

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03824149.8

C07K 19/00

A61K 39/09

A61K 39/00

A61P 15/18

A61P 1/04

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1688606A

[22] 申请日 2003.8.12 [21] 申请号 03824149.8

[30] 优先权

[32] 2002.8.12 [33] US [31] 60/402,838

[86] 国际申请 PCT/AU2003/001018 2003.8.12

[87] 国际公布 WO2004/014956 英 2004.2.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.12

[71] 申请人 昆士兰医学研究所理事会

地址 澳大利亚昆士兰

[72] 发明人 戴维·杰克逊 曾伟光

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 15 页 说明书 140 页 序列表 37 页
附图 24 页

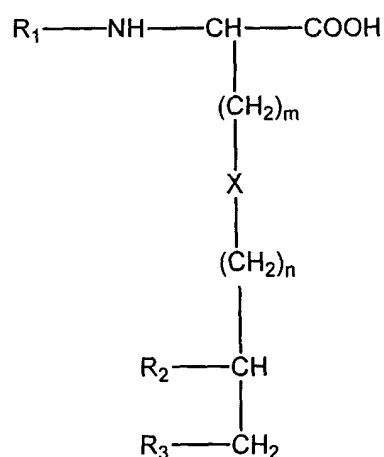
[54] 发明名称 含有辅助 T 细胞和 B 细胞表位的新的免疫原性脂肽

[57] 摘要

本发明提供了含有共线性辅助 T 细胞和 B 细胞表位的合成免疫原性脂肽分子，其制备和用于产生初次和二次免疫应答的方法，及接种受试动物以抗特定抗原的方法。更特别地，本发明提供了高可溶性的脂肽，其中的脂质部分被附着于内部赖氨酸或赖氨酸类似物的末端侧链基团上，优选附着于内部二氨基酸残基的末端侧链基团上。优选该内部赖氨酸或赖氨酸类似物被置于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间或辅助 T 细胞表位里。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1.一种包含缀合于一个或多个脂质部分的多肽的脂肽，其中：
 - (i) 所述多肽包含一氨基酸序列，该序列包含：
 - (a) 一种辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和一种 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所述这两个氨基酸序列是不同的；
和
 - (b) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基，其用于经所述赖氨酸或赖氨酸类似物的 ϵ -氨基或末端侧链基团共价附着所述脂质部分的每一个；和
 - (ii) 所述一个或多个脂质部分的每一个被共价附着到所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或被附着到所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链。
- 2.权利要求 1 的脂肽，其中脂质被附着于赖氨酸残基的 ϵ -氨基上。
- 3.权利要求 1 或 2 的脂肽，其中脂质部分所附着的内部赖氨酸残基被置于 Th 表位和 B 细胞表位之间。
- 4.权利要求 1 或 2 的脂肽，其中脂质部分所附着的内部赖氨酸残基被置于 Th 表位内部。
- 5.包含两个脂质部分的权利要求 1 或 2 的脂肽。
- 6.权利要求 5 的脂肽，其中脂质部分所附着的一个内部赖氨酸残基被置于 Th 表位和 B 细胞表位之间，脂质部分所附着的一个内部赖氨酸残基被置于 Th 表位内部。
- 7.根据权利要求 1-6 中任一项的脂肽，其中脂质部分具有通式 (VII) 的结构：



其中：

(i) X 选自由硫、氧、二硫键(-S-S-)，亚甲基(-CH₂-)和氨基(-NH-)所组成的组；

(ii) m 是整数 1 或 2；

(iii) n 是从 0 到 5 的整数；

(iv) R₁ 选自由氢，羰基(-CO-)和 R'-CO- 组成的组，其中 R' 选自由具有 7-25 个碳原子的烷基，具有 7-25 个碳原子的链烯基和具有 7-25 个碳原子的炔基组成的组，其中所述烷基、链烯基或炔基任选地由羟基、氨基、氧代(OXO)、酰基或环烷基所取代；

(V) R₂ 选自由 R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO- 和 R'-CO-NH-组成的组，其中 R' 选自由具有 7-25 个碳原子的烷基，具有 7-25 个碳原子的链烯基和具有 7-25 个碳原子的炔基组成的组，其中所述烷基、链烯基或炔基任选地由羟基、氨基、氧代、酰基或环烷基所取代；和

(VI) R₃ 选自由 R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO- 和 R'-CO-NH-组成的组，其中 R' 选自由具有 7-25 个碳原子的烷基，具有 7-25 个碳原子的链烯基和具有 7-25 个碳原子的炔基组成的组，其

中所述烷基、链烯基或炔基任选地由羟基、氨基、氧代、酰基或环烷基所取代；

且其中 R_1 , R_2 和 R_3 各自相同的或者不相同。

8.根据权利要求 7 的脂肽,其中 X 是硫, m 和 n 都为 1; R_1 选自氢和 $R'-CO-$,其中 R' 是具有 7-25 个碳原子的烷基; R_2 和 R_3 选自自由 $R'-CO-O-$, $R'-O-$, $R'-O-CO-$, $R'-NH-CO-$ 和 $R'-CO-NH-$ 组成的组,其中 R' 是具有 7-25 个碳原子的烷基。

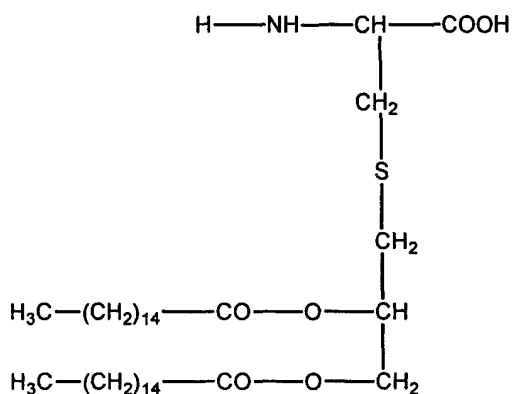
9.根据权利要求 8 的脂肽,其中 R' 选自自由棕榈酰、豆蔻酰、硬脂酰、月桂酰、辛酰和癸酰基组成的组。

10.根据权利要求 9 的脂肽,其中 R' 选自自由棕榈酰、硬脂酰、月桂酰、辛酰和癸酰基组成的组。

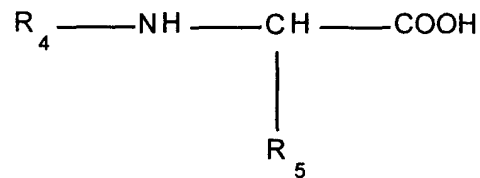
11.根据权利要求 7-10 中任一项的脂肽,其中脂质被包含在选自自由 Pam₂Cys、Pam₃Cys、Ste₂Cys、Lau₂Cys 和 Oct₂Cys 组成的组的脂氨基酸部分的内部。

12.根据权利要求 11 的脂肽,其中的脂氨基酸部分选自自由 Pam₂Cys、Ste₂Cys、Lau₂Cys 和 Oct₂Cys 组成的组

13.根据权利要求 11 的脂肽,其中的脂氨基酸部分具有式 (II) 的结构:



14.根据权利要求 1-6 中任一项的脂肽,其中所述脂质部分具有如下通式(VIII):



其中:

- (i) R_4 选自如下一组: (i)由约 7 个到约 25 个碳原子组成的 α -酰基脂肪酸残基; (ii) α -烷基- β -羟基脂肪酸残基; (iii) α -烷基- β -羟基脂肪酸残基的 β -羟基酯; 和 (iv) 脂氨基酸残基; 和
- (ii) R_5 是氢或氨基酸残基的侧链。

15.根据权利要求 1-14 中任一项的脂肽,其中脂质部分与肽部分被用间隔基分开。

16.权利要求 15 的脂肽,其中的间隔基包括精氨酸、丝氨酸或 6-氨基己酸。

17.权利要求 15 或 16 的脂肽,其中的间隔基由丝氨酸同型二聚体组成。

18.权利要求 15 或 16 的脂肽,其中的间隔基由精氨酸同型二聚体组成。

20.权利要求 15 或 16 的脂肽,其中的间隔基由 6-氨基己酸组成。

21.根据权利要求 1-20 中任一项的脂肽,其中的内部赖氨酸或内部赖氨酸类似物被嵌套在具有低免疫原性的合成氨基酸序列内。

22.根据权利要求 1-21 中任一项的脂肽,其中的辅助 T 细胞表位是流感病毒血凝素的辅助 T 细胞表位或犬瘟热病毒 F (CDV-F) 蛋白的辅助 T 细胞表位。

23.权利要求 22 的脂肽，其中的流感病毒血凝素的辅助 T 细胞表位包含如 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

24.权利要求 23 的脂肽，其中的流感病毒血凝素的辅助 T 细胞表位包含如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

25.权利要求 22 的脂肽，其中的 CDV-F 蛋白的辅助 T 细胞表位包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

26.根据权利要求 1-25 中任一项的脂肽，其中的 B 细胞表位是来自病毒的免疫原性蛋白，脂蛋白或者糖蛋白。

27. 根据权利要求 1-25 中任一项的脂肽，其中的 B 细胞表位是来自原核生物的免疫原性蛋白，脂蛋白或者糖蛋白。

28.根据权利要求 27 的脂肽，其中的 B 细胞表位来自 A 群链球菌的 M 蛋白。

29. 权利要求 28 的脂肽，其中 B 细胞表位包含如 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列。

30. 根据权利要求 1-25 中任一项的脂肽，其中 B 细胞表位来自真核生物免疫原性蛋白、脂蛋白或者糖蛋白。

31.根据权利要求 30 的脂肽，其中真核生物是寄生虫。

32.根据权利要求 30 的脂肽，其中真核生物是哺乳动物。

33.根据权利要求 32 的脂肽，其中 B 细胞表位来自哺乳动物的肽激素。

34.根据权利要求 33 的脂肽，其中肽激素是消化激素或者生殖肽激素。

35.根据权利要求 34 的脂肽，其中消化激素是胃泌素或五肽胃泌素。

36. 根据权利要求 35 的脂肽其包含 SEQ ID NO: 102 或 SEQ ID NO: 113 所示的氨基酸序列。

37.根据权利要求 34 的脂肽，其中生殖激素是促黄体生成激素释放激素（LHRH）或其片段。

38. 根据权利要求 31 的脂肽其包含 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

39.根据权利要求 1-38 中任一项的脂肽，其中多肽包含选自如下一组的一种多肽的氨基酸序列，该多肽包含选自以下一组的一种氨基酸序列：

- (i) GALNNRFQIKGVELKSEHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 5);
- (ii) GALNNRFQIKGVELKSKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 7);
- (iii) KLIPNASLIENCTKAELKHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 9);
- (iv) KLIPNASLIENCTKAELKGLRPG (SEQ ID NO: 13);
- (v) KLIPNASLIENCTKAELHWSYGLRPG (SEQ ID NO: 103);
- (vi) KLIPNASLIENCTKAELGLRPG (SEQ ID NO: 104);
- (vii) KLIPNASLIENCTKAELKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 105);
- (viii) KLIPNASLIENCTKAELKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 106);
- (ix) GALNNRFQIKGVELKSKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 107);
- (x) GALNNRFQIKGVELKSKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO: 108);
- (xi) KLIPNASLIENCTKAELGWMDF (SEQ ID NO: 109);
- (xii) KLIPNASLIENCTKAELKGWMDF (SEQ ID NO: 110);
- (xiii) GALNNRFQIKGVELKSGWMDF (SEQ ID NO: 111); 和
- (xiv) GALNNRFQIKGVELKSKGWMDF (SEQ ID NO: 112).

40.能正调节未成熟的树突细胞（DC）上的 MHC II 类分子的表面表达的根据权利要求 1-39 中任一项的脂肽。

41.权利要求 40 的脂肽，其中的 DC 是 D1 细胞。

42.包含缀合于一个或多个脂质部分的多肽的脂肽，其中：

(i)所述多肽包含有含以下的氨基酸序列：

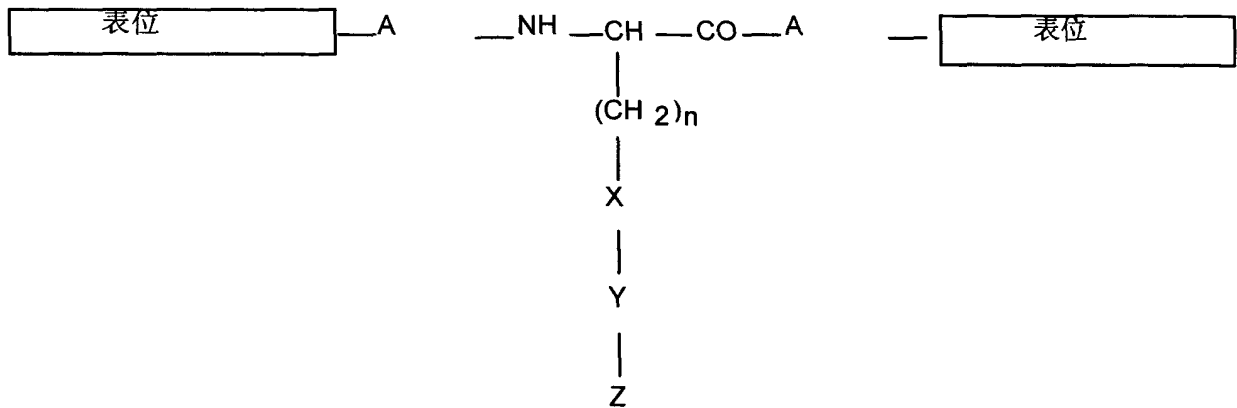
(a) 辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和一种 B 细胞表位的氨基酸序列，其中上述氨基酸序列是不同的；和

(b) 一个或多个内部赖氨酸残基，其用于经所述一个或多个赖氨酸残基的 ϵ -氨基共价附着所述脂质部分的每一个；

(ii)所述一个或多个脂质部分的每一个被共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基；和

(iii)所述脂肽有通式(VI)：

式 (VI)：



其中：

表位 是辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位；

A 或者存在或者不存在，由大约 1 到大约 6 个氨基酸长度的氨基酸间隔基组成；

B 是整数，其值为 1、2、3 或 4；

X 是选自 NH、O 和 S 的末端侧链基团；

Y 或者存在或者不存在，由大约 1 到大约 6 个氨基酸长度的

间隔基组成，其中所述间隔基含有精氨酸、丝氨酸或 6-氨基己酸；和

Z 是选自由 Pam₂Cys, Pam₃Cys, Ste₂Cys, Lau₂Cys 和 Oct₂Cys 组成的组的脂氨基酸。

43. 权利要求 42 的脂肽，其中 A 不存在。

44. 权利要求 43 的脂肽，其中 B 细胞表位包含 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

45. 权利要求 43 的脂肽，其中(i) B 细胞表位包含 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列；(ii) Y 存在并由丝氨酸同型二聚体组成；和(iii) Z 由 Pam₂Cys 组成。

46. 权利要求 45 的脂肽，其中辅助 T 细胞表位包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列，其中脂质通过 SEQ ID NO: 4 内的赖氨酸残基的 ϵ -氨基附着于多肽上。

47. 权利要求 45 的脂肽，其中的脂质部分经 SEQ ID NO: 24 的 Lys-14 附着于多肽上。

48. 权利要求 43 的脂肽，其中：(i) B 细胞表位包含 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列；(ii) Y 存在，且由丝氨酸同型二聚体组成；和(iii) Z 由 Pam₂Cys 组成。

49. 能正调节未成熟的树突细胞 (DC) 上的 MHC II 类分子的表面表达的根据权利要求 42-48 中任一项的脂肽。

50. 权利要求 49 的脂肽，其中的 DC 是 D1 细胞。

51. 一种生产脂肽的方法，包括：

(i) 生产包含一种氨基酸序列的多肽，所述氨基酸序列包含：

(a) 一种辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和一种 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所述氨基酸序列是不同的；和

(b) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基；和

(ii)直接地或间接地将所述一或多个脂质部分共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或附着于所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团，以生产具有被附着于所述内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基的脂质部分或者具有被附着于上述内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团的脂质部分的脂肽。

52. 权利要求 51 的方法，其中的多肽通过化学合成方法合成的。

53. 权利要求 51 或 52 的方法进一步包括生产脂质部分。

54. 权利要求 53 的方法包括合成作为脂氨基酸的脂质部分。

55. 权利要求 54 的方法进一步包括添加间隔基到脂氨基酸的氨基酸部分。

56. 根据权利要求 55 的方法，其中的脂质包含精氨酸同型二聚体或丝氨酸同型二聚体或 6-氨基己酸。

57. 根据权利要求 55 或 56 的方法包括在包括进行缩合、加成、取代或氧化反应的中，经末端羧基添加间隔基到脂氨基酸中。

58. 根据权利要求 55-57 中任一项的方法，其中间隔基包含末端保护氨基酸残基以帮助脂氨基酸缀合到多肽上。

59. 权利要求 58 的方法进一步包括对间隔基的末端保护氨基酸去保护和连接脂氨基酸到多肽上。

60. 权利要求 54 的方法包括在包括进行亲核取代反应的方法中，添加间隔基到多肽的未被修饰的 ϵ 氨基上。

61. 权利要求 60 的方法，其中的多肽具有含单个内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基的氨基酸序列和被封闭的 N-末端。

62. 根据权利要求 60 或 61 的方法，其中的脂质含有精氨酸同型二聚体和丝氨酸同型二聚体或 6-氨基己酸。

63. 包含权利要求 1-50 中任一项的脂肽及药学上可接受的赋形剂或稀释剂的组合物。

64. 权利要求 63 的组合物进一步包含生物学应答修饰剂 (BRM)。

65. 一种在受试者中引起针对抗原性 B 细胞表位的抗体产生的方法, 包括在足以引起产生抗所述抗原性 B 细胞表位的抗体产生的条件下, 对所述受试者施用一段时间的根据权利要求 1-50 中任一项的脂肽或权利要求 63 或 64 的组合物。

66. 根据权利要求 65 的方法, 其中脂肽经鼻内被施用到受试者。

67. 根据权利要求 66 的方法, 其中脂肽通过注射被施用到受试者。

68. 根据权利要求 65-67 中任一项的方法, 包括引起高滴度抗体的产生。

69. 根据权利要求 65-68 中任一项的方法, 其中抗原性 B 细胞表位来自一种病原体, 其中所述方法包括产生该病原体的中和抗体。

70. 根据权利要求 65-69 中任一项的方法, 进一步包括产生针对抗原性 B 细胞表位的单克隆抗体。

71. 一种在受试者体内诱导不育的方法, 包括对所述受试者施用包含有缀合于一个或多个脂质部分的多肽的脂肽, 其中:

(i) 所述多肽包括:

(a) 一种辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和一种生殖激素或激素受体的 B 细胞表位的氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列是不相同的;

(b) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基, 其用于经所述内部赖氨酸的 ϵ -氨基或者经所述内部赖氨酸类似物的末端侧链基团共价附着所述脂质部分的每一个; 和

(c) 所述一个或多个脂质部分的每一个均直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团上; 和

(ii) 所述脂肽在足以引起抗所述抗原性 B 细胞表位的体液免疫应答

条件下被施用一段时间。

72.权利要求 71 的方法，其中脂肽与药学上可接受的赋形剂或稀释剂一起联合施用。

73.权利要求 71 或 72 的方法，其中发生了抗 B 细胞表位的二次免疫应答，足以阻止受试者体内的精子发生、受精、胚胎移植或胚胎发育。

74.根据权利要求 71-73 中任一项的方法，其中抗体水平在被免疫的雌性受试者的至少一个生殖周期内保持不变。

75.根据权利要求 71-74 中任一项的方法，其中 B 细胞表位衍生自促黄体生成激素释放激素（LHRH）的氨基酸序列。

76.权利要求 75 的方法，其中 B 细胞表位包含 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

77.根据权利要求 71-76 中任一项的方法，其中辅助 T 细胞表位包含如 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

78.根据权利要求 71-77 中任一项的方法，其中脂质部分包含选自以下所组成的组的脂氨基酸：(i) Pam₂Cys; (ii) Ste₂Cys; (iii) Lau₂Cys 和(iv) Oct₂Cys。

79.根据权利要求 71-78 中任一项的方法进一步包括生产脂肽。

80.根据权利要求 71-79 中任一项的方法进一步包括测定预先取自受试者的样本中的抗体水平。

81.根据权利要求 71-80 中任一项的方法进一步包括测定受试者的生育力。

82.一种含有根据权利要求 1-50 中任一项的脂肽的避孕药，其中的 B 细胞表位来自生殖激素或激素受体。

83.一种含有根据权利要求 44 的脂肽的避孕药。

84.根据权利要求 44 的脂肽在制备用于降低受试动物繁殖力的避孕药中的用途。

85.一种在个体中诱导抗 A 群链球菌抗原的免疫应答的方法，包括对所述受试者施用含有缀合于一个或多个脂质部分的多肽的脂肽，其中：

(i)所述多肽包括：

(a)一种辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和一种 A 群链球菌抗原的 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所述氨基酸序列是不相同的；

(b)一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基，其用于经所述内部赖氨酸的 ϵ -氨基或者经所述内部赖氨酸类似物的末端侧链基团共价附着所述脂质部分的每一个；和

(c)所述一个或多个脂质部分的每一个均直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团上；和

(ii)所述脂肽在足以引起抗所述抗原 B 细胞表位的体液免疫反应条件下被施用一段时间。

86.权利要求 85 的方法，其中的脂肽与药学上可接受的赋形剂或稀释剂一起被联合施用。

87.权利要求 85 或 86 的方法，其中发生了抗 B 细胞表位的二次免疫反应，足以阻止 A 组链球菌感染的扩散和/或降低随后被 A 组链球菌攻击的受试者中的发病率或死亡率。

88.根据权利要求 85-87 中任一项的方法，其中的 B 细胞表位衍生自 A 组链球菌的 M 蛋白的氨基酸序列。

89.权利要求 88 的方法，其中的 B 细胞表位包含 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列。

90.根据权利要求 85-89 中任一项的方法，其中辅助 T 细胞表位包含如 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

91.根据权利要求 85-90 中任一项的方法，其中的脂质部分包含 Pam₂Cys。

92.根据权利要求 85-91 的方法进一步包括生产脂肽。

93.根据权利要求 85-92 的方法进一步包括测定预先取自受试者的样本中的抗体水平。

94.含有根据权利要求 1-50 中任一项的脂肽的疫苗，其中 B 细胞表位来自 A 组链球菌。

95.含有根据权利要求 45 的脂肽的疫苗。

96.根据权利要求 45 的脂肽在制备用于降低动物受试者的繁殖力的避孕药中的用途。

97.一种在受试者体内诱导抗胃泌素多肽的免疫应答的方法，包括对所述受试者施用包含缀合于一个或多个脂质部分的多肽的脂肽，其中：

(i)所述多肽包括：

(a)一种辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和胃泌素多肽抗原的 B 细胞表位，其中所述氨基酸序列是不同的；

(b) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基，其用于经所述内部赖氨酸的 ϵ -氨基或者经所述内部赖氨酸类似物的末端侧链基团共价附着所述脂质部分的每一个；和

(c)所述一个或多个脂质部分的每一个均直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团上；和

(ii)所述脂肽在足以引起抗所述抗原 B 细胞表位的体液免疫反应的条件被施用一段时间。

98.权利要求 97 的方法，其中脂肽与药学上可接受的赋形剂或稀释剂一起被联合施用。

99.权利要求 97 或 98 的方法，其中发生了抗 B 细胞表位的二次免疫反应，足以防止或阻断需要治疗动物体内的胃酸的分泌。

100.权利要求 99 的方法，其中的动物患有如下一种疾病 hypergastrinemia、Zollinger-Ellison 综合症、胃溃疡、十二指肠溃疡和促胃液素瘤。

101.根据权利要求 97-100 中任一项的方法，其中 B 细胞表位衍生自五肽胃泌素的氨基酸序列。

102.权利要求 101 的方法，其中的 B 细胞表位包含 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列。

103.根据权利要求 97-102 中任一项的方法，其中的辅助 T 细胞表位包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

104.根据权利要求 97-103 中任一项的方法，其中的脂质部分包含 Pam₂Cys。

105.根据权利要求 99-104 中任一项的方法进一步包括生产脂肽。

106. 根据权利要求 97-105 中任一项的方法进一步包括测定预先取自受试者的样本中抗胃泌素的抗体水平。

107.含有根据权利要求 1-50 中任一项的脂肽的疫苗，其中的 B 细胞表位来自胃泌素多肽。

108.含有根据权利要求 46 的脂肽的疫苗。

109.根据权利要求 46 的脂肽在制备降低受试动物体内繁殖力的避孕药中的用途。

110.根据权利要求 65-70 中任一项的方法，其中的抗体包含选自由 IgM、IgA、和 IgG 所组成的组的免疫球蛋白。

111.权利要求 110 的方法，其中免疫球蛋白是 IgM。

112.权利要求 110 的方法，其中免疫球蛋白是 IgA。

113.权利要求 110 的方法，其中免疫球蛋白是 IgG。

114.权利要求 113 的方法, 其中 IgG 选自由 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 组成的组。

含有辅助 T 细胞和 B 细胞表位的新的免疫原性脂肽

发明领域

本发明主要涉及免疫学领域，尤其是用于产生抗体和/或对多肽免疫原的细胞应答的试剂，及用所述试剂来加强受试者的免疫应答或接种受试者的方法。更为特别地，本发明涉及具有被加强的免疫原性活性的脂肽，配剂和含有所述脂肽的疫苗组合物，例如与药学上可接受的载体或赋形剂一起；还涉及制备和使用本发明的这种配方和疫苗组合物的方法。

发明背景

1、概述

本说明书包含基于 Patentln 3.1 版本的氨基酸序列信息，在摘要后列于此。都是。每一条序列在序列表中都可以通过数字指示<210>之后的序列识别符来进行识别（例如：<210>1，<210>2 等）。每条序列的长度及其来源有机体的信息分别通过数字指示<211>和<213>所提供的信息来进行标识。本说明书所涉及的序列是通过序列识别符之后的术语“SEQ ID NO:”进行定义的（例如：SEQ ID NO:1 是指被指定为<400>1 的序列）。

本文中所用术语“来源于”一词，用来说明某种指定的化合物可以从某种具体的原料获得，尽管不必直接来自于该原料。

在本说明书中，除非特别说明，“包含”一词都被理解为意指包含有某一规定的步骤或成分或化合物或者一组规定的步骤或成分或化合物，以及任何其他步骤或成分或化合物或者一组成分或化合物。

本领域技术人员应意识到可容许本发明在明确的描述以外所进行的变化和修改，并且这些变化和修改也应该被包括在本发明之内。本发明也包括在说明书中涉及和指出的所有步骤、特征、成分和化合物中的单一或者是全部形式，以及任意两种或更多步骤或特征的任意和所有组成形式。

本发明并不限于在此所描述的具体实例，在此所描述的具有相同功能的产物、成分及方法也无疑应属于本发明的范围之内。

本申请中所引用的全部参考文献都通过引用被详细地引入本发明。

除非特别指明，本发明是应用分子生物学，微生物学，病毒学，重组 DNA 技术，液相多肽合成，固相多肽合成和免疫学的常规技术，在没有过多的实验的情况下进行的。这些方法被记述在下文中，通过下述参考文献被引入本发明：

1. Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Second Edition (1989), whole of Vols I, II, and III;
2. *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, whole of text;
3. *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed., 1984) IRL Press, Oxford, whole of text, and particularly the papers therein by Gait, pp1-22; Atkinson et al., pp35-81; Sproat et al., pp 83-115; and Wu et al., pp 135-151;
4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, whole of text;

5. Animal Cell Culture: Practical Approach, Third Edition (John R.W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, whole of text;
6. Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, whole of text;
7. Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984);
8. Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), whole of series;
9. J.F. Ramalho Ortigão, "The Chemistry of Peptide Synthesis" In: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany);
10. Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342
11. Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.
12. Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in *The Peptides* (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York.
13. Wünsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart.
14. Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg.
15. Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg.
16. Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474.
17. *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

相关技术描述

免疫疗法或接种疫苗对预防或治疗广泛的机能紊乱具有相当的吸引力，比如某些传染性疾病或癌症。然而，这种治疗方式的应用和成功却部分受制于靶抗原的低免疫原性。许多多肽，糖肽，脂类，脂肽和碳水化合物等是低免疫原性的。几种技术被用于增强受试者机体对多肽免疫原的免疫应答。

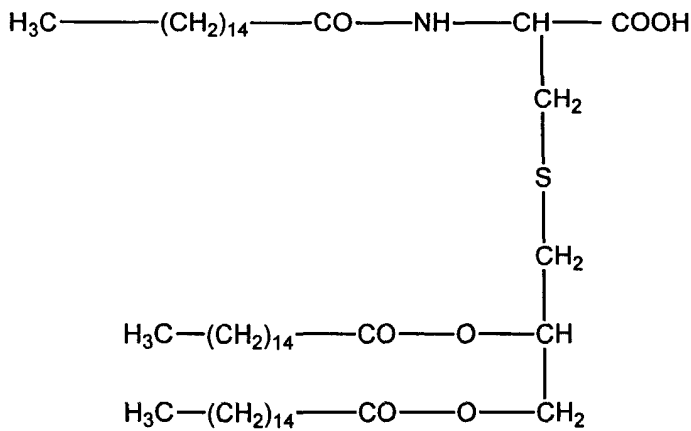
众所周知，可以采用多肽免疫原的外源佐剂配方（即在使用之前与免疫原相混合），例如弗氏完全佐剂（CFA），来增强机体对多肽免疫原的免疫应答。然而目前所能获得的多数佐剂对于用于人类而言毒性过强，或者完全无效。而且，这一类佐剂需要在施用前立即与多肽免疫原进行预混合，这样的配方通常具有较低的溶解性或不溶。

脂肽中所含有的脂质部分可以作为佐剂与多肽免疫原进行共价结合，即可在缺乏外源佐剂的时候增强弱免疫原性多肽的免疫原性 [Jung et al., *Angew Chem, Int Ed Engl* 10, 872, (1985); Martinon et al., *J Immunol* 149, 3416, (1992); Toyokuni et al., *J Am Chem Soc* 116, 395, (1994); Deprez, et al., *J Med Chem* 38, 459, (1995); and Sauzet et al., *Vaccine* 13, 1339, (1995); Benmohamed et al., *Eur. J. Immunol.* 27, 1242, (1997); Wiesmuller et al., *Vaccine* 7, 29, (1989); Nardin et al., *Vaccine* 16, 590, (1998); Benmohamed, et al. *Vaccine* 18, 2843, (2000); and Obert, et al., *Vaccine* 16, 161, (1998)]。合适的脂肽不会产生与佐剂配方相关的有害副作用，并且可以观察到针对于该脂肽的抗体和细胞应答。

已知几种不同的脂肪酸可用于脂质部分中。代表性的脂肪酸包括，但不限于棕榈酰，肉豆蔻酰，硬脂酰和癸酰，或者更普遍地任何 C₂ 到 C₃₀ 的饱和，单不饱和或多不饱和脂酰基都被认为是有益的。

脂氨基酸 N-棕榈酰-S-[2,3-二(棕榈酰氧基)丙基]半胱氨酸，又可被称为 Pam₃Cys 或 Pam₃Cys-OH(Wiesmuller et al., *Z. Physiol.Chem.* 364 (1983), p593), 是横跨革兰氏阴性菌内外膜的 Braun 氏脂蛋白的 N

末端部分的一种合成形式。Pam₃Cys 的结构见于分子式 (I):

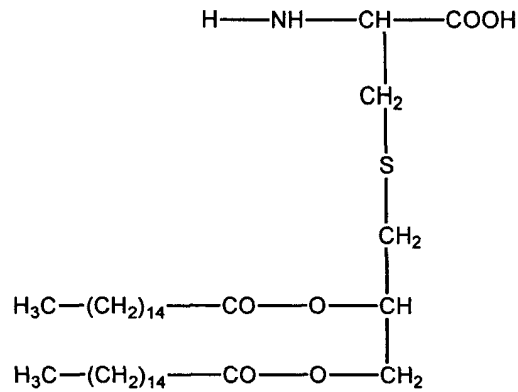


Metzger 等人在其获得的美国专利 No. 5, 700, 910(December 23, 1997)中对数种脂肽制备过程中用做中间体的 N-酰基-S-(2-羟烷基)半胱氨酸进行了描述, 该脂肽可作为合成佐剂, B 淋巴细胞刺激物, 巨噬细胞刺激物或者合成疫苗。Metzger 等人也教导了在合成 Pam₃Cys-OH(Wiesmuller et al., Z. Physiol.Chem. 364, p593, 1983)的过程中, 该化合物以及在其 N 末端含有这种脂氨基酸或其类似物的脂肽作为中间体的应用。

Pam₃Cys 已证明可以刺激流感病毒感染细胞的病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答(Deres et al., Nature 342, 561, 1989), 并可以在与适合的表位结合时, 产生针对于口蹄疫疾病的保护性抗体 (Wiesmuller et al., Vaccine 7, 29, 1989; United States Patent No. 6,024,964 to Jung et al., February 15, 2000)。

最近, Pam₃Cys 的类似物 Pam₂Cys (又名双棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸或 S-[2,3-二(棕榈酰氧基)丙基]半胱氨酸) 已被人工合成 (Metzger, J. W., A. G. Beck-Sickinger, M. Loleit, M. Eckert, W. G. Bessler, and G. Jung. 1995. J Pept Sci 1:184.), 并被证明与从支原体中提取的一种巨噬细胞激活脂肽 MALP-2 的脂质部分相对应(Sacht, G., A. Marten, U. Deiters, R. Sussmuth, G. Jung, E. Wingender, and P. F. Muhlrad. 1998. Eur J Immunol 28:4207; Muhlrad, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R.

Sussmuth, and G. Jung. 1998. *Infect Immun* 66:4804; Muhlradt, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, and G. Jung. 1997. *J Exp Med* 185:1951). Pam₂Cys 的结构见于分子式 (II):



根据报道,对脾细胞和巨噬细胞而言,Pam₂Cys 是一种比 Pam₃Cys 更加有效的刺激物(Metzger et al., *J Pept. Sci* 1, 184, 1995; Muhlradt et al., *J Exp Med* 185, 1951, 1997; and Muhlradt et al., *Infect Immun* 66, 4804, 1998)。

产生针对某一特定抗原的抗体反应需要产生强烈的辅助 T 细胞应答。因此,理想状态下是将一种抗原与至少一种辅助 T 细胞表位一起进行给药(Vitiello et al., *J. Clin. Invest.* 95, 341-349, 1995; Livingston et al., *J. Immunol.* 159, 1383-1392, 1997)。然而,由于辅助 T 细胞应答是由识别抗原呈递细胞(APCs)表面上 MHC II 类分子多肽抗原片断的 CD4⁺ T 细胞所提供的,许多处理后的多肽抗原只表现为 MHC 单倍型的一种或少数几种等位基因型。这就使得针对特定抗原多肽的辅助 T 细胞应答处于个体遗传的严格控制下。

为避免特定群体在对某种抗原的免疫应答中发生大量遗传变异,该抗原是和具有一组辅助 T 细胞表位的一种大分子蛋白联合施用的。

或者,也可以将包含混杂的(promiscuous)或允许的(permissive)辅助 T 细胞表位的多肽与抗原一起联合施用。这些包含混杂的或允许的辅助 T 细胞表位的多肽可以呈现为许多 MHC II 类单倍体型,因此可在远交人群的大多数成员中诱导产生强烈的 CD4⁺ T 细胞反应。这

些混杂的或允许的辅助 T 细胞表位的例子有破伤风毒素多肽、恶性疟原虫 pfg27、乳酸脱氢酶和 HIVgp120 (Contreas et al., *Infect. Immun.* 66, 3579-3590, 1998; Gaudebout et al., *J. A.I.D.S. Human Retrovirol* 14, 91-101, 1997; Kaumaya et al., *J. Mol. Recog.* 6, 81-94, 1993; and Fern and Good *J. Immunol.* 148, 907-913, 1992)。Ghosh 等人 (Ghosh et al., *Immunol* 104, 58-66, 2001) 和国际专利申请 (No. PCT/AU00/00070 (WO 00/46390)) 也描述了来自犬瘟热病毒(CDV-F)融合蛋白的辅助 T 细胞表位。某些混杂的辅助 T 细胞表位诱导针对特定抗原的强烈 B 细胞应答, 并能回避某些单倍体限制性免疫应答(Kaumaya et al., *J. Mol. Recog.* 6, 81-94, 1993)。

通常, 一种疫苗制剂由含有辅助 T 细胞表位和抗原表位的多肽混合物组成, 但是也已知可施用含有辅助 T 细胞表位和抗原表位两者的单一多肽。(Ghosh and Jackson, *Int. Immunol.* 11, 1103, 1999)。

发明概述

在准备本发明的工作中, 发明人力图制备出这样一种高免疫原性的脂肽, 它具有脂质部分和含有辅助 T 细胞表位和抗原 B 细胞表位两者的肽部分抗原 B 细胞, 并期望得到针对上述表位的免疫应答。本发明中的脂肽通过内部赖氨酸或例如鸟氨酸, 二氨基丙酸, 或二氨基丁酸这样的内部赖氨酸类似物的末端侧链氨基将其脂质部分附着于肽部分内。这与先前所描述的 N 末端附着和 C 末端附着大相径庭 (Grass-Masse et al. *Vaccine*, 14, 375, 1996)。

于是, 将上述一个或多个赖氨酸残基或赖氨酸类似物残基在多肽合成时放置于多肽内部的预定位置, 脂质的附着位点可以很容易地确定下来。于是脂肽中脂质部分的定位的目的是提高疫苗或佐剂配方终产物效果。

令人惊奇的是, 发明人发现在许多情况下, 借助于位于辅助 T 细

胞表位与抗原氨基酸序列之间的内部赖氨酸残基的侧链 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团的脂质部分的附着,可以增强脂肽产物的溶解性。

本发明所提供脂肽的一个优势在于它具有足够的免疫原性,因此通常不需要在包含这些脂肽的疫苗配方中加入外源佐剂。

本发明明确包括了位于辅助 T 细胞表位或抗原氨基酸序列内的内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行的脂质部分的附着,仅排除多肽的 N 末端或 C 末端被脂质部分附着的情况。如文中举例说明,发明人明确指出,例如,脂质可以被附着于辅助 T 细胞表位内的内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基,与其中脂质被附着于位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间的赖氨酸的 ϵ -氨基的脂肽相比,不会降低该脂肽产生免疫应答的能力。

“内部”一词的意思是指在除了含有辅助 T 细胞表位和抗原 B 细胞表位的多肽的 N 末端或 C 末端的所有位置。

优选,脂质部分通过位于辅助 T 细胞表位和抗原 B 细胞表位之间的氨基酸序列中的赖氨酸残基的 ϵ -氨基或者内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团被附着于肽部分。

本领域的技术人员熟知,基于商业角度的考虑,非常希望获得抗原的可溶性用于生产疫苗配方。从这个角度来说,发明人已发现本发明中大多数有效的脂肽都是高度可溶的。本发明中的脂肽正调节未成熟树突细胞(DC)上的 MHC II 类分子的表面表达的活性可以反应出该脂肽在缺乏外源佐剂条件下诱导产生抗体应答的相对活性。

举例说明,脂质部分的结构对于最终的脂肽的活性不是必需的,比如包含棕榈酸,月桂酸,硬脂酸或辛酸的脂质部分都可被采用,且不会导致免疫原性的丧失。因此,除非文中特别指明,本发明并不被脂质部分的结构所限制。

同样地,除非文中特别说明,尽管在一般情况下并不必要,本发明也包括将多个脂质部分添加到肽部分上。如文中举例说明,与仅有

单个脂质部分附着的多肽相比较，将多个脂质部分添加到肽部分上，例如添加到辅助 T 细胞表位内的一个位置和添加到位于辅助 T 细胞表位与 B 细胞表位之间的一个位置，这并不会降低该脂肽刺激 IgG 产生的活性。

如前所述，很显然可以很方便地将多肽合成为单条氨基酸链，从而不再需要合成后的修饰来掺入两种表位。

氨基酸间隔可被任意地添加到将被脂质部分附着的内部赖氨酸或赖氨酸类似物的任意一侧，比如，位于辅助 T 细胞和 B 细胞表位之间。

如文中举例说明，发明人通过将脂质部分偶合到位于合成肽部分内的辅助 T 细胞和 B 细胞表位之间的内部赖氨酸残基的暴露 ϵ -氨基上来制备本发明的脂肽，有或没有氨基酸间隔。在这里首选的间隔是丝氨酸二聚体，三聚体，四聚体等。

任一常规类型的间隔都可以在脂质部分和肽部分之间插入。在这里首选的氨基酸间隔包括精氨酸或丝氨酸二聚体，三聚体，四聚体等。可选地，也可以使用 6-氨基己酸间隔。

可供选择的间隔也是可以预期的。比如，可以在与脂质部分进行加成之前，先往内部赖氨酸暴露的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物末端侧链基团上添加一个间隔。

可选地，式 (III) 或 (IV) 的脂氨基酸可以被直接地添加到内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基上或内部赖氨酸类似物末端侧链基团上。

如文中举例说明，当对受试动物施用本发明的脂肽时，可诱导产生针对 B 细胞表位部分的高滴度抗体，而不需要任何佐剂来达到相似的抗体滴度。这一效果也可经过脂肽给药后增强的树突状细胞成熟得到印证(即相对于具有 N 末端结合脂质的脂肽有增强的抗原呈递)。

同样如文中举例说明，本发明中含有抗原 B 细胞表位 LHRH 的脂肽可以在以小鼠模型为代表的哺乳动物中诱导不育。本发明的脂肽可以使得针对于 LHRH 的抗体持续产生，这说明该脂肽在诱导体液

免疫中和作为疫苗制剂中的活性组分的普遍效用。

也如文中举例说明，包含来自于 A 群链球菌（GAS）M 蛋白的抗原 B 细胞表位的本发明的脂肽，可以在以小鼠模型为代表的需要针对 GAS 接种疫苗的人类或其他哺乳动物中诱导保护。这里所提供的数据说明本发明的脂肽可以诱导针对 GAS 的抗体的持续表达（血清 IgG，唾液和粪 IgA），GAS 的调理作用以及抗后续 GAS 攻击的动物存活。这些数据证明了该脂肽对动物机体具有诱导体液免疫和作为抗 GAS 的疫苗制剂中的活性成分的普遍效用。

也如文中举例说明，本发明中含有胃泌素抗原 B 细胞表位（五肽胃泌素）的脂肽可以在以小鼠模型为代表的需要抑制胃酸分泌的其他哺乳动物中诱导抗胃泌素和/或缩胆囊素抗体的持续表达。这里提供的数据都证明了该脂肽可在患有胃酸过多，Zollinger-Ellison 综合症，由于胃酸的过量和不可调分泌导致的胃溃疡或十二指肠溃疡的动物中，诱导产生针对于胃泌素的体液免疫和免疫中和作用，从而阻断胃酸的分泌，或降低或避免在胰腺或十二指肠中形成胃泌素依赖的肿瘤（也就是促胃液素瘤的预防和/或治疗）。

本领域的技术人员应清楚，辅助 T 细胞和 B 细胞表位的性质对本发明而言并不重要。将脂质部分附着于肽部分内的一个或多个内部赖氨酸残基或赖氨酸类似物残基的 ϵ -氨基的新方法才具有广泛的申请空间。所以，基于以上数据，可以理解很大范围的辅助 T 细胞和 B 细胞表位都能用在脂肽结构中。

事实上，本申请所举实例的范围之广，说明了本发明的脂肽在预防和治疗需要产生针对抗原 B 细胞表位的免疫应答的人类和其他哺乳动物的许多不同疾病的普遍性。因此，本发明不局限于对任何具体条件，失调或者疾病状态的治疗。

附图说明

图 1 表示的是合成多肽与脂肽的结构（左）和这些合成多肽与脂肽样本在盐溶液中的相对溶解性（右）。所述多肽被指定如下：

(i)[Th] 为来自于流感病毒血细胞凝集素轻链的一个 CD4⁺ 辅助 T 细胞表位（SEQ ID NO:1）或者来自于 CDV-F 的肽 P25 的 CD4⁺ 辅助 T 细胞（SEQ ID NO:24）；

(ii)[B]为由 LHRH 的残基 1-10（SEQ ID NO:2）或 LHRH 的残基 2-10（SEQ ID NO:3）或 LHRH 的残基 6-10（SEQ ID NO:4）组成的一种 B 细胞表位；一种 A 群链球菌 M 蛋白的 B 细胞表位（肽 J14，SEQ ID NO:101）；或者一种被包含在胃泌素的 C 末端 5 个残基内的胃泌素 B 细胞表位（即五肽胃泌素，SEQ ID NO:102）；

(iii) [Th]-[B]由(i)和(ii)多肽组成（比如，SEQ ID NO:5, 103, 104, 105, 107, 109 或 111）；和

(iv) [Th]-Lys-[B]由被一个赖氨酸残基分隔的(i)和(ii)的多肽组成（比如，SEQ ID NO:7, 9, 13, 106, 108, 110 或 112）。

所述脂肽被指定如下：

(i) Pam₃Cys-[Th]-[B] 由缀合于上述肽[Th]-[B]的 N 末端（即缀合于，例如， SEQ ID NO: 5, 103, 104, 105, 107, 109 或 111 中的任意一个的 N 末端）的式（I）的脂质组成；

(ii) Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 由缀合于上述肽[Th]-[B]的 N 末端（即缀合于，例如， SEQ ID NO 5, 103, 104, 105, 107, 109 或 111 中的任意一个的 N 末端）的式（III）的脂氨基酸组成；

(iii) Pam₂Cys-[Th]-[B] 由缀合于上述肽[Th]-[B]的 N 末端（即缀合于，例如，SEQ ID NO: 5, 103, 104, 105, 107, 109 或 111 中的任意一个的 N 末端）的式（II）的脂质组成；

(iv) Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 由缀合于上述肽[Th]-[B]的 N 末端（即缀合于，例如，SEQ ID NO: 5, 103, 104, 105, 107, 109

或 111 中的任意一个的 N 末端) 的式 (IV) 的脂质组成;

(v) [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B] 由肽[Th]-Lys-[B] (例如, SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110 或 112 中的任意一个) 以及缀合于上述肽的内部赖氨酸 (Lys) 的 ϵ -氨基的式 (I) 的脂质组成;

(vi) [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] 由肽[Th]-Lys-[B] (即 SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110, 或 112 中的任意一个) 和缀合于上述肽内部赖氨酸 (Lys) 的 ϵ -氨基的式 (II) 的脂质组成; 和

(vii) [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] 由依次经内部赖氨酸 (Lys) ϵ -氨基缀合于丝氨酸同型二聚体 (即: 丝氨酸-丝氨酸) 及随后的式 (II) 的脂质的肽[Th]-Lys-[B] (例如 SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110, 或 112 中的任意一个) 组成。因此, 为制备这样的支链脂肽, 两个丝氨酸残基在脂质部分被附着之前就已经被加到了赖氨酸残基的 ϵ -氨基上。

基于流感病毒红细胞凝集素辅助 T 细胞表位(SEQ ID NO: 1)和 LHRH 1-10B 细胞表位(SEQ ID NO: 2)的多肽与脂肽的相对溶解性见于图的右侧, 从低溶解性(-)到高溶解性(++++)。

图 2 表示的是如图 1 中所述脂肽[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] (左)和 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] (右)的溶解性, 其中肽部分的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 5 所示。两种溶液在盐水中的浓度都约为 1mg 脂肽/ml。含有脂肽[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] 的溶液增强的透明度说明了它相对于脂肽 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 来说具有更高的溶解度。

图 3 图示的是使用图 1 中的多肽和脂肽的每一个所获得的抗-LHRH 的抗体滴度, 其中肽部分的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7 所示。被标作 Pam₃Cys-Ser-Lys₄ 阴性对照脂肽, 由缀合于具有氨基酸序列 Ser-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO: 17)的肽的 N 末

端的式 (I) 的脂质组成。所有肽和脂肽都于盐水中进行了皮下(s.c.) 第一次接种 (空心圆) 和第二次接种 (实心圆)。两种未脂化肽 [Th]-Lys-[B]和[Th]-[B]在弗氏完全佐剂(CFA)中进行了第一次接种, 在不完全弗氏佐剂(IFA)中进行了第二次接种。为了对多肽[Th]-[B]和脂肽 Pam₃Cys-S-Lys₄ 进行联合给药, 将多肽溶于盐水中, 并如所示那样以 1: 1 或 1: 5 摩尔比与脂肽进行混合。多肽和脂肽免疫原的给药剂量为 20nmol。在所有情况下, 对照组动物用在弗氏完全佐剂(CFA)中乳化的盐水进行第一次接种, 用在不完全弗氏佐剂(IFA)中乳化的盐水进行第二次接种。

图 4 图示的是在二次抗体应答期间获得或引起的对每一种抗-LHRH 抗体同种型(即 IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 和总 Ig, 横坐标)的抗-LHRH 抗体滴度(log₁₀, 纵坐标), 随后用脂肽 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] (SEQ ID NO: 7)进行接种。鼠用于盐水中的脂肽疫苗通过皮下 (空心方形), 或者鼻内 (实心方形) 二次给药 2 周后进行采血。

图 5 图示的是如图 1 中所示多肽和脂肽(即 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 7)在树突细胞表面提高 MHC II 类分子表达的相对能力。图中肽与脂肽依照图 1 的命名表示在每组中。对每一种多肽和脂肽, 都有 8×10^4 个 D1 细胞被暴露于 4.5 fmole 肽或脂肽并过夜培养。将这些细胞收集, 用 FITC 结合的 anti-I-E^{k,d} 单克隆抗体的进行染色后再采用流式细胞计数对 MHC II 类分子的表达进行检测。每个样本可以分析 3×10^4 个 D1 细胞。显示的数据是四次独立试验的代表, 并显示出增强的单克隆抗体染色 (即增强的 D1 细胞成熟), 随后施用脂肽, 尤其诱导 D1 成熟率接近遭脂多糖 (LPS) 攻击的 D1 细胞所观察到的水平的脂肽[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]。采用未脂化肽[Th]-Lys-[B]得到的数据与在未添加任何肽, 脂肽或脂多糖的培养基中孵育的 D1

细胞完全相同，都呈现出约 26%的自发成熟率。

图 6 图示的是由脂化的[Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B]引起的抗-LHRH 抗体应答，其中[Th]由来源于流感病毒红细胞凝集素轻链的 CD4+ T 细胞表位(SEQ ID NO: 1)组成， [B]是 LHRH 1-10 (SEQ ID NO: 2) 或 LHRH 6-10 (即 LHRH C 末端的 5 个残基; SEQ ID NO: 4)，含有或不含位于脂质部分与肽部分之间的丝氨酸间隔(Ser-Ser)的组成。脂肽 [Th]-Lys(Pam₂Cys)-GlyLeuArgProGly 在结构上与[Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B]相似，区别在于前者含有 SEQ ID NO: 4 替换了 SEQ ID NO: 2。

图 7 图示的是基于辅助 T 细胞表位 P25(SEQ ID NO: 24)和 LHRH 2-10(SEQ ID NO: 3)的不同脂肽构建体的结构数据，HPLC 和质谱数据，其中肽部分具有如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列，脂质部分具有选自(i) Pam₂Cys; (ii) Ste₂Cys; (iii) Lau₂Cys; 和 (iv) Oct₂Cys 所组成的组。在脂质部分和肽部分中间也可以放置不同的间隔，比如：(i) Ser-Ser, 两个丝氨酸残基; (ii) Arg-Arg, 两个精氨酸残基; 和 (iii) Ahx, 6-氨基己酸。脂肽的结构列示于左栏中，脂肽的 HPLC 层析图列示于中栏中，质谱结构列示于图中右栏。

图 8 图示的是如图 7 所述在肽部分和脂质部分之间具有 Ser-Ser 间隔的那些脂肽的免疫原性，其中的脂质部分选自由(i) Pam₂Cys; (ii) Ste₂Cys; (iii) Lau₂Cys; 和(iv) Oct₂Cys 所组成的组。BALB/c 小鼠组(6-8 周龄)用 20nmol 肽免疫原进行皮下第一次接种和第二次接种。所有脂肽都溶于盐水进行给药。未脂化肽[Th]-Lys-[B]被溶于弗氏完全佐剂 (CFA) 进行给药作为对照。在进行第一次接种 (空心圆) 后 4 周和进行第二次接种 (实心圆) 后 2 周采血提取血清。

图 9 图示的来自图 7 的在肽部分和脂质部分之间含有不同间隔的

脂肽免疫原的免疫原性，具体的氨基酸间隔包含丝氨酸同型二聚体(Ser-Ser)，精氨酸同型二聚体(Arg-Arg)或 6-氨基己酸(Ahx)。BALB/c 小鼠(6-8 周龄)被分组并用 20nmol 肽免疫原进行皮下第一次接种和第二次接种。所有脂肽都溶于盐水进行给药。未脂化肽[Th]-Lys-[B]被溶于弗氏完全佐剂(CFA)进行给药作为对照。在进行第一次接种(空心圆)后 4 周和进行第二次接种(实心圆)后 2 周采血提取血清。

图 10 图示的是脂肽构建体[Th](Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]的质量控制数据，其中脂质部分与 SEQ ID NO: 103 所示肽的辅助 T 细胞表位里的内部氨基酸残基(Lys-14)的 ε-氨基相对。脂肽的结构列示于左栏中，脂肽的 HPLC 层析图列示于中栏中，质谱数据列示于图中右栏。

图 11 图示的是如图 10 中所述脂肽免疫原，相对于具有被添加到位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间的内部赖氨酸残基的脂肽免疫原(即脂质部分被添加到如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列上，与 SEQ ID NO: 103 的区别在于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间添加了一个内部赖氨酸)的免疫原性。对照设为具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列的未脂化肽(即[Th]-Lys-[B])。BALB/c 小鼠(6-8 周龄)被分组并用 20nmol 肽免疫原进行皮下第一次接种和第二次接种。所有脂肽都溶于盐水进行给药。未脂化肽[Th]-Lys-[B]被溶于弗氏完全佐剂(CFA)中施用作为对照。在进行第一次接种(空心圆)后 4 周和进行第二次接种(实心圆)后 2 周采血提取血清。脂肽构建体[Th](Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]的脂质部分附着于辅助 T 细胞表位内的赖氨酸残基(Lys-14)的 ε-氨基。脂肽结构[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]的脂质部分附着于两种肽表位间的赖氨酸残基的 ε-氨基。

图 12 图示的是包含辅助 T 细胞表位 P25(SEQ ID NO: 24)和 A 群链球菌 B 细胞表位("J14"; SEQ ID NO: 101)以及具有 SEQ ID NO: 106

所示的氨基酸序列和一个或两个脂质部分的脂肽在小鼠体内产生血清 IgG 的活性。所有被检测的脂肽都含有附着于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间的内部赖氨酸的脂氨基酸部分 Pam₂Cys-Ser-Ser。在脂肽 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14] 中这是唯一的脂质部分，在脂肽 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14] 中，一个额外的脂氨基酸部分 Pam₂Cys-Ser-Ser 被添加到辅助 T 细胞表位的 N 末端氨基酸。其他的免疫原如下，J14，由含有 J14 B 细胞表位的肽 (SEQ ID NO: 101) 组成的未脂化肽；[Th]-[J14]，一种由辅助 T 细胞表位 (SEQ ID NO: 24) 和 J14 肽 (SEQ ID NO: 101) 组成的未脂化肽，其具有 SEQ ID NO: 106 的氨基酸序列；一种由辅助 T 细胞表位 (SEQ ID NO: 24) 和含 LHRH B 细胞表位的肽 (SEQ ID NO: 3) 组成的脂肽，其具有 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列；和磷酸盐缓冲液 (PBS)。用含 60ug 基于肽的疫苗，总体积 30ul PBS 对 4-6 周龄 (15 只/组) 的雌性远交 Quackenbush 小鼠进行鼻内接种。总共进行三次免疫，每次间隔 21 天。在最后一次免疫 7 天后从小鼠的尾静脉采血以检测 J14 特异性血清 IgG。接受任何含有 J14 脂肽免疫的小鼠都比对照组具有显著提高的血清 IgG 滴度 (P<0.05)。

图 13 图示的是如图 12 中所述由未脂化肽和脂肽产生的抗血清的调理能力。用含 60ug 基于多肽的疫苗，总体积 30ul PBS 对 4-6 周龄 (15 只/组) 的雌性远交 Quackenbush 小鼠进行鼻内接种。总共进行三次免疫，每次间隔 21 天。通过在体外的间接杀菌试验来确定来自免疫小鼠的血清调理或杀死 M1 GAS 菌株的活性。采集自接受任何含有 J14 脂肽免疫的小鼠的血清都比采集自对照组肽或脂肽或 PBS 的动物具有显著提高的杀死 GAS 的能力 (P<0.05)。

图 14 图示的是如图 12 种所述的未脂化肽和脂肽刺激小鼠产生唾液 IgA 的能力。用 60ug 各基于多肽的疫苗，总体积 30ul PBS 对 4-6

周龄（15 只/组）的雌性远交 Quackenbush 小鼠进行鼻内接种。总共进行三次免疫，每次间隔 21 天。在最后一次免疫 8 天后收集个体小鼠的唾液，通过标准 ELISA 的方法检测 J14 特异性唾液 IgA 抗体滴度。接受任何含有 J14 脂肽接种的小鼠都比用对照组多肽或脂肽或 PBS 免疫的对照组具有显著提高的抗体滴度($P<0.05$)。

图 15 图示的是如图 12 中所示的含有 J14 肽的未脂化肽和脂肽在小鼠中产生粪 IgA 的能力。用 $60\mu\text{g}$ 基于肽的疫苗，总体积 $30\mu\text{l}$ PBS，对 4-6 周龄（15 只/组）的雌性远交 Quackenbush 小鼠进行鼻内接种。总共进行三次免疫，每次间隔 21 天。在最后一次免疫 6 天后对粪 IgA 进行检测。只有接受其中脂质部分位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间(即[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14])的含有 J14 的单脂化肽接种的小鼠才具有显著的粪 IgA 抗体滴度($P<0.05$)。

图 16 图示的是如图 12 所述采用未脂化肽和脂肽进行免疫后小鼠对细菌攻击的存活能力。在最后一次抗原给药后两周，对小鼠用 M1 GAS 菌株进行鼻内攻击，并在其后的不同时间段测定其存活情况。感染后，接受其中脂质部分位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间(即[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14])的含有 J14 的单脂化肽接种的小鼠具有最高的存活率。

图 17 图示的是基于胃泌素的脂肽免疫原的免疫原性。用 20mmol 多肽免疫原对 BALB/c 小鼠组（5 只/组，6-8 周龄）进行尾基皮下给药。采用的肽为胃泌素-17 (SEQ ID NO: 113)和[P25]-Lys-[五肽胃泌素] (SEQ ID NO: 110)，其中的五肽胃泌素是如(SEQ ID NO: 102)所示的胃泌素的 C 末端序列 GW MDF；和[P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[五肽胃泌素] (SEQ ID NO: 110，其脂质部分结合于内部赖氨酸残基上)。所有脂肽都溶于 PBS 进行给药，未脂化肽被溶于弗氏完全佐剂（CFA）中

进行给药。将以弗氏完全佐剂（CFA）乳化的盐水设为阴性对照。在进行免疫4周后收获血清，同时以相似剂量的抗原进行二次免疫。在二次免疫2周后再次采血，并用ELISA检测能与胃泌素-17序列反应的抗体。其结果以抗胃泌素17的抗体滴度表示。

优选实施例的详细描述

脂肽：

本发明的一个方面提供了含有一种含有被缀合于一个或多个脂质部分的多肽的分离的脂肽，其中：

(i) 所述多肽包含一氨基酸序列，该序列包含：

(a) 一种辅助T细胞（Th）表位的氨基酸序列和一种B细胞表位的氨基酸序列，其中所述氨基酸序列是不同的，和

(b) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基，其用于经所述赖氨酸或赖氨酸类似物的 ϵ -氨基或末端侧链基团共价附着于所述脂质部分的每一个；和

(ii) 所述一个或多个脂质部分的每一个被直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸的 ϵ -氨基，或被附着于所述内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团。

在这里，“脂肽”一词的是指任何非自然形成的物质组合物，这样的组合物包含一种或多种脂质部分和被直接地或间接地缀合的一种或多种氨基酸序列，所述组合物基本上不含非特异性非缀合的脂质或蛋白。

“直接”一词的意思是一个脂质部分和一段氨基酸序列没有被间隔分子分开。

“间接”一词的意思是一个脂质部分和一段氨基酸序列被一个含有一或多个含碳的分子的间隔所分隔，比如一个或多个氨基酸残基。

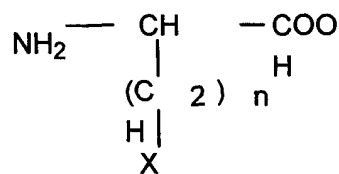
氨基酸序列的长度可以任意，只要其范围符合同同时具有辅助T细

胞表位和 B 细胞表位的功能的长度即可。

“内部赖氨酸残基”意思是指同时含有辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位的多肽中的赖氨酸残基，其中所述赖氨酸既不是所述多肽的 N 末端氨基酸残基，也不是 C 末端残基。这意味着脂质部分所附着的内部赖氨酸残基是存在于辅助 T 细胞表位的氨基酸序列内或抗原氨基酸序列内的残基。内部赖氨酸残基也可以独立于这两个多肽表位，但在这种情况下该赖氨酸残基必须连接多肽的这两种表位。

同样的，“内部赖氨酸类似物残基”意思是指同时含有辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位的多肽内的赖氨酸类似物残基，其中所述赖氨酸类似物既不是所述多肽的 N 末端氨基酸残基，也不是 C 末端残基。确定一个赖氨酸残基是否是“内部”赖氨酸残基的标准经适应性修改也适用于确定某个赖氨酸类似物是否是内部的。

“赖氨酸类似物”一词的意思是一种可以被掺入到肽内部的合成化合物，其具有适合于脂质部分结合的侧链基团，该化合物包括氨基酸类似物或含有这样氨基侧链基团的非天然存在的氨基酸。优选的赖氨酸类似物包括以下通式 (V) 中的化合物：



其中，n 代表从 0 到 3 的整数，X 是选自由 NH，O 和 S 所组成的组的所述内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团。优选 n 是从 1 到 3 的整数。优选 X 是氨基，且赖氨酸类似物是一种二氨基化合物。在其中一个优选实施例中，赖氨酸类似物选自于由 2,3-二氨基丙酸 (Dpr)，2,4-二氨基丁酸 (Dab) 和 2,5-二氨基戊酸[即鸟氨酸 (Orn)] 所组成的组。

本领域中技术人员都已知术语“ε-氨基”的意思。

术语“末端侧链基团”是指赖氨酸类似物侧链上，远离所述类似物 α 碳原子的一个取代基团，例如 2,3-二氨基丙酸的 β 氨基，2,4-二氨基丁酸的 γ 氨基或者是鸟氨酸的 δ 氨基。

发明人发现最有效的脂肽都是高度可溶的。本发明中脂肽在缺乏外源佐剂时诱导抗体应答的相对活性，可以通过它们正调节未成熟树突细胞(DC)，尤其是如 Winzler 等人所描述的 D1 细胞(J Exp Med 185, 317, 1997) 上的 MHC II 类分子的表面表达活性反映出。

本领域技术人员都熟知，赖氨酸中的 ϵ -氨基是该氨基酸中的侧链末端氨基。使用赖氨酸的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团与脂质部分进行交联，有助于作为共-线性氨基酸序列的多肽部分合成，并同时掺入了辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位。其中脂质经赖氨酸残基的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物末端侧链基团附着的脂肽与具有经赖氨酸的 α -氨基附着的脂质的脂肽有明显的结构上的区别，因为后者脂肽仅可将脂质部分缀合于 N-末端残基。

因此，尤其优选那些脂质部分所附着的至少一个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物位于多肽部分内，用来分隔具有免疫学功能性的表位。比如，内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基可以作为一种表位之间的一种间隔和/或连接残基。在自然条件下，当内部赖氨酸或内部赖氨酸类似物位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间时，脂质部分将附着于这些表位之间的某个位置，虽然这样会使得多肽的氨基酸序列形成一个新的分支。优选，采用单个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物来分隔 B 细胞与辅助 T 细胞表位(例如， SEQ ID NO: 7, 9, 13, 106, 108, 110 或 112 中的任何一个)，在这样的情况下，脂质部分经位于辅助 T 细胞表位和抗原 B 细胞表位之间氨基酸序列间的赖氨酸残基的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团被附着。

内部赖氨酸的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团可以通过化学基团进行保护，这些化学基团与那些用来保护其它氨基酸的 α -氨基和侧链功能基团互成直角。这样，赖氨酸的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团就可以被选择性的暴露出来，以允许化学基团，比如含脂质的部分，特异性地附着于恰当的 ϵ -氨基或末端侧链基团。

采用 Fmoc 化学方法进行多肽的合成，可以通过被修饰的氨基酸残基 Fmoc-Lys(Mtt)-OH ($N\alpha$ -Fmoc- $N\epsilon$ -4-甲基三苯甲基-L-赖氨酸)提供被适当正交 (orthogonally) 保护的赖氨酸的 ϵ 氨基。同样也可以预期可以得到类似的被适当正交保护的不同赖氨酸类似物的侧链基团，比如 Fmoc-Orn(Mtt)-OH ($N\alpha$ -Fmoc- $N\delta$ -4-甲基三苯甲基-L-鸟氨酸)，Fmoc-Dab(Mtt)-OH ($N\alpha$ -Fmoc- $N\gamma$ -4-甲基三苯甲基-L-二氨基丁酸)和 Fmoc-Dpr(Mtt)-OH ($N\alpha$ -Fmoc- $N\beta$ -4-甲基三苯甲基-L-二氨基丙酸)。在存在于赖氨酸或赖氨酸类似物 α -氨基的 Fmoc 基团被去除的条件下，侧链保护基团 Mtt 是稳定的，但其可以用溶于二氯甲烷的 1%三氟乙酸选择性去除。Fmoc-Lys(Dde)-OH ($N\alpha$ -Fmoc- $N\epsilon$ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)乙基-L-赖氨酸)或 Fmoc-Lys(ivDde)-OH ($N\alpha$ -Fmoc- $N\epsilon$ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)-3-甲基丁基-L-赖氨酸)也可以应用，其中 Dde 侧链保护基团可以在肽合成过程中通过肼处理选择性地被去除。

Boc-Lys(Fmoc)-OH 可用于 Boc 化学法合成，侧链保护基团 Fmoc 可以通过哌啶或 DBU (1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯)处理进行选择去除，但是当用三氟乙酸对 α 末端的 Boc 基团进行去除时，Fmoc 仍继续存在。

对每一种辅助 T 细胞表位，B 细胞表位和脂的结合来说，辅助 T 细胞表位与 B 细胞表位之间的最适距离，以及随之而来的本发明中脂肽内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基的精确定位和数量，很容易根据经验来确定。就合成肽与多肽来说，对用于制备多肽的合成方法的限制可以部分决定可实现的辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间的分隔，

以及内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基的数量和定位。

优选，辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位至少被包含一个内部赖氨酸残基或赖氨酸类似物残基的一个或两个或三个或四个或五个氨基酸残基所分隔。

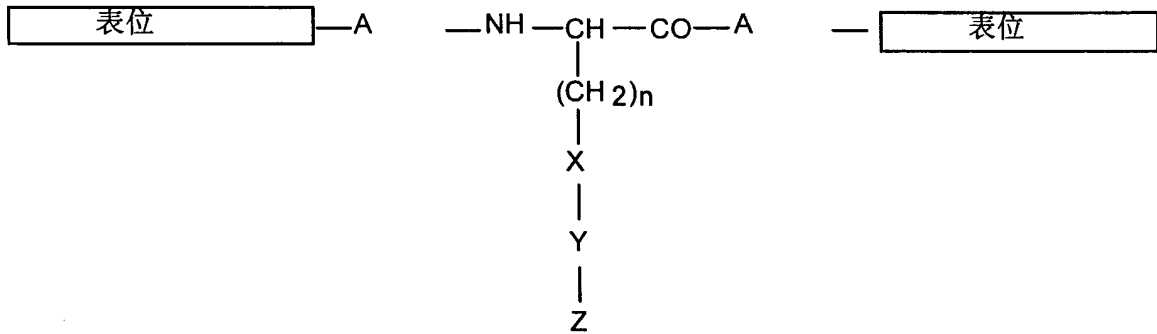
很清楚，本发明致力于将多个脂质部分连接到多肽部分上。为了达到这个目的，多肽可以包含多个内部赖氨酸残基或多个内部赖氨酸残基类似物以及它们的混合形式。在与脂质部分相连时，如果多个内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基的位置过于紧密时，会产生空间位阻的情况，从而导致终产物的混合，或者是产率的降低。

与此相应的一种考虑情况是这样一种事实，即并不需要含有辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位的完整氨基酸序列，才能具有免疫功能。从而，同时包含上述表位的上述氨基酸序列可以拥有不具有辅助 T 细胞活性或 B 细胞表位的额外序列。额外序列含有一个或多个内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基，这些残基的末端侧链基团可以作为脂质部分的附着位点。自然地，必须保留辅助 T 细胞与 B 细胞表位的功能。

用于脂质部分附着的内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物的定位也应该经过选择，这样才能使得在施用了脂肽的受试者中，脂质部分的附着不会影响到辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位的免疫功能。比如，依赖于对脂质部分的选择，所述脂质部分在 B 细胞表位内的附着可以在空间上阻碍抗原呈递。

本发明的脂肽的一种通用的优选形式，其中内部赖氨酸或内部赖氨酸类似物被放置于辅助 T 细胞和 B 细胞表位之间，由通式 (VI) 所提供。

式 (VI)



其中:

表位 是辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位;

A 存在或不存在, 由一个约 1 到 6 个氨基酸长度的氨基酸间隔组成;

n 是 1, 2, 3 或 4 的整数;

X 是选自由 NH, O 和 S 所组成的组的末端侧链基团, 优选含有 NH;

Y 存在或不存在, 由一个约 1 到 6 个氨基酸长度的间隔组成, 其中优选所述间隔包含精氨酸, 丝氨酸或 6-氨基己酸; 和

Z 是脂质部分, 优选一种选自由 Pam₂Cys, Pam₃Cys, Ste₂Cys, Lau₂Cys 和 Oct₂Cys. 所组成的组的脂氨基酸部分。

本领域的技术人员应该意识到, Ste₂Cys 也可称为 S-[2,3-二(硬脂酰氧基)丙基]半胱氨酸或二硬脂酰-S-丙三基-半胱氨酸; Lau₂Cys 也可称为 S-[2,3-双(月桂酰氧基)丙基]半胱氨酸或二月桂酰-S-丙三基-半胱

氨酸；Oct₂Cys 也可被称为 S-[2,3-二(辛酰氧基)丙基]半胱氨酸或二辛酰基-S-丙三基-半胱氨酸。

辅助 T 细胞表位是指任意一种本领域的技术人员已知的用以提高特定的目标受试者（即人类，或一种特定的非人类动物，比如小鼠，大鼠，豚鼠，狗，马，猪或山羊）体内的免疫应答的辅助 T 细胞表位。优选辅助 T 细胞表位包含至少约 10 到 24 残基长度的氨基酸，更普通的情况是包含约 15 到 20 个残基长度的氨基酸。

尤其优选混杂的或允许的辅助 T 细胞表位，因为它们很容易经化学合成而且不需要使用含有多个辅助 T 细胞表位的长多肽。

适合应用于本发明脂肽的混杂的或允许的辅助 T 细胞表位的实例，是选自由以下所组成的组：

- (i) 一种啮齿动物或人类破伤风毒素肽（TTP）的辅助 T 细胞表位，比如 TTP 的氨基酸第 830 位-第 843 位（Panina-Bordignon 等, Eur. J. Immun. 19, 2237-2242, 1989）；
- (ii) 一种啮齿动物或人类恶性疟原虫 pfg27 的辅助 T 细胞表位；
- (iii) 一种啮齿动物或人类乳酸脱氢酶的辅助 T 细胞表位；
- (iv) 一种啮齿动物或人类 HIV 或 HIVgp120 包膜蛋白的辅助 T 细胞表位（Berzofsky 等, J. Clin. Invest. 88, 876-884, 1991）；
- (v) 一种从已知锚定蛋白氨基酸序列（Alexander 等, Immunity 1, 751-761, 1994）预测的合成的人辅助 T 细胞表位（PADRE）；
- (vi) 一种啮齿动物或人类麻疹病毒融合蛋白的辅助 T 细胞表位（MV-F; Muller 等, Mol. Immunol. 32, 37-47, 1995; Partidos et al., J. Gen. Virol., 71, 2099-2105, 1990）；
- (vii) 一种含有犬瘟热病毒融合蛋白（CDV-F）的至少约 10 个氨基酸残基的辅助 T 细胞表位，例如 CDV-F 的氨基酸第 148-第 283 位

(Ghosh 等, Immunol. 104, 58-66, 2001; 国际专利公开号 WO 000/46390);

(viii) 一种从 MUC1 粘蛋白 (美国专利申请号 No.0020018806) 胞外串联重复结构域多肽序列衍生而来的人类辅助 T 细胞表位;

(ix) 一种啮齿动物或人类流感病毒血细胞凝集素 (IV-H) (Jackson 等, Virol. 198, 613-623, 1994) 的辅助 T 细胞表位; 和

(x) 一种牛或骆驼口蹄疫病毒 (FMDV-0₁ Kaufbeuren 病毒株) 的 VP3 蛋白的辅助 T 细胞表位, 它包含 VP3 的残基第 173 位-176 位或与另一 FMDV 病毒株相应的氨基酸序列。

如本领域技术人员所熟知, 一种辅助 T 细胞表位可以为一种或多种不同哺乳动物所识别。由此, 在这里对任意辅助 T 细胞表位的命名并不应被认为限制了其中表位能被识别的物种的免疫系统。比如, 一种啮齿动物辅助 T 细胞表位可以被小鼠, 大鼠, 兔, 豚鼠, 以及其他啮齿动物, 或人类, 或狗的免疫系统所识别。

更优选辅助细胞表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列:

- (i) 来自 IV-H 的 GALNNRFQIKGVELKS (SEQ ID NO:1);
- (ii) 来自 IV-H 的 ALNNRFQIKGVELKS (SEQ ID NO:18);
- (iii) 来自 MV-F 的 LSEIKGVIVHRLEGV (SEQ ID NO:19);
- (iv) 来自 CDV-F 的 TAAQITAGIALHQSNLN (SEQ ID NO:20);
- (v) 来自 CDV-F 的 IGTDNVHYKIMTRPSHQ (SEQ ID NO:21);
- (vi) 来自 CDV-F 的 YKIMTRPSHQYLVIKLI (SEQ ID NO:22);
- (vii) 来自 CDV-F 的 SHQYLVIKLIPNASLIE (SEQ ID NO:23);
- (viii) 来自 CDV-F 的 KLIPNASLIENCTKAEL (SEQ ID NO:24);
- (ix) 来自 CDV-F 的 LIENCTKAELGEYEKLL (SEQ ID NO:25);

- (x) 来自 CDV-F 的 AELGEYEKLLNSVLEPI (SEQ ID NO:26);
- (xi) 来自 CDV-F 的 KLLNSVLEPINQALTLM (SEQ ID NO:27);
- (xii) 来自 CDV-F 的 EPINQALTLMTKNVKPL (SEQ ID NO:28);
- (xiii) 来自 CDV-F 的 TLMTKNVKPLQSLGSGR (SEQ ID NO:29);
- (xiv) 来自 CDV-F 的 KPLQSLGSGRRQRRFAG (SEQ ID NO:30);
- (xv) 来自 CDV-F 的 SGRRQRRFAGVVLAVAGVA (SEQ ID NO:31);
- (xvi) 来自 CDV-F 的 FAGVVLAVAGVALGVATAA (SEQ ID NO:32);
- (xvii) 来自 CDV-F 的 GVALGVATAAQITAGIA (SEQ ID NO:33);
- (xviii) 来自 CDV-F 的 GIALHQSNLNAQAIQSL (SEQ ID NO:34);
- (xix) 来自 CDV-F 的 NLNAQAIQSLRTSLEQS (SEQ ID NO:35);
- (xx) 来自 CDV-F 的 QSLRTSLEQSNKAIEEI (SEQ ID NO:36);
- (xxi) 来自 CDV-F 的 EQSNKAIEEIREATQET (SEQ ID NO:37);
- (xxii) 来自 CDV-F 的 SSKTQTHTQQDRPPQPS (SEQ ID NO:38);
- (xxiii) 来自 CDV-F 的 QPSTELEETRTRSRARHS (SEQ ID NO:39);
- (xxiv) 来自 CDV-F 的 RHSTTSAQRSTHYDPRT (SEQ ID NO:40);
- (xxv) 来自 CDV-F 的 PRTSDRPVSYTMNRTRS (SEQ ID NO:41);
- (xxvi) 来自 CDV-F 的 TRSRKQTSHRLKNIPVH (SEQ ID NO:42);
- (xxvii) 来自 CDV-F 的 TELLISIFGPSLRDPISA (SEQ ID NO:43);
- (xxviii) 来自 CDV-F 的 PRYIATNGYLISNFDES (SEQ ID NO:44);
- (xxix) 来自 CDV-F 的 CIRGDTSSCARTLVSGT (SEQ ID NO:45);
- (xxx) 来自 CDV-F 的 DESSCVFVSESAICSQN (SEQ ID NO:46);
- (xxxii) 来自 CDV-F 的 TSTIINQSPDKLLTFIA (SEQ ID NO:47);
- (xxxiii) 来自 CDV-F 的 SPDKLLTFIASDTCPLV (SEQ ID NO:48);
- (xxxiiii) 来自 MUC-1 的 STAPPAHGVTSAPDTRAPGSTAPP (SEQ ID NO:49);
- (xxxv) 来自 MUC-1 的 GVTSAPDTRPAPGSTASSL (SEQ ID NO:50);
- (xxxvi) 来自 MUC-1 的 GVTSAPDTRPAPGSTASL (SEQ ID NO:51);

- (xxxvi) 来自 MUC-1 的 TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPKKG (SEQ ID NO:52);
- (xxxvii) 来自 MUC-1 的 STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK (SEQ ID NO:53);
- (xxxviii) 来自 FMDV-VP3 蛋白的 GVAE (SEQ ID NO:54);
- (xxxix) 来自 FMDV-VP3 蛋白的 TASGVAETTN (residues 170 to 179) (SEQ ID NO:55); 以及
- (xl) 来自 FMDV 的 TAKSKKFPSYTATYQF (SEQ ID NO:56)。

在这里所公开的辅助 T 细胞表位的目的是仅用于例举。采用本领域技术人员已知的标准多肽合成技术, 可以很容易用其他不同的辅助 T 细胞表位取代在这里所提到的辅助 T 细胞表位, 使本发明中的脂肽适用于不同的物种。因此, 并不排除本领域研究人员所熟知的, 对引起或增强靶物种免疫应答有用的额外辅助 T 细胞表位。

采用体外 T 细胞刺激技术的详细分析可以鉴定额外辅助 T 细胞表位的组分蛋白质, 蛋白质片断和多肽进行详细地鉴定, 进而鉴定出适合的序列(Goodman 和 Sercarz, *Ann. Rev. Immunol.*, 1, 465, (1983); Berzofsky, In: "The Year in Immunology, Vol. 2"第 151 页, Karger, Basel, 1986; 以及 Livingstone 和 Fathman, *Ann. Rev. Immunol.*, 5, 477, 1987)。

B 细胞表位可以方便地衍生自病毒, 原核或真核有机体的免疫原性蛋白质, 脂蛋白或糖蛋白的氨基酸序列, 包括但不限于衍生自哺乳动物受试者或细菌, 真菌, 原生动物或感染了所述受试者的寄生虫的抗原。针对其期望获得免疫应答的独特型及抗独特型 B 细胞表位被明确包括在内, 比如脂质修饰的 B 细胞表位。或者, B 细胞表位可以是一种碳水化合物抗原, 比如一种 ABO 血型抗原, 移植抗原 (比如 Gal α 1-3Gal β -4N-乙酰-D-葡萄糖胺; Sandrin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11391-11395, 1993; Galili et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84,

1369-1373, 1987; Schofield et al., Nature 418: 785-789, 2002) 或其缀合物。

当对哺乳动物施用, B 细胞表位可以引起抗体的生成, 优选中和抗体, 更优选高滴度的中和抗体。

优选较短的 B 细胞表位用以促进肽的合成。

优选 B 细胞表位不超过约 30 个氨基酸长度。更优选 B 细胞表位序列不超过约 25 个氨基酸残基或更短, 更优选少于 20 个氨基酸残基更优选只有约 5-20 个氨基酸残基长度。

优选合成多肽呈现出模拟天然多肽构象的构象, B 细胞表位衍生自该天然多肽。

优选来源于寄生虫的 B 细胞表位与有利什曼原虫, 疟疾, 锥虫病, 巴倍虫病或血吸虫病相关, 比如, 选自由以下所组成的组的 B 细胞表位:

(i) 一种恶性疟原虫的 B 细胞表位(NANP) 3 (Good et al., J. Exp. Med. 164, 655 1986);

(ii) 一种疟原虫环孢子的 B 细胞表位(Good et al, Protein Sci., 235, 1059, 1987);

(iii) 一种含有 *Leishmania donovani* 重复多肽第 326-343 位氨基酸残基的 B 细胞表位(Liew 等, J. Exp. Med. 172, 1359 (1990));

(iv) 一种 *Schistosoma gondii* P30 表面蛋白的 B 细胞表位(Darcy 等, J. Immunol. 149, 3636 (1992)); 以及

(v) 一种 *Schistosoma mansoni* Sm-28GST 抗原(Wolowxzuk et al., J. Immunol 146:1987 (1991))的 B 细胞表位。

优选病毒特异性 B 细胞表位来自于轮状病毒, 疱疹病毒, 冠状病毒, 细小核糖核酸病毒 (即 Aphovirus), 呼吸道合胞病毒, 流感病毒, 副流感病毒, 腺病毒, 痘病毒, 牛疱疹病毒 I 型, 牛病毒性腹泻

病毒，牛轮状病毒，犬瘟热病毒 (CDV)，马鼻炎 A 型病毒 (ERAV)，马鼻炎 B 型病毒 (ERBV)，口蹄疫病毒 (FMDV)，麻疹病毒 (MV)，人免疫缺陷病毒 (HIV)，猫免疫缺陷病毒 (FIV)，埃-巴二氏病毒 (EBV)，或肝炎病毒等，和/或可产生针对上述病毒的抗体。适合的病毒性 B 细胞表位包括且不限于来自于选自由下列物质所组成的组的表位：

- (i) HIV gp120 V3 环,氨基酸残基 308-311 (Jatsushita 等, J. Virol. 62, 2107 (1988));
- (ii) HIV gp120 氨基酸残基 428-443 (Ratner et al., Nature 313:277 (1985));
- (iii) HIV gp120 氨基酸残基 112-124 (Berzofsky et al, Nature 334, 706 (1988));
- (iv) 一种 HIV 逆转录酶的 B 细胞表位(Hosmalinet al. Proc. Natl Acad. Sci.(USA) 87, 2344 (1990));
- (v) 流感病毒核蛋白氨基酸残基 335-349 (Townsend et al.Cell 44, 959 (1986));
- (vi) 流感病毒核蛋白氨基酸残基 366-379 (Townsend 等, Cell 44, 959 (1986));
- (vii) 流感病毒红血球凝集素氨基酸残基 48-66 (Mills 等, J. Exp. Med. 163, 1477 (1986)); ;
- (viii) 流感病毒红血球凝集素氨基酸残基 111-120 (Hackett 等, J. Exp. Med 158, 294 (1983)); ;
- (ix) 流感病毒红血球凝集素氨基酸残基 114-131 (Lamband Green, Immunology 50, 659 (1983));
- (x) 埃-巴二氏病毒 LMP 氨基酸残基 43-53 (Thorley-Lawson 等, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 84, 5384 (1987));

- (xi) 乙型肝炎病毒表面抗原氨基酸残基 95-109 (Milich 等, J. Immunol. 134, 4203 (1985));
- (xii) 乙型肝炎病毒表面抗原氨基酸残基 140-154;
- (xiii) 乙型肝炎病毒 Pre-S 抗原氨基酸残基 120-132 (Milich 等, J. Exp. Med. 164, 532 (1986));
- (xiv) 单纯疱疹病毒 gD 蛋白氨基酸残基 5-23 (Jayaraman 等, J. Immunol. 151, 5777 (1993));
- (xv) 单纯疱疹病毒 gD 蛋白氨基酸残基 241-260 (Wyckoff 等, Immunobiol., 177, 134 (1988));
- (xvi) 狂犬病糖蛋白氨基酸残基 32-44 (MacFarlan 等, J. Immunol. 133, 2748 (1984));
- (xvii) 至少含有口蹄疫病毒血清型 O₁ 的 VP1 衣壳蛋白的氨基酸残基 134-168, 或残基 137-160, 或残基 142-160, 或残基 137-162, 或残基 145-150, 或其他相应的病毒血清型氨基酸残基, 比如血清型 A, C, SAT1, SAT2, SAT3 或 ASIA1 (US 5,864,008 和 6,107,021) 的主要口蹄疫病毒细胞表位; 以及
- (xviii) 丙型肝炎病毒 (HCV) 变种 AD78 病毒 E2 蛋白的高变区 1 (HVR1) (Zibert et al., J. Virol. 71, 4123-4127, 1997)。

优选细菌特异性 B 细胞表位来自于巴斯德菌, 放线菌, 嗜血杆菌, *Listeria monocytogenes*, 分支杆菌, 葡萄球菌, 大肠杆菌和志贺菌等, 和/或可产生针对上述细菌的抗体。适合的细菌性 B 细胞表位包括但不限于选自由以下所组成的组的多肽:

- (i) 结核分枝杆菌 65Kd 蛋白氨基酸残基 112-126 (Lamb et al., EMBO J., 6, 1245 (1987));
- (ii) 结核分枝杆菌 65Kd 蛋白氨基酸残基 163-184 (Lamb et al., EMBO J., 6, 1245 (1987));

- (iii) 结核分枝杆菌 65Kd 蛋白 227-243 氨基酸残基(Lambert al., EMBO J., 6, 1245 (1987));
- (iv) 结核分枝杆菌 65Kd 蛋白 242-266 氨基酸残基(Lambert al., EMBO J., 6, 1245 (1987));
- (v) 结核分枝杆菌 65Kd 蛋白 437-459 氨基酸残基(Lambert al., EMBO J., 6, 1245 (1987));
- (vi) 结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白残基 3-15 (Mortenet al., Infect. Immun. 66, 717-723, 1998);
- (vii) 结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白残基 40-62 (Morten et al., Infect. Immun. 66, 717-723, 1998);
- (viii) 瘰疬分枝杆菌 α -抗原残基 279-290 (Mikikoet al., Microb. Path. 23, 95-100, 1997);
- (ix) 金黄色葡萄球菌核酸酶蛋白氨基酸残基 61-80 (Finnegan 等, J. Exp. Med. 164, 897 (1986));
- (x) 大肠杆菌热稳定肠毒素的一种 B 细胞表位(Cardenas et al., Infect. Immunity 61, 4629 (1993));
- (xi) 大肠杆菌热不稳定肠毒素的一种 B 细胞表位(Clements et al., Infect. Immunity 53, 685 (1986));
- (xii) 宋内志贺菌 I 型抗原的一种 B 细胞表位(Formal et al, Infect. Immunity 34, 746 (1981));
- (xiii) 来自于 A 群链球菌的一种 B 细胞表位, 优选衍生自 M 蛋白, 更优选衍生自 M 蛋白的 C 末端半部分, 更优选衍生自 M 蛋白的保守的 C 末端半部分的最小化, 螺旋状的非寄主交叉反应肽, 它包含有一种用于保持螺旋的折叠和在所述最小化螺旋状的非寄主交叉反应多肽内所呈现的抗原性的非 M 蛋白肽。比如, 该非 M 蛋白肽(例如 J14 肽) 可以用化学方法与一种或多种血清型的 M 蛋白多肽相连, 使得免疫原可以指示所有悬垂于烷烃主链的单个肽, 因此具有了极好

的免疫原性和保护。(US 6,174,528; Brandt et al., Nat. Med. 6: 455-459, 2000)。

(xiv) 一种霍乱毒素 B 亚基(CTB)的 B 细胞表位, 比如由 Kazemi and Finkelstein Mol. Immunol. 28, 865-876, 1991 所描述;

(xv) 一种炭疽杆菌(anthrax)蛋白的 B 细胞表位, 比如一种来源于炭疽外生孢子外壁例如 250kDa 糖蛋白的 B 细胞表位(Sylvestre et al., In: Proc. 4th Int. Conf. Anthrax, St John's College Annapolid, Maryland, CA June 10-13, 2001, Abstract 31B), 以及

(xvi) 一种来源于破伤风蛋白的 B 细胞表位, 比如破伤风类毒素蛋白。

优选来自于哺乳动物受试者的 B 细胞表位衍生自一种肿瘤抗原, 和/或可产生针对该肿瘤抗原的抗体。肿瘤抗原通常是天然的或外源的抗原, 它的表达与肿瘤的发育, 生长, 存在或复发相关。因为肿瘤抗原对于将异常组织从正常组织区分开是有用的, 它们可以用做治疗干涉的靶。肿瘤抗原是本领域中所熟知的。实际上, 已有几个例子被详细描述, 且是目前关于很感兴趣的肿瘤特异性治疗的产生的焦点。肿瘤抗原非限制性的例子有癌胚抗原 (CEA), 前列腺特异性抗原 (PSA), 黑素瘤抗原 (MAGE, BAGE, GAGE) 和粘蛋白, 比如 MUC-1。

或者, 优选来源于哺乳动物受试者的 B 细胞表位衍生自人类或其他哺乳动物比如猪的透明带蛋白例如 ZP3(Chamberlin and Dean Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 87, 6014-6018, 1990)或 ZP3a(Yurewicz et al., Biochim. Biophys. Acta 1174, 211-214, 1993)。在这一类 B 细胞表位中, 尤其优选的是人 ZP3 氨基酸残基 323-341 (Chamberlin 和 Dean Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 87, 6014-6018, 1990); 猪 ZP3a 氨基酸残基 8-18, 或残基 272-283 或残基 319-330 (Yurewicz 等, Biochim. Biophys. Acta

1174, 211-214, 1993)。

更优选哺乳动物 B 细胞表位来源于如过饱激素（即瘦蛋白），消化激素（即胃泌素），生殖性肽类激素（即黄体素释放激素 LHRH），促卵泡素（FSH），黄体素（LH），人绒毛膜促性腺激素（hCG; Carlsen et al., J. Biol. Chem. 248, 6810-6827, 1973）等肽激素，或者 FSH 受体（Kraaij et al., J. Endocrinol. 158, 127-136, 1998）等激素受体，且/或可产生与其相对应的抗体。

更优选哺乳动物 B 细胞表位来源于肽激素，比如过饱激素（即瘦蛋白），消化激素（即胃泌素）或生殖性肽类激素（即黄体素释放激素 LHRH），促卵泡素（FSH），黄体素（LH），人绒毛膜促性腺激素（hCG; Carlsen et al., J. Biol. Chem. 248, 6810-6827, 1973），或者激素受体，如 FSH 受体（Kraaij et al., J. Endocrinol. 158, 127-136, 1998），且/或可产生与其相对应的抗体。在这一类 B 细胞表位中，尤其优选的是具有抗原性且不与 LH 发生交联的 b-hCG 碳末端部分（CTR）（Carlsen et al., J. Biol. Chem. 248, 6810-6827, 1973）。

在某个具体的优选实施例中，含有 B 细胞表位多肽的氨基酸序列是从下面挑选出来的：

(i) 来源于 LHRH 的 EHWSYGLRPG（在这里将其称之为 LHRH1-10, SEQ ID NO:2）；

(ii) 来源于 LHRH 的 HWSYGLRPG（在这里将其称之为 LHRH2-10, SEQ ID NO:3）；

(iii) 来源于 LHRH 的 GLRPG（在这里将其称之为 LHRH6-10, SEQ ID NO:4）；

(iv) 来自于 *Leishmani major* 的 EAEEAARLQA；

(iv) 从下述序列中挑选出来含有口蹄疫病毒非结构蛋白 3A, 3B 或 3C(美国专利 6,048,538)的一段序列：

FRERTLTGQRACNDVNSE (SEQ ID NO:58),

NPLETSGASTVGFRERTL (SEQ ID NO:59),

IRETRKRQKMVDDAVNEY (SEQ ID NO:60),
AKAPVVKEGPYEGPVKKPV (SEQ ID NO:61),
AGPLERQKPLKVKAKAPVV (SEQ ID NO:62),
KVRAKLPQQEGPYAGPLER (SEQ ID NO:63),
GPYTGPLERQRPLKVRAKL (SEQ ID NO:64),
VGRLIFSGEALTYKDIVV (SEQ ID NO:65),
TKHFRDTARMKKGTPVVG (SEQ ID NO:66), 以及
SGAPPTDLQKMVMGNTKPV (SEQ ID NO:67);

(v) 来源于口蹄疫病毒 VP1 主要细胞表位的 NKYSASGSGVRGDFGSLAPRVARQLPASFNYGAIK (US6,107,021; SEQ ID NO:68);

(vi) 从含有 LYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID NO:69), AV KVM DLPQE PALGTT CYA (SEQ ID NO:70), IVGGWECEKHSQPWQ VLVAS (SEQ ID NO:71), CAQVHPQKVTKFML (SEQ ID NO:72), YLMLRLSEPAELTDDAVKVM (SEQ ID NO:73), LLKNRFLRPGDD SSHDLMLLY (SEQ ID NO:74), 以及 ILLGRHSLFHPEDTGQVFQVY (SEQ ID NO:75)等序列中挑选出的一段前列腺特异性抗原 (US 6,326,471);

(vii) 来源于 b-Hcg 的 TCDDPRFQDSSSSKAPPPSLSPSRLPGP SDTPILPQ 序列(SEQ ID NO:76);

(viii) 来源于 FSH 受体的 CQDSKVTEIPTLPRNAI 序列 (SEQ ID NO:77);

(ix) 来源于人 ZP3 蛋白的 NKGDCGTPSHSRRQPHVMS 序列 (SEQ ID NO:78);

(x) 从含有 WLCFPLCLALP (SEQ ID NO:79), LGGLYCGPSSF (SEQ ID NO:80), GSITRDSIFRLR (SEQ ID NO:81), SALPVNIQVFTL (SEQ ID NO:82), ELQIAKDERYGS (SEQ ID NO:83) 和

VKLLREPIYVEV (SEQ ID NO:84)等序列中挑选出的一段猪 ZP3a 蛋白序列;

(xi) 来源于癌胚抗原的 PPAQYSWLIDGN (CEA; SEQ ID NO:85);

(xii) 从含有 ANASQTDNGVNRSGSEDPTV (SEQ ID NO:86)和 PETKHPKKGVEKYGPEASAF (SEQ ID NO:87)的序列中挑选出的一段葡萄球菌核酸酶序列(Cone et al., J. Biol. Chem. 246, 3103-3110. 1971);

(xiii) 从含有 LVLLDYQGMLPVCPL (SEQ ID NO:88) 和 TKPSDGNCTCIPIPS (SEQ ID NO:89)的序列中挑选出的一段乙型肝炎病毒表面抗原序列(Kobayashi and Koike, Gene 30, 227-232, 1984);

(xiv) 来源于乙型肝炎病毒前体表面抗原的 MQWNSTTFHQALL(SEQ ID NO:90);

(xv) 从含有 AAFEDLRVSSFIRGT (SEQ ID NO:91) 和 SNENMETMDSSTLE (SEQ ID NO:92)的序列中挑选出的一段流感病毒和蛋白序列(Gregory et al., J. Gen. Virol. 82, 1397-1406, 2001);

(xvi) 从含有 HPLILDCTIEGLIYGNPS (SEQ ID NO:93), YQRIQIFPDT (SEQ ID NO:94), 和 IQIFPDTIWNVSYSGTSK (SEQ ID NO:95)等的序列中挑选出的一段流感病毒红血球凝集素序列;

(xvii) 来源于口蹄疫病毒衣壳糖蛋白 VP1 的 CKYSASGSGVRGDFGSLAPRVARCLPASFNTGAIKNKY 序列 (SEQ ID NO:96);

(xviii)从含有 EQQWNFAGIEAAA (SEQ ID NO:97) 和 AAAWGGSGSEAYQGVQQKWDATA (SEQ ID NO:98)的序列中挑选出的一段结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白序列;

(xix) 来源于 HCV 的 GGPTRTIGGSQAQTASGLVSMFVSGPSQ K 序列(SEQ ID NO:99);

(xx) 来源于 *M. scrofulaceum* α 抗原的 KFQDAYNAAGGH (SEQ ID NO:100);

(xxi) 来源于 A 群链球菌 M 蛋白 (在这里将其称之为“J14”)的 KQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID NO:101); 和

(xxii) 来源于胃泌素 (即含有胃泌素 C-末端 5 个氨基酸残基的五肽胃泌素) 的 GW MDF (SEQ ID NO:102)。

显然, 从以上描述可知, 脂肽的肽部分可以方便的以单一氨基酸链的形式进行合成, 因此, 不需要合成后的修饰来掺入两种表位。

特别优选含有被连接到流感病毒红血球凝集素的辅助 T 细胞表位 (SEQ ID NO:1) 或 CDVF 的辅助 T 细胞表位 (SEQ ID NO: 20, 24, 26 或 44) 的 LHRH (SEQ ID NO:2 或 3 或 4) 的高免疫原性 B 细胞表位的多肽部分, 比如含有选自以下所组成的组的氨基酸序列的多肽:

(i) GALNNRFQIKGV ELKSEHWSYGLRPG (SEQ ID NO:5);

(ii) EHWSYGLRPGGALNNRFQIKGV ELKS (SEQ ID NO:6);

(iii) GALNNRFQIKGV ELKSKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO:7);

(iv) EHWSYGLRPGKGALNNRFQIKGV ELKS (SEQ ID NO:8);

(v) KLIPNASLIENCTKAELKHWSYGLRPG (SEQ ID NO:9);

(vi) AELGEYEKLLNSVLEPIKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO:10);

(vii) TAAQITAGIALHQS NLNKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO:11);

(viii) PRYIATNGYLISNFDESKEHWSYGLRPG (SEQ ID NO:12);

(ix) KLIPNASLIENCTKAELKGLRPG (SEQ ID NO:13);

(x) AELGEYEKLLNSVLEPIKGLRPG (SEQ ID NO:14);

(xi) TAAQITAGIALHQS NLNKGLRPG (SEQ ID NO:15);

(xii)PRYIATNGYLISNFDESKGLRPG (SEQ ID NO:16);

(xiii)KLIPNASLIENCTKAELHWSYGLRPG (SEQ ID NO:103);

以及

(xiv)KLIPNASLIENCTKAELGLRPG (SEQ ID NO:104)。

在一个具体的优选实施方式中，LHRH表位（即如SEQ ID NO:2所示的LHRH1-10；如SEQ ID NO:3所示的LHRH 2-10或如SEQ ID NO:4所示的LHRH 6-10）被放置于可使得其C-末端甘氨酸残基被暴露出来或不在内部的位置。由此，特别优选如SEQ ID NO5, 7, 或9-16中任一序列所示的构型。

在一个具体的实施例中，LHRH1-10被缀合于流感病毒红血球凝集素辅助T细胞表位（即SEQ ID NO:1），如通过SEQ ID NO:5或7所示的序列描述；LHRH2-10或LHRH6-10被缀合于CDV-F (SEQ ID NO:24)的辅助T细胞表位，如通过SEQ ID NO:9, 13, 103或104所示的序列描述。很显然，其他的结合情况也是有可能发生的，并且应包含在本发明中。

在另一个实施例中，尤其优选包含与CDV-F的辅助T细胞表位（SEQ ID NO:24）或流感病毒红血球凝集素（SEQ ID NO:1）结合的具有高免疫原性的A群链球菌M蛋白（作为SEQ ID NO:101的J14肽）B细胞表位的多肽部分，含有选自有以下所组成的组的氨基酸序列的多肽：

(i)

KLIPNASLIENCTKAELKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLE
DKVK (SEQ ID NO:105);

(ii)

KLIPNASLIENCTKAELKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQL
EDKVK (SEQ ID NO:106);

(iii)

GALNNRFQIKGVELKSKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLE
DKVK (SEQ ID NO:107); 以及

(iv)

GALNNRFQIKGVELKSKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQL
EDKVK (SEQ ID NO:108)。

在另一个实施例中, 尤其优选与 CDV-F 的辅助 T 细胞表位 (SEQ ID NO:24) 或流感病毒红血球凝集素 (SEQ ID NO:1) 结合的具有高免疫原性五肽胃泌素的 B 细胞表位 (如 SEQ ID NO:102) 的多肽部分, 比如含有选自有以下所组成的组的氨基酸序列的多肽 :

(i) KLIPNASLIENCTKAELGWMD (SEQ ID NO:109);

(ii) KLIPNASLIENCTKAELKGWMD (SEQ ID NO:110);

(iii) GALNNRFQIKGVELKSGWMD (SEQ ID NO:111); 以及

(iv) GALNNRFQIKGVELKSKGWMD (SEQ ID NO:112)。

本领域中的技术人员能方便的通过对具有 SEQ ID NO. 5-16 或 SEQ ID NO. 103-112 中的任一序列的辅助 T 细胞和/或 B 细胞表位进行取代, 以合成那些例举的额外多肽。例如如 SEQ ID NO: 18-56 中任一所示的辅助 T 细胞表位或任一 SEQ ID NO: 57-102 所示的 B 细胞表位。而且, 根据靶物种和可见引起免疫应答的抗原, 本领域中的技术人员可从上述公布中选择合适的辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位。

本领域技术人员可以针对特定的目的采用合适的方法, 对这里描述的多肽部分氨基酸序列包括那些被例举的, 如 SEQ ID NO: 5-16 和 SEQ ID NO: 103-112 所示的多肽, 进行修饰而不减弱他们的免疫功能。比如, 可对特定的肽残基进行衍生化作用或化学修饰, 以增强它们的免疫应答或允许肽被偶合到其它的基团上, 尤其是脂质。也可

以在肽链内部对特定的氨基酸进行改变而不影响到肽的整个结构或抗原性，这样的改变被称为“保守的”改变是依赖于残基的疏水性或极性。侧链的大小和/或电荷也是测定那些取代是“保守的”的相关因素。

本领域的技术人员熟知，获得一种具有同等生物学功能的蛋白质或多肽的定义意味着，可在分子内限定的某一部分进行有限次数的改变，以使得该分子具有在可接受范围内的等同生物学活性。在这里所定义的生物学功能等价物多肽，是指那些其中某些特定的氨基酸残基可以被取代的多肽。具体的实施例中包含在多肽的氨基酸序列内有1个，2个，3个，4个，5个或更多氨基酸进行变化。当然，大量具有不同取代的不同蛋白/多肽可以很容易地被制备并根据本发明被使用。

本领域中技术人员应明白以下的取代是允许的保守性取代：(i)涉及到精氨酸，赖氨酸和组氨酸的取代；(ii)涉及到丙氨酸，甘氨酸，丝氨酸和(iii)涉及到苯丙氨酸，色氨酸和酪氨酸。掺入了这些保守性取代基的多肽在这里被定义为生物学功能等价物。

本领域中都熟知氨基酸亲水性指数对蛋白质的互作生物学功能的重要性 (Kyte 和 Doolittle, J.Mol. Biol, 105-132, 1982)。已知某些氨基酸可为其他具有相似亲水性指数或分值的氨基酸所取代，并依然保留了相似的生物学活性。氨基酸的亲水性指数也可用来确定生产功能等价物分子的保守性取代基。基于疏水性和电荷特征，每一种氨基酸都被指定了一种亲水性指数：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸(+2.5)；甲硫氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。

在进行基于亲水性指数变化时，优选亲水性指数介于 ± 0.2 之间的氨基酸的取代。更优选该取代将涉及亲水性指数介于 ± 0.1 之间的氨基酸，最优选介于 ± 0.05 之间。

在本领域中仍能理解进行基于亲水性的相似氨基酸的取代是很有效的，尤其是当这些生物学功能等价蛋白或多肽是用来在如本发明中的免疫学实施例中进行使用的时候（例如 US 4, 554, 101）。如在 US 4,554,101 中所详述的那样，各氨基酸被指定具有以下的水溶性指数：精氨酸(+3.0)；赖氨酸 (+3.0)；天冬氨酸 (+3.0 \pm 0.1)；谷氨酸 (+3.0 \pm 0.1)；丝氨酸(+0.3)；天冬酰胺(+0.2)；谷氨酰胺(+0.2)；甘氨酸(0)；苏氨酸(-0.4)；脯氨酸(-0.5 \pm 0.1)；丙氨酸(-0.5)；组氨酸(-0.5)；半胱氨酸(-1.0)；甲硫氨酸(-1.3)；缬氨酸(-1.5)；亮氨酸(-1.8)；异亮氨酸(-1.8)；酪氨酸(-2.3)；苯丙氨酸(-2.5)；色氨酸(-3.4)。基于相似的水溶性值的变化，优选取代氨基酸得到水溶性指数介于 ± 0.2 之间，更优选 ± 0.1 之间，最优选介于 ± 0.05 之间。

一旦某多肽被认定适于用做免疫原使用，就也可以预期其他具有相似空间结构的化合物也可以用来模拟该多肽结构的关键部分。这些可被称为多肽模拟物的化合物，可以与本发明中的多肽相同的方式使用，因此也是功能性等价物。本领域中技术人员都熟知，可以采用化学设计和建模等技术获得这样的结构功能性等价物。同样，所有这些具有相似空间结构的化合物也落在本发明的范围。

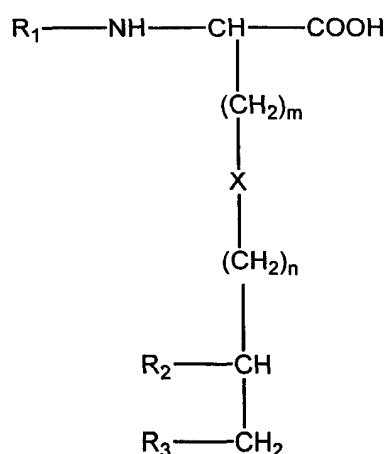
另一种确定修饰多肽“等价性”的方法涉及到功能方法。例如，一种给定的多肽被用来产生单克隆或多克隆抗体。这些抗体随后可以用于对含有成千上万的简并多肽的文库进行筛选，至少在某种程度上可得到具有免疫性的等价物。当然，这样的结构可能与用于产生抗体的多肽具有很大的序列同源性，但也有可能相差很大。

对多肽部分的合成可以采用诸如 Merrifield 氏合成方法的标准技术(Merrifield, J Am Chem Soc, 85,:2149-2154, 1963)及其改进技术(参见, 例如, Synthetic Peptides: A User's Guide, Grant, ed. (1992) W.H. Freeman & Co., New York, pp. 382; Jones (1994), The Chemical Synthesis of Peptides, Clarendon Press, Oxford, pp. 230.); Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in The Peptides (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York; Wünsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Müller, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474)。

脂质部分可包含任何从 C₂ 到 C₃₀ 的饱和, 单不饱和或多不饱和直链或支链脂酰基, 优选脂肪酸基团选自棕榈酰, 肉豆蔻酰, 硬脂酰, 月桂酰, 辛酰和癸酰所组成的组。

脂氨基酸是本文中特别优选的脂质部分。术语“脂氨基酸”在这里是指被共价附着于是氨基酸残基的 1 个, 2 个, 3 个或多个脂质的分子, 比如半胱氨酸或丝氨酸或赖氨酸及其类似物。在一个独特的优选实施例中, 脂氨基酸包含半胱氨酸, 或者可选地含有一个, 两个或多个精氨酸或丝氨酸残基, 或者可选地为 6-氨基己酸。

脂质部分优选是具有以下通式(VII)结构的化合物:



其中：

(i) X 是选自由硫，氧，二硫键(-S-S-)，亚甲基(-CH₂-)和氨基(-NH-)所组成的组；

(ii) m 的值为整数 1 或 2；

(iii) n 的值为整数 0 到 5；

(iv) R₁ 选自由氢，羰基(-CO-)和 R'-CO-所组成的组，其中 R' 选自由具有 7-25 个碳原子的烷基、烯基或炔基所组成的组，其中所述烷基、烯基或炔基可以选择性的被羟基，氨基，氧代，酰基或环烷基所取代；

(v) R₂ 基团选自由 R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-和 R'-CO-NH-所组成的组，其中 R' 选自由具有 7-25 个碳原子的烷基、烯基或炔基的基团中挑选出来的，其中所述烷基、烯基或炔基可以选择性的被羟基，氨基，氧代，酰基或环烷基所取代；

(vi) R₃ 基团选自由 R'-CO-O-, R'-O-, R'-O-CO-, R'-NH-CO-和 R'-CO-NH-所组成的组，其中 R' 选自由具有 7-25 个碳原子的烷基、烯基或炔基所组成的组，其中所述烷基、烯基或炔基可以选择性的被羟基，氨基，氧代，酰基或环烷基所取代，其中 R₁，R₂，和 R₃ 可以相同也可以不同。

根据取代基的不同，通用结构 VII 的脂质部分可以成为一个手性分子，其中直接或间接与 R_1 和 R_2 整体共价相连的碳原子是不对称的右旋或左旋（即，R 或 S）构型。

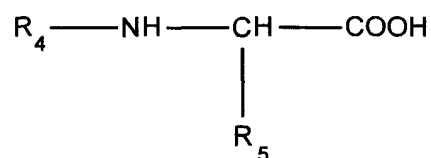
优选，X 为硫；m 和 n 都为 1； R_1 选自自由氢和 $R'-CO$ 所组成的组，其中 R' 是具有 7-25 个碳原子的烷基， R_2 和 R_3 选自自由 $R'-CO-O-$ ， $R'-O-$ ， $R'-O-CO-$ ， $R'-NH-CO-$ 和 $R'-CO-NH-$ 所组成的组，其中 R' 是具有 7-25 个碳原子的烷基。

优选， R' 是选自自由棕榈酰，肉豆蔻酰，硬脂酰，月桂酰，辛酰基和癸酰基所组成的组。更优选， R' 是选自自由棕榈酰基，肉豆蔻酰基，月桂酰基，辛酰基和癸酰基所组成的组。

所述脂质部分中的每一个 R' 整体可以相同也可以不同。

在一个具体的优选实施例中，X 为硫；m 和 n 都为 1； R_1 是从含有氢或 $R'-CO-$ ，其中 R' 选自自由棕榈酰，硬脂酰，月桂酰和辛酰所组成的组中 R_2 和 R_3 都是 $R'-CO-O-$ ，其中 R' 选自自由棕榈酰，硬脂酰，月桂酰和辛酰所组成的组。尤其优选其中 R' 是棕榈酰的化合物如之前的式 (I) 和分式 (II) 中所示。

脂质部分也可以下面的式 (VIII) 形式出现：



其中：

(i) R_4 选自(i)一种含有约 7 个-约 25 个碳原子的 α -酰基脂肪酸残基；(ii)一种 α -烷基- β 羟基脂肪酸残基；(iii)一种 β -羟基酯或 α -烷基- β 羟基脂肪酸残基，其中酯基优选含有超过 8 个碳原子的直链或支链；和 (iv) 脂氨基酸残基；以及

(ii) R_5 是氢或者某种氨基酸的侧链。

优选， R_4 含有约 10 个-约 20 个之间的碳原子，更优选约 14 个-约 18 个之间的碳原子。

当 R_4 是一个脂氨基酸残基时， R_4 和 R_5 的侧链可以形成一种共价附着。比如，当 R_4 含有选自自由赖氨酸，鸟氨酸，谷氨酸，天冬氨酸，

赖氨酸衍生物，鸟氨酸衍生物，谷氨酸衍生物和天冬氨酸衍生物所组成的组的氨基酸时，该氨基酸或衍生物的侧链就会通过酰胺或酯键共价附着于 R₅ 上。

优选，如通式 VIII 所示的结构脂质部分选自由 N,N'-二酰赖氨酸；N,N'-二酰鸟氨酸；二（单烷基）氨基化合物或谷氨酸酯；二（单烷基）氨基化合物或天冬氨酸酯；丝氨酸，高丝氨酸或苏氨酸的 N,O-二酰衍生物；以及半胱氨酸或高胱氨酸的 N,S-二酰衍生物。

尤其是那些疏水性不超过 Pam₃Cys (分子式(I))的两亲性分子，也是优选的分子。

式 (I)，(II)，(VI) 或 (VIII) 的脂质部分都经过了添加一个或多个间隔基分子的合成中或合成后的再修饰，优选间隔基包含碳，更优选包含一个或多个氨基酸残基。这些被方便地添加到脂质结构上，通过传统的缩合反应，加成反应，取代反应或氧化反应中的末端羧基。这些间隔分子的作用是用来将脂质部分和多肽部分分隔开，以降低分子的空间位阻效应，这可能会避免降低脂肽产物的免疫原性。

对这个目的而言，尤其优选精氨酸或丝氨酸二聚体，三聚体，四聚体等或可选地为 6-氨基己酸。

优选，这样的间隔含有一个末端保护氨基酸残基，使得后来经过修饰的脂氨基酸可以缀合于多肽上。

针对本实施例所合成的经修饰的模式脂氨基酸可见于分子式 (III) 和 (IV)，它们可以通过分别向分子式 (I) 和 (II) 添加一个丝氨酸同型二聚体来实现。如文中所列举，对这个目的而言，式 (I) 的 Pam₃Cys 或式 (II) 的 Pam₂Cys 被方便地合成得到式 (III) 的脂氨基酸 Pam₃Cys-Ser-Ser 或式 (IV) 的脂氨基酸 Pam₂Cys-Ser-Ser。

应优选被保护起来，这样的话，脱保护可以促使脂质部分缀合于支链多肽上。

或者，间隔也可以通过传统的亲核取代反应添加到多肽的未经修饰的 ϵ -氨基上。然而，如果具有包含单个内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基和一个封闭的 N 末端的氨基酸序列时，优选采用这种方法。

脂质部分可以通过传统的合成方法获得，比如美国专利 5,700,910 和 6,024,964 中所描述的方法，或由 Wiesmuller 等, Hoppe Seylers Zur Physiol. Chem. 364, 593 (1983), Zeng 等, J. Pept. Sci 2, 66 (1996), Jones 等, Xenobiotica 5, 155 (1975), or Metzger 等, Int. J. Pept. Protein Res. 38, 545 (1991) 所描述的方法。本领域技术人员可以很容易地对这些方法稍加修改，以获得用于缀合与多肽的目的脂质的合成。

也可预期不同脂相互结合可用于本发明的脂肽中。比如，一种或两种含有豆蔻酰基的脂质或脂氨基酸通过内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基被附着于多肽部分上，通过间隔基随意地从多肽分隔开。也不排除其他的组合。

本发明中的脂肽很容易地被修饰后用于诊断用途。比如，通过添加一种天然的或合成的半抗原，抗生素，激素，类固醇，核苷，核苷酸，核酸，酶，酶底物，酶抑制剂，生物素，抗生物素蛋白，聚乙二醇，多肽部分（比如：吞噬细胞增强激素，聚赖氨酸），荧光标记（比如：FITC，RITC，丹磺酰，氨基苯二酰肼或香豆素），生物荧光标记，自旋标记，生物碱，生物胺，维生素，毒素（比如：地高辛，毒伞素，蛾膏蕈毒环肽，河豚毒素）或一种复合剂。

又例如，提供了高的免疫原性和溶解性的脂肽，包括通过多肽的内部赖氨酸 ϵ -氨基缀合的式 (I) 的 Pam₃Cys 或式 (II) 的 Pam₂Cys 或 Ste₂Cys 或 Lau₂Cys 或 Oct₂Cys，这样的多肽包括(i)得自流感病毒红细胞凝集素轻链的 CD4⁺ 辅助 T 细胞表位的氨基酸序列(Jackson 等, Virol. 198, 613-623, 1994; GALNNRFQIKGVELKS; SEQ ID NO:1), 或

得自 CDV-F 蛋白的多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:24); (ii) 含有 B 细胞表位的多肽, 含有选自由黄体生成激素释放激素(LHRH; Fraser 等, J. Endocrinol. 63, 399 (1974); Fraser 和 Baker, J. Endocrinol. 77, 85 (1978); “LHRH 1-10” EHWSYGLRPG, SEQ ID NO:2; “LHRH 2-10” 氨基酸序列 HWSYGLRPG, SEQ ID NO:3; 或“LHRH 6-10” GLRPG, SEQ ID NO:4), A 群链球菌 (GAS) M 蛋白(即 SEQ ID NO:101)和五肽胃泌素(即 SEQ ID NO:102)所组成的组的氨基酸序列; (iii)位于所述 CD4⁺辅助 T 细胞表位与所述 B 细胞表位之间的一个赖氨酸残基; 和可选地(iv)位于所述 CD4⁺辅助 T 细胞表位内部的一个赖氨酸残基。

脂肽的制备

本发明的另一方面提供了一种制备含有以下成分的脂肽的方法:

(i)产生包含一种氨基酸序列的多肽, 所述氨基酸序列包含:

(a)辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和 B 细胞表位的氨基酸序列, 其中所述的氨基酸序列是不同的; 以及

(b)一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基; 以及

(iii) 直接地或间接地将所述一个或多个脂质部分共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基, 或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团, 以生产具有被附着于所述内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基的脂质部分, 或具有被附着于所述内部赖氨酸类似物残基末端侧链基团的脂质部分。

优选该方法还进一步包含了脂质部分的生产。

在进行多肽部分和脂质部分的合成时, 首选的是传统的化学合成方法。

优选, 通过选择性的从内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物的末端侧链基团, 尤其是末端侧链的氨基去除一个封闭基团 (例如 Mtt),

以便允许在该位置添加一个氨基酸残基，一个间隔或脂质部分，包括脂氨基酸。

关于脂质附着于多肽，可以通过本领域众所周知的多肽合成方法便捷地对多肽官能团加以保护，以确保在这些官能团上不发生不需要的反应。

在熟知结合的过程之后，多肽的合成是在固体或如多聚物（比如：Merrifield 树脂）可溶性载体上进行的，并可以附着于间隔基，氨基酸或脂质。例如，内部赖氨酸的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物的末端侧链基团可以用一组保护性基团的其中一个加以保护。封闭基团（也成为保护性基团或掩护基团）是用来保护具有与偶合反应有关的活性羧基的氨基酸的氨基，或者是用来保护具有与偶合反应有关得的酰化氨基得氨基酸得羧基。为保证偶合的发生，封闭基团必须在不打断肽键或对任一附着于多肽另一部分的保护性基团得情况下去除。

对固相的多肽合成来说，经多次处理依然稳定的封闭基团，对在肽链生长时去除氨基保护基团和重复的氨基酸偶合是必不可少的，并可用来保护氨基酸的侧链。而且，通过肽-树脂锚合来对多肽的 C 末端进行的保护贯穿于合成过程的始终，直到需要将树脂与其分开为止。所以，通过明智的选择正交保护的 α -氨基酸，脂质和/或氨基酸在生长多肽仍在树脂上的时候被附着于其合适位置。

优选氨基保护基团应很容易去除但在偶合反应和其他操作时保持稳定，比如对侧链基团进行修饰。优选氨基封闭基团选自以下成分所组成的组：(i)可在室温和常压条件下，经过催化氢化，或在氨水中加入金属钠，在乙酸中加入氢溴酸，去除的苄氧羰基（Z 或苄氧羰基）；(ii)可用 t-丁氧基羰基叠氮化物（Boc）或二叔丁基碳酸氢盐引入，用弱酸，如三氟乙酸（50%三氟乙酸溶于二氯甲烷）或溶于乙酸/二氧杂环己烷/乙酸乙酯的盐酸去除的 t-丁氧基羰基；(iii)在弱碱性，非水解条件下，比如使用伯胺和仲胺（20%哌啶溶于二甲基甲酰胺）

切除的 9-芴基甲基氧羰基 (Fmoc); (iv)2-(4-联苯)丙基(2)氧羰基 (Bpoc); (v) 2-硝基-苯次磺酸基(Nps); 和(vi) 二硫琥珀酰基(Dts)。

侧链保护基团则要根据形成合成多肽的氨基酸的功能性侧链进行选择。侧链保护基团通常是基于 Bzl 或 tBu 基团。在侧链含有醇或羧酸的氨基酸一般以 Bzl 醚, Bzl 酯, cHex 酯, tBu 醚或 tBu 酯的形式进行保护。Fmoc 氨基酸的侧链保护需要在碱性条件稳定, 在弱酸性条件 (TFA) 下不稳定的封闭基团。例如, 可使用 Mtt(如 Fmoc-lysine(Mtt)-OH) 对赖氨酸的 ϵ -氨基进行保护。又如, 卤化苄基衍生物, 比如 CIZ 也可以用来在升高的酸性条件下保护赖氨酸侧链。在一般条件下, 胱氨酸的巯羟基, 组氨酸的咪唑基或精氨酸的胍基都需要特别的保护。许多用于多肽合成的不同的保护基团已被描述(The Peptides, Gross 等, eds., Vol. 3, Academic Press, New York, 1981)。

在保护策略中最常用的是 Boc/Bzl-策略和 Fmoc/tBu 策略。在 Boc/Bzl-策略中, Boc 用来保护氨基而基于 Bzl 或 cHex 的基团则用来保护多种氨基酸的侧链。Boc 基团在催化氢化条件下稳定并被正交地用来与 Z 基团一起对许多侧链基团进行保护。在 Fmoc/tBu 策略中, Fmoc 用来保护氨基而基于 tBu 的基团则用来保护侧链。

多肽通过本领域所熟知的方法被脂化。标准的缩合反应, 加成反应, 取代反应或氧化反应 (例如在内部赖氨酸或内部赖氨酸类似物的末端氨基与进入氨基酸或多肽或脂氨基酸的羧基末端间形成的二硫化物架桥酰氨键形成) 都可以将脂质加成到多肽上。

在另一个实施例中，本发明中的一种用作免疫原的多肽是通过化学选择性络合或化学结合来制备的。这样的方法在本领域中已为大家熟知，允许单独的肽成分通过化学或重组的方法，并随后以适当的构型或构象或顺序进行化学性络合来制备(Nardin 等, Vaccine 16, 590 (1998); Nardin 等, J. Immunol. 166, 481 (2001); Rose 等, Mol. Immunol. 32, 1031 (1995); Rose 等, Bioconjug. Chem 7, 552 (1996); 及 Zeng 等, Vaccine 18, 1031 (2000)，它们在这里通过引用被整合到本发明中)。

脂肽配方

脂肽在药学上可接受的赋形剂或稀释剂中被方便地配制，例如水性的溶剂，非水性的溶剂，无毒的赋形剂比如盐，防腐剂，缓冲液等等。非水性溶剂的例子是丙二醇，聚乙二醇，植物油和可注射的有机酯，比如油酸乙酯。水溶性溶剂包括水，醇/水溶液，盐溶液，胃肠外载体，比如氯化钠，Ringer's 右旋糖，等。防腐剂包括抗菌剂，抗氧化剂，螯合剂和惰性气体。制药成分中的 Ph 值和精确浓度可根据本领域的常规技术来进行调节。

尽管通常并不需要，往脂肽配方中加入外源佐剂也应包括在本发明中。这样的外源佐剂包括了所有可接受的免疫刺激性化合物，比如细胞因子，毒素或合成组分。典型的佐剂包括 IL-1，IL-2，BCG，氢氧化铝，N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thur-MDP)，N-乙酰-去甲-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺 (CGP11637，也称做 nor-MDP)，N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-L-丙氨酸-2- (1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧化)-乙胺 (CGP1983A, MTP-PE)，脂质 A，MPL 和 RIBI，其中含有三种从细菌中分离到的成分，单磷酰脂质 A，海藻糖(trehalose) dimycolate 和细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS)于 2% 角鲨烯/Tween80 乳浊液中。

也可以将生物反应调节物(BRM)与脂肽进行共给药,以下调抑制性 T 细胞的活性。典型的生物反应调节物包括且不限于甲腈咪胍(CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA, USA); 茛甲新(IND; 150 mg/d) (Lederle, NJ, USA)或者是低剂量的环磷酰胺(CYP; 75, 150 或 300 mg/m.sup.2) (Johnson/Mead, NJ, USA)。

脂肽在免疫中的使用

本发明中新颖的脂肽与已知的抗原的脂肽缀合物的本质区别在于它们提高的可溶性和免疫原性,以及在不施用额外佐剂的条件下引起免疫应答的能力。由此,本发明脂肽的特别应用就是用于抗体制造领域,合成疫苗制备,应用抗体和抗体配基的诊断方法,以及用于兽医和人类医学的免疫治疗。

更特别的是,在对动物受试者施用本发明的脂肽时,该脂肽可以诱导针对于 B 细胞表位部分的高滴度抗体的产生,并不需要佐剂来达到相似的抗体滴度。向受试者施用脂肽后会增强树突细胞的成熟,也支持了上述的效用(即与在 N 末端偶合了脂质的脂肽相比具有增强的抗原呈递)。

因此,本发明的第三方面提供了一种引起针对抗原 B 细胞表位的抗体的产生的方法,该方法包括在足以引起针对所述抗原 B 细胞表位的抗体产生的条件下,对所述受试者施用一段时间的一种分离脂肽,该脂肽含有一种偶合于一个或多个脂质部分的多肽,其中:

(i) 所述多肽包含:

(a) 一种辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和一种 B 细胞表位的氨基酸序列,其中所述的氨基酸序列是不同的; 和

(b) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基,其用

于经所述内部赖氨酸的 ϵ -氨基或经所述内部赖氨酸类似物的末端侧链基团共价附着于所述脂质部分的每一个；和

(ii) 所述一个或多个脂质部分的每一个被直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合。

用于抗体产生的有效剂量脂肽根据免疫原性 B 细胞表位的特性施用途径，用于免疫的动物以及所寻求抗体的特性发生变化。这些参数都是通过本领域所公认的方法据试验来确定。

这里所涉及的抗体包括全部的多克隆和单克隆抗体，及其单独或缀合与其他部分结合的部分。抗体部分包含有 Fab 和 F(ab)₂ 片段以及单链抗体。这些抗体可以在适合的实验动物体内获得，或者采用重组 DNA 技术在体外获得工程化抗体（单链抗体或 SCABS 等）。

与本发明的这一方面相对应，这些抗体可以对动物进行免疫获得，在这种情况下，特别优选与 B 细胞表位结合的高滴度或中和抗体。当然，要根据免疫的抗原性 B 细胞表位来选择进行免疫的合适的受试动物。可以预期，本发明将被广泛地用来对多种动物进行免疫，比如农业动物（如马，牛，绵羊，猪，山羊，鸡，鸭，火鸡等），实验动物（如大鼠，小鼠，豚鼠，兔），家养动物（猫，狗，鸟等），野生的外来动物（负鼠，猫，狗，水牛，野狗等）和人。

或者，这些抗体可作为商业或诊断用途，在这种情况下，被施用脂肽的受试者最好是实验动物或农业动物。有很多动物品种都可以用来生产抗血清。兔，小鼠，大鼠，仓鼠，豚鼠，山羊，绵羊，猪，狗，马或鸡都是用来生产抗血清的典型动物。因为兔的血液量较大，所以优选兔来制备多克隆抗体。然而，本领域中的专业人员应熟知，为了从大动物身上为获得大量的抗体，大剂量的免疫原是必需的，而对诸如小鼠等小动物则相反。在这样的情况下，可以期望从被免疫的动物分离目的抗体。

优选抗体是高滴度的抗体。“高滴度”的意思是其滴度高到足以适于在诊断或治疗中使用。本领域中专业人员也应熟知，有一些变化情况也可被认为是高滴度。对大多是使用情况来说，优选滴度介于至少约 10^3 - 10^4 之间，更优选抗体滴度可以介于约 10^4 到约 10^5 之间，甚至是介于约 10^5 到约 10^6 之间

更优选当 B 细胞表位来源于病原体，病毒或细菌时，抗体是中和抗体（即可以中和有机体的传染性，其后自该有机体衍生了 B 细胞表位）。

为了产生抗体，脂肽，可以与任何合适的或有效的载体，佐剂，BRM 或药学上可接受的赋形剂进行配置，以可注射组合物的形式方便地施用。注射方式可为鼻内给药，肌肉给药，皮下给药，静脉内给药，皮内给药，腹膜内给药或其他已知的途径。本发明的脂肽已证明了鼻内给药的效力。如果采用静脉注射，最好再在包含一种或多种液体和营养补充物。制备和分析抗体的方法在本领域应为人所熟知(参见例如，ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988,在此处通过引用合并入本发明中)。

在生产抗体时，脂肽的效能是通过用一种含有脂肽的配方，对如小鼠，大鼠，兔，豚鼠，猪，狗，马，牛，山羊或猪等动物进行免疫，再监测 B 细胞表位的免疫应答来确定的，如实施例中所述。初级免疫应答和次级免疫应答都被监测。可以使用传统的免疫测定技术，如 ELISA 或放射性免疫测定来对抗体滴度进行测定。

可以通过对免疫动物在免疫后的不同时段进行血液抽样来对多克隆抗体的产生进行监测。如果想获得期望的抗体滴度，还可以进行二次的加强给药。重复加强免疫和滴度测定的过程，直到达到适合的滴度。当达到理想的免疫原性水平时，对免疫动物进行采血，分离血清并保存起来，和/或将该动物用来生产单克隆抗体 (Mabs)。

可以采用多种众所周知的技术的任一种来获得单克隆抗体 (Mabs)，例如在 US 4,196,265 中所列举的方法，在此通过引用并入

本发明。

比如，在足以刺激抗体生成细胞的条件下，将用有效量的本发明的脂肽对适合的动物进行免疫。小鼠和大鼠等啮齿类动物是首选的动物，除此之外也可以使用兔，绵羊或青蛙的细胞。使用大鼠会具有某些优点，但优选的是小鼠，尤其优选最常用和可产生更高比例稳定融合的 BALB/c 小鼠。

在免疫之后，能生成抗体尤其是 B 淋巴细胞（B 细胞）的体细胞被选择用于产生单克隆抗体的方法中。这些细胞可以从活体的脾脏，扁桃腺，淋巴结或外周血样本中获得。优选是脾细胞和外周血细胞，选择前者是因为它所富含处于成浆细胞的分裂期的抗体生成细胞，选择后者则是因为外周血很容易获得。通常的做法是对一组动物进行免疫，并将抗体滴度最高动物的脾脏摘除。采用注射器对脾脏进行匀浆以得到脾淋巴细胞。典型地，一只免疫小鼠的脾脏含有大约 5×10^7 到 2×10^8 个淋巴细胞。

来自于免疫动物的 B 细胞随后将与无限增殖骨髓瘤细胞进行融合，它通常来源于采用脂肽配方进行免疫的同种属的动物。适用于杂交瘤产生融合步骤的骨髓瘤细胞系优选是不产生抗体的，它具有极高的融合效率且缺乏酶，这使它们不能在某些只支持期望的融合细胞或杂交瘤生长的选择性培养基中生长。任意一种骨髓瘤细胞都可以被采用，这已为本领域技术人员所熟知（比如：鼠 P3-X63/Ag8，X63-Ag8.653，NS1/1.Ag 4 1，Sp210-Ag14，FO，NSO/U，MPC-11，MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0；或大鼠 R210.RCY3，Y3-Ag 1.2.3，IR983F 和 4B210；以及 U-266，GM1500-GRG2，LICR-LON-HMy2 和 UC729-6）。优选的鼠骨髓瘤细胞是 NS-1 骨髓瘤细胞系（也称为 P3-NS-1-Ag4-1），它可方便地从 NIGMS 人类遗传突变细胞库中获得，获取号为 GM3573。或者可以采用具有 8-叠鸟嘌呤的抗性的鼠骨髓瘤 SP2/0 不产病毒性细胞系。

为了产生抗体生成脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂种细胞，体细胞和骨髓瘤细胞在含有一种或多种促进细胞膜融合试剂（化学的或电子的）存在的条件下，以大约 20: 1 到大约 1: 1 的比例分别进行

混合。采用仙台病毒进行融合的方法已由 Kohler 和 Milstein 等人进行了报道(Kohler 和 Milstein, *Nature* 256, 495-497, 1975; 以及 Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519, 1976.)。使用聚乙二醇 (PEG), 比如 37%(v/v) PEG 进行融合的方法也由 Gefer 等人进行了详细地描述 (Gefer 等, *Somatic Cell Genet.* 3, 231-236, 1977.)。同样也可以采取电诱导的融合方法。

杂种细胞的扩增是通过在含有阻断核苷酸在组织培养基中从头合成的试剂的选择性培养基中进行培养实现的。典型的和优选的试剂是氨基喋呤, 氨甲喋呤和重氮丝氨酸。氨基喋呤和氨甲喋呤可阻断嘌呤和嘧啶的从头合成, 而重氮丝氨酸只能阻断嘌呤的合成。当使用氨基喋呤和氨甲喋呤时, 培养基中需要补充添加作为核苷酸源的次黄嘌呤和胸苷 (HAT 培养基)。而当使用重氮丝氨酸时, 培养基中需要补充添加次黄嘌呤。

优选选择性培养基是 HAT, 因为只有那些可以启动核苷酸补救途径的杂种细胞才可以在 HAT 培养基中存活, 而缺乏补救途径关键酶 (例如次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶或 HPRT) 的杂种细胞则不能存活。B 细胞可以启动这一补救途径, 但它们在培养基中的寿命很短, 通常在约两星期之内就死亡。所以, 在选择性培养基中存活下来的细胞只可能是来自于骨髓瘤细胞和 B 细胞的杂种细胞。

扩增后的杂种细胞被用于针对抗体特异性和/或滴度的功能性选择, 比如免疫测定 (例如放射免疫分析, 酶免疫测定, 细胞毒性分析, 噬菌斑测定, 点免疫结合分析等)。

经过选择的杂种细胞随后被顺次稀释并克隆到单独的抗体生成细胞系中, 这些克隆随后被不定繁殖以提供单克隆抗体。该细胞系可以通过两种基本方式用于单克隆抗体的生产。杂种细胞样本经腹膜腔被注射到用于提供体细胞和骨髓瘤细胞以供原始融合的组织相容性动物。被注射的动物发育分泌由融合杂种细胞所产生的特异性单克隆抗体的肿瘤。该动物的体液, 如血清和腹水可以被抽除以产生高浓度的单克隆抗体。也可以在体外对单个的细胞系进行培养, 其中单克隆抗体被自然地分泌到培养基中并从中容易地获得高浓度的单克隆抗

体。如果需要的话,可以采用过滤,离心,以及多种层析方法如 HPLC 或亲和层析法,对通过以上方法获得的单克隆抗体进行进一步纯化。

通过本领域众所周知的方法获得的本发明中的单克隆抗体,也含有抗独特型抗体。本发明中的单克隆抗体也可能是单克隆复共轭对配合物(即两个或更多抗体分子的杂种细胞)。在另一个实施例中,本发明的单克隆抗体是嵌合的单克隆抗体。在一个方法中,嵌合的单克隆抗体是通过对含有鼠抗-PSA 生成细胞启动区,引导肽和可变区序列,以及人抗体基因恒定区外显子的重组 DNA 进行克隆而得到的。被这样的重组基因所编码的抗体是鼠-人嵌合体。它的抗体特异性决定于来自于鼠序列的可变区,其同种型的抗体特异性则由来源人 DNA 的恒定区决定。

在另一实施例中,通过本领域中众所周知的技术获得的,根据本发明的单克隆抗体是一种“人源化”的单克隆抗体。即鼠的互补决定区(CDRs),从鼠 Ig 重链和轻链 V 区转移到了人的 V 区,伴随着一些人类的残基取代了相应结构区域的鼠源对应残基。根据本发明的“人源化”单克隆抗体尤其适合在体内诊断和治疗方法中进行使用。

如上所述,基于本发明的单克隆抗体及其片断可以通过本领域中众所周知的方法在体外和体内进行扩增。体外的扩增可以在合适的培养基如 DMEM 或 RPMI1640 培养基中得以实现,可选择向其中补充哺乳动物血清如胎牛血清或痕量因子以及维持生长的添加成分,比如养细胞,即正常小鼠腹膜渗出液细胞,脾细胞,骨髓巨噬细胞等体外生产可以提供相对纯粹的抗体,并允许对期望的抗体进行大规模的生产。包括纯系悬浮培养(在一个气动反应器,或一个连续搅拌反应器,或固定化,或截流细胞培养)等对大规模杂种细胞的组织培养条件在本领域内为众人所知。

本发明中的大规模的单克隆抗体也可以通过在体内进行杂种细胞的扩增来获得。将细胞克隆给药到与其亲代细胞具有组织相容性的动物体内(即同系的小鼠),以引起抗体生成肿瘤的生长。主要用烃尤其是降植烷(四甲基五癸烷)等油在给药前进行对动物进行抗原接

触。

与本发明相一致的是，单克隆抗体的片断是从通过对用上述方法得到的单克隆抗体进行胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化，和/或通过化学还原切断二硫键等方法得到的。本发明中单克隆抗体的偶联物，是通过本领域中众所周知的方法，如将通过上述方法得到的单克隆抗体与偶合试剂如戊二醛或高碘酸盐在酶的作用下作用得到的。含有荧光素标记的偶合物是在含有这些偶合试剂的条件下制备的，或者与异硫氰酸盐进行反应得到的。含有金属螯合剂的偶合物也是通过类似的方法得到的。其他与抗体偶合的部分包括诸如 ^3H , ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , 和 ^{152}Eu 等放射性核。本发明中放射性标记的单克隆抗体是根据本领域中众所周知的方法得到的。比如，通过与碘化钠或碘化钾，化学氧化剂次氯酸钠，或乳过氧化物酶等酶氧化剂相接触，将单克隆抗体进行碘化。本发明中的单克隆抗体可通过配给交换进行镓⁹⁹的标记，比如，通过含有锡的溶液还原高镓酸盐，将剩余的镓螯合至 Sephadex 柱子上，并通过直接标记技术将抗体引入到这个柱子上（即，对高镓酸盐的温育，比如 SnCl_2 的还原剂，比如邻苯二甲酸钠钾的缓冲液，和抗体）。

可以采用任何一种免疫分析的方式来监测脂肽配方引起的抗体产生。免疫分析的最基本和直接原理就是结合分析。某些首选的免疫分析是本领域中为众人所知的多样的酶联免疫吸收分析（ELISAs）和放射免疫分析（RIA）。对组织切片进行免疫组化检测也是特别有用的方法。然而，除此之外的 Western 杂交，点杂交，FACS 分析等都是简便易行的检测方法。

更优选检测结果可以产生出定量的数据。

例如，对抗体进行简单的竞争性分析。一种已知的抗体准备与 B 细胞表位相结合，将要检测的抗体与含有该 B 细胞表位的抗原合成物进行温育，更优选一种天然的抗原。“抗原合成物”一词在这里的意

思是指具有某种可接近形式、含有 B 细胞表位某些特征的任何合成物。优选在 ELISA 板上用抗原包被的孔。在一个实施例中，将已知抗体与待测抗体在使用前，以不同的比例（1:1，1:10，1:100）进行一段时间的预混合。如果已知抗体被标记上，对结合于该抗原标记的直接检测就可实现；相对于未混合的样品待测抗体的分析将确定竞争和交联反应。或者使用对已知或待测抗体特异的二抗，也可以确定其竞争情况。

与抗原合成物结合的抗体，可以与已知抗体进行有效的竞争，从而显著的降低后者的结合。将在没有任何待测抗体的条件下，已知抗体的反应性设为对照。待测抗体出现后反应性的降低说明了待测抗体与 B 细胞表位发生了结合（即，与已知抗体发生了交叉反应）。

在一个示范性的 ELISA 中，针对与 B 细胞表位的抗体被固定于具有蛋白亲和性的表面上，比如聚苯乙烯微孔板的小孔中。然后将含有 B 细胞表位的合成物加入这些小孔。在经过结合与洗脱以去除非特异性结合的免疫复合物后，可以检测到结合的表位。通过加入结合于 B 细胞表位的可被检测到的二抗，可以使得检测更加容易。这类 ELISA 是一种简单的“三明治型 ELISA”。同样也可以在加入二抗以后，再加入与二抗具有结合能力、且连有检测标记的三抗，进行检测。

不育的诱导

本发明中一种含有某种生殖性激素或激素受体抗原性 B 细胞表位，具有适当构型的脂肽，可在该对象体内诱导不育。

因此，本发明从另一方面提供了一种在给药了含有结合有一个或多个脂质部分多肽的单独脂肽的对象中诱导不育的方法，其中：

(i) 这样的多肽含有：

(a) 一种辅助 T 细胞表位的氨基酸序列和一种生殖性激素或激素受体 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所属的氨基酸序列并不相同；以

及

(b)通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基，或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团，与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基；以及

(ii)直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基，或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分；以及

(iii) 在足以引起对于所述抗原性 B 细胞表位的体液免疫反应的情况下，对受体动物进行给药的脂肽。

脂肽可以任何在这里描述的方便配方形式进行给药。

“体液免疫”的意思是对于足以产生阻止卵子发生，精子发生，受精，着床或胚胎发育 B 细胞表位进行的二次免疫应答。

更优选，体液免疫产生了针对于受体中 B 细胞表位持续水平的抗体。“持续水平的抗体”意思是产生足够水平针对于阻止卵子发生，精子发生，受精，着床或胚胎发育 B 细胞表位的循环抗体。

优选，对雌性受体来说，抗体水平至少持续一个生殖循环，更优选至少 6 个月，9 个月，12 个月或 2 年。

优选，B 细胞表位来自于黄体激素释放激素 (LHRH)，促卵泡素 (FSH)，黄体素 (LH)，人绒毛膜促性腺激素 (hCG)，透明带蛋白如 ZP3，或 FSH 受体，人或猪 ZP3a 上的氨基酸序列。

在这一种类中，优选 B 细胞表位含有 β -hCG 的 C 末端部分；人 ZP3 的氨基酸残基 323-341；猪 ZP3a 的氨基酸残基 8-18 或 272-283 或 319-330。

更优选，B 细胞表位含有从下列序列挑选出来的氨基酸序列：SEQ ID NO:2， SEQ ID NO:3， SEQ ID NO:4， SEQ ID NO:76， SEQ ID NO:77， SEQ ID NO:78， SEQ ID NO:79， SEQ ID NO:80， SEQ ID NO:81， SEQ ID NO:82， SEQ ID NO:83， 和 SEQ ID NO:84。

优选辅助 T 细胞表位含有从下列序列挑选出来的氨基酸序列：
SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:44, 以及 SEQ ID NO 为 1, 或 18-56 中任意一条。

在本发明的一个优选实施例中, 辅助 T 细胞表位含有以下任意一条的氨基酸序列, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:44; B 细胞表位来自于含有 LHRH 及 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列。与优选实施例一致, 多肽的氨基酸序列来源于 SEQ ID NO5-16, 103 或 104。同样为与优选实施例一致, 优选不是主要的) 含有脂氨基酸的脂质部分是从含有下面的组中挑选出来的: (i) Pam₂Cys; (ii) Ste₂Cys; (iii) Lau₂Cys; 和(iv) Oct₂Cys。

对于 LHRH 可以产生持续的抗体证明了本发明中脂肽作为一种作为诱导不育或避孕试剂的疫苗活性成分的通用效用。

因此, 本发明从另一方面提供了一种含有药物学可接受的稀释液, 以及含有单独结合于一个或多个脂质部分多肽的脂肽避孕试剂, 其中:

(i) 这样的多肽含有:

(a) 一种 T 细胞表位的氨基酸序列和一种生殖激素或激素受体的 B 细胞表位, 其中所述的氨基酸序列并不相同; 以及

(b) 通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基, 或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团, 与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基; 以及

(c) 直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基, 或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分。

本发明的这种疫苗/避孕试剂可以由含有一种或多种载体或赋形

剂或其他在“脂肽配方”中描述过的试剂构成。

类似地，受体动物的进行疫苗/避孕剂的给药也可通过上述方法完成。优选是人，或动物，比如农业动物，实验动物，家养动物，凶猛动物或野生动物。

对于 A 型微球菌的免疫

A 型微球菌（GAS）是一种相对温和的疾病细菌代理，比如脓毒性咽喉炎和脓疱病，以及少有的，严重的，甚至是危及生命的坏死性肌膜炎和链球菌中毒休克综合症。严重甚至是危及生命的 GAS 疾病可能发生在当细菌进入机体中通常不含有细菌的部分时，比如血液，肌肉或肺。一个感染名词“入侵性 GAS 疾病”。两种最严重形式的入侵性 GAS 疾病就是坏死性肌膜炎和链球菌中毒休克综合症。坏死性肌膜炎破坏肌肉，脂肪和皮肤组织。STSS 导致血压急剧降低和脏器丧失功能（肾脏，肝脏和肺）。大约 20%的坏死性肌膜炎患者和超过一半的 STSS 患者会死亡。大约 10-15%患有其他形式入侵性 GAS 疾病的患者也会死亡。在 1999 年美国大约发生了 9,400 起入侵性 GAS 疾病。

入侵性 GAS 感染通常通过越过被感染人的防御系统而对其进行感染，比如，某人皮肤上的伤口可以使得该细菌进入到组织内，或当某人遭受包括 HIV/AIDS 等慢性疾病或影响免疫系统疾病影响，抗感染能力下降时。同样，一些 GAS 有毒菌株比其他菌株更容易引发严重的疾病。对遭受癌症，糖尿病，肾透析和其他使用类固醇进行药物治疗的慢性病人来说，他们的危险性更大。

例如，本发明中由含有 A 型链球菌抗原，尤其是 M 蛋白的 B 细胞表位组成的具有适合构型的脂肽，可以对动物进行 GAS 免疫；也对于 GAS 的再次感染，提供了一种保护性免疫应答，尤其是诱导针对于 GAS 的 M 蛋白的 IgG，唾液 IgA 和粪 IgA 的产生，以降低 GAS

诱导的死亡率。

因此，本发明从另一个方面提供了一种可对给药了含有结合于一个或多个脂质部分多肽的单独脂肽的所述受体诱导产生对于 A 型链球菌的免疫应答，其中：

(iv) 这样的多肽含有：

(b) T 细胞表位的氨基酸序列和一种 A 型链球菌抗原的 B 细胞表位，其中所述的氨基酸序列并不相同；以及

(c) 通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基，或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团，与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基；以及

(v) 直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基，或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分；以及

(vi) 在足以引起对于所述抗原性 B 细胞表位的体液免疫反应的情况下，对受体动物进行给药的脂肽。

脂肽可以任何在这里描述的方便配方形式进行给药。

“体液免疫”的意思是对于足以诱导产生血清 IgG，唾液 IgA 或粪 IgA 的 B 细胞表位进行的二次免疫应答，或提供一种对于 A 型链球菌再次感染的保护性免疫反应。

更优选体液免疫产生了针对于受体中 B 细胞表位持续水平的抗体。“持续水平的抗体”意思是产生足够水平防止 A 型链球菌感染的传播，和/或降低受到 A 型链球菌感染受体动物的致病率或死亡率的 B 细胞表位循环抗体。

优选体水平至少持续 6 个月，9 个月，12 个月或 2 年。

优选 B 胞表位来自于 A 型链球菌 M 蛋白的氨基酸序列。

在这一种类中，首选的 B 细胞表位含有 SEQ ID NO:101 多肽中

的氨基酸序列。

首选的辅助 T 细胞表位含有从下列序列挑选出来的氨基酸序列：SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:44, 以及 SEQ ID NO 为 1, 或 18-56 中任意一条。

在本发明的一个优选实施例中, 辅助 T 细胞表位含有 SEQ ID NO:24 中的氨基酸序列, 而 B 细胞表位含有 SEQ ID NO:101 中的氨基酸序列。与优选实施例一致, 多肽的氨基酸序列来源于 SEQ ID NO105-108。同样为与优选实施例一致, 首选(但不是主要的)的含有脂氨基酸的脂质部分是从含有下面的分子式 (I) 或 (II) 中挑选出来的, 在这里描述的其他脂也同样可用。

对于 J14 多肽可以产生持续的抗体证明了本发明中脂肽作为一种作为对 A 型链球菌提供免疫疫苗活性成分的通用性。

因此, 本发明从另一方面提供了一种含有药理学可接受的稀释液, 以及含有单独结合于一个或多个脂质部分多肽的 A 型链球菌疫苗, 其中:

(ii) 这样的多肽含有:

(b) 一种 T 细胞表位的氨基酸序列和一种 A 型链球菌抗原的 B 细胞表位, 其中所述的氨基酸序列并不相同; 以及

(c) 通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基, 或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团, 与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基; 以及

(iii) 直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基, 或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分。

本发明的这种疫苗可以由含有一种或多种载体或赋形剂或其他在“脂肽配方”中描述过的试剂构成。

类似地, 对受体动物的进行疫苗的给药也可通过上述方法完成。

优选受体是人，或动物，比如农业动物，实验动物，家养动物，凶猛动物或野生动物。

对胃酸过量和不受调控分泌的抑制与预防

已知胃泌素可以通过壁细胞刺激胃酸的分泌，其活性由胃泌素与胃泌素受体或缩胆囊素的结合来进行调控的。胃泌素的末端 4-5 个氨基酸残基提供了全长蛋白质的受体特异性和活性。胃泌素末端的 5 个氨基酸残基并成为五肽胃泌素。作为过量和不受调控胃酸分泌的后果，不受调控的胃泌素表达和分泌可引起高胃泌素血症，并导致 Zollinger-Ellison 综合症，胃十二指肠溃疡，胰或十二指肠促胃液素瘤的形成。针对于胃泌素多肽的内部分泌，可以使用对于胃泌素的抗体进行胃泌素免疫中和可以用来阻止胃酸的分泌。

例如，本发明中由含有胃泌素多肽 B 细胞表位组成的具有适合构型的脂肽，可以对动物进行胃泌素免疫；或在胃酸分泌受到抑制的小鼠模型或其他哺乳动物中得到胃泌素过量分泌。这里的数据证明了在诱导对于胃泌素和胃泌素免疫中和的体液免疫，以及在遭受由于胃酸的过量和不受调控的分泌引起的高胃泌素血症, Zollinger-Ellison 综合征，胃溃疡或十二指肠溃疡阻止胃酸分泌，以及在减少或防止胰和十二指肠中胃泌素分泌肿瘤的形成（预防和/或治疗促胃液素瘤）过程中，脂肽的普遍效用。

因此，本发明从另一方面提供了一种含有药理学可接受的稀释液，以及含有单独结合于一个或多个脂质部分多肽对应于胃泌素的免疫应答，其中

(vii) 这样的多肽含有：

(c) 一种 T 细胞表位的氨基酸序列和一种胃泌素抗原的 B 细胞表位，其中所述的氨基酸序列并不相同；以及

(d) 通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基，或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团，与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸

残基或内部赖氨酸类似物残基；以及

(viii) 直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基，或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分；以及

(ix) 在足以引起对于所述抗原性 B 细胞表位的体液免疫反应的情况下，对受体动物进行给药的脂肽。

脂肽可以任何在这里描述的方便配方形式进行给药。

“体液免疫”的意思是对于足以产生对于胃泌素的血清 IgG 的 B 细胞表位进行的第二次免疫应答。

更优选，体液免疫产生了针对于受体中 B 细胞表位持续水平的抗体。“持续水平的抗体”意思是产生足够水平以阻止对于胃泌素的胃酸的过量和不受调控的分泌的 B 细胞表位循环抗体。

优选，抗体水平至少持续 6 个月，9 个月，12 个月或 2 年。

优选 B 细胞表位含有五肽胃泌素的氨基酸序列。在这一种类中，优选 B 细胞表位含有 SEQ ID NO:102 多肽中的氨基酸序列，或包含全长胃泌素蛋白或任何具有其免疫片段的 B 细胞表位。

优选辅助 T 细胞表位含有从下列序列挑选出来的氨基酸序列：SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:44，以及 SEQ ID NO 为 1，或 18-56 中任一序列。

在本发明的一个优选实施例中，辅助 T 细胞表位含有 SEQ ID NO:24 中的氨基酸序列，而 B 细胞表位含有 SEQ ID NO:102 中的氨基酸序列。与优选实施例一致，多肽的氨基酸序列来源于 SEQ ID NO:109-112。同样为与优选实施例一致，首选（但不是主要的）的含有脂氨基酸的脂质部分是从含有下面的分子式 (I) 或 (II) 中挑选出来的，在这里描述的其他脂也同样可用。

对于五肽胃泌素或胃泌素可以产生持续的抗体证明了本发明中脂肽作为一种作为必要时对降低胃泌素副作用提供疫苗活性成分的通用性。

因此，本发明从另一方面提供了一种含有药理学可接受的稀释液，以及含有单独结合于一个或多个脂质部分多肽的，针对于胃泌素分泌过多诱导的情形或疾病的疫苗，其中：

(iv) 这样的多肽含有：

(c) 一种 T 细胞表位的氨基酸序列和一种胃泌素多肽抗原的 B 细胞表位，其中所述的氨基酸序列并不相同；以及

(d) 通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基，或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团，与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基；以及

(v) 直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基，或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分。

本发明的这种疫苗可以由含有一种或多种载体或赋形剂或其他在“脂肽配方”中描述过的试剂构成。

类似地，对受体动物的进行疫苗的给药也可通过上述方法完成。优选受体是人。

以下将对本发明所涉及的若干实施例和图表进行详述。

优选实施例的详细描述

脂肽：

本发明的一个方面提供了含有与一个或多个脂质部分缀合的单独脂肽，其中：

这样的多肽含有以下的氨基酸序列：

一种辅助 T 细胞表位的氨基酸序列和 B 细胞表位的氨基酸序列，其中这些氨基酸序列并不相同，以及

通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基，或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团，与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基；以及

直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基，或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分。

在这里，“脂肽”一词的意思是任何经非自然反应获得的物质合成物，这样的合成物包含一种或多种脂质部分，一种或多种氨基酸序列，并可直接或间接与其缀合，该合成物充分游离于非特异性非缀合的脂或蛋白。

“直接”一词的意思是一个脂质部分和氨基酸序列没有被间隔分子分开。

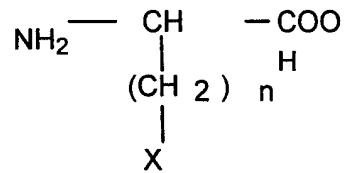
“间接”一词的意思是一个脂质部分和氨基酸序列被一个含有单个或多个碳原子的分子的间隔物所分隔，比如一个或多个氨基酸残基。

氨基酸序列的长度可以任意，只要其范围符合同时具有辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位的功能的长度即可。

同样的，“内部赖氨酸类似物残基”意思是指同时含有辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位多肽链中的赖氨酸类似物残基，其中这样的赖氨酸类似物既不是该多肽链的 N 末端残基，也不是 C 末端残基。成为是否是“内部”赖氨酸残基的标准是采用 *mutatis mutandis* 的方法来确定是否某个赖氨酸类似物是内部的。

“赖氨酸类似物”一词的意思是一种可以参与到一个多肽链的内部，并具有适合于与脂质部分相结合侧链基团的化合物，包括单一的

氨基酸类似物或含有这样氨基侧链非自然形成的氨基酸。首选的赖氨酸类似物包括以下通式 (V) 中的化合物:



其中, n 代表从 0 到 3 的整数, X 是来自于含有 NH, O 和 S 等基团内部赖氨酸类似物残基的一个末端侧链基团。更适宜的情况是 n 是从 1 到 3 的整数, 且 X 是一个氨基基团, 且赖氨酸类似物是一种二氨基化合物。在其中一个优选实施例中, 赖氨酸类似物选自于含有 2, 3-二氨基丙酸 (Ddr), 2, 4-二氨基丁酸 (Dab) 和 2, 5-二氨基戊酸 [即鸟氨酸 (Orn)]。

本领域技术人员都会理解“ ϵ -氨基酸”的意思。

“末端侧链基团”一词的意思是指赖氨酸类似物侧链上, 远离该类似物 α 碳原子的一个取代基团, 比如 2, 3-二氨基丙酸的 β 氨基, 2, 4-二氨基丁酸的 γ 氨基或者是鸟氨酸的 δ 氨基。

发明人发现大多数有效的脂肽都具有极高的溶解性。本发明中脂肽在缺乏外源佐剂时诱导抗体反应的相对活性, 可以通过它们能在未成熟树突细胞 (DC) 表面正调节 MHC II 类分子的表达活力得到反应, 尤其是 Winzler 等人所描述的 D1 细胞 (Winzler *et al* *J Exp Med* 185, 317, 1997)。

本领域技术人员都熟知, 赖氨酸中的 ϵ -氨基是该氨基酸中的侧链末端氨基基团。使用赖氨酸的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团与脂质部分进行交联, 有助于作为共-线性氨基酸序列, 可以同时合并辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位的肽部分合成。脂质部分通过赖氨酸残基的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物末端侧链基团相连的脂肽和脂质

部分通过赖氨酸 α -氨基相连的脂肽有明显的结构特征区别。因为后者脂肽的只含有可以与 N 末端残基缀合的脂质部分。

因此，尤其首选那些位于肽部分之内，与脂质部分相结合，至少含有一个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物，用来分隔具有免疫学功能性的细胞表位。比如，内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基可以作为一种细胞表位之间的隔离物和/或连接残基。在自然条件下，当内部赖氨酸或内部赖氨酸类似物位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间时，脂质部分将会与这些表位之间的某个位置进行连接，虽然这样会使得多肽链的氨基酸序列形成一个新的分支。更适宜的情况是，采用单一的内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物来分隔 B 细胞与辅助 T 细胞表位（例如，以下序列 ID 序号中的任何一个：7, 9, 13, 106, 108, 110 或 112），在这样的情况下，脂质部分将与位于辅助 T 细胞表位和抗原性 B 细胞表位之间氨基酸序列上赖氨酸残基的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物末端侧链基团相连接。

内部赖氨酸的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团可以通过化学基团进行保护，这些基团与那些用来保护 α -氨基和其他氨基酸侧链功能基团互成直角。这样的话，赖氨酸的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团就可以被选择性的暴露出来，与其他化学基团进行结合，比如含脂的部分，可以恰当的与 ϵ -氨基或末端侧链基团进行特异性结合。

采用 Fmoc 化学方法进行多肽的合成，可以通过对 Fmoc-Lys(Mtt)-OH ($N\alpha$ -Fmoc- $N\epsilon$ -4-甲基三苯甲基-L-赖氨酸)氨基酸残基进行修饰来对赖氨酸的 ϵ 氨基进行正交的保护，同样也可以预期也可用于多种赖氨酸类似物侧链基团进行类似的正交保护，比如：Fmoc-Orn(Mtt)-OH (N-Fmoc-N-4-甲基三苯甲基-L-鸟氨酸)，Fmoc-Dab(Mtt)-OH (N-Fmoc-N-4-甲基三苯甲基-L-二氨基丁酸) 和 Fmoc-Dpr(Mtt)-OH (N-Fmoc-N-4-甲基三苯甲基-L-二氨基丙酸)侧链

保护基团 Mtt 对于这样的条件是稳定的，即存在于赖氨酸或赖氨酸类似物的 α 氨基的 Fmoc 基团被移走，但可以选择性地被存在于二氯甲烷中的 1% 三氟乙酸选择性地移走。Fmoc-Lys(Dde)-OH (N α -Fmoc-N ϵ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧杂环己基-1-内鎗盐)乙基-L-赖氨酸)或 Fmoc-Lys(ivDde)-OH (N α -Fmoc-N ϵ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧杂环己基-1-二价)-3-甲基丁基-L-赖氨酸) 也能被用于本文，其中的 Dde 侧链保护基团在通过联氨处理进行多肽合成期间被选择性地移走。

Boc-Lys(Fmoc)-OH 可用于 Boc 化学多肽合成，侧链保护基团 Fmoc 可以通过哌啶或 DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene) 处理进行选择去除，如果用三氟乙酸对 α 末端的 Boc 基团进行去除时，则 Fmoc 可以继续存在。

对每一种与辅助 T 细胞表位，B 细胞表位和脂的结合情况来说，辅助 T 细胞表位与 B 细胞表位之间的最适距离，以及随之而来的本发明中脂肽内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基的精确位置和数量，很容易根据经验来确定。在合成肽与多肽的条件下，对所采用合成方法的限制可以被用来部分的决定 辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间的分隔是可完成的，以及内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基的数量和位置。

更优选，辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位至少被包含一个内部赖氨酸残基或赖氨酸类似物残基的一个或两个或三个或四个或五个氨基酸残基所分隔。

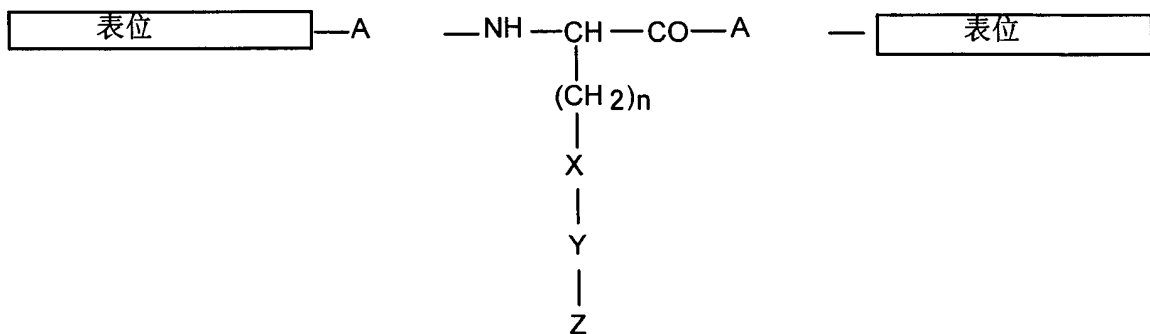
很清楚，本发明致力于将多个脂质部分连接到肽部分上。为了达到这个目的，多肽链可以包含多个内部赖氨酸残基或多个内部赖氨酸残基类似物以及它们的混合形式。在与脂质部分相连时，如果多个内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基的位置过于紧密时，会产生空间位阻的情况，从而导致终产物的混合，或者是产率的降低。

与此相类似的一种考虑情况是这样一种事实，即并不需要含有辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位的整个氨基酸序列，才能具有免疫功能。从而，同时拥有这些表位的上述氨基酸序列可以拥有不具有辅助 T 细胞活性或 B 细胞表位的额外序列。额外序列含有一个或多个内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基，这些残基的末端侧链基团可以作为与脂质部分结合时的位点。很自然，首要的问题是保持辅助 T 细胞的与 B 细胞表位的功能。

与脂质部分结合时内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物的位置也应该经过选择，这样才能使得在注射了脂肽的机体中，与脂质部分进行的结合不会影响到辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位的免疫功能。比如，依赖于对脂质部分的选择，该脂质部分与与 B 细胞表位内部的结合可以在分子空间排布上阻碍抗原呈递。

通式 (VI) 提供了本发明中脂肽的一种广泛首选形式，其中内部赖氨酸或内部赖氨酸类似物被放置于辅助 T 细胞和 B 细胞表位之间。

分子式 (VI)



其中：

表位指的是辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位

A 可以存在或不存在，它含有 1 到 6 残基长度的一种氨基酸间隔；

n 是 1, 2, 3 或 4 的整数；

X 是一个从含有 NH, O 和 S 官能团中挑选出来的的末端侧链基团, 更优选含有 NH 的官能团;

Y 可以存在或不存在, 它含有 1 到 6 残基长度的一种氨基酸间隔, 其中优选氨基酸间隔包括精氨酸, 丝氨酸或 6-氨基己酸; 以及

Z 是一种脂质部分, 更优选一种从含有 Pam₂Cys, Pam₃Cys, Ste₂Cys, Lau₂Cys 和 Oct₂Cys. 的组中挑选出来的脂氨基酸部分。

本领域的技术人员应该意识到, Ste₂Cys 也被认为是 S-[2,3-双(stearoyloxy) 丙基] 半胱氨酸或 distearoyl-S-丙三基-半胱氨酸; Lau₂Cys 也可被认为是 S-[2,3-双(lauroyloxy) 丙基] 半胱氨酸或 dilauroyl-S-丙三基-半胱氨酸); Oct₂Cys 也可被认为是 S-[2,3-双(octanoyloxy) 丙基] 半胱氨酸或二辛胺-S-丙三基-半胱氨酸)。

对本领域的技术人员来说, 辅助 T 细胞表位是指任意一种可以提高目标机体(即人类机体, 或一种具体的非人类动物机体, 比如小鼠, 大鼠, 豚鼠, 狗, 马, 猪或山羊) 免疫应答反应的辅助 T 细胞表位。首选的辅助 T 细胞表位包含至少 10 到 24 残基长度的氨基酸, 更普通的情况是包含 15 到 20 个残基长度的氨基酸。

特别优选混杂或可允许的辅助 T 细胞表位, 因为它们很容易经化学合成而且不需要使用含有多个辅助 T 细胞表位的长多肽。

适合在应用于本发明脂肽中, 含有混杂或可允许的辅助 T 细胞表位的实例, 是从含有下述成分的基团中挑选出来的:

一种啮齿动物或人类破伤风毒素多肽(TTP)的辅助 T 细胞表位, 比如 TTP 的 830-843 残基(Panina-Bordignon *et al.*, *Eur. J. Immun.* 19, 2237-2242, 1989);

一种啮齿动物或人类恶性疟原虫 pfg27 的辅助 T 细胞表位;

一种啮齿动物或人类乳酸脱氢酶的辅助 T 细胞表位;

一种啮齿动物或人类 HIV 或 HIVgp120 外壳蛋白的辅助 T 细胞表位 (Berzofsky *et al.*, *J. Clin. Invest.* 88, 876-884, 1991);

一种从已知锚定蛋白氨基酸序列 (Alexander *et al.*, *Immunity* 1, 751-761, 1994) 进行预测人工合成的人辅助 T 细胞表位 (PADRE);

一种啮齿动物或人类麻疹病毒融合蛋白的辅助 T 细胞表位 (MV-F; Muller *et al.*, *Mol. Immunol.* 32, 37-47, 1995; Partidos *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 71, 2099-2105, 1990);

一种含有至少 10 个氨基酸残基犬瘟热病毒融合蛋白 (CDV-F) 的辅助 T 细胞表位, 例如 CDV-F 中的 148-283 氨基酸残基 (Ghosh *et al.*, *Immunol.* 104, 58-66, 2001; 国际专利申请 WO 00/46390);

一种从 MUC1 粘蛋白 (美国专利 0020018806) 细胞外串联重复结构域多肽序列衍生而来的辅助 T 细胞表位;

一种啮齿动物或人类流感病毒血细胞凝集素 (IV-H) (Jackson *et al. Virol.* 198, 613-623, 1994) 的辅助 T 细胞表位; 以及

一种牛或骆驼口蹄疫病毒 VP3 蛋白 (FMDV-0₁ Kaufbeuren 病毒株) 的辅助 T 细胞表位, 它包含 VP3 中 173-176 残基或与 FMDV 其他病毒株相对应的氨基酸序列。

本领域中的技术人员应意识到, 一种辅助 T 细胞表位可以为一种或多种不同种属的哺乳动物所识别。由此, 在这里对任意辅助 T 细胞表位的命名并不仅限于识别该细胞表位免疫系统的物种本身。比如, 一种啮齿动物辅助 T 细胞表位可以被小鼠, 大鼠, 兔, 豚鼠, 以及其他啮齿动物, 或人类, 或狗等动物的免疫系统所识别。

更优选, 辅助 T 细胞表位具有的氨基酸序列是从含有以下序列的基团中挑选出来的:

GALNNRFQIKGVELKS 来自于 IV-H (序列 ID 序号: 1);

ALNNRFQIKGVELKS 来自于 IV-H (序列 ID 序号: 18);

LSEIKGVIVHRLEGV 来自于 MV-F (序列 ID 序号: 19);
TAAQITAGIALHQSNLN 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 20);
IGTDNVHYKIMTRPSHQ 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 21);
YKIMTRPSHQYLVIKLI 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 22);
SHQYLVIKLIPNASLIE 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 23);
KLIPNASLIENCTKAEL 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 24);
LIENCTKAELGEYEKLL 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 25);
AELGEYEKLLNSVLEPI 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 26);
KLLNSVLEPINQALTLM 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 27);
EPINQALTLMTKNVKPL 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 28);
TLMTKNVKPLQSLGSGR 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 29);
KPLQSLGSGRRQRRFAG 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 30);
SGRRQRRFAGVVLGVA 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 31);
FAGVVLGVALGVATAA 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 32);
GVALGVATAAQITAGIA 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 33);
GIALHQSNLNAQAIQSL 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 34);
NLNAQAIQSLRTSLEQS 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 35);
QSLRTSLEQSNKAIIEEI 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 36);
EQSNKAIIEEIREATQET 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 37);
SSKTQHTTQQDRPPQPS 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 38);
QPSTELEETRTSRARHS 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 39);
RHSTTSAQRSTHYDPRT 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 40);
PRTSDRPVSYTMNRTRS 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 41);
TRSRKQTSRHLKNIPVH 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 42);
TELLSIFGPSLRDPISA 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 43);
PRYIATNGYLISNFDES 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 44);
CIRGDTSSCARTLVSGT 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 45);

DESSCVFVSESAICSQN 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 46);
TSTIINQSPDKLLTFIA 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 47);
SPDKLLTFIASDTCPLV 来自于 CDV-F (序列 ID 序号: 48);
STAPPAHGVTSAPDTRAPGSTAPP 来自于 MUC-1 (序列 ID 序号: 49);
GVTSAPDTRPAPGSTASSL 来自于 MUC-1 (序列 ID 序号: 50);
GVTSAPDTRPAPGSTASL 来自于 MUC-1 (序列 ID 序号: 51);
TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPKKG 来自于 MUC-1 (序列 ID 序号: 52);
STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPK 来自于 MUC-1 (序列 ID 序号: 53);
GVAE 来自于 FMDV-VP3 protein (序列 ID 序号: 54);
TASGVAETTN 来自于 FMDV-VP3 protein (residues 170 to 179) (序列 ID 序号: 55); 以及
TAKSKKFPSYTATYQF 来自于 FMDV (序列 ID 序号: 56)。

在这里所公开的辅助 T 细胞表位的目的是仅限于作为实施例使用。对本领域的研究人员来说, 采用标准的多肽合成技术, 可以很容易用其他不同的辅助 T 细胞表位取代在这里所提到的辅助 T 细胞表位, 使之成为适合于本发明中的脂肽, 在不同的物种上得到应用。因此, 并不排除本领域研究人员所熟知的, 对提升或增强目的物种免疫应答反应的额外辅助 T 细胞表位。

采用体外 T 细胞刺激技术, 可以对构成额外辅助 T 细胞表位的蛋白质组成, 蛋白质片断和多肽进行详细地分析, 进而鉴定出适合的序列 (Goodman 和 Sercarz, *Ann. Rev. Immunol.*, 1, 465, (1983); Berzofsky, *In: "The Year in Immunology, Vol. 2"* page 151, Karger, Basel, 1986; 以及 Livingstone 和 Fathman, *Ann. Rev. Immunol.*, 5, 477, 1987)。

B 细胞表位可以方便的从病毒, 原核或真核有机体中具有免疫原性的蛋白质, 脂蛋白或糖蛋白的氨基酸序列得到, 这些抗原存在于

但不仅限于哺乳动物，细菌，真菌，原生动物或感染了该机体的寄生虫中。对应于免疫应答的特应及抗特异性 B 细胞表位是希望得到并明确包括在内的，比如脂修饰的 B 细胞表位。或者，B 细胞表位是一种碳水化合物抗原，比如一种 ABH 血清抗原，移植抗原（比如 Gal alpha1-3Gal beta1-4GlcNAc; Sandrin 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11391-11395, 1993; Galili 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1369-1373, 1987; Schofield 等, *Nature* 418: 785-789, 2002）或者它们的变化形式。

当对哺乳动物施用，B 细胞表位可以引起抗体的生成，优选中和抗体，更优选高滴度的中和抗体。

优选较短的 B 细胞表位用以促进肽的合成。

优选，B 细胞表位不应该超过 30 个氨基酸的长度。优选 B 细胞表位序列不超过 25 个氨基酸残基或更短，更优选 B 细胞表位序列少于 20 个氨基酸残基甚至是只有 5-20 个氨基酸残基。

更优选，合成多肽的构象与来源于天然的 B 细胞表位多肽项类似。

优选的寄生虫 B 细胞表位与有利什曼原虫，疟疾，锥虫病，巴贝西虫病或血吸虫病相关，比如，从含有下列成分的基团中挑选出的 B 细胞表位：

一种恶性疟原虫的 B 细胞表位 (NANP) 3 (Good 等, *J. Exp. Med.* 164, 655 1986)；

一种疟原虫的 B 细胞表位 (Good 等, *Protein Sci.*, 235, 1059, 1987)；

一种含有利什曼原虫 *donovani* 重复多肽 326-343 氨基酸残基的 B 细胞表位 (Liew *et al.*, *J. Exp. Med.* 172, 1359 (1990))；

一种含有弓形虫 *gondii* P30 表面蛋白的 B 细胞表位(Darcy *et al.*, *J. Immunol.* 149, 3636 (1992)); 以及

一种含有 *Schistosoma mansoni* Sm-28GST 抗原(Wolowxuk *et al.*, *J. Immunol* 146:1987 (1991))的 B 细胞表位。

优选病毒特异性 B 细胞表位来自于轮状病毒, 疱疹病毒, 冠状病毒, 小核糖核酸病毒 (即 *Aphovirus*), 呼吸道合胞病毒, 流感病毒, 副流感病毒, 腺病毒, 痘病毒, 牛疱疹病毒 I 型, 牛病毒性腹泻病毒, 牛轮状病毒, 犬瘟热病毒 (CDV), 马鼻炎 A 型病毒 (ERAV), 马鼻炎 B 型病毒 (ERBV), 口蹄疫病毒 (FMDV), 麻疹病毒 (MV), 人免疫缺失性病毒 (HIV), 猫免疫缺失性病毒 (FIV), 埃-巴二氏病毒 (EBV), 或肝炎病毒等, 和/或可产生与其相对应的抗体。适合的病毒性 B 细胞表位包括且不仅限于来自于含有下列物质的基团:

HIV gp120 V3 环状区域的 308-311 氨基酸残基(Jatsushita 等, *J. Virol.* 62, 2107 (1988));

HIV gp120 的 428-443 氨基酸残基(Ratner 等, *Nature* 313:277 (1985));

HIV gp120 的 112-124 氨基酸残基 (Berzofsky 等, *Nature* 334, 706 (1988));

一种 HIV 逆转录酶的 B 细胞表位(Hosmalin 等. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 87, 2344 (1990));

流感病毒核蛋白的 335-349 氨基酸残基(Townsend 等. *Cell* 44, 959 (1986));

流感病毒核蛋白的 366-379 氨基酸残基(Townsend 等. *Cell* 44, 959 (1986));

流感病毒红血球凝集素的 48-66 氨基酸残基(Mills 等, *J. Exp. Med.* 163, 1477 (1986));

流感病毒红血球凝集素的 111-120 氨基酸残基(Hackett 等, *J. Exp. Med* 158, 294 (1983));

流感病毒红血球凝集素的 114-131 氨基酸残基(Lamb 和 Green, *Immunology* 50, 659 (1983));

埃-巴二氏病毒 LMP 氨基酸的 43-53 残基(Thorley-Lawson 等, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 84, 5384 (1987));

乙型肝炎病毒表面抗原的 95-109 氨基酸残基(Milich 等, *J. Immunol.* 134, 4203 (1985));

乙型肝炎病毒表面抗原的 140-154 氨基酸残基;

乙型肝炎病毒 Pre-S 抗原的 120-132 氨基酸残基(Milich 等, *J. Exp. Med.* 164, 532 (1986));

单纯疱疹病毒 gD 蛋白的 5-23 氨基酸残基(Jayaraman 等, *J. Immunol.* 151, 5777 (1993));

单纯疱疹病毒 gD 蛋白的 241-260 氨基酸残基(Wyckoff 等, *Immunobiol.*, 177, 134 (1988));

狂犬病糖蛋白的 32-44 氨基酸残基(MacFarlan 等, *J. Immunol.* 133, 2748 (1984));

至少含有口蹄疫病毒血清型 O₁ VP1 衣壳蛋白 134-168 残基, 或 137-160 残基, 或 142-160 残基, 或 137-162 残基, 或 145-150 残基, 或者其他病毒血清型的相应氨基酸残基, 比如血清型 A, C, SAT1, SAT2, SAT3 或 ASIA1 (美国专利 5,864,008 和 6,107,021) 的主要口蹄疫病毒细胞表位; 以及

丙型肝炎病毒(HCV)变种 AD78 病毒 E2 蛋白的高度可变区 1(HVR1) (Zibert 等, *J. Virol.* 71, 4123-4127, 1997)。

优选细菌特异性 B 细胞表位来自于巴斯德菌, 放线菌, 嗜血杆菌, 单核细胞增多性李氏菌, 分支杆菌, 葡萄球菌, 大肠杆菌和志贺菌等,

且/或可产生与之相对应的抗体。适合的细菌性 B 细胞表位包括且不仅限于来自于含有下列物质的基团：

结核分枝杆菌 65Kd 蛋白质的 112-126 氨基酸残基(Lamb *et al.*, *EMBO J.*, 6, 1245 (1987));

结核分枝杆菌 65Kd 蛋白质的 163-184 氨基酸残基(Lamb *et al.*, *EMBO J.*, 6, 1245 (1987));

结核分枝杆菌 65Kd 蛋白质的 227-243 氨基酸残基(Lamb *et al.*, *EMBO J.*, 6, 1245 (1987));

结核分枝杆菌 65Kd 蛋白质的 242-266 氨基酸残基(Lamb *et al.*, *EMBO J.*, 6, 1245 (1987));

结核分枝杆菌 65Kd 蛋白质的 437-459 氨基酸残基(Lamb *et al.*, *EMBO J.*, 6, 1245 (1987));

结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白质的 3-15 氨基酸残基(Morten *et al.*, *Infect. Immun.* 66, 717 - 723, 1998);

结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白质的 40-62 氨基酸残基(Morten *et al.*, *Infect. Immun.* 66, 717 - 723, 1998);

淋巴结结核分支杆菌 A-抗原的 279-290 氨基酸残基(Mikiko *et al.*, *Microb. Path.* 23, 95 - 100, 1997);

金黄色葡萄球菌核酸酶 61-80 氨基酸残基(Finnegan *et al.*, *J. Exp. Med.* 164, 897 (1986));

大肠杆菌热稳定肠毒素的一种 B 细胞表位(Cardenas *et al.*, *Infect. Immunity* 61, 4629 (1993));

大肠杆菌热不稳定肠毒素的一种 B 细胞表位(Clements *et al.*, *Infect. Immunity* 53, 685 (1986));

Shigella sonnei I 型抗原的一种 B 细胞表位(Formal *et al.*, *Infect. Immunity* 34, 746 (1981));

来自于 A 群链球菌的一种 B 细胞表位, 一种适宜的情况是从 M 蛋白, 较适宜的情况是来自于 M 蛋白的 C 末端半部分, 更适宜的情况是来自于 M 蛋白保守的 C 末端半部分最小化, 螺旋状的非寄主交叉反应多肽, 它包含有一种非 M 蛋白多肽 拟/原来用于 保持螺旋的折叠和在这种最小化螺旋状的非寄主交叉反应多肽的抗原性。(没有递进关系)比如, 非 M 蛋白多肽 (即 J14 多肽) 可以用化学方法与一种或多种血清型的 M 蛋白多肽相连, 使得免疫原在烷烃主链上表现出所有单个肽链的的伸展情况, 因此具有了极好的免疫原性和保护。(US6,174,528; Brandt *et al.*, *Nat. Med.* 6: 455-459, 2000)。

一种霍乱毒素 B 亚基 (CTB) 的 B 细胞表位, 比如由 Kazemi and Finkelstein *Mol. Immunol.* 28, 865-876, 1991 描述的例子;

一种炭疽杆菌蛋白的 B 细胞表位, 比如一种来源于炭疽外生孢子 250kDa 糖蛋白的 B 细胞表位 (Sylvestre *et al.*, *In: Proc. 4th Int. Conf. Anthrax*, St John' s College Annapolid, Mayland, CA June 10-13, 2001, Abstract 31B), 以及

一种来源于破伤风蛋白的 B 细胞表位, 比如破伤风类毒素蛋白。

优选来自于哺乳动物集体的 B 细胞表位来自于一种肿瘤抗原, 且/或可产生与其相对应的抗体。肿瘤抗原通常是天然的或外源的抗原, 它的表达于肿瘤的发育, 生长, 存在或复发相关。一定数量的肿瘤抗原可使得正常组织分化为异常组织, 并作为干涉治疗的目标。肿瘤抗原在本领域中已为大家深入了解, 目前已有几个详细的案例集中阐述肿瘤特异性治疗的产生。非限制性的肿瘤抗原有癌胚抗原 (CEA), 前列腺特异性抗原 (PSA), 黑素瘤抗原 (MAGE, BAGE, GAGE) 和粘蛋白, 比如 MUC-1。

其他优选的哺乳动物 B 细胞表位来源于人类或其他哺乳动物比如猪透明带蛋白例如 ZP3 (Chamberlin and Dean *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87, 6014-6018, 1990) 或 ZP3a (Yurewicz *et al.*, *Biochim.*

Biophys. Acta 1174, 211-214, 1993)。在这一类 B 细胞表位中，尤其首选的是任 ZP3 蛋白 323-341 氨基酸残基(Chamberlin and Dean *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87, 6014-6018, 1990)或猪 ZP3a 蛋白的 8-18 氨基酸残基，或 272-283 氨基酸残基，或 319-330 氨基酸残基(Yurewicz *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1174, 211-214, 1993)。

更优选哺乳动物 B 细胞表位来源于如过饱激素(即瘦蛋白)，消化激素(即胃泌素)，生殖性肽类激素(即黄体素释放激素 LHRH)，促卵泡素(FSH)，黄体素(LH)，人绒毛膜促性腺激素(hCG; Carlsen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 248, 6810-6827, 1973)等肽激素，或者 FSH 受体(Kraaij *et al.*, *J. Endocrinol.* 158, 127-136, 1998)等激素受体，且/或可产生与其相对应的抗体。

更优选的哺乳动物 B 细胞表位来源于肽激素，比如过饱激素(即瘦蛋白)，消化激素(即胃泌素)或生殖性肽类激素(即黄体素释放激素 LHRH)，促卵泡素(FSH)，黄体素(LH)，人绒毛膜促性腺激素(hCG; Carlsen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 248, 6810-6827, 1973)，或者激素受体，如 FSH 受体(Kraaij *et al.*, *J. Endocrinol.* 158, 127-136, 1998)，且/或可产生与其相对应的抗体。在这一类 B 细胞表位中，尤其优选具有抗原性且不与 LH 发生交联的 b-hCG 碳末端部分(CTR)(Carlsen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 248, 6810-6827, 1973)。在某个特定的优选实施例中，含有 B 细胞表位多肽的氨基酸序列是从下面挑选出来的：

(i) 来源于 LHRH 的 EHWSYGLRPG (在这里将其称之为 LHRH1-10, SEQ ID No. 2)；

(ii) 来源于 LHRH 的 HWSYGLRPG (在这里将其称之为 LHRH2-10, SEQ ID No. 3)；

(iii) 来源于 LHRH 的 GLRPG (在这里将其称之为 LHRH6-10, SEQ ID No. 4) ;

(iv) 来自于 *Leishmani major* 的 EAEEAARLQA;

(v) 从下述序列中挑选出来含有口蹄疫病毒非结构蛋白 3A, 3B 或 3C(美国专利 6, 048, 538)的一段序列:

FRERTLTGQRACNDVNSE (SEQ ID No. 58),
NPLETSGASTVGFRERTL (SEQ ID No. 59),
IRETRKRQKMVDDAVNEY (SEQ ID No. 60),
AKAPVVKEGPYEGPVKKPV (SEQ ID No. 61),
AGPLERQKPLKVKAKAPVV (SEQ ID No. 62),
KVRAKLPQQEGPYAGPLER (SEQ ID No. 63),
GPYTGPLERQRPLKVRACL (SEQ ID No. 64),
VGRLIFSGEALTYKDIVV (SEQ ID No. 65),
TKHFRDTARMKKGTPVVG (SEQ ID No. 66), 以及
SGAPPTDLQKMVMGNTKPV (SEQ ID No. 67);

(vi) 来源于口蹄疫病毒 VP1 主要细胞表位的 NKYSASGSGVRGDFGSLAPRVARQLPASFN YGAIK (US 6, 107, 021 ; SEQ ID No. 68);

(vii) 从含有 LYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID No. 69), AVKVM DLPQEPALGTTCYA (SEQ ID No. 70), IVGGWECEKHSQPWQVLVAS (SEQ ID No. 71), CAQVHPQKVTKFML (SEQ ID No. 72), YLMLLRLSEPAELTDDAVKVM (SEQ ID No. 73), LLKNRFLRPGDDSSHDLMLLY (SEQ ID No. 74), 以及 ILLGRHSLFHPEDTGQVFQVY (SEQ ID No. 75)等序列中挑选出的一段前列腺特异性抗原 (US 6, 326, 471) ;

(viii) 来源于 b-Hcg 的 TCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPIL PQ 序列 (SEQ ID No. 76);

(ix) 来源于 FSH 受体的 CQDSKVTEIPTLPRNAI 序列 (SEQ ID No. 77);

(x) 来源于人 ZP3 蛋白的 NKGDCGTPSHSRRQPHVMS 序列 (序列 ID 号: 78);

(xi) 从含有 WLCFPLCLALP (SEQ ID No. 79), LGGLYCGPSSF (SEQ ID No. 80), GSITRDSIFRLR (SEQ ID No. 81), SALPVNIQVFTL (SEQ ID No. 82), ELQIAKDERYGS (SEQ ID No. 83) 和 VKLLREPIYVEV (SEQ ID No. 84) 等序列中挑选出的一段猪 ZP3a 蛋白序列;

(xii) 来源于癌胚抗原的 PPAQYSWLIDGN (CEA, SEQ ID No. 85);

(xiii) 从含有 ANASQTDNGVNRSGSEDPTV (SEQ ID No. 86) 和 PETKHPKKGVEKYGPEASAF (SEQ ID No. 87) 的序列中挑选出的一段葡萄球菌核酸酶序列 (Cone *et al.*, *J. Biol. Chem.* 246, 3103-3110. 1971);

(xiv) 从含有 LVLLDYQGMLPVCPL (SEQ ID No. 88) 和 TKPSDGNCTCIPIPS (SEQ ID No. 89) 的序列中挑选出的一段乙型肝炎病毒表面抗原序列 (Kobayashi and Koike, *Gene* 30, 227-232, 1984);

(xv) 来源于乙型肝炎病毒前体表面抗原的 MQWNSTTFHQALL (SEQ ID No. 90);

(xvi) 从含有 AAFEDLRVSSFIRGT (SEQ ID No. 91) 和 SNENMETMDSSTLE (SEQ ID No. 92) 的序列中挑选出的一段流感病毒和蛋白序列 (Gregory *et al.*, *J. Gen. Virol.* 82, 1397-1406, 2001);

(xvii) 从含有 HPLILDCTIEGLIYGNS (SEQ ID No. 93), YQRIQIFPDT (SEQ ID No. 94), 和 IQIFPDTIWNVSYSYSGTSK (SEQ ID No. 95) 等的序列中挑选出的一段流感病毒红血球凝集素序列;

(xviii) 来源于口蹄疫病毒衣壳糖蛋白 VP1 的 CKYSASGSGVRGDFGSLAPRVARCLPASFNTGAIKNKY 序列 (SEQ ID No. 96);

(xix) 从含有 EQQWNFAGIEAAA (SEQ ID No. 97) 和 AAWGGSGSEAYQGVQQKWDATA (SEQ ID No. 98) 的序列中挑选出的一段结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白序列;

(xx) 来源于 HCV 的 GGPTRTIGGSQAQTASGLVSMFSVGPSQK 序列 (SEQ ID No. 99);

(xxi) 来源于淋巴结结核分支杆菌 α 抗原的 KFQDAYNAAGGH (SEQ ID No. 100);

(xxii) 来源于 A 型链球菌 M 蛋白 (在这里将其称之为 “J14”) 的 KQAEKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID No. 101);

(xxiii) 来源于胃泌素 (即含有胃泌素碳末端 5 个氨基酸残基的五肽胃泌素) 的 GW MDF (SEQ ID No. 102)。

显然, 从以上描述可知, 脂肽的肽部分可以方便的以单一氨基酸链的形式进行合成, 进而省略了在与两种细胞表位进行连接时的合成后修饰。

特别优选与流感病毒红血球凝集素的辅助 T 细胞表位 (SEQ ID No. 1) 或 CDV-F 的辅助 T 细胞表位 (SEQ ID No. 20, 24, 26 或 44) 结合的具有高免疫原性 LHRH (SEQ ID No. 2 或 3 或 4) B 细胞表位的肽部分, 例如含有选自以下序列所构成的组的氨基酸序列的多肽:

(i) GALNNRFQIKGVELKSEHWSYGLRPG (SEQ ID No. 5);

(ii) EHWSYGLRPGGALNNRFQIKGVELKS (SEQ ID No. 6);

(iii) GALNNRFQIKGVELKSKEHWSYGLRPG (SEQ ID No. 7);

(iv) EHWSYGLRPGKGALNNRFQIKGVELKS (SEQ ID No. 8);

(v) KLIPNASLIENCTKAELKHWSYGLRPG (SEQ ID No. 9);

- (vi) AELGEYEKLLNSVLEPIKEHWSYGLRPG (SEQ ID No. 10);
- (vii) TAAQITAGIALHQSNLNKEHWSYGLRPG (SEQ ID No. 11);
- (viii) PRYIATNGYLISNFDESKEHWSYGLRPG (SEQ ID No. 12);
- (ix) KLIPNASLIENCTKAELKGLRPG (SEQ ID No. 13);
- (x) AELGEYEKLLNSVLEPIKGLRPG (SEQ ID No. 14);
- (xi) TAAQITAGIALHQSNLNKGLRPG (SEQ ID No. 15);
- (xii) PRYIATNGYLISNFDESKGLRPG (SEQ ID No. 16);
- (xiii) KLIPNASLIENCTKAELHWSYGLRPG (SEQ ID No. 103); 和
- (xiv) KLIPNASLIENCTKAELGLRPG (SEQ ID No. 104)。

在一个具体的优选实施方式中，LHRH 表位（即如 SEQ ID No. 2 所示的 LHRH1-10；如 SEQ ID No. 3 所示的 LHRH 2-10 或如 SEQ ID No. 4 所示的 LHRH 6-10）被放置于可使得其 C-末端甘氨酸残基被暴露出来或不在内部的位置。由此，特别优选如 SEQ ID No. 5, 7 或 9-16 中任一序列所示的构型。

在一个具体的实施例中，LHRH 1-10 被缀合于流感病毒红血球凝集素辅助 T 细胞表位（即 SEQ ID No. 1），如通过 SEQ ID No. 5 或 7 所示的序列描述；LHRH 2-10 或 LHRH 6-10 被缀合于 CDV-F 辅助 T 细胞表位（即 SEQ ID No. 24），如通过 SEQ ID No. 9、13、103 或 104 所示的序列描述。很显然，其他的结合情况也是有可能发生的，并被包含在本发明中。

在另一个实施例中，尤其优选的是与 CDV-F（如 SEQ ID No. 24）或流感病毒红血球凝集素（如 SEQ ID No. 1）结合的含有 A 群链球菌 M 蛋白高免疫原性 B 细胞表位的肽部分（如 SEQ ID No. 101 所示的 J14 肽），比如含有选自由下述序列所组成的组的氨基酸序列的多肽：

- (i) KLIPNASLIENCTKAELKQAEKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID No. 105);

- (ii) KLIPNASLIENCTKAELKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID No. 106);
- (iii) GALNNRFQIKGVELKSKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID No. 107); 以及
- (iv) GALNNRFQIKGVELKSKKQAEDKVKASREAKKQVEKALEQLEDKVK (SEQ ID No. 108)。

在另一个实施方式中，优选的是与 CDV-F（如 SEQ ID No. 24）或流感病毒红血球凝集素（如 SEQ ID No. 1）结合的具有高免疫原性五肽胃泌素 B 细胞表位（如 SEQ ID No. 102 所示的序列）的多肽部分，比如含有选自由以下序列所构成的组的氨基酸序列的多肽：

- (i) KLIPNASLIENCTKAELGWMD (SEQ ID No. 109);
- (ii) KLIPNASLIENCTKAELKGWMD (SEQ ID No. 110);
- (iii) GALNNRFQIKGVELKSGWMD (SEQ ID No. 111); 和
- (iv) GALNNRFQIKGVELKSKGWMD (SEQ ID No. 112)。

本领域技术人员能容易地用其它的辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位对 SEQ ID No. 5-16 中的任一序列或 SEQ ID No. 103-112 的任一序列的辅助 T 细胞表位和/或 B 细胞表位进行取代，对此也将例举以用于目的脂肽中。上述其它的表位是如 SEQ ID No. 18-56 所示的辅助 T 细胞表位中的任一个或如 SEQ ID No. 57-102 所示的 B 细胞表位中的任一个。而且，根据靶物种和期望发生针对其的免疫应答的抗原，本领域技术人员可从上述公开中选择合适的辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位的组合。

本领域技术人员可以针对特定的目的采用合适的方法，对这里所描述的实施例中含有如 SEQ ID No. 5-16 和 SEQ ID No. 103-112 所示的肽部分氨基酸序列进行修饰而不减弱他们的免疫功能。比如，可以对特定的肽残基进行衍生或化学修饰，以增强它们的免疫应答或使得它们与其它基团尤其是脂进行结合。也可以在肽链内部对特定的氨

基酸进行改变而不影响到整个肽链结构或抗原性这种被称为“保守的”变化是源于残基的疏水性或极性。

本领域技术人员应熟知，获得一种具有同等生物学功能的蛋白质或多肽的定义意味着，可在分子内限定的某一部分进行有限次数的改变，以使得该分子具有在可接受范围内的等同生物学活性。在这里所定义的生物学功能等价物多肽，是指那些可将某些特定的氨基酸残基进行取代的多肽。具体的实施例中包含可对其进行1个，2个，3个，4个，5个或更多氨基酸进行变化的多肽。当然，本发明也应包括通过简单方法获得与得到应用的，对相同蛋白/多肽进行的不同取代反应的多种不同结构。

本领域技术人员应明白以下的取代情况是可允许的保守性取代：
(i) 涉及到精氨酸，赖氨酸和组氨酸的取代；(ii) 涉及到丙氨酸，甘氨酸，丝氨酸和(iii) 涉及到苯丙氨酸，色氨酸和酪氨酸。与这些保守性取代基结合的多肽在这里被定义为生物学功能等价物。

本领域中都熟知氨基酸亲水性指数对蛋白质互作生物学功能的重要性。某些氨基酸可为其他具有相似亲水性指数的氨基酸所取代，并依然保留了相似的生物学活性。氨基酸的亲水性指数也可用来确定采用何种保守性取代基，以获得相同功能等价物分子。基于疏水性和电荷特征，每一种氨基酸都具有一种亲水性指数：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸(+2.5)；甲硫氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)；和精氨酸(-4.5)在进行基于亲水性指数进行反应时，优选的取代氨基酸亲水性指数应介于+/-0.2之间。优选

所涉及的氨基酸亲水性指数介于 ± 0.1 之间,更优选介于 ± 0.05 之间。

在本领域中进行基于疏水性的氨基酸的取代是很有效的,尤其是当这些生物学活性等同蛋白或多肽是用来在免疫实施例中进行使用的时候。比如,在美国专利 4,554,101 中,各氨基酸具有以下的疏水性指数:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 \pm 0.1);谷氨酸(+3.0 \pm 0.1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 \pm 0.1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。在进行基于疏水性指数进行反应时,首选的取代氨基酸疏水性指数应介于 ± 0.2 之间,适宜的情况是所涉及的氨基酸疏水性指数介于 ± 0.1 之间,更适宜的情况是介于 ± 0.05 之间。

一旦某多肽被认定为可以作为免疫原进行使用,就可以预期其他具有相似空间结构的化合物也可以用来模拟该多肽的关键部分。这些被称为多肽模拟物的化合物,可以在本发明中与其模拟的多肽具有完全相同的性质,即作为功能等同物。本领域中的专业人员都熟知,可以采用化学设计和建模等技术获得这样的机构功能等同物。同样,所有这些具有相似空间结构的化合物也属于本发明的领域。

另一种确定修饰多肽“等同性”的方法涉及到功能方面的方法。例如,一种给定的多肽可以用来产生单克隆或多克隆抗体。这些抗体随后可以用对含有成千上万的简并多肽的文库进行筛选,至少在某种

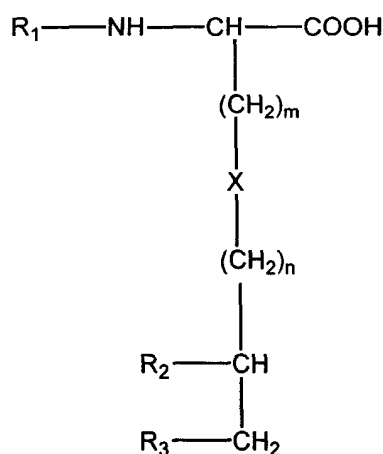
程度上可得到具有免疫结构活性的等价物。当然，这样的结构可能与用于产生抗体的多肽具有很大的序列同源性，但也有可能相差很大。

对肽部分的合成可以采用诸如 Merrifield 氏合成方法的标准技术(Merrifield, *J Am Chem Soc*, 85, :2149-2154, 1963)及其改进技术(参见, 例如, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, Grant, ed. (1992) W.H. Freeman & Co., New York, pp. 382; Jones (1994), *The Chemical Synthesis of Peptides*, Clarendon Press, Oxford, pp. 230.); Barany, G. and Merrifield, R.B. (1979) in *The Peptides* (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York; Wunsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., ed.), vol. 15, 4th edn., Parts 1 and 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474)。

脂质部分可包含任何从 C₂ 到 C₃₀ 的饱和, 单不饱和或多不饱和直链或支链脂酰基, 优选脂肪酸基团选自由棕榈酰, 豆蔻酰, 硬脂酰, 月桂酰, 辛酰和癸酰所组成的组。

脂氨基酸是本文中特别优选的脂质部分。术语“脂氨基酸”在这里指被共价附着于氨基酸残基的 1 个, 2 个, 3 个或多个脂分子进行共价附着的与某个氨基酸残基, 比如半胱氨酸或丝氨酸或赖氨酸及其类似物。在一个特定的优选实施例中, 脂氨基酸由半胱氨酸, 或含有一个, 两个或多个的精氨酸或丝氨酸残基, 或者可选地为 6-氨基己酸。

优选脂质部分是具有以下通式(VII)结构的化合物:



其中：

X 是从含有硫，氧，二硫键 (-S-S-)，亚甲基 (-CH₂-) 和氨基 (-NH-) 等基团中挑选出来的；

m 的值为整数 1 或 2；

n 的值为整数 0 到 5；

R₁ 基团选自由氢，羰基 (-CO-) 和 R' -CO- 所组成的组，其中 R' 选自由含有 7-25 个碳原子的烷基、烯基或炔基所组成的组，其中的烷基、烯基或炔基可以选择性地被羟基，氨基，氧代，酰基或环烷基所取代；

R₂ 基团选自由 R' -CO-O-，R' -O-，R' -O-CO-，R' -NH-CO- 和 R' -CO-NH- 所组成的组，其中 R' 选自由含有 7-25 个碳原子的烷基、烯基或炔基所组成的组，其中的烷基、烯基或炔基可以选择性地被羟基，氨基，氧代，酰基或环烷基所取代；

R₃ 基团选自由 R' -CO-O-，R' -O-，R' -O-CO-，R' -NH-CO- 和 R' -CO-NH- 所组成的组，其中 R' 选自由含有 7-25 个碳原子的烷基、烯基或炔基所组成的组，其中的烷基、烯基或炔基可以选择性地被羟基，氨基，氧代，酰基或环烷基所取代，其中 R₁，R₂，和 R₃ 可以相同也可以不同。

根据取代基的不同,通用结构 VII 的脂质部分可以成为一个手性分子,其中直接或间接与 R_1 和 R_2 整体共价相连的碳原子是不对称的右旋或左旋(即 R 或 S)构型。

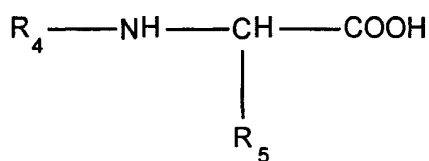
优选, X 为硫; m 和 n 都为 1; R_1 选自由氢和 $R' -CO-$ 所组成的组,其中 R' 是具有 7-25 个碳原子的烷基, R_2 和 R_3 选自由 $R' -CO-O-$, $R' -O-$, $R' -O-CO-$, $R' -NH-CO-$ 和 $R' -CO-NH-$ 所组成的组,其中 R' 是具有 7-25 个碳原子的烷基。

优选, R' 选自由棕榈酰,豆蔻酰,硬脂酰,月桂酰,辛酰和癸酰所组成的组。更优选, R' 选自由棕榈酰,豆蔻酰,月桂酰,辛酰和癸酰所组成的组。

脂质部分中的每一个 R' 整体可以相同也可以不同。

在一个具体的优选实施例中, X 为硫; m 和 n 都为 1; R_1 是氢或 $R' -CO-$, 其中 R' 选自由棕榈酰,硬脂酰,月桂酰和辛酰所组成的组, R_2 和 R_3 都是 $R' -CO-O-$, 其中 R' 选自由棕榈酰,硬脂酰,月桂酰和辛酰所组成的组。尤其优选其中 R' 是棕榈酰的化合物如之前的式 (I) 和分子式 (II) 所示。

脂质部分也可以下面的通式 (VIII) 形式出现:



其中:

(i) R_4 选自由以下所组成的组 (i) 一种含有约 7 个-约 25 个碳原子的 α -酰基脂肪酸残基; (ii) 一种 α -烷基- β 羟基脂肪酸残基; (iii)

一种 β -羟基酯或 α -烷基- β 羟基脂肪酸残基，其中酯基优选含有超过 8 个碳原子的直链或支链；(iv) 脂氨基酸残基；以及

(ii) R_5 是氢或者某种氨基酸的侧链。

优选， R_4 含有约 10-20 个间的碳原子，更优选含有约 14-18 个间的碳原子。

当 R_4 是一个脂氨基酸残基时， R_4 和 R_5 的侧链可以形成一种共价附着。比如，当 R_4 是由含有赖氨酸，鸟氨酸，谷氨酸，天冬氨酸，赖氨酸衍生物，鸟氨酸衍生物，谷氨酸衍生物和天冬氨酸衍生物的氨基酸组成时，该氨基酸或衍生物的侧链就会通过酰胺或酯键共价附着于 R_5 上。

优选，如通式 VIII 所示的结构脂质部分选自由 N, N'-二酰赖氨酸；N, N'-二酰鸟氨酸；二(单烷基)氨基化合物或谷氨酸酯；二(单烷基)氨基化合物或天冬氨酸酯；丝氨酸，高丝氨酸或苏氨酸的 N, O-二酰衍生物；以及半胱氨酸或高胱氨酸的 N, S-二酰衍生物。

尤其是那些疏水性不超过 Pam₃Cys (分子式(I)) 的两性分子，也是优选的分子。

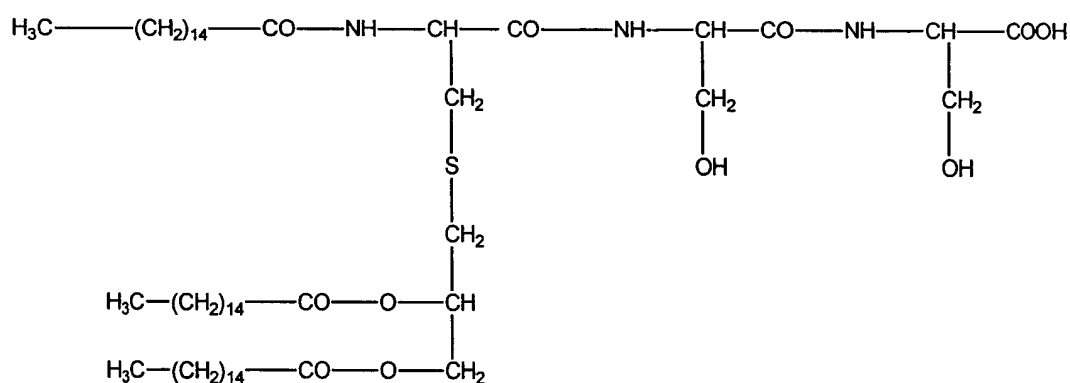
式 (I)，(II)，(VI) 或 (VIII) 脂质部分都经过了添加一个或多个间隔基分子的合成中或合成后的再修饰，优选间隔基包含碳，更优选包含一个或多个氨基酸残基。这样的脂质部分可以通过传统的缩合反应，加成反应，取代反应或氧化反应中的末端羧基添加到脂质结构上。这些间隔分子的作用是用来将脂质部分和多肽部分分隔开，以降低分子的空间位阻效应，这可能会避免降低脂肽产物的免疫原性。

对这个目的而言，尤其优选的分子包括精氨酸或丝氨酸二聚体，三聚体，四聚体或 6-氨基己酸等。

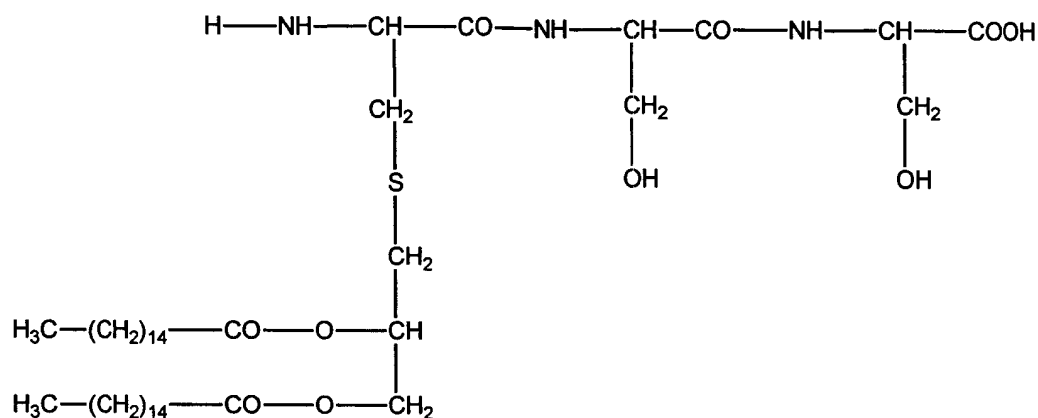
更优选，这样间隔基含有一个末端保护氨基酸残基，使得后来经过修饰的脂氨基酸可以缀合于多肽上。

针对本实施例所合成的经修饰的模式脂氨基酸可见于分子式 (III) 和 (IV)，它们可以通过分别向分子式 (I) 和 (II) 添加一个丝氨酸同型二聚体来实现。比如，对这个目的而言，可以通过对分子式 (I) 的 Pam₃Cys 或分子式 (II) 的 Pam₂Cys 进行合成得到分子式 (III) Pam₃Cys-Ser-Ser 或分子式 (IV) 脂氨基酸 Pam₂Cys-Ser-Ser。

式 (III)：



式 (IV)：



添加到脂质部分间隔基的替代物, 间隔基可以添加于多肽部分里的内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团上, 或者是例如精氨酸或丝氨酸同型二聚体, 同型三聚体或同型四聚体等的短肽, 或者是对氨基酸残基进行顺序加成, 得到一条支链多肽。这种方法的优势在于, 可对内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或赖氨酸类似物的末端侧链基团进行修饰, 从而在对间隔基进行加成反应时产生其特异性。很自然, 为了避免连续的间隔加成, 该间隔基的末端氨基酸残基优选被保护起来, 这样的话, 脱保护可以促使脂质部分缀合于支链多肽上。

或者, 间隔基也可以通过传统的亲核取代反应添加到多肽的未经修饰的 ϵ -氨基上。然而, 这种方法要求多肽链含有一个内部赖氨酸或赖氨酸类似物和一个封闭的 N 末端。

脂质部分可以通过传统的合成方法获得, 比如美国专利 5,700,910 和 6,024,964 中所描述的方法, 或可见于 Wiesmuller *et al.*, *Hoppe Seylers Zur Physiol. Chem.* 364, 593 (1983), Zeng *et al.*, *J. Pept. Sci* 2, 66 (1996), Jones *et al.*, *Xenobiotica* 5, 155 (1975), or Metzger *et al.*, *Int. J. Pept. Protein Res.* 38, 545 (1991)。本领域技术人员可以对这些方法稍加修改, 以获得可与多肽链相结合的目的脂分子。

也可预期不同脂相互结合可用于本发明的脂肽中。比如, 一种或两种含有豆蔻酰的脂质或脂氨基酸通过内部赖氨酸或赖氨酸类似物残基被附着于多肽部分上, 通过间隔基随意地从多肽分隔开分子将多肽随意地分隔开了。也不排除其它的组合。

对本发明中的脂肽稍作修饰即可用于诊断用途。比如，对其添加一种天然或合成的半抗原，抗生素，激素，类固醇，核苷，核苷酸，核酸，种酶，酶底物，酶抑制剂，生物素，抗生物素蛋白，聚乙二醇，多肽部分（比如：吞噬细胞增强激素，聚赖氨酸），荧光标记（比如：FITC，RITC，丹磺酰，氨基苯二酰肼或香豆素），生物荧光标记，自旋标记，生物碱，生物胺，维生素，毒素（比如：地高辛，毒伞素，蛾膏蕈毒环肽，河豚毒素）或一种复合剂。

又如， 假若含有分子式(I)的 Pam₃Cys 或分子式(II)的 Pam₂Cys 或 Ste₂Cys 或 Lau₂Cys 或 Oct₂Cys 通过缀合与以下肽链的内部赖氨酸 ε-氨基相联，这样的脂肽将具有较高的免疫原性和溶解性。这样的肽链有(i)来自于流感病毒红细胞凝集素轻链的 CD4⁺ 辅助 T 细胞表位的氨基酸序列 (Jackson *et al. Virol.* 198, 613-623, 1994; GALNNRFQIKGVELKS; 序列 ID 序号: 1), 或 CDV-F 蛋白的多肽序列(序列 ID 序号: 24); (ii) 含有 B 细胞表位的多肽, 含有选自由黄体生成激素释放激素氨基酸序列(LHRH; Fraser *et al., J. Endocrinol.* 63, 399 (1974); Fraser and Baker, *J. Endocrinol.* 77, 85 (1978); “LHRH 1-10” EHWSYGLRPG, 序列 ID 序号: 2; “LHRH 2-10” 氨基酸序列 HWSYGLRPG, SQE ID No. 3; 或 “LHRH 6-10” GLRPG, SQE ID No. 4), A 群链球菌 (GAS) M 蛋白(即序列 ID 序号: 101)和五肽胃泌素(即 SQE ID No. 102)所组成的组的氨基酸序列; (iii) 位于所述 CD4⁺ 辅助 T 细胞表位与所述 B 细胞表位之间的一个赖氨酸残基; 和可选地 (iv) 位于所述 CD4⁺ 辅助 T 细胞表位内部的一个赖氨酸残基。

脂肽的准备

本发明的另一方面提供了一种制备含有以下成分的脂肽的方法:

(i) 产生包含一种氨基酸序列的多肽, 所述氨基酸序列包含:

(a) 辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所述的氨基酸序列是不同的；以及

(b) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基；以及

(iii) 直接地或间接地将所述一个或多个脂质部分共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基，或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分，以产生将其脂质部分附着于所述内部赖氨酸残基 ϵ -氨基或将其脂质部分附着于所述内部赖氨酸类似物残基末端侧链基团的脂肽。

优选该方法还进一步包括了脂质部分的生产。

在进行多肽部分和脂质部分的合成时，优选传统的化学合成方法。

优选，通过选择性的从内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物的末端侧链基团，尤其是末端侧链的氨基去除一个封闭基团（例如 Mtt），以便允许在该位置添加一个氨基酸残基，一个间隔或脂质部分，包括脂氨基酸。

关于脂质附着于多肽，可以通过本领域众所周知的多肽合成方法便捷地对多肽官能团加以保护，以确保在这些官能团上不发生不需要的反应。

在熟知结合的过程之后，多肽的合成是在固体或如多聚物（比如：Merrifield 树脂）可溶性载体上进行的，并可以附着于间隔基，氨基酸或脂质。例如，内部赖氨酸的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物的末端侧链基团可以用一组保护性基团的其中一个加以保护。封闭基团（也成为保护性基团或掩护基团）是用来保护具有与偶合反应有关的活性羧基的氨基酸的氨基，或者是用来保护具有与偶合反应有关的酰化氨基的羧基。为保证结合作用的发生，封闭基团必须在不打断肽键的情况下去除，对任何结合于肽链上的保护基团都是如此。

对固相的多肽合成来说,经多次处理依然稳定的封闭基团,对在肽链生长时去除氨基保护基团和重复的氨基酸结合必不可少,并可用来保护氨基酸的侧链。而且,通过肽-树脂锚合来对多肽的C末端进行的保护贯穿于合成过程的始终,直到需要将树脂与其分开为止。所以,需要明智的选择正交保护的 α -氨基酸,脂和/或氨基酸,以便当其附着在树脂上时,可以被加成到生长肽链的合适位置。

优选氨基保护基团应很容易去除但在结合反应和其他操作时保持稳定,比如对侧链基团进行修饰。首选的氨基保护基团来自于含有以下成分的基团:(i)可在室温和常压条件下,或在氨水中加入金属钠,在乙酸中加入氢溴酸,经过催化氢化去除的苄氧羰基(Z或苄氧羰基);(ii)可用t-丁醇羰基叠氮化物或2-4-二丁醇酯引入,用不太浓的酸,如三氟乙酸(50%三氟乙酸溶于二氯甲烷)或溶于乙酸/二氧六环/乙酸乙酯的盐酸去除的t-丁醇羰基;(iii)在温和的,中性非水解条件下,比如使用伯胺和仲胺(20%哌啶溶于二甲基甲酰胺)下的9-芴甲氧羰基(Fmoc);(iv)2-(4联苯)丙基(2)氧羰基(Bpoc);(v)2-硝基-苯次磺酸基(Nps);和(vi)二硫琥珀酰基(Dts)。

侧链保护基团则要根据形成合成多肽的氨基酸的功能性侧链进行选择。基团通常是基于Bzl或tBu基团。含有醇或羧酸的侧链一般用Bzl醚,Bzl酯,cHex酯,tBu醚或tBu酯进行保护。Fmoc氨基酸的侧链保护需要保护基团在碱性条件喜爱保持稳定,而在弱酸性条件(TFA)下可发生反应。例如,可使用Mtt(Fmoc-lysine(Mtt)-OH)对赖氨酸的 ϵ -氨基进行保护。又如,卤化苄基衍生物,比如CIZ也可以用来在升高的酸性条件下保护赖氨酸侧链在一般条件下,半胱氨酸的硫醇基,组氨酸的咪唑基或精氨酸的胍基都需要特别的保护。有许多不同的保护基团在多肽合成时得到应用(The Peptides, Gross *et al.* eds., Vol. 3, Academic Press, New York, 1981)。

在保护策略中最常用的是 Boc/Bzl-策略和 Fmoc/tBu 策略。在 Boc/Bzl-策略中, Boc 用来保护氨基而基于 Bzl 或 cHex 的基团则用来保护多种氨基酸的侧链。Boc 基团在催化氢化条件下稳定并被正交地用来与 Z 基团一起对许多侧链基团进行保护。在 Fmoc/tBu 策略中, Fmoc 用来保护氨基而基于 tBu 的基团则用来保护侧链。

多肽通过本领域所熟知的方法被脂化。标准的缩合反应, 加成反应, 取代反应或氧化反应(例如在内部赖氨酸或内部赖氨酸类似物的末端氨基与进入氨基酸或多肽或脂氨基酸的羧基末端间形成的二硫化物架桥酰氨键形成)都可以将脂质加成到多肽上。

在另一个实施例中, 本发明中的一种作为免疫原的多肽是通过化学选择性络合或化学结合来制备的。这样的方法在本领域中已为大家熟知, 允许单独的肽成分通过化学或重组的方法, 并随后以适当的构型或构象或顺序经过化学性络合来制备(Nardin *et al.*, *Vaccine* 16, 590 (1998); Nardin *et al.*, *J. Immunol.* 166, 481 (2001); Rose *et al.*, *Mol. Immunol.* 32, 1031 (1995); Rose *et al.*, *Bioconjug. Chem* 7, 552 (1996); and Zeng *et al.*, *Vaccine* 18, 1031 (2000))。它们在这里通过引用被整合到本发明中)。

脂肽配方

脂肽可作用一种方便的药用赋形剂或稀释液, 例如一种水性的溶剂, 非水性的溶剂, 非毒性的赋形剂比如盐, 防腐剂, 缓冲液等等。非水性溶剂的例子是丙烯乙二醇, 聚乙二醇, 植物油和可注射的有机酯, 比如乙基油酸酯。水溶性溶剂包括水, 醇的水溶液, 盐溶液, 肠胃外载体, 比如氯化钠, Ringer' s 右旋糖苷等。防腐剂包括抗菌的, 抗氧化剂, 螯合剂和惰性气体。制药成分中的 Ph 值和确切的浓度可根据常规技术来进行调节。

尽管通常并不需要，往脂肽配方中加入外源佐剂也应包括在本发明中。这样的外源佐剂包括了所有可接受的免疫刺激化合物，比如细胞因子，毒素，或合成组分。典型的佐剂包括 IL-1，IL-2，BCG，氢氧化铝，N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thur-MDP)，N-乙酰-去甲-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺（CGP11637，也称做 nor-MDP），N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧化)-乙胺（CGP1983A，MTP-PE），脂质 A，MPL 和 RIBI，其中含有三种从细菌中分离到的成分，单磷酰脂质 A，海藻糖（trehalose）dimycolate 和细胞壁骨架（MPL+TDM+CWS）于 2%角鲨烯/Tween80 乳浊液中。

也可以将生物反应调节物(BRM)与脂肽进行共给药，以下调抑制性 T 细胞的活性。典型的生物反应调节物包括且不限于甲腈咪胍(CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA, USA); 茚甲新(IND; 150 mg/d) (Lederle, NJ, USA)或者是低剂量的环磷酰胺(CYP; 75, 150 或 300 mg/m. sup. 2) (Johnson/Mead, NJ, USA)。。

脂肽在免疫中的使用

本发明中新的脂肽与已知的抗原的脂肽缀合物的本质的区别在于它们提高的可溶性和免疫原性，以及在不需使用额外佐剂的条件下引起免疫应答的能力。由此，本发明脂肽的一种特别应用就是用于抗体制造领域，合成疫苗制备，应用抗体和抗体配基的诊断方法，以及用于兽医和人类医学的免疫治疗。

更特别的是，在对动物受试者施用本发明的脂肽时，该脂肽可以诱导针对于 B 细胞表位部分的高滴度抗体的产生，并不需要佐剂来达到相似的抗体滴度。向受试者施用脂肽后会增强树突细胞的成熟，也支持了上述的效用（即与在 N 末端偶合了脂质的脂肽相比具有增强的抗原呈递）。

因此,本发明的第三方面提供了一种引起针对抗原 B 细胞表位的抗体的产生的方法,该方法包括在足以引起针对所述抗原 B 细胞表位的抗体产生的条件下,对所述受试者施用一段时间的一种分离脂肽,该脂肽含有一种偶合于一个或多个脂质部分的多肽,其中:

(i)所述多肽包含:

(a)一种辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和一种 B 细胞表位的氨基酸序列,其中所述的氨基酸序列是不同的;和

(b)一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基,其用于经所述内部赖氨酸的 ϵ -氨基或经所述内部赖氨酸类似物的末端侧链基团共价附着于所述脂质部分的每一个;和

(ii)所述一个或多个脂质部分的每一个被直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团。

用于产生抗体的有效脂肽剂量与免疫原性 B 细胞表位的本性,常规的注射方法,用来进行免疫的动物以及所寻求的抗体特性发生变化。这些参数都是通过本领域所公认的方法据试验来确定。

这里所涉及的抗体包括全部的多克隆抗体,单克隆抗体,以及单独或缀合与其他部分结合的一部分。抗体部分包含有 Fab 和 F(ab)₂ 片段及单链抗体。这些抗体可在适合的实验动物体内获得,或者采用重组 DNA 技术在体外对工程化抗体(单链抗体或 SCABS 等)进行合成。

与本发明的这一方面相对应,这些抗体可以对动物进行免疫获得,在这种情况下,优选与 B 细胞表位结合的高滴度或中和抗体。当然,要根据免疫的抗原性 B 细胞表位来选择进行免疫的合适的受试动物。可以预期,本发明将被广泛地用来对多种动物进行免疫,比如农业动物(如马,牛,绵羊,猪,山羊,鸡,鸭,火鸡等),实验动物(如大鼠,小鼠,豚鼠,兔),家养动物(猫,狗,鸟等),野生的或外来动物(负鼠,猫,狗,水牛,野狗等)和人。

或者，这些抗体可作为商业或诊断用途，在这种情况下，被施用脂肽的受试者最好是实验动物或农业动物。有很多动物品种都可以用来生产抗血清。兔，小鼠，大鼠，仓鼠，豚鼠，山羊，绵羊，猪，狗，马或鸡都是用来生产抗血清的典型动物。因为兔的血液量较大，所以兔是制作多克隆抗体的首选。然而，本领域中的技术人员应熟知，为了从大动物身上为获得大量的抗体，大剂量的免疫原是必需的，而对诸如小鼠等小动物则相反。在这样的情况下，可以期望从被免疫的动物分离目的抗体。

优选抗体是高滴度的抗体。“高滴度”的意思是其滴度高到足以适于在诊断或治疗中使用。本领域技术人员也应熟知，有一些变化情况也可被认为是高滴度。对大多是使用情况来说，优选滴度介于至少约 10^3 - 10^4 之间，更优选抗体滴度可以介于约 10^4 到约 10^5 之间，甚至是介于约 10^5 到约 10^6 之间

更优选当 B 细胞表位来源于病原体，病毒或细菌时，抗体是中和抗体（即可以中和有机体的传染性，其后自该有机体衍生了 B 细胞表位）。

为了产生抗体，脂肽，可以与任何合适的或有效的载体，佐剂，BRM 或药学上可接受的赋形剂进行配置，以可注射组合物的形式方便地施用。注射方式可为鼻内给药，肌肉给药，皮下给药，静脉内给药，皮内给药，腹膜内给药或其他已知的途径。本发明的脂肽已证明了鼻内给药的效力。如果采用静脉注射，最好再在包含一种或多种液体和营养补充物。制备和分析抗体的方法在本领域应为人所熟知(参见例如，ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988,在此处通过引用合并入本发明中)。

在生产抗体时，脂肽的功效是通过用一种含有脂肽的配方，对小鼠，大鼠，兔，豚鼠，猪，狗，马，牛，山羊或猪等动物进行免疫，再监测 B 细胞表位的免疫应答来确定的。初级免疫应答和次级免疫应答都需要进行监测。可以使用传统的免疫分析技术，如 ELISA 或放射性免疫分析来对抗体滴度进行测定。

可以通过对免疫动物在免疫后的不同时段进行血液抽样来对多克隆抗体的产生进行监测。如果想获得期望的抗体滴度，还可以进行二次的加强给药。重复加强免疫和滴度测定的过程，直到达到适合的滴度。当达到理想的免疫原性水平时，对免疫动物进行采血，分离血清并保存起来，和/或将该动物用来生产单克隆抗体（Mabs）。

可以采用多种众所周知的技术的任一种来获得单克隆抗体（Mabs），例如在 US 4,196,265 中所列举的方法，在此通过引用并入本发明。

比如，在足以刺激抗体生成细胞的条件下，将用有效量的本发明的脂肽对适合的动物进行免疫。小鼠和大鼠等啮齿类动物是首选的动物，除此之外也可以使用兔，绵羊或青蛙的细胞。使用大鼠会具有某些优点，但优选的是小鼠，尤其优选最常用和可产生更高比例稳定融合的 BALB/c 小鼠。

在免疫之后，能生成抗体尤其是 B 淋巴细胞（B 细胞）的体细胞被选择用于产生单克隆抗体的方法中。这些细胞可以从活体的脾脏，扁桃腺，淋巴结或外周血样本中获得。优选是脾细胞和外周血细胞，选择前者是因为它所富含处于成浆细胞的分裂期的抗体生成细胞，选择后者则是因为外周血很容易获得。通常的做法是对一组动物进行免疫，并将抗体滴度最高动物的脾脏摘除。采用注射器对脾脏进行匀浆以得到脾淋巴细胞。典型地，一只免疫小鼠的脾脏含有大约 5×10^7 到 2×10^8 个淋巴细胞。

来自于免疫动物的 B 细胞随后将与无限增殖骨髓瘤细胞进行融合，它通常也来源于采用脂肽配方进行免疫的同种属的动物。首选的适用于杂交瘤产生融合步骤的骨髓瘤细胞系是不产生抗体的，它具有极高的融合效率，而且缺乏只有期望的融合细胞才具有的可在选择性培养基中进行生长的酶。本领域中的专业人员应熟知，几乎任何一种骨髓瘤细胞都可以被采用（比如：鼠 P3-X63/Ag8，X63-Ag8.653，

NS1/1. Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NS0/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0; 或大鼠 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 和 4B210; 以及 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 和 UC729-6)。首选的鼠骨髓瘤细胞是 NS-1 骨髓瘤细胞系 (也称为 P3-NS-1-Ag4-1), 可方便的从 NIGMS 人类遗传突变细胞库中获得, 获取号 GM3573。或者可以采用具有 8-叠鸟嘌呤的抗性的鼠骨髓瘤 SP2/0 不产病毒性细胞系。

为了产生抗体生成脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂种细胞, 体细胞和骨髓瘤细胞在含有一种或多种促进细胞膜融合试剂 (化学的或电子的) 存在的条件下, 以大约 20: 1 到大约 1: 1 的比例分别进行混合。采用仙台病毒进行融合的方法已由 Kohler 和 Milstein 等人进行了报道 (Kohler 和 Milstein, *Nature* 256, 495-497, 1975; 以及 Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519, 1976.)。使用聚乙二醇 (PEG), 比如 37%(v/v) PEG 进行融合的方法也由 Gefter 等人进行了详细地描述 (Gefter 等, *Somatic Cell Genet.* 3, 231-236, 1977.)。同样也可以采取电诱导的融合方法。

杂种细胞的扩增是通过在含有阻断核苷酸在组织培养基中从头合成的试剂的选择性培养基中进行培养实现的。典型的和优选的试剂是氨基嘌呤, 氨甲蝶呤和重氮丝氨酸。氨基嘌呤和氨甲蝶呤可阻断嘌呤和嘧啶的从头合成, 而重氮丝氨酸只能阻断嘌呤的合成。当使用氨基嘌呤和氨甲蝶呤时, 培养基中需要补充添加作为核苷酸源的次黄嘌呤和胸苷 (HAT 培养基)。而当使用重氮丝氨酸时, 培养基中需要补充添加次黄嘌呤。

优选选择性培养基是 HAT, 因为只有那些可以启动核苷酸补救途径的杂种细胞才可以在 HAT 培养基中存活, 而缺乏补救途径关键酶 (例如次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶或 HPRT) 的杂种细胞则不能存活。B 细胞可以启动这一补救途径, 但它们在培养基中的寿命很短, 通常在约两星期之内就死亡。所以, 在选择性培养基中存活下来的细胞只可能是来自于骨髓瘤细胞和 B 细胞的杂种细胞。

扩增后的杂种细胞被用于针对抗体特异性和/或滴度的功能性选择，比如免疫测定（例如放射免疫分析，酶免疫测定，细胞毒性分析，噬菌斑测定，点免疫结合分析等）。

经过选择的杂种细胞随后被顺次稀释并克隆到单独的抗体生成细胞系中，这些克隆随后被不定繁殖以提供单克隆抗体。该细胞系可以通过两种基本方式用于单克隆抗体的生产。杂种细胞样本经腹膜腔被注射到用于提供体细胞和骨髓瘤细胞以供原始融合的组织相容性动物。被注射的动物发育分泌由融合杂种细胞所产生的特异性单克隆抗体的肿瘤。该动物的体液，如血清和腹水可以被抽除以产生高浓度的单克隆抗体。也可以在体外对单个的细胞系进行培养，其中单克隆抗体被自然地分泌到培养基中并从中容易地获得高浓度的单克隆抗体。如果需要的话，可以采用过滤，离心，以及多种层析方法如 HPLC 或亲和层析法，对通过以上方法获得的单克隆抗体进行进一步纯化。

通过本领域众所周知的方法获得的本发明中的单克隆抗体，也含有抗独特型抗体。本发明中的单克隆抗体也可能是单克隆复共轭对配合物（即两个或更多抗体分子的杂种细胞）。在另一个实施例中，本发明的单克隆抗体是嵌合的单克隆抗体。在一个方法中，嵌合的单克隆抗体是通过对含有鼠抗-PSA 生成细胞启动区，引导肽和可变区序列，以及人抗体基因恒定区外显子的重组 DNA 进行克隆而得到的。被这样的重组基因所编码的抗体是鼠-人嵌合体。它的抗体特异性决定于来自于鼠序列的可变区，其同种型的抗体特异性则由来源人 DNA 的恒定区决定。

在另一实施例中，通过本领域中众所周知的技术获得的，根据本发明的单克隆抗体是一种“人源化”的单克隆抗体。即鼠的互补决定区（CDRs），从鼠 Ig 重链和轻链 V 区转移到了人的 V 区，伴随着一些人类的残基取代了相应结构区域的鼠源对应残基。根据本发明的“人源化”单克隆抗体尤其适合于在体内的诊断和治疗方法中进行使用。

如上所述,根据本发明的单克隆抗体及其片断可以通过本领域中众所周知的方法在体外和体内进行扩增。体外的扩增可以在合适的培养基如 DMEM 或 RPMI1640 培养基中得以实现,可选择向其中补充哺乳动物血清如胎牛血清或痕量因子以及维持生长的添加成分,比如养细胞,即正常小鼠腹膜渗出液细胞,脾细胞,骨髓巨噬细胞等体外生产可以提供相对纯粹的抗体,并允许对期望的抗体进行大规模的生产。包括纯系悬浮培养(在一个气动反应器,或一个连续搅拌反应器,或固定化,或截流细胞培养)等对大规模杂种细胞的组织培养条件在本领域内为众人所知。

本发明中的大规模的单克隆抗体也可以通过在体内进行杂种细胞的扩增来获得。将细胞克隆注射到与其亲代细胞具有组织相容性的动物体内(即同系的小鼠),以引起抗体生成肿瘤的生长。主要用烃尤其是降植烷(四甲基五癸烷)等油在注射前进行对动物进行抗原接触。

与本发明相一致的是,单克隆抗体的片断是从通过对用上述方法得到的单克隆抗体进行胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化,和/或通过化学还原切断二硫键等方法得到的。本发明中单克隆抗体的偶联物,是通过本领域中众所周知的方法,如将通过上述方法得到的单克隆抗体与偶合试剂如戊二醛或高碘酸盐在酶的作用下作用得到的。含有荧光素标记的偶合物是在含有这些偶合试剂的条件下制备的,或者与异硫氰酸盐进行反应得到的。含有金属螯合剂的偶合物也是通过类似的方法得到的。其他与抗体偶合的部分包括诸如 ^3H , ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , 和 ^{152}Eu 等放射性核。本发明中放射性标记的单克隆抗体是根据本领域中众所周知的方法得到的。比如,通过与碘化钠或碘化钾,化学氧化剂次氯酸钠,或乳过氧化物酶等酶氧化剂相接触,将单克隆抗体进行碘化。本发明中的单克隆抗体可通过配给交

换进行镆⁹⁹的标记，比如，通过含有锡的溶液还原高镆酸盐，将剩余的镆螯合至 Sephadex 柱子上，并通过直接标记技术将抗体引入到这个柱子上（即，对高镆酸盐的温育，比如 SnCl_2 的还原剂，比如邻苯二甲酸钠钾的缓冲液，和抗体）。

可以采用任何一种免疫分析的方式来监测脂肽配方引起的抗体产生。免疫分析的最基本和直接原理就是结合分析。某些首选的免疫分析是本领域中为众人所知的多样的酶联免疫吸收分析（ELISAs）和放射免疫分析（RIA）。对组织切片进行免疫组化检测也是特别有用的方法。然而，除此之外的 Western 杂交，点杂交，FACS 分析等都是简便易行的检测方法。

更优选检测结果可以产生出定量的数据。

例如，对抗体进行简单的竞争性分析。一种已知的抗体准备与 B 细胞表位相结合，将要检测的抗体与含有该 B 细胞表位的抗原合成物进行温育，更优选一种天然的抗原。“抗原合成物”一词在这里的意思是指具有某种可接近形式、含有 B 细胞表位某些特征的任何合成物。优选在 ELISA 板上用抗原包被的孔。在一个实施例中，将已知抗体与待测抗体在使用前，以不同的比例（1:1，1:10，1:100）进行一段时间的预混合。如果已知抗体被标记上，对结合于该抗原标记的直接检测就可实现；相对于未混合的样品待测抗体的分析将确定竞争和交联反应。或者使用对已知或待测抗体特异的二抗，也可以确定其竞争情况。

与抗原合成物结合的抗体，可以与已知抗体进行有效的竞争，从而显著的降低后者的结合。将在没有任何待测抗体的条件下，已知抗体的反应性设为对照。待测抗体出现后反应性的降低说明了待测抗体与 B 细胞表位发生了结合（即，与已知抗体发生了交叉反应）。

在一个示范性的 ELISA 中，针对与 B 细胞表位的抗体被固定于具有蛋白亲和性的的表面上，比如聚苯乙烯微孔板的小孔中。然后将含

有 B 细胞表位的合成物加入这些小孔。在经过结合与洗脱以去除非特异性结合的免疫复合物后，可以检测到结合的表位。通过加入结合于 B 细胞表位的可被检测到的二抗，可以使得检测更加容易。这类 ELISA 是一种简单的“三明治型 ELISA”。同样也可以在加入二抗以后，再加入与二抗具有结合能力、且连有检测标记的三抗，进行检测。

不育的诱导

本发明中一种含有某种生殖性激素或激素受体抗原性 B 细胞表位，具有适当构型的脂肽，可在该对象体内诱导不育。

因此，本发明从另一方面提供了一种在注射了含有结合有一个或多个脂质部分多肽的单独脂肽的对象中诱导不育的方法，其中：这样的多肽含有：

一种辅助 T 细胞表位的氨基酸序列和一种生殖性激素或激素受体 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所属的氨基酸序列并不相同；以及通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基，或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团，与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基；以及

直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基，或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分；以及

在足以引起对于所述抗原性 B 细胞表位的体液免疫反应的条件 下，对受体动物进行注射的脂肽。

脂肽可以任何在这里描述的方便的配方形式进行给药。

“体液免疫”的意思是对于足以产生阻止卵子发生，精子发生，受精，着床或胚胎发育 B 细胞表位进行的第二次免疫应答。

更优选，体液免疫产生了针对于受体中 B 细胞表位持续水平的抗体。“持续水平的抗体”意思是产生足够水平针对于阻止卵子发生，精子发生，受精，着床或胚胎发育 B 细胞表位的循环抗体。

优选，对雌性受体来说，抗体水平至少持续一个生殖循环，更优选，至少 6 个月，9 个月，12 个月或 2 年。

优选，B 细胞表位来自于黄体激素释放激素（LHRH），促卵泡素（FSH），黄体素（LH），人绒毛膜促性腺激素（hCG），透明带蛋白如 ZP3，或 FSH 受体，人或猪 ZP3a 上的氨基酸序列。

在这一种类中，优选 B 细胞表位含有 β -hCG 的 C 末端部分；人 ZP3 的氨基酸残基 323-341；猪 ZP3a 的氨基酸残基 8-18 或 272-283 或 319-330。

更优选，B 细胞表位含有从下列序列挑选出来的氨基酸序列：序列 ID 序号：2，序列 ID 序号：3，序列 ID 序号：4，序列 ID 序号：76，序列 ID 序号：77，序列 ID 序号：78，序列 ID 序号：79，序列 ID 序号：80，序列 ID 序号：81，序列 ID 序号：82，序列 ID 序号：83，和序列 ID 序号：84。

优选辅助 T 细胞表位含有从下列序列挑选出来的氨基酸序列：序列 ID 序号：1，序列 ID 序号：20，序列 ID 序号：24，序列 ID 序号：26 和序列 ID 序号：44，以及序列 ID 序号为 1，或 18-56 中任意一条。

在本发明的一个优选实施例中，辅助 T 细胞表位含有以下任意一条的氨基酸序列，序列 ID 序号：1，序列 ID 序号：20，序列 ID 序号：24，序列 ID 序号：26 和序列 ID 序号：44；B 细胞表位来自于含有 LHRH 及序列 ID 序号：2 或序列 ID 序号：3 或序列 ID 序号：4 的氨基酸序列。与优选实施例一致，多肽的氨基酸序列来源于序列 ID 序号 5-16，103 或 104。同样为与优选实施例一致，优选的（但不是主要的）含

有脂氨基酸的脂质部分是从含有下面的组中挑选出来的：(i) Pam₂Cys；(ii) Ste₂Cys；(iii) Lau₂Cys；和(iv) Oct₂Cys。

对于 LHRH 可以产生持续的抗体证明了本发明中脂肽作为一种作为诱导不育或避孕试剂的疫苗活性成分的通用效用。

因此，本发明从另一方面提供了一种含有药理学可接受的稀释液，以及含有单独结合于一个或多个脂质部分多肽的脂肽避孕试剂，其中：

(i) 上述多肽含有：

(a) 一种辅助 T 细胞 (Th) 表位的氨基酸序列和一种生殖激素或激素受体的 B 细胞表位，其中所述的氨基酸序列是不同的；和

(b) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基，其用于经所述内部赖氨酸 ϵ -氨基或经所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团共价附着于所述脂质部分的每一个；和

(ii) 所述一个或多个脂质部分的每一个被直接地或间接地共价附着于一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团。

本发明的这种疫苗/避孕试剂可以由含有一种或多种载体或赋形剂或其他在“脂肽配方”中描述的试剂构成。

类似地，对受体动物的进行疫苗/避孕剂的注射也可通过上述方法完成。优选受体是人，或动物，比如农业动物，实验动物，家养动物，凶猛动物或野生动物。

对于 A 型微球菌的免疫

A 型微球菌 (GAS) 是一种相对温和的疾病细菌代理，比如脓毒性咽喉炎和脓疱病，以及少有的，严重的，甚至是危及生命的 necrotizing faciitis 和链球菌中毒休克综合症。严重甚至是危及

生命的 GAS 疾病可能发生在当细菌进入机体中通常不含有细菌的部分时，比如血液，肌肉或肺。一个感染名词“入侵性 GAS 疾病”。两种最严重形式的入侵性 GAS 疾病就是 necrotizing fasciitis 和链球菌中毒休克综合症。necrotizing fasciitis 破坏肌肉，脂肪和皮肤组织。STSS 导致血压急剧降低和脏器丧失功能（肾脏，肝脏和肺）。大约 20%的 necrotizing fasciitis 患者和超过一半的 STSS 患者会死亡。大约 10-15%患有其他形式入侵性 GAS 疾病的患者也会死亡。在 1999 年美国大约发生了 9,400 起入侵性 GAS 疾病。

入侵性 GAS 感染通常通过越过被感染人的防御系统而对其进行感染，比如，某人皮肤上的伤口可以使得该细菌进入到组织内，或当某人遭受包括 HIV/AIDS 等慢性疾病或影响免疫系统疾病影响，抗感染能力下降时。同样，一些 GAS 有毒菌株比其他菌株更容易引发严重的疾病。对遭受癌症，糖尿病，肾透析和其他使用类固醇进行药物治疗的慢性病人来说，他们的危险性更大。

例如，本发明中由含有 A 群链球菌抗原，尤其是 M 蛋白的 B 细胞表位组成的具有适合构型的脂肽，可以对动物进行 GAS 免疫；也对于 GAS 的再次感染，提供了一种保护性免疫应答，尤其是诱导针对于 GAS 的 M 蛋白的 IgG，唾液 IgA 和粪 IgA 的产生，以降低 GAS 诱导的死亡率。

因此，本发明从另一个方面提供了一种可对施用了含有附着于一个或多个脂质部分多肽的分离脂肽的所述受体诱导产生对于 A 群链球菌的免疫应答的方法，其中：

(iv) 这样的多肽含有：

(b) 一种辅助 T 细胞表位和一种 A 群链球菌抗原的 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所述的氨基酸序列是不同的；以及

(c) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基，其用于经所述内部赖氨酸的 ϵ -氨基或经所述内部赖氨酸类似物的末端侧链基团共价附着于所述脂质部分的每一个；和

(v) 所述一个或多个脂质部分的每一个被直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团；和

(vi) 在足以引起对于所述抗原性 B 细胞表位的体液免疫反应的情况下，对受体动物施用的脂肽。

脂肽可以任何在这里描述的方便配方形式进行注射。

“体液免疫”的意思是对于足以诱导产生血清 IgG，唾液 IgA 或粪 IgA 的 B 细胞表位进行的第二次免疫应答，或提供一种对于 A 型链球菌再次感染的保护性免疫反应。

更优选，体液免疫产生了针对于受体中 B 细胞表位持续水平的抗体。“持续水平的抗体”意思是产生足够水平防止 A 型链球菌感染的传播，和/或降低受到 A 型链球菌感染受体动物的致病率或死亡率的 B 细胞表位循环抗体。

优选，抗体水平至少持续 6 个月，9 个月，12 个月或 2 年。

优选 B 细胞表位来自于 A 群链球菌 M 蛋白的氨基酸序列。

在这一种类中，优选 B 细胞表位含有 SEQ ID No. 101 多肽中的氨基酸序列。

优选辅助 T 细胞表位含有选自下列序列的氨基酸序列：SEQ ID No. 1，SEQ ID No. 20，SEQ ID No. 24，SEQ ID No. 26 和 SEQ ID No. 44，以及 SEQ ID No. 1 或 18-56 中任意一条。

在本发明的一个优选实施例中，辅助 T 细胞表位含有序列 ID 序号：24 中的氨基酸序列，而 B 细胞表位含有序列 ID 序号：101 中的氨基

酸序列。与优选实施例一致，多肽的氨基酸序列来源于序列 ID 序号 105-108。同样为与优选实施例一致，首选（但不是主要的）的含有脂氨基酸的脂质部分是从含有下面的分子式（I）或（II）中挑选出来的，在这里描述的其他脂也同样可用。

对于 J14 多肽可以产生持续的抗体证明了本发明中脂肽作为一种作为对 A 型链球菌提供免疫疫苗活性成分的通用性。

因此，本发明从另一方面提供了一种含有药理学可接受的稀释液，以及含有单独结合于一个或多个脂质部分多肽的 A 型链球菌疫苗，其中：

这样的多肽含有：

一种 T 细胞表位的氨基酸序列和一种 A 型链球菌抗原的 B 细胞表位，其中所述的氨基酸序列并不相同；以及

通过所述内部赖氨酸 ϵ -氨基，或所述内部赖氨酸类似物末端侧链基团，与所述脂质部分进行共价结合的一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基；以及

直接或间接与所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基，或所述一个或多个内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团进行共价结合的每一个或多个脂质部分。

本发明的这种疫苗可以由含有一种或多种载体或赋形剂或其他在“脂肽配方”中描述过的试剂构成。

类似地，对受体动物的进行疫苗的注射也可通过上述方法完成。优选受体是人，或动物，比如农业动物，实验动物，家养动物，凶猛动物或野生动物。

对胃酸过量和不受调控分泌的抑制与预防

已知胃泌素可以通过壁细胞刺激胃酸的分泌，其活性由胃泌素与胃泌素受体或缩胆囊素的结合来进行调控的。胃泌素的末端 4-5 个氨基酸残基提供了全长蛋白质的受体特异性和活性。胃泌素末端的 5 个

氨基酸残基并成为五肽胃泌素。作为过量和不受调控胃酸分泌的后果，不受调控的胃泌素表达和分泌可引起 hypergastrinemia，并导致 Zollinger-Ellison 综合症，胃十二指肠溃疡，胰或十二指肠促胃液素瘤的形成。针对于胃泌素多肽的内分泌，可以使用对于胃泌素的抗体进行胃泌素免疫中和可以用来阻止胃酸的分泌。

例如，本发明中由含有胃泌素多肽 B 细胞表位组成的具有适合构型的脂肽，可以对宿主动物进行胃泌素免疫；或在胃酸分泌受到抑制的小鼠模型或其他哺乳动物中得到胃泌素过量分泌。这里的数据证明了在诱导对于胃泌素和胃泌素免疫中和的体液免疫，以及在遭受由于胃酸的过量和不受调控的分泌引起的 hypergastrinemia, Zollinger-Ellison 综合征，胃溃疡或十二指肠溃疡阻止胃酸分泌，以及在减少或防止胰和十二指肠中胃泌素分泌肿瘤的形成（预防和/或治疗促胃液素瘤）过程中，脂肽的普遍效用。

因此，本发明进一步提供了一种在受试者体内诱导针对胃泌素肽的免疫应答的方法，该方法包括对所述受试者施用一种含有共价结合于一种或多种脂质部分的多肽的分离脂肽，其中：

(vii) 上述多肽含有：

(c) 一种辅助 T 细胞表位和一种胃泌素抗原的 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所述的氨基酸序列是不同的；和

(d) 一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基，其用于经所述内部赖氨酸的 ϵ -氨基或经所述内部赖氨酸类似物的末端侧链基团共价附着于所述脂质部分的每一个；和

(viii) 所述一个或多个脂质部分的每一个被直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团；和

(ix) 在足以引起对于所述抗原性 B 细胞表位的体液免疫应答的条件下，对受试体动物施用一定时间的脂肽。

脂肽可以任何在这里描述的方便配方形式进行注射。

“体液免疫”的意思是对于足以产生对于胃泌素的血清 IgG 的 B 细胞表位进行的二次免疫应答。

更优选，体液免疫产生了针对于受体中 B 细胞表位持续水平的抗体。“持续水平的抗体”意思是产生足够水平以阻止对于胃泌素的胃酸的过量和不受调控的分泌的 B 细胞表位循环抗体。

优选，抗体水平至少持续 6 个月，9 个月，12 个月或 2 年。

优选 B 细胞表位含有五肽胃泌素的氨基酸序列。在这一种类中，优选 B 细胞表位含有序列 ID 序号：102 多肽中的氨基酸序列，或包含全长胃泌素蛋白或任何具有其免疫片段的 B 细胞表位。

优选辅助 T 细胞表位含有从下列序列挑选出来的氨基酸序列：序列 ID 序号：1，序列 ID 序号：20，序列 ID 序号：24，序列 ID 序号：26 和序列 ID 序号：44，以及序列 ID 序号为 1，或 18-56 中任意一条。

在本发明的一个优选实施例中，辅助 T 细胞表位含有序列 ID 序号：24 中的氨基酸序列，而 B 细胞表位含有序列 ID 序号：102 中的氨基酸序列。与优选实施例一致，多肽的氨基酸序列来源于序列 ID 序号 109-112。同样为与优选实施例一致，优选（但不是主要的）的含有脂氨基酸的脂质部分是从含有下面的分子式（I）或（II）中挑选出来的，在这里描述的其他脂也同样可用。

对于五肽胃泌素或胃泌素可以产生持续的抗体证明了本发明中脂肽作为一种作为必要时对降低胃泌素副作用提供疫苗活性成分的通用性。

因此，本发明从另一方面提供了一种含有药物学可接受的稀释液，以及含有单独结合于一个或多个脂质部分多肽的，针对于胃泌素分泌过多诱导的情形或疾病的疫苗，其中：

(v)上述多肽含有：

(c)一种 T 细胞表位和一种胃泌素多肽抗原的 B 细胞表位的氨基酸序列，其中所述的氨基酸序列是不同的；和

(d)一个或多个内部赖氨酸残基或内部赖氨酸类似物残基，其用于经所述内部赖氨酸的 ϵ -氨基或经所述内部赖氨酸类似物的末端侧链基团共价附着于所述脂质部分的每一个；和

(vi)所述一个或多个脂质部分的每一个被直接地或间接地共价附着于所述一个或多个内部赖氨酸残基的 ϵ -氨基或内部赖氨酸类似物残基的末端侧链基团。

本发明的这种疫苗可以由含有一种或多种载体或赋形剂或其他在“脂肽配方”中描述过的试剂。

类似地，对受体动物的进行疫苗的注射也可通过上述方法完成。优选受试者是人。

本发明用以下非限制性实施例和附图进行进一步描述。

实施例 1

材料和方法

化学制品

除非另作说明，化学制品是分析级或其等价物。N,N'-二甲替甲酰胺(DMF)，哌啶，三氟乙酸(TFA)，O'苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基uroniu 六氟磷酸盐(HBTU)，1-羟基苯并三唑(HOBt)和二异丙基乙胺(DIPEA)和二异丙基碳二亚胺(DIPCDI) 获自 Auspep Pty. Ltd., 墨尔本, 澳大利亚 和 Sigma-Aldrich Pty. Ltd., Castle Hill, 澳大利亚。O'苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基 uronium 四氟硼酸盐(TBTU)获自 Bachem, (Bachem AG, 瑞士)。二氯甲(DCM)和二乙醚获自 MerckPty Ltd. (Kilsyth, 澳大利亚)。苯酚和三异丙基硅烷(TIPS) 来自 Aldrich (Milwaulke, WI)，及三硝基苯甲基磺酸 (TNBSA) 和 diaminopyridine (DMAP) 来自 Fluka；1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)获自 Sigma，棕榈酸来自 Fluka。

配剂的脂质部分的合成 (I)

Pam₃Cys 根据 Weismuller 等人, Hoppe Seylers Z Physiol Chem 364, 593 (1983)中所描述的方法被制备, 如根据 Zeng 等人, *J Pept Sci* 2, : 66 (1996)中所描述的方法被修饰。根据 Zeng 等人(*supra*)所描述的程序, 脂氨基酸 Pam₃Cys 被附着于被暴露的赖氨酸的 ϵ 氨基上。简单地说, 添加超过 2 倍的 Pam₃Cys, TBTU 和 HOBt 被溶解在 DCM 中, 超过 3 倍的 DIPEA 。然后, 溶液被添加到被树脂结合的多肽上以产生脂肽。

配剂的脂质部分的合成 (II)

根据 Jones 等人, *Xenobiotica* 5, 155 (1975)和 Metzger 等人, *Int J Pept Protein Res* 38, 545 (1991)所描述的方法, 制备 Pam₃Cys 及其衍生物 Fmoc-Pam₃Cys-OH。

脂肽的合成

Pam₂Cys, Ste₂Cys, Oct₂Cys 或 Lau₂Cys 被用 Jones 等人, *Xenobiotica* 5, 155 (1975) 和 Metzger 等人, *Int J Pept Protein Res* 38, 545 (1991)所描述的方法的一个变化形式连接到多肽上。

I. S-(2, 3-二羟基丙酯)半胱氨酸的合成:

三乙胺(6g, 8.2 ml, 58mmoles) 被添加到水中的 L-半胱氨酸氢氯化物 (3g, 19mmoles) 和 3-溴基-丙烷-1, 2-二醇 (4.2g, 2.36ml, 27mmoles), 该均相溶液于室温保持 3 天。该溶液在真空中于 40℃ 被还原成硅渣, 硅渣与甲醇 (100ml) 一起被煮沸, 离心, 将残余物溶解在水 (5ml) 中。这一水溶液被添加到丙酮 (300ml) 中, 并通过离心过滤分离沉淀物。该沉淀物通过几次沉淀被从含有丙酮的水中纯化出来, 以提供白色无定形粉末 S-(2, 3-二羟基丙酯)半胱氨酸 (2.4 g, 12.3 mmol, 64.7%)。

II. N-苄基甲氧基羰基-S-(2,3-二羟基丙酯)半胱氨酸(Fmoc-Dhc-OH)的合成:

S-(2,3-二羟基丙酯)半胱氨酸(2.45g, 12.6mmole)被溶解入 9%的碳酸钠中 (20ml)。于乙腈(20 ml)中的苄基甲氧基羰基-N-羟基琥珀酰亚胺溶液(3.45g, 10.5mmole)被加入, 该混合物被搅拌 2 小时, 然后用水 (240ml) 稀释, 并用二乙醚萃取(25ml x 3)。水相被用浓盐酸酸化至 pH 2, 然后用乙酸乙酯萃取(70ml x 3)。萃取物被用水(50ml x 2), 饱和氯化钠溶液(50ml x 2)洗涤, 被在硫酸钠上干燥并被蒸发至干燥状

态。于-20°C, 从乙醚和乙酸乙酯中的重结晶产生无色粉末(2.8g, 6.7 mmole, 63.8%)。

III. Fmoc-Dhc-OH 偶合到树脂结合多肽上 resin-bound peptide:

Fmoc-Dhc-OH (100mg, 0.24mmole)在 DCM 和 DMF (1:1, v/v, 3 ml) 中, 用 HOBt (36mg, 0.24mmole) 和 DICl (37ul, 0.24mmol), 于 0 °C 被激活 5 分钟。该混合物然后被添加带含有树脂结合多肽(0.04mmole, 0.25g 氨基多肽树脂)的容器中。摇动 2 小时后, 溶液通过过滤被移走, 树脂用 DCM 和 DMF 洗涤 (分别 3 x 30ml)。该反应用 TNBSA 实验监控其是否完成。如果需要进行两次偶合。

IVa. Fmoc-Dhc-多肽树脂的两个羟基的棕榈酰化:

棕榈酸 (204mg, 0.8mmole), DICl (154ul, 1mmole) 和 DMAP(9.76mg, 0.08mmole)被溶解在 2ml 的 DCM 和 1ml 的 DMF 中。树脂结合 Fmoc-Dhc-多肽树脂(0.04mmole, 0.25g)被悬浮在上述溶液中并在室温下被摇动 16 小时。溶液通过过滤被移走, 然后用 DSM 和 DMF 彻底地洗涤树脂以移走任何尿素残余物。用 2.5% DBU 完成 Fmoc 基团的移走(2 x 5 分钟)。

IVb. Fmoc-Dhc-多肽树脂的两个羟基的硬脂酰化:

硬脂酸(约 0.8mmole), DICl (154ul, 1mmole)和 DMAP (9.76mg, 0.08mmole)被溶解在 2 ml 的 DCM 和 1 ml 的 DMF 中。树脂结合 Fmoc-Dhc-多肽树脂(0.04mmole, 0.25g) 被悬浮在上述溶液中并在室温下被摇动 16 小时。溶液通过过滤被移走, 然后用 DSM 和 DMF 彻底地洗涤树脂以移走任何尿素残余物。用 2.5% DBU 完成 Fmoc 基团的移走(2 x 5 分钟)。

IVc. Fmoc-Dhc-多肽树脂的两个羟基的十二烷酰化:

十二烷酸(约 0.8mmole), DICl (154ul, 1mmole)和 DMAP (9.76 mg, 0.08mmole) 被溶解在 2 ml 的 DCM 和 1 ml 的 DMF 中。树脂结合 Fmoc-Dhc-多肽树脂(0.04mmole, 0.25g) 被悬浮在上述溶液中并在室温下被摇动 16 小时。溶液通过过滤被移走, 然后用 DSM 和 DMF 彻底地洗涤树脂以移走任何尿素残余物。用 2.5% DBU 完成 Fmoc 基团的移走(2 x 5 分钟)。

IVd. Fmoc-Dhc-多肽树脂的两个羟基的辛酰化:

辛酸(约 0.8mmole), DICl (154ul, 1mmole) 和 DMAP(9.76mg, 0.08mmole) 被溶解在 2 ml 的 DCM 和 1 ml 的 DMF 中。树脂结合 Fmoc-Dhc-多肽树脂(0.04mmole, 0.25g) 被悬浮在上述溶液中并在室温下被摇动 16 小时。溶液通过过滤被移走, 然后用 DSM 和 DMF 彻底地洗涤树脂以移走任何尿素残余物。用 2.5% DBU 完成 Fmoc 基团的移走(2 x 5 分钟)。

多肽合成

用于多肽合成的常规程序已经被 Jackson *et al.*, *Vaccine* 18, 355 (1999)所描述。为使得 CD4⁺ T 细胞表位和 B 细胞表位间的脂质分子结合, Fmoc-赖氨酸(Mtt)-OH 被插入到树脂结合多肽的近似中心内, 两个表位间的一个位置。如果脂质是被添加到多肽内的另一个位置, 例如 SEQ ID NO: 24 的 Lys-14 残基, 那么 Fmoc-赖氨酸(Mtt)-OH 也被插入到那个位置。多肽合成完成后, 使用溶于二氯甲中的 1%的 TFA 通过连续流式洗涤 30-45 分钟移走 Mtt 基团, 以暴露赖氨酸残基的 ε 氨基。当两个丝氨酸残基被用作间隔基的时候, 两个丝氨酸残基被偶合到该 ε 氨基上。可选地, 当两个精氨酸残基被用作间隔基的时候, 两个精氨酸残基被偶合到该 ε 氨基上。可选地, 6-氨基己酸被偶合到该 ε 氨基上。随后的脂质部分, 如 Pam₃Cys, Pam₂Cys, Ste₂Cys, Oct₂Cys,

或 Lau₂Cys 的偶合在前面被描述。

全部的树脂结合多肽结构用试剂 B(88% TFA, 5%苯酚, 2% TIPS, 5% 水) 作用 2 小时, 被从固相载体分开, 且通过如 Zeng *et al.*, *Vaccine* 18, 1031 (2000)所述的倒相层析被纯化。

用被插入到水中 HPLC 系统的 Vydac C4(4.6 x 250 mm)柱进行分析倒相高压液体层析 (RP-HPLC); 将溶于水的 0.1% TFA 和溶于 CH₃CN 的 0.1% TFA 用作限制溶剂, 在流速为 1ml/分钟被展开。全部产品在分析 RP-HPLC 上呈现为单独的主峰; 当在装备定时离子萃取的 Bruker BIFLEX 装置上通过 MALDI-TOF 质谱分析的时候, 具有被期望的分子量。最终的免疫原的定量利用在多肽结构中存在的色氨酸和酪氨酸残基, 通过测量 280nm 处的吸收值进行 (摩尔消光系数为 6.6×10^3)。

通过加入两个残基在多肽和含 Pam₃Cys 多肽与含 Pam₂Cys 多肽的脂质部分之间来研究丝氨酸的效应, 两个丝氨酸残基随后在脂质部分 (其结构如图 1 所示) 的共价附着之前被添加到多肽上。通过分析 RP-HPLC 和质谱分析完成的它们的特征的概述, 由表 1 和表 2 呈现。

免疫方案

5 只 6-8 周龄的雌性 BALB/c 鼠, 在 0 天被接种, 在第 28 天再次接种。或者, 4-6 周龄的雌性杂交繁育的 Quackenbush 鼠, 被经鼻腔免疫并按照初次免疫在每 21 天间隔时提供加强免疫。对于皮下 (s.c.) 接种 (每剂 100 μ l), 脂肽结构在盐中和在等体积的用于初次注射的弗氏完全佐剂 (CFA) 或用于二次免疫的弗氏不完全佐剂中被制成乳状液的未脂化多肽中。对于鼻腔内 (i.n.) 接种, 50 μ l 在盐中的多肽

被用于用 penthrane 麻醉的鼠的鼻孔吸入。血清从取自初次接种后 4 周和二次接种后两周的血液制备，或可选地，从最后一次免疫七天后的尾部放血制备。

酶联免疫吸附测定(ELISA)

在基本如 Ghosh et al., Int Immun. 11, 1103, (1999)所述的血清样本上进行 ELISA 测定，用免疫试剂（如 LHRH, J14 或五肽胃泌素）作为包被抗原。抗体滴度用为达到 OD₂ 的血清最高稀释度的倒数来表示，这呈现出是在没有抗体的情况下的背景结合的约 5 倍。前被 Ghosh et al., Int Immun. 11, 1103, (1999) 所描述的那样，LHRH 或 J14 特异性的抗体的同种型用抗鼠 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 或 IgA（ICN 医药品公司，Costa Mesa, CA）的兔抗血清来测定。

繁殖力研究

在被用多肽免疫原接种后及随后暴露给雄性鼠，对雌性鼠的产仔能力进行测试。一组雌性鼠被用 CFA 中的盐免疫作为对照组。1 只雄性鼠被放入其中饲养由 2 只或 3 只雌性鼠的一个笼中，雄性鼠在各笼间轮换以将每组雌性鼠暴露给每只雄性鼠。雄性和雌性鼠被一起饲养总共 3 周，在该时间段末雄性鼠被移走，雌性鼠被留下用于观察。

表 1

HPLC 洗提和基于流感病毒红血球凝聚素辅助 T 细胞表位 (SEQ ID NO: 1) 和 LHRH B-细胞表位(SEQ ID NO: 2)的多肽疫苗的质量特征

¹ 多肽结构	¹ 保持时间 (分钟)	期望质量 (Da)	² 实验测定质量 (Da)
[Th]-[B]	26.3	2957.1	2957.3
[Th]-Lys-[B]	26.0	3085.5	3084.7
Pam ₃ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]	51.5	4022.4	4020.8
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]	41.8	3785.1	3785.5
Pam ₂ Cys-[Th]-[B]	40.7	3609.3	3605.7
[Th]-Lys(Pam ₃ Cys)-[B]	50.4	3977.4	3969.5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys)-[B]	40.7	3739.5	3739.6
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser	40.3	3913.5	3912.1

¹ 倒相层析发在被插入到水相 HPLC 系统中的 Vydac C4 柱 (4.6x250mm) 上进行, 以流速 1ml/分钟展开, 用存在于水中的 0.1% TFA 和存在于 CH₃CN 中的 0.1% TFA 作为极限溶剂。

² 质谱测定用装备有定时离子萃取的 Bruker BIFLEX MALDI-TOF 装置进行。在线性模型中进行分析。

表 2.

HPLC 洗提基于 CDV-F P25 辅助 T 细胞表位 (SEQ ID NO: 24) 和五肽胃泌素 B-细胞表位(SEQ ID NO:102)的多肽疫苗的质量特征

¹ 多肽结构	¹ 保持时间(分钟)	期望质量 (Da)	² 实验测定质量 (Da)
[Th]-Lys-[B]	31.4	2621.5	2620.7
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]	54.9	3449.7	3450.3
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser-)	53.9	3505.7	3506.7

¹ 倒相层析发在被插入到水相 HPLC 系统中的 Vydac C4 柱 (4.6x300mm) 上进行, 以流速 1ml/分钟展开, 用存在于水中的 0.1% TFA 和存在于 CH₃CN 中的 0.1% TFA 作为极限溶剂。

² 质谱测定用 Agilent 110 LC/MSD 离子阱质谱仪进行。

树突细胞培养

树突细胞 (DC) 被在基于完全 IDDM 的培养基中培养。它由含有 25 mM HEPES 且不含有 α -硫甘油或 L-谷氨酸盐(JRH Bioscience, Lenexa, USA)的 Iscove's Modified Dulbecco's 培养基 (IMDM)组成, 补充 10% (V/V) 加热失活(56°C, 30 min)的胎牛血清 (CSL Ltd., Parkville, Victoria, Australia), 庆大霉素 (24 μ g/mL), 谷氨酸盐 (2 mM), 丙酮酸钠 (2 mM), 青霉素 (100 IU/mL), 链霉素 (180 μ g/mL) 和 2-巯基乙醇 (0.1 mM)。用于 DC 制备, 完全 IMDM 还进一步被添加了 30%的来自被培养的 NIH/3T3 细胞的上清和存在于来自被 GM-CSF 基因转染的 Ag8653 细胞的上清中的 5% 的 GM-CSF (DC 培养基)。

未成熟树突细胞的培养方法是据 Winzler *et al.*, *J. Exp Med.* 185, 317 (1997)的修改。来自 BALB/c 鼠的脾细胞以 1.5×10^6 个细胞/55mm 平皿 (Techno-Plas, S.A., Australia) 接种在 3ml 的 DC 培养基中, 并

于 37°C 与 5% CO₂ 孵育。所有用于培养的装置都没有热源。培养基每隔 4 小时被改变且全部的细胞回到培养皿中。在第 12 天，被悬浮的和轻微黏附的细胞两者都通过有效地移液被收集，随后抽吸培养基。该程序用 2ml PBS 重复两次。剩下的坚固地黏附的细胞被排除。被收集的细胞通过离心过滤被制成丸状并被重新接种到一个新的培养皿中。细胞随后以培养基变化和转变的 4 天一个交替的周期被保持。1 个月连续培养后，浮游的和半黏附的细胞呈现出未成熟树突细胞的外观和着色特性，并被归类为 D1 细胞。在这些传代条件下，多数被培养的 D1 细胞保持了由细胞表面 MHC II 类分子表征的未成熟的表型。

D1 细胞的流式细胞分析

用 1ml DC 培养基将 D1 细胞（每个样本有 1×10^5 个细胞）接种到一个新的有盖培养皿中，以 0.0045 nmole 溶解在完全 IMDM 培养基中的脂肽孵育。将 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化自大肠杆菌血清型 O111:B4（Difco, Detroit, Michigan, USA, 受赠自 Dr. E. Margot Anders, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne）的脂多糖用作阳性对照。过夜孵育后，收获细胞并用含有 1% FCS 的 PBS 洗涤一次。为了阻止对 FC γ RII/III 的非特异性结合，细胞用 20 μL 正常鼠血清在室温下预先孵育 5 分钟。然后在冰面上将细胞暴露于 FITC-缀合单克隆抗体 14-4-4S 30 分钟（IgG_{2a}，抗-I-E^{k,d}；Ozato 等., *J. Immunol.*, 124, 533, 1980）。单克隆抗体 36/1（Brown 等., *Arch Virol* 114, 1 1990）对流感病毒红血球凝聚素具有特异性，被用作同种型对照。所有抗体都在 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 被使用。样本用含有 1%FCS 的 PBS 洗涤一次，并用含有 4%多聚甲醛的 PBS 在冰面上固定 15 分钟。用 FACSsort（Becton Dickinson, San Jose, USA）进行流式细胞记数分析，数据用 FlowJo 软件（Tree Star, Inc., San Carlos, CA, USA）

分析。

实施例 2

含有 LHRH B 细胞表位脂肽的研究

含有 LHRH 脂肽的溶解特性

对含有 LHRH 不同脂肽的目测说明它们在溶解性是具有极大的差别（图 2）。那些脂质部分结合于两种表位中部的分子具有明显增强的溶解性。脂肽[Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B]和[Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B]可以至少 8mg/ml（没有对更高的浓度进行检测）的浓度溶解于盐水中，而那些脂质部分与多肽 N 末端序列结合的结构则在 0.25mg/ml 浓度时就形成了乳白色液体。

试图在脂质部分与多肽 N 末端结合分子的脂质部分和多肽部分之间上加入两个亲水性丝氨酸残基（Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 和 Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]）来增加其溶解性的努力，被证明是不成功的。事实上，脂肽 Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]相当难以溶解，以至于它甚至不能在与其它脂肽相同的条件下进行 RP-HPLC 纯化。我们认为该成分的不溶解性本质使得很难将其作为疫苗生产中的可行性提议加以考虑。

含有 LHRH B 细胞表位脂肽的免疫原性

将下述三种脂肽 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B], [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] 和 [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B]溶于盐水进行皮下给药可以诱导高水平的抗-LHRH 抗体。事实上，用上述脂肽进行两次免疫后的抗体滴度和用弗氏完全佐剂与[Th]-[B]或 [Th]-Lys-[B]混合进行给药的滴度相似（图 3）。接受 Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 或 Pam₂Cys-[Th]-[B]免疫小鼠血清中的抗-LHRH 抗体滴度稍低一些。相对于不可溶的脂肽结构，可溶性脂肽[Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B], [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B]可以在首次

免疫后诱导 10-100 倍的抗-LHRH 抗体表达。相对于采用 Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ 作为佐剂的其他结果(Jung, G.,和 W. G. Bessler. (1995) In: “在医学和生物学中的多肽免疫识别, N. D. Zegers, W. J. A. Boersma, and E. Claassen, eds.. CRC Press, Boca, New York, London, Tokyo, p. 159), 两组各 5 只接受 [Th]-[B] 和 Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ 以 1:1 或 1:5 混合进行免疫的小鼠, 都没有显示出抗-LHRH 抗体的显著提高,

采用多种脂肽进行二次免疫后 2 周的育性试验结果可见于表 3。

没有任何用溶于盐水的脂肽 [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] 或 [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B], 和与弗氏完全佐剂进行混合的非脂肽结构 [Th]-[B] or [Th]-Lys-[B] 免疫过的小鼠怀孕。在接受 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 免疫的组中有 1 只和 2 只用 Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 或 Pam₂Cys-[Th]-[B]免疫的动物产仔。所有采用溶于弗氏完全佐剂盐水或与混有[Th]-[B]和 Pam₃Cys-S-(Lys)₄ 多肽的对照组都产仔。

在二次免疫后对抗体水平进行了 7 个月的跟踪检测。用脂肽和溶于复制完全佐剂中的非脂肽进行免疫小鼠的抗-LHRH 抗体滴度在 26 周内分别下降了 4-20 倍。在二次免疫后 3 个月进行的育性试验结果与该次免疫后 2 周的结果相似。接受溶于盐水的可溶性脂肽 [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] 或 [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B], 或溶于弗氏完全佐剂的非脂肽[Th]-[B] 和 [Th]-Lys-[B] 免疫的小鼠都保持不育。

表 3 在采用多肽结构进行免疫后的抗-LHRH 抗体滴度和怀孕发生率

¹ 接种体	² 二次给药后各周抗-LHRH 抗体滴度(log ₁₀)的平均值						怀孕发生率	
	2 周	7 周	10 周	20 周	28 周	2 次给药后 2 周	2 次给药后 13 周	
Pam ₂ Cys-[Th]-[B]	4.24±0.60	3.38±0.18	3.34±0.97	3.18±0.63	3.16±0.53	2/5	3/5	
Pam ₃ Cys-Ser-Ser-[Th]-[3.36±0.23	3.12±0.16	3.04±0.24	2.78±0.19	2.75±0.23	2/5	0/5	
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[4.78±0.18	3.96±0.10	3.80±0.16	3.52±0.25	3.48±0.25	1/5	2/5	
[Th]-Lys(Pam ₃ Cys)-[B]	4.48±0.62	4.18±0.43	4.06±0.38	3.86±0.54	3.75±0.48	0/5	0/5	
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys)-[B]	4.68±0.40	3.96±0.34	3.94±0.38	3.78±0.21	3.70±0.29	0/5	0/5	
[Th]-[B]	4.92±0.32	4.32±0.32	4.28±0.32	4.06±0.36	3.98±0.35	0/5	0/5	
[Th]-Lys-[B]	4.70±0.18	4.36±0.15	4.24±0.16	4.12±0.20	3.82±0.08	0/5	0/5	
[Th]-[B] + Pam ₂ Cys-Ser-Ser-I ve. (1.5	<2	ND	ND	ND	ND	5/5	ND	
盐水	<2	ND	ND	ND	ND	5/5	3/5	

¹ [Th]-[B], [Th]-Lys-[B]和盐水都溶于弗氏完全佐剂进行给药, 所有其他肽结构都溶于盐水进行给药。皮下给药的剂量为 20nmole。
² 滴度代表的是各组中 5 只雌性 BALB/c 小鼠的几何平均数。

Pam₂Cys 是比 Pam₃Cys 更有效的佐剂

相对于免疫原 Pam₂Cys-[Th]-[B], Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 和 Pam₃Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]来说, 图 3 和表 2 的结果都显示出具有支链的脂肽[Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B] 和 [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B]不仅溶解性更高, 而且可以提高抗体滴度, 尤其是在初次抗体应答时。

为了对这一问题进行深入研究, 我们对[Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B]和 [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B]剂量的降低进行了检测。在 10 nmole 和 1 nmole 水平条件下, [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B]可以比[Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B]又到更高的抗体滴度(表 4)。更令人惊奇的是在接受 10 和 1nmol[Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B]免疫的小鼠的交配实验中, 分别在 5 个个体中观察到了 1 个和 0 个个体的产仔, 而在同样剂量下接受 [Th]-Lys(Pam₃Cys)-[B]免疫的小鼠中, 分别在 5 个个体中观察到了 3 个和 5 个个体的产仔(表 4)。这些结果说明含有 Pam₂Cys 的多肽比含有 Pam₃Cys 的多肽更适于作为免疫原。

含有 Pam₂Cys 的免疫原中加入额外的丝氨酸残基对动物的育性几乎根本没有作用, 尽管这样的做法可以使得在二次免疫后提高抗体的滴度(表 4)。

表 4

采用不同剂量多肽疫苗进行免疫后的抗-LHRH 抗体滴度和怀孕状态

¹ 接种体	二次接种后 2 周的抗-LHRH 抗体滴度(log ₁₀) ^平 均值	² 怀孕状态 (每组中产仔个体数)
[Th]-Lys(Pam ₃ Cys)-[B]	3.76±0.36	3/5
[Th]-Lys(Pam ₃ Cys)-[B]	3.22±0.51	5/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys)-[B]	4.22±0.33	1/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys)-[B]	3.61±1.18	0/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)	4.64±0.23	0/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)	3.92±0.65	1/5
[Th]-[B] in CFA	4.72±0.21	1/5
[Th]-[B] in CFA	3.56±0.22	3/5
溶于弗式完全佐剂的盐水	<2	5/5

¹ 采用溶于盐水的脂肽和溶于弗氏完全佐剂的非脂肽[Th]-[B]和盐水进行首次给药接种，而采用溶于弗氏不完全完全佐剂的非脂肽[Th]-[B]和盐水进行二次接种。所有疫苗都采用常规方式进行皮下给药。

² 在进行疫苗的二次给药 2 周后开始育性试验。

鼻内免疫后的系统性抗体应答

我们采用鼻内免疫方式用溶于盐水的 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]和 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]进行接种。同时也采用皮下免疫的方式对相同的疫苗进行接种并检测系统的抗-LHRH 抗体应答.用于接种[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]的溶液澄清,而用于接种 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]的溶液则呈乳白色,说明这两种配方的溶解性差异。

进行鼻内给药后,每种疫苗所诱导产生的血清抗-LHRH 抗体滴度都稍低于皮下接种诱导产生的滴度(表 5)。溶解性更高的 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]在首次接种后 4 周所诱导产生的抗-LHRH 抗体滴度明显高于溶解度较低的 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] ($p = 0.00007$);而事实上,这与通过皮下给药获得的结果相类似。与接受 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B]鼻内免疫后 5 只中有 3 只小鼠产仔情况相比较,接受[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]鼻内免疫的小鼠没有任何一只怀孕。

通过两种不同方式接受两种疫苗所诱导产生应答的寿命比较可见于表 5。在二次疫苗免疫 26 周后所有小鼠的抗体水平都已经下降到二次免疫 2 周后的水平之下。接受皮下给药[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]的分组中,其诱导产生抗-LHRH 抗体的下降情况并不是非常明显,有一次说明 Pam₂Cys-Ser-Ser 结合于分子中具有优越性。

表 5 接受多种脂肽结构鼻内或皮下接种后抗-LHRH 抗体滴度和怀孕状态

¹ 接种物	抗-LHRH 抗体滴度(log ₁₀)的几何平均数				² 怀孕情况
	首次给药后 4 周	二次给药后 2 周	二次给药后 10 周	二次给药后 26 周	
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] (皮下接种)	2.40±0.5	4.60±0.35	3.80±0.40	3.30±0.39	0/5
Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] (鼻内接种)	1.88±0.42	4.28±0.75	3.18±0.45	2.90±0.23	3/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[B] (皮下接种)	3.46±0.35	4.62±0.35	4.18±0.32	4.02±0.44	0/5
[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)-[B] (鼻内接种)	3.52±0.25	4.22±0.19	3.46±0.35	3.02±0.18	0/5
[Th]-[B] 溶于弗氏完全佐剂 (皮下接种)	4.12±0.41	4.70±0.36	3.88±0.30	3.62±0.37	0/5
盐水溶于弗氏完全佐剂(皮下接种)	1.0	ND	ND	ND	5/5

¹ 采用溶于盐水的脂肽和溶于弗氏完全佐剂的非脂肽[Th]-[B]和盐水进行首次给药接种，而采用溶于弗氏不完全完全佐剂的非脂肽[Th]-[B]和盐水进行二次接种。

² 在进行疫苗的二次给药 2 周后开始育性试验。

我们还检测了可溶性的[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]经过皮下和鼻内两种给药方式所诱导产生直接针对 LHRH 的个别抗体同种型(图 4)。尽管鼻内接种诱导的总 Ig 量少于皮下接种,鼻内接种表现出比皮下接种可诱导 IgG3, IgG2b 和可能的 IgM 的更高水平。

树突细胞与多肽和脂肽的接触可诱导不同水平 MHC II 类分子的细胞表面

原始 CD4⁺ T 细胞在次级淋巴器官的成熟,发生在抗原与成熟的树突细胞接触之前。这样的成熟特征表现为通过正调节 MHC 产物和共刺激树突细胞表面的分子。于是我们通过检测不同多肽与脂肽激活树突细胞能力的区别,来解释这些候选疫苗的不同免疫原性质。

采用一种未成熟的树突细胞, D1 细胞,与多肽接触,并对 MHC II 类分子的表面表达进行染色,然后进行流式细胞分析,该实验的结果证明在导致树突细胞的成熟过程中,[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]最有效,而 Pam₂Cys-[Th]-[B]的效果最差(图 5)。
[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B]正调节 II 类表达的能力接近于细菌脂多糖(LPS),而 Pam₂Cys-Ser-Ser[Th]-[B]和 [Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B]的激活能力则居中。在培养过程中,非脂肽诱导 D1 细胞的成熟并不高于 26%的自发成熟比例。脂肽诱导 D1 细胞的成熟是浓度依赖的(数据未显示)。这些脂肽诱导 D1 细胞的成熟能力直接反应了他们诱导抗体的能力,为免疫原性的区别提供了一种可能的机制。

对于 LHRH C 末端五肽的抗体应答

如图 6 所示,脂化的[Th]-Lys(Pam₂Cys)-[B]可引起大约相同的抗体应答,其中[Th]由来源于流感病毒红细胞凝集素轻链的 CD4⁺ T 细胞表位(SEQ ID NO: 1)组成,[B]由位于脂质部分与多肽部分之间,

含有或不含间隔丝氨酸(Ser-Ser)的 LHRH 1-10 (SEQ ID NO: 2) 或 LHRH 6-10 (即 LHRH C 末端的 5 个残基; SEQ ID NO: 4)组成。这些数据证明了在作为免疫抗原时,脂肽的有用性并不局限于任何具体的氨基酸序列这一假设。

在脂肽结构中除了 Pam₂Cys 之外有用的脂质

如图 7 所示,用 20nmole 多肽免疫原对分组的 BALB/c 小鼠(6-8 周龄)进行皮下初次和二次接种免疫,该多肽免疫原由于具有 SEQ ID NO: 9 氨基酸序列结合的脂质部分 Pam₂Cys, Ste₂Cys, Lau₂Cys, 或 Oct₂Cys(即与具有 SEQ ID NO: 24 的 CDV-F 辅助 T 细胞表位结合的在两个表位之间具有内部赖氨酸残基具有 SEQ ID NO: 3 的 LHRH 2-10)。脂肽的结构可见于图 7。所有多肽都溶于盐水进行给药。非脂肽溶于弗氏完全佐剂进行给药作为对照。从初次免疫 4 周后和二次免疫 2 周后的血液中提取血清。

图 8 中的数据显示出当在脂肽结构中采用 Pam₂Cys 替换其他脂质部分可以获得强烈地初次和二次抗体应答。

可将不同的氨基酸间隔基用于从脂肽中的肽分隔脂

如图 7 所示,用 20nmole 多肽免疫原对分组的 BALB/c 小鼠(6-8 周龄)进行皮下免疫。该多肽免疫原由于具有 SEQ ID NO: 9 氨基酸序列结合的脂质部分 Pam₂Cys, 和用含有丝氨酸同型二聚体,精氨酸同型二聚体或 6-氨基己酸等将其分隔的氨基酸间隔。多肽结构可见图 7。所有脂肽都溶于盐水进行给药,未脂化肽溶于弗氏完全佐剂施用作为对照。从初次免疫 4 周后和二次免疫 2 周后的血液中提取血清。

图 9 中的数据显示出当在脂肽结构中 Pam₂Cys 部分被一系列不同氨基酸间隔与多肽部分分隔时可以获得强烈地初次和二次抗体应答。

脂质部分可以被附着于辅助 T 细胞表位内的内部赖氨酸残基

为了确定与脂质部分结合的内部赖氨酸残基位置的严谨性，我们也对脂质部分与辅助 T 细胞表位内的内部赖氨酸残基结合脂肽结构的免疫原性进行了研究。采用 20nmole 多肽免疫原对分组的 BALB/c 小鼠（0-4 周龄）进行皮下免疫，其中的免疫原包含共价附着于位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间的如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或共价附着于辅助 T 细胞表位内 Lys-14 位置处的如 SEQ ID NO: 103 所示的氨基酸序列的 Pam₂Cys 脂质部分。多肽结构可见于图 7 和 10。所有脂肽都溶于盐水施用，未脂化肽溶于弗氏完全佐剂施用作为对照。从初次免疫 4 周后和二次免疫 2 周后的血液中提取血清。

图 11 中的数据显示出脂质部分结合于任一位置的脂肽都可以获得强烈的抗体应答，由此说明，内部赖氨酸以及脂质部分严谨的位置对于免疫原性来说是无关紧要的。

讨论

在本研究中，我们描述了一系列具有 CD4⁺ T 细胞表位的脂肽免疫原，以及含有一个或多个 B 细胞表位和 Pam₃Cys 或 Pam₂Cys 的 LHRH 多肽本身。

在解除了不需要将脂放置于中央位置的严谨要求后，我们发现将脂放置于多肽免疫原大约中部的 T 细胞表位于 LHRH 之间，而非通常的 N 末端位置所得的疫苗具有提高的溶解性，采用这样的支链结构，可以轻松的获得接种所需要的澄清盐溶液。相比较而言，脂与 N 末端结合的免疫原具有较低的溶解性，在盐溶液中呈乳白色。对抗体应答和后续育性试验的研究说明，水溶性的脂肽可在初次接种 4 周后诱导出更高的抗体滴度，同样也比脂结合于 N 末端溶解性较差的脂肽更有效的防止怀孕。与部分溶解或不溶的材料相比，水溶性的自

我佐剂疫苗在制造过程的简化和剂量的正确度量方面等具有明显的优势。

对脂质部分结合位置严谨要求的研究发现一些机动性也是可能的，因为用一些位于辅助 T 细胞表位内部而不是位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位的脂对动物进行免疫也可以观察到抗体的应答。对不同脂肽剂量效果的研究说明，含有 Pam₂Cys 的脂肽比含有 Pam₃Cys 的脂肽更适于作为免疫原。然而其他脂肽也可以产生强烈的抗体应答，比如含有 Ste₂Cys 的脂肽，含有 Lau₂Cys 的脂肽和含有 Oct₂Cys 的脂肽。

在本研究中，我们还发现，在脂质部分和肽链中插入两个丝氨酸残基或两个精氨酸残基可以提高含有 Pam₂Cys 免疫原的力量。当脂与 N 末端相连时，这两个丝氨酸残基有可能作为脂和多肽序列的间隔物，也可能作为辅助 T 细胞表位的延伸，从而改变其免疫学活性。在那些脂与分子中部赖氨酸残基 ε-氨基结合的情况中，两个丝氨酸残基或两个精氨酸残基就是一个间隔物，因为作为惰性间隔物，6-氨基己酸液具有相似的结果。

我们还发现多肽结构的免疫原性并不依赖于所用辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位中具体的氨基酸序列，说明本方法在多种不同动物宿主体内生产对于不同抗原性 B 细胞表位广谱脂肽的通用性。众所周知巨噬细胞是由微生物产物刺激产生并与细胞表面受体结合的；这种结合的信号通过 Toll-like 受体进行传递，最终导致 pro-inflammatory cytokines 和 chemokines 的产生。这些受体也存在于树突细胞群体中，一旦发生结合，这些受体也会为细胞成熟与迁移以及需要有效抗原呈递分子的生产传递信号。

本研究中使用的多种合成脂肽疫苗都可以用于诱导评估树突细胞成熟程度、存在于未成熟树突细胞表面，MHC II 类分子的正调节。

相对而言,非脂肽结构就不能导致树突细胞的成熟,说明脂质部分是负责这一效应的。T 脂肽诱导树突细胞成熟的层次,也通过包含疫苗的结合以及诱导树突细胞成熟已形成更佳免疫应答能力的多肽结构来展示了免疫原性的层次,有可能通过被告知的成熟和向排泄淋巴结迁移的树突细胞的充填来提高 $CD4^+$ T 细胞成熟的效率。

脂肽可以在缺乏外源佐剂的条件下引发免疫应答,既可以通过非给药途径进行使用。于是,我们对含有 Pam₂Cy 的多肽进行鼻内接种以研究随后的抗体应答。所得结果说明采用 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] 或 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B] 进行鼻内接种诱导的系统性抗-LHRH 抗体滴度低于采用皮下接种方法的滴度,并且产生的免疫球蛋白的同种型也不一样。相对于皮下免疫,可溶性脂肽 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] 的鼻内接种可诱导更高水平的 IgG2b 和 IgG3,但更低水平的 IgG1 和 IgG2a。这样的结果说明了两种免疫方法可能诱导了不同的 T 细胞亚族来帮助产生抗体,部分可能是与不同类群树突细胞在不同的位置发生了结合。也可能反应了树突细胞对异常几何构象分子的偏好性。

相对于不溶性的 Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-[B], 对水溶性 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] 肽结构的鼻内接种,可在首次疫苗给药后 4 周诱导显著增高的抗体滴度。育性试验证明,仅有 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] 鼻内免疫的小鼠才能完全没有进行繁殖。尽管在进行二次给药的两组小鼠中都有相似的抗体滴度,只有 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[B] 在能在初次应答中诱导产生高滴度的抗体。由此可见,可能一种免疫避孕的疫苗是有效的,高滴度抗体的出现时间是决定其功效的重要依据。

总的来说,对抗体滴度的检测和育性试验的结果都说明,在在大约整个合成多肽疫苗中部,B 细胞表位和辅助 T 细胞表位之间放置的 Pam₂Cys, 可以提高疫苗的溶解性和免疫原性。这种提高的免疫原性

可以通过在支链多肽疫苗的脂和肽序列之间引入两个丝氨酸残基得到再次增强。与脂、自我佐剂部分在基于肽疫苗不同位置的结合可以深入地改变疫苗的物理，免疫原性和生物学性质，从而为成功的疫苗设计提供不同的策略。

实施例 3

含有来自于 A 型链球菌 M 蛋白 B 细胞表位脂肽的研究

多脂的效用

为了检测脂肽的免疫原性是否依赖于和多肽结合的脂质分子数，以及有效脂肽是否可以生成针对不同抗原性 B 细胞表位的多肽，我们置备了含有 CDV-F P25 辅助 T 细胞表位和 A 型链球菌 B 细胞表位 J14（即具有 SEQ ID NO: 105 的氨基酸序列）多肽部分和一个或两个脂质部分的脂肽。脂氨基酸部分 Pam₂Cys-Ser-Ser 被结合在位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间的内部赖氨酸上，在其中一种结构中，额外的脂氨基酸部分 Pam₂Cys-Ser-Ser 被结合在位于辅助 T 细胞表位的 N 末端赖氨酸上。

用含 60ug 基于多肽的疫苗，总体积 30ul PBS 对 4-6 周龄（15 只/组）的雌性远交 Quackenbush 小鼠进行鼻内接种。总共进行三次免疫，每次间隔 21 天。在最后一次给药 6 天后对粪 IgA 进行检测。在最后一次给药 7 天后从小鼠的尾静脉采血以检测 J14 特异的血清 IgG。通过在体外对 M1 GAS 菌株具有的调理或杀死情况的间接杀菌试验来确定免疫小鼠血清的活性。在最后一次给药 8 天后收集个体小鼠的唾液，通过标准 ELISA 的方法检测平均的 J14 特异的唾液 IgA 抗体。在最后一次给药 2 周后，用 M1 GAS 菌株对小鼠进行鼻内感染，并在其后多个时间段对存活率进行计算。

图 12 中的数据说明相对于非脂肽或 PBS 而言,用任何一种脂肽进行免疫都可以显著的提升血清 IgG 滴度($P<0.05$),标志着脂肽结构并不依赖于对辅助 T 细胞表位或 B 细胞表位的选择,在进行鼻内免疫之后,含有一个或多个脂质部分的脂肽都可以提升血清 IgG 水平。

图 13 中的数据也说明,相比较于从接受非脂肽或 PBS 免疫对照小鼠中采集的血清,从接受含有一个或两个脂质部分具有 J14 的脂肽免疫小鼠中采集的血清可以更显著的杀死 GAS 的能力($P<0.05$)。

图 14 中的数据说明,相比较于从接受非脂肽或 PBS 免疫的对照小鼠,接受含有一个或两个脂质部分具有 J14 的脂肽免疫的小鼠具有更高的唾液 IgA 滴度($P<0.05$)。而通过鼻内免疫,单脂多肽远远比二脂多肽可诱导唾液种 IgA 的高水平。

有意思的是,相比较于 PBS 或非脂肽,只有采用单脂化含有 J14 多肽接种的小鼠才能在最后一次免疫 6 天后具有显著的粪 IgA 滴度(图 15),其中的脂质部分位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间(即 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14])。这可能是因为时间的顺序,因为粪 IgA 是在唾液 IgA 或血清 IgG 之前进行测定的,也可能是鼻内免疫的顺序关系,目前也还有其他的解释。

图 16 的数据说明,相比较于二脂化肽或非脂肽,只有采用单脂化含有 J14 多肽接种的小鼠才能在接受后续的鼻内 GAS 攻击后具有最高的存活率,其中的脂质部分位于辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位之间(即 [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-[J14])。然而,相对于单独的 J14 多肽或 PBS,二脂化肽和非脂肽也都可以产生一些保护性免疫。

总的来说,实施例 2 和 3 中的数据说明,本发明的脂肽配方可以

广泛的应用于诱导动物体内，尤其是鼠类模型中，一系列辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位强烈的抗体应答。而且，由于可以得到强烈的 IgG 和 IgA 的应答，该脂肽配方尤其适用于鼻内给药。然而我们的数据表明，至少对 J14 免疫原来说，单脂多肽比含有多脂质部分的多肽更适于作为黏膜佐剂。

实施例 4

对含有来自胃泌激素的 B 细胞表位的脂肽的研究

测定基于胃泌激素的脂肽免疫原的免疫原性。用 20nmoles 多肽或脂肽免疫原皮下接种雌性 BALB/c 鼠的尾巴基部。所有的脂肽都在 PBS 中施用，非脂化多肽在 CFA 中施用。使用 CFA 的盐乳化被用作阴性对照。所用多肽是胃泌激素-17(序列 EGPWLEEEEEAYGWMDF; SEQ ID NO: 113); [P25]-Lys-五肽胃泌素 (SEQ ID NO: 110)，其中五肽胃泌素是胃泌激素-17 的 C 末端序列 (也就是 SEQ ID NO: 102); 和 [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-五肽胃泌素。免疫 4 周后，从动物获得血清并同时接受第二次相似剂量的抗原。第二次抗原剂量后经过 2 周，鼠被第二次取血；能与多肽胃泌激素-17 序列反应的抗体在 ELISA 中测定。

如图 17 中所示，用 CFA 中的胃泌激素-17 接种的鼠包含抗-胃泌激素-17 抗体的水平，相当于存在于 CFA 中的盐的阴性对照。因为非脂化多肽 [P25]-Lys-五肽胃泌素免疫引起很低水平的抗-胃泌激素-17 抗体，鼠用显示高抗体滴度的脂肽 [P25]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-五肽胃泌素免疫，这与用 CFA 中的多肽免疫后引起的结果相类似。这些数据再次说明本发明的脂肽配方可广泛适用于诱导动物体内强烈的抗

体反应，同时具有多种的辅助 T 细胞表位和 B 细胞表位。

<110> 昆七兰医学研究所理事会

<120> 含有辅助T细胞和B细胞表位的新的免疫原性脂肽

<130> 94946/MRO

<150> US 60/402838

<151> 2002-12-08

<160> 113

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 1

Gly Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 2

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 3

His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 4

Gly Leu Arg Pro Gly
1 5

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 5

Gly Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
1 5 10 15

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 6

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Ala Leu Asn Asn Arg
1 5 10 15

Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
20 25

<210> 7

<211> 27

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 7

Gly Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
1 5 10 15

Lys Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 8

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Lys Gly Ala Leu Asn Asn
1 5 10 15

Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
20 25

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 9

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
1 5 10 15

Leu Lys His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 10

Ala Glu Leu Gly Glu Tyr Glu Lys Leu Leu Asn Ser Val Leu Glu Pro
1 5 10 15

Ile Lys Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 11

Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu
1 5 10 15

Asn Lys Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 12

Pro Arg Tyr Ile Ala Thr Asn Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu
1 5 10 15

Ser Lys Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
 20 25

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 13

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
1 5 10 15

Leu Lys Gly Leu Arg Pro Gly
 20

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 14

Ala Glu Leu Gly Glu Tyr Glu Lys Leu Leu Asn Ser Val Leu Glu Pro
1 5 10 15

Ile Lys Gly Leu Arg Pro Gly
 20

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 15

Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu
1 5 10 15

Asn Lys Gly Leu Arg Pro Gly
 20

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 16

Pro Arg Tyr Ile Ala Thr Asn Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu
1 5 10 15

Ser Lys Gly Leu Arg Pro Gly
 20

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 17

Ser Lys Lys Lys Lys
1 5

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 18

Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 19

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
1 5 10 15

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 20

Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu
1 5 10 15

Asn

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 21

Ile Gly Thr Asp Asn Val His Tyr Lys Ile Met Thr Arg Pro Ser His
1 5 10 15

Gln

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 22

Tyr Lys Ile Met Thr Arg Pro Ser His Gln Tyr Leu Val Ile Lys Leu
1 5 10 15

Ile

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 23

Ser His Gln Tyr Leu Val Ile Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile
1 5 10 15

Glu

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 24

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
1 5 10 15

Leu

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 25

Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu Leu Gly Glu Tyr Glu Lys Leu
 1 5 10 15

Leu

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 26

Ala Glu Leu Gly Glu Tyr Glu Lys Leu Leu Asn Ser Val Leu Glu Pro
 1 5 10 15

Ile

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 27

Lys Leu Leu Asn Ser Val Leu Glu Pro Ile Asn Gln Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15

Met

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 28

Glu Pro Ile Asn Gln Ala Leu Thr Leu Met Thr Lys Asn Val Lys Pro
1 5 10 15

Leu

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 29

Thr Leu Met Thr Lys Asn Val Lys Pro Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 30

Lys Pro Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Arg Arg Gln Arg Arg Phe Ala
1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 31

Ser Gly Arg Arg Gln Arg Arg Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Val
 1 5 10 15

Ala

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 32

Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala
 1 5 10 15

Ala

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 33

Gly Val Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile
 1 5 10 15

Ala

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 34

Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Asn Leu Asn Ala Gln Ala Ile Gln Ser
1 5 10 15

Leu

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 35

Asn Leu Asn Ala Gln Ala Ile Gln Ser Leu Arg Thr Ser Leu Glu Gln
1 5 10 15

Ser

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 36

Gln Ser Leu Arg Thr Ser Leu Glu Gln Ser Asn Lys Ala Ile Glu Glu
1 5 10 15

Ile

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 37

Glu Gln Ser Asn Lys Ala Ile Glu Glu Ile Arg Glu Ala Thr Gln Glu
1 5 10 15

Thr

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 38

Ser Ser Lys Thr Gln Thr His Thr Gln Gln Asp Arg Pro Pro Gln Pro
1 5 10 15

Ser

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 39

Gln Pro Ser Thr Glu Leu Glu Glu Thr Arg Thr Ser Arg Ala Arg His
1 5 10 15

Ser

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 40

Arg His Ser Thr Thr Ser Ala Gln Arg Ser Thr His Tyr Asp Pro Arg
1 5 10 15

Thr

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 41

Pro Arg Thr Ser Asp Arg Pro Val Ser Tyr Thr Met Asn Arg Thr Arg
1 5 10 15

Ser

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 42

Thr Arg Ser Arg Lys Gln Thr Ser His Arg Leu Lys Asn Ile Pro Val
1 5 10 15

His

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 43

Thr Glu Leu Leu Ser Ile Phe Gly Pro Ser Leu Arg Asp Pro Ile Ser
1 5 10 15

Ala

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 44

Pro Arg Tyr Ile Ala Thr Asn Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu
1 5 10 15

Ser

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 45

Cys Ile Arg Gly Asp Thr Ser Ser Cys Ala Arg Thr Leu Val Ser Gly
1 5 10 15

Thr

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 46

Asp Glu Ser Ser Cys Val Phe Val Ser Glu Ser Ala Ile Cys Ser Gln
1 5 10 15

Asn

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 47

Thr Ser Thr Ile Ile Asn Gln Ser Pro Asp Lys Leu Leu Thr Phe Ile
1 5 10 15

Ala

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 48

Ser Pro Asp Lys Leu Leu Thr Phe Ile Ala Ser Asp Thr Cys Pro Leu
1 5 10 15

Val

<210> 49

<211> 24

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 49

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
20

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 50

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15

Ser Ser Leu

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 51

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15

Ser Leu

<210> 52

<211> 27

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 52

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro
1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Lys Lys Gly
 20 25

<210> 53

<211> 26

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 53

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Lys
 20 25

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 54

Gly Val Ala Glu
1

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 55

Thr Ala Ser Gly Val Ala Glu Thr Thr Asn
1 5 10

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 56

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
1 5 10 15

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 57

Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Gln Ala
1 5 10

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 58

Phe Arg Glu Arg Thr Leu Thr Gly Gln Arg Ala Cys Asn Asp Val Asn
1 5 10 15

Ser Glu

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 59

Asn Pro Leu Glu Thr Ser Gly Ala Ser Thr Val Gly Phe Arg Glu Arg
1 5 10 15

Thr Leu

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 60

Ile Arg Glu Thr Arg Lys Arg Gln Lys Met Val Asp Asp Ala Val Asn
1 5 10 15

Glu Tyr

<210> 61

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 61

Ala Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys
1 5 10 15

Lys Pro Val

<210> 62

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 62

Ala Gly Pro Leu Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys Ala Lys Ala
1 5 10 15

Pro Val Val

<210> 63

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 63

Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Ala Gly Pro
1 5 10 15

Leu Glu Arg

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 64

Gly Pro Tyr Thr Gly Pro Leu Glu Arg Gln Arg Pro Leu Lys Val Arg
1 5 10 15

Ala Lys Leu

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 65

Val Gly Arg Leu Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile
 1 5 10 15

Val Val

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 66

Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys Gly Thr Pro Val
 1 5 10 15

Val Gly Val

<210> 67

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 67

Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn Thr
 1 5 10 15

Lys Pro Val

<210> 68

<211> 35

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 68

Asn Lys Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Gly Asp Phe Gly Ser
1 5 10 15

Leu Ala Pro Arg Val Ala Arg Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn Tyr Gly
 20 25 30

Ala Ile Lys
 35

<210> 69

<211> 20

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 69

Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile
1 5 10 15

Val Ala Asn Pro
 20

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 70

Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr
 1 5 10 15

Cys Tyr Ala

<210> 71

<211> 20

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 71

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ser
 20

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 72

Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu
 1 5 10

<210> 73

<211> 21

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 73

Tyr Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu Pro Ala Glu Leu Thr Asp Asp
 1 5 10 15

Ala Val Lys Val Met
20

<210> 74

<211> 21

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 74

Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp
1 5 10 15

Leu Met Leu Leu Tyr
20

<210> 75

<211> 21

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 75

Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln
1 5 10 15

Val Phe Gln Val Tyr
20

<210> 76

<211> 37

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 76

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
1 5 10 15

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
 20 25 30

Pro Ile Leu Pro Gln
 35

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 77

Cys Gln Asp Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Thr Leu Pro Arg Asn Ala
 1 5 10 15

Ile

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 78

Asn Lys Gly Asp Cys Gly Thr Pro Ser His Ser Arg Arg Gln Pro His
 1 5 10 15

Val Met Ser

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 79

Trp Leu Cys Phe Pro Leu Cys Leu Ala Leu Pro
1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 80

Leu Gly Gly Leu Tyr Cys Gly Pro Ser Ser Phe
1 5 10

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 81

Gly Ser Ile Thr Arg Asp Ser Ile Phe Arg Leu Arg
1 5 10

<210> 82

<211> 12

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 82

Ser Ala Leu Pro Val Asn Ile Gln Val Phe Thr Leu
1 5 10

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 83

Glu Leu Gln Ile Ala Lys Asp Glu Arg Tyr Gly Ser
1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 84

Val Lys Leu Leu Arg Glu Pro Ile Tyr Val Glu Val
1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 85

Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asp Gly Asn
1 5 10

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 86

Ala Asn Ala Ser Gln Thr Asp Asn Gly Val Asn Arg Ser Gly Ser Glu
1 5 10 15

Asp Pro Thr Val
20

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 87

Pro Glu Thr Lys His Pro Lys Lys Gly Val Glu Lys Tyr Gly Pro Glu
1 5 10 15

Ala Ser Ala Phe
 20

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 88

Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu
1 5 10 15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 89

Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser
1 5 10 15

<210> 90

<211> 13

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 90

Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu
1 5 10

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 91

Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe Ile Arg Gly Thr
1 5 10 15

<210> 92

<211> 14

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 92

Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met Asp Ser Ser Thr Leu Glu
1 5 10

<210> 93

<211> 19

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 93

His Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly Leu Ile Tyr Gly
1 5 10 15

Asn Pro Ser

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 94

Tyr Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr
1 5 10

<210> 95

<211> 18

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 95

Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr Ile Trp Asn Val Ser Tyr Ser Gly Thr
1 5 10 15

Ser Lys

<210> 96

<211> 38

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 96

Cys Lys Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Gly Asp Phe Gly Ser
1 5 10 15

Leu Ala Pro Arg Val Ala Arg Cys Leu Pro Ala Ser Phe Asn Thr Gly
20 25 30

Ala Ile Lys Asn Lys Tyr
35

<211> 12

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 100

Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Gly Gly His
1 5 10

<210> 101

<211> 29

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 101

Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln
1 5 10 15

Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
20 25

<210> 102

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 102

Gly Trp Met Asp Phe
1 5

<210> 103

<211> 26

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 103

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
 1 5 10 15

Leu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
 20 25

<210> 104

<211> 22

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 104

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Gly Leu Arg Pro Gly
 20

<210> 105

<211> 46

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 105

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys
 20 25 30

Gln Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
 35 40 45

<210> 106

<211> 47

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 106

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
1 5 10 15

Leu Lys Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys
20 25 30

Lys Gln Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
35 40 45

<210> 107

<211> 45

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 107

Gly Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
1 5 10 15

Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys Gln
20 25 30

Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
35 40 45

<210> 108

<211> 46

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 108

Gly Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
1 5 10 15

Lys Lys Gln Ala Glu Asp Lys Val Lys Ala Ser Arg Glu Ala Lys Lys
20 25 30

Gln Val Glu Lys Ala Leu Glu Gln Leu Glu Asp Lys Val Lys
 35 40 45

<210> 109

<211> 22

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 109

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Met Asp Phe
 20

<210> 110

<211> 23

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 110

Lys Leu Ile Pro Asn Ala Ser Leu Ile Glu Asn Cys Thr Lys Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Lys Gly Trp Met Asp Phe
 20

<210> 111

<211> 21

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 111

Gly Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Gly Trp Met Asp Phe
20

<210> 112

<211> 22

<212> PRT

<213> synthetic

<400> 112

Gly Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
1 5 10 15

Lys Gly Trp Met Asp Phe
20

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

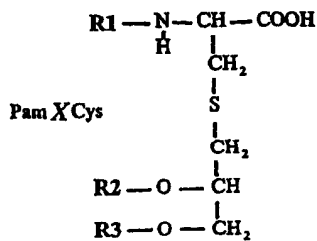
<213> synthetic

<400> 113

Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
1 5 10 15

Phe

			溶解度
		Th	++++
		B	++++
	—	[Th]-[B]	+++
	— K —	[Th]-Lys-[B]	+++
	—	Pam ₃ Cys-[Th]	+/-
— Ser — Ser	—	Pam ₃ Cys-Ser-Ser-[Th]	+/-
	—	Pam ₂ Cys-[Th]	+
— Ser — Ser	—	Pam ₂ Cys-Ser-Ser-[Th]	+
	— K —	[Th]-Lys(Pam ₃ Cys)	++++
	— K —	[Th]-Lys(Pam ₂ Cys)	++++
	— K — — Ser — Ser	[Th]-Lys(Pam ₂ Cys-Ser-Ser)	++++



对于 Pam₃Cys, R1, R2 & R3 = H₃C(H₂C)₁₄CO

对于 Pam₂Cys, R1 = H, R2 & R3 = H₃C(H₂C)₁₄CO

图 1

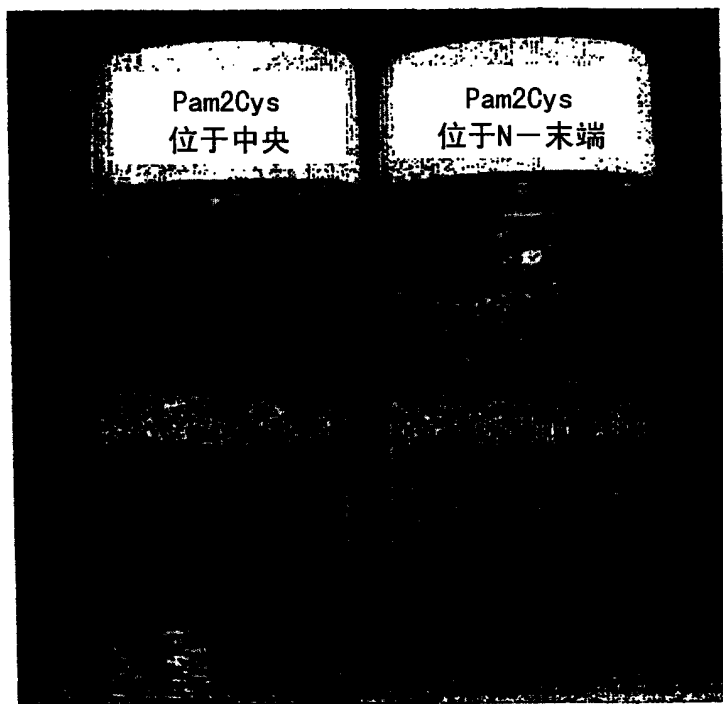


图2

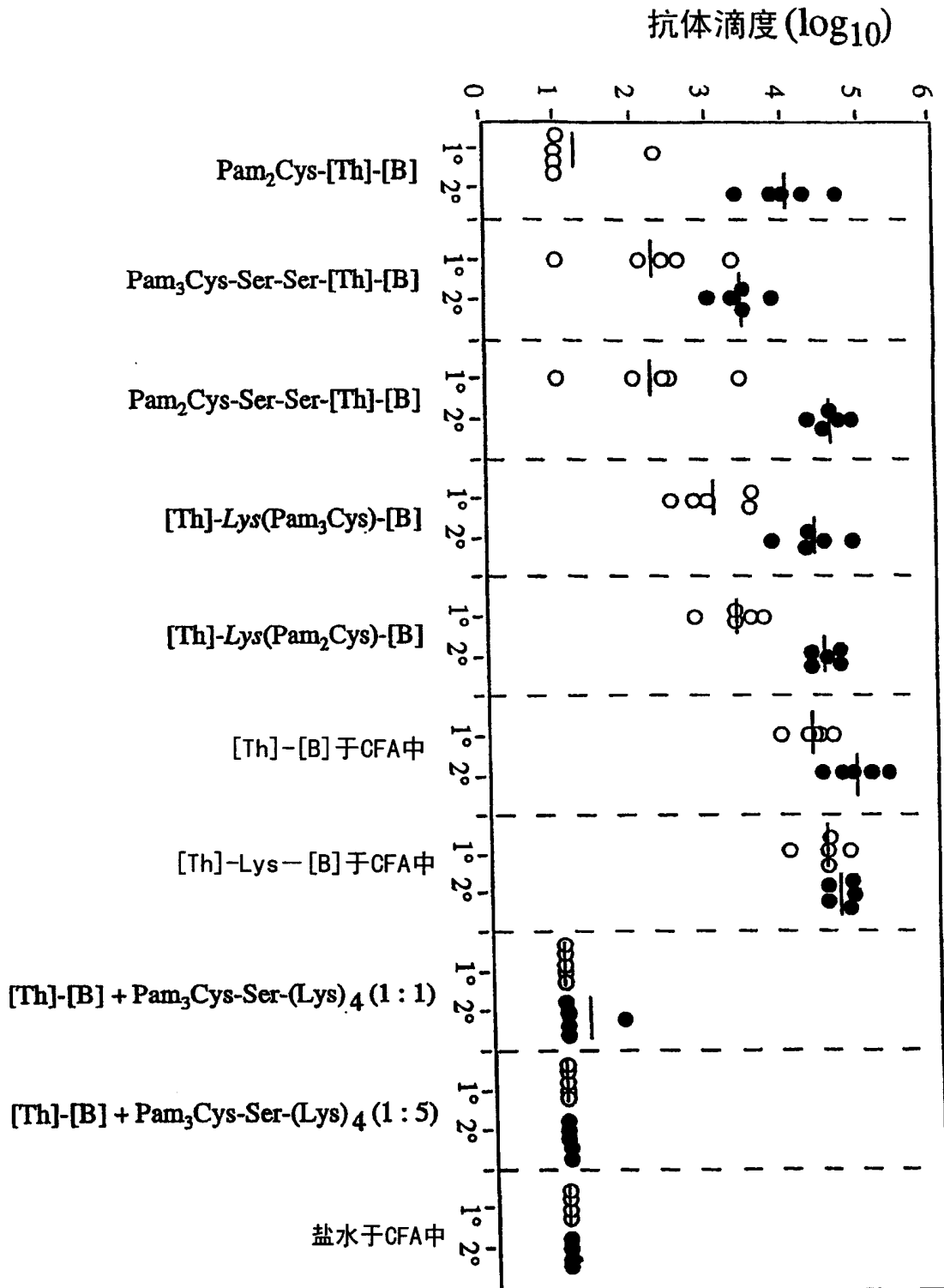


图 3

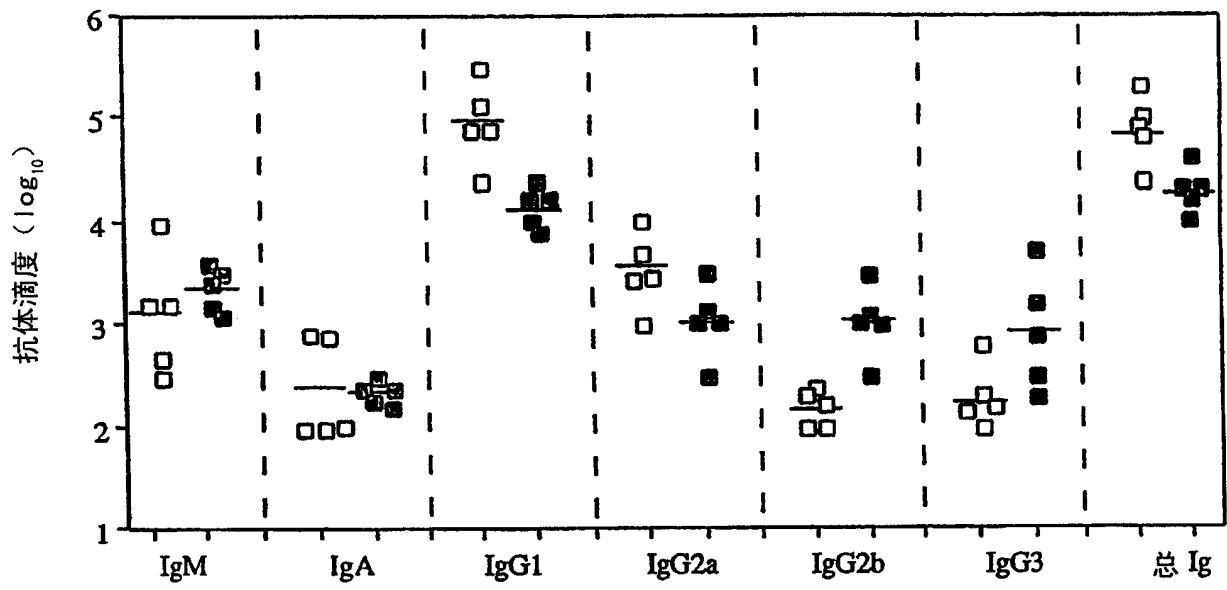


图4

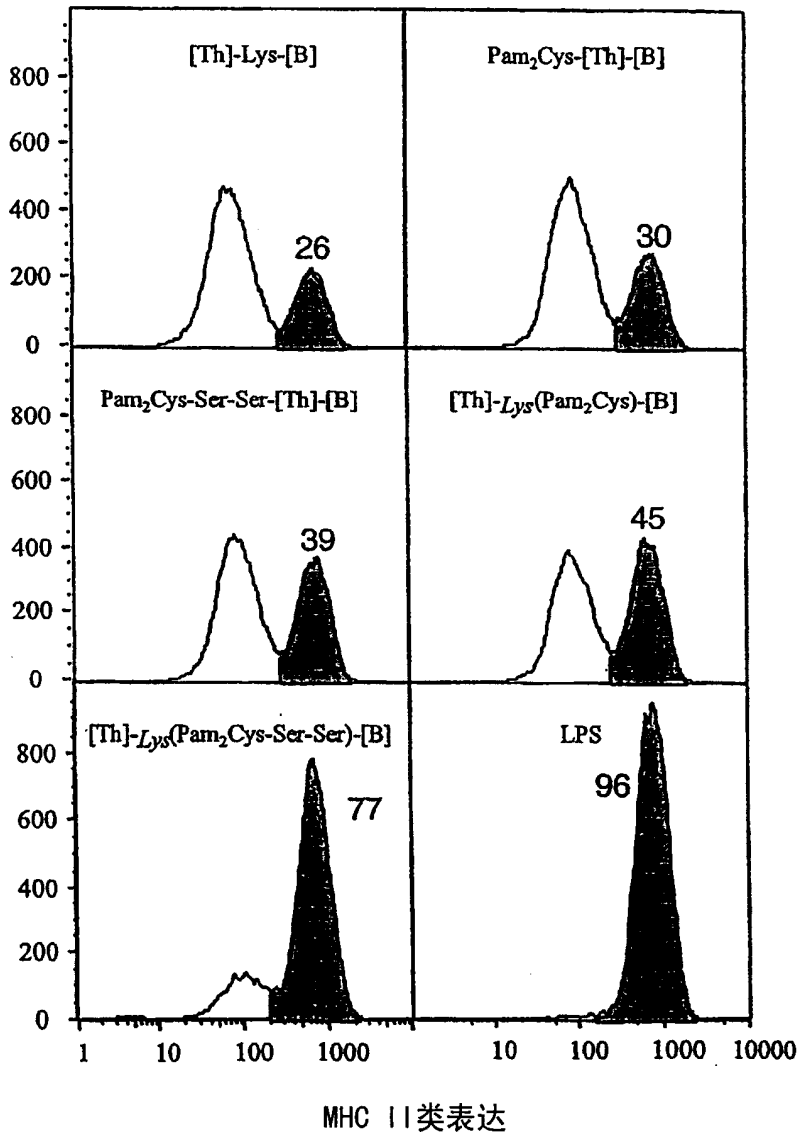


图5

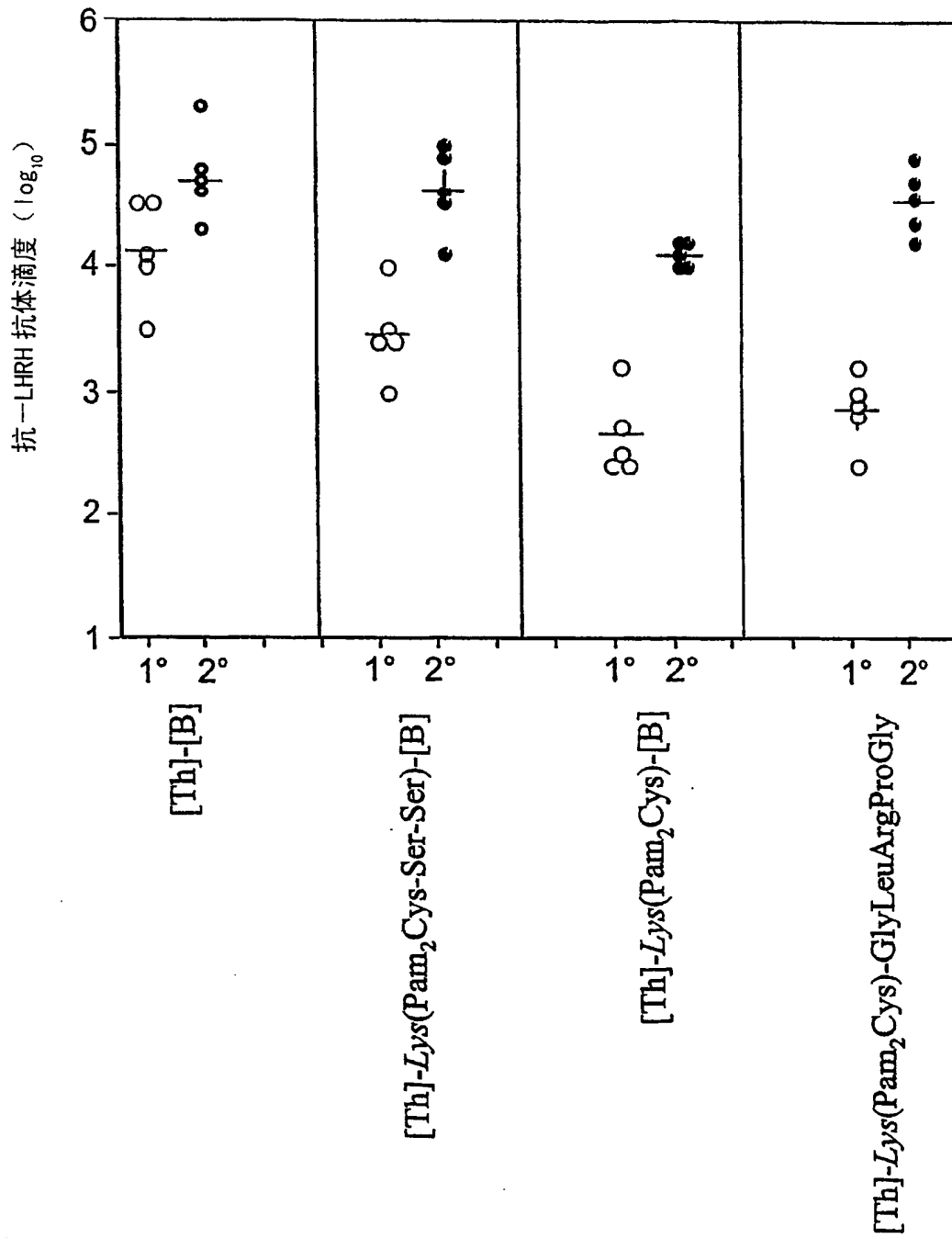


图6

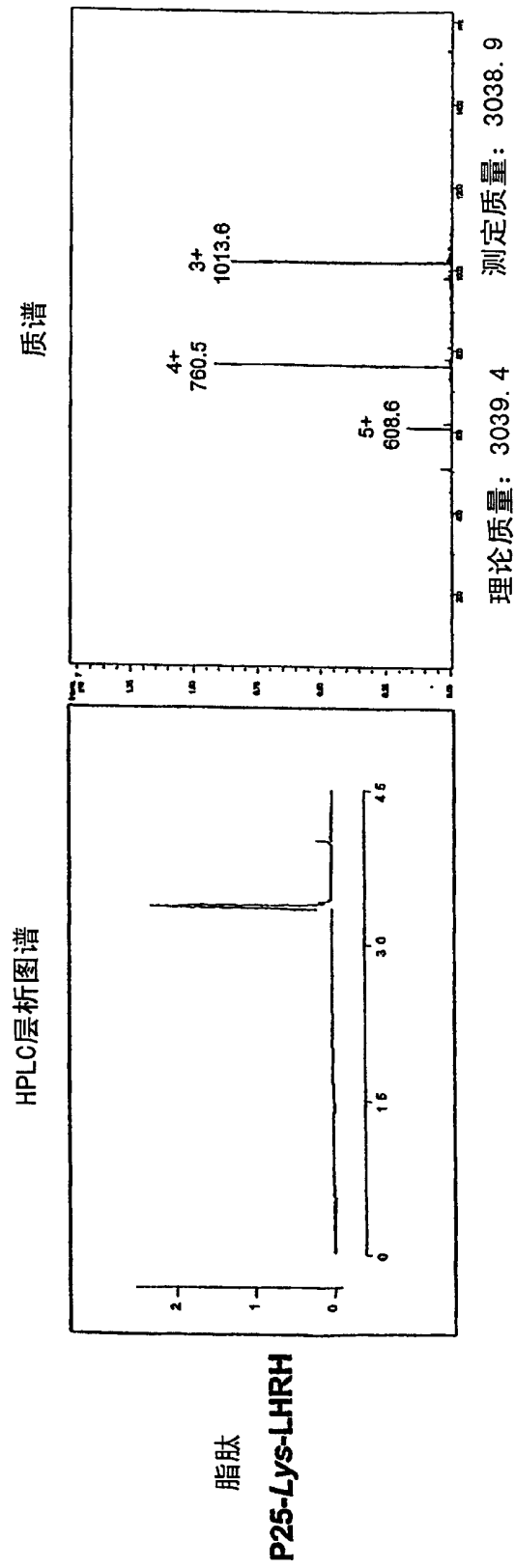


图7a

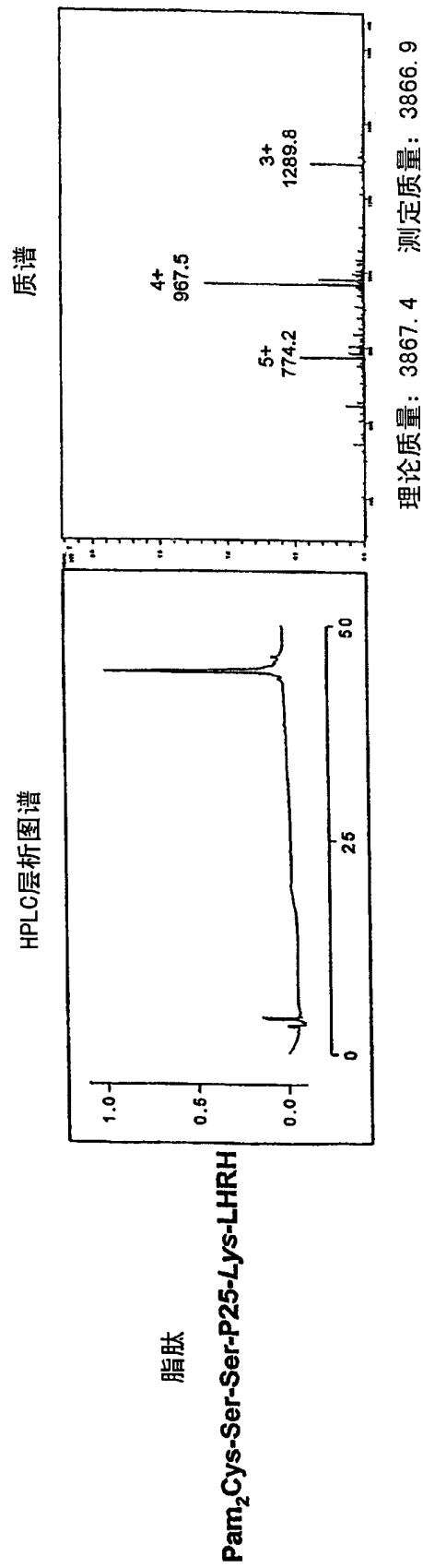


图7b

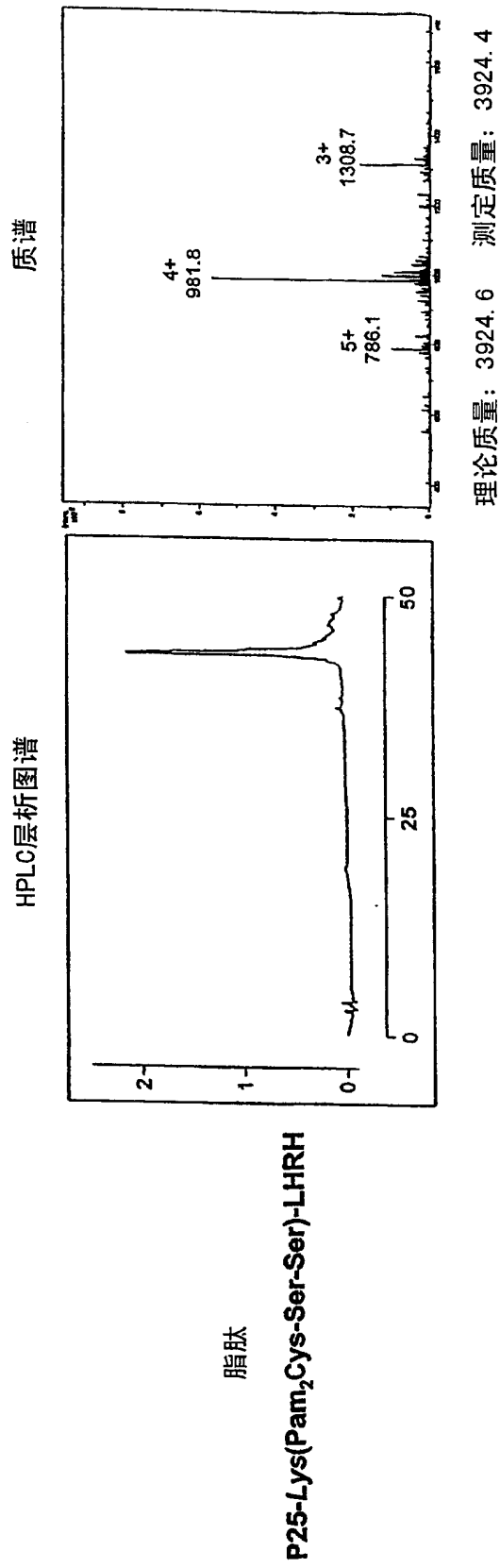
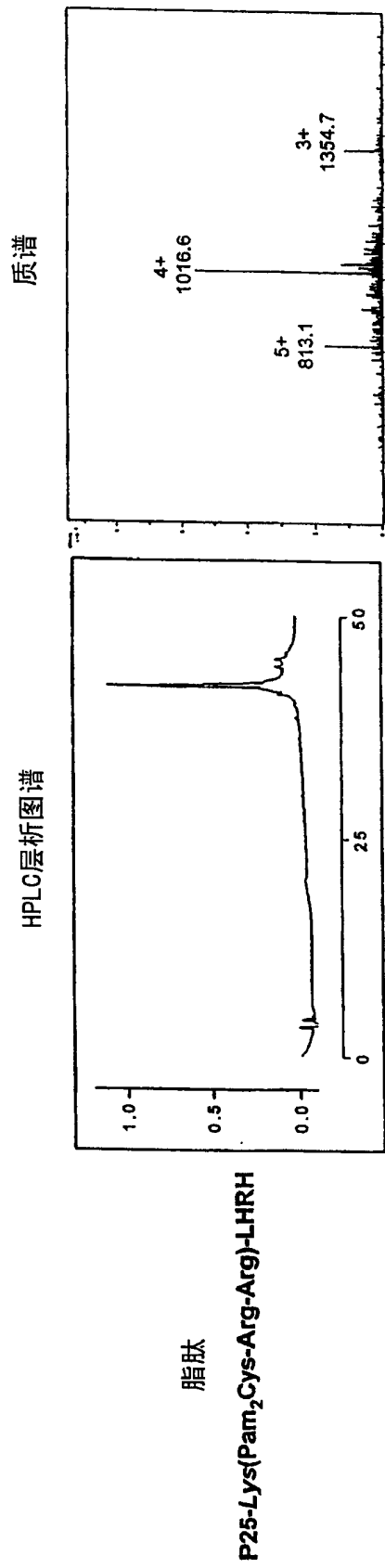


图7c



理论质量: 4062.4 测定质量: 4062.5

图7d

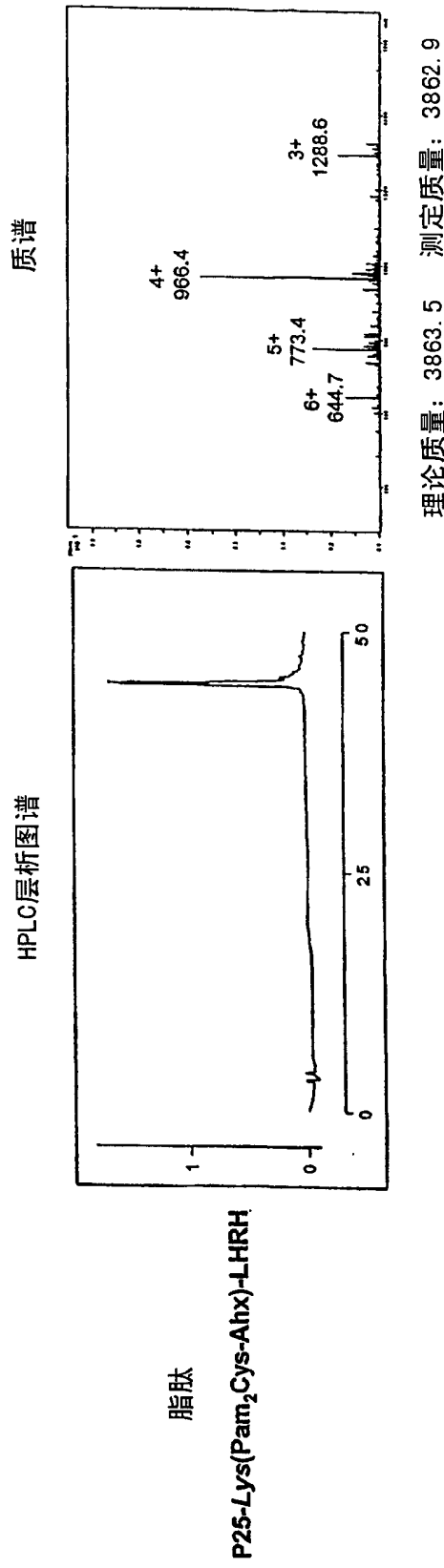
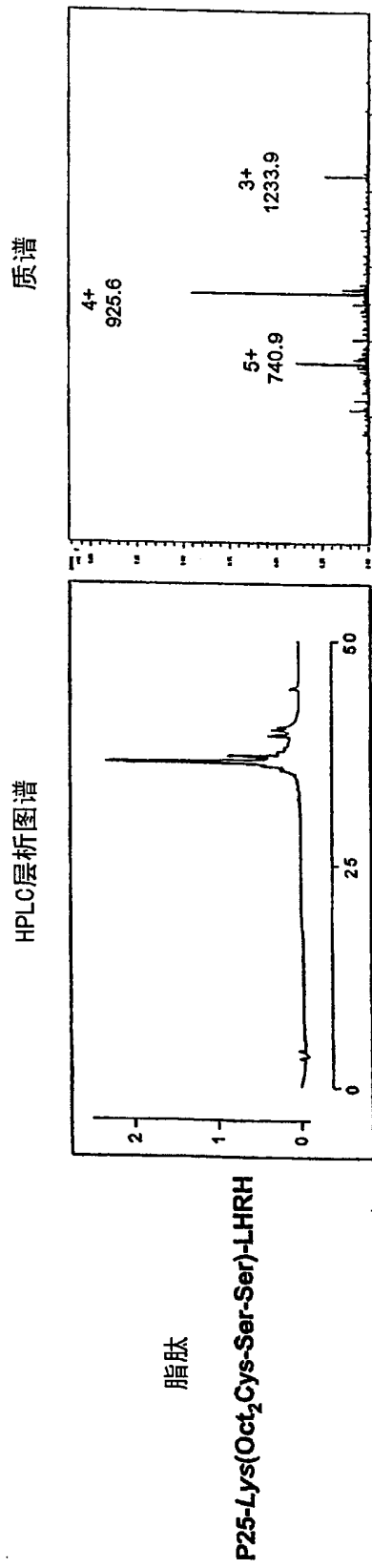


图7e



理论质量: 3701.0 测定质量: 3699.7

图7f

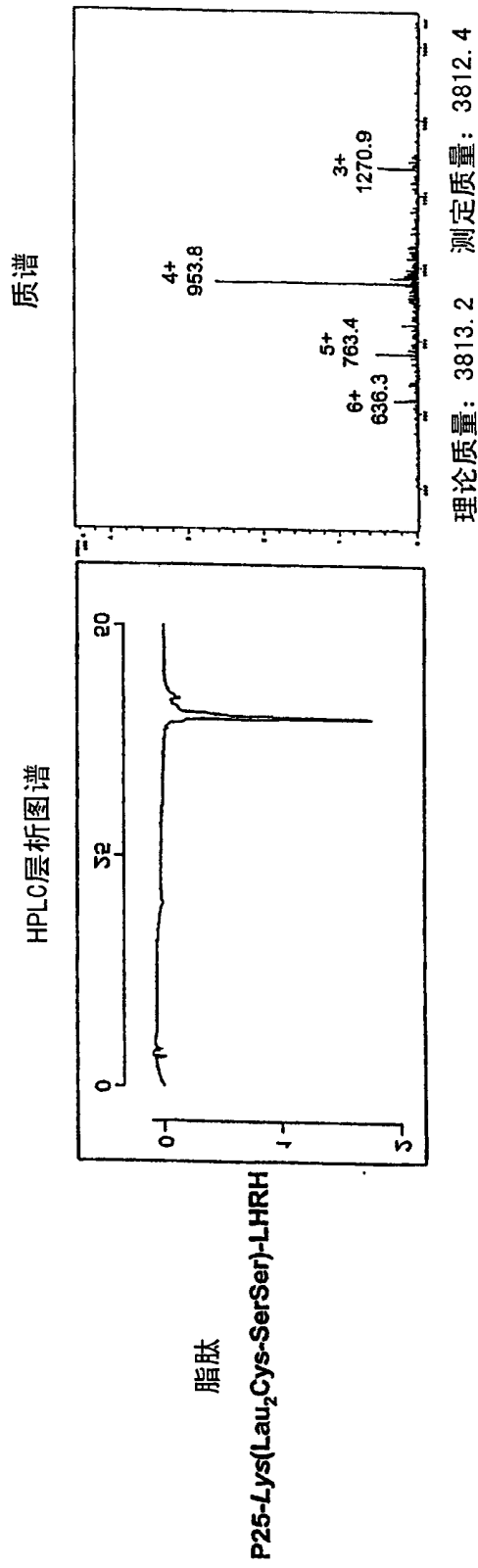


图78

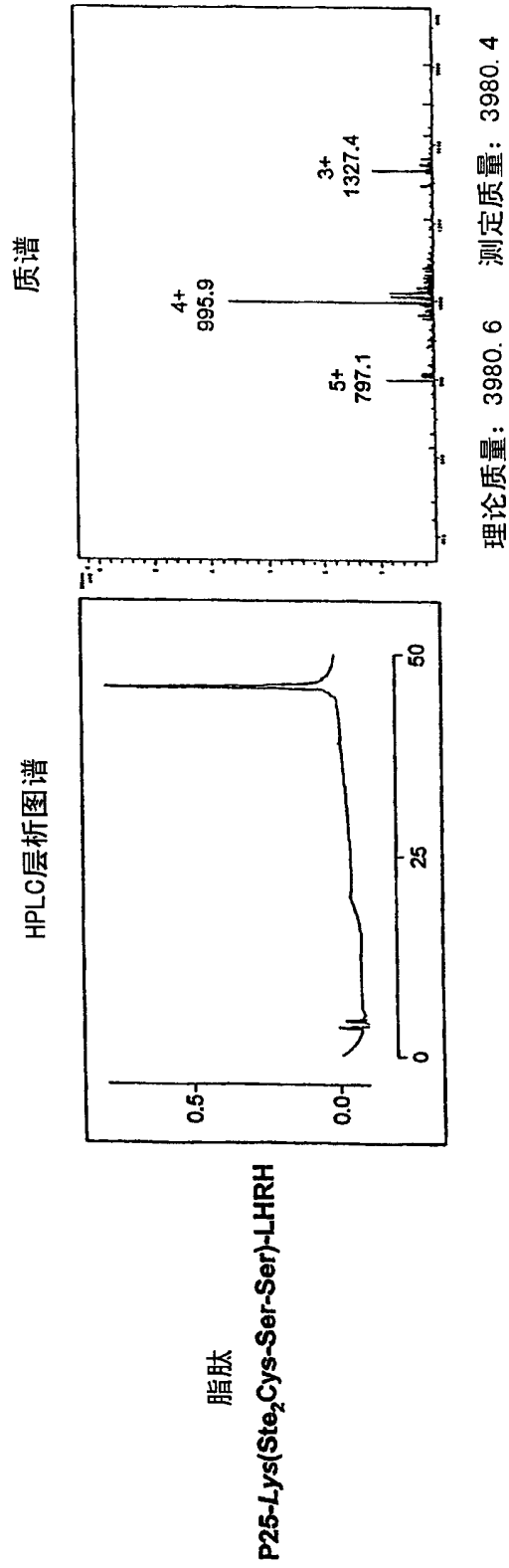


图7h

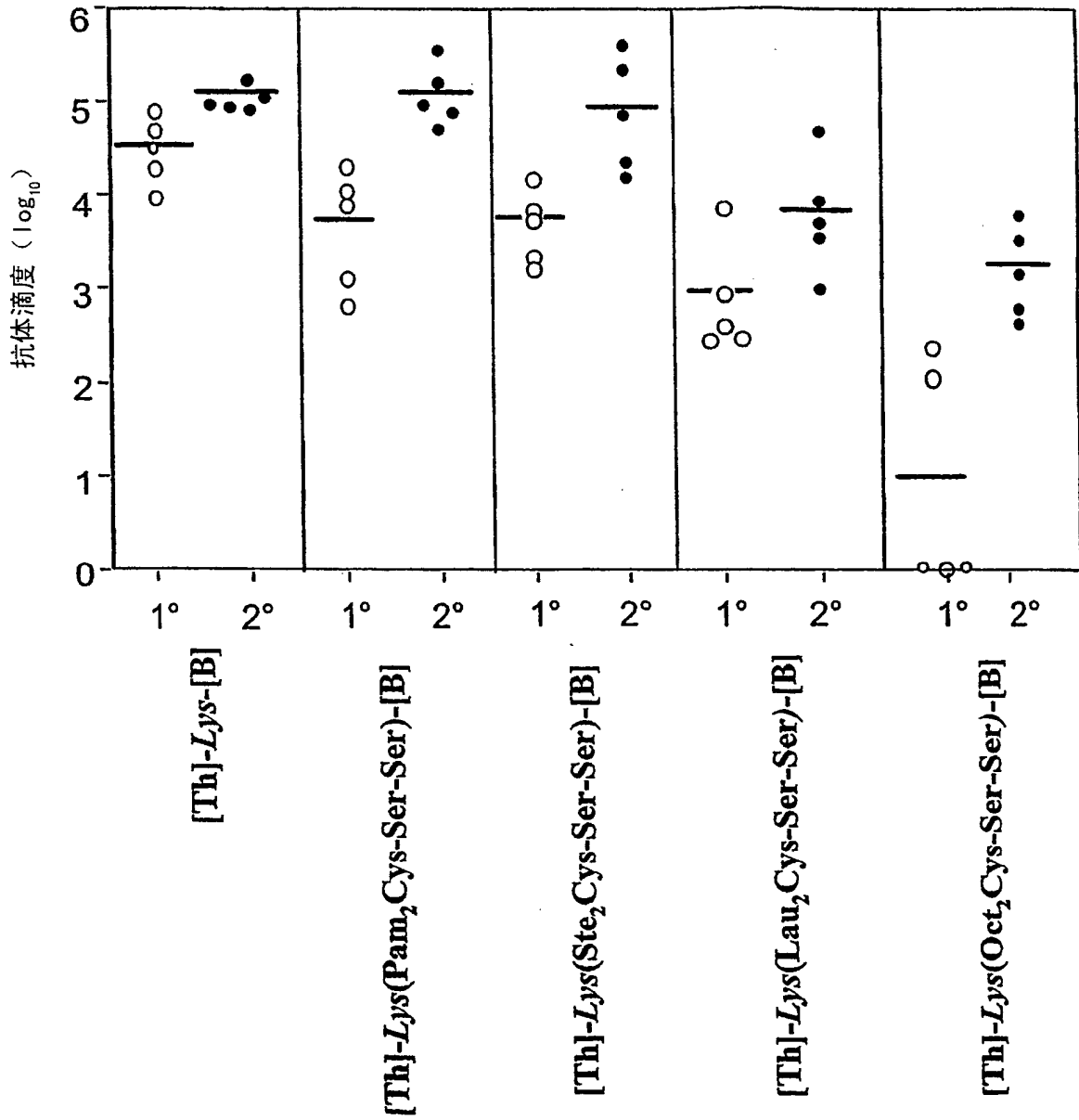


图 8

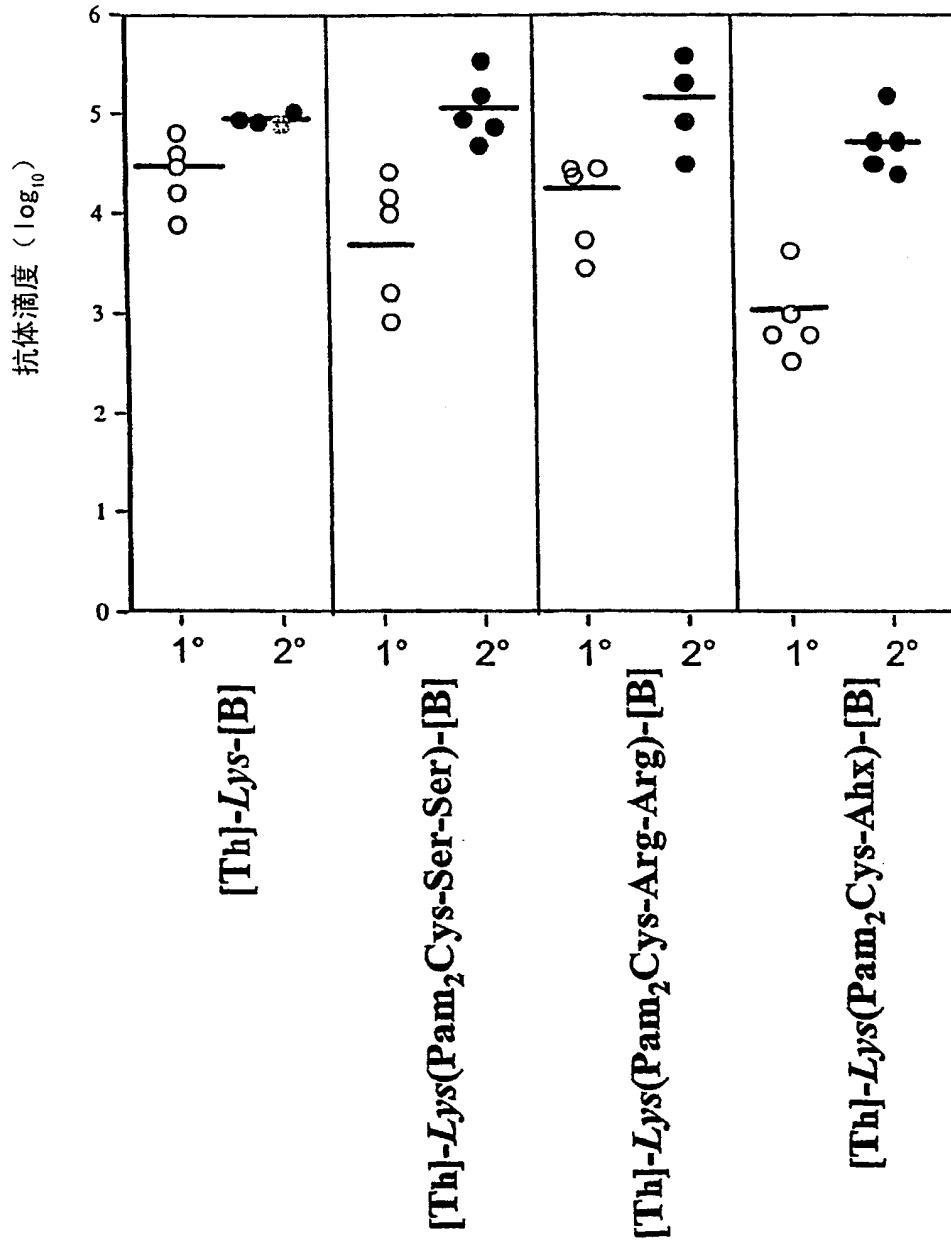


图 9

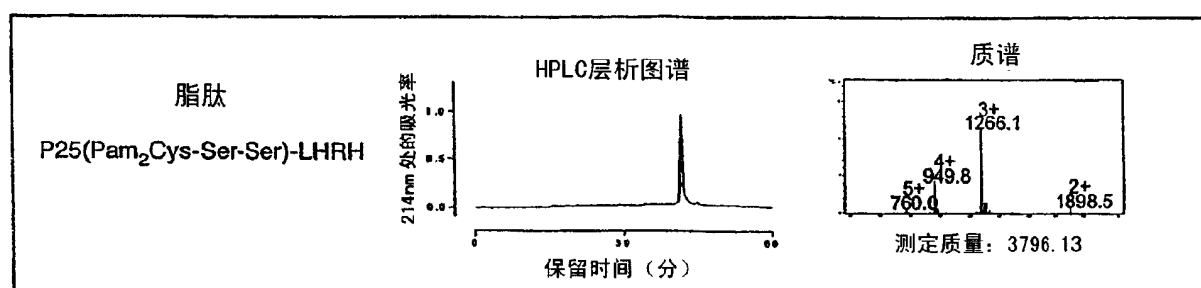


图10

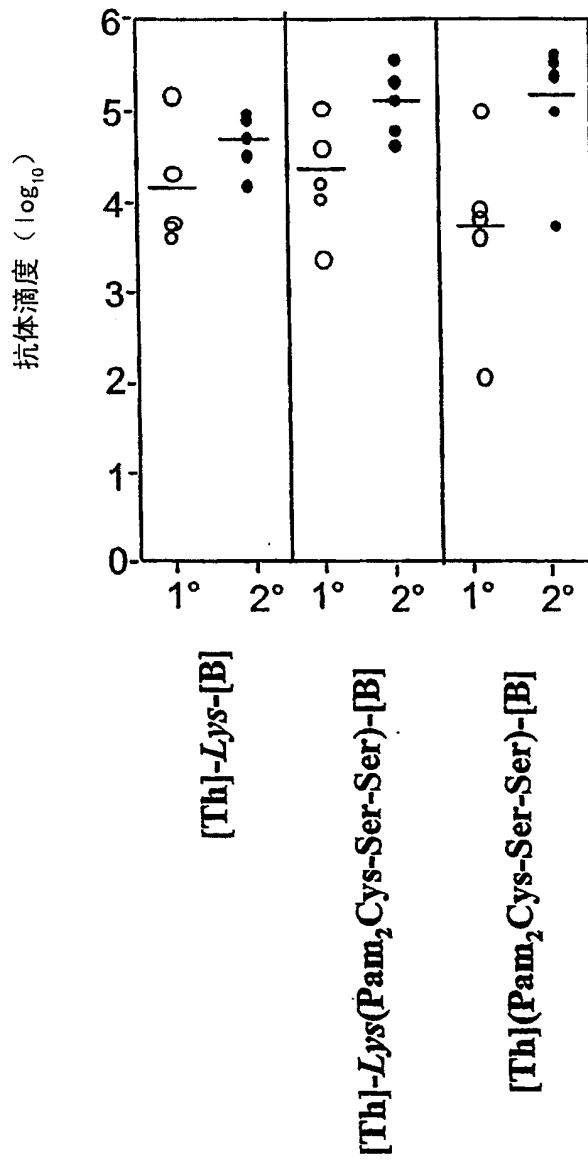


图 11

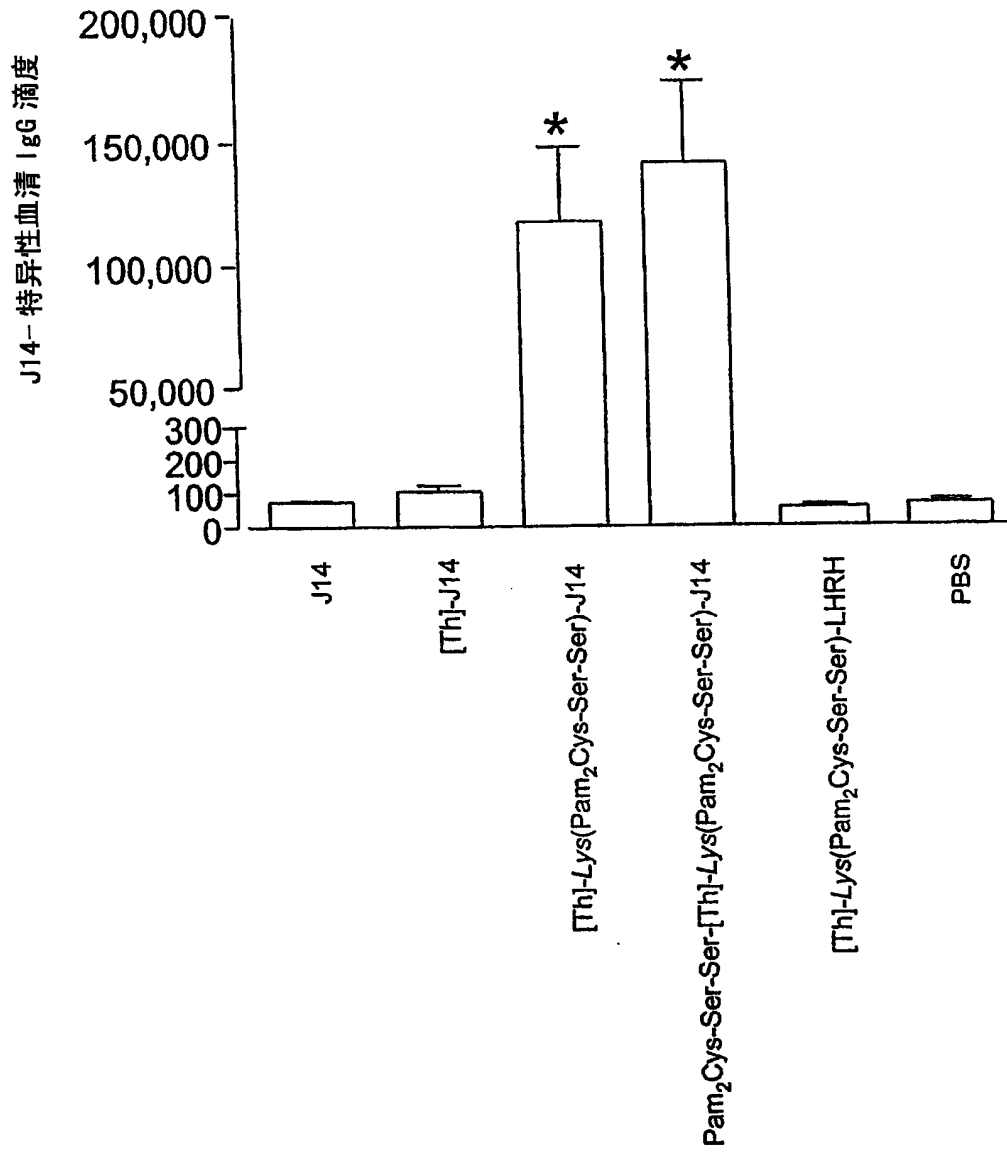


图12

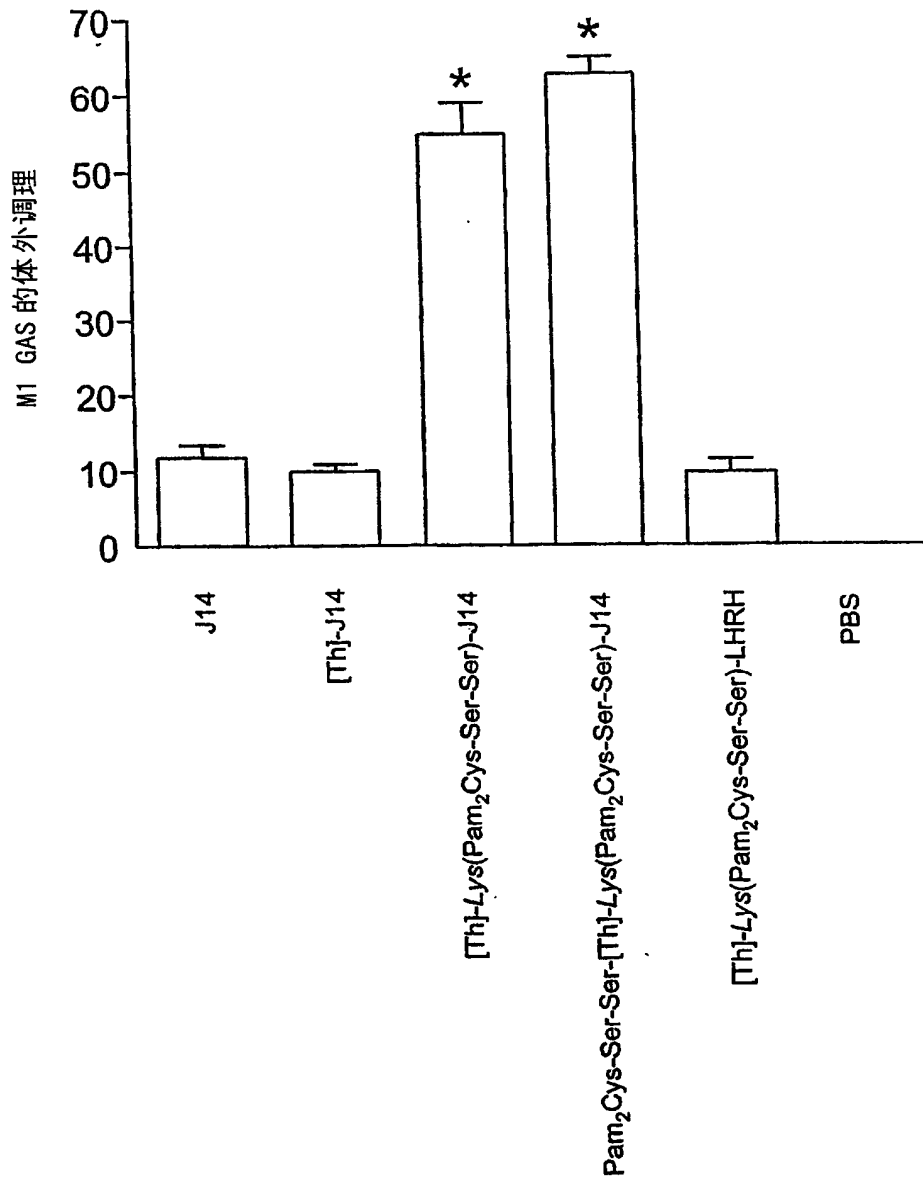


图13

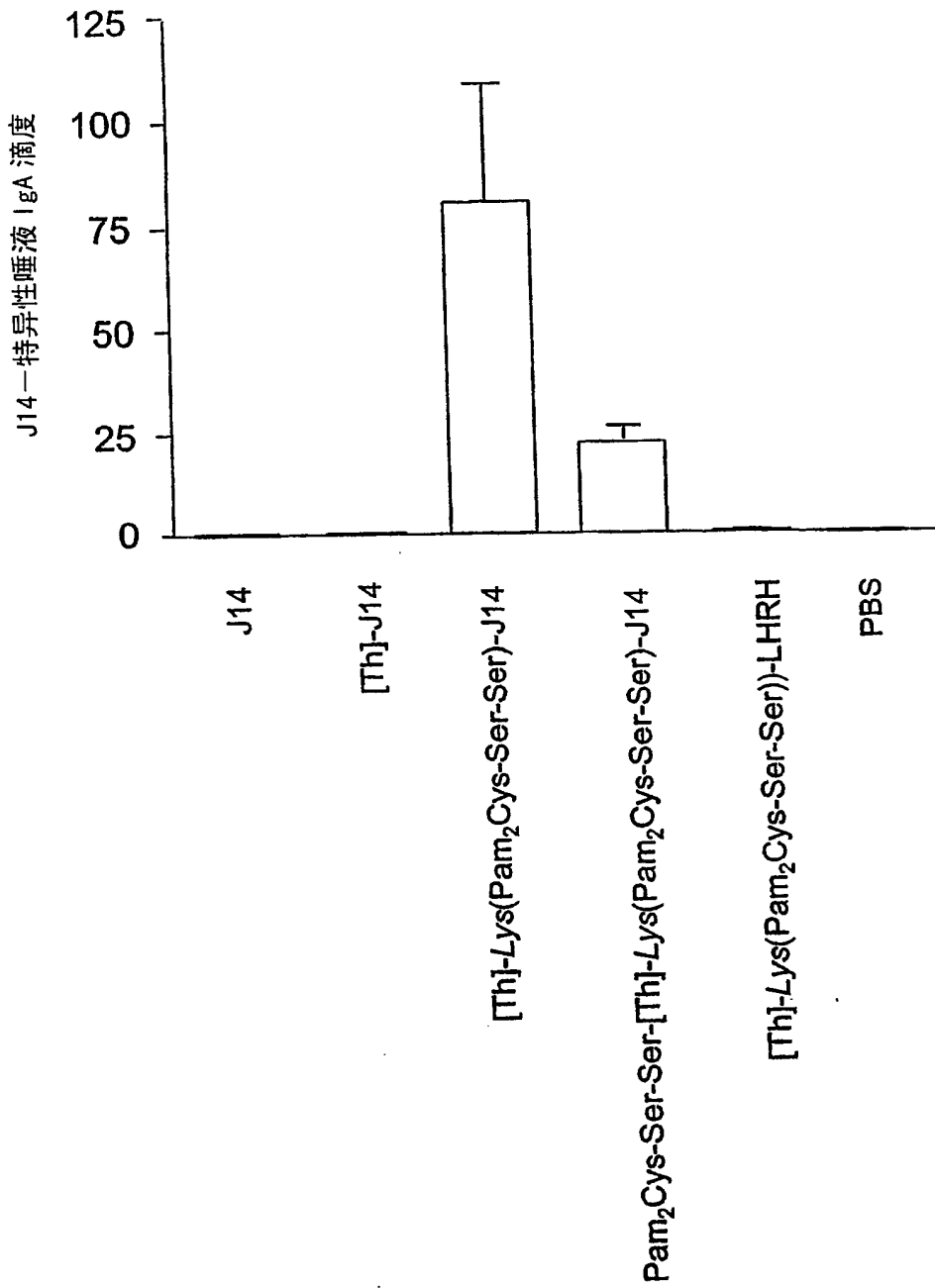


图 14

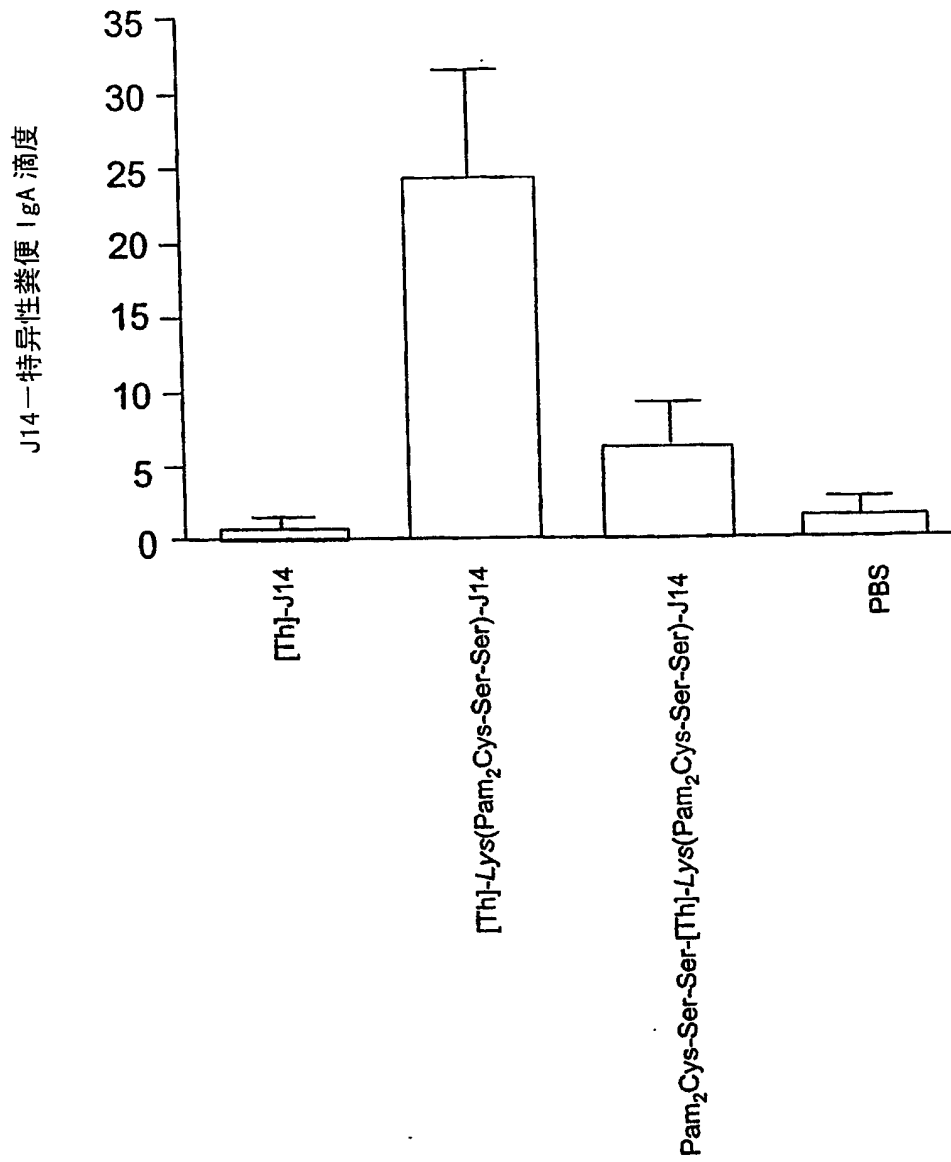
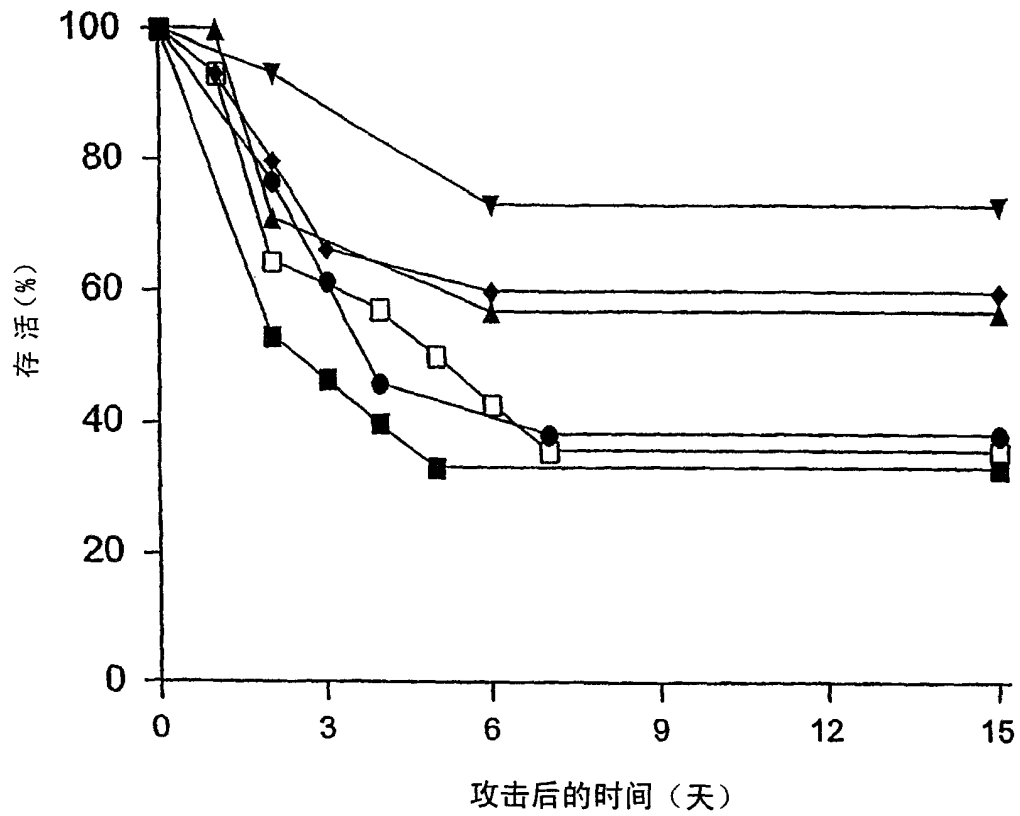


图15



- ▼ [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-J14
- ◆ Pam₂Cys-Ser-Ser-[Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-J14
- ▲ [Th]-J14
- [Th]-Lys(Pam₂Cys-Ser-Ser)-LHRH
- J14
- PBS

图16

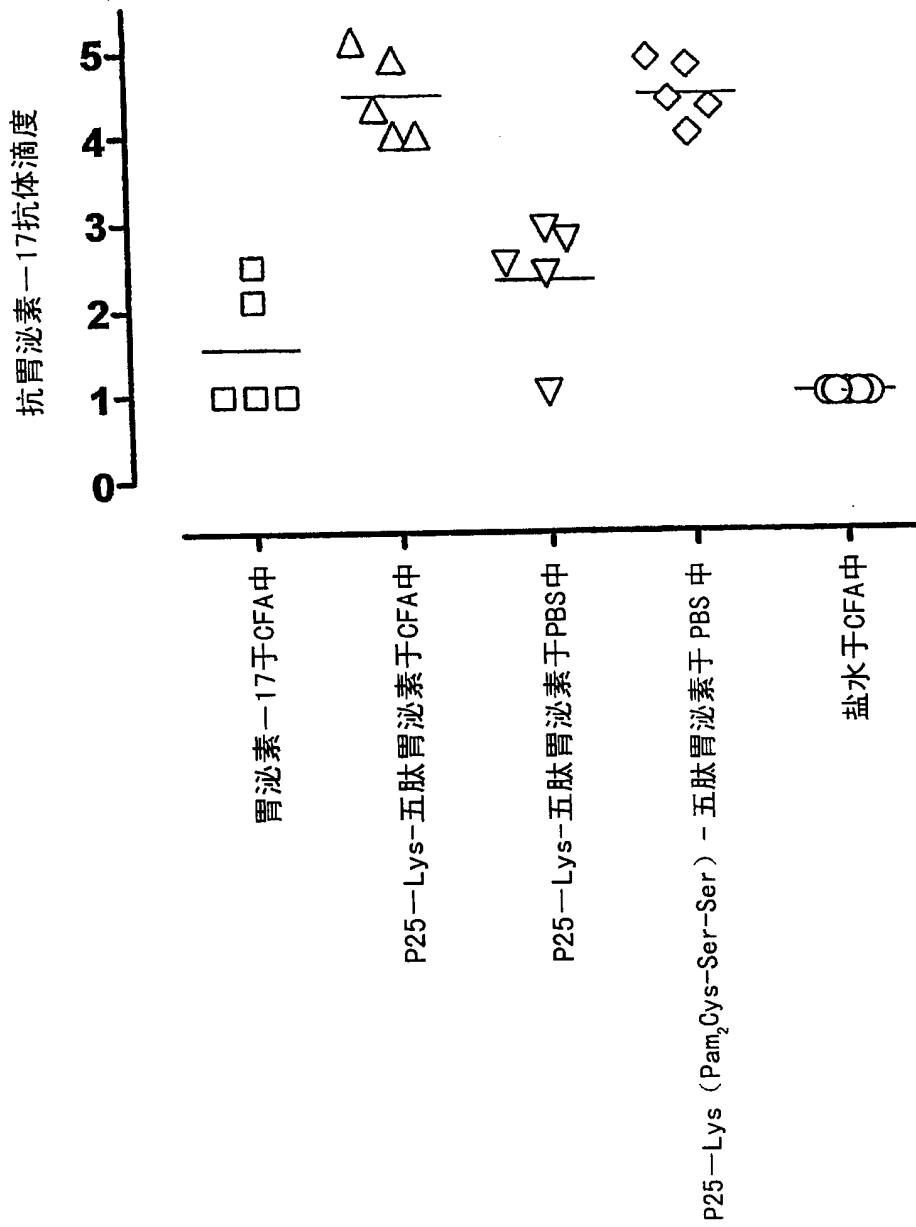


图 17