



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101687912 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 22

(21) 申请号 200880011016. 5

(56) 对比文件

(22) 申请日 2008. 01. 29

WO 2006032216 A2, 2006. 03. 30, 摘要.

(30) 优先权数据

审查员 李晨

60/898, 347 2007. 01. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 09. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/001148 2008. 01. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/094538 EN 2008. 08. 07

(73) 专利权人 埃皮瓦克斯公司

地址 美国罗德岛州

(72) 发明人 A·德格鲁特 W·马丁 D·里韦拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 梁谋 付磊

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

权利要求书2页 说明书36页

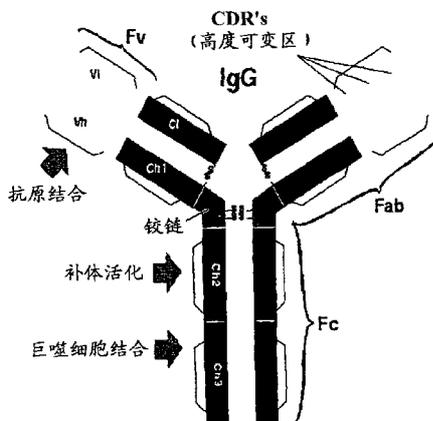
序列表42页 附图16页

(54) 发明名称

调节性 T 细胞表位、组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及 T 细胞表位, 其中所述表位包含的肽或多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定或可变区。本发明还涉及使用本发明表位的方法以及制备本发明表位的方法。



1. 一种 T 细胞表位多肽组合物,其包含由 SEQ ID NO :4 的序列组成的分离的 T 细胞表位多肽。

2. 一种核酸,其编码 SEQ ID NO :4 的 T 细胞表位多肽。

3. 一种载体,其包含根据权利要求 2 的核酸。

4. 一种细胞,其包含根据权利要求 3 的载体。

5. 一种药用组合物,其包含权利要求 1 的 T 细胞表位多肽组合物和药学可接受的载体。

6. 包含由 SEQ ID NO :4 的序列组成的分离的 T 细胞表位多肽的 T 细胞表位多肽组合物在制备用于治疗或预防医学病症的药物中的用途,其中所述医学病症以不想要的免疫应答存在为标志。

7. 根据权利要求 6 的用途,其中所述医学病症选自:变态反应、自身免疫疾病、移植相关病症、酶或蛋白缺乏症、凝血障碍、癌症、不育;以及病毒、细菌或寄生虫感染。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述移植相关病症为移植物抗宿主病。

9. 预防或治疗受试者中医学病症的药盒,其中所述药盒包括包含由 SEQ ID NO :4 的序列组成的分离的 T 细胞表位多肽的 T 细胞表位多肽组合物,其中所述医学病症以不想要的免疫应答存在为标志。

10. 扩增调节性 T 细胞群的方法,其包括:

(a) 提供受试者的生物样品;

(b) 从生物样品中分离调节性 T- 细胞;以及

(c) 将分离的调节性 T- 细胞与有效量的 Tregitope 组合物在使 T- 调节性细胞数量增加以形成扩增的调节性 T- 细胞组合物的条件下接触,

其中所述 Tregitope 组合物包含由 SEQ ID NO :4 的序列组成的分离的 T 细胞表位多肽,

藉此扩增生物样品中的调节性 T- 细胞。

11. 刺激生物样品中调节性 T 细胞的方法,其包括:

(a) 提供受试者的生物样品;

(b) 从生物样品中分离调节性 T- 细胞;以及

(c) 将分离的调节性 T- 细胞与有效量的 Tregitope 组合物在 T- 调节性细胞被刺激以改变一种或多种生物学功能的条件下接触,

其中所述 Tregitope 组合物包含由 SEQ ID NO :4 的序列组成的分离的 T 细胞表位多肽,

藉此刺激生物样品中的调节性 T- 细胞。

12. 包含由 SEQ ID NO :4 的序列组成的分离的 T 细胞表位多肽的肽在制备抑制受试者中免疫应答的药物中的用途,其中所述肽抑制免疫应答。

13. 权利要求 12 的用途,其中所述肽抑制效应 T 细胞应答。

14. 权利要求 12 的用途,其中所述肽抑制辅助 T 细胞应答。

15. 权利要求 12 的用途,其中所述肽抑制 B 细胞应答。

16. Tregitope 组合物在制备用于抑制受试者中抗原特异性免疫应答的药物中的用途,其中所述 Tregitope 组合物包含由 SEQ ID NO :4 的序列组成的分离的 T 细胞表位多肽,以及

其中所述分离的 T 细胞表位多肽与特异目标抗原共价结合、非共价结合或混合,引起对目标抗原免疫应答的降低。

17. 权利要求 16 的用途,其中所述抑制作用由天然 Treg 介导。

18. 权利要求 16 的用途,其中所述抑制作用由适应性 Treg 介导。

19. 权利要求 16 的用途,其中所述 Tregitope 组合物抑制效应 T 细胞应答。

20. 权利要求 16 的用途,其中所述 Tregitope 组合物抑制辅助 T 细胞应答。

21. 权利要求 16 的用途,其中所述 Tregitope 组合物抑制 B 细胞应答。

22. 增强疫苗递送载体的免疫原性的方法,其包括鉴定和去除一种或多种调节性 T 细胞表位,其中所述一种或多种 T 细胞表位中的一种为 SEQ ID NO :4。

## 调节性 T 细胞表位、组合物及其用途

### 发明领域

[0001] 本发明广泛涉及新颖种类的 T 细胞表位组合物（称作“Tregitopes”）。本发明提供 Tregitope 组合物、其制备方法和用途。

### [0002] 发明背景

[0003] 人工诱导对自身或外源抗原的耐受是治疗自身免疫、移植变态反应和其他疾病的目标，并且在用自体蛋白和非 - 自体蛋白的疗法中也是需要的。直至最近，治疗性耐受诱导依赖于可引起细胞排除 (celldepletion) 和细胞因子特性改变的基础广泛的方法。这些基础广泛的方法一般会减弱免疫系统并使许多受试者易于患机会感染、自身免疫攻击和癌症。本领域需要侵袭性较低并且更具靶向性的方法诱导免疫耐受。

[0004] 免疫耐受由 T 细胞、B 细胞、细胞因子和表面受体之间的复杂相互作用调节。最早自我 / 非我辨别发生在新生儿发育过程中的胸腺，其髓质上皮细胞表达对未成熟 T 细胞的特异自身蛋白表位。以高亲和性识别自身抗原的 T 细胞被清除，但是具有中等亲和性的自身反应性 T 细胞可免于被清除并且可转化成所谓的“天然”调节性 T 细胞 ( $T_{Reg}$ )。这些天然  $T_{Reg}$  细胞被运输至外周并提供对自身免疫的长久抑制。

[0005] 第二种形式的耐受发生在外周，其中成熟 T 细胞在 IL-10 和 TGF- $\beta$  存在下经它们的 T 细胞受体活化转化成“适应性” $T_{Reg}$  表型。这些适应性  $T_{Reg}$  细胞的可能作用包括成功清除入侵病原体后缓冲免疫应答作为控制变态反应或低水平慢性感染可能引起的过度炎症反应的方法，或可能辅助有益的共生细菌和病毒的共存。“适应性” $T_{Reg}$  也可在控制经历了体细胞超突变的人抗体的生存周期中发挥作用。

[0006] 天然调节性 T 细胞是外周免疫调节的重要组分。经它们的 TCR 活化后，天然 Tregs 可经接触依赖型和非依赖型机制抑制对不相关抗原的旁观者效应 T 细胞应答。此外这些细胞释放的细胞因子包括 IL-10 和 TGF- $\beta$  可诱导抗原特异性适应性 Tregs。尽管已做出了大量努力，除少数例外，天然 Tregs 并且更重要的在具有临床意义的体积中循环的天然 Tregs 的特异性仍是未知。

[0007] 本领域需要鉴别包含在普通自体蛋白例如 IgG (“Tregitopes”) 中的调节性 T 细胞表位以及与其制备相关的方法和用途。

### [0008] 概述

[0009] 本发明利用调节性 T 细胞 ( $T_{Reg}$ ) 尤其是已在外周调节对外源和自身蛋白的免疫应答的那些细胞（预存或天然  $T_{Reg}$ ）的功能。在一方面本发明提供 T- 细胞表位多肽组合物。

[0010] 通过使用 Tregitopes 和 Tregitope- 抗原融合物选择性黏附和活化预存天然  $T_{Reg}$  作为治疗以不想要的免疫应答存在为标志的任何疾病或症状的手段具有治疗价值。实例包括以下：自身免疫疾病例如 I 型糖尿病、MS、狼疮和 RA；移植相关病症例如移植植物抗宿主疾病 (GVHD)；变态反应；生物药物例如单克隆抗体，替代蛋白例如 FVIII 或胰岛素，治疗性毒素例如肉毒杆菌毒素的应用引起的免疫排斥；以及对急性或慢性传染病免疫应答的控制。

[0011] 在一个实施方案中，本发明涉及 T- 细胞表位多肽组合物，其包括至少一种选自 SEQ ID NOS:4-58 的多肽。在具体的实施方案中，本发明涉及包括本发明多肽和药学可接

受载体的药用组合物。

[0012] 在一个实施方案中本发明涉及编码至少一种选自 SEQ ID NOS :4-58 的 T-细胞表位多肽的核酸。在具体的实施方案中,本发明涉及包括本发明核酸的载体。在另一实施方案中,本发明涉及包括本发明载体的细胞。

[0013] 在一个实施方案中本发明涉及治疗或预防有需要的受试者中医学病症的方法,其包括给予治疗有效量的选自 SEQ ID NOS :4-58 的 T-细胞表位多肽。在具体的实施方案中,该医学病症选自:变态反应、自身免疫疾病、移植相关疾病、移植物抗宿主疾病、酶或蛋白质缺乏症、凝血障碍、癌症、不育;以及病毒、细菌或寄生虫感染。

[0014] 在一个实施方案中本发明涉及预防或治疗受试者医学病症的试剂盒,其中该试剂盒包括至少一种选自 SEQ ID NOS :4-58 的 T-细胞表位多肽。

[0015] 在一个实施方案中,本发明涉及扩增调节性 T 细胞群的方法,其包括:(a) 提供受试者的生物样品;(b) 从生物样品中分离调节性 T-细胞;以及将分离的调节性 T-细胞与有效量的本发明 Tregitope 组合物在 T-调节性细胞数量增加形成扩增的调节性 T-细胞组合物的条件下接触,藉此扩增生物样品中的调节性 T-细胞。

[0016] 在一个实施方案中,本发明涉及刺激生物样品中调节性 T-细胞的方法,其包括:(a) 提供受试者的生物样品;(b) 从生物样品中分离调节性 T-细胞;以及将分离的调节性 T-细胞与有效量的本发明 Tregitope 组合物在 T-调节性细胞被刺激以改变一种或多种生物学功能的条件下接触,藉此刺激生物样品中的调节性 T-细胞。

[0017] 在一个实施方案中本发明涉及抑制受试者中免疫应答的方法,其包括给予受试者包括治疗有效量的包括 Tregitope 的肽的组合物,其中该肽抑制免疫应答。在具体的实施方案中,该肽抑制效应 T 细胞应答。在具体的实施方案中,该肽抑制辅助 T 细胞应答。在另一实施方案中,该肽抑制 B 细胞应答。

[0018] 在一个实施方案中,本发明涉及通过给予治疗有效量的包括一种或多种 Tregitopes 的组合物抑制受试者中抗原特异性免疫应答的方法,其中一种或多种 Tregitopes 与特异目标抗原或共价结合、或非共价结合或混合,引起对该目标抗原的免疫应答降低。在具体的实施方案中,抑制作用由天然 Treg 介导。在另一实施方案中,该抑制作用由适应性 Treg 介导。在另一实施方案中,该肽抑制效应 T 细胞应答。在另一实施方案中,该肽抑制辅助 T 细胞应答。在另一实施方案中,该肽抑制 B 细胞应答。在具体的实施方案中,该肽包括选自 SEQ ID NOS :4-58 的序列。

[0019] 在一个实施方案中。本发明涉及增强疫苗递送载体免疫原性的方法,其包括鉴别和去除调节性 T 细胞表位。在具体的实施方案中该 T 细胞表位选自 SEQ ID NOS :4-58。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1 为免疫球蛋白 G(IgG) 的示意图。

[0022] 图 2 为比较加帽和不加帽肽的一系列图解表示。用单独(上图)的 CEF(阳性对照肽库)、CEF+Tregitope 289-酰胺(中图)或 CEF+Tregitope-289-不加帽(下图)在培养基中刺激 PBMC 8 天。与单独 CEF 温育相比,CEF 与 Tregitope-289-酰胺共温育 1) 得到更高的具有调节性表型的细胞百分比(左图)和 2) 导致响应 CEF 再刺激的  $\gamma$  干扰素分泌的相关显著性 ( $p < 0.0005$ ) 降低(右图)。相反,与单独 CEF 温育(上图)相比,与 Tregitope 289-不加帽(下图)共温育未引起显著性差异。

[0023] 图 3 显示了 Tregitope 存在下天然 Tregs 的活化。在破伤风毒素肽 (TT<sub>830-844</sub>)、Tregitope 或无刺激物存在下体外直接刺激人 PBMCs 四天。用抗 -CD4 和抗 -CD25 胞外染色细胞并接着用 FoxP3 胞内染色,用流式细胞仪分析。与 TT<sub>830-844</sub> (745 个细胞的 12.5%) 或无刺激物相比 (497 个细胞的 19.5%),用 Tregitope 温育增加了 CD4+CD25+Foxp3+T 细胞的百分比 (644 个细胞的 53.6%)。

[0024] 图 4 为显示 Tregitope 诱导 T- 调节性细胞因子和趋化因子上调和 T- 效应细胞因子和趋化因子下调的一系列柱形图。用 a) 衍生自 C3d 蛋白的免疫原性肽库 (黑色柱形); b) C3d 肽 +Tregitope-167 (浅灰色柱形) 或 c) C3d 肽 +Tregitope 134 (中度灰色柱形) 初始刺激后对 C3d 再刺激的应答。第二次温育中, 应答显示为高于背景的倍数增加, 其中背景为无刺激物 (对照)。以 pg/ml 表示的各自的基线 (背景) 值在 x- 轴标注中指出。IL-4、TNF  $\alpha$  或 TGF  $\beta$  1 水平没有显著性差异。

[0025] 图 5 为显示用 a) 衍生自 C3d 蛋白的免疫原性肽库 (黑色柱形) 或 b) C3d 肽 +Tregitope-167 (浅灰色柱形) 初始刺激后对 C3d 肽再刺激的应答的一系列柱形图。第二次温育中, 应答显示为高于背景的倍数增加, 其中背景为无刺激物 (对照)。对于各细胞因子, 基线 (无刺激物, 背景) 值显示于 x- 轴标注中。

[0026] 图 6 为显示用衍生自 TSHR 的表位协同刺激的柱形图, TSHR 为格雷夫斯病的靶抗原, 抑制对格雷夫斯病患者 PBMC 表位的免疫应答。来自格雷夫斯病患者的 PBMC 首先与 1) 单独 TSHR 肽库或 2) TSHR 肽库和 Tregitope-134、Tregitope-167 和 Tregitope-289 库温育 8 天。然后收获细胞、洗涤并与 1) 单个的 TSHR 肽和 Tregitope 库或 2) TSHR 肽库和 Tregitope 库温育 (在所描述的 IL-4 ELISpot 板中)。也有“无刺激物”的对照板。相对于未用抗原再刺激显示应答。黑色柱形对应于单独用抗原的温育和再刺激, 灰色柱形对应于用抗原 +Tregitope 库的温育和再刺激。在本实验中 Tregitope 共温育将对单独 TSHR 肽的应答抑制了 35% 至 67% 并将对 TSHR 肽库的应答抑制了 65%。显示成对比较的 P 值。

[0027] 图 7 为显示与以下: 单独的 CEF、CEF+Tregitope-289、CEF+Tregitope 294、CEF+Tregitope-029、CEF+Tregitope-074 或 CEF+Tregitope-009 之一温育八天后三个受试者对商业购买的阳性对照肽 (CEF) 库的平均应答的柱形图。对 CEF 的应答被抑制了 29% 至 48%, 取决于所使用的单个 Tregitope。对 CEF (在之前与单独的 CEF 温育的样品中) 的基线应答高于背景范围为 1404 至 10139 IFN- $\gamma$  SFC/ 百万 PBMC (背景为无刺激物)。显示成对比较的 P 值。

[0028] 图 8 为显示与 Tregitope 共温育抑制对衍生自肉毒杆菌神经毒素肽表位的免疫应答的柱形图。取有证据证明存在抗 -BoNT/A 抗体的受试者的外周血。PBMC 首先与单独的 BoNT/A 肽库或 BoNT/A 肽库 +Tregitopes (Tregitope-134、Tregitope-167 和 Tregitope-289) 库温育八天。接着收集细胞、洗涤并接着与一式三份的单个 BoNT/A 肽或一式三份的 BoNT/A 肽库温育 (在 IFN- $\gamma$  ELISpot 板中)。相对于未用抗原的再刺激显示应答。黑色柱形对应于与单独抗原的温育, 灰色柱形对应于与抗原 +Tregitopes 库的温育。对 BoNT/A 的应答被抑制了 26% 至 73%; 对 BoNT/A 肽库的应答被抑制了 59%。显示成对比较的 P 值。

[0029] 图 9 为显示 Tregitope-289 和 Tregitope-134 响应体外联合给药免疫显性抗原下调增殖的一系列图形。PBMC 分离自血库供体并用单独的 CEF、CEF+Tregitope-134 或

CEF+Tregitope-289 刺激八天。与两种 Tregitopes 之一共温育导致对 CEF 的应答降低（如 IFN- $\gamma$  ELISA 测定（左图））和增殖降低（如 CFSE 荧光测定（右图））（灰色阴影指抗原-Tregitope 共温育抑制的应答；黑色指与单独的抗原温育后的基线应答）。

[0030] 图 10 为显示对牛痘苗肽应答的曲线图。PBMC 分离自血库供体并用单独的 CEF、CEF+Tregitope-134 或 CEF+Tregitope-289 刺激八天。与两种 Tregitopes 之一共温育导致对 CEF 的应答降低（如 IFN- $\gamma$  ELISA 测定（左图））和增殖降低（如 CFSE 荧光测定（右图））。灰色阴影指抗原-Tregitope 共温育抑制的应答；黑色指与单独的抗原温育后的基线应答。

[0031] 图 11 为显示 Tregitope 抑制由具有调节性表型的细胞介导的一系列图形。Tregitope 抑制依赖于 CD4+CD25Hi T 细胞。左图：用抗-CD4 和抗-CD25 抗体染色来自过敏个体的 PBMC 并用流式细胞仪分析。从剩余的 PBMC 中排除 CD4+CD25Hi 亚群（框（gate））。中图：用含有或不含 Tregitope-289 的 HDM 裂解物协同刺激排除和未排除 CD4+CD25Hi 的 PBMC。排除 CD4+CD25Hi 的 PBMC 对 IFN- $\gamma$  的抑制低于未排除 PBMC。右图：HDM 裂解物和 Tregitope-289 共温育导致响应 HDM 裂解物刺激的 CD4+ 细胞增殖降低。

[0032] 图 12 为显示与 IL-10 分泌相关的 TReg (CD4/CD25Hi) 扩增的曲线图和图形。与 Tregitope-289 和 HDM 共温育后 CD4/CD25 Hi T 细胞的扩增；和用单独 HDM 再刺激后共温育细胞分泌的 IL-10 的量。用 Tregitope-167 共温育的结果相似：CD4/CD25hi 细胞从 1.67% 增加至 7.5% 以及 IL-10 分泌增加五倍。

[0033] 图 13 为显示 Tregitope 共温育引起抗原特异性变应性 Th2 应答抑制的一系列图形和曲线。与 Tregitope 和 Bet v 1141-155 变应原共培养导致从 Th2 效应细胞至 Th1/T<sub>Reg</sub> 的转变。用含有或不含 Tregitope-167 的 Bet v 1141-155 肽协同刺激来自三名对白桦树花粉过敏的受试者的 PBMC。十天的 Tregitope 协同刺激引起 Bet v 1144-155 四聚体阳性 CD4+ 细胞产生的 IL-5 分泌的降低（左下图）和 Th2- 相关表面标记（上图）的降低。延时培养（30 天，右下图）引起 Bet v 1144-155- 特异细胞中从 Th2 (IL-5) 至 Th1 (IFN- $\gamma$ ) 的显著转变。

[0034] 图 14 为显示 Tregitope 联合给药引起对体内联合给予的蛋白质药物的效应细胞应答 (effector response) 抑制的图形。单独 ANTIGEN-XX (见实施例 5A) 免疫（黑色柱形）激起 IL-4 (左边成对的柱形, 左轴) 和抗-ANTIGEN-XX 抗体滴度 (右边成对的柱形, 右轴) 二者的强烈应答。当联合给予 ANTIGEN-XX 与 Tregitope-167 和 Tregitope-106 的鼠同源物时这些应答均减半（灰色柱形）。在假免疫的动物中对 ANTIGEN-XX 的应答如预期为阴性。抗体的应答（右边成对的柱形）和 IL-4 ELISpot (左边成对的柱形) 相关联。

[0035] 图 15 的图形显示了对屋尘螨裂解物 (HDML) 和尘螨抗原的 IL-4 和抗体应答。HDML 免疫（黑色柱形）激起 IL-4 (左边成对的柱形, 左轴) 和抗 HDM 抗原抗体滴度 (右边成对的柱形, 右轴) 二者的强烈应答。当联合给予 HDML 与 Tregitope-289 的鼠同源物时这些应答均减半。在假免疫动物中对 HDML 的应答如预期为阴性。抗体的应答（右边成对的柱形）和 IL-4 ELISpot (左边成对的柱形) 相关联。这些图形显示 DM 未免疫小鼠中 38% 的体内抑制和预致敏小鼠中为 84%。参见实施例 5B。

[0036] 图 16 为显示 Tregitope 联合给予对免疫原性肽药物 (“IPT”) 的 T 效应细胞应答体内抑制的柱形图。每日三次皮下给予 HLA DR4 Tg 小鼠单独 IPT 或 IPT+ 鼠 FC

或 IPT+Tregitope-289(鼠同源物)。最后一次剂量后一周,处死小鼠并在 48hr IL-4 ELISpot 测定中用免疫原性肽药物刺激脾细胞。联合给予免疫原性蛋白质药物和 Fc 或 Tregitope-289 导致 IL-4 斑点形成细胞的显著减少。参见实施例 5C。

[0037] 发明详述

[0038] 综述

[0039] 当可溶性蛋白质抗原被抗原递呈细胞 (APCs) 摄取并经 II 类抗原递呈途径加工时适应性免疫级联开始。II 类递呈途径中的蛋白质抗原被存在于内质网中的各种蛋白酶降解。一些形成的蛋白质片段与 MHC II 类分子结合。荷载肽的 MHC 分子被运输至细胞表面,在那里被 CD4+T 细胞识别。可结合至 MHC 分子并介导 APC 和循环 T 细胞之间细胞-细胞相互作用的肽片段被称作 T 细胞表位。CD4+T 细胞对这些肽-MHC 复合物的识别根据应答 T 细胞的表型和局部的细胞因子/趋化因子环境可引起免疫活化或免疫抑制应答。一般而言,MHC/肽复合物和 T 效应细胞的 T 细胞受体 (TCR) 之间的黏附导致促炎性细胞因子例如 IL-4 和 IFN- $\gamma$  的活化和分泌。另一方面天然 T 调节性细胞 (TReg) 的活化导致免疫抑制细胞因子中 IL-10 和 TGF- $\beta$  的表达 (Shevach, E., Nat. Rev. Immunol., 2 :389-400, 2002)。这些细胞因子直接作用于附近的效应 T 细胞在一些情况下引起无反应性或凋亡。在其他情况下调节性细胞因子和趋化因子将效应 T 细胞转换成 T 调节性表型;这一过程在本文中称作“诱导性”或“适应性”耐受。可结合至 MHC 分子并黏附和活化循环 Treg 的 T 细胞表位称作 Tregitopes。

[0040] 最早自我/非我辨别发生在新生儿发育过程中的胸腺,其髓质上皮细胞表达对未成熟 T 细胞的特异自身蛋白表位。以高亲和性识别自身抗原的 T 细胞被清除但是具有中等亲和性的自身反应性 T 细胞可免于被清除并且可转化成所谓的“天然”调节性 T 细胞 (T<sub>Reg</sub>)。这些天然 T<sub>Reg</sub> 细胞被运输至外周并提供对自身免疫的长久抑制。天然调节性 T 细胞是免疫调节和自身耐受的重要组分。

[0041] 自身耐受由 T 细胞、B 细胞、细胞因子和表面受体之间的复杂相互作用调节。T 调节性免疫应答平衡对蛋白质抗原(不论自身的或外源的)的 T 效应细胞免疫应答。通过增加自身反应性 T 效应细胞的数量功能或通过减少 T 调节性细胞的数量或功能使该平衡向自身反应性一边的倾斜表现为自身免疫。

[0042] 第二种形式的耐受发生在外周,其中成熟 T 细胞在 IL-10 和 TGF- $\beta$  (通常由旁观者 T 调节性细胞提供)存在下经它们的 T 细胞受体活化转化成“适应性”T<sub>Reg</sub> 表型。这些适应性 T<sub>Reg</sub> 细胞的可能作用包括成功清除入侵病原体后缓冲免疫应答作为控制变态反应或低水平慢性感染可能引起的过度炎症反应的手段,或可能辅助有益的共生细菌和病毒的共存。“适应性”T<sub>Reg</sub> 也可在控制经历了体细胞超突变的人抗体的生存周期中发挥作用。

[0043] 据信免疫球蛋白的恒定区包含数种重要的 Tregitopes,其主要功能是抑制对超突变 CDRs 的免疫应答。由于循环 IgG 的高容量,可能也存在对应于包含于 IgG 的 Tregitopes 的高容量 T 调节性细胞。这一推断的部分证据认为包括免疫球蛋白 Fc 部分的嵌合蛋白赋予嵌合蛋白若干期望性质,包括稳定性增强、血浆半衰期增加、与 Fc 受体结合以及免疫原性降低 (Lei, T. 等, Cell. Immunol., 235 :12-20, 2005, Baxevanis, C. et al., Eur. J. Immunol., 16 :1013-1016, 1986)。

[0044] TReg 细胞也在 B 细胞耐受中发挥作用。B 细胞在它们的细胞表面表达单个低亲和

性 Fc 受体 FcγRIIB (Ravetch, J. 等, Science, 234 :718-725, 1986)。这一受体在其胞质结构域中包含免疫受体酪氨酸基抑制基序序列 (ITIM)。免疫复合物对 FcγRIIB 和 BCR 的共连接可触发 ITIM 的酪氨酸磷酸化导致肌醇磷酸酶 SHIP 的募集,其可通过干扰 MAP 激酶的活化抑制 BCR 诱导的增殖并通过将 Burton 酪氨酸激酶 (Btk) 从细胞膜解离阻断吞噬作用,其抑制进入细胞的钙内流。FcγRIIB 也可诱导不依赖 ITIM 的凋亡。在 ICs 作用下 FcRIIB 同类聚集时 Btk 与细胞膜的联系被增强,触发凋亡性应答 (Pearse, R. 等, Immunity, 10 :753-760, 1999)。FcγRIIB 的表达高度可变并依赖于细胞因子。由活化的 Th2 和 TReg 细胞表达的 IL-4 和 IL-10 已显示可协同增强 FcγRIIB 表达 (Joshi, T. 等, Mol. Immunol., 43 :839-850, 2006), 因此有助于抑制体液应答。

[0045] 有可能利用 Tregitope 特异性 TReg 细胞抑制不想要的免疫应答并诱导对共递送蛋白质的适应性 TReg。这一发现对设计治疗方案和用于移植的抗原特异疗法、蛋白质药物、变态反应、慢性感染、自身免疫和疫苗设计具有意义。与 Tregitope 一起给予药物、蛋白质或变应原可抑制效应细胞免疫应答。Tregitope 可用于有意操纵免疫系统的耐受性。

[0046] 本发明肽可用于调节性 T 细胞的选择性黏附和活化。本文例证了某些预存调节性 T 细胞群可被黏附、活化并用于抑制全身的和限制性的疾病特异性条件下的不想要的免疫应答。

[0047] 尽管付出了许多努力,除了少数例外,天然 Tregs 并且更重要的在具有临床意义的体积中循环的天然 Tregs 的抗原特异性仍是未知。本文例证了一些在血液中循环的人类蛋白,例如免疫球蛋白或血清白蛋白,包含与 T 调节性细胞的天然种群相关的 T 细胞表位。在正常的免疫监督过程中这些蛋白质被专职 APC 例如树突状细胞或巨噬细胞摄取并降解。在降解过程中一些包含于这些蛋白质的表位与 MHV 分子结合,转运至细胞表面递呈给调节性 T 细胞。这些细胞一旦被 APC 活化即释放细胞因子和趋化因子帮助抑制自身免疫应答,否则自身免疫应答会阻碍胞外蛋白质功能。

[0048] 通过使用本发明肽选择性活化这些预存调节性 T 细胞,本文显示本发明肽可用于抑制各种不想要的免疫应答。在最简单的形式中,本发明肽的全身应用可用作全身免疫抑制剂,其可用于控制严重的自身免疫反应例如多发性硬化症急性发作、变态反应、移植反应或对感染的不可控应答。在更加受控的应用中,例如局部应用至受风湿性关节炎 (RA) 影响的关节,本发明肽可用于抑制局部自身免疫应答。在靶向应用中,例如可通过该肽与一些其他 T 细胞表位的融合或结合所达到的,这些肽可抑制高特异性免疫反应并使免疫系统的平衡保持完整。举例而言,通过给予和自身免疫抗原例如胰岛素或变应原例如 Brazil nut 抗原融合的调节性肽,免疫系统可经训练通过将应答效应 T 细胞的表型转换至适应性调节 T 细胞的表型而“耐受”共递送的抗原。

[0049] 如上所述,本发明肽衍生自循环胞外蛋白。为了具有可用性这些肽必须是真正的 T 细胞表位 (即可与 MHC 分子和 TCRs 二者结合) 并与足够大以具有治疗作用的预存调节性 T 细胞群相关。T 细胞表位簇,可结合至多个 MHC 等位基因和多个 TCRs 的表位,是满足后一资格的关键。

[0050] 定义

[0051] 为了进一步辅助对本发明的理解,在下文中定义多个术语和短语。

[0052] 如本文所使用,术语“生物样品”指生物体的组织、细胞或分泌物的任何样品。

[0053] 如本文所使用,术语“移植”指从一个受试者取出细胞、组织或器官,称作“移植体”或“移植物”并将它们置于(通常)不同的受试者中。提供移植物的受试者称作“供体”,接受该移植物的受试者称作“受体”。在两个相同种但基因不同的受试者之间移植的器官或移植物称作“同种异体移植物”。在不同种受试者之间移植的移植物称作“异种移植物”。

[0054] 如本文所使用,术语“医学病症”包括但不限于表现为一种或多种身体和/或心理症状(需要对其进行治疗和/或预防)的任何病症或疾病,并包括之前和新鉴定的疾病和其他病症。

[0055] 如本文所使用,术语“免疫应答”指淋巴细胞、抗原递呈细胞、吞噬细胞、粒细胞和上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的协同作用,其可选择性损伤、破坏或从人体清除癌性细胞、转移的肿瘤细胞、恶性黑色素瘤、侵入病原体、病原体感染的细胞或组织或自身免疫或病理性炎症的情况下的正常的人体细胞或组织。

[0056] 如本文所使用,术语组合物的“有效量”为足以达到预期治疗和/或预防作用的量,例如可引起被治疗疾病相关症状的预防或减少的量。给予受试者的本发明组合物的量取决于疾病的类型和严重性以及个体的特征,例如总体健康、年龄、性别、体重和对药物的耐受。也取决于疾病的程度、严重性和类型。技术人员可根据这些和其他因素确定适当的剂量。本发明组合物也可相互之间或与一种或多种其他治疗性化合物联合给药。

[0057] 如本文所使用术语“T 细胞表位”指蛋白决定簇,长度为 7 至 30 个氨基酸并可特异结合 HLA 分子并与特异 TCRs 相互作用。一般而言,T 细胞表位是线性的并且不表达特异的三维特征。T 细胞表位不受变性溶剂的影响。

[0058] 如本文所使用,术语“B 细胞表位”指可特异结合抗体的蛋白决定簇。表位通常由分子例如氨基酸或糖侧链的化学活性表面基团组成并通常具有特异的三维结构特性以及特异的电荷特性。构象和非构象表位的区别为在变性溶剂存在下丧失与前者而不是与后者的结合。

[0059] 如本文所使用,术语“受试者”指可在其中引起免疫应答的任何活的生物体。术语受试者包括但不限于人、非人灵长类例如猩猩和其他猿猴和猴子种;农场动物例如牛、羊、猪、山羊和马;家养哺乳动物例如狗和猫;实验室动物包括啮齿类例如小鼠、大鼠和豚鼠。该术语不表示具体的年龄或性别。因此成年或新生儿受试者以及胎儿不论雄性或雌性均被涵盖。

[0060] 如本文所使用,术语 MHC 复合物指可与被称作 HLA 配体的特异性全部多肽(repertoire)结合并将所述配体运输至细胞表面的蛋白质复合物。

[0061] 如本文所使用,术语“MHC 配体”指可结合一个或多个特异 MHC 等位基因的多肽。术语“HLA 配体”可与术语 MHC 配体互换。在其表面表达 MHC/配体复合物的细胞被称作“抗原递呈细胞”(APCs)。

[0062] 如本文所使用,术语 T 细胞受体或 TCR 指由可与递呈于 APCs 表面的特异的 MHC/配体复合物黏附的 T 细胞表达的蛋白质复合物。

[0063] 如本文所使用,术语“T 细胞表位”指可与特异 T 细胞受体 (TCRs) 相互作用的 MHC 配体。可通过计算机 (in silico) 法 (De Groot, A. 等, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 13 : 539-541, 1997 ; Schafer, J. 等, Vaccine, 16 : 1880-1884, 1998 ; De Groot, A. 等, Vaccine, 19 : 4385-95, 2001 ; DeGroot, A. 等, Vaccine, 21 : 4486-504, 2003) 预测 T 细胞表位。



框架内融合。

[0077] 分离的多肽可纯化自天然表达该多肽的细胞,纯化自经改变可表达该多肽(重组)的细胞,或使用已知的蛋白质合成方法合成。在一个实施方案中,通过重组DNA技术生产多肽。举例而言,将编码该多肽的核酸分子克隆至表达载体,将表达载体引入宿主细胞,该多肽表达于该宿主细胞中。接着可通过适当的纯化方案使用标准蛋白质纯化技术从细胞中分离该多肽。

[0078] 对于本发明目的,多肽可包括例如天然氨基酸经修饰的形式例如D-立体异构体、非天然氨基酸;氨基酸类似物以及模拟体。

[0079] 尽管与本文所述相似或等同的方法和材料可用于实施或检测本发明,本文描述了优选的方法和材料。本发明的其他特征、目标和优点从描述和权利要求中显而易见。在说明书和附加权利要求中,单数形式包括复数指代物除非文章另外指明。除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员理解的不同含义。本文引用的所有参考文献均以其完整内容并于本文作为参考并用于所有目的,其引用程度如同明确并独立指明各单独的出版物、专利或专利申请以其完整内容并于本文作为参考用于所有目的。

[0080] 组合物

[0081] 一方面本发明提供新颖种类的T细胞表位组合物,称作“Tregitopes”,其包括具有一个或多个下文所列特性的肽或多肽。即本发明Tregitopes包括但不限于具有一个或多个下列特性:

[0082] (1) 本发明Tregitopes衍生自普通的人蛋白。

[0083] (2) 本发明Tregitopes在他们来源蛋白的已知变异体中高度保守(例如,存在于多于50%的已知变异体中)。

[0084] (3) 本发明Tregitopes包括至少一个经EpiMatrix分析鉴定的推定T细胞表位。EpiMatrix是EpiVax开发的专有计算机算法,其可用于筛选蛋白质序列以确定是否存在推定的T细胞表位。输入序列被解析成重叠的9-mer框架,其中各框架与上一个重叠8个氨基酸。就与一组八个普通II类HLA等位基因(DRB1\*0101、DRB1\*0301、DRB1\*0401、DRB1\*0701、DRB1\*0801、DRB1\*1101、DRB1\*1301和DRB1\*1501)的预测结合亲和力给各所得框架评分。根据随机生成肽的较大样本的分数标准化初始分数。报告所得“Z”分数。任何等位基因特异性EpiMatrix Z-分数超过1.64的任何9-mer肽,理论上为任何给定样品的前5%,被认为是推定的T细胞表位。

[0085] 在优选的实施方案中本发明Tregitopes包含若干推定T细胞表位,形成已知为T细胞表位簇的模式。推定的T细胞表位并不是随机分布在整个蛋白质序列中,而是“集簇”在特定区域中。此外,包含推定T细胞表位簇的肽在体外和体内的验证检测中更可能检测为阳性。从初始EpiMatrix分析的结果使用第二种称作Clustimer的专有算法筛选推定T细胞表位“集簇”的存在。Clustimer算法可鉴定包含于任何包含统计学显著高数量的推定T细胞表位的氨基酸序列中的亚区。典型的T-细胞表位“集簇”的长度约9至约30个氨基酸,考虑到它们与多个等位基因的亲和力以及跨越多个9-mer框架,其可在任何位置包含约4至约40个推定T细胞表位。对于各鉴定的表位簇,通过总和推定T细胞表位分数并减去基于候选表位簇长度的矫正因子和随机生成的相同长度集簇的预期分数计算聚集

EpiMatrix 分数。大于 +10 的 EpiMatrix 集簇评分被认为是显著性的。

[0086] 许多最具有反应性的 T 细胞表位簇包含被称作“EpiBar”的特征。EpiBar 为预期与至少四个不同 HLA 等位基因具有反应性的单个 9-mer 框架。包含 EpiBar 的序列包括流感血凝素 307-319 (集簇评分 18)、破伤风毒素 825-850 (集簇评分 16) 和 GAD65 557-567 (集簇评分 19)。在另一实施方案中,本发明肽可包括一个或多个 EpiBar。

[0087] (4) 本发明 Tregitopes 可以至少中等亲和力 (例如,在基于可溶 HLA 分子的 HLA 结合测定法中  $IC_{50} < 200 \mu M$ ) 结合至少一个并优选两个或更多普通 HLA II 类分子。

[0088] (5) 本发明 Tregitopes 可在至少一个并在优选的实施方案中为两个或多个 HLA 等位基因的情况下被 APCs 递呈至细胞表面。

[0089] (6) 在这一情况下,Tregitope-HLA 复合物可被具有特异于 Tregitope-HLA 复合物的 TCRs 并在正常对照受试者中循环的预存调节性 T 细胞群识别。Tregitope-HLA 复合物的识别可引起匹配调节性 T 细胞的活化并分泌调节性细胞因子和趋化因子。

[0090] (7) 具有本发明 Tregitope 的刺激调节性 T 细胞引起一种或多种以下细胞因子和趋化因子的分泌增加:IL-10、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 MCP1。调节性细胞因子和趋化因子分泌的增加是调节性 T 细胞的标志。

[0091] (8) 被本发明 Tregitope 活化的调节性 T 细胞表达 CD4+CD25+FOXP3 表型。

[0092] (9) 被 Tregitope 活化的调节性 T 细胞直接抑制离体 T- 效应细胞免疫应答,如通过抗原特异性 Th1- 或 Th2- 相关细胞因子 (主要是 INF- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-5) 水平降低以及通过抗原-特异性 T 效应细胞增殖降低 (如通过 CFSE 稀释测定) 所测定。

[0093] (10) 被 Tregitope 活化的调节性 T 细胞直接抑制体内 T- 效应细胞免疫应答,如通过抗原特异性 Th1- 或 Th2- 相关细胞因子 (如 Elisa 测定法测定) 水平降低、抗原-特异性 T 效应细胞水平 (如 EliSpot 测定法测定) 降低和蛋白质抗原的抗体滴度降低所测定。

[0094] (11) 被本发明 Tregitopes 活化的天然调节性 T 细胞刺激适应性  $T_{reg}$  细胞的发育。将外周 T 细胞与本发明 Tregitopes 在抗原存在下共温育引起抗原特异性 CD4+/CD25+ T 细胞的扩增、上调这些细胞上 FOXP3+ 的表达并抑制抗原-特异性 T 效应细胞的体外活化。

[0095] 本发明 Tregitopes 可用于调节对单克隆抗体、蛋白质药物、促进自身免疫应答的自身抗原、变应原、移植组织的免疫应答和其他应用中,其中耐受为期望结果。本发明 Tregitopes 的选择性实施方案总结于实施例 1 的表 2 中。

[0096] 在一个实施方案中本发明 Tregitopes 为如表 2 所述分离的 T 细胞表位。表 2 的 Tregitopes (SEQ ID NOs :4 至 58) 可结合 MHC II 类分子,在 MHC II 类分子情况下黏附 TCR 并活化天然调节性 T 细胞。

[0097] 本发明多肽可纯化至均质或部分纯化。然而应理解的是其中的多肽未纯化至均质的制剂也可用。关键特征为制剂可实现多肽的期望功能,甚至在大量其他组分存在的情况下。因此,本发明涵盖各种等级的纯度。在一个实施方案中,“基本不含细胞物质”包括含有少于约 30% (干重) 其他蛋白质 (例如,污染蛋白)、少于约 20% 其他蛋白质、少于约 10% 其他蛋白质或少于约 5% 其他蛋白质的多肽制剂。

[0098] 当重组生产一种多肽时,它也可以基本不含培养基,例如培养基占多肽制剂体积的少于约 20%、少于约 10% 或少于约 5%。“基本不含化学前体或其他化学物质”包括分离自与其合成相关的化学前体或其他化学物质的多肽制剂。“基本不含化学前体或其他化学

物质”可包括例如含有少于约 30%（干重）化学前体或其他化学物质、少于约 20%化学前体或其他化学物质、少于约 10%化学前体或其他化学物质或少于约 5%化学前体或其他化学物质的多肽制剂。

[0099] 如本文所使用,当氨基酸序列至少约 45-55%、通常至少约 70-75%、更通常至少约 80-85%并更通常大于约 90%或更同源或相同时两个多肽（或多肽的一个区域）为基本同源或相同。为了测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同源性或一致性百分比,将序列比对用于最佳比较目的（例如,可在一个多肽或核酸分子中引入空位用于和另一多肽或核酸分子的最佳比对）。接着比较对应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当一个序列上的一个位点被与另一序列上对应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,那么这些分子在这一位点是同源的。如本文所使用,氨基酸或核酸“同源性”等同于氨基酸或核酸“一致性”。两个序列之间的同源性百分比是这些序列共有相同位点数量的函数（例如,同源性百分比等于相同位点数量 / 总位点数量 × 100）。

[0100] 本发明也涵盖具有较低程度一致性但具有足够的相似性以执行本发明核酸分子编码的多肽所执行的一种或多种相同功能的多肽。相似度由保守氨基酸替换测定。这些替换为用另一性质相似的氨基酸替换多肽中的给定氨基酸。保守替换很可能是表型沉默的。通常被看做保守替换的为在脂肪族氨基酸 Ala、Val、Leu 和 Ile 中的相互替换；羟基残基 Ser 和 Thr 互换,酸性残基 Asp 和 Glu 交换,酰胺残基 Asn 和 Gln 之间的替换,碱性残基 Lys 和 Arg 之间的交换以及芳香残基 Phe 和 Tyr 之间的替换。对于哪些氨基酸变化可能是表型沉默的指导参见例如 Bowie, J. 等, Science, 247 :1306-1310, 1990。

[0101] 变异体多肽的氨基酸差异可为一个或多个替换、缺失、插入、倒位、融合和截短或这些的任意组合。变异体多肽可具有完整的功能或缺少一个或多个活性的功能。具有完全功能的变异体通常仅包含保守变异或非关键残基或非关键区域中的变异。功能性变异体也可包含相似氨基酸的替换,其不引起或引起不显著的功能变化。或者,这些替换可在一定程度上正向或反向影响功能。非功能性变异体通常包含一个或多个非保守氨基酸替换、缺失、插入、倒位或截短或关键残基或关键区域的替换、插入、倒位或缺失。变异体多肽的若干实例包括于表 2 中。

[0102] 本发明也包括本发明多肽的多肽片段。本发明也涵盖本文所述多肽变异体的片段。如本文所使用,片段包括至少约 5 个连续的氨基酸。可用片段包括保留了多肽的一种或多种生物学活性的片段以及可用作免疫原生成多肽-特异性抗体的片段。生物学活性片段的长度例如约 6、9、12、15、16、20 或 30 个氨基酸。片段可为离散的（不与其他氨基酸或多肽融合）或可在更大的多肽内。数个片段可包括在单个较大的多肽内。在一个实施方案中经设计用于在宿主细胞中表达的片段可具有与多肽片段的氨基端融合的前多肽和多肽原 (pre- and pro-polypeptide) 区以及与片段羧基端融合的附加区域。

[0103] 本发明也提供嵌合或融合多肽。这些包括与具有与该多肽不实质同源的氨基酸序列的异源蛋白或多肽可操作地连接的本发明多肽。“可操作地连接”表示该多肽和异源蛋白质为框架内融合。异源蛋白可与该多肽的 N-端或 C-端融合。在一个实施方案中融合多肽不影响该多肽自身的功能。举例而言,融合多肽可为 GST-融合多肽,其中该多肽序列与 GST 序列的 C-端融合。融合多肽的其他类型包括但不限于酶融合多肽例如  $\beta$ -半乳糖苷酶融合、酵母双杂交 GAL 融合、多聚-组氨酸融合和 Ig 融合。这些融合多肽尤其是多聚-组

氨酸融合或亲和标签融合可辅助重组多肽的纯化。在一些宿主细胞（例如哺乳动物宿主细胞）中，可通过使用异源信号序列增加多肽的表达和 / 或分泌。因此，在另一实施方案中，融合多肽在其 N- 端包含异源信号序列。

[0104] 可通过标准重组 DNA 技术生产嵌合或融合多肽。举例而言，根据常规技术将编码不同多肽序列的 DNA 片段在框架内连接在一起。在另一实施方案中，可通过常规技术包括自动化 DNA 合成仪合成融合基因。或者，可使用锚定引物进行核酸片段的 PCR 扩增，锚定引物可在两个保守核酸片段之间生成互补的突出端，其随后可复性并再次扩增生成嵌合核酸序列 (Ausubel 等., Current Protocols in Molecular Biology, 1992)。此外，可商业购买许多已编码融合部分（例如 GST 蛋白）的表达载体。编码本发明多肽的核酸分子可克隆至表达载体中，这样该融合部分与多肽框架内相连。

[0105] 分离的多肽可纯化自天然表达该多肽的细胞，纯化自经改变可表达该多肽（重组）的细胞，或使用已知的蛋白质合成方法合成。在一个实施方案中，通过重组 DNA 技术生产多肽。举例而言，将编码该多肽的核酸分子克隆至表达载体，将表达载体引入宿主细胞，该多肽表达于该宿主细胞中。接着可通过适当的纯化方案使用标准蛋白质纯化技术从细胞中分离该多肽。

[0106] 本发明也提供编码本发明完整或部分多肽的核酸。本发明核酸分子可插入载体中并用作例如表达载体或基因疗法载体。可通过例如静脉注射、局部给药（美国专利号 5328470）或通过立体定位注射 (Chen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 :3054-3057, 1994) 给予受试者基因疗法载体。基因疗法载体的药物制剂可包括可接受稀释剂中的基因疗法载体或可包括包埋了基因递送载体的缓释基质。或者，当可从重组细胞中生产完整的基因递送载体例如逆转录病毒载体时，该药物制剂可包括一个或多个生产该基因递送系统的细胞。药物组合物可连同使用 说明包含在容器、包装或给药器中。

[0107] 本发明 Tregitopes 可包括等位或序列变异体（“突变体”）或其类似物，或可包括化学修饰（例如 PEG 化、糖基化）。在一个例子中，突变体可提供与 MHC 分子更强的结合。在另一实例中，突变体可导致与 TCRs 更强的结合。在另一实例中，突变体可导致与 MHC 分子和 / 或 TCRs 结合的降低。也包括可以结合但是不允许经 TCRs 的信号传导的突变体。

[0108] 本发明提供 Tregitope 组合物，其为嵌合蛋白组合物。在一个实施方案中，Tregitope 组合物包括连接在一起的第一和第二多肽链，其中第一链包括序列编号 4 至 58 或其任意组合，并且所述第二链包括生物活性分子。在一个实施方案中，生物活性分子选自：免疫原性分子、T 细胞表位、病毒蛋白、细菌蛋白。在一个实施方案中，本发明 Tregitope 组合物包括连接在一起的第一和第二多肽链，其中第一链包括 Fc 区，其中 289-309 区的氨基酸已被改变从而不与 MHC II 类分子结合，并且所述第二链包括免疫原性分子。

[0109] 一方面本发明提供生产识别至少一部分 SEQ ID NOS :4-58 的调节性 T 细胞系的方法。在一个实施方案中，一个或多个选自 SEQ ID NOS :4-58 的肽与适当的辅料混合。这些组合物可用于预防或治疗有需要的受试者中的炎症，其中和适当的辅料一起局部给予该混合物可减少受试者的炎症。

[0110] 在一个实施方案中，一个或多个选自 SEQ ID NOS :4-58 的肽与抗原或变应原混合。这些组合物可用于在有需要的受试者中诱导对该抗原或变应原的耐受的方法中，其中局部给予与抗原或变应原的混合物可增强受试者对该抗原或变应原的耐受，并且与适当的辅料

一起给予可诱导对该抗原或变应原的耐受。

[0111] 在一个实施方案中,本发明提供编码包括一个或多个选自 SEQ ID NOS :4-58 的 Tregitope 多肽的核酸。在一个实施方案中,本发明提供包括编码一个或多个选自 SEQ ID NOS :4-58 的 Tregitope 多肽的核酸的载体。在一个实施方案中,本发明提供包括本发明载体的细胞。该细胞可为哺乳动物细胞、细菌细胞、昆虫细胞或酵母细胞。

[0112] 克隆 Tregitope 特异 T 细胞

[0113] 可根据本领域技术人员已知的技术进行 Tregitope 特异 T 细胞的克隆。举例而言,用包含 20% HSA 的 RPMI 培养基中 10  $\mu$ g/ml Tregitopes 刺激分离的 PBMCs。从第 5 天开始每隔一天加入 IL-2 (终浓度为 10U/ml)。在第 11 或 12 天用四聚体库染色 T 细胞。对于每一库,将 2-3 $\times 10^5$  个细胞与 0.5mg PE- 标记的四聚体在 50ml 培养基 (10mg/ml) 中于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 至 2 小时,然后用抗 -CD4-FITC (BDPharMingen, San Diego, CA) 于室温下染色 15 分钟。在 Becton Dickinson FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 上洗涤并分析细胞。产生载有对应的单个肽的四聚体用于给出阳性染色的库,并在第 14 或 15 天进行分析。对特定四聚体是阳性的细胞为在同一天或第二天用 Becton Dickinson FACSVantage (San Jose, CA) 分拣至 96- 孔 U- 形底培养板的单个细胞。用每孔 1.5-3 $\times 10^5$  个不匹配的、经辐射 (5000rad) 的 PBMC 作为饲养细胞并在 24 小时后加入 2.5mg/ml PHA 和 10U/ml IL-2 扩增已分拣的细胞。通过用四聚体染色 (载有同源肽或对照肽, HA307-319) 和用 10mg/ml 特异肽进行 T 细胞增殖测定 (Novak, E. 等, J. Immunol., 166 :6665-6670, 2001) 验证已克隆 T 细胞的特异性。

[0114] Tregitope 组合物的应用方法

[0115] 一方面本发明提供使用 Tregitope 用于设计小分子的方法。在本发明一个方法中,用小分子混合物库以 1  $\mu$ g/ml 的浓度刺激 Tregitope 特异 T 细胞三次并用自体树突状细胞 (DC) 以两周间隔刺激,接着用异源 DC 和抗原刺激。在圆底 96- 板的每孔中加入 T 细胞 (1.25 $\times 10^5$ ) 和 DC (0.25 $\times 10^5$ )。通过添加含有 50ml FCS (HyClone)、青霉素和链霉素 (GIBCO) 的 500ml RPMI 培养基 1640 ;20mM Hepes (GIBCO) ;和 4ml 1N NaOH 溶液制备 T 细胞培养基。IL-2 浓度起始为 0.1nM 并在之后的几轮刺激中逐渐增加至 1nM。通过用 0.6 $\times 10^5$  个 Epstein-Barr 病毒转化的 B 细胞 (100 Gray) 和 1.3 $\times 10^5$  个异源外周血单核细胞 (33 Gray) 作为饲养细胞以及包含 2nM IL-2 培养基中的 1  $\mu$ g/ml 植物凝集素 (Difco) 有限稀释而衍生 T 细胞克隆。接着以单个分子检测刺激 Tregitope 特异 T 细胞的小分子库。

[0116] 一方面本发明提供使用 Tregitopes 用于克隆 T 细胞受体的方法。用 RNeasy Mini Kit (Qiagene) 从如上所述生成的 Tregitopes 特异 T 细胞系中萃取总 RNA。通过 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 法 (GeneRacer Kit, Invitrogen) 将一毫克的总 RNA 用于克隆 TCR cDNAs。在合成单链 cDNA 之前, RNA 为脱磷酸化的、脱帽的并根据 5' RACE GeneRacer Kit 的使用说明与 RNA 寡聚核苷酸连接。用 SuperScript II RT 和 GeneRacer Oligo-dT 逆转录 RNA 寡聚核苷酸连接的 mRNA 至单链 cDNAs。使用 GeneRacer 5' (GeneRacer Kit) 作为 5' 引物和基因-特异引物 TCR $\alpha$  (5' -GTT AAC TAG TTC AGC TGG ACC ACA GCCGCA GC-3' ; SEQ ID NO :64) 或 TCR $\beta$ 1 (5' -CGG GTT AAC TAGTTC AGA AAT CCT TTC TCT TGA CCA TGG C-3' ; SEQ ID NO :65), 或 TCR $\beta$ 2 (5' -CTA GCC TCT GGA ATC CTT TCT CTT G-3' ; SEQ ID NO :66) 分别作为 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$ 1 或  $\beta$ 2 链的 3' 引物进行 5' RACE。将聚合酶链式反应 (PCR) 产

物克隆至 pCR2.1 TOPO 载体 (Invitrogen) 并接着转化至 One Shot TOP10 感受态大肠杆菌 (Invitrogen)。从 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  1 和  $\beta$  2 链的各构建体的 96 个单个克隆制备质粒 DNAs。测序所有质粒的全长插入物以确定  $v\alpha/v\beta$  应用 (Zhao, Y. 等, *J. Immunother.*, 29 :398-406, 2006)。

#### [0117] 药物制剂

[0118] 本发明提供治疗患有医学病症的受试者的方法,其包括与药学可接受载体或辅料一起给予治疗有效量的 Tregitope。本发明 Tregitope 可并入适于给药的药物组合物中。该药物组合物通常包括至少一种 Tregitope 和适于给予受试者的形式的药学可接受载体。药学可接受载体部分取决于所给予的具体组合物以及用于给予该组合物的具体方法。因此,许多适当的药用组合物制剂可用于给予 Tregitope 组合物 (参见,例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 第 18 版, 1990)。药用组合物通常配制成无菌的,基本等渗的并完全符合美国食品药品监督管理局的所有优良操作规范 (GMP) 章程。

[0119] 当指组合物、载体、稀释剂和试剂时,术语“药学可接受的”、“生理耐受的”及其语法变体可互换使用并表示可给予受试者而不产生禁止给予该组合物程度的不良生理学作用的材料。“药学可接受的辅料”指例如可用于制备基本安全、无毒并有利的药用组合物的辅料,并且包括可用于兽用和人用药物用途的辅料。这些辅料可为固体、液体、半固体或如果是气雾剂组合物时为气体。本领域普通技术人员可确定给予具体药物和本发明组合物的适当时间、顺序和剂量。

[0120] 这些载体或稀释剂的优选实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和 5% 人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水溶媒例如非挥发油。将这些介质和化合物用于药学活性物质为本领域熟知。除非任何常规介质或化合物均与 Tregitope 不相容,可考虑其在组合物中的用途。也可将附加活性物质并入该组合物中。

[0121] 本发明组合物配制成与其预期给药途径相容。本发明 Tregitope 组合物可经肠胃外、局部、静脉内、口腔、皮下、动脉内、皮内、经皮、直肠、颅内、腹膜内、鼻内;阴道;肌肉内途径或作为吸入剂给药。在本发明的一些实施方案中,直接将药物注入沉积物可聚积的特定组织中,例如颅内注射。肌肉内注射或静脉内输注为 Tregitope 的优选给药方式。在一些方法中将本发明特定 Tregitope 直接注入颅内。在一些方法中本发明 Tregitope 作为缓释组合物或装置例如 Medipad™ 装置给药。

[0122] 本发明 Tregitope 可任选与至少部分有效地治疗本文所述各种医学病症的其他药剂联合给药。在给药至受试者的中枢神经系统时,本发明 Tregitope 也可与可增强本发明药剂通过血脑屏障的其他药剂联合给药。

[0123] 用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或混悬液包括以下组分:无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、非挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌化合物例如苯甲醇或尼泊金甲酯;抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合化合物例如乙二胺四乙酸 (EDTA);缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的化合物例如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱调 pH,例如盐酸或氢氧化钠。辅料的实例可包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米粉、面粉、白垩、硅胶、水、乙醇、DMSO、甘油、丙烯、脱脂奶粉等。该组合物也可包含 pH 缓冲剂和润湿或乳化剂。

[0124] 肠胃外制剂可包含于玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量管形瓶中。

[0125] 适用于注射的药用组合物包括无菌水溶液（当为水溶性时）或分散剂和无菌粉末用于临时制备无菌注射液或分散体。对于静脉内给药，适当的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, N. J.) 或磷酸盐缓冲液 (PBS)。在所有情况下，该组合物为无菌的并且流动性应达到通针性良好的程度。它在生产和保存条件下是稳定的并经防腐处理以避免微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可为溶剂或分散介质，包含例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）及其适当的混合物。例如可通过使用包衣例如卵磷脂，通过在分散体中维持所要求的粒径并通过使用表面活性剂维持适当的流动性。防止微生物的作用可通过许多抗菌和抗真菌化合物达成，例如尼泊金、三氯叔丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下优选在组合物中包括等渗化合物例如糖类、多元醇类例如甘露醇、山梨醇、氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的化合物例如单硬脂酸铝和明胶达到可注射组合物的长效吸收。

[0126] 可将适当溶剂中的要求量的 Tregitope 与一种或多种上文所列成分按需要合并，接着过滤除菌制备无菌注射液。通常将粘合剂并入包含基础分散介质和要求的上文所列其他成分的无菌溶媒中制备分散体。对于制备无菌注射液的无菌粉末，制备方法为真空干燥和冷冻干燥，其可得到活性成分和之前无菌过滤溶液的任何其他要求成分的粉末。本发明药剂可以配制成允许活性成分缓释或脉动释放方式的储库注射剂 (depot injection) 或植入物制剂形式给药。

[0127] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。它们可包被于明胶胶囊中或压制成片。对于口服治疗给药目的，可将粘合剂与辅料合并并用于片剂、糖锭或胶囊形式中。也可使用用于漱口剂的流体载体制备口服组合物，其中将流体载体中的化合物应用于口腔，漱口并吐出或吞咽。也可包括药学相容性粘合化合物和 / 或辅料作为组合物的一部分。片剂、药丸、胶囊、糖锭等可包含任何以下成分或具有相似性质的化合物：粘合剂例如微晶纤维素、西黄蓍胶或明胶；辅料例如淀粉或乳糖，崩解化合物例如褐藻酸、Primogel 或玉米淀粉；润滑剂例如硬脂酸镁或 Sterotes；助流剂例如胶体二氧化硅；甜味化合物例如蔗糖或糖精；或芳香化合物例如薄荷、水杨酸甲酯或柑桔香精。

[0128] 对于吸入给药，可从加压容器或包含适当抛射剂例如气体如二氧化碳的给药器或喷雾器以气雾剂形式给予 Tregitope(s)。

[0129] 全身给药也可为经粘膜或经皮方式。对于经粘膜或经皮方式给药，在制剂中使用适用于待渗透屏障的渗透剂。这些渗透剂通常为本领域已知并包括例如用于经粘膜给药的去污剂、胆盐和夫西地酸衍生物。可通过使用鼻喷雾剂或栓剂完成经粘膜给药。对于经皮给药，将 Tregitope 配制于软膏、油膏、凝胶或乳膏中并应用于局部或经本领域一般熟知的经皮贴剂技术应用。

[0130] Tregitope 也可制备为用于直肠给药的栓剂（例如用常规的栓剂基质例如可可脂和其他甘油酯）或保留灌肠剂形式的药用组合物。

[0131] 在一个实施方案中，用可防止 Tregitope 被人体快速清除的载体制备 Tregitope，例如控释制剂，包括植入物和微囊化给药系统。可使用可生物降解的、生物相容性聚合物，例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、多正酯类和聚乳酸。制备这些制剂的方法对本领域技术人员是显而易见的。也可从 Alza Corporation 和 NovaPharmaceuticals, Inc 商

业购买这些材料。脂质体混悬剂（包括用抗病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体）也可用作药物可接受载体。这些可通过本领域技术人员已知的方法制备（美国专利号 4522811）。Tregitopes 或嵌合蛋白可植入生物聚合物固相载体或与其连接，其允许 Tregitopes 或嵌合蛋白缓慢释放至期望位点。

[0132] 将口服或肠胃外组合物以剂量单位形式配制以便于给药和计量均一性是尤其有利的。如本文所使用剂量单位形式指适用做被治疗受试者单一剂量的物理不连续单位；各单位包含经计算可与所要求药物载体一起产生期望疗效的预定量的粘合剂。本发明剂量单位形式的规格取决并直接依赖于粘合剂的独特特性和要达到的具体疗效以及配制该 Tregitope 用于治疗受试者的技术固有的限制。

[0133] 预防和治疗医学病症的方法

[0134] 本发明涉及例如治疗一种或多种医学病症的方法，其包括给予本发明 Tregitope 或嵌合蛋白，藉此治疗医学病症。医学病症可为例如原发性免疫缺陷；免疫介导的血小板减少症、川崎病、20 岁以上患者中的造血干细胞移植、慢性 B- 细胞淋巴细胞性白血病和儿童 I 型 HIV 感染。具体实例包括：（血液学）再生障碍性贫血、单纯红细胞再生障碍、戴 - 布二氏贫血、自身免疫性溶血性贫血、新生儿溶血、获得性因子 VIII 抑制剂、获得性冯·威利布兰德病、免疫介导中性粒细胞减少症、血小板输注无效、新生儿同种免疫 / 自身免疫血小板减少症、输血后紫癜、血栓性血小板减少性紫癜 / 溶血尿毒综合征；（感染性疾病）其中患有感染性疾病的是有害的病症包括低出生体重（例如，< 1500g）、实体器官移植、手术、创伤、烧伤和 HIV 感染；（神经学）癫痫和儿童顽固性格林 - 巴利综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、重症肌无力、Lambert-Eaton 肌无力综合症、多灶性运动神经病、多发性硬化症；（产科学）反复妊娠丢失；（肺病学）哮喘、慢性胸症状（chronic chest symptoms）；风湿病学，类风湿性关节炎（成人和青少年）、全身性红斑狼疮、全身血管炎、皮炎、多发性肌炎、包涵体肌炎、韦格纳肉芽肿病；（混合性）脑白质肾上腺萎缩症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、白塞综合症、急性心肌病、慢性疲乏综合症、阻塞型心脏传导阻滞、囊性纤维病、自身免疫脓疱性皮肤病、糖尿病、急性特发性家族性自主神经机能异常、急性播散性脑脊髓炎、内毒素血症、溶血性输血反应、噬血细胞综合症、急性成淋巴细胞性白血病、下位运动神经元综合症、多发性骨髓瘤、人 T 细胞淋巴营养性病毒 -1- 相关脊髓病、肾炎综合症、膜性肾病、肾病综合症、甲状腺功能正常型眼病、眼阵挛 - 肌阵挛、复发性中耳炎、副肿瘤性小脑变性、副蛋白血症性神经病、细小病毒感染（全身）、多发性神经病，器官巨大症，内分泌病，M- 蛋白质和皮肤改变（POEMS）综合症、进行性腰骶神经丛病、Lyme 神经根神经炎、Rasmussen 综合症、莱特尔综合症、急性肾功能衰竭、血小板减少症（非免疫的）、链球菌中毒性休克综合症、眼色素层炎和伏格特 - 小柳 - 原田三氏综合症。

[0135] 在具体的实施方案中，本发明涉及例如治疗变态反应、自身免疫疾病、移植相关疾病例如移植物抗宿主病、酶或蛋白质缺乏症、凝血障碍、癌症、不育或感染（病毒、细菌或寄生虫）的方法。本发明 Tregitopes 或嵌合蛋白可与其他用于治疗患有医学病症的受试者的蛋白质化合物联合使用以减少不良事件或增加联合给予化合物的药效。

[0136] 应用于变态反应。变应原 - 特异性调节性 T 细胞在控制变态反应和哮喘的发展中发挥重要作用。天然 CD4/CD25 调节性 T 细胞和第二  $T_{Reg}$ （抗原特异性调节性 T 细胞），二者均表达转录因子 FOXP3，已显示可抑制变应性疾病中的不适当免疫应答。一些近期的研究

表明调节性 T 细胞在控制易感个体（不仅是动物模型而且在人体中）中 T- 辅助细胞 2 型为主的免疫应答的过度发展。近期研究表明 T 调节性细胞也通过分泌 TGF- $\beta$  和 IL-10 抑制 T 细胞协同刺激,表明 T 调节性细胞在调节变应性疾病中的重要作用。天然或适应性调节性 T 细胞扩增受损可导致变态反应的发生,诱导变应原 - 特异性调节性 T 细胞的治疗可提供变态反应和哮喘的治愈性治疗。

[0137] 用于预防和治疗哮喘的一种策略为诱导调节性 T 细胞。可通过免疫刺激引起 Th1 或 Tr 应答防止动物产生哮喘。

[0138] 应用于移植。本发明 Tregitopes 可用于诱导移植过程中的耐受,其方式为促进特异下调对供体细胞免疫应答的细胞的发育。诱导抗原 - 特异性  $T_{Reg}$  细胞用于治疗器官特异性自身免疫是重要的治疗学发展,避免了全身免疫抑制。在骨髓移植的鼠类模型中, $T_{Regs}$  促进供体骨髓移植并降低移植抗宿主病的发病率和严重性而不取消有益的移植抗肿瘤免疫作用。这些发现,与小鼠和人类中的  $T_{Regs}$  共享表型和功能特性的观察一致,已引起对使用这些细胞减少与造血细胞移植相关并发症的积极研究。 $T_{Regs}$  和效应 T 细胞的失调促进移植抗宿主病的发展。然而,免疫调节的机制,尤其是  $T_{Regs}$  的同种识别性质,它们对其他免疫细胞的作用和相互作用以及它们抑制活性的位点还是未知。

[0139] 来自人和实验动物模型的累积证据已表明  $T_{Regs}$  参与移植抗宿主病 (GVHD) 的发展。 $T_{Regs}$  可将 GVHD 从移植抗肿瘤 (GVT) 活性分离的例证表明可操控它们的免疫抑制潜能以减少 GVHD 而对 GVT 作用无有害影响。尽管已报导了多种具有免疫抑制能力的 T 淋巴细胞,但是两个研究最充分的亚群为天然存在的、胸腺内生成的  $T_{Regs}$  (天然  $T_{Regs}$ ) 和外周生成的可诱导  $T_{Regs}$  (可诱导  $T_{Regs}$ )。

[0140] 应用于自身免疫。Tregitopes 可用作免疫原性化合物 (蛋白质药物) 的耐受剂。这一发现对蛋白质药物的设计具有意义。因此,与 Tregitopes 联合给予单克隆抗体、自体细胞因子或外源蛋白可抑制不良 T 效应细胞免疫应答。在体内,  $T_{Regs}$  通过树突状细胞限制自身反应性 T 细胞活化,因此防止它们分化和获得效应细胞功能。通过限制提供活化的致病细胞,  $T_{Regs}$  防止或减缓自身免疫疾病的进展。然而这一保护性机制对自身免疫个体而言是不足的,很可能因为缺少  $T_{Regs}$  细胞和 / 或  $T_{Reg}$ - 抗性致病 T 细胞在长期疾病进程中的发展和积累。因此,这些患者中自身耐受的恢复需要清除致病 T 细胞并同时输注控制现行组织损伤能力增强的  $T_{Regs}$ 。器官特异性自身免疫疾病例如甲状腺炎和胰岛素依赖型糖尿病已归因于这一耐受机制的瓦解。

[0141] 应用于糖尿病。I 型 (少年) 糖尿病为器官特异性自身免疫疾病,由产生胰岛素的胰岛  $\beta$  细胞破坏引起。在非糖尿病患者中,胰岛细胞抗原 - 特异性 T 细胞或在胸腺发育中被清除或被转化成可积极抑制对胰岛细胞抗原的效应细胞应答的 T 调节性细胞。在少年糖尿病患者中中和少年糖尿病的 NOD 小鼠模型中,缺失这些耐受机制。在它们缺失的情况下,胰岛细胞抗原由人白细胞抗原 I 和 II 类分子递呈并被 CD8(+) 和 CD4(+) 自身反应性 T 细胞识别。这些自身反应性细胞对胰岛细胞的破坏最终导致葡萄糖耐受不良。同时给予 Tregitopes 和胰岛细胞抗原导致天然 T 调节性细胞的活化和现有的抗原特异效应 T 细胞转化至调节性表型。这样改变了有害的自身免疫应答导致对抗原特异性适应性耐受的诱导。通过诱导抗原 - 特异性耐受调节对自体表位的自身免疫应答可预防现行的  $\beta$  - 细胞破坏。因此,本发明 Tregitope 可用于预防或治疗糖尿病的方法中。

[0142] 应用于乙肝病毒 (HBV) 感染。慢性 HBV 通常为获得性 (由母体胎儿传播) 或在罕见情况下为成人急性 HBV 感染的结果。慢性乙肝 (CH-B) 急剧加重通常伴随着对乙肝核心抗原和 e 抗原 (HBcAg/HBeAg) 细胞毒性 T 细胞应答的增强。在近期的研究中, SYFPEITHI T 细胞表位定位系统可用于预测 HBcAg 和 HbeAg 的 MHC II 类 - 限制性表位肽。使用高分评分肽构建 MHC II 类四聚体并用于测定  $T_{Reg}$  和 CTL 频率。结果显示在加重过程中特异于 HBcAg 的  $T_{Reg}$  细胞减少, 伴随着 HBcAg 肽 - 特异细胞毒性 T 细胞的增加。在耐受期, 鉴定 FOXP3<sup>-</sup> 表达  $T_{Reg}$  细胞克隆。这些数据表明 HbcAg  $T_{Reg}$  T 细胞的减少解释了慢性乙肝病毒感染自然进程上的自发加重。因此, 本发明 Tregitope 可用于预防或治疗病毒感染例如 HBV 感染的方法中。

[0143] 应用于 SLE。已确定了在系统性红斑狼疮 (SLE) 或干燥综合征 (Sjögren's syndrome) 中发挥重要作用的 TReg 表位。该肽包括剪接体蛋白的残基 131-151 (RIHMVYSKRSGKPRGYAFIEY ;SEQ IDNO :67)。可溶性 HLA II 类分子的结合测定法和分子建模实验表明该表位表现为混合表位并结合至一大组人 DR 分子。与普通 T 细胞和来自非 - 狼疮自身免疫患者的 T 细胞相反, 来自 40% 随机筛选的狼疮患者的 PBMCs 包含响应肽 131-151 而增殖的 T 细胞。配体的改变修饰了 T 细胞应答, 表明存在响应该肽的数个 T 细胞种群, 其中有 TReg 细胞。也确定了干燥综合症中的 T 调节性表位。因此, 与上述表位联合给予的本发明 Tregitope 可用于预防和治疗 SLE 的方法中。

[0144] 应用于格雷夫斯病 (Graves' Disease)。格雷夫斯病是以自身促甲状腺激素受体 (TSHR) 的抗体为特点的自身免疫疾病, 导致甲状腺功能亢进或从甲状腺非正常地强烈释放激素。若干遗传因素可影响对格雷夫斯病的易感性。女性比男性更容易感染该疾病; 白人和亚洲人比黑人的风险更高并且 HLA DRB1-0301 与该疾病密切相关。因此, 联合给予本发明 Tregitope (s) 和 TSHR 或其他格雷夫斯病的抗原或其部分可用于预防和治疗格雷夫斯病的方法中。

[0145] 应用于自身免疫性甲状腺炎。自身免疫性甲状腺炎为对自身甲状腺过氧化酶和 / 或甲状腺球蛋白产生抗体时发生的疾病, 其引起甲状腺滤泡的逐渐破坏。HLA DR5 与该疾病紧密相关。因此, 联合给予本发明 Tregitope 和甲状腺过氧化酶和 / 或甲状腺球蛋白 TSHR 或其部分可用于预防和治疗自身免疫性甲状腺炎的方法中。

[0146] 应用于疫苗载体的设计。靶向树突状细胞表面受体 DEC-205 的单克隆抗体已显示作为可靶向疫苗抗原至树突状细胞的疫苗载体的潜能。然而抗 -DEC-205 可成功作为强炎性免疫应答的刺激剂依赖于联合给予非特异树突状细胞成熟因子。当它们不存在时, 抗 -DEC-205 诱导抗原 - 特异性耐受而不是免疫。因此, 包含于抗 -DEC-205 的调节性 T 细胞表位可促进致耐受性反应, 其只有通过联合给予非特异性免疫刺激剂才可克服。这一点已被试验验证, 也就是说包含于抗 -DEC-205 载体中的 Tregitopes 引起调节性 T 细胞的抗原特异性扩增并抑制炎性免疫应答。修饰这些 Tregitopes 这样它们不再结合 MHC 分子将显著降低致耐受性, 使得可将抗 -DEC-205 用作消除免疫系统非特异性活化相关危险的有效的独一无二的抗原递送系统。

[0147] 试剂盒

[0148] 例如可通过使用包括至少一种本发明 Tregitopes 组合物的预包装试剂盒实施本文所述方法, 其可方便地用于例如临床环境治疗显示本文所述医学病症症状或家族史的受

试者。在一个实施方案中,该试剂盒进一步包括至少一种本发明 Tregitopes 组合物的使用说明以治疗显示本文所述医学病症症状或家族史的受试者。

[0149] 用 Tregitopes 离体扩增 T- 调节性细胞

[0150] 在另一方面,本发明提供离体扩增调节性 T 细胞的方法。在一个实施方案中,本发明提供扩增生物样品中调节性 T 细胞的方法,该方法包括:(a) 提供来自受试者的生物样品;(b) 从生物样品中分离调节性 T 细胞;以及将分离的调节性 T 细胞与有效量的本发明 Tregitope 组合物在 T- 调节性细胞数量增加得到扩增的调节性 T 细胞组合物的条件下接触,藉此扩增生物样品中的调节性 T 细胞。在一个实施方案中,该方法进一步包括给予受试者扩增的调节性 T 细胞组合物的步骤。在一个实施方案中,给予了扩增的调节性 T 细胞组合物的受试者(例如通过自体移植扩增的调节性 T 细胞组合物)为获得原始生物样品的相同个体(Ruitenber, J. 等, *BMC Immunol.*, 7 :11, 2006)。

[0151] Tregitope 组合物的体外应用

[0152] 在另一方面,本发明提供使用本发明 Tregitope 组合物作为在体外实验模型中研究调节性 T 细胞功能的试剂。在一个实施方案中,本发明提供刺激生物样品中调节性 T 细胞的体外方法,该方法包括:(a) 提供来自受试者的生物样品;(b) 从生物样品中分离调节性 T 细胞;以及将分离的调节性 T 细胞与有效量的本发明 Tregitope 组合物在 T 调节性细胞被刺激而改变一种或多种生物功能的条件下接触,藉此刺激生物样品中的调节性 T 细胞。在一个实施方案中,本发明提供测定 Tregitope 与调节性 T 细胞或其片段结合的体外方法。

[0153] 下文的实施例不应理解为以何方式限制本发明范畴。就本公开而言,本文权利要求范围内的许多实施方案对于本领域普通技术人员而言是显而易见的。

[0154] 例证

[0155] 将 Tregitopes(1) 用 T 细胞表位定位算法 EpiMatrix 鉴定,(2) 验证其结合至可溶性 HLA,(3) 证明其与天然调节性 T 细胞黏附,(4) 证明其离体(在人 PBMC 中)抑制对联合给予抗原的免疫应答和(5) 证明其体内(在小鼠中)抑制对联合给予抗原的免疫应答。这些发现的方法列于下文,后面为对应的结果。

[0156] (1) 鉴定 T 细胞表位和 T 细胞表位集簇的方法

[0157] T 细胞特异识别由抗原递呈细胞(APCs) 在 MHC(主要组织相容性复合物) II 类分子情况下递呈的表位。可以包括 7 至 30 个连续氨基酸并适合 MHC II 类分子结合沟槽的线性序列递呈这些 T- 辅助细胞表位。已开发一些计算机算法并用于检测各种来源蛋白质分子中的 II 类表位(De Groot, A. 等, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 13 :539-541, 1997; Schafer, J. 等, *Vaccine*, 16 :1880-1884, 1998; De Groot, A. 等, *Vaccine*, 19 :4385-95, 2001; De Groot, A. 等, *Vaccine*, 21 :4486-504, 2003)。这些对 T- 辅助细胞表位的“计算机算法(in silico)”预测已成功应用于疫苗设计和治疗性蛋白的去免疫性。

[0158] EpiMatrix 系统为预测 I 类和 II 类表位的工具。该算法使用预测结合 HLA 分子的 9- 和 10-mer 肽的矩阵。各矩阵以与氨基酸结合亲和力(由与口袋谱型法(pocket profile method)(Sturniolo, T. 等, *Nat. Biotechnol.*, 17 :555-561, 1999) 相似但是不相同的方法阐明)相关的位置特异性系数为基础。EpiMatrix 系统已用于前瞻性预测大量的已在体外或体内经过验证的表位。首先将任何给定序列的完整氨基酸分割成重叠的 9-mer 框架,其中各框架与上一个重叠八个氨基酸。就其与八个普通 II 类 HLA 单倍型(DRB1\*0101、

DRB1\*0301、DRB1\*0401、DRB1\*0701、DRB1\*0801、DRB1\*1101、DRB1\*1301 和 DRB1\*1501) 的预测亲和力和给各框架评分。由于它们的普遍性和它们之间的差异,这些 8 个等位基因涵盖了约 97% 的世界人群。然后相对于衍生自大量随机生成肽序列的分数分布标准化 EpiMatrix 初始分数。所得“Z”分数通常正态分布并可在等位基因之间直接比较。

[0159] EpiMatrix 肽评分。已测定在 EpiMatrix “Z” 范围中的评分高于 1.64 (约任何给定肽组的前 5%) 的任何肽具有显著的机会与被预测的 MHC 分子结合。在该范围内评分高于 2.32 (前 1%) 的肽极有可能结合;大多数已发表的 T 细胞表位在这一评分范围内。之前研究已证明 EpiMatrix 可准确预测已公开的 MHC 配体和 T 细胞表位。

[0160] 鉴定混合 T 细胞表位簇。表位定位后,筛选 EpiMatrix 算法生成的结果组判断 T 细胞表位簇和 EpiBars 的存在。潜在的 T 细胞表位并不是随机分布在整个蛋白质序列中而是易于“集簇”。T 细胞表位“(集)簇(cluster)”的长度为 9 至约 30 个氨基酸并且,考虑到它们与多个等位基因的亲和力以及跨越多个基因,其在任何位置包含 4 至 40 个结合基序。使用已知为 ClustiMer 的适当算法鉴定推定的 T 细胞表位簇。简略而言,聚集所分析的各 9-mer 肽的 EpiMatrix 分数并根据统计学获得的阈值检查。接着将高分 9-mer 一次延伸一个氨基酸。再次聚集已延伸序列的分数并与修改的阈值比较。重复该过程直至预定的延伸不再提高集簇的整体分数。在本研究中鉴定的 Tregitope(s) 由 ClustiMer 算法鉴定为 T 细胞表位簇。它们包含显著数量的推定 T 细胞表位和 EpiBars,表明 MHC 结合和 T 细胞反应性的巨大潜力。

[0161] (2) 评价肽合成和结合可溶性 MHC 的方法

[0162] 肽合成。可通过直接化学合成或重组方法 (Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) 生产 Tregitopes。通过 New England peptide 的 9- 芴甲氧羰基 (Fmoc) 合成法在自动化 Rainen Symphony/ 蛋白质技术合成仪 (Synpep, Dublin, CA) 上制备对应于本发明 Tregitopes 的肽。经 HPLC、质谱和 UV 扫描 (分别确证纯度、质量和光谱) 验证该肽以纯度 > 80% 递送。

[0163] 所生产肽的结合。将非生物素化的待检测肽重悬于 96- 孔聚丙烯板中至终浓度在 0.1  $\mu$ M-400  $\mu$ M 的范围内,一式三孔。接着在这些孔中加入已纯化重组 HLA II 类分子的在 150mM 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液 (pH 5.4) 中包含 1mM Pefabloc、0.75% 正-辛基-B-D-吡喃葡萄糖苷的溶液至终浓度 200ng/孔。将 96 孔板于 37°C 在 6% CO<sub>2</sub> 中温育 45 分钟。温育后,将生物素化 Fl<sub>u</sub> HA 肽 307-319 (或另一适当的对照肽) 加入至终浓度 0.1  $\mu$ M/孔并 37°C 温育 20 小时。接着将各孔的内容物加入预先包被了抗-人 HLA-DR L243 捕获抗体 (Becton Dickinson) 的 96- 孔高结合 ELIS 板中并于 4°C 温育 20 小时。接着向各孔中加入 100  $\mu$ l (10  $\mu$ g/ml) 钼-标记链霉亲和素 (Perkin-Elmer) 和 100  $\mu$ l 富集缓冲液 (Perkin-Elmer) 显色。在室温下于暗处使反应进行 15-30 分钟并接着在 Wallac Victor 3-V 时间分辨荧光免疫分析仪上测定荧光。通过使用 SigmaPlot 分析程序用非线性回归分析计算 IC<sub>50</sub> 值。基于与已知肽的比较,250  $\mu$ M 或更大的 IC<sub>50</sub> 指示弱结合并且 400  $\mu$ M 或更大的 IC<sub>50</sub> 指示无结合相互作用。

[0164] (3) 评价肽黏附天然调节性 T 细胞能力的方法

[0165] T 细胞分离。本研究方案涉及从 Rhode Island Blood Bank, Providence 获得的捐赠血液,来自 Clinical Partners, Johnston, Rhode Island 招募的志愿者的血液,从

Stauergenes, Paris, France 招募的志愿者获得的血液以及从供应商获得的样品。遵循联邦指南以及 Stallergenes 和 EpiVax 机构政策获得供体血液。获得供体血液的方案经各自机构审查委员会的批准。根据 Accuspin 方案 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 分离外周血单核细胞。尘螨过敏性个体的冷藏 PBMC 获自 Cellular Technologies Ltd. (Cleveland, Ohio)。

[0166] 天然 Treg 测定法。在单独破伤风毒素肽 TT<sub>830-844</sub>、单独 Tregitope、单独植物凝血素 (促有丝分裂阳性对照) 存在下或无刺激物条件下离体直接刺激人 PBMCs 4 天。用抗 -CD4-FITC (克隆 RPA-T4 ;eBioscience) 和抗 -CD25-APC (克隆 BC96 ;eBioscience) 抗体在冰上在流式染色缓冲液 (eBioscience) 中将  $1 \times 10^6$  个细胞染色 30 分钟并用缓冲液洗涤两次。细胞表面染色后, 根据使用手册将细胞固定并透化处理 (eBioscience), 并对 FOXP3 (克隆 PCH101 ;eBioscience) 胞内染色。在不同培养条件下 FOXP3 阳性 CD4+/CD25+T 细胞的频率由 Flowjo 分析软件列出。CD4+CD25+ 表达的增加指示 T 细胞活化, 当伴随 FOXP3 表达增加时指示被活化的细胞为调节性的。

[0167] (4) 评价肽离体抑制对联合给予抗原的应答能力的方法

[0168] 旁观者抑制测定法。将分离的 PBMCs 在单独免疫原性抗原或该抗原和 Tregitope 肽存在下于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养 8 天。将待测抗原以  $10 \mu\text{g/ml}$  加入并包括 1) 典型抗原例如破伤风毒素肽 TT<sub>830-844</sub>、流感血凝素肽 307-319、牛痘肽表位和 CEF 阳性对照肽库 (网站 aidsreagent.org 的 NIH AIDS Research & Reference Reagent Program ;Currier, J. 等 1., J. Immunol. Methods, 260 :157-72, 2002 ;Mwau, M. 等, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 18 : 611-8, 2002), 2) 蛋白质药物例如肉毒杆菌神经毒素 A、自体自身抗原例如促甲状腺激素和补体组分 Csd。待测抗原也包括变应原 :白桦树花粉抗原 Betv1、屋尘螨裂解物和经纯化的屋尘螨抗原 Der P2。在第 2 天将重组 IL-2 ( $10\text{IU/ml}$ ) 和 IL-7 ( $20\text{ng/ml}$ ) 加入 PBMC 培养物中。刺激 8 天后收获细胞并用 PBS 洗涤数次并根据下文描述的人细胞因子释放测定法测定。

[0169] 人 IFN- $\gamma$  ELISpot。用购自 Mabtech 的人 IFN- $\gamma$  ELISpot 试剂盒进行 IFN- $\gamma$  ELISpot 测定。以  $10 \mu\text{g/ml}$  将目标肽加入包含 250000 个人外周血单核细胞 (在含 10% 人血清的 RPMI1640 中) 的一式三份重复孔 中并于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  气氛下温育十八至二十二小时。在一式三份重复孔中加入  $10 \mu\text{g/ml}$  的 PHA。六个不含肽的孔用于背景测定。如果经 Mann-Whitney U 检测肽检测孔中的斑点数量与对照孔具有统计学差异 ( $p < 0.05$ ) 则认为是阳性应答。一般而言, 如果斑点数量至少为背景的四倍并且每一百万细胞超过背景大于 50 个斑点 (每 20000 个脾细胞有 1 次应答超过背景) 则认为是阳性应答。结果记录为高于背景的平均斑点数并调节至每一百万接种细胞的斑点数。当测定为统计学显著时, 10% 或更大的抑制率被认为是统计学显著的。

[0170] 人 IFN- $\gamma$  ELISpot。用购自 Mabtech 的人 IL-4 ELISpot 试剂盒进行 IFN- $\gamma$  ELISpot 测定。以  $10 \mu\text{g/ml}$  将目标肽加入包含 250000 个人外周血单核细胞 (在含 10% 人血清的 RPMI1640 中) 的一式三份重复孔中并于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  气氛下温育十八至二十二小时。在一式三份重复孔中加入  $10 \mu\text{g/ml}$  的 PHA。六个不含肽的孔用于背景测定。如果经 Mann-Whitney U 检测肽检测孔中的斑点数量与对照孔具有统计学差异 ( $p < 0.05$ ) 则认为是阳性应答。一般而言, 如果斑点数量至少为背景的四倍并且每一百万细胞超过背景大于 50 个斑点 (每

20000 个脾细胞有 1 次应答超过背景) 则认为是阳性应答。结果记录为高于背景的平均斑点数并调节至每一百万接种细胞的斑点数。当测定为统计学显著时, 10% 或更大的抑制率被认为是统计学显著的。

[0171] 人 IL-4 ELISpot。用购自 Mabtech 的人 IL-4 ELISpot 试剂盒进行 IL-4 ELISpot 测定。以 10  $\mu$ g/ml 将目标肽加入包含 250000 个人外周血单核细胞 (在含 10% 人血清的 RPMI1640 中) 的一式三份重复孔中并于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 气氛下温育十八至二十二小时。在一式三份重复孔中加入 2  $\mu$ g/mL 的 PHA。六个不含肽的孔用于背景测定。使用变体排列测试 (variant permutation test) (Hudgens, M. 等, J. Immunol. Methods, 288 :19-34, 2004) 进行统计学检测。如果肽检测孔中的斑点数量与对照孔具有统计学差异 ( $p < 0.01$ ) 则认为是阳性应答。一般而言, 如果斑点数量至少为背景的四倍并且每一百万细胞超过背景大于 50 个斑点 (每 20000 个脾细胞有 1 次应答超过背景) 则认为是阳性应答。结果记录为高于背景的平均斑点数并调节至每一百万接种细胞的斑点数。当测定为统计学显著时, 10% 或更大的抑制率被认为是显著的。

[0172] 人 IFN- $\gamma$  ELISASpot。以 10  $\mu$ g/ml 将目标肽加入包含添加了 10% 人血清的 RPMI1640 中人外周血单核细胞的培养物中并于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 气氛下温育十八至二十二小时。用 10  $\mu$ g/mL PHA 刺激或未用肽刺激的培养物作为对照。使用 R&D Systems Quantikine ELISA 试剂盒进行人 IFN- $\gamma$  定量夹心 ELISAs。将特异于 IFN- $\gamma$  的多克隆抗体预包被至 96-孔微量滴定板上。将试剂盒提供的标准品和包括 PHA 的细胞上清样品和无肽对照 (100  $\mu$ l) 加入孔中并且任何存在的 IFN- $\gamma$  被固定化抗体在室温下经 2 小时结合。洗去未结合物质之后, 在孔中加入特异于 IFN- $\gamma$  的酶联多克隆抗体并于室温下温育 2 小时。洗去任何未结合抗体酶试剂后, 在孔中加入底物溶液 30 分钟, 与结合 IFN- $\gamma$  的量成正比显色。停止显色并在 Wallac Victor3 上于 450nm 测定颜色强度。通过从 450nm 值减去 540nm 的强度进行板子光学缺陷的修正。通过 t-检验评价不同试验组之间细胞因子水平的差异。如果在试验和对照孔之间所观察到的细胞因子表达差异有统计学差异 ( $p < 0.01$ ) 则该应答被认为是阳性的。

[0173] 多路人细胞因子 / 趋化因子 ELISA。用 SearchLight multiplexELISA 技术评价 PBMC 培养物上清的细胞因子和趋化因子水平。所测定的人细胞因子包括 IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、TNF $\alpha$  和 TGF $\beta$ 。所测定的人趋化因子包括 MCP-1、MIP-1 $\alpha$  和 MIP-1 $\beta$ 。SearchLight Proteomic Arrays 为定量多路夹心 ELISA, 其包含点样于 96 孔聚苯乙烯微量滴定板底部的多至 16 种不同的捕获抗体。各抗体捕获由生物素化抗体检测的特异蛋白质, 然后加入链霉亲和素-HRP, 最后用电荷耦合装置 (CCD) 照相机检测 SuperSignal ELISAFemto 化学发光底物。通过 t-检验评价不同试验组之间细胞因子水平的差异。如果所观察到的试验和对照孔之间的细胞因子表达差异有统计学差异 ( $p < 0.01$ ) 则该应答被认为是阳性的。

[0174] 细胞分离 / 排除方法。使用 invitrogen dynabeads 系统 (用于人 CD4 和 CD25) 根据使用说明 (Invitrogen, Carlsbad, California) 从 PBMC 中排除或阳性分离人 Treg 细胞群。

[0175] (5) 体内抑制对联合给予抗原的应答的方法

[0176] 为了测定在生命体系中 Tregitopes 对蛋白质 - 诱导的效应细胞应答的免疫抑制

作用,使用鼠类模型进行试验。用单独的抗原、抗原和 tregitope 的混合物或与 tregitope 融合的抗原免疫数组小鼠。也评价阴性对照组(溶剂组)。最后一次注射后一周,根据所有的机构和联邦指南处死小鼠并收获脾。使用新鲜分离的小鼠脾细胞测定体内细胞免疫应答。制备单个脾细胞混悬液并用于下文的测定法中。心脏穿刺获得全血并收集血清用于定量对联合给予抗原的抗体应答。

[0177] 鼠 IFN- $\gamma$  ELISpot. 用购自 Mabtech 的鼠 IFN- $\gamma$  ELISpot 试剂盒进行 IFN- $\gamma$  ELISpot 测定。以 10  $\mu$  g/ml 将目标肽加入包含 300000 个鼠脾细胞(含 10% FCS 的 RPMI1640 中)的一式三份重复孔中并于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 气氛下温育十八至二十二小时。在一式三份重复孔中加入 10  $\mu$  g/mL 的 ConA。六个不含肽的孔用于背景测定。如果经 Mann-Whitney U 检测肽检测孔中的斑点数量与对照孔具有统计学差异( $p < 0.05$ ) 则认为是阳性应答。一般而言,如果斑点数量至少为背景的四倍并且每一百万细胞超过背景大于 50 个斑点(每 20000 个脾细胞有 1 次应答超过背景) 则认为是阳性应答。结果记录为高于背景的平均斑点数并调节至每一百万接种细胞的斑点数。

[0178] 鼠 IL-4 ELISpot. 用购自 Mabtech 的鼠 IL-4 ELISpot 试剂盒进行 IL-4 ELISpot 测定。以 10  $\mu$  g/ml 将目标肽加入包含 300000 个鼠脾细胞(含 10% FCS 的 RPMI1640 中)的一式三份重复孔中并于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 气氛下温育十八至二十二小时。在一式三份重复孔中加入 10  $\mu$  g/mL 的 ConA。六个不含肽的孔用于背景测定。用变体排列测试(variant permutation test) (Hudgens, M. 等, J. Immunol. Methods, 288 :19-34,2004) 进行统计学检测。如果肽检测孔中的斑点数量与对照孔具有统计学差异( $p < 0.01$ ) 则认为是阳性应答。一般而言,如果斑点数量至少为背景的四倍并且每一百万细胞超过背景大于 50 个斑点(每 20000 个脾细胞有 1 次应答超过背景) 则认为是阳性应答。结果记录为背景上的平均斑点数并调节至每一百万接种细胞的斑点数。

[0179] 鼠 IFN- $\gamma$  ELISA. 将目标肽以 10  $\mu$  g/ml 加入包含人外周血单核细胞(添加了 10% 人血清的 RPMI1640 中)的培养物中并于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 气氛下温育十八至二十二小时。用 10  $\mu$  g/mL PHA 刺激的或未用肽刺激的培养物作为对照。使用 R&D Systems Quantikine ELISA 试剂盒进行鼠 IFN- $\gamma$  定量夹心 ELISAs。将特异于 IFN- $\gamma$  的多克隆抗体预包被至 96-孔微量滴定板上。将试剂盒提供的标准品和包括 PHA 的细胞上清样品和无肽对照(100  $\mu$  l) 加入孔中并且任何存在的 IFN- $\gamma$  被固定化抗体在室温下经 2 小时结合。洗去未结合物质之后,在孔中加入特异于 IFN- $\gamma$  的酶联多克隆抗体并于室温下温育 2 小时。洗去任何未结合抗体酶试剂后,在孔中加入底物溶液 30 分钟,与结合 IFN- $\gamma$  的量成正比显色。停止显色并在 Wallac Victor3 上于 450nm 测定颜色强度。通过从 450nm 值减去 540nm 的强度进行板子光学缺陷的修正。通过 t-检验评价不同试验组之间细胞因子水平的差异。如果所观察到的试验和对照孔之间的细胞因子表达差异有统计学差异( $p < 0.01$ ) 则该应答被认为是阳性的。

[0180] 流式细胞计量法。将脾细胞以  $2 \times 10^6$  细胞/孔加入含添加 10% FCS、100U/mL 青霉素、100  $\mu$  g/mL 硫酸链霉素的 RPMI 1640 的 96-孔组织培养板中。各测定中包括未刺激对照和阳性对照(ConA)。将细胞于 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 温育过夜。温育后,在包含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 中洗涤并用表面抗体(例如,CD4、CD25) 染色。接着用 Cytofix/Cytoperm 试剂盒(BD PharMingen) 根据使用说明将细胞洗涤并固定。固定后,在 Cytoperm 缓冲液中洗涤

细胞两次并用抗胞内标记（例如，FOXP3、IL-10）的抗体染色。染色后用为流式细胞计量法制备的包含 1%多聚甲醛的 PBS 洗涤并固定。在 BD FACS Calibur 仪器上分析细胞。每样品收集 20000 个事件。使用 FloJo 软件进行数据分析。所有数据均减去背景。基于 Wilcoxon 等级和检验进行组之间比较。成对比较应用显著性  $p < 0.05$ ，多重比较应用  $p < 0.01$ 。

[0181] 细胞分离 / 排除方法。使用 invitrogen dynabeads 系统（用于鼠 CD4 和 CD25）根据使用说明（Invitrogen, Carlsbad, California）从 PBMC 中排除或阳性分离鼠 Treg 细胞群。

[0182] 定量联合给予抗原的抗体

[0183] 通过抗体 - 捕获 ELISA 定量抗原的 IgG 抗体。将抗原（ $10 \mu\text{g/mL}$ ）溶解于碳酸盐缓冲液中并置于 96-孔微量滴定板中  $4^\circ\text{C}$  过夜。接着用包含 0.05% Tween 20 (PBST) 的经磷酸盐缓冲的盐水洗涤板子并用 5% 胎牛血清 (FBS ;Gibco) 的 PBS 溶液于室温下封闭三小时。将 0.5% FBS/PBS 中系列稀释的血清加入板子中并于室温下温育两个小时。接着用 PBST 洗涤微量滴定板并在各孔中加入以 1 : 10000 稀释于 0.5% FBS/PBS 中的与辣根过氧化物酶 (Southern Biotechnology Associates) 偶联的  $100 \mu\text{L}$  山羊抗 - 小鼠 IgG ( $\gamma$  链特异)。用 PBST 洗涤微量滴定板并接着用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB ;Moss) 显色。在 WallacVictor3 上于 450nm 波长处读取吸光度。通过从 450nm 值减去 540nm 的强度修正板子的光学缺陷。

[0184] 实施例 1. 鉴定 Tregitope 组合物

[0185] 鉴定人 IgG 蛋白表位为调节性。评价大量抗体的免疫原性潜能后，观察到一种重复出现模式。某些表位簇出现在多个抗体中。不愿受到理论的束缚，据推断高度保守的表位簇不太可能促进抗 - 抗体免疫应答。进一步推断这些重复出现模式可被免疫系统被动耐受或主动地黏附负责抑制抗 - 抗体免疫应答的调节性 T 细胞。将重复出现表位簇的序列与 GenBank 的蛋白数据库比较确定了包含于 IgG 抗体序列中既保守又可潜在刺激调节性 T 细胞的 19 个区域（见表 2）。

[0186] 根据 EpiMatrix 系统，所有这些 19 个区域具有显著的免疫刺激潜能，各包含至少一个至多 14 个结合基序并且在 EpiVax 免疫原性等级上的评分在 1 至 25 之间。此外，若干这些序列包含一个或多个“EpiBars”。EpiBars 为预期结合至少 4 种不同 II 类 HLA 的单个 9mer 框架。EpiBars 是免疫刺激潜能增加的标志。

[0187] 表 2 : 本发明 Tregitopes 及其 EpiMatrix 分值

[0188]

| 簇来源<br>蛋白质 | 蛋白质中<br>簇位置 | 簇序列                        | SEQ<br>ID NO | 肽 ID<br>相互对应关系 | EpiMatrix<br>簇分值 | HLA 结<br>合基序<br>数量 |
|------------|-------------|----------------------------|--------------|----------------|------------------|--------------------|
| IgG_HC     | 289-309     | EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW      | 4            | Tregitope-289  | 23.85            | 14                 |
| IgG_HC     | 167-194     | PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ | 5            | Tregitope-167  | 16.74            | 14                 |
| IgG_HV     | 9-23        | PGLVVRPSQTLSLTCT           | 6            | Tregitope-009  | 12.98            | 6                  |
| IgG_HV     | 9-29        | GGLVQPQGSRLRLSQAASGFTF     | 7            |                | 8.68             | 7                  |
| IgG_HV     | 9-29        | GGLVQPGRSLRLSQAASGFTF      | 8            |                | 8.68             | 7                  |
| IgG_HV     | 16-30       | GASVKVSCKASGYTF            | 9            |                | 7.36             | 4                  |
| IgG_HV     | 29-43       | WSWVRQPPGRGLEWI            | 10           | Tregitope-029  | 22.25            | 12                 |
| IgG_HV     | 29-43       | WSWIRQPPGKGLEWI            | 11           |                | 12.74            | 7                  |
| IgG_HV     | 29-43       | MHWVRQAPGKGLEWV            | 12           |                | 22.81            | 11                 |
| IgG_HV     | 29-43       | MHWVRQAPGQGLEWM            | 13           |                | 24.92            | 12                 |
| IgG_HV     | 74-94       | VDTSKNQFSLRLSSVTAADTA      | 14           | Tregitope-074  | 12.93            | 10                 |
| IgG_HV     | 88-108      | NTRYLQMNLSRAEDTAVYYCA      | 15           |                | 23.7             | 13                 |
| IgG_HV     | 106-119     | FQHWGGTTLVTVSS             | 16           | Tregitope-106  | -0.89            | 0                  |
| IgG_HV     | 106-119     | FDLWGRGTLVTVSS             | 17           |                | -0.89            | 0                  |
| IgG_HV     | 106-119     | FDIWGQGTMTVTVSS            | 18           |                | -0.89            | 0                  |
| IgG_HV     | 106-119     | FDYWGGTTLVTVSS             | 19           |                | -0.89            | 0                  |
| IgG_HV     | 106-119     | FDPWGGTTLVTVSS             | 20           |                | -0.89            | 0                  |
| IgG_HV     | 106-119     | MDVWGQGTTLVTVSS            | 21           |                | -0.89            | 0                  |
| IgG_HV     | 106-119     | MDVWGQGTITVTVSS            | 22           |                | 8.76             | 5                  |
| IgG_LC     | 134-157     | LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS   | 23           | Tregitope-134  | 13.02            | 10                 |
| IgG_LC     | 294-307     | KVYACEVTHQGLSS             | 24           | Tregitope-294  | 1.69             | 1                  |
| IgG_LV     | 1-13        | DIQMTQSPSSLSA              | 25           |                | 9.49             | 5                  |
| IgG_LV     | 1-13        | EIVLTQSPGTLSL              | 26           |                | 7.39             | 4                  |
| IgG_LV     | 16-30       | GDRVITTCRASQGIS            | 27           |                | 5.61             | 3                  |
| IgG_LV     | 41-54       | LAWYQQKPGKAPKL             | 28           |                | 6.99             | 4                  |
| IgG_LV     | 41-54       | LAWYQQKPGQAPRL             | 29           |                | 6.99             | 4                  |
| IgG_LV     | 52-66       | LLIYGASSRATGIPD            | 30           |                | 8.11             | 4                  |
| IgG_LV     | 84-98       | GTDFTLTISSLQPED            | 31           |                | 7.57             | 4                  |
| IgG_LV     | 1-13        | SYELTQPPSVSVS              | 32           |                | 5.31             | 3                  |
| IgG_LV     | 16-30       | GQSITISCTGTSSDV            | 33           |                | 6.29             | 4                  |
| IgG_LV     | 39-52       | VSWYQQHPGKAPKL             | 34           |                | 6.99             | 4                  |
| IgG_LV     | 39-52       | VHWYQQKPGQAPVL             | 35           |                | 6.99             | 4                  |
| IgG_LV     | 39-52       | VSWYQQLPGTAPKL             | 36           |                | 6.99             | 4                  |
| IgG_LV     | 52-66       | LMIYEVSNRPSGVDP            | 37           |                | 5.71             | 3                  |
| 白蛋白        | 159-177     | LKKYLYEIAARRHPYFYAPE       | 38           |                | 18.37            | 11                 |
| 白蛋白        | 175-196     | APELLFFAKRYKAAFTCCQAA      | 39           |                | 30.75            | 18                 |
| 白蛋白        | 362-382     | HPDYSVVLLRLAKTYETTL        | 40           |                | 29.69            | 17                 |
| 白蛋白        | 362-376     | HPDYSVVLLRLAKT             | 41           | Tregitope-362  | 10.7             | 7                  |
| 白蛋白        | 369-382     | LLRLAKTYETTL               | 42           | Tregitope-369  | 17.96            | 9                  |
| 白蛋白        | 422-466     | LGEYKFNALLVRYTKVQVSTPT     | 43           | Tregitope-422  | 39.71            | 22                 |
| 胶原         | 1345-1366   | PADVAIQLTFLRLMSTEASQNI     | 44           |                | 24.31            | 13                 |
| 胶原         | 1381-1399   | TGNLKKALLQGSNEJIR          | 45           |                | 16.06            | 10                 |
| 胶原         | 1113-1128   | DGDFYRADQPRASPL            | 46           |                | 19.74            | 10                 |
| 胶原         | 1247-1271   | SKEMATQLAFMRLLANYSQNITYH   | 47           |                | 25.51            | 16                 |
| 纤维蛋白原      | 149-167     | VQHIQLLQKNVRAQLVDMK        | 48           |                | 23.95            | 13                 |
| 纤维蛋白原      | 705-727     | GEPFLGNDYLHLLTQRGSVLRVE    | 49           |                | 22               | 13                 |
| 纤维蛋白原      | 189-209     | QSGLYFIKPLKANQQFLVYCE      | 50           |                | 27.16            | 16                 |
| 纤维蛋白原      | 250-270     | TEFWLGNERIHLISTQSAIPY      | 51           |                | 19.08            | 12                 |
| 触珠蛋白       | 287-310     | NANFKFTDHLKYMVLPVADQDQICR  | 52           |                | 25               | 15                 |
| 骨钙素        | 42-67       | GSEVVKRPRRYLYQWLGAPVPYPDPL | 53           |                | 27.96            | 17                 |
| 前列腺素       | 124-139     | PCQWWRPTTSTRCT             | 54           |                | 15.32            | 9                  |
| 前列腺素       | 139-160     | PGEDFRMATLYSRTQTPEAL       | 55           |                | 22.14            | 14                 |
| 超氧化物歧化酶    | 153-170     | DGSLWRYRAGLAASLAGP         | 56           |                | 26.13            | 13                 |
| 超氧化物歧化酶    | 78-98       | VTGVVLFRLQAPRAKLDAFFA      | 57           |                | 30.46            | 18                 |
| 转铁蛋白       | 61-79       | KASYLDCIRAIAANEADAV        | 58           |                | 13.77            | 8                  |

[0189] 保守。将所有 IgG 衍生的推定 Tregitope 序列与 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgD 和 IgM 的种系序列经视觉检查比较。发现 IgG- 衍生的 Tregitopes 在 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的种系序列中高度保守。在 IgA、IgE、IgD 或 IgM 的种系序列中未发现同源性。其他 Tregitopes 序列也高度保守（在人蛋白质变异体中）并通常大量存在于循环中。

[0190] 种。进行 IgG- 衍生的 Tregitopes 与非人物种的同源性分析。将序列经 NCBI 网站 (ncbi.nlm.nih.gov/blast) 上传至 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)。

程序将蛋白质序列与序列数据库比对并计算匹配的统计学显著性以发现序列之间局部相似性区域。发现 IgG- 衍生的 Tregitopes 在非人物种例如小鼠、大鼠、猫、骆驼、奶牛和非人灵长类中是保守的。表 3 显示了 Tregitope-289 (SEQ NO :4) 的 BLAST 报告。

表 3 Tregitope-289 (SEQ ID NO:4) 与其他生物体的同源性

| #BLAST 命中 | 序列                    | 登录号          | 生物体  |
|-----------|-----------------------|--------------|--|
|           | EEQYINSTYKYSVLTPLKQDN |              |  |
| 13        | -----                 | AAG00448     | [合成构建]                                     |
| 1         | -G-----N-             | 1FRT-C       |  |
| 1         | -----T-               | AAM93487     | [猕猴( <i>Macaca mulatta</i> )]              |
| 1         | -----                 | AAB37424     | [小鼠( <i>Mus sp.</i> )]                     |
| 1         | -P-----V-             | XP_522970    | [人类( <i>Homo sapiens</i> )]                |
| 6         | -P-----V-             | AAT11503     | 白结猴( <i>Cercopithecus torquatus atys</i> ) |
| 1         | -P-----V-             | XP_001168435 | [人类( <i>Homo sapiens</i> )]                |
| 4         | -P-----V-             | BAAS2230     | 猫( <i>Felis catus</i> )                    |
| 1         | -P-----V-             | XP_001168196 | [人类( <i>Homo sapiens</i> )]                |
| 3         | -P-----IQ-            | CAB64854     | 骆驼( <i>Camelus dromedarius</i> )           |
| 7         | -P-----T-             | AAT11502     | 白结猴( <i>Cercopithecus torquatus atys</i> ) |
| 1         | -S-----A-V            | CAH89990     | 海绵( <i>Pongo pygmaeus</i> )                |
| 19        | -P-----PIQ            | AAAS1294     |  |
| 11        | -P-----PIQ            | AAT11504     | 白结猴( <i>Cercopithecus torquatus atys</i> ) |
| 2         | -P-----RIQ            | CAC44624     | 马( <i>Equus caballus</i> )                 |
| 1         | -P-----PIQ            | AAM93489     | [猕猴( <i>Macaca mulatta</i> )]              |
| 2         | -N-----PIQ            | AAP82181     | 马( <i>Equus caballus</i> )                 |
| 3         | -P-----A-PIQ          | AAT85187     | 海狗( <i>Truncatops truncatus</i> )          |
| 5         | -P-----A-PIQ          | AAA60738     |  |
| 1         | -A-P-----PIQ          | CAC44761     | 马( <i>Equus caballus</i> )                 |
| 6         | -P-----A-RIQ          | AAC48761     | 牛( <i>Bos taurus</i> )                     |
| 1         | -Q-P-----PIE          | AAL35304     | 人( <i>Homo sapiens</i> )                   |
| 1         | -P-----PTK            | AAA82733     |  |
| 1         | -P-P-----A-PIM        | 1IGY-B       |  |
| 1         | -P-G-----PIG          | AAL35302     | 人( <i>Homo sapiens</i> )                   |
| 2         | -Q-P-----PIQ          | AAA51261     | 猴( <i>Macaca mulatta</i> )                 |
| 1         | -Q-P-----A-PIQ        | AAT85196     | 海狗( <i>Truncatops truncatus</i> )          |
| 2         | -P-----A-PIQ          | S31459       |  |

[0191]

[0192] 在普通循环人蛋白质中鉴定调节性表位。在后续的分析中 EpiVax 鉴定出一组可能也包含 Tregitopes 的普通循环蛋白。被分析的蛋白质组包括人体分离物：肌动蛋白、白蛋白、胶原、纤维蛋白原、触珠蛋白、角蛋白、肌球蛋白、骨钙素、前列腺素、超氧化物歧化酶、肌联蛋白和转铁蛋白。如上所述用 EpiMatrix 和 ClustiMer 分析各蛋白质的普通分离物并筛选一组高分并且高度保守的推定 T 细胞表位用于进一步分析。见表 2, SEQ ID NOS : 38-58。

[0193] 实施例 2. 通过与 HLA II 类分子的结合合成和鉴定 Tregitope 组合物

[0194] 根据上文所述方法在合成 IgG Tregitope 上进行可溶性 MHC 结合测定。从强结合对照肽的六点抑制曲线得到 IC<sub>50</sub> 值 (μM)。计算机 (insilico) 分析鉴定的 Tregitopes 与人 MHC 分子结合。见下文的表 4。

表 4: Tregitopes 分别与 4 个普通 HLA 的结合亲和力

| 肽             | DRB*0101 | DRB*0401 | DRB*0701 | DRB*1501 |
|---------------|----------|----------|----------|----------|
| Tregitope-009 | 无        | 中        | 高        | 高        |
| Tregitope-029 | 中        | 中        | 中        | 中        |
| Tregitope-074 | 中        | 高        | 中        | 中        |
| Tregitope-167 | 高        | 高        | 高        | 高        |
| Tregitope-289 | 中        | 高        | 高        | 低        |
| Tregitope-134 | 无        | 高        | 低        | 低        |

[0195]

[0196] 与氨基和羧基端的结构修饰相关的附加测定。对肽的氨基和羧基端的修饰已显示可改变 MHC 结合、蛋白水解降解和 T 细胞活化 (Maillère, B. 等, Mol. Immunol., 32: 1377-85, 1995; Allen, P. 等, Int. Immunol., 1: 141-50, 1989)。如果所观察到的 nTregs 活化确实由 Tregitope- 特异 TCR 识别, 那么对 Tregitope 肽羧基端的细微改变应导致不同的抑制作用。合成包含和不包含 C- 端酰胺帽的相同 Tregitope 肽序列。在 HLA 结合测定法中评价不加帽肽与 DRB1\*0101 和 DRB1\*1501 的亲和力并显示以比加帽肽更高的亲和力与两个等位基因结合。使用来自 DRB1\*0101 受试者的 PBMC 研究 Tregitope 肽 (加帽和不加帽) 抑制对联合温育的 CEF、MHC I 类免疫原性肽库的免疫应答的能力。在第 1 天刺激细胞并培养 6 天。在第 7 天收集细胞并将其一半用 CD4、CD25 和 CD127 染色并用流式细胞仪分析。剩余的细胞加入 IFN- $\gamma$  ELISpot 板中并用 CEF 再刺激。与不加帽 Tregitope-289 相比, 与 C- 端酰胺加帽 Tregitope 的共培养导致 CD4+CD25+CD127lowTregs 增加 (图 2, 左图)。与之前显示 CD4+CD25+CD127low Tregs 是高度抑制性的研究一致, 加帽 Tregitope-289 而不是不加帽 Tregitope-289 可抑制 CEF- 特异 IFN- $\gamma$  分泌 (图 2, 右图)。

[0197] 后续分析显示加帽和不加帽 Tregitope-289 (SEQ NO :4) 之间小 1 道尔顿的改变。经质谱分析 Tregitope-289 酰胺化肽小 1 道尔顿。本文例证 Tregitope-289 C- 端酰胺化改变了其结合和功能特性。由于加帽 Tregitope-289 肽显示更好的功能性, 在所有的后续测定中使用加帽 (酰胺化) 肽。在进一步的报告中, 本文显示的 Tregitope-289 结果指加帽形式。本文描述的 Tregitopes 的加帽和不加帽形式均涵盖于本发明中。

[0198] 实施例 3. 通过天然调节性 T 细胞刺激鉴定 Tregitope 组合物

[0199] 在单独破伤风毒素肽 TT<sub>830-844</sub>、单独 Tregitope、单独植物凝血素 (促有丝分裂阳性对照) 存在下或无刺激物条件下离体直接刺激人 PBMCs 4 天。用抗 -CD4-FITC (克隆 RPA-T4; eBioscience) 和抗 -CD25-APC (克隆 BC96; eBioscience) 抗体在冰上在流式染色缓冲液 (eBioscience) 中将  $1 \times 10^6$  个细胞染色 30 分钟并用缓冲液洗涤两次。细胞表面染色后, 根据使用手册将细胞固定并透化处理 (eBioscience), 并对 FOXP3 胞内染色 (克隆 PCH101; eBioscience)。在不同培养条件下 FOXP3 阳性 CD4+/CD25+T 细胞的频率由 Flowjo 分析软件列出。破伤风毒素- 和 Tregitope- 刺激样品中 CD25 表达相似的增加表明两种肽

对 T 细胞的活化 (图 3 ;显示了 Tregitope-289 的结果)。然而 CD4+CD25+ 亚群中 FoxP3 的表达存在显著差异,取决于所使用的刺激物。破伤风毒素刺激导致 FoxP3 表达降低 7%,而 Tregitope 刺激导致表达增加大于两倍,分别表明 Th 和 nTreg 活化。

[0200] 实施例 4. 通过体外抑制联合给予抗原鉴定 Tregitope 组合物

[0201] 4A :Tregitope-167 和 Tregitope-134 在体外下调对联合给予抗原的效应细胞应答并上调其调节性应答

[0202] 将 PBMCs 与 a) 单独免疫原性肽库,或 b) 含 hTregitope-167 免疫原性肽的库,或 c) 含 hTregitope-134 的免疫原性肽库一起培养 8 天。收获细胞并用 PBS 洗涤。将细胞 ( $2 \times 10^5$  细胞 / 孔) 加入 96-孔板中并用单独免疫原性肽库、免疫原性肽库和 Tregitope 或无肽 (阴性对照) 再刺激 65 小时。根据如上所述的多路 ELISA 分析法分析上清。在初始刺激中与 Tregitope 共温育导致调节性细胞因子和趋化因子 (IL-10 和 MCP-1) 的分泌增加以及辅助 T 细胞细胞因子和趋化因子 (IL-5、IL-6、IFN- $\gamma$  和 MIP-1 $\alpha$ ) 分泌减少,证明了 Tregitopes 黏附并活化调节性 T 细胞的能力 (图 4)。

[0203] 4B :Tregitope-289 在体外下调对联合给予抗原的效应细胞应答并上调其调节性应答。

[0204] 将 PBMCs 与 a) 单独免疫原性肽库,或 b) 含 Tregitope-289 的免疫原性肽库,或 c) 含 Tregitope-289 的免疫原性肽库一起培养 8 天。免疫原性肽库中的肽衍生自 C3d, 一种免疫原性自体蛋白 (Knopf, P. 等, Immunol. Cell Biol., 2008 Jan 8 ;doi :10.1038/sj.icb.7100147)。收获细胞并用 PBS 洗涤。如上所述,将细胞 ( $2 \times 10^5$  细胞 / 孔) 加入 96-孔板中并在一式三份重复孔中在各条件下再刺激 65 小时 :单独 C3d 库、C3d 库 +Tregitope、PHA 对照或无肽 (阴性对照)。用多路 ELISA 分析法分析上清。两种培养条件之后对阳性对照 PHA 的应答是强效的。在初始刺激中与 Tregitope 共温育导致调节性细胞因子 IL-10 的分泌增加、调节性趋化因子 TGF $\beta$  略微增加以及辅助 T 细胞细胞因子和趋化因子 IFN $\gamma$  和 MIP 1 $\alpha$  分泌增加,进一步证明了 Tregitopes 黏附并活化调节性 T 细胞的能力 (图 5)。

[0205] 4C :Tregitopes 库体外下调对联合给予抗原的效应细胞自身免疫应答

[0206] 与衍生自 TSHR (格雷夫斯病的目标抗原) 的表位共温育抑制对格雷夫斯病患者 PBMC 表位的免疫应答。将 PRMCs 与含有或不含 Tregitope 肽库 (Tregitope-134、Tregitope-167、Tregitope-289) 的 TSHR 肽库一起培养 8 天。收获细胞并用 PBS 洗涤。如上所述,在 IL-4ELISpot 板中用 1) 个体 TSHR 表位 +Tregitope-134、Tregitope-167 和 Tregitope-289 的库,2) TSHR 表位库 +Tregitope-134、Tregitope-167 和 Tregitope-289 的库,或 3) 无刺激物对照再刺激  $2.5 \times 10^5$  个细胞。两种培养条件后对阳性对照 PHA 的应答是强效的。

[0207] 在再刺激中抗原 (TSHR 肽) 与 Tregitope 共温育导致 IL-4 斑点形成细胞的显著减少。这一数据显示 Tregitopes 抑制效应 T 细胞的细胞因子分泌 (图 6)。

[0208] 4D :个体 Tregitopes 体外下调对 CEF (免疫显性联合给予肽抗原的库) 的效应细胞应答。

[0209] 与 Tregitope 共温育抑制对 CEF (衍生自普通病原体的免疫显性肽表位库) 的免疫应答。将 PBMCs 与或不与单个的 Tregitope 肽 (Tregitope-289、Tregitope 294、Tregitope-029、Tregitope-074、Tregitope-009) 一起培养 8 天。收获细胞并用 PBS 洗涤。

如上文所述,在 IFN- $\gamma$  ELISpot 板中用单独 CEF、PHA 阳性对照 (未显示) 或无刺激物对照再刺激  $2.5 \times 10^5$  个细胞。两种培养条件后对阳性对照 PHA 的应答均是强效的。

[0210] 在温育期间将 Tregitope 与抗原 (CEF) 共温育导致响应 CEF 再刺激 IFN- $\gamma$  斑点形成细胞的显著减少。这些数据显示 Tregitopes 抑制效应 T 细胞的细胞因子的分泌。

[0211] 4E:Tregitopes 库下调对联合给与治疗性蛋白质抗原的体外效应细胞应答

[0212] 与 Tregitope 共温育抑制对衍生自肉毒杆菌神经毒素 (用于治疗张力障碍 (运动失调) 的蛋白质) 的肽表位的免疫应答。在有证据证明抑制剂 (抗-BoNT 抗体) 存在下将受试者的 PBMCs 与或不与 Tregitope 肽库 (Tregitope-167、Tregitope-134 和 Tregitope-289) 一起培养 8 天。收获细胞并用 PBS 洗涤。如上文所述,在 IFN- $\gamma$  ELISpot 板中用单个 BoNT 肽、BoNT 肽库、阳性 PHA 对照 (未显示) 或无刺激物对照再刺激  $2.5 \times 10^5$  个细胞。未显示不具有显著基线应答的肽。两种培养条件后对阳性对照 PHA 的应答均是强效的。

[0213] 在温育期间将抗原 (CEF) 与 Tregitope 共温育导致响应 CEF 再刺激 IFN- $\gamma$  斑点形成细胞显著减少。这些数据显示 Tregitopes 响应免疫原性治疗性蛋白质抑制效应 T 细胞的细胞因子分泌 (图 8 和表 5)。

[0214]

表 5. +/- Tregitopes 温育后对肉毒杆菌毒素抗原刺激物的干扰素- $\gamma$  ELISpot 应答  
(高于无刺激物背景的斑点形成细胞)

| 初始温育后,<br>再刺激以:             | BoNT-L1 | BoNT-L2 | BoNT-L3 | BoNT-L4 | BoNT-L5 | BoNT-<br>库 | PHA<br>对照 |
|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|-----------|
| 与 BoNT/A 温育                 | 522     | 209     | 214     | 434     | 247     | 1,119      | 2,102     |
| 标准偏差                        | 98      | 7       | 33      | 39      | 76      | 64         | 546       |
| 与 BoNT/A 和<br>Tregitopes 温育 | 332     | 105     | 57      | 228     | 183     | 460        | 1,750     |
| 标准偏差                        | 22      | 42      | 42      | 18      | 57      | 17         | 103       |
| 成对比较的 P 值                   | 0.007   | 0.003   | 0.003   | 0.001   | 0.124   | 0.008      | 0.000     |
| 抑制百分比                       | 36%     | 50%     | 73%     | 47%     | 26%     | 59%        | 17%       |

[0215] 4F:Tregitope-289 和 Tregitope-134 响应联合给予的免疫显性抗原体外下调增殖

[0216] CEF 是可商业购买的来自普通病原体的免疫显性肽表位。将 PBMCs 与单独 CEF、CEF+Tregitope-134 或 CEF+Tregitope-289 一起培养 8 天。收获细胞并用 PBS 洗涤。根据标准方案将  $2 \times 10^6$  个细胞用 CFSE 染料 (Invitrogen) 预标记并用 CEF 库或无肽 (阴性对

照)或 PHA 分裂素对照再刺激 65 小时;收集上清并如上所述进行 hIFN- $\gamma$  ELISAs。两种培养条件后对阳性对照 PHA 的应答均是强效的。再刺激期间与 Tregitope 共温育导致 IFN- $\gamma$  形成显著减少(左图),其与效应 T 细胞增殖减少相关(图 9,右图)。

[0217] 4G:Tregitope-289 响应联合给与抗原体外下调增殖

[0218] 将之前用牛痘免疫的受试者的 PBMCs 与单独的免疫原性牛痘肽或含如上所述 Tregitope-289 的免疫原性牛痘肽一起培养 8 天。收获细胞并用 PBS 洗涤。根据标准方案将  $2 \times 10^6$  个细胞用 CFSE 染料(Invitrogen)预标记并用牛痘肽、牛痘肽和 Tregitope-289 或无肽(阴性对照)再刺激 65 小时。温育期间与 Tregitope 共温育导致效应 T 细胞增殖显著降低,进一步证明了由 Tregitope 活化的调节性 T 细胞降低效应 T 细胞增殖的能力(图 10)。

[0219] 4H:Tregitope 抑制由具有调节性表型的细胞(CD4+CD25Hi T 细胞)和 IL-10 上调介导。

[0220] 制备来自单个尘螨-过敏性个体的两个 PBMC 样品。一个样品用抗-CD4 和抗-CD25 抗体染色并用流式细胞仪分析。在这一样品中通过上文所述方法从剩余的 PBMC 中排除 CD4+CD25Hi 细胞亚群。另一样品保持不动。接着用含有或不含 Tregitope-289 的 HDM 裂解物协同刺激两个样品。排除 CD4+CD25Hi 的 PBMC 抑制 IFN- $\gamma$  的能力小于未排除 PBMC,表明 Tregitope 的抑制作用由 CD4+CD25Hi 细胞介导。在(完整)PBMCs 的辅助分析中,与单独 HDM 裂解物温育相比,与 HDM 裂解物和 Tregitope-289 共温育之后对 HDM 裂解物的 CD4+增殖性应答被抑制。

[0221] 图 11 证明了初始共温育中对 CD4+/CD25hi T 细胞的要求。在 CD4+/CD25hi T 细胞存在下,与 Tregitope-289 和 HDM 协同刺激引起单独 HDM 再刺激后  $\gamma$ -干扰素释放的抑制;在 CD4+/CD25hi T 细胞不存在下(温育之前已分拣),与用单独 HDM 再刺激后更大量的抑制(65%:33.5 至 11.8pg/ml)相比,Tregitope-289 和 HDM 协同刺激与更低量的抑制(16%:16.5 至 12.4pg/ml)相关。图 11 显示包含 Tregs 的细胞亚群对于诱导对抗原的耐受是必需的。

[0222] 4I:Tregitope 共温育引起具有调节性表型细胞(CD4+ CD25Hi T 细胞)的增殖和响应变应原的调节性细胞因子 IL-10 的上调。

[0223] 适应性耐受的诱导:为了测定 Tregitope nTreg 活化是否可导致变应原特异  $\alpha$ TReg 的生成,分析首先与单独尘螨(DM)抗原、尘螨抗原+Tregitope-289 或尘螨抗原+Tregitope-167 温育 8 天的 PBMC(来自尘螨敏感性个体)。如上图显示(图 12),与 DM 抗原和 Tregitope-289 共温育 PBMC 导致 CD4+CD25Hi 细胞扩增近四倍;与 DM 抗原和 Tregitope-167 共温育 PBMC 也具有相同的结果(1.6 至 7.5%)。在两种 Tregitope 共温育中,也发现 IL-10 分泌增加了五倍(图 12,下图);这一发现与增加的 CD4+CD25Hi 细胞可为 HDM-特异性适应性 Treg 的可能性一致。本领域技术人员可在这一体内测定法中验证扩增的 CD4+CD25hi 群分泌 IL-10。在扩增的 CD4+CD25hi 调节性细胞群存在下,响应联合给与抗原的 IL-10 分泌,表明在与抗原的共温育中诱导了适应性 Tregs。

[0224] 这些数据显示了在相同的患者和相同的实验中与 Tregitope-289 和 DM 抗原共温育后和与 Tregitope-167 和 DM 抗原共温育后的 CD4CD25hi T 细胞扩增;以及用单独 HDM 再刺激后由共温育细胞分泌的 IL-10 的量。

[0225] 4J:Tregitope 共温育引起抗原特异变应性 Th2 应答的抑制

[0226] Tregitope 共温育也可导致 CCR4、CD30、CRTH2 和 CCR6 表达的显著减少,其已显示与 Th2 应答相关。接着评价在延长 Tregitope 协同刺激后变应原-特异性 CD4+T 细胞对细胞因子应答的调节。培养 30 天后,Tregitope 协同刺激促进 Bet v1<sub>1141-1155</sub>-特异性 CD4+T 细胞混合群的产生。用抗原和 Tregitope 延长刺激后,42%的这些表位-特异性细胞既不是 IL5 阳性也不是 IFN- $\gamma$  阳性,并且 44%在这一延长的温育中显示出转换至 Th-1-样增加的干扰素应答(图 13)。

[0227] 众所周知,筛选研究受试者是否存在 HLA DR\*1 1501 以增加四聚体结合机会;Tregitope-167(Treg 诱导增加五倍)的作用比 Tregitope-289(三倍增加)更显著。在 HLB 结合测定法中 Tregitope-289 未显示与 DR1501 结合。相反 Tregitope-167 可高亲和和力地结合至 HLA 1501(50  $\mu$  M 时结合抑制为 87%)。

[0228] 实施例 5. 通过体内抑制联合给予抗原鉴定 Tregitope 组合物

[0229] 5A:联合给予 Tregitope 引起对联合给与蛋白质药物的效应细胞 应答的体内抑制

[0230] 本文显示 Tregitope 抑制对细菌来源的治疗性蛋白质(称作“ANTIGEN-XX”)的应答(图14)。在未公开的研究中 ANTIGEN-XX 已引起人体中显著的免疫原性。研究本发明 Tregitope 是否可以体内抑制对蛋白质的效应细胞免疫应答。给 HLA DR4 转基因小鼠(4-6 周,雌性)每周三次皮下(颈背)注射 1)单独的 50  $\mu$  g ANTIGEN-XX, 2)50  $\mu$  g ANTIGEN-XX+25  $\mu$  g 鼠 Tregitope-167 和 25  $\mu$  g 鼠 Tregitope106 或 3)PBS 假对照。收获脾细胞并如上所述加入鼠 IL-4 elispot 板子中。

[0231] 通过如上文所述的抗体-捕获 ELISA 测定 ANTIGEN-XX 的 IgG 抗体定量。将 ANTIGEN-XX(10  $\mu$  g/mL)溶于碳酸盐缓冲液中(10mMNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 35mM NaHCO<sub>3</sub>[pH 9])并置于 96-孔微量滴定板中 4°C 过夜。接着用包含 0.05% Tween 20(PBST)的经磷酸盐缓冲的盐水洗涤板子并用 PBS 中 5%胎牛血清(FBS;Gibco)于室温下封闭 3 小时。将 0.5% FBS/PBS 中系列稀释的血清加入板子中并于室温下温育两个小时。接着用 PBST 洗涤微量滴定板并在各孔中加入以 1:10000 稀释于 0.5% FBS/PBS 中的与辣根过氧化物酶(Southern BiotechnologyAssociates)偶联的 100  $\mu$  L 山羊抗-小鼠 IgG( $\gamma$  链特异)。用 PBST 洗涤微量滴定板并接着用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB;Moss)显色。在 Wallac Victor3 上于 450nm 波长处读取吸光度。通过从 450nm 值减去 540nm 的强度修正板子的光学缺陷。两种免疫条件后对阳性对照 PHA 的应答均为强效的,并且两个测定法均可读出。

[0232] 该研究验证了与抗原联合给予的人 Tregitopes 的鼠同源物的体内抑制作用。

[0233] 5B:Tregitopes 联合给予引起对联合给予变应原的效应细胞应答的体内抑制。

[0234] 尘螨在人体中引起显著的变应性应答,使用屋尘螨裂解物(HDML)的小鼠模型可作为与人类相似的模型。研究本发明 Tregitope 是否可以体内抑制对 HDML 的效应细胞免疫应答。给 HLADR4 转基因小鼠(4-6 周,雌性)每周三次皮下(颈背)注射 1)50  $\mu$  g 单独 HDML, 2)50  $\mu$  g HDML+50  $\mu$  g Tregitope-289 鼠同源物或 3)PBS 假对照。在第四臂,通过每周三次注射 50  $\mu$  g 使小鼠首先对 HDML 预致敏,接着同时注射 HDML(50  $\mu$  g)和 Tregitope-289 处理小鼠。最后一次注射后一周将小鼠处死。

[0235] 收获脾细胞并如上所述加入鼠 IL-4 ELISpot 板中;向加入板中的细胞加入(一

式三份) :PBS(无刺激物对照)、HDM 裂解物、纯化的 HDM 抗原 DerP2 和 PHA。HDM DerP2 为 HDM 裂解物的组分。

[0236] 心脏穿刺获得血清。通过上文所述的抗体捕获 ELISA 测定 HDM 抗原的 IgG 抗体定量。将 HDM 抗原 DerP2 (10  $\mu$ g/mL) 置于 96-孔微量滴定板中于 4°C 过夜。接着用包含 0.05% Tween 20 (PBST) 的经磷酸盐缓冲的盐水洗涤板子并用 PBS 中 5% 胎牛血清 (FBS ;Gibco) 于室温下封闭 3 小时。将 0.5% FBS/PBS 中系列稀释的血清加入板子中并于室温下温育两个小时。接着用 PBST 洗涤微量滴定板并在各孔中加入以 1 : 10000 稀释于 0.5% FBS/PBS 中的与辣根过氧化物酶 (SouthernBiotechnology Associates) 偶联的 100  $\mu$ L 山羊抗-小鼠 IgG( $\gamma$  链特异)。用 PBST 洗涤微量滴定板并接着用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB ;Moss) 显色。在 Wallac Victor3 上于 450nm 波长处读取吸光度。通过从 450nm 值减去 540nm 的强度修正板子的光学缺陷。两种免疫条件后对阳性对照 PHA 的应答均为强效的,并且两个测定法均可读出(图 15)。

[0237] 该研究验证了与 DM 抗原联合给予的人 Tregitopes 的鼠等价物的体内抑制作用。

[0238] 5C :Tregitopes 共给予引起对联合给与药物的效应细胞应答的体内抑制。

[0239] 为了检测体内联合给予 Tregitopes 是否能够抑制对免疫原性治疗性蛋白质的免疫应答,给小鼠每周三次注射 HLA DRB1\*0401,用单独的 50  $\mu$ g 免疫原性蛋白药物制剂 (“IPT”) 或与 50  $\mu$ g 的 Tregitope-289 联用的制剂或 IPT 与鼠 Fc 联用的制剂。与鼠 Fc 区联合给予 IPT 可降低 IL-4 应答,然而体内联合给予“IPT”和鼠同源物 Tregitope-289 导致 IL-4 减少更多(由 ELISpot 测定)(图 16)。

[0240] 实施例 6. FVIII-Tregitope 构建体的生成

[0241] Tregitope 与免疫原性蛋白的融合可引起对免疫原性蛋白外周耐受的诱导。凝血因子 VIII 在患有严重 A 型血友病的患者中具有免疫原性。生产由凝血因子 VIII 和 Tregitope 的编码序列组成的嵌合构建体 (Sambrook 等, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))。简略而言,通过复性重叠寡聚核苷酸生成融合于 Tregitope 羧基端的凝血因子 VIII 的编码区并亚克隆至表达质粒中。将质粒转染至 DG44 CHO 细胞并筛选稳定的转化子。经免疫亲和柱纯化嵌合蛋白并评价致耐受性。表 6 显示了该嵌合蛋白的一个实施方案。

表 6: 凝血因子 VIII-Tregitope (Tregitope 粗体显示)

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMOSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF  
VEFTDHLFNI AKPRPPWMLLGP T IQAEVYD TVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQR  
EKEDDKVFPGGSHYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQT  
LHKFILLFAVFEDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMG  
TTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMLDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPE  
EPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEDWDYAPLVLA  
PDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASR  
PYNIIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSEVNMER  
DLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVF DENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDEPFQAS  
[0242] NIMHSINGYVFDLQSLVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETV FMS  
MENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPST  
RQKQFNATTIPENDIEKTDPFWAHRTMPMKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYTFSDDP  
PGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHS GDMVFTPE SGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPS  
DNLAA GTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSPLTESGGPLSLSEENNSKLLSEGLMNSQESSWG  
KNVSTESGR LFKGKRAHGPA LLTKDNALFKVISL LKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQN  
ILES DTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLF  
LPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSEVGEQNF LSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSS  
RNLFLTNLDNLHENNTHNQEKIQEEIEKKE TLIQENNVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQNVESYD  
GAYAPVLQDFRSLNDSTNR TKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRS  
KRALKQFR LPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIP  
QANRSP LPIAKVSSFP SIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGA KKNL SLAILTLE  
MTGDQREV GSLGTSATNSV TYKKVENTVLPKPDLPKTS GKVELLPKVHIYQKDLFP TETSNGSPGHLDLV  
EGSLIQGT EGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSP EKTA  
FKKKTILSLNACESNHAI AAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPV LKRHQREITRTTLQSDQEE  
IDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQK KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFK  
KVVFQEF T DGSFTQPLYRGELNEHLG L L GPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSS LISYEEDQRQGA E  
PRKNFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHRQV  
TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPSNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR  
WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIG EHLHAGMS  
TLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI I  
HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTG TLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPP I IARYIRL  
HPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP  
QVNNPKEWLQVDFQKTMKVTVGVT TQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFT  
PVVNSLDPPLLTRYLR IHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY**EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW** SEQ ID NO:1

[0243] 实施例 7. FVIII- 多个 -Tregitope 构建体的生成

[0244] 多个 Tregitope 可存在于高免疫原性蛋白质中以促进适应性耐受。制备由凝血因子 VIII 和多个 Tregitope (s) 的编码序列组成的嵌合构建体 (Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))。简略而言,通过复性重叠寡聚核苷酸 Tregitope 生成融合于 Tregitope 羧基端的凝血因子 VIII 编码区并亚克隆至表达质粒中。将质粒转染至 DG44 CHO 细胞并筛选稳定的转化子。经免疫亲和柱纯化嵌合蛋白并评价致耐受性。表 7 显示了该嵌合蛋白的一个实施

方案。

[0245]

| 表 7: 凝血因子 VIII-多个 Tregitope (Tregitope (s) 粗体显示)   |
|--|
| <p>           MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPPNTSVVYKKTFLF<br/>           VEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQR<br/>           EKEDDKVFPFGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQT<br/>           LHKFILLFAVFEDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMG<br/>           TTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPE<br/>           EPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEDWDYAPLVLA<br/>           PDDRSYKSYQLNNGPQRIGRKYKVKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGD TLLIIFKNQASR<br/>           PYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFFVNMER<br/>           DLASGLIGPLLYCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS<br/>           NIMHSINGYVFDLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTFLSVFFSGYTFKHKMVEDTLTLFPFSGETVFM<br/>           MENPGLWLILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPST<br/>           RQKQFNATTIPENDIEKTDPFWAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYETFSDDPS<br/>           PGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHSMDVFTPEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLSTIPS<br/>           DNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TTFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNSKLLSGLMNSQESSWG<br/>           KNVSSSTESGRLFKGRKRAHPALLTKDNALFKVVISLTKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQN<br/>           ILESDETFKVTPLIHRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLF<br/>           LPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVQGNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSS<br/>           RNLFLTNDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENNVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQNVESYD<br/>           GAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPTSQQNFVTQRS<br/>           KRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIP<br/>           QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNLNSLAILTLE<br/>           MTGDQREVGLGTSATNSVTYKVENTVLPKPDLPKTSKGVVLLPKVHIYQKDLFPETETSNGPSGLDLV<br/>           EGSLQGTGEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTA<br/>           FKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLRKHQREITR TTLQSDQEE<br/>           IDYDDTISVEMKKEDEFDIYDEENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFK<br/>           KVVVFQEFDTGFSFTQPLYRGLNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGA<br/>           PRKNFVKPNETKTYFWKQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV<br/>           TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPSNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR<br/>           WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMS<br/>           TFLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI<br/>           HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL<br/>           HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP<br/>           QVNNPKEWLQVDFQTKMKTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFT<br/>           PVVNSLDPPLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWEEQYNSTY<br/>           RVVSVLTVLHQDWEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWEEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW SEQ ID NO: 2         </p> |

[0246] 实施例 8. 强化疫苗递送载体的产生

[0247] Fc 结合至 Fc 受体增强抗原递呈细胞递呈至 T 和 B 淋巴细胞的摄取。位于 IgG 分子 Fc 结构域的 Tregitope-289 可作为递送抑制信号。修饰 Fc 以致 Tregitope-289 不再结合 MHC 分子和调节性 T 细胞使得可以有效靶向候选疫苗而避免抑制作用。降低 Tregitopes 与

MHC 分子结合的修饰是可用的。表 8 显示了这种修饰。设计由各种蛋白或所关注的表位假蛋白和 Tregitope 修饰的 mIgG Fc 组成的嵌合构建体 (Sambrook 等., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, ColdSpring Harbor Laboratory Press, (1989))。简略而言, 通过复性重叠寡聚核苷酸生成蛋白质或所关注的表位假蛋白并亚克隆至 Tregitope 修饰的 Fc 融合表达质粒中。将质粒转染至 DG44 CHO 细胞并筛选稳定的转化子。经蛋白 A 柱纯化嵌合蛋白同聚物并评价其免疫原性。表 8 显示了该嵌合蛋白的一个实例, 其中所关注的假蛋白为衍生自与经修饰的 Fc 蛋白融合的 Epstein Barr 病毒 (EBV) 的一串免疫原性 T 细胞表位, 其中 Tregitope 已被修饰而不再结合 MHCII 类分子并不能刺激天然调节性 T 细胞。表 8 中 EBV-Tregitope 修饰的 Fc SEQUENCE (Kb SIGNAL SEQUENCE) 由下划线文本表示。Tregitope 以粗体文本表示。Tregitope 修饰的氨基酸以阴影文本表示。人 Fc 区以斜体文本指明。

表 8: EBV-Tregitope 修饰的 Fc 序列

[0248] mvpctlllllaaalaptqtraenkggdggpplmtdggggppgplssslglalllllllallfwlyivmsdwtggal  
 lvlysfalmliiiiiliififrrdllcplgalciillmitlllialwnlhggalflgvlffifgcllvlgwiylle  
 mlwrlgatiwqllafflaffldlillliialylqgnwvtllvdllwllflailiwmyyhqqrhshdehhddslphg  
 ppppprhrdgvrrpqrkpscigckgppgiaeqlrallarshvertgpppgagvfvyggsktslynlrrgtalai  
 gpppgtslynlrrgtalaipqcrlltplsrlgppgresivcyfmvflqthifaevlgppggaikdlvmtkpapcn  
 irvgppgppqrrggdnhgrgrdktht**cp**pcpapell**gg**psvfl**fp**pkp**kd**tl**mi**srtpevt**cv**vv**dv**shedpevk  
 fnwyvdgvevhnakt**kp**ree**qn**st**nr**av**sv**l**tv**lh**qd**wl**ng**keyk**ck**vs**nk**al**p**apiekt**isk**ak**g**pp**re**pp**qv**yt  
 lppsrdeltknqvs**lt**cl**vk**gfypsdiavewes**ng**qpennyk**tt**pp**vl**ds**dg**sfflysk**lt**vdks**rw**q**q**gn**vf**scs  
 vmheal**hn**hy**tq**ks**ls**l**sp**g SEQ ID NO:3

[0249] 参考文献

[0250] Ahlers, J. 等, J. Clin. Invest., 108 :1677-1685, 2001.

[0251] Bischof, F. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 :12168-73, 2001. Epub. 2001 Oct 2.

[0252] Cobbold, S. 等, Immunol Rev., 213 :239-55, 2006.

[0253] D' Ambrosio, D. 等, J. Immunol., 161 :5111-5, 1998.

[0254] De Groot, A. 和 Berzofsky, J., Methods, 34 :425-428, 2004.

[0255] De Groot, A. 等, Immunol. Cell Biol., 80 :255-269, 2002.

[0256] Durinovic-Bello, I. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 :11683-11688, 2006.

[0257] El-Amine, M. 等, J. Immunol., 165 :5631-5636, 2000.

[0258] El-Amine, M. 等., Int. Immunol., 14 :761-766, 2002.

[0259] Feng, I. 等, J Biomed Sci., 14 :43-57, 2006.

[0260] Hjelm, F. 等., Scand. J. Immunol., 64 :177-184, 2006.

[0261] Hochweller, K. 等, Curr. Mol. Med., 6 :631-43, 2006.

[0262] Huang, X. 等, J. Immunol., 175 :4283-4291, 2005.

[0263] Jordan, S. 等, Am. J. Transplant., 6 :459-66, 2006.

[0264] Karlsson M. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 :2244-2249, 1999.

[0265] Klee, L. 和 Zand, R., Neuroinformatics, 2 :59-70, 2004.

[0266] Monneaux, F. 等, J. Immunol., 175 :5839-5847, 2005.

[0267] Mudd, P. 等, Scand. J. Immunol., 64 :211-8, 2006.

[0268] Nagata, K. 等, J. Immunol., 162 :1278-86, 1999.

[0269] Nguyen, V. 等, Biol. Blood Marrow Transplant, 12 :995-1009, 2006.

- [0270] Phillips, W. 等, *Int. Rev. Immunol.*, 24 :501-17, 2005.
- [0271] Reijonen, H. 和 Kwok W. , *Methods*, 29 :282-288, 2003.
- [0272] Reitan, S. 和 Hannestad, K. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 :7588-7593, 2002.
- [0273] Shevach, E. 等, *Immunol. Rev.* , 212 :60-73, 2006.
- [0274] Shioji, K. 等, *Circ. Res.* , 89 :540-546, 2001.
- [0275] Southwood, S. 等, *J. Immunol.* , 160 :3363-3373, 1998.
- [0276] St. Clair, E. 等, *Annu. Rev. Med.* , 58 :329-346, 2006.
- [0277] Stock, P. 等, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* , 6 :12-16, 2006.
- [0278] Sumida, T. 等, *Arthritis Rheum.* , 40 :2271-2273, 1997.
- [0279] Tang, Q. 和 Bluestone, J. *Immunol. Rev.* , 212 :217-37, 2006.
- [0280] Wing, K. 和 Sakaguchi, S. , *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* , 6 :482-488, 2006.
- [0281] Wohlleben, G. 和 Erb, K. , *Curr. Pharm. Des.* , 12 :3281-92, 2006.
- [0282] Zambidis, E. 和 Scott, D. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 :5019-5024, 1996.
- [0283] 等同方案
- [0284] 尽管已联系其具体的实施方案描述了本发明,但应理解的是其可进一步修改。此外,本申请预期涵盖本发明的任何变化、应用或调整,包括本发明所属领域已知或常规实践之内以及属于本发明附加权利要求范围的与本公开的偏离。

## 序列表

- [0001] <110>EPIVAX, INC.  
 [0002]  
 [0003] <120>REGULATORY T CELL EPITOPES, COMPOSITIONS AND USES  
 [0004] THEREOF  
 [0005]  
 [0006] <130>077545-0225  
 [0007] <140>PCT/US08/001148  
 [0008] <141>2008-01-29  
 [0009]  
 [0010] <150>60/898, 347  
 [0011] <151>2007-01-30  
 [0012]  
 [0013] <160>95  
 [0014]  
 [0015] <170>PatentIn version 3.3  
 [0016]  
 [0017] <210>1  
 [0018] <211>2372  
 [0019] <212>PRT  
 [0020] <213> 人工序列  
 [0021]  
 [0022] <220>  
 [0023] <221> 来源  
 [0024] <223>/ 注=人工序列描述：  
 [0025] 合成结构”  
 [0026]  
 [0027] <400>1  
 [0028] Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe  
 [0029] 1 5 10 15  
 [0030] Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser  
 [0031] 20 25 30  
 [0032] Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg  
 [0033] 35 40 45  
 [0034] Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val  
 [0035] 50 55 60  
 [0036] Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile  
 [0037] 65 70 75 80

|        |   |
|--------|---|
| [0038] | Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln |
| [0039] | 85 90 95  |
| [0040] | Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser |
| [0041] | 100 105 110   |
| [0042] | His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser |
| [0043] | 115 120 125   |
| [0044] | Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp |
| [0045] | 130 135 140   |
| [0046] | Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu |
| [0047] | 145 150 155 160   |
| [0048] | Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser |
| [0049] | 165 170 175   |
| [0050] | Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile |
| [0051] | 180 185 190   |
| [0052] | Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr |
| [0053] | 195 200 205   |
| [0054] | Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly |
| [0055] | 210 215 220   |
| [0056] | Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp |
| [0057] | 225 230 235 240   |
| [0058] | Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr |
| [0059] | 245 250 255   |
| [0060] |   |
| [0061] | Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val |
| [0062] | 260 265 270   |
| [0063] | Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile |
| [0064] | 275 280 285   |
| [0065] | Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser |
| [0066] | 290 295 300   |
| [0067] | Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met |
| [0068] | 305 310 315 320   |
| [0069] | Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His |
| [0070] | 325 330 335   |
| [0071] | Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro |
| [0072] | 340 345 350   |
| [0073] | Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp |
| [0074] | 355 360 365   |
| [0075] | Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser |
| [0076] | 370 375 380   |

|        |   |
|--------|---|
| [0077] | Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr |
| [0078] | 385 390 395 400   |
| [0079] | Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro |
| [0080] | 405 410 415   |
| [0081] | Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn |
| [0082] | 420 425 430   |
| [0083] | Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met |
| [0084] | 435 440 445   |
| [0085] | Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu |
| [0086] | 450 455 460   |
| [0087] | Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu |
| [0088] | 465 470 475 480   |
| [0089] | Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro |
| [0090] | 485 490 495   |
| [0091] | His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys |
| [0092] | 500 505 510   |
| [0093] | Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe |
| [0094] | 515 520 525   |
| [0095] | Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp |
| [0096] | 530 535 540   |
| [0097] | Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg |
| [0098] | 545 550 555 560   |
| [0099] | Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu |
| [0100] | 565 570 575   |
| [0101] | Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val |
| [0102] | 580 585 590   |
| [0103] | Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu |
| [0104] | 595 600 605   |
| [0105] | Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp |
| [0106] | 610 615 620   |
| [0107] | Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val |
| [0108] | 625 630 635 640   |
| [0109] | Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp |
| [0110] | 645 650 655   |
| [0111] | Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe |
| [0112] | 660 665 670   |
| [0113] | Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr |
| [0114] | 675 680 685   |
| [0115] | Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro |

|        |   |     |      |
|--------|---|-----|------|
| [0116] | 690   | 695 | 700  |
| [0117] | Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly |     |      |
| [0118] | 705   | 710 | 715  |
| [0119] | Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp |     |      |
| [0120] |   | 725 | 730  |
| [0121] | Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys |     |      |
| [0122] |   | 740 | 745  |
| [0123] | Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro |     |      |
| [0124] |   | 755 | 760  |
| [0125] | Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp |     |      |
| [0126] |   | 770 | 775  |
| [0127] | Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys |     |      |
| [0128] |   | 785 | 790  |
| [0129] | Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser |     |      |
| [0130] |   | 805 | 810  |
| [0131] | Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr |     |      |
| [0132] |   | 820 | 825  |
| [0133] | Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn |     |      |
| [0134] |   | 835 | 840  |
| [0135] | Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly |     |      |
| [0136] |   | 850 | 855  |
| [0137] | Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu |     |      |
| [0138] |   | 865 | 870  |
| [0139] | Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys |     |      |
| [0140] |   | 885 | 890  |
| [0141] | Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn |     |      |
| [0142] |   | 900 | 905  |
| [0143] | Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met |     |      |
| [0144] |   | 915 | 920  |
| [0145] | Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys |     |      |
| [0146] |   | 930 | 935  |
| [0147] | Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu |     |      |
| [0148] |   | 945 | 950  |
| [0149] | Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu |     |      |
| [0150] |   | 965 | 970  |
| [0151] | Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe |     |      |
| [0152] |   | 980 | 985  |
| [0153] | Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala |     |      |
| [0154] |   | 995 | 1000 |

|        |                             |                     |             |
|--------|-----------------------------|---------------------|-------------|
| [0155] | Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser | Leu Leu Lys Thr Asn | Lys Thr Ser |
| [0156] | 1010                        | 1015                | 1020        |
| [0157] | Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg | Lys Thr His Ile Asp | Gly Pro Ser |
| [0158] | 1025                        | 1030                | 1035        |
| [0159] | Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro | Ser Val Trp Gln Asn | Ile Leu Glu |
| [0160] | 1040                        | 1045                | 1050        |
| [0161] | Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys | Val Thr Pro Leu Ile | His Asp Arg |
| [0162] | 1055                        | 1060                | 1065        |
| [0163] | Met Leu Met Asp Lys Asn Ala | Thr Ala Leu Arg Leu | Asn His Met |
| [0164] | 1070                        | 1075                | 1080        |
| [0165] | Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser | Lys Asn Met Glu Met | Val Gln Gln |
| [0166] | 1085                        | 1090                | 1095        |
| [0167] | Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro | Pro Asp Ala Gln Asn | Pro Asp Met |
| [0168] | 1100                        | 1105                | 1110        |
| [0169] | Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe | Leu Pro Glu Ser Ala | Arg Trp Ile |
| [0170] | 1115                        | 1120                | 1125        |
| [0171] | Gln Arg Thr His Gly Lys Asn | Ser Leu Asn Ser Gly | Gln Gly Pro |
| [0172] | 1130                        | 1135                | 1140        |
| [0173] | Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser | Leu Gly Pro Glu Lys | Ser Val Glu |
| [0174] | 1145                        | 1150                | 1155        |
| [0175] | Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu | Lys Asn Lys Val Val | Val Gly Lys |
| [0176] | 1160                        | 1165                | 1170        |
| [0177] | Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val | Gly Leu Lys Glu Met | Val Phe Pro |
| [0178] | 1175                        | 1180                | 1185        |
| [0179] | Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu | Thr Asn Leu Asp Asn | Leu His Glu |
| [0180] | 1190                        | 1195                | 1200        |
| [0181] | Asn Asn Thr His Asn Gln Glu | Lys Lys Ile Gln Glu | Glu Ile Glu |
| [0182] | 1205                        | 1210                | 1215        |
| [0183] | Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln | Glu Asn Val Val Leu | Pro Gln Ile |
| [0184] | 1220                        | 1225                | 1230        |
| [0185] | His Thr Val Thr Gly Thr Lys | Asn Phe Met Lys Asn | Leu Phe Leu |
| [0186] | 1235                        | 1240                | 1245        |
| [0187] | Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val | Glu Gly Ser Tyr Asp | Gly Ala Tyr |
| [0188] | 1250                        | 1255                | 1260        |
| [0189] | Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe | Arg Ser Leu Asn Asp | Ser Thr Asn |
| [0190] | 1265                        | 1270                | 1275        |
| [0191] | Arg Thr Lys Lys His Thr Ala | His Phe Ser Lys Lys | Gly Glu Glu |
| [0192] | 1280                        | 1285                | 1290        |
| [0193] | Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly | Asn Gln Thr Lys Gln | Ile Val Glu |

|        |   |      |      |
|--------|---|------|------|
| [0194] | 1295  | 1300 | 1305 |
| [0195] | Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln |      |      |
| [0196] | 1310  | 1315 | 1320 |
| [0197] | Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg |      |      |
| [0198] | 1325  | 1330 | 1335 |
| [0199] | Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp |      |      |
| [0200] | 1340  | 1345 | 1350 |
| [0201] | Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro |      |      |
| [0202] | 1355  | 1360 | 1365 |
| [0203] | Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala |      |      |
| [0204] | 1370  | 1375 | 1380 |
| [0205] | Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser |      |      |
| [0206] | 1385  | 1390 | 1395 |
| [0207] | Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser |      |      |
| [0208] | 1400  | 1405 | 1410 |
| [0209] | Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe |      |      |
| [0210] | 1415  | 1420 | 1425 |
| [0211] | Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys |      |      |
| [0212] | 1430  | 1435 | 1440 |
| [0213] | Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys |      |      |
| [0214] | 1445  | 1450 | 1455 |
| [0215] | Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly |      |      |
| [0216] | 1460  | 1465 | 1470 |
| [0217] | Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser |      |      |
| [0218] | 1475  | 1480 | 1485 |
| [0219] | Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp |      |      |
| [0220] | 1490  | 1495 | 1500 |
| [0221] | Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His |      |      |
| [0222] | 1505  | 1510 | 1515 |
| [0223] | Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser |      |      |
| [0224] | 1520  | 1525 | 1530 |
| [0225] | Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr |      |      |
| [0226] | 1535  | 1540 | 1545 |
| [0227] | Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val |      |      |
| [0228] | 1550  | 1555 | 1560 |
| [0229] | Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser |      |      |
| [0230] | 1565  | 1570 | 1575 |
| [0231] | Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln |      |      |
| [0232] | 1580  | 1585 | 1590 |

|        |   |
|--------|---|
| [0233] | Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys |
| [0234] | 1595 1600 1605  |
| [0235] | Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys |
| [0236] | 1610 1615 1620  |
| [0237] | Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys |
| [0238] | 1625 1630 1635  |
| [0239] | Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg |
| [0240] | 1640 1645 1650  |
| [0241] | Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu |
| [0242] | 1655 1660 1665  |
| [0243] | Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr |
| [0244] | 1670 1675 1680  |
| [0245] | Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile |
| [0246] | 1685 1690 1695  |
| [0247] | Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys |
| [0248] | 1700 1705 1710  |
| [0249] | Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr |
| [0250] | 1715 1720 1725  |
| [0251] | Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser |
| [0252] | 1730 1735 1740  |
| [0253] | Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr |
| [0254] | 1745 1750 1755  |
| [0255] | Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu |
| [0256] | 1760 1765 1770  |
| [0257] | His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp |
| [0258] | 1775 1780 1785  |
| [0259] | Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser |
| [0260] | 1790 1795 1800  |
| [0261] | Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly |
| [0262] | 1805 1810 1815  |
| [0263] | Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr |
| [0264] | 1820 1825 1830  |
| [0265] | Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu |
| [0266] | 1835 1840 1845  |
| [0267] | Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu |
| [0268] | 1850 1855 1860  |
| [0269] | Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His |
| [0270] | 1865 1870 1875  |
| [0271] | Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln |

|        |   |      |      |
|--------|---|------|------|
| [0272] | 1880  | 1885 | 1890 |
| [0273] | Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp |      |      |
| [0274] | 1895  | 1900 | 1905 |
| [0275] | Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Ser Asn |      |      |
| [0276] | 1910  | 1915 | 1920 |
| [0277] | Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His |      |      |
| [0278] | 1925  | 1930 | 1935 |
| [0279] | Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met |      |      |
| [0280] | 1940  | 1945 | 1950 |
| [0281] | Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser |      |      |
| [0282] | 1955  | 1960 | 1965 |
| [0283] | Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr |      |      |
| [0284] | 1970  | 1975 | 1980 |
| [0285] | Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr |      |      |
| [0286] | 1985  | 1990 | 1995 |
| [0287] | Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly |      |      |
| [0288] | 2000  | 2005 | 2010 |
| [0289] | Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly |      |      |
| [0290] | 2015  | 2020 | 2025 |
| [0291] | Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro |      |      |
| [0292] | 2030  | 2035 | 2040 |
| [0293] | Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala |      |      |
| [0294] | 2045  | 2050 | 2055 |
| [0295] | Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His |      |      |
| [0296] | 2060  | 2065 | 2070 |
| [0297] | Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser |      |      |
| [0298] | 2075  | 2080 | 2085 |
| [0299] | Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile |      |      |
| [0300] | 2090  | 2095 | 2100 |
| [0301] | Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser |      |      |
| [0302] | 2105  | 2110 | 2115 |
| [0303] | Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr |      |      |
| [0304] | 2120  | 2125 | 2130 |
| [0305] | Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn |      |      |
| [0306] | 2135  | 2140 | 2145 |
| [0307] | Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile |      |      |
| [0308] | 2150  | 2155 | 2160 |
| [0309] | Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg |      |      |
| [0310] | 2165  | 2170 | 2175 |

|        |   |
|--------|---|
| [0311] | Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys     |
| [0312] | 2180 2185 2190  |
| [0313] | Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln     |
| [0314] | 2195 2200 2205  |
| [0315] | Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser     |
| [0316] | 2210 2215 2220  |
| [0317] | Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp     |
| [0318] | 2225 2230 2235  |
| [0319] | Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe     |
| [0320] | 2240 2245 2250  |
| [0321] | Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys     |
| [0322] | 2255 2260 2265  |
| [0323] | Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser     |
| [0324] | 2270 2275 2280  |
| [0325] | Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys     |
| [0326] | 2285 2290 2295  |
| [0327] | Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val     |
| [0328] | 2300 2305 2310  |
| [0329] | Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His     |
| [0330] | 2315 2320 2325  |
| [0331] | Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu     |
| [0332] | 2330 2335 2340  |
| [0333] | Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr     |
| [0334] | 2345 2350 2355  |
| [0335] | Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp         |
| [0336] | 2360 2365 2370  |
| [0337] | <210>2  |
| [0338] | <211>2435   |
| [0339] | <212>PRT  |
| [0340] | <213>人工序列   |
| [0341] |   |
| [0342] | <220>   |
| [0343] | <221>来源   |
| [0344] | <223>/注="人工序列描述：  |
| [0345] | 合成结构"   |
| [0346] |   |
| [0347] | <400>2  |
| [0348] | Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe |
| [0349] | 1 5 10 15   |

|        |   |
|--------|---|
| [0350] | Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser |
| [0351] | 20 25 30  |
| [0352] | Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg |
| [0353] | 35 40 45  |
| [0354] | Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val |
| [0355] | 50 55 60  |
| [0356] | Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile |
| [0357] | 65 70 75 80   |
| [0358] | Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln |
| [0359] | 85 90 95  |
| [0360] | Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser |
| [0361] | 100 105 110   |
| [0362] | His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser |
| [0363] | 115 120 125   |
| [0364] | Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp |
| [0365] | 130 135 140   |
| [0366] | Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu |
| [0367] | 145 150 155 160   |
| [0368] | Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser |
| [0369] | 165 170 175   |
| [0370] | Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile |
| [0371] | 180 185 190   |
| [0372] | Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr |
| [0373] | 195 200 205   |
| [0374] | Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly |
| [0375] | 210 215 220   |
| [0376] | Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp |
| [0377] | 225 230 235 240   |
| [0378] | Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr |
| [0379] | 245 250 255   |
| [0380] | Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val |
| [0381] | 260 265 270   |
| [0382] | Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile |
| [0383] | 275 280 285   |
| [0384] | Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser |
| [0385] | 290 295 300   |
| [0386] | Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met |
| [0387] | 305 310 315 320   |
| [0388] | Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His |

|        |   |     |  |     |  |     |
|--------|---|-----|--|-----|--|-----|
| [0389] |   | 325 |  | 330 |  | 335 |
| [0390] | Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro |     |  |     |  |     |
| [0391] |   | 340 |  | 345 |  | 350 |
| [0392] | Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp |     |  |     |  |     |
| [0393] |   | 355 |  | 360 |  | 365 |
| [0394] | Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser |     |  |     |  |     |
| [0395] |   | 370 |  | 375 |  | 380 |
| [0396] | Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr |     |  |     |  |     |
| [0397] |   | 385 |  | 390 |  | 395 |
| [0398] | Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro |     |  |     |  |     |
| [0399] |   | 405 |  | 410 |  | 415 |
| [0400] | Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn |     |  |     |  |     |
| [0401] |   | 420 |  | 425 |  | 430 |
| [0402] | Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met |     |  |     |  |     |
| [0403] |   | 435 |  | 440 |  | 445 |
| [0404] | Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu |     |  |     |  |     |
| [0405] |   | 450 |  | 455 |  | 460 |
| [0406] | Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu |     |  |     |  |     |
| [0407] |   | 465 |  | 470 |  | 475 |
| [0408] | Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro |     |  |     |  |     |
| [0409] |   | 485 |  | 490 |  | 495 |
| [0410] | His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys |     |  |     |  |     |
| [0411] |   | 500 |  | 505 |  | 510 |
| [0412] | Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe |     |  |     |  |     |
| [0413] |   | 515 |  | 520 |  | 525 |
| [0414] | Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp |     |  |     |  |     |
| [0415] |   | 530 |  | 535 |  | 540 |
| [0416] | Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg |     |  |     |  |     |
| [0417] |   | 545 |  | 550 |  | 555 |
| [0418] | Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu |     |  |     |  |     |
| [0419] |   | 565 |  | 570 |  | 575 |
| [0420] | Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val |     |  |     |  |     |
| [0421] |   | 580 |  | 585 |  | 590 |
| [0422] | Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu |     |  |     |  |     |
| [0423] |   | 595 |  | 600 |  | 605 |
| [0424] | Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp |     |  |     |  |     |
| [0425] |   | 610 |  | 615 |  | 620 |
| [0426] | Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val |     |  |     |  |     |
| [0427] |   | 625 |  | 630 |  | 635 |
|        |   |     |  |     |  | 640 |

|        |   |
|--------|---|
| [0428] | Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp |
| [0429] | 645 650 655   |
| [0430] | Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe |
| [0431] | 660 665 670   |
| [0432] | Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr |
| [0433] | 675 680 685   |
| [0434] | Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro |
| [0435] | 690 695 700   |
| [0436] | Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly |
| [0437] | 705 710 715 720   |
| [0438] | Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp |
| [0439] | 725 730 735   |
| [0440] | Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys |
| [0441] | 740 745 750   |
| [0442] | Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro |
| [0443] | 755 760 765   |
| [0444] | Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp |
| [0445] | 770 775 780   |
| [0446] | Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys |
| [0447] | 785 790 795 800   |
| [0448] | Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser |
| [0449] | 805 810 815   |
| [0450] | Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr |
| [0451] | 820 825 830   |
| [0452] | Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn |
| [0453] | 835 840 845   |
| [0454] | Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly |
| [0455] | 850 855 860   |
| [0456] | Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu |
| [0457] | 865 870 875 880   |
| [0458] | Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys |
| [0459] | 885 890 895   |
| [0460] | Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn |
| [0461] | 900 905 910   |
| [0462] | Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met |
| [0463] | 915 920 925   |
| [0464] | Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys |
| [0465] | 930 935 940   |
| [0466] | Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu |

|        |   |      |      |      |
|--------|---|------|------|------|
| [0467] | 945   | 950  | 955  | 960  |
| [0468] | Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu |      |      |      |
| [0469] |   | 965  | 970  | 975  |
| [0470] | Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe |      |      |      |
| [0471] |   | 980  | 985  | 990  |
| [0472] | Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala |      |      |      |
| [0473] |   | 995  | 1000 | 1005 |
| [0474] | Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser     |      |      |      |
| [0475] |   | 1010 | 1015 | 1020 |
| [0476] | Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser     |      |      |      |
| [0477] |   | 1025 | 1030 | 1035 |
| [0478] | Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu     |      |      |      |
| [0479] |   | 1040 | 1045 | 1050 |
| [0480] | Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg     |      |      |      |
| [0481] |   | 1055 | 1060 | 1065 |
| [0482] | Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met     |      |      |      |
| [0483] |   | 1070 | 1075 | 1080 |
| [0484] | Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln     |      |      |      |
| [0485] |   | 1085 | 1090 | 1095 |
| [0486] | Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met     |      |      |      |
| [0487] |   | 1100 | 1105 | 1110 |
| [0488] | Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile     |      |      |      |
| [0489] |   | 1115 | 1120 | 1125 |
| [0490] | Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro     |      |      |      |
| [0491] |   | 1130 | 1135 | 1140 |
| [0492] | Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu     |      |      |      |
| [0493] |   | 1145 | 1150 | 1155 |
| [0494] | Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys     |      |      |      |
| [0495] |   | 1160 | 1165 | 1170 |
| [0496] | Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro     |      |      |      |
| [0497] |   | 1175 | 1180 | 1185 |
| [0498] | Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu     |      |      |      |
| [0499] |   | 1190 | 1195 | 1200 |
| [0500] | Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu     |      |      |      |
| [0501] |   | 1205 | 1210 | 1215 |
| [0502] | Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile     |      |      |      |
| [0503] |   | 1220 | 1225 | 1230 |
| [0504] | His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu     |      |      |      |
| [0505] |   | 1235 | 1240 | 1245 |

|        |                             |                     |             |
|--------|-----------------------------|---------------------|-------------|
| [0506] | Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val | Glu Gly Ser Tyr Asp | Gly Ala Tyr |
| [0507] | 1250                        | 1255                | 1260        |
| [0508] | Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe | Arg Ser Leu Asn Asp | Ser Thr Asn |
| [0509] | 1265                        | 1270                | 1275        |
| [0510] | Arg Thr Lys Lys His Thr Ala | His Phe Ser Lys Lys | Gly Glu Glu |
| [0511] | 1280                        | 1285                | 1290        |
| [0512] | Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly | Asn Gln Thr Lys Gln | Ile Val Glu |
| [0513] | 1295                        | 1300                | 1305        |
| [0514] | Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg | Ile Ser Pro Asn Thr | Ser Gln Gln |
| [0515] | 1310                        | 1315                | 1320        |
| [0516] | Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser | Lys Arg Ala Leu Lys | Gln Phe Arg |
| [0517] | 1325                        | 1330                | 1335        |
| [0518] | Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu | Leu Glu Lys Arg Ile | Ile Val Asp |
| [0519] | 1340                        | 1345                | 1350        |
| [0520] | Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser | Lys Asn Met Lys His | Leu Thr Pro |
| [0521] | 1355                        | 1360                | 1365        |
| [0522] | Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp | Tyr Asn Glu Lys Glu | Lys Gly Ala |
| [0523] | 1370                        | 1375                | 1380        |
| [0524] | Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser | Asp Cys Leu Thr Arg | Ser His Ser |
| [0525] | 1385                        | 1390                | 1395        |
| [0526] | Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser | Pro Leu Pro Ile Ala | Lys Val Ser |
| [0527] | 1400                        | 1405                | 1410        |
| [0528] | Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro | Ile Tyr Leu Thr Arg | Val Leu Phe |
| [0529] | 1415                        | 1420                | 1425        |
| [0530] | Gln Asp Asn Ser Ser His Leu | Pro Ala Ala Ser Tyr | Arg Lys Lys |
| [0531] | 1430                        | 1435                | 1440        |
| [0532] | Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser | Ser His Phe Leu Gln | Gly Ala Lys |
| [0533] | 1445                        | 1450                | 1455        |
| [0534] | Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala | Ile Leu Thr Leu Glu | Met Thr Gly |
| [0535] | 1460                        | 1465                | 1470        |
| [0536] | Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser | Leu Gly Thr Ser Ala | Thr Asn Ser |
| [0537] | 1475                        | 1480                | 1485        |
| [0538] | Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu | Asn Thr Val Leu Pro | Lys Pro Asp |
| [0539] | 1490                        | 1495                | 1500        |
| [0540] | Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys | Val Glu Leu Leu Pro | Lys Val His |
| [0541] | 1505                        | 1510                | 1515        |
| [0542] | Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe | Pro Thr Glu Thr Ser | Asn Gly Ser |
| [0543] | 1520                        | 1525                | 1530        |
| [0544] | Pro Gly His Leu Asp Leu Val | Glu Gly Ser Leu Leu | Gln Gly Thr |

|        |                             |                     |             |
|--------|-----------------------------|---------------------|-------------|
| [0545] | 1535                        | 1540                | 1545        |
| [0546] | Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn | Glu Ala Asn Arg Pro | Gly Lys Val |
| [0547] | 1550                        | 1555                | 1560        |
| [0548] | Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr | Glu Ser Ser Ala Lys | Thr Pro Ser |
| [0549] | 1565                        | 1570                | 1575        |
| [0550] | Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala | Trp Asp Asn His Tyr | Gly Thr Gln |
| [0551] | 1580                        | 1585                | 1590        |
| [0552] | Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys | Ser Gln Glu Lys Ser | Pro Glu Lys |
| [0553] | 1595                        | 1600                | 1605        |
| [0554] | Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp | Thr Ile Leu Ser Leu | Asn Ala Cys |
| [0555] | 1610                        | 1615                | 1620        |
| [0556] | Glu Ser Asn His Ala Ile Ala | Ala Ile Asn Glu Gly | Gln Asn Lys |
| [0557] | 1625                        | 1630                | 1635        |
| [0558] | Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp | Ala Lys Gln Gly Arg | Thr Glu Arg |
| [0559] | 1640                        | 1645                | 1650        |
| [0560] | Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro | Val Leu Lys Arg His | Gln Arg Glu |
| [0561] | 1655                        | 1660                | 1665        |
| [0562] | Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln | Ser Asp Gln Glu Glu | Ile Asp Tyr |
| [0563] | 1670                        | 1675                | 1680        |
| [0564] | Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu | Met Lys Lys Glu Asp | Phe Asp Ile |
| [0565] | 1685                        | 1690                | 1695        |
| [0566] | Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln | Ser Pro Arg Ser Phe | Gln Lys Lys |
| [0567] | 1700                        | 1705                | 1710        |
| [0568] | Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala | Ala Val Glu Arg Leu | Trp Asp Tyr |
| [0569] | 1715                        | 1720                | 1725        |
| [0570] | Gly Met Ser Ser Ser Pro His | Val Leu Arg Asn Arg | Ala Gln Ser |
| [0571] | 1730                        | 1735                | 1740        |
| [0572] | Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys | Lys Val Val Phe Gln | Glu Phe Thr |
| [0573] | 1745                        | 1750                | 1755        |
| [0574] | Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro | Leu Tyr Arg Gly Glu | Leu Asn Glu |
| [0575] | 1760                        | 1765                | 1770        |
| [0576] | His Leu Gly Leu Leu Gly Pro | Tyr Ile Arg Ala Glu | Val Glu Asp |
| [0577] | 1775                        | 1780                | 1785        |
| [0578] | Asn Ile Met Val Thr Phe Arg | Asn Gln Ala Ser Arg | Pro Tyr Ser |
| [0579] | 1790                        | 1795                | 1800        |
| [0580] | Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser | Tyr Glu Glu Asp Gln | Arg Gln Gly |
| [0581] | 1805                        | 1810                | 1815        |
| [0582] | Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe | Val Lys Pro Asn Glu | Thr Lys Thr |
| [0583] | 1820                        | 1825                | 1830        |

|        |   |
|--------|---|
| [0584] | Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu |
| [0585] | 1835 1840 1845  |
| [0586] | Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu |
| [0587] | 1850 1855 1860  |
| [0588] | Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His |
| [0589] | 1865 1870 1875  |
| [0590] | Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln |
| [0591] | 1880 1885 1890  |
| [0592] | Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp |
| [0593] | 1895 1900 1905  |
| [0594] | Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Ser Asn |
| [0595] | 1910 1915 1920  |
| [0596] | Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His |
| [0597] | 1925 1930 1935  |
| [0598] | Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met |
| [0599] | 1940 1945 1950  |
| [0600] | Ala Gln Asp Gln ArgIle Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser  |
| [0601] | 1955 1960 1965  |
| [0602] | Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr |
| [0603] | 1970 1975 1980  |
| [0604] | Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr |
| [0605] | 1985 1990 1995  |
| [0606] | Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly |
| [0607] | 2000 2005 2010  |
| [0608] | Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly |
| [0609] | 2015 2020 2025  |
| [0610] | Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro |
| [0611] | 2030 2035 2040  |
| [0612] | Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala |
| [0613] | 2045 2050 2055  |
| [0614] | Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His |
| [0615] | 2060 2065 2070  |
| [0616] | Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser |
| [0617] | 2075 2080 2085  |
| [0618] | Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile |
| [0619] | 2090 2095 2100  |
| [0620] | Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser |
| [0621] | 2105 2110 2115  |
| [0622] | Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr |

|        |   |      |      |
|--------|---|------|------|
| [0623] | 2120  | 2125 | 2130 |
| [0624] | Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn |      |      |
| [0625] | 2135  | 2140 | 2145 |
| [0626] | Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile |      |      |
| [0627] | 2150  | 2155 | 2160 |
| [0628] | Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg |      |      |
| [0629] | 2165  | 2170 | 2175 |
| [0630] | Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys |      |      |
| [0631] | 2180  | 2185 | 2190 |
| [0632] | Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln |      |      |
| [0633] | 2195  | 2200 | 2205 |
| [0634] | Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser |      |      |
| [0635] | 2210  | 2215 | 2220 |
| [0636] | Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp |      |      |
| [0637] | 2225  | 2230 | 2235 |
| [0638] | Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe |      |      |
| [0639] | 2240  | 2245 | 2250 |
| [0640] | Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys |      |      |
| [0641] | 2255  | 2260 | 2265 |
| [0642] | Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser |      |      |
| [0643] | 2270  | 2275 | 2280 |
| [0644] | Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys |      |      |
| [0645] | 2285  | 2290 | 2295 |
| [0646] | Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val |      |      |
| [0647] | 2300  | 2305 | 2310 |
| [0648] | Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His |      |      |
| [0649] | 2315  | 2320 | 2325 |
| [0650] | Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu |      |      |
| [0651] | 2330  | 2335 | 2340 |
| [0652] | Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr |      |      |
| [0653] | 2345  | 2350 | 2355 |
| [0654] | Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Glu |      |      |
| [0655] | 2360  | 2365 | 2370 |
| [0656] | Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val |      |      |
| [0657] | 2375  | 2380 | 2385 |
| [0658] | Leu His Gln Asp Trp Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val |      |      |
| [0659] | 2390  | 2395 | 2400 |
| [0660] | Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Glu Glu Gln Tyr |      |      |
| [0661] | 2405  | 2410 | 2415 |

[0662] Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 [0663] 2420 2425 2430  
 [0664] Asp Trp  
 [0665] 2435  
 [0666] <210>3  
 [0667] <211>628  
 [0668] <212>PRT  
 [0669] <213>人工序列  
 [0670]  
 [0671] <220>  
 [0672] <221>来源  
 [0673] <223>/注="人工序列描述：  
 [0674] 合成结构"  
 [0675]  
 [0676] <400>3  
 [0677] Met Val Pro Cys Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro  
 [0678] 1 5 10 15  
 [0679] Thr Gln Thr Arg Ala Glu Asn Lys Gly Gly Asp Gln Gly Pro Pro Leu  
 [0680] 20 25 30  
 [0681] Met Thr Asp Gly Gly Gly Gly Pro Gly Pro Gly Pro Leu Ser Ser Ser  
 [0682] 35 40 45  
 [0683] Leu Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe Trp Leu  
 [0684] 50 55 60  
 [0685] Tyr Ile Val Met Ser Asp Trp Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr  
 [0686] 65 70 75 80  
 [0687] Ser Phe Ala Leu Met Leu Ile Ile Ile Ile Leu Ile Ile Phe Ile Phe  
 [0688] 85 90 95  
 [0689] Arg Arg Asp Leu Leu Cys Pro Leu Gly Ala Leu Cys Ile Leu Leu Leu  
 [0690] 100 105 110  
 [0691] Met Ile Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Asn Leu His Gly Gln Ala  
 [0692] 115 120 125  
 [0693] Leu Phe Leu Gly Ile Val Leu Phe Ile Phe Gly Cys Leu Leu Val Leu  
 [0694] 130 135 140  
 [0695] Gly Ile Trp Ile Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu Gly Ala Thr  
 [0696] 145 150 155 160  
 [0697] Ile Trp Gln Leu Leu Ala Phe Phe Leu Ala Phe Phe Leu Asp Leu Ile  
 [0698] 165 170 175  
 [0699] Leu Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu  
 [0700] 180 185 190

|        |   |
|--------|---|
| [0701] | Val Asp Leu Leu Trp Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ile Leu Ile Trp Met |
| [0702] | 195 200 205   |
| [0703] | Tyr Tyr His Gly Gln Arg His Ser Asp Glu His His His Asp Asp Ser |
| [0704] | 210 215 220   |
| [0705] | Leu Pro His Gly Pro Gly Pro Gly Gly Pro Arg His Arg Asp Gly Val |
| [0706] | 225 230 235 240   |
| [0707] | Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile Gly Cys Lys Gly Pro Gly |
| [0708] | 245 250 255   |
| [0709] | Pro Gly Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val |
| [0710] | 260 265 270   |
| [0711] | Glu Arg Thr Gly Pro Gly Pro Gly Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly |
| [0712] | 275 280 285   |
| [0713] | Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile |
| [0714] | 290 295 300   |
| [0715] | Gly Pro Gly Pro Gly Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala |
| [0716] | 305 310 315 320   |
| [0717] | Leu Ala Ile Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Gly Pro |
| [0718] | 325 330 335   |
| [0719] | Gly Pro Gly Arg Glu Ser Ile Val Cys Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln |
| [0720] | 340 345 350   |
| [0721] | Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Gly Pro Gly Pro Gly Ala Ile Lys |
| [0722] | 355 360 365   |
| [0723] | Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn Ile Arg Val Gly |
| [0724] | 370 375 380   |
| [0725] | Pro Gly Pro Gly Gly Pro Gln Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg |
| [0726] | 385 390 395 400   |
| [0727] | Gly Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu |
| [0728] | 405 410 415   |
| [0729] | Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr |
| [0730] | 420 425 430   |
| [0731] | Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val |
| [0732] | 435 440 445   |
| [0733] | Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val |
| [0734] | 450 455 460   |
| [0735] | Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asn Asn Ser |
| [0736] | 465 470 475 480   |
| [0737] | Thr Asn Arg Ala Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu |
| [0738] | 485 490 495   |
| [0739] | Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala |

|        |   |     |     |
|--------|---|-----|-----|
| [0740] | 500   | 505 | 510 |
| [0741] | Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro |     |     |
| [0742] | 515   | 520 | 525 |
| [0743] | Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln |     |     |
| [0744] | 530   | 535 | 540 |
| [0745] | Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala |     |     |
| [0746] | 545   | 550 | 555 |
| [0747] | Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr |     |     |
| [0748] | 565   | 570 | 575 |
| [0749] | Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu |     |     |
| [0750] | 580   | 585 | 590 |
| [0751] | Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser |     |     |
| [0752] | 595   | 600 | 605 |
| [0753] | Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser |     |     |
| [0754] | 610   | 615 | 620 |
| [0755] | Leu Ser Pro Gly   |     |     |
| [0756] | 625   |     |     |
| [0757] | <210>4  |     |     |
| [0758] | <211>21   |     |     |
| [0759] | <212>PRT  |     |     |
| [0760] | <213> 人 (Homo sapiens)  |     |     |
| [0761] |   |     |     |
| [0762] | <400>4  |     |     |
| [0763] | Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val |     |     |
| [0764] | 1   | 5   | 10  |
| [0765] | Leu His Gln Asp Trp   |     |     |
| [0766] | 20  |     |     |
| [0767] | <210>5  |     |     |
| [0768] | <211>26   |     |     |
| [0769] | <212>PRT  |     |     |
| [0770] | <213> 人 (Homo sapiens)  |     |     |
| [0771] |   |     |     |
| [0772] | <400>5  |     |     |
| [0773] | Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val |     |     |
| [0774] | 1   | 5   | 10  |
| [0775] | Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln                         |     |     |
| [0776] | 20  | 25  |     |
| [0777] | <210>6  |     |     |
| [0778] | <211>15   |     |     |

[0779] <212>PRT  
 [0780] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0781]  
 [0782] <400>6  
 [0783] Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr  
 [0784] 1 5 10 15  
 [0785] <210>7  
 [0786] <211>21  
 [0787] <212>PRT  
 [0788] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0789]  
 [0790] <400>7  
 [0791] Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 [0792] 1 5 10 15  
 [0793] Ser Gly Phe Thr Phe  
 [0794] 20  
 [0795] <210>8  
 [0796] <211>21  
 [0797] <212>PRT  
 [0798] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0799]  
 [0800] <400>8  
 [0801] Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 [0802] 1 5 10 15  
 [0803] Ser Gly Phe Thr Phe  
 [0804] 20  
 [0805] <210>9  
 [0806] <211>15  
 [0807] <212>PRT  
 [0808] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0809]  
 [0810] <400>9  
 [0811] Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 [0812] 1 5 10 15  
 [0813] <210>10  
 [0814] <211>15  
 [0815] <212>PRT  
 [0816] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0817]

[0818] <400>10  
 [0819] Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0820] 1 5 10 15  
 [0821] <210>11  
 [0822] <211>15  
 [0823] <212>PRT  
 [0824] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0825]  
 [0826] <400>11  
 [0827] Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0828] 1 5 10 15  
 [0829] <210>12  
 [0830] <211>15  
 [0831] <212>PRT  
 [0832] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0833]  
 [0834] <400>12  
 [0835] Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0836] 1 5 10 15  
 [0837] <210>13  
 [0838] <211>15  
 [0839] <212>PRT  
 [0840] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0841]  
 [0842] <400>13  
 [0843] Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0844] 1 5 10 15  
 [0845] <210>14  
 [0846] <211>21  
 [0847] <212>PRT  
 [0848] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0849]  
 [0850] <400>14  
 [0851] Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr  
 [0852] 1 5 10 15  
 [0853] Ala Ala Asp Thr Ala  
 [0854] 20  
 [0855] <210>15  
 [0856] <211>21

[0857] <212>PRT  
 [0858] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0859]  
 [0860] <400>15  
 [0861] Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
 [0862] 1                    5                    10                    15  
 [0863] Val Tyr Tyr Cys Ala  
 [0864]                    20  
 [0865] <210>16  
 [0866] <211>14  
 [0867] <212>PRT  
 [0868] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0869]  
 [0870] <400>16  
 [0871] Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0872] 1                    5                    10  
 [0873] <210>17  
 [0874] <211>14  
 [0875] <212>PRT  
 [0876] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0877]  
 [0878] <400>17  
 [0879] Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0880] 1                    5                    10  
 [0881] <210>18  
 [0882] <211>14  
 [0883] <212>PRT  
 [0884] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0885]  
 [0886] <400>18  
 [0887] Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 [0888] 1                    5                    10  
 [0889] <210>19  
 [0890] <211>14  
 [0891] <212>PRT  
 [0892] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0893]  
 [0894] <400>19  
 [0895] Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

|        |   |   |       |
|--------|---|---|-------|
| [0896] | 1   | 5 | 10    |
| [0897] | <210>20   |   |       |
| [0898] | <211>14   |   |       |
| [0899] | <212>PRT  |   |       |
| [0900] | <213> 人 (Homo sapiens)  |   |       |
| [0901] |   |   |       |
| [0902] | <400>20   |   |       |
| [0903] | Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser         |   |       |
| [0904] | 1   | 5 | 10    |
| [0905] | <210>21   |   |       |
| [0906] | <211>14   |   |       |
| [0907] | <212>PRT  |   |       |
| [0908] | <213> 人 (Homo sapiens)  |   |       |
| [0909] |   |   |       |
| [0910] | <400>21   |   |       |
| [0911] | Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser         |   |       |
| [0912] | 1   | 5 | 10    |
| [0913] | <210>22   |   |       |
| [0914] | <211>14   |   |       |
| [0915] | <212>PRT  |   |       |
| [0916] | <213> 人 (Homo sapiens)  |   |       |
| [0917] |   |   |       |
| [0918] | <400>22   |   |       |
| [0919] | Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser         |   |       |
| [0920] | 1   | 5 | 10    |
| [0921] | <210>23   |   |       |
| [0922] | <211>24   |   |       |
| [0923] | <212>PRT  |   |       |
| [0924] | <213> 人 (Homo sapiens)  |   |       |
| [0925] |   |   |       |
| [0926] | <400>23   |   |       |
| [0927] | Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp |   |       |
| [0928] | 1   | 5 | 10 15 |
| [0929] | Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser                                 |   |       |
| [0930] | 20  |   |       |
| [0931] | <210>24   |   |       |
| [0932] | <211>14   |   |       |
| [0933] | <212>PRT  |   |       |
| [0934] | <213> 人 (Homo sapiens)  |   |       |

[0935]

[0936] <400>24

[0937] Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

[0938] 1 5 10

[0939] <210>25

[0940] <211>13

[0941] <212>PRT

[0942] <213> 人 (Homo sapiens)

[0943]

[0944] <400>25

[0945] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

[0946] 1 5 10

[0947] <210>26

[0948] <211>13

[0949] <212>PRT

[0950] <213> 人 (Homo sapiens)

[0951]

[0952] <400>26

[0953] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu

[0954] 1 5 10

[0955] <210>27

[0956] <211>15

[0957] <212>PRT

[0958] <213> 人 (Homo sapiens)

[0959]

[0960] <400>27

[0961] Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser

[0962] 1 5 10 15

[0963] <210>28

[0964] <211>14

[0965] <212>PRT

[0966] <213> 人 (Homo sapiens)

[0967]

[0968] <400>28

[0969] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

[0970] 1 5 10

[0971] <210>29

[0972] <211>14

[0973] <212>PRT

[0974] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0975]  
 [0976] <400>29  
 [0977] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu  
 [0978] 1 5 10  
 [0979] <210>30  
 [0980] <211>15  
 [0981] <212>PRT  
 [0982] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0983]  
 [0984] <400>30  
 [0985] Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp  
 [0986] 1 5 10 15  
 [0987] <210>31  
 [0988] <211>15  
 [0989] <212>PRT  
 [0990] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0991] <400>31  
 [0992] Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
 [0993] 1 5 10 15  
 [0994] <210>32  
 [0995] <211>13  
 [0996] <212>PRT  
 [0997] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0998]  
 [0999] <400>32  
 [1000] Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser  
 [1001] 1 5 10  
 [1002] <210>33  
 [1003] <211>15  
 [1004] <212>PRT  
 [1005] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1006]  
 [1007] <400>33  
 [1008] Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val  
 [1009] 1 5 10 15  
 [1010] <210>34  
 [1011] <211>14  
 [1012] <212>PRT

- [1013] <213> 人 (Homo sapiens)
- [1014]
- [1015] <400>34
- [1016] Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
- [1017] 1 5 10
- [1018] <210>35
- [1019] <211>14
- [1020] <212>PRT
- [1021] <213> 人 (Homo sapiens)
- [1022]
- [1023] <400>35
- [1024] Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
- [1025] 1 5 10
- [1026] <210>36
- [1027] <211>14
- [1028] <212>PRT
- [1029] <213> 人 (Homo sapiens)
- [1030]
- [1031] <400>36
- [1032] Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
- [1033] 1 5 10
- [1034] <210>37
- [1035] <211>15
- [1036] <212>PRT
- [1037] <213> 人 (Homo sapiens)
- [1038] <400>37
- [1039] Leu Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp
- [1040] 1 5 10 15
- [1041] <210>38
- [1042] <211>19
- [1043] <212>PRT
- [1044] <213> 人 (Homo sapiens)
- [1045] <400>38
- [1046] Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr
- [1047] 1 5 10 15
- [1048] Ala Pro Glu
- [1049] <210>39
- [1050] <211>22
- [1051] <212>PRT

[1052] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1053]  
 [1054] <400>39  
 [1055] Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr  
 [1056] 1 5 10 15  
 [1057] Glu Cys Cys Gln Ala Ala  
 [1058] 20  
 [1059] <210>40  
 [1060] <211>21  
 [1061] <212>PRT  
 [1062] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1063]  
 [1064] <400>40  
 [1065] His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr  
 [1066] 1 5 10 15  
 [1067] Glu Thr Thr Leu Glu  
 [1068] 20  
 [1069] <210>41  
 [1070] <211>15  
 [1071] <212>PRT  
 [1072] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1073]  
 [1074] <400>41  
 [1075] His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
 [1076] 1 5 10 15  
 [1077] <210>42  
 [1078] <211>14  
 [1079] <212>PRT  
 [1080] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1081]  
 [1082] <400>42  
 [1083] Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu  
 [1084] 1 5 10  
 [1085] <210>43  
 [1086] <211>25  
 [1087] <212>PRT  
 [1088] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1089]  
 [1090] <400>43





[1169] Ser Ala Ile Pro Tyr  
 [1170] 20  
 [1171] <210>52  
 [1172] <211>25  
 [1173] <212>PRT  
 [1174] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1175]  
 [1176] <400>52  
 [1177] Asn Ala Asn Phe Lys Phe Thr Asp His Leu Lys Tyr Val Met Leu Pro  
 [1178] 1 5 10 15  
 [1179] Val Ala Asp Gln Asp Gln Cys Ile Arg  
 [1180] 20 25  
 [1181] <210>53  
 [1182] <211>26  
 [1183] <212>PRT  
 [1184] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1185]  
 [1186] <400>53  
 [1187] Gly Ser Glu Val Val Lys Arg Pro Arg Arg Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu  
 [1188] 1 5 10 15  
 [1189] Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu  
 [1190] 20 25  
 [1191] <210>54  
 [1192] <211>16  
 [1193] <212>PRT  
 [1194] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1195] <400>54  
 [1196] Pro Cys Gln Trp Trp Arg Pro Thr Thr Thr Ser Thr Arg Cys Cys Thr  
 [1197] 1 5 10 15  
 [1198] <210>55  
 [1199] <211>22  
 [1200] <212>PRT  
 [1201] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1202]  
 [1203] <400>55  
 [1204] Pro Gly Glu Asp Phe Arg Met Ala Thr Leu Tyr Ser Arg Thr Gln Thr  
 [1205] 1 5 10 15  
 [1206] Pro Arg Ala Glu Leu Lys  
 [1207] 20

[1208] <210>56  
 [1209] <211>18  
 [1210] <212>PRT  
 [1211] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1212]  
 [1213] <400>56  
 [1214] Asp Gly Ser Leu Trp Arg Tyr Arg Ala Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala  
 [1215] 1 5 10 15  
 [1216] Gly Pro  
 [1217] <210>57  
 [1218] <211>21  
 [1219] <212>PRT  
 [1220] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1221]  
 [1222] <400>57  
 [1223] Val Thr Gly Val Val Leu Phe Arg Gln Leu Ala Pro Arg Ala Lys Leu  
 [1224] 1 5 10 15  
 [1225] Asp Ala Phe Phe Ala  
 [1226] 20  
 [1227] <210>58  
 [1228] <211>19  
 [1229] <212>PRT  
 [1230] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [1231]  
 [1232] <400>58  
 [1233] Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala  
 [1234] 1 5 10 15  
 [1235] Asp Ala Val  
 [1236] <210>59  
 [1237] <211>9  
 [1238] <212>PRT  
 [1239] <213> 人流感病毒  
 [1240]  
 [1241] <400>59  
 [1242] Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu  
 [1243] 1 5  
 [1244] <210>60  
 [1245] <211>9  
 [1246] <212>PRT

- [1247] <213> 人流感病毒  
[1248]  
[1249] <400>60  
[1250] Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys  
[1251] 1 5  
[1252] <210>61  
[1253] <211>9  
[1254] <212>PRT  
[1255] <213> 人流感病毒  
[1256]  
[1257] <400>61  
[1258] Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu  
[1259] 1 5  
[1260] <210>62  
[1261] <211>9  
[1262] <212>PRT  
[1263] <213> 人流感病毒  
[1264]  
[1265] <400>62  
[1266] Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala  
[1267] 1 5  
[1268] <210>63  
[1269] <211>9  
[1270] <212>PRT  
[1271] <213> 人流感病毒  
[1272]  
[1273] <400>63  
[1274] Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
[1275] 1 5  
[1276] <210>64  
[1277] <211>32  
[1278] <212>DNA  
[1279] <213> 人工序列  
[1280]  
[1281] <220>  
[1282] <221> 来源  
[1283] <223>/ 注 = " 人工序列描述：  
[1284] 合成引物"  
[1285]



- [1325] Ala Phe Ile Glu Tyr  
 [1326] 20  
 [1327] <210>68  
 [1328] <211>21  
 [1329] <212>PRT  
 [1330] <213> 人工序列  
 [1331]  
 [1332] <220>  
 [1333] <221> 来源  
 [1334] <223>/ 注 = " 人工序列描述：  
 [1335] 合成肽"  
 [1336]  
 [1337] <400>68  
 [1338] Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1339] 1 5 10 15  
 [1340] Leu His Gln Asp Trp  
 [1341] 20  
 [1342] <210>69  
 [1343] <211>21  
 [1344] <212>PRT  
 [1345] <213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)  
 [1346]  
 [1347] <400>69  
 [1348] Glu Gln Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1349] 1 5 10 15  
 [1350] Leu His Gln Asn Trp  
 [1351] 20  
 [1352] <210>70  
 [1353] <211>21  
 [1354] <212>PRT  
 [1355] <213> 狒狒 (*Papio anubis anubis*)  
 [1356]  
 [1357] <400>70  
 [1358] Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1359] 1 5 10 15  
 [1360] Thr His Gln Asp Trp  
 [1361] 20  
 [1362] <210>71  
 [1363] <211>21

- [1364] <212>PRT  
 [1365] <213> 小鼠 (Mus sp.)  
 [1366]  
 [1367] <400>71  
 [1368] Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Phe Ser Val Leu Thr Val  
 [1369] 1 5 10 15  
 [1370] Leu His Gln Asp Trp  
 [1371] 20  
 [1372] <210>72  
 [1373] <211>21  
 [1374] <212>PRT  
 [1375] <213> 泛类人猿 (Pan troglodytes)  
 [1376]  
 [1377] <400>72  
 [1378] Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1379] 1 5 10 15  
 [1380] Val His Gln Asp Trp  
 [1381] 20  
 [1382] <210>73  
 [1383] <211>21  
 [1384] <212>PRT  
 [1385] <213> 白脸猴 (Cercocebus torquatus atys)  
 [1386]  
 [1387] <400>73  
 [1388] Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1389] 1 5 10 15  
 [1390] Thr His Gln Asp Trp  
 [1391] 20  
 [1392] <210>74  
 [1393] <211>21  
 [1394] <212>PRT  
 [1395] <213> 泛类人猿 (Pan troglodytes)  
 [1396]  
 [1397] <400>74  
 [1398] Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 [1399] 1 5 10 15  
 [1400] Leu His Gln Asp Trp  
 [1401] 20  
 [1402] <210>75

|        |  |
|--------|--|
| [1403] | <211>21  |
| [1404] | <212>PRT   |
| [1405] | <213> 猫 (Felis catus)  |
| [1406] |  |
| [1407] | <400>75  |
| [1408] | Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile    |
| [1409] | 1                    5                    10                    15 |
| [1410] | Leu His Gln Asp Trp  |
| [1411] | 20   |
| [1412] | <210>76  |
| [1413] | <211>21  |
| [1414] | <212>PRT   |
| [1415] | <213> 泛类人猿 (Pan troglodytes)                                       |
| [1416] |  |
| [1417] | <400>76  |
| [1418] | Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val    |
| [1419] | 1                    5                    10                    15 |
| [1420] | Val His Gln Asp Trp  |
| [1421] | 20   |
| [1422] | <210>77  |
| [1423] | <211>21  |
| [1424] | <212>PRT   |
| [1425] | <213> 骆驼 (Camelus dromedarius)                                     |
| [1426] | <400>77  |
| [1427] | Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Ile    |
| [1428] | 1                    5                    10                    15 |
| [1429] | Gln His Gln Asp Trp  |
| [1430] | 20   |
| [1431] | <210>78  |
| [1432] | <211>21  |
| [1433] | <212>PRT   |
| [1434] | <213> 白脸猴 (Cercocebus torquatus atys)                              |
| [1435] |  |
| [1436] | <400>78  |
| [1437] | Glu Thr Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val    |
| [1438] | 1                    5                    10                    15 |
| [1439] | Thr His Gln Asp Trp  |
| [1440] | 20   |
| [1441] | <210>79  |

- [1442] <211>21  
 [1443] <212>PRT  
 [1444] <213> 猩猩 (*Pongo pygmaeus*)  
 [1445]  
 [1446] <400>79  
 [1447] Glu Glu Gln Ser Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Ala Val  
 [1448] 1 5 10 15  
 [1449] Val His Gln Asp Trp  
 [1450] 20  
 [1451] <210>80  
 [1452] <211>21  
 [1453] <212>PRT  
 [1454] <213> 野猪 (*Sus scrofa*)  
 [1455]  
 [1456] <400>80  
 [1457] Glu Glu Gln Phe Ash Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile  
 [1458] 1 5 10 15  
 [1459] Gln His Gln Asp Trp  
 [1460] 20  
 [1461] <210>81  
 [1462] <211>19  
 [1463] <212>PRT  
 [1464] <213> 白脸猴 (*Cercocebus torquatus atys*)  
 [1465]  
 [1466] <400>81  
 [1467] Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Thr His  
 [1468] 1 5 10 15  
 [1469] Gln Asp Trp  
 [1470] <210>82  
 [1471] <211>21  
 [1472] <212>PRT  
 [1473] <213> 马 (*Equus caballus*)  
 [1474]  
 [1475] <400>82  
 [1476] Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Arg Ile  
 [1477] 1 5 10 15  
 [1478] Gln His Gln Asp Trp  
 [1479] 20  
 [1480] <210>83



- [1520] <211>21  
 [1521] <212>PRT  
 [1522] <213> 马 (Equus caballus)  
 [1523] <400>87  
 [1524] Glu Ala Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile  
 [1525] 1                    5                    10                    15  
 [1526] Gln His Gln Asp Trp  
 [1527]                    20  
 [1528] <210>88  
 [1529] <211>21  
 [1530] <212>PRT  
 [1531] <213> 牛 (Bos taurus)  
 [1532]  
 [1533] <400>88  
 [1534] Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Ala Leu Arg Ile  
 [1535] 1                    5                    10                    15  
 [1536] Gln His Gln Asp Trp  
 [1537]                    20  
 [1538] <210>89  
 [1539] <211>21  
 [1540] <212>PRT  
 [1541] <213> 狗 (Canis familiaris)  
 [1542]  
 [1543] <400>89  
 [1544] Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile  
 [1545] 1                    5                    10                    15  
 [1546] Glu His Gln Asp Trp  
 [1547]                    20  
 [1548] <210>90  
 [1549] <211>19  
 [1550] <212>PRT  
 [1551] <213> 仓鼠 (Cricetulus migratorius)  
 [1552]  
 [1553] <400>90  
 [1554] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Lys His  
 [1555] 1                    5                    10                    15  
 [1556] Gln Asp Trp  
 [1557] <210>91  
 [1558] <211>21

- [1559] <212>PRT  
 [1560] <213> 小鼠 (*Mus musculus*)  
 [1561]  
 [1562] <400>91  
 [1563] Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile  
 [1564] 1 5 10 15  
 [1565] Met His Gln Asp Trp  
 [1566] 20  
 [1567] <210>92  
 [1568] <211>21  
 [1569] <212>PRT  
 [1570] <213> 狗 (*Canis familiaris*)  
 [1571]  
 [1572] <400>92  
 [1573] Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile  
 [1574] 1 5 10 15  
 [1575] Gly His Gln Asp Trp  
 [1576] 20  
 [1577] <210>93  
 [1578] <211>21  
 [1579] <212>PRT  
 [1580] <213> 鼬鼠 (*Mustela vison*)  
 [1581] <400>93  
 [1582] Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile  
 [1583] 1 5 10 15  
 [1584] Gln His Gln Asp Trp  
 [1585] 20  
 [1586] <210>94  
 [1587] <211>21  
 [1588] <212>PRT  
 [1589] <213> 海豚 (*Tursiops truncatus*)  
 [1590] <400>94  
 [1591] Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile  
 [1592] 1 5 10 15  
 [1593] Gln His Gln Asp Trp  
 [1594] 20  
 [1595] <210>95  
 [1596] <211>21  
 [1597] <212>PRT



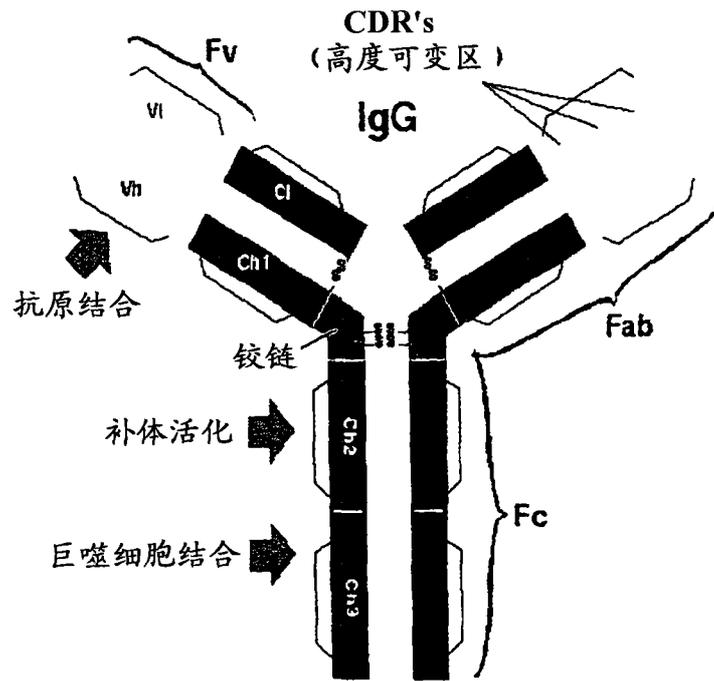


图 1

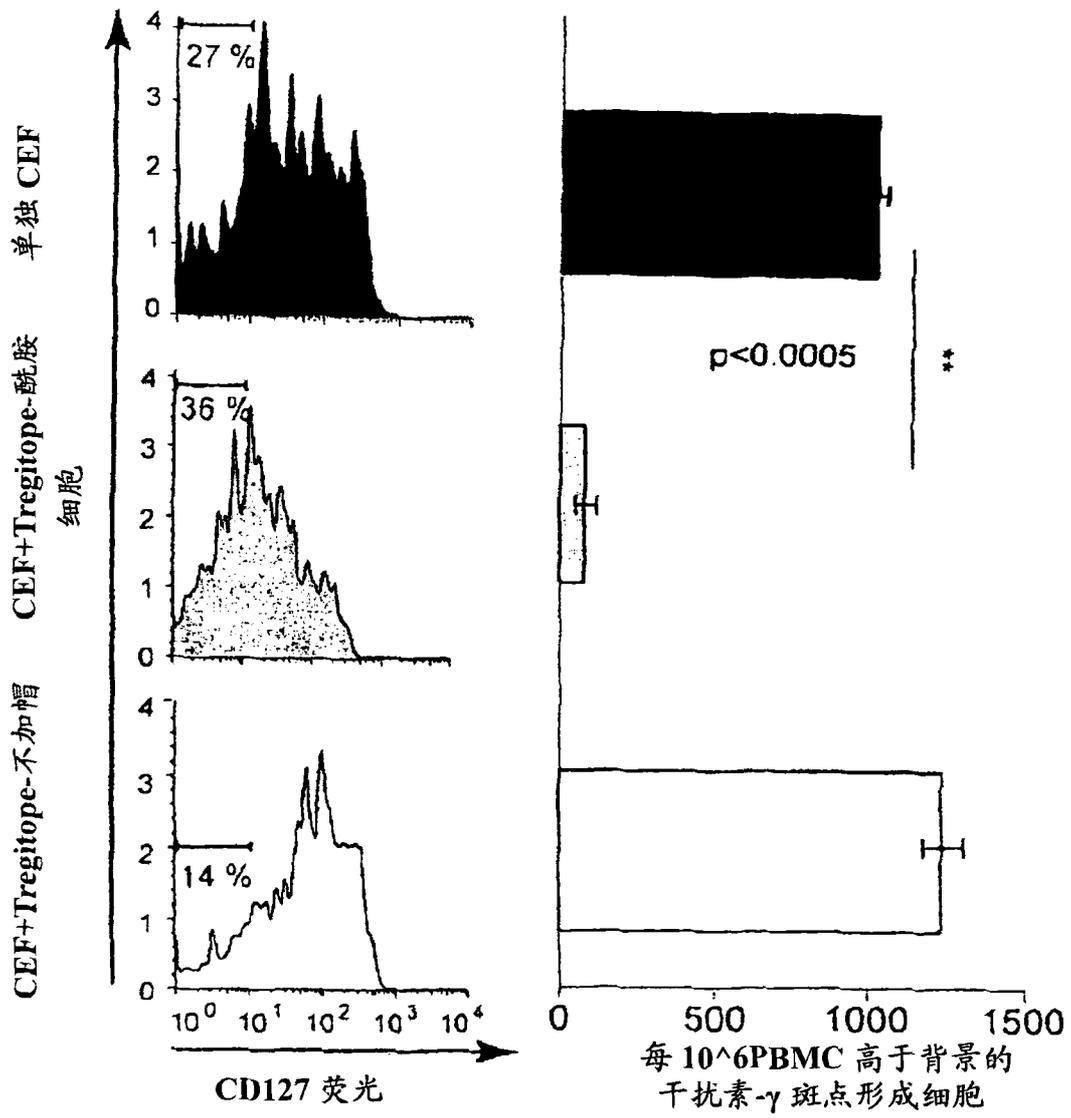


图 2

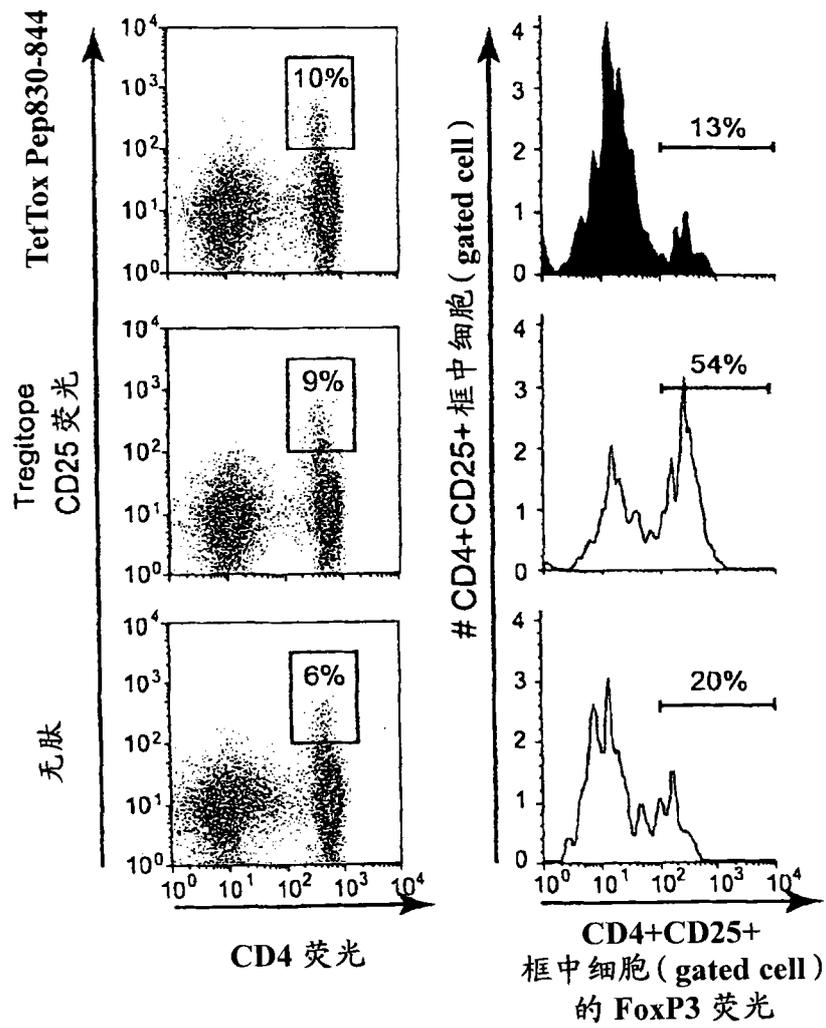


图 3

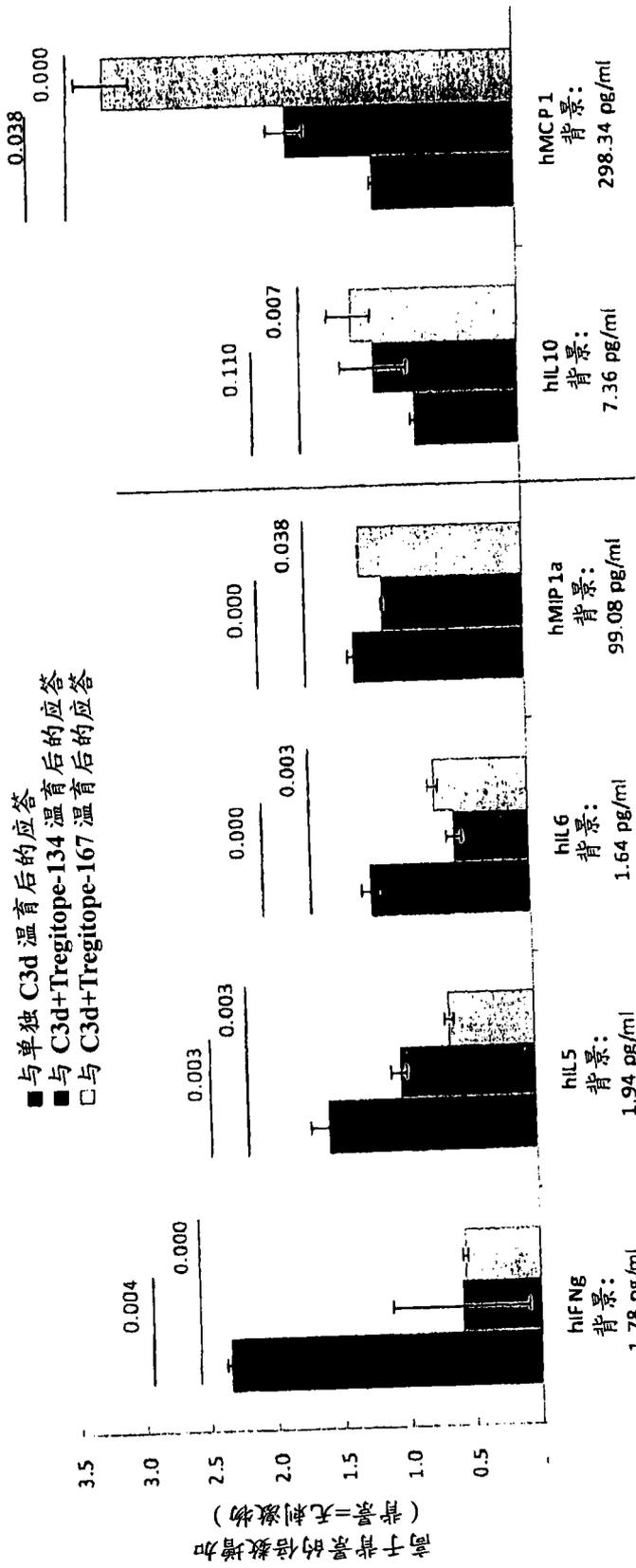


图 4

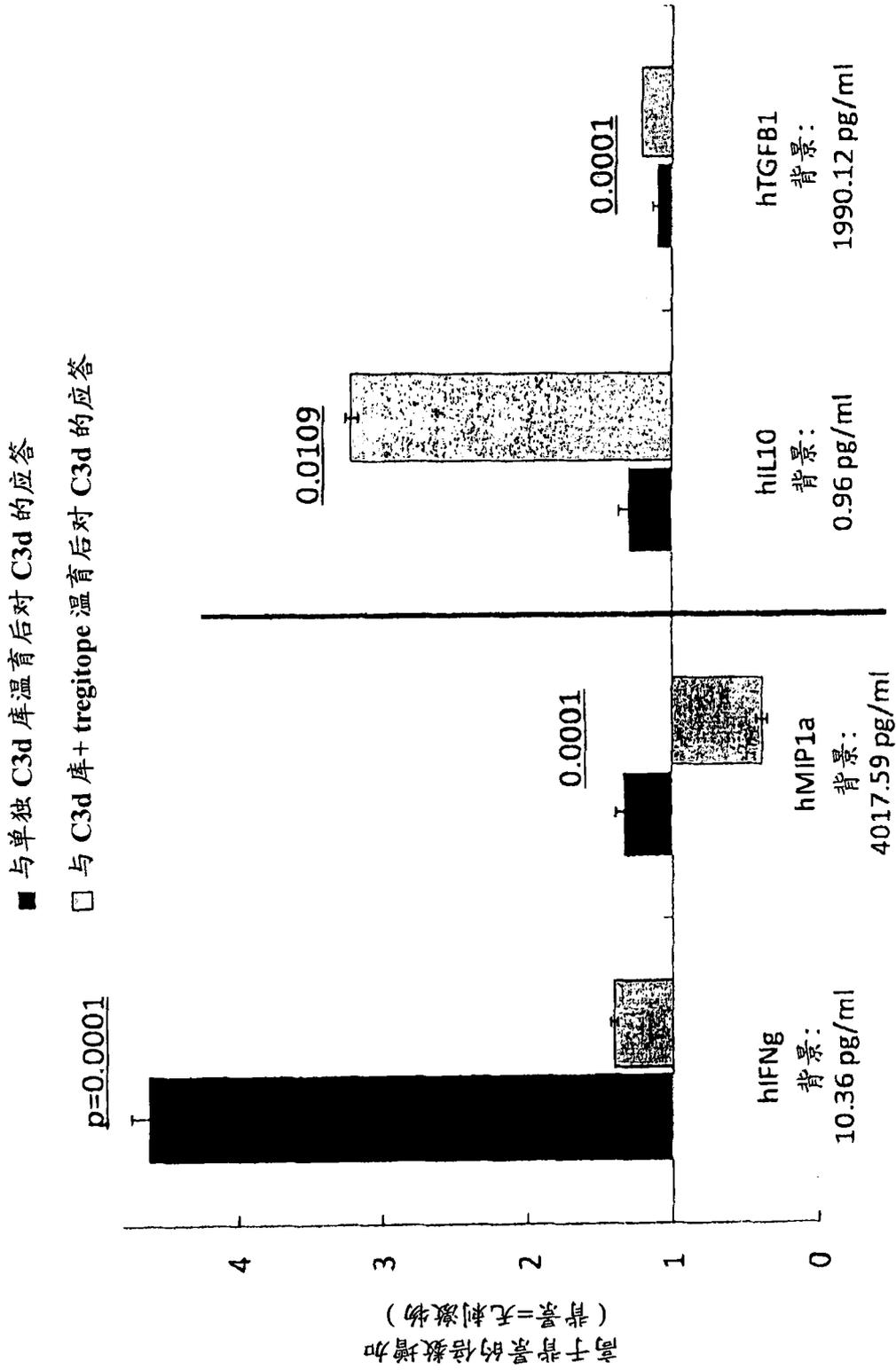


图 5

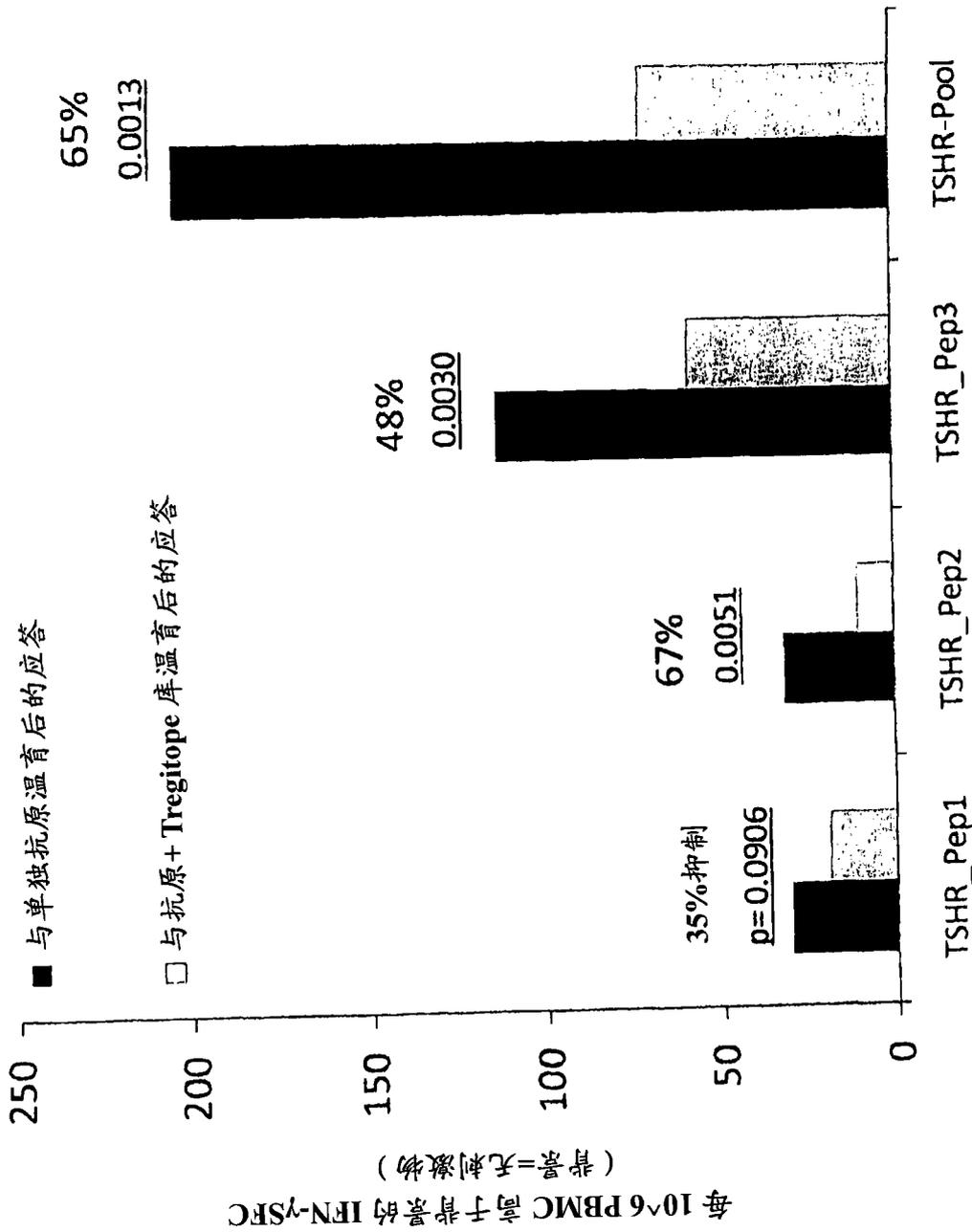


图 6

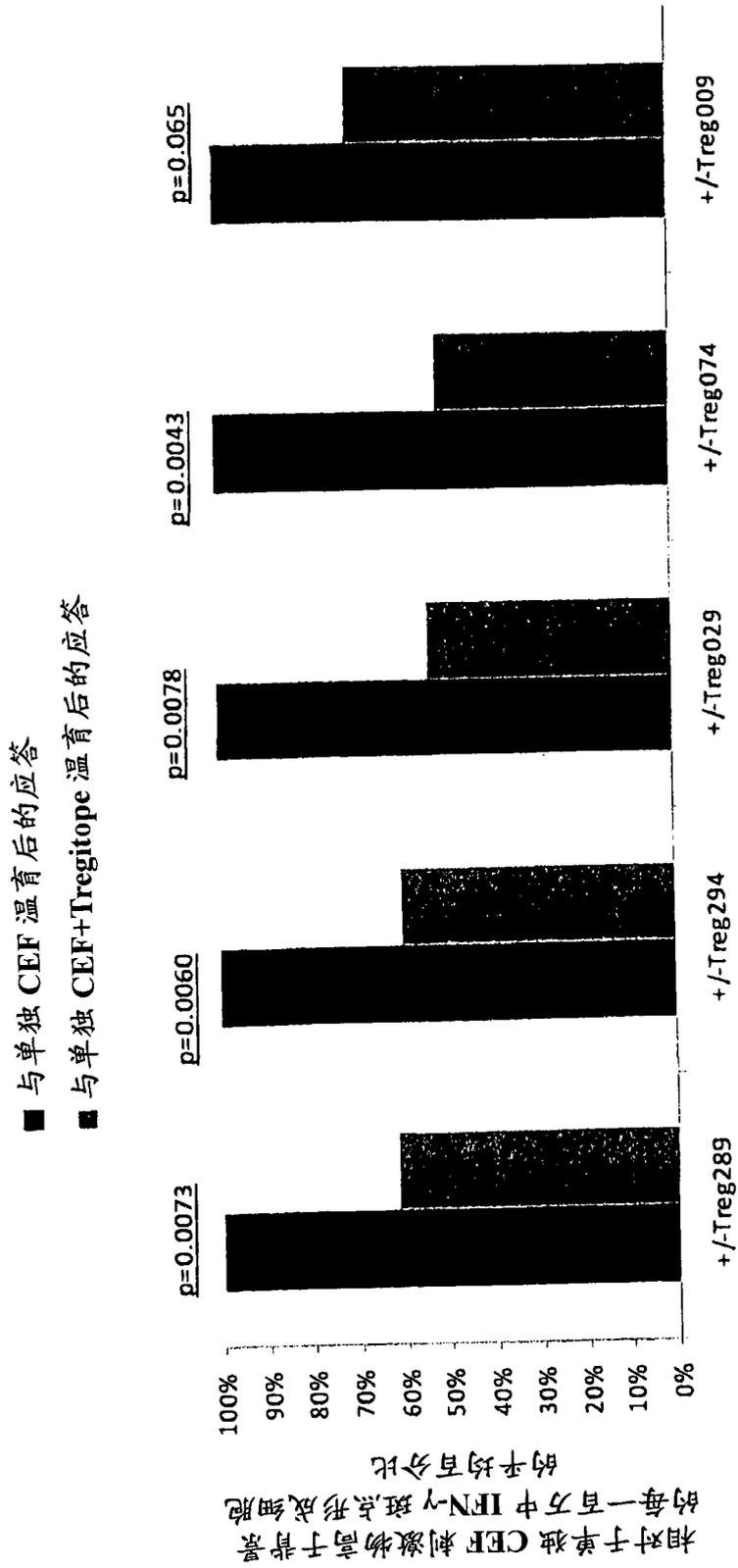


图 7

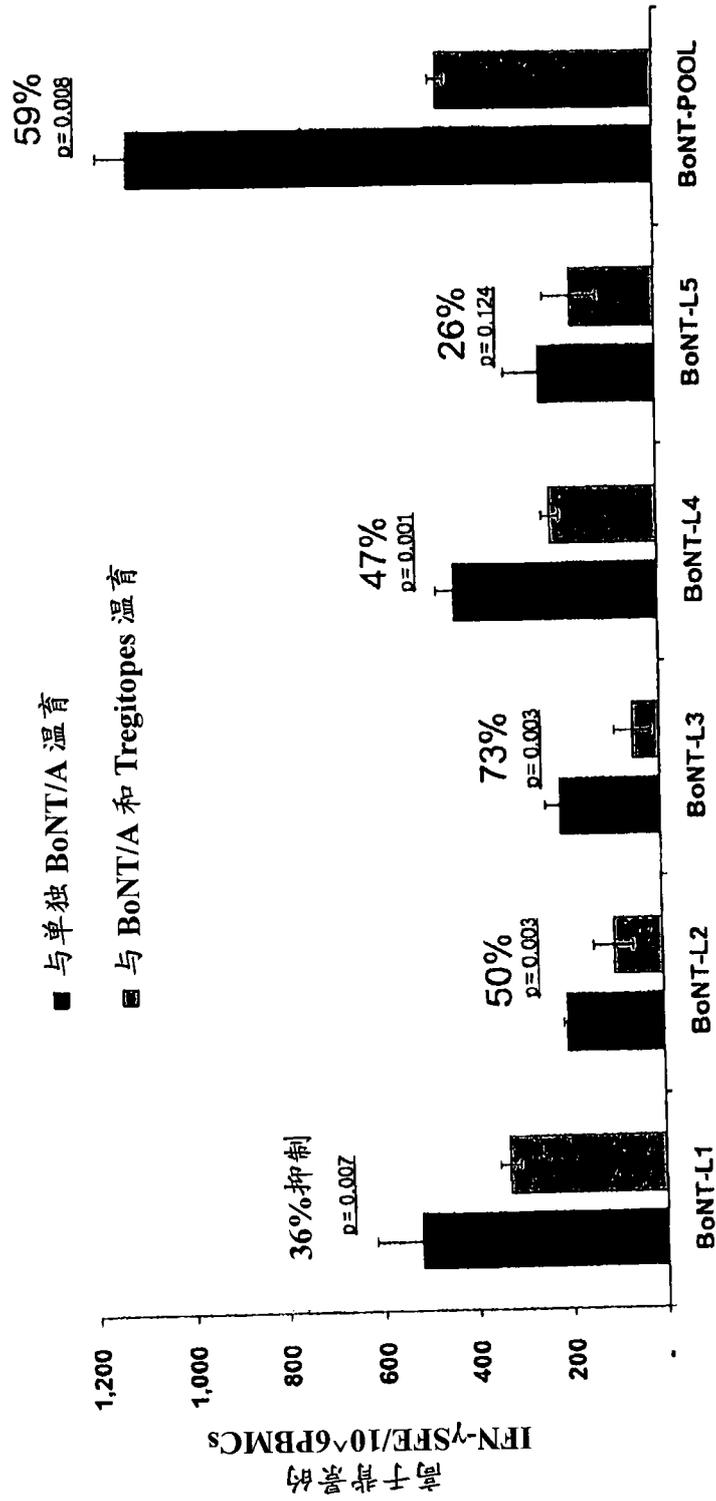


图 8

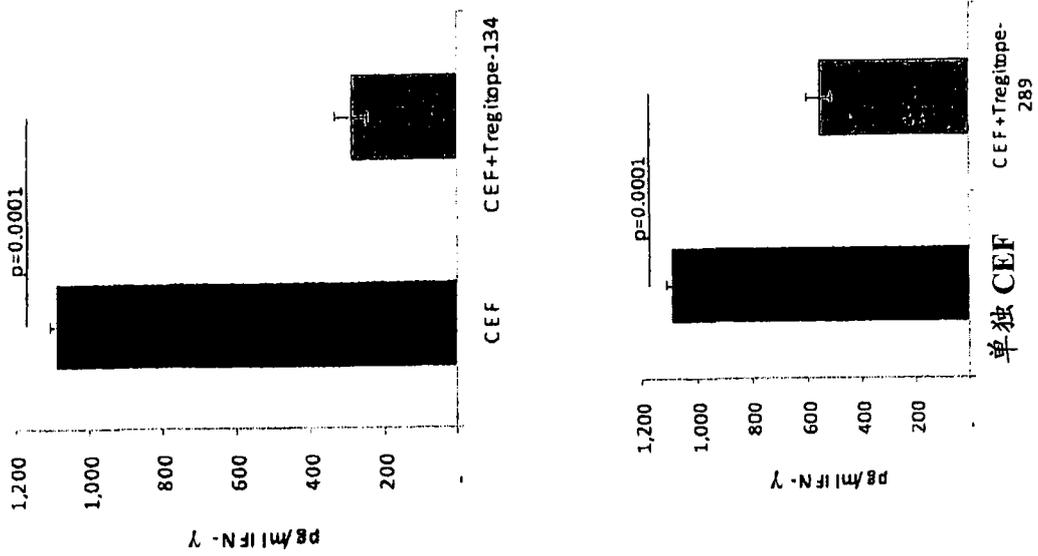
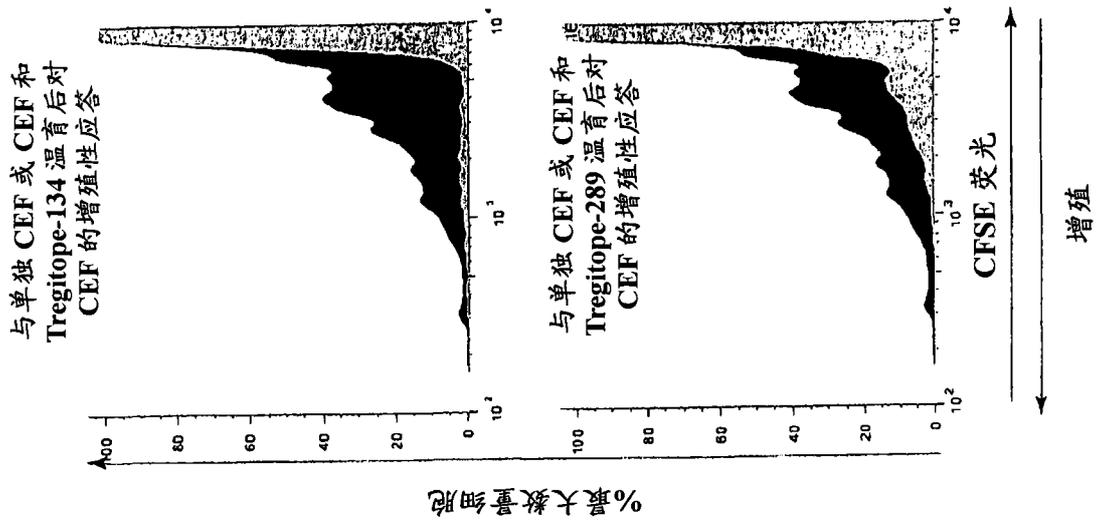


图 9

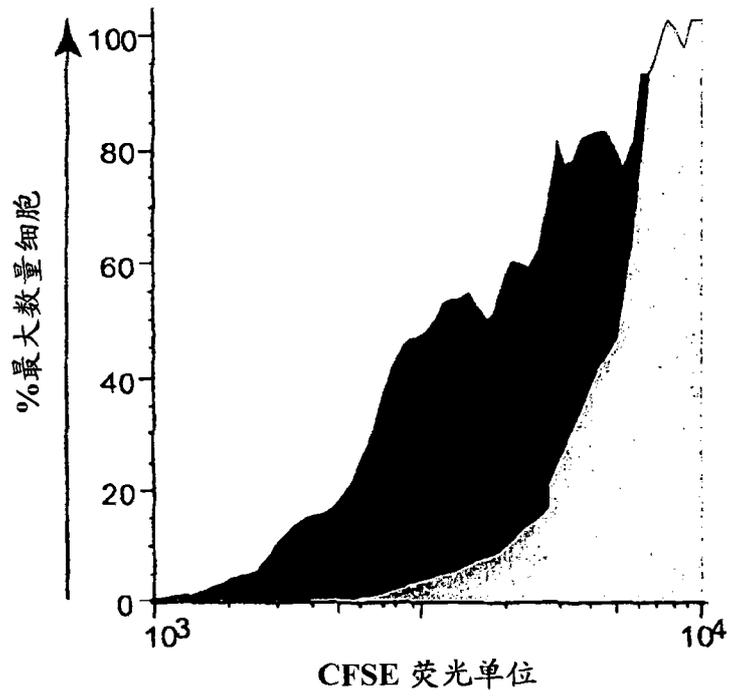


图 10

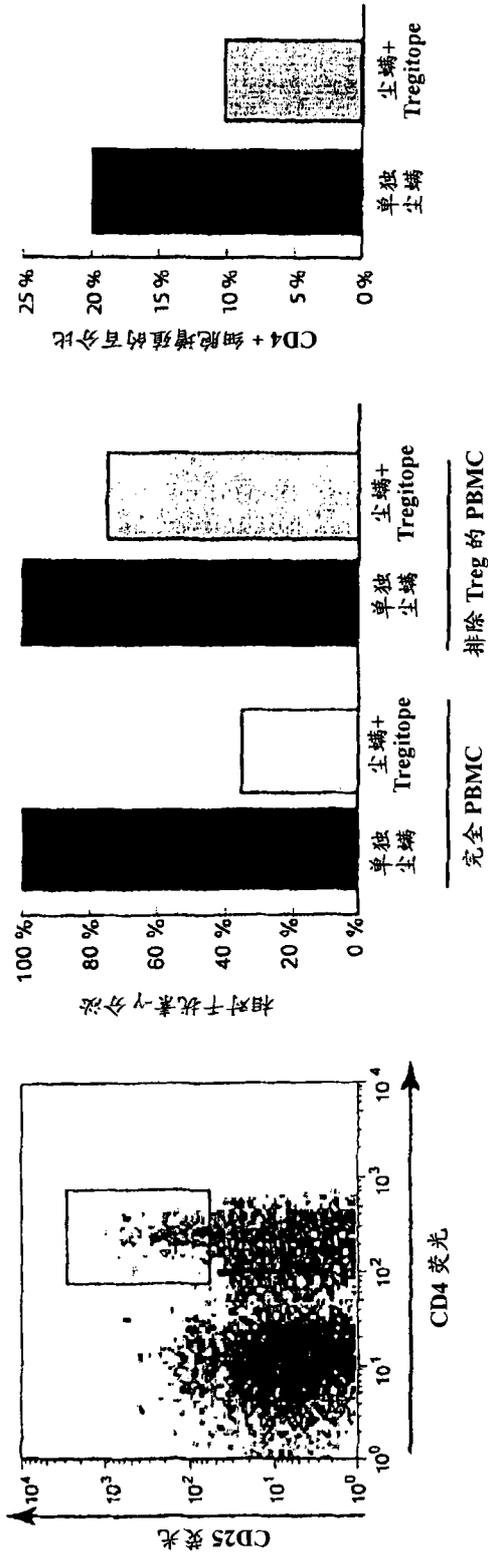


图 11

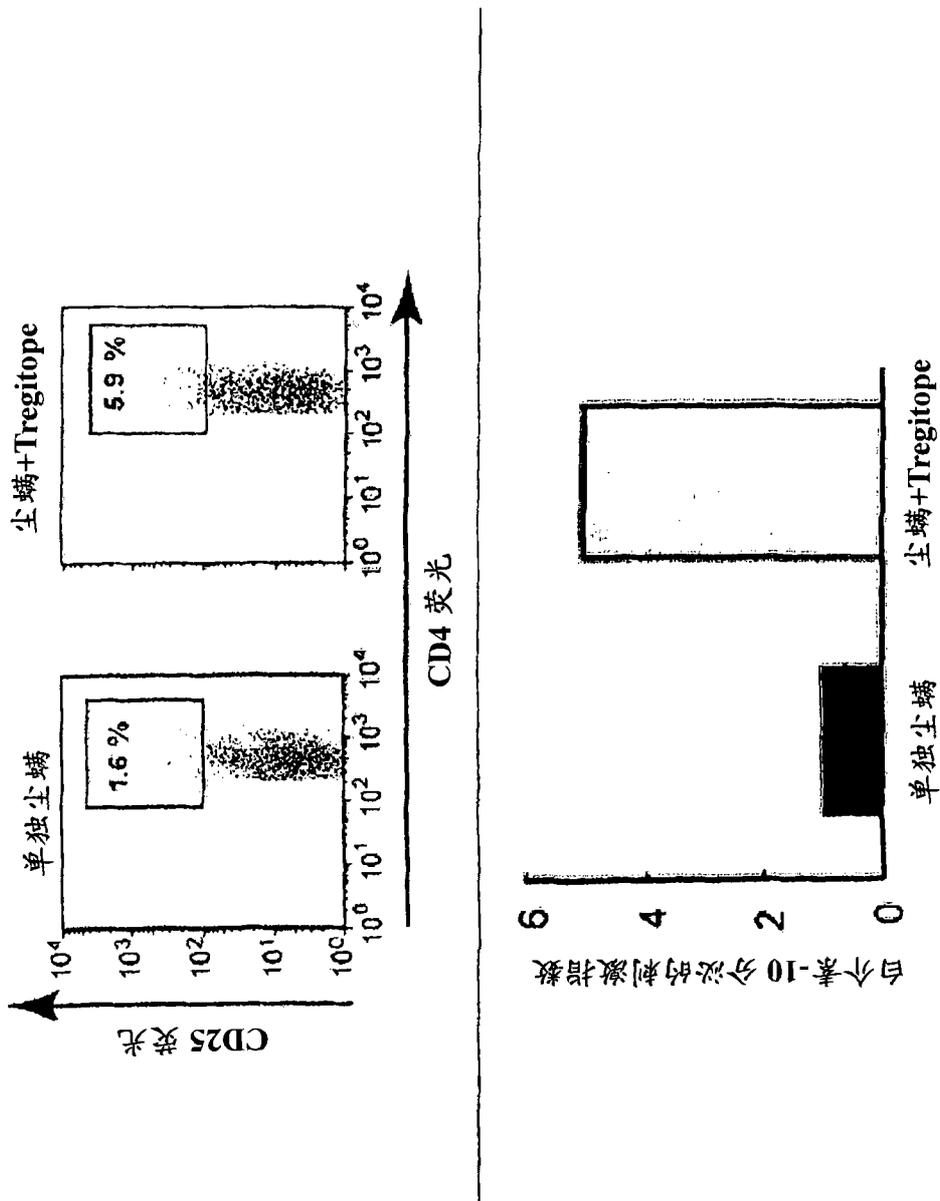


图 12

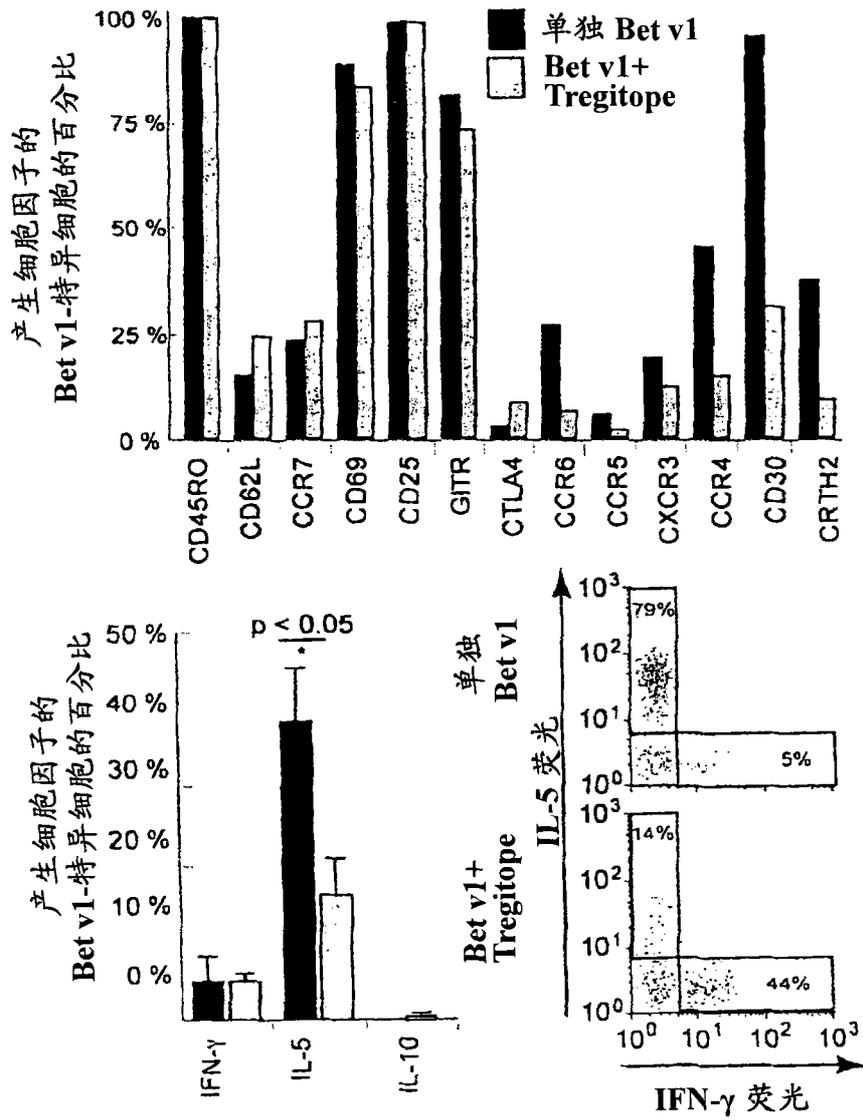


图 13

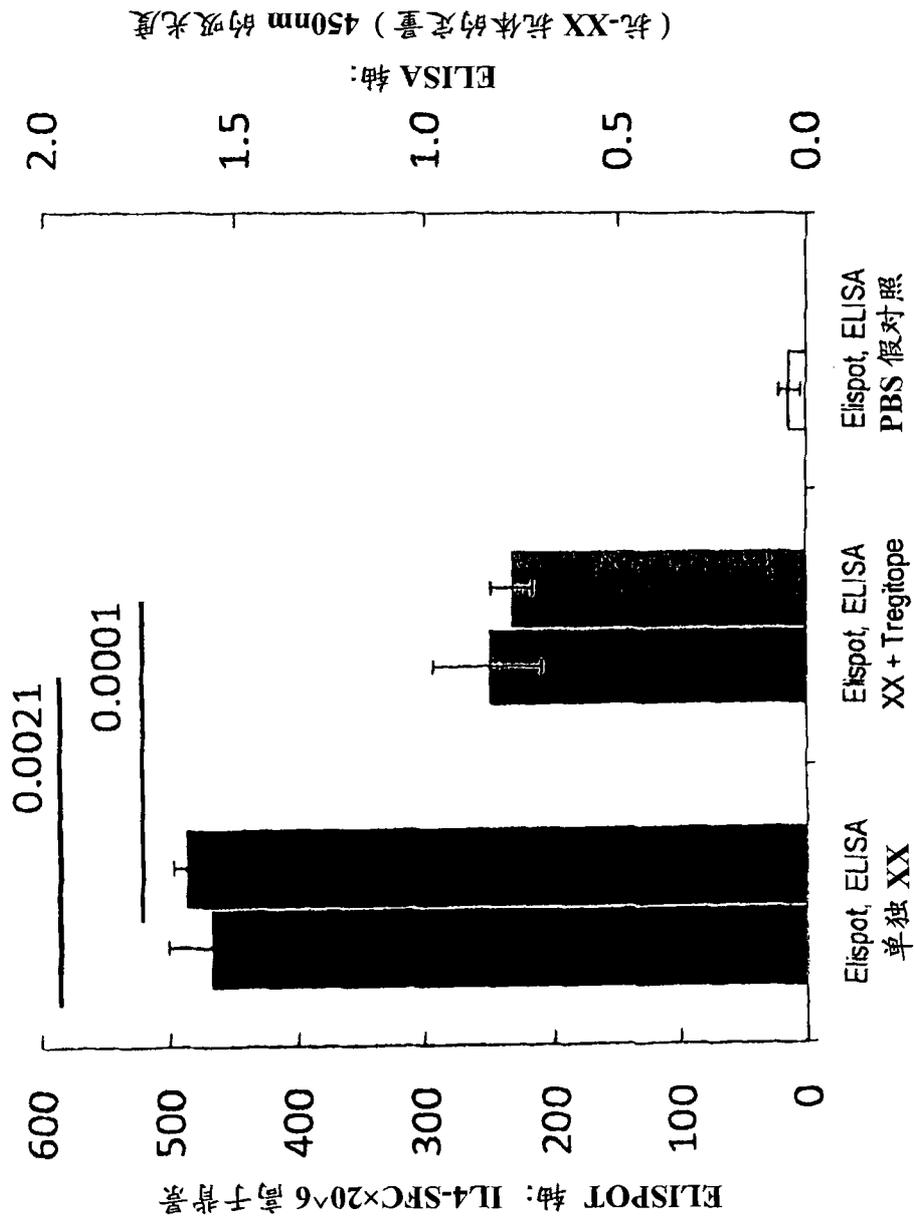


图 14

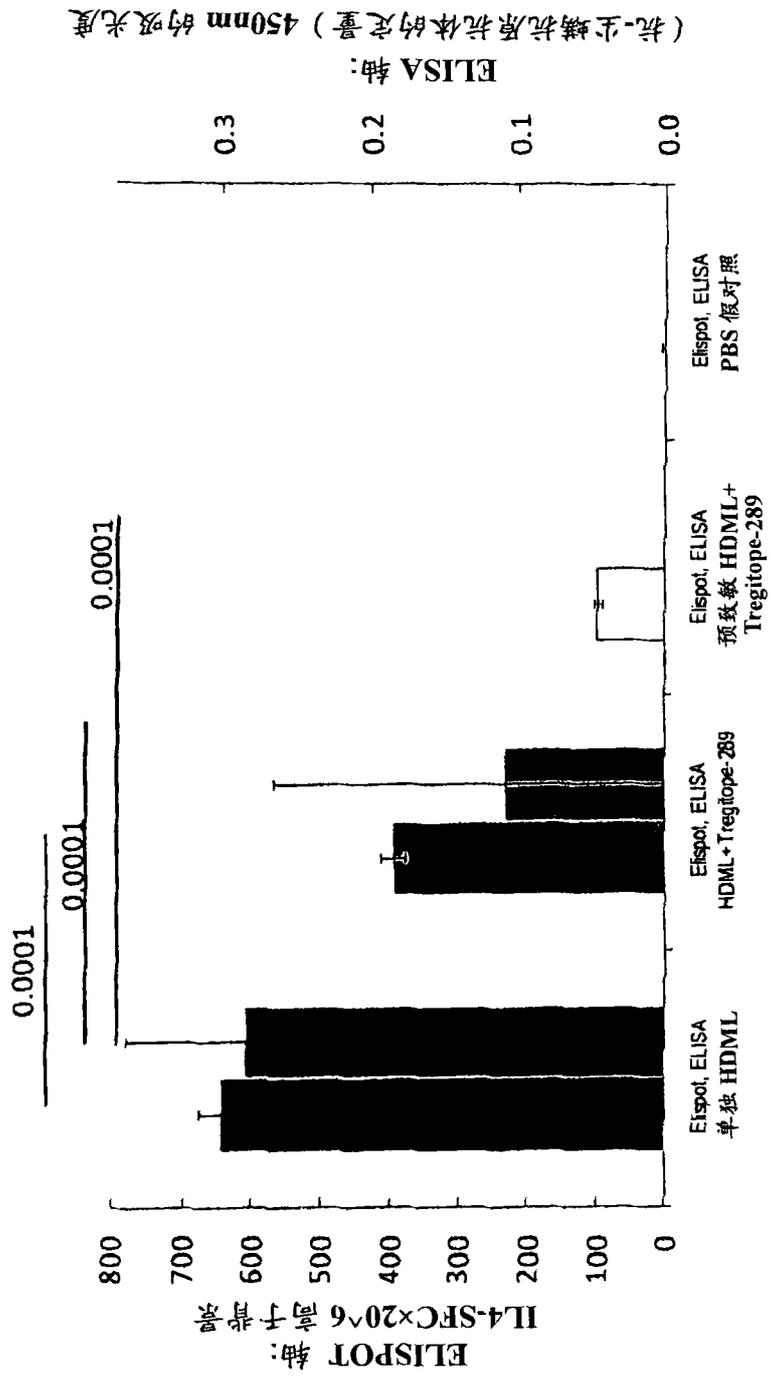


图 15

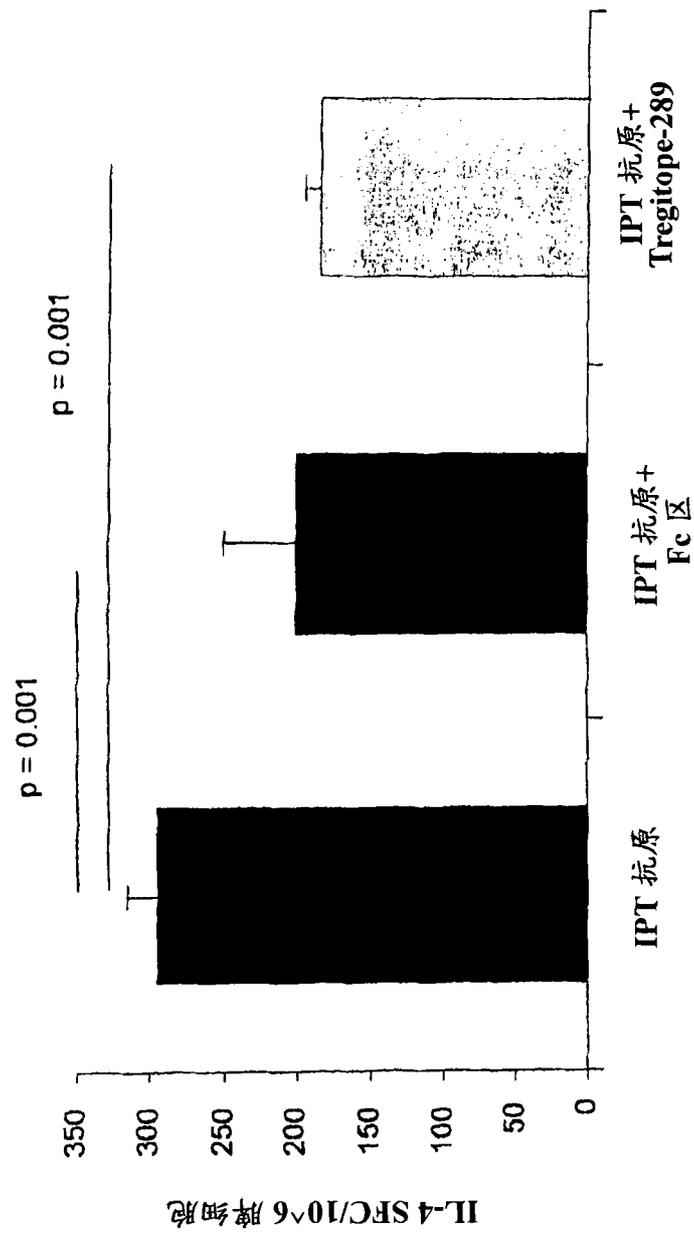


图 16