



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112218655 A

(43) 申请公布日 2021.01.12

(21) 申请号 201980030194.0

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2019.05.03

代理人 张文辉

(30) 优先权数据

62/667,123 2018.05.04 US

(51) Int.Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 7/00 (2006.01)

2020.11.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/030649 2019.05.03

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/213555 EN 2019.11.07

(71) 申请人 UBI IP 控股公司

地址 开曼群岛大开曼岛

(72) 发明人 王长怡

权利要求书4页 说明书24页

序列表31页 附图1页

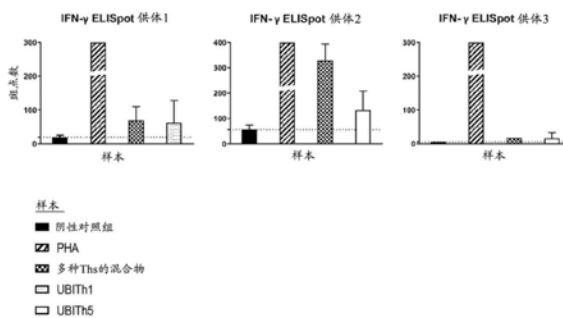
(54) 发明名称

以人工混合T辅助细胞表位以有限度的T细胞炎性反应促进目标抗体的生产

(57) 摘要

本发明涉及可提供目标抗原位点最佳免疫原性的新型异源性混杂、人工T辅助细胞表位(Th表位)。当本揭露Th表位与肽免疫原构建体中的B细胞表位共价连接时,可诱发针对目标抗原位点B细胞表位的强烈抗体反应。Th表位本身为免疫沉默的,即利用肽免疫原构建体产生的抗体很少(如果有的话)是针对Th表位,因此允许产生针对目标抗原位点非常集中的免疫反应。异源性混杂的Th表位可提供有效且安全的肽免疫原,在给予后不会产生发炎、抗自身、细胞介导的免疫反应。

在正常血液供体的幼稚PBMC中可检测到UBITh反应性T细胞



1. 一种治疗疾病的方法,包括对有此需要的个体给予肽,其中该肽包括T辅助细胞表位及抗原呈递表位,其中该肽产生比阳性对照组低至少约3倍的免疫原性炎性反应。
2. 如权利要求1所述的方法,其中该抗原呈递表位为B细胞表位。
3. 如权利要求1所述的方法,其中该抗原呈递表位为肽半抗原。
4. 如权利要求1所述的方法,其中该抗原呈递表位为 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)。
5. 如权利要求4所述的方法,其中该抗原呈递表位选自由A β ₁₋₁₄、A β ₁₋₁₆、A β ₁₋₂₈、A β ₁₇₋₄₂及A β ₁₋₄₂组成的群组。
6. 如权利要求5所述的方法,其中该抗原呈递表位为A β ₁₋₁₄。
7. 如权利要求5所述的方法,其中该抗原呈递表位为A β ₁₋₄₂。
8. 如权利要求1所述的方法,其中该T辅助细胞表位为Th1表位。
10. 如权利要求1所述的方法,其中该T辅助细胞表位为Th2表位。
11. 如权利要求1所述的方法,其中该T辅助细胞表位与该抗原呈递表位共价连接。
12. 如权利要求11所述的方法,其中该T辅助细胞表位与该抗原呈递表位的氨基端或羧基端共价连接。
13. 如权利要求11所述的方法,其中该T辅助细胞表位与该抗原呈递表位以硫酯键共价连接。
14. 如权利要求1所述的方法,其中该T辅助细胞表位透过间隔子与该抗原呈递表位连接。
15. 如权利要求14所述的方法,其中该间隔子为Gly-Gly。
16. 如权利要求14所述的方法,其中该间隔子为(ϵ -N) Lys。
17. 如权利要求1所述的方法,其中该肽还包括免疫刺激序列。
18. 如权利要求17所述的方法,其中该免疫刺激序列为侵袭素蛋白(invasin protein)的结构域。
19. 如权利要求1所述的方法,其中该疾病为阿尔兹海默氏症。
20. 如权利要求19所述的方法,其中该疾病为早期阿尔兹海默氏症。
21. 如权利要求19所述的方法,其中该疾病为轻度阿尔兹海默氏症。
22. 如权利要求1所述的方法,其中该免疫原性炎性反应是于外周血单个核细胞中进行测量。
23. 如权利要求1所述的方法,其中该免疫原性炎性反应是于分离的外周血单个核细胞中进行测量。
24. 如权利要求1所述的方法,其中该免疫原性炎性反应为细胞因子浓度增加。
25. 如权利要求1所述的方法,其中该细胞因子浓度增加为IL-2、IL-6、IL-10、INF- γ 或TNF- α 浓度增加。
26. 如权利要求1所述的方法,其中该给予为静脉内给予。
27. 如权利要求1所述的方法,其中该给予为肌肉内给予。
28. 如权利要求1所述的方法,其中该阳性对照组为植物血凝素促细胞分裂原(phytohaemagglutinin mitogen)。
29. 如权利要求1所述的方法,其中该给予包括给予约150 μ g的该肽。
30. 如权利要求1所述的方法,其中该给予包括给予约750 μ g的该肽。

31. 如权利要求1所述的方法,其中该肽如下式:

$(A)_n - (\text{目标抗原位点}) - (B)_o - (\text{Th})_m - X$

或

$(A)_n - (B)_o - (\text{Th})_m - (B)_o - (\text{目标抗原位点}) - X$

或

$(A)_n - (\text{Th})_m - (B)_o - (\text{目标抗原位点}) - X$

或

$(\text{目标抗原位点}) - (B)_o - (\text{Th})_m - (A)_n - X$

或

$(\text{Th})_m - (B)_o - (\text{目标抗原位点}) - (A)_n - X$

其中:

A为氨基酸或免疫刺激序列;

B为至少一个氨基酸、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}(\epsilon\text{N})\text{Lys}-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{S}-$ 琥珀酰亚氨基($\epsilon\text{N})\text{Lys}-$ 或 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{S}-$ (琥珀酰亚氨基)-;

Th为辅助T细胞表位、其类似物、或其片段;

目标抗原位点是B细胞表位或其免疫反应性类似物;

X为氨基酸的 $\alpha\text{-COOH}$ 或 -CONH_2 ;

n为1至约10;

m为1至约4;以及

o为0至约10。

32. 如权利要求1至31中任一项所述的方法,其中该T细胞表位为人工T细胞表位。

33. 一种治疗疾病的方法,包括对此需要的个体给予肽,其中该肽包括T辅助细胞表位及抗原呈递表位,其中该肽于该个体中产生比阴性对照组高小于约3倍的免疫原性炎症反应。

34. 如权利要求33所述的方法,其中该抗原呈递表位为B细胞表位。

35. 如权利要求33所述的方法,其中该抗原呈递表位为肽半抗原。

36. 如权利要求33所述的方法,其中该抗原呈递表位为 β 淀粉样蛋白($\text{A}\beta$)。

37. 如权利要求36所述的方法,其中该抗原呈递表位选自由 $\text{A}\beta_{1-14}$ 、 $\text{A}\beta_{1-16}$ 、 $\text{A}\beta_{1-28}$ 、 $\text{A}\beta_{17-42}$ 及 $\text{A}\beta_{1-42}$ 组成的群组。

38. 如权利要求37所述的方法,其中该抗原呈递表位为 $\text{A}\beta_{1-14}$ 。

39. 如权利要求37所述的方法,其中该抗原呈递表位为 $\text{A}\beta_{1-42}$ 。

40. 如权利要求33所述的方法,其中该T辅助细胞表位为Th1表位。

41. 如权利要求33所述的方法,其中该T辅助细胞表位为Th2表位。

42. 如权利要求33所述的方法,其中该T辅助细胞表位与该抗原呈递表位共价连接。

43. 如权利要求42所述的方法,其中该T辅助细胞表位与该抗原呈递表位的氨基端或羧基端共价连接。

44. 如权利要求42所述的方法,其中该T辅助细胞表位与该抗原呈递表位以硫酯键共价连接。

45. 如权利要求33所述的方法,其中该T辅助细胞表位透过间隔子与该抗原呈递表位连

接。

46. 如权利要求45所述的方法,其中该间隔子为Gly-Gly。

47. 如权利要求45所述的方法,其中该间隔子为(ϵ -N) Lys。

48. 如权利要求33所述的方法,其中该肽还包括免疫刺激序列。

49. 如权利要求48所述的方法,其中该免疫刺激序列为侵袭素蛋白(invasin protein)的结构域。

50. 如权利要求33所述的方法,其中该疾病为阿尔兹海默氏症。

51. 如权利要求50所述的方法,其中该疾病为早期阿尔兹海默氏症。

52. 如权利要求50所述的方法,其中该疾病为轻度阿尔兹海默氏症。

53. 如权利要求33所述的方法,其中该免疫原性炎性反应是于外周血单个核细胞中进行测量。

54. 如权利要求33所述的方法,其中该免疫原性炎性反应是于分离的外周血单个核细胞中进行测量。

55. 如权利要求33所述的方法,其中该免疫原性炎性反应为细胞因子浓度增加。

56. 如权利要求33所述的方法,其中该细胞因子浓度增加为IL-2、IL-6、IL-10、INF- γ 或TNF- α 浓度增加。

57. 如权利要求33所述的方法,其中该给予为静脉内给予。

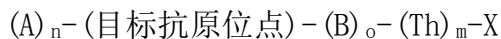
58. 如权利要求33所述的方法,其中该给予为肌肉内给予。

59. 如权利要求33所述的方法,其中该阳性对照组为植物血凝素促细胞分裂原。

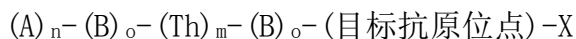
60. 如权利要求33所述的方法,其中该给予包括给予约150 μ g的该肽。

61. 如权利要求33所述的方法,其中该给予包括给予约750 μ g的该肽。

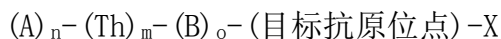
62. 如权利要求33所述的方法,其中该肽如下式:



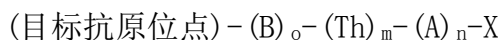
或



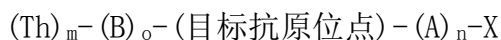
或



或



或



其中:

A为氨基酸或免疫刺激序列;

B为至少一个氨基酸、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO-、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO(ϵ N)Lys-、-NHCH(X)CH₂S-琥珀酰亚氨基(ϵ N)Lys-或-NHCH(X)CH₂S-(琥珀酰亚氨基)-;

Th为该辅助T细胞表位、其类似物、或其片段;

目标抗原位点是该B细胞表位或其免疫反应性类似物;

X为氨基酸的 α -COOH或-CONH₂;

n为1至约10;

m为1至约4;以及

o为0至约10。

63. 如权利要求33-62中任一项所述的方法,其中该T细胞表位为人工T细胞表位。

以人工混合T辅助细胞表位以有限度的T细胞炎性反应促进目标抗体的生产

[0001] 本申请是要求2018年5月4日提交的美国临时申请序列号62/667,123的权益的PCT国际申请,该申请通过引用完整并入本文。

背景技术

[0002] 免疫反应需要抗原呈递细胞和T辅助细胞之间的相互协同作用。诱发有效的抗体反应需要抗原呈递细胞辨识免疫原的目标抗原位点,且T辅助细胞辨识T辅助细胞表位。一般来说,免疫原上的T辅助细胞表位不同于其B细胞表位。B细胞表位是可被B细胞所辨识位于欲求目标上的位点,其造成产生针对欲求目标位点的抗体。目标的天然构型决定了抗体直接结合的位点。Th细胞反应的诱导需要Th细胞受体辨识抗原呈递细胞膜上的复合物,其形成于目标蛋白的加工的肽片段及联合的第2类主要组织相容性复合体(MHC)之间。因此,Th细胞的反应需要目标蛋白的肽切割及三方辨识。由于(1)关键的第2类MHC接触残基在不同的MHC结合肽(Th表位)内有不同的位置;(2)不同的MHC结合肽具有多变的长度和不同的氨基酸序列;(3)依据宿主的遗传组成,第2类MHC分子具高度多样性,因此难以确认此三个部份的复合物。对特定Th表位的免疫反应部份是由宿主的MHC基因所决定,且族群个体之间的Th表位反应性不同。难以鉴别混杂的Th表位(即跨越物种与单一物种内之个体具反应性的Th表位)。

[0003] T细胞辨识的每个组成步骤需要多个因子,例如,抗原呈递细胞进行适当的肽加工,以遗传性决定的第2类MHC分子呈现肽,以及由Th细胞上的受体辨识MHC分子或肽复合物。对用以提供广泛反应性的混杂Th表位辨识的要求难以确定。

[0004] 很明显地,为了诱导抗体,免疫原必须包含B细胞表位与T细胞表位。通常,载体蛋白与目标偶联以提供Th反应,可增加目标的免疫原性。然而,此技术仍存在许多缺点。由于以下原因,难以制备明确、安全且有效的肽-载体蛋白缀合物:

[0005] (a) 化学偶联为引入大小和组成异质性的随机反应,例如与戊二醛结合(Borras-Cuesta等,Eur J Immunol,1987;17:1213-1215);

[0006] (b) 载体蛋白可能会导入非所欲的免疫反应,例如过敏和自体免疫反应(Bixler等,WO 89/06974);

[0007] (c) 大型肽-载体蛋白引发无关的免疫反应,其主要地错误地针对载体蛋白而非目标位点(Cease等,Proc Natl Acad Sci USA,1987;84:4249-4253);以及

[0008] (d) 在先前已经利用含有相同载体蛋白的免疫原进行免疫的宿主中,载体蛋白亦可能引入表位抑制。当随后用另一种免疫原免疫宿主时,其中相同的载体蛋白与不同的半抗原(hapten)偶联,对载体蛋白而言所得的免疫反应是增强的,但对半抗原而言所得的免疫反应是抑制的(Schutze等,J Immunol,1985;135:2319-2322)。

[0009] 为了避免上述风险,欲在不使用传统载体蛋白的情况下引发T细胞辅助。

发明内容

[0010] 本揭露提供了混杂的人工T辅助细胞(Th)表位,其可用于制造肽免疫原,此肽免疫原可刺激针对功能性位点的抗体反应以提供疗效。本揭露人工Th表位可以透过任选的间隔子与合成的肽B细胞表位(“目标抗原位点”)连接,以产生免疫原性肽。免疫原性肽更可包含其他组成,包括一般免疫刺激序列。

[0011] 人工Th表位赋予肽免疫原诱发强T辅助细胞介导的免疫反应的能力,产生针对“目标抗原位点”的高水平抗体。利用专门设计用于改善肽免疫原的免疫原性的人工Th表位,本发明进一步提供在建立的肽免疫原中对载体蛋白和病原体衍生的T辅助细胞位点的有利替代。含有本发明人工Th表位的短肽免疫原可引发针对特定目标抗原位点B细胞表位的高水平抗体,而不引起显著炎性反应。

[0012] 本发明的人工Th表位可以与目标抗原位点和任选的免疫刺激序列连接。本发明的免疫原性肽如下式表示:

[0013] $(A)_n - (\text{目标抗原位点}) - (B)_o - (\text{Th})_m - X$

[0014] 或

[0015] $(A)_n - (B)_o - (\text{Th})_m - (B)_o - (\text{目标抗原位点}) - X$

[0016] 或

[0017] $(A)_n - (\text{Th})_m - (B)_o - (\text{目标抗原位点}) - X$

[0018] 或

[0019] $(\text{目标抗原位点}) - (B)_o - (\text{Th})_m - (A)_n - X$

[0020] 或

[0021] $(\text{Th})_m - (B)_o - (\text{目标抗原位点}) - (A)_n - X$

[0022] 其中:

[0023] 每个A独立地为氨基酸;

[0024] 每个B独立地为氨基酸、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}(\epsilon\text{N})\text{Lys}-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{S}-$ 琥珀酰亚氨基($\epsilon\text{N})\text{Lys}-$ 或 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{S}-$ (琥珀酰亚氨基)-;

[0025] 每个Th独立地为人工Th细胞表位、其类似物或其片段;

[0026] 目标抗原位点为B细胞表位、肽半抗原、或其免疫反应性类似物;

[0027] X为氨基酸的 $\alpha\text{-COOH}$ 或 $\alpha\text{-CONH}_2$;

[0028] n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[0029] m为1、2、3或4;以及

[0030] o为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0031] 作为目标抗原位点的肽半抗原的实施例为 β -淀粉样(A β)蛋白的第1-14个氨基酸(A β_{1-14}) (SEQ ID NO:56)。

[0032] 本发明组合物包括可在免疫宿主中引发针对欲求目标抗原位点的抗体反应的肽。目标抗原位点可源自病原生物以及通常免疫沉默的自身抗原和肿瘤相关标靶。

[0033] 因此,本发明组合物可使用于许多不同的医学及兽医学应用。这些应用包括提供传染病保护性免疫的疫苗、治疗因正常生理过程失常所引起的疾病的免疫疗法、治疗癌症的免疫疗法,以及欲求地干预和改变正常生理过程的药剂。

[0034] 可与本发明Th表位共价连接的一些目标抗原包括以下抗原的部分:用于治疗阿尔

兹海默氏症的 β -淀粉样蛋白 (A β)、用于治疗帕金森氏症的 α -突触核蛋白 (α -Syn)、用于治疗过敏性疾病的膜结合IgE的细胞外膜近端结构域(或IgE EMPD)、用于治疗tau蛋白病(包含阿尔兹海默氏症)的Tau,以及用于治疗异位性皮肤炎的白介素-31 (IL-31),仅举几例。更具体地,A β ₁₋₁₄(如美国专利号9,102,752所述)、 α -Syn₁₂₆₋₁₃₅(如美国临时案申请号62/521,287所述)、IgE EMPD₁₋₃₉(如国际PCT申请案号PCT/US2017/069174所述)、Tau₃₇₉₋₄₀₈(如美国临时案申请号62/578,124所述)和IL-31₉₇₋₁₄₄(如美国临时案申请号62/597,130所述)。

[0035] 在一些实施例中,本发明提供一种疾病治疗方法,包括将肽投予有需要的个体,其中此肽包括T辅助细胞表位和抗原呈递表位,其中相较于阳性对照组的免疫原性炎性反应,此肽所产生的免疫原性炎性反应低至少约3倍。

附图说明

[0036] 图1显示在正常供体幼稚外周血单个核细胞中混杂人工Th肽反应性T细胞的检测。

具体实施方式

[0037] 本揭露提供了混杂的人工T辅助细胞(Th)表位,其可用于制造肽免疫原,此肽免疫原可刺激针对功能性位点的抗体反应以提供疗效。本揭露人工Th表位可以透过任选的间隔子与合成的肽B细胞表位(“目标抗原位点”)连接,以产生免疫原性肽。

[0038] 人工Th表位赋予肽免疫原诱发强T辅助细胞介导的免疫反应的能力,产生针对“目标抗原位点”的高水平抗体。利用专门设计用于改善肽免疫原的免疫原性的人工Th表位,本发明进一步提供在建立的肽免疫原中对载体蛋白和病原体衍生的T辅助细胞位点的有利替代。含有本发明人工Th表位的短肽免疫原可引发针对特定目标抗原位点B细胞表位的高水平抗体,而不引起显著炎性反应。

[0039] 本揭露肽免疫原可于接受免疫的宿主中引起针对欲求目标抗原位点的抗体反应。在一些实施例中,抗原位点取自病原体(如FMDV VP1、PRRSV GP5等)。在一些实施例中,抗原位点取自通常免疫沉默的自身抗原或肿瘤相关标靶(如A β 、Tau、Alpha突触核蛋白、IgE EMPD、IL-31等)。

[0040] 本揭露所描述的人工Th表位可用于提供诱导靶向特定蛋白质的抗体的肽免疫原。目标抗原位点可包括来自任何目标肽或蛋白质的任何氨基酸序列。在一些实施例中,本揭露所描述的人工Th表位可用于提供肽免疫原,此肽免疫原可诱发抗体,抗体靶向 β 淀粉样蛋白(A β)、口蹄疫(FMD)衣壳蛋白、猪生殖和呼吸道综合症病毒(PRRSV)的糖蛋白、促黄体激素释放激素(LHRH),以及任何其他肽或蛋白质序列。

[0041] 本发明肽可用于医学及兽医学应用。在一些实施例中,本发明肽可作为疫苗以提供对传染病或神经退化性疾病的保护性免疫、治疗因正常生理过程失常引起的疾病、作为治疗癌症的免疫疗法,以及作为干预正常生理过程的药剂。

[0042] 肽免疫原

[0043] 本文使用术语“肽免疫原”是指包含透过常规肽键或透过他种共价键型式(例如硫酯)共价连接至目标抗原位点的Th表位的分子,藉此形成单一较大的肽。

[0044] 本揭露提供肽免疫原及含肽免疫原的组合物。在一些实施例中,免疫原性肽包括人工异源性Th表位、含B细胞表位的目标抗原位点、以及任选的异源性间隔子。

[0045] 在肽免疫原中存在人工Th表位可引发强Th细胞介导的免疫反应。在一些实施例中,在免疫原性肽中存在人工异源性Th表位可产生针对目标抗原位点的高水平抗体。在一些实施例中,本揭露描述利用设计用于改善免疫原性的人工异源性Th细胞表位在建立的肽免疫原中对载体蛋白和病原体衍生的Th细胞位点的有利替代。在一些实施例中,含有人工Th表位的肽免疫原可引发靶向B细胞表位(如, A β 、Tau、Alpha突触核蛋白、IgE EMPD、IL-31等)的高水平抗体产生。

[0046] 在一些实施例中,本揭露免疫原性肽可以下式表示:

[0047] (A)_n- (目标抗原位点) - (B)_o- (Th)_m-X

[0048] 或

[0049] (A)_n- (B)_o- (Th)_m- (B)_o- (目标抗原位点) -X

[0050] 或

[0051] (A)_n- (Th)_m- (B)_o- (目标抗原位点) -X

[0052] 或

[0053] (目标抗原位点) - (B)_o- (Th)_m- (A)_n-X

[0054] 或

[0055] (Th)_m- (B)_o- (目标抗原位点) - (A)_n-X

[0056] 其中:

[0057] 每个A独立地为氨基酸;

[0058] 每个B独立地为氨基酸、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO-、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO(ϵ N)Lys-、-NHCH(X)CH₂S-琥珀酰亚氨基(ϵ N)Lys-或-NHCH(X)CH₂S-(琥珀酰亚氨基)-;

[0059] 每个Th独立地为人工Th细胞表位、其类似物或其片段;

[0060] 目标抗原位点为B细胞表位、肽半抗原、或其免疫反应性类似物;

[0061] X为氨基酸的 α -COOH或 α -CONH₂;

[0062] n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[0063] m为1、2、3或4;以及

[0064] o为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0065] 本揭露肽免疫原包括约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约85、约90、约95、或约100个氨基酸残基。在一些实施例中,本揭露肽免疫原可包括约20、约30、约40、约50、约60、约70、或约80个氨基酸残基。

[0066] A-氨基酸

[0067] 本揭露免疫原性肽中的每个A独立地为异源性氨基酸序列。

[0068] 本文使用术语“异源性”是指非目标抗原位点(B细胞表位)野生型氨基酸序列的一部分或与其同源的氨基酸序列。因此,A的异源性氨基酸序列含有在目标抗原位点蛋白质或肽中非天然存在的氨基酸序列。由于组分A的序列与目标抗原位点具异源性,当组分A与目标抗原位点共价连接时,目标抗原位点的天然氨基酸序列不会向氨基端或羧基端方向延伸。

[0069] 在一些实施例中,每个A独立地为非天然或天然的氨基酸。

[0070] 天然氨基酸包括丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨

酸、色氨酸、酪氨酸及缬氨酸。

[0071] 非天然氨基酸包括,但不限于, ϵ -N赖氨酸、 β -丙氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、甲状腺素、 γ -氨基丁酸、高丝氨酸、瓜氨酸、氨基苯甲酸、6-氨基己酸(Aca;6-氨基己酸)、巯基丙酸(MPA)、3-硝基-酪氨酸、焦谷氨酸及其类似物。

[0072] 在一些实施例中,n为大于1,且每个A独立地为相同的氨基酸。在一些实施例中,n为大于1,且每个A独立地为不同的氨基酸。

[0073] B-任选的异源性间隔子

[0074] 本揭露免疫原性肽中的每个B为任选的异源性间隔子。

[0075] 如以上讨论,术语“异源性”是指非目标抗原位点(B细胞表位)野生型氨基酸序列的一部分或与其同源的氨基酸序列。因此,当间隔子为氨基酸时,间隔子包含在目标抗原位点蛋白质或肽中非天然存在的氨基酸序列。由于组分B的序列与目标抗原位点具异源性,当组分B与目标抗原位点共价连接时,目标抗原位点的天然氨基酸序列不会向氨基端或羧基端方向延伸。

[0076] 组分B的任选的异源性间隔子独立地为氨基酸、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}(\epsilon\text{N})\text{Lys}-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{S}-$ 琥珀酰亚氨基($\epsilon\text{N})\text{Lys}-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{S}-$ (琥珀酰亚氨基)-及/或其任意组合。间隔子可含有一或多个天然或非天然的氨基酸残基,如同上述组分A的内容。

[0077] 间隔子可以是柔性铰链间隔子,以增强Th表位和目标抗原位点的分离。在一些实施例中,柔性铰链序列可富含脯氨酸。在某些实施例中,柔性铰链具有序列Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro(SEQ ID NO:55),其模拟在免疫球蛋白重链中存在的柔性铰链区域。其中Xaa可为任何氨基酸。在一些实施例中,Xaa为天冬氨酸。在一些实施例中,间隔子提供的构象分离可以允许呈现的肽免疫原与适当的Th细胞和B细胞之间更有效的相互作用。可增强针对Th表位的免疫反应以提供更好的免疫反应性。

[0078] 当 $o>1$ 时,每个B独立地为相同或不同。在一些实施例中,B为Gly-Gly、Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro(SEQ ID NO:55)、 ϵNLys 、 $\epsilon\text{NLys-Lys-Lys-Lys}$ (SEQ ID NO:53)、Lys-Lys-Lys、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}(\epsilon\text{NLys})-$ 、 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{S}-$ 琥珀酰亚氨基- $\epsilon\text{NLys}-$ 或 $-\text{NHCH}(X)\text{CH}_2\text{S}-$ (琥珀酰亚氨基)-及/或其任意组合。

[0079] 异源性间隔子的示例如表2所示。

[0080] 目标抗原位点

[0081] 本揭露所描述的人工Th表位可用于提供诱导靶向特定蛋白质的抗体的肽免疫原。目标抗原位点可包括来自任何目标肽或蛋白质(包括外源或自身肽或蛋白质)的任何氨基酸序列。

[0082] 在一些实施例中,本揭露描述可用以提供肽免疫原的人工Th表位,此肽免疫原可引发抗体,抗体靶向促黄体激素释放激素(LHRH)(如美国专利号6,025,468、6,228,987、6,559,282及美国专利公开号2017/0216418); β 淀粉样蛋白(AB)(如美国专利号6,906,169、7,951,909、8,232,373及9,102,752);口蹄疫衣壳蛋白(如美国专利号6,048,538、6,107,021及美国专利公开号2015/0306203);用于预防和治疗HIV感染的HIV病毒颗粒表位(如美国专利号5,912,176、5,961,976及6,090,388);来自猪第二型环状病毒(PCV2)的衣壳蛋白(如美国专利公开号2013/0236487)、来自猪生殖和呼吸道综合症病毒(PRRSV)的糖蛋白(如美国

专利公开号2014/0335118)、IgE(如美国专利号7,648,701及6,811,782)、 α -突触核蛋白(α -Syn)(美国临时案申请号62/521,287)、膜结合IgE的细胞外膜近端结构域(或IgE EMPD)(国际PCT申请案号PCT/US2017/069174)、Tau(美国临时案申请号62/578,124)及白介素-31(IL-31)(美国临时案申请号62/597,130)、用于预防疟疾的疟原虫CS抗原;用于预防及治疗动脉硬化的CETP,及任何其他肽或蛋白序列。所有专利和专利公开案均透过引用整体并入本文。

[0083] 目标抗原位点的示例如表3所示。

[0084] Th-T辅助细胞表位

[0085] 于肽免疫原构建体中的Th表位可增强目标抗原位点的免疫原性,有利于透过合理设计产生针对优化的目标B细胞表位的特异性高效价抗体。

[0086] 在一些实施例中,Th表位为异源性序列。如上所述,术语“异源性”是指氨基酸序列,其衍生自非目标抗原位点野生型序列的一部分或与其同源的氨基酸序列。因此,异源性Th表位是衍生自在目标抗原位点中非天然存在的氨基酸序列的Th表位。由于Th表位与目标抗原位点具异源性,当异源性Th表位与目标抗原位点共价连接时,目标抗原位点的天然氨基酸序列不会向氨基端或羧基端方向延伸。

[0087] Th表位可具有衍生自任何物种(例如人、猪、牛、狗、大鼠、小鼠、豚鼠等)的氨基酸序列。Th表位还可具有针对多种物种第2类MHC分子的混杂结合基序。在某些实施例中,Th表位包含多个混杂的第2类MHC结合基序,以最大限度活化T辅助细胞,从而导致启动及调控免疫反应。优选的Th表位本身为免疫沉默的,即利用肽免疫原构建体产生的抗体很少(如果有的话)会针对Th表位,因此可产生针对目标抗原位点的非常集中的免疫反应。

[0088] Th表位的大小为约15至约50个氨基酸残基。在一些实施例中,Th表位可具有约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45或约50个氨基酸残基。Th表位可共享共同的结构特征及特定特征序列。在一些实施例中,Th表位具有两性螺旋结构,即 α -螺旋结构,其具有疏水性氨基酸残基占据螺旋的一面,而带电和极性残基占据周围各面。

[0089] WO 1999/066957的Th表位和公开内容以及相对应的美国专利号6,713,301透过引用整体并入本文。

[0090] 混杂的Th决定簇(Th determinant)可有效地增强低免疫原性的肽。精心设计的混杂Th/B细胞表位嵌合肽可在遗传多样性群体的大多数成员中诱发Th反应和针对B细胞位点的抗体反应。在一些实施例中,可透过将肽-载体共价连接至充分表征的混杂Th表位来将Th细胞提供给目标抗原肽。

[0091] 混杂的Th表位可含有额外的一级氨基酸模式。在一些实施例中,混杂的Th表位可含有Rothbard序列,其中混杂的Th表位含有一个带电残基(例如-Gly-),接着是2至3个疏水性残基,接着是一个带电或极性残基(Rothbard和Taylor,EMBO J,1988;7:93-101)。混杂的Th表位遵守1、4、5、8规则,其中带正电的残基在第四、第五和第八位置跟着疏水性残基,这与两性螺旋1、4、5和8位置位于同一面的情形一致。在一些实施例中,疏水性、带电及极性氨基酸的1、4、5、8模式可在单一Th表位内重复。在一些实施例中,混杂的T细胞表位包含Rothbard序列或遵守1、4、5、8规则的表位中的至少一种。在其它实施例中,Th表位含有一个以上的Rothbard序列。

[0092] 衍生自病原体的混杂Th表位包括,但不限于:乙型肝炎表面抗原Th细胞表位

(HBsAg Th)、乙型肝炎核心抗原Th细胞表位(HBc Th)、百日咳毒素Th细胞表位(PT Th)、破伤风毒素Th细胞表位(TT Th)、麻疹病毒F蛋白Th细胞表位(MVF Th)、沙眼衣原体主要外膜蛋白Th细胞表位(CT Th)、白喉毒素Th细胞表位(DT Th)、恶性疟原虫环孢子蛋白Th细胞表位(PF Th)、曼氏血吸虫磷酸丙糖异构酶Th细胞表位(SM Th)和大肠杆菌TraT Th细胞表位(TraT Th)、破伤风梭菌、百日咳杆菌、霍乱毒素、流行性感冒病毒MP1、流行性感冒病毒NSP1、埃巴病毒(EBV)、人类巨细胞病毒(HCMV)。本揭露所使用的Th表位例子如表1所示。

[0093] 在一些实施例中,本揭露的Th表位可以是包含含有类似氨基酸序列的肽混合物的组合Th表位。结构合成抗原库(SSALs),又称为组合人工Th表位,包含多个Th表位,以其氨基酸序列围绕着在特定位置具取代物的不变残基的结构性框架而组成。透过保留相对不变的残基和改变其他残基来确定SSAL表位的序列,以提供对多种MHC限制性元素的辨识。SSAL表位的序列可以透过比对混杂Th的一级氨基酸序列、选择和保留负责Th肽的独特结构的残基作为骨架,并根据已知的MHC限制性元素改变剩余残基来确定。具有MHC限制性元素的优选氨基酸的不变和可变位置可用于获得MHC结合基序,其可用于设计Th表位的SSAL。

[0094] 作为组合序列呈现的异源性Th表位肽包含基于此特定肽的同源物的可变残基在肽框架内的特定位置处表示的氨基酸残基的混合物。在一些实施例中,Th表位文库序列被设计为维持混杂Th表位的结构基序并适应对更广范围单倍型的反应性。在一些实施例中,SSAL的成员可以是退化的Th表位SSAL1 Th1,其是以取自麻疹病毒F蛋白的混杂表位为模型(例如SEQ ID NOs:1-5)。在其他实施例中,SSAL的成员可以是退化的Th表位SSAL2Th2,其是以取自HBsAg1的混杂表位为模型(例如SEQ ID NOs:19-24)。

[0095] 合成后存在于组合人工Th表位(或SSAL)混合物中的肽总数可以透过将在每个可变位置的可用的选项数量相乘来计算。例如,SEQ ID NO:16代表32种不同肽的组合,因为它包含5个可变位置,其中每个可变位置具有2个不同残基的选项(即, $2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2 = 2^5 = 32$)。类似地,SEQ ID NO:5代表524,288种不同肽的组合(即, $2 \times 4 \times 2 \times 4 \times 2 \times 4 \times 4 \times 4 \times 2 \times 4 \times 2 \times 4 = 2^5 \times 4^7 =$

[0096] 524,288)。组合人工Th表位序列包括(a)可变序列涵盖的所有肽混合物及(b)含有组合内单个序列的各个肽。

[0097] 在一些实施例中,可在位置1加入带电残基Glu或Asp,以增加Th疏水面周围的电荷。在一些实施例中,可以藉由在第2、5、8、9、10、13和16位置的疏水残基保持两性螺旋的疏水面。在一些实施例中,可以藉由改变第2、5、8、9、10及13位置的氨基酸残基以提供具有可结合到各种MHC限制元素能力的表面。在一些实施例中,氨基酸残基的变异可以扩大人工Th表位的免疫反应范围。

[0098] 人工Th表位可包含已知混杂Th表位的所有特性和特征。在一些实施例中,人工Th表位是SSAL的一员。在一些实施例中,人工Th位点可与取自自身抗原和外源抗原的肽序列组合,以提供针对位点特异性目标的增强的抗体反应。在一些实施例中,人工Th表位免疫原可提供有效且安全的抗体反应,展现出高免疫效力,并表现出广泛的反应性。

[0099] 已提供了理想化的人工Th表位。这些理想化的人工Th表位是以W095/11998揭露的2种已知的天然Th表位和SSAL肽原型为模型。SSALs包含组合MHC分子结合基序(Meister等,1995),旨在引起遗传多样性群体成员之间的广泛免疫反应。SSAL肽原型是基于麻疹病毒和B型肝炎病毒抗原的Th表位设计,透过引入多个MHC结合基序进行修饰。其他Th表位的设计

是以其他已知Th表位为模型,透过简化、添加及/或修饰多个MHC结合基序以产生一系列新的人工Th表位。将混杂人工Th位点合并进入具有多种目标抗原位点的合成肽免疫原中。得到的嵌合肽能够刺激针对目标抗原位点的有效抗体反应。

[0100] 表1所示原型人工辅助T细胞(Th)表位“SSAL1 Th1”,为4种肽(SEQ ID NOs:1-4)的混合物,是以麻疹病毒F蛋白的混杂Th表位为模型的理想化Th表位(Partidos等,1991)。模型Th表位,如表1显示的“MVF Th(UBITh®5)”(SEQ ID NO:6)对应麻疹病毒F蛋白第288-302位置的残基。根据“Rothbard规则”,透过在位置1处添加带电残基Glu/Asp以增加表位的疏水面周围的电荷;添加或保留位置4、6、12和14处的带电残基或Gly;以及在位置7和11处添加或保留带电残基或Gly,以将MVF Th(SEQ ID NO:6)修饰为SSAL1 Th1原型(SEQ ID NOs:1-4)。Th表位的疏水面包含位于第2、5、8、9、10、13和16位置的残基。位于这些位置与混杂表位相关的疏水性残基通常会被取代,以提供组合Th SSAL表位,SSAL1 Th1(SEQ ID NOs:1-4)。原型SSAL1 Th1(SEQ ID NOs:1-4)的另一个重要特征是第1和4位置在第9位置另一侧以回文方式不完全地重复,以模拟MHC结合基序。在SEQ ID NO:2(表1)中进一步修饰SSAL1 Th1的这种“1、4、9”回文模式,以更接近地反映原始MvF模型Th的序列(SEQ ID NO:6)。

[0101] 组合人工Th表位可被简化以提供一系列单一序列表位。例如,SEQ ID NO:5的组合序列可被简化为SEQ ID NOs:1-4所代表的单一序列Th表位。这些单一序列Th表位可与目标抗原位点耦合,以提供增强的免疫原性。

[0102] 在一些实施例中,以非极性和极性不带电的氨基酸(例如Ile和Ser)延伸氨基端,并以带电和疏水性的氨基酸(例如Lys和Phe)延伸羧基端,以改善Th表位的免疫原性。另外,向Th表位添加一个赖氨酸残基或多个赖氨酸残基(例如,KKK)可改善肽在水中的溶解度。进一步的修饰包括以共同的MHC结合基序AxTxIL进行羧基端取代(Meister等,1995)。

[0103] 人工Th表位可以是已知的天然Th表位或SSAL肽原型。在一些实施例中,来自SSAL的Th表位可掺入组合MHC分子结合基序,以诱发遗传多样性群体成员间广泛的免疫反应。在一些实施例中,可基于麻疹病毒和B型肝炎病毒抗原的Th表位设计SSAL肽原型,藉由引入多个MHC结合基序进行修饰。在一些实施例中,人工Th表位可以简化、添加及/或修饰多个MHC结合基序以产生一系列新的人工Th表位。在一些实施例中,可将新改造的混杂人工Th位点合并进入带有多种目标抗原位点的合成肽免疫原中。在一些实施例中,所获得的嵌合肽可刺激针对目标抗原位点的有效抗体反应。

[0104] 本揭露人工Th表位可以是包含第2类MHC分子结合位点的天然或非天然氨基酸的连续序列。在一些实施例中,人工Th表位可以增强或刺激针对目标抗原位点的抗体反应。在一些实施例中,Th表位可由连续或不连续的氨基酸片段组成。在一些实施例中,并非Th表位的每个氨基酸都与MHC的辨识有关。在一些实施例中,本发明Th表位可包含免疫功能同源物,例如免疫增强同源物、交叉反应同源物及其片段。在一些实施例中,功能性Th同源物可进一步包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基的保守性取代、添加、缺失和插入,并提供Th表位的Th-刺激功能。

[0105] Th表位可直接连接到目标位点。在一些实施例中,Th表位可透过任选的异源性间隔子(例如肽间隔子(如Gly-Gly或(ϵ -N)Lys)连接至目标位点。间隔子物理性地将Th表位与B细胞表位分开,并可破坏由于Th表位或功能同源物与目标抗原位点连接所产生任何人工

二级结构的形成,以消除对Th及/或B细胞反应的任何干扰。

[0106] Th表位包括理想化的人工Th表位与组合的理想化人工Th表位,如表1所示。在一些实施例中,Th表位是SEQ ID NOs:1-52的混杂Th细胞表位,其任何同源物,及/或其任何免疫类似物。Th表位还包括Th表位的免疫类似物。免疫Th类似物包括免疫增强类似物、交叉反应类似物及任何这些Th表位的片段,其足以增强或刺激针对目标抗原位点的免疫反应。

[0107] Th表位肽的功能性免疫类似物也是有效的且包含在本发明的一部分中。功能性免疫Th类似物包括Th表位中1至约5个氨基酸残基的保守性取代、添加、缺失及插入,其基本上不改变Th表位的Th刺激功能。可以利用天然或非天然氨基酸完成保守性取代、添加和插入,如上文针对目标抗原位点所述。表1辨识了Th表位肽功能类似物的其他种变异体。特别是,MvF1和MvF2 Th的SEQ ID NOs:6和7是MvF4和MvF5 Th的SEQ ID NOs:16和17的功能类似物,其差异在于氨基酸框架中分别在氨基端和羧基端缺失(SEQ ID NOs:6和7)或添加(SEQ ID NOs:16和17)两个氨基酸。在类似序列的这两个系列之间的差异并不会影响包含于此些序列中的Th表位的功能。因此,功能性免疫Th类似物包括源自麻疹病毒融合蛋白MvF1-4 Ths (SEQ ID NOs:6-18)与源自肝炎表面蛋白HBsAg 1-3Ths (SEQ ID NOs:19-31)的Th表位的各种形式。

[0108] 肽免疫原构建体中的Th表位可在目标抗原位点的氨基端或羧基端共价连接,以产生嵌合的Th/B细胞位点肽免疫原。在一些实施例中,Th表位可以透过化学耦合或直接合成的方式共价连接至目标抗原位点。在一些实施例中,Th表位与目标抗原位点的氨基端共价连接。在其他实施例中,Th表位与目标抗原位点的羧基端共价连接。在某些实施例中,一个以上的Th表位与目标抗原位点共价连接。当一个以上的Th表位与目标抗原位点连接时,每个Th表位可具有相同氨基酸序列或不同氨基酸序列。此外,当一个以上的Th表位与目标抗原位点连接时,Th表位可以任何顺序排列。例如,Th表位可连续地连接到目标抗原位点的氨基端,或连续地连接到目标抗原位点的羧基端,或一Th表位可与目标抗原位点的氨基端共价连接,而另一Th表位与目标抗原位点的羧基端共价连接。Th表位相对于目标抗原位点的排列并无限制。

[0109] 在一些实施例中,Th表位直接与目标抗原位点共价连接。在其他实施例中,Th表位透过下文进一步详细描述的同源性间隔子与目标抗原位点共价连接。

[0110] 合成方法

[0111] 可使用化学方法合成本揭露肽免疫原。在一些实施例中,可使用固相肽合成法合成本揭露的肽免疫原。在一些实施例中,利用t-Boc或Fmoc以保护 α -NH₂或侧链氨基酸使用自动化美利弗德(Merrifield)固相肽合成法来合成本发明的肽。

[0112] 作为组合序列呈现的同源性Th表位肽包含基于此特定肽之同源物的可变残基在肽框架内的特定位置处表示的氨基酸残基的混合物。藉由于合成过程中在指定位置添加指定受保护的氨基酸混合物,而非一种特定氨基酸,可在一个程序中合成组合肽的组装。此种组合同源性Th表位肽组装可允许对具有不同遗传背景之动物的广泛Th表位覆盖。同源性Th表位肽的代表性组合序列包括SEQ ID NOs:5、10、13、16、24和27,如表1所示。本发明Th表位肽对来自遗传多样性群体的动物和患者提供广泛的反应性和免疫原性。

[0113] 有趣的是,在Th表位、B细胞表位及/或含有Th表位和B细胞表位的肽免疫原构建体合成过程中可能引入的不一致性及/或错误于接受治疗的动物中通常不会妨碍或阻止欲求

的免疫反应。事实上,在肽合成期间可能引入的不一致性/错误会伴随目标肽合成产生多种肽类似物。这些类似物可包括氨基酸插入、缺失、取代和提前终止。如上所述,在用于免疫学应用时,这些肽类似物适合作为肽制剂中抗原性和免疫原性的提供者,或作为用于免疫诊断目的的固相抗原或作为用于疫苗接种目的的免疫原。

[0114] 包含Th表位的肽免疫原构建体在与目标抗原位点串联的单一固相肽合成中同时产生。Th表位还包括Th表位的免疫类似物。免疫性Th类似物包括免疫增强类似物、交叉反应性类似物和任何这些Th表位的片段,其足以增强或刺激针对目标抗原位点的免疫反应。

[0115] 在完成欲求肽免疫原的组装后,可处理固相树脂,以将肽从树脂上切割下来,并除去氨基酸侧链上的官能基。透过HPLC纯化游离肽并分析生化特征。在一些实施例中,以氨基酸分析来描绘游离肽的生化特征。在一些实施例中,以肽序列来描绘游离肽的特征。在一些实施例中,以质谱仪分析描绘游离肽的特征。

[0116] 本发明肽免疫原可以透过硫醚键的形成,使用卤代乙酰化(haloacetylated)和半胱氨酸化(cysteinyllated)肽进行合成。在一些实施例中,可将半胱氨酸加至含Th肽的羧基端,且半胱氨酸残基的硫醇基可用于与亲电子基团(例如N^α氯乙酰-修饰基团或马来酰亚胺(maleimide)衍生的离氨酸残基的 α -或 ϵ -NH₂基团)形成共价键。所获得的合成中间体可以连接到目标抗原位点肽的氨基端,

[0117] 可使用核酸克隆技术合成更长的合成肽缀合物。在一些实施例中,本发明的Th表位可透过表达重组DNA和RNA来合成。为了构建表达本发明Th/目标抗原位点肽的基因,可将氨基酸序列反翻译成核酸序列。在一些实施例中,使用对于其中具有待表现基因的生物体来说优化的密码子将氨基酸序列反翻译成核酸序列。可制备编码肽的基因。在一些实施例中,编码肽的基因可以透过合成编码肽及必要调节因子的重叠寡核苷酸来制备。将合成的基因进行组装并插入欲求的表达载体中。

[0118] 本揭露的合成核酸序列包括多个核酸序列,其编码本发明Th表位、包含Th表位的肽、其免疫学功能同源物、以及以于非编码序列的变化为特征的核酸结构(其未改变肽或编码的Th表位的免疫学特性)。将合成的基因插入适合的克隆载体中,以获得并分析重组体。然后在适合于所选表达系统及宿主的条件下表达Th表位及包含Th表位的肽。纯化及表征Th表位或肽。

[0119] 医药组合物

[0120] 本揭露更描述了包含本揭露肽免疫原的医药组合物。在一些实施例中,本揭露医药组合物可作为药学上可接受的传送系统,用于投予肽免疫原。在一些实施例中,本揭露医药组合物可包含一或多种肽免疫原的免疫有效剂量。

[0121] 本发明的肽免疫原可配制成免疫原性组合物。在一些实施例中,免疫原性组合物可包含佐剂、乳化剂、药学上可接受的载体或疫苗组合物中常规提供的其他成分。可用于本发明的佐剂或乳化剂包括明矾、不完全弗氏佐剂(IFA)、liposyn、皂苷、角鲨烯、L121、emulsigen、单磷酸脂质A(MPL)、二甲基双十八烷基溴化铵(DDA)、QS21和ISA 720、ISA 51、ISA35、ISA 206和其他有效的佐剂和乳化剂。在一些实施例中,本发明的组合物可以配制成立即释放。在一些实施例中,本发明的组合物可以配制成持续释放。

[0122] 药物组合物中使用的佐剂可包括油类、铝盐、仿病毒颗粒(virosomes)、磷酸铝(例如ADJU-PHOS®)、氢氧化铝(例如ALHYDROGEL®)、liposyn、皂苷、角鲨烯、L121、

Emulsigen®,单磷酸脂质A (MPL)、QS21、ISA 35、ISA 206、ISA50V、ISA51、ISA 720及其他佐剂和乳化剂。

[0123] 在一些实施例中,药物组合物含有Montanide™ ISA 51(由植物油和二缩甘露醇油酸酯组成的油质佐剂组合物,用于生产油包水乳液)、**TWEEN® 80**(也称为聚山梨醇酯80或聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单油酸酯)、CpG寡核苷酸及/或其任意组合。在其他实施例中,医药组合物是含有作为佐剂的EMULSIGEN或EMULSIGEN D的水包油包水(即w/o/w)乳液。

[0124] 在一些实施例中,可配制组合物作为疫苗。疫苗组合物可以透过任何方便的途径给药,包括皮下、口服、肌肉内、腹膜内、肠胃外或肠内给药。在一些实施例中,免疫原以单剂量给予。在一些实施例中,免疫原以多剂量给予。

[0125] 药物组合物可配制成注射剂型,为液体溶液或悬浮液。含有肽免疫原构建体的液体载体也可在注射前制备。医药组合物可透过任何适合的用法给予,例如,i.d.、i.v.、i.p.、i.m.、鼻内、口服、皮下等,且可置于任何适合的传送装置中施用。在某些实施例中,配制的医药组合物可以静脉、皮下、皮内或肌肉内给予。也可制备成适合其他给药方式的医药组合物,包括口服和鼻内给予。

[0126] 本发明组合物可含有一或多种肽免疫原的有效剂量和药学上可接受的载体。在一些实施例中,合适剂量单位形式的组合物可含有每kg受试者体重约0.5μg至约1mg的肽免疫原。在一些实施例中,合适剂量单位形式的组合物可为每kg受试者体重含有约10μg、约20μg、约30μg、约40μg、约50μg、约60μg、约70μg、约80μg、约90μg、约100μg、约200μg、约300μg、约400μg、约500μg、约600μg、约700μg、约800μg、约900μg或约1000μg的肽免疫原。在一些实施例中,合适剂量单位形式的组合物可含有每kg受试者体重约100μg、约150μg、约200μg、约250μg、约300μg、约350μg、约400μg、约450μg或约500μg的肽免疫原。在一些实施例中,合适剂量单位形式的组合物可含有每kg受试者体重约0.5μg至约1mg的肽免疫原。在一些实施例中,合适剂量单位形式的组合物可含有约10μg、约20μg、约30μg、约40μg、约50μg、约60μg、约70μg、约80μg、约90μg、约100μg、约200μg、约300μg、约400μg、约500μg、约600μg、约700μg、约800μg、约900μg或约1000μg的肽免疫原。在一些实施例中,合适剂量单位形式的组合物可含有约100μg、约150μg、约200μg、约250μg、约300μg、约350μg、约400μg、约450μg或约500μg的肽免疫原。

[0127] 当以多剂量传送时,组合物可以依剂量分成适当的量。在一些实施例中,剂量为约0.2mg至约2.5mg。在一些实施例中,剂量为约1mg。在一些实施例中,剂量为约1mg并以注射给予。在一些实施例中,剂量为约1mg并经肌肉内给予。在一些实施例中,一剂之后可以是重复(加强)剂量。可根据受试者的年龄、体重和一般健康状况优化剂量。

[0128] 包含肽免疫原混合物的疫苗可在更广泛的群体中提供增强的免疫效果。在一些实施例中,肽免疫原的混合物包含衍生自MVF Th和HBsAg Th的Th位点。在一些实施例中,包含肽免疫原混合物的疫苗可以提供针对目标抗原位点的改善的免疫反应。

[0129] 针对Th/目标抗原位点缀合物的免疫反应可以藉由透过包埋于生物降解微粒中或于其上进行递送而加以改善。在一些实施例中,肽免疫原可以在有或无佐剂的状况下进行包封,且这种微粒可以携带免疫刺激佐剂。在一些实施例中,可共同给予微粒与肽免疫原以增强免疫反应。

[0130] 免疫刺激复合物

[0131] 本揭露也关于含有与CpG寡核苷酸形成免疫刺激复合物的肽免疫原构建体的医药组合物。CpG寡核苷酸的示例如表5所示。此种免疫刺激复合物特别适合作为佐剂及肽免疫原稳定剂。免疫刺激复合物呈颗粒形式,可有效地将肽免疫原呈现给免疫系统的细胞,产生免疫反应。免疫刺激复合物可配制成肠胃外给予的悬浮液。免疫刺激复合物也可以以w/o乳液的形式配制,作为与矿物盐或原位凝胶聚合物结合的悬浮液,以在肠胃外给药后,可将肽免疫原有效传送到宿主免疫系统的细胞。

[0132] 稳定化的免疫刺激复合物可藉由透过静电结合将肽免疫原构建体与阴离子型分子、寡核苷酸、多核苷酸或其组合复合而形成。稳定化的免疫刺激复合物可并入医药组合物中,作为免疫原传送系统。

[0133] 在某些实施例中,将肽免疫原构建体设计为含有阳离子部分,其在pH5.0至8.0的范围内带正电荷。肽免疫原构建体或结构混合物的阳离子部分的净电荷计算是依据,序列中每个赖氨酸(K)、精氨酸(R)或组氨酸(H)带有+1电荷,每个天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)带有-1电荷,以及其它氨基酸所带的电荷为0。将在肽免疫原构建体的阳离子部分内的电荷相加并表示为净平均电荷。适合的肽免疫原具有具有净平均正电荷为+1的阳离子部份。优选地,肽免疫原具有范围大于+2的净正电荷。在一些实施例中,肽免疫原构建体的阳离子部分是异源性间隔子。在某些实施例中,当间隔子序列是 $(\alpha, \epsilon\text{-N})\text{Lys}$ 或 $\epsilon\text{-N-Lys-Lys-Lys-Lys}$ (SEQ ID NO:53)时,肽免疫原构建体的阳离子部分具有+4电荷。

[0134] 如本文所述的“阴离子型分子”是指pH5.0-8.0范围内带负电荷的任何分子。在某些实施例中,阴离子型分子是寡聚合物或聚合物。寡聚合物或聚合物上的净负电荷计算是依据,在寡聚合物中每个磷酸二酯或硫代磷酸酯基团带有-1电荷。适合的阴离子型寡核苷酸是具有8至64个核苷酸碱基的单链DNA分子,其CpG基序的重复数在1至10的范围内。优选地,CpG免疫刺激性单股DNA分子含有18至48个核苷酸碱基,其CpG基序的重复数在3至8的范围内。

[0135] 更优选地,阴离子型寡核苷酸可以分子式 $5'X^1CGX^23'$ 表示,其中C和G是未甲基化的; X^1 选自由A(腺嘌呤)、G(鸟嘌呤)和T(胸腺嘧啶)组成的群组;且 X^2 为C(胞嘧啶)或T(胸腺嘧啶)。或者,阴离子型寡核苷酸可以分子式 $5'(X^3)_2CG(X^4)_23'$ 表示,其中C和G为未甲基化的;且 X^3 选自由A、T或G组成的群组;且 X^4 为C或T。

[0136] 所获得的免疫刺激复合物呈颗粒形式,其大小通常为1-50微米,且是许多因子(包括相互作用成分的相对电荷化学计量和分子量)的函数。颗粒状免疫刺激复合物可提供佐剂化和在体内上调特异性免疫反应的优点。此外,稳定化的免疫刺激复合物适合透过各种方法(包括油包水乳液、矿物盐悬浮液和聚合凝胶)制备医药组合物。

[0137] 应用

[0138] 本发明的肽可应用于医学和兽医学。在一些实施例中,本发明的肽可作为疫苗以提供对传染病的保护性免疫、作为治疗因正常生理过程失常所致疾病的免疫疗法、作为治疗癌症的免疫疗法,以及作为干预或改变正常生理过程的药剂。

[0139] 当与各种微生物、蛋白质或肽的目标B细胞表位组合时,本揭露的人工Th表位可引发免疫反应。在一些实施例中,本揭露的人工Th表位可与一个目标抗原位点连接。在一些实施例中,本揭露的人工Th表位可与两个目标抗原位点连接。

[0140] 本揭露人工Th表位可与目标抗原位点连接以预防及/或治疗各种疾病和病症。在

一些实施例中,本发明组合物可用于预防及/或治疗神经退化性疾病、传染病、动脉硬化、前列腺癌、预防公猪臭、用于动物的免疫去势、治疗子宫内膜异位症、乳癌和受性腺类固醇激素影响的其他妇科癌、以及作为男性和女性的避孕药。例如,人工Th表位可连接下列蛋白质的抗原位点:

[0141] a. 促生长素抑制素以促进经济动物的生长

[0142] b. IgE以治疗过敏性疾病

[0143] c. Th细胞的CD4受体以治疗及/或预防人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染和免疫失调

[0144] d. 口蹄疫 (FMD) 病毒衣壳蛋白以预防口蹄疫

[0145] e. HIV病毒颗粒表位以预防及治疗HIV感染

[0146] f. 恶性疟原虫的环孢子蛋白抗原以预防及治疗疟疾

[0147] g. CETP以预防及治疗动脉硬化

[0148] h. A β 以针对阿尔兹海默氏症进行治疗或疫苗接种

[0149] i. α -突触核蛋白以针对帕金森氏症进行治疗或疫苗接种

[0150] j. Tau以针对包括阿尔兹海默氏症的tau蛋白病进行治疗及疫苗接种

[0151] k. IL-31以治疗异位性皮炎

[0152] 已发现使用异源性人工Th表位对于靶向涉及神经退化性疾病的蛋白质(例如,A β 、 α -突触核蛋白、Tau)特别重要。具体来说,含有靶向神经退化性蛋白质的内源性Th表位的肽免疫原在给予受试者时会引起脑炎。相反地,含有连接至神经退化性蛋白质的抗原位点的异源性人工Th表位的肽免疫原构建体不会引起脑炎。

[0153] β 淀粉样蛋白

[0154] A β 肽被认为是阿尔兹海默氏症发生和发展的关键。A β 寡聚体和A β 纤维的毒性形式被认为是导致阿尔兹海默氏症和痴呆病理的突触和神经元死亡的原因。针对阿尔兹海默氏症的成功改善病程进展的治疗可包括影响脑中A β 动向的产品。

[0155] 本揭露的肽免疫原包含Th细胞表位和A β 靶向肽。在一些实施例中,Th细胞表位为Th1或Th2。在一些实施例中,肽免疫原可包含Th1和Th2。A β 靶向肽或B细胞表位可为A β ₁₋₁₄、A β ₁₋₁₆、A β ₁₋₂₈、A β ₁₇₋₄₂或A β ₁₋₄₂。在一些实施例中,A β 靶向肽是A β ₁₋₁₄。如本文所用,术语“A β _{x-y}”表示全长野生型A β 蛋白的从氨基酸x至氨基酸y的A β 序列。

[0156] 本揭露肽免疫原可包含一种以上的A β 靶向肽。在一些实施例中,肽免疫原可包含2种A β 靶向肽。在一些实施例中,肽免疫原可包含一种A β ₁₋₁₄和一种A β ₁₋₄₂肽。在一些实施例中,肽免疫原可包含2种A β ₁₋₁₄靶向肽。在一些实施例中,肽免疫原可包含2种A β ₁₋₁₄靶向肽,每种肽可与不同的Th细胞表位连接作为嵌合肽。

[0157] 本揭露还提供包含2种A β ₁₋₁₄靶向肽的A β ₁₋₁₄肽疫苗,每种A β ₁₋₁₄靶向肽与不同的Th细胞表位连接作为嵌合肽。在一些实施例中,嵌合A β ₁₋₁₄肽可配制于Th1偏向递送系统中以使T细胞炎性反应最小化。在一些实施例中,嵌合A β ₁₋₁₄肽可配制于Th2偏向传递系统中以使T细胞炎性反应最小化。

[0158] 通则

[0159] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,不应被理解为限制所描述的主题。本申请中引用的所有参考文献或其部分出于任何目的透过引用明确地将整体并入本文。

[0160] 除非特别说明,在此使用的所有技术和科学用语与本发明所属技术领域中具有通

常知识者的通常理解具有相同意义。除非上下文清楚地指出,否则单词“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包含复数形式。类似地,单词“或(or)”是意指包括“和(and)”,除非上下文另有明确说明。因此,“包含A或B”是指包括A,或B,或A和B。更应被理解的是,用于给定多肽的所有的氨基酸大小和所有分子量或分子质量值是近似的,并且被提供作为描述之用。然而类似或等同于在此描述者的方法和材料可被用于以下所述之揭露的方法、合适的方法和材料的实践或测试中。在此提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献透过引用整体并入本文。在冲突的情况下,以本说明书(包括术语的解释)为准。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的而非意指加以限制。

[0161] 实施例

[0162] 实施例1. 肽和肽免疫原构建体的制备

[0163] 使用自动化固相合成法合成肽(包括肽免疫原构建体),以预备的HPLC进行纯化,并使用基质辅助激光脱附离子化飞行时间(MALDI-TOF)质谱仪、氨基酸分析和反相HPLC描绘特性。

[0164] A β 疫苗(UB-311)包含2种肽免疫原,每种都具有氨基端A β_{1-14} 肽,其透过氨基酸间隔子合成地连接至衍生自2种病原体蛋白质(乙型肝炎表面抗原及麻疹病毒融合蛋白)的不同Th细胞表位肽(UBI $\text{Th}^{\text{®}}$ 表位)。具体来说,与麻疹病毒融合蛋白连接的肽免疫原是A β_{1-14} - ϵ K-KKK-MvF5 Th (SEQ ID NO:67),而与乙型肝炎表面抗原连接的肽免疫原是A β_{1-14} - ϵ K-HBsAg3Th (SEQ ID NO:68)。

[0165] UB-311配制于含有明矾的Th2偏向递送系统中,并含有等摩尔比值的A β_{1-14} - ϵ K-HBsAg3 Th与A β_{1-14} - ϵ K-KKK-MvF5 Th肽。将2种A β 免疫原与聚阴离子CpG寡脱氧核苷酸(ODN)混合以形成微米级颗粒的稳定免疫刺激复合物。将铝矿物盐(ADJU-PHOS $^{\text{®}}$)加入到最终剂型中,同时加入氯化钠调整张力及0.25%的2-苯氧基乙醇作为防腐剂。

[0166] 几个例示性的目标抗原位点(B细胞表位)的序列显示于表3中。几种例示性肽免疫原构建体(含有A β_{1-14} 作为目标抗原位点以与Th表位共价连接)的序列如表4所示。

[0167] 实施例2. 肽免疫原构建体在豚鼠中的独特免疫原性,其靶向A β 肽,而非Th表位

[0168] 利用以等摩尔比值配制在一起的肽免疫原构建体A β_{1-14} - ϵ K-KKK-MvF5Th (SEQ ID NO:67)和A β_{1-14} - ϵ K-HBsAg3 Th (SEQ ID NO:68)在第0周和第4周免疫接种六只豚鼠。在第8周,将动物放血并收集血清样品,以ELISA分析测定抗A β 肽和抗Th表位抗体的效价(log₁₀)。所有6只豚鼠的抗体反应特异性地靶向A β_{1-42} 肽,而非2种人工Th表位(MvF5 Th和HBsAg3 Th),如表6所示。

[0169] 实施例3. 狒狒和猕猴外周血单个核细胞(PBMC)培养物中的细胞免疫反应

[0170] 透过Ficoll-hypaque梯度离心分离来自狒狒和食蟹猕猴的外周血单个核细胞(PBMC)。对于肽诱导的增殖和细胞因子生成,将细胞(每孔洞 2×10^5 个细胞)单独培养或与加入的个别肽结构域(包括A β_{1-14} 、A β_{1-42} 、UBI $\text{Th}^{\text{®}}$ 和非相关肽)一起培养。以促进细胞分裂原(PHA、PWM、Con A)作为阳性对照组(于培养物中体积百分比为1% (v/v),浓度为10 μ g/mL)。在第6天,将1 μ Ci的3H-胸腺嘧啶核苷(3H-TdR)加入三重培养孔洞中的每一个孔洞内。培养18小时后,收集细胞并分析3H-TdR嵌合。刺激指数(S.I.)表示为抗原存在下的平均每分钟计数(cpm)除以不存在抗原时的cpm;S.I.>3.0被认为具有显著差异。

[0171] 来自食蟹猕猴PBMC培养物的细胞因子(IL-2、IL-6、IL-10、IL-13、TNF α 、IFN γ)分析是在仅有培养基或在肽结构域或促细胞分裂原存在下的培养基的等分样本上进行。根据试剂盒说明将猴特异性细胞因子三明治ELISA试剂盒(U-CyTech Biosciences,Utrecht, The Netherlands)用于测定个别细胞因子的浓度。

[0172] 由在第15、21和25.5周从猕猴收集的全血中分离PBMCs。在各种A β 肽(A β ₁₋₁₄和A β ₁₋₄₂)存在下培养分离的PBMCs。

[0173] 当加入A β ₁₋₁₄肽至培养基时,未观察到淋巴细胞的增殖反应。然而,当将A β ₁₋₄₂肽添加至PBMC培养物时,可发现阳性增殖反应。

[0174] 还在A β 肽或PHA促细胞分裂原存在下分析在第15、21和25.5周所收集PBMC样本的细胞因子的分泌。如表7所示,三种细胞因子(IL-2、IL-6、TNF α)显示出对于全长A β ₁₋₄₂肽而非A β ₁₋₁₄肽反应的可检测的分泌;与安慰剂疫苗样本相比,在UBI $\text{Th}^{\text{®}}$ AD疫苗处理的样品中未检测到细胞因子分泌的上调。于A β 肽存在下,测试的其它3种细胞因子(IL-10、IL-13、IFN γ)在所有PBMC培养物中低于检测极限。

[0175] 使用仅具有含有外源T辅助细胞表位的氨基端A β ₁₋₁₄肽免疫原的UB-311疫苗免疫食蟹猕猴,其没有A β ₁₇₋₄₂肽结构域,显示在A β ₁₋₄₂肽存在下于PBMC培养物中所注意到的阳性增殖结果与UB-311疫苗反应无关,而是对天然A β 的背景反应。

[0176] 此结果支持仅具有A β ₁₋₁₄和外源T辅助细胞表位的UB-311疫苗的安全性,证明其不会对正常食蟹猕猴中A β 肽产生潜在的炎性抗自身细胞介导的免疫反应。相反地,在AN-1792疫苗的临床试验研究与脑炎相关的不良事件部分可归因于在疫苗的纤维/聚集A β ₁₋₄₂免疫原中包含T细胞表位。

[0177] 实施例4. 淋巴细胞增殖分析及细胞因子分析

[0178] 透过Ficoll-hypaque梯度离心分离阿尔兹海默氏症患者的外周血单个核细胞(PBMC)。对于肽诱导的增殖和细胞因子产生,以三重复的方式,将细胞(每孔洞 2.5×10^5 个细胞)单独培养,或将细胞与加入的个别肽结构域(最终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$)一起培养,肽结构域包括A β ₁₋₁₄(SEQ ID NO:56)、A β ₁₋₁₆(SEQ ID NO:57)、A β ₁₋₂₈(SEQ ID NO:59)、A β ₁₇₋₄₂(SEQ ID NO:58)、A β ₁₋₄₂(SEQ ID NO:60)和非相关的38-mer肽(p1412)。将培养物在 37°C 下于5%CO₂环境中培养72小时,然后从每个孔洞中取出 $100 \mu\text{L}$ 上清液并冷冻于 -70°C 供细胞因子分析使用。于每个孔洞中添加 $10 \mu\text{L}$ 含有 $0.5 \mu\text{Ci}$ 的 ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR, Amersham, Cat No. TRK637)的培养基,并培养18小时,然后以液体闪烁计数器检测嵌入的放射性同位素。以促细胞分裂原植物血凝素(PHA)作为淋巴细胞增殖的阳性对照组。以没有A β 肽之单独培养的细胞或PHA促细胞分裂原分别作为阴性及阳性对照组。刺激指数(SI)的计算为具有A β 肽的三重复实验培养物的平均每分钟计数(cpm)除以三重复阴性对照组培养物的平均cpm;SI > 3.0 被认为是显著的增殖反应。

[0179] a. 增殖分析

[0180] 由于第0周(基线)和第16周(接种第三剂后4周)收集的全血中分离出外周血单个核细胞样品,然后在不存在或存在各种A β 肽的情况下进行培养。如表8所示,当在培养基中加入A β ₁₋₁₄、其他A β 肽或p1412(非相关对照肽)时,未观察到淋巴细胞的显著增殖反应。如所预期的,当将PHA促细胞分裂原添加至培养基中时,有阳性增殖反应。在UB-311免疫前、后观察到与对PHA类似的反应($p=0.87$)表示研究受试者的免疫功能没有显著改变(表8)。

[0181] 统计分析。以配对t检验分析第0周和第16周之间淋巴细胞增殖的差异。以双尾检测确定统计显著性水平 ($p < 0.05$)。使用R version 2.14.1进行所有的统计分析。

[0182] b. 细胞因子分析

[0183] 来自PBMC培养物的细胞因子分析 (IL-2、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ) 是在培养基 (只具有细胞的培养基,或在A β 肽结构域或PHA存在下的具有细胞的培养基) 的等分试样上进行。根据制造商的说明书,使用人类特异性细胞因子三明治ELISA试剂盒 (U-CyTech Biosciences, Utrecht, The Netherlands) 检测各细胞因子的浓度 (pg/mL) (Clin Diag Lab Immunol. 5 (1) :78-81) (1998))。

[0184] 将在第0周和第16周收集的PBMC样本也用于测试细胞因子分泌,其在单独细胞 (阴性对照组) 或细胞在A β 肽、p1412 (非相关肽) 或PHA促细胞分裂原 (阳性对照组) 存在下培养3天后进行测试。试剂盒的可量化范围介于5至320pg/mL之间。低于5pg/mL或高于320pg/mL的任何测量浓度分别以低于定量极限 (BQL) 或高于定量极限 (AQL) 表示。然而,出于统计考虑, BQL或AQL分别用较低 (5pg/mL) 或较高 (320pg/mL) 的可量化极限值替换。在第0周和第16周的每种细胞因子平均浓度如表9所示。如预期,除了IL-2之外,在PHA存在下 (阳性对照组) 细胞因子的产生显著增加。在基线 (第0周) 和第16周可观察到对利用A β_{1-14} 或其他A β 肽刺激反应的细胞因子生成,但出现的大多数数值与相对应的阴性对照组 (仅有细胞) 相似。

[0185] 为了评估免疫后细胞介导的免疫反应的变化,将从基线到第16周的平均细胞因子浓度变化与阴性对照组进行比较,并以配对Wilcoxon符号等级检验 (Wilcoxon signed-rank test) 进行检验。在对全长A β_{1-42} 肽反应中显示出4种细胞因子 (IFN- γ 、IL-6、IL-10、TNF- α) 的分泌显著增加;此观察结果可能是由于A β_{1-42} 聚集体的构型表位。在A β_{1-14} 或其他A β 肽中未检测到细胞因子分泌的上调。

[0186] c. 摘要

[0187] UB-311疫苗含有2种肽免疫原,每种都具有分别与MvF5 Th和HBsAg3Th表位合成连接的氨基端A β_{1-14} 肽。以体外淋巴细胞增殖和细胞因子分析评估UB-311疫苗接种对细胞免疫反应的影响。当将A β_{1-14} 肽或任何其他A β 肽添加到培养基时,未观察到淋巴细胞的增殖反应,如表8所示。除了A β_{1-42} 以外,在利用A β_{1-14} 和其他A β 肽处理后未检测到UB-311疫苗接种患者淋巴细胞的细胞因子分泌的上调,当与处理前第0周的水平相比时,A β_{1-42} 在UB-311免疫接种后于第16周引起4种细胞因子 (IFN- γ 、IL-6、IL-10、TNF- α) 明显增加 (表9)。因为单独使用A β_{1-14} 未检测到细胞因子上调,所以透过Th2型T细胞反应导致的细胞因子释放增加更可能与UB-311疫苗反应无关。对A β_{1-42} 的反应被怀疑是对天然A β 的背景反应,其可能与A β_{1-42} 上鉴定的天然T辅助细胞表位有关。观察到在对PHA的反应中缺乏IL-2产生,这与利用正常人PBMC在相似的实验条件下于Clin Diagn Lab Immunol 1998;5:78-81中由Katial RK等人报导的结果一致。总而言之,这些结果显示UB-311疫苗在参与第I期临床试验的轻至中度阿尔兹海默氏症患者中未产生可能的炎性抗自身、细胞介导免疫反应,因此进一步证明UB-311疫苗的安全性。

[0188] 实施例5. 相较于阴性对照组在具有中度免疫原性炎性反应的正常血液供体中的幼稚外周血单个核细胞 (PBMC) 内可检测到混杂的人工Th反应细胞

[0189] ELISpot分析可用于检测正常血液供体中的幼稚外周血单个核细胞内的混杂人工Th反应细胞,以评估当与强效促细胞分裂原植物血凝素 (PHA) 和阴性对照组相比时其引发

炎性反应的能力。

[0190] ELISpot测定使用三明治酶联免疫吸附分析法(ELISA)技术。为了分析T细胞的活化,检测IFN- γ 或相关细胞因子作为分析物。将对所选分析物具有特异性的单克隆或多克隆抗体预先涂覆在以PVDF(聚偏氟乙烯)膜为底的微孔板上。将适当刺激的细胞移到孔洞中,并将微孔板置于加湿的37°C CO₂培养箱中一段特定的时间。在培养期间,固定化的抗体紧邻分泌细胞,与分泌的分析物结合。在洗去任何细胞和未结合的物质后,于孔洞中加入对所选分析物具有特异性的生物素化多克隆抗体。清洗除去任何未结合的生物素化抗体后,加入与链霉抗生物素蛋白缀合连接的碱性磷酸酶。接着清洗去除未结合的酶,并加入基质溶液(BCIP/NBT)。形成蓝黑色沉淀并在细胞因子定位的位点处出现斑点,每个单独的斑点代表个别分析物分泌细胞。使用自动ELISpot图像分析仪系统或立体显微镜手动计数计算斑点的数目。

[0191] 在进行的体外研究中,将PHA浓度为10 μ g/mL的培养物作为阳性对照组。针对呈现于定期正常血液供体外周血单个核细胞内的反应细胞数目,测试UBITh®1 (SEQ ID NO:17) 和UBITh®5 (SEQ ID NO:6) 肽。制备具有SEQ ID NOs:33至52混杂人工Th表位肽的混合物作为另一阳性对照组。以单独培养基作为标准T细胞刺激细胞培养条件中的阴性对照组。简单来说,将利用促细胞分裂原(浓度为10 μ g/mL的PHA) 或Th抗原(UBITh®1、UBITh®5或多个Ths混合物,浓度为10 μ g/mL) 刺激的PBMCs(体积为100 μ L/孔洞,含2x10⁵个细胞) 在CO₂培养箱中于37°C反应48小时。收集孔洞/微孔盘的上清液。清洗并处理微孔盘上的细胞以检测目标分析物,IFN- γ 。

[0192] 如图1所示,针对其对混杂人工UBITh®1或UBITh®5表位肽的反应细胞,将代表性供体1、2和3进行测试。利用与PHA培养的幼稚供体PBMCs总是检测到压倒性的IFN- γ ELISPOT数目(数量太多而不能计数),而用对照培养基培养的PBMCs给出介于5到50之间的背景IFN- γ ELISPOT数目。对于使用UBITh®1或UBITh®5培养的幼稚供体PBMCs检测到介于20到约120的中等ELISPOT数值。具有SEQ ID NOs:33-52的多种Th肽的混合物也可与幼稚供体PBMCs进行培养以比较ELISPOT数值(如同预期,其数目为20至约300)。与阴性对照组相比,由UBITh®1或UBITh®5肽引发的刺激反应为约3至5倍。

[0193] 综上所述,在幼稚供体PBMCs中可轻易地检测到混杂人工Th反应细胞,其随时准备引发免疫反应以协助B细胞抗体产生,并透过分泌特征性细胞因子以协助相对应的效应T细胞反应。在此使用IFN- γ 作为实例说明这些Th表位肽的刺激特性。然而,此种刺激性炎症反应足够适度的去引发适合的效应细胞反应(产生抗体的B细胞,可杀死目标抗原细胞的细胞毒性T细胞),使疫苗接种过程中不会引起不利的发炎病理生理反应。

[0194] 表1、用于肽免疫原构建体设计包括理想化人工Th表位的病原体蛋白质衍生的Th表位的氨基酸序列

说明	序列	SEQ ID NO
MvF Th (SSAL1 Th1)	DLSDLKGLLLHKLDGL	1
	EI EIR III RIE I	2
	V V VVV V V	3
	F F FFF F F	4
	XXSXXXGXXXHXXGX	5
MvF1 Th (UBITh@5)	LSEIKGVIVHRLEGV	6
MvF2 Th	ISEIKGVIVHKIEGI	7
MvF3 Th	ISISEIKGVIVHKIEGILF	8
	T RT TR T	9
	ISIXEIXXVIVXXIEXILF	10
KKKMvF3 Th	KKKISISEIKGVIVHKIEGILF	11
	T RT TR T	12
	KKKISIXEIXXVIVXXIEXILF	13
MvF4 Th (UBITh@3)	ISISEIKGVIVHKIETILF	14
	T RT TR	15
	ISIXEIXXVIVXXIETILF	16
MvF5 Th (UBITh@1)	ISITEIKGVIVHRIETILF	17
KKKMvF5 Th (UBITh@1a)	KKKISITEIKGVIVHRIETILF	18
HBsAg1 Th (SSAL2 Th2)	KKKFLLLTKLLTLPQSLD	19
	RRRIKI RII I L IR	20
	VRVV VV V I V	21
	F FF FF F V F	22
	F	23
XXXXXXXXTXXTXPXSXX	24	
HBsAg2 Th	KKKIITITRIITIPQSLD	25
	FFLL L ITTI	26
	KKKXXXTRIXTIXXXD	27
HBsAg3 Th (UBITh@2)	KKKIITITRIITITID	28
HBsAg Th (UBITh@4)	FFLLTRILTIPQSLD	29
KKK-HBsAg Th	KKKFFLLTRILTIPQSLD	30
HBsAg Th	FFLLTRILTIPQSL	31
百日咳杆菌 Th (UBITh@7)	GAYARCPNGTRALTVAELRGNAEL	32
霍乱毒素Th	ALNIWDRFDVFTLGATTGYLKGNS	33
破伤风杆菌 TT1 Th	QYIKANSKFIGITEL	34
破伤风杆菌 Th (UBITh@6)	KKQYIKANSKFIGITEL	35
破伤风杆菌 TT2 Th	FNNFTVSVFLRVPKVSASHLE	36
破伤风杆菌 TT3 Th	KFIIKRYTPNNEIDSF	37
破伤风杆菌 TT4 Th	VSIDKFRIFCKALNPK	38
破伤风杆菌2 Th	WVRDIIDDFTNESSQKT	39
白喉Th	DSETADNLEKTVAALSILPGHGC	40
EBV BHRF1 Th	AGLTLSELLVICSYLFISRG	41
EBV EBNA-1 Th	PGPLRESIVCYFMVFLQTHI	42
EBV CP Th	VPGLYSPCRAFFNKEELL	43
EBV GP340 Th	TGHGARTSTEPTDY	44
EBV BPLF1 Th	KELKRQYEKLRQ	45
EBV EBNA-2	TVFYNIIPMPL	46
HCMV IE1 Th	DKREMWMACIKELH	47
流行性感冒病毒MP1_1 Th	FVFTLTVPSER	48
流行性感冒病毒MPI 2 Th	SGPLKAEIAQRLEDV	49
流行性感冒病毒NSP1 Th	DRLRRDQKS	50
恶性疟原虫 Th	DHEKKHAKMEKASSVFNVNS	51
曼氏血吸虫Th	KWFKTNAPNGVDEKRRH	52

[0195]

[0196] 表2、任选的异源性间隔子的例子

[0197]

说明	序列/组成	SEQ ID NO
天然氨基酸	天然氨基酸包括： 丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸及缬氨酸。	N/A
非天然氨基酸	非天然氨基酸包括，但不限于： ϵ -N赖氨酸、 β -丙氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、甲状腺素、 γ -氨基丁酸、高丝氨酸、瓜氨酸、氨基苯甲酸、6-氨基己酸(Aca; 6-氨基己酸)、巯基丙酸(MPA)、3-硝基酪氨酸、焦谷氨酸及其类似物。	N/A
化学物质	-NHCH(X)CH ₂ SCH ₂ CO-, -NHCH(X)CH ₂ SCH ₂ CO(ϵ N)Lys-, -NHCH(X)CH ₂ S-琥珀酰亚胺(ϵ N)Lys-, -NHCH(X)CH ₂ S-(琥珀酰亚胺)-	N/A
Gly-Gly	-GG-	N/A
Epsilon-N赖氨酸	ϵ -K	N/A
Epsilon-N赖氨酸-KKK	ϵ -K-KKK	53
KKK-Epsilon-N赖氨酸	KKK- ϵ -K	54
铰链序列	Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro	55

[0198] 表3、目标抗原位点(B细胞表位)的例子

说明	序列	SEQ ID NO
Aβ ₁₋₁₄	DAEFRHDSGYEVVHH	56
Aβ ₁₋₁₆	DAEFRHDSGYEVHHQK	57
Aβ ₁₇₋₄₂	LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	58
Aβ ₁₋₂₈	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	59
Aβ ₁₋₄₂	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	60
[0199] α-Syn ₁₂₆₋₁₃₅ (衍生自 GenBank: NP_000336)	EMPSEEGYQD	61
IgE EMPD ₁₋₃₉	GLAGGSAQSQRAPDRVLCHSGQQQLPRAAGGSVPHPRC	62
Tau ₃₇₉₋₄₀₈ (衍生自 GenBank: AGF19246.1)	RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHL	63
IL-31 ₉₇₋₁₄₄ (衍生自 Uniprot C7G0W1-1; GenBank: BAH97742.1)	LSDKNIIDKIIQLDKLKFQHEPETEISVPADTFECKSFILITLQQFS	64

[0200] 表4、例示性肽免疫原构建体

说明	序列	SEQ ID NO
[0201] Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK-MvF4 Th	DAEFRHDSGYEVVHH-εK-KKK-ISISEIKGVIVHKKIETILF T RT TR	65
Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg2 Th	DAEFRHDSGYEVVHH-εK-KKK-IITITRIITIPQSLD FLL L ITTI	66
Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK-MvF5 Th	DAEFRHDSGYEVVHH-εK-KKK-ISITEIKGVIVHRIETILF	67
Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg3 Th	DAEFRHDSGYEVVHH-εK-KKK-IITITRIITITITID	68

[0202] 表5、例示性CpG寡核苷酸

说明	序列/组成	SEQ ID NO
[0203] CpG1	5' TCg TCg TTT TgT CgT TTT gTC gTT TTg TCg TT 3' (完全硫代磷酸酯化)	69
CpG2	Phosphate TCg TCg TTT TgT CgT TTT gTC gTT 3'	70
[0204] CpG3	(完全硫代磷酸酯化) 5' TCg TCg TTT TgT CgT TTT gTC gTT 3' (完全硫代磷酸酯化)	71

[0205] 表6、Aβ₁₋₁₄免疫原在豚鼠中靶向Aβ肽而非Th表位的独特免疫原性

肽免疫原	动物 编号	第8周的抗体效价 (\log_{10})		
		$A\beta_{1-42}$ (SEQ ID NO: 60)	MvF5 Th (SEQ ID NO: 17)	HBsAg3 Th (SEQ ID NO: 28)
[0206] $A\beta_{1-14}$ - ϵ K-KKK-MvF5 Th (SEQ ID NO: 67) + $A\beta_{1-14}$ - ϵ K-HBsAg3 Th (SEQ ID NO: 68)	1	4.68	0.21	0.31
	2	3.88	0.33	0.42
	3	3.92	0.43	0.31
	4	3.58	0.54	0.55
	5	3.35	0.52	0.38
	6	3.48	0.40	0.42
	平均 值 (标准 偏差)	3.82 (0.48)	0.41 (0.12)	0.39 (0.09)

[0207] 表7、经 $A\beta_{1-14}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 肽或PHA (植物血凝素) 促细胞分裂原刺激于食蟹猕猴外周血单个核细胞 (PBMCs) 中的细胞因子浓度的分析

细胞因子	接种剂量	细胞因子浓度 ^a (pg/mL)		
		$A\beta_{1-14}$ (SEQ ID NO: 56)	$A\beta_{1-42}$ (SEQ ID NO: 58)	PHA
[0208] IL-2	安慰剂	BDL ^b	23.3 ± 13.1	90.6 ± 12.4
	150 μ g	BDL	19.4 ± 9.7	96.1 ± 13.3
	750 μ g	BDL	25.2 ± 11.8	97.5 ± 6.6

[0209] IL-6	安慰剂	BDL	23.1 ± 11.7	69.1 ± 12.0
	150 μ g	BDL	15.0 ± 9.1	70.6 ± 15.7
	750 μ g	BDL	23.4 ± 10.5	66.2 ± 7.3
TNF- α	安慰剂	BDL	9.2 ± 5.3	91.0 ± 29.1
	150 μ g	BDL	7.9 ± 4.8	96.1 ± 22.2
	750 μ g	BDL	7.8 ± 5.9	89.0 ± 13.7

[0210] ^a结果以平均值 ± 标准偏差显示

[0211] ^b BDL, 低于检测水平

[0212] 表8、评估19名阿尔兹海默氏症患者外周血单个核细胞的刺激指数

[0213]

肽	第0周	第16周	差异	配对t检验
	平均值 (标准偏差)	平均值 (标准偏差)	平均值 (标准偏差)	p值
Aβ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 56)	0.93 (0.36)	0.90 (0.22)	-0.03 (0.39)	0.73
Aβ₁₋₁₆ (SEQ ID NO: 57)	0.92 (0.30)	0.98 (0.25)	0.06 (0.40)	0.54
Aβ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 59)	0.96 (0.30)	1.04 (0.34)	0.08 (0.56)	0.55
Aβ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 58)	0.96 (0.34)	1.04 (0.29)	0.08 (0.49)	0.47
Aβ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 60)	0.97 (0.38)	1.08 (0.49)	0.10 (0.53)	0.40
p1412 (非相关肽)	0.87 (0.22)	0.99 (0.33)	0.11 (0.34)	0.18
PHA	28.73 (14.2)	27.75 (32.9)	-0.98 (26.6)	0.87

[0214]
浓度¹表9、A β 肽或PHA促细胞分裂原刺激后人类外周血单个核细胞(PBMC)中的细胞因子

[0215]

肽	Th1				Th2				2者	
	IL-2		IFN- γ		IL-6		IL-10		TNF- α	
	W0	W16	W0	W16	W0	W16	W0	W16	W0	W16
Aβ₁₋₁₄ (SEQ ID NO: 56)	31.1 (32.5)	31.2 (24.3)	13.5 (16.9)	16.1 (12.9)	31.3 (29.7)	50.7 (52.0)	5.7 (1.6)	5.6 (1.6)	36.8 (62.8)	39.8 (51.7)
Aβ₁₋₁₆ (SEQ ID NO: 57)	31.4 (31.4)	36.0 (23.9)	15.0 (16.1)	13.8 (14.2)	52.5 (31.7)	50.4 (42.6)	5.7 (1.6)	5.8 (1.8)	47.4 (72.2)	47.23 (69.7)
Aβ₁₋₂₈ (SEQ ID NO: 59)	36.7 (34.3)	40.6 (28.0)	16.0 (23.6)	20.7 (24.4)	31.7 (25.4)	42.3 (41.8)	5.6 (1.5)	6.2 (2.5)	41.6 (66.5)	51.2 (67.8)
Aβ₁₇₋₄₂ (SEQ ID NO: 58)	24.6 (25.7)	29.2 (21.2)	9.7 (9.7)	13.6 (15.6)	>44.6 (70.9) ³	46.9 (51.3)	5.3 (0.86)	5.6 (1.5)	15.6 (18.4)	24.8 (39.3)
Aβ₁₋₄₂ (SEQ ID NO: 60)	23.1 (17.7)	27.3 (16.9)	13.4 (16.1)	>44.8 (77.3)	>141 (130) ⁴	>202 (121) ⁵	11.1 (22.7)	31.9 (50.2)	>31.6 (71.5) ³	>88.8 (133) ⁶
p1412	30.9 (27.4)	40.0 (26.0)	14.4 (18.4)	21.7 (30.0)	31.8 (52.1)	60.7 (95.8)	5.3 (0.64)	5.2 (0.53)	17.1 (23.5)	20.9 (29.3)
PHA	10.4 ⁷ (11.3)	12.8 ⁷ (6.5)	>320 (0.00) ²	>319 (4.8) ²	>320 (0.00) ²	>320 (0.00) ²	174 (84.8)	>163 (99.7)	>313 (30.5) ²	>301 (46.5) ²
细胞对 照组	33.4 (24.9)	38.8 (33.1)	13.8 (12.3)	17.8 (18.2)	45.9 (41.9)	65.3 (76.5)	5.9 (2.5)	5.7 (1.6)	44.3 (70.9)	46.7 (67.8)

[0216] ¹测定的可量化范围介于5至320pg/mL[0217] ²>90%受试者的浓度高于量化限制上限 (AQL>320pg/mL)[0218] ³1名患者具AQL值[0219] ⁴6名患者具AQL值[0220] ⁵8名患者具AQL值

[0221] ⁶4名患者具AQL值

[0222] ⁷在对PHA促细胞分裂原反应中所观察到的缺乏IL-2产生与在类似实验条件下报导的数据一致

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile Glu Thr
 1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (22)

<223> KKKMvF3 Th

<400> 11

Lys Lys Lys Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys
 1 5 10 15

Ile Glu Gly Ile Leu Phe
 20

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (22)

<223> KKKMvF3 Th

<400> 12

Lys Lys Lys Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg
 1 5 10 15

Ile Glu Thr Ile Leu Phe
 20

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (22)

<223> KKKMvF 3 Th

<220>

<221> 位点

<222> (7) .. (7)

<223> S或T

<220>

<221> 位点

<222> (10) .. (10)

<223> K或R

<220>

<221> 位点

<222> (11) .. (11)

<223> G或T

<220>

<221> 位点

<222> (15) .. (15)

<223> H或T

<220>

<221> 位点

<222> (16) .. (16)

<223> K或R

<220>

<221> 位点

<222> (19) .. (19)

<223> G或T

<400> 13

Lys Lys Lys Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa

1 5 10 15

Ile Glu Xaa Ile Leu Phe

20

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (19)

<223> MvF4 Th

<400> 14

Ile Ser Ile Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Lys Ile Glu Thr

1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 15
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (19)
 <223> MvF4 Th
 <400> 15
 Ile Ser Ile Thr Glu Ile Arg Thr Val Ile Val Thr Arg Ile Glu Thr
 1 5 10 15
 Ile Leu Phe
 <210> 16
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (19)
 <223> MvF4 Th (UBITh3)
 <220>
 <221> 位点
 <222> (4) .. (4)
 <223> S或T
 <220>
 <221> 位点
 <222> (7) .. (7)
 <223> K或R
 <220>
 <221> 位点
 <222> (8) .. (8)
 <223> G或T
 <220>
 <221> 位点
 <222> (12) .. (12)
 <223> H或T
 <220>
 <221> 位点
 <222> (13) .. (13)

<223> K或R

<400> 16

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (19)

<223> MvF5 Th (UBITh1)

<400> 17

Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Ile Glu Thr
1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> 麻疹病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (22)

<223> KKKMvF5 Th (UBITh1a)

<400> 18

Lys Lys Lys Ile Ser Ile Thr Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg
1 5 10 15

Ile Glu Thr Ile Leu Phe

20

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> HBsAg1 Th

<400> 19

Lys Lys Lys Leu Phe Leu Leu Thr Lys Leu Leu Thr Leu Pro Gln Ser
 1 5 10 15

Leu Asp

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> HBsAg1 Th

<400> 20

Arg Arg Arg Ile Lys Ile Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Ile Arg

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> HBsAg1 Th

<400> 21

Lys Lys Lys Val Arg Val Val Thr Lys Val Val Thr Val Pro Ile Ser
 1 5 10 15

Val Asp

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> HBsAg1 Th

<400> 22

Lys Lys Lys Phe Phe Phe Phe Thr Lys Phe Phe Thr Phe Pro Val Ser
 1 5 10 15

Phe Asp

<210> 23

<211> 18

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> HBsAg1 Th

<400> 23

Lys Lys Lys Leu Phe Leu Leu Thr Lys Leu Leu Thr Leu Pro Phe Ser

1

5

10

15

Leu Asp

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> HBsAg 1 Th

<220>

<221> 位点

<222> (1) .. (1)

<223> K或R

<220>

<221> 位点

<222> (2) .. (2)

<223> K或R

<220>

<221> 位点

<222> (3) .. (3)

<223> K或R

<220>

<221> 位点

<222> (4) .. (4)

<223> L或I或V或F

<220>

<221> 位点

<222> (5) .. (5)

<223> F或K或R
 <220>
 <221> 位点
 <222> (6) .. (6)
 <223> L或I或V或F
 <220>
 <221> 位点
 <222> (7) .. (7)
 <223> L或I或V或F
 <220>
 <221> 位点
 <222> (9) .. (9)
 <223> K或R
 <220>
 <221> 位点
 <222> (10) .. (10)
 <223> L或I或V或F
 <220>
 <221> 位点
 <222> (11) .. (11)
 <223> L或I或V或F
 <220>
 <221> 位点
 <222> (13) .. (13)
 <223> L或I或V或F
 <220>
 <221> 位点
 <222> (15) .. (15)
 <223> Q或L或I或V或F
 <220>
 <221> 位点
 <222> (17) .. (17)
 <223> L或I或V或F
 <220>
 <221> 位点
 <222> (18) .. (18)
 <223> D或R
 <400> 24
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Pro Xaa Ser

1	5	10	15
Xaa Xaa			
<210> 25			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 乙型肝炎病毒			
<220>			
<221> 肽			
<222> (1) .. (18)			
<223> HBsAg2 Th			
<400> 25			
Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Pro Gln Ser			
1	5	10	15
Leu Asp			
<210> 26			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 乙型肝炎病毒			
<220>			
<221> 肽			
<222> (1) .. (18)			
<223> HBsAg2 Th			
<400> 26			
Lys Lys Lys Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Ile Thr Thr			
1	5	10	15
Ile Asp			
<210> 27			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 乙型肝炎病毒			
<220>			
<221> 肽			
<222> (1) .. (18)			
<223> HBsAg 2 Th			
<220>			
<221> 位点			
<222> (4) .. (4)			
<223> I或F			
<220>			

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> HBsAg 3 Th

<400> 28

Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr
1 5 10 15

Ile Asp

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (15)

<223> HBsAg4 Th (UBITh4)

<400> 29

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp
1 5 10 15

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> KKK-HBsAg Th

<400> 30

Lys Lys Lys Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (14)

<223> HBsAg Th

1	5	10	15
<210> 35			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 破伤风杆菌			
<220>			
<221> 肽			
<222> (1) .. (17)			
<223> 破伤风杆菌1 Th			
<400> 35			
Lys	Lys	Gln	Tyr
Ile	Lys	Ala	Asn
Ser	Lys	Phe	Ile
Gly	Ile	Thr	Glu
1	5	10	15
Leu			
<210> 36			
<211> 21			
<212> PRT			
<213> 破伤风杆菌			
<220>			
<221> 肽			
<222> (1) .. (21)			
<223> 破伤风杆菌TT2 Th			
<400> 36			
Phe	Asn	Asn	Phe
Thr	Val	Ser	Phe
Trp	Leu	Arg	Val
Pro	Lys	Val	Ser
1	5	10	15
Ala			
Ser			
His			
Leu			
Glu			
20			
<210> 37			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 破伤风杆菌			
<220>			
<221> 肽			
<222> (1) .. (16)			
<223> 破伤风杆菌TT3 Th			
<400> 37			
Lys	Phe	Ile	Ile
Lys	Arg	Tyr	Thr
Pro	Asn	Asn	Glu
Ile	Asp	Ser	Phe
1	5	10	15
<210> 38			
<211> 16			

<221> 肽

<222> (1) .. (19)

<223> EBV BHRF1 Th

<400> 41

Ala Gly Leu Thr Leu Ser Leu Leu Val Ile Cys Ser Tyr Leu Phe Ile

1

5

10

15

Ser Arg Gly

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> 埃巴病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (20)

<223> EBV EBNA-1 Th

<400> 42

Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys Tyr Phe Met Val Phe Leu

1

5

10

15

Gln Thr His Ile

20

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> 埃巴病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (18)

<223> EBV CP Th

<400> 43

Val Pro Gly Leu Tyr Ser Pro Cys Arg Ala Phe Phe Asn Lys Glu Glu

1

5

10

15

Leu Leu

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> 埃巴病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (15)

<223> EBV GP340 Th

<400> 44

Thr Gly His Gly Ala Arg Thr Ser Thr Glu Pro Thr Thr Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> 埃巴病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (13)

<223> EBV BPLF1 Th

<400> 45

Lys Glu Leu Lys Arg Gln Tyr Glu Lys Lys Leu Arg Gln

1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> 埃巴病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (11)

<223> EBV EBNA-2 Th

<400> 46

Thr Val Phe Tyr Asn Ile Pro Pro Met Pro Leu

1 5 10

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> 人类巨细胞病毒

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (14)

<223> HCMV IE1 Th

<400> 47

Asp Lys Arg Glu Met Trp Met Ala Cys Ile Lys Glu Leu His

1 5 10

<210> 48

<211> 11

<212> PRT
 <213> 流行性感冒病毒
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (11)
 <223> 流行性感冒病毒基质蛋白1_1 Th
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (11)
 <223> 流行性感冒病毒基质蛋白1_1 Th
 <400> 48
 Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 流行性感冒病毒
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (15)
 <223> 流行性感冒病毒基质蛋白1_2 Th
 <400> 49
 Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 流行性感冒病毒
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (9)
 <223> 流行性感冒病毒非结构蛋白1 Th
 <400> 50
 Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser
 1 5
 <210> 51
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 恶性疟原虫

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (21)

<223> 恶性疟原虫Th

<400> 51

Asp His Glu Lys Lys His Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe

1 5 10 15

Asn Val Val Asn Ser

20

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 曼氏血吸虫

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (17)

<223> 曼氏血吸虫Th

<400> 52

Lys Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp Glu Lys His Arg

1 5 10 15

His

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> 合成肽

<220>

<221> 位点

<222> (1) .. (1)

<223> epsilon-K

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (4)

<223> epsilon-K-KKK作为间隔子

<400> 53

Lys Lys Lys Lys

1

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> 合成肽

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (4)

<223> KKK-epsilon-K作为间隔子

<220>

<221> 位点

<222> (4) .. (4)

<223> epsilon-K

<400> 54

Lys Lys Lys Lys

1

<210> 55

<211> 6

<212> PRT

<213> 合成肽

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (6)

<223> 柔性铰链间隔子

<400> 55

Pro Pro Xaa Pro Xaa Pro

1

5

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (14)

<223> Abeta 1-14

<400> 56

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His

1

5

10

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> Abeta 1-42

<400> 60

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (10)

<223> Alpha-Syn 126-135 (衍生自GenBank: NP_000336)

<400> 61

Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp

1 5 10

<210> 62

<211> 39

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (39)

<223> IgE-EMPD1-39

<400> 62

Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg Val

1 5 10 15

Leu Cys His Ser Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala Gly Gly

20 25 30

Ser Val Pro His Pro Arg Cys

35

<210> 63

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 肽
 <222> (1) .. (30)
 <223> Tau 379-408 (衍生自GenBank: AGF19246.1)
 <400> 63
 Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
 1 5 10 15
 Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 20 25 30
 <210> 64
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (48)
 <223> IL-31 97-144 (衍生自Uniprot C7GOW1-1; GenBank: BAH97742.1)
 <400> 64
 Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys
 1 5 10 15
 Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp
 20 25 30
 Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser
 35 40 45
 <210> 65
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 合成肽
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (14)
 <223> Abeta 1-14
 <220>
 <221> 肽
 <222> (15) .. (18)
 <223> epsilon-K-KKK作为间隔子
 <220>
 <221> 位点
 <222> (15) .. (15)
 <223> epsilon-K

<220>

<221> 肽

<222> (19) .. (37)

<223> MvF 4 Th

<220>

<221> 位点

<222> (22) .. (22)

<223> S或T

<220>

<221> 位点

<222> (25) .. (25)

<223> K或R

<220>

<221> 位点

<222> (26) .. (26)

<223> G或T

<220>

<221> 位点

<222> (30) .. (30)

<223> H或T

<220>

<221> 位点

<222> (31) .. (31)

<223> K或R

<400> 65

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys

1

5

10

15

Lys Lys Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile

20

25

30

Glu Thr Ile Leu Phe

35

<210> 66

<211> 33

<212> PRT

<213> 合成肽

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (14)

<223> Abeta 1-14

<220>
<221> 位点
<222> (15) .. (15)
<223> epsilon-K
<220>
<221> 肽
<222> (16) .. (33)
<223> HBsAg 2 Th
<220>
<221> 位点
<222> (19) .. (19)
<223> I或F
<220>
<221> 位点
<222> (20) .. (20)
<223> I或F
<220>
<221> 位点
<222> (21) .. (21)
<223> T或L
<220>
<221> 位点
<222> (22) .. (22)
<223> I或L
<220>
<221> 位点
<222> (26) .. (26)
<223> I或L
<220>
<221> 位点
<222> (29) .. (29)
<223> P或I
<220>
<221> 位点
<222> (30) .. (30)
<223> Q或T
<220>
<221> 位点
<222> (31) .. (31)

<223> S或T

<220>

<221> 位点

<222> (32) .. (32)

<223> L或I

<400> 66

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Lys	Lys
1				5					10					15	
Lys	Lys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Arg	Ile	Xaa	Thr	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		

Asp

<210> 67

<211> 37

<212> PRT

<213> 合成肽

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (14)

<223> Abeta 1-14

<220>

<221> 位点

<222> (15) .. (15)

<223> epsilon K

<220>

<221> 肽

<222> (15) .. (18)

<223> epsilon K-KKK作为间隔子

<220>

<221> 肽

<222> (19) .. (37)

<223> MvF5 Th (UBITh1)

<400> 67

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Lys	Lys
1				5					10					15	
Lys	Lys	Ile	Ser	Ile	Thr	Glu	Ile	Lys	Gly	Val	Ile	Val	His	Arg	Ile
			20					25					30		

Glu Thr Ile Leu Phe

35

<210> 68

<211> 33
 <212> PRT
 <213> 合成肽
 <220>
 <221> 肽
 <222> (1) .. (14)
 <223> Abeta 1-14
 <220>
 <221> 位点
 <222> (15) .. (15)
 <223> epsilon K
 <220>
 <221> 肽
 <222> (16) .. (33)
 <223> HBsAg3 Th
 <400> 68
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Lys Lys
 1 5 10 15
 Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr Ile Ile Thr Thr Ile
 20 25 30
 Asp
 <210> 69
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CpG1寡去氧核苷酸ODN
 <400> 69
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgttttgteg tt 32
 <210> 70
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CpG2寡脱氧核苷酸ODN
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (1)
 <223> 硫代磷酸酯基团

<400> 70
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24
<210> 71
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> CpG3寡脱氧核苷酸ODN
<400> 71
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

在正常血液供体的幼稚PBMC中可检测到UBITh反应性T细胞

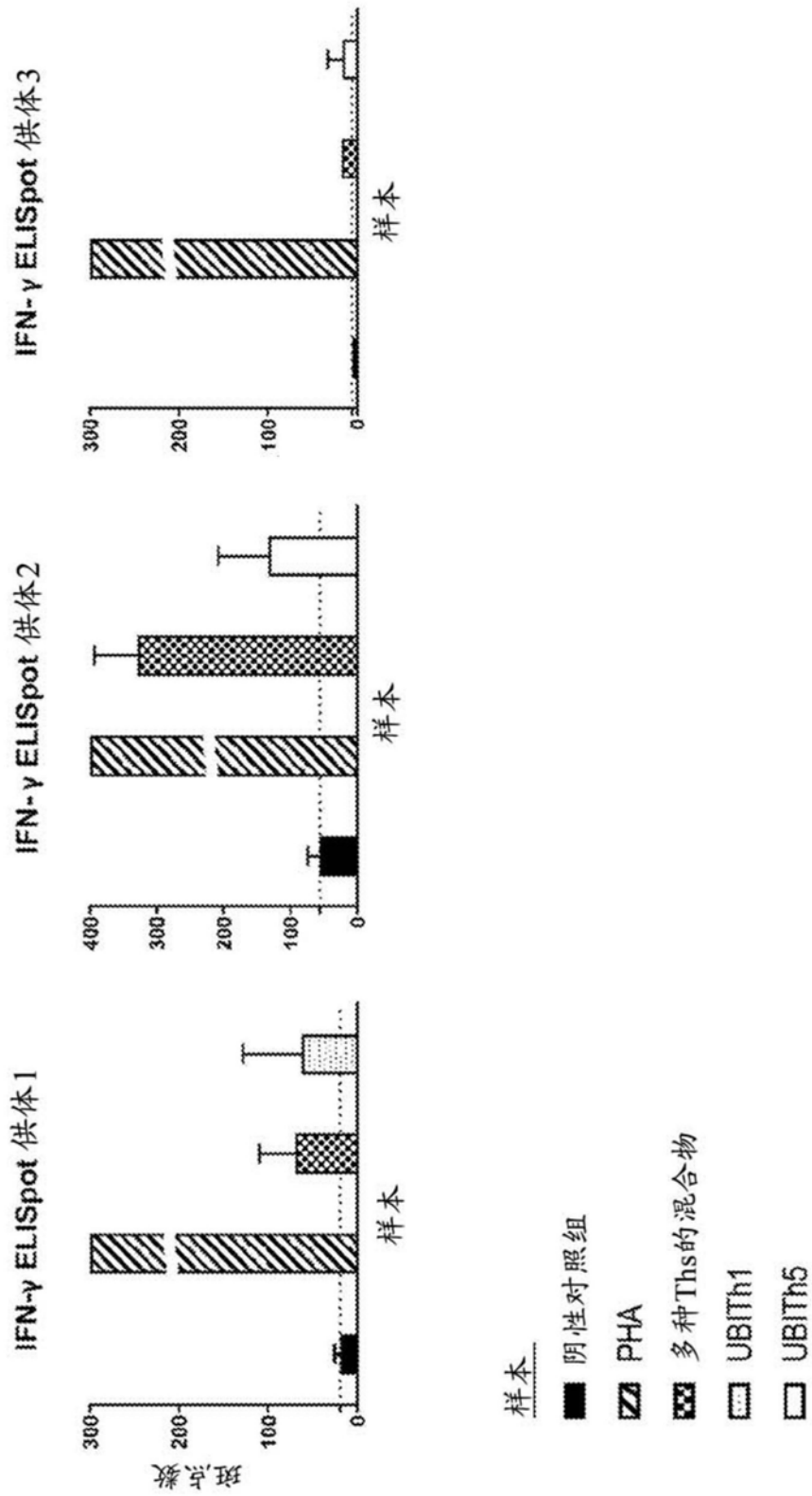


图1