



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95192262.9

[43]公开日 1997 年 5 月 7 日

[11] 公开号 CN 1149257A

[22]申请日 95.3.21

[30]优先权

[32]94.3.24 [33]US[31]08 / 217,188

[86]国际申请 PCT / US95 / 03535 95.3.21

[87]国际公布 WO95 / 25530 英 95.9.28

[85]进入国家阶段日期 96.9.24

[71]申请人 路德维格癌症研究所

地址 美国纽约州

共同申请人 莱顿大学

[72]发明人 科尼利斯·J·M·梅利夫

M·W·威塞伦 W·M·凯斯特

皮埃尔·范德布鲁根

蒂尔瑞·博恩-法勒尔

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘国平

权利要求书 2 页 说明书 34 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 分离的肿瘤排斥抗原前体 MAGE-2 衍生的肽及其应用

[57]摘要

本发明描述了源于肿瘤排斥抗原前体 MAGE-2 的肽。这些肽与 HL A-A2 分子结合,并呈递能引起胞溶性 T 细胞的产生的复合物。由此产生的“CTLs”特异于 HL A-A2 和肽的复合物,该复合物可用于产生单克隆抗体。产生的胞溶性 T 细胞可用于免疫治疗,如过继转移。

权 利 要 求 书

1、分离的肽, 选自如下一组: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, EY SEQ ID NO: 11。

2、如权利要求1所述的分离的肽, 命名为SEQ ID NO: 1。

3、如权利要求1所述的分离的肽, 命名为SEQ ID NO: 6。

4、如权利要求1所述的分离的肽, 命名为SEQ ID NO: 9。

5、HLA-A2 和权利要求1分离的肽的分离的复合物。

6、如权利要求5所述的分离的复合物, 其中所述的肽被命名为SEQ ID NO: 1。

7、如权利要求5所述的分离的复合物, 其中所述的肽被命名为SEQ ID NO: 6。

8、如权利要求5所述的分离的复合物, 其中所述的肽被命名为SEQ ID NO: 9。

9、分离的胞溶性T 细胞克隆, 其特异于HLA-A2 和选自如下一组的肽形成的复合物: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 及 SEQ ID NO: 11。

10、如权利要求9所述的分离的胞溶性T 细胞克隆, 其中所述的肽是SEQ ID NO: 1。

1 1、如权利要求9 所述的分离的胞溶性T 细胞克隆，其中所述的肽是S E Q I D NO: 6。

1 2、如权利要求9 所述的分离的胞溶性T 细胞克隆，其中所述的肽是S E Q I D NO: 9。

1 3、单克隆抗体，其特异地结合H L A - A 2 与选自如下一组的肽形成的复合物: S E Q I D NO: 1, S E Q I D NO: 2, S E Q I D NO: 3, S E Q I D NO: 3, S E Q I D NO: 4, S E Q I D NO: 5, S E Q I D NO: 6, S E Q I D NO: 7, S E Q I D NO: 8, S E Q I D NO: 9, S E Q I D NO: 10 及S E Q I D NO: 11。

1 4、如权利要求1 3 所述的单克隆抗体，其中所述的肽是S E Q I D NO: 1。

1 5、如权利要求1 3 所述的单克隆抗体，其中所述的肽是S E Q I D NO: 6。

1 6、如权利要求1 3 所述的单克隆抗体，其中所述的肽是S E Q I D NO: 9

1 7、治疗患有癌症疾病的患者的方法，所述的疾病的特征在于在其表面呈递由H L A - A 2 及选自S E Q I D NOS 1 - 1 1 的肽分子形成的复合物的癌细胞，所述的方法包括给予患者足以溶解所述的癌细胞的量的如权利要求9 所述的胞溶性T 细胞克隆。

1 8、如权利要求1 7 所述的方法，其中所述的肽是S E Q I D NO: 1。

1 9、如权利要求1 7 所述方法，其中所述的肽是S E Q I D NO: 6。

2 0、如权利要求1 7 所述的方法，其中所述的肽是S E Q I D NO: 9。

分离的肿瘤排斥抗原前体MAGE - 2 衍生的肽及其应用

发明领域

本发明涉及免疫遗传学和肽化学, 尤其涉及在各方面用途广泛的九肽, 包括作为免疫原及HLA - A2 分子的配位体。更具体地, 本发明涉及所谓的“肿瘤排斥抗原”, 它来源于MAGE - 2 基因编码的肿瘤排斥抗原前体并由MHC I 类分子HLA - A2 所呈递。

背景和现有技术

有关癌细胞被宿主有机体识别或是这种识别作用的丧失的研究已在许多不同的方向上开展起来。对该领域的了解意味着对基础的免疫学及肿瘤学的一些了解。

在小鼠肿瘤方面的早期研究揭示出, 这些被呈递的分子能够在把肿瘤细胞移植到同源动物体内时导致对这些肿瘤细胞的排斥作用。这些分子被受体动物的T - 细胞“识别”, 唤起一种细胞溶解性T - 细胞反应, 将移植的细胞溶解。这一证据的第一次获得是在体外用化学致癌物质, 例如甲基胆蒽诱发的肿瘤中。后来发现由肿瘤所表达的能引起T - 细胞反应的抗原在每种肿瘤中是不同的。见以下有关讲授用化学致癌物诱发肿瘤及细胞表面抗原差异的文献: Prehn, et al., J. Natl. Canc. Inst. 18: 769 - 778 (1957); Klein et al., Cancer Res. 20: 1561 - 1572 (1960); Gross, Cancer Res. 3: 326 - 333 (1943); Basombrio, Cancer Res. 30: 2458 - 2462 (1970)。这一类抗原后来被称作“肿瘤特异性移植抗原”或“TSTAS”。在观察到当用化学致癌物诱导时这类抗原的存在以后, 当在体外通过紫外照射诱发肿瘤时也得到了类似的结果。见Kripke, J. Natl. Canc. Inst. 53: 333 - 336 (1974)。

当在上述类型的肿瘤中观察到T - 细胞介导的免疫反应时, 自发性肿瘤通常被认为是非免疫原性的。因而相信在这些肿瘤携带者体内不会出现能引起针对这些肿瘤的反应的抗原。见Hewitt, et al., Brit. J. Cancer 33: 241 - 259 (1976)。

t u m⁻ 抗原呈递细胞株家族是通过诱变小鼠肿瘤细胞或细胞株而得到的致免疫性突变体, 如Boon et al., J. Exp. Med. 152: 1184-1193 (1980) 所述, 该文献引入本文作参考。为了验证, 通过突变在同源小鼠中不产生免疫应答并将形成肿瘤的肿瘤细胞(即“t u m⁻”细胞)而获得t u m⁻ 抗原。当这些t u m⁺ 细胞被诱变时, 它们被同源小鼠排斥, 不能形成肿瘤(因而叫“t u m⁻”)。见Boon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 272 (1977) (引入本文作参考) 许多种类型的肿瘤已被发现表现出这种现象。见Frost et al., Cancer Res. 43: 125 (1983)。

因为t u m⁻ 突变体能产生一个免疫排斥过程, 因而它们似乎不能形成进行性的肿瘤。支持该假说的证据包括, 不能以正常方式形成肿瘤的“t u m⁻”肿瘤突变体, 在其免疫系统被亚致死量射线处理抑制过的小鼠中又恢复了形成肿瘤的能力。见Van Pel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5282-5285 (1979)。还包括观察到的腹腔注射的肥大细胞瘤P 815 t u m⁻ 细胞在以指数级数增殖12-15天后, 在注入淋巴细胞及巨噬细胞仅仅几天后就消失了。(Uyttenhove et al., J. Exp. Med. 152: 1175-1183, 1980)。更多的证据包括观察到小鼠获得了一种免疫记忆, 这样使得它们能抵抗随后的同种t u m⁻ 突变体的攻击, 即使是在给予同种t u m⁻ 突变体之前给予免疫抑制量的射线时。见Boon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 272-275 (1977); Van Pel et al., supra; Uyttenhove et al., supra。

后期的研究发现, 当自发性肿瘤易被诱变时, 就生产出能引起反应的致免疫性突变体。确实, 这些突变体能够引发一种针对原始肿瘤的免疫保护性反应。见Van Pel et al., J. Exp. Med. 157: 1992-2001 (1983)。由此可见在肿瘤中引起作为同源排斥反应的靶的物的“肿瘤排斥抗原”的呈递是可能的。在外源基因转染到自发性肿瘤中时也得到了类似的结果。见Fearon et al., Cancer Res. 48: 2975-1980 (1988)。

已经辨认出一种抗原, 它被呈递于肿瘤细胞的表面, 并被细胞溶解性T 细胞所识别, 从而导致溶解。后文中将把这类抗原称作“肿瘤排斥抗原”或“TRA s”。TRA s 可能也可能不会引起抗体反应。有关这些抗原的进一步的研究是

通过体外的细胞溶解性T 细胞特征研究, 例如通过特定细胞溶解性T 细胞亚系 (后文中称之为“CTL”) 对抗原的鉴定的研究而进行的。该亚系在识别被呈递的肿瘤排斥抗原后增殖, 呈递抗原的细胞被溶解。特征性研究已经鉴别出特异性裂解表达该抗原的细胞的CTL 克隆。这些工作的实例可见Levy et al., *Adv. Cancer Res.* 24: 1-59 (1977); Boon et al., *J. Exp. Med.* 152: 1184-1193 (1980); Brunner et al., *J. Immunol.* 124: 1627-1634 (1980); Maryanski et al., *Eur. J. Immunol.* 124: 1627-1634 (1980); Maryanski et al., *Eur. J. Immunol.* 126: 406-412 (1982); Palladino et al., *Canc. Res.* 47: 5074-5079 (1987)。其它类型的被CTLs 识别的抗原也要求进行这类分析, 包括次要组织相容性抗原, 雄性特异性H-Y 抗原, 以及在此讨论的被认为是“tum⁻”抗原的抗原。

以上所述的肿瘤的一个范例是P 185。见Deplaen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2274-2278 (1988); Szikora et al., *EMBO J.* 9: 1041-1050 (1990), 以及Sibille et al., *J. Exp. Med.* 172: 35-45 (1990), 所述文献引入本文作参考。P 815 肿瘤是一种肥大细胞瘤, 用甲基胆蒽在DBA/2 小鼠中诱发, 并以体外肿瘤及细胞株形式培养。P 815 株经过诱变后产生许多tum⁻突变体, 包括P 91A (Deplaen, supra), 35B (Szikora, supra) 以及P 198 (Sibille, supra) 突变体。与肿瘤排斥抗原形成对照的是-并且这是一个关键性的差别-tum⁻抗原仅仅在肿瘤细胞被诱变后才呈递。肿瘤排斥抗原呈递于给定的无须诱变的肿瘤细胞。因此, 一种细胞株可以是tum⁺的, 例如称作P 1 的株, 也能够被引发而产生tum⁻突变体。由于tum⁻的表型与其父代细胞株有差异, 因此可以预期这两种细胞株的DNA 也会有差别, 这种差别就可以被开发来在tum⁻细胞中定位感兴趣的基因。其结果是, 已经发现tum⁻突变体, 例如P 91A, 35B 和P 198, 其基因与其正常等位基因的差别在于基因的编码区域发生了点突变。见Szikora and Sibille, supra, 以及Lurquin et al., *Cell* 58: 293-303 (1989)。已证明本发明的TRAs 不是这种情况。这些文献还阐明了衍生于tum⁻抗原的肽为了被CTLs 识别而被L^d 分子呈递。P 91A 被L^d 呈递。P 35 被D^d 以及P 198 被K^d 所呈递。

于1992年5月22日申请的PCT申请PCT/US92/04354, 讲授了一个人的肿瘤排斥抗原前体编码基因家族, 称作MAGE家族。这些基因中的几个还在以下文献中讨论过: Van der Bruggen et al., Science 254:1643 (1991)。现已清楚MAGE家族的各种基因在肿瘤细胞中表达, 并可作为诊断这种肿瘤的标记, 并用于该文讨论的各种应用。另外参见Traversari et al., Immunogenetics 35:145 (1992); Van der Bruggen et al., Science 254:1643 (1991)。有关某蛋白质被修饰及其在细胞表面呈递的机制现在已得到很好的证明。对该领域发展的粗略的了解可参看Barinaga "Getting Some 'Backbone': How MHC Binds Peptides", Science 257:880 (1992); Fremont et al., Science 257:919 (1992); Matsumura et al., Science 257:927 (1992), Latron et al., Science 257:964 (1992)。这些文献普遍地指出的一个要求是, 这些结合到MHC/HLA分子的肽长度为9个氨基酸(一种“九肽”), 而且九肽的第一个和第九个残基很重要。

有关MAGE家族基因的研究现已揭示出, 在一些肿瘤细胞的表面确实呈递着某特定的九肽, 而且要求呈递九肽的分子是HLA-A1。MAGE-1肿瘤排斥抗原(TRA8或九肽)复合物导致呈递它的细胞被细胞溶解性T细胞(“CTLs”)所溶解。

应注意的是, 例如Townsend et al.的申请号____, 申请日____, 以及Melief et al.的申请号____, 申请日____中的其它MAGE衍生肽类。

美国专利申请Serial No. 07/938,334 (1992年8月31日申请)及073,103, (1993年6月7日申请)的研究表明, 比较MAGE-1基因中编码相关九肽的区域与各种MAGE基因的同源区域时, 有着大量的同源性。实际上, 这些观察结果导致本发明的一个方面, 即九肽家族中的所有成员具有相同的N-端和C-端氨基酸。这些九肽可用于各种目的, 包括用作免疫原, 无论是单独使用还是与载体肽偶联。九肽已有足够的大小以构成抗原决定簇, 由其而产生的抗体可用来鉴定这些九肽, 无论其单独存在, 或者作为一个较大的多肽的一部分。

这些文献, 尤其是申请号为0 7 3 , 1 0 3 的申请, 显示出在HLA - A 1 与MAGE - 3 之间的一种联系; 然而, 仅仅有大约2 6 % 的白人和1 7 % 的黑人在其细胞表面呈递HLA - A 1 分子。因此, 寻找一些能被其它类型的MHC 分子呈递的肽的信息是极其有用的, 这样相当比例的人口将从以上的讨论过的研究工作中受益。

现在已经发现, MAGE - 3 衍生肽的抗原呈递并非仅仅局限于HLA - A 1 分子。本发明鉴定出了一些肽类, 它们能与MHC I 类分子HLA - A 2 形成复合物。这一发现的应用, 包括在治疗和诊断方面的用途, 都在本发明的内容之内并在下文中描述。

实施例1

实验条件:

除另外规定之外, 所有实验都在室温下进行。所有Fmoc 保护的氨基酸、合成聚合物、肽及TFA 都贮存在-20 °C。

肽的合成

肽是在自动化多肽合成仪中 (Abimed AMS 422) 通过固相策略合成的。(见Gausepohl and Frank, 1980; Gausepohl et al., (1990))

肽是以多轮方式合成, 在每一轮中, 48 个不同的肽是同时合成的。

Tentagel SAC (Rapp et al., 1990; Sheppard and Williams, 1982), 一种在聚苯乙烯基质中聚乙二醇间隔臂的接枝聚合物, 被用作树脂 (每种肽用40 -60 mg, 填充10 μ mol Fmoc 氨基酸)。

重偶合如下进行, 即在每个反应容器中加入90 μ l 0.67 M 的溶于NMP 中的BOP (Gausepohl et al., 1988; Castro et al., 1975), 20 μ l 溶于NMP 2 / 1 (v / v) 中的NMM, 及100 μ l 0.60 M 溶于NMP 中 (6 倍过量) 的适当的Fmo

c 氨基酸溶液 (Fields and Noble, 1990)。在70%的反应时间, 在每个反应容器中加入约50 μ l 二氯甲烷。

Fmoc-脱保护通过向每个反应容器中加入3次0.8 ml 的哌啶/DMA 1/4 (v/v) 而进行。

随着合成的继续进行, 偶合及脱保护次数增加, 分别始于30分钟和3次3分钟。

在偶合及Fmoc-脱保护之后, 用1.2 ml DMA洗6次。在得到所要求的序列及最后的Fmoc-脱保护被除去之后, 用DMA, 二氯甲烷, 二氯甲烷/乙醚1/1 (v/v) 及乙醚分别洗肽基树脂, 然后干燥。

肽的裂解及分离

肽从树脂中的裂解及侧链保护基团的除去如下进行, 即在每个反应容器中每隔5分钟加入200 μ l TFA/水 19/1 (v/v) 6次, 这样可产生游离羧基肽。为得到含Trp肽, 则使用TFA/水/乙硫醇18/1/1 (v/v/v)。

首次向肽中加入TFA两小时后, 通过加入10 ml 乙醚/戊烷1/1 (v/v) 及冷却到-20℃而将肽从结合滤液中沉淀出。通过离心分离 (-20℃, 2500 g, 10分钟), 肽被分离出。

在用乙醚/戊烷1/1 (v/v) 处理沉淀及用同样离心分离程序分离后, 在45℃干燥此肽15分钟。

将每种肽溶入2 ml 水 (或2 ml 10 vol %乙酸) 中, 用液氮冷冻此溶液3分钟, 在离心分离的同时冻干此溶液, (1300 rpm, 8-16h)。

分析与提纯

肽纯度是通过逆相HPLC来测定, 将大约50 nmol 等分试样溶于100 μ l 30% (vol) 乙酸中。将此溶液的30 μ l 加到由三元溶剂系统; A: 水, B: 乙腈, C: 2 vol %TFA水溶液配制的RP-HPLC系统中。

梯度洗脱 (1.0 ml / min) 在30分钟内从90%A, 5%B, 5%C到20%A, 75%B, 5%C进行。在214nm检测。

随机取的试样在PDMS上通过质谱测定来分析。所有31种结合肽都是在PDMS上通过质谱测定及在HP Amiunoquant中水解后通过氨基酸定量分析来分析。按照使用设备的制造者说明, 所有被分析的试样其计算质量与检测质量之间的差别均属于实验误差 (0.1%) 范围。

实施例2

肽

将所有的71种MAGE-2肽都冻干, 取其重量为1mg溶于10μl DMSO中。用0.9%NaCl将所有溶解的肽稀释为0.5mg/ml, 将PH值用经蒸馏水稀释的5%乙酸 (CH₃COOH, Merck Darmstadt, Germany: 56-1000) 或经蒸馏水稀释的1N NaOH (Merck Darmstadt, Germany: 6498) 中和至PH=7。

细胞

在Iscove's改良的Dulbecco培养基 (Biocrom KG Seromed Berlin, Germany: F0465) 中培养174CEM.T2细胞, 所述的培养基中补加100IU/ml青霉素 (Biocades Pharma, Leiderdorp, The Netherlands), 100μg/ml卡那霉素 (Sigma St. Louis, USA: K-0254), 2mM谷氨酰胺 (ICN Biomedicals Inc. Costa Mesa, CA, USA: 15-801-55) 及10%胎牛血清 (FCS, Hyclone Laboratories Inc. Logan, Utah, USA: A-1115-L)。在37℃, 在含5%CO₂湿润空气中将细胞以密度为 2.5×10^5 / ml培养3天。

肽的结合

用不含FCS的培养基冲洗174CEM.T2细胞二次, 将其以密度为 2×10^6 细胞/ml置入无血清培养基中。将40μl此悬浮液与10μl用0.9%NaCl两倍稀释的单个肽的稀释液 (范围从500μg/ml~15.6

$\mu\text{g} / \text{ml}$) 一起置入一个“V”形底的96孔板中 (Greiner GmbH, Frickenhausen, Germany: 651101) 。最终浓度范围为从 $200 \mu\text{g} / \text{ml} \sim 3.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的肽与 8×10^4 个174 CEM. T2 细胞。将此溶液轻轻振动3 分钟后, 在 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 湿润空气中培养16 小时。然后用 $100 \mu\text{l}$ $0.9\% \text{NaCl}$, 0.5% 牛血清白蛋白 (Sigma St. Louis, USA: A-7409), $0.02\% \text{NaN}_3$ (Merck Darmstadt, Germany: 822335) 冲洗一次此细胞。在离心机旋转 1200rpm 离心后, 将沉淀在 4°C 下悬浮于 $50 \mu\text{l}$ 含饱和数量的HLA-A2.1 特异性鼠单克隆抗体BB7.2 中30 分钟。然后将该细胞冲洗二次并用已与异硫氰酸荧光素 (Tago Inc. Burlingame, CA, USA: 4350) 偶联的稀释度为 $1:40$ 及总体积为 $25 \mu\text{l}$ 的山羊抗鼠IgG的F(ab) $_2$ 片段温育30 分钟。

经最终培养后, 将细胞冲洗二次并用FACScan 流式细胞光度计 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 在 488nm 下检测荧光。可获得HLA-A2.1 在174 CEM. T2 细胞上的 0.5 最大增量调节的浓度的测定可使用与肽浓度对比绘制的荧光指数曲线图。结果显示于表1。

表1

衍生于人黑素瘤相关的MAGE-2蛋白并与HLA-A2.1基序相适应的肽的结合亲和力 (compilation of Falk et al., 1991, Hunt et al., 1992 and Nijman et al., 1993)

肽	序列	残基	诱导0.5最大FI时的肽浓度
	GLEARGEALGL	15- 25	>100 µg/ml
	GLEARGEAL	15- 23	60 µg/ml
	ALGLVGQAQA	22- 30	>100 µg/ml
	GLVGQAQAPA	24- 32	65 µg/ml
	DLESEFOAA	100-108	>100 µg/ml
	DLESEFOAAI	100-109	>100 µg/ml
	AISRQIVELV	108-117	>100 µg/ml
	AISRQIVEL	108-116	>100 µg/ml
2	KIVELVEFL	112-120	40 µg/ml
	KIVELVEFLL	112-121	>100 µg/ml
	KIVELVEFLLL	112-122	>100 µg/ml
	LLKYRAREPV	120-130	>100 µg/ml
	LLKYRAREPV	121-130	>100 µg/ml
	VLRNCODFFPV	139-149	>100 µg/ml
3	VIFSKASEYL	149-158	35 µg/ml
4	YLQLVFGIEV	157-166	35 µg/ml
	YLQLVFGIEVV	157-167	>100 µg/ml
5	QLVFGIEVV	159-167	25 µg/ml
6	QLVFGIEVVEV	159-169	30 µg/ml
	GIEVVEVVP	163-172	>100 µg/ml
	PISELYILV	171-179	55 µg/ml
	ELYILVTCL	174-182	>100 µg/ml
	ELYILVTCLGL	174-184	>100 µg/ml
	YILVTCLGL	176-184	>100 µg/ml
	CLGLSYDGL	181-189	65 µg/ml
	CLGLSYDGLL	181-190	>100 µg/ml
	VMPKTGLLI	195-203	>100 µg/ml
	VMPKTGLLII	195-204	>100 µg/ml
	VMPKTGLLITV	195-205	>100 µg/ml
	GLLIIVLAI	200-208	>100 µg/ml
	GLLIIVLAI	200-209	>100 µg/ml
	GLLIIVLAI	200-210	>100 µg/ml
	LLIIVLAI	201-209	>100 µg/ml
	LLIIVLAI	201-210	>100 µg/ml
	LLIIVLAI	201-211	>100 µg/ml
	LIIVLAI	202-210	>100 µg/ml
	LIIVLAI	202-211	>100 µg/ml
7	IIIVLAI	203-211	20 µg/ml
	IIAIEGDCA	208-216	>100 µg/ml
	KIWEELSM	220-228	>100 µg/ml
8	KIWEELSMLEV	220-230	25 µg/ml
	LMQDLVQENYL	246-256	>100 µg/ml
	FLWGPRALI	271-279	65 µg/ml
9	ALIETSYVKV	277-286	20 µg/ml
	ALIETSYVKVL	277-287	>100 µg/ml
10	LIETSYVKV	278-286	30 µg/ml
	LIETSYVKVL	278-287	55 µg/ml
	TLKIGGEPEI	290-299	>100 µg/ml
	HISYPPLERA	298-308	>100 µg/ml

此174CEM.T2细胞系表达“空的”和不稳定的HLA-A2分子,当肽与这些分子上的肽呈递沟结合时这些分子可以变得稳定。稳定的HLA-A2.1分子将不易降解,是被分析的肽的结合结果。这导致HLA-A2.1分子在细胞表面的表达增加。荧光指数用来测定HLA-A2.1分子的增量调节的数量。荧光指数的计算依据以下公式:

MF = 荧光 FI = 荧光指数

$$FI = \text{荧光指数} = \frac{(MF)_{\text{实验}} - (MF)_{\text{空白}}}{(MF)_{\text{空白}}}$$

背景荧光指数为0。

结果

为鉴定能与174CEM.T2细胞表达的HLA-A2.1分子结合的MAGE-2肽,对MAGE-2的氨基酸序列进行了检测。对所有的与已发表的HLA-A2.1结合基序相适应的9、10或11个氨基酸长度的肽做了检测(表I)。

只有表II的1~11号的肽能在低肽浓度下增量调节HLA-A2.1分子的表达,表明了实施例2中所述的它们与HLA-A2.1的结合。其它60种肽的任何一种都不能增量调节。荧光检测结果见表I。HLA-A2.1分子在174CEM.T2细胞上的0.5最大增量调节的测定是通过与每个单肽浓度相对比绘制的FI曲线图来确定的。

这些实验表明,只有一小部分与HLA-A2.1基序相适应的肽能以高亲和力和此HLA分子相结合,因此只有MAGE-2蛋白的候选者能被人CTL识别,因为只有当与HLA分子结合时,CTL才能识别肽。

表II

衍生于人黑素瘤相关的MAGE-2蛋白并与延伸的HLA-A2.1基序相适应的另外一些肽的结合亲和力 (Ruppert et al.)

肽	序列	残基	诱导0.5最大FI时的肽浓度
1	QTASSSSTL	37-45	>100 $\mu\text{g/ml}$
	QTASSSSTLV	37-46	>100 $\mu\text{g/ml}$
	STLVEVTLGEV	43-53	45 $\mu\text{g/ml}$
	VTLGEVPAA	48-56	>100 $\mu\text{g/ml}$
	VTKAEMLESV	130-139	70 $\mu\text{g/ml}$
	VTKAEMLESVL	130-140	>100 $\mu\text{g/ml}$
	VTCLGLSYDGL	179-189	>100 $\mu\text{g/ml}$
	KTGLLIIVL	198-206	65 $\mu\text{g/ml}$
	KTGLLIIVLA	198-207	80 $\mu\text{g/ml}$
	KTGLLIIVLAI	198-208	>100 $\mu\text{g/ml}$
	HTLKIGGEPHI	289-299	100 $\mu\text{g/ml}$

表III 结合于HLA-A2.1的由黑素瘤蛋白MAGE-2衍生的肽

肽	氨基酸序列	区域	序列号
1	STLVEVTLGEV	residues 43-53	1
-	LVEVTLGEV	residues 45-53	2
2	KMVELVHFL	residues 112-120	3
3	VIFSKASEYL	residues 149-158	4
4	YLQLVFGIEV	residues 157-166	5
5	QLVFGIEVV	residues 159-167	6
6	QLVFGIEVVEV	residues 159-169	7
7	IIVLAIIAI	residues 203-211	8
8	KIWEELSMLEV	residues 220-230	9
9	ALIETSYVKV	residues 277-286	10
10	LIETSYVKV	residues 278-286	11

residues=残基

实施例3

此实施例显示初次免疫应答的体外诱导。作为可能诱导初次免疫应答的一般例证, 包括MAGE -2 肽通过应用加工缺陷型细胞系174CEM.T2, 显示了对HPV肽的如此应答。

通过在含相关肽的培养基中培养T2细胞, 可以增加HLA-A2.1细胞(T2)的表达。T2细胞将大量呈递与HLA-A2.1结合的相关肽, 因此是良好的抗原呈递细胞(APC)。在最近的诱导应答的方法(Kast et al., 1993)中, 将T2细胞系用作APC并将post-Ficol1单核细胞用作应答细胞。

方法

1) 在T2上把肽加载到HLA-A2.1

将浓度为 2×10^6 个细胞/ml 的T2细胞在装有无血清IMDM (=Iscoves Modified Dulbecco's Medium: Biochrom KG, Seromed Berlin, Germany, cat. nr. F0465) (该培养基含谷氨酰胺 (2 mM, ICN Biochemicals Inc., Costa Mesa, USA, cat. nr. 15-801-55), 抗菌素 (100 IU/ml 青霉素 (Brocades Pharma, Leiderdorp, The Netherlands), 100 μ g/ml 卡那霉素 (Sigma, St. Louis, USA, k-0245)) 及浓度为80 μ g/ml 选定的MLDLQPETT 肽的T25 烧瓶 (Becton Dickinson, Falcov, Plymouth England cat. nr. 3013) 中在37 °C下培养13 小时。

2) T2 (APc) 的丝裂霉素C 处理

将被培养的T2细胞旋转; 随后在无血清RPMI 培养基 (Gibco Paislan Scotland. cat. nr. 041-02409) 中以密度为 2.0×10^6 个细胞/ml 用丝裂霉素C (50 μ g/ml) 在37 °C下处理1 小时。然后将此T2细胞用RPMI 冲洗3 次。

3) 初次免疫反应诱导的制备

所有96孔U形底板的孔 (Costar, Cambridge, USA, cat, nr, 3799) 都装满在50 μ l 无血清完全RPMI 培养基中的100,000个丝裂霉素C处理过的T2细胞, 所述的培养基含谷氨酰胺 (2 mM, ICN Biochemicals Inc., Costa Mesa, USA, cat, nr. 15-801-55), 青霉素 (100 IU/ml, Brocades Pharma, Leiderdorp, The Netherlands), 卡那霉素 (100 μ g/ml, Sigma, St. Louis, USA, K-0245) 及浓度为80 μ g/ml 的MLDLQPETT肽。

4) 应答细胞

应答细胞是HLA-A2.1亚型供体 (=C.B) 的单核外周血淋巴细胞 (PBL)。经Ficoll步骤 (Ficoll制备: Lymphoprep of Nycomed Pharma, Oslo, Norway, cat nr. 105033) 将PBL从淡黄色表层中分离出来, 用RPMI 冲洗两次。经分离及冲洗后, 将PBL重新悬浮于含30%人混合血清 (HPS) 的RPMI 完全培养基中。(HPS是为试验在混合淋巴细胞培养物中的抑制活性。)

5) 初次免疫应答的诱导

将在50 μ l 培养基 (如4) 所述培养基) 中的400,000个PBL-C.B加到已装满T2细胞的96孔U形底板的每个孔中且在含5%CO₂, 湿度为90%的培养箱中在37°C下培养7天。

6) 再刺激 (第7天)

在培养PBL、MLDLQPETT肽和T2细胞 (步骤1-5) 7天后, 用MLDLQPETT肽再刺激PBL-C.B。为此目的, 所有的来自96孔的细胞和培养基被采集。用Ficoll步骤分离存活的细胞并用RPMI 冲洗。将50,000个这些存活的细胞与含15%HPS的50 μ l 完全RPMI 培养基一起置入一个新的96孔U形底板的每个孔中。将20,000个自身的、照射过的 (3000 rad) PBL和50,000个自身的照射过的 (100

0 r a d) 的 E B V - 转化的 B 淋巴细胞 (= E B V - C . B) 与含 1 5 % H P S 及浓度为 $80 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的 M L D L Q P E T T 肽的 $50 \mu\text{l}$ 完全 R P M I 培养基一起加入到每个孔中。在含 5 % C O ₂ 且湿度为 9 0 % 的培养箱中, 在 3 7 ° C 下培养该细胞 7 天。

7) 再刺激 (第 1 4 天)

在培养 P B L 、 M L D L Q P E T T 肽和 T 2 细胞 (如步骤 1 - 5) 1 4 天后, 用 M L D L Q P E T T 肽再刺激 P B L - C . B 。进行此步骤已在 6) 中阐述。

8) 有限稀释以克隆化

在培养 P B L 、 M L D L Q P E T T 肽和 T 2 细胞 2 1 天后, 所有的来自 9 6 孔的细胞和培养基被采集。经 F i c o l l 步骤分离出存活细胞并用含 1 5 % H P S 的完全 R P M I 培养基冲洗, 存活细胞的这一集团 (b u l k) 通过有限稀释被克隆化。将 $50 \mu\text{l}$ 含 1 5 % H P S 的完全 R P M I 培养基与 1 0 0 个存活细胞 (= H P V 1 6 集团抗 M L D L Q P E T T) 一起加入到一个新 9 6 孔 U 形底板的每个孔中。在其它新的 9 6 孔 U 形底板中, 除了孔内细胞的数目不同外, 重复此步骤, 每个孔含 1 0 , 1 或 0 . 3 个细胞。将 2 0 , 0 0 0 个混合的和照射过的 (3 0 0 0 r a d) 4 种不同供体的 P B L 及 1 0 , 0 0 0 个混合的和照射过的 (1 0 , 0 0 0 r a d) 3 种不同 H L A - A 2 . 1 供体的 E B V - 转化的 B 淋巴细胞与含 1 5 % H P S 和浓度为 $40 \mu\text{g} / \text{ml}$ M L D L Q P E T T 肽、浓度为 2 % 的白细胞凝集素 (P h a r m a c i a , U p p s a l a S w e d e n , c a t , n r 1 7 - 0 6 3 - 0 1) 、浓度为 1 2 0 I U / m l 的人重组 I L - 2 (E u r o c e t u s , A m s t e r d a m , T h e N e t h e r l a n d s) 的完全 R P M I 培养基一起加入到所有的孔中。

9) 扩大克隆化

在每个孔中加入: (总体积为 $100 \mu\text{l}$)

- 2 5 , 0 0 0 个存活细胞

- 2 0 , 0 0 0 个照射过的 P B L 集合体 (如 8))

-10,000 个照射过的EBV 集合体 (如8))

2 μ g MLDLQPETT 肽

6 IU 重组IL-2

在49天, 细胞毒性分析用65个克隆及一个集团作为效应细胞, T2 (有或无相关的MLDLQPETT 肽) 作为靶细胞。背景杀伤指的是杀伤与不相关 (但与HLA-A2.1 结合) 的肽: GILGFVTL 温育的T2 细胞。此流感病毒基质蛋白衍生的肽是HLA-A2.1 限制的流感特异性CTL。

使用HLA-A2.1 基序 (compilation of Rammensee et al., 1991, Hunt et al., 1992 and Nijman et al., 1993) 发现了大多数HLA-A2.1 结合肽。使用扩充的HLA-A2.1 基序 (Ruppert et al., 1993) 只发现了1个另外的HLA-A2.1 结合肽。

资料提示上述肽是已鉴定序列的单一的多肽。但这些肽的同系物、异构物或遗传变异体可以存在于细胞的内或外环境中。本发明包含上述肽的所有同系物, 异构物或遗传变异体, 条件是其与HLA-A2.1 分子相结合。

是肽的同系物的多肽具体包括那些与表I I 的氨基酸序列有至少40% 保守、优选60% 保守、最优选75% 保守性的多肽。

本领域技术人员需了解的是以上显示的肽的其它变异体包含于本发明范围内。特别是包括一些与上述合成的肽只是保守的氨基酸取代不同的变异体。尤其是由于已知在合成及处理过程中, 含半胱氨酸肽易于 (空气) 氧化, 因此用A (丙氨酸)、S (丝氨酸)、 α -氨基丁酸及其它氨基酸取代C (半胱氨酸) 的肽。许多如此保守的氨基酸取代已由Taylor (1986) 阐明。

本文上述的肽或其片段包括任何经保守氨基酸取代、缺失或其它程序处理而在氨基酸序列中发生的变异, 条件是该多肽与HLA-A2.1 分子相结合。肽片段可以是小至5个或更多个氨基酸序列的小肽, 当所述的多肽与HLA-A2.1 分子结合时, 所述的序列是那些在表II 中表明的。

比所显示的肽大的多肽当其诱导HLA-A2.1 阳性个体中的MAGE -

2 特异性CTL 应答并包括如表II所述(部分)氨基酸序列或其保守取代时,此多肽也包括于本发明范围内。此多肽可具有9-12,更优选地9-11或甚至是9-10个氨基酸长度。

本发明也包括经各种方法如基因工程,用固相策略合成肽或其它方法产生的多肽的应用。前述肽可在末端进行各种化学修饰并也在本发明范围内。其它化学修饰尤其是环状及二聚体构型也是可以的。术语“衍生物”指的是包括所有如此修饰过的肽。

本发明的多肽发现对治疗或预防由包括黑素瘤细胞和其它癌细胞在内的MAGE-2表达细胞所致的疾病有功效。

在所有应用中,肽是以免疫原方式施用的。由于此肽相对较短,因此需要与赋予免疫原性的载体物质如类脂物或其它物质联合应用或使用佐剂。

本发明的多肽的预防或治疗用量值当然要随病人群(年龄、性别、体重等)、需治疗疾病的严重性质、本发明特定的肽及其给药途径的不同而变化。可以使用任何合适的给药途径以得到经本发明确定的多肽的有效剂量,同样药学领域技术人员也可以很好地了解一些剂量类型。另外还可以通过控制释放方式和/或输送方式给予此多肽。它们也可以与其它活性物质如,尤其是白介素2等的T细胞激活剂联合应用。

本发明的肽也可用于其它目的,如诊断应用。例如它们可以用于检验接种本发明的肽是否成功。这可以在体外通过测试所述的肽是否能激活接种人的T细胞来进行。

本发明的其它方面对于熟练技术人员很清楚,在此无须重述。

在此处所用的一些术语与表达仅是出于描述的需要而非限制,并且这些术语和表达的使用不排除任意等价的被显示或描述的特征或其部分,在本发明的范畴之内各种修改是可能的。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人: Melief, Cornelis J.M.

Visseren, M. J. W.

Kast, W. M.

van der Bruggen, Pierre

Boon-Falleur, Thierry

(i i) 发明名称: 分离的肿瘤排斥抗原前体MAGE - 2 衍生的肽及其应用

(i i i) 序列数: 6 2

(i v) 联系地址:

(A) 联系人: Felfe & Lynch

(B) 街道: 805 Third Avenue

(C) 城市: 纽约市

(D) 州: 纽约州

(E) 国家: 美国

(F) 邮编: 1 0 0 2 2

(v) 计算机可读形式:

(A) 媒体类型: 软盘5 . 2 5 寸, 3 6 0 k b 存储量

(B) 计算机: I B M P S / 2

(C) 操作系统: P C - D O S

(D) 软件: Wordperfect

(v i) 本申请资料

(A) 申请号:

(B) 申请日:

(C) 分类:

(v i) 本申请资料

(A) 申请号: 0 8 / 2 1 7 , 1 8 8

(B) 申请日: 1 9 9 4 年3 月2 4 日

(v i i i) 代理人/ 代理信息:

(A) 姓名: Hanson, Norman D.

(B) 登记号: 3 0 , 9 4 6

(C) 案号/ 文档号: L U D 5 3 4 0 - P C T

(i x) 电信资料:

(A) 电话: (2 1 2) 6 8 8 -9 2 0 0

(B) 传真: (2 1 2) 8 3 8 -3 8 8 4

(2) SEQ ID NO: 1 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 1

Ser Thr Leu Val Glu Val Thr Leu Gly Glu Val
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 2 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 2

Leu Val Glu Val Thr Leu Gly Glu Val
1 5

(2) SEQ ID NO: 3 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 3

Lys Met Val Glu Leu Val His Phe Leu
1 5

(2) SEQ ID NO: 4 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 4

Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Glu Tyr Leu
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 5 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 5

Tyr Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Val

1

5

10

(2) SEQ ID NO: 6 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 6

Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Val Val

1

5

(2) SEQ ID NO: 7 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 7

Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Val Val Glu Val

1

5

10

(2) SEQ ID NO: 8 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 8

Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile Ala Ile

1

5

(2) SEQ ID NO: 9 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 9

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Met Leu Glu Val

1 5 10

(2) SEQ ID NO: 10 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 10

Ala Leu Ile Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val

1 5 10

(2) SEQ ID NO: 11 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 11

Leu Ile Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val

1 5

(2) SEQ ID NO: 12 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 12

Gly Leu Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu

1 5 10

(2) SEQ ID NO: 13 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 13

Gly Leu Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu

1

5

(2) SEQ ID NO: 14 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 14

Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala

1

5

(2) SEQ ID NO: 15 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 15

Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala

1

5

(2) SEQ ID NO: 16 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 16

Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala

1

5

(2) SEQ ID NO: 17 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 17

Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Ile

1

5

10

(2) SEQ ID NO: 18 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 18

Ala Ile Ser Arg Lys Met Val Glu Leu Val

1

5

10

(2) SEQ ID NO: 19 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 19

Ala Ile Ser Arg Lys Met Val Glu Leu

1

5

(2) SEQ ID NO: 20 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 20

Lys Met Val Glu Leu Val His Phe Leu Leu

1

5

10

(2) SEQ ID NO: 21 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 21

Lys Met Val Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu

1 5 10

(2) SEQ ID NO: 22 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 22

Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 23 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 23

Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val

1 5 10

(2) SEQ ID NO: 24 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 24

Val Leu Arg Asn Cys Gln Asp Phe Phe Pro Val
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 25 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 25

Tyr Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Val Val
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 26 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 26

Gly Ile Glu Val Val Glu Val Val Pro Ile
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 27 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 27

Pro Ile Ser His Leu Tyr Ile Leu Val
1 5

(2) SEQ ID NO: 28 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 28

His Leu Tyr Ile Leu Val Thr Cys Leu
1 5

(2) SEQ ID NO: 29 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 29

His Leu Tyr Ile Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 30 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 30

Tyr Ile Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu
1 5

(2) SEQ ID NO: 31 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 31

Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu
1 5

(2) SEQ ID NO: 32 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 32

Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 33 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 33

Val Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile
1 5

(2) SEQ ID NO: 34 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 34

Val Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 35 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 35

Val Met Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 36 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 36

Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile
1 5

(2) SEQ ID NO: 37 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 37

Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 38 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 38

Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile Ala
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 39 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 39

Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile
1 5

(2) SEQ ID NO: 40 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 40

Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile Ala
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 41 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 41

Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile Ala Ile
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 42 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 42

Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile Ala
1 5

(2) SEQ ID NO: 43 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 43

Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile Ala Ile
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 44 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 44

Ile Ile Ala Ile Glu Gly Asp Cys Ala
1 5

(2) SEQ ID NO: 45 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 45

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Met Leu
1 5

(2) SEQ ID NO: 46 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 46

Leu Met Gln Asp Leu Val Gln Glu Asn Tyr Leu
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 47 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 47

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ile
1 5

(2) SEQ ID NO: 48 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 48

Leu Ile Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val
1 5

(2) SEQ ID NO: 49 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 49

Ala Leu Ile Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 50 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 50

Thr Leu Lys Ile Gly Gly Glu Pro His Ile
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 51 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 51

His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu His Glu Arg Ala
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 52 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 52

Gln Thr Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu
1 5

(2) SEQ ID NO: 53 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 53

Gln Thr Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 54 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 54

Val Thr Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala
1 5

(2) SEQ ID NO: 55 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 55

Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Glu Ser Val
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 56 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 56

Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Glu Ser Val Leu
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 57 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 57

Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 58 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 58

Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu
1 5

(2) SEQ ID NO: 59 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 10 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 59

Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 60 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 60

Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 61 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 11 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 61

His Thr Leu Lys Ile Gly Gly Glu Pro His Ile
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 62 的资料

(i) 序列特征

(A) 长度: 9 个氨基酸残基

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(i i) 分子类型: 蛋白质

(x i) 序列描述: SEQ ID NO: 62

Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5

说明书附图

图1

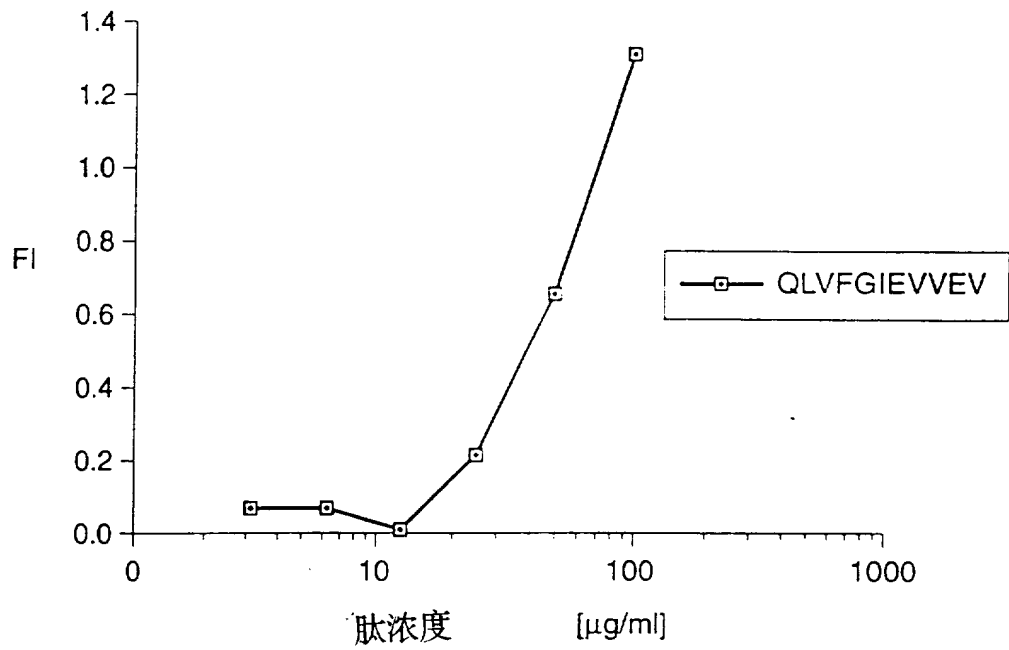


图2

