



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102458445 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 11

(21) 申请号 201080032337. 0

(22) 申请日 2010. 05. 17

(30) 优先权数据

0908515. 0 2009. 05. 18 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 01. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2010/000997 2010. 05. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/133834 EN 2010. 11. 25

(73) 专利权人 艾匹托普国际股份有限公司

地址 比利时迪彭贝克

(72) 发明人 D. 赖思

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 38/37(2006. 01)

C07K 14/755(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101889024 A, 2010. 11. 17,

WO 02098454 A2, 2002. 12. 12,

WO 02060917 A2, 2002. 08. 08,

WO 2009095646 A3, 2010. 03. 11,

TAKURO SUGIHARA et al.. IDENTIFICATION OF PLASMA ANTIBODY EPITOPES AND GENE ABNORMALITIES IN JAPANESE HEMOPHILIA A PATIENTS WITH FACTOR VIII INHIBITOR. 《Nagoya J. Med. Sci.》. 2000, 第 63 卷 (第 1-2 期), 25-39.

审查员 李楠

权利要求书1页 说明书24页

序列表30页 附图15页

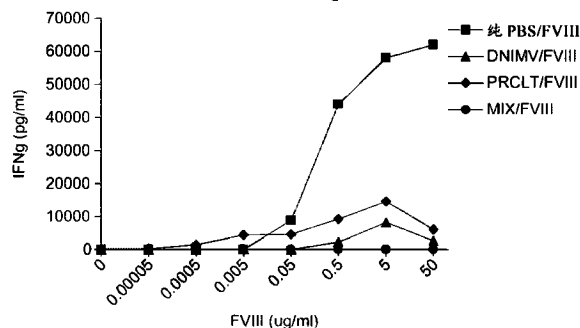
(54) 发明名称

FVIII 衍生肽

(57) 摘要

本发明提供至少部分地衍生自 FVIII 的肽, 所述肽无需进一步的抗原加工就能够结合 II 类 MHC 分子, 并能由因子 VIII 特异性 T 细胞所识别。具体地说, 本发明提供一种肽, 其包括序列 EDNIMVTFRNQASR 或由序列 EDNIMVTFRNQASR 组成。本发明还涉及这样的肽用于防止或阻遏 A 型血友病和 / 或获得性血友病中抑制剂抗体形成的用途。

响应于 FVIII 的 LNC IFN γ 产生



1. 一种肽,其序列如 EDNIMVTFRNQASR 所示。
2. 一种包含多种肽的组合物,其包括权利要求 1 所述的肽。

FVIII 衍生肽

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肽。具体地说,本发明涉及至少其核心序列可衍生自因子 VIII(FVIII) 的肽。这些肽可以用来减少或阻止因子 VIII 抑制剂抗体 (factor VIII inhibitor antibody) 的形成,例如在 A 型血友病治疗和获得性血友病中。

[0002] 发明背景

[0003] 血友病

[0004] 血友病 (haemophilia) 属于一组遗传性血液病症,包括 A 型血友病、B 型血友病 (克里斯马斯病 (Christmas disease)) 和血管性血友病 (Von Willebrand' s disease)。

[0005] 在血友病中,血液凝固能力由于某种关键的凝血因子的部分或全部缺失而严重降低,导致出血时间增加。A 型血友病是一种凝血因子 VIII 缺陷,而 B 型血友病是一种凝血因子 IX 缺陷。在这两种疾病中,出问题的基因均存在于 X 染色体上,因此这些症候是 X 连锁的。A 型血友病的常见程度是 B 型血友病的五倍。

[0006] 血友病是一种终身性、遗传性的基因疾病,其影响女性 (作为携带者) 和遗传了这种症候的男性。大约三分之一的新确诊病例没有过往家族史。这种疾病在全世界都有出现,在所有种族中均有发生。在英国大约有 6000 人受血友病影响。

[0007] 血友病人 (haemophiliacs) 在受伤后发生长时间的出血。外部损伤,如切割伤或擦伤,通常不会造成严重问题:往往可以通过施加一定程度的压力和包覆受伤区域 (例如用石膏) 即可止血。

[0008] 主要的问题是向关节、肌肉和软组织中的内出血,这些可能自发发生。内出血,例如向脑中的出血,非常难以处理,且可能致命。关节中的重复出血会导致急性疼痛,并可导致致残的长期性关节损伤和 / 或关节炎。

[0009] 血友病的治疗通常是通过替代 (replacement) 缺失的凝血因子。在轻度或中度的血友病中,可以在发生出血时提供注射 (应求式 (on-demand) 疗法)。但是,在严重血友病中,则有规律地提供预防性注射,以帮助血液凝固并尽可能减小长期性关节损伤的可能性。

[0010] A 型血友病凝血因子 (coagulation factor) 替代治疗的一个潜在的严重并发症是会产生可中和因子 VIII 的促凝血功能的抗体。因子 VIII 抑制剂在大约 25% 的严重 A 型血友病人中出现。由于先天性 A 型血友病人可能具有 FVIII 的遗传缺陷,抑制剂的合成是一种针对为了预防或治疗出血事件而施用的外来蛋白的同种异体免疫应答。

[0011] CD4+T 细胞在针对 FVIII 的免疫应答中扮演着中枢角色。FVIII 被抗原呈递细胞 (APC) 掺入后,经过蛋白水解性降解成为肽片段 (Reding 等 (2006) Haemophilia 12(supp 6) 30-36)。然后这些肽与 II 类 MHC 分子结合呈递在 APC 的表面。然后,该复合物由对 FVIII 特异性的 CD4+ 细胞的 T 细胞受体所识别。在合适的共刺激信号的存在下,这种识别作用最终导致 CD4+ 细胞去指导 B 细胞合成抗体。

[0012] 抑制剂形成的频度最开始随着因子 VIII 治疗的次数增加而增加,但是在暴露 50-100 天后似乎达到平台。抑制剂形成在严重血友病中比在中度或轻度的病中常见得多,而且某些分子缺陷,最明显的是因子 VIII 轻链中的大段缺失和无义突变,似乎引起抑制剂

形成的倾向。替代因子的浓度、类型（纯化的或重组的）、以及治疗历史等参数也可能影响抗体产生的可能性。

[0013] 管理携带抑制剂的血友病患者是正在面临的挑战。使用脱敏技术的免疫耐受诱导 (ITI) 在一些携带抗因子 VIII 的同种抗体的患者中获得了成功。这种治疗手段要求正在暴露于因子替代治疗,因此是一种长期性的策略。

[0014] 虽然 ITI 可能取得成功,但有相当比例 (大约 30%) 的患者对 ITI 无应答。抑制剂效价高的患者对治疗应答的可能性低得多。另一个明显起作用的因素是开始 ITI 时的年龄,当患者大于 20 岁时成功率大大降低 (Hay 等 (2005) *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 32:15-21)。

[0015] 当 ITI 疗法不成功时,抑制剂一般会持续终身,而由于这样的患者通常是高应答者,需要使用 FVIII 旁路产品,如活化的凝血酶原复合物浓缩物 (FEIBA™) 和重组 - 活化的 FVII,来治疗出血事件。然而,使用此类药剂与弥漫性血管内凝血、急性心肌梗死、肺栓塞和血栓等不良事件相关 (Acharya 和 DiMichele (2006) *Best Practice&Research Clinical Haematology* 19:51-66)。

[0016] 对于不应答 ITI 的患者有时使用免疫抑制疗法。治疗包括施用非特异性地靶向免疫系统的免疫抑制药如环磷酰胺 (cyclophosphamide)、强的松 (prednisone)、硫唑嘌呤 (azathioprine) 和环孢菌素 (cyclosporine)。这些治疗可能具有与普遍性免疫抑制相关的副作用。

[0017] 人们对利用利妥昔单抗 (Rituximab™)——一种针对 B 细胞 CD20 抗原的人源化单克隆抗体——进行的选择性 B 细胞耗竭又产生了兴趣。但是,用这种药物治疗一些儿童时,发生了输注反应、血清病和机会性感染 (DiMichele (2007) *J Thromb Haemost* 5:143-50)。

[0018] 获得性血友病

[0019] 获得性血友病是一种罕见的自身免疫病症,在每 100 万人中有 1 至 4 人罹患此病。在此病症中,生来不具有血友病的受试者产生对抗一种凝血因子如因子 VIII 的抗体。人们认为妊娠和自身免疫疾病如类风湿性关节炎及癌症可能增加发生获得性血友病的风险。虽然在导致其产生的潜在免疫机制方面有所不同,但应答于凝血因子替代治疗而产生的 FVIII 抑制剂与获得性血友病中产生的 FVIII 抑制剂的临床表现是相似的。

[0020] 获得性血友病患者的死亡率接近 25%,部分地是由于获得的抑制剂与严重的出血并发症有关联。对获得性自身抗体抑制剂的治疗,主要是根据控制或阻止急性出血性并发症的需要 (这些并发症常常危及生命和四肢),其次是去除自身抗体以恢复正常凝血的需要。

[0021] 对于某些伴随有低效价自身抗体抑制剂 (< 5 个 Bethesda 单位) 的出血,可以通过高剂量施用 FVIII 浓缩物来有效治疗。先前,猪 FVIII 浓缩物被看作针对获得性血友病相关出血的关键的一线治疗,因为它是唯一提供了在实验室中实际测量输注后 FVIII 凝血活性水平的机会的替代治疗。由于猪血浆池被猪细小病毒污染,该产品于 2004 年下市。目前,最常用的是“旁路 (bypassing)”药物,但存在产生血栓的潜在风险,而且每种产品的效力仅有约 80%。可能需要通过血浆去除术和体外免疫吸附进行血浆交换,以暂时性将抑制剂效价降低,该降低足以使旁路药物或 FVIII 替代法提供充分的止血。

[0022] 自身抗体抑制剂的根除取决于免疫抑制措施,如:(1) 施用皮质类固醇,在 3-6 周

内的效力为 30% -50% ; (2) 使用细胞毒性和骨髓抑制性化疗剂, 例如环磷酰胺、环孢菌素、2- 氯脱氧腺苷 ; (3) 用静脉内免疫球蛋白进行的免疫调节 ; 和 (4) 用利妥昔单抗进行的选择性 B 淋巴细胞耗竭。利妥昔单抗 (Rituximab™) 应答者可能需要同时使用类固醇, 复发可对再次治疗有应答。

[0023] 因此, 目前所有可用来减少与 A 型血友病治疗相关的同种异体抗体产生、以及获得性血友病中自身抗体产生的方法, 都存在着缺点。因此需要改进的方法来解决 A 型血友病和获得性血友病中抗 -VIII 抗体的问题。

[0024] 本发明人发现, 通过用 FVIII 衍生肽预耐受化患者, 来阻止 FVIII 抑制剂抗体形成是可能的。

发明内容

[0025] 因此, 本发明的第一个方面涉及至少部分序列可从 FVIII 衍生的、能够诱导或恢复对 FVIII 的耐受的肽。

[0026] 在第一个实施方案中, 本发明提供一种肽, 其包含下列 FVIII 衍生序列之一 :

[0027]

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYSSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

[0028] 具有下列修饰中的一种或多种 :

[0029] (i) 去除一个或多个疏水性氨基酸 ;

[0030] (ii) 用荷电亲水性氨基酸取代一个或多个疏水性氨基酸 ; 和

[0031] (iii) 在一端或两端插入一荷电氨基酸

[0032] 所述修饰的肽无需进一步抗原加工就能够结合 II 类 MHC 分子, 并能由因子 VIII

特异性 T 细胞所识别。

[0033] “亲本”(未修饰的)肽可以是 PRCLTRYSSFVNME 或者 DNIMVTFRNQASRPY。

[0034] 在第二个实施方案中,本发明提供一种肽,其包含序列:

[0035] $X(aa)_n$ -核心序列- $(aa)_m$

[0036] 其中 X 是荷电亲水性残基;

[0037] aa 是氨基酸;

[0038] n 是 0-5 的整数;

[0039] m 是 0-5 的整数;并且

[0040] “核心序列”选自下列 FVIII 衍生肽组成的组:

[0041] LYISQFIIM

[0042] FIIMYSLDG

[0043] IARYIRLHP

[0044] LIIFKNQAS

[0045] LTRYSSFV

[0046] MVTFRNQAS

[0047] LRIHPQSWV

[0048] 所述肽无需进一步抗原加工就能够结合 II 类 MHC 分子,并能由因子 VIII 特异性 T 细胞所识别。

[0049] 例如,所述肽可以包括序列 XDNIMVTFRNQAS。

[0050] 在第三个实施方案中,本发明提供一种肽,其包含序列:

[0051] $Y(aa)_n$ -核心序列- $(aa)_mZ$

[0052] 其中 Y 和 Z 是具有相反极性的荷电氨基酸;

[0053] aa 是氨基酸;

[0054] n 是 0-5 的整数;

[0055] m 是 0-5 的整数;并且

[0056] “核心序列”选自下列 FVIII 衍生肽组成的组:

[0057] LYISQFIIM

[0058] FIIMYSLDG

[0059] IARYIRLHP

[0060] LIIFKNQAS

[0061] LTRYSSFV

[0062] MVTFRNQAS

[0063] LRIHPQSWV

[0064] 所述肽无需进一步抗原加工就能够结合 II 类 MHC 分子,并能由因子 VIII 特异性 T 细胞所识别。

[0065] 例如,所述肽可以包含序列 YDNIMVTFRNQASZ。

[0066] 在第三个实施方案中,例如,Y 可以是荷正电荷的氨基酸而 Z 可以是荷负电荷的氨基酸。或者 Y 可以是荷负电荷的氨基酸而 Z 可以是荷正电荷的氨基酸。

[0067] 例如,荷电亲水性氨基酸可以是 D,E,K,H 或者 R。例如,荷正电的氨基酸可以是 K,

H 或者 R。例如,荷负电的氨基酸可以是 D 或者 E。

[0068] 本发明的第一个方面的肽可以,例如,包含序列 EDNIMVTFRNQASR 或由序列 EDNIMVTFRNQASR 组成。

[0069] 在第二个方面,本发明提供一种组合物,例如药物组合物,其包含本发明第一个方面的一种或多种肽。所述组合物可以包含全部或部分衍生自 FVIII 的多个肽,所述多个肽能够诱导或者恢复对 FVIII 的耐受。

[0070] 组合物可以是试剂盒的形式,其中分别地提供所述多个肽,以供分开 (separate)、相继 (subsequent)、顺序 (sequential) 或同时 (simultaneous) 施用。

[0071] 本发明的肽或组合物可用于阻遏、减少、或阻止因子 VIII 抑制剂抗体的产生。

[0072] 本发明还提供这样的肽或组合物在制备用于阻遏、减少或防止因子 VIII 抑制剂抗体产生的药物中的用途。

[0073] 本发明还提供一种用于阻遏、防止或减少受试者中因子 VIII 抑制剂抗体产生的方法,包括对所述受试者施用这样的肽或组合物的步骤。

[0074] 受试者可以是 FVIII 缺陷的。特别地,受试者可患有 A 型血友病,并且可能进行,或者即将进行因子 VIII 替代治疗。

[0075] 或者,受试者可能患有获得性血友病,或者有风险感染 (contract) 获得性血友病。

[0076] 因子 VIII 抑制剂在表达 HLA-DR2 的个体中更常见。用本发明的方法治疗的受试者因此可以是 HLA-DR2 阳性的。

附图说明

[0077] 图 1 :用 rhFVIII/CFA 初始刺激 (prime) 的 FVIII+DR2+ 小鼠的淋巴结细胞 (LNC) 的回忆应答

[0078] a) 针对 FVIII 肽 1-6 的 LNC 增殖

[0079] b) 针对 FVIII 肽 7-12 的 LNC 增殖

[0080] c) 针对 FVIII 肽 1、3 和 11 的 LNC 增殖

[0081] 图 2 :对 FVIII 衍生肽特异性的 FVIII+DR2+T 细胞杂交瘤克隆的代表例

[0082] 图 3 :用 rhFVIII/CFA 初始刺激的 FVIII-DR2+ 小鼠的 LNC 的回忆应答

[0083] 图 4 :对 FVIII 衍生肽特异性的 FVIII-DR2+T 细胞杂交瘤克隆的代表例

[0084] 图 5 :对 a)DNIMV 和 b)PRCLT 特异性的 FVIII-/- 克隆

[0085] 图 6 :用肽 3x i. p. 处理后用 rhFVIII/CFA 初始刺激的 FVIII+DR2+ 小鼠的 LNC 对 FVIII 的回忆应答。

[0086] 图 7 :利用针对 FVIII 衍生的重叠肽特异性的 FVIII-DR2+T 细胞杂交瘤克隆确定能够起 epitope 作用的肽表位的范围。原始肽称为 0。向 N 末端移动一个氨基酸是 -1,向 N 末端移动两个氨基酸是 -2,等等。向 C 末端移动一个氨基酸是 +1,等等。

[0087] 图 8 :用 FVIII 衍生肽 PRCLT、DNIMV 或这二者的混合物处理的 FVIII-DR2+ 小鼠响应于 FVIII 的淋巴结细胞 IFN- γ 产生。

[0088] 图 9 :用 EDNIMVTFRNQASR (EDNIMV) 或对照肽 (DNIMV) 刺激的首次接受实验 (naïve) 小鼠或耐受化小鼠的应答。

[0089] 详述

[0090] 肽

[0091] 本发明涉及一种肽。

[0092] 术语“肽”使用其普通意义,意指一系列残基,通常是 L-氨基酸,它们相互连接,通常通过相邻氨基酸的 α -氨基和羧基之间的肽键。该术语包括修饰的肽和合成的肽类似物。

[0093] 本发明的肽可以使用化学方法来制备 (Peptide Chemistry, A practical Text book. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.)。例如,可以用固相技术合成肽 (Roberge JY 等 (1995) Science 269 :202-204), 将其从树脂上切下,并用制备型高效液相层析来纯化 (例如, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY)。可以使用例如 ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) 按照制造商提供的指导来实现自动化合成。

[0094] 或者,肽可以通过重组手段,或通过从因子 VIII 切割肽继之以在一端或两端的修饰来制备。肽的组成可以通过氨基酸分析或测序 (例如 Edman 降解方法) 来确认。

[0095] 为了实际目的,存在多种所述肽可以表现出的其他特征。例如,所述肽在体内足够稳定是重要的,以使得它在治疗上有用。肽在体内的半衰期可以为至少 10 分钟、30 分钟、4 小时或 24 小时。

[0096] 所述肽还可在体内表现良好的生物利用度。所述肽可在体内维持这样的构象,使得它能够结合细胞表面的 MHC 分子而没有应有的阻碍。

[0097] 核心残基

[0098] 在适应性免疫应答中, T 淋巴细胞能够识别蛋白质抗原的内部表位。抗原呈递细胞 (APC) 掺入蛋白质抗原并把它们降解成短的肽片段。肽可与细胞内的 I 类或 II 类主要组织相容性复合物 (MHC) 分子结合,并被带到细胞表面。当肽与 MHC 分子结合被呈递于细胞表面时,该肽可由 T 细胞 (通过 T 细胞受体 (TCR)) 所识别,在这种情况下该肽是 T 细胞表位。

[0099] 因此表位是这样一种肽,它能够从抗原衍生而来,能够结合 I 类或 II 类 MHC 分子的肽结合沟 (peptide-binding groove) 并由 T 细胞所识别。

[0100] 最小表位是能够从表位衍生而来的、能够结合 I 类或 II 类 MHC 分子的肽结合沟并由 T 细胞所识别的最短片段。对于给定的免疫原性区域,通常能够产生“一组套叠的” (a nested set) 重叠肽,这些肽发挥表位作用,都包含最小表位,但它们的侧翼区域不同。

[0101] 类似地,对于特定的 MHC 分子:T 细胞组合,可以通过测量针对截短的肽的应答来鉴定最小表位。例如,如果获得了针对重叠文库中包含残基 1-15 的肽的应答,那么可以使用两端截短的组 (即 1-14、1-13、1-12 等,及 2-15、3-15、4-15 等) 来鉴定最小表位。

[0102] 本发明提供包含 FVIII 的“核心残基”序列的肽,核心残基序列选自下列:

[0103] LYISQFIIM

[0104] FIIMYSLDG

[0105] IARYIRLHP

[0106] LIIFKNQAS

[0107] LTRYSSFV

[0108] MVTFRNQAS

[0109] LRIHPQSWV

[0110] 如实施例所示,这些核心残基序列使用 HLA-DR2 结合算法预测以代表或包含每个区域的最小表位。

[0111] Apitope

[0112] 本发明人先前已确定,肽在无需进一步抗原加工的条件下结合 I 类或 II 类 MHC 分子并被呈递给 T 细胞的能力,与该肽诱导体内耐受性的能力之间存在关联 (WO 02/16410)。如果肽过长,以至于其不经过进一步加工 (例如修剪) 就无法结合 MHC 分子的肽结合沟,或者以不合适的构象结合,则它不会在体内具有致耐受性。另一方面,如果肽具有合适的大小和构象以直接结合 MHC 肽结合沟并呈递给 T 细胞,则可预计该肽可用于诱导耐受性。

[0113] 因此,有可能通过考察肽在体外能否无需进一步抗原加工而结合 I 类或 II 类 MHC 分子并呈递给 T 细胞,来考察该肽的致耐受能力。

[0114] 本发明的肽是 apitope (Antigen Processing-Indepent Epitopes, 不依赖抗原加工的表位),因为它们无需进一步抗原加工就能够结合 II 类 MHC 分子并刺激来自因子 VIII 特异性 T 细胞的应答。可以预计,依照 WO 02/16410 中描述的基于规则的 (rule-based) 方法,这样的 apitope 会导致对 FVIII 的耐受。

[0115] 本发明的肽可以为任何能够无需进一步加工即结合 I 类或 II 类 MHC 分子的长度。通常,本发明的肽能够结合 II 类 MHC 分子。

[0116] 结合 I 类 MHC 分子的肽通常为 7-13 个,更通常为 8-10 个氨基酸长。在肽的两端,通过肽主链中的原子与所有 I 类 MHC 分子的肽结合沟中的不变位点之间的接触使得肽的结合稳定化。在所述沟的两端均有不变位点,它们结合肽的氨基和羧基末端。肽主链中的扭转 (kinking) 适应肽长度的变化,扭转常常在脯氨酸或甘氨酸残基处发生,这些残基容许所需的柔性。

[0117] 结合 II 类 MHC 分子的肽通常为 8 到 20 个氨基酸长,更通常为 10 到 17 个氨基酸长,并且可以更长 (例如长达 40 个氨基酸)。这些肽沿着 MHC II 肽结合沟采取伸展的构象,这种沟 (与 I 类 MHC 肽结合沟不同) 两端是开放的 (open at both ends)。肽主要通过主链原子与排列成肽结合沟的保守残基的接触被固定到位 (held in place)。

[0118] 肽序列

[0119] 本发明的第一个实施方案涉及一种肽,其包含下列 FVIII 衍生序列之一:

[0120]

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRIHPQSW

MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHQPQSWVHQIA

[0121] 具有下列修饰中的一种或多种：

[0122] (i) 去除一个或多个疏水性氨基酸；

[0123] (ii) 用荷电亲水性氨基酸取代一个或多个疏水性氨基酸；和

[0124] (iii) 在一端或两端插入一荷电氨基酸

[0125] 所述修饰的肽无需进一步抗原加工就能够结合 II 类 MHC 分子，并能由因子 VIII 特异性 T 细胞所识别。

[0126] 在表 1 中给出了标准氨基酸的列表，连同它们的侧链极性、电荷和疏水性指数。

[0127] 表 1

[0128]

氨基酸	3- 字母	1- 字母	侧链极性	侧链电荷 (pH 7)	疏水性 指数
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	1.8
精氨酸	Arg	R	极性	正电	-4.5
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
天冬氨酸	Asp	D	极性	负电	-3.5
半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性	2.5
谷氨酸	Glu	E	极性	负电	-3.5
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	-0.4
组氨酸	His	H	极性	正电	-3.2
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	4.5
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	3.8
赖氨酸	Lys	K	极性	正电	-3.9
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	1.9
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	2.8
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	-1.6
丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
色氨酸	Trp	W	非极性	中性	-0.9
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
缬氨酸	Val	V	非极性	中性	4.2

[0129] 疏水性氨基酸包括 :G, C, M, A, P, I, L, V 和芳族氨基酸 F 和 W。可以从序列末端或序列内部去除疏水性氨基酸。

[0130] 荷电亲水性氨基酸包括 :K, R, D, H 和 E。可以在序列末端或序列内部用荷电亲水性氨基酸替换疏水性氨基酸。

[0131] 序列的 N 末端可以插入一个或多个荷电氨基酸。有利地,为了产生电荷偶极,在一端插入或取代一荷正电氨基酸并在另一端插入 / 取代一荷负电荷的氨基酸。

[0132] 亲本序列的修饰不应显著地损害肽与 MHC 分子的肽结合沟的结合、其由 T 细胞识别的能力,或者其充当 apitope (无需进一步的抗原加工就能够结合 MHC 分子并呈递至 T 细

胞)的能力。这可以使用已知的抗原呈递测定法和 T 细胞杂交瘤容易地检测。

[0133] 本发明的第二个实施方案涉及一种肽,其包含下列序列:

[0134] $X(aa)_n$ -核心序列 $-(aa)_m$

[0135] 其中 X 是荷电亲水性残基;

[0136] aa 是氨基酸;

[0137] n 是 0-5 的整数;

[0138] m 是 0-5 的整数;并且

[0139] “核心序列”选自下列 FVIII 衍生肽组成的组:

[0140] LYISQFIIM

[0141] FIIMYSLDG

[0142] IARYIRLHP

[0143] LIIFKNQAS

[0144] LTRYSSSFV

[0145] MVTFRNQAS

[0146] LRIHPQSWV

[0147] 所述肽无需进一步抗原加工就能够结合 II 类 MHC 分子,并能由因子 VIII 特异性 T 细胞所识别。

[0148] 序列 $(aa)_n$ 或 $(aa)_m$ 可以是 4-5 个氨基酸的任意序列。例如,肽可以具有序列: XDNIMVTFRNQAS,在这种情况下 $n = 3$ 并且 $m = 0$ 。

[0149] 本发明的第三个实施方案涉及一种肽,其包含下列序列:

[0150] $Y(aa)_n$ -核心序列 $-(aa)_mZ$

[0151] 其中 Y 和 Z 是具有相反极性的荷电氨基酸;

[0152] aa 是氨基酸;

[0153] n 是 0-5 的整数;

[0154] m 是 0-5 的整数;并且

[0155] “核心序列”选自下列 FVIII 衍生肽组成的组:

[0156] LYISQFIIM

[0157] FIIMYSLDG

[0158] IARYIRLHP

[0159] LIIFKNQAS

[0160] LTRYSSSFV

[0161] MVTFRNQAS

[0162] LRIHPQSWV

[0163] 所述肽无需进一步抗原加工就能够结合 II 类 MHC 分子,并能由因子 VIII 特异性 T 细胞所识别。

[0164] 例如,对于肽 EDNIMVTFRNQASR,

[0165] $Y = E$;

[0166] $(aa)_n = DNI$

[0167] $m = 0$;并且

[0168] $Z = R$

[0169] 所述肽可包含核心序列,以及附加的位于 N 和 / 或 C 端的侧翼序列(分别是 $(aa)_n$ 和 $(aa)_m$),只要所得的肽能够无需进一步抗原加工即能够结合 II 类 MHC 分子即可。

[0170] 侧翼的 N 和 / 或 C 端序列可以是从小 FVIII 核心残基序列侧翼的序列衍生的。

[0171] APIPS

[0172] 已知多种不依赖抗原加工的呈递系统 (antigen processing independent presentation systems, APIPS),包括:

[0173] a) 固定的 APC(有或无针对 CD28 的抗体);

[0174] b) 含有 I 类或 II 类 MHC 分子的脂质膜(有或无针对 CD28 的抗体);和

[0175] c) 以结合于平板的形式存在的、经纯化的天然或重组 MHC(有或无针对 CD28 的抗体)。

[0176] 全部这些系统都能够呈递与 MHC 分子结合的抗原,但不能加工抗原。在所有这些系统中,加工功能或者缺失,或者被失能化。这就为研究某种肽是否能在不经过进一步抗原加工的条件下结合 I 类或 II 类 MHC 分子并被呈递至 T 细胞提供了可能。

[0177] 使用固定的 APC 来研究 T 细胞应答在本领域是众所周知的,例如,在通过测量针对截短的肽的应答来考察多肽内的最小表位的研究中 (Fairchild 等 (1996) Int. Immunol. 8 : 1035-1043)。APC 可以使用例如甲醛(通常是多聚甲醛)或戊二醛来固定。

[0178] 脂质膜(可以是平面膜或者脂质体)可以用人工脂质来制备,或者可以是来自 APC 的质膜/微粒体级分。

[0179] 在使用中,可以将 APIPS 施加到组织培养板的孔中。然后加入肽抗原,并通过添加所选的 T 细胞系或克隆检测所述肽与 APIPS 的 MHC 部分的结合。T 细胞系或克隆的活化可以用本领域中已知的任何方法来测量,例如通过 3H - 胸苷掺入或细胞因子分泌。

[0180] 因子 VIII

[0181] 本发明的肽的核心序列可衍生自因子 VIII。一侧或两侧的侧翼序列 $((aa)_n$ 和 $(aa)_m$) 也可衍生自因子 VIII。

[0182] 因子 VIII 参与内在的血液凝固途径;因子 VIII 是因子 IXa 的辅因子,后者在 Ca^{+2} 和磷脂的存在下将因子 X 转化为活化形式 Xa 。

[0183] 因子 VIII 的基因产生两种可选的经剪接的转录物。转录物变体 1 编码一种大的糖蛋白,亚型 a,其在血浆中循环并与 von Willebrand 因子缔合成非共价的复合物。该蛋白质经历多个切割事件。转录物变体 2 编码一种推定的小蛋白,亚型 b,其主要由因子 VIIIc 的磷脂结合域组成。该结合域对促凝剂活性来说是关键。

[0184] 在 1980 年代中期阐明了人因子 VIII 基因的 186,000 个碱基对的全序列 (Gitschier 等 (1984) Nature 312:326-330)。同时,在经培养的哺乳动物细胞中使用了编码全部 2351 个氨基酸序列的 DNA 克隆来产生生物学活性的因子 VIII (Wood 等 (1984) Nature 312 :330-337)。人因子 VIII 的全部 2,351 个氨基酸的序列在 SEQ ID NO :1 中给出。

[0185] 本发明的肽的核心序列可衍生自因子 VIII。任选的,侧翼序列也可衍生自因子 VIII,只要它们与天然因子 VIII 多肽中核心序列侧翼的序列相同。所述序列可以是能够从因子 VIII 序列的切割获得的,或者是从因子 VIII 序列的切割获得的。

[0186] 可溶性

[0187] 本发明的第一个实施方案的肽是下列肽之一的修饰形式：

[0188]

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHTY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYSSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

[0189] 已经证明这些肽作为 apitope 发挥作用并且在体内是致耐受的（见实施例和国际专利申请 No PCT/GB2008/003996）。

[0190] 众所周知，在肽介导的耐受诱导中，可溶性是重要的考虑因素。可以通过下列方式中的一种或多种提高可溶性：

[0191] (i) 去除一个或多个疏水性残基；

[0192] (ii) 添加 / 取代以添加一个或多个荷电亲水性残基

[0193] (iii) 在任一端放置 (placing) 荷正电或荷负电的氨基酸以造成电荷偶极。

[0194] 修饰的肽可能比亲本（未修饰的）肽具有更高的可溶性。修饰的肽可以比亲本肽具有 2、3、4 或 5 倍高的可溶性。这些肽可以在高至 0.5mg/ml、1mg/ml，或 5mg/ml 的浓度下是可溶的。

[0195] 耐受性

[0196] T 细胞表位在针对任何抗原（自身的或外来的）的适应性免疫应答中扮演着中枢性的角色。已经通过利用实验模型证明了 T 细胞表位在超敏性疾病（包括变态反应、自身免疫疾病和移植物排斥）中的中枢性作用。通过注射合成肽（基于 T 细胞表位的结构）和佐剂的组合，可以诱导炎症性或变应性疾病。

[0197] 与之形成对照的是，已经证明，通过施用可溶形式的肽表位来诱导针对特定抗原的免疫耐受是可能的。已经在实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE，一种多发性硬化（MS）的模型）(Metzler 和 Wraith(1993) Int. Immunol. 5 :1159-1165 ;Liu 和 Wraith(1995) Int.

Immunol. 7 :1255-1263 ;Anderton and Wraith(1998) Eur. J. Immunol. 28 :1251-1261)、以及关节炎、糖尿病和葡萄膜视网膜炎 (uveoretinitis) (Anderton 和 Wraith(1998),同上中有综述) 的实验模型中,证明了施用可溶性肽抗原是有效的疾病抑制手段。还证明了它是治疗 EAE 中正在进行的疾病的手段。

[0198] 耐受是对抗原的不应答。对自身抗原的耐受是免疫系统的一个关键特征,如果丧失了这种耐受,就可能导致自身免疫疾病。适应性免疫系统必须保持这样的能力:对千差万别的致病原 (infectious agent) 产生应答,同时避免对其自己的组织中所含的自身抗原的自身免疫攻击。这一点在很大程度上是由未成熟的 T 淋巴细胞对胸腺中凋亡性细胞死亡的敏感性 (中心耐受) 所调控的。然而,不是所有的自身抗原都在胸腺中被检测到,所以自身反应性胸腺细胞的死亡仍然是不完全的。因此还存在这样的机制,使得外周组织中成熟的自身反应性 T 淋巴细胞可以获得耐受 (外周耐受)。Anderton 等 (1999) (Immunological Reviews 169 :123-137) 提供了关于中心耐受和外周耐受的机制的综述。

[0199] 在 A 型血友病中,患者在因子 VIII 基因中有缺陷。这意味着因子 VIII 不被免疫系统识别为“自身”抗原。因此,当在凝血因子替代治疗过程中施用因子 VIII 时,针对该外来蛋白产生了同种异体免疫应答,导致 FVIII 抑制剂抗体的产生。

[0200] 本发明的肽能够诱导对因子 VIII 的耐受,这样当治疗性施用 FVIII 时,它不诱导免疫应答,也不产生 FVIII 抑制剂。

[0201] 获得性血友病是一种对因子 VIII 的耐受被破坏的自身免疫疾病,在这种情况下,可以施用本发明的肽来恢复针对这种自身蛋白的耐受并减少病原性的免疫应答。

[0202] 耐受可能是至少一部分 CD4+T 细胞被诱导出无反应性 (anergy) 的结果,或者以至少一部分 CD4+T 细胞被诱导出无反应性为特征。为了活化 T 细胞,肽必须与“专职”APC 结合;“专职”APC 能够把两种信号传递给 T 细胞。第一种信号 (信号 1) 由 APC 细胞表面上的 MHC-肽复合物传递而 T 细胞通过 TCR 接收。第二种信号 (信号 2) 由 APC 表面上的共刺激分子如 CD80 和 CD86 传递并被 T 细胞表面的 CD28 所接收。认为当 T 细胞在没有信号 2 的情况下接收到信号 1 时,它不被活化,并且事实上变成无反应性的。无反应性 T 细胞对接下来的抗原刺激 (challenge) 无反应,并且可能能够阻遏其它免疫应答。无反应性 T 细胞被认为与介导 T 细胞耐受有关。

[0203] 不希望受理论束缚,本发明人预测,需要加工后方可与 MHC 分子结合呈递的肽不诱导耐受,因为它们必需由成熟的抗原呈递细胞来处理。成熟的抗原呈递细胞 (如巨噬细胞、B 细胞和树突细胞) 能够进行抗原加工,但是也能够将信号 1 和信号 2 二者传递给 T 细胞,导致 T 细胞活化。另一方面,apitope 将能够结合未成熟 APC 上的 II 类 MHC。因此它们会在没有共刺激的条件下被呈递给 T 细胞,导致 T 细胞无反应性和耐受。

[0204] 当然,apitope 也能够结合成熟 APC 的细胞表面上的 MHC 分子。然而,免疫系统所含的未成熟 APC 的丰度高于成熟 APC (已经提出少于 10% 的树突细胞是活化的,Summers 等. (2001) Am. J. Pathol. 159 :285-295)。因此,apitope 的缺省状态 (default position) 应该是无反应性 / 耐受,而不是活化。

[0205] 针对 FVIII 的耐受的诱导可以在体内通过本领域已知的技术寻找下列各项的水平降低来加以监测:

[0206] (i) FVIII 抑制性抗体:

[0207] (ii) 针对 FVIII 特异性的 CD4+T 细胞

[0208] (iii) 能够分泌 FVIII 抑制性抗体的 B 细胞。

[0209] 已经证明当通过施用肽诱导了耐受时,抗原特异性 CD4+T 细胞的增殖能力降低。同时,这些细胞的 IL-2、IFN- γ 及 IL-4 的产生受到下调,但 IL-10 的产生增加。已经证明,在肽诱导的耐受状态的小鼠中,中和 IL-10 完全恢复对疾病的易感性。已经提出,在耐受状态下仍然存在某个调节细胞群体,它们产生 IL-10 并介导免疫调节 (Burkhart 等 (1999) Int. Immunol. 11 :1625-1634)。

[0210] 因此,耐受性的诱导可以通过包括下述在内的多种技术来监测:

[0211] (a) CD4+T 细胞中的无反应性的诱导 (这可以通过后续的在体外用 FVIII 的刺激来检测);

[0212] (b) CD4+T 细胞群体中的变化,包括

[0213] (i) 增殖的减少;

[0214] (ii) IL-2、IFN- γ 和 IL-4 产生的下调;和

[0215] (iii) IL-10 的产生的增加。

[0216] 如本文中使用的,术语“致耐受性”(tolerogenic)意指能够诱导耐受。

[0217] 组合物

[0218] 本发明还涉及一种组合物,例如药物组合物,其包含一种或多种根据本发明的肽。

[0219] 所述肽可包括多种本发明的肽,例如两种,三种,四种,五种或六种本发明的肽。

[0220] 本发明的组合物可以用于预防或治疗用途。

[0221] 当施用所述组合物用于预防时,所述组合物可减少或防止针对 FVIII 的免疫应答的产生。免疫应答的水平低于未使用该组合物处理时该患者中本应得到的免疫应答。术语“减少”表示观察到免疫应答的部分减少,例如在尚未使用该组合物处理的患者中会观察到的应答(或在同一时间段中未处理患者中观察到的应答)的 50%、70%、80%或 90%的减少。术语“防止”表示没有观察到可觉察的针对 FVIII 的免疫应答。

[0222] 当施用所述组合物用于治疗用途时,所述组合物可阻遏已经处于正在进行的针对 FVIII 的免疫应答。术语“阻遏”(suppress)表示与肽处理之前的水平,或若不接受处理于同一时间点上可观察到的水平相比,正在进行的免疫应答的水平下降。

[0223] 用本发明的组合物治疗可导致下列各项中任一项或全部的水平减少:

[0224] (i) FVIII 抑制性抗体

[0225] (ii) FVIII 特异性 CD4+T 细胞

[0226] (iii) 分泌 FVIII 抑制性抗体的 B 细胞。

[0227] 所有这些因素的检测都可以通过本领域已知的技术如 ELISA、FACS 等来实施。

[0228] 并且/或者,用本发明的组合物治疗可导致针对 FVIII 特异性的 CD4+T 细胞的无反应性。无反应性可以例如通过后续在体外用 FVIII 刺激来检测。

[0229] 重要的是不能忘记,不是所有的针对 FVIII 的免疫应答都是致病性的。在没有抑制剂的血友病患者中 (Moreau 等 (2000) Blood 95 :3435-41) 和大约 15%的健康献血者中 (Algiman 等 (1992) 89 :3795-9) 可以发现非抑制性的抗 FVIII 抗体。

[0230] FVIII 抑制剂可以利用凝血 Bethesda 测定法的 Nijmegen 修改版本来检测,该方法中测试患者血浆对正常血浆中的 FVIII 的灭活能力。一个 Bethesda 单位定义为中和 50%

的血浆 FVIII 活性的抗体量,且 0.6BU 或更高的效价提示抗体的存在。

[0231] 一般而言,抑制剂若水平 < 5BU 则归类为低效价,若 $\geq$ 5BU 则归类为高效价。

[0232] 循环中的 FVIII 抑制性抗体的水平可以减少到若患者不接受治疗可观察到的抗体水平的 90%、75%、50%、20%、10%、5%。

[0233] 循环中的 FVIII 抑制性抗体的水平可以被减少到 5、4、3、2、1、或 0.5BU。

[0234] 本发明的肽和组合物可以增加治疗性施用的 FVIII 中可用于帮助患者凝血的量或比例。这是因为减少了 FVIII 抑制剂, FVIII 抑制剂可能有效地使一部分 FVIII 不能发挥其治疗功能。本发明的肽或组合物可以使可用 FVIII 的量增加,例如,10%、25%、50%、75%或 100%。

[0235] 因此本发明的肽和组合物可以减少为了帮助患者凝血而需要施用的 FVIII 的量。

[0236] 制剂

[0237] 所述组合物可以制备为可注射制剂,作为液体溶液或悬浮液;还可以制备适于在注射前溶解于或悬浮于液体中的固体形式。制备物还可以乳化,或者将肽包埋在脂质体中。可以将活性成分与可药用且与该活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂有,例如,水、盐水(例如,磷酸盐缓冲盐水)、葡萄糖、甘油、乙醇、等等,以及它们的组合。

[0238] 此外,如果期望,组合物可以含有次要量的辅助物质如润湿剂或乳化剂和/或 pH 缓冲剂。缓冲性盐包括磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐。可以使用盐酸和/或氢氧化钠调节 pH。为了稳定化,可以使用二糖,如蔗糖或海藻糖。

[0239] 如果组合物含有多种肽,各种肽的相对比例可以是大致相等的。或者可以改变各种肽的相对比例,例如,可以改变各种肽的相对比例以便将致耐受性应答集中于某一特定的自身反应性 T 细胞子集,或者若发现在特定 HLA 类型中某种肽的作用好于其他肽,可改变各种肽的相对比例。

[0240] 配制后,可以将组合物装入无菌容器中,然后密封,并于低温(例如 4°C)保存,或者可以将其冷冻干燥。

[0241] 方便地,组合物制备为冻干(冷冻干燥)粉末。冻干允许以稳定形式长期保存。冻干方法是本领域众所周知的,例如参见 <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/97/01/006.html>。在冷冻干燥前通常使用填充剂,如甘露醇、葡聚糖或甘氨酸。

[0242] 组合物可以以方便的方式施用,如通过口服、静脉内(当可水溶时)、肌肉内、皮下、舌下、鼻内、皮内或栓剂途径,或植入(例如利用缓释分子)。

[0243] 组合物有利地可以通过鼻内、皮下或皮内途径施用。

[0244] 本发明的肽和组合物可以用来治疗人受试者。受试者可患有 A 型血友病,尤其是严重 A 型血友病。受试者可以是 FVIII 遗传缺陷的。受试者可患有获得性血友病。受试者可具有抑制性抗 FVIII 抗体。

[0245] 受试者可正在进行或即将进行使用 FVIII 的凝血替代治疗。

[0246] 受试者可正在进行或即将进行使用 FVIII 基因的基因治疗。

[0247] 受试者可以是与产生抑制性抗 FVIII 同种抗体或自身抗体的倾向相关的 HLA 单体型。受试者可表达 HLA-DR2。测定个体的 HLA 单体型的方法是本领域已知的。

[0248] 通常,医师会为每个受试者确定最合适的实际剂量,且该剂量将随着特定患者的年龄、体重和应答而变化。

[0249] 在一个优选的实施方案中,可遵循“剂量提升”方案,其中以递增的浓度给患者施用多个剂量。这种手段已经用于例如对蜂毒变态反应的免疫治疗应用中的磷脂酶 A2 肽 (Müller 等 (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101 :747-754, 以及 Akdis 等 (1998) J. Clin. Invest. 102 :98-106)。

[0250] 试剂盒

[0251] 方便地,如果所述组合物包含多种肽,它们可以以混合的组合物或鸡尾酒混合物的形式一起施用。但是,可能在有些情况下优选以试剂盒的形式各别地提供所述肽,用于同时、分开、顺序或联合施用。

[0252] 试剂盒还可包含混合和 / 或施用手段 (例如用于鼻内施用的汽化器 (vapouriser); 或用于皮下 / 皮内定量给药的注射器和针头)。试剂盒还可包含使用说明。

[0253] 本发明的药物组合物或试剂盒可以用来治疗和 / 或预防疾病。

[0254] 特别地,所述组合物 / 试剂盒可以用来治疗和 / 或预防 A 型血友病或获得性血友病。

[0255] A 型血友病

[0256] A 型血友病 (经典血友病) 是由因子 VIII 的缺陷造成的。

[0257] A 型血友病的估计发病率是每 10,000 名男性中 1 人,而 B 型血友病估计是每 40,000 名男性中 1 人。每 5,000 名女性中约有 1 人是 A 型血友病携带者,而每 20,000 名女性中有 1 人是 B 型血友病携带者。

[0258] 根据血液中凝血因子的水平,血友病通常分为 3 类:严重、中度和轻度。在严重血友病中,正常凝血因子少于 1%。严重程度在世代之间倾向于保持一致。

[0259] 与普遍的想法相反,对于血友病患者而言,轻微的切割和伤口通常没有威胁。相反,最大的危险来自于可能发生于关节和肌肉中的自发出血。这在快速生长的年龄最容易发生,通常在 5 到 15 岁之间。

[0260] 关节中重复的自发出血可造成关节炎和相邻肌肉逐渐弱化。血液累积引起的对神经的压迫可导致疼痛、麻木、以及患处暂时性移动不能。

[0261] A 型血友病通常用血液检测来诊断,以测定凝血效率并考察凝血因子水平是否异常。

[0262] 在 1970 年代,纯化的凝血因子 (从捐献的血液中分离的) 的开发显著改善了血友病患者的长期远景。轻度到中度的血友病患者可以基于特定情况 (on an adhoc basis) 使用 FVIII 治疗,而严重血友病患者可能需要规律性的、无期限的治疗。

[0263] 从前,给予患者的因子 VIII 浓缩物是从数千份血浆捐献品汇集而来的。这样造成了严重的病毒性病原体,尤其是人免疫缺陷病毒和肝炎病毒污染的问题。单克隆抗体纯化技术、热灭活和杀病毒去污剂处理已经使得血浆来源的浓缩物相对安全。

[0264] 重组 DNA 技术现在已经提供了一系列合成产品,如 Recombinate™ 和 Kogenate™。Kogenate 是利用表达人因子 VIII 的幼仓鼠肾细胞制备的。所得的因子是高度纯化的,排除了任何从血浆中带入病毒的可能。

[0265] 本发明的肽或组合物可以在因子 VIII 替代治疗之前和 / 或之中施用。

[0266] A 型血友病是基因治疗的理想目标疾病,因为 i) 它是在单个已鉴定的基因中的突变造成的, ii) 体内凝血因子水平的稍许提高即将严重血友病转化为较轻微的疾病,和

iii) 现有的替代治疗被认为差强人意。此外,如果期望的凝血活性水平“过火”的话,有很宽的安全范围。

[0267] 遗憾的是,迄今为止通过基因治疗治愈血友病的承诺尚未实现,这主要是因为难以找到一种具有充分的非免疫原性以容许长期表达凝血因子的基因投递系统。

[0268] 本发明的肽还会适用于在用因子 VIII 进行基因治疗之前使受试者耐受化和 / 或在基因治疗之后应对患者中的 FVIII 抑制剂生成。

[0269] 获得性血友病

[0270] 获得性血友病的特征是,在先前凝血正常的个体中抗 FVIII 的自身抗体抑制剂的存在。它是一种少见的病症,估计发病率为每年每百万人的群体中 1-3 人。与获得性自身抗体抑制剂相关的死亡率接近 25%,而相比之下具有同种异体抗体的个体中的死亡风险显著更低。

[0271] 与同种抗体抑制剂患者相比,获得性血友病的特征在于:(1) 更严重的出血模式;(2) 在年龄较大的群体中的发生率更高;(3) 其发生伴随着可鉴定的原因性 (identifiable underlying) 自身免疫疾病、淋巴增殖性或实体瘤性恶性肿瘤、妊娠、以及在大约 50% 的病例中使用特定的抗生素如青霉素和磺胺;和 (4) 遵循 II 型药代动力学模式的体外抑制剂活性,以及自身抗体对目标凝血因子活性的不完全中和,通常造成患者血浆中残留因子 VIII 水平为 2% -18%。

[0272] 本发明的肽或组合物可以施用于患有获得性血友病的患者,或者被认为有风险患上获得性血友病的患者,例如由于

[0273] i) 即将进行例如青霉素或磺胺治疗,

[0274] ii) 肿瘤或其他恶性肿瘤的进展,

[0275] iii) 即将开始的或早期妊娠。

[0276] 下面将借助实施例进一步说明本发明,这些实施例仅仅意在用来帮助本领域普通技术人员实施本发明,而绝不意在限制本发明的范围。

实施例

[0277] 实施例 1:HLA-DR2 因子 VIII 肽的选择

[0278] 使用 3 种 HLA-DR 结合算法比较了一系列 FDVIII 15 聚体肽:

[0279] SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>)

[0280] ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>) 和

[0281] IEDB (<http://www.immuneepitope.org/home.do>)。

[0282] 选择由超过一种上述程序预测为 HLA-DR2 结合性的肽,并为预测的核心残基 (表 2) 设计侧翼序列。

[0283] 表 2

[0284]

肽 编号	FVIII 第 一氨基酸	单字母氨基酸符号表示的序列	本文中又称:
1	2140	GTLMVFFGNVDSSGI	GTLMV
2	0208	TQTLHKFILLFAVFD	TQTLH
3	2114	SLYISQFIIMYSLDG	SLYIS
4	2161	PPIIARYIRLHPHXY	PPIIA
5	2318	PPLLTRYLRIHPQSW	PPLLT
6	250	MHTVNGYVNRSLPGL	MHTVN
7	322	LGQFLLFCHISSHQH	LGQFL
8	478	DTLLIIFKNQASRPY	DTLLI
9	545	PRCLTRYYSFVNME	PRCLT
10	607	TENIQRFLPNPAGVQ	TENIQ
11	1788	DNIMVTFRNQASRPY	DNIMV
12	2322	RYLRIHPQSWVHQIA	RYLRI

[0285] 实施例 2:考察来自因子 VIII 免疫的小鼠的 HLA-DR2 限制性细胞对肽的应答

[0286] 用佐剂中的人因子 VIII 免疫 HLA-DR2 转基因小鼠。收集引流淋巴结细胞,用不同浓度的来自表 2 的 12 种肽进行体外再刺激。结果示于图 1

[0287] 来自因子 VIII 免疫的小鼠的 HLA-DR2 限制性细胞明显地对肽 DNIMV (第一个氨基酸为 1788) 强应答。对肽 PRCLT (545) 和 PPIIA (2161) 也有应答。

[0288] 实施例 3:考察来自 HLA-DR2 小鼠的 T 细胞对肽的应答

[0289] 首先用佐剂中的因子 VIII 免疫 HLA-DR2 小鼠。在体外用因子 VIII 对来自免疫小鼠的脾细胞进行再刺激,并使用聚乙二醇将所得的淋巴母细胞与 BW5147 胸腺瘤融合。

[0290] T 细胞杂交瘤在 HAT 培养基中选择,克隆杂交瘤并测试它们对因子 VIII 的应答。然后以杂交瘤对 12 种预测肽的应答为条件对它们进行筛选。在被筛选的 27 个杂交瘤中,11 个对 DNIMV 应答,3 个对 PRCLT 应答,而 3 个对 PPIIA 应答,尽管对 PPIIA 的应答较弱且特异性较低。两个对 DNIMV 和 PRCLT 特异性的杂交瘤的应答如图 2 所示。

[0291] 实施例 4:考察来自 FVIII-DR2+ 小鼠的淋巴结细胞对肽的应答

[0292] 将 HLA-DR2 小鼠与因子 VIII 缺陷小鼠杂交以产生表达人 II 类 MHC 分子的血友病模型。

[0293] 用佐剂中的因子 VIII 免疫这些 FVIII-DR2+ 动物。分离引流淋巴结并测试它们对肽组的应答。如图 3 所示,这些细胞对 PRCLT 和 DNIMV 应答良好。对 GTLMV 有弱应答,对 RYLRI 应答显著。

[0294] 实施例 5:考察来自 HLA-DR2 小鼠的 T 细胞对肽的应答

[0295] 用佐剂中的因子 VIII 免疫表达 HLA-DR2 的因子 VIII 缺陷小鼠。将来自经免疫

小鼠的脾细胞在体外用因子 VIII 再刺激,并将所得的淋巴母细胞与 BW5147 融合,如上所述。以其针对 12 种预测肽的应答为条件筛选 T 细胞杂交瘤。同样,大部分杂交瘤对 DNIMV 和 PRCLT 肽有应答。在 19 个对因子 VIII 特异性的杂交瘤中,10 个对 DNIMV 有应答,6 个对 PRCLT 有应答,1 个对 PPIIA 有应答,1 个对 SLYIS 有应答,而 1 个对 DTLII 有应答。这些杂交瘤的应答的实例如图 4 所示。

[0296] 基于这些实验,很明显两种肽 DNIMV(第一个氨基酸编号为 1788)和 PRCLT(第一个氨基酸为 545)构成针对人因子 VIII 的 HLA-DR2 限制性 T 细胞应答中的免疫显性 T 细胞表位。

[0297] 实施例 6:DNIMV 和 PRCLT 表现为 apitope

[0298] 要成为 apitope,肽必须有这样的能力:在不经进一步抗原加工(即修剪(trimming))的条件下即能结合 I 类或 II 类 MHC 分子,并被呈递给 T 细胞。在本案中,考察了肽被固定的 APC 呈递的能力。

[0299] Mgar 细胞是新鲜的或者用 1%多聚甲醛固定的。通过将 100 μ l 杂交瘤细胞与 5×10^4 个 Mgar 细胞在有或无 20 μ g/ml rhFVIII 或肽表位的存在下一同培养过夜来测试克隆的抗原特异性。然后收集上清液,并通过 ELISA 评估 IL-2 生成。rhFVIII 必须由活的 Mgar 细胞呈递的事实表明,完整蛋白要呈递需要抗原加工。另一方面,肽 DNIMV 和 PRCLT 既被活 Mgar 细胞呈递,又被固定的 Mgar 细胞呈递,表明这些肽有 apitope 的功能(图 5)。

[0300] 实施例 7:能够发挥 apitope 功能的肽表位的范围的确定

[0301] 通过制备一组重叠肽(如 30-32 页所示),并按照与实施例 5 相同的方法使用 T 细胞杂交瘤来筛选它们,以鉴定 DNIMV、PRCLT 及其他肽周围的序列中能够发挥 apitope 功能的肽表位的范围(图 7)。

[0302] 实施例 8:DNIMV 和 PRCLT 诱导针对完整因子 VIII 蛋白的耐受

[0303] 用两种可溶肽中的任一种或作为对照的 PBS 处理 HLA-DR2 转基因小鼠,然后用佐剂中的因子 VIII 进行免疫。分离引流淋巴结并用因子 VIII 蛋白对细胞进行体外再刺激,以评估小鼠的免疫状态。如图 6 所示,用 DNIMV 或 PRCLT 处理小鼠导致针对因子 VIII 的免疫应答的显著阻遏。

[0304] 实施例 9:考察 DNIMV 和 PRCLT 能否在因子 VIII 敲除小鼠中诱导耐受

[0305] 从实施例 8 可知,这两种肽在表达内源性因子 VIII 的小鼠中能够防止针对因子 VIII 的免疫应答。用 FVIII-DR2+ 动物重复该实验以确定这些肽是否也阻止因子 VIII 缺陷小鼠中针对因子 VIII 的免疫应答。

[0306] 实施例 10:考察 DNIMV 和 PRCLT 的组合能否在因子 VIII 敲除小鼠中诱导耐受

[0307] 将这两种已在实施例 9 中证明能够单独降低因子 VIII 缺陷小鼠中针对因子 VIII 的免疫应答的肽组合起来。如图 8 所示,用 DNIMV 和 PRCLT 二者处理小鼠导致针对因子 VIII 的免疫应答的显著阻遏,表现为 IFN- γ 产生的减少。IFN- γ 是小鼠中中和性抗体所需的主要类别转换淋巴因子。显示的效果比任何一种肽单独使用时观察到的效果都要高。

[0308] 实施例 11:使用修饰肽进行耐受的诱导

[0309] 肽 DNIMV 是部分而非完全可溶。为提高这种肽的可溶性,设计了一种具有下列序列的修饰形式:EDNIMVTFRNQASR。

[0310] 这是在 N 端延长以添加一荷电亲水性残基。还在 C 端截短以除去脯氨酸和酪氨酸

残基。此外通过在肽的任一端放置荷正电或荷负电的氨基酸,造成了据报道可提高可溶性的电荷偶极。

[0311] 修饰的肽比 DNIMV 可溶性更高并足够可溶以允许鼻腔肽递送。为了评估使用此种肽表位对耐受的诱导,取 FVIII 缺陷小鼠并用修饰的 EDNIMV 肽(图 9 中被称为“耐受化(tolerised)”组)处理一半小鼠。接着用 CFA 中的 DNIMV 免疫小鼠,并在 10 天后收集引流淋巴结并在体外用 DNIMV 或 EDNIMV 刺激。图 9 显示了来自体外用 DNIMV 或 EDNIMV 刺激的 naïve 小鼠或耐受化小鼠的应答结果。

[0312] 该结果证明了 EDNIMV 能使用 DNIMV 免疫的小鼠重新产生(recall)免疫应答。此外,非常清楚地证明了用 EDNIMV 耐受化的小鼠无法在体内对 DNIMV 产生免疫应答,正如体外用 CFA 中的 DNIMV 初次刺激后对 DNIMV 或 EDNIMV 缺乏应答所揭示的一样。

[0313] 实施例 12:EDNIMV 诱导对完整因子 VIII 蛋白的耐受

[0314] 对修饰的肽 EDNIMV 重复实施例 8 所述实验以证明 EDNIMV 能够抑制对完整因子 VIII 蛋白的免疫应答。

[0315] 方法

[0316] (i) 用 rhFVIII 初次刺激的 DR2+ 小鼠的回忆应答

[0317] 用 40 μ g rhFVIII 在尾根部皮下免疫 HLA-DR2+ 鼠类 II 类 MHC 缺失小鼠(HLA-DR2+murine MHC class II null mice),其中 rhFVIII 乳化在加有 400 μ g 热灭活的结核分枝杆菌(M. tuberculosis)H37Ra 的完全弗氏佐剂中。10 天后处死小鼠,取出引流淋巴结。制备单细胞悬液,将在 96 孔平底平板中以 $4-5 \times 10^5$ 个细胞/孔的淋巴细胞与标示浓度的肽或对照抗原一起温育 72 小时,然后再用 0.5 μ Ci/孔的氚标记胸苷脉冲刺激(pulse)16 小时。然后冷冻平板,再将细胞收集到玻璃过滤垫片(glassfilter mat)上,并使用液体闪烁 β 计数器测量放射性掺入。

[0318] (ii) 产自 DR2+ 小鼠的 T 细胞杂交瘤的 FVIII 肽特异性

[0319] 如上所述免疫 HLA-DR2+ 鼠类 II 类 MHC 缺失小鼠。在第 10 天取出引流淋巴结,并在 24 孔平板中以 1ml/孔、 2.5×10^6 个细胞/ml 在 20 μ g/ml rhFVIII 存在下培养 3 天。在这样刺激之后,回收淋巴细胞,洗涤,并如 Nelson 等(1980)PNAS 77(5):2866 所述,使用聚乙二醇将淋巴细胞与 TCR α - β -BW 融合配偶体细胞以 4 个 BW 细胞对 1 个淋巴细胞的比例融合。将融合的细胞小心洗涤后铺在 96 孔平底平板上,2 天后加入 HAT 培养基以选择 T 细胞杂交瘤。监控细胞生长,并在实施融合后大约 10 天时,选择单个克隆,并转移到 24 孔板中的 HAT 培养基中。将克隆保持在 HAT 培养基中至少 2 周,然后转换为 HT 培养基,再转换为完全培养基。将 100 μ l 杂交瘤细胞与 5×10^4 个 Mgar 细胞在有或无 20 μ g/ml rhFVIII 存在下培养过夜来测试克隆的抗原特异性。然后收集上清液,通过 ELISA 评估 IL-2 产生,其中将响应于 rhFVIII 而产生 IL-2 的克隆视为 FVIII 特异性阳性。为了考察预测的 FVIII 肽的库(repertoire),将 FVIII 特异性克隆与 20 μ g/ml 的 12 种肽中的每一种分别温育过夜后,再次测试 IL-2 产生。

[0320] (iii) 用 rhFVIII 初次刺激的 FVIII-/- 小鼠的回忆应答

[0321] 采用与 (i) 相同的方法,只是小鼠为 FVIII 缺陷、HLA-DR2+ 且鼠类 II 类 MHC 缺失的。

[0322] (iv) 自 FVIII-/- 小鼠产生的 T 细胞杂交瘤的 FVIII 肽特异性

[0323] 按照 (ii) 同样的方法,只是小鼠为 FVIII 缺陷和 HLA-DR2+ 的。

[0324] (v) 通过利用免疫显性 FVIII 肽预处理使 DR2+ 小鼠中 FVIII 特异性应答耐受化

[0325] 将 HLA-DR2+ 鼠类 II 类 MHC 缺失小鼠用 PBS 中的 100 μ g DNIMV、PRCLT 或 PPIIA 或等体积的单独的 PBS 处理 3 次。腹膜内施用肽,各剂之间间隔 3-4 天。最后一次施用后,如 (i) 所述用在完全弗氏佐剂中乳化的 rhFVIII 初次刺激小鼠。10 天后,回收引流淋巴结,然后将淋巴细胞在体外与 rhFVIII,或与耐受化肽和对照肽中的每一种一起培养 72 小时,再如 (i) 所述加入氘标记的胸苷。

[0326] (vi) 通过用免疫显性 FVIII 肽的组合预处理使 DR2+ 小鼠中 FVIII 特异性应答耐受化

[0327] 用溶于 PBS 的 DNIMV、PRCLT、或 DNIMV 与 PRCLT 二者的组合,或等体积的单独的 PBS 处理 HLA-DR2+ 鼠类 II 类 MHC 缺失小鼠 3 次。在 8 天时间内腹膜内施用肽。最后一次施用之后,如 (i) 所述用乳化在完全弗氏佐剂中的 rhFVIII 初次刺激小鼠。10 天后,回收引流淋巴结,然后用 rhVIII 体外再刺激淋巴细胞。然后收集上清液,并测量 IFN- γ 。

[0328] 本文通过提述并入本说明书中提及的所有出版物。本领域技术人员在不背离本发明的范围和精髓的前提下可以容易地想到本发明所述方法和系统的各种修改和变化。虽然结合具体的优选实施方案描述了本发明,但应当理解的是,不应将要求保护的发明过分地限制到这些具体实施方案。事实上,对于分子免疫学或相关领域的技术人员容易想到的、对本文描述的本发明的实施模式的各种修改,都是下文所述的权利要求的范围所意图涵盖的。

[0329] SEQ ID No. 1

[0330] 1 mqieltstcfff lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsdll gelpvdarfp prvpksfpfn

[0331] 61 tsvvykktlf veftdhlfni akprppwmgll lgptiqaevy dtvvitlknm ashpvsilhav

[0332] 121 gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshtyvwqvl kengpmasdp lcltysylsh

[0333] 181 vdlvkdlng ligallvcre gslakektqt lhkfillfav fdegkswhse tknslmqdrd

[0334] 241 aasarawpkm htvnngyvnrs lpgligchrk svywhvigmg ttpevsifl eghtflvrnh

[0335] 301 rqaaleispi tfltaqtlm dlqgflfch isshqhdgme aykvdscepe epqlrmkne

[0336] 361 eaedyddldt dsemdvrrfd ddnspsfqi rsvakhhpkt wwhyiaaeed dwdyaplvl

[0337] 421 pddrsyksqy lnngpqrigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl

[0338] 481 liifknqasr pyniypggit dvrplysrrl pkgvkhkdf pilpgeifky kwtvtvedgp

[0339] 541 tksdprcltr yyssfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfde

[0340] 601 nrswylteni qrflpnpagv qledpefqas nimhsingyv fdlqlslvcl hevaywyils

[0341] 661 igaqtdflsv ffsgytfkhk myedtltlf pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrnrg

[0342] 721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknaieprs fsqnsrhpst rqkqfnatti

[0343] 781 pendiekt dp wfahrtmpk iqnvssdl mllrqsptph glslsdlqea kyetfsddps

[0344] 841 pgaidnsnsl semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrlne klgttaatel kklldfkvsst

[0345] 901 snnlistips dnlaagtdnt sslgppsmpv hydsqldttl fgkksplte sggplslsee

[0346] 961 nndskllesg lmnsqesswg knvsstesgr lfkgkrahgp alltkdnalf kvsislktn

[0347] 1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkk vtplihdrml mdknatalrl

[0348] 1081 nhmsnktts knmemvqqkk egpipdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg

- [0349] 1141 qgpspkqlvs lgpeksvegq nflseknkvv vgkgeftkdv glkemvfpss rnlfltnldn
- [0350] 1201 lhennthnqe kkiqeeiekk etliqenvvl pqihtvtgtk nfmknlflls trqnvegsyd
- [0351] 1261 gayapvlqdf rslndstnrt kkhtahfskk geeenleglg nqtkqiveky acttrispnt
- [0352] 1321 sqqnfvtrrs kralkqfrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
- [0353] 1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrsplpia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshlpaaasy
- [0354] 1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlsailtle mtgdqrevgs lgtsatnsvt ykkventvlp
- [0355] 1501 kpdlpktskg vellpkvhiy qkdldftets ngspghldlv egslldqteg aikwneanrp
- [0356] 1561 gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsil
- [0357] 1621 nacesnhaia ainegnkpe ievtwakqgr terlcsqnpp vlkrhqreit rttlqsdqee
- [0358] 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkktrhyfia averlwdygm sssphvlrnr
- [0359] 1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlglgp yiraevedni mvtftrnqasr
- [0360] 1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
- [0361] 1861 dlekdvhs gl igpllvchtn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmerncra
- [0362] 1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngymdtlpg lvmaqdrir wyllsmgshe nihsihfsg
- [0363] 1981 vftvrkkeey kmalynlypg vftvempls kagiwrvecl ige hlhagms tflflvysnkc
- [0364] 2041 qtplgmasgh irdfqitasg qyqwapkla rlhysgsina wstkepfswi kvdlldapmii
- [0365] 2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
- [0366] 2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
- [0367] 2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvttqgvksl ltsmyvkefl
- [0368] 2281 isssqdghqw tlffqngkvk vfqgnqdsft pvvnslppl ltrylrihpq swvhqialrm
- [0369] 2341 evlgceaqdly
- [0370] 实施例 7 中制备的重叠肽组
- [0371] 对于 DTLLIIFKNQASRPY 的重叠组
- [0372] 1. 473-488 YGEVGD TLLIIFKNQ
- [0373] 2. 474-489 GEVGD TLLIIFKNQA
- [0374] 3. 475-490 EVGD TLLIIFKNQAS
- [0375] 4. 476-491 VGD TLLIIFKNQASR
- [0376] 5. 477-492 GDTLLIIFKNQASRP
- [0377] 6. 478-493 DTLLIIFKNQASRPY
- [0378] 7. 479-494 TLLIIFKNQASRPYN
- [0379] 8. 480-495 LLIIFKNQASRPYNI
- [0380] 9. 481-496 LIIFKNQASRPYNIY
- [0381] 10. 482-497 IIFKNQASRPYNIYP
- [0382] 11. 483-498 IFKNQASRPYNIYPH
- [0383] 对于 PRCLTRYSSFVNME 的重叠组
- [0384] 1. 540-554 PTKSDPRCLTRYSS
- [0385] 2. 541-555 TKSDPRCLTRYSSF
- [0386] 3. 542-556 KSDPRCLTRYSSFV
- [0387] 4. 543-557 SDPRCLTRYSSFVN

[0388]	5. 544-558	DPRCLTRYSSFVNM
[0389]	6. 545-559	PRCLTRYSSFVNME
[0390]	7. 546-560	RCLTRYSSFVNMER
[0391]	8. 547-561	CLTRYSSFVNMERD
[0392]	9. 548-562	LTRYSSFVNMERDL
[0393]	10. 549-563	TRYSSFVNMERDLA
[0394]	11. 550-564	RYYSSFVNMERDLAS
[0395]	对于 DNIMVTFRNQASRPY 的重叠组	
[0396]	1. 1783-1797	RAEVEDNIMVTFRNQ
[0397]	2. 1784-1798	AEVEDNIMVTFRNQA
[0398]	3. 1785-1799	EVEDNIMVTFRNQAS
[0399]	4. 1786-1800	VEDNIMVTFRNQASR
[0400]	5. 1787-1801	EDNIMVTFRNQASRP
[0401]	6. 1788-1802	DNIMVTFRNQASRPY
[0402]	7. 1789-1803	NIMVTFRNQASRPYS
[0403]	8. 1790-1804	IMVTFRNQASRPYSF
[0404]	9. 1791-1805	MVTFRNQASRPYSFY
[0405]	10. 1792-1806	VTFRNQASRPYSFYS
[0406]	11. 1793-1807	TFRNQASRPYSFYSS
[0407]	对于 SLYISQFIIMYSLDG 的重叠组	
[0408]	1. 2109-2123	RQKFSSLYISQFIIM
[0409]	2. 2110-2124	QKFSSLYISQFIIMY
[0410]	3. 2111-2125	KFSSLYISQFIIMYS
[0411]	4. 2112-2126	FSSLYISQFIIMYSL
[0412]	5. 2113-2127	SSLYISQFIIMYSLD
[0413]	6. 2114-2128	SLYISQFIIMYSLDG
[0414]	7. 2115-2129	LYISQFIIMYSLDGK
[0415]	8. 2116-2130	YISQFIIMYSLDGKK
[0416]	9. 2117-2131	ISQFIIMYSLDGKKW
[0417]	10. 2118-2132	SQFIIMYSLDGKKWQ
[0418]	11. 2119-2133	QFIIMYSLDGKKWQT
[0419]	对于 PPIIARYIRLHPHY 的重叠组	
[0420]	1. 2156-2170	HNIFNPPIIARYIRL
[0421]	2. 2157-2171	NIFNPPIIARYIRLH
[0422]	3. 2158-2172	IFNPPIIARYIRLHP
[0423]	4. 2159-2173	FNPPPIIARYIRLHPT
[0424]	5. 2160-2174	NPPIIARYIRLHPH
[0425]	6. 2161-2175	PPIIARYIRLHPHY
[0426]	7. 2162-2176	PIIARYIRLHPHYS

[0427]	8. 2163-2177	IIARYIRLHPTHYSI
[0428]	9. 2164-2178	IARYIRLHPTHYSIR
[0429]	10. 2165-2179	ARYIRLHPTHYSIRS
[0430]	11. 2166-2180	RYIRLHPTHYSIRST
[0431]	对于 RYLRIHPQSWVHQIA 的重叠组	
[0432]	1. 2317-2331	PPLLTRYLRIHPQSW
[0433]	2. 2318-2332	PLLTRYLRIHPQSWV
[0434]	3. 2319-2333	LLTRYLRIHPQSWVH
[0435]	4. 2320-2334	LTRYLRIHPQSWVHQ
[0436]	5. 2321-2335	TRYLRIHPQSWVHQI
[0437]	6. 2322-2336	RYLRIHPQSWVHQIA
[0438]	7. 2323-2337	YLRIHPQSWVHQIAL
[0439]	8. 2324-2338	LRIHPQSWVHQIALR
[0440]	9. 2325-2339	RIHPQSWVHQIALRM
[0441]	10. 2326-2340	IHPQSWVHQIALRME
[0442]	11. 2327-2341	HPQSWVHQIALRMEV

[0001]

序列表

<110> 艾匹托普技术（布里斯托尔）有限(Apitope Technology (Bristol) Limited)

<120> FVIII 衍生肽

<130> P036475CN

<140> PCT/GB2010/000997

<141> 2010-05-17

<150> GB 0908515.0

<151> 2009-05-18

<160> 83

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

[0002]

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser		
115	120	125
Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp		
130	135	140
Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu		
145	150	155 160
Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser		
165	170	175
Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile		
180	185	190
Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr		
195	200	205
Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly		
210	215	220
Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp		
225	230	235 240
Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr		
245	250	255
Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val		
260	265	270
Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile		
275	280	285
Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser		
290	295	300
Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met		
305	310	315 320
Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His		

[0003]

	325	330	335
Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro	340	345	350
Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp	355	360	365
Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser	370	375	380
Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr	385	390	395
Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro	405	410	415
Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn	420	425	430
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met	435	440	445
Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu	450	455	460
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu	465	470	475
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro	485	490	495
His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys	500	505	510
Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe	515	520	525
Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp	530	535	540

[0004]

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

[0005]

Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro
	755						760					765			
Ser	Thr	Arg	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp
	770						775					780			
Ile	Glu	Lys	Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys
	785						790				795				800
Ile	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser
			805							810					815
Pro	Thr	Pro	His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr
			820						825					830	
Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn
		835						840					845		
Ser	Leu	Ser	Glu	Met	Thr	His	Phe	Arg	Pro	Gln	Leu	His	His	Ser	Gly
	850						855					860			
Asp	Met	Val	Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu
	865						870			875					880
Lys	Leu	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys
					885				890					895	
Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Asn	Leu	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn
			900						905					910	
Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Pro	Ser	Met
		915						920				925			
Pro	Val	His	Tyr	Asp	Ser	Gln	Leu	Asp	Thr	Thr	Leu	Phe	Gly	Lys	Lys
	930						935					940			
Ser	Ser	Pro	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu
	945						950				955				960

[0006]

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu		
965	970	975
Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe		
980	985	990
Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala		
995	1000	1005
Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser		
1010	1015	1020
Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser		
1025	1030	1035
Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu		
1040	1045	1050
Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg		
1055	1060	1065
Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met		
1070	1075	1080
Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln		
1085	1090	1095
Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met		
1100	1105	1110
Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile		
1115	1120	1125
Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro		
1130	1135	1140
Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu		
1145	1150	1155
Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys		

[0007]

1160	1165	1170
Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val	Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro	
1175	1180	1185
Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu	Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu	
1190	1195	1200
Asn Asn Thr His Asn Gln Glu	Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu	
1205	1210	1215
Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln	Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile	
1220	1225	1230
His Thr Val Thr Gly Thr Lys	Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu	
1235	1240	1245
Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val	Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr	
1250	1255	1260
Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe	Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn	
1265	1270	1275
Arg Thr Lys Lys His Thr Ala	His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu	
1280	1285	1290
Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly	Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu	
1295	1300	1305
Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg	Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln	
1310	1315	1320
Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser	Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg	
1325	1330	1335
Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu	Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp	
1340	1345	1350
Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser	Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro	
1355	1360	1365

[0008]

Ser Thr	Leu Thr Gln Ile Asp	Tyr Asn Glu Lys Glu	Lys Gly Ala
1370	1375	1380	
Ile Thr	Gln Ser Pro Leu Ser	Asp Cys Leu Thr Arg	Ser His Ser
1385	1390	1395	
Ile Pro	Gln Ala Asn Arg Ser	Pro Leu Pro Ile Ala	Lys Val Ser
1400	1405	1410	
Ser Phe	Pro Ser Ile Arg Pro	Ile Tyr Leu Thr Arg	Val Leu Phe
1415	1420	1425	
Gln Asp	Asn Ser Ser His Leu	Pro Ala Ala Ser Tyr	Arg Lys Lys
1430	1435	1440	
Asp Ser	Gly Val Gln Glu Ser	Ser His Phe Leu Gln	Gly Ala Lys
1445	1450	1455	
Lys Asn	Asn Leu Ser Leu Ala	Ile Leu Thr Leu Glu	Met Thr Gly
1460	1465	1470	
Asp Gln	Arg Glu Val Gly Ser	Leu Gly Thr Ser Ala	Thr Asn Ser
1475	1480	1485	
Val Thr	Tyr Lys Lys Val Glu	Asn Thr Val Leu Pro	Lys Pro Asp
1490	1495	1500	
Leu Pro	Lys Thr Ser Gly Lys	Val Glu Leu Leu Pro	Lys Val His
1505	1510	1515	
Ile Tyr	Gln Lys Asp Leu Phe	Pro Thr Glu Thr Ser	Asn Gly Ser
1520	1525	1530	
Pro Gly	His Leu Asp Leu Val	Glu Gly Ser Leu Leu	Gln Gly Thr
1535	1540	1545	
Glu Gly	Ala Ile Lys Trp Asn	Glu Ala Asn Arg Pro	Gly Lys Val
1550	1555	1560	

[0009]

Pro	Phe	Leu	Arg	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser
1565						1570					1575			
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln
1580						1585					1590			
Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys
1595						1600					1605			
Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys
1610						1615					1620			
Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys
1625						1630					1635			
Pro	Glu	Ile	Glu	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg
1640						1645					1650			
Leu	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu
1655						1660					1665			
Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
1670						1675					1680			
Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1685						1690					1695			
Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1700						1705					1710			
Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1715						1720					1725			
Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1730						1735					1740			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1745						1750					1755			

[0010]

Asp Gly	Ser Phe Thr Gln Pro	Leu Tyr Arg Gly Glu	Leu Asn Glu
1760	1765	1770	
His Leu	Gly Leu Leu Gly Pro	Tyr Ile Arg Ala Glu	Val Glu Asp
1775	1780	1785	
Asn Ile	Met Val Thr Phe Arg	Asn Gln Ala Ser Arg	Pro Tyr Ser
1790	1795	1800	
Phe Tyr	Ser Ser Leu Ile Ser	Tyr Glu Glu Asp Gln	Arg Gln Gly
1805	1810	1815	
Ala Glu	Pro Arg Lys Asn Phe	Val Lys Pro Asn Glu	Thr Lys Thr
1820	1825	1830	
Tyr Phe	Trp Lys Val Gln His	His Met Ala Pro Thr	Lys Asp Glu
1835	1840	1845	
Phe Asp	Cys Lys Ala Trp Ala	Tyr Phe Ser Asp Val	Asp Leu Glu
1850	1855	1860	
Lys Asp	Val His Ser Gly Leu	Ile Gly Pro Leu Leu	Val Cys His
1865	1870	1875	
Thr Asn	Thr Leu Asn Pro Ala	His Gly Arg Gln Val	Thr Val Gln
1880	1885	1890	
Glu Phe	Ala Leu Phe Phe Thr	Ile Phe Asp Glu Thr	Lys Ser Trp
1895	1900	1905	
Tyr Phe	Thr Glu Asn Met Glu	Arg Asn Cys Arg Ala	Pro Cys Asn
1910	1915	1920	
Ile Gln	Met Glu Asp Pro Thr	Phe Lys Glu Asn Tyr	Arg Phe His
1925	1930	1935	
Ala Ile	Asn Gly Tyr Ile Met	Asp Thr Leu Pro Gly	Leu Val Met
1940	1945	1950	
Ala Gln	Asp Gln Arg Ile Arg	Trp Tyr Leu Leu Ser	Met Gly Ser

[0011]

1955	1960	1965
Asn Glu 1970	Asn Ile His Ser Ile 1975	His Phe Ser Gly His Val Phe Thr 1980
Val Arg 1985	Lys Lys Glu Glu Tyr 1990	Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr 1995
Pro Gly 2000	Val Phe Glu Thr Val 2005	Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly 2010
Ile Trp 2015	Arg Val Glu Cys Leu 2020	Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly 2025
Met Ser 2030	Thr Leu Phe Leu Val 2035	Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro 2040
Leu Gly 2045	Met Ala Ser Gly His 2050	Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala 2055
Ser Gly 2060	Gln Tyr Gly Gln Trp 2065	Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His 2070
Tyr Ser 2075	Gly Ser Ile Asn Ala 2080	Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser 2085
Trp Ile 2090	Lys Val Asp Leu Leu 2095	Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile 2100
Lys Thr 2105	Gln Gly Ala Arg Gln 2110	Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser 2115
Gln Phe 2120	Ile Ile Met Tyr Ser 2125	Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr 2130
Tyr Arg 2135	Gly Asn Ser Thr Gly 2140	Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn 2145
Val Asp 2150	Ser Ser Gly Ile Lys 2155	His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile 2160

[0012]

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg		
2165	2170	2175
Ser Thr Leu Arg Met Glu Trp Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys		
2180	2185	2190
Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln		
2195	2200	2205
Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser		
2210	2215	2220
Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp		
2225	2230	2235
Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe		
2240	2245	2250
Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys		
2255	2260	2265
Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser		
2270	2275	2280
Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys		
2285	2290	2295
Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val		
2300	2305	2310
Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His		
2315	2320	2325
Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu		
2330	2335	2340
Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr		
2345	2350	

[0013]

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Thr	Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp
1				5				10					15	

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly
1				5				10					15	

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 4

Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr
1				5				10					15	

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp
1				5				10					15	

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu

[0014]

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 7

Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His
1				5					10					15

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 8

Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr
1				5					10					15

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 9

Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu
1				5					10					15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10

Thr	Glu	Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln
1				5					10					15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 11

[0015]

Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 12

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 13

Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
1 5 10 15

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 14

Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 15

Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0016]

<400> 16

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 17

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 18

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 19

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 20

Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
1 5

<210> 21

<211> 13

[0017]

<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是荷电亲水性氨基酸残基

<400> 21

Xaa Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser
1 5 10

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是与位置 14 的 Xaa 具有相反极性的荷电氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa 是与位置 1 的 Xaa 具有相反极性的荷电氨基酸

<400> 22

Xaa Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Xaa
1 5 10

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 23

Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg
1 5 10

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0018]

<400> 24

Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 25

Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 26

Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 27

Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 28

Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

[0019]

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 29

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

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 30

Leu	Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile
1				5					10					15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 31

Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 32

Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro
1				5					10					15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 33

Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His
1				5					10					15

<210> 34

[0020]

<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 34

Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser
1				5					10					15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 35

Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe
1				5					10					15

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 36

Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val
1				5					10					15

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 37

Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn
1				5					10					15

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 38

Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met
1				5					10					15

[0021]

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 39

Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg
1				5					10				15	

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 40

Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp
1				5					10				15	

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 41

Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu
1				5					10				15	

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 42

Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala
1				5					10				15	

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 43

Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser

[0022]

1	5	10	15
<210> 44			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人(Homo sapiens)			
<400> 44			
Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln			
1	5	10	15
<210> 45			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人(Homo sapiens)			
<400> 45			
Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala			
1	5	10	15
<210> 46			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人(Homo sapiens)			
<400> 46			
Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser			
1	5	10	15
<210> 47			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人(Homo sapiens)			
<400> 47			
Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg			
1	5	10	15
<210> 48			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人(Homo sapiens)			
<400> 48			

[0023]

Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro
1 5 10 15

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 49

Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 50

Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe
1 5 10 15

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 51

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr
1 5 10 15

<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 52

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0024]

<400> 53

Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser
1			5					10					15	

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 54

Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met
1			5					10					15	

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 55

Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr
1			5					10					15	

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 56

Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser
1			5					10					15	

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 57

Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu
1			5					10					15	

<210> 58

<211> 15

[0025]

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 58

Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp
1				5					10				15	

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 59

Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys
1				5				10					15	

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 60

Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys
1				5				10					15	

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 61

Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp
1				5				10					15	

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 62

Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln
1				5				10					15	

[0026]

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 63

Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr
1				5					10				15	

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 64

His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu
1				5					10				15	

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 65

Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His
1				5					10				15	

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 66

Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro
1				5					10				15	

<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 67

Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr
1				5					10				15	

[0027]

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 68

Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His
1				5					10					15

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 69

Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser
1				5					10					15

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 70

Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile
1				5					10					15

<210> 71
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 71

Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg
1				5					10					15

<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 72

[0028]

Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser
1 5 10 15

<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 73

Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr
1 5 10 15

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 74

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 75

Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val
1 5 10 15

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 76

Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His
1 5 10 15

<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0029]

<400> 77

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 78

Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile
1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 79

Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu
1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 80

Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
1 5 10 15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 81

Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met
1 5 10 15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

[0030]

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 82

Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu
1				5					10					15

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 83

His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val
1				5					10					15

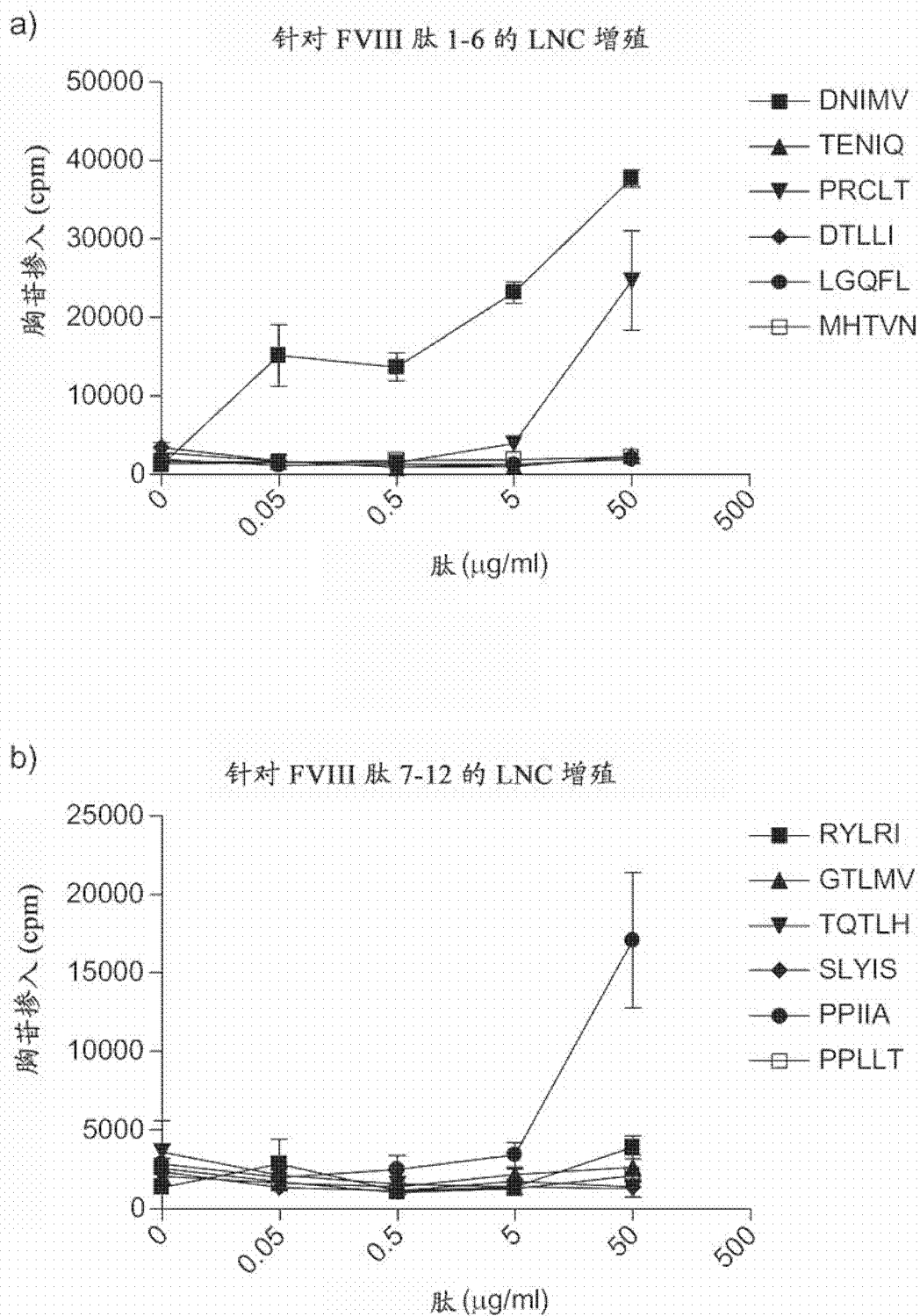


图 1

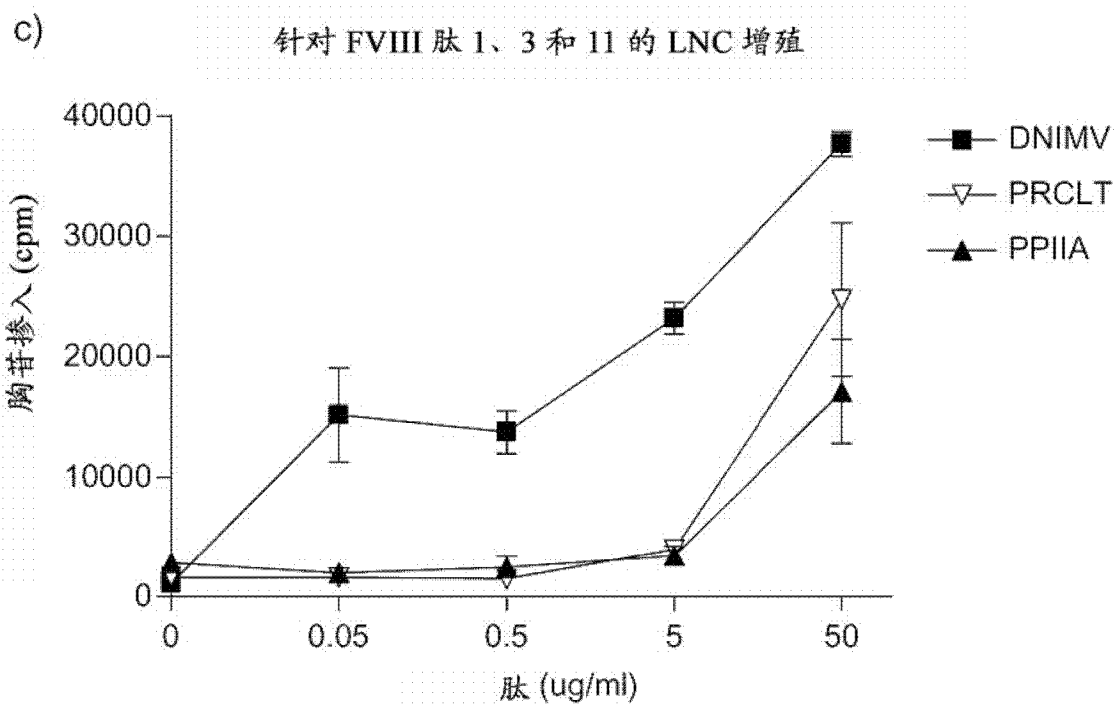


图 1(续)

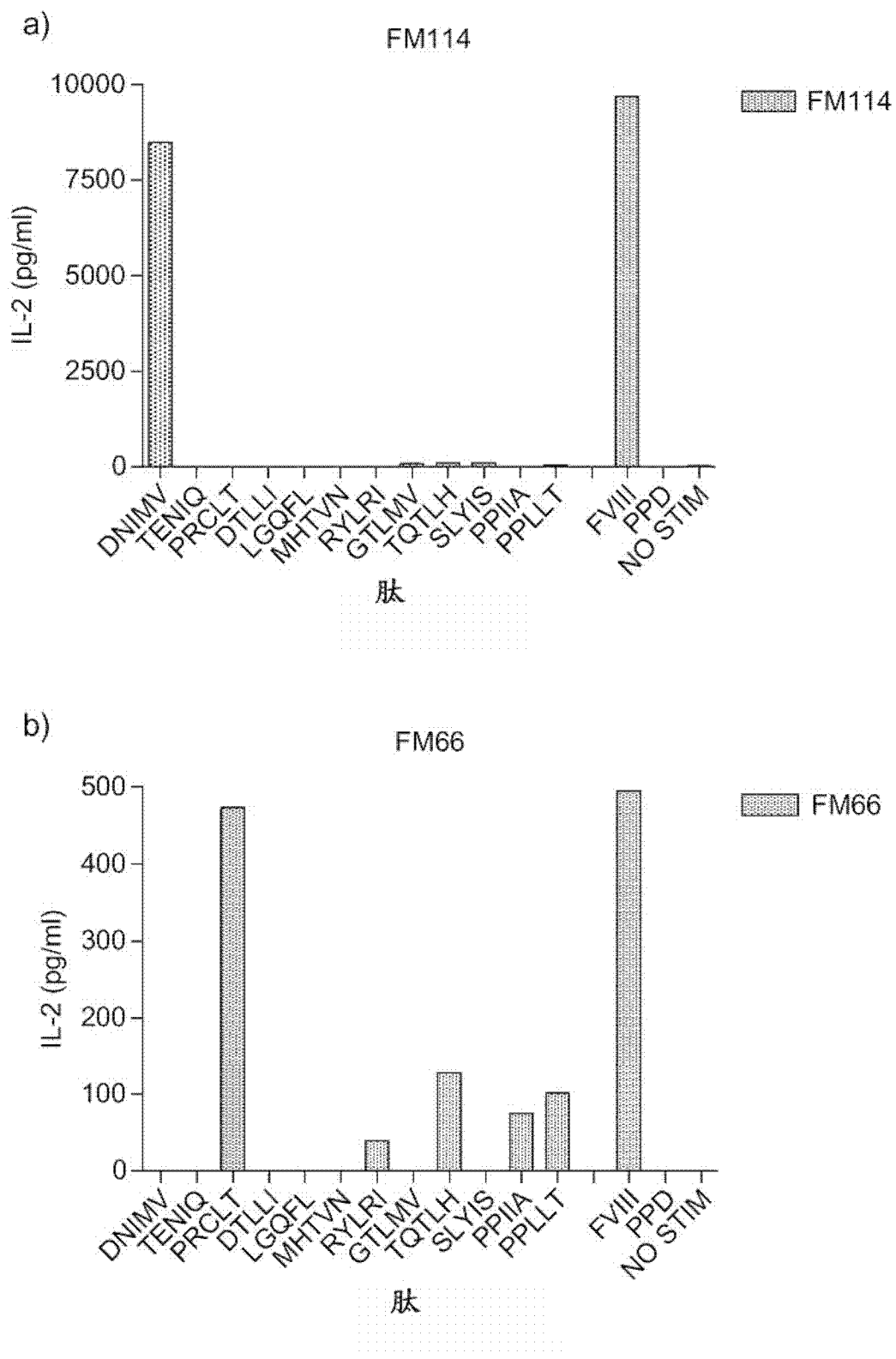


图 2

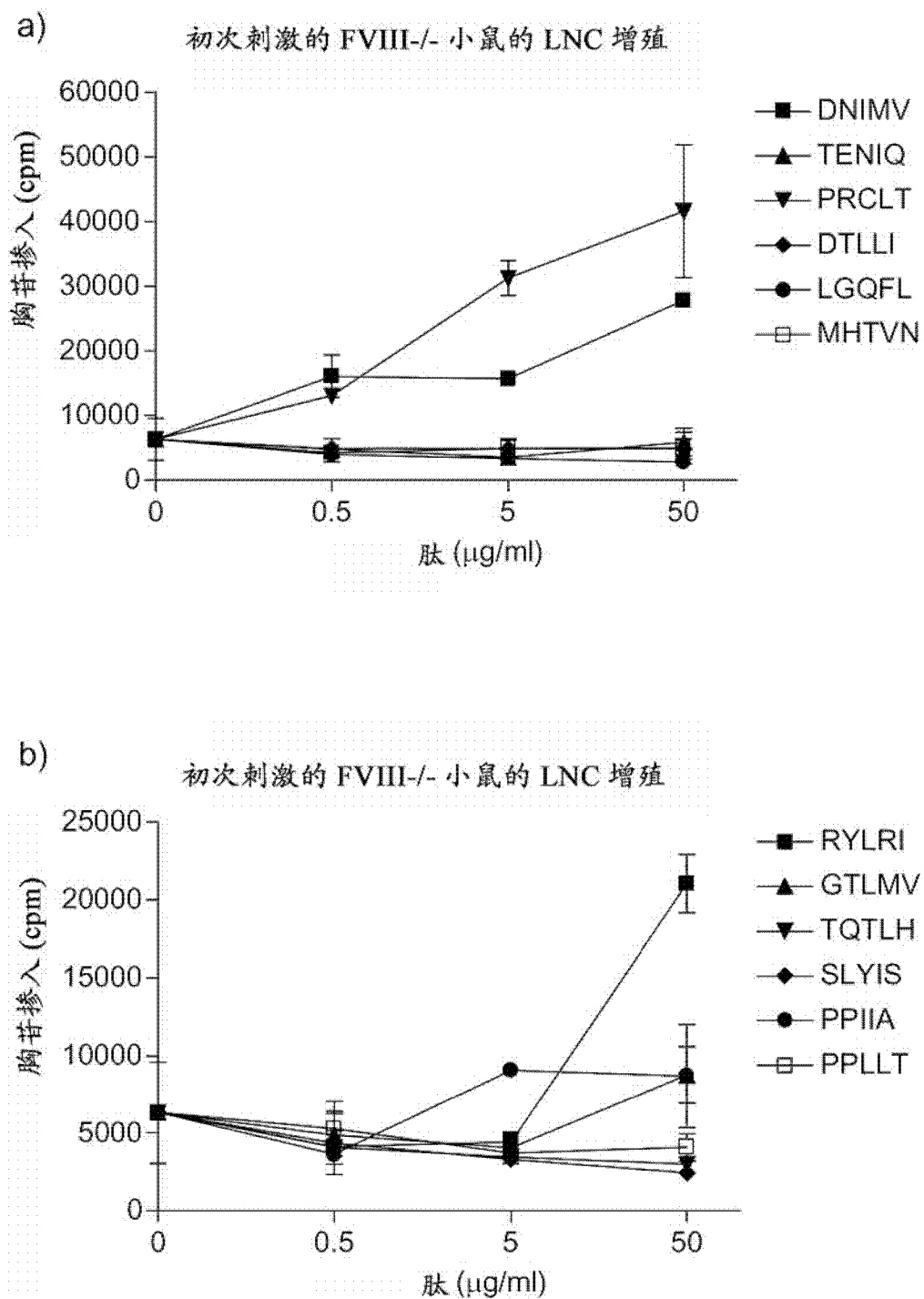


图 3

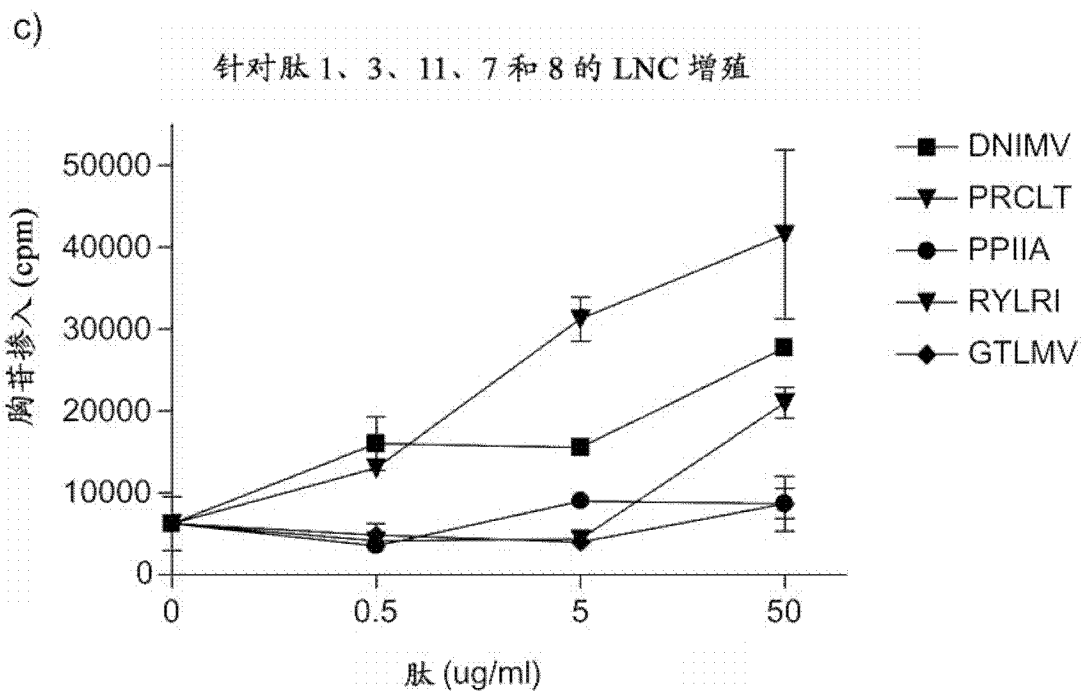


图 3(续)

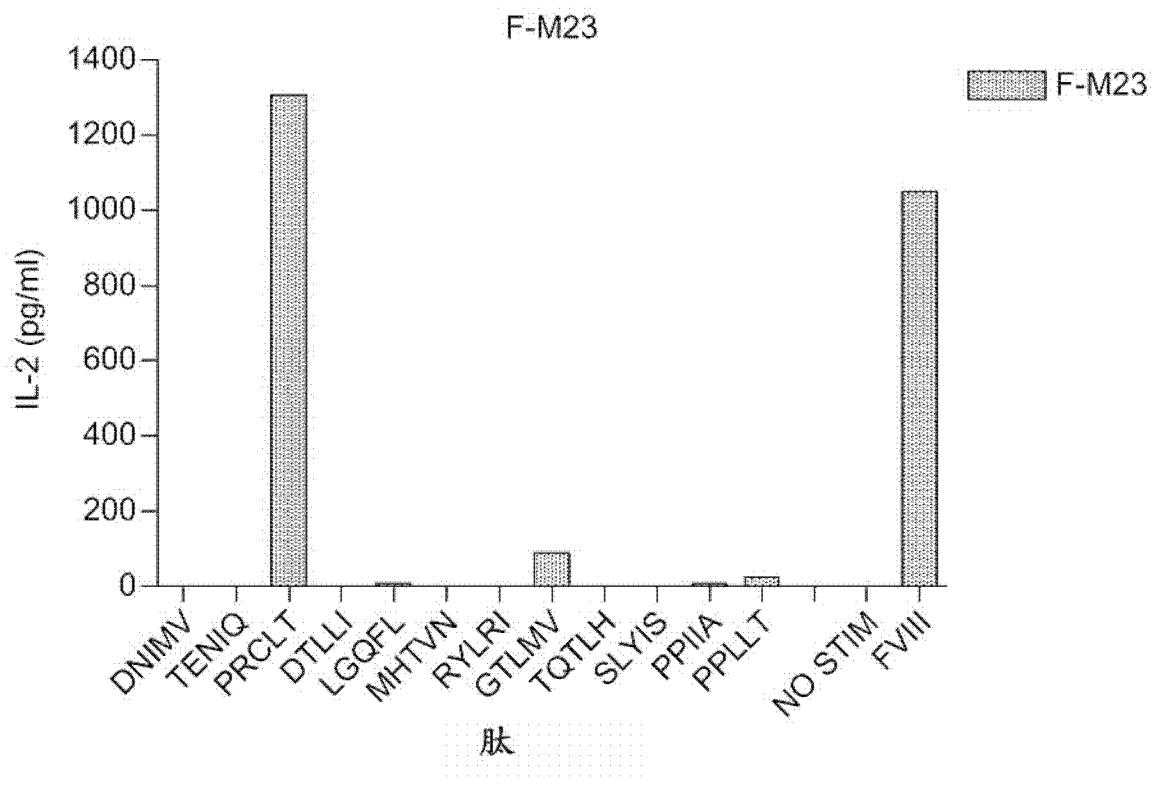
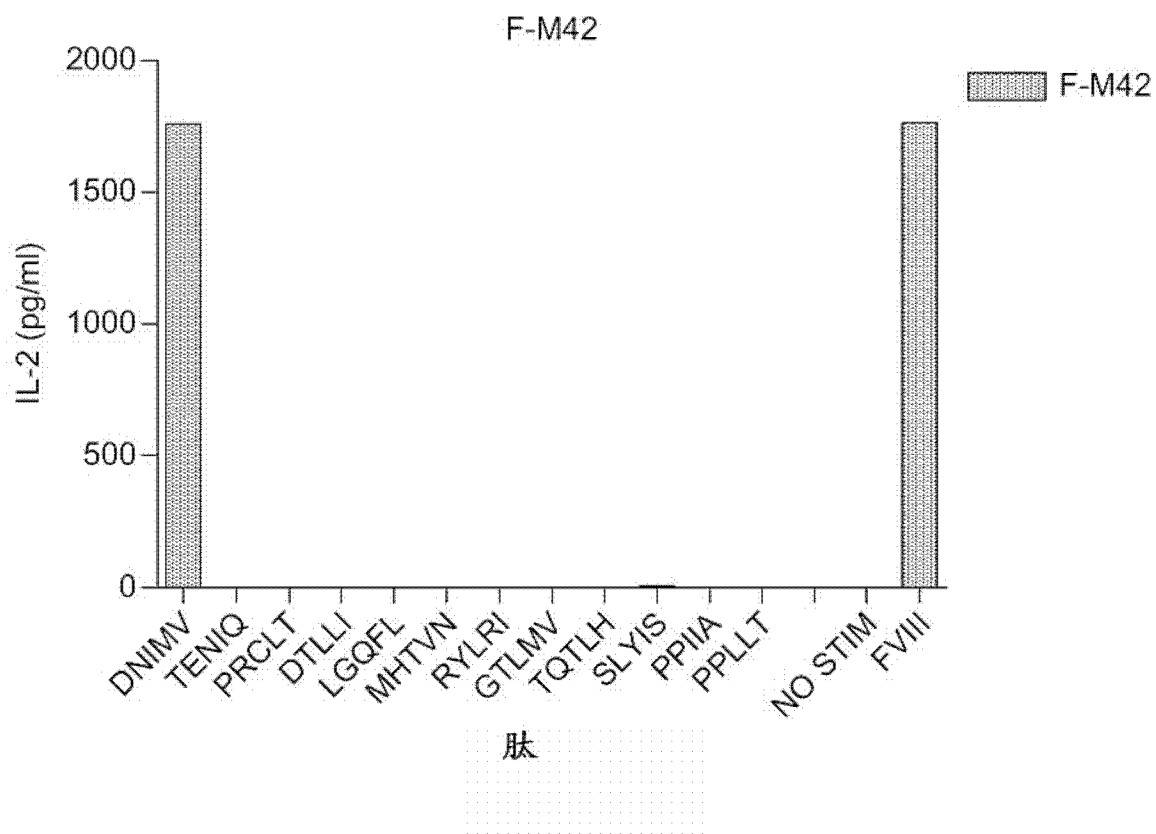


图 4

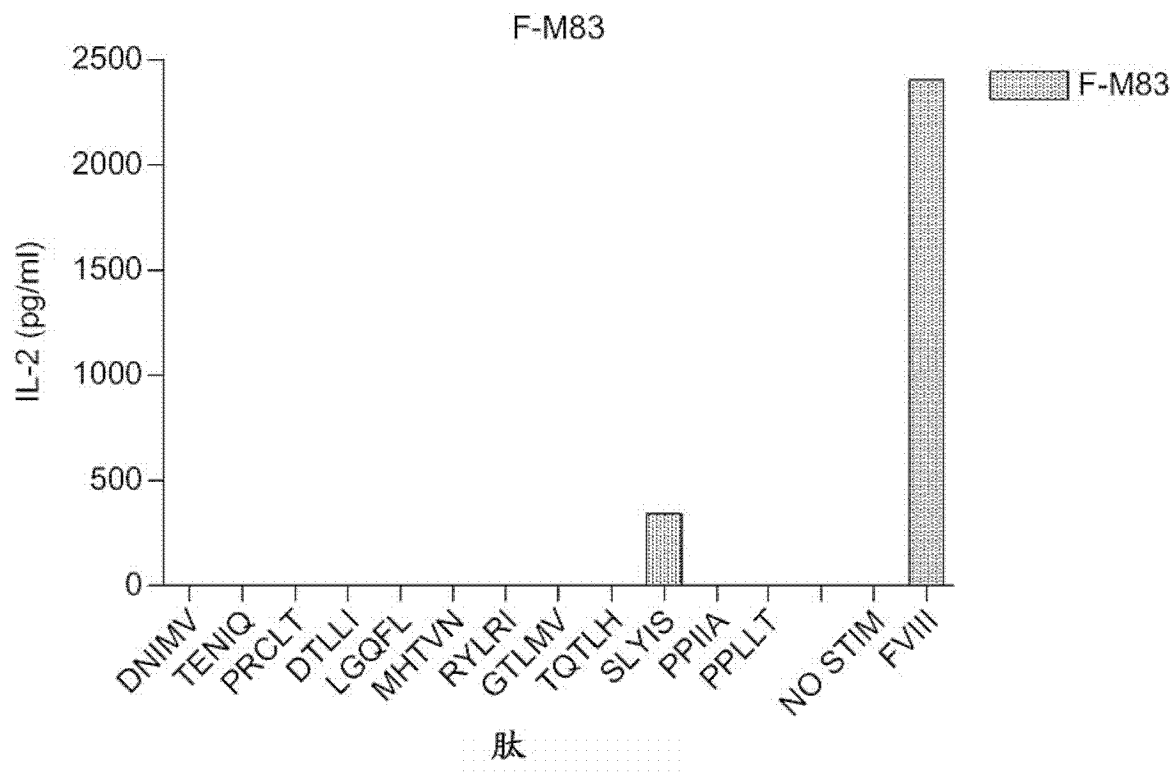
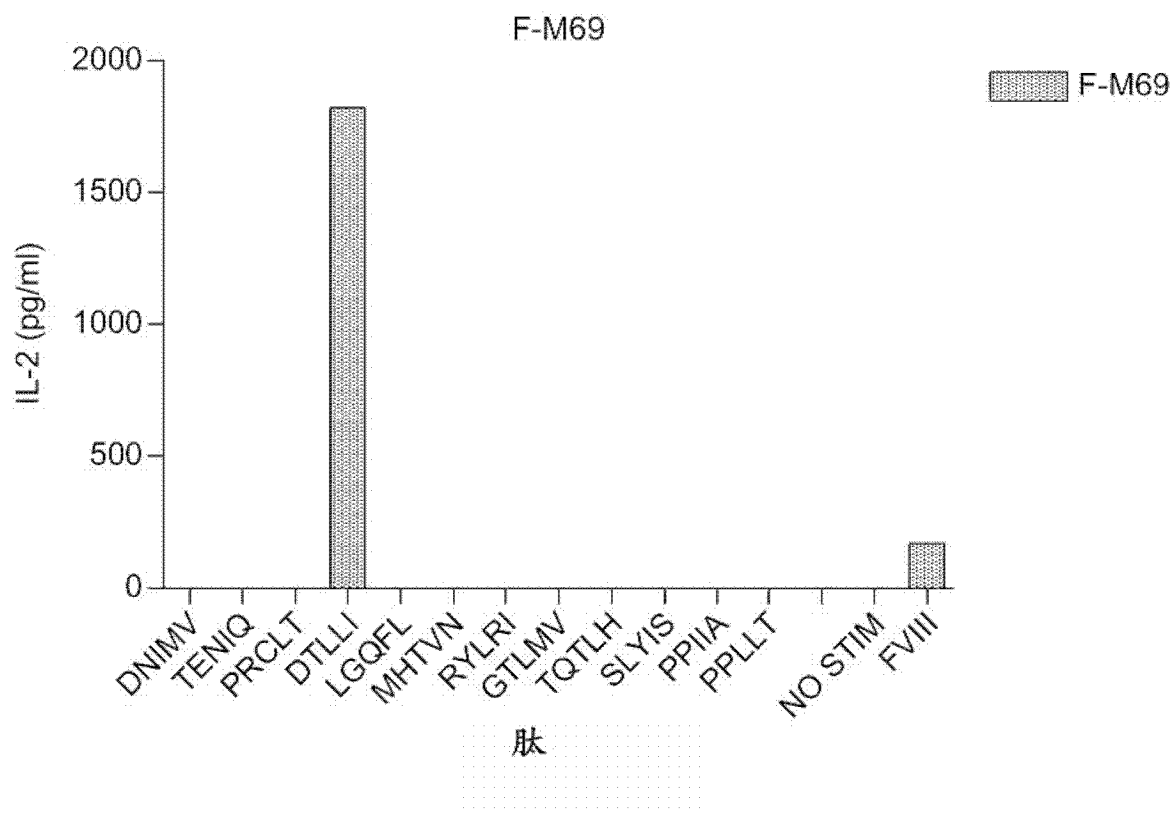


图4(续)

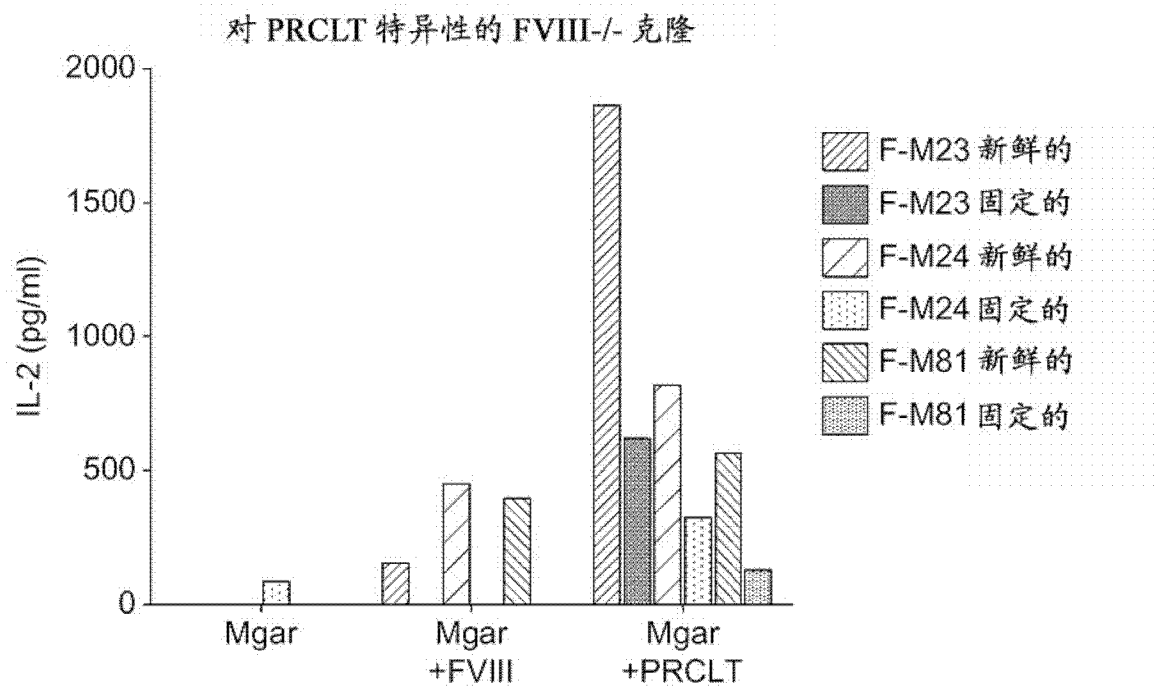
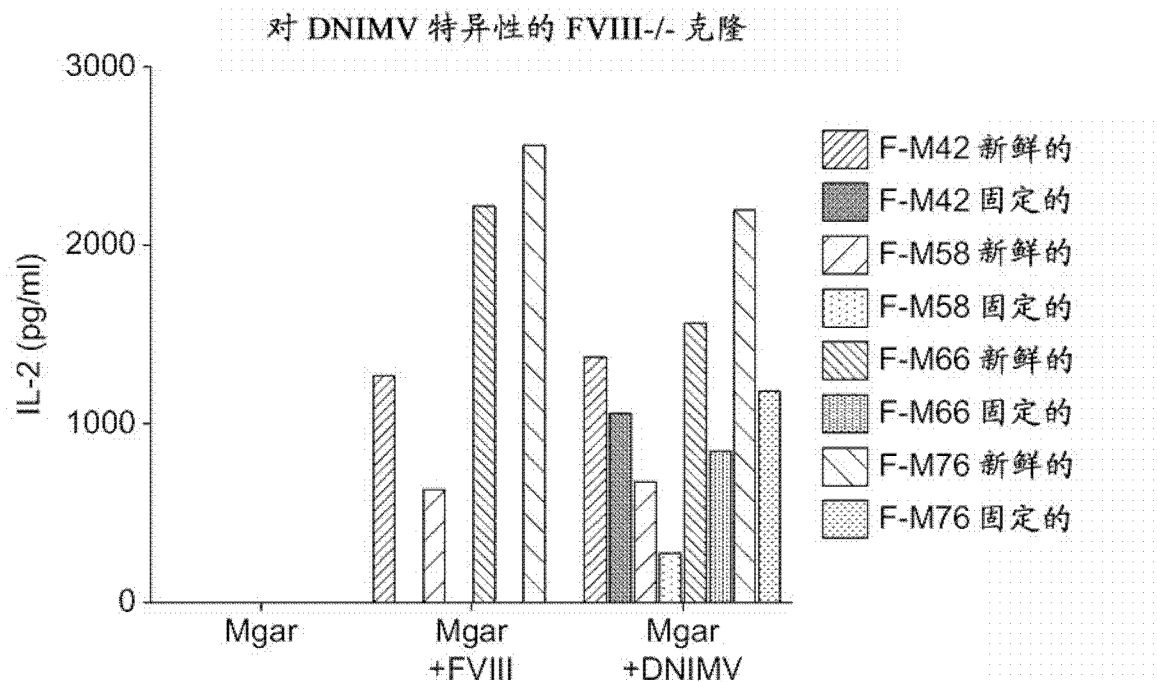


图 5

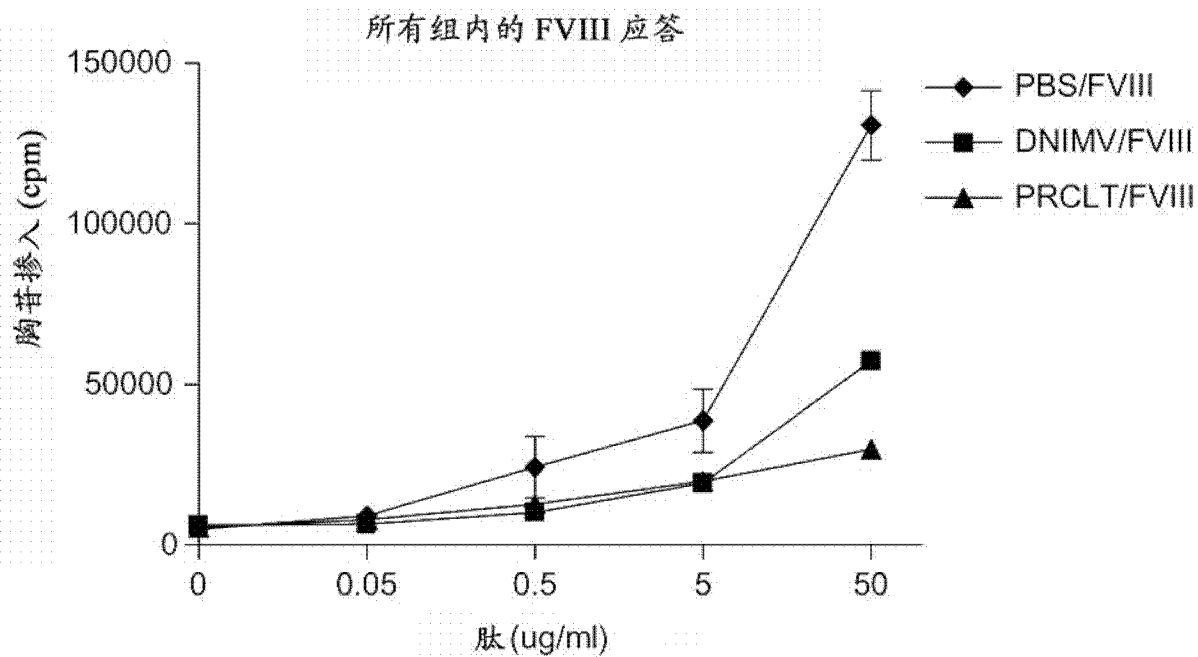


图 6

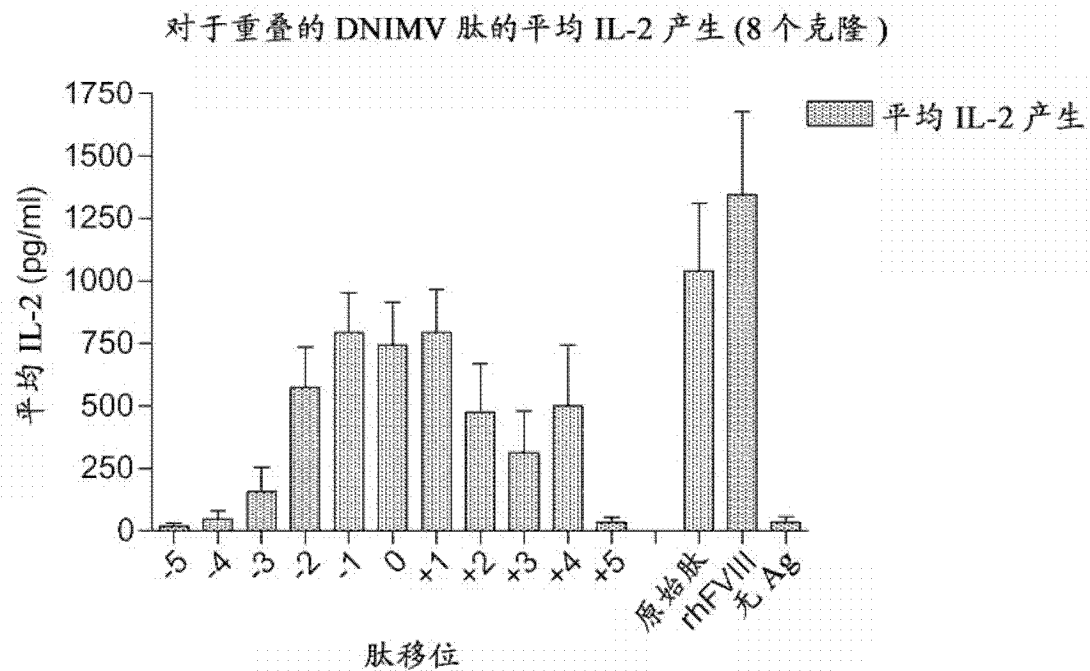


图 7a

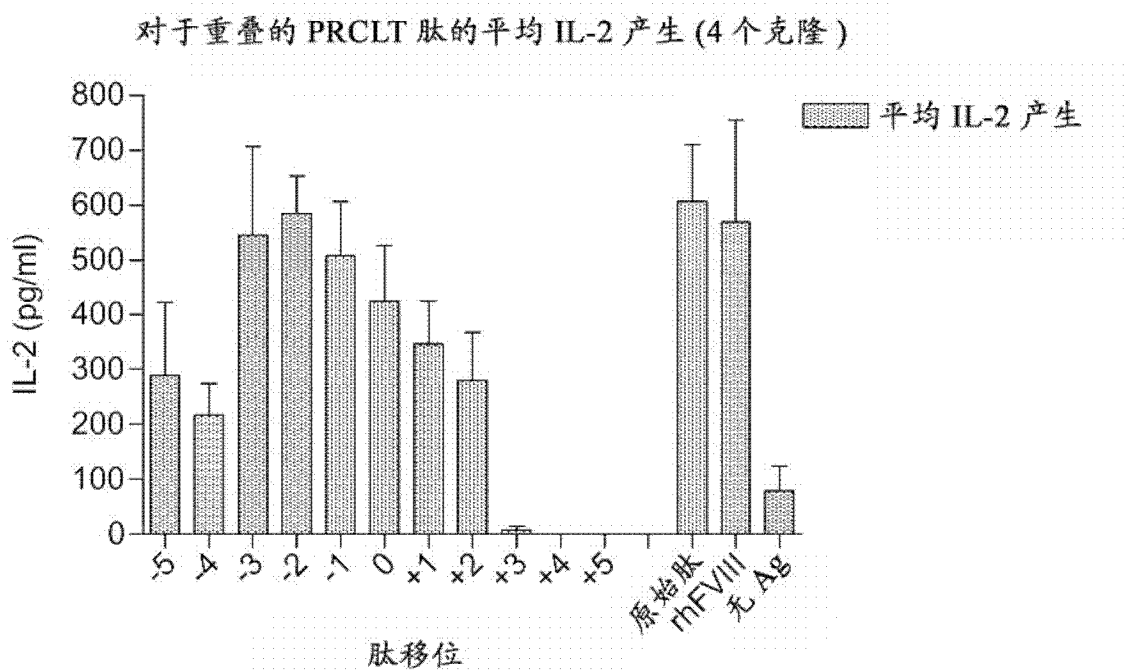
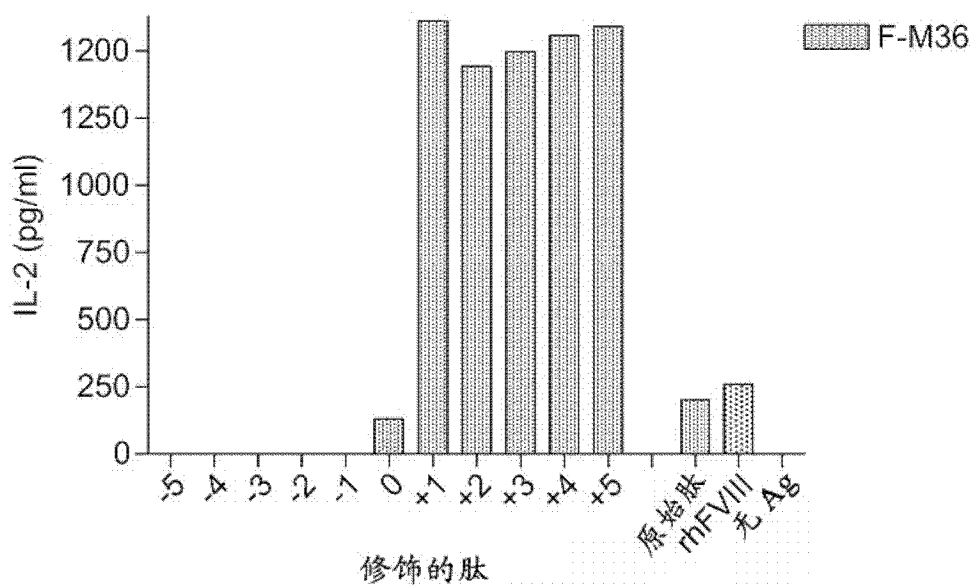


图 7b

对于重叠肽 PPIIA、DTLLI、SLYIS 和 RYLRI 的平均 IL-2 产生

PPIIA 重叠肽筛选: F-M36



PPIIA 重叠肽筛选: FM6 (DR2 克隆)

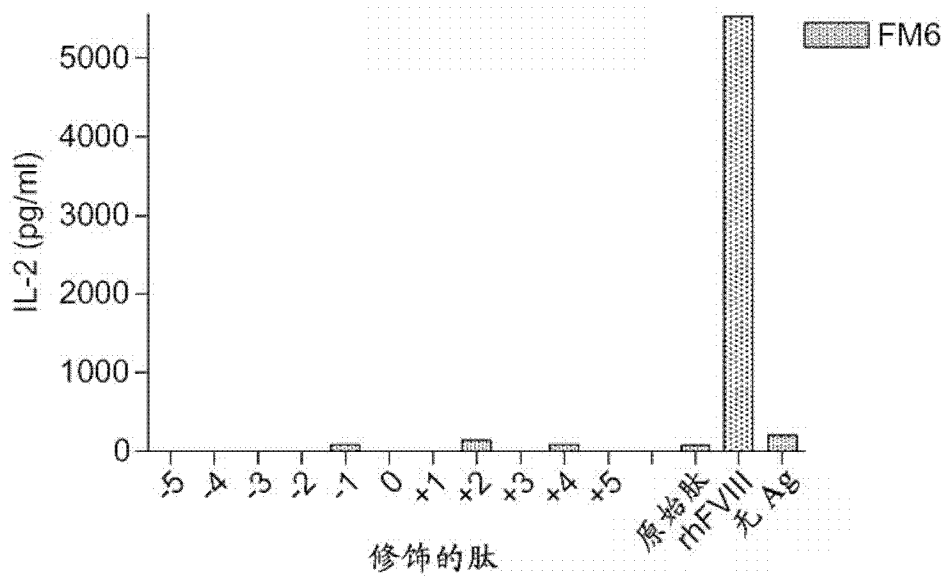


图 7c

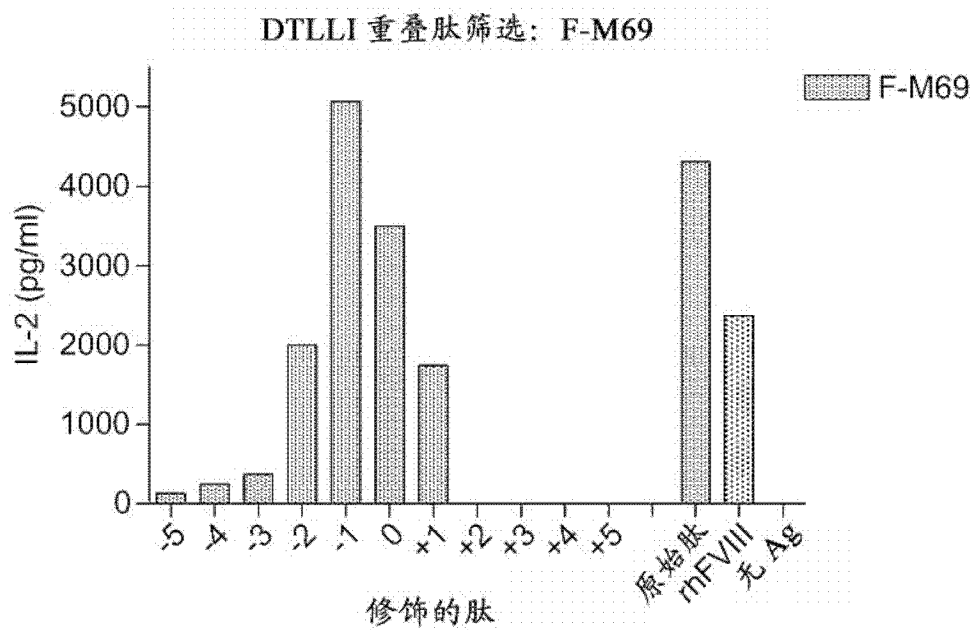
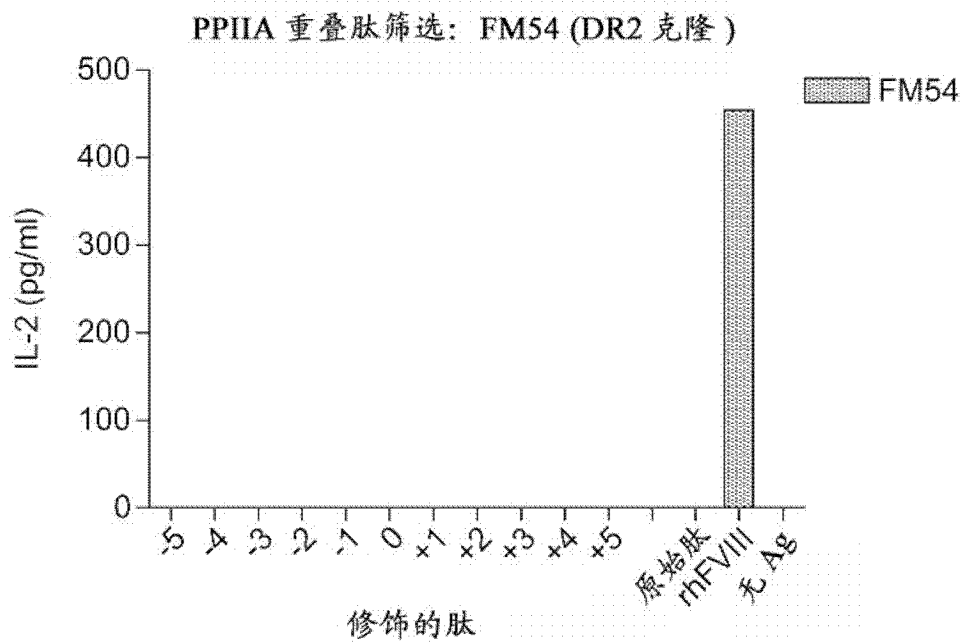


图7(续)

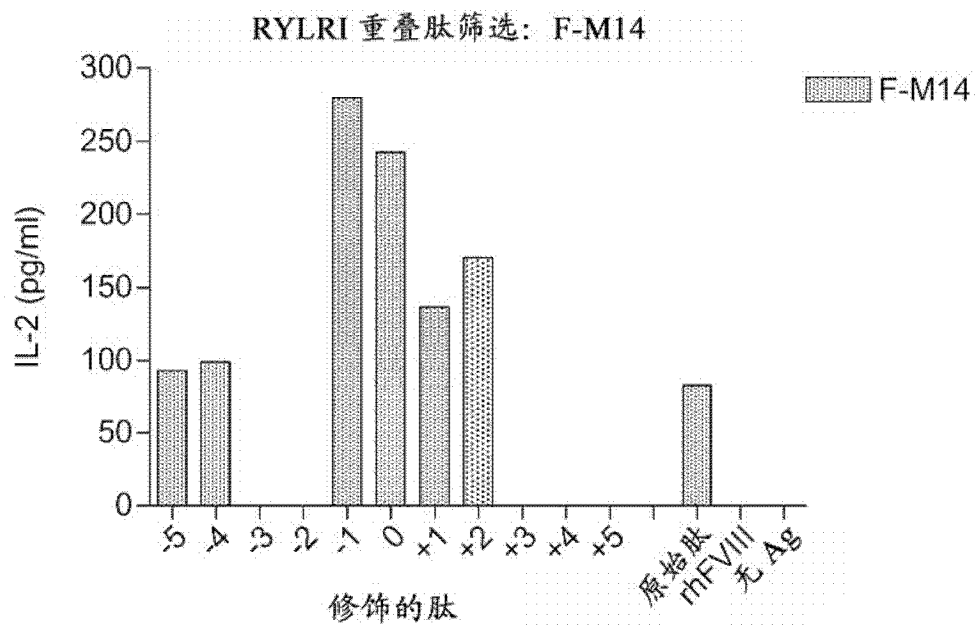
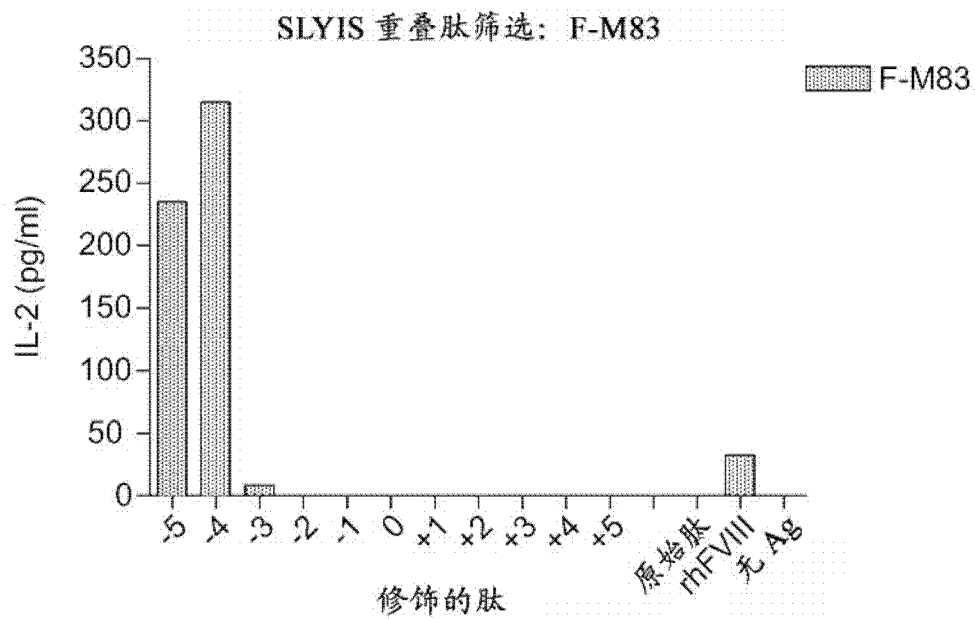


图 7(续)

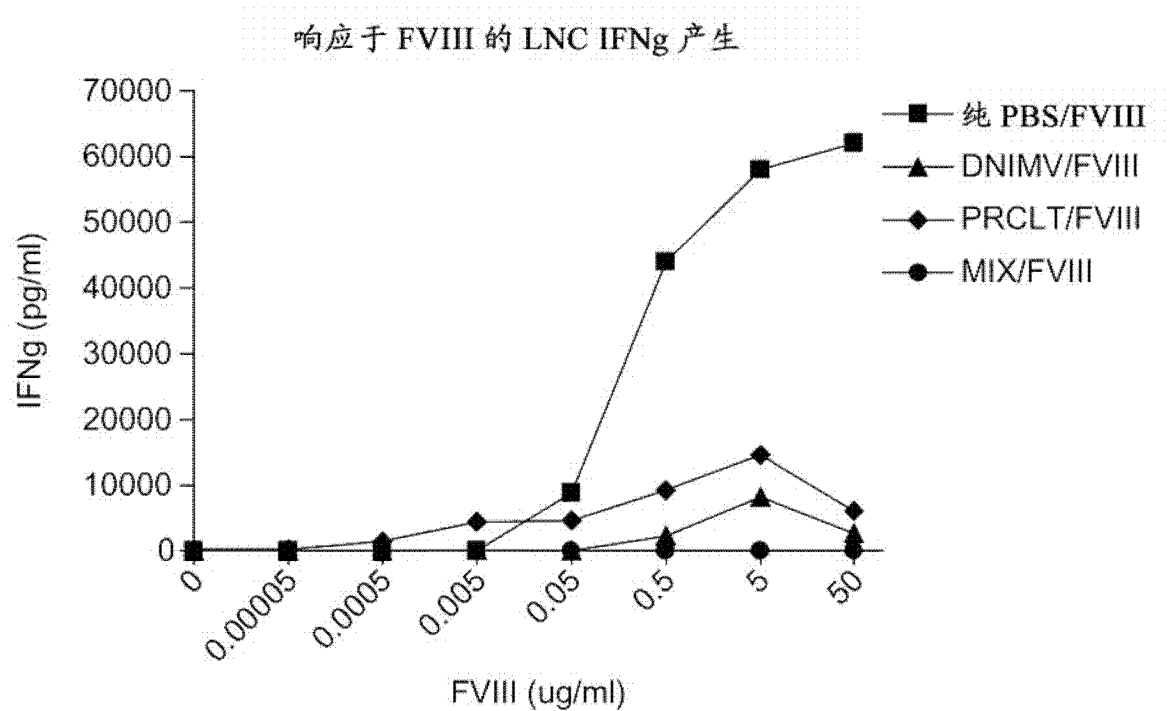


图 8

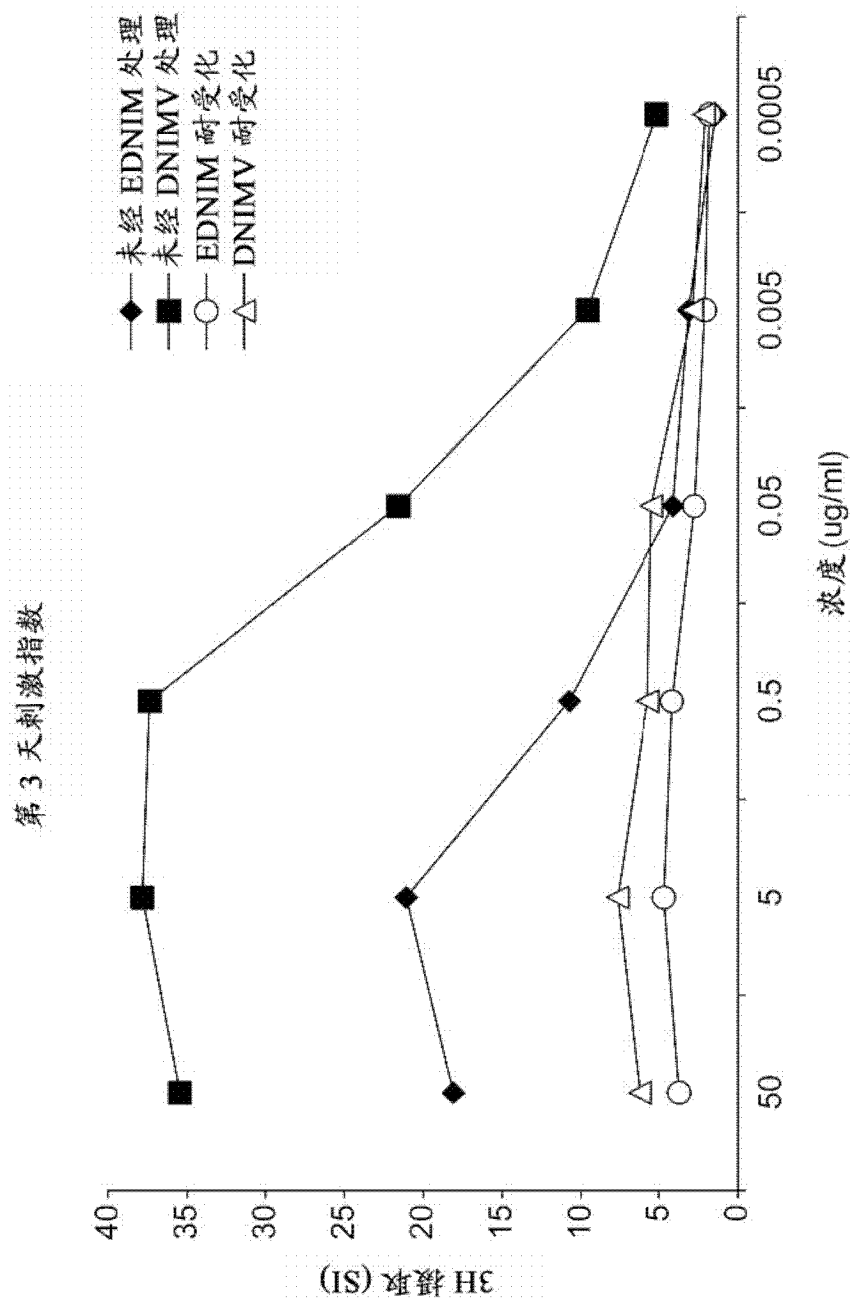


图 9