(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113015542 A
(43)申请公布日 2021.06.22

(21)申请号 201980074481.1

(22)申请日 2019.11.12

(30)优先权数据
18205611.9 2018.11.12 EP
18205615.0 2018.11.12 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.05.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/080929 2019.11.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/099356 EN 2020.05.22

(71)申请人 易姆赛斯股份公司
地址 比利时列日

(72)发明人 米洛斯·埃拉克
吕克·范德埃尔斯特

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 张福誉

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 39/08(2006.01)
A61K 39/35(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)

权利要求书5页 说明书35页 附图7页

(54)发明名称

具有改善的氧化还原酶基序的免疫原性肽

(57)摘要

本发明涉及包含T细胞表位和具有提高活性的氧化还原酶基序的免疫原性肽，及其在对象中调节免疫应答的用途。

CN 113015542 A

1.免疫原性肽,所述免疫原性肽包含:

a)氧化还原酶基序,

b)抗原蛋白的T细胞表位,以及

c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头

其中:

(i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:

$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST];

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

(ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST];

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

(iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST],

其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;或者

(iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$,

其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸,优选K或R或非天然碱性氨基酸,如L-鸟氨酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^2)是任意氨基酸,并且其中m是0至3的整数,条件是当$(Z_3)^+$是R时,m是0;而当$(Z_3)^+$是H时,m是0或1。

2.根据权利要求1所述的免疫原性肽,其中$(Z_1)^+$选自包含以下的组:K或非天然碱性氨基酸;和/或其中任一个$(Z_2)^+$和/或$(Z_3)^+$各自单独地选自包含以下的组:K、R或非天然碱性氨基酸。

3.根据权利要求1或2所述的免疫原性肽,其中任一个$(Z_1)^+$、$(Z_2)^+$和/或$(Z_3)^+$是K或L-鸟氨酸。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的免疫原性肽,其中抗原蛋白的所述T细胞表位是NKT细胞表位或MHC II类T细胞表位。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的免疫原性肽,其中所述表位的长度为7至30个氨基酸,优选7至25个氨基酸,更优选7至20个氨基酸。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的免疫原性肽,其长度为11至50个氨基酸,优选11至40个氨基酸,更优选11至30个氨基酸。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的免疫原性肽,其中所述抗原蛋白是自身抗原、可溶性同种因子、由移植物脱落的同种抗原、胞内病原体的抗原、用于基因治疗或基因疫苗接种的病毒载体的抗原、肿瘤相关抗原或变应原。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的免疫原性肽,其用于医学。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的免疫原性肽,其用于治疗和/或预防自身免疫病,胞内病原体感染,肿瘤,同种异体移植排斥,或者响应于可溶性同种因子、变应原暴露或者

用于基因治疗或基因疫苗接种的病毒载体的免疫应答。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的免疫原性肽,其中在所述基序中至少一个X是P或Y。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的免疫原性肽,其中所述接头具有0至4个氨基酸。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的免疫原性肽,其中所述氧化还原酶基序不天然存在于所述抗原蛋白中T细胞表位的N端或C端的11个氨基酸的区域内。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的免疫原性肽,其中所述T细胞表位不天然包含所述氧化还原酶基序。

14.用于制备根据权利要求1至13中任一项所述的免疫原性肽的方法,所述方法包括以下步骤:

(a)提供由所述抗原蛋白的T细胞表位组成的肽序列,以及

(b)将所述氧化还原酶基序与所述肽序列连接,以使得所述基序与所述表位彼此相邻或被至多7个氨基酸的接头隔开。

15.用于获得针对呈递抗原的APC的所述抗原的特异性溶细胞性CD4+T细胞群的方法,所述方法包括以下步骤:

-提供外周血细胞;

-使所述细胞与免疫原性肽接触,所述免疫原性肽包含:

a)氧化还原酶基序,

b)抗原蛋白的T细胞表位,以及

c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头,

其中:

(i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:

$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST];

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

(ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST];

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

(iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST],

其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;或者

(iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$,

其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸,优选K或R或非天然碱性氨基酸,如L-鸟氨酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^2)是任意氨基酸,并且其中m是0至3的整数,条件是当$(Z_3)^+$是R时,m是0;而当$(Z_3)^+$是H时,m是0或1;以及

-在存在IL-2的情况下扩增所述细胞。

16.用于获得抗原特异性NKT细胞群的方法,所述方法包括以下步骤:

-提供外周血细胞;

-使所述细胞与免疫原性肽接触,所述免疫原性肽包含:

a)氧化还原酶基序,

b)抗原蛋白的T细胞表位,以及

c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头,

其中:

(i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:

$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST];

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

(ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST];

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

(iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST],

其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;或者

(iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$,

其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸,优选K或R或非天然碱性氨基酸,如L-鸟氨酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^2)是任意氨基酸,并且其中m是0至3的整数,条件是当$(Z_3)^+$是R时,m是0;而当$(Z_3)^+$是H时,m是0或1;以及

-在存在IL-2的情况下扩增所述细胞。

17.用于获得针对呈递抗原的APC的所述抗原的特异性溶细胞性CD4+T细胞群的方法,所述方法包括以下步骤:

-提供免疫原性肽,所述免疫原性肽包含:

a)氧化还原酶基序,

b)抗原蛋白的T细胞表位,以及

c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头,

其中:

(i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:

$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST];

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

其中X是任意氨基酸;

其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

(ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST];

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

其中X是任意氨基酸；

其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

(iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]，

其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸；

其中X是任意氨基酸；或者

(iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，

其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸，优选K或R或非天然碱性氨基酸，如L-鸟氨酸；

其中X是任意氨基酸；

其中(B^2)是任意氨基酸，并且其中m是0至3的整数，条件是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；而当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1；

-将所述肽施用于对象；以及

-从所述对象中获得所述抗原特异性溶细胞性CD4+T细胞群。

18.用于获得抗原特异性NKT细胞群的方法，所述方法包括以下步骤：

-提供免疫原性肽，所述免疫原性肽包含：

a)氧化还原酶基序，

b)抗原蛋白的T细胞表位，以及

c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头，

其中：

(i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：

$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST]；

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

其中X是任意氨基酸；

其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

(ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]；

其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

其中X是任意氨基酸；

其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

(iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]，

其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸；

其中X是任意氨基酸；或者

(iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，

其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸，优选K或R或非天然碱性氨基酸，如L-鸟氨酸；

其中X是任意氨基酸；

其中(B^2)是任意氨基酸，并且其中m是0至3的整数，条件是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；而当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1；

-将所述肽施用于对象；以及

-从所述对象获得所述抗原特异性NKT细胞群。

19.可通过权利要求15至18中任一项所述的方法获得的抗原特异性溶细胞性CD4+T细

胞群或NKT细胞群，其用于治疗和/或预防自身免疫病，胞内病原体感染，肿瘤，同种异体移植排斥，或者响应于可溶性同种因子、变应原暴露或者用于基因治疗或基因疫苗接种的病毒载体的免疫应答。

具有改善的氧化还原酶基序的免疫原性肽

背景技术

[0001] 已描述了数种策略来防止针对抗原的不希望免疫应答的产生。WO2008/017517描述了使用包含给定抗原蛋白的MHC II类抗原和氧化还原酶基序的肽的新策略。这些肽将CD4+ T细胞转化为具有细胞溶解特性的细胞类型,称为溶细胞性CD4+ T细胞。这些细胞能够通过触发凋亡杀伤那些抗原呈递细胞(antigen presenting cell,APC),所述抗原呈递细胞呈递从中获得肽的抗原。WO2008/017517示出了用于变态反应和自身免疫病(例如I型糖尿病)的这一概念。此处,胰岛素可充当自身抗原。

[0002] WO2009101207和Carlier et al.(2012)Plos one 7,10e45366进一步更详细地描述了抗原特异性溶细胞性细胞。

[0003] WO2009101206描述了具有氧化还原酶基序和可溶性同种抗原的MCH II类表位的肽当用于替代治疗中时用于防止针对这样的抗原的免疫应答的用途(例如,在糖尿病患者中针对注射胰岛素的不希望的免疫应答)。

[0004] WO2016059236公开了经进一步修饰的肽,其中在氧化还原酶基序附近存在另外的组氨酸。

[0005] 在针对I型糖尿病的肽的设计中,可考虑许多因素,例如自身抗原(胰岛素、GAD65、……)的类型、自身抗原的特异性结构域和表位、氧化还原酶基序、氧化还原酶基序与表位序列之间的长度和氨基酸序列。

[0006] 除包含变应原或抗原的MHC II类表位的肽之外,WO2012069568A2还公开了使用NKT细胞表位结合CD1d受体并导致溶细胞性抗原特异性NKT细胞活化的可能性,已表明所述溶细胞性抗原特异性NKT细胞以抗原特异性方式消除呈递所述特异性抗原的APC。

[0007] 这两种策略都建立于使用[CST]X2C或CX2[CST]类型的氧化还原酶基序。为了提高使用这样的免疫原性肽的治疗效力,继续寻找更具有活性的肽和/或更强效的氧化还原酶基序。

发明内容

[0008] 本发明提供了包含抗原的T细胞表位和氧化还原酶基序的新的免疫原性肽。

[0009] 本发明人已测试了在传统上使用的CXX[CST]或[CST]XXC氧化还原酶基序之前、之内或之后添加不同的碱性(带电荷的)氨基酸组合的作用。

[0010] 通过这样做,他们发现:在许多情况下,当使用所要求保护的特定组合时,氧化还原酶的活性改变。这意味着在基序中某些碱性氨基酸的选择不是任意的,而是导致了基序作用的改善。更特别地,本发明人已表明,碱性氨基酸K(赖氨酸)或R(精氨酸)的使用优于H(组氨酸)的使用。在一些特定位置中,K和R残基也优于彼此,并且基序中多个碱性氨基酸残基的组合显示出进一步提高了这些作用。这些作用在附图中示出,并在实施例部分中进行了说明。还已测试了在模型系统中对细胞水平的作用,并证实了本发明的免疫原性肽活性的提高。

[0011] 本发明涉及以下方面:

[0012] 方面1:免疫原性肽,所述免疫原性肽包含:

[0013] a)氧化还原酶基序,

[0014] b)抗原蛋白的T细胞表位,以及

[0015] c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头

[0016] 其中:

[0017] (i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:

[0018] $(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST];

[0019] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

[0020] 其中X是任意氨基酸;

[0021] 其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

[0022] (ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST];

[0023] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸;

[0024] 其中X是任意氨基酸;

[0025] 其中(B^1)是任意氨基酸,并且其中n是0至3的整数;或者

[0026] (iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST];

[0027] 其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸,优选K;

[0028] 其中X是任意氨基酸;或者

[0029] (iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组:[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$;

[0030] 其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸,

[0031] 当T细胞表位是NKT细胞表位时,优选非H,更优选R或K;

[0032] 当T细胞表位是MHC II类表位时,优选H、K或R或非天然碱性氨基酸,如L-鸟氨酸;更优选R或K;

[0033] 其中X是任意氨基酸;

[0034] 其中(B^2)是任意氨基酸,并且其中m是0至3的整数,条件是当$(Z_3)^+$是R时,m是0;而当$(Z_3)^+$是H时,m是0或1。

[0035] 方面2:根据方面1所述的免疫原性肽,其中$(Z_1)^+$选自包含以下的组:K或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸;和/或其中任一个$(Z_2)^+$和/或$(Z_3)^+$选自包含以下的组:K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0036] 方面3:根据方面1或2所述的免疫原性肽,其中X是除C、S或T之外的任意氨基酸。

[0037] 方面4:根据方面1至3中任一项所述的免疫原性肽,其中X是除碱性氨基酸之外的任意氨基酸。

[0038] 方面5:根据方面1至4中任一项所述的免疫原性肽,其中任一个$(Z_1)^+$、$(Z_2)^+$和/或$(Z_3)^+$是K或L-鸟氨酸。

[0039] 方面6:根据方面1至5中任一项所述的免疫原性肽,其中所述抗原蛋白的T细胞表位是NKT细胞表位或MHC II类T细胞表位。

[0040] 方面7:根据方面1至6中任一项所述的免疫原性肽,其中所述表位的长度为7至30个氨基酸,优选7至25个氨基酸,更优选7至20个氨基酸。

[0041] 方面8:根据方面1至7中任一项所述的免疫原性肽,其长度为11至50个氨基酸,优

选11至40个氨基酸，更优选11至30个氨基酸。

[0042] 方面9：根据方面1至8中任一项所述的免疫原性肽，其中所述抗原蛋白是自身抗原、可溶性同种因子(allofactor)、由移植物脱落的同种抗原、胞内病原体的抗原、用于基因治疗或基因疫苗接种的病毒载体的抗原、肿瘤相关抗原或变应原。

[0043] 方面10：根据方面1至9中任一项所述的免疫原性肽，其中在所述基序中至少一个X是P或Y。

[0044] 方面11：根据方面1至10中任一项所述的免疫原性肽，其中所述接头具有0至4个氨基酸。

[0045] 方面12：根据方面1至11中任一项所述的免疫原性肽，其中所述氧化还原酶基序不天然存在于所述抗原蛋白中T细胞表位的N端或C端的11个氨基酸的区域内。

[0046] 方面14：根据方面1至13中任一项所述的免疫原性肽，其中所述T细胞表位不天然包含所述氧化还原酶基序。

[0047] 方面15：根据方面1至14中任一项所述的免疫原性肽，其用于医学中，更特别地用于治疗和/或预防自身免疫病，胞内病原体感染，肿瘤，同种异体移植排斥，或者响应于可溶性同种因子、变应原暴露或者用于基因治疗或基因疫苗接种的病毒载体的免疫应答。

[0048] 方面16：用于制备根据方面1至13中任一项所述的免疫原性肽的方法，其包括以下步骤：

[0049] (a)提供由所述抗原蛋白的T细胞表位组成的肽序列，以及

[0050] (b)将所述氧化还原酶基序与所述肽序列连接，以使得所述基序与所述表位彼此相邻或被至多7个氨基酸的接头隔开。

[0051] 方面17：用于获得针对呈递抗原的APC的所述抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞群的方法，所述方法包括以下步骤：

[0052] -提供外周血细胞；

[0053] -使所述细胞与根据方面1至14中任一项所述的免疫原性肽接触，所述免疫原性肽更特别地包含：

[0054] a)氧化还原酶基序，

[0055] b)抗原蛋白的T细胞表位，以及

[0056] c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头

[0057] 其中：

[0058] (i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：

[0059] $(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST]；

[0060] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

[0061] 其中X是任意氨基酸；

[0062] 其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0063] (ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]；

[0064] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

[0065] 其中X是任意氨基酸；

[0066] 其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0067] (iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]；

[0068] 其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸，优选K；

[0069] 其中X是任意氨基酸；或者

[0070] (iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$；

[0071] 其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸，

[0072] 当T细胞表位是NKT细胞表位时，优选非H，更优选R或K；

[0073] 当T细胞表位是MHC II类表位时，优选H、K或R或非天然碱性氨基酸，如L-鸟氨酸；更优选R或K；

[0074] 其中X是任意氨基酸；

[0075] 其中(B^2)是任意氨基酸，并且其中m是0至3的整数，条件是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；而当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1；以及

[0076] -在存在IL-2的情况下扩增所述细胞。

[0077] 方面18：用于获得抗原特异性NKT细胞群的方法，所述方法包括以下步骤：

[0078] -提供外周血细胞；

[0079] -使所述细胞与根据方面1至14中任一项所述的免疫原性肽接触，所述免疫原性肽更特别地包含：

[0080] a)氧化还原酶基序，

[0081] b)抗原蛋白的T细胞表位，以及

[0082] c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头

[0083] 其中：

[0084] (i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：

[0085] $(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST]；

[0086] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

[0087] 其中X是任意氨基酸；

[0088] 其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0089] (ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]；

[0090] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

[0091] 其中X是任意氨基酸；

[0092] 其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0093] (iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]；

[0094] 其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸，优选K；

[0095] 其中X是任意氨基酸；或者

[0096] (iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$；

[0097] 其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸，

[0098] 当T细胞表位是NKT细胞表位时，优选非H，更优选R或K；

[0099] 当T细胞表位是MHC II类表位时，优选H、K或R或非天然碱性氨基酸，如L-鸟氨酸；更优选R或K；

[0100] 其中X是任意氨基酸；

[0101] 其中(B^2)是任意氨基酸，并且其中m是0至3的整数，条件是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；而当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1；以及

[0102] -在存在IL-2的情况下扩增所述细胞。

[0103] 方面19：用于获得针对呈递抗原的APC的所述抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞群的方法，所述方法包括以下步骤：

[0104] -提供根据方面1至14中任一项所述的免疫原性肽，所述免疫原性肽更特别地包含：

[0105] a)氧化还原酶基序，

[0106] b)抗原蛋白的T细胞表位，以及

[0107] c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头

[0108] 其中：

[0109] (i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：

[0110] $(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST]；

[0111] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

[0112] 其中X是任意氨基酸；

[0113] 其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0114] (ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]；

[0115] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

[0116] 其中X是任意氨基酸；

[0117] 其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0118] (iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]；

[0119] 其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸，优选K；

[0120] 其中X是任意氨基酸；或者

[0121] (iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$；

[0122] 其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸，

[0123] 当T细胞表位是NKT细胞表位时，优选非H，更优选R或K；

[0124] 当T细胞表位是MHC II类表位时，优选H、K或R或非天然碱性氨基酸，如L-鸟氨酸，更优选R或K；

[0125] 其中X是任意氨基酸；

[0126] 其中(B^2)是任意氨基酸，并且其中m是0至3的整数，条件是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；而当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1；

[0127] -将所述肽施用于对象；以及

[0128] -从所述对象中获得所述抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞群。

[0129] 方面20：用于获得抗原特异性NKT细胞群的方法，所述方法包括以下步骤：

[0130] -提供根据方面1至14中任一项所述的免疫原性肽，所述免疫原性肽更特别地包含：

[0131] a)氧化还原酶基序，

[0132] b)抗原蛋白的T细胞表位，以及

[0133] c)在a)与b)之间的0至7个氨基酸的接头

[0134] 其中：

[0135] (i)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：

[0136] $(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]XXC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CXX[CST]；

[0137] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

[0138] 其中X是任意氨基酸；

[0139] 其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0140] (ii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]；

[0141] 其中$(Z_2)^+$是非H的碱性氨基酸；

[0142] 其中X是任意氨基酸；

[0143] 其中(B^1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0144] (iii)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]；

[0145] 其中$(Z_1)^+$是非H或R的碱性氨基酸，优选K；

[0146] 其中X是任意氨基酸；或者

[0147] (iv)所述氧化还原酶基序选自包含以下的组：[CST]XXC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$；

[0148] 其中$(Z_3)^+$是碱性氨基酸，

[0149] 当T细胞表位是NKT细胞表位时，优选非H，更优选R或K；

[0150] 当T细胞表位是MHC II类表位时，优选H、K或R或非天然碱性氨基酸，如L-鸟氨酸，更优选R或K；

[0151] 其中X是任意氨基酸；

[0152] 其中(B^2)是任意氨基酸，并且其中m是0至3的整数，条件是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；而当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1；

[0153] -将所述肽施用于对象；以及

[0154] -从所述对象中获得所述抗原特异性NKT细胞群。

[0155] 方面21：通过方面17至20所述的方法可获得的抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞或NKT细胞群，其用于治疗和/或预防自身免疫病，胞内病原体感染，肿瘤，同种异体移植排斥，或者响应于可溶性同种因子、变应原暴露或者用于基因治疗或基因疫苗接种的病毒载体的免疫应答。

[0156] 方面22：在个体中治疗和/或预防自身免疫病，胞内病原体感染，肿瘤，同种异体移植排斥，或者响应于可溶性同种因子、变应原暴露或者用于基因治疗或基因疫苗接种的病毒载体的免疫应答的方法，所述方法包括向所述个体施用根据方面1至13中任一项所述的免疫原性肽或者根据方面17至20中任一项所述的细胞群的步骤。

[0157] 方面23：在个体中治疗或预防自身免疫病，胞内病原体感染，肿瘤，同种异体移植排斥，或者响应于可溶性同种因子、变应原暴露或者用于基因治疗或基因疫苗接种的病毒载体的免疫应答的方法，所述方法包括以下步骤：

[0158] -提供所述个体的外周血细胞，

[0159] -使所述细胞与根据方面1至13中任一项的抗原肽接触，

[0160] -扩增所述细胞，以及

[0161] -向所述个体施用所述扩增的细胞。

[0162] 在上述方面中任一项中所述氧化还原酶基序的一个优选实施方案中，当存在时，B^1和/或B^2各自独立地选自:H、K或R，优选H。

[0163] 该方面的一些特别优选的实例包括以下氧化还原酶基序之一：

[0164] KCXXC，其中X是任意氨基酸，优选RCPYC、RCGHC或RCHGC；

[0165] KCXXC，其中X是任意氨基酸，优选KCPYC、KCGHC或KCHGC；

[0166] KHCXXC，其中X是任意氨基酸，优选RHCPYC、RHCGHC或RHCHGC；

[0167] KRCXXC，其中X是任意氨基酸，优选KHCPYC、KHCGHC或KHCHGC；

[0168] CXRC，其中X是任意氨基酸，优选CGRC、CPRC、CHRC；

[0169] CXKC，其中X是任意氨基酸，优选CGKC、CPKC、CHKC；

[0170] CXXCK，其中X是任意氨基酸，优选CHGCK、CPYCK、CGHCK；

[0171] CXXCHK，其中X是任意氨基酸，优选CHGCHK、CPYCHK、CGHCHK；

[0172] CXXCR，其中X是任意氨基酸，优选CHGCR、CPYCR、CGHCR；

[0173] CXXCHR，其中X是任意氨基酸，优选CHGCHR、CPYCHR、CGHCHR；

[0174] KCKXC、RCKXC、KCRXC或RCRXC，其中X是任意氨基酸

[0175] KCXKC、RCXKC、KCXRC或RCXRC，其中X是任意氨基酸

[0176] KCKXCK、RCKXCK、KCRXCK、KCKXCR、RCRXCK、RCKXCR、

[0177] KCRXCR或RCRXCR，其中X是任意氨基酸

[0178] KCKXCHK、RCKXCHK、KCRXCHK、KCKXCHR、RCRXCHK、RCKXCHR、KCRXCHR或RCRXCHR，其中X是任意氨基酸

[0179] KCXXCK、KCXXCR、RCXXCK或RCXXCR，其中X是任意氨基酸

[0180] KCXXCHK、KCXXCHR、RCXXCHK、RCXXCHR，其中X是任意氨基酸

[0181] KCXKCK、RCXKCK、KCXRCK、KCXKCR、RCXRCK、RCXKCR、KCXRCR或RCXRCR，其中X是任意氨基酸

[0182] KCXKCHK、RCXKCHK、KCXRCHK、KCXKCHR、RCXRCHK、RCXKCHR、KCXRCHR或RCXRCHR，其中X是任意氨基酸。

[0183] 在上述方面中任一项中，从其设计表位的抗原可选自包含以下的组:胰岛素原、胰岛素、C肽、MOG和破伤风毒素。

[0184] 在所述方面中任一项的一个优选实施方案中，接头包含至少1个氨基酸、至少2个氨基酸、至少3个氨基酸或至少4个氨基酸。优选地，所述接头包含1至7个氨基酸，例如2至7个氨基酸、3至7个氨基酸或4至7个氨基酸。

[0185] 在所述方面中任一项的一个优选实施方案中，尤其是在其中氧化还原酶基序为[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]的那些方面中，所述氧化还原酶基序不是CRLC和/或免疫原性肽不是CRLC-KVAPVIKAR-MM。

[0186] 在所述方面中任一项的另一个优选实施方案中，T细胞表位在其N-末端(即紧邻接头或氧化还原酶基序)不包含碱性氨基酸，更特别地在接头不存在或仅包含1或2个氨基酸的情况下。更优选地，在其中氧化还原酶基序为[CST]XXC$(B^2)_m(Z_2)^+$或CXX[CST]$(B^2)_m(Z_2)^+$的所有方面中，T细胞表位在其N-末端(即紧邻接头或氧化还原酶基序)不包含碱性氨基酸，更特别地在接头不存在或仅包含1或2个氨基酸的情况下。

[0187] 在所述方面中任一项的另一个实施方案中，T细胞表位从其N末端(即紧邻接头或氧化还原酶基序)算起的第1、2和/或3位不包含碱性氨基酸，更特别地在接头不存在或仅包含1或2个氨基酸的情况下。

[0188] 在所述方面中任一项的另一个实施方案中，任一个X、(B^1)和/或(B^2)可以是碱性氨基酸。在另一个实施方案中，任一个X、(B^1)和/或(B^2)是除C、S或T之外的任意氨基酸。在又一个实施方案中，任一个X、(B^1)和/或(B^2)是除碱性氨基酸之外的任意氨基酸。

[0189] 本发明的肽具有以下优点：与现有技术的肽相比，已使用这些肽产生的溶细胞性CD4+ T细胞具有提高的IFN-γ和sFasL产生。还认为在所述CD4+ T细胞中，颗粒酶B的产生提高。

[0190] 这些标志物表达水平的提高指示：与现有技术的肽相比，本发明的肽具有更大的产生溶细胞性CD4+ T细胞的能力。

附图说明

[0191] 图1：示出了包含CHGC基序和胰岛素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原活性的动力学。将碱性氨基酸插入氧化还原酶基序的N端，并追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用具有无任何带电荷氨基酸或在其N端有H的氧化还原酶基序的肽作为对照肽。详情参见表1。

[0192] 图2：示出了包含CPYC基序和破伤风毒素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原活性的动力学。将碱性氨基酸插入氧化还原酶基序的N端，并追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用具有无任何带电荷氨基酸或在其N端有H的氧化还原酶基序的肽作为对照肽。详情参见表2。

[0193] 图3：示出了包含CPYC基序和MOG T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原活性的动力学。将碱性氨基酸插入氧化还原酶基序的N端，并追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用具有无任何带电荷氨基酸或在其N端有H的氧化还原酶基序的肽作为对照肽。详情参见表3。

[0194] 图4：示出了具有胰岛素T细胞表位并包含CPYC基序的免疫原性肽的氧化还原活性的动力学，其中P或Y被K替代。追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用CPYC基序作为对照肽。详情参见表4。

[0195] 图5：示出了具有胰岛素T细胞表位并包含CHGC基序的免疫原性肽的氧化还原活性的动力学，其中H或G被K替代。追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用CHGC和CRGC基序作为对照肽。详情参见表5。

[0196] 图6：示出了具有胰岛素T细胞表位并包含CGHC基序的免疫原性肽的氧化还原活性的动力学，其中H被K或R替代。还已测试了CHKC基序。追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用CGHC基序作为对照肽。详情参见表6。

[0197] 图7：示出了包含CHGC基序和胰岛素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原活性的动力学。将碱性氨基酸插入氧化还原酶基序的C端，并追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用在其C端无任何碱性氨基酸的CHGC基序作为对照肽。详情参见表7。

[0198] 图8：示出了包含CPYC基序和破伤风毒素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原活性的动力学。将碱性氨基酸插入氧化还原酶基序的C端，并追踪氧化还原活性的初始速度10分

钟。使用在其C端无任何碱性氨基酸的CPYC基序作为对照肽。详情参见表8。

[0199] 图9:示出了包含CPYC基序和胰岛素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶活性的动力学。将碱性氨基酸插入氧化还原酶基序内及其N/C端,并追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用CPYCSLQPLALEGSLQKRG肽作为对照肽。详情参见表9。

[0200] 图10:示出了包含CPYC基序和MOG T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶活性的动力学。将碱性氨基酸插入氧化还原酶基序内及其N/C端,并追踪氧化还原活性的初始速度10分钟。使用CPYCGWYRSPFSRVVHL肽作为对照肽。详情参见表10。

[0201] 图11:示出了在不存在和存在包含MOG T细胞表位和氧化还原酶基序的测试肽和参照肽的情况下,与APC共培养16小时之后的Ag特异性CD4 T细胞的百分比。虚线示出了与所有测试肽和对照肽(白色柱)相比,具有HCPYC基序的参照肽(黑色柱)的Ag特异性CD4+ T细胞百分比之间的差异。对照条件包括无肽添加或添加来自包含氧化还原酶基序的DBY的肽或添加来自包含氧化还原酶基序的鼠PPI的肽。对于每种条件,均示出了对于生物学重复的FACS测量的SD。详情参见表11。

[0202] 图12:示出了在不存在和存在包含MOG T细胞表位和氧化还原酶基序的测试肽和参照肽的情况下,与APC共培养24小时之后的2D2-总CD4 T细胞分泌的sIL2。虚线示出了与所有实验和对照条件(白色柱)相比,具有HCPYC基序的参照肽(黑色柱)的sIL2量(pg/ml)之间的差异。对照条件包括没有肽的APC、没有T细胞的仅APC、仅培养基或添加来自包含氧化还原酶基序的DBY的肽或添加来自包含氧化还原酶基序的鼠PPI的肽。对于每种条件,均示出了对于生物学重复的FACS测量的SD。详情参见表11。

[0203] 图13:示出了在不存在和存在包含MOG T细胞表位和氧化还原酶基序的测试肽的情况下,在用APC刺激之后16小时,单独或组合地表达颗粒酶A、颗粒酶B、CD107a/b的Ag特异性CD4 T细胞的百分比。将没有任何硫氧化还原活性的wt肽的测量值从经修饰肽的每个其他测量值中去除以表明氧化还原酶基序对裂解标志物的诱导作用。虚线示出了与所有实验修饰肽相比具有HCPYC基序的参照肽在CD4+ T细胞上的裂解标志物的表达百分比之间的差异。由于技术困难(事件数量不足),KHCPYC-MOG肽的结果尚不确定。详情参见表11。

具体实施方式

[0204] 将针对具体实施方案来描述本发明,但是本发明不限于此,而是仅由权利要求书来限制。权利要求书中的任何附图标记不应被解释为限制范围。仅提供以下术语或定义以帮助理解本发明。除非本文中明确定义,否则本文中使用的所有术语具有与其对于本发明领域的技术人员来说相同的含义。本文中提供的定义的范围不应被解释为小于本领域普通技术人员所理解的范围。

[0205] 除非另外指明,否则对本领域技术人员将明显的是,可以以本身已知的方式进行并且已经进行了未具体详细描述的所有方法、步骤、技术和操作。例如,再次参考标准手册、上面提及的一般背景技术以及其中引用的其他参考文献。

[0206] 除非上下文另外明确地指出,否则本文中使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种和更多个/种。当与本文中使用的方面、权利要求或实施方案相关使用时,术语“任何/任意”是指任意单一一个/种(即任意)以及所涉及的所述方面、权利要求或实施方案的所有组合。

[0207] 本文中使用的术语“包含/括”和“由.....构成”与“包括/含”或“含有”同义，并且是包括性的或开放式的，而不排除另外的未引用成员、要素或方法步骤。所述术语还涵盖“基本上由.....组成”和“由.....组成”的实施方案。

[0208] 通过端点对数值范围的列举包括在相应范围内纳入的所有数字和分数，以及所列举的端点。

[0209] 本文中涉及例如参数、量、时距(temporal duration)等可测量值时使用的术语“约/大约”意在涵盖指定值的或相对于指定值的+/-10％或更小、优选+/-5％或更小、更优选+/-1％或更小、并且还更优选+/-0.1％或更小的变化，并且在此范围内这样的变化适合于在所公开的发明中实施。应理解，修饰语“约/大约”所指的值本身也被具体地且优选地公开。

[0210] 如本文中所用的，在“用于治疗疾病的组合物”中使用的术语“用于”还应公开相应的治疗方法和相应的用于制备用于治疗疾病的药物的制剂的用途。

[0211] 本文中使用的术语“肽”是指包含通过肽键连接的12至200个氨基酸的氨基酸序列但是其可包含非氨基酸结构的分子。

[0212] 本文中使用的术语“免疫原性肽”是指具有免疫原性，即包含能够引发免疫应答的T细胞表位的肽。

[0213] 根据本发明的肽可包含任何常规的20个氨基酸或其经修饰形式，或者可包含通过化学肽合成或通过化学或酶修饰并入的非天然存在氨基酸。

[0214] 本文中使用的术语“抗原”是指大分子的结构，通常是蛋白质(具有或不具有多糖)或由包含一种或更多种半抗原并包含T或NKT细胞表位的蛋白质组合物制成。

[0215] 本文中使用的术语“抗原蛋白”是指包含一个或更多个T或NKT细胞表位的蛋白质。本文中使用的自身抗原或自身抗原蛋白是指存在于体内的人或动物蛋白或其片段，其在同一人或动物体内引发免疫应答。

[0216] 术语“食品或药物抗原蛋白”是指存在于食品或药物产品中(例如疫苗中)的抗原蛋白。

[0217] 术语“表位”是指抗原蛋白的一个或数个部分(其可定义构象表位)，其被抗体或其部分(Fab'，Fab2'等)或者在B细胞、T细胞或NKT细胞的细胞表面存在的受体特异性地识别并结合，并且所述B细胞、T细胞或NKT细胞能够通过所述结合诱导免疫应答。

[0218] 在本发明的上下文中，术语“T细胞表位”是指显性(dominant)、亚显性(sub-dominant)或次要(minor)的T细胞表位，即抗原蛋白的一部分，其被T淋巴细胞的细胞表面上的受体特异性地识别并结合。表位是显性、亚显性还是次要取决于针对该表位引发的免疫反应。显性取决于在蛋白质的所有可能的T细胞表位中，这样的表位被T细胞识别并能够活化它们的频率。

[0219] T细胞表位是由MHC II类分子识别的表位，其由适合MHC II分子的沟(groove)的+/-9个氨基酸的序列组成。在表示T细胞表位的肽序列中，表位中的氨基酸编号为P1至P9，表位的N端氨基酸编号为P-1、P-2等，表位的C端氨基酸编号为P+1、P+2等。由MHC II类分子而非MHC I类分子识别的肽称为MHC II类限制性T细胞表位。

[0220] 从抗原蛋白中鉴定和选择T细胞表位是本领域技术人员已知的。

[0221] 为了鉴定适合于本发明情况的表位，通过例如T细胞生物学技术来测试抗原蛋白

的分离的肽序列,以确定该肽序列是否引发T细胞应答。将发现引发T细胞应答的那些肽序列定义为具有T细胞刺激活性。

[0222] 人T细胞刺激活性还可通过以下来测试:将获自例如患有T1D的个体的T细胞与来源于参与T1D的自身抗原的肽/表位一起培养,以及确定T细胞是否响应于所述肽/表位而发生增殖,如通过氚标记胸腺嘧啶核苷(tritiated thymidine)的细胞摄取所测量的。可将T细胞对肽/表位的应答的刺激指数计算为响应于肽/表位的最大CPM除以对照CPM。认为等于或大于背景水平两倍的T细胞刺激指数(S.I.)为"阳性"。阳性结果用于计算所测试的肽/表位组的每个肽/表位的平均刺激指数。

[0223] 任选地,可进一步对非天然(或经修饰的)T细胞表位测试其与MHC II类分子的结合亲和力。这可以以不同的方式进行。例如,可溶性HLA II类分子通过裂解对于给定II类分子为纯合的细胞获得。后者通过亲和色谱法纯化。将可溶的II类分子与经生物素标记的参照肽一起孵育,该肽根据其对II类分子的强结合亲和力而产生。然后将待评估II类结合的肽以不同浓度孵育,并通过添加中性抗生物素蛋白来计算它们将参照肽从其II类结合中置换出来的能力。

[0224] 为了通过例如精细作图技术(fine mapping technique)确定最佳的T细胞表位,通过在肽的氨基末端或羧基末端添加或缺失氨基酸残基来对具有T细胞刺激活性并因此包含至少一个T细胞表位(如通过T细胞生物学技术确定的)的肽进行修饰并对其进行测试以确定T细胞对经修饰肽的反应性变化。如果发现在天然蛋白序列中共有重叠区域的两个或更多个肽具有人T细胞刺激活性(如通过T细胞生物学技术确定的),则可产生包含全部或部分这样的肽的另外的肽,并且这些另外的肽可通过类似的操作进行测试。按照该技术,选择并重组或合成产生肽。基于多种因素来选择T细胞表位或肽,所述因素包括在个体群体中T细胞对肽/表位应答的强度(例如,刺激指数)和T细胞对肽应答的频率。

[0225] 作为补充和/或替代,可使用一种或更多种体外算法来鉴定抗原蛋白内的T细胞表位序列。合适的算法包括但不限于在以下中描述的那些:Zhang et al.(2005)Nucleic Acids Res 33,W180-W183(PREDBALB);Salomon&Flower(2006)BMC Bioinformatics 7,501(MHCBN);Schuler et al.(2007)Methods Mol.Biol.409,75-93(SYFPEITHI);Donnes&Kohlbacher(2006)Nucleic Acids Res.34,W194-W197(SVMHC);Kolaskar&Tongaonkar(1990)FEBS Lett.276,172-174,Guan et al.(2003)Appl.Bioinformatics 2,63-66(MHCPred)以及Singh和Raghava(2001)Bioinformatics 17,1236-1237(Propred)。更特别地,这样的算法允许在抗原蛋白内预测一个或更多个八肽或九肽序列,其将适合MHC II分子的沟,并且这对于不同的HLA类型也是如此。

[0226] 术语"MHC"是指"主要组织相容性抗原(major histocompatibility antigen)"。在人中,MHC基因被称为HLA("人白细胞抗原(human leukocyte antigen)")基因。尽管没有始终遵循的惯例,但是一些文献使用HLA指代HLA蛋白分子,并且使用MHC指代编码HLA蛋白的基因。因此,当在本文中使用时,术语"MHC"和"HLA"是等同物。人中的HLA系统在小鼠中具有其等同物,即H2系统。研究最深入的HLA基因是九种所谓的经典MHC基因:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLA DQB1、HLA-DRA和HLA-DRB1。在人中,MHC分为三个区域:I、II和III类。A、B和C基因属于MHC I类,而六个D基因属于II类。MHC I类分子由包含3个结构域(α1、2和3)的单一多态链构成,该链与细胞表面上的β2微球蛋白缔合。II类分

子由2种多态链构成,每种链包含2条链(α1和2,以及β1和2)。

[0227] I类MHC分子在几乎所有有核细胞上表达。

[0228] 在I类MHC分子的情况下呈递的肽片段由CD8+ T淋巴细胞(溶细胞性T淋巴细胞或CTL)识别。CD8+ T淋巴细胞经常成熟为溶细胞性效应物,其可裂解带有刺激性抗原的细胞。II类MHC分子主要在活化的淋巴细胞和抗原呈递细胞上表达。CD4+ T淋巴细胞(辅助T淋巴细胞或Th)通过识别由II类MHC分子呈递的独特肽片段而活化,该片段通常在抗原呈递细胞(例如巨噬细胞或树突细胞)上发现。CD4+ T淋巴细胞增殖并分泌支持抗体介导的和细胞介导的应答的细胞因子,例如IL-2、IFN-γ和IL-4。

[0229] 功能性HLA的特征在于内源性以及外来、潜在的抗原肽与之结合的结合沟深。该沟的特征还在于明确限定的形状和物理化学特性。HLA I类结合位点是封闭的,因为肽末端被固定在沟的末端中。它们还参与具有保守HLA残基的氢键网络。考虑到这些限制,结合的肽的长度限制为8、9或10个残基。但是,已证明多至12个氨基酸残基的肽也能够结合HLA I类。不同HLA复合体结构的比较证实了一般的结合方式,其中肽采用相对线性、延伸的构象或者可涉及中心残基向沟外凸出。

[0230] 与HLA I类结合位点相反,II类位点在两端均开放。这允许肽从实际结合区延伸,从而在两端“悬垂(hanging out)”。因此,II类HLA可结合具有9个至超过25个氨基酸残基的可变长度的肽配体。与HLA I类类似,II类配体的亲和力由“恒定”和“可变”组分确定。恒定部分同样由HLA II类沟中保守残基与结合肽的主链之间形成的氢键网络产生。然而,该氢键模式不限于肽的N端和C端残基,而是分布在整个链上。后者是重要的,因为它将复合肽的构象限制为严格的线性结合方式。这对于所有II类同种异型都是常见的。由于II类结合位点内多态性的某些位置,确定肽结合亲和力的第二组分是可变的。不同的同种异型在沟内形成不同的互补口袋,从而说明了肽的亚型依赖性选择或特异性。重要地,对II类口袋中保留的氨基酸残基的限制通常比对I类的更“柔和”。在不同的HLA II类同种异型之间,存在多得多的肽交叉反应性。适合于MHC II分子的沟的MHC II类T细胞表位的+/-9个氨基酸(即8、9或10)的序列通常编号为P1至P9。另外的表位N端氨基酸编号为P-1、P-2等,表位C端氨基酸编号为P+1、P+2等。

[0231] 术语“NKT细胞表位”是指抗原蛋白的一部分,其被NKT细胞的细胞表面上的受体特异性地识别并结合。特别地,NKT细胞表位是被CD1d分子结合的表位。NKT细胞表位具有一般基序[FWYHT]-X(2)-[VILM]-X(2)-[FWYHT]。该一般基序的替代形式在第1位和/或第7位具有替代项[FWYH],因此是[FWYH]-X(2)-[VILM]-X(2)-[FWYH]。

[0232] 该一般基序的替代形式在第1位和/或第7位具有替代项[FWYT],[FWYT]-X(2)-[VILM]-X(2)-[FWYT]。该一般基序的替代形式在第1位和/或第7位具有替代项[FWY],[FWY]-X(2)-[VILM]-X(2)-[FWY]。

[0233] 不论第1位和/或第7位的氨基酸如何,一般基序的替代形式在第4位具有替代项[ILM],例如[FWYH]-X(2)-[ILM]-X(2)-[FWYH]或[FWYHT]-X(2)-[ILM]-X(2)-[FWYHT]或[FWY]-X(2)-[ILM]-X(2)-[FWY]。

[0234] 可通过手工、或通过使用例如ScanProsite De Castro E.et al.(2006)Nucleic Acids Res.34(Web Server issue):W362-W365的算法,通过扫描上述序列基序的序列来鉴定蛋白质中的CD1d结合基序。

[0235] “天然杀伤T”或“NKT”细胞构成独特的非常规T淋巴细胞亚群，所述非常规T淋巴细胞识别由非经典MHC复合物分子CD1d呈递的抗原。目前描述了两个NKT细胞亚群。I型NKT细胞，也称为不变NKT细胞(invariant NKT，iNKT)是最丰富的。其特征在于存在由不变的α链(小鼠中为Vα14，人中为Vα24)构成的α-β T细胞受体(T cell receptor，TCR)。该α链与可变但数目有限的β链缔合。2型NKT细胞具有α-β TCR，但具有多态α链。然而，明显的是，存在其他NKT细胞亚群，其表型仍未完全限定，但其共有被在CD1d分子的情况下呈递的糖脂活化的特征。

[0236] NKT细胞通常表达天然杀伤(natural killer，NK)细胞受体的组合，包括NKG2D和NK1.1。NKT细胞是固有免疫系统的一部分，其可通过它们在获得完全的效应物能力之前不需要扩增的事实而与适应性免疫系统区分开。它们的大多数介质(mediator)是预先形成的，并且不需要转录。已表明NKT细胞是针对胞内病原体和肿瘤排斥的免疫应答中的主要参与者。还提倡它们在控制自身免疫病和移植排斥中的作用。

[0237] 识别单元CD1d分子的结构与MHC I类分子的结构极其相似，包括存在β-2微球蛋白。其特征在于以两条α链为边界的深的槽(cleft)，并包含接受脂链的高度疏水的残基。该槽在两个末端都敞开，使得其能够容纳更长的链。CD1d的规范配体是合成的α半乳糖神经酰胺(αGalCer)。然而，已经描述了许多天然的替代配体，包括糖脂和磷脂、在髓磷脂中发现的天然脂质硫苷脂(lipid sulfatide)、微生物磷酸肌醇甘露糖苷(phosphoinositol mannoside)和α-葡糖醛酸神经酰胺(alpha-glucuronosylceramide)。目前本领域中的共识(Matsuda et al(2008)，Curr.Opinion Immunol.，20358-368；Godfrey et al(2010)，Nature rev.Immunol 11，197-206)仍然是CD1d仅结合这样的配体，其包含脂链或通常由埋入CD1d的脂质尾和从CD1d突出的糖残基头基构成的常见结构。

[0238] 关于本发明上下文中使用的表位，本文中使用的术语“同源物”是指这样的分子，其与天然存在表位具有至少50％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％或至少98％氨基酸序列同一性，从而维持表位结合抗体或者B和/或T细胞的细胞表面受体的能力。表位的特定同源物对应于在至多三个，更特别地在至多2个，最特别地在一个氨基酸中修饰的天然表位。

[0239] 关于本发明的肽，本文中使用的术语“衍生物”是指这样的分子，其包含至少肽活性部分(即氧化还原基序和能够引发溶细胞性CD4+ T细胞活性的MHC II类表位)并且除此之外还包含可具有不同的目的(例如稳定肽或改变肽的药代动力学或药效学特性)的互补部分。

[0240] 本文中使用的术语两个序列的“序列同一性”涉及当比对当两个序列时，具有相同核苷酸或氨基酸的位置数除以序列中较短者的核苷酸或氨基酸数。特别地，序列同一性为70％至80％、81％至85％、86％至90％、91％至95％、96％至100％或100％。

[0241] 本文中使用的术语“肽编码多核苷酸(或核酸)”和“编码肽的多核苷酸(或核酸)”是指这样的核苷酸序列，其在适当的环境中表达时导致相关肽序列或其衍生物或同源物的产生。这样的多核苷酸或核酸包括编码该肽的正常序列，以及能够表达具有所需活性的肽的这些核酸的衍生物和片段。编码根据本发明的肽或其片段的核酸是编码源自于哺乳动物或对应于哺乳动物的肽或其片段(最特别是人肽片段)的序列。

[0242] 术语“氧化还原酶基序”、“硫醇-氧化还原酶基序”，“硫代还原酶基序”、“硫代氧化

还原基序”或“氧化还原基序”在本文中用作同义词并且是指涉及将电子从一个分子(还原剂,也称为氢或电子供体)转移到另一个分子(氧化剂,也称为氢或电子接受体)的基序。特别地,术语“氧化还原酶基序”是指序列基序[CST]-X-X-C或C-X-X-[CST],其中C代表半胱氨酸,S代表丝氨酸,T代表苏氨酸,并且X代表任意氨基酸。

[0243] 术语“碱性氨基酸”是指像布朗斯特-劳里(Bronsted-Lowry)和路易斯碱一样起作用的任何氨基酸,并且包括天然碱性氨基酸,例如精氨酸(R)、赖氨酸(K)或组氨酸(H),或者非天然碱性氨基酸,例如但不限于:

[0244] • 赖氨酸变体,如Fmoc-β-Lys(Boc)-OH(CAS号219967-68-7)、也称为L-鸟氨酸或鸟氨酸的Fmoc-Orn(Boc)-OH(CAS号109425-55-0)、Fmoc-β-Homolys(Boc)-OH(CAS号203854-47-1)、Fmoc-Dap(Boc)-OH(CAS号162558-25-0)或Fmoc-Lys(Boc)OH(DiMe)-OH(CAS号441020-33-3);

[0245] • 酪氨酸/苯丙氨酸变体,如Fmoc-L-3Pal-OH(CAS号175453-07-3)、Fmoc-β-HomoPhe(CN)-OH(CAS号270065-87-7)、Fmoc-L-B-HomoAla(4-吡啶基)-OH(CAS号270065-69-5)或Fmoc-L-Phe(4-NHBoc)-OH(CAS号174132-31-1);

[0246] • 脯氨酸变体,如Fmoc-Pro(4-NHBoc)-OH(CAS号221352-74-5)或Fmoc-Hyp(tBu)-OH(CAS号122996-47-8);

[0247] • 精氨酸变体,如Fmoc-β-Homoarg(Pmc)-OH(CAS号700377-76-0)。

[0248] 术语“免疫病症”或“免疫疾病”是指其中免疫系统的反应负责或维持生物体中功能异常或非生理状况的疾病。免疫病症尤其包括变应性紊乱和自身免疫病。

[0249] 本文中使用的术语“变应性疾病”或“变应性病症”是指特征在于免疫系统对称为变应原的特定物质(例如花粉、螫针(sting)、药物或食品)的超敏反应的疾病。变态反应是每当特应性个体患者遇到变应原(该个体已针对其致敏)时所观察到的体征和症状的集合,其可导致发生多种疾病,特别是呼吸疾病和症状例如支气管哮喘。存在多种类型的分类,并且大多数变应性病症根据其在哺乳动物体内发生的位置而具有不同的名称。“超敏反应”是个体在暴露于抗原(该个体已变得针对其致敏)之后在该个体中产生的不期望的(有害的、产生不适并且有时是致命的)反应。“速发型超敏反应”取决于IgE抗体的产生,并且因此等同于变态反应。

[0250] 术语“自身免疫病”或“自身免疫紊乱”是指由于生物体无法将其自身组成部分(直至亚分子水平)识别为“自身”而导致针对其自身细胞和组织的异常免疫应答所导致的疾病。疾病组可分为两类:器官特异性疾病和全身性疾病。

[0251] “变应原”被定义为在易患(特别是遗传倾向的)个体(特应性)患者中引发IgE抗体的产生的物质,通常为大分子或蛋白质组合物。在Liebers et al.(1996)Clin.Exp.Allergy 26,494-516中也提出了类似的定义。

[0252] 术语“治疗有效量”是指在患者中产生期望的治疗或预防作用的本发明的肽或其衍生物的量。例如,关于疾病或病症,其是在一定程度上降低该疾病或病症的一种或更多种症状的量,并且更特别地是与该疾病或病症相关或引起该疾病或病症的生理或生化参数部分或全部恢复正常的量。通常来说,治疗有效量是将导致正常生理状况的改善或恢复的本发明的肽或其衍生物的量。例如,当用于治疗性治疗受免疫病症影响的哺乳动物时,其为每日量肽/kg所述哺乳动物体重。或者,在通过基因治疗施用的情况下,调节裸露的DNA或病毒

载体的量以确保局部产生相关剂量的本发明的肽、其衍生物或同源物。

[0253] 当涉及肽时，术语“天然”涉及以下事实：序列与天然存在蛋白质(野生型或突变型)的片段相同。与此相反，术语“人工”是指其本身在自然界中不存在的序列。人工序列通过有限的修饰例如在天然存在序列内改变/缺失/插入一个或更多个氨基酸，或者通过在天然存在序列的N或C端添加/去除氨基酸而从天然序列获得。

[0254] 在这种背景下，认识到通常在表位扫描的背景下从抗原产生肽片段。巧合地，这样的肽可在其序列中包含T细胞表位(MHC II类表位或CD1d结合表位)，并且在其附近是具有如本文中所限定的经修饰氧化还原基序的序列。或者，在所述表位与所述氧化还原酶基序之间可存在至多11个氨基酸、至多7个氨基酸、至多4个氨基酸、至多2个氨基酸，或者甚至0个氨基酸(换句话说，表位与氧化还原酶基序序列彼此紧邻)的氨基酸序列。在优选实施方案中，不要求保护这样的天然存在肽。

[0255] 在本文中，氨基酸以其全称、其三字母缩写或其一个字母的缩写来提及。

[0256] 氨基酸序列的基序在本文中根据Prosite的格式书写。基序用于描述在序列的特定部分处的某个序列变化。符号X或B用于其中接受任意氨基酸的位置。符号$(Z_1)^+$、$(Z_2)^+$和$(Z_3)^+$用于其中接受任意碱性氨基酸的位置，如本文中其他地方所限定的。可通过在方括号(“[ ]”)之间列出给定位置的可接受氨基酸来表示替代氨基酸。例如：[CST]代表选自Cys、Ser或Thr的氨基酸。被排除作为替代物的氨基酸可通过在波形括号(“{}”)之间将它们列出来表示。例如：{AM}代表除Ala和Met之外的任何氨基酸。基序中的不同要素任选地由连字符(-)彼此隔开。为了区分氨基酸，可将氧化还原酶基序之外的那些称为外部氨基酸，将氧化还原基序内的那些称为内部氨基酸。

[0257] 包含T细胞表位(例如MHC II类T细胞表位或NKT细胞表位(或CD1d结合肽表位))和具有还原活性的经修饰肽基序序列的肽能够产生抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞，各自地为针对抗原呈递细胞的溶细胞性NKT细胞。

[0258] 因此，在其最广泛的意义上，本发明涉及包含具有触发免疫反应的潜力的抗原(自身或非自身)的至少一种T细胞表位(MHC II类T细胞表位或NKT细胞表位)以及对肽二硫键具有还原活性的经修饰硫还原酶序列基序的肽。T细胞表位和经修饰氧化还原基序序列可在肽中彼此紧邻或任选地被一个或更多个氨基酸(所谓的接头序列)隔开。任选地，该肽另外地包含内体靶向序列和/或另外的“侧翼”序列。

[0259] 本发明的肽包含具有触发免疫反应潜力的抗原(自身或非自身)的T细胞表位和经修饰氧化还原基序。肽中基序序列的还原活性可通过例如在胰岛素溶解度测定(其中胰岛素的溶解度在还原之后改变)中其还原巯基的能力来测定，或者用经荧光标记的底物(例如胰岛素)来测定。这样的测定的一个实例使用荧光肽，并描述于Tomazzolli et al.(2006)Anal.Biochem.350,105-112中。当带有FITC标记的两个肽通过二硫桥彼此共价连接时，它们会自猝灭。在被根据本发明的肽还原之后，被还原的单个肽再次变为荧光的。

[0260] 经修饰氧化还原基序可位于T细胞表位的氨基末端侧或T细胞表位的羧基末端。

[0261] 在硫还原酶中遇到具有还原活性的肽片段，所述硫还原酶是小的二硫化物还原酶，包括谷氧还蛋白、核氧化还原蛋白(nucleoredoxin)、硫氧还蛋白和其他硫醇/二硫化物氧化还原酶(Holmgren(2000)Antioxid.Redox Signal.2,811-820;Jacquot et al.(2002)Biochem.Pharm.64,1065-1069)。它们是多功能、普遍存在的，并且存在于许多原核生物和

真核生物中。已知它们通过从以下中公知的保守活性结构域共有序列内的氧化还原活性半胱氨酸对蛋白质(例如酶)上的二硫键发挥还原活性:例如Fomenko et al.((2003)Biochemistry 42,11214-11225;Fomenko et al.(2002)Prot.Science 11,2285-2296),其中X代表任意氨基酸;以及WO2008/017517,其在第1位和/或第4位包含半胱氨酸。因此,基序为CXX[CST]或[CST]XXC。这样的结构域也存在于较大蛋白质,例如蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase,PDI)和磷酸肌醇特异性磷脂酶C中。本发明已经重新设计了所述基序,以寻求更大的效力和活性。

[0262] 如进一步详细说明的,本发明的肽可通过化学合成来制备,其允许并入非天然氨基酸。因此,在上述经氧化还原修饰的氧化还原基序中"C"代表半胱氨酸或具有巯基的另一种氨基酸例如巯基缬氨酸(mercaptovaline)、高半胱氨酸或者其他具有巯基功能的天然或非天然氨基酸。为了具有还原活性,存在于经修饰氧化还原基序中的半胱氨酸不应作为胱氨酸二硫桥的一部分出现。然而,经氧化还原修饰的氧化还原基序可包含经修饰半胱氨酸,例如甲基化的半胱氨酸,其在体内被转化为具有游离巯基的半胱氨酸。

[0263] 肽还可包含修饰以提高稳定性或溶解性,例如修饰N端NH_2基或修饰C端COOH基(例如,将COOH修饰成$CONH_2$基)。

[0264] 在包含经修饰氧化还原基序的本发明的肽中,对基序进行定位以使得当表位适合于MHC沟或结合CD1d受体时,基序保留在MHC或CD1d受体结合沟的外部。经修饰氧化还原基序位于紧邻肽内的表位序列[换句话说,基序与表位之间的接头序列为零个氨基酸],或者通过包含7个氨基酸或更少的氨基酸序列的接头与T细胞表位隔开。更特别地,接头包含1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。一些具体的实施方案是在表位序列与经修饰氧化还原基序序列之间具有0、1或2个氨基酸接头的肽。除肽接头之外,其他有机化合物也可用作接头,以将肽的部分彼此(例如,经修饰氧化还原基序序列与T细胞表位序列)连接。

[0265] 本发明的肽还可在包含T细胞表位和经修饰氧化还原基序的序列的N或C端包含另外的短氨基酸序列。这样的氨基酸序列在本文中通常被称为"侧翼序列"。侧翼序列可位于表位与内体靶向序列之间和/或经修饰氧化还原基序与内体靶向序列之间。在某些不包含内体靶向序列的肽中,短氨基酸序列可在肽中经修饰氧化还原基序和/或表位序列的N和/或C端存在。更特别地,侧翼序列是1至7个氨基酸的序列,最特别是2个氨基酸的序列。

[0266] 经修饰氧化还原基序可位于表位的N端。或者,经修饰氧化还原基序可位于表位的C端。

[0267] 在本发明的某些实施方案中,提供了包含一个表位序列和经修饰氧化还原基序序列的肽。在另一些具体实施方案中,经修饰氧化还原基序在肽中出现数次(1、2、3、4或甚至更多次),例如作为可通过一个或更多个氨基酸彼此间隔的经修饰氧化还原基序的重复序列,或者作为彼此紧邻的重复序列。或者,在T细胞表位序列的N和C端二者均提供一个或更多个经修饰氧化还原基序。

[0268] 针对本发明的肽设想的其他变化形式包含含有T细胞表位序列的重复序列的肽,其中每个表位序列在经修饰氧化还原基序之前和/或之后(例如"经修饰氧化还原基序-表位"的重复序列或"经修饰氧化还原基序-表位-经修饰氧化还原基序"的重复序列)。在本文中,经修饰氧化还原基序可都具有相同的序列,但这不是必须的。应注意,包含其本身包含经修饰氧化还原基序的表位的肽的重复序列还将导致序列包含"表位"和"经修饰氧化还原

基序”二者。在这样的肽中，在一个表位序列内的经修饰氧化还原基序作为在第二个表位序列外的经修饰氧化还原基序发挥作用。

[0269] 通常来说，本发明的肽仅包含一个T细胞表位。如下所述，可通过功能测定和/或二氧化硅预测测定中的一个或更多个来鉴定蛋白质序列中的T细胞表位。T细胞表位序列中的氨基酸根据其在MHC蛋白的结合沟中的位置来编号。存在于肽中的T细胞表位由7至30个氨基酸，例如8至25个氨基酸，但更特别地8至16个氨基酸组成，但最特别地由8、9、10、11、12、13、14、15或16个氨基酸组成。

[0270] 在一个更具体的实施方案中，T细胞表位由7、8或9个氨基酸的序列组成。在另一个具体实施方案中，T细胞表位是由MHC II类分子呈递给T细胞的表位[MHC II类限制性T细胞表位]。通常来说，T细胞表位序列是指适合MHC II蛋白的槽的八肽或更特别地是九肽序列。

[0271] 在一个更具体的实施方案中，T细胞表位由7、8或9个氨基酸的序列组成。在另一个具体实施方案中，T细胞表位是由CD1d分子呈递的表位[NKT细胞表位]。通常来说，NKT细胞表位序列是指与CD1d蛋白结合并由其呈递的7个氨基酸的肽序列。

[0272] 本发明的肽的T细胞表位可对应于蛋白质的天然表位序列，或者可以是其经修饰形式，前提是：与天然T细胞表位序列类似，经修饰T细胞表位保留其在MHC槽内结合或结合CD1d受体的能力。经修饰T细胞表位可具有与天然表位相同的对MHC蛋白或CD1d受体的结合亲和力，但也可具有降低的亲和力。特别地，经修饰肽的结合亲和力比原始肽小不少于10倍，更特别地小不少于5倍。本发明的肽对蛋白质复合体具有稳定作用。因此，肽-MHC或CD1d复合体的稳定作用补偿了经修饰表位对MHC或CD1d分子的降低的亲和力。

[0273] 包含肽内的T细胞表位和还原性化合物的序列可进一步与促进肽被摄取到晚期内体中以用于MHC II类决定簇中的加工和呈递的氨基酸序列(或另一种有机化合物)连接。晚期内体靶向是由存在于蛋白质的胞质尾区中的信号介导的，并且对应于公认的肽基序。晚期内体靶向序列允许通过MHC II类分子加工和高效呈递抗原来源的T细胞表位。这样的内体靶向序列包含在例如gp75蛋白(Vijayasaradhi et al.(1995)J.Cell.Biol.130,807-820)、人CD3γ蛋白、HLA-BM 11(Copier et al.(1996)J.lmmunol.157,1017-1027)、DEC205受体胞质尾区(Mahnke et al.(2000)J.Cell Biol.151,673-683)内。在Bonifacio和Traub(2003)Annu.Rev.Biochem.72,395-447的综述中公开了作为内体的分拣信号发挥作用的肽的其他实例。或者，该序列可以是来自蛋白质的亚优势或次要T细胞表位的序列，其促进晚期内体中的摄取但未克服T细胞对抗原的应答。晚期内体靶向序列可位于抗原来源肽的氨基端或羧基端，以用于有效摄取和加工，并且也可通过侧翼序列，例如多至10个氨基酸的肽序列偶联。当使用次要T细胞表位用于靶向目的时，后者通常位于抗原来源肽的氨基端。

[0274] 或者，本发明涉及包含疏水残基的肽的产生，所述疏水残基赋予与CD1d分子结合的能力。在施用之后，这样的肽被APC摄取，被引导至晚期内体，在那里它们被加载到CD1d上并在APC表面处呈递。所述疏水性肽的特征在于对应于通用序列[FW]-xx-[ILM]-xx[FWTH]或[FWTH]-xx-[ILM]-xx-[FW]的基序，其中P1位和P7位被例如苯丙氨酸(F)或色氨酸(W)的疏水残基占据。然而，P7在其接受苯丙氨酸或色氨酸的替代疏水残基(例如苏氨酸(T)或组氨酸(H))的意义上是自由的。P4位被例如异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)或甲硫氨酸(M)的脂肪族残基占据。本发明涉及由天然地构成CD1d结合基序的疏水残基构成的肽。在一些实施方案中，通常通过用提高与15CD1d结合的能力的残基进行替换来修饰所述基序的氨基酸残基。

在一个具体实施方案中，修饰基序以更紧密地适合于通用基序[FW]-xx-[ILM]-xx-[FWTH]。更特别地，产生在第7位包含F或W的肽。

[0275] 因此，本发明设想了抗原蛋白的肽及其在引发特异性免疫反应中的用途。这些肽可对应于在其序列内包含被至多10个，优选7个氨基酸或更少的氨基酸隔开的即还原性化合物和T细胞表位的蛋白质片段。或者，并且对于大多数抗原蛋白，本发明的肽是通过将本文中所述的还原性化合物(更特别地还原性经修饰氧化还原基序)在N端或C端地与抗原蛋白的T细胞表位偶联(或者与其直接相邻或用至多10个、更特别地至多7个氨基酸的接头)而产生的。此外，与天然存在的序列相比，可修饰蛋白质的T细胞表位序列和/或经修饰氧化还原基序和/或可引入(或修饰)一个或更多个侧翼序列和/或靶向序列。因此，取决于是否可在目的抗原蛋白的序列内发现本发明的特征，本发明的肽可包含“人工的”或“天然存在的”序列。

[0276] 本发明的肽的长度可显著变化。肽的长度可从13或14个氨基酸变化，即由8至9个氨基酸的表位组成，与用多至20、25、30、40或50个氨基酸的组氨酸修饰的氧化还原基序相邻。例如，肽可包含40个氨基酸的内体靶向序列、约2个氨基酸的侧翼序列、5个氨基酸的如本文中所述的基序、4个氨基酸的接头和9个氨基酸的T细胞表位肽。

[0277] 因此，在一些具体实施方案中，完整的肽由13个氨基酸至20、25、30、40、50、75或100个氨基酸组成。更特别地，在还原性化合物是如本文中所述的经修饰氧化还原基序的情况下，包含任选地通过接头连接的表位和经修饰氧化还原基序的(人工或天然)序列(本文中称为“表位-经修饰氧化还原基序”序列)(无内体靶向序列)的长度是至关重要的。“表位-经修饰氧化还原基序”更特别地具有13、14、15、16、17、18或19个氨基酸的长度。这样的13或14至19个氨基酸的肽可任选地与其大小不太关键的内体靶向信号偶联。

[0278] 如上所述，在一些具体实施方案中，本发明的肽包含与T细胞表位序列连接的如本文中所述的还原性经修饰氧化还原基序。

[0279] 在另一些具体实施方案中，本发明的肽是包含T细胞表位的肽，该T细胞表位不包含在其天然序列内具有氧化还原特性的氨基酸序列。

[0280] 然而，在一些替代实施方案中，T细胞表位可包含确保表位与MHC槽或CD1d分子结合的任何氨基酸序列。在抗原蛋白的目的表位在其表位序列内包含如本文中所述的经修饰氧化还原基序的情况下，根据本发明的免疫原性肽包含如本文中所述的经修饰氧化还原基序的序列和/或在N或C端与表位序列偶联使得(与埋在槽中的表位中存在的经修饰氧化还原基序相反)连接的经修饰氧化还原基序可确保还原活性的另一种还原序列的序列。

[0281] 因此，T细胞表位和基序彼此紧邻或隔开，并且不重叠。为了评估“紧邻”或“隔开”的概念，确定适合MHC槽或CD1d分子的8或9个氨基酸序列，并确定该八肽或九肽与氧化还原基序四肽或经修饰氧化还原基序五肽(包括组氨酸)之间的距离。

[0282] 通常来说，本发明的肽不是天然的(因此没有像这样的蛋白质片段)而是人工肽，其除T细胞表位之外还包含如本文中所述的经修饰氧化还原基序，由此通过由多至7个氨基酸、最特别地多至4个或多至2个氨基酸组成的接头将经修饰氧化还原基序与T细胞表位直接隔开。

[0283] 已表明，在向哺乳动物施用(即注射)包含氧化还原酶基序和MHC II类T细胞表位的肽(或包含这样的肽的组合物)之后，该肽引起识别抗原来源的T细胞表位的T细胞活化，

并通过降低表面受体向T细胞提供另外的信号。这种超佳的活化导致T细胞获得对呈递T细胞表位的细胞的细胞溶解特性，以及对旁观者T细胞的抑制特性。

[0284] 另外，已表明，在向哺乳动物施用(即注射)包含氧化还原酶基序和NKT细胞表位的肽(或包含这样的肽的组合物)之后，该肽引起识别抗原来源的T细胞表位的T细胞活化，并通过与CD1d表面受体结合向T细胞提供另外的信号。该活化导致NKT细胞获得对呈递T细胞表位的细胞的细胞溶解特性。

[0285] 以这种方式，本发明所述的肽或包含所述肽的组合物(其包含抗原来源的T细胞表位以及表位之外的经修饰氧化还原基序)可用于哺乳动物包括人的直接免疫接种。因此，本发明提供了用作药物的本发明的肽或其衍生物。因此，本发明提供了治疗方法，其包括向有此需要的患者施用一种或更多种根据本发明的肽。

[0286] 本发明提供了方法，通过该方法，被赋予细胞溶解特性的抗原特异性T细胞可通过用小肽进行的免疫接种来引起。已经发现包含以下的肽分别引起溶细胞性CD4+ T细胞或NKT细胞：(i)编码来自抗原的T细胞表位的序列和(ii)具有氧化还原特性的共有序列，并且另外任选地还包含促进该肽被摄取到晚期内体中以用于高效的MHC II类呈递或CD1d受体结合的序列。

[0287] 本发明肽的免疫原性特性在治疗和预防免疫反应中是特别令人感兴趣的。

[0288] 本文中所述的肽用作药物，更特别地用于制造用于在哺乳动物中(更特别地在人中)预防或治疗免疫疾病的药物。

[0289] 本发明描述了通过使用本发明的肽、其同源物或衍生物来治疗或预防需要这样的治疗或预防的哺乳动物的免疫疾病的方法，该方法包括向患有免疫疾病或处于免疫疾病的风险之中的所述哺乳动物施用治疗有效量的本发明的肽、其同源物或衍生物例如以降低免疫疾病的症状的步骤。设想了对人和动物(例如宠物和农场动物)二者的治疗。在一个实施方案中，待治疗的哺乳动物是人。在一个具体实施方案中，上述免疫疾病选自变应性疾病和自身免疫病。

[0290] 优选通过皮下或肌内施用来施用本发明的肽或包含如本文中所限定的这样的肽的药物组合物。优选地，可将肽或包含这样的肽的药物组合物皮下(SC)注射到位于肘和肩中间的上臂的外侧部的区域中。当需要两次或更多次独立注射时，其可同时在两条臂中施用。

[0291] 以治疗有效剂量施用根据本发明的肽或包含这样的肽的药物组合物。示例性但非限制性的剂量方案为50至1500μg，优选100至1200μg。根据患者的状况和疾病的严重程度，更具体的剂量方案可以是50至250μg、250至450μg、或850至1300μg。剂量方案可包括同时或连续地以单剂量或以2、3、4、5或更多次剂量施用。示例性的非限制性施用方案如下：

[0292] -低剂量方案，其包括以每次25μg(每次100μL)的两次独立注射SC施用50μg肽，随后是25μg肽(如同每次12.5μg(每次50μL)的两次独立注射一样)的三次连续注射。

[0293] -中剂量方案，其包括以每次75μg(每次300μL)的两次独立注射SC施用150μg肽，随后是75μg肽(如同每次37.5μg(每次150μL)的两次独立注射一样)的三次连续施用。

[0294] -高剂量方案，其包括以每次225μg(每次900μL)的两次独立注射SC施用450μg肽，随后是225μg肽(如同每次112.5μg(每次450μL)的两次独立注射一样)的三次连续施用。

[0295] 包含已知氧化还原酶基序和T细胞表位的免疫原性肽的示例性剂量方案可在

ClinicalTrials.gov上以标识符NCT03272269找到。

[0296] 本发明提供了免疫原性肽，其包含任选地被0至7个氨基酸的接头隔开的改善的氧化还原酶基序和抗原蛋白的T细胞表位。

[0297] 所述改善的氧化还原酶基序选自包含以下的组：

[0298] (i)[CST](Z1)+XC或C(Z1)+X[CST]；

[0299] 其中(Z1)+是非H或R的碱性氨基酸；

[0300] 其中X是任意氨基酸；

[0301] 其中(B1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；

[0302] (ii)[CST]X(Z2)+C、CX(Z2)+[CST]、(Z2)+(B1)n[CST]XXC或(Z2)+(B1)nCXX[CST]；

[0303] 其中(Z2)+是非H的碱性氨基酸；

[0304] 其中X是任意氨基酸；

[0305] 其中(B1)是任意氨基酸，并且其中n是0至3的整数；或者

[0306] (iii)[CST]XXC(B2)m(Z3)+或CXX[CST](B2)m(Z3)+；

[0307] 其中(Z3)+是碱性氨基酸，

[0308] 其中X是任意氨基酸；

[0309] 其中(B2)是任意氨基酸，并且其中m是0至3的整数，前提是当(Z3)+是R时，m是0；并且当(Z3)+是H时，m是0或1。

[0310] 优选地，所述X选自：G、A、V、L、I、M、F、W、P、S、T、C、Y、N、Q、D、E、K和R、H，或选自以下的非天然碱性氨基酸：

[0311] • 赖氨酸变体，例如Fmoc-β-Lys(Boc)-OH(CAS号219967-68-7)、Fmoc-Orn(Boc)-OH(也称为L-鸟氨酸或鸟氨酸)(CAS号109425-55-0)、Fmoc-β-Homolys(Boc)-OH(CAS号203854-47-1)、Fmoc-Dap(Boc)-OH(CAS号162558-25-0)或Fmoc-Lys(Boc)OH(DiMe)-OH(CAS号441020-33-3)；

[0312] • 酪氨酸/苯丙氨酸变体，例如Fmoc-L-3Pal-OH(CAS号175453-07-3)、Fmoc-β-HomoPhe(CN)-OH(CAS号270065-87-7)、Fmoc-L-β-HomoAla(4-吡啶基)-OH(CAS号270065-69-5)或Fmoc-L-Phe(4-NHBoc)-OH(CAS号174132-31-1)；

[0313] • 脯氨酸变体，例如Fmoc-Pro(4-NHBoc)-OH(CAS号221352-74-5)或Fmoc-Hyp(tBu)-OH(CAS号122996-47-8)；

[0314] • 精氨酸变体，例如Fmoc-β-Homoarg(Pmc)-OH(CAS号700377-76-0)。

[0315] 在一些优选的实施方案中，(Z1)+选自包含以下的组：K、R或非天然碱性氨基酸；和/或(Z2)+和/或(Z3)+各自单独地选自包含以下的组：K、H、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在一个优选的实施方案中，(Z1)+、(Z2)+和/或(Z3)+可各自独立地是K或L-鸟氨酸。

[0316] 在一些优选的实施方案中，X是除C、S或T之外的任意氨基酸。

[0317] 在一些实施方案中，B1和/或B2是H。

[0318] 在一些实施方案中，X是除碱性氨基酸之外的任意氨基酸。

[0319] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST](Z1)+XC或C(Z1)+X[CST]，其中X是酪氨酸(Y)，例如：C(Z1)+YC、S(Z1)+YC、T(Z1)+YC、C(Z1)+YC、C(Z1)+YS、C(Z1)+YT。在所述基序的任一种中，(Z1)+可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，(Z1)+是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0320] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]，其中X是脯氨酸(P)，例如：CP$(Z_2)^+$C、SP$(Z_2)^+$C、TP$(Z_2)^+$C、CP$(Z_2)^+$C、CP$(Z_2)^+$S、CP$(Z_2)^+$T。在所述基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0321] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]，其中X是甘氨酸(G)，例如：C$(Z_1)^+$GC、S$(Z_1)^+$GC、T$(Z_1)^+$GC、C$(Z_1)^+$GC、C$(Z_1)^+$GS、C$(Z_1)^+$GT。在所述基序的任一种中，$(Z_1)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_1)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0322] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]，其中X是组氨酸(H)，例如：CH$(Z_2)^+$C、SH$(Z_2)^+$C、TH$(Z_2)^+$C、CH$(Z_2)^+$C、CH$(Z_2)^+$S、CH$(Z_2)^+$T。在所述基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0323] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]，其中X为脯氨酸(P)，例如：C$(Z_1)^+$PC、S$(Z_1)^+$PC、T$(Z_1)^+$PC、C$(Z_1)^+$PC、C$(Z_1)^+$PS、C$(Z_1)^+$PT。在所述基序的任一种中，$(Z_1)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_1)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0324] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]，其中X是甘氨酸(G)，例如：CG$(Z_2)^+$C、SG$(Z_2)^+$C、TG$(Z_2)^+$C、CG$(Z_2)^+$C、CG$(Z_2)^+$S、CG$(Z_2)^+$T。在所述基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0325] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]，其中X为脯氨酸(P)，例如：C$(Z_1)^+$PC、S$(Z_1)^+$PC、T$(Z_1)^+$PC、C$(Z_1)^+$PC、C$(Z_1)^+$PS、C$(Z_1)^+$PT。在所述基序的任一种中，$(Z_1)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_1)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0326] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]，其中X是苯丙氨酸(F)，例如：C$(Z_1)^+$FC、S$(Z_1)^+$FC、T$(Z_1)^+$FC、C$(Z_1)^+$FC、C$(Z_1)^+$FS、C$(Z_1)^+$FT。在所述基序的任一种中，$(Z_1)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_1)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0327] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]，其中X是组氨酸(H)，例如：C$(Z_1)^+$HC、S$(Z_1)^+$HC、T$(Z_1)^+$HC、C$(Z_1)^+$HC、C$(Z_1)^+$HS、C$(Z_1)^+$HT。在所述基序的任一种中，$(Z_1)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_1)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0328] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]X$(Z_2)^+$C或CX$(Z_2)^+$[CST]，其中X是精氨酸(R)，例如：CR$(Z_2)^+$C、SR$(Z_2)^+$C、TR$(Z_2)^+$C、CR$(Z_2)^+$C、CR$(Z_2)^+$S、CR$(Z_2)^+$T。在所述基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0329] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]$(Z_1)^+$XC或C$(Z_1)^+$X[CST]，其中X是亮氨酸(L)，例如：C$(Z_1)^+$LC、S$(Z_1)^+$LC、T$(Z_1)^+$LC、C$(Z_1)^+$LC、C$(Z_1)^+$LS、C$(Z_1)^+$LT。在所述基序的任一种中，$(Z_1)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H和/或优选不是R。在一些具体

实例中，$(Z_1)^+$是K或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。

[0330] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]PYC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CPY[CST]，例如$(Z_2)^+(B^1)_n$CPYC、$(Z_2)^+(B^1)_n$SPYC、$(Z_2)^+(B^1)_n$TPYC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CPYC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CPYS或$(Z_2)^+(B^1)_n$CPYT。在这些基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^1)可以是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且n是0至3的整数。

[0331] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]HGC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CHG[CST]，例如$(Z_2)^+(B^1)_n$CHGC、$(Z_2)^+(B^1)_n$SHGC、$(Z_2)^+(B^1)_n$THGC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CHGC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CHGS或$(Z_2)^+(B^1)_n$CHGT。在这些基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^1)可以是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且n是0至3的整数。

[0332] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]GPC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CGP[CST]，例如$(Z_2)^+(B^1)_n$CGPC、$(Z_2)^+(B^1)_n$SGPC、$(Z_2)^+(B^1)_n$TGPC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CGPC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CGPS或$(Z_2)^+(B^1)_n$CGPT。在这些基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^1)可以是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且n是0至3的整数。

[0333] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]GHC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CGH[CST]，例如$(Z_2)^+(B^1)_n$CGHC、$(Z_2)^+(B^1)_n$SGHC、$(Z_2)^+(B^1)_n$TGHC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CGHC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CGHS或$(Z_2)^+(B^1)_n$CGHT。在这些基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^1)可以是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且n是0至3的整数。

[0334] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]GFC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CGF[CST]，例如$(Z_2)^+(B^1)_n$CGFC、$(Z_2)^+(B^1)_n$SGFC、$(Z_2)^+(B^1)_n$TGFC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CGFC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CGFS或$(Z_2)^+(B^1)_n$CGFT。在这些基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^1)可以是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且n是0至3的整数。

[0335] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]RLC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CRL[CST]，例如$(Z_2)^+(B^1)_n$CRLC、$(Z_2)^+(B^1)_n$SRLC、$(Z_2)^+(B^1)_n$TRLC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CRLC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CRLS或$(Z_2)^+(B^1)_n$CRLT。在这些基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^1)可以是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且n是0至3的整数。

[0336] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]HPC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CHP[CST]，例如$(Z_2)^+(B^1)_n$CHPC、$(Z_2)^+(B^1)_n$SHPC、$(Z_2)^+(B^1)_n$THPC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CHPC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CHPS或$(Z_2)^+(B^1)_n$CHPT。在这些基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^1)可以是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且n是0至3的整数。

[0337] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是$(Z_2)^+(B^1)_n$[CST]HGC或$(Z_2)^+(B^1)_n$CHG[CST]，例如$(Z_2)^+(B^1)_n$CHGC、$(Z_2)^+(B^1)_n$SHGC、$(Z_2)^+(B^1)_n$THGC、$(Z_2)^+(B^1)_n$CHGCS、$(Z_2)^+(B^1)_n$CHGS或$(Z_2)^+(B^1)_n$CHGT。在这些基序的任一种中，$(Z_2)^+$可以是任意碱性氨基酸，优选不

是H。在一些具体实例中，$(Z_2)^+$是K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^1)可以是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且n是0至3的整数。

[0338] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]PYC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CPY[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，例如CPYC$(B^2)_m(Z_3)^+$、SPYC$(B^2)_m(Z_3)^+$、TPYC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CPYC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CPYS$(B^2)_m(Z_3)^+$或CPYT$(B^2)_m(Z_3)^+$。在这些基序的任一种中，$(Z_3)^+$可以是任意碱性氨基酸。在一些具体实例中，$(Z_3)^+$是H、K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^2)是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且其中m是0至3的整数，前提是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；并且当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1。

[0339] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]HGC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CHG[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，例如CHGC$(B^2)_m(Z_3)^+$、SHGC$(B^2)_m(Z_3)^+$、THGC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CHGC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CHGS$(B^2)_m(Z_3)^+$或CHGT$(B^2)_m(Z_3)^+$。在这些基序的任一种中，$(Z_3)^+$可以是任意碱性氨基酸。在一些具体实例中，$(Z_3)^+$是H、K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^2)是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且其中m是0至3的整数，前提是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；并且当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1。

[0340] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]GPC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CGP[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，例如CGPC$(B^2)_m(Z_3)^+$、SGPC$(B^2)_m(Z_3)^+$、TGPC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CGPC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CGPS$(B^2)_m(Z_3)^+$或CGPT$(B^2)_m(Z_3)^+$。在这些基序的任一种中，$(Z_3)^+$可以是任意碱性氨基酸。在一些具体实例中，$(Z_3)^+$是H、K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^2)是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且其中m是0至3的整数，前提是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；并且当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1。

[0341] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]GHC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CGH[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，例如CGHC$(B^2)_m(Z_3)^+$、SGHC$(B^2)_m(Z_3)^+$、TGHC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CGHC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CGHS$(B^2)_m(Z_3)^+$或CGHT$(B^2)_m(Z_3)^+$。在这些基序的任一种中，$(Z_3)^+$可以是任意碱性氨基酸。在一些具体实例中，$(Z_3)^+$是H、K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^2)是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且其中m是0至3的整数，前提是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；并且当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1。

[0342] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]GFC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CGF[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，例如CGFC$(B^2)_m(Z_3)^+$、SGFC$(B^2)_m(Z_3)^+$、TGFC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CGFC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CGFS$(B^2)_m(Z_3)^+$或CGFT$(B^2)_m(Z_3)^+$。在这些基序的任一种中，$(Z_3)^+$可以是任意碱性氨基酸。在一些具体实例中，$(Z_3)^+$是H、K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^2)是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且其中m是0至3的整数，前提是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；并且当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1。

[0343] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]RLC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CRL[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，例如CRLC$(B^2)_m(Z_3)^+$、SRLC$(B^2)_m(Z_3)^+$、TRLC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CRLC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CRLS$(B^2)_m(Z_3)^+$或CRLT$(B^2)_m(Z_3)^+$。在这些基序的任一种中，$(Z_3)^+$可以是任意碱性氨基酸。在一些具体实例中，$(Z_3)^+$是H、K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^2)是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且其中m是0至3的整数，前提是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；并且当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1。

[0344] 在一个优选的实施方案中，所述氧化还原酶基序是[CST]HPC$(B^2)_m(Z_3)^+$或CHP

[CST]$(B^2)_m(Z_3)^+$，例如CHPC$(B^2)_m(Z_3)^+$、SHPC$(B^2)_m(Z_3)^+$、THPC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CHPC$(B^2)_m(Z_3)^+$、CHPS$(B^2)_m(Z_3)^+$或CHPT$(B^2)_m(Z_3)^+$。在这些基序的任一种中，$(Z_3)^+$可以是任意碱性氨基酸。在一些具体实例中，$(Z_3)^+$是H、K、R或如本文中所限定的非天然碱性氨基酸。在这些基序的任一种中，(B^2)是任意氨基酸，优选H，或者不是碱性氨基酸，并且其中m是0至3的整数，前提是当$(Z_3)^+$是R时，m是0；并且当$(Z_3)^+$是H时，m是0或1。

[0345] 在以上公开的所述示例性氧化还原酶基序的一个优选实施方案中，B^1和/或B^2为H。

[0346] 该方面的一些特别优选的实例包括以下氧化还原酶基序之一：

[0347] KCXXC，其中X是任意氨基酸，优选RCPYC、RCGHC或RCHGC；

[0348] KCXXC，其中X是任意氨基酸，优选KCPYC、KCGHC或KCHGC；

[0349] KHCXXC，其中X是任意氨基酸，优选RHCPYC、RHCGHC或RHCHGC；

[0350] KRCXXC，其中X是任意氨基酸，优选KHCPYC、KHCGHC或KHCHGC；

[0351] CXRC，其中X是任意氨基酸，优选CGRC、CPRC、CHRC；

[0352] CXKC，其中X是任意氨基酸，优选CGKC、CPKC、CHKC；

[0353] CXXCK，其中X是任意氨基酸，优选CHGCK、CPYCK、CGHCK；

[0354] CXXCHK，其中X是任意氨基酸，优选CHGCHK、CPYCHK、CGHCHK；

[0355] CXXCR，其中X是任意氨基酸，优选CHGCR、CPYCR、CGHCR；

[0356] CXXCHR，其中X是任意氨基酸，优选CHGCHR、CPYCHR、CGHCHR；

[0357] KCKXC、RCKXC、KCRXC或RCRXC，其中X是任意氨基酸

[0358] KCXKC、RCXKC、KCXRC或RCXRC，其中X是任意氨基酸

[0359] KCKXCK、RCKXCK、KCRXCK、KCKXCR、RCRXCK、RCKXCR、

[0360] KCRXCR或RCRXCR，其中X是任意氨基酸

[0361] KCKXCHK、RCKXCHK、KCRXCHK、KCKXCHR、RCRXCHK、RCKXCHR、KCRXCHR或RCRXCHR，其中X是任意氨基酸

[0362] KCXXCK、KCXXCR、RCXXCK或RCXXCR，其中X是任意氨基酸

[0363] KCXXCHK、KCXXCHR、RCXXCHK、RCXXCHR，其中X是任意氨基酸

[0364] KCXKCK、RCXKCK、KCXRCK、KCXKCR、RCXRCK、RCXKCR、KCXRCR或RCXRCR，其中X是任意氨基酸

[0365] KCXKCHK、RCXKCHK、KCXRCHK、KCXKCHR、RCXRCHK、RCXKCHR、KCXRCHR或RCXRCHR，其中X是任意氨基酸。

[0366] 本发明的肽还可在用于在样品中检测II类限制性CD4+ T细胞的体外诊断方法中使用。在该方法中，使样品与II类MHC分子与根据本发明的肽的复合体接触。CD4+ T细胞通过测量复合体与样品中细胞的结合来检测，其中复合体与细胞的结合指示样品中CD4+ T细胞的存在。复合体可以是肽与MHC II类分子的融合蛋白。或者，复合体中的MHC分子是四聚体。复合体可作为可溶性分子提供或者可连接至载体。

[0367] 本发明的肽还可在用于在样品中检测NKT细胞的体外诊断方法中使用。在该方法中，使样品与CD1d分子与根据本发明的肽的复合体接触。NKT细胞通过测量复合体与样品中细胞的结合来检测，其中复合体与细胞的结合指示样品中NKT细胞的存在。复合体可以是肽与CD1d分子的融合蛋白。

[0368] 因此，在一些具体实施方案中，本发明的治疗和预防方法包括施用如本文中所述

的免疫原性肽，其中所述肽包含抗原蛋白的T细胞表位，其在待治疗的疾病中起作用(例如如以上描述的那些)。在另一些具体实施方案中，使用的表位是显性表位。

[0369] 根据本发明的肽将通过合成其中T细胞表位与经修饰氧化还原基序将被0至5个氨基酸隔开的肽来制备。在某些实施方案中，经修饰氧化还原基序可通过在表位序列之外引入1、2或3个突变来获得，以保留如在蛋白质中存在的序列背景。通常来说，参照作为天然序列的一部分的九肽，P-2和P-1以及P+10和P+11中的氨基酸被保留在肽序列中。这些侧翼残基通常使与MHC II类或CD1d分子的结合稳定化。在另一些实施方案中，表位的序列N端或C端将与包含T细胞表位序列的抗原蛋白的序列无关。

[0370] 因此，基于以上用于设计肽的方法，通过化学肽合成、重组表达方法或在更特殊情况下的蛋白质的蛋白水解碎裂或化学碎裂来产生肽。

[0371] 可在体外和体内方法中测试如在上述方法中产生的肽的T细胞表位的存在，并且可在体外测定中测试其还原活性。作为最终的质量控制，可在体外测定中测试肽以验证肽是否可产生CD4+ T或NKT细胞，这些细胞通过凋亡途径对呈递包含表位序列(其也存在于具有经修饰氧化还原基序的肽中)的抗原的抗原呈递细胞进行细胞溶解。

[0372] 可使用重组DNA技术在细菌、酵母菌、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞中产生本发明的肽。考虑到肽的有限长度，其可通过化学肽合成来制备，其中通过将不同的氨基酸彼此偶联来制备肽。化学合成特别适合于包含例如D-氨基酸、具有非天然存在侧链的氨基酸或具有经修饰侧链的天然氨基酸，例如甲基化半胱氨酸。

[0373] 化学肽合成方法已被充分描述，并且肽可从例如Applied Biosystems和其他公司的公司订购。

[0374] 肽合成可以作为固相肽合成(solid phase peptide synthesis，SPPS)或与液相肽合成相反地进行。最著名的SPPS方法是t-Boc和Fmoc固相化学：

[0375] 在肽合成期间，使用了数个保护基。例如，羟基和羧基官能团被叔丁基保护，赖氨酸和色氨酸被t-Boc基团保护，并且天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸和组氨酸被三苯甲基保护，并且精氨酸被pbf基团保护。如果合适的话，这样的保护基可在合成之后留在肽上。可使用如Kent(Schnelzer&Kent(1992)lnt.J.Pept.Protein Res.40，180-193)最初所描述并且例如在Tam et al.(2001)Biopolymers 60，194-205中所综述的连接策略(两个未经保护的肽片段的化学选择性偶联)将肽彼此连接以形成更长的肽，所述连接策略为实现超出SPPS范围的蛋白质合成提供了巨大的潜力。通过这种方法已成功地合成了许多大小为100至300个残基的蛋白质。由于SPPS的巨大进步，合成肽在生物化学、药理学、神经生物学、酶学和分子生物学的研究领域中继续发挥着越来越重要的作用。

[0376] 或者，可通过使用在合适的表达载体中编码本发明肽的包含编码核苷酸序列的核酸分子来合成肽。这样的DNA分子可使用自动DNA合成仪和遗传密码的公知密码子-氨基酸关系来容易地制备。这样的DNA分子还可使用寡核苷酸探针和常规杂交方法作为基因组DNA或作为cDNA来获得。可将这样的DNA分子并入到表达载体(包括质粒)中，所述表达载体适合于在合适的宿主中表达DNA和生产多肽，所述合适的宿主例如细菌(例如大肠杆菌(Escherichia coli))、酵母菌细胞、动物细胞或植物细胞。

[0377] 检查目的肽的物理和化学特性(例如溶解性、稳定性)，以确定该肽是否/将是否适合用于治疗性组合物中。通常来说，这是通过调节肽的序列来优化的。任选地，可在合成之

后使用本领域已知的技术对肽进行修饰(化学修饰,例如添加/缺失官能团)。

[0378] 包含标准氧化还原酶基序和MHC II类T细胞表位的免疫原性肽的作用机制由上文引用的PCT申请WO2008/017517和本发明人的出版物中公开的实验数据证实。包含标准氧化还原酶基序和结合CD1d的NKT细胞表位的免疫原性肽的作用机制由上文引用的PCT申请WO2012/069568和本发明人的出版物中公开的实验数据证实。

[0379] 本发明提供了用于在体内或体外产生抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞(当使用如本文中所公开的包含MHC II类表位的免疫原性肽时)或抗原特异性溶细胞性NKT细胞(当使用如本文中所公开的包含结合CD1d分子的NKT细胞表位的免疫原性肽时)的方法。

[0380] 本发明描述了用于产生抗原特异性CD4+ T细胞或NKT细胞的体内方法。一个具体实施方案涉及用于通过以下来产生或分离CD4+ T细胞或NKT细胞的方法:用如本文中所述的本发明的肽来免疫接种动物(包括人),并随后从经免疫接种的动物中分离CD4+ T细胞或NKT细胞。本发明描述了用于产生针对APC的抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞或NKT细胞的体外方法。本发明提供了用于产生针对APC的抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞和NKT细胞的方法。

[0381] 在一个实施方案中,提供了方法,其包括分离外周血细胞,通过根据本发明的免疫原性肽体外刺激细胞群,以及扩增经刺激的细胞群,更特别地在存在IL-2的情况下。根据本发明的方法具有以下优点:产生大量的CD4+ T细胞,并且可产生对抗原蛋白具有特异性的CD4+ T细胞(通过使用包含抗原特异性表位的肽)。

[0382] 在一个替代实施方案中,CD4+ T细胞可在体内产生,即通过向对象注射本文中所述的免疫原性肽,并收集体内产生的溶细胞性CD4+ T细胞。

[0383] 可通过本发明的方法获得的针对APC的抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞对于施用于哺乳动物以用于免疫治疗、预防变态反应以及治疗自身免疫病是特别令人感兴趣的。设想了使用同种异基因细胞和自体细胞(autogeneic cell)二者。

[0384] 如本文中下文所述获得溶细胞性CD4+ T细胞群。

[0385] 在一个实施方案中,本发明提供了扩增特定NKT细胞的方法,作为结果其具有包括但不限于以下的提高的活性:

[0386] (i)细胞因子产生提高

[0387] (ii)抗原呈递细胞的接触依赖性和可溶性因子依赖性的消除提高。因此,结果是针对胞内病原体、自身抗原、同种因子、变应原、肿瘤细胞的更有效的应答,以及对针对用于基因治疗/基因疫苗接种的移植物和病毒蛋白的免疫应答的更有效的抑制。

[0388] 本发明还涉及在体液或器官中鉴定具有所需特性的NKT细胞。该方法包括通过其表面表型鉴定NKT细胞,所述表面表型包括NK1.1、CD4、NKG2D和CD244的表达。然后使细胞与限定为能够由CD1d分子呈递的肽的NKT细胞表位接触。然后在IL-2或IL-15或IL-7的存在下体外扩增细胞。

[0389] 如本文中所述的抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞或NKT细胞可用作药物,更特别地用于过继细胞治疗,更特别地用于治疗急性变态反应和自身免疫病(例如多发性硬化)的复发。如所述地分离的溶细胞性CD4+ T细胞或NKT细胞或细胞群,更特别地如所述地产生的抗原特异性溶细胞性CD4+ T细胞或NKT细胞群用于制备用于预防或治疗免疫疾病的药物。公开了通过使用分离的或产生的溶细胞性CD4+ T细胞或NKT细胞进行治疗的方法。

[0390] 如WO2008/017517中所述的，基于细胞的表达特征，可将针对APC的溶细胞性CD4+ T细胞与天然Treg细胞区分开。更特别地，与天然Treg细胞群相比，溶细胞性CD4+ T细胞群表现出一种或更多种以下特征：活化之后表面标志物(包括CD103、CTLA-4、Fasl和ICOS)的表达提高，CD25中等表达，CD4、ICOS、CTLA-4、GITR表达，以及CD127(IL7-R)表达较低或不表达，CD27不表达，转录因子T-bet和egr-2(Krox-20)表达，但转录阻遏物Foxp3不表达、IFN-γ大量产生以及没有或有仅痕量的IL-10、IL-4、IL-5、IL-13或TGF-β。

[0391] 此外，溶细胞性T细胞表达CD45RO和/或CD45RA，不表达CCR7、CD27，并且呈递高水平的颗粒酶B和其他颗粒酶以及Fas配体。

[0392] 如WO2008/017517中所述的，基于细胞的表达特征，可将针对APC的溶细胞性NKT细胞与非溶细胞性NKT细胞区分开。更特别地，与非溶细胞性NKT细胞群相比，溶细胞性CD4+ NKT细胞群表现出一种或更多种以下特征：NK1.1、CD4、NKG2D和CD244的表达。

[0393] 在施用于活的动物(通常是人)之后，本发明的肽将引起对旁观者T细胞发挥抑制活性的特异性T细胞。

[0394] 在一些具体实施方案中，本发明的溶细胞性细胞群的特征在于FasL和/或干扰素γ的表达。在一些具体实施方案中，本发明的溶细胞性细胞群的特征还在于颗粒酶B的表达。

[0395] 该机制还意味着并且实验结果表明，本发明的肽尽管包含某些抗原的特定T细胞表位，但可用于预防或治疗由针对同一抗原的其他T细胞表位的免疫反应引起的疾病，或者在某些情况下甚至用于治疗由针对其他不同抗原的其他T细胞表位的免疫反应引起的疾病，如果所述其他不同的抗原由在本发明的肽活化的T细胞附近的MHC II类分子或CD1d分子通过相同的机制来呈递的话。

[0396] 公开了具有上述特征的细胞类型的分离的细胞群，其另外是抗原特异性的，即能够抑制抗原特异性免疫应答。

[0397] 本发明提供了包含一种或更多种根据本发明的肽的药物组合物，其还包含可药用载体。如上所详述的，本发明还涉及用作药物的组合物或通过使用所述组合物来治疗哺乳动物免疫疾病的方法，以及所述组合物用于制造用于预防或治疗免疫疾病的药物的用途。药物组合物可例如是疫苗，其适用于治疗或预防免疫疾病，尤其是空气源性(airborne)和食源性(foodborne)的变态反应以及变应性来源的疾病。作为本文中另外描述的药物组合物的一个实例，将根据本发明的肽吸附在适合于向哺乳动物施用的佐剂上，例如氢氧化铝(明矾)。通常来说，以2周的间隔通过皮下途径注射3次50μg的吸附在明矾上的肽。对于本领域技术人员来说应明显的是，其他施用途径也是可能的，包括经口、鼻内或肌内。同样，注射次数和注射量可根据待治疗的病症而变化。此外，可使用除明矾之外的其他佐剂，前提是其促进MHC II类呈递中的肽呈递和T细胞活化。因此，尽管可单独施用活性成分，但它们通常以药物制剂存在。本发明的制剂，用于兽用用途和用于人用途二者，均包含至少一种如上所述的活性成分以及一种或更多种可药用载体。本发明涉及药物组合物，其包含与可药用载体混合的作为活性成分的一种或更多种根据本发明的肽。本发明的药物组合物应包含治疗有效量的活性成分，例如下文关于治疗或预防方法所指示的。任选地，组合物还包含其他治疗性成分。合适的其他治疗性成分以及其取决于其所属类别的常规剂量是本领域技术人员公知的，并且可选自用于治疗免疫疾病的其他已知药物。

[0398] 本文中使用的术语“可药用载体”意指与活性成分一起配制以便于例如通过溶解、分散或扩散该组合物来促进其在待治疗的部位的施加或散布，和/或在不损害其效力的情况下促进其存储、运输或处理的任何材料或物质。可药用载体包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂(例如苯酚、山梨酸、氯丁醇)、等张剂(例如糖或氯化钠)等。为了控制组合物中免疫原性肽的作用持续时间，可包含另外的成分。可药用载体可以是固体或液体或已被压缩以形成液体的气体，即本发明的组合物可合适地用作浓缩剂、乳剂、溶液剂、颗粒剂、粉尘剂、喷雾剂、气雾剂、混悬剂、软膏剂、乳膏剂、片剂、丸剂或粉剂。用于药物组合物及其制剂的合适的药物载体是本领域技术人员公知的，并且在本发明内对其选择没有特别限制。可药用载体还可包括添加剂，例如润湿剂、分散剂、黏贴剂(sticker)、黏合剂、乳化剂、溶剂、包衣、抗细菌和抗真菌剂(例如苯酚、山梨酸、氯丁醇)、等张剂(例如糖或氯化钠)等，前提是它们与药学实践一致，即不会对哺乳动物造成永久损害的载体和添加剂。本发明的药物组合物可以以任何已知方式制备，例如通过以一步或多步操作将活性成分与所选的载体材料以及(合适的话)其他添加剂(例如表面活性剂)一起均质地混合、包衣和/或研磨来制备。它们也可通过微粉化(micronisation)来制备，例如，考虑到以通常具有约1至10μm直径的微球形式获得它们，即用于制造用于受控或持续释放活性成分的微胶囊剂。

[0399] 待用于本发明药物组合物中的合适的表面活性剂(也称为乳化剂(emulgent)或乳化剂(emulsifier))是具有良好的乳化、分散和/或润湿特性的非离子型、阳离子型和/或阴离子型材料。合适的阴离子型表面活性剂包括水溶性皂和水溶性合成表面活性剂。合适的皂是碱金属盐或碱土金属盐，高级脂肪酸(C10至C22)的未经取代或经取代的铵盐，例如油酸或硬脂酸的钠盐或钾盐，或可从椰子油或动物脂油(tallow oil)获得的天然脂肪酸混合物的钠盐或钾盐。合成的表面活性剂包括聚丙烯酸的钠盐或钙盐；脂肪磺酸盐和硫酸盐；磺化苯并咪唑衍生物和烷基芳基磺酸盐。脂肪磺酸盐或硫酸盐通常为以下形式：碱金属盐或碱土金属盐，具有8至22个碳原子的未经取代的铵盐或经烷基或酰基基团取代的铵盐，例如，木素磺酸(lignosulphonic acid)或十二烷基磺酸的钠盐或钙盐，或者从天然脂肪酸中获得的脂肪醇硫酸盐、硫酸酯或磺酸酯的碱金属盐或碱土金属盐(例如月桂基硫酸钠)和脂肪醇/环氧乙烷加合物的磺酸的混合物。合适的磺化苯并咪唑衍生物通常包含8至22个碳原子。烷基芳基磺酸盐的一些实例是十二烷基苯磺酸或二丁基萘磺酸或萘磺酸/甲醛缩合产物的钠盐、钙盐或链烷醇胺盐。同样合适的是相应的磷酸盐，例如磷酸酯的盐，以及对壬基苯酚与环氧乙烷和/或环氧丙烷的加合物，或磷脂。用于此目的的合适的磷脂是脑磷脂或卵磷脂类型的天然的(来源于动物或植物细胞的)或合成的磷脂，例如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、溶血卵磷脂、心磷脂、二辛酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱，及其混合物。

[0400] 合适的非离子型表面活性剂包括在分子中包含至少12个碳原子的烷基酚、脂肪醇、脂肪酸、脂肪族胺或酰胺的聚乙氧基化和聚丙氧基化衍生物；烷基芳烃磺酸盐和二烷基磺基琥珀酸盐，例如脂肪醇和环脂肪醇、饱和和不饱和脂肪酸和烷基酚的聚乙二醇醚衍生物，这些衍生物通常在烷基酚的(脂肪族)烃部分中包含3至10个二醇醚基和8至20个碳原子，并且在烷基部分中包含6至18个碳原子。另外的合适的非离子型表面活性剂是聚环氧乙烷与聚丙二醇、在烷基链中包含1至10个碳原子的乙二氨基聚丙二醇(ethylenediaminopolypropylene glycol)的水溶性加合物，该加合物包含20至250个乙二

醇醚基和/或10至100个丙二醇醚基。这样的化合物通常包含1至5个乙二醇单元/丙二醇单元。非离子型表面活性剂的代表性实例是壬基酚-聚乙氧基乙醇、蓖麻油聚乙醇酸醚(castor oil polyglycolic ether)、聚环氧丙烷/聚环氧乙烷加合物、三丁基苯氧基聚乙氧基乙醇、聚乙二醇和辛基苯氧基聚乙氧基乙醇。如下物质的脂肪酸酯也是合适的非离子型表面活性剂:聚乙烯脱水山梨糖醇(例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇三油酸酯)、甘油、脱水山梨糖醇、蔗糖和季戊四醇。合适的阳离子型表面活性剂包括季铵盐,特别是卤化物,其具有4个任选地被卤素、苯基、经取代的苯基或羟基取代的烃基;例如包含至少一个C8C22烷基(例如鲸蜡基、月桂基、棕榈基、肉豆蔻基、油基等)作为N-取代基以及未经取代或卤代的低级烷基、苄基和/或羟基-低级烷基作为另外的取代基的季铵盐。

[0401] 适用于此目的的表面活性剂的更详细描述可见于例如“McCutcheon′s Detergents and Emulsifiers Annual”(MC Publishing Crop.,Ridgewood,New Jersey,1981)、“Tensid-Taschenbucw”第2版(Hanser Verlag,Vienna,1981)和“表面活性剂百科全书(Encyclopaedia of Surfactants)”(Chemical Publishing Co.,New York,1981)中。根据本发明的肽、其同源物或衍生物(以及全部包括在术语“活性成分”中的其生理上可接受的盐或药物组合物)可通过适合于待治疗病症并且适合于所述化合物的任何途径来施用,在此施用蛋白质和片段。可能的途径包括局部、全身、经口(固体形式或吸入)、经直肠、经鼻、局部(包括经眼、经颊和舌下)、经阴道和肠胃外(包括皮下、肌内、静脉内、皮内、动脉内、鞘内和硬膜外)。优选的施用途径可根据例如接受者的状况或待治疗的疾病而变化。如本文中所述,在与制剂的其他成分相容并且对其接受者无害的意义上,载体最佳地是“可接受的”。所述制剂包括适用于经口、经直肠、经鼻、局部(包括经颊和舌下)、经阴道和肠胃外(包括皮下、肌内、静脉内、皮内、动脉内、鞘内和硬膜外)施用的那些。

[0402] 适用于肠胃外施用的制剂包括:水性和非水性无菌注射溶液剂,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,其使制剂与预期接受者的血液等张;以及水性和非水性无菌混悬剂,其可包括助悬剂和增稠剂。制剂可存在于单位剂量或多剂量的容器(例如密封的安瓿和小瓶)中,并且可储存在冷冻干燥(冻干)条件下,仅需要在使用之前立即添加无菌液体载体(例如注射用水)。即用型(extemporaneous)注射溶液剂和混悬剂可由前述类型的无菌粉末剂、颗粒剂和片剂制备。

[0403] 典型的单位剂量制剂是包含如上文中所述的活性成分的每日剂量或单位每日亚剂量或其适当分数的那些。应理解,除以上特别提及的成分之外,考虑到所讨论的制剂的类型,本发明的制剂可包含本领域常规的其他试剂,例如适用于经口施用的那些可包含矫味剂。根据本发明的肽、其同源物或衍生物可用于提供包含一种或更多种本发明化合物作为活性成分的控释药物制剂(“控释制剂”),其中活性成分的释放可被控制和调节,以允许较低频率的给药或改善给定的本发明化合物的药代动力学谱或毒性谱。可根据常规方法制备适用于经口施用的控释制剂,其中的离散单元包含一种或更多种本发明化合物。为了控制组合物中活性成分的作用持续时间,可包含另外的成分。因此,可通过选择合适的聚合物载体来获得控释组合物,所述合适的聚合物载体例如如聚酯、聚氨基酸、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白等。药物释放的速率和作用的持续时间还可通过将活性成分并入到聚合物的颗粒(例如微胶囊)中来控制,所述聚合物例如水凝胶、聚乳酸、羟甲基纤维素、聚甲基丙烯酸甲酯和其他上述聚合物。这样的方法

包括胶体药物递送系统，如脂质体、微球、微乳剂、纳米粒、纳米胶囊等。根据施用途径，药物组合物可需要保护性包衣。适用于注射的药物形式包括无菌水性溶液剂或分散体以及用于其即用型制剂的无菌粉剂。因此，用于此目的的典型载体包括生物相容性水性缓冲剂、乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇等，以及其混合物。鉴于以下事实：当组合使用数种活性成分时，其不一定在待治疗的哺乳动物中同时直接发挥其联合的治疗作用，因此相应的组合物也可以是在单独但相邻的储器或室中包含两种成分的药盒或药包的形式。因此，在后一种背景下，每种活性成分可以以适用于不同于另一种成分的施用途径的方式配制，例如，它们之一可以是经口或肠胃外制剂的形式，而另一个是用于静脉内注射的安瓿或气雾剂的形式。

[0404] 如在体外和体内所证实的，如本发明中获得的溶细胞性CD4+ T细胞在MHC-II类依赖性的同源激活之后诱导APC凋亡，影响树突细胞和B细胞二者，并且(2)在IL-10和/或TGF-β不存在的情况下通过接触依赖性机制抑制旁观者T细胞。如WO2008/017517中详细讨论的，可将溶细胞性CD4+ T细胞与天然Treg和适应性Treg区分开。

[0405] 包含赋予与CD1d分子结合的能力的疏水残基的本发明免疫原性肽。在施用之后，被APC摄取，被引导至晚期内体，在那里他们被加载到CD1d上并在APC表面处呈递。一旦由CD1d分子呈递，肽中的硫代还原酶基序增强了活化NKT细胞使其变为溶细胞性NKT细胞的能力。所述免疫原性肽激活例如IFN-γ的细胞因子产生，其将激活其他效应细胞，包括CD4+T细胞和nCD8+ T细胞。如WO2012/069568中详细讨论的，CD4+和CD8+T细胞二者均可参与消除呈递抗原的细胞。

[0406] 干扰素γ是表征溶细胞性CD4+ T细胞的重要标志物。通过用免疫原性肽引发和刺激来自T1D患者(T1D07)的初始CD4+ T细胞，可获得特定的CD4+ T细胞系。在多次(例如)12次刺激之后，可将细胞与负载有(2μM)所述免疫原性肽的自体LCL B细胞一起共培养。24小时之后，收集上清液，并通过多重测定测量IFN-γ。

[0407] 另外，可测试溶细胞性CD4+ T细胞系的FasL释放来评估本发明的免疫原性肽的作用。可将用如上所述的免疫原性肽最初产生的T细胞系使用自体LCL B细胞系作为APC在4次连续的体外刺激中用所述免疫原性肽进行分裂和刺激。在每次刺激(共4次)的第11天，在用由自体B细胞呈递的其相应肽再刺激之后测试细胞的FasL。在共培养24小时(刺激1和2)或72小时(刺激3和4)之后收集上清液。

[0408] 现在将通过以下实施例对本发明进行举例说明，所述实施例是在不具有任何限制意图的情况下提供的。此外，本文中所述的所有参考文献均通过引用明确地包含在本文中。

[0409] 实施例

[0410] 实施例1：评估免疫原性肽的还原活性的方法。

[0411] 使用Tomazzolli et al.(2006)Anal.Biochem.350,105-112中所述的荧光测定来确定免疫原性肽的氧化还原酶活性。当具有FITC标记的两个肽通过二硫桥彼此共价连接时，它们会自动猝灭。在被根据本发明的肽还原之后，被还原的单个肽再次变为荧光的。对照实验可用二硫苏糖醇(100％还原活性)和水(0％还原活性)进行。

[0412] 实施例2：在氧化还原酶基序的N端处添加碱性氨基酸对免疫原性肽的还原活性的影响。

[0413] 下表1至3表示用于测试在包含T细胞表位的多种免疫原性肽的氧化还原酶基序的N端处碱性氨基酸内分泌的影响的肽序列。使用这些肽的所有测试均以一式两份进行，并且

每个测试进行两次。图1、2和3表示一个重复的初始速度。活性以重复的平均值表示。结果以相对荧光单位(Relative Fluorescent Unit,RFU)表示。与具有H或不具有任何另外的N端氨基酸的对照肽相比,在与胰岛素T细胞表位连接的CHGC氧化还原酶基序的N端处包含K、KH、R或RH氨基酸的肽显示出更高的氧化还原酶活性(参见表1和图1)。以相同的方式,与具有H或不具有任何另外的N端氨基酸的对照肽相比,在与破伤风毒素T细胞表位连接的CPYC氧化还原酶基序的N端处包含K或KH氨基酸的肽显示出更高的氧化还原酶活性(参见表2和图2)。与具有H或不具有任何另外的N端氨基酸的对照肽相比,在与MOG T细胞表位连接的CPYC氧化还原酶基序的N端处包含K或KH氨基酸的肽显示出更高的氧化还原酶活性(参见表3和图3)。

[0414]

表1:包含胰岛素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶基序(CHGC)的N端处的碱性氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
1	K	CHGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
2	KH	CHGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
3	R	CHGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
4	RH	CHGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
5		CHGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	对照
6	H	CHGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	对照

[0415]

表2:包含破伤风毒素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶基序(CPYC)的N端处的碱性氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
7	K	CPYC	V	QYIKANSKFIGIT	EL	受试肽
8	KH	CPYC	V	QYIKANSKFIGIT	EL	受试肽
9		CPYC	V	QYIKANSKFIGIT	EL	对照
10	H	CPYC	V	QYIKANSKFIGIT	EL	对照

[0416]

表3:包含MOG T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶基序(CPYC)的N端处的碱性氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
11	K	CPYC	GW	YRSPFSRVVHL	YR	受试肽
12	KH	CPYC	GW	YRSPFSRVVHL	YR	受试肽
13		CPYC	GW	YRSPFSRVVHL	YR	对照
14	H	CPYC	GW	YRSPFSRVVHL	YR	对照

[0417] 实施例3:在氧化还原酶基序内添加碱性氨基酸对免疫原性肽的还原活性的影响。

[0418] 下表4至6表示用于测试在包含T细胞表位的多种免疫原性肽的氧化还原酶基序内添加碱性氨基酸的影响的肽序列。使用这些肽的所有测试均以一式两份进行,并且每个测试进行两次。图4、5和6表示一个重复的初始速度。活性以重复的平均值表示。结果以相对荧

光单位(RFU)表示。与具有经典CPYC氧化还原酶基序的对照肽相比，具有胰岛素T细胞表位并包含在基序内具有K的氧化还原酶基序的肽显示出更高的氧化还原酶活性(参见表4和图4)。以相同的方式，与具有CHGC或CRGC经典氧化还原酶基序的对照肽相比，具有胰岛素T细胞表位并包含在基序内具有K的氧化还原酶基序的肽显示出更高的氧化还原酶活性(参见表5和图5)。使用CGHC氧化还原酶基序获得了相同的结果(参见表6和图6)。

[0419]

表4：包含胰岛素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶基序（CPYC）内的碱性氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
15	-	CPKC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
16	-	CKYC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
17	-	CPYC	SLQP	LALEGSLQK	RG	对照

[0420]

表5：包含胰岛素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶基序（CHGC）内的碱性氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
18	-	CHKC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
19	-	CKGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
20	-	CRGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	对照
21	-	CHGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	对照

[0421]

表6：包含胰岛素细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶基序（CGHC）内的碱性氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
22	-	CHKC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
23	-	CGRC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
24		CGHC	SLQP	LALEGSLQK	RG	对照
25		CGKC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽

[0422] 实施例4：在氧化还原酶基序的C端处添加碱性氨基酸对免疫原性肽的还原活性的影响。

[0423] 下表7和8表示用于测试在包含T细胞表位的多种免疫原性肽的氧化还原酶基序的C端处碱性氨基酸内分泌的影响的肽序列。使用这些肽的所有测试均以一式两份进行，并且每个测试进行两次。图7和8表示一个重复的初始速度。活性以重复的平均值表示。结果以相对荧光单位(RFU)表示。与不具有任何另外的碱性C端氨基酸的对照肽相比，在与胰岛素T细胞表位连接的CHGC氧化还原酶基序的C端处包含K或HK氨基酸的肽显示出更高的氧化还原酶活性(参见表7和图7)。与不具有任何另外的碱性C端氨基酸的对照肽相比，在与破伤风毒素T细胞表位连接的CPYC氧化还原酶基序的C端处包含K或HK氨基酸的肽显示出更高的氧化还原酶活性(参见表8和图8)。

[0424]

表7：包含胰岛素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶基序（CHGC）的C端处的碱性氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
26	-	CHGC	KSLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
27	-	CHGC	HKSLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
28	-	CHGC	SLQP	LALEGSLQK	RG	对照

[0425]

表8：包含破伤风毒素T细胞表位的免疫原性肽的氧化还原酶基序（CPYC）的C端处的碱性氨基酸

名称	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
29	-	CPYC	KV	QYIKANSKFIGIT	EL	受试肽
30	-	CPYC	HKV	QYIKANSKFIGIT	EL	受试肽
31	-	CPYC	V	QYIKANSKFIGIT	EL	对照

[0426] 实施例5:在氧化还原酶基序中和/或附近插入多个碱性氨基酸对免疫原性肽的还原活性的影响。

[0427] 下表9和10表示用于测试在氧化还原酶基序内以及在其N/C端处插入多个碱性氨基酸(K)对免疫原性肽的还原活性的影响的肽序列。使用这些肽的所有测试均以一式两份进行,并且每个测试进行两次。图9和10表示一个重复的初始速度。活性以重复的平均值表示。结果以相对荧光单位(RFU)表示。与包含胰岛素T细胞表位的CPYCSLQPLALEGSLQKRG对照肽相比,包含具有多个碱性氨基酸的氧化还原酶基序的肽显示出更高的氧化还原酶活性(参见表9和图9)。使用包含MOG T细胞表位的CPYCGWYRSPFSRVVHL肽的变体获得了相同的结果(参见表10、图10)。

[0428]

表9：包含胰岛素T细胞表位的Imotope的氧化还原基序（CPYC）中的多个带电荷的氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
32	K	CKYC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
33	K	CPKC	SLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
34	K	CPKC	KSLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
35	K	CKYC	KSLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
36	K	CPYC	KSLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
37	K	CPKC	HKSLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
38	K	CKYC	HKSLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
39	K	CPYC	HKSLQP	LALEGSLQK	RG	受试肽
40		CPYC	SLQP	LALEGSLQK	RG	对照

[0429]

表10：包含MOG T细胞表位的Imotope的氧化还原基序（CPYC）中的多个带电荷的氨基酸

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
41	KH	CKYC	GW	YRSPFSRVVHL	YR	受试肽
42	K	CKYC	GW	YRSPFSRVVHL	YR	受试肽
43	K	CPKC	HKGW	YRSPFSRVVHL	YR	受试肽
44	H	CPYC	GW	YRSPFSRVVHL	YR	对照
45		CPYC	GW	YRSPFSRVVHL	YR	对照

[0430] 实施例6:包含具有碱性氨基酸的氧化还原酶基序的免疫原性肽的生物学作用。

[0431] 为了研究包含具有碱性氨基酸的氧化还原酶基序的免疫原性肽的生物学作用,设计并合成了具有序列CPYCGWYRSPFSRVVHLYR的肽的不同变体,其包含小鼠MOG T细胞表位和CPYC氧化还原酶基序(表11)。然后测量每种肽的氧化还原酶活性,并确认通过碱性氨基酸修饰的肽的最高氧化还原酶活性(数据未显示)。

[0432]

表11:包含小鼠MOG T细胞表位和CPYC氧化还原酶基序的肽 CPYCGWYRSPFSRVVHLYR及其具有包含碱性氨基酸的氧化还原酶基序的变体

SEQ ID #	N端	基序	接头	T-表位	C端	目的
46	H	CPYC	GW	YRSPFSRVV	HLYR	对照
47	KH	CPYC	GW	YRSPFSRVV	HLYR	受试肽
48	K	CPYC	GW	YRSPFSRVV	HLYR	受试肽
49	KH	CKYC	GW	YRSPFSRVV	HLYR	受试肽
50	K	CKYC	GW	YRSPFSRVV	HLYR	受试肽
51	K	CPKC	HKGW	YRSPFSRVV	HLYR	受试肽
52	RH	CPYC	GW	YRSPFSRVV	HLYR	受试肽
53	R	CPYC	GW	YRSPFSRVV	HLYR	受试肽
54		CPYC	GW	YRSPFSRVV	HLYR	对照

[0433] 为了比较表11中示出的肽的生物学作用,使用2D2转基因小鼠(Jackson Laboratory)作为CD4+细胞的来源。已表明这些小鼠含有髓鞘寡突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein,MOG)特异性的自反应性T细胞库,这使其成为研究CD4+均质群对表11的肽的反应性的合适候选者。在本研究中,使用制造商的说明书(Miltenyi Biotec,130-104-454)纯化2D2-总CD4+细胞,并针对来自C57BL6小鼠(与2D2转基因小鼠相容)的T细胞库耗竭抗原呈递细胞(CD90.2耗竭,Miltenyi Biotec,130-104-454)。

[0434] 每项研究的对照条件是无肽添加或添加来自DBY(人男性染色体)的包含氧化还原酶基序的肽、或来自鼠PPI(前胰岛素原)的包含氧化还原酶基序的肽,后两者均可与来自C57BL6-APC的MHCII有效结合,但不能激活来自2D2转基因CD4+ T细胞的TCR。

[0435] 我们首先通过使用CD154+标志物(CD40L)测量Ag特异性T细胞的参与(engagement)研究了通过在氧化还原酶基序内以及在其N/C端处插入碱性氨基酸对肽的氧化还原酶基序进行的修饰是否会影响这些肽活化CD4+ T细胞的能力。为了实现该目标,在CD40阻断抗体存在下,将2D2-总CD4+和C57BL6 APC(比例1:1)的共培养物暴露于最终浓度

为5μM的每种受试肽和对照肽16小时。在孵育时间之后,通过流式细胞术确定所有实验条件和对照条件的Ag特异性细胞的频率(Pro-19-004-v00)(图11)。

[0436] 结果表明,与具有CPYC或HCPYC基序的对照相比,具有包含碱性氨基酸的氧化还原酶基序的肽变体已能够诱导更高百分比的Ag特异性细胞(CD4+CD154+)的参与(图11;虚线)。

[0437] 接下来,我们尝试确定由于碱性氨基酸而具有更高的氧化还原酶活性是否会导致活化的Ag特异性CD4 T细胞对IL-2的诱导提高。为此,将2D2-总CD4+和经丝裂霉素C处理的C57BL6 APC(比例1:1)的共培养物暴露于最终浓度为5μM的每种受试肽和对照肽24小时。在孵育时间之后,通过添加终止蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Scientific;78430)收集上清液(SN),并将其储存在-80冷冻机中,直到使用流式细胞术(LEGENDplex小鼠Th细胞因子组(13-plex);Cat No.740005;Pro-19-007-v00)测量所有实验和对照条件的所分泌IL2(sIL2)的量。FACS结果表明,与具有CPYC或HCPYC基序的对照相比,具有包含碱性氨基酸的氧化还原酶基序的肽变体已能够诱导更高量的sIL2(图12;虚线)。

[0438] 从本领域已知,包含T细胞表位和氧化还原酶基序的经修饰肽能够诱导允许CD4+细胞获得裂解标志物并分化为溶细胞性CD4+ T细胞的途径。

[0439] 因此,我们尝试确定由于碱性氨基酸而具有更高氧化还原酶活性的免疫原性肽是否会在活化的Ag特异性CD4 T细胞中导致更早和/或更强(百分比或强度)的裂解特性。在这组实验中,用经丝裂霉素C处理的C57BL6 APC(比例1:1)和最终浓度为5μM的每种受试肽和对照肽刺激2D2-总CD4+(刺激1)。在10至14天的间隔之后,在不存在和存在有关肽的情况下,再次刺激来自所有测试和对照条件的每种细胞培养物(刺激2,第0天)。第二次刺激(S2D1)之后16小时,收集细胞并进行染色,用于通过流式细胞术(Pro-19-014-v00)进行胞内(IC)裂解标记物(颗粒酶A和B,CD107a和b)的测量。值得注意的是,如所预期的,对照肽条件未能使培养物包含在S2的测量中。

[0440] 然后确定所有肽变体的FACS结果,并从所有其他测量中去除对包含MOG T细胞表位而无任何硫代氧化还原活性的野生型肽的测量,以单纯地确定每种经修饰氧化还原酶基序对诱导裂解特性的作用。到目前为止,该结果表明,与具有CPYC或HCPYC基序的对照相比,具有包含碱性氨基酸的氧化还原酶基序的经修饰肽已能够诱导更高百分比的裂解标志物(图13;虚线),除了KHCPYC肽因为技术困难(具有少于1000个事件)使我们无法获得此特定肽的结果之外。

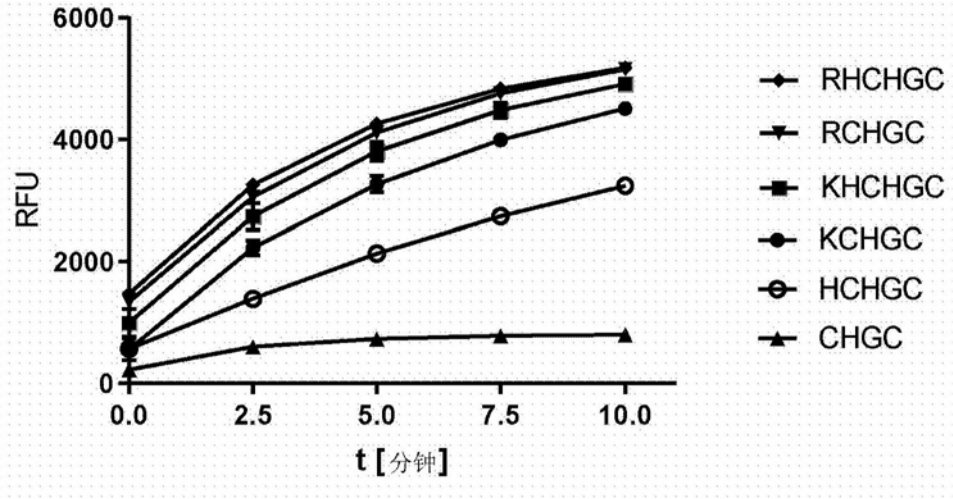

6000
4000
2000
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
RHCHGC
RCHGC
KHCHGC
KCHGC
HCHGC
CHGC

图1

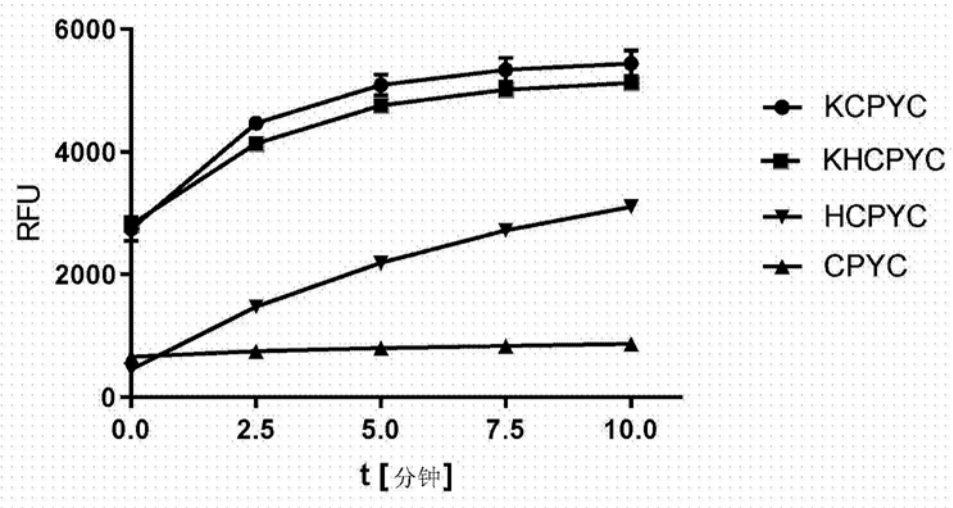

6000
4000
2000
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
KCPYC
KHCPYC
HCPYC
CPYC

图2

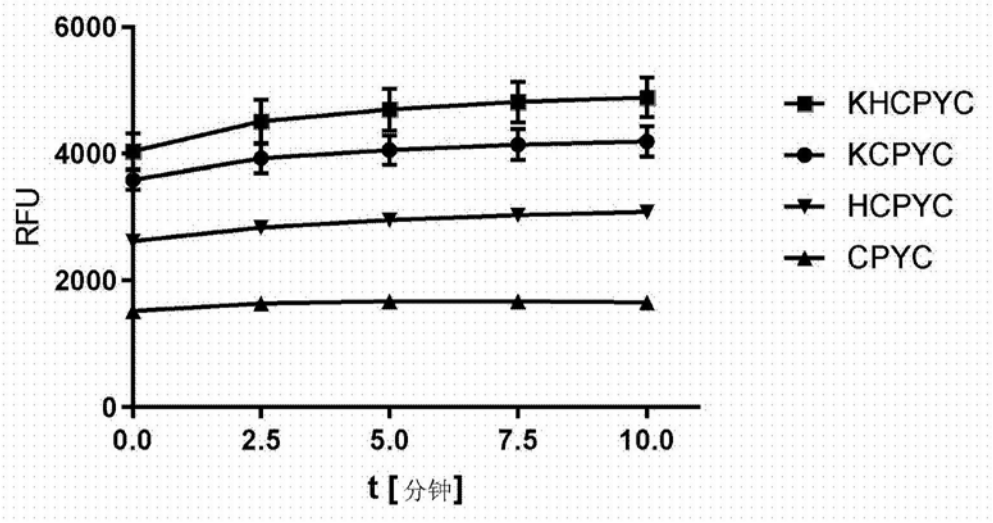

6000
4000
2000
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
KHCPYC
KCPYC
HCPYC
CPYC

图3

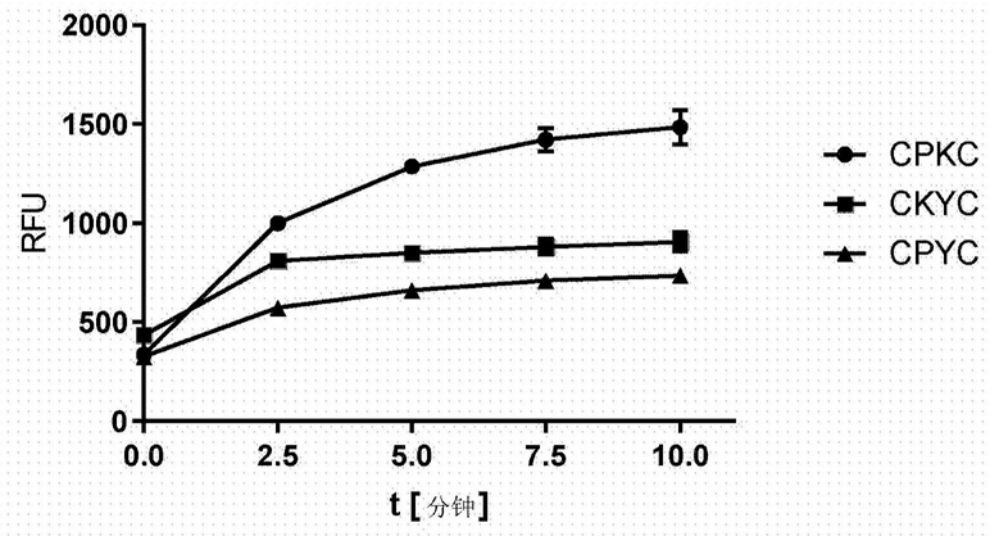

2000
1500
1000
500
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
CPKC
CKYC
CPYC

图4

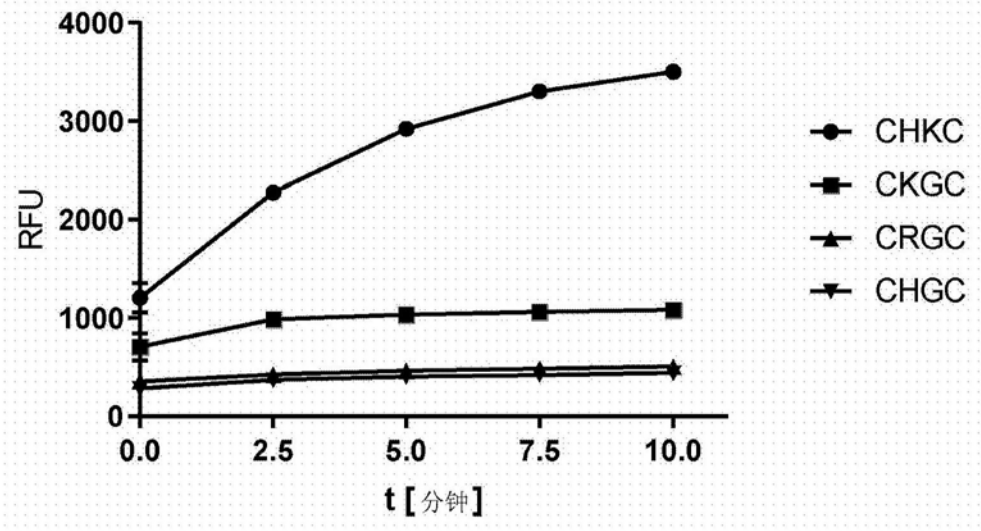

4000
3000
2000
1000
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
CHKC
CKGC
CRGC
CHGC

图5

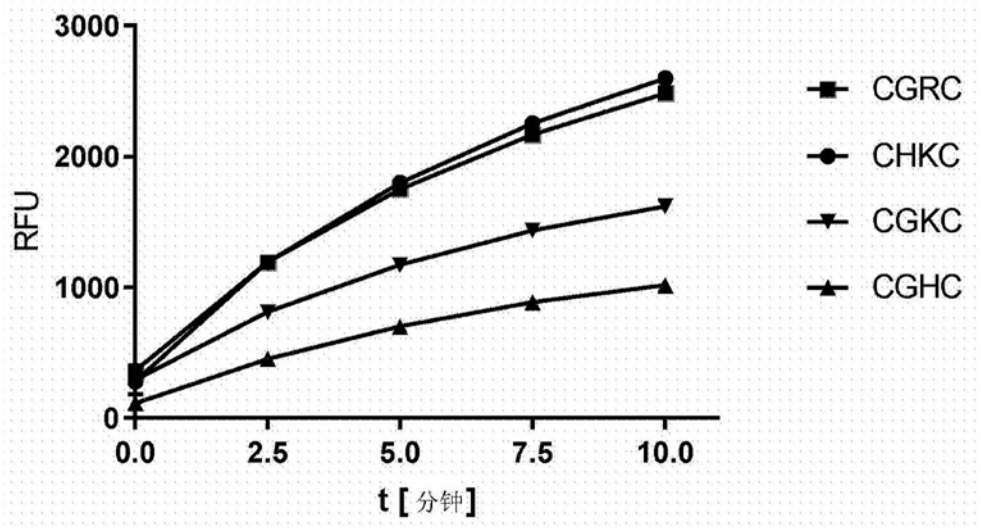

3000
2000
1000
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
CGRC
CHKC
CGKC
CGHC

图6

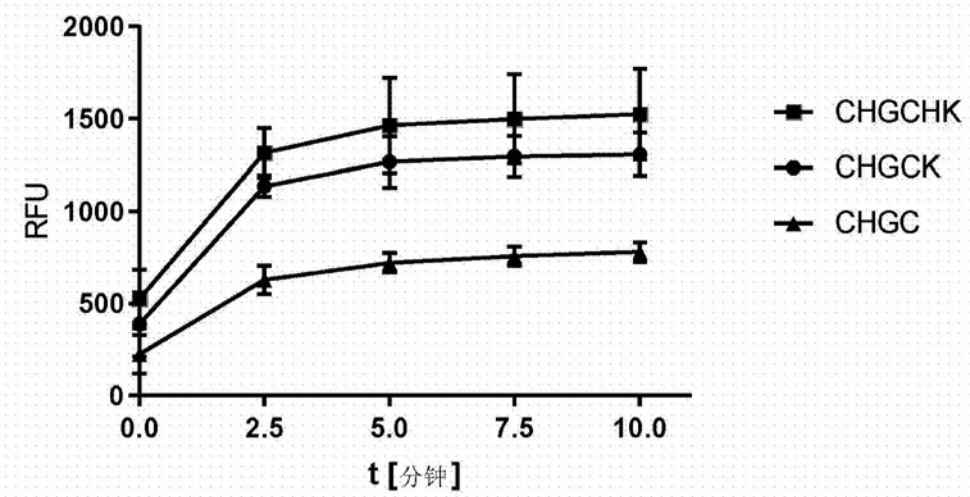

2000
1500
1000
500
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
CHGCHK
CHGCK
CHGC

图7

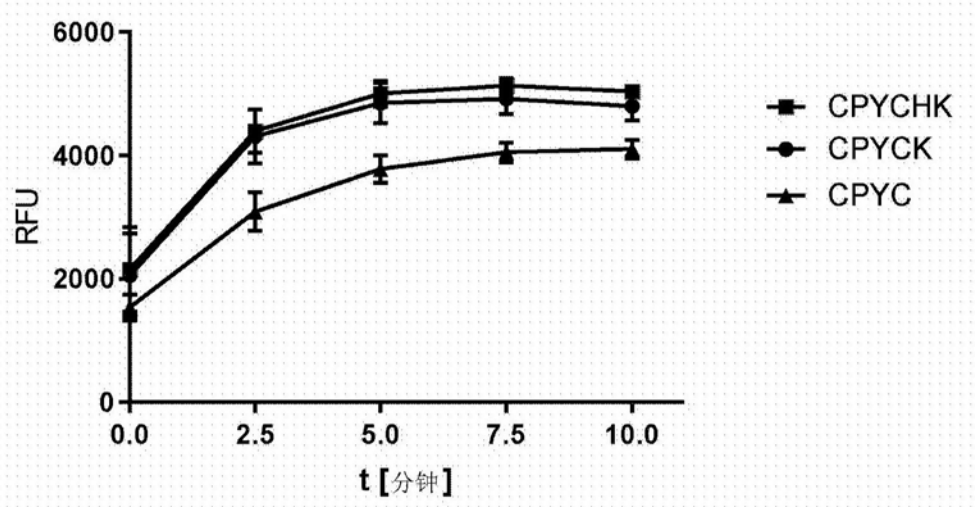

6000
4000
2000
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
CPYCHK
CPYCK
CPYC

图8

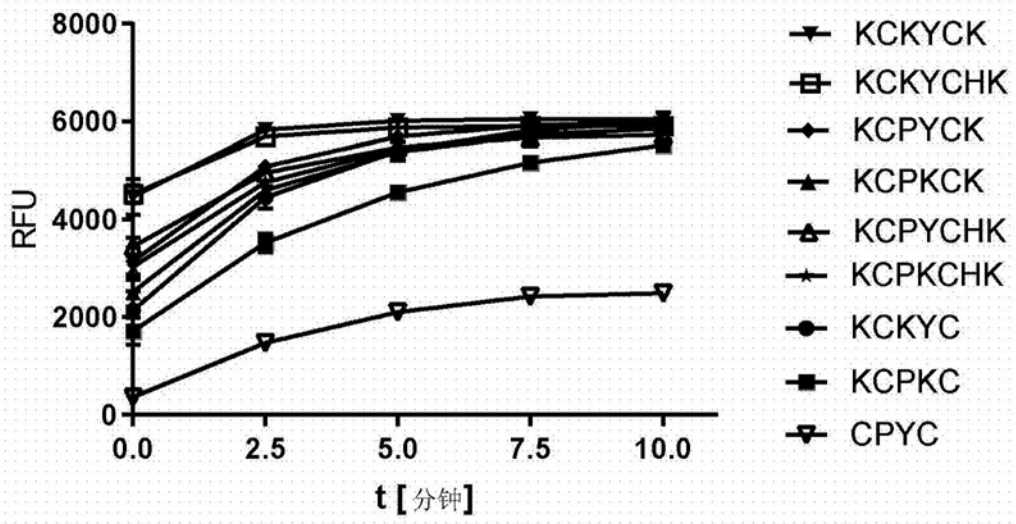

8000
6000
4000
2000
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
KCKYCK
KCKYCHK
KCPYCK
KCPKCK
KCPYCHK
KCPKCHK
KCKYC
KCPKC
CPYC

图9

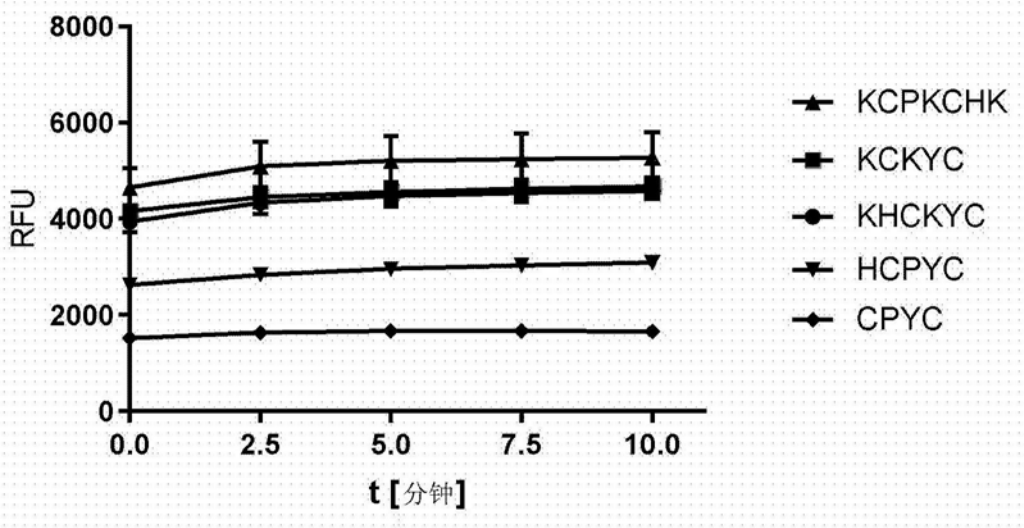

8000
6000
4000
2000
0
RFU
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
t [分钟]
KCPKCHK
KCKYC
KHCKYC
HCPYC
CPYC

图10

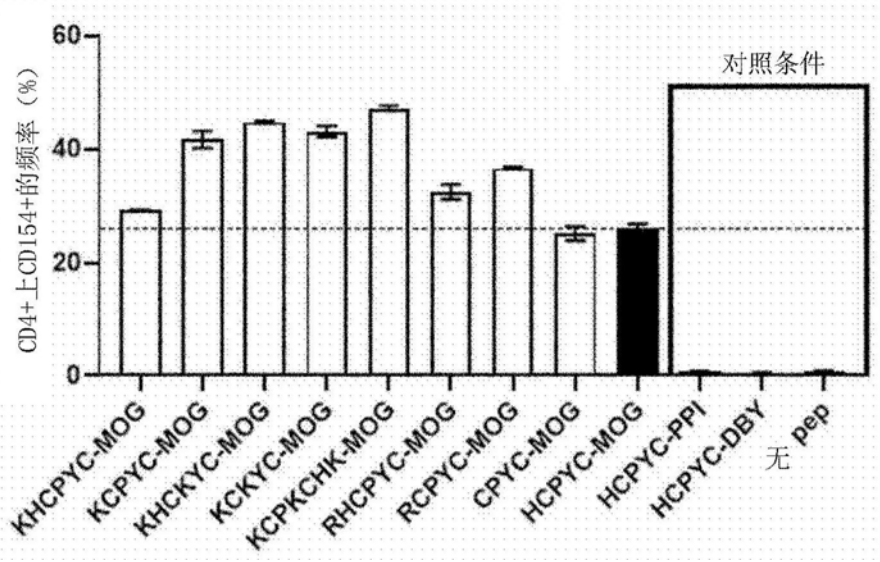

CD4+上CD154+的频率（%）
60
40
20
0
对照条件
KHCPYC-MOG
KCPYC-MOG
KHCKYC-MOG
KCKYC-MOG
KCPKCHK-MOG
RHCPYC-MOG
RCPYC-MOG
CPYC-MOG
HCPYC-MOG
HCPYC-PPI
HCPYC-DBY
无 pep

图11

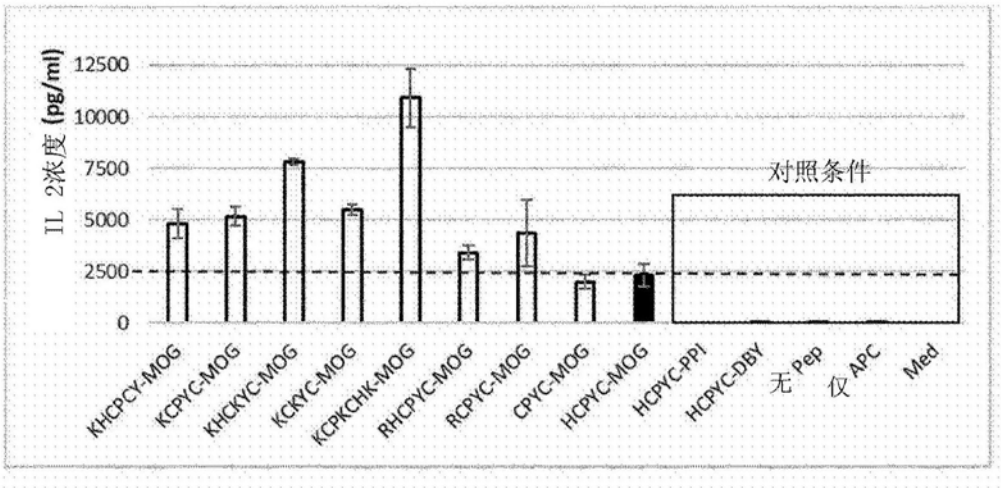

IL 2浓度 (pg/ml)
12500
10000
7500
5000
2500
0
对照条件
KHCPCY-MOG
KCPYC-MOG
KHCKYC-MOG
KCKYC-MOG
KCPKCHK-MOG
RHCPYC-MOG
RCPYC-MOG
CPYC-MOG
HCPYC-MOG
HCPYC-PPI
HCPYC-DBY
无 Pep
仅 APC
Med

图12

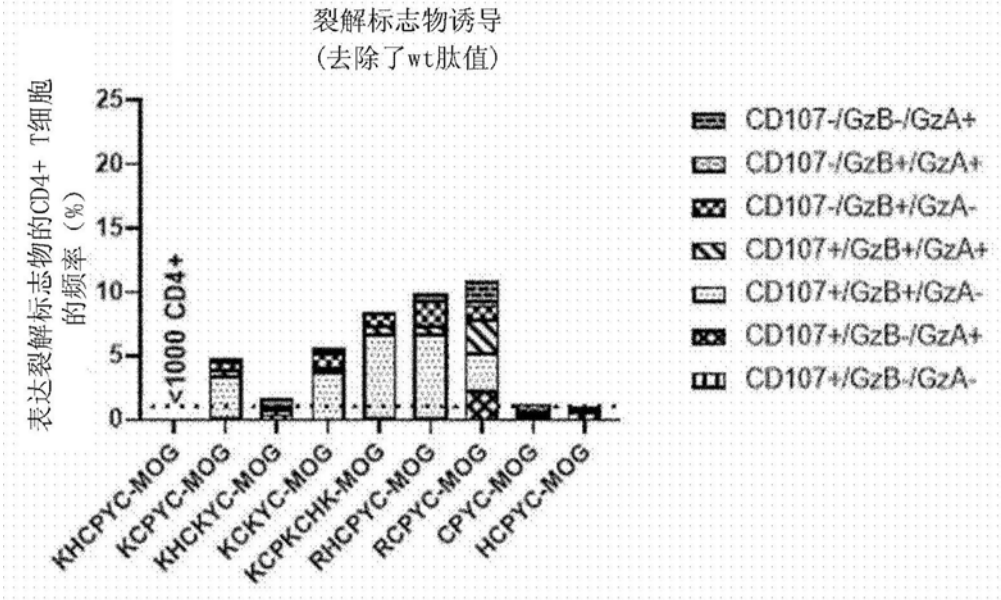

裂解标志物诱导
(去除了wt肽值)
表达裂解标志物的CD4+ T细胞的频率（%）
25
20
15
10
5
0
<1000 CD4+
KHCPYC-MOG
KCPYC-MOG
KHCKYC-MOG
KCKYC-MOG
KCPKCHK-MOG
RHCPYC-MOG
RCPYC-MOG
CPYC-MOG
HCPYC-MOG
CD107-/GzB-/GzA+
CD107-/GzB+/GzA+
CD107-/GzB+/GzA-
CD107+/GzB+/GzA+
CD107+/GzB+/GzA-
CD107+/GzB-/GzA+
CD107+/GzB-/GzA-

图13