

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)



[21] 申请号 200680030009.0

[43] 公开日 2008 年 9 月 24 日

[11] 公开号 CN 101273056A

[22] 申请日 2006.6.16

[21] 申请号 200680030009.0

[30] 优先权

[32] 2005. 6.17 [33] US [31] 60/691,889

[86] 国际申请 PCT/US2006/023489 2006. 6. 16

[87] 国际公布 WO2006/138562 英 2006.12.28

[85] 进入国家阶段日期 2008.2.18

[71] 申请人 曼康公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 刘利平 阿德里安·博特 龚 剑
戴维·C·戴蒙德

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 王 旭

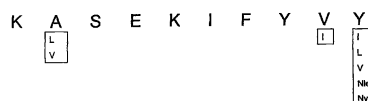
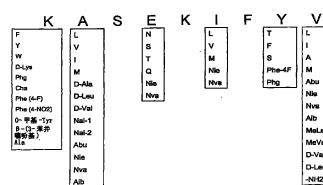
权利要求书 7 页 说明书 105 页 附图 49 页

[54] 发明名称

表位类似物

[57] 摘要

一些实施方案涉及与 I 类 MHC - 限制性 T 细胞表位相对应的肽的类似物以及产生它们的方法。 这些类似物可以含有在直接与 MHC 分子相互作用的残基的氨基酸取代, 并且可以赋予提高的、改进的或有用的免疫学特性。 另外, 本发明公开了各种类似物, 其中各种取代包括非标准残基正亮氨酸和/或正缬氨酸。



1. 一种分离的肽，其基本上由下述序列组成，其中：

P0 是 X, XX, 或 XXX, 其中 X 指定任何氨基酸或没有氨基酸；和

P1 是 S, K, F, Y, T, Orn, 或 Hse; 和

P2 是 L, V, M, I, Nva, Nle 或 Abu; 和

P3 是 L, Nva, Nle 或 Abu; 和

P4 是 Q; 和

P5 是 H; 和

P6 是 L, Nva, Nle 或 Abu; 和

P7 是 I; 和

P8 是 G, A, S, 或 Sar; 和

在 P9 的 P Ω 是 L, V, I, A, Nle, Nva, Abu, 或 L-NH₂; 并且

P Ω +1 是 X, XX, 或 XXX, 其中 X 指定任何氨基酸或没有氨基酸;

并且

其中所述序列不是 SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 71)。

2. 权利要求1的分离的肽，其基本上由下述序列组成：

{K, F, Y, T, Orn, 或 Hse}LLQHLIGL (SEQ ID NO: 72); 或

S{V, M, I, Nva, Nle, 或 Abu}LQHLIGL (SEQ ID NO: 73); 或

SL{Nva, Nle 或 Abu}QHLIGL (SEQ ID NO: 74); 或

SLLQH{Nva, Nle 或 Abu}IGL (SEQ ID NO: 75); 或

SLLQHLI{A, S, 或 Sar}L (SEQ ID NO: 76); 或

SLLQHLLIG{V, I, A, Nle, Nva, Abu, 或 L-NH₂} (SEQ ID NO: 77); 或

{F, Y, T, Orn, 或 Hse}{Nva, Nle, M, 或 I}LQHLIGL (SEQ ID NO: 78); 或

S{Nva, Nle, 或 M}LQHLIG{Nva, Nle, 或 V} (SEQ ID NO: 79); 或

{K, F, Y, T, Orn, 或 Hse}LLQHLIGV (SEQ ID NO: 80); 或

{F 或 T}LLQHLIG{Nle} (SEQ ID NO: 81); 或

{F 或 T}{Nva 或 M}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO: 82)。

3. 权利要求2的分离的肽，其基本上由下述序列组成：
{F, Y, T, Orn, 或 Hse}LLQHLIGL (SEQ ID NO: 83); 或
S{Nva, Nle, 或 M}LQHLIGL (SEQ ID NO: 84); 或
SLLQHLIG{Nle, Nva, 或 L-NH₂} (SEQ ID NO: 85); 或
SLLQH{Nva 或 Abu}IGL (SEQ ID NO: 86); 或
S{Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO: 87); 或
{F 或 T}{L 或 Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO: 88)。
4. 权利要求3的分离的肽，其基本上由下述序列组成：
S{L 或 Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO: 89); 或
T{Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO: 90)。
5. 权利要求4的分离的肽，其基本上由下述序列组成：
S{Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO: 87)。
6. 权利要求1的分离的肽，其中所述肽具有对于I类MHC肽结合裂口的亲和力。
7. 权利要求6的分离的肽，其中所述I类MHC是HLA-A2。
8. 一种分离的肽，其包括在序列SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 71)中的1至3个取代，具有对于I类MHC结合裂口的亲和力，所述亲和力相似于或大于SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 71)对于所述I类MHC结合裂口的亲和力。
9. 权利要求8的分离的肽，其中半解离时间相似于或者大于SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 71)从所述I类MHC结合裂口的半解离时间。
10. 权利要求8的分离的肽，其被具有对于肽SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 71)的特异性的T细胞识别。
11. I类MHC/肽复合物，其中所述肽具有权利要求1的肽的序列。
12. 权利要求11的I类MHC/肽复合物，其与识别I类MHC/PRAME₄₂₅₋₄₃₃复合体的TCR交叉反应。
13. 权利要求12的I类MHC/肽复合物，其中所述I类MHC/复合物是HLA-A2/PRAME₄₂₅₋₄₃₃复合物。
14. 一种多肽，其包括包埋在释放序列内的权利要求1的肽序列。
15. 一种免疫原性组合物，其包括权利要求1的肽。

16. 一种免疫原性组合物，其包括权利要求 14 的多肽。
17. 编码权利要求 14 的多肽的核酸。
18. 用于表达权利要求 1 的肽的核酸工具。
19. 一种免疫原性组合物，其包括权利要求 17 或 18 的核酸。
20. 一种诱导、维持、或增强 CTL 应答的方法，其包括结节内施用权利要求 15 的组合物。
21. 一种引发 I 类 MHC-限制性 T 细胞应答的方法，其包括结节内施用权利要求 15 的组合物和免疫强化剂。
22. 一种诱导、维持、或引发 CTL 应答的方法，其包括结节内施用权利要求 19 的组合物。
23. 一种分离的肽，其基本上由下述序列组成，其中：
 - P0是X, XX, 或XXX, 其中X 指定任何氨基酸或没有氨基酸; 和
 - P1是G, A, S, Abu, 或 Sar; 和
 - P2是L, M, I, Q, V, Nva, Nle, 或 Abu; 和
 - P3是P 或 W; 和
 - P4是S; 和
 - P5是I; 和
 - P6是P; 和
 - P7是V; 和
 - P8是H; 和
 - P9是P, A, L, S, 或 T; 和
 - 在P10的P Ω 是I, L, V, Nva, 或 Nle; 和
 - P Ω +1是 X, XX, 或 XXX, 其中X 指定任何氨基酸或没有氨基酸; 并且其中所述序列不是GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42)。
24. 一种分离的肽，其基本上由下述序列组成：
 - {S, Sar, 或 Abu}LPSIPVHPI (SEQ ID NO. 43); 或
 - G{M 或 Nle}PSIPVHPI (SEQ ID NO. 44); 或
 - G{L, I, Nva, 或 Nle}WSIPVHPI (SEQ ID NO. 45); 或
 - GLWSIPVHP{Nva 或 V} (SEQ ID NO. 46); 或

GLPSIPVH{A 或 S}I (SEQ ID NO. 47); 或
GLPSIPVHP{V, L, Nva, 或 Nle} (SEQ ID NO. 48); 或
G{Nle}PSIPVHP{Nva, 或 Nle} (SEQ ID NO. 49); 或
G{Nva}PSIPVHP{Nva} (SEQ ID NO. 50); 或
G{V, Nva, 或 Nle}PSIPVHPV (SEQ ID NO. 51); 或
{Sar 或 Abu}LPSIPVHP{V 或 Nva} (SEQ ID NO. 52); 或
A{V, I, Nva, 或 Nle}WSIPVHPI (SEQ ID NO. 53); 或
AVPSIPVHP{V或Nva} (SEQ ID NO. 54); 或
A{Nva}PSIPVHPV (SEQ ID NO. 55); 或
ALWSIPVHP{V 或 Nva} (SEQ ID NO. 56); 或
GVWSIPVHP{V或Nva} (SEQ ID NO. 57); 或
G{Nva}WSIPVHPV (SEQ ID NO. 58)。

25. 一种分离的肽，其基本上由下述序列组成：

{Abu}LPSIPVHPI (SEQ ID NO. 59); 或
G{V, Nva, 或 Abu}PSIPVHPI (SEQ ID NO. 60); 或
GLPSIPVHP{V 或 Nva} (SEQ ID NO. 61); 或
GLWSIPVHP{I 或 Nva} (SEQ ID NO. 62); 或
G{Nle}PSIPVHP{Nva} (SEQ ID NO. 63); 或
G{Nle 或 Nva}PSIPVHPV (SEQ ID NO. 64); 或
{A 或 Abu}LPSIPVHP{V 或 Nva} (SEQ ID NO. 65); 或
G{Nva}WPSIPVHP{I 或 V} (SEQ ID NO. 66); 或
A{Nva 或 Nle}WSIPVHPI (SEQ ID NO. 67); 或
A{V 或 Nva}PSIPVHPV (SEQ ID NO. 68)。

26. 权利要求 25 的分离的肽，其基本上由下述序列组成：

{Abu}LPSIPVHPI (SEQ ID NO. 59); 或
GLPSIPVHP{V 或 Nva} (SEQ ID NO. 61); 或
GLWSIPVHPI (SEQ ID NO. 69); 或
G{Nle}PSIPVHP{Nva} (SEQ ID NO. 63)。

27. 权利要求 26 的分离的肽，其基本上由下述序列组成：

GLPSIPVHPV (SEQ ID NO. 70)。

28. 权利要求 23 的分离的肽，其中所述肽具有对于 I 类 MHC 肽结合裂口的亲和力。

29. 权利要求 28 的分离的肽，其中所述 I 类 MHC 是 HLA-A2。

30. I 类 MHC/肽复合物，其中所述肽具有权利要求 23 的肽的序列。

31. 权利要求 30 的 I 类 MHC/肽复合物，其与识别 I 类 MHC/PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 复合体的 TCR 交叉反应。

32. 权利要求 31 的 I 类 MHC/肽复合物，其中所述 I 类 MHC/复合物是 HLA-A2/PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 复合物。

33. 一种多肽，其包括包埋在释放序列内的权利要求 23 的肽序列。

34. 一种免疫原性组合物，其包括权利要求 23 的肽。

35. 一种免疫原性组合物，其包括权利要求 33 的多肽。

36. 编码权利要求 33 的多肽的核酸。

37. 用于表达权利要求 23 的肽的核酸工具。

38. 一种免疫原性组合物，其包括权利要求 36 或 37 的核酸。

39. 一种诱导、维持、或增强 CTL 应答的方法，其包括结节内施用权利要求 34 的组合物。

40. 一种引发 I 类 MHC-限制性 T 细胞应答的方法，其包括结节内施用权利要求 33 的组合物和免疫强化剂。

41. 一种诱导、维持、或引发 CTL 应答的方法，其包括结节内施用权利要求 38 的组合物。

42. 一种分离的肽，其包括在序列 GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42) 中的 1 至 3 个取代，具有对于 I 类 MHC 结合裂口的亲和力，所述亲和力相似于或大于 GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42) 对于所述 I 类 MHC 结合裂口的亲和力。

43. 权利要求 42 的分离的肽，其中所述半解离时间相似于或者大于 GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42) 从所述 I 类 MHC 结合裂口的半解离时间。

44. 权利要求 42 的分离的肽，其被具有对于肽 GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42) 的特异性的 T 细胞识别。

45. 由 pSEM 质粒表达的免疫原性肽的分离的肽类似物，其基本上由下述序列组成：

E{A, L, Nva, Nle}AGIGILT{V, Nva, Nle} (SEQ ID NO: 91); 或
Y{M, V, Nva, Nle}DGTMSQ{V, Nva, Nle} (SEQ ID NO: 92);
并且其中所述序列不是E{A, L}AGIGILTV (SEQ ID NO: 93) 或
YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 94)。

46. 权利要求 45 的分离的肽类似物, 其中所述肽类似物选自由下列各项组成的组: ELAGIGILT_{Nva} (SEQ ID NO: 95), EN_{Nva}AGIGILTV (SEQ ID NO: 96), YVDGTMSQ_{Nva} (SEQ ID NO: 97), YVDGTMSQV (SEQ ID NO: 98)和 YMDGTMSQ_{Nva} (SEQ ID NO: 99)。

47. 权利要求 46 的分离的肽类似物, 其基本上由氨基酸序列 EN_{Nva}AGIGILTV (SEQ ID NO: 96)组成。

48. 权利要求 46 的分离的肽类似物, 其基本上由序列 YMDGTMSQ_{Nva} (SEQ ID NO: 99)组成。

49. 权利要求 45 的分离的肽类似物, 其中所述肽具有对于 I 类 MHC 肽结合裂口的亲和力。

50. 权利要求 49 的分离的肽类似物, 其中所述 I 类 MHC 是 HLA-A2。

51. 一种分离的肽类似物, 其包括在序列 EAAGIGILTV (SEQ ID NO: 100)中的 1 至 3 个取代, 具有对于 I 类 MHC 结合裂口的亲和力, 所述亲和力相似于或大于 EAAGIGILTV (SEQ ID NO: 100)对于所述 I 类 MHC 结合裂口的亲和力。

52. 权利要求 51 的分离的肽, 其中所述半解离时间相似于或者大于 EAAGIGILTV (SEQ ID NO: 100)从所述 I 类 MHC 结合裂口的半解离时间。

53. 权利要求 51 的分离的肽, 其被具有对于肽 EAAGIGILTV (SEQ ID NO: 100)的特异性的 T 细胞识别。

54. 一种分离的肽类似物, 其包括在序列 YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 94)中的 1 至 3 个取代, 具有对于 I 类 MHC 结合裂口的亲和力, 所述亲和力相似于或大于 YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 94)对于所述 I 类 MHC 结合裂口的亲和力。

55. 权利要求 54 的分离的肽, 其中所述半解离时间相似于或者大于 YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 94)从所述 I 类 MHC 结合裂口的半解离时间。

56. 权利要求 54 的分离的肽, 其被具有对于肽 YMDGTMSQV (SEQ

ID NO: 94)的特异性的 T 细胞识别。

57. 一种 I 类 MHC/肽复合体, 其中所述肽具有权利要求 1 的肽的序列。

58. 权利要求 57 的 I 类 MHC/肽复合体, 其与识别 I 类 MHC/Melan-A₂₆₋₃₅ 复合体的 TCR 交叉反应。

59. 权利要求 58 的 I 类 MHC/肽复合体, 其中所述 I 类 MHC/复合体是 HLA-A2/Melan-A₂₆₋₃₅ 复合体。

60. 权利要求 57 的 I 类 MHC/肽复合体, 其与识别 I 类 MHC/酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ 复合体的 TCR 交叉反应。

61. 权利要求 60 的 I 类 MHC/肽复合体, 其中所述 I 类 MHC/复合体是 HLA-A2/酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ 复合体。

62. 一种多肽, 其包括包埋在释放序列内的权利要求 45 的肽序列。

63. 一种免疫原性组合物, 其包括权利要求 45 的任一种肽。

64. 一种免疫原性组合物, 其包括权利要求 62 的多肽。

65. 编码权利要求 62 的多肽的核酸。

66. 一种免疫原性组合物, 其包括权利要求 65 的核酸。

67. 一种诱导、维持、或增强 CTL 应答的方法, 其包括结节内施用权利要求 63 的组合物。

68. 一种引发 I 类 MHC-限制性 T 细胞应答的方法, 其包括结节内施用权利要求 63 的组合物和免疫强化剂。

69. 一种诱导、维持、或引发 CTL 应答的方法, 其包括结节内施用权利要求 66 的组合物。

表位类似物

相关申请的交叉参考

本申请要求于 2005 年 6 月 17 日提交的美国临时专利申请序列号. 60/691,889 的提交日期的利益, 其无放弃地完全结合于此作为参考。

发明背景

发明领域

在某些实施方案中, 本文所公开的发明涉及与 I 类 MHC 限制性 T 细胞表位相对应的肽的类似物, 和用于它们的产生的方法。这些类似物可以含有在直接与 MHC 分子相互作用的残基上的氨基酸取代, 并且可以赋予提高的、改善的或有用的免疫特性。特别地, 鉴定了来自肿瘤相关的抗原 SSX-2、NY-ESO-1、PRAME、PSMA、酪氨酸酶、和 melan-A 的表位类似物。另外, 公开了类似物的种类, 其中各种取代包括非标准的残基正亮氨酸和/或正缬氨酸。

相关技术的描述

主要组织相容性复合体与 T 细胞靶点识别

T 淋巴细胞 (T 细胞) 是在应答具体的抗原信号中起作用的抗原-特异性免疫细胞。B 淋巴细胞和它们产生的抗体也是抗原-特异性的实体。然而, 与 B 淋巴细胞不同, T 细胞不应答游离的或溶解形式的抗原。对于 T 细胞应答抗原, 它需要所述抗原结合到包含主要组织相容性复合体 (MHC) 蛋白的呈递复合体上。

MHC 蛋白提供 T 细胞区分本有的或“自身”细胞与外来细胞的方式。MHC 分子是一类免疫受体, 其呈递随后要受到 T 细胞监测的潜在的肽表位。存在 2 种类型的 MHC, I 类 MHC 和 II 类 MHC。CD4⁺ T 细胞与 II 类 MHC 蛋白相互作用, 并且主要具有辅助表型, 而 CD8⁺ T 细胞与 I 类

MHC 蛋白相互作用，并且主要具有细胞溶解表型，但是它们每一种还可以表现出调控功能，特别是抑制性的功能。I 类和 II 类两类 MHC 都是跨膜蛋白，它们的大部分结构位于细胞的外表面。另外，两类 MHC 都在它们的外侧部分具有肽结合裂口。就是在这一裂口，将小片段蛋白，内在的或外来的，结合并且呈递到细胞外环境。

称为抗原呈递细胞（APCs）的细胞应用 MHC 将抗原展示给 T 细胞。T 细胞可以识别抗原，如果所述抗原是存在于 MHC 上的话。这种需要叫作 MHC 限制性。如果抗原不是由可识别的 MHC 所展示，所述 T 细胞将不识别和作用于所述抗原信号。对结合到可识别的 MHC 上的肽特异性的 T 细胞结合到这些 MHC-肽复合体上，并且进行免疫应答下面的阶段。

发明概述

SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物实施方案

实施方案包括 I 类 MHC-限制性 T 细胞表位 SSX-2₄₁₋₄₉ 的类似物，KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1)，包括这些类似物的多肽（其可以由 pAPC 加工以呈递所述表位类似物），和表达所述类似物的核酸。与野生型表位相比较，所述类似物可以具有相似的或提高的免疫特性。

一个特别的实施方案涉及一种分离的 SSX-2 肽，其具有包括序列 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1) 的一个或多个氨基酸取代的序列，所述 SSX-2 肽以充分的量存在，足以激发从由针对具有序列 KASEKIFYV (SEQ ID NO: 1) 的表位的免疫而产生的 T 细胞系产生细胞因子。一方面，所述充分的量小于 10 μ M。另一方面，所述量小于 3 μ M。另一方面，所述量小于 1 μ M。一方面，所述一个或多个氨基酸取代可以包括至少一个标准的氨基酸取代。当用于本文时，“标准氨基酸”包括 20 种遗传编码的氨基酸中的任一种。因此，一方面，例如，所述至少一个标准氨基酸取代可以为 Tyr、Val、Leu、Ala、Ile、Met、Trp、Phe、Asp、Asn 或 Ser。另一方面，所述一个或多个氨基酸取代可以包括至少一个非标准的氨基酸取代。所述非标准的氨基酸包括，例如，但不限于，下列各项中的任一种：正亮氨酸 (Nle)，正缬氨酸 (Nva)，苯基甘氨酸 (Phg)，4-氟苯丙氨酸 (Phe(4-F))，4-硝基苯丙氨酸 (Phe(4-NO₂))， α -氨基丁酸 (Abu)， α -氨基异丁

酸 (Aib), 甲基-亮氨酸(MeLeu), 甲基缬氨酸(MeVal), β -(3-苯并噻吩基)-丙氨酸(β -(3-苯并噻吩基)Ala), O-甲基酪氨酸 (O-methyltyrosine) (O-甲基-Tyr), 环己基丙氨酸(Cha), β -(1-萘基)-丙氨酸(Nal-1), β -(2-萘基)-丙氨酸(Nal-2), 标准氨基酸的 D-立体异构体, 或其中羧基末端已被修饰成酰胺 (显示为-NH₂) 的氨基酸。因此, 在一个方面, 所述至少一个非标准氨基酸取代可以是 Nle、Nva、Abu、或标准氨基酸的 D-立体异构体。另一方面, 所述一个或多个氨基酸取代可以包括修饰的末端氨基酸。一方面, 所述修饰的末端氨基酸可以是酰胺化的 C 端氨基酸。另一方面, 至少一种取代可以是氨基酸的添加, 其中所述添加是 C 端添加。另一方面, 肽还可以包括在任何位点的保守氨基酸的取代, 但是优选地在不明显参与任何 MHC 相互作用的 P3、P5 或 P7 位点。

另一个实施方案涉及 9 个氨基酸 P1-P9 的分离的肽, 其可以在每个位点包括一个氨基酸。例如, P1 可以是 K、F、Y、W、Phg、Phe(4-F)、Phe(4-NO₂)、MeTyr、 β -(3-苯并噻吩基)-Ala、或 D-Lys; P2 可以是 A、L、V、I、M、D-Ala、Nal-2、Abu、Aib、Nle 或 Nva; P3 可以是 S; P4 可以是 E、Q、Nle、或 Nva; P5 可以是 K; P6 可以是 I、L、V、Nle 或 Nva; P7 可以是 F; P8 可以是 Y、F、Phe(4-F); 和在 P9 的 P Ω (P- Ω)可以是 V、I、A、Nva、MeVal、或 Abu。在一些实例中, 所述序列不是 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1)。

另一个实施方案涉及一种 9 个氨基酸 P1-P9 的分离肽, 其可以在每个位点包括一个氨基酸。例如, P1 可以是 K、F、Y、W、Phg、Phe(4-F)、Phe(4-NO₂)、MeTyr、 β -(3-苯并噻吩基)-Ala、或 D-Lys; P2 可以是 V、L、M、Abu、Nle 或 Nva; P3 可以是 S; P4 可以是 E、Q、Nle、或 Nva; P5 可以是 K; P6 可以是 I、L、V、Nle 或 Nva; P7 可以是 F; P8 可以是 Y、F、Phe(4-F); 和在 P9 的 P Ω 可以是 V、I、A、Nva、MeVal、Abu 或 V-NH₂。

另一个实施方案涉及一种 9 个氨基酸 P1-P9 的分离肽, 其可以在每个位点包括一个氨基酸。例如, P1 可以是 K、F、Y、W、Phg、Phe(4-F)、Phe(4-NO₂)、MeTyr、 β -(3-苯并噻吩基)-Ala、或 D-Lys; P2 可以是 A、L、V、M、Abu、Nle 或 Nva; P3 可以是 S; P4 可以是 E、Q、Nle、或 Nva; P5 可以是 K; P6 可以是 I、L、V、Nle 或 Nva; P7 可以是 F; P8 可以是

Y、F、Phe(4-F); P9 可以是 V; 和在 P10 的 PΩ 可以是 I 或 L。

另一个实施方案涉及一种 9 个氨基酸 P1-P9 的分离肽, 其可以在每个位点包括一个氨基酸。例如, P1 可以是 K、F、Y、W、Phg、Phe(4-F)、Phe(4-NO₂)、MeTyr、β-(3-苯并噻吩基)-Ala、或 D-Lys; P2 可以是 V; P3 可以是 S; P4 可以是 E、Q、Nle、或 Nva; P5 可以是 K; P6 可以是 I、L、V、Nle 或 Nva; P7 可以是 F; P8 可以是 Y、F、Phe(4-F); P9 可以是 V; 和在 P10 的 PΩ 可以是 I、L、V、或 Nle。

另一个实施方案涉及一种 9 个氨基酸 P1-P9 的分离肽, 其可以在每个位点包括一个氨基酸。例如, P1 可以是 K、F、Y、W、Phg、Phe(4-F)、Phe(4-NO₂)、MeTyr、β-(3-苯并噻吩基)-Ala、或 D-Lys; P2 可以是 L; P3 可以是 S; P4 可以是 E、Q、Nle、或 Nva; P5 可以是 K; P6 可以是 I、L、V、Nle 或 Nva; P7 可以是 F; P8 可以是 Y、F、Phe(4-F); P9 可以是 V; 和在 P10 的 PΩ 可以是 I、L、V、Nle 或 Nva。

另一个实施方案涉及具有下述序列的分离肽: K{L, V, M, I, D-Ala, D-Val, Nal-2, Aib, Abu, Nle, 或 Nva}SEKIFYV (SEQ ID NO. 2); 或{F, Phg, Y, Phe(4-F), Phe(4-NO₂), O-甲基-Tyr, 或 β-(3-苯并噻吩基)-Ala}ASEKIFYV (SEQ ID NO. 3); 或{Y, F, 或 W}{V, M, 或 I}SEKIFYV (SEQ ID NO. 4); 或{F 或 W}LSEKIFYV (SEQ ID NO. 5); 或 K{A, V, 或 L}SEKIFYI (SEQ ID NO. 6); 或 K{L 或 V}SEKIFYV-NH₂ (SEQ ID NO. 7); 或 FVSEKIFY{I, A, Nva, Abu, 或 MeVal} (SEQ ID NO. 8); 或 FVS{Q, Nle, 或 Nva}KIFYV (SEQ ID NO. 9); 或 FVSEK{L, V, Nle, 或 Nva}FYV (SEQ ID NO. 10); 或 FVSEKIF{F 或 Phe(4-F)}V (SEQ ID NO. 11); 或 KASEKIFYV{I 或 L} (SEQ ID NO. 12); 或 KVSEKIFYV{I, L, V, 或 Nle} (SEQ ID NO. 13); 或 KLSEKIFYV{L, V, Nle, 或 Nva} (SEQ ID NO. 14)。

另一个实施方案涉及具有下述序列的分离肽: K{L, V, M, Abu, Nle, 或 Nva}SEKIFYV (SEQ ID NO. 15); 或{F 或 Phg}A SEKIFYV (SEQ ID NO. 16); 或 YVSEKIFYV (SEQ ID NO. 17); 或 F{L, V, 或 I}SEKIFYV (SEQ ID NO. 18); 或 W{L 或 I}SEKIFYV (SEQ ID NO. 19); 或 K{V 或 L}SEKIFYI (SEQ ID NO. 20); 或 FVSEKIFY{I 或 Nva} (SEQ ID NO. 21)。

另一个实施方案涉及具有下述序列的分离肽: K{V 或 L}SEKIFYV

(SEQ ID NO. 22); 或{F 或 Y}ASEKIFYV (SEQ ID NO. 23); 或 FVSEKIFYI (SEQ ID NO. 24)。

另一个实施方案涉及 I 类 MHC/肽复合物, 其中所述肽具有在上文和本文的其它地方所描述的实施方案中的任何一种肽的序列。一方面, 所述复合物可以与识别 I 类 MHC/SSX-2₄₁₋₄₉ 复合物的 T 细胞受体 (TCR) 交叉反应。另一方面, 所述复合物可以是 HLA-A2/SSX-2₄₁₋₄₉ 复合物。

另一个实施方案涉及一种免疫原性组合物, 其可以包括上文和本文的其它地方所描述的肽实施方案中的任一种。一方面, 所述肽可以具有, 例如, 下述序列: K{L, V, M, Abu, Nle, 或 Nva} SEKIFYV (SEQ ID NO. 15); 或{F 或 Phg}A SEKIFYV (SEQ ID NO. 16); 或 YVSEKIFYV (SEQ ID NO. 17); 或 F{L, V, 或 I}SEKIFYV (SEQ ID NO. 18); 或 W{L 或 I}SEKIFYV (SEQ ID NO. 19); 或 K{V 或 L}SEKIFYI (SEQ ID NO. 20); 或 FVSEKIFY{I 或 Nva} (SEQ ID NO. 21), 或 K{V 或 L}SEKIFYV (SEQ ID NO. 22); 或{F 或 Y}ASEKIFYV (SEQ ID NO. 23); 或 FVSEKIFYI (SEQ ID NO. 24)。

一些其它的实施方案涉及 I 类 MHC 限制性 T 细胞表位 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, SLLMWITQC (SEQ ID NO. 25) 的类似物, 包含这些类似物的多肽, 以及表达所述类似物的核酸, 所述多肽可以由 pAPC 处理以呈递所述表位类似物。与野生型表位相比较, 所述类似物可以具有相似的或提高的免疫特性。

一个实施方案涉及分离的 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 肽, 其具有包括序列 SLLMWITQC (SEQ ID NO. 25) 的一个或多个氨基酸取代的序列, 所述 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 肽以充分的量存在, 足以激发从由针对具有序列 SLLMWITQC (SEQ ID NO. 25) 的表位的免疫而产生的 T 细胞系产生细胞因子。例如, 一方面, 所述充分的量可以小于 10 μ M。另一方面, 所述量可以小于 3 μ M。此外, 另一方面, 所述量可以小于 1 μ M。另一方面, 所述量小于 0.3 μ M。一方面, 所述一个或多个氨基酸取代可以包括至少一个标准的氨基酸。另一方面, 所述一个或多个氨基酸取代可以包括至少一个非标准的氨基酸。另一方面, 所述一个或多个氨基酸取代可以包括修饰的末端氨基酸。一方面, 所述修饰的末端氨基酸可以是酰胺化的 C-端

氨基酸。在另一方面，至少一种取代可以是氨基酸的添加，其中所述添加是 C 端添加。

一个实施方案涉及一种具有这样的序列的分离肽，其中：

P1 是 S, F, K, 或 W;

P2 是 L, I, V, Nle, 或 Nva;

P3 是 L;

P4 是 M, L, 或 N;

P5 是 W;

P6 是 I, A, L, V, 或 N;

P7 是 T;

P8 是 Q, E, D, 或 T;

在 P9 的 P Ω 是 C, V, I, L, A, Nva, Nle, V-NH₂, 或 L-NH₂; 并且

其中所述序列不是 SLLMWITQ{C, V, I, L, 或 A} (SEQ ID NO. 26), FVLMWITQA (SEQ ID NO. 27), 或 FILMWITQ{L 或 I} (SEQ ID NO. 28)。

另一实施方案涉及具有这样的序列的分离肽，其中：

P1 是 Y;

P2 是 L, V, I, Nle, 或 Nva;

P3 是 L;

P4 是 M, L, 或 N;

P5 是 W;

P6 是 I, A, L, V, 或 N;

P7 是 T;

P8 是 Q, E, D, 或 T;

在 P9 的 P Ω 是 V, I, L, Nva, Nle, V-NH₂, 或 L-NH₂; 并且

其中所述序列不是 YVLMWITL (SEQ ID NO. 29) 或 YLLMWIT{I 或 L} (SEQ ID NO. 30)。

另一个实施方案涉及一种分离的十聚体肽，其具有序列 {S 或 Y}LLMWITQ{C 或 V}{L, I 或 Nle} (SEQ ID NO. 31)。

另一个实施方案涉及一种分离的肽，其具有序列 SILMWITQ{C, V, L, 或 A} (SEQ ID NO. 32), YLLMWITQ{Nva 或 Nle} (SEQ ID NO. 33), F{L 或

V}LMWITQ{V, L,或 I} (SEQ ID NO. 34), Y{I, Nva, 或 Nle}LMWITQV (SEQ ID NO. 35), YLLWITQV (SEQ ID NO. 36), 或 TVLMWITQV (SEQ ID NO. 37)。

另一个实施方案涉及一种分离肽, 其具有序列{S 或 F}VLMWITQV (SEQ ID NO. 38), SLMWITQNva (SEQ ID NO. 39), 或 SNvaLMWITQV (SEQ ID NO. 40)。

另一个实施方案涉及一种具有序列 SNvaLMWITQV (SEQ ID NO. 40) 的分离肽。

一些实施方案涉及一种分离肽。所述肽可以包括这样的序列或基本上由其组成, 其中:

P0 是 X, XX, 或 XXX, 其中 X 指定任何氨基酸或无氨基酸; 和

P1 是 K, F, Y, W, Phg, Phe(4-F), Phe(4-NO₂), MeTyr, β -(3-苯并噻吩基)-Ala, 或 D-Lys; 和

P2 是 A, L, V, I, M, D-Ala, Nal-2, Abu, Aib, Nle, 或 Nva; 和

P3 是 S; 和

P4 是 E, Q, Nle, 或 Nva; 和

P5 是 K; 和

P6 是 I, L, V, Nle, 或 Nva; 和

P7 是 F; 和

P8 是 Y, F, Phe(4-F); 和

在 P9 的 P Ω 是 V, I, A, Nva, MeVal, Abu, 或 V-NH₂, 或 P9 是 V, 并且在 P10 的 P Ω 是 I, L, V, Nle 或 Nva; 和

P Ω +1 是 X, XX, 或 XXX, 其中 X 指定任何氨基酸或没有氨基酸; 并且

其中所述序列不是 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1);

所述分离肽可以包括下述序列或基本上由下述序列组成:

K{L, V, M, I, D-Ala, D-Val, Nal-2, Aib, Abu, Nle, 或 Nva}SEKIFYV (SEQ ID NO. 2); 或

{F, Phg, Y, Phe(4-F), Phe(4-NO₂), O-甲基-Tyr, 或 β -(3-苯并噻吩基-Ala)ASEKIFYV (SEQ ID NO. 3); 或

{Y, F, 或 W} {V, M, 或 I} SEKIFYV (SEQ ID NO. 4); 或
{F 或 W} LSEKIFYV (SEQ ID NO. 5); 或
K{A, V, 或 L} SEKIFYI (SEQ ID NO. 6); 或
K{L 或 V} SEKIFYV-NH₂ (SEQ ID NO. 7); 或
FVSEKIFY{I, A, Nva, Abu, 或 MeVal} (SEQ ID NO. 8); 或
FVS{Q, Nle, 或 Nva} KIFYV (SEQ ID NO. 9); 或
FVSEK{L, V, Nle, 或 Nva} FYV (SEQ ID NO. 10); 或
FVSEKIF{F 或 Phe(4-F)} V (SEQ ID NO. 11); 或
KASEKIFYV{I 或 L} (SEQ ID NO. 12); 或
KVSEKIFYV{I, L, V, 或 Nle} (SEQ ID NO. 13); 或
KLSEKIFYV {L, V, Nle, 或 Nva} (SEQ ID NO. 14)。

所述分离肽可以包括下述序列或基本上由下述序列组成:

K{L, V, M, Abu, Nle, 或 Nva} SEKIFYV (SEQ ID NO. 15); 或
{F 或 Phg} A SEKIFYV (SEQ ID NO. 16); 或
YVSEKIFYV (SEQ ID NO. 17); 或
F{L, V, 或 I} SEKIFYV (SEQ ID NO. 18); 或
W{L 或 I} SEKIFYV (SEQ ID NO. 19); 或
K{V 或 L} SEKIFYI (SEQ ID NO. 20); 或
FVSEKIFY{I 或 Nva} (SEQ ID NO. 21)。

此外, 所述分离肽可以包括下述序列或基本上由下述序列组成:

K{V 或 L} SEKIFYV (SEQ ID NO. 22); 或
{F 或 Y} ASEKIFYV (SEQ ID NO. 23); 或
FVSEKIFYI (SEQ ID NO. 24); 或
KVSEKIFYV (SEQ ID NO. 41)。

此外, 所述分离肽可以包括或基本上由序列 KVSEKIFYV (SEQ ID NO. 41)组成。

所述分离肽可以具有对于 I 类 MHC 肽结合裂口的亲和力。所述 MHC 可以是, 例如, HLA-A2。

一些实施方案涉及 I 类 MHC/肽复合物, 其中所述肽可以具有上文或本文其它地方所述的任一种肽的序列。所述 I 类 MHC/肽复合物可以与识

别 I 类 MHC/SSX-2₄₁₋₄₉ 复合体的 TCR 交叉反应。所述 I 类 MHC/肽复合体可以是 HLA-A2/SSX-2₄₁₋₄₉ 复合体。

其它实施方案涉及一种包括如上文和本文其它地方所述的多肽，其包埋在释放序列 (liberation sequence) 内部。

另一实施方案涉及免疫原性组合物，其包括如上文或本文其它地方所述的多肽。

其它实施方案涉及编码或者用于表达如上文或本文其它地方所述的多肽的核酸或核酸工具 (means)。并且，一些实施方案涉及包括这样的核酸或核酸工具的免疫原性组合物。

一些实施方案涉及诱导、维持、或增强 CTL 应答的方法。所述方法可以包括结节内施用如上文和本文其它地方所述的组合物。

其它实施方案涉及引发 (entraining) I 类 MHC 限制性 T 细胞应答的方法，所述方法可以包括结节内施用如上文或本文其它地方所述的组合物。所述方法还可以包括免疫强化剂的施用。

其它实施方案涉及诱导、维持、或引发 CTL 应答的方法，所述方法可以包括结节内施用如上文和本文其它地方所述的组合物。

一些实施方案涉及包括在序列 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1) 中有 1-3 个氨基酸取代的分离肽，其具有对于 I 类 MHC 结合裂口的亲和力，所述亲和力相似于或大于 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1) 对于所述 I 类 MHC 结合裂口的亲和力。解离半衰期可以相似于或大于 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1) 对于所述 I 类 MHC 结合裂口的解离半衰期。所述分离肽可以被具有对肽 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1) 的特异性的 T 细胞识别。

其它实施方案涉及包括或基本上由下述序列组成的分离肽，其中：

P1 是 K, F, Y, W, Phg, Phe(4-F), Phe(4-NO₂), MeTyr, β -(3-苯并噻吩基)-Ala, 或 D-Lys; 和

P2 是 A, L, V, I, M, D-Ala, Nal-2, Abu, Aib, Nle, 或 Nva; 和

P3 是 S; 和

P4 是 E, Q, Nle, 或 Nva; 和

P5 是 K; 和

P6 是 I, L, V, Nle, 或 Nva; 和

P7 是 F; 和

P8 是 Y, F, Phe(4-F); 和

在 P9 的 PΩ 是 V, I, A, Nva, MeVal, 或 Abu;

其中所述序列不是 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1);

或

P1 是 K, F, Y, W, Phg, Phe(4-F), Phe(4-NO₂), MeTyr, β-(3-苯并噻吩基)-Ala, 或 D- Lys; 和

P2 是 V, L, M, Abu, Nle, 或 Nva; 和

P3 是 S; 和

P4 是 E, Q, Nle, 或 Nva; 和

P5 是 K; 和

P6 是 I, L, V, Nle, 或 Nva; 和

P7 是 F; 和

P8 是 Y, F, Phe(4-F); 和

在 P9 的 PΩ 是 V, I, A, Nva, MeVal, Abu, 或 V-NH₂;

或

P1 是 K, F, Y, W, Phg, Phe(4-F), Phe(4-NO₂), MeTyr, β-(3-苯并噻吩基)-Ala, 或 D-Lys; 和

P2 是 A, L, V, M, Abu, Nle, 或 Nva; 和

P3 是 S; 和

P4 是 E, Q, Nle, 或 Nva; 和

P5 是 K; 和

P6 是 I, L, V, Nle, 或 Nva; 和

P7 是 F; 和

P8 是 Y, F, Phe(4-F); 和

P9 是 V; 和

在 P10 的 PΩ 是 I 或 L;

或

P1 是 K, F, Y, W, Phg, Phe(4-F), Phe(4-NO₂), MeTyr, β-(3-苯并噻吩基)-Ala, 或 D-Lys; 和

P2 是 V; 和

P3 是 S; 和

P4 是 E, Q, Nle, 或 Nva; 和

P5 是 K; 和

P6 是 I, L, V, Nle, 或 Nva; 和

P7 是 F; 和

P8 是 Y, F, Phe(4-F); 和

P9 是 V; 和

在 P10 的 P Ω 是 I, L, V, 或 Nle;

或

P1 是 K, F, Y, W, Phg, Phe(4-F), Phe(4-NO₂), MeTyr, β -(3-苯并噻吩基)-Ala, 或 D-Lys; 和

P2 是 L; 和

P3 是 S; 和

P4 是 E, Q, Nle, 或 Nva; 和

P5 是 K; 和

P6 是 I, L, V, Nle, 或 Nva; 和

P7 是 F; 和

P8 是 Y, F, Phe(4-F); 和

P9 是 V; 和

在 P10 的 P Ω 是 I, L, V, Nle 或 Nva。

一些实施方案涉及包括或基本上由这样的序列组成的分离肽, 其中:

P0 是 X, XX 或 XXX, 其中 X 指定任何氨基酸或没有氨基酸; 和

P1 是 S, F, K, W 或 Y; 和

P2 是 L, I, V, Nle, 或 Nva; 和

P3 是 L; 和

P4 是 M, L, 或 N; 和

P5 是 W; 和

P6 是 I, A, L, V, 或 N; 和

P7 是 T; 和

P8 是 Q, E, D, 或 T; 和

在 P9 的 P Ω 是 C, V, I, L, A, Nva, Nle, V-NH₂, 或 L-NH₂; 和

P Ω +1 是 X, XX, XXX, 其中 X 指定为任何氨基酸或没有氨基酸; 并且

其中所述序列不是 SLLMWITQ{C, V, I, L, 或 A} (SEQ ID NO. 26), FVLMWITQA (SEQ ID NO. 27), FILMWITQ{L 或 I} (SEQ ID NO. 28), YVLMWITL (SEQ ID NO. 29) 或 YLLMWIT{I 或 L} (SEQ ID NO. 30)。

P1 是 S, F, K, 或 W;

P2 是 L, I, V, Nle, 或 Nva;

P3 是 L;

P4 是 M, L, 或 N;

P5 是 W;

P6 是 I, A, L, V, 或 N;

P7 是 T;

P8 是 Q, E, D, 或 T;

在 P9 的 P Ω 是 C, V, I, L, A, Nva, Nle, V-NH₂, 或 L-NH₂; 并且

其中所述序列不是 SLLMWITQ{C, V, I, L, 或 A} (SEQ ID NO. 26), FVLMWITQA (SEQ ID NO. 27), 或 FILMWITQ{L 或 I} (SEQ ID NO. 28);

或

P1 是 Y;

P2 是 L, V, I, Nle, 或 Nva;

P3 是 L;

P4 是 M, L, 或 N;

P5 是 W;

P6 是 I, A, L, V, 或 N;

P7 是 T;

P8 是 Q, E, D, 或 T;

在 P9 的 P Ω 是 V, I, L, Nva, Nle, V, V-NH₂, 或 L-NH₂; 并且

其中所述序列不是 YVLMWITL (SEQ ID NO. 29) 或 YLLMWIT{I 或 L} (SEQ ID NO. 30)。

另一实施方案涉及 I 类 MHC/肽复合体, 其中所述肽可以具有上文或本文其它地方所述的实施方案中的任何肽的序列。一方面, 所述复合体可以与识别 I 类 MHC/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 复合体的 TCR 交叉反应。另一方面, 所述复合体可以是 HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 复合体。

在上述实施方案的一个方面中, 所述肽可以具有对于 I 类 MHC 肽结合裂口, 诸如 HLA-A2 的亲合力。

另一个实施方案涉及一种与释放序列缔合的多肽, 其包括本文所述的任何实施方案的肽序列。

另一个实施方案涉及包括本文所述的任何肽实施方案的免疫原性组合物。一方面, 所述肽可以具有如本文所列出的序列。

另一个实施方案涉及编码本文所述的任何肽实施方案的核酸, 但是优选地是那些没有非标准氨基酸取代的核酸。在另一个方面, 所述核酸可以编码在载体内。

另一个实施方案涉及包括编码本文所公开的任何肽实施方案的核酸的免疫原性组合物。

另一个实施方案涉及诱导 CTL 应答的方法, 其包括结节内施用本文所公开的实施方案的任何组合物或肽。在另一个方面, 所述方法可以允许维持 CTL 应答。在另一个方面, 所述方法可以允许增强 I 类 MHC 限制性 T 细胞应答。在另一个方面, 所述方法可以允许引发 I 类 MHC 限制性 T 细胞应答。在另一个方面, 所述方法还可以包括施用免疫强化剂。

一些实施方案涉及具有包括天然表位序列中 1-3 或 4 个氨基酸取代的序列的分离肽, 其中激发从通过针对具有所述序列的表位免疫而产生的 T 细胞系产生细胞因子所需要的所述肽的浓度不大于具体的浓度, 例如, 10 μ M, 1 μ M, 0.3 μ M, 等。所述 1-3 或 4 个氨基酸取代可以包括至少一个标准氨基酸取代和/或至少一个非标准氨基酸取代, 等等。所述至少一个非标准氨基酸可以是本文所述的那些中的任一种, 例如, 标准氨基酸的 D-立体异构体, Nva, 或 Nle。所述 1-3 或 4 个氨基酸取代可以包括修饰的末端氨基酸, 并且所述修饰的末端氨基酸可以是酰胺化的 C 末端氨基酸。一种取代可以是氨基酸的添加, 例如, 所述添加可以是 C 末端添加。

其它实施方案涉及具有某种氨基酸序列的肽, 所述氨基酸序列包括与

靶点相关抗原片段序列的至少一种差异,所述片段具有已知的或预测的对于 MHC 蛋白的肽结合裂口的亲和力,其中所述至少一种差异可以是取代位于所述片段中 MHC 结合基序锚定位的残基的 Nle 或 Nva。所述锚定位可以是初级锚定位,例如, P2 或 P Ω 。所述锚定位可以是辅助性锚定位。所述差异可以包括取代所述片段中的疏水性残基的 Nle 或 Nva 残基。在一些方面中, I, L, 或 V 可以是 MHC 结合基序锚定位中的优选的残基。一些方面中,所述肽可以具有约 8-约 14 个氨基酸的长度,或者更优选地,例如, 9-10 个氨基酸的长度。

所述 MHC 蛋白可以是人 MHC 蛋白,例如, I 类 HLA 蛋白。所述 MHC 蛋白可以是,例如,诸如 HLA-A2, A3, A24, A30, A66, A68, A69, B7, B8, B15, B27, B35, B37, B38, B39, B40, B48, B51, B52, B53, B 60, B61, B62, B63, B67, B70, B71, B75, B77, C4, Cw1, Cw3, Cw4, Cw6, Cw7, 和 Cw10 的类型。在一些方面中,所述 MHC 蛋白可以是 HLA-A2 或 A24。MHC 可以具有锚定残基结合口袋,其中所述口袋是与 HLA-A*0201 的 B-或 F-口袋同源的。负责形成结合口袋,并且所述结合口袋容纳表位锚定残基并且由此确定 MHC 分子的结合特异性的所述 MHC 残基,在本领域内是充分理解的。这样的信息的一种汇编可以在 FIMM (功能免疫学)网址以超文本转移链接(<http://sdmc.lit.org.sg:8080/fimm/>)找到。(也可以参见 Schönbach C., Koh J.L.Y., Sheng X., Wong L., 和 V.Brusic. FIMM, 功能分子免疫学数据库。 *Nucleic Acids Research* (核酸研究), 2000. 卷 28. No. 1 222-224; Schönbach C., Koh JL, Flower DR, Wong L., 和 Brusic V. FIMM, 功能分子免疫学数据库; 2002 更新, *Nucleic Acids Research* (核酸研究), 2002. 卷 30. No. 1 226-229; 以及 Zhang, C.等, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 281: 929-947, 1998; 它们中的每一个通过参考完全并入本申请中)。并且,所述肽可以具有至少一种结合特征,所述结合特征基本上等同于,或好于所述片段对于所述 MHC 的相应的特征。例如,与所述片段相比较,所述结合特征可以是提高的。例如,在一些实施方案中,所述结合特征可以是结合的亲和力或稳定性。

所述肽可以具有基本上等同于,或好于所述片段的免疫原性的免疫原性。所述免疫原性可以被增加。所述免疫原性可以引发与所述片段交叉反

应的免疫应答，或者可以引发 CTL 应答。所述免疫原性可以得到评估，例如，应用通过测定识别所述肽的免疫应答，通过测定识别所述片段的免疫应答的 MHC-四聚体检测，细胞因子检测，细胞毒性检测，应用体外免疫系统，或任何其它适宜的方法。所述免疫系统可以包括人细胞。所述免疫原性可以应用体内免疫系统进行评估，例如，包括转基因小鼠的免疫系统。所述肽可以具有如所述片段对于所述 MHC 的至少相似的结合特征。例如，在一些方面中，基于本公开内容，可以确定认为什么是“相似的”。在一些具体的方面，“相似性”可以基于，例如，用于半最大结合的肽浓度，相对亲和力，稳定性（一半解离时间）和交叉反应性/功能亲和力（avidity）。作为实例，如果它具有在天然肽的值的 2 倍、甚至是 3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍内的结果或特征，那么可以认为肽是相似的。例如，对于交叉反应性/功能亲和力，相似的结果可以是这样的，即，其中所述数据在天然肽的 3 和 10 倍之内。作为另一个实例，当在天然肽的 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 或 20%之内时，可以认为结合值的百分比是相似的。在一些方面中，当在天然序列的 2 或 3 倍之内时，可以认为 ED₅₀ 值是相似的。例如，相似的半解离时间可以在 2 或 3 倍之内。作为另一个实例，同野生型约有 2 倍不同的交叉反应性值可以认为是相似的。这些相似的值仅是示例性的，并且在一些实施方案的一些方面的内容中给出。基于本文的实验和教导，可以确定其它“相似的”值。

所述肽可以与所述片段免疫性交叉反应。因此，所述交叉反应性可以通过用所述片段免疫和评估所述肽的识别而进行评估。备选地，所述交叉反应性可以通过用所述肽进行免疫和评估所述片段的识别而进行评估。

例如，可以对上文和本文其它地方所述的肽进行修饰以包括两种差异。在一些实例中，每种差异可以独立地包括 Nle 或 Nva 残基。在一些实例中，一种差异可以不是 Nle 或 Nva 取代。并且，上文和本文其它地方所述的肽可以包括 3 种或更多的差异。

所述靶点-相关的抗原可以是肿瘤-相关抗原。所述靶点-相关的抗原可以是病原体-相关的抗原。

其它实施方案涉及包括如上述和本文其它地方描述的本发明肽的免疫原性组合物。其它实施方案涉及免疫方法，其包括给哺乳动物施用这样

的组合物,例如,直接施用到哺乳动物的淋巴系统。

其它实施方案涉及制备 T 细胞表位类似物的方法。所述方法可以包括提供靶点-相关抗原的片段的氨基酸序列,所述片段可以具有已知的或预测的对于 MHC 蛋白的肽结合裂口的亲和力;将与 MHC 结合基序的锚定位位置相对应的序列的至少一个氨基酸改变成 Nle 或 Nva;并且合成包含所改变的序列的肽。例如,所述合成可以是化学合成或任何其它的合成方法。

一些实施方案涉及 T 细胞表位肽类似物,其中所述类似物不同于天然表位肽,其通过用 Nle 或 Nva 残基置换与 MHC 结合基序的锚定位位置相对应的至少一个天然残基而实现。

一些实施方案涉及包括或基本上由这样的序列组成的分离肽,其中:

P0 是 X, XX 或 XXX, 其中 X 指定任何氨基酸或没有氨基酸; 和

P1 是 G, A, S, Abu 或 Sar; 和

P2 是 L, M, I, Q, V, Nva, Nle, 或 Abu; 和

P3 是 P 或 W; 和

P4 是 S; 和

P5 是 I; 和

P6 是 P; 和

P7 是 V; 和

P8 是 H; 和

P9 是 P, A, L, S 或 T; 和

在 P10 的 P Ω 是 I, L, V, Nva, 或 Nle; 和

P Ω +1 是 X, XX, 或 XXX, 其中 X 指定为任何氨基酸或没有氨基酸;

并且

其中所述序列不是 GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42)。

所述分离肽可以包含或基本上由下述序列组成:

{S, Sar, 或 Abu}LPSIPVHPI (SEQ ID NO. 43); 或

G{M或Nle}PSIPVHPI (SEQ ID NO. 44); 或

G{L, I, Nva, 或 Nle}WSIPVHPI (SEQ ID NO. 45); 或

GLWSIPVHP{Nva或V} (SEQ ID NO. 46); 或

GLPSIPVH{A或S}I (SEQ ID NO. 47); 或

GLPSIPVHP{V, L, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 48); 或
G{Nle}PSIPVHP{Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 49); 或
G{Nva}PSIPVHP{Nva} (SEQ ID NO. 50); 或
G{V, Nva, 或Nle}PSIPVHPV (SEQ ID NO. 51); 或
{Sar或Abu}LPSIPVHP{V或Nva} (SEQ ID NO. 52); 或
A{V, I, Nva, 或Nle}WSIPVHPI (SEQ ID NO. 53); 或
AVPSIPVHP{V或Nva} (SEQ ID NO. 54); 或
A{Nva}PSIPVHPV (SEQ ID NO. 55); 或
ALWSIPVHP{V或Nva} (SEQ ID NO. 56); 或
GVWSIPVHP{V或Nva} (SEQ ID NO. 57); 或
G{Nva}WSIPVHPV (SEQ ID NO. 58)。

此外, 所述分离肽可以包含或基本上由下述序列组成:

{Abu}LPSIPVHPI (SEQ ID NO. 59); 或
G{V, Nva, 或Abu}PSIPVHPI (SEQ ID NO. 60); 或
GLPSIPVHP{V或Nva} (SEQ ID NO. 61); 或
GLWSIPVHP{I或Nva} (SEQ ID NO. 62); 或
G{Nle}PSIPVHP{Nva} (SEQ ID NO. 63); 或
G{Nle或Nva}PSIPVHPV (SEQ ID NO. 64); 或
{A 或 Abu}LPSIPVHP{V 或 Nva} (SEQ ID NO. 65); 或
G{Nva}WPSIPVHP{I 或 V} (SEQ ID NO. 66); 或
A{Nva 或 Nle}WSIPVHPI (SEQ ID NO. 67); 或
A{V或Nva}PSIPVHPV (SEQ ID NO. 68)。

特别地, 所述分离肽可以包含或基本上由下述序列组成:

{Abu}LPSIPVHPI (SEQ ID NO. 59); 或
GLPSIPVHP{V或Nva} (SEQ ID NO. 61); 或
GLWSIPVHPI (SEQ ID NO. 69); 或
G{Nle}PSIPVHP{Nva} (SEQ ID NO. 63)。

优选地, 所述分离肽可以包含或基本上由下述序列组成:

GLPSIPVHPV (SEQ ID NO. 70)。

所述肽可以具有对于I类MHC肽结合裂口的亲和力, 并且所述I类

MHC可以例如是, HLA-A2。

其它实施方案涉及I类MHC/肽复合物, 其中所述肽具有上文及本文其它地方所述的肽序列。I类MHC/肽复合物可以与识别I类MHC/PSMA₂₈₈₋₂₉₇复合物的TCR交叉反应。所述I类MHC/肽复合物可以是HLA-A2/PSMA₂₈₈₋₂₉₇复合物。

一些实施方案涉及包括如上文及本文其它地方所述的肽序列的多肽, 所述肽序列包埋在释放序列内。

其它实施方案涉及包含上文及本文其它地方所述的肽的免疫原性组合物。

其它实施方案涉及编码或者用于表达如上文及本文其它地方所述的多肽的核酸或核酸工具 (means), 以及包括所述核酸或核酸工具的免疫原性组合物。

一些其它的实施方案涉及诱导、维持、或增强CTL应答的方法。所述方法可以包括结节内施用如上文及本文其它地方所述的组合物。

此外, 一些方法涉及引发I类MHC-限制性T细胞应答的方法, 所述方法可以包括结节内施用如上文及本文其它地方所述的组合物。所述方法还可以包括免疫强化剂的施用。

其它实施方案涉及包括在序列GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42)中有1-3个取代的分离肽, 其具有对于I类MHC结合裂口的亲和力, 所述亲和力相似于或大于GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42)对于所述I类MHC结合裂口的亲和力。半解离时间可以相似于或大于GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42)从所述I类MHC结合裂口半解离的时间。所述分离肽可以被具有针对肽GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42)的特异性的T细胞识别。

一些实施方案涉及包含这样的序列或基本上由其组成的分离肽, 其中:

P0是X, XX, 或XXX, 其中X指定任何氨基酸或没有氨基酸; 和

P1是S, K, F, Y, T, Orn, 或 Hse; 和

P2是L, V, M, I, Nva, Nle, 或 Abu; 和

P3是L, Nva, Nle 或 Abu; 和

P4是Q; 和

P5是H; 和

P6是L, Nva, Nle, 或 Abu; 和

P7是I; 和

P8是G, A, S, 或 Sar; 和

在P9的PΩ是L, V, I, A, Nle, Nva, Abu, 或 L-NH₂; 和

PΩ+1是X, XX, 或XXX, 其中X指定任何氨基酸或没有氨基酸; 并且其中所述序列不是SLLQHLIGL (SEQ ID NO. 71)。

所述分离肽可以包含或基本上由下述序列组成:

{K, F, Y, T, Orn, 或Hse}LLQHLIGL (SEQ ID NO. 72); 或

S {V, M, I, Nva, Nle, 或Abu}LQHLIGL (SEQ ID NO. 73); 或

SL{Nva, Nle 或 Abu}QHLIGL (SEQ ID NO. 74); 或

SLLQH{Nva, Nle 或 Abu}IGL (SEQ ID NO. 75); 或

SLLQHLI{A, S, 或 Sar}L (SEQ ID NO. 76); 或

SLLQHLIG{V, I, A, Nle, Nva, Abu, 或 L-NH₂} (SEQ ID NO. 77); 或

{F, Y, T, Orn, 或 Hse}{Nva, Nle, M, 或I}LQHLIGL (SEQ ID NO. 78);

或

S{Nva, Nle, 或M}LQHLIG{Nva, Nle, 或V} (SEQ ID NO. 79); 或

{K, F, Y, T, Orn, 或 Hse}LLQHLIGV (SEQ ID NO. 80); 或

{F 或 T}LLQHLIG{Nle} (SEQ ID NO. 81); 或

{F 或 T}{Nva 或 M}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO. 82)。

此外, 所述分离肽可以包含或基本上由下述序列组成:

{F, Y, T, Orn, 或 Hse}LLQHLIGL (SEQ ID NO. 83); 或

S{Nva, Nle, 或 M}LQHLIGL (SEQ ID NO. 84); 或

SLLQHLIG{Nle, Nva, 或 L-NH₂} (SEQ ID NO. 85); 或

SLLQH{Nva 或 Abu}IGL (SEQ ID NO. 86); 或

S{Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO. 87); 或

{F 或 T}{L 或 Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO. 88)。

此外, 所述分离肽可以包含或基本上由下述序列组成:

S{L或Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO. 89); 或

T{Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO. 90)。

所述分离肽可以包含或基本上由序列S{Nva}LQHLIG{Nle} (SEQ ID NO. 87) 组成。

所述分离肽可以具有对于I类MHC肽结合裂口的亲和力，并且例如，所述I类MHC可以是HLA-A2。

实施方案涉及I类MHC/肽复合体，其中所述肽可以具有上文及本文其它地方所公开的肽序列。I类MHC/肽复合体可以与识别I类MHC/PRAME₄₂₅₋₄₃₃复合体的TCR交叉反应。所述I类MHC/肽复合体可以是HLA-A2/PRAME₄₂₅₋₄₃₃复合体。

其它实施方案涉及包括如上文及本文其它地方所述的肽序列的多肽，所述肽序列与释放序列缔合。

其它实施方案涉及包含上文及本文其它地方所述的肽的免疫原性组合物。

一些实施方案涉及编码和用于表达如上文及本文其它地方所述的多肽的核酸和核酸工具，以及包括所述核酸及工具的免疫原性组合物。

一些其它的实施方案涉及诱导、维持、或增强CTL应答的方法，所述方法可以包括结节内施用如上文及本文其它地方所述的组合物。一些实施方案涉及引发I类MHC-限制性T细胞应答的方法，所述方法可以包括结节内施用如上文及本文其它地方所述的组合物。在一些实施方案中，所述方法还包括免疫强化剂的施用。

一些实施方案涉及包括在序列SLLQHLIGL (SEQ ID NO. 71)中有1-3个取代的分离肽，其具有对于I类MHC结合裂口的亲和力，所述亲和力相似于或大于SLLQHLIGL (SEQ ID NO. 71)对于所述I类MHC结合裂口的亲和力。半解离时间可以相似于或大于SLLQHLIGL (SEQ ID NO. 71)从所述I类MHC结合裂口半解离的时间。所述分离肽可以被具有针对肽SLLQHLIGL (SEQ ID NO. 71)的特异性的T细胞识别。

其它实施方案涉及产生并且获得包括(representing)免疫活性的并且在一个或多个MHC锚定残基携带非天然氨基酸的肽的组合物方法。

本发明的另一个实施方案涉及pSEM质粒以及由这一质粒表达的与Melan-A₂₆₋₃₅和/或酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇表位相对应的免疫原性肽。pSEM质粒以允许它们通过pAPCs表达并且呈递的方式而编码Melan-A和酪氨酸酶表位。

pSEM质粒的详细信息在美国专利申请公布号20030228634中公开,所述专利申请通过引用完全结合于此。

在本发明的具体的实施方案中,提供由pSEM质粒表达的免疫原性肽的分离的肽类似物,其基本上由下述序列组成: E{A, L, Nva, 或 Nle}AGIGILT{V, Nva, 或 Nle} (SEQ ID NO. 91); 或 Y{M, V, Nva, 或 Nle}DGTMSQ{V, Nva, 或 Nle} (SEQ ID NO. 92); 并且其中所述序列不是E{A 或 L}AGIGILTV (SEQ ID NO. 93) 或 YMDGTMSQV (SEQ ID NO. 94)。本发明的分离肽类似物可以选自由下列各项组成的组: ELAGIGILT Nva (SEQ ID NO. 95), ENvaAGIGILTV (SEQ ID NO. 96), YVDGTMSQ Nva (SEQ ID NO. 97), YVDGTMSQV (SEQ ID NO. 98)和 YMDGTMSQ Nva (SEQ ID NO. 99)。

在其它实施方案中,所述分离肽类似物是基本上由氨基酸序列 ENvaAGIGILTV (SEQ ID NO. 96)组成的类似物。在其它实施方案中,所述分离肽类似物是基本上由氨基酸序列YMDGTMSQ Nva (SEQ ID NO. 97)组成的类似物。在其它实施方案中,所述肽具有针对I类MHC肽结合裂口的亲和力。所述I类MHC是HLA-A2。

本发明的其它实施方案涉及包括在序列EAAGIGILTV (SEQ ID NO. 100)中有1-3个取代的分离肽类似物,其具有对于I类MHC结合裂口的亲和力,所述亲和力相似于或大于EAAGIGILTV (SEQ ID NO. 100)对于所述I类MHC结合裂口的亲和力。在其它实施方案中,半解离时间相似于或大于EAAGIGILTV (SEQ ID NO. 100)从所述I类MHC结合裂口半解离的时间。在其它实施方案中,所述分离肽被具有针对肽EAAGIGILTV (SEQ ID NO. 100)的特异性的T细胞识别。

在另一个实施方案中,本发明涉及包括在序列YMDGTMSQV (SEQ ID NO. 94)中有1-3个取代的分离肽类似物,其具有对于I类MHC结合裂口的亲和力,所述亲和力相似于或大于YMDGTMSQV (SEQ ID NO. 94)对于所述I类MHC结合裂口的亲和力。在其它实施方案中,半解离时间相似于或大于YMDGTMSQV (SEQ ID NO. 94)从所述I类MHC结合裂口半解离的时间。在其它实施方案中,所述分离肽被具有针对肽YMDGTMSQV (SEQ ID NO. 94)的特异性的T细胞识别。

本发明的实施方案还涉及I类MHC/肽复合体,其中所述肽具有下述肽序列: E{A, L, Nva, 或Nle}AGIGILT{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 91); 或 Y{M, V, Nva, 或Nle}DGTMSQ{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 92); 并且其中所述序列不是E{A 或 L}AGIGILTV (SEQ ID NO. 93) 或 YMDGTMSQV (SEQ ID NO. 94)。在其它实施方案中,所述I类MHC/肽复合体与识别I类MHC/Melan-A₂₆₋₃₅复合体的TCR交叉反应。所述I类MHC/肽复合体是HLA-A2/Melan-A₂₆₋₃₅复合体。

在另一个实施方案中,所述I类MHC/肽复合体与识别I类MHC/酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇复合体的TCR交叉反应。所述I类MHC/肽复合体是HLA-A2/酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇复合体。

本发明的一些实施方案涉及包括包埋在释放序列内的下列肽序列的多肽: E{A, L, Nva, 或Nle}AGIGILT{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 91); 或 Y{M, V, Nva, 或 Nle}DGTMSQ{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 92); 其中所述序列不是E{A或L}AGIGILTV (SEQ ID NO. 93) 或 YMDGTMSQV (SEQ ID NO. 94)。在另一个实施方案中,本发明涉及包括下述的任何肽的免疫原性组合物: E{A, L, Nva, 或Nle}AGIGILT{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 91); 或Y{M, V, Nva, 或Nle}DGTMSQ{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 92); 并且其中所述序列不是E{A 或 L}AGIGILTV (SEQ ID NO. 93) 或 YMDGTMSQV (SEQ ID NO. 94)。本发明还涉及包括含有下述任何肽的多肽的免疫原性组合物: E{A, L, Nva, 或Nle}AGIGILT{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 91); 或Y{M, V, Nva, 或Nle}DGTMSQ{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 92), 并且涉及编码这样的多肽的核酸。本发明的实施方案还涉及包括所述核酸的免疫原性组合物。

本发明的免疫原性组合物可以作为针对癌症诸如成胶质细胞瘤(glioblastoma)和黑素瘤的免疫策略的引发部分而施用,但是并不限于此。另外,与Melan-A₂₆₋₃₅和酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇表位及表位类似物相对应的肽可以作为同一免疫策略的增强部分而施用。在优选的实施方案中,所述肽类似物E{A, L, Nva, 或Nle}AGIGILT{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 91); 或 Y{M, V, Nva, 或Nle}DGTMSQ{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 92)可以用于增强步骤。本发明所用的引发-和-增强流程如在美国专利公布号

20050079152和美国临时专利申请号 60/640,402中更详细地公开, 二者的题目皆为METHODS TO ELICIT, ENHANCE AND SUSTAIN IMMUNE RESPONSES AGAINST MHC CLASS I-RESTRICTED EPITOPES, FOR PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC PURPOSES (用于预防或治疗目的, 激发、增强并且维持针对I类MHC-限制性表位的免疫应答的方法), 其每一个都通过引用完全结合于此。

因此, 在一个实施方案中, 提供诱导、维持或增强CTL应答的方法。所述方法可以包括结节内施用包括编码某种多肽的核酸的免疫原性组合物, 所述多肽包括由pSEM质粒表达的免疫原性肽的肽序列, 所述肽序列基本上由下述序列组成: E{A, L, Nva, 或Nle}AGIGILT{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 91); 或Y{M, V, Nva, 或Nle}DGTMSQ{V, Nva, 或Nle} (SEQ ID NO. 92)。在其它实施方案中, 提供一种引发I类MHC-限制性T细胞应答的方法, 所述方法包括结节内施用免疫原性组合物和免疫强化剂。在其它实施方案中, 提供诱导、维持或引发CTL应答的方法, 所述方法包括结节内施用本文公开的任何免疫原性组合物。

附图简述

图 1A 和 B 总结对于 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物分别在九聚体(nonamer)和十聚体的每个单独的氨基酸位置的取代。

图 2 是鉴定类似物的优选实施方案方法的示意图。

图 3 是显示在单一位置取代的 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 4 是显示在两个位置取代的 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 5 是显示在多于两个位置取代的 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 6 是显示包括指定 (nominal) 的 41-49 肽的 SSX-2₄₁₋₄₉ 十聚体类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 7 是显示 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物注射时间表的图表。

图 8 是显示 SSX-2₄₁₋₄₉ A42V、A42L 类似物和野生型在肿瘤细胞裂解

物中的活性的柱状图。

图 9 是显示对于体内细胞毒性研究和离体 (*ex vivo*) 细胞毒性研究的注射时间表以及用于加强的 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物肽的时间表。

图 10 是显示与对照 (野生型肽) 和 EAA (Melan-A 26-35) 相比, 许多类似物的体内特异性裂解结果的表格。

图 11 是显示与对照 (野生型肽) 和 EAA 相比, 许多 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物的体内特异性裂解结果, 以及 MHC 结合和 MHC 稳定性的表格。

图 12 是显示与野生型对照相比, 用许多类似物免疫后所获得的肿瘤细胞 (624.38 人肿瘤细胞) 的特异性裂解百分数的柱状图。

图 13A-C 是总结分别在九聚体和十聚体的每个单独的氨基酸位置的取代, 以及对于每个所获得的结果的表格。

图 14 是显示对于分析和检测 NY-ESO-1 类似物所用的注射时间表的时间表。

图 15A-C 显示当通过从受激发的动物移除脾和 PBMC 并且通过流式细胞术测量 CFSE 荧光所测量的靶细胞的特异性消除。

图 16A 和 B 是显示在用 NY-ESO-1 类似物加强后, 针对用野生型肽包被的靶细胞的体内细胞毒性的柱状图。

图 17A 和 B 是显示当通过细胞因子的产生进行评估时, 对所述类似物引发针对所述野生型表位的增强的免疫性的能力的离体分析的柱状图。

图 18 图示用于确认 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 表位的抗原性的流程, 以及所述检测的结果。

图 19 是显示在单一位置取代的 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 20 是显示在两个位置取代的 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 21 是显示在多于两个位置取代的 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 22 是显示通过 Elispot 测定的各种 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 类似物的免疫原性的柱状图。

图 23 是显示通过 Elispot 测定的 I297V 类似物抗-PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 应答的

增强的线状图。

图 24 是显示用 I297V 类似物加强的结果的柱状图。所述检测显示所述加强导致针对 PSMA⁺人肿瘤系的细胞毒性免疫性。

图 25 图示确认 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 表位抗原性的流程，以及所述检测的结果。

图 26 是显示在单一位置取代的 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 27 A 和 B 是显示在两个位置取代的 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 28 是显示在多于两个位置取代的 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物的交叉反应性和功能亲和力的表格。

图 29 是显示通过 Elispot 测定的 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物的免疫原性的柱状图。

图 30 显示使用 L426Nva L433Nle 类似物进行加强的结果。所述检测表明所述加强导致针对天然表位包被的细胞的细胞毒性免疫性。

图 31 显示用于 PRAME 类似物的体内评估的流程，以及显示所述评估的结果的柱状图。

图 32 显示在类似物诱导的、天然表位重新刺激的 T 细胞内产生细胞因子的离体刺激的流程，及显示所述评估的结果的柱状图。

图 33 是显示用 L426Nva L433Nle 类似物进行加强的结果的柱状图。所述检测表明所述加强导致针对人肿瘤细胞系的细胞毒性免疫性。

图 34 描述针对 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 体外免疫的流程。

图 35 显示在用 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物体外免疫后四聚体分析的结果。

图 36 描述质粒 pCTLR2 的结构，其为表达 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 表位的质粒。

图 37 是显示其中人肿瘤细胞（624.38）被 T 细胞裂解的实验的检测结果的柱状图，其中所述 T 细胞用质粒 DNA 激活并且用肽加强。

图 38 是显示在用 Tyr₃₆₉₋₃₇₇ 质粒激活和用 V377Nva 类似物肽加强后的四聚体分析的结果的柱状图。

图 39 是显示针对类似的酪氨酸酶和 Melan A 表位的体内应答的柱状图。

图 40 是显示酪氨酸酶类似物免疫原性评估流程的时间表。

图 41 是显示针对与来自 HHD 的效应细胞接触的 624.38 细胞的免疫应答结果的柱状图，所述 HHD 用质粒激活并且用 Tyr₃₆₉₋₃₇₇ 类似物加强。

优选实施方案详述

包含 T 细胞表位的肽通常是弱免疫原或免疫调节剂，原因在于下列多种因素的一种：亚最佳的药物代谢动力学模式，与 MHC 分子的有限结合（减小的 K_{on} 和增加的 K_{off} ），或在正常免疫所有组成成分中存在的 T 细胞的减少的内在识别（例如，通过各种形式的耐受性）。已经寻找了许多方法来提高肽的免疫特性，特别是其序列不同于天然表位的肽的筛选和应用。在本领域内，这样的类似物通过各种命名而已知，诸如杂环（heteroclytic）肽和改变的肽配体(APL)。这样的类似物的产生最经常地应用来自于遗传编码的残基的标准形式的氨基酸（参见，例如，Valmori, D. 等., *J. Immunol.*（免疫学杂志）160: 1750-1758, 1998）。典型地，非标准氨基酸的应用与提高所述肽的生化稳定性的努力相关（参见，例如，Blanchet, J.-S.等., *J. Immunol.*（免疫学杂志）167:5852-5861, 2001）。

一般地，可以将类似物分类成下述两种主要类别：(1) 修饰肽锚定残基，以获得更好的 HLA 结合模式和更高的免疫应答，和 (2) 修饰肽锚定残基和 TCR 接触残基，以避免 T 细胞对自身抗原的耐受性。

本文所述发明的一些实施方案涉及具有至少一种下述保留的或提高的特性的类似物，其包括但不限于：

1. 与 TCR 的交叉反应性和功能亲和力；
2. 与 I 类 MHC 结合的亲和力和稳定性；
3. 对免疫性的体内作用，通过细胞毒性进行评估；
4. 对免疫性的体内作用，通过 IFN- γ 的离体产生进行评估；和/或
5. 对蛋白质水解的增加的抗性。

一些实施方案涉及肽序列，其包括类似物，其中所述序列的氨基酸用位置指示显示，例如，P1, P2, P3, P Ω 等。另外，所述肽序列可以显示为包括 P0 和/或 P Ω +1 指示。在一些方面中，P0 可以是 X, XX, 或 XXX，其中 X 是任何氨基酸或没有氨基酸。类似地，在一些方面中，P Ω +1 可以是 X,

XX, 或 XXX, 其中 X 是任何氨基酸或没有氨基酸。因此, 例如, XXX 可以意指任何氨基酸残基的任何组合或没有氨基酸残基。因此, 这些实施方案可以包括在特定序列的 N 端或 C 端具有多达 3 个添加的氨基酸 (具有氨基酸残基的任何组合) 的多肽。并且, 在一些方面中, 所述实施方案可以在 N 端或 C 端不包括另外的氨基酸残基。

在本领域内很好理解负责形成结合口袋的 MHC 残基, 哪个结合口袋容纳表位锚定残基, 并且因此定义 MHC 分子的结合特异性。这样的信息的一种汇编可以在 FIMM (功能免疫学) 网址以超文本转移链接(<http://sdmc.lit.org.sg:8080/fimm/>)找到, 将其全部内容并入本文作为参考。(还可以参见 Schönbach C., Koh J.L.Y., Sheng X., Wong L., 和 V.Brusic. FIMM, a database of functional molecular immunology (功能分子免疫学数据库). Nucleic Acids Research (核酸研究), 2000. 卷 28. No. 1 222-224; 和 Schönbach C., Koh JL, Flower DR, Wong L., 和 Brusica V. FIMM, 功能分子免疫学数据库; 2002 更新. Nucleic Acids Research (核酸研究), 2002. 卷 30. No. 1 226-229; 它们中的每一个通过参考完全并入本申请中)。

当用于本文时, 短语“释放序列”是指包括或编码表位或类似物的肽, 其被包埋在更大的序列中, 所述更大的序列提供容许所述表位或类似物通过免疫蛋白酶的加工, 直接地或者与 N 端修剪或其它生理性过程组合, 而被释放出来的背景环境(context)。在一些方面中, 所述类似物或表位可以是设计的或被改造的。

其它实施方案涉及表位阵列和其它多肽, 其包括可以被处理而释放所述类似物的表位类似物序列。其它实施方案涉及核酸, 特别是 DNA 质粒, 其编码所述多肽, 或只是编码类似物, 以及它们从所述核酸的表达。所述类似物、包含它们的多肽、和编码核酸可以全部都是免疫原性组合物的成分, 特别是适于淋巴内递送的组合物, 所有这些组合物涉及其它实施方案。

具有提高的免疫特性的肽类似物可以通过修饰参与同 MHC 分子相互作用的锚定残基而设计, 以增加结合并且稳定 MHC-肽复合体的形成。这样的修饰可以由限制性 MHC 分子的结合基序或优选锚定残基的知识而指导。还存在可以用来预测携带各种取代的类似物的特性的各种规则、指标和运算法则, 限制条件是, 所述取代选自遗传可编码的氨基酸的标准系列。

然而,没有预测用非标准氨基酸置换锚定残基的结果的数据库或运算法则,并且先前没有充分研究它们的有效性。本文公开了非标准氨基酸正亮氨酸(Nle)和正缬氨酸(Nva)可以有利地取代 MHC-结合肽的锚定残基位置。优选地,它们应该被置于由疏水性或大的氨基酸,特别是 I、L、或 V 有利占据的位置。

MHC-结合基序通常依据在 8-10 个氨基酸跨度内指定位置的优选残基侧链而定义(参见,例如, Rammensee 等., "MHC Ligands and Peptide Motifs, (MHC 配体和肽基序)" (Molecular Biology Intelligence Unit (分子生物学信息所)), Springer-Verlag, 德国, 1997 兰迪斯生物科学 (Landes Bioscience), 奥斯汀, 德克萨斯州; 和 Parker, 等., "Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains, (基于单个肽侧链的独立结合排列潜在的 HLA-A2 结合肽的方案)" J. Immunol. (免疫学杂志) 152:163-175)。网上运算法则也是可用的,其可以用来预测 MHC 结合。参见,例如, Hans-Georg Rammensee, Jutta Bachmann, Niels Emmerich, Stefan Stevanovic 的全球网页: SYFPEITHI: 关于 MHC 配体和肽基序的国际互联网数据库 (An Internet Database for MHC Ligands and Peptide Motifs)(超文本转移链接访问通过: syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm), 和 "bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind"。对于 I 类-限制性表位, C 端位置, P Ω , 典型地是初级锚定基。第二个位置, P2, 也通常是初级锚定基, 或者, 备选地, P3 和/或 P5 可以起到这种作用。位置 P2 到 P7 都被认为是用于一种或另一种 MHC 的次级或辅助性锚定位置(参见 Rammensee 等., 和参见美国专利申请公布号 20030215425 的表 6 (美国专利申请号 10/026,066, 于 2001 年 12 月 7 日递交, 题目为 EPITOPE SYNCHRONIZATION IN ANTIGEN PRESENTING CELLS (抗原呈递细胞中的表位同步性); 其通过参考将其全部公开内容完全并入本申请中)。对于 II 类-限制性表位, P1, P4, P6, P7 和 P9 已被认为是锚定位置。前述内容意欲作为一般指导, 并且应该被视为是示例性的而不是详尽的或限制性的。结合基序、锚定残基等的许多分析和汇编可以在科学和专利文献中以及在国际互联网上找到。当与本文的教导相结合时, 它们的惯例和结果进一步为本领域的技术人员提

供关于设计表位类似物的有用的指导。

实际上结合到呈递 MHC 分子上的肽的长度可以比指定的基序序列更长。II 类 MHC 分子的结合裂口末端是开放的, 以便所结合的肽可以在核心基序的任一端延伸。相反, 在 I 类 MHC 分子中所述结合裂口在两端是闭合的, 以致所结合的肽的末端通常必须与所述基序相对应, 然而, 长度上的显著变化可以通过将所结合的肽的中心区域凸起和折叠而进行调整, 以致长度上多达至少大约 14 个氨基酸的肽可被呈递 (参见, 例如, Probst-Kepper, M. 等., *J. Immunol.* (免疫学杂志) 173:5610-5616, 2004)。

表位类似物可以具有关于与 I 类 MHC 分子相互作用的提高的 K_{on} 和 K_{off} , 以及保留的或增加的与识别初始表位的 T 细胞受体的相互作用, 在特异性 T 细胞群体增加的扩展中所反映出来的改进的或提高的体内或离体活性, 通过特异性 T 细胞的提高的细胞因子生产, 或针对携带天然表位的靶点的体内或体外细胞毒性, 所述细胞毒性由与所述肽反应的 T 细胞介导。另外, 这样的类似物可以以更理想的方式与多种不同的 I 类 MHC 分子相互作用。

这样具有提高的免疫特性的肽类似物可以包括一种或多种取代, 其包括一种或多种非标准氨基酸取代。在非标准氨基酸取代中, 由于, 如下文示例, 它们不但可以提高与 I 类 MHC 的相互作用, 而且可以保持与对天然表位特异性的 TCR 的交叉反应性, 并且表现出提高的体内免疫模式, 所以由正缬氨酸或正亮氨酸组成的对初级锚定残基的取代是优选的。例如, 将 P2 氨基酸残基从 A、L 或 V 突变成正缬氨酸或正亮氨酸, 改善了免疫特性, 并且因此是优选的。另外, 将 C 端残基修饰成正缬氨酸或优选地正亮氨酸, 改善了所述类似物的免疫特征。另外, 包括在初级和/或次级锚定残基的多种取代的类似物可以与改善的免疫特性相关, 所述类似物包括在 P2 或 P Ω 的正缬氨酸和/或正亮氨酸。

正缬氨酸(Nva)和正亮氨酸(Nle)的某些应用在美国专利号 6,685,947、PCT 公布号 WO 03/076585 A2 和 WO 01/62776 A1 以及美国专利公布号 20040253218A1 中提及。这些参考文献没有教导在 MHC 结合肽的锚定位取代的 Nva 或 Nle 提高免疫特性的一般用途。所述 '218 公布教导所取代的残基应该结合在 TCR-相互反应位置, 而不是 MHC-相互反应位置。

在本发明的另一个实施方案中,所述肽是衍生于 NS-特异性抗原的肽的类似物,所述 NS-特异性抗原是免疫原性的但不是致脑炎性的。用于这一目的最适宜的肽是那些其中致脑炎性自身肽在 T 细胞受体 (TCR) 结合位点而不是在 MHC 结合位点被修饰的肽,以致免疫应答被激活而不是使之无反应性(Karin 等, 1998; Vergelli 等, 1996)。

其他人还提议各种非标准氨基酸可以被取代而并不破坏肽的用途(参见,例如 WO 02/102299A)。非标准氨基酸还可以用来研究 TCR 和 MHC-肽复合体之间的相互作用(参见,例如 WO 03/076585A 和 Sasada, T.等. Eur. J. Immunol. (欧洲免疫学杂志) 30:1281-1289, 2000)。Baratin 显示了在由鼠 MHC 分子 H2-Db 呈递的 p53 肽中 Nle 和 Abu 在非锚定位置和 Nle 在锚定位置的一些应用(J. Peptide Sci. (肽科学杂志) 8:327-334, 2002)。上述文件的每一个都通过引用完全结合于此。

WO 01/62776 中所公开的结合 Nle 的 HLA-A2.1-限制性肽衍生于 CEA、p53、和 MAGE-3。在 CEA 肽 I(Nle)GVLVGV 和 p53 肽 S(Nle)PPPGTRV (SEQ ID NO. 101)中, Nle 存在于 P2 位置。没有提供关于正亮氨酸的一般用途的教导,并且没有提供当与天然序列比较时,表明这些取代怎样或者是否改变所述类似物的特性的公开内容。

本发明实施方案的一些涉及在促进与 MHC 结合的位置结合 Nva 和/或 Nle 的表位类似物。一些实施方案特异地排斥在 HLA-A2.1-限制性表位,来自 CEA、p53、和/或 MAGE-3 的 HLA-A2.1 表位,或衍生于 MAGE-3、CEA、和/或 p53 的其它肽中应用 Nle 和/或 Nva。在一些实施方案中,特异性排除了在上述引用的专利参考文献中公开的一种或多种具体序列。在其它实施方案中,排除鼠或其它非人 MHC-限制性表位的类似物。其它示例性实施方案包括 Nle 和/或 Nva 在 P3、P5、和/或 P Ω 锚定位置、在辅助性锚定位置的应用,以在不是衍生于癌基因或胎性癌蛋白的肽的锚定位置,和在衍生于 CT 抗原的肽的锚定位置制备非-A2-或非-A2.1-HLA 限制性表位的类似物。

一般地,这样的类似物可以有效用于各种疾病,诸如感染、癌症或炎症疾病的免疫治疗和/或预防,其作为单一药剂或在组合治疗中而应用。这是由于它们与 MHC 分子和 T 细胞受体的最优化相互作用,其是免疫应

答发生和调控的关键。

类似物制备

所述类似物可以应用本领域的技术人员已知的任何方法而制备，包括应用肽合成方法，或表达编码需要的肽类似物的核酸而制备所述肽。因此，当所述类似物包括一种或多种非标准氨基酸时，更可能地，它们通过肽制备方法而产生。当所述类似物仅包括一种或多种标准氨基酸的取代时，它们可以应用本领域的技术人员已知的任何方法从表达载体表达出来。备选地，所述肽可以应用基因治疗方法而表达。

类似物检测

为了评估类似物的有效性和/或活性、和/或改善的特性并且以任何方式将所述类似物与野生型相比较，进行一种或多种下述检测：对于 HLA-A*0201 的肽结合亲和力；肽-HLA-A*0201 复合体稳定性检测；交叉反应性检测（通过野生型肽-特异性的 CTL 识别肽类似物，或通过应用肽类似物所产生的 CTL 来识别野生型肽）；免疫原性检测，诸如 IFN- γ 分泌检测，细胞毒性检测，和/或 Elispot 检测；抗原性检测，诸如体外肿瘤细胞裂解检测，离体肿瘤细胞裂解，和体内肿瘤细胞裂解；以及蛋白质水解检测，以鉴定对蛋白质水解的增加的抗性。示例性检测的详细内容在下述实施例中陈述。

应用上述方法，鉴定有用的和/或改善的类似物。对于有用，类似物可以不必在所述被鉴定的检测中被发现是改善的。例如，有用的肽可以含有其它特性，诸如在耐受性患者中有用或抗蛋白质水解。对于改善，可以发现肽在与 TCR 结合、与 MHC 分子结合中具有明显的提高，并且有提高的免疫应答或任何其它生物活性。在一些实例中，当应用鼠检测系统时，有用的肽似乎不是改善的，但是由于在人免疫系统中的差异，当在人中检测时确定是改善的。在一些情形中，所述的有效性可以源于在耐受性患者中破坏耐受的能力。在一些实例中，所述有用性可以源于这样的能力，即，应用所述肽作为基础用于进一步的取代以鉴定改善的类似物。

类似物的应用

应用所公开的类似物诱导、引发 (entraining)、维持、调控并且增强 I 类 MHC-限制性 T 细胞应答、和特别是针对抗原的效应和记忆 CTL 应答的有效方法在下列各项中描述：美国专利号 6,994,851(2/7/06) 和 6,977,074 (12/20/2005)，二者题目皆为“A Method of Inducing a CTL Response” (“诱导 CTL 应答的方法”)；美国临时申请号 60/479,393，于 2003 年 6 月 17 日提交，题目为“METHODS TO CONTROL MHC CLASS I-RESTRICTED IMMUNE RESPONSE” (“控制 I 类 MHC-限制性免疫应答的方法”)；和于 2004 年 12 月 29 日提交的美国专利申请号 10/871,707 (公布号 2005 0079152) 和临时美国专利申请号 60/640,402，二者题目皆为“METHODS TO ELICIT, ENHANCE AND SUSTAIN IMMUNE RESPONSES AGAINST MHC CLASS I-RESTRICTED EPITOPES, FOR PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC PURPOSE” (“用于预防或治疗目的，激发、增强并且维持针对 I 类 MHC-限制性表位的免疫应答的方法”)。所述类似物还可以用于研究中，以获得进一步优化的类似物。许多管家表位在下列各项中提供：美国申请号 10/117,937，于 2002 年 4 月 4 日提交(公布号 20030220239 A1)，和 10/657,022 (20040180354)，和 PCT 申请号 PCT/US2003/027706 (公布号 WO04022709A2)，于 2003 年 9 月 5 号提交；和美国临时申请号 60/282,211，其于 2001 年 4 月 6 日提交；60/337,017，其于 2001 年 11 月 7 日提交；60/363,210，于 2002 年 3 月 7 日提交；和 60/409,123，其于 2002 年 9 月 5 日提交；这些申请的每一个题目都是“EPITOPE SEQUENCES” (“表位序列”)。所述类似物还可以用于这些申请中所描述的各种模式中的任一种。表位簇，其可以包括或含有本发明类似物，在美国专利申请号 09/561,571 中公开并且更加充分地定义，所述美国专利申请号 09/561,571 于 2000 年 4 月 28 日提交，题目为“EPITOPE CLUSTERS” (“表位簇”)。应用和递送本发明类似物的方法学在美国专利申请 09/380,534 和 6977074 (2005 年 12 月 20 日授权)，和在 PCT 申请号 PCTUS98/14289 (公布号 WO9902183A2) 中描述，上述每一申请题目为“A METHOD OF INDUCING A CTL RESPONSE” (“诱导 CTL 应答的方法”)。对于这样的免疫治疗的有益表位选择原则在下列各项中公开：于 2000 年 4 月 28 日

提交的美国专利申请号09/560,465,于2001年12月7日提交的10/026,066 (公布号20030215425 A1),和于2001年11月7日提交的10/005,905,上述所有专利申请题目皆为“EPITOPE SYNCHRONIZATION IN ANTIGEN PRESENTING CELLS”(“抗原呈递细胞中的表位同步性”);6,861,234 (2005年3月1日授权;申请号09/561,074),题目为“METHOD OF EPITOPE DISCOVERY (“表位发现的方法”) ”; 09/561,571,于2000年4月28日提交,题目为“EPITOPE CLUSTERS”(“表位簇”);10/094,699 (公布号20030046714 A1),于2002年3月7日提交,题目为“ANTI-NEOVASCULATURE PREPARATIONS FOR CANCER”(“用于癌症的抗-新生脉管系统制剂”);申请号10/117,937 (公布号20030220239 A1)和PCTUS02/11101 (公布号WO02081646A2),二者皆于2002年4月4日提交,并且题目皆为“EPITOPE SEQUENCES”(“表位序列”);和申请号10/657,022和PCT申请号PCT/US2003/027706 (公布号WO04022709A2),二者皆于2003年9月5日提交,并且题目皆为“EPITOPE SEQUENCES”(“表位序列”)。疫苗质粒的综合设计方面在下列各项中公开:美国专利申请号09/561,572,于2000年4月28日提交,题目为“EXPRESSION VECTORS ENCODING EPITOPES OF TARGET-ASSOCIATED ANTIGENS”(“编码靶点-相关抗原的表位的表达载体”),和10/292,413 (公布号20030228634 A1),于2002年11月7日提交,题目为“EXPRESSION VECTORS ENCODING EPITOPES OF TARGET-ASSOCIATED ANTIGENS AND METHODS FOR THEIR DESIGN”(“编码靶点-相关抗原的表位的表达载体及它们的设计方法”);于2002年8月20日提交的10/225,568 (公布号2003-0138808),于2003年8月19日提交的PCT申请号PCT/US2003/026231 (公布号WO 2004/018666),二者题目皆为“EXPRESSION VECTORS ENCODING EPITOPES OF TARGET-ASSOCIATED ANTIGENS”(“编码靶点-相关抗原的表位的表达载体”);和美国专利号6,709,844,题目为“AVOIDANCE OF UNDESIRABLE REPLICATION INTERMEDIATES IN PLASMID PROPAGATION”(“在质粒增殖中避免不需要的复制中间体”)。在引导针对具体癌症的免疫应答中特别有益的特异性抗原组合在下列各项中

公开：于2003年6月17日提交的临时美国专利申请号60/479,554，和于2004年6月17日提交的美国专利申请号10/871,708，和PCT专利申请号PCT/US2004/019571（公布号WO 2004/112825），所有这些题目皆为“COMBINATIONS OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS IN VACCINES FOR VARIOUS TYPES OF CANCERS”（“肿瘤-相关抗原在用于各种类型的癌症的疫苗中的组合”）。与肿瘤新生脉管系统相关的抗原（例如，PSMA, VEGFR2, Tie-2）还与癌症疾病相关应用，如在美国专利申请号10/094,699（公布号20030046714 A1）中所公开的那样，其于2002年3月7日提交，题目为“ANTI-NEOVASCULATURE PREPARATIONS FOR CANCER”（“用于癌症的抗-新生脉管系统制剂”）。通过生物应答调节物的靶点施用而引发、维持和调控免疫应答的方法在于2004年12月29日提交的美国临时申请号60/640,727中公开。在免疫应答诱导中绕过CD4+细胞的方法在于2004年12月29日提交的美国临时申请号60/640,821中公开。示例性的疾病，生物体，以及与目标生物体、细胞和疾病相关的抗原和表位在美国申请号6977074（于2005年12月20日授权）中描述，所述申请于2001年2月2日提交，题目为“METHOD OF INDUCING A CTL RESPONSE”（“诱导CTL应答的方法”）。示例性的方法学在2004年6月17日提交的美国临时申请号60/580,969和2006年1月12日公布的美国专利申请号2006-0008468-A1中找到，所述申请的题目皆为“COMBINATIONS OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS IN DIAGNOSTICS FOR VARIOUS TYPES OF CANCERS”（“肿瘤-相关抗原在各种类型的癌症的诊断中的组合”）。方法学和组合物还在美国临时申请号60/640,598中公开，其于2004年12月29日提交，题目为“COMBINATIONS OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS IN COMPOSITIONS FOR VARIOUS TYPES OF CANCER”（“肿瘤-相关抗原在用于各种类型的癌症的组合物中的组合”）。评估并且监测用包括应用本发明类似物的免疫方法的免疫应答性的诊断技术的综合在于2004年6月17日提交的临时美国专利申请号60/580,964和于2005年12月29日公布的美国专利申请号US-2005-0287068-A1中更加充分地讨论，所述两个申请的题目皆为“IMPROVED EFFICACY OF ACTIVE IMMUNOTHERAPY BY

INTEGRATING DIAGNOSTIC WITH THERAPEUTIC METHODS”（“通过结合诊断和治疗方法提高主动免疫治疗的功效”）。免疫原性多肽编码载体在下列各项中公开：美国专利申请号10/292,413 (公布号20030228634 A1), 于2002年11月7日提交, 题目为EXPRESSION VECTORS ENCODING EPITOPES OF TARGET-ASSOCIATED ANTIGENS AND METHODS FOR THEIR DESIGN（编码靶点-相关抗原的表位的表达载体及它们的设计方法），和美国临时申请号60/691,579, 于2005年6月17日提交和相应的美国专利申请序列号_____(代理卷号: MANNK.053A, 与本申请在同一日提交), 题目皆为“METHODS AND COMPOSITIONS TO ELICIT MULTIVALENT IMMUNE RESPONSES AGAINST DOMINANT AND SUBDOMINANT EPITOPES EXPRESSED ON CANCER CELLS AND TUMOR STROMA”（“激发针对在癌细胞和肿瘤基质上表达的优势和次优势表位的多价免疫应答的方法和组合物”）。包括实质方法和组合物的其它有用的公开内容在美国临时申请号60/691,581中找到, 其于2005年6月17日提交, 题目为“MULTIVALENT ENTRAIN-AND-AMPLIFY IMMUNOTHERAPEUTICS FOR CARCINOMA”（“用于癌症的多价引发-和-增强免疫治疗剂”）。其它方法学、组合物、肽和肽类似物在美国临时申请号60/581,001和60/580,962中公开, 上述申请皆于2004年6月17日提交, 并且题目分别为“SSX-2 PEPTIDE ANALOGS”（“SSX-2肽类似物”）和“NY-ESO PEPTIDE ANALOGS”（“NY-ESO肽类似物”）。在上段中提及的每一申请和专利全部通过参考将它们所教导的全部内容结合于本申请中。其它类似物、肽和方法在下列各项中公开：美国专利申请公布号20060063913, 题目为“SSX-2 PEPTIDE ANALOGS”（“SSX-2肽类似物”）；和于2006年3月16日公布的美国专利公布号2006-0057673 A1, 题目为“EPITOPE ANALOGS”（“表位类似物”）；和PCT申请公布号WO/2006/009920, 题目为“EPITOPE ANALOGS”（“表位类似物”）；所有申请于2005年6月17日提交, 以及美国临时专利申请号60/691,889, 其于2005年6月17日提交, 题目为EPITOPE ANALOGS（表位类似物）；和美国专利申请号___/_____, 题目为PRAME PEPTIDE ANALOGUES（PRAME肽类似物）(代理卷号: MANNK.052A), 美国专利申请号__

/_____, 题目为PSMA PEPTIDE ANALOGUES (PSMA肽类似物) (代理人卷号: MANNK.052A2), 和美国专利申请号___/_____, 题目为MELANOMA ANTIGEN PEPTIDE ANALOGUES (黑素瘤抗原肽类似物) (代理人卷号: MANNK.052A3), 其中每一个通过引用完全结合于此。示例性的免疫原性产品在下述中公开: 于2005年6月17日提交的美国临时专利申请号60/691,581, 和正好在本申请日期提交的美国专利申请号___/_____

(代理人卷号: MANNK.054A), 每一申请题目为MULTIVALENT ENTRAIN-AND-AMPLIFY IMMUNOTHERAPEUTICS FOR CARCINOMA (用于癌症的多价引发-和-增强免疫治疗剂), 并且每一申请通过引用完全结合于此。其它方法和组合物在下述中公开: 美国临时申请号60/581,001, 于2004年6月17日提交, 题目为“SSX-2 PEPTIDE ANALOGS” (“SSX-2肽类似物”), 和美国临时申请号60/580,962, 于2004年6月17日提交, 题目为“NY-ESO PEPTIDE ANALOGS” (“NY-ESO肽类似物”); 每一申请通过引用完全结合于此。通过引用明确结合于本文中的其它申请为: 美国专利申请系列号11/156,253 (公布号:), 于2005年6月17日提交, 题目为“SSX-2 PEPTIDE ANALOGS” (“SSX-2肽类似物”); 美国专利申请系列号11/155,929, 于2005年6月17日提交, 题目为“NY-ESO-1 PEPTIDE ANALOGS” (“NY-ESO-1肽类似物”) (公布号); 美国专利申请系列号11/321,967, 于2005年12月29日提交, 题目为“METHODS TO TRIGGER, MAINTAIN AND MANIPULATE IMMUNE RESPONSES BY TARGETED ADMINISTRATION OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS INTO LYMPHOID ORGANS” (“通过向淋巴器官中靶点施用生物应答调节剂而引发、维持并且处理免疫应答的方法”); 美国专利申请系列号11/323,572, 于2005年12月29日提交, 题目为“METHODS TO ELICIT ENHANCE AND SUSTAIN IMMUNE RESPONSES AGAINST MCH CLASS I RESTRICTED EPITOPES, FOR PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC PURPOSES” (“为了预防或治疗目的, 激发、增强并且维持针对I类MHC限制性表位的免疫应答的方法”); 美国专利申请系列号11/323,520, 于2005年12月29日提交, 题目为“METHODS TO BYPASS CD4+ CELLS IN THE INDUCTION OF AN

IMMUNE RESPONSE”(“在诱导免疫应答时绕过CD4+细胞的方法”);美国专利申请系列号 11/323,049, 于 2005 年 12 月 29 日提交, 题目为“COMBINATION OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS IN COMPOSITIONS FOR VARIOUS TYPES OF CANCERS”(“肿瘤-相关抗原在用于各种类型的癌症的组合物中的组合”);美国专利申请系列号 11,323,964, 于 2005 年 12 月 29 日提交, 题目为“COMBINATIONS OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS IN DIAGNOSTICS FOR VARIOUS TYPES OF CANCERS.”(肿瘤-相关抗原在用于各种类型的癌症的诊断剂中的组合)。作为实例, 而不是局限于其, 每一参考文献通过引用将它们所教导的关于I类MHC-限制性表位、类似物、类似物的设计、表位和类似物的应用、应用和制备表位的方法、和用于它们的表达的核酸载体的设计与应用、以及制剂的内容结合到本申请中。

抗原

存在许多抗原, 其表位可以被T细胞以MHC-限制性方式识别, 因此, 针对它们的免疫应答的操作具有治疗或预防潜力。本文所描述的用于制备MHC-结合肽的类似物的原理通常适用于这些抗原及其表位的任一种。本公开内容特别关注的是来源于肿瘤相关抗原(TuAA) SSX-2、NY-ESO-1、PRAME、PSMA、酪氨酸酶、和Melan-A的表位。

SSX-2, 也叫作Hom-Mel-40, 是高度保守的睾丸癌抗原家族的一员(Gure, A.O.等. *Int. J. Cancer* (国际癌症杂志) 72:965-971, 1997, 其通过参考全部并入本申请)。其作为TuAA抗原的鉴定在题目为“ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES THAT ENCODE A MELANOMA SPECIFIC ANTIGEN AND USES THEREOF”(“编码黑素瘤特异性抗原的分离的核酸分子及其应用”)的美国专利6,025,191中教导, 其通过参考全部并入本申请中。睾丸癌抗原在许多肿瘤中发现, 但是在除了睾丸外的正常成人组织中一般不存在。SSX-2表达在许多不同类型的肿瘤中, 包括滑膜肉瘤、黑素瘤、头颈癌、乳腺癌、结肠和卵巢癌。除了其在各种癌症中的广泛表达, 它在患有晚期疾病的患者中也是免疫原性的。并且, 存在这样的证据, 即, 在转移肿瘤患者中有针对这种抗原的自发的体液和细胞

免疫应答(Ayyoub M, 等., *Cancer Res.* (癌症研究) 63(17): 5601-6, 2003; Ayyoub M,等. *J Immunol.* (免疫学杂志) 168(4): 1717-22, 2002), 其通过参考完全并入本申请中。最近应用反式T细胞免疫学, 已经鉴定了两种HLA-A2限制性T细胞表位, 即SSX-2₄₁₋₄₉ (Ayyoub M,等. *J Immunol.* (免疫学杂志) 168(4): 1717-22, 2002; 美国专利号6,548,064, 题目为“ISOLATED PEPTIDES CONSISTING OF AMINO ACID SEQUENCES FOUND IN SSX OR NY-ESO-1 MOLECULES, THAT BIND TO HLA MOLECULE”

(“与HLA分子结合的由在SSX或NY-ESO-1分子中发现的氨基酸序列组成的分离的肽”); 美国专利申请号10/117,937 (公布号US 2003-0220239 A1), 题目为“EPITOPE SEQUENCES”(“表位序列”))和SSX-2₁₀₃₋₁₁₁ (Wagner C,等. *Cancer Immunity* (癌症免疫性) 3:18, 2003), 其每一个通过参考完全并入本申请中。两种表位的C末端都可以通过体外蛋白酶体消化而有效地产生。来自SSX-2阳性患者的肿瘤-渗透性淋巴结的分离的HLA-A*0201/SSX-2₄₁₋₄₉多聚体⁺ CD8⁺ T细胞表现出高度的功能亲和力, 并且可以有效地识别SSX-2阳性肿瘤; 然而, 自发发生的免疫应答不足以使肿瘤停止生长, 可能是由于这些免疫应答直到疾病进展的相当晚期才发展, 并且所活化的T细胞不是足够多。美国专利号6,548,064 (其通过参考完全并入本申请中) 进一步描述了在SSX-2表位的P2和P Ω 位置取代T或A残基。

NY-ESO-1是在广泛种类的肿瘤中发现的睾丸癌抗原, 并且还叫作CTAG-1 (睾丸癌症抗原-1) 和 CAG-3 (癌症抗原-3)。作为肿瘤-相关抗原(TuAA)的NY-ESO-1在美国专利5,804,381中公开, 其题目为“ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULE ENCODING AN ESOPHAGEAL CANCER ASSOCIATED ANTIGEN, THE ANTIGEN ITSELF, AND USES THEREOF”(“编码食道癌症相关抗原的分离的核酸分子, 抗原本身, 及其应用”), 通过参考完全并入本申请中。编码具有广泛的序列同一性的抗原的旁系同源基因座, LAGE-1a/s和LAGE-1b/L, 已经在人类基因组的公众可用汇编中公开, 并且推论其通过交替剪接(alternate splicing)而产生。另外, CT-2 (或CTAG-2, 睾丸癌症抗原-2)似乎是LAGE-1b/L的等位基因、突变体、或测序偏差(sequencing discrepancy)。由于广泛的序列

同一性，许多来自NY-ESO-1的表位还可以诱导针对表达这些其它抗原的肿瘤的免疫性。所述蛋白到氨基酸70实质上是相同的。从残基71-134，NY-ESO-1和LAGE之间最长的同一性是6个残基，但是存在潜在的交叉反应序列。从残基135-180，除了单个残基外，NY-ESO和LAGE-1a/s是相同的，但是由于交替剪接，LAGE-1b/L是不相关的。CAMEL和LAGE-2抗原似乎衍生于LAGE-1 mRNA，但是衍生于改变的阅读框，因此产生不相关的蛋白序列。最近，GenBank登记号AF277315.5，人染色体X克隆RP5-865E18，RP5-1087L19，完整序列，其通过引用完全结合于此，报道了这一区域中的3个独立的基因座，其标记为LAGE1（在基因组集合中与CTAG-2相对应），加上LAGE2-A和LAGE2-B（在基因组集合中二者与CTAG-1相对应）。

在题目为“ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULE ENCODING CANCER ASSOCIATED ANTIGEN, THE ANTIGEN ITSELF, AND USES THEREOF”（“编码癌症相关抗原的分离的核酸分子，抗原本身，及其应用”）的美国专利号6,274,145中，将NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅鉴定为HLA-A2限制性表位，并且题目为“EPITOPE SEQUENCES”（“表位序列”）的美国专利申请号10/117,937（公布号20030220239）报道了这种C末端是在体外检测中通过看家蛋白酶体而产生的。单独地在PΩ取代A, V, L, I, P, F, M, W, 或G, 或与另一位置的A组合的类似物，在美国专利号6,417,165和6,605,711中公开，二者题目皆为“NY-ESO-1-PEPTIDE DERIVATIVES AND USES THEREOF”（“NY-ESO-1-肽衍生物及其应用”）。本段所述的每一参考文献通过引用全部并入本申请中。

PRAME，还叫作MAPE、DAGE、和OIP4，最初观察为黑素瘤抗原。后来，它被公认为CT抗原，但是不同于许多CT抗原（例如，MAGE、GAGE、和BAGE），它在急性髓细胞样白血病中表达。PRAME是MAPE家族的一员，MAPE家族主要由同PRAME具有有限的序列相似性的假定的蛋白组成。PRAME作为TuAA的用途在美国专利号5,830,753中教导，其题目为“ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULES CODING FOR TUMOR REJECTION ANTIGEN PRECURSOR DAGE AND USES THEREOF”（“编码肿瘤排斥抗原前体DAGE的分离的核酸分子及其应用”），其通过

参考全部并入本申请中。美国专利申请号 10/181,499 (公布号: US 2003-0186355 A1), 题目为 “METHODS FOR SELECTING AND PRODUCING T CELL PEPTIDE EPITOPES AND VACCINES INCORPORATING SAID SELECTED EPITOPES” (“选择和生产 T 细胞肽表位的方法和结合所选表位的疫苗”) (其通过参考全部并入本申请中), 应用免疫蛋白酶体的体外消化, 鉴定了许多潜在的表位, 包括 PRAME₄₂₅₋₄₃₃。

PSMA (前列腺-特异性膜抗原), 在题目为 “PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANES ANTIGEN” (“前列腺-特异性膜抗原”) 的美国专利 5,538,866 中描述的 TuAA, 是由正常的前列腺上皮细胞所表达的, 并且在前列腺癌中以更高的水平表达, 所述美国专利 5,538,866 通过参考全部并入本申请中。它还在非前列腺肿瘤的新血管系统中被发现。因此, PSMA 可以形成针对前列腺癌和针对其它肿瘤的新血管系统的疫苗的基础。后一观点在下列各项中更充分地描述: 美国专利公布号 20030046714; PCT 公布号 WO 02/069907; 和临时美国专利申请号 60/274,063, 题目为 “ANTI-NEOVASCULAR VACCINES FOR CANCER” (“用于癌症的抗-新血管系统疫苗”), 其于 2001 年 3 月 7 日提交, 以及美国申请号 10/094,699 (公布号: US 2003-0046714 A1), 其于 2002 年 3 月 7 日提交, 题目为 “ANTI-NEOVASCULAR PREPARATIONS FOR CANCER” (“用于癌症的抗-新血管系统制剂”), 上述每一项通过参考全部并入本申请中。在所述出版物和申请中公开的教导和实施方案提供与本发明相关的并且有效与本发明联系的支持原理和实施方案。简要地, 由于肿瘤生长, 它们恢复了新血管的向内生长。由于未血管化的肿瘤中心通常是坏死的, 并且已经报道血管生成抑制剂引起肿瘤消退, 所以这被理解为是维持生长所必需的。这样的新血管或新血管系统, 表达在已建立的脉管中没有发现的抗原, 并且因此可以被特异性地靶向。通过诱导针对新生血管抗原的 CTL, 所述血管可以被破坏, 这中断了营养向肿瘤的流动 (并且从肿瘤移除废物), 引起肿瘤的消退。

PSMA mRNA 的交替剪接还导致在 Met₅₈ 的具有明显的起点的蛋白, 由此删除推定的 PSMA 膜锚定区域, 如在美国专利 5,935,818 中所描述的

那样，所述专利题目为“ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULE ENCODING ALTERNATIVELY SPLICED PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANES ANTIGEN AND USES THEREOF”（“编码选择剪接的前列腺-特异性膜抗原的分离的核酸分子及其应用”），其通过参考完全并入本申请中。叫作 PSMA 样蛋白的蛋白，Genbank 登记号 AF261715，其通过参考完全并入本申请中，几乎同 PSMA 的氨基酸 309-750 一致，并且具有不同的表达模式。因此，更优选的表位是那些具有位于氨基酸 58-308 的 N 端的表位。在 WO 01/62776 中，PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 被确定为具有 HLA-A2 结合基序，所述 WO 01/62776 题目为“HLA BINDING PEPTIDES AND THEIR USES”（“HLA 结合肽与它们的应用”），其通过参考完全并入本申请中。它在体外用看家蛋白酶体消化产生并且实际上与 HLA-A2 结合，在题目为“EPITOPE SEQUENCES”（“表位序列”）的美国专利申请公布号 20030220239 中公开。

酪氨酸酶是黑色素生物合成酶，其被认为是黑素细胞分化的最特异的标记之一。酪氨酸酶在很少的细胞类型中表达，主要在黑素细胞中表达，并且高水平通常在黑素瘤细胞发现。酪氨酸酶作为 TuAA 的用途在美国专利 5,747,271 中教导，其题目为“METHOD FOR IDENTIFYING INDIVIDUALS SUFFERING FROM A CELLULAR ABNORMALITY SOME OF WHOSE ABNORMAL CELLS PRESENT COMPLEXES OF HLA-A2/TYROSINASE DERIVED PEPTIDES, AND METHODS FOR TREATING SAID INDIVIDUALS”（“鉴定患有细胞异常的个体的方法，其中一些异常细胞呈递 HLA-A2/酪氨酸酶衍生的肽复合体，以及治疗所述个体的方法”），其通过参考完全并入本申请中。

Melan-A，也叫作 MART-1（T 细胞识别的黑素瘤抗原），是在黑素瘤中以高水平表达的另一种黑色素生物合成蛋白。Melan-A/MART-1 作为 TuAA 的用途在美国专利号 5,874,560 和 5,994,523 中教导，二者题目皆为“MELANOMA ANTIGENS AND THEIR USE IN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC METHODS”（“黑素瘤抗原及其在诊断和治疗方法中的应用”），以及在美国专利号 5,620,886 中教导，其题目为“ISOLATED NUCLEIC ACID SEQUENCE CODING FOR A TUMOR REJECTION

ANTIGEN PRECURSOR PROCESSED TO AT LEAST ONE TUMOR REJECTION ANTIGEN PRESENTED BY HLA-A2” (“编码被加工成至少一种由 HLA-A2 呈递的肿瘤排斥抗原的肿瘤排斥抗原前体的分离的核酸序列”), 所有这些通过参考完全并入本申请中。来源于这种 TuAA 的免疫显性 HLA-A2 限制性表位是 Melan-A₂₆₋₃₅。已表明它是由看家蛋白酶体产生的(Morel, S.等. *Immunity* (免疫性) 12:107-117, 2000, 其通过参考完全并入本申请中)。结合标准氨基酸的各种类似物, 包括在 P2 取代 L 的改善的类似物, 在美国专利号 6,025,470 中公开, 其题目为“ISOLATED NONA- AND DECAPEPTIDES WHICH BIND TO HLA MOLECULES, AND THE USE THEREOF (“结合 HLA 分子的分离的九-和十肽, 及其应用”)”, 其通过参考完全并入本申请中。结合非标准氨基酸的类似物的应用, 其具有改善生化稳定性的基本目的, 由 Blanchet, J.-S. 等., *J. Immunol.* (免疫学杂志) 167:5852-5861, 2001 报道, 其通过参考完全并入本申请中。

SSX-2 41-49 类似物

如上文提及, 癌症患者中针对 SSX-2 的天然免疫应答, 包括针对 SSX-2₄₁₋₄₉ 的应答, 可能不会有效地控制癌症。另外, 野生型 SSX-2₄₁₋₄₉ 只是中等免疫原性肽, 这可能进一步限制它的临床潜力。由应用超拮抗剂类似物诱导的更强的 SSX-2 特异性免疫应答对患有 SSX-2 阳性肿瘤的患者产生临床益处。

因此, 在一个实施方案中, 所述类似物可以用在刺激受试者的免疫应答的组合物中, 以增加针对显示靶点抗原的靶细胞的免疫应答。所述实施方案可具有在治疗和预防致瘤性和病毒性疾病中的用途。

由于野生型 SSX-2₄₁₋₄₉ 只是中等免疫原性肽, 这可能会妨碍它在体内有效地消除肿瘤, 所以应用一种方法重新设计更有效或具有许多改善的特性的 SSX-2₄₁₋₄₉ 变体。通过应用更有免疫原性的 SSX-2 类似物肽, 可能刺激更强的免疫应答和/或增强天然发生的免疫应答, 以获得更好的临床反应时机。因此, 对于每种类似物, 分析与野生型表位的结合特性(亲和力和 HLA-A*0201/肽复合体稳定性)、免疫原性、抗原性和交叉反应性, 以确定改善的特性。在一些实施方案中, 改善的特性一般意指, 对于某些目

的,所述类似物可以比野生型更好地应用。因此,所述类似物不必展现出改善的结合、稳定性、或要被改善的活性,并且甚至可以表现出减少的调控所述过程的某些部分的能力,但是对于其它方式的应用仍然是改善的。例如,在耐受野生型抗原的人体系统中,保留某些活性但不是全部活性的类似物,可能更好。

以前,通过结合有利的锚定残基修饰天然肿瘤-相关的肽表位产生了具有改善的与 HLA 分子的结合模式和增强的免疫原性的类似物。最成功的实例之一是 Melan-A 26-35 表位的 A27L 肽类似物。Valmori 等., "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogs," ("通过选择的 Melan-A/MART-1 免疫显性肽类似物增强特异性肿瘤-反应性 CTL 在体外的产生") *J Immunol.* (免疫学杂志) 1998, 160(4):1750-8; 其通过参考完全并入本申请中。由于它在位置 2 缺少最佳的锚定氨基酸残基,最初的表位没能与 HLA-A2 分子形成稳定的复合体。修饰的 A27L Melan A 26-35 肽类似物明确地显示出增加的与 HLA-A2 分子的结合模式和比其野生型负体更强的免疫原性。用这一类似物免疫患者可以产生能够识别在细胞表面呈递的野生型表位的强 T 细胞免疫应答。已经成功地获得了相似的修饰,其具有许多其它肿瘤相关的表位,诸如 GP100 209-217 (Parkhurst 等., "Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues," ("使用来源于在 HLA-A*0201-结合残基修饰的黑素瘤抗原 gp100 的肽提高黑素瘤-反应性 CTL 的诱导") *J Immunol.* (免疫学杂志) 1996, 157(6): 2539-48; 其通过参考完全并入本申请中), 和 Her-2 369-377 (Vertuani 等., "Improved immunogenicity of an immunodominant epitope of the HER-2/neu protooncogene by alterations of MHC contact residues," ("通过改变 MHC 接触残基提高 HER-2/neu 原癌基因的免疫显性表位的免疫原性") *J Immunol.* (免疫学杂志) 2004, 172(6): 3501-8; 其通过参考完全并入本申请中)。

本文公开可以用于鉴定并且产生滑膜肉瘤 X 断裂点 2 (SSX-2) 野生型序列的类似物的方法。应用本文公开的方法,鉴定了一组 95 种基于氨基酸 241-249 的野生型序列的新 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物,其具有各种改善的特

性。所述改善的特性包括，但不限于，与 I 类 MHC 和 T 细胞受体(TCR) 分子的结合，和生物反应，诸如 IFN- γ 分泌、细胞毒性，和肿瘤细胞裂解。还鉴定了具有改善的效力的肽，其保持与野生型表位的交叉反应性。在这些类似物中，一些已经证明是野生型 SSX-2₄₁₋₄₉ 肽的超拮抗剂变体，其中的一些已经显示出具有同 HLA-A*0201 分子高得多的亲和力，并且所述肽-HLA 复合体具有扩大的稳定性。这些类似物在使用它们进行免疫的 HHD 转基因小鼠中诱导增强的 CTL 免疫应答。所获得的 CTLs 可以有效地在体内和体外裂解 A2+和 SSX-2+肿瘤细胞系，这表明应用所述类似物产生的 CTLs 能够识别在细胞表面天然呈递的野生型 SSX-2₄₁₋₄₉ 表位。与野生型 SSX-2₄₁₋₄₉ 表位相比较，所述类似物是研发癌症疫苗的更好的候选物。

因此，本发明公开的实施方案包括长度为 9 或 10 个氨基酸的一种或多种肽的家族，序列上与人睾丸癌(CT)抗原 SSX-2 的氨基酸 41-49 (SSX-2₄₁₋₄₉)相关。个体肽实施方案具有在野生型序列中的一至多个确定的氨基酸取代。所取代的氨基酸不同地为通常遗传编码的标准系列氨基酸的其它成员，其衍生物，其 D-立体异构体，或其它非标准 L-氨基酸。这些类似物用于研究野生型表位与 I 类 MHC 和 TCR 分子以及免疫应答其它成分之间的相互作用，并且用于设计具有进一步优化的免疫学特性的其它类似物。在检验它们的 HLA-转基因小鼠模型中，所述类似物的一些实施方案具有至少与野生型表位相似的免疫学特性。由于 SSX-2 是自体抗原，针对其可以预测一定程度的耐受性，并且类似物的氨基酸差异可以帮助刺激 T 细胞群体，所述 T 细胞群体避免了阴性选择但是与野生型表位交叉反应，所以这样的肽可以用于人体。许多肽实施方案可以具有一种或多种改善的免疫学特性，因为它们具有对于 MHC 的更大的亲和力或更大的与 MHC 结合的稳定性，激发更多的细胞因子产生或需要更低的肽浓度来激发从识别野生型表位的 T 细胞产生相似的细胞因子，它们更有免疫原性，可以诱导或增强对野生型表位的交叉反应性细胞溶解反应，和/或可以破坏耐受性。

在一个实施方案中，所述类似物可以在选自 P1、P2、P4、P6、P8、P9 和 P10 组成的组的残基具有至少一个取代。在另一个实施方案中，所述类似物可以在选自 P1、P2、P4、P6、P8、P9 和 P10 组成的组的残基

具有至少两个取代。在另一个实施方案中，所述类似物可以在选自 P1、P2、P4、P6、P8、P9 和 P10 组成的组的残基具有至少 3 个取代。在另一个实施方案中，所述类似物可以具有在位置 P2 和 P9 的取代。在另一个实施方案中，所述肽可以具有在残基 P1、P2 和 P9 的取代。在另一个实施方案中，所述肽类似物可以具有在残基 P1、P2 和 P4 的取代。在另一个实施方案中，所述肽类似物可以具有在残基 P1、P2 和 P6 的取代。在另一个实施方案中，所述肽类似物可以具有在残基 P1、P2 和 P8 的取代。在一个实施方案中，两种取代可以产生改善的特性。在另一个实施方案中，一种取代可以产生改善的特性。在另一个实施方案中，三种取代可以产生改善的特性。在另一个实施方案中，一种或多种取代可以产生改善的特性，但是仍然可以被识别野生型序列的 TCR 识别（仍然与野生型序列交叉反应）。

一个实施方案涉及表位阵列和其它包括可以被加工以释放所述类似物的表位类似物序列的多肽。其它实施方案涉及编码所述多肽的核酸，特别是 DNA 质粒，或只是类似物，及其从所述核酸的表达。所述类似物、包括它们的多肽、以及所述编码的核酸可以都是免疫原性组合物的成分，特别是适于淋巴内递送的组合物的成分，这组成了其它的实施方案。

类似物设计

实施方案涉及 SSX-2₄₁₋₄₉ 肽，其含有序列 KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1) 的取代（参见图 1）。在另一个实施方案中，所述类似物通常可以是具有序列 KASEKIFYVY (SEQ ID NO. 1) 的 SSX-2₄₁₋₅₀ 十聚体肽的类似物。组成所述肽的残基或氨基酸在本文中称为 P1-P9 或 P1-P10，以指明在肽内按照从 N-到 C-端编号的位置，在九聚体中 P1 对应 N 端的赖氨酸，和 P9 对应 C 端的缬氨酸。备选地，所述残基可以通过它们涉及的分子的主要活性而指示。例如，残基 P2 描述为 N 端一级锚定分子，而 P9（或者在十聚体中的 P10）描述为一级 C 端锚点。残基 P4、P6 和 P8 主要参与 TCR 相互作用。取代可以应用任何氨基酸，包括标准氨基酸和非标准氨基酸，这对本领域的技术人员是已知的。本申请公开了许多示例性氨基酸，然而，本申请所公开的取代不必意指包括所有的设想取代的列表，而是可能的取代的示

例。本领域的技术人员可以在目录和参考文献中找到许多其它非标准的氨基酸，其可以购买或化学产生，以与本申请的类似物一起使用。

许多可能的类似物通过修饰肽锚定残基而产生，以获得更好的 HLA 结合模式和更高的免疫应答，其包括在 N 端一级锚点(anchor) (P2 位置)，在 N 端二级锚点 (P1 位置)，在 N 端一级和二级锚点 (P1 和 P2 位置)，和在 N 端一级/二级锚点 (P1 和 P2 位置) 以及 C 端一级锚点 (P9 位置)。并且，产生具有在锚定残基和 TCR 接触残基的修饰的肽，以防止 T 细胞对自身抗原的耐受性，这些修饰包括在 N 端一级/二级锚点 (P1 和 P2 位置) 和二级 TCR 识别位点 (P4、P6 和/或 P8 位置) 的修饰，在 N 端一级/二级锚点 (P1 和 P2 位置) 的修饰，和在 C 端一级锚点 (P9) 以及在二级 TCR 识别位点 (P4、P6 和/或 P8 位置) 的修饰。并且，产生了十聚体类似物。

哪种残基将最好地产生具有改善的特性的类似物的选择包括对 MHC 肽相互作用的研究、TCR 肽相互作用和本领域已知的先前的类似物的分析。一些残基主要参与具体的相互作用，并且一些是次要地或者甚至是三级地参与。因此，所述残基怎样参与这些分子的结合的知识涉及所述分析。并且，优选一些野生型残基，意味着它们很好地进行所需要的相互作用；而其它不是优选的，意味着它们极差地进行相互作用。因此，在一个实施方案中，非优选的残基可以被取代。例如，在 C 端的缬氨酸通常是优选的锚定残基，由于它产生与 HLA 分子的强相互作用，并且因此，更少优选取代这一残基。然而，通过结合有利的锚定残基而修饰野生型肿瘤-相关的肽表位已经产生了具有与 HLA 分子改善的结合模式和增强的免疫原性的类似物。最成功的实例之一是 Melan-A 26-35 表位的 A27L 肽类似物 (Valmori D, 等. *J Immunol.* (免疫学杂志) 160(4): 1750-8, 1998; 其通过参考完全并入本申请中)。由于它在位置 2 缺少最适锚定残基，初始表位没能与 HLA-A2 分子形成稳定的复合体。相反，修饰的 Melan A₂₆₋₃₅ A27L 肽类似物明确地表现出与 HLA-A2 分子增加的结合模式和比其野生型负体更高的免疫原性。用这种类似物免疫患者产生能够识别在细胞表面存在的野生型表位的强 T 细胞免疫应答。成功地获得了相似的修饰，其具有许多其它肿瘤-相关的表位，诸如 GP100 209-217 (Parkhurst MR, 等., *J*

Immunol. (免疫学杂志) 157(6): 2539-48, 1996; 其通过参考完全并入本申请中), Her-2 369-377 (Vertuani S, 等., *J Immunol.* (免疫学杂志) 172(6): 3501-8, 2004; 其通过参考完全并入本申请中)。

有多少残基要取代的选择包括这样的要求, 即, 取代更好的残基, 但是仍然保留足够的表位性质, 以便它仍然将被识别野生型表位的 T 细胞而识别。因此, 在一个实施方案中, 可以对野生型肽进行一种和两种取代。在另一个实施方案中, 可以对野生型肽进行多于两种的取代, 而仍然保留与野生型肽的交叉反应性。

一般地, 理想地取代参与 TCR 识别的肽的部分, 以产生改善的免疫原性, 而仍然与野生型表位交叉反应。在一个实例中, 优选表现出增加的免疫原性的肽。由于据信 P2 位置或在 N 末端的第二个氨基酸主要参与主要通过改善的结合特性产生改善的免疫原性的过程, 所以它是优选的取代位点, 并且在示例性类似物中进行了许多修饰, 以鉴定理想的取代。相似的考虑应用到羧基端位置, P Ω , 其对于 MHC 结合也是重要的。

因此, 在一个实施方案中, 所述类似物可以包括在 P2 残基的取代, 其用更加疏水性的残基取代野生型丙氨酸。在另一个实施方案中, 所述疏水性残基还可以具有更大的侧链。在另一个实施方案中, 在 P1 的残基可以用更加疏水的残基取代。在另一个实施方案中, 残基 P1 和 P2 都可以用更加疏水的残基取代。其它实施方案中, 在 P1、P2、和 P9 的至少一个残基可以被取代。在另一个实施方案中, 在 P1、P2、和 P9 的至少两个残基可以被取代。在另一个实施方案中, 在 P1、P2、P9、P4 和 P6 的至少两个残基可以被取代, 包括参与 TCR 结合的一个或多个残基。

在一些实施方案中, 取代那些仅次要地参与同 TCR 或 MHC 分子结合的残基可以是有利的。例如, 取代次要的 TCR 结合氨基酸可以产生这样的类似物, 即, 其仍然结合并且产生应答, 并不妨碍与 MHC 分子的结合, 但是优选地克服自身抗原的耐受组织。由于患有癌症的患者可以部分地耐受所述抗原, 所以这是有用的。因此, 为了克服所述耐受性, 保留一些活性的类似物可以优选地为具有改善的免疫原性的类似物, 原因在于它将被免疫系统识别为“自身”的可能性更少。

除了取代在多个确定的指定表位位置的氨基酸之外, 长度变体也可以

用作类似物。最典型地，从肽的一端、另一端或两端加上或移除额外的氨基酸残基。在一些实例中，加上的末端残基在施用给受试者之后通过蛋白水解去除，在与 MHC 结合之前重新生成指定的表位或相同长度的类似物。在其它情形中，改变长度的肽是真正抗原性交叉反应的，如在实施例 20 中所述，或通过 Melan-A₂₇₋₃₅ 和 Melan-A₂₆₋₃₅ 之间的关系而示例。应该理解，特别包括或排除在这些加上的末端位置（在本文中的一些地方叫作 P0 和 P Ω +1）的任何位置的任何具体氨基酸的个体实施方案在本文公开的本发明的范围之内。当说某种类似物基本上由某种序列组成时，应该理解这需要被剪裁或者保留交叉反应性的这样长度短的变体。在一些实施方案中，插入更小的氨基酸（例如，甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸），特别是在锚定位点之间，可以与在 TCR-相互作用残基中的改变相似地作用。

1. N 端近端一级锚点修饰(P2)

N 端一级锚点是肽的第二个 N 端氨基酸，并且是 N 端近端一级锚点。它主要参与与 MHC 分子的相互作用，并且取代可以导致改善的结合和稳定性。然而，它还可以次要地参与 TCR 相互作用。因此，在这一位点的取代可以形成具有与 MHC 分子改善的相互作用以及与 TCR 改善的相互作用的肽。

通常，据信对于与 MHC 分子相互作用，在野生型序列的这一位置发现的丙氨酸是非优选的。因此，所述类似物的优选的实施方案具有在这一位置的取代。在一个实施方案中，野生型序列中初始发现的 Ala 42 可以用更加疏水性的氨基酸取代。可以应用任何更加疏水性的氨基酸，包括任何可用的或为本领域的技术人员已知的，包括标准氨基酸和非标准氨基酸。在另一个实施方案中，初始 Ala 42 用还具有大侧链的更加疏水性的氨基酸取代。更加疏水性的氨基酸的实例包括，但不限于：Leu、Val、Ile、Met、 α -氨基丁酸、正亮氨酸和正缬氨酸。表 1 是 N-端近端一级锚点修饰和每一修饰的结果的总结。

表 1
N 端近端一级锚点修饰

种类	肽名	序列	SEQ ID NO.	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (mM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
天然肽	SSX2 41-49	KASEKIFYV	1	22 / 1017	14.64	1.0	11	1
N-端一级锚点	SSX2 41-49 (A42L)	KLSEKIFYV	102	28 / 73228	8.89	1.6	19	0.03
	SSX2 41-49 (A42V)	KVSEKIFYV	103	22 / 6407	5.2	2.8	20	0.03
	SSX2 41-49 (A42I)	KISEKIFYV	104	26 / 10068	8.8	1.7	22.5	3
	SSX2 41-49 (A42M)	KMSEKIFYV	105	26 / 52887	8.8	1.7	22.5	0.1
	SSX2 41-49 (A42(D-Ala))	K(D-Ala)SEKIFYV	106	NA	N/B	N/B	N/B	10
	SSX2 41-49 (A42(D-Leu))	K(D-Leu)SEKIFYV	107	NA	N/B	N/B	N/B	N/T
	SSX2 41-49 (A42(D-Val))	K(D-Val)SEKIFYV	108	NA	N/B	N/B	N/B	3
	SSX2 41-49 (A42(Nal-1))	KNal-1SEKIFYV	109	NA	N/B	N/B	N/B	>10
	SSX2 41-49 (A42(Nal-2))	KNal-2SEKIFYV	110	NA	13.9	1.1	N/A	3
	SSX2 41-49 (A42(Abu))	KAbuSEKIFYV	111	NA	7.56	1.9	N/A	0.3
	SSX2 41-49 (A42(Nle))	KNleSEKIFYV	112	NA	5.82	2.5	24	0.1
	SSX2 41-49 (A42(Nva))	KNvaSEKIFYV	113	NA	11.4	1.3	N/A	0.1
种类	肽名	序列	SEQ ID NO.	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (mM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
	SSX2 41-49 (A42(Aib))	KAibSEKIFYV	114	NA	18.4	0.8	N/A	3

2. N 端二级锚点修饰(P1)

N 端二级锚点是在 N 端的第一个氨基酸。这一残基是 Lys 41, 并且定义为与 HLA-A*0201 分子相互作用中的二级锚定残基。然而, 它还在某种程度上参与与 T 细胞受体的相互作用。因此, 这一位置的修饰可以产生一些更有免疫原性并且更适于研发肿瘤疫苗的不规则的类似物。尽管通常认

为在这一位置赖氨酸是有利的，但是取代可以导致高度改善的特性。

因此，在一个实施方案中，在野生型序列中发现的初始 Lys 43 可以用更加疏水的氨基酸取代。可以应用任何更加疏水的氨基酸，包括任何可用的或本领域的技术人员已知的，包括标准氨基酸和非标准氨基酸。在另一个实施方案中，Lys 43 可以用芳香氨基酸取代。更加疏水的氨基酸的实例包括，但不限于：Phe、Tyr、Trp、和 D-Lys。表 2 是 N-端二级锚点修饰和每一修饰的结果的总结。

表 2
N 端二级锚点修饰

种类	肽名	序列	SEQ ID NO.	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (mM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
天然的	SSX2 41-49	KASEKIFYV	1	22 / 1017	14.64	1.0	11	1
N-端二级锚点	SSX2 41-49 (K41F)	FASEKIFYV	115	23 / 1336	9.55	1.5	>24	0.3
	SSX2 41-49 (K41W)	WASEKIFYV	116	22 / 1336	27.07	0.5	N/A	>10
	SSX2 41-49 (K41Y)	YASEKIFYV	117	21 / 1336	8.74	1.7	>24	3
	SSX2 41-49 (K41(D-Lys))	(D-Lys)ASEKIFYV	118	NA	N/B	N/B	N/B	>10
	SSX2 41-49 (K41(Phg))	PhgASEKIFYV	119	NA	5.83	2.5	>24	0.1
	SSX2 41-49 (K41(Cha))	ChaASEKIFYV	120	NA	N/B	N/B	N/B	>10
	SSX2 41-49 (K41(Phe-4F))	Phe(4-F)ASEKIFYV	121	NA	6.72	2.2	>24	3
	SSX2 41-49 (K41(Phe-4NO2))	Phe(4-NO2)ASEKIFYV	122	NA	12.8	1.1	N/A	3
	SSX2 41-49 (K41(O-甲基 Tyr))	O-甲基-TyrASEKIFYV	123	NA	19.5	0.8	20	3
	SSX2 41-49 (K41(b-3-苯并噻吩基)Ala))	b-3-苯并噻吩基)AlaASEKIFYV	124	NA	24.1	0.6	N/A	10

3. N 端一级和二级修饰(P2 和 P1)

在一个实施方案中，一级和二级锚定残基都被取代，而导致对 HLA 分子提高的结合亲和力。在另一个实施方案中，所述双取代产生与 HLA 分子结合的提高了的稳定性。其它实施方案中，结合和/或稳定性没有提高，并且甚至可以被减小，但是改善了所述分子的其它特性，诸如活性或被耐受个体的识别。表 3 是 N-端一级和二级锚点修饰和每一修饰的结果的总结。

表 3
N 端一级和二级锚点修饰

种类	肽名	序列	SEQ ID NO.	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (mM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
天然的	SSX2 41-49	KASEKIFYV	1	22 / 1017	14.64	1.0	11	1
N-端一级 / 二级锚点	SSX2 41-49 (K41Y, A42L)	YLSEKIFYV	125	29 / 96243	11.8	1.2	>24	N/T
	SSX2 41-49 (K41Y, A42V)	YVSEKIFYV	126	23 / 8421	14.6	1.0	>24	0.1
	SSX2 41-49 (K41Y, A42M)	YMSEKIFYV	127	27 / 69508	25	0.6	>24	3
种类	肽名	序列	SEQ ID NO.	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (mM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
	A42M)							
	SSX2 41-49 (K41Y, A42I)	YISEKIFYV	128	27 / 13233	6.5	2.3	N/A	1
	SSX2 41-49 (K41F, A42L)	FLSEKIFYV	129	28 / 96243	4.9	3.0	>24	0.3
	SSX2 41-49 (K41F, A42V)	FVSEKIFYV	130	22 / 8421	4.675	3.1	24	0.1
	SSX2 41-49 (K41F, A42M)	FMSEKIFYV	131	26 / 69508	6.58	2.2	>24	3
	SSX2 41-49 (K41F, A42I)	FISEKIFYV	132	26 / 13233	5.368	2.7	>24	0.3
	SSX2 41-49 (K41W, A42L)	WLSEKIFYV	133	27 / 96243	4.472	3.3	>24	0.3
	SSX2 41-49 (K41W, A42V)	WVSEKIFYV	134	21 / 8421	4.82	3.0	>24	1
	SSX2 41-49 (K41W, A42M)	WMSEKIFYV	135	25 / 69508	5.13	2.9	>24	1
	SSX2 41-49 (K41W, A42I)	WISEKIFYV	136	25 / 13233	6.98	2.1	>24	0.1
	SSX2 41-49 (K41(D-Lys), A42L)	(D-Lys)LSEKIFYV	137	N/A	2.5	5.9	15	10
	SSX2 41-49 (K41(D-Lys), A42V)	(D-Lys)VSEKIFYV	138	N/A	24.5	0.6	N/A	10

4. N 端一级/二级锚点和 C 端一级修饰(P2, P1 和 P9)

野生型肽的 C 端 Val 通常是优选的锚定残基，并且主要参与同 MHC 分子的相互作用。然而，进行取代，以确定哪个氨基酸改善了具有一级和二级 N 端修饰的类似物。在不存在一种或多种 N 端修饰时，也可以应用这些 C 端取代。

这些修饰表现出提高的结合亲和力和稳定性，并且在一些情形中，导致具有减少的交叉反应性的类似物。因此，在一些实施方案中，对 C 端的取代导致具有提高的结合和/或稳定性而没有减少的交叉反应性的肽。然而，在其它实施方案中，对 C 端的取代导致具有提高的结合和/或稳定性具有相等的或减少的交叉反应性的肽。每种分子可以在特定情形中或在特定患者中应用。在一个实施方案中，将 C 端的缬氨酸用大的脂族氨基酸取代。表 4 是 N-端一级/二级锚点和 C 端一级修饰和每一修饰的结果的总结。

表 4
N 端一级/二级锚点和 C 端一级修饰

种类	肽名	序列	SEQ ID NO.	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (nM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
天然的	SSX2 41-49	KASEKIFYV	1	22 / 1017	14.64	1.0	11	1
N-端一级/二级锚点, C-端一级锚点	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49L)	FVSEKIFYL	139	22 / 2586	10.7	1.4	17	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49I)	FVSEKIFYI	140	20 / 1263	9	1.6	24	0.3
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49A)	FVSEKIFYA	141	16 / 601	6.9	2.1	16	1
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49M)	FVSEKIFYM	142	16 / 601	17.8	0.8	22	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49Nle)	FVSEKIFY(NIe)	143	N/A	5.59	2.6	>24	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49Nva)	FVSEKIFY(Nva)	144	N/A	1.89	7.7	20	0.1
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49MeVal)	FVSEKIFY(MeVal)	145	N/A	17.9	0.8	22	10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49Aib)	FVSEKIFY(Aib)	146	N/A	N/A	N/A	N/A	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49Abu)	FVSEKIFY(Abu)	147	N/A	3.43	4.3	20	1
N-端一级锚点, C-端一级锚点	SSX2 41-49 (A42V, V49I)	KVSEKIFYI	148	20 / 961	13.9	1.1	N/A	0.3
	SSX2 41-49 (A42L, V49I)	KLSEKIFYI	149	26 / 10984	5.682	2.6	N/A	0.03
	SSX2 41-49 (A42a, V49v)	K(D-Ala)SEKIFY(D-Val)	150	N/A	N/B	N/B	N/B	>10
C-端一级锚点	SSX2 41-49 (V49I)	KASEKIFYI	151	20 / 152.56	14	1.0	N/A	10

5. N 端一级/二级锚点和 TCR 残基修饰

TCR 位点通常认为是残基 P4、P6、和 P8，并且是参与结合 TCR 的主要残基。然而，其它残基也可以较少程度地参与相互作用。在一个实施方案中，可以取代主要参与 TCR 相互作用的一个或多个位点以增加相互作用。优选地，这些取代可以产生不规则的类似物，所述类似物不妨碍与 MHC 分子结合，但是克服野生型肽的耐受问题。在另一个实施方案中，可以包括至少一种 TCR 取代，其在位置 P1、P2、和/或 P9 具有至少一个取代。在另一个实施方案中，在 P4、P6、和 P8 位置的任何一个或多个的取代可以是极性氨基酸。在另一个实施方案中，所述取代可以是在位置 P8 的芳香族氨基酸。在另一个实施方案中，所述取代可以是在位置 P6 的具有大的脂族侧链的氨基酸。在另一个实施方案中，所述取代可以是具有更大的侧链以维持 (preserve) 相互作用的氨基酸。表 5 是 N-端一级/二级锚点和 TCR 残基修饰以及每一修饰的结果的总结。

表 5
N 端一级/二级锚点和 TCR 位点修饰

种类	肽名	序列	SEQ ID NO.	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (nM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
天然的	SSX2 41-49	KASEKIFYV	1	22 / 1017	14.64	1.0	11	1
N-端一级/二级锚点, TCR 位点	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44D)	FVSDKIFYV	152	21 / 8421	13.18	1.1	N/A	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44N)	FVSNKIFYV	153	20 / 2054	8.97	1.6	N/A	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44S)	FVSSKIFYV	154	20 / 2054	17.5	0.8	N/A	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44T)	FVSTKIFYV	155	20 / 2054	12.94	1.1	N/A	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44Q)	FVSQKIFYV	156	20 / 2054	40.8	0.4	N/A	10

种类	肽名	序列	SEQ ID NO.	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (mM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44Nle)	FVS(Nle)KI FYV	157	N/A	13	1.1	N/A	10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44Nva)	FVS(Nva)KI FYV	158	N/A	3.8	3.9	>24	3
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L)	FVSEKLFY V	159	22 / 8421	7.8	1.9	24	3
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46V)	FVSEKVFY V	160	22 / 8421	N/A	N/A	24	1
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46M)	FVSEKMFY V	161	18 / 8421	9.2	1.6	22	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46Nle)	FVSEK(Nle) FYV	162	N/A	12.8	1.1	19	10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46Nva)	FVSEK(Nva) FYV	163	N/A	6.21	2.4	>24	1
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48T)	FVSEKIFTV	164	24 / 1531	3.9	3.8	24	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48F)	FVSEKIFFV	165	22 / 8421	8.8	1.7	20	10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48S)	FVSEKIFSV	166	24 / 1531	3.8	3.9	20	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48(Phe-4F))	FVSEKIF(P he-4F)V	167	N/A	10.6	1.4	24	10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48Phg)	FVSEKIF(P hg)V	168	N/A	5.85	2.5	>24	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48T)	FVSEKLFT V	169	24 / 1531	5.67	2.6	24	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48S)	FVSEKLFS V	170	24 / 1531	N/A	N/A	N/A	N/T
N-端一级 / 二级锚点, C-端一级锚点, TCR 位点	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48T, V49A)	FVSEKLFT A	171	18 / 109	6.3	2.3	12	>10
	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48S, V49A)	FVSEKLFS A	172	18 / 109	6.2	2.4	N/A	>10

6. C 端酰胺

在一些实施方案中, 可以修饰 C 端残基, 以含有取代游离的羧酸的酰胺。因此, 例如, 如果所述肽是 9-mer (九聚体), 那么可以修饰 P9 残基。如果所述肽是 10-mer (十聚体), 那么可以修饰 P10 残基。优选地, 这形成在生物介质中具有增加的稳定性的肽或类似物, 所述生物介质包括但不限于血、淋巴、和 CNS。优选地, 所述肽可以保留其它必要的活性, 以形成可用于接种疫苗或作为免疫原的类似物。表 6 是 C-端酰胺修饰和每一修饰的结果的总结。

表 6
C 端酰胺

种类	肽名	序列	SEQ ID NO	预测得分 (R/NIH)	半最大结合 (nM)	相对亲和力 (1/RA)	稳定性 (T1/2) (小时)	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
天然的	SSX2 41-49	KASEKIFYV	1	22 / 1017	14.64	1.0	11	1
N-端一级锚点	SSX2 41-49-NH2	KASEKIFYV-NH2	173	N/A	N/B	N/B	N/T	>10
	SSX2 41-49-NH2 (A42L)	KLSEKIFYV-NH2	174	N/A	N/B	N/B	N/T	3
	SSX2 41-49-NH2 (A42V)	KVSEKIFYV-NH2	175	N/A	N/B	N/B	N/T	10

7. 十聚体

典型的 MHC 结合肽的长度可以从大约 8 个到大约 11 个氨基酸的长度而不同。然而，大多数早先应用的 HLA-A*0201 是 9-mers (九聚体) 或 10-mers (十聚体)。因此，在一个实施方案中，所述类似物可以是野生型序列 SSX-2₄₁₋₅₀ 的类似物。然而，由于所述野生型 10-mer 没有正确的结合基序并且没有表现出免疫学活性，所以通过取代在 P10 位置的氨基酸而制备 10-mer，并且鉴定各种野生型和类似物的作用 (参见图 1B)。

8. 其余残基

参考图 1A 和 1B，任何残基还可以用保守氨基酸取代。保守取代可以与任何上述可以产生作用的取代组合。备选地，保守取代可以特异性地在这样的残基，即，据信其不参与一级、二级、或者甚至三级水平的任何活性。这样的残基包括 P3、P5 和 P7。例如，在位置 P3 的丝氨酸可以用丙氨酸或苏氨酸取代而产生类似物。典型地，这样的保守取代没有显著地影响类似物的活性，然而，在一些实施方案中，它们可以增加某些活性或减少某些活性。

NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅类似物

上文公开了许多关于各种实施方案的特征和类似物设计的方面,通用的或如应用到 SSX-2 表位上。应该理解这样的公开也可以应用到这一表位和后续表位上。为了简洁,将这样的公开的明确重述减少到最少。

实施方案涉及 I 类 MHC 限制性 T 细胞表位 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, SLLMWITQC (SEQ ID NO. 25)的类似物,包括这些可以被 pAPC 处理而呈递所述表位类似物的类似物的多肽,和表达所述类似物的核酸。与野生型表位相比较,所述类似物可以具有相似的或提高的免疫学特性。

一个实施方案涉及衍生并且改善 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 的类似物的方法,以及包括取代的特异序列。所述类似物可以含有至少一种取代,但是可以具有多种取代,包括单一的或以各种组合的标准的或非标准的氨基酸。所述类似物可以形成具有保留的或改善的特性的肽。

通过测定针对这样的细胞的表位特异性 T 细胞活性,已经表明表位 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 由 NY-ESO-1 表达细胞系呈递(Jaeger, E. 等., J. Exp. Med. (实验医学杂志) 187:265-270, 1998; 美国专利号 6,274,145, 题目为“ISOLATED NUCLEIC ACID MOLECULE ENCODING CANCER ASSOCIATED ANTIGEN, THE ANTIGEN ITSELF, AND USES THEREOF”(“编码癌症相关抗原的分离的核酸分子,抗原本身,及其应用”)), 其每一个通过参考完全并入本申请中。在题目为“NY-ESO-1-PEPTIDE DERIVATIVES, AND USES THEREOF(NY-ESO-1-肽衍生物及其应用)”的美国专利号 6,417,165 中描述了改善肽 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 的物理化学特性的方法,其通过参考完全并入本申请中,并且所述方法可以由用保持或增强与 MHC 的相互作用且没有干扰活性的二硫 C-C 键形成的不利特性的其它氨基酸置换末端半胱氨酸而组成。然而, C 端半胱氨酸残基的单独处理忽视了这样的益处,即,优化遍及用于主要组织相容性(MHC)和/或 T 细胞受体(TCR)结合的肽的多个残基。因此,除了突变 Cys 残基的实用性外,存在相当多突变遍及所述肽的其它氨基酸的机会。例如,取代可以用于以使得在临床中更加有效的方式进一步优化与 MHC 和/或 TCR 的结合。

实施方案涉及长度为 9 或 10 个氨基酸的一种或多种肽的家族,其在

序列上与人睾丸癌(CT)抗原 NY-ESO-1 的氨基酸 157-165 (NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅) 相关。

类似物设计

所述类似物通常是 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 的类似物，其具有序列 SLLMWITQC (SEQ ID NO:25)。野生型氨基酸是优选的还是非优选的分析应用早先关于其它肽-MHC 或 TCR 相互作用的分析。例如，由于它没有产生同 HLA 分子的强相互作用，所以在 C 端的半胱氨酸通常是非优选的锚定残基，并且因此，取代这一残基是高度优选的。然而，尽管在位置 P1 的丝氨酸通常是优选的，但是发现取代芳族氨基酸可产生具有改善的特性的肽。并且，在位置 P2 的亮氨酸通常是可接受的，但是取代疏水性和/或大氨基酸导致具有改善的活性的肽。主要参与同 TCR 相互作用的残基 (P4、P6 和 P8) 表现出通常对于某种极性的偏好，并且在 P8 的情形中，芳族氨基酸 (aromatic) 通常产生具有有利特性的肽。

一个优选的实施方案涉及在 P2 位置具有取代的类似物。在一个这样的实施方案中，所述取代可以是疏水性残基。在另一个实施方案中，所述取代可以是大的疏水性残基。在另一个实施方案中，P1 的残基可以用更加疏水的残基取代。在另一个实施方案中，残基 P1 和 P2 都可以用更加疏水的残基取代。在其它实施方案中，在 P1、P2、和 P9 的至少一个残基可以被取代。在另一个实施方案中，在 P1、P2、和 P9 的至少两个残基可以被取代。在另一个实施方案中，在 P1、P2、P9、P4 和 P6 的至少两个残基可以被取代，包括参与 TCR 结合的一个或多个残基。在另一个实施方案中，在 P8 的残基可以用芳香残基取代。下述取代的实例在图 13A-13C 中显示。

1. N 端近端一级锚点修饰(P2)

N 端一级锚点是肽的第二个 N 端氨基酸，因此，它是 N 端近端的一级锚点。尽管对于与 MHC 分子结合，初始亮氨酸 158 不被认为是“非优选的”，但是取代可以产生具有提高的结合的肽。因此，在一个实施方案中，野生型序列中的初始 Leu 158 可以用相似的或更加疏水性的氨基酸取

代。可以应用任何疏水性的氨基酸，包括任何可用的或为本领域的技术人员已知的，包括标准氨基酸和非标准氨基酸。在另一个实施方案中，初始 Leu 158 可以用还具有大侧链的更加疏水的氨基酸取代。更加疏水性的氨基酸的实例包括，但不限于：Leu、Val、Ile、Met、 α -氨基丁酸、正亮氨酸和正缬氨酸。并且，萘亚甲基侧链也可被取代。优选地，所述取代导致与 HLA 分子的提高的结合和稳定性。然而，这一残基可以二级或三级参与 TCR 相互作用，并且取代还可以导致提高的被 TCR 的识别。

2. N 端二级锚点修饰(P1)

N 端二级锚点是在 N 端的第一个氨基酸或 P1。这一残基参与许多相互作用。残基 Ser 157 被确定为与 HLA-A*0201 分子相互作用的二级锚点残基，它还在某种程度上参与与 T 细胞受体的相互作用。因此，这一位置的修饰产生一些更有免疫原性并且更适于研发肿瘤疫苗的不规则的类似物。因此，取代可以导致许多改善的性质。

尽管丝氨酸没有被认为是“非优选的”，但是许多取代可以导致改善的肽的性质。因此，在一个实施方案中，在野生型序列中的初始 Ser 157 可以用更加疏水的氨基酸取代。可以应用任何更加疏水的氨基酸，包括可用的或为本领域的技术人员已知的，包括标准氨基酸和非标准氨基酸。更加疏水的氨基酸的实例包括，但不限于：Phe、Tyr、Trp、和 D-Lys。

3. N 端一级和二级修饰(P2 和 P1)

在一个实施方案中，一级和二级锚定残基都被取代，而导致对 HLA 分子提高的结合亲和力。在另一个实施方案中，所述双取代产生与 HLA 分子结合的稳定性。其它实施方案中，结合和/或稳定性没有提高，并且甚至可以被减小，但是改善了所述分子的其它特性，诸如活性或被耐受个体的识别。

4. N 端一级/二级锚点和 C 端一级修饰(P2, P1 和 P9)

野生型肽的 C 端半胱氨酸通常是非优选的锚定残基。由于这一残基通常主要参与同 MHC 分子的相互作用，所以可以优选地取代导致与 MHC

分子更强的相互作用的残基。因此，取代表现出提高的结合亲和力和稳定性，并且在一些情形中，导致具有减少交叉反应性的类似物。在一些实施方案中，对 C 端的取代可以形成具有提高的结合和/或稳定性而没有减少的交叉反应性的肽。然而，在其它实施方案中，对 C 端的取代可以形成具有提高的结合和/或稳定性具有相等的或减少的交叉反应性的肽。由于先前已经表明这一残基的取代提供改善的肽，所以可以优选地产生这样的肽，即，其在与 MHC 分子的相互作用以及其它相互作用中，诸如被 TCR 识别中，是更加改善的。因此，在一些实施方案中，C 端的取代可以与至少一种其它取代组合 (paired)。对 C 端氨基酸的取代的实例包括，但不限于，缬氨酸、赖氨酸、丙氨酸、和异亮氨酸。

5. N 端一级/二级锚点和 TCR 残基修饰

参与同 TCR 相互作用的主要残基通常被认为是残基 P4、P6、和 P8。然而，其它残基也可以较少程度地参与所述相互作用。在一个实施方案中，可以取代主要参与 TCR 相互作用的一个或多个位点以导致改善的相互作用。优选地，这些取代产生不规则的类似物，所述类似物不妨碍与 MHC 分子结合，但是克服野生型肽的耐受问题。在一个实施方案中，可以包括至少一种 TCR 取代，在位置 P1、P2、和/或 P9 具有至少一个取代。在一个实施方案中，在 P4、P6、和 P8，具有某种极性的氨基酸可以取代。在另一个实施方案中，芳族氨基酸可以在 P8 位置被取代。

6. C 端酰胺

在一些实施方案中，可以修饰 C 端残基，以含有取代游离的羧酸的酰胺。因此，例如，如果所述肽是 9-mer (九聚体)，那么可以修饰 P9 残基。如果所述肽是 10-mer (十聚体)，那么可以修饰 P10 残基。优选地，这形成在生物介质中具有增加的稳定性的肽或类似物，所述生物介质包括但不限于血、淋巴、和 CNS。优选地，所述肽保留它们其它的活性，以形成可用于接种疫苗或作为免疫原的类似物。

7. 十聚体

典型的 MHC 结合肽的长度从大约 8 个到大约 11 个氨基酸的长度而不等。然而,大多数早先应用的 HLA-A*0201 是 9-mers(九聚体)或 10-mers(十聚体)。因此,在一个实施方案中,所述类似物可以是野生型序列 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₆ 的 10-mer。然而,由于所述野生型 10-mer 没有正确的结合基序并且没有表现出免疫学活性,所以通过取代在 P10 位置的氨基酸而制备 10-mer,并且鉴定各种修饰的作用(参见图 13A-13C)。在一个实施方案中,在 C 端添加或取代野生型的残基可以选自由正缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、和丙氨酸组成的组。

8. 其余残基

参考图 13A 和 13C,任何残基还可以用保守氨基酸取代。保守取代可以与可以产生作用的上述任何取代组合。备选地,保守取代可以特异性地在这样的残基,即,据信其不参与一级、二级、或者甚至三级水平的任何活性。这样的残基可以包括 P3、P5 和/或 P7。保守取代是本领域的技术人员已知的,但是,例如,在位置 P3 的亮氨酸可以用丙氨酸或苏氨酸取代而产生类似物。典型地,这样的保守取代没有显著地影响类似物的活性。然而,在一些实施方案中,它们可以增加某些活性或减少某些活性。由于已知的相互作用,这样的保守取代不可能对任何活性都具有显著的作用。

PSMA₂₈₈₋₂₉₇类似物

上文公开了许多关于各种实施方案的特征和类似物设计的方面,通用的或如应用到具体表位上。应该理解这样的公开内容也可以应用到这一表位和后续表位上。为了简洁,将这样的公开清楚重述减少到最少。

一些实施方案涉及 I 类 MHC 限制性 T 细胞表位 PSMA₂₈₈₋₂₉₇, GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42)的类似物,包括这些可以被 pAPC 处理而呈递所述表位类似物的类似物的多肽,和表达所述类似物的核酸。与野生型表位相比较,所述类似物可以具有相似的或提高的免疫学特性。确认这一表位通过人癌症细胞呈递的证据在下述实施例 32 中描述。

一个实施方案涉及衍生和改善 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 的类似物的方法,以及包括取代的特异序列。所述类似物可以含有至少一种取代,但是可以具有多

种取代,包括单一的或以各种组合的标准的或非标准的氨基酸。所述类似物可以形成具有保留的或改善的特性的肽。

实施方案涉及长度为 9 或 10 个氨基酸的一种或多种肽的家族,其在序列上与人 PSMA 的氨基酸 288-297 相关。

类似物设计

在一些实施方案中,PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 类似物可以含有序列 GLPSIPVHPI (SEQ ID NO. 42)的取代。参考结合基序数据,诸如在下述实施例 2 中的表 7 所列出的那些,表明 P2 锚定残基可以在 A2.1-限制性表位中对任何位置的亲和力做出最大的个体贡献。在这种情形中,在 P2 位置的氨基酸是最理想的优选的亮氨酸。PΩ 锚定残基,异亮氨酸,是有利的。应用 T2 细胞检测系统的体外结合研究(未显示)已经表明,特别是当与 SSX-2 和 NY-ESO-1 表位相比较时,天然肽通常具有优良的结合特征。尽管这与饱和度的相对少的上升相匹配,但是所述表位在相对低的浓度表现出显著的结合。可以改善野生型表位。诸如表 7 和 8 所代表的那些分析是平均情况,并且在具体序列中给出的残基的行为可能不同于平均情况。与对于上文讨论的 SSX-2 和 NY-ESO-1 表位用 Nle 和 Nva 所获得的有利结果相一致,Nle 和 Nva 还可以成功地用于所述 PSMA 表位。最后,如果与帮助克服可能存在的针对所述表位的任何耐受性的变化相组合,即使相似的结合特征可以增加所述肽的有效免疫原性。在转基因小鼠模型中,天然肽很少有免疫原性(例如参见实施例 35),其可以反映针对所述表位的耐受性;在小鼠和人 PSMA 之间,这一表位由此所衍生的 PSMA 区域是相同的。

1. N 端近端一级锚点修饰(P2)

如上文所述,尽管在这一表位 P2 位置的天然残基通常是遗传编码的氨基酸中优化的残基,但是,对于结合、耐受性破坏和交叉反应免疫性的潜在的改善,检验了取代其它优选的或大的疏水性残基的效果。示例性的取代可以包括 Met、Ile、Gln、Val、Nva、Nle、和氨基丁酸(Abu)。

2. N 端二级锚点修饰(P1)

N 端二级锚点是 N 端的第一个氨基酸。天然 Gly 是在这一位置唯一边缘性优选的。各种观察（例如参见表 7 和 8）表明具有改善所述表位的潜力的氨基酸包括 Ala、Ser、Abu 和肌氨酸（sarkosine）（Sar，即，N-甲基甘氨酸）。

3. C 端一级锚点修饰(PΩ)

在这一位置的天然 Ile 通常是优选的但不是最理想的残基。在这一位置的取代可以改善结合。示例性的取代可以包括 Val、Leu、Nva、和 Nle。

4. 二级锚点和 TCR 研究

倒数第二个位置(PΩ-1)可以作为二级锚点和 TCR 相互作用的位置。尽管它还可以促进改善的结合，但是 Ala、Leu、Ser、或 Thr 的取代可以具有对 TCR 相互作用的主要作用。P3 是可以影响结合和免疫原性的另一个位置。在这一位置的 Trp 取代可以改善二者。

为了组合、协同、并且抵消用单一取代获得的各种效果，其它实施方案涉及在多个位置的取代的组合。

PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物

上文公开了许多关于各种实施方案的特征和类似物设计的方面，通用的或应用到具体表位上。应该理解这样的公开内容也可以应用到这一表位和后续表位上。为了简洁，将这样的公开内容清楚重述减少到最少。

实施方案包括 I 类 MHC-限制性 T 细胞表位 PRAME₄₂₅₋₄₃₃，SLLQHLIGL (SEQ ID NO. 71)的类似物，包含这些可以被 pAPC 处理而呈递所述表位类似物的类似物的多肽，和表达所述类似物的核酸。与野生型表位相比较，所述类似物可以具有相似的或提高的免疫学特性。确认这一表位通过人癌症细胞呈递的证据在下述实施例 39 中描述。

一个实施方案涉及衍生并且改善 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的类似物的方法，以及包括取代的特异序列。所述类似物可以含有至少一种取代，但是可以具有多种取代，包括单一的或以各种组合的标准的或非标准的氨基酸。所述类似物可以形成具有保留的或改善的特性的肽。

一些实施方案涉及长度为 9 或 10 个氨基酸的一种或多种肽的家族，其在序列上与人 PRAME 序列的氨基酸 425-433 相关。

类似物设计

一些实施方案涉及 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的类似物，其可以含有序列 SLLQHLIGL (SEQ ID NO. 71) 的取代。参考结合基序数据，诸如在下述实施例 2 表 7 中列出的那些，表明 P2 锚定残基可以在 A2.1-限制性表位中对任何位置的亲和力做出最大的个体贡献。在这种情形中，在 P2 位置的氨基酸是最理想优选的亮氨酸。PΩ 锚定残基，亮氨酸是有利的，尽管不是强优选的，对于所述位置野生型 PΩ 残基也不必是最优选的。诸如表 7 和 8 所报道的那些分析是平均情况，并且具体序列中给出的残基的行为可能不同于平均情况。与对于其它表位用 Nle 和 Nva 所获得的有利结果相一致，用 Nle 和 Nva 取代这一序列可以获得相似的改善。最后，如果与帮助克服可能存在的针对所述表位的任何耐受性的变化相配合，即使相似的结合特征也可以增加所述肽的有效免疫原性。

各种取代的基本原理已经在上文中列出。对于 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 表位所研究的具体取代遵循相同的逻辑，并且在实施例 40-48 和图 25-27 中公开。取代在一级锚定位置 P2 和 PΩ (P9)、二级锚定位置 P1 和 PΩ-1 (P8) 进行。取代还可以在 TCR 相互作用位置 (除了二级锚定位置外) P3 和 P6 进行。所选的取代对 I 类 MHC-肽复合体的结合和/或稳定性有影响；I 类 MHC-肽复合体的结合和/或稳定性是确定肽的免疫学特性的关键特征。另外，由于 T 细胞总体考虑，并且为了克服负责针对天然表位的有限的免疫性的机制，保持类似物与识别天然肽的 T 细胞受体相互作用的能力的取代可以是有实用价值的。

实施例

下述实施例提供类似物和鉴定类似物的方法。所述类似物可以用作，例如，免疫原，疫苗，和/或各种癌症的治疗。所述类似物可以如在实施例 1 中那样制备。SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物如在实施例 2 中所示那样确定，并且在实施例 3 中列出。如实施例 4-21 所示那样检测所述类似物改善的特性。

检测 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 类似物的改善的特性在实施例 22-30 中描述。检测 PSMA 类似物的改善的特性在实施例 33-38 中描述。检测 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物的改善的特性在实施例 40-48 中描述。

实施例 1

肽合成、纯化和特征鉴定

应用标准的 Fmoc 固相化学, 在 Symphony 多种肽合成仪(PTI 技术公司 (PTI technologies), 马萨诸塞州 (MA)) 或 ABI 433A 肽合成仪(应用生物系统 (Applied Biosystems), 福斯特城, 加利福尼亚州) 上以 0.05-0.1 毫摩尔规模合成肽。应用预装的 PEG-PS 树脂 (在 Symphony 上) 或 Wang 树脂 (在 ABI 上) 合成 C 端游离酸肽。C 端酰胺化的肽在 Fmoc-PAL-PEG-PS 树脂上合成。所有的树脂从应用生物系统 (Applied Biosystems) (福斯特城, 加利福尼亚州) 购买。在肽合成中应用的 Fmoc-氨基酸从诺瓦生物化学 (Novabiochem) (圣地亚哥, 加利福尼亚州) 和 AnaSpec (圣何塞, 加利福尼亚州) 购买。通过标准流程进行合成后的切割。

肽的纯化在半制备 HPLC 柱或 SPE 柱体(菲罗门 (Phenomenex), 托兰斯, 加利福尼亚州) 上进行。所有肽的纯度 $\geq 90\%$ 。通过 Maldi-TOF MS (Voyager DE, 应用生物系统 (Applied Biosystems)) 和应用 Synergi C12 柱 (菲罗门 (Phenomenex), 托兰斯, 加利福尼亚州) 的分析 HPLCs (瓦里安 (Varian) 或岛津 (Shimazu)), 检验每种肽的特性。

实施例 2

从新设计的 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物

中等抗原性肽的结构修饰可以极大地改善肽-MHC 结合、CTL 识别、和/或免疫原性。关于怎样修饰野生型表位以获得具有增强的功效的肽类似物的综合指导是本领域已知的。一个重要的策略是将讨论中用于结合具体的 MHC 分子的所谓的锚定位置的残基优化。在 HLA-A2 的情形中, 已经观察到在 P2 和 P Ω 位置对疏水性残基的显著偏爱, 特别是在 P2 的 L 和 M, 以及在 P Ω 的 V (P Ω 表示表位的 C 端残基。对于 HLA-A2, 取决于所述肽的长度, 其是 P9 或 P10。)。用芳香残基, 诸如 F、Y 和 W 置换 P1

位置也可以是有利的。

表 7. BIMAS 运算法则所用的系数

(运算法则可以通过超文本转移链接:

[//bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/](http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)可用)

关于 HLA_A_0201 的 9-mer 系数表									
氨基酸类型					位置				
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
C	1.000	0.470	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
D	0.075	0.100	0.400	4.100	1.000	1.000	0.490	1.000	0.003
E	0.075	1.400	0.064	4.100	1.000	1.000	0.490	1.000	0.003
F	4.600	0.050	3.700	1.000	3.800	1.900	5.800	5.500	0.015
G	1.000	0.470	1.000	1.000	1.000	1.000	0.130	1.000	0.015
H	0.034	0.050	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.015
I	1.700	9.900	1.000	1.000	1.000	2.300	1.000	0.410	2.100
K	3.500	0.100	0.035	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.003
L	1.700	72.000	3.700	1.000	1.000	2.300	1.000	1.000	4.300
M	1.700	52.000	3.700	1.000	1.000	2.300	1.000	1.000	1.000
N	1.000	0.470	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.015
P	0.022	0.470	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.003
Q	1.000	7.300	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.003
R	1.000	0.010	0.076	1.000	1.000	1.000	0.200	1.000	0.003
S	1.000	0.470	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.015
T	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.500
V	1.700	6.300	1.000	1.000	1.000	2.300	1.000	0.410	14.000
W	4.600	0.010	8.300	1.000	1.000	1.700	7.500	5.500	0.015
Y	4.600	0.010	3.200	1.000	1.000	1.500	1.000	5.500	0.015
终常数	0.069								

表 8.通过 SYFPEITHI 运算法则所用的 HLA-A*0201 的得分模式(9-mers)

(运算法则可以通过超文本转移链接:

[// syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm](http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm) 可用)

AA	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	2	6	2	0	0	0	2	1	6
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	-1	0	0	1	0	0	0	0	0
E	-1	0	-1	2	0	0	0	2	0
F	1	0	1	-1	1	0	0	0	0
G	1	0	0	2	2	0	0	1	0
H	0	0	0	0	0	0	1	0	0
I	2	8	2	0	0	6	0	0	8
K	1	0	-1	0	1	0	-1	2	0
L	2	10	2	0	1	6	1	0	10
M	0	8	1	0	0	0	0	0	6
N	0	0	1	0	0	0	1	0	0
P	0	0	0	2	1	0	1	0	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	2	0	0	0	0	0	0	2	0
T	0	6	-1	0	0	2	0	2	6
V	1	6	0	0	0	6	2	0	10
W	0	0	1	0	0	0	0	0	0
X	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y	2	0	1	-1	1	0	1	0	0

摘自：Rammensee, Bachmann, Stevanovic: *MHC ligands and peptide motifs* (MHC 配体和肽基序). Landes Bioscience (Landes 生物科学) 1997

实施例 3

下述类似物应用实施例 1 中的预测而产生。

表 9.

种类	SEQ ID 号	肽名	序列
野生型	1	SSX-2 41-49	KASEKIFYV
N-端一级锚点	102	SSX-2 41-49 (A42L)	KLSEKIFYV
	103	SSX-2 41-49 (A42V)	KVSEKIFYV
	104	SSX-2 41-49 (A42I)	KISEKIFYV
	105	SSX-2 41-49 (A42M)	KMSEKIFYV
	106	SSX-2 41-49 (A42(D-Ala))	K(D-Ala)SEKIFYV
	107	SSX-2 41-49 (A42(D-Leu))	K(D-Leu)SEKIFYV
	108	SSX-2 41-49 (A42(D-Val))	K(D-Val)SEKIFYV
	109	SSX-2 41-49 (A42(Nal-1))	KNal-1SEKIFYV
	110	SSX-2 41-49 (A42(Nal-2))	KNal-2SEKIFYV
	111	SSX-2 41-49 (A42(Abu))	KAbuSEKIFYV
	112	SSX-2 41-49 (A42(Nle))	KNleSEKIFYV
	113	SSX-2 41-49 (A42(Nva))	KNvaSEKIFYV
	114	SSX-2 41-49 (A42(Aib))	KAibSEKIFYV

N-端二级锚点	115	SSX-2 41-49 (K41F)	FASEKIFYV
	116	SSX-2 41-49 (K41W)	WASEKIFYV
	117	SSX-2 41-49 (K41Y)	YASEKIFYV
	118	SSX-2 41-49 (K41(D-Lys))	(D-Lys)ASEKIFYV
	119	SSX-2 41-49 (K41(Phg))	PhgASEKIFYV
	120	SSX-2 41-49 (K41(Cha))	ChaASEKIFYV
	121	SSX-2 41-49 (K41(Phc-4F))	Phc(4-F)ASEKIFYV
	122	SSX-2 41-49 (K41(Phc-4NO ₂))	Phc(4-NO ₂)ASEKIFYV
	123	SSX-2 41-49 (K41(O-甲基 Tyr))	O-甲基-TyrASEKIFYV
	124	SSX-2 41-49 (K41(β-(3-苯并噻吩基)Ala))	β-(3-苯并噻吩基)AlaASEKIFYV
N-端一级 / 二级锚点	125	SSX-2 41-49 (K41Y, A42L)	YLSEKIFYV
	126	SSX-2 41-49 (K41Y, A42V)	YVSEKIFYV
	127	SSX-2 41-49 (K41Y, A42M)	YMSEKIFYV
	128	SSX-2 41-49 (K41Y, A42I)	YISEKIFYV
	129	SSX-2 41-49 (K41F, A42L)	FLSEKIFYV
	130	SSX-2 41-49 (K41F, A42V)	FVSEKIFYV
	131	SSX-2 41-49 (K41F, A42M)	FMSEKIFYV
	132	SSX-2 41-49 (K41F, A42I)	FISEKIFYV
	133	SSX-2 41-49 (K41W, A42L)	WLSEKIFYV
	134	SSX-2 41-49 (K41W, A42V)	WVSEKIFYV
	135	SSX-2 41-49 (K41W, A42M)	WMSEKIFYV
	136	SSX-2 41-49 (K41W, A42I)	WISEKIFYV
	137	SSX-2 41-49 (K41(D-Lys), A42L)	(D-Lys)LSEKIFYV
	138	SSX-2 41-49 (K41(D-Lys), A42V)	(D-Lys)VSEKIFYV
N-端一级 / 二级锚点, C-端一级锚点	139	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49L)	FVSEKIFYL
	140	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49I)	FVSEKIFYI
	141	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49A)	FVSEKIFYA
	142	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49M)	FVSEKIFYM
	143	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49Nle)	FVSEKIFY(Nle)
	144	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49Nva)	FVSEKIFY(Nva)
	145	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49MeVal)	FVSEKIFY(MeVal)
	176	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49MeLeu)	FVSEKIFY(MeLeu)
	146	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49Aib)	FVSEKIFY(Aib)
	147	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, V49Abu)	FVSEKIFY(Abu)
N-端一级 / 二级锚点, TCR 位点	152	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, E44D)	FVSDKIFYV
	153	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, E44N)	FVSNKIFYV
	154	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, E44S)	FVSSKIFYV
	155	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, E44T)	FVSTKIFYV
	156	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, E44Q)	FVSKIFYV
	157	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, E44(Nle))	FVS(Nle)KIFYV
	158	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, E44(Nva))	FVS(Nva)KIFYV
	159	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46L)	FVSEKLFYV
	160	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46V)	FVSEKVFYV

	161	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46M)	FVSEKMFYV
	162	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46(Nle))	FVSEK(Nle)FYV
	163	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46(Nva))	FVSEK(Nva)FYV
	164	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, Y48T)	FVSEKIFTV
	165	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, Y48F)	FVSEKIFFV
	166	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, Y48S)	FVSEKIFSV
	167	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, Y48(Phe-4F))	FVSEKIF(Phe-4F)V
	168	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, Y48(Phg))	FVSEKIF(Phg)V
	169	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48T)	FVSEKLFTV
	170	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48S)	FVSEKLFSV
N-端一级/ 二级锚点, C-端一级锚点, TCR位点	171	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48T, V49A)	FVSEKLFTA
	172	SSX-2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48S, V49A)	FVSEKLFSV
N-端一级锚点, C-端一级锚点	148	SSX-2 41-49 (A42V, V49I)	KVSEKIFYI
	149	SSX-2 41-49 (A42L, V49I)	KLSEKIFYI
	150	SSX-2 41-49 (A42(D-Ala), V49(D-Val))	K(D-Ala)SEKIFY(D-Val)
		SSX-2 41-49 (A42(D-Leu), V49(D-Val))	K(D-Leu)SEKIFY(D-Val)
		SSX-2 41-49 (A42(D-Val), V49(D-Val))	K(D-Val)SEKIFY(D-Val)
C-端一级锚点	151	SSX-2 41-49 (V49I)	KASEKIFYI
C-端酰胺	173	SSX-2 41-49-NH2	KASEKIFYV-NH2
	174	SSX-2 41-49-NH2 (A42L)	KLSEKIFYV-NH2
	175	SSX-2 41-49-NH2 (A42V)	KVSEKIFYV-NH2
十聚体	177	SSX-2 41-50	KASEKIFYVY
	178	SSX-2 41-50 (Y50I)	KASEKIFYVI
	179	SSX-2 41-50 (Y50L)	KASEKIFYVL
	180	SSX-2 41-50 (Y50V)	KASEKIFYVV
	181	SSX-2 41-50 (Y50(Nle))	KASEKIFYV(Nle)
	182	SSX-2 41-50 (Y50(Nva))	KASEKIFYV(Nva)
	183	SSX-2 41-50 (A42V, Y50I)	KVSEKIFYVI
	184	SSX-2 41-50 (A42L, Y50I)	KLSEKIFYVI
	185	SSX-2 41-50 (A42V, Y50L)	KVSEKIFYVL
	186	SSX-2 41-50 (A42L, Y50L)	KLSEKIFYVL
	187	SSX-2 41-50 (A42V, Y50V)	KVSEKIFYVV
	188	SSX-2 41-50 (A42L, Y50V)	KLSEKIFYVV
	189	SSX-2 41-50 (A42V, Y50(Nle))	KVSEKIFYV(Nle)
	190	SSX-2 41-50 (A42L, Y50(Nle))	KLSEKIFYV(Nle)
	191	SSX-2 41-50 (A42V, Y50(Nva))	KVSEKIFYV(Nva)
	192	SSX-2 41-50 (A42L, Y50(Nva))	KLSEKIFYV(Nva)
	193	SSX-2 41-50 (A42V, V49I, Y50I)	KVSEKIFYII
	194	SSX-2 41-50 (A42L, V49I, Y50I)	KLSEKIFYII
	195	SSX-2 41-50 (V49I, Y50I)	KASEKIFYII

用于非标准氨基酸的缩写如下：Nle，正亮氨酸；Nva，正缬氨酸；Phg，苯基甘氨酸；Phe(4-F)，4-氟苯丙氨酸；Phe(4-NO₂)，4-硝基苯丙氨酸

酸; Abu, α -氨基丁酸; Aib, α -氨基异丁酸; MeLeu, 甲基-亮氨酸; MeVal, 甲基缬氨酸; β -(3-苯并噻吩基)Ala, β -(3-苯并噻吩基)-丙氨酸; O-甲基-Tyr, O-甲基酪氨酸; Cha, 环己基丙氨酸; Nal-1, β -(1-萘基 (naphthyl))-丙氨酸; Nal-2, β -(2-萘基)-丙氨酸; -NH₂ 表示羧基端已经被修饰成为酰胺。

实施例 4-21

检测 SSX-2₄₁₋₄₉ 类似物

在下述实施例 4-21 中检测实施例 3 中产生的类似物的活性, 诸如结合和生物效果:

实施例 4

应用 T2 细胞的肽的结合

应用基于 T2 细胞的检测, 评估肽类似物和野生型表位与 HLA-A*0201 的亲和力(Regner M, 等., *Exp Clin Immunogenet.*(实验临床免疫遗传学) 1996; 13(1):30-5; 其通过参考完全并入本申请中)。

对于结合检测, 简要地说, 将缺少 TAP 的表达并且因此不在细胞表面装配稳定的 I 类 MHC 的 T2 细胞用不同浓度的肽(对照或类似物)在 37°C 脉冲处理(pulsed)过夜, 充分洗涤, 用识别 I 类 MHC (A2 等位基因)的荧光标记抗体染色, 并且通过 FACSscan 分析仪运行。在与给定浓度的类似物和阴性对照(非 MHC 结合物)相对应的 MFI(平均荧光强度)之间的差异, 是有多少 MHC 和肽之间的稳定复合体在 T2 细胞表面展示的函数。因此, 在肽的有限浓度, 这主要是 K_{on} 的测量, 并且在肽的饱和水平, 是 K_{on} 和 K_{off} 的测量。所述结合通过两种数学相关的因子而量化: 半最大结合(给出 50% 的与饱和相对应的信号的肽的浓度)和相对亲和力(1/RA)。相对亲和力 RA 是针对参考(野生型肽)标准化的结合; 例如, 在对照相对于肽类似物的半最大结合之间的比例。1/RA 指数越高, 并且半最大结合越低, 类似物和 MHC 之间相互作用的 K_{on} 越高。

应用这些结合参数鉴定的 53 种类似物确定相对于野生型肽被改善。这些改善的结合物携带包括已知参与同 MHC 和/或 TCR 相互作用的位置的 1 个、2 个、3 个或多个取代(包括标准的和/或非标准的氨基酸)。然

而，对 MHC 结合的全部作用取决于所述修饰。这样的肽类似物可以用于治疗性组合物或作为进一步衍生治疗性组合物的平台。

实施例 5

应用 T2 细胞的肽的稳定性

关于 MHC 的肽稳定性 (K_{off}) 通常不能仅从结合 (K_{on}) 推断出来。由于 T 细胞的激活取决于“信号 1” (MHC 肽复合体与 T 细胞受体的相互作用) 的持续时间，所以，关于这样的肽的免疫性特性，除了结合之外，肽在 I 类 MHC 上的稳定性公知是重要的。对于稳定性检测，简要地说，将缺少 TAP 的表达并且因此不在细胞表面装配稳定的 I 类 MHC 的 T2 细胞，用一定浓度的已知获得最大负荷的 I 类 MHC (“饱和”) 的肽 (对照或类似物) 在 37°C 脉冲处理过夜，充分洗涤，并且在吐根碱的存在下追踪 (chased) 不同的时间间隔，所述吐根碱阻滞内源蛋白的合成。充分洗涤后，将细胞用识别 I 类 MHC (A2 等位基因) 的荧光标记抗体染色，并且通过 FacsScan 分析仪运行。在与给定浓度的类似物和阴性对照 (非 MHC 结合物) 相对应的 MFI (平均荧光强度) 之间的差异，是有多少 MHC 和肽之间的稳定复合体在 T2 细胞表面展示的函数。将所述信号随时间的衰减用数学法表示为相对于在 0 小时 (在追踪时间间隔的开始) 的结合的指数衰减的 50%。

这样改善的类似物可以携带包括已知参与同 MHC 和/或 TCR 相互作用的位置的 1 个、2 个、3 个或多个取代 (包括标准的和/或非标准的氨基酸)，具有取决于所述修饰的对 MHC 稳定性的全部作用。这样的肽类似物可以用于治疗性组合物或作为进一步衍生治疗性组合物的平台。43 种类似物相对于天然肽具有增加的稳定性。

表现出改善的结合和稳定性的类似物用于改善的组合物或者作为产生治疗益处的改善的组合物平台。

实施例 6

评估类似物的免疫学特性：

交叉反应性和功能亲和力

肽的免疫学特性可以描述为与 MHC 分子结合 (K_{on} 和 K_{off}) 和与 TCR (TCR 和 MHC-肽复合体之间相互作用的亲和力) 结合的函数。关于对与 MHC 分子结合的全部影响, 一级 MHC 锚定残基的修饰通常具有显著程度的可预知性。

二级 MHC 锚定残基的修饰可以影响 MHC-肽复合体与 TCR 的相互作用的亲和力以及相对于肽-MHC 相互作用的 K_{on} 和 K_{off} 。

设计一种方法, 其允许以与提议的应用方法一致的方式快速并且合理地筛选肽类似物, 并且模拟全部免疫学特性 (在整合方式中相对于 MHC 相互作用的 K_{on} 和 K_{off} 和 TCR 结合特性)。在一些实例中, 这种方法包括产生针对天然 (未突变的) 表位(SSX-2₄₁₋₄₉)的 T 细胞系, 和应用足以有效地在携带人 MHC (诸如 A2 等位基因) 的转基因小鼠中产生有效的应答的免疫策略。在活性 APCs 和所测定的对天然 (未突变的) 表位特异性的 T 细胞的功能性影响存在下, 离体检验肽类似物。由于在交叉反应性肽的情形中期望的作用是两阶段性的 (由于抗原-诱导的细胞死亡, AICD, 在有限的浓度激活, 并且在更高的浓度抑制), 所述评估在类似物的不同浓度进行。下述 3 种参数的测定可以用来定义肽类似物的基本和有用的特征:

1. 引发指示 T 细胞活化的作用 (例如, 细胞因子产生) 的最小需要的肽类似物浓度;
2. 在任何类似物浓度的最大 (峰值) 作用 (例如, 细胞因子产生);
3. 在活化作用峰值的类似物浓度 (例如, 细胞因子浓度)。

例如, 导致与参数 #1 和 3 相关的减少的值但是增加与参数 #2 相关的值的类似物, 可以是有用的。将天然表位和不相关的非交叉反应性肽用作参考, 在鉴定潜在值的类似物的种类中是有价值的。根据这样的事实, 即, 尽管它们保留交叉反应性, 但是它们可以展现出与天然肽的免疫学特性截然不同的免疫学特性——例如, 更低的在体内诱导 AICD 的倾向性或者破坏耐受性或恢复反应性的能力, 仍然认为展现出数量上相当的或者甚至适当地从天然表位的特性适当减弱的特性的类似物是有用的。

这种筛选策略的一些优点包括实用性和快速性, 应用更加相关的多克隆 T 细胞系而不是潜在有偏倚的 T 细胞克隆作为读出, 和复合值, 积分

参数, 诸如 K_{on} 、 K_{off} 和 TCR 亲和力, 所述参数可以转化为肽-MHC 复合体相对应 TCR 的交叉反应性和功能亲和力。这些参数可以预测体内免疫学特性, 并且因此可以描述有用的肽类似物的全体, 以进行进一步的评估、优化和实际应用。预计结合 MHC 并且保留针对对指定的野生型肽特异的 TCR 的交叉反应性的类似物在这一检测中引发可以测量的作用。全部方法在图 2 中描述。

用于产生 T 细胞系的方法如下: 在第 0, 4, 14 和 18 天, 将携带 A2 人等位基因的 HHD 转基因小鼠 (Pascolo 等. J. Exp Med.(实验医学杂志) 185(12):2043-51, 1997, 其通过参考完全并入本申请中) 用与 25 μ g pIpC 混合的 50 μ g SSX-2 天然表位(41-49)免疫, 通过两侧施用到腹股沟淋巴结中而进行。在最后一次加强后 7 天, 将小鼠处死, 并且在完全 HL-1 培养基中制备 5×10^6 百万细胞/ml 的脾细胞悬浮液。将细胞在平底 96 孔平板 (200 μ l/孔) 中与不同浓度的肽温育 48 小时, 并且与添加到孔中的 10U/ml 的 rIL-2 继续温育 24 小时。收集上清, 并且通过标准方法, 诸如 ELISA, 评估 IFN- γ 的浓度

实施例 7

在单一位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

将上述方法 (实施例 6, 图 2) 用来检查相对于以其野生型形式的天然 SSX-2₄₁₋₄₉ 表位(KASEKIFYV (SEQ ID NO. 1))携带单一取代的类似物的文库 (图 3)。在离体激发 IFN- γ 产生的最少需要的类似物的量和在类似物的任何浓度产生细胞因子的最大量之间发现强的反相关性。

在这一检测中评估, 用 L、V 或 M 取代 A₄₂ 改善了所述肽的免疫学特性。L 和 V 突变体是有活性的。M 比天然表位更具活性。I 突变体保留了针对识别野生型表位的 TCR 的交叉反应性。

在位置 42 用非标准氨基酸 Abu、Nle 或 Nva 置换 A 改善了所述肽相对于野生型表位的免疫学特性, 在引发细胞因子产生所需的类似物的最少量和所产生的细胞因子的最大量这两个方面改善。在这一检测中, 相对于天然肽, 包括 D-Ala、D-Val、Nal-2 或 Aib 的突变体表现出保留的交叉反应性和减少的免疫活性, 但是还可以用于进一步的衍生 (derivitization),

以调整或增强它们的特性。在位置 42 的 Nal-1 消除了所述活性。

第一个残基 K₄₁ 的改变表明, 尽管在这一检测中, 用 F 或 Phg 置换提高了活性, 但是 W、D-Lys、和 Cha 消除了免疫学特性。用 Y、Phe-4F、Phe(4-NO₂)、O-甲基-Tyr 或 β -(3-苯并噻吩基-Ala)置换 K 保留了活性。

与初始表位相比较, 通过用 I 置换位置 V₄₉ (C 端残基) 的修饰以更低的水平保留了活性。通过添加-NH₂ 部分而修饰最后的残基消除了肽的活性, 所述活性随后通过在位置 42 用 L 或 V 修饰 A 而恢复。这直接表明, 具有比野生型肽的活性更低的活性的类似物仍然可用于进一步的衍生。

实施例 8

在两个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

将实施例 6 的方法 (图 2) 用来检查相对于以其野生型形式的野生型 SSX-2₄₁₋₄₉ 表位携带两个取代的类似物的文库 (图 4)。

在位置 1 和 2 协调的修饰对类似物的活性具有可变的作用。例如, 用 Y、F 或 W 取代 K₄₁, 确证了 (corroborated) 用 V、M 或 I 取代 A₄₂, 并导致类似物相对于野生型肽的保留的或增强的活性。由于 P1 残基在某种程度上参与结合 TCR, 所以, 这样的双突变肽提供增加的机会, 从而以导致耐受性破坏的方式影响同 TCR 的相互作用 (因此对实际应用是有用的)。下列各项之间的组合: Y (位置 41) 与 V (位置 42), W (位置 41) 与 I 或 L (位置 42), 和 F (位置 41) 与 L、V、I (位置 42), 形成相对于野生型肽更加有活性的类似物。在位置 41 的 Y 和位置 42 的 I, 或位置 41 的 W 和 42 的 V 或 M 之间的组合, 赋予同野生型肽的活性相似的活性。在位置 41 用 D-赖氨酸置换 K, 在这一检测中形成具有保留的活性的类似物。由于包括非标准氨基酸的这样肽的代谢降解在体内下降, 这样的肽可以是非常有用的。

在位置 42 的 V 或 L 和位置 49 的 I 之间的组合导致比天然肽增加的活性。

实施例 9

在多个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

将实施例 6 的方法（图 2）用来检查相对于以其野生型形式的天然 SSX-2₄₁₋₄₉ 表位携带 3 个或更多取代的类似物的文库（图 5）。

分别在位置 41 和 42 的 F 和 V，与在位置 49 的 I 或 A 组合，导致相对于野生型表位改善的或相似的活性。相反，在位置 49 的 L 或 M 导致极大减少的活性。

在最后位置包括非标准氨基酸 Nva、Abu 或 MeVal 的三元突变体导致免疫活性的保持或提高。由于增加的体内稳定性和对酶促降解的抗性，这样的肽极其有用。

修饰在推定的 TCR 结合区域内的氨基酸残基可以形成相当大的价值的肽，其保持与 MHC 结合以及交叉反应性。由于它们在 MHC 槽中的构象与天然肽的构象稍微不同，所述肽用于恢复免疫应答性或者耐受性破坏。在位置 44(Q, Nva 或 Nle)、位置 46(L, V, Nle 或 Nva) 或 48 (F 或 Phe-4F) 的其它取代形成活性类似物，其中在位置 44 的 D、N、S 或 T，在位置 46 的 M 或在位置 48 的 T、S、Phg，或在位置 46 的 L 与在 48 的 T，形成没有活性的类似物。最后，具有 5 个取代的 2 种类似物没有表现出活性（图 5）。

实施例 10

包括天然肽和在不同位置的突变的十聚体的交叉反应性和功能亲和力

将实施例 6 的方法(图 2) 用来检查包括指定的 SSX-2₄₁₋₄₉ 肽的十聚体的类似物的文库（图 6）。

十聚体 SSX-2₄₁₋₅₀ 在刺激对 41-49 九聚体特异的 T 细胞系中，相对于后者显著地更不活跃。在位置 50 将 Y 残基修饰成 I 或 L，但是以更少的或无的程度修饰成 V、Nle 或 Nva，在这一检测中导致活性的恢复。十聚体类似物活性的进一步优化通过将位置 2 的 A 用 L 或 V 修饰而获得。A42L 取代挽救了 Y50Nva 十聚体的活性。由于：i) 更加有限的 AICD；ii) 由于在 I 类 MHC 上增加的稳定性和/或稍微修饰的与 TCR 的相互作用，潜在更高的体内活性，所述稍微修饰的与 TCR 的相互作用可能对于耐受性破坏是重要的，所以，与天然肽相比较，相似的或减少的体外活性（但是保留交叉反应性）的肽类似物仍然有效用于诱导或加强免疫应答。

实施例 11

离体评估，应用类似物来引发针对天然表位的增强的免疫性

将 3 组小鼠($n=4$)用表达 SSX-2₄₁₋₄₉ 天然表位的质粒免疫，在第 0, 3, 14 和 17 天，以 25 μ l PBS 中 25 μ g 质粒/淋巴结，通过直接接种到腹股沟淋巴结内进行。这之后是在第 28 和 31 天的两次额外的肽加强(相似的用量)。免疫的时间安排在图 7 中显示。加强后一周，将脾细胞用 SSX-2₄₁₋₄₉ 天然肽离体刺激，并且在不同的 E:T 比例针对 ⁵¹Cr 标记的靶细胞 (T2 细胞) 进行检测 (图 8)。所述结果表明，与类似物 A42L 或野生型肽本身相比，作为加强剂，类似物 A42V 引发针对表达天然肽的靶细胞的更高的应答。这与通过离体实验确定的结合和稳定参数相关。

实施例 12

体内评估，应用类似物来引发针对天然表位的增强的免疫性

将 8 组小鼠($n=4$)用表达 SSX-2₄₁₋₄₉ 天然表位的质粒免疫，在第 0, 3, 14 和 17 天，以 25 μ l PBS 中 25 μ g 质粒/淋巴结，通过直接接种到腹股沟淋巴结内进行。这之后是在第 28 和 31 天的两次额外的肽加强(相似的用量)，其使用阴性对照肽(Melan A 26-35 "EAA")，天然肽或类似物，如在图 9 中所示。

为了评估针对天然肽的体内应答，将脾细胞从同窝出生的对照 HHD 小鼠分离，并且与 20 μ g/mL 或 1 μ g/ml 的天然肽一起温育 2 小时。然后将这些细胞用 CFSE^{hi} 荧光染色 (4.0 μ M 或 1 μ M 持续 15 分钟)，并且与用 CFSE^{lo} 荧光(0.4 μ M)染色的等量的对照脾细胞一起静脉内共同注射到免疫的小鼠中。18 小时后，通过从被激发的动物移除脾和 PBMC 而测定靶细胞的特异性消除，并且通过流式细胞术检测 CFSE 荧光。相对于对照 (未负荷的) 群体计算与负荷肽的脾细胞相对应的群体的相对损耗，并且表示为 % 特异性裂解。图 10 (脾) 和 11 (血) 显示由图 7 描述的方案激发的体内细胞毒性。相对于天然肽，所检测的肽中有 3 种，A42V、K41F 和 K41Y，在脾和血中都表现出针对用 20 μ g/ml 以及 1 μ g/ml 的天然肽包被的靶细胞的增加的活性 (图 11)。

实施例 13

应用类似物来引发针对肿瘤细胞的增强的应答

将 8 组小鼠(n=4)用表达 SSX-2₄₁₋₄₉ 天然表位的质粒免疫，在第 0，3，14 和 17 天，以 25 μ l PBS 中 25 μ g 质粒/淋巴结，通过直接接种到腹股沟淋巴结内进行。这之后是在第 28 和 31 天的两次额外的肽加强(相似的用量)，其应用阴性对照肽(Melan A 26-35 "EAA")，天然肽或类似物，如在图 9 中所示。

加强后一周，将脾细胞用 SSX-2₄₁₋₄₉ 野生型肽离体刺激，并且在不同的 E:T 比例针对 ⁵¹Cr 标记的人肿瘤细胞(624.38 黑素瘤细胞)进行检测(图 12)。类似物 A42V 和 K41F A42V V49I 激发这样的免疫应答，即，其调控针对表达天然 SSX-2₄₁₋₄₉ 表位的人肿瘤细胞的增加的细胞毒性。

实施例 14

N 端近端一级锚点修饰 (第 2 个 AA)

当检测表 3 中所示的取代类似物时，与野生型肽表位相比较，所述类似物表现出改善的结合和稳定性模式。然而，对于每种类似物，改善的量级不同，并且，在与 HLA-A*0201 分子的结合亲和力方面，A42V 取代表现出最高的改善。并且，A42V-HLA-A*0201 复合体的稳定性比在野生型肽和 HLA-A*0201 之间形成的复合体更好：T_{1/2} 从 11.5 小时延长至 20 小时。具有 42 A 到 L、V 和 M 取代的肽能够在显著更低的浓度诱导野生型肽特异的 CTL 的 IFN- γ 分泌。42A 到 I 取代产生具有改善的结合和稳定性模式的类似物。在 P2 位置的残基还可以以某种程度参与同 TCR 的相互作用。这一观察也得到关于 42 A 到 Aib 类似物的结果的支持，相对于野生型表位，所述类似物具有相似的与 HLA-A*0201 结合的亲和力。

实施例 15

N 端二级锚点修饰 (第 1 个 AA)

N 端二级锚点是在 N 端的第一个氨基酸。因此，在一个实施方案中，野生型序列中发现的初始 Lys 43 被更加疏水的和大的氨基酸取代。还可

以应用任何更加疏水的和大的氨基酸,包括任何本领域的技术人员可获得的或为本领域的技术人员已知的,包括标准氨基酸和非标准氨基酸。更加疏水的氨基酸的实例包括,但不限于: Phe、Tyr、Trp、和 D-Lys。

残基 Lys 41 定义为与 HLA-A*0201 分子相互作用中的二级锚定残基,并且它还以某种程度参与同 T 细胞受体的相互作用。因此,这一位置的修饰可以产生一些不规则的类似物,其更有免疫原性并且更适于肿瘤疫苗的开发。

如在表 3 所示,可以看出通过将 Lys 41 置换成为 Tyr、Phe 或 Phe 衍生物(苯基甘氨酸、对氟代苯丙氨酸、对硝基苯丙氨酸)所获得的类似物具有同 HLA-A*0201 分子更高的亲和力,并且形成更稳定的复合体。另一方面,尽管基于所预测的运算法则,Trp 类似物应该具有同 Tyr 和 Phe 类似物的亲和力相似的亲和力,但是 Lys 到 Trp 或 Trp 衍生物的类似物已表现出同 HLA-A*0201 分子显著减小的亲和力。实验数据证明了预测运算法则的局限性。例如: Lys 41 到 Phg 取代形成具有同 HLA-A*0201 分子提高的亲和力和扩大的稳定性的类似物。尽管它与 HLA-A*0201 分子的亲和力大约与野生型肽的亲和力相同,但是表明对硝基苯丙氨酸类似物在低得多的浓度下诱导野生型肽特异性 CTL 的 IFN- γ 分泌。

实施例 16

N 端一级/二级锚点修饰

当 N 端的一级和二级锚定残基都被修饰时,一般的趋势是,所获得的类似物表现出与 HLA-A*0201 分子改善的亲和力和扩大的稳定性(表 3),只有少数例外: (K41Y, A42V), (K41Y, A42M) 和 (K41(D-Lys), A42V)。另外,它们具有非常好的同野生型肽特异性 CTL 的交叉反应性。将 K41W 取代与 A42V 或 A42L 组合改善了结合/稳定性模式。这些类似物还具有理想的同野生型肽的交叉反应活性。N 端一级锚点和二级锚点的组合修饰在更大程度上改变了肽的结构和构象。

实施例 17

N 端一级/二级锚点和 C 端一级修饰

野生型肽的 C 端 Val 是优选的锚定残基。然而, 当它突变成具有一个附加的-CH₂ 基团的 Ile 时, 观察到改善的效果。Val 到 Abu 取代时也观察到相似的改善。其余的类似物表现出同 MHC 分子改善的结合亲和力和稳定性。这些类似物的结果表明, 所述肽 C 端锚定残基还在 T 细胞的识别中起重要作用。(表 4)

实施例 18

N 端一级/二级锚点和 TCR 位点修饰

二级 TCR 结合氨基酸残基的取代产生不规则的类似物, 所述不规则的类似物不妨碍同 MHC 分子的结合, 但是克服了自身抗原的耐受性问题。通过将 N 端一级/二级锚定残基 (K41F 和 A42V) 与 TCR 位点的取代组合, 产生了具有改善的结合亲和力和稳定性的类似物 (表 6)。这些类似物中的一些在更低的浓度诱导野生型肽特异性 CTL 的 IFN- γ 产生, 诸如 K41F、A42V、E44(Nva)/(Nle) 突变体和 K41F、A42V、I46L/(Nva)/(Nle) 突变体。

实施例 19

N 端酰胺

用酰胺置换肽的游离羧酸 C 末端通过赋予对蛋白质水解的稳定性而改善了肽在生物介质中的稳定性, 并且赋予针对所述肽的二肽基羧肽酶的抗性。然而, 所形成的类似物的一些失去了显著量的它们与 MHC 分子的亲和力, 以及免疫原性和抗原性。出乎意料地, 尽管本申请在表 7 中公开的 3 种类似物失去了它们与 MHC 分子的结合能力, 但是 SSX-2₄₁₋₄₉-NH₂ (A42V) 保留其与野生型肽特异性 CTLs 的反应性, 如由它在与野生肽的浓度相似的浓度下诱导 IFN- γ 分泌的能力所表明那样。然而, SSX-2₄₁₋₄₉-NH₂ (A42L) 能够在更低的浓度刺激 IFN- γ 的产生。

实施例 20

十聚体

典型的 MHC 结合肽的长度从 8-mer 到 11-mer 不等, 并且大多数

HLA-A*0201 结合肽是 9-mers 或 10-mers。在早先的观察中,发现来自天然序列的 9-mer 和 10-mer 都具有对于相同 MHC 的结合基序,并且具有相同的 N 端。从蛋白酶体处理的观点来看,它们是不同的表位,但是虽然如此还是抗原性交叉反应性的。在野生型表位 SSX-2₄₁₋₄₉ 的情形中,所述表位是 9-mer 肽,并且 10-mer 肽,SSX-2₄₁₋₅₀,缺少适当的 MHC 结合基序,并且没有表现出免疫学活性。因此,用可以产生适当的结合基序的氨基酸将野生型表位延长至 10-mer。如在表 8 中所示,尽管许多 10-mer 类似物具有更低的与 HLA-A*0201 分子的结合亲和力,但是类似物 SSX-2₄₁₋₅₀ (A42L, Y50L/V/Nle/Nva)表现出提高的与 HLA-A*0201 分子的结合亲和力。特别地,两种 10-mer 类似物, A42L 和 Y50 Nle/Nva,能够在比野生型肽更低的浓度下诱导针对野生型肽免疫的 T 细胞产生 IFN- γ 。

实施例 21

应用类似物克服耐受性 (TOLERIZATION)

其中类似物可以代表对于野生型表位的改善的一个方面是在人体系统中增加的免疫原性和耐受性破坏。TCR 全体中的差异,不管是由于种系差异还是在阴性选择中的差异,具有给出反常结果的潜力。为了阐明所述问题,将所述类似物用于 HLA-A2⁺血的体外免疫以产生 CTL。体外免疫的技术,甚至应用首次用于实验的供体,是本领域已知的,例如, Stauss 等., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报) 89:7871-7875, 1992; Salgaller 等. *Cancer Res.* (癌症研究) 55:4972-4979, 1995; Tsai 等., *J. Immunol* (免疫学杂志) 158: 1796-1802, 1997; 和 Chung 等., *J. Immunother.* (免疫治疗杂志) 22:279-287, 1999; 其中每一篇通过参考全部并入本申请中。

具体地,通过在 Ficoll-Hypaque 中离心将来自正常供体的 PBMCs 从淡黄色包被层中纯化出来。所有的培养物应用自身血浆(AP)进行,以避免暴露于潜在的异种病原体和 FBS 肽的识别。为了有助于在体外产生肽-特异性的 CTL,将自体树突细胞(DCs)用作 APCs。产生 DCs,并且用 DCs 和来自 PBMCs 的肽诱导 CTLs,如在 Keogh 等, 2001 中描述的那样,其通过参考全部并入本申请中。简要地说,将单核细胞富集的细胞级分用

GM-CSF 和 IL-4 培养 5 天，并且在具有 2 $\mu\text{g/ml}$ CD40 配体的培养基中继续培养 2 天，以诱导成熟。将 2×10^6 个 CD8⁺-富集的 T 淋巴细胞/孔和 2×10^5 个肽-脉冲的 DCs/孔在 24 孔平板中在补充了 10% AP、10 ng/ml IL-7 和 20 IU/ml IL-2 的 2 ml RPMI 中共同培养。在第 7 和 14 天将培养物再次用自身辐射的肽-脉冲的 DCs 刺激。应用本文所描述的体外细胞毒性和细胞因子生产测定而检测免疫原性。

实施例 22-30

检测 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 类似物

检测图 13 中列出的类似物的活性，诸如结合和生物作用，如在实施例 22-30 中所述：

实施例 22

在单一位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力（图 13 A-C）

将上述方法（实施例 6）用来检查相对于其天然（或野生型）形式的野生型 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 表位而携带单一取代的类似物的文库（图 13）。在离体激发 IFN- γ 产生的最少需要的类似物的量和在类似物的任何浓度产生细胞因子的最大量之间发现强的反相关性。

用 F 或 K 取代 S157，形成部分保留 MHC 结合和与对指定表位特异的 T 细胞的交叉反应性的类似物。用 I 取代 L158 改善了肽的免疫学特征，如通过这种方法所评估的那样；而 L158V 导致活性的部分保持。用氨基酸 V、L、A、或 I 的任何一种修饰 C165 导致改善的免疫特性。

在 N 端位置或其它位置具有取代，并且在这一检测中相对于野生型肽而具有保留的但没有增加的活性的肽，可以用于人。另外，它们是用于进一步衍生的材料，以改善它们的特性，如下述所描述的那样。

实施例 23

在两个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力（图 13 A-C）

将实施例 6 的方法用来检查相对于野生型 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 表位携带两个取代的类似物的文库。发现在位置 2 和 9 同时发生的半保守修饰对类似

物的免疫特性具有显著的作用，这取决于所述类似物精确的同一性。将 L158I 与 C165V 或 C165L 组合进一步增加了它们相对于野生型肽的活性。类似地，L158V 改善了 C165V 或 C165L 类似物的活性，相对于野生型肽，其进一步增加了这样的活性。L158V 部分保持了 C165A 或 C165I 类似物的活性，表明一级锚定残基双突变的令人感兴趣的效果。类似地，L158I 部分保持了 C165A 类似物的活性。

在位置 1 和 9 的同时修饰对类似物的免疫特性具有显著的作用，这取决于所述类似物的精确的同一性。S157Y 与位置 9 的 C165Nva (正缬氨酸) 或 Nle (正亮氨酸) 组合导致比单独的 S157Y 或者野生型肽基本上改善的活性。C165V 突变体还挽救了 S157Y 突变体的活性。在位置 9 的 V-NH₂ 或 L-NH₂ 部分挽救了 S157Y 类似物的活性——然而，A-NH₂ 没有这样的作用。S157F 和在第 9 个位置上的 V、L、I、以及更少程度上的 A 的组合，保持了类似物的强活性，并且由于第一个残基参与同 TCR 的相互作用，其可以比在位置 9 的单一突变体更加有用。S157K 和在第 9 个位置上的 V、L、I、以及更少程度上的 A 的组合，保持了类似物的强活性，并且由于第一个残基参与同 TCR 的相互作用和位置 1 的 K 对肽的可溶性的完全有益作用，其可以比在位置 9 的单一突变体更加有用。

实施例 24

在多个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力 (图 13 A-C)

将实施例 6 的方法用来检查相对于野生型 NY-ESO-1 表位携带多个取代的类似物的文库。

L158Nva 或 L158Nle 极大地改善了 S157Y C165V 突变体的活性。相对于野生型肽，在位置 158 的 V 或 I 和在 165 的 V、L、A 或 I 之间的组合，部分恢复类似物相对于野生型肽的功效。相对于野生型肽和具有 C165V 或 C165I 的 S157V，S157Y L158I C165V 表现出增加的活性；并且具有 C165L 或 I 的 S157I，保持了 MHC 结合和与对野生型肽特异性的 T 细胞的交叉反应性。

除了在 160 的 L 或 N；在 162 的 A、L、V、或 N；或在 164 的 E、D 或 T 之外，包括分别在位置 157 和 165 的 Y 和 V 的三元取代，在这种交

叉反应性检测中,保持了所述肽的活性,由于位置 160、162 和 164 参与同 TCR 的相互作用,这使得这些类似物成为用于在体内破坏 T 细胞耐受性的有效化合物。

在实施例 2 所描述的检测中,包括 157F 和 158V 加上位置 165 的 V、L 或 I 的三元取代表现出活性。另外,包括 S157F 和 L158I 加上位置 165 的 V 或 A 的三元突变体保持了活性。综合起来,这些数据强调了所述多个取代的复杂的相互作用和非线性的性质。

最后,相对于野生型肽,包括 S157W 和更高层次的 S157T 以及 158V 和 165V 的三元突变体,分别表现出保持的或者增加的活性。

实施例 25

包括野生型肽和在不同位置突变的十聚体的交叉反应性和功能亲和力(图 13A-C)

将实施例 6 的方法用来检查包括指定的 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 肽的十聚体的类似物的文库。尽管所述十聚体本身在体外缺少显著的活性,但是在这一位置的各种取代部分地挽救了活性,诸如在 166 的 L,或者在 166 的 L、I、Nle 与在 157 的 Y 和在 165 的 V 组合。

由于: i) 更加有限的 AICD (抗原-诱导的细胞死亡); ii) 由于在 I 类 MHC 上增加的稳定性和/或稍微修饰的与 TCR 的相互作用而引起的更高的体内活性,所以与野生型肽相比较,在体外具有相似的或减少的活性的肽类似物(但是具有保持的交叉反应性)仍然有效用于诱导或加强免疫应答。因此,这些类似物有效地用于破坏耐受性。

实施例 26

评估类似物的免疫学特性: 与 I 类 MHC 分子结合的肽(图 13A-C)

肽类似物和野生型表位与 HLA-A*0201 的亲和力通过基于 T2 细胞的检测进行评估(参考 Regner M,等., *Exp Clin Immunogenet.* (实验临床免疫遗传学) 1996;13(1):30-5, 其通过参考全部并入本申请中)。对于结合检测,简要地说,将缺少 TAP 的表达并且因此不在细胞表面装配稳定的 I 类 MHC 的 T2 细胞用不同浓度的肽(对照或类似物)在 37°C 脉冲处理过夜,充分

洗涤，用识别 I 类 MHC (A2 等位基因)的荧光标记抗体染色，并且通过 FacsScan 分析仪运行。结合 A2 的肽稳定其在细胞表面的存在。在与给定浓度的类似物和阴性对照（非 MHC 结合肽）相对应的 MFI（平均荧光强度）之间的差异，是有多 MHC 和肽之间的稳定的复合体在 T2 细胞表面展示的函数。因此，在肽的限制性浓度，这主要是 K_{on} 的测量，并且在肽的饱和水平，是 K_{on} 和 K_{off} 的测量。

在图 13 中，所述结合通过两种数学相关的因子而量化：半最大结合（给出 50% 的与饱和相对应的信号的肽的浓度）和相对亲和力($1/RA$)，所述相对亲和力是针对参考（野生型肽）标准化的结合——即，在对照相对于肽类似物的半最大结合之间的比例。 $1/RA$ 指数越高，并且半最大结合越低，类似物和 MHC 分子之间相互作用的 K_{on} 越高。图 13 中，相对于野生型肽，有 39 种所述类似物具有改善的这样的结合参数。这样改善的结合物携带在已知参与同 MHC 和/或 TCR 相互作用的位置的 1 个、2 个、3 个或多个标准和/或非标准氨基酸的取代，对 MHC 结合的全部作用取决于精确的/缀合的修饰。这样的肽类似物有效用于治疗性组合物或作为进一步衍生治疗性组合物的平台。

实施例 27

免疫方法（图 14）

将 8 组小鼠($n=4$)用表达野生型 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 表位的质粒免疫，在第 0, 3, 14 和 17 天，将每个淋巴结用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒，通过直接接种到腹股沟淋巴结内而进行。这之后是在第 28 和 31 天的两次肽加强（相似的用量），应用阴性对照肽(HBVc)，野生肽或类似物，如在图 14 中所示。

实施例 28

在体内评估类似物引发针对野生型表位的增强的免疫性的应用(图 15

A-C)

为了评估所获得的针对野生型表位的体内应答，将脾细胞从同窝出生的对照 HHD 小鼠分离，并且用 20 μ g/mL 或 1 μ g/ml 的野生型肽温育 2 小

时。然后将这些细胞用 CFSE^{hi} 和 CFSE^{med} 荧光染色(分别为 4.0 μ M 或 1 μ M 持续 15 分钟), 并且与用 CFSE^{lo} 荧光(0.4 μ M)染色的等量的对照脾细胞一起静脉内共同注射到免疫的小鼠中。18 小时后, 通过从被激发的动物移除脾和 PBMC 而测定靶细胞的特异性消除, 并且通过流式细胞术测定 CFSE 荧光。相对于对照(未负荷的)群体, 计算与负荷肽的脾细胞相对应的群体的相对消耗, 并且表示为%特异性裂解。图 15A 显示在接受阴性对照肽的小鼠中缺少体内细胞毒性。图 15B 显示在用质粒免疫并且用野生型肽增强的小鼠中的可变的细胞毒性。图 15C 显示在用质粒免疫并且用类似物 L158Nva C165V 增强的小鼠中的基本上恒定的细胞毒性。

实施例 29

在体内评估各种类似物在引发针对野生型表位的增强的免疫性中的比较

(图 16 A-B)

按照实施例 8 所述的免疫流程内容 and 应用实施例 9 所述的方法, 在分别对于引发和增强流程应用质粒和肽类似物进行引发和增强流程后, 对针对用有限的 (1 μ M; 图 16A) 或超最适量的野生型肽 (20 μ M; 图 16B) 包被的靶细胞的体内细胞毒性进行评估。表示为平均%特异性裂解 $\pm$ SE 的结果表明, 类似物 L158V C165Nva 诱导最高的活性, 并且类似物 L158V C165V, L158V C165Nva 和 S157K L158V C165V 表现出同野生型肽或 C165V 突变体相同范围的效果。由于多个取代可以改变 TCR 结合位点, 因此, 这样的类似物可以比野生型肽在破坏针对自身表位的耐受性中更加有效。另外, S157K 三元突变体可以改善野生型肽或具有直接的实际应用的其它类似物的极低的溶解度。

实施例 30

通过细胞因子生产离体评估类似物引发针对野生型表位的增强的免疫性的应用 (图 17 A-B)

按照实施例 27 所述的免疫流程的内容, 并且按照实施例 28 所述的激发, 将脾细胞分离, 收集并且在体外用 10 μ M 的野生型肽 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 分别刺激 3 和 6 天。收集上层清液, 并且通过 ELISA 测定 IFN- γ 浓度。

当离体刺激时,类似物 L158Nva C165V 更迅速地诱导生产巨大水平的 IFN- γ 的 T 细胞(图 17A)。其它类似物,诸如 S157F L158V C165V, L158V C165Nva, 和 L158V C165V, 在用野生型肽离体再次刺激时, 诱导生产增加量的 IFN- γ 的 T 细胞(图 17B)。相反, 相对于野生型肽, 按照实施例 27-28 中所述的流程, C165V 没能诱导 T 细胞生产 IFN- γ 的增加的能力。

实施例 31

通过 ELISA 表征结合和稳定性 (ITOPIA 检测)

将用所谓的占位肽 (placeholder peptide) 负荷的含有 I 类单体的抗生物素蛋白包被的微量滴定平板用来评估肽的结合、亲和力和解离率 (off-rate)。提供单体包被的平板作为 iTopia 表位发现系统试剂盒 (iTopia Epitope Discovery System Kit)(贝克曼库尔特公司 (Beckman Coulter, Inc.), 圣地亚哥, 加利福尼亚, 美国)的部分。检测缓冲液, 抗-MHC-FITC mAb 和 β 2-微球蛋白和对照肽也与试剂盒一起提供。

结合检测:

通过结合检测, 首先评估天然肽和类似物它们结合每种 MHC 分子的能力。这一检测测定个体肽在标准化的最适结合条件下结合 HLA 分子的能力。首先将单体-包被的平板打开 (stripped), 释放占位肽并且只使 MHC 重链结合到平板上。然后, 在最适折叠条件下, 引入检测肽, 以及抗 MHC-FITC mAb。将平板在 21°C 温育 18 小时。抗 MHC-FITC mAb 优先结合重折叠的 MHC 复合体。因此, 每种肽产生的荧光强度与肽和 MHC 分子形成复合体的能力相关。相对于试剂盒中提供的阳性对照肽, 评估每种肽的结合, 并且将结果表示为 “%结合”。随后, 将相对于天然肽鉴定为 ‘更好的结合物’ 的类似物在亲和力和解离率检测中进行分析。

亲和力检测:

对于亲和力检测, 在开始去除占位肽后, 将给定的等位基因的增加浓度 (10^{-4} - 10^{-8} M 范围) 的每种测试肽添加到一系列孔中, 并且在前文所述的条件下温育。将平板在荧光计上读数。应用 Prism 软件产生 S 形剂量反

应曲线。将获得最大值的 50%所需要的肽的用量记作 ED₅₀ 值。

解离率检测:

对于解离率检测, 在 21℃温育 18 小时后, 洗涤平板以去除过量的肽。然后将平板在等位基因特异性的单体平板上在 37℃温育。在多个时间点(0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6 和 8 小时)测量平板的相对荧光强度。将 50%的肽与 MHC 单体解离所需要的时间定义为 T1/2 值 (小时)。

iScore 计算:

iScore 是在 iTopia 软件中提供的多参数计算。它的值是基于结合、亲和力和稳定数据计算的。

实施例 32

检验 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 的抗原性

在第 0, 3, 14 和 17 天, 将 HHD 转基因小鼠(n=4)用 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 肽(每个淋巴结 25μg, 在 25μl PBS 中, 加上 12.5μg 的 pI:C)免疫。加强后一周, 将脾细胞用天然 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 肽离体刺激, 并且在不同的 E:T 比例, 针对 ⁵¹Cr-标记的人肿瘤细胞 (PSMA⁺ A2⁺ LnCap 细胞, 或作为阴性对照, 用 I 类 MHC-封闭的抗体包被的 LnCap 细胞) 进行检测。表示为 %特异性裂解 (平均值±SEM) 的结果, 表明 PSMA 特异性 T 细胞能够以一种取决于 I 类 MHC 可用性的方式裂解人肿瘤细胞, 这证实了 PSMA 表位以一种允许免疫介导的攻击的方式在肿瘤细胞的 I 类 MHC 上的展示。

实施例 33-38

检测 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 类似物

检测在图 19 和 20 中列出的类似物的各种特性, 诸如改善的亲合力和结合稳定性, 与天然表位的交叉反应性, 和免疫原性, 如实施例 33-38 所述。

实施例 33

在单一位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

应用实施例 31 所述的方法,彼此互相比评估 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 和类似物的结合特征(参见图 19)。结合的阳性对照是 melan-A₂₆₋₃₅ A27L。通过应用类似物肽刺激对天然表位特异性的 T 细胞系分泌 IFN- γ ,基本上如在实施例 6 中所述的那样,而评估与天然表位的交叉反应性。图 19 所示的数据通过用 10 μ g/ml 的类似物(大约 10 μ M)刺激而产生。对于所述类似物,这一浓度通常导致最大的或接近最大的 IFN- γ 产生,并且因此被选作代表交叉反应性。

观察到的类似物的亲和力在图 19 中报道为 ED₅₀s。Met, Ile, Gln, Val, Nva, Nle, 和 Abu 在 P2 位置取代。这些取代一般导致相似的亲和力。Nle 和 Met 取代还维持了相似的结合稳定性,作为以小时为单位的半解离时间而测定。Val、Nva、和 Abu 类似物激发相似水平的 IFN- γ 产生。

在 P Ω 一级锚定位置用 Val、Leu、Nva、和 Nle 取代 Ile。所有这 4 种具有相似的结合亲和力。Val 和 Nva 取代改善了结合的稳定性和增加了生产的 IFN- γ 的量,这表明交叉反应性并且所述类似物可具有改善的免疫原性。

在 P1 的 Ser、Ala、Sar、和 Abu 取代维持了相似的结合特征,但是具有边缘相似的交叉反应性。在 P Ω -1 位置的 Ala、Leu、Ser、和 Thr 取代也维持了相似的结合特征。最后,在 P3 的 Trp 取代表现出都增加了大约 2 倍的亲和力和结合稳定性,以及为天然肽的 2 倍之内的 IFN- γ 产量,所有都通常为相似的值。

实施例 34

在两个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

上文可见的模式,在这种表位中的取代没能极大地削弱结合亲和力,继续用双取代来检验(图 20)与天然肽相比较,哪一种均一地表现出相似的或改善的结合亲和力。在具有在两个一级锚定位置具有取代的类似物中,具有在 P2 的 Nva 或 Nle 与在 P Ω 的 Val,和在 P2 的 Val 与在 P Ω 的 Nva 的那些类似物显示改善的结合稳定性,并且前两者增加了 IFN- γ 产生(对于第 3 种类似物没有显示数据)。在 P Ω 的 Val 和 Nva 取代还与在 P1

的 Ala 和 Abu 取代配对。这些类似物都具有强的结合稳定性，并且与单一的 P Ω 取代比较，具有提高的 IFN- γ 产生，因而进一步改善了 P1 的取代。尽管各种结合参数通常是相似的，但是当与 P3 Trp 取代组合时，P Ω Nva 取代还能够维持比 P Ω V 更好的交叉反应性。

实施例 35

在三个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

在 P1、P2、和 P3；P1、P2、和 P Ω ；P2、P3、和 P Ω ；以及 P1、P3、和 P Ω 进行三元取代（图 21）。在所有情形中，P1 取代是 Ala，P3 取代是 Trp，以及 P Ω 取代是 Val 或 Nva。如上，保持了至少同天然肽相似的亲和力。对于 P1、P2、P3 类，在 P2 的 Nva 和 Nle 改善了结合稳定性。这种 P2Nva 类似物激发了相似量的 IFN- γ ，而 Nle 类似物表现出基本的增加。

对于 P1、P2、P Ω 类，以各种组合的在 P2 和 P Ω 的 Nva 和 Val 改善了结合稳定性。这种 P2 Nva P Ω Val 类似物还在 IFN- γ 产生上表现出基本的增加（数据未显示）。在这种三元取代中在 P2 和 P Ω 的 Val 都表现出结合稳定性，和几乎为天然肽的 IFN- γ 产生的一半的 IFN- γ 产生。

对于 P2、P3、P Ω 组，只有 Nva/W/V 类似物表现出提高的结合或 IFN- γ 产生。对于所检验的两种 P1、P3、P Ω 类似物，P Ω 为 Val 或 Nva 的类似物改善了结合稳定性。

实施例 36

各种类似物的交叉反应性免疫原性

在第 0，3，14 和 17 天，将 HHD 转基因小鼠组(n=8)用肽（天然表位 PSMA₂₈₈₋₂₉₇，或携带在一级或二级锚定残基的取代的类似物）免疫，通过直接接种到腹股沟淋巴结中，每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g + 12.5 μ g pI:C 而进行。

在最后一次加强后 10 天，将小鼠处死，制备脾细胞，并且通过 ELISPOT 分析评估 IFN- γ 产生。在用抗 IFN- γ 抗体包被的 ELISPOT 平板中，将不同数目脾细胞/孔用 10 μ g/ml 的天然肽刺激。在温育后 48 小时，进行检测，并且自动计数识别天然 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 肽的生产细胞因子的 T 细

胞的频率。数据在图 22 中作为斑点形成克隆/孔的数目（一式三份平均值 $\pm$ SD）列出。所述数据表明，通过 I297V 和 P290W 类似物获得针对天然表位的免疫应答的增加的引发，另一种类似物表现出比天然肽（I297Nva 或 G288Abu 或 L289Nle I297Nva）略微更高（但是显著的）活性。在这种程度上，天然表位的弱的免疫原性反映耐受性，这些类似物的改善的活性代表耐受性的破坏。

实施例 37

通过 I297V 类似物增强由质粒诱导的针对 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 的应答

在第 0, 3, 14 和 17 天，将 2 组 HHD 转基因小鼠(n=8)用表达 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 的质粒免疫，通过直接接种到腹股沟淋巴结内，每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行 2 次肽加强(25 μ g)，使用天然肽或 I297V 类似物。

在最后一次加强后 10 天，将小鼠处死，制备脾细胞，并且通过 ELISPOT 分析评估 IFN- γ 产生。在用抗 IFN- γ 抗体包被的 ELISPOT 平板中，将不同数目脾细胞/孔用 10 μ g/ml 的天然肽刺激。在温育后 48 小时，进行检测，并且自动计数识别天然 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 肽的生产细胞因子的 T 细胞的频率。数据在图 23 中作为针对 0.5 百万应答细胞标准化的特异性 T 细胞的频率（一式三份的平均值 $\pm$ SD）列出。所述数据表明，在用 I297V 类似物免疫的小鼠组中，不论脾细胞数目/孔，天然表位特异性 T 细胞的频率是极高的。

实施例 38

针对人肿瘤细胞的离体细胞毒性

在第 0, 3, 14 和 17 天，将 HHD 转基因小鼠(n=4)用表达 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 表位的质粒免疫，通过直接接种到腹股沟淋巴结内，每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行 2 次肽加强（相同的用量），使用 I297V 类似物。在加强后一周，将脾细胞用天然 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 肽离体刺激，并且在不同 E:T 比例针对 ⁵¹Cr-标记的人肿瘤细胞（Lncap, A2⁺ PSMA⁺；或 624.38 A2⁺ PSMA⁻或对照 624.28 细胞 A2⁻

PSMA⁻) 进行过夜检测。所获得的免疫性有效地介导针对 LNCAP 的细胞毒性 (图 24)。

实施例 39

检验 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的抗原性

在第 0, 3, 14 和 17 天, 将 HHD 转基因小鼠(n=4) 用 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 肽免疫 (每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 肽, 加上 12.5 μ g pI:C)。在加强后一周, 将脾细胞用天然 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 肽离体刺激, 并且在不同 E:T 比例针对 ⁵¹Cr-标记的人肿瘤细胞 (PRAME⁺ A2⁺ 624.38 黑素瘤细胞; 或 A2 表达缺陷的阴性对照 624.38 细胞) 进行检测。表示为 % 特异裂解 (平均值 $\pm$ SEM) 的结果表明 PRAME-特异性 T 细胞能够裂解人肿瘤细胞, 这证实了 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 表位在肿瘤细胞的 I 类 MHC 上以允许免疫介导的攻击的方式展示 (图 25)。

实施例 40-48

检测 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物

检测图 26-28 列出的类似物的各种特性, 诸如改善的亲合力和结合稳定性, 与天然表位的交叉反应性, 以及免疫原性, 如实施例 40-48 所述。应用实施例 31 所述的方法, PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 和 69 种类似物的 HLA-A*0201 结合特征彼此相互比较进行评估。用于结合的阳性对照是 melan-A₂₆₋₃₅ A27L。观察到的类似物的亲和力报道为 % 结合 (与阳性对照相比较) 和 ED₅₀, 和作为半解离时间的结合稳定性。与天然表位的交叉反应性通过应用类似物肽来刺激对天然表位特异的 T 细胞系分泌 IFN- γ 而进行评估, 基本上如实施例 6 所述的那样。通过用大约 0.3 μ M 的类似物肽刺激而产生图 26-28 所示的数据。所述结果从 3 次独立的实验收集而来, 并且针对每次实验中由天然肽激发的 IFN- γ 的量而标准化。在一些情形中, 所报道的值是两次确定的平均值。星号 “*” 表明 IFN- γ 的产生不能同背景区分开来。

实施例 40

在单一位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力 (图 26)

对于 P2 一级锚定位置的 Leu 进行 Val、Met、Ile、Nle、Nva、和 Abu 的单一取代。所有这些类似物表现出为天然肽的 20% 之内的 % 结合。对于 Met 类似物的 ED50 具有与天然肽相当的亲和力, 而 Nva 和 Ile 类似物的亲和力减小了大约 3 倍以内, 但是仍然与 PSMA₂₈₈₋₂₈₇ 表位相当。所有的 P2 取代维持了至少与天然肽相似的结合稳定性。Met、Nle、和 Nva 类似物激发了为天然肽 2 倍之内的 IFN- γ 产生, 并且 Val 类似物稍微更少一些。

对于 P1 位置的 Ser, 进行 Lys、Phe、Tyr、Thr、Orn (鸟氨酸)、和 Hse (高丝氨酸) 的单一取代。除了超出了上限 (high side) 的范围的 Phe 类似物之外, 所有这些类似物表现出为天然肽的 20% 内的 % 结合。对于 Lys 类似物的 ED50 几乎减少 6 倍, 但是其它 5 种类似物具有为天然肽的 3 倍内的亲和力。结合稳定性通常与天然肽相似, 在这一组中, Phe P1 类似物表现出最大的结合稳定性, 与天然肽的 12.2 小时相比, 其具有 17.7 小时的半解离时间。除了 Lys P1 类似物, 其激发天然肽的 40% 的 IFN- γ , 由于它们激发为天然肽的 2 倍内的 IFN- γ 产生, 所以认为所有这些类似物是交叉反应性的。

对 P Ω 锚定位置进行 Val、Ile、Ala、Nle、Nva、Abu 的单一取代, 以及通过添加酰胺基而修饰羧基端。所有这些类似物表现出为天然肽的 20% 内的 % 结合。ED50 检测在从少于 Ala 取代的大于 10 倍到 Nle 取代的相当的值的范围; Nva 取代和 C-端酰胺还在天然肽的 ED50 的 3 倍之内。结合稳定性还通常与 Nva 类似物在高端的异常值相似, $t_{1/2}$ 为 17.2 小时, 并且在低端的 C-端酰胺具有显著的减少, $t_{1/2}$ 只有 3 小时。Val、Ile、Ala、和 Abu P Ω 类似物表现出更少优选的交叉反应性, 但是其余的类似物激发为天然肽 2 倍之内的 IFN- γ 生产。

还进行了在主要影响 TCR 相互作用位置的单一取代: 在 P3 和 P6 的 Nle、Nva 和 Abu, 以及在 P8 的 Ala、Ser 和 Sar。P6 Nva 类似物产生为天然肽的 2 倍之内的 IFN- γ , 尽管 P6 Abu 类似物接近 44%。

实施例 41

在两个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

应用上述单一取代的不同组合,在 P1 和 P2, P2 和 P Ω , 以及 P1 和 P Ω 产生双取代类似物(图 27A 和 27B)。所检验的 P1-P2 双取代没有一种具有结合亲和力或稳定性的基本变化,但是在 IFN- γ 检测中没有一种表现出显著的交叉反应性。然而,关于 P2-P Ω 双取代的类似物观察到相似的模式,在 IFN- γ 检测中, L426Nva L433Nle 类似物表现出显著水平的与天然肽的交叉反应性,以及其相似的、稍微改善的结合特征。最后,对于 P1-P Ω 双取代,所检验的类似物还符合具有至少相似的结合特征的通用模式,但是在交叉反应性检测中激发可以忽略的 IFN- γ 。这一组中的例外是 S425F L433Nle 类似物,其表现出稍微改善的结合稳定性和显著的交叉反应性,并且 S425F L433Nle 类似物具有多于 4 倍减少的 ED₅₀,几乎加倍的半解离时间,并且比天然肽激发更多的 IFN- γ 。

实施例 42

在三个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

研究了 4 种三元取代类似物,其具有在 P1 的 Phe 或 Thr,在 P2 的 Nva 或 Met,以及在 P Ω 的 Nle。S425T L426M L433Nle 类似物具有相似的亲和力,而对于其余 3 种类似物,亲和力被改善了。具有 P2 Nva 取代的两种类似物都表现出增加的结合稳定性和显著水平的交叉反应性。参见图 28。

实施例 43

L426NVA L433NLE 类似物的交叉反应免疫原性

在第 0, 3, 14 和 17 天,将 2 组 HHD 转基因小鼠(n=8)用下述实施例 49 中所述的表达 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的质粒 pCTLR2 免疫,通过直接接种到腹股沟淋巴结中,每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天应用天然肽或 PRAME 表位类似物 L426Nva L433Nle 进行两次肽加强(2.5 μ g)。

在最后一次加强后 10 天将小鼠处死,制备脾细胞,并且在用 10 μ g/ml 天然肽体外刺激 0.5×10^6 细胞/孔后,评估 IFN- γ 的产生。在温育后 48 小

时, 收集上层清液, 并且通过 ELISA 测定应答 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 肽而产生的 IFN- γ 的浓度。所述数据在图 29 中描述, 并且表明在用 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ L426Nva L433Nle 类似物加强的小鼠中 IFN- γ 产生的显著增加。

实施例 44

由 L426NVA L433NLE 类似物诱导的体内细胞毒性

将 2 组 HHD 转基因小鼠(n=8)如上述实施例 43 所描述的那样进行免疫。

为了评估针对天然表位获得的体内应答, 将脾细胞从同窝生的对照 HHD 小鼠分离, 并且与 20 μ g/mL 或 1 μ g/ml 的天然肽一起温育 2 小时。然后, 将这些细胞用 CFSE^{hi} 和 CFSE^{med} 荧光(分别为 4.0 μ M 或 1 μ M, 15 分钟)染色, 并且与用 CFSE^{lo} 荧光(0.4 μ M)染色的等数目的对照脾细胞一起静脉内共同注射到免疫小鼠中。18 小时后, 通过从激发的动物移除脾和 PBMC, 而测定靶细胞的特异性消除, 并且通过流式细胞术测定 CFSE 荧光。相对于对照(未负荷的)群体, 计算与负荷肽的脾细胞相对应的群体的相对消耗, 并且表示为%特异性裂解。图 30 的结果表明当类似物取代天然肽作为加强剂时细胞毒性的保守诱导。这一趋势表明所述类似物可以改善细胞毒性免疫性的诱导。

实施例 45

体内细胞毒性和四聚体染色

在第 0, 3, 14 和 17 天, 将 7 组 HHD 转基因小鼠(n=4)用表达 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的质粒 pCTRL2 免疫, 通过直接接种到腹股沟淋巴结中, 每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行两次肽加强(2.5 μ g), 应用天然肽, 阴性对照(EAAGIGILTV 肽(SEQ ID NO.100))或在一级和/或二级锚定残基携带突变的 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 表位类似物—S425F, L426Nva L433Nle, S425T L433Nle, 和 S425T L426Nva L433Nle。

为了评估针对天然肽的体内应答, 将脾细胞从同窝生的对照 HHD 小鼠分离, 并且与 0.2 μ g/ml 或 20 μ g/ml 的天然肽一起温育 2 小时。然后, 将

这些细胞用 CFSE 荧光（分别为 1 和 2.5 μ M, 15 分钟）染色，并且与用 CFSE^{lo} 荧光（0.4 μ M）染色的等数目的对照脾细胞一起静脉内共同注射到免疫小鼠中。18 小时后，通过从受激发的动物移除脾，而测定靶细胞的特异性消除，并且通过流式细胞术测定所获得的细胞悬浮液中的 CFSE 荧光。相对于对照（未负荷的）群体，计算与负荷肽的脾细胞相对应的群体的相对消耗，并且表示为 % 特异性裂解。另外，PRAME₄₂₅₋₄₃₃-特异性 T 细胞的频率，通过四聚体/CD8 共染色而进行评估。

基于体内细胞毒性和四聚体染色，当与天然肽相比较时，用包括一级或二级锚定残基的突变的类似物加强表现出相当的免疫活性。所述类似物能够增强免疫应答，如通过与用不相关的肽加强的“EAA”组相比较所显示的那样。在这方面，如通过体内细胞毒性所评估的，包括 S425F, L33Nle, L426Nva L433Nle, S425T L433Nle, 或 S425T L426Nva L433Nle 的类似物都能够扩大针对天然表位的免疫性。然而，只有 L433Nle, L426Nva L433Nle, 和 S425T L426Nva L433Nle 类似物以显著高于用质粒激活并且用阴性对照肽加强的小鼠的水平扩大了针对天然表位特异性的 T 细胞的亚组（图 31）。

实施例 46

离体细胞因子产生

在第 0, 3, 14 和 17 天，将 3 组 HHD 转基因小鼠(n=4)用表达 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的质粒 pCTL2 免疫，通过直接接种到腹股沟淋巴结中，每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行两次肽加强（2.5 μ g），应用 PRAME 表位类似物 L426Nva L433Nle 和 S425T L426Nva L433Nle 或阴性对照肽 Melan A (EAAGIGILTV (SEQ ID NO.100)) 而进行。

在最后一次加强后 10 天将小鼠处死，制备脾细胞，并且在与 10 μ g/ml 天然肽温育后 48 小时，通过 ELISA 评估 IFN- γ 的产生。数据在图 32 中描述为以 pg/ml 单位的细胞因子浓度（一式三份的平均值 $\pm$ SD）。所述数据表明，用两种类似物加强的小鼠的脾细胞离体产生细胞因子，并且针对 L426Nva L433Nle 的应答大于针对 S425T L426Nva L433Nle 的应答。

实施例 47

在用类似物肽加强后针对人肿瘤细胞系的离体细胞毒性

在第 0, 3, 14 和 17 天, 将 HHD 转基因小鼠(n=4)用表达 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的质粒 pCTRL2 免疫, 通过直接接种到腹股沟淋巴结中, 每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行两次肽加强 (2.5 μ g), 其应用类似物 L426Nva L433Nle。加强后一周, 用天然肽离体刺激脾细胞, 并且在不同 E:T 比例针对 ⁵¹Cr-标记的人肿瘤细胞 (用或没用 IFN- γ 预处理的 PRAME⁺624.38 黑素瘤细胞; 或 HLA-A2 表达缺陷的阴性对照 624.38 细胞) 进行检测。类似物 L426Nva L433Nle 激发介导针对表达 A2 (624.38) 的人肿瘤细胞的显著的细胞毒性的免疫应答, 当它们用 IFN- γ 预处理时, 其稍微地升高。相反, 针对 A2-624.28 对照细胞没有测量到显著的活性。参见图 33。

实施例 48

针对 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的体外免疫

体外免疫按照图 34 中列出的通用方案进行。通过 Ficoll-分离, 从健康的供体(HLA- A*0201⁺)获得外周血单核细胞(PBMCs)。将新鲜的 PBMCs (2.5 $\times 10^6$), 与 5 ng/ml PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 或肽类似物一起接种到 T 细胞培养基中。随后, 在 72 和 96 小时后, 每孔加入 20 IU/ml 的白介素-2, 并且在第 7 天加入额外的肽 (5 ng/ml)。在收集效应细胞并且将其用于四聚体染色之前, 将培养物继续维持 10 天。将 IVS PBMCs 用 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 四聚体标记, 并且在 FACSCalibur (BD, 圣何塞, 加利福尼亚)上进行分析。基于用不相关的 HBV 四聚体和 SSX2 四聚体染色的阴性对照, 建立象限, 并且捕获了最少的 10,000 的门控事件 (gated events)。将四聚体-阳性细胞表示为淋巴细胞群体的百分数。与天然肽相比较, 在用肽类似物 IVS 之后, PRAME₄₂₅₋₄₃₃-特异性四聚体被显著地增强了。参见图 35。这证明所述类似物可以是优选的免疫原。

实施例 49

PCTLR2, 一种表达 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 表位的质粒

pCTLR2 是一种重组 DNA 质粒疫苗, 其编码这样一种多肽, 即, 所述多肽具有来自 PRAME 的 HLA A2-特异性 CTL 表位, 即氨基酸残基 425-433 SLLQHLIGL (SEQ ID NO. 71), 和 PRAME 的表位簇区域, 即氨基酸 422-509。对于质粒中多肽的 cDNA 序列受控于巨细胞病毒(CMVp)的启动子/增强子序列, 当被抗原呈递细胞摄取时, 其允许所述多肽的信使的充分转录。在所述编码序列 3'端的牛生长激素多聚腺苷酸化信号(BGH polyA)提供用于信使多聚腺苷酸化的信号, 以增加其稳定性以及从核到细胞质的转移。为了促进质粒转运到核, 将来自猿猴空泡病毒 40 的核输入序列(NIS)插入到质粒主链中。将一个拷贝的 CpG 免疫刺激基序构建到质粒中, 以进一步加强免疫应答。最后, 质粒中的两种原核遗传元件负责在大肠杆菌 (E.coli) 中的扩增, 卡那霉素抗性基因(Kan R)和 pMB 细菌复制起点 (参见图 36)。

免疫原翻译产物序列

所编码的多肽的氨基酸序列 (长度上为 150 个氨基酸残基) 在下文给出。

malqslqlhliglsnlthvlypvplesyedihgtihlerlaylharlrellcelgrpsmvwlsan
pcphcgdrtydpepilpcfmpnkrsl**lqlhliglgdaaysllqlhligliskeeqyiasllqlhliglkrpsikrslqlhli**
gl (SEQ ID NO: 196).

前 89 个氨基酸残基是代表 PRAME 422-509 的表位簇区域。在这一表位簇区域, 应用各种表位预测运算法则, 已经发现了许多潜在的 HLA A2-特异性 CTL 表位。氨基酸残基 90-150 是表位释放 (Synchrotope™) 序列, 具有嵌入的 4 个拷贝的 PRAME 425-433 CTL 表位 (**黑体**)。在定义的 PRAME CTL 表位两侧的是短的氨基酸序列, 已表明其在处理 PRAME CTL 表位中起着重要作用。另外, 将氨基酸序列 ispekeeqyia (SEQ ID NO.197) (与 PRAME 氨基酸 276-286 相对应, *斜体*) 构建到串珠 (sting-of-beads) 区域, 以帮助所编码的多肽表达的检测。

应用各种免疫学测定,包括四聚体、ELISPOT、ELISA、和细胞毒性,从用 pCTLR2 质粒免疫的 HLA-A2 转基因小鼠中已经检测到对表位 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 特异的强 CTL 应答,这表明 pCTLR2 的免疫原性功效。这些数据表明,所述质粒被抗原呈递细胞摄取,所编码的多肽被合成,并且被蛋白水解处理,以产生九聚体表位肽,和结合 HLA-A2 用于呈递的九聚体表位肽。

质粒构建

长的互补寡聚核苷酸系列的逐步连接导致产生编码“串珠”("String-of-Beads")表位释放序列(氨基酸 90-150)中的氨基酸残基的 cDNA。这些 cDNA 产生用于限制性酶的适当的粘性末端,其可以用于同编码 PRAME 表位簇区域(氨基酸 1-89)的 cDNA 的进一步连接,所述 cDNA 通过在作为模板的编码 PRAME 的 cDNA 上进行 PCR 而扩增。然后,将完整的插入片段连接到 *Afl* II 和 *Eco*R I 位点之间的载体主链中。完整的编码序列通过 DNA 测序而进行验证。

实施例 50

抗原特异性 T 细胞应答的产生

在没有病原体的条件下,笼养 H-2 I 类-阴性、HLA-A2.1-转基因 HHD 小鼠,并且用于评估 HLA-A2.1-限制性人肿瘤相关的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)表位的免疫原性。将 8-12 周龄的雌性小鼠用于淋巴内免疫,并且用于脾细胞的分离,以用于体内细胞毒性研究。小鼠通过两侧腹股沟淋巴结注射而进行免疫。通过吸入异氟烷而将小鼠麻醉,并且在无菌条件下进行手术。手术准备之后,在腹股沟褶皱处切开长度为 0.5 cm 的切口,并且暴露出腹股沟淋巴结。应用 0.5 mL 胰岛素注射器,将最大体积 25 μ l (25 μ g) 的质粒 DNA 疫苗或肽直接注射到所述淋巴结内。伤口用无菌的 6-0 尼龙皮肤缝线闭合。

实施例 51

针对人肿瘤细胞的离体细胞毒性

在第 0, 3, 14 和 17 天, 将 HHD 转基因小鼠(n=4/组)用表达 melan-A₂₆₋₃₅ A27L 表位类似物的质粒 pSEM (在美国专利申请号 10/292,413 (公开号 20030228634 A1)中更充分地描述, 其通过引用完全结合于此) 进行免疫, 通过直接接种到腹股沟淋巴结内, 每淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行两次额外的肽加强 (相同用量), 使用类似物 A27L、A27Nva、或 A27L V35Nva 进行。加强后一周, 将脾细胞离体用天然 melan-A₂₆₋₃₅ 肽进行刺激, 并且在不同的 E:T 比例针对 ⁵¹Cr-标记的人肿瘤细胞 (624.38 细胞) 进行检测。在用 A27L 或 A27Nva 类似物加强后获得的免疫性相当于和比天然肽 EAAGIGILTV (SEQ ID NO. 100) 更加有效 (图 37)。由于所述激活质粒表达 A27L 类似物, 所以本实验对所述肽具有潜在的偏爱。因此, 如果激活是利用相同的序列的话, 那么用 A27Nva 类似物获得的基本的细胞毒性可能被低估了其功效。

实施例 52

四聚体分析

CD8+抗原-特异性 T 细胞的计数需要 I 类 MHC/肽复合体同源识别 T 细胞受体(TCR)。这可以应用 I 类 MHC 四聚体进行, 其由 4 个 I 类 HLA MHC 分子的复合体组成, 每个分子结合到特定的肽上并且与荧光蛋白缀合。因此, 四聚体检测允许对给定的与具体的 MHC 分子复合的肽特异的总 T 细胞群体的量化。并且, 由于结合不依赖功能途径, 这一群体包括所有特异的 CD8+ T 细胞, 而不论功能状态。通过用 HLA-A*0201 MART1 (ELAGIGILTV (SEQ ID NO.100))-PE MHC 四聚体(贝克曼 库尔特 (Beckman Coulter), TO 1008)或酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ (YMDGTMSQV (SEQ ID NO.94))特异的四聚体试剂(HLA-A*0201 酪氨酸酶-PE, 贝克曼 库尔特)和 FITC 缀合的大鼠抗小鼠 CD8a (Ly-2)单克隆抗体 (BD 生物科学 (Biosciences)), 将密度离心 (哺乳动物淋巴细胞分离液 (Lympholyte Mammal), Cedarlane 实验室) 后从外周血分离的单核细胞共染, 而测定免疫动物的 CTL 应答。应用 BD FACS Calibur 流式细胞仪收集数据, 并且应用 cellquest 软件通过门控淋巴细胞群体进行分析, 并且计算 CD8⁺ CTL 群体内四聚体⁺细胞的百分数。

实施例 53

四聚体染色（质粒激活，肽加强——天然相对类似物）

在第 0, 3, 14 和 17 天, 将两组 HHD 转基因小鼠($n=8$)用表达酪氨酸酶 369-377 的质粒免疫, 通过直接接种到腹股沟淋巴结内, 每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行两次额外的肽加强（相似用量）, 使用天然肽或 377Nva 类似物进行。10 天后, 应用酪氨酸酶 369-377 特异的四聚体试剂(HLA-A*0201 酪氨酸酶-PE, 贝克曼 库尔特), 而监测免疫应答。将个体小鼠通过眼眶后窦静脉采血, 并且应用 2000rpm 持续 25 分钟的密度离心(哺乳动物淋巴细胞分离液, Cedarlane 实验室)分离 PBMC。将 PBMC 用小鼠对 CD8 特异的抗体(BD 生物科学 (Biosciences))和酪氨酸酶四聚体试剂一起共染色, 并且通过应用 FACS 口径流式细胞仪(BD 生物科学 (Biosciences))的流式细胞术确定具体的百分数。酪氨酸酶特异的 CD8⁺细胞百分数, 表明用类似物代替天然肽保持了酪氨酸酶特异的亚组的扩展。所述趋势表明所述类似物可以改善酪氨酸酶特异的 T 细胞的扩展（图 38）。

实施例 54

体内细胞毒性和四聚体染色

（天然肽和全体类似物候选物之间的逐一比较）

在第 0, 3, 14 和 17 天, 将 4 组 HHD 转基因小鼠($n=6$)用表达酪氨酸酶 369-377 和 Melan-A₂₆₋₃₅ A27L 表位的质粒(pSEM)免疫, 通过直接接种到腹股沟淋巴结内, 每个淋巴结施用在 25 μ l PBS 中的 25 μ g 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行两次肽加强（相似用量）, 将 Melan-A₂₆₋₃₅ A27L 加入到左侧腹股沟淋巴结内, 并且将携带在一级和/或二级锚定残基的取代的酪氨酸酶 369-377 类似物接种到右侧淋巴结内。将仅用质粒免疫的小鼠或首次用于实验的小鼠用作对照。

为了评估针对天然酪氨酸酶和 Melan A 表位的体内应答, 将脾细胞从同窝生的对照 HHD 小鼠分离, 并且分别独立地与 20 μ g/ml 的天然肽（Melan-A₂₆₋₃₅ 或酪氨酸酶 369-377）一起温育 2 小时, 温育在没有 HL-1 血

清的培养基(Cambrex)中进行,浓度为 20×10^6 细胞/mL。然后,将这些细胞用 CFSE (Vybrant CFDA SE 细胞示踪试剂盒,分子探针 (Molecular Probes))(分别为 1 和 $2.5 \mu\text{M}$, 15 分钟)染色,并且与用 CFSE^{lo} 荧光($0.4 \mu\text{M}$)染色的等数目的对照没有肽包被的脾细胞一起静脉内共同注射到免疫小鼠或首次用于实验的对照 HHD 小鼠中。18 小时后,通过从激发的动物移除脾,并且通过流式细胞术测定所获得的细胞悬浮液中的 CFSE 荧光,而测定靶细胞的特异性消除。相对于对照(未负荷的)群体,计算与负荷肽的脾细胞相对应的群体的相对消耗,并且将其表示为 % 特异性裂解。另外,酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ 和 Melan-A₂₆₋₃₅-特异性 T 细胞的频率,通过四聚体/CD8 共染色 (HLA-A*0201-四聚体,贝克曼 库尔特 (Beckman Coulter)) 而进行评估。

酪氨酸酶类似物 V377Nva 能够扩增酪氨酸酶-特异的 T 细胞群体,并且增强细胞毒性免疫性,与天然肽相似并且大于酪氨酸酶类似物 M370V V377Nva (图 39)。

实施例 55

针对人肿瘤细胞的离体细胞毒性

在第 0, 3, 14 和 17 天,将 HHD 转基因小鼠($n=4/\text{组}$)用表达酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ 表位的质粒(pSEM)免疫(按照图 40 的一般流程),通过直接接种到腹股沟淋巴结内,每个淋巴结施用在 $25 \mu\text{l}$ PBS 中的 $25 \mu\text{g}$ 质粒而进行。这之后在第 28 和 31 天进行两次肽加强(相同用量),使用天然肽或携带在一级锚定残基 P2 和 P Ω (370 和 377)取代的类似物。加强后一周,将脾细胞离体用天然酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ 肽刺激,并且在不同的 E:T 比例针对 ⁵¹Cr-标记的人肿瘤细胞(624.38 细胞)进行检测。天然肽和 M370V V377Nva 类似物都产生了针对 624.38 细胞的强细胞毒性(图 41)。尽管对于天然肽存在某些稀释的细胞溶解活性,但是对于所述类似物不存在这样的活性,这进一步证实了从实施例 52 的四聚体结果所获得的更大的免疫原性的指示。与前述实施例综合来看,这一观察阐明了用更灵敏的检测(体外刺激后离体细胞毒性)补充更严谨的检测(体内细胞毒性和四聚体染色)对提出潜在有效的类似物的有效性。

实施例 56

通过 ITOPIA 系统表征天然肽和类似物的结合和稳定性（半衰期）

由于与 MHC 1 复合体结合的肽的结合和稳定性是获得良好的免疫应答所必要的，所以应用 iTopia 表位发现系统（还在实施例 31 中讨论）检测天然表位及其类似物与 A0201 限制性 1 类 MHC 分子的结合和稳定性（ $T_{1/2}$ ）。对于 6 种天然表位和设计成增强免疫应答的它们的类似物确定结合和解离率（offrate）（ $T_{1/2}$ ）。所示天然肽和类似物如下：NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (L158Nva, C165V), Melan-A₂₆₋₃₅, Melan-A₂₆₋₃₅ (A27Nva), SSX-2₄₁₋₄₉, SSX-2₄₁₋₄₉ (A42V), Prame₄₂₅₋₄₃₃, Prame₄₂₅₋₄₃₃ (L426Nva, L433Nle), 酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇, 酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ (V377Nva), PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 和 PSMA₂₈₈₋₂₉₇(I297V)。

表 10（下述）显示六种类似物及它们的天然肽的肽结合和稳定性或半衰期的平均值。与天然肽相比，SSX-2₄₁₋₄₉ 和 NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ 的类似物表现出结合百分数的显著增加。与天然肽相比，Melan-A₂₆₋₃₅、PsmA₂₈₈₋₂₉₇、Prame₄₂₅₋₄₃₃ 和酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ 的类似物表现出肽的结合百分数的少量增加。

与天然肽相比，Melan A₂₆₋₃₅ (A27Nva)表现出稳定性（半衰期）的显著增加。对于其它类似物 PsmA₂₈₈₋₂₉₇ (I297V), NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (L158Nva, C165V), Prame₄₂₅₋₄₃₃ (L236Nva, L433Nle)和 SSX-2₄₁₋₄₇ (A42V)观察到稳定性的显著增加。与天然肽相比，在类似物酪氨酸酶₃₆₉₋₃₇₇ (V377Nva)的半衰期没有观察到显著的不同。在类似物的半衰期中观察到的不同可能是由于每种类似物与 MHC 1 分子结合的机制的差异。

表 10. 天然肽及其类似物的结合百分数和稳定性（半衰期）的平均值

#	肽名	半衰期 ($T_{1/2}$)	%在 T0 的 肽结合
1	Melan-A 26-35	1.85	74
2	Melan-A 26-35 (A27Nva)	13.55	79
3	PSMA 288-297	7.34	85

4	PSMA 288-297(I297V)	16.72	92
5	Nyeso-1 157-165	12.74	63
6	Nyeso-1 157-165 (L158Nva,C165V))	16.98	100
7	PRAME 425-433	12.42	79
8	Prame 425-433 (L426Nva, L433Nle)	16.87	89
9	SSX2 41-49	9.90	55
10	SSX2 41-49 (A42V)	15.01	71
11	酪氨酸酶 369-377	14.39	73
12	酪氨酸酶 369-377 (V377Nva)	14.74	77

上文所述的各种方法和技术提供了许多实行本发明的方法。当然，应该理解，按照本申请所述的任何具体的实施方案，没有必要实现所述所有的目的或益处。因此，例如，本领域的那些技术人员应该意识到，所述方法可以实现或优化本申请所教导的一种益处或一组益处而不必实现本申请教导或提示的其它目的或益处的方式进行。许多有益的和不利备选方案在本文提及。应该理解，一些优选的实施方案特异性地包括一个、另一个、或一些有利的特征，而其它实施方案特异性地排除一个、另一个或一些不利特征，而其它实施方案通过包括一个、另一个或一些有利特征而特异性地减少不利特征的出现。

并且，熟练的技术人员应该意识到不同的实施方案的各种特征的适应性。类似地，上文所讨论的各种组成部分、特征和步骤，以及每种这样的组成部分、特征或步骤的其它已知的等价物，可以由本领域的普通技术人员混合并且匹配，以按照本申请所述的原理实行方法。在各种组成部分、特征和步骤中，在不同的实施方案中，一些将被特异性地包含在内，而另一些将被特异性地排除在外。

尽管已经在某些实施方案和实施例中公开了本发明，本领域的技术人员应该理解，本发明超出具体公开的实施方案延伸到其它备选的实施方案和/或应用及其改进和等价物。

已经公开了许多本发明的变化和备选的组成部分。其它变化和备选的组成部分对于本领域的技术人员应该是显而易见的。在这些变化中，没有限制，为在筛选全体中或由治疗产品靶向的抗原的具体数目、抗原的类型、

癌症的类型、和指定的具体抗原。本发明的各种实施方案可以特异性地包括或排除任何这些变化或组成部分。

在一些实施方案中，应该理解，用来描述并且要求本发明的特定的实施方案的表示成分的量的数目、特性诸如分子量、反应条件等在一些实例中通过术语“大约”而修正。因此，在一些实施方案中，在撰写的描述和后附的权利要求中列出的数字参数是可以依据具体的实施方案寻找要获得的需要的特性而变化的近似值。在一些实施方案中，所述数字参数应该依据所报道的显著数字的数目并且通过应用常规凑整技术进行解释。尽管在本发明的一些实施方案的宽范围中列出的数字范围和参数是近似的，但是在具体实施例中列出的数值同实际一样精确地报道。在本发明的一些实施方案中描述的数值可以含有由在它们各自的检测测定中发现的标准偏差导致的必要的某些错误。

在一些实施方案中，在描述本发明的具体的实施方案的上下文中（特别是在特定的下述权利要求的上下文中）的术语“一个”和“一种”和“所述”以及类似的指示物可以解释为包括单数和复数。在本文中值的范围的引用仅仅是意欲作为单独提及落入所述范围的每一个单独的值的速记方法。除非在本文另外指明，每一单独的值如同它单独在本文中引用一样而结合在说明书中。除非本文另外指明或者与上下文另外明显地相抵触，本文所述的所有方法可以以任何适当的顺序实行。关于本文某些实施方案提供的任何以及所有实施例、或示例性语言（例如，“诸如”）的应用只是意欲更好地举例说明本发明，而不是对另外要求的本发明的范围造成限制。说明书中没有语言应该被解释为指示任何未要求的对实施本发明重要的组成部分。

本文所公开的发明的备选组成部分或实施方案的组合不应该被解释为限制。每一组成员可以单独或与本文发现的组的其它成员或其它组成部分任何组合地提及并且要求。由于便利和/或可专利性的缘故，预计组的一个或多个成员可以包含在组内或者从组删除。当发生任意所述包含或删除时，此处认为本说明书包含改进的组，因此满足在后附的权利要求中所用的所有 Markush 组的撰写描述。

在本文中描述了本发明的优选的实施方案，包括本发明人已知的实行

本发明的最好的模式。当阅读前述描述时，关于这些优选的实施方案的变化对于本领域的普通技术人员是显而易见的。应该考虑到，熟练的技术人员可以适当地应用所述变化，并且本发明可以以与本文特异描述不同地实行。因此，按照适用的法律允许，本发明的许多实施方案包括在其后附的权利要求中引用的主题的所有改进和等价物。并且，在其所有可能的变化中的上述组成部分的任何组合包含在本发明中，除非本文另外指明或者通过上下文另外明显地抵触。

此外，在贯串本说明书中，许多参考参见专利和印刷的出版物。上文引用的参考文献和印刷的出版物的每一个分别通过引用完全并入本申请中。

最后，应该理解，本文公开的发明的实施方案是举例说明本发明的原理。可以应用的其它改进可以在本发明范围之内。因此，通过举例的方式，但是不限于此，可以按照本文的教导应用本发明的备选配置。因此，本发明不限于精确所示和所描述的那些。

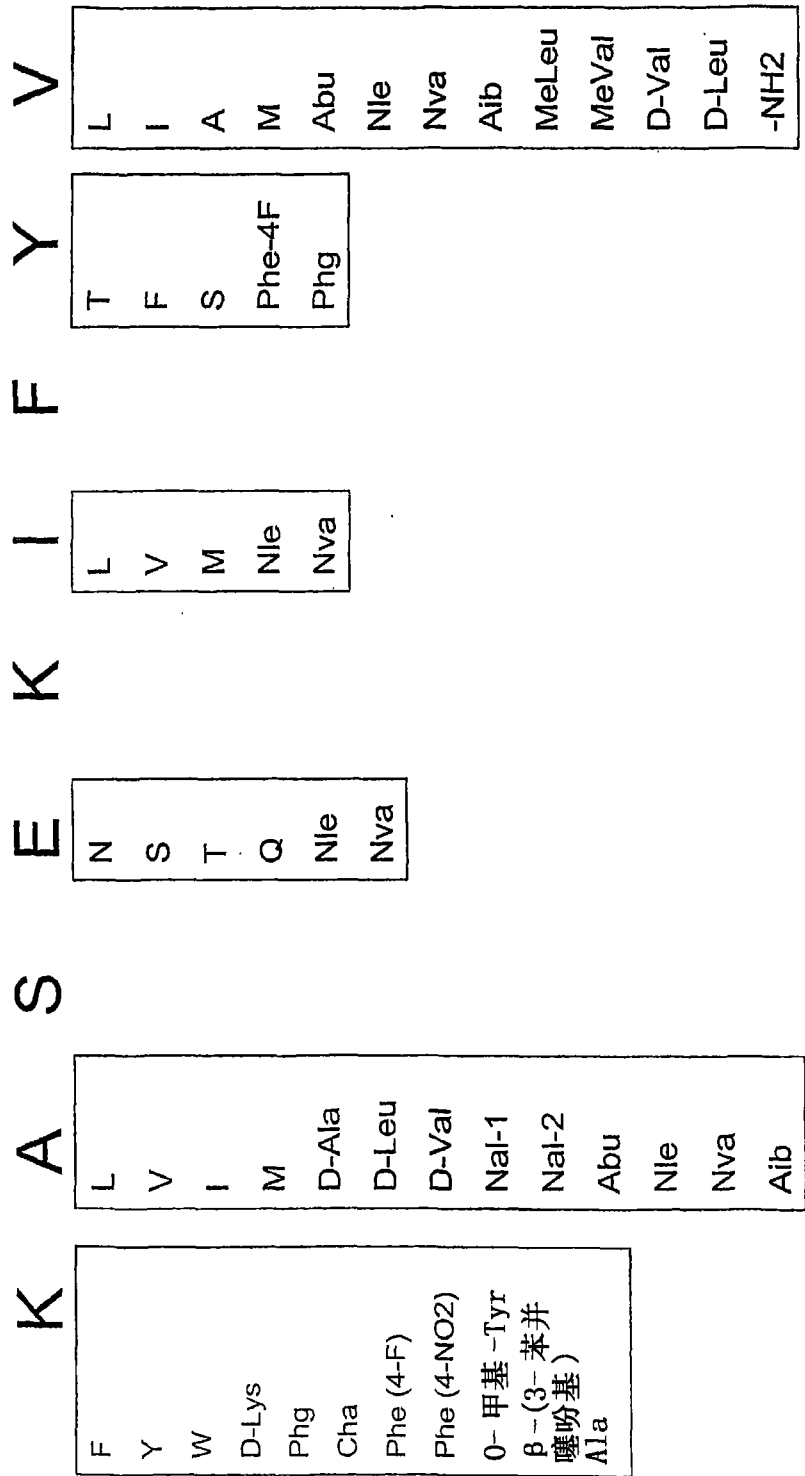


图 1A: 设计的九聚体类似物的概述

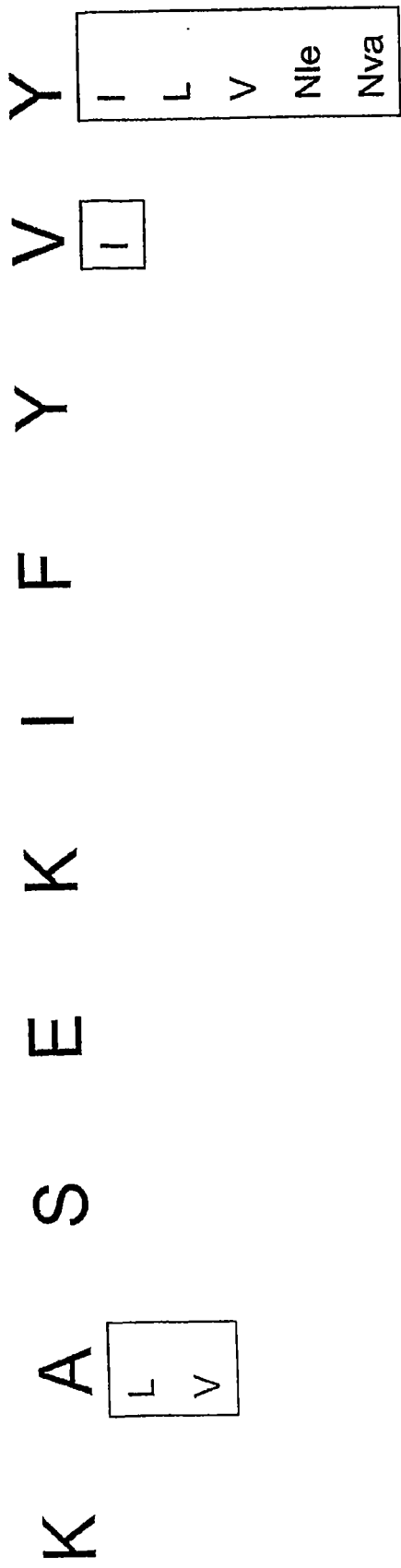


图 1B: 设计的十聚体类似物的概述

图 2: 方法

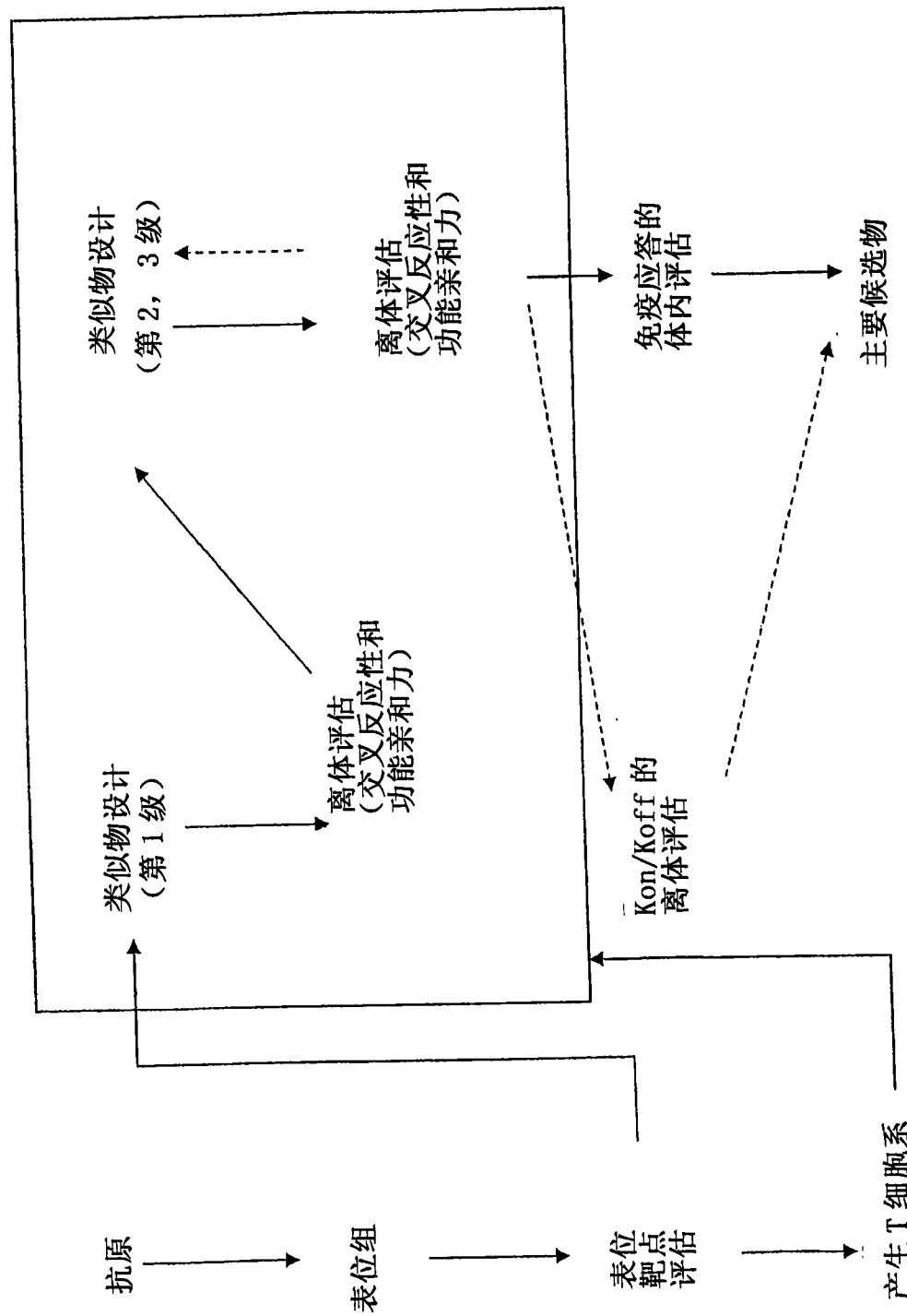


图 3：在单一位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

种类	数目	肽名	序列	注释	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *	** 交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有， 最大 IFN γ)
天然的	1	SSX2 41-49	KASEKIFYV	天然肽	1	46
N 端一级锚点	2	SSX2 41-49 (A42L)	KLSEKIFYV		0.03	89
	3	SSX2 41-49 (A42Y)	KVSEKIFYV		0.03	65
	4	SSX2 41-49 (A42I)	KISEKIFYV		3	55
	5	SSX2 41-49 (A42M)	KMSEKIFYV		0.1	65
	6	SSX2 41-49 (A42a)	KASEKIFYV	小写字母代表相应的 d-氨基酸	10	26
	7	SSX2 41-49 (A42v)	KASEKIFYV		3	43
	8	SSX2 41-49 (A42Nal-1)	KNal-1SEKIFYV	Nal-1 是 L-苯基 L-Ala	>10	12
	9	SSX2 41-49 (A42Nal-2)	KNal-2SEKIFYV	Nal-1 是 2-苯基 L-Ala	3	48
	10	SSX2 41-49 (A42Abu)	KAbuSEKIFYV	Abu 是 L- α -氨基丁酸	0.3	60
	11	SSX2 41-49 (A42Nle)	KNleSEKIFYV	Nle 是正亮氨酸	0.1	69
	12	SSX2 41-49 (A42Nva)	KNvaSEKIFYV	Nva 是正缬氨酸	0.1	72
	13	SSX2 41-49 (A42Aib)	KAbSEKIFYV	Aib 是 α -氨基异丁酸	3	70
N 端二级锚点	14	SSX2 41-49 (K41F)	FASEKIFYV		0.3	59
	15	SSX2 41-49 (K41W)	WASEKIFYV		>10	16
	16	SSX2 41-49 (K41Y)	YASEKIFYV		3	53
	17	SSX2 41-49 (K41k)	KASEKIFYV	K 是 d-Lys	>10	10
	18	SSX2 41-49 (K41Phg)	PhgASEKIFYV	Phg 是苯基甘氨酸	0.1	40
	19	SSX2 41-49 (K41Cha)	ChASEKIFYV	Cha 是 β -环己基丙氨酸	>10	18
	20	SSX2 41-49 (K41Phe-4F)	Phe(4-F)ASEKIFYV	Phe(4-F) 是 4-苯基丙氨酸	3	49
	21	SSX2 41-49 (K41Phe-4NO2)	Phe(4-NO2)ASEKIFYV	Phe(4-NO2) 是 4-硝基苯丙氨酸	3	46
	22	SSX2 41-49 (K41O-甲基 Tyr)	O-甲基-TyrASEKIFYV	O-甲基-Tyr 是 O-甲基-L-酪氨酸	3	41
	23	SSX2 41-49 (K41 β -3-苯并噻吩基)Ala)	β -3-苯并噻吩基)AlaASEKIFYV		10	23
	24	SSX2 41-49 (V49I)	KASEKIFYI	基于第 1 轮交叉反应性数据	10	24
C 端酰胺	25	SSX2 41-49-NH2	KASEKIFYV-NH2	研究 C 端锚定残基	>10	12
	26	SSX2 41-49-NH2 (A42L)	KLSEKIFYV-NH2	研究 C 端锚定残基	3	65
	27	SSX2 41-49-NH2 (A42V)	KVSEKIFYV-NH2	研究 C 端锚定残基	10	49

* μ M; **ng/ml

图 4：在两个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力和

种类	数目	肽名	序列	注释	交叉反应性和 fct 亲和力和 (类似物固有) *	** 交叉反应性和 fct 亲和力和 (类似物固有, 最大 IFN γ)	** 交叉反应性和 fct 亲和力和 (类似物固有, 最大 IFN γ) <在最大 IFN γ 的类似物浓度>
天然的 N 端一级 / 二级端点	1	SSX2 41-49	KASEKIFYV	天然肽	1	46	10
	2	SSX2 41-49 (K41Y, A42V)	YVSEKIFYV		0.1	69	10
	3	SSX2 41-49 (K41Y, A42M)	YMSEKIFYV		3	44	10
	4	SSX2 41-49 (K41Y, A42I)	YISEKIFYV		1	52	3
	5	SSX2 41-49 (K41F, A42L)	FLSEKIFYV		0.3	50	10
	6	SSX2 41-49 (K41F, A42V)	FVSEKIFYV		0.1	61	10
	7	SSX2 41-49 (K41F, A42M)	FMSEKIFYV		3	36	10
	8	SSX2 41-49 (K41F, A42I)	FISEKIFYV		0.3	51	10
	9	SSX2 41-49 (K41W, A42L)	WLSEKIFYV		0.3	43	10
	10	SSX2 41-49 (K41W, A42V)	WMSEKIFYV		1	54	10
	11	SSX2 41-49 (K41W, A42M)	WMSEKIFYV		1	49	10
	12	SSX2 41-49 (K41W, A42I)	WISEKIFYV		0.1	53	10
	13	SSX2 41-49 (K41K, A42L)	KLSEKIFYV		10	48	10
	14	SSX2 41-49 (K41K, A42V)	KVSEKIFYV		10	52	10
N 端一级端点, C 端一级端点							
	16	SSX2 41-49 (A42V, V49I)	KVSEKIFYI		0.3	68	10
	17	SSX2 41-49 (A42L, V49I)	KLSEKIFYI		0.03	68	10
	18	SSX2 41-49 (A42K, V49V)	KaSEKIFYv		>10	15	3

* μ M; **ng/ml

图 5: 在多于两个位置取代的类似物的交叉反应性和功能亲和力

种类	数目	肽名	序列	注释	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *	**交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有, 最大 IFN γ)	**交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *
天然的	1	SSX2 41-49	KASEKIFVY	天然肽	1	46	10
N 端一级 / 二级锚点, C 端一级锚点	2	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49L)	FVSEKIFVYL	研究 C 端锚定残基	>10	20	10
	3	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49I)	FVSEKIFVI	研究 C 端锚定残基	0.3	49	10
	4	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49A)	FVSEKIFYA	研究 C 端锚定残基	1	45	10
	5	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49M)	FVSEKIFYM	研究 C 端锚定残基	>10	15	10
	6	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49Nle)	FVSEKIFY(Nle)	研究 C 端锚定残基	>10	0	N/A
	7	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49Nva)	FVSEKIFY(Nva)	研究 C 端锚定残基	0.1	63	10
	8	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49MeVal)	FVSEKIFY(MeVal)	研究 C 端锚定残基	10	30	10
	9	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49Aib)	FVSEKIFY(Aib)	研究 C 端锚定残基	>10	0	N/A
	10	SSX2 41-49 (K41F, A42V, V49Abu)	FVSEKIFY(Abu)	研究 C 端锚定残基	1	48	10
N 端一级 / 二级锚点, TCR 位点	11	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44D)	FVSDKIFYV	研究 TCR 位点	>10	14	10
	12	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44N)	FVSNKIFYV	研究 TCR 位点	>10	15	10
	13	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44S)	FVSSKIFYV	研究 TCR 位点	>10	13	10
	14	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44T)	FVSTKIFYV	研究 TCR 位点	>10	19	10
	15	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44Q)	FVSKIFYV	研究 TCR 位点	10	30	10
	16	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44Nle)	FVSNleKIFYV	研究 TCR 位点	10	42	10
	17	SSX2 41-49 (K41F, A42V, E44Nva)	FVSNvaKIFYV	研究 TCR 位点	3	37	10
	18	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L)	FVSEKIFYV	研究 TCR 位点	3	43	10
	19	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46M)	FVSEKIFYV	研究 TCR 位点	1	53	3
	20	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46V)	FVSEKIFYV	研究 TCR 位点	>10	20	10
	21	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46Nle)	FVSEKIFYV	研究 TCR 位点	10	35	10
	22	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46Nva)	FVSEKIFYV	研究 TCR 位点	1	33	10
	23	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48T)	FVSEKIFTV	研究 TCR 位点	>10	0	N/A
	24	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48F)	FVSEKIFTV	研究 TCR 位点	10	14	10
	25	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48S)	FVSEKIFTV	研究 TCR 位点	>10	0	N/A
	26	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48Phe-4F)	FVSEKIFTV	研究 TCR 位点	10	25	10
	27	SSX2 41-49 (K41F, A42V, Y48Phe)	FVSEKIFTV	研究 TCR 位点	P1>10, P2>10, P3>10	0	N/A
	28	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48T)	FVSEKIFTV	基于 SAR 的研究	>10	0	N/A
N 端一级 / 二级锚点, C 端一级锚点, TCR 位点	30	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48T, V49A)	FVSEKLFTA	基于 SAR 的研究	>10	0	N/A
	31	SSX2 41-49 (K41F, A42V, I46L, Y48S, V49A)	FVSEKLFTA	基于 SAR 的研究	>10	0	N/A

* μ M; **ng/ml

图 6:- 包括指定的 41-49 肽的十聚体类似物的交叉反应性和功能亲和力

种类	项目	肽名	序列	注释	交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有) *	** 交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有, 最大 IFN γ)	** 交叉反应性和 fct 亲和力 (类似物固有, 最大 IFN γ)
天然的 十聚体	1	SSX2 41-49	KASEKIFYV	天然肽	1	46	10
	2	SSX2 41-50	KASEKIFYV	天然肽	>10	20	10
	3	SSX2 41-50 (Y50I)	KASEKIFYV		10	25	10
	4	SSX2 41-50 (Y50L)	KASEKIFYV		10	31	10
	5	SSX2 41-50 (Y50V)	KASEKIFYV		>10	9	10
	6	SSX2 41-50 (Y50Nle)	KASEKIFYV(Nle)		>10	20	10
	7	SSX2 41-50 (Y50Nva)	KASEKIFYV(Nva)		>10	0	N/A
	8	SSX2 41-50 (A42V, Y50I)	KVSEKIFYV		10	44	10
	9	SSX2 41-50 (A42V, Y50L)	KVSEKIFYV		10	41	10
	10	SSX2 41-50 (A42L, Y50L)	KLSEKIFYV		3	58	10
	11	SSX2 41-50 (A42V, Y50V)	KVSEKIFYV		10	25	10
	12	SSX2 41-50 (A42L, Y50V)	KLSEKIFYV		10	44	10
	13	SSX2 41-50 (A42V, Y50Nle)	KVSEKIFYV(Nle)		10	55	10
	14	SSX2 41-50 (A42L, Y50Nle)	KLSEKIFYV(Nle)		10	39	10
	15	SSX2 41-50 (A42V, Y50Nva)	KVSEKIFYV(Nva)		>10	0	N/A
	16	SSX2 41-50 (A42L, Y50Nva)	KLSEKIFYV(Nva)		10	40	10

* μ M; **ng/ml

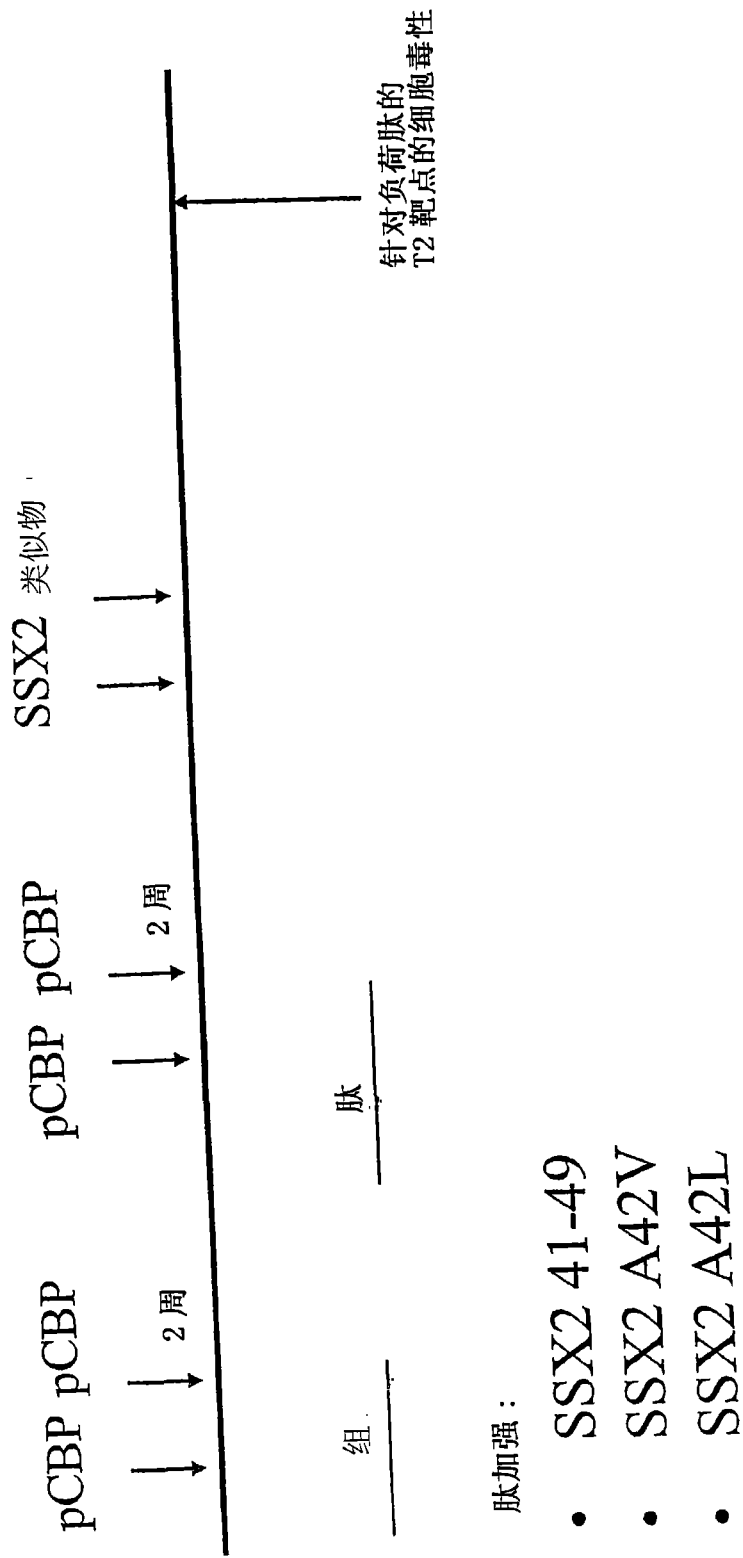


图 7

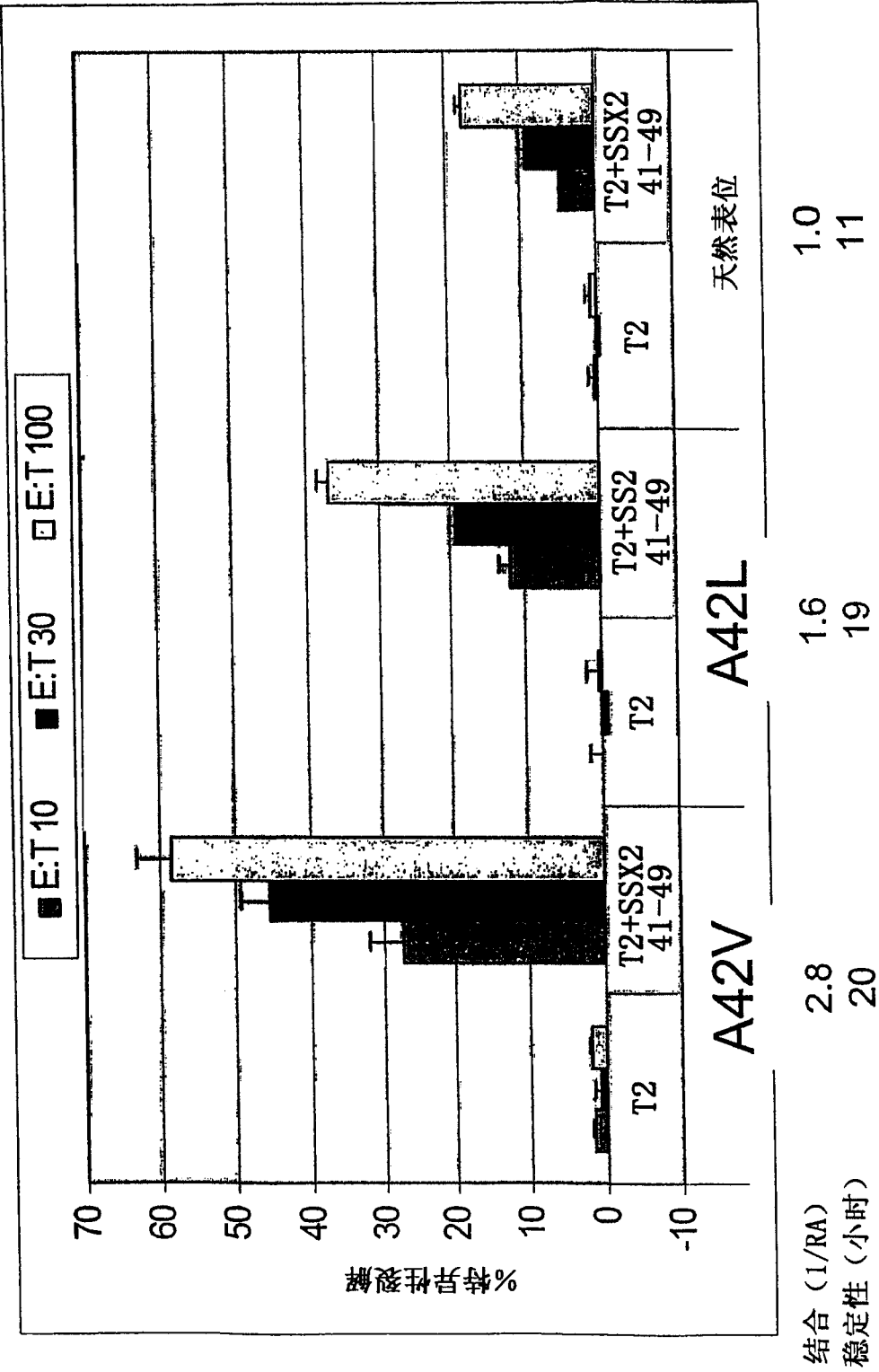


图 8

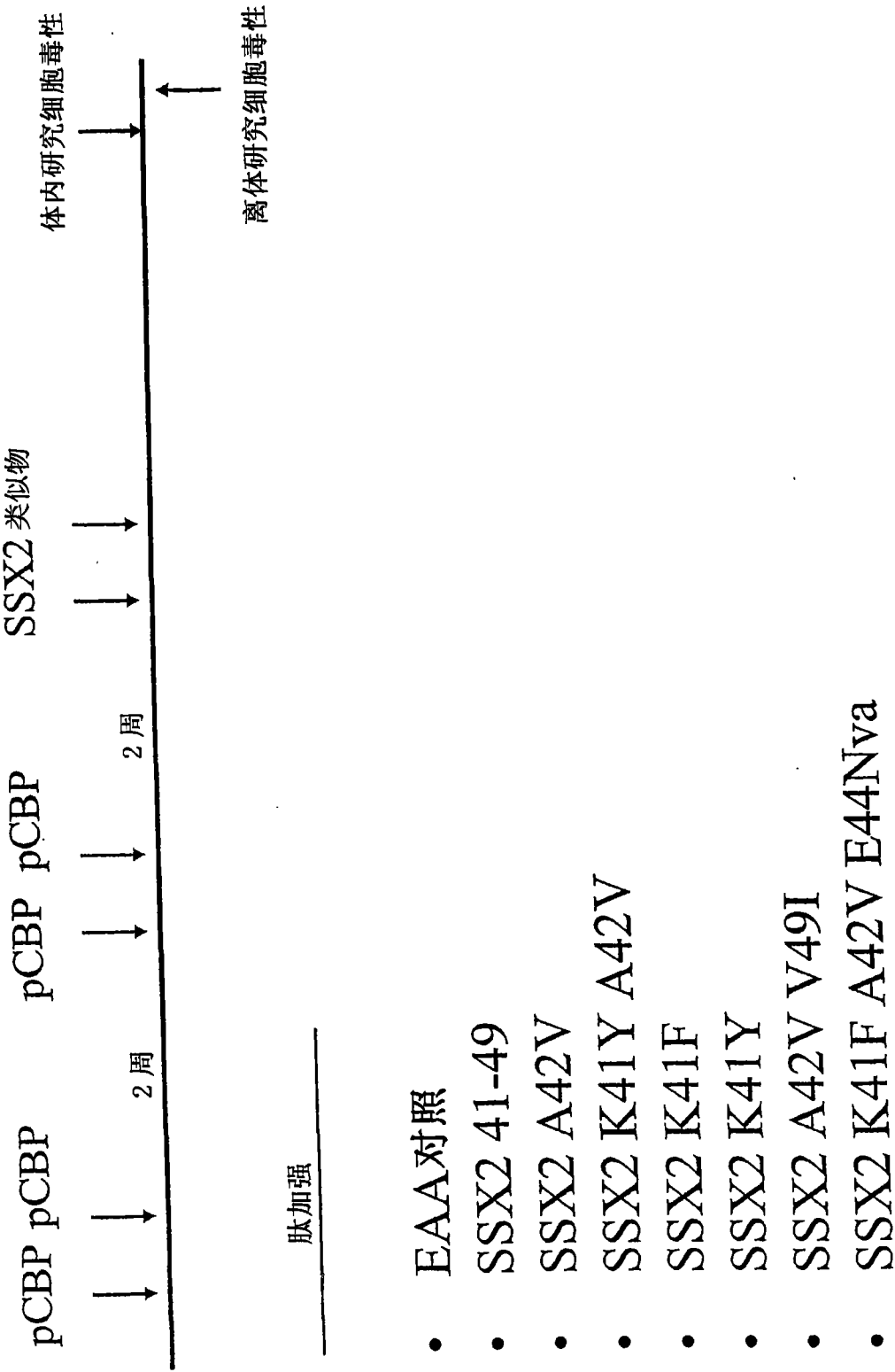


图 9

体内特异性裂解					
脾	SSX2	1ug/ml		20ug/ml	
		平均值	SEM	平均值	SEM
对照		-0.2	2.8	-0.2	2.8
SSX 41-49 天然		50.8	13.9	71.9	17.1
SSX2 A42V		72.4	4.42	94.7	3.22
SSX2 K41F		68.2	9.5	91.3	5.4
SSX2 K41Y		69.2	14.45	90.7	8.45
SSX2 A42V V49I		56.3	28.29	74.4	27.34
SSX2 K41Y A42V		46.8	23.5	67.2	29.1
SSX2 K41F A42V E44Na		53.0	7.6	70.1	14.7
EAA		0.6	2.85	1.7	1.8

图 10

体内特异性裂解						MHC 结合 (1/RA)	MHC 稳定性 (小时)
血	SSX2 1ug/ml	SSX2 20ug/ml	SEM	平均值	SEM		
对照	-0.01	0.88	0.88	0.3	1.61	-	-
SSX 41-49天然	59.64	15.33	15.33	73.33	15.53	1.0	11
SSX2 A42V	79.31	3.91	3.91	90.84	0.72	2.8	20
SSX2 K41F	74.28	11.46	11.46	89.07	3.20	1.5	>24
SSX2 K41Y	72.49	11.69	11.69	88.21	4.02	1.7	>24
SSX2 A42V V49I	61.27	27.62	27.62	68.84	27.86	1.1	
SSX2 K41Y A42V	52.60	25.65	25.65	66.21	28.18		>24
SSX2 K41F A42V E44Nva	55.38	-	-	65.98	-	3.9	>24
EAA	3.06	1.26	1.26	2.61	3.96		

图 11

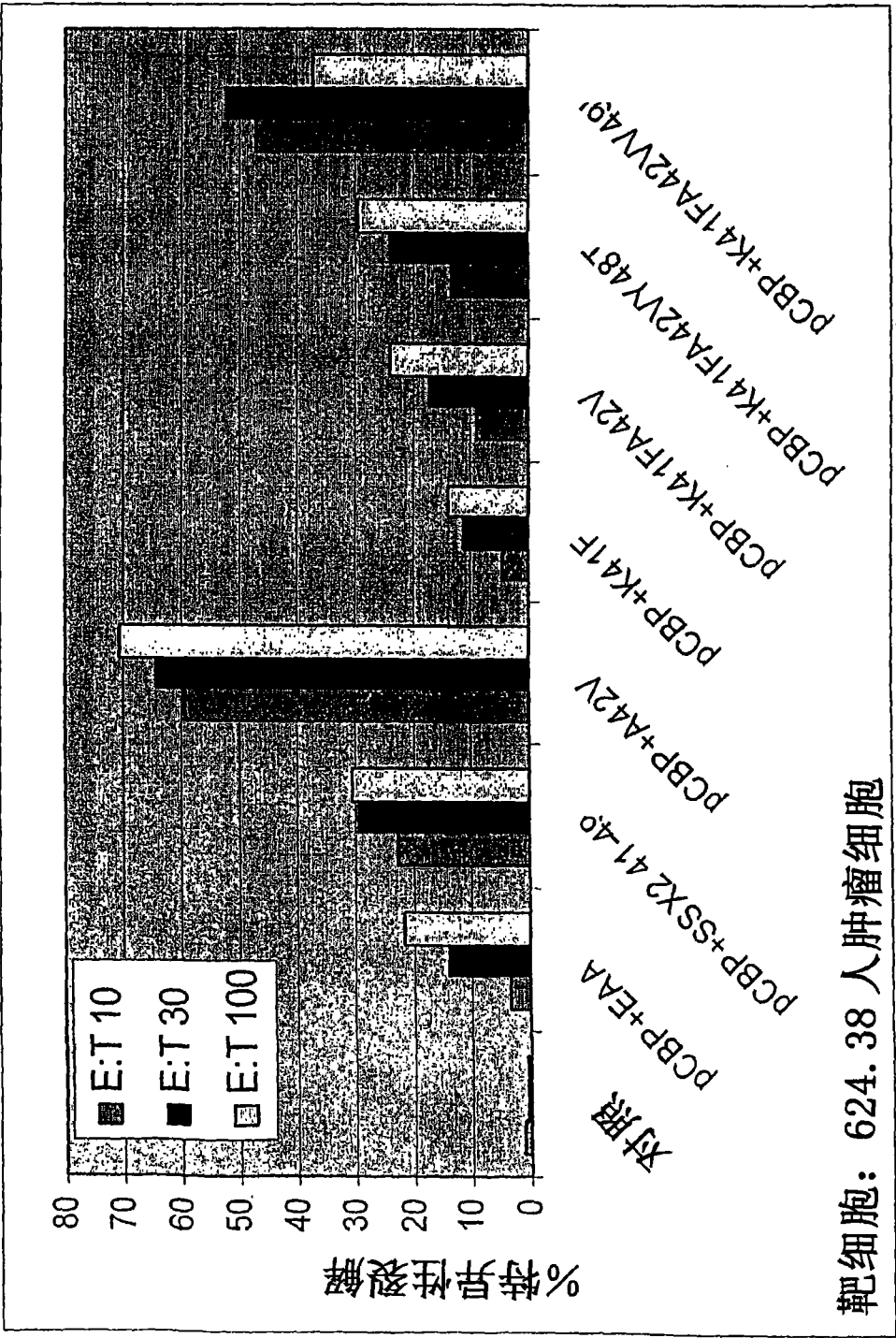


图 12

* 对于值 > 10×bck 的类似物的最小浓度 (μM) ** 细胞因子的最大浓度 (ng/ml): bkg=0.046±0.011 ng/ml 与 L' s C165V 相当或比其更有效 比天然的更有效, 不如 L' s 有效							
没有显著性							
种类	肽名	序列	注释	半最大结合 (μM)	相对亲和力 (1/RA)	* 交叉反应性和 fet 亲和力 (类似物固有, 最小浓度)	** 交叉反应性和 fet 亲和力 (类似物固有, 最大 IPNY)
天然的 N端一级锚点	NY-ESO-1 157-165	SLLMWITQC	天然肽	27.89	1.0	0.3	1.83
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y)	YLLMWITQC	锚点研究	26.32	1.1	>10	0.44
	NY-ESO-1 157-165 (S157F)	FLLMWITQC	锚点研究			10	1.9
N端一级 / 二级锚点	NY-ESO-1 157-165 (S157K)	KLLMWITQC	锚点研究 (改善溶解性)			10	1.61
	NY-ESO-1 157-165 (S157E, L158V)	FVLMWITQC	锚点研究	12.19	2.3	>10	0.08
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158I)	FILMWITQC	锚点研究	27.07	1.0	>10	0.17
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158V)	YVLMWITQC	锚点研究	24.9	1.1	>10	0.28
N端二级和 C端一级锚点	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158I)	YILMWITQC	锚点研究				
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, C165V)	YLLMWITQV	锚点研究	1.92	14.5	0.3	0.78
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, C165L)	YLLMWITQL	锚点研究	6.05	4.6	>10	0.45
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, C165A)	YLLMWITQA	锚点研究	2.26	12.3	>10	0.28
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, C165I)	YLLMWITQI	锚点研究	2.33	12.0	>10	0.35
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, C165V)	FLLMWITQV	锚点研究	2.95	9.5	0.001	1.67
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, C165L)	FLLMWITQL	锚点研究	1.96	14.2	0.03	0.74
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, C165A)	FLLMWITQA	锚点研究	1.84	15.2	1	1
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, C165I)	FLLMWITQI	锚点研究	2.09	13.3	0.03	0.91
	NY-ESO-1 157-165 (S157K, C165V)	KLLMWITQV	锚点研究 (改善溶解性)			0.001	1.66
	NY-ESO-1 157-165 (S157K, C165L)	KLLMWITQL	锚点研究 (改善溶解性)			0.03	2.77
	NY-ESO-1 157-165 (S157K, C165A)	KLLMWITQA	锚点研究 (改善溶解性)			1	0.68
NY-ESO-1 157-165 (S157K, C165I)	NY-ESO-1 157-165 (S157K, C165I)	KLLMWITQI	锚点研究 (改善溶解性)			0.01	1.65
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, C165(Abu))	YLLMWITQ(Abu)	锚点研究			0.001	1.9
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, C165(Nva))	YLLMWITQ(Nva)	锚点研究			0.001	1.5
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, C165(Nle))	YLLMWITQ(Nle)	锚点研究			0.001	1.5

图 13A

种类	肽名	序列	注释	半最大结合 (nM)	相对亲和力 (1/RA)	*交叉反应性和 f _{ct} 亲和力 (类似物固有, 最小浓度)	**交叉反应性和 f _{ct} 亲和力 (类似物固有, 最大 IFN γ)
N端 - 羧基端 和 C端 - 羧基端	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158V, C165V)	YVLMWITQV	端点研究	2.33	12.0	1	0.72
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158V, C165L)	YVLMWITQL	端点研究	3.12	8.9	>10	0.08
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158V, C165A)	YVLMWITQA	端点研究	5.44	5.1	>10	0.07
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158V, C165I)	YVLMWITQI	端点研究	5.02	5.6	3	0.59
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158V, C165V)	YVLMWITQV	端点研究	1.13	24.7	0.1	1.51
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158I, C165L)	YVLMWITQL	端点研究	4.25	6.6	3	1.62
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158I, C165V)	YVLMWITQV	端点研究	1.11	25.1	>10	0.12
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158I, C165A)	YVLMWITQA	端点研究	2.31	12.1	3	0.81
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, L158I, C165I)	YVLMWITQI	端点研究	1.63	17.1	0.3	1.21
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158V, C165V)	FVLMWITQV	端点研究	1.15	24.3	0.3	0.6
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158V, C165L)	FVLMWITQL	端点研究	4.26	6.5	>10	0.13
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158V, C165A)	FVLMWITQA	端点研究	4.21	6.6	3	0.55
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158V, C165I)	FVLMWITQI	端点研究	12.28	2.3	0.3	0.81
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158I, C165V)	FVLMWITQV	端点研究	6.17	4.5	>10	0.37
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158I, C165L)	FVLMWITQL	端点研究	2.98	9.4	1	0.8
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158I, C165A)	FVLMWITQA	端点研究	3.55	7.9	>10	0.38
	NY-ESO-1 157-165 (S157F, L158I, C165I)	FVLMWITQI	端点研究	5.62	5.0	>10	0.14
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, M160A, C165V)	YLLVWITQV	TCR 研究	6.9	4.0	>10	0.32
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, M160V, C165V)	YLLVWITQV	TCR 研究	3.83	7.3	>10	0.13
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, M160L, C165V)	YLLVWITQV	TCR 研究	0.83	33.6	0.1	0.69
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, M160N, C165V)	YLLVWITQV	TCR 研究	6.07	4.6	10	0.54
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, I162A, C165V)	YLLVWITQV	TCR 研究	0.81	34.4	3	1.1
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, I162L, C165V)	YLLVWITQV	TCR 研究	6.12	4.6	>10	0.58
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, I162V, C165V)	YLLVWITQV	TCR 研究	4.53	6.2	3	0.08
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, I162N, C165V)	YLLVWITQV	TCR 研究	5.45	5.1	10	0.81
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, Q164A, C165V)	YLLVWITAV	TCR 研究			>10	0.54
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, Q164E, C165V)	YLLVWITEV	TCR 研究			10	0.31
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, Q164D, C165V)	YLLVWITDV	TCR 研究			10	1.57
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, Q164N, C165V)	YLLVWITNV	TCR 研究			>10	0.49
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, Q164T, C165V)	YLLVWITTV	TCR 研究			3	0.36
	NY-ESO-1 157-165 (S157Y, Q164S, C165V)	YLLVWITSV	TCR 研究			>10	0.49
N端二端和 TCR 位点							0.37

图 13B

种类	肽名	序列	注释	半最大结合 (nM)	相对亲和力 (1/R _A)	*交叉反应性和 亲和力 (类似物固有, (类似物固有, 最小浓度) 最大 IPN Y)	**交叉 反应性和 亲和力 (类似物固有, (类似物固有, 最小浓度) 最大 IPN Y)
C 端酰胺	NY-ESO-1 157-165-NH2 (S157Y, C165V)	YLLMWITQV-NH2	熔点研究			1	0.6
	NY-ESO-1 157-165-NH2 (S157Y, C165L)	YLLMWITQL-NH2	熔点研究			3	0.68
	NY-ESO-1 157-165-NH2 (S157Y, C165A)	YLLMWITQA-NH2	熔点研究			>10	0.04
	NY-ESO-1 157-165 (C165V)	SLLMWITQV	熔点研究	6.13	4.5	0.001	2.46
	NY-ESO-1 157-165 (C165L)	SLLMWITQL	熔点研究			0.001	2.44
	NY-ESO-1 157-165 (C165A)	SLLMWITQA	熔点研究	4.29	6.5	0.01	2.2
十聚体	NY-ESO-1 157-165 (C165I)	SLLMWITQI	熔点研究	9.99	2.8	0.001	3.44
	NY-ESO-1 157-166	SLLMWITQCF	基于 Ddlasmond 的建议			>10	0.19
	NY-ESO-1 157-166 (F166L)	SLLMWITQCL	基于 Ddlasmond 的建议			10	0.78
	NY-ESO-1 157-166 (S157Y, C165V, F166L)	YLLMWITQVL	基于 Ddlasmond 的建议			1	0.95
	NY-ESO-1 157-166 (S157Y, C165V, F166I)	YLLMWITQVI	基于 Ddlasmond 的建议			1	0.65
	NY-ESO-1 157-166 (S157Y, C165V, F166V)	YLLMWITQVV	基于 Ddlasmond 的建议			>10	0.22
	NY-ESO-1 157-166 (S157Y, C165V, F166(Nle))	YLLMWITQV(Nle)	基于 Ddlasmond 的建议			10	1.68
	NY-ESO-1 157-166 (S157Y, C165V, F166(Nva))	YLLMWITQV(Nva)	基于 Ddlasmond 的建议			>10	0.16
		SVLMWITQL	添加的肽			0.03	2.93
		SVLMWITQI	添加的肽			0.03	2.68
		SVLMWITQV	添加的肽			0.001	3.84
		SILMWITQL	添加的肽			0.001	3.25
		YNleLMWITQV	添加的肽			0.003	2.61
		WVLMWITQV	添加的肽			1	2.35
		SVLMWITQA	添加的肽			0.3	1.87
		SVLMWITQC	添加的肽			1	1.47
		TVLMWITQV	添加的肽			0.01	3.64
		YNvalMWITQV	添加的肽			0.001	2.91
		SILMWITQC	添加的肽			0.1	2.59
		SILMWITQA	添加的肽			0.03	2.91
		SILMWITQV	添加的肽			0.001	3.57

图 13C

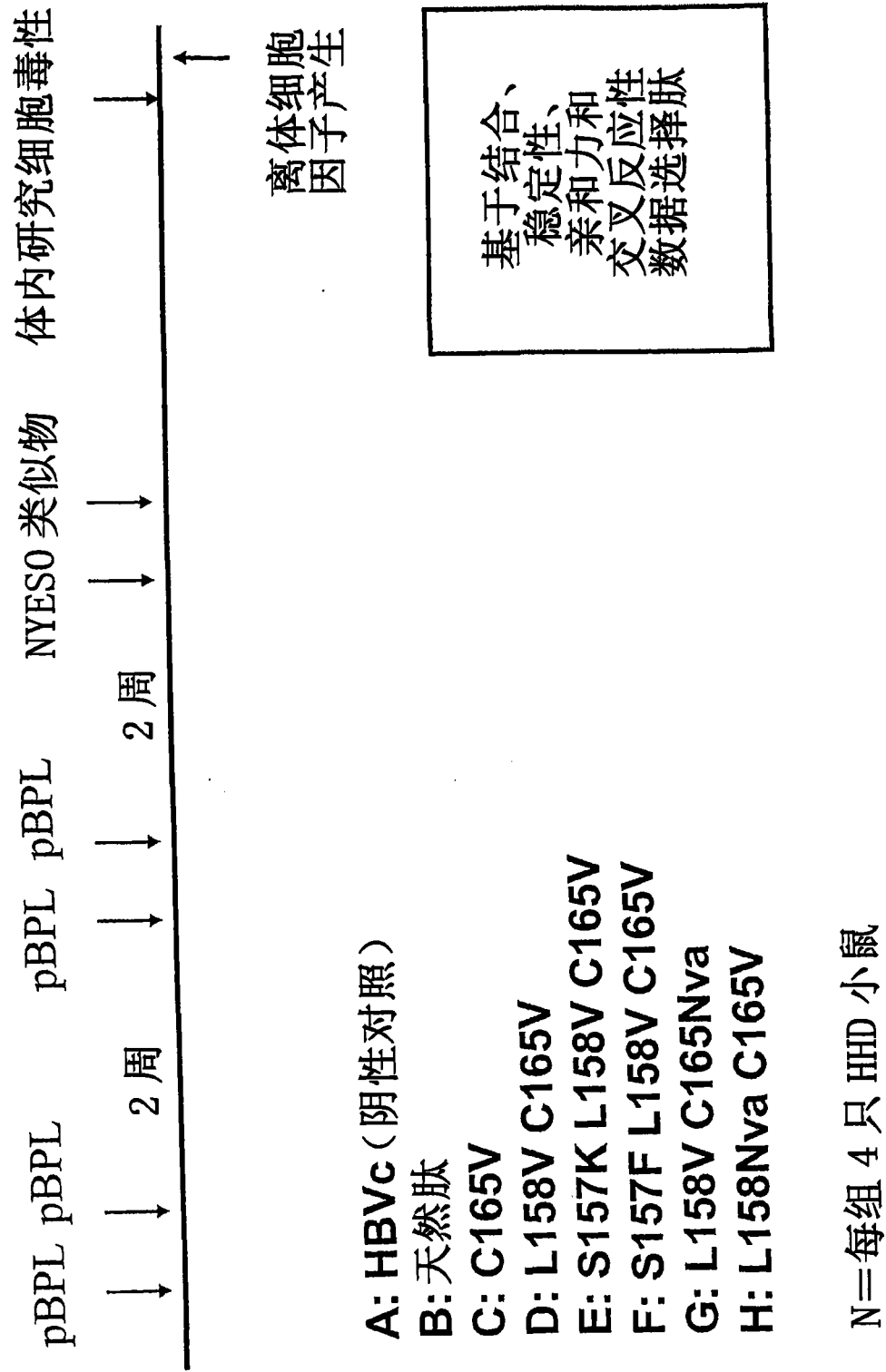


图 14

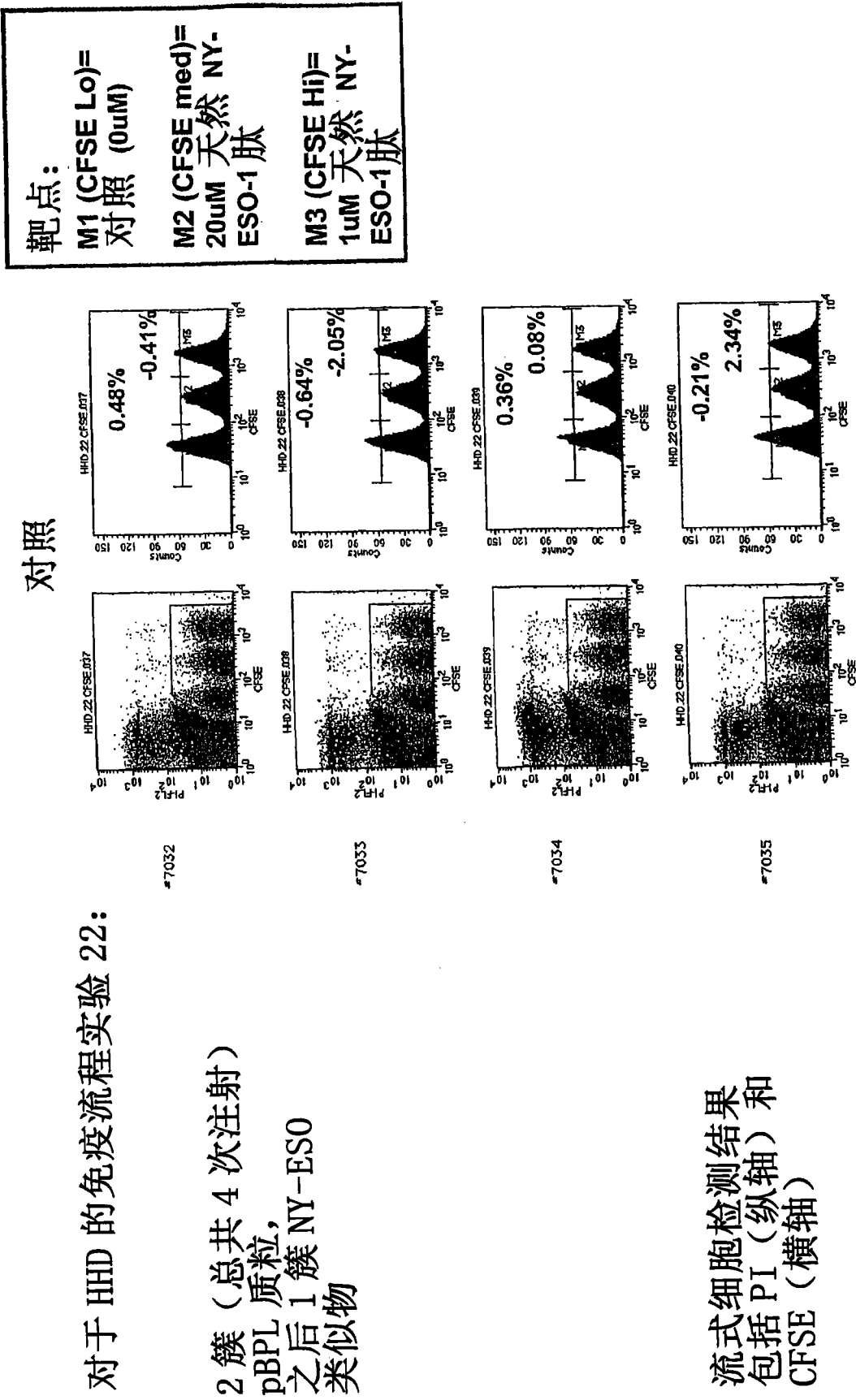


图 15A

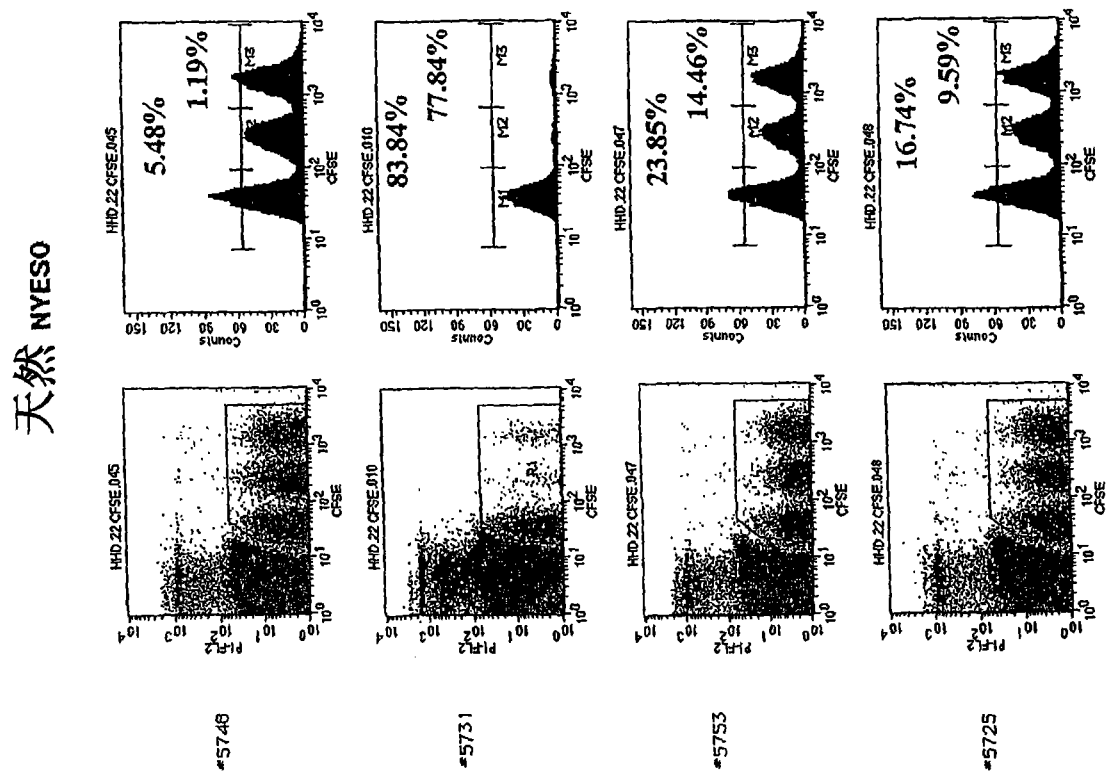


图 15B

图 15C : (L158Nva, C165V)

L158Nva C165V NYES0

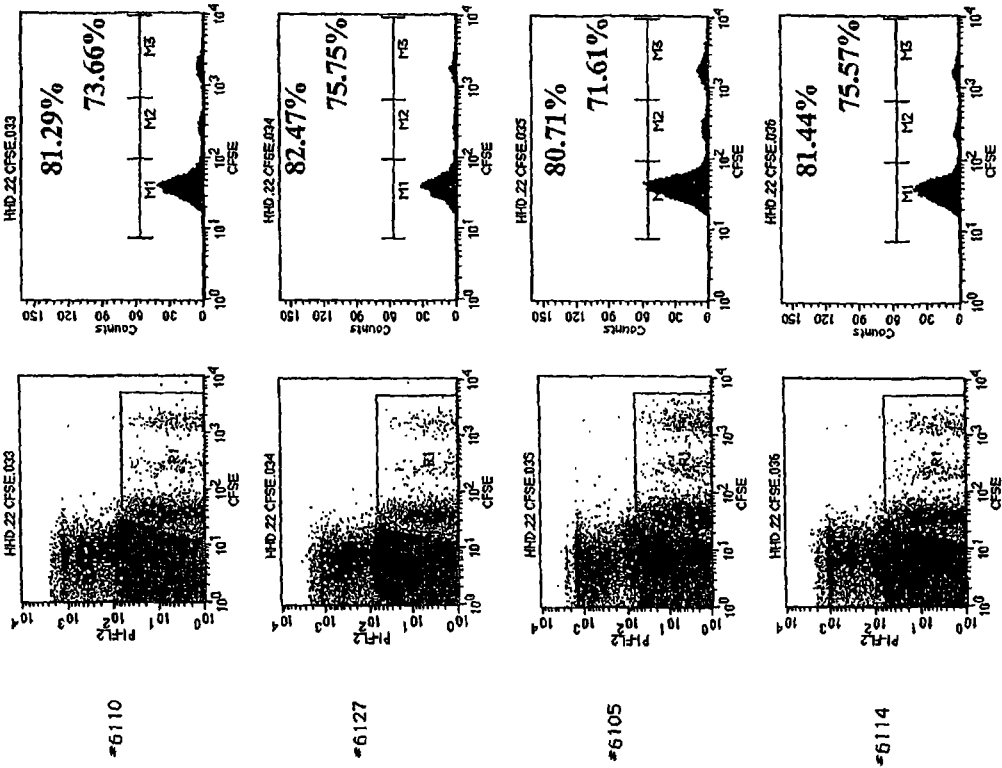
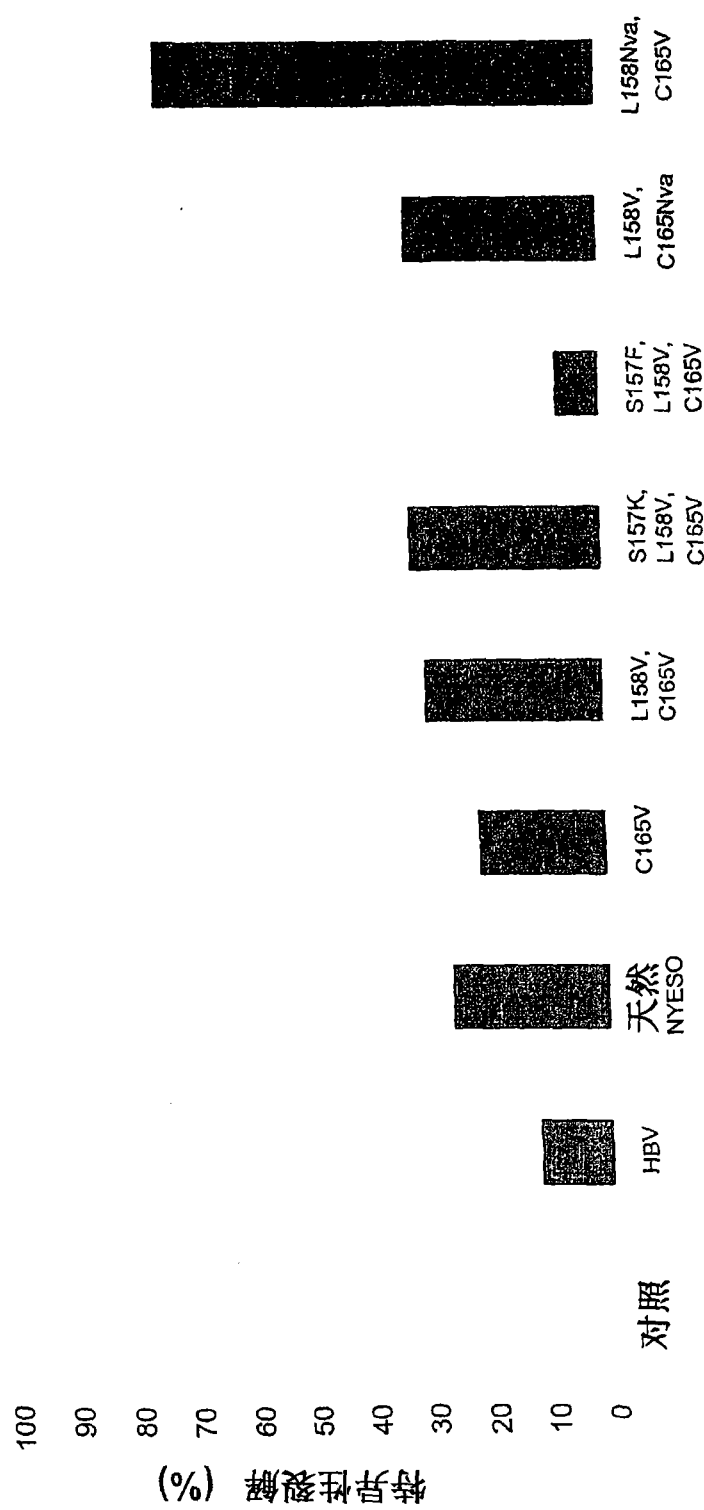


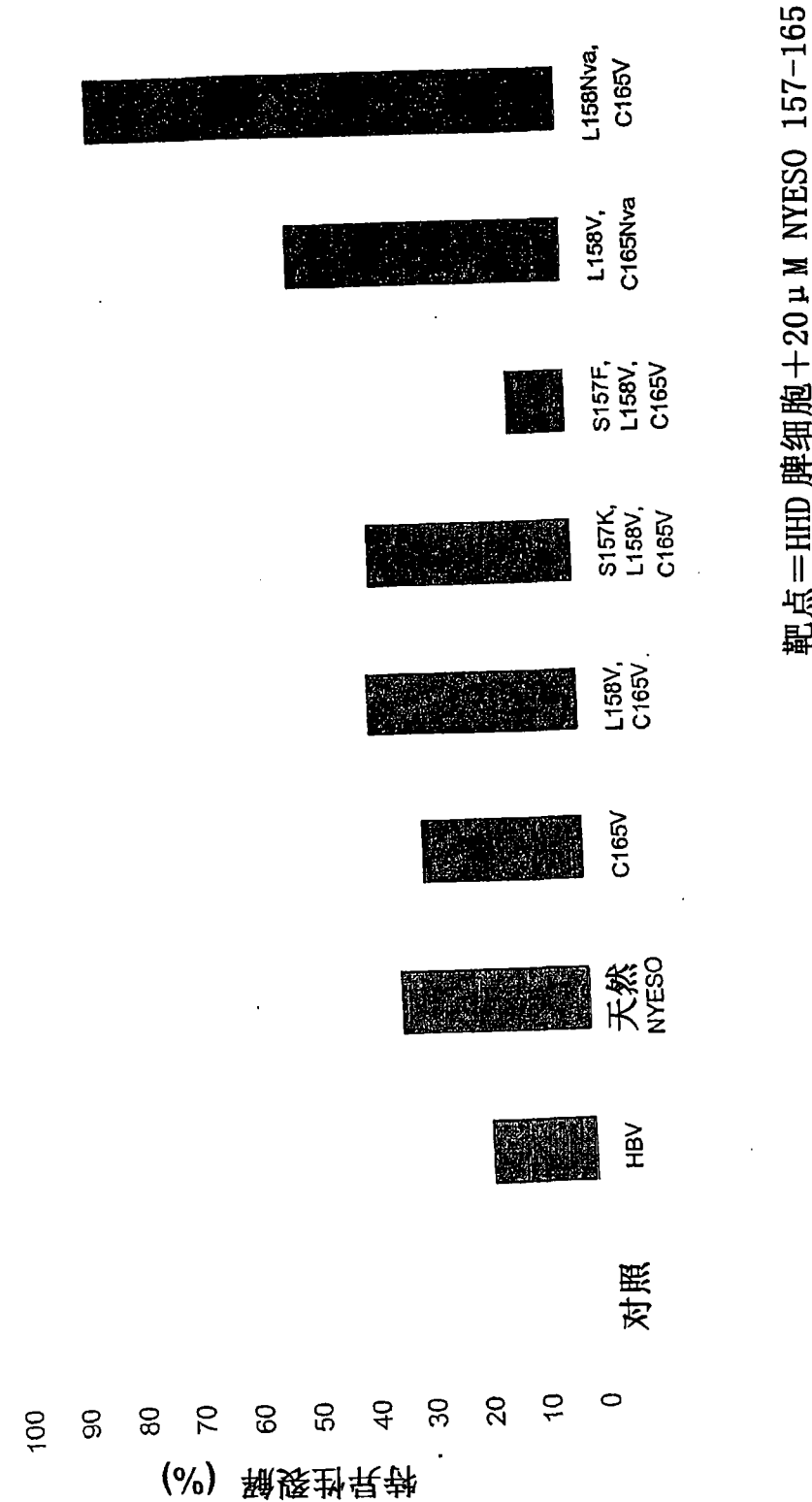
图 16A: NY-ESO-1 激活 - 加强候选物的 CFSE 体内细胞毒性检测



靶点=HHD 脾细胞 + 1 μ M NYESO 157-165

N = 4

图 16B: NY-ESO-1 激活 - 加强候选物的 CFSE 体内细胞毒性检测



N = 4

靶点=HHD 脾细胞+20 μ M NYESO 157-165

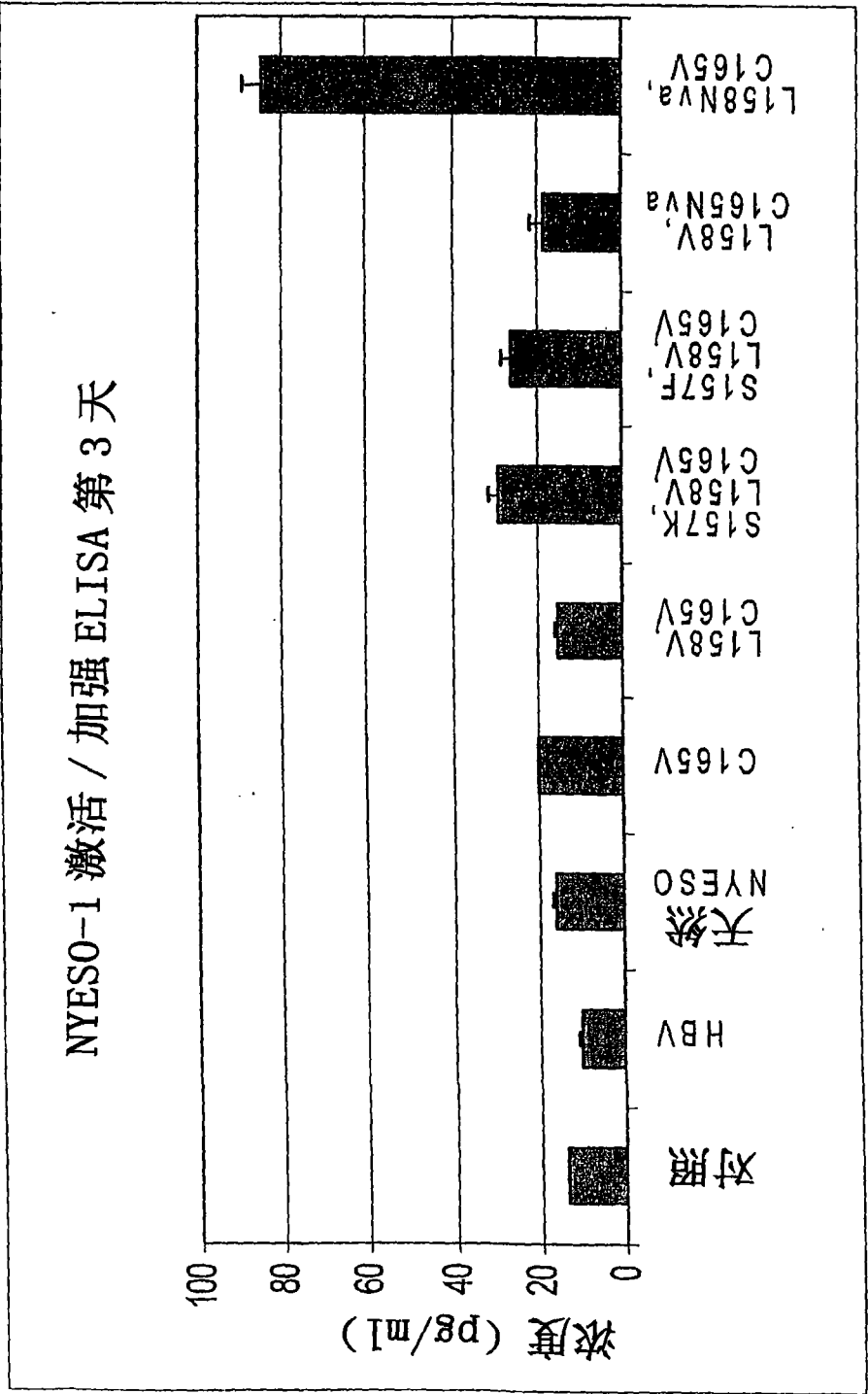


图 17A

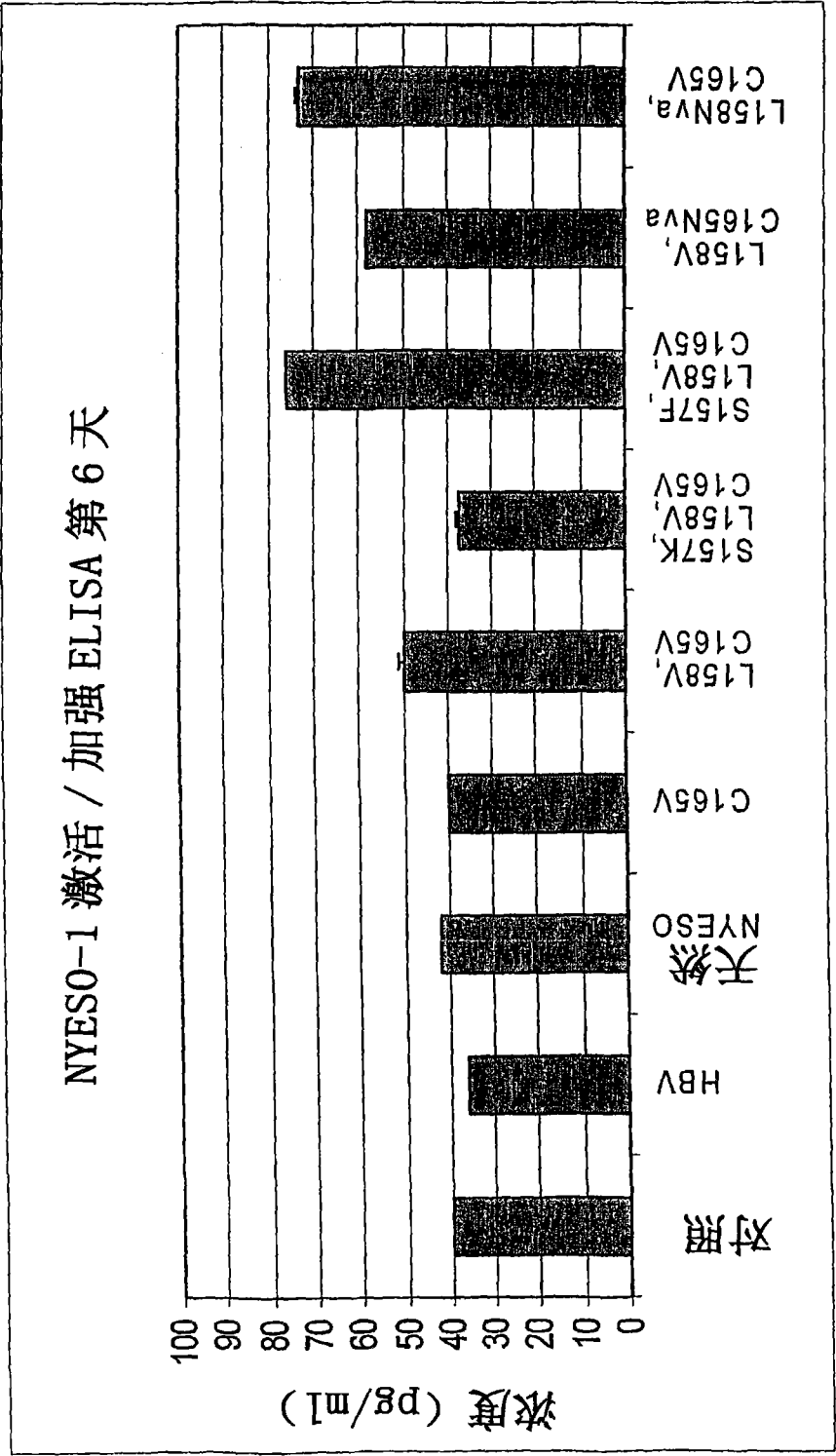


图 17B

图 18: PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 表位检验——通过特异性 T 细胞系裂解人肿瘤细胞

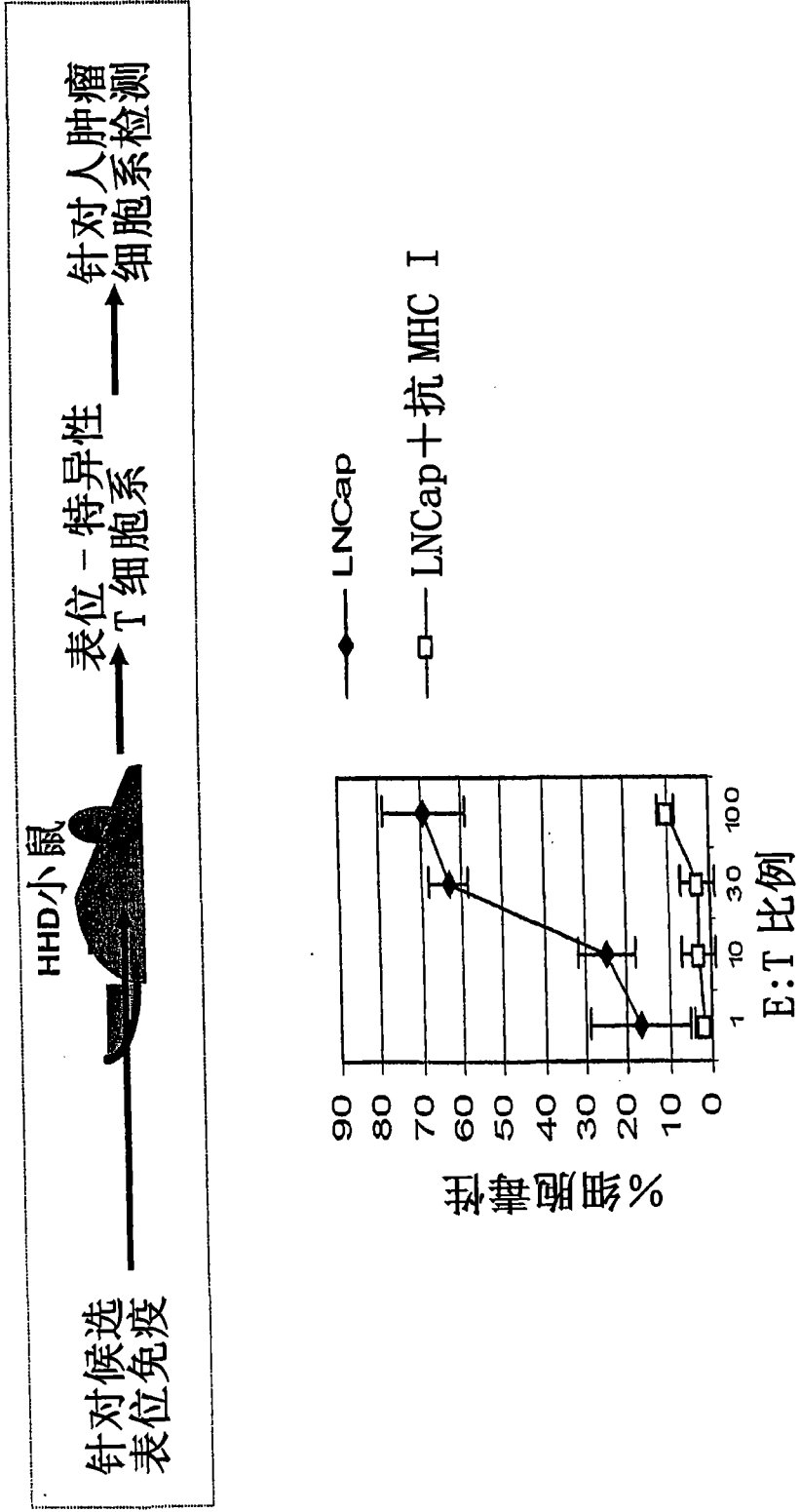


图 19: PSMA₂₈₈₋₂₉₇的单一取代类似物

种类	SEQ ID No.	肽名	序列	%结合	ED ₅₀ (nM)	稳定性 (t _{1/2}) (小时)	IScore	反应性 (IPN-Y)
天然的	1	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇	GLPSIPVHPF	86.3	1.330E-06	5.941	0.683	27.29
	2	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (L289A)	GMPSIPVHPF	93.2	1.072E-06	3.340	0.605	-4.89
N端一级锚点	3	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (L289I)	GLEPSIPVHPF	76.3	1.314E-06	0.346	0.198	4.39
	4	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (L289Q)	GQPSIPVHPF	84.9	6.687E-07	1.445	0.402	-1.65
	5	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (L289V)	GVPSIPVHPF	69.9	2.414E-06	0.212	0.105	18.86
	6	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (L289Nva)	GNvaPSIPVHPF	100.0	5.946E-07	4.342	0.81	5.36
	7	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (L289Nle)	GNlePSIPVHPF	65.3	1.234E-06	0.891	0.189	13.85
	8	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (L289Abu)	GAbuPSIPVHPF	74.4	9.806E-07	9.331	0.858	8.60
	9	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (G288A)	ALPSIPVHPF	87.7	6.851E-07	4.337	0	12.65
	10	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (G288S)	SLPSIPVHPF	80.4	4.083E-07	7.815	1.037	6.41
C端一级锚点	11	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (G288Ser)	(Ser)GLPSIPVHPF	101.4	4.083E-07	7.815	1.173	15.28
	12	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (G288Abu)	(Abu)GLPSIPVHPF	98.6	8.344E-07	13.123	1.312	59.90
	13	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (D297V)	GLPSIPVHPV	83.6	1.166E-06	3.256	0.54	11.67
	14	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (D297L)	GLPSIPVHPL	92.4	1.227E-06	10.062	1.02	40.19
	15	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (D297Nva)	(GLPSIPVHP(Nva)	97.3	8.525E-07	4.860	0.787	11.32
	16	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (D297Nle)	GLPSIPVHP(Nle)	90.4	8.160E-07	8.506	0.989	6.41
	17	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (F296A)	GLPSIPVHAL	86.3	5.859E-07	1.894	0.477	11.58
	18	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (F296L)	GLPSIPVHLI	83.6	4.468E-07	4.053	0.712	1.12
TCR研究 / 二级锚点	19	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (F296S)	GLPSIPVHSI	82.2	4.829E-07	2.361	0.632	3.19
	20	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (F296T)	GLPSIPVHTI	102.7	7.770E-07	10.768	1.243	15.19
	21	PSMA ₂₈₈₋₂₉₇ (F290W)	GLWSIPVHPF					

表位类似物 (EPI TOPE ANALOGS)
Liu 等
Appl. No.: 未知 代理卷号: MANNK. 052PA

图 20: PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 的双取代类似物

种类	SEQ ID No.	肽名	序列	%结合	ED ₅₀ (nM)	稳定性 (1/2) (小时)	IScore	反应性 (FN-Y)
天然的 N端一级锚点和 C端一级锚点	1	PSMA 288-297	GLPSIPVEPI	88.3	1.330E-06	5.341	0.693	27.29
	22	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	G(Nva)PSIPVEPI(Nle)	82.2	3.438E-07	1.044	0.374	5.57
	23	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	G(Nle)PSIPVEPI(Nva)	86.3	5.445E-07	4.308	0.728	13.86
	24	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	G(Nva)PSIPVEPI(Nle)	97.3	1.187E-05	6.958	0.649	10.81
	25	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	G(Nle)PSIPVEPI(Nva)	100.0	5.243E-07	4.548	0.647	6.52
	26	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	G(Nva)PSIPVEPI(Nle)	94.6	2.195E-06	13.685	1.094	68.32
	27	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	G(Nle)PSIPVEPI(Nva)	92.4	2.271E-08	13.332	1.053	57.46
	28	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	G(Nva)PSIPVEPI(Nle)	78.3	3.323E-06	1.624	0.301	8.43
	29	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	G(Nle)PSIPVEPI(Nva)	94.3	1.146E-06	2.478	0.634	0.00
	30	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	G(Nva)PSIPVEPI(Nle)	98.6	8.239E-07	14.942	1.739	0.00
N端一级锚点和 C端一级锚点	31	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	GLPSIPVEPI	81.6	2.682E-07	2.685	0.502	0.00
	32	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	ALPSIPVEPI	86.0	5.967E-08	14.157	0.882	72.33
	33	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	ALPSIPVEPI(Nva)	81.6	1.006E-06	10.320	0.924	48.11
	34	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	(Abn)LPSPVHPV	85.1	7.888E-07	13.618	1.185	66.58
	35	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	(Abn)LPSPVHPV(Nva)	92.0	9.468E-07	10.894	1.141	56.01
C端一级锚点和 TCR研究	36	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	GLWSIPVEPI	89	1.244E-06	12.082	1.082	10.83
	37	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	GLWSIPVEPI(Nva)	102.2	8.329E-07	13.693	1.379	26.58
	38	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	G(Nva)WSIPVEPI	101.1	1.411E-05	13.688	1.247	41.79
	39	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	G(Nle)WSIPVEPI	83.7	2.184E-06	2.316	0.408	8.45
	40	PSMA 288-297 (L289(Nva), L297(Nle))	G(Nva)WSIPVEPI	105.4	1.242E-08	10.527	1.155	21.2
	41	PSMA 288-297 (L289(Nle), L297(Nva))	GLWSIPVEPI	89.7	1.639E-07	9.687	1.202	0.00

表位类似物 (EPI TOPE ANALOGS)
Liu 等
Appl. No.: 未知 代理卷号: MANNK. 052PA

图 21: PSMA₂₈₈₋₂₉₇的三元取代类似物

种类	SEQ ID No.	肽名	序列	% 结合	ED ₅₀ (nM)	稳定性 (t _{1/2}) (小时)	IScore	反应性 (IPN-V)
天然的	1	PSMA 288-297	GLPSIPVHPV	86.3	1.330E-06	5.341	0.683	27.29
N 端一级 / 二级锚点和 TCR 研究	42	PSMA 288-297 (G288A, L289(Nva), P290W)	A(Nva)WSIPVHPV	96.6	1.307E-06	13.559	1.562	26.59
	43	PSMA 288-297 (G288A, L289V, P290W)	AVWSIPVHPV	85.1	8.419E-07	4.626	0.662	6.26
	44	PSMA 288-297 (G288A, L289(Nle), P290W)	A(Nle)WSIPVHPV	106.7	2.464E-06	13.775	1.2	71.97
	45	PSMA 288-297 (G288A, L289I, P290W)	AIWSIPVHPV	90.8	1.340E-07	5.124	0.841	0.00
N 端一级 / 二级锚点和 C 端一级锚点	46	PSMA 288-297 (G288A, L289(Nva), I297V)	A(Nva)PSIPVHPV	85.9	1.254E-05	13.517	1.108	119.1
	47	PSMA 288-297 (G288A, L289V, I297V)	AVPSIPVHPV	78.3	1.082E-06	2.765	0.477	16.06
	48	PSMA 288-297 (G288A, L289V, I297(Nva))	AVPSIPVHP(Nva)	98.9	2.854E-07	16.057	1.66	
	49	PSMA 288-297 (L289(Nva), P290W, I297V)	Q(Nva)WSIPVHPV	102.2	1.372E-06	17.765	1.493	60.91
N 端和 C 端一级锚点和 TCR	50	PSMA 288-297 (L289V, P290W, I297V)	GYWSIPVHPV	78	1.917E-06	9.552	0.803	0.00
	51	PSMA 288-297 (L289(Nva), P290W, I297(Nva))	G(Nva)WSIPVHP(Nva)	78.2	3.655E-07	0.707	0.239	0.00
	52	PSMA 288-297 (L289V, P290W, I297(Nva))	GYWSIPVHP(Nva)	92.4	2.747E-06	3.706	0.637	8.1
N 端二级, C 端一级锚点和 TCR	53	PSMA 288-297 (G288A, P290W, I297V)	ALWSIPVHPV	102.3	4.937E-07	13.530	1.672	6.16
	54	PSMA 288-297 (G288A, P290W, I297(Nva))	ALWSIPVHP(Nva)	106.5	4.332E-06	13.715	1.069	6.6

表位类似物 (EPTIPE ANALOGS)
Liu 等
Appl. No.: 未知 代理序号: MANNK. 052PA

图 22: 通过 Elispot 测定的各种 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 类似物的免疫原性

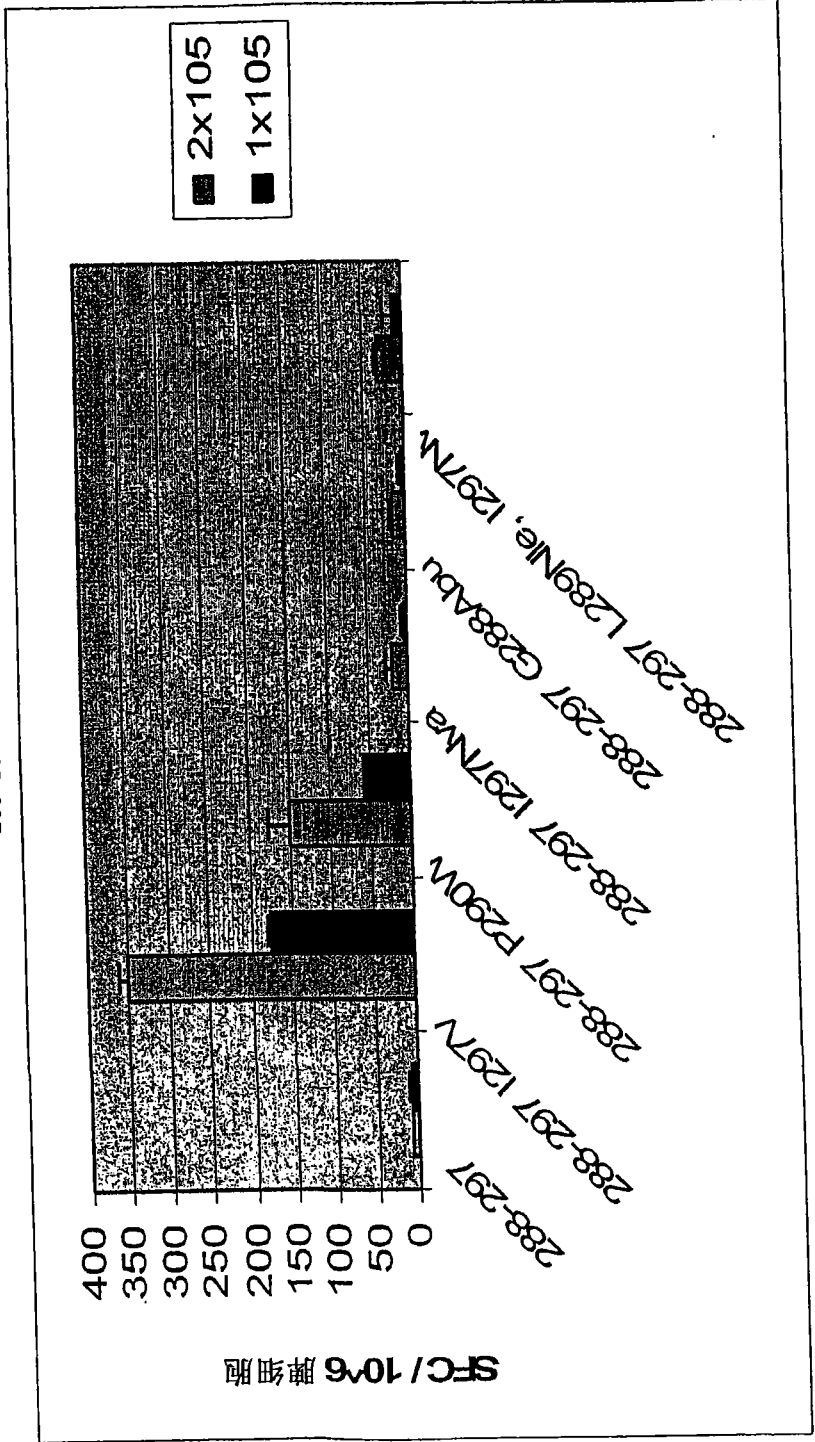


图 23: 通过 Elispot 测定的 I297V 类似物对抗 PSMA₂₈₈₋₂₉₇ 应答的增强。

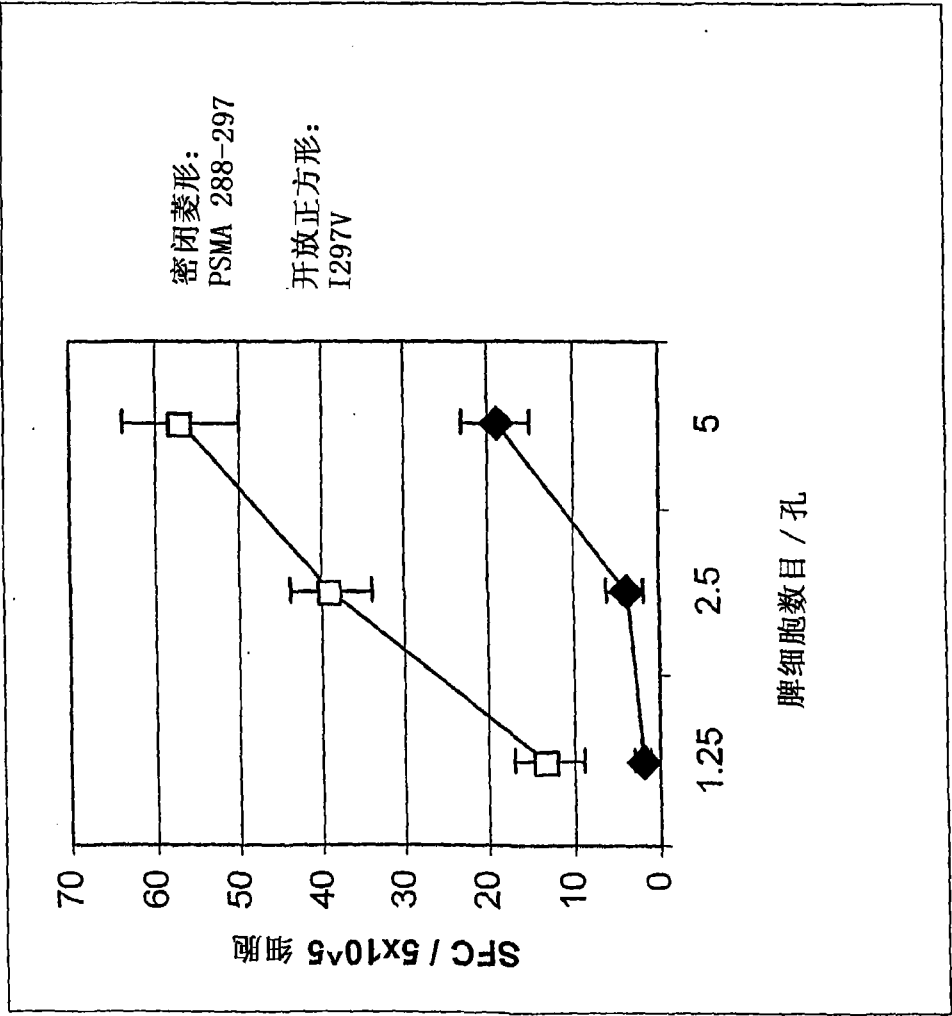


图 24: 用 I297V 表位类似物加强导致针对 PSMA⁺ 人肿瘤细胞系的细胞毒性 免疫性

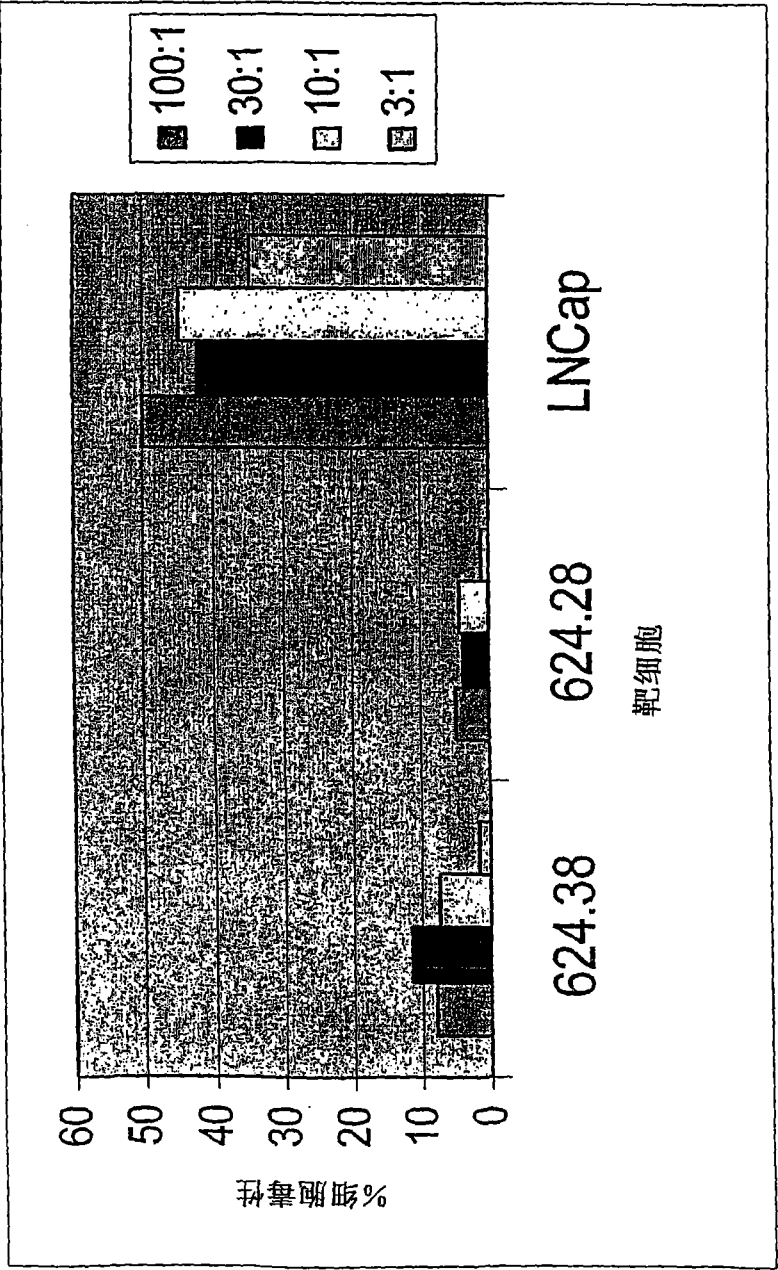


图 25: PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 表位检验——用特异的 T 细胞系裂解人肿瘤细胞

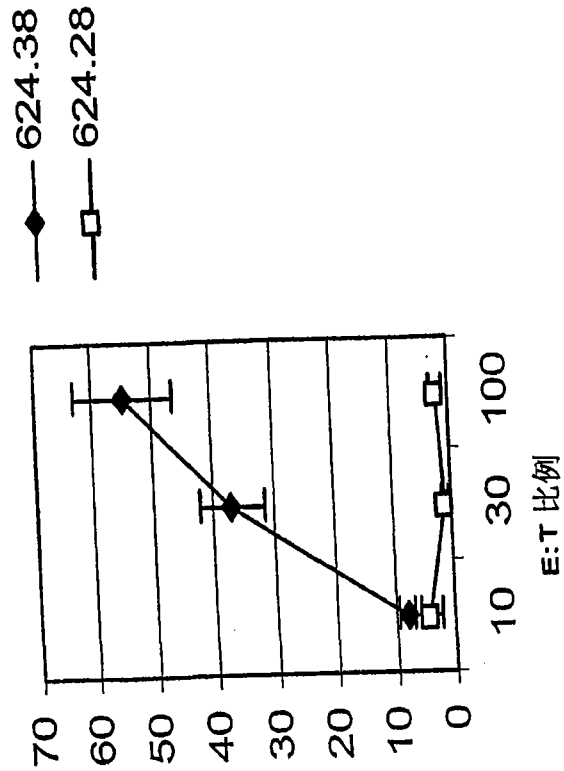
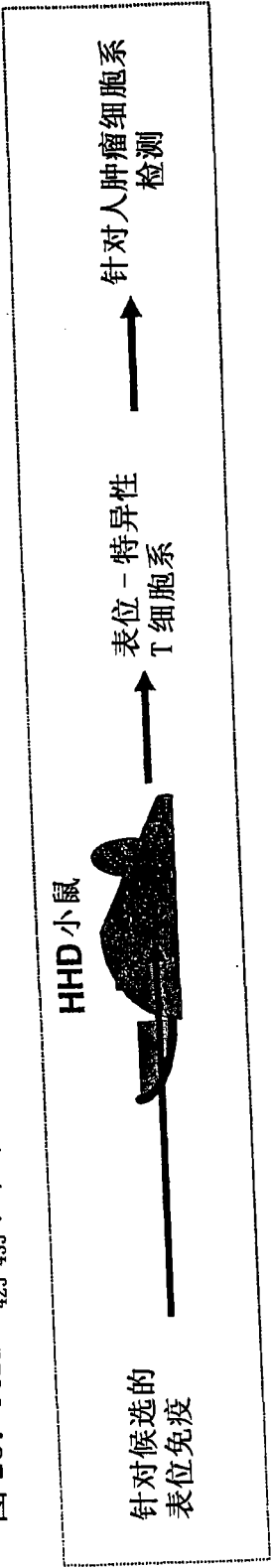


图 26: PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的单—取代类似物

种类	SEQ ID No.	肽名	序列	%结合 (A0201)	稳定性 (t1/2) (小时) (A0201)	ED50 (mM) (A0201)	iScore (A0201)	作为 标准化的 IFN- γ 生产的 交叉反应性
天然的	1	Prime 425-433	SLQHLIGL	81	12.2	7.158E-07	1.17	1.00
	2	Prime 425-433 (L426V)	SVLQHLIGL	66	7.1	6.178E-06	0.49	0.4
	3	Prime 425-433 (L426M)	SMLQHLIGL	100	10.3	9.884E-07	1.14	0.6
	4	Prime 425-433 (L426I)	SILQHLIGL	76	9.4	1.828E-06	0.80	•
N 端一级锚点	5	Prime 425-433 (L426(Nle))	S(Nle)QHLIGL	93	12.6	2.423E-06	1.01	0.56
	6	Prime 425-433 (L426(Nva))	S(Nva)QHLIGL	92	11.4	1.911E-06	1.00	0.8
	7	Prime 425-433 (L426(Abu))	S(Abu)QHLIGL	73	8.1	4.849E-06	0.58	•
	8	Prime 425-433 (S425K)	KLLQHLIGL	82	10.8	4.412E-06	0.77	0.4
	9	Prime 425-433 (S425F)	FLQHLIGL	110	17.7	4.335E-07	1.88	0.52
	10	Prime 425-433 (S425Y)	YLLQHLIGL	99	11.8	5.496E-07	1.54	0.8
	11	Prime 425-433 (S425T)	TLLQHLIGL	88	9.3	1.452E-06	0.92	0.81
	12	Prime 425-433 (S425(Orn) (Orn 是 L-鸟氨酸))	(Orn)LLQHLIGL	89	10.0	2.252E-06	0.89	0.55
N 端二级锚点	13	Prime 425-433 (S425(Hse) (Hse 是 L-高丝氨酸))	(Hse)LLQHLIGL	90	10.8	1.360E-06	1.01	0.85
	14	Prime 425-433 (L433V)	SLQHLIGV	80	12.6	7.310E-06	0.74	•
	15	Prime 425-433 (L433I)	SILQHLIGI	75	11.9	3.349E-06	0.79	•
	16	Prime 425-433 (L433A)	SLLQHLIGA	80	13.6	8.430E-06	0.85	•
	17	Prime 425-433 (L433(Nle))	SLQHLIG(Nle)	98	14.8	7.768E-07	1.40	0.72
	18	Prime 425-433 (L433(Nva))	SLQHLIG(Nva)	92	17.2	1.663E-06	1.26	0.52
	19	Prime 425-433 (L433(Abu))	SLQHLIG(Abu)	81	12.3	3.411E-06	0.85	•
	20	Prime 425-433-NH ₂	SLQHLIGL-NH ₂	89	3.0	1.384E-06	0.53	0.6
C 端酰胺	21	Prime 425-433 (G432A)	SLQHLIAL	88	12.4	1.728E-06	1.02	•
	22	Prime 425-433 (G432S)	SLQHLISL	71	10.7	4.357E-06	0.69	•
	23	Prime 425-433 (G432(Sar) Sar 是肌氨酸)	SLQHLI(Sar)L	74	9.2	2.368E-06	0.73	•
	24	Prime 425-433 (L427(Nle))	SL(Nle)QHLIGL	81	12.3	2.493E-06	0.90	•
TCR 研究	25	Prime 425-433 (L427(Nva))	SL(Nva)QHLIGL	78	11.7	3.153E-06	0.81	0.24
	26	Prime 425-433 (L427(Abu))	SL(Abu)QHLIGL	74	10.1	9.258E-06	0.80	•
	27	Prime 425-433 (L430(Nle))	SLQHLI(Nle)IGL	81	11.2	4.740E-06	0.77	•
	28	Prime 425-433 (L430(Nva))	SLQHLI(Nva)IGL	74	11.4	7.265E-06	0.66	0.61
	29	Prime 425-433 (L430(Abu))	SLQHLI(Abu)IGL	78	10.6	5.140E-06	0.70	0.44

图 27A: PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的双取代类似物

种类	SEQ ID No.	肽名	序列	% 结合 (A0201)	稳定性 (t1/2) (hr) (A0201)	ED50 (mM) (A0201)	iScore (A0201)	作为标准化的 IFN- γ 生产的交叉反应性
天然的	1	Prame 425-433	SLQLHLIGL	81	12.2	7.158E-07	1.17	1.00
	30	Prame 425-433 (S425F, L426(Nva))	F(Nva)QLHLIGL	106	11.7	4.518E-07	1.46	*
	31	Prame 425-433 (S425Y, L426(Nva))	Y(Nva)QLHLIGL	96	9.4	1.660E-06	0.97	*
	32	Prame 425-433 (S425T, L426(Nva))	T(Nva)QLHLIGL	87	10.7	2.386E-06	0.92	*
	33	Prame 425-433 (S425(Hse), L426(Nva))	(Hse)(Nva)QLHLIGL	90	18.6	1.449E-06	1.12	*
	34	Prame 425-433 (S425(Orn), L426(Nva))	(Orn)(Nva)QLHLIGL	88	12.3	5.019E-06	0.85	*
	35	Prame 425-433 (S425F, L426(Nle))	F(Nle)QLHLIGL	118	11.4	5.661E-07	1.62	*
	36	Prame 425-433 (S425Y, L426(Nle))	Y(Nle)QLHLIGL	110	11.5	5.572E-07	1.44	*
	37	Prame 425-433 (S425T, L426(Nle))	T(Nle)QLHLIGL	100	12.6	2.554E-06	1.07	*
	38	Prame 425-433 (S425(Hse), L426(Nle))	(Hse)(Nle)QLHLIGL	81	10.9	2.546E-06	0.84	*
N 端一级 / 二级锚点	39	Prame 425-433 (S425(Orn), L426(Nle))	(Orn)(Nle)QLHLIGL	80	9.9	4.704E-06	0.83	*
	40	Prame 425-433 (S425F, L426(Nle))	F(Nle)QLHLIGL	100	12.8	1.160E-06	1.24	*
	41	Prame 425-433 (S425Y, L426(Nle))	Y(Nle)QLHLIGL	109	11.7	2.861E-07	1.62	*
	42	Prame 425-433 (S425T, L426(Nle))	T(Nle)QLHLIGL	83	9.2	2.011E-06	0.89	*
	43	Prame 425-433 (S425(Hse), L426(Nle))	(Hse)(Nle)QLHLIGL	93	11.7	4.674E-06	0.88	*
	44	Prame 425-433 (S425(Orn), L426(Nle))	(Orn)(Nle)QLHLIGL	86	10.5	2.951E-06	0.90	*
	45	Prame 425-433 (S425F, L426(Nle))	F(Nle)QLHLIGL	98	10.3	1.152E-07	1.63	*
	46	Prame 425-433 (S425Y, L426(Nle))	Y(Nle)QLHLIGL	87	10.1	7.155E-07	1.07	*
	47	Prame 425-433 (S425T, L426(Nle))	T(Nle)QLHLIGL	75	8.1	3.321E-06	0.65	*
	48	Prame 425-433 (S425(Hse), L426(Nle))	(Hse)(Nle)QLHLIGL	75	9.9	2.774E-06	0.72	*
	49	Prame 425-433 (S425(Orn), L426(Nle))	(Orn)(Nle)QLHLIGL	84	8.8	1.952E-06	0.81	*

图 27B: PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的双取代类似物

种类	SEQ ID No.	肽名	序列	% 结合 (A0201)	稳定性 (t1/2) (hr) (A0201)	ED50 (mM) (A0201)	IScore (A0201)	作为 标准化的 IFN- γ 生产的 交叉反应性
天然的	1	Prame 425-433	SLQHLIGL	81	12.2	7.158E-07	1.17	1.00
	50	Prame 425-433 (L426(Nva), L433(Nva))	S(Nva)LQHLIG(Nva)	91	13.2	2.936E-06	0.89	*
	51	Prame 425-433 (L426(Nva), L433(Nle))	S(Nva)LQHLIG(Nle)	93	13.7	8.475E-07	1.27	0.69
	52	Prame 425-433 (L426(Nva), L433V)	S(Nva)LQHLIGV	88	16.0	2.980E-06	1.06	*
	53	Prame 425-433 (L426(Nle), L433(Nva))	S(Nle)LQHLIG(Nva)	90	12.5	1.125E-06	1.18	*
	54	Prame 425-433 (L426(Nle), L433(Nle))	S(Nle)LQHLIG(Nle)	100	12.4	8.950E-07	1.25	*
	55	Prame 425-433 (L426(Nle), L433V)	S(Nle)LQHLIGV	93	13.9	2.481E-06	1.07	*
	56	Prame 425-433 (L426M, L433(Nva))	SMLQHLIG(Nva)	99	13.4	6.878E-07	1.37	*
	57	Prame 425-433 (L426M, L433(Nle))	SMLQHLIG(Nle)	104	11.2	6.148E-07	1.84	*
	58	Prame 425-433 (L426M, L433V)	SMLQHLIGV	97	15.5	9.401E-07	1.38	*
N 端一级锚点和 C 端一级锚点	59	Prame 425-433 (S425K, L433V)	KLQHLIGV	77	14.2	8.038E-06	0.74	*
	60	Prame 425-433 (S425F, L433V)	FLQHLIGV	110	16.3	7.180E-07	1.64	*
	61	Prame 425-433 (S425Y, L433V)	YLQHLIGV	91	14.3	2.816E-06	1.19	*
	62	Prame 425-433 (S425T, L433V)	TLQHLIGV	85	17.2	3.722E-06	1.02	*
	63	Prame 425-433 (S425(Om), L433V)	(Om)LLQHLIGV	79	12.9	2.740E-06	0.89	*
	64	Prame 425-433 (S425(Hse), L433V)	(Hse)LLQHLIGV	77	10.2	6.849E-06	0.57	*
	65	Prame 425-433 (S425F, L433(Nle))	FLQHLIGNle	88	23.3	1.538E-07	2.14	1.16
	66	Prame 425-433 (S425T, L433(Nle))	TLQHLIGNle	88	13.9	1.251E-06	1.16	0.75
N 端二级锚点和 C 端一级锚点								

图 28: PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 的三元取代类似物

种类	SEQ ID No.	肽名	序列	% 结合	ED50 (M)	稳定性 (t1/2) (小时)	IScore	作为 标准化的 IFN- γ 生产的 交叉反应性
天然的	1	Prame 425-433	SLLOHLGL	81	7.158E-07	12.2	1.17	1.00
N 端一级 / 二级锚点和 C 端一级锚点	67	Prame 425-433 (S425F, L426(Nva), L433(Nle))	FNvalQHLGNle	108	1.158E-07	25.3	2.78	0.82
	68	Prame 425-433 (S425T, L426(Nva), L433(Nle))	TNvalLQHLGNle	118	2.844E-07	19.6	2.24	0.91
	69	Prame 425-433 (S425F, L426M, L433(Nle))	FMlLQHLGNle	124	1.803E-07	13.1	2.05	ND
	70	Prame 425-433 (S425T, L426M, L433(Nle))	TMLQHLGNle	97	6.802E-07	13.5	1.36	ND

图 29: 通过 Elispot 测定的 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 类似物的免疫原性

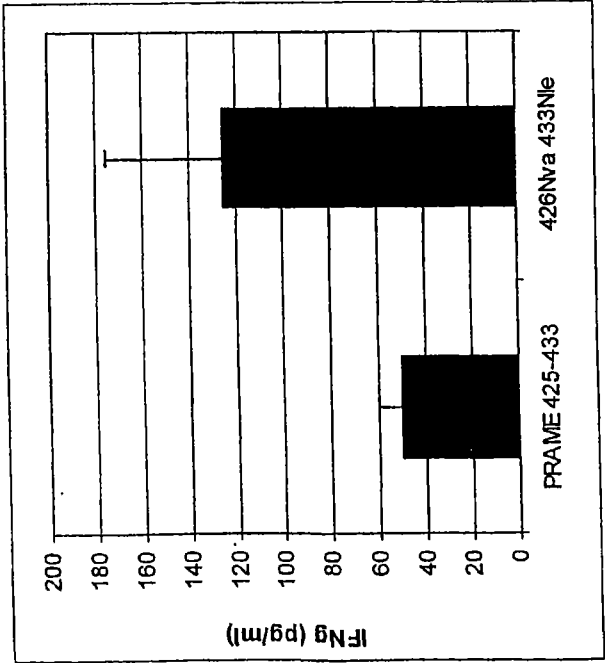


图 30: 用 L426Nva L433Nle 表位类似物加强导致针对天然表位包被的细胞的体内细胞毒性。

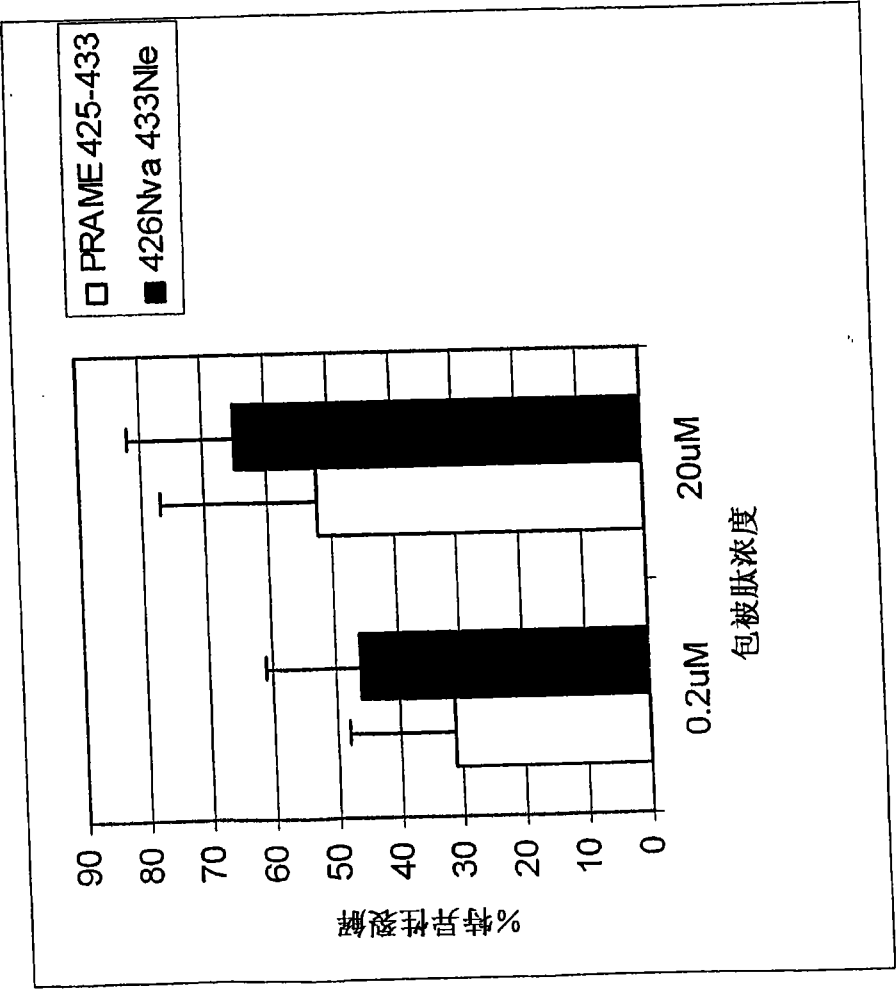


图 31: PRAME 类似物的体内评估

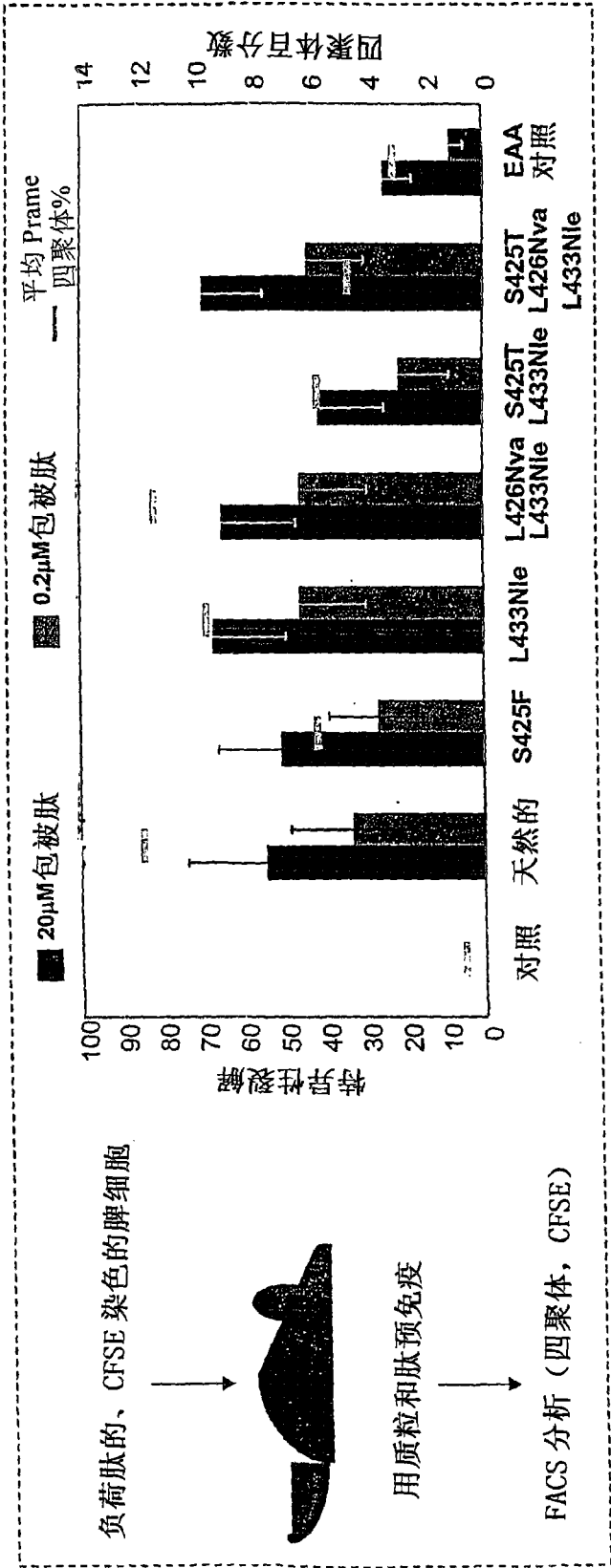
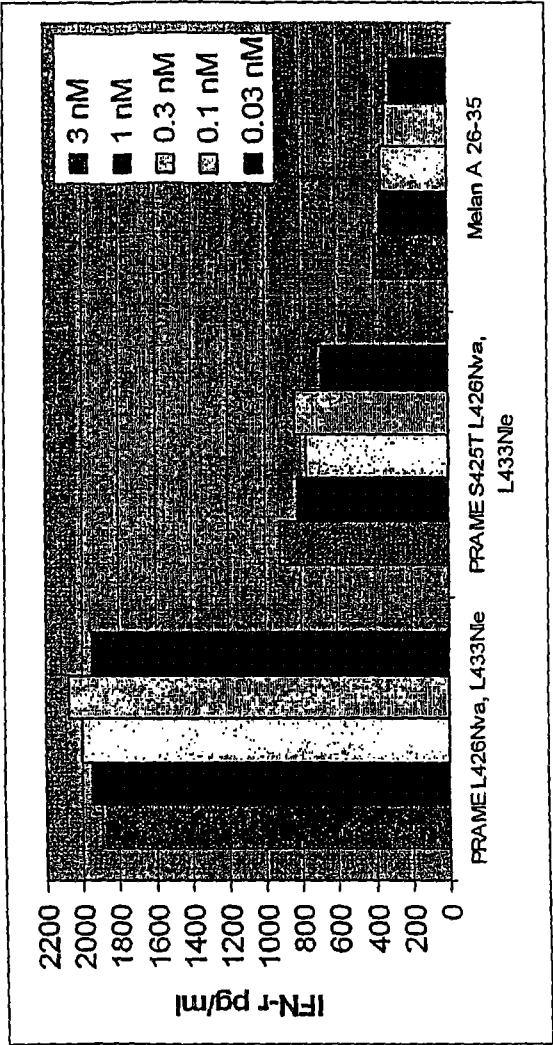


图 32: 类似物诱导的、天然表位再次刺激的 T 细胞离体生产细胞因子

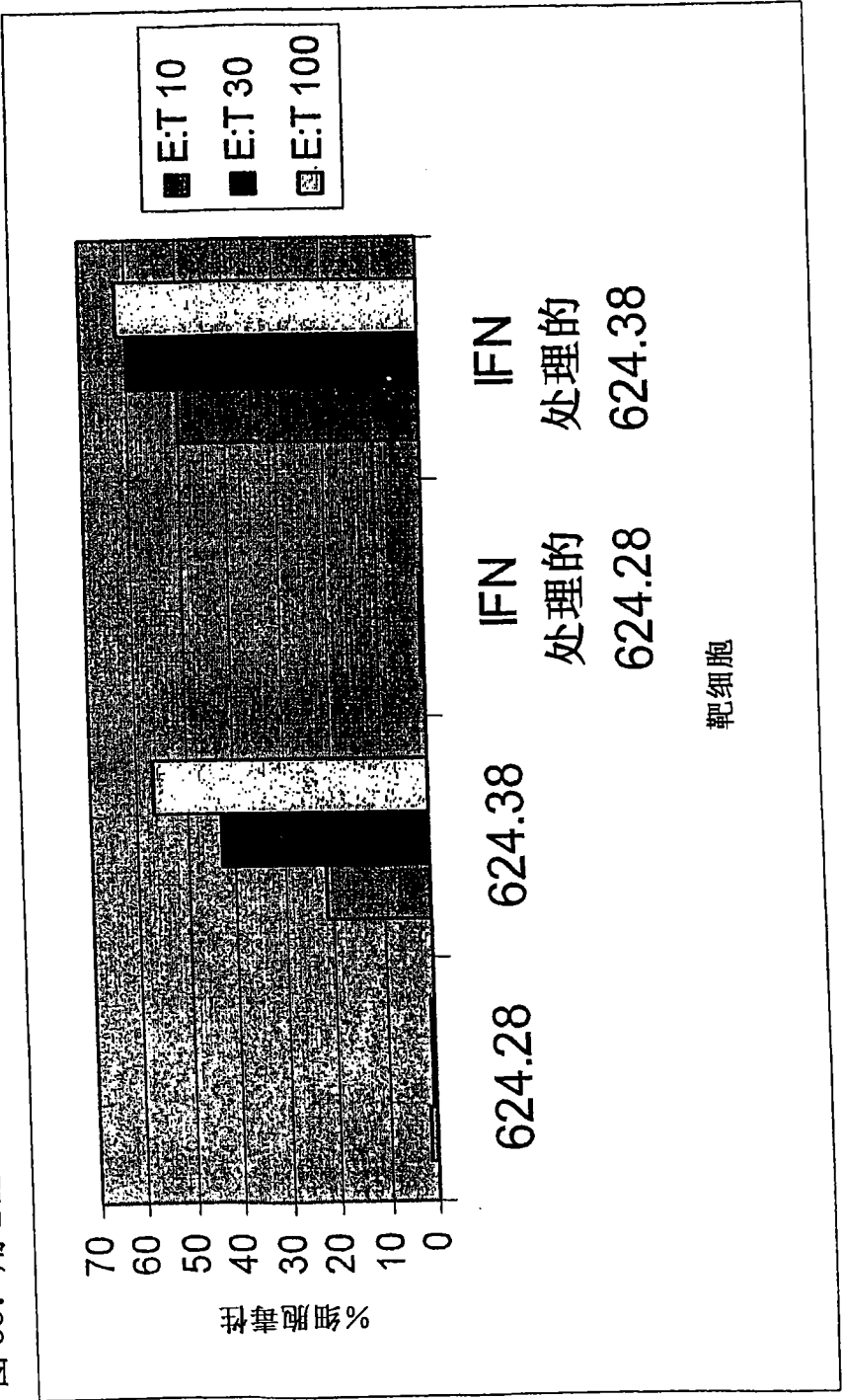


用质粒免疫并且用肽加强



离体刺激（天然肽，有效剂量）和 ELISA

图 33: 用 L426Nva L433NIe 类似物加强导致针对人肿瘤细胞系的细胞毒性免疫性。



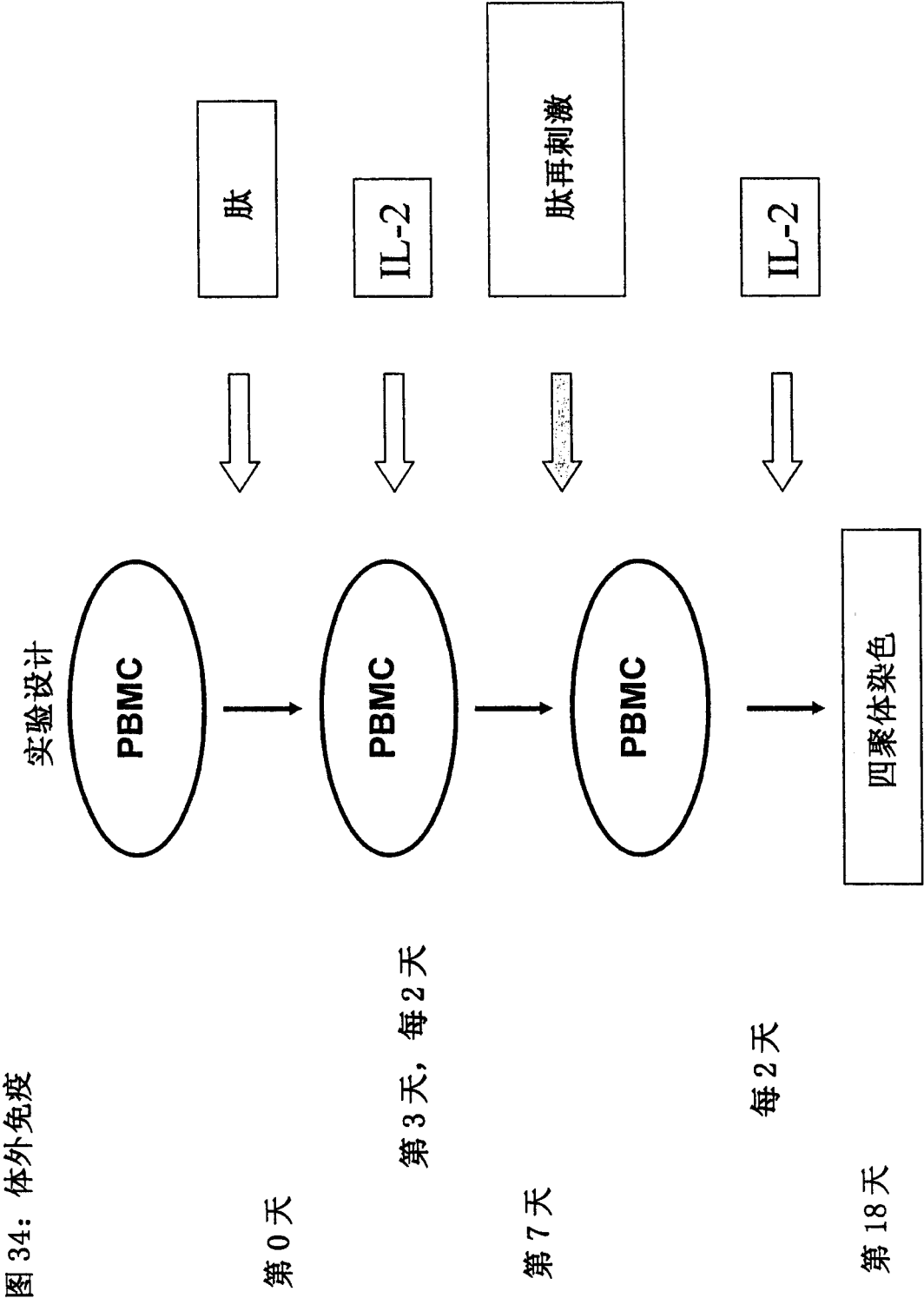


图 35: 用 PRAME 类似物体外免疫产生四聚体⁺ 细胞

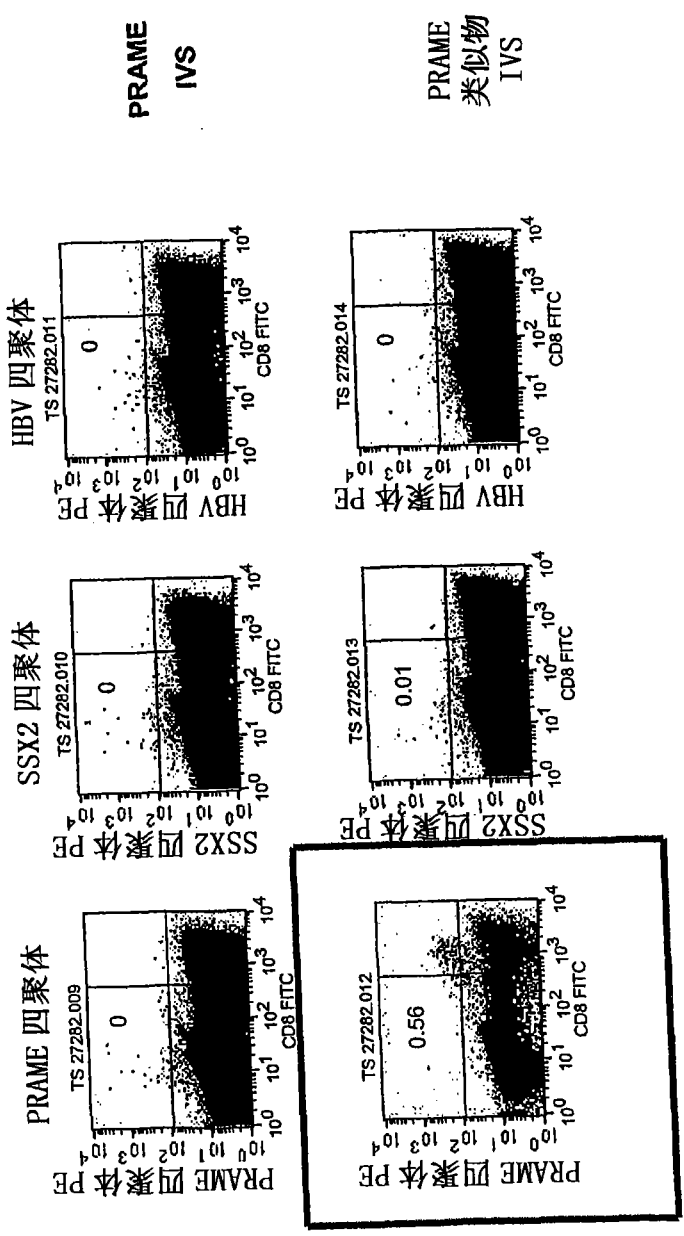


图 36: pCTLR2, 一种表达 PRAME₄₂₅₋₄₃₃ 表位的质粒

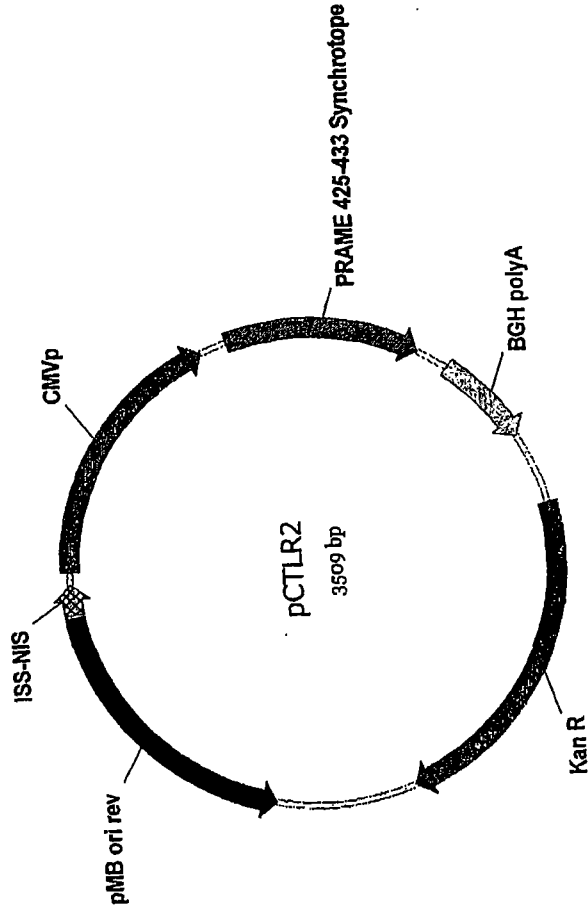


图 37: 通过用质粒 DNA 激活并且用肽加强的 T 细胞裂解 624.38 细胞

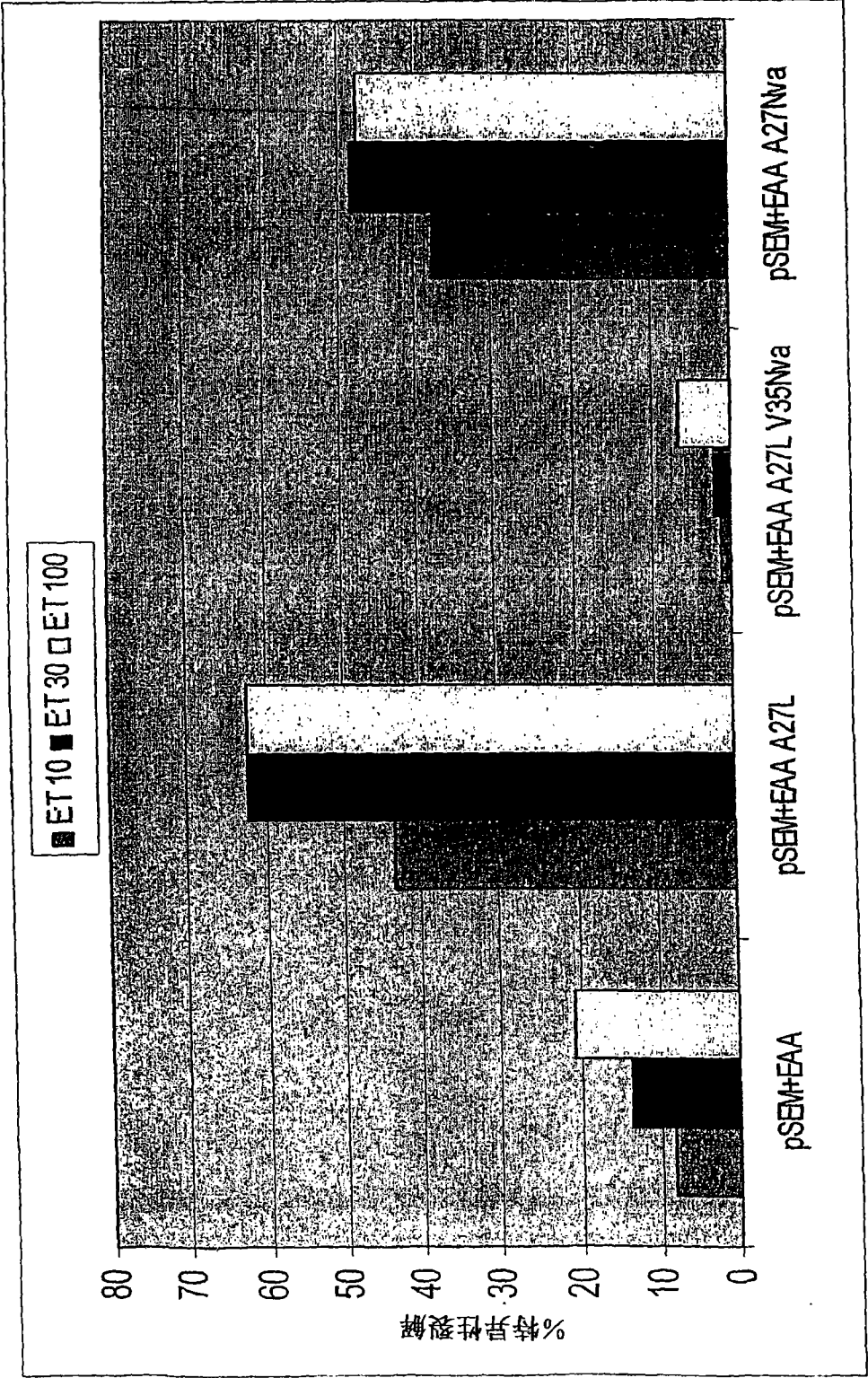


图 38: Tyr₃₆₉₋₃₇₇ 四聚体染色 (质粒激活, 肽加强)

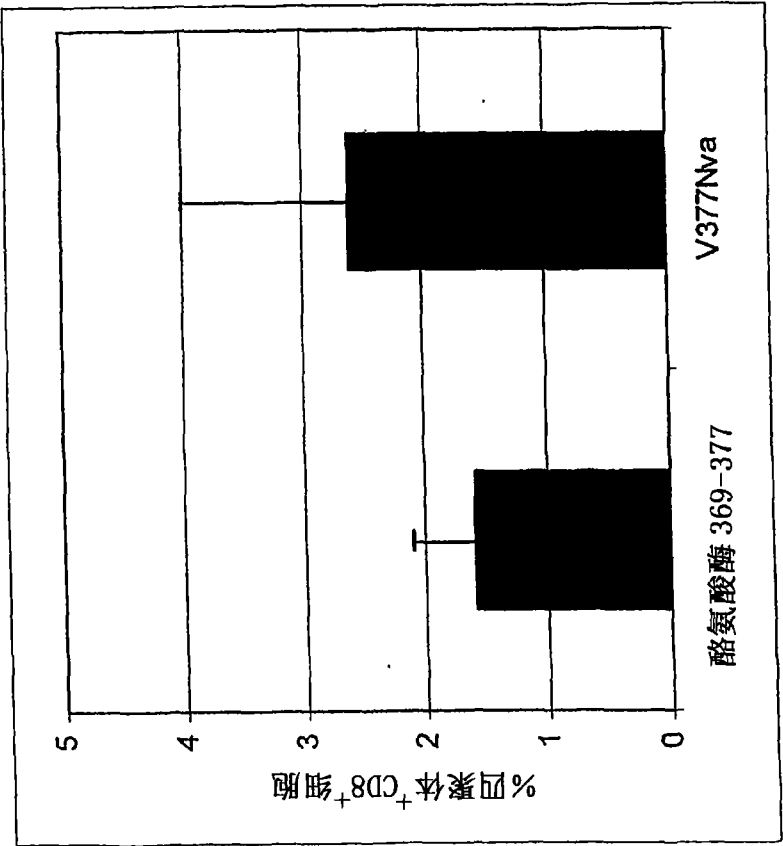


图 39: 关于多价 Melan A A27Nva/ 酪氨酸酶类似物免疫的动物的 CFSE 体内激发

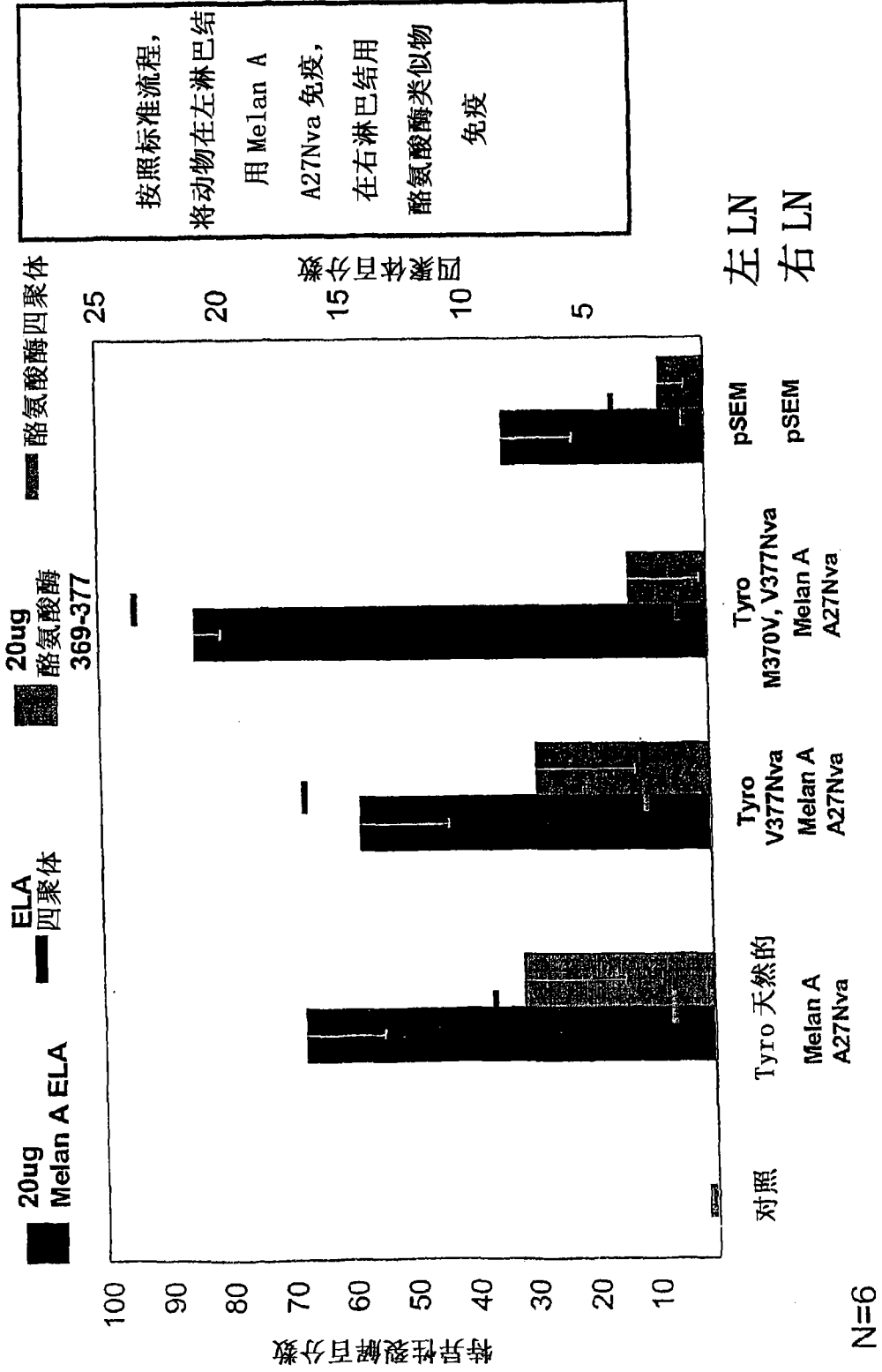


图 40: 类似物免疫原性评估流程的示意图

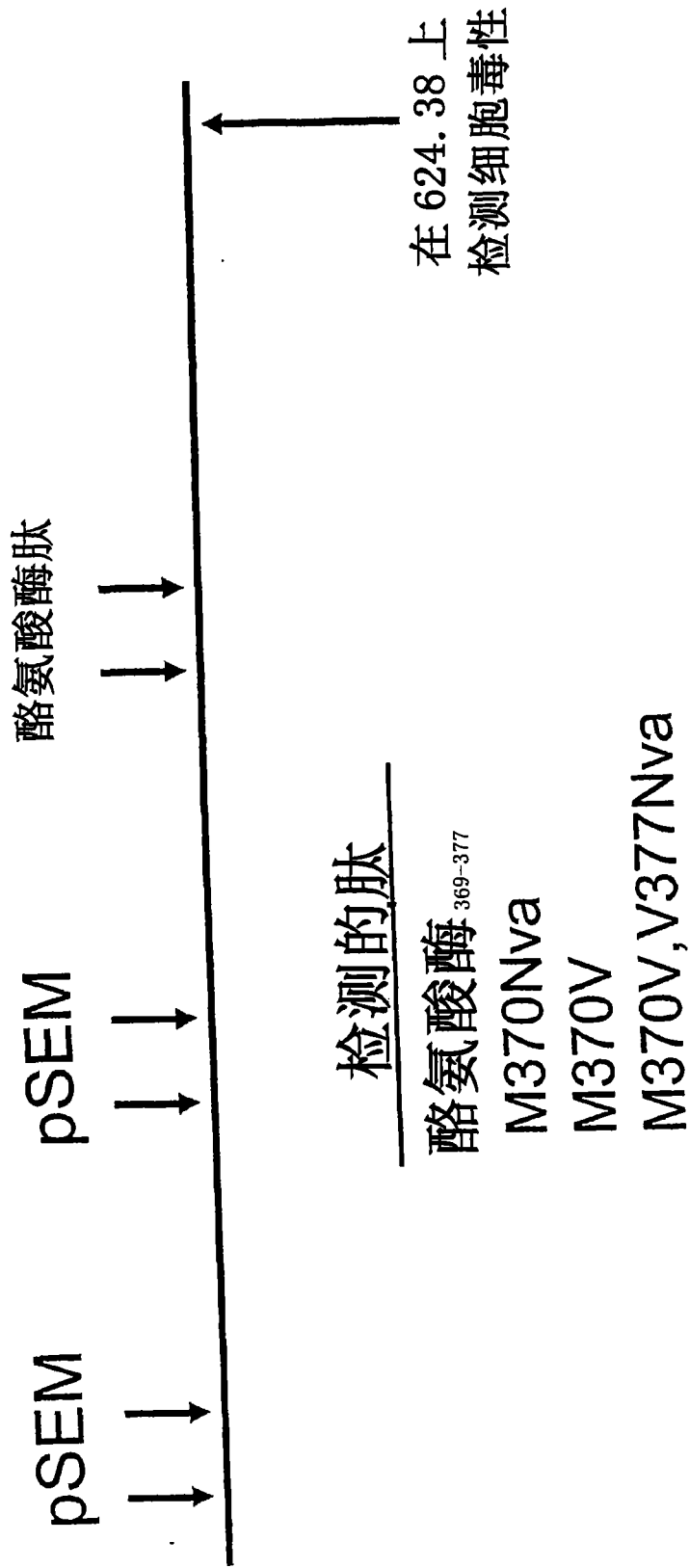


图 41: 针对 624.38 细胞的免疫应答
效应细胞来自用 pSEM 激活并且用 Tyr₃₆₉₋₃₇₇ 类似物加强的 HHD

