



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1846000 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 03

(21) 申请号 200480025351. 2

代理人 黄革生 刘金辉

(22) 申请日 2004. 08. 23

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006. 01)

60/500, 452 2003. 09. 05 US

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

WO 03072746 A, 2003. 09. 04, 全文.

2006. 03. 03

审查员 赵彦豪

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/027263 2004. 08. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02005/025497 EN 2005. 03. 24

(73) 专利权人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 F·A·哈丁 J·M·穆乔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 4 页

(54) 发明名称

HPV CD8⁺T 细胞表位

(57) 摘要

本发明提供了鉴定任何感兴趣蛋白质中的功能性CD8⁺T细胞表位的方法。本发明还进一步提供了多种多样蛋白质的CD8⁺T细胞表位。在另外的实施方案中,本发明提供适合在预防和/或治疗疫苗中使用的表位。在特别优选的实施方案中,本发明提供适合用于预防和/或治疗疫苗中的修饰表位。在一些优选的实施方案中,本发明提供了用于开发HPV疫苗的方法,特别是用于预防由高危HPV病毒株发生感染的多价疫苗。具体而言,本发明提供了在诸如HPV16和HPV18的HPV病毒株中鉴定CD8⁺T细胞表位的方法。在另外的实施方案中,本发明提供用于开发抗高危HPV型的治疗疫苗的方法,该疫苗防止良性和/或恶性肿瘤在被感染个体内的发展。本发明还进一步提供了适合在预防和/或治疗疫苗中应用的表位。

1. 用于鉴定 CD8⁺ 表位的方法,包括以下步骤:
 - (a) 取得感兴趣的蛋白质;
 - (b) 制备该感兴趣蛋白质的众多氨基酸片段,使得每一个片段都和在其序列上都与其相邻的片段重叠;
 - (c) 使该感兴趣蛋白质的所述氨基酸片段与包含原初人 CD8⁺T 细胞和树突状细胞的溶液接触,其中所述树突状细胞已经被分化,并且其中所述 CD8⁺T 细胞在其与所述树突状细胞和所述氨基酸片段接触之前已经暴露于抗 -CD40 抗体;和
 - (d) 利用该感兴趣蛋白质的所述氨基酸片段鉴定 CD8⁺ 表位,其中所述鉴定步骤包括测量所述 CD8⁺ 表位刺激所述原初人 CD8⁺T 细胞增殖的能力。
2. 用于确定蛋白质中的 CD8⁺ 表位的方法,包括以下步骤:
 - (a) 从单一人血源获得树突状细胞的溶液和原初 CD8⁺T 细胞的溶液;
 - (b) 在树突状细胞的所述溶液中分化所述树突状细胞,以产生分化的树突状细胞的溶液;
 - (c) 从所述蛋白质制备肽集;
 - (d) 将所述 CD8⁺T 细胞的所述溶液与抗 -CD40 抗体组合起来,以提供 T 细胞和抗体的溶液;
 - (e) 将所述分化的树突状细胞和所述肽集与所述 T 细胞和抗体的溶液组合起来;和
 - (f) 测量所述 T 细胞在所述步骤 (e) 中的增殖。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述蛋白质选自病毒蛋白质,细菌蛋白质,寄生生物的蛋白质,真菌蛋白质和肿瘤相关蛋白质。
4. 减少蛋白质的变应原性的方法,包括以下步骤:
 - (a) 使用权利要求 1 中阐述的方法,鉴定所述蛋白质中的 T 细胞表位;和
 - (b) 修饰步骤 (a) 中鉴定出的所述蛋白质的 T 细胞表位,以便中和所述 T 细胞表位,使得所述修饰表位的变应原性低于原始蛋白质的变应原性。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述 T 细胞表位通过取代而被修饰,所述取代选自:
 - (a) 用来自该感兴趣蛋白质的同源蛋白质的类似序列取代所述 T 细胞表位的氨基酸序列;和
 - (b) 用模拟该表位的三级结构属性的序列取代所述 T 细胞表位的氨基酸序列。
6. 增加蛋白质的免疫原性的方法,包含以下步骤:
 - (a) 使用权利要求 1 中阐述的方法,鉴定所述蛋白质中的 T 细胞表位;和
 - (b) 修饰步骤 (a) 中鉴定出的所述蛋白质的 T 细胞表位,以便产生修饰的蛋白质,使得所述修饰蛋白质的免疫原性大于原始蛋白质的免疫原性。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述 T 细胞表位通过取代被修饰,所述取代选自:
 - (a) 用来自该感兴趣蛋白质的同源蛋白质的类似序列取代所述 T 细胞表位的氨基酸序列;和
 - (b) 用模拟该表位的三级结构属性的序列取代所述 T 细胞表位的氨基酸序列。

HPV CD8⁺T 细胞表位

发明领域

[0001] 本发明提供在任何感兴趣蛋白质中鉴定功能性 CD8⁺T 细胞表位 (CD8⁺T-cell epitopes) 的方法。本发明进一步提供了多种多样蛋白质的 CD8⁺T 细胞表位 (CD8⁺T-cell epitopes)。在一些优选的实施方案中,本发明提供了人乳头瘤病毒 (human papillomavirus (HPV)) 的 CD8⁺T 细胞表位。在另外的实施方案中,本发明提供了适合用在预防和 / 或治疗疫苗中的表位 (epitopes)。在一些特别优选的实施方案中,本发明提供适合用在预防和 / 或治疗疫苗中的修饰表位 (modified epitopes)。

[0002] 发明背景

[0003] 淋巴细胞,特别是 B 细胞和 T 细胞,是参与人和其他动物的免疫应答的两种主要的细胞类型。B 细胞参与免疫应答的体液方面,负责产生抗体,而 T 细胞参与免疫应答的细胞介导方面。然而,这两种淋巴细胞种类 (two lymphocyte classes) 通过由识别因素、细胞因子和免疫应答的其它成分 (element) 组成的复杂网络共同工作。

[0004] 在 T 细胞内,存在两种主要细胞种类,即细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T-cells (Tc)) 和辅助 T 细胞 (helper T-cells (Th))。一经激活,细胞毒性 T 细胞杀灭受感染细胞,而辅助 T 细胞则激活其它细胞,例如 B 细胞和巨噬细胞。原初 T 细胞 (naïve T-cells) 在暴露于特定抗原之际则被激活而产生“武装的 (armed)”效应 T 细胞,该特定抗原与主要组织相容性复合体的一个组分结合、呈递在抗原呈递细胞的表面上。这两种主要的 T 细胞经常被根据其细胞表面受体进行描述。细胞毒性 T 细胞经常被称做“CD8” (“CD8⁺”) 细胞,辅助 T 细胞经常被称做“CD4” (“CD4⁺”) 细胞。尽管它们的功能不同,CD4⁺ 和 CD8⁺ 并不是彼此独立地工作。实际上,已知 CD8⁺ 细胞经常依靠 CD4⁺ 细胞而发动对免疫原 (immunogen) 的反应。因此,在杀灭受感染细胞中,CD8⁺ 细胞经常需要 CD4⁺ 细胞的激活。另外,在一些情况下,似乎 CD8⁺ 细胞可以有效地杀灭受感染细胞;而在有些情况下,这些细胞是无效的。然而,尽管近年来对免疫反应的了解不断加深,仍然需要可以可靠鉴定有效的 CD8⁺ 细胞表位的方法,以及将有效的表位和无效的表位区分开来的方法。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明提供在任何有价值的蛋白质上鉴定功能性 CD8⁺T 细胞表位 (CD8⁺T-cell epitope) 的方法。本发明进一步提供了多种蛋白的 CD8⁺T 细胞表位 (CD8⁺T-cell epitope)。在一些实施方案中,本发明提供了人乳头瘤病毒 (human papillomavirus (HPV)) 的 CD8⁺T 细胞表位。本发明进一步提供了适合用在预防和 / 或治疗疫苗中的表位 (epitope)。在一些特别优选的实施方案中,本发明提供适合用在预防和 / 或治疗疫苗中的修饰表位 (modified epitope)。

[0007] 该发明提供检测 CD8⁺T 细胞以功能性方式进行反应的手段。具体而言,本发明提供了体外方法来评估在抗体存在下的 CD8⁺T 细胞反应,这模拟了体内 T- 细胞激活。在一些优选的实施方案中,本发明提供用于鉴定感兴趣蛋白质的免疫原性 (immunogenicity) 的方法,包含以下步骤:取得感兴趣的蛋白质;制备该感兴趣蛋白质的众多氨基酸片段,使得每一个片段在序列上都和与其相邻的片段重叠;使该感兴趣蛋白质的这些氨基酸

片段与包含原初人 CD8⁺T 细胞和树突状细胞的溶液接触,其中树突状细胞已经被分化(differentiated),并且其中 CD8⁺ T 细胞在它们与树突状细胞和肽接触之前已经暴露于抗 CD40 抗体;以及利用该感兴趣蛋白质的这些氨基酸片段鉴定表位区域,其中鉴定步骤包括测量该表位区域刺激这些原初人 CD8⁺T 细胞的增殖的能力。在一些特别优选的实施方案中,树突状细胞和 CD8⁺ 细胞从同一血液来源获得。在另外特别优选的实施方案中,在 CD8⁺T 细胞、树突状细胞(dendritic cells)和肽被组合到一起之后,抗-CD40 抗体(anti-CD40 antibody)被加入到该溶液中。

[0008] 本发明进一步提供了用于修饰感兴趣蛋白质的免疫原性(immunogenicity)的方法,包括以下步骤:取得感兴趣蛋白质;制备该感兴趣蛋白质的众多氨基酸片段,使得每一个片段都和与其相邻的片段在序列上重叠;使包含原初人 CD8⁺T 细胞和树突状细胞的溶液与该感兴趣蛋白质的这些氨基酸片段接触,其中树突状细胞已经经过分化,并且其中 CD8⁺T 细胞在其与树突状细胞和肽接触之前已经暴露于抗 CD40 的抗体;以及利用该感兴趣蛋白质的这些氨基酸片段鉴定表位区域,其中鉴定步骤包括测量该表位区域刺激原初的人 CD8⁺T 细胞的增殖的能力;以及,然后,修饰该感兴趣蛋白质的该业已鉴定的表位区域,使得修饰表位的免疫原性大于或低于原始的感兴趣蛋白质的免疫原性。在一些实施方案中,多个表位被修饰。在一些特别优选的实施方案中,树突状细胞和 CD8⁺ 细胞从单一血液来源获得。在另外特别优选的实施方案中,在将 CD8⁺T 细胞、树突状细胞和肽结合到一起之后,抗 CD40 抗体被加入到溶液中。

[0009] 在一些实施方案中,本发明提供了鉴定病毒的表位的方法和组合物,这些病毒包括但不限于 HPV。具体而言,本发明提供修饰 T 细胞检测系统的应用(即 I-MUNE[®] 试验),来进行多种病毒(包括 HPV)中的 CD8⁺T 细胞表位的鉴定。在另外的实施方案中,本发明提供用于鉴定各种 HPV 型的序列中的 HPV 表位的方法,以及肽的生产方法;当该肽被引入到 HPV 序列中时,可以引发 CD8⁺T 细胞反应。

[0010] 在一些实施方案中,该发明提供方法用于鉴定 HPV 序列中 CD8⁺T 细胞表位的方法和可以引发 CD8⁺T 细胞反应的肽的生产。具体而言,本发明提供用来增加 HPV 表位的免疫原性的方法和组合物,该 HPV 表位适合用于 HPV 疫苗制备中。

[0011] 在这些实施方案中,该发明提供用于确定人 T 细胞对抗多种表位,包括感兴趣蛋白质的反应的方法。在另外的实施方案中,一旦显著表位被通过使用这里描述的 I-MUNE[®] 检测系统所鉴定,显著表位(significant epitopes)就被改变,从而产生可诱导针对该蛋白质的增强的免疫反应的表位。

[0012] 因此,如上面指出的,当与由它们的前体 DNA 编码的天然蛋白质比较时,本发明的蛋白质表现出修饰的免疫原性应答(modified immunogenic responses)(例如抗原性和/或免疫原性)。例如,表现出增强的免疫原性应答的 HPV(比如,变异体 HPV 表位),可以在治疗和预防的疫苗组合物中发现是有用的。

[0013] 本发明还提供来自两株(human papillomavirus(HPV))的、在 E7 蛋白质中的 CD8⁺T 细胞表位。在一些优选的实施方案中,本发明提供用于开发 HPV 疫苗的方法,特别是开发预防由高危 HPV 病毒株感染的多价疫苗(multivalent vaccines)。在另外的实施方案中,本发明提供用于开发抗高危 HPV 型的治疗疫苗的方法,该疫苗适合用于阻止在受感染个体中良性和/或恶性肿瘤的发展。本发明进一步提供了适合用在预防和/或治疗疫苗

中的表位。在一些优选的实施方案中,本发明提供了由序列 SEQ. ID NOS :1-25 所示的表位。在格外优选的实施方案中,本发明提供了适合用在预防和 / 或治疗疫苗中的修饰表位。

[0014] 本发明进一步提供了组合物和方法,用于开发直接对抗两种高危性 HPV 病毒株(即 16 和 18 号病毒株)的 E7 蛋白质的疫苗组合物。在一些特别优选的实施方案中,疫苗组合物包含至少一种表位,选自 SEQ. ID NOS :1 到 25。在一些替代优选实施方案中,疫苗组合物包含选自至少一种高危 HPV 病毒株和 / 或至少一种在本领域已知的中等危险 HPV 病毒株的表位。的确,可以认为:本发明的 HPV 疫苗将应用于众多 HPV 病毒株的治疗和预防中。并非意图使本发明限于任何具体表位和 / 或包含任何具体表位的疫苗组合物。因此,在本发明的各种疫苗实施方案中,适用于期望用途的表位的任何组合都可以应用于本发明。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 提供一幅图表,显示针对受试 HPV E7. 16 中的每个表位的反应。

[0017] 图 2 提供一幅图表,显示针对受试 HPV E7. 18 中的每个表位的反应。

[0018] 图 3 提供一幅图表,显示在抗 -CD40 抗体和抗 -IgG1 同种型抗体存在下的针对 HPV E7. 18 的反应。

[0019] 图 4 提供一幅图表,显示了二十个随机供体的反应,它们是在使用 HPV 18. E7 肽的酶联免疫斑点分析 INF- γ 测定 (ELISPOT INF- γ assay) 和 CD8I-MUNE[®]测定 (CD8I-MUNE[®] assay) 的平行试验中被测验的。

[0020] 发明描述

[0021] 本发明提供在任何感兴趣蛋白质中鉴定功能性 CD8⁺T 细胞表位 (functional CD8⁺T-cell epitopes) 的方法。本发明进一步提供多种蛋白质的 CD8⁺T 细胞表位。在一些优选的实施方案中,本发明提供人乳头瘤病毒 (HPV) 的 CD8⁺T 细胞表位 (CD8⁺T-cell epitopes)。在另外一些实施方案中,本发明提供适合使用在预防和 / 或治疗疫苗中的表位。在特别优选的一些实施方案中,本发明提供适合使用在预防和 / 或治疗疫苗中的修饰表位。在一些格外优选的实施方案中,本发明提供开发疫苗的方法,是基于来自微生物包括病毒的多种株系的 T 细胞表位,以及用于防止癌症。

[0022] 正如这里和 1998 年 4 月 15 日提出的美国专利申请序列号 09/060,872 ;2000 年 2 月 2 日提出的 09/500,135 ;2001 年 1 月 23 日提出的 09/768,080 ;以及相关申请中描述的,I-MUNE[®]测定被开发用来鉴定任何感兴趣蛋白质中功能性 T 细胞表位。这个检测的一个特征是要使用从社会捐赠者处得到的细胞,这些社会捐赠者有可能包括没有被暴露于感兴趣蛋白质的个体。正如所引述的申请和出版物所描述,该测定在多种蛋白质的 CD4⁺T 细胞表位的鉴定中取得了巨大的成功。然而,当研究 CD8⁺T 细胞表位时,结果一般不是可靠的 (robust)。根据文献,CD8⁺T 细胞反应经常需要依靠 CD4⁺T 细胞“帮助”它们做出应答。部分地,这种帮助包括抗原呈递细胞 (antigen-presenting cells (APCs)) 的活化。当 CD4⁺T 细胞与 APC 相互作用时,APC 活化就发生了。CD4⁺T 细胞和 APC 之间的相互作用,部分地,由 CD40 配体 /CD40 受体的相互作用所介导。因此,在本发明的开发中,抗 CD40 单克隆抗体在测定中就作为激活 CD4⁺T 细胞存在的替代品被使用。

[0023] 另外,据认为在一些情况下,同罹患慢性病的病人相比,痊愈的病人具有抗不同表位的免疫反应。的确,这种情况体现在被 HCV 感染而自然痊愈的个体身上 (参见 Wertheimer 等, Hepatol., 37 :577-589[2003]), 以及体现在尽管携带高病毒量而具有较强 CD8⁺ 反应的

HIV 感染个体身上（参见 Addo 等, *J. Virol.*, 77 :2081-2092[2003]）。因此,对正常健康捐赠者的表位的鉴定,正如这里所描述的,可以在潜在有效的与无效的 CD8⁺ 表位的鉴定中应用。

[0024] 如这里所描述,在 CD8⁺I-MUNE[®]测定的重复实验 (replicate) 中,对抗 -CD40 单克隆抗体进行试验,以评价其对 CD8⁺T 细胞的增殖反应的影响。如在实施例 1 中更为详细的描述,狭窄的浓度范围 (体外) 被发现是有效的。正如所指出,通过使用抗 CD40 抗体,体外上调了 CD8⁺ 增殖和 IFN- γ 分泌。然而,如同样在这里所描述的,用类似的实验尝试了许多其它的抗体,但是它们没有诱导 CD8⁺T 细胞活化。

[0025] 功能性 CD8⁺T 细胞表位鉴定的其它方法,要依靠从捐赠者处得到的、携带了记忆性免疫反应的细胞。在这些试验中,外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells (PBMC)) 被使用,或者在使用前被体外培养,或者被克隆。的确,大部分当前的 HPV 和其它的主要组织相容性复合体 (MHC) I 类表位肽的鉴定方法,都依赖于对来自经核实的暴露供体的外周血液来源的使用,这些供体拥有丰富的抗原特定 CD8⁺T 细胞。对这些富集的群体,可以使用四聚体染色 (tetramer staining) 和增殖方法。的确,使用肽集的四聚体分析结合 Elispot 分析被用来发现表位反应,以确保 CD8⁺T 细胞是功能性的 (参见,例如 Terajima 等, *J. Exp. Med.*, 197 :927-932[2003])。然而,四聚体的使用稍具局限性,因为目前仅能得到为数不多的 I 型构建物 (参见 Sato 等, *J. Immunol. Meth.*, 271 :177-184[2002]; 以及 Altman 等, *Science* 274 :94-96[1996], 勘误于 *Science* 280 :1821[1998])。

[0026] 另外,用于 CD8⁺T 细胞表位的许多预测性算法是已知的,其中的一些似乎非常有效和准确 (参见 Nussbaum 等, *Curr. Opin. Immunol.*, 15 :69-74[2003])。在一些实施方案中,这些计算机算法被用来预测 I 类 MHC 的结合作用。然而,通过这些方法没有提供完整的解答,因为基于计算机算法而鉴定的预测表位必须同时也在功能上被证实。

[0027] 本发明提供了优于现在所用方法的显著优势,因为本测定使用未暴露的细胞供体,并且不依赖于计算机算法评估表位和免疫反应之间的关系。重要的是,本发明提供可功能上证实从每个表位和样品所得结果的方法。

[0028] 定义

[0029] 除非在此被另外定义,否则这里用到的所有技术与科学词语与本发明所属领域中的普通技术人员一般理解的意义相同。比如,Singleton 和 Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 第二版, John Wiley 和 Sons, NY(1994); Hale 和 Marham, *The HarperCollins Dictionary of Biology*, Harper Perennial, NY(1991), 向本领域普通技术人员提供了许多本发明中用到的词语的综合词典。尽管与这里描述的相似或者等同的任何方法和材料在本发明的实践中得到了应用,优选的方法和材料都在这里被描述。因此通过参考作为一个整体的说明书,下面所定义的词语会被更完全地予以描述。同样,如此处所用,除非上下文另外明确指出,单数“a”,“an”,和“the”包括复数指代。为了使得本发明更容易被理解,下面定义了许多词语。

[0030] 如此处所有,“HPV”和“人乳头瘤病毒 (humanpapillomavirus)”指的是有能力感染人类的乳头瘤病毒属 (genuspapillomavirus) 的成员。存在两类主要 HPV (即生殖和皮肤类),每个类别包含多种病毒“型”或“株” (比如 HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 32 等)。在本发明中,特别感兴趣的是与生殖感染和恶性肿瘤有关的 HPV 型。

[0031] 如此处所用,“预防的 (prophylactic)”和“预防性的 (preventive)”疫苗,是指为预防由病原生物引起或与病原生物特别是 HPV 相关的感染、疾病和 / 或任何相关后遗症而设计和施用的疫苗。

[0032] 如此处所用,“治疗 (therapeutic)”疫苗,指的是为已经被病原生物所感染的病人而设计和施用的疫苗,比如被至少一种 HPV 病毒株所感染。治疗疫苗 (例如,HPV 治疗疫苗),被用来阻止和 / 或治疗在这些受感染者中的良性或恶性肿瘤的发展。

[0033] 如此处所用,“抗原呈递细胞 (antigen presenting cells)” (“APC”),指的是在其表面呈现抗原的、免疫系统的细胞。这种抗原可被 T 细胞识别。树突状细胞 (dendritic cells)、并指状细胞 (interdigitating cells)、激活的 B 细胞和巨噬细胞,都是抗原呈递细胞的实例。

[0034] 术语“淋巴的”,当被用来指细胞系或者细胞的时候,是指该细胞系或细胞衍生自淋巴谱系 (lineage),并且包括 B 和 T 淋巴细胞谱系的细胞。

[0035] 如此处所用,术语“T 淋巴细胞 (T lymphocyte)”和“T 细胞 (T-cell)”,包括从 T 细胞前体 (包括不含重排 T 细胞受体 [TCR] 基因的 Thy 阳性细胞) 到成熟 T 细胞 (即对 CD4⁺ 或 CD8⁺ 呈单阳性,表面 TCR 阳性细胞) 的属于 T 淋巴细胞谱系的任何细胞。

[0036] 如此处所用,术语“B 淋巴细胞 (B lymphocyte)”和“B 细胞 (B-cell)”包括从 B 细胞前体,例如前 B 细胞 (开始重排 Ig 重链基因的 B220⁺ 细胞) 到成熟 B 细胞和浆细胞的属于 B 细胞谱系的任何细胞。

[0037] 如此处所用,“CD4⁺T 细胞 (CD4⁺T-cell)”和“CD4T 细胞 (CD4T-cell)”是指辅助 T 细胞,而“CD8⁺T 细胞 (CD8⁺T-cell)”和“CD8T 细胞 (CD8T-cell)”是指细胞毒性 T 细胞。

[0038] 如此处所用,“B 细胞增殖 (B-cell proliferation)”,指的是用带有或者不带有抗原的抗原呈递细胞对 B 细胞进行培养的过程中所产生的 B 细胞数量增加。

[0039] 如此处所用,“基线 B 细胞增殖 (baseline B-cell proliferation)”,如此处所使用,指的是 B 细胞增殖的程度;在肽或蛋白质抗原缺乏时,一般在个体上观察到应答暴露于抗原呈递细胞的 B 细胞增殖。对于此处的目的, B 细胞增殖基线水平被测定为缺乏抗原时的 B 细胞增殖,是基于每个个体的每个样本进行测定。

[0040] 如此处所用,“B 细胞表位 (B-cell epitope)”指的是肽或者蛋白质的特征,其在对含有该抗原的肽 (即免疫原) 所起的免疫反应中被 B 细胞受体识别。

[0041] 如此处所用,“改变的 B 细胞表位 (altered B-cell epitope)”指的是与感兴趣的前体肽或者肽不同的表位氨基酸序列,使得感兴趣的变体肽在人体或其它动物体内产生不同的 (即改变的) 免疫原反应。改变的免疫原反应包括改变的免疫原性和 / 或变应原性 (即增加或者减少的总免疫原反应),这也被考虑在内。在一些实施方案中,改变的 B 细胞表位包含对选自位于鉴定表位内的那些残基的氨基酸的取代和 / 或删除。在替代的实施方案中,改变的 B 细胞表位包含在表位中增加一个或多个残基。

[0042] 如此处所用,“T 细胞表位 (T-cell epitope)”是指肽或者蛋白质的特征,其在对含有该抗原的肽的免疫原反应的引发过程中被 T 细胞受体识别。T 细胞对 T 细胞表位的识别一般被认为是通过这样的机理进行,其中 T 细胞识别与表达在抗原呈递细胞上的 I 类或者 II 类主要组织相容性复合体 (MHC) 分子结合的抗原肽片段 (参看 Moeller (ed), Immunol. Rev., 98 :187 [1987])。在本发明的一些实施方案中,如这里描述而鉴定的表位或者表位片

段,应用于检测具有可以结合或显示表位或片段的 MHC 分子的细胞抗原呈递细胞。在一些实施方案中,表位 / 表位片段进一步包含可检测标记 (即标记物),该标记使对结合或显示感兴趣的表位 / 表位片段的细胞的鉴定更加方便。

[0043] 如此处所用,“T 细胞增殖 (T-cell proliferation)”,是指在用带有或者不带有抗原的抗原呈递细胞进行的 T 细胞培养过程中,产生的 T 细胞数量。

[0044] 如此处所用,“基线 T 细胞增殖 (baseline T-cell proliferation)”指的是 T 细胞增殖的程度,其一般在个体上在肽或蛋白质抗原缺乏时对暴露于抗原呈递细胞的反应中被观察到。就此处的目的而言,基线 T 细胞增殖水平被测定为在抗原缺乏时应答抗原呈递细胞的 T 细胞增殖,是基于每个个体的每个样本测定。

[0045] 如此处所用,“改变的免疫原性反应 (altered immunogenic response)”是指增加的或者减少的免疫原性反应。当蛋白质或者肽引起的 T 细胞和 / 或 B 细胞反应比其亲本 (例如前体) 蛋白质或肽 (例如感兴趣蛋白质) 引起的反应大时,该蛋白质和肽表现出“增加的免疫原性反应”。一般地,这种较高反应的净结果是定向于抗变异体蛋白质或肽的抗体反应增加。当蛋白质或者肽引起的 T 细胞和 / 或 B 细胞反应比其亲本 (例如前体) 蛋白或肽引起的反应小时,该蛋白质和肽表现出“减少的免疫原性反应”。在一些实施方案中,这种较低的反应的净结果是定向于抗变异体蛋白质或肽的抗体反应减少。在一些优选的实施方案中,亲本蛋白是野生型蛋白质或者肽。

[0046] 对于特定氨基酸序列,“表位 (epitope)”是指氨基酸残基的组,其参与通过特定免疫球蛋白的识别,或在 T 细胞环境下,这些残基对通过 T 细胞受体蛋白质和 / 或主要组织相容性复合体 (MHC) 受体的识别是必需的。在免疫系统环境中,无论体内或体外,表位是分子的集体特征,例如一级、二级和三级肽结构,以及电荷,其共同形成由免疫球蛋白、T 细胞受体或 HLA 分子识别的位点。贯穿于本公开,“表位 (epitope)”和“肽 (peptide)”可以被交换使用。

[0047] 如此处所用,术语“主要表位 (major epitope)”指的是表位 (即 T 细胞和 / 或 B 细胞表位),其中在被测供体库中的反应率比平均背景 (mean background response rate) 反应率高出至少三个标准差。

[0048] 如此处所用,术语“中等表位 (moderate epitope)”指的是表位 (即 T 细胞和 / 或 B 细胞表位),其中在被测供体库中的反应率至少超过平均值两个标准偏差或者三倍于背景值。

[0049] 如此处所用,术语“次要表位 (minor epitope)”是指表位 (即 T 细胞和 / 或 B 细胞表位),其中在被测供体库中的反应率是背景的至少二倍。

[0050] 如此处所用,术语“显著表位 (significant epitope)”指的是表位 (即 T 细胞和 / 或 B 细胞表位),其中被测供体库中的反应率等于或者大于背景反应率的大约三倍。

[0051] 如此处所用,“弱显著表位 (weakly significant epitope)”指的是表位 (即 T 细胞和 / 或 B 细胞表位),其中被测供体库中的反应率大于背景反应率,但是小于背景反应率的大约三倍。

[0052] 如此处所用,“背景水平 (background level)”和“背景反应 (background response)”,指的是在被测蛋白质的数据集中反应者对任何特定肽的平均百分数。通过平均组中所有肽的反应者百分数而测定该值,这基于所有被测供体进行汇总。例如,3% 的背

景响应表示：当在 100 个供体上进行试验时，对数据集中任何肽，平均有三个阳性（SI 大于 2.95）响应。

[0053] 如此处所用，术语“样本 (sample)”是取其最广泛的意义被使用。然而，在优选的实施方案中，该词语被用于指包含肽（即在肽集 (pepset) 内的肽，该肽集包含感兴趣蛋白质的序列）的样品（如等分试样），该肽被分析、被鉴定、被修饰和 / 或以及（或者）同其它肽相比较。因此，在大多数情况下，该词语被用于指包括感兴趣的蛋白质或肽的物质。

[0054] 如此处所用，“感兴趣蛋白质 (protein of interest)”指的是被分析、被鉴定和 / 或被修饰的蛋白质。自然的天然出现的以及重组蛋白、合成制备的、变异体及衍生蛋白质都在本发明中得到应用。

[0055] 如此处所用，“蛋白质 (protein)”是指包含氨基酸和被本领域普通技术人员识别为蛋白质的任何组合物。在这里词语“蛋白质 (protein)”、“肽 (peptide)”、多肽 (polypeptide) 被替换使用。氨基酸可以通过其全称（如丙氨酸），或通过一般承认的一个字母（如 A），或者通过三字母缩写（如 ala）被提及。其中肽是蛋白质的一部分，本领域普通的技术人员理解在上下文中所使用的这个概念。词语“蛋白质 (protein)”包括成熟形态的蛋白质，也包括相关蛋白质的前体 (pro-) 和原前体形式 (prepro-)。蛋白质的原前形式包含蛋白质的成熟形式，该蛋白质具有与蛋白质的氨基末端可操作相连的前序列，和与前序列的氨基末端可操作相连的“原”或者“信号”序列。

[0056] 如此处所用，功能相似蛋白质被认为是“相关蛋白质”。在一些实施方案中，这些蛋白质衍生自不同的属和 / 或种，包括生物体的纲之间的差异例如细菌蛋白质和真菌蛋白质。在另外的实施方案中，相关蛋白来自相同的种。的确，并不意图使本发明受限于来自任何具体来源的相关蛋白质。

[0057] 如此处所用，术语“衍生物”指的是以这样的方式衍生自前体蛋白质的蛋白质：向 N 末端和 C 末端中的任何一端或两端添加一个或多个氨基酸，在氨基酸序列中的一个或多个不同位点上取代一个或多个氨基酸，和 / 或在蛋白质的任何一端或两端或者在氨基酸序列中的一个或者多个位点上删除一个或多个氨基酸，和 / 或在氨基酸中的一个或多个位点上插入一个或多个氨基酸。蛋白质衍生物的制备优先通过如下方法得到：修饰编码天然蛋白质的 DNA 序列，将 DNA 序列转化进入合适的宿主，和通过修饰 DNA 序列的表达而形成衍生蛋白质。

[0058] “变异体蛋白质 (variant protein)”是相关蛋白质（以及衍生蛋白质）的一种类型。在优选的实施方案中，通过少量的氨基酸残基，变异体蛋白质不同于亲本蛋白质，以及变异体蛋白质之间彼此不同。不同的氨基酸残基的数目可以是一个或多个，优选为 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 或者更多的氨基酸残基。在一个优选的实施方案中，变异体之间不同氨基酸的数目为 1 到 10。在特别优选的实施方案中，相关蛋白质和具体 (particularly) 变异体蛋白质包含至少 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 或者 99% 的氨基酸序列同源性。另外，相关蛋白质或者变异体蛋白质，如这里用到的，指的是在显著区域 (prominent region) 的数目上区别于另一种相关蛋白质或亲本蛋白质的蛋白质。例如，在一些实施方案中，变异体蛋白质具有 1, 2, 3, 4, 5 或 10 个与其亲本蛋白质不同的对应的显著区域。

[0059] 在一个实施方案中，变异体的显著对应区域仅仅产生背景水平的免疫原性反应。

为进行取代、插入和删除而鉴定的一些残基是保守残基,而其它则不是。在残基为不保守的情况下,一个或多个氨基酸的替换限于产生具有与天然存在的序列不相符的氨基酸序列的变异体取代。在残基是保守的情况下,这样的替换应该不导致天然发生的序列。

[0060] 在一些实施方案中,下面的盒式诱变方法在本发明的蛋白质变异体的构建中得到应用,尽管也可以使用其它方法。第一,编码蛋白质的天然存在的基因被全部或部分地获得和测序。然后对序列进行扫描以找出一个位点,在该位点处进行所编码蛋白质中的一个或几个氨基酸的突变(删除,插入或取代)是期望的。评估位于该位点侧翼的序列是否存在限制位点,以使用寡核苷酸库替换该基因的短节段;当其被表达时,将编码各种突变体。这样的限制位点优选是位于该蛋白质基因内的唯一位点,以使基因节段的替换更加方便。然而,可以使用在该蛋白质基因中的非过度冗余的任何便利的限制位点,条件是经限制酶切消化而产生的基因片段可以以适当的顺序被重新装配(reassemble)。如果限制位点没有在处于所选点的附近距离内(从10到15个核苷酸)的位置上出现,这样的位点是通过以这样的方式取代该基因中的核苷酸而产生,即在最终构建中阅读框架或被编码氨基酸均不发生变化。为将基因序列变成与期望序列一致而进行的基因突变,是依照一般已知的方法、通过M13引物延伸得以完成。定位合适的侧翼区以及评估为到达两个便利的限制酶切位点序列而需要改变的任务,是通过该基因编码的丰余序列、该基因的限制酶图谱、以及数量众多的不同限制酶得以常规地完成。要注意,如果存在合适的侧翼限制位点可以被利用,上述方法需要仅仅在与不含位点的侧翼区相关的情况下使用。

[0061] 一经克隆天然存在的DNA或者合成DNA,用同族限制酶(cognate restriction enzymes)消化位于待突变位置侧翼的限制位点,并且将多个的末端互补寡核苷酸盒子(end termini-complementary oligonucleotide cassettes)连接到该基因中。通过这种方法简化了诱变,因为所有的寡核苷酸都可以被合成,致使具有相同的限制位点,不需要合成的接头(synthetic linkers)产生限制位点。

[0062] 如此处所用,“相应(corresponding to)”,指的是处于蛋白质或肽中的所述计数位置上的残基,或者是与蛋白质或者肽中的计数残基类似、同源或等价的残基。

[0063] 如此处所用,“相应区域(corresponding region)”一般指沿着相关蛋白质或者亲本蛋白质的类似位置。

[0064] 如此处所用,术语“类似序列(analogous sequence)”指的是在蛋白质中提供与感兴趣蛋白质(即一般为感兴趣的原始蛋白质)具有相似功能、三级结构、和/或保守残基的序列。在特别优选的实施方案中,类似序列包含处于表位上或表位附近的序列。例如,在包含 α 螺旋或 β 折叠结构的表位区域中,在类似序列中的替换氨基酸优选保持相同的具体结构。该词语也指核苷酸序列,以及氨基酸序列。在一些实施方案中,类似序列被发展,使得替换氨基酸与感兴趣蛋白质中的、处于表位上或者表位附近的氨基酸显示相似的功能、三级结构和/或保守残基。因此,在表位包含诸如 α 螺旋或 β 折叠结构的情况下,替换氨基酸优选保持其特定结构。

[0065] 如此处所用,“同源蛋白质(homologous protein)”指的是与感兴趣蛋白质具有相似作用、结构、抗原性和/或免疫原性反应的蛋白质。并不意味着:需要同系物和感兴趣蛋白质必须是进化相关的。因此,意图在于该术语包含来自不同物种的相同功能的蛋白质。在一些优选的实施方案中,需要鉴定与感兴趣蛋白质具有相似的三级和/或一级结构的同系

物,因为用来自同系物的类似区段替换感兴趣蛋白质中的表位会减少该变化的破坏性。因此,在大多数情况下,相近的同源蛋白质提供表位取代的最期望来源。可替代地,就给定蛋白质而言,寻找人的类似物是有利的。例如,在一些实施方案中,用来自另一种 HPV 或者其它物种的乳头瘤病毒的序列取代一种人 HPV 型中的具体表位,将会导致其免疫原性增加到适合用于疫苗制备的水平。

[0066] 如此处所用,“同源基因 (homologous genes)”指的是来自不同、但通常为相关物种的至少一对基因,其彼此对应,而且彼此相同或非常类似。该术语包括由于物种形成而被分离的基因(即新物种的发展)(例如,直向同源基因),以及通过遗传重复而被分离的基因(例如,共生同源基因)。这些基因编码“同源蛋白 (homologous proteins)”。

[0067] 如此处所用,“直向同源物 (ortholog)”和“直向同源基因 (orthologous gene)”指的是通过物种形成从共同的祖基因(即同源基因)进化得到的、存在于不同物种中的基因。一般地,直向同源物在进化过程中保持相同的功能。直向同源物的鉴定可应用于新测序基因组中的基因功能的可靠预测中。

[0068] 如此处所用,“共生同源物 (paralog)”和“共生同源基因 (paralogous gene)”指的是通过基因组中的重复而被联系起来的基因。虽然直向同源物在进化过程中保持了同一功能,共生同源物则发展出新的功能,即使一些功能经常与最初功能相关。共生同源物的例子包括但不限于编码胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶的基因,这些都是丝氨酸蛋白酶,而且一起出现在同一物种内。

[0069] 如此处所用,“野生型 (wild-type)”和“天然的 (native)”蛋白质是指那些在自然界中被发现的蛋白质。术语“野生型序列 (wild-type sequence)”和“野生型基因 (wild-type gene)”在这里可以通用,用来指天然或自然出现在宿主细胞中的序列。在一些实施方案中,野生型序列是指作为基因工程项目中起始点的感兴趣序列。编码天然存在(即前体)蛋白质的基因,可以根据使用本领域普通技术人员已知的一般方法被获取。该方法包括合成具有编码感兴趣蛋白质区域的推定序列的标记探针,从表达该蛋白质的生物体中制备基因组文库,以及通过与探针的杂交筛选感兴趣基因的文库。阳性杂交克隆随即被作图和测序。

[0070] 如此处所用,术语“重组 DNA 分子 (recombinant DNA molecule)”是指通过分子生物学技术方法接合在一起的 DNA 区段所组成的 DNA 分子。

[0071] 序列间的同源性程度 (degree of homology),可以用本领域中已知的任何合适的方法进行确定(参见 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482[1981]; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443[1970]; Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444[1988]; Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI) 中的软件,例如 GAP, BESTFIT, FASTA 和 TFASTA; 以及 Devereux 等, *Nucl. Acid Res.*, 12:387-395[1984])。

[0072] 例如, PILEUP 是确定同源性水平的一个有用程序。PILEUP 使用渐进成对对齐,从一组相关序列中产生多重序列对齐 (multiple sequence alignment)。它还可以画出显示用于产生对齐的群集关系 (clustering relationship) 的树图。PILEUP 使用 Feng 和 Doolittle 渐进对齐方法的简化方法 (Feng and Doolittle, *J. Mol. Evol.*, 35:351-360[1987])。该方法与由 Higgins 和 Sharp 描述的方法近似 (Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:

151-153[1989])。有用的 PILEUP 参数包括:默认空位权重 (gap weight) 是 3.00, 默认空位长度权重 (gap lengthweight) 是 0.10, 以及加权末端空位 (weighted end gaps)。另一个有用的算法的例子是由 Altschul 等人描述的 BLAST 算法 (Altschul 等, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410[1990]; 和 Karlin 等, *Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787[1993])。一个特别有用的 BLAST 程序是 WU-BLAST-2 程序 (参见 Altschul 等, *Meth. Enzymol.*, 266:460-480[1996])。参数“W”, “T”和“X”决定对齐 (alignment) 的灵敏性和速度。BLAST 程序默认字长 (W) 为 11, BLOSUM62 打分矩阵 (参见 Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915[1989]) 对齐值 (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, M' 5, N' 4 以及比较两条链。

[0073] 如此处所用, “核酸同一性百分数 (%) (percent (%) nucleic acid sequence identity)”, 是指与序列中核苷酸残基相同的候选序列中的核苷酸残基的百分率。

[0074] 如此处所用, 术语“杂交 (hybridization)”指的是一条核酸链通过碱基配对与互补的核酸链结合的过程, 正如本领域所已知的。

[0075] 如此处所用, “最大严格 (maximum stringency)”是指一般在大约 $T_m - 5^\circ\text{C}$ (温度比探针解链温度 (T_m) 低 5°C) 下发生的杂交水平; “高度严格 (high stringency)”是在比 T_m (解链温度) 低大约 5°C 至 10°C 下; “中等严格 (intermediate stringency)”是在 T_m (解链温度) 低大约 10°C 至 20°C 下; “低严格 (low stringency)”是在比 T_m (解链温度) 低大约 20°C 到 25°C 下。正如本领域技术人员所理解, 最大严格杂交可以被用来鉴定或者检测相同的多核苷酸, 而中等或低严格杂交可以被用来鉴定或检测多核苷酸序列同系物。

[0076] 在两个核酸或者多肽的上下文中, 短语“基本相似 (substantially similar)”和“基本相同 (substantially identical)”一般意味着: 多核苷酸或多肽包含如下序列, 其与参考序列 (野生型) 相比, 具有至少 75% 的序列同一性, 优选至少 80%, 更优选至少 90%, 更优选 95%, 最优选 97% 的序列同一性, 有时可达 98% 和 99% 的序列同一性。序列同一性可以通过已知的程序, 诸如 BLAST, ALIGN 和 CLUSTAL, 使用标准参数进行确定。(参见 Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215:403-410[1990]; Henikoff 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915[1989]; Karin 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873[1993]; 以及 Higgins 等, *Gene* 73:237-244[1988])。用来进行 BLAST 分析的软件, 可以从 National Center for Biotechnology Information 公开得到。而且, 可以用 FASTA 搜索数据库 (Pearson 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448[1988])。

[0077] 如此处所用, “等价残基 (equivalent residue)”指的是共享特定氨基酸残基的蛋白质。例如, 通过确定蛋白质 (例如 IFN- β) 在三级结构水平上的同源性可以鉴定等价残基, 该蛋白质的三级结构已经通过 X 射线衍射技术被测定。等价残基定义为这样的残基: 具有假定等价残基的蛋白质和感兴趣蛋白质 (N 和 N, CA 和 CA, C 和 C, O 和 O) 的一个特定氨基酸残基的两个或多个主链原子的原子坐标, 在对齐之后, 位于 0.13nm 之内, 和优选地在 0.1nm 之内。在最优模型被定向并定位, 从而产生所分析蛋白质的非氢蛋白质原子坐标的最大重叠之后, 对比就完成了。优选的模型是晶体模型, 其在可用的最高分辨率下给实验衍射数据提供了最小的 R 因子, 使用结晶学与蛋白质鉴定 / 分析领域中的普通技术人员所已知的方法进行测定。

[0078] 在一些实施方案中, 优选对编码前体酶的氨基酸序列的“前体 DNA 序列 (precursor DNA sequence)”进行修饰, 但是可以通过操作前体蛋白进行。在残基为非保守

的情况下,一个或多个氨基酸的替换只限于生成变异体的取代:该变体含有与天然发现的氨基酸序列不相符的氨基酸序列。在保守残基的情况下,这样的替换不应该得到自然发生的序列。由本发明提供的衍生物进一步包括改变蛋白酶特性的化学修饰。

[0079] 在一些优选的实施方案中,蛋白质基因被连接在合适的表达质粒中。然后,该克隆蛋白质基因被用于转化或转染宿主细胞,目的是表达该蛋白质基因。该质粒可以在宿主细胞中复制,在这个意义上,它包含质粒复制所需要的众所周知的成分;或者质粒被设计成可以整合到宿主染色体中。必需的元件被提供,以便进行有效的基因表达(例如,启动子可操作地连接到感兴趣基因上)。在一些实施方案中,这些必需元件被供应为该基因自身的同源启动子,如果它被识别的话,(即被宿主转录);转录终止子(真核宿主细胞的聚腺苷酸化区域),其为外生的或者由该蛋白质基因的内生终止子区提供。在一些实施方案中,也包括选择基因,诸如抗生素抗性基因;该基因通过在含有抗微生物物质的培养基中生长而使质粒转染宿主细胞得以保持连续培养。

[0080] 本发明包括具有改变的免疫原性的蛋白质,它们是等价物。是“等价的”,意味着在中等严格到高严格条件下,蛋白质是由可以杂交到该多核苷酸上的多核苷酸编码的,该核苷酸具有如此处提供的任何一个序列中所示的序列;并且仍然保持对人 T 细胞的改变的免疫原反应性。是“等价的”,意味着:相对于表位序列,蛋白酶具有至少 55%,至少 65%,至少 70%,至少 75%,至少 80%,至少 85%,至少 90%,至少 95%,至少 97% 或者至少 99% 的同一性;以及含有这样的表位的变异体蛋白酶(如具有修饰的氨基酸序列)。

[0081] 如此处所用,术语“杂交体蛋白质(hybrid proteins)”和“融合蛋白质(fusion proteins)”,指的是从至少两个不同的或者“亲本的”蛋白质经过工程制得的蛋白质。在优选的实施方案中,这些亲本蛋白相互之间为同系物。例如,在一些实施方案中,优选的杂交体蛋白酶或融合蛋白质,包含了一个蛋白质的 N 末端和该蛋白质同系物的 C 末端。在一些优选的实施方案中,两个末端被结合以与全长活性蛋白质相符合。在另一些替代的优选实施方案中,这些同系物共享基本的相似性,但不具有相同的 T-细胞表位。因此,在一个实施方案中,本发明提供这样的感兴趣的蛋白酶:它的 C 末端上有一个或多个 T 细胞表位,但是在其中,该 C 末端被同系物的 C 末端替换,该同系物在其 C 末端上具有较低活性 T 细胞表位、或者较少的 T 细胞表位或没有 T 细胞表位。因此,普通技术人员会理解,通过可以在同系物中鉴定 T 细胞表位,可以形成多种可产生不同免疫原性反应的变种。此外,应当理解:内在部分和不止一个同系物可以被用来产生本发明的变种。

[0082] “可操作连接(operably linked)”和“以可操作结合的方式(inoperable combination)”,当描述两个 DNA 区域之间的关系时,仅仅意味着:它们功能性地彼此相连。例如,如果前序列作为信号序列起作用,参与最可能涉及信号序列切割的蛋白质成熟形式的分泌,则前序列被可操作地连接于肽上。如果启动子控制序列的转录,则启动子被可操作地连接于编码序列上;如果核糖结合位点被定位以允许翻译,则核糖结合位点被可操作地连接于编码序列上。

[0083] DNA 分子被叙述成具有“5' 末端”和“3' 末端”,因为单核苷酸以如下这样的一种方式反应而形成寡核苷酸,使得一个单核苷酸戊糖环上的 5' 磷酸通过磷酸二酯键以一个方向被连接到其邻居的 3' 氧上。因此,如果寡核苷酸的 5' 磷酸没有与单核苷酸戊糖环上的 3' 氧相连,其末端被称作“5' 末端”;如果寡核苷酸的 3' 氧没有被连接到随后的单核

苷酸戊糖环的 5' 磷酸上,这个末端则被称作“3' 末端”。如这里所使用,核酸序列,即使在大的寡核苷酸的内部,也可以被称为具有 5' 末端和 3' 末端。在线性或环状 DNA 分子中,离散的元件被称为“下游”或者 3' 元件之“上游”或者 5' 端。这个专门名词反映了转录过程是沿着 DNA 链、从 5' 到 3' 的方式予以进行的事实。指导连锁基因的转录的启动子和增强子元件,一般位于编码区的 5' 或上游(甚至当位于启动子元件和编码区域的 3' 时,增强子也可以发挥其作用)。转录终点或多腺苷酸化信号位于编码区的 3' 或者下游。

[0084] 术语“具有编码基因的核苷酸序列的寡核苷酸”,意指含有基因的编码区的 DNA 序列,或者换句话说,是指编码基因产物的 DNA 序列。该编码区可以以 cDNA 或者基因组 DNA 的形式存在。如果需要,适当的控制元件比如增强子/启动子,剪接点(splice conjunction),多腺苷酸化信号等可以被放置在与基因编码区密切接近处,从而容许转录的恰当起始和/或初生 RNA 转录物(primary RNA transcript)的正确加工。可选择地,在本发明的表达载体中所使用的编码区,可以包含内源增强子/启动子,剪接点,间插序列,多腺苷酸化信号等,或者内源性和外源性控制元件的结合。

[0085] 术语“重组寡核苷酸(combinant oligonucleotide)”,是指使用分子生物学操作所创制的寡核苷酸,这些分子生物学操作包括但不限于:通过限制酶切消化多核苷酸序列而得到的两个或多个寡核苷酸的连接反应,寡核苷酸的合成(例如,引物或者寡核苷酸的合成)以及相似的操作。

[0086] 如这里使用的,术语“转录单位(transcription unit)”是指处于转录的起始和终止位点之间的 DNA 区段,和对有效起始和终止必不可少的调控元件。例如,包含增强子/启动子、编码区和终止及多腺苷酸化序列的 DNA 区段组成一个转录单位。

[0087] 如这里用到的,术语“调控元件(regulatory element)”是指控制核酸序列表达的某个方面的遗传学元件。例如,启动子是促使可操作连接的编码区的转录起始的调控元件。其它调控元件是剪接信号,多腺苷酸化信号,终止信号等(由下文说明)。

[0088] 如这里使用的,术语“表达载体(expression vector)”是指重组 DNA 分子,其包含期望的编码序列和对可操作连接的编码基因在具体宿主生物内的表达所必不可少的合适的核酸序列。对原核细胞中的表达必需的核酸序列包括启动子,任选包括操纵基因序列,核糖体结合位点及可能的其它序列。已知原核细胞利用启动子,增强子以及终止和多腺苷酸化信号。一经转化进入合适的宿主,载体可以独立于宿主基因组进行复制和发挥作用,或者,在一些情况下,自己整合进入基因组。在本说明书中,“质粒(plasmid)”和“载体(vector)”有时可以交换通用,因为质粒是当前最普遍使用的载体形式。然而,本发明意图包括表达载体的这样的其它形式,其发挥等价作用,其在本领域是已知的或将变为已知的,包括但不限于:质粒,噬菌体颗粒,病毒载体和/或仅为潜在的基因组插入物。

[0089] 本发明中使用的“宿主细胞”一般为含有表达载体和/或感兴趣基因的原核或真核宿主。用使用重组 DNA 技术构建的载体转化或转染宿主细胞。这样的转化宿主细胞有能力复制编码蛋白质变异体的载体或表达期望蛋白质变异体。在编码蛋白质变异体的前体(pre-)或原前体(prepro-)形式的载体情况下,这样的变异体,当其被表达的时候,一般被从宿主细胞分泌到宿主细胞介质中。

[0090] 术语“启动子/增强子(promoter/enhancer)”,表示 DNA 区段,其包含可以提供启动子和增强子功能的序列(例如,逆转录病毒的长末端重复序列包含启动子和增强子两种

功能)。增强子/启动子可以是“内源的”或“外源的”或“异源的”。内源增强子/启动子是天然连接在基因组中的特定基因上的增强子/启动子。外源(异源)增强子/启动子是以遗传操作(即分子生物学技术)手段被放置于基因并列位置中的增强子/启动子。

[0091] 在表达载体上的“剪接信号(splicing signals)”的存在,导致重组转录物的更高水平表达。剪接信号介导了内含子从初生 RNA 转录物上的去除,其由剪接供体和受体位点组成。(Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York [1989], pp. 16.7-16.8)。普遍使用的剪接供体和受体位点是来自 SV40 的 16S RNA 的剪接点(splice junction)。

[0092] 重组 DNA 序列在真核细胞中的有效表达,需要指导所形成的转录物的有效终止和多腺苷酸化的信号。转录终止信号一般被发现在多腺苷酸化信号的下游,长度为几百个核苷酸。如这里使用的术语“聚腺苷酸部位”或者“聚腺苷酸序列”,表示指导新生 RNA 转录物的终止和多腺苷酸化的 DNA 序列。重组转录物的有效多腺苷酸化或聚腺苷酸化(polyadenylation)是希望的,因为缺乏聚腺苷酸尾(poly A tail)的转录物不稳定,会很快被降解。表达载体所利用的聚腺苷酸信号可以是“异源的”或者“内源的”。内源聚腺苷酸信号是自然存在于基因组上的特定基因的编码区之 3' 末端的聚腺苷酸信号。异源聚腺苷酸信号是从一个基因分离出来并被放置于另一个基因的 3' 的聚腺苷酸信号。普遍使用的异源聚腺苷酸信号是 SV40 聚腺苷酸信号。

[0093] 术语“稳定的转染(stable transfection)”和“稳定地转染的(stably transfected)”,是指将外源 DNA 引入和整合到被转染细胞的基因组中。术语“稳定转染物”是指已将外来 DNA 稳定整合入基因组 DNA 的细胞。

[0094] 术语“选择性标记(selectable marker)”和“选择性基因产物(selectable gene product)”,正如用于此处,是指基因的使用,该基因编码酶促活性,一旦细胞表达选择性标记时,该酶促活性提供对抗生素或药物的抗性。

[0095] 如此处所用,术语“扩增(amplification)”和“基因扩增(gene amplification)”指的是一个过程,通过该过程,具体 DNA 序列被不成比例地复制,使得扩增基因在基因组中,以同原来的存在数量相比,以更高的拷贝数存在。在一些实施方案中,通过在药物(例如,可抑制酶的抑制剂)存在下的生长而选择细胞,这导致编码在药物存在下生长所需的基因产物的内源基因的扩增,或导致编码此基因产物的外源(即输入)序列的扩增,或者二者同时扩增。基因扩增自然发生在具体基因的发展过程中,比如两栖类卵母细胞中的核糖体基因的扩增。通过用药物处理培养的细胞可以诱导基因扩增。药物诱导扩增的例子是哺乳动物细胞中内源性 dhfr 基因的甲氨蝶呤诱导扩增(Schmike 等, *Science* 202: 1051 [1978])。通过在药物(如可抑制酶的抑制剂)存在下的生长选择细胞,可导致编码药物存在下生长所需的基因产物的内源基因的扩增,或者借助编码此基因产物的外源(即输入)基因的扩增,或者两者都扩增。

[0096] 扩增是核酸复制的一种特殊情况,涉及模板特异性。它与非特异性模板复制(即依靠模板但不依靠特定模板的复制)形成对照。这里的模板特异性区别于复制的保真度(即合成正确的多核苷酸序列)和核苷酸(核糖的或脱氧核糖的)特异性。经常地,以“靶”特异性来描述模板特异性。靶序列为“靶”,意义在于它们被试图从其它核酸中挑选出来。扩增技术主要被设计用来进行这种挑选。

[0097] 如此处所用,术语“共扩增 (co-amplification)”指的是将可扩增标记结合其它基因序列 (即包含一个或者多个非选择性基因,比如那些包含在表达载体中的基因) 一起引入单细胞内,并且施加合适的选择压力,使得细胞扩增可扩增标记和它的非选择性基因序列。可扩增标记 (amplifiable marker) 可以被物理地连接于其它序列;或者替代性地,可以向同一细胞中引入两段分开的 DNA,一段包含可扩增标记,另一段包含非选择性标记。

[0098] 如此处所用,术语“可扩增标记 (amplifiable marker)”,“可扩增基因 (amplifiable gene)”和“扩增载体 (amplification vector)”指的是这样的基因或者载体:该基因或者载体编码在合适的生长条件下容许该基因扩增的基因。

[0099] 如此处所用,术语“可扩增核酸 (amplifiable nucleic acid)”指的是通过任何扩增手段可以被扩增的核酸。可设想为“可扩增核酸”通常包括“样本模板 (sample template)”。

[0100] 如此处所用,术语“样品模板 (sample template)”指的是源自被分析是否存在“靶”(在下面给出定义)的样品的核酸。相反,“背景模板 (background template)”被用于指样品模板之外的核酸,其可以出现或者不出现在样品中。背景模板经常被忽视。这可能是样品转移的结果,或者可能是由于试图从样品中纯化去除的核酸污染物的存在。例如,除了来自那些待检测的生物体以外,试验样品中的来自生物体的核酸都可作为背景存在。

[0101] “模板特异性 (template specificity)”在大多数扩增技术中是通过酶的选择而达到的。扩增酶是这样的酶:在它们被使用的条件下,它们仅仅加工核酸的特定序列,该核酸处在由核酸组成的异质混合物中。例如:在 Q β 复制酶的情形中,MDV-1RNA 是该复制酶的特异性模板 (参见 Kacian 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:3038[1972])。其它的核酸不被该扩增酶复制。类似地,在 T7RNA 聚合酶的情形中,这种扩增酶对其自身的启动子具有严格的特异性 (参见 Chamberlin 等,Nature 228:117[1970])。在 T4DNA 连接酶的情况下,该酶不会连接如下两段寡核苷酸或者多核苷酸,其中这些寡核苷酸或者多核苷酸底物与位于连接点上的模板之间存在错配 (参见 Wu and Wallace,Genomics 4:560[1989])。最后,发现 Taq 和 Pfu 聚合酶,通过其可在高温下发挥功能的能力,对由引物结合从而由其限定的序列具有高特异性;高温导致了有利于引物与靶序列杂交、而不与非靶序列杂交的热力学条件。

[0102] 如此处所用,术语“引物 (primer)”指的是寡核苷酸,该寡核苷酸无论是自然存在于经纯化的限制酶切消化物中还是合成产生,当其被放置于互补于核酸链的引物延伸产物的合成被诱导的条件下时,它可以作为合成的起始点发挥作用,(即在核苷酸和诱导剂例如 DNA 聚合酶存在下,在合适温度和 pH 下)。为了在扩增中得到最大效率,引物优选是单链的,但替代地,可以是双链的。如果是双链的,在用来制备延伸产物之前,引物首先经过处理以分开其双链。优选地,引物是寡脱氧核糖核酸。引物必须足够长,从而在诱导剂存在的条件下引发延伸产物的合成。引物的准确长度依赖于许多因素,包括温度,引物来源和方法使用。

[0103] 如此处所用,术语“探针 (probe)”,是指寡核苷酸 (即核苷酸的序列),其能够杂交到另一个感兴趣的寡核苷酸上,无论该寡核苷酸是自然存在于纯化的限制酶切消化物中,还是合成产生的、重组地或者由 PCR 扩增而产生。探针可以是单链或双链的。探针在特定基因序列的检测、鉴定和分离中是有用的。本发明中使用的任何探针将用“报告分子

(reporter molecule)”进行标记,从而使其在任何检测系统是可检测的,包括但不限于酶(如 ELISA,以及基于酶的组织化学测验)、荧光的、放射性的以及发光检测系统,这也被考虑在内。无意使本发明限于任何特定检测系统或标记物。

[0104] 如此处所用,术语“靶(target)”,当其用来指聚合酶链反应时,指的是被引物结合的核酸区域,用于聚合酶链反应。因此,“靶”被试图从其它核酸序列中被挑选出来。“区段或片段(segment)”被定义为目标序列中的核酸的区域。

[0105] 如此处所用,词语“聚合酶链反应”(polymerase chain reaction “PCR”)指的是美国专利号 4,683,195 ;4,683,202 和 4,965,188 中的方法,其在此被引入作为参考,这些参考文件包括不通过克隆或纯化用于增加基因组 DNA 的混合物中的靶序列片段的浓度的方法。扩增靶序列的过程包括:向含有期望靶序列的 DNA 混合物中引入大大过量的两种寡核苷酸引物,随后在 DNA 聚合酶存在的情况下进行精确的连续热循环过程。此两种引物与它们各自的双链靶序列的链互补。为了实现扩增,混合物被变性,并且随后引物被退火到靶分子内的其互补序列上。退火过程之后,用聚合酶延长引物,从而形成一对新的互补链。变性、引物退火和聚合酶延伸的步骤可以被重复多次(即变性、退火和延伸组成一个“循环”,这样的循环可以进行许多次)以得到高浓度的期望靶序列的扩增区段。期望靶序列的扩增区段的长度,是通过引物彼此之间的相对位置而确定的,因此,这个长度是一个可控制的参数。因为该过程的可重复性,该方法被称为“聚合酶链反应”(下文中为“PCR”)。因为靶序列期望扩增片段在混合物中变成为占优势的序列(以浓度而言),所以它们被称为“PCR 扩增的”。

[0106] 如此处所用,术语“扩增试剂(amplification reagents)”指的是除引物、核酸模板和扩增酶以外的、扩增所需的那些试剂(脱氧核糖核苷三磷酸,缓冲液,等)。一般地,扩增试剂同其它反应组分一起被放置并包含于反应容器(试管,微孔板,等)中。

[0107] 借助 PCR,用标记探针,通过几种不同的方法(例如,与标记探针的杂交;掺入生物素化引物,然后进行抗生物素-蛋白酶偶联物检测;掺入³²p 标记的脱氧核糖核苷三磷酸,例如 dCTP 或者 dATP,到扩增片段中),将基因组 DNA 中的特定靶序列的一个单一拷贝扩增到可检测的水平是可能的。除了基因组 DNA 以外,任何寡核苷酸或者聚核苷酸序列都可以用合适的引物分子的集合进行扩增。具体而言,经由 PCR 过程自身而产生的扩增区段,其本身就是后续 PCR 扩增的有效模板。

[0108] 如此处所用,术语“PCR 产物(PCRproduct)”,“PCR 片段(PCRfragment)”和“扩增产物(amplification product)”,是指:在变性、退火和延伸的 PCR 步骤的两个或多个循环结束以后,所生成的化合物的混合物。这些术语包括如下情况:其中一个或多个靶序列之一或多个片段得以扩增。

[0109] 如此处所用,术语“限制性内切酶(restriction endonucleases)”和“限制酶(restriction enzymes)”指的是细菌酶,每一个细菌酶在具体核苷酸序列(specific nucleotide sequence)之上或者其附近切割双链 DNA。

[0110] 术语“核酸分子编码(nucleic acid molecule encoding)”,“DNA 序列编码(DNA sequence encoding)”,和“DNA 编码(DNA encoding)”,指的是沿着脱氧核糖核酸链的脱氧核糖核苷酸顺序或序列。这些脱氧核糖核苷酸的顺序决定了沿多肽(蛋白质)链的氨基酸的顺序。因此 DNA 序列编码氨基酸序列。

[0111] 本发明的肽,及其药物组合物和疫苗组合物,就施与哺乳动物,特别是人,以便治疗和/或预防 HPV 感染而言,是有用的。包含如这里所描述的免疫原性有效量的一种或多种肽的疫苗,是本发明的进一步的实施方案。一旦合适的免疫原性表位被确定,它们,在此称为“疫苗”组合物,就可以以多种手段进行传递。例如,这样的疫苗组合物可以包括脂肽(lipopeptides)(如 Vitiello 等, *J Clin. Invest.*, 95:341[1995]);和 PCTUS00/P17842;被封装于聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)(“TLG”)微球体中的肽组合物(参见 Eldridge 等, *Molec. Immunol.*, 28:287-294[1991];Alonso 等, *Vaccine* 12:299-306[1994];Jonse 等, *Vaccine* 13:675-681[1995]),包含于免疫激发复合物(ISCOMS)中的肽组合物(参见 Takahashi 等, *Nature* 344:873-875[1990];Hu 等, *Clin. Exp. Immunol.*, 113:235-243[1998]),多抗原肽系统(MAPs)(参见 Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:5409-5413[1988];Tam, *J. Immunol. Meth.*, 196:17-32[1996]),病毒传送载体(Perkus 等,于 Concepts in Vaccine Development, Kaufmann(ed.), p. 379[1996];Chakrabarti 等, *Nature* 320:535[1986];Hu 等, *Nature* 320:537[1986];Kieny 等, *AIDSBio/Technol.*, 4:790[1986];Top 等, *J Infect. Dis.*, 124:148[1971];Chanda 等, *Virology*, 175:535[1990]),病毒或合成来源的微粒(如, Kofler 等, *J Immunol., Meth.*, 192:25[1996];Eldridge 等, *Sem. Hematol.*, 30:16[1993];Falo 等, *Nature Med.*, 7:649[1995]),佐剂(Warren 等, *Ann. Rev. Immunol.*, 4:369[1986];Gupta 等, *Vaccine* 11:293[1993];脂质体(liposomes)(Reddy 等, *J Immunol.*, 148:1585[1992];Rock, *Immunol. Today* 17:131[1996]);或者,裸露 DNA 和颗粒吸附 DNA(Ulmer 等, *Science* 259:1745[1993];Robinson 等, *Vaccine* 11:957[1993]);Shiver 等在 Concepts in Vaccine Development 中, Kaufmann(ed.), p. 423[1996];Cease and Berzofsky, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:923[1994];和 Eldridge 等, *Sem. Hematol.*, 30:16[1993])。毒素导向传送技术,也已知为受体介导定向,比如 Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts) 的那些技术,也可以使用。

[0112] 本发明的疫苗组合物包含核酸介导用药程式。编码本发明的一种或多种肽的 DNA 或 RNA 也可以被施与患者。举例而言,该方法在 Wolff 等, *Science* 247:1465(1990);和美国专利号 5,580,859;5,589,466;5,804,566;5,739,118;5,736,524;5,679,647;WO 98/04720 中得到描述;并且下文进行了更详细的描述。基于 DNA 的递送技术的例子包括“裸 DNA”,易化(普鲁卡因(bupivacaine),聚合物,肽介导的)递送,阳离子脂质复合体,和微粒介导的(“基因枪”)或者压力介导的递送(参见美国专利号 5,922,687)。

[0113] 用于治疗或预防的免疫接种目的,本发明的肽可由病毒或细菌载体表达。表达载体的例子包括减毒病毒宿主,例如牛痘或禽痘。例如,本途径包括使用牛痘病毒作为表达编码本发明肽的核苷酸序列的载体。在引入到急性或慢性感染的宿主或未感染宿主中后,重组牛痘病毒表达免疫原性的肽,从而引起宿主 CTL 和/或 HTL 反应。免疫接种方案中有用的牛痘载体和方法,在例如美国专利号 4,722,848 中得到描述。另外一个载体是 BCG(Bacille Calmette Guerin(卡介苗))。BCG 在 Stover 等, *Nature* 351:456-460(1991) 中得到描述。对本发明的肽的治疗施用或免疫接种有用的多种多样的其它载体,比如腺病毒载体及腺相关病毒载体,逆转录病毒载体,伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)载体,去毒炭疽毒素载体,以及类似的载体,通过这里的描述,对本领域普通技术人员来说是显而易见的。

[0114] 此外,依照本发明的疫苗可以包括本发明的肽之一或多种。因而,肽可以单独出

现在疫苗中。作为选择地,该肽也可以被单独连接于它自己的载体(carrier)上;作为选择地,该肽可以以包含相同肽的多拷贝的同聚物形式存在,或者以多种肽的杂聚物形式存在。聚合物具有这样的优点:其具有增强的免疫学反应,并且,在用多种不同的肽表位组成聚合物的情况下,其具有诱导抗体和/或CTLs的额外能力,该抗体和/或CTLs与免疫反应中作为靶的病原生物的不同抗原决定簇反应。组成成分可以是抗原上自然发生的区域或者可以如此制备,比如被重组制备或者藉由化学合成。

[0115] 可与本发明的疫苗一起被使用的载体(carrier)是为本领域所熟知的,包括:例如,甲状腺球蛋白;白蛋白,如人血清白蛋白;破伤风类毒素;聚氨酸,例如聚L-赖氨酸,聚L-谷氨酸;流感病毒,B型肝炎病毒,核心蛋白(core protein)以及类似的载体。疫苗可以包含生理耐受的(即可接受的)稀释剂,比如水或盐水,优选磷酸缓冲盐溶液。疫苗一般也可以包含佐剂。诸如不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant),磷酸铝,氢氧化铝,或者明矾,是为本领域中所熟知的物质的例子。另外,可以通过将本发明的肽与脂类,例如三棕榈酰-S-甘油半胱氨酰丝氨酰-丝氨酸(tiipalmitoyl-S-glycerylcysteinylserine (P3CSS)),进行偶联而引发CTL反应。

[0116] 经由注射,气雾剂,口服,透皮给药,透粘膜给药,胸膜的,鞘内的和其它合适的途径,免疫接种按照本发明的肽组合物之后,宿主的免疫系统通过启动CD8⁺T-细胞反应而响应疫苗。

[0117] 结果,宿主对后来的感染变得具有至少部分的免疫力;或者对发展正在发生的慢性感染具有至少部分的抵抗力;或者,在抗原是肿瘤相关时,得到至少一些治疗益处。

[0118] 在一些实施方案中,诱导T-细胞反应的组分与诱导对感兴趣的靶抗原的抗体反应的组分被结合起来。此种组合物的优选实施方案包含按照本发明的I类和II类表位。

[0119] 对药物组合物而言,本发明的免疫原性肽被给予已经感染HPV的个体。处于感染的潜伏期或者急性发作期的个体,可以通过单独使用免疫原性的肽或者在合适的情况下结合其它的治疗方法进行治疗。在治疗应用中,以这样的剂量对患者施用组合物:该剂量足以引发对病毒的有效CD8⁺T细胞反应,而且足以治愈或者至少部分抑制症状和/或并发症。足够达到这种效果的量被定义为“治疗上有效剂量(therapeutically effective dose)”。对此用途,有效量取决于许多因素,包括但不限于:肽组成,给药方式,所治疗疾病的阶段和严重程度,病人的体重和总体健康状态,治疗医生的判断,但针对重70kg的病人而言,一般首次免疫接种的范围(即用于治疗或预防给药)为约1.0ug到约50,000ug的肽,随后在数周到数月内,根据患者的反应和状态,通过测量患者血液中的特定CD8⁺T细胞活性,依照加强方案,以约1.0ug到约50,000ug的肽剂量进行加强。

[0120] 免疫剂量和随后在确定的间隔之下的加强剂量(例如从一个星期到四个星期),可能是需要的,可能需要一个延长的时间段以有效地免疫个体。在慢性感染的情形中,在至少临床症状或实验室试验表明病毒感染已经被消除或充分减少以前和此后的一段时间内,都应该持续施用。

[0121] 用于治疗处理的药物组合物意欲通过肠胃外的(parenteral),表面的(topical),口服的(oral)或局部的(local)施用。优选地,药物组合物被注射给药(例如静脉地,皮下地,皮内地,肌肉地)。因此,本发明提供可供注射施用的组合物,其包含免疫原性肽溶解于或者悬浮于可接受的载体溶液中,优选含水载体。多种含水载体可以被使用,

例如,水,缓冲水,0.9%盐水,0.3%甘氨酸,透明质酸以及类似物。这些组合物可以通过传统的、熟知的灭菌技术进行灭菌,或者可以无菌过滤。所得的水溶液可以按照其使用的状态进行包装,或者经过冻干,冻干的制品在施用前与无菌溶液相组合。组合物可以包含药理学可接受辅料,以便达到接近生理环境所需,例如 pH 调节与缓冲剂,张力调节剂,湿润剂以及类似物,比如乙酸钠,乳酸钠,氯化钠,氯化钾,氯化钙,失水山梨糖醇单月桂酸酯 (sorbitan monolaurate),油酸合三乙醇胺 (triethanolamine oleate),等。

[0122] 本发明提供用于在多种 HPV 型的序列中鉴定 HPV 表位的方法,以及肽的生产方法;当肽被引入到 HPV 序列中的时候,其可以启动 CD8⁺T 细胞反应。

[0123] 在一些实施方案中,本发明提供用于鉴定 HPV 序列中的 CD8⁺T 细胞表位和产生能够用于引发 CD8⁺T 细胞反应的肽的方法。具体而言,本发明提供适合增加 HPV 表位的免疫原性的方法和组合物,这些表位在制备 HPV 疫苗中有用途。

[0124] 在这些实施方案中,本发明提供手段,用于确定抵抗包含感兴趣蛋白质的多种表位的人 CD8⁺T 细胞反应。在另外的实施方案中,一旦用这里描述的修饰 I-MUNE[®]测定系统鉴定了显著表位,显著表位随即被改变,以产生可诱导针对该蛋白质的增强免疫反应的表位。

[0125] 因此,如上面所指出的,本发明的蛋白质表现出修饰的免疫原性反应(如抗原性和/或免疫原性),这是与由它们的前体 DNA 所编码的天然蛋白质相比而言。例如,表现出增强的免疫原性反应的 HPV(例如,变异体 HPV 表位),可以应用于治疗和预防疫苗组合物中。发明的详细描述

[0126] 本发明提供鉴定任何感兴趣蛋白质中的功能性 CD8⁺T 细胞表位的方法。本发明进一步提供多种蛋白质的 CD8⁺T 细胞表位。在一些优选的实施方案中,本发明提供人乳头瘤病毒 (human papillomavirus (HPV)) 的 CD8⁺T 细胞表位。在另外的实施方案中,本发明提供适用于预防/治疗疫苗中的表位。在特别优选的实施方案中,本发明提供适合用于预防和/或治疗疫苗中的修饰表位。

[0127] 在本发明的发展中,确定了:向试验系统中加入抗 CD40 抗体提供了可评估 CD8⁺T 细胞对多种肽的反应的方法。尽管无意使本发明受限于任何具体机理,但据信:抗 CD40 抗体的掺入在激活的 CD4⁺T 细胞上模拟了 CD40 配体。它附着到存在于 APC(如树突状细胞)表面上的 CD40 受体上,并通过增加 MHC 和 B7 表达刺激相关 CD8⁺T 细胞的激活。

[0128] 在初步实验中,用 HLA-A2 限定性肽,在 I-MUNE[®]测定系统中试验抗 -CD40 抗体。当未使用抗 -CD40 抗体时,观察不到任何反应。相反,当抗 -CD40 抗体被加入时,观察到反应显著提高。在这些早期的实验中,试验了 5 个浓度 (10ug/ml, 5ug/ml, 2ug/ml, 1ug/ml 和 0.5ug/ml) 的抗 -CD40。10ug/ml 的浓度被确定是过高的,因为它杀死了细胞。0.5ug/ml 的浓度稍微太低,尽管在细胞供体具有比通常情况更高的背景值的情形中,它的确起了作用。因此,采用 5ug/ml, 2ug/ml 和 1ug/ml 的浓度进行六个比较。使用 Stat-Ease DX6.1 软件 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN) 对结果进行统计学分析。根据这些结果,选择 1ug/ml 的浓度,因为:与背景相比,该浓度导致了最高的增殖反应。与 2.5ug/ml 和 5ug/ml 的浓度进行比较,1ug/ml 的浓度也有助于保持更低的背景,从而使被检测到的反应更多。虽然如此,但是应该理解到:在其它测定系统中,将会应用不同的抗体浓度。

[0129] 本发明进一步提供来自两株人乳头瘤病毒 (HPV) 的 E7 蛋白质中的 CD8⁺T 细胞表

位。在一些优选的实施方案中,本发明提供用于开发 HPV 疫苗的手段,具体为用于预防高危 HPV 病毒株感染的多价疫苗。在另外的实施方案中,本发明提供方法,用于开发适合用于阻止受感染个体的良性和 / 或恶性肿瘤发展的、抗高危 HPV 型的治疗疫苗。本发明进一步提供了适合用于预防和 / 或治疗疫苗中的表位。在特别优选的实施方案中,本发明提供了适合用于预防和 / 或治疗疫苗中的修饰表位。

[0130] 因为其在宫颈癌病例中的普遍表达,来自 HPV 的 E7 癌蛋白是 DNA 疫苗的特别有吸引力的靶。E7 蛋白质和 E6 蛋白质是 HPV 具有致癌特征的原因 (Finzer 等, *Cancer Lett.*, 188 :15-24[2002])。宫颈癌细胞的连续增殖和存活需要这两种蛋白质的连续表达 (vonKnebel-Doeberitz 等, *Cancer Res.*, 48 :3780-6[1988])。E6 和 E7 负责宫颈病变的转化和抑制细胞凋亡。几个研究表明:对抗这些蛋白质的免疫学反应,就对抗宫颈癌而言,是保护性的。相对于有鳞状上皮内瘤形成 (SIL) 的 HPV16 阳性妇女,没有鳞状上皮内瘤形成 (squamousintraepithelial neoplasia (SIL)) 的 HPV16 阳性妇女显示了更普遍的针对 E6 和 E7 的自然 CTL 反应。(Nakagawa 等, *J. Infect. Dis.*, 175 :927-931[1997])。另外,针对 E6 和 E7 的特定保护性肽的细胞介导的免疫反应,也与疾病消退和病毒感染的解决有关系。(Kadish 等, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 11 :483-488[2002])。此外,已经证明:用 E7DNA 进行疫苗接种,在激发细胞毒性 T 细胞反应上,是高度有效的 (Osen 等, *Vaccine* 19 :4276-4286[2001])。

[0131] 在本发明中使用了表位疫苗而不是全长疫苗,这使得本发明很有吸引力,因为它避免了施用致癌产品的问题。并且,由于 DNA 疫苗的大小限制,仅仅包含 E7 的免疫原性区域使得覆盖更多高危险性病毒株成为可能。具有 HPV 感染的病人经常携带不止一种的 HPV 病毒株,而且清除了一株的 HPV 感染的个体可以被另一株再感染。尽管 CTL 表位一般与抗病毒疫苗联用,在本发明的一些优选的实施方案中,有几个理由包含结合 CD8⁺ 表位的 CD4⁺T 细胞表位。例如,抗原特异性 CD4⁺ 辅助细胞,一般而言,对通过抗原呈递细胞的交互引发 (cross-priming) 而激活 CD8⁺ 溶细胞活性是必需的 (参见 Bennett 等, *Nature* 393 :478-480[1998]; Schoenberger 等, *Nature* 393 :480-483[1998]; 和 Ridge 等, *Nature* 393 :474-478[1998])。此外,在动物模型上的研究 证明:包含源自同种抗体的 CD4 和 CD8 表位的疫苗,诱导了强烈的保护性反应 (参见 Ossendrop 等, *J. Exp. Med.*, 187 :693-702[1998]; DeVeermann 等, *J. Immunol.*, 162 :144-151[1999]; 和 Zwaveling 等, *J. Immunol.*, 169 :350-8[2002])。

[0132] 在一些优选的实施方案中,本发明提供组合物和方法,用于开发对抗 HPV 病毒株的疫苗组合物,特别是与较高危险的恶性肿瘤相关的那些病毒株的疫苗组合物。因此,在一些特别优选的实施方案中,本发明提供用于开发直接对抗两种高危 HPV 病毒株 (即 16 号和 18 号病毒株) 的 E7 蛋白质的疫苗组合物和方法。重要的是,来自这些 HPV 病毒株的 DNA 的出现与宫颈病变和宫颈癌相关。(Lorincz 等, *ObstetGynecol.*, 79 :328-337. [1992])。如于 2003 年 4 月 28 提出的正在共同审理中的美国专利序列号 60/466, 235 中描述,多种高危险和中等危险的 HPV 病毒株的 E6 和 E7 蛋白质中的 II 类 MHC 辅助表位被鉴定。因而,除了前面描述的辅助表位以外,涉及本发明的 CD8⁺ 表位的组合物和方法会在治疗 and / 或预防疫苗组合物中得到应用,这也被考虑在内。

[0133] 实验

[0134] 提供下面的实施例,用来证明和进一步阐述本发明的某些优选实施方案和方面,不应该理解为限制其范围。

[0135] 在下面的实验公开中,应用下面的缩写:M(摩尔/升);mM(毫摩尔/升); μ M(微摩尔/升);nM(纳摩尔/升);mol(摩尔);mmol(毫摩尔); μ mol(微摩尔);nmol(纳摩尔);gm(克);mg(毫克); μ g(微克);pg(皮克);L(升);ml(毫升); μ l(微升);cm(厘米);mm(毫米); μ m(微米);nm(纳米); $^{\circ}$ C(摄氏度);cDNA(拷贝或互补DNA);DNA(脱氧核糖核酸);ssDNA(单链DNA);dsDNA(双链DNA);dNTP(脱氧核糖核酸三磷酸);RNA(核糖核酸);HRP(辣根过氧化物酶);AEC底物(乙酸钠、二甲基亚砷、甲醇和过氧化脲的溶液);AEC色原(3-氨基-9-乙基咪唑(2% w/v)和N,N-二甲基甲酰胺的溶液);PBS(磷酸缓冲盐溶液);g(重力);DC(树突状细胞);PHA(植物凝集素);OD(光密度);Dulbecco氏磷酸缓冲液(DPBS);HEPES(N-[2-羟乙基]哌嗪-N-[2-乙磺酸]);HBS(HEPES缓冲盐水);SDS(十二烷基硫酸钠);Tris-HCL(三[羟甲基]氨基甲烷-盐酸);DMSO(二甲基亚砷);EGTA(乙二醇-双(β -氨基乙醚)N,N,N',N'-四乙酸);EDTA(乙二胺四乙酸);DPBS(Dulbecco氏磷酸缓冲液);bla(β -内酰胺酶或氨苄青霉素抗性基因);Endogen(Endogen, Woburn, MA);CytoVax(加拿大Edmonton的CytoVax);Wyeth-Ayerst(Wyeth-Ayerst, Philadelphia, PA);NEN(NEN Life Science Products, Boston, MA);Wallace Oy(芬兰Turku的Wallace Oy);Pharma AS(挪威Oslo的PharmaAS);Dynal(挪威Oslo的Dynal);Bio-Synthesis(Bio-Synthesis, Lewisville, TX);Mimotopes(Mimotopes Inc., San Diego, CA);ATCC(American Type Culture, Rockville, MD);Gibco/BRL(Gibco/BRL, Grand Island, NY);Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);Pharmacia(Pharmacia Biotech, Pisacataway, NJ);Invitrogen(Invitrogen, Inc., Grand Island, NY);Abbott(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL);List(List Biological Laboratories, Campbell, CA);Perkin Elmer(PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA);eBioscience(eBioscience, San Diego, CA);BD Bioscience(BD Bioscience);Cellular Technology(Cellular Technology, Cleveland, OH);和Stratagene(Stratagene, La Jolla, CA)。

[0136] 实施例 1

[0137] E7 表位的制备

[0138] 使用来自 HPV 16 和 18 的 E7 蛋白质的全长氨基酸序列,产生 9-聚体(9-mer)的肽集。SwissProt. P03129 对应于 HPV16E7, SwissProt. P06788 对应于 HPV18E7。这些变异体肽由模拟表位(Mimotopes)合成,使用在本领域已知的多针合成技术进行(例如,参见 Maeji 等, J. Immunol. Meth., 134:23-33[1990])。9-聚体肽是如此产生的,使得序列与邻接肽共享 8 个氨基酸(即每个肽偏移一个氨基酸)。用 DMSO 稀释肽,以提供大约是 2mg/ml 的储液浓度。使用于每个试验中的肽终浓度是 5 μ g/ml。

[0139] 实施例 2

[0140] 使用人 T 细胞制备在鉴定 HPV 的肽 T 细胞表位的测试系统中予以应用的细胞

[0141] 从未知的暴露于 HPV 状态的人,收集新鲜的人外周血细胞。这些细胞被试验,以确定在 HPV16 和 HPV18 中的抗原性的表位,如在实施例 3 中所述的。

[0142] 外周单核血细胞(peripheral mononuclear blood cells)(储藏于室温,不高于二十四小时),以下面的方法制备。通过在 Lymphoprep 衬垫物之上、在 1000 \times g 下、离心 30

分钟,将 PBMC 从淡黄色表层物质 (buffy coat material) 中分离出来。收集界面层并洗涤,用 Cell-Dyn 3700 System (Abbott) 计数。然后,制备含有 10^8 的 PBMC 的悬液,是重悬于 30ml 的 AIM-5 (Invitrogen) 中,随后使其黏附到塑料质的 T-75 培养瓶上,时间两个小时。剩余的细胞被冷冻,是在 45% FCS (Gibco/BRL), 45% PBS w/o Ca&Mg (Mediatech) 和 10% DMSO (Sigma) 中,以 5×10^7 个细胞/ml 进行冷冻。在两小时的 PBMC 培养之后,未黏附的细胞被从培养瓶中移出。黏附的细胞在培养瓶中培养,是用 800 单位/ml 的重组人 GM-CSF (R&D System) 和 100 单位/ml 的重组人 IL-4 (Endogen) 进行,在 37°C , 5% CO_2 下进行。在培养的第 5 天,向培养物中,加入 50 单位/ml 的重组人 IL-1 α (Endogen) 和 0.2 单位/ml 的重组人 TNF- α 。在第七天,在用 30mg/ml 的丝裂霉素 C (Sigma) 和 10mM EDTA 经过一个小时处理之后,收获黏附的和未黏附的树突状细胞,清洗并计数。

[0143] 从 PBMCs 的冷冻等份中制备自体 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞。在 DPBS 中解冻和洗涤之后,用商业可得的 CD8 负选择试剂盒 (Dyna1), 根据制造商的说明书,分离 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞。用 Abbott Cell-Dyn 3700 System 计数细胞。使用这些方法得到的纯度一般被发现大于 90%。

[0144] 实施例 3

[0145] T 细胞增殖测定

[0146] 本实施例描述了在本发明使用的测定系统。基本的试验系统也叫做“ $\text{I-MUNE}^{\text{®}}$ ”测定系统。基本 $\text{I-MUNE}^{\text{®}}$ 测定系统如此处所述被修饰,以便对 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞反应的分析更方便。如下文更加详细地描述,用于本发明的开发中的修饰涉及:在 PBMC 上,使用 CD8 负选择珠 (CD8 negative selection beads) (即代替 CD4)。另外,当 CD8 细胞被重悬浮时,在将 DCs (树突状细胞) 和肽铺板于培养板中之前,加入在 1.5×10^5 ml 到 2.5×10^5 ml 之间的 $2 \mu\text{g/ml}$ 的抗 CD40 溶液 (抗 CD40 的终浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$); 并且用 $1 \mu\text{l}$ 的 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 PHA 代替破伤风类毒素,用作阳性对照。

[0147] 在 96-孔的圆底平板中,将自体树突状细胞和 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞与试验肽混合起来。更具体而言,在 $100 \mu\text{l}$ /孔的体积中,将在 AIM V 中的 2×10^4 个树突状细胞与个体肽组合起来 (肽终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$, DMSO 终浓度为 0.25%)。在 37°C 、5% CO_2 下,经一个小时培养之后,将 2×10^5 个 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞与 $2 \mu\text{g/ml}$ 的抗 CD40 (eBioscience; Clone 5C3 mouse IgG1, kappa (克隆 5C3 鼠 IgG1, κ)) 被加入到该培养物中,总体积为 $200 \mu\text{l}$, 抗 CD40 终浓度为每孔 $1 \mu\text{g/ml}$ 。阴性对照孔含有树突状细胞, $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞和 0.25% 的 DMSO。阳性对照孔含有树突状细胞, $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞 (在与试验孔相同的浓度下) 和 0.25% 的 DMSO, 带有 $5 \mu\text{g/ml}$ PHA (Sigma) (List)。在一些实验中, $1 \mu\text{g/ml}$ 的抗-IgG1 (eBioscience; Clone P3 mouse IgG1, kappa) 被作为同种型对照使用,用于比较的目的。对于每个供体,个体肽被重复试验两次或三次。

[0148] 在 37°C 、5% CO_2 下培养 5 天之后,培养物用 $0.25 \mu\text{Ci}$ /孔的氚化胸苷 (Perkin Elmer) 脉冲处理。在随后的 24 小时培养过后,收获培养板,并且用 Wallac Microbeta TriLux 液体闪烁计数器 (Perkin Elmer) 评价氚化胸苷的掺入。通过对每个样品进行重复试验,对反应取平均值。阳性反应被定义为具有的反应至少为背景的 2.95 倍。根据用抗-CD40 抗体和抗-IgG1 同种型抗体得到的结果,发现抗-CD40 的效果是特异的 (见图 3)。

[0149] 以至少 45 个供体试验,针对两种蛋白质,积累一组数据。对供体的整个群体,确定每个肽的反应率百分比。在这个测定系统中,“供体群体的平均背景反应率 (mean

background response rate for apopulation of donors)”,被定义为针对一个集合中的所有肽的平均反应百分比。在这个测定系统中,“主要表位 (major epitope)”被定义为具有高于平均背景反应率至少三个标准差的反应率。“中等表位 (moderate epitopes)”是那些产生高于平均背景至少两个标准差或三倍于背景的结果的表位。“次要表位 (minor epitopes)”是那些具有的反应率是至少两倍于背景值的表位。如这里所述,该测定,在被试验的两株 HPV 病毒株中,鉴定出数个表位。

[0150] A. HPV E7.16

[0151] 对于该抗原,在 I-MUNE[®]测定中,测验了 45 个供体,以确定针对 HPV E7.16 的表位。图 1 提供了显示针对每个表位的反应的图解。同样如在表 1 中所表明的,在这个抗原上鉴定了 19 个有价值的表位。

[0152]

肽编号	表位分类	表位序列	SEQ IDNO:
1	次要表位	MHGDTPTLH	SEQ ID NO: 1
4	中等表位	DTPTLHEYM	SEQ ID NO: 2
5	次要表位	TPTLHEYML	SEQ ID NO: 3
7	次要表位	TLHEYMLDL	SEQ ID NO: 4
8	次要表位	LHEYMLDLQ	SEQ ID NO: 5
9	次要表位	HEYMLDLQP	SEQ ID NO: 6
12	次要表位	MLDLQPETT	SEQ ID NO: 7
21	主要表位	DLYCYEQLN	SEQ ID NO: 8
36	中等表位	DEIDGPAGO	SEQ ID NO: 9
43	次要表位	GQAEPDRAH	SEQ ID NO: 10
54	次要表位	IVTFCCKCD	SEQ ID NO: 11
76	次要表位	IRTLEDLLM	SEQ ID NO: 12
79	次要表位	LEDLLMGTL	SEQ ID NO: 13
80	次要表位	EDLLMGTLG	SEQ ID NO: 14
81	次要表位	DLLMGTLGI	SEQ ID NO: 15
82	次要表位	LLMGTLGIV	SEQ ID NO: 16
83	次要表位	LMGTLGIVC	SEQ ID NO: 17
84	次要表位	MGTLGIVCP	SEQ ID NO: 18
89	次要表位	IVCPICSQK	SEQ ID NO: 19

[0153] B. HPV E7. 18

[0154] 对于该抗原, 58 个供体在 I-MUNE[®]测定中被测验, 以确定针对 HPV E7. 18 的有价值表位。图 2 提供了一个图表, 显示了针对每个表位的反应。同样, 如在表 2 中所明示, 在这个抗原中鉴定了 6 个有价值的表位。

[0155]

表 2 有价值的 HPV E7.18 表位			
肽编号	表位分类	表位序列	SEQ ID NO
12	主要表位	VLHLEPQNE	SEQ ID NO: 20
17	次要表位	PQNEIPVDL	SEQ ID NO: 21
51	次要表位	ARRAEPQRH	SEQ ID NO: 22
66	次要表位	CKCEARIKL	SEQ ID NO: 23
71	次要表位	RIKLVVSS	SEQ ID NO: 24
95	次要表位	SFVCPWCAS	SEQ ID NO: 25

[0156] 上面所示结果提供了 HPV16 和 HPV18 E7 蛋白质中有价值的表位。因此, 本发明不仅提供手段, 来评价针对感兴趣蛋白质表位的 CD8⁺T 细胞反应, 而且提供了适合修饰并且用于这样的组合物中作为疫苗的表位。

[0157] 实施例 4

[0158] INF- γ 酶联免疫斑点分析 (ELISPOT) 测定

[0159] 在这个实施例中, 使用酶联免疫斑点分析 (ELISPOT) (BDBiosciences) 测定, 以便确定在前面的实施例中所鉴定的表位是否是效应子表位 (effector epitopes)。在这些实验中, 用如上所述鉴定出的表位, 连同来自 HPV E7 肽集 (HPV18 E7 pepset) 的低反应肽和无反应肽, 进行 INF- γ ELISPOT (INF- γ 酶联免疫斑点分析) 测定。这些测定与 CD8⁺I-MUNE[®]表位作图测定 (CD8⁺I-MUNE[®] epitope mapping assay) 平行进行试验, 以 20 个供体进行试验。

[0160] 在这些实验中, CD8⁺T 细胞和树突状细胞被铺板在圆底的 96 孔格式的板中, 每孔中每种细胞混合液为 100 μ L。将 0.25% DMSO 中的每种感兴趣肽都以 5 μ g/ml 的终浓度加到孔中。对照孔中含有 DMSO, 但不含有肽。在每个孔中, 加入 1 μ g/ml 的抗-人 CD40Ab (eBioscience)。每个肽被试验两次。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下, 培养培养物 5 天。

[0161] 在培养过程中的第五天, 通过移液管的移取, 使细胞重悬, 然后将细胞悬浮液转移到 ELISPOT (BD Biosciences) 平板上, 其已经用纯化的 α -人 IFN- γ 抗体进行预包被。培养板在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下被培养 24 小时。洗涤培养板, 然后用生物素化的 α -人 IFN- γ 检测抗体温育两个小时。使用抗生物素蛋白-HRP (Avidin-HRP) 和 AEC 底物和色原, 进行斑点显色 (spot development)。用 ImmunoSpot[®] 分析仪 (细胞技术公司 (Cellular Technology)), 按照制造商的指示, 量化斑点。阳性反应被定义为高于背景水平至少三倍的反应。

[0162] 在图 4 中, 提供了汇编结果。如这个图中显示, 在 INF- γ 产生和表位增殖之间具有强相关性 ($r = 0.67$; $p = 0.0019$)。在 INF- γ 分泌和 CD8⁺T 细胞增殖之间的这种相关性,

充分显示了增殖中的 CD8⁺T 细胞的确是效应细胞。CD8⁺ 增殖与 INF- γ 产生的比较显示,所发现的表位是效应表位。因此, I-MUNE[®]测定中的 CD8⁺ 增殖属于效应细胞,而不是无反应性的细胞 (anergic cell)。

[0163] 如上文指出,存在一些肽,相对增殖而言,其对 INF- γ 更有效。不增殖而产生细胞因子并不是一种非普通的现象,特别是作为记忆细胞反应。在没有 INF- γ 生产而观察到增殖的情况下,检测到 INF- γ 在背景水平的二倍处,但是这并没有满足在本发明的开发中已建立的“阳性的”标准。然而,这可以被许多其它研究者认为是阳性的。总之,这里提供的结果证明:用 I-MUNE[®]测定所鉴定的表位,可以通过诸如 INF- γ ELISPOT 测定的商业可得的测定系统,证实 CTL 活性。

图 1

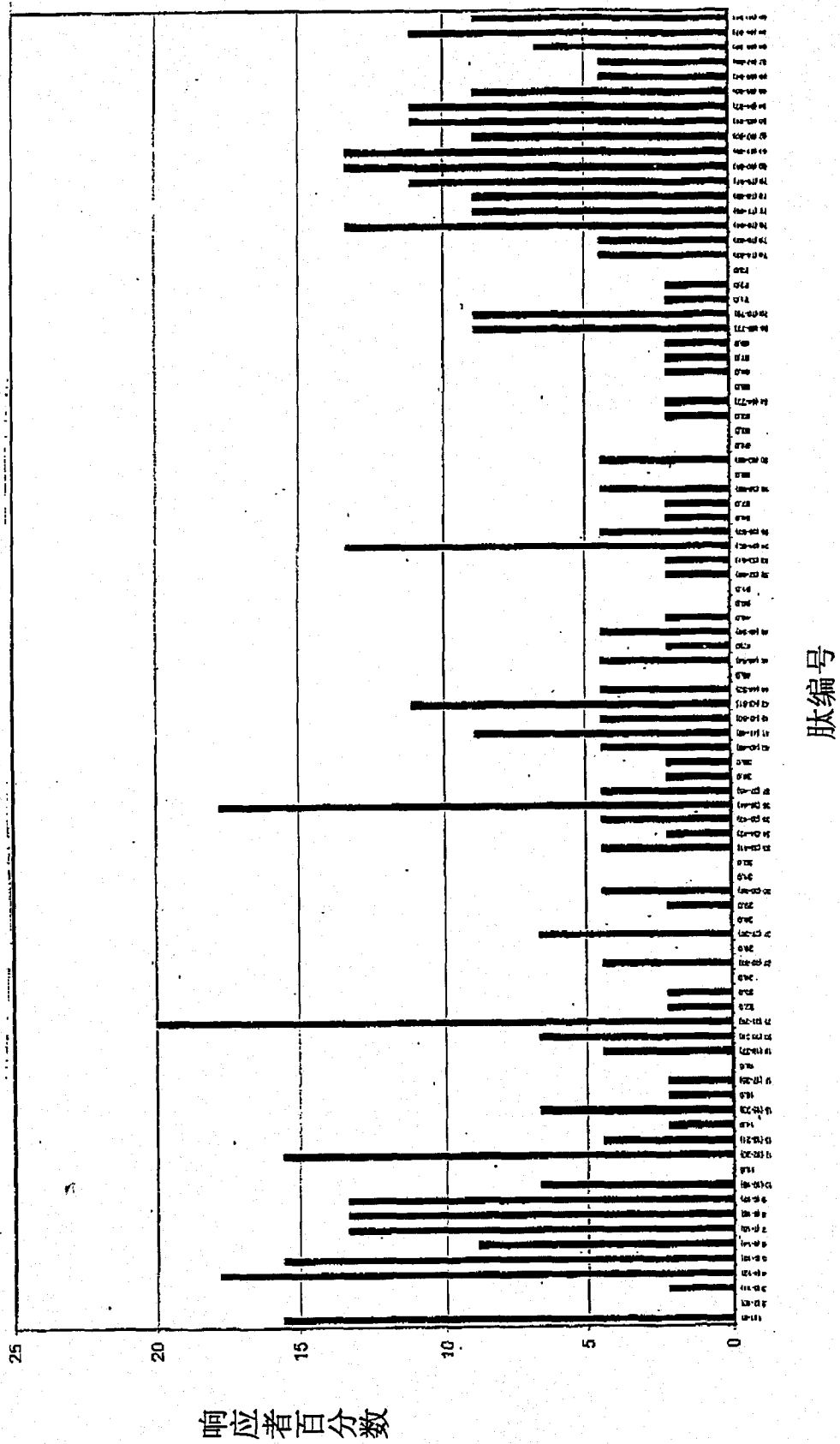


图 2

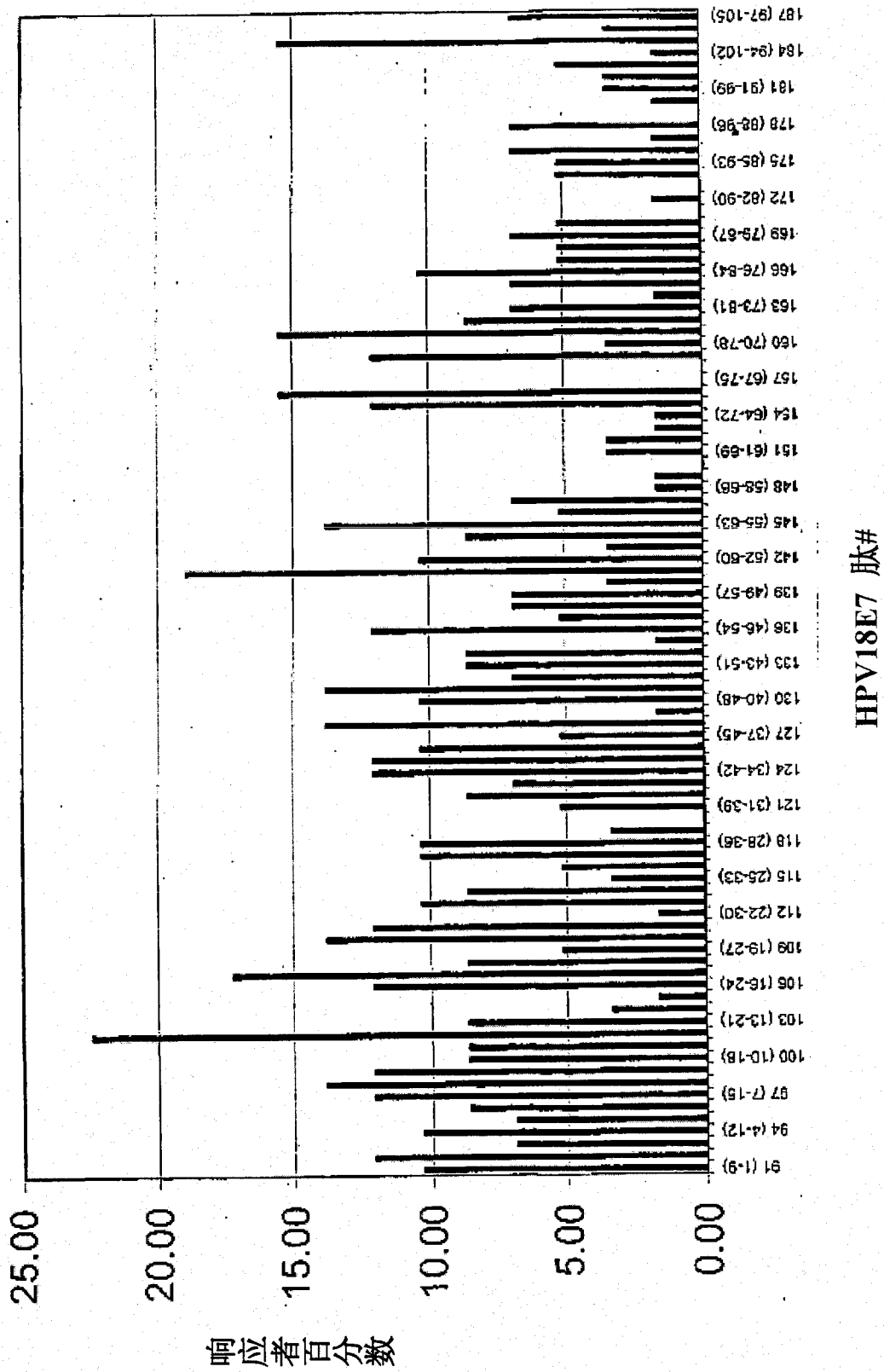
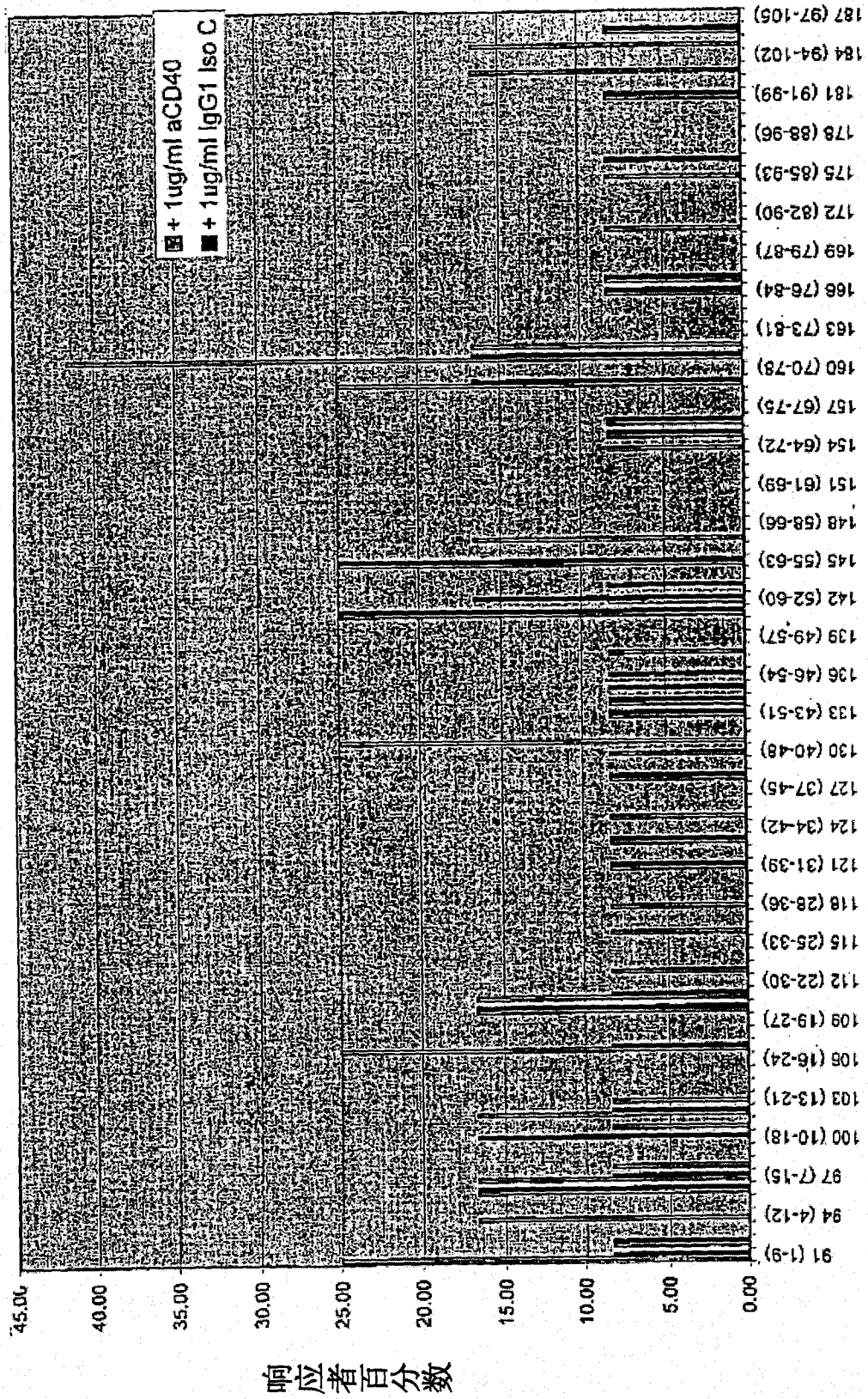


图 3



HPV18E7 肽

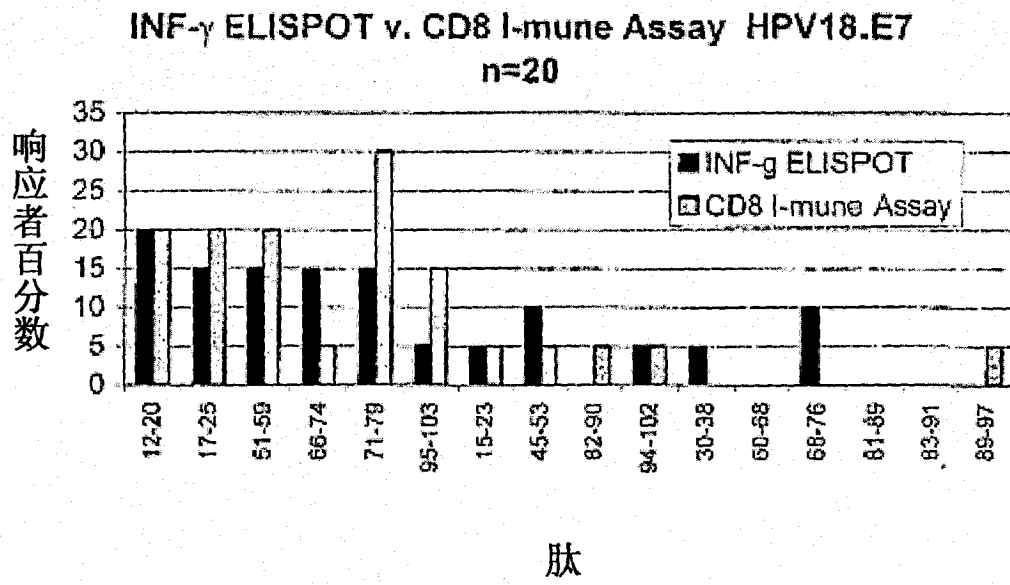


图 4

专利名称(译)	HPV CD8+T细胞表位		
公开(公告)号	CN1846000B	公开(公告)日	2012-10-03
申请号	CN200480025351.2	申请日	2004-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
[标]发明人	FA哈丁 JM穆乔		
发明人	F· A· 哈丁 J· M· 穆乔		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K A61K38/00 C07H21/04 C07K C07K14/01 C07K14/74 C12N7/00 C12P21/04 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/567 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2333/70578 A61K2039/525 G01N2333/70517 C12N2710/20022 G01N33/6878 C07K14/005 C12N7/00 G01N33/505		
代理人(译)	刘金辉		
优先权	60/500452 2003-09-05 US		
其他公开文献	CN1846000A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了鉴定任何感兴趣蛋白质中的功能性CD8+T细胞表位的方法。本发明还进一步提供了多种多样蛋白质的CD8+T细胞表位。在另外的实施方案中，本发明提供适合在预防和/或治疗疫苗中使用的表位。在特别优选的实施方案中，本发明提供适合用于预防和/或治疗疫苗中的修饰表位。在一些优选的实施方案中，本发明提供了用于开发HPV疫苗的方法，特别是用于预防由高危HPV病毒株发生感染的多价疫苗。具体而言，本发明提供了在诸如HPV16和HPV18的HPV病毒株中鉴定CD8+T细胞表位的方法。在另外的实施方案中，本发明提供用于开发抗高危HPV型的治疗疫苗的方法，该疫苗防止良性和/或恶性肿瘤在被感染个体内的发展。本发明还进一步提供了适合在预防和/或治疗疫苗中应用的表位。

肽编号	表位分类	表位序列	SEQ ID NO:
1	次要表位	MHGDTPTLH	SEQ ID NO: 1
4	中等表位	DTPTLHEYM	SEQ ID NO: 2
5	次要表位	TPTLHEYML	SEQ ID NO: 3
7	次要表位	TLHEYMLDL	SEQ ID NO: 4
8	次要表位	LHEYMLDLQ	SEQ ID NO: 5
9	次要表位	HEYMLDLQP	SEQ ID NO: 6
12	次要表位	MLDLQPETF	SEQ ID NO: 7
21	主要表位	DLYCYEQLN	SEQ ID NO: 8
36	中等表位	DEIDGPAGO	SEQ ID NO: 9
43	次要表位	GQAEPDRAH	SEQ ID NO: 10
54	次要表位	IVTFCKCD	SEQ ID NO: 11
76	次要表位	IRTLEDLLM	SEQ ID NO: 12
79	次要表位	LEDLLMGTL	SEQ ID NO: 13
80	次要表位	EDLLMGTLG	SEQ ID NO: 14
81	次要表位	DLLMGTLGI	SEQ ID NO: 15
82	次要表位	LLMGTLGIV	SEQ ID NO: 16
83	次要表位	LMGTGIVC	SEQ ID NO: 17
84	次要表位	MGTGIVCP	SEQ ID NO: 18
89	次要表位	IVCPICSQK	SEQ ID NO: 19