



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101932594 A

(43) 申请公布日 2010.12.29

(21) 申请号 200980103767.4

A61K 39/00(2006.01)

(22) 申请日 2009.01.29

(30) 优先权数据

08101221.3 2008.02.01 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/050996 2009.01.29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/109428 EN 2009.09.11

(71) 申请人 阿尔法-O肽股份公司

地址 瑞士阿尔施韦尔

(72) 发明人 P·布克哈德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李志东 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07K 14/00(2006.01)

权利要求书 15 页 说明书 67 页 序列表 77 页

附图 6 页

(54) 发明名称

可用作疫苗的自装配肽纳米颗粒

(57) 摘要

描述了掺入 T- 和 / 或 B- 细胞表位的自装配肽纳米颗粒 (SAPN)。本发明的纳米颗粒由连续肽链的聚集体组成,所述连续肽链包含通过连接区段相连的两个寡聚化结构域,其中一个或两个寡聚化结构域在它们的肽序列中掺入 T- 和 / 或 B- 细胞表位。这些纳米颗粒可用作疫苗的和佐剂。

1. 由多个式 (I) 构造块的聚集体组成的自装配肽纳米颗粒, 所述式 (I) 构造块由包含肽寡聚化结构域 D1、连接区段 L 和肽寡聚化结构域 D2 的连续链组成,

D1-L-D2 (I),

其中 D1 是其具有形成 m 个亚基 D1 的寡聚体 (D1)_m 的倾向的肽, D2 是具有形成 n 个亚基 D2 的寡聚体 (D2)_n 的倾向的肽, m 和 n 各自是 2 至 10 之间的数字, 条件是, m 不等于 n, 且 m 不是 n 的倍数, 且 n 不是 m 的倍数, L 是键或短连接区段, D1 或 D2 中的任一个或 D1 和 D2 两者是在寡聚化结构域中掺入一个或更多个 T- 和 / 或 B- 细胞表位的卷曲螺旋, 且其中 D1、D2 和 L 任选地被进一步取代。

2. 根据权利要求 1 的肽纳米颗粒, 其中所述卷曲螺旋寡聚化结构域由七肽和 / 或十一肽重复组成。

3. 根据权利要求 1 或 2 的肽纳米颗粒, 其中 D1 肽链在它的 N- 末端和 / 或 D2 肽链在它的 C- 末端被一个或更多个另外的 T- 和 / 或 B- 细胞表位、一个或更多个其它的功能性肽或蛋白、或一个或更多个另外的半抗原或其它功能性分子取代。

4. 式 S1-D1-L-D2、D1-L-D2-S2 或 S1-D1-L-D2-S2 的根据权利要求 3 的肽纳米颗粒, 其中 S1 和 S2 是肽取代物。

5. 由相同构造块 D1-L-D2 组成的根据权利要求 1-4 中任一项的肽纳米颗粒, 其中至少一个相同的构造块在 D1 的 N- 末端和 / 或 D2 的 C- 末端携带一个或更多个不同的取代物。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项的肽纳米颗粒, 其中寡聚化结构域 D1 和 D2 之一是色氨酸拉链的五聚化结构域或其衍生物。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项的肽纳米颗粒, 其中寡聚化结构域 D1 和 D2 之一是 tetrabrachion 的四聚化结构域或其衍生物。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项的肽纳米颗粒, 其中至少一个表位是 CTL 表位。

9. 根据权利要求 1-7 中任一项的肽纳米颗粒, 其中至少一个表位是 HTL 表位。

10. 根据权利要求 1-7 中任一项的肽纳米颗粒, 其中至少一个表位是 B- 细胞表位。

11. 根据权利要求 8-10 中任一项的肽纳米颗粒, 其中所述序列 D1-L-D2 包含一系列任选重叠的 T- 和 / 或 B- 细胞表位。

12. 一种组合物, 其包含根据权利要求 1-11 中任一项的肽纳米颗粒。

13. 权利要求 12 的组合物, 其中至少一个 B- 或 T- 细胞表位选自:

- (a) 适合诱导针对细菌的免疫应答的抗原;
- (b) 适合诱导针对病毒的免疫应答的抗原;
- (c) 适合诱导针对寄生虫的免疫应答的抗原;
- (d) 适合诱导针对癌细胞的免疫应答的抗原;
- (e) 适合诱导针对变应原的免疫应答的抗原;
- (f) 适合诱导针对成瘾的免疫应答的抗原;
- (g) 适合诱导针对疾病和代谢性病症的免疫应答的抗原;
- (h) 适合诱导畜牧动物的免疫应答的抗原; 和
- (i) 适合诱导宠物的免疫应答的抗原。

14. 权利要求 12 的组合物, 其中至少一个 B- 或 T- 细胞表位选自造成选自下述的疾病的病原体的蛋白: 阿米巴病, 炭疽, 弯曲杆菌感染, 水痘, 霍乱, 登革, 白喉, 脑炎, 埃博拉, 流

感,日本脑炎,利什曼病,疟疾,麻疹,脑膜炎球菌疾病,腮腺炎,医院感染,百日咳,肺炎球菌疾病,小儿麻痹症(脊髓灰质炎),风疹,带状疱疹,血吸虫病,破伤风,蜱传脑炎,滴虫病,锥虫病,结核病,伤寒,水痘,和黄热病。

15. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 或 T- 细胞表位选自下述的病原体的蛋白: 弯曲杆菌属,巨细胞病毒,EB 病毒,口蹄疫病毒,B 型流感嗜血杆菌,幽门螺旋杆菌. 乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,戊型肝炎病毒,单纯疱疹病毒,人免疫缺陷病毒,人乳头状瘤病毒,脑膜炎奈瑟菌,绿脓假单胞菌,金黄色葡萄球菌. 肺炎链球菌,呼吸道合胞病毒,轮状病毒,蛔虫,钩虫,和西尼罗病毒。

16. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 或 T- 细胞表位选自流感蛋白血凝素和 / 或 M2。

17. 权利要求 16 的组合物,其中所述 M2B- 细胞表位是该蛋白 M2e 的胞外部分的四聚体形式,其结合在四聚体卷曲螺旋寡聚化结构域 D1 的 N- 末端。

18. 权利要求 17 的组合物,其中所述四聚体寡聚化结构域 D1 是 tetrabrachion 的四聚体卷曲螺旋结构域或其衍生物。

19. 权利要求 12-18 中任一项的组合物,其中至少一个 T- 细胞表位选自下述流感肽

	SEQ ID NO :
IRHENRMVL	228
QAYQKRMGV	229
LKMPASRYL	230
SRYLDMTL	231
FMLMPKQKV	232
MRMGDFHSL	233
YLLAWKQVL	234
APIEHIASM	235
RRNYFTA EV	236
IQMCTELKL	237
AAGAAVKGV	238
VGTMMELI	239

NPTLLFLKV	240
RLIDFLKDV	241
MQIRGFVYF	242
IMFSNKMARL	243
MFSNKMARL	244
ERNEQGQTL	245
VAYMLEREL	246
LRHFQKDAK	247
VRDQRGNVL	248

20. 权利要求 12-19 中任一项的组合物,其中至少一个 B-细胞表位选自下述流感肽

	SEQ ID NO :
SIQSRGLFGA	211
QIESRGLFGA	212
ERQTRGIFGA	213
EKATRGLFGA	214
KRKTRGLFGA	215
RRKKRGLFGA	216
QIATRGLFGA	217
IPKGRGLFGA	218
KKKGRGLFGA	219
KREKRGLFGA	220

SIEPKGLFGA	221
AASYRGLFGA	222
IIQGRGLFGA	223
AIATRGLFGA	224
AISNRGLFGA	225
LLKERGFFGA	226

和其片段,其至少包含从 SEQ ID NO :211-226 的第三个氨基酸开始的 6 个氨基酸的序列。

21. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是 8 至 48 个残基的序列,其构成镰状疟原虫环孢子 (CS) 蛋白的 B 细胞表位,所述 B 细胞表位包含 2 至约 12 个氨基酸残基序列 Asn-Ala-Asn-Pro 重复或其变换。

22. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是 8 至 48 个残基的序列,其构成间日疟原虫环孢子 (CS) 蛋白的 B 细胞表位,所述 B 细胞表位包含 1 至约 6 个下述任意氨基酸残基序列的重复:

	SEQ ID NO :
GDRAAGQPA	65
GDRADGQPA	66
GDRADGQAA	67
GNGAGGQPA	68
GDGAAGQPA	69
GDRAAGQAA	70
GNGAGGQAA	71

23. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位选自下述疟疾肽:

	SEQ ID NO:
IKTMNTQISTLKNVDHLLNEQIDKLNNEKGTLSKISELNVQIMDL	72
LLSKDKEIEEKNNKIKELNNDIKKL	73
ICSLTTEVMELNKKNELIEENNKLNLVDQGGKLLKDVQKQKEIEKL	74
VDKIEEHILDYDEEINKSRSNLFQLKNEICSLTTEVMELNKKNELIEENNKLNLVDQGGK KLLKDVQKQKEIEKL	75
LDENEDNIKKMKSIDDMEKEIKYR	76
GMNNMNGDINNIN(GDINNMN) ₄	77
KKRNVVEELHSLRKNYNIINEEIEEIT	78
EEIKEEIKEVKEEIKEVKEEIKEVKEEIKEVKEEIKE	79
KNDINVQLDDINVQLDDINVQLDDINIQLDEINLN	80
KIQIEEIKKETNQINKDIDHIEMNIINLKKKIEF	81
DSMNNHKDDMNNYNDNINNYVESMNNYDDIMNK	82
MCELNV MENNMNIIHSNNNISTHMDDVIE	83
KEIQMLKNQILSLEESIKSLNEFINNLKN	84
GGLKNSNHNLNNIEMKYNTLNNNMNSINK	85
EKLKKNNEISSLKKELDILNEKMGKCT	86
EKMNMKMEQMDMKMEKIDVNMDQMDVKMEQMDVKMEQMDVKMKRMNK	87
KNKLNKKWEQINDHINNLETNINDYNKKIKEGDSQLNIIQLQCENIEQKINKIKE	88
NEMNKEVNKMNEEVNKMNEEVNKMNEEVNKMNEVNKMDEEVNKMNEVNKMNK	89
QNKMEMDMNIIKNDMNIMENDMNIMENDMNIIKNDMNIMEKDMNIIKNDMNIIKNMNII KNEMNIIKNV	90
TKKLNKELSEGKLEKLEKNIKELEETNNTLENDIKV	91
ENINNMDEKINNVDEQNNMDEKINNVDEKK	92
ARDDIQKDINKMESELINVSNEINRLD	93
EKKLDILKVNISNINNSLDKLL	94
NSLDYYKKVVIKLNINNMEEYTNNITNDINV LKAHID	95
PDFDAYNEKLGSIQSIDEIKKKIDNLQKEIKVANK	96
QLEEKTKQYNDLQNNMKTIKEQNEHLKNKFQSMGK	97
IIDIKKHLEKLEKIEKEKEDLENL	98

或其在一个或多个核心位置 aa(a) 和 / 或 aa(d) 处的修饰。

24. 权利要求 12 的组合物, 其中至少一个 HTL 表位选自下述肽类:

	SEQ ID NO:
MRKLAILS SVSSFLFV	99
LVNLLIFHINKI IKNS	100
MNYYGKQENWYSLKK	101

RHNWVNHAVPLAMKLI	102
VKNVIGPFMKAVCVE	103
SSVFNVVNSSIGLIM	104
AGLLGNVSTVLLGGV	105
KSKYKLATSVLAGLL	106
GLAYKFVVPGAATPY	107
HNWVNHAVPLAMKLI	108
KYKIAGGIAGGLALL	109
EKKIAKMEKASSVFNVV	110
EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT	111

25. 权利要求 12 的组合物, 其中至少一个 CTL 表位选自下述疟疾肽:

	SEQ ID NO :
KPNDKSLY	112
KPKDELDY	113
KPIVQYDNF	114
ASKNKEKALII	115
GIAGGLALL	116
MNPNDPNRNV	117
MINAYLDKL	118
ISKYEDEI	119
HLGNVKYLV	120

KSLYDEHI	121
LLMDCSGSI	122
KSKDELDY	123
IPSLALMLI	124
MPLQLAI	125
MPNDPNRNV	126
YLNKIQNSL	127
MEKLKELEK	128
ATSVLAGL	129

26. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是选自蛋白 gp41、gp120 或 gp160 的 HIV 蛋白。

27. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是选自 gp41 与中和抗体 2F5 和 / 或 4E10 的结合部位的 HIV 肽。

28. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是选自 HIV 的 gp120 的 V3- 环的 HIV 肽。

29. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 T- 细胞表位选自下述 HIV 肽 :

肽序列	SEQ ID NO :
PLDEGFRKYTAFTIPSINNE	189
AVFIHNFKRKGGIGG	190
IIGRNLLTQIGCTLNFPISPIETVPV	191
DFWEVQLGIPHPAGLKKKSV	192
LTEEALELAENREILKDPVHGV	193
KGPAKLLWKEGAV	194
LVSQGIRKVLFLDGIDK	195

RWIIILGLNKIVRMYSVILDI	196
WQVMIVWQVDRMR	197
SPAIFQSSMTK	198
SDIKVPPRR	199
LLQLTVWGI	200
APRKKGCWK	201
LYVGSLEIGQHR	202

30. 权利要求 12 的组合物, 其中至少一个 T- 细胞表位选自下述 HIV 肽:

CTL- 表位	SEQ ID NO :
PLDEGFRKY	130
LLQLTVWGI	131
YTAFTIPSI	132
GLNKIVRMY	133
ILKDPVHGV	134
YTAFTIPSI	135
IIGRNLLTQI	136
KGPAKLLWK	137
VLFLDGIDK	138
AVFIHFKR	139
HNFKRGGI	140
IVWQVDRMR	141

SDIKVPPRR	142
YTAFTIPSI	143
LGIPHPAGL	144
FSVPLDEGF	145
AVFIHNFKR	146
RWIILGLNK	147
AIFQSSMTK	148
AVFIHNFKR	149
AVFIHNFKR	150
WQVMIVWQV	151
YSPVSILDI	152
APRKKGCWK	153
LKDPVHGVY	154
YTAFTIPSI	155
TLNFPISPI	156
FKRKGIGG	157
LLQLTVWGI	158
EILKDPVHGV	159
GIPHPAGLK	160
GPAKLLWKG	161
SQIRKVLV	162

SDLEIGQHR	163
LVSQGIRKV	164
QGIRKVLFL	165
EEAELELAE	166
FTIPSINNE	167
FKRKGIGG	168
KGPAKLLWK	169
LLTQIGCTL	170
KGPAKLLWK	171
YTAFTIPSIN	172
LYVGSDEI	173
LLTQIGCTL	174
DFWEVQLGI	175
LLWKEGAV	176
MIVWQVDRM	177
FPISPIETV	178
AGLKKKKS	179
APRKKGCWK	180
ISPIETVPV	181
WEVQLGIPH	182
AIFQSSMTK	183

GIPHPAGLK	184
AELELAENR	185
SDIKVPRR	186
LTEEALEL	187
SPAIFQSSM	188

31. 权利要求 12 的组合物,其中所述 B- 细胞表位是适合诱导针对选自下述成瘾的免疫应答的抗原:阿片制剂,大麻,苯异丙胺,可卡因,巴比妥酸盐,格鲁米特,甲乙哌酮,水合氯醛,甲喹酮,苯并二氮卓, LSD, 尼古丁,抗胆碱能药,抗精神病药,色胺,其它精神症状药物,镇静药,苯环利定,赛洛西宾,挥发性的亚硝酸盐,和诱导躯体依赖性和 / 或精神依赖性的其它药物。

32. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是尼古丁。

33. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是可卡因。

34. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 或 T- 细胞表位选自适合诱导针对选自下述癌症类型的癌细胞的免疫应答的抗原:脑癌,乳腺癌,子宫颈癌,结肠直肠癌,食管癌,成胶质细胞瘤,白血病(急性骨髓性和慢性髓细胞样),肝癌,肺癌(非小细胞肺癌,小细胞肺癌),淋巴瘤(非霍奇金淋巴瘤),黑素瘤,卵巢癌,胰腺癌,前列腺癌,和肾癌。

35. 权利要求 12 的组合物,其包含选自下述的序列:

	SEQ ID NO:
KCDICTDEY	249
YMDGTMSQV	250
MLLAYLYQL	251
AFLPWHLRF	252
AFLPWHLFL	253
SEIWRDIDF	254
YLEPGPVTA	255
KTWGQYWQV	256

ITDQVPFSV	257
VLYRYGSFSV	258
LLDGTATLRL	259
ALLAVGATK	260
MLGHTMEV	261
LIYRRRLMK	262
ALNFPGSQK	263
AAGIGILTV	264
ILTVILGVL	265
MSLQRQFLR	266
SVYDFFVWL	267
LLGPRPYR	268
YLSGANLNL	269
KIFGSLAFL	270
VMAGVGSPYV	271
IISAVVGIL	272
LLHETDSAV	273
ALFDIESKV	274
EADPTGHSY	275
SLFRAVITK	276
SAYGEPRKL	277

KMVELVHFL	278
YLQLVFGIEV	279
EVDPIGHLY	280
FLWGPRALV	281
MEVDPIGHLY	282
AARAVFLAL	283
YRPRPRRY	284
VLPDVFIRC	285
QLSLLMWIT	286
SLLMWITQC	287
ASGPGGGAPR	288
QDLTMKYQIF	289
AYGLDFYIL	290
EAYGLDFYIL	291
SYLDSGIHF	292
ETVSEQSNV	293
FPSDSWCYF	294
EEKLIVVLF	295

36. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 或 T- 细胞表位选自下述抗原:

A β - 片段 (A β)
血管紧张素 I/II (ATII//I)
胆固醇酯转移蛋白 (CETP)

人体绒毛膜促性腺激素 (hCG)
表皮生长因子 (EGF)
促卵泡激素 (FSH)
胃泌素
ghrelin
促性腺激素释放激素 (GnRH)
Her2
IgE
IL-1 β b
干扰素 α (IFN α)
粘蛋白
肿瘤坏死因子 α (TNF α)
RANKL
IL-17

37. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是 A β - 肽或其片段,其至少包含从 N- 末端氨基酸开始 6 个氨基酸的序列。

38. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是血管紧张素 I 或血管紧张素 II。

39. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是 grehlin。

40. 权利要求 12 的组合物,其中至少一个 B- 细胞表位是 TNF α 或其片段,其至少包含从 TNF α 的第四个 N- 末端氨基酸开始 20 个氨基酸的序列。

41. 给人或非人动物免疫接种的方法,其包含,给需要这种免疫接种的受试者施用有效量的根据权利要求 1-11 中任一项的肽纳米颗粒或根据权利要求 12-39 中任一项的组合物。

42. 式 (I) 的单体构造块,其由包含肽寡聚化结构域 D1、连接区段 L 和肽寡聚化结构域 D2 的连续链组成,

D1-L-D2(I),

其中 D1 是其具有形成 m 个亚基 D1 的寡聚体 (D1)_m 的倾向的肽, D2 是具有形成 n 个亚基 D2 的寡聚体 (D2)_n 的倾向的肽, m 和 n 各自是 2 至 10 之间的数字,条件是, m 不等于 n, 且 m 不是 n 的倍数,且 n 不是 m 的倍数, L 是键或短连接区段, D1 或 D2 中的任一个或 D1 和 D2 两者是在寡聚化结构域中掺入一个或更多个 T- 和 / 或 B- 细胞表位的卷曲螺旋,且其中

D1、D2 和 L 任选地被进一步取代。

可用作疫苗的自装配肽纳米颗粒

发明领域

[0001] 本发明涉及掺入 B- 细胞表位和 / 或 T- 细胞表位的自装配肽纳米颗粒。此外, 本发明涉及这样的纳米颗粒用于疫苗接种的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 适应性免疫系统具有两类不同的应答, 体液免疫应答和细胞免疫应答。第一类的特征在于抗体应答, 其中这些抗体结合病原体的表面表位, 而第二类的特征在于细胞毒性的 T- 淋巴细胞 (CTLs), 它们杀死已经被感染的细胞。两类免疫应答进一步受到 T- 辅助细胞的刺激, 后者会激活生产结合特定病原体的抗体的 B- 细胞或针对受感染的细胞的 T- 细胞。

[0004] B- 细胞生产的抗体和病原体之间相互作用的特异性, 由病原体的表面结构 (所谓的 B- 细胞表位) 决定, 而 CTLs 与受感染的靶细胞的相互作用的特异性, 是借助于靶细胞的表面分子上存在的 T- 细胞表位, 所谓的主要组织相容性复合物 I 类分子 (MHC I)。这类 T- 细胞表位 (CTL- 表位) 是由受感染的细胞生产的来自病原体的蛋白的片段。最后, T- 辅助细胞与各个 B- 细胞或 CTL 的相互作用的特异性, 由 T- 辅助细胞的受体分子与 B- 细胞或 CTL- 细胞上的 MHC II 类分子 (MHC II) 呈递的其它类型 T- 细胞表位 (HTL- 表位) 的结合来决定。

[0005] 抗体与 B- 细胞表位的结合需要 B- 细胞表位呈现特定的三维结构, 该 B- 细胞表位在它的天然环境中 (即当它是在病原体的表面时) 具有相同的结构。B- 细胞表位可以由超过一条肽链组成, 它的三维结构由蛋白支架来组织。

[0006] 但是, T- 细胞表位不需要特定的三维结构, 各个 MHC I 或 MHC II 分子以非常特异性的方式结合它们。为了最佳呈递, MHC I 分子把 CTL 表位修剪成长度为 9 个氨基酸的大小, 而 HTL 表位与 MHC II 分子发生类似的相互作用, 但是可能比仅 9 个氨基酸更长。在本发明的上下文中, 重要的是, 表位与 MHC 分子的结合, 遵循非常特殊的规则, 即仅具有特定特征的肽能结合各个 MHC 分子, 并从而用作表位。这些特征已经得到彻底研究, 且从已知的表位知识, 已经开发出预测程序, 其能高准确度地预测能结合 MHC 分子的表位。现在正在构建在线性肽链中由几个这样的 T- 细胞表位组成的肽串作为疫苗候选物。

[0007] 原则上, 有效的疫苗应当诱导强烈的体液免疫应答以及强烈的细胞免疫应答。已经证实, 通过 B- 细胞表位的重复抗原显示, 可以实现强烈的体液免疫应答。病毒样颗粒 (VLPs) 可以用作有效的工具, 以规则的、重复的和严格的方式呈递 B- 细胞表位, 因此 VLPs 现在广泛地用于疫苗设计。在专利 EP 1 594 469 B1 中, 已经描述了重复抗原显示的另一个方案。在该专利中, 已经构建出由三聚体和五聚体蛋白寡聚化结构域组成的自装配肽纳米颗粒 (SAPN), 它们在表面上重复显示 B- 细胞表位。B- 细胞表位结合在寡聚化结构域的末端, 以便确保 B- 细胞表位以多个拷贝呈递在纳米颗粒表面。最常遇到的蛋白寡聚化基序之一是卷曲螺旋结构基序, 该基序可以有效地用于这些 SAPN 的设计中。

发明内容

[0008] 本发明涉及掺入 T- 和 / 或 B- 细胞表位的自装配肽纳米颗粒 (SAPN)。更具体地, 本发明的纳米颗粒由连续肽链的聚集体组成, 所述连续肽链包含通过连接区段相连的两个寡聚化结构域, 其中一个或两个寡聚化结构域是在它的肽序列中掺入 T- 和 / 或 B- 细胞表位的卷曲螺旋。

[0009] 本发明另外涉及使用这样的掺入 T- 和 / 或 B- 细胞表位的自装配肽纳米颗粒免疫接种人或非人动物的方法。

附图说明

[0010] 图 1: 共价连接卵白蛋白肽 (OVA323-339) 的小鼠 MHC II 分子 I-Ad 的结构, 它是 I-Ad 的 HTL 表位。从顶部以 C- α 示踪, 将 MHC II 蛋白显示为灰色。形成表位结合部位的壁的 2 个螺旋侧接结合的肽。肽在全原子球棍模型中显示为黑色。结合形式的肽 HTL 表位是处于展开构象中, 这可以通过图底部单独肽的结构更清楚地看到。

[0011] 图 2: 分别是三聚体和五聚体寡聚化结构域 [左侧, A)] 和三聚体和四聚体寡聚化结构域 [右侧, B)] 的 " 均匀单元 " 的示意图。单体 (构造块) 的数目由构造块的两个寡聚化结构域 D1 和 D2 的寡聚化状态的最小公倍数 (LCM) 决定。在均匀单元中, 所有构造块的连接区段彼此尽可能近地排列, 即尽可能接近肽纳米颗粒的中心, 因此均匀单元会自装配成球形纳米颗粒。

[0012] 图 3: 十二面体 / 二十面体的内部对称性元件。旋转对称轴 (2- 倍、3- 倍和 5- 倍) 显示为标有 2、3 和 5 的线。在 A) 中, 显示了由寡聚化结构域 D1 (左边, 具有 3 倍对称的卷曲螺旋结构域)、连接区段 L (底部) 和寡聚化结构域 D2 (右边, 具有 5 倍对称的卷曲螺旋结构域) 组成的单体构造块, 使得寡聚化结构域 D1 和 D2 的内部对称性元件在多面体的对称元件上重叠。在 B) 中, 显示了完整的卷曲螺旋结构域 D1 和 D2。由多面体的 3- 倍和 5- 倍旋转对称元件产生的其它对称对象显示为圆柱体, 而起始分子显示为象在 A) 中一样的螺旋。

[0013] 图 4: 实施例 1 中从具有序列 SEQ ID NO :8 的肽制备的自装配的肽纳米颗粒的动态光散射 (DLS, A) 和透射电子显微术 (TEM, B)。DLS 分析显示出平均粒径为 32.01nm 的大小分布, 多分散性指数为 12.9% (A)。TEM 照片 (B) 显示出与通过 DLS 测得相同大小的纳米颗粒。

[0014] 图 5: 实施例 2 中从具有序列 SEQ ID NO :10 的肽制备的自装配的肽纳米颗粒的透射电子显微术 (TEM)。TEM 照片显示出 25nm 相同大小的纳米颗粒。

[0015] 图 6: 实施例 3 中从具有序列 SEQ ID NO :12 的肽制备的自装配的肽纳米颗粒的透射电子显微术 (TEM)。TEM 照片显示出约 20 至 30nm 大小的纳米颗粒。

[0016] 图 7: 用于人和鸡流感疫苗的从分别具有序列 SEQ ID NO :37 (小图 A) 和 SEQ ID NO :38 (小图 B) 的肽制备的自装配的肽纳米颗粒 (实施例 9) 的透射电子显微术 (TEM)。TEM 照片显示出约 25nm 大小的纳米颗粒。

[0017] 图 8: 实施例 11 中从具有序列 SEQ ID NO :41 的肽制备的自装配的肽纳米颗粒的透射电子显微术 (TEM)。TEM 照片显示出约 25nm 大小的纳米颗粒。

[0018] 发明详述

[0019] 单体构造块

[0020] 自装配肽纳米颗粒 (SAPN) 由多个式 (I) 的单体构造块制成, 所述式 (I) 的单体构

造块由包含肽寡聚化结构域 D1、连接区段 L 和肽寡聚化结构域 D2 的连续链组成，

[0021] D1-L-D2(I)，

[0022] 其中 D1 是合成的或天然的肽，其具有形成 m 个亚基 D1 的寡聚体 $(D1)_m$ 的倾向，D2 是合成的或天然的肽，其具有形成 n 个亚基 D2 的寡聚体 $(D2)_n$ 的倾向， m 和 n 各自是 2 至 10 之间的数字，条件是， m 不等于 n ，且 m 不是 n 的倍数，且 n 不是 m 的倍数，L 是键或选自下述的短连接链：任选取代的碳原子、任选取代的氮原子、氧原子、硫原子、和它们的组合；D1 或 D2 中的任一个或 D1 和 D2 两者是在寡聚化结构域中掺入一个或更多个 T- 和 / 或 B- 细胞表位的卷曲螺旋，且其中 D1、D2 和 L 任选地被进一步取代。

[0023] 肽（或多肽）是通过酰胺键共价连接的氨基酸的链或序列。肽可以是天然的、修饰的天然的、部分合成的或完全合成的。“修饰的天然的、部分合成的或完全合成的”应当理解为，表示不是天然存在的。术语氨基酸包括，选自 20 种必需的天然的 α -L-氨基酸的天然存在的氨基酸，合成的氨基酸，例如 α -D-氨基酸、6-氨基己酸、正亮氨酸、高半胱氨酸等，以及已经以某些方式进行修饰来改变某些性质（例如电荷）的天然存在的氨基酸，例如磷酸丝氨酸或磷酸酪氨酸等。在氨基酸的衍生物中，形成酰胺键的氨基被烷基化，或侧链氨基、羟基、或硫官能团被烷基化或酰化，或侧链羧基官能团被酰胺化或酯化。

[0024] 短连接链 L 选自任选取代的碳原子、任选取代的氮原子、氧原子、硫原子、和它们的组合，链中优选 1 至 60 个原子、特别是 1 至 20 个原子。这样的短连接链是，例如聚乙烯氧（polyethylenoxy）链、糖链或优选地肽链，例如由 1 至 20 个氨基酸、特别是 1 至 6 个氨基酸组成的肽链。

[0025] m 和 n 各自是 2 至 10 之间的数字，条件是， m 不等于 n ，且 m 不是 n 的倍数，且 n 不是 m 的倍数。 n 和 m 的优选组合是这样的组合，其中 m 是 2 且 n 是 5，或 m 是 3 且 n 是 4 或 5，或 m 是 4 且 n 是 5。同样地， n 和 m 的优选组合是这样的组合，其中 m 是 5 且 n 是 2，或 m 是 4 或 5 且 n 是 3，或 m 是 5 且 n 是 4。最优选的是这样的组合，其中 m 或 n 是 5。

[0026] 卷曲螺旋是肽序列，其具有间隔 3 和 4 个残基的主要疏水的残基的连续图案，装配形成多聚体螺旋束，这将在下文中更详细地解释。

[0027] “掺入 T- 细胞和 / 或 B- 细胞表位的卷曲螺旋”是指，对应的表位包含在寡聚化结构域中，从而在表位的 N- 末端和 C- 末端的氨基酸序列迫使表位适应仍然是卷曲螺旋的构象，后者与包含所述表位的寡聚化结构域的寡聚化性质相一致。更具体地，“掺入”不包括这样的情况，其中所述表位结合在卷曲螺旋寡聚化结构域的任一个末端。

[0028] 在本文件的上下文中，术语 T- 细胞表位用于指 CTL 和 HTL 表位。

[0029] T- 细胞表位会结合处于展开构象的 MHC 分子（图 1）。因此，将 T- 细胞表位掺入 α -螺旋状的卷曲螺旋（对比图 3A 和图 1）不是蛋白工程的日常任务。在本发明中，证实了这些具有展开构象的肽序列当结合各个 MHC 分子时仍然可以掺入 α -螺旋状的卷曲螺旋寡聚化结构域。

[0030] D1、D2 和 L 的任选取代物是例如 B- 细胞表位、靶向物质或增强纳米颗粒的佐剂性质的取代物，例如免疫刺激的核酸，优选含有脱氧肌苷的寡脱氧核苷酸，含有脱氧尿苷的寡脱氧核苷酸，含有 CG 基序的寡脱氧核苷酸，或含有肌苷和胞苷的核酸分子。增强纳米颗粒的佐剂性质的其它取代物是抗微生物的肽，例如阳离子肽，它们是一类能促进和 / 或提高适应性免疫应答的免疫刺激性的、带正电荷的分子。这样的具有免疫增强性质的肽的一个

实例是带正电荷的人工的抗微生物的肽 KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO :63),它在激发-强化免疫接种后会诱导有效的蛋白特异性的类型-2 驱动适应性免疫。视作取代物的特定靶向物质是靶向内质网的信号,即诱导蛋白或肽向内质网 (ER) 运输的信号肽。其它任选的取代物是,例如,酰基,例如乙酰基,其结合游离氨基,尤其是 N-末端氨基酸,或氨基,其结合 C-末端氨基酸的游离羧基,以产生羧酰胺官能团。

[0031] 任选的取代物,例如上述的那些任选的取代物,优选地连接接近寡聚化结构域 D1 和 / 或 D2 的游离末端的合适的氨基酸。肽纳米颗粒自装配后,这样的取代物然后会呈现在 SAPN 的表面。

[0032] 在一个最优化的实施方案中,取代物是另一个肽序列 S1 和 / 或 S2,它代表肽链 D1-L-D2 在任一端或在两端的简单延伸,产生任一种下述形式的组合的单个肽序列: S1-D1-L-D2, D1-L-D2-S2, 或 S1-D1-L-D2-S2, 其中 S1 和 S2 是在上文中和在下文中定义的肽取代物。取代物 S1 和 / 或 S2 用于延伸 SAPN 的核心序列 D1-L-D2。任意这样的肽序列 S1-D1-L-D2, D1-L-D2-S2, 或 S1-D1-L-D2-S2 可以在重组蛋白表达系统中表达为一个单独的分子。

[0033] 优选的取代物 S1 和 / 或 S2 是 B-细胞表位。考虑的其它 B-细胞表位是半抗原分子,例如碳水化合物或尼古丁,它们同样结合在寡聚化结构域 D1 和 / 或 D2 的末端,因此会显示在 SAPN 的表面。

[0034] 显然,也可能使超过一种取代物结合寡聚化结构域 D1 和 / 或 D2。例如,考虑肽序列 S1-D1-L-D2-S2,可以将另一种取代物与它共价连接,优选在远离连接区段 L 的位置,接近 D1 和 / 或 D2 的末端,或在取代物 S1 和 / 或 S2 中的任意位置。

[0035] 也可能使取代物结合连接区段 L。在这样的情况下,在重新折叠 SAPN 后,取代物将位于 SAPN 的内腔中。

[0036] 形成寡聚体的倾向是指,根据条件,这样的肽可以形成寡聚体,例如在变性条件下,它们是单体,而在生理条件下,它们可以形成例如三聚体。在预定的条件下,它们会采取一种单一的寡聚化状态,后者是纳米颗粒形成所必需的。但是,它们的寡聚化状态可以随条件变化而变化,例如在增加盐浓度后,从二聚体变成三聚体 (Burkhard P. 等人, *ProteinScience* 2000, 9 :2294-2301),或在降低 pH 后,从五聚体变成单体。

[0037] 根据式 (I) 的构造块结构明显不同于病毒衣壳蛋白。病毒衣壳由一种单一蛋白组成,形成 60 或其倍数的寡聚体,例如乙型肝炎病毒颗粒 (EP1 262 555, EP 0 201 416),或由超过一种蛋白组成,它们共装配,形成病毒衣壳结构,后者也可以采取除二十面体以外的其它几何形状,这取决于病毒的类型 (Fender P. 等人, *Nature Biotechnology* 1997, 15 : 52-56)。本发明的自装配肽纳米颗粒 (SAPN) 也明显不同于病毒样颗粒,因为它们:(a) 不是用病毒衣壳蛋白构建,且 (b) 在纳米颗粒中央的空腔太小,不足以容纳整个病毒基因组的 DNA/RNA。

[0038] 肽寡聚化结构域是众所周知的 (Burkhard P. 等人, *Trends Cell Biol* 2001, 11 :82-88)。最简单的寡聚化结构域可能是卷曲螺旋折叠基序。已经证实,该寡聚化基序作为二聚体、三聚体、四聚体和五聚体存在。一些实例是 GCN4 亮氨酸拉链、fibrin、tetrabrachion 和 COMP,分别代表二聚体、三聚体、四聚体和五聚体卷曲螺旋。

[0039] 一个或两个寡聚化结构域 D1 和 D2 彼此独立地是卷曲螺旋结构域。一个卷曲螺旋

是一个肽序列,其具有间隔 3 和 4 个残基的主要疏水的残基的连续图案,通常在 7 个氨基酸(七肽重复)或 11 个氨基酸(十一肽重复)的序列中,它装配(折叠)形成多聚体螺旋束。也包括这样的卷曲螺旋,其具有包含一些不规则分布的 3 和 4 个残基间隔的序列。疏水的残基具体地是疏水的氨基酸 Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Phe 和 Trp。主要疏水的是指,至少 50%的残基必须选自所述的疏水氨基酸。

[0040] 例如,在式 (I) 的一个优选的单体构造块中, D1 和 / 或 D2 是任意下式的肽

[0041] $[aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)]_x$ (IIa),

[0042] $[aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)]_x$ (IIb),

[0043] $[aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)]_x$ (IIc),

[0044] $[aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)]_x$ (IId),

[0045] $[aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)]_x$ (IIe),

[0046] $[aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)]_x$ (IIIf),

[0047] $[aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)]_x$ (IIg),

[0048] 其中 aa 表示氨基酸或其衍生物, aa(a), aa(b), aa(c), aa(d), aa(e), aa(f), 和 aa(g) 是相同的或不同的氨基酸或其衍生物, 优选地 aa(a) 和 aa(d) 是相同的或不同的疏水氨基酸或其衍生物; 且 X 是 2 至 20 之间的数, 优选 3, 4, 5 或 6。

[0049] 疏水氨基酸是 Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Phe 和 Trp。

[0050] 七肽是式 aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g) (IIa) 或式 (IIb) 至 (IIg) 的变换之一的七肽。

[0051] 优选的是式 (I) 的单体构造块, 其中一个或两个肽寡聚化结构域 D1 或 D2 是

[0052] (1) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中 X 是 3, 且 aa(a) 和 aa(d) 选自 20 种天然 α -L-氨基酸, 使得表 1 中对这 6 个氨基酸的评分总和是至少 14, 且这样的肽包含最高达 17 个其它的七肽; 或

[0053] (2) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中 X 是 3, 且 aa(a) 和 aa(d) 选自 20 种天然 α -L-氨基酸, 使得表 1 中对这 6 个氨基酸的评分总和是至少 12, 条件是, 一个氨基酸 aa(a) 是能与邻近七肽的氨基酸 aa(d) 或 aa(g) 形成螺旋间盐桥的带电荷的氨基酸, 或一个氨基酸 aa(d) 是能与邻近七肽的氨基酸 aa(a) 或 aa(e) 形成螺旋间盐桥的带电荷的氨基酸, 且这样的肽包含最高达 2 个其它的七肽。能与邻近七肽的氨基酸形成螺旋间盐桥的带电荷的氨基酸是, 例如, Asp 或 Glu, 如果其它氨基酸是 Lys, Arg 或 His, 反之亦然。

[0054] 表 1: 用于确定优选的氨基酸评分

[0055]

氨基酸	位置 aa(a)	位置 aa(d)
L (Leu)	3.5	3.8
M (Met)	3.4	3.2
I (Ile)	3.9	3.0
Y (Tyr)	2.1	1.4

F(Phe)	3.0	1.2
V(Val)	4.1	1.1
Q(Gln)	-0.1	0.5
A(Ala)	0.0	0.0
W(Trp)	0.8	-0.1
N(Asn)	0.9	-0.6
H(His)	-1.2	-0.8
T(Thr)	0.2	-1.2
K(Lys)	-0.4	-1.8
S(Ser)	-1.3	-1.8
D(Asp)	-2.5	-1.8
E(Glu)	-2.0	-2.7
R(Arg)	-0.8	-2.9
G(Gly)	-2.5	-3.6
P(Pro)	-3.0	-3.0
C(Cys)	0.2	-1.2

[0056] 也优选的是式 (I) 的单体构造块, 其中一个或两个肽寡聚化结构域 D1 或 D2 选自下述优选的肽:

[0057] (11) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中 aa(a) 选自 Val, Ile, Leu 和 Met, 和其衍生物, 且 aa(d) 选自 Leu, Met 和 Ile, 和其衍生物。

[0058] (12) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中一个 aa(a) 是 Asn, 其它 aa(a) 选自 Asn, Ne 和 Leu, 且 aa(d) 是 Leu。这样的肽通常是二聚化结构域 (m 或 n = 2)。

[0059] (13) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中 aa(a) 和 aa(d) 都是 Leu 或都是 Ile。这样的肽通常是三聚化结构域 (m 或 n = 3)。

[0060] (14) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中 aa(a) 和 aa(d) 都是 Trp。这样的肽通常是五聚化结构域 (m 或 n = 5)。

[0061] (15) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中 aa(a) 和 aa(d) 都是 Phe。这样的肽通常是五聚化或四聚化结构域 (m 或 n = 4 或 5)。

[0062] (16) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中 aa(a) 和 aa(d) 都是 Trp 或 Phe。这样的肽通常是五聚化结构域 (m 或 n = 5)。

[0063] (17) 式 (IIa) 至 (IIg) 中任一个的肽, 其中 aa(a) 是 Leu 或 Ile, 且一个 aa(d) 是 Gln, 且其它 aa(d) 选自 Gln, Leu 和 Met。这样的肽具有成为五聚化结构域 (m 或 n = 5) 的潜力。

[0064] 其它优选的肽是在上文中定义的肽 (1), (2), (11), (12), (13), (14), (15), (16) 和 (17), 且其中另外

[0065] (21) 至少一个 aa(g) 选自 Asp 和 Glu, 且在下述七肽中的 aa(e) 是 Lys, Arg 或 His; 和 / 或

[0066] (22) 至少一个 aa(g) 选自 Lys, Arg 和 His, 且在下述七肽中的 aa(e) 是 Asp 或 Glu, 和 / 或

[0067] (23) 至少一个 aa(a 至 g) 选自 Lys, Arg 和 His, 且序列中间隔 3 或 4 个氨基酸的 aa(a 至 g) 是 Asp 或 Glu。这样的氨基酸 aa(a 至 g) 对是, 例如 aa(b) 和 aa(e) 或 aa(f)。

[0068] 卷曲螺旋预测程序例如 COILS

[0069] (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html; Gruber M. 等人, J. Struct. Biol. 2006, 155(2):140-5) 或 MULTICOIL (<http://groups.csail.mit.edu/cb/multicoil/cgi-bin/multicoil.cgi>) 可以预测形成卷曲螺旋的肽序列。因此, 在式 (I) 的一个优选的单体构造块中, D1 和 / 或 D2 是含有至少一个长度为 2 个七肽重复的序列的肽, 用卷曲螺旋预测程序 COILS 预测, 利用 14、21 或 28 的窗大小中的至少一个, 所有它的氨基酸形成卷曲螺旋的概率高于 0.9。

[0070] 在式 (I) 的一个更优选的单体构造块中, D1 和 / 或 D2 是含有至少一个长度为 3 个七肽重复的序列的肽, 用卷曲螺旋预测程序 COILS 预测, 利用 14、21 或 28 的窗大小中的至少一个, 所有它的氨基酸形成卷曲螺旋的概率高于 0.9。

[0071] 在式 (I) 的另一个更优选的单体构造块中, D1 和 / 或 D2 是含有至少 2 个分开的长度为 2 个七肽重复的序列的肽, 用卷曲螺旋预测程序 COILS 预测, 利用 14、21 或 28 的窗大小中的至少一个, 所有它的氨基酸形成卷曲螺旋的概率高于 0.9。

[0072] 在另一个优选的实施方案中, 一个寡聚化结构域 D1 或 D2 是 COMP (Malashkevich V. N. 等人, Science 1996, 274:761-765) 的五聚化结构域 (m 或 n = 5) 或其衍生物。该五聚化结构域具有序列 LAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITFLKNTVMECDACG (SEQ ID NO:1)。也预见到该结构域的小修饰。这样的修饰可以是, 例如, 用 Cys 置换在五聚体外侧在位置 aa(b)、aa(c) 或 aa(f)、优选在位置 aa(f) 处的氨基酸, 其目的是在邻近的结构域之间形成二硫键。该结构域的表面氨基酸的其它修饰可以包括氨基酸的置换, 用于优化邻近的寡聚化结构域之间的界面处的相互作用, 例如疏水的、亲水的或离子的相互作用或共价键如二硫键。也预见到该结构域更短的构建体, 例如缺少 C-末端 CDACG 基序, 其中半胱氨酸在该五聚化结构域的 C-末端形成分子间二硫键。也预见到影响该结构域的寡聚化状态的氨基酸修饰, 导致例如从五聚体向四聚体的转变。该结构域的表面氨基酸的其它修饰可以包括, 氨基酸的置换 (例如置换为半胱氨酸或赖氨酸), 以产生官能团的结合部位。

[0073] 在另一个优选的实施方案中, 一个寡聚化结构域 D1 或 D2 是色氨酸拉链 (Liu J 等人, Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(46):16156-61) 的五聚化结构域 (m 或 n = 5)

或其衍生物。该五聚化结构域具有序列 SSNAKWDQWSSDWQTNNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARW NQRWDNWAT (SEQ ID NO :2)。也预见到该结构域的小修饰。这样的修饰可以是,例如,用 Cys 置换在五聚体外侧在位置 aa(b)、aa(c) 或 aa(f)、优选在位置 aa(f) 处的氨基酸,其目的是在邻近的结构域之间形成二硫键。该结构域的表面氨基酸的其它修饰可以包括氨基酸的置换,用于优化邻近的寡聚化结构域之间的界面处的相互作用,例如疏水的、亲水的或离子的相互作用或共价键如二硫键。也预见到该结构域更短的构建体。也预见到影响该结构域的寡聚化状态的氨基酸修饰,例如用 Phe 交换核心残基 Trp,导致从五聚化结构域向四聚化结构域的转变。也考虑在实施例 10 中的其它核心残基突变,但是至少 70% 的核心位置 aa(a) 和 aa(d) 必须是 Trp 或另一种芳族氨基酸。该结构域的表面氨基酸的其它修饰可以包括,氨基酸的置换(例如置换为半胱氨酸或赖氨酸),以产生官能团的结合部位。

[0074] 在另一个优选的实施方案中,一个寡聚化结构域 D1 或 D2 是 tetrabrachion(Stetefeld J. 等人, Nature Structural Biology, 2000 ;7(9) :772-776) 的卷曲螺旋结构域的四聚化结构域 (m 或 $n = 4$) 或其衍生物。该四聚化结构域具有序列 I INETADDIVYRLTVIIDDREYSLKNLITLRADRLMIINDNVSTILASG (SEQ ID NO :64)。卷曲螺旋序列的特征在于 7 个残基的七肽重复,其中含有 3,4- 疏水的重复。在小数目的折叠 (turn) 后允许残基假定半价位置的下一个周期性是 3 个折叠或 11 个残基。基于 11- 残基重复的存在,来自嗜热的古细菌 *Staphylothermus marinus* 的表面层糖蛋白 tetrabrachion 的 C- 末端形成右手卷曲螺旋结构。它形成长 70nm 的四聚体的 α - 螺旋状的卷曲螺旋茎,后者在它的 C- 末端锚定在细胞膜上。该四聚体卷曲螺旋含有一系列 HTL 表位(实施例 9),因此理想地适合作为自装配肽纳米颗粒 (SAPN) 的核心寡聚体。

[0075] 在另一个优选的实施方案中,一个寡聚化结构域 D1 或 D2 是噬菌体 T4 蛋白 fibritin(Tao, Y. 等人, Structure 1997, 5 :789-798) 的三聚化结构域 (foldon) 或其衍生物。该三聚化结构域 (m 或 $n = 3$) 具有序列 GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO :3)。也预见到该结构域的小修饰。这样的修饰可以是,用 Cys 置换 Asp9,其目的是在邻近的结构域之间形成二硫键。该结构域的表面氨基酸的其它修饰可以包括残基的置换,用于优化邻近的寡聚化结构域之间的界面处的相互作用,例如疏水的、亲水的或离子的相互作用或共价键如二硫键。该结构域的表面氨基酸的其它修饰可以包括,氨基酸的置换(例如置换为半胱氨酸或赖氨酸),以产生官能团的结合部位。

[0076] 最优选的是在实施例中所述的卷曲螺旋序列和单体构造块。

[0077] 自装配肽纳米颗粒:均匀单元

[0078] 自装配肽纳米颗粒 (SAPN) 由式 (I) 的单体构造块制成。如果这样的构造块装配,它们会形成所谓的“均匀单元”。将装配成这样的均匀单元的单体构造块的数目,由最小公倍数 (LCM) 决定。因此,如果例如单体构造块的寡聚化结构域形成三聚体 $(D1)_3$ ($m = 3$) 和五聚体 $(D2)_5$ ($n = 5$), 15 个单体会形成一个均匀单元(图 2A)。如果连接区段 L 具有适当的长度,该均匀单元可以装配成球形肽纳米颗粒的形式。类似地,如果单体构造块的寡聚化结构域 D1 和 D2 形成三聚体 $(D1)_3$ ($m = 3$) 和四聚体 $(D2)_4$ ($n = 4$), 形成一个均匀单元所需的单体的数目是 12(图 2B)。

[0079] 由于 m 和 n 不能彼此相同或成倍数,最小公倍数 (LCM) 总是大于 m 和 n 。

[0080] 通过仅一个或超过一个均匀单元的装配,可以形成自装配肽纳米颗粒 (SAPN) (表

2)。这样的 SAPN 代表拓扑上封闭的结构。

[0081] 表 2:寡聚化状态的可能组合

[0082]

ID No.	m	n	多面体类型	LCM	均匀单元的数目	构造块的数目
1	5	2	十二面体/二十面体	10	6	60
2	5	3	十二面体/二十面体	15	4	60
3	4	3	立方体/八面体	12	2	24
4	3	4	立方体/八面体	12	2	24
5	3	5	十二面体/二十面体	15	4	60
6	2	5	十二面体/二十面体	10	6	60
7	5	4	不规则	20	1	20
8	4	5	不规则	20	1	20

[0083] 规则的多角体

[0084] 存在 5 种规则的多角体,四面体,立方体,八面体,十二面体和二十面体。它们具有不同的内部旋转对称元件。四面体具有 1 个 2-倍和 2 个 3-倍轴,立方体和八面体具有 1 个 2-倍、1 个 3-倍和 1 个 4-倍旋转对称轴,十二面体和二十面体具有 1 个 2-倍、1 个 3-倍和 1 个 5-倍旋转对称轴。在立方体中,这些轴的空间定向与在八面体中完全一样,在十二面体和二十面体中,这些轴相对于彼此的空间定向也完全一样。因此,为了本发明的 SAPN 的目的,立方体和八面体,类似地十二面体和二十面体,可以视作相同。立方体/八面体由 24 个相同的三维构造块构成,而十二面体/二十面体由 60 个相同的三维构造块构成(表 2)。这些构造块是多面体的不对称单位(AU)。它们是三锥体,每个锥体边缘对应着一个旋转对称轴,因此这些 AU 会在它们的边缘具有 2-倍、3-倍和 4-倍或 5-倍对称元件,这依赖于多面体类型。如果这些对称元件由肽寡聚化结构域制成,这样的 AU 是由上述的单体构造块构成。足以沿着 AU 的 2 个对称轴排列两个寡聚化结构域 D1 和 D2(图 3)。如果这两个寡聚化结构域形成稳定的寡聚体,将自动产生沿着第三个对称轴的对称界面,且它可以通过优化沿着该界面的相互作用(例如疏水的、亲水的或离子的相互作用或共价键例如二硫键)来稳定化。

[0085] 装配具有规则多角体对称性的自装配肽纳米颗粒(SAPN)

[0086] 为了生成具有规则几何形状(十二面体,立方体)的自装配肽纳米颗粒(SAPN),需要超过一个均匀单元。例如,为了用含有三聚体和五聚体寡聚化结构域的单体形成十二面体,需要 4 个均匀单元,每个由 15 个单体构造块组成,即具有规则几何形状的肽纳米颗粒由 60 个单体构造块组成。在表 2 中列出了形成任意的规则多角体所需的两个寡聚化结构域的寡聚化状态的组合和均匀单元的数目。

[0087] 均匀单元是否能进一步装配形成由超过一个均匀单元组成的规则多角体,依赖于 2 个寡聚化结构域 D1 和 D2 相对于彼此的几何排列,特别是两个寡聚化结构域的旋转对称轴之间的角度。这由下述因素决定:i) 纳米颗粒中邻近结构域之间的界面处的相互作用,ii) 连接区段 L 的长度,iii) 单个寡聚化结构域的形状。与在规则多面体中的排列相比,该角度在均匀单元中更大。在单体构造块中该角度也不相同,这不同于规则的多面体。如果该

角度限制为规则多面体（借助于疏水的、亲水的或离子的相互作用，或共价二硫键）的更小的值，且连接区段 L 足够短，给定数目的拓扑上封闭的均匀单元（每个含有确定数目的单体构造块）将会进一步对合，形成规则的多面体（表 2），或包围更多单体构造块，形成缺乏多面体的严格内部对称性的纳米颗粒。

[0088] 如果两个寡聚化结构域之间的角度足够小（甚至小于在具有二十面体对称性的规则多面体中），则大数目的（几百）肽链可以装配成肽纳米颗粒。这可以如下实现：用小残基丙氨酸替换位于两个螺旋之间的界面处（如在 Raman S. 等人, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2006, 2 :95-102 的原始设计中）且形成两个螺旋之间的二硫键的 2 个半胱氨酸，如在序列 SEQ ID NO :33 中。两个螺旋之间的角度可以更小，结果超过 60 个肽链可以装配进 SAPN。在这样的设计中，SAPN 具有约 4MD 的分子量，这对应着约 330 个肽链（实施例 6）。

[0089] T- 细胞表位和 B- 细胞表位

[0090] 由于 T- 细胞表位（相对于 B- 细胞表位）不需要显示在载体表面上来引起免疫接种，它们可以掺入 SAPN 的核心支架（即寡聚化结构域的卷曲螺旋序列）中。在本发明中，证实了如何将 T- 细胞表位的 MHC 结合（MHC 结合需要展开构象（图 1）的特征与卷曲螺旋形成（卷曲螺旋形成需要 α -螺旋构象）的特征相结合，使得这些表位都成为 SAPN 的卷曲螺旋支架的一部分，并能结合各个 MHC 分子。应当指出，并非所有的卷曲螺旋序列都能结合 MHC 分子，也并非所有的 T- 细胞表位都可以掺入卷曲螺旋结构中。本发明提供了一般规则，如何选择适当的 T- 细胞表位，并描述了如何将它们掺入特定卷曲螺旋寡聚化结构域，使得这些肽会形成 SAPN。通过使用这些规则，可以将许多种 T- 细胞表位掺入 SAPN 的卷曲螺旋支架中。

[0091] 在本发明的另一个方面，如下将不是卷曲螺旋的 B- 细胞表位掺入 SAPN 寡聚化结构域的卷曲螺旋序列中：通过将它们插入 2 串卷曲螺旋区段之间，使得该整个序列起单个寡聚化结构域的作用。这是特别令人感兴趣的，因为卷曲螺旋支架可以提供工具，使 B- 细胞表位的构象限制为几何与它的天然构象相同的构象。

[0092] T- 细胞表位的来源

[0093] 为了将 T- 细胞表位掺入寡聚化结构域，最终产生自装配肽纳米颗粒 (SAPN)，T- 细胞表位可以选自不同的来源：例如，T- 细胞表位可以通过文献已知的实验方法来测定，它们可以通过基于特定病原体的现有蛋白序列的预测算法来预测，或它们可以是新设计的肽或它们的组合。

[0094] 在科学文献中可得到已知的 T- 细胞表位的知识。这些 T- 细胞表位可以选自特定病原体（例如在实施例 12, 13 和 14 中），选自癌症特异性的肽序列（例如在实施例 4 中），或它们可以是具有特定特征的从新设计的肽，例如结合许多不同的 MHC II 分子的 PADRE 肽（美国专利 5, 736, 142），这使它成为所谓的泛宿主性的 T- 细胞表位（例如在实施例 1 中）。存在公众可接近的含有数千不同 T- 细胞表位的数据库，例如 MHC- 数据库 " MHCBN VERSION 4.0 " (<http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbn/index.html>) 或 PDB- 数据库 " Protein Data Bank " (<http://www.rcsb.org/pdb>)，或其它。

[0095] 众所周知且有很多文献记载，将 HTL 表位掺入原本非免疫原性的肽序列中或使它结合非肽抗原，可以使它们具有高得多的免疫原性。结合 pan-DR 的肽 HTL 表位 PADRE 已经

广泛地用于疟疾、阿尔茨海默氏病的疫苗设计和许多其它疫苗。

[0096] 根据 MHCBN 数据库（同上）的定义，T- 细胞表位是与对应的 MHC 分子的结合亲和力（ IC_{50} 值）小于 50,000nM 的肽。这样的肽视作 MHC 结合物。根据该定义，截止 2006 年 8 月，在 MHCBN 数据库的 4.0 版中，可以得到下述数据：20717 种 MHC 结合物和 4022 种 MHC 不结合物。

[0097] 合适的 T- 细胞表位也可以使用预测算法得到。这些预测算法可以扫描来自病原体的现有蛋白序列中的推定 T- 细胞表位，或它们可以预测，从新设计的肽是否结合特定的 MHC 分子。公众在因特网上可接近许多这样的预测算法。实例是 SVRMHCdb (<http://svrmhc.umn.edu/SVRMHCdb> ;J.Wan 等人, BMC Bioinformatics 2006,7 :463), SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>), MHCpred (<http://www.jenner.ac.uk/MHCpred>), 基序扫描器 (http://hcv.lanl.gov/content/immuno/motif_scan/motif_scan) 或针对 MHC II 结合分子的 NetMHCIIpan (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan>) 和针对 MHC I 结合表位的 NetMHCpan (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan>)。

[0098] 本文所述的和设计优选的 HTL 表位是通过生物物理学方法测得或通过 NetMHCIIpan 预测会以优于 500nM 的结合亲和力（ IC_{50} 值）结合任意 MHC II 分子的肽序列。这些被视作弱结合物。优选地，这些表位通过生物物理学方法测得或通过 NetMHCIIpan 预测会以优于 50nM 的 IC_{50} 值结合任意 MHC II 分子。这些被视作强结合物。

[0099] 本文所述的和设计优选的 CTL 表位是通过生物物理学方法测得或通过 NetMHCpan 预测会以优于 500nM 的结合亲和力（ IC_{50} 值）结合任意 MHC I 分子的肽序列。这些被视作弱结合物。优选地，这些表位通过生物物理学方法测得或通过 NetMHCpan 预测会以优于 50nM 的 IC_{50} 值结合任意 MHC I 分子。这些被视作强结合物。

[0100] T- 细胞表位的位置

[0101] T- 细胞表位可以掺入卷曲螺旋寡聚化结构域 D1 和 / 或 D2 肽序列内的几个位置。为此，含有 T- 细胞表位的特定序列必须服从卷曲螺旋形成的规则以及 MHC 结合的规则。卷曲螺旋形成的规则已经在上面详细描述。结合 MHC 分子的规则混入 MHC 结合预测程序中，该程序使用复杂的算法来预测 MHC 结合肽。

[0102] 存在许多不同的 HLA 分子，其中在它们的序列中具有氨基酸限制的每一个会最佳地结合它。在表 3 中总结了结合基序。在该表中，基序在显示 x 的位置可以具有任意氨基酸，在方括号中，氨基酸（列表）仅可以在结合基序的特定位置。

[0103] 表 3 :HLA 基因型的 MHC- 结合基序

[0104]

MHC分子	基序 ¹⁾	参考文献 ²⁾
A*01	xx[DE]xxxxx[Y]	SYFPEITHI
A*0101	xx[DE]xxxxx[Y]	Marsh2000
A*0201	x[L(M)]xxxxxx[V(L)]	Marsh2000
A*0201	x[LM]xxxxxx[VL]	SYFPEITHI
A*0202	x[L]xxxxxx[L]	Marsh2000
A*0202	x[L(A)]xxxxxx[LV]	SYFPEITHI
A*0204	x[L]xxxxxx[L]	Marsh2000
A*0204	x[L]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
A*0205	x[V(QL)]xxxxxx[L]	Marsh2000
A*0205	xxxxxxx[L]	SYFPEITHI
A*0206	x[V(Q)]xxxxxx	Marsh2000
A*0206	x[V(Q)]xxxxxx[V(L)]	SYFPEITHI
A*0207	x[L][D]xxxxx[L]	Marsh2000
A*0207	x[L]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
A*0214	x[QV]xxx[K]xx[VL]	Luscher2001

[0105]

A*0214	x[VQ(L)]xxxxxx[L]	Marsh2000
A*0214	x[VQL(A)]xxxxxx[L(VM)]	SYFPEITHI
A*0217	x[L]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
A*03	x[LVM]xxxxxx[KYF]	SYFPEITHI
A*0301	x[LVM(IAST)]xxxxxx[KY(FR)]	Marsh2000
A*1101	xxxxxxx[K]	Marsh2000
A*1101	xxxxxxx[KR]	SYFPEITHI
A*24	x[Y(F)]xxxxxx[ILF]	SYFPEITHI
A*2402	x[YF]xxxxxx[FWIL]	Marsh2000
A*2402	x[YF]xxxxxx[LFI]	SYFPEITHI
A*2501	xxxxxxx[W]	Yusim2004
A*2601	x[VTIFL]xxxxxx[YF]	Marsh2000
A*2601	x[VTILF]xxxxxx[YF]	SYFPEITHI
A*2602	x[VTILF]xxxxxx[YFML]	Marsh2000
A*2602	x[VTILF]xxxxxx[YF(ML)]	SYFPEITHI
A*2603	x[VFILT]xxxxxx[YFML]	Marsh2000
A*2603	x[VTILF]xxxxxx[YFML]	SYFPEITHI
A*2902	x[E(M)]xxxxxx[Y(L)]	Marsh2000
A*2902	x[E(M)]xxxxxx[Y(L)]	SYFPEITHI
A*3001	x[YF(VLIMIT)]xxxxxx[L(YFM)]	SYFPEITHI
A*3002	x[YFLV]xxxxxx[Y]	SYFPEITHI
A*3003	x[FYIVL]xxxxxx[Y]	SYFPEITHI
A*3004	xxxxxxx[YML]	SYFPEITHI
A*3101	xxxxxxx[R]	Marsh2000
A*3101	xxxxxxx[R]	SYFPEITHI
A*3201	x[!]xxxxxx[W]	Yusim2004
A*3303	xxxxxxx[R]	Marsh2000
A*3303	xxxxxxx[R]	SYFPEITHI
A*6601	x[TV(APLIC)]xxxxxx[RK]	SYFPEITHI
A*6801	x[VT]xxxxxx[RK]	Marsh2000
A*6801	x[VT]xxxxxx[RK]	SYFPEITHI
A*6802	x[TV]xxxxxx[VL]	Yusim2004
A*6901	x[VT(A)]xxxxxx[VL]	Marsh2000
A*6901	x[VTA]xxxxxx[VL(MQ)]	SYFPEITHI
B*07	x[P]xxxxxx[LF]	SYFPEITHI
B*0702	x[P]xxxxxx[L(F)]	Marsh2000
B*0702	x[P(V)]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
B*0703	x[P]xxxxxx	Marsh2000
B*0703	x[P(ND)]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
B*0705	x[P]xxxxxx	Marsh2000
B*0705	x[P]xxxxxx[L(F)]	SYFPEITHI
B*08	xx[K(R)]x[KR]xxx[L(FM)]	SYFPEITHI
B*0801	xx[K(R)]x[K(RH)]xxxx	Marsh2000
B*0801	xx[K(R)]xxxxxx	SYFPEITHI
B*0802	xx[K(RY)]x[K(H)]xxxx	Marsh2000
B*0802	xx[K(RY)]x[K(H)]xxxx	SYFPEITHI
B*14	x[RK]xx[RH]xxx[L]	SYFPEITHI
B*1402	x[R(K)]xx[R(H)]xxx[L]	Marsh2000
B*1501	x[Q(LMVP)]xxxxxx[YF]	Marsh2000
B*1501	x[QL(MVP)]xxxxxx[FY]	SYFPEITHI
B*1502	xxxxxxx[YF(M)]	Marsh2000
B*1502	x[QLVP]xxxxxx[FYM]	SYFPEITHI

[0106]

B*1503	x[QK]xxxxxx[YF]	SYFPEITHI
B*1508	x[P(A)]xxxxxx[YF]	Marsh2000
B*1508	x[PA]xxxxxx[YF]	SYFPEITHI
B*1509	x[H]xxxxxx[L(F)]	Marsh2000
B*1509	x[H]xxxxxx[LFM]	SYFPEITHI
B*1510	x[H]xxxxxx[L(F)]	SYFPEITHI
B*1512	x[Q(LM)]xxxxxx[YF]	SYFPEITHI
B*1513	xxxxxxx[W]	Marsh2000
B*1513	x[LIQVPM]xxxxxx[W]	SYFPEITHI
B*1516	x[T(S)]xxxxxx[Y(IVFM)]	Marsh2000
B*1516	x[ST(F)]xxxxxx[IVYF]	SYFPEITHI
B*1517	x[TS]xxxx[L]x[Y(F)]	Marsh2000
B*1517	x[TS]xxxxxx[YFLI]	SYFPEITHI
B*1518	x[H]xxxxxx[Y(F)]	SYFPEITHI
B*18	x[E]xxxxxx	Marsh2000
B*27	x[R]xxxxxx	SYFPEITHI
B*2701	x[RQ]xxxxxx[Y]	Marsh2000
B*2701	x[RQ]xxxxxx[Y]	SYFPEITHI
B*2702	x[R]xxxxxx[FY(ILW)]	Marsh2000
B*2702	x[R]xxxxxx[FYILW]	SYFPEITHI
B*2703	x[R(M)]xxxxxx	Marsh2000
B*2703	x[R]xxxxxx[YF(RMWL)]	SYFPEITHI
B*2704	x[R]xxxxxx[YLF]	Marsh2000
B*2704	x[R]xxxxxx[YLF]	SYFPEITHI
B*2705	x[R(K)]xxxxxx	Marsh2000
B*2705	x[R]xxxxxx[LFYRHK(MI)]	SYFPEITHI
B*2706	x[R]xxxxxx[L]	Marsh2000
B*2706	x[R]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
B*2707	x[R]xxxxxx[L]	Marsh2000
B*2707	x[R]xxxxxx[LF]	SYFPEITHI
B*2709	x[R]xxxxxx[LVFIM]	Marsh2000
B*2710	x[R]xxxxxx[YF]	Marsh2000
B*35	x[P(AVYRD)]xxxxxx[YFMLI]	SYFPEITHI
B*3501	x[P(AV)]xxxxxx	Marsh2000
B*3501	x[P(AVYRD)]xxxxxx[YFMLI]	SYFPEITHI
B*3503	x[P(A)]xxxxxx[ML(F)]	Marsh2000
B*3503	x[P(MILFV)]xxxxxx[ML(F)]	SYFPEITHI
B*3701	x[D(E)]xxxxxx[FML][IL]	Marsh2000
B*3701	x[DE(HPGSL)]xxxxxx[FML(QKYL)][IL(TENDQ GH)]	SYFPEITHI
B*3801	xxxxxxx[FL]	Marsh2000
B*3801	xxxxxxx[FL(I)]	SYFPEITHI
B*3901	x[RH]xxxxxx[L]	Marsh2000
B*3901	x[RH]xxxxxx[L(VIM)]	SYFPEITHI
B*3902	x[KQ]xxxxxx[L]	Marsh2000
B*3902	x[KQ]xxxxxx[L(FM)]	SYFPEITHI
B*3909	x[RH(P)]xxxxxx[LF]	SYFPEITHI
B*40	x[E]xxxxxx[LWMATR]	SYFPEITHI
B*4001	x[E]xxxxxx[L]	Marsh2000
B*4001	x[E]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
B*4002	x[E]xxxxxx[IAVL]	Yusim2004
B*4006	x[E]xxxxxx[V]	Marsh2000

[0107]

B*4006	x[E(P)]xxxxxx[V(AP)]	SYFPEITHI
B*4201	x[P]xxxxxx[L]	Yusim2004
B*44	x[E]xxxxxx[Y]	SYFPEITHI
B*4402	x[E]xxxxxx[YF]	Marsh2000
B*4402	x[E(MILD)]xxxxxx[FY]	SYFPEITHI
B*4403	x[E]xxxxxx[YF]	Marsh2000
B*4403	x[E(MILVD)]xxxxxx[YF]	SYFPEITHI
B*4601	xxxxxxx[YF]	Marsh2000
B*4601	x[M(l)]xxxxxx[YF]	SYFPEITHI
B*4801	x[QK]xxxxxx[L]	Marsh2000
B*4801	x[QK(M)]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
B*5101	xxxxxxx[FI]	Marsh2000
B*5101	x[APG(WF)]xxxxxx[VI(WMVL)]	SYFPEITHI
B*5102	x[APG]xxxxxx[IV]	Marsh2000
B*5102	x[APG]xxxxxx[IV]	SYFPEITHI
B*5103	xxxxxxx[VIF]	Marsh2000
B*5103	x[APG(FW)]xxxxxx[VIF]	SYFPEITHI
B*5201	xxxxxxx[IV][IV]	Marsh2000
B*5201	xxxxxxx[IV(MF)][IV(MF)]	SYFPEITHI
B*5301	x[P]xxxxxx	Marsh2000
B*5301	x[P]xxxxxx[WFL]	SYFPEITHI
B*5401	x[P]xxxxxx	Marsh2000
B*5401	x[P]xxxxxx	SYFPEITHI
B*5501	x[P]xxxxxx	Marsh2000
B*5501	x[P]xxxxxx	SYFPEITHI
B*5502	x[P]xxxxxx	Marsh2000
B*5502	x[P]xxxxxx	SYFPEITHI
B*5601	x[P]xxxxxx	Marsh2000
B*5601	x[P]xxxxxx[A(L)]	SYFPEITHI
B*5701	x[ATS]xxxxxx[FW]	Marsh2000
B*5701	x[ATS]xxxxxx[FWY]	SYFPEITHI
B*5702	x[ATS]xxxxxx[FW]	Marsh2000
B*5702	x[ATS]xxxxxx[FW]	SYFPEITHI
B*5801	x[ATS]xxxxxx[WF]	Marsh2000
B*5801	x[AST(G)]xxxxxx[FW(Y)]	SYFPEITHI
B*5802	x[ST]xxx[R]xx[F]	Marsh2000
B*5802	x[ST]xxx[R]xx[F]	SYFPEITHI
B*6701	x[P]xxxxxx	Marsh2000
B*6701	x[P]xxxxxx	SYFPEITHI
B*7301	x[R]xxxxxx[P]	Marsh2000
B*7301	x[R]xxxxxx[P]	SYFPEITHI
B*7801	x[PAG]xxxxxx	Marsh2000
B*7801	x[PAG]xxxxxx[A(KS)]x	SYFPEITHI
B*8101	x[P]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*0102	xx[P]xxxxxx[L]	Marsh2000
Cw*0102	x[AL]xxxxxx[L]	SYFPEITHI
Cw*0103	x[AL]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*0202	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*0203	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*0301	xxxxxxx[LFMl]	SYFPEITHI
Cw*0302	x[A]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*0303	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004

[0108]

Cw*0304	x[A]xxxxxx[LM]	Marsh2000
Cw*0304	x[A]xxxxxx[LM]	SYFPEITHI
Cw*0305	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0306	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0307	x[A]xxxxxx[LF]	Yusim2004
Cw*0308	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0309	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0401	x[YP]xxxxxx	Marsh2000
Cw*0401	x[YPF]xxxxxx[LFM]	SYFPEITHI
Cw*0402	x[YP]xxxxxx[LF]	Yusim2004
Cw*0403	x[P]xxxxxx[LF]	Yusim2004
Cw*0404	x[YP]xxxxxx[LF]	Yusim2004
Cw*0405	x[YP]xxxxxx[LF]	Yusim2004
Cw*0406	x[P]xxxxxx[LF]	Yusim2004
Cw*0501	x[A]xxxxxx[LF]	Yusim2004
Cw*0502	x[A]xxxxxx[LF]	Yusim2004
Cw*0601	xxxxxxx[LIVY]	SYFPEITHI
Cw*0602	xxxxxxx[L]	Marsh2000
Cw*0602	xxxxxxx[LIVY]	SYFPEITHI
Cw*0603	x[ALP]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*0604	x[RQ]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*0701	x[RHK]xxxxxx[Y]	Yusim2004
Cw*0702	xxxxxxx[YFL]	SYFPEITHI
Cw*0703	x[YP]xxxxxx[YL]	Yusim2004
Cw*0704	x[RQ]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0705	x[RQ]xxxxxx[Y]	Yusim2004
Cw*0706	x[RHK]xxxxxx[Y]	Yusim2004
Cw*0707	x[RHK]xxxxxx[YL]	Yusim2004
Cw*0708	x[RQ]xxxxxx[YL]	Yusim2004
Cw*0709	x[RHK]xxxxxx[YL]	Yusim2004
Cw*0710	x[YP]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*0711	x[R]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0712	x[R]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0801	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0802	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0803	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0804	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0805	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*0806	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004
Cw*1202	x[A]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*1203	x[A]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*1204	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*1205	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*1206	x[A]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*1402	x[YP]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*1403	x[YP]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*1404	x[YP]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*1502	x[A]xxxxxx[LMYF]	Yusim2004
Cw*1503	x[A]xxxxxx[LMYF]	Yusim2004
Cw*1504	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*1505	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*1506	x[A]xxxxxx[LM]	Yusim2004

[0109]

Cw*1507	x[A]xxxxxx[LMY]	Yusim2004
Cw*1601	x[A]xxxxxx[FWY]	Yusim2004
Cw*1602	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*1604	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*1701	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*1702	x[A]xxxxxx[L]	Yusim2004
Cw*1801	x[RQ]xxxxxx[LY]	Yusim2004
Cw*1802	x[RQ]xxxxxx[LY]	Yusim2004
DPA1*0102/DPB1*0201	[FLMVWY]xxx[FLMY]xx[IAMV]	SYFPEITHI
DPA1*0103/DPB1*0201	[YLVFK]xx[DSQT]x[YFWV]xx[LVI]	Marsh2000
DPA1*0103/DPB1*0201	[FLM]xxx[FL]xx[IA]	Marsh2000
DPA1*0201/DPB1*0401	[FLYM(IVA)]xxxxx[FLY(MVIA)]xx[VYI(AL)]	Marsh2000
DPA1*0201/DPB1*0401	[FLYMIVA]xxxxx[FLYMVIA]xx[VYIAL]	SYFPEITHI
DPA1*0201/DPB1*0901	[RK]xxx[AGL]xx[LV]	Marsh2000
DPB1*0301	x[R]xxxxxx	Marsh2000
DQA1*0101/DQB1*0501	[L]xxx[YFW]	Marsh2000
DQA1*0102/DQB1*0602	xxxxx[LIV(APST)]xx[AGST(LIVP)]	Marsh2000
DQA1*0301/DQB1*0301	xx[AGST]x[AVLI]	Marsh2000
DQA1*0301/DQB1*0301	[DEW]xx[AGST]x[ACLM]	SYFPEITHI
DQA1*0301/DQB1*0302	[RK]xxx[AG]xx[NED]	Marsh2000
DQA1*0301/DQB1*0302	[TSW]xxxxxxx[RE]	SYFPEITHI
DQA1*0501/DQB1*0201	[FWYILV]xx[DELVIH]x[PDE(H)][ED]x[FYWVILM]	Marsh2000
DQA1*0501/DQB1*0201	[FWYILV]xx[DELVIH]x[PDEHPA][DE]x[FWYILVM]	SYFPEITHI
DQA1*0501/DQB1*0301	[FYIMLV]xxx[VLIMY]x[YFMLVI]	Marsh2000
DQA1*0501/DQB1*0301	[WYAVM]xx[A]x[AIVTS]xxx[QN]	SYFPEITHI
DQB1*0602	[AFCILMNQSTVWYDE]x[AFGILMNQSTVWY CDE][AFGILMNQSTVWY]x[LIVAPST]xx[ASTGLIVP]	SYFPEITHI
DRB1*0101	[YFWLIMVA]xx[LMAIVN]x[AGSTCP]xx[LAINFYMW]	Marsh2000
DRB1*0101	[YVLFIAMW]xx[LAIMVNQ]x[AGSTCP]xx[LAINVNFY]	SYFPEITHI
DRB1*0102	[ILVM]xx[ALM]x[AGSTCP]xx[ILAMYW]	Marsh2000
DRB1*0102	[ILVM]xx[ALM]x[AGSTP]xx[ILAMYW]	SYFPEITHI
DRB1*0301	[LIFMV]xx[D]x[KR(EQN)]x[L][YLF]	Marsh2000
DRB1*0301	[LIFMV]xx[D]x[KREQN]xx[YLF]	SYFPEITHI
DRB1*0301 or DRB3*0201	[FILVY]xx[DNQT]	Marsh2000
DRB1*0401	[FLV]xxxxxxx[NQST]	Marsh2000
DRB1*0401 or DRB4	[FYWILVM]xx[FWILVADE]x[NSTQHR]xx[K]	Marsh2000
DRB1*0401 or DRB4*0101	[FYW]xxxxxxx[ST]	Marsh2000
DRB1*0401 or DRB4*0101	[FYWILVM]xx[PWILVADE]x[NSTQHR][DEHK NQRSTYACILMV]x[DEHKNQRSTYACILMV]	SYFPEITHI
DRB1*0402 or DRB4	[VILM]xx[YFWILMRNH]x[NSTQHK]x[RKHNQP]x[H]	Marsh2000
DRB1*0402 or DRB4	[VILM]xx[YFWILMRN]x[NQSTK][RKHNQP]x[DEHLNQRSTYACILMVHA]	SYFPEITHI
DRB1*0404 or DRB4	[VILM]xx[FYWILVMADE]x[NTSQR]xx[K]	Marsh2000
DRB1*0404 or DRB4	[VILM]xx[FYWILVMADE]x[NTSQR]xx[K]	SYFPEITHI
DRB1*0405 or DRB4	[FYWVILM]xx[VILMDE]x[NSTQKD]xxx[DEQ]	Marsh2000
DRB1*0405 or DRB4	[FYWVILM]xx[VILMDE]x[NSTQKD]xxx[DEQ]	SYFPEITHI

[0110]

DRB1*0405 or DRB4*0101	[Y]xxxx[VT]xxx[D]	Marsh2000
DRB1*0407 or DRB4	[FYW]xx[AVTK]x[NTDS]xxx[QN]	Marsh2000
DRB1*0407 or DRB4	[FYW]xx[AVK]x[NTDS]xxx[QN]	SYFPEITHI
DRB1*0701	[FILVY]xxxx[NST]	Marsh2000
DRB1*0701	[FYWILV]xx[DEHKNQRSTY]x[NST]xx[VILYF]	SYFPEITHI
DRB1*0801	[FILVY]xxx[HKR]	Marsh2000
DRB1*0901 or DRB4*0101	[YFWL]xx[AS]	Marsh2000
DRB1*0901 or DRB4*0101	[WYFL]xx[AVS]	SYFPEITHI
DRB1*1101	[YF]xx[LVMFY]x[RKH]xx[AGSP]	Marsh2000
DRB1*1101	[WYF]xx[LVMFY]x[RKH]xx[AGSP]	SYFPEITHI
DRB1*1101 or DRB3*0202	[YF]xxxx[RK]x[RK]	Marsh2000
DRB1*1104	[ILV]xx[LVMFY]x[RKH]xx[AGSP]	Marsh2000
DRB1*1104	[ILV]xx[LVMFY]x[RKH]xx[AGSP]	SYFPEITHI
DRB1*1201 or DRB3	[ILFY(V)]x[LVN(VA)]xx[VY(FIN)]xx[YFM(IV)]	Marsh2000
DRB1*1201 or DRB3	[ILFYV]x[LVNVA]xx[VYFINA]xx[YFMIV]	SYFPEITHI
DRB1*1301	[IVF]xx[YWLVAM]x[RK]xx[YFAST]	Marsh2000
DRB1*1301	[ILV]xx[LVMAWY]x[RK]xx[YFAST]	SYFPEITHI
DRB1*1301 or DRB3*0101	[ILV]xxxx[RK]xx[Y]	Marsh2000
DRB1*1302	[YFVAI]xx[YWLVAM]x[RK]xx[YFAST]	Marsh2000
DRB1*1302	[YFVAI]xx[LVMAWY]x[RK]xx[YFAST]	SYFPEITHI
DRB1*1302 or DRB3*1301	[ILFY]xxxx[RK]xx[Y]	Marsh2000
DRB1*1501	[LVI]xx[FYI]xx[ILVMF]	Marsh2000
DRB1*1501	[LVI]xx[FYI]xx[ILVMF]	SYFPEITHI
DRB1*1501 or DRB5*0101	[ILV]xxxxxxxx[HKR]	Marsh2000
DRB3*0202	[YFIL]xx[N]x[ASPDE]xx[LVISG]	Marsh2000
DRB3*0202	[YFIL]xx[N]x[ASPDE]xx[LVISG]	SYFPEITHI
DRB3*0301	[ILV]xx[N]x[ASPDE]xx[ILV]	Marsh2000
DRB3*0301	[ILV]xx[N]x[ASPDE]xx[ILV]	SYFPEITHI
DRB5*0101	[FYLM]xx[QVIM]xxxx[RK]	Marsh2000
DRB5*0101	[FYLM]xx[QVIM]xxxx[RK]	SYFPEITHI

[0111] 1) 锚残基显示在方括号中。在锚位置优选的但是非优势的氨基酸显示在圆括号中。例如,基序 X-[VTILF]-X-X-X-X-X-X-[YF(ML)] 是指,第二个和 C-末端位置是锚位置。在第二个位置的优势氨基酸是 V, T, I, L, F, 在 C-末端锚位置的优势氨基酸是 Y 和 F, 同时 M 和 L 是优选的,但是非优势的。

[0112] 2) Marsh2000: Marsh S. G. E., Parham P. 和 Barber L. D., The HLA Factsbook. Academic Press, San Diego, 2000. URL: <http://www.anthonynolan.com/HIG/>. SYFPEITHI: The SYFPEITHI Database of MHC Ligands, Peptide Motifs and Epitope Prediction. Jan. 2003. URL: <http://www.syfpeithi.de>. Luscher 2001: Luscher M. A. 等人, Immunogenetics. 2001, 53(1): 10-14. Yusim 2004: Yusim K. 等人, Appl Bioinformatics 2005, 4(4): 217-225.

[0113] 许多 MHC 分子具有非常类似的结合基序, 因此它们可以分组成所谓的 HLA 超型。在表 4 中总结了这些超型的结合基序。

[0114] 表 4: HLA 超型的 MHC- 结合基序

[0115]

超型	基序	基因型
A1	x[TI(SVLM)]xxxxxx[WFY]	A*0101, A*0102, A*2501, A*2601, A*2604, A*3201, A*3601, A*4301, A*8001
A2	x[LIVMATQ]xxxxxx[LIVMAT]	A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*6802, A*6901
A3	x[AILMVST]xxxxxx[RK]	A*0301, A*1101, A*3101, A*3301, A*6801
A24	x[YF(WIVLMT)]xxxxxx[FI(YWLM)]	A*2301, A*2402, A*2403, A*2404, A*3001, A*3002, A*3003
B7	x[P]xxxxxx[ALIMVFWY]	B*0702, B*0703, B*0704, B*0705, B*1508, B*3501, B*3502, B*3503, B*51, B*5301, B*5401, B*5501, B*5502, B*5601, B*5602, B*6701, B*7801
B27	x[RKH]xxxxxx[FLY(WMI)]	B*1401, B*1402, B*1503, B*1509, B*1510, B*1518, B*2701, B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706, B*2707, B*2708, B*3801, B*3802, B*3901, B*3902, B*3903, B*3904, B*4801, B*4802, B*7301
B44	x[E(D)]xxxxxx[FWYLIMVA]	B*18, B*3701, B*4001, B*4006, B*4101, B*4402, B*4403, B*4501, B*4901, B*5001
B58	x[AST]xxxxxx[FWY(LIV)]	B*1516, B*1517, B*5701, B*5702, B*58
B62	x[QL(IVMP)]xxxxxx[FWY(MIV)]	B*1301, B*1302, B*1501, B*1502, B*1506, B*1512, B*1513, B*1514, B*1519, B*1521, B*4601, B*52

[0116] 也可以总结特定氨基酸在 T- 细胞表位的某个位置出现的频率。对于 MHC 结合, T- 细胞表位中的位置 1、4、6 和 9 是最关键的位置。在表 5 中列出了在这些位置最优的残基,但是,这些位置的特定氨基酸偏好在不同的 MHC 分子之间有很大差异。因此,如上所述,上面列出的预测程序可以更精确地预测特定氨基酸序列与 MHC 分子的结合。

[0117] 表 5 :在 T- 细胞表位的特定位置氨基酸的总频率

[0118] (源自基序扫描器 :http://hcv.lanl.gov/content/immuno/motif_scan/motif_scan)

[0119]

位置 1	位置 2	位置 3	位置 4	位置 5	位置 6	位置 7	位置 8	位置 9	位置 10
<u>L 37</u>		L 2	<u>V 21</u>	H 1	S 20	M 3	K 2	Y 17	Q 4
<u>I 35</u>		M 2	<u>L 20</u>	K 1	K 17	V 3	R 2	L 14	D 3
<u>V 33</u>		N 2	<u>M 20</u>	R 1	R 17	L 3	H 1	A 14	E 2

<u>F 31</u>		V 2	A 20		T 17	I 3	N 1	S 14	H 2
Y 28		A 2	Y 15		N 16	F 2	Q 1	I 13	N 2
<u>M 16</u>			<u>I 14</u>		Q 10	K 2	P 1	F 11	K 1
<u>W 13</u>			<u>F 11</u>		A 9	R 2		V 11	R 1
A 4			<u>W 10</u>		D 8	H 2		T 8	
			N 10		P 8	N 2		M 7	
			D 10		H 7	Q 2		K 6	
			E 7		E 6	P 1		G 6	
			Q 5		G 4	D 1		N 5	
			K 3		V 3	E 1		P 4	
			R 3		C 3	S 1		R 4	
			T 3		Y 2	T 1		W 3	
			S 3		F 2	Y 1		H 3	
			H 2		I 2	A 1		Q 3	
			P 1			C 1		E 2	
								D 2	
								C 2	

[0120] 从该表 5 可以容易地看出,例如,在位置 1 和位置 4 最频繁遇到的氨基酸是在卷曲螺旋七肽重复的核心位置处发现的那些(用下划线指出)。位置 1 和 4 可以重叠在七肽重复位置 aa(a) 和 aa(d)。因此,在位置 1 具有氨基酸 L 和在位置 4 具有氨基酸 V 的 T- 细胞表位与在七肽重复的核心位置 aa(a) 和 aa(d) 具有相同氨基酸的卷曲螺旋肽完全一致。因此,如果肽序列服从两项 T- 细胞结合基序限制以及卷曲螺旋七肽重复基序限制,可以将它掺入 SAPN 的卷曲螺旋寡聚化结构域中。通过调节肽序列的排列,使得 T- 细胞结合基序与卷曲螺旋形成基序重叠,这可以对大量 T- 细胞表位实现。

[0121] 将 T- 细胞表位构建进卷曲螺旋

[0122] 为了构建 SAPN,其在 SAPN 的卷曲螺旋寡聚化结构域中掺入 T- 细胞表位,必须采取三步。在第一步中,必须使用来自文献或来自数据库的已知 T- 细胞表位或使用合适的表位预测程序预测的 T- 细胞表位,选择候选 T- 细胞表位。在第二步中,必须将蛋白酶体切割位点插入 CTL 表位的 C- 末端。这可以如下实现:使用蛋白酶体切割位点预测程序 PAProc(http://www.paproc2.de/paproc_1/paproc1.html;Hadeler K.P. 等人, Math.

Biosci. 2004, 188 :63-79), 并修饰紧挨在目标切割位点之后的残基。HTL 表位不需要这第二步。在第三步也是最重要的步骤中, 必须将 T- 细胞表位序列与卷曲螺旋序列比对, 使它最佳地符合上述的卷曲螺旋形成规则。可以预测具有掺入的 T- 细胞表位的序列是否实际上形成卷曲螺旋, 使用可以从因特网上得到的卷曲螺旋预测程序 s 例如 COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html; Gruber M. 等人, J. Struct. Biol. 2006, 155(2) :140-5) 或 MULTICOIL (<http://groups.csail.mit.edu/cb/multicoil/cgi-bin/multicoil.cgi>), 可以优化 T- 细胞表位序列和卷曲螺旋重复序列之间的最佳比对。

[0123] 即使不可能发现合适的比对 (可能因为 T- 细胞表位含有与卷曲螺旋结构不相容的一个甘氨酸或甚至一个脯氨酸), 也可以将 T- 细胞表位掺入寡聚化结构域 (参见实施例 3)。在该情况下, T- 细胞表位必须侧接相同寡聚化状态的强卷曲螺旋形成序列。这将会稳定化卷曲螺旋结构至足够的程度, 或者, 它可以在该卷曲螺旋寡聚化结构域内产生环结构。这基本上是与下一部分关于将 B- 细胞表位掺入 SAPN 的卷曲螺旋核心序列所述相同的程序。

[0124] 将 B- 细胞表位构建进卷曲螺旋核心

[0125] 在本发明的一个特定方面, 预见到将非 α -螺旋状的小 B- 细胞表位掺入 SAPN 的卷曲螺旋核心。这可以通过与上面关于与卷曲螺旋结构不相容的 T- 细胞表位所述相同的程序来实现。T4 fibritin (pdb 登记码 1aa0, <http://www.rcsb.org/pdb/>) 的结构在它的卷曲螺旋内含有 2 个环结构。环从 2 个螺旋回转之间的卷曲螺旋伸出, 从而不阻断卷曲螺旋的螺旋结构。在 fibritin 中, 环在卷曲螺旋的位置 aa(b) 离开螺旋, 在卷曲螺旋序列的位置 aa(c) 重新进入螺旋。一个环是短的 β -折叠, 而另一个环是更不规则的环结构。卷曲螺旋中残基 aa(b) 和 aa(c) 之间的距离理想地适合用作反向平行的 β -折叠肽的锚点。当残基 aa(b) 或 aa(c) 或它们二者是甘氨酸残基时, 这允许存在蛋白二级结构所需的柔性, 并重新进入卷曲螺旋的 α -螺旋。

[0126] .. VQNLQVEIGNNSAGIKGQVVALNTLVNGTNPNGSTVEERGLTNSIKANETNIASVTQEV...

[0127] a d a d a d a d a d a d a

[0128] (SEQ ID NO :4)

[0129] 在上面 fibritin 的序列中, 用斜体显示环结构, 用下划线指示在 aa(b) 和 aa(c) 位置处的残基 (这里存在 2 个环, 并重新进入螺旋)。这 4 个残基中的 3 个是甘氨酸残基。用它作为模板, 具有反向平行的 β -折叠构象的 B- 细胞表位现在可以掺入 SAPN 的卷曲螺旋核心。卷曲螺旋结构必须足够稳定, 以允许掺入这样的环结构, 因此它必须能在环的两侧形成卷曲螺旋。到目前为止描述的最小的自动折叠的卷曲螺旋序列是 2 个七肽重复长。在下面的序列中, 将来自 HIV 的蛋白 gp120 的 V3 表位的尖端 (它是一种反向平行的 β -折叠肽) 掺入设计的稳定的卷曲螺旋的卷曲螺旋, 其在两侧侧接超过 2 个七肽重复的螺旋。这些是源自 Burkhard P. 等人, JMoI Biol 2002, 318 :901-910 的非常稳定的卷曲螺旋片段。

[0130] LEELERRLEELERRLEELERRLGSIRIGPGQTFYAGVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :5)

[0131] a d a d a d a d a d a d 核心残基

[0132] 这会使卷曲螺旋内的 V3 环的构象限制为反向平行的 β -折叠构象, 后者对应着该肽在蛋白上的天然构象。

[0133] 优选的设计

[0134] 为了构建用于特定用途的具有最佳免疫学性能的 SAPN, 必须考虑下述方面:

[0135] CTL 表位在它们的 C- 末端需要蛋白酶体切割位点。表位应当不类似于人序列, 以避免自身免疫应答, 除了当目标是引起针对人肽的免疫应答以外。可能的实例是实施例 4 的癌症特异性的 CTL 表位。

[0136] 因此, 这样的 SAPN 是优选的, 其中至少一个 T- 细胞表位是 CTL 表位, 且具体地, 其中所述序列在 CTL 表位后另外含有蛋白酶体切割位点。

[0137] 同样优选这样的 SAPN, 其中至少一个 T- 细胞表位是 HTL 表位, 具体地, 结合 pan-DR 的 HTL 表位。这样的结合 pan-DR 的 HTL 表位会结合表 3 底部列出的许多 MHC II 类分子, 因此会在大多数健康个体中被识别, 这对于好疫苗是至关重要的。

[0138] 也优选这样的 SAPN, 其中序列 D1-L-D2 含有一系列重叠的 T- 细胞表位, 如果 D1 或 D2 是三聚体 (实施例 7 和 8)、四聚体 (实施例 9) 或五聚体 (实施例 10)。

[0139] B- 细胞表位需要显示在 SAPN 的表面。它们可以是或不是卷曲螺旋序列的一部分, 即卷曲螺旋自身可以部分地是 B- 细胞表位, 这取决于卷曲螺旋的该部分是否是表面可接触的。例如, 由有包膜病毒的表面蛋白的三聚体卷曲螺旋组成的 B- 细胞表位可以显示在 SAPN 的表面, 同时是卷曲螺旋序列的一部分。在 Raman S. 等人, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2006 ;2 :95-102 中, 显示了这种设计的一个实例。通常, 任意寡聚化状态的卷曲螺旋特别适合以构象特异性的方式被 SAPN 呈递。卷曲螺旋是丰富的, 不仅在有包膜病毒的表面蛋白中, 而且在例如疟疾病原体镰状疟原虫的基因组中 (Villard V 等人, *PLoS ONE* 2007 ;2(7) :e645)。

[0140] 但是, 一般而言, B- 细胞表位不是卷曲螺旋寡聚化结构域的一部分, 或它们可以由卷曲螺旋和另一个不是卷曲螺旋的部分组成, 例如细菌的三聚体自运载体粘连 (TAA), 它们具有卷曲螺旋茎和球形头结构域, 例如脑膜炎奈瑟菌的 TAA。

[0141] 特别感兴趣的是蛋白作为 B- 细胞表位, 它们自身是寡聚体的, 例如三聚体血凝素和四聚体唾液酸酶或流感的 M2 表面蛋白。

[0142] 设计针对病原体的疫苗时的考虑方面

[0143] 这样的疫苗优选含有所有 3 类表位、B- 细胞、HTL 和 CTL 表位。(1) 优选地, 仅一个 (或非常少的) B- 细胞表位应当位于肽链的任一端。在重复的抗原显示中, 这会使 B- 细胞表位位于 SAPN 的表面。(2) HTL 表位应当尽可能是泛宿主性的。它们不一定需要源自病原体, 但是可以是引起强 T- 辅助免疫应答的肽。一个实例是 PADRE 肽。优选地, 它们是掺入 SAPN 的 D1-L-D2 核心序列中的 T- 细胞表位。(3) CTL 表位需要是病原体特异性的, 它们需要具有 C- 末端蛋白酶体切割位点。因为 T- 细胞表位不需要重复的抗原显示, 可以如下将几种不同的 T- 细胞表位掺入一个单独的 SAPN: 通过共装配不同的肽链, 所述不同的肽链都具有相同的形成纳米颗粒的 D1-L-D2 核心, 但是携带不作为核心形成序列的一部分因而不会掺入卷曲螺旋序列中的不同 T- 细胞表位。

[0144] 以类似的方式, 可以将携带靶向内质网的信号 (即信号肽, 其诱导蛋白或肽向内质网 (ER) 的运输) 的肽链共装配进同一个 SAPN, 以使 CTL 表位进入内质网, 被 MHC I 分子适当呈递, 因为交叉呈递在人中不是非常有效。但是, 靶向内质网的信号不需要在分开的肽链上, 它可以在与 CTL 表位相同的肽中。合适的内质网信号肽是例如靶向内质网的信号 (E3/19K) MRYMILGLLALAAVCSA (SEQ ID NO :6)。

[0145] 目的在于产生强抗体应答的治疗疫苗

[0146] 目的在于产生强抗体应答的治疗疫苗特别地用于治疗阿尔茨海默病、高血压、肥胖症、药瘾或炎症。对于这样的疫苗，优选使用仅一个 B- 细胞表位。通过在 SAPN 中包含一个或更多个泛宿主性的 HTL 表位，可以进一步增强归因于重复抗原显示的强体液免疫应答。优选地，它们是掺入 SAPN 的 D1-L-D2 核心序列中的 T- 细胞表位。此外，应当存在尽可能少的和尽可能弱的结合 CTL 表位——特别不针对人肽，以避免自身免疫应答。

[0147] 用于诱导 CTL 应答例如针对癌症的治疗疫苗

[0148] 在该情况下，不必使用 B- 细胞表位。通过在 SAPN 中包含一个或更多个泛宿主性的 HTL 表位，进一步增强针对特定 CTL 表位（例如 MAGE-1, 2, 3 ; MART-1, 2, 3 ; 或 Her-2/neu, 也参见实施例 4）的免疫应答。

[0149] 作为佐剂的自装配肽纳米颗粒 (SAPN)

[0150] 由许多 HTL 表位组成的 SAPN 会诱导强 T- 辅助免疫应答（参见实施例 2）。如果以与任意其它疫苗制剂相同的剂量施用，这会导致免疫应答的刺激。这样的 SAPN 将成为佐剂，不需要任意 CTL 或 B- 细胞表位。但是，B- 细胞和 CTL 表位可以与这样的佐剂 SAPN 相组合。另外，可以将特定佐剂分子共价偶联至 SAPN，作为寡聚化结构域 D1 或 D2 的取代物，以进一步刺激 SAPN 的佐剂效应。特别感兴趣的是免疫刺激的核酸，优选含有脱氧肌苷的寡脱氧核苷酸，含有脱氧尿苷的寡脱氧核苷酸，含有 CG 基序的寡脱氧核苷酸，或含有肌苷和胞苷的核酸分子。其它免疫刺激的分子是，例如，抗微生物的肽，例如阳离子肽，它们是一类能促进和 / 或提高适应性免疫应答的免疫刺激性的、带正电荷的分子。这样的具有免疫增强性质的肽的一个实例是带正电荷的人工的抗微生物的肽 KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO :63)，它在激发 - 强化免疫接种后会诱导有效的蛋白特异性的类型 -2 驱动适应性免疫。

[0151] 优选地，本发明的抗原选自：(a) 适合诱导针对癌细胞的免疫应答的蛋白；(b) 适合诱导针对感染性疾病的免疫应答的蛋白或碳水化合物；(c) 适合诱导针对变应原的免疫应答的蛋白；(d) 适合诱导治疗人疾病的免疫应答的肽激素；和 (e) 适合诱导治疗成瘾或其它病症的免疫应答的半抗原分子。包含这样的蛋白、其肽片段、肽、碳水化合物或半抗原的肽纳米颗粒，可以适合诱导人或畜牧动物和宠物的免疫应答。

[0152] 在本发明的一个优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇是可用于预防感染性疾病的那些。这样的治疗可用于预防影响广范围宿主的多种感染性疾病，例如人或非人动物，例如牛、羊、猪、狗、猫、其它哺乳动物物种和非哺乳动物物种。

[0153] 具体地，本发明涉及包含下述抗原之一的 SAPN：

[0154] (a) 适合诱导针对细菌的免疫应答的抗原；

[0155] (b) 适合诱导针对病毒的免疫应答的抗原；

[0156] (c) 适合诱导针对寄生虫的免疫应答的抗原；

[0157] (d) 适合诱导针对癌细胞的免疫应答的抗原；

[0158] (e) 适合诱导针对变应原的免疫应答的抗原；

[0159] (f) 适合诱导针对成瘾的免疫应答的抗原；

[0160] (g) 适合诱导针对疾病和代谢性病症的免疫应答的抗原；

[0161] (h) 适合诱导畜牧动物的免疫应答的抗原；和

[0162] (i) 适合诱导宠物的免疫应答的抗原。

[0163] 可治疗的感染性疾病是本领域技术人员众所周知的。实例包括病毒的、细菌的或寄生虫的病因学感染,例如下述疾病:阿米巴病,炭疽,弯曲杆菌感染,水痘,霍乱,登革,白喉,脑炎,埃博拉,流感,日本脑炎,利什曼病,疟疾,麻疹,脑膜炎球菌疾病,腮腺炎,医院感染,百日咳,肺炎球菌疾病,小儿麻痹症(脊髓灰质炎),风疹,带状疱疹,血吸虫病,破伤风,蜱传脑炎,滴虫病,锥虫病,结核病,伤寒,水痘,和黄热病。

[0164] 具体地,本发明涉及包含来自下述寄生虫的下述抗原之一的 SAPN:弯曲杆菌属,巨细胞病毒,EB 病毒,口蹄疫病毒,B 型流感嗜血杆菌,幽门螺旋杆菌,乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒,戊型肝炎病毒,单纯疱疹病毒,人免疫缺陷病毒,人乳头状瘤病毒,脑膜炎奈瑟菌,绿脓假单胞菌,金黄色葡萄球菌,肺炎链球菌,呼吸道合胞病毒,轮状病毒,蛔虫,钩虫,和西尼罗病毒。

[0165] 在本发明的一个优选的方面,预见到用于预防和治疗疟疾的组合物(实施例 11)。疟疾寄生虫的生命周期提供了几个在这期间的干扰会导致感染过程停止的阶段。在疟疾寄生虫的生命周期中,因为雌性疟蚊的叮咬,人受到疟疾的感染。蚊子将它的探针插入宿主,在这过程中,注射孢子形式的镰状疟原虫(或间日疟原虫),后者存在于蚊子的唾液中。可能适用于设计肽疫苗的蛋白和肽序列可以含有来自下述疟原虫蛋白的序列:MSP-1(一种在寄生虫细胞表面表达的大多形蛋白),MSA1(主要的裂殖子表面抗原 1),CS 蛋白(天然的环孢子),根据美国专利 4,735,799 的 35KD 蛋白或 55KD 蛋白或 195KD 蛋白,AMA-1(顶膜抗原 1),或 LSA(肝阶段抗原)。

[0166] 在一个优选的设计中,B- 细胞表位之一是 8 至约 48 个残基的序列,其构成环孢子(CS)蛋白的 B 细胞表位。该 B- 细胞表位是镰状疟原虫的氨基酸序列 NANP 的多余重复区域。在一个优选的 SAPN 设计中,该 B 细胞表位包含氨基酸残基序列 NANP 或其变换 ANPN、NPNA 和 PNAN 的 2 至约 5 个重复。间日疟原虫中对应的重复区域由下述高度相似的序列中的任一个组成:

[0167] 表 6:间日疟原虫 CS 重复 B- 细胞表位序列

[0168]

肽	SEQ ID NO :
GDRAAGQPA	65
GDRADGQPA	66
GDRADGQAA	67
GNGAGGQPA	68
GDGAAGQPA	69
GDRAAGQAA	70

GNGAGGQAA	71
-----------	----

[0169] 在一个优选的设计中，B-细胞表位之一是由这些序列中的任一个组成的 8 至约 48 个残基的序列。

[0170] 在下面的 3 个表中为 B-细胞表位、HTL-表位和 CTL-表位列出了用于设计治疗疟疾的 SAPN 的具体肽序列。

[0171] 下面的表 7 列出了优选的镰状疟原虫卷曲螺旋 B-细胞表位 (Villard V. 等人, PLoS ONE 2007, 2(7) :e645 和 Agak G. W., Vaccine(2008) 26, 1963-1971)。因为对于 B-细胞表位, 仅表面可接近的残基对于它们与 B-细胞受体的相互作用和抗体的生产是至关重要的, 可以在一定程度上修饰非表面暴露的在 aa(a) 和 aa(d) 位置的卷曲螺旋核心残基, 而不改变免疫原的引起中和抗体的能力。例如, 用异亮氨酸交换在 aa(a) 位置的缬氨酸, 不会影响卷曲螺旋 B-细胞表位的以便免疫学性质。因此, 通过为最好的卷曲螺旋形成和稳定性优化核心残基, 可以人工地稳定化这些卷曲螺旋序列 (实施例 13), 而不消除它们的免疫学潜力。因此, 也为这些 B-细胞表位预见在它们于 aa(a) 和 / 或 aa(d) 处的核心残基中的一个或多个处修饰这些肽 B-细胞表位, 且保持上面详述的形成卷曲螺旋的倾向。

[0172] 因而, 在一个优选的设计中, 在它们的一个或多个核心位置具有修饰的卷曲螺旋 B-细胞表位是这样的肽, 其含有至少一个长度为 2 个七肽重复的序列, 用卷曲螺旋预测程序 COILS 预测, 利用 14、21 或 28 的窗大小中的至少一个, 所有它的氨基酸形成卷曲螺旋的概率高于 0.9。

[0173] 在一个更优选的设计中, 在它们的一个或多个核心位置具有修饰的卷曲螺旋 B-细胞表位是这样的肽, 其含有至少一个长度为 3 个七肽重复的序列, 用卷曲螺旋预测程序 COILS 预测, 利用 14、21 或 28 的窗大小中的至少一个, 所有它的氨基酸形成卷曲螺旋的概率高于 0.9。

[0174] 在另一个更优选的设计中, 在它们的一个或多个核心位置具有修饰的卷曲螺旋 B-细胞表位是这样的肽, 其含有至少两个分开的长度为 2 个七肽重复的序列, 用卷曲螺旋预测程序 COILS 预测, 利用 14、21 或 28 的窗大小中的至少一个, 所有它的氨基酸形成卷曲螺旋的概率高于 0.9。

[0175] 表 7: 镰状疟原虫卷曲螺旋 B-细胞表位序列

[0176]

B- 细胞表位	SEQ ID NO:
IKTMNTQISTLKNVDHLLNEQIDKLNNEKGTLSKISELNVQIMDL	72
LLSKDKEIEEKKNKKIKELNNDIKKL	73
ICSLTTEVMELNNKKNELIEENNKLNLVDQGKKLKKDVEKQKKEIEKL	74
VDKIEEHILDYDEEINKSRSNLFQLKNEICSLTTEVMELNNKKNELIEENN KLNLVDQGKKLKKDVEKQKKEIEKL	75
LDENEDNIKKMKS KIDDMEKEIKYR	76
GMNNMNGDINNIN(GDINNMN) ₄	77
KKRNVVEEELHSLRKNYNIINEEIEEIT	78
EEIKEEIKEVKKEEIKEVKKEEIKEVKKEEIKEVKKEEIKE	79
KNDINVQLDDINVQLDDINVQLDDINIQLDEINLN	80
KIQIEEIKKETNQINKDIDHIEMNIINLKKKIEF	81
DSMNNHKDDMNNYNDNINNYVESMNNYDDIMNK	82
MCELNVMENNMNNIHSNNNNISTHMDDVIE	83
KEIQMLKNQILSLEESIKSLNEFINNLKN	84
GGLKNSNHLNNIEMKYNTLNNMMSINK	85
EKLKYNNEISSLKKELDILNEKMGKCT	86
EKMNMKMEQMDMKMEKIDVNMDQMDVKMEQMDVKMEQMDVKMKR MNK	87
KNKLNKKWEQINDHINNLETNINDYNKKIKEGDSQLNNIQLQCENIEQKI NKIKE	88
NEMNKEVNKMNEEVNKMNEEVNKMNEEVNKMNKEVNKMDEEVNKM NKEVNKMNK	89
QNKMENDMNIKNDMNIMENDMNIMENDMNIKNDMNIMEKDMNIIKND MNIKNNMNIKNEMNIIKNV	90
TKKLNKELSEGNKELEKLEKNIKELEETNNTLENDIKV	91
ENINNMDEKINNVDEQNNNMDEKINNVDEKK	92
ARDDIQKDINKMESELINVSNEINRLD	93
EKKLDILKVNISNINNSLDKLG	94
NSLDYYKKVIKLNINNMEEYTNNITNDINVLKAHID	95
PDFDAYNEKLGSIQSISIDEIKKKIDNLQKEIKVANK	96
QLEEKTKQYNDLQNNMKTIKEQNEHLKNKFQSMGK	97
IIDIKKHLEKLEKIEKEKEDLENL	98

[0177] 下面的表 8 列出了优选的镰状疟原虫 HTL 表位 (Doolan, D. L., The Journal of Immunology, 2000, 165 :1123-1137 ;美国专利 5, 114, 713)

[0178] 表 8 :镰状疟原虫 HTL 表位序列

[0179]

蛋白	HTL 表位	SEQ ID NO :
CSP-2	MRKLATLSVSSFLFV	99

LSA-13	LVNLLIFHINGKLIKNS	100
CSP-53	MNYYGKQENWYSLKK	101
SSP2-61	RHNWVNHAVPLAMKLI	102
SSP2-223	VKNVIGPFMKAVCVE	103
CSP-375	SSVFNVVNSSIGLIM	104
EXP-82	AGLLGNVSTVLLGGV	105
EXP-71	KSKYKLATSVLAGLL	106
SSP2-527	GLAYKFVVPGAATPY	107
SSP2-62	HNWVNHAVPLAMKLI	108
SSP2-509	KYKIAGGIAGGLALL	109
CSP	EKKIAKMEKASSVFNVV	110
CSP	EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT	111

[0180] 下面的表 9 列出了优选的镰状疟原虫 CTL 表位 (美国专利 5, 028, 425, 5, 972, 351, 6, 663, 871)

[0181] 表 9 : 镰状疟原虫 CTL 表位序列

[0182]

CTL 表位	HLA- 限制	SEQ ID NO :
KPNDKSLY	B35	112
KPKDEL DY	B35	113
KPIVQYDNF	B35	114
ASKNKEKALII	B8	115
GIAGGLALL	A2. 1	116
MNPNDPNRNV	B7	117

MINAYLDKL	A2. 2	118
ISKYEDEI	B17	119
HLGNVKYLV	A2. 1	120
KSLYDEHI	B58	121
LLMDCSGSI	A2. 2	122
KSKDELDY	B35	123
IPSLALMLI	unknown	124
MPLETQLAI	unknown	125
MPNDPNRNV	B7	126
YLNKIQNSL	A2. 1	127
MEKLKELEK	B8	128
ATSVLAGL	B58	129

[0183] 在本发明的另一个优选的方面,预见到用于预防和治疗 HIV 的组合物(实施例 5 和 12)。为了制备抗-HIV 疫苗,可以使用能引起 HIV- 特异性的抗体的合成肽,所述合成肽具有 HIV-1 的外膜或 gag 蛋白或 gp120 或 gp41 的功能性的 T- 细胞表位或 B- 细胞表位的氨基酸序列,以提供免疫应答。特别感兴趣的是在 gp41 或 gp120 内的序列,它们可以诱导构象特异性的能干扰融合过程的中和抗体,如已知的抗体 2F5 和 4E10,或来自 gp41 或 gp120 的 V3- 环。这样的序列主要位于 HR1 和 HR2 和簇 I 和簇 II 区域中或附近。结合例如 gp41 的卷曲螺旋三聚体且由本发明的掺入该卷曲螺旋三聚体的肽纳米颗粒引起的抗体,会抑制发夹形成,并从而抑制病毒融合。类似地,针对埃博拉或具有类似融合过程的另一种病毒的三聚体卷曲螺旋产生的抗体,会抑制这些病毒的病毒进入。

[0184] 使用 Letourneau S. 等人,PLoS ONE 2007, 10 :e984 所述的高度保守的 HIV 蛋白序列,使用 SVRMHCdb (<http://svrmhc.umn.edu/SVRMHCdb>; Wan J. 等人, BMC Bioinformatics 2006, 7 :463), 预测 CTL 表位。这些保守的蛋白序列含有 CTL 表位,据预测其会结合在表 10 中列出的 HLA 分子,且是设计 SAPN-HIV 疫苗的优选 CTL 表位。这些肽表位含有大量重叠的序列,它们可以组合成更长的肽序列,后者在一个单独连续肽串中具有多个 CTL 表位(表 11)。

[0185] 表 10 :预测的保守的 HIV CTL 表位

[0186]

CTL-表位	SEQ ID NO :	HLA 限制
PLDEGFRKY	130	A * 0101
LLQLTVWGI	131	A * 0201
YTAFTIPSI	132	A * 0202
GLNKIVRMY	133	A * 0203
ILKDPVHGV	134	A * 0204
YTAFTIPSI	135	A * 0206
IIGRNLLTQI	136	A * 0207
KGPAKLLWK	137	A * 0301
VLFLDGIDK	138	A * 0302
AVFIHNFKR	139	A * 1101
HNFKRKGGI	140	A * 3101
IVWQVDRMR	141	A * 3301
SDIKVPRR	142	A * 6801
YTAFTIPSI	143	A * 6802
LGIPHPAGL	144	B * 0702
FSVPLDEGF	145	B * 3501
AVFIHNFKR	146	A11
RWIILGLNK	147	A24
AIFQSSMTK	148	A3
AVFIHNFKR	149	A31

AVFIHNFKR	150	A68
WQVMIVWQV	151	B35
YSPVSILDI	152	B51
APRKKGCWK	153	B7
LKDPVHGVY	154	A * 0101
YTAFTIPSI	155	A * 0201
TLNFPISPI	156	A * 0203
FKRKGIGG	157	A * 0204
LLQLTVWGI	158	A * 0206
EILKDPVHGV	159	A * 0207
GIPHPAGLK	160	A * 0301
GPAKLLWKG	161	A * 1101
SQGIRKVLV	162	A * 3101
SDLEIGQHR	163	A * 6801
LVSQGIRKV	164	A * 6802
QGIRKVLFL	165	B * 0702
EEAELELAE	166	B * 3501
FTIPSINNE	167	B * 5301
FKRKGIGG	168	B * 5401
KGPAKLLWK	169	A11
LLTQIGCTL	170	A2

KGPAKLLWK	171	A3
YTAFTIPSIN	172	A68
LYVGSdleI	173	B35
LLTQIGCTL	174	B51
DFWEVQLGI	175	A * 0201
LLWKEGAV	176	A * 0202
MIVWQVDRM	177	A * 0203
FPISPIETV	178	A * 0204
AGLKKKKSv	179	A * 0206
APRKKGCWK	180	A * 0301
ISPIETVPV	181	B * 0702
WEVQLGIPH	182	B * 5401
AIFQSSMTK	183	A11
GIPHPAGLK	184	A3
AELELAENR	185	A31
SDIKVPRR	186	A68
LTEEAEL	187	B35
SPAIFQSSM	188	B7

[0187]

[0188]

[0189] 表 11 :预测的保守的组合的 HIV CTL 表位

[0190]

肽	SEQ ID NO :	HLA-限制
PLDEGFRKYTAFTIPSINNE	189	A*0101, A*0201, A*0202, A*0206, A*6802, B*3501, B*5301, A68
AVFIHNFKRKGGIGG	190	A*3101, A*1101, A11, A31, A68, B*5401, A*0204
IIGRNLLTQIGCTLNFPIETVPV	191	A*0207, B51, A2, B*0702, A*0204, A*0203
DFWEVQLGIPHPAGLKKKSV	192	A*0201, B*0702, A*0301, A*0206, B*5401, A3
LTEEALELAENREILKDPVHGV	193	A31, B35, B*3501, A*0204, A*0101
KGPAKLLWKEGAV	194	A*0202, A*1101, A*0301, A11, A3
LVSQGIRKVLFLDGIDK	195	A*0302, A*3101, A*6801, B*0702
RWIILGLNKIVRMYSVILDI	196	A24, A*0203, B51
WQVMIVWQVDRMR	197	A*3301, B35, A*0203
SPAIFQSSMTK	198	A3, A11, B7
SDIKVPRR	199	A*6801, A68
LLQLTVWGI	200	A*0202, A*0206
APRKKGCWK	201	A*0301, B7
LYVGSLEIGQHR	202	A*6801, B35

[0191] 在本发明的另一个优选的方面,预见到用于预防和治疗流感的组合物。甲型流感编码完整的膜蛋白 M2,它是一种同源四聚体,它的亚基具有一个 23 个氨基酸残基的小外部结构域 (M2e)。天然 M2 蛋白以几个拷贝存在于病毒颗粒中,并通过大量的其它 2 种表面蛋白血凝素和唾液酸酶回避免疫系统。另一方面,它大量存在于病毒感染的细胞的膜表面。M2e 的序列是高度保守的。已经证实,M2e 作为嵌合的 GNC4-M2e 蛋白中的四聚体呈递给免疫系统,产生高度特异性的且保护性的体液免疫应答 (DeFilette M. 等人, J Biol Chem 2008 ; 283 (17) :11382-11387)。

[0192] 对于人和禽特异性的流感株而言,M2e 四聚体是高度保守的 B- 细胞表位 (表 12 和 13)。在本发明的一个优选的实施方案中,当结合来自 SAPN 的 tetrabrachion (或任意其它四聚体卷曲螺旋) 的四聚体卷曲螺旋的 N- 末端时,它可以显示它的天然四聚体构象 (实施例 9)。

[0193] 表 12 :M2e 人特异性的 M2e 序列

[0194]

代表株	亚型	宿主	氨基酸序列	SEQ ID NO :
A/New Caledonia/20/99	H1N1	人	SLLTEVETPIRNEWGRCNDSSDP	203
A/Aichi/470/68	H3N1	人	SLLTEVETPIRNEWGRCNDSSDP	203
A/Ann arbor/6/60	H2N2	人	SLLTEVETPIRNEWGRCNDSSDP	203
A/Berkeley/1/68	H2N2	人	SLLTEVETPIRNEWGRCNDSSDP	203

A/Puerto Rico/8/34	H1N1	人	SLLTEVETPIRNEWGCRNGSSDP	204
A/Wisconsin/3523/88	H1N1	人	SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSDP	205
A/Hebei/19/95	H3N2	人	SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSDP	204
A/Viet Nam/1203/2004	H5N1	人	SLLTEVETPTRNEWECRCSDDSDP	206
A/Hong Kong/156/97	H5N1	人	SLLTEVETLTRNGWGCRCSDDSDP	207
A/Hong Kong/1073/99	H9N2	人	SLLTEVETLTRNGWECKCRDSSDP	208

[0195] 表 13 :M2e 禽特异性的 M2e 序列

[0196]

代表株	亚型	宿主	氨基酸序列	SEQ ID NO:
A/Chicken/Nakorn-Patom/Thailand	H5N1	禽	SLLTEVETPTRNEWECRCSDDSDP	206
A/Thailand/1(KAN-1)/04	H5N1	禽	SLLTEVETPTRNEWECRCSDDSDP	206
A/Duck/1525/81	H5N1	禽	SLLTEVETPTRNGWECKCSDDSDP	209
A/Chicken/New York/95	H7N2	禽	SLLTEVETPTRNGWECKCSDDSDP	209
A/Chicken/Hong Kong/G9/97	H9N2	禽	SLLTEVETPTRNGWGCRCSGSSDP	210

[0197] 通过前体蛋白切割成 2 个分开的肽链,激活流感血凝素 (HA) (Steinauer D. S. 等人, Virology 1999 ;258 :1-20)。需要 HA 前体分子 HA0 的切割来激活病毒感染力,激活蛋白酶在宿主中的分布是趋向性和相应病原性的决定因素之一。哺乳动物和非病原性的禽病毒的 HAs 在细胞外切割,这会限制它们在宿主中传播至遇到适当蛋白酶的组织。另一方面,病原性病毒的 HAs 在细胞内被广泛存在的蛋白酶切割,因此具有感染不同的细胞类型并造成全身感染的能力。

[0198] 不同于 M2e 序列,切割肽的 N- 末端部分不是高度保守的 (切割肽的 C- 末端实际上是高度保守的)。在 HA 前体蛋白中,切割肽是表面暴露的,在切割位点周围的 6 个残基 (切割位点每一侧 3 个残基) 是该肽序列的最大特征 (在表 14 中用粗体突出显示)。在一个优选的 SAPN 设计中,这 6 个残基代表 B- 细胞表位,它们可以诱导抗体,后者在结合该肽后,可以保护 HA 前体蛋白免于切割。

[0199] 通过共装配具有相同的 SAPN 形成核心 D1-L-D2、但是结合不同 B- 细胞表位的的肽,可以将 SAPN 理想地用于显示对不同 HA 类型特异性的多种不同的切割序列 (表 14) (实施例 15)。

[0200] 表 14 :来自甲型流感和乙型流感的血凝素切割位点序列

[0201]

类型	序列	SEQ ID NO :
H1	SIQSRGLFGA	211

H2	QIESRGLFGA	212
H3	ERQTRGIFGA	213
H4	EKATRGLFGA	214
H5 共有 1	KRKTRGLFGA	215
H5 共有 2	RRKKRGLFGA	216
H6	QIATRGLFGA	217
H7 共有 1	IPKGRGLFGA	218
H7 共有 2	KKKGRGLFGA	219
H7 共有 3	KREKRGLFGA	220
H8	SIEPKGLFGA	221
H9	AASYRGLFGA	222
H10	IIQGRGLFGA	223
H11	AIATRGLFGA	224
H13	AISNRGLFGA	225
B	LLKERGFPGA	226

[0202] 例如,包含H1、H2和H3切割位点序列(其具有插入的天冬氨酸氨基酸,使该序列更易溶和碱性更低)的血凝素B-细胞表位串看起来象:SIQSRGLFGDIESRGLFGERQTRGIFG(SEQ ID NO:227)。

[0203] 可以将具有相同核心序列、但是具有不同B-细胞表位或表位串的肽共装配进一个SAPN,生成多价SAPN免疫原,其可能包括表14的所有或大部分重要的(对于人疫苗而言,H1,H2,H3,H5,H7和H9)序列(实施例15)。

[0204] 在一个类似的方案中,可以将由6条肽链组成的流感疫苗SAPN共装配进一个SAPN,所述肽链含有相同的核心和相同的N-末端B-细胞表位M2e和约20个在C-末端的CTL表位(每条肽链3个或4个)(实施例14)。在表15中,列出了来自Parida R.等人,Vaccine 2007,25:7530-7539的优选的保守的CTL表位。由于这6条肽链的核心是相同的,这6条肽链共装配进一个SAPN,会将约20个不同的CTL表位掺入一个SAPN。

[0205] 表 15 :来自 Parida R. 等人的保守的流感 CTL 表位

[0206]

蛋白名称	肽	SEQ ID NO :	HLA 限制
基质蛋白 1	IRHENRMVL	228	B 2705
基质蛋白 1	QAYQKRMGV	229	B 5101
非结构蛋白 1	LKMPASRYL	230	Cw 0301
非结构蛋白 1	SRYLTDMTL	231	B 2705
非结构蛋白 1	FMLMPKQKV	232	A 0201
非结构蛋白 2	MRMGDFHSL	233	B 2705
非结构蛋白 2	MRMGDFHSL	233	Cw 0301
聚合酶	YLLAWKQVL	234	A 0201
聚合酶	APIEHIASM	235	Cw 0401
聚合酶	RRNYFTAEV	236	B 2705
核壳体蛋白	IQMCTELKL	237	B 2705
核壳体蛋白	AAGAAVKGV	238	B 5101
核壳体蛋白	VGTMVMELI	239	B 5101
聚合酶碱性蛋白 1	NPTLLFLKV	240	B 5101
聚合酶碱性蛋白 1	RLIDFLKDV	241	A 0201
聚合酶碱性蛋白 1	MQIRGFVYF	242	B 2705
聚合酶碱性蛋白 1	IMFSNKMAR	243	B 2705
聚合酶碱性蛋白 1	MFSNKMARL	244	Cw 0401
聚合酶碱性蛋白 2	ERNEQGQTL	245	B 2705

聚合酶碱性蛋白 2	VAYMLEREL	246	B 5101
聚合酶碱性蛋白 2	LRHFQKDAK	247	B 2705
聚合酶碱性蛋白 2	VRDQRGNVL	248	B 2705

[0207] 在另一个优选的实施方案中,本发明的组合物是免疫治疗剂,其可以用于治疗代谢性病症和疾病或成瘾。最优选的是用于治疗阿尔茨海默病、高血压、肥胖症、尼古丁和可卡因成瘾的免疫治疗剂。

[0208] 表 16 :用于 SAPN 疫苗的 B 细胞表位

[0209]

靶抗原	适应症 (s)
尼古丁	尼古丁成瘾
可卡因	可卡因成瘾
A β -片段 (A β)	阿尔茨海默氏病
血管紧张素 I/II (ATII/I)	高血压
胆固醇酯转移蛋白 (CETP)	高脂血症
人体绒毛膜促性腺激素 (hCG)	生育力管理
表皮生长因子 (EGF)	非小细胞肺癌
促卵泡激素 (FSH)	生育力管理
胃泌素	胰腺癌
ghrelin	肥胖症
促性腺激素释放激素 (GnRH)	生育力管理
促性腺激素释放激素 (GnRH)	前列腺癌
Her2	乳腺癌
IgE	变压性哮喘
IL-1 β b	类风湿性关节炎
干扰素 α (IFN α)	HIV/AIDs

粘蛋白	癌症
肿瘤坏死因子 α (TNF α)	银屑病
肿瘤坏死因子 α (TNF α)	关节炎
RANKL	骨质疏松症
IL-17	多发性硬化

[0210] A β -片段 (A β) 是 42 个氨基酸长的肽 (A β 1-42)。因为整个 42 个残基长的肽序列也含有可以造成自身免疫反应的 CTL 表位, 希望仅使用该肽的更短的片段用于疫苗设计, 例如 A β 1-12 或甚至象 A β 1-6 这样的短肽 (美国专利 7, 279, 165)。

[0211] 同样, 全长 TNF α 蛋白作为免疫原具有一些限制。局部过量生成的促炎症细胞因子 TNF α 至关重要地参与几种慢性阳性病症的发病机理, 包括类风湿性关节炎、银屑病和克罗恩病。用单克隆抗体 (mAbs, 英夫利昔单抗, 阿达木单抗) 或嵌合的可溶性受体 (依那西普) 中和 TNF α , 可以有效地治疗这些病症, 但是具有几个潜在的缺点。它可能诱导同种异型 - 或个体基因型特异性的抗体, 后者可能限制在许多患者中的长期功效。此外, 随着治疗的患者的数目的增加, 越来越明显的是, 用 TNF α - 拮抗剂 (具体地, mAbs) 进行治疗会增加机会性感染的风险, 特别是由细胞内病原体如结核分支杆菌、单核细胞增多性李司忒菌或荚膜组织胞浆菌造成的那些。已经证实, 用仅包含残基 4-23 的 TNF α 的更短片段进行免疫接种, 会避免一些这样的问题 (G. Spohn 等人, *The Journal of Immunology*, 2007, 178 : 7450-7457)。因此, 免疫接种 TNF α 4-23 是类风湿性关节炎和其它自身免疫病的一种新颖的有效疗法, 这会为现有的抗 -TNF α 疗法增加新水平的安全性。通过选择性地仅靶向可溶形式的 TNF α 和节省跨膜形式, 用疫苗中和 TNF α 的致病效应, 同时在宿主对细胞内病原体的应答中的重要功能保持完整。

[0212] 除了尼古丁和可卡因以外, 下述化合物也可以用作半抗原分子, 用于设计针对成瘾的 B- 细胞 SAPN 疫苗: 阿片制剂, 大麻, 苯异丙胺, 巴比妥酸盐, 格鲁米特, 甲乙哌酮, 水合氯醛, 甲喹酮, 苯并二氮卓, LSD, 抗胆碱能药, 抗精神病药, 色胺, 其它精神症状药物, 镇静药, 苯环利定, 赛洛西宾, 挥发性的亚硝酸盐, 和诱导躯体依赖性和 / 或精神依赖性的其它药物。

[0213] 在另一个优选的实施方案中, 本发明的组合物是可以用于治疗变态反应的免疫治疗剂。用于治疗变态反应的组合物和方法的抗原或抗原决定簇的选择, 是治疗这样的病症的医学领域的技术人员已知的。这类抗原或抗原决定簇的代表性实例包括: 蜂毒磷酸脂肪酶 A2, Bet v I (白桦花粉变应原), 5DoI m V (白脸大黄蜂毒液变应原), 和 Der p I (房尘螨变应原)。

[0214] 在另一个优选的实施方案中, 本发明的组合物是可以用于治疗癌症的免疫治疗剂。靶向疫苗设计的主要癌症如下: 脑癌, 乳腺癌, 子宫颈癌, 结肠直肠癌, 食管癌, 成胶质细胞瘤, 白血病 (急性骨髓性和慢性髓细胞样), 肝癌, 肺癌 (非小细胞肺癌, 小细胞肺癌), 淋巴瘤 (非霍奇金淋巴瘤), 黑素瘤, 卵巢癌, 胰腺癌, 前列腺癌, 肾癌。

[0215] 用于治疗癌症的组合物和方法的抗原或抗原决定簇的选择, 是治疗这样的病症

的医学领域的技术人员已知的。这类抗原或抗原决定簇的代表性实例包括下述的:HER2/neu(乳腺癌), GD2(神经母细胞瘤), EGF-R(恶性成胶质细胞瘤), CEA(髓样甲状腺癌), CD52(白血病), MUC1(在血液恶性肿瘤中表达), gp100 蛋白, 或肿瘤抑制基因 WT1 的产物。在表 17 中, 显示了感兴趣的癌症特异性的 T- 细胞表位和相关的起源蛋白和 MHC 限制。

[0216] 表 17 :SAPN 疫苗的癌症 T- 细胞表位

[0217]

肽序列	蛋白	MCH 限制	SEQ ID NO:
KCDICTDEY	酪氨酸酶	A1	249
YMDGTMSQV	酪氨酸酶	A2	250
MLLAYLYQL	酪氨酸酶	A2	251
AFLPWHRLF, AFLPWHRLFL	酪氨酸酶	A24	252 253
SEIWRDIDF	酪氨酸酶	B44	254
YLEPGPVTA	gp100/pMEL17	A2	255
KTWGQYWQV	gp100/pMEL17	A2	256
ITDQVPFSV	gp100/pMEL17	A2	257
VLYRYGSFSV	gp100/pMEL17	A2	258
LLDGTATLRL	gp100/pMEL17	A2	259
ALLAVGATK	gp100/pMEL17	A3	260
MLGTHTMEV	gp100/pMEL17	A3	261
LIYRRRLMK	gp100/pMEL17	A3	262
ALNFPQSQK	gp100/pMEL17	A3	263
AAGIGILTV	MART-1/MelanA	A2	264
ILTVILGVL	MART-1/MelanA	A2	265
MSLQRQFLR	gp75/TRP-1	A31	266
SVYDFVWL	TRP-2	A2	267
LLGPGRPYR	TRP-2	A31, A33	268
YLSGANLNL	CEA	A2	269
KIFGSLAFL	HER-2/neu	A2	270
VMAGVGSPPV	HER-2/neu	A2	271
IISAVVGIL	HER-2/neu	A2	272
LLHETDSAV	PSMA	A2	273
ALFDIESKV	PSMA	A2	274
EADPTGHSY	MAGE-1	A1	275
SLFRAVITK	MAGE-1	A3	276

[0218]

SAYGEPRKL	MAGE-1	Cw*1601	277
KMVELVHFL	MAGE-2	A2	278
YLQLVFGIEV	MAGE-2	A2	279
EVDPIGHLY	MAGE-3	A1	280
FLWGPRALV	MAGE-3	A2	281
MEVDPIGHLY	MAGE-3	B44	282
AARAVFLAL	BAGE	Cw*1601	283
YRPRPRRY	GAGE-1,2	Cw6	284
VLPDVFIRC	GnT-V	A2	285
QLSLLMWIT	NY-ESO-1	A2	286
SLLMWITQC	NY-ESO-1	A2	287
ASGPGGGAPR	NY-ESO-1	A31	288
QDLTMKYQIF	43kD 蛋白	A2	289
AYGLDFYIL	p15	A24	290
EAYGLDFYIL			291
SYLDSGIHF	突变的 β 连环蛋白	A24	292
ETVSEQSNV	突变的延伸因子2	A*6802	293
FPSDSWCYF	突变的 CASP-8 (FLICE/MACH)	B35.3	294
EEKLIVVLF	跨内含子/外显子接头突变的 MUM-1 基因产物	B*4402	295

[0219] 最优选的是在实施例中所描述的卷曲螺旋序列、B- 细胞 -、HTL- 和 CTL- 表位、单体构造块、SAPN 和疫苗设计。

实施例

[0220] 下面的实施例用于进一步解释本发明,但是不以任何方式限制本发明的范围。

[0221] 实施例 1 :PADRE (P5c-8-Ma1)

[0222] 使用下述的设计标准,将含有序列 AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO :296) 的 pan-DR 表位 PADRE 掺入 SAPN 的三聚体卷曲螺旋:残基丙氨酸 (A) 具有形成 α -螺旋的强倾向。排列卷曲螺旋核心位置,使得残基缬氨酸、色氨酸和丙氨酸位于七肽重复图谱的 aa(a)、aa(d) 和另一个 aa(a) 位置。设计位于 HTL 表位的 N- 末端和 C- 末端的三聚体卷曲螺旋的剩余部分,使得该序列预测会形成非常强的卷曲螺旋。

[0223] RLLARLEELERRLEELAKFVAAWTLKAAAVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :7)

[0224] d a d a d a d a d a d a d 核心残基

[0225] 用预测程序 COILS 预测,该肽的序列 (SEQ ID NO :7) 会形成卷曲螺旋。使用 21 个氨基酸的窗口用于卷曲螺旋预测,序列中的所有残基形成卷曲螺旋的概率超过 95% (参见下面的表 18)。因此这是预测的也含有 T- 细胞表位的卷曲螺旋。

[0226] 非常重要地认识到,如果窗口仅包含 14 个氨基酸,在 T- 细胞表位序列内卷曲螺旋预测下降至小于 2% 概率的非常低的值。在整个序列中具有高预测卷曲螺旋倾向的 21 个氨基酸的更大的窗大小显示出在 T- 细胞表位的 N- 和 C- 末端的侧接区域的效应。如果它们

是强烈有利于卷曲螺旋形成的序列,则可以补偿 T- 细胞表位的不太有利于卷曲螺旋倾向,且可以诱导整个序列形成卷曲螺旋,即使 T- 细胞表位不含有非常有利的卷曲螺旋序列。

[0227] 表 18 :包含 PanDR 表位 PADRE 的 SEQ ID NO :7 的卷曲螺旋倾向

[0228]

氨基酸	窗口 14	窗口 21
R	1.000	0.997
L	1.000	0.997
L	1.000	0.997
A	1.000	0.997
R	1.000	0.997
L	1.000	0.997
E	1.000	0.997
E	1.000	0.997
L	1.000	0.997
E	1.000	0.997
R	1.000	0.997
R	1.000	0.997
L	1.000	0.997
E	1.000	0.997
E	1.000	0.997
L	1.000	0.997
A	1.000	0.997
K	1.000	0.997
F	0.970	0.997

V	0.911	0.997
A	0.710	0.997
A	0.356	0.992
W	0.062	0.961
T	0.018	0.961
L	0.034	0.956
K	0.156	0.986
A	0.156	0.986
A	0.336	0.986
A	0.649	0.986
V	0.902	0.986
D	0.992	0.986
L	0.992	0.986
E	0.999	0.986
L	0.999	0.986
A	0.999	0.986
A	0.999	0.986
L	0.999	0.986
R	0.999	0.986
R	0.999	0.986
R	0.999	0.986
L	0.999	0.986
E	0.999	0.986

E	0.999	0.986
L	0.999	0.986
A	0.999	0.986
R	0.999	0.986

[0229] 然后将 SEQ ID NO :7 的该三聚体卷曲螺旋包含进下面 SEQ ID NO :8 的 SAPN 序列中,后者包含 His- 标签、COMP 的五聚体卷曲螺旋、由包含 PADRE T- 细胞表位的 SEQ ID NO :7 序列组成的三聚体卷曲螺旋、和来自柏格鼠疟原虫的 CS- 蛋白的 B- 细胞表位。

[0230] MGHHHHHHGDKWGDGGLVPRGSDEMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITFLRALLMGGRLRLARLEE

[0231] LERRLEELAKFVAAWTLKAAAVDLELAALRRRLEELARGGSGDPPPPNPNDPPPPNPND

[0232] (SEQ ID NO :8)

[0233] 在大肠杆菌中表达具有该序列的肽,并通过标准的生物技术操作,在镍亲和柱上纯化。根据 Raman S. 等人, *Nanomedicine :Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2(2006)95-102,进行重新折叠。通过动态光散射 (DLS) 技术和透射电子显微术 (TEM),分析重新折叠的 SAPN 的纳米颗粒形成。DLS 分析显示出平均粒径为 32.01nm 的良好大小分布,多分散性指数为 12.9% (图 4A)。TEM 照片 (图 4B) 显示出通过 DLS 测得相同大小的纳米颗粒。

[0234] 实施例 2 :P5c-6- 一般的

[0235] 该卷曲螺旋序列含有 4 个重叠的 HTL 表位,各自具有序列 LEELERSIW、IWMLQQAAA、WMLQQAAAR 和 MLQQAAARL,它们通过算法 SVRMHC 预测会分别结合不同的 MHC II 分子 DQA1*0501、DRB1*0501、DRB5*0101 和 DRB1*0401,预测的结合亲和力 (pIC50 值) 分别是 6.122、8.067、6.682 和 6.950。使这些 HTL 表位与卷曲螺旋七肽重复对齐,使得它们预测会形成非常强的卷曲螺旋。卷曲螺旋的 aa(a) 和 aa(d) 核心位置被 Leu、Leu、Ile、Leu、Ala 和 Leu 占据,它们中的大多数对于高形成卷曲螺旋的倾向而言是非常好的残基,仅 Ala 是稍微不太有利的。

[0236] RLLARLEELERSIWMLQQAAARLERAINTVLDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :9)

[0237] d a d a d a d a d a d a d 核心残基

[0238] 结果,通过预测程序 COILS 预测该肽的序列会形成卷曲螺旋。该序列中 HTL 表位的所有残基形成卷曲螺旋的概率超过 99% (表 19)。对比用于卷曲螺旋预测的小和大窗尺寸,再次显示出侧接序列对卷曲螺旋稳定性的影响。利用 28 个氨基酸的窗大小,预测完整序列形成卷曲螺旋的概率是 100%,而 14 个氨基酸的更小的窗大小显示出 N- 末端处 T- 细胞表位的更低卷曲螺旋倾向的效应,卷曲螺旋形成具有更低的预测值。因此,对于完整序列,预测该肽会形成包含 4 个不同 HTL 表位的稳定卷曲螺旋。

[0239] 表 19 :包含 4 个不同 HTL 表位的 SEQ ID NO :9 的卷曲螺旋倾向

[0240]

氨基酸	窗口 14	窗口 28

R	0.443	1.000
L	0.443	1.000
L	0.443	1.000
A	0.529	1.000
R	0.713	1.000
L	0.713	1.000
E	0.713	1.000
E	0.713	1.000
L	0.713	1.000
E	0.713	1.000
R	0.713	1.000
S	0.713	1.000
I	0.713	1.000
W	0.713	1.000
M	0.903	1.000
L	0.947	1.000
Q	0.947	1.000
Q	0.947	1.000
A	0.947	1.000
A	0.947	1.000
A	0.947	1.000
R	0.947	1.000
L	0.947	1.000

E	0.947	1.000
R	0.947	1.000
A	0.947	1.000
I	0.947	1.000
N	0.947	1.000
T	0.947	1.000
V	0.902	1.000
D	0.992	1.000
L	0.992	1.000
E	0.999	1.000
L	0.999	1.000
A	0.999	1.000
A	0.999	1.000
L	0.999	1.000
R	0.999	1.000
R	0.999	1.000
R	0.999	1.000
L	0.999	1.000
E	0.999	1.000
E	0.999	1.000
L	0.999	1.000
A	0.999	1.000
R	0.999	1.000

[0241]

[0242] 然后将该三聚体卷曲螺旋包含进下面 SEQ ID NO :10 的 SAPN 序列中,后者包含 His- 标签、COMP 的五聚体卷曲螺旋、SEQ ID NO :9 的三聚体卷曲螺旋、和来自柏格鼠疟原虫的 CS- 蛋白的 B- 细胞表位。

[0243] MGHHHHHHGDKWKGGLVPRGSDEMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITFLRALLMGGRLRAR

[0244] LEELERSIWMLQQAAARLERINTVDLELAALRRRLEELARGGSGDPPPPNPNDPPPPNPND

[0245] (SEQ ID NO :10)

[0246] 在大肠杆菌中表达具有该序列的肽,并通过标准的生物技术操作,在镍亲和柱上纯化。根据 Raman S. 等人,Nanomedicine(同上),进行重新折叠。通过动态光散射 (DLS) 技术和透射电子显微术 (TEM),分析重新折叠的 SAPN 的纳米颗粒形成。DLS 分析显示出平均粒径为 46.96nm 的良好大小分布,非常低的多分散性指数为 8.7%。TEM 照片 (图 5) 显示出约 30nm 大小的纳米颗粒。

[0247] 实施例 3 :T1c-7- 流感

[0248] 该卷曲螺旋序列含有 2 个具有序列 IRHENRMVL 和 YKIFKIEKG 的共有 HTL 表位,它们分别来自甲型流感病毒的蛋白 M1 和神经氨酸酶。通过计算机算法 SVRMHC,预测它们强烈地结合 MHC II 分子 DRB1*0405 和 DRB1*0401,预测的结合亲和力 (pIC50 值) 分别是 8.250 和 6.985。此外,根据 Parida R. 等人, vaccine 2007, 25 :7530-7539,预测第一个 T- 细胞表位 IRHENRMVL 也会结合许多其它的 HLA 分子,例如 B14, B1510, B2705, B2706, B3909, DP9, DR11, DR12, DR17, DR53, 和 DRB1,即它是预测的泛宿主性的表位。

[0249] 下面显示了这些 HTL 表位与卷曲螺旋七肽重复的最佳比对 (SEQ IDNO :11)。但是,这些表位中的第二个表位的序列含有一个不利的甘氨酸残基,它通常作为破坏螺旋的残基。卷曲螺旋三聚体的侧接部分是相对短的序列,但是具有强烈的形成卷曲螺旋的倾向。当在卷曲螺旋预测程序 COILS 中使用 14 个氨基酸的小窗口时,显然为 T- 细胞表位的两侧预测出卷曲螺旋结构 (参见下面的表 20)。因此,整个序列会再次作为单个折叠单元,并形成具有三聚体寡聚化状态的稳定卷曲螺旋。

[0250] RLLARLEEIRHENRMVLYKIFKIEKGINTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :11)

[0251] d a d a d a d a d a d a d 核心残基

[0252] 表 20 :包含 2 个来自甲型流感病毒的 HTL- 表位的 SEQ ID NO :11 的卷曲螺旋倾向

[0253]

氨基酸	窗口 14
R	0.716
L	0.716
L	0.716
A	0.716
R	0.716

L	0.716
E	0.716
E	0.716
I	0.716
R	0.716
H	0.716
E	0.716
N	0.716
R	0.716
M	0.256
V	0.051
L	0.051
Y	0.005
K	0.005
I	0.004
F	0.001
K	0.011
I	0.011
E	0.028
K	0.028
G	0.028
I	0.201
N	0.252

T	0.467
V	0.902
D	0.992
L	0.992
E	0.999
L	0.999
A	0.999
A	0.999
L	0.999
R	0.999
R	0.999
R	0.999
L	0.999
E	0.999
E	0.999
L	0.999
A	0.999
R	0.999

[0254]

[0255] 然后将该三聚体卷曲螺旋包含进下面的 SAPN 序列 SEQ ID NO:12, 后者包含 His- 标签、五聚体 Trp- 拉链卷曲螺旋、上述的三聚体卷曲螺旋和来自柏格鼠疟原虫的 CS- 蛋白的 B- 细胞表位。

[0256] MGHHHHHHGDWKWDGGLVPRGSWQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLRLAR

[0257] LEEIRHENRMVLYKIFKIEKGINTVDLELAALRRRLEELARGGSGDPPPPNPNDPPPPNPND

[0258] (SEQ ID NO:12)

[0259] 在大肠杆菌中表达具有该序列的肽, 并通过标准的生物技术操作, 在镍亲和柱上纯化。根据 Raman S. 等人, Nanomedicine(同上), 进行重新折叠。通过动态光散射 (DLS)

技术和透射电子显微术 (TEM), 分析重新折叠的 SAPN 的纳米颗粒形成。DLS 分析显示出平均粒径为 57.70nm 的稍微更宽的大小分布, 多分散性指数为 21.6%。TEM 照片 (图 6) 显示出约 30-50nm 大小的纳米颗粒。它们中的一些具有粘到一起的倾向, 重新折叠条件需要更多的改进。

[0260] 实施例 4 : 癌症 CTL 表位的卷曲螺旋的预测

[0261] 在下面的实施例中, 证实了如何将癌症特异性的 T- 细胞表位包含进形成 SAPN 的肽中。将 19 种不同的 T- 细胞表位构建进 SAPN 的三聚体卷曲螺旋, 计算这些序列的前 10 个的对应的卷曲螺旋倾向。非常清楚地发现, T- 细胞表位的卷曲螺旋倾向相当低, 但是具有非常高卷曲螺旋倾向的侧接序列会在整个序列中补偿和诱导卷曲螺旋形成, 这类似于上面实施例 1-3 所证实的。

[0262] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERRLEMLLAYLYQLERAI

[0263] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :13)

[0264] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERRLEELLDGTATLRLAI

[0265] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :14)

[0266] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERRLLIYRRRLMKLERAI

[0267] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :15)

[0268] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERRLEILTVILGVLERAI

[0269] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :16)

[0270] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERELAGIGILTVELERAI

[0271] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :17)

[0272] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERRMSLQRQFLRELERAI

[0273] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :18)

[0274] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERRLEEKIFGSLAFLERAI

[0275] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :19)

[0276] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERRLEIISAVVGILERAI

[0277] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :20)

[0278] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERLLHETDSAVEELERAI

[0279] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :21)

[0280] WQTWNAKWDQWSNDWN~~AW~~RS~~W~~QAWKDD~~W~~ARWRALWMGG~~R~~LLARLEELERALFDIESKVEELERAI

[0281] NTVDLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :22)

[0282] 表 21 : 包含癌症 CTL 表位的 SEQ ID NO :13 至 SEQ ID NO :22 的卷曲螺旋倾向

[0283]

SEQ ID NO:13		SEQ ID NO:14		SEQ ID NO:15		SEQ ID NO:16		SEQ ID NO:17	
aa	窗口 14	aa	窗口 14	aa	窗口 14	aa	窗口 14	aa	窗口 14
R	1.000	R	1.000	R	0.989	R	1.000	R	1.000
L	1.000	L	1.000	L	0.989	L	1.000	L	1.000
L	1.000	L	1.000	L	0.989	L	1.000	L	1.000
A	1.000	A	1.000	A	0.989	A	1.000	A	1.000
R	1.000	R	1.000	R	0.989	R	1.000	R	1.000
L	1.000	L	1.000	L	0.989	L	1.000	L	1.000
E	1.000	E	1.000	E	0.989	E	1.000	E	1.000
E	1.000	E	1.000	E	0.989	E	1.000	E	1.000
L	1.000	L	1.000	L	0.989	L	1.000	L	1.000
E	1.000	E	1.000	E	0.989	E	1.000	E	1.000
R	1.000	R	1.000	R	0.989	R	1.000	R	1.000
R	1.000	R	1.000	R	0.989	R	1.000	E	1.000
L	1.000	L	1.000	L	0.989	L	1.000	L	1.000
E	1.000	E	1.000	L	0.989	E	1.000	A	1.000
M	0.999	E	1.000	I	0.948	I	0.999	G	0.998
L	0.999	L	1.000	Y	0.948	L	0.999	I	0.975
L	0.999	L	1.000	R	0.948	T	0.999	G	0.837
A	0.999	D	1.000	R	0.948	V	0.992	I	0.509
Y	0.806	G	0.996	R	0.948	I	0.839	L	0.169
L	0.806	T	0.716	L	0.948	L	0.839	T	0.102
Y	0.024	A	0.403	M	0.855	G	0.098	V	0.283
Q	0.547	T	0.083	K	0.855	V	0.087	E	0.637
L	0.547	L	0.083	L	0.855	L	0.289	L	0.637
E	0.547	R	0.025	E	0.855	E	0.289	E	0.637
R	0.547	L	0.020	R	0.855	R	0.289	R	0.637
A	0.547	A	0.092	A	0.855	A	0.289	A	0.637
I	0.547	I	0.201	I	0.855	I	0.289	I	0.637
N	0.547	N	0.252	N	0.855	N	0.289	N	0.637
T	0.547	T	0.467	T	0.855	T	0.467	T	0.637
V	0.902	V	0.902	V	0.902	V	0.902	V	0.902
D	0.992	D	0.992	D	0.992	D	0.992	D	0.992
L	0.992	L	0.992	L	0.992	L	0.992	L	0.992
E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999
L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999
A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999
A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999
L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999
R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999
R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999
R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999
L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999
E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999
E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999
L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999
A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999
R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999

[0284]

SEQ ID NO:18		SEQ ID NO:19		SEQ ID NO:20		SEQ ID NO:21		SEQ ID NO:22	
aa	窗口 14	aa	窗口 14	aa	窗口 14	aa	窗口 14	aa	窗口 14
R	0.997	R	1.000	R	1.000	R	0.981	R	0.761
L	0.997	L	1.000	L	1.000	L	0.993	L	0.761
L	0.997	L	1.000	L	1.000	L	0.993	L	0.761
A	0.997	A	1.000	A	1.000	A	0.993	A	0.915
R	0.997	R	1.000	R	1.000	R	0.993	R	0.915
L	0.997	L	1.000	L	1.000	L	0.993	L	0.915
E	0.997	E	1.000	E	1.000	E	0.993	E	0.915
E	0.997	E	1.000	E	1.000	E	0.993	E	0.915
L	0.997	L	1.000	L	1.000	L	0.993	L	0.915
E	0.997	E	1.000	E	1.000	E	0.993	E	0.915
R	0.997	R	1.000	R	1.000	R	0.993	R	0.915
R	0.997	R	1.000	R	1.000	L	0.993	A	0.915
M	0.997	L	1.000	L	1.000	L	0.993	L	0.915
S	0.997	E	1.000	E	1.000	H	0.993	F	0.915
L	0.963	K	1.000	I	0.998	E	0.993	D	0.997
Q	0.963	I	0.999	I	0.986	T	0.912	I	0.997
R	0.963	F	0.983	S	0.986	D	0.912	E	0.997
Q	0.963	G	0.871	A	0.986	S	0.831	S	0.997
F	0.364	S	0.493	V	0.812	A	0.788	K	0.997
L	0.663	L	0.493	V	0.605	V	0.788	V	0.997
R	0.663	A	0.219	G	0.040	E	0.876	E	0.997
E	0.663	F	0.098	I	0.085	E	0.876	E	0.997
L	0.663	L	0.289	L	0.289	L	0.876	L	0.997
E	0.663	E	0.289	E	0.289	E	0.876	E	0.997
R	0.663	R	0.289	R	0.289	R	0.876	R	0.997
A	0.663	A	0.289	A	0.289	A	0.876	A	0.997
I	0.663	I	0.289	I	0.289	I	0.876	I	0.997
N	0.663	N	0.289	N	0.289	N	0.876	N	0.997
T	0.663	T	0.467	T	0.467	T	0.876	T	0.982
V	0.902	V	0.902	V	0.902	V	0.902	V	0.980
D	0.992	D	0.992	D	0.992	D	0.992	D	0.992
L	0.992	L	0.992	L	0.992	L	0.992	L	0.992
E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999
L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999
A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999
A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999
L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999
R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999
R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999
R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999
L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999
E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999
E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999	E	0.999
L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999	L	0.999
A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999	A	0.999
R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999	R	0.999

[0285] 下面的序列同样显示出高卷曲螺旋倾向,尽管 T- 细胞表位的卷曲螺旋倾向相当低,但是具有非常高卷曲螺旋倾向的侧接序列会在整个序列中补偿和诱导卷曲螺旋形成。

- [0286] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEELERRLSLFRAVITKLERAI
 [0287] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :23)
 [0288] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEELERKMVELVHFLEELERAI
 [0289] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :24)
 [0290] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEELERRYLQLVFGIEVLERAI
 [0291] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :25)
 [0292] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEELERAARAVFLALEELERAI
 [0293] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :26)
 [0294] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEELERRLEEQDLTMKYQIFAI
 [0295] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :27)
 [0296] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEELEREAYGLDFYILELERAI
 [0297] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :28)
 [0298] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEELERRLSYLDSGIHFLERAI
 [0299] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :29)
 [0300] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEELERRLEETVSEQSNVERAI
 [0301] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :30)
 [0302] WQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWMGGRLARLEEELEEKLIVVLFRLLEELERAI
 [0303] NTVBLELAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :31)

[0304] 实施例 5 :HIV-V3

[0305] 该卷曲螺旋序列含有反向平行的 β -折叠肽,它是来自 HIV 的 gp120 的 V3 环的尖端。该肽是 HIV 的众所周知的 B- 细胞表位。通过在卷曲螺旋的位置 aa (b) 和 aa (c) 处的 2 个甘氨酸残基,将它插入卷曲螺旋七肽重复。

[0306] 卷曲螺旋三聚体的侧接部分是相对短的序列,但是具有强烈的形成卷曲螺旋的倾向。当在卷曲螺旋预测程序 COILS 中使用 14 个氨基酸的小窗口时,显然为 B- 细胞表位的两侧预测出卷曲螺旋结构 (参见下面的表 22)。因此,整个序列会作为单个折叠单元,并形成稳定的卷曲螺旋,其具有含有突出的 β -折叠肽的三聚体寡聚化状态。

[0307] RLLARLEELERRLEELERRLEELERRLGSIRIGPGQTFYAGVDLELAALRRRLEELAR

[0308] d a d a d a d a d a d a d a d 核心残基

[0309] (SEQ ID NO :32)

[0310] 表 22 :包含 HIV 的 2 个 B- 细胞表位的 SEQ ID NO :32 的卷曲螺旋倾向

[0311]

氨基酸	窗口 14
R	1.000
L	1.000
L	1.000

A	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
E	1.000
R	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
E	1.000
R	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
E	1.000
R	1.000
R	1.000

L	1.000
G	1.000
S	1.000
I	0.992
R	0.969
I	0.843
G	0.271
P	0.000
G	0.000
Q	0.004
T	0.004
F	0.007
Y	0.098
A	0.396
G	0.611
V	0.927
D	0.999
L	0.999
E	1.000
L	1.000
A	1.000
A	1.000
L	1.000

R	1.000
R	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
A	1.000
R	1.000

[0312]

[0313] 实施例 6 :P5c 的分析超速离心

[0314] 使用 His- 标签亲和纯化方案,在标准的大肠杆菌表达系统中重组表达下述序列 (SEQ ID NO :33) 的肽 :

[0315] MGHHHHHHGDWKGGLVPRGSDEMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITFLRALLMGGRLARL

[0316] EELERRLEELERRLEELERAINTVDLLEAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :33)

[0317] 该序列与来自实施例 1 和 2 的序列 (SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :10) 相关,但是没有 C- 末端 B- 细胞表位。形成的 SAPN 不具有 2 个螺旋之间的二硫键 (标下划线的残基 55 和 64,与 Raman S. 等人, *Nanomedicine :Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2006 ;2 : 95-102 的原始设计相比,用丙氨酸替代 2 个半胱氨酸),但是具有替代的更小的氨基酸丙氨酸,允许 2 个螺旋之间实现更小的角度,因此超过 60 个肽链被掺入 SAPN 中。

[0318] 为从单体构造块 SEQ ID NO :33 装配纳米颗粒,测试了 3 种条件。通过分析超速离心,评估 SAPN 的分子量 (MW) :以 0.42mg/ml、0.34mg/ml 和 0.21mg/ml,将肽溶于 150mM NaCl、20mM Tris、pH 7.5。测量的分子量对应着由约 330 个单体组成的 SAPN,即比 60 个不对称单位的规则多面体所需单体更多的纳米颗粒 (表 23)。两个寡聚化结构域的 2 个螺旋不是通过二硫键固定它们彼此的相对方位,更小的氨基酸丙氨酸允许 2 个螺旋更接近,因此允许它们之间的角度更小。

[0319] 表 23 :SEQ ID NO :33 的分析超速离心

[0320]

浓度	分子量 kDa	单体的数目
0.42mg/ml	4331	344

0.34mg/ml	4128	328
0.21mg/ml	4066	323

[0321] 实施例 7 : 具有一系列重叠的测量的 HTL 表位的三聚体卷曲螺旋 (pan3m)

[0322] 下面是包含来自乙型肝炎病毒聚合酶的肽表位的三聚体卷曲螺旋设计的一个实例, 已经测量了它们对不同 MHCII 分子的结合亲和力 (Mizukoshi E. 等人, J Immunol 2004, 173 :5863-5871)。根据该文件中所述的原理, 将这些肽中的 2 个先后设计进三聚体卷曲螺旋。

[0323] RLLARLEELERRLEELQSLTNLLSSNLSWLSLDVSAAFRRLEELEARVM(SEQ ID NO :34)

[0324] d a d a d a d a d a d a d a 核心残基

[0325] 测量的来自乙型肝炎病毒聚合酶的序列 LQSI DRB1 * 0301(62), DRB1 * 0401(10), DRB1 * 0405(17), DRB1 * 0701(173), DRB1 * 0802 亲和 (598), DRB1 * 0901(791), DRB1 * 1101(303), DRB1 * 1201(397), DRB1 * 1302(143), DRB1 * 1501(21), DRB3 * 0101(5), DRB4 * 0101(7),

[0326] 通过预测程序 COILS, 预测该肽的序列会形成卷曲螺旋。序列中所有残基形成卷曲螺旋的概率超过 98% (表 24), 因此预测整个序列会形成完全折叠的卷曲螺旋。

[0327] 表 24 :SEQ ID NO :34 的卷曲螺旋倾向

[0328]

氨基酸	窗口 28
R	1.000
L	1.000
L	1.000
A	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
E	1.000
R	1.000

R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
Q	1.000
S	1.000
L	1.000
T	1.000
N	1.000
L	1.000
L	1.000
S	1.000
S	1.000
N	1.000
L	1.000
S	1.000
W	1.000
L	1.000
S	1.000
L	1.000
D	0.999
V	0.996

S	0.996
A	0.996
A	0.996
F	0.996
R	0.996
R	0.996
L	0.996
E	0.996
E	0.996
L	0.996
E	0.996
A	0.996
R	0.996
V	0.996
M	0.988

[0329]

[0330] 实施例 8 :具有一系列重叠的预测的 HTL 表位的三聚体卷曲螺旋 (pan3p)

[0331] 下面是三聚体卷曲螺旋设计的一个实例,其包含来自 (Mizukoshi E. 等人, J Immunol 2004,173 :5863-5871) 的 SEQ ID NO :34 的 HTL 表位的小部分以及作为 PADRE HTL 表位序列的小部分的序列。

[0332] RLLARLEELERRLEELARFVAAWTLKVREVERELSWLSLDVSAAFR (SEQ ID NO :35)

[0333] d a d a d a d a d a d 核心残基

[0334] 下面是通过算法 NetMHCII 预测的序列 ARFVAAWTLKVREVERELSWLSLDVSAAF 中含有的表位对下述不同 MHCII 分子的结合亲和力 (括号中是结合亲和力,按 nM 计算) :

[0335] DRB1 * 0101 (23),
DRB1 * 0401 (72), DRB1 * 0405 (37), DRB1 * 0701 (164), DRB1 * 0802 (462), DRB1 *
0901 (440), DRB1 * 1101 (271), DRB1 * 1302 (303), DRB1 * 1501 (16), DRB3 * 0101 (60),
DRB4 * 0101 (51).

[0336] 该序列在有些部分含有与序列 pan3m (SEQ ID NO :34) 相同的表位,它们实际上

已经表现出比 NetMHCII 程序预测更强的对 MHCII 分子的结合力 (Mizukoshi E. 等人, J Immunol 2004, 173 :5863-5871)。

[0337] 通过预测程序 COILS 预测, 该肽的序列会形成卷曲螺旋。除了最后 8 个残基以外, 序列中的所有残基 (表 25) 形成卷曲螺旋的概率超过 80%, 因此预测该序列形成完全折叠的卷曲螺旋, C- 末端扰乱 (fray) 一部分距离, 这不会妨碍 SAPN 形成, 因为在 N- 末端的大部分序列形成卷曲螺旋。

[0338] 表 25 :SEQ ID NO :35 的卷曲螺旋倾向

[0339]

氨基酸	窗口 28
R	1.000
L	1.000
L	1.000
A	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
E	1.000
R	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
A	1.000

R	1.000
F	1.000
V	1.000
A	1.000
A	1.000
W	1.000
T	1.000
L	1.000
K	1.000
V	1.000
R	1.000
E	1.000
V	1.000
E	1.000
R	1.000
E	1.000
L	1.000
S	1.000
W	0.971
L	0.971
S	0.838
L	0.593
D	0.532

V	0.206
S	0.070
A	0.032
A	0.011
F	0.004
R	0.004

[0340] 实施例9:具有一系列部分重叠的预测的HTL表位的四聚体卷曲螺旋(BN5c-M2eN)

[0341] 来自 tetrabrachion(Stetefeld J. 等人, Nature Structural Biology 2000, 7(9):772-776) 的四聚体卷曲螺旋序列的特征在于十一肽卷曲螺旋重复,而不是七肽重复。下面是源自该四聚体卷曲螺旋的轻微修饰的序列。

[0342] LYRLTVIIDDRIESLKNLITLRADRLMIINDNVSTLRALLM(SEQ ID NO:36)

[0343] efghijklkabcdefghijkabcdefghijkabcdefghijkab 核心残基

[0344] 该四聚体卷曲螺旋特别适合作为 SAPN 的核心卷曲螺旋,因为它含有一系列重叠的预测的HTL表位。通过算法 NetMHCII 预测,表位 YRLTVIIDD、LKNLITLRA、LITLRADRL、IINDNVSTLR、INDNVSTLRA 和 VSTLRALLM 的序列会分别结合不同的 MHC II 分子

[0345] DRB1 * 0101, DRB1 * 0401, DRB1 * 0404, DRB1 * 0405, DRB1 * 0701, DRB1 * 1101, DRB1 * 1302, 和 DRB1 * 1501

[0346] 预测的结合亲和力 (nM) 分别是 3、48、78、162、243、478、12 和 420。

[0347] 该四聚体卷曲螺旋也特别适合呈递四聚体 B- 细胞表位,例如来自流感的 M2e 肽,这已经在具有下面的序列 (SEQ ID NO:37) 的人疫苗 SAPN 设计中实现:

[0348] MGHHHHHASLVPRGSLLEVEVTPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVIIDDRIESLKNLITLRADRL

[0349] MIINDNVSTLRALLMGGRLRLARLEELERRLEELERRLEELERAINTVDLELAALRRRLEELAR

[0350] (SEQ ID NO:37)

[0351] 该肽 (SEQ ID NO:37) 含有,从 N- 末端开始:His- 标签,来自人特异性的流感株的 M2e B- 细胞表位,具有 HTL 表位的四聚体卷曲螺旋,连接物,和三聚体卷曲螺旋。在大肠杆菌中表达具有该序列的肽,并通过标准的生物技术操作,在镍亲和柱上纯化。根据 Raman S. 等人, Nanomedicine :Nanotechnology, Biology, and Medicine 2006 ;2 :95-102, 进行重新折叠。通过透射电子显微术 (TEM), 分析重新折叠的 SAPN 的纳米颗粒形成。TEM 照片 (图 7A) 显示出约 30nm 相同大小的纳米颗粒。

[0352] 来自流感的鸡特异性的 M2e 肽也可以以它的天然寡聚化状态和构象显示,作为 tetrabrachion 的四聚体卷曲螺旋上的四聚体,这已经在具有下面的序列 (SEQ ID NO:38) 的动物疫苗 SAPN 设计中实现:

[0353] MGHHHHHASLVPRGSLLEVEVTPTRNGWECKCSDSSGSLYRLTVIIDDRIESLKNLITLRADRL

[0354] MIINDNVSTLRALLMGGRLRLARLEELERRLEELERRLEELERAINTVDLELAALRRRLEELAR

[0355] (SEQ ID NO:38)

[0356] 在大肠杆菌中表达具有该序列 (SEQ ID NO :38) 的肽,并通过标准的生物技术操作,在镍亲和柱上纯化。它含有,从 N- 末端开始 :His- 标签,来自鸡特异性的流感株的 M2e B- 细胞表位,具有 HTL 表位的四聚体卷曲螺旋,连接物,和三聚体卷曲螺旋。根据 Raman S. 等人,Nanomedicine :Nanotechnology,Biology,and Medicine 2006 ;2 :95-102,进行重新折叠,缓冲液为 20mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl 和 5% 甘油。通过动态光散射 (DLS) 技术和透射电子显微术 (TEM),分析重新折叠的 SAPN 的纳米颗粒形成。DLS 分析显示出平均粒径为 45nm 的大小分布,多分散性指数为 8.9%。TEM 照片 (图 7B) 显示出约 30nm 相同大小的纳米颗粒。

[0357] 实施例 10 :具有一系列重叠的预测的 HTL 表位的五聚体卷曲螺旋

[0358] 根据二级结构预测程序 PSIPRED

[0359] (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>-The PSIPRED Protein Structure Prediction Server),预测该序列高概率地 (大部分最高评分 9) 形成 α- 螺旋 (H)。由于卷曲螺旋的七肽重复的核心位置 aa(a) 和 aa(d) 大部分是色氨酸残基,预测该序列会形成五聚体卷曲螺旋 (Liu J 等人,Proc Natl AcadSci USA 2004 ;101(46) : 16156-61)。

[0360] ERFVAAWTLKVAEWEEKWKIWKSLWKAWRLLWM (SEQ ID NO :39)

[0361] a d a d a d a d a 卷曲螺旋核心残基

[0362] 567899998899899999999999999999999999999999999999999 二级结构的评分

[0363] HH 二级结构的类型

[0364] 该五聚体卷曲螺旋序列含有部分重叠的 HTL 表位,具有序列 FVAAWTLKV、WKIWKSLWK 和 KSLWKAWRL,通过算法 NetMHCII 预测它们会分别结合不同的 MHC II 分子

[0365] DRB1 * 0101, DRB1 * 0401, DRB1 * 0405, DRB1 * 0701, DRB1 * 0801, DRB1 * 0901, DRB1 * 1101, DRB1 * 1501, 和 DRB5 * 0101,

[0366] 预测的结合亲和力 (nM) 分别是 24、73、13、120、42、596、396、6 和 13。

[0367] 实施例 11 :具有镰状疟原虫 HTL 表位的三聚体卷曲螺旋 (t811c-9-pf)

[0368] 下面是三聚体卷曲螺旋设计的一个实例,其包含来自镰状疟原虫的结合 pan DR 的表位。该序列对应着 17 个 C- 末端氨基酸,2 个半胱氨酸被丙氨酸替换,也称作来自环孢子蛋白 CS 的 CS. T3 肽 (SEQ IDNO :40)。

[0369] RLLLRLEELERRLEELEKKIAKMEKASSVFNVLAALRRRLEELAR (SEQ ID NO :40)

[0370] d a d a d a d a d a d a d 核心残基

[0371] 在细胞增殖试验中已经证实,该 CS. T3 肽具有 pan DR 活性,且对于 DR1、DR2、DR4、DR5、DRw6、DR7 和 DR9 分子是刺激性的 (美国专利 5, 114, 713)。

[0372] 通过预测程序 COILS,预测该肽的序列会形成卷曲螺旋。除了最后 2 个氨基酸以外,序列中所有残基形成卷曲螺旋的概率超过 99% (表 26)。因此,预测整个序列会形成完全折叠的卷曲螺旋。

[0373] 表 26 :SEQ ID NO :40 的卷曲螺旋倾向

[0374]

氨基酸	窗口 28
R	1.000
L	1.000
L	1.000
L	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
E	1.000
R	1.000
R	1.000
L	1.000
E	1.000
E	1.000
L	1.000
E	1.000
K	1.000
K	1.000
I	1.000
A	1.000
K	1.000

M	1.000
E	1.000
K	1.000
A	1.000
S	1.000
S	1.000
V	1.000
F	1.000
N	1.000
V	1.000
V	1.000
L	1.000
A	0.999
A	0.997
L	0.997
R	0.991
R	0.991
R	0.991
L	0.991
E	0.991
E	0.991
L	0.991
A	0.927

R	0.927
---	-------

[0375]

[0376] 该卷曲螺旋 (SEQ ID NO :40) 已经用于设计具有下述序列 (SEQ IDNO :41) 的 SAPN :

[0377] MGHHHHHHHSWKWDGGLVPRGSWQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWAFWRALWMGGRLLLLRLE

[0378] ELERRLEELEKKI AKMEKASSVFNVVLAALRRRLEELARGGSGANANPNANPNANPNANP

[0379] (SEQ ID NO :41)

[0380] 该序列 (SEQ ID NO 41) 含有 his- 标签、五聚体卷曲螺旋色氨酸拉链、连接物、三聚体卷曲螺旋 SEQ ID NO :40、和镰状疟原虫 B- 细胞表位,它是相同环孢子蛋白 CS 的重复序列的的四肽重复 (NANP)。

[0381] 在大肠杆菌中表达具有该序列的肽,并通过标准的生物技术操作,在镍亲和柱上纯化。根据 Raman S. 等人, Nanomedicine (同上), 进行重新折叠。通过动态光散射 (DLS) 技术和透射电子显微术 (TEM), 分析重新折叠的 SAPN 的纳米颗粒形成。在 pH 6.5 的 DLS 分析显示出粒径为 44.6nm 的大小分布,多分散性指数为 19.6%。TEM 照片 (图 8) 显示出约 30nm 大小的纳米颗粒。

[0382] 实施例 12 :HIV 疫苗 :HTL、CTL、B- 细胞共装配

[0383] 下面是 HIV 疫苗设计的一个实例。它们是保守的蛋白序列,含有预测会结合在表 10 中列出的 HLA 分子的 CTL 表位。

[0384] ELDKWASLWNWFNITNWLWYIRSWQTWNAKWDQWAKFIAAWTLKVAAWKDDWARWRALWMGGRLLLLRL

[0385] EELERRLEELEKKI AKMEKASSVFNVVLAALRRRLEELARPLDEGFRKYTAFTIPSINNE

[0386] (SEQ ID NO :42)

[0387] ELDKWASLWNWFNITNWLWYIRSWQTWNAKWDQWAKFIAAWTLKVAAWKDDWARWRALWMGGRLLLLRL

[0388] EELERRLEELEKKI AKMEKASSVFNVVLAALRRRLEELARKGPAKLLWKGEAVFIHNFKRKGGIGG

[0389] (SEQ ID NO :43)

[0390] ELDKWASLWNWFNITNWLWYIRSWQTWNAKWDQWAKFIAAWTLKVAAWKDDWARWRALWMGGRLLLLRL

[0391] EELERRLEELEKKI AKMEKASSVFNVVLAALRRRLEELARI IGRNLLTQIGCTLNFPISPIETVPV

[0392] (SEQ ID NO :44)

[0393] ELDKWASLWNWFNITNWLWYIRSWQTWNAKWDQWAKFIAAWTLKVAAWKDDWARWRALWMGGRLLLLRL

[0394] EELERRLEELEKKI AKMEKASSVFNVVLAALRRRLEELARDFWEVQLGIPHPAGLKKKKS

[0395] (SEQ ID NO :45)

[0396] ELDKWASLWNWFNITNWLWYIRSWQTWNAKWDQWAKFIAAWTLKVAAWKDDWARWRALWMGGRLLLLRL

[0397] EELERRLEELEKKI AKMEKASSVFNVVLAALRRRLEELARL TEEAELELAENREILKDPVHGV

[0398] (SEQ ID NO :46)

[0399] ELDKWASLWNWFNITNWLWYIRSWQTWNAKWDQWAKFIAAWTLKVAAWKDDWARWRALWMGGRLLLLRL

[0400] EELERRLEELEKKI AKMEKASSVFNVVLAALRRRLEELARLVSQGI R KVLFLDGIDK

[0401] (SEQ ID NO :47)

[0402] 将表 10 的前 7 个 CTL 表位串构建在具有相同核心和相同 N- 末端 B- 细胞表位的 6 个肽链的 C- 末端,从而共装配进单个 SAPN。

[0403] 核心含有与实施例 11 相同的三聚体,具有泛宿主性的镰状疟原虫 HTL 表位,其连接含有 PADRE HTL 表位的 Trp- 拉链五聚体卷曲螺旋。

[0404] B- 细胞表位是 GP41 的膜近侧区,通过单克隆中和抗体 2F5 和 4E10 的结合,证实它具有中和潜力。该表位在溶液中是 α - 螺旋状,通过部分地构建进五聚体卷曲螺旋,保持处于 α - 螺旋构象。在该设计中,表面可接近的残基(即不是卷曲螺旋核心残基的残基)是被抗体 4E10 结合的那些。

[0405] 实施例 13 :疟疾疫苗 :HTL-CTL-B- 细胞 - 核心、B- 细胞、CTL 共装配

[0406] 下面是 6 个肽链组成的疟疾疫苗 SAPN 的一个实例,所述肽链具有相同的核心和相同的 C- 末端 B- 细胞表位和在 N- 末端的约 18 个 CTL 表位(每条肽链 3 个),共装配进单个 SAPN。

[0407] KPNDKSLYKPKDEL DYEAKPIVQYDNFMNGSERFVAAWTLKVAEWEEKWKIWKSLWKAWRLLWMGGRL

[0408] LLRLEELMEKLKELEKCLRNL EEEELHSLRKNLNILNEEELTRGGSGANANPNANPNANPNANP

[0409] (SEQ ID NO :48)

[0410] ASKNKEKALIIAAGIAGGLALLRSLLMDCSGSIGSERFVAAWTLKVAEWEEKWKIWKSLWKAWRLLWMG

[0411] GRLLLRL EELMEKLKELEKCLRNL EEEELHSLRKNLNILNEEELTRGGSGANANPNANPNANPNANP

[0412] (SEQ ID NO :49)

[0413] MNPNDPNRNVQMPNDPNRNVQKSLYDEHIGSERFVAAWTLKVAEWEEKWKIWKSLWKAWRLLWMGG

[0414] RLLLRL EELMEKLKELEKCLRNL EEEELHSLRKNLNILNEEELTRGGSGANANPNANPNANPNANP

[0415] (SEQ ID NO :50)

[0416] MINAYLDKLRRAISKYEDEIFAHLGNVKYLVGSERFVAAWTLKVAEWEEKWKIWKSLWKAWRLLWMGGRR

[0417] LLLRL EELMEKLKELEKCLRNL EEEELHSLRKNLNILNEEELTRGGSGANANPNANPNANPNANP

[0418] (SEQ ID NO :51)

[0419] ENDIEKKI AKMEKASKSLYDEHILLMDCSGSIGSERFVAAWTLKVAEWEEKWKIWKSLWKAWRLLWMG

[0420] GRLLLRL EELMEKLKELEKCLRNL EEEELHSLRKNLNILNEEELTRGGSGANANPNANPNANPNANP

[0421] (SEQ ID NO :52)

[0422] KSKDEL DYEAI PSLALMLIMPLETQLAIGSERFVAAWTLKVAEWEEKWKIWKSLWKAWRLLWMGGRRLL

[0423] LRLEELMEKLKELEKCLRNL EEEELHSLRKNLNILNEEELTRGGSGANANPNANPNANPNANP

[0424] (SEQ ID NO :53)

[0425] 核心(标有下划线)是含有 CTL 表位 MEKLKELEK 和修饰的 B- 细胞表位 KLRNL EEEELHSLRKNLNILNEEELT(在 Villard V. 等人,PLoS ONE 2007,2(7) :e645 中的序列 27) 的三聚体卷曲螺旋和在实施例 10 中证实具有优良的 panDR 结合性质的五聚体的组合。在 C- 末端,所有 6 个肽链具有相同的 B- 细胞表位,它是来自镰状疟原虫的环孢子蛋白 CS 的重复序列的四肽重复(NANP)。在 N- 末端是约 18 个不同的镰状疟原虫 CTL 表位(美国专利 5,028,425,5,972,351,6,663,871),每条链 3 个不同的表位。CTL- 表位被优化的蛋白酶体切割位点隔开(<http://www.paproc2.de/paproc1/paproc1.html>;Hadel K. P. 等人,Math. Biosci. 2004,188 :63-79)。由于这 6 条肽链的核心是相同的,将这 6 条肽链共装配进一个单独的 SAPN,允许将约 18 个不同的 CTL 表位掺入一个单独的 SAPN。

[0426] 实施例 14 :流感疫苗 :HTL- 核心、B- 细胞四聚体、CTL 共装配

[0427] 下面是 6 个肽链组成的流感疫苗 SAPN 的一个实例,所述肽链具有相同的核心和相

同的 N- 末端 B- 细胞表位 M2e 和在 C- 末端的约 20 个 CTL 表位（每条肽链 3 个或 4 个），共装配进单个 SAPN。核心（标有下划线）是实施例 7 的三聚体和实施例 9 的具有优良的 panDR 结合性质的四聚体的组合。四聚体 N- 末端 B- 细胞表位与在实施例 9 中相同。来自 Parida R. 等人, Vaccine 2007, 25 :7530-7539 保守的 CTL 表位（表 15）放置在 C- 末端。由于这 6 条肽链的核心是相同的，将这 6 条肽链共装配进一个单独的 SAPN，允许将约 20 个不同的 CTL 表位掺入一个单独的 SAPN。

[0428] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0429] GGRLLARLEELERRLEELQSLTNLLSSNLSWLSLDVSAAFRRLEELEARV IRHENRMVLQAYQKRM

[0430] GVLKMPASRYLSRYLTDMTL (SEQ ID NO :54)

[0431] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0432] GGRLLARLEELERRLEELQSLTNLLSSNLSWLSLDVSAAFRRLEELEARV FMLMPKQKVMRMGDFH

[0433] SLYLLAWKQVL (SEQ ID NO :55)

[0434] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0435] GGRLLARLEELERRLEELQSLTNLLSSNLSWLSLDVSAAFRRLEELEARV APIEHASMRRNRYFTA

[0436] EVIQMCTELKL (SEQ ID NO :56)

[0437] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0438] GGRLLARLEELERRLEELQSLTNLLSSNLSWLSLDVSAAFRRLEELEARV AAGAAVKGVVGTMVME

[0439] LINPTLLFLKV (SEQ ID NO :57)

[0440] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0441] GGRLLARLEELERRLEELQSLTNLLSSNLSWLSLDVSAAFRRLEELEARV RLIDFLKDVMIQIRGFV

[0442] YFIMFSNKMARL (SEQ ID NO :58)

[0443] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0444] GGRLLARLEELERRLEELQSLTNLLSSNLSWLSLDVSAAFRRLEELEARV ERNEQGQTLVAYMLER

[0445] ELLRHFQKDAKVRDQRGNVL (SEQ ID NO :59)

[0446] 实施例 15 :流感疫苗 :HTL- 核心、B- 细胞四聚体、切割肽共装配

[0447] 下面是 3 个肽链组成的流感疫苗 SAPN 的一个实例，所述肽链具有相同的核心和相同的 N- 末端 B- 细胞表位 M2e 和在 C- 末端的 9 个 B- 细胞表位（每条肽链 3 个），共装配进单个 SAPN。

[0448] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0449] GGRLLARLEELERRLEELAKFVAAWTLKVREVERELSWLSLDVSAAFLE RKKRGLFGDIQSRGLFG

[0450] DERQTRGIFG (SEQ ID NO :60)

[0451] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0452] GGRLLARLEELERRLEELAKFVAAWTLKVREVERELSWLSLDVSAAFLE RKTRGLFGDPKGRGLFG

[0453] DQIESRGLFG (SEQ ID NO :61)

[0454] SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSGSLYRLTVI IDDRYESLKNLI TLRADRLEMI INDNVSTLRALLM

[0455] GGRLLARLEELERRLEELAKFVAAWTLKVREVERELSWLSLDVSAAFLE KKRGLFGDASYRGLFG

[0456] DKREKGRGLFG (SEQ ID NO :62)

[0457] 核心（标有下划线）是实施例 8 的三聚体和实施例 9 的具有优良的 panDR 结合性质的四聚体的组合。四聚体 N- 末端 B- 细胞表位与在实施例 9 中相同。C- 末端 B- 细胞表

位来自表 8, H1、H2、H3、H5 共有 1、H5 共有 2、H7 共有 1、H7 共有 2、H7 共有 3、H9 在表位之间带有负电荷,使 B- 细胞表位串带更少的正电荷。

[0001]

序列表

<110> Alpha-O Peptides AG
Burkhard, Peter

<120> 可用作疫苗的自装配肽纳米颗粒

<130> P362A

<150> EP08101221
<151> 2008-02-01

<160> 296

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, COMP的五聚化结构域

<400> 1

Leu Ala Pro Gln Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala Ala Leu
1 5 10 15

Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Gln Ile Thr Phe
 20 25 30

Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly
 35 40

<210> 2
<211> 53
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 色氨酸拉链的五聚化结构域

<400> 2

Ser Ser Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Ser Asp Trp Gln Thr Trp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser
 20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp Asn Gln Arg Trp
 35 40 45

Asp Asn Trp Ala Thr
 50

<210> 3
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 合成构建体, T4 蛋白 fibritin 的三聚化结构域

<400> 3

Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys
 1 5 10 15

Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
 20 25

<210> 4

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, T4 蛋白 fibritin

<400> 4

Val Gln Asn Leu Gln Val Glu Ile Gly Asn Asn Ser Ala Gly Ile Lys
 1 5 10 15

Gly Gln Val Val Ala Leu Asn Thr Leu Val Asn Gly Thr Asn Pro Asn
 20 25 30

Gly Ser Thr Val Glu Glu Arg Gly Leu Thr Asn Ser Ile Lys Ala Asn
 35 40 45

Glu Thr Asn Ile Ala Ser Val Thr Gln Glu Val
 50 55

<210> 5

<211> 53

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 掺入 fibritin 三聚化结构域的 gp120 HIV 的 V3 表位

<400> 5

Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Glu Arg Arg Leu Gly Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr
 20 25 30

Phe Tyr Ala Gly Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
 35 40 45

Glu Glu Leu Ala Arg
 50

<210> 6

<211> 17

[0003]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, ER靶向信号E3/19K

<400> 6

Met Arg Tyr Met Ile Leu Gly Leu Leu Ala Leu Ala Ala Val Cys Ser
1 5 10 15

Ala

<210> 7
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 掺入PADRE的卷曲螺旋三聚化结构域

<400> 7

Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu
1 5 10 15

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Leu
 20 25 30

Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg
 35 40 45

<210> 8
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 构造块, 其包含 His标签, COMP,
PADRE和CS蛋白

<400> 8

Met Gly His His His His His His Gly Asp Trp Lys Trp Asp Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Asp Glu Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr
 20 25 30

Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys
 35 40 45

Gln Ile Thr Phe Leu Arg Ala Leu Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala
 50 55 60

Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Lys Phe Val
65 70 75 80

[0004]

Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala
85 90 95

Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Gly Ser Gly Asp Pro
100 105 110

Pro Pro Pro Asn Pro Asn Asp Pro Pro Pro Pro Asn Pro Asn Asp
115 120 125

<210> 9
<211> 46
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 卷曲螺旋P5c-6, 具有重叠的 HTL表位

<400> 9

Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Ser Ile Trp Met Leu
1 5 10 15

Gln Gln Ala Ala Ala Arg Leu Glu Arg Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu
20 25 30

Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg
35 40 45

<210> 10
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 构造块, 具有His标签, COMP,
重叠的HTL表位和CS蛋白

<400> 10

Met Gly His His His His His His Gly Asp Trp Lys Trp Asp Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Asp Glu Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr
20 25 30

Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys
35 40 45

Gln Ile Thr Phe Leu Arg Ala Leu Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala
50 55 60

Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Ser Ile Trp Met Leu Gln Gln Ala Ala
65 70 75 80

Ala Arg Leu Glu Arg Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala
85 90 95

[0005]

Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Gly Ser Gly Asp Pro
 100 105 110

Pro Pro Pro Asn Pro Asn Asp Pro Pro Pro Pro Asn Pro Asn Asp
 115 120 125

<210> 11
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 卷曲螺旋, 具有来自流感病毒的HTL表位

<400> 11

Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val
 1 5 10 15

Leu Tyr Lys Ile Phe Lys Ile Glu Lys Gly Ile Asn Thr Val Asp Leu
 20 25 30

Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg
 35 40 45

<210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 构造块具有His标签, Trp 拉链, 来自流感病毒的HTL
 表位和CS蛋白

<400> 12

Met Gly His His His His His His Gly Asp Trp Lys Trp Asp Gly Gly
 1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln
 20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys
 35 40 45

Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu
 50 55 60

Ala Arg Leu Glu Glu Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Tyr Lys
 65 70 75 80

Ile Phe Lys Ile Glu Lys Gly Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala
 85 90 95

Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Gly Ser Gly Asp

[0006]

100	105	110
Pro Pro Pro Pro Asn Pro Asn Asp Pro Pro Pro Pro Asn Pro Asn Asp		
115	120	125
<p><210> 13 <211> 85 <212> PRT <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 合成构建体, 三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位</p> <p><400> 13</p>		
Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn		
1	5	10 15
Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp		
20	25	30
Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu		
35	40	45
Glu Arg Arg Leu Glu Met Leu Leu Ala Tyr Leu Tyr Gln Leu Glu Arg		
50	55	60
Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu		
65	70	75 80
Glu Glu Leu Ala Arg		
85		
<p><210> 14 <211> 85 <212> PRT <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 合成构建体, 三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位</p> <p><400> 14</p>		
Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn		
1	5	10 15
Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp		
20	25	30
Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu		
35	40	45
Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu		
50	55	60
Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu		

[0007]

65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 15
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋,具有癌症CTL表位

<400> 15

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 16
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋,具有癌症CTL表位

<400> 16

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Leu Glu Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu

[0008]

65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 17
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 17

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Glu Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 18
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 18

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg Glu Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu

[0009]

65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 19
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 19

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Leu Glu Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 20
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 20

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Leu Glu Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu

[0010]

65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 21
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋,具有癌症CTL表位

<400> 21

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Glu Glu Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 22
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋,具有癌症CTL表位

<400> 22

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Glu Glu Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu

[0011]

65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 23
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 23

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Leu Ser Leu Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 24
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 24

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Lys Met Val Glu Leu Val His Phe Leu Glu Glu Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu

[0012]

65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 25
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 25

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Tyr Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Val Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 26
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 26

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Ala Ala Arg Ala Val Phe Leu Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu

[0013]

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 27
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋,具有癌症CTL表位

<400> 27

Trp	Gln	Thr	Trp	Asn	Ala	Lys	Trp	Asp	Gln	Trp	Ser	Asn	Asp	Trp	Asn
1		5		10		15									

Ala	Trp	Arg	Ser	Asp	Trp	Gln	Ala	Trp	Lys	Asp	Asp	Trp	Ala	Arg	Trp
	20			25		30									

Arg	Ala	Leu	Trp	Met	Gly	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu
	35			40		45									

Glu	Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Gln	Asp	Leu	Thr	Met	Lys	Tyr	Gln	Ile	Phe
	50			55		60									

Ala	Ile	Asn	Thr	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Arg	Arg	Leu
65			70			75									80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 28
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋,具有癌症CTL表位

<400> 28

Trp	Gln	Thr	Trp	Asn	Ala	Lys	Trp	Asp	Gln	Trp	Ser	Asn	Asp	Trp	Asn
1		5		10		15									

Ala	Trp	Arg	Ser	Asp	Trp	Gln	Ala	Trp	Lys	Asp	Asp	Trp	Ala	Arg	Trp
	20			25		30									

Arg	Ala	Leu	Trp	Met	Gly	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu
	35			40		45									

Glu	Arg	Glu	Ala	Tyr	Gly	Leu	Asp	Phe	Tyr	Ile	Leu	Glu	Leu	Glu	Arg
	50			55		60									

Ala	Ile	Asn	Thr	Val	Asp	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Arg	Arg	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0014]

65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 29
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 29

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Leu Ser Tyr Leu Asp Ser Gly Ile His Phe Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 30
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 30

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Arg Arg Leu Glu Glu Thr Val Ser Glu Gln Ser Asn Val Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu

[0015]

65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 31
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,三聚卷曲螺旋, 具有癌症CTL表位

<400> 31

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu
35 40 45

Glu Glu Lys Leu Ile Val Val Leu Phe Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg
50 55 60

Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Ala Arg
85

<210> 32
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体,卷曲螺旋, 具有HIV-V3 B-细胞表位

<400> 32

Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu
1 5 10 15

Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Gly Ser Ile Arg Ile
20 25 30

Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Gly Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala
35 40 45

Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg
50 55

<210> 33

[0016]

<211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 构造块, 其包含His-标签, COMP和
 P5c6

<400> 33

Met Gly His His His His His His Gly Asp Trp Lys Trp Asp Gly Gly
 1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Asp Glu Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr
 20 25 30

Asn Ala Ala Leu Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys
 35 40 45

Gln Ile Thr Phe Leu Arg Ala Leu Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala
 50 55 60

Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu
 65 70 75 80

Glu Glu Leu Glu Arg Ala Ile Asn Thr Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala
 85 90 95

Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg
 100 105

<210> 34
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 三聚卷曲螺旋, 具有HBV 表位

<400> 34

Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu
 20 25 30

Asp Val Ser Ala Ala Phe Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Ala Arg Val
 35 40 45

Met

<210> 35
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0017]

<220>

<223> 合成构建体, 三聚卷曲螺旋, 具有PADRE和HBV
表位

<400> 35

Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu
1 5 10 15Ala Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Arg Glu Val Glu Arg
 20 25 30Glu Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Arg
 35 40 45

<210> 36

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 来自 tetrabrachion 的 修饰的四聚卷曲螺旋

<400> 36

Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys
1 5 10 15Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp
 20 25 30Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu Leu Met
 35 40

<210> 37

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 四聚卷曲螺旋, 具有M2e B-细胞
表位, 来自人类流感病毒

<400> 37

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

[0018]

Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu Leu
65 70 75 80

Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu
 85 90 95

Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Ala Ile Asn Thr
 100 105 110

Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala
 115 120 125

Arg

<210> 38

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 四聚卷曲螺旋, 具有M2e B-细胞表位, 来自鸡流感病毒

<400> 38

Met Gly His His His His His Ala Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5 10 15

Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys Lys
 20 25 30

Cys Ser Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile Asp
 35 40 45

Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp Arg
 50 55 60

Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu Leu
65 70 75 80

Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu
 85 90 95

Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Ala Ile Asn Thr
 100 105 110

Val Asp Leu Glu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala
 115 120 125

Arg

[0019]

<210> 39
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 五聚卷曲螺旋, 具有HTL 表位

<400> 39

Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Glu Trp Glu Glu
 1 5 10 15

Lys Trp Lys Ile Trp Lys Ser Leu Trp Lys Ala Trp Arg Leu Leu Trp
 20 25 30

Met

<210> 40
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 三聚卷曲螺旋, 具有P. falciparum HTL
 表位

<400> 40

Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
 20 25 30

Val Leu Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg
 35 40 45

<210> 41
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 五聚卷曲螺旋, 具有色氨酸
 拉链和 三聚卷曲螺旋, 具有P. falciparum HTL 表位

<400> 41

Met Gly His His His His His Ala Ser Trp Lys Trp Asp Gly Gly
 1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln
 20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys
 35 40 45

[0020]

Asp Asp Trp Ala Phe Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu
50 55 60

Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys Lys
65 70 75 80

Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Leu Ala
 85 90 95

Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Gly Ser Gly Ala
 100 105 110

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
 115 120 125

<210> 42
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, HIV 疫苗, 具有 *P. falciparum* HTL 表位,
PADRE HTL 表位 和 GP41 B-细胞表位

<400> 42

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn
1 5 10 15

Trp Leu Trp Tyr Ile Arg Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp
20 25 30

Gln Trp Ala Lys Phe Ile Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Ala Trp
35 40 45

Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu
50 55 60

Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80

Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Leu
85 90 95

Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Pro Leu Asp Glu
100 105 110

Gly Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu
115 120 125

<210> 43
<211> 135
<212> PRT
<213> 人工序列

[0021]

<220>

<223> 合成构建体, HIV 疫苗, 具有P. falciparum HTL 表位,
PADRE HTL 表位 和 GP41 B-细胞表位

<400> 43

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn
1 5 10 15Trp Leu Trp Tyr Ile Arg Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp
20 25 30Gln Trp Ala Lys Phe Ile Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Ala Trp
35 40 45Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu
50 55 60Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Leu
85 90 95Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Lys Gly Pro Ala
100 105 110Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys
115 120 125Arg Lys Gly Gly Ile Gly Gly
130 135

<210> 44

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, HIV 疫苗, 具有P. falciparum HTL 表位,
PADRE HTL 表位 和 GP41 B-细胞表位

<400> 44

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

[0022]

Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80

Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Leu
 85 90 95

Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Ile Ile Gly Arg
 100 105 110

Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe Pro Ile Ser Pro
 115 120 125

Ile Glu Thr Val Pro Val
 130

<210> 45
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, HIV 疫苗, 具有P. falciparum HTL 表位,
PADRE HTL 表位 和 GP41 B-细胞表位

<400> 45

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn
1 5 10 15

Trp Leu Trp Tyr Ile Arg Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp
 20 25 30

Gln Trp Ala Lys Phe Ile Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Ala Trp
 35 40 45

Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu
 50 55 60

Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80

Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Leu
 85 90 95

Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Asp Phe Trp Glu
 100 105 110

Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser
 115 120 125

Val

[0023]

<210> 46
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, HIV 疫苗, 具有P. falciparum HTL 表位,
 PADRE HTL 表位 和 GP41 B-细胞表位

<400> 46

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn
 1 5 10 15

Trp Leu Trp Tyr Ile Arg Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp
 20 25 30

Gln Trp Ala Lys Phe Ile Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Ala Trp
 35 40 45

Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu
 50 55 60

Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys
 65 70 75 80

Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Leu
 85 90 95

Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Leu Thr Glu Glu
 100 105 110

Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile Leu Lys Asp Pro Val
 115 120 125

His Gly Val
 130

<210> 47
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, HIV 疫苗, 具有P. falciparum HTL 表位,
 PADRE HTL 表位 和 GP41 B-细胞表位

<400> 47

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn
 1 5 10 15

Trp Leu Trp Tyr Ile Arg Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp
 20 25 30

Gln Trp Ala Lys Phe Ile Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Ala Trp
 35 40 45

[0024]

Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu
50 55 60

Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80

Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Leu
85 90 95

Ala Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Leu Val Ser Gln
100 105 110

Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys
115 120 125

<210> 48

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 疟疾疫苗, 具有P. falciparum CTL
表位

<400> 48

Lys Pro Asn Asp Lys Ser Leu Tyr Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr
1 5 10 15

Glu Ala Lys Pro Ile Val Gln Tyr Asp Asn Phe Met Asn Gly Ser Glu
20 25 30

Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Glu Trp Glu Glu Lys
35 40 45

Trp Lys Ile Trp Lys Ser Leu Trp Lys Ala Trp Arg Leu Leu Trp Met
50 55 60

Gly Gly Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Met Glu Lys Leu Lys
65 70 75 80

Glu Leu Glu Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Glu Glu Leu His Ser Leu
85 90 95

Arg Lys Asn Leu Asn Ile Leu Asn Glu Glu Leu Glu Glu Leu Thr Arg
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Ala Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn
115 120 125

Pro Asn Ala Asn Pro
130

[0025]

<210> 49

<211> 137

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 疟疾疫苗, 具有P. falciparum CTL
表位

<400> 49

Ala Ser Lys Asn Lys Glu Lys Ala Leu Ile Ile Ala Ala Gly Ile Ala
1 5 10 15Gly Gly Leu Ala Leu Leu Arg Ser Leu Leu Met Asp Cys Ser Gly Ser
20 25 30Ile Gly Ser Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Glu
35 40 45Trp Glu Glu Lys Trp Lys Ile Trp Lys Ser Leu Trp Lys Ala Trp Arg
50 55 60Leu Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Met
65 70 75 80Glu Lys Leu Lys Glu Leu Glu Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Glu Glu
85 90 95Leu His Ser Leu Arg Lys Asn Leu Asn Ile Leu Asn Glu Glu Leu Glu
100 105 110Glu Leu Thr Arg Gly Gly Ser Gly Ala Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn
115 120 125Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
130 135

<210> 50

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 疟疾疫苗, 具有P. falciparum CTL
表位

<400> 50

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

Ser Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Glu Trp Glu

[0026]

35 40 45
 Glu Lys Trp Lys Ile Trp Lys Ser Leu Trp Lys Ala Trp Arg Leu Leu
 50 55 60

 Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Met Glu Lys
 65 70 75 80

 Leu Lys Glu Leu Glu Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Glu Glu Leu His
 85 90 95

 Ser Leu Arg Lys Asn Leu Asn Ile Leu Asn Glu Glu Leu Glu Glu Leu
 100 105 110

 Thr Arg Gly Gly Ser Gly Ala Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 115 120 125

 Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
 130 135

 <210> 51
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体, 疟疾疫苗, 具有 *P. falciparum* CTL
 表位

 <400> 51

 Met Ile Asn Ala Tyr Leu Asp Lys Leu Arg Ala Ile Ser Lys Tyr Glu
 1 5 10 15

 Asp Glu Ile Phe Ala His Leu Gly Asn Val Lys Tyr Leu Val Gly Ser
 20 25 30

 Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Glu Trp Glu Glu
 35 40 45

 Lys Trp Lys Ile Trp Lys Ser Leu Trp Lys Ala Trp Arg Leu Leu Trp
 50 55 60

 Met Gly Gly Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Met Glu Lys Leu
 65 70 75 80

 Lys Glu Leu Glu Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Glu Glu Leu His Ser
 85 90 95

 Leu Arg Lys Asn Leu Asn Ile Leu Asn Glu Glu Leu Glu Glu Leu Thr
 100 105 110

 Arg Gly Gly Ser Gly Ala Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 115 120 125

[0027]

Asn Pro Asn Ala Asn Pro
130

<210> 52
<211> 136
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 疟疾疫苗, 具有P. falciparum CTL
表位

<400> 52

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

Ser Leu Tyr Asp Glu His Ile Leu Leu Met Asp Cys Ser Gly Ser Ile
20 25 30

Gly Ser Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Glu Trp
35 40 45

Glu Glu Lys Trp Lys Ile Trp Lys Ser Leu Trp Lys Ala Trp Arg Leu
50 55 60

Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Met Glu
65 70 75 80

Lys Leu Lys Glu Leu Glu Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Glu Glu Leu
85 90 95

His Ser Leu Arg Lys Asn Leu Asn Ile Leu Asn Glu Glu Leu Glu Glu
100 105 110

Leu Thr Arg Gly Gly Ser Gly Ala Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
115 120 125

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
130 135

<210> 53
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 疟疾疫苗, 具有P. falciparum CTL
表位

<400> 53

Lys Ser Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Ala Ile Pro Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

[0028]

Met Leu Ile Met Pro Leu Glu Thr Gln Leu Ala Ile Gly Ser Glu Arg
20 25 30

Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Ala Glu Trp Glu Glu Lys Trp
35 40 45

Lys Ile Trp Lys Ser Leu Trp Lys Ala Trp Arg Leu Leu Trp Met Gly
50 55 60

Gly Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Met Glu Lys Leu Lys Glu
65 70 75 80

Leu Glu Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Glu Glu Leu His Ser Leu Arg
85 90 95

Lys Asn Leu Asn Ile Leu Asn Glu Glu Leu Glu Glu Leu Thr Arg Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Ala Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
115 120 125

Asn Ala Asn Pro
130

<210> 54
<211> 152
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
和 流感病毒CTL 表位

<400> 54

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
20 25 30

Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
35 40 45

Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
50 55 60

Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser
85 90 95

Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Arg Arg Leu Glu Glu Leu

[0029]

100 105 110
 Glu Ala Arg Val Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu Gln Ala Tyr
 115 120 125

 Gln Lys Arg Met Gly Val Leu Lys Met Pro Ala Ser Arg Tyr Leu Ser
 130 135 140

 Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu
 145 150

 <210> 55
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
 和 流感病毒CTL 表位

 <400> 55

 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

 Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
 20 25 30

 Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
 35 40 45

 Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
 50 55 60

 Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
 65 70 75 80

 Leu Glu Glu Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser
 85 90 95

 Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Arg Arg Leu Glu Glu Leu
 100 105 110

 Glu Ala Arg Val Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val Met Arg Met
 115 120 125

 Gly Asp Phe His Ser Leu Tyr Leu Leu Ala Trp Lys Gln Val Leu
 130 135 140

 <210> 56
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>

[0030]

<223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
和 流感病毒CTL 表位

<400> 56

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
20 25 30

Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
35 40 45

Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
50 55 60

Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser
85 90 95

Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Arg Arg Leu Glu Glu Leu
100 105 110

Glu Ala Arg Val Ala Pro Ile Glu His Ile Ala Ser Met Arg Arg Asn
115 120 125

Tyr Phe Thr Ala Glu Val Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu
130 135 140

<210> 57

<211> 143

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
和 流感病毒CTL 表位

<400> 57

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
20 25 30

Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
35 40 45

Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
50 55 60

[0031]

Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser
85 90 95

Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Arg Arg Leu Glu Glu Leu
100 105 110

Glu Ala Arg Val Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Val Gly Thr
115 120 125

Met Val Met Glu Leu Ile Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val
130 135 140

<210> 58

<211> 144

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
和 流感病毒CTL 表位

<400> 58

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
20 25 30

Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
35 40 45

Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
50 55 60

Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser
85 90 95

Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Arg Arg Leu Glu Glu Leu
100 105 110

Glu Ala Arg Val Arg Leu Ile Asp Phe Leu Lys Asp Val Met Gln Ile
115 120 125

Arg Gly Phe Val Tyr Phe Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu
130 135 140

<210> 59

[0032]

<211> 152
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
 和 流感病毒CTL 表位

 <400> 59

 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

 Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
 20 25 30

 Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
 35 40 45

 Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
 50 55 60

 Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
 65 70 75 80

 Leu Glu Glu Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser
 85 90 95

 Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Arg Arg Leu Glu Glu Leu
 100 105 110

 Glu Ala Arg Val Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Val Ala Tyr
 115 120 125

 Met Leu Glu Arg Glu Leu Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys Val
 130 135 140

 Arg Asp Gln Arg Gly Asn Val Leu
 145 150

 <210> 60
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
 和 其他流感病毒B-细胞表位

 <400> 60

 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

 Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
 20 25 30

[0033]

Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
 35 40 45

Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
 50 55 60

Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Arg
 85 90 95

Glu Val Glu Arg Glu Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala
 100 105 110

Phe Leu Glu Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg
 115 120 125

Gly Leu Phe Gly Asp Glu Arg Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly
 130 135 140

<210> 61
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
 和其他流感病毒B-细胞表位

<400> 61

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
 20 25 30

Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
 35 40 45

Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
 50 55 60

Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Arg
 85 90 95

Glu Val Glu Arg Glu Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala
 100 105 110

[0034]

Phe Leu Glu Arg Lys Thr Arg Gly Leu Phe Gly Asp Pro Lys Gly Arg
 115 120 125

Gly Leu Phe Gly Asp Gln Ile Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly
 130 135 140

<210> 62
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 流感病毒疫苗, 具有B-细胞表位 M2e
 和其他流感病毒B-细胞表位

<400> 62

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Arg Leu Thr Val Ile Ile
 20 25 30

Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala Asp
 35 40 45

Arg Leu Glu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Leu Arg Ala Leu
 50 55 60

Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Ala Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Val Arg
 85 90 95

Glu Val Glu Arg Glu Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala
 100 105 110

Phe Leu Glu Lys Lys Gly Arg Gly Leu Phe Gly Asp Ala Ser Tyr Arg
 115 120 125

Gly Leu Phe Gly Asp Lys Arg Glu Lys Arg Gly Leu Phe Gly
 130 135 140

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 人工抗微生物的肽

<400> 63

Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys
 1 5 10

[0035]

<210> 64
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, tetrabrachion的四聚卷曲螺旋

<400> 64

Ile Ile Asn Glu Thr Ala Asp Asp Ile Val Tyr Arg Leu Thr Val Ile
 1 5 10 15

Ile Asp Asp Arg Tyr Glu Ser Leu Lys Asn Leu Ile Thr Leu Arg Ala
 20 25 30

Asp Arg Leu Met Ile Ile Asn Asp Asn Val Ser Thr Ile Leu Ala Ser
 35 40 45

Gly

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 疟原虫

<400> 65

Gly Asp Arg Ala Ala Gly Gln Pro Ala
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 疟原虫

<400> 66

Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln Pro Ala
 1 5

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 疟原虫

<400> 67

Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln Ala Ala
 1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 疟原虫

<400> 68

Gly Asn Gly Ala Gly Gly Gln Pro Ala

[0036]

1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 疟原虫

<400> 69

Gly Asp Gly Ala Ala Gly Gln Pro Ala
 1 5

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 疟原虫

<400> 70

Gly Asp Arg Ala Ala Gly Gln Ala Ala
 1 5

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 疟原虫

<400> 71

Gly Asn Gly Ala Gly Gly Gln Ala Ala
 1 5

<210> 72
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 72

Ile Lys Thr Met Asn Thr Gln Ile Ser Thr Leu Lys Asn Asp Val His
 1 5 10 15

Leu Leu Asn Glu Gln Ile Asp Lys Leu Asn Asn Glu Lys Gly Thr Leu
 20 25 30

Asn Ser Lys Ile Ser Glu Leu Asn Val Gln Ile Met Asp Leu
 35 40 45

<210> 73
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 73

Leu Leu Ser Lys Asp Lys Glu Ile Glu Glu Lys Asn Lys Lys Ile Lys
 1 5 10 15

Glu Leu Asn Asn Asp Ile Lys Lys Leu
 20 25

[0037]

<210> 74
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 74
 Ile Cys Ser Leu Thr Thr Glu Val Met Glu Leu Asn Asn Lys Lys Asn
 1 5 10 15

 Glu Leu Ile Glu Glu Asn Asn Lys Leu Asn Leu Val Asp Gln Gly Lys
 20 25 30

 Lys Lys Leu Lys Lys Asp Val Glu Lys Gln Lys Lys Glu Ile Glu Lys
 35 40 45

 Leu

 <210> 75
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 75
 Val Asp Lys Ile Glu Glu His Ile Leu Asp Tyr Asp Glu Glu Ile Asn
 1 5 10 15

 Lys Ser Arg Ser Asn Leu Phe Gln Leu Lys Asn Glu Ile Cys Ser Leu
 20 25 30

 Thr Thr Glu Val Met Glu Leu Asn Asn Lys Lys Asn Glu Leu Ile Glu
 35 40 45

 Glu Asn Asn Lys Leu Asn Leu Val Asp Gln Gly Lys Lys Lys Leu Lys
 50 55 60

 Lys Asp Val Glu Lys Gln Lys Lys Glu Ile Glu Lys Leu
 65 70 75

 <210> 76
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 76
 Leu Asp Glu Asn Glu Asp Asn Ile Lys Lys Met Lys Ser Lys Ile Asp
 1 5 10 15

 Asp Met Glu Lys Glu Ile Lys Tyr Arg
 20 25

 <210> 77

[0038]

<211> 41
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 77

Gly Met Asn Asn Met Asn Gly Asp Ile Asn Asn Ile Asn Gly Asp Ile
 1 5 10 15

Asn Asn Met Asn Gly Asp Ile Asn Asn Met Asn Gly Asp Ile Asn Asn
 20 25 30

Met Asn Gly Asp Ile Asn Asn Met Asn
 35 40

<210> 78
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 78

Lys Lys Arg Asn Val Glu Glu Glu Leu His Ser Leu Arg Lys Asn Tyr
 1 5 10 15

Asn Ile Ile Asn Glu Glu Ile Glu Glu Ile Thr
 20 25

<210> 79
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 79

Glu Glu Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Val Lys Glu Glu Ile Lys Glu
 1 5 10 15

Val Lys Glu Glu Ile Lys Glu Val Lys Glu Glu Ile Lys Glu Val Lys
 20 25 30

Glu Glu Ile Lys Glu
 35

<210> 80
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 80

Lys Asn Asp Ile Asn Val Gln Leu Asp Asp Ile Asn Val Gln Leu Asp
 1 5 10 15

Asp Ile Asn Val Gln Leu Asp Asp Ile Asn Ile Gln Leu Asp Glu Ile
 20 25 30

Asn Leu Asn

[0039]

35

<210> 81
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 81

Lys Ile Gln Ile Glu Glu Ile Lys Lys Glu Thr Asn Gln Ile Asn Lys
 1 5 10 15

Asp Ile Asp His Ile Glu Met Asn Ile Ile Asn Leu Lys Lys Lys Ile
 20 25 30

Glu Phe

<210> 82
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 82

Asp Ser Met Asn Asn His Lys Asp Asp Met Asn Asn Tyr Asn Asp Asn
 1 5 10 15

Ile Asn Asn Tyr Val Glu Ser Met Asn Asn Tyr Asp Asp Ile Met Asn
 20 25 30

Lys

<210> 83
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 83

Met Cys Glu Leu Asn Val Met Glu Asn Asn Met Asn Asn Ile His Ser
 1 5 10 15

Asn Asn Asn Asn Ile Ser Thr His Met Asp Asp Val Ile Glu
 20 25 30

<210> 84
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 84

Lys Glu Ile Gln Met Leu Lys Asn Gln Ile Leu Ser Leu Glu Glu Ser
 1 5 10 15

Ile Lys Ser Leu Asn Glu Phe Ile Asn Asn Leu Lys Asn

[0040]

20 25

<210> 85
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 85

Gly Gly Leu Lys Asn Ser Asn His Asn Leu Asn Asn Ile Glu Met Lys
 1 5 10 15

Tyr Asn Thr Leu Asn Asn Asn Met Asn Ser Ile Asn Lys
 20 25

<210> 86
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 86

Glu Lys Leu Lys Lys Tyr Asn Asn Glu Ile Ser Ser Leu Lys Lys Glu
 1 5 10 15

Leu Asp Ile Leu Asn Glu Lys Met Gly Lys Cys Thr
 20 25

<210> 87
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 87

Glu Lys Met Asn Met Lys Met Glu Gln Met Asp Met Lys Met Glu Lys
 1 5 10 15

Ile Asp Val Asn Met Asp Gln Met Asp Val Lys Met Glu Gln Met Asp
 20 25 30

Val Lys Met Glu Gln Met Asp Val Lys Met Lys Arg Met Asn Lys
 35 40 45

<210> 88
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 88

Lys Asn Lys Leu Asn Lys Lys Trp Glu Gln Ile Asn Asp His Ile Asn
 1 5 10 15

Asn Leu Glu Thr Asn Ile Asn Asp Tyr Asn Lys Lys Ile Lys Glu Gly
 20 25 30

Asp Ser Gln Leu Asn Asn Ile Gln Leu Gln Cys Glu Asn Ile Glu Gln

[0041]

35 40 45

Lys Ile Asn Lys Ile Lys Glu
50 55

<210> 89
<211> 54
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 89

Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Asn Lys Met Asn Glu Glu Val Asn Lys
1 5 10 15

Met Asn Glu Glu Val Asn Lys Met Asn Glu Glu Val Asn Lys Met Asn
20 25 30

Lys Glu Val Asn Lys Met Asp Glu Glu Val Asn Lys Met Asn Lys Glu
35 40 45

Val Asn Lys Met Asn Lys
50

<210> 90
<211> 70
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 90

Gln Asn Lys Met Glu Asn Asp Met Asn Ile Ile Lys Asn Asp Met Asn
1 5 10 15

Ile Met Glu Asn Asp Met Asn Ile Met Glu Asn Asp Met Asn Ile Ile
20 25 30

Lys Asn Asp Met Asn Ile Met Glu Lys Asp Met Asn Ile Ile Lys Asn
35 40 45

Asp Met Asn Ile Ile Lys Asn Asn Met Asn Ile Ile Lys Asn Glu Met
50 55 60

Asn Ile Ile Lys Asn Val
65 70

<210> 91
<211> 38
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 91

Thr Lys Lys Leu Asn Lys Glu Leu Ser Glu Gly Asn Lys Glu Leu Glu
1 5 10 15

[0042]

Lys Leu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Leu Glu Glu Thr Asn Asn Thr Leu
20 25 30

Glu Asn Asp Ile Lys Val
35

<210> 92
<211> 31
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 92

Glu Asn Ile Asn Asn Met Asp Glu Lys Ile Asn Asn Val Asp Glu Gln
1 5 10 15

Asn Asn Asn Met Asp Glu Lys Ile Asn Asn Val Asp Glu Lys Lys
20 25 30

<210> 93
<211> 27
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 93

Ala Arg Asp Asp Ile Gln Lys Asp Ile Asn Lys Met Glu Ser Glu Leu
1 5 10 15

Ile Asn Val Ser Asn Glu Ile Asn Arg Leu Asp
20 25

<210> 94
<211> 22
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 94

Glu Lys Lys Leu Asp Ile Leu Lys Val Asn Ile Ser Asn Ile Asn Asn
1 5 10 15

Ser Leu Asp Lys Leu Lys
20

<210> 95
<211> 39
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 95

Asn Ser Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Val Ile Ile Lys Leu Lys Asn Asn
1 5 10 15

Ile Asn Asn Met Glu Glu Tyr Thr Asn Asn Ile Thr Asn Asp Ile Asn
20 25 30

[0043]

Val Leu Lys Ala His Ile Asp
35

<210> 96
<211> 36
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 96

Pro Asp Phe Asp Ala Tyr Asn Glu Lys Leu Gly Ser Ile Ser Gln Ser
1 5 10 15

Ile Asp Glu Ile Lys Lys Lys Ile Asp Asn Leu Gln Lys Glu Ile Lys
20 25 30

Val Ala Asn Lys
35

<210> 97
<211> 35
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 97

Gln Leu Glu Glu Lys Thr Lys Gln Tyr Asn Asp Leu Gln Asn Asn Met
1 5 10 15

Lys Thr Ile Lys Glu Gln Asn Glu His Leu Lys Asn Lys Phe Gln Ser
20 25 30

Met Gly Lys
35

<210> 98
<211> 25
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 98

Ile Ile Asp Ile Lys Lys His Leu Glu Lys Leu Lys Ile Glu Ile Lys
1 5 10 15

Glu Lys Lys Glu Asp Leu Glu Asn Leu
20 25

<210> 99
<211> 15
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 99

Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe Leu Phe Val
1 5 10 15

[0044]

<210> 100
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 100

Leu Val Asn Leu Leu Ile Phe His Ile Asn Gly Lys Ile Ile Lys Asn
 1 5 10 15

Ser

<210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 101

Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser Leu Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 102
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 102

Arg His Asn Trp Val Asn His Ala Val Pro Leu Ala Met Lys Leu Ile
 1 5 10 15

<210> 103
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 103

Val Lys Asn Val Ile Gly Pro Phe Met Lys Ala Val Cys Val Glu
 1 5 10 15

<210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 104

Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ser Ile Gly Leu Ile Met
 1 5 10 15

<210> 105
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

<400> 105

Ala Gly Leu Leu Gly Asn Val Ser Thr Val Leu Leu Gly Gly Val
 1 5 10 15

[0045]

<210> 106
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 106

 Lys Ser Lys Tyr Lys Leu Ala Thr Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 107
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 107

 Gly Leu Ala Tyr Lys Phe Val Val Pro Gly Ala Ala Thr Pro Tyr
 1 5 10 15

<210> 108
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 108

 His Asn Trp Val Asn His Ala Val Pro Leu Ala Met Lys Leu Ile
 1 5 10 15

<210> 109
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 109

 Lys Tyr Lys Ile Ala Gly Gly Ile Ala Gly Gly Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 110
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 110

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

Val

<210> 111
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 镰状疟原虫

 <400> 111

[0046]

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro
1 5 10 15

Cys Ser Val Thr
20

<210> 112
<211> 8
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 112

Lys Pro Asn Asp Lys Ser Leu Tyr
1 5

<210> 113
<211> 8
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 113

Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 114

Lys Pro Ile Val Gln Tyr Asp Asn Phe
1 5

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 115

Ala Ser Lys Asn Lys Glu Lys Ala Leu Ile Ile
1 5 10

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 116

Gly Ile Ala Gly Gly Leu Ala Leu Leu
1 5

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

[0047]

<400> 117

Met Asn Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val
1 5 10

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> 镰状疟原虫

<400> 118

Met Ile Asn Ala Tyr Leu Asp Lys Leu
1 5

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> 镰状疟原虫

<400> 119

Ile Ser Lys Tyr Glu Asp Glu Ile
1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> 镰状疟原虫

<400> 120

His Leu Gly Asn Val Lys Tyr Leu Val
1 5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> 镰状疟原虫

<400> 121

Lys Ser Leu Tyr Asp Glu His Ile
1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 镰状疟原虫

<400> 122

Leu Leu Met Asp Cys Ser Gly Ser Ile
1 5

<210> 123

<211> 8

<212> PRT

<213> 镰状疟原虫

<400> 123

[0048]

Lys Ser Lys Asp Glu Leu Asp Tyr
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 124

Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Leu Ile
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 125

Met Pro Leu Glu Thr Gln Leu Ala Ile
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 126

Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 127

Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 128

Met Glu Lys Leu Lys Glu Leu Glu Lys
1 5

<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> 镰状疟原虫

<400> 129

Ala Thr Ser Val Leu Ala Gly Leu
1 5

[0049]

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 130

Pro Leu Asp Glu Gly Phe Arg Lys Tyr
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 131

Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 132

Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 133

Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 134

Ile Leu Lys Asp Pro Val His Gly Val
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 135

Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile
1 5

[0050]

<210> 136
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 136

Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile
 1 5 10

<210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 137

Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys
 1 5

<210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 138

Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys
 1 5

<210> 139
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 139

Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg
 1 5

<210> 140
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 140

His Asn Phe Lys Arg Lys Gly Gly Ile
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 141

Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met Arg
 1 5

<210> 142
 <211> 9

[0051]

<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 142

Ser Asp Ile Lys Val Val Pro Arg Arg
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 143

Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile
1 5

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 144

Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu
1 5

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 145

Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu Gly Phe
1 5

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 146

Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg
1 5

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 147

Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

[0052]

<400> 148

Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys
1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 149

Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg
1 5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 150

Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg
1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 151

Trp Gln Val Met Ile Val Trp Gln Val
1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 152

Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile
1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 153

Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys
1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 154

[0053]

Leu Lys Asp Pro Val His Gly Val Tyr
1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 155

Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 156

Thr Leu Asn Phe Pro Ile Ser Pro Ile
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 157

Phe Lys Arg Lys Gly Gly Ile Gly Gly
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 158

Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile
1 5

<210> 159
<211> 10
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 159

Glu Ile Leu Lys Asp Pro Val His Gly Val
1 5 10

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 160

Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys

[0054]

1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 161

Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly
1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 162

Ser Gln Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 163

Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln His Arg
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 164

Leu Val Ser Gln Gly Ile Arg Lys Val
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 165

Gln Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 166

Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu
1 5

[0055]

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 167

Phe Thr Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu
1 5

<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 168

Phe Lys Arg Lys Gly Gly Ile Gly Gly
1 5

<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 169

Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys
1 5

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 170

Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu
1 5

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 171

Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys
1 5

<210> 172
<211> 10
<212> PRT
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 172

Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Ile Asn
1 5 10

<210> 173

[0056]

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 173

Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile
 1 5

<210> 174
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 174

Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu
 1 5

<210> 175
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 175

Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile
 1 5

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 176

Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val
 1 5

<210> 177
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 177

Met Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met
 1 5

<210> 178
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 178

Phe Pro Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val
 1 5

<210> 179
 <211> 9
 <212> PRT

[0057]

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 179

Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val
1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 180

Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys
1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 181

Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val
1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 182

Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His
1 5

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 183

Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys
1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 184

Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys
1 5

<210> 185

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

[0058]

<400> 185

Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg
1 5

<210> 186

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 186

Ser Asp Ile Lys Val Val Pro Arg Arg
1 5

<210> 187

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 187

Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu
1 5

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 188

Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met
1 5

<210> 189

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 189

Pro Leu Asp Glu Gly Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser
1 5 10 15

Ile Asn Asn Glu
20

<210> 190

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 190

Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg Lys Gly Gly Ile Gly Gly

[0059]

1 5 10 15

<210> 191
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 191

Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe
1 5 10 15

Pro Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val
 20 25

<210> 192
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 192

Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys Ser Val
 20

<210> 193
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 193

Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile Leu
1 5 10 15

Lys Asp Pro Val His Gly Val
 20

<210> 194
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 194

Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val

[0060]

1 5 10

<210> 195
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 195

Leu Val Ser Gln Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp
 1 5 10 15

Lys

<210> 196
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 196

Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro
 1 5 10 15

Val Ser Ile Leu Asp Ile
 20

<210> 197
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 197

Trp Gln Val Met Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met Arg
 1 5 10

<210> 198
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 198

Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys
 1 5 10

<210> 199

[0061]

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 199

Ser Asp Ile Lys Val Val Pro Arg Arg
 1 5

<210> 200
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 200

Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile
 1 5

<210> 201
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 201

Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys
 1 5

<210> 202
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合HIV CTL 表位

<400> 202

Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln His Arg
 1 5 10

<210> 203
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 203

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Pro
 20

[0062]

<210> 204
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 204

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp Pro
 20

<210> 205
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 205

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

Lys Cys Asn Asp Ser Ser Asp Pro
 20

<210> 206
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 206

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro
 20

<210> 207
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 207

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys
 1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro
 20

<210> 208
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 208

[0063]

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Lys Cys Arg Asp Ser Ser Asp Pro
20

<210> 209
<211> 24
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 209

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys
1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp Pro
20

<210> 210
<211> 24
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 210

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys
1 5 10 15

Arg Cys Ser Gly Ser Ser Asp Pro
20

<210> 211
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 211

Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 212
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 212

Gln Ile Glu Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 213
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 213

[0064]

Glu Arg Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 214
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 214

Glu Lys Ala Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 215
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 215

Lys Arg Lys Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 216
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 216

Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 217
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 217

Gln Ile Ala Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 218
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 218

Ile Pro Lys Gly Arg Gly Leu Phe Gly Ala
1 5 10

<210> 219
<211> 10
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 219

Lys Lys Lys Gly Arg Gly Leu Phe Gly Ala
1 5 10

[0065]

<210> 220
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 220

Lys Arg Glu Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala
 1 5 10

<210> 221
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 221

Ser Ile Glu Pro Lys Gly Leu Phe Gly Ala
 1 5 10

<210> 222
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 222

Ala Ala Ser Tyr Arg Gly Leu Phe Gly Ala
 1 5 10

<210> 223
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 223

Ile Ile Gln Gly Arg Gly Leu Phe Gly Ala
 1 5 10

<210> 224
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 224

Ala Ile Ala Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala
 1 5 10

<210> 225
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 225

Ala Ile Ser Asn Arg Gly Leu Phe Gly Ala
 1 5 10

[0066]

<210> 226
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 流感病毒B病毒

<400> 226

Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala
 1 5 10

<210> 227
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体, 组合甲型流感病毒 B-细胞表位

<400> 227

Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Asp Ile Glu Ser Arg Gly Leu
 1 5 10 15

Phe Gly Glu Arg Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly
 20 25

<210> 228
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 228

Ile Arg His Glu Asn Arg Met Val Leu
 1 5

<210> 229
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 229

Gln Ala Tyr Gln Lys Arg Met Gly Val
 1 5

<210> 230
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 230

Leu Lys Met Pro Ala Ser Arg Tyr Leu
 1 5

<210> 231
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒

<400> 231

[0067]

Ser Arg Tyr Leu Thr Asp Met Thr Leu
1 5

<210> 232
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 232

Phe Met Leu Met Pro Lys Gln Lys Val
1 5

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 233

Met Arg Met Gly Asp Phe His Ser Leu
1 5

<210> 234
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 234

Tyr Leu Leu Ala Trp Lys Gln Val Leu
1 5

<210> 235
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 235

Ala Pro Ile Glu His Ile Ala Ser Met
1 5

<210> 236
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 236

Arg Arg Asn Tyr Phe Thr Ala Glu Val
1 5

<210> 237
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 237

Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu

[0068]

1 5

<210> 238
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 238

Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 239

Val Gly Thr Met Val Met Glu Leu Ile
1 5

<210> 240
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 240

Asn Pro Thr Leu Leu Phe Leu Lys Val
1 5

<210> 241
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 241

Arg Leu Ile Asp Phe Leu Lys Asp Val
1 5

<210> 242
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 242

Met Gln Ile Arg Gly Phe Val Tyr Phe
1 5

<210> 243
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 243

Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg
1 5

[0069]

<210> 244
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 244

Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu
1 5

<210> 245
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 245

Glu Arg Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu
1 5

<210> 246
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 246

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu
1 5

<210> 247
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 247

Leu Arg His Phe Gln Lys Asp Ala Lys
1 5

<210> 248
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<400> 248

Val Arg Asp Gln Arg Gly Asn Val Leu
1 5

<210> 249
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 249

Lys Cys Asp Ile Cys Thr Asp Glu Tyr
1 5

<210> 250

[0070]

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 250

Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
1 5

<210> 251
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 251

Met Leu Leu Ala Tyr Leu Tyr Gln Leu
1 5

<210> 252
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 252

Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe
1 5

<210> 253
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 253

Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 254
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 254

Ser Glu Ile Trp Arg Asp Ile Asp Phe
1 5

<210> 255
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 255

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
1 5

<210> 256
<211> 9
<212> PRT

[0071]

<213> 智人

<400> 256

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210> 257

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 257

Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 258

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 258

Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val
1 5 10

<210> 259

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 259

Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu
1 5 10

<210> 260

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 260

Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys
1 5

<210> 261

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 261

Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
1 5

<210> 262

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

[0072]

<400> 262

Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys
1 5

<210> 263

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 263

Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys
1 5

<210> 264

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 264

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

<210> 265

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 265

Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu
1 5

<210> 266

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 266

Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg
1 5

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 267

Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
1 5

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 268

[0073]

Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5

<210> 269
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 269

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
1 5

<210> 270
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 270

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 271
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 271

Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
1 5 10

<210> 272
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 272

Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
1 5

<210> 273
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 273

Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val
1 5

<210> 274
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 274

Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val
1 5

[0074]

<210> 275
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 275

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr
1 5

<210> 276
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 276

Ser Leu Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys
1 5

<210> 277
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 277

Ser Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Lys Leu
1 5

<210> 278
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 278

Lys Met Val Glu Leu Val His Phe Leu
1 5

<210> 279
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 279

Tyr Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Val
1 5 10

<210> 280
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 280

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
1 5

[0075]

<210> 281
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 281

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 282
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 282

Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
1 5 10

<210> 283
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 283

Ala Ala Arg Ala Val Phe Leu Ala Leu
1 5

<210> 284
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 284

Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
1 5

<210> 285
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 285

Val Leu Pro Asp Val Phe Ile Arg Cys
1 5

<210> 286
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 286

Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr
1 5

<210> 287
<211> 9

[0076]

<212> PRT
<213> 智人

<400> 287

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
1 5

<210> 288
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 288

Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg
1 5 10

<210> 289
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 289

Gln Asp Leu Thr Met Lys Tyr Gln Ile Phe
1 5 10

<210> 290
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 290

Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu
1 5

<210> 291
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 291

Glu Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu
1 5 10

<210> 292
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 292

Ser Tyr Leu Asp Ser Gly Ile His Phe
1 5

<210> 293
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

[0077]

<400> 293

Glu Thr Val Ser Glu Gln Ser Asn Val
1 5

<210> 294

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 294

Phe Pro Ser Asp Ser Trp Cys Tyr Phe
1 5

<210> 295

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 295

Glu Glu Lys Leu Ile Val Val Leu Phe
1 5

<210> 296

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体, pan-DR 表位 PADRE

<400> 296

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

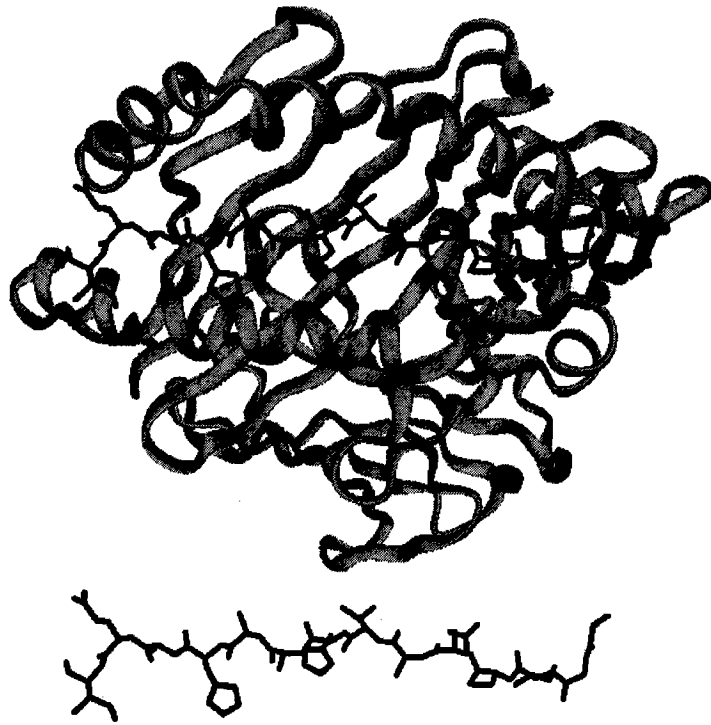


图 1

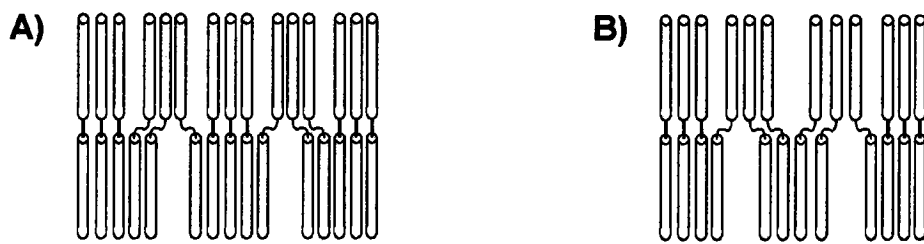


图 2

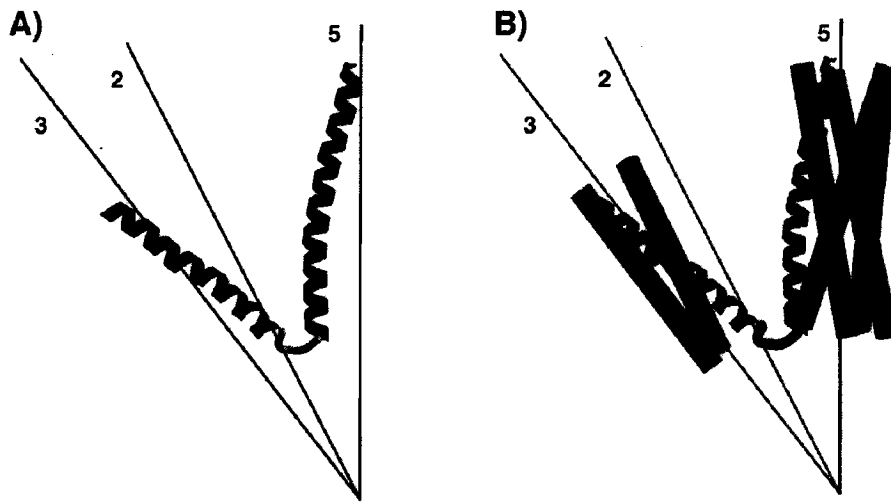


图 3

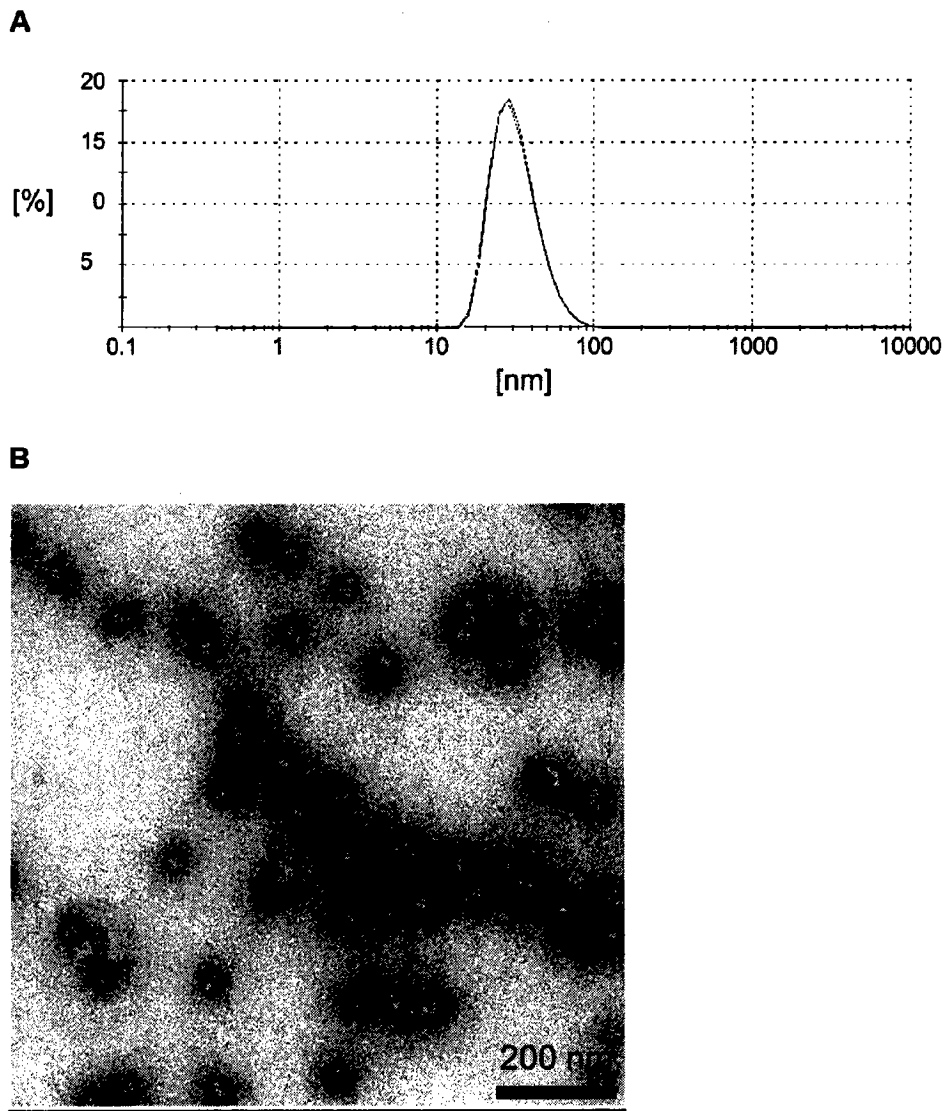


图 4

A (P5c-6-CSP)

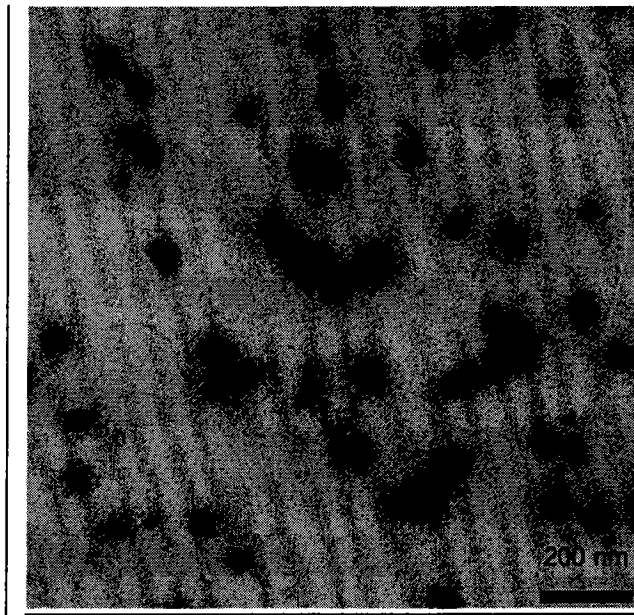


图 5

A (T1c-7-CSP)

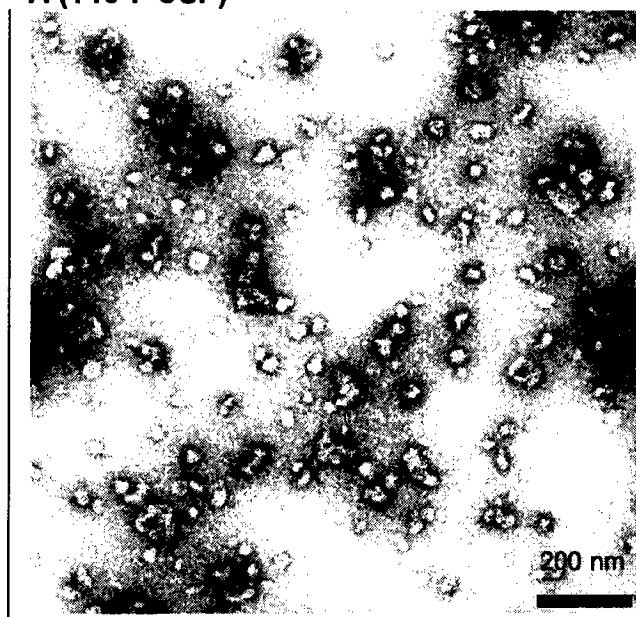
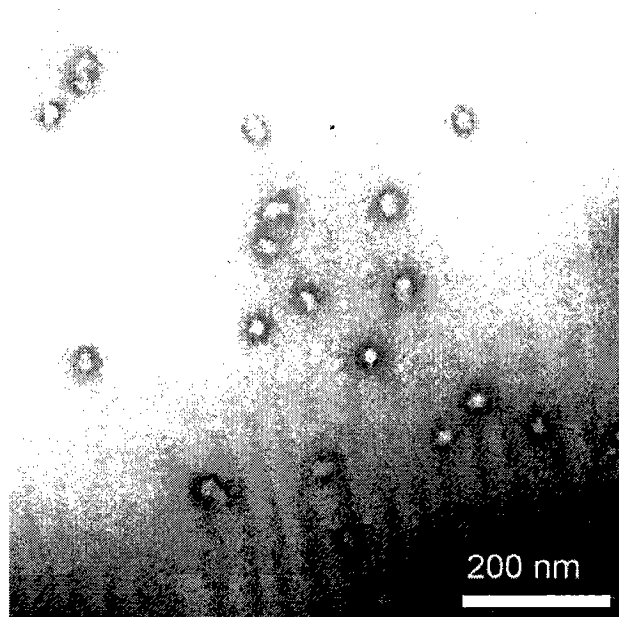


图 6

A (BN5c-M2eN-CTL)



B (BN5c-M2eN-ctl_CH)

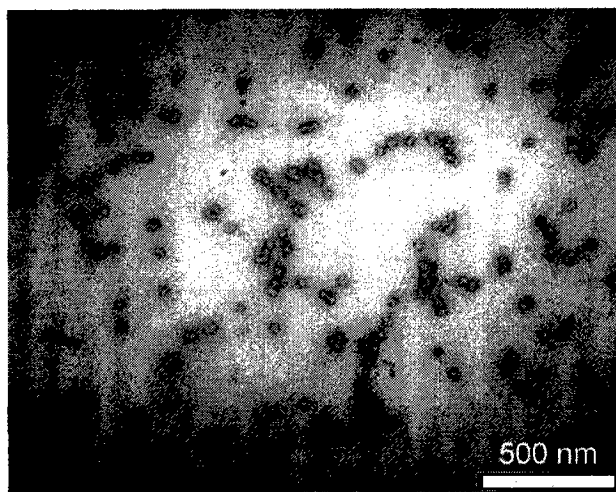


图 7

A (T811c-9-Pf)

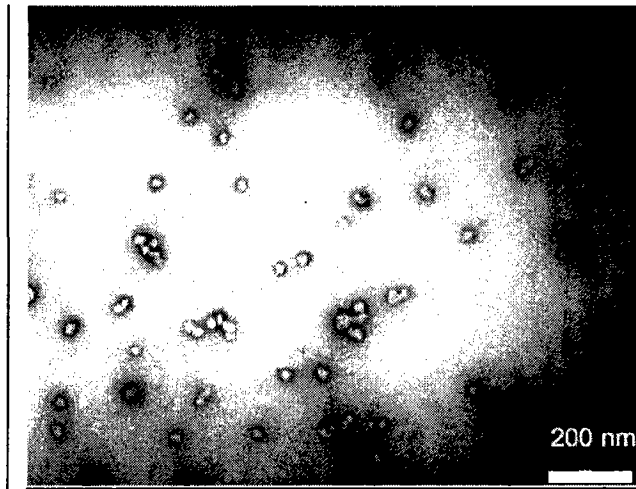


图 8