

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00812837.5

[51] Int. Cl.
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100558395C

[22] 申请日 2000.8.25 [21] 申请号 00812837.5
[30] 优先权
[32] 1999.9.14 [33] US [31] 09/396,813
[86] 国际申请 PCT/US2000/040755 2000.8.25
[87] 国际公布 WO2001/021193 英 2001.3.29
[85] 进入国家阶段日期 2002.3.13
[73] 专利权人 抗原表达公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 罗伯特·E·汉弗莱斯
莎莉伊·亚当斯 徐民楨
[56] 参考文献
WO9837178A 1998.8.27
US5919639A 1999.7.6
审查员 吴永庆

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 过晓东

权利要求书 6 页 说明书 39 页

[54] 发明名称

杂交肽调制免疫反应

[57] 摘要

本发明提供了 MHC II 类抗原呈递增强杂交体多肽。杂交体具有 N - 末端, 包括哺乳动物 Ii - Key 肽 LRMKLPKPPKPVSKMR (SEQ ID NO: 1) 及其保持抗原呈递增强活性的修饰; C - 末端, 包括结合在 MHC II 类分子的抗原肽结合位点中的多肽或类肽形式的抗原表位; 以及间插化学结构, 共价结合杂交体的 N - 末端和 C - 末端。本文也描述了鉴别在 MHC II 类抗原呈递增强杂交体中以与 Ii Key 肽等同的方式起作用的分子的方法。本发明还提供了一种增强 MHC II 类限制性抗原表位向 T 细胞呈递的方法。本发明还提供了体内和体外方法。本发明还提供了鉴别一种 MHC II 类抗原呈递作用的化合物的方法。

1. 一种 MHC II 类抗原呈递增强杂交体多肽，包括：
 - (a) N-末端，由哺乳动物 Ii-Key 肽 LRMK 所组成；
 - (b) C-末端，包括结合 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的多肽的抗原表位；以及
 - (c) 共价结合杂交体 N-末端和 C-末端的间插化学结构，所述化学结构是原子的共价结合基团，该基团选自： ϵ -氨基-戊酸、 ϵ -氨基-戊酸- ϵ -氨基-戊酸-、LPKS-、LPKSAKP-、LPKSAKPVSK-。
2. 根据权利要求 1 所述的 MHC II 类抗原呈递增强杂交体多肽，其中间插化学结构不能以任何空间不同的方式氢键结合 MHC II 类分子。
3. 根据权利要求 1 所述的 MHC II 类抗原呈递增强杂交体多肽，其中间插化学结构是同样以线性方式排列的长度为 4 到 6 个氨基酸。
4. 根据权利要求 1 所述的 MHC II 类抗原呈递增强杂交体多肽，其中 Ii Key 肽通过 C-末端截短到 LRMK 来修饰。
5. 根据权利要求 1 所述的 MHC II 类抗原呈递增强杂交体多肽，其中多肽选自由下列成员构成的组：Ac-LRMK-5-氨基戊酸-IAYLKQATAK-NH₂，Ac-LRMK-5-氨基戊酸-5-氨基戊酸-IAYLKQATAK-NH₂，Ac-LRMKLPKSIAYLKQATAK-NH₂，Ac-

LRMKLPKSAKPIAYLKQATAK - NH₂ , 和 Ac - LRMKLPKSAKPVSKIAYLKQATAK - NH₂。

6. 下述物质在制备用于增强 MHC II 类限制性抗原表位向 T 细胞呈递的药物中的应用, 所述物质为: MHC II 类限制性抗原表位掺入到 MHC II 类抗原呈递增强杂交体多肽中所形成的物质, 杂交体多肽包括:

(i) N-末端, 由哺乳动物 Ii-Key 肽 LRMK 所组成;

(ii) C-末端, 包括结合 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的多肽的抗原表位; 以及

(iii) 共价结合杂交体 N-末端和 C-末端的间插化学结构, 所述化学结构是原子的共价结合基团, 该基团选自: ϵ -氨基-戊酸-、 ϵ -氨基-戊酸- ϵ -氨基-戊酸-、LPKS-、LPKSAKP-、LPKSAKPVSK-;

所述物质用于在生理学条件下接触:

(i) MHC II 类表达抗原呈递细胞; 以及

(ii) 对抗原呈递细胞的 MHC II 类分子呈递的抗原表位应答的 T 细胞。

7. 根据权利要求 6 的应用, 其中对抗原表位的 MHC II 类等位基因应答是增加的。

8. 下述物质在制备用于增强等位基因限制性抗原表位的 MHC II 类等位基因呈递范围的药物中的应用, 所述物质为: 将抗原表位掺入到抗原呈递增强杂交体多肽中所形成的物质, 杂交体多肽包括:

(i) N-末端, 由哺乳动物 Ii-Key 肽 LRMK 所组成;

(ii) C-末端, 包括结合 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的多肽的抗原表位; 以及

(iii) 共价结合杂交体 N-末端和 C-末端的间插化学结构, 所述化学结构是原子的共价结合基团, 该基团选自: ϵ -氨基-戊酸-、 ϵ -氨基-戊酸- ϵ -氨基-戊酸-、LPKS-、LPKSAKP-、LPKSAKPVSK-;

所述物质用于在生理学条件下与抗原呈递细胞和对抗原呈递细胞的 MHC II 类分子呈递的抗原表位应答的 T 淋巴细胞接触。

9. 下述物质在制备用于鉴别表现预定模式的 MHC II 类限制性 Th1 和 Th2 刺激作用的抗原表位的制剂中的应用, 所述物质为: 将候选抗原表位掺入到抗原呈递增强杂交体多肽中所形成的物质, 杂交体多肽包括:

(i) N-末端, 由哺乳动物 Ii-Key 肽 LRMK 所组成;

(ii) C-末端, 包括结合 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的多肽的抗原表位; 以及

(iii) 共价结合杂交体 N-末端和 C-末端的间插化学结构, 所述化学结构是原子的共价结合基团, 该基团选自: ϵ -氨基-戊酸-、 ϵ -氨基-戊酸- ϵ -氨基-戊酸-、LPKS-、LPKSAKP-、LPKSAKPVSK-;

所述物质用于在生理学条件下通过将杂交体多肽与下列物质接触, 筛查表现具有预定模式的 MHC II 类限制性 Th1 和 Th2 刺激作用的呈递活性的杂交体分子:

(i) MHC II 类表达抗原呈递细胞; 以及

(ii) 对抗原呈递细胞的 MHC II 类分子呈递抗原表位应答的 Th1 细胞或 Th2 细胞; 以及

(iii)通过MHC II类呈递鉴别刺激预定模式的Th1 和Th2细胞的杂交体多肽。

10. MHC II类抗原呈递增强杂交体多肽在制备药物中的应用，所述药物用于通过增强分子的抗原表位向个体的T淋巴细胞的MHC II类呈递作用，来调节个体对特异分子的免疫应答，所述MHC II类抗原呈递增强杂交体多肽包括：

(i) N-末端，由哺乳动物Ii-Key肽LRMK所组成；

(ii) C-末端，包括结合MHC II类分子的抗原肽结合位点的多肽的抗原表位；以及

(iii)共价结合杂交体N-末端和C-末端的间插化学结构，所述化学结构是原子的共价结合基团，该基团选自： ϵ -氨基-戊酸-、 ϵ -氨基-戊酸- ϵ -氨基-戊酸-、LPKS-、LPKSAKP-、LPKSAKPVSK-。

11. 通过下述方法获得的细胞在制备药物中的应用，所述药物用于通过增强分子的抗原表位向个体的T淋巴细胞的MHC II类呈递作用，来增强个体对特异分子的免疫应答，所述方法包括：

(a) 从个体获得抗原呈递细胞群；

(b) 在适于杂交体与抗原呈递细胞的MHC II类分子结合的条件下，用MHC II类抗原呈递增强杂交体体外治疗这些细胞；MHC II类抗原呈递增强杂交体包括：

(i) N-末端，由哺乳动物Ii-Key肽LRMK所组成；

(ii) C-末端，包括结合MHC II类分子的抗原肽结合位点的多肽的抗原表位；以及

(iii)共价结合杂交体 N-末端和 C-末端的间插化学结构,所述化学结构是原子的共价结合基团,该基团选自: ϵ -氨基-戊酸-、 ϵ -氨基-戊酸- ϵ -氨基-戊酸-、LPKS-、LPKSAKP-、LPKSAKPVSK-。

12. 下述物质在制造药物中的应用,所述药物用于抑制 MHC II 类限制性抗原表位向 T 淋巴细胞呈递:

(a) MHC II 类表达抗原呈递细胞,在其表面上展示 T 淋巴细胞呈递的抗原表位; 以及

(b) 抗原呈递抑制杂交体多肽, 包括:

(i) N-末端, 由哺乳动物 Ii-Key 肽 LRMK 所组成;

(ii) C-末端, 包括结合 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的多肽的抗原表位; 以及

(iii)共价结合杂交体 N-末端和 C-末端的间插化学结构,所述化学结构是原子的共价结合基团,该基团选自: ϵ -氨基-戊酸-、 ϵ -氨基-戊酸- ϵ -氨基-戊酸-、LPKS-、LPKSAKP-、LPKSAKPVSK-; 以及

(c) 淋巴细胞,其对抗原呈递细胞的 MHC II 类分子呈递 a)部分抗原表位应答。

13. MHC II 类抗原呈递抑制杂交体多肽在制造药物中的应用,所述药物用于通过抑制个体抗原呈递细胞的 MHC II 类抗原呈递来治疗个体的与产生不利免疫应答有关的疾病,所述 MHC II 类抗原呈递抑制杂交体多肽包括:

(i) N-末端, 由哺乳动物 Ii-Key 肽 LRMK 所组成;

(ii) C-末端, 包括结合 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的多肽的抗原表位; 以及

(iii)共价结合杂交体 N-末端和 C-末端的间插化学结构, 所述化学结构是原子的共价结合基团, 该基团选自: ϵ -氨基-戊酸-、 ϵ -氨基-戊酸- ϵ -氨基-戊酸-、LPKS-、LPKSAKP-、LPKSAKPVSK-。

杂交肽调制免疫反应

本发明的背景

免疫系统通过识别“外源”或“异常”结构作为抗原对外源病原体，肿瘤细胞，自身免疫性疾病诱导的过程，变应原，及移植体应答。这些抗原大部分是蛋白质，其可通过宿主细胞合成，或通过病原体合成。这种抗原可加工成（蛋白酶解）肽片段，其可在抗原呈递细胞表面上的肽呈递结构中应答免疫系统的淋巴细胞呈递。这些肽呈递结构称为主要组织相容性复合体（MHC）分子。它们有这样的名称是由于它们首先被识别为在MHC基因座中的多态等位基因的产物，这些基因控制着鼠同系繁殖菌株中的移植体排斥。

为了区别从“非自身”分子衍生的肽及从“非自身”分子的衍生肽衍生的肽，动物已经发展出这种复合体方法以呈递及识别抗原。本发明涉及在免疫应答的第一步中使用这种基本过程的物质和方法。本文还公开了加强将所选取的抗原肽加入到某些MHC分子中作为免疫系统疫苗的化合物和方法。这样的疫苗将增强对抗外源侵入病原体，或肿瘤细胞的毒性反应。使用本发明化合物的其他方法，也可用来增强对自身的识别作用，以控制自身免疫疾病，变应性疾病，或移植体排斥。

对特异抗原的免疫应答是由识别MHC分子中这些抗原肽片段的T淋巴细胞调节。在抗原呈递细胞（APC）中，蛋白酶解处理的抗原的肽片段结合在主要组织相容性复合体细胞（MHC）

分子的抗原肽结合位点中。然后将这些肽 - MHC 复合体转运到细胞表面通过应答 T 淋巴细胞上的 T 细胞受体来进行识别作用（外源肽和呈递 MHC 分子的邻接表面）。这 T 淋巴细胞可以具有免疫调节功能（辅助或抑制免疫应答）或效应子功能（如通过细胞毒性免疫应答来清除病原体或肿瘤）。抗原 - 特异识别事件启动免疫应答级联，免疫应答级联产生保护性免疫应答，或在自身免疫过程中，产生有害免疫应答。

两种类型的 MHC 分子作为 T 细胞的抗原肽的免疫系统呈递者。在内质网中在大约 MHC I 类分子合成时，MHC I 类分子从内源合成的蛋白质接收肽，如传染性病毒。在细胞表面 MHC I 类结合抗原肽呈递给 CD8 - 正性细胞毒性 T 淋巴细胞，然后其被激活并能直接杀死表达病毒的细胞。相反，MHC II 类分子是在内质网合成的，它们的抗原肽结合位点被不变链蛋白质（Ii）阻断。MHC II 类分子和 Ii 蛋白质的这些复合体从内质网转运到后 - Golgi 区室，其中 Ii 由蛋白质水解释放，特异抗原肽与 MHC II 类分子结合（Blum 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*85: 3975（1988）；Riberdy 等人，*自然* 360: 474（1992）；Daibata 等人，*Mol. Immunol.*31: 255（1994）；Xu 等人，*Mol. Immunol.* 31:723（1994）；Xu 等人，*Antigen Processing and Presentation*, Academic Press, NY p227（1994）；Kropshofer 等人，*科学* 270: 1357（1995）；Urban 等人，*J. Exp. Med.* 180:751（1994））。

R. Humphreys（1996）美国专利 No.5,559,028 和 Humphreys 等人（1999）美国专利 No.5,919,639 揭示了 Ii 蛋白质裂解的机理，在裂解过程中释放出片段来调节 MHC II 类分子的抗原结合位点内的抗原肽的结合和禁闭（Adams 等人，*Eur. J. Immunol.* 25: 1693（1995）；Adams 等人，*Arzneim. Forsch. / 药物研究* 47: 1069（1997）；以及 Xu 等人，*Arzneim. Forsch. / Drug Research in Press*

(1999))。Ii 蛋白质的一个片段, Ii (77-92), 发现在抗原肽结合位点外接近保持抗原肽的 N-末端的位点的末端的变构象位点上起作用。并且, 所引用的专利还公开了通过三种类型的机理控制免疫应答的这种起始调节的、抗原肽识别事件的新型治疗化合物和方法。在第一种机理中, 通过本发明的化合物的作用抗原肽从细胞表面 MHC II 类分子溢出。

在第二种机理中, 本发明的化合物改善这些分子上的抗原肽结合位点结合其他合成肽的荷电。这种插入肽序列可以是抗原表位或是仍然牢固结合以阻断抗原肽结合位点的非抗原肽序列。第三种机理包括用调节应答 T 淋巴细胞的分化和功能的方式, 改变抗原肽从这些复合体的缔合/解离速度, 以及 MHC 分子/抗原肽/T 细胞受体复合体的三分子组成的相互作用属性, 并且还改变三分子复合体与辅助细胞-细胞相互作用分子的相互作用。

本发明揭示了令人惊异的发现, Ii-Key 肽同系物与抗原肽的共价偶联致使抗原表位的呈递能力显著增加。并且, 核心间的接头, Ii-Key 肽的生物活性片段不需要是从 Ii 蛋白质衍生的特别肽序列。由重复的亚甲基(CH₂)基团组成的柔性简单接头就足够了并且是优选的。

本发明的化合物可以在不同种疾病和病况中用作为新型治疗及诊断化合物。通过在起始调节时起作用, 免疫应答的抗原肽识别事件, 这些化合物优于具有不同毒性副作用的其他治疗试剂。

本文公开了在 1) 鉴别传染性, 恶性, 自身免疫性及变应性疾病和移植排斥中的应用, 2) 为诊断的目的使用这样的表位, 3) 为治疗的目的使用这样的表位。

本发明的简述

本发明的一个方面涉及增强 MHC II 类抗原呈递的杂交体多肽。杂交体包括 N-末端和 C-末端, 以及共价连接杂交体 N-末端和 C-末端组成的间插化学结构, 其中 N-末端包括哺乳动物 Ii key 肽 LRMKLPKPPKPVSKMR (SEQ ID NO: 1) 及其保持增强抗原呈递活性的修饰, C-末端包括多肽或结合 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的类肽结构形式的抗原表位, 化学结构是原子的共价结合基团, 原子在以线性方式排列时形成柔性链, 柔性链延伸到 20 个氨基酸的长度, 同样地以线性方式排列。在优选实施方案中, 间插化学结构不能以任何空间不同的方式氢键结合 MHC II 类分子, 并且优选的长度约 4 个到 6 个氨基酸, 同样地以线性方式排列。使用在杂交体中的 Ii Key 肽的修饰包括, 从 N-末端的一个或多个氨基酸的缺失, 从 C-末端的一个或多个氨基酸的缺失, 保护 N-末端, 氨基酸取代, 以及产生环化衍生物。在一个实施方案中, 使用在杂交体中的 Ii Key 肽通过 C-末端截短成 LRMK (SEQ ID NO: 3) 来修饰。本发明的优选杂交体包括 Ac-LRMK (SEQ ID NO: 3) - 5-氨基 pentanoyl - IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8) - NH₂, Ac-LRMK (SEQ ID NO: 3) - 5-氨基 pentanoyl - 5-氨基 pentanoyl - IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8) - NH₂, Ac-LRMKLPKSIA YLKQATAK - NH₂ (SEQ ID NO: 9), Ac-LRMKLPKSAKPIAYL KQATAK - NH₂ (SEQ ID NO: 10), 或者 Ac-LRMKLPKSAKPVSKIAYLKQATAK - NH₂ (SEQ ID NO: 11)。使用在杂交体中的 Ii Key 肽的另一种优选修饰是用类肽结构, D-异构体氨基酸, N-甲基氨基酸, L-异构体氨基酸, 修饰的 L 异构体氨基酸, 或环化的衍生物取代一个或多个氨基酸。本发明还提供了鉴别在增强 MHC II 类抗原呈递的杂交体邻近以与 Ii Key 肽等同的方式起作用的分子的方法。

本发明的另一个方面涉及一种增强 MHC II 类限制性抗原表位呈递到 T 细胞上的方法，方法包括将 MHC II 类限制性抗原表位掺入到本发明的 MHC II 类抗原呈递增强杂交体多肽中，然后在生理学条件下接触杂交体多肽，MHC II 类表达抗原呈递细胞，和 T 细胞，T 细胞对抗原呈递细胞的 MHC II 类分子呈递的抗原表位应答。这种方法可用来增加 MHC II 类等位基因对掺入的抗原表位的应答。当抗原表位掺入到本发明的杂交体中时，表现预定模式的 MHC II 类限制性 Th1 就 Th2 刺激作用的抗原表位更容易鉴别。通过增强分子的抗原表位将 MHC II 类分子呈递到个体的特异 T 淋巴细胞上，本发明的杂交体也可用来调节个体对特异分子的免疫应答。本发明提供了体内的和体外的方法。

本发明的另一个方面涉及一种抑制向 T 细胞呈递 MHC II 类限制性抗原的方法。方法包括在生理学条件下接触下列组成：MHC II 类表达抗原呈递细胞在其表面显示 T 淋巴细胞 - 呈递的抗原表位；对由抗原呈递细胞的 MHC II 类分子呈递的抗原表位应答的 T 淋巴细胞；抗原呈递抑制杂交体多肽，其包括 i) N-末端，N-末端包括哺乳动物 Ii Key 肽 LRMKLPKPPKPVSKMR (SEQ ID NO: 1) 及其保持增强抗原呈递活性的修饰，ii) C-末端，C-末端包括结合到 MHC II 类分子的抗原肽结合位点中的抗原结合配体或类肽结构，iii) 共价结合杂交体的 N-末端和 C-末端的间插化学结构，化学结构是原子的共价结合基团，原子在以线性方式排列时形成柔性链，柔性链延伸到 20 个氨基酸的长度，同样地以线性方式排列。通过抑制个体抗原呈递细胞呈递 MHC II 类抗原，这种方法可用来治疗患有与产生非 - 有益免疫应答相关的疾病的个体。本发明也提供了一种鉴别抑制 MHC II 类抗原呈递化合物的方法。

本发明的详细描述

本发明的各个方面是基于发现，通过适当的间插化学结构与哺乳动物 Ii Key 肽共价结合形成杂交体多肽的 MHC II 类限制性抗原表位，由抗原呈递细胞呈递到 T 淋巴细胞时具有比前体抗原表位显著高的功效。形成的杂交体多肽本文称为“增强 MHC II 类抗原呈递杂交体多肽”，或更简单地称为“增强杂交体”。本发明的增强杂交体具有包括哺乳动物 Ii Key 肽，或其保持抗原呈递增强活性的修饰的 N-末端，下面进行更详细的描述。共价与 Ii Key 肽结合的是要呈递的特异抗原表位。在 Ii Key 肽和抗原表位之间是间插化学结构，间插化学结构共价连接着其他两个组成。这种间插化学结构本文称为“间隔基”。间隔基的必要参数在下面更详细地描述。

已有显示，哺乳动物 Ii Key 肽 LRMKLPKPPKPVSKMR (SEQ ID NO: 1)，和修饰的哺乳动物 Ii Key 肽，YRMKLPKPPKPVSKMR (SEQ ID NO: 2)，具有改变某些 MHC II 类限制性抗原肽向识别这些抗原肽的 T 淋巴细胞 - 杂交瘤呈递的能力 (R. Humphreys (1996) 美国专利 No.5,559,028; Humphreys 等人，(1999) 美国专利 No.919,639，这些专利的内容参考收入本篇)。

使用修饰 Ii - Key 肽的先前的试验显示在不损害活性的情况下可以对这种多肽进行非常多种类的修饰。确实，修饰常常能增强多肽的抗原呈递活性。在下面实施例部分详细列出的结果显示所有保持增强抗原呈递活性的修饰 Ii - Key 肽，当适当掺入时都会在本发明的增强杂交体中起作用。对 Ii - Key 肽的修饰包括从 N-末端的一个或多个氨基酸的缺失，从 C-末端的一个或多个氨基酸的缺失，保护 N-末端，氨基酸取代，环形肽的引入。保留原序列的至少 4 个邻接氨基酸的 Ii Key 肽的缺失，

或其取代形式都表现出功能活性。多种天然或非-天然的氨基酸可以在不同的残基位置取代。一些可以被取代的分子实例有类肽结构，D-异构体氨基酸，N-甲基氨基酸，L-异构体氨基酸，修饰L-异构体氨基酸，和环化的衍生物。此外，此领域的技术人员可以使用医疗化学过程通过常规试验方法获得杂交体N-末端片段的其他修饰。这种过程的实例有推理性药物设计法，根据X-射线衍射数据，核磁共振数据获得的结构信息得到分子模型，和其他计算法，以及筛查组合化学合成法合成的产物，和天然产物的分离。已知的保持高活性的Ii-Key肽的修饰形式实例有LRMK (SEQ ID NO: 3)，LRMKLPK (SEQ ID NO: 4)，LRMKLPKS (SEQ ID NO: 5)，LRMKLPKSAKP (SEQ ID NO: 6)，和LRMKLPKSAKPVSK (SEQ ID NO: 7)。其他修饰和Ii-Key肽的修饰形式在Humphreys等人，(1999)美国专利No.5,919,639和Humphreys (1996)美国专利No.5,559,028中描述。已知保持活性的Ii-Key肽的修饰形式(YRMKLPKPPKPVSKMR, SEQ ID NO: 2)本文称为“Ii-Key同系物”。如本文所使用的Ii-Key同系物包括Ii-Key肽本身。

增强杂交体的“抗原表位”是由有些MHC II类分子的有些等位基因呈递给有些T细胞的表位。这样，抗原表位与MHC II类分子的抗原肽结合位点相结合。选取用来生成本发明的增强杂交体的“抗原表位”可以进一步被修饰以进行使用。也就是说，天然或修饰序列的多肽，类肽结构，和不是天然或修饰氨基酸的化学结构也包括在抗原表位中。此外，也可对抗原表位进行多种化学修饰，例如，加入全部或部分非天然氨基酸，或其他主链或侧链组成，其中修饰物以对T细胞刺激有益的方式保持抗原表位在哺乳动物MHC II类分子的抗原肽结合位点中的结合。这样的化学结构可以带有与从天然蛋白质序列衍生的任何抗原肽适度的，少量的，或没有明显结构上的类同之处。这

样的修饰可以对或可以不对 T 细胞受体的识别作用有影响。修饰可以增加对抗原表位的识别作用（如，产生先前非-识别亚集的 T 细胞受体的识别作用）。

杂交体中的间插化学片段或“间隔基”连接 Ii-Key 同系物和抗原表位。两个或多个这样的间插片段称为“间隔基组”间隔基由从零个到数个原子的共价结合基团组成，当原子以线性方式排列时，间隔基将延伸到 20 个氨基酸的肽酰主链原子的长度，同样以线性方式排列。优选地，间隔基的长度少于线性排列的 9 个氨基酸的肽酰主链。最优地，间隔基的长度为线性排列的 4 个到 6 个氨基酸的肽酰主链长度。优选地，间隔基不能以任何空间不同的方式氢键结合 MHC II 类分子。

除了氨基酸，有多种化学基团可以掺入到间隔基片段中。实例在 Tournier 等人的（1999）美国专利 No.5,910,300 中描述，专利的内容参考收入本篇。在优选实施方案中，间隔基包括优选地由杂原子间断的脂肪族链，如 $C_2 - C_6$ 亚烷基，或 $=N - (CH_2)_{2-6} - N =$ 。可替换地，间隔基可以由替换单元组成，如疏水性，亲脂性，脂肪族和芳基脂肪族序列，任意地由杂原子如 O, N, 或 S 间断。间隔基的这种组成优选地从下列类型的化合物中选取：固醇，烷基醇，具有不同烷基官能的聚甘油酯，烷基-苯酚，烷基-胺，憎羟基聚氧化烯，等等。其他实例有疏水聚酐，聚原酸酯，聚磷腈，多羧酸，聚己酸丙酯，polyactic，聚乙二醇多羟基酪酸。间隔基也可含有重复短脂肪族链，如聚亚丙基，异亚丙基，亚丁基，异亚丁基，1,5-亚戊基，等等，有氧原子隔开。

其他可使用在间隔基中的肽酰序列在 Whitlow 等人的（1999）美国专利 No.5,856,456 中描述，专利的容纳参考收入本篇。在一个实施方案中，间隔基具有可以进行裂解的掺入化

学基团，没有限制地，这样的化学基团可以设计进行由蛋白酶，化学基团，或催化单克隆抗体催化的裂解。在蛋白酶-敏感化学基团情况中，优选的是胰蛋白酶靶（带有阳离子侧链的两个氨基酸），胰凝乳蛋白酶靶（带有疏水侧链），和组织蛋白敏感性（B，D 或 S）。“胰蛋白酶靶”本文是用来描述由胰蛋白酶或类-胰蛋白酶识别的氨基酸序列。“胰凝乳蛋白酶靶”本文是用来描述由胰凝乳蛋白酶或类-胰凝乳蛋白酶识别的氨基酸序列。此外，在肽合成，酶催化以及有机化学领域中的技术人员众所周知的催化单克隆抗体的化学靶和其他化学裂解基团也可设计在杂交体结构中，并使用常规试验方法来合成。

本发明的杂交体完全的肽特性到基本上非-肽特性变化，根据一些同系物是还原的或是非肽特性的事实，它们将更可能具有有益的属性，如渗透穿过细胞膜，溶解性，抗蛋白水解，抗由于缀合而灭活，口服生物可用性，以及延长体内半衰期。

包括在本发明的范围内的还有当酸性或碱性基团存在时杂交分子药物可接受的盐。“药物可接受的盐”意指包括所有可接受的盐，如醋酸盐，铵盐，苯磺酸盐，安息香酸盐，硼酸盐，溴化物，乙二胺四乙酸钙，camsylate，碳酸盐，氯化物/二盐酸化物，柠檬酸盐，棒酸盐，乙二胺四乙酸盐，edisylate，estolate，esylate，延胡索酸盐，己基 resorcinate，hydrabamine，羟基苯甲酸盐，碘化物，异硫代硫酸盐，乳酸盐，乳糖酸盐，月桂酸盐，甲磺酸盐，甲基溴化物，甲基硝酸盐，甲基硫酸盐，粘酸盐（mucate），萘磺酸盐，硝酸盐，N-甲基丙烯醇酸胺（glucamide），oleate，草酸盐，双羟基萘酸盐，棕榈酸盐，panoate，泛酸盐，磷酸盐/二磷酸盐，多聚半乳糖醛酸盐，碱式乙酸盐，硫酸盐，酒石酸盐，甲苯磺酸盐，triethiodide，戊酸盐，等等。药物可接受的盐可以用作为药剂形式，来调节溶解性或水解性

质，或可使用在持续释放或药物前体配方中。根据本发明化合物的具体功能性，本发明化合物的药物可接受的盐可以从阳离子制成，如钠盐，钾盐，铝盐，钙盐，锂盐，镁盐，锌盐，以及从碱制成，如氨，精氨酸，氯普鲁卡因，维生素 B 复合体 (choline)，二乙醇胺，二乙胺，乙撑二胺，赖氨酸，N-甲基-谷氨酰胺，鸟氨酸，二苯基乙撑二乙胺，哌嗪，普鲁卡因 (procaine)，三(羟甲基)氨基甲烷，四亚甲基二胺氢氧化物，等等。这些盐可以通过标准方法制备，如，通过将游离酸与适当的有机或无机碱反应。当碱性基团存在时，如胺，酸性盐，即醋酸盐，溴化氢，氯化氢，双羟萘酸盐，等等可用作为药剂形式。

同样，在酸(-COOH)或醇基团存在的情况下，可以使用药物可接受的酯，例如，醋酸酯，马来酸酯，三甲基乙酰氧甲基，等等，以及用作为持续释放或药物前体配方调节溶解性和水解特性的此领域中众所周知的那些酯。

本发明杂交体分子或它们的组成也可以具有手性中心，因此可以外消旋，外消旋混合物存在，以及以个别的对映异构体或非对映异构体存在，所有这样的异构体形式以及它们的混合物都包括在本发明中。并且，本发明的杂交化合物的一些晶体形式也可以以同质异像体存在，所以这样同质异像体也包括在本发明中。此外，本发明的一些化合物可以与水或常见有机溶剂形成溶剂化物。这样的溶剂化物也包括在本发明的范围内。

本发明的增强杂交体可以由肽或类肽或其他化学基团构成，肽或类肽或其他化学基团可以通过已经研究出的抗原肽的合成及选取方法来合成及选取。这样的方法和化合物存在于下列专利中：Geysen 等人的(1987)美国专利 No.4,708,871；Geysen 等人的(1993)美国专利 No.5,194,392；Schatz 等人的(1993)

美国专利 No.5,270,170; Lam 等人的 (1995) 美国专利 No.5,382,513; Geysen 等人的 (1996) 美国专利 No.5,539,084; Pinilla 等人的 (1996) 美国专利 No.5,556,762; Geysen 等人的 (1997) 美国专利 No.5,595,915; Key 等人的 (1998) 美国专利 No.5,747,334; 和 Nova 等人的 (1999) 美国专利 No.5,874,214, 所有这些专利文献参考收入本篇。

在一个或多个系列的免疫学测试法中可以确定杂交体的活性, 免疫学测试法用来检测对 T 细胞识别抗原肽作用的影响。在下面实施例部分中详细描述的实施例显示了将抗原肽 IAYLKQATAK - NH₂ (SEQ ID NO: 8) 掺入到下列杂交体中的效用: Ac - LRMK (SEQ ID NO: 2) - 5 - 氨基 pentanoly - IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8) NH₂ - ; Ac - LRMK (SEQ ID NO: 2) - 5 - 氨基 pentanoly - 5 - 氨基 pentanoly - IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8) NH₂ - ; Ac - LRMKLPKSIAYLKQATAK - NH₂ (SEQ ID NO: 9), Ac - LRMKLPKSAKPIAYLKQATAK - NH₂ (SEQ ID NO: 10), 和 Ac - LRMKLPKSAKPVSKIAYLKQATAK - NH₂ (SEQ ID NO: 11)。这些杂交体中的每一种都显示出能刺激应答 T 细胞杂交瘤, 比未掺入抗原肽 Ac - IAYLKQATAK - NH₂ (SEQ ID NO: 8) 杂交体效力要高。这可通过测定杂交体和抗原表位与抗原呈递细胞的结合与浓度的关系, 接着通过具有识别结合到抗原呈递细胞的 MHC II 类分子的抗原肽结合位点中的表位的 T 细胞受体的 T 细胞杂交瘤的识别作用来确定。所使用的抗原呈递细胞是 CH27 细胞种系, 所使用的 T 细胞杂交瘤是 Tpc9.1 T 杂交瘤细胞种系。试验方法的其他详细内容在下面的实施例中提供。

这些结果显示, 每种测试的杂交体都比对照抗原表位具有显著高的活性。具体地, 未掺入的抗原表位的最大刺激作用半

值终点为约 20nm。使用杂交体 Ac-LRMKLPKSAKPIAYLKQATAK-NH₂ (SEQ ID NO: 10) 和 Ac-LRMK (SEQ ID NO: 3) -5-氨基 pentanoly-5-氨基 pentanoly-IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8) -NH₂ 的最大刺激作用半值终点为约 50pm。使用亚甲基间隔基的杂交体的活性可以与 Ii 蛋白质的天然序列的活性相比。这些试验显示了 Ii-Key 核心序列和抗原表位的杂交体在体外的功效,说明当掺入到本发明的增强杂交体中时,结合 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的抗原表位的抗原呈递功效增加了,这些试验还显示从 Ii 蛋白质的基本序列衍生的,与 Ii Key 序列配准的肽序列不是必须的,并且也不是最优的。

其他测试系统也可用来测定将抗原表位掺入到本发明的增强杂交体中的作用。具有在 MHC II 类分子中识别抗原表位的可选择输出结果的测试法没有限制地包括,测定 B 细胞产出免疫球蛋白的功效,测定生成细胞毒性 T 细胞的功效,使用从杂交,近交,同基因异系,转基因动物获得的天然 T 细胞获取 T 细胞受体或另一种生物学相关分子。

本发明的增强杂交体的存在也具有抑制或调节 T 细胞对由结合在 MHC II 类分子的脱位表位呈递的其他抗原表位的应答。在这个方面中,杂交体还作涉及所有其他抗原表位的 MHC II 类限制性抗原呈递的抑制剂。在这个方面中,杂交体也可称为“MHC II 类抗原呈递抑制杂交体多肽”或简单地称为“抑制杂交体”。

结合在 MHC II 类分子抗原结合位点的,并且不具有 T 细胞刺激活性的分子,可以考虑作为与其结合的这种 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的阻断剂。阻断剂的结合抑制或脱离呈递抗原表位的结合。这样的分子具有作为免疫抑制剂的價值。本发明的抑制杂交体也可通过将阻断剂掺入到通常由抗原表位占据的位置来制备。将阻断剂掺入到抑制杂交体中增强了阻断剂的

抑制活性。本文所使用的“抗原结合位点配体”是指结合在 MHC II 类分子抗原结合位点的分子。这种表达包括抗原表位和非 - 抗原分子。

类似的参数适用于用来产生抑制杂交体的抗原结合位点配体的物理需求，如上面所列出的用于抗原表位的参数。用来产生抑制杂交体的抗原结合位点配体本文限定为包括天然或修饰序列，或类肽序列，或不包括天然或修饰氨基酸的化学结构的任何肽序列，其中肽序列具有已显示出或考虑到会结合到哺乳动物 MHC II 类分子中的性质，其全部或部分地结合到显示要被某些 T 细胞识别的已知抗原肽占据的位置中。抗原结合位点配体不需要仅包括天然氨基酸，其也可以包括全部或部分非天然氨基酸的多种修饰，或包括其他主链或侧链组成，以实现所需结果的方式，这些修饰产生哺乳动物 MHC II 类分子的抗原肽结合位点中的适宜结合。这样的化学结构可以带有与从天然蛋白质序列衍生的任何抗原肽适度的，少量的，或没有显著的结构类同之处。

当具有抑制活性的抗原结合位点配体掺入到本发明的杂交体中时，可以是下面所描述的化合物中的一个，或可以通过使用下列专利组中的一个或多个专利中的方法发现，这些专利文献的内容参考收入本篇：Sette 等人的（1998）美国专利 No.5,736,142；Adams 等人的（1998）美国专利 No.5,817,757；Gaeta 等人的（1997）美国专利 No.5,679,640；Kubo 等人的（1997）美国专利 No.5,662,907；Robbins 等人的（1998）美国专利 No.5,843,648；以及 Kawakami 等人的（1998）美国专利 No.5,844,075。

此领域中技术人员可以使用常规试验过程设计测试法，来测定通过抑制本发明的杂交体对 T 细胞对另一种抗原表位（如

标准或对照抗原表位) 应答的抑制作用或调节作用的影响。在这样的测试法中, 在将另一种抗原表位加入之前, 同时, 或之后, 将抑制杂交体加入到标准测试混合物中。当加入杂交体发生在加入另一种抗原表位之前或之后时, 杂交体可以不只一次加入。在变化的条件下, 这样的测试法具有多种效用, 如检测产生免疫应答抑制作用的最佳杂交体结构, 或检测产生在生理学条件下排除内源加工的及荷电的抗原肽, 并用合成肽替换的最佳杂交体结构。

本发明的另一个方面是一种鉴别在本发明的增强杂交体周围用与 Ii Key 肽等同的方式起作用的分子的方法。这样的分子包括新型 Ii Key 同系物, 并且也可能包括表面上不相关的分子。这样的分子可以从化合物文库(如从天然源获得的分子文库, 或通过组合化学合成法制备的分子)中获得并鉴别。为此, 制备候选分子的文库, 并且将文库中的每种化合物通过适当的间隔基与抗原表位的 N-末端共价结合, 以形成候选杂交体。当使用肽组合文库作为候选分子时, 在合成过程中, 杂交体的候选分子 N-末端片段的每个氨基酸都可以 C 到 N 方向, 通过合成的自动操作法从杂交体的 C-末端氨基酸残基开始, 加到杂交体的 N-末端片段上。在类肽合成情况中, 如通过上述专利中所公开的方法, 可以使用聚合物合成常规的试验方法。在有机环-基化合物的组合化学合成的情况中, 这样的化合物可以通过间隔基与抗原肽共价结合。这种有机环-基化合物的实例, 其可在同系物文库中制备, 在下列专利中公开, 这些专利文献参考收入本篇: Valerio 等人的(1997)美国专利 No.5,627,210; Houghten 等人的(1998)美国专利 No.5,783,577; Nefzi 等人的(1998)美国专利 No.5,786,448; Ostresh 等人的(1999)美国专利 No.5,856,107; 以及 Meyer 等人的(1999)美国专利 No.5,859,190。此领域中的技术人员可以通过下列方法来鉴别其

他修饰，推理性药物设计，筛查组合化学合成的产品，以及筛查天然源的分离物，通过常规试验。

使用在这种方法中的抗原表位应与上面描述的抗原表位相一致。优选地，使用的抗原表位是其有可利用的可靠的 T 细胞杂交瘤应答测试法的抗原表位（如鸽子细胞色素 C 表位）。使用在这种方法中的间隔基也应与上面描述的间隔基一致。

一旦候选分子适当地与抗原表位结合，则使用 T 细胞杂交瘤应答测试法测试产生的杂交体的抗原呈递增强活性，T 细胞杂交瘤应答测试法是对 MHC II 类分子环境中由抗原呈递细胞呈递的抗原表位特异。具有抗原呈递增强活性的杂交体通过这种测试法确定，对杂交体的确定说明掺入到确定杂交体的 N-末端中的相应的候选分子在这种环境中以与 Ii Key 肽等同的方式起作用。这种方法也适于用来确定同样以与 Ii Key 肽等同的方式起作用的特异分子（如，由推理性设计制备的分子）。这样的分子可以简单地掺入到适当的杂交体中，然后如上面所描述的测试杂交体的抗原呈递增强活性。

本发明还包括通过上述方法确定的在 MHC II 类抗原呈递增强肽中起作用的分子，以及掺入这种分子的增强杂交体。

在另一个方面中，本发明涉及一种增强 MHC II 类限制性抗原表位呈递到 T 淋巴细胞上的方法。在这种方法中，将 MHC II 类限制性抗原表位适当地掺入到本发明的增强杂交体的 C-末端中，如上面所描述的。然后在生理学条件下将制备的增强杂交体与 MHC II 类表达抗原呈递细胞接触，其中 MHC II 类表达抗原呈递细胞正在与 T 细胞接触，或然后与 T 细胞接触，T 细胞对由抗原呈递细胞的 MHC II 类分子呈递的抗原表位应答。这种方法适于与上面列出的抗原表位一致的所有抗原表位一起使

用。在体外测试这种增强作用的方法实例在下面实施例部分及列出的专利公开的美国专利中详细描述。

增强 MHC II 类限制性抗原表位呈递到 T 淋巴细胞上的方法在诊断及治疗疾病中具有广泛的应用。T 细胞对诊断抗原表位的应答可以在疾病的诊断中进行测定，特别涉及病原性感染试剂。使用掺入这种诊断抗原表位的本发明的增强杂交体可以增加体外诊断测试中这些杂交体的敏感性。在感染性疾病和癌症情况中，确定为病原体或癌症特异的抗原表位可以掺入到本发明的增强杂交体中，然后使用杂交体启动 Th 对病原体或癌症特异 MHC II 类呈递抗原表位的应答。这种应答致使 T 辅助性细胞活化并扩展，T 辅助性细胞接着激活或“许可”树状细胞来引发 MHC II 类限制性细胞毒性 T 淋巴细胞对侵入有机体的有效应答。在自身免疫疾病，变态反应，及移植体排斥情况中，确定触发病原体免疫应答的特异抗原表位，然后将其掺入到本发明的增强杂交体中。然后使用杂交体以产生 Th2 应答的方式刺激 T 细胞，Th2 应答将向下调节 T 细胞应答。在这种情况下，使用对抑制性细胞应答的刺激作用来向下调节病原体免疫应答。确定特异刺激预先确定的 T 淋巴细胞亚集的增强杂交体的方法在下面进行描述。在治疗疾病中这种杂交体的其他方法和应用如下面所考虑到的。

在本发明的另一个方面中涉及一种确定刺激给定（预先确定的）T 淋巴细胞，或其衍生的克隆细胞的特异抗原表位的方法，其中使用组合化学过程进行肽合成。由本发明的增强杂交体产生的增加敏感性的 MHC II 类限制性 T 细胞刺激作用使得使用给定 T 淋巴细胞对大量不同的分子筛查 T 细胞刺激活性可行。在这种方法中，提供或合成候选肽或化合物的文库。文库中的每种候选化合物都与哺乳动物 Ii Key 同系物 N - 末端独立

地结合，如上面所描述的，通过间隔基的共价键，如上面所描述的，产生类似本发明增强杂交体的杂交体。然后测试每一种这些杂交体刺激存在于抗原呈递细胞的 MHC II 类分子中的预先确定的 T 淋巴细胞的能力。这可以通过将每种杂交体产物分别与抗原呈递细胞和 T 淋巴细胞接触来实施，T 淋巴细胞将对抗原呈递细胞的 MHC II 类分子中呈递的适当抗原表位应答。在优选实施方案中，这种测试法可大规模实施，以筛查大量的候选物。当由抗原呈递细胞呈递时确定刺激 T 淋巴细胞的杂交体确定地包括刺激 T 淋巴细胞的抗原表位。

候选化合物可从多种来源获得，如，天然可获得分子的文库和组合化学文库。在一个实施方案中，候选化合物的合成过程可以扩充以制备需要的杂交体。在许多情况中，这种文库用在某些序列位置上限定一个或几个氨基酸的某种可能的序列集来设计。在合成这些肽的过程中，沿着 C 到 N 的方向，加上一个或多个间隔基序列残基，接着加上所需的 Ii Key，N - 末端片段残基。候选化合物可以由上面确定的作为如本文所限定的抗原表位的可能的物质或组分的任何物质或组分组成。优选地，候选化合物是预测会结合到 MHC II 类分子的抗原肽结合位点的多肽或类肽结构。

本发明还包括通过这种方法确定的特异抗原表位。同样包括在本发明中的还有其中掺入特异抗原表位的增强杂交体。

候选化合物也可通过在基因水平上产生多样性，接着表达多肽基序列的体外方法获得。通过上述筛查确定的化合物可被用作其他在相同或其他测试中进行筛查的亚文库的基础。多种方法可以用来产生抗原表位序列多样性，如噬菌体展示，核糖体展示，以及体外 RNA - 蛋白质融合技术。这些方法部分在下列专利中提供，这些专利的内容参考收入本篇：Huang 等

人的(1996)美国专利 No.5,516,637; Garrard 等人(1998)美国专利 No.5,821,047; Kay 等人(1998)美国专利 No.5,852,167; Collines 等人(1998)美国专利 No.5,925,559。这些方法中一些也在下列公开物中部分提供: Roberts 等人(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 12297; Hanes 等人(1998)Natl. Acad. Sci. USA. 95: 14130; Jermutus 等人(1998)Curr. Opin. Biotechnol. 9: 534。对这些方法来说,一个过程要求将 L R M K 序列 (SEQ ID NO:3), 及其修饰通过遗传学方法引入到多肽基产物中。L R M K (SEQ ID NO:3) 基元在产物线性序列中的位置通过如上所述的间隔基与抗原表位隔开。产生, 表达及分析多肽基产物的常规实验, 和选取一种或多种具有较好属性的多肽基产物的方法, 对此领域中的技术人员是众所周知的。

将抗原表位掺入到本发明的增强杂交体中, 除了增加抗原呈递细胞呈递抗原表位的总效力, 还可以增加等位基因限制性抗原表位呈递的 MHC II 类等位基因的范围。增加的与抗原表位对应的增强杂交体的等位基因范围, 可通过实施上述的测试过程使用表达一定范围的 MHC II 类等位基因的抗原呈递细胞来检测。MHC II 类等位基因的范围应反映出所需的范围。这种用于 MHC II 类分子的多等位基因测试系统的实例在下列专利中提供: R. Humphreys (1996) 美国专利 No.5,559,028 和 Humphreys 等人(1999)美国专利 No.5,919,639, 这些专利的内容参考收入本篇。选择具有所需 MHC II 类等位基因范围的表现出最大活性的杂交体进行使用。预先确定的等位基因活性范围可能与已知的疾病或其他医疗状况有关系。在优选实施方案中, MHC II 类等位基因的范围是从与风湿性关节炎, 多发性硬化, 依赖于胰岛素的糖尿病 mellitus 相关的 HLA-D 等位基因中选取的。对 HLA-DR 等位基因的选择, 以及选取在这种等位基因上进行反应性测试的抗原呈递细胞种系, 和 T 细胞种系和杂交瘤, 此领

域中的技术人员可使用方便获得的物质和常规的实验条件容易地确定。

在另一个方面中，本发明涉及一种确定或选取表现预定模式 MHC II 类限制性 Th1 和 Th2 刺激作用的抗原表位的方法。所需预定模式的刺激作用可以是仅对 Th1 的刺激作用，或仅对 Th2 的刺激作用，或对 Th1 和 Th2 的刺激作用，在将 MHC II 类限制性抗原表位呈递到 T 细胞上的应答。将候选抗原表位适当地掺入到本发明的抗原呈递增强杂交体多肽中。然后将显示具有所需模式的 MHC II 类限制性 Th1 和 Th2 刺激作用的呈递活性的增强杂交体从产生的增强杂交体中确定出来。筛查显示所需活性的杂交体分子是通过将杂交体多肽与 MHC II 类表达抗原呈递细胞和 T 细胞接触来实施的，其中 T 细胞对抗原呈递细胞的 MHC II 类分子对抗原表位的呈递应答。杂交体和细胞的接触应在生理学条件下进行。对 Th1 和 Th2 应答的测试过程可如下列专利文献中所描述来实施，这些专利文献的内容参考收入本篇：Daynee 等人的(1996)美国专利 No.5,540,919；Powrie 等人的(1997)美国专利 No.5,601,815；Metzger 等人的(1997)美国专利 No.5,665,347；Hsu 等人的(1998)美国专利 No.5,776,451；Sedlacek 等人的(1998)美国专利 No.5,837,269；Daynee 等人的(1998)美国专利 No.8,837,269；Reed(1999)美国专利 No.5,879,687；Wang(1999)美国专利 No.5,895,646；Baumann 等人的(1999)美国专利 No.5,897,990；以及 Levitt 等人的(1999)美国专利 No.5,908,839。

Th1 和 Th2 刺激作用通常通过细胞因子释放测试法来确定。显示出与所需 Th1 和 Th2 刺激作用模式相关的产生细胞因子释放的最大活性的增强杂交体可确定并选取使用。在优选实施方案中细胞因子释放的预定模式反映出与疾病或其他身体状况的增强或抑制相关的模式。例如，产生与自身免疫疾病相关的细

胞因子释放模式是优选的，自身免疫疾病有如风湿性关节炎，多发性硬化症，或依赖于胰岛素的糖尿病 mellitus。此外，对与感染性疾病和变态反应有关的细胞因子释放模式有有益影响的杂交体可以选取。通过方便获得的物质和常规的实验条件，此领域中的技术人员可方便地确定选取并实施适当的测试法来确定 Th1 和 Th2 刺激作用，包括动物实验和在那些动物中进行的体外辅助性测试，并且也包括其他体外测试。

本发明的增强杂交体通过增强抗原表位对 MHC II 类分子向个体 T 淋巴细胞的呈递，可以用来调节个体对特异分子的免疫应答。免疫应答的调节作用可以是增强的或是抑制的，并对应于 T 淋巴细胞的亚集，T 辅助性细胞或 T 抑制性细胞分别被刺激。

哪一种淋巴细胞被刺激由服用的特异增强杂交体来确定，如上所述，来选取所需 T 淋巴细胞刺激作用的特异杂交体。一旦适当增强杂交体产生并选取，杂交体可以在适于将杂交体运送到个体的抗原呈递细胞的条件下给个体服用。为了适当增强杂交体的运送可以使用药物可接受的载体。本发明的增强杂交体适当的配方没有限制地包括局部用药配方，口服用药配方，系统或非肠道用药配方。用药配方，方法及剂量在下面详细描述。

上面所描述的调节个体免疫应答的方法，可以应用在患有疾病或病况的个体的治疗中。对其具有认为对于治疗患者有益的增强免疫应答的抗原表位是首先要选取的。在一个实施方案中，从抗原表位衍生的分子在发病机理中起到作用。可替换地，抗原表位可能在有害的试剂中如病原体上，或在病原体感染细胞上找到。如本文所使用的，“治疗”包括在确定或考虑认为患病的个体中减轻疾病病征或候征，或控制疾病的发展。如本文

所使用的“预防”包括在可能还没有疾病的可识别病征或候征的个体中，减轻疾病的潜在病因或可能发病的相关因子。

疾病可以是由细菌，病毒，寄生物，真菌，(立克次氏体) *richettsia*，或其他感染性试剂，或这种试剂的组合引起的或与由其感染相关的感染性疾病。治疗可以针对疾病的毒素。对于表位衍生物优选的毒素没有限制地包括，葡萄球菌肠毒素，中毒性中风症毒素，逆转录病毒抗原(如从人类免疫缺损病毒衍生的抗原)，链球菌抗原，支原体菌属，分直杆菌属，以及疱疹病毒。特别优选的毒素是 SEA, SEB, SE₁₋₃, SED 和 SEE。疾病或病况可以考虑是自身免疫疾病，如风湿性关节炎，多发性硬化症，红斑狼疮，糖尿病 mellitus，重症肌无力，甲状腺炎，硬皮症，皮肤肌炎，天疱疹，和类似的疾病。可以用来评定本发明的化合物和方法的效果的自身免疫疾病的模型系统的实例是系统性红斑狼疮，重症肌无力，风湿性关节炎，依赖于胰岛素的糖尿病 mellitus，和实验变应性脑脊髓炎。实施这些实验的方法在 Clark 等人的(1994)美国专利 No.5,284,935 中提供，专利的内容参考收入本篇。

可以考虑认为是变应性过程的疾病和病况如，哮喘，枯草热，过敏性鼻炎，局部皮炎，结肠炎，以及其他这种由特殊过敏原或非确定过敏原引起或相关的过程。这种过敏原的实例有植物，动物，细菌，寄生性过敏原和引起接触性过敏的金属基过敏原。使用的本发明中的优选的过敏原是种子，草，花生，螨虫，跳蚤和猫过敏原。

或者可替换地，疾病或病况可以是增殖或恶性过程，如癌症，良性前列腺肥大，牛皮癣，腺瘤或其他内部器官的细胞增殖，或对病毒或其他感染性，刺激性或环境过程应答的细胞增殖。

如使用在本文中的，“哺乳动物”意指包括人类物种以及所有其他哺乳动物物种。本发明的化合物和方法可以使用在所有哺乳动物物种的个体中产生的疾病或病况的治疗中。如本文所使用的，“个体”是指任何一种哺乳动物物种，包括人类物种。在人类物种个体中产生的疾病或病况，如本文实施例中所提及的，应包括在其他物种产生的，是由相同的有机体或致病过程引起的，或由相关的有机体或致病过程引起的，或由未知或其他已知有机体和/或致病过程引起的可比疾病或病况。如本文所使用的，“医师”也包括兽医，或参与诊断和/或治疗哺乳动物个体的任何个体。

本发明还提供了在适当的药物配方中用于服用的化合物，如化合物药物，化合物前体药物，或化合物代谢药物。“服用”或“服用化合物”可以理解为将本发明的化合物以化合物药物，化合物前体药物，或化合物代谢药物提供给需要治疗或预防疾病的个体。这样的药物含有一种或多种本发明的杂交体多肽作为主要或要素活性组分，使用在一种或多种上述疾病或病况的治疗或预防中，这样的药物可以以多种治疗剂型在用于局部用药，口服用药，系统用药，和非肠道用药的传统载体中服用。依据要进行治疗的疾病或病况，用药途径和用药法是变化的，并且是由熟练的技术人员来确定。例如，化合物可以以口服剂型用药，如以片剂，胶囊（每个包括定时释放配方和持续释放配方），丸剂，粉末，粒剂，酏剂，酊剂，溶液，悬浮液，糖浆和乳液，或者化合物可以通过注射服用。同样，它们也可以以静脉内（通过大丸剂或灌注法），腹腔内，皮下，有或没有闭塞的局部，或肌肉内方式用药。所有这些方式对制药领域的普通技术人员是众所周知的。

产品的每日剂量可以在每天每位成人 0.001 毫克到 1000 毫克的范围内变化。对于口服用药，组合物优选地以含有 0.001 毫克到 1000 毫克的活性组分的片剂形式提供，优选地含有 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 毫克活性组分，在治疗过程中根据患者的病征或候征进行候征调节剂量。有效量的药物通常以从每天每公斤体重约 0.0001 毫克到约 50 毫克剂量提供。这个范围更具体地从每天每公斤体重约 0.0001 毫克到约 7 毫克。

有益地，本发明适当的配方可以以每天单一剂型服用，或者可以将每天的总剂量分开服用，如分成两次，三次或四次每天。本发明增强杂交体多肽可用来制备治疗上述疾病或病况的药物或药剂。并且，本发明的化合物可以以鼻内用药方式服用，通过局部使用适当的鼻内载体，或者通过经皮途径用药，通过使用此领域中普通技术人员众所周知的经皮贴片。为了以经皮给药系统形式服用，在用药过程中当然应使用连续用药，而不是间断用药。

为了治疗或预防疾病，本发明的杂交体多肽可以以药物组合物服用，药物组合物包括活性组分和适于局部用药使用的药物可接受的载体。局部用药药物组合物可以是溶液，霜剂，膏剂，胶体，洗液，香波，或适于皮肤涂用的气雾剂形式的。这些含有本发明的化合物的局部药物组合物一般包括约占含有药物可接受的载体的混合物的 0.005%到 5%重量比的活性组分。

为了治疗及预防疾病和病况，如上面所列出的，本发明的杂交体可以与其他已知用来治疗这种疾病和病况的试剂一起使用。对于使用多于一种活性试剂的组合治疗，在活性试剂可以同时服用的情况中，活性试剂可以同时服用，或者它们可以在错开分别服用。

使用在本发明组合物中的剂量用法可以依据多种因素来选取，包括如类型，物种，年龄，体重，性别和患者的医疗状况，要治疗的病况的严重性，以及使用的本发明的具体化合物。具有普通技术的医师可以方便地确定并开出预防，减轻，或控制疾病和病况所需的有效量的药物的处方。获得产生效力并且没有毒性或具有可接受毒性的药物浓度的最佳精确决定需要依据药物对于靶位点的有效性的动力学的用药体制。这个过程涉及药物的分配，平衡，和排除，这在熟练技术人员的能力范围内。

在本发明的方法中，本文详细描述化合物可以制成活性组分，并且可以与适当的药物稀释剂，赋形剂或考虑到所需的服用方式选取的并与传统制药惯例一致的 carder（统一称为“carder 物料”）形成的混合物一起服用，carder 有口服片剂，胶囊，酏剂，糖浆，等等。例如，对于片剂或胶囊形式的口服用药方式，活性药物组分可以与口服、无毒性药物可接受的惰性载体组合，惰性载体有乙醇，甘油，水，等等。并且，当需要时，适当的结合剂，润滑剂分解试剂和着色剂也可以掺入到混合物中。适当的结合剂没有限制地包括，淀粉，凝胶，天然糖如葡萄糖或 β -乳糖，谷类甜味剂，天然或合成的树脂，如阿拉伯胶，黄芪胶，或藻酸钠，羟甲基纤维素，聚乙烯乙二醇，蜡等等。使用在这些剂型中的润滑剂没有限制地包括油酸钠，硬脂酸钠，苯甲酸钠，乙酸钠，氯化钠等等。分解试剂没有限制地包括淀粉，甲基纤维素，aga，斑脱土，黄原胶等等。

液体形式可以是适当地调味的悬浮或分散试剂，如合成的及天然的树脂，例如，黄芪胶，阿拉伯胶，甲基纤维素等等。可以使用的其他分散试剂是甘油等。对于非肠道用药，无菌悬浮液是所需溶液。当静脉内用药时，通常含有适当防腐剂的等张 predation 是所需的。

含有活性药物组分的局部用药制备品可以与此领域中众所周知的多种载体物质混合，如醇，芦荟凝胶 (aloe vera gel)，allatoin，甘油，维生素 A 或 E 油，矿物油，PPG2 丙酸肉豆蔻酯，等等，形成醇溶液，局部清洗剂，清洗霜剂，皮肤凝胶，皮肤洗液，以及凝胶或霜剂配方的香波。

本发明杂交体也可以以微脂粒给药系统的形式服用，如，小单层囊，大单层囊和多层囊。微脂粒可从多种化合物制成，如胆固醇，硬脂酰胺磷脂酰胆碱。

本发明的杂交体多肽及其配方可以与生物可降解类聚合物结合使用，用来获得控释药，如聚乳酸，polyepsilon 己内酯，多羟基酪酸，聚原酸酯，聚缩醛，聚二氢吡喃，聚氰基丙烯酸盐，和水凝胶交联的或两性分子嵌段共聚物。

本发明的杂交体多肽及其配方可使用方便获得的原材料，试剂并通过传统的合成法来制备。在这些反应中，也可以使用此领域中普通技术人员众所周知的，但在本文中沒有详细描述的方法。

作为将本发明的增强杂交体直接给个体服用以增强抗原表位向个体的 T 淋巴细胞呈递 MHC II 类分子的一种选择，可以从个体获得抗原呈递细胞种群，并在体外用本发明增强的杂交体治疗。将这些细胞在适于杂交体与抗原呈递细胞的 MHC II 类分子结合的条件下用增强的杂交体治疗。治疗后，在促进治疗的细胞与个体 T 淋巴细胞接触的条件下，将抗原呈递细胞给个体服用。如上面所描述的，对免疫应答的影响，增强或抑制，将取决于哪一种 T 细胞亚集优先受到增强杂交体的刺激。对免疫应答的增强作用可能对于抗癌细胞或感染有机体的细胞毒性应答有有益的影响。可替换地，增强 T 抑制性细胞应答可能对抑

制对特异分子的免疫应答有影响。当使用从自身免疫疾病的病因学抗原获得的抗原表位时，这样的抑制作用可以具有治疗效果，自身免疫疾病如风湿性关节炎，多发性硬化症，重症肌无力，或红斑狼疮。使用本发明的化合物和方法体外治疗从患者获取的细胞的方法和过程可遵从于下列专利，这些专利文献的参考收入本篇：Rosenberg (1998) 美国专利 No.5,126,132; Chada 等人 (1997) 美国专利 No.5,693,522; Kriegler 等人 (1998) 美国专利 No.5,849,586; Gruber 等人 (1999) 美国专利 No.5,856,185; 和 Kriegler 等人 (1999) 美国专利 No.5,874,077。

在另一个方面中，使用 Celis 等人 (1998) 美国专利 No.5,846,827 中所描述的化合物和方法，本发明的化合物和方法可在体外条件下使用，以促进细胞毒性 T 淋巴细胞产生，上述专利文献的内容参考收入本篇。

本发明的另一个方面提供了一种抑制 MHC II 类限制性抗原肽向 T 淋巴细胞呈递的方法。如上面所讨论的，抗原结合位点配体组成结合在主要组织相容性 II 类分子的抗原肽结合位点中的任何肽或分子，这样的分子可以或可以不具有 T 淋巴细胞刺激活性。抗原结合位点配体与 Ii-Key 同系物的结合（通过间隔基），产生了具有抑制 MHC II 类限制性抗原呈递的增强活性的杂交体。为了抑制 MHC II 类限制性抗原表位向 T 淋巴细胞的呈递，将抗原呈递抑制杂交体多肽与 MHC II 类表达抗原呈递细胞接触，MHC II 类表达抗原呈递细胞在其表面展示 MHC II 类限制性 T 淋巴细胞 - 呈递的抗原表位。这种作用的结果调节了对抗原呈递细胞的 MHC II 类分子呈递抗原表位的应答的 T 淋巴细胞功能。

体外测试显示对抗原表位向 T 细胞呈递的抑制作用在 R.Humphrey (1996) 美国专利 No.5,559,028; 和 Humphrey 等人

(1999) 美国专利 No.5,919,639 中提供, 这些专利的内容参考收入本篇。杂交体的生物活性, 如抑制抗原-特异 T 淋巴细胞活化的能力, 也可以在多种系统中得到测试。在一个示例性方案中, 将过量的杂交体与已知的 MHC 表达 (如 HLA-DR1) 的抗原呈递细胞, 已知抗原特异性的 T 细胞克隆体 (破伤风毒素 (830-843) 和 MHC 限制 (又, DR1)), 和抗原肽本身 (破伤风毒素 (830-843)) 一起温育。将测试培养物温育足够长的时间以使 T 细胞增殖, 如 1 到 4 天, 然后定量增殖。定量可以通过在最后 18 小时温育中用氘化胸苷脉冲来实施, 或通过上清液流体转移到 HT-2 细胞的第二培养物中来实施, T 细胞的增殖取决于应答 T 细胞的白细胞介素释放并且通过最后 18 小时温育中用氘化胸苷脉冲来测定。然后计算相对与没有接受抑制剂的对照物的抑制作用百分比。在体外测试中杂交体和其他抗原呈递抑制剂的能力可以与这种化合物体内抑制免疫应答的能力相关联。体内活性可以通过动物模型确定, 如, 通过服用已知限制到由肽识别的具体 MHC 分子的抗原, 和免疫调节杂交体。T 淋巴细胞随后从动物体内移出, 并与一定剂量范围的抗原一起培养。通过传统方式测定对刺激作用的抑制, 如通过用氘化胸苷脉冲, 并与适当的对照物比较。某些试验细节对此领域中的技术人员是显然的。

通过将抗原肽结合位点配体掺入到本发明的抑制杂交体中产生增强的活性可以更快更精确地检测抑制性活性。这种增强的检测作用能确定抑制 MHC II 类抗原呈递的新型化合物。在这个方面, 本发明涉及一种确定抑制 MHC II 类抗原呈递的化合物的方法。这种方法包括提供预计是抗原结合位点配体的候选化合物文库, 并将每种候选化合物独立地通过间隔基与哺乳动物 Ii Key 同系物共价结合, 这样 Ii Key 同系物在 N-末端, 候选化合物在 C-末端。这种产物称为“候选抗原呈递抑制杂交体多

肽”或“候选抑制杂交体”。然后，通过将个体候选抑制杂交体与抗原呈递细胞，（抗原呈递细胞在其一些 HMC II 类分子中表达天然产生序列的抗原肽），以及对在抗原呈递细胞的 MHC II 类分子中呈递的抗原表位应答的 T 淋巴细胞（也称为 T 淋巴细胞活化测试法）接触来筛查。与对照反应相比，如果候选抑制杂交体的接触降低了 T 淋巴细胞的活化作用，那么就确定了。在试验中确定降低的 T 淋巴细胞活化作用说明掺入到杂交体中的候选化合物，和候选抑制杂交体本身，都是 MHC II 类抗原呈递的抑制剂。

用来产生候选抑制杂交体的候选化合物可以是天然产生的产物，组合产生的肽，类肽，或其他以及化合物。

本发明也包括通过上述方法确定的抑制分子和抑制杂交体。对于体外应用，这种抗原呈递抑制剂的主要应用是体内临床应用？？这种杂交体可以应用在治疗自身免疫疾病中，如上所述。

本发明的另一个方面涉及一种通过抑制对抗原表位特异的 T 淋巴细胞的应答来治疗患有疾病的个体的治疗方法，给个体服用本发明的抑制杂交体以抑制个体的 T 淋巴细胞的应答。抑制杂交体的可接受配方和方法以及用药法与上面所描述的本发明的增强杂交体的配方和方法以及用药法相对应。

本发明的化合物和方法不同于 Kappler 等人的（1998）美国专利 No.5,820,866 中的化合物和方法，专利文献的内容参考收入本篇，不同之处在于本发明中的抗原肽是结合在各自位点上非共价结合在 MHC II 类分子上的 Ii 蛋白质的片段上的，而不是共价结合在两条 MHC II 类分子链中一条链的 N-末端的。此外，本发明还包括其中抗原肽与其他化合物结合的构建，其他

化合物用适当的亲和力与 MHC II 类分子结合（不需要在 Ii Key 同系物的结合位点上），或包括其中抗原肽与其他细胞表面蛋白质结合的构建，如 CD4，其与 MHC II 类分子和 T 细胞受体结合形成的复合体相互作用，如在抗原呈递细胞和 T 淋巴细胞之间。这样的杂交体可以从 MHC II 类分子的结构模型中设计出来，如通过传统的药物设计方法，或如在本文其他地方所描述的，通过筛查组合合成的产物，或筛查分离的天然产物。

本发明的化合物和方法不同于 Clark 等人的（1994）美国专利 No.5,284,935 中的化合物和方法，该专利内容参考收入本篇，不同之处在于，在本发明的化合物中，毒素是缀合在 MHC II 类分子上或缀合在复合体的抗原肽上的，其中抗原肽共价结合在 MHC II 类分子上，如结合在 MHC Ii 类分子一条链的 N-末端。

本发明的化合物和方法不同于 Stanton 等人的（1998）美国专利 No.5,807,552 总的化合物和方法，该专利内容参考收入本篇，不同之处在于，在所引用发明的化合物中，抗原肽通过两性分子螺旋状肽的片段结合，以产生周期隔开的抗原表位的非共价结合多聚体的方式相互作用。

本发明的化合物和方法不同于包括在 Ii 蛋白质的序列中被取代的抗原表位的化合物和方法，其中修饰的 Ii 序列在将修饰基因转染到抗原呈递细胞中后表达（Barton 等人，国际免疫学，10: 1159（1998）；Fujii 等人，人类免疫学，59: 607（1998）；Malcherek 等人，欧洲免疫学期刊，28: 1524（1998）；Suttmptner 等人，EMBO 期刊 16: 5807（1997）；Van Bergen 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7499（1997））。至少，这样的构建有利于定向在 Ii 蛋白质和 MHC II 类分子之间形成的复合体细胞内转运到后-Golgi 区室，以进行抗原/Ii 蛋白质处理和 MHC II 类肽荷电（Bakke 等人，细胞 16: 707（1990）；Lamb 等人，免疫学期刊

148: 3478 (1992)) 因此, 涉及本发明的分子和细胞生物学机理没有很好地开发。

根据当前的公开内容, 常规试验将可以发展出新型的治疗方法。虽然在下面实施例部分列出的数据是中实施鼠科动物生物学活性测试的试验中获得的, 但是在体外生理学条件下使用人类细胞也可以得到相似的结果。常规试验就可以优化从 Ii-Key 序列衍生的杂交体构建的片段和间隔基的片段。

实施例

实施例 1 使用 Ii-Key 核心基元和抗原表位之间可变的间隔基设计合成杂交体肽

将 Ii-Key 肽的活性核心和抗原表位共价结合到一个“杂交体”肽中。制备这样的构建是为了获得增强的效力和其他功能优点, 如在 Ii-Key 结构对掺入到杂交体中的抗原表位的 MHC II 类分子呈递方面的影响方面。制备具有不同的在两个生物活性单元之间定位的间隔基(长度和组合物)的几种杂交体来确定生物活性。

在杂交体设计中的第一个结构问题是活性所必需的 Ii-Key 核心肽的范围。Ii-Key 肽 LRMK (SEQ ID NO: 3) 的最小活性序列用来制备在本项研究中进行测试的杂交体。预先确定的这种四肽保持了对抗原肽对 MHC II 类分子的呈递作用影响的测试中测试的 Ii-Key 肽系列的任何肽的至少 50% 最大活性(Adams 等人, 欧洲免疫学期刊, 25: 1693 (1995); Adams 等人, *Arzneim, Forsch./药物研究* 47: 1069 (1997))。在 Ii 蛋白质序列中, 具有从 LRMK (SEQ ID NO: 3) C-末端延伸的其他残基的肽, 在将肽荷电增强到 MHC II 类分子中的基础测试中已确定表现出较

大的活性。然而，对于这个系列的同系物，Ii-Key 肽部分保持持续使用 LRMK (SEQ ID NO: 3)。

在这个系列的杂交体肽中抗原表位也是保持不变的。其是 鸽细胞色素 C (PGCC) 抗原表位 PGCC 95-104 IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8)。

列在表 1 中的系列杂交体设计用来测试间隔基的长度和组合对活性的影响。设计这个系列的化合物的推理是从 (部分地) 有关 Ii 蛋白质衍生的肽和抗原肽是如何结合到 MHC II 类分子的抗原肽结合沟中的知识中吸取的。使用从流感病毒红血球凝聚素获得的抗原肽, HA (307-319) (Stern 等人, 自然, 378: 215-221), 和 Ii-蛋白质衍生肽, 称为裂解亮肽素-诱导肽 (CLIP) 的 Ii (86-102) (Ghosh 等人, 自然, 378: 457-462 (1995)) 推断的 X-射线结晶学分析揭示了在 HLA-DR1, MHC II 类分子的抗原肽结合位点中两种肽的分子取向。在抗原肽结合位点中定位的位置 CLIP 在缺失 HLA-DM 分子的细胞系中被鉴别到, HLA-DM 分子的作用是将弱结合肽, 包括 CLIP 移出, 换成更牢固结合的抗原肽 (Sette 等人, 科学 258: 1801 (1992); Avva 等人, 免疫学 1: 763-772 (1994); Sloan 等人, 自然 375: 802-805 (1995); Dennzin 等人, 细胞, 82: 155-163 (1995))。Ii-Key 的核心, LRMK (SEQ ID NO: 3) 在已经鉴别的 CLIP 系列中最长的肽的 N-末端的末梢 (Chicz 等人, 自然 358: 764 (1992))。然而, Ii-Key 肽 (从 LRMK (SEQ ID NO: 3) 的 C-末端延伸的) 系列的较长的同系物与 CLIP 较长形式的 N-末端的初级氨基酸序列重叠。

表 I 中的杂交体 6 是由 Ii-Key 核心序列 LRMK (SEQ ID NO: 3) 组成的杂交体, 通过 Ii 蛋白质残基 LPKSAKPVSK (SEQ ID NO: 12) 间隔基的延伸到 C-末端, 延伸到抗原表位

IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8)。要作为“引用杂交体”的间隔基片段的 Ii 蛋白质序列的这种排布可以通过将杂交体 6 的结晶学成像与预先通过 X-射线结晶学产生的两个各自的成像重叠获得。这两个成像是结合到 HLA-DR1 MHC II 类分子结合袋中的 HA (307-319) 的成像和 CLIP 的成像 (Stern 等人, 自然, 378: 215-221 (1994), Ghosh 等人, 自然, 378: 457-462 (1995))。在这两个结晶学成像中, HLA-DR1 MHC II 类分子的 P1 疏水袋填充了 CLIP 的 Ii 序列的蛋氨酸⁹⁹, 或填充了 HA (307-319) 肽的亮氨酸⁸⁷。可以合理地预测, PGCC (95-104) 的 Ile⁹⁵ 也将存在与疏水 P1 袋中。因此, 杂交体包括 Ii 蛋白质序列通过赖氨酸⁹⁰ 之后到具有 PGCC (95-104) 序列的杂交体的 C 末端。在 Ii 蛋白质和抗原肽序列之间杂交体序列的交换出现在预计结合到 HLA-DR1 的 P1 疏水袋的残基位置之前。

仔细考虑 Ii 和抗原肽的二级结构和排布为聚脯氨酰 II 类 (PPII) 螺旋体, 在抗原肽结合沟的沟内, 设计出剩余杂交体肽。X-射线结晶学成像显示 CLIP 和抗原肽每个都在聚脯氨酰 II 类螺旋的二级结构中卷曲。在这种类型的螺旋体中, 每个回转过氨基酸重复频率为 3.0 个氨基酸, 相反在已充分了解的 α -螺旋中发现每个回转过氨基酸重复频率为 3.2 个氨基酸。沿着两种类型螺旋的纵向轴看去, PPII 螺旋比 α -螺旋中发现的每个回转过伸展约两倍的距离。PPII 螺旋不具有稳定 α -螺旋的内回转过氢键。也就是, 在 α -螺旋中残基 I 的肽酰主链酰亚胺部分氢键结合残基 I+3 的肽酰主链羰基。由于这种沿着肽酰主链的回转过内在稳定作用, α -螺旋形成能量相对强的局部二级结构。这些螺旋可以在蛋白质内折叠, 彼此折叠及折叠在其他局部二级结构上。相反, PPII 构型使用在蛋白质中, 作为蛋白质: 蛋白质相互作用的识别单元。这样的 PPII 螺旋发现在 SR-1 区域内调节跨膜受体的细胞内区域的细胞内蛋白质的识别作用, 识别作用通过一

些细胞表面事件（在结构或空间方面）来改变。T 细胞识别的抗原表位也是如 PPII 结构的卷曲。这样的 PPII 结构具有比 α -螺旋可能具有的展示抗原序列的可变侧链的区域要宽。这样产生等边的金字塔结构，其中在 MHC II 类分子的抗原肽结合裂缝的底部沿着抗原肽螺旋的一个脊部的残基结合到疏水袋中。沿着抗原肽 PPII 螺旋的另外两个脊部的侧链暴露在沿着 MHC 分子表面的浅袋中，以与 T 细胞受体相互作用。当序列是 PPII 螺旋而不是 α -螺旋时，大约两倍于 MHC II 类和 TCR 分子侧链原子的原子可以接触抗原序列的每条侧链。在两个反平行螺旋之间的抗原肽结合槽中，结合肽的 PPII 螺旋构型在 N-末端延伸至少 5 个残基的位置超过通常鉴别的抗原表位的第一个残基。Ii 序列的 P⁸⁷ 的特点在于，在两个反平行 α -螺旋形成的槽的末端的 X-射线的结晶成像，在两个反平行 α -螺旋之间是 CLIP 或是抗原肽。

模拟连接 Ii-Key 核心结构 LRMK (SEQ ID NO: 3) 和抗原表位 IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8) 的杂交体可能的相互作用，产生有关在连接 LRMK (SEQ ID NO: 3) 功能基团和抗原肽的杂交体的间隔基中原子与 MHC II 类分子（表 1）相互作用的结构需求的几种假设。在一种假设中，仅当间隔基是卷曲如 PPII 螺旋时，间隔基的氨基酸侧链的原子最理想地与 MHC II 类分子的特异残基相互作用。这个观点可使用杂交体 6 测试。在这种杂交体中，全部 10 个氨基酸残基立即 C-末端与 Ii 蛋白质序列中的 LRMK⁹¹ (SEQ ID NO: 3) 结合，组成间隔基，保留在 X-射线结晶学模式重叠时观察到的 CLIP 的 Ii 蛋白质序列和 HA 抗原肽之间的配准。如果杂交体 6 是唯一具有生物活性的测试杂交体，那么可以得出结论，在槽末端中的 MHC II 类残基到抗原序列的第一残基一定是接触的。

另一个可替换的假设是，仅有一些间隔基中的残基在杂合体肽中是功能上需要的。杂合体 5 (表 I) 设计成这样的，直接 C-末端结合在 Ii 蛋白质序列中的 LRMK⁹¹ (SEQ ID NO: 3) 的仅前七个残基，作为间隔基存在。在杂合体 4 中，直接 C-末端结合在 Ii 蛋白质序列中的 LRMK⁹¹ (SEQ ID NO: 3) 的仅前四个残基，作为间隔基存在。如果杂合体 4 和 5 与杂合体 6 相比具有活性，那么这种发现说明作为聚脯氨酰 II 类 (PPII) 螺旋的间插片段的二级结构是不重要的。这种发现也促使人们进行对 MHC II 类分子中重要的接触残基的研究，及对这种相互作用重要的推测主链位置 (如，肽酰羰基或亚氨基残基) 的研究。

对其他杂合体测试间隔基的 Ii 蛋白质序列的外在残基的需求，找到对间隔基序列中 Ii 蛋白质的特异残基的需求，可以支持这样的间隔基一定在其活性位点是如 PPII 螺旋的卷曲的观点。在这些杂合体中，将间隔基氨基酸残基用 ϵ -氨基-戊酸 (ava) 残基替换。杂合体 3 含有两个 ava 残基，杂合体 2 含有一个 ava 残基。这些杂合体肽分别是杂合体 5 和 4 的同系物。Ava 残基的线性延伸，包括氨基基团-亚甲基桥-羧基基团，约等于三肽酰基单元的主链长度。在这些“缺失同系物”杂合体 4 和杂合体 5 具有生物活性的情况下，可以得出结论对间隔基的侧链原子和 MHC II 类抗原肽结合沟之间的特异相互作用没有功能上的需要。

使用在本项研究中的杂合体肽是在 N-末端完全酰基化的，在 C-末端酰胺化的，以抑制肽链端解酶的活性。

表 I 使用 Ii-Key 核心基元和抗原表位之间的
可变间隔基设计杂交肽

杂交体	从 Ii	序列	抗原	符号
1	Ac-		IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 8)	△
2	Ac-LRMK(SEQ ID NO:3)-	Ava-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 8)	○
3	Ac-LRMK(SEQ ID NO:3) -	Ava- Ava-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 8)	□
4	Ac-LRMK -	LPKS-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 9)	●
5	Ac-LRMK -	LPKSA KP-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 10)	■
6	Ac-LRMK -	LPKSA KPVSK-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 11)	▼

使用在本公开中的单个字母氨基酸代码表示如下: A=L-丙氨酸, D=L-天冬氨酸盐, E=L-谷氨酸盐, F=L-苯丙氨酸, H=L-组氨酸, I=L-异亮氨酸, K=L-赖氨酸, L=L-亮氨酸, M=L-蛋氨酸, N=L-天冬酰胺, P=L-脯氨酸, R=L-精氨酸, Q=L-谷氨酰胺, T=L-苏氨酸, Y=L-酪氨酸 Ava=5 氨基戊酸 (ϵ -氨基-n-戊酸)。

表 I 中的肽由 Commonwealth 生物技术有限公司 (601 Biotech Drive, Richmond VA 23225) 合成。每种肽的纯度和组合通过 HPLC 分离和质谱测定法确定。

实施例2 杂交体肽的生物活性

列在表 I 中的肽系列的生物活性通过 T 杂交瘤应答测试来确定。将对天蛾幼虫(Hornworm moth)细胞 C 表位 IAVLKQATAK (SEQ ID NO: 8) 特异的 T 细胞杂交瘤用抗原肽或用列在表 I 中的核心 Ii-Key 序列的抗原肽的杂交体系列中的杂交体来刺激。将杂交体与不同长度的间隔基连接。间隔基含有 Ii 蛋白质天然序列的氨基酸, 或 5-氨基-n-戊酸(ava; 5-氨基戊酸)的亚甲基(-CH₂-)基团。将抗原呈递细胞和 T 细胞杂交瘤的培养物与抗原肽的系列 1:4 稀释液(从 3μM)一起温育。通过测定抗原刺激培养物(24 小时刺激作用)的上清液已被转移到其中的 HT-2 培养物对氘化胸苷的吸收来确定应答。对杂交体 1, 抗原肽应答的半最大值终点约为 20nm。用杂交体 5 和 2 刺激的半最大值终点约为 50Pm。具有亚甲基间隔基的杂交体, 杂交体 2 和 3 的活性, 可以与具有 Ii 蛋白质天然序列的杂交体的活性相比。这些试验说明了 Ii-Key 核心序列和抗原肽之间的杂交体的体外效用。

这些试验的结果显示有效的治疗作用是由 Ii-Key 核心序列(如, LRMK, SEQ ID NO: 3)通过柔性链与选取的抗原表位共价杂交而产生的。柔性链可以在长度从 3 个到 6 个肽酰单元延伸, 并且可以由不以任何空间不同的方式氢键结合 MHC II 类分子的简单的重复单元构成。这种短且简单的柔性间隔基产生比由特异氨基酸残基组成的较长的间隔基增加的活性, 如杂交体 7 的次-最大活性所示, 杂交体 7 具有由天然存于与 Ii 蛋白质中的 LRMK (SEQ ID NO: 3) 和推定交换位点之间 CLIP 和抗原肽之间的 10 个氨基酸组成的间隔基, 如结晶学成像数据所示。

表 II 增强的 T 细胞对包含 Ii Key 核心序列，可变间隔基，
和抗原肽的杂交体增殖性应答

Conc. nm	杂交体					
	1	2	3	4	5	6
3000	25.2	25.1	31.9	25.2	27.3	21.5
750	27.8	23.9	31.7	23.3	27.5	23.4
188	32.4	27.2	26.2	20.8	29.1	26.9
47	29.5	20.8	26.2	19.5	26.2	25.3
12	10.9	21.9	29.5	23.1	44.6	39.2
3	0.4	30.1	27.9	19	31.4	31.4
0.73	4	28.8	22.3	19.2	30.1	28.7
0.18	0	31.2	21.6	9.1	36.7	11.9
0.05	0	19.8	5.3	5.8	21.3	2.4
0.01	0	3.4	0.6	2.5	14.3	2.9

对表 II 的说明。在每分钟上千次计数中，对抗原表位的免疫应答与从 3 μ M 备用溶液的杂交体 (1: 4) 系列稀释液的稀释因子有关。

试验

对于这项测试，将下列组成同时加入到初级培养物中：(a) 含有抗原表位的杂交体肽 (表 I); (b) 丝裂霉素 C-处理的，带有结合特异抗原肽及其呈递到抗原肽-特异 T 细胞杂交瘤上所需的 MHC II 类等位基因的 MHC II 类正性抗原呈递细胞 (APC); (c) 对抗原肽和限制其呈递的 MHC II 类等位基因特异的 MHC II 类等位基因-限制的 T 细胞杂交瘤。在这种初级培

养物温育的最后，将培养物的上清液等分份转移到第二培养皿中，与依赖于白细胞介素的成淋巴细胞（lymphoblastoid）细胞种系一起温育。通过确定氘化胸苷脱氧核糖（ $^3\text{[H]TdR}$ ）在第二培养物的 HT-2 指示细胞的 DNA 中的吸收量，来测定在初级培养物中从活化的 T 细胞杂交瘤释放的白细胞介素对第二指示细胞的刺激作用。

Ii-Key 核心序列 LRMK (SEQ ID NO: 3) 和 PGCC95-104 (鸽细胞色素 C95-104, IAYLKQATAK (SEQ ID NO: 8)) 之间的杂交体由 E^k 呈递。将肽溶解到磷酸缓冲液盐水 (PBS; 0.01M 磷酸钠缓冲液, PH7.2, 0.1M 氯化钠) 中。通过过滤对溶液除菌。TPc9.1T 杂交瘤对呈递在鼠科动物 II 类 MHC 等位基因 E^k 上的鸽细胞色素 C81-104 肽特异。将表达 H-2 k 等位基因的 CH27 B 细胞淋巴瘤用作为抗原呈递细胞。

通过下列过程测定抗原肽-特异 T 细胞活化作用。通过将 5×10^6 细胞/毫升和 0.25 毫克/毫升的丝裂霉素 C (Sigma) 在 37 °C 在改进 eagle 培养基 (DMEM) /10mM N-2 (羟乙基哌嗪-N' [2-乙磺酸]) (HEPES) 中温育 20 分钟，接着用四倍体积的 DMEM-5% 牛胎血清 (FCS) 冲洗两次产生丝裂霉素 C-处理的 CH28 细胞 ($A^k E^k$) APC。在每次测试前，将 T 细胞杂交瘤在 2200rad 照射。

对于初级培养物的测试，将 5×10^4 丝裂霉素 C-处理的 APC, 5×10^4 T 杂交瘤细胞和从 3 μM 含抗原表位的肽获得的系列 1: 4 稀释液在 PH7.2-7.4, 完全 DMEM-5% FCS, 10mM HEPES, 1X 非必需氨基酸 (Sigma), 1mM 丙酮酸钠, 2mM L-谷氨酰胺, 100U/毫升青霉素 G, 100 μg /毫升硫酸链霉素, $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2-巯基乙醇 (2-ME) 中培养。对仅含 T 杂交瘤细胞 (T) + APC 的培养皿监测背景 T 细胞活化作用；对含 T + APC

+ 抗原肽的培养皿监测每种 AE101 系列肽对非 - 特异 T 杂交瘤的活化作用。将每份培养物的上清液 (20, 40 或 75 μ l 等份) 移出, 24 小时后, 测定它们对 1×10^4 依赖于白细胞介素的 HT-2 成淋巴细胞 (分别加入到 140, 120 或 75 μ l 完全 Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 缓冲液 - 5% FCS 中) 生长的影响, 在 24 小时 HT-2 测试的最后 5 个小时, 掺入 ^3H TdR, 加入 1 μ Ci/培养皿进行测试。对于所有测试, 记录的数值是三个培养皿的平均值, 平均标准误差少于 $\pm 10\%$ 。由于在测试中刺激作用是变化的, 所以, 通常在初级培养物和二级 2-HT 指示培养物中为了比较在不同时间实施的测试, 标准或参考肽都包括在其中。

专利名称(译)	杂交肽调制免疫反应		
公开(公告)号	CN100558395C	公开(公告)日	2009-11-11
申请号	CN00812837.5	申请日	2000-08-25
[标]申请(专利权)人(译)	抗原表达公司		
申请(专利权)人(译)	抗原表达公司		
当前申请(专利权)人(译)	抗原表达公司		
[标]发明人	罗伯特E汉弗莱斯 莎莉伊亚当斯 徐民桢		
发明人	罗伯特·E·汉弗莱斯 莎莉伊·亚当斯 徐民桢		
IPC分类号	A61K38/00 C07K5/00 C12P21/04 G01N33/53 C12Q1/02 A61K39/00 A61K45/00 A61K47/48 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/74 C07K19/00 G01N33/50		
CPC分类号	C07K14/70539 A61K38/00 C07K19/00 G01N33/505		
审查员(译)	吴永庆		
优先权	09/396813 1999-09-14 US		
其他公开文献	CN1373668A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了MHC II类抗原呈递增强杂交体多肽。杂交体具有N-末端，包括哺乳动物Ii-Key肽LRMKLPKPPKPVSKMR(SEQ ID NO: 1)及其保持抗原呈递增强活性的修饰；C-末端，包括结合在MHC II类分子的抗原肽结合位点中的多肽或类肽形式的抗原表位；以及间隔化学结构，共价结合杂交体的N-末端和C-末端。本文也描述了鉴别在MHC II类抗原呈递增强杂交体中以与Ii Key肽等同的方式起作用的分子的方法。本发明还提供了一种增强MHC II类限制性抗原表位向T细胞呈递的方法。本发明还提供了体内和体外方法。本发明还提供了鉴别一种MHC II类抗原呈递作用的化合物的方法。

杂交体	从 Ii	序列	抗原	符号
1	Ac-	间隔基	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 8)	△
2	Ac-LRMK(SEQ ID NO:3)-	Ava-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 8)	○
3	Ac-LRMK(SEQ ID NO:3)-	Ava- Ava-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 8)	□
4	Ac-LRMK -	LPKS-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 9)	●
5	Ac-LRMK -	LPKSA KP-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 10)	■
6	Ac-LRMK -	LPKSA KPVSK-	IAYLKQATAK - NH ₂ (SEQ ID NO: 11)	▼