

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 19/00

A61K 39/395



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99806643.5

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1207306C

[22] 申请日 1999. 6. 21 [21] 申请号 99806643. 5

[30] 优先权

[32] 1998. 6. 20 [33] US [31] 09/100,409

[86] 国际申请 PCT/US1999/014030 1999. 6. 21

[87] 国际公布 WO1999/067294 英 1999. 12. 29

[85] 进入国家阶段日期 2000. 11. 27

[71] 专利权人 美国联合生物医学公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 王长怡

审查员 安玉苹

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 胡交宇

权利要求书 4 页 说明书 87 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用于预防和治疗 HIV 感染和免疫疾
病的肽组合物

[57] 摘要

本发明提供了含有一种与 CD4 的 CDR-2 类结构域的一部分同源的序列的肽，所述的序列与辅助 T 细胞表位共价相连，并任选地与其它免疫刺激序列相连。本发明提供了这种肽作为免疫原诱导哺乳动物产生高滴度的多克隆自体抗体的应用，这种抗体对 CD4 表面复合体具有特异性。这些自体抗体防止 HIV 病毒颗粒与 CD4+ 细胞的结合。这些肽可用于药物组合物种，提供针对 HIV 感染的免疫治疗，以及防止 HIV 感染。

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

1. 一种 CD4-CDR2 抗原肽，其中所述抗原肽长度在 30 到 46 个氨基酸之间；其中所述 CD4-CDR2 抗原肽含有由 28 到 40 个氨基酸残基的插入序列分隔开的两个半胱氨酸残基，并且其中所述插入序列是 SEQ ID NO:1 的 27 到 66 位残基所代表的序列的一段连续部分，其中所述连续部分包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 的 CD4-CDR2 抗原肽，其中所述抗原肽选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11。

3. 一种长度为 50 到 80 个氨基酸的合成肽，其含有：

- (a) 一种辅助 T 细胞表位；
- (b) 一种按照权利要求 1 的 CD4-CDR2 抗原肽；和
- (c) 一种免疫刺激侵染素结构域。

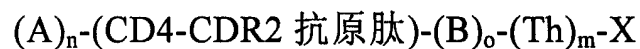
4. 一种长度为 50 到 80 个氨基酸的合成肽，其含有：

- (a) 一种辅助 T 细胞表位；
- (b) 一种按照权利要求 2 的 CD4-CDR2 抗原肽；和
- (c) 一种免疫刺激侵染素结构域。

5. 一种含有与权利要求 1 的 CD4-CDR2 抗原肽共价结合的辅助 T 细胞表位的肽。

6. 一种含有与权利要求 2 的 CD4-CDR2 抗原肽共价结合的辅助 T 细胞表位的肽。

7. 一种由下式表示的肽：



或



其中：

每一个 A 独立地为一种氨基酸，或一种一般性免疫刺激序列；

每一个 B 选自氨基酸、 $-\text{NHCH}(\text{X})\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{X})\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}(\epsilon\text{-N})\text{Lys}-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{X})\text{CH}_2\text{S}-$ 琥珀酰亚胺($\epsilon\text{-N})\text{Lys}-$ ，和 $-\text{NHCH}(\text{X})\text{CH}_2\text{S}-$ (琥珀酰亚胺)-；

5 每一个 Th 独立地为一种氨基酸序列，该氨基酸序列含有一种辅助 T 细胞表位；

CD4-CDR2 抗原肽代表权利要求 1 的一种抗原肽的序列；

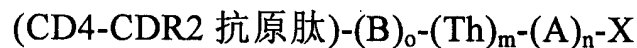
X 为一种氨基酸的 $\alpha\text{-COOH}$ 或 $\alpha\text{-CONH}_2$ ；

n 为从 0 到 10；

m 为 1；和

10 o 为从 0 到 10。

8. 一种由下式表示的肽：



或



15 其中：

每一个 A 独立地为一种氨基酸或一种一般性免疫刺激序列；

每一个 B 选自氨基酸、 $-\text{NHCH}(\text{X})\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{X})\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CO}(\epsilon\text{-N})\text{Lys}-$ 、 $-\text{NHCH}(\text{X})\text{CH}_2\text{S}-$ 琥珀酰亚胺($\epsilon\text{-N})\text{Lys}-$ ，和 $-\text{NHCH}(\text{X})\text{CH}_2\text{S}-$ (琥珀酰亚胺)-；

20 每一个 Th 独立地为一种氨基酸序列，该氨基酸序列含有一种辅助 T 细胞表位；

CD4-CDR2 抗原肽代表权利要求 1 的一种抗原肽的序列；

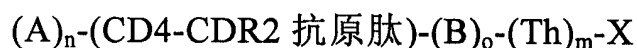
X 为一种氨基酸的 $\alpha\text{-COOH}$ 或 $\alpha\text{-CONH}_2$ ；

n 为从 0 到 10；

25 m 为 1；和

o 为从 0 到 10。

9. 一种由下式表示的肽：



或

30 $(\text{A})_n-(\text{Th})_m-(\text{B})_o-(\text{CD4-CDR2 抗原肽})\text{-X}$

其中：

每一个 A 独立地为一种氨基酸，或一种一般性免疫刺激序列；

每一个 B 选自氨基酸、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO-、-NHCH(X)
CH₂SCH₂CO(ε-N)Lys-、-NHCH(X)CH₂S-琥珀酰亚胺(ε-N)Lys-，和
5 -NHCH(X)CH₂S-(琥珀酰亚胺)-；

每一个 Th 独立地为一种氨基酸序列，该氨基酸序列含有一种辅助 T
细胞表位；

CD4-CDR2 抗原肽代表权利要求 2 的一种抗原肽的序列；

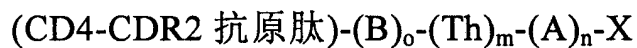
X 为一种氨基酸的 α-COOH 或 α-CONH₂；

10 n 为从 0 到 10；

m 为 1；和

o 为从 0 到 10。

10. 一种由下式表示的肽：



15 或



其中：

每一个 A 独立地为一种氨基酸或一种一般性免疫刺激序列；

每一个 B 选自氨基酸、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO-、-NHCH(X)
20 CH₂SCH₂CO(ε-N)Lys-、-NHCH(X)CH₂S-琥珀酰亚胺(ε-N)Lys-，或
-NHCH(X)CH₂S-(琥珀酰亚胺)-；

每一个 Th 独立地为一种氨基酸序列，该氨基酸序列含有一种辅助 T
细胞表位；

CD4-CDR2 抗原肽代表权利要求 2 的一种抗原肽的序列；

25 X 为一种氨基酸的 α-COOH 或 α-CONH₂；

n 为从 0 到 10；

m 为 1；和

o 为从 0 到 10。

11. 一种按照权利要求 3-10 任意之一的肽，其中所述 Th 具有一种
30 选自 SEQ ID NOS: 6、8、12、13、36、或 38-59 的氨基酸序列。

12. 一种按照权利要求 11 的肽,其中所述 Th 具有一种选自 SEQ ID NOS: 6 或 8 的氨基酸序列。
13. 一种按照权利要求 3-10 任意之一的肽,其中 n 为 3, (A)₃ 为(侵染素结构域) -Gly-Gly。
- 5 14. 一种按照权利要求 11 的肽,其中至少一个 A 部分为一种侵染素结构域。
15. 一种按照权利要求 12 的肽,其中至少一个 A 部分为一种侵染素结构域。
16. 一种按照权利要求 3-10 任意之一的肽,其中所述 CD4-CDR2
10 抗原肽选自 SEQ ID NOS: 4、5、10、或 11。
17. 一种按照权利要求 11 的肽,其中所述 CD4-CDR2 抗原肽选自 SEQ ID NOS: 4、5、10、或 11。
18. 一种按照权利要求 12 的肽,其中所述 CD4-CDR2 抗原肽选自 SEQ ID NOS: 4、5、10、或 11。
- 15 19. 一种选自 SEQ ID NOS: 32、33、34、35、或 60 的肽。
20. 一种药物组合物,其含有一种免疫有效量的权利要求 3-10 或 19 之一的肽,还含有一种药物可接受的载体。
21. 按照权利要求 20 的药物组合物,其中所述肽的所述免疫有效量在 0.5 μg 到 1 mg 每公斤体重每剂量之间。

5 用于预防和治疗 HIV 感染和免疫疾病的肽组合物

发明领域

本发明涉及肽组合物作为免疫原的应用，其中包含的每个肽包括一个由抗宿主细胞 HIV 受体/共同受体复合物的抗体识别的目标抗原性位点。该复合物包含与趋化因子受体结构域有关的 CD4。目标抗原位点是线形共价连接的环状，其串联连接（1）通过化学偶联一种载体蛋白，或优选地（2）通过化学偶联或更优选通过直接合成连接一种肽辅助 T 细胞表位和其它免疫刺激肽序列。更具体地说，本发明涉及该肽组合物作为诱导健康哺乳动物包括人产生高效价抗体的免疫原的应用，所述抗体具有抗 1 型 HIV（HIV-1）所有进化枝的原代分离株和 2 型 HIV（HIV-2）原代分离株的广泛的中和活性。本发明还涉及将所述肽组合物用作免疫原预防和治疗免疫缺陷病毒感染以及治疗不希望的免疫应答例如移植排斥、自体免疫疾病例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、和牛皮癣的方法。

20

发明背景

虽然 14 年以来由于 HIV 的发现和表征对其疫苗已有深入研究，但对 HIV 疫苗和免疫治疗的发展还存在重大障碍。这些障碍包括 HIV-1 的变异性、对该病毒结构缺乏认识、以及对预防 HIV 感染必需的免疫应答缺乏了解。参见 D. Burton 和 J. Moore, 天然药物 (Nature Medicine), 1998, 4:496-48。美国政府 AIDS 疫苗研究委员会首脑于 1998 年 2 月 1 日声称，预防 AIDS 的安全疫苗距测试仍然需要十年以上，因为关于身体免疫系统如何工作仍然有很多还处于未知状态 (<http://cnn.com/HEALTH/9802/01/aids.vaccine.search>)。

5 早先对于有效的重组 HIV-1 包膜亚单位疫苗（例如，gp120 和 gp160 疫苗产品）很乐观，已知来自几个临床实验的疫苗血清能够体外中和 HIV-1 的实验室分离体（Belshe 等，美牛皮癣国医学协会杂志（J. Am. Med. Assoc.），1994,272:475; Keefer 等，AIDS 研究，人逆转录病毒（AIDS Res. Hum Retroviruses），1994，10：1713）。当发现这种疫苗血清对于中和 HIV-1 原代患者分离体大部分无效（Hanson, AIDS 研究，人类逆转录病毒，1994，10：645; Mascola 等，传染病杂志，1996，173：340）时，这种乐观动摇了。这些令人失望的结果导致 NIH 在 1994 年 6 月决定推迟几种基于 HIV 亚单位疫苗的重组包膜蛋白的花费巨大的大规模效果实验。

15 目前 HIV 疫苗的研究集中在原代分离株，其被认为在导致人类感染方面比通常使用的实验室株系更类似 HIV 株系（Sawyer 等，病毒学杂志，1994，68：1342; Wrin 等，病毒学杂志，1995，69：39）。HIV-1 的原代分离株通过患者 PBMC 或血浆与未感染的 PBMC 进行限制性培养得到。可以通过下面描述的表型轻易将原代病毒从已在人 T 淋巴细胞系中传代若干次并已在这些 T 细胞系中良好生长的 T 细胞系适应（TCLA）病毒例如 IIIb/LAI、SF2、和 MN 中分辨出来：

20 (1) 不象 TCLA 病毒，大多数原代分离株不易在 T 细胞系中生长。

(2) 不象 TCLA 病毒是全合胞体诱导性的，原代分离株包括在 PBMC 培养中诱导合胞体形成的双合胞体诱导（SI）分离体和非合胞体诱导（NSI）分离体。在 SI 原代分离株中，大多数将在，尤其是在 HIV-敏感 T 细胞系 MT2 中复制，而极少能够在通常用于培养 TCLA 分离体的几乎不许可的 T 细胞系例如 CEM 或 H9 中复制。非合胞体诱导（NSI）原代分离株仅在原代 T 细胞中复制。

25 (3) 原代分离株在体外对病毒受体蛋白 CD4（rsCD4）的重组可溶形式的中和具有高度抗性，对于等量中和比 TCLA 株系需要 200-2700 多倍的 rsCD4（Daar 等，PNAS USA，1990，87：6574-6578）。

30 (4) 原代分离株也对中和应用 gp120（包膜）疫苗诱导的抗体具有抗性。相比较而言，TCLA 株系对于对病毒包膜具有特异性的

抗体的中和是灵敏的 (Sawyer 等, 病毒学杂志, 1994, 68: 1342; Mascola 等, 1996)。

原代分离株的这些表型特征起因于 HIV 的尚不太了解的结构特征, 尤其是与抗-env 抗体相关的病毒包膜的难以研究的特性 (D. Burton 和 J. Moore, 天然药物, 1998, 4: 495-498)。病毒的变异性, 一种基因型特征, 也成为研制全世界范围有效的 HIV 疫苗的一个障碍 (Mascola 等, 1996)。这些因素共同造成研制抗易于生长的 TCLA 同型株系的针对病毒的 AIDS 疫苗的没有预期到的失败。一种研制 HIV 疫苗的替代途径可以通过以下方法进行, 干扰宿主细胞的 HIV 受体, 由此通过防止 HIV 与易感细胞结合或融合而阻断感染。针对细胞的研究提供了克服 HIV 包膜高度变异性和表型多样性的方法。

SIV 恒河猴短尾猿模型中的主动和被动免疫研究提示了进行防止 HIV 感染的针对细胞的研究, 其显示抗-细胞抗体有效地致力于保护免受感染 (Stott, 自然, 1991, 353: 393)。另外, 抗 CD4 的单克隆抗体, 一种 MHC II 类分子的 T 细胞受体和 HIV 结合的初级受体, 长期以来已经知道其在 HIV-1 中和分析中以 CD4 表位而非病毒株系依赖性方式阻断感染 (Sattentau 等, 科学, 1986; 234: 1120)。在该免疫预防研究中, 已经发现抗-CD4 单克隆抗体有效地阻断细胞被原代分离株感染 (Daar 等, 美国国家科学院科学进展, 1990, 87: 6574; Hasunuma 等, 免疫学杂志, 1992, 148: 1841)。

其它潜在有效的涉及细胞的研究包括靶向趋化因子受体 CXCR4、CCR5、CCR2b、和 CCR3, 最近它们被鉴定为 HIV 的共同受体 (Feng 等, 科学, 1996, 272: 872; Doranz 等, 细胞, 1996, 85: 1149)。这些共同受体与 CD4 一起行使功能, 启动病毒包膜糖蛋白与宿主细胞膜的后期结合相互作用以及逆转录病毒复制的后期侵入步骤 (Chackerian 等, 病毒学杂志, 1997; 71: 3932)。

进行有效 HIV 结合和融合需要 CD4 和共同受体表明这些分子之一或二者都可能是细胞-导向策略抑制感染的很好目标。抗宿主细胞 CD4/共同受体复合物的抗体已经显示影响 HIV 感染的结合和后期结

合步骤 (Wang, WO97/46697)。这些抗体中和 HIV 的合胞体诱导 (SI) 和非合胞体诱导 (NSI) 株系的病毒到细胞或细胞到细胞传送。

结合 CCR5 的趋化因子拮抗剂也显示能够有效地防止 SI 和 NSI 病毒感染 (Simmons 等, 科学, 1997, 276: 276)。中和 NSI 分离体
5 尤其有意义, 因为据信 NSI 株系负责大多数 HIV 传送, 并往往对中和
TCLA 分离体的抗-HIV 抗体具有抗性 (Fauci, 1996)。靶向 HIV 细
胞受体的试剂使人们不需要面对病毒包膜多样化表型和高变异性, 并
另外提供了潜在的针对 HIV-2 和 SIV 的中和活性 (Chen 等, 病毒学
杂志, 1997, 71: 2705; Pleskoff 等, 病毒学杂志, 1997, 71: 3259;
10 WO97/46697)。

据一个共同待审的专利申请 (WO 97/46697) 报道, 促进病毒结合
和侵入宿主 T 细胞的、包括宿主 T 细胞表面上的 CD4 和趋化因子共
同受体的宿主细胞受体/共同受体复合物是中和抗体的有效目标。在该
申请中, 发明人证明了所得到的抗体特异性地抗这种细胞表面的抗原
15 复合物。在被 HIV-1 原代分离株中和的 HPB-ALL 细胞上的细胞表面
抗原应答过程中, 没有培育出其它的抗-细胞抗体。该申请中描述的具
有所需性质的抗体能够阻断猴子被 SIV 感染、在小鼠中重建的人免疫
系统被 HIV-1 体内感染、人细胞被多样化表型和基因型的 HIV-1 原代
分离株在体外感染、以及阻断人细胞被 HIV-2 感染。这些包含 CD4
20 受体与趋化因子共同受体联合的细胞表面抗原复合物成为保护性抗-
细胞抗体的目标。

抗 CD4/共同-受体复合物的抗-细胞抗体比抗病毒包膜的抗-病毒
抗体表现更有效的抗相关 HIV 株系的中和模式。如共同待审的申请
(WO 97/46697) 所示, 产生的抗 HPB-ALL 的单克隆抗体 (MAb B4)
25 对重组的可溶性 CD4 (rsCD4) 蛋白质具有中等反应性, 同时强烈结
合 HPB-ALL 细胞。发现对 CD4/共同受体细胞表面复合物的特异性在
中和 HIV-1 原代分离株中高度有效, 但在中和 TCLA 株系中几乎无
效。相比较而言, 抗-env 抗体对 TCLA 株系的优先中和表现相反的模式。

发现 MA b B4 在体外微平板分析中以 $<10 \mu\text{g/ml}$ 的浓度中和 HIV 原代分离株。相比较而言，对于重组的可溶性 CD4 (rsCD4) 具有高滴度 ($>5 \text{Log}_{10}$) 特异性的多克隆抗体没有表现对 HIV 原代分离株的任何中和活性，尽管它们具有强烈的 T 细胞结合活性。因此，原代分离株可能对细胞表面 CD4/共同受体抗原复合物具有特异性的抗体比
5 对具有单纯 CD4 特异性的抗体优先敏感。由抗-CD4/共同受体复合物的抗体进行的 HIV 中和的广泛表征包括 MA b B4 和其类似物 MA b M2 和 MA b B13 (WO 97/46697)。

针对 CD4/共同-受体复合物的抗体的广泛的中和活性的机制还不清楚，因为那些细胞表面复合物在介导 HIV 感染过程中作用多变，正如同那些抗体具有影响 HIV 感染的结合和后期结合步骤的能力所示的那样 (Wang, WO 97/46697)。CD4/共同受体细胞表面复合物在介导 HIV 感染和发病过程中可能具有双重作用：(1) 作为 HIV 结合、细胞被 HIV 融合和侵入的 T 细胞表面受体；或 (2) 作为 HIV 抑制因
10 子。

然而，虽然这些物质对抑制 HIV 感染有效，但是上述细胞-指向的拮抗剂或抗体不能被用作预防性疫苗。以前描述的细胞-指向拮抗剂或抗体 (WO97/46697) 不是免疫原，而且不能被用作预防性疫苗。它们是被动免疫剂。需要频繁施用这些物质，以维持全部受体被占据
20 的血清浓度才能发挥它们的功效。通过主动免疫诱导抗 CD4/共同受体复合物的主动抗-自身抗体应答的疫苗对于保护性免疫应当是优选的。这种疫苗，如果能够被研制出来，应当提供长期有效的抗感染保护，同时需要少量免疫原不频繁和方便施用。

对于效果，这类疫苗的免疫原成分必需包含或类似一个 B 细胞表位，一个在宿主细胞受体/共同受体复合物上的相关位点，具有足以诱导交叉-抑制抗体的可靠性，同时保留足以避免不利免疫抑制作用的位点特异性。虽然中和 HIV 的抗-细胞抗体，包括具有中和活性的抗-CD4 抗体已经可以得到，但这类合成抗原的模拟位点目前还不容易鉴定。已报道的用于中和的抗-CD4 单克隆抗体 (Burkly 等，免疫学杂志，
30 1992, 149: 1779) 和 Wang 等报道的广泛中和的抗-CD4/共同受体的

单克隆抗体 (WO 97/46697) 识别 CD4 上的不易复制的不连续构型位点。缺乏易受攻击位点的准确知识, 从长重组免疫原中选择有用的宿主细胞抗原性目标并对其复制非常困难。通过 CD4 免疫得到的大多数抗体缺乏具有实用价值的特异性 (Davis 等, 自然, 1992, 358: 76)。

- 5 例如, rsCD4 的高滴度高免疫抗血清缺乏中和 HIV 原代分离株的活性 (WO 97/46697)。而且, 对 T 细胞抗原的广泛区域具有广泛反应性的抗体可能会过度免疫抑制 (Reimann 等, AIDS 研究, 人类逆转录病毒, 1997, 13: 933)。

另外, 虽然 CD4 的大量绘图研究已经制作出分子的结构功能图谱
10 (Sattentau 等, 科学, 1986, 234: 1120); Peterson 和 Seed, 细胞, 1988, 54: 65; Jameson 等, 科学, 1988, 240: 1335; Sattentau 等, 实验医学杂志, 1989, 170: 1319; Hasunuma 等, 免疫学杂志, 1992, 148: 1841; Burkly 等, 免疫学杂志, 1992, 149: 1779; Davis 等, 自然, 1992, 358: 76), 这些图谱没有提供预测易感效应子位点的
15 足够精确的结构模型, 从而使其可能被复制成为合成肽。公开的 CD4 模型没有公开有用的基于 CD4 的免疫原。

除了合适的位点-特异性, 有效 HIV 疫苗的受体/共同受体免疫原必需具有高度免疫刺激作用, 以便诱导足够产生保护水平的抗体应答。这些免疫原还必需设计成能够克服对自身分子表现的强烈耐受
20 性。因此, 还需要具备足够免疫力的免疫原。

本发明的一个目的在于提供具有所需的位点特异性和免疫力的肽组合物, 作为预防 HIV 感染的免疫原。

本发明的有用的合成肽免疫原的改进的免疫原性和适当的特异性已经通过一系列鉴定和设计合成肽免疫原的方法的组合而实现。这些
25 方法包括: (1) 一种有效地鉴定有效高亲和力目标表位的程序; (2) 通过引入环形限制 (cyclic constraints) 稳定合成肽上的目标位点的结构特征的方法, 从而使对自身分子的交叉反应最大化; (3) 通过将它与含有广泛反应性的混杂 T 辅助细胞 (Th) 表位混合增强 B 细胞目标表位免疫原性的方法; 和 (4) 通过应用组合的肽化学增大 T 细胞

表位的全部功能的方法，由此进一步适应远亲后代种群的变异的免疫应答性。

合成肽已经被用于“表位作图”，以鉴定用于研制新疫苗和诊断试剂的蛋白质表面的免疫结构域决定簇或表位。表位作图应用一系列目标蛋白质上对应区域的重叠肽，以鉴定参与抗体-免疫原决定簇相互作用的位点。通常，表位作图应用长度相对较短的肽，以精确检测线性决定簇。已知最快的表位作图法是 PEPSCAN，它是基于同时合成数百个偶联到固体支持物上的长度为 8-14 个氨基酸的重叠肽。检测偶联肽的结合抗体的能力。PEPSCAN 研究在定位线性连续决定簇方面有效，但对于鉴定模拟不连续效应子位点所需的表位无效，例如 HIV 受体/共同-受体结合位点 (Meloan 等, *Ann Biol. Clin.*, 1991,49:231-242)。一种替代方法依赖于一系列长度范围从 15-60 个残基不等的嵌套重叠肽合成物。这些较长的肽是可靠的，但需要通过一系列独立的固相肽合成法繁琐地合成，而不是通过快速和同步 PEPSCAN 合成。得到的一系列嵌套重叠肽然后可以用于在例如实验免疫和中和感染系统中分析抗体结合，以便鉴定包括简单不连续表位的最佳呈递的免疫结构域决定簇。该方法通过 Wang 等关于来自 HTLV I/II (US 5476765) 和 HCV (US 5106726) 的免疫结构域位点作图研究示例说明。它被用于选择 gp120 序列上 HIV 中和表位最佳出现的精确位置 (Wang 等, *科学*, 1991, 254: 285-288)。

肽免疫原通常比蛋白质更柔韧，不易保持任何优选结构。因此通过引入环形限制来稳定肽免疫原是有用的。一种准确环化的肽免疫原可以模拟和保持目标表位的构象，由此诱导真正分子上与该位点具有交叉反应性的抗体。例如，通过添加有利安排的半胱氨酸残基，然后经巯基环化，能够在合成肽上更准确地复制存在于真正表位上的环形结构 (Moore, *合成肽第二章：用户指南*, ed. Grant, WH Freeman and Company: New York, 1992, pp/63-67)。

影响来源于受体/共同受体复合物的肽免疫原的免疫原性的另一个重要因素是通过与宿主 T-辅助细胞受体和第 II 类 MHC 分子反应的 T 辅助细胞表位将该肽呈递给免疫系统 (Babbitt 等, *自然*, 1985, 317:

359-361)。T-辅助表位(Th)通常由载体蛋白质提供,由于难于生产准确限定的肽-载体结合物、大多数抗体对载体应答的错误指向、以及载体诱导的表位抑制使所述载体蛋白质同时存在缺点(Cease, Intern Rev Immunol, 1990, 7: 85-107; Schutze 等, 免疫学杂志, 1985, 135: 2319-2322)。或者, T 细胞辅助可以通过含有 Th 位点的合成肽刺激。因此, 被称为混杂 Th 的第 II 类 Th 表位诱导有效的 T 细胞辅助, 并能够与自身具备很低免疫原性的合成 B 细胞表位混合, 以产生有效的肽免疫原(US 5759551)。设计良好的混杂 Th/B 细胞表位嵌合肽能够诱导 Th 应答以及随之而来的靶向表现多样性 MHC 单倍体的种属多样性种群的大多数成员中的 B 细胞位点的抗体应答。混杂 Th 可以通过来源于有效外源性抗原的特异性序列提供, 例如麻疹病毒 F 蛋白、乙型肝炎病毒表面抗原、和沙眼衣原体主要外膜蛋白(MOMP)。一些已知的混杂 Th 已经显示在强化相当于十肽激素的低免疫原性肽方面是有效的(US 5759551)。

混杂 Th 表位长度范围为约 15-约 40 个氨基酸残基(US 5759551), 通常具有共同的结构特征, 可以含有特异性标志序列。例如, 共同特征是两性分子螺旋, 它是疏水氨基酸残基占据螺旋一面, 带电荷和极性残基占据周围面的 α -螺旋结构(Cease 等, 美国国家科学院科学进展, 1987, 84: 4249-4253)。表位通常含有其它的一级氨基酸模式, 例如一个 Gly 或带电荷残基后跟随两到三个疏水残基, 其后依次跟随一个带电荷或极性残基。该模式描述了一种被称为 Rothbard 序列的模式。另外, 表位通常遵循 1、4、5、8 原则, 其中一个带阳性电荷的残基后第四位、第五位和第八位跟随疏水残基, 与 1、4、5、8 位定位在同一侧上的两性螺旋一致。因为所有这些结构由共同的疏水、带电荷和极性氨基酸构成, 所以各结构能够在同一个 Th 表位中同时存在(Partidos 等, 遗传病毒学杂志(J Gen Virol), 1991, 72:1293-99; Alexander 等, 免疫学, 1994, 1: 751-761)。即使不是全部, 但大多数混杂 T 细胞表位含有至少一个上述周期性。这些特征可以被插入“理想化人工 Th 位点”的设计。

来源于外源病原体的混杂 Th 表位包括例如，但不限于，乙肝表面抗原和核心抗原辅助 T 细胞表位 (HB_s Th 和 HB_c Th)，百日咳毒素辅助 T 细胞表位 (PT Th)，破伤风毒素辅助 T 细胞表位 (TT Th)、麻疹病毒 F 蛋白辅助 T 细胞表位 (MV_F Th)、沙眼衣原体主要外膜蛋白辅助 T 细胞表位 (CT Th)、白喉毒素辅助 T 细胞表位 (DT Th)、镰状疟原虫环孢子体辅助 T 细胞表位 (PF Th)、曼森氏血吸虫三糖磷酸盐异构酶辅助 T 细胞表位 (SM Th)，及大肠杆菌 TraT 辅助 T 细胞表位 (TraT Th)。病原体衍生的 Th 在 US 5759551 中的 SEQ ID NOS: 2-9 和 42-52 列出；衣原体辅助位点 P11 在 Stagg 等，免疫学，1993，79: 1-9 中列出；HBc 肽 50-69 在 Ferrari 等，临床研究杂志，1991，88: 214-222 中列出。

有用的 Th 位点还可以包括组合的 Th，其将选择的简并位点插入理想化的 Th 位点的设计中。在 Wang 等 (WO 95/11998) 中，一类特别组合表位被称之为“结构性合成抗原文库”或 SSAL。结构如 SSAL 表位的 Th 由组织围绕一种不变残基的结构框架的位置取代物组成。SSAL 的序列通过排列混杂 Th 的一级氨基酸序列确定，在构成 Th 肽独特结构的位置上保留相对不变的残基，并在与识别多变性 MHC 限制元件有关的位置上提供简并性。MHC-结合基因座的不变和可变位置以及优选氨基酸列表已有公开 (Meister 等，疫苗，1995，13: 581-591; Alexander 等，免疫学，1994，1: 751-761)。

SSAL 的所有成员在一个单一固相肽合成中与目标 B 细胞表位和其它序列同时产生。Th 文库序列保留了混杂 Th 的结构基因座并提供对广泛单倍体的反应性。例如，从麻疹病毒 F 蛋白质中得到一种混杂表位之后，模拟被描述为 SSAL1TH1 的简并 Th 表位 (Partidos 等，1991)。SSAL1TH1 与 LHRH 目标肽一同应用。象麻疹表位一样，SSAL1TH1 遵循 Rothbard 序列和 1、4、5、8 规则：

1	5	10	15
Asp-Leu-Ser-Asp-Leu-Lys-Gly-Leu-Leu-Leu-His-Lys-Leu-Asp-Gly-Leu			
30	Glu Ile	Glu Ile Arg	Ile Ile Ile Arg Ile Glu Ile

Val	Val	Val Val Val	Val	Val
Phe	Phe	Phe Phe Phe	Phe	Phe

5 将带电荷残基 Glu 或 Asp 加在位置 1，以增加 Th 疏水侧周围的电荷。然后在两性螺旋疏水侧的 2、5、8、9、10、13 和 16 位保留疏水残基，2、5、8、9、10、13 和 16 位的可变性提供了一种具有结合广泛 MHC 限制元件能力的表面。SSAL 特征的静作用在于增大了人工 Th 的免疫抑制的范围 (WO 95/11998)。

10 按照本发明，已经用精确的表位图谱、环状限制、插入混杂 Th 表位或理想化的混杂 Th、以及理想化的 SSAL Th 表位设计了对 HIV 有效的肽免疫原。这种肽是优选的，因为它们是安全有效的。由于通过精确定位和环化作用以及应用广泛反应性 Th 应答表位而优化的 HIV 受体/共同受体结合位点的有效呈递，相信本发明的肽免疫原提供了免疫效力。

15

发明概述

本发明的肽组合物包含一种或多种如上述设计的肽免疫原。该肽组合物是有效地预防和治疗 HIV 感染和免疫疾病的疫苗的基础。由于本发明的肽成分呈现中和 CD4 的 CDR2-样结构域的受体/共同受体效应子位点而成为优选。这些肽由于 (1) 具有优化的位点特异性，其通过 CDR2-样结构域的精确表位作图和考虑到 CDR2 的自身构型而选择的环化作用得到，以及 (2) 它们的广泛反应性 Th 应答，使它们诱导有效的抗体应答。

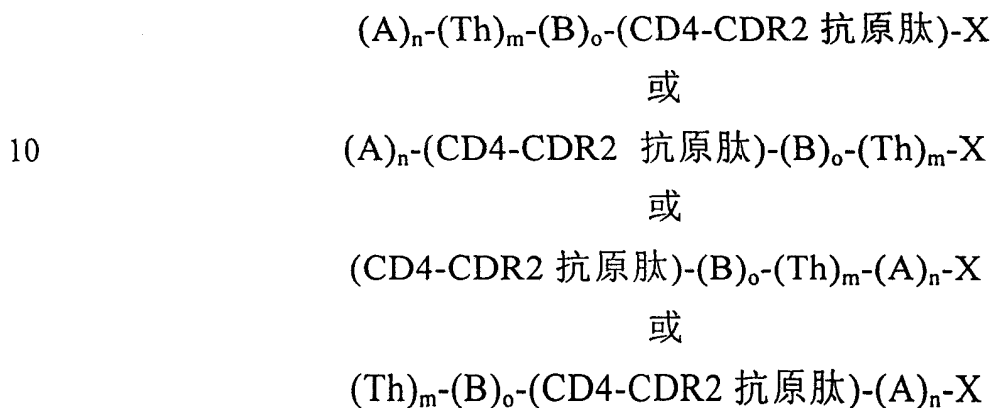
25 按照本发明，提供了一种或多种肽，每种肽包括定位在 CD4 的 CDR2 结构域上相应效应子位点的两个肽序列，或其免疫功能类似物。

另外，通过化学偶联共价连接的载体蛋白质，或更优选通过化学偶联共价连接合成的免疫刺激成分 (例如混杂 Th 表位)，或更优选

30

通过直接肽合成赋予本发明肽的目标位点更强的免疫原性。载体蛋白质和免疫刺激成分的具体实例已有提供，例如，匙孔帽贝血蓝蛋白载体、改性的百日咳内毒素 A (PEA)、Th 表位（例如，SEQ ID NO: 6）、和一般的免疫刺激肽（例如，耶尔森氏鼠疫杆菌的侵袭素肽 (Inv) (SEQ ID NO: 7)。

本发明的合成肽可以由下式表示：



15

其中：

各 A 独立地为一个氨基酸，或一种一般性免疫刺激肽；

各 B 独立地为一个氨基酸或其它化学键；

X 为一个氨基酸的 α -COOH 或 α -CONH₂；

20 Th 为一个辅助 T 细胞表位或一个免疫增强类似物或其片段；

“CD4-CDR2 抗原肽”是一种能够诱导与 CD4 表面复合物反应的抗体的肽抗原；

n 为从 1-约 10 的数；

m 为从 1 到约 4 的数；和

25 o 为从 0 到约 10 的数。

本发明的肽组合物包含从约 30 到约 115 个氨基酸残基，优选从约 40 到约 90 个氨基酸残基，更优选从约 50 到约 80 个氨基酸残基的肽免疫原。

本发明的组合物任选地进一步含有佐剂和/或给药载体和其它加入疫苗制剂的常规成分。本发明提供了剂量说明，以便产生对抗目标 CD4-CDR2 效应子位点的免疫治疗抗体。

5 本发明首次提供了能够在哺乳动物体内诱导抗体的合成肽，其保护性对抗来自多种进化枝的 HIV 原代分离株感染。

当对宿主施用含有本发明肽组合物的疫苗制剂时，对本发明肽组合物的抗体应答通过以下几方面对宿主提供抗 HIV 感染的保护或治疗：（1）阻断 HIV 与 CD4-表达细胞结合，（2）阻断 CD4-表达细胞之间 HIV-诱导的杂交细胞形成，（3）在体外有效中和 CD4 阳性细胞
10 被来自 HIV 1 型和 HIV 2 型所有进化枝的原代分离株感染，和（4）预防被 HIV 的原代分离株感染。

这种肽组合物对于预防和治疗 HIV-1 所有进化枝的原代分离株和 HIV-2 的原代分离株引起的 HIV 感染，以及对于治疗不期望的 CD4 细胞-介导的免疫应答例如抑制排斥、和自主免疫疾病例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、和牛皮癣有用。
15

附图简述

图 1 描述了人 CD4 的氨基酸序列（SEQ ID NO: 1），它是宿主细胞抗原 CD4/共同受体复合物的一部分，它由核酸序列推测出。

20 氨基酸用下面的标准单字母代码表示：

Ala:A Cys:C His:H Met:M Thr:T Arg:R Gln:Q

Ile:I Phe:F Trp:W Asn:N Glu:E Leu:L Pro:P

Tyr:Y Asp:D Gly:G Lys:K Ser:S Val:V

编号系统是 Littman 等中描述的（细胞，1988，55：541）。下化线区
25 （AA27-AA66）是本发明的 CD4-CDR2 抗原肽来源的区域。

发明详述

本文使用的“1 型人免疫缺陷病毒（HIV-1）的原代分离株”通过在来自供体的外周血单核细胞（PBMC）上限制性培养至第 5 代得到。
30 原代分离株可以从已经在人 T-淋巴细胞系中传代若干次的 T 细胞系

适应性 (TCLA) 实验室株系例如 IIIb/LAI、SF2、和 MN 中分辨出来。首先，大多数原代分离株不易在 T 细胞系中生长，它们表现合胞体诱导 (SI) 和非-合胞体诱导 (NSI) 表型。例如，很多在 PBMC 培养物中诱导合胞体形成的原代分离株将在 HIV-特别敏感的 MT2 T 细胞系中复制，但很少一部分在几乎不许可的 T 细胞系例如 CEM 或 H9 中复制。NSI 原代分离株将仅在原代 T 细胞中复制。其次，它们与 TCLA 株系不同之处在于它们在体外对病毒受体蛋白质 CD4 的重组可溶形式 (rsCD4) 的中和的敏感性 (Daar 等, PNAS USA, 1990, 87: 6574-6578)。第三，实验室-适应性株系对特异于病毒包膜的抗体的中和敏感，而原代分离株是抗性的 (Sawyer 等, 病毒学杂志, 1994, 68: 1342; Mascola 等, 传染病杂志, 1996, 173: 340)。

本文使用的“CD4”指所有由天然存在的 CD4 基因编码的 CD4 蛋白质。起初 CD4 被描述成一种 T-辅助淋巴细胞的细胞表面标识。之后发现 CD4 很少在单核细胞、岛细胞、小神经胶质细胞、和 B 细胞类成分上表达。还发现 CD4 分子通过其作为 MHC II 类分子受体的功能直接参与抗原-特异性 T 辅助细胞的激活。在 1984 年, 发现人 CD4 是 HIV 的受体 (Dalglish 等, 自然, 1984, 312: 763)。HIV 包膜糖蛋白, gp120 与 CD4 的结合代表病毒侵入目标细胞的第一步。人 CD4 的氨基酸序列从 Maddon 等的文献中引入本文 (细胞, 1985, 42: 93; 和 Littman 等, 细胞, 1988, 55: 541), 如图 1 和 SEQ ID NO: 1 所示。

本文使用的“重组可溶性 CD4”或“rsCD4”是一种由人 CD4 的 AA₁-AA₃₇₅ 组成的重组微生物或细胞表达的多肽 (图 1, SEQ ID NO: 1)。

本文使用的“表面 CD4 复合物”或“含有 CD4 的表面复合物”或“含有 CD4 的表面受体/共同受体复合物”指 CD4 蛋白质在其自然环境中在哺乳动物细胞表面和/或与任何相关膜蛋白复合在一起出现的完整自身 CD4 蛋白质。

本文使用的术语“免疫原”涉及一种肽组合物, 当其对宿主施用 30 时, 能够诱导针对存在于 CD4 的 CDR2 结构域 (SEQ ID NOS: 2 和 3)

上的目标效应子位点的抗体，产生对来源于 1 型 HIV (HIV-1) 和 2 型 HIV (HIV-2) 所有进化枝的原代分离株具有广泛中和活性的高效价抗体。图 1 中 CDR2-CD4 目标位点用下划线表示，同时在 SEQ ID NOS: 2 和 3 中列出。

5 本发明的“CD4-CDR2 抗原肽”的长度约为 25 至 50，优选 30 到 46 个氨基酸之间，含有两个由 28 到 40 个氨基酸残基的插入序列分隔开的半胱氨酸残基。插入序列可以是 SEQ ID NO: 1 的残基 27-66 所代表序列的任何连续部分，或者可以是一种 SEQ ID NO: 1 的残基 27-66 的免疫学功能类似物。

10 本文使用的肽结合物指含有共价连接有 Th 辅助表位肽的 CD4-CDR2 抗原肽，除了分子的直接肽合成之外，可通过任何其它方法进行共价连接。CD4-CDR2 抗原肽于 Th 表位肽共价偶联以形成肽结合物的实例是硫醇-卤族乙酰胺偶联，硫醇-马来酰亚胺偶联，硫醇-硫醇链间二硫键形成等。

15 本文使用的“肽免疫原”指一种肽或肽结合物，其含有共价连接有 Th 表位肽的 CD4-CDR2 抗原肽，任选进一步含有一种常规的免疫刺激肽，一种连接物，和本文进一步描述的间隔区；其具有诱导抗 CD4-CDR2 抗原肽的抗体的能力。

20 本文使用的术语“类似物”指与高达约 10% 氨基酸的保守取代具有基本上相同氨基酸序列的肽。保守取代是其中一个氨基酸被另一个氨基酸取代，优选从同类氨基酸（例如，疏水、极性、带电荷等）中的一个取代，但不明显改变肽的免疫学性质的那些取代。类似物可以人工得到，也可以作为本文公开的肽序列的天然存在变异体出现。

25 免疫学功能类似物是诱导免疫系统基本上相同反应，例如，T-细胞应答、B-细胞应答、或诱导抗特定抗原的抗体的类似物。

本发明涉及新的肽组合物用作免疫原的应用。该免疫原对于通过主动免疫在哺乳动物包括人体内产生高效价的抗 CD4 的 CDR2 结构域上的效应位点 (SEQ ID NOS: 2 和 3) 的抗体是有用的。本发明的免疫原对于预防和治疗免疫缺陷病毒感染以及对于指不期望的 CD4+

细胞-介导的免疫应答,例如移植排斥和自主免疫疾病例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、和牛皮癣。

这种特异性 CD4-反应性抗体在预防和治疗 HIV 感染和免疫疾病方面的应用,即一种免疫治疗,能够通过用对 CD4 的 CDR2-样结构域上的位点特异的“位点靶向”抗体预防性治疗被动获得。如本文所述,更优选的治疗可以通过主动免疫,即通过用含有一种或多种本发明的肽免疫原的组合物接种宿主实现。这些免疫原诱导宿主产生自身位点靶向 CD4-CDR2 反应性抗体,该抗体具有抗 1 型 HIV (HIV-1) 和 2 型 HIV (HIV-2) 所有进化枝的原代分离株的广泛中和活性。相信这些主动免疫将提供比被动免疫更有效和长期的保护。

人 CD4 (SEQ ID NOS: 2 和 3) 的 CDR2-样结构域上的目标位点 (SEQ ID NOS: 2 和 3) 是构象限制性的,即通过在 N 和 C 末端添加半胱氨酸残基环化 (SEQ ID NOS: 4 和 5)。该目标位点还可以包括含有 1-5 个来自 SEQ ID NOS: 2 和 3 末端之一附加氨基酸的 SEQ ID NOS: 4 和 5 的免疫类似物 (例如, SEQ ID NOS: 10 和 11), 只要保留有单一二硫键的环结构。

通过将目标位点化学偶联到载体蛋白质,例如,匙孔帽贝血蓝蛋白、(KLH) 和改性的百日咳内毒素 A (PEA) 上,进一步将其修饰成为免疫原性 CD4-CDR2 抗原肽。该基于“CD4-CDR2 抗原肽-载体蛋白质”的疫苗的缺陷在于 (1) 目标抗原位点的弱的免疫原性,一种与几乎所有自身-抗原相关的内在问题; (2) 很大一部分抗载体蛋白质的非功能性抗体; 和 (3) 载体-诱导的表位抑制潜力。

因此通过化学偶联或优选通过直接肽合成串联附加化学定义为混杂 Th 和/或其它免疫刺激肽,赋予肽免疫原性是优选的。本发明的优选的免疫原使不相关抗体的产生减至最小,从而刺激对“目标序列”更为专一的免疫应答。理想的抗体具有与 CD4 表面复合物的反应性,但不产生可能使预防和治疗 HIV 感染和免疫疾病的免疫治疗过程复杂化的不期望的副作用。而且,靶向所需位点的位点特异性抗体可以在遗传多样化宿主群中通过应用混杂 Th 更广泛地产生。这些抗体应

答产生对 1 型和 2 型 HIV 所有进化枝的原代分离株具有广泛中和活性的高效价抗体。

本发明还涉及应用所述肽组合物作为免疫原预防和治疗免疫缺陷病毒以及治疗 CD4 细胞-介导的不期望的免疫应答例如移植排斥、和自主免疫疾病例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、和牛皮癣。

与特异于 rsCD4 的抗体有所不同，特异于包含 CD4 的宿主细胞表面受体/共同-受体复合物的抗体可能在以下几个方面与免疫系统相互作用：

1. 它们可能阻断 CD4-表达性 T 细胞和其它活性 T 细胞、B 细胞、或单核细胞之间的 CD4-II 类相互作用；
2. 它们可能给 T 细胞传送信号，因此抑制正常 CD4+ T-细胞介导的免疫调节功能；
3. 它们可能通过 T 细胞受体分子同时接合引发细胞凋亡，而诱导 CD4-表达性细胞死亡；
4. 它们阻断 CD4 和 HIV 之间的相互作用，其抑制 HIV-介导的免疫病理学。

抗含有 CD4 的表面复合物的抗体是预防和治疗 HIV 感染和 HIV-相关性疾病包括 AIDS 的良好候选物。在一个更普遍的水平上，抗表面 CD4 复合物的抗体可能对于预防或治愈 CD4-表达性 T 细胞介导的不期望的免疫应答，例如移植排斥、和自主免疫疾病例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、或牛皮癣有效。

由本发明的肽组合物产生的抗体的特性基于实施例 1-5 得到的结果概括如下：

1. 在 ELISA 分析中结合 rsCD4；
2. 在免疫荧光分析中结合 CD4-表达性细胞；和
3. 在体外微平板分析中中和中和抗性-HIV 原代分离株。

具有这些特征的抗体在预防和治疗主要目标为 CD4-阳性细胞的感染原导致的人类疾病中尤其有用。因此，本发明提供了肽组合物作为免疫原，用于预防和治疗主要目标为 CD4-阳性细胞的感染原导致

的人类疾病，特别是 HIV-相关性疾病包括 AIDS 的所有阶段。本发明还提供了这些抗体组合物的应用方法。

本发明的肽组合物包括肽免疫原，其插入定位在 CD4 的 CDR2-样结构域上相应目标效应子位点的两个肽序列之一（SEQ ID NOS：2 和 3），或其免疫功能类似物。该免疫原的特征在于它们诱导抗 CD4 的 CDR2 结构域上的 CD4/共同-受体效应子位点的中和抗体。该免疫原依靠经（1）精确的表位作图；（2）由于它们的自身构象，环化以限制它们的构象；和（3）它们广泛的反应性 Th 应答获得的其优化的位点特异性，来诱导保护性抗体应答。

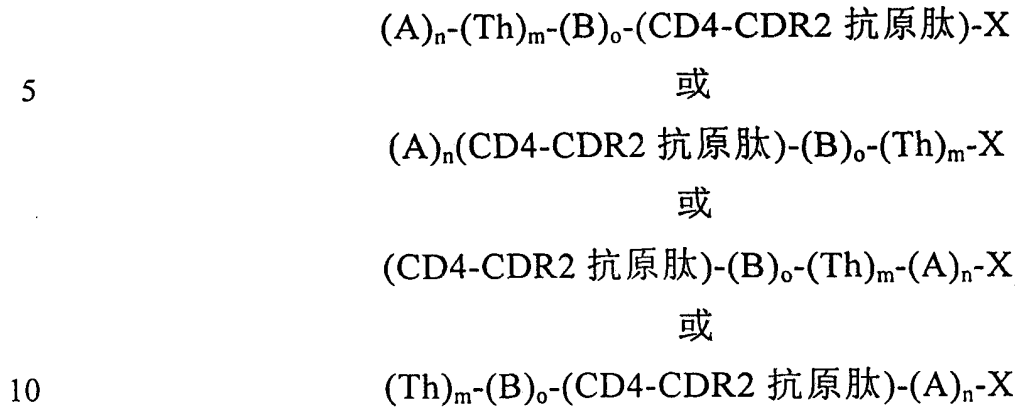
具体地说，目标位点来自自身人 CD4 序列的 CDR2-样结构域。人 CD4 的氨基酸序列来自 Maddon 等（细胞，1985；42：93；和 Littman 等，细胞，1988；55：541—）的文献，将其引入本文，在图 1 和 SEQ ID NO：1 中表示。CD4-CDR2 目标位点如图 1 中的下划线部分所示，并在 SEQ ID NOS：2 和 3 中列出。本发明的肽组合物优选作为含有目标位点（SEQ ID NOS：2 和 3）的合成肽产生，其中目标物通过在或靠近其自身序列的 N 末端和 C 末端插入半胱氨酸残基被修饰，以便促进环化肽的形成（例如 SEQ ID NOS：4 和 5）。

本发明的肽组合物还包括可能含有来自 SEQ ID NOS：2 和 3 末端之一的 1-5 个附加氨基酸的 SEQ ID NOS：4 和 5 的免疫类似物（例如，SEQ ID NOS：10 和 11），只要保留有单一二硫键的环结构。目标位点还包括含有一个长度约为 25-50 个氨基酸、具有来自 SEQ ID NOS：2 和 3 的连续氨基酸序列的环化肽的免疫功能类似物。环状结构是本发明的基本要素，因为含有目标位点的线性对应物的肽不能诱导具有中和 HIV 原代分离株活性的抗体。

另外，通过将载体蛋白质与合成的免疫刺激物质例如来源于致病性病毒和细菌的混杂 Th 表位、人工混杂 Th 表位、和常规免疫刺激肽共价连接，赋予本发明的肽的目标位点免疫原性。载体蛋白质和免疫刺激物质的具体实例已有提供，例如匙孔帽贝血蓝蛋白（KLH）载体蛋白质、改性的百日咳内毒素 A（PEA）载体蛋白质、来源于乙肝病毒表面抗原的 Th（SEQ ID NO：8）、人工 Th（例如，SEQ ID NO：

6)、和来源于耶尔森氏鼠疫杆菌的常规免疫刺激侵袭素肽(Inv)(SEQ ID NO: 7)。

本发明的完全合成肽可以由下式表示:



其中:

每个 A 独立地为氨基酸、 α -NH₂、或常规免疫刺激肽;

每个 B 独立地选自氨基酸、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO-、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO(ϵ -N)Lys-、-NHCH(X)CH₂S-琥珀酰亚胺基(ϵ -N)Lys-、和-NHCH(X)CH₂S-(琥珀酰亚胺)-;

X 为氨基酸的 α -COOH 或 α -CONH₂;

Th 是一种辅助 T 细胞表位或一种免疫增强类似物或其片段;

“CD4-CDR2 抗原肽”如前面的定义, 优选为 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5, 或其交叉反应性免疫功能类似物;

n 为 1 至约 10;

m 为 1 至约 4; 和

o 为 0 至约 10。

本发明的肽组合物含有长度约为 30 到 115 个氨基酸残基, 优选约为 40 到 90 个氨基酸残基, 更优选约为 50 到 80 个氨基酸残基的肽免疫原。

如果 A 为一种氨基酸, 它可以是任何天然存在的或非天然存在的氨基酸。非天然存在的氨基酸包括但不限于 D-氨基酸、 β -丙氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、甲状腺氨酸、 γ -氨基丁酸、高丝氨酸、瓜氨酸等。而且, 如果 m 大于 1, 二个或三个 A 基团为氨基酸, 那么每个氨基酸可以独立地相同或不同。

如果 A 为一种侵染素的结构域，则它可以是来自耶尔森氏鼠疫杆菌种侵染素蛋白的免疫刺激表位。这种免疫刺激特性来源于这种侵染素结构域与 T 细胞上存在的 $\beta 1$ 整联蛋白分子相互作用的能力。发现与 $\beta 1$ 整联蛋白相互作用的侵染素结构域的特定序列已经由 Brett 等描述（欧洲免疫学杂志，1993；23：1608）。

在 US 5759551 中已经描述过用于连接混杂 Th 表位的侵染素结构域 (Inv) 的一种优选实施方式，其经参考插入本文。Inv 结构域优选具有如下序列：

Thr-Ala-Lys-Ser-Lys-Lys-Phe-Pro-Ser-Tyr-Thr-Ala-Thr-Tyr-Gln-Phe
10 (SEQ ID NO:7)

或为来源于另一种耶尔森氏鼠疫杆菌种侵染素蛋白相应区域的其免疫刺激类似物。这种类似物还可以含有取代、删除或株系变异，只要类似物保留免疫刺激特性。这种侵染素结构域优选通过一种间隔区结合，只要将氨基酸“A”添加到 Th 肽上。

15 在一个优选实施方式中，n 为 3，(A)₃ 依次为一种侵染素结构域 (Inv)、甘氨酸和甘氨酸。

(B)_n 任选为一种间隔区，可包括天然存在或上述非天然存在的氨基酸。每个 B 独立地相同或不同。载体蛋白质通过间隔区（例如，Lys-Lys-Lys）经化学偶联与肽共价结合。(B)_n 氨基酸还可以为一种
20 位于混杂 Th 表位和 CD4-CDR2 抗原肽 (SEQ ID NOS: 4 和 5) 之间的间隔区，例如 Gly-Gly 或 ϵ NLys，以便诱导有效的抗体应答。除了使 Th 表位与 B 细胞表位（例如 SEQ ID NOS: 4 和 5）和其免疫类似物物理分隔，一种间隔区例如 Gly-Gly 可以破坏 Th 表位与 CD4-CDR2 抗原肽结合产生的所有人工二级结构，因此减弱了 Th 和/或 B 细胞应
25 答之间的干扰。

(B)_n 的氨基酸还可以构成一种作为增强 Th 和 IgE 结构域分隔作用的柔韧性绞链的间隔区。在免疫球蛋白重链绞链区中发现了编码柔韧性绞链的序列的实例。柔韧性绞链序列通常富含脯氨酸。一种特别有用的柔韧性绞链为序列 Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro (SEQ ID
30 NO:9)，其中 Xaa 为任意氨基酸，优选为天冬氨酸。由 (B)_n 氨基酸

提供的构象间隔使本发明的肽免疫原和合适 Th 细胞和 B 细胞之间的相互作用更为有效，由此增强了对 Th 表位和抗体-诱导性表位以及它们的交叉相互反应性和免疫功能类似物的免疫应答。

Th 是一种含有 Th 表位的氨基酸序列（天然或非天然氨基酸）。

5 Th 表位可以由连续或不连续表位构成，因此不是 Th 的每一个氨基酸一定是表位的一部分。Th 表位，包括 Th 表位的类似物和片段，能够增强或刺激对 CD4-CDR2 抗原肽（例如，SEQ ID NOS: 4 和 5，及其免疫功能类似物）的免疫应答。表现为免疫结构域和混杂的 Th 表位在动物和人群中与广泛的趋异进化 MHC 型具有高度和广泛的反应性（Partidos 等，1991；US 5759551）。本发明肽的 Th 结构域约具有
10 10 到 50 个氨基酸，优选约具有 10 到 30 个氨基酸。当出现多重 Th 表位（即 $m \geq 2$ ），则每个 Th 表位独立地相同或不同。Th 片段是 Th 表位的连续部分，其足以增强或刺激对 CD4-CDR2 抗原肽（例如，SEQ ID NOS: 4 和 5），和/或对其免疫功能类似物的免疫应答。

15 本发明的表位包括来源于外源病原体以及作为实施例提供的那些表位，但不限于此，乙肝病毒表面和核心抗原辅助 T 细胞表位（HBs TH 和 HBc Th）、百日咳毒素辅助 T 细胞表位（PT Th）、破伤风毒素辅助 T 细胞表位（TT Th）、麻疹病毒 F 蛋白辅助 T 细胞表位（MV_F Th）、沙眼衣原体主要外膜蛋白辅助 T 细胞表位（CT Th）、白喉毒素辅助 T 细胞表位（DT Th）、镰状疟原虫环孢子体辅助 T 细胞表位（PF Th）、曼森氏血吸虫三糖磷酸盐异构酶辅助 T 细胞表位（SM Th），及大肠杆菌 TraT 辅助 T 细胞表位（TraT Th）。病原体衍生的 Th 在 US 5759551 中的 SEQ ID NOS: 2-9 和 42-52 列出；衣原体辅助位点 P11 在 Stagg 等，免疫学，1993，79: 1-9 中列出；HBc 肽 50-69 在 Ferrari 等，临床研究杂志，
20 1991，88: 214-222 中列出，它们经参考插入本文，并一起在本文中 SEQ ID NOS: 8、13、38-58（表 8）列出。

Th 表位进一步包括人工理想化 Th，例如，SEQ ID NOS: 6, 12, 36, 59（表 9），及其免疫功能类似物。Th 的功能类似物包括免疫增强类似物、交叉反应性类似物和这些 Th 表位的片段。功能性 Th 类似物进一步
30 包括在 Th 表位中保守地取代、添加、删除和插入 1 至约 10 个氨基酸残

基，其基本上不改变 Th 表位的 Th 刺激功能。

本发明的肽结合物还包括与一种载体蛋白质（例如匙孔帽贝血蓝蛋白）偶联的 CD4-CDR2 抗原肽（例如 SEQ ID NOS: 4 或 5）。

本发明的优选肽是含有 CD4-CDR2 抗原肽（例如 SEQ ID NOS: 4 或 5，或其免疫功能类似物）和 Th 表位、以及任选地含有一种常规免疫刺激位点，例如，Inv（SEQ ID NO: 7）。在一个更为优选的实施方式中，TH 表位是一种来源于外源病原体的 HBs Th、HBc Th、MV_F Th、PT Th、TT Th、CT Th 或 HIV Th 或一种理想化的人工 Th、或它们的免疫功能类似物。任选地，A 是一种常规免疫刺激肽，例如，Inv
10 （SEQ ID NO: 7），优选经 Gly-Gly 或 ε N Lys 间隔区结合。

修饰位点的结构基于取自人 CD4 的 CDR2-样结构域的肽序列（SEQ ID NO: 1 的氨基酸 27-66），或者来源于另一个物种的类似物序列。所述 CD4-CDR2 目标位点接受下列修饰：

- （1） 在靠近 N-末端侧添加或插入一个半胱氨酸残基，
- 15 （2） 在靠近 C-末端侧，优选在或靠近 66 位或一个类似位置添加或插入一个半胱氨酸残基，和
- （3） 在保留的半胱氨酸之间形成一个二硫键，从而产生一个环状结构。

所述肽结构还可以包括 1 到 5 个取自 CD4 的 27-66 或 39-66 片段
20 末端之一的附加氨基酸，只要保留单一二硫键环状结构（例如，SEQ ID NOS: 10 和 11）。优选地，自身序列中非预期用于环化的任何插入半胱氨酸将被，例如丝氨酸，保守取代。

例如，人 CD4-CDR2 目标位点（SEQ ID NOS: 2 和 3）通过在或靠近 N-和 C-末端加入半胱氨酸（例如，SEQ ID NOS: 4 和 5），或者通过在 N-末端添加一个半胱氨酸和在 C 末端附近进行一个半胱氨酸取代（例如，将 67 位的 Phe 取代为 Cys，得到 SEQ ID NOS: 10 和
25 11）的方式环化。具有下列序列的修饰、环化、和重叠的 CD4-CDR2 抗原肽通过实施例的方式提供：

30

Cys His Trp Lys Asn Trp Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly

Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu
Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
Gly Asn Cys (SEQ ID NO.:4)

5 Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp
Gln Gly Asn Cys (SEQ ID NO.:5)

10 Cys His Trp Lys Asn Trp Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly
Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu
Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
Gly Asn Cys Pro Leu Ile Ile (SEQ ID NO.:10)

和

15 Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp
Gln Gly Asn Cys Pro Leu Ile Ile (SEQ ID NO:11)

在这些实施例中，修饰位置通过黑体字说明。

20 通过含有本发明的 CD4-CDR2 抗原肽的肽免疫原诱导的抗体与宿
主细胞的含有 CD4 的表面受体/共同受体复合物交叉反应，并中和 HIV
的原代分离株。其它物种的细胞表面 CD4 的相应目标抗原性位点同样
也能够来源于相关物种的同源片段。

25 CD4-CDR2 抗原肽的交叉反应性和免疫功能类似物 (SEQ ID
NOS: 4、5、10 和 11) 可以进一步包括保守取代、添加、删除、或
插入一到四个氨基酸残基，只要该肽类似物能够诱导与 CD4-CDR2
(SEQ ID NOS: 2、3、4 和 5) 交叉反应性和具有中和 HIV 原代分离
株活性的免疫应答。保守取代、添加、和插入对于本领域技术人员是
已知的，并可以用天然或本文限定的非-天然氨基酸轻易地实现。

30 本发明的优选的肽免疫原为含有以下组分的肽：(1) 本文中称
之为 CD4-CDR2 抗原肽的环状、修饰的 CD4-CDR2 位点 (例如，SEQ

ID NOS: 4、5、10 和 11) 或其免疫类似物, 和 (2) 表位肽。更优选的肽免疫原是那些含有环化 CD4-CDR2 抗原肽 (SEQ ID NOS: 4、5、10 和 11) 或其交叉反应性和免疫功能类似物的串联结构; 一种间隔区 (例如, Gly-Gly 或 ϵ NLys); 一种选自 HBs Th、HBc Th、MVF Th、PT Th、TT Th、SMTh、HIVTh 的 Th 表位 (例如, SEQ ID NOS: 8、38-50、55), 一种人工 Th (例如, SEQ ID NOS: 6、12、36、59)、或一种其类似物; 和任选地, 一种 Inv 结构域 (SEQ ID NO: 7) 或其类似物。

本发明的肽免疫原可以通过本领域普通技术人员公知的化学合成法制备。参见, 例如, Fields 等, 《合成肽: 用户指南》第三章, Grant, W. H. 编, Freeman 和 Co., New York, NY, 1992, p.77。因此, 可以应用固相合成法——自动匹配 Merrifield 技术, 用 t-Boc 或 Fmoc 化合物保护 α -NH₂, 并应用商业提供的侧链保护的氨基酸合成肽。用于肽合成的适当装置的实例为 430A 或 431 型应用生物系统肽合成仪 (the Applied Biosystems 肽 Synthesizer Models 430A or 431)。

完成所需肽免疫原的装配后, 按照标准程序处理树脂, 以从树脂上切除肽, 并使氨基酸侧链上的功能基团脱封闭。通过 HPLC 纯化游离肽, 通过例如氨基酸分析、质谱、和/或通过测序鉴定生化特征。肽的纯化和特征鉴定方法对于本领域技术人员是公知的。

其它产生本发明的含有 CD4 和 Th 位点的肽结构物的化学方法包括通过形成一种“硫醚”键连接卤族乙酰化和半胱氨酰化肽。例如, 可以将一个半胱氨酸加到含 Th 肽的 C 末端, 半胱氨酸的硫基可以用于与结合到 CD4-CDR2 抗原肽的 N-末端的亲电基团形成一个共价键 (例如, 一个半胱氨酸的一个 N-(氯乙酰) 或一个源于马来酰亚胺的 α -或 ϵ -NH₂ 基)。在该模式中, 含有 Th-(B)_o-(CD4-CDR2 抗原 TAI) 或其反向, (CD4-CDR2 抗原肽)-(B)_o-Th, 有或没有常规免疫刺激位点的肽结合物组合可以得到, 其中连接物“B”之一为 Gly-Gly、(ϵ -N)Lys、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO-、-NHCH(X)CH₂SCH₂CO(ϵ -N)Lys-、-NHCH(X)CH₂S-琥珀酰亚胺 (ϵ -N)Lys-, 或者 -NHCH(X)CH₂S-(琥珀酰亚胺)-。

本发明的免疫原还可以是聚合的。可以通过将免疫原与交联剂利用常规方法反应实现,例如通过戊二醛和赖氨酸残基的-NH₂之间的反应。

通过另一种方法,即通过应用一个添加到免疫原 N-末端的附加半胱氨酸残基使合成肽免疫原聚合或共聚合。N-末端半胱氨酸的巯基可以用于与卤族乙酰基修饰的氨基酸或一种结合于分支的多聚-赖氨酰核心分子(例如, K₂K、K₄K₂K 或 K₈K₄K₂K)的 N-末端赖氨酸残基的马来酰亚胺基来源的 α-或 ε-NH₂ 基形成一种“硫醚”键。还可以通过在一种分支的多聚赖氨酰核心树脂上直接合成所需的肽结构,使本发明的免疫原聚合成为一种分支结构(Wang 等, 科学, 1991; 254: 285-288)。

或者,较长的合成肽免疫原可以通过公知的重组 DNA 技术合成。一些关于 DNA 技术的标准手册提供了详细的制备本发明肽的方法。为了构建编码本发明肽的基因,将氨基酸序列逆向翻译成一种核酸序列,优选利用应用于基因将在其中表达的有机体的优化密码子。接着,制备合成基因,通常通过合成编码肽和任何必需调控元件的重叠寡核苷酸。将合成基因插入适当的克隆载体,得到重组体并鉴定特征。然后在选择的表达系统和宿主适合的适当条件下表达肽。

上述核酸自身可以用作称之为“DNA 疫苗”的成分。在本发明的所述实施方式中,通过将编码所述肽的核酸,优选应用在人类细胞中优化表达的密码子和启动子,导入患者自身细胞,诱导本发明的免疫原性肽在那些细胞中表达。制备和应用 DNA 疫苗的方法公开于 US 专利 5580859, 5589466, 和 5703055; 同时参见 WO 97/02840 和 W. McKonnell 和 F. Askari, 新英格兰医学杂志, 1996, 334: 2-45, 它们均经被参考插入本文。认为制备和应用本发明的肽和肽结合物的方法在本发明的范围内。

本发明的肽组合物的效果可以通过注射动物例如,豚鼠,然后通过检查免疫血清中和 HIV 原代分离株的能力,监测对 CD4-CDR2 抗原肽的激素免疫应答证实,如实施例中的详细描述。

本发明的另一方面提供了一种在一种药物可接受的传送系统中含有一种免疫有效量的一种或多种本发明的肽免疫原的疫苗组合物。该免疫原性组合物用于预防和治疗免疫缺陷病毒感染以及用于治疗不期望的 CD4-表达性 T 细胞介导的免疫应答例如移植排斥、和自主免疫疾病例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、和牛皮癣

因此，可以应用佐剂、乳化剂、药物可接受载体或其它疫苗组合物中常规提供的成分将本发明的肽组合物配制成一种免疫原性组合物。可以用于本发明的佐剂或乳化剂包括明矾、不完全弗氏佐剂、liposyn、皂甙、角鲨烯、L121、emulsigen、单磷脂酰脂类 A (MPL)、二甲基-二-十八烷基溴化氨 (DDA)、QS21、ISA206、和 ISA 720，以及其它已知的有效佐剂和乳化剂。本领域普通技术人员能够容易地确定所述制剂，所述制剂还包括速释和/或缓释制剂，以及用于诱导系统免疫性和/或诱导局部粘膜免疫性的制剂，其可以通过，例如，免疫原包封或与微粒共同给药实现。本发明的疫苗可以通过任何常规途径给药，包括皮下、口服、肌内、或其它非肠道或肠道途径给药。同样，免疫原可以作为单剂量或多剂量给药。本领域普通技术人员能够容易地确定免疫方案。

本发明的免疫原性组合物含有一种有效量的一种或多种本发明的肽免疫原和一种药物可接受的载体。在一种适当剂量单位剂型中的组合物通常含有每公斤体重约 $0.5 \mu\text{g}$ 到约 1mg 的免疫原。如果以多剂量给药，可以方便地分成每剂量单位制剂的适当量。例如，初始剂量，例如 $0.2\text{-}2.5 \text{mg}$ ，优选 1mg 的由本发明的肽组合物表示的免疫原将通过注射优选肌肉内注射给药，然后施用重复剂量（增强量）。剂量将根据患者的年龄、体重和一般健康状况而定，正如疫苗和治疗领域公知的那样。

含有两种或多种 Th 表位的本发明肽免疫原混合物的疫苗可以在更广泛的人群中增强免疫效果，由此提供了一种对 CD4-CDR2 抗原肽（例如，SEQ ID NOS: 4 和 5）的改善的免疫应答。

对本发明的合成 CD4-CDR2 免疫原的免疫应答可以通过捕获在 O'Hagan 等（疫苗，1991；9：768）描述类型的生物可降解微粒中或

其上传送来改进。可以将免疫原与或不与佐剂一起包封，所述微粒能够运载一种免疫刺激佐剂。微粒还可以与肽免疫原一同给药，以加强免疫应答，包括特别适用于病毒例如 HIV 经粘膜运送的局部粘膜免疫性，并提供用于口服给药和局部给药的延时或周期性应答的时间-控制
5 释放（O'Hagan 等，1991；和 Eldridge 等，1991；28：287）。

为了更好地理解本发明，阐述下列实施例。这些实施例仅为了举例说明，并不构成对本发明范围的任何形式的限制。

实施例

10 以下实施例的目标抗原位点肽通过实施例 1 中描述的固相法合成。每种肽可以由下式表示： $(A)_n-(Th)_m-(B)_o-(CD4-CDR2 \text{ 抗原肽})$ 或者 $(A)_n-(CD4-CDR2 \text{ 抗原肽})-(B)_o-(Th)_m$ ，但上面描述的其它通式也被包括在本发明之内。CD4 目标抗原位点是一种环状肽，由 SEQ ID
15 NOS：4、5、10、和 11 示例说明，但包括长度约为 25-50 个氨基酸、具有来源于 SEQ ID NOS：2 或 3 的一个连续氨基酸序列和一个结合在环状结构的 N-或 C-末端的附加的 5 个氨基酸序列的环状肽的免疫功能类似物也应该在本发明范围内。

用于这些实施例的每种肽具有 Gly-Gly 或 Nlys 作为 Th 和修饰的 CD4-CDR2 目标位点免疫元件之间的 $(B)_o$ 间隔区，某些插入一种任
20 选的含有 Inv-Gly-Gly（其中 Inv（SEQ ID NO：7）与抗原肽（例如，SEQ ID NOS：32-35）偶联）的 $(A)_3$ 元件，但本发明的肽还含有其它间隔区（例如，SEQ ID NO：9，NLys）或没有间隔区。Th 表位，如表 8 中的示例，包括来源于外源病原体例如乙肝病毒表面和核心抗原和麻疹病毒 F 蛋白的混杂辅助位点，和表 8 中显示的其它 Th 表位（SEQ ID
25 NOS：8、13、和 43-58）以及表 9 所示的人工 Th（例如 SEQ ID NOS：6、12、36、59）。这些实施例的肽还包括一种任选的常规免疫刺激位点（例如 SEQ ID NO：7）。另外，本发明不限于 Inv 作为附加的免疫刺激元件。

30

实施例 1

表面 CD4/共同受体复合物上的潜在效应子位点的鉴定

A. 肽的设计

在人 CD4 的所有四种结构域内的位点以及代表四种趋化因子受体的外部结构域的共同受体位点，包括 CC-CKR1、CC-CKR2b、CC-CKR3、CCKR5 和 LESTR 被选择出来作为肽的模拟物。因为识别的“表位”（WO 97/46697）是一种天然构型，因此来源于上述受体/共同受体的线形肽均不与 MAb B4 强烈反应，虽然在存在某些来源于 WO 97/46697 所示的趋化因子共同受体结构域的肽时，MAb B4 与 rsCD4 的反应性被显著增强。

10 尽管 MAb B4 与任何单一 CD4-或趋化因子共同受体来源肽缺乏强烈的反应性，但是检测到 MAb B4 对来源于 CD4 多种区域（AA1-A20, AA81-92, AA60-AA109, AA118-AA165, AA235-251, AA297-AA351, or AA361-AA375）的弱反应性。这提示了一种不同的辅助设计合成肽的研究，其将诱导对 MAb B4 识别的构象位点相邻的位点具有反应性的高度亲和抗体，用来抑制目标细胞的 HIV 感染。

因此这种遍布 CD4 的所有四种结构域和多种趋化因子共同受体的外部结构域的潜在位点序列将被设计，和被合成作为目标肽，并通过将来源于 HBsAg（SEQ ID NO: 8）和 Inv（SEQ ID NO: 7）的混杂 Th 与目标位点连接构建肽（如表 1 和表 2 所示），合成免疫原。

20 这些结构域中的特定 CD4 被选择用于环化，其基于 Brookhaven 关于人 CD4 的表面暴露环的 3-维模型预测

（<http://www.pdb.bnl.gov/pdb/bin/pdbids>）。将特定环状限制安置到这些肽中，以便使目标抗原位点和天然 CD4 分子之间的交叉反应最大化。

25 因此，表 1 和 2 中的几个合成结构用天然序列中没有发现、引入的半胱氨酸合成，以产生 Brookhaven 模型所预测的环结构模拟物中的二硫键环。在某些情况下，用丝氨酸取代天然存在的半胱氨酸，以便防止形成对该模型不利的构型。对于趋化因子共同受体来源肽，它们天然结构模拟物中外部结构域 2 和 3 肽之间的交联，如表 2 最右边

30 所示，通过各自结构域中自然存在的半胱氨酸残基形成。

表 1 描述栏中标*的位点已经设计具有特定环化。其它肽位点是线形的。表 1 和 2 的构型栏中标“a”的肽代表单独的 CD4 或 CCKR 目标抗原位点。它们被用作基于肽的 ELISA 的底物抗原。标“b”的肽如图所示被合成与 HBs Th 位点 (SEQ ID NO: 8) 串联连接的目标抗原位点。标“c”的肽是如表 1 和 2 所示与 Inv 结构域的免疫刺激肽 (SEQ ID NO: 7) 串联合成的“b”构建体的变异体。设计为“d”的肽是与通过一个 Gly-Gly 连接结合到 N-末端的第二 Th 肽, CT P11 TH (SEQ ID NO: 13) 串联合成的“b”构建体的变异体。标“e”的肽被合成成为具有定位在 C 末端的 TH 位点和构建体 N-末端的目标抗原位点的若干“b”。标“g”的肽代表一种直接在多聚赖氨酸核心树脂上合成的分支四聚肽。标“x”的肽代表含有一种双链结构的肽, 所述双链结构通过存在于各自链上的自然存在的半胱氨酸残基形成链间二硫键连接而成。

表 1 和 2 所示实验中应用, 但没有在这里显示的其它 Th 位点应用了人工 TH 位点“1、4、9 PALINDROMIC” (SEQ ID NO: 6) 和“Syn Th (1、2、4)” (SEQ ID NO: 12)。还制备了 C 末端上定位有 Inv 位点的肽, 以及 N 末端上 (CD4-CDR2 抗原肽-GG-Th-GG-Inv) 的 CD4-CDR2 抗原, 但没有显示。

还应用用于分隔目标抗原位点和 Th 位点的 Gly-Gly 间隔区, 以及分隔 Th 和 Inv 或第二 Th 免疫刺激位点的间隔区, 合成了用于研究表 1 和 2 的“b”、“c”、“d”、“e”、“x”、和“其它” Th 免疫原性肽。筛选得到的肽免疫原, 得到具有在免疫的宿主中诱导具有下列特性的抗体能力的候选目标抗原位点:

1. 在 ELISA 分析中结合目标抗原位点;
2. 在 ELISA 分析中, 在 CD4 来源的抗原肽的情况下结合 rsCD4,
3. 在免疫荧光分析中结合表达含有 CD4 的细胞表面受体/共同受体复合物的 T 细胞; 和
4. 在体外微平板分析中中和中和抗性-HIV 原代分离株。

B. 候选目标抗原肽的筛选:

1. CD4-和趋化因子受体-来源的目标抗原肽的合成

表 1 和 2 中列出的、其相应构型为 “a”、“b”、“c”、“d”、“e”、或 “x” 的肽分别通过 Merrifield 固相合成技术在 Applied Biosystems 自动肽合成仪 (430、431 和 433A 型) 上应用 Fmoc 化学合成。通过提供 SEQ ID NO: 6 的设计中指定的适当比率的、用于在特定可变位置偶联的可替换氨基酸混合物, 制备含有一种用于人工 T 细胞表位 “(1、4、9 PALINDROMIC) Th” (SEQ ID NO: 6) 的构建合成抗原文库 (SSAL) 的肽免疫原。具有为 B 细胞目标抗原位点或其它 SSAL TH 位点而设计的文库的 SSAL 肽能够以类似方式合成。当完成这些所需肽的组装后, 按照标准程序应用三氟乙酸处理树脂, 以从树脂上切除肽, 并使氨基酸侧链上的保护基团脱封闭。对于环状肽, 将切除下来的肽在 15% DMSO 水溶液中静置 48 小时, 以促进链内半胱氨酸之间二硫键的形成。通过 HPLC 纯化经切除、提取和清洗的肽, 通过质谱和反相 HPLC 鉴定特征。

1. CD4 和趋化因子受体-来源的目标抗原位点-特异性免疫血清的功能效果和评价的形成

按照如下描述的抗体应答血清学分析的实验免疫方案的指示评价肽组合物的免疫原性效果。

标准实验设计:

免疫原:

- (1) 个体肽免疫原; 或
- (2) 含有等摩尔比率的、各方案所指示的肽免疫原的混合物。

剂量:

每次免疫 0.5 ml 中含有 100 μ g, 除非另有说明。

途径:

肌内, 除非另有说明。

佐剂:

- (1) 弗氏完全佐剂 (CFA) /不完全佐剂 (IFA) ;
- (2) 0.4%明矾 (氢氧化铝) ; 或
- (3) 如说明的其它佐剂。每组每个免疫原一种佐剂。

剂量方案:

- 5 0、 2 和 4 周; 或 0、 3 和 6 周; 或另有说明。CFA/IFA 组在 0 周接受 CFA, 在跟着的几周接受 IFA。明矾或其它指定佐剂组对于所有剂量均接受同样的配方。

取血方案:

第 0、 3、 6、 和 8 周, 或另有说明。

- 10 动物品种:

Duncan Hartley 豚鼠

组数:

3 只豚鼠/组

分析:

- 15 用于每种免疫血清的抗-肽活性的具体 ELISA。固相底物是对应“a”型的目标抗原肽 (例如, CD4 目标抗原肽, 趋化因子受体来源的肽, 等)。

采血, 处理成血清, 在通过 ELISA 用目标抗原肽测定效价之前储藏。

20

2. 血清和抗体

- 在几个血清学分析中评价下列血清学反应物, 来源于豚鼠的免疫血清或者鼠科动物或人化单克隆抗体。如上述在免疫后的各时间点得到抗 rsCD4、CD4-和趋化因子共同受体-来源的目标抗原位点的所有豚鼠血清。其它血清学反应物通过以前的研究或所述外界资源获得。它们偶尔为了比较的目的而被引入。

- 例如 gp 抗-gp120 V3 MN (抗-V3 MN) 是从经一种相应于来自 HIV-1 MN gp120 的超可变 V3 结构域的合成肽抗原超免疫的豚鼠中收集的 (Wang 等, 科学, 1991, 254: 285-288)。从用约 10^{13} 可能性 HIV-1 V3 序列的 SSAL 表示的肽复杂混合物超免疫的豚鼠中得

30

到的 GP 抗-gp120 V3 MN 文库血清汇集抗血清（抗-V3 SSAL）。用于免疫豚鼠的 V3 MN 和 V3 SSAL 免疫原是多分支的 V3 合成肽免疫原，其用于产生具有中和几种如 Walfield 等（《AIDS 研究综述》第 18 章，Koff 等编，Marcel Dekker: New York, 1993, pp.345-360）所述 5 的 HIV-1 实验株系的活性的多克隆抗体。

另一种抗-gp120 抗体是一种被称为 IgG1 b12 的重组人单克隆抗体，其对 CD4 的 gp120 结合位点具有特异性（抗-gp120 CD4-BS）（Burton 等，科学，1994，266：1024-1027）。从长期无症状的 HIV-1 血清阳性供体的骨髓制备的抗体-噬菌体陈列文库中产生作为一种 10 Fab 片段的 IgG1 b12，然后通过克隆到重组 DNA IgG1 表达载体中将其转化成一种完全人类抗体。它被看作中和多样性 HIV 原代分离株的抗体的“黄金标准”（Burton 等，同上）。

3. 抗-肽的 ELISA

15 通过 ELISA（酶联免疫吸附分析），应用相应的“a”型目标抗原肽作为免疫吸附剂涂布的 96 孔平底微滴度平板确定抗-肽的抗体活性。浓度为 5 μ g/ml 的目标抗原肽溶液的等分样（100 μ L）在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。用 3%明胶/PBS 溶液封闭平板，再次于 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。然后干燥封闭平板，用于分析。实验免疫血清的等分样（100 μ L）， 20 在样品稀释缓冲液中用 1:100 的稀释度起始，然后将十倍连续稀释液加入肽涂布的平板中。平板在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。

用 0.05% PBS/TWEEN[®]缓冲液冲洗平板六次。加入适当稀释度的在结合稀释缓冲液（含有 0.5 M NaCl、和正常山羊血清的磷酸盐缓冲液）中的 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的山羊-抗-品种特异性抗体。平 25 板在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时，然后如上述清洗。然后加入间苯二胺底物溶液的等分样（100 μ L）。用 5-15 分钟的时间形成颜色，然后加入 50 μ L 2N H₂SO₄ 终止酶颜色反应。在平板读数仪中记录各孔 A₄₉₂ 的含量。基于吸收度的线性回归分析，将截止 A₄₉₂ 置于 0.5，计算以吸收度倒数的 Log₁₀ 显示的 ELISA 效价。该截止值是精确的，因为进行每次分 30 析稀释正常豚鼠对照样品的值均少于 0.15。

4. 确定与 rsCD4、和与 CD4-表达细胞的抗体反应能力

a. 通过 rsCD4 ELISA 确定抗-CD4 的反应性

从商业途径(美国生物技术公司, Cambridge, MA)和从 NIH(USA) AIDS 研究和参考试剂项目(NIH(USA) AIDS Research and Reference Reagent Program)得到纯化的重组可溶性 CD4(rsCD4)。用 0.25 μ g/ml rsCD4 的 10 mM NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.5)每孔置 100 μ L, 在 4 $^{\circ}$ C 保温过夜, 得到的涂布 96-孔微滴度平板用于进行 rsCD4 ELISA。将 250 μ L 3%重量的明胶 PBS 溶液加入 rsCD4-涂布的孔中, 于 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 以封闭结合位点的非特异性蛋白质, 用含有体积百分比为 0.05% TWEEN 20 的 PBS 清洗 3 次, 然后干燥。

用含有体积百分比为 20%的正常山羊血清、重量百分比为 1%的明胶和体积百分比为 0.05%的 TWEEN 20 的 PBS 以 1:20 的体积对体积稀释度连续稀释免疫血清或单克隆抗体, 除非另有说明。将 100 μ L 的稀释样品加入各孔, 使其在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。然后用体积百分比为 0.05% TWEEN 20 的 PBS 溶液清洗孔六次, 以除去未结合的标记抗体。向各孔中加入在体积百分比为 1%的正常山羊血清、体积百分比为 0.05% TWEEN 20 的 PBS 中稀释度为 1:1000 的 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的山羊抗-小鼠 IgG 或山羊抗-豚鼠 IgG, 于 37 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟。用体积百分比为 0.05% TWEEN 20 的 PBS 清洗孔 6 次, 以除去未结合的标记抗体结合物, 然后与 100 μ L 含有重量百分比为 0.04%间苯二胺(OPD)和体积百分比为 0.12%过氧化氢的柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)底物混合物反应 15 分钟。加入 100 μ L 1.0 M H₂SO₄ 中止反应, 测定 492 nm (A₄₉₂) 的吸收度。计算 Log₁₀ 抗体效价的倒数, 评价各实验样品的终点反应性, 如插入的线形回归, 如抗-肽 ELISA 的描述。

a. 通过间接免疫荧光染色确定对 CD4-表达细胞的反应性

每孔 0.5 \times 10⁶ CD4-表达细胞(例如, HPB-ALL、MT2 或 SUP-T1 细胞系的细胞)在含有 1% BSA 的 PBS 中清洗两次, 之后将它们与指定的免疫血清或单克隆抗体, 以各实验所确定的最佳浓度, 在室温下保温 45 分钟。当细胞与第一染色抗体保温后, 在同样的清洗缓冲液

中再清洗两次，然后与适当稀释度的第二种荧光素异硫氰酸酯 (FITC) -结合的山羊抗-小鼠 IgG 或 (FITC) -结合的山羊抗-品种特异性 IgG 试剂 (Cappel, Malvern PA) 一起在室温下保温 45 分钟。被染色的细胞再次在同样的清洗缓冲液中清洗，处理细胞通过用于确定染色细胞百分数和染色密度的细胞荧光照相和/或免疫荧光显微镜进行荧光分析。

b. 间接荧光抑制分析

为了比较应用间接免疫荧光染色技术的“生物素酰化单克隆抗体 B4-T 细胞”的结合抑制分析，首先将细胞与干扰试剂或适当稀释的免疫血清共同保温，然后在同样的清洗缓冲液中清洗两次，之后加入生物素酰化的单克隆抗体 B4。通过随后与适当稀释的 FITC-抗生物素蛋白共同保温，完成 CD4-表达 T 细胞的染色，然后再清洗三次，之后通过细胞荧光照相或高分辨荧光显微镜分析。

5. 通过抗体确定病毒中和

a. 细胞

将人 T 细胞系 MT-2 (ATCC 237) 在如以前所述的添加 15%胎牛血清的 Dulbecco's 改进 Eagle 培养基 (Hanson 等, 临床微生物杂志, 1990, 28: 2030-2034) 中维持生长。通过 Ficoll-Hypaque 梯度分离 (Organon Teknika Corp., Durham, NC) 从血沉棕黄层单元中分离 HIV-1 血清阴性供体的外周血单核细胞 (PBMC)。得到的 PBMC 用 0.5% PHA-P (Difco Laboratories, Detroit, MI) 刺激。3-4 天后，除去含 PHA-P 的培养基，细胞在添加 15%胎牛血清、900 μ g/ml 谷氨酰胺、抗生素、和 5%白介素-2 (Cellular Products, Inc., Buffalo, NY) 的 RPMI 中维持。

b. 病毒

HIV-1 MN 是一种由国立卫生研究所, Bethesda MD (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program Catalog no. 402) 提供和维持的、作为持续感染的 H9 细胞培养物的 TCLA 株系，从中制备无细胞浓缩贮备液。通过 PBMC 共培养从患者 PBMC 制备 HIV-1 的原代分

离株。制备在 PBMC 中不超过 3-5 代的原代分离株储备培养物，然后通过离心澄清（Sawyer 等，病毒学杂志，1994，68：1342-1349）。California 健康服务部，Berkeley CA 的 Carl Hanson 提供它们。

c. MT-2 微噬斑中和分析

- 5 应用连续稀释的血清或抗体与固定量的 HIV 预保温，随后感染 HIV-敏感 MT-2 细胞，并形成显示 HIV 诱导的微噬斑的细胞单层，来确定 HIV-中和抗体的效价。结果通过微噬斑定量记分。该分析仅适用于 SI 分离体，是 TCLA 还是原代分离株，因为微噬斑代表由 MT-2 细胞与 HIV-感染细胞融合形成的巨大合胞体。该分析适用于评价
- 10 病毒对细胞和细胞对细胞传递的抑制，因为合胞体形成的抑制来自抗体对 HIV 颗粒或 HIV-感染细胞的作用，即，该分析测定了病毒对细胞 HIV-诱导的融合或细胞对细胞 HIV-诱导的融合的抑制。然后 1 周后通过列举 propidium 碘染色的噬斑观察到的噬斑的减少观察中和作用（参见，Hanson 等，临床微生物学杂志，1990，28：2030-2034）。
- 15 在该分析中，病毒和血清或抗体在 50%汇集的、去除纤维蛋白的正常人血浆中稀释，以忽略任何非特异性增强或抑制效应。

C. 结果

用于免疫原性和初步功能研究的候选 CD4-或趋化因子共同受体来源的目标抗原位点和肽在表 1 和 2 中描述。

- 20 用“b”或“c”型目标抗原位点如上述免疫豚鼠，除非表 3 和 4 中另有说明，首次免疫后的第 6 或 8 周收集的免疫血清通过抗-肽 ELISA 和 rsCD4 ELISA 如程序中的描述进行分析。

- 25 如表 3 和 4 中所示，大多数 CD4-和趋化因子共同受体来源的肽免疫原具有高度免疫原性，因为它们诱导效价在 2.5 到 >5 Log_{10} 范围内的抗-肽抗体，除了肽 p1590b、p1699b、p1699c 和 p1700b。含有 CD4 受体长片段（例如，p1612c、p1678b、p1678c、p1686b、p1697b、p1697b、p1817b、p1889b 和 p1901b）以及一些环化的目标位点的 CD4-来源的抗原位点与 rsCD4 高度交叉反应，如同它们相应的 >3.5 Log_{10} 的抗-rsCD4 的 ELISA 效价所示（参见表 3，A2 栏）。每种肽构建体与 rsCD4
- 30 的交叉反应性是不可预测的。而且，该 rsCD4 交叉反应性不延伸到相

应宿主细胞表面的、肽构建体具有高度 CD4 交叉反应性的 CD4，通过用 HPB-ALL 或 MT2 细胞系间接免疫荧光染色仅发现 p1697b 和 p1901b 与 CD4 表达 T 细胞具有强烈反应性（表 3，B 栏）。

相比较而言，来源于 CD4 目标抗原位点、具有环状结构的肽（例如 p1472b、p1472c）或来源于 CDR2 结构域（例如 p1403b、p1471c）的血清与 CD4 表达 T 细胞强烈反应，尽管它们与 rsCD4 的交叉反应性较低（表 3，B 栏）。对于趋化因子共同-受体，发现来源于肽构建体 p1990、p1999、p2028、p2047、p2048、p2049、p2087 和 p2089 的血清，其中大多数具有来自共同受体 1、3 或 4 结构域的序列，与“表面受体/共同受体复合物”反应（表 4，B 栏）。

上述结果表明与 rsCD4 或表明受体/共同受体复合物的交叉反应性是一种复杂且不可预测的现象，其被仅能够通过实验观察推测的构象特征影响。

还通过上述 MT-2 微噬斑中和分析筛选了由上述肽构建体获得的免疫血清（初始免疫后 6 或 8 周）的抗 HIV-1 B 进化枝原代分离株 VL 135 的中和活性。尽管在某些免疫血清中存在与 rsCD4 或“表面 CD4/共同受体复合物”交叉反应的高效价抗体，但该中和抗体未显示显著水平（表 3 和 4，C 栏）。

进一步评价与 CD4-表达 T 细胞具有高亮度免疫荧光染色模式的免疫血清的抑制或阻断 MA b B4 与 CD4 表达 T 细胞结合的能力，以便确定靠近 MA b B4 识别构象表位的不连续位点的潜在效应子位点。从这些实验得到的结果可能得出有效地设计新的肽免疫原的思路。通过涉及“MA b B4-T 细胞”结合的免疫荧光染色抑制的实验进行上述评价。将 CD4+目标 T 细胞（例如，MT2 T 细胞）与适当稀释（例如 1:10）的免疫原预保温，然后将细胞与生物素酰化的 MA b B4 和 FITC-结合的抗生物素蛋白按照前面描述的详细程序共同保温。

在所有被评价的免疫血清中，仅发现通过用来源于 CD4-CDR2 结构域的肽 p1471c 免疫产生的血清抑制 MA b B4 的结合（表 5）。用趋化因子共同受体来源肽免疫得到的那些血清不干扰“MA b B4-T 细胞”的结合。该“MA b B4-T 细胞”结合抑制作用的缺乏可能部分与

抗体对潜在效应位点表现不够理想的亲和力有关，可能不单因为目标抗原位点所代表的位点至 MA b B4 识别位点的空间距离所致。

除了一个之外的全部抗受体和共同受体肽的超免疫血清均不能抑制 MA b B4 与 T 细胞的结合，而且没有表现抗 HIV 原代分离株的中和活性。进一步进行如下尝试，基于 CD4 序列中 p1471 的位置，设计具有目标的新的肽构建体，以捕获表面 CD4 上的潜在效应位点，通过“MA b B4-T 细胞结合”抑制研究提供了线索。

更具体地说，含有在 CD4-CDR2 结构域周围、按照 SEQ ID NO: 1 编号系统跨越 20-75 位氨基酸残基的目标抗原位点的肽被再次设计，在特别强调保留该区 3D-结构的情况下，通过在来源于具有环状结构、大小在 30-45 个氨基酸之间的 CDR2 区的肽的 N-和 C-末端插入半胱氨酸残基重新设计了覆盖该区的其它肽构建体。来源于所述区域的代表性肽构建体的氨基酸序列如表 6 所示。

初始免疫后 6 或 8 周收集免疫血清，按照类似于前面筛选中所述的方法评价。在 41 个被评价的目标抗原位点中，发现 p205、 p2189、 p2190、和 p2240 (SEQ ID NOS:4, 11, 10, 和 5)，即“c”构建体 (SEQ ID NOS:32-35)能够诱导抗 HIV-1 原代分离株的中和抗体(表 6)。分离株 VL135 (表 6) (Sawyer 等，病毒学杂志，1994, 68:1342-1349)是一种代表性的中和抗性原代分离株。它不是一种能够用于提供表观但易误导阳性的非典型性中和敏感性原代分离株(D. Burton and J. Moore, 天然药物, 1998, 4:495-48)。因此，这里观察到的病毒中和作用不是一种容易被中和的病毒的钝化作用，而证明是对 HIV 野生分离株攻击所产生的保护性免疫。在 AIDS 研究领域还未曾观察到化学概念的免疫原诱导具有上述严格 HIV 中和功能的抗体。尽管 MA b B4 对任何 C4-CDR2 结构域位点肽缺乏结合活性（如共同待审的专利申请公开文本 WO97/46697 中所示），本文证明 CD4-CDR2 目标位点靠近构成中和性单克隆抗体 B4 的识别位点的不连续分布表位。该识别位点可能含有来自 CD4 所有四种结构域的的肽位点，这可能由于 MA b B4 识别的“包含 CD4 的表面受体/共同受体复合物”的弧形性质。这种“表面 CD4”不同于众所周知的 rsCD4 的延伸 3D-模型。值得注意的是仅某

些来源于 CD4-CDR2 区的目标抗原位点，即跨越更宽区域并表现位环状肽的那些（例如，p2057c、p2189c、p2190c 和 p2240c，SEQ ID NOS:32-35），诱导所述中和抗体。

5

实施例 2

肽 p2057c 和 p2240c 产生的超免疫血清表明广泛的抗 HIV 多种原代进化枝的反应性中和抗体

如表 7 所示，在一个与 MAb B4 证明模式的平行模式中，来源于肽免疫原 p2057c 和 p2240c（SEQ ID NOS: 32 和 35）初始免疫后 15 和 12 周采集血样的超免疫血清均证明具有显著的、90%的抗 HIV 多种进化枝原代分离株的中和抗体效价。中和抗体效价范围为增加的级数，对于进化枝 D、A、B（DH12）、E 到 B（VL 135）和进化枝 C 的原代分离株（是针对 p2057c 的免疫血清，SEQ ID NO: 32）为 1:20 至 1:185；对于进化枝 D、B（DH12）、A、E 到进化枝 B（VL 135）的原代分离株（是针对 p2240c 的免疫血清，SEQ ID NO: 35）为 1:20 到 1:324。为了测定当量值，将 MAb B4 对 HIV-1 进化枝 D、A、E、C、B（DH12）的原代分离株到进化枝 B（原代分离株 VL 135）的中和活性定在 25.6 μ g/ml-1.54 μ g/ml 范围内。相比较而言，针对 N 段 gp120 V3 区域的豚鼠血清及针对 HIV-1 MN(MAb 50.1)gp120 N 段的 V3 区域或较少变异构形的 gp120 CD4 结合位点（MAb IgG1 b12）的单克隆抗体无法中和任何这类中和抗性 HIV 原代分离株。如表 7 所证明的，抗 p2057c 和抗 p2240c 的免疫血清（针对 HIV A 到 E 型原代分离株可提供 90%的中和作用）的 1:20 至 1:300 稀释度近似为 MAb B4 在约 300 μ g/ml 的未稀释血清中的浓度（数值得自等量中和活性的血清稀释浓度与 MAb B4 浓度计算（即，MAb B4 的平均浓度（ μ g/ml）x 抗每种相应分离株的中和活性的免疫血清稀释系数）。

25

实施例 3

在具有保护恒河猴抗 SIVmac251 感染功效的血清中，

中和抗体效价的相互关系

在共同待审的专利申请 WO 97/46697 中，通过 MA b B4 对抗以 SIV 实验性感染恒河猴的攻击实验评价 MA b B4 的保护功效及其在体内对中和抗体的相互关系，这也是针对人类 AIDS 常用的实验动物模型。

5 在该研究中，用 MA b B4 灌注恒河猴，在处理前、攻击前、及攻击后 1 小时的时间点收集血清用于评价。通过对预校正的 MA b B4 曲线的 rsCD4 免疫分析确定 MA b B4 抗体的血清浓度，发现对所有接受 5 mg/kg 体重剂量的所有动物，MA b B4 抗体的血清浓度均在 30-45 μ g/ml 范围内。在一年的监测期内，3/4 接受 MA b B4 的动物可以被保护而对抗 SIVmac251。存在于被攻击动物体内血清中的 MA b B4 的浓度（即，30-45 μ g/ml）远低于抗-（CD4-CDR2 抗原肽）抗体的预估浓度（约 300 μ g/ml），它是已由一种含 p2057c 或 p2240c（SEQ ID NOS: 32 和 35）的免疫原成分免疫宿主后，存在宿主体内免疫血清中的抗体。

15 因此，以本发明的包含 SEQ ID NOS: 4、5、10 和 11 或其类似物的本发明肽组合物免疫的宿主可预期具有保护性免疫性，从而避免被 HIV 多种进化枝的分离株所感染。

实施例 4

20 包含一种混杂人工 Th 表位的免疫原性肽组合物

依照(SEQ ID NO:6)-Gly-Gly-(SEQ ID NO:5)的设计，合成一种人工 Th/CD4-CDR2 抗原肽，并命名为 SEQ ID NO: 60。

SEQ ID NO: 60 的肽被配制于 ISA 206/DDA。ISA 206/DDA 是一种油/水乳剂，其中将二甲基十八烷基溴化铵（DDA）分散于
25 MONTANIDE™ ISA 206（30 mg/ml）（MONTANIDE™ ISA 206 是由 SEPPIC Inc., Fairfield, NJ）提供的油性可代谢溶液）。接着油性悬浮液以 1: 1 的体积比乳化于水性肽溶液，其已调整多肽含量以提供在最终 0.5 ml 制备物中所需剂量量的肽组合物。

在上述制剂中，在 0、3 和 6 周接受 100 μ g/剂量的豚鼠中建立 SEQ
30 ID NO: 60 的免疫原性。通过实施例 1 中描述的抗-肽 ELISA，利用

SEQ ID NO: 5 作为用于固相底物的环化目标抗原位点肽确定免疫原性。全部六只豚鼠均成功地血清转化成 ELISA 反应性。

显著地，还发现 SEQ ID NO: 60 在大量动物中具有高度免疫原性和功能活性。在不完全弗氏佐剂 (IFA) 中配制含有 SEQ ID NO: 5 60 的免疫原性组合物，300 μ g/剂量，然后在第 0、3、和 6 周通过肌肉注射施用给猪。经血清转化的猪及取自第 8 周的血清通过 MT-2 微噬斑中和作用分析 (实施例 1) 测试对抗原代分离株 HIV-1 VL135 的中和作用活性。猪血清样品对以 1: 249 稀释度注入的病毒提供 50% 的中和作用；对 1: 97 稀释度则提供 90% 中和作用。因此，用本发明的肽组合物免疫赋予大型动物宿主一种免疫反应，这种反应包括抗体对包含 CD4 的宿主细胞受体和中和 HIV 的活性。

实施例 5

本发明的代表性肽构建体

15 表 10 中所示的本发明的免疫原性肽是完全合成的构建体，其通过实施例 1 中描述的固相法合成。该表中的每种肽均可由式(A)_n-(Th)_m-(B)_o-(CD4-CDR2 抗原)-X 表示，但前面公开的其它通式所代表的肽应当理解为在本发明的肽范围内。CD4-CDR2 抗原序列是 SEQ ID NO: 4 或 5。所示的免疫原性肽包含人工 Th 位点 (如表 9 所示)。

20 该实施例的每种肽在免疫原性元件之间都有 Gly-Gly 间隔区，但本发明的肽还可能具有其它间隔区，例如 ϵ NLY 或无间隔区。

材料和方法

如实施例 1 所述将表 10 所列出的本发明的代表性肽构建体 (SEQ ID NOS: 60、61、和 62) 合成、切除、环化和纯化。配制所述肽构建体，免疫小动物例如豚鼠或大动物例如猪或狒狒，用于评价它们的免疫原性。将肽在体积为 0.5 ml 的包含代表性乳化剂或佐剂例如 ISA51、ISA720、DDA 或单磷脂酰脂类 A (MPL) 中悬浮。对于豚鼠肽剂量为 100 μ g，对于猪或狒狒为 300 μ g，将动物肌肉内接种。

30 如表 1 的说明，动物在 0、3 和 6 周接受注射。通过实施例 1 描述的 rsCD4 ELISA 评价初始免疫后 5、8 或其它指定周测试血样对

rsCD4 的交叉反应性，然后仍然按照实施例 1 所述进一步测试它们中和 HIV-1 原代分离株的能力。

结果

代表性肽构建体均具有相关的免疫原性，所有被测试的肽均诱导
5 对相应 rsCD4 的强烈的位点-导向交叉反应性，正如在抗-人 rsCD4
ELISA 中 Log_{10} 效价超过 3.5 所示（表 11）。还观察到从豚鼠、猪、
和狒狒中得到的免疫血清具有中和 HIV-1 原代分离株（例如，VL135）
的作用。狒狒血清的该功能性交叉反应性非常值得注意，因为狒狒血
10 清中和人 HIV 原代分离株的作用几乎为一种人类系统。因此，该灵长
类动物模型有力地指明了本发明的肽构建体作为通过主动免疫预防
和/或免疫治疗 HIV 感染的试剂的功效。

表 1

来源于 CD4 的肽的结构描述

代码	描述	形式†	代码	描述	形式†
-	rsCD4	a	p1616	(C) CD4 (40-43)(C) *	b, c
p1403	CD4 (43-55)	b, c	p1617	(C) CD4 (52-54)(C) *	b, c
p1404	(C)CD4(38-47)(C)*	b, c	p1618	(C) CD4 (51-55)(C) *	b, c
p1405	CD4 (81-92)	b, c	p1619	(C) CD4 (48-52)(C) *	b, c
p1406	CD4 (18-29)	b, c	p1620	(C) CD4 (85-90)(C)*	b, c
p1460	CD4 (1-109)	a	p1621	(C) CD4 (85-89)(C)*	b, c
p1468	CD4 (47-64)	b, c	p1622	(C) CD4 (85-90)(C) *	b, c
p1469	CD4 (39-45)	b, c	p1678	(C) CD4 (291-306)(C)*	b, c
p1470	(C) CD4 (36-45)(C)*	b, c	p1679	(C) CD4 (297-302)(C)*	b, c
p1471	CD4 (39-67)	b, c	p1680	(C) CD4 (303-315)(C)*	b, c
p1472	(C) CD4 (115-130 (C→S) -137)	b, c	p1681	(C) CD4 (309-313)(C) *	b, c
p1518	CD4 (60-109)	b, c	p1682	(C) CD4 (314-328)(C) *	b, c
p1585	(C) CD4 (36-47)(C) *	b, c	p1683	(C) CD4 (291-306)(C) *	b, c
p1586	(C) CD4 (42-59)(C) *	b, c	p1684	(C) CD4 (315-346)(C)*	b, c
p1587	(C) CD4 (44-56)(C) *	b, c	p1685	(C) CD4 (338-343)(C)*	b, c
p1588	(C) CD4 (46-55)(C) *	b, c	p1686	(C) CD4 (341-360)(C)*	b, c
p1589	(C) CD4 (79-96)(C)*	b, c	p1687	(C) CD4 (349-353)(C)*	b, c
p1590	(C) CD4 (104-115)(C)*	b, c	p1688	(C) CD4 (202-205)(C)*	b, c
p1608	CD4 (16-25)(C) *	c	p1689	(C) CD4 (213-226)(C)*	b, c
p1609	(C) CD4 (118-128)(C)*	c	p1690	(C) CD4 (217-221)(C)*	b, c
p1610	(C) CD4 (127-130 (C→S) -141)(C)*	c	p1691	(C) CD4 (228-239)(C) *	b, c
p1611	(C) CD4 (138-146)(C)*	c	p1692	(C) CD4 (231-237)(C) *	b, c
p1612	(C) CD4 (133-153)(C)*	c	p1693	(C) CD4 (235-251)(C)*	b, c
p1613	CD4 (159-169)(C)*	c	p1694	(C) CD4 (243-246)(C) *	b, c
p1615	(C) CD4 (39-44)(C) *	b, c	p1695	(C) CD4 (247-259)(C) *	b, c
p1696	(C) CD4 (250-255)(C) *	b, c	p1817	CD4[118-130(C)-159(C)-165]*	b
p1697	(C) CD4 (274-286)(C) *	b, c	p1818	CD4(81-92) X CD4 (6-20)	b x a
p1698	(C) CD4 (277-282)(C) *	b, c	p1820	CD4 (154-165) X CD4 (117-140)	a x b

表 1 (续页)

代码	描述	构成	代码	描述	构成
p1699	CD4 (168-182)	b, c	p1821	CD4 (154-165) X CD4 (123-	a x b
p1700	(C)CD4 (151-178) (C)*	b, c	p1848	CD4[(68-92)-M]	q
p1701	CD4 (361-375)	b, c	p1856	CD4(79-88) X CD4(1-20)	a x b
p1702	CD4 (14-22)	b	p1857	CD4(79-88) X CD4(1-20)	b x a
p1761	CD4 (123-134)	b	p1858	CD4 (1-20)	b
p1763	CD4 (72-92)	b	P1864	CD4(1-20) X CD4 (156-173)	b x a
p1765	(C) CD4 (70-84)	b	p1868	CD4 (297-351) *	b
p1766	CD4 (6-26)	b	p1875	CD4(87-98)	b
p1767	CD4 (6-20)	b	p1876	CD4 (81-98)	b
p1768	CD4 (154-165)	b	p1877	CD4 (76-98)	b
p1769	CD4 (156-173)	b	p1878	(C) CD4 (77-98) (C) *	b
p1770	CD4 (146-170)	b	p1879	(C) CD4 (77-103) *	b
p1771	CD4 (117-140)	b	p1880	CD4 (72-103) *	b
p1773	CD4 (72-92) X CD4 (6-26)	a x b	p1886	CD4(341-375)	b
p1775	CD4 (72-92) X CD4 (6-20)	a x b	p1889	CD4(213-251)	b
p1777	CD4 (117-140) X CD4	a x b	p1901	CD4(1-26)	b
p1778	CD4 (117-140) X CD4	a x b	p1905	CD4(303-C345-353) *	b
p1780	CD4 (123-134) X CD4	a x b	p2037	(C) CD4(68-C84-88) *	b
p1781	CD4 (123-134) X CD4	a x b	p2038	(C) CD4(68-C84) *	b
p1783	CD4 (6-20) X CD4 (72-92)	a x b	p2078	CD4 (1-20)	e
p1784	CD4 (6-26) X CD4 (72-92)	a x b	p2100	(C) CD4(68-C84 -92) *	b
p1813	CD4 (79-88)	b	p2101	(C) CD4(68-C84 -98) *	b

t 肽构建体的构成被命名为 a, b, c, e, g, 和 x, 其中:

a 代表目标抗原位点

b 代表 HBsTh-GG-目标抗原位点

c 代表 Inv-GG-HBsTh-GG-目标抗原位点

e 代表目标抗原位点-GG-HBsTh

g 代表在 K₂KAA 核心上的分支四聚体目标抗原位点

x 代表通过链间二硫键交联的肽链

* 通过在或靠近目标抗原位点 N 和 C 端的半胱氨酸环化的肽

表 2
来源于β 趋化因子受体的肽的结构描述

趋化因子受体 的类型	代表趋化因子受体外部结构域的肽抗原														
	1			2			3			4			2/3		
	代码	描述	构成	代码	描述	†	代码	描述	†	代码	描述	†	代码	描述	†
CC-CKR1#	p1999	AA1-AA34	e	p2004	AA94-AA107	e	p2027	AA168-AA203	b	p2028	AA261-AA287	b	p2006	AA94-AA107 X	d x a
CC-CKR2#	p2086	AA1-AA43	e	p2087	AA100-AA114	b	p2088	AA182-AA207	b	p2089	AA269-AA285	b	p2091	AA172-AA203 AA100-AA114 X	b x a
CC-CKR3#	p2079	AA1-AA35	e	p2080	AA92-AA107	b	p2081	AA173-AA204	b	p2082	AA265-AA281	b	p2084	AA92-AA107 X	b x a
CC-CKR5#	p2045	AA1-AA29	e	p2046	AA88-AA102	b	p2047	AA168-AA199	b	p2048	AA261-AA277	b	p2049	AA88-AA102 X	a x a
Fusin (LESTR)#	p1987	AA1-AA38	e	p2041	AA103-AA114	b	p1990	AA181-AA203	e	p1991	AA262-AA285	b	p1996	AA181-203 X	d x a

† 肽构建体的构成被列作 a, b, d, e, 和 x, 其中:

- a 代表目标抗原位点
- b 代表 HBsTh-GG-目标抗原位点
- d 代表 CT P11 Th-GG-HBsTh-GG-目标抗原位点
- e 代表目标抗原位点-GG-HBsTh
- x 代表通过一个链间二硫键交联的两个肽链
- # 趋化因子外部结构域肽, 从下面描述的核酸序列推测出的氨基酸序列的编号系统

LESTR (Loetscher *et al*, 生物化学杂志, 1994, 269:232)
 CC-CKR1, CC-CKR2b, CC-CKR3, CC-CKR5 (M. Samson 等, 生物化学 (Biochemistry) 1996, 35, 3362)

表 3

通过 ELISA 及中和分析确定的 CD4-来源肽的免疫原性和功能图谱

肽代码			B	C	肽代码	A1	A2	B	C	肽代码	A1	A2	B	C
rs CD4		>5	+++	<1:10	p1588 b	4.3	3.2	-	<1:10	p1621 c	3.5	1.1	-	<1:10
p1403 b	4.3	2.6	+++	<1:10	p1588 c	4.3	3.2	-	<1:10	p1622 b	4.3	1.1	-	<1:10
p1403 c	4.3	2.1	Tr	<1:10	p1589 b	4.3	2.2	-	<1:10	p1678 b	2.8	4.5	+	<1:10
p1404 b	2	<1	Tr	<1:10	p1589 c	4.3	2.2	-	<1:10	p1678 c	4.3	4.5	+	<1:10
p1404 c	4.3	2.6	++	<1:10	p1590 b	4.8	1.7	-	<1:10	p1679 b	2.5	2.1	-	<1:10
p1405 b	4.3	1.1	-	<1:10	p1590 c	4.8	1.7	-	<1:10	p1679 c	2.5	1.9	+	<1:10
p1405 c	>5	1.8	-	<1:10	p1608 c	3.3	0.8	tr	<1:10	p1680 b	4.5	2.9	++	<1:10
p1406 b	4.3	0.9	-	1:12	p1609 c	4.3	1.5	tr	<1:10	p1680 c	4.5	2.5	++	<1:10
p1406 c	4.3	0.9	-	<1:10	p1610 c	3.3	<1	-	<1:10	p1681 b	4.3	1.8	++	<1:10
p1460 a	4.3	2.4	-	<1:10	p1611 c	2	1.9	tr	<1:10	p1681 c	3.5	1.6	+	<1:10
p1460 #	3.3	1.2	-	<1:10	p1612 c	>5	>5	-	<1:10	p1682 b	>5	2.7	+	<1:10
p1469 b	4.3	2.6	-	<1:10	p1613 c	4.3	1.0	tr	<1:10	p1682 c	>5	2.7	+	<1:10
p1469 c	4.3	3.1	Tr	<1:10	p1614 b	>5	1.9	-	<1:10	p1683 b	>5	1.8	+	<1:10
p1470 b	3	0.5	Tr	<1:10	p1614 c	>5	2.6	-	<1:10	p1683 c	4.0	1.6	+	<1:10
p1471 a	3.3	2.5	-	<1:10	p1615 b	2.0	1.3	-	<1:10	p1684 b	>5	2.9	+	<1:10
p1471 b	3.3	2.8	Tr	<1:10	p1615 c	4.3	1.7	-	<1:10	p1684 c	>5	2.5	++	<1:10
p1471 c	4.3	2.7	++	<1:10	p1616 b	>5	1.1	tr	<1:10	p1685 b	>5	1.8	+	<1:10
p1472 b	4.3	1.3	+++	<1:10	p1616 c	3.8	1.2	-	<1:10	p1685 c	3.0	1.6	+	<1:10
p1472 c	4.3	1.8	+++	<1:10	p1617 b	>5	1.2	-	<1:10	p1686 b	4.3	4.1	+	<1:10
p1518 b	4.3	3.7	-	<1:10	p1617 c	2.0	1.4	-	<1:10	p1686 c	4.3	3.5	tr	<1:10
p1518 c	4.3	3.7	-	<1:10	p1618 b	>5	1.0	-	<1:10	p1687 b	4.3	2.9	++	<1:10
p1585 b	4.3	3.0	-	<1:10	p1618 c	4.3	1.1	-	<1:10	p1687 c	4.3	2.0	+	<1:10
p1585 c	4.3	3.0	-	<1:10	p1619 b	4.3	1.4	-	<1:10	p1688 b	>5	2.4	+	<1:10
p1586 b	4.3	3.2	-	<1:10	p1619 c	4.3	1.4	-	<1:10	p1688 c	4.3	2.4	+	<1:10
p1586 c	4.3	3.2	-	<1:10	p1620 b	>5	1.7	tr	<1:10	p1689 b	4.3	2.9	++	<1:10
p1587 b	4.3	3.2	-	<1:10	p1620 c	>5	1.4	-	<1:10	p1689 c	3.8	2.5	++	<1:10
p1587 c	4.3	3.2	-	<1:10	p1621 b	>5	1.4	-	<1:10	p1690 b	3	2.1	++	<1:10

表 3 (续页)

肽代码	A1	A2	B	C	肽代码	A1	A2	B	C
p1690 c	2.0	1.9	++	<1:10	p1771 b	>5	2.8	+++	<1:10
p1692 b	4.3	1.7	+	<1:10	p1773 x	>5	1.2	-	<1:10
p1693 c	4.3	2.7	+	<1:10	p1775 x	4.3	1.3	-	<1:10
p1694 b	3.0	1.8	-	<1:10	p1777 x	4.5	1.7	-	<1:10
p1694 c	3	1.8	Tr	<1:10	p1778 x	>5	2.7	-	<1:10
p1695 b	3.0	2.0	++	<1:10	p1780 x	>5	1.2	++	<1:10
p1695 c	2.5	2.1	+	<1:10	p1781 x	>5	2.7	-	<1:10
p1696 b	>5	1.8	+	<1:10	p1783 x	4.3	1.2	-	<1:10
p1696 c	>5	1.9	Tr	<1:10	p1784 x	4.3	1.4	-	<1:10
p1697 b	>5	4.2	++	<1:10	p1813 b	3.3	1.5	-	<1:10
p1697 c	3.5	2.1	+	<1:10	p1817 b	>5	4.5	+	<1:10
p1697 c	3.5	2.1	++	<1:10	p1818 x	>5	1.3	-	<1:10
p1698 b	3.5	1.7	-	<1:10	p1820 x	>5	2.5	tr	<1:10
p1698 c	2.0	1.8	-	<1:10	p1821 x	>5	1.3	-	<1:10
p1699 b	1.5	-	-	<1:10	p1848 q	>5	3.1	+++	<1:10
p1699 c	1.5	-	-	<1:10	p1856 x	4.3	1.5	-	<1:10
p1700 b	1.5	-	-	<1:10	p1857 x	>5	2.3	-	<1:10
p1700 c	2.5	1.7	-	<1:10	p1864 x	3	2.5	+++	<1:10
p1701 b	>5	2.2	++	<1:10	p1878 b	4	2	-	<1:10
p1701 c	>5	2.6	++	<1:10	p1889 b	>5	4.4	1.5	<1:10
p1761 b	4.3	2.2	++	<1:10	p1901 b	>5	4	3	<1:10
p1763 b	4.3	2.1	-	<1:10	p2037 b	>5	NT	tr	<1:10
p1765 x	3.5	1.3	-	<1:10	p2038 b	4.3	NT	-	<1:10
p1766 b	>5	1.2	-	<1:10	p2078 b	4.3	NT	++	<1:10
p1767 b	3.8	3.0	-	<1:10	p2100 b	3.5	NT	+	<1:10
p1768 b	>5	1.4	-	<1:10	p2101 b	3.0	NT	tr	<1:10
p1769 b	>5	1.3	-	<1:10					

图例, 表 3:

#: p1460 - BSA 结合物
A1: Log₁₀ ELISA 抗-目标抗原位点的倒数效价
A2: Log₁₀ ELISA 抗-rsCD4 的倒数效价
B: IFA (间接免疫荧光染色分析)
C: 在 MT-2 中和分析中, 对进化枝 B HIV-1 VL 135 50%抑制时的血清稀释度
g: 分支的四聚体肽
tr: 痕量
NT: 未检测

表 4

通过 ELISA 中和分析得到的趋化因子的免疫原性和功能图谱

趋化因子 受体 的类型	代表趋化因子受体结构域的肽抗原															
	1			2			3			4			2/3			
	代码	A	B	C	代码	A	B	C	代码	A	B	C	代码	A	B	C
CC-CKR1	p1999	>5	+++	<1:10	p2004	>5	-	<1:10	p2027	2.5	-	<1:10	p2028	4.3	++	<1:10
CC-CKR2	p2086	4.3	-	<1:10	p2087b	4.3	++	<1:10	p2088	>5	-	<1:10	p2089	4.3	+	<1:10
CC-CKR3	p2079	4.3	tr	<1:10	p2080 b	3.0	-	<1:10	p2081	3.0	-	<1:10	p2082	2.5	tr	<1:10
CC-CKR5	p2045	>5	tr	<1:10	p2046 b	3.0	tr	<1:10	p2047	3.5	++	<1:10	p2048	4.8	+++	<1:10
Fusin (LESTR)	p1987	>4	tr	<1:10	p2041 b	4.3	-	<1:10	p1990	2.5	++	<1:10	p1991	3.5	-	<1:10

A: Log₁₀ ELISA 抗-目标抗原位点倒数效价

B: IFA (间接免疫荧光染色分析)

C: 在 MT-2 中和分析中对进化枝 B HIV-1 VL 135 50%抑制的血清稀释度

tr:痕量

表 5
CD4-或趋化因子共同受体来源肽产生的免疫血清对 MAB B4 结合 MT2 T 细胞的抑制作用

CD4-来源肽		趋化因子共同受体来源肽					
肽代码*	免疫血清 (1:50) †	免疫血清 (1:10) #		免疫血清 (1:50) †		免疫血清 (1:10) #	
	FITC-Gt αGP IgG	B4-生物素 x FITC	抑制	FITC-Gt αGP IgG	B4-生物素 x 抗体素蛋白-FITC	% Pos 细胞	强度
1430b	>95 +++	>95 +++	No	>95 ++	>95 ++	>95	++
1471c	>95 +++	0	Yes	>95 ++	>95 ++	>95	++
1472c	>95 +++	>95 ++	No	>95 ++	>95 ++	>95	++
1684c	>95 +++	>95 ++	No	>95 +++	>95 +++	>95	++
1771b	>95 ++	>95 ++	No	>95 +++	>95 +++	>95	++
1817b	>95 +	>95 ++	No	>95 ++	>95 ++	>95	++
1848d	>95 +++	>95 ++	No	>95 ++	>95 ++	>95	++
1864	>95 +++	>95 ++	No	>95 +++	>95 +++	>95	++
1889b	>95 +++	>95 ++	No	>95 +++	>95 +++	0	0
1901b	>95 +++	>95 ++	No	>95 -	>95 -	>95	++

† IFA
抑制性 IFA
* 参见表 2 有关肽代码描述的图解
‡ 仅培养基

表 6
肽诱导抗 HIV 原代分离株的中和抗体的能力

肽代码	目标抗原位点的描述	目标抗原肽的氨基酸序列 (a)	形成	A1	A2	B	C
p1403	CD4 (43-55) (SEQ ID NO:14)	FLTKGPSKLNDR A	b	4.3	2.6	++	<1:10
p1404	(C) CD4 (38-47) (C) * (SEQ ID NO:15)	(C) GNQGSFLTKG (C)	c	4.3	2.1	tr	<1:10
p1468	CD4 (49-63) (SEQ ID NO:16)	GPSKLNDRADRRSLWDQ	b	4.3	3.1	tr	<1:10
p1469	CD4 (39-45) (SEQ ID NO:17)	NQGSFLT	c	4.3	2.4	-	<1:10
p1470	CD4 (37-46) * (SEQ ID NO:18)	(C) ILGNQGSFLT (C)	b	4.3	2.6	-	<1:10
p1471	CD4 (39-67) (SEQ ID NO:19)	NQGSFLT KGPSKLNDRADRRSLWDQGNF	c	4.3	3.1	tr	<1:10
p1518	CD4 (60-109) (SEQ ID NO:20)	SKLNDRADRRSLWDQGNFPLIIKLNKIEDSDTYICEVEDQKEEVQLLVFGLTANS DTHLL	b	3	0.5	tr	<1:10
p1585	CD4 (36-47) * (SEQ ID NO:21)	(C) ILGNQGSFLTKG (C)	c	1.5	0.8	-	<1:10
p1586	CD4 (42-59) * (SEQ ID NO:22)	(C) SFLTKGPSKLNDRADRR (C)	b	3.3	2.8	tr	<1:1
p1587	CD4 (44-56) * (SEQ ID NO:23)	(C) LTKGPSKLNDRAD (C)	c	4.3	2.7	-	<1:10
p1588	CD4 (46-55) * (SEQ ID NO:24)	(C) KGPSKLNDR A (C)	b	4.3	3.7	-	<1:10
p1589	CD4 (79-96) * (SEQ ID NO:25)	(C) SDTYICEVEDQKEEVQLL (C)	c	4.3	3.0	-	<1:10
			b	4.3	3.2	-	<1:10
			c	4.3	3.2	-	<1:10
			b	4.3	3.2	-	<1:10
			c	4.3	3.2	-	<1:10
			b	4.3	3.2	-	<1:10
			c	4.3	3.2	-	<1:10
			b	4.3	3.2	-	<1:10
			c	4.3	3.2	-	<1:10
			b	4.3	3.2	-	<1:10
			c	4.3	3.2	-	<1:10
			b	4.3	3.2	-	<1:10
			c	4.3	3.2	-	<1:10
			b	4.3	3.2	-	<1:10
			c	4.3	3.2	-	<1:10

表 6 (续)

肽代码	目标抗原位点的描述	目标抗原肽的氨基酸序列 (a)	形成	A1	A2	B	C
p1614	CD4 (38-45) (C) * (SEQ ID NO:26)	(C)GNQGSFLT (C)	b	>5	1.9	NT	<1:10
p1615	CD4 (39-44) (C) * (SEQ ID NO:27)	(C)NQGSFL (C)	c	>5	2.6	NT	<1:10
p1616	CD4 (40-43) (C) * (SEQ ID NO:28)	(C)QGSF (C)	b	>4	1.7	NT	<1:10
p1617	CD4 (52-54) (C) * (SEQ ID NO:29)	(C)NTR (C)	c	>5	1.1	NT	<1:10
p1618	CD4 (51-55) (C) * (SEQ ID NO:30)	(C)LNTRA (C)	c	3.5	1.2	NT	<1:10
p1619	CD4 (48-52) (C) * (SEQ ID NO:31)	(C)PSKLN (C)	b	>5	1.2	NT	<1:10
p2057	(C)CD4 (27-66) (C) * (SEQ ID NO:4)	(C)HWKNSNQIKILGNQGSFLT ⁶⁷ KGPSKLNTRADSRRLWDQGN (C)	c	2.9	1.4	NT	<1:10
p2189	(C)CD4 (39-71) * [F ₆₇ → C] (SEQ ID NO:11)	(C)NQGSFLT ⁶⁷ KGPSKLNDRADSRRLWDQGN (C) PLII	c	>5	1.0	NT	<1:10
p2190	(C)CD4 (27-71) * [F ₆₇ → C] (SEQ ID NO:10)	(C)HWKNSNQIKILGNQGSFLT ⁶⁷ KGPSKLNDRADSRRLWDQGN (C) PLII	c	>4	1.1	NT	<1:10
p2240	(C)CD4 (39-66) (C) * (SEQ ID NO:5)	(C)NQGSFLT ⁶⁷ KGPSKLNDRADSRRLWDQGN (C)	c	>4	1.4	NT	<1:10
			c	>5	4.4	NT	<1:10
			c	4.5	>5	NT	1:165
			c	>5	>5	+++	1:23
			c	>5	>5	+++	1:15
			c	>4	>5	+++	1:283

A1: Log₁₀ ELISA 抗-目标抗原位点倒数效价

B: IFA

A2: Log₁₀ ELISA 抗-rsCD4 倒数效价

C: 在 MT-2 中和分析中对进化枝 B HIV-1 VL 135 50%抑制的血清稀释度

*: 环化肽

表 7

单克隆抗体和免疫血清中和进化枝 A、B、C、和 E 的 HIV-1 原代分离株 (MT-2 微噬斑中和分析)

抗体类型	UGO29# (进化枝 A)	VL 135 (进化枝 B)	ZIM 748# (进化枝 C)	UG266# (进化枝 D)	TH036# (进化枝 E)	DH12# (进化枝 B)
α p2057c (SEQ ID NO:32) (15 wpi)	90% 1:20	90% 1:157	90% 1:184	90% 1:20	90% 1:87	90% 1:20
α p2240c (SEQ ID NO:35) (12 wpi)	1:76	1:324	NT	1:20	1:102	1:36
MAb B4	6.76 $\mu\text{g/ml}$	1.54 $\mu\text{g/ml}$	2.82 $\mu\text{g/ml}$	25.6 $\mu\text{g/ml}$	3.32 $\mu\text{g/ml}$	2.1 $\mu\text{g/ml}$
α N-端 V3 _{MN}	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$	>100 $\mu\text{g/ml}$
Ig G1 b12 MAb α gp120	38.5 $\mu\text{g/ml}$	41.7 $\mu\text{g/ml}$	>50 $\mu\text{g/ml}$	>50 $\mu\text{g/ml}$	>50 $\mu\text{g/ml}$	NT
MAb 50.1 α gp120 (N-terminal V3)	>50 $\mu\text{g/ml}$	>50 $\mu\text{g/ml}$	>50 $\mu\text{g/ml}$	>50 $\mu\text{g/ml}$	>50 $\mu\text{g/ml}$	>50 $\mu\text{g/ml}$

#: 由 WHO 关于 AIDS 的全球计划提供 HIV-1 原代分离株.

表 8

外源病原体来源的 Th 表位的氨基酸序列

Th 的描述	SEQ ID NO:	氨基酸序列
MV _{F288-302} Th	38	LSEIKGVIVHRLEGV
MV _{F258-277} Th	39	GILESRGIKARITHVDTESY
TT ₈₃₀₋₈₄₄ Th	40	KKQYIKANSKFIGITEL
TT ₉₄₇₋₉₆₆ Th	41	KKFNNFTVSFWLRVPKVSASHL
PT ₁₄₉₋₁₇₆ Th	42	KKLRRLLYMIYMSGLAVRVHVSKEEQYYDY
TT ₇₃₋₉₉ Th	43	YDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIK
PT ₁₈₋₄₁ Th	44	GAYARCPNGTRALTVAELRGNAEL
HB _{S19-32} Th	8	FFLLTRILTIPQSLD
HB _{C120-140} Th	45	VSGVWIRTTPPAYRPPNAPIL
HB _{C21-40} Th	46	SDFFPSVRDLLDTASALYRE
HB _{c50-69}	47	PHHTALRQAILCWGELMTLA
TT ₆₁₅₋₆₃₁ Th	48	WVRDIIDDFTNESSQKT
HIV gp41 Th ₆ (N-)	49	RAGRAILHIPTRIRQGLER
HIV gp41 Th ₆ (C-)	50	AVAEGTDRVIEVLQRAGRAIL
CT A ₈₁₀₆₋₁₃₀ Th	51	ALNIWDRFDVFTLGATSGYLKGNS
CT P ₁₁ Th	13	TINKPKGYVGKE
DT ₁ Th	52	DSETADNLEKTVAALSILPGHG
DT ₄ Th	53	EEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAATNFVE
PF Th	54	^{sc} DIEKIAKMEKASSVFNVNS
SM Th	55	KWFKTNAPNGVDEKIRI
TraT ₁ Th	56	GLQGKIADAVKAKG
TraT ₄ Th	57	GLAAGLVGMAADAMVEDVN
TraT ₆ Th	58	STETGNQHHYQTRVVSNAK

表 9
人工 Th 表位的氨基酸序列

Th 的描述	SEQ ID NO:	氨基酸序列
1,4,9 PALINDROMIC	6	ISEIKGVIVHKIEGI MT RT TRM TM L L V
Syn Th (1,2,4)	12	KKKIIITRIITITID
IS(1,4,9 PALINDROMIC)LF 简化	36	ISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T
IS(1,4,9 PALINDROMIC)LF	59	ISISEIKGVIVHKIEGILF MT RT TRM TM L L V

表 10
本发明的其它代表性肽

肽代码	Th 表位的描述	目标 B 肽	代表性肽构建体的氨基酸序列
2249 b (Seq. ID No:60)	1, 4, 9 PALINDROMIC Th (Seq. ID No. 6)	(C)X(39-66) (C), 环化 (Seq. ID No. 5)	ISEIKGVIVHKIEGI - GG - MT RT TRM TM L L V (C) NQ GSFLTCKGPSK LNDRADSRRS LWDQGN (C)
1902 b (Seq. ID No:61)	IS (1, 4, 9 PALINDROMIC Th 简化游离) LF (Seq. ID No. 36)	(C)X(39-66) (C), 环化 (Seq. ID No. 5)	ISISEIKGVIVHKIEGILF-GG- T RT TR T (C) NQ GSFLTCKGPSK LNDRADSRRS LWDQGN (C)
2249 f (Seq. ID No.62)	gp41 Th ₆ (N end) (Sq. ID No. 50) -GG -1,4,9 PALINDROMIC Th (Seq. ID No. 6)	(C)X(39-66) (C), 环化 (Seq. ID No. 5)	AVAEGTDRVIEVLQRAIRAIL - GG - ISEIKGVIVHKIEGI - GG - MT RT TRM TM L L V (C) NQ GSFLTCKGPSK LNDRADSRRS LWDQGN (C)

表 11
本发明代表性肽的免疫原性

动物种	组#	佐剂和免疫方案	肽代码	代表性肽构建体的描述	WPI	在目标抗原上的 Log ₁₀ ELISA 效价		中和分析得出的血清效价 (HIV-1 Clade B VL135)	
						50% 抑制	90% 抑制	50% 抑制	90% 抑制
豚鼠	1	水包油型乳剂 (0, 3, 水包油型乳剂 6 WPI)	p2249 b (Seq ID No. 60)	1, 4, 9 PALINDROMIC Th-GG-(C)X(39-66)(C), 环化 (Seq ID No. 6) - GG - (Seq ID No.5)	5	3.806	23	12	
					8	4.000	161	56	
豚鼠	2	水包油型乳剂 (0, 3, 6 WPI)	p1902 b (Seq ID No. 61)	IS (1, 4, 9 PALINDROMIC Th simplified lib)LF - GG -(C)X(39-66)(C), 环化 (Seq ID No. 36) - GG - (Seq ID No.5)	5	4.684	24	12	
					8	over	178	95	
猪	1	水包油型乳剂 (0, 3, 水包油型乳剂 6 WPI)	p1902 b (Seq ID No. 61)	IS (1, 4, 9 PALINDROMIC Th 简化游离) LF- GG-(C)X(39-66)(C), 环化 (Seq ID No. 36) - GG - (Seq ID No.5)	5	4.500	106	35	
					8	5.050	209	102	
猪	2	水包油型乳剂 (0, 3, 6 WPI)	p2249f (Seq ID No. 62)	gp41 Th ₆ (N end) -GG - 1, 4, 9 PALINDROMIC Th-GG-(C)X(39-66)(C), 环化 (Seq ID No. 50) - GG - (Seq ID No.6) - GG - (Seq ID No.5)	5	4.688	99	31	
					8	5.237	496	140	
猪	1	水包油型乳剂 (0, 3, 6 WPI)	p2249f (Seq ID No. 62)	gp41 Th ₆ (N end) -GG-1, 4, 9 PALINDROMIC Th- GG-(C)X(39-66)(C), 环化 (Seq ID No. 50) - GG - (Seq ID No.6) - GG - (Seq ID No.5)	15	4.570	25	11	
					23	4.894	37	12	
猪	1	水包油型乳剂 (0, 3, 6 WPI)	p2249f (Seq ID No. 62)	gp41 Th ₆ (N end) -GG-1, 4, 9 PALINDROMIC Th- GG-(C)X(39-66)(C), 环化 (Seq ID No. 50) - GG - (Seq ID No.6) - GG - (Seq ID No.5)	38	4.689	45	13	

序列表

(1) 总信息:

- 5 (i) 申请人: 联合生物医学公司, 等
- (ii) 发明名称: 用于预防和治疗 HIV 感染和免疫疾病的肽组合物
- 10 (iii) 序列数目: 61
- (iv) 通讯地址:
- (A) 地址: MORGAN & FINNEGAN
- (B) 街: 345 Park Avenue
- 15 (C) 市: New York
- (D) 州: NY
- (E) 国家: USA
- (F) 邮政编码: 10154-0054
- (v) 计算机可读形式:
- 20 (A) 媒体类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 软件: Word 7.0
- 25 (vi) 在先申请数据:
- (A) 申请号: US 09/100,409
- (B) 申请日: 20-JUNE-1998
- (C) 分类号: 514
- 30 (vii) 当前申请数据:
- (A) 申请号: 待定
- (B) 申请日: 21-JUNE-1999
- (C) 分类号:
- 35 (viii) 代理机构和代理人信息:
- (A) 名称: MARIA C.H. LIN, ESQ.
- (B) 注册号: 29,323
- (C) 参考/记录号: 1151-4154PC1
- 40 (ix) 电讯信息:
- (A) 电话: 212-758-4800
- (B) 电传: 212-751-6849

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 433 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

```

Lys Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val
1      5      10
Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile
15      15      20
Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile
25      30      35
Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
40      45
20 Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser
50      55      60
Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys
65      70
25 Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys
75      80
Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
85      90      95
Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu
100     105
30 Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser
110     115     120
Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser
125     130
35 Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
135     140
Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr
145     150     155
Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val
160     165
40 Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln
170     175     180
Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu
185     190
45 Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val
195     200

```

	Glu	Lys	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Trp	Trp	Gln
	205					210						215
	Ala	Glu	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Trp	Ile	Ile
				220					225			
5	Phe	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Val	Ser	Val	Lys	Arg
		230					235					240
	Val	Thr	Gln	Asp	Pro	Lys	Leu	Gln	Met	Gly	Lys	Lys
				245						250		
	Leu	Pro	Leu	His	Leu	Thr	Leu	Pro	Gln	Ala	Leu	Pro
10			255					260				
	Gln	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Leu
	265					270					275	
	Glu	Ala	Lys	Thr	Gly	Lys	Leu	His	Gln	Glu	Val	Asn
				280					285			
15	Leu	Val	Val	Met	Arg	Ala	Thr	Gln	Leu	Gln	Lys	Asn
		290					295					300
	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Trp	Gly	Pro	Thr	Ser	Pro	Lys
				305						310		
	Leu	Met	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu	Glu	Asn	Lys	Glu	Ala
20			315					320				
	Lys	Val	Ser	Lys	Arg	Glu	Lys	Pro	Val	Trp	Val	Leu
	325					330					335	
	Asn	Pro	Glu	Ala	Gly	Met	Trp	Gln	Cys	Leu	Leu	Ser
				340					345			
25	Asp	Ser	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Glu	Ser	Asn	Ile	Lys
		350					355					360
	Val	Leu	Pro	Thr	Trp	Ser	Thr	Pro	Val	Gln	Pro	Met
				365						370		
	Ala	Leu	Ile	Val	Leu	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Leu
30			375					380				
	Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Gly	Ile	Phe	Phe	Cys	Val	Arg
	385					390					395	
	Cys	Arg	His	Arg	Arg	Arg	Gln	Ala	Glu	Arg	Met	Ser
				400					405			
35	Gln	Ile	Lys	Arg	Leu	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Thr	Cys
		410					415					420
	Gln	Cys	Pro	His	Arg	Phe	Gln	Lys	Thr	Cys	Ser	Pro
				425						430		
	Ile											

40

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

45

(A) 长度: 40 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

5

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

```

His Trp Lys Asn Trp Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly
1          5          10
10 Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
    15          20
    Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp
    25          30          35
    Asp Gln Gly Asn
15          40

```

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

20

(i) 序列特征:

(A) 长度: 28 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

25

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

```

Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
1          5          10
30 Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp
    15          20
    Asp Gln Gly Asn
25

```

35

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

(i) 序列特征:

40

(A) 长度: 42 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

45

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

```

Cys His Trp Lys Asn Trp Asn Gln Ile Lys Ile Leu
1          5          10
Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
5          15          20
Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu
25          30          35
Trp Asp Gln Gly Asn Cys
          40

```

10

(2) SEQ ID NO:5 的信息:

(i) 序列特征:

15

(A) 长度: 30 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

20

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

```

Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
1          5          10
25 Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu
          15          20
Trp Asp Gln Gly Asn Cys
25          30

```

30

(2) SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特征:

35

(A) 长度: 15 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

40

(ix) 特性:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Leu"

45

(ix) 特性:

(A) 名称/关键词: 修饰位点

(B) 位置: 2

- (D) 其它信息: /注= "Ser 或 Thr"
- 5 (ix) 特性:
 (A) 名称/关键词: 修饰位点
 (B) 位置: 4
 (D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"
- 10 (ix) 特性:
 (A) 名称/关键词: 修饰位点
 (B) 位置: 5
 (D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"
- 15 (ix) 特性:
 (A) 名称/关键词: 修饰位点
 (B) 位置: 10
 (D) 其它信息: /注= "His 或 Thr"
- 20 (ix) 特性:
 (A) 名称/关键词: 修饰位点
 (B) 位置: 11
 (D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"
- 25 (ix) 特性:
 (A) 名称/关键词: 修饰位点
 (B) 位置: 12
 (D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Leu"
- 30 (ix) 特性:
 (A) 名称/关键词: 修饰位点
 (B) 位置: 14
 (D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"
- 35 (ix) 特性:
 (A) 名称/关键词: 修饰位点
 (B) 位置: 15
 (D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Val"
- 40 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:
 Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Gly Val Ile Val Xaa Xaa Xaa
 1 5 10
 Glu Xaa Xaa
 15

(2) SEQ ID NO:7 的信息:

- 5 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 16 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

10 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

15 Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala
 1 5 10
 Thr Tyr Gln Phe
 15

20 (2) SEQ ID NO:8 的信息:

- (i) 序列特征:
 (A) 长度: 15 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 25 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

30 Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln
 1 5 10
 Ser Leu Asp
 15

35

(2) SEQ ID NO:9 的信息:

- (i) 序列特征:
 40 (A) 长度: 6 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

45

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

Pro Pro Xaa Pro Xaa Pro
1 5

5

(2) SEQ ID NO:10 的信息:

(i) 序列特征:

10

(A) 长度: 46 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

Cys His Trp Lys Asn Trp Asn Gln Ile Lys Ile Leu
1 5 10
20 Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
15 20
Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu
25 30 35
25 Trp Asp Gln Gly Asn Cys Pro Leu Ile Ile
40 45

(2) SEQ ID NO:11 的信息:

30

(i) 序列特征:

(A) 长度: 34 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

35

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser
40 1 5 10
Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu
15 20
25 Trp Asp Gln Gly Asn Cys Pro Leu Ile Ile
30

45

(2) SEQ ID NO:12 的信息:

- (i) 序列特征:
 (A) 长度: 18 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性
- 5
- (ii) 分子类型: 肽
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:
- 10
 Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr
 1 5 10
 Ile Ile Thr Thr Ile Asp
 15
- 15
- (2) SEQ ID NO:13 的信息:
- (i) 序列特征:
 (A) 长度: 12 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性
- 20
- (ii) 分子类型: 肽
- 25
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:
- Thr Ile Asn Lys Pro Lys Gly Tyr Val Gly Lys Glu
 1 5 10
- 30
- (2) SEQ ID NO:14 的信息:
- (i) 序列特征:
 (A) 长度: 13 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性
- 35
- (ii) 分子类型: 肽
- 40
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:
- Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala
 1 5 10
- 45
- (2) SEQ ID NO:15 的信息:

- 5 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 12 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- 10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:15:
 Cys Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Cys
 1 5 10
- 15 (2) SEQ ID NO:16 的信息:
- (i) 序列特征:
 (A) 长度: 18 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性
- 20 (ii) 分子类型: 肽
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:16:
 25 Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg
 1 5 10
 Arg Ser Leu Trp Asp Gln
 15
- 30 (2) SEQ ID NO:17 的信息:
- (i) 序列特征:
 35 (A) 长度: 7 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- 40 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:17:
 Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr
 1 5

(2) SEQ ID NO:18 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 12 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:18:

Cys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Cys
1 5 10

15

(2) SEQ ID NO:19 的信息:

(i) 序列特征:

- 20 (A) 长度: 29 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

25

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:19:

Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
1 5 10
30 Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp
15 20
Asp Gln Gly Asn Phe
25

35

(2) SEQ ID NO:20 的信息:

(i) 序列特征:

- 40 (A) 长度: 61 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:20:

5 Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser
 1 5 10
 Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys
 15 20
 Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys
 25 30 35
 10 Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
 40 45
 Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu
 50 55 60
 Leu
 15

(2) SEQ ID NO:21 的信息:

(i) 序列特征:

20 (A) 长度: 14 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

25

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:21:

30 Cys Ile Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys
 1 5 10
 Gly Cys

(2) SEQ ID NO:22 的信息:

35

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

40

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:22:

45 Cys Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn
 1 5 10
 Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Cys
 15 20

(2) SEQ ID NO:23 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 15 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:23:

Cys Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg
1 5 10
15 Ala Asp Cys
15

(2) SEQ ID NO:24 的信息:

20

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 12 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

25

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:24:

30 Cys Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Cys
1 5 10

(2) SEQ ID NO:25 的信息:

35

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 20 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

40

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:25:

```

Cys Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp Gln
1           5           10
5 Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Cys
      15           20

```

(2) SEQ ID NO:26 的信息:

10

(i) 序列特征:

(A) 长度: 10 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

15

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:26:

```

20 Cys Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Cys
   1           5           10

```

(2) SEQ ID NO:27 的信息:

25

(i) 序列特征:

(A) 长度: 8 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

30

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:27:

```

35 Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Cys
   1           5

```

(2) SEQ ID NO:28 的信息:

40

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

45

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:28:

5 Cys Gln Gly Ser Phe Cys
1 5

(2) SEQ ID NO:29 的信息:

10 (i) 序列特征:
(A) 长度: 5 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

15 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:29:

20 Cys Asn Thr Arg Cys
1 5

(2) SEQ ID NO:30 的信息:

25 (i) 序列特征:
(A) 长度: 7 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

30 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:30:

35 Cys Leu Asn Thr Arg Ala Cys
1 5

(2) SEQ ID NO:31 的信息:

40 (i) 序列特征:
(A) 长度: 7 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

45 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:31:

5 Cys Pro Ser Lys Leu Asn Cys
1 5

(2) SEQ ID NO:32 的信息:

(i) 序列特征:

10 (A) 长度: 77 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:32:

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala
1 5 10
20 Thr Tyr Gln Phe Gly Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg
15 20
Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Gly Gly Cys
25 30 35
His Trp Lys Asn Trp Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly
25 40 45
Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
50 55 60
Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp
65 70
30 Asp Gln Gly Asn Cys
75

(2) SEQ ID NO:33 的信息:

(i) 序列特征:

35 (A) 长度: 69 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

40

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:33:

```

5   Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala
    1           5           10
    Thr Tyr Gln Phe Gly Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg
      15           20
    Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Gly Gly Cys
    25           30           35
10  Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
      40           45
    Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp
      50           55           60
    Asp Gln Gly Asn Cys Pro Leu Ile Ile
15           65

```

(2) SEQ ID NO:34 的信息:

```

20  (i) 序列特征:
      (A) 长度: 81 氨基酸
      (B) 类型: 氨基酸
      (D) 拓扑结构: 线性

```

```

25  (ii) 分子类型: 肽

```

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:34:

```

30  Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala
    1           5           10
    Thr Tyr Gln Phe Gly Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg
      15           20
    Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Gly Gly Cys
    25           30           35
35  His Trp Lys Asn Trp Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly
      40           45
    Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
      50           55           60
    Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp
      65           70
40  Asp Gln Gly Asn Cys Pro Leu Ile Ile
      75           80

```

(2) SEQ ID NO:35 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 64 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:35:

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala
1 5 10
15 Thr Tyr Gln Phe Gly Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg
15 20
Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Gly Gly Cys
25 30 35
20 Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys
40 45
Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp
50 55 60
Asp Gln Gly Cys

25

(2) SEQ ID NO:36 的信息:

(i) 序列特征:

- 30 (A) 长度: 19 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

35

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 4
(D) 其它信息: /注= "Ser 或 Thr"

40

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 7
(D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 8
- (D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"

5

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 12
- (D) 其它信息: /注= "His 或 Thr"

10

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 13
- (D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"

15

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 16
- (D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"

20

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:36:

```

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa
1           5                               10
25 Xaa Ile Glu Xaa Ile Leu Phe
    15
  
```

(2) SEQ ID NO:37 的信息:

30

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 50 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑结构: 线性

35

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:37:

5 Lys Lys Lys Ile Ile Thr Ile Thr Arg Ile Ile Thr
 1 5 10
 Ile Ile Thr Thr Ile Asp Gly Gly Cys Asn Gln Gly
 15
 Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp
 25 30 35
 10 Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly
 40 45
 Asn Cys
 50

15

(2) SEQ ID NO:38 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 15 氨基酸
 20 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

25

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:38:

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu
 1 5 10
 30 Glu Gly Val
 15

(2) SEQ ID NO:39 的信息:

35

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 20 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

40

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:39:

5 Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile
 1 5 10
 Thr His Val Asp Thr Glu Ser Tyr
 15 20

10 (2) SEQ ID NO:40 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

15 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:40:

20 Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile
 1 5 10
 Gly Ile Thr Glu Leu
 15

25

(2) SEQ ID NO:41 的信息:

(i) 序列特征:

30 (A) 长度: 22 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

35

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:41:

40 Lys Lys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
 1 5 10
 Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu
 15 20

(2) SEQ ID NO:42 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 30 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:42:

Lys Lys Leu Arg Arg Leu Leu Tyr Met Ile Tyr Met
1 5 10
15 Ser Gly Leu Ala Val Arg Val His Val Ser Lys Glu
15 20
Glu Gln Tyr Tyr Asp Tyr
25 30

20 (2) SEQ ID NO:43 的信息:

(i) 序列特征:

- 25 (A) 长度: 27 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:43:

30

Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr Asp Ser Asp Lys
1 5 10
Asp Arg Phe Leu Gln Thr Met Val Lys Leu Phe Asn
15 20
35 Arg Ile Lys
25

(2) SEQ ID NO:44 的信息:

(i) 序列特征:

- 40 (A) 长度: 24 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:44:

5
 Gly Ala Tyr Ala Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala
 1 5 10
 Leu Thr Val Ala Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu
 15 20
 10

(2) SEQ ID NO:45 的信息:

(i) 序列特征:

15 (A) 长度: 21 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

20

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:45:

Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
 1 5 10
 25 Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
 15 20

(2) SEQ ID NO:46 的信息:

(i) 序列特征:

30 (A) 长度: 20 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

35

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:46:

Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 1 5 10
 40 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu
 15 20

(2) SEQ ID NO:47 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 20 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:47:

Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys
1 5 10
15 Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala
15 20

(2) SEQ ID NO:48 的信息:

20

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 17 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

25

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:48:

30 Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn Glu
1 5 10
Ser Ser Gln Lys Thr
15

35

(2) SEQ ID NO:49 的信息:

(i) 序列特征:

- 40 (A) 长度: 19 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:49:

```

5   Arg Ala Gly Arg Ala Ile Leu His Ile Pro Thr Arg
    1           5           10
    Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg
      15

```

10 (2) SEQ ID NO:50 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

15 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:50:

```

20   Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val
    1           5           10
    Leu Gln Arg Ala Gly Arg Ala Ile Leu
      15           20

```

25

(2) SEQ ID NO:51 的信息:

(i) 序列特征:

30 (A) 长度: 25 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

35

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:51:

```

40   Ala Leu Asn Ile Trp Asp Arg Phe Asp Val Phe Ser
    1           5           10
    Thr Leu Gly Ala Thr Ser Gly Tyr Leu Lys Gly Asn
      15           20
    Ser
    25

```

(2) SEQ ID NO:52 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 22 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:52:

Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Val
 1 5 10
 15 Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly His Gly
 15 20

(2) SEQ ID NO:53 的信息:

20

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 39 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

25

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:53:

30 Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser
 1 5 10
 Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu
 15 20
 35 Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Thr Asn Phe Val
 25 30 35
 Glu Ser Cys

(2) SEQ ID NO:54 的信息:

40

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 21 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

45

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:54:

```

5   Asp Ile Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala
   1           5           10
   Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser
       15           20

```

(2) SEQ ID NO:55 的信息:

10

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

15

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:55:

```

20   Lys Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp
   1           5           10
   Glu Lys Ile Arg Ile
       15

```

25 (2) SEQ ID NO:56 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 14 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

30

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:56:

35

```

   Gly Leu Gln Gly Lys Ile Ala Asp Ala Val Lys Ala
   1           5           10
   Lys Gly

```

(2) SEQ ID NO:57 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 19 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:57:

Gly Leu Ala Ala Gly Leu Val Gly Met Ala Ala Asp
1 5 10
Ala Met Val Glu Asp Val Asn
15 15

(2) SEQ ID NO:58 的信息:

20 (i) 序列特征:

- (A) 长度: 20 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

25 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:58:

Ser Thr Glu Thr Gly Asn Gln His His Tyr Gln Thr
30 1 5 10
Arg Val Val Ser Asn Ala Asn Lys
15 20

35 (2) SEQ ID NO:59 的信息:

(i) 序列特征:

- 40 (A) 长度: 19 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

- 5 (ix) 特性:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 3
(D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Leu"
- 10 (ix) 特性:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 4
(D) 其它信息: /注= "Ser 或 Thr"
- 15 (ix) 特性:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 7
(D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"
- 20 (ix) 特性:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 8
(D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"
- 25 (ix) 特性:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 12
(D) 其它信息: /注= "His 或 Thr"
- 30 (ix) 特性:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 13
(D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"
- 35 (ix) 特性:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 14
(D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Leu"
- 40 (ix) 特性:
(A) 名称/关键词: 修饰位点
(B) 位置: 17
(D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Val"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:59:

```

Ile Ser Xaa Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa
1          5          10
5 Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Leu Phe
   15

```

(2) SEQ ID NO:60 的信息:

10

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 51 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑结构: 线性

15

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 4
- (D) 其它信息: /注= "Ser 或 Thr"

20

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 7
- (D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"

25

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 8
- (D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"

30

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 12
- (D) 其它信息: /注= "His 或 Thr"

35

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 13
- (D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"

40

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 16
- (D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:60:

```

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa
1           5           10
5 Xaa Ile Glu Xaa Ile Leu Phe Gly Gly Cys Asn Gln
   15           20
Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn
25           30           35
10 Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln
   40           45
Gly Asn Cys
   50

```

(2) SEQ ID NO:61 的信息:

15

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 70 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑结构: 线性

20

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 24
- (D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Leu"

25

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 25
- (D) 其它信息: /注= "Ser 或 Thr"

30

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 27
- (D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"

35

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 28
- (D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"

40

(ix) 特性:

- (A) 名称/关键词: 修饰位点
- (B) 位置: 33
- (D) 其它信息: /注= "His 或 Thr"

45

- 5 (ix) 特性:
 - (A) 名称/关键词: 修饰位点
 - (B) 位置: 34
 - (D) 其它信息: /注= "Lys 或 Arg"
- 10 (ix) 特性:
 - (A) 名称/关键词: 修饰位点
 - (B) 位置: 35
 - (D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Leu"
- 15 (ix) 特性:
 - (A) 名称/关键词: 修饰位点
 - (B) 位置: 37
 - (D) 其它信息: /注= "Gly 或 Thr"
- 20 (ix) 特性:
 - (A) 名称/关键词: 修饰位点
 - (B) 位置: 38
 - (D) 其它信息: /注= "Ile, Met 或 Val"

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:61:

```

Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val
1          5          10
25 Leu Gln Arg Ala Gly Arg Ala Ile Leu Gly Gly Xaa
    15          20
Xaa Glu Xaa Xaa Gly Val Ile Val Xaa Xaa Xaa Glu
25          30          35
Xaa Xaa Gly Gly Cys Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr
30          40          45
Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser
50          55          60
Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Cys
          65          70
35
  
```

人 CD4 的推导的氨基酸序列 (序列号 : 1)

10 20 30 40 50 60 70 80
 KKVVLGKKG TVELTCTASQ KKSIGFHWKN SNQIKILGNQ GSFLTCKGPK LNDRADSRFS LWDQGNFPLI IKNLKIEDSD
 90 100 110 120 130 140 150 160
 TYICEVEDQK EEVQLLVFGL TANS DTHLLQ GQSLTLTLES PPGSSPSVQC RSPRGKNIQG GKTL SVSQLE LQDSGTWTCT
 170 180 190 200 210 220 230 240
 VLQNQKKVEF KIDIVVLA FQ KASSIVYKKE GEQVEFSFPL AFTVEKLTGS GELWQAERA SSSKSWIIFD LKNKEVSVKR
 250 260 270 280 290 300 310 320
 VTQDPKLQMG KKLPLHLTLP QALPQYAGSG NLTALAEAKT GKLHQEVNLY VMRATQLQKN LTCEVWGPTS PKLMLSLKLE
 330 340 350 360 370 380 390 400
 NKEAKVSKRE KPVWVLNPEA GHWQCLLSDS SQVLLLESNIK VLPTWSTPVQ PMALIVLGGV AGLLLFIGLG IFFCVR CRHR
 410 420 430 433
 RRQAERMSQI KRLLSEKKT C QCPHRFQKTC SPI

胞质尾区

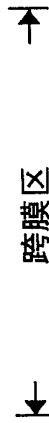


图 1