



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1711279 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

- (21) 申请号 200380102880.3 *C07K 14/05* (2006.01)
- (22) 申请日 2003.11.03 *C07K 16/08* (2006.01)
- (30) 优先权数据 *C07H 21/04* (2006.01)
- 2002952524 2002.11.07 AU *C12N 15/79* (2006.01)
- 2003901792 2003.04.15 AU *A61K 38/08* (2006.01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日 *A61K 38/10* (2006.01)
- 2005.05.08 *A61K 31/7088* (2006.01)
- (86) PCT申请的申请数据 *A61P 31/20* (2006.01)
- PCT/AU2003/001451 2003.11.03 *G01N 33/53* (2006.01)
- (87) PCT申请的公布数据 *G01N 33/566* (2006.01)
- W02004/041849 EN 2004.05.21 *G01N 33/68* (2006.01)
- (73) 专利权人 昆士兰医学研究所理事会
- 地址 澳大利亚昆士兰
- (72) 发明人 拉吉夫·康纳
- 贾库马尔·杜赖斯瓦米
- (74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
- 72002
- 代理人 林晓红
- (51) Int. Cl.
- C07K 7/06* (2006.01)
- C07K 7/08* (2006.01)

(56) 对比文件
GenBank 登录号 CAD53472.2002,
审查员 周霞

权利要求书 2 页 说明书 56 页 附图 11 页

(54) 发明名称
Epstein Barr 病毒肽表位、多表位及其输送系统

(57) 摘要

本发明提供了 Epstein Barr 病毒 LMP1 蛋白的免疫原性细胞毒性 T 细胞表位肽,它具有 9 到 17 个氨基酸,其最小共有序列选自 QRH, AGNDG, QNW, VLYS 和 DSNSNE。这些肽不论是单独存在或存在于多表位结构中,在药物组合物、疫苗和治疗与 Epstein Barr 病毒相关的疾病例如包括但不限于有何杰金氏病和 / 或鼻咽癌的方法中均是有用的。优选多表位输送方式为基于腺病毒的系统。

CN 1711279 B

1. 一种分离的 EBV CTL 肽表位, 由选自以下的组中的氨基酸序列所组成: IALYLQQNW (SEQ ID NO :21); ALYLQQNWW (SEQ IDNO :22); QNWTLLVD (SEQ ID NO :23); LYLQQNWWT (SEQ IDNO :24); IALYLQQNWWTL (SEQ ID NO :25); LIIALYLQQNWWTLLVD (SEQ ID NO :27)。

2. 权利要求 1 的分离的 EBV CTL 肽表位的变异体, 其由以下氨基酸序列组成:

- (i) 与 SEQ ID NO :21 有 1 个氨基酸不同;
- (ii) 与 SEQ ID NO :22 有 1 或 2 个氨基酸不同;
- (iii) 与 SEQ ID NO :23 有 1 个或 2 个氨基酸不同;
- (iv) 与 SEQ ID NO :25 有 1 个或 2 个氨基酸不同; 或
- (v) 与 SEQ ID NO :27 有 1 个或 2 个氨基酸不同;

其中所述变异体能够通过至少一种 T 细胞克隆型引起免疫应答。

3. 权利要求 2 的分离的 EBV CTL 肽表位的变异体, 其由 SEQ IDNO :49 和 50 中任一氨基酸序列组成。

4. 一种分离的蛋白质, 其包含大量相邻的 EBV CTL 表位和 / 或 EBV CTL 表位变异体, 其中至少一种所述 EBV CTL 表位和 / 或 EBVCTL 表位变异体是根据权利要求 1-3 中任一项的表位和 / 或变异体。

5. 权利要求 4 的分离的蛋白质, 其为多表位蛋白质, 包含氨基酸序列 IALYLQQNW (SEQ ID NO :21)。

6. 权利要求 5 的分离的多表位蛋白质, 其包含 13 种 EBV CTL 表位, 这些表位分别具有氨基酸序列 YLLEMLWRL (SEQ ID NO :3); YLQQNWWTL (SEQ ID NO :1); ALLVLYSFA (SEQ ID NO :30); IALYLQQNW (SEQ ID NO :21); SSCSSCPLSKI (SEQ ID NO :51); PYLFWLAAI (SEQ ID NO :52); TYGPVFMCL (SEQ ID NO :53); RRRWRRLTV (SEQ ID NO :54); LLSAWILTA (SEQ ID NO :55); LTAGFLIFL (SEQ ID NO :56); VMSNTLLSAW (SEQ ID NO :57); IEDPPFNSL (SEQ ID NO :58); CLGGLTMV (SEQ ID NO :59)。

7. 权利要求 6 的分离的多表位蛋白质, 其包含如 SEQ ID NO :81 所示的氨基酸序列。

8. 一种分离的核酸, 其编码权利要求 1-3 中任一项的分离的 EBVCTL 表位或表位变异体。

9. 一种分离的核酸, 其编码权利要求 4-7 中任一项的分离的蛋白质。

10. 权利要求 8 的分离的核酸, 其由如 SEQ ID NO :78 或 79 所示的核苷酸序列组成。

11. 权利要求 9 的分离的核酸, 其由如 SEQ ID NO :80 所示的核苷酸序列组成。

12. 一种表达结构, 其包含可操作地连接于表达载体中的一或多个调控核苷酸序列上的权利要求 8-11 中任一项的分离的核酸。

13. 权利要求 12 的表达结构, 其基于腺病毒。

14. 权利要求 12 的表达结构, 其编码如 SEQ ID NO :81 所示的氨基酸序列。

15. 包含权利要求 12-14 任一项的表达结构的分离的宿主细胞。

16. 一种药物组合物, 其包含至少一种根据权利要求 1 的分离的 EBV CTL 肽表位和 / 或至少一种根据权利要求 2 或 3 的分离的 EBVCTL 肽表位变异体, 以及药学上可接受的载体, 稀释剂或赋形剂。

17. 权利要求 16 的药物组合物, 其包含由氨基酸序列 IALYLQQNW (SEQ ID NO :21) 组成

的分离的 EBV CTL 表位。

18. 权利要求 16 或 17 的药物组合物,其包含多表位蛋白质,该多表位蛋白质包含如 SEQ ID NO :81 所示的氨基酸序列。

19. 一种药物组合物,其包含权利要求 12 的表达结构以及药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂。

20. 权利要求 19 的药物组合物,其包含编码氨基酸序列 IALYLQQNW (SEQ ID NO :21) 的表达结构。

21. 权利要求 20 的药物组合物,其包含一表达结构,该结构编码具有如 SEQ ID NO :81 所示的氨基酸序列的多表位蛋白质。

22. 权利要求 21 的药物组合物,其包含如 SEQ ID NO :82 所示的核苷酸序列。

23. 权利要求 16-22 中任一项的药物组合物,该组合物是一种免疫疗法用组合物。

24. 权利要求 23 的药物组合物,该组合物是疫苗。

25. 至少一种权利要求 1 的分离的 EBV CTL 表位和 / 或至少一种权利要求 2 或 3 的分离的 EBV CTL 表位变异体在制备用于治疗 and / 或预防动物中与 EBV 相关的疾病的药物中的应用。

26. 权利要求 25 的应用,其中的至少一种表位包含氨基酸序列 IALYLQQNW (SEQ ID NO :21)。

27. 权利要求 25 的应用,其中的至少一种肽表位是包含如 SEQ ID NO :81 所示的氨基酸序列的多表位蛋白质。

28. 权利要求 12-14 任一项的表达结构在制备用于治疗 and / 或预防动物中与 EBV 相关的疾病的药物中的应用。

29. 权利要求 28 的应用,其中的表达结构编码包含氨基酸序列 IALYLQQNW (SEQ ID NO :21) 的多表位蛋白质。

30. 权利要求 29 的应用,其中的表达结构包含如 SEQ ID NO :82 所示的核苷酸序列。

31. 权利要求 25-30 中任一项的应用,其中与 EBV 相关的疾病选自 B 细胞及 T 细胞非何杰金氏淋巴瘤,何杰金氏病,以及淋巴上皮瘤状癌。

32. 权利要求 31 的应用,其中与 EBV 相关的疾病是鼻咽癌 (NPC)。

33. 权利要求 25-32 中任一项的应用,其中的动物是哺乳动物。

34. 权利要求 33 的应用,其中的哺乳动物是人。

35. 权利要求 34 的应用,其中至少一种 EBV 肽表位的一个或多个是根据要接受治疗的人的 HLA 类型来选择的。

36. 至少一种根据权利要求 1 的 EBV 肽表位或者根据权利要求 2 或 3 的变异体在制备用于检测某一动物是否携带或曾接触过 EpsteinBarr 病毒的方法的组合物中的应用,所述方法包括将分离自所述个体的一种或多种 T 细胞与至少一种根据权利要求 1 的 EBV 肽表位或者根据权利要求 2 或 3 的变异体相接触的步骤,所述一种或多种 T 细胞对至少一种 EBV 肽表位的应答可以指示该动物是否携带或是曾接触过 Epstein Barr 病毒。

37. 权利要求 36 的应用,其中的动物是哺乳动物。

38. 权利要求 36 的应用,其中的动物是人。

Epstein Barr 病毒肽表位、多表位及其输送系统

技术领域

[0001] 本发明涉及 Epstein Barr 病毒的免疫原性肽。尤其,本发明涉及衍生自 Epstein Barr 病毒 LMP1 蛋白的细胞毒性 T 细胞表位。本发明还提供了含有一个或多个 Epstein Barr 病毒细胞毒性 T 细胞表位的药物组合物,多表位,基于腺病毒的疫苗输送系统和治疗与 Epstein Barr 病毒相关的疾病的方法,这些疾病例如有何杰金氏病和 / 或鼻咽癌但不限于此。本发明还提供了一种鉴定 Epstein Barr 病毒细胞毒性 T 细胞表位的方法。

背景技术

[0002] Epstein Barr 病毒 (EBV) 不仅是分布最广的人类病毒之一,有些矛盾的是,它也和一些肿瘤有关 (Anagnostopoulos 1996)。这包括各种 B 细胞及 T 细胞非何杰金氏淋巴瘤,何杰金氏病,以及一些淋巴上皮瘤状癌,其典型即为鼻咽癌 (NPC)。这些肿瘤与 EBV 的关系,以及 EBV 在体外的致癌潜力已有文献记载 (Rickinson 1996 ;Khanna 2000)。CD8⁺T 细胞活性在控制 EBV 感染中扮演重要角色,这是通过识别衍生自被 MHC I 型分子呈递到表面的被感染的细胞的小分子肽实现的。EBV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 制剂可通过刺激来自健康病毒携带者的外周血的记忆 T 细胞在体外制得,该携带者含有被自身 EBV 转化的淋巴芽细胞系 (LCL) 细胞 (Khanna1992 ;Murray 1992)。在一种 LCL 中,EBV 表达六个核抗原 (EMNAs_{1,2,3A,3B,3C} 和 LP),以及两个潜伏型膜蛋白 (LMP1 及 LMP2)。其中,EBNA3 家族 (EBNA 3A,3B,3C) 在 CTL 对许多人类白细胞抗原 (HLA) 的应答中为免疫显性 (Khanna 1992 ;Murray 等 1992)。

[0003] 何杰金氏病以及鼻咽癌的肿瘤细胞皆会表达病毒蛋白,已知是为 CTL 提供靶表位。这两种恶性肿瘤表达核抗原 EBNA1, BARF0, LMP1 和 LMP2。EBNA1 包括一个甘氨酸 - 丙氨酸重复 (GAR),此抗原在蛋白酶体降解中用做顺式抑制信号,并从而阻断该抗原内的 CTL 表位内源性呈递 (Levitskaya 1995)。BARF0 表位的 CTL 呈递被病毒转录体的差别剪接所影响,结果产生了 CTL 决定簇被去除了的显性蛋白质同种型 (Kienzle 2000)。和 EBNA1 及 BARF0 相反,LMP1 和 LMP2 两者都是 EBV 特异性 CTL 的强靶的,因此许多注意力皆集中在鉴别这两种抗原内的靶表位 (Lee 1997 ;Khanna 1998 ;Meij 2002)。

[0004] LMP1 为一跨膜蛋白,其胞质 N 末端及 C 末端结构域被 6 个跨膜区段分隔开。LMP1 已经被认为是最重要的潜伏型蛋白之一,用于 EBV 介导的正常 B 细胞的转化,并能在转基因鼠中独特地诱导恶性肿瘤生成和增生 (Kulwichit 1998)。而且,还已知 LMP1 对 B 细胞的细胞表型呈现出多效性,其中包括活化抗原的诱导 (Wang 1990),程序性细胞死亡抑制因子的表达 (Henderson 1991 ;Laherty 1992),以及经由 TRAF 信号传递途径的 NF- κ B 活化 (Hammar-skjold 1992 ;Mosialos 1995)。先前的研究显示 LMP1 的作用为一种结构上活化的受体样分子,与配体的结合无关。LMP1 的 C 末端通过 C 末端活化剂区域 (是指 CTAR1,氨基酸 194-231 及 CTAR2,氨基酸 332-386 及 CTAR3,氨基酸 275-330) 引发信号传导。CTAR1 和 CTAR2 区域与 NF- κ B 的诱导有关,CTAR2 为主要 NF- κ B 活化剂位点,而 CTAR3 结构域最近被报导与 Janus 激酶 3 结合 (Gires 1999)。

[0005] 发明概述

[0006] 本申请的发明人采用了一种新的基于 IFN- γ 的分析,在多组病毒携带者中进行广泛的 LMP1 特异性 T 细胞应答的序列分析。该方法与功能性细胞毒性分析相结合以评定 LMP1 特异性 CTL 溶解被 EBV 感染的靶细胞的能力。

[0007] 概括地说,本发明提供了一种衍生自 LMP1 的新的和有效的 EBV 肽,其潜在地适用对包括 B 细胞和 T 细胞非何杰金氏淋巴瘤、何杰金氏病及如鼻咽癌 (NPC) 这样的淋巴上皮瘤状癌在内的肿瘤的免疫治疗。

[0008] 本发明还提供了一种基于腺病毒的疫苗输送系统,该系统当用于输送 EBV 多表位结构时尤其有效。

[0009] 因此,本发明中提供了一种分离的 EBV CTL 肽表位,其包含了 LMP1 蛋白的至少 9 个连续的氨基酸残基,其中所述 EBV CTL 肽不是 YLQQNWWTL (SEQ ID NO :1) 或 YLLEMLWRL (SEQ ID NO :3)。

[0010] 第一方面,本发明提供了一种分离的 EBV CTL 肽表位,其包含氨基酸序列 QRH (SEQ ID NO :4)。

[0011] 在一个优选的实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列:

[0012] (i) QRHSDEHHH (SEQ ID NO :9);

[0013] (ii) GQRHSDEHH (SEQ ID NO :10);

[0014] (iii) YYHGQRHSD (SEQ ID NO :11); 和

[0015] (iv) WMYYHGQRH (SEQ ID NO :12)。

[0016] 在第一方面的其它实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列:

[0017] (i) YYHGQRHSDEHH (SEQ ID NO :13);

[0018] (ii) IWMYYHGQRHSD (SEQ ID NO :14); 和

[0019] (iii) LIWMYYHGQRHSDEHHH (SEQ ID NO :15)

[0020] 第二方面,本发明提供了一种分离的 EBV CTL 肽表位,其包含氨基酸序列 AGNDG (SEQ ID NO :5)。

[0021] 在第二方面的一个优选实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列:

[0022] (i) AGNDGGPPQ (SEQ ID NO :16); 和

[0023] (ii) PSDSAGNDG (SEQ ID NO :17)。

[0024] 在第二方面的其它实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列:

[0025] (i) SDSAGNDGGPPQ (SEQ ID NO :18);

[0026] (ii) DSAGNDGGPPQL (SEQ ID NO :19); 和

[0027] (iii) PHSPDSAGNDGGPPQL (SEQ ID NO :20)。

[0028] 第三方面,本发明提供了一种分离的 EBV CTL 肽表位,其包含氨基酸序列 QNW (SEQ ID NO :6),特别地,其中不包括序列 YLQQNWWTL (SEQ ID NO :1)。

[0029] 在第三方面的一个优选实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列:

- [0030] (i) IALYLQQNW (SEQ ID NO :21) ;
- [0031] (ii) ALYLQQNWW (SEQ ID NO :22) ;
- [0032] (iii) QNWWTLLVD (SEQ ID NO :23) ;和
- [0033] (iv) LYLQQNWWT (SEQ ID NO :24) 。
- [0034] 在第三方面的其它实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列 :
- [0035] (i) IALYLQQNWWTL (SEQ ID NO :25) ;
- [0036] (ii) YLQQNWWTLLVD (SEQ ID NO :26) ;和
- [0037] (iii) LIIALYLQQNWWTLLVD (SEQ ID NO :27) 。
- [0038] 第四方面,本发明提供了一种分离的EBV CTL肽表位,其包含氨基酸序列VLYS (SEQ ID NO :7) 。
- [0039] 在其中的一个优选实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列 :
- [0040] (i) ALLVLYSFAL (SEQ ID NO :28) ;
- [0041] (ii) LLVLYSFAL (SEQ ID NO :29) ;
- [0042] (iii) ALLVLYSFA (SEQ ID NO :30) ;和
- [0043] (iv) VLYSFALML (SEQ ID NO :31) 。
- [0044] 在第四方面的其它实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列 :
- [0045] (i) ALLVLYSFALML (SEQ ID NO :32) ;
- [0046] (ii) GALLVLYSFALM (SEQ ID NO :33) ;
- [0047] (iii) DWTGGALLVLYS (SEQ ID NO :34) ;
- [0048] (iv) GGALLVLYSFAL (SEQ ID NO :35) ;和
- [0049] (v) DWTGGALLVLYSFALML (SEQ ID NO :36) 。
- [0050] 第五方面,本发明提供了一种分离的EBV CTL肽表位,其包含氨基酸序列DSNSNE (SEQ ID NO :8),特别地,其中不包括氨基酸序列ESDSNSNEG (SEQ ID NO :2) 。
- [0051] 在第五方面的一个优选实施方案中,所述表位包含选自由以下所组成的组的氨基酸序列 :
- [0052] (i) DSNSNEGRH (SEQ ID NO :37) ;
- [0053] (ii) SGHESDSNSNEG (SEQ ID NO :38) ;和
- [0054] (iii) TDDSGHESDSNSNEGRH (SEQ ID NO :39) 。
- [0055] 本发明还提供了一种变异体EBV CTL表位。
- [0056] 在特别的实施方案中,所述变异体含有如表4所示的氨基酸序列 (SEQ ID NO :40-44 和 47-50) 。
- [0057] 第六方面,本发明提供了一种分离的蛋白,该蛋白包含根据上述各方面的至少一个EBV CTL表位。
- [0058] 优选,该分离的蛋白是多表位蛋白,其包含选自由 ALLVLYSFA (SEQ ID NO :30) 及 IALYLQQNW (SEQ ID NO :21) 所组成的组的氨基酸序列。
- [0059] 在一个优选的实施方案中,该分离的多表位蛋白包含如表5所示的各个EBV CTL

表位。

[0060] 在一个更优选的实施方案中,该分离的多表位蛋白包含如 SEQID NO :81 所示的氨基酸序列。

[0061] 本发明的第七方面,提供了一种分离的核酸,该核酸编码上述任一方面的 EBV CTL 表位或多表位。

[0062] 在一个优选的实施方案中,该分离的核酸编码如 SEQ ID NO :81 所列的多表位氨基酸序列。

[0063] 在该实施方案中,更优选该分离的核酸编码具有如 SEQ ID NO :82 所列的核苷酸序列。

[0064] 该方面,还提供了一种分离的核酸,该核酸编码上述各方面的 EBV CTL 表位变异体。

[0065] 在特别的实施方案中,所述分离的核酸包含如表 4 所示的一种核苷酸序列 (SEQ ID NO :63-65,67-69,71-76 及 78-80)。

[0066] 第八方面,本发明提供了一种表达结构,它包含可操作地连接于表达载体中的一个或多个调控核苷酸序列的第六方面的分离的核酸。

[0067] 在一个优选的实施方案中,该表达结构是基于腺病毒的。

[0068] 在一个特别的实施方案中,所述表达结构是编码本发明中多数 EBV CTL 表位的多表位结构。

[0069] 第九方面,本发明提供了一种宿主细胞或生物体,其包含有第八方面的表达结构。

[0070] 第十方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含根据上述任一方面的 EBV CTL 表位或分离的核酸或编码其的表达结构。

[0071] 优选,该药物组合物是一种免疫疗法组合物。

[0072] 更优选,该药物组合物是一种疫苗。

[0073] 第十一方面,本发明提供了一种治疗与 EBV 相关的疾病的方法,包括对动物施用本发明的一种或多种 EBV CTL 表位或编码其的表达结构的步骤。

[0074] 此方面的方法包括施用蛋白质以及核酸组合物,用于对与 EBV 相关的疾病的治疗和 / 或预防。

[0075] 尽管不限于此,与 EBV 相关的疾病优选包括各种 B 和 T 细胞非何杰金氏淋巴瘤,何杰金氏病,以及几种淋巴上皮瘤状癌,其中鼻咽癌 (NPC) 为特别受注目的形式。

[0076] 优选,该动物是哺乳动物。

[0077] 更优选,该动物是人。

[0078] 在一个优选的实施方案中,第十方面的方法更进一步包括根据要接受治疗的人的 HLA 类型来选择一种或多种 EBV CTL 表位的步骤。

[0079] 第十二方面,本发明提供了一种鉴定 EBV CTL 表位的方法,上述方法包括以下步骤:

[0080] (i) 制备大量衍生自 LMP1 蛋白的不同肽;

[0081] (ii) 将上述一种或多种所述肽与获自 EBV 血清阳性个体的一种或多种 T 淋巴细胞相结合;和

[0082] (iii) 测量在对上述一种或多种肽的应答中的上述一种或多种 T 淋巴细胞的

IFN- γ 产量,其中 IFN- γ 产量高于参考量即表示所述一种或多个肽具有至少一种 EBV CTL 表位。

[0083] 在一个优选的实施方案中,该方面的方法进一步包括步骤 (iv) 检测是否步骤 (ii) 所产生的上述一种或多种 T 淋巴细胞能溶解一种或多种被 EBV 感染的靶细胞。

[0084] 第十三方面,本发明提供了一种抗体,该抗体能与根据本发明的上述各方面的一种或多种 EBV CTL 表位结合。

[0085] 第十四方面,本发明提供了一种检测动物是否携带或曾接触过 EBV 的方法,所述方法包括这样的步骤:将分离自上述个体的一种或多种 T 细胞与本发明的一种或多种 EBV 肽相接触,由此上述一种或多种 T 细胞对一种或多种肽中的至少一个的应答可指示该动物携带 EBV 或曾接触过 EBV。

[0086] 优选,该动物是哺乳动物。

[0087] 更优选,该动物是人。

[0088] 本说明书全文,除非特别指出,各处的“包含”是指“包括在内”而不是“排除在外”,因此所陈述的整体可以包括一个或多个其它未陈述的整体。

[0089] 附图和表格说明

[0090] 表 1:EBV 免疫的健康捐赠者或 NPC 病患的 HLA 抗原类型(I 型)被包括在本说明书中。

[0091] 表 2:被 EBV 特异性 T 细胞从健康病毒携带者所识别到的 LMP1 序列列表。

[0092] 表 3:T 细胞对 MHC I 型和 MHC II 型限制性 LMP1 表位的应答频率,该表位存在于不同种族的健康个体与 NPC 患者中。

[0093] 表 4:由高加索人、非洲人、中国人、新几内亚人和印度尼西亚人分离出的存在于 EBV 中的 HLA I 型限制性 LMP1 表位的序列。编码每个表位的核苷酸序列和存在于特定分离体的序列改变都被表示出来。SEQ ID NO:30 的肽序列变异体被表示为 SEQ ID NO:40。SEQ ID NO:21 的肽序列变异体被表示为 SEQ ID NO:41-43。肽序列变异体 YLLEMLWRL(SEQ ID NO:3) 被表示为 SEQ ID NO:44-48。肽序列变异体 YLQQNWWTL(SEQ ID NO:1) 被表示为 SEQ ID NO:49 和 50。编码野生型与变异体表位的核苷酸序列被表示为 SEQ ID NO:62-80。

[0094] 表 5:EBV 多表位肽序列和 HLA 特异性。YLLEMLWRL(SEQ ID NO:3);YLQQNWWTL(SEQ ID NO:1);ALLVLYSFA(SEQ ID NO:30);IAYLQQNW(SEQ ID NO:21);SSCSSCPLSKI(SEQ ID NO:51);PYLFWLAAI(SEQ ID NO:52);TYGPVFMCL(SEQ ID NO:53);RRRWRLTV(SEQ ID NO:54);LLSAWILTA(SEQ ID NO:55);LTAGFLIFL(SEQ ID NO:56);VMSNTL LSAW(SEQ ID NO:57);IEDPPFNLSL(SEQ ID NO:58);CLGGLTMV(SEQ ID NO:59)。

[0095] 图 1:一组健康的血清阳性个体中的 LMP1 特异性 T 细胞应答体内分布图。A:用来自 LMP1 的重叠合成肽(10 μ g/ml)刺激来自健康的血清阳性个体的 PMBC,且 IFN- γ 产量用如材料和方法部分所描述的 ELISPOT 分析法测量。结果被表示为每 10^6 PBMC 中斑点形成细胞的个数(spot forming cell, SFC)。B:LMP1 蛋白中的 T 细胞活性的图表分布。C:在 ELISPOT 分析法中被健康的病毒携带者所识别的肽表位的氨基酸序列:肽 9(SEQ ID NO:36);肽 17(SEQ ID NO:60);肽 21(SEQ ID NO:27);肽 24(SEQ ID NO:15);肽 25(SEQ ID NO:61);肽 27(SEQ ID NO:39);肽 38(SEQ ID NO:20)。

[0096] 图 2:由 CD4⁺ 与 CD8⁺T 细胞群体分泌的 IFN- γ 体内检测,再继以 LMP1 肽的刺激。

用如材料与方法中所述的抗人类 CD4 或 CD8 免疫磁性颗粒将 CD4⁺ 细胞或 CD8⁺ 细胞从新鲜的 PBMCs 中排除。将这些细胞于生长培养基中重悬,再用 DWTGGALLVLYSFALML 肽 (SEQ ID NO : 36 ;组 A) 与 TDDSGHESDSNSNEGRH 肽 (SEQ IDNO :39 ;组 B) (10 μ g/ml) 刺激,然后用 ELISPOT 分析法检测 INF-γ 分泌情况。

[0097] 图 3 :用 ELISPOT 分析法对最小表位序列做图。用重叠肽 (5 μ g/ml) 刺激来自捐赠者 MM (组 A 和 B), RE (组 C), LL (组 D) 的 PBMC,且 INF-γ 产量用如材料和方法部分所描述的 ELISPOT 分析法测量。结果被表示为每 10⁶PBMC 中斑点形成细胞 (SFC) 的个数。

[0098] 图 4 :用 ELISPOT 分析法对最小表位序列做图。用重叠肽 (1 μ g/ml) 刺激来自捐赠者 LL (组 A), MM (组 B), RE (组 C 和 D) 的 PBMC,且 INF-γ 产量在如材料和方法部分所描述的 ELISPOT 分析法中测量。结果被表示为每 10⁶PBMC 中斑点形成细胞 (SFC) 的个数。

[0099] 图 5 :A :对 IALYLQQNW 特异性 CTL 克隆 MM22 的 HLA I 型限制性分析。一些与捐赠者 MM 有相同的 HLA I 型等位基因的自体与异源 EBV 转化的 LCL 和 PHA 胚细胞与 CTL 克隆 MM22 相接触。PHA 胚细胞用 IALYLQQNW 肽表位进行预敏。与靶的比例为 2 : 1 的效应物被用于该分析中。B :被 CTL 克隆 MM23 所识别的 CTL 识别 IALYLQQNW 表位。用一系列稀释肽对 PHA 胚细胞致敏,然后暴露给 IALYL QQNW 特异性 CTL 克隆 MM23。

[0100] 图 6 :A :对得自捐赠者 LL 的 ALLVLYSFA 特异性 CTL 系进行 HLA I 型限制性分析。在该肽存在或不存在的条件下,一些与捐赠者 LL 有相同的 HLA I 型等位基因的自体与异源 PHA 胚细胞与表位特异性 CTL 系相接触。与靶的比例为 10 : 1 的效应物被用于该分析中。B :被来自于捐赠者 LL 的 CTL 系所识别的 CTL 识别 ALLVLY SFA 表位。用一系列稀释肽对 PHA 胚细胞致敏,然后暴露给 ALLVLYSFA 特异性 CTL 系。

[0101] 图 7 :A :变异体和原型 HLAA2 限制性 LMP1 表位 YLLEMLWRL 的 CTL 识别。PHA 胚细胞与一系列各肽的稀释液致敏,然后暴露给任一 YLLEMLWRL 特异性 CTL 克隆 SB7。B :用变异体与原型 HLAA2 限制性 LMP1 表位在 T2 细胞上做 MHC 稳定性分析。T2 细胞起初用 200 μ l 的每种肽 (10 μ g/ml) 在 26℃ 下孵育 14-16 小时,接着于 37℃ 下孵育 2-3 小时。HLAA2 在这些细胞上的表达用 HLAA2 特异性单克隆抗体 FACS 来分析。

[0102] 图 8 :重组腺病毒载体的结构图,该载体表达编码含有 13 种 HLAI 型限制性 LMP1 和 LMP2 表位 (SEQ ID NO :79,也见于表 5) 的多表位蛋白的合成 DNA (SEQ ID NO :79)。编码该多表位蛋白的 DNA 序列是使用序列特异性引物 (表示为 LMP-A, LMP-B, LMP-C 及 LMP-D) 和基于交互引导 (mutual priming) 与重叠延伸的技术来构成。该片段的核酸序列编码 (从 5' 端) 一个 BamH I 限制性酶切位点,一段 Kozak 序列,一个甲硫氨酸起始密码子,13 个前后相连的最小 LMP1 CTL 表位,一个终止密码子,以及一个在 3' 端的 EcoR I 限制性酶切位点。LMP 多表位的插入片段是从 pcDNA3.1 表达载体上切下并克隆到 pAdTrack 表达载体中。在 E. coli 中扩增和重组后,Ad5-LMPpoly 载体通过转染人类胚肾 (HEK) 293 细胞,被包装到转染性腺病毒中。通过冷冻与解冻来收获重组腺病毒。

[0103] 图 9 :由 Ad5LMP 多表位编码的 CTL 表位的内源性加工。

[0104] 图 10 :Ad5LMP 多表位的免疫原性。

[0105] 图 11 :Ad5-LMPpoly 的免疫作用对表达 EL4-A2/K^b 肿瘤细胞的 LMP1 提供保护。两组小鼠,每组 6 只,分别用 Ad5-LMPpoly 或对照组腺病毒 (10⁸PFU/只小鼠) 免疫。免疫后 21 天,用 EL4-A2/K^b-LMP1 细胞 (10⁷ 个细胞 / 只小鼠) 对小鼠进行皮下进攻,并在进攻后 16

天监测肿瘤大小。肿瘤大小数据以平均 ± 标准差表示。

[0106] 发明详述

[0107] 本说明书描述了许多新的和意料不到的衍生自 LMP 1 蛋白的 EBV CTL 表位。用一种新的基于 IFN- γ 分析来鉴定 EBV CTL 表位,并用功能性细胞毒性分析来评估 LMP1 特异性 CTL 溶解被 EBV 感染的靶细胞的能力。

[0108] 令人惊奇地,本发明的 CTL 表位优先衍生自 CTAR1 与 LMP1 蛋白的跨膜结构域,实际上并不包括 CTAR2 结构域与 N 末端。

[0109] 本发明的衍生自 LMP1 的 EBV 肽潜在地适用于治疗与 EBV 相关的疾病的免疫疗法。尤其,本发明中所考虑的与 EBV 相关的肿瘤包括 B 细胞及 T 细胞非何杰金氏淋巴瘤,何杰金氏病,和例如鼻咽癌 (NPC) 这样的淋巴上皮瘤状癌。

[0110] 为实现本发明的目的,“分离的”意指物质由其自然状态被移开或使其能够被人类使用。分离的物质可以完全地或基本上与其在自然状态下所伴随的成分相分离,或可以被操纵以使得与其自然状态中所伴随的成分共存。分离的物质可以是天然的,化学合成的或重组形式。

[0111] “蛋白质”是指一种氨基酸聚合体,该氨基酸可以是自然的或非自然的氨基酸,D- 或 L- 型氨基酸,或是本领域所熟知的化学衍生氨基酸。

[0112] “肽”是指具有不超过 50 个氨基酸的蛋白质。

[0113] “多肽”是指具有超过 50 个以上的氨基酸的蛋白质。

[0114] “EBV CTL 表位”是指由 EBV 基因组编码的一种氨基酸序列,在体外或体内,在有 MHC I 型存在的情况下,当该氨基酸序列遇到至少一种 T 细胞克隆型 (clonotype) 时,它可以通过至少一种 T 细胞克隆型 (clonotype) 引起免疫应答。此外该定义不排除 T 细胞表位,例如辅助 T 细胞或 B 细胞表位。

[0115] 如 SEQ ID NO :4-8 所示的共有氨基酸序列为本发明的 EBV CTL 肽 (SEQ ID NO :2, 9-25 和 27-39) 中最小的共同区域 (列于表 2)。

[0116] 适合地,上述 EBV CTL 肽表位由至少 9 个但不超过 20 个相连的氨基酸所组成。

[0117] 在某些实施例中,上述 EBV CTL 肽表位由 9 个,12 个或 17 个相连的氨基酸所组成。

[0118] 在一个优选的实施方案中,上述 EBV CTL 肽表位具有选组如下所作成的组的氨基酸:SEQ ID NO :2 ;SEQ ID NO :9 ;SEQ ID NO :10 ;SEQ ID NO :11 ;SEQ ID NO :12 ;SEQ ID NO :16 ;SEQ ID NO :17 ;SEQ ID NO :21 ;SEQ ID NO :22 ;SEQ ID NO :23 ;SEQ ID NO :24 ;SEQ ID NO :28 ;SEQ ID NO :29 ;SEQ ID NO :30 ;SEQ ID NO :31 和 SEQ IDNO :37。

[0119] 本发明还考虑到了例如多肽或多表位蛋白这样的分离的蛋白,其包含本发明的一种或多种,或优选大量的 EBV CTL 表位。例如,所述表位可以是单独存在或重复存在,其中也包括一前一后排列的重复表位。“间隔基”氨基酸也可以包括在存在于上述分离的蛋白中的一个或多个该 EBV CTL 表位间。

[0120] 在一个实施方案中,一种纯化的蛋白可能由一种或多种或优选大量的本发明 EBV CTL 表位所组成。

[0121] 在另一个实施方案中,一种纯化的蛋白基本上可为由一种或多种或优选大量的本发明 EBV CTL 表位所组成。

[0122] “基本上由... 所组成”是指除了 EBV CTL 表位序列之外,每种 EBV CTL 肽表位具

有不超过 5 个,或优选不超过 3 个氨基酸。

[0123] 就特殊的多表位蛋白而言,这些额外的氨基酸残基可以是指“间隔基”氨基酸。

[0124] 还发现,本发明的多表位蛋白可以额外地包含一种或多种其它 EBV CTL 肽,例如一种或多种列于表 2 或表 5 的现有技术的 LMP 表位,和 / 或 EBV CTL 表位 YLLEMLWRL (SEQ ID NO :2) 和 YLQQNWWTL (SEQ ID NO :1)。

[0125] 在一个优选的实施方案中,分离的多表位蛋白包含大量 MHC I 型限制性 LMP1 和 / 或 LMP2 CTL 表位。

[0126] 优选,至少有一种上述 CTL 表位具有选自以下所构成的组的氨基酸序列: ALLVLYSFA (SEQ ID NO :30) 和 IALYQQNW (SEQ IDNO :21)。

[0127] 在一个特别优选的实施方案中,分离的多表位包含 13 种 EBVCTL 表位,该表位分别具有以下的氨基酸: YLLEMLWRL (SEQ IDNO :3); YLQQNWWTL (SEQ ID NO :1); ALLVLYSFA (SEQ IDNO :30); IAYLQQNW (SEQ ID NO :21); SSCSSCPLSKI (SEQ ID NO :51); PYLFWLAAI (SEQ ID NO :52); TYGPVFMCL (SEQ IDNO :53); RRRWRRLTV (SEQ ID NO :54); LLSAWILTA (SEQ ID NO :55); LTAGFLIFL (SEQ ID NO :56); VMSNTLLSAW (SEQ IDNO :57); IEDPPFNSL (SEQ ID NO :58); CLGGLLTMV (SEQ IDNO :59)。

[0128] 更优选,该分离的多表位蛋白具有如 SEQ ID NO :81 (图 .8) 所示的氨基酸序列。

[0129] 表 5 及图 8 中的多表位中的 CTL 表位是被筛选的包括了广泛的 MHC I 型特异性的表位。例如,估计这些最优选的 HLA 特异性包含了约 90% 的亚洲、非洲以及高加索人群。

[0130] 还注意到,图 8 中的分离的多表位蛋白 (SEQ ID NO :81) 已被本申请的发明者证实可以诱导被多表位免疫的小鼠中的 CD8⁺CTL 应答,该应答可保护小鼠不受到肿瘤的攻击。

[0131] 同时还考虑了 EBV CTL 表位的变异体。

[0132] 一般来说,此处所用术语“变异体”是本发明的 EBV CTL 表位,其中被删除了一个或多个氨基酸或被不同的氨基酸所取代,但本质上不改变其免疫原性。本领域熟知某些氨基酸可以被改变成具有广泛相似的特性的其它氨基酸,但并不改变其免疫原性 (保守取代)。

[0133] 选择性取代 (selecting substitution) 会造成功能的本质改变,选择性改变的保守度较小,其能被忍受的程度也相对较低。一般来说,可能会造成蛋白质特性最大改变的取代是那些其中 (a) 亲水性残基 (如 Ser 或 Thr) 被疏水性残基 (如 Ala, Leu, Ile, Phe 或 Val) 所取代; (b) 半胱氨酸或脯氨酸被其它任何残基所取代; (c) 具有带正电侧链的残基 (如 Arg, His 或 Lys) 被带负电的残基 (如 Glu 或 Asp) 所取代; 或 (d) 具有大侧链的残基 (如 Phe 或 Trp) 被具有小侧链的残基 (如 Ala 或 Ser) 或无侧链的残基 (如 Gly) 所取代。

[0134] 自然发生的变异体 EBV CTL 表位的特殊例子由表 4 与 SEQ IDNO :44-44 和 47-50 提供,这些变异体衍生自特定的种族区域的 EBV 分离物,并将在以下详细讨论。

[0135] 从表 4 可见,所提供的变异体 EBV CTL 表位与 SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :21 和 SEQ ID NO :30 有一个氨基酸的差异。SEQ ID NO :3 的变异体有 1 个、2 个或 3 个氨基酸残基的差异。

[0136] 本发明还讨论了本发明的 EBV CTL 表位的“衍生物”,例如通过氨基酸残基的化学修饰,生物素酰化,与荧光染料结合,加入表位标记 (如 c-myc, 血细胞凝集素和 FLAG 标记), 以及便于重组蛋白表达、检测和纯化 (如谷胱甘肽-S-转移酶、绿色荧光蛋白,六组氨酸和麦芽糖结合蛋白,但不限于此) 的融合配偶体 (fusion partners) 来生成。

[0137] 氨基酸的化学修饰包括但不限于, 酰化作用修饰, 脎化, 赖氨酸的 pyridoxylation, 还原性烷基化, 用 2,4,6-三硝基苯硫酸 (TNBS) 将氨基进行三硝基苯化作用, 通过将半胱氨酸过甲酸氧化成磺基丙氨酸来进行羧基的酰胺修饰与氢硫基修饰, 水银剂衍生物的形成, 二硫化物与其它硫醇化合物的混合物的形成, 与马来酰亚胺的反应, 碘乙酸或碘乙酰胺的羧甲基化, 以及在碱性 pH 下氰酸盐的氨甲酰化, 虽然不限于此。

[0138] 在这方面, 本领域技术人员可以参考 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan 等 (John Wiley 和 Sons NY, 1995-2000) 第 15 章, 其中有广泛的与蛋白质化学修饰相关的方法。

[0139] 本发明的 EBV CTL 表位, EBV 多表位以及包含此表位的蛋白质可以通过任何现有技术中的已知方法来生产, 包括但不限于, 化学合成, DNA 重组技术和 LMP 蛋白的蛋白酶剪切以产生肽片段。

[0140] 在一个实施例中, EBV CTL 表位可以通过化学合成制备, 包含固相和液相合成。这些方法是本领域中所熟知的, 虽然参考文献中有化学合成技术的实施例, 如 SYNTHETIC VACCINES Ed. Nicholson (Black 孔 Scientific Publications) 的第 9 章以及 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan 等 (John Wiley 和 Sons, Inc. NY USA 1995-2001) 的第 15 章所提供的。在该方面, 参考文献也见于 WO 99/02550 和 WO 97/45444。

[0141] 在另一实施例中, 本发明的重组 EBV CTL 表位, 或优选, 包含 EBV CTL 表位的蛋白质, 可由本领域技术人员采用标准实验步骤方便地制备, 例如 Sambrook 等, 分子克隆: 实验手册 (冷泉港出版社, 1989), 特别是第 16 和 17 章; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Eds. Ausubel 等, (John Wiley 和 Sons, Inc. NY, USA, 1995-2001), 特别是第 10 和 16 章; 以及 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan 等, (John Wiley 和 Sons, Inc. NY, USA, 1995-2001), 特别是第 1, 5 和 6 章。

[0142] 核酸与表达结构

[0143] 本发明提供了一种分离的核酸, 其编码本发明的 EBV CTL 表位或多表位。

[0144] 编码本发明经选择的 EBV CTL 表位及其变异体的核苷酸序列如表 4 中所示。编码本发明其它 EBV CTL 表位的核苷酸序列, 可容易地由已公开的完整 LMP1 编码核酸序列推导出来, 例如 Genbank 获取号 X58140。

[0145] 本发明还提供了编码 EBV 肽变异体的核苷序列, 例如表 4 中所示 (SEQ ID NO: 63-65, 67-69, 71-76 和 78-80)。

[0146] 编码多表位蛋白的分离的核苷序列如 SEQ ID NO: 82 和图 8 所示。

[0147] 此处所用术语“核酸”指单链或双链 mRNA, RNA, cRNA, RNAi 和 DNA, 其中 DNA 包括 cDNA 和基因组 DNA。

[0148] “多核苷酸”是具有 80 个或 80 个以上的连续核苷酸的核酸, 而“寡核苷酸”具有少于 80 个的连续核苷酸。

[0149] “探针”可以是单链或双链寡核苷酸或多核苷酸, 适当标记后用于在 Northern 或 Southern 杂交中检测其互补序列。

[0150] “引物”通常为单链寡核苷酸, 优选具有 15-50 个连续核苷酸, 它可与其互补核酸模板退火, 并由例如 Taq 聚合酶, 依赖于 RNA 的聚合酶或测序酶 (Sequenase™) 这样的 DNA 聚合酶作用以依赖模板的方式延伸。

[0151] 本发明还包括利用密码子序列冗余序列修饰的核苷酸。在一个更特别的例子中，密码子的使用可以被修饰以将特定生物或细胞型中的核酸的表达最大化。

[0152] 本发明还包括经修饰的嘌呤（例如次黄苷，甲基次黄苷和甲基腺苷）和经修饰的嘧啶（如硫尿核苷及甲基胞嘧啶）的用途。

[0153] 本发明还提供了表达结构，其包括编码至少一个，或优选大量的本发明的 EBV CTL 表位的核苷酸序列。

[0154] 恰当地，上述表达结构包含被可操作地连接到表达载体中的一个或多个调控核苷酸序列的所述核苷酸序列。

[0155] 存在于表达载体中的“调控核苷酸序列”可包括增强子，启动子，剪接供体 / 受体信号，Kozac 序列，终止子及聚腺苷酸化序列，如本领域所熟知的那样并促进被可操作地连接于其上的核苷酸序列的表达，或促进被编码的蛋白质的表达。

[0156] 这里所用的“可操作地连接”是指所述调控核苷酸序列与本发明的核苷酸序列有位置上的关联，用以引起，调节或控制其转录。

[0157] 调控核苷酸序列通常对用于表达的宿主细胞或生物是适当的。在本领域中已知有适用于各种宿主细胞的大量的各种适当的表达载体和合适的调控序列。

[0158] 对于启动子，结构性启动子（如 CMV, SV40, 牛痘, HTLV1 以及人类延长因子启动子）与诱导性 / 抑制性启动子（如 tet- 抑制性启动子及 IPTG- 金属硫蛋白 - 或蜕皮激素 - 诱导性启动子）都是本领域中所熟知的，并包含于本发明中。也将意识到，启动子可以是结合超过一个启动子元件的杂交型启动子。

[0159] 优选，所述表达结构还包括一个或多个选择性标记，这些标记适用于被转化的细菌（如 bla, kanR 及 tetR）的筛选或被转化的哺乳动物细胞（如潮霉素, G418 以及嘌呤霉素）的筛选。

[0160] 表达结构还可以包含了一个融合配偶体 (fusion partner)，典型地由表达载体提供)，所以本发明的重组蛋白作为融合蛋白与所述融合配偶体一起被表达。融合配偶体主要的优点是可以协助所述融合蛋白的鉴定和 / 或纯化。

[0161] 融合配偶体的例子已在前文中描述过。典型地，在以亲和层析分离融合蛋白时，融合配偶体特别有用。为了使用亲和层析纯融合多肽时，用于层析的相关基质分别为抗体，蛋白 A- 或 G-，谷胱甘肽，直链淀粉，以及镍或钴缀合树脂。许多这样的基质皆可买到试剂盒的形式获得，例如适用于 (HIS₆) 融合配偶体的 QIAexpress™ 系统 (Qiagen) 和 Pharmacia GST 纯化系统。

[0162] 适合于表达的宿主细胞可为原核或真核细胞，如大肠杆菌（例如 DH5 α），酵母细胞，应用于杆状病毒表达系统的 Sf9 细胞，哺乳动物细胞系如原淋巴细胞系，鼠 EL4 细胞和分离自被转化的如人或鼠这样的被转化的宿主生物的脾细胞，尽管不限于此。

[0163] 表达结构可以通过许多已熟知的任一技术导入宿主细胞或生物中，这样的技术包括但不限于：热激转化，电穿孔，DEAE- 葡聚糖转染，显微注射，脂质体介导的转染，磷酸钙沉淀，原生质融合，微粒轰击，病毒转化及类似技术。

[0164] 在一个特别的实施例中，本发明提供了一种以多表位表达结构的形式存在的表达结构。

[0165] 优选，所述此多表位结构适于用做 DNA 疫苗。

[0166] 根据这一实施例,编码大量EBV CTL表位的核酸可以,例如由合成的寡核苷酸采用例如 Splice Overlap by Extension PCR 这样的技术来合成,如 Thomson 等,1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 5845 中所描述的那样。

[0167] 在一些特别的形式中,本发明的表达结构可用于表达和运送病毒源载体,如痘病毒与腺病毒。

[0168] 当被用做疫苗运送系统时,病毒源的表达结构可以 VLPs 的形式或作为“裸露的”核酸结构施用于动物。

[0169] 在一个特别实施例中,根据该实施例的多表位表达结构包含牛痘病毒启动子,如存在于质粒子载体中的 p7.5 启动子。例如, Khanna 等,1992 提出以标记获救重组来生产 TK- 重组体牛痘病毒。

[0170] 在一个更优选的实施方案中,本发明提供了一种基于腺病毒的表达结构,用于疫苗运送系统。基于腺病毒的结构可感染大范围的哺乳动物或人类细胞,包括休眠或增生细胞。

[0171] 这种基于腺病毒的表达结构可以包含结构性或诱导性 / 抑制性启动子,如四环素诱导性 / 抑制性系统。

[0172] 这种基于腺病毒的表达结构的优选形式为缺少至少一个 E1 基因的衍生自不可复制型 A5 腺病毒。这样的不可复制型用克隆技术的 Aden-X 系统来提供。

[0173] 下文详细提供了特别优选的基于腺病毒的表达结构与疫苗运送系统。

[0174] 药物组合物与疫苗

[0175] 本发明还提供了包含本发明的一种或多种 EBV CTL 表位的药物组合物,包括变体及其衍生物,或是编码相同表位的核酸表达结构。

[0176] 优选的药物组合物为“免疫疗法组合物”,提供可对如前所述的与 EBV 相关的疾病的治疗与预防。

[0177] 在一特别实施例中,所述药物组合物是疫苗。

[0178] 疫苗的形式可以是富含蛋白疫苗 (proteinacious vaccine) 的形式,其包含一种或多种本发明 EBV CTL 表位,包括了亚单位疫苗或 DNA 疫苗形式,它的一个特别的例子是如前文所述的多表位表达结构。

[0179] 与 DNA 疫苗相关的潜在的合适的技术可见于 WO 96/03144 和 Thomson 等,1998, J. Immunol. 160 1717。

[0180] 基于腺病毒结构的运送可经系统性施用于动物或是经由如树突细胞这样的初级转导抗原呈递细胞,接着将被转导细胞施用于动物体内。

[0181] Ranieri, 1999 和 Gahn 等, 2001 年提出了被腺病毒转导的树突细胞用于治疗与 EBV 相关的疾病时的运送实例。

[0182] 恰当地,药物组合物更进一步包含药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂。

[0183] “药学上可接受的载体,稀释剂或赋形剂”是指可以安全地进行系统性施用的固体或液体填充物,稀释剂或做成胶囊的物质等。依照施用时的特殊途径,可以使用本领域中所熟知的各种不同的载体。这些载体以选自包括糖类,淀粉,纤维素及其衍生物,麦芽,明胶,滑石,硫酸钙,植物油,合成油,多元醇,藻酸,磷酸缓冲液,乳化剂,等张盐水与盐类,盐类是如同包括了氯化氢的矿物酸盐,溴化物与硫化物,有机酸如醋酸盐,丙酸盐与丙二酸盐以及

无热原水 (pyrogen-free water)。

[0184] 一篇描述药学上可接受的载体, 稀释剂和赋形剂的有用参考文献, 见于 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N. J. USA, 1991)。

[0185] 可用任何安全途径为患者提供本发明的组合物。可使用例如经口, 直肠, 肠外注射, 舌下, 口腔, 静脉内, 关节内, 肌肉内, 真皮内与皮下的注射, 或经吸入, 眼球内, 腹膜内, 脑室内或经透皮肤等及其类似途径。例如, 肌肉内与皮下注射较适合于免疫原性组合物, 富含蛋白疫苗以及 DNA 疫苗的施用。

[0186] 药剂形式包括药片, 散剂 (dispersions), 悬浮物, 注射剂, 溶液, 糖浆, 片剂, 胶囊, 栓剂, 喷剂, 穿透皮肤的贴片等及其类似形式。药剂形式也可包括注射或移植一种专门设计的受控制放射装置, 或是其它经过修饰形式的有其它作用的移植物。受控制的治疗试剂的放射可受其包被影响, 例如, 有疏水性聚合物包括丙烯酸树脂, 蜡, 高脂肪醇, 多乳酸与多甘醇酸 (polyglycolic acids), 以及一些纤维素衍生物如羟丙基甲基纤维素。另外, 受控制的放射也可以用其它聚合物聚合物基质, 脂质体和 / 或微球体粒子来影响。

[0187] 适合口服或肠外注射的本发明的药物组合物可以独立单位呈现, 如胶囊, 小袋, 或药片, 每单位含有一种以上预定量的本发明的一种或多种药剂, 以粉末或颗粒或以溶液, 水溶液中的悬浮物, 非水溶液, 油分散于水中的乳浊液或水分散于油中的乳浊液。这种组合物可用任何配药方法配制, 但每种方法皆包含这样的步骤: 将含有一种或多种必须成分的载体与一种或多种上述药剂结合。一般来说, 本发明的药剂与液相载体或精细分隔的固相载体或两者皆有, 做完全一致的混合后制成组合物, 之后若需要的话, 再将产物塑成想要的外型。

[0188] 可用与药剂设计兼容的方法来以药物有效量施用上述组合物。在本发明内容中, 对病患施用的剂量足以在一段适当时间在患者身上产生有利的应答。施用剂量应由医师判断, 视施用对象的各种因素而定, 如年龄, 性别, 体重及其一般健康状况等。

[0189] 在一个特别的免疫疗法组合物与疫苗的例子中, “药学上可接受的载体, 稀释剂或赋形剂” 可为一佐剂。在本领域中将会了解, “佐剂” 是指包含一种或多种物质的组合物, 其可增强疫苗组合物的免疫原性与效力。合适的佐剂没有限定性的例子, 包括角鲨烷和角鲨烯 (或其它动物油); 嵌段共聚物; 洗涤剂如 Tween[®]-80; Quil[®] A, 矿物油如 Drakeol 或 Marcol, 植物油如花生油; 棒状杆菌衍生佐剂如氨苄咪唑; 丙酸杆菌衍生佐剂如 Propionibacterium acne; 牛型结核菌 (Bacille Calmette 和 Guerin 或 BCG); 百日咳博德特氏菌抗原; 破伤风类毒素; diptheria 类毒素; 白细胞介素如白细胞介素 2 和白细胞介素 12; 单核因子如白细胞介素 1; 肿瘤坏死因子; 干扰素如 gamma- 干扰素; 组合物如皂苷- 氢氧化铝或 Quil-A aluminium 氢氧化铝; 脂质体; ISCOM[®] 和 ISCOMATRIX[®] 佐剂; 结核杆菌细胞壁萃取物; 合成糖肽如胞壁酰二肽或其它衍生物; Avridine; 脂质 A 衍生物; 葡聚糖硫酸酯; 单独的 DEAE-extran 或与磷酸铝的混合物; 羧基聚甲烯如聚羧乙烯 / EMA; 丙烯酸共聚物乳浊液如 Neocryl A640 (例如 US 5047238); 水分散于油中的乳浊液如 Montanide ISA 720; 小儿麻痹病毒, 牛痘或动物痘病毒蛋白; 或其混合物。

[0190] 对于亚单位疫苗, 这种疫苗的一个制配实施例是以 ISCOM[®] 来配制, 如同 W097/45444 所描述的。

[0191] 抗体

[0192] 本发明还包括针对本发明的 EBV CTL 表位的抗体。

[0193] 本发明的抗体可以是单克隆或多克隆抗体。抗体制造,纯化与使用的方法已为大家所熟知,可见于 Coligan 等,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley 和 Sons NY, 1991-1994) 的第二章以及 Harlow, E. 和 O Lane, D, 抗体:实验室手册,冷泉港,冷泉港实验室,1988,两者在此处都通过引用被合并近来。

[0194] 一般来说,本发明的抗体会与本发明的一个多肽,片段,变异体或衍生物结合或缀合结合。例如,抗体可包含多克隆抗体。制备这种抗体,可以将本发明的多肽,片段,变异体或衍生物注射到生产型物种,这可以包括小鼠与家兔,以获的多克隆抗血清。本领域技术人员熟知制备多克隆抗体的方法。可以使用的典型方法见于前述的 Coligan 等, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Harlow 和 Lane, 1988。

[0195] 用于代替获自生产物种的多克隆抗血清,单克隆抗体可以标准方法来制备,这样的方法例如详述于之前所提的 Köhler 和 Milstein, 1975, Nature 256, 495 中所描述的,或多个其最近修饰体如 Coligan 等, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY 所描述的,是将一种或多种多肽,片段,变异体或衍生物接种到生产用的物种,取其无限增殖的脾脏细胞或其它抗体产生细胞来制备单克隆抗体。

[0196] 本发明还包括在上述单克隆或多克隆抗体中,包含抗体的 Fc 或 Fab 片段。可选地,抗体可包含针对本发明的分离的蛋白的单链抗体 Fv (scFvs)。这种 scFv 例如可以依照下列各文中的方法来制备, US No5091513, EP239400 或 Winter 和 Milstein, 1991, Nature 349 293 的

[0197] 标记与本发明的抗体或抗体片段有关。

[0198] 标记选择包括以下的组:色素原,催化剂,酶,荧光剂,化学冷光分子,镧系离子如铕 (Eu^{34}),放射性同位素与直接视觉标记。直接视觉标记可以由下列物质组成使用,包括胶状或非金属粒子,染色粒子,酶或底物,有机聚合体,乳浊液颗粒,脂质体,或其它含有信号产生物质的小泡,及类似物。

[0199] 于 US 4366241, US 4843000 和 US 4849338 详细陈述许多可用来做标记的酶,它们在这通过引用合并入本发明。本发明中有用的酶标记包括碱性磷酸酶,辣根过氧化物酶,荧光素酶, b- 半乳糖苷酶,葡萄糖氧化酶,溶菌酶,苹果酸脱氢酶及类似物质。蛋白质标记可以单独使用或者与溶液中的第二种酶结合来使用。

[0200] 虽不限于此,但经实施例,荧光染色剂可为异硫氰酸荧光素 (FITC), 奥地绿 (oregon green), 异硫氰酸荧光素 (TRITL), 别藻蓝素 (APC) 及 R- 藻红蛋白 (RPE)。

[0201] 所以本发明可容易地被理解并付诸实际作用,下列非限制性实施例可引导技术人员,其中实施例一提出本发明 EBV CTL 表位的说明与免疫特性描述,实施例二则提出腺病毒介导的本发明的 EBV 多表位运输方式。

实施例

[0202] 实施例 1

[0203] 材料与amp;方法

[0204] 细胞系的建立与amp;维持

[0205] 以 B95. 8, BL74 与 QIMR-WIL 病毒分离株来将外周 B 细胞做外源性病毒转化,由血

清阳性的捐赠者来建立 EBV 转化的 LCLs。这些细胞系例行性地保持在添加了 2mM L- 谷氨酸盐, 100IU/ml 青霉素以及 100 μ g/ml 链霉素外加 10% 胎牛血清 (FCS) 的培养基 RPMI1640 中。此外, 肽运输物 (TAP)- 阴性 B x T 杂交细胞系。174 \times CEM. T2 (称为 T2) (Salter 1986) 肽稳定性分析。

[0206] 为了产生植物凝集素 (PHA) 胚细胞, 以 PHA 刺激外周血单核细胞 (PBMC) (CSL Ltd, Melbourne, Australia), 培养三天后, 含有 MLA 144 上清液的生长培养基和高度纯化的重组人类 IL-2 (rIL-2) 被添加 (Khanna 1992)。每两周更换 rIL-2 与 MLA 上清液以使 PHA 胚细胞增殖 (不再添加 PHA), 直至六周。

[0207] 病毒分离株

[0208] LCLs (类淋巴母细胞系) 由一组不相关的健康捐赠者来建立, 这些捐赠者为血清阳性的非洲人, 高加索人以及新几内亚人。建立的方法为, 在 0.1 μ g/ml 环孢菌素 A 存在的条件下 (Moss 1988), 让培养的外周淋巴细胞自发性的生长。总数为 29 的自发性 LCLs (11 个高加索人, 11 个新几内亚人, 2 个非洲人, 以及 5 个东南亚人) 被用来使每个独立个体重获其固有的 EBV 分离群。此外, 由 EBV 携带者的鼻咽癌活体切片直接测序 16 种来自东南亚人的病毒分离株。

[0209] EBV 基因片段的 PCR 与 DNA 测序

[0210] 侧面连接 LMP1 基因不同区域的特定寡核苷酸引物被选择用于 PCR 扩增 (表 1)。结果的 PCR 的产物以 QIAquick 旋转柱 (Qiagen Inc. Chatsworth, CA) 纯化, 而且遵照制造者的实验步骤以 PRISM ready reaction dyedeoxy terminator cycle 测序试剂盒 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) 从两端做测序。

[0211] 合成肽

[0212] 肽的氨基酸序列是由公布的 LMP1 序列而来, 这些 LMP1 序列是原自高加索原样型 1EBV 菌株 B95.8。用 Merrifield 固相法 (Mimotopes Pty Ltd, Melbourne, Australia) 在自动肽合成仪上合成 45 个肽, 长度为 17 个氨基酸, 8 个残基重叠, 且横跨整个 LMP1 序列。肽试样量被溶于 20% DMSO 中至 2mg/ml。

[0213] EBV 血清阳性捐赠者

[0214] 招募一组来自不同种族的 42 位健康病毒携带者与鼻咽癌患者来进行此研究。每位捐赠者经血清学和基于 PCR 的 DNA 分型方法进行 HLA 分型 (表 2)。

[0215] INF- γ -ELISPOT 分析

[0216] ELISPOT 分析是用来评估来自带有 LMP1 肽的大量血清阳性捐赠者的 PBMC 经刺激后能否诱导 T 细胞中 INF- γ 的表达 (Bharadwaj 2000)。简言之, 将 96 孔充分混合的纤维素酯膜平板 (Millipore, Bedford, USA) 预先涂上 100 μ L/ 孔的 10 μ g/mL 的抗-INF- γ mAb, 1-D1K (Mabtech, Stockholm, Sweden), 于 4 $^{\circ}$ C 过夜。每板用磷酸缓冲盐 (PBS) 洗涤 3 次, 不具活性的部位以 5% 的牛胎血清阻断。来自已知 HLA 分型的健康的 EBV 携带者的 PBMCs 用 Ficoll-Hypaque (Sigma) 密度梯度离心从全血中分离出来。将 PBMCs 加入三个一组的孔中, 每孔体积 100 μ L 含 2.5×10^5 个细胞, 然后将肽加入 PBMCs 中至终浓度达 5 μ g/mL。同时做一组含三种不同细胞数的测试, 三个孔分别含 2.5×10^5 , 1.5×10^5 及 1×10^5 个 PBMC 细胞。分析 PBMCs 对不同浓度肽的反应, 肽浓度分别为 10 μ g/mL, 5 μ g/mL 及 1 μ g/mL。在阴性对照中, 将 PBMCs 单独培养在未加肽的生长培养基中。平板于 37 $^{\circ}$ C, 5% 的 CO₂ 浓度下培养过

夜(约 16-20 小时),再前后分别以 PBST(0.05%的 Tween-20 于 PBS 中)与 PBS 冲洗三次,然后每孔加入 100 μ l 的 1 μ g/mL 抗 -IFN- γ mAb,7-B6-1(Mabtech,Stockholm,Sweden),并于室温孵育 3-4 小时。孵育后再前后分别以 PBST 与 PBS 各冲洗三次,再在每孔添加 100 μ l 的 1 μ g/mL 抗生蛋白链霉素-碱性磷酸酯酶缀合物(Sigma)。平板在室温下孵育 2 小时。然后再次分别以 PBST 与 PBS 洗涤孔各三次,用碱性磷酸酶缀合基质(BCIP/NBT;Sigma)与 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐和氮蓝四唑进行 30 分钟到 1 小时的显色反应,就可以看到呈黑色斑点状的个别 IFN- γ 生成细胞。以影像分析软件自动计算斑点数(ImagePro)(Bharadwaj 2001),并以斑点形成细胞(SFC)/ 10^6 PBMCs 来表示。分泌 IFN- γ 的 T 细胞的其数目是通过从实验组的 SFC 计数中减去阴性对照值来计算。

[0217] 去除 CD4⁺ 与 CD8⁺ 细胞

[0218] 用抗人 CD4⁺ 或 CD8⁺ 免疫磁性微粒去除新鲜 PBMCs 中的 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞(Dynabeads M450-CD4 和 M450-CD8),分别(Dyna1,Oslo,Norway)依照厂商的建议。通过对被去除的 PBMCs 用 FITC- 缀合抗 -CD8 和 PE- 缀合抗 -CD4 抗体双重染色,及用 Coulter EPICSXL 细胞计数器的流式细胞仪来确定去除的有效性。FACScan 分析可确定此实验方法能去除 > 95% 的 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞。细胞被重新计数,再将细胞重悬于 R10 中,并设置于一式三份的 ELISPOT 分析中。

[0219] 多克隆 CTL 系与 LMP1 特异性 CTL 克隆的建立

[0220] 依先前公布的方法(Moss1988;Khanna1998)来建立多克隆 CTL 系与 LMP1 特异性 CTL 克隆。简言之,在 24 孔板中 2ml 孔体积,用被 10 μ M 肽所触发的 1×10^6 个自体淋巴细胞刺激 2×10^6 个 PBMCs(应答物对刺激物比值为 2 : 1)1 小时。3 天后加入含有 IL-2(10IU/ml)的培养基让细胞继续增殖。到第 7 天时以 γ 放射性(8000rad)自体 LCLs 再次刺激淋巴细胞。在培养基中十天后,这些细胞在针对肽敏感的自体 PHA 胚细胞的标准 ^{51}Cr 放射分析中用作多克隆效应子。

[0221] 为了生产对 LMP1 衍生肽有特异性的外周血 CTL 克隆,在孔体积在培养基中的 24 孔板的 2ml 孔中用对肽敏感的(10 μ g 肽/ml)自体免疫细胞(1×10^6)重新活化健康捐赠者的 PBMCs(2×10^6)。3 天后,细胞被接种到 0.35% 的琼脂糖上,并在含有 Γ IL-2(50IU/ml)的 T 细胞生长培养基维持。3 天后,长出的克隆被转移到圆底的 96-孔培养皿中(Life Technologies),并培养于含有 Γ IL-2(50-100IU/ml)的 T 细胞培养基中。

[0222] T 细胞对 T 细胞的杀伤

[0223] 此项技术(Burrows,1992)是基于在 CTL 培养基中的细胞对彼此呈递肽抗原的活性,如果是合适的肽,将导致 CTL-CTL 杀伤。CTL 克隆(约 300 个细胞/孔)孵育在含 10 μ M 肽的 25 μ l T 细胞培养基中。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 小时后用倒置显微镜评估细胞溶解的情形。

[0224] 细胞毒性分析

[0225] 以合成的肽表位对靶细胞预敏,然后用 ^{51}Cr 孵育 90 分钟。孵育后在生长培养基中洗涤这些细胞,并将这些细胞用做 5 小时 ^{51}Cr 放射分析中的靶(Moss,1988)。

[0226] MHC 稳定性分析

[0227] 为评估 MHC 与 EBV 分离群得到的 HLA A2-限制性 LMP1 表位变异体的结合,将 T2 细胞(2×10^5)与 200 μ l 的每种肽(100 μ g/ml)在 26 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 14-16 小时,接着在于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2-3 小时。孵育后采用以特异性单克隆抗体(HB82,ATCC),通过 FACS 测量 HLA A2 的

表达。

[0228] 结果

[0229] 不同种族健康病毒携带者体内的 LMP1- 特异性 T 细胞应答

[0230] 为了充分描述记忆 T 细胞对血清阳性病毒携带者体内 LMP1 的应答,我们使用 ELISPOT 分析法,这种分析法可以在体内快速地勾勒出 LMP1- 特异性免疫应答而不会延长体内培养。用整组重叠 LMP1 肽刺激分离自血清阳性病毒携带者的 PBMC(表 2),并检测生产 INF- γ 的细胞。图 1A 和 B 代表用整组重叠肽做 ELISPOT 分析的数据(17 个氨基酸长度,8 个残基重叠)。在检测的 21 个健康捐赠者中,有 7 位对 45 种肽中的 7 种有强烈的体内应答(SFC 范围从 39-824/10⁶ 个 PBMC)(图 1A)。这些应答的一个有趣现象是大部分的 T 细胞反应都直接针对这些存在于 LMP1 跨膜部分与 CTAR1 结构域中的表位,然而没有发现任何针对 CTAR2 和 N 末端的反应(图 1B)。特别地,CTAR1 结构域中几乎有 80% 的区域皆会被 T 细胞识别。图 1 列出所有会被不同捐赠者识别的 17 个氨基酸长度的肽。为了鉴定出能对这些肽有应答的 T 细胞亚型,我们从 7 位能识别 17mer 肽的捐赠者中分离出 PBMCs,将其分成 CD4 消去型与 CD8 消去型两群,然后再用 ELISPOT 分析法检测。这些肽中有 5 种对 CD4⁺ 与 CD8⁺T 细胞都有活性,这表明这些序列包括了 MHC I 型与 MHC II 型限制性表位。另一方面,肽 DWTGGA LLVLYSFALML 清楚地显示出其只对依赖于 CD8⁺T 细胞的活性,然而对肽 TDDSGHES DSNSNEGRH 的应答则主要是由 CD4⁺T 细胞介导(图 2A 和 B)。肽 TDDSGHES DSNSNEGRH 的依赖于 CD4 的活性与先前 Leen 及其同事所观察到的结果一致,他们图绘出了该序列中的 HLA DQ2- 限制性表位。

[0231] LMP1 特异性 T 细胞应答的详细做图

[0232] 在 ELISPOT 分析中,使用经过截短的 17mer 肽来得到 LMP1 特异性 CD8⁺T 细胞应答的详细做图。实验起初以 12mer 重叠性肽来绘制 17mer 肽中的免疫原性区域。取自 4 位个体捐赠者的重叠肽的代表性如图 3A-D 所示。总的 12 种 12mer 肽被认为可能是决定因子(参见表 2)。基于这些 12mer 肽,跨越 12mer 肽的重叠的 9mer 肽被用于界定出最小表位序列。来自 4 个不同捐赠者的代表性数据如图 4A-D 所示。共有 18 种 9mer 肽被认为可能是最小的表位序列(表 3)。其中两种最小序列(YLLEMLWRL 和 YLQQNWWTL)在之前已被鉴定为 CTL 表位(Khanna, 1998),而其它的序列则是在本研究中第一次被发现。

[0233] 新 LMP1 CTL 表位的特性

[0234] 为了进一步描述由 ELISPOT 分析所确定的最小 T 细胞表位的特性,我们制备出对这些表位有特异性的多克隆 CTL 细胞系与克隆 CTL 细胞系。用合成的肽表位刺激来自健康血清阳性捐赠者的 PBMCs,并在标准 ⁵¹Cr 放射实验来建立 CTL 克隆或多克隆细胞系。图 5 与图 6 为两种新表位(IALYLQQNW 和 ALLVLYSFA)的一系列数据。先以肽敏感的自体 PBMC 来刺激,接着再以放射性自体 LCL 连续重复刺激以产生 IALYLQQNW 肽特异性 CTL 克隆。用 ⁵¹Cr 放射分析针对于对肽敏感的自体与异体 PHA 胚细胞以及 LCLs 来筛选具有 IALYLQQNW 特异性 CTL 活性的 CTL 克隆。图 5A 中的数据清楚地显示,与 CTL 仅共享 HLA B57 的靶细胞被 IALYLQQNW 特异性 CTL 克隆所识别,这表明该表位只受 HLA B57 等位基因限制。自体 PHA 胚细胞最小表位的滴定进一步确定了该 CTL 克隆的精细特异性(图 5B)。

[0235] 先前对 HIV CTL 表位的研究显示,相似的 HLA I 型分子可呈现出完全相同的肽如 CTL 表位(Goulder 等,2000)。因为 HLA B57 与 HLA B58 的一般亚型只有几个氨基酸

的差异,并享有相似的肽结合基元,所以我们便探究 IALTLQQNW 也会受到 HLA B58 等位基因的限制的可能性。我们对两位 HLA B58 健康血清阳性捐赠者的研究也确实显示出对最小 IALTLQQNW 表位有同等强烈的应答(表 3)。这些观察显示,该表位展现出对 HLAB57 与 HLAB58 两者的双重 HLA 限制。用与上述相类似的方式鉴定了 HLA-A2 限制性 CTL 表位。用肽特异性 T 细胞系来确认 ALLVLYSFA 表位的 HLA A2 限制性(图 6A)。ALLVLYSFA 表位特异性 CTL 克隆的精细特异性随后通过最小肽的剂量应答分析来证实(图 6B)。

[0236] 其它 17-mer 肽, TDDSGHESDSNSNEGRH, 在 ELISPOT 分析中表现出 CD8⁺T 细胞应答, 分析中有 3/21 的健康捐赠者其反应大小介于 131-190SFC/10⁶PBMC 之间(图 1A)。建立自两位不同捐赠者的多克隆 CTL 细胞系会识别以肽包被的自体 PHA 胚细胞(数据未列出来)。两位捐赠者(MM 和 RE)分别识别最小肽 ESDSNSNEG 和 DSNSNEGRH, 但这些最小表位并不会导致 CTL 细胞系的产生。值得注意的是, Leen 及其同事之前已绘制出一个位于 17mer 序列之间的 HLA DQ2- 限制性 T 细胞表位(表 3)。

[0237] 不同人种对最小 HLA I 型 - 限制性 LMP1 CTL 表位的识别

[0238] 为了确定对 HLA I 型 - 限制性 LMP1 CTL 表位识别的频率, 我们用 ELISPOT 分析法从一组不同种族的健康病毒携带者中筛选出 PBMC。分析的详细摘要列于表 3。此分析中包含 4 种不同的 HLA I 型限制性及一种 HLA II 型限制性 T 细胞表位。我们观察到对有 35-45% 测试的捐赠者中对 HLA-A2 限制性 YLLEMLWRL, YLQQNWWTL 和 ALLVLYSFA 表位有强烈应答。这些应答在高加索人中有较高的一致性, 而这些表位被东南亚捐赠者识别的频率则较低。HLA-B57 限制性 IALYLQQNW 表位被 5/7 的 HLA B57 阳性个体所识别。令人感兴趣的是, 一些 HLA B58 阳性捐赠者(3/5)也识别该表位, 且与 HLA B57 阳性捐赠者同样有效, 由此进一步证实了该表位有双重的 HLA I 型限制性。HLA II 型限制性 LMP1 表位 TDDSGHESDSNSNEGRH 会被所有三种健康的病毒携带者所识别。

[0239] 源自不同地理区域的 EBV 分离群中其 HLA I 型限制性 LMP1 CTL 表位的序列分析

[0240] 本发明与我们实验室先前的研究(Khanna, 1998)中, LMP1 内的表位都通过参考 I 型 EBV 菌株, B95.8 再活化的 CTL 来确认。然而在治疗 EBV 相关恶性肿瘤时, 这种表位若是有效 CTL 治疗的基础, 我们就必须首先确定这些表位序列在世界各地不同人群的其它 EBV 菌株中的保守程度。因此, 我们从健康病毒携带者与 NPC 活体切片中分离出许多 EBV, 并将其编码 LMP1 表位的 DNA 区域做序列分析。四种 LMP1 表位(IALYLQQNW, ALLVLYSFA, YLLEMLWRL 和 YLQQNWWTL)的序列分析结果的详细摘要列于表 4。来自高加索, 非洲以及东南亚捐赠者病毒分离株, 其 HLAA2 限制性(ALLVLYSFA 和 YLQQNWW TL)以及 HLA B57 和 B58 限制性(IALYLQQNW)表位皆高度保留(表 4)。只有少数病毒分离株显示出有轻微的表位序列变异。在新几内亚人分离株中, 虽然 YLQQNWW TL 和 IALYLQQNW 表位通常是保守的, 然而取代的情形在 ALLV LYSFA 中更加普遍。每单一分离株都显示有一个相同的改变, 即在第 7 位由丝氨酸变为丙氨酸(表 4)。

[0241] 对 HLA A2 限制性表位的序列分析, 来自不同人种的 EBV 分离株中的 YLLEMLWRL 揭示了一个有趣的遗传变异形式。高加索人分离株有 5/11 对 YLLEM LWRL 表位表现出原样型 B95.8 序列, 其它 7/11 的分离株则有一些改变, 影响一个或多个残基(表 4)。在四个分离株中, 位置 2 的亮氨酸, 位置 5 的甲硫氨酸以及位置 8 的精氨酸分别被取代为苯丙氨酸, 异亮氨酸以及甘氨酸。其它两个分离株在位置 2 与位置 5 或只有位置 5 显示有取代。对来自

东南亚人群的病毒分离株的序列分析显示几乎所有分离株皆有相同的取代情形,其中包括位置 2(L → F) 和位置 5(M → I) 的取代。一个分离株显示在位置 4 有突变(E → D)。在这必须重要地强调,来于自发性 LCLs 和 NPC 活体切片两者的病毒分离株一般都表现出相同的突变形式(表 4)。在东南亚人群的分离株中,并没有检测到任何的野生型序列。令人感兴趣的是,在东南亚人群中发现的表位 YLLEMLWRL 表位的显性遗传变异形式(YFLEILWRL),这也常出现在高加索人群的病毒分离株中。

[0242] 为了更进一步表针 YLLEMLWRL 表位的遗传变异体,我们合成每种变异体序列的合成肽,并用 EBV 特异性 CTL 来做 HLA 结合和免疫识别的评估。如图 7 所示的数据表明,在致敏性自体 PHA 胚细胞被特异性 CTL 克隆水解时,大多数变异体序列的合成肽作用效率比原养野生型 YLLEMLWRL 肽显著要低。只有一种变异体序列 YLLEILWRL 被认为与野生型表位同样有效(图 7A)。此外,在用常见于东南亚人群分离株的变异体肽序列(YFLEILWRL) 孵育 T2 细胞时,并无法挽救 HLA A2 的表达(图 7B)。其它变异体肽(YFLEILWGL, YLMEILWRL 和 YLLEILWRL) 却明显地增加了 T2 细胞上 MHC 表达,这表示造成这些变异体丧失其抗原性归因于 T 细胞受体与 MHC-肽复合体间的相互作用不恰当,而不是不与 MHC 结合。

[0243] 实施例 2

[0244] 材料与方法

[0245] 重组 LMP1 多表位插入片段的构建

[0246] 编码多表位氨基酸序列的 DNA 序列是由通用密码子设计的。我们将有 20 个碱基对重叠的 5 条长寡核苷酸(引物 1-5,长度范围在 74-100 个碱基之间)代表了多表位 DNA 序列,通过重叠延伸和逐步不对称 PCR(stepwise asymmetric PCR)(参见图 8)的剪接方式将它们在一起退火。简言之,多表位序列特异性引物 LMPA 与 LMPB 用开始为高温的 PCR 反应(94°C,1 分钟)扩增 5 个循环,反应体积为 20 μl 内含延长酶混合物与 PCR 缓冲液。5 个循环结束时,PCR 程序会暂停在 72°C,将上述反应液体 2 μl 转移到新的 72°C 预热的 20 μl 反应液中,用引物 LMPC 及多表位序列特异性正向引物再进行另五个循环。在第 10 个循环时,程序会再次暂停,再将 2 μl 后一次的反应液添加到新的 20 μl 反应液中,用引物 LMPD 及多表位序列特异性正向引物再进行五个循环。所有寡核苷酸都被加入之前,该逐步 PCR 被一直重复。在最后一个步骤中,用多表位序列特异性正向和反向引物将最后一次的 2 μl 反应液做扩增 25 个循环。

[0247] 该片段的核酸序列(从 5'末端起)依次编码 Bam HI 限制性酶切位点,Kozak 共有序列,甲硫氨酸起始密码子,13 个连续的最小 LMP1 和 LMP2 CTL 表位(表 5),终止密码子,EcoRI 限制性酶切位点(图 8)。全长凝胶纯化的 PCR 片段被克隆到接入 pcDNA3 表达载体的 BamHI/EcoRI 位点,通过测序检查突变。

[0248] 制备 Ad5-LMP 多表位疫苗载体

[0249] 使用使用 Adeno-X 系统(CLONTECH, Palo Alto, CA) 的高效的连接方法 {Mizuguchi 1998 & 1999} 来装配和生产基于 Ad5 的腺病毒(参见图 8)。LMP1 多表位插入片段被接到 pAd-TrackCMV 的 EcoRI 与 BamHI 位点。然后通过转染人类胚胎肾脏(HEK)293 细胞,将重组 Ad5 载体包装入感染性腺病毒中,并通过冻-融从被转染的细胞收获重组腺病毒(指 Ad5-LMPpoly)。

[0250] 细胞系的建立和维持

[0251] 用 B95.8 病毒分离株对外周 B 细胞进行外源性病毒转化, 以从血清阳性捐赠者建立起 EBV 转化的 LCLs。这些细胞系一直被常规地维持在添加有 2mM L-谷氨酸盐, 100IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素和 10% FCS (生长培养基) 的 RPMI 1640 中 (Gibco Invi-trogen Corp., Carlsbad, CA)。此外, 胚胎肾脏细胞系 293 {Graham, 1977} 被维持在含 10% 的牛胎儿血清的 DMEM 中。

[0252] 用 Ad5-LMPpoly 载体对 HLA A2/K^b 转基因鼠的免疫

[0253] 用于本研究的 HLA A2/K^b 转基因鼠已再别处描述过 (Theobald, 1997)。这些小鼠表达一种嵌合 I 型分子, 该分子由人类 A*0201 等位基因的 $\alpha 1$ 与 $\alpha 2$ 结构域, 以及鼠 H-2K^bI 型分子的 $\alpha 3$ 结构域所组成。用 10^8 噬斑形成单位 (plaque forming units, PFU) 的重组 Ad5-LMPpoly 或对照组腺病毒对这些鼠进行腹膜内接种疫苗。3 周后收成脾脏细胞, 并测试表位-特异性 T 细胞应答。用 ELISPOT 和体内 CTL 实验来检测这些 T 细胞应答。

[0254] 肿瘤攻击和多表位免疫

[0255] 应用两种不同的接种策略来评价 LMP 多表位疫苗的功效。在第一组实验中, 用或 Ad5-LMPpoly 或对照组腺病毒 (10^9 PFU/ 每只鼠) 对 HLA A2/K^b 鼠进行腹膜内免疫。免疫 3 周后, 用 10^7 个活 EL4-A2/K^b-LMP1 细胞这些鼠被皮下攻击。攻击后, 定期地监测这些鼠 21 天, 并以标尺测量肿瘤大小。在第二组实验中, 先用 EL4-A2/K^b-LMP1 (每只鼠 10^7 个细胞) 肿瘤细胞攻击 HLA A2/K^b 鼠。攻击 10 天后, 当肿瘤直径大小约位 0.2cm 时, 再用或者 Ad5-LMPpoly 或者对照组腺病毒免疫这些鼠。定期地监测肿瘤的退化来评价 LMP 多表位疫苗的治疗效果。根据动物伦理委员会的准则, 肿瘤直径 > 1.0cm 的任何小鼠都必须使其死亡。

[0256] 结果

[0257] 重组腺病毒 LMP 多表位编码的 CTL 表位的内源性加工与 CTL 识别

[0258] 为了监测是否多表位 (Ad5-LMPpoly) 所编码的 LMP 表位 (表 5) 被内源性加工了, 我们把被 Ad5-LMPpoly 感染的靶的细胞暴露给对各种表位具有特异性的 LMP1 或 LMP2 特异性 CTL 多克隆细胞系。这些 CTL 细胞系是来自于健康的病毒携带者。与 HLA 配对的成纤维细胞和 Ad5-LMPpoly 感染的 LCLs, 被个别的 LMP 特异性 CTL 细胞系所识别 (图 9)。这些结果清楚地显示, 被包括在腺病毒 LMP 多表位内的 HLA I 型限制性 CTL 多表位能被有效的加工并呈递给靶的细胞。

[0259] 在接下来的实验中, 腺病毒 LMP 多表位被用于在体外反复刺激 PBMC 以产生二级 CTL 应答, PBMC 源自健康的 EBV 血清阳性个体。所产生的多克隆培养物被用做抗自体 PHA 胚细胞的效应物, 这些胚细胞已先被 LMP1 或 LMP2 肽表位致敏。图 10 的数据清楚地显示 LMP 多表位能高效地唤起多重 CTL 应答, 其应答对每一位捐赠者所表达的 HLA 等位基因所限制的表位有特异性。例如, LMP 多表位会刺激针对表位 YLQ (HLA A2- 限制性, LMP1) 和 CLG (HLA A2- 限制性, LMP2) 的强烈的 T 细胞应答, 也观察到针对表位 ALL (HLA A2- 限制性, LMP1) 和 YLL (HLA A2-, A68- 和 A69- 限制性, LMP1) 的应答。

[0260] 相反地, 用 EBV 转化的 LCL 刺激诱导非常有限的 LMP 特异性 T 细胞的扩展, 而且 LMP 肽致敏的靶的细胞的溶解水平低于可被检测的程度 (数据未显示)。

[0261] Ad5-LMPpoly 疫苗的免疫作用反转了 LMP1 表达肿瘤的生长

[0262] 为了检测腺病毒 LMP1 多表位疫苗所诱导的 T 细胞应答是否能提供针对表达 LMP1 的肿瘤细胞的保护作用, 用 Ad5-LMPpoly 或对照组腺病毒对两组 HLA A2/K^b 小鼠 (每组 10

只) 进行首次免疫两次, 每次间隔 14 天, 然后用 EL4-A2/K^b-LMP1 细胞攻击, 并定期地监测这些小鼠的肿瘤生长情况。虽然两组都有肿瘤长出, 但在对照组的腺病毒免疫的小鼠中肿瘤生长情况较剧烈, 而且对肿瘤的攻击并不显示任何保护作用 (图 11)。于此必须强调, 用对照组腺病毒或 Ad5-LMPpoly 免疫的动物不显示针对 EL4/A2K^b 细胞攻击的保护作用, 这表示表位特异性免疫应答是此保护作用的关键 (数据未显示)。

[0263] 讨论

[0264] 何杰金氏病与鼻咽癌有一个重要的共同特征, 即 EBV 抗原的表达通常都受限于 EBNA1, LMP1 和 LMP2。其中 EBNA1 被 HLA I 型路径保护, 以避免进行加工 (Levitskaya, 1995), 所以只有 LMP1 与 LMP2 才是靶的抗原, 可用于发展新的免疫策略以扩展抗原 - 特异性 T 细胞免疫以治疗何杰金氏病与鼻咽癌。其治疗方法主要在增加 T 细胞对 LMP 抗原的应答, 这在治疗与 EBV 相关的复发鼻咽癌和何杰金氏病中很有用。我们采用 ELISPOT 分析以充分描绘一组病毒携带者中 LMP1 特异性 T 细胞应答。在所有这些受测试的捐赠者中, 55-60% 的健康高加索人检测到有 LMP1 特异性 T 细胞应答。另一方面, 这种应答在东南亚的健康病毒携带者与鼻咽癌患者中则较少见。

[0265] 目前研究有一个令人感兴趣的现象, 即 80% 以上的针对 LMP1 的 T 细胞反应都是直接作用于跨膜区和 CTAR1 结构域。特别有趣的是, 不同的受测者皆会优先作用于 CTAR1 结构域。由 ELISPOT 分析法鉴定的 15mer 决定子中, 有 3/7 被定位于 CTAR1 结构域中。另一方面, 我们无法检测到 T 细胞对任何位于远端 C 末端 CTAR2 结构域内的肽有应答, 然而, CTAR2 结构域对一些 LMP1 介导的功能来说都是必须的。先前的研究已表明单独的该区域的突变或缺失就会完全破坏 LMP1 介导的讯号传导与调节过程。虽然 T 细胞对 CTAR2 区域没有应答的确切原因还未知, 但有可能是 EBV 会保护此重要的功能区域以避免受到潜在的免疫控制。如果知道这种避免的机制就有可能找到对 CTAR2 结构域起免疫性作用的原因, 如此不仅能阻断 LMP1 介导的转化作用, 还能破坏正常细胞与恶性细胞的潜在感染。

[0266] 先前的研究提出, 全世界不同地理区域的 LMP1 序列有高度的变异性。在使用 LMP1 作为治疗复发的 HD 与 NPC 疾病时的潜在免疫疗法的靶的时, 该遗传变异被认为是一个最主要的阻碍。因此, 确定 B95.8 衍生的 LMP1 表位序列在来自全世界不同地理区的 EBV 分离株中的保受状况是很重要的。研究一大组来自不同地区的人的外周血液衍生的 EBV 分离株和 NPC 活体切片, 我们发现来自 LMP1 的 T 细胞表位序列通常是高度保守的。这里所测序的 4 种表位中有 3 种显示出轻微的变异。有重大变异的唯一序列为 HLA A2 父型 (supertype) - 限制性 YLLEMLWRL, 其在来自不同地区的 EBV 分离株中有不同的序列形式。这在来自东南亚的分离株中表现的尤其明显, 因为其 YLLEMLWRL 表位区域内有相同形式的遗传变异。而且在分离自 NPC 与自发性 LCLs 的分离株间, 其遗传变异情形相同。虽然在高加索人和 PNG 中的 YLLE MLWRL 表位中也发现共同序列变异体, 但这些分离出的表位在每一特定地理区会额外表现出不同的遗传变异。对 YLLEMLWRL 表位的遗传变异做抗原性分析发现, 变异体序列 (YFLEILWRL) 与野生型序列相较, 其普遍见于东南亚人群的变异序列不仅难被表位特异性 CTL 识别, 也明显的不被 HLA A2 结合。相反地, 虽然一些其他的变异序列 (YFLEILWGL 和 YLMEILWRL) 不易被 T 细胞识别, 但它们对 HLA A2 的结合却没有明显影响。虽然该表位内有如此高的程度的遗传变异的确切原因 / 机制还未明, 但有可能是来自 NPC 流行的东南亚的分离株中的该表位内的突变可以有助于保护这些分离株免受 EBV 特异性 CTL 应答的影响。

[0267] 鉴于 LMP1 有高度致癌可能性,所以基于全长 LMP1 的疫苗或免疫疗法策略很可能不是治疗 NPC 与 HD 的优先选择。而且,本研究表明了在大多数健康的病毒携带者中, LMP1 通常只引发低水平的 T 细胞应答。推测这是因为 LMP1 位于贯穿膜的区域,使其不易进入典型的 MHC I 型代谢路径。使用高度保守的 LMP1 与 LMP2 表位作为多表位疫苗明显地能够克服这些潜在的限制。

[0268] 相应地,本申请发明人已经证明了用表达含有一系列邻近的最小 LMP1 与 LMP2 CTL 表位的 LMP 多表位蛋白的腺病毒载体免疫接种能够引起多重独立的 MHC- 限制性 CTL 应答。这些表位不仅被人类细胞进行有效的内源性加工,也能在健康的病毒携带者中唤起对 LMP 抗原具有特异性的记忆型 CTL 应答。而且,腺病毒多表位疫苗也能引发初级 T 细胞应答,这显示其在肿瘤攻击系统中有治疗效果。

[0269] 于此需特别强调,用于 HD 和 NPC 的基于多表位的疫苗有许多优于传统疫苗的地方,它是基于全长的 LMP 抗原。多表位蛋白尤其不稳定,而且由于它们的限制性 2 级与 3 级结构,它们在细胞质中会快速地被分解。另一方面,全长的 LMP 抗原不可能被快速分解,而且可以引起细胞内多种讯号传导作用导致注射部位的二级癌症的发生。其它重要优点包括,多表位疫苗以相对微小的构造,不需其它相关物质,就可引发长期保护性 CTL 应答以对抗大量的 CTL 表位。最后,基于多表位的疫苗也可能能够克服全世界不同地理人群中广泛存在的 LMP1 遗传变异的潜在问题。

[0270] 如果基于 CTL 的 NPC 与 HD 的治疗可以应用于显著性数量的患者,靶的群体必须通过以高频率存在的 HLA 等位基因的频率必须要高。在本文中,除了通过 A11, A24 和 B40 被限制的 LMP1, LMP2 特异性应答的等位基因特别令人感到兴趣,因为这些等位基因在中国南方人群中很常见 (A11, 56% ;A24, 27% ;B40, 28%),特别其中 NPC 是地方性疾病。因此,我们发展出一种新的 LMP 多表位治疗疫苗,使用含有 LMP1 与 LMP2 两表位的不具复制能力的腺病毒,这些表位被普遍存于不同种族人群中的 HLA 等位基因, A2, A11, A23, A24, B27, B40 和 B57 所限制。估计这些优先筛选的 MHC I 型限制性表位可有效作用在 90% 以上的亚洲,非洲以及高加索人群。

[0271] 整个专利说明书的主要目的是要描述本发明的优选实施方案,但而不将本发明限制于任一实施方案或特定的特性集合。此文中所解释描述的实施例可做不同的改变或修饰而不会背弃本发明的精神和范围。

[0272] 本说明书中提及的所有计算机程序,计算方法,专利以及科学文献在此处通过引用都完整地整合到本说明书中。

[0273] 参考文献

[0274] 1. Anagnostopoulos, I. and M. Hummel. 1996. Epstein-Ban-virus intumours. *Histopathology* 29 :297-315.

[0275] 2. Bharadwaj, M. , P. G. Parsons, and D. J. Moss. 2001. Cost-efficient quantification of enzyme-linked immunospot. *Biotechniques* 2001. Jan. ;30. (1.) :36. -8. 30 :36-38.

[0276] 3. Burrows, S. R. , S. J. Rodda, A. Suhrbier, H. M. Geysen, and D. J. Moss. 1992. The specificity of recognition of a cytotoxic T lymphocyte epitope. *Eur. J. Immunol.* 22 :191-195.

- [0277] 4. Gahn B, Siller-Lopez F, Pirooz AD, Yvon E, Gottschalk S, Longnecker R, Brenner MK, Heslop HE, Aguilar-Cordova E, Rooney CM. 2001. Adenoviral gene transfer into dendritic cells efficiently amplifies the immune response to LMP2A antigen: a potential treatment strategy for Epstein-Barr virus-positive Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Cancer* 93:706-713.
- [0278] 5. Gires, O., F. Kohlhuber, E. Kilger, M. Baumann, A. Kieser, C. Kaiser, R. Zeidler, B. Scheffer, M. Ueffing, and W. Hammerschmidt. 1999. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J.* 18:3064-3073.
- [0279] 6. Goulder, P. J., Y. Tang, S. I. Pelton and B. D. Walker. 2000. HLA-B57-restricted cytotoxic T-lymphocyte activity in a single infected subject toward two optimal epitopes, one of which is entirely contained within the other. *J. Virol.* 74:5291-5299.
- [0280] 7. Hammarskjöld, M. L. and M. C. Simurda. 1992. Epstein-Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of NF- κ B activity. *J. Virol.* 66:6496-6501.
- [0281] 8. Henderson, S., M. Rowe, C. Gregory, D. Croom-Carter, F. Wang, R. Longnecker, E. Kieff, and A. B. Rickinson. 1991. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65:1107-1115.
- [0282] 9. Khanna, R., S. R. Burrows, J. Nicholls, L. M. Poulsen. 1998. Identification of cytotoxic T cell epitopes within Epstein-Barr virus (EBV) oncogene latent membrane protein 1 (LMP1): evidence for HLA A2 supertype-restricted immune recognition of EBV-infected cells by LMP1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 28:451-458.
- [0283] 10. Khanna, R. and S. R. Burrows. 2000. Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:19-48.
- [0284] 11. Khanna, R., S. R. Burrows, M. G. Kurilla, C. A. Jacob, I. S. Misko, T. B. Sculley, E. Kieff, and D. J. Moss. 1992. Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T-cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J. Exp. Med.* 176:169-176.
- [0285] 12. Kienzle, N., M. Buck, S. L. Silins, S. R. Burrows, D. J. Moss, A. Winterhalter, A. Brooks, and R. Klann: 2000. Differential splicing of antigen-encoding RNA reduces endogenous epitope presentation that regulates the expansion and cytotoxicity of T cells. *J. Immunol.* 165:1840-1846.
- [0286] 13. Kulwichit, W., R. H. Edwards, E. M. Davenport, J. F. Baskar, V. Godfrey, and N. Raab-Traub. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:11963-11968.

- [0287] 14. Laherty, C. D., H. M. Hu, A. W. Opipari, F. Wang, and V. M. Dixit. 1992. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zincfinger protein expression by activating nuclear factor k B. *J. Biol. Chem.* 267 :24157-24160.
- [0288] 15. Lee, S. P., R. J. Tierney, W. A. Thomas, J. M. Brooks, and A. B. Rickinson 1997. Conserved CTL epitopes within EBV latent membraneprotein 2 :a potential target for CTL-based tumor therapy. *J. Immunol.* 158 :3325-3334.
- [0289] 16. Leen, A., P. Meij, I. Redchenko, J. Middeldorp, E. Bloemena, A. Rickinson and N. Blake. 2001. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+)T-helper 1 responses. *J Virol* 75 :8649-59.
- [0290] 17. Levitskaya, J., M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, P. M. SteigerwaldMullen G. Klein, M. G. Kurilla, and M. G. Masucci. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature.* 375 :685-688.
- [0291] 18. Meij, P., A. Leen, A. B. Rickinson, S. Verkoeijen, M. B. Vervoort, E. Bloemena, and J. M. Middeldorp. 2002. Identification and prevalence of CD8(+)T-cell responses directed against Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 and latent membrane protein 2. *Int. J. Cancer* 99 :93-99.
- [0292] 19. Mosialos, G., M. Birkenbach, R. Yalamanchili, T. VanArsdale, C. Ware, and E. Kieff. 1995. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80 :389-399.
- [0293] 20. Moss, D. J., I. S. Misko, S. R. Burrows, K. Burman, R. McCarthy, and T. B. Sculley. 1988. Cytotoxic T-cell clones discriminate between A- and B-type Epstein-Barr virus transformants. *Nature* 331 :719-721.
- [0294] 21. Murray, N. and A. McMichael. 1992. Antigen presentation in virus infection. *Curr. Opin. Immunol.* 4 :401-407.
- [0295] 22. Ranieri E, Herr W, Gambotto A, Olson W, Rowe D, Robbins PD, Kierstead LS, Watkins SC, Gesualdo L, Storkus WJ. 1999. Dendritic cell transduced with an adenovirus vector encoding Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B :a new modality for vaccination. *J Virol.* 73 :10416-25.
- [0296] 23. Rickinson, A. B. and E. Kieff. 1996. Epstein-Barr Virus, p. 2397-2446. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- [0297] 24. Salter, R. D. and P. Cresswell. 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J.* 5 :943-949.
- [0298] 25. Theobald, M. Biggs, J. Hernandez, J. Lustgarten, J. Labadie, C. Sherman L. A. 1997. Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 185 :833-841.
- [0299] 26. Wang, F. C. Gregory, C. Sample, M. Rowe, D. Liebowitz, R. Murray, A. Rickinson, E. Kieff. 1990. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear

proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes :EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. J. Virol. 64 :2309-2318.

[0300] 表 1

[0301]

捐赠者代码	HLA 类型	种族来源
DM	A24A29B44	高加索人
NK	A2B14B44	高加索人
LC	A1B8B18	高加索人
LL	A2B7B44	高加索人
MM	A1A3B44B57	高加索人
RE	A1A3B50B57	印度人
GC	A1A2B7B51	高加索人
MW	A1A3B8B35	高加索人
DY	A11A32B35B44	高加索人
TN	A11A24B54B75	越南人
MG	A1A3B7	高加索人
MB	A1A24B7B58	印度人
JD	A31A33B35B58	印度人
IM	A1A11B8B51	高加索人
LM	A28A32B12	高加索人
SS	A2A24B8B60	高加索人
SE	A2A29B44B60	高加索人
SB	A2B35B57	高加索人
CS	A3A23B35B44	高加索人
JT	A2A32B44B62	高加索人
MS	A1A24B7B8	高加索人
DS	A2B44B60	高加索人
WS	A2A32B27B60	高加索人
EL	A2A3B7B35	高加索人
KG	A1A3B7B57	高加索人
JG	A1B8B57	高加索人
AS	A2A3B7B35	高加索人
JF	未分型	高加索人
CV	未分型	越南人
TL	A2B13B58	泰国人 / 中国人
PR	A2A4B35B60	泰国人 / 中国人
PA	A2A11B60	泰国人
WE	A2A33B44B46	泰国人
SUr	A2A3B13B61	泰国人
CHu	A2A3B7B35	泰国人 / 中国人
SUm	A2B57	泰国人
SO	A1A24B35B57	泰国人
AN	A3A33B57B75	泰国人
CHa	A11A24B57B62	泰国人
SUc	A11A24B51B58	泰国人 / 中国人

捐赠者代码	HLA 类型	种族来源
CI	A2A33B46B58	

[0302]

表 2

肽编号	表位序列	识别的 12 个氨基酸序列	最小识别序列	CTL 反应性	HLA 限制性	参考资料
9	DWTGGALLVLYSFALML	ALLVLYSFALML GALLVLYSFALM DWTGGALLVLYS GGALLVLYSFAL	ALLVLYSFAL LLVLYSFAL ALLVLYSFAL VLYSFALML	Y Y Y Y	HLA A2 ND HLA A2 HLA A2	
17	LVLGIWYLLLEMLWRRLG	IYLLLEMLWRLG	YLLLEMLWRL	Y	HLA A2	Khanna 等
21	ILLALYLQQNWWTLLVD	IALYLQQNWWTL YLQQNWWTLLVD	IALYLQQNW ALYLQQNWW YLQQNWWTL QNWWTLLVD LYLQQNWWT	Y Y Y NT NT	HLA B57/B58 ND HLA A2 ND ND	Khanna 等
24	LJWMYYHGQRHSDEHHH	YYHGQRHSDEHH IWMYYHGQRHSD	QRHSDEHHH GQRHSDEHH YYHGQRHSD WMYYHGQRH	ND ND NT NT	ND ND ND ND	
27	TDDSGHESDSNSNEGRH	SGHESDSNSNEG	ESDSNSNEG DSNSNEGRH	Y ND	HLA DQ2 ND	Lee 等
38	PHSPSPDSAGNDGGPPQL	SDSAGNDGGPPQ DSAGNDGGPPQL	AGNDGGPPQ PSDSAGNDG	ND NT	ND ND	

[0303]

表 3

[0304]

表位	受测者 HLA 类型	受测者代 码	种族来源	CTL 反应 (SFC/10 ⁶ PBMC)
ALLVLYSFA	A2	LL	高加索人	192
	A2	GC	高加索人	96
	A2	NK	高加索人	88
	A2	SE	高加索人	10
	A2	EL	高加索人	80
	A2	TL	越南人	128
	A2	PR	泰国人 / 中国人	0
	A2	PA	泰国人 / 中国人	0
	A2	WE	泰国人	0
	A2	DS	高加索人	1184
	A2	WS	高加索人	592
	A2	SUr	泰国人	0
	A2	SB	高加索人	480
	A2	CHu	泰国人	0
	A2	SUm	泰国人 / 中国人	0
	A2	CI (NPC)	泰国人 / 中国人	0
	LALYLQQNW	B57	RE	印度人
B57		SB	高加索人	455
B57		MM	高加索人	80
B57		SUm	泰国人 / 中国人	0
B57		KG	高加索人	1952
B57		SO	泰国人	48
B57		AN	泰国人	100
B57		Cha	泰国人	0
B58		MB	印度人	240
B58		JD	印度人	955
B58		TL	越南人	504
B58		SUc (NPC)	泰国人	0
B58		CI (NPC)	泰国人 / 中国人	0

[0305] TDDSGHESDSNSNEGRH

[0306]

	HLA II 型	NK	高加索人	141
		MM	高加索人	131
		RE	印度人	190
YLLEMLWRL	A2	JF	高加索人	0
	A2	WS	高加索人	66
	A2	CV	高加索人	20
	A2	LL	高加索人	42
	A2	EL	高加索人	300
	A2	PR	泰国人/中国人	0
	A2	PA	泰国人/中国人	0
	A2	TL	越南人	136
	A2	WE	泰国人	0
	A2	NK	高加索人	160
	A2	AS	高加索人	100
	A2	SUr	泰国人	0
	A2	CHu	泰国人	0
	A2	SUm	泰国人/中国人	0
	A2	CI (NPC)	泰国人/中国人	0
YLQQNWWTL	A2	NK	高加索人	244
	A2	AS	高加索人	110
	A2	LL	高加索人	28
	A2	EL	高加索人	100
	A2	PR	泰国人/中国人	0
	A2	PA	泰国人/中国人	0
	A2	TL	越南人	196
	A2	WE	泰国人	0
	A2	JF	高加索人	44
	A2	WS	高加索人	38
	A2	CV	高加索人	26
	A2	SUr	泰国人	0
	A2	CHu	泰国人	0
	A2	SUm	泰国人/中国人	0
	A2	CI (NPC)	泰国人/中国人	0

[0307] 表 4

[0308]

病毒来源	表位序列									HLA 限制性	分离群数目
B95.8	GCC CTC CTT GTC CTC TAT TCC FTT GCT										
	A	L	L	V	L	Y	S	F	A	HLA A2	
高加索人	---	---	---	---	---	---	---	---	---		4
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	--G	---	---	---	---	---	---	---	---		1
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
非洲人	---	---	---	---	---	---	---	---	---		2
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
东南亚人 (自发)	--G	---	---	---	---	---	---	---	---		4
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
东南亚人 (NPC)	--G	---	---	---	---	---	---	---	---		14
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
新几内亚人	--A	---	T-G	---	---	---	G--	---	---		7
	-	-	-	-	-	-	A	-	-		
	--G	---	---	---	---	---	G--	---	---		1
	-	-	-	-	-	-	A	-	-		
B95.8	ATT GCT CTC TAT CTA CAA CAA AAC TGG										
	I	A	L	Y	L	Q	Q	N	W	HLA B57 和 B58	
高加索人	---	---	---	---	---	---	---	---	---		10
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	---	---	---	---	---	--C	---	---	---		1
	-	-	-	-	-	H	-	-	-		
非洲人	---	---	---	---	---	---	---	---	---		2
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
东南亚人 (自发)	---	---	---	---	---	---	---	---	---		4
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
东南亚人 (NPC)	---	---	---	---	---	---	---	---	---		14
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	C--	---	---	---	---	---	---	---	---		1
	L	-	-	-	-	-	-	-	-		
新几内亚人	---	---	---	---	---	---	---	---	---		10
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	---	---	---	---	---	---	--C	---	---		1
	-	-	-	-	-	H	-	-	-		

[0309]

病毒来源	表位序列									HLA 限制性	分离群数目
B95.8	TAC	TTA	TTG	GAG	ATG	CTC	TGG	CGA	CTT		
	Y	L	L	E	M	L	W	R	L	HLA A2	
高加索人	---	--C	---	---	--T	---	---	---	---		1
	-	F	-	-	I	-	-	-	-		
	---	---	---	---	---	---	---	---	---		5
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	---	--C	---	---	--T	---	---	G-G	---		4
	-	F	-	-	I	-	-	G	-		
	---	---	---	---	-T	---	---	---	---		1
非洲人	-	-	-	-	I	-	-	-	-		
	---	---	---	---	--T	---	---	---	---		2
	-	-	-	-	I	-	-	-	-		
东南亚人 (自发)	---	--C	---	---	--T	---	---	--G	---		3
	-	F	-	-	I	-	-	-	-		
	---	--C	---	--C	--T	---	---	--G	---		1
	-	F	-	D	I	-	-	-	-		
东南亚人 (NPC)	---	--C	---	---	--T	---	---	--G	---		15
	-	F	-	-	I	-	-	-	-		
新几内亚人	---	--C	---	---	--T	---	---	--G	---		4
	-	F	-	-	I	-	-	-	-		
	---	--C	---	--A	--T	---	---	--G	---		6
	-	F	-	-	I	-	-	-	-		
	---	C--	A--	---	--T	---	---	---	---		1
	-	-	M	-	I	-	-	-	-		
B95.8	TAT	CTA	CAA	CAA	AAC	TGG	TGG	ACT	CTA		
	Y	L	Q	Q	N	W	W	T	L	HLA A2	
高加索人	---	---	---	---	---	---	---	---	---		10
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	---	---	--C	---	---	---	---	---	---		1
	-	-	H	-	-	-	-	-	-		
非洲人	---	---	---	---	---	---	---	---	---		2
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
东南亚人 (自发)	---	---	---	---	---	---	---	---	---		4
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
东南亚人 (NPC)	---	---	---	---	---	---	---	---	---		15
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
新几内亚人	---	---	---	---	---	---	---	---	---		10
	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	---	---	---	--C	---	---	---	---	---		1
	-	-	-	H	-	-	-	-	-		

[0310] 表 5

[0311]

表位序列	表位代码	EBV 抗原	LMP1 定位	HLA 限制性	参考资料
YLLEMLWRL	YLL	LMP1	aa125-133	HLAA2, A68 和 A69	(Khanna1998)
YLQQNWWTL	YLQ	LMP1	aa159-167	HLAA2	(Khanna1998)
ALLVLYSFA	ALL	LMP1	aa51-60	HLAA2	本研究
IALYLQQNW	IAL	LMP2	aa156-164	HLAB57, B58	本研究
SSCSSCPLSKI	SSC	LMP2	aa340-350	HLAA11	(Lee1997)
PYLFWLAAI	PYL	LMP2		HLAA23	(Khanna1998)
TYGPVFMCL	TYG	LMP2	aa419-427	HLAA24	(Lee1997)
RRRWRLTV	RRR	LMP2	aa236-244	HLAB27	(Lee1997)
LLSAWILTA	LLS	LMP2	aa447-455	HLAA2. 3	(Lee1997)
LTAGFLIFL	LTA	LMP2	aa453-461	HLA2. 1	(Lee1997)
VMSNTLLSAW	VMS	LMP2	aa442-451	HLAA25	(Lee1997)
IEDPPFNSL	IED	LMP2	aa200-208	HLAB40	(Lee1997)
CLGGLTMV	CLG	LMP2	aa426-434	HLAA2. 1	(Lee1997)

[0312] 序列表

[0313] <110>The Council of the Queensland Institute of Medical

[0314] Research

[0315] Khanna, Rajiv

[0316] Jaikumar, Duraiswamy

[0317] <120>Epstein Barr Virus Peptide Epitopes, Polyepitopes

[0318] and Delivery System Therefor

[0319] <130>11441US2

[0320] <140>PCT/AU2003/01451

[0321] <141>2003-11-03

[0322] <150>2003901792

[0323] <151>2003-04-15

[0324] <150>2002952524

- [0325] <151>2002-11-07
[0326] <160>125
[0327] <170>PatentIn version 3.3
[0328] <210>1
[0329] <211>9
[0330] <212>PRT
[0331] <213>Epstein Barr Virus
[0332] <400>1
[0333] Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu
[0334] 1 5
[0335] <210>2
[0336] <211>9
[0337] <212>PRT
[0338] <213>Epstein Barr Virus
[0339] <400>2
[0340] Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu Gly
[0341] 1 5
[0342] <210>3
[0343] <211>9
[0344] <212>PRT
[0345] <213>Epstein Barr Virus
[0346] <400>3
[0347] Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu
[0348] 1 5
[0349] <210>4
[0350] <211>3
[0351] <212>PRT
[0352] <213>Epstein Barr Virus
[0353] <400>4
[0354] Gln Arg His
[0355] 1
[0356] <210>5
[0357] <211>5
[0358] <212>PRT
[0359] <213>Epstein Barr Virus
[0360] <400>5
[0361] Ala Gly Asn Asp Gly
[0362] 1 5
[0363] <210>6

- [0364] <211>3
[0365] <212>PRT
[0366] <213>Epstein Barr Virus
[0367] <400>6
[0368] Gln Asn Trp
[0369] 1
[0370] <210>7
[0371] <211>4
[0372] <212>PRT
[0373] <213>Epstein Barr Virus
[0374] <400>7
[0375] Val Leu Tyr Ser
[0376] 1
[0377] <210>8
[0378] <211>6
[0379] <212>PRT
[0380] <213>Epstein Barr Virus
[0381] <400>8
[0382] Asp Ser Asn Ser Asn Glu
[0383] 1 5
[0384] <210>9
[0385] <211>9
[0386] <212>PRT
[0387] <213>Epstein Barr Virus
[0388] <400>9
[0389] Gln Arg His Ser Asp Glu His His His
[0390] 1 5
[0391] <210>10
[0392] <211>9
[0393] <212>PRT
[0394] <213>Epstein Barr Virus
[0395] <400>10
[0396] Gly Gln Arg His Ser Asp Glu His His
[0397] 1 5
[0398] <210>11
[0399] <211>9
[0400] <212>PRT
[0401] <213>Epstein Barr Virus
[0402] <400>11

- [0403] Tyr Tyr His Gly Gln Arg His Ser Asp
 [0404] 1 5
 [0405] <210>12
 [0406] <211>9
 [0407] <212>PRT
 [0408] <213>Epstein Barr Virus
 [0409] <400>12
 [0410] Trp Met Tyr Tyr His Gly Gln Arg His
 [0411] 1 5
 [0412] <210>13
 [0413] <211>12
 [0414] <212>PRT
 [0415] <213>Epstein Barr Virus
 [0416] <400>13
 [0417] Tyr Tyr His Gly Gln Arg His Ser Asp Glu His His
 [0418] 1 5 10
 [0419] <210>14
 [0420] <211>12
 [0421] <212>PRT
 [0422] <213>Epstein Barr Virus
 [0423] <400>14
 [0424] Ile Trp Met Tyr Tyr His Gly Gln Arg His Ser Asp
 [0425] 1 5 10
 [0426] <210>15
 [0427] <211>17
 [0428] <212>PRT
 [0429] <213>Epstein Barr Virus
 [0430] <400>15
 [0431] Leu Ile Trp Met Tyr Tyr His Gly Gln Arg His Ser Asp Glu
 [0432] His His
 [0433] 1 5 10 15
 [0434] His
 [0435] <210>16
 [0436] <211>9
 [0437] <212>PRT
 [0438] <213>Epstein Barr Virus
 [0439] <400>16
 [0440] Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro Gln
 [0441] 1 5

- [0442] <210>17
 [0443] <211>9
 [0444] <212>PRT
 [0445] <213>Epstein Barr Virus
 [0446] <400>17
 [0447] Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly
 [0448] 1 5
 [0449] <210>18
 [0450] <211>12
 [0451] <212>PRT
 [0452] <213>Epstein Barr Virus
 [0453] <400>18
 [0454] Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro Gln
 [0455] 1 5 10
 [0456] <210>19
 [0457] <211>12
 [0458] <212>PRT
 [0459] <213>Epstein Barr Virus
 [0460] <400>19
 [0461] Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro Gln Leu
 [0462] 1 5 10
 [0463] <210>20
 [0464] <211>17
 [0465] <212>PRT
 [0466] <213>Epstein Barr Virus
 [0467] <400>20
 [0468] Pro His Ser Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro
 [0469] Pro Gln
 [0470] 1 5 10 15
 [0471] Leu
 [0472] <210>21
 [0473] <211>9
 [0474] <212>PRT
 [0475] <213>Epstein Barr Virus
 [0476] <400>21
 [0477] Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp
 [0478] 1 5
 [0479] <210>22
 [0480] <211>9

- [0481] <212>PRT
[0482] <213>Epstein Barr Virus
[0483] <400>22
[0484] Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp
[0485] 1 5
[0486] <210>23
[0487] <211>9
[0488] <212>PRT
[0489] <213>Epstein Barr Virus
[0490] <400>23
[0491] Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu Val Asp
[0492] 1 5
[0493] <210>24
[0494] <211>9
[0495] <212>PRT
[0496] <213>Epstein Barr Virus
[0497] <400>24
[0498] Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr
[0499] 1 5
[0500] <210>25
[0501] <211>12
[0502] <212>PRT
[0503] <213>Epstein Barr Virus
[0504] <400>25
[0505] Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu
[0506] 1 5 10
[0507] <210>26
[0508] <211>12
[0509] <212>PRT
[0510] <213>Epstein Barr Virus
[0511] <400>26
[0512] Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu Val Asp
[0513] 1 5 10
[0514] <210>27
[0515] <211>17
[0516] <212>PRT
[0517] <213>Epstein Barr Virus
[0518] <400>27
[0519] Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu

[0520]	Leu Val			
[0521]	1	5	10	15
[0522]	Asp			
[0523]	<210>28			
[0524]	<211>10			
[0525]	<212>PRT			
[0526]	<213>Epstein Barr Virus			
[0527]	<400>28			
[0528]	Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala Leu			
[0529]	1	5	10	
[0530]	<210>29			
[0531]	<211>9			
[0532]	<212>PRT			
[0533]	<213>Epstein Barr Virus			
[0534]	<400>29			
[0535]	Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala Leu			
[0536]	1	5		
[0537]	<210>30			
[0538]	<211>9			
[0539]	<212>PRT			
[0540]	<213>Epstein Barr Virus			
[0541]	<400>30			
[0542]	Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala			
[0543]	1	5		
[0544]	<210>31			
[0545]	<211>9			
[0546]	<212>PRT			
[0547]	<213>Epstein Barr Virus			
[0548]	<400>31			
[0549]	Val Leu Tyr Ser Phe Ala Leu Met Leu			
[0550]	1	5		
[0551]	<210>32			
[0552]	<211>12			
[0553]	<212>PRT			
[0554]	<213>Epstein Barr Virus			
[0555]	<400>32			
[0556]	Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala Leu Met Leu			
[0557]	1	5	10	
[0558]	<210>33			

[0598] <213>Epstein Barr Virus
 [0599] <400>38
 [0600] Ser Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu Gly
 [0601] 1 5 10
 [0602] <210>39
 [0603] <211>17
 [0604] <212>PRT
 [0605] <213>Epstein Barr Virus
 [0606] <400>39
 [0607] Thr Asp Asp Ser Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu
 [0608] Gly Arg
 [0609] 1 5 10 15
 [0610] His
 [0611] <210>40
 [0612] <211>9
 [0613] <212>PRT
 [0614] <213>Epstein Barr Virus
 [0615] <400>40
 [0616] Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ala Phe Ala
 [0617] 1 5
 [0618] <210>41
 [0619] <211>9
 [0620] <212>PRT
 [0621] <213>Epstein Barr Virus
 [0622] <400>41
 [0623] Ile Ala Leu Tyr Leu His Gln Asn Trp
 [0624] 1 5
 [0625] <210>42
 [0626] <211>9
 [0627] <212>PRT
 [0628] <213>Epstein Barr Virus
 [0629] <400>42
 [0630] Ile Ala Leu Tyr Leu Gln His Asn Trp
 [0631] 1 5
 [0632] <210>43
 [0633] <211>9
 [0634] <212>PRT
 [0635] <213>Epstein Barr Virus
 [0636] <400>43

- [0637] Leu Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp
[0638] 1 5
[0639] <210>44
[0640] <211>9
[0641] <212>PRT
[0642] <213>Epstein Barr Virus
[0643] <400>44
[0644] Tyr Phe Leu Glu Ile Leu Trp Arg Leu
[0645] 1 5
[0646] <210>45
[0647] <211>9
[0648] <212>PRT
[0649] <213>Epstein Barr Virus
[0650] <400>45
[0651] Tyr Phe Leu Glu Ile Leu Trp Gly Leu
[0652] 1 5
[0653] <210>46
[0654] <211>9
[0655] <212>PRT
[0656] <213>Epstein Barr Virus
[0657] <400>46
[0658] Tyr Leu Leu Glu Ile Leu Trp Arg Leu
[0659] 1 5
[0660] <210>47
[0661] <211>9
[0662] <212>PRT
[0663] <213>Epstein Barr Virus
[0664] <400>47
[0665] Tyr Phe Leu Asp Ile Leu Trp Arg Leu
[0666] 1 5
[0667] <210>48
[0668] <211>9
[0669] <212>PRT
[0670] <213>Epstein Barr Virus
[0671] <400>48
[0672] Tyr Leu Met Glu Ile Leu Trp Arg Leu
[0673] 1 5
[0674] <210>49
[0675] <211>9

- [0676] <212>PRT
[0677] <213>Epstein Barr Virus
[0678] <400>49
[0679] Tyr Leu His Gln Asn Trp Trp Thr Leu
[0680] 1 5
[0681] <210>50
[0682] <211>9
[0683] <212>PRT
[0684] <213>Epstein Barr Virus
[0685] <400>50
[0686] Tyr Leu Gln His Asn Trp Trp Thr Leu
[0687] 1 5
[0688] <210>51
[0689] <211>11
[0690] <212>PRT
[0691] <213>Epstein Barr Virus
[0692] <400>51
[0693] Ser Ser Cys Ser Ser Cys Pro Leu Ser Lys Ile
[0694] 1 5 10
[0695] <210>52
[0696] <211>9
[0697] <212>PRT
[0698] <213>Epstein Barr Virus
[0699] <400>52
[0700] Pro Tyr Leu Phe Trp Leu Ala Ala Ile
[0701] 1 5
[0702] <210>53
[0703] <211>9
[0704] <212>PRT
[0705] <213>Epstein Barr Virus
[0706] <400>53
[0707] Thr Tyr Gly Pro Val Phe Met Cys Leu
[0708] 1 5
[0709] <210>54
[0710] <211>9
[0711] <212>PRT
[0712] <213>Epstein Barr Virus
[0713] <400>54
[0714] Arg Arg Arg Trp Arg Arg Leu Thr Val

- [0715] 1 5
[0716] <210>55
[0717] <211>9
[0718] <212>PRT
[0719] <213>Epstein Barr Virus
[0720] <400>55
[0721] Leu Leu Ser Ala Trp Ile Leu Thr Ala
[0722] 1 5
[0723] <210>56
[0724] <211>9
[0725] <212>PRT
[0726] <213>Epstein Barr Virus
[0727] <400>56
[0728] Leu Thr Ala Gly Phe Leu Ile Phe Leu
[0729] 1 5
[0730] <210>57
[0731] <211>10
[0732] <212>PRT
[0733] <213>Epstein Barr Virus
[0734] <400>57
[0735] Val Met Ser Asn Thr Leu Leu Ser Ala Trp
[0736] 1 5 10
[0737] <210>58
[0738] <211>9
[0739] <212>PRT
[0740] <213>Epstein Barr Virus
[0741] <400>58
[0742] Ile Glu Asp Pro Pro Phe Asn Ser Leu
[0743] 1 5
[0744] <210>59
[0745] <211>9
[0746] <212>PRT
[0747] <213>Epstein Barr Virus
[0748] <400>59
[0749] Cys Leu Gly Gly Leu Leu Thr Met Val
[0750] 1 5
[0751] <210>60
[0752] <211>18
[0753] <212>PRT

- [0754] <213>Epstein Barr Virus
 [0755] <400>60
 [0756] Leu Val Leu Gly Ile Trp Ile Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp
 [0757] Arg Arg
 [0758] 1 5 10 15
 [0759] Leu Gly
 [0760] <210>61
 [0761] <211>17
 [0762] <212>PRT
 [0763] <213>Epstein Barr Virus
 [0764] <400>61
 [0765] Arg His Ser Asp Glu His His His Asp Asp Ser Leu Pro His
 [0766] Pro Gln
 [0767] 1 5 10 15
 [0768] Gln
 [0769] <210>62
 [0770] <211>27
 [0771] <212>DNA
 [0772] <213>Epstein Barr Virus
 [0773] <400>62
 [0774] gccctccttg tectctattec ctttgct
 [0775] 27
 [0776] <210>63
 [0777] <211>27
 [0778] <212>DNA
 [0779] <213>Epstein Barr Virus
 [0780] <400>63
 [0781] gcgctccttg tectctattec ctttgct
 [0782] 27
 [0783] <210>64
 [0784] <211>27
 [0785] <212>DNA
 [0786] <213>Epstein Barr Virus
 [0787] <400>64
 [0788] gcactcttgg tectctattec ctttgct
 [0789] 27
 [0790] <210>65
 [0791] <211>27
 [0792] <212>DNA

[0793] <213>Epstein Barr Virus
[0794] <400>65
[0795] gcgctccttg tcctctatac ctttgct
[0796] 27
[0797] <210>66
[0798] <211>27
[0799] <212>DNA
[0800] <213>Epstein Barr Virus
[0801] <400>66
[0802] attgctctct atctacaaca aaactgg
[0803] 27
[0804] <210>67
[0805] <211>27
[0806] <212>DNA
[0807] <213>Epstein Barr Virus
[0808] <400>67
[0809] attgctctct atctacacca aaactgg
[0810] 27
[0811] <210>68
[0812] <211>27
[0813] <212>DNA
[0814] <213>Epstein Barr Virus
[0815] <400>68
[0816] cttgctctct atctacaaca aaactgg
[0817] 27
[0818] <210>69
[0819] <211>27
[0820] <212>DNA
[0821] <213>Epstein Barr Virus
[0822] <400>69
[0823] attgctctct atctacaaca caactgg
[0824] 27
[0825] <210>70
[0826] <211>27
[0827] <212>DNA
[0828] <213>Epstein Barr Virus
[0829] <400>70
[0830] tacttattgg agatgctctg gcgactt
[0831] 27

- [0832] <210>71
[0833] <211>27
[0834] <212>DNA
[0835] <213>Epstein Barr Virus
[0836] <400>71
[0837] tacttcttgg agattctctg gcgactt
[0838] 27
[0839] <210>72
[0840] <211>27
[0841] <212>DNA
[0842] <213>Epstein Barr Virus
[0843] <400>72
[0844] tacttcttgg agattctctg ggggctt
[0845] 27
[0846] <210>73
[0847] <211>27
[0848] <212>DNA
[0849] <213>Epstein Barr Virus
[0850] <400>73
[0851] tacttattgg agattctctg gcgactt
[0852] 27
[0853] <210>74
[0854] <211>27
[0855] <212>DNA
[0856] <213>Epstein Barr Virus
[0857] <400>74
[0858] tacttcttgg agattctctg gcgctt
[0859] 27
[0860] <210>75
[0861] <211>27
[0862] <212>DNA
[0863] <213>Epstein Barr Virus
[0864] <400>75
[0865] tacttcttgg acattctctg gcgctt
[0866] 27
[0867] <210>76
[0868] <211>27
[0869] <212>DNA
[0870] <213>Epstein Barr Virus

- [0871] <400>76
 [0872] tacctaattgg agattctctg gcgactt
 [0873] 27
 [0874] <210>77
 [0875] <211>27
 [0876] <212>DNA
 [0877] <213>Epstein Barr Virus
 [0878] <400>77
 [0879] tatctacaac aaaactggtg gactcta
 [0880] 27
 [0881] <210>78
 [0882] <211>27
 [0883] <212>DNA
 [0884] <213>Epstein Barr Virus
 [0885] <400>78
 [0886] tatctacacc aaaactggtg gactcta
 [0887] 27
 [0888] <210>79
 [0889] <211>27
 [0890] <212>DNA
 [0891] <213>Epstein Barr Virus
 [0892] <400>79
 [0893] tatctacaac acaactggtg gactcta
 [0894] 27
 [0895] <210>80
 [0896] <211>27
 [0897] <212>DNA
 [0898] <213>Epstein Barr Virus
 [0899] <400>80
 [0900] tacttcttgg aaattctctg gcggctt
 [0901] 27
 [0902] <210>81
 [0903] <211>122
 [0904] <212>PRT
 [0905] <213>Synthetic protein sequence
 [0906] <400>81
 [0907] Met Pro Tyr Leu Phe Trp Leu Ala Ala Ile Ser Ser Cys Ser
 [0908] Ser Cys
 [0909] 1 5 10 15

[0910] Pro Leu Ser Lys Ile Thr Tyr Gly Pro Val Phe Met Cys Leu
 [0911] Arg Arg
 [0912] 20 25 30
 [0913] Arg Trp Arg Arg Leu Thr Val Leu Leu Ser Ala Trp Ile Leu
 [0914] Thr Ala
 [0915] 35 40 45
 [0916] Leu Thr Ala Gly Phe Leu Ile Phe Leu Cys Leu Gly Gly Leu
 [0917] Leu Thr
 [0918] 50 55 60
 [0919] Met Val Val Met Ser Asn Thr Leu Leu Ser Ala Trp Ile Glu
 [0920] Asp Pro
 [0921] 65 70 75
 [0922] 80
 [0923] Pro Phe Asn Ser Leu Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu
 [0924] Tyr Leu
 [0925] 85 90 95
 [0926] Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser
 [0927] Phe Ala
 [0928] 100 105 110
 [0929] Leu Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp
 [0930] 115 120
 [0931] <210>82
 [0932] <211>366
 [0933] <212>DNA
 [0934] <213>Synthetic nucleotide sequence
 [0935] <400>82
 [0936] atgccctacc tgttctggct ggccgccatc agcagctgca gcagctgccc
 [0937] cctgagcaag 60
 [0938] atcacctacg gccccgtgtt catgtgcctg aggaggaggt ggaggaggct
 [0939] gaccgtgctg 120
 [0940] ctgagcgcct ggattctgac cgccctgacc gccggcttcc tgatcttctt
 [0941] gtgcctgggc 180
 [0942] ggccctgctga ccatggtggt gatgagcaac accctgctga ggcctggat
 [0943] cgaggacccc 240
 [0944] cccttcaaca gcctgtacct gctggagatg ctgtggaggc tgtacctgca
 [0945] gcagaactgg 300
 [0946] tggaccctgg ccctgctggt gctgtacagc ttcgccctga tcgccctgta
 [0947] cctgcagcag 360
 [0948] aactgg

- [0949] 366
- [0950] <210>83
- [0951] <211>12
- [0952] <212>PRT
- [0953] <213>Epstein Barr Virus
- [0954] <400>83
- [0955] Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu Val
- [0956] 1 5 10
- [0957] <210>84
- [0958] <211>12
- [0959] <212>PRT
- [0960] <213>Epstein Barr Virus
- [0961] <400>84
- [0962] Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu
- [0963] 1 5 10
- [0964] <210>85
- [0965] <211>12
- [0966] <212>PRT
- [0967] <213>Epstein Barr Virus
- [0968] <400>85
- [0969] Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu
- [0970] 1 5 10
- [0971] <210>86
- [0972] <211>12
- [0973] <212>PRT
- [0974] <213>Epstein Barr Virus
- [0975] <400>86
- [0976] Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr
- [0977] 1 5 10
- [0978] <210>87
- [0979] <211>12
- [0980] <212>PRT
- [0981] <213>Epstein Barr Virus
- [0982] <400>87
- [0983] Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp
- [0984] 1 5 10
- [0985] <210>88
- [0986] <211>12
- [0987] <212>PRT

[0988] <213>Epstein Barr Virus
 [0989] <400>88
 [0990] His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu Gly Arg His
 [0991] 1 5 10
 [0992] <210>89
 [0993] <211>12
 [0994] <212>PRT
 [0995] <213>Epstein Barr Virus
 [0996] <400>89
 [0997] Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu Gly Arg
 [0998] 1 5 10
 [0999] <210>90
 [1000] <211>12
 [1001] <212>PRT
 [1002] <213>Epstein Barr Virus
 [1003] <400>90
 [1004] Asp Ser Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu
 [1005] 1 5 10
 [1006] <210>91
 [1007] <211>12
 [1008] <212>PRT
 [1009] <213>Epstein Barr Virus
 [1010] <400>91
 [1011] Asp Asp Ser Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn
 [1012] 1 5 10
 [1013] <210>92
 [1014] <211>12
 [1015] <212>PRT
 [1016] <213>Epstein Barr Virus
 [1017] <400>92
 [1018] Thr Asp Asp Ser Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser
 [1019] 1 5 10
 [1020] <210>93
 [1021] <211>12
 [1022] <212>PRT
 [1023] <213>Epstein Barr Virus
 [1024] <400>93
 [1025] Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro
 [1026] 1 5 10

- [1027] <210>94
[1028] <211>12
[1029] <212>PRT
[1030] <213>Epstein Barr Virus
[1031] <400>94
[1032] Ser Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro
[1033] 1 5 10
[1034] <210>95
[1035] <211>12
[1036] <212>PRT
[1037] <213>Epstein Barr Virus
[1038] <400>95
[1039] His Ser Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly
[1040] 1 5 10
[1041] <210>96
[1042] <211>12
[1043] <212>PRT
[1044] <213>Epstein Barr Virus
[1045] <400>96
[1046] Pro His Ser Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly
[1047] 1 5 10
[1048] <210>97
[1049] <211>12
[1050] <212>PRT
[1051] <213>Epstein Barr Virus
[1052] <400>97
[1053] Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala
[1054] 1 5 10
[1055] <210>98
[1056] <211>12
[1057] <212>PRT
[1058] <213>Epstein Barr Virus
[1059] <400>98
[1060] Trp Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe
[1061] 1 5 10
[1062] <210>99
[1063] <211>12
[1064] <212>PRT
[1065] <213>Epstein Barr Virus

- [1066] <400>99
[1067] Asp Trp Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser
[1068] 1 5 10
[1069] <210>100
[1070] <211>9
[1071] <212>PRT
[1072] <213>Epstein Barr Virus
[1073] <400>100
[1074] Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala Leu Met
[1075] 1 5
[1076] <210>101
[1077] <211>9
[1078] <212>PRT
[1079] <213>Epstein Barr Virus
[1080] <400>101
[1081] Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe
[1082] 1 5
[1083] <210>102
[1084] <211>9
[1085] <212>PRT
[1086] <213>Epstein Barr Virus
[1087] <400>102
[1088] Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser
[1089] 1 5
[1090] <210>103
[1091] <211>9
[1092] <212>PRT
[1093] <213>Epstein Barr Virus
[1094] <400>103
[1095] Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr
[1096] 1 5
[1097] <210>104
[1098] <211>9
[1099] <212>PRT
[1100] <213>Epstein Barr Virus
[1101] <400>104
[1102] Trp Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu
[1103] 1 5
[1104] <210>105

- [1105] <211>9
[1106] <212>PRT
[1107] <213>Epstein Barr Virus
[1108] <400>105
[1109] Asp Trp Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val
[1110] 1 5
[1111] <210>106
[1112] <211>9
[1113] <212>PRT
[1114] <213>Epstein Barr Virus
[1115] <400>106
[1116] Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu Val
[1117] 1 5
[1118] <210>107
[1119] <211>9
[1120] <212>PRT
[1121] <213>Epstein Barr Virus
[1122] <400>107
[1123] Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu
[1124] 1 5
[1125] <210>108
[1126] <211>9
[1127] <212>PRT
[1128] <213>Epstein Barr Virus
[1129] <400>108
[1130] Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr
[1131] 1 5
[1132] <210>109
[1133] <211>9
[1134] <212>PRT
[1135] <213>Epstein Barr Virus
[1136] <400>109
[1137] Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn
[1138] 1 5
[1139] <210>110
[1140] <211>9
[1141] <212>PRT
[1142] <213>Epstein Barr Virus
[1143] <400>110

- [1144] Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln
[1145] 1 5
[1146] <210>111
[1147] <211>9
[1148] <212>PRT
[1149] <213>Epstein Barr Virus
[1150] <400>111
[1151] Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro Gln Leu
[1152] 1 5
[1153] <210>112
[1154] <211>9
[1155] <212>PRT
[1156] <213>Epstein Barr Virus
[1157] <400>112
[1158] Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro Gln
[1159] 1 5
[1160] <210>113
[1161] <211>9
[1162] <212>PRT
[1163] <213>Epstein Barr Virus
[1164] <400>113
[1165] Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro
[1166] 1 5
[1167] <210>114
[1168] <211>9
[1169] <212>PRT
[1170] <213>Epstein Barr Virus
[1171] <400>114
[1172] Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro
[1173] 1 5
[1174] <210>115
[1175] <211>9
[1176] <212>PRT
[1177] <213>Epstein Barr Virus
[1178] <400>115
[1179] Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly
[1180] 1 5
[1181] <210>116
[1182] <211>9

- [1183] <212>PRT
[1184] <213>Epstein Barr Virus
[1185] <400>116
[1186] Ser Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp
[1187] 1 5
[1188] <210>117
[1189] <211>9
[1190] <212>PRT
[1191] <213>Epstein Barr Virus
[1192] <400>117
[1193] His Ser Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn
[1194] 1 5
[1195] <210>118
[1196] <211>9
[1197] <212>PRT
[1198] <213>Epstein Barr Virus
[1199] <400>118
[1200] Pro His Ser Pro Ser Asp Ser Ala Gly
[1201] 1 5
[1202] <210>119
[1203] <211>9
[1204] <212>PRT
[1205] <213>Epstein Barr Virus
[1206] <400>119
[1207] Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu Gly Arg
[1208] 1 5
[1209] <210>120
[1210] <211>9
[1211] <212>PRT
[1212] <213>Epstein Barr Virus
[1213] <400>120
[1214] His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu
[1215] 1 5
[1216] <210>121
[1217] <211>9
[1218] <212>PRT
[1219] <213>Epstein Barr Virus
[1220] <400>121
[1221] Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn

- [1222] 1 5
[1223] <210>122
[1224] <211>9
[1225] <212>PRT
[1226] <213>Epstein Barr Virus
[1227] <400>122
[1228] Ser Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser
[1229] 1 5
[1230] <210>123
[1231] <211>9
[1232] <212>PRT
[1233] <213>Epstein Barr Virus
[1234] <400>123
[1235] Asp Ser Gly His Glu Ser Asp Ser Asn
[1236] 1 5
[1237] <210>124
[1238] <211>9
[1239] <212>PRT
[1240] <213>Epstein Barr Virus
[1241] <400>124
[1242] Asp Asp Ser Gly His Glu Ser Asp Ser
[1243] 1 5
[1244] <210>125
[1245] <211>9
[1246] <212>PRT
[1247] <213>Epstein Barr Virus
[1248] <400>125
[1249] Thr Asp Asp Ser Gly His Glu Ser Asp
[1250] 1 5

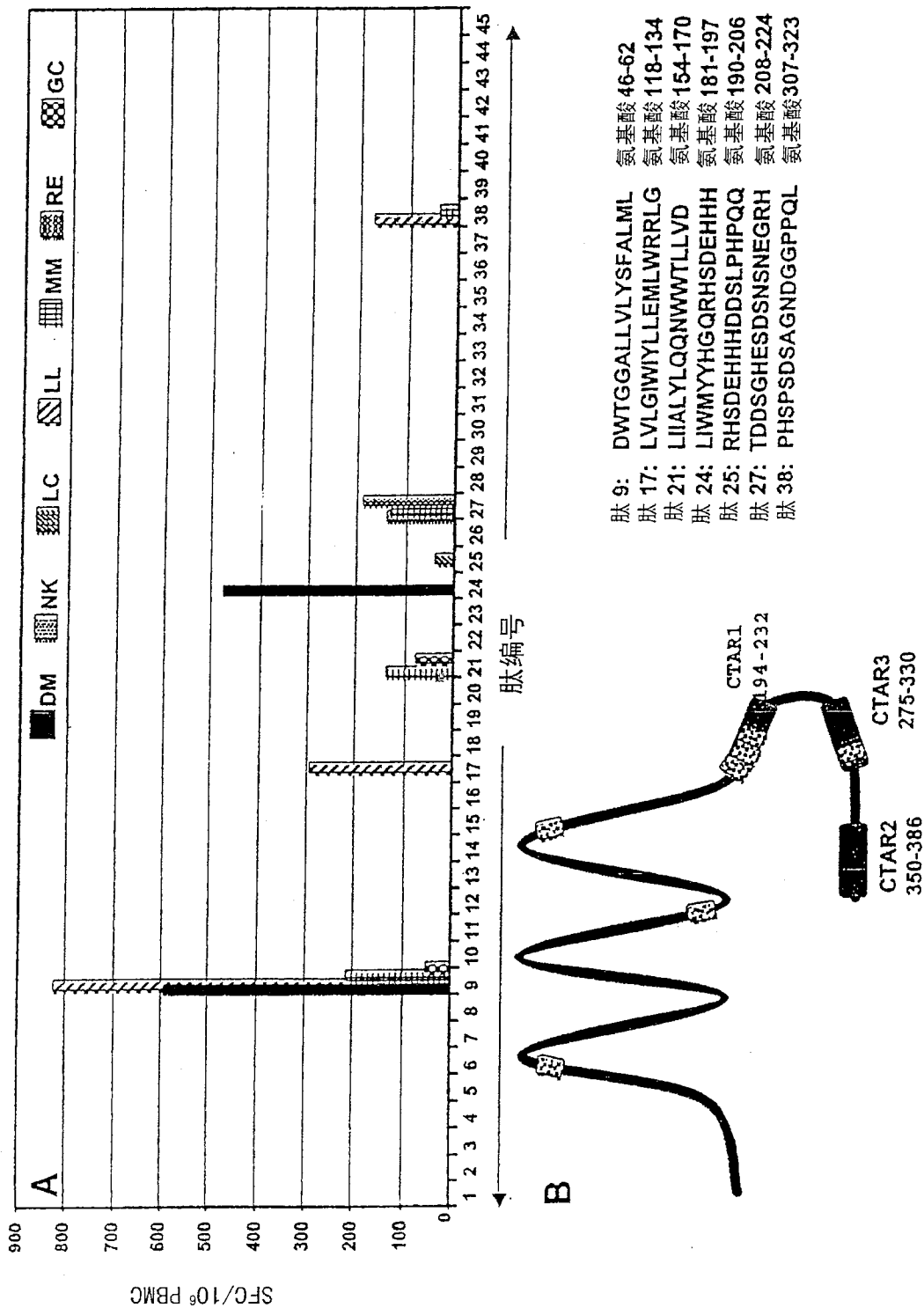


图 1

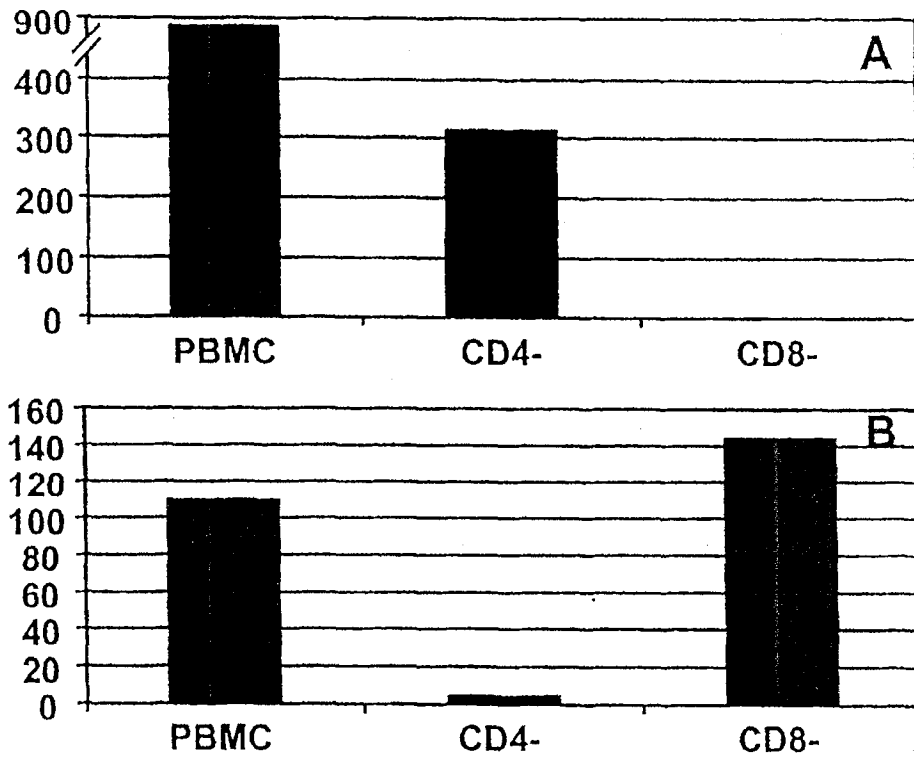


图 2

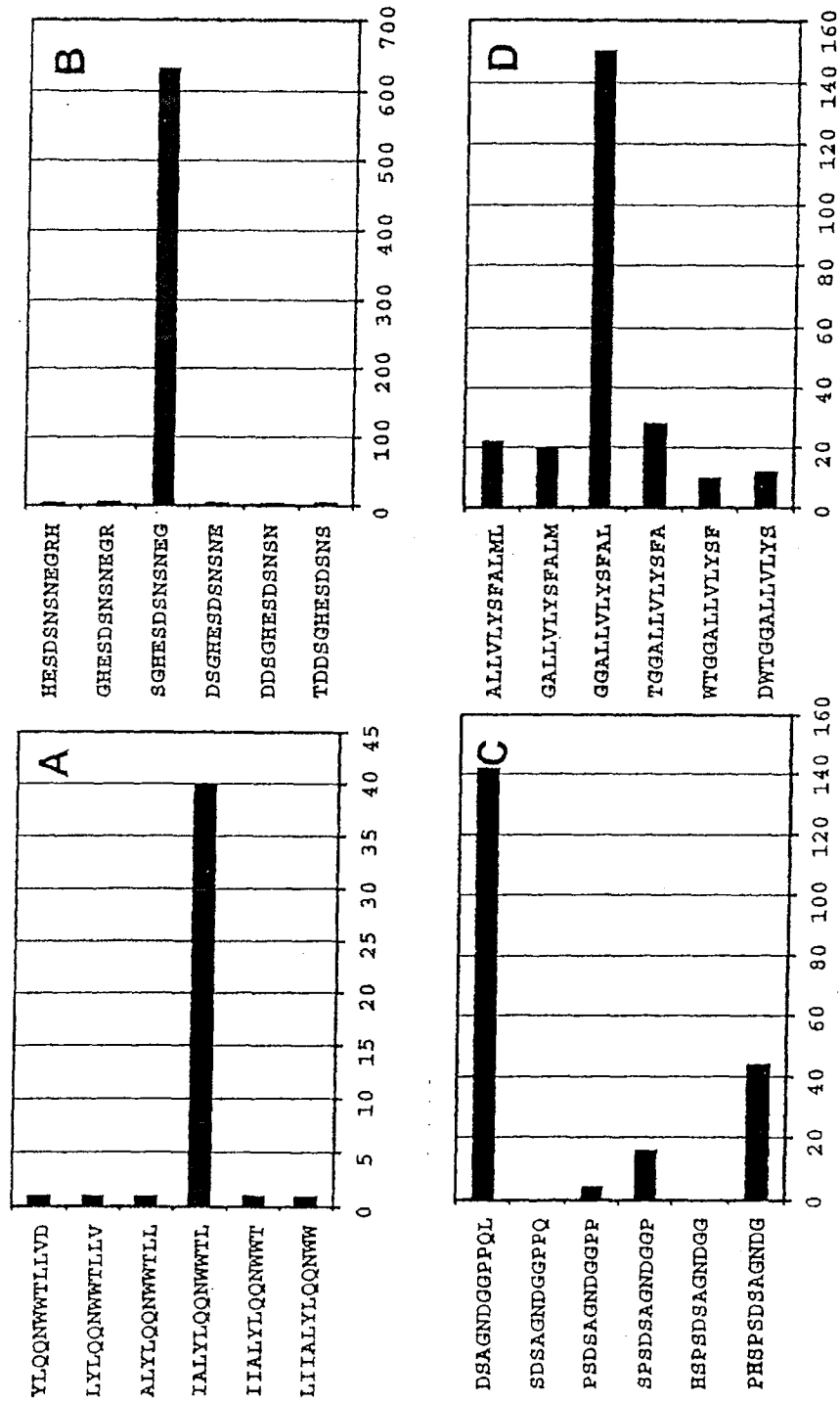


图 3

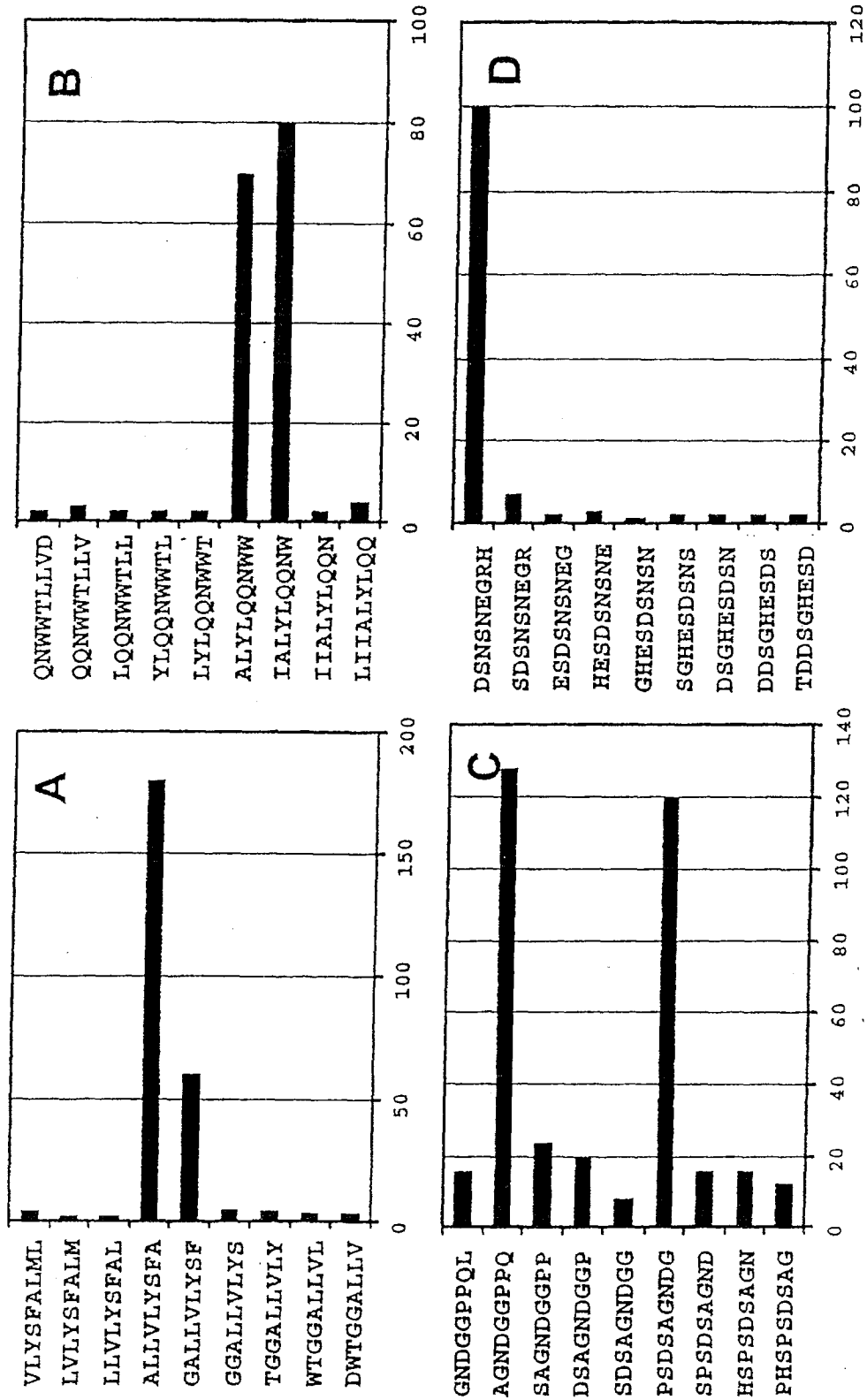


图 4

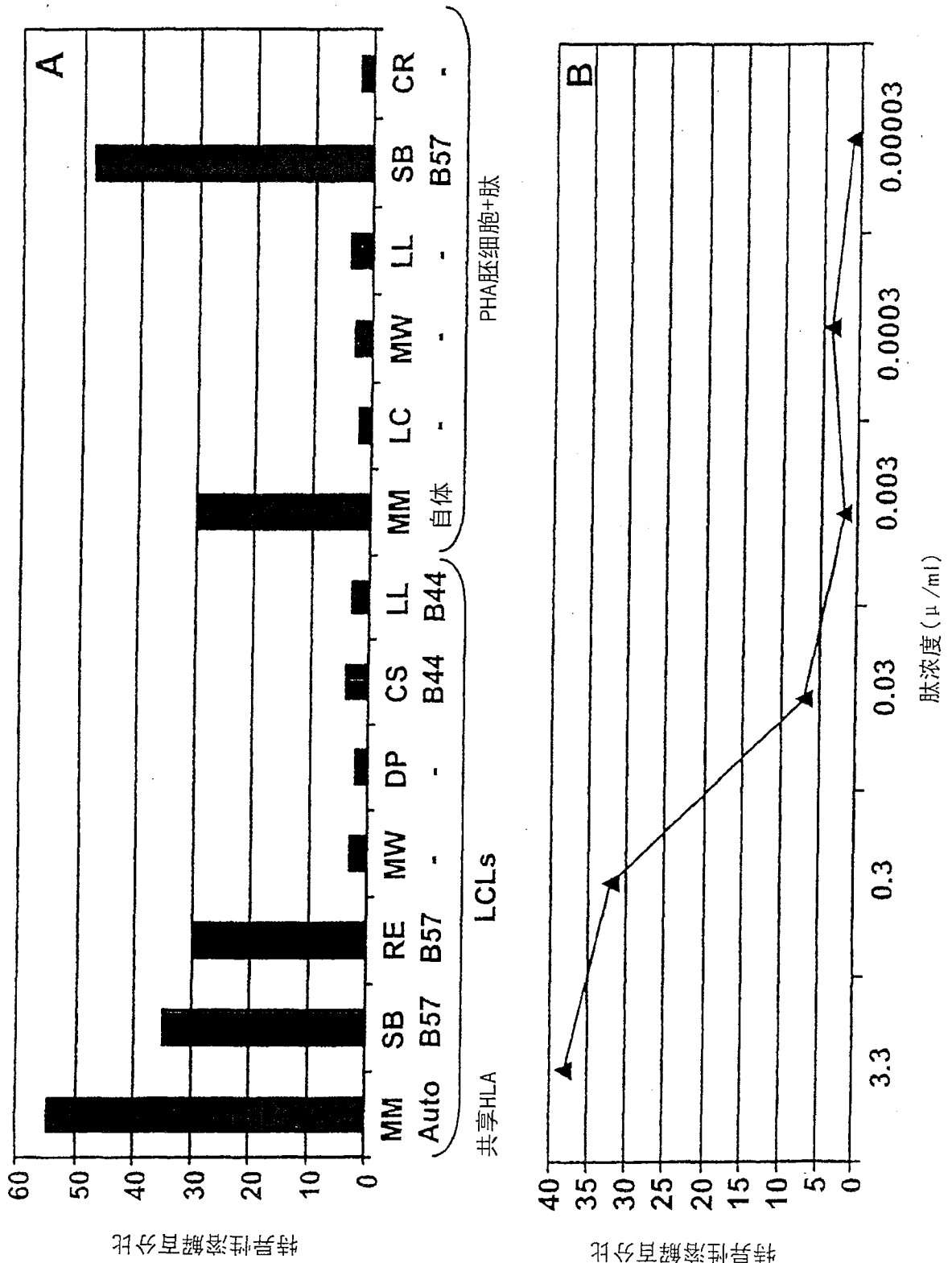


图 5

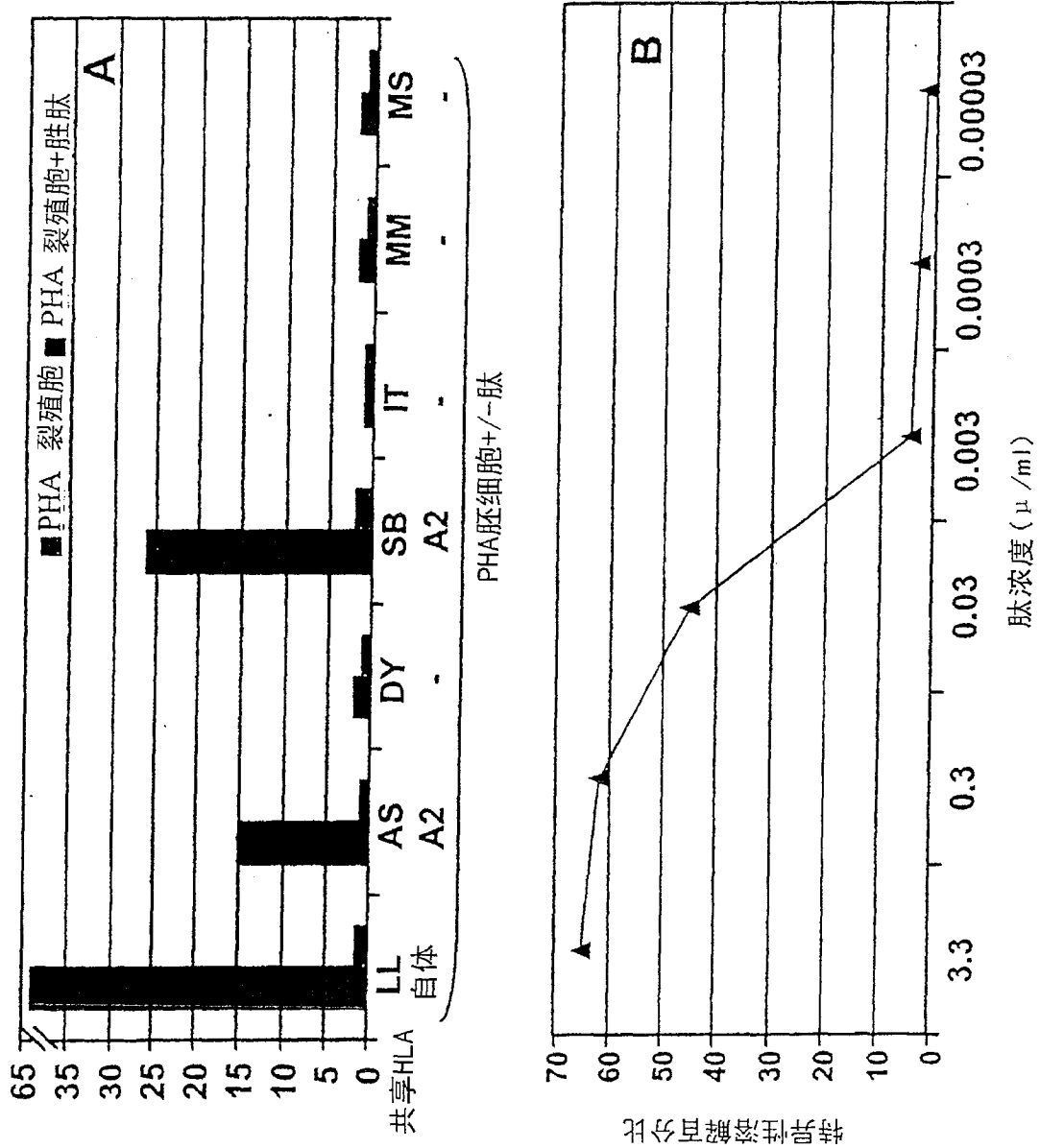


图 6

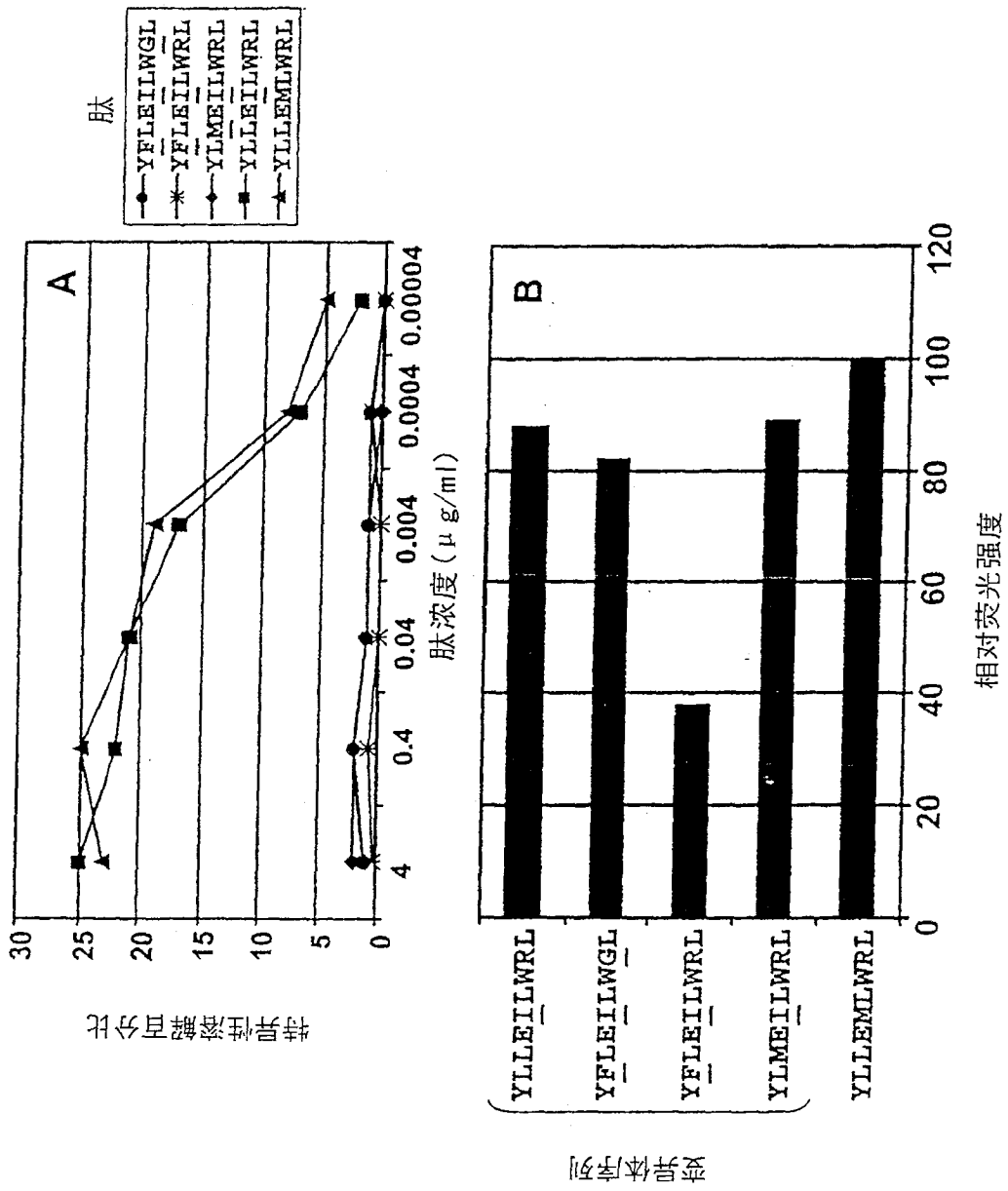


图 7

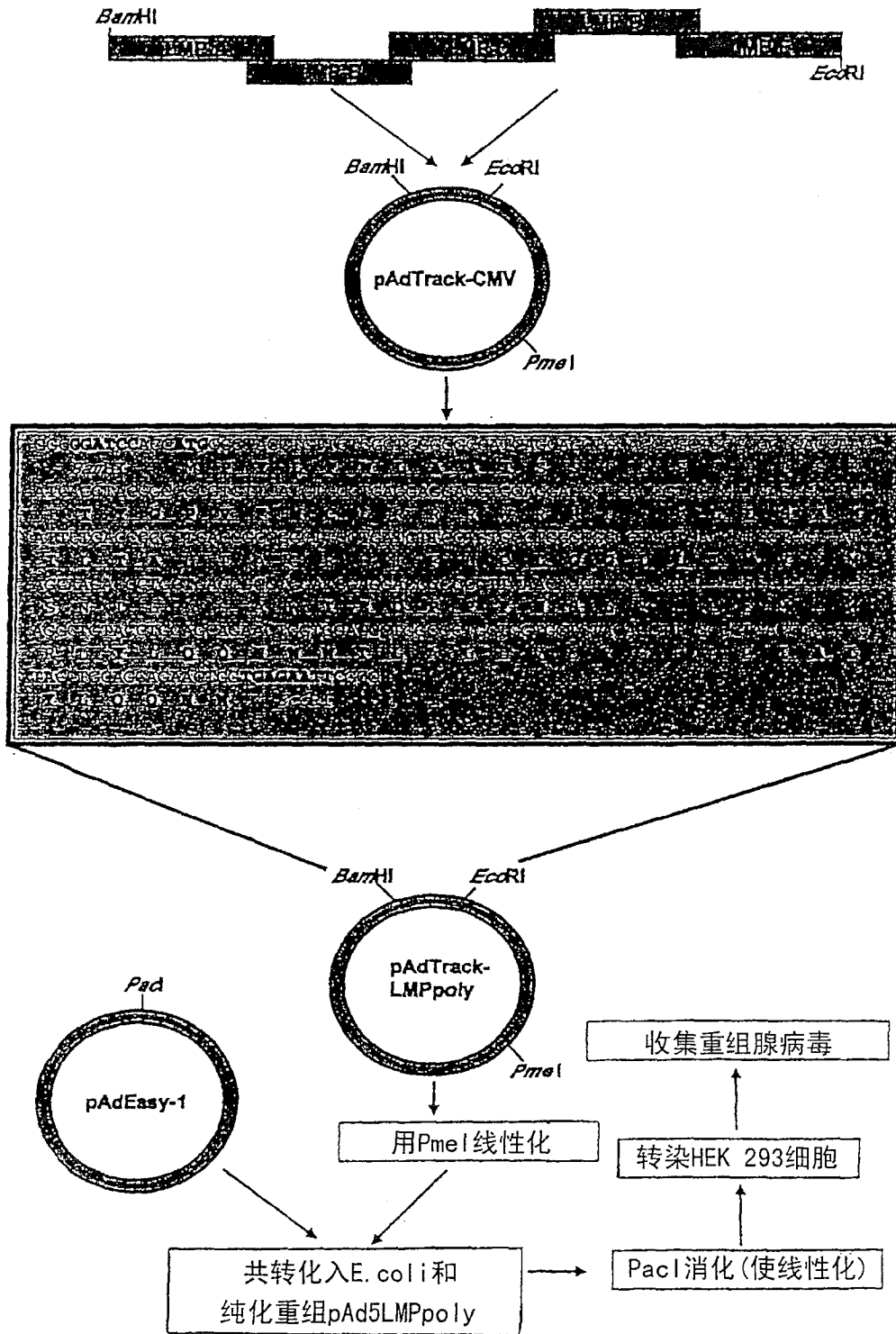


图 8

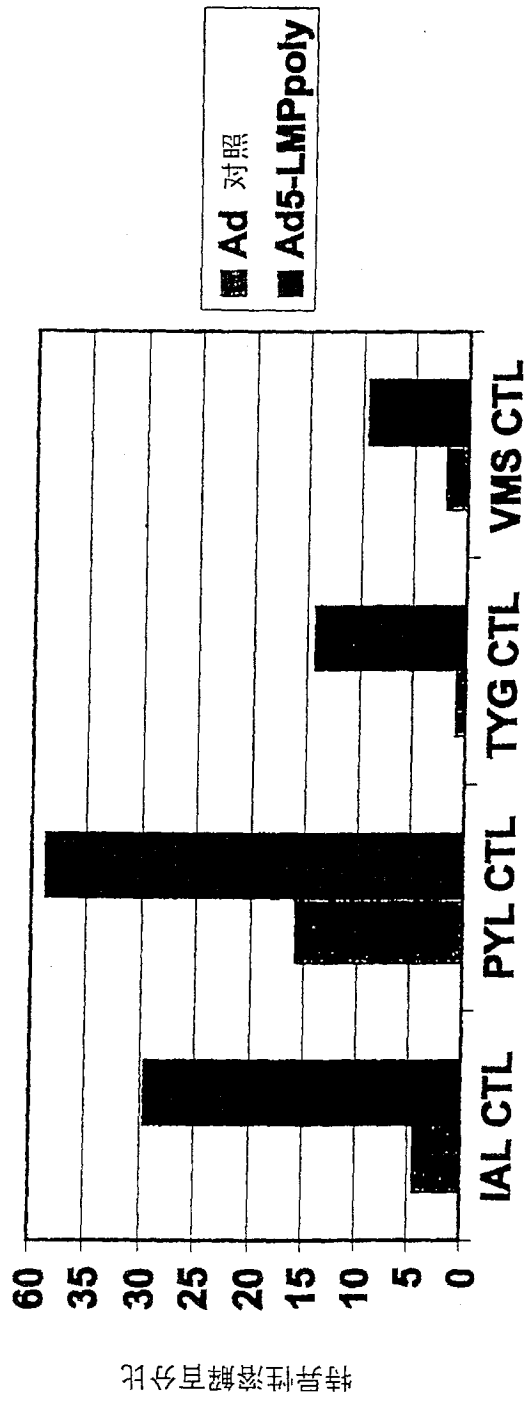


图 9

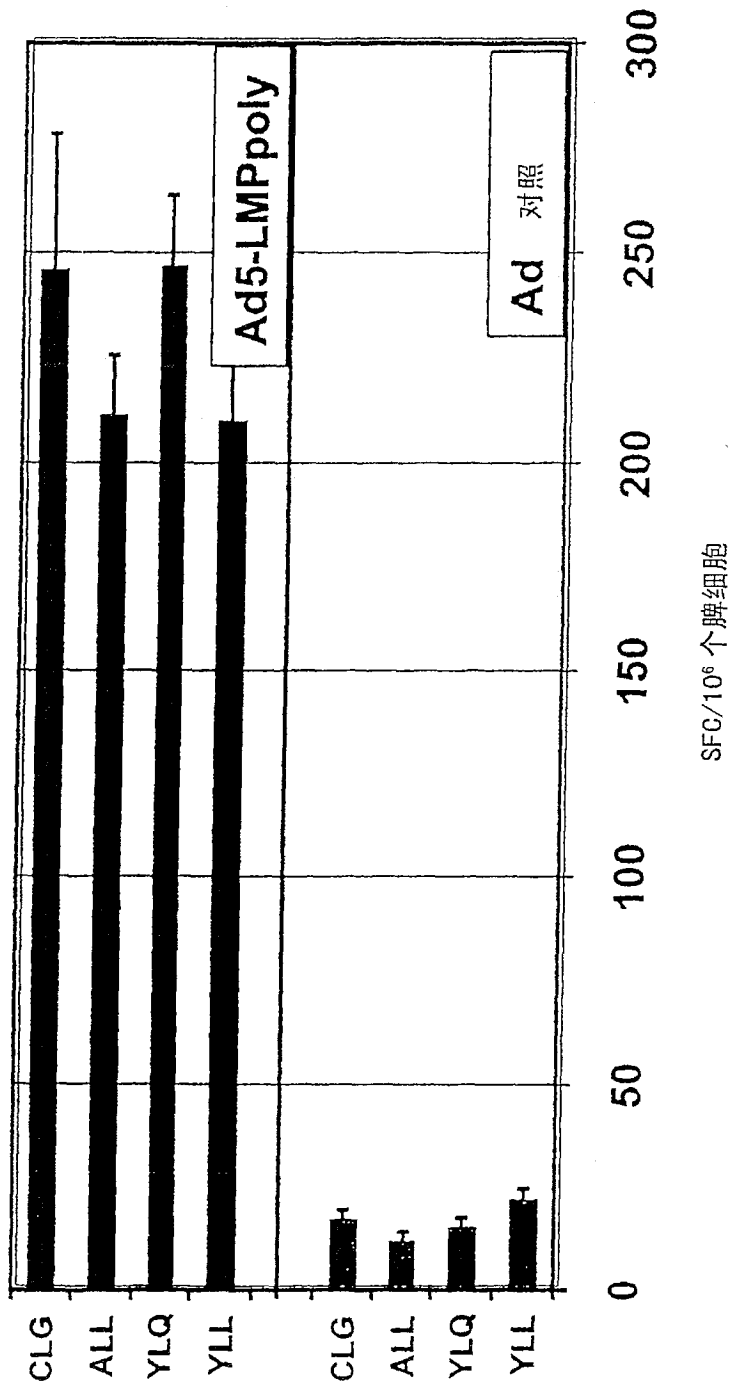


图 10

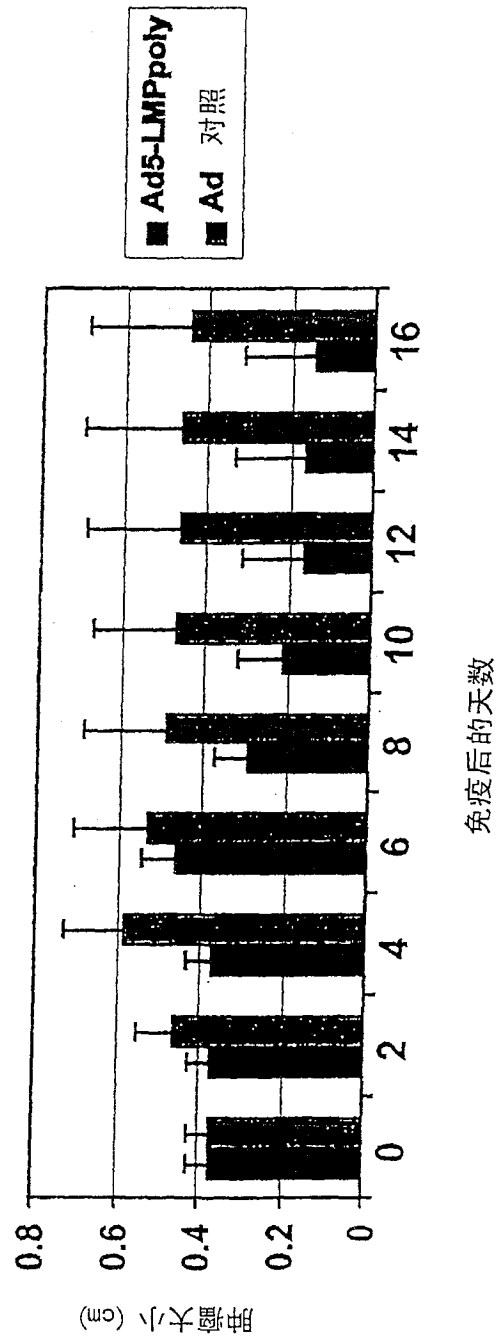


图 11

专利名称(译)	Epstein Barr病毒肽表位、多表位及其输送系统		
公开(公告)号	CN1711279B	公开(公告)日	2010-05-26
申请号	CN200380102880.3	申请日	2003-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	昆士兰医学研究所理事会		
申请(专利权)人(译)	昆士兰医学研究所理事会		
当前申请(专利权)人(译)	昆士兰医学研究所理事会		
[标]发明人	拉吉夫康纳 贾库马尔杜赖斯瓦米		
发明人	拉吉夫·康纳 贾库马尔·杜赖斯瓦米		
IPC分类号	C07K7/06 C07K7/08 C07K14/05 C07K16/08 C07H21/04 C12N15/79 A61K38/08 A61K38/10 A61K31/7088 A61P31/20 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
代理人(译)	林晓红		
审查员(译)	周霞		
优先权	2003901792 2003-04-15 AU 2002952524 2002-11-07 AU		
其他公开文献	CN1711279A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了Epstein Barr病毒LMP1蛋白的免疫原性细胞毒性T细胞表位肽，它具有9到17个氨基酸，其最小共有序列选自QRH，AGNDG，QNW，VLYS和DSNSNE。这些肽不论是单独存在或存在于多表位结构中，在药物组合物、疫苗和治疗与Epstein Barr病毒相关的疾病例如包括但不限于有何杰金氏病和/或鼻咽癌的方法中均是有用的。优选多表位输送方式为基于腺病毒的系统。

表 2

肽编号	表位序列	表位中17个氨基酸序列	CTL 表位		HLA 限制性	参考资料
			最小肽序列	性		
9	DWTGGALVYSRLAM	ALLVYSRLAM GALVYSRLAM DWTGGALVYS GGALVYSRLAM	ALLVYSRLAM LVVYSRLAM ALLVYSRLAM VYSRLAM	Y Y Y Y	HLA-A2 ND HLA-A2 HLA-A2	
17	LVYLGWVYLEMWRRLG	YLEMWRRLG LVYLGWVYLEMWRRLG	YLEMWRRLG LVYLGWVYLEMWRRLG	Y Y	HLA-A2 Klarna 等	
21	ILLALHQQWVILLFD	IALYQQWVIL VLYQQWVILLFD	IALYQQWVIL ALYQQWVIL VLYQQWVIL QWVILLFD LYQQWVIL	Y Y Y NT NT	HLA-B*58:01 ND HLA-A2 ND ND	Klarna 等
24	LWNYTHGQMSDEHH	YTHGQMSDEHH WNYTHGQMSD	QMSDEHH GQMSDEHH YTHGQMSD WNYTHGQMSD	ND ND NT NT	ND ND ND ND	
27	TDNSGHSNSNGRH	SCHESNSNG	SCHESNSNG	Y	HLA-DQ ND	Lat 等
38	PSPSAGDCGPPQ	SNSAGDCGPPQ DSAGDCGPPQ	AGDCGPPQ PSPSAGDCGPPQ	ND NT	ND ND	