



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104220080 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201380007164. 0

代理人 陶家蓉

(22) 申请日 2013. 01. 30

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

1201511. 1 2012. 01. 30 GB

61/592, 404 2012. 01. 30 US

A61K 35/14(2006. 01)

C07K 14/435(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/BE2013/000006 2013. 01. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/113076 EN 2013. 08. 08

(71) 申请人 鲁汶天主教大学

地址 比利时勒芬

申请人 生命科学研究合作伙伴 VZW 公司

(72) 发明人 J-M·圣-莱美

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

权利要求书3页 说明书24页

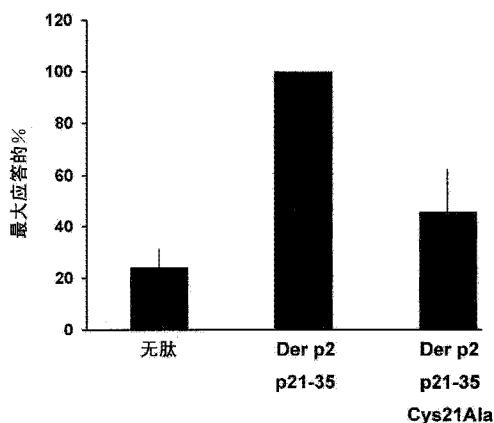
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

用于加强 CD4+T 细胞应答的经修饰表位

(57) 摘要

本发明涉及包含 T 细胞表位的免疫原性肽。所述的表位经修饰从而与用不含所述修饰的相同的肽得到的 CD4+T 细胞应答相比,可以得到强得多的 CD4+T 细胞应答。具体地,该修饰是添加半胱氨酸、插入半胱氨酸或使位于该肽的 MHC- 结合位点的外侧相邻的位置上的残基突变成半胱氨酸。还公开了这类经修饰的肽在治疗、抑制或预防诸如感染性或过敏性疾病和自身免疫疾病的疾病、预防或抑制移植物排斥或肿瘤细胞的根除中的用途。



1. 一种分离的免疫原性肽,所述免疫原性肽包含:

a) 结合到 MHC 蛋白的缝隙的 T 细胞表位,

和

b) 1~6 个氨基酸的序列,所述序列位于所述表位的 n- 末端和 / 或 c- 末端侧并且包含半胱氨酸残基,限制条件是:当出现基序 Cxx[CST] 或 [CST]xxC 与所述表位相邻或与所述表位相隔至多 7 个氨基酸时,所述半胱氨酸不出现在所述基序的序列中,

其中所述分离的免疫原性肽是人工肽,其中部分 a) 和 b) 中定义的序列与所述抗原性蛋白质的野生型序列中出现的序列不同。

2. 如权利要求 1 所述的肽,其特征在于,部分 b) 中定义的序列仅含有一个半胱氨酸。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的肽,其特征在于,所述表位是 MHC II 型表位。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的肽,其特征在于,所述肽具有 9-100 个氨基酸的长度。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的肽,其特征在于,所述肽具有 9-50 个氨基酸的长度。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的肽,其特征在于,所述肽具有 9-20 个氨基酸的长度。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的免疫原性肽,其特征在于,所述半胱氨酸氨基酸位于与所述表位的 N- 末端或 C- 末端相邻处,在所述表位和所述半胱氨酸氨基酸之间没有氨基酸。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的免疫原性肽,其特征在于,所述 T 细胞表位是感染因子的 T 细胞表位。

9. 如权利要求 1-7 中任一项所述的免疫原性肽,其特征在于,所述 T 细胞表位是自身抗原、变应原、同种异体因子或同种异体移植物抗原的 T 细胞表位。

10. 如权利要求 1-7 中任一项所述的免疫原性肽,其特征在于,所述 T 细胞表位是对肿瘤有特异性或优先性的 T 细胞表位。

11. 一种包含分离的免疫原性肽的组合物,所述肽包含:

a) 结合到 MHC 蛋白的缝隙的 T 细胞表位,

b) 1~6 个氨基酸的序列,所述序列位于所述表位的 n- 末端和 / 或 c- 末端侧并且包含半胱氨酸残基,限制条件是:当出现基序 Cxx[CST] 或 [CST]xxC 与所述表位相邻或与所述表位相隔至多 7 个氨基酸时,所述半胱氨酸不出现在所述基序的序列中,和

c) 溶剂、稀释剂、运载体或佐剂中的至少一种。

12. 一种分离的免疫原性肽,所述肽包含:

a) 结合到 MHC 蛋白的缝隙的 T 细胞表位,

b) 1~6 个氨基酸序列,所述序列位于所述表位的 n- 末端和 / 或 c- 末端侧并且包含半胱氨酸残基,限制条件是:当出现基序 Cxx[CST] 或 [CST]xxC 与所述表位相邻或与所述表位相隔至多 7 个氨基酸时,所述半胱氨酸不出现在所述基序的序列中,所述免疫原性肽用作药物。

13. 如权利要求 12 所述的用作药物的肽,其特征在于,部分 b) 中定义的序列仅含有一个半胱氨酸。

14. 如权利要求 11 或 12 所述的用作药物的肽,其特征在于,所述表位是 MHC II 型表位。

15. 如权利要求 11-14 中任一项所述的用作药物的肽,其特征在于,所述肽具有 8-100 个氨基酸的长度。

16. 如权利要求 11-15 中任一项所述的用作药物的肽,其特征在于,所述肽具有 8-50 个氨基酸的长度。

17. 如权利要求 11-16 中任一项所述的用作药物的肽,其特征在于,所述肽具有 8-20 个氨基酸的长度。

18. 如权利要求 11-16 中任一项所述的免疫原性肽,所述免疫原性肽用于治疗或预防感染性疾病的药物。

19. 如权利要求 11-16 中任一项所述的免疫原性肽,所述免疫原性肽用于治疗或预防自体免疫疾病、过敏疾病或中和同种异体因子的免疫应答。

20. 如权利要求 11-16 中任一项所述的免疫原性肽,所述免疫原性肽用于治疗或预防肿瘤的药物。

21. 如权利要求 11-16 中任一项所述的免疫原性肽,所述免疫原性肽用于诱导效应 CD4+T 细胞应答、用于诱导 CD4+ 调节 T 细胞应答或用于诱导 CD8+T 细胞激活的药物。

22. 如权利要求 21 所述的肽,其特征在于,所述 CD8+T 细胞激活是通过由超活化的 CD4+T 细胞产生诸如白介素 2 的细胞因子的间接激活。

23. 一种治疗或预防病症的方法,所述方法包括给予有效量的分离的免疫原性肽的步骤,所述肽包含:

a) 结合到 MHC 蛋白的缝隙的 T 细胞表位,

b) 1 ~ 6 个氨基酸的序列,所述序列位于所述表位的 n- 末端和 / 或 c- 末端侧并且包含半胱氨酸残基,限制条件是:当出现基序 Cxx[CST] 或 [CST]xxC 与所述表位相邻或与所述表位相隔至多 7 个氨基酸时,所述半胱氨酸不出现在所述基序的序列中,所述免疫原性肽用作药物,其中所述疾病选自下组:感染性疾病、自体免疫疾病、过敏疾病、肿瘤或中和同种异体因子的免疫应答。

24. 一种用于制备能引发 CD4+T- 细胞应答的抗原性蛋白质的肽的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 提供由所述抗原性蛋白质的 T- 细胞表位组成的肽序列,和

b. 将包含半胱氨酸残基的序列连接至 (a) 的肽序列,其中所述半胱氨酸残基与所述表位序列相隔至多 5 个氨基酸,限制条件是:当出现基序 [CST]-xx-C 或 C-xx-[CST] 与所述 MHC 结合区相邻或与所述 MHC 结合区相隔至多 7 个氨基酸时,所述半胱氨酸并不以所述基序序列中的半胱氨酸出现,

c. 合成包含步骤 a) 和 b) 中定义的序列的肽。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,通过计算机算法和 / 或生物化学试验来确定抗原性蛋白质中 T 细胞表位的序列。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的方法,其特征在于,部分 b 的肽序列通过修饰距离所述表位序列的 N 末端或 C 末端最多 6 个氨基酸的区域中的抗原性蛋白质的氨基酸序列来得到。

27. 如权利要求 24-26 中任一项所述的方法,其特征在于,所述突变选自下组:引入半胱氨酸、删除以基序 [CST]-xx-C 或 C-xx-[CST] 中的半胱氨酸出现的半胱氨酸,和在一个位

置处删除半胱氨酸并在另一个位置处引入半胱氨酸。

28. 如权利要求 24-26 中任一项所述的方法,其特征在于,部分 b 的肽序列是与距离所述表位序列的 N 末端或 C 末端最多 6 个氨基酸的区域中的所述抗原性蛋白质的序列不相关的人工序列。

用于加强 CD4+T 细胞应答的经修饰表位

技术领域

[0001] 本发明涉及包含 T 细胞表位的免疫原性肽。所述的表位经修饰,从而与用不含所述修饰的相同的肽得到的 CD4+T 细胞应答相比,可以得到强得多的 CD4+T 细胞应答。具体地,该修饰是在接近该肽的 MHC- 结合位点的但在该位点外侧的位置上添加半胱氨酸、插入半胱氨酸或使该位置的残基突变成半胱氨酸。还公开了这类修饰的肽在治疗、抑制或预防疾病(诸如感染性和过敏性疾病和自身免疫疾病)、预防或抑制移植物排斥,或肿瘤细胞的根除中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 针对病原体的疫苗接种的目标是引起尽可能强的特异性免疫应答。这样的疫苗接种使用固有免疫原性弱的抗原。这种弱免疫原性的原因与人群中组织相容性复合物的多样性较大有关。这类复合物(用于向 CD8+T 细胞呈递的 I 型或用于向 CD4+T 细胞呈递的 II 型)在称为抗原呈递细胞的特殊细胞的表面上向 T 细胞呈递抗原。T 细胞被激活的强度取决于载有抗原加工后所得的肽的抗原呈递细胞和特异性 T 细胞之间形成突触的强度和持续时间。

[0004] 克服弱免疫原性的常规方法是添加佐剂。已经描述了这些佐剂中的数种,从铝盐到油乳剂。佐剂增加免疫原性的机制是非特异性的,并且取决于使用的佐剂类型。然而,在许多情况中,佐剂的使用因炎性的不利影响而受到限制。

[0005] 非常需要可特异性地增加疫苗抗原的免疫原性的通用方法。这涉及针对诸如细菌或寄生虫的胞外病原体的疫苗抗原,以及针对诸如病毒的胞内病原体的疫苗抗原。

[0006] 可通过调节 T 细胞来抑制免疫应答。这类细胞属于在胸腺中集中选择的天然亚组或通过抗原接触在外周中得到的外周亚组,其使用多种机制来抑制免疫应答,包括产生诸如 IL-10 或 TGF- β 的抑制性细胞因子,使目标细胞缺少诸如精氨酸或色氨酸的必需营养素,或使细胞接触。天然调节 T 细胞库是自身反应性的,这归因于对胸腺中自体抗原呈递的选择。通过与自体抗原或同种异体抗原接触来形成和激活外周调节 T 细胞或诱导的调节 T 细胞。

[0007] 抗原特异性的调节性 T 细胞的百分比很低,并且这些细胞难以在体外扩增。除此以外,在体内扩增这类细胞的方法也不太成功。例如,在没有佐剂的情况下给予包括 MHC(主要组织相容性复合物)II 型表位的合成肽引发 IL-10 生成型调节 T 细胞的扩增。然而,已知调节性 T 细胞的激活和扩增严格依赖于共刺激,即抗原呈递细胞的激活,导致共刺激分子的表面表达,所述分子包括与 T 细胞表面上的表面 CD28 相互作用的 B7 家族中的那些。CD28 缺陷小鼠不产生调节性 T 细胞并且具有大幅增加的自身免疫疾病的发生率。

[0008] 因此,非常需要使扩增调节 T 细胞所需的疫苗抗原的免疫原性提高的通用方法。在该设计中的疫苗抗原包括自体抗原和同种异体抗原。

[0009] 许多肿瘤表达可用为治疗靶标的抗原。这类抗原从肿瘤上脱落并且由宿主抗原呈递细胞向宿主免疫系统呈递。这种称为间接抗原呈递途径的过程引发肿瘤特异性 CD4+ 和 CD8+T 细胞。然而,在大多数情况下,肿瘤细胞并不表达 MHC II 型决定簇,并且有效免疫应

答仅仅依赖于识别由MHC I型决定簇呈递的肿瘤源性肽的CD8+T细胞。如使用I型限制的肽增强肿瘤特异性CD8+T细胞的各种尝试所示,这是低效的(Boon等,2006,Ann Rev Immunol 24,175-208)。因此需要新的策略。

[0010] 已有一些提议称肿瘤特异性CD4+T细胞甚至可以在肿瘤不表达MHC II型决定簇时在肿瘤排斥中起作用(Perez-Diez等,2007,Blood 15,5346-5354),这表明对NK细胞或间质细胞有间接影响。然而,还没有提出增强CD4+T细胞应答的尝试。

[0011] 非常需要能使对于通过间接途径呈递的肿瘤抗原的CD4+T细胞特异性应答加强的通用方法。这涉及产生致癌基因或原癌基因的肿瘤、病毒衍生的蛋白质、存活因子或克隆型决定簇。

[0012] 因此,上述共同希望得到的是如下试剂或方法的发现,所述试剂或方法使CD4+T细胞激活加强,其进而导致效应CD4+T细胞功能增强、调节T细胞功能增强和CD8+T细胞激活增强中的一种或多种。当被激活时,CD4+T细胞不具天然细胞毒性或细胞溶解性。已经公开了向不含氧化还原活性肽标签(“CXXC”或“CXX[S/T]”或“[S/T]XXC”肽基序)的T-细胞抗原添加这种标签使被这类修饰的T细胞抗原激活CD4+T细胞从非细胞溶解性CD4+T细胞转化为细胞溶解性CD4+T细胞(WO 2008/017517;WO 2009/100505;WO 2009/100204;WO 2009/100205;WO 2009/100206;WO 2009/100207;WO 2009/100208)。然而这些文献都没有描述使CD4+T细胞的“正常”激活增强而不使非细胞溶解性CD4+T细胞转化为细胞溶解性CD4+T细胞。

发明内容

[0013] 本发明的一个方面涉及分离的免疫原性肽,其包含:

[0014] a) 结合到MHC蛋白裂隙的T细胞表位,

[0015] 和

[0016] b) 1~6个氨基酸的序列,该序列位于所述表位的n-末端和/或c-末端侧并且包含半胱氨酸残基,限制条件是:当出现基序Cxx[CST]或[CST]xxC与所述表位相邻或与所述表位相隔至多7个氨基酸时,该半胱氨酸并不出现在该基序的序列中,

[0017] 其中所述分离的免疫原性肽是人工肽,其中部分a)和b)中定义的序列与所述抗原性蛋白质的野生型序列中出现的序列不同。

[0018] 在具体的实施方式中,部分b)中定义的序列仅含有一个半胱氨酸。

[0019] 在特定实施方式中,该表位是MHC II型表位。

[0020] 在具体实施方式中,所述肽长度为9-100个氨基酸、9-50个氨基酸或9-20个氨基酸。

[0021] 在其他特定实施方式中,所述半胱氨酸氨基酸位于与所述表位相邻的N-末端或C-末端,在该表位和半胱氨酸氨基酸之间没有氨基酸。

[0022] 在本发明的内容中与疾病相关的T细胞表位的示例有:感染因子的T细胞表位,自身抗原、变应原、同种异体因子或同种异体移植物抗原的T细胞表位。与疾病相关的T细胞表位的其他示例有:肿瘤特异性或优先性的T细胞表位。

[0023] 本发明涉及免疫原性肽。具体地,所述免疫原性肽如下组成:

[0024] (i)T细胞表位,限制条件是:如果所述T细胞表位包含与结合至MHC的氨基酸残

基不同并且与该结合至 MHC 的氨基酸残基侧接的氨基酸残基,则所述侧接的氨基酸残基在所述 T 细胞表位的 MHC 结合区域的相邻至多 6 个氨基酸内不天然包含半胱氨酸氨基酸,并且不包含单半胱氨酸氧化还原基序或二半胱氨酸氧化还原基序;和

[0025] (ii) 位于 T 细胞表位的 MHC- 结合区域之外的位置上的半胱氨酸氨基酸,其中所述半胱氨酸氨基酸在所述位置上被添加或插入该 T 细胞表位,或其中所述半胱氨酸氨基酸由位于 T 细胞表位所述位置上的非半胱氨酸氨基酸突变成半胱氨酸而得到。

[0026] 在本发明的免疫原性肽中,(ii) 中所述的半胱氨酸氨基酸可在与 MHC- 结合区域相隔最多 5 个氨基酸的位置被添加或插入该 T 细胞表位,或者 (ii) 中所述的半胱氨酸氨基酸可由与 MHC- 结合区域相隔最多 5 个氨基酸的位置上的非半胱氨酸氨基酸突变成半胱氨酸氨基酸而得到。

[0027] 此外,在本发明的免疫原性肽中,(ii) 中所述的半胱氨酸氨基酸可由最多 5 个氨基酸的人工接头氨基酸序列与 T 细胞表位 MHC- 结合区域隔开。

[0028] 在本发明的任一免疫原性肽中,所述半胱氨酸氨基酸可以位于与 MHC 结合区域相邻的 N- 末端或 C- 末端。

[0029] 在本发明的任一免疫原性肽中,所述与疾病相关的 T 细胞表位包括感染因子、自身抗原、变应原、同种异体因子或同种异体移植物抗原的 T 细胞表位,或肿瘤特异性或优先性的 T 细胞表位。

[0030] 本发明还涉及包含本发明免疫原性肽且另包含溶剂、稀释剂、运载体或佐剂中的至少一种的组合物。

[0031] 本发明的免疫原性肽或包含这类肽的本发明的组合物适于用作药物。视所述免疫原性肽中含有的 T 细胞表位的性质而定,包含该免疫原性肽的药物可被用作治疗或预防感染性疾病的药物,用于治疗、预防或抑制自身免疫疾病、过敏疾病的药物,用于预防或抑制移植物排斥的药物,用于预防或抑制中和同种异体因子的免疫反应的药物,或用于治疗、预防或根除肿瘤或癌细胞的药物。通常,本发明的免疫原性肽或包含这类肽的本发明组合物被用作诱导有效 CD4+T 细胞应答的药物,该应答可导致有效的效应 CD4+T 细胞应答、有效的调节 T 细胞应答和 / 或 CD8+T 细胞的有效激活。

[0032] 本文中 CD8+T 细胞的激活是通过由超活化的 CD4+T 细胞产生诸如白介素 2 的细胞因子的间接激活。

[0033] 本发明的另一个方面涉及制备能够引发 CD4+T 细胞应答的抗原性蛋白质的肽的方法,该方法包括以下步骤

[0034] (a) 提供由所述抗原性蛋白质的 T 细胞表位组成的肽序列,和

[0035] (b) 将包含半胱氨酸残基的序列连接至 (a) 的肽序列,其中所述半胱氨酸残基与所述表位序列相隔至多 5 个氨基酸,限制条件是:当出现基序 [CST]-xx-C 或 C-xx-[CST] 与所述 MHC 结合区域相邻或与所述 MHC 结合区域相隔至多 7 个氨基酸时,所述半胱氨酸并不以该基序序列中的半胱氨酸出现。

[0036] (c) 合成包含步骤 a) 和 b) 中定义的序列的肽。

[0037] 在本文中,可以通过计算机算法和 / 或生物化学试验来确定抗原性蛋白质中 T 细胞表位的序列。

[0038] 在该方法中,可以通过在距离表位序列的 N 末端或 C 末端最多 6 个氨基酸的区域

处修饰所述抗原性蛋白质的氨基酸序列来得到 b 部分的肽序列。

[0039] 这可以通过选自下组的突变来进行：引入半胱氨酸、删除以基序 [CST]-xx-C 或 C-xx-[CST] 中的半胱氨酸出现的半胱氨酸，和在一个位置上删除半胱氨酸并在另一个位置上引入半胱氨酸。

[0040] 或者，b 部分的肽序列可是与距离表位序列的 N 末端或 C 末端最多 6 个氨基酸的区域中的抗原性蛋白质的序列无关的人工序列。

[0041] 还设想使用本发明的免疫原性肽或包含这类肽的组合物在产生用于治疗、预防或抑制自身免疫疾病、过敏疾病，用于预防或抑制移植物排斥，用于预防或抑制中和同种异体因子的免疫反应，或用于治疗、预防或根除肿瘤或癌细胞的药物中的应用。

附图说明

[0042] 图 1. 在未载有任何肽（“无肽”）或载有天然 p21-35 肽（“Der p2p21-35”），或载有其中位点 21 上的半胱氨酸（p21-35 的 N-末端氨基酸）突变为丙氨酸的 p21-35 肽（“Der p2 p21-35 Cys21Ala”）的天然抗原呈递细胞存在下，Der p2 p21-35 肽 - 特异性 CD4+T 细胞克隆的增殖。

[0043] 图 2. 在未经预处理（三角形）或通过用衍生自 ALK 蛋白的 T 细胞抗原预免疫来预处理（方块）的免疫活性 C57BL/6 小鼠中 NPM-ALK 肿瘤的生长，其中所述 T 细胞抗原包含与该 T 细胞抗原的 MHC-结合区域相邻的半胱氨酸。

[0044] 图 3. 通过引入氚标记的胸腺嘧啶评价的在用如下物质刺激细胞后 CD4+T 细胞的增殖速率：(a) 具有 GAA EGG WTGPGAGPR 序列 (SEQ ID NO :14)（对应于天然或野生型（图中的 wtALK））的 ALK 蛋白的氨基酸 1541-1555）的肽，或 (b) 具有 CGG WTGPGAGPR (SEQ ID NO :15)（其中在 ALK 蛋白的位置 1544 处添加单个半胱氨酸）的肽。

[0045] 发明详述

[0046] 定义

[0047] 本文所用的术语“肽”指某一分子，所述分子包含 2-200 个氨基酸、由肽键连接的氨基酸序列，但其在具体实施方式中可包含非氨基酸结构（例如，连接有机化合物）。本发明所述的肽可包含任意 20 个常规氨基酸或其修饰形式，或可包含通过化学肽合成或通过化学或酶修饰引入的非天然氨基酸。

[0048] 本文所用的术语“表位”指蛋白质或因子的一个或数个部分（其可定义一个构象表位），所述部分被抗体或其部分（Fab'、Fab2' 等）或存在于 B 或 T 细胞淋巴细胞的细胞表面的受体特异性识别并结合，并能够通过所述结合来诱导免疫应答。

[0049] 本文所用的术语“抗原”指包含一种或多种半抗原（仅当连接到运载体时引发免疫应答）和 / 或包含一个或多个 T 细胞表位的大分子结构。通常，所述大分子是蛋白质或肽（含或不含多糖）或由蛋白质成分组成且包含一个或多个表位；本文所述的大分子可替代性地指“抗原性蛋白质”或“抗原性肽”。

[0050] 所述术语“同种异体因子”指在相同物种的 2 个个体间比较时显示多态性的蛋白质、肽或因子（例如，任何分子），更通常指在接受所述同种异体因子的对象内诱导（同种异体反应性）免疫应答的任何蛋白质、肽或因子。

[0051] 本发明内容中的术语“T 细胞表位”或“T-细胞表位”指显性、亚显性或隐性 T 细

胞表位,例如,被 T 淋巴细胞的细胞表面受体特异性识别并结合的抗原性蛋白质或因子的部分。表位是显性、亚显性或是隐性取决于针对所述表位引起的免疫反应。显性取决于所述表位在蛋白质的所有可能 T 细胞表位中被 T 细胞识别以及能够激活 T 细胞的频率。具体而言,T 细胞表位是由 MHC I 型或 MHC II 型分子结合的表位。蛋白质序列中的 T 细胞表位可通过功能性实验和 / 或一种或多种模拟预测实验来鉴定。T 细胞表位序列中的氨基酸根据其 MHC 蛋白的结合槽中的位置来编号。本发明的肽内存在的 T- 细胞表位可由 8-25 个氨基酸,8-16 个氨基酸组成,或可由 8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 个氨基酸组成。本发明的免疫原性肽的 T 细胞表位可以对应蛋白质的天然表位序列,或者可以是其修饰形式,前提是修饰的 T 细胞表位与天然 T 细胞表位序列相似,保留其在 MHC 缝隙内结合的能力。修饰的 T 细胞表位就 MHC 蛋白而言可具有与天然表位相同的结合亲和性,但也可以具有较低亲和性。在具体的实施方式中,经修饰肽的结合亲和性相较原始肽降低不小于 10 倍,更优选降低不小于 5 倍。

[0052] 术语“MHC”指“主要组织相容性抗原”。在人类中,MHC 基因被称为 HLA (“人白细胞抗原”) 基因。虽然没有一致遵循的习惯,一些文献使用 HLA 指代 HLA 蛋白分子,而使用 MHC 指代编码 HLA 蛋白的基因。如此,本文使用的术语“MHC”和“HLA”是等同的。在人的 HLA 系统在小鼠中具有其等价物,例如,H2 系统。最详尽研究的 HLA 基因是 9 个所谓的经典 MHC 基因:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA 和 HLA-DRB1。在人类中,MHC 分为 3 种:I、II 和 III 型。A、B 和 C 基因属于 MHC I 型,其中 6 个 D 基因属于 II 型。MHC I 型分子由含有 3 个结构域的单一多态性链组成($\alpha 1$ 、2 和 3),其与细胞表面上的 $\beta 2$ 微球蛋白相关。II 型分子由 2 条多态性链组成,其各自含有 2 条链($\alpha 1$ 和 2,以及 $\beta 1$ 和 2)。

[0053] MHC I 型分子在几乎所有的有核细胞上表达。在 I 型 MHC 分子中呈递的肽片段由 CD8+T 淋巴细胞(细胞毒性 T 淋巴细胞或 CTL) 识别。CD8+T 淋巴细胞常常成熟为细胞毒性效应子,其可以裂解带有刺激抗原的细胞。II 型 MHC 分子主要在激活的淋巴细胞和抗原呈递细胞上表达。利用对 II 型 MHC 分子呈递的独特的肽片段的识别来激活 CD4+T 淋巴细胞(辅助 T 淋巴细胞或 HTL),通常在像巨噬细胞或树突细胞的抗原呈递细胞上发现这种 II 型 MHC 分子。CD4+T 淋巴细胞增殖并分泌细胞因子,其通过产生 IL-4 和 IL-10 支持抗体介导的应答或通过产生 IL-2 和 IFN- γ 支持细胞介导的应答。

[0054] 功能性 HLA 的特征是深结合槽,其供于内源以及外来的,潜在抗原性肽与其结合。槽的另外特征在于明确的形状和物理-化学性质。肽末端固定进入槽的末端中时,HLA I 型结合位点关闭。它们也涉及与保守性 HLA 残基形成的氢键网络。从这些限制条件来看,结合的肽的长度限制在 8-10 个残基。然而,已经证明高达 12 个氨基酸残基的肽也能够结合 HLA I 型。不同 HLA 复合物的结构的叠加证明了结合的一般模式,其中肽采取了相对线性、伸展的构象。

[0055] 与 HLA I 型结合位点相反,II 型位点在两端开放。这使得肽从结合的实际区域中伸展,从而在两个末端“伸出”。因此,II 型 HLA 可以结合在 9 到超过 25 个氨基酸残基之间变化的长度的肽配体。与 HLA I 型相似,由“恒定”和“可变”组分决定 II 型配体的亲和性。再次由 HLA II 型槽中的保守性残基和结合的肽的主链之间形成的氢键网络产生恒定部分。然而,这种氢键模式并不限于肽的 N- 末端和 C- 末端但是分布于整条链。后者是重要的,

因为其将复合的肽的构象限定为严格的线性结合模式。这对于所有 II 类同种异型是常见的。决定肽的结合亲和性的第二个组分是变化的,这归因于 II 型结合位点内某些位点的多态性。不同的同种异型在槽内形成不同的互补口袋,从而构成了肽的亚型依赖性选择或特异性。重要的是,在 II 型口袋中保持的氨基酸残基的限制通常比 I 型“柔软”。在不同的 HLAII 型同种异型之间存在多得多的肽交叉反应性。适合于 MHC II 分子的槽中的 MHC II 型 T 细胞表位的 +/-9 个氨基酸的序列通常编号为 P1-P9。表位的 N 末端的额外氨基酸编为 P-1、P-2 等,表位的 C 末 - 端的氨基酸编为 P+1、P+2 等。

[0056] 术语“肿瘤 - 相关抗原”指与肿瘤或肿瘤细胞相关(携带、产生、分泌等)的任何蛋白质、肽或抗原。肿瘤相关抗原可以(几乎)排他地与肿瘤或肿瘤细胞相关,并且不与健康的正常细胞相关,或与健康的正常细胞相比,可在肿瘤或肿瘤细胞中过表达(例如,10 倍、100 倍、1000 倍或更多)。更具体地,肿瘤相关抗原是能够由肿瘤细胞的 MHC 决定簇(以加工后形式)呈递的抗原。因此,肿瘤相关抗原可能仅仅与表达 MHC 分子的肿瘤或肿瘤细胞相关。肿瘤相关抗原也可以指对肿瘤有特异性或优先性的抗原。本文中,肿瘤相关抗原中包含的 T 细胞表位是指对肿瘤有特异性或优先性的 T 细胞表位。

[0057] “变应原”定义为一种物质,通常是大分子或蛋白质成分,其在有倾向的、尤其是遗传倾向的个体(特异性)患者中引发 IgE 抗体产生。

[0058] 术语“治疗有效量”指本发明的肽或其衍生物的量,其在患者中产生需要的治疗或预防效果。例如,参照疾病或病症,其为一定程度上减少疾病或病症的一种或多种症状,并且更尤其是部分或完全回到正常的与疾病或病症相关或引起疾病或病症的生理或生化参数的量。按照本发明的一个具体实施方式,治疗有效量是可导致正常生理状态的改善或恢复的本发明的肽或其衍生物的量。例如,当用于治疗受到免疫病症影响的哺乳动物时,其为肽的每日量/kg 所述哺乳动物的体重。或者,当通过基因治疗给予时,调节裸 DNA 或病毒载体的量以确保局部产生本发明的肽、其衍生物或同源物的相关剂量。

[0059] 本文中对本发明的肽使用的术语“衍生物”是指至少含有肽活性部分(例如,能够引发细胞溶解性 CD4+T 细胞活性)的分子,并且所述分子还包含可以具有不同目的(诸如使所述肽稳定或改变所述肽的药代动力学或药效性质)的互补部分。

[0060] 本文中对核苷酸序列使用的术语“肽 - 编码性多核苷酸(或核酸)”和“编码肽的多核苷酸(或核酸)”是指当在合适的环境中表达时,导致产生相关的肽序列或其衍生物或同源物的序列。这类多核苷酸或核酸包括编码所述肽的正常序列,以及能够表达具有所需活性的肽的这些核酸的衍生物或片段。因此,按照一个实施方式,编码本发明的肽或其片段的核酸是编码源自哺乳动物或对应于哺乳动物的肽或其片段(最特定是人肽片段)的序列。

[0061] 发明描述

[0062] 如上述,添加 4- 氨基酸氧化还原活性肽标签(“CXXC”或“CXX[S/T]”或“[S/T]XXC”基序)至 T 细胞抗原(外部具有所述标签并且所述标签侧接所述抗原的 MHC- 结合位点),使 CD4+T 细胞转化成激活后的细胞溶解性 CD4+T 细胞。这种转化通常并不天然发生,而天然免疫应答中诱导的溶细胞性细胞限于细胞溶解性 CD8+T 细胞。在研究上述系统和引导本发明的进一步工作中,发现当向 T 细胞抗原添加的肽标签的氧化还原活性因将所述氧化还原标签中的至少一个半胱氨酸残基转化为非半胱氨酸残基(仍排除丝氨酸或苏氨酸

作为非半胱氨酸残基)而消除时,可激活 CD4+T 细胞。然而,令人惊讶地,在所述肽标签中完全不存在半胱氨酸残基的情况下,这种激活要强得多。另外发现在 T 细胞抗原中的 MHC- 结合区域或所述 T 细胞抗原位点相邻处存在的单一半胱氨酸残基就足以引发所述的更强的 CD4+T 细胞激活。

[0063] 因此,不受任何理论或作用模式的限制,在 CD4+T 细胞的激活类型中似乎存在连续:(i) 由在侧接上述 MHC- 结合位点的区域中不包含氧化还原活性肽标签或单一半胱氨酸的 T 细胞抗原的“基本”天然激活,(ii) 由在相邻或侧接 MHC- 结合位点的区域中包含单一半胱氨酸的 T 细胞抗原的增加的激活(与基本激活相比),和(iii) 当由在与 T 细胞抗原的 MHC- 结合位点相邻/侧接的区域中包含氧化还原活性肽标签的 T 细胞抗原激活时由 CD4+T 细胞转化为细胞溶解性 CD4+T 细胞。

[0064] 本发明涉及经修饰在抗原肽序列的 MHC 结合位点以外包含半胱氨酸残基的分离的 T 细胞抗原,并且涉及如此修饰的抗原用于使 CD4+T 细胞的激活增加的用途。所述的激活增加是相较于由在抗原肽以外不包含这种半胱氨酸残基的 T 细胞抗原导致的 CD4+T 细胞的激活。在下文中更详细地描述了按照本发明的这些免疫原性肽及其用途。

[0065] 本发明因此涉及免疫原性肽。具体地,所述免疫原性肽如下组成:

[0066] (i) T 细胞表位,其中如果所述 T 细胞表位包含与结合至 MHC 的氨基酸残基侧接的(或与构成 T 细胞表位的 MHC 结合位点的氨基酸残基侧接的)氨基酸残基,则所述侧接的氨基酸残基并不天然地与与所述 T 细胞表位的 MHC 结合区域相邻(且邻近)的最多 6 个氨基酸内的位置处包含半胱氨酸且不包含单-半胱氨酸或二-半胱氨酸氧化还原基序或氧化还原活性基序;和

[0067] (ii) 位于 T 细胞表位的 MHC- 结合区域之外的位置上的半胱氨酸氨基酸,其中所述半胱氨酸氨基酸在所述位置上被添加或插入该 T 细胞表位,或其中所述半胱氨酸氨基酸由位于 T 细胞表位所述位置上的非半胱氨酸氨基酸突变成半胱氨酸而得到。

[0068] 本发明的免疫原性肽可以表示为 A-L-B 或 B-L-A,其中 A 代表 T- 细胞表位,L 代表接头(linker) 并且 B 代表游离的半胱氨酸残基。本发明的免疫原性肽可以通过化学合成来制备,其允许引入非天然氨基酸。因此,所述半胱氨酸残基可由带有硫醇基团的其它氨基酸替代,例如巯基缬氨酸、高半胱氨酸,或具有硫醇功能的其它天然或非天然氨基酸。为了具有还原活性,半胱氨酸残基应不作为半胱氨酸二硫桥的部分出现。不过,半胱氨酸残基可以经(例如通过甲基化)修饰,由于甲基化的半胱氨酸在体内转化为含游离硫醇基团的半胱氨酸。

[0069] 本发明的免疫原性肽可以在长度上大幅变化,例如从约 12-13 个氨基酸(8-9 个氨基酸的 T- 细胞表位和含有半胱氨酸残基的 4 个侧接氨基酸)到多至 50 或更多个氨基酸。例如,本发明的免疫原性肽可以包含 40 个氨基酸的内体靶标序列、包含半胱氨酸的约 6 个氨基酸的侧接序列和 9 个氨基酸的 T 细胞表位肽。在具体实施方式中,本发明的免疫原性肽由 12 个和 20 多至 25、30、50、75、100 或 200 个之间的氨基酸组成。在更具体的实施方式中,所述肽由 10-20 个氨基酸组成。这类肽可以任选地偶联至内体靶向信号。

[0070] 如上述,T 细胞表位表示天然产生的蛋白质的毗连部分。该毗连部分可以是由例如抗原呈递细胞的蛋白酶或内涵体消化的天然产生蛋白质的消化结果。或者,该部分可以是人造的(例如,经重组或合成/化学产生)。在所有情况下,T 细胞表位具有与天然产生

蛋白质的部分相同的氨基酸序列,例如,其具有如天然产生的毗连氨基酸序列。

[0071] T 细胞表位可以仅仅由结合至主要组织相容性复合物 (MHC) 的槽的氨基酸组成,或可以包含连同侧接氨基酸残基的相同氨基酸。这类侧接残基并非有助于表位与 MHC 的结合而是“伸出”MHC 槽外。侧接残基可以存在于 T 细胞表位的 MHC- 结合部分的 N- 末端和 / 或 C- 末端。所述半胱氨酸残基位于本发明的免疫原性肽中,使得当所述肽纳入 MHC 槽中时,所述半胱氨酸残基仍然留在 MHC 结合槽以外。包含侧接残基的 T 细胞表位可以在其氨基酸序列中天然包含半胱氨酸残基,诸如在本文的实施例 2 中采用的 T 细胞表位,其部分为本发明来源(所述 T 细胞表位在 N- 末端侧包含 2 个侧接氨基酸残基并且与 MHC- 结合部分天然毗连;所述侧接氨基酸残基包含天然存在的半胱氨酸)。当半胱氨酸残基出现在 MHC- 结合氨基酸的最多 6 个氨基酸内(即,直接天然毗连 MHC- 结合氨基酸的 N- 末端或 C- 末端)的毗连天然序列中时,在本发明所述要求位置上的天然包含半胱氨酸的 T 细胞表位被排除在本发明外。另外从本发明中排除的是在 MHC- 结合位点外包含侧接氨基酸残基的免疫原性肽,其中所述侧接氨基酸残基包含单-半胱氨酸氧化还原基序或二半胱氨酸氧化还原基序(天然、非天然或在如本发明所述添加/插入/突变为半胱氨酸之后)。如上述,在后者的肽中存在的氧化还原基序将非细胞溶解性 CD4+T- 细胞转化为细胞溶解性 CD4+T- 细胞,即,转化为具有本发明中不希望特点的 CD4+T- 细胞。上述的二半胱氨酸氧化还原基序是“CXXC”- 基序,其中单半胱氨酸氧化还原基序是“CXX[S/T]”或“[S/T]XXC”基序。在 MHC- 结合区域中包含半胱氨酸(或者,在结合到 MHC 分子后埋入 MHC- 缝隙中的半胱氨酸)的本发明的免疫原性肽并不排除在本发明外。

[0072] 在本发明的免疫原性肽中,可以在与 MHC- 结合区域相隔至多 5 个氨基酸的位置上(即,在 MHC- 结合区域的末端氨基酸和所述半胱氨酸之间可以有至多 5 个氨基酸)添加或插入如(ii)所述的半胱氨酸氨基酸,或可以通过将在与 MHC- 结合区域相隔至多 5 个氨基酸的位置上(即,在所述半胱氨酸和 MHC- 结合区域的末端氨基酸之间可以有至多 5 个氨基酸)的非半胱氨酸氨基酸突变为半胱氨酸氨基酸而得到如(ii)所述的半胱氨酸氨基酸。

[0073] 另外,在本发明的免疫原性肽中,如(ii)所述的半胱氨酸氨基酸可以通过至多 5 个氨基酸的人工接头氨基酸序列与 T 细胞表位的 MHC- 结合区域隔开(即,在所述半胱氨酸和 MHC- 结合区域的末端氨基酸之间可以有至多 5 个氨基酸)。除肽接头以外,可使用其它有机化合物作为接头来使所述免疫原性肽部分相互连接。

[0074] 在任何一个本发明的免疫原性肽中,所述半胱氨酸氨基酸可以位于与 MHC 结合区域相邻的 N- 末端或 C- 末端。

[0075] 在任何一个本发明的免疫原性肽中,所述与疾病相关的 T 细胞表位包括感染因子、自身抗原、变应原、同种异体因子或同种异体移植物抗原的 T 细胞表位,和对肿瘤有特异性或优先性的 T 细胞表位。

[0076] 本发明的免疫原性肽还包含促进所述肽被摄取进入(晚期)内体以加工并在 MHC II 型决定簇内呈递的氨基酸序列(或其他有机化合物)。因此,本发明的免疫原性肽还可以包含,例如,内体靶向序列。所述晚期内体的靶向由蛋白质的胞质尾内存在的信号介导,并对应良好鉴定的肽基序,例如基于双亮氨酸的基序 [DE]XXXL[LI] 或 DXXLL 基序(例如 DXXXLL)、基于酪氨酸的 YXX Φ 基序或所谓酸性簇基序。所述标志 Φ 代表具有大体积疏水侧链(例如 Phe、Tyr 和 Trp)的氨基酸残基。所述晚期内体靶向序列允许加工以及由

MHC-II 型分子有效呈递抗原源性 T 细胞表位。这类内体靶向序列包含在 (例如) gp75 蛋白、(Vijayasradhi 等, (1995) *J Cell Biol* 130, 807-820)、人 CD3 γ 蛋白、HLA-BM β (Copier 等, (1996) *J. Immunol.* 157, 1017-1027)、DEC205 受体的胞质尾 (Mahnke 等, (2000) *J Cell Biol* 151, 673-683) 的内部。作为内体分选信号的肽的其它例子公开于 Bonifacio 和 Traub (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395-447 的综述。或者, 所述序列可以是源自蛋白质的亚优势或次要 T 细胞表位 (minor T cell epitope) 序列, 其促进摄入进入晚期内体, 而不需要克服针对病原体相关源性 T 细胞表位的 T 细胞应答, 或自体或同种异体抗原源性 T 细胞表位的 T 细胞应答。任何上述免疫原性肽可通过化学合成或通过重组表达来生成。

[0077] 本发明还涉及包含本发明的免疫原性肽且另包含溶剂、稀释剂、运载体或佐剂中的至少一种的组合物。

[0078] 本发明涉及分离的免疫原性肽用于通过增加针对源自疫苗接种策略中所用感染性抗原的免疫应答来预防、治疗或抑制对象中的感染应用。具体地, 免疫应答是在所述对象中激活 CD4+ 辅助 T 细胞和 / 或抗体应答。在上述情况中, 所述病原体 - 相关的抗原可以衍生自病毒、细菌或寄生虫。具体地, 本发明提供了强化、增强或增大效应 CD4+T 细胞 (其也称为辅助 CD4+T 细胞) 的扩增和功能活性的方式。这类效应或辅助 CD4+T 细胞属于根据其表面表型、产生的细胞因子和转录组定义的几种细胞亚型。因此, 已经描述了作为不同效应子亚组的代表的 Th1、Th2、Th17 和 Tfh。另外, 最近已经描述了 Th9 细胞 (综述可参见 Locksley 等, 2009, *J Exp Med* 206, 1643-1646)。具体地, 本发明提供了扩增特异性 CD4+T 辅助细胞的方式。结果是获得针对病原体更有效的应答, 包括产生更高的抗体浓度。

[0079] 本发明也涉及分离的免疫源性肽在通过增加对变应原或自体抗原有特异性的调节 T 细胞应答来抑制对象中针对该变应原或自体抗原的免疫应答中的应用。本发明还涉及分离的免疫源性肽在通过增加对同种异体抗原有特异性的调节 T 细胞应答来抑制对象中针对该同种异体抗原的免疫应答中的应用。在上述内容中, 所述自体抗原或同种异体抗原包括与自身免疫疾病相关的自体抗原, 诸如胰岛素依赖性糖尿病、甲状腺炎、多发性硬化、类风湿性关节炎, 并且包括衍生自 I 型或 II 型主要组织相容性复合物 (MHC) 的同种异体抗原、次要组织相容性抗原或组织特异性抗原。在针对同种异体抗原 (本文中使用的同义词: 同种异体因子) 的免疫应答中, 免疫应答可以中和同种异体因子的生物活性。后者的示例包括在例如血友病中产生针对外源因子 VIII 的中和抗体。本发明提供了预防、治疗或抑制对象中自身免疫疾病或移植物排斥, 或预防、治疗或抑制对象中中和同种异体因子 (诸如凝血因子 VIII, 对其有需要的接受者可能发生针对其的免疫应答, 这种免疫应答中和给予的因子 VIII) 的免疫应答的方法。具体而言, 本发明提供增加调节 CD4+T 细胞的扩增和功能活性的方法。这类调节 T 细胞属于由表达 Foxp3 转录抑制物定义的天然调节 T 细胞群或主要由产生诸如 IL-10 和 TGF- β 的抑制性细胞因子定义的诱导的或获得性调节 T 细胞的亚组之一 (综述参见 Yi 等, 2006, *Cell Mol Immunol* 3, 189-195)。具体地, 本发明提供了扩增特异性 CD4+ 调节 T 细胞的方法。结果是获得对于针对自体抗原的免疫应答的更有效抑制和降低移植物排斥率。

[0080] 本发明也涉及分离的免疫原性肽在疫苗接种策略中通过增加针对肿瘤脱落的肿瘤特异性抗原的免疫应答来治疗对象肿瘤中的应用。具体地, 所述免疫应答是激活所述对象中效应 CD4+T 细胞应答。在上述中, 所述肿瘤衍生的抗原可以衍生自癌基因、原癌基因、

病毒来源的蛋白质、存活因子或克隆型决定簇。本发明提供了预防或抑制对象中肿瘤或癌细胞生长,或治疗肿瘤或癌症的方法。这也包括以预防致肿瘤或致癌病原体(例如,人乳头瘤病毒的某些毒株)的感染为目标的疫苗接种。具体地,本发明提供了通过经增强或增加的效应 CD4+T 细胞活性来增强 CD8+T 细胞的扩增和功能活性的方法。具体地,本发明提供了扩增特异性 CD8+T 细胞的方式。结果是获得针对肿瘤衍生的抗原或来自致肿瘤病原体的抗原更有效的应答,以及 CD8+T 细胞的较高活性。

[0081] 在上述的任何内容中,“治疗”理解为至少产生经治疗的疾病或病症的稳定或者产生疾病或病症向健康情况的部分或完全反转。疾病或病症的“抑制”理解为当与所述疾病或病症在未处理情况下的进一步发展平均水平相比,导致所述疾病或病症的进一步发展较慢。由于可以在疫苗接种方法中使用本发明的免疫原性肽,其允许向并未展现出目标疾病或病症或患有目标疾病或病症的对象给予,所述给予的目的在于预防所述目标疾病或病症发展。这种预防性或在先免疫或预防可完全阻断目标疾病或病症的发展,或者可预防目标疾病或病症向例如虚弱水平发展。在因对于例如病原体的接触(风险)增加,因遗传或其他倾向,因先天性缺陷等而处于发生疾病或病症的风险中的对象中预防性疫苗接种或免疫是特别令人感兴趣的。

[0082] 通过使用本发明增加的免疫应答能够预防、缓解或治疗的疾病的示例如下所述。也列举了可衍生用于本发明的 T- 细胞表位的抗原。

[0083] ● 针对过敏疾病的疫苗接种

[0084] 可用于选择 T- 细胞表位的变应原通常是选自下组的变应原:

[0085] - 如下物种中存在的食物变应原:花生 (Ara h1)、鱼(副白蛋白)(例如,鳕鱼),蛋白(卵清蛋白),甲壳动物(例如,虾)(原肌球蛋白),乳(β 乳球蛋白)(例如牛乳),小麦(谷蛋白),谷物、蔷薇科的水果(苹果、李、草莓)、百合科、十字花科、茄科和伞形科的蔬菜,树生坚果,芝麻,花生,大豆和其他豆科变应原,香料,瓜,鳄梨,芒果,无花果,香蕉等。

[0086] - 来自如下物种中的室内尘螨变应原:尘螨属 (*Dermatophagoides* spp) 或户尘螨 (*D. pteronyssinus*)、粉尘螨 (*D. farinae*) 和微角尘螨 (*D. microceras*)、埋内欧螨 (*Euroglyphus maynei*) 或无爪螨属 (*Blomia* sp.),

[0087] - 来自昆虫的变应原:存在于蟑螂 (*Blattella germanica*) 或膜翅目 (*Hymenoptera*) 中的变应原,

[0088] - 来自花粉的变应原,尤其是来自树、草和杂草的花粉的变应原,

[0089] - 来自动物的变应原,尤其是来自猫 (*Felis catus*)、狗、马和啮齿类 (*Mus mus*) 的变应原,

[0090] - 来自真菌的变应原,尤其是来自曲霉 (*Aspergillus*) (*aspf1*)、链格孢 (*Alternaria*) (*Alt A6*) 或枝孢 (*Cladosporium*) (*cla h3*) 的变应原,

[0091] - 在诸如胶乳、淀粉酶等的产品中存在的职业性变应原。

[0092] ● 针对胞内或胞外病原体的疫苗接种

[0093] - 胞内病原体选自由具有细胞内生命周期的病毒、细菌、分枝杆菌或寄生虫衍生的任何抗原。病毒包括 ssDNA、dsDNA 和 RNA 病毒,例子有疱疹病毒 (*Herpesviridae*)、黄病毒科 (*Flaviviridae*) 和小核糖核酸病毒 (*Picornaviridae*)、流感病毒、麻疹病毒和免疫缺陷病毒。细菌和分枝杆菌包括结核分枝杆菌、人或动物的其它致病性分枝杆菌、耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)、布鲁氏菌 (*Brucella*)、衣原体、支原体、立克次体、沙门氏菌

(Salmonellae) 和志贺氏菌 (Shigellae)。寄生虫包括疟原虫、利什曼病 (Leishmanias)、锥虫、弓形虫、李斯特菌 (Listeria)、组织胞浆菌 (Histoplasma) 等。

[0094] - 胞外病原体选自下组：主要具有胞外生命周期的病毒、细菌和寄生虫，并且本发明中使用的抗原可以由其衍生。

[0095] ● 针对肿瘤的疫苗接种

[0096] 可被本发明的产品靶向的示例性的肿瘤和可用于本发明的示例相关的抗原选自下组：

[0097] - 癌基因，诸如在一些黑色素瘤中鉴定的 MAGE；

[0098] - 原癌基因，诸如在软组织癌（诸如肾或甲状旁腺）上以及在多种骨髓瘤中的细胞周期蛋白 D1；

[0099] - 病毒衍生的蛋白质，诸如来自一些癌和一些霍奇金 - 型淋巴瘤中的 EB 病毒的那些蛋白质；

[0100] - 存活因子，其为抗凋亡因子，诸如生存素或 bc12；

[0101] - 克隆型决定簇，诸如衍生自滤泡性淋巴瘤或多发性骨髓瘤中 B 细胞受体的独特型决定簇或者 T 细胞恶性肿瘤中的 T 细胞受体决定簇。

[0102] 通过使用本发明引发调节 T 细胞增加的耐受能够预防、缓解或治疗的疾病的示例如下所述。还列举了可衍生用于本发明的 T 细胞表位的抗原。

[0103] ● 上述的过敏疾病

[0104] ● 自身免疫疾病

[0105] 自身免疫疾病选自下组

[0106] (a) 器官特异性疾病，诸如阿狄森氏病、溶血性或恶性贫血、古德帕斯彻氏综合征、格雷夫斯氏病、特发性血小板减少性紫癜、胰岛素依赖性糖尿病、青少年糖尿病、葡萄膜炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、天疱疮、特应性皮炎、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肺炎、自身免疫性心脏炎、重症肌无力、肾小球肾炎和自发性不育；

[0107] (b) 全身性疾病，诸如红斑狼疮、银屑病、脉管炎、多肌炎、硬皮病、多发性硬化、关节强直性脊椎炎、类风湿性关节炎和舍格伦 (Sjogren) 综合征。因此，自身免疫病症针对自身细胞或组织，并且包含与“自体抗原”的反应，自体抗原表示的抗原（例如，蛋白质）是特定哺乳动物生物体自己的组成部分。在这种机制中，由 B- 细胞和 / 或 T- 细胞识别自体抗原，其会引起针对所述自体抗原的免疫反应。

[0108] 术语“自身免疫疾病”或“自身免疫病症”所包括的疾病的非限制性列表包含急性播散性脑脊髓炎 (ADEM)、阿狄森氏病、斑秃、抗磷脂抗体综合征 (APS)、自身免疫性溶血、自身免疫性肝炎、大疱性类天疱疮、白塞氏病、腹部疾病、炎性肠病 (IBD)（诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎）、皮炎、1 型糖尿病、古德帕斯彻氏综合征、格雷夫斯氏病、格 - 巴二氏综合征 (Guillain-Barré syndrome) (GBS)、桥本病、特发性血小板减少性紫癜、红斑狼疮、混合型结缔组织病、多发性硬化 (MS)、重症肌无力、嗜睡症、慢性天疱疮、恶性贫血、银屑病、银屑病性关节炎、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、类风湿性关节炎 (RA)、舍格伦综合征、颞动脉炎、脉管炎、韦格纳肉芽肿病和特应性皮炎。

[0109] 表。代表性自体抗原及其相关的疾病

[0110]

疾病	抗原
甲状腺疾病	甲状腺球蛋白 甲状腺过氧化物酶 TSH 受体
1 型糖尿病	胰岛素（胰岛素原） 谷氨酸脱羧酶（GAD） 酪氨酸磷酸酶 IA-2 热激蛋白 HSP65 胰岛特异性葡萄糖 6-磷酸酶催化亚基相关蛋白（IGRP）
肾上腺炎	21-OH 羟化酶
多内分泌综合症	17- α 羟化酶
[0111]	组氨酸脱羧酶 色氨酸羟化酶 酪氨酸羟化酶
胃炎和恶性贫血	H ⁺ /K ⁺ ATP 酶内因子
多发性硬化	髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白（MOG） 髓磷脂碱性蛋白（MBP） 蛋白脂质蛋白（PLP）
重症肌无力	乙酰胆碱受体
眼部疾病	视黄醇结合蛋白（RBP）
内耳疾病	II 型和 IX 型胶原
腹腔疾病	组织谷氨酰胺转移酶
炎性肠病	pANCA 组蛋白 H1 蛋白
动脉粥样硬化	热激蛋白 HSP60
[0112]	● 移植
[0113]	用于本发明的同种异体抗原选自下组：
[0114]	- I 型或 II 型主要组织相容性复合物
[0115]	- 次要组织相容性复合物
[0116]	- 组织特异性抗原
[0117]	● 对同种异体因子的免疫应答

[0118] 用于本发明的同种异体因子选自下组：

[0119] - 用于凝血缺陷或溶解缺陷的替代治疗，包括因子 VIII、因子 IX 和葡萄球菌激酶，

[0120] - 激素，诸如生长激素或胰岛素，

[0121] - 细胞因子和生长因子，诸如干扰素 - α 、干扰素 - γ 、GM-CSF 和 G-CSF，

[0122] - 用于调节免疫应答的抗体，包括过敏疾病中的抗 -IgE 抗体，移植物排斥和多种自身免疫疾病中的抗 -CD3 和抗 -CD4 抗体，非霍奇金淋巴瘤中的抗 -CD20 抗体，在肾机能不全中的促红细胞生长素

[0123] 在本文所述的任何应用和方法中，可用由本发明的免疫原性肽准备好的 CD4+ 效应 T- 细胞或可用编码所述免疫原性肽的核苷酸序列替代所述免疫原性肽（例如，以裸 DNA 或病毒载体的形式代替免疫原性肽给予个体）。另外，可以上述任何形式使用多种免疫原性肽的组合，即超过 1 种（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或更多种）免疫原性肽的组合。

[0124] 本发明还包括分离的病毒载体，其特征在于，所述病毒载体能够表达本发明的免疫原性肽。

[0125] 在本文所述的任何应用中，所述接受者是哺乳动物，尤其是灵长类（非人）或人。

[0126] 本发明的免疫原性肽可以从感兴趣的抗原的 T 细胞表位产生。具体地，所用 T- 细胞表位可以是优势 T- 细胞表位。鉴定和选择来自本发明的内容中所用的感兴趣抗原的 T- 细胞表位为本领域技术人员所知。例如，可以由，例如 T 细胞生物技术来测试分离自感兴趣抗原的肽序列，以测定所述肽序列是否引发 T 细胞应答。被发现引发 T 细胞应答的那些肽序列被界定为具有 T 细胞刺激活性。可以进一步通过培养对感兴趣抗原敏化的个体的 T 细胞和衍生自感兴趣抗原的肽 / 表位来测试人 T 细胞刺激活性，之后测定是否响应检测的肽 / 表位而出现 T 细胞增殖（例如通过氘标记的胸腺嘧啶的细胞摄入来进行所述检测）。T 细胞对肽 / 表位响应的刺激指数可以由响应肽 / 表位的最大 CPM 除以对照 CPM 来计算。等于或大于背景水平两倍的 T 细胞刺激指数 (S. I.) 被认为是“阳性”的。使用阳性结果来计算就测试肽 / 表位组而言各肽 / 表位的平均刺激指数。还能任选地测试非天然（或修饰的）T 细胞表位结合 MHC II 型分子的能力。非天然（或修饰的）T- 细胞表位对 MHC II 型分子的结合可以不同方式进行。例如，通过裂解与给定 II 型分子同型的细胞得到可溶的 HLA II 型分子。后者通过亲和色谱纯化。可溶性 II 型分子与生物素标记的参比肽孵育，所述参比肽根据其对该 II 型分子的强结合亲和性生成。然后，待评估 II 型结合性的肽以不同浓度孵育，而其从 II 型结合中替代所述参比肽的能力通过添加中性链亲和素来计算。方法可参见例如 Texier 等，2000，J. Immunology 164, 3177-3184。本发明免疫原性肽的平均 T 细胞刺激指数大于或等于 2.0。认为 T 细胞刺激指数大于或等于 2.0 的免疫原性肽可用作预防或治疗剂。本发明的免疫原性肽的平均 T 细胞刺激指数是至少 2.5，至少 3.5，至少 4.0 或甚至至少 5.0。此外，所述肽通常具有的阳性指数 (P. I.) 是至少约 100，至少 150，至少约 200 或至少约 250。肽的阳性指数如下确定：将平均 T 细胞刺激指数乘以对病毒载体抗原敏感的个体群中（例如，至少 9 个个体，至少 16 个个体或至少 29 或 30 个个体或更多）具有响应所述肽的 T 细胞的个体的百分比（从而对应于 SI 乘以所述肽 / 表位的混杂特性）。因此，所述阳性指数既代表 T 细胞对肽的响应强度 (S. I.)，也代表 T 细胞在对感兴趣抗原敏感的个体群中响应肽的频率。为了通过例如精细制图技术测定最优 T 细胞表位，具有 T 细胞刺激活性且因而包含如 T 细胞生物技术所测至少一个 T 细胞表位的肽通过在所

述肽的 N- 末端或 C- 末端添加或删除氨基酸残基进行修饰和测试,以测定 T 细胞对所述修饰肽的反应性变化。若发现两种或多种共有天然蛋白序列中重叠区域的肽具有人 T 细胞刺激活性,如 T 细胞生物技术所测定,即可以生成包含所有或部分所述肽的额外肽,并且这些额外的肽可通过类似的方法测试。按照该技术选择并通过重组或合成生成肽。T 细胞表位或肽的选择基于多种因素,包括 T 细胞对所述肽 / 表位响应的强度(例如,刺激指数)以及所述 T 细胞在个体群中对所述肽响应的频率。

[0127] 用于鉴定抗原的方法为本领域已知。因此,可以使用定位克隆或表达克隆策略来鉴定候选抗原。对于该方法的详细描述,参见例如 Mendoza 等,1997,Immunity 7,461-472。或者,MHC I 型或 II 型分子中由 APC 实际呈递的肽可以通过各种色谱方法洗脱并分离。对所述方法的详细描述可参见 Scott 等,2000,Immunity 12,711-720。候选抗原可以通过一种或多种体外算法筛选,以鉴定抗原性蛋白质内的 T 细胞表位序列。合适的算法包括但不限于在下列网站发现的那些算法:

[0128] -<http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>;

[0129] -<http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc/>;

[0130] -<http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbn/>;

[0131] -<http://www.syfpeithi.de/home.htm>;

[0132] -<http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/SVMHC>;

[0133] -<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>;

[0134] -<http://www.jenner.ac.uk/MHCPred/>。

[0135] 这些算法的更详细内容见述于,例如 Zhang 等,(2005)Nucleic Acids Res 15 33, W180-W183(PREDBALB);Salomon 和 Flower(2006)BMCBioinformatics 7, 501(MHCBN);Schuler 等,(2007)Methods Mo/Biol.409,75-93(SYFPEITHI);Donnes 和 Kohlbacher(2006)Nucleic Acids Res.34, W194-W197(SVMHC);Kolaskar 和 Tongaonkar(1990)FEBS Lett.276,172-174 和 Guan 等,(2003)Appl Bioinformatics 2, 63-66(MHCPred)。

[0136] 更具体地,所述算法能预测抗原性蛋白质内匹配进入 MHC II 分子槽的一条或多条九肽序列。

[0137] 本发明的免疫原性肽可以在例如细菌细胞(例如,大肠杆菌(*Escherichia coli*))、酵母细胞(例如,毕赤酵母(*Pichia*)、汉逊酵母(*Hansenula*)、酵母(*Saccharomyces*)或裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*))、昆虫细胞(例如,来自草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*))、植物细胞或哺乳动物细胞(例如,CHO、COS 细胞)中通过重组表达来生成。因而获得的合适表达载体的构建(包括其它信息例如启动子和终止序列)涉及当时的标准重组 DNA 技术。重组生成的本发明免疫原性肽可源自较大前体蛋白,例如,通过酶促切割在毗邻所述免疫原性肽 N- 末端和 / 或 C- 末端插入的酶切割位点,然后进行合适的纯化。

[0138] 由于本发明免疫原性肽的长度有限,其可以通过化学肽合成来制备,其中,通过使不同的氨基酸相互偶联来制备肽。化学合成特别适合内含例如 D- 氨基酸、含有非天然产生侧链的氨基酸或含有经修饰侧链的氨基酸例如甲基化半胱氨酸。已详细描述化学肽合成方法,肽可以购自例如应用生物公司(Applied Biosystems)和其它公司。肽的合成能

以固相肽合成 (SPPS) 方式或与之相反的溶液相肽合成方式来实行。最有名的 SPPS 方法是 t-Boc 和 Fmoc 固相化学法, 所述方法为本领域技术人员熟知。此外, 如 Kent 最初描述的 (Schnolzer 和 Kent 1992, *Int J Pept Prot Res* 40, 180-193) 和例如 Tam 等人综述的 (Tam 等, 2001, *Biopolymers* 60, 194-205), 使用连接策略可以使肽彼此相连以形成较长的肽 (化学选择性偶联两个未保护肽片段)。这为实现超越 SPPS 范围的蛋白合成提供了巨大潜力。已通过该方法成功合成许多大小为 100 ~ 300 个残基的蛋白。由于在 SPPS 方面的巨大进步, 合成肽持续地在生物化学、药理学、神经生物学、酶学和分子生物学中起到越来越重要的作用。

[0139] 检测感兴趣免疫原性肽的物理和化学性质 (例如, 溶解性、稳定性) 以测定所述肽是否 / 能否合适用于治疗性组合物。通常, 通过调整所述肽的序列来最优化。任选地, 可在合成后使用本领域已知的技术修饰所述肽 (化学修饰, 例如, 添加 / 删除官能团)。

[0140] 本发明还提供了在体内或体外 (离体) 产生抗原特异性效应 CD4+T 细胞或抗原特异性调节 T 细胞 (Treg 或 CD4+ 调节 T- 细胞) 的方法。按照本发明的方法具有以下优势: 产生较高数量的 CD4+ 效应 T 细胞或 CD4+ 调节 T 细胞并且能够产生的所述细胞对感兴趣抗原有特异性。

[0141] 这类方法包括用于得到具有增加的增殖性质的 CD4+ 效应细胞的方法, 所述方法包含以下步骤:

[0142] • 提供外周血细胞;

[0143] • 使这些细胞与本发明的免疫原性肽接触, 其中 T 细胞抗原衍生自感染因子; 和

[0144] • 在 IL-2 存在下扩增这些细胞。

[0145] 这类方法还包括用于获得增殖性质提高的 CD4+ 效应细胞的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0146] • 提供本发明的免疫原性肽;

[0147] • 向对象给予免疫原性肽, 其中 T 细胞表位衍生自感染因子; 和

[0148] • 得到增殖性质提高的 CD4+ 效应细胞。

[0149] 这类方法还包括用于获得抑制性质提高的 CD4+ 调节细胞的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0150] • 提供外周血细胞;

[0151] • 使这些细胞与本发明的免疫原性肽接触, 其中 T 细胞表位衍生自自体抗原或同种异体抗原; 和

[0152] • 在 IL-2 存在下扩增这些细胞

[0153] 这类方法还包括用于获得抑制性质提高的 CD4+ 调节细胞的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0154] • 提供本发明的免疫原性肽, 其中 T 细胞表位衍生自自体抗原或同种异体抗原;

[0155] • 将所述免疫原性肽给予对象; 和

[0156] • 得到抑制性质提高的 CD4+ 调节细胞。

[0157] 这类方法还包括用于获得增殖性质提高的效应 CD4+T 细胞的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0158] • 提供外周血细胞;

[0159] • 将这些细胞与本发明的免疫原性肽接触,其中 T 细胞表位衍生自肿瘤源性抗原;和

[0160] • 在 IL-2 存在下扩增这些细胞。

[0161] 这类方法还包括用于获得增殖性质提高的效应 CD4+T 细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

[0162] • 提供本发明的免疫原性肽,其中 T 细胞表位衍生自肿瘤源性抗原;

[0163] • 将所述免疫原性肽给予对象;和

[0164] • 得到增殖性质提高的效应 CD4+T 细胞。

[0165] 可通过上述方法得到的增殖性质提高的效应 CD4+T 细胞群和抑制性质提高的 CD4+ 调节细胞,以及其用于生产供于治疗目标疾病或病症的药物的用途也是本发明的部分。

[0166] 对于本发明的任何免疫原性肽的上述用途,可以用抗原特异性效应 CD4+T 细胞或抗原特异性调节 T 细胞替代所述肽。既考虑同种异体基因又考虑自体细胞的应用。包括向有需要的对象给予所述抗原特异性效应 CD4+T 细胞或抗原特异性调节 T 细胞的任何方法也称为过继细胞治疗。在治疗疾病或病症的急性病症的病例中或治疗这类疾病或病症的复发的病例中,这种治疗是特别令人感兴趣的。CD4+ 效应 T 细胞对于预防诸如病毒、细菌或寄生虫疾病的感染性疾病是至关重要的并因而具有重大潜力。它们的功效取决于抗原特异性。CD4+ 调节 T 细胞在免疫调节中是关键的和具有重大治疗潜力。基于调节 T 细胞的免疫治疗的功效取决于调节 T 细胞的抗原特异性。此外,与多克隆扩增的调节 T 细胞相反,抗原特异性调节 T 细胞的应用减少了治疗所需的调节 T 细胞的总数量。CD4+ 效应 T 细胞对于诸如表达癌基因、原癌基因、病毒衍生的蛋白质、存活因子或克隆型决定簇的那些肿瘤的治疗而言至关重要。

[0167] 本发明还涉及编码本发明免疫原性肽的核酸序列,以及其应用方法,例如,用于重组表达或基因治疗。具体而言,所述核酸序列能够表达本发明的免疫原性肽。

[0168] 事实上可以通过使用任何合适的基因治疗方法向有需要的对象给予本发明免疫原性肽。可以将采用本发明免疫原性肽的免疫,采用合适基因治疗的免疫和过继细胞转移联用。在联用时,所述免疫、过继细胞转移和基因治疗可以同时使用,或以任何可能的组合依次使用。

[0169] 在基因治疗中,编码所述免疫原性肽的重组核酸分子可以裸露 DNA 或以脂质体或用于递送至靶细胞的其它脂质系统形式使用。用于直接转移质粒 DNA 进入细胞的其它方法为人基因治疗应用领域的技术人员熟知,并且涉及通过复合所述质粒 DNA 至蛋白来使所述 DNA 靶向细胞上的受体。以其最简单形式,基因转移可以用微注射方法通过简单注射微量 DNA 进入细胞核来实行。一旦重组基因被引入细胞,它们能够被用于转录和翻译的细胞常规机制识别,从而将表达基因产物。也有其它方法试图将 DNA 引入更大数量的细胞。这些方法包括:转染,其中 DNA 用磷酸钙沉淀,并通过胞饮被摄入细胞;电穿孔,其中细胞暴露于大电压脉冲以将孔引入膜;脂质转染/脂质体融合,其中 DNA 包装进入亲脂小泡,其与靶细胞融合;以及使用结合至小射弹的 DNA 的粒子轰击。用于将 DNA 引入细胞的另一个方法是使所述 DNA 与化学修饰的蛋白偶联。腺病毒蛋白能够打破内体的稳定从而增强摄取 DNA 进入细胞。将腺病毒混合至含有 DNA 复合物的溶液,或者使用大幅促进所述重组基因摄取和表达

的蛋白交联剂使 DNA 结合共价连接腺病毒的聚赖氨酸。腺相关病毒载体也可用于递送基因进入血管细胞。本文所用的基因转移指将外源核酸分子引入细胞的过程,其常规进行以使由所述基因编码的特定产物得以表达。所述产物可包括蛋白质、多肽、反义 DNA 或 RNA,或者酶活性 RNA。基因转移可以在培养的细胞中或通过直接给予哺乳动物来实行。在另一个实施方式中,提供含有编码本发明所述免疫原性肽的核酸分子序列的载体。在具体的实施方式中,生成所述载体从而所述核酸分子序列仅在特定组织中表达。实现组织特异性基因表达的方法为本领域熟知,例如,通过将编码本发明免疫原性肽的序列置于启动子控制下,所述启动子指导所述肽在一种或多种组织或器官中特异性表达。源自病毒的表达载体可以用于递送编码本发明所述肽及其同源物或衍生物的核苷序列(例如, cDNA)进入靶标组织或细胞群,所述病毒例如反转录病毒、牛痘病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、RNA 病毒或牛乳头状瘤病毒。可以使用本领域技术人员熟知的方法构建含有所述编码序列的重组病毒载体。或者,可以在基因治疗中使用含有编码本发明所述免疫原性肽的核酸分子的工程细胞。

[0170] 用于基因治疗或基因疫苗接种目的的病毒载体对通过重组核酸技术进行修饰是高度适宜的。根据上文,技术人员能进一步方便考虑修饰所述病毒载体 T- 细胞表位以应用于所述免疫原性肽,而其根据本发明所述的应用可以病毒载体本身直接引入。因此,本发明还包括定义为分离的病毒载体的经修饰的病毒载体,其特征在于,通过如本发明关于免疫原性肽所述引入半胱氨酸残基来修饰病毒载体蛋白中的至少一个中存在的至少一个 T- 细胞表位。在又一个实施方式中,所述病毒载体还具有以下特征:所述经修饰的 T- 细胞表位能够被 MHC II 型决定簇呈递。在另一个实施方式中,所述分离的病毒载体还具有以下特征:其细胞转导性质相较于未携带所述 T- 细胞表位修饰的相同病毒载体没有显著变化。

[0171] 当通过基因转移确保给予一种或多种本发明所述的肽时(即,给予的核酸在给予后确保表达本发明所述的肽),所述核酸的合适剂量可以基于所引入核酸最终表达的肽量来确定。

[0172] 本发明的药物通常但不必须是(药物)制剂,所述制剂包含作为活性成分的至少一种本发明的免疫原性肽、所述免疫原性肽的 CD4⁺ 效应 T 细胞(群)或 CD4⁺ 调节 T 细胞(群),或能够表达所述免疫原性肽的基因治疗载体。除了所述一种或多种活性成分之外,所述制剂还包括(药学上可接受的)稀释剂、溶剂、运载体或佐剂中的至少一种。通常,药学上可接受的化合物(诸如稀释剂、溶剂、运载体和佐剂)可参见例如 Pharmacopeia handbook(《药典手册》)(例如,美国、欧洲或国际药典)。本发明的药物或药物组合物常规上包含(预防或治疗上)有效量的一种或多种活性成分,其中,所述有效性与待预防或治疗的病症和疾病相关。具体而言,本发明的药物组合物是用于预防或治疗应用的疫苗。

[0173] 本发明的药物或药物组合物可能需要作为包含多次给予所述药物或组合物的预防性或治疗性方案一部分给予需要的对象。所述多次给药通常依次进行,而两次给药之间的时间间隔可不同,且可根据所述活性成分的性质和待预防或治疗的病症性质予以调整。在单次给药中给予需要对象的活性分量也可以不同,且将取决于例如所述对象的身体状况(例如,体重、年龄)、待预防或治疗的病症状况以及实施治疗的医生、医师或护士的经验等因素。

[0174] 所述术语“稀释剂”指例如生理盐水溶液。所述术语“佐剂”通常指的是药理学或

免疫学试剂,所述试剂调节(优选增加)其它试剂(例如药物、疫苗)的作用,同时其在单独给予时几乎没有任何直接作用。作为一个例子给予佐剂氢氧化铝(明矾),该佐剂能吸附本发明的免疫原性肽。此外,可使用本领域已知许多其它佐剂,前提是其促进 MHC II 型呈递中的肽呈递和 T 细胞激活。所述术语“药学上可接受的运载体”指配制所述活性成分的任何材料或物质以促进其应用或(例如通过溶解、分散或扩散所述成分)散布至待治疗位置和/或在不影响其有效性的情况下促进其储存、运输或操作。其包括任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌试剂(例如苯酚、山梨酸、氯丁醇)、等渗剂(诸如糖或氯化钠)等。可以包括其它成分以控制所述组合中活性成分作用的持续时间。所述药学上可接受的运载体可以是固体或液体或已压缩形成液体的气体,即,本发明的组合可适于用作浓缩剂、乳剂、溶液、颗粒、粉尘、喷雾、气溶胶、混悬液、软膏、乳膏、片剂、丸剂或粉末使用。用于所述药物组合和其制剂的合适药物运载体为本领域技术人员熟知,其在本发明范围内的选择没有特殊限定。其还可包括添加剂例如湿润剂、分散剂、黏着剂、粘合剂、乳化剂、溶剂、包衣、抗细菌和抗真菌试剂(诸如苯酚、山梨酸、氯丁醇)、等渗剂(诸如糖或氯化钠)等,只要与药学实践一致,即,对哺乳动物不产生永久损伤的运载体或添加剂。本发明的药物组合能以任何已知的方式制备,例如,通过一步或多步程序,用所选载体材料和(若合适)其它添加剂例如表面活性剂均质混合、包覆和/或磨碎所述活性成分。本发明的药物组合还可通过微粉化来制备,例如以获得其微球体形式(直径通常是 1-10 μm),即制造用于控制或持续释放所述活性成分的微胶囊。

[0175] 本发明所述的免疫原性肽及其同源物或衍生物(及其生理学上可接受的盐或药物组合)皆包含于所述术语“活性成分”可以通过任何适于待预防或治疗病症和适合所述化合物(在此是免疫原性蛋白质)的途径给予。可能的途径包括区域性、全身性、口服(固体形式或吸入)、直肠、鼻腔、局部(包括眼部、口颊和舌下)、阴道和胃肠外(包括皮下、肌肉内、静脉内、皮内、动脉内、鞘内和硬膜外)。给药的优选途径可以随例如受体的状况或随待预防或治疗的病症而变化。

[0176] 所述制剂可以作为单位剂型方便地提供,且可通过药学领域熟知的任何方法制造。本发明适于口服给药的制剂可以是各种含有预定量活性成分的独立单位形式,例如胶囊、扁胶囊或片剂;粉末或颗粒;溶于水性液体或非水性液体的溶液或悬液;或水包油液体乳剂或油包水液体乳剂。该活性成分也可制成大丸剂、药糖剂或糊剂。片剂可以通过与任选的一种或多种辅助成份压缩或模塑来制作。压缩片剂可通过在合适的机器中压缩诸如粉末或颗粒等自由流动形式的活性成份,任选与粘结剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂混合。模塑片剂可通过在合适的机器中对用惰性液态稀释剂湿润的粉末状化合物的混合物进行模塑。片剂可任选地包衣或刻痕,并可配制成能够缓释或控释其中活性成分。

[0177] 本发明现将通过以下实施例来说明,提供以下实施例并不构成任何限制。此外,本文所述的所有参考文献通过引用明确纳入本文。

实施例

[0178] 实施例 1

[0179] 室内尘螨衍生的变应原 Der p2 是一种 14 kD 的非糖基化蛋白质,其含有 H-2b

或 H-2d 限制的 MHC II 型表位或序列 EPCIIHRGKPF (SEQ ID NO :1 ;Der p2 的氨基酸残基 25-35), 其中 E 对应于第一锚定残基。序列 CHGS (SEQ ID NO :2 ;Der p2 的氨基酸残基 21-24) 的氨基末端的侧接残基包含单半胱氨酸谷氧还蛋白基序。

[0180] 为了确定位于 P(-4) 的半胱氨酸残基在与载有包含氨基酸 CHGSEPCIIHRGKPF (侧接 MHC 结合位点的氨基酸残基用下划线表示) (SEQ ID NO :3) 的肽同种相互作用之后是否增加了特异性 CD4+ 效应 T 细胞的增殖反应, 侧接序列的 4 个氨基酸残基各被替代为丙氨酸。

[0181] T 细胞 - 消耗的丝裂霉素 C- 处理的来自原初 BALB/c 小鼠的脾细胞被用作抗原呈递细胞, 并且载有不同突变肽 (0.1 μ M)。然后向培养物添加 p21-35 (SEQ ID NO :3) - 特异性 CD4+T 细胞克隆并孵育 48 小时, 之后添加 ³H- 胸腺嘧啶并且在另培养 18 小时后检测其纳入情况。结果以通过与 p21-35 野生型序列 (SEQ ID NO :3) 比较得到的纳入百分比形式示于图 1。在 P(-4) 上用丙氨酸替代半胱氨酸 (SEQ ID NO :4 的肽 :AHGSEPCIIHRGKPF) 使特异性 T 细胞克隆的增殖性反应减少了 70%。数据代表 3 次独立实验。

[0182] 实施例 2

[0183] NPM-ALK 嵌合基因编码组成型激活的酪氨酸激酶, 其已被显示是有力的癌基因。该融合基因由核磷蛋白 (NPM) 和一种名为间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 的新型受体酪氨酸激酶基因组成。衍生自 NPM-ALK 融合蛋白转基因小鼠品系的淋巴瘤细胞系展现出致癌性质。当在免疫活性接受者中接种时, 这类细胞发展成侵略性的肿瘤。这类肿瘤细胞系的表型评价显示它们没有表现出 II 型主要组织相容性决定簇, 但呈 I 型 MHC 决定簇阳性。

[0184] 通过皮下注射 NPM-ALK 肿瘤细胞接种 C57BL/6 小鼠 (2x10⁶ 个肿瘤细胞 (R80 NPM-ALK 细胞, H-2b- 限制) 悬浮于 100 μ l PBS 中) 并在最末肽注射 10 天后在腋下皮下注射, 并且用卡尺评价肿瘤生长。通常, 这类小鼠在 5-6 天内发展出肿瘤, 其然后在 3 周内生长达到 \pm 12 mm 的直径。在接种肿瘤细胞之前, 用 50 μ g 的序列 YCT QDPDVINTA (SEQ ID NO :5) 的肽以 10 天为间隔 4 次免疫 C57BL/6 小鼠; 所述肽吸附在明矾 (铝胶) 运载载体上。这种 MHC II 型 - 限制表位是 ALK 蛋白的毗连部分并且对应于 GenBank 登录号 Q9UM73 (Q9UM73. 2 版) 中给出的 ALK 蛋白的氨基酸 1385-1396。在最末免疫后 10 天接种肿瘤细胞。在预先免疫的小鼠中跟踪肿瘤生长并且与未预先免疫的对照组比较。图 2 所示的结果显示在预先免疫的小鼠中肿瘤生长大幅减小。序列 YCTQDPDVINTA (SEQ ID NO :5) 的肽被证明增强 ALK- 特异性 CD4+T 细胞的激活。经 Mann-Whitney U 检验评价, 组间的差异在第 20 天时高度显著 (p < 0.008)。

[0185] 实施例 3. 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)

[0186] 结核分枝杆菌每年导致上千例死亡。仅有的疫苗接种, 基于卡介 (Calmette-Guérin) 牛型结核菌 (*Mycobacterium bovis*) 的疫苗 (BCG) 并非有效。另外, 几种分枝杆菌菌株显示出对常规化疗的耐受性。已知在结核病中出现抗原 - 特异性 CD4+ 细胞 (Winslow 等, (2003) *J. Immunol.* 170 :2046-2052), 其可具有保护性 (Khader 等, (2007) *Nature Immunol.* 8 :369-377)。

[0187] 结核分枝杆菌产生由 MHC I 型和 MHC II 型决定簇呈递的多种抗原。由 I 型决定簇呈递的抗原由 CD8+T 淋巴细胞识别, 其具有以清除受结核分枝杆菌感染的细胞为目的的细胞溶解活性。然而, 在慢性携带患者中, 这种机制并不足以有效清除受感染的细胞。

[0188] CD8+T 细胞要求来自其他淋巴细胞亚组（尤其是属于 CD4+ 谱系的细胞）的协助。CD4+T 细胞的激活导致 IL-2 的产生，其提供了 CD8+T 细胞获得完全细胞溶解潜力的必要信号。因此激活特异性 CD4+T 细胞的治疗策略有益于结核分枝杆菌感染的细胞的 CD8+T 细胞 - 依赖性消除。

[0189] 供于该目的的最佳候选抗原之一是抗原 85b (Ag85b)，其为由胞内结合分支杆菌产生的蛋白质。已经绘制了对应于氨基酸序列 266-275 的优势 T 细胞表位。该表位的全序列是 YWGAQLNAM (SEQ ID NO :6)。

[0190] 在 SEQ ID NO :6 的氨基末端和羧基末端中侧接残基的检测鉴定在 6 个氨基酸的长度内没有半胱氨酸。在肽的氨基末端的 P-4 位置处添加半胱氨酸残基，其产生具有以下序列的经修饰的 T- 细胞表位：CSWE YWGAQLNAM (SEQ ID NO :7 ;用下划线标记半胱氨酸并且之前是 Ag85b 抗原氨基酸 163-275)。

[0191] 用 SEQ ID NO :7 的肽和佐剂（如明矾）一起免疫 C57BL/6 小鼠。以 2 周的间隔进行 3 次 50 μ g 肽的注射。在最末免疫后 2 周，处死小鼠并且通过密度梯度离心和抗体包被的磁珠上的选择由脾脏制备 CD4+ 淋巴细胞。然后使用载有 SEQ ID NO :7 的肽的抗原 - 呈递细胞在体外激活并扩增 CD4+T 细胞，并且通过有限稀释来克隆。

[0192] 对于对照实验，用 SEQ ID NO :6 的肽来免疫 C57BL/6 小鼠。如上述使用由抗体包被的磁珠的选择步骤的组合由脾脏得到 CD4+T 细胞。

[0193] 为了得到特异性 CD8+T 细胞的来源，用重组 Ag85b 免疫 C57BL/6 小鼠并且如上述使用由抗 -CD8+ 抗体加载的磁珠由脾脏制备 CD8+T 细胞。

[0194] 在 37°C 下用 Ag85b 孵育来自 C57BL/6 小鼠的巨噬细胞 60 分钟并且在 4°C 下过夜供于蛋白质摄入和在 I 型和 II 型 MHC 决定簇中的呈递。进一步用 ^{51}Cr 来孵育这类巨噬细胞以采用铬释放试验来评价巨噬细胞的 CD8 T 细胞 - 依赖性杀伤。

[0195] 为了测试 CD4+T 细胞激活 CD8+T 细胞以供巨噬细胞裂解的能力，进行了以下实验。在呈递 Ag85b 衍生的表位的 ^{51}Cr 标记的巨噬细胞的培养物中，将如上所述获自用 SEQ ID NO :7 的肽注射的小鼠的 CD4+T 细胞与获自用 Ag85b 免疫的小鼠的 CD8+T 细胞群一起加入。作为对照实验，用从 Ag85b 免疫的动物中得到的巨噬细胞和 CD8+ 孵育从用 SEQ ID NO :6 的肽免疫的小鼠得到的 CD4+T 细胞。

[0196] 可见采用 SEQ ID NO :7 的肽免疫的小鼠中得到 CD4+T 细胞而非 SEQ ID NO :6 的肽的免疫引起的 CD4+ 时，得到显著程度的巨噬细胞裂解（通过 ^{51}Cr 释放检测）。

[0197] 因此结论是：在 II 型 - 限制的 T 细胞表位的侧接区域中半胱氨酸的存在足以增强呈递 Ag85b 衍生的 T 细胞表位的巨噬细胞的杀伤。这种杀伤由高度激活的 CD8+T 细胞产生。

[0198] 实施例 4. 流感病毒

[0199] 与任何其他病毒一样，流感病毒是一种专性胞内病原体。已知其每年影响上百万人，因与其高度的接触传染性和快速突变的能力相关的原因，使获得性免疫年复一年地低效。病毒具有非常显著的发病率和死亡率。现有的疫苗接种策略利用诸如凝集素和神经氨酸酶的表面蛋白，其诱导高效价的特异性抗体，但是就引发会消除受感染的细胞的细胞溶解性 T 细胞而言是相当低效的。

[0200] 血球凝集素抗原携带多种在 MHC-II 型决定簇的环境中呈递的 T 细胞表位并且激

活效应 T 细胞,其有助于产生特异性抗体。CD8+T 细胞的诱发也产生 I 型 - 限制的 T 细胞表位。然而,CD8+T 细胞对受感染细胞的细胞溶解活性不足以消除感染在身体中的扩散。可以增加细胞溶解性 CD8+T 细胞的活性的方法有益于本发明和流感感染的治愈。

[0201] 因此,肽 YSTVASSLV (SEQ ID NO :8 ;例如,GenBank 登录号 AF408859_1 的血球凝集素前体氨基酸序列的氨基酸 534-542) 包括来自 H1N9 流感病毒的 II 型限制的 T 细胞表位。对侧接残基的序列的检测显示在氨基末端或羧基末端上在最多 6 个氨基酸的侧接区域内没有半胱氨酸残基。

[0202] 产生在 P-4 位置上含有半胱氨酸残基的具有序列 CLAI YSTVASSLV LLV (SEQ ID NO :9 ;用下划线表示半胱氨酸并且之前是例如 GenBank 登录号 AF408859_1 的血球凝集素前体氨基酸序列的氨基酸 531-545) 的合成肽,其还含有 3 个氨基酸的羧基末端 - 侧接区。

[0203] 使用与实施例 3 中所述相同的方案用 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :8 的肽来免疫 C57BL/6 小鼠,以得到特异性 CD4+T 细胞的群。

[0204] 如实施例 3 中所述,用 H1N9 流感疫苗的重组血球凝集素免疫 C57BL/6 小鼠组以得到特异性 CD8+T 细胞的来源。

[0205] 从各组用 SEQ ID NO :8 或 SEQ ID NO :9 的肽免疫的小鼠的脾脏制备 CD4+T 细胞。

[0206] 用载有 H1N9 流感病毒的重组血球凝集素的树突细胞供于 I 型或 II 型决定簇中的表位呈递。还用 ⁵¹Cr 孵育加载的树突细胞培养物作为树突细胞裂解的标志物 (铬释放试验)。

[0207] 用来自 SEQ ID NO :9 的肽免疫的小鼠的 CD4+T 细胞和从用血球凝集素免疫的小鼠制备的 CD8+T 细胞一起孵育这类树突细胞诱导了载有血球凝集素的树突细胞的明显裂解,而用 SEQ ID NO :8 的肽免疫后得到的 CD4+T 细胞进行的实验没有显示裂解。略去培养物中的 CD8+T 细胞完全抑制了树突细胞裂解,表明裂解是由激活的 CD8+T 细胞介导的。

[0208] 因此,在 II 型限制的 T 细胞表位的侧接区域中引入单个半胱氨酸残基足以加强导致靶细胞明显裂解的 CD8+T 细胞的激活。

[0209] 实施例 5. 抗 - 同种异体因子抗体

[0210] 给予治疗性蛋白质 (在本实施例中称为同种异体因子) 是医学中的常规实践。一个示例是在 A 型血友病患者中给予凝固途径的因子 VIII。不幸的是,在许多情况下,这种给予导致引发识别并且中和治疗性蛋白质活性的抗体。在 A 型血友病中,通过因子 VIII 的输注治疗的大约 30% 的患者发展出抑制因子 VIII 的促凝血活性的抗体。因此开发出可以特异性消除不希望的抗 - 同种异型因子抗体的方法是有优势的。

[0211] B02C11 抗体是一种人单克隆抗体,其通过与 C2 结构域的结合抑制因子 VIII 的功能从而防止因子 VIII 结合磷脂 (Jacquemin 等, (1998) Blood 92 :496-506)。B02C11 的重链 (VH 区域) 的可变部分的序列含有 II 型限制的 T 细胞表位,其与互补决定区 3 (CDR3) 重叠。通过消除识别这种肽的 CD4+T 细胞来增加针对 B02C11 的抗体可构成消除 B02C11 抗体的特异性方法,同时通过形成与循环 B02C11 的复合物并且通过在 B 细胞受体的水平抑制 B02C11 抗体的产生。

[0212] 序列 YCAVPDPDA (SEQ ID NO :10 ;对应于 GenBank 登录号 CAA11829 的氨基酸序列的氨基酸 114-122) 包含位于 B02C11 VH 区的 CDR3 区的 II 型限制的 T 细胞表位。检查这个肽的氨基末端和羧基末端的氨基酸序列在 6 个氨基酸内没有鉴定出半胱氨酸。产生其中

在位置 P-4 处添加半胱氨酸残基的肽,得到包含 3 个氨基酸的羧基末端的天然侧接序列的序列 CAVY YCAVPDPDA FDI (SEQ ID NO :11 ;用下划线表示半胱氨酸并且之前是 GenBank 登录号 CAA11829 的氨基酸序列的氨基酸 111-125)。

[0213] 建立表达作为 B 细胞受体的 B02C11 分子的小鼠品系。用吸附在明矾上的 SEQ ID NO :11 的肽免疫所述小鼠,以 10- 天间隔,50 μ g 免疫 4 次。然后对小鼠进行采血并且测试识别 SEQ ID NO :10 的肽和 B02C11 抗体的抗体的存在,其由直接结合 ELISA 评价。检测到高浓度的针对 SEQ ID 10 的肽或 B02C11 抗体的抗体。

[0214] 此外,通过使用抗-人 Fc- γ 抗体的 FACS 评价循环、脾和骨髓 B 细胞上 B02C11 BCR 的存在。显示用 SEQ ID 11 的肽免疫的小鼠在循环、脾脏或骨髓中没有表达转基因 BCR 的 B 细胞。

[0215] 结论是给予包含衍生自抗体的 VH 区的 II 型限制性 T 细胞表位并且在侧接残基内含有半胱氨酸的肽导致目标抗体和产生这种抗体的 B 细胞的消除。

[0216] 实施例 6. 抗-T 细胞受体抗体

[0217] 致病性 CD4+T 细胞被认为是包括过敏疾病和自体免疫疾病的多种病变中的关键元素。这类细胞产生供于辅助 B 细胞产生抗体的细胞因子并且向 CD8+T 细胞提供辅助以全面激活并且获得效应子功能。因此特别需要能够特异性地消除致病性 CD4+T 细胞的方法。

[0218] CD4+T 细胞的 α - β T 细胞受体 (TCR) 在重链和轻链内含有可变部分。这种可变部分包括 II 型限制的 T 细胞表位,其可以在本发明的范围内使用。

[0219] 克隆 G121 是针对户尘螨 (*Dermatophagus pteronyssinus*) 的变应原 Der p2 产生的 CD4+T 细胞。TCR 的 VH 区含有以下序列的 II 型限制的 T 细胞表位 :VYFCASSER (SEQ ID NO :12) 对应于 G121 TCR VH 区的氨基酸 106-114。该序列在羧基末端含有属于 VH 的 CDR3 区的 5 个氨基酸。

[0220] 检测侧接残基的序列没有在表位的氨基末端或羧基末端上的 6 个氨基酸序列之内鉴定出半胱氨酸。产生其中在 P-4 的位置处添加半胱氨酸残基的肽,得到包括 3 个氨基酸的羧基末端的天然侧接序列的序列 CQTAVYFCASSER TGG (SEQ ID NO :13,用下划线表示半胱氨酸)。

[0221] 如实施例 5 关于抗体-衍生的 T 细胞表位所述,用 SEQ ID NO13 的肽免疫 BALB/c 小鼠。用 CFSE 标记 G121 CD4+T 细胞克隆并且通过在每只小鼠尾静脉中注射 200,000 个细胞来免疫小鼠。在给予细胞后 1 天,处死小鼠并且通过 FACS 分析检测外周血和脾脏中的 CFSE- 标记的 G121 克隆的存在。用 SEQ ID NO :13 的肽免疫的小鼠显示出在外周血或脾脏中都没有残留的 G121 细胞。用未经免疫的小鼠进行的对照实验显示脾脏中的 CFSE- 标记的 G121 细胞。另外,经免疫的小鼠的血清含有针对 G121 TCR 的抗体,如 Facs 分析所鉴定,其中首先用由 SEQ ID NO13 的肽免疫的小鼠的血清的稀释孵育 G121 细胞,洗涤并且进一步用 FITC- 标记的抗-小鼠 Fc γ 抗体孵育。

[0222] 结论是用包含位于 TCR 的可变区的 II 型 T 细胞表位的肽免疫引发了抗体应答,该抗体应答足以消除携带相应表位的称为 G121 克隆的细胞。

[0223] 实施例 7. ALK+ 肿瘤

[0224] 在实施例 2 中报道的实验表明用包含在侧接残基中含有单个半胱氨酸的 ALK 的 II 型-限制表位的肽直接免疫小鼠导致肿瘤生长的显著延迟和肿瘤尺寸的减小。SEQ ID

NO :5 的肽引发针对 II 型 - 限制的 CD4+T 细胞的增加的激活性质。这种预先免疫的体内效果归因于对肿瘤细胞具有细胞溶解性质的 CD8+T 细胞的引发。本领域熟知 CD8+T 细胞需要 CD4+T 细胞提供辅助以获得完全效应物性质。

[0225] 为了证明增加的特异性 CD4+T 细胞的激活是用侧接残基中含有单个半胱氨酸的表位 (如 SEQ ID NO :5 的肽所列举) 免疫所产生的主要效果, 我们设计了一个体外实验, 其中幼稚 CD4+T 细胞通过暴露于 ALK 的 II 型 - 限制肽转化为有效的效应细胞。

[0226] 因此, 使用磁珠分选法从 C57BL/6 小鼠的脾脏中分离幼稚 CD4+T 细胞。用载有序列 GAA EGG WTGPGAGPR (SEQ ID NO :14) 的肽 (对应于天然或野生型 (图中的 wt) ALK 蛋白序列的氨基酸 1541-1555) 或序列 CGG WTGPGAGPR (SEQ ID NO :15) 的肽 (其中在 ALK 蛋白的位置 1544 处添加单个半胱氨酸) 的同系树突细胞孵育细胞。

[0227] 在用 20 μ g 的各肽刺激 4 个周期后, 洗涤细胞并且以 5/1 的比例加到去除了 T- 细胞的脾细胞中, 该脾细胞用作抗原呈递细胞并且载有 1 μ M 或 10 μ M 的 SEQ ID NO :14 的肽。

[0228] 图 3 表明当使用含有单个半胱氨酸的肽 (SEQ ID NO :15) 刺激 CD4+T 细胞时, 通过纳入氘标记的胸腺嘧啶进行评估显示, CD4+T 细胞的增殖速率明显增加。

[0229] 在本申请中已经公开了以下序列并且纳入到序列表中:

[0230] SEQ ID NO :1

[0231] Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe

[0232] SEQ ID NO :2

[0233] Cys His Gly Ser

[0234] SEQ ID NO :3

[0235] Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe

[0236] SEQ ID NO :4

[0237] Ala His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe

[0238] SEQ ID NO :5

[0239] Tyr Cys Thr Gln Asp Pro Asp Val Ile Asn Thr Ala

[0240] SEQ ID NO :6

[0241] Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met

[0242] SEQ ID NO :7

[0243] Cys Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met

[0244] SEQ ID NO :8

[0245] Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val

[0246] SEQ ID NO :9

[0247] Cys Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val

[0248] SEQ ID NO :10

[0249] Tyr Cys Ala Val Pro Asp Pro Asp Ala

[0250] SEQ ID NO :11

[0251] Cys Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Val Pro Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile

[0252] SEQ ID NO :12

-
- [0253] Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Glu Arg
- [0254] SEQ ID NO :13
- [0255] Cys Gln Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Glu Arg Thr Gly Gly
- [0256] SEQ ID NO :14
- [0257] Gly Ala Ala Glu Gly Gly Trp Thr Gly Pro Gly Ala Gly Pro Arg
- [0258] SEQ ID NO :15
- [0259] Cys Gly Gly Trp Thr Gly Pro Gly Ala Gly Pro Arg

[0001]

序列表

<110> 鲁汶天主教大学 (Katholieke Universiteit Leuven - K.U.Leuven R&D)
生命科学研究合作伙伴VZW公司 (Life Sciences Research Partners yzw)

<120> 用于加强CD4⁺ T细胞应答的经修饰表位

<130> IMC1700CN

<150> US61/592,404

<151> 2012-01-30

<150> GB1201511.1

<151> 2012-01-30

<160> 15

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 户尘螨 (Dermatophagoides pteronyssinus)

<400> 1

Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
1 5 10

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 户尘螨 (Dermatophagoides pteronyssinus)

<400> 2

Cys His Gly Ser
1

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 户尘螨 (Dermatophagoides pteronyssinus)

<400> 3

Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽; 具有突变c21A的Der p2氨基酸21-35

<400> 4

Ala His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe
1 5 10 15

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽; ALK-表位

<400> 5

Tyr Cys Thr Gln Asp Pro Asp Val Ile Asn Thr Ala
1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0002]

- <220>
<223> 合成肽; 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) Ag85b, 氨基酸266-275
- <400> 6
Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met
1 5
- <210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成肽; 前面有半胱氨酸的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) Ag85b, 氨基酸263-275
- <400> 7
Cys Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met
1 5 10
- <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成肽; 流感病毒 (*influenza virus*) H1N9, 血球凝集素前体的氨基酸534-542
- <400> 8
Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val
1 5
- <210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成肽; 流感病毒 (*influenza virus*) H1N9, 前面有半胱氨酸的血球凝集素前体的氨基酸534-542
- <400> 9
Cys Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
1 5 10 15
- <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成肽; 人抗-因子VIII抗体B02C11的vh (CDR3)的氨基酸114-122
- <400> 10
Tyr Cys Ala Val Pro Asp Pro Asp Ala
1 5
- <210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成肽; 前面有半胱氨酸的人抗-因子VIII抗体B02C11的VH的氨基酸111-125
- <400> 11
Cys Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Val Pro Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15
- <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> 合成肽；抗-Der p2 CD4+ T-细胞克隆G121的VH (CDR3)的氨基酸106-114

<400> 12

Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Glu Arg
1 5

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽；前面有半胱氨酸的抗-Der p2 CD4+ T-细胞克隆G121的VH的氨基酸103-117

<400> 13

Cys Gln Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Glu Arg Thr Gly Gly
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽；ALK蛋白的氨基酸1541-1555

<400> 14

Gly Ala Ala Glu Gly Gly Trp Thr Gly Pro Gly Ala Gly Pro Arg
1 5 10 15

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽；前面有半胱氨酸的ALK蛋白的氨基酸1544-1555

<400> 15

Cys Gly Gly Trp Thr Gly Pro Gly Ala Gly Pro Arg
1 5 10

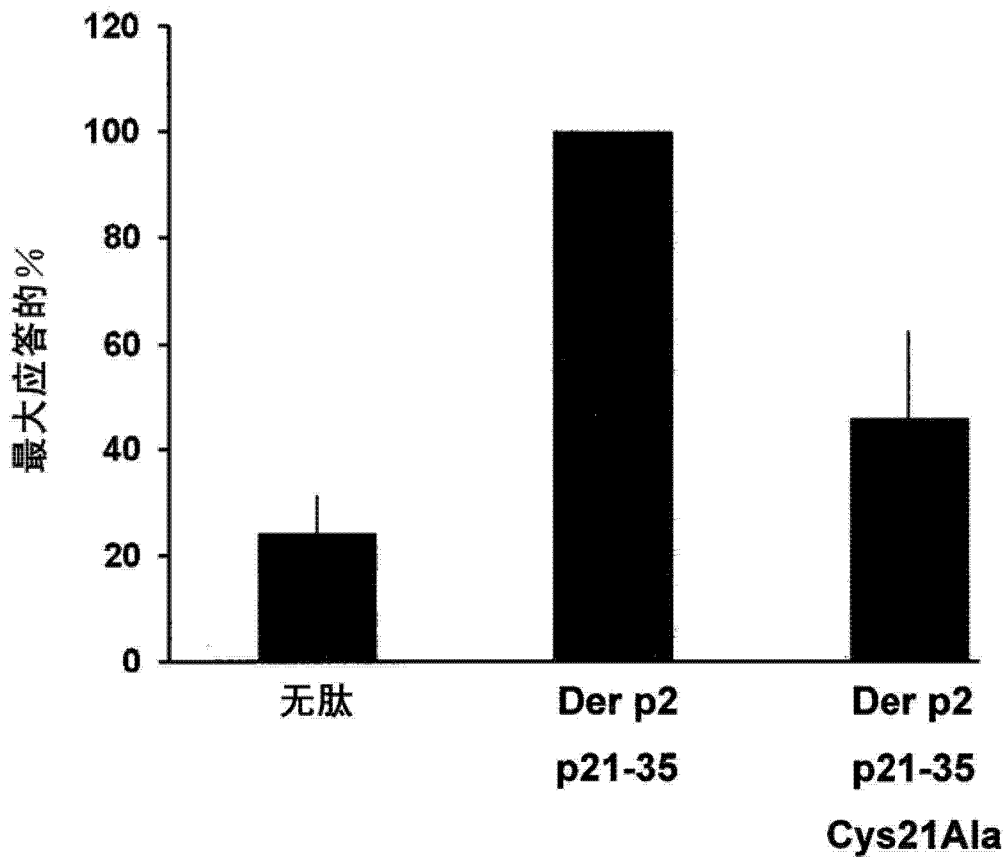


图 1

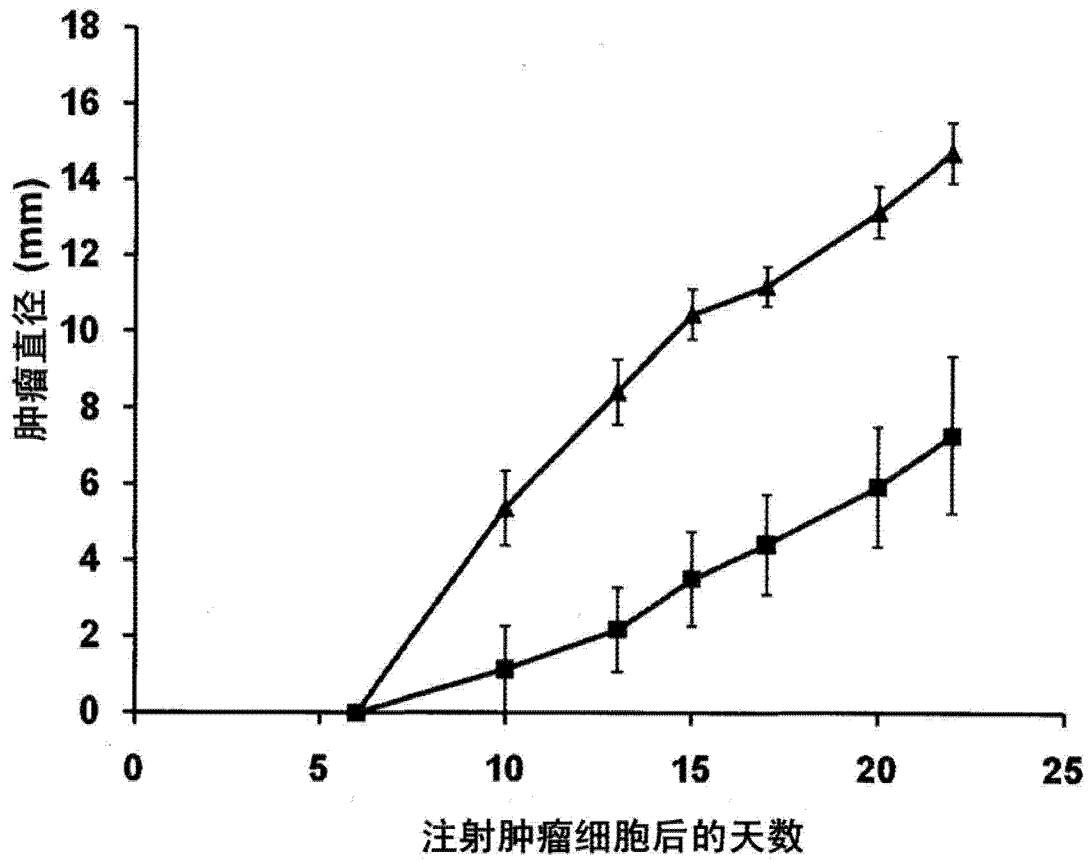


图 2

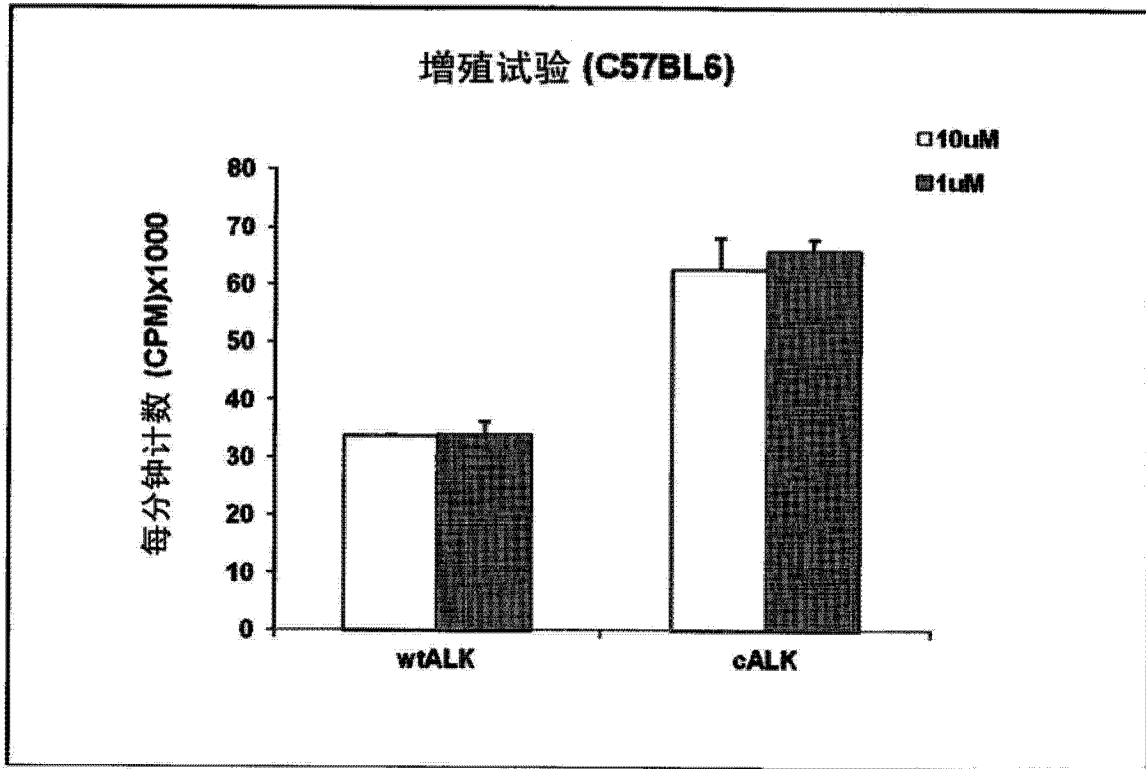


图 3