment of hypersensitivity disorders. Hypersensitivity reactions include:
- (i) allergies, resulting from inappropriate responses to innocuous foreign substances;
 - 10 (ii) autoimmune diseases, resulting from responses to self tissue antigens; and
 - (iii) graft rejection, resulting from responses to a transplant.

Examples of allergies include, but are not limited to: hay fever, extrinsic asthma, insect bite and sting allergies, food and drug allergies, allergic rhinitis, bronchial asthma chronic
15 bronchitis, anaphylactic syndrome, urticaria, angioedema, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis, erythema nodosum, erythema multiforme, Stevens-Johnson Syndrome, rhinconjunctivitis, conjunctivitis, cutaneous necrotizing venulitis, inflammatory lung disease and bullous skin diseases.

20 Examples of the autoimmune diseases include, but are not limited to: rheumatoid arthritis (RA), myasthenia gravis (MG), multiple sclerosis (MS), systemic lupus erythematosus (SLE), autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis), Graves' disease, inflammatory bowel disease, autoimmune uveoretinitis, polymyositis and certain types of diabetes, systemic vasculitis, polymyositis-dermatomyositis, systemic sclerosis (scleroderma),
25 Sjogren's Syndrome, ankylosing spondylitis and related spondyloarthropathies, rheumatic fever, hypersensitivity pneumonitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, inorganic dust pneumoconioses, sarcoidosis, autoimmune hemolytic anemia, immunological platelet disorders, cryopathies such as cryofibrinogenemia and autoimmune polyendocrinopathies.

30 A variety of tissues are commonly transplanted in clinical medicine, including kidney, liver, heart lung, skin, cornea and bone marrow. All grafts except corneal and some bone marrow grafts usually require long-term immunosuppression at present.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

In one embodiment of this aspect of the invention, the peptide is for use in the treatment and/or prevention of diabetes. In this embodiment, the peptide may be derivable from the target antigen IA2.

5

In a further embodiment of this aspect of the invention, the peptide is for use in the treatment and/or prevention of multiple sclerosis (MS). Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease characterised by multiple demyelinating lesions disseminated throughout the CNS white matter and occurring at various sites and times (McFarlin and McFarland, 1982 *New England J. Medicine* 307:1183-1188 and 1246-1251). MS is thought to be mediated by autoreactive T cells.

10

In this embodiment the peptide may be derivable from one of autoantigens, in particular myelin basic protein (MBP) or proteolipid protein (PLP). MBP is possibly more appropriate than PLP, because PLP is highly hydrophobic and peptides derived from it tend to clump together. MBP is immunogenic and MBP-specific T lymphocytes have encephalitogenic activity in animals (Segal *et al.*, 1994 *J. Neuroimmunol.* 51:7-19; Voskuhl *et al.*, 1993 *J. Neuroimmunol.* 42:187-192; Zamvil *et al.*, 1985 *Nature* 317:355-8).

15

20 In a preferred embodiment, the peptide is derivable from one of the immunodominant regions of MBP, namely: 1-24, 30-54, 75-99, 90-114, 105-129, 120-144, 135-159 and 150-170.

In an especially preferred embodiment the peptide is selected from one of the MBP peptides shown to act as epitopes by the present inventors, which include the following peptides: 30-44, 80-94, 83-99, 81-95, 82-96, 83-97, 84-98, 110-124, 130-144, 131-145, 132-146 and 133-147.

25

30 Apitopes for MHC class I may be used, for example, to modify anti-viral CD8+ responses in a tolerogenic fashion.

Pharmaceutical composition

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

The present inventors predict that, despite "bystander suppression" it may be necessary to target a number of different T cell clones in order to induce tolerance effectively. Hence a plurality of peptides may be administered to an individual in order to prevent or treat a disease.

In a third aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising a plurality of apitopes.

10 The pharmaceutical composition may, for example comprise between 2 and 50 apitopes, preferably between 2 and 15 apitopes. The apitopes may be derivable from the same or different target antigen(s). Preferably the apitopes are either all able to bind to MHC class I, or all able to bind MHC class II, without further processing. In a preferred embodiment all the apitopes in the pharmaceutical composition are either able to bind to MHC class I
15 or class II without further processing.

The pharmaceutical composition may be in the form of a kit, in which some or each of the apitopes are provided separately for simultaneous, separate or sequential administration.

20 Alternatively (or in addition) if the pharmaceutical composition (or any part thereof) is to be administered in multiple doses, each dose may be packaged separately.

The pharmaceutical composition may comprise a therapeutically or prophylactically effective amount of the or each apitope and optionally a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

25 Also, in the pharmaceutical compositions of the present invention, the or each apitope may be admixed with any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), or solubilising agent(s).

30
Administration

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

The peptide should be administered in soluble form in the absence of adjuvant.

Preferably the peptide is administered by a mucosal route.

5 Studies have shown that peptide, when given in soluble form intraperitoneally (i.p.), intravenously (i.v.) or intranasally (i.n.) or orally can induce T cell tolerance (Anderton and Wraith (1998) as above; Liu and Wraith (1995) as above; Metzler and Wraith (1999) Immunology 97:257-263).

10 Preferably the peptide is administered intranasally.

Studies in mice have demonstrated that the duration of peptide administration required to induce tolerance depends on the precursor frequency of T cells in the recipient (Burkhart et al (1999) as above). In many experimental studies, it has been shown that repeated
15 doses of peptide are required to induce tolerance (Burkhart et al (1999) as above). The exact dose and number of doses of peptide will therefore depend on the individual, however, in a preferred embodiment a plurality of doses is administered.

If a plurality of peptides is administered simultaneously, they may be in the form of a
20 "cocktail" which is suitable for administration in single or multiple doses. Alternatively it may be preferably to give multiple doses but vary the relative concentrations of the peptides between doses.

In a preferred embodiment a "dose escalation" protocol may be followed, where a plurality
25 of doses is given to the patient in ascending concentrations. Such an approach has been used, for example, for phospholipase A2 peptides in immunotherapeutic applications against bee venom allergy (Müller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101:747-754 and Akdis et al (1998) J. Clin. Invest. 102:98-106).

30 EXAMPLES

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

The following examples serve to illustrate the present invention, but should not be construed as a limitation thereof. The invention particularly relates to the specific embodiments described in these examples

5 EXAMPLE 1 – Identification of T cell epitopes in MBP

Materials and Methods

Antigens

10 Human MBP is prepared from brain white matter as described by Deibler *et al.* (Deibler *et al.*, 1972 *Preparative Biochemistry* 2:139), and its purity assessed by SDS-PAGE. MBP and *Mycobacterium tuberculosis* purified protein derivative (PPD) (UK Central Veterinary Laboratory, Surrey) are used in proliferative assays at previously determined optimal concentrations; the optimum concentration for each antigen is 50 µg/ml. A panel of 15-
15 mer overlapping peptides spanning the whole MBP molecule are synthesized using standard F-moc chemistry on an Abimed AMS 422 multiple peptide synthesizer (Abimed, Langenfeld, Germany). Each peptide is displaced by 5 aa and overlapped by 10 aa. We produce 33 peptides that are pooled into groups of 3 and pools are tested at the optimum concentration of 50 µg/ml, such that *in vitro* each peptide is present at a concentration of
20 16.6 µg/ml.

Patients and control subjects

The subjects of this study consist of 12 patients with clinically definite or laboratory supported definite MS (Poser *et al.*, 1983), with an age range of 29-51 years. Eight of the
25 12 patients are involved in a trial of interferon-β, otherwise all other MS patients have received no corticosteroid treatment for at least 3 months prior to the commencement of the study. The control group consisted of 13 healthy individuals with an age range of 25-55 years, and none have received immunosuppressive therapy for at least 3 months prior to the blood sample being obtained.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

Tissue culture medium

RPMI-1640 medium supplemented with 20mM HEPES (Sigma, Poole, UK), penicillin (100U/ml), streptomycin sulphate (100 mg/ml), and 4 mM L-glutamine (all from Life Technologies, Paisley, Scotland), is used as the tissue culture medium. Medium without serum is used for washing lymphoid cells and TCL. For all culture conditions and assays, medium is supplemented with 10 % heat inactivated autologous plasma.

Culture conditions and T cell proliferative assays

10 Citrated peripheral blood (50-100 ml) is collected by venepuncture from each subject after informed written consent had been obtained. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are isolated from blood by density centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma, Poole, UK), and cultured in 1.5 ml volumes in 24-well tissue culture plates (Nunc International, Costar, Corning Inc. New York, USA) at a concentration of 1×10^6 cells per ml, containing either 15 PPD, MBP or peptides of MBP. The plates are incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 /95% air. Between days 5 and 14 duplicate aliquots of 100 μl are withdrawn from each culture, transferred to a 96-well round bottom microtitre plate and pulsed with 0.4 μCi [^3H]-Thymidine (Amersham International, Amersham, UK). After 18 hours cells are harvested onto glass fibre mats (LKB-Wallac, Turku, Finland) using a 20 Mach 111 harvester 96 (Tomtec, Orange, New Jersey, USA). [^3H]- Thymidine incorporation is determined using a Microbeta liquid scintillation counter (LKB-Wallac). Test wells containing antigen are considered positive when the $\delta\text{cpm} > 1000$ and the Stimulation Index (SI) > 3 , where $\text{SI} = \text{CPM antigen containing culture} / \text{CPM culture without antigen}$.

25

Generation of T cell lines and T cell clones

MBP-specific T cell lines (TCL) are generated from 8 MS patients and 2 healthy control donors. PBMC from each subject are separated as described above and plated out at 1×10^6 cells/ml in 6-well plates in the presence of MBP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$); a portion of PBMC from each 30 subject is regularly frozen and stored for subsequent restimulations. Seven days later the cells are fed with fresh medium containing 2% IL-2 (Lymphocult-HT; Biotest LTD., Birmingham, UK), and on day 12 of culture all cells are restimulated with antigen, IL-2

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

and irradiated (2500 Rad) autologous PBMC as a source of antigen presenting cells (APC), at a cell ratio of 1T cell:5 APC. Cells are expanded in IL-2 every 3-4 days, and on day 14 are restimulated with antigen, IL-2 and PBMC, as described above. On the day of the first restimulation cells are examined for specific proliferation to MBP. Briefly, 2×10^4

5 T cells and 1×10^5 irradiated autologous PBMC are cultured in triplicate, in 96-well round-bottom plates, in the presence of MBP. Cells are cultured for 2 days and pulsed with (^3H)-Thymidine at $0.4 \mu\text{Ci}/\text{well}$ during the last 18 hours of the culture. Cells are then harvested as described above, and a TCL is considered to be MBP-specific with a $\delta\text{cpm} > 1000$ and a $\text{SI} > 3$.

10 Following 3 restimulation/expansion cycles TCL are cloned using PHA (Sigma, Poole, Dorset, UK) in the presence of autologous irradiated PBMC as APC. T cells are plated under limiting dilution conditions at 0.1 cell/well, 0.3 cell/well and 1 cell/well and cultured in Terasaki plates (Nunc International, Costar) with 1×10^4 irradiated PBMC,

15 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ PHA, and 2% IL-2. After 10-12 days, growth-positive wells are expanded onto 96-well round-bottom plates, using 1×10^5 irradiated PBMC, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ PHA and IL-2. Three days later wells are fed with fresh medium containing IL-2, and on day 7 the clones are expanded onto 48-well plates using 5×10^5 irradiated PBMC, PHA and IL-2; at this point clones are tested in proliferation assays for specific responses to MBP. MBP-specific

20 clones are expanded a week later onto 24-well plates, using 1×10^6 irradiated PBMC with PHA or Dynabeads (Dyna, UK) and IL-2. The clones are maintained in 24-well plates using a 7-10 day restimulation/expansion cycle, essentially as described above. The ability of T cell clones (TCC) to recognise the panel of MBP peptides is tested by proliferation assays, as described above.

25

Results

MBP-peptide recognition amongst MS patients and healthy individuals

30 The present inventors use a kinetic response assay in which PBMC from MS patients and healthy subjects are tested for their ability to respond to a panel of overlapping 15-mer synthetic peptides spanning the full length of human MBP. The proliferative response of

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

- PBMC from each culture is examined at 5 time points over a period of 2 weeks, and the kinetic profile of the response to MBP and peptides is compared with the response to PPD, the latter representing a secondary response/memory antigen. No significant difference is found in the PBMC response to MBP and/or peptides between patients on Interferon- β and those on no treatment (data not shown). The response to MBP in both MS patients and healthy controls peaked later than the response to PPD, thereby following the kinetic characteristics of the response to a non-recall antigen. Figure 1 shows a typical example of the kinetic profile to PPD and MBP in MS patients and healthy individuals.
- 10 As shown in Figure 2, the two peptides most commonly recognised by MS patients are 90-114 and 75-99 (6/12 patients each), followed by regions 30-54, 135-159 and 150-170 (5/12 patients), and 1-24 and 105-129 (4/12 patients). Three patients respond to aa 15-39 and 120-144. Two patients recognise 45-69, and none of the MS patients respond to region 60-84.
- 15 According to Figure 10, where all the patients are HLA-DR2 positive, the two peptides most commonly recognised by MS patients are 90-114 and 75-99 (6/11 patients each), followed by regions 120-144, 135-159 and 150-170 (5/11 patients), and 1-24, 15-39, 30-54 and 105-129 (4/11 patients). Three patients respond to aa 45-69, and again none of the MS patients respond to region 60-84.
- 20 By contrast, healthy individuals recognise significantly fewer peptides, with only 2 control subjects responding to more than 2 peptides (C and J; Figure 3). Control individuals C and J are the only two who recognise aa 60-84, a region not seen by this group of patients. Interestingly both these individuals express the DRB1* 0701 allele. Regions 45-69 and 105-129 are not recognised by any of the healthy donors, whereas 75-99 and 150-170 are recognised by 4 healthy individuals; 135-159 is recognised by three healthy individuals; 1-24, 30-54, 60-84 and 120-144 is recognised by two healthy individuals; and 15-39 and 90-114 are recognised by one individual. Overall, 8/13 healthy individuals do not respond to any of the overlapping peptides, whereas only 1/12 MS patients (MS 19) consistently fail to recognise the MBP peptides. Notably this patient is unique in not responding to MBP protein.
- 30

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

Figure 11 also shows the response of healthy individuals to MBP peptides. In this study, only 1 control subject responds to more than 2 peptides (N11). N11 is also the only individual who recognises aa 60-84, a region not seen by this group of patients. Regions 15-39, 45-69 and 105-129 are not recognised by any of the healthy donors, whereas 120-144 and 135-159 are recognised by two healthy individuals; and 1-24, 30-54, 60-84, 75-99, 90-114 and 150-170 are recognised by one individual. Overall, 9/12 healthy individuals do not respond to any of the overlapping peptides.

10 Overall, the day on which the response to MBP and/or peptides peaked did not differ significantly between healthy individuals and patients, and the kinetics in both groups resembled those of a primary antigenic response. In addition, the magnitude of the response to MBP and peptides did not differ between patients and healthy individuals.

15 MBP-peptide recognition changes over time

Having established that patients with MS respond to a broad spectrum of MBP peptides, the present inventors decided to examine whether PBMC recognition in the same individuals is focused and stable over the course of approximately 4-12 months. As shown in Figures 2, 10 and 3 neither the MS patients nor the healthy individuals exhibited the same peptide recognition pattern.

Figure 4 represents an example of an MS patient (MS 49) who responds to multiple peptides at 2 different time points, but the recognition profile during the second time point, measured 4 months later, differs significantly. That is, in the second kinetic assay the PBMC response to aa 15-39, 30-54 and 150-170 persists, however the response to 75-99 and 105-129 regresses and shifts to regions 90-114 and 135-159.

Figure 5 (MS 60) illustrates an example of a patient whose broad epitope response regressed to a focused response over the period of 4 months. The healthy individuals who are tested the second time round fail to respond to any of the peptides (Figure 3).

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

Overall the results demonstrate that patients with MS do not exhibit set patterns of recognition. Within each patient the PBMC response to several peptides can persist, regress, and shift to new regions of MBP, as seen in patient MS 49.

5 Cycling of peptide recognition

When the PBMC response to peptides is analysed at 3 or more different time points over a period of 12 months, it becomes clear that in certain patients epitope recognition appears to fluctuate rather than shift irreversibly to new peptide regions. For example, as shown in Figures 2 and 10, patient MS 60 exhibits a cycling pattern of recognition to aa 120-144 and 135-159; that is, residues 120-144 and 135-159 are amongst many recognised at the first time point tested, the response to these 2 regions regresses by the second time point and then reappears at the third time point measured 4 months later. The kinetic profile of patient MS 41 demonstrates, similarly, that recognition of aa 135-159 fluctuates over several time points (see Figures 2 and 10).

15

Amongst the healthy control group (Figure 3), one individual (M) exhibits a fluctuating response to regions 75-99 and 135-159, a second individual (F) recognises 75-99 at two of the three time points analysed, whilst a third subject (D) shows a cyclical response to residue 15-39.

20

Fine mapping the response to MBP

TCC are generated from 8 MS patients and 2 healthy individuals, and used to clarify the fine specificity of the peptide regions identified in the kinetic response assay. The specificity of each TCC is tested by its proliferative response to the panel of 15-mer peptides. Clone SD:A7 recognised region 1-24, and within this region this TCC responded to aa 5-19. Region 30-54 is recognised by 4 clones (MS49:D3, MS49:C8, MS49:A8, MS49:B6) and the epitope within this region is 30-44. One clone (MS39:D7) from an MS patient recognises peptide 60-74, and interestingly one healthy individual responds to this region (60-84) in our kinetic response assay. Five clones (MS43:A7, MS41:B6, MS41:A2, MS41:C6, N5:8) recognise aa 83-99 which is contained in region 75-99. One patient produced TCC specific for aa 110-124 (MS60:A2, MS60:B3), contained within the 105-129 pool, and another TCC from the same patient is specific to 130-144 (MS60:E1),

25

30

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

found within the 120-144 region. Five individuals produce clones which recognise epitopes within the region 135-159: MS60:F7, MS60:D1, MS59:F1 and N5:19 recognises aa 140-154; MS57:A1 is specific to 140-149, and TCC MS17:A3 responds to sequence 130-144. This panel of clones clearly demonstrates the presence of at least 2 T cell epitopes within the 135-159 region of MBP. Lastly, region 150-170 is recognised by 2 clones specific to aa 156-169. The specificity of all TCC is summarised in Figure 6.

EXAMPLE 2 – Identification of epitopes in MBP

10 *Materials and methods*

Antigen-presentation assay using an APIPS

Presentation of the peptides to T cell clones is measured by proliferation. APC are fixed in 0.5% paraformaldehyde and plated at 1×10^5 cells per well of a 96-well tissue culture plate. T cells clones are plated at 2×10^4 cells per well in the presence of varying concentrations of peptide. After incubation for 48 h at 37°C, proliferation is measured by [³H] thymidine incorporation over 16-20h. Results are compared with the ability of T cells to respond to the epitope presented by live APC.

20 Presentation of peptides to T cells isolated from DR2:MBP82-100 transgenic mouse was essentially as described above except APC were plated at 5×10^5 cells per well, T cells were plated at 1×10^5 cells per well, and incubation was allowed to proceed for 72h prior to the addition of [³H]-thymidine.

25 *Results*

In this experiment, peptides which have been identified as epitopes in the previous example are examined for their capacity to be presented using an APIPS. The results are shown in Figure 7b. Of the five epitopes examined so far, four were found to be epitopes (30-44, 80-94, 110-124 and 130-144) and one was found to act as an epitope but not an epitope (156-170).

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

Example 2A - Investigation of MBP peptides 30-44, 110-124, 130-144 and 156-170

In order to investigate whether various MBP peptides are apitopes, their capacity to be presented to T-cells by fixed APC is investigated. Live or pre-pulsed Mgar (HLA-DR2+ve) cells are pre-pulsed with the peptide in serum, or serum alone for 3.5 hours. Excess peptide is then removed from cells and the appropriate T cell clone added. The T cell proliferative response is measured by ³H-thymidine uptake.

As shown in Figures 8 and 9, peptides 30-44 (Fig 8A), 110-124 (Fig 8B), and 130-144 (Fig 9A) can be presented by fixed APC without further processing. These peptides are therefore defined as apitopes. Peptide 156-170, on the other hand, requires further processing for presentation to T cells (Fig 9B). Fixed APC are unable to present this epitope to T cells, so 156-170 is not an apitope.

15 Example 2B - Identification of apitopes within the regions 77-100 and 125-148 of MBP

For any given epitope, there may exist one or more apitopes, capable of being presented to APC without further processing. The presence of apitopes within two regions of MBP is investigated by incubating live or p-formaldehyde-fixed Mgar (HLA-DR2+ve) cells are incubated with overlapping peptides in serum from MBP regions 77-100 (Figure 12) and 125-148 (Figure 13) or in serum alone. T cells were added and after 72h (Figure 12) or after 48h (Figure 13) the T cell proliferative response was measured by ³H-thymidine uptake. For MBP 77-100, the T cells are isolated from a DR2:MBP 82-100 transgenic mouse, whereas for MBP 130-144 the T cell clone MS17:A3 is used.

For MBP region 77-100 the following peptides are defined as apitopes:

MBP 83-99 ENPVVHFFKNIVTPRTP
30 MBP 80-94 QDENPVVHFFKNIV
MBP 81-95 QDENPVVHFFKNIVT
MBP 82-96 DENPVVHFFKNIVTP

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

MBP 83-97 ENPVVHFFKNIVTPR
MBP 84-98 MPVVHFFKNIVTPRT

The minimum MBP sequence recognised by T cells from DR2 MBP 82-100 transgenic
5 mouse is region 85-94.

For MBP region 125-148 the following peptides are defined as apitopes:

MBP 130-144 RASDYKSAHKGFKGV
10 MBP 131-145 ASDYKSAHKGFKGVDA
MBP 132-146 SDYKSAHKGFKGVDA
MBP 133-147 DYKSAHKGFKGVDAQ

The minimum MBP sequence recognised by T-cell clone MS17:A3 is region 133-144.
15

Example 2C – Investigation of region 89-101 of MBP

The present inventors have previously shown that, in contrast to other myelin T cell
epitopes, administration of peptide 89-101 in soluble form does not prevent murine
20 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) induced with either whole myelin or
the 89-101 peptide itself (Anderton and Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28:1251).

MBP 89-101 comprises three T cell epitopes

25 In order to investigate T cell reactivity to the 81-111 region of MBP, lymph node cells
from mice primed with 81-111 are stimulated with 81-111 in vitro and these cells are
tested with a panel of overlapping 10-mer peptides with two residue shifts covering the 81-
111 region (namely: 81-90, 83-92, 85-94, 87-96, 89-98, 91-100, 93-102, 95-104, 97-106,
99-108 and 101-111). The response pattern to peptides covering the 89-101 show
30 stimulatory capacity for 5 adjacent peptides (N terminal 87-96 through to 95-104)
reflecting the presence of at least two (and perhaps three) distinct epitopes.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

in order to investigate this region further, three sub-lines are generated from the original 81-111-responsive T-cell line and these are retested with a panel of overlapping 10-mer peptides with one residue shift covering the 84-106 region. The results reveal the existence of three distinct but overlapping T cell epitopes within the 89-101 sequence: 89-94, 92-98 and 95-101 (see Figure 14).

MBP peptide 92-98 is a cryptic epitope

The three epitope-specific T cell lines (TCL) show interesting differences when tested to reactivity to the 89-101 peptide and whole recombinant MBP. All three TCL respond to the peptide (89-101) but only the 89-94 and 95-101-specific TCL respond to whole MBP. This indicates that antigen processing of intact MBP preferentially generates ligands for T cells recognising 89-94 and 95-101 but not those recognising 92-98. This suggests that the 92-98 epitope is cryptic (i.e. cannot be generated by processing of native antigen). It seems that the MBP 89-101 peptide can partake in three distinct interactions with the MHC molecule resulting in peptide/MHC ligands which are recognised by three separate T cell populations. Processing of MBP however only generates ligands for two of these T cell populations (see Fig 14).

Induction of EAE requires T cell recognition of autoantigenic epitopes expressed in the CNS as a result of degradation of intact MBP. Immunisation of mice with peptides comprising only one of the three previously identified T cell epitopes shows that only those containing a naturally processed epitope (89-94 or 95-101) are capable of inducing EAE. This further supports the finding that 92-98 is a cryptic epitope.

MBP peptide 92-98 is the dominant epitope for MBP region 89-101

As mentioned above, the region 89-101 contains three distinct but overlapping peptides. Of these, peptide 92-98 appears to be dominant for this region. For example, when T cell clones are generated from mice primed with the 89-101 peptide, all six clones which were generated respond to the 92-98. Using 89-101 analog peptides containing individual alanine substitutions at each position, it has been found that substitution of any of the

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

positions 92-98 leads to a lack of responsiveness, showing that alteration of any residues within the 92-98 core has gross effects on recognition of this epitope.

5 MBP peptide 89-101 fails to tolerize EAE-relevant T cells recognising a naturally processed MBP epitope.

10 To summarise the findings above, the present inventors have found that a) the 89-101 sequence has the potential to generate 3 distinct T cell epitopes; b) only two of these epitopes (89-94 and 95-101) are generated by antigen processing of intact MBP (both in vitro and in vivo); c) only peptides containing the naturally processed epitopes and not those containing a cryptic epitope are effective at inducing EAE; d) the 89-101 peptide fails to protect against EAE in peptide therapy experiments.

15 This information provides a basis for investigating the hypothesis that peptide 89-101 fails to tolerize against EAE through a failure to directly ligate the disease relevant T cells. In order to support the hypothesis, the peptide (89-101) should fail to induce tolerance to the major encephalitogenic epitope (89-94) since it will not bind directly to the MHC restriction element (I-A^s) in the appropriate conformation. In other words, 89-101 will not act as an epitope for T cells responding to 89-94.

20

In order to test this possibility tolerance experiments are performed with the 89-101 and 87-96 peptides (Fig 15 A & B). The 87-96 peptide contains the epitope (89-94) most effective at inducing EAE.

25 *Methods*

30 Mice received 200 µg of peptide in PBS or PBS alone intraperitoneally on days -8, -6 and -4 prior to 100 µg of peptide in complete Freund's adjuvant on day 0. After 10 days, draining lymph node cells (6 x10⁵ per well) were cultured in X-Vivo 15 medium supplemented with 5 x 10⁻⁵M 2-mercaptoethanol and 2M L-glutamine with or without antigen for 72 hours. Cultures were pulsed for the final 16 hours with 0.5 µCi

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

ri.ymidine and incorporation measured using a liquid scintillation counter. Results are expressed as means counts per minute for triplicate cultures.

Results

5

Priming with 87-96 induced a strong recall response to itself and a weaker response to 89-101 (Fig 15 A and B □ and ○ respectively). This is consistent with the need for antigen processing to generate 89-94 from 89-101. The use of 87-96 as a tolerogen prior to priming with 87-96 suppressed recall responses to both 87-96 and 89-101 (Fig 15 A ■ and ●). This fits with 89-94 reactive T cells, once rendered unresponsive in vivo, failing to respond in vitro to 89-94 whether they are generated from 89-96 or 89-101. Crucially, however, the use of 89-101 as the tolerogen prior to priming with 87-96 failed to inhibit recall responses to either 87-96 or 89-101 (Fig 15 B A ■ and ●). These data demonstrate that administration of peptide 89-101 in tolerogenic form fails to tolerize to the naturally processed encephalitogenic epitope based on the 89-94 sequence: the 89-101 peptide fails to behave as an epitope for the 89-94 epitope.

Without wishing to be bound by theory, the present inventors believe that the observations can be explained by the position of peptide 89-101 in the MHC peptide binding site. If the peptide preferentially binds so that the region 92-98 is in the peptide-binding pocket, then it will be recognised by MBP92-98-specific T cells. This would explain why, when mice are primed with the MBP89-101 peptide, all the T cell clones generated recognise the MBP92-98 epitope. Equally, when 89-101 is used to tolerise T cells, it will mainly tolerise cells which recognise the MBP92-98 epitope. If MBP92-98 is a cryptic epitope, it is not generated by natural processing of the whole antigen and T-cells recognising this epitope will probably not exist in vivo. Even if an MBP92-98-specific T cells cell did exist in vivo, it would not be relevant to the disease. Hence, 89-101 fails to prevent EAE induced with whole MBP.

30

EXAMPLE 3 -- Peptide therapy for a mouse model of MS

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

The present inventors have previously shown that a single dose of peptide antigen administered systemically either by the intraperitoneal (Liu and Wraith (1995) *Int Immunol* 8:1255-1263) or intranasal (Metzler and Wraith (1993) 5:1159-1165) route will effectively protect mice from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) for up to 5 three months (Metzler and Wraith (1999) *Immunology* 97:257-263). At least 5 doses of peptide were required to induce tolerance in the Tg4-transgenic mouse (Burkhart et al (1999) 11:1625-1634) expressing an EAE-specific T cell receptor (Liu et al (1995) *Immunity* 3:407-415). Recent work has shown the intranasal (IN) route is safer than the intraperitoneal (IP) route in the Tg4 mouse, even though both approaches are equally safe 10 in the non transgenic mouse.

Peptide 83-99 of MBP is tested in the Fug/D6 transgenic mouse which expresses both the appropriate HLA-DR2 class II MHC molecule and a TCR from a human T cell clone specific for this peptide. Mice are treated with peptide following either the standard dose 15 used for treatment of the Tg4 transgenic mouse (Tg4 protocol) or the desensitisation protocol of peptide dose escalation which has been used in treatment of patients suffering from allergy (Desensitisation protocol).

Tg4 protocol: Groups of mice are treated by intranasal administration of peptide 83-99 20 (4mg/ml in phosphate-buffered saline (PBS)) or PBS alone in a total volume of 25 μ l. Mice are treated every 1st and 5th day of the week for 5 weeks giving a total of 10 doses. At the beginning of week 6 each mouse is injected with peptide 83-99 in Complete Freund's Adjuvant (CFA) and also receives an IP injection of Pertussis Toxin (200ng) on day 1 and 3. The progression of EAE is monitored for at least 30 days.

25 Desensitisation protocol: Groups of mice are treated by intranasal administration of an escalating dose of peptide 83-99 or PBS alone in a total volume of 25 μ l. The dose escalation starts at 0.1 μ g and proceed through 1, 3, 6, 12, 50 and then three times 100 μ g. Mice are treated every 1st and 5th day of the week for 5 weeks giving a total of 10 doses. 30 At the beginning of week 6 each mouse is injected with peptide 83-99 in Complete Freund's Adjuvant (CFA) and also receives an IP injection of Pertussis Toxin (200ng) on day 1 and 3. The progression of EAE is monitored for at least 30 days.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

EXAMPLE 4 – Nasal administration of an epitope cocktail to MS patients

A vaccine is made comprising the MBP peptides 30-44, 83-99, 110-124 and 130-144 (i.e. some of those epitopes of MBP which have been identified as apitopes). The vaccine is given to thirty-five patients in a Phase Ia/Ib trial. The trial is a single crossover trial in which patients remain untreated for three months followed by a single dose of peptide (Ia). Patients are then monitored for three months following the single dose of vaccine to assess safety. Treatment then consists of twice weekly administration by intranasal deposition.

For each patient: clinical activity is analysed monthly by magnetic resonance imaging; immunological activity is monitored using a kinetic response assay for proliferation; and cytokine production is monitored using a cell-based ELISA.

The trial initially involves treatment of 5 patients suffering from chronic progressive (CP) disease. These patients are selected on the basis of low MRI activity and are treated first with the highest dose of peptides. Treatment is started in the CP patient group because they are most likely to demonstrate any possible harmful effects as evidenced by an increase in MRI activity. Treatment of relapsing remitting patients begins once it is clear that the both single and multiple dose treatment is safe in the CP group. A larger group of 30 relapsing remitting patients are recruited on the basis of their suffering enhancing MRI lesions during a monitoring period of 3 months. These are divided into three groups to be treated with a high, medium or low dose of peptide.

TIME POINT (MONTHS)	CHRONIC PROGRESSIVE (CP) PATIENTS	RELAPSING REMITTING (RR) PATIENTS
0	Begin monthly monitoring	
3	Start phase Ia (single dose of peptide) with MRI at 1-2 weeks after treatment and monthly monitoring	

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

6	Start phase Ib (twice weekly dose of peptide) and continue monthly monitoring	Begin monthly monitoring and recruit patients with enhancing lesions
9		Start phase Ib (twice weekly dose of peptide) and continue monthly monitoring
12	End treatment and continue monthly monitoring for further 6 months	
15		End treatment and continue monthly monitoring for further 6 months

Abbreviations: APC = antigen presenting cells; MHC = major histocompatibility complex; TCR = T cell receptor; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; APITOPE = antigen processing independent epitope; AIPS = antigen processing independent presentation system; aa = amino acid; MS = Multiple Sclerosis; MBP = myelin basic protein; PLP = proteolipid protein; TCL = T cell line; TCC = T cell clone; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; PPD = Mycobacterium tuberculosis purified protein derivative; PHA = phytohemagglutinin

- 10 Various modifications and variations of the described methods and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the
- 15 described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in chemistry or biology or related fields are intended to be covered by the present invention. All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference.

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

P9611wo
CLAIMS

1. A method for selecting a tolerogenic peptide which comprises the step of selecting a peptide which is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing.
- 5
2. A method according to claim 1, wherein the peptide is capable of binding to an MHC class II molecule without further processing.
- 10
3. A method according to claim 1 or 2, wherein the peptide is selected from a plurality of peptides each comprising a T cell epitope.
4. A method according to claim 3, wherein the plurality of peptides is eluted from the MHC class II molecules of an antigen presenting cell.
- 15
5. A method according to claim 3 or 4, wherein each peptide in the plurality of peptides is capable of inducing a disease associated with the antigen in a subject when administered to the subject with adjuvant.
- 20
6. A method according to claim 1 or 2, wherein the peptide is selected from a nested set of truncated peptides.
7. A method according to any preceding claim, wherein the peptide comprises a T cell epitope and presence of a T cell epitope is determined by:
- 25
- (i) treating:
- a sample of cells from a subject having the disease, and
a sample of cells from a subject not having the disease
with the peptide; and
- (ii) comparing the T cell responses between the cell samples.
- 30
8. A method according to any preceding claim which comprises the following steps:

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

- 7
8 (i) treating an antigen processing independent presentation system (APIPS) with a
9 peptide; and
10 (ii) analysing binding of the peptide to MHC class I or II molecules within the
11 APIPS.
- 12 9. A method according to claim 8, wherein binding of the peptide to MHC class I or
13 II molecules is analysed by adding T cells and measuring T cell activation.
- 14 10. A method according to claim 8, wherein the APIPS comprises:
15 (i) fixed antigen presenting cells
16 (ii) lipid membranes comprising MHC class I or II molecules; or
17 (iii) plate-bound MHC class I or II molecules.
- 18 11. A peptide selected by the method according to any preceding claim.
- 19 12. A peptide according to claim 11, which is selected from the following myelin basic
20 protein peptides: 30-44, 80-94, 83-99, 81-95, 82-96, 83-97, 84-98, 110-124, 130-144, 131-
21 145, 132-146 and 133-147.
- 22 13. A peptide according to claim 11 or 12, for use in the treatment and/or prevention of
23 a disease.
- 24 14. A peptide according to claim 13, wherein the disease is a hypersensitivity disorder.
- 25 15. A pharmaceutical composition comprising a plurality of peptides according to any
26 of claims 11 to 14, each peptide comprising a T cell epitope for the disease.
- 27 16. A method for treating and/or preventing a disease in a subject in need of same
28 which comprises the step of administering a peptide according to any of claims 11 to 14 to
29 the subject.
- 30 17. A method according to claim 16, which comprises the following steps:

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

- ,
- (i) identifying an antigen for the disease
 - (ii) identifying an epitope for the antigen; and
 - (iii) administering the epitope to the subject.
- 5 18. A method according to claim 16 or 17 wherein the peptide or epitope is administered in multiple doses.
19. A method according to any of claims 16 to 18, wherein the peptide or epitope is administered intranasally.

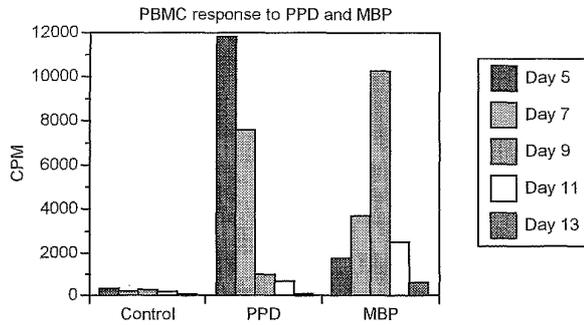


FIG. 1A

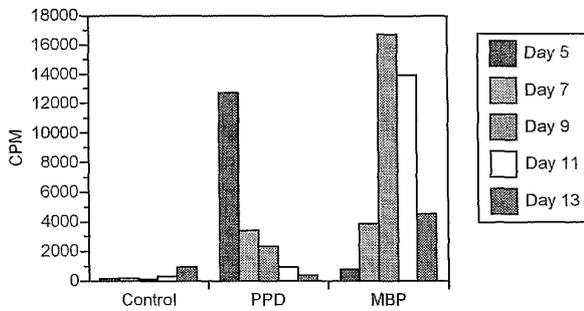


FIG. 1B

Response to MBP peptides in MS patients: 1st time point												
MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170	
MS 10	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MS 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 39	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MS 41	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MS 43	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
MS 49	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MS 57	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 59	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
MS 60	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
MS 67	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
MS 80	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Response to MBP peptides in MS patients: 2nd time point												
MS 10	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
MS 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MS 41	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MS 49	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
MS 57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS 60	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MS 43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Response to MBP peptides in MS patients: 3rd time point												
MS 41	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
MS 60	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
MS 59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 2

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

3 / 16

Response to MBP peptides in healthy individuals: 1st time point		Response to MBP peptides in healthy individuals: 2nd time point		Response to MBP peptides in healthy individuals: 3rd time point							
Individual	MBP	1 to 24	15-39	30-54	45-69	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-17
A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Response to MBP peptides in healthy individuals: 2nd time point											
G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Response to MBP peptides in healthy individuals: 3rd time point											
D	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
J	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 3

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

4 / 16

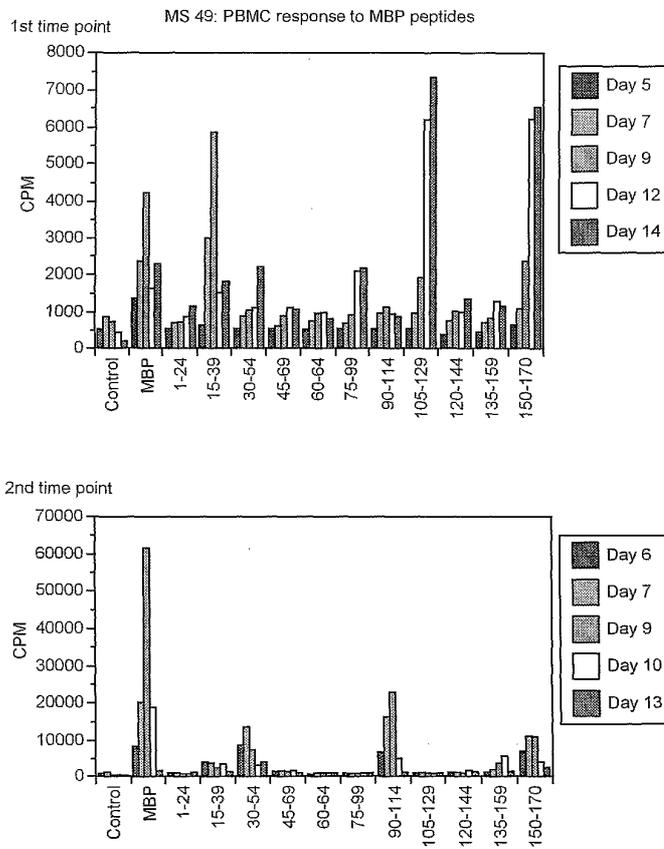


FIG. 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/16410

PCT/GB01/03702

5 / 16

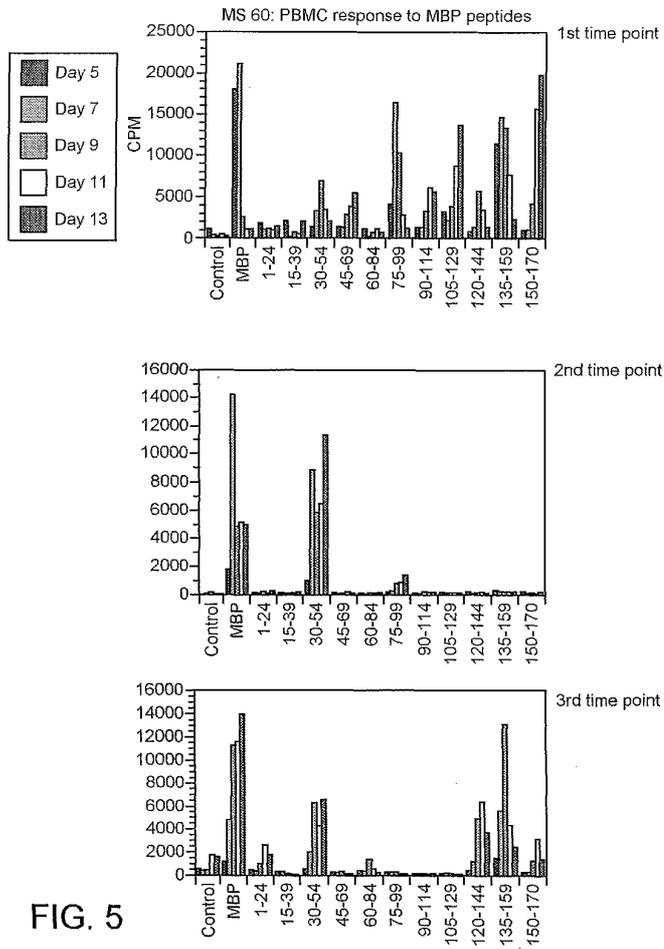


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

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

FIG. 6

PROTEIN REGION STUDIED	EPITOPES IDENTIFIED USING T CELL CLONES
1-24	5-19
15-39	Not common
30-54	30-44
45-69	Not common
60-84	60-74
75-99	80-94 83-99
90-114	Not common
105-29	110-124
120-144	130-144
135-159	130-144 140-154
150-170	150-164 156-169

FIG. 7A

EPITOPE STUDIED	APITOPE STUDIED
5-19	Not done
30-44	++
60-74	Not done
80-94	++
83-99	++
110-124	++
130-144	++
140-154	Not done
156-170	-

FIG. 7B

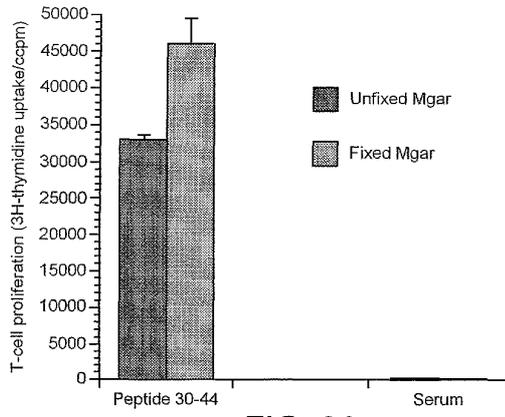


FIG. 8A

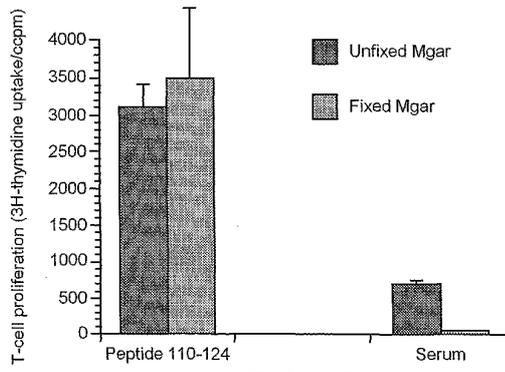


FIG. 8B

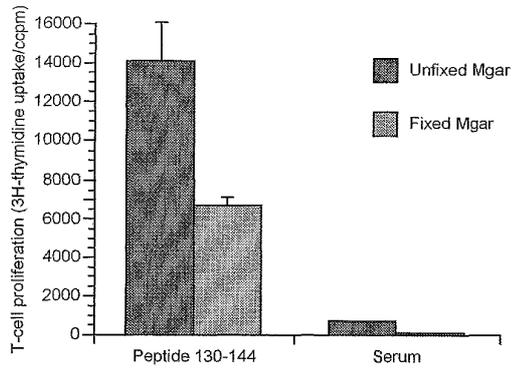


FIG. 9A

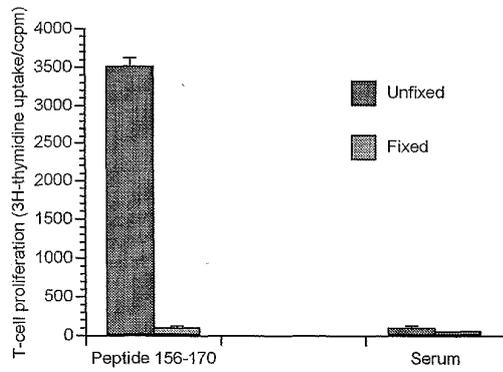


FIG. 9B

	Time point	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
MS 10	1	14	17	3	15	55	1	1	2	15	1	2	1
	2	4	1	<1	<1	<1	<1	9	4	1	<1	4	1
	3	8	3	1	1	1	<1	1	1	2	1	1	0
MS 17	1	29	1	1	1	1.5	2	<1	<1	1	1	1.5	2
	2	51	1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	9
	3	51	1	<1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
MS 19	1	1	2	1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1
	2	1.5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 39	1	39	3	5	1	3	2	2	7.5	6	<1	2	2
	2	68	1	<1	<1	2	2	<1	<1	<1	1	<1	<1
	3	50	8	1	1	1	2	1	1.5	1	<1	3	<1
MS 41	1	59	2	3	2	2	1.5	1	1	2	6	7	3
	2	116	1	<1	<1	<1	2	1	<1	1	<1	<1	<1
	3	74	2	1.5	1	2	2	8	<1	<1	<1	95	<1
MS 43	1	32	4	22	3	3	3	24	4	2	12	3	4
	2	75	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	66	2	2	1	13	2	1	2	2	2	7	1
MS 49	1	6	5	9	11	5	4	11	4	35	6	5	31
	2	202	2	8	23	4	3	2	73	2	2	11	34
	3	2	1	2	4	1	2	1	1	1	1	1	2
MS 57	1	36	8	<1	1.5	1	1	2	2	<1	<1	<1	<1
	2	7	2	2	2	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	3	6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 59	1	57	2	1	65	1	1	9	37	1	1	2	14
	2	27	1	<1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	3	14	1	9	2	1	1	4	2	2	63	137	1
MS 60	1	44	3	2	19	8	2	28	9	11	16	16	12
	2	133	1	<1	83	<1	<1	20	<1	1	<1	2	<1
	3	23	2	<1	13	<1	2	<1	<1	<1	10	26	2
MS 67	1	49	2	3	2	1	2	2	1	<1	1	58	

FIG. 10

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

FIG. 11

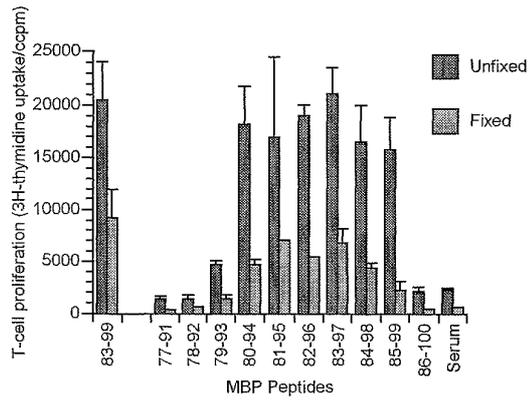


FIG. 12

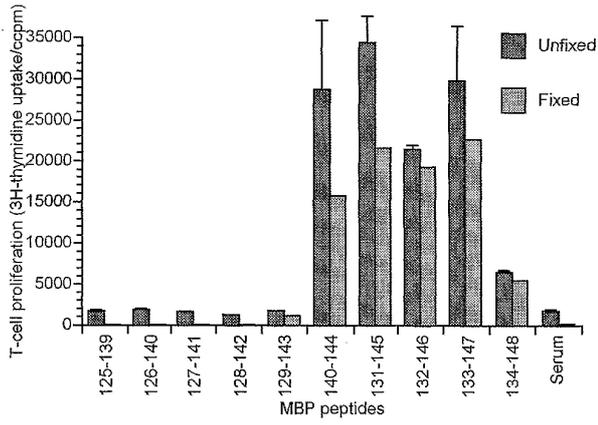


FIG. 13

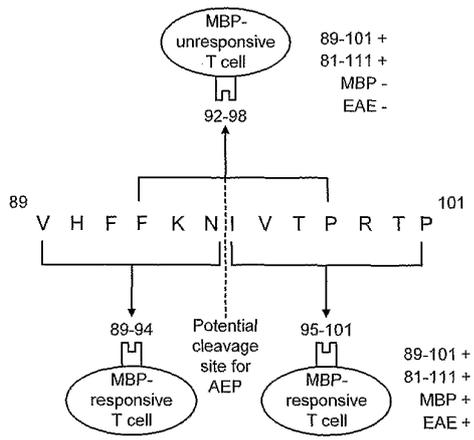


FIG. 14

Symbol	Intraperitoneal Peptide	Peptide for priming	Peptide for recall in vitro
□	None	87-96	87-96
○	None	87-96	89-101
■	87-96	87-96	87-96
●	87-96	87-96	89-101

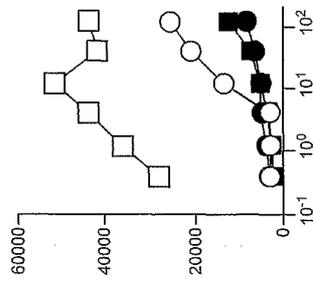


FIG. 15A

Symbol	Intraperitoneal Peptide	Peptide for priming	Peptide for recall in vitro
□	None	87-96	87-96
○	None	87-96	89-101
■	89-101	87-96	87-96
●	89-101	87-96	89-101

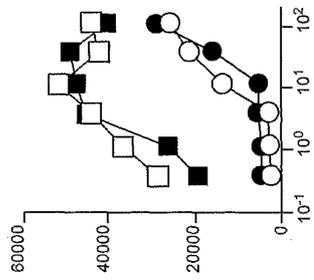


FIG. 15B

【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
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016410 A3

(51) International Patent Classification: C07K 14/47, G01N 33/50, A61K 38/17, A61P 37/00 (74) Agents: HOLLIDAY, Louise, Caroline et al.; D Young & Co., 21 New Fetter Lane, London EC4A 1DA (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/03702

(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, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) International Filing Date: 17 August 2001 (17.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0020618.5 21 August 2000 (21.08.2000) GB
0114547.3 14 June 2001 (14.06.2001) GB

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): THE UNIVERSITY OF BRISTOL [GB/GB]; Senate House, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WRAITH, David, Cameron [GB/GB]; Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB). ANDERTON, Stephen, Mark [GB/GB]; Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB). MAZZA, Graziella [IT/GB]; Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB). PONSFORD, Mary [GB/GB]; Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB). STREETER, Heather, Barbara [GB/GB]; Department of Pathology and Microbiology, University of Bristol, Bristol BS8 1TD (GB).

Published:

with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report: 12 September 2002

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.



WO 02/016410 A3

(54) Title: PEPTIDE SELECTION METHOD

(57) Abstract: There is provided a method for selecting a tolerogenic peptide by selecting a peptide which is capable of binding to an MHC class I or II molecule without further processing. There is also provided a peptide selected by such a method and its use in a pharmaceutical composition and a method to treat and/or prevent a disease.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/03702
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 G01N33/50 A61K38/17 A61P37/00		
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) IPC 7 C07K G01N A61K A61P		
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 practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 11027 A (NOVARTIS AG) 2 March 2000 (2000-03-02) page 3, line 10 - page 4, line 23; page 16, line 26 - page 20, line 16; claims 1,46; figure 8; examples 4-10,17	1-19
X	US 5 858 980 A (WEINER ET AL.) 12 January 1999 (1999-01-12) column 10, line 53 -column 11, line 20; claim 1; examples 1-4	1-19
X	WO 96 32957 A (BRIGHAM & WOMEN'S HOSPITAL) 24 October 1996 (1996-10-24) claim 10; examples 1-4	1-19
X	WO 98 13378 A (RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN) 2 April 1998 (1998-04-02) page 15 -page 19; table 1	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*I* 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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
3 June 2002	11/06/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010	Authorized officer Schmidt, H	

International Application No. PCT/GB 01 03702

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-6,11-19 (all partially)

Present claims 1-6 relate to a method defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a method wherein a peptide is capable of binding to an MHC class I or II without further processing. Moreover, the method lacks any technical feature of how to select a tolerogenic peptide.

The claims cover all methods having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such methods. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Present claims 11 and 13-19 relate to an extremely large number of possible peptides lacking any technical feature. In fact, the claims contain so many options that a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. It is unclear in the sense of Article 6 PCT what is meant by "a peptide selected by the method according to any preceding claim" (see claim 11). This expression may comprise a wide range of peptides and is therefore speculative, embracing a great variety of possibilities not yet explored by the applicant, the effect of which cannot be expected by the skilled person using the teaching disclosed in the current application and his technical knowledge to reproduce without undue burden all the possibilities which are actually claimed.

Peptides of claim 12 corresponding to MBP 30-44 and MBP 110-124 have not been searched as they are neither explicitly disclosed in the description nor are part of the sequence list (Rule 5.2 PCT).

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear and disclosed, namely to the method as set out in claim 7 and the peptides having SEQ ID NOs 1-10 (see also Example 2B), their compositions and their methods.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/88 01 03702

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-19 (all partially)

peptides having SEQ ID NOs 1-6 and their methods

2. Claims: 1-19 (all partially)

peptides having SEQ ID NOs 7-10 and their methods

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/GB 01/03702

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 0011027	A	02-03-2000	US 6251396 B1 26-06-2001			
			AU 6020099 A 14-03-2000			
			EP 1105419 A1 13-06-2001			
			WO 0011027 A1 02-03-2000			
			US 6379670 B1 30-04-2002			
US 5858980	A	12-01-1999	US 6036957 A 14-03-2000			
			US 6077509 A 20-06-2000			
			AU 720695 B2 08-06-2000			
			AU 3754297 A 20-11-1997			
			AU 3778593 A 13-09-1993			
			BR 9306042 A 18-11-1997			
			CA 2117492 A1 02-09-1993			
			EP 0627933 A1 14-12-1994			
			HU 74832 A2 28-02-1997			
			IL 104880 A 13-07-1997			
			JP 8504745 T 21-05-1996			
			NO 943151 A 26-10-1994			
			WO 9316724 A1 02-09-1993			
			US 5843445 A 01-12-1998			
			US 5720955 A 24-02-1998			
			US 5783188 A 21-07-1998			
			AT 170874 T 15-09-1998			
			AT 212358 T 15-02-2002			
			AU 680824 B2 14-08-1997			
			AU 4282493 A 18-11-1993			
			BR 9306272 A 23-06-1998			
			CA 2133749 A1 28-10-1993			
			DE 69320967 D1 15-10-1998			
			DE 69320967 T2 12-05-1999			
			DE 69331501 D1 14-03-2002			
			DK 863155 T3 13-05-2002			
			EP 0650498 A1 03-05-1995			
			EP 0863155 A1 09-09-1998			
			HU 69169 A2 28-08-1995			
			JP 8500083 T 09-01-1996			
			NO 943755 A 02-12-1994			
			WO 9321222 A1 28-10-1993			
			AT 210721 T 15-12-2001			
			AU 651350 B2 21-07-1994			
			AU 7898991 A 30-10-1991			
			BR 9106303 A 13-04-1993			
			CA 2078549 A1 01-10-1991			
			DE 69132863 D1 24-01-2002			
			DK 522091 T3 08-04-2002			
			EP 0522091 A1 13-01-1993			
			HU 63334 A2 30-08-1993			
			NO 923778 A 16-11-1992			
			WO 9115225 A1 17-10-1991			
			US 6039947 A 21-03-2000			
			WO 9632957	A	24-10-1996	AU 5851196 A 07-11-1996
						CA 2216936 A1 24-10-1996
						EP 0825870 A1 04-03-1998
WO 9632957 A1 24-10-1996						
WO 9813378	A	02-04-1998	EP 0849275 A1 24-06-1998			
			AU 4401997 A 17-04-1998			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/GB 01/03702

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9813378	A	WO 9813378 A1	02-04-1998

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72) 発明者 レイス、デイビッド、キャメロン
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー
- (72) 発明者 アンダートン、ステファン、マーク
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー
- (72) 発明者 マツァ、グラツィエラ
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー
- (72) 発明者 ボンスフォード、メアリー
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー
- (72) 発明者 ストリーター、ヘザー、バーバラ
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA40 BA11 BB50 DA36
4B063 QA18 QQ08 QQ79 QR42 QR48 QR69 QR77 QS11 QS24
4C084 AA02 AA06 BA44 CA25 CA28 MA59 NA14 ZB02 ZB13
4H045 AA11 BA17 CA45 DA86 EA22

专利名称(译)	肽选择方法		
公开(公告)号	JP2004506921A	公开(公告)日	2004-03-04
申请号	JP2002521505	申请日	2001-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	阿皮托普技术(布里斯托尔)有限公司		
申请(专利权)人(译)	Apitopu科技(布里斯托尔)有限公司		
[标]发明人	レイスデイビッドキャメロン アンダートンステファンマーク マツアグラツイエラ ポンスフォードメアリー ストリーターヘザーバーバラ		
发明人	レイス、デイビッド、キャメロン アンダートン、ステファン、マーク マツア、グラツイエラ ポンスフォード、メアリー ストリーター、ヘザー、バーバラ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K C07K14/46 C07K14/47 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P25/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/4713 G01N33/505 A61K38/10 A61K38/17 C07K14/47 A61K39/0008		
FI分类号	G01N33/50.Z A61P37/06 A61P37/08 C07K14/46 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA36 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063 /QQ79 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS11 4B063/QS24 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/BA44 4C084/CA25 4C084/CA28 4C084/MA59 4C084/NA14 4C084/ZB02 4C084 /ZB13 4H045/AA11 4H045/BA17 4H045/CA45 4H045/DA86 4H045/EA22		
代理人(译)	小池 晃		
优先权	2000020618 2000-08-21 GB 2001014547 2001-06-14 GB		
其他公开文献	JP5431628B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：促进选择有效预防和治疗免疫系统疾病（如过敏性疾病）的免疫耐受性肽。通过选择能够结合MHC I类或II类分子而不加速处理的肽来提供选择免疫耐受性肽的方法。这里选择的肽可治疗和预防免疫系统疾病。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 37/06	4 B O 6 3
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/08	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/08	C O 7 K 14/46	4 H O 4 5
C O 7 K 14/46	C I 2 Q 1/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 88 頁) 最終頁に続		

(21) 出願番号	特願2002-521505 (P2002-521505)	(71) 出願人	503070650
(8) (22) 出願日	平成13年8月17日 (2001.8.17)		アビトープ テクノロジー (ブリストル)
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月21日 (2003.2.21)		リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003702		イギリス国 B S 1 4 L Y ブリストル
(87) 国際公開番号	W02002/016410		クイーンズ スクエア 4 6 - 4 8
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)	(74) 代理人	100067736
(31) 優先権主張番号	0020618.5		弁理士 小池 晃
(32) 優先日	平成12年8月21日 (2000.8.21)	(74) 代理人	100086335
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		弁理士 田村 榮一
(31) 優先権主張番号	0114547.3	(74) 代理人	100096677
(32) 優先日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		弁理士 伊賀 誠司
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く