



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102227442 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 200980147596. 5

A61K 39/215(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 11. 27

A61K 47/24(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 47/26(2006. 01)

2008-304965 2008. 11. 28 JP

A61K 47/28(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 31/12(2006. 01)

2011. 05. 27

C12N 5/078(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/JP2009/070043 2009. 11. 27

WO 2004092360 A2, 2004. 10. 28,

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 1572875 A, 2005. 02. 02,

W02010/061919 JA 2010. 06. 03

Jody B berry et al..Development and characterisation of neutralising monoclonal antibody to the SARS-coronavirus. 《Journal of Virological Methods》.2004, 第120卷(第1期), 第87-96页.

(73) 专利权人 日油株式会社

地址 日本东京都

专利权人 学校法人埼玉医科大学

国立感染症研究所所长代表的日

本国

审查员 王奇

(72) 发明人 松井政则 内田哲也 小田洋

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王灵菇 白丽

(51) Int. Cl.

C07K 7/06(2006. 01)

A61K 9/127(2006. 01)

A61K 35/76(2006. 01)

权利要求书2页 说明书19页

序列表27页 附图3页

(54) 发明名称

SARS 冠状病毒的细胞毒性 T 细胞表位肽及其用途

(57) 摘要

本发明的目的在于提供 SARS 冠状病毒的新的 CTL 表位肽。本发明提供包含选自自由序列号 10、11、12、13、15、17、18、23 和 24 组成的组中的氨基酸序列的肽。

1. 一种肽结合脂质体,其是在脂质体的表面结合有肽的肽结合脂质体,其中,脂质体含有磷脂和稳定剂,所述磷脂包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基;
肽为由序列号 24 的氨基酸序列构成的肽。
2. 如权利要求 1 所述的肽结合脂质体,其中,所述磷脂为包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基的磷脂。
3. 如权利要求 1 所述的肽结合脂质体,其中,所述磷脂为具有油酰基的磷脂。
4. 如权利要求 1 所述的肽结合脂质体,其中,所述磷脂为选自二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酰甘油、二酰基磷脂酸、二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、琥珀酰亚胺基-二酰基磷脂酰乙醇胺和马来酰亚胺-二酰基磷脂酰乙醇胺中的至少 1 种。
5. 如权利要求 1 所述的肽结合脂质体,其中,所述稳定剂为胆固醇。
6. 如权利要求 1 所述的肽结合脂质体,其中,在脂质体中所含的、包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂上结合有所述肽。
7. 如权利要求 1 所述的肽结合脂质体,其中,脂质体具有以下组成:
(A) 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂 1 ~ 99.8 摩尔%;
(B) 稳定剂 0.2 ~ 75 摩尔%。
8. 如权利要求 1 所述的肽结合脂质体,其具有以下组成:
(I) 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的酸性磷脂:1 ~ 85 摩尔%;
(II) 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的中性磷脂:0.01 ~ 80 摩尔%;
(III) 结合有所述肽、且包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂:0.2 ~ 80 摩尔%;
(IV) 稳定剂:0.2 ~ 75 摩尔%。
9. 一种抗原呈递细胞,其是通过使表达细胞表面抗原 HLA-A2 的细胞在体外与权利要求 1 所述的肽结合脂质体中的所述肽接触而制备的。
10. 如权利要求 9 所述的抗原呈递细胞,其中,所述细胞为自体来源的细胞。
11. 如权利要求 9 所述的抗原呈递细胞,其中,所述细胞为同种来源的细胞。
12. 权利要求 1 所述的肽结合脂质体在制备 SARS 冠状病毒特异性的 HLA-A2 限制性 CTL 的诱导剂中的用途。
13. 权利要求 1 所述的肽结合脂质体在制备用于预防 SARS 冠状病毒感染的疫苗中的用途。
14. 权利要求 9 ~ 11 中任一项所述的抗原呈递细胞在制备 SARS 冠状病毒特异性的 HLA-A2 限制性 CTL 的诱导剂中的用途。
15. 权利要求 9 ~ 11 中任一项所述的抗原呈递细胞在制备用于预防 SARS 冠状病毒感染的疫苗中的用途。
16. 如权利要求 12 所述的用途,其中,所述诱导剂还含有 CpG-DNA。

17. 如权利要求 13 所述的用途,其中,所述疫苗还含有 CpG-DNA。

SARS 冠状病毒的细胞毒性 T 细胞表位肽及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及 SARS 冠状病毒的细胞毒性 T 细胞表位肽及其用途。

背景技术

[0002] 重症急性呼吸系统综合征(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)是一种由新型 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)引起的致死率高的新发感染性疾病。自 2003 年在中国爆发以来,已有 8000 人以上感染,约 800 人死亡。然而,尚未有有效的预防、治疗方法。SARS 发生以后,已鉴定出作为 SARS 的致病病毒的 SARS 病毒(非专利文献 1),并确定了其碱基序列(非专利文献 2)。

[0003] SARS 冠状病毒是属于单链(+)RNA 病毒的冠状病毒科的新种类的冠状病毒。SARS 冠状病毒基因组非常大,有 29.7kb(非专利文献 2),根据推测编码 23 个蛋白质。作为主要的结构蛋白,有刺突(Spike、1256aa)、核壳体(Nucleocapsid、423aa)、膜(Membrane、222aa)和较小的包膜(Envelope、77aa)。作为非结构蛋白,有 2 个多聚蛋白 pp1a (4382aa、序列号 31 ;GenBank 收录号 AAP13439)和 pp1b (2696aa),利用蛋白酶可以位点特异性地从这些多聚蛋白中切出各个蛋白质。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献 1 :Ksiazek, T. G. et al., N. Engl. J. Med. 348 :1953-1966 (2003)

[0007] 非专利文献 2 :Marra, M. A. et al., Science300 :1399-1404 (2003)

[0008] 非专利文献 3 :Yang, Z. Y. et al., Nature428 :561-564 (2004)

[0009] 非专利文献 4 :Wang, Y. D. et al., J. Virol. 78 :5612-5618 (2004)

[0010] 非专利文献 5 :Chen, H. et al., J. Immunol. 175 :591-598 (2005)

[0011] 非专利文献 6 :Zhou, M. et al., J. Immunol. 177 :2138-2145 (2006)

发明内容

[0012] 发明所要解决的课题

[0013] 迄今为止,已有利用编码刺突蛋白的 DNA 疫苗来诱导病毒中和抗体的报道(非专利文献 3)。有效的防御反应需要体液免疫和细胞免疫,在涉及 SARS 冠状病毒的领域中,与体液免疫相比,细胞免疫的研究尚未取得进展。细胞免疫中对于病毒防御发挥重要作用的是细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL),SARS 冠状病毒特异性 CTL 活性的调控可能成为针对 SARS 冠状病毒的新的治疗方法。从该观点出发,希望鉴定 SARS 冠状病毒蛋白中抗原性强的 CTL 表位肽。作为 SARS 冠状病毒特异性的 CTL 表位肽,到目前为止已经鉴定了几种来自作为结构蛋白的刺突蛋白的部分肽(非专利文献 4~6)。但是,关于来自非结构蛋白的 CTL 表位肽,目前还没有任何报道。

[0014] 本发明的目的在于提供 SARS 冠状病毒的新的 CTL 表位肽。更具体而言,本发明的目的在于提供包含来自 SARS 冠状病毒 pp1a 蛋白的新的 CTL 表位的肽、肽结合脂质体和抗

原呈递细胞。另外,本发明的目的还在于提供以该肽、肽结合脂质体或抗原呈递细胞为有效成分的 SARS 冠状病毒特异性的 HLA-A2 限制性 CTL 的诱导剂、用于治疗或预防 SARS 冠状病毒感染的疫苗等。

[0015] 解决课题所采用的手段

[0016] 为了鉴定迄今尚未报道过的来自 SARS 冠状病毒的 CTL 表位,本发明人进行了以下的研究。首先,着眼于 SARS 冠状病毒的非结构蛋白 pp1a 蛋白,从预测的表位候选肽中选择 30 种肽。然后,确认了肽对作为 MHC I 类分子的 HLA-A2 分子具有结合亲和力,并发现了表位候选肽中特别有 9 种肽具有显著的 CTL 诱导活性。进而,通过用包含肽的肽结合脂质体进行免疫,可知可诱导 CTL 以及在体内活化 CTL 应答。基于上述见解,本发明人使提供包含来自 SARS 冠状病毒 pp1a 蛋白的新的 CTL 表位的肽成为可能,从而完成了本发明。

[0017] 即,本发明提供一种肽,其包含选自自由序列号 10、11、12、13、15、17、18、23 和 24 组成的组中的氨基酸序列。另外,本发明的肽优选包含选自自由序列号 10、12、15、17 和 24 组成的组中的氨基酸序列,更优选包含序列号 24 的氨基酸序列。本发明的肽的特征在于,其为包含 SARS 冠状病毒特异性的细胞毒性 T 细胞表位的肽,是包含 HLA-A2 限制性细胞毒性 T 细胞表位的肽。

[0018] 本发明提供一种肽结合脂质体,其是在脂质体的表面结合有肽的肽结合脂质体,其中,脂质体含有磷脂和稳定剂,所述磷脂包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基;肽为选自上述肽中的至少 1 种。

[0019] 上述磷脂优选为包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基的磷脂,更优选为具有油酰基的磷脂。另外,上述磷脂优选为选自二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酰甘油、二酰基磷脂酸、二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、琥珀酰亚胺基 - 二酰基磷脂酰乙醇胺和马来酰亚胺 - 二酰基磷脂酰乙醇胺中的至少 1 种。

[0020] 通过使脂质体中所含的磷脂具备这样的构成,能够有效地增强用于杀伤病原体感染细胞的 CTL,从而能够预防、治疗感染症。

[0021] 上述稳定剂优选为胆固醇。通过该构成,能够使上述脂质体更稳定。

[0022] 上述肽优选结合在上述脂质体所含的磷脂上。由此,能够将肽呈递到脂质体表面,从而能够更有效地诱导 SARS 冠状病毒特异性的 CTL。

[0023] 另外,本发明的肽结合脂质体中,优选脂质体具有以下组成。

[0024] (A) 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂:1 ~ 99.8 摩尔%;

[0025] (B) 稳定剂:0.2 ~ 75 摩尔%。

[0026] 另外,本发明的肽结合脂质体优选以下的组成。

[0027] (I) 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的酸性磷脂:1 ~ 85 摩尔%;

[0028] (II) 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的中性磷脂:0.01 ~ 80 摩尔%;

[0029] (III) 结合有选自上述肽中的至少 1 种的、包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂:0.2 ~ 80 摩尔%;

[0030] (IV) 稳定剂 :0.2 ~ 75 摩尔 %。

[0031] 本发明提供一种抗原呈递细胞,其是通过使表达细胞表面抗原 HLA-A2 的细胞在体外与选自上述肽中的至少 1 种接触而制备的。上述细胞优选为自体来源的细胞,优选为同种来源的细胞。

[0032] 另外,本发明还提供一种 SARS 冠状病毒特异性的 HLA-A2 限制性 CTL 的诱导剂,其含有选自上述肽中的至少 1 种、上述肽结合脂质体或上述抗原呈递细胞作为有效成分。

[0033] 本发明提供一种用于预防 SARS 冠状病毒感染的疫苗,其含有选自上述肽中的至少 1 种、上述肽结合脂质体或上述抗原呈递细胞作为有效成分。

[0034] 此外,本发明提供对需要提供针对 SARS 冠状病毒的免疫性的对象提供免疫性的方法,其中,包括对上述对象给予选自上述肽中的至少 1 种、上述肽结合脂质体或上述抗原呈递细胞。

[0035] 本发明提供对需要提供针对 SARS 冠状病毒的免疫性的对象提供免疫性的方法,其中,包括:从上述对象采集细胞,使细胞在体外与选自上述肽中的至少 1 种接触而制备抗原呈递细胞,将抗原呈递细胞回输给上述对象。上述细胞优选为淋巴系单核细胞,更优选为树突细胞。

[0036] 发明的效果

[0037] 本发明提供包含来自 SARS 冠状病毒 pp1a 蛋白的新的 CTL 表位的肽、肽结合脂质体和抗原呈递细胞。另外,通过该肽、肽结合脂质体或抗原呈递细胞,可诱导 CTL 以及在体内活化 CTL 应答,因此,本发明的肽、肽结合脂质体和抗原呈递细胞均可以作为用于排除 SARS 冠状病毒的 CTL 诱导剂和 / 或疫苗来使用。另外,由于非结构蛋白在病毒感染过程中比结构蛋白更早合成,因此,通过利用来自非结构蛋白 pp1a 蛋白的 CTL 表位来活化免疫反应,能够期待在病毒感染初期排除病毒的效果。

附图说明

[0038] 图 1 是利用流式细胞仪获得的用肽结合脂质体免疫的小鼠的 CD8 和 IFN- γ 的染色图。

[0039] 图 2 是利用流式细胞仪获得的用刺突 -1203 肽结合脂质体免疫的小鼠的 CD8 和 IFN- γ 的染色图。

[0040] 图 3 是利用流式细胞仪获得的用 CFSE 标记的抗原呈递细胞加强免疫的小鼠的 CFSE 的染色图。

具体实施方式

[0041] 以下,对用来实施本发明的最佳实施方式进行详细说明。

[0042] 本发明中的肽是包含来自 SARS 冠状病毒 pp1a 蛋白的 CTL 表位的肽,具体可以举出包含选自由序列号 10、11、12、13、15、17、18、23 和 24 组成的组中的氨基酸序列的肽、以及由选自由序列号 10、11、12、13、15、17、18、23 和 24 组成的组中的氨基酸序列构成的肽。另外,优选选自由序列号 10、12、15、17 和 24 组成的组中的氨基酸序列,更优选序列号 24 的氨基酸序列。这些肽包含 HLA-A2 限制性 CTL 表位,更具体而言,包含 HLA-A*0201 限制性 CTL 表位。另外,本发明的肽在不损害原来的 CTL 表位活性的条件下,可以以各种形式(例如未

变性、融合体、糖基化、非糖基化等)使用,可以包含 C 末端修饰(酰胺化、酯化、醛化等)、N 末端修饰(乙酰化、生物素化、荧光标记等)和官能团的化学修饰(磷酸化、硫酸化、生物素等)。

[0043] 这里,关于肽的合成,可以根据通常的肽化学中使用的方法来进行。作为公知的肽合成方法,可以举出文献(Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ;The Proteins, Vol2, Academic Press Inc., New York, 1976 ;ペプチド合成,丸善株式会社, 1975 ;ペプチド合成の基礎と实验,丸善株式会社,1985 ;医药品の開発続第 14 卷・ペプチド合成,广川书店,1991) 等中记载的方法。

[0044] 以上所述的本发明的肽通过使用一种或将两种以上组合,能够作为 SARS 冠状病毒特异性的 HLA-A2 限制性 CTL 的诱导剂和 / 或用于治疗或预防 SARS 冠状病毒感染的疫苗使用。即,本发明的肽能够与 HLA-A2 分子结合,通过呈递给表达 HLA-A2 分子的细胞而强烈地诱导 CTL,因此,本发明的肽能够作为用于排除 SARS 冠状病毒的 CTL 诱导剂和 / 或疫苗使用。

[0045] 本发明的肽结合脂质体中所用的脂质体是指具有封闭空间的磷脂双层膜。

[0046] 本发明的肽结合脂质体中所用的脂质体含有磷脂和稳定剂,所述磷脂包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基。作为磷脂,优选使用包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基的磷脂。

[0047] 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基的磷脂中,酰基的碳原子数优选为 16 ~ 22,更优选为 18 ~ 22,最优选为 18。作为酰基,具体可以举出棕榈油酰基、油酰基、瓢儿菜基(Erucoyl)等,最优选为油酰基。包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂中,烃基的碳原子数优选为 16 ~ 22,更优选为 18 ~ 22,最优选为 18。作为烃基,具体可以举出十四碳烯基、十六碳烯基、十八碳烯基、C20 单烯基、C22 单烯基、C24 单烯基等。磷脂所具有的甘油残基的 1- 位和 2- 位上结合的不饱和酰基或不饱和烃基可以相同也可以不同。从工业上的生产率的观点出发,优选 1- 位和 2- 位的基团相同。

[0048] 从使 CTL 活性增强至实用上足够的水平的观点出发,优选磷脂包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基。当酰基的碳原子数少于 13 时,有时脂质体的稳定性变差、或者 CTL 活性增强效果不充分。另外,当酰基的碳原子数超过 24 时,有时脂质体的稳定性变差。

[0049] 作为包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂,可以举出酸性磷脂、中性磷脂、具有能够结合肽的的官能团的反应性磷脂等种类。这些磷脂可以根据各种要求适当选择其种类和比例。

[0050] 作为酸性磷脂,可以使用磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰肌醇等。从使 CTL 活性增强至实用上足够的水平的观点和工业上的供给性、作为医药品使用的品质等观点出发,优选使用包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基的二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酰甘油、二酰基磷脂酸和二酰基磷脂酰肌醇。酸性磷脂给脂质体的表面提供阴离子性电离基团,因而会赋予脂质体表面负性的 ζ 电位。因此,脂质体能够获得电荷排斥力,从而在水性溶剂中作为稳定的制剂而存在。这样,酸性磷脂在确保水性溶剂中的脂质体的稳定性的方面是非常重要的。

[0051] 作为中性磷脂,例如可以使用磷脂酰胆碱等。本发明中能够使用的中性磷脂,可以在实现 CTL 活性增强效果的范围内适当选择其种类和量来使用。与酸性磷脂和结合有肽的

磷脂相比,中性磷脂使脂质体稳定化的功能强,能够提高膜的稳定性。从该观点出发,本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体优选含有中性磷脂。可以在确保用于实现 CTL 活性增强效果的酸性磷脂、用于肽结合的反应性磷脂和稳定剂的含量的基础上,确定中性磷脂的使用量。

[0052] 本发明的肽通过与脂质体中所含的、包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂结合而结合到脂质体的表面上。作为用于结合该肽的磷脂,可以使用具有肽能够结合的官能团的反应性磷脂。包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的反应性磷脂,可以根据各种要求适当选择其种类和比例。与前述磷脂同样,反应性磷脂中也不优选磷脂中所含的不饱和酰基或不饱和烃基的碳原子数超过 24 或者少于 14 的情况。

[0053] 作为反应性磷脂,可以举出磷脂酰乙醇胺或其末端改性物。另外,磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰肌醇和它们的末端改性物也可以作为反应性磷脂使用。从工业上的获得性、与肽的结合工序的简便性、收率等的角度出发,优选使用磷脂酰乙醇胺或其末端改性物。磷脂酰乙醇胺在其末端具有能够结合抗体的氨基。另外,从使 CTL 活性增强至实用上足够的水平的角度以及在脂质体中的稳定性和工业上的供给性、作为医药品使用的品质等的角度出发,最优选使用包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基的二酰基磷脂酰乙醇胺或其末端改性物。

[0054] 二酰基磷脂酰乙醇胺例如可以通过以二酰基磷脂酰胆碱为原料,使用磷脂酶 D 使胆碱与乙醇胺发生碱交换反应而得到。具体而言,将溶解有二酰基磷脂酰胆碱的氯仿溶液与溶解有磷脂酶 D 和乙醇胺的水以适当比率混合,可以得到粗反应物。利用氯仿 / 甲醇 / 水性溶剂,将粗反应物用硅胶柱纯化,可以得到目标二酰基磷脂酰乙醇胺。本领域技术人员可以适当选择溶剂组成比等柱纯化条件来实施。

[0055] 作为末端改性物,可以举出在二酰基磷脂酰乙醇胺的氨基上结合有二元反应性化合物的一个末端的二酰基磷脂酰乙醇胺末端改性物。作为二元反应性化合物,可以使用在至少一个末端上具有能够与二酰基磷脂酰乙醇胺的氨基反应的醛基或琥珀酰亚胺基的化合物。作为具有醛基的二元反应性化合物,可以举出乙二醛、戊二醛、丁二醛、对苯二甲醛等。优选为戊二醛。作为具有琥珀酰亚胺基的二元反应性化合物,可以举出二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)、乙二醇 - 双(琥珀酰亚胺基丁二酸酯)、双琥珀酰亚胺基丁二酸酯、双琥珀酰亚胺基辛二酸酯或双琥珀酰亚胺基戊二酸酯等。

[0056] 另外,作为一个末端具有琥珀酰亚胺基、另一个末端具有马来酰亚胺基的二元反应性化合物,可以举出 N-琥珀酰亚胺基 4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯、磺基琥珀酰亚胺基 -4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯、N-琥珀酰亚胺基 -4-(对马来酰亚胺苯基)乙酸酯、N-琥珀酰亚胺基 -4-(对马来酰亚胺苯基)丙酸酯、琥珀酰亚胺基 -4-(N-马来酰亚胺乙基) - 环己烷 -1- 羧酸酯、磺基琥珀酰亚胺基 -4-(N-马来酰亚胺乙基) - 环己烷 -1- 羧酸酯、N-(γ -马来酰亚胺丁酰氧基)琥珀酰亚胺、N-(ϵ -马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺等。当使用这样的二元反应性化合物时,能够得到具有马来酰亚胺基作为官能团的二酰基磷脂酰乙醇胺末端改性物。通过将以上所述的二元反应性化合物的一个末端的官能团结合在二酰基磷脂酰乙醇胺的氨基上,能够得到二酰基磷脂酰乙醇胺末端改性物。

[0057] 作为在脂质体的表面结合肽的方法,例如可以举出制备含有上述反应性磷脂的脂质体,然后添加肽使肽与脂质体中的反应性磷脂结合的方法。另外,通过预先使肽与反应性磷脂结合,然后,将所得的肽结合反应性磷脂与除反应性磷脂以外的磷脂和稳定剂混合,也可以得到表面结合有肽的脂质体。在反应性磷脂上结合肽的方法是本技术领域公知的。

[0058] 本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体含有至少1种、例如含有2种以上、优选含有3种以上包含具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的酰基或具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的烃基的磷脂。例如,本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体含有选自二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酰甘油、二酰基磷脂酸、二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、琥珀酰亚胺基-二酰基磷脂酰乙醇胺和马来酰亚胺-二酰基磷脂酰乙醇胺中的至少1种、例如2种以上、优选3种以上的、包含具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的酰基或具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的烃基的磷脂。

[0059] 另外,本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体优选分别含有至少1种下述磷脂:

[0060] 包含具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的酰基或具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的烃基的酸性磷脂、

[0061] 包含具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的酰基或具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的烃基的中性磷脂,和

[0062] 包含具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的酰基或具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的烃基的反应性磷脂。

[0063] 本发明中,作为脂质体的稳定剂,可以使用固醇类或生育酚类。作为固醇类,只要是一般作为固醇类已知的物质即可,例如可以举出胆固醇、谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇等,从容易获得等观点出发,特别优选使用胆固醇。作为生育酚类,只要是一般作为生育酚已知的物质即可,例如,从容易获得等观点出发,优选举出市售的 α -生育酚。

[0064] 此外,只要不损害本发明的效果,本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体也可以含有能够构成脂质体的、公知的脂质体构成成分。

[0065] 作为本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体的组成,例如可以举出以下组成:

[0066] (A) 包含具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的酰基或具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的烃基的磷脂:1~99.8摩尔%;

[0067] (B) 稳定剂:0.2~75摩尔%。

[0068] 需要说明的是,各成分的含量以相对于肽结合脂质体的全部构成成分的摩尔百分比来表示。

[0069] 从脂质体的稳定性的观点出发,上述成分(A)的含量优选为10~90摩尔%、更优选为30~80摩尔%、进一步优选为50~70摩尔%。

[0070] 从脂质体的稳定性的观点出发,上述成分(B)的含量优选为5~70摩尔%、更优选为10~60摩尔%、进一步优选为20~50摩尔%。当稳定剂的含量超过75摩尔%时,脂质体的稳定性受损,因而不优选。

[0071] 上述成分(A)中包含以下物质:

[0072] (a)未结合有肽的、包含具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的酰基或具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的烃基的磷脂,和

[0073] (b)结合有肽的、包含具有1个不饱和键的碳原子数为14~24的酰基或具有1个

不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂。

[0074] 上述成分(a)的含量通常为 0.01 ~ 85 摩尔%、优选为 0.1 ~ 80 摩尔%、更优选为 0.1 ~ 60 摩尔%、进一步优选为 0.1 ~ 50 摩尔%。

[0075] 上述成分(b)的含量通常为 0.2 ~ 80 摩尔%、优选为 0.3 ~ 60 摩尔%、更优选为 0.4 ~ 50 摩尔%、进一步优选为 0.5 ~ 25 摩尔%。当含量低于 0.2 摩尔%时,肽量减少,因而难以使 CTL 活化至实用上足够的水平,当超过 80 摩尔%时,脂质体的稳定性下降。

[0076] 上述成分(a)的磷脂中通常含有上述的酸性磷脂和中性磷脂。另外,上述成分(b)的磷脂中含有上述的反应性磷脂。

[0077] 酸性磷脂的含量通常为 1 ~ 85 摩尔%、优选为 2 ~ 80 摩尔%、更优选为 4 ~ 60 摩尔%、进一步优选为 5 ~ 40 摩尔%。当含量低于 1 摩尔%时, ζ 电位减小,脂质体的稳定性降低,另外,难以使 CTL 活化至实用上足够的水平。另一方面,当含量超过 85 摩尔%时,作为其结果,脂质体中的肽结合磷脂的含量下降,难以使 CTL 活化至实用上足够的水平。

[0078] 中性磷脂的含量通常为 0.01 ~ 80 摩尔%、优选为 0.1 ~ 70 摩尔%、更优选为 0.1 ~ 60 摩尔%、进一步优选为 0.1 ~ 50 摩尔%。当含量超过 80.0 摩尔%时,脂质体中所含的酸性磷脂、肽结合磷脂和脂质体的稳定剂的含量下降,难以使 CTL 活化至实用上足够的水平。

[0079] 结合有肽的磷脂是肽结合在所述的反应性磷脂上而得到的,关于反应性磷脂与肽结合的比例,可以在不妨碍本发明效果的范围内,通过适当应用结合所用的官能团的种类、结合处理条件等来进行选择。例如,在使用在二酰基磷脂酰乙醇胺的末端氨基上结合二元反应性化合物双琥珀酰亚胺基丁二酸酯的一个末端而得到的二酰基磷脂酰乙醇胺的末端改性物作为反应性磷脂的情况下,通过选择结合处理各条件,能够使 10 ~ 99% 的反应性磷脂与肽结合。此时,未与肽结合的反应性磷脂成为酸性磷脂而含有在脂质体中。

[0080] 作为本发明的肽结合脂质体的优选方式,可以举出以下的组成:

[0081] (I) 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的酸性磷脂:1 ~ 85 摩尔%;

[0082] (II) 包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的中性磷脂:0.01 ~ 80 摩尔%;

[0083] (III) 结合有选自上述肽中的至少 1 种的、包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的烃基的磷脂:0.2 ~ 80 摩尔%;

[0084] (IV) 稳定剂:0.2 ~ 75 摩尔%。

[0085] (总计 100 摩尔%)

[0086] 作为本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体的更优选的方式,可以举出以下的组成:

[0087] 上述成分(I):2 ~ 80 摩尔%

[0088] 上述成分(II):0.1 ~ 70 摩尔%

[0089] 上述成分(III):0.3 ~ 60 摩尔%

[0090] 上述成分(IV):10 ~ 70 摩尔%

[0091] (总计 100 摩尔%)

[0092] 作为本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体的进一步优选的方式,可以举出以下

的组成：

[0093] 上述成分(I)：4～60 摩尔%

[0094] 上述成分(II)：0.1～60 摩尔%

[0095] 上述成分(III)：0.4～50 摩尔%

[0096] 上述成分(IV)：20～60 摩尔%

[0097] (总计 100 摩尔%)

[0098] 作为本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体的特别优选的方式，可以举出以下的组成：

[0099] 上述成分(I)：5～40 摩尔%

[0100] 上述成分(II)：0.1～50 摩尔%

[0101] 上述成分(III)：0.5～25 摩尔%

[0102] 上述成分(IV)：25～55 摩尔%

[0103] (总计 100 摩尔%)

[0104] 虽然肽结合脂质体中使用的脂质体中的磷脂中所含的不饱和酰基或不饱和烃基的特征碳原子数为 14～24 是本发明的特征，但是在不妨碍本发明效果的范围内，也可以含有包含碳原子数少于 14 或超过 24 的不饱和酰基或不饱和烃基的磷脂。相对于本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体中的磷脂所含的全部不饱和酰基或不饱和烃基的总数，碳原子数为 14～24 的不饱和酰基或不饱和烃基数的比例例如为 50% 以上、优选为 60% 以上、更优选为 75% 以上、进一步优选为 90% 以上、最优选为 97% 以上(例如实质上为 100%)。

[0105] 本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体在不妨碍本发明的效果的情况下，可以含有包含碳原子数为 14～24 的范围的酰基或烃基的除磷脂以外的脂质。该脂质的含量通常为 40 摩尔% 以下、优选为 20 摩尔% 以下、更优选为 10 摩尔% 以下、进一步优选为 5 摩尔% 以下(例如实质上为 0 摩尔%)。

[0106] 本发明中使用的脂质体可以通过使用作为构成成分的磷脂、反应性磷脂、稳定剂、肽等，适当进行配合或加工，并将其添加到适当的溶剂中等方法而得到。例如可以举出挤压法、涡流搅拌法、超声波法、表面活性剂去除法、反相蒸发法、乙醇注入法、预囊泡法(プレベシクル法)、弗氏压碎器法、W/O/W 型乳液法、退火法、冻融法等制造方法。脂质体的粒径没有特别限定，从保存稳定性等的角度出发，粒径可以举出 20～600nm、优选为 30～500nm、更优选为 40～400nm、进一步优选为 50～300nm、最优选为 70～230nm。

[0107] 需要说明的是，本发明中，为了提高脂质体的理化稳定性，在脂质体的制备过程中或制备后，可以在脂质体的内水相和/或外水相中添加糖类或多元醇类。特别是需要长期保存或制剂化过程中需要保存的情况下，优选添加并溶解糖或多元醇作为脂质体的保护剂，并通过冷冻干燥除去水分制成磷脂组合物的冷冻干燥物。

[0108] 作为糖类，例如可以举出葡萄糖、半乳糖、甘露糖、果糖、肌醇、核糖、木糖等单糖类；蔗糖、乳糖、纤维二糖、海藻糖、麦芽糖等双糖类；棉籽糖、松三糖等三糖类；环糊精等寡糖；糊精等多糖类；木糖醇、山梨糖醇、甘露醇、麦芽糖醇等糖醇等。这些糖类中，优选单糖类或双糖类，其中，从容易获得等的角度出发，更优选举出葡萄糖或蔗糖。

[0109] 作为多元醇类，例如可以举出甘油、二甘油、三甘油、四甘油、五甘油、六甘油、七甘油、八甘油、九甘油、十甘油、聚甘油等甘油类化合物；山梨糖醇、甘露醇等糖醇类化合物；

乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、五乙二醇、六乙二醇、七乙二醇、八乙二醇、九乙二醇等。其中,从容易获得的角度出发,优选列举甘油、二甘油、三甘油、山梨糖醇、甘露醇、分子量为 400 ~ 10000 的聚乙二醇。脂质体的内水相和 / 或外水相中所含的糖类或多元醇类的浓度以相对于脂质体溶液的重量浓度计,例如可以举出 1 ~ 20 重量 %, 优选举出 2 ~ 10 重量 %。

[0110] 制造本发明的肽结合脂质体时,通过在制作肽结合前的脂质体之后使其与肽结合,能够简便地得到肽结合脂质体。例如,制备含有磷脂、稳定剂和用于在膜表面结合肽的反应性磷脂的脂质体、例如脂质体溶液,在其外水相中添加 2 ~ 10 重量 % 左右的前述糖类之一的蔗糖并溶解。将该糖添加后的制剂转移到 10ml 的玻璃制小瓶中,置于层式冷冻干燥机内,冷却至 -40℃ 等使试样冻结后,利用常规方法得到冷冻干燥物。这里得到的脂质体的冷冻干燥物已经除去了水分,因此能够长期保存,然后根据需要添加特定的肽而实施后续步骤,由此能够快速简便地得到本发明的肽结合脂质体。在肽与脂质体的相互作用强因而不稳定性强的情况下等,像这样以脂质体的冷冻干燥物的阶段进行保存,并在需要时结合肽来使用是非常简便的。

[0111] 本发明的肽结合脂质体中使用的脂质体可以含有结合有肽的磷脂。作为得到含有结合有肽的磷脂的脂质体的方法,可以举出以下的(A)和(B)的方法。

[0112] (A) 制备含有磷脂、反应性磷脂、稳定剂的脂质体,向其中添加肽和二元反应性化合物,使脂质体中含有的反应性磷脂的官能团与肽的官能团通过二元反应性化合物连接。这里可使用的二元反应性化合物可以同样地使用在反应性磷脂的末端改性物制备中所用的二元反应性化合物。具体而言,作为具有醛基的二元反应性化合物,可以举出乙二醛、戊二醛、丁二醛、对苯二甲醛等。优选举出戊二醛。另外,作为具有琥珀酰亚胺基的二元反应性化合物,可以举出二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)、乙二醇-双(琥珀酰亚胺基丁二酸酯)、双琥珀酰亚胺基丁二酸酯、双琥珀酰亚胺基辛二酸酯或双琥珀酰亚胺基戊二酸酯等。另外,作为一个末端具有琥珀酰亚胺基、另一个末端具有马来酰亚胺基的二元反应性化合物,可以使用 N-琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯、N-琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺苯基)乙酸酯、N-琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺苯基)丙酸酯、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺乙基)-环己烷-1-羧酸酯、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺乙基)-环己烷-1-羧酸酯、N-(γ -马来酰亚胺丁酰氧基)琥珀酰亚胺、N-(ϵ -马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺等。使用所述二元反应性化合物时,能够得到具有马来酰亚胺基作为官能团的反应性磷脂(例如磷脂酰乙醇胺)的末端改性物。

[0113] (B) 制备含有磷脂、反应性磷脂、稳定剂的脂质体,向其中添加肽而使脂质体中所含的反应性磷脂的官能团与肽的官能团连接而结合的方法。

[0114] 作为所述(A)和(B)中的键的种类,例如可以举出离子键、疏水键、共价键等,优选为共价键。进而,作为共价键的具体例子,可以举出席夫碱键、酰胺键、硫醚键、酯键等。以上的2种方法均能够在脂质体中所含的反应性磷脂上结合肽,从而形成脂质体中结合有肽的磷脂。

[0115] 上述(A)的方法中,作为使原料脂质体与肽通过二元反应性化合物相结合的方法的具体例子,例如可以举出利用席夫碱键的方法。作为通过席夫碱键将脂质体与肽结合的

方法,可以举出制备表面具有氨基的脂质体,在脂质体的悬浮液中添加肽,然后,加入作为二元反应性化合物的二醛,使脂质体表面的氨基与肽中的氨基通过席夫碱而结合的方法。

[0116] 作为该结合顺序的具体例子,例如可以举出以下的方法。

[0117] (A-1) 为得到表面具有氨基的脂质体,在脂质体原料脂质(磷脂、脂质体的稳定剂等)中混合包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的羟基的反应性磷脂(例如,磷脂酰乙醇胺),制成脂质体表面存在规定量的氨基的脂质体。

[0118] (A-2) 向上述脂质体悬浮液中添加肽。

[0119] (A-3) 然后,加入戊二醛作为二元反应性化合物,进行规定时间的反应从而在脂质体与肽之间形成席夫碱键。

[0120] (A-4) 然后,为使剩余的戊二醛的反应性失活,在脂质体悬浮液中加入甘氨酸作为含氨基的水溶性化合物并使其反应。

[0121] (A-5) 通过凝胶过滤、透析、超滤、离心分离等方法,除去未结合到脂质体上的肽、戊二醛与甘氨酸的反应产物和剩余的甘氨酸,得到肽结合脂质体悬浮液。

[0122] 作为上述(B)的方法的具体例子,可以举出在磷脂膜中引入具有能够形成酰胺键、硫醚键、席夫碱键、酯键等的官能团的反应性磷脂的方法。作为这样的官能团的具体例子,可以举出琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺基、氨基、亚氨基、羧基、羟基、巯基等。作为引入到脂质体中的反应性磷脂的例子,可以使用前述的包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基或具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的羟基的反应性磷脂(例如磷脂酰乙醇胺)的氨基末端的末端改性物。

[0123] 作为该结合顺序的具体例子,以使用二酰基磷脂酰乙醇胺的情况为例如下进行说明。

[0124] (B-1)通过公知的方法,使包含具有 1 个不饱和键的碳原子数为 14 ~ 24 的酰基的二酰基磷脂酰乙醇胺与双琥珀酰亚胺基丁二酸酯仅在一个末端发生反应,得到末端具有琥珀酰亚胺基作为官能团的、结合有双琥珀酰亚胺基丁二酸酯的二酰基磷脂酰乙醇胺。

[0125] (B-2) 通过公知的方法,将上述结合有双琥珀酰亚胺基丁二酸酯的二酰基磷脂酰乙醇胺与其它脂质体构成成分(磷脂、稳定剂等)混合,制成表面具有琥珀酰亚胺基作为官能团的脂质体组合物。

[0126] (B-3) 在上述脂质体组合物悬浮液中加入肽,使肽中的氨基与磷脂膜表面的琥珀酰亚胺基反应。

[0127] (B-4) 通过凝胶过滤、透析、超滤、离心分离等方法除去未反应的肽、反应副产物等,得到含有肽结合磷脂的脂质体悬浮液。

[0128] 使脂质体与肽结合时,以多数情况下作为官能团含有的氨基或巯基为对象在实用上是优选的。以氨基为对象时,通过与琥珀酰亚胺基反应,能够形成席夫碱键。以巯基为对象时,通过与马来酰亚胺基反应,能够形成硫醚键。

[0129] 本发明中的抗原呈递细胞是通过使表达细胞表面抗原 HLA-A2 的细胞在体外与 1 种或 2 种以上的肽接触而制备的细胞。细胞优选为自体来源和 / 或同种来源的细胞。另外,作为细胞,可以举出表达细胞表面抗原 HLA-A2 (例如 HLA-A*0201) 的细胞。优选为淋巴系单核细胞(T 细胞、巨噬细胞、B 细胞、树突细胞等),更优选为树突细胞。

[0130] 本发明的抗原呈递细胞通过给予(注入)对象,能够作为 SARS 冠状病毒特异性的 HLA-A2 限制性 CTL 的诱导剂和 / 或用于治疗或预防 SARS 冠状病毒的感染的疫苗使用。即,本发明的抗原呈递细胞将本发明的肽呈递到细胞表面,能够强烈地诱导 CTL,因此能够作为用于排除 SARS 冠状病毒的 CTL 诱导剂和 / 或疫苗使用。抗原呈递细胞优选每 10^7 的细胞使用优选 $1 \sim 100 \mu\text{M}$ 、更优选 $5 \sim 50 \mu\text{M}$ 、例如 $10 \mu\text{M}$ 的肽而制备的抗原呈递细胞。

[0131] 本发明的肽、肽结合脂质体和抗原呈递细胞能够作为 SARS 冠状病毒特异性的 HLA-A2 限制性 CTL 的诱导剂和 / 或用于治疗或预防 SARS 冠状病毒感染的疫苗使用。对象可以是包括人在内的任何动物。在特定的实施方式中,对象为人。本发明的诱导剂和 / 或疫苗根据作为有效成分的物质性状制成一般的医药组合物的形态,组合物的直接递送一般通过非经口的注射(例如皮下注射、腹腔内注射、静脉内注射、肌肉内注射、组织间隙的空间内的注射等)来实现。作为其它给予方法,可以举出粘膜给予(例如,经口、滴鼻或经肺)、经眼的给予、经皮的给予和栓剂。

[0132] 即,非经口给予的情况下,可以以注射剂、经鼻剂、局部给予剂(经皮剂等)、直肠给予剂等给予形态给予。经口给予的情况下,可以以本领域中通常使用的给予形态给予。作为注射剂,例如可以举出无菌的溶液或悬浮液、乳剂等,具体可以举出水、水-丙二醇溶液、缓冲液、0.4% 的生理盐水等。另外,制成液态制剂的情况下,可以冷却保存或者通过冷冻干燥等除去水分后进行保存。冷冻干燥制剂在使用时加入注射用蒸馏水等,再溶解后使用。作为局部给予剂,例如可以举出霜剂、软膏、洗剂、经皮剂等。作为经口剂或直肠给予剂,例如可以举出胶囊、片剂、丸剂、散剂、滴剂、栓剂、液体剂等。

[0133] 以上的剂型通过本领域中通常实施的方法与药学上可容许的赋形剂、添加剂一起制成制剂。作为药学上可容许的赋形剂、添加剂,可以举出载体、结合剂、香料、缓冲剂、增粘剂、着色剂、稳定剂、乳化剂、分散剂、助悬剂、防腐剂、pH 调节剂、渗透度调节剂、浸润剂等。另外,作为药学上可容许的载体,例如可以举出碳酸镁、乳糖、果胶、淀粉、甲基纤维素等。

[0134] 含有本发明的肽、肽结合脂质体或抗原呈递细胞作为有效成分的诱导剂、以及含有本发明的肽、肽结合脂质体或抗原呈递细胞作为有效成分的疫苗,为了增强其效果,还可以含有佐剂。作为佐剂,可以举出氢氧化铝凝胶、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、百日咳菌佐剂、聚(I:C)、CpG-DNA 等。其中,优选 CpG-DNA。CpG-DNA 是含有非甲基化 CpG 基序的 DNA,通过活化树突细胞,能够增强本发明的肽、肽结合脂质体或抗原呈递细胞的 CTL 诱导效应。

[0135] 制剂中的本发明的肽的给予量、制剂的给予次数因症状、年龄、体重、给予形态等的不同而不同,通常为 $0.01 \mu\text{g} \sim 1\text{mg}$ 、优选为 $0.1 \mu\text{g} \sim 500 \mu\text{g}$ 、更优选为 $1.0 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$,优选以该剂量几天至几个月给予 1 次。例如,在初始免疫(即,治疗性或预防性给予)时对于成人患者给予 $1.0 \mu\text{g} \sim 500 \mu\text{g}$ 的肽,根据患者血液中的特异性 CTL 活性测定所反映的患者的应答和状态,在几周至几个月后按照加强疗法在其后进行 $1.0 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ 的肽的加强给予。另外,本发明的抗原呈递细胞的给予细胞数优选为 $10^9 \sim 10^6$ 个、更优选为 $10^8 \sim 10^7$ 个,可以根据症状、年龄、体重、给予形态等进行适当调整。

[0136] 实施例

[0137] 以下,基于实施例更具体地说明本发明,但本发明不限于以下的实施例。

[0138] (实施例 1:CTL 表位的预测)

[0139] 使用两种表位预测计算机软件 BIMAS (URL:<http://www-bimas.cit.nih.gov/>)

molbio/hla_bind/)和 SYFPEITHI (URL :http://www.syfpeithi.de/)对 pp1a 的候选表位进行检索。从以 HLA 分子 :HLA-A*0201 和肽长度 :9 ~ 10 氨基酸残基为对象的检索中选出 30 种在两种分析方法中均显示高预测分值的表位候选肽。这 30 种表位候选肽的氨基酸序列如表 1 所示。对于 30 种表位候选肽,分别制作合成肽,并对实际能够作为表位起作用的肽进行检索,为进一步分析鉴定出的 9 种表位肽的功能进行以下的实施例 4 和 5。

[0140] [表 1]

[0141]

表位	序列	序列 ID 号	BIMAS	SYFPEITHI
1)pp1a-15	QLSLPVLQV	1	160. 0	26
2)pp1a-103	TLGVLVPHV	2	160. 0	26
3)pp1a-445	TLNEDLLEI	3	98. 4	28
4)pp1a-634	KLSAGVEFL	4	463. 5	27
5)pp1a-651	FUTGVFDI	5	640. 2	27
6)pp1a-1121	ILLAPLLSA	6	71. 9	26
7)pp1a-1139	SLQVCVQTV	7	160. 0	28
8)pp1a-1288	MLSRALKKV	8	272. 0	25
9)pp1a-1652	YLSSVLLAL	9	226. 0	28
10)pp1a-2187	CLDAGINYV	10	351. 9	27
11)pp1a-2207	AMWLLLLSI	11	143. B	27
12)pp1a-2340	WLMWFIIsI	12	1551. 9	26
13)pp1a-2546	ILLLDQVLV	13	437. 5	26
14)pp1a-2754	TLLCVLAAL	14	181. 8	29
15)pp1a-2755	LLCVLAALV	15	118. 2	25
16)pp1a-2758	VLAALVCYI	16	224. 4	26
17)pp1a-2990	ALSGVFCGV	17	132. 1	25
18)pp1a-3444	VLAWLYAAV	18	177. 4	27
19)pp1a-3459	FLNRFTTTL	19	373. 4	27

20)pp1a-3560	MLLTFLTSL	20	1174. 4	29
21)pp1a-3564	FLTSLILV	21	735. 9	25
22)pp1a-3616	FLLPSLATV	22	2722. 7	33
23)pp1a-3687	TLMNVITLV	23	591. 9	25
24)pp1a-3709	SMWALVISV	24	958. 9	28
25)pp1a-3730	FLARAIIVFV	25	4047. 2	29
26)pp1a-3745	LLFITGNTL	26	134. 4	26
27)pp1a-3816	KLNIKLLGI	27	84. 0	27
28)pp1a-3848	VLLSVLQQL	28	309. 1	27
29)pp1a-4071	ALWEIQQVV	29	970. 0	25
30)pp1a-4219	VLGSLAA IV	30	118. 2	26

[0142] (实施例 2:肽对 HLA-A*0201 分子的结合亲和力的测定)

[0143] 对于表 1 列举的 30 种表位候选肽,测定对作为主要组织相容性抗原复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子的 HLA-A*0201 的结合亲和力。测定使用人淋巴细胞系细胞株 T2 细胞。T2 细胞因 TAP 基因缺失而无法转运自身抗原来源的自身肽,因此在细胞表面表达未结合肽的 HLA-A*0201。当添加到细胞外部的肽与 HLA-A*0201 结合时,会形成 HLA-A*0201 复合体,从而稳定化。利用该原理,根据形成的 HLA-A*0201 复合体量与添加的肽的浓度的关系,计算结合亲和力。作为检测 HLA-A*0201 复合体的抗体,使用抗 HLA-A2 单克隆抗体 BB7. 2 (ATCC)。另外,使用丙型肝炎病毒的表位(NS3-1585)作为对照。

[0144] 具体而言,将 T2 细胞与各种浓度的肽一起在 37°C 下孵育过夜。然后,使其与抗 HLA-A2 抗体 BB7. 2 反应,然后,通过流式细胞仪对与 FITC 标记的二次抗体反应后的细胞进行分析。以 NS3-1585 致敏的 T2 细胞的平均荧光强度(MFI)为基准(100%),将各个肽的用 BL₅₀ (half-maximal binding level,半数最大结合水平)表示的 50% 平均荧光强度的肽浓度示于表 2。将 BL₅₀ 低于 100 μ M、BL₅₀ 为 100 ~ 200 μ M 和 BL₅₀ 高于 200 μ M 时的各自的结合亲和力分别分类为“高”、“中”、“低”3 个级别,结果存在 24 种显示高结合亲和力的肽。

[0145] [表 2]

[0146]

表位	序列 ID 号	BL ₅₀ (μ M)	亲和力
1)pp1a-15	1	75. 7	高
2)pp1a-103	2	3. 1	高

3)pp1a-445	3	19. 2	高
4)pp1a-634	4	59. 8	高
5)pp1a-651	5	8. 4	高
6)pp1a-1121	6	40. 3	高
7)pp1a-1139	7	4. 9	高
8)pp1a-1288	8	65. 1	高
9)pp1a-1652	9	6. 7	高
10)pp1a-2187	10	3. 0	高
11)pp1a-2207	11	323. 0	低
12)pp1a-2340	12	2432. 8	低
13)pp1a-2546	13	7. 6	高
14)pp1a-2754	14	96. 7	高
15)pp1a-2755	15	187. 2	中
16)pp1a-2758	16	97. 3	高
17)pp1a-2990	17	6. 2	高
18)pp1a-3444	18	53. 0	高
19)pp1a-3459	19	39. 6	高
20)pp1a-3560	20	47. 1	高
21)pp1a-3564	21	100. 4	中
22)pp1a-3616	22	31. 8	高
23)pp1a-3687	23	22. 8	高
24)pp1a-3709	24	6. 4	高
25)pp1a-3730	25	25. 7	高
26)pp1a-3745	26	153. 7	中

27)pp1a-3816	27	68. 1	高
28)pp1a-3848	28	102. 5	中
29)pp1a-4071	29	8. 3	高
30)pp1a-4219	30	53. 3	高

[0147] (实施例3:对使用肽致敏的抗原呈递细胞进行了免疫的小鼠的肽特异性CTL的诱导)

[0148] 为了研究表1列举的30种表位候选肽是否肽特异性地诱导CTL,在体外用肽致敏的小鼠脾细胞免疫小鼠,用肽刺激该脾细胞后,测定CTL诱导活性。小鼠使用在敲除了小鼠MHC I类和p2-微球蛋白(p2-m)的小鼠中导入有人MHC I类分子之一的HLA-A*0201和人 β 2-m基因的HLA-A2转基因小鼠(HDD II小鼠、巴斯德研究所、法国;由F. Lemonnier博士提供)。以CD8阳性细胞中 γ 干扰素(IFN- γ)产生亢进的细胞的比例为指标,测定CTL诱导活性。

[0149] 将从初始(naive)的HLA-A2转基因小鼠制备的脾细胞在体外与各肽10 μ M一起在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。将用肽致敏的脾细胞静脉注射给另一个体的初始HLA-A2转基因小鼠进行免疫。

[0150] 免疫1周后,从免疫的小鼠制备脾细胞,悬浮于含有10%胎牛血清(FCS)的培养基中,以96孔板的每孔的细胞数为2 \times 10⁶细胞的方式播种。然后,在各孔中分别添加各肽(终浓度为10 μ M)和25倍稀释的GolgiPlusTM溶液(日本BD)5 μ L,并在37 $^{\circ}$ C孵育5小时。这里,GolgiPlusTM用于使细胞内的转运停止从而抑制产生的IFN- γ 的分泌。将细胞洗涤后,为了封闭细胞表面的Fc受体从而抑制非特异性反应,相对于悬浮在100 μ L的FACS缓冲液(含有2%FCS和0.1%叠氮化钠的PBS)中的每10⁶个细胞添加1 μ g的Fc封闭抗体(日本BD),在4 $^{\circ}$ C孵育10分钟。

[0151] 然后,为检测CD8阳性细胞,在细胞悬浮液中添加异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗CD8抗体0.5 μ g,在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟后,将细胞洗涤2次、进行染色。进而,利用细胞内细胞因子染色(ICS、Intracellular cytokine staining),按照以下顺序对细胞内的IFN- γ 进行染色。首先,向细胞中添加每孔100 μ L的Cytofix/CytopermTM溶液(日本BD),在4 $^{\circ}$ C静置20分钟将细胞固定,使细胞膜渗透。将细胞洗涤2次后进行回收。然后,添加0.5 μ g藻红蛋白(PE)标记的抗IFN- γ 抗体,在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗涤细胞后,悬浮于100 μ L的FACS固定缓冲液(含有2%FCS、0.1%叠氮化钠和1%甲醛的PBS)中,供于流式细胞仪分析。

[0152] 对于各表位候选肽,CD8阳性细胞内IFN- γ 阳性细胞的比例(%)如表3所示。

[0153]

表位	序列ID号	ICS (在CD8+细胞中的百分比)
1) pp1a-15	1	0.05
2) pp1a-103	2	0.07
3) pp1a-445	3	0.08
4) pp1a-634	4	0.08
5) pp1a-651	5	0.02
6) pp1a-1121	6	0.05
7) pp1a-1139	7	0.07
8) pp1a-1288	8	0.05
9) pp1a-1652	9	0.05
10) pp1a-2187	10	*0.19
11) pp1a-2207	11	*0.48
12) pp1a-2340	12	*0.21
13) pp1a-2546	13	*0.17
14) pp1a-2754	14	0.04
15) pp1a-2755	15	*0.18
16) pp1a-2758	16	0.03
17) pp1a-2990	17	*0.16
18) pp1a-3444	18	*0.12
19) pp1a-3459	19	0.03
20) pp1a-3560	20	0.04
21) pp1a-3564	21	0.06
22) pp1a-3616	22	0.07
23) pp1a-3687	23	*0.20
24) pp1a-3709	24	*0.50
25) pp1a-3730	25	0.06
26) pp1a-3745	26	0.03
27) pp1a-3816	27	0.07
28) pp1a-3848	28	0.07
29) pp1a-4071	29	0.06
30) pp1a-4219	30	0.01

[0154] *: ICS0.1%以上

[0155] 其结果是,30种候选肽中,9种肽(pp1a-2187、pp1a-2207、pp1a-2340、pp1a-2546、pp1a-2755、pp1a-2990、pp1a-3444、pp1a-3687和pp1a-3709;序列号10、11、12、13、15、17、18、23和24)显著地诱导了CD8阳性细胞中的IFN- γ 阳性细胞,因此将这9种肽确定为表位。其中,包括实施例2中对HLA-A*0201的结合亲和力低的表位(pp1a-2207和pp1a-2340)和结合亲和力中等程度的表位(pp1a-2755)。

[0156] (实施例4:脂质体和肽结合脂质体的制备)

[0157] 对于实施例3中显示特别高的CTL诱导活性的9种CTL表位肽(pp1a-2187、pp1a-2207、pp1a-2340、pp1a-2546、pp1a-2755、pp1a-2990、pp1a-3444、pp1a-3687和pp1a-3709;序列号10、11、12、13、15、17、18、23和24),通过以下的方法制备肽结合脂质体。

另外,通过同样的方法制备结合有辅助肽(氨基酸序列:TPPAYRPPNAPIL;序列号 32)的脂质体。需要说明的是,作为辅助肽,使用基于 A. Sette 博士等人(Glenn Y 等, J. Immunol. 162: 3915-3925 (1999) 等)所使用的 HBV 核心 128 辅助肽而合成的辅助肽(Operon 公司)。

[0158] (4-1) 由末端改性磷脂酰乙醇胺构成的反应性磷脂(琥珀酰亚胺基-二油酰基磷脂酰乙醇胺)的合成

[0159] 在氯仿 50ml 中添加、溶解二油酰基磷脂酰乙醇胺 2g 和三乙胺 180 μ l, 并装入 300ml 容积的四口烧瓶中。将该烧瓶用磁力搅拌器在室温下搅拌,同时按照常规方法用 4 小时滴加另外制备的、在氯仿 80ml 中溶解有二元反应性化合物双琥珀酰亚胺基辛二酸酯 3g 的溶液,使双琥珀酰亚胺基辛二酸酯的一个末端与二油酰基磷脂酰乙醇胺的氨基反应。将该粗反应溶液转移到茄型烧瓶中,通过蒸发器蒸馏除去溶剂。然后,向该烧瓶中加入少量恰好能溶解粗反应物的氯仿,得到高浓度的粗反应物溶液,使用以氯仿/甲醇/水(65/25/1、体积比)平衡的硅胶按照常规方法进行柱层析,仅回收作为目标的、在二油酰基磷脂酰乙醇胺的氨基上结合有双琥珀酰亚胺基辛二酸酯的一个末端的级分,蒸馏除去溶剂,得到目标琥珀酰亚胺基-二油酰基磷脂酰乙醇胺。

[0160] (4-2) 脂质混合粉末的制备

[0161] 取二油酰基磷脂酰胆碱 1.3354g (1.6987mmol)、实施例 4-1 中制备的琥珀酰亚胺基-二油酰基磷脂酰乙醇胺 0.2886g (0.2831mmol)、胆固醇 0.7663g (1.9818mmol)和二油酰基磷脂酰甘油钠盐 0.4513g (0.5662mmol)至茄形烧瓶中,加入氯仿/甲醇/水(65/25/4、体积比)混合溶剂 50ml,在 40 $^{\circ}$ C 下溶解。然后,使用旋转蒸发器,在减压下蒸馏除去溶剂,制作脂质的薄膜。进而,添加注射用蒸馏水 30ml 并搅拌,得到均匀的浆料。将该浆料冷冻,用冷冻干燥机干燥 24 小时,得到脂质混合粉末。

[0162] (4-3) 脂质体的制备

[0163] 然后,在装有上述脂质混合粉末的茄形烧瓶内加入另外制作的缓冲液 A (1.0mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.25M 蔗糖、pH7.4) 60ml,在 40 $^{\circ}$ C 搅拌、同时使脂质进行水合,得到脂质体。然后,用挤出机调节脂质体的粒径。首先,使其通过 8 μ m 的聚碳酸酯过滤器,接着依次通过 5 μ m、3 μ m、1 μ m、0.65 μ m、0.4 μ m 和 0.2 μ m 的过滤器。结果,脂质体粒子达到 206nm 的平均粒径(利用动态光散射法测定)。

[0164] (4-4) 肽结合脂质体的制备

[0165] 取实施例 4-3 中得到的脂质体 1.5ml 至试管中,加入另外制备的 3ml 各肽溶液 (1.25mM) / 缓冲液 A,然后在 5 $^{\circ}$ C 下轻轻搅拌 48 小时使其进行反应。将该反应液用已用缓冲液 A 平衡的琼脂糖 CL-4B 按照常规方法进行凝胶过滤。需要说明的是,由于脂质体级分为白浊状,因而目标级分能够容易地识别,但也可以用 UV 检测器等确认。测定这里得到的脂质体悬浮液中的磷浓度(磷脂检测、Wako),用缓冲液 A 进行稀释调节以使磷脂来源的磷浓度为 2mM,得到各肽结合脂质体的悬浮液。

[0166] (实施例 5:用肽结合脂质体进行了免疫的小鼠的肽特异性 CTL 的诱导)

[0167] 对于实施例 3 中显示特别高的 CTL 诱导活性的 9 种 CTL 表位肽(pp1a-2187、pp1a-2207、pp1a-2340、pp1a-2546、pp1a-2755、pp1a-2990、pp1a-3444、pp1a-3687 和 pp1a-3709;序列号 10、11、12、13、15、17、18、23 和 24),测定用肽结合脂质体进行了免疫的小鼠的 CTL 诱导活性。

[0168] 用实施例 4 中制备的肽结合脂质体(25 μ l)、辅助肽结合脂质体(25 μ l)和具有 CpG 基序的寡核酸(5 μ g、碱基序列:5'-tccatgacgt tctgatggtt-3';序列号 33)混合而得到的免疫溶液在初始 HLA-A2 转基因小鼠的足垫(foot pad)内进行免疫。免疫后饲养 1 周,然后通过实施例 3 相同的方法测定 CTL 诱导活性。需要说明的是,作为对照,使用未结合肽的脂质体代替肽结合脂质体。作为具有 CpG 基序的寡核酸,使用基于 Nagata, T. 等, *Vaccine*25 :4914-4921 (2007) 通过基因合成的寡核酸(北海道 System Science 株式会社)。

[0169] 利用流式细胞仪获得的、用肽结合脂质体进行了免疫的小鼠的 CD8 和 IFN- γ 的染色图如图 1 所示。各曲线的右上框内的各点相当于 CD8 阳性细胞中的 IFN- γ 阳性细胞,框内的数值表示 CD8 阳性细胞中的 IFN- γ 阳性细胞的比例(%)。其结果可知,通过所含的肽结合脂质体的免疫,引起了 CTL 诱导。

[0170] (比较例)

[0171] 作为实施例 5 的比较对照实验,进行以下的实验。代替 pp1a 的 CTL 表位肽使用 SARS-CoV 的刺突蛋白的 CTL 表位肽(刺突-1203、氨基酸序列:FIAGLIAIV;序列号 34),并通过向初始 HLA-A2 转基因小鼠的大腿肌肉内进行肌肉注射来进行免疫,除此以外利用与实施例 4 相同的方法测定 CTL 诱导活性。

[0172] 利用流式细胞仪获得的、用刺突-1203 肽结合脂质体进行了免疫的小鼠的 CD8 和 IFN- γ 的染色图如图 2 所示。分析的结果是,使用目前已知的刺突蛋白的 CTL 表位肽(刺突-1203)时,CD8 阳性细胞中的 IFN- γ 阳性细胞的比例(%)为 0.29。与实施例 4 的结果相比可知,pp1a 来源的 8 种 CTL 表位肽(pp1a-2187、pp1a-2207、pp1a-2340、pp1a-2546、pp1a-2755、pp1a-2990、pp1a-3687 和 pp1a-3709;序列号 10、11、12、13、15、17、23 和 24)显示比刺突蛋白的 CTL 表位肽高的 CTL 诱导活性。

[0173] (实施例 6:用肽结合脂质体进行了免疫的小鼠的体内 CTL 分析)

[0174] 对于实施例 4 中显示高 CTL 诱导活性的 5 种 CTL 表位肽(pp1a-2187、pp1a-2340、pp1a-2755、pp1a-2990 和 pp1a-3709;序列号 10、12、15、17 和 24),测定用肽结合脂质体进行了免疫的小鼠的体内的 CTL 应答活性。

[0175] 体内 CTL 应答活性测定的原理如下所述。将未经肽致敏的靶细胞(阴性对照)用低浓度的羟基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺脂(CFSE)标记,另一方面,将肽致敏的靶细胞用高浓度(10 倍)的 CFSE 标记。将两种细胞群各以相同的细胞数混合,将所得混合细胞移入预先用肽结合脂质体免疫的小鼠中。然后,从移入了混合细胞的小鼠回收脾细胞,制备脾细胞悬浮液,并通过流式细胞仪分析测定 CFSE 标记的移入细胞的比率。在对抗原肽不具有 CTL 应答活性的小鼠中回收等量的 CFSE 标记的移入细胞。然而,在对抗原肽有 CTL 应答活性的小鼠中,被抗原肽包覆的靶细胞溶解,因此通过利用流式细胞仪对高 CFSE 标记细胞的减少进行定量,能够测定体内的溶解程度。

[0176] 具体而言,通过以下的方法进行测定。

[0177] 预先用利用各肽制备的肽结合脂质体对小鼠进行免疫,准备诱导了肽特异性 CTL 的移入用小鼠。需要说明的是,作为对照,使用以未结合肽的脂质体代替肽结合脂质体进行免疫的小鼠。免疫 1 周后,从另一个体的初始小鼠制备脾细胞,悬浮于 RPMI-1640 (Sigma)中并使每 2mL RPMI-1640 的细胞数为 2×10^8 个细胞,分别取 1mL 的等分(アリコット)至两

个试管中。仅在一个试管中添加肽使终浓度为 $10 \mu\text{M}$, 并将两试管在 37°C 孵育 1 ~ 2 小时。将细胞洗涤 1 次后, 悬浮于 20mL 的 PBS/0.1%BSA 中, 并进行短时间涡流振荡。然后, 在肽致敏的细胞的试管中添加 $10 \mu\text{L}$ 的 5mM CFSE, 并立即在未与肽孵育的细胞的试管中添加 $1 \mu\text{L}$ 的 5mM CFSE, 将两个试管通过涡流振荡进行悬浮, 并在 37°C 的水浴中孵育 10 分钟。将两个细胞群离心并洗涤 1 次, 计数活细胞数后, 将各细胞群以 5×10^7 细胞/mL 悬浮于 HBSS 中。将各细胞悬浮液以等量混合作为免疫溶液, 通过静脉注射将细胞悬浮液 $200 \mu\text{L}$ (1×10^7 细胞/个体) 移入预先免疫了的小鼠体内。移入 12 小时后, 从小鼠回收脾细胞, 每个脾的脾细胞悬浮于 1mL 的 PBS/1%FBS/5mM EDTA 中。离心后, 悬浮于 1mL 的 FACS 固定缓冲液中, 将该脾细胞悬浮液 $100 \mu\text{L}$ 用 2mL 的 FACS 缓冲液稀释后, 供于流式细胞仪分析。

[0178] 利用流式细胞仪获得的、移入 CFSE 标记的靶细胞后的小鼠的 CFSE 的染色图如图 3 所示。各图的最右侧的峰表示肽致敏的细胞群, 右起第二个峰表示未经肽致敏的细胞。对于各 CTL 表位肽, 可以看出, 与用脂质体免疫的对照(左图)相比, 用肽结合脂质体免疫的小鼠(右图)中肽致敏的细胞数减少。CTL 所致的靶细胞的肽特异性溶解率(%) 分别为: pp1a-2187 :79.2%、pp1a-2340 :68.5%、pp1a-2755 :70.5%、pp1a-2990 :73.4% 和 pp1a-3709 :96.3%, 均具有高 CTL 应答活性。其中, 可知 pp1a-3709 具有特别高的 CTL 应答活性。因此可知, 这些 CTL 表位肽(pp1a-2187、pp1a-2340、pp1a-2755、pp1a-2990 和 pp1a-3709 ; 序列号 10、12、15、17 和 24) 是 CTL 应答活性高的优势肽。

[0001]

序 列 表

- <110> 日油株式会社
学校法人琦玉医科大学
国立感染症研究所所长代表的日本国
- <120> SARS冠状病毒的细胞毒性T细胞表位肽及其用途
- <130> P08743W0
- <150> JP2008-304965
<151> 2008-11-28
- <160> 34
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> SARS coronavirus
- <400> 1
- Gln Leu Ser Leu Pro Val Leu Gln Val
1 5
- <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> SARS coronavirus
- <400> 2
- Thr Leu Gly Val Leu Val Pro His Val
1 5
- <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> SARS coronavirus
- <400> 3
- Thr Leu Asn Glu Asp Leu Leu Glu Ile
1 5
- <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> SARS coronavirus
- <400> 4
- Lys Leu Ser Ala Gly Val Glu Phe Leu

[0002]

1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 5

Phe Leu Ile Thr Gly Val Phe Asp Ile
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 6

Ile Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser Ala
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 7

Ser Leu Gln Val Cys Val Gln Thr Val
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 8

Met Leu Ser Arg Ala Leu Lys Lys Val
 1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 9

Tyr Leu Ser Ser Val Leu Leu Ala Leu
 1 5

[0003]

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 10

Cys Leu Asp Ala Gly Ile Asn Tyr Val
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 11

Ala Met Trp Leu Leu Leu Ser Ile
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 12

Trp Leu Met Trp Phe Ile Ile Ser Ile
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 13

Ile Leu Leu Leu Asp Gln Val Leu Val
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 14

Thr Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Leu
 1 5

<210> 15

[0004]

<211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 15

Leu Leu Cys Val Leu Ala Ala Leu Val
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 16

Val Leu Ala Ala Leu Val Cys Tyr Ile
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 17

Ala Leu Ser Gly Val Phe Cys Gly Val
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 18

Val Leu Ala Trp Leu Tyr Ala Ala Val
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> SARS coronavirus

<400> 19

Phe Leu Asn Arg Phe Thr Thr Thr Leu
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT

[0005]

<213> SARS coronavirus

<400> 20

Met Leu Leu Thr Phe Leu Thr Ser Leu
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 21

Phe Leu Thr Ser Leu Leu Ile Leu Val
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 22

Phe Leu Leu Pro Ser Leu Ala Thr Val
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 23

Thr Leu Met Asn Val Ile Thr Leu Val
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 24

Ser Met Trp Ala Leu Val Ile Ser Val
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

[0006]

<400> 25

Phe Leu Ala Arg Ala Ile Val Phe Val
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 26

Leu Leu Phe Ile Thr Gly Asn Thr Leu
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 27

Lys Leu Asn Ile Lys Leu Leu Gly Ile
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 28

Val Leu Leu Ser Val Leu Gln Gln Leu
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 29

Ala Leu Trp Glu Ile Gln Gln Val Val
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> SARS coronavirus

<400> 30

[0007]

Val Leu Gly Ser Leu Ala Ala Thr Val
1 5

<210> 31
<211> 4382
<212> PRT
<213> SARS coronavirus

<400> 31

Met Glu Ser Leu Val Leu Gly Val Asn Glu Lys Thr His Val Gln Leu
1 5 10 15

Ser Leu Pro Val Leu Gln Val Arg Asp Val Leu Val Arg Gly Phe Gly
20 25 30

Asp Ser Val Glu Glu Ala Leu Ser Glu Ala Arg Glu His Leu Lys Asn
35 40 45

Gly Thr Cys Gly Leu Val Glu Leu Glu Lys Gly Val Leu Pro Gln Leu
50 55 60

Glu Gln Pro Tyr Val Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Leu Ser Thr Asn
65 70 75 80

His Gly His Lys Val Val Glu Leu Val Ala Glu Met Asp Gly Ile Gln
85 90 95

Tyr Gly Arg Ser Gly Ile Thr Leu Gly Val Leu Val Pro His Val Gly
100 105 110

Glu Thr Pro Ile Ala Tyr Arg Asn Val Leu Leu Arg Lys Asn Gly Asn
115 120 125

Lys Gly Ala Gly Gly His Ser Tyr Gly Ile Asp Leu Lys Ser Tyr Asp
130 135 140

Leu Gly Asp Glu Leu Gly Thr Asp Pro Ile Glu Asp Tyr Glu Gln Asn
145 150 155 160

Trp Asn Thr Lys His Gly Ser Gly Ala Leu Arg Glu Leu Thr Arg Glu
165 170 175

Leu Asn Gly Gly Ala Val Thr Arg Tyr Val Asp Asn Asn Phe Cys Gly
180 185 190

[0008]

Pro Asp Gly Tyr Pro Leu Asp Cys Ile Lys Asp Phe Leu Ala Arg Ala
 195 200 205

Gly Lys Ser Met Cys Thr Leu Ser Glu Gln Leu Asp Tyr Ile Glu Ser
 210 215 220

Lys Arg Gly Val Tyr Cys Cys Arg Asp His Glu His Glu Ile Ala Trp
 225 230 235 240

Phe Thr Glu Arg Ser Asp Lys Ser Tyr Glu His Gln Thr Pro Phe Glu
 245 250 255

Ile Lys Ser Ala Lys Lys Phe Asp Thr Phe Lys Gly Glu Cys Pro Lys
 260 265 270

Phe Val Phe Pro Leu Asn Ser Lys Val Lys Val Ile Gln Pro Arg Val
 275 280 285

Glu Lys Lys Lys Thr Glu Gly Phe Met Gly Arg Ile Arg Ser Val Tyr
 290 295 300

Pro Val Ala Ser Pro Gln Glu Cys Asn Asn Met His Leu Ser Thr Leu
 305 310 315 320

Met Lys Cys Asn His Cys Asp Glu Val Ser Trp Gln Thr Cys Asp Phe
 325 330 335

Leu Lys Ala Thr Cys Glu His Cys Gly Thr Glu Asn Leu Val Ile Glu
 340 345 350

Gly Pro Thr Thr Cys Gly Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Val Val Lys Met
 355 360 365

Pro Cys Pro Ala Cys Gln Asp Pro Glu Ile Gly Pro Glu His Ser Val
 370 375 380

Ala Asp Tyr His Asn His Ser Asn Ile Glu Thr Arg Leu Arg Lys Gly
 385 390 395 400

Gly Arg Thr Arg Cys Phe Gly Gly Cys Val Phe Ala Tyr Val Gly Cys
 405 410 415

[0009]

Tyr Asn Lys Arg Ala Tyr Trp Val Pro Arg Ala Ser Ala Asp Ile Gly
 420 425 430

Ser Gly His Thr Gly Ile Thr Gly Asp Asn Val Glu Thr Leu Asn Glu
 435 440 445

Asp Leu Leu Glu Ile Leu Ser Arg Glu Arg Val Asn Ile Asn Ile Val
 450 455 460

Gly Asp Phe His Leu Asn Glu Glu Val Ala Ile Ile Leu Ala Ser Phe
 465 470 475 480

Ser Ala Ser Thr Ser Ala Phe Ile Asp Thr Ile Lys Ser Leu Asp Tyr
 485 490 495

Lys Ser Phe Lys Thr Ile Val Glu Ser Cys Gly Asn Tyr Lys Val Thr
 500 505 510

Lys Gly Lys Pro Val Lys Gly Ala Trp Asn Ile Gly Gln Gln Arg Ser
 515 520 525

Val Leu Thr Pro Leu Cys Gly Phe Pro Ser Gln Ala Ala Gly Val Ile
 530 535 540

Arg Ser Ile Phe Ala Arg Thr Leu Asp Ala Ala Asn His Ser Ile Pro
 545 550 555 560

Asp Leu Gln Arg Ala Ala Val Thr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Glu Gln
 565 570 575

Ser Leu Arg Leu Val Asp Ala Met Val Tyr Thr Ser Asp Leu Leu Thr
 580 585 590

Asn Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Val Thr Gly Gly Leu Val Gln Gln
 595 600 605

Thr Ser Gln Trp Leu Ser Asn Leu Leu Gly Thr Thr Val Glu Lys Leu
 610 615 620

Arg Pro Ile Phe Glu Trp Ile Glu Ala Lys Leu Ser Ala Gly Val Glu
 625 630 635 640

[0010]

Phe Leu Lys Asp Ala Trp Glu Ile Leu Lys Phe Leu Ile Thr Gly Val
 645 650 655

Phe Asp Ile Val Lys Gly Gln Ile Gln Val Ala Ser Asp Asn Ile Lys
 660 665 670

Asp Cys Val Lys Cys Phe Ile Asp Val Val Asn Lys Ala Leu Glu Met
 675 680 685

Cys Ile Asp Gln Val Thr Ile Ala Gly Ala Lys Leu Arg Ser Leu Asn
 690 695 700

Leu Gly Glu Val Phe Ile Ala Gln Ser Lys Gly Leu Tyr Arg Gln Cys
 705 710 715 720

Ile Arg Gly Lys Glu Gln Leu Gln Leu Leu Met Pro Leu Lys Ala Pro
 725 730 735

Lys Glu Val Thr Phe Leu Glu Gly Asp Ser His Asp Thr Val Leu Thr
 740 745 750

Ser Glu Glu Val Val Leu Lys Asn Gly Glu Leu Glu Ala Leu Glu Thr
 755 760 765

Pro Val Asp Ser Phe Thr Asn Gly Ala Ile Val Gly Thr Pro Val Cys
 770 775 780

Val Asn Gly Leu Met Leu Leu Glu Ile Lys Asp Lys Glu Gln Tyr Cys
 785 790 795 800

Ala Leu Ser Pro Gly Leu Leu Ala Thr Asn Asn Val Phe Arg Leu Lys
 805 810 815

Gly Gly Ala Pro Ile Lys Gly Val Thr Phe Gly Glu Asp Thr Val Trp
 820 825 830

Glu Val Gln Gly Tyr Lys Asn Val Arg Ile Thr Phe Glu Leu Asp Glu
 835 840 845

Arg Val Asp Lys Val Leu Asn Glu Lys Cys Ser Val Tyr Thr Val Glu
 850 855 860

Ser Gly Thr Glu Val Thr Glu Phe Ala Cys Val Val Ala Glu Ala Val

[0011]

865	870	875	880
Val Lys Thr Leu Gln Pro Val Ser Asp	885	Leu Leu Thr Asn Met Gly Ile	895
Asp Leu Asp Glu Trp Ser Val Ala Thr Phe Tyr Leu Phe Asp Asp Ala	900	905	910
Gly Glu Glu Asn Phe Ser Ser Arg Met Tyr Cys Ser Phe Tyr Pro Pro	915	920	925
Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Ala Glu Cys Glu Glu Glu Ile Asp	930	935	940
Glu Thr Cys Glu His Glu Tyr Gly Thr Glu Asp Asp Tyr Gln Gly Leu	945	950	955
Pro Leu Glu Phe Gly Ala Ser Ala Glu Thr Val Arg Val Glu Glu Glu	965	970	975
Glu Glu Glu Asp Trp Leu Asp Asp Thr Thr Glu Gln Ser Glu Ile Glu	980	985	990
Pro Glu Pro Glu Pro Thr Pro Glu Glu Pro Val Asn Gln Phe Thr Gly	995	1000	1005
Tyr Leu Lys Leu Thr Asp Asn Val Ala Ile Lys Cys Val Asp Ile	1010	1015	1020
Val Lys Glu Ala Gln Ser Ala Asn Pro Met Val Ile Val Asn Ala	1025	1030	1035
Ala Asn Ile His Leu Lys His Gly Gly Gly Val Ala Gly Ala Leu	1040	1045	1050
Asn Lys Ala Thr Asn Gly Ala Met Gln Lys Glu Ser Asp Asp Tyr	1055	1060	1065
Ile Lys Leu Asn Gly Pro Leu Thr Val Gly Gly Ser Cys Leu Leu	1070	1075	1080
Ser Gly His Asn Leu Ala Lys Lys Cys Leu His Val Val Gly Pro	1085	1090	1095

[0012]

Asn 1100	Leu	Asn	Ala	Gly	Glu	Asp 1105	Ile	Gln	Leu	Leu	Lys 1110	Ala	Ala	Tyr
Glu 1115	Asn	Phe	Asn	Ser	Gln	Asp 1120	Ile	Leu	Leu	Ala	Pro 1125	Leu	Leu	Ser
Ala 1130	Gly	Ile	Phe	Gly	Ala	Lys 1135	Pro	Leu	Gln	Ser	Leu 1140	Gln	Val	Cys
Val 1145	Gln	Thr	Val	Arg	Thr	Gln 1150	Val	Tyr	Ile	Ala	Val 1155	Asn	Asp	Lys
Ala 1160	Leu	Tyr	Glu	Gln	Val	Val 1165	Met	Asp	Tyr	Leu	Asp 1170	Asn	Leu	Lys
Pro 1175	Arg	Val	Glu	Ala	Pro	Lys 1180	Gln	Glu	Glu	Pro	Pro 1185	Asn	Thr	Glu
Asp 1190	Ser	Lys	Thr	Glu	Glu	Lys 1195	Ser	Val	Val	Gln	Lys 1200	Pro	Val	Asp
Val 1205	Lys	Pro	Lys	Ile	Lys	Ala 1210	Cys	Ile	Asp	Glu	Val 1215	Thr	Thr	Thr
Leu 1220	Glu	Glu	Thr	Lys	Phe	Leu 1225	Thr	Asn	Lys	Leu	Leu 1230	Leu	Phe	Ala
Asp 1235	Ile	Asn	Gly	Lys	Leu	Tyr 1240	His	Asp	Ser	Gln	Asn 1245	Met	Leu	Arg
Gly 1250	Glu	Asp	Met	Ser	Phe	Leu 1255	Glu	Lys	Asp	Ala	Pro 1260	Tyr	Met	Val
Gly 1265	Asp	Val	Ile	Thr	Ser	Gly 1270	Asp	Ile	Thr	Cys	Val 1275	Val	Ile	Pro
Ser 1280	Lys	Lys	Ala	Gly	Gly	Thr 1285	Thr	Glu	Met	Leu	Ser 1290	Arg	Ala	Leu
Lys 1295	Lys	Val	Pro	Val	Asp	Glu 1300	Tyr	Ile	Thr	Thr	Tyr 1305	Pro	Gly	Gln

[0013]

Gly Cys Ala Gly Tyr Thr Leu Glu Glu Ala Lys Thr Ala Leu Lys
 1310 1315 1320

 Lys Cys Lys Ser Ala Phe Tyr Val Leu Pro Ser Glu Ala Pro Asn
 1325 1330 1335

 Ala Lys Glu Glu Ile Leu Gly Thr Val Ser Trp Asn Leu Arg Glu
 1340 1345 1350

 Met Leu Ala His Ala Glu Glu Thr Arg Lys Leu Met Pro Ile Cys
 1355 1360 1365

 Met Asp Val Arg Ala Ile Met Ala Thr Ile Gln Arg Lys Tyr Lys
 1370 1375 1380

 Gly Ile Lys Ile Gln Glu Gly Ile Val Asp Tyr Gly Val Arg Phe
 1385 1390 1395

 Phe Phe Tyr Thr Ser Lys Glu Pro Val Ala Ser Ile Ile Thr Lys
 1400 1405 1410

 Leu Asn Ser Leu Asn Glu Pro Leu Val Thr Met Pro Ile Gly Tyr
 1415 1420 1425

 Val Thr His Gly Phe Asn Leu Glu Glu Ala Ala Arg Cys Met Arg
 1430 1435 1440

 Ser Leu Lys Ala Pro Ala Val Val Ser Val Ser Ser Pro Asp Ala
 1445 1450 1455

 Val Thr Thr Tyr Asn Gly Tyr Leu Thr Ser Ser Ser Lys Thr Ser
 1460 1465 1470

 Glu Glu His Phe Val Glu Thr Val Ser Leu Ala Gly Ser Tyr Arg
 1475 1480 1485

 Asp Trp Ser Tyr Ser Gly Gln Arg Thr Glu Leu Gly Val Glu Phe
 1490 1495 1500

 Leu Lys Arg Gly Asp Lys Ile Val Tyr His Thr Leu Glu Ser Pro
 1505 1510 1515

[0014]

Val Glu Phe His Leu Asp Gly Glu Val Leu Ser Leu Asp Lys Leu
 1520 1525 1530
 Lys Ser Leu Leu Ser Leu Arg Glu Val Lys Thr Ile Lys Val Phe
 1535 1540 1545
 Thr Thr Val Asp Asn Thr Asn Leu His Thr Gln Leu Val Asp Met
 1550 1555 1560
 Ser Met Thr Tyr Gly Gln Gln Phe Gly Pro Thr Tyr Leu Asp Gly
 1565 1570 1575
 Ala Asp Val Thr Lys Ile Lys Pro His Val Asn His Glu Gly Lys
 1580 1585 1590
 Thr Phe Phe Val Leu Pro Ser Asp Asp Thr Leu Arg Ser Glu Ala
 1595 1600 1605
 Phe Glu Tyr Tyr His Thr Leu Asp Glu Ser Phe Leu Gly Arg Tyr
 1610 1615 1620
 Met Ser Ala Leu Asn His Thr Lys Lys Trp Lys Phe Pro Gln Val
 1625 1630 1635
 Gly Gly Leu Thr Ser Ile Lys Trp Ala Asp Asn Asn Cys Tyr Leu
 1640 1645 1650
 Ser Ser Val Leu Leu Ala Leu Gln Gln Leu Glu Val Lys Phe Asn
 1655 1660 1665
 Ala Pro Ala Leu Gln Glu Ala Tyr Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Asp
 1670 1675 1680
 Ala Ala Asn Phe Cys Ala Leu Ile Leu Ala Tyr Ser Asn Lys Thr
 1685 1690 1695
 Val Gly Glu Leu Gly Asp Val Arg Glu Thr Met Thr His Leu Leu
 1700 1705 1710
 Gln His Ala Asn Leu Glu Ser Ala Lys Arg Val Leu Asn Val Val
 1715 1720 1725
 Cys Lys His Cys Gly Gln Lys Thr Thr Thr Leu Thr Gly Val Glu

[0015]

1730	1735	1740
Ala Val Met Tyr Met Gly Thr Leu Ser Tyr Asp Asn Leu Lys Thr 1745	1750	1755
Gly Val Ser Ile Pro Cys Val Cys Gly Arg Asp Ala Thr Gln Tyr 1760	1765	1770
Leu Val Gln Gln Glu Ser Ser Phe Val Met Met Ser Ala Pro Pro 1775	1780	1785
Ala Glu Tyr Lys Leu Gln Gln Gly Thr Phe Leu Cys Ala Asn Glu 1790	1795	1800
Tyr Thr Gly Asn Tyr Gln Cys Gly His Tyr Thr His Ile Thr Ala 1805	1810	1815
Lys Glu Thr Leu Tyr Arg Ile Asp Gly Ala His Leu Thr Lys Met 1820	1825	1830
Ser Glu Tyr Lys Gly Pro Val Thr Asp Val Phe Tyr Lys Glu Thr 1835	1840	1845
Ser Tyr Thr Thr Thr Ile Lys Pro Val Ser Tyr Lys Leu Asp Gly 1850	1855	1860
Val Thr Tyr Thr Glu Ile Glu Pro Lys Leu Asp Gly Tyr Tyr Lys 1865	1870	1875
Lys Asp Asn Ala Tyr Tyr Thr Glu Gln Pro Ile Asp Leu Val Pro 1880	1885	1890
Thr Gln Pro Leu Pro Asn Ala Ser Phe Asp Asn Phe Lys Leu Thr 1895	1900	1905
Cys Ser Asn Thr Lys Phe Ala Asp Asp Leu Asn Gln Met Thr Gly 1910	1915	1920
Phe Thr Lys Pro Ala Ser Arg Glu Leu Ser Val Thr Phe Phe Pro 1925	1930	1935
Asp Leu Asn Gly Asp Val Val Ala Ile Asp Tyr Arg His Tyr Ser 1940	1945	1950

[0016]

Ala Ser Phe Lys Lys Gly Ala Lys Leu Leu His Lys Pro Ile Val
1955 1960 1965

Trp His Ile Asn Gln Ala Thr Thr Lys Thr Thr Phe Lys Pro Asn
1970 1980

Thr Trp Cys Leu Arg Cys Leu Trp Ser Thr Lys Pro Val Asp Thr
1985 1990 1995

Ser Asn Ser Phe Glu Val Leu Ala Val Glu Asp Thr Gln Gly Met
2000 2005 2010

Asp Asn Leu Ala Cys Glu Ser Gln Gln Pro Thr Ser Glu Glu Val
2015 2020 2025

Val Glu Asn Pro Thr Ile Gln Lys Glu Val Ile Glu Cys Asp Val
2030 2035 2040

Lys Thr Thr Glu Val Val Gly Asn Val Ile Leu Lys Pro Ser Asp
2045 2050 2055

Glu Gly Val Lys Val Thr Gln Glu Leu Gly His Glu Asp Leu Met
2060 2065 2070

Ala Ala Tyr Val Glu Asn Thr Ser Ile Thr Ile Lys Lys Pro Asn
2075 2080 2085

Glu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Leu Lys Thr Ile Ala Thr His Gly
2090 2095 2100

Ile Ala Ala Ile Asn Ser Val Pro Trp Ser Lys Ile Leu Ala Tyr
2105 2110 2115

Val Lys Pro Phe Leu Gly Gln Ala Ala Ile Thr Thr Ser Asn Cys
2120 2125 2130

Ala Lys Arg Leu Ala Gln Arg Val Phe Asn Asn Tyr Met Pro Tyr
2135 2140 2145

Val Phe Thr Leu Leu Phe Gln Leu Cys Thr Phe Thr Lys Ser Thr
2150 2155 2160

[0017]

Asn Ser Arg Ile Arg Ala Ser Leu Pro Thr Thr Ile Ala Lys Asn
 2165 2170 2175

Ser Val Lys Ser Val Ala Lys Leu Cys Leu Asp Ala Gly Ile Asn
 2180 2185 2190

Tyr Val Lys Ser Pro Lys Phe Ser Lys Leu Phe Thr Ile Ala Met
 2195 2200 2205

Trp Leu Leu Leu Leu Ser Ile Cys Leu Gly Ser Leu Ile Cys Val
 2210 2215 2220

Thr Ala Ala Phe Gly Val Leu Leu Ser Asn Phe Gly Ala Pro Ser
 2225 2230 2235

Tyr Cys Asn Gly Val Arg Glu Leu Tyr Leu Asn Ser Ser Asn Val
 2240 2245 2250

Thr Thr Met Asp Phe Cys Glu Gly Ser Phe Pro Cys Ser Ile Cys
 2255 2260 2265

Leu Ser Gly Leu Asp Ser Leu Asp Ser Tyr Pro Ala Leu Glu Thr
 2270 2275 2280

Ile Gln Val Thr Ile Ser Ser Tyr Lys Leu Asp Leu Thr Ile Leu
 2285 2290 2295

Gly Leu Ala Ala Glu Trp Val Leu Ala Tyr Met Leu Phe Thr Lys
 2300 2305 2310

Phe Phe Tyr Leu Leu Gly Leu Ser Ala Ile Met Gln Val Phe Phe
 2315 2320 2325

Gly Tyr Phe Ala Ser His Phe Ile Ser Asn Ser Trp Leu Met Trp
 2330 2335 2340

Phe Ile Ile Ser Ile Val Gln Met Ala Pro Val Ser Ala Met Val
 2345 2350 2355

Arg Met Tyr Ile Phe Phe Ala Ser Phe Tyr Tyr Ile Trp Lys Ser
 2360 2365 2370

[0018]

Tyr Val His Ile Met Asp Gly Cys Thr Ser Ser Thr Cys Met Met
 2375 2380 2385
 Cys Tyr Lys Arg Asn Arg Ala Thr Arg Val Glu Cys Thr Thr Ile
 2390 2395 2400
 Val Asn Gly Met Lys Arg Ser Phe Tyr Val Tyr Ala Asn Gly Gly
 2405 2410 2415
 Arg Gly Phe Cys Lys Thr His Asn Trp Asn Cys Leu Asn Cys Asp
 2420 2425 2430
 Thr Phe Cys Thr Gly Ser Thr Phe Ile Ser Asp Glu Val Ala Arg
 2435 2440 2445
 Asp Leu Ser Leu Gln Phe Lys Arg Pro Ile Asn Pro Thr Asp Gln
 2450 2455 2460
 Ser Ser Tyr Ile Val Asp Ser Val Ala Val Lys Asn Gly Ala Leu
 2465 2470 2475
 His Leu Tyr Phe Asp Lys Ala Gly Gln Lys Thr Tyr Glu Arg His
 2480 2485 2490
 Pro Leu Ser His Phe Val Asn Leu Asp Asn Leu Arg Ala Asn Asn
 2495 2500 2505
 Thr Lys Gly Ser Leu Pro Ile Asn Val Ile Val Phe Asp Gly Lys
 2510 2515 2520
 Ser Lys Cys Asp Glu Ser Ala Ser Lys Ser Ala Ser Val Tyr Tyr
 2525 2530 2535
 Ser Gln Leu Met Cys Gln Pro Ile Leu Leu Leu Asp Gln Val Leu
 2540 2545 2550
 Val Ser Asp Val Gly Asp Ser Thr Glu Val Ser Val Lys Met Phe
 2555 2560 2565
 Asp Ala Tyr Val Asp Thr Phe Ser Ala Thr Phe Ser Val Pro Met
 2570 2575 2580
 Glu Lys Leu Lys Ala Leu Val Ala Thr Ala His Ser Glu Leu Ala

[0019]

2585						2590						2595							
Lys	Gly	Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Val	Leu	Ser	Thr	Phe	Val	Ser	Ala					
2600						2605					2610								
Ala	Arg	Gln	Gly	Val	Val	Asp	Thr	Asp	Val	Asp	Thr	Lys	Asp	Val					
2615						2620					2625								
Ile	Glu	Cys	Leu	Lys	Leu	Ser	His	His	Ser	Asp	Leu	Glu	Val	Thr					
2630						2635					2640								
Gly	Asp	Ser	Cys	Asn	Asn	Phe	Met	Leu	Thr	Tyr	Asn	Lys	Val	Glu					
2645						2650					2655								
Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Asp	Leu	Gly	Ala	Cys	Ile	Asp	Cys	Asn	Ala					
2660						2665					2670								
Arg	His	Ile	Asn	Ala	Gln	Val	Ala	Lys	Ser	His	Asn	Val	Ser	Leu					
2675						2680					2685								
Ile	Trp	Asn	Val	Lys	Asp	Tyr	Met	Ser	Leu	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg					
2690						2695					2700								
Lys	Gln	Ile	Arg	Ser	Ala	Ala	Lys	Lys	Asn	Asn	Ile	Pro	Phe	Arg					
2705						2710					2715								
Leu	Thr	Cys	Ala	Thr	Thr	Arg	Gln	Val	Val	Asn	Val	Ile	Thr	Thr					
2720						2725					2730								
Lys	Ile	Ser	Leu	Lys	Gly	Gly	Lys	Ile	Val	Ser	Thr	Cys	Phe	Lys					
2735						2740					2745								
Leu	Met	Leu	Lys	Ala	Thr	Leu	Leu	Cys	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Val					
2750						2755					2760								
Cys	Tyr	Ile	Val	Met	Pro	Val	His	Thr	Leu	Ser	Ile	His	Asp	Gly					
2765						2770					2775								
Tyr	Thr	Asn	Glu	Ile	Ile	Gly	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gln	Asp	Gly	Val					
2780						2785					2790								
Thr	Arg	Asp	Ile	Ile	Ser	Thr	Asp	Asp	Cys	Phe	Ala	Asn	Lys	His					
2795						2800					2805								

[0020]

Ala Gly Phe Asp Ala Trp Phe Ser Gln Arg Gly Gly Ser Tyr Lys
2810 2815 2820

Asn Asp Lys Ser Cys Pro Val Val Ala Ala Ile Ile Thr Arg Glu
2825 2830 2835

Ile Gly Phe Ile Val Pro Gly Leu Pro Gly Thr Val Leu Arg Ala
2840 2845 2850

Ile Asn Gly Asp Phe Leu His Phe Leu Pro Arg Val Phe Ser Ala
2855 2860 2865

Val Gly Asn Ile Cys Tyr Thr Pro Ser Lys Leu Ile Glu Tyr Ser
2870 2880

Asp Phe Ala Thr Ser Ala Cys Val Leu Ala Ala Glu Cys Thr Ile
2885 2890 2895

Phe Lys Asp Ala Met Gly Lys Pro Val Pro Tyr Cys Tyr Asp Thr
2900 2905 2910

Asn Leu Leu Glu Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Glu Leu Arg Pro Asp
2915 2920 2925

Thr Arg Tyr Val Leu Met Asp Gly Ser Ile Ile Gln Phe Pro Asn
2930 2935 2940

Thr Tyr Leu Glu Gly Ser Val Arg Val Val Thr Thr Phe Asp Ala
2945 2950 2955

Glu Tyr Cys Arg His Gly Thr Cys Glu Arg Ser Glu Val Gly Ile
2960 2965 2970

Cys Leu Ser Thr Ser Gly Arg Trp Val Leu Asn Asn Glu His Tyr
2975 2980 2985

Arg Ala Leu Ser Gly Val Phe Cys Gly Val Asp Ala Met Asn Leu
2990 2995 3000

Ile Ala Asn Ile Phe Thr Pro Leu Val Gln Pro Val Gly Ala Leu
3005 3010 3015

[0021]

Asp Val Ser Ala Ser Val Val Ala Gly Gly Ile Ile Ala Ile Leu
 3020 3025 3030

Val Thr Cys Ala Ala Tyr Tyr Phe Met Lys Phe Arg Arg Val Phe
 3035 3040 3045

Gly Glu Tyr Asn His Val Val Ala Ala Asn Ala Leu Leu Phe Leu
 3050 3055 3060

Met Ser Phe Thr Ile Leu Cys Leu Val Pro Ala Tyr Ser Phe Leu
 3065 3070 3075

Pro Gly Val Tyr Ser Val Phe Tyr Leu Tyr Leu Thr Phe Tyr Phe
 3080 3085 3090

Thr Asn Asp Val Ser Phe Leu Ala His Leu Gln Trp Phe Ala Met
 3095 3100 3105

Phe Ser Pro Ile Val Pro Phe Trp Ile Thr Ala Ile Tyr Val Phe
 3110 3115 3120

Cys Ile Ser Leu Lys His Cys His Trp Phe Phe Asn Asn Tyr Leu
 3125 3130 3135

Arg Lys Arg Val Met Phe Asn Gly Val Thr Phe Ser Thr Phe Glu
 3140 3145 3150

Glu Ala Ala Leu Cys Thr Phe Leu Leu Asn Lys Glu Met Tyr Leu
 3155 3160 3165

Lys Leu Arg Ser Glu Thr Leu Leu Pro Leu Thr Gln Tyr Asn Arg
 3170 3175 3180

Tyr Leu Ala Leu Tyr Asn Lys Tyr Lys Tyr Phe Ser Gly Ala Leu
 3185 3190 3195

Asp Thr Thr Ser Tyr Arg Glu Ala Ala Cys Cys His Leu Ala Lys
 3200 3205 3210

Ala Leu Asn Asp Phe Ser Asn Ser Gly Ala Asp Val Leu Tyr Gln
 3215 3220 3225

[0022]

Pro Pro Gln Thr Ser Ile Thr Ser Ala Val Leu Gln Ser Gly Phe
 3230 3235 3240

Arg Lys Met Ala Phe Pro Ser Gly Lys Val Glu Gly Cys Met Val
 3245 3250 3255

Gln Val Thr Cys Gly Thr Thr Thr Leu Asn Gly Leu Trp Leu Asp
 3260 3265 3270

Asp Thr Val Tyr Cys Pro Arg His Val Ile Cys Thr Ala Glu Asp
 3275 3280 3285

Met Leu Asn Pro Asn Tyr Glu Asp Leu Leu Ile Arg Lys Ser Asn
 3290 3295 3300

His Ser Phe Leu Val Gln Ala Gly Asn Val Gln Leu Arg Val Ile
 3305 3310 3315

Gly His Ser Met Gln Asn Cys Leu Leu Arg Leu Lys Val Asp Thr
 3320 3325 3330

Ser Asn Pro Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Phe Val Arg Ile Gln Pro
 3335 3340 3345

Gly Gln Thr Phe Ser Val Leu Ala Cys Tyr Asn Gly Ser Pro Ser
 3350 3355 3360

Gly Val Tyr Gln Cys Ala Met Arg Pro Asn His Thr Ile Lys Gly
 3365 3370 3375

Ser Phe Leu Asn Gly Ser Cys Gly Ser Val Gly Phe Asn Ile Asp
 3380 3385 3390

Tyr Asp Cys Val Ser Phe Cys Tyr Met His His Met Glu Leu Pro
 3395 3400 3405

Thr Gly Val His Ala Gly Thr Asp Leu Glu Gly Lys Phe Tyr Gly
 3410 3415 3420

Pro Phe Val Asp Arg Gln Thr Ala Gln Ala Ala Gly Thr Asp Thr
 3425 3430 3435

Thr Ile Thr Leu Asn Val Leu Ala Trp Leu Tyr Ala Ala Val Ile

[0023]

3440														
Asn 3455	Gly	Asp	Arg	Trp	Phe	Leu	Asn	Arg	Phe	Thr	Thr	Thr	Leu	Asn
3445														
3465														
Asp 3470	Phe	Asn	Leu	Val	Ala	Met	Lys	Tyr	Asn	Tyr	Glu	Pro	Leu	Thr
3485														
3495														
Gln 3485	Asp	His	Val	Asp	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Ser	Ala	Gln	Thr	Gly
3500														
3510														
Ile 3500	Ala	Val	Leu	Asp	Met	Cys	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln
3515														
3525														
Asn 3515	Gly	Met	Asn	Gly	Arg	Thr	Ile	Leu	Gly	Ser	Thr	Ile	Leu	Glu
3530														
3540														
Asp 3530	Glu	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	Val	Val	Arg	Gln	Cys	Ser	Gly	Val
3545														
3555														
Thr 3545	Phe	Gln	Gly	Lys	Phe	Lys	Lys	Ile	Val	Lys	Gly	Thr	His	His
3560														
3570														
Trp 3560	Met	Leu	Leu	Thr	Phe	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Val	Gln
3575														
3585														
Ser 3575	Thr	Gln	Trp	Ser	Leu	Phe	Phe	Phe	Val	Tyr	Glu	Asn	Ala	Phe
3590														
3600														
Leu 3590	Pro	Phe	Thr	Leu	Gly	Ile	Met	Ala	Ile	Ala	Ala	Cys	Ala	Met
3605														
3615														
Leu 3605	Leu	Val	Lys	His	Lys	His	Ala	Phe	Leu	Cys	Leu	Phe	Leu	Leu
3620														
3630														
Pro 3620	Ser	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Tyr	Phe	Asn	Met	Val	Tyr	Met	Pro
3635														
3645														
Ala 3635	Ser	Trp	Val	Met	Arg	Ile	Met	Thr	Trp	Leu	Glu	Leu	Ala	Asp
3650														
3660														
Thr 3650	Ser	Leu	Ser	Gly	Tyr	Arg	Leu	Lys	Asp	Cys	Val	Met	Tyr	Ala

[0024]

Ser Ala Leu Val Leu Leu Ile Leu Met Thr Ala Arg Thr Val Tyr
3665 3670 3675

Asp Asp Ala Ala Arg Arg Val Trp Thr Leu Met Asn Val Ile Thr
3680 3685 3690

Leu Val Tyr Lys Val Tyr Tyr Gly Asn Ala Leu Asp Gln Ala Ile
3695 3700 3705

Ser Met Trp Ala Leu Val Ile Ser Val Thr Ser Asn Tyr Ser Gly
3710 3715 3720

Val Val Thr Thr Ile Met Phe Leu Ala Arg Ala Ile Val Phe Val
3725 3730 3735

Cys Val Glu Tyr Tyr Pro Leu Leu Phe Ile Thr Gly Asn Thr Leu
3740 3745 3750

Gln Cys Ile Met Leu Val Tyr Cys Phe Leu Gly Tyr Cys Cys Cys
3755 3760 3765

Cys Tyr Phe Gly Leu Phe Cys Leu Leu Asn Arg Tyr Phe Arg Leu
3770 3775 3780

Thr Leu Gly Val Tyr Asp Tyr Leu Val Ser Thr Gln Glu Phe Arg
3785 3790 3795

Tyr Met Asn Ser Gln Gly Leu Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ile Asp
3800 3805 3810

Ala Phe Lys Leu Asn Ile Lys Leu Leu Gly Ile Gly Gly Lys Pro
3815 3820 3825

Cys Ile Lys Val Ala Thr Val Gln Ser Lys Met Ser Asp Val Lys
3830 3835 3840

Cys Thr Ser Val Val Leu Leu Ser Val Leu Gln Gln Leu Arg Val
3845 3850 3855

Glu Ser Ser Ser Lys Leu Trp Ala Gln Cys Val Gln Leu His Asn
3860 3865 3870

[0025]

Asp Ile Leu Leu Ala Lys Asp Thr Thr Glu Ala Phe Glu Lys Met
 3875 3880 3885

Val Ser Leu Leu Ser Val Leu Leu Ser Met Gln Gly Ala Val Asp
 3890 3895 3900

Ile Asn Arg Leu Cys Glu Glu Met Leu Asp Asn Arg Ala Thr Leu
 3905 3910 3915

Gln Ala Ile Ala Ser Glu Phe Ser Ser Leu Pro Ser Tyr Ala Ala
 3920 3925 3930

Tyr Ala Thr Ala Gln Glu Ala Tyr Glu Gln Ala Val Ala Asn Gly
 3935 3940 3945

Asp Ser Glu Val Val Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ser Leu Asn Val
 3950 3955 3960

Ala Lys Ser Glu Phe Asp Arg Asp Ala Ala Met Gln Arg Lys Leu
 3965 3970 3975

Glu Lys Met Ala Asp Gln Ala Met Thr Gln Met Tyr Lys Gln Ala
 3980 3985 3990

Arg Ser Glu Asp Lys Arg Ala Lys Val Thr Ser Ala Met Gln Thr
 3995 4000 4005

Met Leu Phe Thr Met Leu Arg Lys Leu Asp Asn Asp Ala Leu Asn
 4010 4015 4020

Asn Ile Ile Asn Asn Ala Arg Asp Gly Cys Val Pro Leu Asn Ile
 4025 4030 4035

Ile Pro Leu Thr Thr Ala Ala Lys Leu Met Val Val Val Pro Asp
 4040 4045 4050

Tyr Gly Thr Tyr Lys Asn Thr Cys Asp Gly Asn Thr Phe Thr Tyr
 4055 4060 4065

Ala Ser Ala Leu Trp Glu Ile Gln Gln Val Val Asp Ala Asp Ser
 4070 4075 4080

[0026]

Lys Ile Val Gln Leu Ser Glu Ile Asn Met Asp Asn Ser Pro Asn
 4085 4090 4095

Leu Ala Trp Pro Leu Ile Val Thr Ala Leu Arg Ala Asn Ser Ala
 4100 4105 4110

Val Lys Leu Gln Asn Asn Glu Leu Ser Pro Val Ala Leu Arg Gln
 4115 4120 4125

Met Ser Cys Ala Ala Gly Thr Thr Gln Thr Ala Cys Thr Asp Asp
 4130 4135 4140

Asn Ala Leu Ala Tyr Tyr Asn Asn Ser Lys Gly Gly Arg Phe Val
 4145 4150 4155

Leu Ala Leu Leu Ser Asp His Gln Asp Leu Lys Trp Ala Arg Phe
 4160 4165 4170

Pro Lys Ser Asp Gly Thr Gly Thr Ile Tyr Thr Glu Leu Glu Pro
 4175 4180 4185

Pro Cys Arg Phe Val Thr Asp Thr Pro Lys Gly Pro Lys Val Lys
 4190 4195 4200

Tyr Leu Tyr Phe Ile Lys Gly Leu Asn Asn Leu Asn Arg Gly Met
 4205 4210 4215

Val Leu Gly Ser Leu Ala Ala Thr Val Arg Leu Gln Ala Gly Asn
 4220 4225 4230

Ala Thr Glu Val Pro Ala Asn Ser Thr Val Leu Ser Phe Cys Ala
 4235 4240 4245

Phe Ala Val Asp Pro Ala Lys Ala Tyr Lys Asp Tyr Leu Ala Ser
 4250 4255 4260

Gly Gly Gln Pro Ile Thr Asn Cys Val Lys Met Leu Cys Thr His
 4265 4270 4275

Thr Gly Thr Gly Gln Ala Ile Thr Val Thr Pro Glu Ala Asn Met
 4280 4285 4290

Asp Gln Glu Ser Phe Gly Gly Ala Ser Cys Cys Leu Tyr Cys Arg

[0027]

4295

4300

4305

Cys His Ile Asp His Pro Asn Pro Lys Gly Phe Cys Asp Leu Lys
4310 4315 4320

Gly Lys Tyr Val Gln Ile Pro Thr Thr Cys Ala Asn Asp Pro Val
4325 4330 4335

Gly Phe Thr Leu Arg Asn Thr Val Cys Thr Val Cys Gly Met Trp
4340 4345 4350

Lys Gly Tyr Gly Cys Ser Cys Asp Gln Leu Arg Glu Pro Leu Met
4355 4360 4365

Gln Ser Ala Asp Ala Ser Thr Phe Leu Asn Gly Phe Ala Val
4370 4375 4380

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> HBV core 128

<400> 32

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> CpG5002

<400> 33
tccatgacgt tctgatggt

19

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> SARS coronavirus

<400> 34

[0028]

Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val
1 5

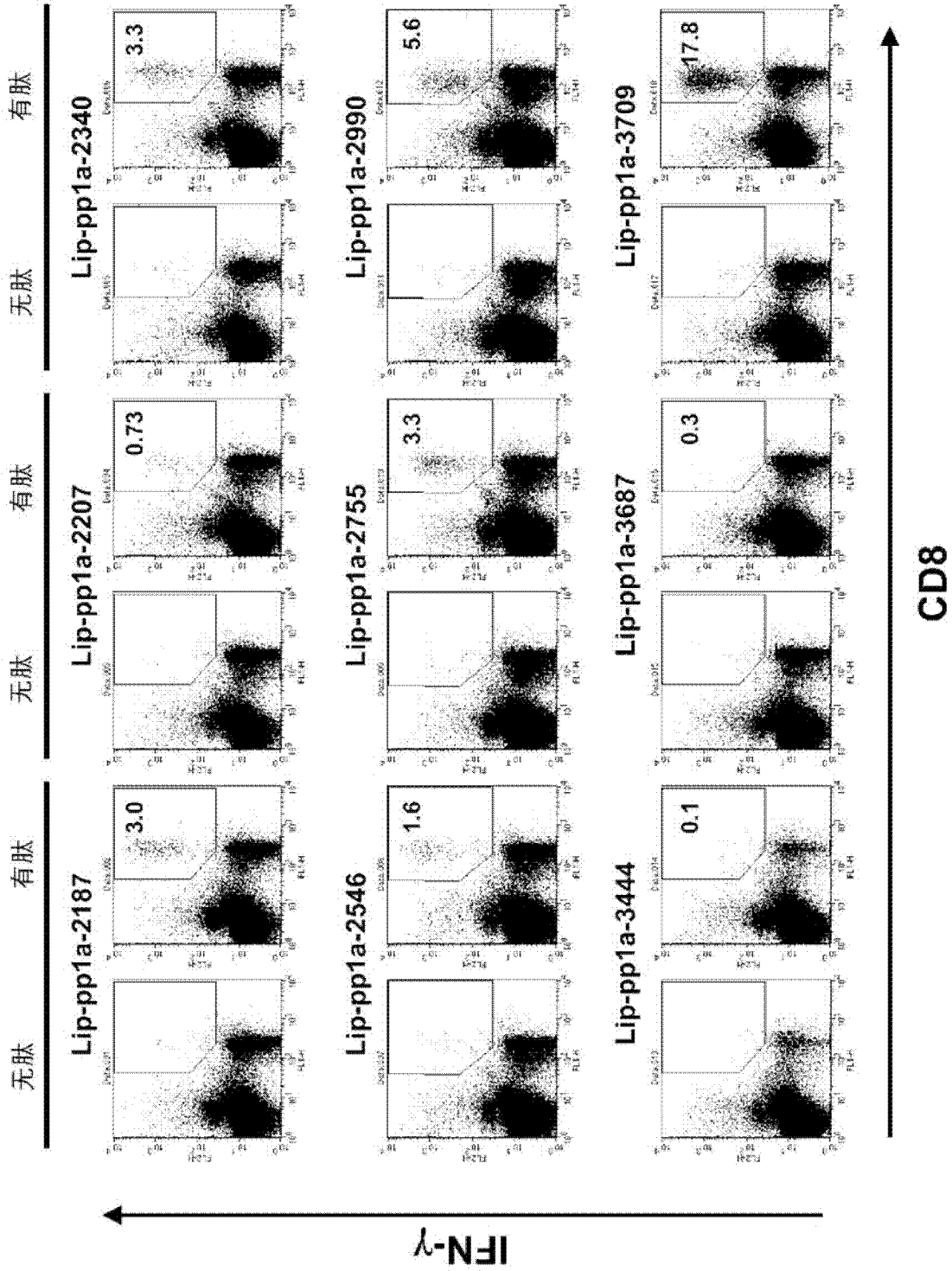


图 1

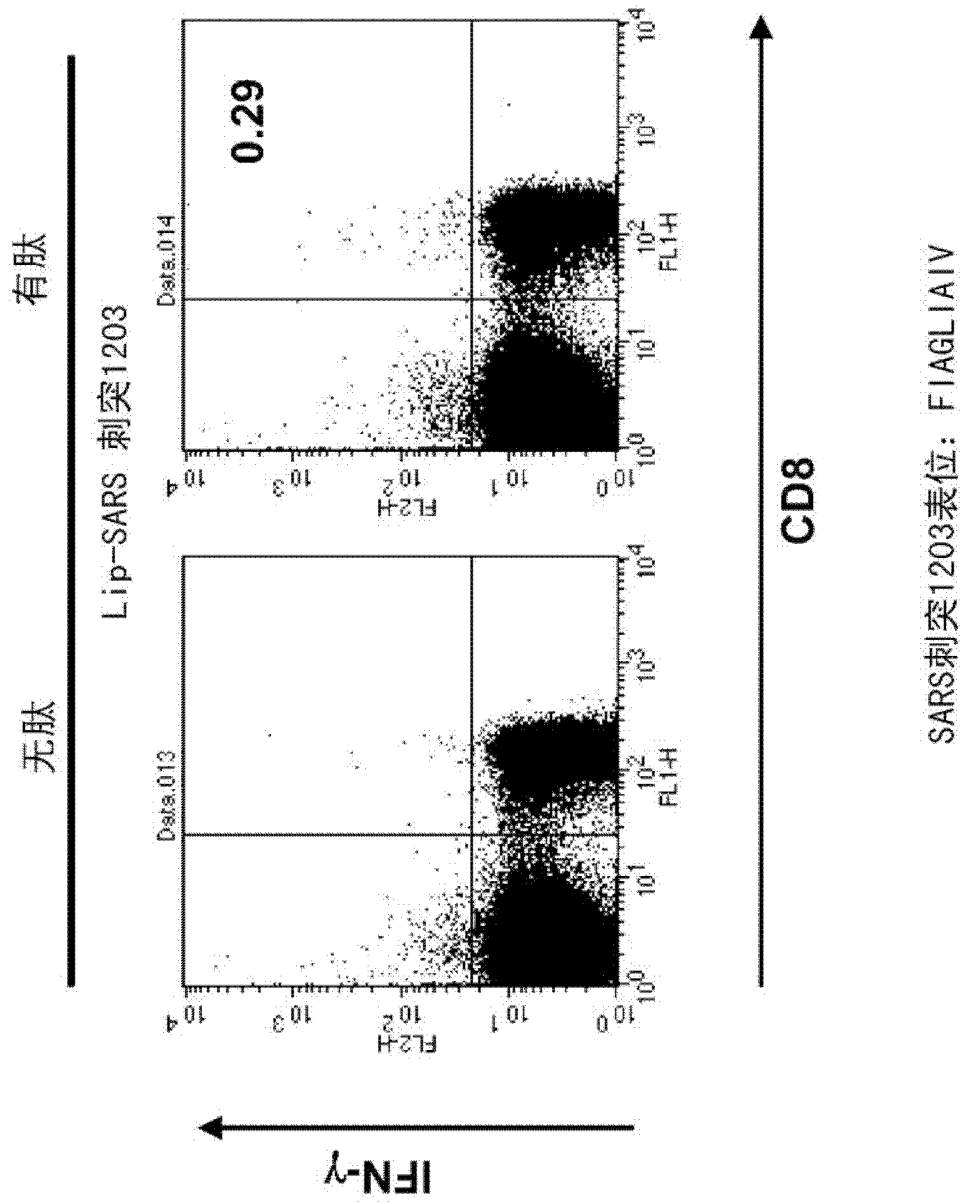


图 2

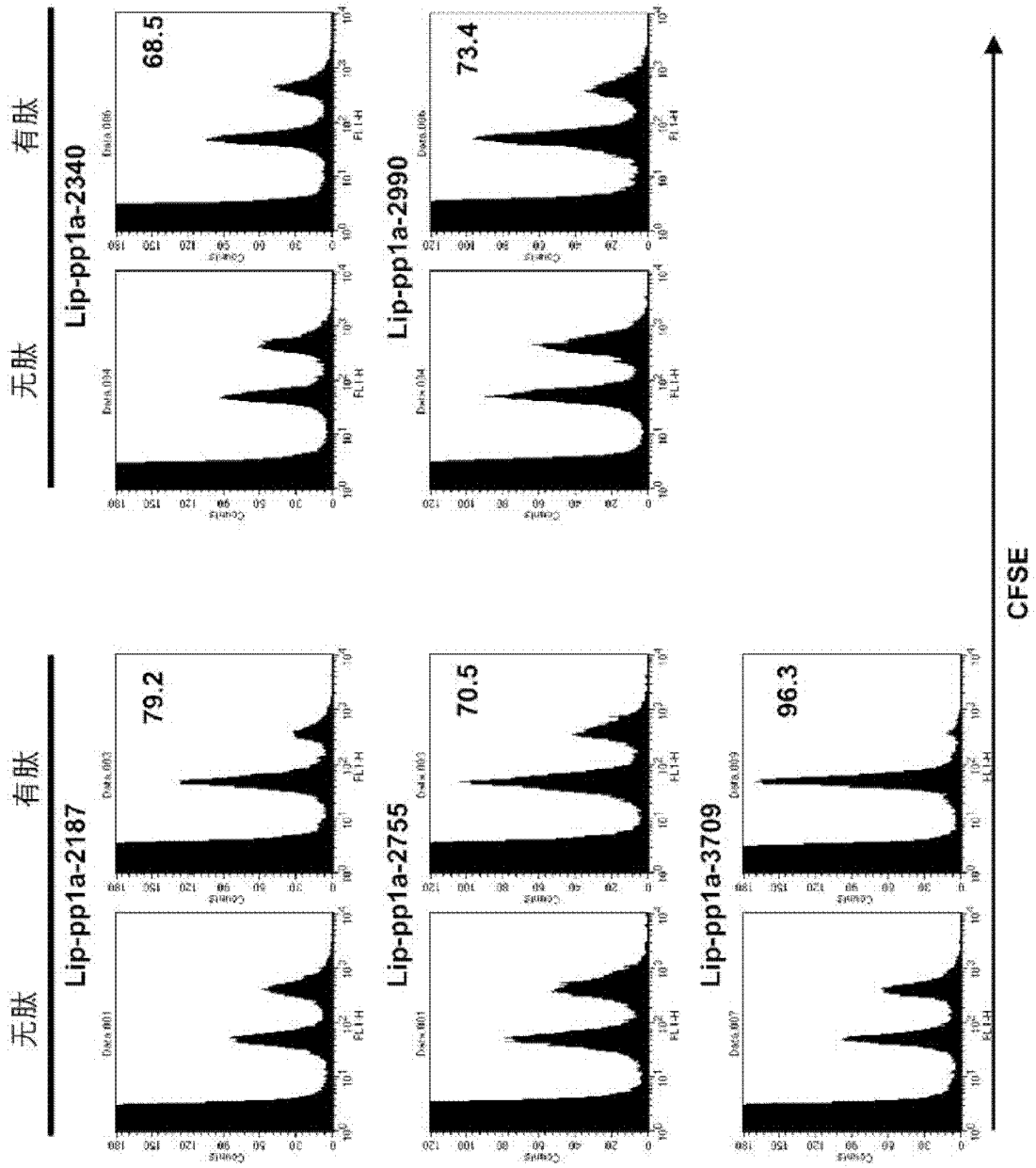


图 3