

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

A61K 38/00

A61K 38/08 C07K 7/00

## [12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97194554.3

[43]公开日 1999年6月2日

[11]公开号 CN 1218404A

[22]申请日 97.3.21 [21]申请号 97194554.3

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

[30]优先权

代理人 卢新华 齐曾庆

[32]96.3.21 [33]US [31]60/013,833

[32]97.3.20 [33]US [31]08/821,739

[86]国际申请 PCT/US97/04451 97.3.21

[87]国际公布 WO97/34617 英 97.9.25

[85]进入国家阶段日期 98.11.11

[71]申请人 西特尔公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 R·T·库伯 H·M·格雷 A·瑟特  
E·瑟利斯

权利要求书 3 页 说明书 33 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 HLA结合肽及其用途

[57]摘要

本发明提供一种肽组合物,它能特异性地结合于所选择的MHC等位基因,并在由MHC等位基因限制的T细胞中诱导T细胞激活。这种肽可用于诱发针对所要求抗原的免疫反应。

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

## 权 利 要 求 书

1. 一种针对病人预选抗原的诱导细胞毒 T 细胞反应的方法，此方法包括使来自病人的细胞毒 T 细胞与一种免疫原性肽相接触，这种肽以小于大约  $5 \times 10^{-7}$  M 的解离常数结合 HLA - A3. 2 MHC 产物，并能诱导细胞毒 T 细胞反应，这种免疫原性肽具有大约 9 - 10 个残基，并且从 N - 端至 C - 端具有如下残基：

5 选自：L、M、I、V、S、A、T、F、C、G、D 和 E 的第一保守残基；

以及选自 K、R、Y、H 和 F 的第二保守残基；

10 其中第一和第二保守残基相隔 6 - 7 个残基。

2. 权利要求 1 的方法，其中第一保守残基位于从 N - 端数第 2 位

置。  
15 3. 一种针对病人预选抗原的诱导细胞毒 T 细胞反应的方法，此方法包括使来自病人的细胞毒 T 细胞与一种免疫原性肽相接触，这种肽以小  
于大约  $5 \times 10^{-7}$  M 的解离常数结合 HLA - A1 MHC 产物，并能诱导  
细胞毒 T 细胞反应，这种免疫原性肽具有大约 9 - 10 个残基，并且从  
N - 端至 C - 端具有如下残基：

选自 T、S 和 M 的第一保守残基；和

选自 D、E、A、S 和 T 的第二保守残基；

20 第三保守残基 Y；

其中第一和第二保守残基相邻接，第二和第三保守残基相隔 5 或 6 个残基。

4. 权利要求 3 的方法其中第一保守残基位于从 N - 端数第 2 位置。

25 5. 一种针对病人预选抗原的诱导细胞毒 T 细胞反应的方法，此方法包括使来自病人的细胞毒 T 细胞与一种免疫原性肽相接触，这种肽以小  
于大约  $5 \times 10^{-7}$  M 的解离常数结合 HLA - A1 MHC 产物，并能诱导  
细胞毒 T 细胞反应，这种免疫原性肽具有大约 9 - 10 个残基，并且从  
N - 端至 C - 端具有如下残基：

选自 T、S 和 M 的第一保守残基；和

30 第二保守残基 Y；

其中第一和第二保守残基相隔 6 - 7 个残基。

6. 权利要求 5 的方法，其中第一保守残基位于从 N - 端数第 2 位

置，第二保守残基位于从 N - 端数第 9 或第 10 位置。

7. 一种针对病人预选抗原的诱导细胞毒 T 细胞反应的方法，此方法包括使来自病人的细胞毒 T 细胞与一种免疫原性肽相接触，这种肽以小于大约  $5 \times 10^{-7} M$  的解离常数结合 HLA - A1 MHC 产物，并能诱导细胞毒 T 细胞反应，这种免疫原性肽具有大约 9 - 10 个残基，并且从 N - 端至 C - 端具有如下残基：

选自 D、E、A、S 和 T 的第一保守残基；和

第二保守残基 Y；

其中第一和第二保守残基相隔 5 - 6 个残基。

10 8. 权利要求 7 的方法，其中第一保守残基位于从 N - 端数的第 3 位置，第二保守残基位于从 N - 端数的第 9 或第 10 位置。

9. 一种针对病人预选抗原的诱导细胞毒 T 细胞反应的方法，此方法包括使来自病人的细胞毒 T 细胞与一种免疫原性肽相接触，这种肽以小于大约  $5 \times 10^{-7} M$  的解离常数结合 HLA - A11 MHC 产物，并能诱导细胞毒 T 细胞反应，这种免疫原性肽具有大约 9 - 10 个残基，并且从 N - 端至 C - 端具有如下残基：

选自 L、M、I、V、A、S、T、G、N、Q、C、F、D、E 的第一保守残基；和

选自 K、R、H 的第二保守残基；

20 其中第一和第二保守残基相隔 6 - 7 个残基。

10. 权利要求 9 的方法，其中第一保守残基位于从 N - 端数第 2 位置。

11. 一种针对病人预选抗原的诱导细胞毒 T 细胞反应的方法，此方法包括使来自病人的细胞毒 T 细胞与一种免疫原性肽相接触，这种肽以小于大约  $5 \times 10^{-7} M$  的解离常数结合 HLA - A24.1 MHC 产物，并能诱导细胞毒 T 细胞反应，这种免疫原性肽具有大约 9 - 10 个残基，并且从 N - 端至 C - 端具有如下残基：

选自 Y、F、W 的第一保守残基；和

选自 F、I、L、W、M 的第二保守残基；

30 其中第一和第二保守残基相隔 6 - 7 个残基。

12. 权利要求 11 的方法，其中第一保守残基位于从 N - 端数第 2 位置。

13. 一种针对病人预选抗原的诱导细胞毒 T 细胞反应的方法，此方法包括使来自病人的细胞毒 T 细胞与一种免疫原性肽相接触，这种肽以小于大约  $5 \times 10^{-7}$  M 的解离常数结合 HLA - A3. 2 MHC 产物，并能诱导细胞毒 T 细胞反应，这种免疫原性肽具有大约 9 - 10 个残基，并且从 N - 端至 C - 端具有如下残基：

位于第 2 位置的第一保守残基，选自 A、I、L、M、T 和 V；  
位于 C - 端位置的第二保守残基选自 K 和 R；

其中第一和第二保守残基相隔 6 - 7 个残基。

14. 一种针对病人预选抗原的诱导细胞毒 T 细胞反应的方法，此方法包括使来自病人的细胞毒 T 细胞与一种免疫原性肽相接触，这种肽以小于大约  $5 \times 10^{-7}$  M 的解离常数结合 HLA - A3. 2 MHC 产物，并能诱导细胞毒 T 细胞反应，这种免疫原性肽具有大约 9 - 10 个残基，并且从 N - 端至 C - 端具有如下残基：

位于从 N - 端数第 2 位置的第一保守残基，选自 A、I、L、M、  
T 和 V；和

位于 C - 端位置的第二保守残基选自 K；

其中第一和第二保守残基相隔 6 - 7 个残基。

15. 权利要求 1、3、5、7、11、13 或 14 的方法，其中的免疫原性肽在体外与细胞毒 T 细胞接触。

20 16. 权利要求 1、3、5、7、11、13 或 14 的方法，其中使细胞毒 T 细胞与免疫原性肽相接触的步骤，是通过对病人给予编码这种肽的核酸来实现。

17. 权利要求 1、3、5、7、11、13 或 14、5 的方法，其中的免疫原性肽是来自病毒抗原。

25 18. 权利要求 1、3、5、7、11、13 或 14 的方法，其中的免疫原性肽是来自癌抗原。

19. 一种含有免疫原性肽的组合物，其中该免疫原性肽选自序列 1 - 111。

# 说 明 书

## HLA 结合肽及其用途

本专利申请是 USSN 60/013, 833 的部分继续，后者又与 USSN  
5 08/589, 107 、 USSN 08/451, 913 , 以及 USSN 08/347, 610 有关，并且  
在如下专利中，相继地前者是后者的部分继续： USSN 60/013, 833 、  
USSN 08/159, 339 、 USSN 08/103, 396 、 USSN 08/027, 746 、 USSN  
07/926, 666 。本申请还与 USSN 08/186, 266 有关。上面所有的专利申  
请在此都被引入作为参考。

10

### 发明背景

本发明是关于用于对许多病理状态如病毒性疾病和癌症进行预  
防、治疗或诊断的组合物和方法。特别是提供了能结合于所选择的主要  
组织相容性复合物（ MHC ）分子并诱发免疫反应的新型肽。

MHC 分子被分类为 I 类分子或 II 类分子。 II 类 MHC 分子主要是  
15 在与启动和维持免疫反应有关的细胞上表达，如 T 淋巴细胞、 B 淋巴细  
胞、巨噬细胞等。 II 类分子可被辅助 T 淋巴细胞识别，诱导辅助 T 淋  
巴细胞增殖并放大对特定的免疫原性肽所展示的免疫反应。 I 类 MHC  
分子可在几乎所有的有核细胞上表达，被细胞毒性 T 淋巴细胞  
（ CTLs ）识别，然后破坏携带抗原的细胞。 CTLs 在肿瘤排斥和抗病  
20 毒感染过程中特别重要。 CTL 能识别结合于 MHC I 类分子的以肽片  
段形式存在的抗原，而不是完整的外来抗原本身。在正常情况下抗原必须  
被细胞内源性地合成，并在细胞质中，部分蛋白质抗原被裂解成小肽  
片段。某些这种小肽位移进入前 Golgi 区，并与 I 类分子重链相互作用，  
以便于适当地折叠并与  $\beta_2$  微球蛋白的亚单位结合。然后，这种肽 - MHC  
25 I 类复合物被转移到细胞表面，便于表现并可能被特别的 CTLs 识别。

对人 MHC I 类分子， HLA - A2.1 的晶体结构研究表明，通过 I  
类分子重链  $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  结构域的折叠，形成了一个肽结合槽（ Bjorkman et  
al Nature 329 : 506 ( 1987 ) ）。但是，在这些研究中，对结合于此  
槽内肽的种类并未确定。

30 Buus et al, Science 242 : 1065 ( 1988 ) 首先描述了一种从 MHC  
上酸洗脱结合肽的方法。随后， Rammensee 及其合作者 ( Falk et al,  
Nature 351 : 290 ( 1991 ) ) 建立了一种方法，用于鉴定天然产生的结

合于 I 类分子的肽。其它一些研究者借助于质谱分析法，通过对从 B 型 I 类分子 ( Jardetzky et al, Nature 353 : 326 ( 1991 ) ) 和从 A2.1 型 I 类分子中洗脱的肽进行常规的自动测序，已成功地达到了对各种 HPLC 组分中较大量的肽进行直接氨基酸测序的目的 ( Hunt et al. Science 5 225 : 1261 ( 1992 ) ) 。 Rötzschke 和 Falk 已提供了有关对 MHC I 类分子中天然产生的结合肽鉴定的述评 ( Rötzschke and Falk, Immunol. Today 12 : 447 ( 1991 ) ) 。

Sette et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 3296 ( 1989 ) 的研究表明， MHC 等位基因特异性基元可用于预测 MHC 结合能力。 10 Schaeffer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 4649 ( 1989 ) 的研究表明， MHC 结合与免疫原性有关，几位研究者 ( De Bruijn et al. Eur., J. Immunol. 21 : 2963 - 2970 ( 1991 ); Pamer et al, Nature 353 : 15 852 - 955 ( 1991 ) ) 已提供了初步证据表明， I 类分子结合基元可用于对动物模型鉴定潜在的免疫原性肽。还必须对那些对许多已知 I 类同种型分子的人等位基因具有特异性的 I 类分子基元进行阐述。理想的情况是，这些不同等位基因的聚合频度应该足够高，以便能包括大部分，或者大多数异系繁殖人群。

尽管技术在发展，但是，现有的技术还必须在此研究的基础上提供有用基于人肽的疫苗或治疗药剂。本发明提供了这种肽，并具有其它 20 一些优点。

#### 发明概述

本发明提供的免疫原性肽具有对 MHC I 类分子的结合基元。这种免疫原性肽典型的具有大约 8 - 11 个残基，并含有包含在由适当的 MHC 等位基因编码的结合蛋白中的保守残基。已经鉴别出若干等位基 25 因特异性基元。

例如，对 HLA - A3.2 的基元，从 N - 端至 C - 端在位置 2 含有第一保守残基 L、M、I、V、S、A、T 或 F，在 C - 末端含有第二保守残基 K、R 或 Y。其它的第一保守残基是 C、G 或 D，或者是 E。其它的第二保守残基是 H 或 F。第一和第二保守残基优选地是相隔 30 6 - 7 个残基。

对于 HLA - A1 的基元，从 N - 端至 C - 端含有第一保守残基 T、S 或 M，第二保守残基 D 或 E，以及第三保守残基 Y。其它的第二保

守残基是 A、S 或 T。第一和第二保守残基相邻，优选地与第三保守残基相隔 6 - 7 个残基。第二基元由第一保守残基 E 或 D 和第二保守残基 Y 组成，在此第一和第二保守残基相隔 5 - 6 个残基。

对于 HLA - A11 的基元，从 N - 端至 C - 端在位置 2 含有第一保守残基 T 或 V，在 C - 端含有（第二）保守残基 K。第一和第二保守残基优选地相隔 6 - 7 个残基。

对于 HLA - A24.1 基元，从 N - 端至 C - 端含有在位置 2 的第一保守残基 Y、F 或 W，以及 C - 端的（第二）保守残基 F、I、W、M 或 L。第一和第二保守残基优选地相隔 6 - 7 个残基。

可以按此方法鉴别许多潜在性靶蛋白质上的表位。可根据来自病原体（例如病毒病原体、真菌病原体、细菌病原体、原生动物病原体，等）或来自癌相关抗原的抗原蛋白质序列制备这种肽。适当抗原例子包括前列腺特异性抗原（PSA），乙型肝炎核心抗原和表面抗原（HBVc、HBVs），丙型肝炎抗原，恶性黑素瘤抗原（MAGE - 1），Epstein - Barr 病毒抗原，I 型人免疫缺损病毒（HIV1）抗原和乳头状瘤病毒抗原。这种肽或编码它们的核酸在药剂组合物中是有用的，可用于体内和体外的治疗和诊断。

#### 说 明

名词“肽”和“寡肽”在本说明书中可互换使用，指的是一系列氨基酸残基，典型的 L - 氨基酸残基，一般是相邻氨基酸的  $\alpha$  - 氨基和羧基之间通过肽键相互连接而成的。本发明寡肽的长度少于大约 15 个残基，通常由大约 8 - 11 个残基组成，优选地是 9 个或 10 个残基。

“免疫原性肽”是含有等位基因特异性基元的肽，并因此它能结合于 MHC 等位基因，并能诱发 CTL 反应。因此，免疫原性肽能结合于适当的 I 类 MHC 分子，诱发针对产生此免疫原性肽的抗原发生细胞毒 T 细胞反应。

以二种不同的实验方法分析了分散的肽表位对 MHC I 类分子的结合亲和性和其免疫原性之间的相互关系（Sette et al, J. Immunol. 153 : 5586 - 5592 (1994)）。第一种方法分析表明，对于 HLA - A\*0201 转基因小鼠，在 MHC 结合亲和性范围内潜在性表位的免疫原性超过 10000 倍。第二种方法通过使用急性肝炎病人的 PBL，对大约 100 个不同的来自乙型肝炎病毒（HBV），并都带有 A\*0201 结合基元的

潜在性表位，测定了其抗原性。在此二种情况中都发现，大约 500nM (优选地在 500nM 或小于 500nM ) 的亲和性阈限可确立肽表位诱发 CTL 反应的能力。这些资料正好与对天然产生的肽或以前所述 T 细胞表位测定的 I 类分子结合亲和性结果一致。这些资料表明，在 T 细胞应答 5 形成中决定簇选择具有重要的作用。

“保守残基”是在肽基元中某一特定位置，与通过随机分布所预测的相比较，以显著较高的频度存在的氨基酸。典型的保守残基是免疫原性肽可能在此提供与 MHC 分子连接点的残基。对于某一免疫原性肽。在限定长度的肽内含有 1 - 3 个，优选地含有 2 个保守残基，定义为一个基元。这些残基典型地是与肽结合槽有紧密的接触，其侧链埋藏在槽 10 本身的特定凹陷中。一般情况下，一个免疫原性肽含有多至 3 个保守残基，更通常是 2 个保守残基。

在此使用的名词“负结合残基”指的是这样一些氨基酸，如果它们在肽的某些位置存在，将导致肽成为无结合性或弱结合性，并因而不诱发 CTL 反应，尽管此肽中存在适合的保守残基。 15

名词“基元”指的是在限定长度，通常是大约 8 - 11 个氨基酸的肽内，可被特定的 MHC 等位基因识别的残基模式。对于每种人 MHC 等位基因的肽基元一般都不相同，其差别在于高度保守残基的模式。

可以更确切地定义一个等位基因的结合基元。在一种情况下，肽中 20 所有的保守残基都在正确的位置上，并且不存在阴性结合残基。

名词“分离”或“生物学纯”指的是此物质基本上没有在天然状态发现的正常陪伴成分。这样，本发明的肽不含有在原位环境正常与它们结合的物质，例如在抗原呈递细胞上的 MHC I 分子。即使在一个蛋白质已经被分离成同质或优势带状态，仍然还存在与所需要蛋白质共纯化的范围在 5 - 10 % 的天然蛋白质微量污染。本发明的分离肽不含有这种内源性共纯化的蛋白质。 25

名词“残基”指的是通过酰胺键或酰胺键模拟物掺入寡肽的氨基酸或氨基酸模拟物。

#### 优选实施方案说明

本发明是关于确定人 I 类 MHC (有时称为 HLA) 等位基因亚型的等位基因特异性肽基元。然后将这些基元用于限定来自任何所需抗原的 T 细胞表位，特别是那些与人类病毒性疾病，癌症或自身免疫性疾病有

关的抗原，对于这些疾病，其潜在性抗原或自身抗原靶标的氨基酸序列是已知的。

按照这种方式，可对许多潜在性靶标蛋白质上的表位进行鉴定。适合的抗原例子包括前列腺特异性抗原（PSA），乙型肝炎核心和表面抗原（HBVc、HBVs），丙型肝炎抗原，Epstein - Barr 病毒抗原，黑素瘤抗原（例如，MAGE - 1），人免疫缺损病毒（HIV）抗原，以及人乳头状瘤病毒（HPV）抗原。

可能用本发明的肽减轻其症状，对它进行治疗或者防止其发生或复发的自身免疫相关性疾病包括例如：多发性硬化（MS）、类风湿性关节炎（RA）、Sjogren 综合症、硬皮病、多发性肌炎、皮肌炎、系统性红斑狼疮、少年类风湿性关节炎、强直性脊椎炎、重症肌无力（MG）、类天疱疮性大疱（抗体针对上皮连接处的基底膜）、天疱疮（抗体针对粘多糖蛋白质复合物或细胞内粘合物质）、血管球性肾炎（抗体针对肾小球基底膜）、Goodpaseure's 综合症、自身免疫溶血性贫血（抗体针对红细胞）、Hashimoto's 病（抗体针对甲状腺）、恶性贫血（抗体针对内在因子）、自发性血小板减少性紫癜（抗体针对血小板）、Grave's 病，以及 Addison's 病（抗体针对甲状腺球蛋白）等。

已经发现了与多种此类疾病有关的自身抗原。例如，在实验性诱发的自身免疫性疾病中，与一些发病机理有关的抗原已被鉴定：对于关节炎大鼠和小鼠，在胶原蛋白诱发的关节炎中发现了天然的 II 型胶原蛋白，以及在佐剂性关节炎中发现了分枝杆菌热休克蛋白；在小鼠实验过敏性甲状腺炎（EAT）中发现了甲状腺球蛋白；在实验过敏性重症肌无力（EAMG）中发现了乙酰胆碱受体（AChR）；以及在小鼠和大鼠的实验过敏性脑脊髓炎（EAE）中发现了髓鞘碱性蛋白（MBP）和蛋白脂蛋白（PLP）。此外，对于人也发现了靶抗原：人类风湿性关节炎中的 II 型胶原蛋白；以及重症肌无力中的乙酰胆碱受体。

若不囿于理论，据信由 HLA I 类分子呈递抗原，可作为引起 CD8<sup>+</sup> 抑制型 T 细胞抑制自身反应性 T 细胞的媒介（参见例如，Jiang et al, Science 256 : 1213 (1992)）。这种抑制型 T 细胞释放特异性抑制自身反应性 T 细胞的细胞因子如转化生长因子 -  $\beta$  (TGF -  $\beta$ )。Miller et, Proc Natl. Acad. Sci. USA 89 : 421 - 425 (1992)。

先合成含有来自这些抗原的表位的肽，然后测定它们结合于适当

MHC 分子的能力，可使用例如纯化的 I 类分子和放射性碘标记肽，以及/或者不表达 I 类分子的细胞，借助于如免疫荧光染色法和流式显微荧光测定法，肽依赖性 I 类分子装配试验，以及肽对 CTL 识别的竞争性抑制进行测定。再进一步对那些结合于 I 类分子的肽评估它们用于对来自受感染或被免疫个体的 CTLs 作为靶标的能力，以及它们在体外或体内诱发初级 CTL 反应的能力，这种反应可导致产生能与病毒感染的靶细胞或肿瘤细胞反应的，可作为潜在治疗剂的 CTL 群。  
5

MHC I 类抗原是由 HLA - A、B 和 C 基因座编码。HLA - A 和 B 抗原以大致相等的密度在细胞表面被表达，而 HLA - C 抗原的表达则明显较低（可能低于 10 倍）。这些基因座的每一个都有许多等位基因。  
10 本发明的肽结合基元对各等位基因亚型具有相对的特异性。

为了用于以肽为基础的疫苗，本发明的肽优选地含有可被人群中广泛分布的 MHC I 类分子识别的基元。因为 MHC 等位基因在不同的人种群和种族中以不同的频度存在，所以对靶标 MHC 等位基因的选择可能取决于靶标人群。表 I 显示在不同种族中，各种等位基因在 HLA - A 基因座产物存在的频度。例如，大多数高加索人群可包括结合于四种 HLA - A 等位基因亚型的肽，具体地说这种等位基因亚型是 HLA - A2.1, A1, A3.2 和 A24.1。类似地是，大多数亚洲人还包括结合于第五种等位基因 HLA - A11.2 的肽，  
15

表 1

	<u>A 等位基因/亚型</u>	<u>N(69)*</u>	<u>A(54)</u>	<u>C(502)</u>
5	A1	10.1(7)	1.8(1)	27.4(138)
	A2.1	11.5(8)	37.0(20)	39.8(199)
	A2.2	10.1(7)	0	3.3(17)
	A2.3	1.4(1)	5.5(3)	0.8(4)
	A2.4	-	-	-
	A2.5	-	-	-
10	A3.1	1.4(1)	0	0.2(0)
	A3.2	5.7(4)	5.5(3)	21.5(108)
	A11.1	0	5.5(3)	0
	A11.2	5.7(4)	31.4(17)	8.7(44)
	A11.3	0	3.7(2)	0
	A23	4.3(3)	-	3.9(20)
15	A24	2.9(2)	27.7(15)	15.3(77)
	A24.2	-	-	-
	A24.3	-	-	-
	A25	1.4(1)	-	6.9(35)
	A26.1	4.3(3)	9.2(5)	5.9(30)
	A26.2	7.2(5)	-	1.0(5)
20	A26V	-	3.7(2)	-
	A28.1	10.1(7)	-	1.6(8)
	A28.2	1.4(1)	-	7.5(38)
	A29.1	1.4(1)	-	1.4(7)
	A29.2	10.1(7)	1.8(1)	5.3(27)
	A30.1	8.6(6)	-	4.9(25)
25	A30.2	1.4(1)	-	0.2(1)
	A30.3	7.2(5)	-	3.9(20)
	A31	4.3(3)	7.4(4)	6.9(35)
	A32	2.8(2)	-	7.1(36)
	Aw33.1	8.6(6)	-	2.5(13)
	Aw33.2	2.8(2)	16.6(9)	1.2(6)
	Aw34.1	1.4(1)	-	-
	Aw34.2	14.5(10)	-	0.8(4)
	Aw36	5.9(4)	-	-

此表由 B. DuPont, 在 Immunobiology of HLA Vol. 1, Histocompatibility Testing 1987. Springer - Verlag, New York 1989 中编制。

\*N = 黑人; A = 亚洲人; C = 高加索人。

括号中的数字代表包括在此分析中的个体数目。

的特定实施方案的结构式中其氨基和羧基，虽然未具体说明，是以假定它们处于生理 pH 值的状态存在，除非另有说明。在氨基酸结构式中，每个残基一般是以标准的三字母符号或单字母符号表示。L - 型氨基酸残基以大写的单字母符号或大写第一字母的三字母符号表示，而那些 5 D - 型氨基酸以小写字体单字母符号或小写字体三字母符号表示。甘氨酸没有不对称碳原子，被简单地表示为 Gly 或 G。

一般是按照在 Falk et al. Nature 351 : 290 ( 1991 ) 中所述的方法对本发明的肽进行鉴定，此文献在此被引入作为参考。简单地说，本方法包括大批量分离 MHC I 类分子，典型地是通过免疫沉淀或亲和层析从适当的细胞或细胞株分离。技术人员同样熟知的分离所需 MHC 分子的其它方法包括：离子交换层析法，凝集素层析法，大小排阻层析，高效配体层析，以及联合使用上述所有技术。 10

许多带有明确 MHC 分子，特别是 MHC I 类分子的细胞是已知的，且容易得到，例如，已证明人 EBV - 转化的 B 细胞株是用于制备分离 I 类和 II 类 MHC 分子的出色来源。从私人和市场途径可得到被良好鉴定的细胞株，例如从美国典型培养物保藏中心（ American Type Culture Collection ）（ “ Catalogue of Cell Lines and Hybridomas ” 6ht edition ( 1988 ) Rockville, Maryland, U. S. A ）； National Institute of General Medical Sciences 1990/1991 Catalog of Cell Lines ( NIGMS ) Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, NJ ； 和 ASHI Repository, Bingham and Women's Hospital, 75 Francis Street, Boston, MA 02115 。表 2 列举了一些适合用作 HLA - A 等位基因来源的 B 细胞株。所有这些细胞都可以被大量培养，因此可用于大批量生产 MHC 分子。技术人员应该认识到，这些仅仅是示范性的细胞株，其它许多的细胞来源都可以利用。类似的 HLA - B 和 HLA - C 纯合的 EBV B 细胞株，分别可用作 HLA - B 和 HLA - C 等位基因的来源。 15 20 25

表 2  
人细胞株 (HLA - A 的来源)

	HLA-A 等位基因	B 细胞株
5	A1	MAT COX (9022) STEINLIN (9087)
10	A2.1	JY
15	A3.2	EHM (9080) HO301 (9055)GM3107
20	A24.1	KT3(9107), TISI (9042)
	A11	BVR (GM6828A) WT100 (GM8602)WT52 (GM8603)

在一般情况下，免疫沉淀法可用于分离所需要的等位基因，许多方案可被采用，取决于所用抗体的特异性。例如，可将等位基因特异性 mAb 试剂用于亲和纯化 HLA - A、HLA - B 和 HLA - C 分子。用于分离 HLA - A 分子的几种 mAb 试剂都可以得到（表 3）。因此，对于所针对的每个 HLA - A 等位基因，可用于直接分离 HLA - A 分子的试剂都可以得到。以这类 mAbs 用标准的技术制备的亲和性层析柱，已成功地用于纯化出各自的 HLA - A 等位基因产品。

除等位基因特异性 mAbs 外，广泛反应性的抗 - HLA - A、B、C mAbs，如 W6/32 和 B9.12.1，以及一个抗 - HLA - B、C mAb，

B1.23.2 也可以在另一些亲和纯化方案中使用，如在下面实施例部分所述。

表 3  
抗体试剂

5

	抗 -HLA	名称
	HLA-A1	12/18
10	HLA-A3	GAPA3 (ATCC, HB122)
	HLA-B11,24.1	A11.1M (ATCC, HB164)
	HLA-A,B,C	W6/32 (ATCC, HB95)
	单态的	B9.12.1 (INSERM-CNRS)
15	HLA-B,C	B.1.23.2 (INSERM-CNRS)
	单态的	

与所分离 MHC 分子的肽连接槽结合的肽通常可用酸处理洗脱。也可通过各种常规的变性处理使肽与 I 类分子分离，例如加热、pH、去污剂、盐和离液剂（ Chaotropic agents ）处理，或者这几种方法结合处理。

然后进一步借助于反相高效液相层析（ HPLC ）法将肽组分从 MHC 分子中分离出，并测序。还可以通过技术人员熟知的各种其它标准方法分离出肽，包括过滤、超滤、电泳、大小排阻层析、随特异性抗体沉淀、离子交换层析、等电聚焦等。

可按照标准的技术如 Edman 降解对所分离的肽进行测序（ Hunkapiller, M. W. et al, Method Enzymol, 91, 399 [ 1983 ] ）。适合于测序的其它方法包括对单个肽测序的质谱分析法，如以前所述（ Hunt, et al., Science 225 : 1261 ( 1992 )，在此引入作为参考）。通过对大量来自不同 I 类分子的异源性肽（例如，合并的 HPLC 组分）进行氨基酸测序，一般可揭示出各种 I 类分子等位基因的特征性序列基元。

确定了对不同 I 类分子等位基因特异性的基元，就能够鉴别来自已知其氨基酸序列的抗原蛋白的潜在性肽表位。典型情况下，对潜在性肽表位的鉴别开始是用计算机对所需抗原的氨基酸序列进行扫描，找出存在的基元。然后是合成这种抗原表位序列。以各种不同的方法测定其结合 MHC 类分子的能力。一种方法是例如在上面提到的有关申请中所述的 I 类分子结合测定法。在文献中所述的其它方法包括抗原呈递抑制法 ( Sette et al, J. Immunol. 141 : 3893 ( 1991 ) )，体外装配测定法 ( Townsend et al., Cell 62 : 285 ( 1990 ) )，以及使用突变细胞如 RMA - S，基于 FACS 的测定法 ( Melief et al., Eur. J. Immunol. 21 : 2963 ( 1991 ) )。

下一步是对在 MHC I 类结合测定中呈阳性的肽，检测其在体外诱发特异性 CTL 反应的能力。例如，可以对已经与肽共同温育的抗原呈递细胞，测定其在反应性细胞群中诱发 CTL 反应的能力。抗原呈递细胞可以是正常的细胞如外周血单核细胞，或者是树突状细胞 ( Inaba et al., J. Exp. Med. 166 : 182 ( 1987 ) ; Boog, Eur, J. Immunol. 18 : 219 ( 1988 ) )。

另一种选择是，可方便地使用突变型哺乳动物细胞株，它们缺乏用内部加工的肽装配 I 类分子的能力，并且它们已用合适的人 I 类分子基因转染过，对它们加入肽时，可测定这种肽在体外诱发初级 CTL 反应的能力，这种细胞株包括例如小鼠细胞株 RMA - S ( Kärre, et al., Nature, 319 : 675 ( 1986 ), Ljunggren, et al, Eur, J. Immunol. 21 : 2963 - 2970 ( 1991 )), 和人体 T 细胞杂交瘤 T - 2 株 ( Cerundolo et al, Nature 345 : 449 - 452 ( 1990 ) )。可能使用的其它真核细胞株包括各种昆虫细胞株如蚊幼虫 ( ATCC 细胞株 CCL 125、126、1660、25 1591、6585、6586 ), 蚕 ( ATCC CRL 8851 ), 粘虫 ( ATCC CRL 1711 ), 蛾 ( ATCC CCL 80 ) 以及果蝇细胞株如 Schneider 细胞株 ( 参见 Schneider J. Embryol. Exp. Morphol. 27 : 353 - 365 ( 1927 ) ), 这些细胞株都用适当的人等位基因 I 类 MHC 编码基因和人  $\beta_2$  微球蛋白基因转染了。

对正常献血者或病人作简单的静脉穿刺或白细胞提取 ( leukapheresis ) 之后，可方便地分离出外周血淋巴细胞，用作 CTL 前体反应性细胞源。在一个实施方案中，将适合的抗原呈递细胞在适当

培养条件下，与 10 - 100 $\mu$ M 肽的无血清培养基共温育 4 小时。然后在最适培养条件下，将这种装有肽的抗原呈递细胞与反应性细胞群在体外共温育 7 - 10 天。通过测定培养物中存在 CTL，可确定为阳性 CTL 激活作用，这种 CTLs 能杀死放射性标记的靶细胞，不论是特异性肽激发的靶细胞（peptide-pulsed targets）或者是表达产生肽序列的相关病毒或肿瘤抗原内源性加工形式的靶细胞都能被杀死。

通过试验可以确定 CTL 针对不同的表达适当或不适当人 MHC I 类分子的肽靶细胞的特异性和 MHC 限制性。在 MHC 结合试验中呈阳性并产生特异性 CTL 反应的肽，在此被称为免疫原性肽。

可人工合成或者通过重组 DNA 技术或从天然来源如完整的病毒或肿瘤分离来制备免疫原性肽。虽然这种肽优选地基本上是不含其它天然存在的宿主细胞蛋白质和其片段，但是，在某些实施方案中，这种肽可通过人工合成与天然片段或颗粒结合。这种多肽或肽可以是不同长度，以其中性（不带电荷）形式或盐的形式存在，并且还可以是没有修饰的形式或包含修饰的形式如糖基化，侧链氧化，或磷酸化，只要这种修饰不破坏在此所述的多肽的生物活性。

理想地是，这种肽应该尽可能地小，但是仍基本上保持大肽的全部生物活性。如果有可能，理想的是将本发明的肽最优化至 9 个或 10 个氨基酸残基的长度，大小与在细胞表面结合于 MHC I 类分子的内源性加工的病毒肽或肿瘤细胞肽相当。

必要时可对具有所需活性的肽进行修饰，以便在增加或至少基本保持未修饰的肽结合所需 MHC 分子并激活适当 T 细胞的全部生物活性的同时，提供某些需要的特性如增进的药理学性质。例如，这种肽可以进行各种改变如取代，保守性或非保守性取代，在此，这些改变可能对它们的用途提供某些好处如增强对 MHC 结合。保守性取代意指以另一个生物学和/或化学上相似的氨基酸残基替换一个氨基酸残基，例如以一个疏水残基取代另一个疏水残基，或以一个极性残基取代另一个极性残基。包括如下取代组合：Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; 和 Phe, Tyr。单氨基酸取代的作用也可用 D-氨基酸探测，这种修饰可以用熟知的肽合成法来实施，如在 Merrifield Science 232 : 341 - 347( 1986 ), Baren and Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer, eds. ( N. Y. Academic Press ) , pp. 1 -

284 (1979)，以及 Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Rockford, Ill, Pierce), 2d, Ed (1984) 中所述，在此引入作为参考。

还可以通过延长或缩短组合氨基酸的序列，对这种肽进行修饰，例如通过增加或删除氨基酸。本发明的肽或相似物还可以通过改变某些残基的顺序或组成来修饰，但是，容易理解的是，当某些对生物活性必需的氨基酸残基，例如那些位于关键接触位点的或保守性残基被改变时，一般将伴随对生物活性发生不利的影响。非关键性氨基酸则不必限于蛋白质中天然存在的氨基酸，如 L- $\alpha$ -氨基酸或它们的 D- 异构体，而是还可能包括非天然存在的氨基酸如  $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ - 氨基酸，以及 L- $\alpha$ - 氨基酸的许多衍生物。  
10

一般是运用一系列带有单氨基酸取代的肽来测定静电荷，疏水性等对其结合的影响。例如，一系列带正电荷（如 Lys 或 Arg）或带负电荷的（如 Glu）氨基酸取代作用是沿着肽的长度进行，展示出对各种 MHC 分子和 T 细胞受体不同的敏感性模式。此外，还可以运用小的，15 相对中性的残基如 Ala, Gly, Pro, 或类似的残基进行多取代作用。这种替代物可以是同源低聚体或异源低聚体。被取代或加入的残基的数目和类型取决于最重要接触点之间所必需的间距和所追求的某些功能特性（如疏水性与亲水性之比）。还可通过这种取代作用，达到与原有肽的亲和性相比，增加对 MHC 分子或 T 细胞受体亲和性的目的。在任何情况下，这种取代作用应该选用能避免如空间和电荷干扰的氨基酸残基或其它分子片段，这种干扰可能会破坏其结合。  
20

氨基酸取代作用一般是单残基的取代。可以将取代、删除、插入，或其任何组合形式结合起来，以便获得最终的肽。取代的变化形式是在其中至少有肽的一个残基已被去掉，并在此位置插入了不同的残基。当25 需要细微地调整肽的特性时，一般可按照如下表 4 进行这种取代作用。

表 4

<u>原来的残基</u>		<u>示范性取代</u>
--------------	--	--------------

	Ala	ser
5	Arg	lys
	Asn	gln; his
	Asp	glu
	Cys	ser
10	Gln	asn
	Glu	asp
	Gly	pro
	His	asn; gln
15	Ile	leu; val
	Leu	ile; val
	Lys	arg
	Met	leu; ile
20	Phe	met; leu; tyr
	Ser	thr
	Thr	ser
	Trp	tyr
25	Tyr	trp; phe
	Val	ile; leu

功能上的基本改变（如对 MHC 分子或 T 细胞受体的亲和性）可通过选择比表 4 中的那些具有更少保守性的取代作用来产生，也就是说，选择对维持如下特性具有更显著不同作用的残基：（a）在取代区域中的肽骨架结构，例如片层状或螺旋状构象，（b）在靶标位点分子的电荷或疏水性，或（c）侧链的大小。通常被预期使肽的性质产生最大改

变的取代作用，是那些在其中（a）亲水性残基如丝氨酸基被用于取代（或被取代）疏水性残基如亮氨酸基、异亮氨酸基、苯丙氨酸基、缬氨酸基或丙氨酸基；（b）带正电荷的侧链残基如赖氨酸基，精氨酸基或组氨酸基被用于取代（或被取代）带负电荷的残基如谷氨酰基或天冬氨酰基；或者（c）带有庞大侧链的残基如苯丙氨酸被用于取代（或被取代）不带侧链的残基如甘氨酸。

这种肽还可能在免疫原性肽中含有二个或二个以上残基的等配物。在此所定义的等配物是一个二个或二个以上残基的序列，由于第一序列的立体构象适合于第二序列的特异性结合位点，使之可被用于取代第二序列。此名词特定地包括本领域技术人员熟知的对肽骨干的修饰。这种修饰包括对酰胺氮原子， $\alpha$ -碳原子，酰胺羧基的修饰，酰胺键完全移位，还包括延长，删除或骨干交联等修饰。一般可参见，Spotola，氨基酸、肽及蛋白质的化学和生物化学，Vol. VII (Weinstein ed., 1983)。

以各种氨基酸模拟物或非天然氨基酸对肽进行修饰，对增加肽在体内的稳定性特别有用。可用许多方法测定稳定性。例如，肽酶和各种生物基质如人血浆，血清已被用于测定稳定性。参见例如Verhoef et al. Eur. J. Drug Metab Pharmacokin., 11: 291 - 302 (1986)。用 25 % 人血清 (v/v) 试验法可方便地测定本发明肽的半衰期。实验方案通常如下。使用前将混合人血清 (AB型，非热灭活) 通过离心脱脂。然后以 RPMI 组织培养基将此血清稀释至 25 %，用于测定肽的稳定性。以预定的时间间隔取出少量反应液，加到 6 % 三氯乙酸水溶液中或乙醇中。将此混浊的反应样品冷却 (4 °C) 15 分钟，然后离心分离出沉淀的血清蛋白质。最后通过反相 HPLC，用稳定 - 特异性层析条件确定肽的存在。

对具有 CTL 刺激活性的本发明的肽或其类似物，可能通过修饰提供所需要的特性，而不是改善其血清半衰期。例如，这种肽诱导 CTL 活性的能力，可通过连接于一个序列来增强，此序列含有至少一个能诱发辅助 T 细胞反应的表位。特别优选的免疫原性肽/辅助 T 结合物是通过一个间隔分子连接的。间隔分子通常由比较小的中性分子组成，例如氨基酸或氨基酸模拟物，在生理条件下它基本上不带电荷。间隔分子通常可选自如丙氨酸、甘氨酸，或者其它非极性氨基酸或中性极性氨基酸

的中性间隔分子。应该理解，任选存在的间隔区不一定由相同的残基组成，因此可能是异源性 - 或同源性低聚体。当存在间隔区时，它通常至少是一个或二个残基，更通常是 3 - 6 个残基。另一种情况是，CTL 肽可能不通过间隔区连接于 T 辅助肽。

5 免疫原性肽可能在 CTL 肽的氨基端或羧基端，直接地或通过间隔区连接于 T 辅助肽。免疫原性肽或 T 辅助肽的氨基端都可以被酰基化。

在某些实施方案中，理想的可能是，在本发明的药剂组合物中包含有至少一种帮助激发 CTL 的成分。已发现类脂化合物在体内具有作为帮助激发针对病毒抗原的 CTL 促进剂的能力。例如，棕榈酸残基可附着在 Lys 残基的  $\alpha$  和  $\epsilon$  氨基上，然后例如通过一个或几个连接残基如 Gly，Gly - Gly，Ser，Ser - Ser 等，连接于免疫原性肽。最后，脂化的肽可以微胞的形式直接注射，掺入脂质体，或者在佐剂如不完全 Freund's 佐剂中被乳化。在一个优选的实施方案中，特别有效的免疫原含有附着于 Lys  $\alpha$  和  $\epsilon$  氨基的棕榈酸，它是通过连接残基如 Ser - Ser 15 连接于免疫原性肽的氨基端。

作为类脂化合物激发 CTL 反应的另一个例子，*E. coli* 脂蛋白如三棕榈酰基 - S - 甘油基半胱氨酸酰基丝氨酸酰基 - 丝氨酸 ( $P_3CSS$ )，当被共价连接于适当的肽时，可用于激发病毒特异性 CTL。参见 Deres et al, *Nature* 342 : 561 - 564 ( 1989 )，在此被引入作为参考。例如，可将本发明的肽偶联于  $P_3CSS$ ，再将此脂肽对个人给药，以便特异性地激发对靶抗原的 CTL 反应。进一步地，因为对于展示适当表位的肽，用结合于它的  $P_3CSS$  也可以激发中和抗体的诱导作用，所以可将这二种组合物合并，以便更有效地引发对感染的体液和细胞介导的应答。

此外，可以将补充的氨基酸加到肽的末端，以便为肽的相互连接，25 为偶联于载体支撑物或更大的肽，为修饰肽或低聚肽的物理或化学性质等方面作准备。可在肽或低聚肽的 C 端或 N - 端导入氨基酸如酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸，或天冬氨酸等。有时对 C - 端的修饰也可能改变肽的连接特性。此外，这种肽或低聚肽的序列可能由于被如下修饰而不同于天然的序列：通过  $NH_2$  - 端酰基化如链烷基 ( $C_1 - C_{20}$ ) 30 或硫代乙醇酰基乙酰化，通过如氨、甲基胺等的羧基端酰胺化。在某些例子中，这类修饰作用可能为连接于支持物或其它分子提供位点。

可以按照各种不同的方法制备本发明的肽。因为它们比较短，所以

可以按照常规技术在液体中或者在固体载体上合成这种肽。可以从市场上购得各种自动合成仪，按照已知的方案进行合成。参见例如 Stewart and Young , Solid Phase Peptid Synthesis. 2d ed. Pierce Chemical Co. ( 1984 ) , 同上, (在此引入作为参考)。

5 另一种选择是，可运用重组 DNA 技术，其中是将编码所需免疫原性肽的核苷酸插入表达载体，再经转化或转染进入适当的宿主细胞。然后在适合表达的条件下进行培养。这些程序是本领域技术人员普遍了解的，通常如在 Sambrook et al, Moleculer Cloning A. Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press , Cold Spring Harbor, New York ( 1982 ) 中所述，在此被引入作为参考。因此，含有一个或几个 10 本发明肽序列的融合蛋白可用于呈递适当的 T 细胞表位。

因为在此可以通过化学技术，如 Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103 : 3185 ( 1981 ) 的磷酸三酯法，合成预期长度的肽编码序列，所以可通过以适当的碱基取代编码天然肽序列的碱基而简便地进行修饰作用。然后可对此编码序列提供适当的接头，使之结合于本领域常用的表达载体，并用此载体转化适当的宿主，以便产生所需的融合蛋白。现在已可得到许多这样的载体和适合的宿主系统。为了表达此融合蛋白，还应给此编码序列提供可操作连接的起始密码子和终止密码子，启动子区和终止子区，以及通常一个复制系统，以便为在所需的细胞宿主 15 中表达提供表达载体。例如，把与细菌宿主相容的启动子序列提供给质粒，此质粒含有适合于插入所需编码序列的限制性酶切位点。将此形成的表达载体转化进入适合的细菌宿主。当然，运用适合的载体和控制序列，酵母细胞或哺乳动物细胞宿主也可以使用。

本发明的肽，以及其药剂和疫苗组合物可用于对哺乳动物，特别是 25 人给药，用于治疗和/或预防病毒感染和癌症。用本发明的免疫原性肽可治疗的疾病包括例如前列腺癌、乙型肝炎、丙型肝炎， AIDS , 肾癌、颈癌、淋巴癌。 CMV 和 condyloma acuminatum 。

用于药剂组合物时，本发明的免疫原性肽可对已患有癌症或被相关 30 病毒感染的个体给药。对于那些潜伏期或急性期的个体都可以用此免疫原性肽单独治疗或与其它适当的治疗合并使用。在治疗应用中，此组合物应以足以诱发对病毒或肿瘤抗原有效 CTL 反应的剂量对病人给药，以便能治愈或者至少部分地抑制其症状和/或并发症。这种适合于达到

的剂量被称为“治疗有效剂量”。对此用途有效的剂量，取决于如此肽组成，给药方式，被治疗疾病的病程阶段和严重程度，病人的体重和一般的健康状况，以及处方医生的判断，但是，对于一个 70kg 的病人，一般用于初次免疫的剂量（对于治疗或预防性给药）是约 1.0 $\mu$ g - 5 5000 $\mu$ g 肽，随后进行几周至几个月的加强免疫，剂量为大约 1.0 $\mu$ g - 1000 $\mu$ g 肽，取决于根据对病人血液测定的特异性 CTL 活性而表现的病人反应和状态。必须记住，本发明的这种肽和组合物通常可能是用于严重的疾病状态，即威胁生命的或可能威胁生命的情况。在这种情况下，根据使外来物质减到最少的原则，以及这种肽相对非毒性的性质，使治疗医生感到理想的是，有可能以基本上过量的这种肽组合物给药。  
10

用于治疗时，在患病毒感染的早期症兆时，或者在肿瘤检测或手术切除后，或者对急性感染诊断之后，都应立即开始给药。随后再以加强剂量给药，直到至少症状基本消除并持续一段时间。对于慢性感染，可能需要加大剂量，随后再给予加强剂量。

15 用本发明的组合物治疗感染病人，对急性感染病人可加速感染的消除。对那些易感性的（或倾向于）发展成慢性感染的病人，给予该组合物对于防止从急性感染演变成慢性感染是特别有用的方法。例如，当在感染之前或在感染过程中发现是易感性病人，如在此所述，此组合物可针对它们给药，从而使对较大群体给药的必要性降至最小。

20 此肽组合物还可用于治疗慢性感染，刺激免疫系统消除携带者中病毒感染的细胞，重要的是以一种给药制剂和模式提供能足以有效地刺激细胞毒性 T 细胞反应的一定量免疫加强肽。因此，用于慢性感染的治疗时，对于 70kg 的病人，每人代表性的剂量范围是大约每剂 1.0 $\mu$ g - 5000 $\mu$ g，优选地是大约 5 $\mu$ g - 1000 $\mu$ g。免疫剂量之后随之在确定的时  
25 间间隔给予加强剂量，例如可能需要 1 - 4 周的时间，或者可能需要更长的时间，以便有效地免疫个体。对于慢性感染，给药应该持续到至少临床症状或实验室检测表明病毒感染已被消除，或者基本上消除，并再持续一段时间。

30 打算将用于治疗的药剂组合物以非经肠道的，表面的，局部的或口服的形式给药。优选地该药剂组合物是非经肠道给药，例如静脉内、皮下、皮内或肌内注射给药。因此，本发明提供了用于非经肠道给药的组合物，它包含有溶解于或混悬于所允许的载体中的免疫原性肽溶液，优

选的载体是水性载体。各种水性载体都可使用，例如水，缓冲的水，0.9 % 生理盐水，0.3 % 甘氨酸，透明质酸等。可通过常规的，熟知的灭菌技术将这种组合物灭菌，或者过滤除菌。形成的水溶液可以被包装待直接使用，或者被冷冻干燥，给药之前将冷冻干燥的制剂与灭菌溶液合并。当要求近似生理条件时，本组合物还可以含有药剂学可接受的辅助物质，如 pH 调节剂和缓冲剂，张力调节剂、湿润剂等，例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。

本发明药物制剂中 CTL 刺激肽的浓度范围可能广泛地变化，即按重量可从小于大约 0.1 %，通常是或至少是大约 2 %，到大至 20 % - 50 % 或更多些，主要根据所选用的特定给药方式取决于溶液的体积，粘度等因素。

本发明的肽还可以通过脂质体给药，使此肽以特定的细胞组织如淋巴样组织为目标，脂质体还可用于增加肽的半衰期，脂质体包括乳剂、泡沫、微胶粒、不溶性单层、液晶、磷脂分散体、片层等多种形式。在这些制剂中，待给药的肽是作为脂质体的一部分混合在其中，单独地或者与结合于如受体的分子形成共轭体，此受体如单克隆抗体广泛存在于淋巴样细胞中，与 CD45 抗原结合，或者还可以与其它治疗或免疫原性组合物结合。因此，装满本发明所需肽的脂质体可指向淋巴样细胞部位，然后脂质体在此释放出选择性治疗/免疫原性肽组合物。本发明的脂质体我们是用标准的形成囊泡的脂质构成，通常包括中性和带负电荷磷脂和固醇如胆固醇。脂质选择一般应考虑到如脂质体的大小，对酸的不稳定性，以及脂质体在血流中的稳定性。有多种方法可用于制备脂质体，如在 Szoke et al, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9 : 462 ( 1980 ) , U. S. Patent Nos, 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028 和 5,019,369 中所述，在此引入作为参考。

为了以免疫细胞为目标，被掺入脂质体的配体包括例如对所要求免疫系统细胞表面抗原决定簇特异性的抗体或其片段。含有肽的脂质体悬液可以通过静脉内注射或局部、表面等方式给药，剂量可改变，取决于特别是给药方式，所给予的肽，和所治疗疾病的病程。

对于固体制剂，可使用常规的无毒固体载体，包括例如药品级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗

糖、碳酸镁等。用于口服给药时，可通过掺入如下成分形成药剂学可接受的无毒组合物：任何正常采用的赋形剂如上面所列举的那些载体，以及通常 10 - 95% 活性成分，即一种或几种本发明的肽，更优选的浓度是 25% - 75%。

5 用于气雾剂给药时，该免疫原性肽优选地是以微分散的形式，随同表面活性剂和抛射剂一起施用。肽的重量百分数一般是 0.01% - 2%，优选地是 1% - 10%。当然表面活性剂必须是无毒的，并优选地在抛射剂中是可溶性的。代表性的这种试剂是脂肪酸的酯或部分酯，此脂肪酸可以是含有 6 - 22 个碳原子的，如带有脂肪酸多元醇或其环酐的己酸、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、油硬脂酸(olesteric acid)、和油酸。还可采用混合酯，如混合的或天然的甘油酯。表面活性剂可能构成组合物重量的 0.1% - 20%，优选地是 0.25 - 5%。组合物的平衡剂通常是抛射剂。需要时还可以包含一种载体，如用于鼻内给药的卵磷脂。

15 本发明的另一方面是针对疫苗，它含有作为活性成分的在此所述的致免疫有效剂量的免疫原性肽。这种肽可以被引入宿主，包括人，与其自身的载体连接，或者作为活性肽单位的均聚体，或杂聚体。这种多聚体具有增加免疫反应的优点，在此不同的肽被用于构成多聚体，以及对于与病毒或肿瘤细胞的不同抗原决定簇反应的抗体和/或 CTLs 增加的诱导能力。本领域熟知的有用载体包括例如，甲状腺球蛋白、白蛋白如牛血清白蛋白、破伤风类毒素、聚氨基酸如聚(赖氨酸：谷氨酸)、乙型肝炎病毒核心蛋白、乙型肝炎病毒重组疫苗等。此疫苗还可以含有生理耐受的(可接受的)稀释剂如水、磷酸缓冲盐水、或生理盐水，通常还可包括一个佐剂。佐剂如不完全 Freund's 佐剂，磷酸铝、氢氧化铝，或明矾都是本领域熟知的材料。并且如上所述，借助于本发明的肽与脂质如 P<sub>3</sub>CSS 的结合肽也可以激发 CTL 反应。当用在此所述的肽组合物通过注射、喷雾、口服、透皮或其它途径给药免疫时，宿主的免疫系统对此疫苗发生反应，产生大量对所需抗原特异性的 CTL，该宿主变成对以后的感染至少有部分地免疫作用，或者对发展成慢性感染有抗性。

30 用含有本发明肽的疫苗组合物对病毒感染敏感的或者是处于病毒感染危险中的病人，或对癌症病人给药，可诱发对抗这种抗原的免疫反

应，并因此提高了病人自身的免疫反应能力。这样的剂量被称为“致免疫有效剂量”。使用时其确切的用量同样取决于病人的健康状况和体重，给药方式，制剂的性质等，但是，对于一个 70kg 的病人，通常的剂量范围是大约  $1.0\mu\text{g} - 5000\mu\text{g}$ ，更普遍地是大约  $10\mu\text{g} - 500\mu\text{g}/70\text{kg}$  体重。

在某些情况下理想的可能是，将本发明的肽疫苗与对所针对的病毒，特别是对病毒外膜抗原诱发中和抗体反应的疫苗合并使用。

为用于治疗或免疫的目的，也可以将本发明的肽用通常的减毒病毒宿主，如牛痘或家禽痘来表达。此方法包括使用牛痘病毒作为表达编码本发明肽的核苷酸序列的载体。当被导入急慢或慢性感染的宿主或非感染的宿主时，重组的牛痘病毒表达该免疫原性肽，并因此诱发宿主的 CTL 反应。在免疫方案中使用的牛痘载体及方法，在例如 U. S. Patent 4,722,848 中已有描述，在此引入作为参考。另一个载体是 BCG (Bacille Calmette Guerin)。BCG 在 Stover 等，Nature 351 : 456 - 460 (1991) 中被描述了，此文在此引入作为参考。根据在此的描述，本领域的技术人员显然可以发现其它多种可用于本发明的肽治疗给药或免疫的载体如伤寒沙门氏菌载体等。

还可以用编码一种或几种本发明肽的核酸对病人给药。这种方法已在例如 Wolff et al. Science 247 : 1465 - 1468 (1990)，以及 U. S. Patent Nos. 5,580,859 和 5,589,466 中被描述了。

为了给予编码本发明肽的核酸，优选的方法是使用编码本发明多表位的小基因构建体。为了产生编码所选择 CTL 表位的 DNA 序列（小基因）用于在人细胞中表达，可将该表位的氨基酸序列进行反翻译。一分人密码子使用表被用于指导每个氨基酸的密码子选择。这些编码表位的 DNA 序列被直接相连，产生连续的多肽序列。为了使表达和/或免疫原性最优化，可将补充成分掺入小基因的设计中。可被逆翻译并包含在小基因序列中的氨基酸序列的例子包括：辅助 T 淋巴细胞表位，前导（信号）序列，以内织网保留信号（retention signal）。此外，MHC 对 CTL 表位的呈递可通过引入合成的（如聚丙氨酸）或邻接于 CTL 表位的天然存在的侧翼序列来增强。

通过装配编码小基因正链和负链的寡核苷酸，可将小基因序列转化成 DNA。应用已知的技术在适当的条件下可合成重叠的寡核苷酸（30

- 100 碱基长度），并使之磷酸化，纯化和退火。用 T4 DNA 连接酶可将寡核苷酸的末端连接起来。然后可将这种合成的编码 CTL 表位多肽的小基因克隆进入所需的表达载体。

为了确保在靶细胞中的表达，载体中应包含本领域技术人员熟知的标准调节序列。需要几个载体成分：一个启动子，带有用于小基因插入的下游克隆位点；一个加 poly (A) 信号，用于有效地终止转录；E.coli 复制起点；以及 E. coli 选择性标记（例如氨苄青霉素和卡那霉素抗性）。许多启动子可用于此目的，例如人巨细胞病毒（hCMV）启动子。其它适合的启动子序列可参见 U. S. Patent Nos. 5, 580, 859 和 5, 589, 466。

为了使小基因表达和免疫原性最佳化，可能需要对载体作进一步修饰。在某些情况下，为了有效的基因表达需要内含子，可以将 1 个或几个合成的或天然存在的内含子掺入到小基因的转录区中。为了增加小基因表达，还可以考虑加入 mRNA 稳定化序列。最近有人提出，免疫刺激序列（ISSs 或 CpGs）对 DNA 疫苗的免疫原性有作用。如果想提高免疫原性，可将这些序列引入载体中，在小基因编码序列的外边。

在某些实施方案中，可使用双顺反子表达载体，以便有可能产生为了提高或减弱免疫原性而引入的小基因编码的抗原表位和第二蛋白质。如果共表达时，可能有利于提高免疫反应的蛋白或多肽包括细胞因子（如 IL 2、IL 12、GM - CSF），细胞因子诱导分子（如 LeIF）或共刺激分子。辅（HTL）表位可能与细胞内靶标信号相连接，分别从 CTL 表位表达。这可能使 HTL 表位指向不同于 CTL 表位的细胞区室。如果按此要求，这有可能促进 HTL 表位更有效地进入 MHC II 类分子的路径，因而促进 CTL 诱导作用。与 CTL 诱导相反，通过免疫抑制分子（如 TGF - β）的共同表达，特异性地降低免疫反应可能有利于某些疾病。

一旦选择了一个表达载体，可将小基因克隆进入启动子下游的多接头区。将此质粒转化进入适当的 E. coli 株，并用标准的技术制备 DNA。用限制性作图和 DNA 序列分析法可证实小基因的定位和 DNA 序列，以及包含在载体中的其它成分。包藏有适当质粒的细菌细胞可作为主细胞库和工作细胞库被保存起来。

通过在 E. coli 中发酵，产生治疗量质粒 DNA，随后进行纯化。取出等分量工作细胞，用于在发酵培养基（如 Terrific 液体培养基）中孵

育，按照熟知的技术使之在摇瓶或生物反应器中生长至饱和。可用标准的生物分离技术将质粒 DNA 纯化，例如用 Quiagen 提供的固相阴离子交换树脂纯化。如果需要，可用凝胶电泳或其它方法从开环和线型 DNA 中分离出超螺旋 DNA。

5 纯化的质粒 DNA 可以多种制剂形式用于注射给药。最简单的制剂是在无菌磷酸缓冲盐水（PBS）中重配的冷冻干燥 DNA。被称为“裸露 DNA”的这种形式目前正被临床试验用于肌肉内（IM）给药。为了使小基因 DNA 疫苗的免疫治疗作用达到最大，可能需要另一种方法用于配制纯化的质粒 DNA。各种方法已被描述，还可以利用新技术。  
10 在此制剂中还可以使用阳离子脂质（参见例如在 Debs and Zhu  
（1993）WO 93/24640；Mannino and Gould - Fogerite（1988）  
BioTechniques 6（7）：682 - 691；Rose U.S. Pat. No. 5,279,833；  
Brigham（1991）WO 91/06309，以及 Felgner et al（1987）Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA 84：7413 - 7414 中所述）。此外，还可以将糖脂，  
15 融合脂质体、肽，以及共同称为保护，相互作用，非凝缩化合物（PINC）  
的化合物，复合到纯化的质粒 DNA 中，以便影响如下各种可变因素：  
稳定性，肌肉内的弥散作用，或者对特定器官或细胞类型的定向。

20 此核酸还可以用投射给药法（ballistic delivery）给药，如在 U. S.  
Patent No. 5,204,253 中所述。可给予仅含有 DNA 的颗粒。另一种方  
法是，DNA 可被粘附在颗粒上，如金颗粒。

靶细胞致敏作用可用作对小基因编码的 CTL 表位的表达和 MHC  
I 类分子呈递进行功能测定，质粒 DNA 被导入适合作为标准 CTL 铬释  
放测定法靶标的哺乳动物细胞株，所采用的转染法取决于最后的制剂形  
式。电穿孔法可用于“裸露”的 DNA，而阳离子脂质使之有可能在体  
25 外直接转染。表达绿色荧光蛋白（GFP）的质粒可以被共转染，以便  
有可能用荧光激活细胞分类术（FACS）富集转染的细胞。然后用铬 -  
51 标记这些细胞，用作表位特异性 CTL 株的靶细胞。通过<sup>51</sup>Cr 释放测  
定的细胞溶解，表明产生了小基因编码 CTL 表位的 MHC 呈递。

30 用于小基因 DNA 制剂功能测定的第二种方法是体内免疫原性试  
验。用 DNA 产物免疫表达人适当 MHC 分子的转基因小鼠。免疫给药  
剂量和途径取决于制剂形式（如对于 PBS 中配制的 DNA IM 给予，对  
于 DNA 的脂质复合物 IP 给予）。免疫 21 天之后，收集脾细胞，在编

码每种待测表位的肽存在的情况下，对脾细胞再刺激 1 周。用标准的技术测定这些效应细胞（CTLs）作为载有肽的<sup>51</sup>铬标记靶细胞的细胞溶解作用。由于 MHC 载有相应于小基因编码的表位的肽而致敏的靶细胞溶解，证明了 DNA 在体内诱导 CTL 的疫苗功能。

5 抗原肽也可以用于离体诱导 CTL。所形成的 CTL 可用于治疗病人的慢性感染（病毒或细菌感染）或肿瘤，所述病人对其它常规的治疗方式没有反应，或者对肽疫苗治疗法也没反应。通过在组织培养中共同温育人的 CTL 前体细胞（CTLp）和抗原呈递细胞（APC）源，以及适当的免疫原性肽，可诱导对特定抗原（感染性抗原或肿瘤抗原）的离体  
10 CTL 反应。在适当的温育时间（一般是 1 - 4 周）后，其中的 CTLp 被激活，生长成熟，增大成为 CTL 效应细胞，将这种细胞输回给病人，它们将破坏其特异性靶细胞（感染细胞或肿瘤细胞）。为了使产生特异性的细胞毒 T 细胞的体外条件最佳化，对刺激细胞的培养应保持在适当的无血清培养基中。

15 在将刺激细胞与待激活细胞如前体 CD8+ 细胞共同温育之前，先将一定量抗原肽加入到刺激细胞培养物中，此加入量足以使之装载在将被表达在刺激细胞表面的人 I 类分子上。在本发明中，足够的肽量是在每个刺激细胞的表面能表达约 200 个，优选地是 200 个或更多些，装载有肽的人 I 类 MHC 分子。优选刺激细胞与大于 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的肽共同温育。

20 然后将静止的或前体 CD8+ 细胞在适当的刺激细胞培养物中温育足以激活 CD8+ 细胞的一段时间。优选地是，CD8+ 细胞是以抗原特异性方式被激活。静止的或前体 CD8+（效应）细胞与刺激细胞之比可能各不相同，可能更多地取决于各种可变因素如个体的淋巴细胞对培养条件的适应性以及疾病或其它使用此处所述的治疗模式的状况的性质  
25 和严重程度。但是，淋巴细胞：刺激细胞的比率优选地是在大约 30 : 1 至 300 : 1 的范围之内。对效应细胞/刺激细胞的培养可能需要维持足够长的一段时间，以便能刺激形成治疗有用或有效数量的 CD8+ 细胞。

30 在体外对 CTL 的诱导，需要一种肽的特异性识别作用，这种肽已连接于 APC 上的等位基因特异性 MHC I 类分子。每个 APC 上特异性 MHC/肽复合物的数目，对于刺激 CTL，特别是在初级免疫反应中是决定性的。虽然每个细胞上有少量肽/MHC 复合物就足以使细胞对被 CTL 溶解变得敏感，或者足以激活次级 CTL 反应，但是要在初级反应过程

中成功地激活 CTL 前体 ( pCTL ) 需要相当大量的 MHC/肽复合物。细胞上的空载主要组织相容性复合物分子装载肽可诱导初级细胞毒 T 淋巴细胞反应。细胞上的空载主要组织相容性复合物分子装载肽也能够诱导初级细胞毒 T 淋巴细胞反应。

5 因为不是每种人 MHC 等位基因都存在突变型细胞株，所以最好采用一种技术从 APC 表面除去内源性 MHC 结合肽，随后将需要的免疫原性肽装载在所形成的空载 MHC 分子上。为了设计目的在于发展离体 CTL 治疗的 CTL 诱导方案，理想的是使用非 - 转化的（非 - 肿瘤源的）细胞，非 - 感染的细胞，而优选的是病人的自体细胞作 APC。本专利  
10 申请公开了从 APC 表面剥去内源性 MHC - 结合肽，然后装上所需肽的方法。

稳定的 MHC I 类分子是由如下成分构成的三聚体复合物： 1 ) 一个通常 8 - 10 个残基的肽， 2 ) 一条在其  $\alpha_1$  和  $\alpha_2$  结构域具有肽结合位点的跨膜多形性蛋白质重链，和 3 ) 一条非共价结合的非多形性蛋白质轻链，  $\beta_2$  - 微球蛋白。从该复合物除去结合的肽和 / 或分离出  $\beta_2$  微球蛋白，将使 MHC I 类分子丧失功能，变得不稳定，导致迅速降解。所有从 PBMCs 分离出的 MHC I 类分子都带有与它结合的内源性肽。因此，在对它们加入外源性肽之前，第一步是除去 APC 上结合于 MHC I 类分子的所有内源性肽，而不引起它们降解。  
15

20 使 MHC I 类分子完全除去结合肽的二种可能的途径包括，降低培养温度，从 37 °C 降至 26 °C，培养过夜，使  $\beta_2$  微球蛋白不稳定，以及用温和的酸处理，从细胞上脱去内源性肽。这种方法将原先结合的肽释放到细胞外环境中，并允许新的外源性肽结合于空载的 I 类分子。这种冷 - 温孵育法使外源性肽能有效地结合于 MHC 复合物，但需要在 26 °C 培养过夜，这可能降低了细胞的代谢速度，也很可能通过冷温培育过程使不主动合成 MHC 分子的细胞（如静止的 PBMC ）不能产生多量表面空载的 MHC 分子。  
25

30 生硬的酸剥离法包括用三氟乙酸在 pH 2 提取肽，或者使免疫亲和纯化的 I 类分子 - 肽复合物酸变性。这些方法对 CTL 诱导是不可行的，因为重要的是除去内源性肽，但同时保持 APC 的活性，并使代谢状态最佳化，这些对于抗原的呈递是至关重要的。 pH 3 的温和酸溶液如甘氨酸或柠檬酸盐 - 磷酸盐缓冲液已被用于鉴别内源性肽，并被用于鉴别

肿瘤结合的 T 细胞表位。这种处理特别有效，因为其仅使 MHC I 类分子不稳定（并分离出释放的肽），而其它表面抗原包括 MHC II 类分子仍保持原样。最重要的是，用温和的酸溶液处理细胞不影响细胞的活性或代谢状态。温和的酸处理法是快速的，因为在 4 °C 二分钟内就发生了内源性肽的剥离，并且在装载了适当的肽之后，APC 可立即执行其功能。在此该技术被用于使肽特异性的 APCs 产生初级抗原特异性 CTL。所形成的 APC 对诱导肽特异性 CD8+ CTL 是有效的。

用各种已知的方法之一，可将活化的 CD8+ 细胞从刺激细胞中有效地分离出来。例如，对刺激细胞，对装载在刺激细胞上的肽，或者对 CD8+ 细胞（或者其碎片）特异性的单克隆抗体，都可用于结合它们适当的互补配体。然后借助于适当的方法如周知的免疫沉淀或免疫检测法，从刺激细胞 - 效应细胞混合物中分离出抗体标记的分子。

活化 CD8+ 细胞的有效的细胞毒量，对于体外和体内应用可各不相同，并且随这些杀伤细胞的最终靶细胞的数量和类型不同而变化。这种细胞量还随病人的状况不同而不同，应该由专业人员通过考虑所有的适合因素来决定。但是用于成年人优选地是大约  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^{12}$  个活化的 CD8+ 细胞，更优选地是大约  $1 \times 10^8 - 1 \times 10^{11}$ ，更加优选地是大约  $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ ，相比之下用于小鼠的是大约  $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$  个细胞。

如上面所述优选的情况是，在对待治疗病人给予 CD8+ 细胞之前，从细胞培养物中收集活化的 CD8+ 细胞。但是，重要的是应注意，不同于其它目前和提议的治疗方式，本治疗方法是使用非致肿瘤性细胞培养系统。因此，如果没有达到将刺激细胞和活化的 CD8+ 细胞完全分离，就没有已知的与给予少量刺激细胞有关的内在危险性，而给予哺乳动物促肿瘤细胞可能是极端冒险的。

重复导入细胞成分的方法是专业人员熟知的，包括例如那些在 U. S. Patent No. 4, 844, 983 中 Honsik et al 和 U. S. Patent No. 4, 690, 915 中 Rosenberg 所引证的程序，例如通过静脉内输注给予活化的 CD8+ 细胞是适当的。

本发明的免疫原性肽还可以用于制造单克隆抗体。这种抗体可能用作潜在的诊断剂或治疗剂。

这种肽也发现可用作诊断试剂。例如，本发明的肽可用于测定某一

特定病人对应用肽或相关肽的治疗方案的敏感性，因而可能有助于修改现有的治疗方案，或确定受害病人的预后。此外，这种肽还可以用于预测哪些病人将处于发展成慢性感染的真实危险中。

为了鉴别本发明的肽，按在相关申请中所述进行 I 类分子抗原的分离，并对天然形成的肽进行分离和测序。然后用这些肽限定对如下每个等位基因 A3.2、A1、A11 和 A24.1 特异性结合的基元。在相关的申请中已对这些基元进行了描述，下面在表 5 - 8 中给予概括。

表 5

对 HLA - A3.2 等位基因 - 特异性基元的总结

	位置	保守残基
10	1	-
	2	V, L, M
	3	Y, D
	4	-
15	5	-
	6	-
	7	I
	8	Q, N
	9	K
20	10	K

表 6

对 HLA - A1 等位基因 - 特异性基元的总结

	位置	保守残基
25	1	-
	2	S, T
	3	D, E
	4	P
	5	-
	6	-
30	7	L
	8	-
	9	Y

表 7

对 HLA - A11 等位基因 - 特异性基元的总结  
位置 保守残基

	1	-
5	2	T, V
	3	M, F
	4	-
	5	-
	6	-
10	7	-
	8	Q
	9	K
	10	K

表 8

对 HLA - A3.2 等位基因特异性基元的总结  
位置 保守残基

	1	-
15	2	Y
	3	I, M
20	4	D, E, G, K, P
	5	L, M, N
	6	V
	7	N, V
	8	A, E, K, Q, S
25	9	F, L
	10	F, A

## 实施例 1

## 免疫原性肽的鉴定

用上面鉴定的对各种 MHC I 类等位基因的基元，分析来自各种病  
30 毒和肿瘤相关的蛋白质是否存在这些基元。按在相关申请中所述进行筛选。  
表 9 中给出了对这些抗原的查找结果。

上面的叙述仅对本发明提供说明，而不是限制它的范围。本发明的

其它变化形式对本领域的每个普通的技术人员都是显而易见的，这些将包括在所附权利要求中。所有在此被引证的刊物，专利，以及专利申请都被引入作为参考。

表 9

序列号	氨基酸数目	序列	来源	起点或基元
1	9	HSNLNDTTY	FLU A NP 140	A03
2	9	FVEALFQEY	聚腺苷酸 CSP	A03/A11
3	9	AADAAAAAY	A1 poly-A	A01
4	9	DADAAAAAY	A1 poly-A	A01
5	9	AADSAAAAY	A1 poly-A	A01
6	9	AADAPAAAY	A1 poly-A	A01
7	9	AADAAAQAY	A1 poly-A	A01
8	9	QADAAAAAY	A1 poly-A	A01
9	9	AADADAAAAY	A1 poly-A	A01
10	9	AADAGAAAAY	A1 poly-A	A01
11	9	AADAAKAAY	A1 poly-A	A01
12	9	AADAAAPAY	A1 poly-A	A01
13	9	AADAAAAPY	A1 poly-A	A01
14	9	ATAAAAAAAY	A1 poly-A	A01
15	9	DTAAAAAAAY	A1 poly-A	A01
16	9	ATASAAAAAY	A1 poly-A	A01
17	9	ATAAAPAAAY	A1 poly-A	A01
18	9	ATAAAAAQAY	A1 poly-A	A01
19	9	ATAAAAAKY	A1 poly-A	A01
20	9	QTAAAAAAAY	A1 poly-A	A01
21	9	ATAADAAAAY	A1 poly-A	A01
22	9	ATAAGAAAAY	A1 poly-A	A01
23	9	ATAAAKAAY	A1 poly-A	A01
24	9	ATAAAAAPAY	A1 poly-A	A01
25	9	ATAAAAAAPY	A1 poly-A	A01
26	9	TYLISSIPL	GCDFP-15 70	A24
27	9	FYTNRTVQI	GCDFP-15 102	A24
28	10	PLOGAFNYKY	GCDFP-15 77	A01
29	10	LCDDNPKTFY	GCDFP-15 90	A01
30	9	TTNLRPTTY	GAD 21	A01
31	9	CLELAEYLY	GAD 483	A01
32	9	LLSPRPISY	HCV NS3 1157	A01
33	9	LLSPRPVSY	HCV NS3 1157	A01
34	9	PTVTVFHVY	HSV-1 POL 142	A01
35	9	ETAGRHVGY	HSV-1 POL 688	A01
36	9	GSGPELLFY	HSV-1 TERM 612	A01

序列号	氨基酸数目	序列	来源	起点或基元
37	9	LSPQWVADY	HSV-1 ENV 143	A01
38	9	VVERTDVYY	HSV-1 POL 252	A01
39	9	SLEHTLCTY	HSV-1 ENV 587	A01
40	9	PSQRHGSKY	Hu MBP 6	A01
41	9	CSAVPVYIY	Hu PLP 169	A01
42	9	LTFMIAATY	Hu PLP 255	A01
43	9	GTASFFFY	Hu PLP 74	A01
44	9	GTEKLIETY	Hu PLP 42	A01
45	9	TTWCSQTSY	LCMV GP 217	A01
46	9	RTWENHCTY	LCMV GP 233	A01
47	9	OSSINISGY	LCMV NUC 232	A01
48	9	IITEMLRKDY	LCMV GP 417	A01
49	9	QSSFYSDWY	M. Tuherc. 85A/3	A01
50	9	SSALTLAIY	M. Tuherc. 85A/3	A01
51	9	ATWLGDDGY	M. Tuherc. cat/p	A01
52	9	QSTSINLPY	M. Tuherc. DNAK	A01
53	9	QSSFYSDWY	M. Tuherc. 7S	A01
54	9	YABELMTADY	M. Tuherc. POL	A01
55	9	STNEVTRIY	PSM 348	A01
56	9	RVDCTPLMY	PSM 463	A01
57	9	RGRRQPIPK	HCV CORE 59	A03/A11
58	9	KTKRNTNRR	HCV CORE 10	A03/A11
59	9	LGFGAYMSK	HCV NS3 1267	A03/A11
60	9	VAGALVAFK	HCV NS4 1864	A03/A11
61	9	NFISGIQYL	HCV NS4 1772	A24
62	9	FWAKHMWNF	HCV NS4 1765	A24
63	10	EVDGVRLHRY	HCV NS5 2129	A01
64	10	DLSGWVFVAGY	HCV NS5 2999	A01
65	10	AACNWTRGER	HCV NS1/E2 647	A03/A11
	9	KVYLAWVPA	HTV-1 POL 74	A03
67	9	TLFCASDAK	HTV-1 ENV 82	A03/A11
68	9	1SLWDQSLK	HTV-1 ENV 78	A03/A11
69	9	RIVELLGRR	HTV-1 ENV 53	A03/A11
70	9	MVHQAISPR	HTV-1 GAG 45	A03/A11
71	9	TIKIGGQLK	HTV-1 POL 65	A03/A11
72	9	KLVSAGIRK	HTV-1 POL 57	A03/A11
73	9	KGLGISYGR	HTV-1 TAT 77	A03/A11

序列号	氨基酸数目	序列	来源	起点或基元
74	9	GLGISYGRK	HIV-1 TAT 77	A03/A11
75	9	VMTVVQVDR	HIV-1 VIF 83	A03/A11
76	9	OMAVFIHNF	HIV-1 POL 92	A03/A24
77	9	SMTKILEPF	HIV-1 POL 87	A03/A24
78	9	IWGCGSGKLI	HIV-1 ENV 69	A24
79	9	LYKYKVVVKI	HIV-1 ENV 49	A24
80	9	VWKEATITL	HIV-1 ENV 47	A24
81	9	GWMTNNPPI	HIV-1 GAG 31	A24
82	9	RFAVNPGLL	HIV-1 GAG 26	A24
83	9	PYNTPVFAI	HIV-1 POL 74	A24
84	9	WWAGIKQEF	HIV-1 POL 70	A24
85	9	LWQRPLVTI	HIV-1 POL 61	A24
86	9	IYETYGDTW	HIV-1 VPR 92	A24
87	9	PYNEWTLEL	HIV-1 VPR 56	A24
88	10	ILQOLLFIH	HIV-1 VPR 72	A03
89	10	TTLFCASDAK	HIV-1 ENV 81	A03/A11
90	10	LLGIWGCSGK	HIV-1 ENV 73	A03/A11
91	10	IISLWDQSLK	HIV-1 ENV 66	A03/A11
92	10	LLQLTVWGIK	HIV-1 ENV 61	A03/A11
93	10	SILDHQGPK	HIV-1 GAG 72	A03/A11
94	10	OMVHOAISPR	HIV-1 GAG 45	A03/A11
95	10	TAVOMAVFIH	HIV-1 POL 88	A03/A11
96	10	ISPIETVPVK	HIV-1 POL 87	A03/A11
97	10	LGIPHPAGLK	HIV-1 POL 87	A03/A11
98	10	PAIFQSSMTK	HIV-1 POL 78	A03/A11
99	10	KVYLAWVPAH	HIV-1 POL 74	A03/A11
100	10	DIIATDIOTK	HIV-1 POL 67	A03/A11
101	10	VTRKIGGOLK	HIV-1 POL 65	A03/A11
102	10	KAACWWAGIK	HIV-1 POL 65	A03/A11
103	10	VSQIIEQLIK	HIV-1 POL 61	A03/A11
104	10	KGLGISYGRK	HIV-1 TAT 77	A03/A11
105	10	VWKEATITLF	HIV-1 ENV 47	A24
106	10	YWQATWIPEW	HIV-1 POL 96	A24
107	10	VYYDPSKDLI	HIV-1 POL 70	A24
108		ALAAGAAAR	A3 poly-A	A03
109		AAAAGAAAK	A3 poly-A	A03
110	9	AFLPWHRLF	Tyrosinase	A24

序列号	氨基酸 数目	序列	来源	起点或 基元
111	9	AYGLDFYIL	p15	A24