(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108472345 B
(45)授权公告日 2023.05.23

(21)申请号 201680067136.1
(22)申请日 2016.09.16
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108472345 A
(43)申请公布日 2018.08.31
(30)优先权数据
PA201570591 2015.09.16 DK
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/DK2016/050301 2016.09.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/045691 EN 2017.03.23
(73)专利权人 IO生物技术公司
地址 丹麦哥本哈根
(72)发明人 梅斯·哈尔德·安德森
(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
专利代理师 陈玉平 姜建成
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
US 7018627 B1,2006.03.28
US 7018627 B1,2006.03.28
WO 0078334 A1,2000.12.28
WO 2014037811 A2,2014.03.13
Guo et al..Macrophage-derived chemokine gene transfer results in tumor regression in murine lung carcinoma model through efficient induction of antitumor immunity.《Gene Therapy》.2002,
审查员 王娟
权利要求书1页 说明书48页
序列表5页 附图17页

(54)发明名称

包含C-C基序趋化因子22(CCL22)或其片段的疫苗组合物

(57)摘要

本公开涉及作为癌症免疫抑制中的T细胞靶的CCL22。

CN 108472345 B

1.C-C基序趋化因子22的免疫原性活性肽片段，其中其氨基酸序列选自RLQTALLVVL、MATLRVPLLVALVLLAVAIQTS或VALVLLAVAI。

2.疫苗组合物，其包含根据权利要求1所述的免疫原性活性肽片段和佐剂。

3.根据权利要求2所述的疫苗组合物，其中所述佐剂选自GM-CSF、基于细菌DNA的佐剂、基于油/表面活性剂的佐剂、基于病毒dsRNA的佐剂和imidazochiniline。

4.根据权利要求2或3所述的疫苗组合物，其中所述佐剂是Montanide ISA佐剂，任选地Montanide ISA 51或Montanide ISA 720。

5.根据权利要求2或3所述的疫苗组合物，其中所述疫苗组合物包含抗原呈递细胞，所述抗原呈递细胞包括所述免疫原性活性肽片段或编码所述免疫原性活性肽片段的核酸。

6.根据权利要求4所述的疫苗组合物，其中所述疫苗组合物包含抗原呈递细胞，所述抗原呈递细胞包括所述免疫原性活性肽片段或编码所述免疫原性活性肽片段的核酸。

7.根据权利要求5所述的疫苗组合物，其中所述抗原呈递细胞是树突细胞和/或其中所述核酸包括在载体内。

8.根据权利要求6所述的疫苗组合物，其中所述抗原呈递细胞是树突细胞和/或其中所述核酸包括在载体内。

9.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性活性肽片段或疫苗组合物在制备用于治疗或预防与C-C基序趋化因子22的表达相关的临床病症的药剂中的用途。

10.根据权利要求9所述的用途，其中所述临床病症为癌症、炎症或感染。

11.根据权利要求10所述的用途，其中所述癌症为其中表达C-C基序趋化因子22的癌症或其中所述炎症或感染导致在抗原呈递细胞 中的表达。

12.根据权利要求9或10所述的用途，其与另外的癌症治疗组合或与针对感染的另外的治疗组合。

13.根据权利要求11所述的用途，其与另外的癌症治疗组合或与针对感染的另外的治疗组合。

14.根据权利要求12所述的用途，其中所述另外的癌症治疗选自化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质的治疗、基因治疗、抗体的治疗和使用树突细胞的治疗。

15.根据权利要求13所述的用途，其中所述另外的癌症治疗选自化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质的治疗、基因治疗、抗体的治疗和使用树突细胞的治疗。

16.编码根据权利要求1所述的免疫原性活性肽片段的核酸。

包含C-C基序趋化因子22(CCL22)或其片段的疫苗组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及癌症的预防和治疗领域。具体而言，在此提供了能够引发抗癌免疫应答的蛋白质C-C基序趋化因子22(CCL22)或肽片段。具体而言，本发明涉及CCL22或其衍生肽或CCL22特异性T细胞用于治疗癌症的用途。本发明因此涉及任选地可以与其他免疫疗法组合的抗癌疫苗，并涉及通过疫苗接种在体内过继转移或诱导的CCL22特异性T细胞，其用于治疗癌症。本发明的一个方面是本文提供的药物可以与癌症化学疗法联合使用。另一方面涉及通过与上述相同的手段预防和治疗感染。

[0002] 还提供了CCL22和其免疫原性肽片段在癌症和感染的治疗、诊断和预后中的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 免疫系统是细胞和分子的复杂设置，通过消除所有被认为是危险的要素来保持生物体的完整性。几种调节机制的作用是终止对抗原的免疫应答，在抗原被清除后使免疫系统恢复到基础状态，并维持对自身抗原的无反应性或耐受性。不幸的是，一些预防自身免疫的机制被癌症劫持以获得免疫逃逸。事实上，在Hanahan和Weinberg的“The Hallmarks of cancer”中，逃避免疫破坏现在被列为新兴的标志(Nomi等人,2007)。这种逃避免疫破坏基于几种机制。实体瘤由癌细胞本身以及不仅提供支持框架而且允许免疫逃避的基质组成。为此目的，肿瘤吸引和/或转化生成和维持免疫允许微环境的免疫活性细胞。这些免疫活性细胞通常涉及维持免疫稳态的中枢和外周耐受机制的复杂网络，包括因子叉头框P3(Foxp3)阳性调节性T细胞(Treg)、NKT细胞、树突细胞亚型、骨髓源抑制性细胞(MDSC)、M2(又名肿瘤相关)巨噬细胞和粒细胞。图1说明了CCL22被认为在癌症中起作用的机制。

[0005] 这种免疫逃避在癌症免疫疗法中是有害的。因此，靶向一种或多种免疫抑制途径与其中免疫抑制机制拮抗所需效应的抗癌免疫疗法的组合可能是高度有用的。正在研究几种不同的靶向癌症免疫抑制的潜在治疗策略，特别是使用单克隆抗体阻断抑制途径。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明如权利要求书中所定义。

[0008] CCL22的表达和潜在的CCL22诱导的癌症免疫抑制在治疗癌症中造成问题。

[0009] 本发明解决了癌症免疫抑制的问题，其提供了CCL22作为新型T细胞靶。

[0010] 因此，本发明提供了通过直接靶向表达CCL22的癌细胞并通过杀死表达CCL22的癌细胞来治疗癌症疾病的材料和方法。这是通过使T细胞能够识别表达CCL22的细胞来完成的。有趣的是，本发明公开了即使表达CCL22的细胞可以拮抗其他免疫治疗方法的所需作用，也可以提高针对表达CCL22的细胞的细胞毒性免疫应答。因此，尽管CCL22通过吸引免疫抑制细胞例如Treg来实现肿瘤逃避，但本发明显示免疫系统可以对趋化因子起反应，并且可能提高针对CCL22的特异性免疫应答。这提供了通过抑制向肿瘤募集免疫抑制性细胞和表达CCL22的癌细胞来治疗例如癌症的一种新颖机制。

[0011] 同样，本发明提供了用于治疗通常可以引起免疫应答的其他疾病例如感染的材料和方法。在本发明的方法中，T细胞能够杀死表达CCL22的抗原呈递细胞(APC)和/或树突细胞(DC)。

[0012] 因此，本发明利用免疫抑制趋化因子CCL22在癌细胞中的表达并靶向这些表达CCL22的细胞。

[0013] 本发明的一个方面是提供令人惊讶地能够产生针对自身蛋白质CCL22的免疫应答的疫苗组合物。

[0014] 本文提供疫苗组合物，其包含：

[0015] a)以下一种或多种：

[0016] (i)SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22或包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的连续氨基酸序列的CCL22的免疫原性活性肽片段；

[0017] (ii)CCL22的免疫原性活性肽片段，其为MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段；

[0018] (iii)(i)和(ii)的多肽的功能同系物，其中所述功能同系物与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70％的序列同一性，和/或所述功能同系物是由与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:14的连续氨基酸序列除了最多三个氨基酸、例如最多两个氨基酸、例如最多一个氨基酸发生置换之外的相同序列组成的免疫原性活性多肽；

[0019] (iv)包含(i)、(ii)或(iii)的多肽中任一个的多肽；

[0020] (v)编码(i)、(ii)或(iii)的多肽中任一个的核酸；和

[0021] (b)佐剂

[0022] 其用作药物。

[0023] 疫苗组合物可以用作药物，并可以例如用于治疗表达CCL22的癌症疾病或用于治疗导致抗原呈递细胞(APC)中CCL22表达的感染。

[0024] 本发明还提供包含疫苗组合物和第二活性成分的套装药盒(kit-of-parts)。

[0025] 本发明还记载了CCL22的肽片段和I类HLA或II类HLA分子或这样的分子的片段的复合物。所述肽片段可以例如为本文下文在章节“CCL22的免疫原性活性肽片段”、“包含CCL22或其片段的多肽”和“MHC”中所述的CCL22的肽片段中任意肽片段。

[0026] 本发明公开了在患有临床病症的个体中检测CCL22反应性T细胞的存在的方法，该方法包括使肿瘤组织或血液样品与包含上述CCL22的肽片段的复合物接触，并检测所述复合物与组织或血细胞的结合。

[0027] 本发明还公开了能够特异性结合CCL22的肽片段的分子，所述CCL22的肽片段可以例如为本文下文在章节“CCL22的免疫原性活性肽片段”、“包含CCL22或其片段的多肽”和“MHC”中所述的CCL22的肽片段中任意肽片段。

[0028] 本发明还提供治疗特征在于表达CCL22的临床病症，该方法包括向罹患所述临床病症的个体施用有效量的本发明的疫苗组合物、本发明的套装药盒、本发明的组合物和/或CCL22的免疫原性活性肽片段，例如为本文下文在章节“CCL22的免疫原性活性肽片段”、“包含CCL22或其片段的多肽”和“MHC”中所述的CCL22的肽片段中任意肽片段。

[0029] 本发明还提供本发明的疫苗组合物用于制备治疗或预防临床病症例如癌症和/或炎症的药物中的用途。

[0030] 本发明还提供监测免疫接种的方法，所述方法包括以下步骤

[0031] a)提供来自个体的血液样品；

[0032] b)提供包含SEQ ID NO:12的连续序列的免疫原性活性肽片段或与SEQ ID NO:12

的具有至少70％的同一性的功能同系物或编码所述肽片段或功能同系物的核酸；

[0033] c)确定所述血液样品是否包含特异性结合该蛋白或肽的抗体或包含T细胞受体的T细胞；

[0034] 从而确定所述个体是否已经对所述蛋白或肽产生免疫应答。

[0035] 另外，本发明提供包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11的CCL22片段的连续序列的免疫原性活性CCL22肽片段或其功能同系物，或编码所述CCL22肽片段的核酸，其用于治疗或预防与CCL22的表达相关的临床病症，例如癌症和/或感染，所述功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换之外相同序列的多肽。

附图说明

[0036] 图1：癌症中CCL22的作用。

[0037] 图2：CCL22特异性CD8+T细胞存在于外周血中。A-IFNγ和TNFα释放的细胞内染色显示CD8+(左)而不是CD4+(右)T细胞针对CCL22-3肽表位反应。B-左：CCL22-3肽反应性T细胞能够通过用肽脉冲的自身DC刺激从黑素瘤癌症患者的外周血中富集。右-四聚体分离并迅速扩增的CCL22-3特异性T细胞培养。

[0038] 图3：CCL22反应性T细胞具有细胞毒性。A-CCL22-3但不是HIV肽脉冲的T2细胞被CCL22特异性T细胞裂解。B-CCL22长肽(SEQ ID NO:1)被CCL22特异性T细胞识别。因此，用CCL22长和CCL22-3脉冲的T2细胞被识别并杀死。用对照肽脉冲的T2细胞不被CCL22特异性T细胞识别。C-CCL22特异性T细胞的细胞毒性活性是HLA依赖性的。因此，用HLA-A2转染并用CCL22-3肽脉冲的K562细胞被识别并杀死。K562细胞、用CCL22-3脉冲的K562细胞或用HLA-A2转染的K562细胞不被识别。D-CCL22-3肽比9-mer CCL22-2肽得更好地被识别。CCL22-3和CCL22-2肽的肽滴定显示CCL22特异性T细胞交叉反应但以更高亲合力识别CCl22-3。

[0039] 图4：CCL22反应性T细胞能够识别和杀死表达CCL22的癌细胞系。IFNγ未处理或预处理的癌细胞系的^{51}Cr释放测定：SW480-结肠直肠腺癌(A)；MDA-MB-231-乳腺癌(B)；Uke-1-急性骨髓性白血病(C)；THP-1-急性单核细胞白血病(D)；RPMI6666-霍奇金淋巴瘤(E)；Set-2-原发性血小板增多症(F)。同样的效应CCL22特异性T细胞培养物用作效应细胞。G-IFNγ诱导的用CCL22 siRNA转染或CCL22特异性T细胞横断的模拟物转染的THP-1细胞的裂解。转染后48h进行测定。H-电穿孔后48小时，与用模拟物对照转染的THP-1细胞相比，来自siRNA转染的THP-1细胞的上清中的CCL22表达的ELISA分析。

[0040] 图5：CCL22特异性T细胞的细胞毒性是CCL22依赖性的。A-CCL22特异性T细胞的细胞毒性随着CCL22的较低表达而降低。因此，CCL22 siRNA转染的THP-1细胞的裂解低于模拟物转染的细胞的裂解。B-在siRNA转染后48小时，THP-1细胞上清中CCL22表达的ELISA分析。C-CCL22特异性T细胞以CCL22依赖性方式识别树突细胞。因此，使用流式细胞术，在没有和用CCL22 siRNA转染的情况下，将CCL22特异性T细胞与自身树突细胞孵育时，检测了TNF-α和CD107a的释放。

[0041] 图6：应答于健康供体外周血的自发性CCL22-3。

[0042] A-如IFNγELISPOT显示的来自具有和没有CCL22-3肽的健康供体的PBMC应答的ELISPOT实例。B-在用IL-2与CCL22-3肽或HIV对照肽刺激后，来自相同供体的PBMC上清中的CCL22表达。C-在用IL-2与CCL22-3肽或HIV对照肽刺激后在肽刺激后，来自相同供体的PBMC

上清中的IL6和TNFα。D-在CCL22-3/HLA-A2四聚体富集(左)或CCL22-3/HLA-A2四聚体耗尽(右)后,来自相同供体的PBMC的IL-2刺激的PMBC上清中的CCL22表达。

[0043] 图7:通过添加CCL22-3肽影响卵巢癌腹水细胞的CCL22表达水平。从用CCL22-3或HIV肽刺激并添加IL2的患有卵巢癌的患者中分离的腹水细胞的细胞培养2天(A)和7天(B)后的上清的ELISA分析。

[0044] 图8:$CCL22_{3-12}$-反应性T细胞存在于健康供体和癌症患者中。A-在三个黑素瘤患者(MM)和两个健康供体(HD)中IFNγELISPOT实例显示针对$pCCL22_{3-12}$表位的T细胞应答。B-癌症患者和健康供体中$pCCL22_{3-12}$肽特异性IFNγELISPOT应答。对于每个供体计算每$3x10^5$个PBMC的$pCCL22_{3-12}$-特异性点的平均数量(减去未添加肽的孔中的点后)。C-PBMC中$pCCL22_{3-12}$-特异性T细胞耗尽/富集的实验设置。用$pCCL22_{3-12}$肽刺激来自健康供体的PBMC两次,然后使用$pCCL22_{3-12}$-PE-四聚体与抗PE磁珠组合分离$pCCL22_{3-12}$-特异性T细胞(抗CCL22 T细胞)。剩下的耗尽的PBMC分成两个培养物,然后$pCCL22_{3-12}$-四聚体分离细胞添加到这些得到的四聚体富集的培养物之一中。四聚体富集的培养物中的CCL22特异性T细胞靶向产生CCL22的T细胞(如黑色箭头所示)。D-随着时间的推移,与四聚体耗尽的PBMC培养物相比,来自$pCCL22_{3-12}$-四聚体富集的PBMC培养物上清中CCL22的ELISA分析。

[0045] 图9:CCL22特异性T细胞的激活随着微环境中CCL22水平而降低。A-如通过CCL22ELISA测量的来自用$pCCL22_{3-12}$或HIV肽刺激后分离自健康供体的PBMC上清中CCL22的水平(*,P=0.01,ns-不显著,t-检验)。针对每种肽以一式三份进行实验。B-如通过CCL22 ELISA在第7天测量的,相比于HIV对照肽,用$pCCL22_{3-12}$肽刺激后分离自11个健康供体PBMC的PBMC上清中CCL22水平的变化。C-如通过CCL22 ELISA在第7天测量的,相比于HIV对照肽,用$pCCL22_{3-12}$肽刺激后分离自13个癌症患者的PBMC上清中CCL22水平的变化。).针对每种肽以一式三份或两份进行实验。D-如通过CCL22 ELISA测量的,用$pCCL22_{3-12}$肽或HIV肽刺激后分离自两个卵巢癌患者的分离自卵巢癌腹水的细胞上清中CCL22水平。

[0046] 图10:CCL22特异性T细胞的刺激影响PBMC细胞因子谱。

[0047] A-相比于HIV对照肽刺激,$pCCL22_{3-12}$刺激后分离自11个癌症患者(左)或10个健康供体(右)的PBMC上清中IL-6表达的总体变化(分别为P=0.02和P=0.06,配对t-检验)。B-相比于HIV对照肽刺激,pCCL223-12刺激后分离自11个癌症患者(左)或10个健康供体(右)的PBMC上清中TNFα表达的总体变化(分别为P=0.16和P=0.7,配对t-检验)。

[0048] 图11:免疫应答能够在体内提高。上图显示的是mCCL22长(SEQ ID NO:13)或mCCL22短(SEQ ID NO:14)皮下注射接种小鼠,一周一次,持续三周,然后在最后一次疫苗接种后一周处死。在从处死小鼠脾脏制备的脾细胞上进行ELISPOT测定。为了研究对鼠CCL22肽的IFNγ应答,将细胞与肽(5μM)或作为对照的R10在37℃孵育18-20小时。ELISPOT在室温下用缓冲液(PBS,0.5%BSA和NaN3)中的浓度为1μg/ml的小鼠IFNγ特异性检测抗体(R4-6A2-生物素;Mabtech)显色2小时,随后在PBS中洗涤6次。接下来,室温下添加在缓冲液中的链霉抗生物素蛋白-ALP(1:1000;Mabtech)1小时。通过添加底物溶液BCIP/NBT(Mabtech)将点显色并通过在自来水中洗涤进行终止。通过ELISPOT Reader(CTL-Immunospot)分析ELISPOT。结果显示,接种疫苗的小鼠表现出增加的免疫应答。

[0049] 定义

[0050] 佐剂:任何以下物质,其与施用的免疫原性决定簇/抗原/核酸构建体的混合物增

加或以其他方式改变对所述决定簇的免疫应答。

[0051] 抗原:能够与克隆分布的免疫受体(T细胞或B细胞受体)结合的任何物质。通常为肽、多肽或多聚体多肽。抗原优选能够引发免疫应答。

[0052] APC:抗原呈递细胞。APC是在其表面上展示与MHC复合的抗原的细胞。T细胞可以使用其T细胞受体(TCR)识别该复合物。APC分为两类:专职抗原呈递细胞(其中有三种类型:树突细胞、巨噬细胞和B细胞)或非专职抗原呈递细胞(不组成性表达与初始T细胞相互作用所需的主要组织相容性复合体蛋白;这些仅在通过某些细胞因子如IFN-γ刺激非专职APC时才表达)。

[0053] 加强免疫:通过加强注射(shot)或剂量来加强免疫是在初始剂量之后的一定时间施用另外剂量的免疫剂如疫苗以维持由先前剂量的相同免疫剂所引发的免疫应答。

[0054] 载体(carrier):抗原与其偶联以帮助诱导免疫应答的实体或化合物。

[0055] CCL:C-C基序趋化因子22。CCL22的野生型人序列示于SEQ ID NO:12中。

[0056] $CCL22_{xx-yy}$:如本文所用,该命名法是指由SEQ ID NO:12的氨基酸xx-yy组成的CCL22的多肽片段。mCCL22是指鼠CCL22,$mCCL22_{xx-yy}$是指由SEQ ID NO:15的氨基酸xx-yy组成的mCCL22的多肽片段。

[0057] 嵌合蛋白:遗传工程改造的蛋白质,其由通过将两个或更多个完整或部分基因或一系列(非)随机核酸拼接在一起而制备的核苷酸序列编码。

[0058] 临床病症:需要医疗护理的病症,在本文中尤其是与CCL22表达相关的病症。这样的病症的实例包括:增殖性疾病,如癌症和感染。

[0059] 补体:一系列血液蛋白复合体,其作用在于“补充”抗体的工作。补体破坏细菌,产生炎症,并调节免疫反应。

[0060] CTL:细胞毒性T淋巴细胞。表达CD8以及T细胞受体并因此能够响应由I类分子呈递的抗原的T细胞的亚组。

[0061] 递送载剂(vehicle):一种实体,藉此核苷酸序列或多肽或两者能够从至少一种介质转运到另一种介质。

[0062] DC:树突细胞。(DC)是免疫细胞并形成部分哺乳动物免疫系统。它们的主要功能是加工抗原材料并将其在表面上呈递到免疫系统的其他细胞,从而作为抗原呈递细胞(APC)发挥作用。

[0063] 片段:用于表示核酸或多肽的非全长部分。因此,片段本身分别是核酸或多肽。

[0064] 功能同系物:功能同系物可以是任意多肽,其表现出与野生型多肽具有至少一些序列同一性并且保留了原始功能的至少一个方面。在本文中,CCL22的功能同系物或其免疫原性肽片段是与CCL22具有至少一些序列同一性的多肽或其片段并且其具有诱导针对表达CCL22的细胞的免疫应答的能力。

[0065] 免疫原性活性肽:能够在施用于至少一个个体后引发所述个体的免疫应答的肽。

[0066] 个体:通常鸟类、哺乳动物、鱼类、两栖类或爬行动物的任何种或亚种,优选哺乳动物,最优选人类。

[0067] 感染:在本文中,术语“感染”是指任何类型的临床病症,其涉及通过致病因子侵入宿主生物体。具体而言,感染是指涉及通过病原体侵入个体的临床病症。

[0068] 分离的:与本文公开的核酸、多肽和抗体一起使用的“分离的”是指这些已经从其

天然的，通常是细胞的环境的组分中鉴定和分开和/或回收。本发明的核酸、多肽和抗体优选是分离的，并且本发明的疫苗和其他组合物优选包含分离的核酸、多肽或分离的抗体。

[0069] MHC：主要组织相容性复合体，存在MHC的两个主要亚类：I类和II类。

[0070] 核酸：传递遗传信息的链或核苷酸序列。就本发明而言，核酸通常是脱氧核糖核酸(DNA)。

[0071] 核酸构建体：基因工程改造的核酸。通常包含几个元件，如基因及其片段、cDNA、启动子、增强子、终止子、多聚A尾、接头、多聚接头、可操作性接头、多克隆位点(MCS)、标志物、终止密码子、其他调控元件、内部核糖体进入位点(IRES)或其他元件。

[0072] 可操作性接头：以确保核酸或多肽的生物学加工的方式将核酸构建体或(嵌合)多肽的两部分结合在一起的核苷酸或氨基酸残基序列。

[0073] 病原体：特异性的疾病致病因子，特别是一种生物剂，例如病毒、细菌、朊病毒或寄生虫，它能够导致其宿主感染疾病，也称为传染原。

[0074] PBL：外周血细胞是血液的细胞成分，由红细胞、白胞和血小板组成，这些血细胞在血液循环池中发现，并且不被隔离在淋巴系统、脾脏、肝脏或骨髓内。

[0075] PBMC：外周血单核细胞(PBMC)是具有圆核的血细胞，例如淋巴细胞或单核细胞。这些血细胞是免疫系统中对抗感染和应对入侵者的关键成分。淋巴细胞群体由T细胞(CD4和CD8阳性约75％)、B细胞和NK细胞(合计约25％)组成。

[0076] 多肽：多个共价连接的氨基酸残基，其限定序列并通过酰胺键连接。该术语类似于寡肽和肽使用。如本领域已知的，术语多肽还包括通过化学或酶催化反应引入的翻译后修饰。该术语能够指多肽的变体或片段。

[0077] 药物载体：也称为赋形剂或稳定剂，在所用的剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或个体无毒。通常，药物载体是pH缓冲水溶液。药物载体的实例包括缓冲剂如磷酸、柠檬酸或其他有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸；低分子量(小于约10个残基)多肽；蛋白质如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如EDTA；糖醇如甘露糖醇或山梨醇；成盐配对离子如钠；和/或非离子表面活性剂如TWEEN.TM.、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS.TM.。

[0078] 多个：至少两个。

[0079] 增殖性疾病：在本文中，任何肿瘤前或肿瘤疾病，良性或恶性，其中“肿瘤”是指细胞异常增殖。增殖性疾病的非限制性实例是癌症。

[0080] 启动子：DNA链的结合位点，在该处RNA聚合酶通过一个或多个邻近结构基因结合起始转录的信使RNA。

[0081] 信号肽：短的氨基酸序列，其决定蛋白质在细胞中的最终位置，也称为分选肽。

[0082] 表面活性剂：表面活性剂，其能够降低溶解其的液体的表面张力。表面活性剂是含有亲水的极性基团和疏水的非极性基团的化合物，并通常由脂肪链组成。

[0083] Treg：调节性T细胞/T淋巴细胞。

[0084] 治疗：本文所用的术语“治疗”是指治愈性治疗和/或改善治疗和/或减轻疾病症状和/或延缓疾病进展的治疗。

[0085] 疫苗：一种物质或组合物，其能够诱导个体，特别是哺乳动物，优选人类中的免疫

应答。还指在本发明中的免疫原性组合物。根据本发明的疫苗通常可以是包含至少一种佐剂和一种免疫原性肽的组合物。针对物质的免疫应答是在生物体中诱导记忆的体液、抗体和/或细胞应答，导致所述物质通过再次而非初次应答而被对付，从而减少其对宿主生物体的影响。所述物质可以是病原体。在本发明的上下文中，该物质优选是癌细胞。本发明的疫苗可以作为预防而给予，以降低遭受临床病症的风险和/或作为治疗临床病症的治疗药物。该组合物可以包含以下的一种或多种：抗原、编码一种或多种抗原的核酸构建体、载体、佐剂和药物载体。

[0086] 变体：给定参照核酸或多肽的“变体”是指与所述参照核酸或多肽显示一定程度的序列同源性/同一性但与所述参照核酸或多肽不相同的核酸或多肽。

[0087] 发明详述

[0088] 本公开涉及疫苗组合物，其包含：

[0089] a)以下一种或多种：

[0090] (i)SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22或包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的连续氨基酸序列的CCL22的免疫原性活性肽片段；

[0091] (ii)CCL22的免疫原性活性肽片段，其为MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段；

[0092] (iii)(i)和(ii)的多肽的功能同系物，其中所述功能同系物与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70％的序列同一性，和/或所述功能同系物是由与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的连续氨基酸序列除了最多三个氨基酸、例如最多两个氨基酸、例如最多一个氨基酸发生置换之外的相同序列组成的免疫原性活性多肽；

[0093] (iv)包含(i)、(ii)或(iii)的多肽中任一个的多肽；

[0094] (v)编码(i)、(ii)或(iii)的多肽中任一个的核酸；和

[0095] 佐剂；

[0096] 其用作药物。

[0097] 本公开还涉及包含本文所述的疫苗组合物和第二活性成分的套装药盒。

[0098] 在又一个方面，本公开涉及本文所定义的肽片段和I类HLA或II类HLA分子或这样的分子的片段的复合物。

[0099] 在又一个方面，本公开涉及在患有临床病症的个体中检测CCL22反应性T细胞的存在的方法，该方法包括使肿瘤组织或血液样品与本公开的复合物接触，并检测所述复合物与组织或血细胞的结合。

[0100] 在又一个方面，公开了能够特异性结合如本文所定义的肽片段的分子。

[0101] 在又一个方面，公开了一种分子，其能够阻断能够特异性结合如本文所定义的肽片段的分子的结合。

[0102] 在又一个方面，公开了治疗或预防特征在于CCL22表达的临床病症的方法，该方法包括向罹患所述临床病症的个体施用有效量的本文所述的组合物、分子或套装药盒。

[0103] 在又一个方面，本公开涉及本文所述的疫苗组合物、套装药盒或分子在制备用于治疗或预防临床病症的药物中的用途。

[0104] 在又一个方面，本公开涉及监测免疫接种的方法，所述方法包括以下步骤

[0105] a)提供来自个体的血液样品；

[0106] b)提供SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22,或包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的连续序列的免疫原性活性肽片段,或与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的具有至少70%的同一性的功能同系物,或编码所述肽片段或功能同系物的核酸;

[0107] c)确定所述血液样品是否包含特异性结合该蛋白或肽的抗体或包含T细胞受体的T细胞;

[0108] 从而确定所述个体是否已经对所述蛋白或肽产生免疫应答。

[0109] 在又一个方面,本公开涉及包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的连续序列或其功能同系物的免疫原性活性CCL22肽片段或编码所述CCL22肽片段的核酸,其用于治疗或预防与CCL22的表达相关的临床病症,例如癌症和/或炎症,所述功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换之外相同序列的多肽。

[0110] 疫苗组合物

[0111] 本发明的一个方面是提供疫苗组合物,其包含以下一种或多种:

[0112] (i)SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22或包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的连续氨基酸序列的CCL22的免疫原性活性肽片段;

[0113] (ii)CCL22的免疫原性活性肽片段,其为MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段;

[0114] (iii)(i)和(ii)的多肽的功能同系物,其中所述功能同系物与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70%的序列同一性,和/或所述功能同系物是由与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的连续氨基酸序列除了最多三个氨基酸、例如最多两个氨基酸、例如最多一个氨基酸发生置换之外的相同序列组成的免疫原性活性多肽;

[0115] (iv)包含(i)、(ii)或(iii)的多肽中任一个的多肽;

[0116] (v)编码(i)、(ii)或(iii)的多肽中任一个的核酸。

[0117] 除了上述内容之外,所述疫苗组合物优选还包含佐剂,其例如可以是本文在下文的章节“佐剂”中所述的任意佐剂。

[0118] 功能同系物,其可以用于本发明的疫苗组合物,描述于本文下文的章节“C-C基序趋化因子22”;“CCL22的免疫原性活性肽片段”;“功能同系物”和“包含CCL22或其片段的多肽”中。

[0119] C-C基序趋化因子22

[0120] C-C基序趋化因子22是在人中由CCL22基因编码的蛋白质。人CCL22的氨基酸序列示于SEQ ID NO:12中,鼠CCL22的氨基酸序列示于SEQ ID NO:15中。由该基因编码的蛋白质通过树突细胞和巨噬细胞进行分泌,并通过与细胞表面趋化因子受体如CCR4相互作用而对其靶细胞引发其作用。CCL22基因位于人染色体16,与称为CX3CL1和CCL17的其他趋化因子在一个簇中。CCL22趋化并募集表达CCR4的CD25+CD4+Treg。先前已显示CCL22的表达导致Foxp3+Treg在卵巢癌、前列腺癌、食管癌、胃癌和乳腺癌中的积累。

[0121] 根据本公开的CCL22可以是任何有用的CCL22。在本公开全文中,术语“CCL22”是指全长CCL22,例如SEQ ID NO:12中所示的人CCL22或SEQ ID NO:15中所示的鼠CCL22。一般而言,CCL22优选与要用本公开的疫苗组合物治疗的CCL22属于相同的物种。在本公开的优选实施方案中,疫苗组合物旨在用于施用于人,因此CCL22可以是人CCL22。野生型人CCL22的氨基酸序列如本文SEQ ID NO:12所示。在其他实施方案中,CCL22可以是SEQ ID NO:15所示

的鼠CCL22。

[0122] 因此,CCL22可以优选是SEQ ID NO:12的CCL22或与SEQ ID NO:12的CCL22具有至少70%的序列同一性的功能同系物,并因此是与SEQ ID NO:12的人CCL22优选具有至少75%的序列同一性、例如至少80%的序列同一性、例如至少85%的序列同一性、例如至少90%的序列同一性、例如至少91%的序列同一性、例如至少91%的序列同一性、例如至少92%的序列同一性、例如至少93%的序列同一性、例如至少94%的序列同一性、例如至少95%的序列同一性、例如至少96%的序列同一性、例如至少97%的序列同一性、例如至少98%的序列同一性、例如至少99%的序列同一性的功能同系物。

[0123] 因此,CCL22可以在其他实施方案中是SEQ ID NO:15的CCL22或与SEQ ID NO:15的CCL22具有至少70%的序列同一性的功能同系物,并因此是与SEQ ID NO:15的人CCL22优选具有至少75%的序列同一性、例如至少80%的序列同一性、例如至少85%的序列同一性、例如至少90%的序列同一性、例如至少91%的序列同一性、例如至少91%的序列同一性、例如至少92%的序列同一性、例如至少93%的序列同一性、例如至少94%的序列同一性、例如至少95%的序列同一性、例如至少96%的序列同一性、例如至少97%的序列同一性、例如至少98%的序列同一性、例如至少99%的序列同一性的功能同系物。

[0124] 在下文的“功能同系物”章节中更详细地描述了CCL22的功能同系物和确定序列同一性的方法。

[0125] 因为CCL22潜在地可能具有不需要的活性,所以在本公开的一个实施方案中,疫苗组合物包含突变CCL22,其不能趋化并募集表达CCR4的CD25+CD4+Treg,或其只能发挥SEQ ID NO:12的CCL22的最多10%的活性。这样的突变CCL22可以特别是SEQ ID NO:12的CCL22,其中氨基酸中的一个或多个被突变为另一氨基酸或者缺失。突变CCL22还可以是突变CCL22片段,例如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的突变片段,其中氨基酸中的一个或多个被突变为另一氨基酸或者缺失。在本发明的上下文中,CCL22的“功能同系物”可以是突变CCL22,其不具有野生型CCL22的催化活性,但具有诱导针对表达CCL22的细胞的免疫应答的能力。

[0126] CCL22的免疫原性活性肽片段

[0127] 野生型人CCL22,即天然存在的非突变形式的蛋白质鉴定于SEQ ID NO:12中。野生型鼠CCL22鉴定于SEQ ID NO:15中。本发明涵盖了包含人或鼠CCL22;人或鼠CCL22的免疫原性活性肽片段;其中最多两个氨基酸发生置换的人或鼠CCL22的肽片段;和/或包含与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70%的序列同一性的人或鼠CCL22的功能同系物的疫苗组合物。术语多肽片段用于本文以定义从SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的至少一部分直接衍生或合成为与其相同的任何非全长(与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15相比)的氨基酸残基串。肽片段可以例如是SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的范围为5至24个氨基酸、例如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的5至22个氨基酸、例如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的8至22个氨基酸的连续序列,例如肽片段可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16。

[0128] 功能同系物可以定义为与野生型CCL22如野生型人或鼠CCL22序列不同,但仍然能够诱导针对表达CCL22的细胞如癌细胞和DC的免疫应答的CCL22的全长或片段。在这些细胞中表达的CCL22可以是野生型或者内源性突变的(如先天性突变体或在细胞分裂或其他过

程中诱导的突变)。功能同系物可以是野生型CCL22的突变形式或备选剪接变体。在另一个方面,CCL22的功能同系物定义为如本文下文所述。功能同系物可以是但不限于具有离体导入的一个或多个突变和/或一个或多个序列缺失和/或插入的全长或片段CCL22的重组形式。

[0129] 因此,在具体实施方案中,本发明的免疫原性活性肽片段由鉴定于SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15中的CCL22的最多90个连续氨基酸残基、例如最多80个连续氨基酸残基、例如最多70个连续氨基酸残基、例如最多60个连续氨基酸残基、例如最多50个连续氨基酸残基、例如最多45个连续氨基酸残基、例如最多40个连续氨基酸残基、例如最多35个连续氨基酸残基、例如最多30个连续氨基酸残基、例如最多25个连续氨基酸残基、例如18至25个连续氨基酸或其功能同系物组成;功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。所述免疫原性活性肽片段还可以由鉴定于SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15中的CCL22的最多80个连续氨基酸残基、例如最多70个连续氨基酸残基、例如最多60个连续氨基酸残基、例如最多50个连续氨基酸残基、例如最多45个连续氨基酸残基、例如最多40个连续氨基酸残基、例如最多35个连续氨基酸残基、例如最多30个连续氨基酸残基、例如最多25个连续氨基酸残基、例如18至25个连续氨基酸组成,其中一个或多个氨基酸已被突变成另一氨基酸或缺失。

[0130] 在本发明的一个优选实施方案中,免疫原性活性肽片段由鉴定于SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15中的CCL22的范围为18至25个氨基酸、优选22个连续氨基酸或其功能同系物组成;功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。

[0131] 因此,在另一具体实施方案中,本发明的免疫原性活性肽片段由来自SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的最多25个氨基酸残基、例如最多24个氨基酸残基、例如最多23个氨基酸残基、例如最多22个氨基酸残基、例如最多21个氨基酸残基、例如最多20个氨基酸残基、例如最多19个氨基酸残基、例如最多18个氨基酸残基、例如最多17个氨基酸残基、例如最多16个氨基酸残基、例如最多15个氨基酸残基、例如最多14个氨基酸残基、例如最多13个氨基酸残基、例如最多12个氨基酸残基、例如最多11个氨基酸残基、例如8至10个连续氨基酸或其功能同系物组成;功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。

[0132] 在本发明的一个优选实施方案中,免疫原性活性肽片段由来自鉴定于SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15中的CCL22的最多10个连续氨基酸残基、例如最多9个连续氨基酸残基、例如8个连续氨基酸残基、例如7个连续氨基酸残基或其功能同系物组成;功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。具体而言,免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的10个连续氨基酸残基组成或者免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的9个连续氨基酸残基组成。

[0133] 在本发明的另一优选实施方案中,免疫原性活性肽包含来自SEQ ID NO:1的CCL22肽片段的最多11个连续氨基酸残基、例如最多10个连续氨基酸残基、例如最多9个连续氨基酸残基、例如8个连续氨基酸残基、例如来自鉴定于SEQ ID NO:1中的CCL22肽片段的7个连续氨基酸残基或其功能同系物;功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两

个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。具体而言，免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:1的CCL22肽片段的10个连续氨基酸残基组成或者免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:1的CCL22肽片段的9个连续氨基酸残基组成。

[0134] 具体而言，免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:3的CCL22肽片段的10个连续氨基酸残基组成或者免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:3的CCL22肽片段的9个连续氨基酸残基组成。

[0135] 在本发明的另一优选实施方案中，免疫原性活性肽包含来自SEQ ID NO:4的CCL22肽片段的最多11个连续氨基酸残基、例如最多10个连续氨基酸残基、例如最多9个连续氨基酸残基、例如8个连续氨基酸残基、例如来自鉴定于SEQ ID NO:4中的CCL22肽片段的7个连续氨基酸残基或其功能同系物；功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。具体而言，免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:4的CCL22肽片段的10个连续氨基酸残基组成或者免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:4的CCL22肽片段的9个连续氨基酸残基组成。

[0136] 在本发明的另一优选实施方案中，免疫原性活性肽包含来自SEQ ID NO:11的CCL22肽片段的最多11个连续氨基酸残基、例如最多10个连续氨基酸残基、例如最多9个连续氨基酸残基、例如8个连续氨基酸残基、例如来自鉴定于SEQ ID NO:11中的CCL22肽片段的7个连续氨基酸残基或其功能同系物；功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。具体而言，免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:11的CCL22肽片段的10个连续氨基酸残基组成或者免疫原性活性肽可以由来自SEQ ID NO:11的CCL22肽片段的9个连续氨基酸残基组成。

[0137] 在一些实施方案中，免疫原性活性肽片段包含或由$VX_1LVLLAVAX_2$(SEQ ID NO:16)组成，特别是，肽片段可以包含或由SEQ ID NO:16组成，其中X_1是缬氨酸残基或丙氨酸残基，X_2是亮氨酸残基或异亮氨酸残基。因此，在一些实施方案中，免疫原性活性肽片段包括包含SEQ ID NO:16的最多11个连续氨基酸残基，例如由SEQ ID NO:16组成的最多10个连续氨基酸残基。

[0138] 在本发明的一些实施方案中，免疫原性活性肽可选自由表1所列的肽或其功能同系物组成；功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。

[0139] 在本发明的一些实施方案中，免疫原性活性肽可以选自由表1中所列的肽或其功能同系物组成的组，功能同系物为与所列肽具有至少70％的序列同一性、例如至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、与所列肽具有例如至少99％的序列同一性的多肽。

[0140] 因此，在优选实施方案中，免疫原性活性肽可以是SEQ ID NO:1的CCL22肽片段或其功能同系物，功能同系物为与所列肽具有至少70％的序列同一性、例如至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、与所列肽具有例如至少99％的序列同一性的多肽。

[0141] 在另一优选实施方案中，免疫原性活性肽可以是SEQ ID NO:3的CCL22肽片段或其功能同系物，功能同系物为与所列肽具有至少70％的序列同一性、例如至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、与所列肽具有例如至少99％的序列同一性的多肽。

[0142] 在另一优选实施方案中，免疫原性活性肽可以是SEQ ID NO:4的CCL22肽片段或其功能同系物，功能同系物为与所列肽具有至少70％的序列同一性、例如至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、与所列肽具有例如至少99％的序列同一性的多肽。

[0143] 在另一优选实施方案中，免疫原性活性肽可以是SEQ ID NO:11的CCL22肽片段或其功能同系物，功能同系物为与所列肽具有至少70％的序列同一性、例如至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、与所列肽具有例如至少99％的序列同一性的多肽。

[0144] 在另一优选实施方案中，免疫原性活性肽可以是SEQ ID NO:13的CCL22肽片段或其功能同系物，功能同系物为与所列肽具有至少70％的序列同一性、例如至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、与所列肽具有例如至少99％的序列同一性的多肽。

[0145] 在另一优选实施方案中，免疫原性活性肽可以是SEQ ID NO:14的CCL22肽片段或其功能同系物，功能同系物为与所列肽具有至少70％的序列同一性、例如至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、与所列肽具有例如至少99％的序列同一性的多肽。

[0146] 在另一优选实施方案中，免疫原性活性肽可以是SEQ ID NO:16的CCL22肽片段或其功能同系物，功能同系物为与所列肽具有至少70％的序列同一性、例如至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、与所列肽具有例如至少99％的序列同一性的多肽。

[0147] 表1有用的CCL22肽

[0148]

SEQ ID NO	**名称**	**在 SEQ ID NO:1 中的氨基酸编号**	**序列**
SEQ ID NO: 1	CCL22 长	$CCL22_{1-22}$	MDRLQTALLVVLVLLAVALQAT
SEQ ID NO: 2	CCL22-1	$CCL22_{7-15}$	ALLVVLVLL
SEQ ID NO: 3	CCL22-2	$CCL22_{3-11}$	RLQTALLVV
SEQ ID NO: 4	CCL22-3	$CCL22_{3-12}$	RLQTALLVVL
SEQ ID NO: 5	CCL22-4	$CCL22_{11-19}$	VLVLLAVAL
SEQ ID NO: 6	CCL22-5	$CCL22_{5-13}$	QTALLVVLV
SEQ ID NO: 7	CCL22-6	$CCL22_{14-22}$	LLAVALQAT
SEQ ID NO: 8	CCL22-7	$CCL22_{8-17}$	LLVVLVLLAV
SEQ ID NO: 9	CCL22-8	$CCL22_{9-17}$	LVVLVLLAV
SEQ ID NO: 10	CCL22-9	$CCL22_{6-15}$	TALLVVLVL
SEQ ID NO: 11	CCL22 信号	$CCL22_{1-24}$	MDRLQTALLVVLVL LAVALQATEA
SEQ ID NO	**名称**	**在 SEQ ID NO:15 中的氨基酸编号**	**序列**
SEQ ID NO: 13	mCCL22 长	$mCCL22_{1-22}$	MATLRVPLLVALVLLAVAIQTS
SEQ ID NO: 14	mCCL22 短	$mCCL22_{10-19}$	VALVLLAVAI
SEQ ID NO: 16	**共有序列**		**$VX_1LVLLAVAX_2$**

[0149] 在本发明的优选实施方案中，免疫原性活性肽选自由以下组成的组：

[0150] a)SEQ ID NO:1($CCL22_{1-22}$)；

[0151] b)SEQ ID NO:3($CCL22_{3-11}$)；

[0152] c)SEQ ID NO:4($CCL22_{3-12}$)；

[0153] d)SEQ ID NO:11($CCL22_{1-24}$)；

[0154] e)SEQ ID NO:14($mCCL22_{10-19}$)和

[0155] f)根据a)至d)中任一多肽的功能同系物；功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。

[0156] 本发明的其他肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的4至90、优选5至80、更优选10至70、又更优选12至60、甚至更优选15至40、例如18至25个连续氨基酸，或者与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70％、优选至少80％、更优选至少90％、甚至更优选至少95％、又更优选至少98％、例如至少99％的序列同一性的功能同系物。

[0157] 功能同系物

[0158] CCL22的功能同系物或其免疫原性活性片段是多肽，其也是免疫原性活性的，并且

其与CCL22，特别是SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22具有至少一定程度的序列同一性。

[0159] 对于较短的多肽，例如短于50个氨基酸，例如短于25个氨基酸的多肽，则功能同系物可以是除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的免疫原性活性多肽。

[0160] 或者，功能同系物可以是与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22具有至少70％的序列同一性的免疫原性活性多肽，并因此功能同系物与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的人CCL22优选具有至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少92％的序列同一性、例如至少93％的序列同一性、例如至少94％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、例如至少99％的序列同一性。

[0161] 在优选实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:1的CCL22肽片段具有至少70％的序列同一性的免疫原性活性多肽，并因此功能同系物与SEQ ID NO:1的CCL22肽片段优选具有至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少92％的序列同一性、例如至少93％的序列同一性、例如至少94％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、例如至少99％的序列同一性。

[0162] 在优选实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:3的CCL22肽片段具有至少70％的序列同一性的免疫原性活性多肽，并因此功能同系物与SEQ ID NO:3的CCL22肽片段优选具有至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少92％的序列同一性、例如至少93％的序列同一性、例如至少94％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、例如至少99％的序列同一性。

[0163] 在另一优选实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:4的CCL22肽片段具有至少70％的序列同一性的免疫原性活性多肽，并因此功能同系物与SEQ ID NO:4的CCL22肽片段优选具有至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少92％的序列同一性、例如至少93％的序列同一性、例如至少94％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、例如至少99％的序列同一性。

[0164] 在另一优选实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:11的CCL22肽片段具有至少70％的序列同一性的免疫原性活性多肽，并因此功能同系物与SEQ ID NO:11的CCL22肽片段优选具有至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少92％的序列同一性、例如至少93％的序列同一性、例如至少94％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一

性、例如至少98％的序列同一性、例如至少99％的序列同一性。

[0165] 在另一优选实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:13的CCL22肽片段具有至少70％的序列同一性的免疫原性活性多肽，并因此功能同系物与SEQ ID NO:13的CCL22肽片段优选具有至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少92％的序列同一性、例如至少93％的序列同一性、例如至少94％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、例如至少99％的序列同一性。

[0166] 在另一优选实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:14的CCL22肽片段具有至少70％的序列同一性的免疫原性活性多肽，并因此功能同系物与SEQ ID NO:14的CCL22肽片段优选具有至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少92％的序列同一性、例如至少93％的序列同一性、例如至少94％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、例如至少99％的序列同一性。

[0167] 在另一优选实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:16的CCL22肽片段具有至少70％的序列同一性的免疫原性活性多肽，并因此功能同系物与SEQ ID NO:16的CCL22肽片段优选具有至少75％的序列同一性、例如至少80％的序列同一性、例如至少85％的序列同一性、例如至少90％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少91％的序列同一性、例如至少92％的序列同一性、例如至少93％的序列同一性、例如至少94％的序列同一性、例如至少95％的序列同一性、例如至少96％的序列同一性、例如至少97％的序列同一性、例如至少98％的序列同一性、例如至少99％的序列同一性。

[0168] 在一些实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:1的CCL22肽片段不同在于至少一个氨基酸、例如至少两个氨基酸、例如至少三个氨基酸的免疫原性活性多肽。

[0169] 在一些实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:3的CCL22肽片段不同在于至少一个氨基酸、例如至少两个氨基酸、例如至少三个氨基酸的免疫原性活性多肽。

[0170] 在另一实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:4的CCL22肽片段不同在于至少一个氨基酸、例如至少两个氨基酸、例如至少三个氨基酸的免疫原性活性多肽。

[0171] 在另一实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:11的CCL22肽片段不同在于至少一个氨基酸、例如至少两个氨基酸、例如至少三个氨基酸的免疫原性活性多肽。

[0172] 在一些实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:14的CCL22肽片段不同在于至少一个氨基酸、例如至少两个氨基酸、例如至少三个氨基酸的免疫原性活性多肽。

[0173] 在一些实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:14的CCL22肽片段不同在于至少一个氨基酸、例如至少两个氨基酸、例如至少三个氨基酸的免疫原性活性多肽。

[0174] 在一些实施方案中，功能同系物是与SEQ ID NO:16的CCL22肽片段不同在于至少一个氨基酸、例如至少两个氨基酸、例如至少三个氨基酸的免疫原性活性多肽。

[0175] 序列同一性可以使用许多众所周知的算法并应用多种不同的缺口罚分来计算。相对于全长参照序列例如相对于全长SEQ ID NO:1计算序列同一性。任何序列比对工具，例如但不限于FASTA、BLAST或LALIGN可用于检索同系物和计算序列同一性。而且，在适当的情况

下，任何通常已知的替代矩阵(例如但不限于PAM、BLOSSUM或PSSM矩阵)可以与检索算法一起应用。例如，可以通过PSI-BLAST程序应用PSSM(位置特异性评分矩阵)。此外，可以使用针对缺口开放和延伸的一系列罚分来进行序列比对。例如，可以以5-12的范围内的缺口开放罚分和1-2的范围内的缺口延伸罚分来使用BLAST算法。

[0176] 功能同系物可以进一步包含化学修饰，例如泛素化，标记(例如用放射性核素、各种酶等)，聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生化)或通过插入(或通过化学合成置换)氨基酸(氨基酸)例如鸟氨酸，其通常不存在于人蛋白质中，然而优选功能等同物不含化学修饰。

[0177] 与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22相比，或与SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的CCL22片段相比，对氨基酸残基序列所做的任何改变优选为保守置换。本领域技术人员将知道如何完成和评估“保守”氨基酸置换，其中一个氨基酸被具有一个或多个共有的化学和/或物理特征的另一个氨基酸置换。保守氨基酸置换不太可能影响蛋白质的功能。氨基酸可根据共有的特征进行分组。保守氨基酸置换是预定组的氨基酸内的一个氨基酸置换同一组内的另一个氨基酸，其中预定组内的氨基酸表现出相似或基本相似的特征。

[0178] 因此，在本发明的实施方案中，疫苗组合物包含由SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的范围为8至50个氨基酸，优选范围为8至10个或20至25个氨基酸的连续序列组成的多肽，其中最多三个氨基酸发生置换，并且其中置换优选保守置换。

[0179] 包含CCL22或其片段的多肽

[0180] 还包括在本发明的范围内的是，本发明的疫苗组合物可以包括包含CCL22或其片段的多肽。因此，CCL22的免疫原性活性肽片段可以是包含CCL22片段的多肽，例如在本文此章节中所述的任意多肽。

[0181] 具体而言，这样的多肽可以包含全长CCL22，例如本文上文中的“C-C基序趋化因子22”章节中所述的任何CCL22。例如，多肽可以包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22或与其具有至少70％、例如至少80％、例如至少90％、例如至少95％的序列同一性的功能同系物。具体而言，这样的多肽可以除了SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22之外包含最多90、例如最多50、例如最多25、例如最多10个氨基酸。

[0182] 还包括在本发明的范围内的是，本发明的疫苗组合物可以包括包含CCL22的片段的多肽，例如在本文上文的章节“CCL22的免疫原性活性肽片段”中所述的任意片段。这样的多肽还可以包含CCL22的任意免疫原性活性肽片段，其为MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段，例如如在章节“MHC”中所述的MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段中的任意片段。

[0183] 因此，所述多肽可以是包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的连续氨基酸序列的最多400个氨基酸、例如最多300个氨基酸、例如最多200个氨基酸、例如最多100个氨基酸、例如最多50个氨基酸的多肽，其中所述SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的连续氨基酸序列由来自SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的最多50个氨基酸残基、例如最多45个氨基酸残基、例如最多40个氨基酸残基、例如最多35个氨基酸残基、例如最多30个氨基酸残基、例如最多25个氨基酸残基、例如范围为18至25个、例如范围为8至10个连续氨基酸或其功能同系物组成。

[0184] 具体而言，所述多肽可以是由鉴定于SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15中的CCL22的

最多100个连续氨基酸残基、最多90个连续氨基酸残基、最多80个连续氨基酸残基、例如最多70个连续氨基酸残基、例如最多60个连续氨基酸残基、例如最多50个连续氨基酸残基、例如最多45个连续氨基酸残基、例如最多40个连续氨基酸残基、例如最多35个连续氨基酸残基、例如最多30个连续氨基酸残基、例如最多25个连续氨基酸残基、例如18至25个连续氨基酸、例如20个连续氨基酸或其功能同系物的多肽，并且包含选自由以下组成的组的免疫原性活性肽：

[0185] a)SEQ ID NO:1($CCL22_{1-22}$)；

[0186] b)SEQ ID NO:3($CCL22_{3-11}$)；

[0187] c)SEQ ID NO:4($CCL22_{3-12}$)；

[0188] d)SEQ ID NO:11($CCL22_{1-24}$)；

[0189] e)SEQ ID NO:14($mCCL22_{10-19}$)；

[0190] f)表1中所述的任意序列；和

[0191] g)根据a)至d)中任一多肽的功能同系物；功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。

[0192] 在一些实施方案中，免疫原性活性肽片段包含SEQ ID NO:16所示的序列，即具有序列$VX_1LVLLAVAX_2$(SEQ ID NO:16)，其中X_1选自由缬氨酸和丙氨酸组成的组，X_2选自由异亮氨酸和亮氨酸组成的组。

[0193] 所述多肽还可以是包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的连续氨基酸序列的最多100个氨基酸、例如最多50个氨基酸、例如最多30个氨基酸、例如最多20个氨基酸、例如最多15个氨基酸的多肽，其中所述SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的连续氨基酸序列由来自SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的范围为8至10个、例如范围为9至10个连续氨基酸或其功能同系物组成。因此，所述多肽可以是包含选自由以下组成的组的免疫原性活性肽的最多100个氨基酸、例如最多50个氨基酸、例如最多30个氨基酸、例如最多20个氨基酸、例如最多15个氨基酸的多肽：

[0194] a)SEQ ID NO:1($CCL22_{1-22}$)；

[0195] b)SEQ ID NO:3($CCL22_{3-11}$)；

[0196] c)SEQ ID NO:4($CCL22_{3-12}$)；

[0197] d)SEQ ID NO:11($CCL22_{1-24}$)；

[0198] e)SEQ ID NO:14($mCCL22_{10-19}$)

[0199] f)表1中所述的任意序列；和

[0200] g)根据a)至c)中任一多肽的功能同系物；功能同系物为除了最多三个氨基酸发生置换、例如最多两个氨基酸发生置换、例如最多一个氨基酸发生置换之外具有相同序列的多肽。

[0201] 在一些实施方案中，免疫原性活性肽由包含氨基酸序列$VX_1LVLLAVAX_2$(SEQ ID NO:16)的最多100个氨基酸、例如最多50个氨基酸、例如最多30个氨基酸、例如最多20个氨基酸、例如最多15个氨基酸组成。具体而言，所述多肽可以是由鉴定于SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15中的CCL22的最多100个连续氨基酸残基、最多90个连续氨基酸残基、最多80个连续氨基酸残基、例如最多70个连续氨基酸残基、例如最多60个连续氨基酸残基、例如最多50个连

续氨基酸残基、例如最多45个连续氨基酸残基、例如最多40个连续氨基酸残基、例如最多35个连续氨基酸残基、例如最多30个连续氨基酸残基、例如最多25个连续氨基酸残基、例如18至25个连续氨基酸、例如20个连续氨基酸或其功能同系物的多肽，其中所述连续序列包含$VX_1LVLLAVAX_2$(SEQ ID NO:16)。优选在SEQ ID NO:16内，X_1选自由缬氨酸和丙氨酸组成的组，X_2选自由异亮氨酸和亮氨酸组成的组

[0202] MHC

[0203] 包括在本发明的范围内的是，CCL22的免疫原性活性肽片段可以是MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段，例如如在该章节中所述的MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段中的任意片段。

[0204] 有两种类型的MHC分子：MHC I类分子和MHC II类分子。CD8 T细胞识别MHC I类分子，CD8 T细胞是适应性免疫应答的主要效应细胞。MHC II类分子主要在抗原呈递细胞(APC)的表面表达，其中最重要的似乎是树突细胞。APC刺激初始T细胞以及免疫系统中的其他细胞。它们刺激CD8 T细胞和CD4 T细胞二者。

[0205] 在一个实施方案中，本发明提供免疫原性活性CCL22肽(任选包含于较大的肽中和/或于疫苗组合物中)，其中所述免疫原性活性CCL22肽是MHC I类限制性肽片段，所述MHC I类限制性肽片段由来自SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的8-10个连续氨基酸、例如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的肽片段或其功能同系物组成，其中SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的最多两个氨基酸发生置换，其特征在于具有若干特征中的至少一个，其中之一是与I类HLA分子结合的能力，I类HLA分子的亲和力受到限制，所述亲和力是如通过能够半数最大回收I类HLA分子的肽的量(C_{50}值)所测量的(最多50μM)，如通过本文所述的组装结合测定所测定的。该组装测定基于肽载入肽转运蛋白缺陷型细胞系T2后稳定HLA分子。随后，使用构象依赖性抗体使正确折叠的稳定的HLA重链免疫沉淀，并定量肽结合。该实施方案中的肽包含(或更优选尤其组成)SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的CCL22的最多100个、优选最多50个、更优选最多25个、还更优选最多20个、还甚至更优选最多15个、例如最多10个、例如范围为8至10个连续氨基酸或其功能同系物，其中SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的最多两个氨基酸发生置换。

[0206] 该测定提供了根据候选肽以上述亲和力与给定HLA等位基因分子结合的能力筛选候选肽的简单手段。在一个优选实施方案中，本发明的肽片段具有这样的C_{50}值，其为最多30μM，例如这样的C_{50}值，其为最多20μM，包括最多10μM、最多5μM和最多2μM的C_{50}值。

[0207] 在另一优选实施方案中，提供了SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的新型MHC II类限制性肽片段，例如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的肽或其功能同系物，其中SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的最多两个氨基酸发生置换(本文中也称为“肽”)，其特征在于具有如本文下文中所述的若干特征中的至少一个。该实施方案的肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的4至93个、优选8至90个、更优选10至75个、又更优选12至60、甚至更优选15至40、例如18至25个连续氨基酸或其功能同系物，其中SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的最多两个、优选最多一个氨基酸发生置换。在优选实施方案中，肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID

NO:1的CCL22肽片段的4至15个、优选5至14个、更优选6至13个、又更优选7至12个、甚至更优选8至11个、例如8至10个、例如9个连续氨基酸。在另一优选实施方案中，肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID NO:3的CCL22肽片段的4至9个、优选5至9个、更优选6至9个、又更优选7至8个、例如8或9个连续氨基酸。在另一优选实施方案中，肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID NO:4的CCL22肽片段的4至10个、优选5至10个、更优选6至10个、又更优选7至9个、例如9或10个连续氨基酸。在又一个优选实施方案中，肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID NO:11的CCL22肽片段的4至15个、优选5至14个、更优选6至13个、又更优选7至12个、甚至更优选8至11个、例如8至10个、例如9个连续氨基酸。在优选实施方案中，肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID NO:13的CCL22肽片段的4至15个、优选5至14个、更优选6至13个、又更优选7至12个、甚至更优选8至11个、例如8至10个、例如9个连续氨基酸。在又一个优选实施方案中，肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID NO:14的CCL22肽片段的4至10个、优选5至10个、更优选6至10个、又更优选7至10个、例如8或9个连续氨基酸。在又一个优选实施方案中，肽包含(或更优选地由其组成)SEQ ID NO:16的CCL22肽片段的4至10个、优选5至10个、更优选6至10个、又更优选7至10个、例如8或9个连续氨基酸。

[0208] 因此，提供了SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22的8-10个氨基酸的新型MHC I类限制性肽片段或18-25个氨基酸的新型MHC II类限制性肽片段或其功能同系物，其中SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的最多两个氨基酸发生置换，其特征在于具有在本文下文中所述的若干特征中的至少一个，其中之一是与其所限制的I类或II类HLA分子结合的能力。

[0209] 在具体实施方案中，提供了肽片段，其为具有以下特征中的至少一个的MHC I类限制性肽或MHC II类限制性肽：

[0210] (i)能够以如ELISPOT测定所测定的至少$1/10^4$PBL的频率引发至少一个癌症患者的PBL群体中的产生INF-γ的细胞，和/或

[0211] (ii)能够原位检测肿瘤组织的CTL，其与表位肽反应。

[0212] (iii)能够体外诱导CCL22特异性T细胞生长。

[0213] 根据本发明的更优选的肽是能够提高如ELISPOT测定，例如在本文下文的实施例1中所述的ELISPOT测定所测定的特异性T细胞应答的肽。尽管一些肽不以高亲和力结合MHC I类或II类，它们仍然可以产生如ELISPOT所测定的T细胞应答。能够以高亲和力结合MHC I类或II类的其他肽也可以产生如ELISPOT所测定的T细胞应答。两种类型的肽是根据本发明的优选肽。

[0214] 因此，根据本发明的优选肽是能够提高如ELISPOT测定所测定的特异性T细胞应答的肽，其中测量到每10^8个细胞、更优选每10^7个、甚至更优选每10^6个、又更优选每10^5个细胞、例如每10^4个细胞超过50个肽特异性点。

[0215] 根据本发明的最优选的肽是能够引发罹患特征在于CCL22的表达的临床病症的个体中细胞免疫应答的肽，临床病症优选为癌症或感染，并且最优选癌症。

[0216] 如上所述，HLA系统表示人主要组织相容性(MHC)系统。通常，MHC系统控制一系列特征：移植抗原、胸腺依赖性免疫应答、某些补体因子和某些疾病的预先倾向性。更具体地，MHC编码三种不同类型的分子，即I类、II类和III类分子，其决定了MHC更一般性的特征。在这些分子中，I类分子是存在于大多数有核细胞和血小板表面上的所谓的HLA-A、HLA-B和HLA-C分子。

[0217] 本发明的肽特征在于它们结合具体的MHC I类HLA分子(被其限制)的能力。因此，在一个实施方案中，肽是被MHC I类HLA-A分子限制的肽，所述MHC I类HLA-A分子包括HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A9、HLA-A10、HLA-A11、HLA-Aw19、HLA-A23(9)、HLA-A24(9)、HLA-A25(10)、HLA-A26(10)、HLA-A28、HLA-A29(w19)、HLA-A30(w19)、HLA-A31(w19)、HLA-A32(w19)、HLA-Aw33(w19)、HLA-Aw34(10)、HLA-Aw36、HLA-Aw43、HLA-Aw66(10)、HLA-Aw68(28)、HLA-A69(28)。在整个文献中也使用更简单的名称，其中仅使用主要数字标记，例如，HLA-A19或HLA-A24分别代替HLA-Aw19和HLA-A24(49)。在具体实施方案中，本发明的肽受选自由HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11和HLA-A24组成的组的MHC I类HLA物质的限制。在具体实施方案中，本发明的肽受MHC I类HLA物质HLA-A2或HLA-A3的限制。

[0218] 在另外的有用实施方案中，本发明的肽是这样的肽，其受包括以下任意分子的MHC I类HLA-B分子的限制:HLA-B5、HLA-B7、HLA-B8、HLA-B12、HLA-B13、HLA-B14、HLA-B15、HLA-B16、HLA-B17、HLA-B18、HLA-B21、HLA-Bw22、HLA-B27、HLA-B35、HLA-B37、HLA-B38、HLA-B39、HLA-B40、HLA-Bw41、HLA-Bw42、HLA-B44、HLA-B45、HLA-Bw46和HLA-Bw47。在本发明的具体实施方案中，本发明的肽能够结合的MHC I类HLA-B物质选自HLA-B7、HLA-B35、HLA-B44、HLA-B8、HLA-B15、HLA-B27和HLA-B51。

[0219] 在另外的有用实施方案中，本发明的肽是这样的肽，其受包括但不限于以下任意分子的MHC I类HLA-C分子的限制:HLA-Cw1、HLA-Cw2、HLA-Cw3、HLA-Cw4、HLA-Cw5、HLA-Cw6、HLA-Cw7和HLA-Cw1。

[0220] 在另外的有用实施方案中，本发明的肽是这样的肽，其受包括但不限于以下任意分子的MHC II类HLA分子的限制:HLA-DPA-1、HLA-DPB-1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA、HLA-DRB和这些组中的所有等位基因和HLA-DM、HLA-DO。

[0221] 能够通过结合给定的特定HLA分子的已知序列的比对来选择可能具有结合特定HLA分子的能力的肽，从而揭示肽中特定位置上少数相关氨基酸的优势。此类优势氨基酸残基在本文中也称为“锚定残基”或“锚定残基基序”。通过基于能够在可访问的数据库中发现的已知序列数据遵循这种相对简单的程序，肽能够衍生自CCL22，其可能结合特定的HLA分子。下表给出了一系列HLA分子的这种分析的代表性实例：

[0222] 表2

[0223]

HLA 等位基因	位置 1	位置 2	位置 3	位置 5	位置 6	位置 7	C 末端
HLA-A1		T,S	D,E			L	Y
HLA-A2		L, M			V		L,V
HLA-A3		L,V,M	F,Y				K, Y, F
HLA-A11		V,I,F, Y	M,L,F,Y, I				K, R
HLA-A23		I,Y					W,I
HLA-A24		Y		I,V	F		I,L,F
HLA-A25		M,A,T	I				W
HLA-A26	E,D	V,T,I, L,F			I,L,V		Y,F
HLA-A28	E,D	V,A,L					A,R
HLA-A29		E					Y,L
HLA-A30		Y,L,F, V					Y
HLA-A31			L,M,F,Y				R
HLA-A32		I,L					W
HLA-A33		Y,I,L, V					R
HLA-A34		V,L					R
HLA-A66	E,D	T,V					R,K
HLA-A68	E,D	T,V					R,K
HLA-A69		V,T,A					V,L
HLA-A74		T					V,L
HLA-B5		A,P	F,Y				I,L
HLA-B7	*	P					L,F
HLA-B8			K	K,R			L
HLA-B14		R,K					L,V

	HLA-B15 (B62)		Q,L,K ,P,H,V ,I,M,S, T				F,Y,W
	HLA-B17						L,V
	HLA-B27		R				Y, K,F,L
	HLA-B35		P				I, L, M, Y
	HLA-B37		D,E				I,L,M
	HLA-B38		H	D,E			F,L
	HLA-B39		R,H				L,F
	HLA-B40 (B60,61)		E	F,I,V			L,V,A,W, M,T,R
	HLA-B42		L,P				Y,L
	HLA-B44		E				F,Y,W
	HLA-B46		M,I,L, V				Y,F
	HLA-B48		Q,K				L
[0224]	HLA-B51		A,P,G				F,Y,I,V
	HLA-B52		Q	F,Y			I,V
	HLA-B53		P				W,F,L
	HLA-B54		P				
	HLA-B55		P				A,V
	HLA-B56		P				A,V
	HLA-B57		A,T,S				F,W,Y
	HLA-B58		A,T,S				F,W,Y
	HLA-B67		P				L
	HLA-B73		R				P
	HLA-Cw1		A,L				L
	HLA-Cw2		A,L				F,Y
	HLA-Cw3		A,L				L,M
	HLA-Cw4		Y,P,F				L,M,F,Y
	HLA-Cw6						L,I,V,Y
	HLA-Cw6		Y				L,Y,F
	HLA-Cw8		Y				L,I,
	HLA-Cw16		A,L				L,V

[0225] *在一个实施方案中,该位置没有特定的锚定残基,然而在优选的实施方案中,锚定残基是R或A。

[0226] 因此,作为实例,可能具有与HLA-A3结合的能力的九肽将具有以下序列之一:Xaa-

L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K、Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Y、Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-F或Xaa-V-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K(Xaa表示任何氨基酸残基)。以类似的方式，能够设计可能具有结合任何其他HLA分子的能力的序列。应该理解，本领域普通技术人员将能够鉴定给定HLA分子的进一步“锚定残基基序”。

[0227] 本发明的肽可以具有衍生自CCL22的天然序列的序列。然而，对任何给定HLA分子具有更高亲和力的肽可以通过修饰该序列通过置换、缺失或添加至少一个氨基酸残基衍生自这样的天然序列，例如，基于上述程序，从而鉴定关于给定HLA分子的锚定残基基序。

[0228] 因此，在有用的实施方案中，本发明的多肽包括这样的肽，对于表中列出的每种特定HLA等位基因，其序列包含表中所示的任何氨基酸残基。

[0229] 因此，本发明的肽可以是包含来自CCL22的连续序列的任何上述肽，其中范围为1至10个、优选范围为1至5个、更优选范围为1至3个、甚至更优选范围为1至2个、又更优选1个氨基酸与另一个氨基酸交换，优选以使得肽包含如上表所示的给定的HLA-A特异性肽的一个或多个、优选所有锚定残基的方式。

[0230] 本发明的优选肽被其所限制的优选HLA物质的实例包括：选自由HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11和HLA-A24组成的组的MHC I类HLA物质，更优选地，肽被HLA-A3或HLA-A2限制。或者，优选的HLA物质包括选自由HLA-B7、HLA-B35、HLA-B44、HLA-B8、HLA-B15、HLA-B27和HLA-B51组成的MHC I类HLA-B物质。

[0231] 鉴定本发明的多肽的方法包括以下步骤：选自具体的HLA分子，例如在给群体中以高比例存在的HLA分子，进行如上所述的比对分析以鉴定CCL22蛋白中的“锚定残基基序”，分离或构建包含所鉴定的锚定残基中的一个或多个的合适大小的肽，并测试所得肽引发癌症患者的PBL群体中产生INF-γ细胞的能力，所述引发是以如实施例1中所述的通过ELISPOT测定所测定的至少$1/10^4$个PBL的频率引发的。例如，该肽引发癌症患者的PBL群体中产生INF-γ细胞的能力具有至少$1/10^4$个PBMC的频率。

[0232] 在本发明的一个方面，提供了长度超过8至10个氨基酸残基的CCL22衍生肽。长度超过8至10个氨基酸的多肽被蛋白酶体加工成更短长度用于结合HLA分子。因此，当施用长度超过8至10个氨基酸残基的多肽时，CCL22的“长”多肽/蛋白质/蛋白质片段/变体可以在胞液内由蛋白酶体体内加工成一系列更短的肽。使用可被蛋白酶体加工成各种不同的更短的肽的更长多肽的好处是可以用被限制于特定HLA类的一个8至10个氨基酸的肽靶向更多的HLA类。

[0233] 令人惊讶的是，本发明的一些肽以足够高的亲和力结合MHC分子，使得置换是不必要的并准备就绪用作在此呈递(presented)的抗原。优选地，本发明的疫苗组合物包含以下中的一种或多种：CCL22蛋白(SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15)，来自它们的多肽片段，类似的变体，全长或部分长度CCL22的功能同系物，CCL22的连续肽及其功能同系物。更优选地，疫苗组合物包含表1中所列的任意序列。非常优选地，疫苗组合物包含肽SEQ ID NO:1($CCL22_{1-22}$)，SEQ ID NO:3($CCL22_{3-11}$)SEQ ID NO:4($CCL22_{3-12}$)，SEQ ID NO:11($CCL22_{1-24}$)，SEQ ID NO:13($mCCL22_{1-22}$)或SEQ ID NO:14($mCCL22_{1-24}$)。

[0234] 本发明的肽的显著特征是其能够在罹患癌症和/或感染的个体的APC或肿瘤/赘生细胞(靶细胞)上识别或引发产生INF-γ的应答T细胞，即特异性识别PBL群体中的特定肽的细胞毒性T细胞(CTL))的能力。通过对来自个体的PBL、PBMC、APC或肿瘤细胞进行ELISPOT测

定，可以容易地测定该活性。在测定之前，通过使细胞与待测试的肽接触来刺激要测定的细胞可能是有利的。优选地，肽能够以至少$1/10^4$个PBL的频率引发或识别产生INF-γ的T细胞，例如如通过本文使用的ELISPOT测定所测定的至少$1/10^4$个PBMC的频率更优选地，频率为至少$5/10^4$个PBL，最优选至少$10/10^4$个PBL，例如至少50或$100/10^4$个PBL。例如，频率为至少$5/10^4$个PBMC，最优选至少$10/10^4$个PBMC，例如至少50或$100/10^4$个PBMC。

[0235] ELISPOT测定代表了监测CCL22肽特异性T细胞应答的有力工具。本文的发现的主要含义是本发明的肽在癌细胞和/或表达CCL22的APC上表达并且与HLA分子复合。这使得这些癌细胞容易被CTL破坏，并强调了CCL22免疫接种对抗癌症和感染的有用性。黑素瘤患者的PBL中对HLA限制性CCL22衍生肽表位的自发CTL应答的存在显示出CCL22免疫原性肽的免疫治疗潜力。

[0236] 在本发明的实施方案中，本发明的肽能够在患有临床病症的个体的PBL群体中引发产生INF-γ的细胞，其中表达SEQ ID NO:12的CCL22或者与SEQ ID NO:12具有至少70％的同一性的功能同系物。临床病症优选是癌症和/或感染，并且最优选是癌症。

[0237] 个体

[0238] 待用本发明的疫苗组合物治疗的个体是罹患临床病症的个体。个体优选哺乳动物物种并且最优选人类。个体可以为任何年龄，年轻的或者年长的，并且可以是雄性(男性)或雌性(女性)。个体所罹患的临床病症可以是赘生性疾病，例如癌症，或感染，例如微生物或病毒感染，例如HIV。

[0239] 本发明的实施方案提供用于治疗癌症、降低癌症风险、稳定癌症或预防癌症的疫苗。在另一实施方案中，本发明提供用于治疗源自感染的疾病、降低源自感染的疾病的风险、稳定或预防源自感染的疾病的疫苗，所述感染例如微生物或病毒感染。

[0240] 癌症

[0241] 本发明的疫苗组合物可以用于预防临床病症、降低临床病症风险或治疗临床病症。优选地，临床病症与CCL22的表达相关或者特征在于CCL22的表达。CCL22可以是如鉴定于SEQ ID NO:12中的CCL22或者可以是与其野生形式具有至少70％的同一性但不必然具有功能的同系物。据此理解，CCL22的表达水平(表达例如是hnRNA、RNA、前体蛋白、完全加工的蛋白的表达)与未罹患临床病症的个体相同或更高。

[0242] 在本发明的一个实施方案中，临床病症是增殖性疾病，例如赘生前或赘生性疾病。在本发明的优选实施方案中，临床病症是癌症。癌症(恶性赘生物)是一类疾病，其中一组细胞表现出的特点是不受控制的生长(超出正常限度的生长和分裂)，侵袭(侵入和破坏邻近组织)，以及有时转移(通过淋巴或血液传播到体内的其他位置)。这三种癌症的恶性特征将它们与其为自限性、不会侵润或转移的良性肿瘤区分开来。大多数癌症形成肿瘤，但有些像白血病一样不形成肿瘤。

[0243] 作为可通过施用本发明的疫苗来治疗、控制和/或预防的癌症的实例而给出的非限制性癌症组包括:结肠癌，乳腺癌，胰腺癌，卵巢癌，前列腺癌，纤维肉瘤，粘液肉瘤，脂肪肉瘤，软骨肉瘤，成骨性肉瘤，脊索瘤，血管肉瘤，内皮肉瘤，淋巴管肉瘤，淋巴管内皮肉瘤，滑膜瘤，间皮瘤，尤因肉瘤，平滑肌肉瘤，横纹肌肉瘤，鳞状细胞癌，基底细胞癌，腺癌，汗腺癌，皮脂腺癌，乳头状癌，乳头状腺癌，囊腺癌，髓样癌，支气管癌，肾细胞癌，肝细胞癌，胆管癌，绒毛膜癌，精原细胞瘤，胚胎癌，维尔姆斯瘤，宫颈癌，睾丸肿瘤，肺癌，小细胞肺癌，膀胱

癌，上皮癌，胶质母细胞瘤，神经元癌(neuronomas)，craniopharingiomas，神经鞘瘤，胶质瘤，星形细胞瘤，髓母细胞瘤，颅咽管瘤，室管膜瘤，松果体瘤，成血管细胞瘤，听神经瘤，少突神经胶质瘤，脑膜瘤，黑素瘤，成神经细胞瘤，视网膜母细胞瘤，白血病和淋巴瘤，急性淋巴细胞性白血病和急性骨髓性红细胞增多症，多发性骨髓瘤，瓦氏巨球蛋白血症，和重链病，急性非淋巴细胞白血病，慢性淋巴细胞白血病，慢性骨髓性白血病，霍奇金病，非霍奇金淋巴瘤，直肠癌，尿路癌，子宫癌，口腔癌，皮肤癌，胃癌，脑肿瘤，肝癌，喉癌，食道癌，乳腺瘤，儿童无急性淋巴细胞白血病(ALL)，胸腺ALL，B细胞ALL，急性骨髓性白血病，骨髓单核细胞白血病，急性巨核细胞白血病，伯基特淋巴瘤，急性骨髓性白血病，慢性骨髓性白血病，和T细胞白血病，小和大的非小细胞肺癌，急性粒细胞白血病，生殖细胞瘤，子宫内膜癌，胃癌，头颈癌，慢性淋巴细胞白血病，毛细胞白血病和甲状腺癌。

[0244] 在优选的实施方案中，根据本发明的疫苗组合物能够引发受试者中的临床应答，其中临床应答可以特征在于稳定疾病，在优选的实施方案中，临床应答可以特征在于部分应答，或优选临床应答可以特征在于癌症的完全缓解。优选地，癌症选自以下的组：黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、血液癌症(如白血病)、结肠癌和肾细胞癌。

[0245] 在本发明的一个方面，疫苗组合物能够引发个体中的临床应答。在一个实施方案中，临床应答可以特征在于稳定疾病(没有进一步恶化或进展)，在优选的实施方案中，临床应答可以特征在于部分应答或者优选临床应答可以特征在于癌症或感染的完全缓解。可以如本文下文所述确定临床应答。

[0246] 在本发明的另一方面，疫苗组合物能够引发受试者中的临床应答，其中临床应答特征在于最大靶病变的最长直径的总和减小。可以如本文下文所述确定减小。

[0247] 代表所有相关器官的所有可测量的病变(每个器官最多5个病变和总共10个病变)应被鉴定为靶病变，并在基线处记录和测量。

[0248] • 靶病变应基于它们的大小(具有最长直径的病变)和它们适用于准确的重复测量(通过成像技术或临床)来进行选择。

[0249] • 将计算所有靶病变的最长直径(LD)的总和并将其报告为基线总和LD。基线总和LD将用作表征目标肿瘤的参照。

[0250] • 所有其他病变(或疾病部位)应被鉴定为非靶病变，并且应在基线时记录。这些病变的测量不是必需的，但是在随访期间应该注意每个病变的存在或不存在。

[0251] 靶病变的评估

[0252] • 完全应答(CR)：所有靶病变消失。

[0253] • 部分应答(PR)：参照基线总和LD，靶病变LD的总和减少至少30％。

[0254] • 进行性疾病(PD)：参照自治疗开始以来记录的最小总和LD，靶病变LD的总和至少增加20％，或出现一个或多个新病变。

[0255] • 稳定疾病(SD)：参照自处理开始以来最小的总和LD，既没有足够的收缩来符合PR的要求，也没有足够的增加来符合PD的要求。

[0256] 非靶病变的评估

[0257] • 完全应答(CR)：所有非靶病变消失和肿瘤标记物水平正常化。

[0258] • 不完全应答/稳定疾病(SD)：一个或多个非靶病变的持续性或/和肿瘤标志物水平维持在高于正常限值。

[0259] • 进行性疾病(PD):一个或多个新病变的出现和/或现有非靶病变的明确进展

[0260] 在本发明的实施方案中,包含任何本文所述的蛋白质和/或多肽的疫苗组合物能够引发受试者中的临床应答,其中临床应答特征在于最大靶病变的最长直径的总和减小。

[0261] 预期本发明的疫苗组合物在向罹患表达CCL22的癌症的个体施用时能够引发针对表达SEQ ID NO:12的CCL22或其与SEQ ID NO:12具有至少70%同一性的功能同源物的癌症的免疫应答。本发明的疫苗组合物能够引发接种个体中对癌细胞、表达CCL22的APC具有细胞毒性作用的效应T细胞的产生和/或诱导受试者中肿瘤基质中的抗原特异性T细胞的浸润。

[0262] 除了它们在PBL群体中引起免疫应答的能力之外,还预期本发明的肽能够原位即在实体瘤组织中引发细胞溶解免疫应答。这可以例如通过提供HLA-肽复合物来证明,例如,被多聚化并且被提供有可检测标记,并且使用这种复合物用于免疫组织化学染色以在肿瘤组织中检测与本发明的表位肽反应的CTL。因此,本发明的肽的另一个显著特征是其能够在肿瘤组织中原位检测与表位肽反应的CTL。

[0263] 还预期到,除了它们结合HLA分子导致HLA和肽在细胞表面上的复合物(所述复合物进而作为细胞溶解T细胞的表位或靶标)的呈递的能力外,本发明的肽还可以引发其他类型的免疫应答,例如导致产生针对复合物的抗体和/或迟发型超敏反应(DTH)的B细胞应答。后一种免疫应答类型被定义为在注射本发明的肽的位点发红并可触知的硬化。

[0264] 本发明的一个目的是提供疫苗组合物,其包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的C-C基序趋化因子22,或与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70%的同一性的功能同系物,或包含所述CCL22或所述其功能同系物的连续序列的免疫原性活性肽片段,或编码所述CCL22或所述肽片段的核酸;和佐剂,其用于预防癌症、降低癌症风险或治疗癌症。

[0265] 癌症联合治疗

[0266] 在一些情况下,将本发明的治疗方法与进一步的癌症治疗如化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质治疗、基因治疗、抗体治疗和使用树突细胞治疗相结合将是适当的。

[0267] 由于CCL22在肿瘤细胞中的表达升高导致对免疫系统的抑制,本发明公开的基于CCL22的免疫疗法与细胞毒性化学疗法和/或另一种抗癌免疫治疗疗法的组合是治疗癌症的有效方法。这些疗法(remedy)在本文中也被称为“第二活性成分”。

[0268] 与本发明的疫苗组合物共同施用(依次或同时)相关的化疗剂的实例包括但不限于:全反式视黄酸、Actimide、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西紫杉醇、去氧氟尿苷、阿霉素、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊立替康、来那度胺、甲酰四氢叶酸、氮芥、美法仑、巯嘌呤、甲氨喋呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、雷利米得(Revlimid)、替莫唑胺、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。在一个实施方案中,用于与本发明的药剂组合使用的化疗剂本身可以是不同化疗剂的组合。合适的组合包括FOLFOX和IFL。FOLFOX是包括5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲酰四氢叶酸和奥沙利铂的组合。IFL治疗包括伊立替康、5-FU和甲酰四氢叶酸。

[0269] 另一种第二活性成分可以是激酶抑制剂,用于分开、同时或组合用于治疗肿瘤。合适的激酶抑制剂包括已经显示具有抗肿瘤活性的那些(例如吉非替尼(易瑞沙)和厄洛替尼(特罗凯)),并且这些可以与肽组合使用。已经显示在肾细胞癌治疗中有效的受体酪氨酸激

酶抑制剂,例如苹果酸舒尼替尼和索拉非尼也适合用作第二活性成分。

[0270] 第二活性成分的其他实例是免疫刺激物质,例如细胞因子和抗体。例如细胞因子可以选自由以下组成的组,但不限于:GM-CSF、I型IFN、白介素21、白介素2、白介素12和白介素15。抗体优选是免疫刺激性抗体,例如抗CD40或抗CTLA-4抗体。免疫刺激物质也可以是能够耗尽免疫抑制性细胞(例如调节性T细胞)或因子的物质,所述物质可以是例如E3泛素连接酶。E3泛素连接酶(HECT、RING和U框蛋白)已经成为免疫细胞功能的关键分子调节剂,并且每种都可能在感染过程中通过靶向特异性抑制分子进行蛋白水解破坏来参与调节免疫应答。几种HECT和环E3蛋白现在也与免疫自身耐受的诱导和维持有关:c-Cbl、Cbl-b、GRAIL、Itch和Nedd4各自负调节T细胞生长因子的生成和增殖。

[0271] 在实施方案中,包含CCL22衍生多肽的本发明的疫苗组合物与第二活性成分例如免疫刺激物质组合施用。免疫刺激物质优选白介素例如IL-21或IL-2或化学疗法剂。

[0272] 本发明的疫苗组合物还可以包含除了CCL22之外的一种或多种额外的抗原。所述抗原可以例如是衍生自癌症相关蛋白的免疫原性活性肽。

[0273] 因此,本发明的疫苗组合物除了CCL22和/或其免疫原性活性肽片段之外还可以包含一种或多种以下物质:

[0274] 1)吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)

[0275] 2)IDO的免疫原性活性肽片段

[0276] 3)1)或2)的功能同系物

[0277] 4)包含1)、2)或3)的多肽

[0278] 5)编码1)、2)、3)或4)中任一种的核酸。

[0279] 所述IDO可以特别是WO 2009/143843中SEQ ID NO:1的IDO、WO 2009/143843中SEQ ID NO:13的IDO、WO 2009/143843中SEQ ID NO:14的IDO、WO 2009/143843中SEQ ID NO:15的IDO或WO 2009/143843中SEQ ID NO:16的IDO。能够被包含在本发明的疫苗组合物中的IDO的有用的免疫原性活性肽片段描述于WO 2009/143843中。

[0280] 本发明的疫苗组合物除了CCL22和/或其免疫原性活性肽片段之外还可以包含一种或多种以下物质:

[0281] 1)PD-L1

[0282] 2)PD-L1的免疫原性活性肽片段

[0283] 3)1)或2)的功能同系物

[0284] 4)包含1)、2)或3)的多肽

[0285] 5)编码1)、2)、3)或4)中任一种的核酸

[0286] 所述PD-L1可以特别是WO2013/056716中SEQ ID NO:1的PD-L1。能够被包含在本发明的疫苗组合物中的PD-L1的有用的免疫原性活性肽片段描述于WO2013/056716中。

[0287] 本发明的疫苗组合物除了CCL22和/或其免疫原性活性肽片段之外还可以包含一种或多种以下物质:

[0288] 1)色氨酸2,3-双加氧酶(TDO)

[0289] 2)TDO的免疫原性活性肽片段

[0290] 3)1)或2)的功能同系物

[0291] 4)包含1)、2)或3)的多肽

[0292] 5)编码1)、2)、3)或4)中任一种的核酸。

[0293] 所述TDO可以特别是由本发明人递交的未决申请“包含色氨酸2,3-双加氧酶或其片段的疫苗组合物”中SEQ ID NO:1的TDO。能够被包含在本发明的疫苗组合物中的TDO的有用的免疫原性活性肽片段描述于所述未决申请中。

[0294] 感染

[0295] 在本发明的另一实施方案中,本文公开的疫苗组合物用于治疗或预防炎性病症。

[0296] 本文所用的术语“炎性病症”涉及引起免疫反应如炎症的任何类型的临床病症,并因此包括感染性疾病、慢性感染、自身免疫病症和变应性炎症。因此,诸如感染性疾病、慢性感染、自身免疫病症和变应性炎症的炎性病症都是与本发明相关的临床条件,并且依次在下文中进行论述。

[0297] 炎症是血管组织对有害刺激物(如病原体、受损细胞或刺激物)的复杂生物应答。它是生物体消除有害刺激以及启动组织愈合过程的保护性尝试。炎症可分为急性或慢性。急性炎症是身体对有害刺激的最初应答,并且是通过浆细胞(plasma)和白细胞从血液到受伤组织中运动的增加而实现的。生化事件的级联反应会传播和使炎症应答成熟,涉及局部血管系统、免疫系统和受伤组织内的各种细胞。称为慢性炎症的长期炎症导致存在于炎症部位的细胞类型逐渐改变,并且其特征在于炎症过程中组织的同时破坏和愈合。在任何一种情况下,CCL22均由免疫系统的细胞如APC表达,因此感染和炎症是可以通过施用本发明的疫苗组合物而治疗、预防或降低风险的临床病症。疫苗组合物优选包含CCL22蛋白、由其衍生的蛋白片段、多肽或肽或这些中任一种的功能同系物。

[0298] 与本发明相关的与炎症相关的疾病的实例包括但不限于:变应性炎症、哮喘、自身免疫疾病、慢性炎症、慢性前列腺炎、肾小球肾炎、超敏反应、传染性疾病、炎性肠病、盆腔炎、再灌注损伤、类风湿性关节炎、移植排斥和血管炎。

[0299] 慢性炎症

[0300] 慢性炎症与本发明特别相关。慢性炎症是以并发活动性炎症、组织破坏和修复尝试为特征的病理病症。慢性炎症组织的特征为单核免疫细胞(单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞)的浸润、组织破坏和愈合尝试,包括血管生成和纤维化。

[0301] 在急性炎症中,刺激的去除阻止了单核细胞(在适当激活下变成巨噬细胞)向发炎组织中的募集,并且现有巨噬细胞通过淋巴管离开组织。然而,在慢性炎症的组织中,刺激持续存在,因此维持了单核细胞的募集,现有的巨噬细胞被束缚在适当的位置,并且巨噬细胞的增殖受到刺激(特别是在动脉粥样硬化斑块中)。

[0302] 本发明的一个目的是提供疫苗组合物,其包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22或与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70%的同一性的功能同系物或包含所述CCL22或所述其功能同系物的连续序列的免疫原性活性肽片段或编码所述CCL22或所述肽片段的核酸;和佐剂,其用于预防慢性炎症、降低慢性炎症风险或治疗慢性炎症。

[0303] 传染性疾病

[0304] 本发明的疫苗组合物可以用于预防临床病症、降低临床病症风险或治疗临床病症。在本发明的优选实施方案中,临床病症是传染性疾病。传染性疾病可以由能够在罹患传染性疾病的个体中诱导增加的CCL22表达的任何传染原如细菌、病毒、寄生虫和/或真菌来促进;优选地,传染性疾病是慢性疾病或者处于变成慢性疾病的风险中。如发明背景中所

述，CCL22的表达增加通过夺取其色氨酸而对表达CCL22的生物体附近的微生物剂产生直接影响。然而，如果表达CCL22的细胞是APC，因为CCL22表达诱导的增加会抑制Treg细胞的活性，所以这种方法适得其反。因此，本发明的一个方面是提供包含CCL22蛋白、蛋白片段、肽和/或它们任何一种的变体的疫苗组合物用于治疗、改善(减轻严重度)稳定和/或预防由传染原导致的疾病。

[0305] 可以由病毒引起传染性疾病，并且可以在治疗中施用本发明的疫苗组合物以对抗的病毒性疾病包括但不限于以下病毒性疾病：HIV、AIDS、AIDS相关综合征、水痘(Chickenpox(Varicella))、普通感冒、巨细胞病毒感染、科罗拉多蜱热、登革热、埃博拉出血热、手足口病、肝炎、单纯疱疹、带状疱疹、HPV(人乳头瘤病毒)、流感(Flu)、拉沙热、麻疹、马尔堡出血热、传染性单核细胞增多症、腮腺炎、诺如病毒、脊髓灰质炎、进行性多灶性脑白质病、狂犬病、风疹、SARS、天花(Smallpox(Variola))、病毒性脑炎、病毒性胃肠炎、病毒性脑膜炎、病毒性肺炎、西尼罗河病和黄热病。优选地，疫苗组合物被施用给患有HIV/AIDS和可能导致癌症的病毒感染的个体。与人类癌症有关的主要病毒是人类乳头瘤病毒、乙型肝炎和丙型肝炎病毒、EB病毒和人类T淋巴细胞病毒；因此，本发明的一个目的是作为这些病毒感染的治疗或作为治疗这些病毒感染的一部分来施用。

[0306] 与本发明相关的细菌感染的实例包括但不限于：炭疽、细菌性脑膜炎、肉毒中毒、布鲁菌病、弯曲菌病、猫抓病、霍乱、白喉、流行性斑疹伤寒、淋病、脓疱病、军团菌病、麻风(汉森氏病)、钩端螺旋体病、李斯特菌病、莱姆病、类鼻疽、风湿热、MRSA感染、诺卡菌病、百日咳(Pertussis(Whooping Cough))、瘟疫、肺炎球菌肺炎、鹦鹉热、Q热、落基山斑疹热(RMSF)、沙门氏菌病、猩红热、志贺菌病、梅毒、破伤风、沙眼、肺结核、兔热病、伤寒、斑疹伤寒和尿路感染。本发明的目的是提供用于治疗和/或预防和/或降低细菌感染风险的疫苗。

[0307] 本发明的另一目的是提供用于治疗和/或预防和/或降低以下疾病风险的疫苗组合物：寄生虫性传染性疾病例如但不限于：非洲锥虫病、阿米巴病、蛔虫病、巴贝西虫病、美洲锥虫病、华支睾吸虫病、隐孢子虫病、囊虫病、裂头绦虫病、龙线虫病、棘球蚴病、蛲虫病、片形吸虫病、姜片虫病、丝虫病、自生阿米巴感染、贾第虫病、腭口线虫病、膜壳绦虫病、等孢球虫病、黑热病、利什曼病、疟疾、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、蛲虫感染、疥疮、血吸虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓形体病、旋毛虫病、毛线虫病、鞭虫病、滴虫病和锥虫病；真菌传染性疾病例如但不限于：曲菌病、芽生菌病、念珠菌病、球孢子菌病、隐球菌病、组织胞浆菌病、足癣；朊病毒传染性疾病例如但不限于：传染性海绵状脑病、牛海绵状脑病、克-雅脑病、库鲁致命性家族性失眠症和阿尔珀斯综合征；因此本发明的一个目的是作为治疗这些寄生虫、真菌或朊病毒引起的感染的治疗或作为其一部分来施用。

[0308] 传染性疾病联合治疗

[0309] 进一步提供的是，通过施用根据本发明的疫苗组合物来治疗任何感染性疾病可以与另外的(第二)活性成分联合施用或与另外的治疗例如抗生素治疗、化疗、用免疫刺激物质治疗、使用树突细胞、抗病毒剂和寄生虫剂治疗等组合。

[0310] 可用于与本发明的疫苗组合治疗传染性疾病的第二活性成分的实例包括但不限于抗生素。本文的术语抗生素脂质具有抗细菌、抗真菌、抗病毒和/或抗寄生虫活性的物质；与本发明相关的实例包括但不限于：阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、奈替米星、巴龙霉素、链霉素、妥布霉素、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、氯霉素、氟喹诺酮类、环丙沙星、

加替沙星、吉米沙星、格帕沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、莫西沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、司帕沙星、曲伐沙星、糖肽类、万古霉素、林可酰胺类、克林霉素、大环内酯类/酮内酯类、阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素、红霉素、头孢羟氨苄、头孢唑林、头孢氨苄、头孢菌素、头孢匹林、头孢拉定、头孢克洛、头孢羟唑、头孢尼西、头孢替坦、头孢西丁、头孢罗齐、头孢呋辛、氯碳头孢、头孢地尼、头孢托仑、头孢克肟、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢他啶、头孢布坦、头孢唑肟、头孢曲松、头孢吡肟、单环β-内酰胺类、氨曲南、硝基咪唑类、甲硝唑、噁唑烷酮类、利奈唑胺、青霉素类、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、氨苄青霉素、舒巴坦、巴氨西林、羧苄青霉素、氯唑西林、双氯青霉素、甲氧西林、美洛西林、乙氧萘青霉素、苯唑青霉素、青霉素G、青霉素V、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林、替卡西林/克拉维酸、链阳菌素、奎奴普丁、达福普汀、磺胺/磺胺甲噁唑、甲氧苄啶、四环素类、地美环素、多西环素、米诺环素、四环素、唑类抗真菌药克霉唑氟康唑、伊曲康唑、酮康唑、咪康唑、伏立康唑、两性霉素B、制霉菌素、棘球白素、卡泊芬净、米卡芬净、环吡酮、氟胞嘧啶、灰黄霉素和特比萘芬。更相关的是抗病毒药物、如阿糖腺苷、阿昔洛韦、丙氧鸟苷和万赛维(缬更昔洛韦)、核苷类似物逆转录酶抑制剂(NRTI):AZT(齐多夫定)、ddI(地达诺新)、ddC(扎西他滨)、d4T(司他夫定)、3TC(拉米夫定)、非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI):奈韦拉平、地拉夫定、蛋白酶抑制剂:沙奎那韦、利托那韦、茚地那韦、奈非那韦、利巴韦林、金刚烷胺/金刚乙胺、瑞乐沙和达菲、普来可那立、干扰素。

[0311] 在实施方案中,本发明涉及包含CCL22衍生的蛋白质、多肽和/或它们的功能同系物的疫苗组合物,其用于与至少一种抗生素联合治疗传染性疾病。优选地,本发明的疫苗组合物用于治疗慢性感染,例如,HIV,因此可以与任何上面列出的抗生素如抗病毒剂联合使用。

[0312] 自身免疫疾病

[0313] 当生物体不能将其自身组成部分(低至亚分子水平)识别为自身时,就会产生自身免疫疾病,这会导致针对其自身细胞和组织的免疫应答。由这种异常免疫应答引起的任何疾病称为自身免疫疾病,并且与本发明相关。其实例包括但不限于:乳糜泻、1型糖尿病(IDDM)、全身性红斑狼疮(SLE)、Sjögren综合征、多发性硬化症(MS)、桥本甲状腺炎、格雷夫斯病、特发性血小板减少性紫癜和类风湿性关节炎(RA)。

[0314] 本发明的目的是提供包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22或与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70%同一性的功能同源物的疫苗组合物或包含所述CCL22或所述其功能同源物的连续序列的免疫原性活性肽片段或编码所述CCL22或所述肽片段的核酸;和佐剂,用于预防自身免疫疾病、减少自身免疫疾病的风险或治疗自身免疫疾病。

[0315] 自身免疫疾病联合治疗

[0316] 目前对自身免疫疾病的治疗通常是免疫抑制、抗炎或姑息治疗。饮食控制限制了乳糜泻的严重程度。甾体或NSAID治疗限制许多疾病的炎症症状。免疫球蛋白静脉注射制剂(IVIG)用于慢性炎性脱髓鞘多发性神经病(CIDP)和吉兰-巴雷综合征(GBS)。已经显示更特异的免疫调节疗法(例如TNFα拮抗剂依那西普)可用于治疗RA。这些免疫治疗可能与增加不良反应的风险,例如感染的易感性相关。

[0317] 已经根据这些观察结果开发了蠕虫疗法,并涉及用特定的寄生性肠道线虫(蠕虫)接种个体。目前有两种密切相关的治疗方法,接种美洲钩虫(Necator americanus),俗称钩

虫,或者猪鞭虫卵(Trichuris Suis Ova),俗称猪鞭虫卵。现有研究表明,这种方法在治疗各种自身免疫疾病方面非常有效,包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、哮喘、变态反应、多发性硬化症和慢性炎症性疾病。

[0318] 在实施方案中,本文公开的疫苗与第二活性成分例如任何上述药物和抗自身免疫疾病的治疗组合使用。

[0319] 变应性炎症

[0320] 变态反应是通常也称为特应性的免疫系统疾病。对称为变应原的环境物质会发生变态反应;这些反应是获得的、可预测和快速的。严格来说,变态反应是超敏反应的四种形式之一,被称为I型(或速发型)超敏反应。它的特征是被称为肥大细胞和嗜碱性粒细胞的某些白细胞被称为IgE的一类抗体过度激活,导致极度炎症反应。常见的变态反应包括湿疹、荨麻疹、花粉病、哮喘、食物变态反应,以及对黄蜂和蜜蜂等针昆虫的毒素的反应。

[0321] 变应性炎症是包括变应性哮喘、特应性皮炎、变应性鼻炎和几种眼部变应性疾病的几种失能或医疗病症的重要病理生理学特征。

[0322] 本发明的目的是提供疫苗组合物,其包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22或与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70%的同一性的功能同系物或包含所述CCL22或其所述功能同系物的连续序列的免疫原性活性肽片段或编码所述CCL22或所述肽片段的核酸;和佐剂,其用于预防变应性炎症、降低变应性炎症风险或治疗变应性炎症。

[0323] 变应性炎症联合治疗

[0324] 两种类型的治疗可用于治疗变应性炎症,药物疗法和免疫疗法:药物疗法和免疫疗法。

[0325] 药物疗法是使用拮抗性药物来阻断变应介质的作用、或者阻止细胞激活和脱粒过程。这些包括抗组胺药、可的松、地塞米松、氢化可的松、肾上腺素(epinephrine(adrenaline))、茶碱、色甘酸钠和抗白三烯、如孟鲁司特(顺尔宁)或扎鲁司特(安可来);抗胆碱能药、减充血剂、肥大细胞稳定剂和被认为可减弱嗜酸性粒细胞趋化性的其他化合物也是常用的。

[0326] 免疫疗法是脱敏或减敏治疗,其中个体逐渐接种逐渐增大剂量的所考虑的变应原。第二种免疫疗法形式包括静脉注射单克隆抗IgE抗体。第三种类型(舌下免疫疗法)是一种口服施用疗法,它利用对非致病性抗原如食物和驻留细菌的口服免疫耐受性。

[0327] 在实施方案中,本文公开的疫苗与第二活性成分例如任何上述提及的药物和抗变应性炎症的治疗组合使用。

[0328] 药物组合物

[0329] 本发明涉及能够在个体中治疗与CCL22表达相关的临床病症、降低与CCL22表达相关的临床病症的风险和/或预防与CCL22表达相关的临床病症的药物组合物。所述药物组合物可以特别是疫苗组合物。本发明的疫苗组合物可以是包含抗原如蛋白质多肽和/或核酸分子的“传统”疫苗组合物。它们也可以是包含细胞、例如源自个体并且随后加工的修饰细胞的组合物的形式,或者包含复合分子例如抗体或TCR的组合物。

[0330] 通常,疫苗是能够在个体中诱导免疫应答的物质或组合物。组合物可以包含以下一种或多种:“活性组分”,例如抗原(例如蛋白质、多肽、肽、核酸等),包含一种或多种抗原以及其他元件的核酸构建体,细胞(例如负载的APC,用于过继转移的T细胞),复合物分子

(抗体、TCR和MHC复合物等)，载体，佐剂和药物载体。在下文中，更详细地公开了根据本发明的疫苗组合物的各种组分。

[0331] 本发明的疫苗组合物在向罹患癌症和/或感染(导致CCL22的表达)的个体施用时能够引发针对表达SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15的CCL22或与SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:15具有至少70％同一性的功能同源物的癌症、DC或APC的免疫应答。在优选实施方案中，临床病症是癌症。本发明的疫苗组合物能够在接种个体中引发对表达CCL22的癌细胞、APC和DC具有细胞毒性作用的效应T细胞的产生和/或诱导受试者中肿瘤基质中的抗原特异性T细胞的浸润。

[0332] 抗原和其他活性组分

[0333] 基于蛋白质/多肽的疫苗组合物

[0334] 本发明的肽可以本文所述形式即用作抗原。优选地，本发明的疫苗组合物包含以下中的一种或多种：

[0335] 1)C-C基序趋化因子22(CCL22)，其可以是本文在章节“C-C基序趋化因子22”中所述的CCL22中任一种，特别是人或鼠CCL22；

[0336] 2)包含CCL22的连续氨基酸序列的CCL22的免疫原性活性肽片段，其可以是本文下文在章节“CCL22的免疫原性活性肽片段”中所述的肽中任一种。

[0337] 3)CCL22的免疫原性活性肽片段，其为MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段，例如如在章节“MHC”中所述的MHC I类限制性肽片段或MHC II类限制性肽片段中的任意片段。

[0338] 4)1)、2)和3)中多肽的功能同系物；

[0339] 5)包含1)、2)、3)和4)中任意多肽的多肽，其可以是本文下文在章节“包含CCL22或其片段的多肽”中所述的多肽中任一种。

[0340] 6)编码1)、2)、3)或4)中任意多肽的核酸。

[0341] 本发明疫苗组合物中抗原的选择将取决于本领域技术人员可确定的参数。如上所述，本发明的每种不同肽都由特定的HLA分子呈递在细胞表面上。因此，如果待治疗的受试者针对HLA表型进行分型，则选择已知结合该特定HLA分子的一种肽/多种肽。或者，基于给定群体中各种HLA表型的流行率选择目标抗原。举例而言，HLA-A2是高加索人群中最普遍的表型，因此含有与HLA-A2结合的肽的组合物在该人群的很大比例中有活性。此外，本发明的抗原/肽可根据表2中呈现的锚定残基基序进行修饰，以增强与特定HLA分子的结合。

[0342] 本发明的组合物还可以含有两种或更多种CCL22的免疫原性活性肽片段的组合，例如在“CCL22的免疫活性肽片段”、“包含CCL22或其片段的多肽”和“MHC”章节中描述的任何肽。所述CCL22的免疫原性活性肽片段可以与不同的HLA分子特异性相互作用，以覆盖更大比例的靶群体。因此，举例而言，药物组合物可以含有被HLA-A分子限制的肽和被HLA-B分子限制的肽的组合，例如，包括对应于靶群体中流行的HLA表型的那些HLA-A和HLA-B分子，例如，HLA-A2和HLA-B35。另外，组合物可以包含受HLA-C分子限制的肽。

[0343] 在基于肽的疫苗的情况下，表位可以以“MHC-可用的”形式施用，其能够通过不依赖于抗原摄取的外源载荷由宿主抗原呈递细胞处理而呈递。本发明的肽包含短’MHC-可用的’形式的肽和需要蛋白酶体加工的更长形式的肽，从而提供可靶向多种肿瘤抗原的更复杂的疫苗组合物。疫苗靶向的HLA不同群体越多，疫苗在不同人群中起作用的可能性就越

高。

[0344] 多表位疫苗组合物

[0345] 本发明还涉及高免疫原性多表位疫苗。优选地，应该设计这样的疫苗以便于同时递送CCL22的最适合的免疫原性活性肽片段，任选地与下文所述的其他合适的肽和/或佐剂组合。发明涵盖这样的多表位疫苗，其包含任选与如下文所述的不属于或衍生于CCL22的另外的蛋白或肽片段和/或佐剂组合的CCL22的免疫原性活性肽片段。推动开发具有更复杂组成的疫苗的重要因素是希望靶向多种肿瘤抗原，例如通过设计包含或编码仔细选择的CTL和T_h细胞表位集合的疫苗。因此，本发明一方面涉及包含I类和II类限制性CCL22表位的疫苗组合物。

[0346] 因此，本发明的肽包含短'MHC-可用的'形式(I类限制)和需要通过蛋白酶体加工的更长形式(II类限制)的肽。因此，根据本发明的组合物可以作为包含上文定义的I类限制性表位和/或II类限制性表位的多表位疫苗提供。

[0347] 基于核酸的疫苗组合物

[0348] 根据本发明的疫苗组合物可以包含编码CCL22多肽或其免疫活性肽片段的核酸。所述核酸因此可以编码任何上述蛋白质和肽片段。核酸可以例如是DNA、RNA、LNA、HNA、PNA，优选核酸是DNA或RNA。

[0349] 本发明的核酸可以包括在任何合适的载体(vector)如表达载体内。许多载体是可用的，本领域技术人员将能够选择用于特定目的的有用载体。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒颗粒或人工染色体的形式。可以通过多种方法将适当的核酸序列插入载体中，例如，可以使用本领域众所周知的技术将DNA插入合适的限制性内切核酸酶位点中。除了根据本发明的核酸序列之外，载体还可以包含一个或多个信号序列、复制起点、一个或多个标志物基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。载体还可以包含另外的序列，例如增强子、多聚A尾、接头、多聚接头、可操作接头、多克隆位点(MCS)、终止密码子、内部核糖体进入位点(IRES)和用于整合的宿主同源序列或其他定义的元件。用于工程改造核酸构建体的方法是本领域众所周知的(参见例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Sambrook等人,eds.,Cold Spring Harbor Laboratory,第二版,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989)。载体优选表达载体，其包含与指导核酸在合适细胞中表达的调控核酸序列可操作连接的核酸。在本发明的范围内，所述调控核酸序列通常应该能够指导在哺乳动物细胞、优选人细胞中、更优选在抗原呈递细胞中表达。

[0350] 在一个优选实施方案中，载体是病毒载体。载体还可以是细菌载体，例如减毒细菌载体。可以使用减毒细菌载体以诱导感染和持续部位的持久粘膜免疫应答。不同的重组细菌可以用作载体，例如细菌载体可以选自沙门氏菌(Salmonella)、乳球菌(Lactococcus)和李斯特氏菌(Listeria)。一般而言，可以显示对异源抗原HPV16L1或E7的免疫诱导，在小鼠中具有强烈的CTL诱导和肿瘤消退。载体还可以包含编码T细胞刺激性多肽的核酸.

[0351] 负载的APC

[0352] 在有用的实施方案中，直接针对癌症疾病的免疫原性应答是通过施用本发明的肽而引发的，所述施用是通过负载MHC I类或II类分子到来自个体的抗原呈递细胞(APC)上、通过从个体分离PBL并孵育细胞与肽然后将细胞注射回个体或通过从个体分离前体APC并使用细胞因子和抗原将细胞分化成专职APC然后将细胞注射回个体。

[0353] 因此本发明的一个方面是提供包含抗原呈递细胞的疫苗组合物,所述抗原呈递细胞包含CCL22或其免疫活性肽片段或编码所述蛋白或所述免疫活性肽片段的核酸。抗原呈递细胞可以是能够将抗原呈递给T细胞的任何细胞。优选的抗原呈递细胞是树突细胞。树突细胞(DC)可根据例如如下文所述的任何合适的方案制备并用于治疗过程。本领域技术人员将会理解,该方案可以被采用以用于具有不同HLA类型和不同疾病的个体。

[0354] 树突细胞(DC)可以在37℃下用50μg/ml HLA-限制性肽(以GMP品质合成)脉冲1小时,并且在第1天和第14天皮下施用$5x10^6$个细胞,随后每4周一次,5次接种后进行额外的白细胞单采术。用于临床使用和质量控制的DC的产生可以基本上如Nicolette等(2007)中所述进行。

[0355] 因此,在本发明的一个实施方案中,治疗罹患特征在于CCL22表达的临床病症的个体的方法(优选其中临床病症是癌症或感染)是这样的方法,其中通过将肽离体呈递至个体的抗原呈递细胞(APC)然后通过将如此经处理的APC注射回个体来施用该肽。至少有两种可供选择的方式来执行此操作。一种可供选择的方式是从个体分离APC并用肽孵育(负载)MHC I类分子。负载MHC I类分子是指用肽孵育APC,使得特异性针对该肽的具有MHC I类分子的APC会结合该肽并因此能将其呈递给T细胞。随后,APC重新注射给个体。另一种可供选择的方式依赖于最近在树突细胞生物学领域取得的发现。在这种情况下,从个体分离单核细胞(其为树突细胞前体)并通过使用细胞因子和抗原将其体外分化成专职APC(或树突细胞)。随后,用肽脉冲体外生成的DC并注射给个体。

[0356] 过继免疫疗法/过继转移

[0357] 本发明的一个重要方面涉及在体外培养CCL22特异性T细胞并将它们过继转移给个体。过继转移意味着医生直接将已经能够产生特异性免疫应答的免疫系统的实际组分转移给个体。

[0358] 本发明的一个目的是提供CCL22特异性T细胞,其可用于例如过继转移。包含能够特异性结合CCL22肽/MHC I类或CCL22肽/MHC II类复合物的T细胞受体的分离的T细胞可过继转移至个体,所述T细胞优选为体外扩增的T细胞,其中CCL22肽可以是上文提到的CCL22的任何免疫原性活性肽片段。体外扩增T细胞的方法是技术人员众所周知的。本发明还涉及治疗方法,所述方法包括将包含能够与MHC-限制性CCL22肽复合物特异性结合的T细胞受体的T细胞施用于个体,诸如罹患癌症疾病的人,其中CCL22衍生的肽可以是上文提到的任何CCL22肽。本发明还涉及包含能够特异性结合CCL22或其肽片段的T细胞受体的T细胞在制备用于治疗癌症或感染的药物中的用途。基本上如Walter等人(1995)中所述进行自身T细胞转移。

[0359] TCR转移

[0360] 在又一个实施方案中,这样的T细胞可以被辐照,然后过继转移以控制个体中的增殖。可以通过TCR基因转移基因工程改造T细胞的特异性(Engels等人,2007)。这允许将携带CCL22肽特异性的T细胞转移到个体中。通常,T细胞用于过继免疫疗法的用途是有吸引力的,因为它允许T细胞在无肿瘤或无病毒的环境中扩增,并且在输注之前分析T细胞功能。TCR基因修饰的T细胞(例如用指导表达异源TCR的表达构建体转化的T细胞)在过继转移中的应用与T细胞系转移相比具有几个优点:(i)重定向T细胞的产生通常是可用的。(ii)能够选择或产生高亲和力或非常高亲和力的TCR并用于工程改造T细胞。(iii)能够使用密码子

优化的或鼠源化的TCR来产生高亲和力T细胞，从而允许稳定的TCR更好地表面表达。可以基本上如Morgan等人2006中所述进行由T细胞受体(TCR)基因转移基因工程改造T细胞特异性。

[0361] TCR转染

[0362] 具有已知的抗肿瘤反应性的TCR能够被遗传导入原代人T淋巴细胞。编码来自肿瘤特异性CTL克隆的TCRα和β链的基因能够被转染入原代T细胞，并以这种方式重编程T细胞以具有针对肿瘤抗原的特异性。通过电穿孔将TCR RNA转染入PBL(Schaft等人,2006)。或者，可以通过TCR基因转移使用逆转录病毒载体给T细胞提供新的特异性(Morgan等人,2006)。然而，来自逆转录病毒载体的原病毒可能随机整合到转染细胞的基因组中，并随后干扰细胞生长。用TCR编码RNA电穿孔T细胞克服了这个缺点，因为RNA只是瞬时存在于转染的细胞中，不能整合到基因组中(Schaft等人,2006)。此外，细胞的转染是常规在实验中使用的。

[0363] 佐剂和载体

[0364] 根据本发明的疫苗组合物优选包含佐剂和/或载体。有用的佐剂和载体的实例给出于本文下文中。因此，CCL22多肽、CCL22的免疫原性活性肽片段或其功能同系物、包含它们的多肽或编码它们的核酸可以在本发明的组合物中与佐剂和/或载体联合。

[0365] 佐剂是其混入疫苗组合物中的任何物质，其增加或以其他方式改变针对CCL22或CCL22的免疫原性活性肽片段的免疫应答，参见下文。载体是支架结构，例如多肽或多糖，CCL22或其肽片段能够与其联合并且其帮助呈递特别是本发明的肽。

[0366] 本发明的许多肽是相对小的分子，因此如本文所述的组合物中可能需要组合肽与各种材料如佐剂和/或载体以产生疫苗、免疫原性组合物等。佐剂广泛定义为促进免疫应答的物质。在Goding,Monoclonal Antibodies:Principles&Practice(第二版,1986)第61-63页提供了佐剂的一般性讨论。Goding指出，当目标抗原分子量低或免疫原性差时，建议与免疫原性载体偶联。这样的载体分子的实例包括钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白和鸡免疫球蛋白。也已经提出各种皂苷提取物可用作免疫原性组合物中的佐剂。已经提出使用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(一种众所周知的细胞因子)作为佐剂(WO 97/28816)。

[0367] 载体可以独立于佐剂存在。载体的功能可以例如是增加特别是肽片段的分子量以提高它们的活性或免疫原性，以赋予稳定性，以提供生物学活性，或者以增加血清半衰期。此外，载体可以帮助呈递CCL22蛋白、其多肽、功能同系物或肽片段给T细胞。载体可以是本领域技术人员已知的任何合适的载体，例如蛋白质或抗原呈递细胞。载体蛋白可以是但不限于钥孔血蓝蛋白、血清蛋白如转铁蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白或卵清蛋白、免疫球蛋白或激素如胰岛素或棕榈酸。对于人的免疫接种，载体必须是对于人可接受且安全的生理学可接受的载体。然而，在本发明的一个实施方案中，破伤风类毒素和/或白喉类毒素是合适的载体。或者，载体可以是葡聚糖例如琼脂糖。

[0368] 因此，本发明的一个方面是组合物中存在的CCL22蛋白、由其衍生的多肽片段、变体或肽与载体例如上述蛋白质或抗原呈递细胞例如树突细胞(DC)联合。

[0369] 佐剂可以例如选自由以下组成的组：$AlK(SO_4)_2$、$AlNa(SO_4)_2$、$AlNH_4(SO_4)$、二氧化硅、明矾、$Al(OH)_3$、$Ca_3(PO_4)_2$、高岭土、碳、氢氧化铝、胞壁酰二肽、N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酰-D-异谷氨酰胺(thr-DMP)、N-乙酰-去甲胞壁酰(nornuramyl)-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺

(CGP 11687、也称为nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1’2’-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(CGP 19835A、也称为MTP-PE)、RIBI(MPL+TDM+CWS)于2%角鲨烯/Tween-80.RTM.乳液中、脂多糖及其各种衍生物、包括脂质A、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂、Merck Adjuvant 65、多核苷酸(例如多聚IC和多聚AU酸)、来自结核分枝杆菌(Mycobacterium、tuberculosis)的蜡D、短小棒状杆菌(Corynebacterium parvum)、百日咳鲍特菌(Bordetella pertussis)、和属rucella的成员中发现的物质、Titermax、ISCOMS、Quil A、ALUN(参见US 58767或5,554,372)、脂质A衍生物、霍乱毒素衍生物、HSP衍生物、LPS衍生物、合成肽基质或GMDP、白介素1、白介素2、Montanide ISA-51和QS-21。用于本发明的优选佐剂包括基于油/表面活性剂的佐剂,例如Montanide佐剂(可获得自Seppic,Belgium),优选Montanide ISA-51。其他优选佐剂是基于细菌DNA的佐剂,如包括CpG寡核苷酸序列的佐剂。又一个优选佐剂是基于病毒dsRNA的佐剂,如多聚I:C。咪唑并苯胺(imidazochiniline)是优选佐剂的又一个实例。最优选的佐剂是适合于人使用的佐剂。

[0370] Montanide佐剂(均可获得自Seppic,Belgium)可以选自由Montanide ISA-51,Montanide ISA-50、Montanide ISA-70、Montanide ISA-206、Montanide ISA-25、Montanide ISA-720、Montanide ISA-708、Montanide ISA-763A、Montanide ISA-207、Montanide ISA-264、Montanide ISA-27、Montanide ISA-35、Montanide ISA 51F、Montanide ISA 016D和Montanide IMS组成的组,优选选自由Montanide ISA-51、Montanide IMS和Montanide ISA-720组成的组,更优选选自由Montanide ISA-51组成的组。Montanide ISA-51(Seppic,Inc.)是基于油/表面活性剂的佐剂,其中不同的表面活性剂与不可代谢的矿物油、可代谢的油或两者的混合物组合。它们被制备成与包含CCL22或其肽片段的水溶液一起用作乳液。表面活性剂是二缩甘露醇油酸酯。QS-21(Antigenics;Aquila Biopharmaceuticals,Framingham,MA)是高度纯化的、水溶性皂苷,可作为水溶液处理。QS-21和Montanide ISA-51佐剂可以提供与无菌一次性使用的小瓶中。

[0371] 众所周知的细胞因子GM-CSF是本发明的另一优选佐剂。GM-CSF已经被用作佐剂十年了并且优选如WO 97/28816中所述的GM-CSF。

[0372] 下表列出了根据本发明能够使用的佐剂的理想功能。

[0373] 表3:佐剂作用模式

[0374]

作用	佐剂类型	好处
1.免疫调节	通常是修饰细胞因子网络的小分子或蛋白质	上调免疫应答。选择 Th1 或 Th2
2.呈递	通常为两性分子或复合物，其与天然构象的免疫原相互作用	提高中和抗体应答。应答持续时间更长
3.CTL 诱导	● 可以结合或包裹免疫原并可以与细胞膜融合或破坏细胞膜的颗粒	蛋白质的胞质加工产生正确的 1 类限制性肽
	● w/o 乳液，用于将肽直接附着至细胞表面 MHC-1	如果混杂肽已知则为简单的过程

[0375]

4.靶向	● 与免疫原结合的微粒佐剂。饱和库普弗细胞的佐剂	有效使用佐剂和免疫原
	● 碳水化合物佐剂，其靶向巨噬细胞和 DC 上的凝集素受体	同上。如果是靶向选择性的，还可以确定应答类型
5. 储库生成（Depot Generation）	● 用于短期的 w/o 乳液	效率
	用于长期的微球或纳米球	单剂量疫苗的潜力

[0376] 来源:Cox,J.C.和Coulter,A.R.(1997).Vaccine 15,248-56.

[0377] 根据本发明的疫苗组合物可以包含多于一种佐剂。此外，本发明包括治疗组合物，其进一步包含包括任何上述物质或其组合的任何佐剂物质和/或载体。还预期CCL22蛋白、其变体或肽片段和佐剂可以以任何合适的顺序分开施用。优选地，本发明的疫苗组合物包含Montanide佐剂，例如Montanide ISA 51或Montanide ISA 720或GM-CSF佐剂。

[0378] 因此，本发明包括治疗组合物，其进一步包含包括任何上述物质或其组合的任何佐剂物质。还预期抗原即本发明的肽和佐剂可以同时或以任何合适的顺序分开施用。

[0379] 剂量与施用

[0380] 取决于具体应用，本发明的CCL22或CCL22的免疫原性活性肽片段在疫苗组合物中的量可以变化。然而，单剂量的肽组合物优选约10μg至约5000μg，更优选约50μg至约2500μg，例如约100μg至约1000gμ中的任何量。具体而言，在待治疗个体为人类的本发明的实施方案中，单剂量可以范围为50μg至500μg，例如范围为80μg至300μg，例如范围为100μg至250μg的CCL22或CCL22的所述免疫活性肽片段。通常，疫苗组合物随着时间重复施用。例如，疫苗组合物可以施用至少2次，优选至少5次，更优选至少10次，例如10至20次。疫苗组合物也可以连续施用。可以以任何有用的频率重复施用。因此，例如疫苗组合物可以每周施用一次，例如每两周一次，例如每3周一次，例如每月一次，例如每两个月一次，例如每三个月一次，例如每半年一次，例如每年一次。具体而言，疫苗组合物可以连续施用。在所述时间内，施用频率可能会改变。在一个实施方案中，疫苗组合物每1至3个月连续施用一次。施用模式包括

皮内、皮下和静脉内施用，以定时释放制剂形式植入等。本文涵盖本领域已知的任何和所有形式的施用。还涵盖本领域已知适于配制可注射免疫原性肽组合物的任何和所有常规剂型，例如冻干形式和溶液、悬浮液或乳液形式，如果需要，其含有常规的药学上可接受的载体、稀释剂、防腐剂、佐剂、缓冲组分等。

[0381] 可以使用本领域技术人员已知的任何常规方案来制备和施用药物组合物。在实施例中，给出3-5个根据本发明的疫苗组合物的制备的非限制性实例以及诸如疫苗的施用的非限制性实例。本领域技术人员将会理解，该方案可以容易地被改编以适合本文所述的任何疫苗组合物。在本发明的另一实施方案中，本发明的药物组合物可用于治疗罹患以CCL22表达为特征的临床病症如癌症和感染的个体。

[0382] 本发明组合物的免疫保护作用可以使用本领域技术人员已知的几种方法来确定。成功的免疫应答也可以通过在免疫接种后发生DTH反应和/或检测特异性识别疫苗组合物的肽的抗体来确定。

[0383] 可以治疗有效量向个体施用根据本发明的疫苗组合物。有效量可能因各种因素而异，例如个体的病症、体重、性别和年龄。其他因素包括施用模式。

[0384] 药物组合物可以通过多种途径例如皮下、局部、口服和肌内提供给个体。药物组合物的施用通过口服或肠胃外实现。肠胃外递送的方法包括局部、动脉内(直接到组织)、肌肉内、皮下、髓内、鞘内、心室内、静脉内、腹膜内或鼻内施用。本发明的目的还在于提供用疫苗组合物预防和治疗的方法中使用的合适的局部、口服、全身和肠胃外药物制剂。

[0385] 例如，疫苗组合物可以以诸如片剂、胶囊剂(各自包括定时释放和缓释制剂)、丸剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、酊剂、溶液、混悬剂、糖浆和乳剂的口服剂型或通过注射来施用。同样地，它们也可以静脉内(推注和输注)、腹膜内、皮下、局部(有或无阻断，topical with or without occlusion)，或肌内形式施用，所有这些均使用制药领域普通技术人员众所周知的形式。包含任何本文所述化合物的有效但无毒量的疫苗可以用作预防剂或治疗剂。还涵盖本领域已知适于配制可注射免疫原性肽组合物的任何和所有常规剂型，例如冻干形式和溶液、悬浮液或乳液形式，如果需要，其含有常规的药学上可接受的载体、稀释剂、防腐剂、佐剂、缓冲组分等。

[0386] 根据本发明的疫苗组合物的优选施用方式包括但不限于全身施用，例如静脉内或皮下施用，皮内施用，肌内施用，鼻内施用，口服施用，直肠施用，阴道施用，肺部施用和通常是任何形式的粘膜施用。此外，在本发明的范围内，本文中提及的用于任何施用形式的手段都包括在本发明中。

[0387] 根据本发明的疫苗可以施用一次，或者任意次数，例如2、3、4或5次。不止一次地施用疫苗具有加强所产生的免疫应答的效果。通过以不同于先前施用的形式或身体部分施用疫苗，可进一步加强疫苗。加强疫苗注射(booster shot)可以是同源的或者异源的加强疫苗注射。同源加强疫苗注射是其中第一次和随后的疫苗接种包含相同的构建体并且更具体而言是相同的递送媒介物、特别是相同的病毒载体。异源加强疫苗注射是其中相同构建体包含在不同病毒载体内的情况。

[0388] 第二活性成分

[0389] 本发明的一个方面是将本文提供的疫苗组合物与第二活性成分组合使用。疫苗组合物和第二活性成分的施用可以是顺序的或组合的。以上给出了用于癌症和感染的第二活

性成分的实例。另一方面，疫苗组合物可以与针对待治疗的给定临床病症的其他相关疗法组合使用。这种治疗可以包括手术、化学疗法或基因治疗、免疫刺激物质或抗体；本领域技术人员能够确定针对给定情景的适当组合治疗。

[0390] 在一些情况下，将本发明的治疗方法与进一步的医疗治疗如化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质治疗、基因治疗、抗体和/或抗生素治疗和使用树突细胞治疗相结合将是适当的。

[0391] 监测免疫接种

[0392] 在优选的实施方案中，本发明的药物组合物是疫苗组合物。因此，感兴趣的是本发明的一个方面是监测施用了本发明疫苗组合物的个体中的免疫接种。该药物组合物因此可以是能够引发对癌症和/或感染的免疫应答的免疫原性组合物或疫苗。本文所用的表述“免疫原性组合物或疫苗”是指引发针对表达CCL22的细胞如癌症细胞、APC或DC的至少一种类型的免疫应答的组合物。因此，这样的免疫应答可以是以下任何一种：产生能够识别呈递于导致细胞溶解的细胞表面上的HLA/肽复合物的CTL的CTL应答，即疫苗在接种受试者中引发对癌细胞具有细胞毒性效应的效应T细胞的产生；导致产生抗癌抗体的B细胞应答；和/或DTH类型的免疫应答。本发明的目的是通过监测在将本发明的组合物给施用于所述个体之后的任何上述反应来监测个体的免疫接种。

[0393] 在一个方面，本公开涉及监测免疫接种的方法，所述方法包括以下步骤

[0394] i)提供来自个体的血液样品；

[0395] ii)提供CCL22或其肽片段，其中所述蛋白质或肽可以是本文所述的任何蛋白质或肽；

[0396] iii)确定所述血液样品是否包含特异性结合该蛋白或肽的抗体或包含T细胞受体的T细胞；

[0397] iv)从而确定所述个体是否已经对所述蛋白或肽产生免疫应答。

[0398] 个体优选是人，例如已经用CCL22或CCL22的免疫活性肽片段或编码所述蛋白质或肽的核酸免疫接种的人。

[0399] 套装药盒

[0400] 本发明还涉及套装药盒，其包含

[0401] • 本文所述的任何疫苗组合物，和/或

[0402] • CCL22蛋白或其功能同系物，和/或

[0403] • CCL22、其功能同系物的任何免疫原性活性肽片段，和/或衍生自如本文这里所述的肽，和/或

[0404] • 编码上述两个重点蛋白质的任何核酸，

[0405] 和关于如何使用套装药盒的说明书。

[0406] 本发明还涉及套装药盒，其包含

[0407] • 本文所述的任何疫苗组合物，和/或

[0408] • CCL22蛋白或其功能同系物，和/或

[0409] • CCL22、其功能同系物的任何免疫原性活性肽片段，和/或衍生自如本文这里所述的肽，和/或

[0410] • 编码上述两个重点蛋白质的任何核酸，

[0411] 和第二活性成分。

[0412] 优选地，根据待治疗的临床病症选择第二活性成分，使得在待治疗癌症的情况下，第二活性成分选自例如如上所列的化疗剂。同样，如果治疗微生物/病毒感染，第二活性成分优选是抗生物剂和/或抗病毒剂。

[0413] 套装药盒的组分优选包含在单独的组合物中，然而，在本发明的范围内，套装药盒的组分全部包含在相同的组合物中。因此，套装药盒的组分可以同时或以任何顺序依次施用。

[0414] 序列表

[0415]

SEQ ID NO	描述
SEQ ID NO:1	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{1-22}$
SEQ ID NO:2	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{7-15}$
SEQ ID NO:3	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{3-11}$
SEQ ID NO:4	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{3-12}$
SEQ ID NO:5	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{11-19}$
SEQ ID NO:6	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{5-13}$
SEQ ID NO:7	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{14-22}$
SEQ ID NO:8	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{8-17}$
SEQ ID NO:9	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{9-17}$
SEQ ID NO:10	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{6-15}$
SEQ ID NO:11	人CCL22的多肽片段，$CCL22_{1-24}$
SEQ ID NO:12	智人的CCL22的氨基酸序列
SEQ ID NO:13	mCL22长
SEQ ID NO:14	mCL22短
SEQ ID NO:15	鼠CCL22的全长氨基酸序列，Uniprot登录号088430
SEQ ID NO:16	共有序列

实施例

[0416] 通过以下实施例进一步说明本发明，然而这些实施例不应被解释为对本发明的限制。

[0417] 实施例1-方法

[0418] PBMC-患者材料

[0419] 从健康个体和癌症患者(黑素瘤、肾细胞癌和乳腺癌患者)收集外周血单核细胞(PBMC)。终止任何种类的抗癌治疗后至少4周抽取血样。使用Lymphoprep™分离来分离PBMC，进行HLA分型并冷冻于10％的DMSO的FCS中。新鲜卵巢腹水用70μm过滤器过滤并通过离心分离细胞(1500RPMI-1640,5min)。如果腹水含有高丰度的红细胞，则通过向细胞中加入裂解缓冲液(Ortho-Mune Lysing Solution)并孵育3-5分钟来除去它们。迅速洗去裂解缓冲液并将细胞用含10％DMSO的人血清在-140度下冷冻保存直至使用。由丹麦首都地区科学伦理委员会批准方案并根据赫尔辛基宣言的规定进行。在进入研究之前获得患者的书面知情同意书。

[0420] 抗原特异性T细胞培养物的建立

[0421] 通过用经辐照的负载有$pCCL22_{3-12}$肽的自身DC或PBMC刺激癌症患者的PBMC来建立CCL22特异性T细胞培养物。次日加入IL-7和IL-12(PeproTech,London,UK)。用负载有$pCCL22_{3-12}$肽的经辐照的自身DC,接着用负载有$pCCL22_{3-12}$肽的经辐照的自身PBMC每8天刺激培养物。肽刺激的次日加入IL-2(PeproTech,London,UK)。总共进行4次DC刺激和1次PBMC刺激。

[0422] DC的产生

[0423] 通过在37℃下在RPMI-1640中贴壁培养皿1-2小时从PBMC产生DC。在补充有10％胎牛血清的RPMI-1640中在IL-4(250U/ml)和GM-CSF(1000U/ml)存在下培养贴壁单核细胞6天。通过加入IL-β(1000U/ml)、IL-6(1000U/ml)、TNF-α(1000U/ml)和PGE_2(1ug/ml)使DC成熟。

[0424] 细胞毒性测定

[0425] 如别处所述进行CTL介导的细胞毒性的常规^{51}Cr释放测定(Andersen等人,1999)。靶细胞为在进行细胞毒性测定之前2天加入或不加入IFN-γ(100U/ml)的T2细胞(ATCC),$HLA\text{-}A2^{+}$EBV转化的B细胞系(RPMI6666),AML细胞(UKE-1和THP1)结肠癌细胞(SW480),黑素瘤细胞系(FM55-M2),乳腺癌细胞MDA-MB231。

[0426] 对于肽滴定细胞毒性测定,使用T2细胞作为靶细胞,并且对所有肽浓度使用3:1的恒定效应物与靶的比例。制备从10-2mM至10-9mM的$pCCL22_{3-12}$和$pCCL22_{3-11}$的10倍系列肽稀释液。

[0427] siRNA介导的CCL22沉默

[0428] 从Invitrogen(Invitrogen,Paisley,UK)获得用于靶向沉默CCL22的一组三个Stealth siRNA双链体(HSS109578、HSS184551、HSS184552)。对于CCL22沉默实验,使用如先前的所述电穿孔参数用CCL22siRNA转染THP-1细胞(Met等人,2011;Hobo等人,2010)。

[0429] 流式细胞检测分析

[0430] 流式细胞检测分析在FACSCanto™ II(BD Biosciences,San Jose CA,USA)上进行,细胞分选在FACSAria™(BD Biosciences,San Jose CA,USA)上进行。

[0431] 在用HIV或$pCCL22_{3-12}$肽刺激细胞5小时后,进行CCL22特异性T细胞培养物的细胞内染色(在第一小时后加入BD GolgiPlug™)。然后根据制造商的说明书对细胞表面标志物进行染色,然后通过使用固定/透化和透化缓冲液(eBioscience)洗涤和透化。使用的抗体:IFNγ-PE-Cy7,TNFα-APC,CD4-PerCP,CD8-FITC(均来自BD Biosciences)。根据制造商的说明书使用LIVE/DEAD®可固定近红外死细胞染色试剂盒对死细胞进行染色。

[0432] 对于四聚体染色和分选,除了CD4-PerCP和CD8-FITC(BD Biosciences)之外还使用PE和APC偶联的HLA-A2多聚体与HIV或$pCCL22_{3-12}$肽。通过使用先前描述的MHC肽交换技术内部生产HLA-A2多聚体(15)。

[0433] ELISPOT测定

[0434] 在本研究中,ELISPOT是根据CIP提供的指导方针进行的(http://cimt.eu/cimt/files/dl/cip_guidelines.pdf)。如先前所述,ELISPOT测定用于定量释放细胞因子(IFNγ、TNFα、IL-17A或IL-10)的肽表位特异性效应细胞(Sørensen等人,2012)。在一些实验中,PBMC在分析之前用肽体外刺激一次。在一些实验中,将10^4个自身DC添加到孔中作为抗原呈

递细胞。使用ImmunoSpot Series 2.0分析仪对点进行计数(C.T.L.-Europe,Bonn,Germany)。在一些实验中,按照制造商的说明书,通过EasySep人$CD4^+$T细胞富集试剂盒(Stem Cell technologies,Grenoble,France)分离$CD4^+$细胞。这产生了高纯度培养物(>97%$CD4^+$),其通过如下对细胞内细胞因子染色(ICS)和流式细胞检测(FCM)所述的用表面抗体染色来证实。

[0435] 将PBMC置于用IFN-γ捕获抗体(Mabtech)预涂布的ELISPOT平板(MultiScreen MAIP N45;Millipore的硝酸纤维素底96孔板)的底部,并且以5μg/ml添加肽。来自每位患者的PBMC以一式两份或一式三份形式用于肽和对照刺激。将细胞在抗原存在下在ELISPOT平板中孵育14-16小时,之后将它们洗掉并加入生物素化二抗(Mabtech)。孵育2小时后,洗去未结合的二抗并加入链霉抗生物素蛋白缀合的碱性磷酸酶(AP)(Mabtech)1小时。接下来,洗去未结合的结合酶,通过加入BCIP/NBT底物(Mabtech)使测定显色。使用Immunospot软件v5.1在CTL ImmunoSpot S6 Ultimate-V分析仪上分析显色的ELISPOT平板。应答计算为用$pCCL22_{3-12}$肽刺激的孔中平均点数与对照孔之间的差异。

[0436] 分析CCL22的表达

[0437] 根据制造商的说明,使用人CCL22/MDC DuoSet ELISA试剂盒(R&D Systems)分析来自PBMC、癌细胞系和腹水细胞培养物的细胞培养上清以及siRNA转染的THP-1细胞。

[0438] PBMC和腹水细胞的肽刺激

[0439] 将来自健康供体或癌症患者的PBMC解冻并在X-VIVO 15™(Lonza)中静置4小时,然后在含有5%人血清的X-Vivo培养基中以$2x10^6$细胞/孔置于24孔板中。向各孔中加入20μg/ml的DMSO中的$pCCL22_{3-12}$肽或无菌水中的HIV肽。向HIV对照孔中加入适量的DMSO以控制$pCCL22_{3-12}$肽的溶剂。第二天,加入IL-2至终浓度120U/ml(腹水细胞刺激360U)。在培养2或7天后收集上清样品。刺激细胞两次,然后在ELISPOT测定中进行测试。

[0440] 细胞因子表达LUMINEX

[0441] 使用Bio-Rad的Bio-Plex Pro ™人趋化因子测定分析来自用CCL22-3或HIV肽刺激的PBMC或腹水细胞的细胞培养物上清的IFN-γ、TNF-α、IL-6、IL-10和IL-1β。样品在Bio Plex 200系统上采集,并使用Bio-Plex Manager™ v6进行分析。

[0442] 统计学分析

[0443] 当比较$pCCL22_{3-12}$刺激与HIV对照时,使用t检验对来自癌症患者和健康供体的ELISA样品进行统计分析。使用相同的分析来比较$pCCL22_{3-12}$刺激后的IFN-γ、TNF-α、IL-6、IL-10表达与HIV对照。由于多个零值,使用Wilcoxon符号秩检验来对IL-10表达进行统计学分析。

[0444] 实施例2-结果

[0445] 使用SYFPEITHI数据库预测了一组CCL22衍生的HLA结合肽(www.syfpeithi.de):

[0446]

CCL22-1	ALLVVLVLL	(7-15)
CCL22-2	LQTALLVV	(3-11)
CCL22-3	RLQTALLVVL	(3-12)
CCL22-4	VLVLLAVAL	(11-19)
CCL22-5	QTALLVVLV	(5-13)
CCL22-6	LLAVALQAT	(14-22)
CCL22-7	LLVVLVLLAV	(8-17)
CCL22-8	LVVLVLLAV	(9-17)
CCL22-9	TALLVVLVL	(6-15)
CCL22长	MDRLQTALLVVLVLLAVALQAT	(1-22)
CCL22-信号	MDRLQTALLVVLVLLAVALQ ATEA	(1-24)

[0447] 通过IFNγELISPOT筛选来自癌症患者的PBMC针对这些肽表位的应答。在许多黑素瘤患者中发现了针对CCL22肽CCL22-3(SEQ ID NO:4)的特异性应答的迹象。

[0448] 用CCL22-3肽脉冲的自身DC刺激来自黑素瘤患者的PBMC。5次刺激后,发现T细胞培养物特异性识别并裂解CCL22-3脉冲的T2细胞(图3A)。

[0449] 然后通过四聚体染色分离CCL22特异性细胞并扩增,获得澄清的CCL22-3:四聚体阳性群体群(图2B)。

[0450] 通过细胞内染色评估CCL22特异性T细胞的性质和反应性,发现CD8+T细胞响应于CCL22-3肽刺激而分泌IFN-γ和TNF-α,而从CD4+T细胞未观察到反应性(图2A)。

[0451] 通过使用HLA-A2阴性和稳定转染的K562细胞作为铬释放测定中的靶(图3),显示了CCL22特异性T细胞的HLA-A2限制性反应性。

[0452] 测试CCL22特异性培养物对几种不同癌细胞(即白血病细胞(THP-1、RPMI6666、UKE-1)、结肠癌(SW480)以及乳腺癌(MDA))的反应性。

[0453] 如铬释放测定所示,与CCL22-3反应的T细胞能够识别和裂解表达CCL22的癌细胞系(图4)。我们还发现CCL22-肽特异性细胞能够裂解用和不用IFN-γ处理的各种癌细胞系(图4)。

[0454] CCL22特异性T细胞杀死靶细胞依赖于靶细胞的CCL22表达。因此,通过siRNA转染THP-1细胞降低的CCL22表达降低了T细胞介导的裂解(图5)。

[0455] 实施例3-CCL22特异性T细胞

[0456] 我们使用www.syfpeithi.de上可获得的SYFPEITHI表位预测算法筛选人CCL22蛋白的氨基酸序列以寻找可能的HLA-A2结合肽表位。有趣的是,所有得分高的表位都位于该序列的信号肽部分,其在蛋白质分泌之前被切除。得分高的CCL22衍生肽之一是RLQTALLVVL,以下称为pCCL22$_{3-12}$。为了表征pCCL22$_{3-12}$特异性T细胞,我们从黑素瘤患者获得PBMC,并使用用pCCL22$_{3-12}$肽脉冲的自身DC或PBMC刺激这些细胞。经过五次刺激后,我们进行了pCCL22$_{3-12}$-四聚体染色,其显示了小而不同的四聚体阳性细胞群(图2A,左)。使用快速扩增方案成功分离和扩增四聚体阳性群体(图2B,右)。在扩增的培养物中,我们进行了对肽刺激响应的INFγ和TNFα的细胞内染色。响应于pCCL22$_{3-12}$肽刺激,约30%的CD8$^+$细胞分泌IFNγ和TNFα(图2A)。只有CD8$^+$T细胞响应于pCCL22$_{3-12}$肽分泌INFγ和TNFα,而从CD4$^+$T细胞

检测不到应答。在四聚体分离和扩增之前，发现了与细胞内染色相同的结果(数据未显示)。

[0457] 实施例4-pCCL22$_{3-12}$-特异性T细胞展示HLA-A2限制性杀死

[0458] 接下来，我们检查了CCL22特异性T细胞的细胞毒性能力。pCCL22$_{3-12}$特异性T细胞能够裂解pCCL22$_{3-12}$-脉冲的T2细胞，但不识别用来自HIV的阴性对照肽脉冲的T2细胞(图3A)。为了证实CCL22特异性T细胞的HLA-A2限制性反应性，我们使用经过和不经过pCCL22$_{3-12}$脉冲的HLA-A2转染的K562细胞作为靶(图3B)，发现T细胞仅识别用pCCL22$_{3-12}$脉冲的K562-A2细胞。作为另外的对照，我们检查了未转染的HLA阴性K562细胞，确定即使用pCCL22$_{3-12}$脉冲时这些细胞也不被pCCL22$_{3-12}$特异性T细胞识别。

[0459] 我们进一步检查了pCCL22$_{3-12}$表位是否可以从CCL22蛋白的22聚体信号肽序列(称为CCL22-信号肽;MDRLQTALLVVLVLLAVALQAT)交叉呈递。事实上，pCCL22$_{3-12}$特异性T细胞溶解了用CCL22-信号肽脉冲的T2细胞(图3C)，表明即使在这些细胞中没有TAP表达，T2细胞也可以交叉呈递pCCL22$_{3-12}$表位。然后，我们检查了pCCL22$_{3-12}$特异性T细胞对比pCCL22$_{3-12}$短一个氨基酸的pCCL22$_{3-11}$肽(RLQTALLVV)的T细胞亲和力，并且通过计算机算法预测以高亲和力结合HLA-A2。尽管T细胞针对两种肽均有反应，但它们对十聚体pCCL22$_{3-12}$表位表现出最高的亲和力(图3D)。

[0460] 实施例5-针对表达CCL22的癌细胞的细胞毒性

[0461] 测试CCL22特异性细胞毒T细胞淋巴细胞(CTL)培养物对白血病细胞系THP-1、RPMI6666、UKE-1和SET-2;结肠癌细胞系SW480;乳腺癌细胞系MDA;和黑素瘤细胞系FM55-M2的反应性。PCR分析揭示除FM55-M2(数据未显示)以外的所有这些细胞系中的CCL22表达，尽管SET-2仅显示弱带。我们发现，在用和没有用干扰素-γ(IFN-γ)预处理的情况下，pCCL22$_{3-12}$特异性细胞溶解了大部分研究的癌细胞系(图4A-E)。据报道IFN-γ诱导癌细胞系中的CCL22表达，并增加HLA的表面表达。铬释放测定显示SET-2细胞未被杀死，其在PCR上仅为CCL22 mRNA弱阳性(图4F)。另外，黑素瘤细胞系FM55-M2在PCR上没有显示CCL22 mRNA，并且这些细胞不被CCL22特异性CTL溶解(数据未显示)。为了证实CCL22特异性CTL对癌细胞的杀伤确实依赖于CCL22表达，我们使用siRNA转染来抑制IFNγ预处理的THP-1细胞中的CCL22表达。该转染将这些细胞从T细胞介导的裂解中拯救出来(图4G)。图4H描绘了通过ELISA从上清测量的siRNA转染后THP-1细胞中的CCL22抑制。

[0462] 实施例6-针对CCL22的自发T细胞应答

[0463] 我们接下来从13个癌症患者和10个健康个体获得PBMC，并且在低剂量IL-2存在下用pCCL22$_{3-12}$肽刺激这些细胞两周。我们使用IFN-γ酶联免疫点(ELISPOT)测定来分析针对pCCL22$_{3-12}$肽的反应性。在多种黑色素瘤患者和健康供体中检测到针对pCCL22$_{3-12}$的自发特异性T细胞反应性(图8A)。值得注意的是，在健康供体和癌症患者中总体反应似乎相似(图8B)。

[0464] 实施例7-T细胞介导的CCL22水平在微环境中下降

[0465] 然后在IL2存在下用pCCL22$_{3-12}$肽刺激在ELISPOT中显示pCCL22$_{3-12}$应答的供体PBMC两次。接下来，使用HLA-A2/pCCL22$_{3-12}$-四聚体和磁珠耗尽培养物的pCCL22$_{3-12}$-反应性T细胞。该T细胞耗尽培养物分成两部分，并将HLA-A2/pCCL22$_{3-12}$-四聚体分离的T细胞加回到其中一个部分(图8C)。我们然后监测两种培养物上清中的CCL22浓度。值得注意的是，仅在一天后加入pCCL22$_{3-12}$特异性T细胞的培养物中CCL22水平较低，并且这种差异随着培养时间

而增加。九天的培养之后，与四聚体富集培养物相比，四聚体耗尽培养物中的CCL22浓度几乎高三倍(图8D)。

[0466] 实施例8-pCCL22$_{3-12}$刺激降低微环境中的CCL22水平

[0467] 为了模拟癌症患者接种CCL22衍生肽的环境，我们体外用pCCL22$_{3-12}$肽表位和IL-2刺激PMBC。我们然后调查pCCL22$_{3-12}$特异性T细胞的这种激活是否影响PMBC中总体CCL22浓度。首先，使用pCCL22$_{3-12}$肽刺激在ELISPOT中显示出pCCL22$_{3-12}$应答的供体PBMC，并且我们在一周内测量了上清中的CCL22浓度(图9A)。与用HIV对照肽刺激的培养物相比，在用pCCL22$_{3-12}$肽刺激的培养物中CCL22的表达较低。这种差异在培养两天后明显并且在一周后达到显著水平(P＝0.01)．

[0468] 我们随后使用pCCL22$_{3-12}$肽或HIV对照肽刺激来自11个健康供体和13个癌症患者的PBMC，然后在刺激后一周测量上清中的CCL22浓度。在来自健康供体的PBMC中，在用pCCL22$_{3-12}$肽刺激后，CCL22浓度显著降低(P＝0.02)(图9B)。另一方面，在来自癌症患者的PBMC中，用pCCL22$_{3-12}$刺激后的CCL22浓度的总体降低没有达到显著性(P＝0.17)(图9C)。当根据低CCL22表达(≤2000pg/mL)和高CCL22表达(≥5000pg/mL)将来自癌症患者的PBMC区分时(图9C)，高表达组显示pCCL22$_{3-12}$刺激后CCL22浓度的显著降低(P＝0.005)。

[0469] 据报道，卵巢腹水含有癌细胞和免疫浸润细胞的混合物，以及高水平的CCL22。为了检测pCCL223-12特异性T细胞是否可能直接影响肿瘤微环境中的CCL22浓度，我们收集了5例HLA-A2阳性上皮性卵巢癌患者的腹水，并分离出腹水细胞。其中两个患者的腹水细胞活力低下，因此我们只能分析三个患者的细胞。来自这些患者之一的腹水细胞不包含任何T淋巴细胞。用剩余的两个卵巢癌患者的腹水细胞用pCCL22$_{3-12}$肽刺激，这导致刺激后一周时上清中总CCL22水平降低(图9D)。

[0470] 实施例8-pCCL22$_{3-12}$刺激影响细胞因子水平

[0471] 我们进一步检查了与HIV对照肽相比来自11个癌症患者和10个健康供体的PBMC上清的细胞因子水平在用pCCL223-12肽刺激一周后的变化。来自用CCL22肽刺激的癌症患者的PBMC显示IL-6水平显著增加(P＝0.02)。在来自健康供体的PBMC培养物中观察到类似的增加，尽管这种改变没有达到显著性(P＝0.06)(图10A)。我们还观察到来自健康供体(10个中的7个)和癌症患者(11个中的7个)的PBMC培养物中TNFα水平降低的趋势；然而，这些变化没有达到显著性(分别为P＝0.7和P＝0.16，)(图10B)。我们进一步检查了培养上清中IL-1β、IL-10和IFN-γ的浓度。我们检测到在用pCCL22$_{3-12}$肽刺激的培养物与对照肽之间的这些细胞因子中没有明确的差异。刺激之后，IL-10在上清液中几乎检测不到，并且仅在一个癌症患者和两个健康供体(数据未显示)中，在用pCCL22$_{3-12}$刺激后诱导IL-1β。

[0472] 实施例9-结论

[0473] 我们目前的发现证明特异性T细胞可能靶向表达CCL22的细胞。

[0474] 我们证明了T细胞有可能识别HLA限制性CCL22来源的肽表位，因此我们能够通过体外用CCL22肽再刺激PBMC来扩增CCL22特异性T细胞。我们的铬释放细胞毒性测定的结果进一步证明了表达CCL22的癌细胞(乳腺癌和结肠癌细胞和白血病细胞)的特异性识别和裂解。此外，通过siRNA转染的CCL22敲低拯救了被CCL22特异性T细胞杀死的细胞。这些研究结果表明，在表达CCL22的细胞中，信号肽被降解并且表位随后被加工并呈递在限于HLA-A2分子的细胞表面上。我们还发现CCL22信号肽可被摄取并在非专职抗原呈递细胞的表面上交

叉呈递。

[0475] 我们使用ELISPOT分析来检测来自HLA-A2+癌症患者和健康个体的PBMC对CCL22衍生的T细胞表位的反应性，并发现T细胞自发地与CCL22衍生的肽反应。四聚体富集/耗尽实验显示，在PBMC中添加HLA-A2限制性CCL22特异性T细胞降低了微环境中的CCL22水平。我们进一步确定，通过肽表位刺激激活CCL22特异性T细胞显著降低来自健康供体和具有高CCL22产生的癌症患者的PMBC中的CCL22水平。这样的激活也导致了从卵巢癌患者分离的腹水来源细胞的上清中CCL22的减少。这些发现表明，CCL22特异性T细胞可用于靶向表达CCL22的细胞，从而抑制CCL22介导的Treg迁移至肿瘤微环境。

[0476] 有趣的是，通过肽刺激激活CCL22特异性T细胞也导致IL-6向PMBC上清中的释放增加，表明CCL22特异性T细胞可能影响整个促炎性微环境。ELISPOT结果显示在癌症患者和健康供体中均出现自发的CCL22特异性T细胞应答，这是有些令人惊讶的，因为CCL22在正常免疫细胞中大量表达。

[0477] 总之，我们目前的结果表明$CD8^+$T细胞可以识别HLA限制性CCL22肽表位。这些T细胞以依赖于CCL22表达的方式识别和裂解各种癌细胞系，并且天然存在于癌症患者和健康个体中。CCL22特异性T细胞的激活可能直接影响微环境中的CCL22浓度。

[0478] 实施例10-C57BL/6的鼠CC122肽疫苗接种

[0479] 小鼠

[0480] 雌性C57BL/6小鼠获得自Taconic M&B(Denmark)或Janvier(France)。在每次实验开始之前使所有小鼠适应至少一周。小鼠在约8-14周龄进入实验。该实验程序已经由丹麦国家道德委员会批准实验动物福利，并根据丹麦指导方针进行。

[0481] 肽

[0482] 两种不同的鼠CCL22肽：一种长肽，这里命名为mCCL22长(MATLRVPLLVALVLLAVAIQTS)和一个短肽，这里命名为mCCL22短(VALVLLAVAI;mCCL22长的部分)由TAG Copenhagen(Copenhagen,Denmark)合成。

[0483] 肽接种

[0484] 在DMSO中制备10mM(mCCL22短)和5mM(mCCL22长)的鼠CCL22肽(TAG Copenhagen,Denmark)储备液。在100μl总体积的1:1(体积/体积)IFA/PBS乳液中用100μg肽在下背部皮下(s.c)接种小鼠。小鼠每周接种一次，持续3周，并在最后一次接种后一周处死。

[0485] 制备脾细胞单细胞溶液

[0486] 移出处死小鼠的脾脏并通过细胞滤网(0.7μm)捣碎并用R10培养基洗涤：含10％FCS(Gibco®,Life technologies™)的RPMI 1640(Life technologies™)。通过加入红细胞裂解缓冲液2分钟裂解红细胞，然后用含10％胎牛血清的R10洗涤两次。

[0487] ELISPOT测定

[0488] 按照制造商的说明书所述进行ELISPOT。简言之，96孔MSIPN4W ELISPOT板(Millipore)在4℃下用在PBS中浓度为12μg/ml的小鼠IFNγ特异性捕获抗体(AN18;Mabtech)涂布过夜。$8x10^5$或$4x10^5$个脾细胞/孔一式三份接种于板中。为了研究对鼠CCL22肽的IFNγ应答，将细胞与不同的肽(5μM)或作为对照的R10在37℃孵育18-20小时。ELISPOT在室温下用缓冲液(PBS，0.5％BSA和NaN_3)中的浓度为1μg/ml的小鼠IFNγ特异性检测抗体(R4-6A2-生物素;Mabtech)显色2小时，随后在PBS中洗涤6次。接下来，在室温下添加在缓冲

液中的链霉抗生物素蛋白-ALP(1:1000;Mabtech)1小时。通过添加底物溶液BCIP/NBT(Mabtech)将点显色并通过在自来水中洗涤进行终止。

[0489] 通过ELISPOT酶标仪(CTL-Immunospot)分析ELISPOT。结果显示在图11中,并且显示可以使用本公开的肽在体内提高免疫应答。

[0490] 参考文献

[0491] Andersen MH,Bonfill JE,Neisig A,Arsequell G,Sondergaard I,Valencia G,等人Phosphorylated Peptides Can Be Transported by TAP Molecules,Presented by Class I MHC Molecules,and Recognized by Phosphopeptide-Specific CTL.J Immunol 1999;163:3812-8

[0492] Hobo W,Maas F,Adisty N,de WT,Schaap N,van d,V,等人siRNA silencing of PD-L1 and PD-L2 on dendritic cells augments expansion and function of minor histocompatibility antigen-specific CD8+T cells.Blood 2010;116:4501-11

[0493] Met O,Balslev E,Flyger H,Svane IM.High immunogenic potential of p53 mRNA-transfected dendritic cells in patients with primary breast cancer.Breast Cancer Res Treat 2011;125:395-406.

[0494] Morgan RA,Dudley ME,Wunderlich JR,Hughes MS,Yang JC,Sherry RM,Royal RE,Topalian SL,Kammula US,Restifo NP,Zheng Z,Nahvi A,de Vries CR,Rogers-Freezer LJ,Mavroukakis SA,Rosenberg SA.Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.Science.2006Oct 6;314(5796):126-9.电子出版2006年8月31日.

[0495] Nicolette CA,Healey D,Tcherepanova I,Whelton P,Monesmith T,Coombs L,Finke LH,Whiteside T,Miesowicz F,(2007).Dendritic cells for active immunotherapy:optimizing design and manufacture in order to develop commercially and clinically viable products.Vaccine,Sep 27;25增刊2:B47-60.电子出版2007

[0496] Nomi T,Sho M,Akahori T,Hamada K,Kubo A,Kanehiro H等人Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1ligand/programmed death-1pathway in human pancreatic cancer.Clin Cancer Res 2007;13:2151-2157.

[0497] Pilotte L,Larrieu P,Stroobant V,Colau D,Dolusic E,Frédérick R,等人Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase.Proc Natl Acad Sci U S A[Internet].2012[2013年4月6日引用];109:2497-502

[0498] Rammensee H,Bachmann J,Emmerich NP,Bachor O a,StevanovićS.SYFPEITHI:database for MHC ligands and peptide motifs.Immunogenetics[Internet].1999;50:213-9.

[0499] SørensenRB,Berge-Hansen L,Junker N,Hansen CA,Hadrup SR,Schumacher TNM,等人The immune system strikes back:cellular immune responses against indoleamine 2,3-dioxygenase.PLoS One[Internet].2009[2012年8月15日引用];4:

e6910

[0500] Toebes M,Coccoris M,Bins A,Rodenko B,Gomez R,Nieuwkoop NJ,等人Design and use of conditional MHC class I ligands.Nat Med.2006;12:246

[0501] Walter EA,Greenberg PD,Gilbert MJ,Finch RJ,Watanabe KS,Thomas ED,Riddell SR(1995).Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor.N Engl J Med.1995年10月19日;333(16):1038-44

[0502] Zeeberg Iversen T,Engell-Noerregaard L,Ellebaek E,Andersen R,Kiaer Larsen S,Bjoern J,等人Long-lasting disease stabilization in the absence of toxicity in metastatic lung cancer patients vaccinated with an epitope derived from indoleamine 2,3dioxygenase.Clin cancer Res[Internet].2013[2013年11月14日引用]。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> Herlev Hospital

[0003] <120> Vaccine compositions comprising C-C motif chemokine 22 (CCL22) or

[0004] fragments thereof

[0005] <130> P3946PC00

[0006] <160> 16

[0007] <170> PatentIn version 3.5

[0008] <210> 1

[0009] <211> 22

[0010] <212> PRT

[0011] <213> Homo sapiens

[0012] <400> 1

[0013] Met Asp Arg Leu Gln Thr Ala Leu Leu Val Val Leu Val Leu Leu Ala

[0014] 1 5 10 15

[0015] Val Ala Leu Gln Ala Thr

[0016] 20

[0017] <210> 2

[0018] <211> 9

[0019] <212> PRT

[0020] <213> Homo sapiens

[0021] <400> 2

[0022] Ala Leu Leu Val Val Leu Val Leu Leu

[0023] 1 5

[0024] <210> 3

[0025] <211> 9

[0026] <212> PRT

[0027] <213> Homo sapiens

[0028] <400> 3

[0029] Arg Leu Gln Thr Ala Leu Leu Val Val

[0030] 1 5

[0031] <210> 4

[0032] <211> 10

[0033] <212> PRT

[0034] <213> Homo sapiens

[0035] <400> 4

[0036] Arg Leu Gln Thr Ala Leu Leu Val Val Leu

[0037] 1 5 10

[0038] <210> 5

[0039] <211> 9

[0040] <212> PRT

[0041] <213> Homo sapiens

[0042] <400> 5

[0043] Val Leu Val Leu Leu Ala Val Ala Leu

[0044] 1 5

[0045] <210> 6

[0046] <211> 9

[0047] <212> PRT

[0048] <213> Homo sapiens

[0049] <400> 6

[0050] Gln Thr Ala Leu Leu Val Val Leu Val

[0051] 1 5

[0052] <210> 7

[0053] <211> 9

[0054] <212> PRT

[0055] <213> Homo sapiens

[0056] <400> 7

[0057] Leu Leu Ala Val Ala Leu Gln Ala Thr

[0058] 1 5

[0059] <210> 8

[0060] <211> 10

[0061] <212> PRT

[0062] <213> Homo sapiens

[0063] <400> 8

[0064] Leu Leu Val Val Leu Val Leu Leu Ala Val

[0065] 1 5 10

[0066] <210> 9

[0067] <211> 9

[0068] <212> PRT

[0069] <213> Homo sapiens

[0070] <400> 9

[0071] Leu Val Val Leu Val Leu Leu Ala Val

[0072] 1 5

[0073] <210> 10

[0074] <211> 9

[0075] <212> PRT

[0076] <213> Homo sapiens

[0077] <400> 10

[0078] Thr Ala Leu Leu Val Val Leu Val Leu

[0079] 1 5

[0080] <210> 11

[0081] <211> 24

[0082] <212> PRT

[0083] <213> Homo sapiens

[0084] <400> 11

[0085] Met Asp Arg Leu Gln Thr Ala Leu Leu Val Val Leu Val Leu Leu Ala

[0086] 1 5 10 15

[0087] Val Ala Leu Gln Ala Thr Glu Ala

[0088] 20

[0089] <210> 12

[0090] <211> 93

[0091] <212> PRT

[0092] <213> Homo sapiens

[0093] <400> 12

[0094] Met Asp Arg Leu Gln Thr Ala Leu Leu Val Val Leu Val Leu Leu Ala

[0095] 1 5 10 15

[0096] Val Ala Leu Gln Ala Thr Glu Ala Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Met Glu

[0097] 20 25 30

[0098] Asp Ser Val Cys Cys Arg Asp Tyr Val Arg Tyr Arg Leu Pro Leu Arg

[0099] 35 40 45

[0100] Val Val Lys His Phe Tyr Trp Thr Ser Asp Ser Cys Pro Arg Pro Gly

[0101] 50 55 60

[0102] Val Val Leu Leu Thr Phe Arg Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Arg

[0103] 65 70 75 80

[0104] Val Pro Trp Val Lys Met Ile Leu Asn Lys Leu Ser Gln

[0105] 85 90

[0106] <210> 13

[0107] <211> 22

[0108] <212> PRT

[0109] <213> Mus musculus

[0110] <400> 13

[0111] Met Ala Thr Leu Arg Val Pro Leu Leu Val Ala Leu Val Leu Leu Ala

[0112] 1 5 10 15

[0113] Val Ala Ile Gln Thr Ser

[0114] 20

[0115] <210> 14

[0116] <211> 10

[0117] <212> PRT

[0118] <213> Mus musculus

[0119] <400> 14

[0120] Val Ala Leu Val Leu Leu Ala Val Ala Ile

[0121] 1 5 10

[0122] <210> 15

[0123] <211> 92

[0124] <212> PRT

[0125] <213> Mus musculus

[0126] <400> 15

[0127] Met Ala Thr Leu Arg Val Pro Leu Leu Val Ala Leu Val Leu Leu Ala

[0128] 1 5 10 15

[0129] Val Ala Ile Gln Thr Ser Asp Ala Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Val Glu

[0130] 20 25 30

[0131] Asp Ser Ile Cys Cys Gln Asp Tyr Ile Arg His Pro Leu Pro Ser Arg

[0132] 35 40 45

[0133] Leu Val Lys Glu Phe Phe Trp Thr Ser Lys Ser Cys Arg Lys Pro Gly

[0134] 50 55 60

[0135] Val Val Leu Ile Thr Val Lys Asn Arg Asp Ile Cys Ala Asp Pro Arg

[0136] 65 70 75 80

[0137] Gln Val Trp Val Lys Lys Leu Leu His Lys Leu Ser

[0138] 85 90

[0139] <210> 16

[0140] <211> 10

[0141] <212> PRT

[0142] <213> Artificial sequence

[0143] <220>

[0144] <223> Consensus sequence

[0145] <220>

[0146] <221> MISC_FEATURE

[0147] <222> (2)..(2)

[0148] <223> X1 is V or A

[0149] <220>

[0150] <221> MISC_FEATURE

[0151] <222> (10)..(10)

[0152] <223> X2 is Ile or Leu

[0153] <400> 16

[0154] Val Xaa Leu Val Leu Leu Ala Val Ala Xaa

[0155] 1 5 10

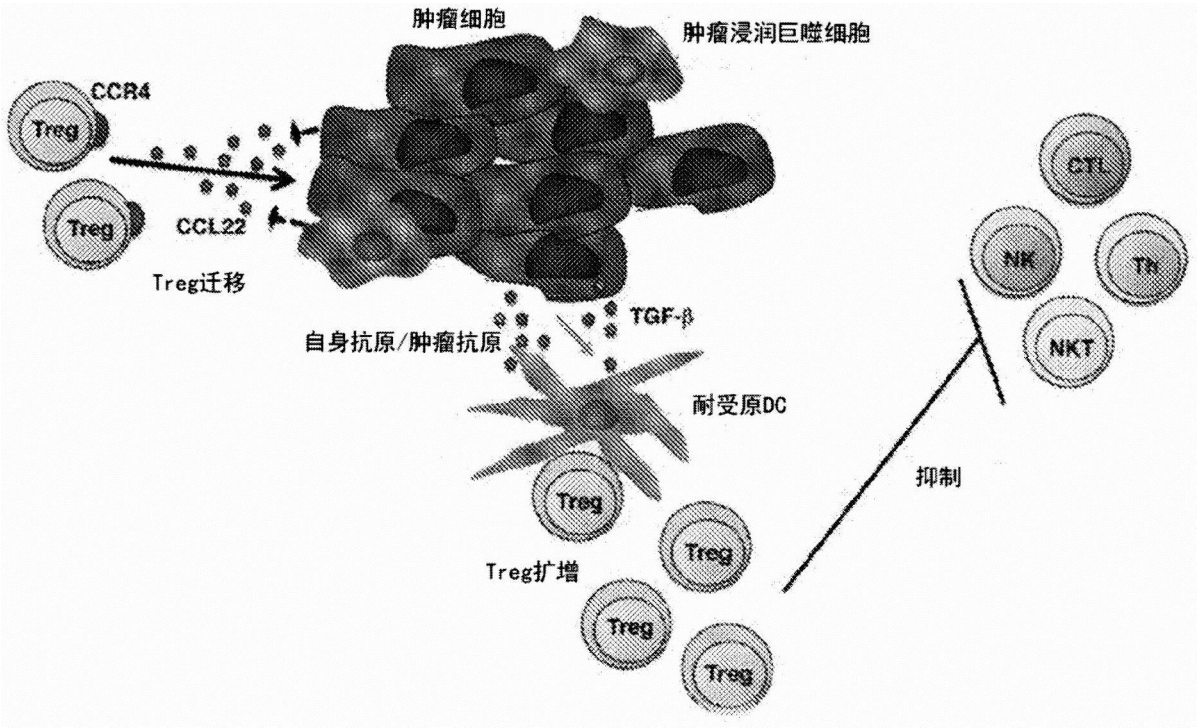
肿瘤细胞
肿瘤浸润巨噬细胞
CCR4
Treg
Treg
CCL22
Treg迁移
TGF-β
自身抗原/肿瘤抗原
耐受原DC
Treg
Treg
Treg扩增
Treg
Treg
CTL
NK
Th
NKT
抑制

图1

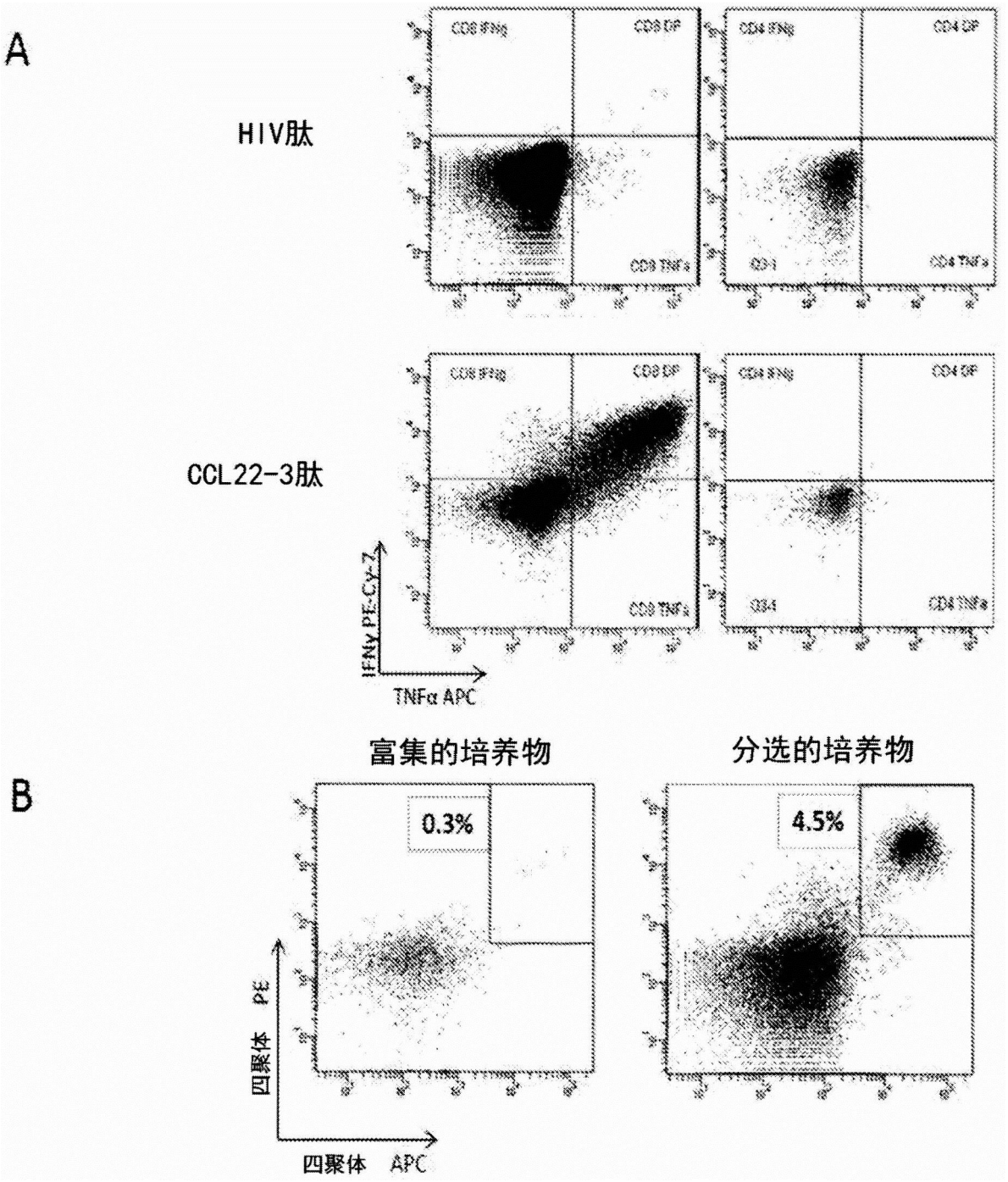
A
HIV肽
CCL22-3肽
IFNγ PE-Cy7
TNFα APC
B
富集的培养物
分选的培养物
0.3%
4.5%
四聚体 PE
四聚体 APC

图2

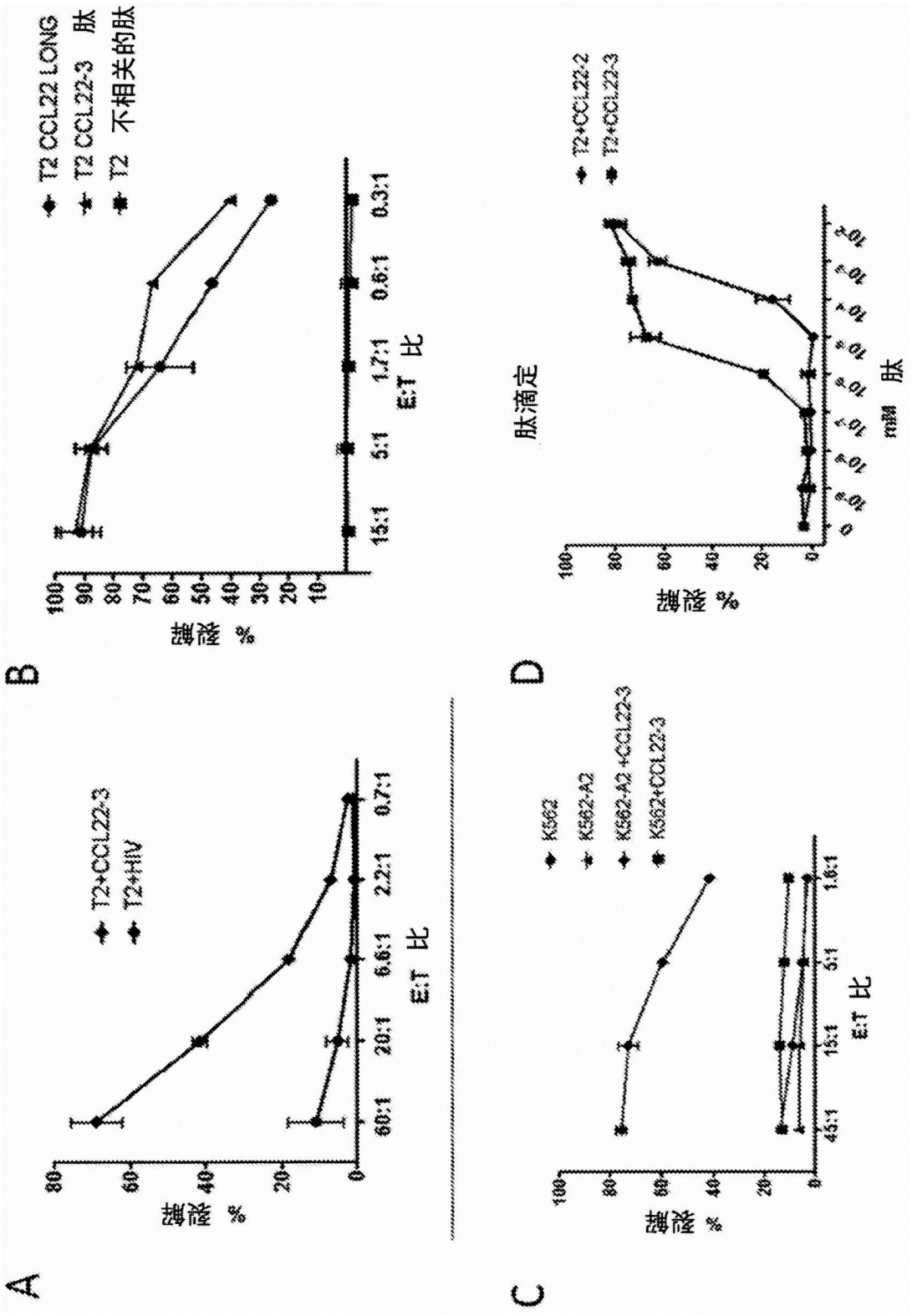
A
% 裂解
E:T 比
T2+CCL22-3
T2+HIV
60:1
20:1
6.6:1
2.2:1
0.7:1
B
% 裂解
E:T 比
T2 CCL22 LONG
T2 CCL22-3 肽
T2 不相关的肽
15:1
5:1
1.7:1
0.6:1
0.3:1
C
% 裂解
E:T 比
K562
K562-A2
K562-A2 +CCL22-3
K562+CCL22-3
45:1
15:1
5:1
1.6:1
D
% 裂解
肽滴定
T2+CCL22-2
T2+CCL22-3
nM 肽

图3

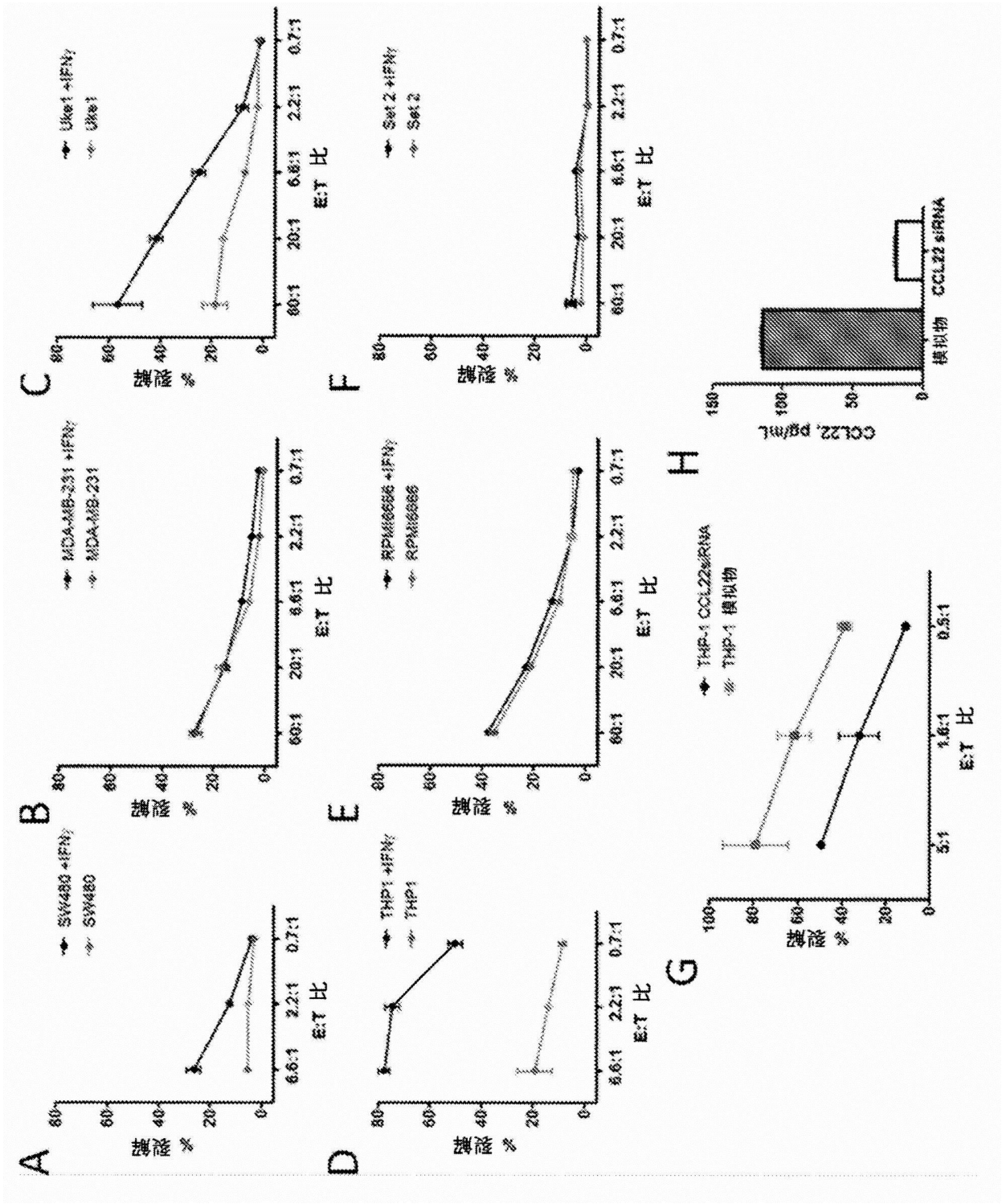
A
B
C
D
E
F
G
H
% 裂解
E:T 比
SW480 +IFNγ
SW480
MDA-MB-231 +IFNγ
MDA-MB-231
Uke1 +IFNγ
Uke1
THP1 +IFNγ
THP1
RPMI8866 +IFNγ
RPMI8866
Set 2 +IFNγ
Set 2
THP-1 CCL22siRNA
THP-1 模拟物
CCL22, pg/mL
模拟物
CCL22 siRNA

图4

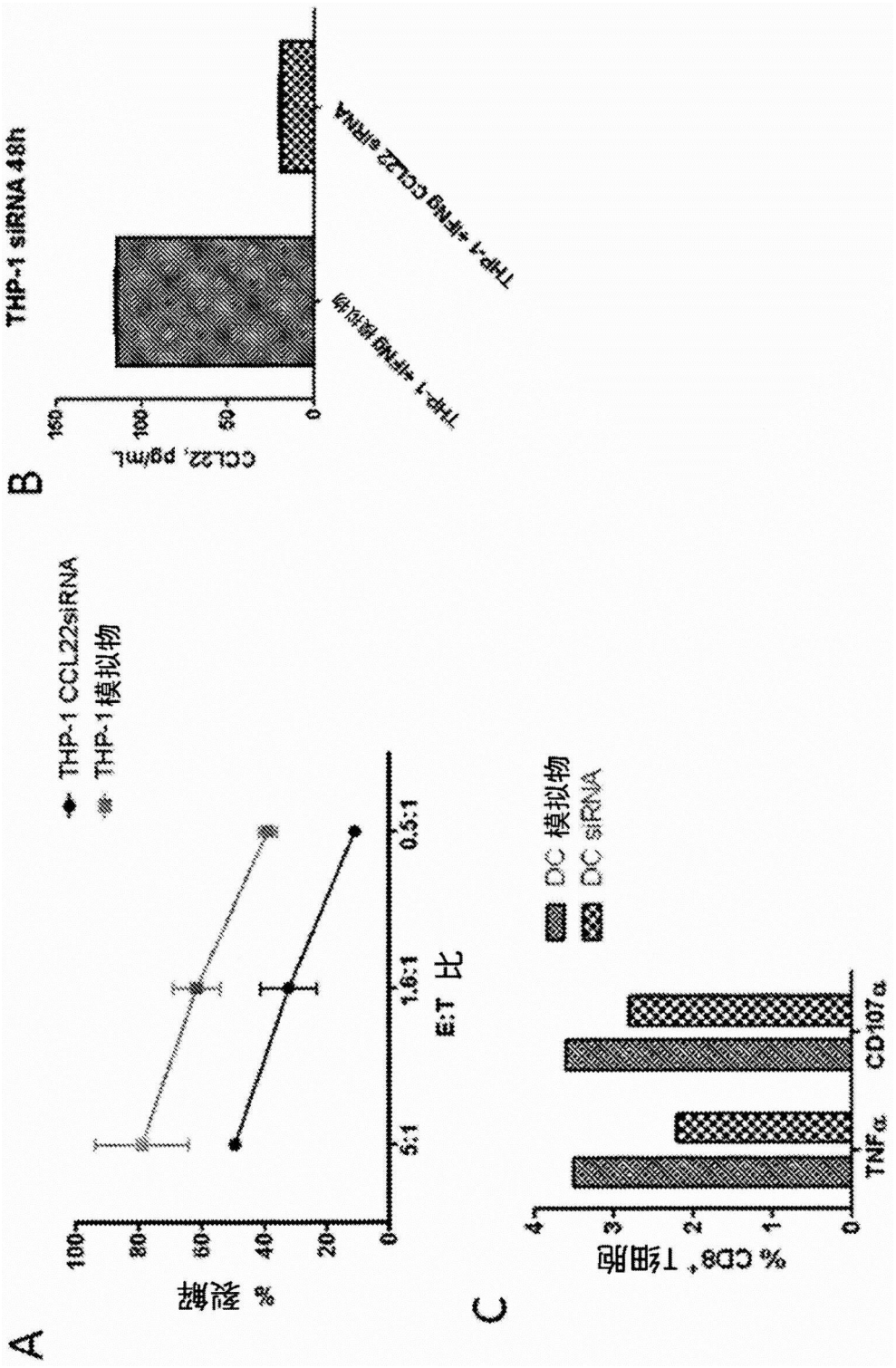
A
% 裂解
E:T 比
100:1
50:1
25:1
12.5:1
6.25:1
THP-1 CCL22siRNA
THP-1 模拟物
B
THP-1 siRNA 48h
CCL22, pg/mL
THP-1 +PEI模拟物
THP-1 +PEI CCL22 siRNA
C
DC 模拟物
DC siRNA
% CD8+ T细胞
TNFα
CD107α

图5

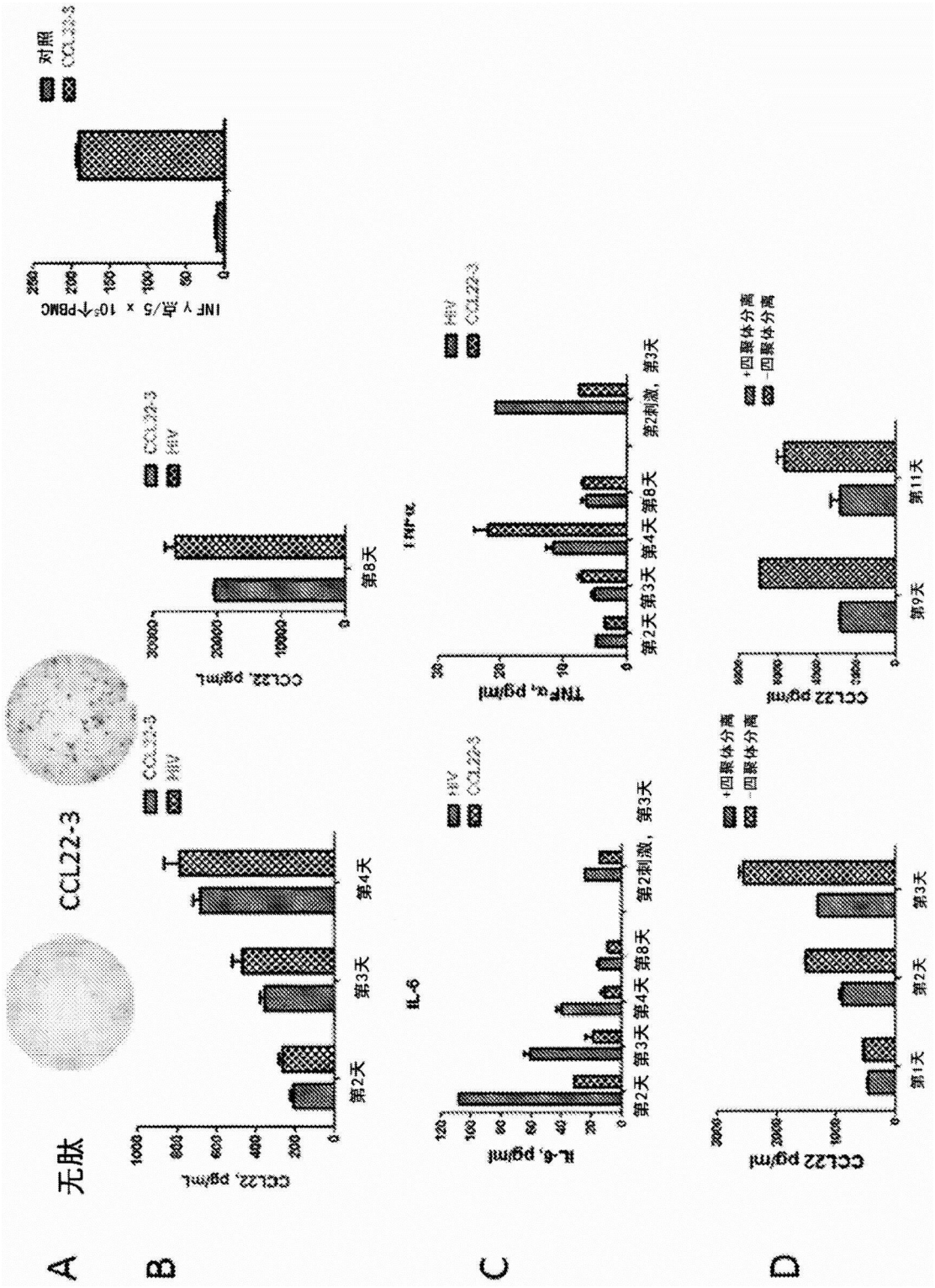
A
无肽
CCL22-3
B
CCL22, pg/mL
第2天
第3天
第4天
第8天
CCL22-3
HEV
C
IL-6
IL-6, pg/ml
第2天 第3天 第4天 第8天 第2刺激，第3天
TNFα, pg/ml
第2天 第3天 第4天 第8天 第2刺激，第3天
D
+四聚体分离
-四聚体分离
CCL22 pg/ml
第1天
第2天
第3天
第9天
第11天

图6

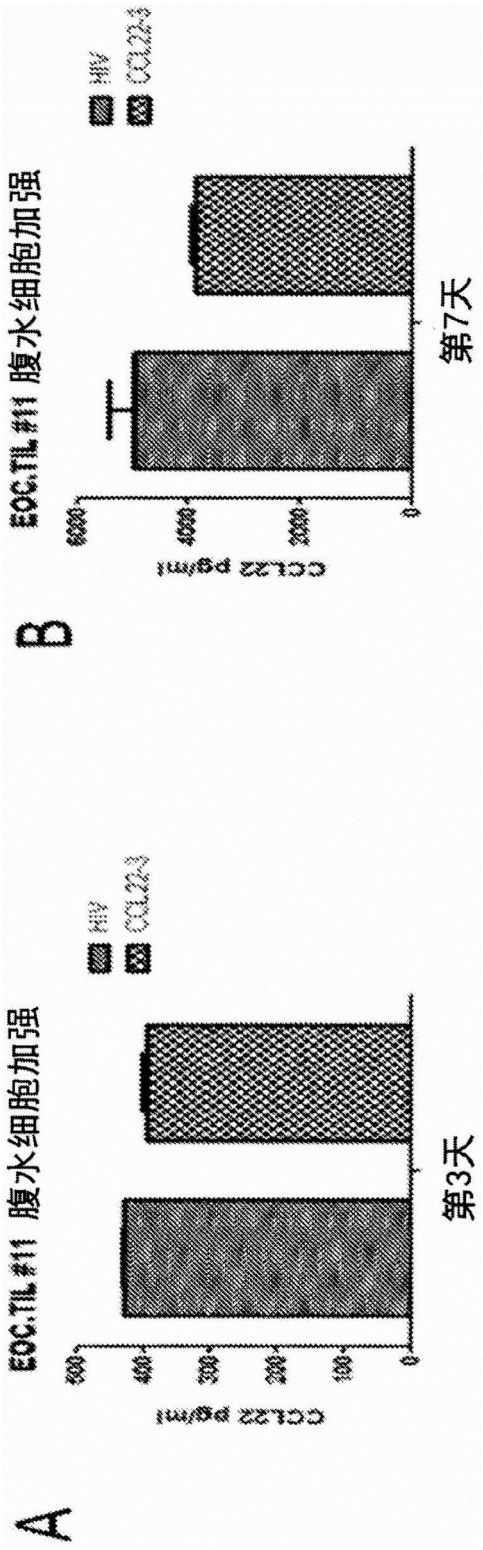
A
EOC.TIL #11 腹水细胞加强
HBV
CCL22-3
CCL22 pg/ml
600
400
200
100
0
第3天
B
EOC.TIL #11 腹水细胞加强
HBV
CCL22-3
CCL22 pg/ml
6000
4000
2000
0
第7天

图7

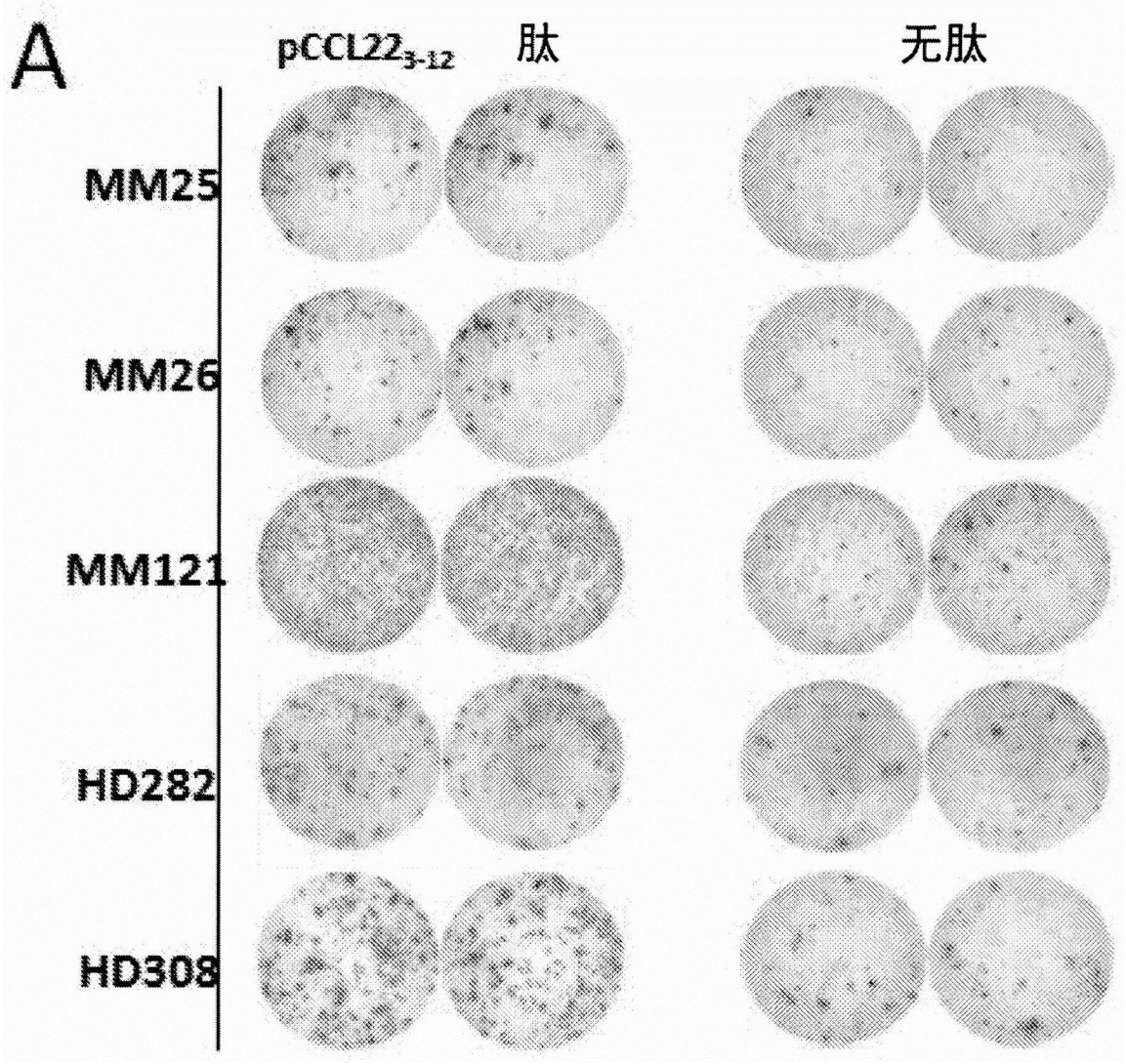

图8

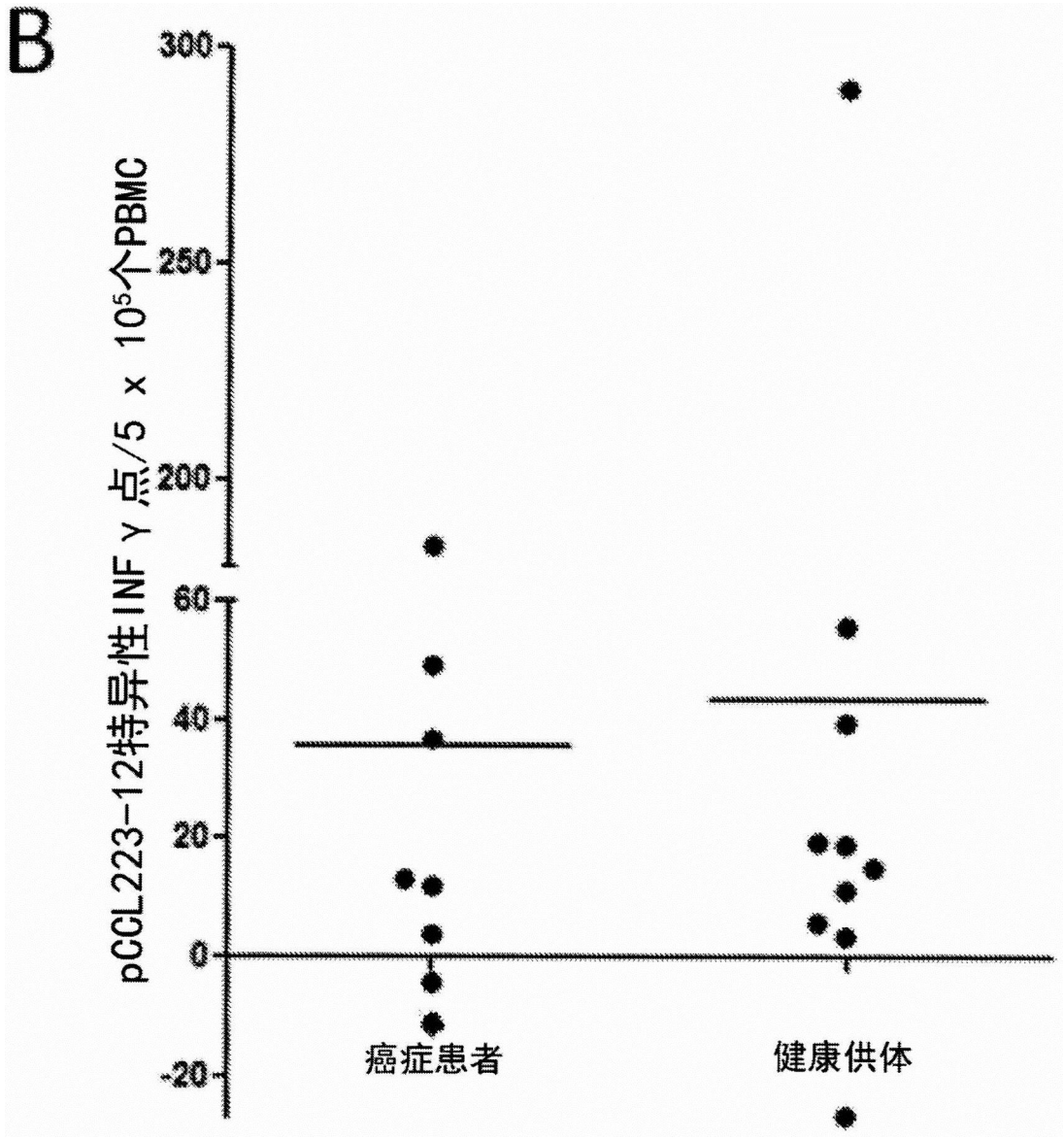
B
300
250
200
60
40
20
0
-20
pCCL223-12特异性INF γ 点/5 x 10⁵个PBMC
癌症患者
健康供体

图8(续)

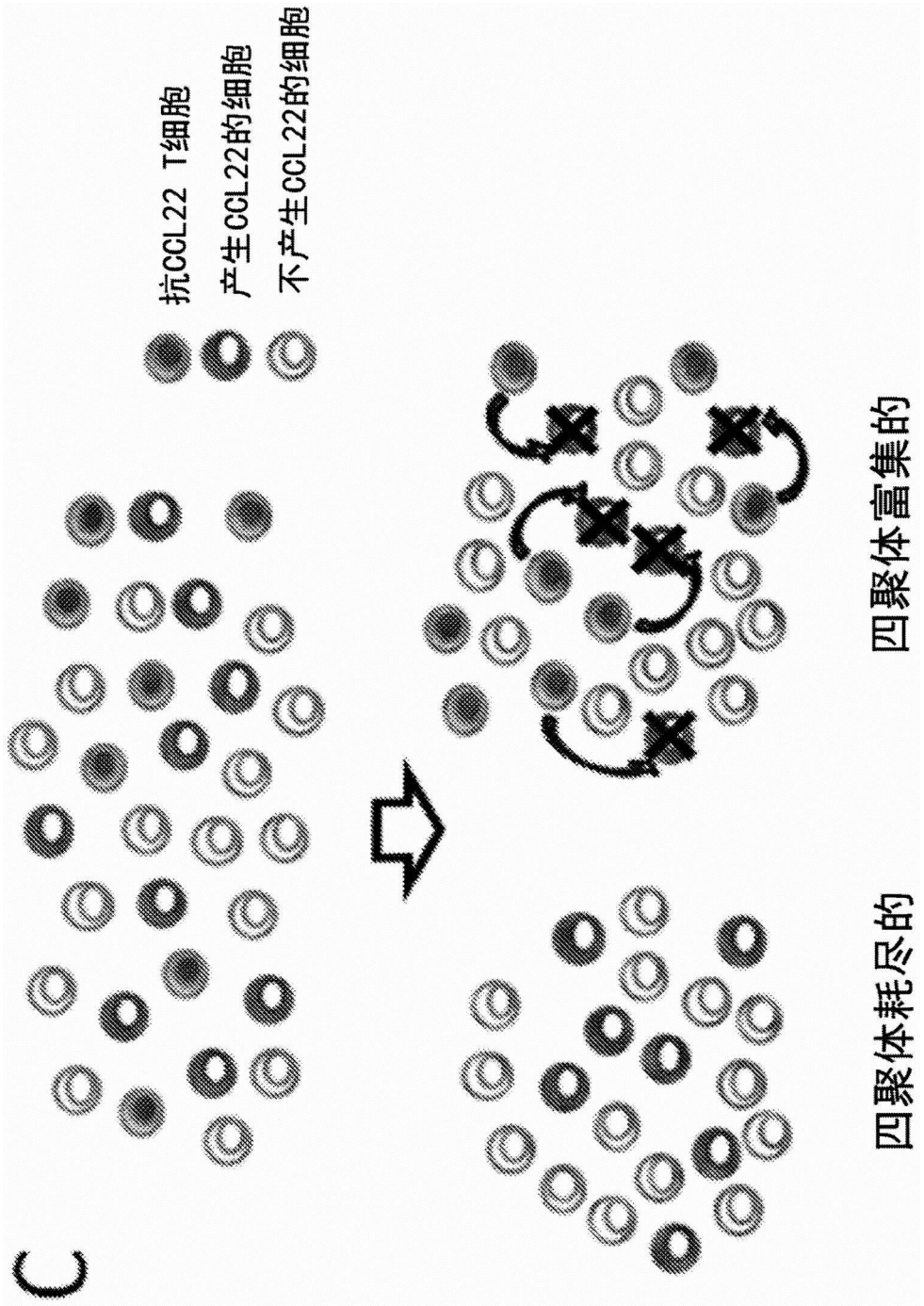

图8(续)

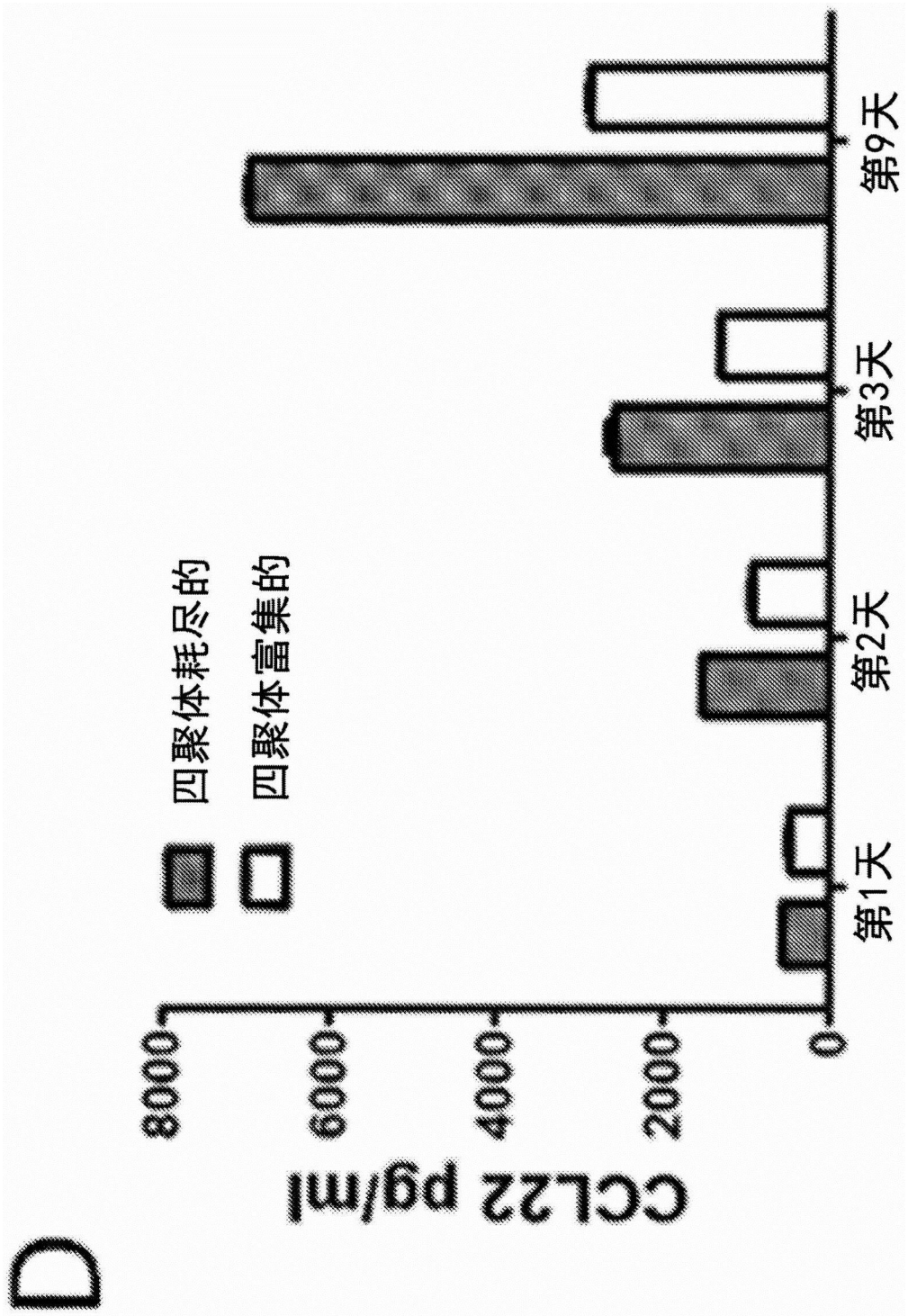
D
CCL22 pg/ml
8000
6000
4000
2000
0
四聚体耗尽的
四聚体富集的
第1天
第2天
第3天
第9天

图8(续)

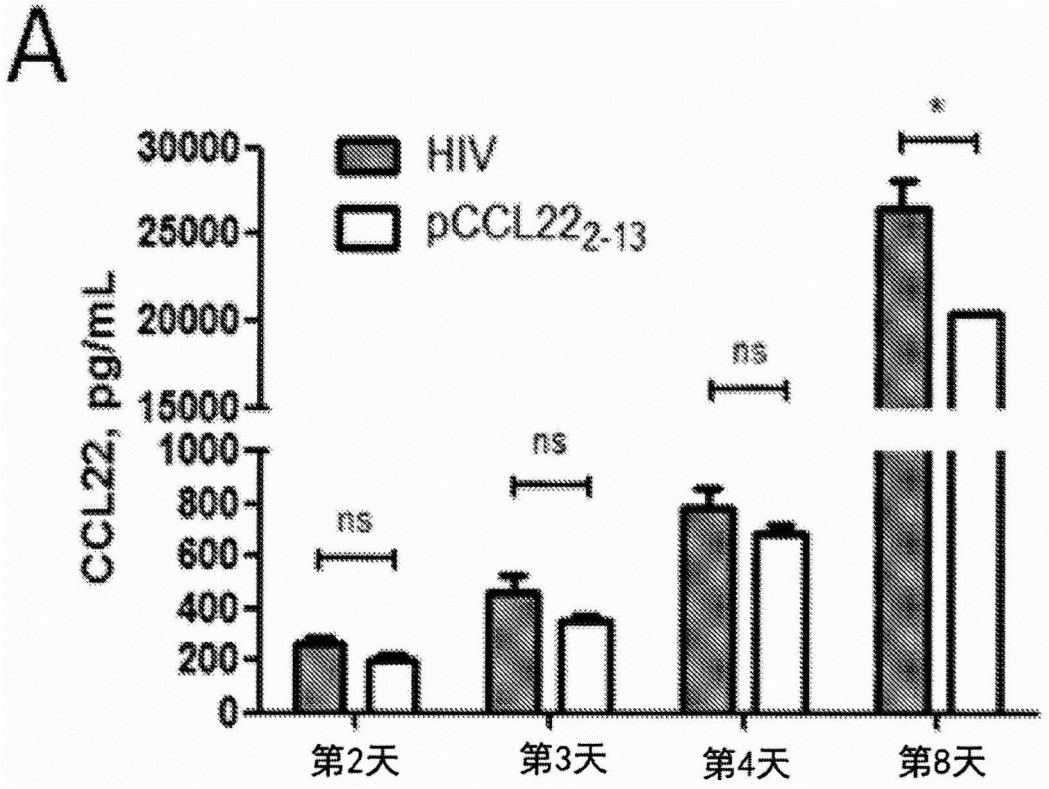
A
30000
25000
20000
15000
1000
800
600
400
200
0
CCL22, pg/mL
HIV
pCCL22 2-13
ns
ns
ns
*
第2天
第3天
第4天
第8天

图9

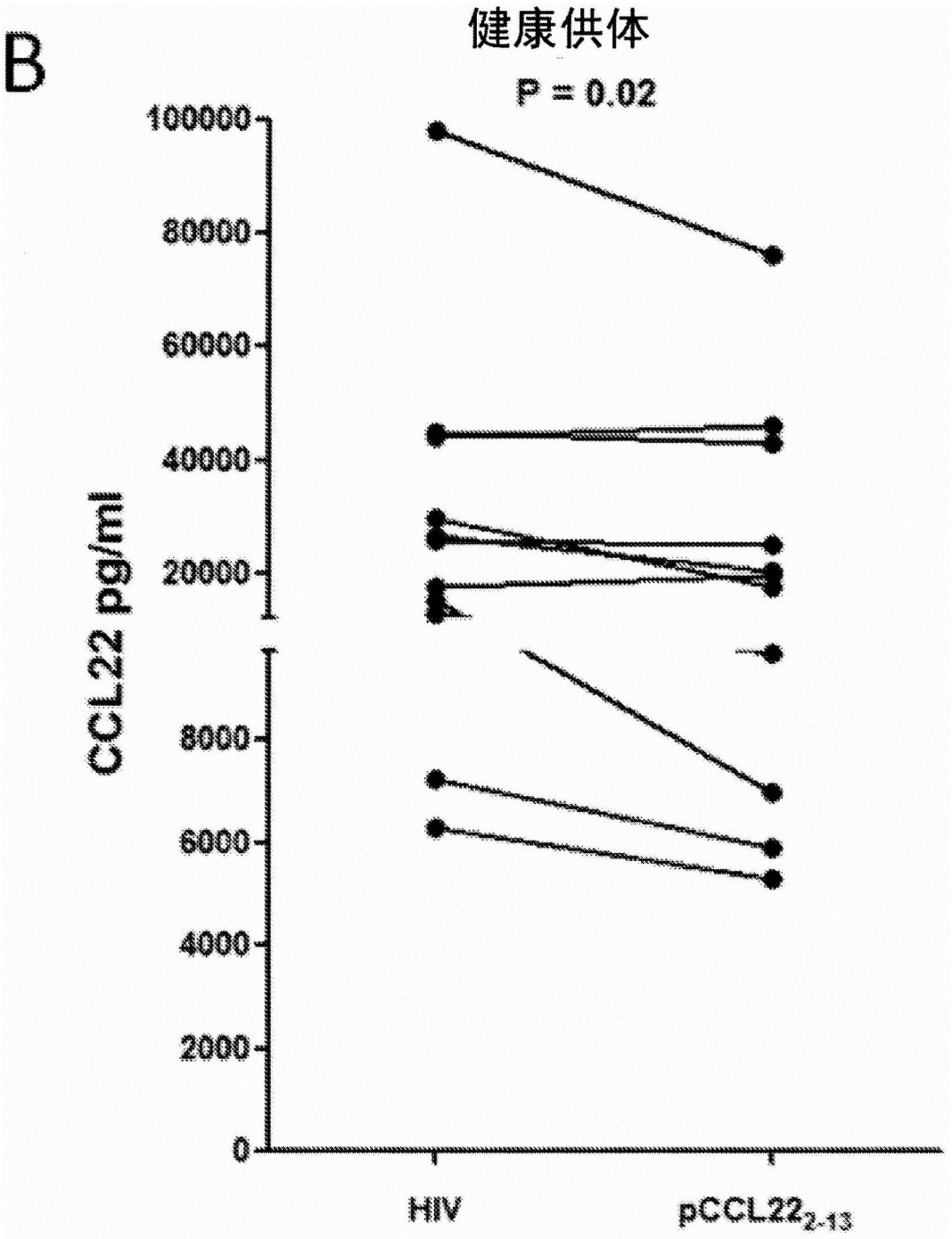
B
健康供体
P = 0.02
CCL22 pg/ml
100000
80000
60000
40000
20000
8000
6000
4000
2000
0
HIV
pCCL22 2-13

图9(续)

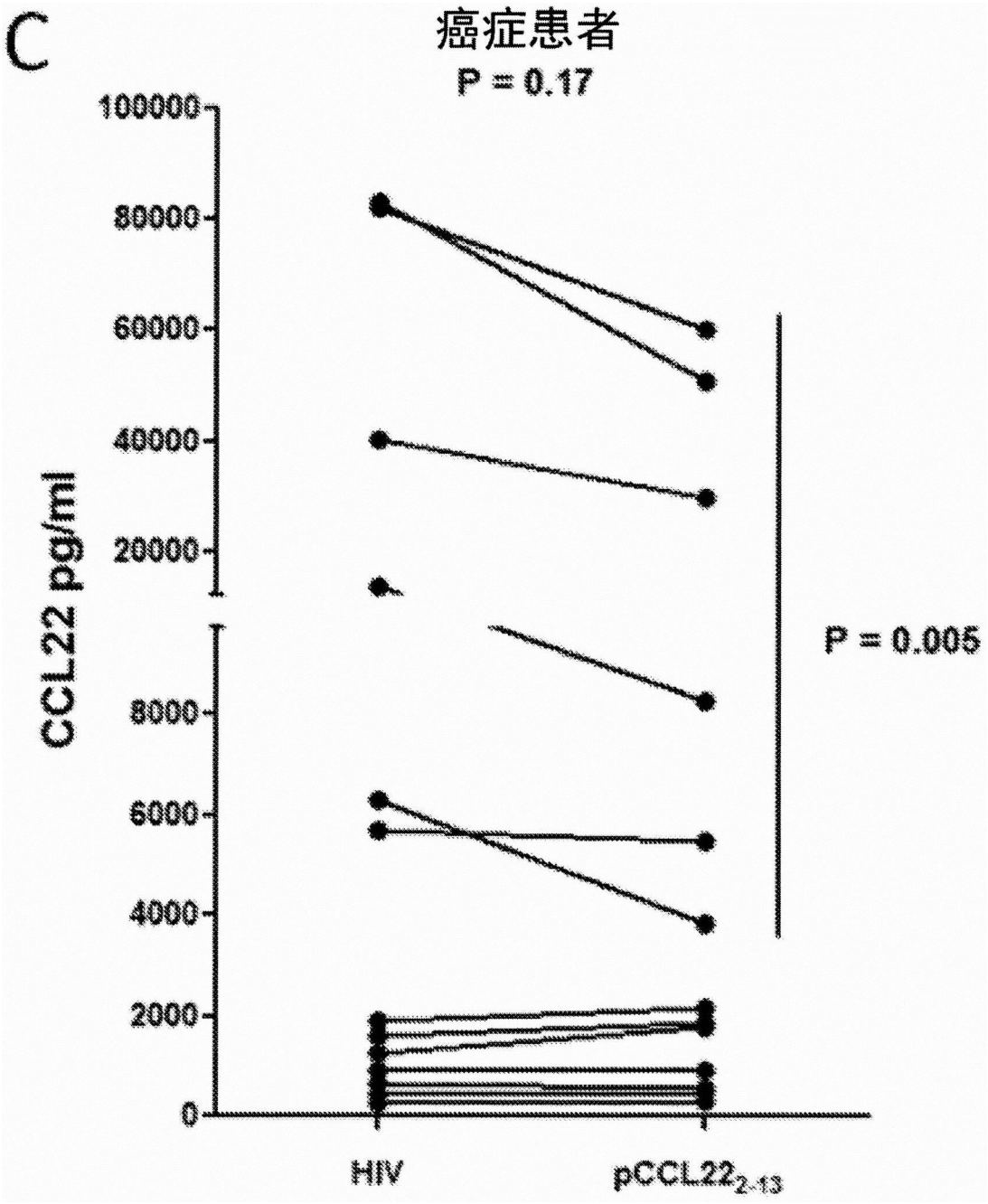
C
癌症患者
P = 0.17
P = 0.005
CCL22 pg/ml
100000
80000
60000
40000
20000
8000
6000
4000
2000
0
HIV
pCCL22 2-13

图9(续)

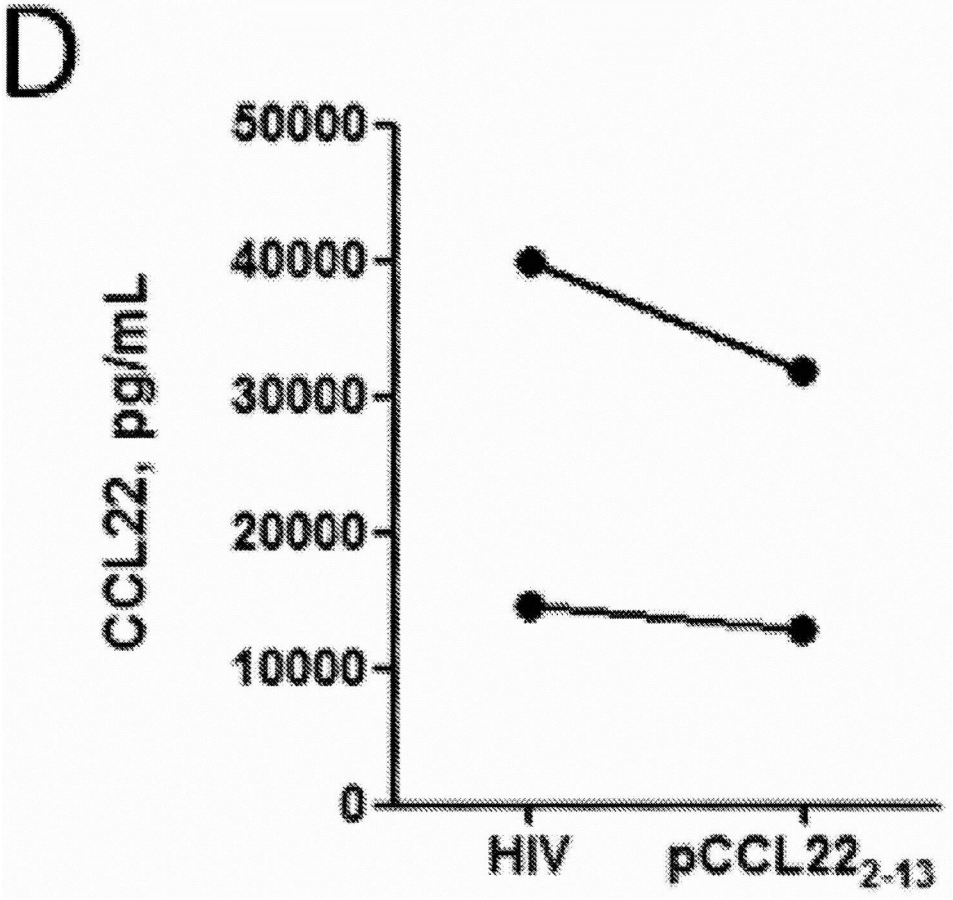

图9(续)

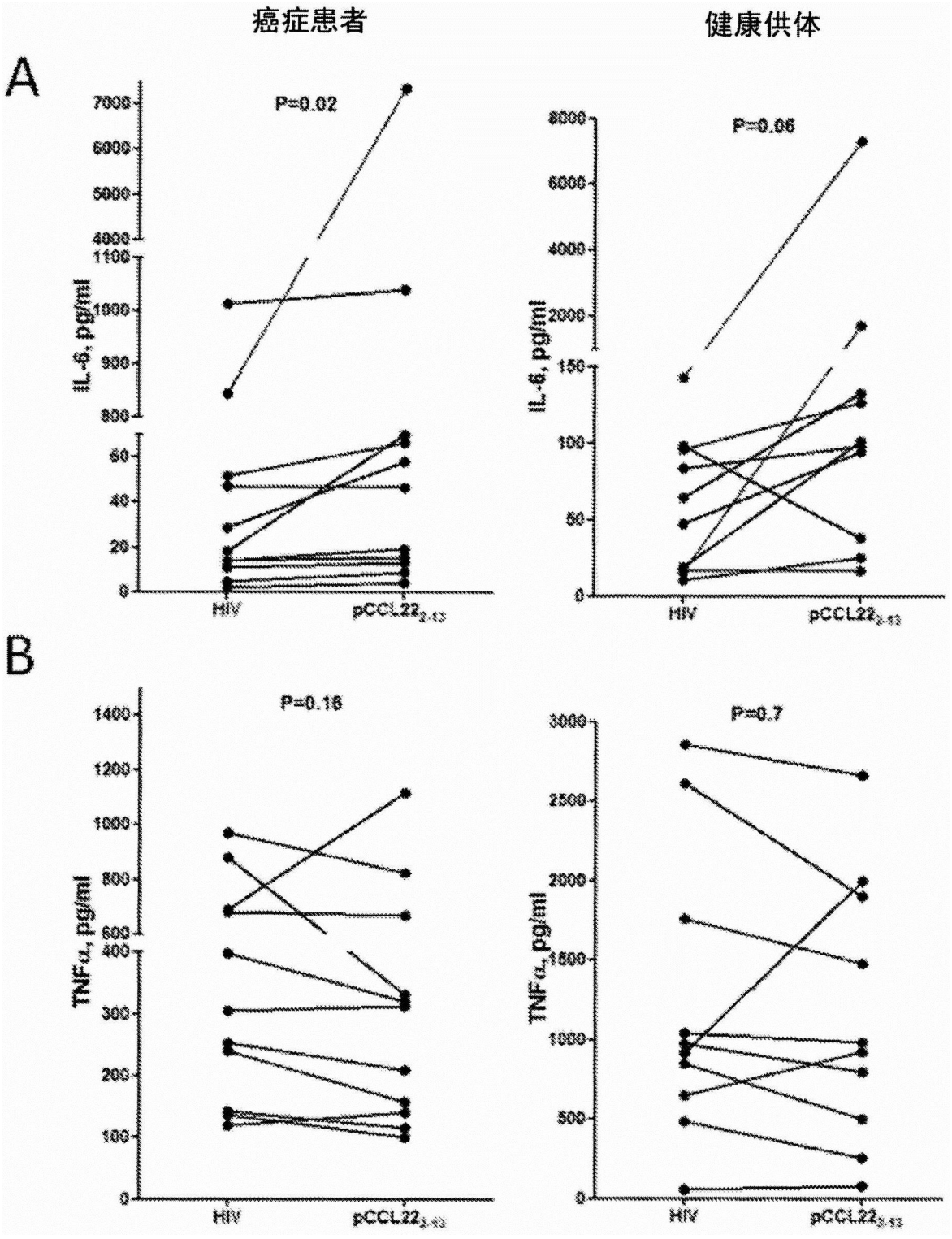

图10

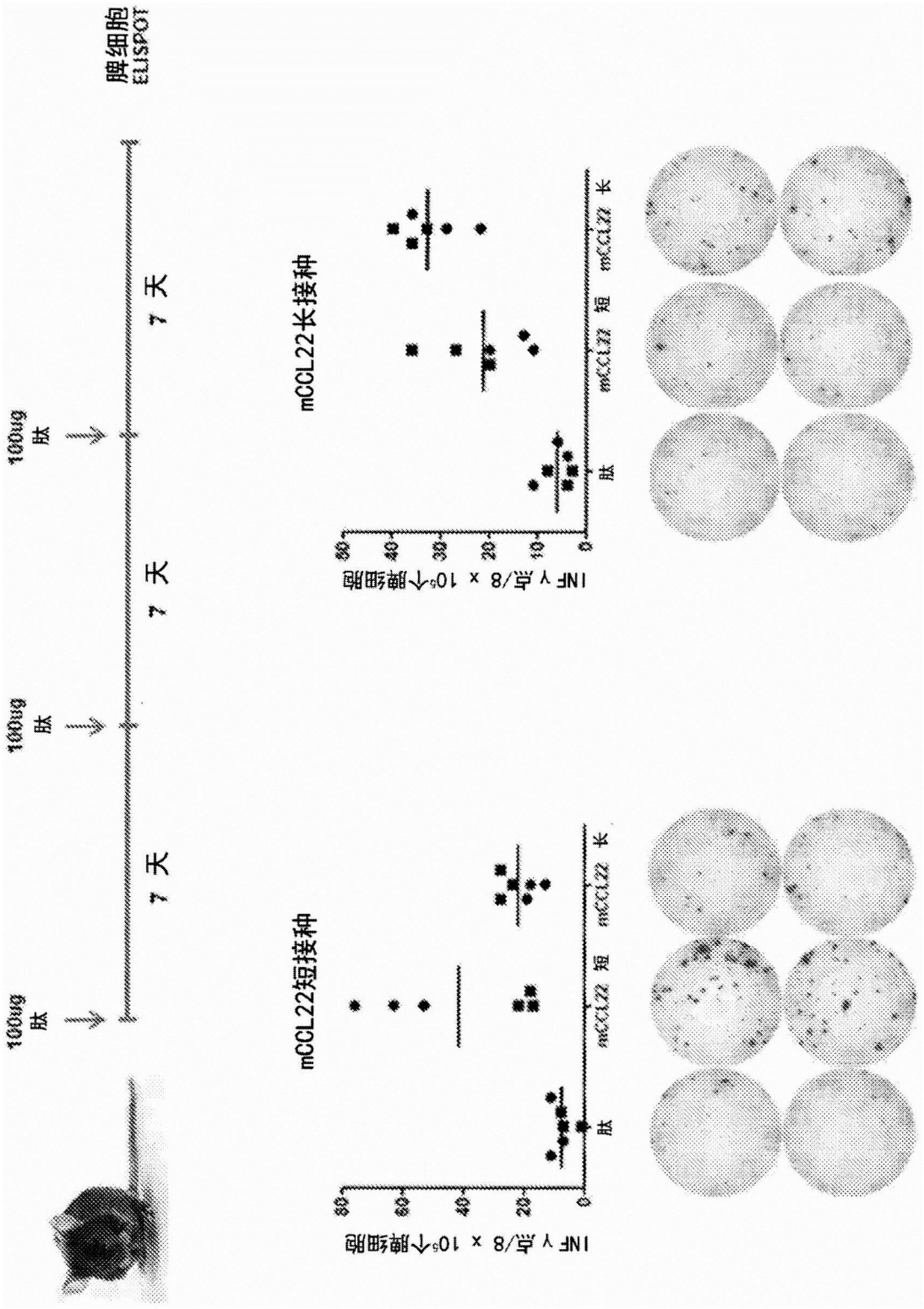
100ug
肽
100ug
肽
100ug
肽
7 天
7 天
7 天
脾细胞
ELISPOT
mCCL22短接种
mCCL22长接种
INF γ点/8 x 10⁵个脾细胞
肽
mCCL22 短
mCCL22 长

图11