



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103189510 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201180053599. X

A61K 39/00(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 09. 06

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 7/06(2006. 01)

61/380, 611 2010. 09. 07 US

C12N 9/10(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2013. 05. 07

W0 2004018667 A1, 2004. 03. 04,

(86) PCT国际申请的申请数据

W0 2010023856 A1, 2010. 03. 04,

PCT/JP2011/004987 2011. 09. 06

US 7745391 B2, 2010. 06. 29, 全文.

(87) PCT国际申请的公布数据

STEFAN NIEWIESK et al.. Naturally

W02012/032764 EN 2012. 03. 15

Occurring Variants of Human T-cell Leukemia

(73) 专利权人 肿瘤疗法科学股份有限公司

Virus Type I Tax Protein Impair Its

地址 日本神奈川县

Recognition by Cytotoxic Lymphocytes and

(72) 发明人 中村佑辅 角田卓也 大泽龙司

the Transactivation Function of Tax.《JOURNAL

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

OF VIROLOGY》. 1995, 第 2651 页.

11105

审查员 沈晶晶

代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.

C12N 15/09(2006. 01)

A61K 38/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书49页

序列表23页 附图9页

(54) 发明名称

TTLL4 肽及包含它们的疫苗

(57) 摘要

本文种描述了针对癌症的肽疫苗。尤其是, 提供了源自 TTLL4 基因的引发 CTL 的表位肽。还提供了针对此类肽的抗原呈递细胞和分离的 CTL, 以及用于诱导所述抗原呈递细胞或 CTL 的方法。本发明还提供含有源自 TTLL4 的肽或编码所述多肽的多核苷酸作为活性成分的药物组合物。此外, 本发明提供用于治疗 and / 或预防 (即防范) 癌症 (肿瘤)、和 / 或防范其手术后复发的方法, 以及用于诱导 CTL 的方法, 用于诱导抗肿瘤免疫的方法, 所述方法使用本发明的源自 TTLL4 的肽、编码所述肽的多核苷酸, 或呈递所述肽的抗原呈递细胞, 或药物组合物。

1. 分离的肽,其中所述肽选自由下述 (a) 和 (b) 组成的组:
 - (a) 分离的肽,其由选自 SEQ ID NO:21, 20, 39 和 44 的氨基酸序列组成;和
 - (b) 分离的肽,其具有细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 可诱导性,其中所述肽由在选自 SEQ ID NO:21, 20, 39 和 44 的氨基酸序列中取代 1 个或 2 个氨基酸的氨基酸序列组成,其中所述取代选自:
 - (i) 选自 SEQ ID NO:21 和 20 的氨基酸序列的自 N 端起的第二个氨基酸选自苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸;和
 - (ii) 选自 SEQ ID NO:21 和 20 的氨基酸序列的 C 末端氨基酸选自亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸和甲硫氨酸;或者,其中所述取代选自:
 - (iii) 选自 SEQ ID NO:39 和 44 的氨基酸序列的自 N 端起的第二个氨基酸选自亮氨酸和甲硫氨酸;和
 - (iv) 选自 SEQ ID NO:39 和 44 的氨基酸序列的 C 末端氨基酸是亮氨酸。
2. 分离的多核苷酸,其编码权利要求 1 的分离的肽。
3. 一种用于诱导 CTL 的组合物,其中所述组合物包含一种或多种权利要求 1 的肽,或者一种或多种权利要求 2 的多核苷酸。
4. 一种用于治疗癌症的药物组合物,其中所述组合物包含一种或多种权利要求 1 的肽,或者一种或多种权利要求 2 的多核苷酸。
5. 权利要求 4 的药物组合物,其中所述组合物配制为供施用于 HLA 抗原为 HLA-A24 或 HLA-A2 的受试者。
6. 一种用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞 (APC) 的体外方法,其中所述方法包括选自下组的步骤:
 - (a) 在体外使 APC 与权利要求 1 的肽接触,和
 - (b) 将编码权利要求 1 的肽的多核苷酸导入 APC。
7. 一种诱导 CTL 的体外方法,其中所述方法包含选自下组的步骤:
 - (a) 将 CD8 阳性 T 细胞与在表面上呈递 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物的 APC 共培养,其中所述 HLA 抗原是 HLA-A24 或 HLA-A02;
 - (b) 将 CD8 阳性 T 细胞与在表面上呈递 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物的外来体共培养,其中所述 HLA 抗原是 HLA-A24 或 HLA-A02;和
 - (c) 将包含编码结合权利要求 1 的肽的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸的基因导入 T 细胞。
8. 一种分离的 APC,所述 APC 在其表面上呈递 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物。
9. 权利要求 8 的 APC,其是通过权利要求 6 的方法诱导的。
10. 一种分离的 CTL,其靶向权利要求 1 的肽,所述 CTL 是通过权利要求 7 的方法诱导的。
11. 权利要求 1 的肽或编码所述肽的多核苷酸在制备用于在有需要的受试者中诱导针对表达 TTLL4 的癌症的免疫应答的组合物中的用途,所述受试者的 HLA 抗原是 HLA-A24 或 HLA-A02。
12. 针对权利要求 1 的肽的抗体。
13. 一种载体,其包含编码权利要求 1 的肽的核苷酸序列。

14. 经根据权利要求 13 的表达载体转化或转染的宿主细胞。
15. 一种诊断试剂盒,其包含权利要求 1 的肽、权利要求 2 的核苷酸或权利要求 12 的抗体。

TTLL4 肽及包含它们的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及生物科学领域,更具体的说是癌症治疗领域。具体而言,本发明涉及作为癌症疫苗有效的新肽,用于治疗 and 预防肿瘤的药物,以及用于诊断肿瘤的方法。

[0002] 优先权

[0003] 本申请要求 2010 年 9 月 7 日提交的美国临时申请 61/380,611 的权益,通过述及将其全部内容收入本文用于所有目的。

背景技术

[0004] 已经证明,CD8 阳性细胞毒性 T 细胞细胞 (CTL) 可识别主要组织相容性复合物 (MHC) I 类分子上出现的肿瘤相关抗原 (TAA) 所衍生的表位肽,然后杀死肿瘤细胞。从 TAA 的第一个例子——黑素瘤抗原 (MAGE) 家族被发现起,人们主要通过免疫学手段 (NPL 1, NPL 2) 已经发现了许多其它 TAA。这些 TAA 中的一些目前正在作为免疫治疗靶标进行临床开发。

[0005] 有利的 TAA 对于癌细胞的扩增和存活而言是不可或缺的。使用这样的 TAA 作为免疫治疗的靶标,可以最大程度的减小人们熟知的癌细胞免疫逃逸的风险。癌细胞免疫逃逸可归因于治疗驱动的免疫选择 (therapeutically driven immune selection) 而导致的 TAA 删除、突变或下调。因此,能够诱导强力且特异性的抗肿瘤免疫应答的新 TAA 的鉴定保证了进一步开发并且由此利用针对各种类型癌症的肽疫苗接种策略的临床考察正在进行中 (NPL 3 ;NPL 4 ;NPL 5 ;NPL 6 ;NPL 7 ;NPL 8 ;NPL 9 ;NPL 10)。迄今为止,已经有数项使用这些肿瘤相关抗原衍生的肽进行临床试验的报告。不幸的是,在这些癌症疫苗试验中只观察到了较低的客观应答率 (NPL 11 ;NPL 12 ;NPL 13)。因此,对作为免疫治疗靶的新 TAA 存在的需求。

[0006] TTLL4 (GenBank Accession No:NP_055455),微管蛋白酪氨酸连接酶样家族成员 4,是一种聚谷氨酰酶。它在数种微管功能中扮演重要角色。聚谷氨酰化是通过谷氨酸顺序共价附接到靶蛋白的内部谷氨酸残基上而生成的可逆修饰 (NPL 14)。其生物学意义尚不很清楚。聚谷氨酰化仅有的已知靶物是 α -和 β -微管蛋白 (微管的结构单元) (NPL15),以及核小体组装蛋白 NAP1 和 NAP2 (NPL 16)。

[0007] 对胰导管腺癌 (PDAC) 细胞的全基因组基因表达谱分析表明 TTLL4 在 PDAC 中过表达。此外,用 siRNA 敲低 PDAC 细胞中的 TTLL4 减弱了 PDAC 细胞的生长,且外源导入 TTLL4 增强了细胞生长 (NPL17)。Northern 印迹分析显示 TTLL4 在除睾丸之外的正常组织中不表达。

[0008] 总的来看,这些数据提示 TTLL4 可能是癌症免疫治疗规程的合适靶物,尤其是对于具有表达 TTLL4 肿瘤的患者而言。

[0009] 引用表

[0010] 非专利文献

[0011] [NPL 1] Boon T, Int J Cancer 1993, 54(2):177-80

[0012] [NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996, 183(3):725-9

- [0013] [NPL 3]Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88(20):1442-55
- [0014] [NPL 4]Butterfield LH et al., Cancer Res 1999, 59(13):3134-42
- [0015] [NPL 5]Visser J et al., Cancer Res 1999, 59(21):5554-9
- [0016] [NPL 6]van der Burg SH et al., J Immunol 1996, 156(9):3308-14
- [0017] [NPL 7]Tanaka F et al., Cancer Res 1997, 57(20):4465-8
- [0018] [NPL 8]Fujie T et al., Int J Cancer 1999, 80(2):169-72
- [0019] [NPL 9]Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81(3):459-66
- [0020] [NPL 10]Oiso M et al., Int J Cancer 1999, 81(3):387-94
- [0021] [NPL 11]Bellini F et al., J Clin Oncol 2002, 20(20):4169-80
- [0022] [NPL 12]Coulie PG et al., Immunol Rev 2002, 188:33-42
- [0023] [NPL 13]Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10(9):909-15
- [0024] [NPL 14]Edde B. et al., Science. 1990 ;247(4938):83-5
- [0025] [NPL 15]Rudiger M. et al., FEBS Lett. 1992 ;308(1):101-5
- [0026] [NPL 16]Regnard C., J Biol Chem. 2000 ;275(21):15969-76
- [0027] [NPL 17]Kotabe K., Cancer Res. 2010 ;70(10):4024-33

发明内容

[0028] 本发明至少部分地基于能够作为合适的免疫疗法靶标的新肽的发现。由于 TAA 一般被免疫系统察觉为“自身”并因此常常没有天然免疫原性,适宜靶标的发现是极其重要的。通过本发明, TTLL4 (SEQ ID NO:80, 由 GenBank Accession No. NM_014640 (SEQ ID NO:79) 的基因编码), 已经被证明为在癌症细胞中特异性过表达, 所述癌症尤其是膀胱癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞样白血病 (CML)、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、软组织肿瘤和骨肉瘤, 但不限于此。因此, 本发明聚焦于 TTLL4 作为候选的癌症 / 肿瘤免疫疗法靶标。

[0029] 本发明还涉及从 TTLL4 的基因产物中鉴定具有诱导针对 TTLL4 特异性的 CTL 的能力的特异性表位肽。如下文详细讨论的, 使用源自 TTLL4 的 HLA-A*2402 或 HLA-A*0201 结合性候选肽刺激从健康供体获得的外周血单个核细胞 (PBMC)。然后建立了可特异性识别经每种候选肽刺激的 HLA-A24 或 HLA-A2 阳性靶细胞的 CTL。本文中的结果证明这些肽是鉴定了能诱导针对 TTLL4 的强而特异性的免疫应答的 HLA-A24 或 HLA-A2 限制型表位肽。这些结果进一步表明 TTLL4 具有强免疫原性, 而且它的表位是肿瘤免疫治疗的有效靶标。

[0030] 因此, 本发明的一个目的是提供结合 HLA 抗原且包含 TTLL4 序列 (SEQ ID NO:80) 或其免疫学活性片段的分离的肽。这样的肽预期具有 CTL 诱导能力, 因此可以用来体外、离体或体内诱导 CTL 或者用来施用给受试者以诱导针对癌症的免疫应答, 癌症的例子包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤, 但不限于此。优选的肽是九肽和十肽, 更优选地是具有 SEQ ID NO:1, 3-37 和 38-73 的氨基酸序列的九肽和十肽。在这些之中, 具有选自 SEQ ID NO:1, 6, 11, 12, 16, 20, 21, 22, 28, 29, 32, 37, 38, 39, 44 和 59 的氨基酸序列的肽是最优选的。

[0031] 本发明还考虑修饰肽, 它们具有选自 SEQ ID NO:1, 3-37 和 38-73 的氨基酸序列,

所述序列中替代、缺失、插入或添加了一个、两个或更多个氨基酸，只要所得的修饰肽保留原始的未修饰肽的必要的 CTL 诱导能力和 HLA 结合活性。

[0032] 本发明还涵盖编码任何一种本发明的肽的分离的多核苷酸。这些多核苷酸可以用来诱导或者制备具有 CTL 诱导能力的 APC。像上述的本发明的肽一样，这样的 APC 可以施用给受试者以诱导针对癌症的免疫应答。

[0033] 当施用给受试者时，本发明的肽优选被呈递在抗原呈递细胞的表面上，以诱导靶向相应肽的 CTL。因此，本发明的一个目的是提供诱导 CTL 的作用剂和 / 或组合物，此类作用剂或组合物包含一种或多种本发明的肽，或编码此类肽的多核苷酸。这样的作用剂、物质和 / 或组合物可以用来治疗和 / 或预防原发性癌症、转移或其手术后复发。癌症的例子包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。

[0034] 本发明的还涵盖包含或掺入有任何本发明的肽或者多核苷酸的药物组合物或药剂，配制为用于治疗和 / 或预防如上文指明的原发性癌症、转移或其手术后复发。作为此处的肽或多核苷酸的替代或者补充，此处的药剂和 / 或组合物或物质可包括呈递任何此处的肽的 APC 或外来体作为活性成分。

[0035] 本发明的肽或多核苷酸可以用来诱导在表面上呈递 HLA 抗原与本发明的肽的复合物的 APC，例如通过使源自受试者的 APC 与肽接触，或者通过将编码本发明的肽的多核苷酸导入到 APC 中。这样的 APC 具有针对靶肽的高的 CTL 诱导能力，并且可用于癌症免疫疗法。因此，本发明涵盖用于诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 的方法和通过该方法获得的 APC。

[0036] 本发明的另一个目的是提供用于诱导 CTL 的方法，所述方法包括将 CD8 阳性 T 细胞与在其表面上呈递 HLA 抗原与一个或多个本发明的肽的复合物的 APC 共培养的步骤，将 CD8 阳性 T 细胞与在其表面上呈递 HLA 抗原与一个或多个本发明的肽的复合物的外来体共培养的步骤，或者导入包括一个或多个编码结合本发明的肽的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸的基因的步骤。通过此类方法获得的 CTL 能够用于癌症的治疗和 / 或预防，所述癌症的例子包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。因此，本发明的又一个目的是提供 CTL。

[0037] 本发明的另一个目的是提供分离的 APC，其在表面上呈递 HLA 抗原与本发明的肽的复合物。本发明还提供靶向本发明的肽的分离的 CTL。这些 APC 和 CTL 可以用于癌症免疫治疗。

[0038] 本发明的还有一个目的是提供在有此需要的受试者体内诱导针对癌症的免疫应答的方法，这样的方法包括对受试者施用组合物的步骤，所述组合物包含本发明的肽或编码此类肽的多核苷酸。

[0039] 本发明的应用可延及多种涉及或者源于 TTLL4 过表达的疾病中的任何一种，其例子包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。除了上述之外，在联系附图和实施例阅读下面的详细说明时，本发明的这些和其它目的和特征将变得更加显而易见。然而，应当理解，前面的发明概要和后面的详细说明都仅仅提出了示例性的实施方案，并不对本发明或本发明的其它可替代实施方案构成限制。尤其是，虽然在本文中就若干具体的实施方案对

本发明进行了说明,应当理解这些描述对本发明而言是示例说明性的,不解释成对本发明的限制。在不背离如随附的权利要求所描述的本发明的精神和范围的前提下本领域技术人员将容易地想到本发明的多种修改和应用。类似地,本发明的其它目的、特征、好处和优势是从此处的概要和下文描述的特定实施方案可以容易地想到的,并且是本领域技术人员可以显见的。根据上文的内容并结合随附的实施例、数据、附图以及从中能够合理推断的内容,或者进一步考虑本文中引用的参考文献,这样的目的、特征、好处和优势是容易想到的。

[0040] 附图简述

[0041] 本领域技术人员在考虑了下文的附图简要说明及对本发明及其优选实施方案的详细说明后将清楚地得知本发明的各个方面的应用。

[0042] [图 1-1] 图 1-1 由一系列照片 (a)-(j) 组成,描绘显示对用源自 TTLL4 的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。用 TTLL4-A24-9-750 (SEQ ID NO:1) (a) 刺激的 7 号孔,用 TTLL4-A24-9-79 (SEQ ID NO:6) (b) 刺激的 8 号孔、用 TTLL4-A24-9-793 (SEQ ID NO:11) (c) 刺激的 8 号孔、用 TTLL4-A24-9-691 (SEQ ID NO:12) (d) 刺激的 5 号孔、用 TTLL4-A24-9-103 (SEQ ID NO:16) (e) 刺激的 1 号孔、用 TTLL4-A24-10-103 (SEQ ID NO:20) (f) 刺激的 3 号孔、用 TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21) (g) 刺激的 3 号孔、用 TTLL4-A24-10-883 (SEQ ID NO:22) (h) 刺激的 8 号孔、用 TTLL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO:28) (i) 刺激的 2 号孔,和用 TTLL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO:29) (j) 刺激的 3 号孔中的 CTL 分别与对照相比显示了强的 IFN- γ 生成。这些图片上孔上的方框表示来自相应孔中的细胞被扩增以建立 CTL 系。在图中,“+”指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0043] [图 1-2]

[0044] 图 1-2 由一系列照片 (k)-(m) 组成,描绘显示对用源自 TTLL4 的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。用 TTLL4-A24-10-994 (SEQ ID NO:32) (k) 刺激的 1 号孔和用 TTLL4-A24-10-891 (SEQ ID NO:37) (l) 刺激的 6 号孔中的 CTL 分别与对照相比显示了强的 IFN- γ 生成。这些图片上孔上的方框表示来自相应孔中的细胞被扩增以建立 CTL 系。相比之下,作为典型的阴性数据实例,没有检测到来自 TTLL4-A24-9-579 (SEQ ID NO:2) (m) 刺激的 CTL 的特异性 IFN- γ 生成。用在图中,“+”指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0045] [图 2] 图 2 由一系列线图 (a)-(f) 组成,描绘 IFN- γ ELISA 测定的结果,依次演示用 TTLL4-A24-9-750 (SEQ ID NO:1) (a), TTLL4-A24-9-79 (SEQ ID NO:6) (b), TTLL4-A24-9-691 (SEQ ID NO:12) (c), TTLL4-A24-9-103 (SEQ ID NO:16) (d), TTLL4-A24-10-103 (SEQ ID NO:20) (e) 和 TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21) (f) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。结果显示用每种肽刺激而建立的 CTL 系与对照相比显示了强的 IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0046] [图 3] 图 3 由一系列线图 (a)-(d) 组成,描绘从用 TTLL4-A24-9-750 (SEQ ID NO:1) (a), TTLL4-A24-9-79 (SEQ ID NO:6) (b), TTLL4-A24-10-103 (SEQ ID NO:20) (c) 和 TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21) (d) 刺激的 CTL 系通过有限稀释而建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 克隆与对照相比均显示了强的

IFN- γ 生成。在图中，“+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成，而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0047] [图 4] 图 4 由一系列线图 (a)-(c) 组成，描绘针对外源性表达 TTLL4 和 HLA-A*2402 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备用 HLA-A*2402 或用全长 TTLL4 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 TTLL4-A24-9-103 (SEQ ID NO:16) (a) 建立的 CTL 系和用 TTLL4-A24-10-103 (SEQ ID NO:20) (b) 及 TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21) (c) 建立的 CTL 克隆针对用 TTLL4 和 HLA-A*2402 二者转染的 COS7 细胞显示了特异性 CTL 活性（黑色菱形）。另一方面，没有检测到显著的针对表达 HLA-A*2402（三角形）或 TTLL4（圆形）任一靶细胞的特异性 CTL 活性。

[0048] [图 5] 图 5 由一系列照片 (a)-(d) 组成，显示对用源自 TTLL4 的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。用 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38) (a) 刺激的 3 号孔、用 TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (b) 刺激的 7 号孔、用 TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) (c) 刺激的 8 号孔，和用 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) (d) 刺激的 7 号孔中的 CTL 分别与对照相比显示了强的 IFN- γ 生成。这些图的孔上的方框表示来自相应孔的细胞被扩增以建立 CTL 系。在图中，“+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成，而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0049] [图 6] 图 6 由一系列线图 (a)-(d) 组成，描绘了 IFN- γ ELISA 测定的结果，依次显示用 IFN- γ ELISA 测定法测得的、用 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38) (a)，TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (b)，TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) (c) 和 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。结果显示用每种肽刺激而建立的 CTL 系与对照相比显示了强的 IFN- γ 生成。在图中，“+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成，而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0050] [图 7] 图 7 由一系列线图 (a)-(c) 组成，描绘了 IFN- γ ELISA 测定的结果，依次显示用 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38) (a)、TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (b)、和 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) (c) 刺激的 CTL 系通过有限稀释而建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 克隆显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中，“+”指示针对经合适的肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成，而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0051] [图 8] 图 8 由一系列线图组成，描绘针对外源表达 TTLL4 和 HLA-A*0201 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备用 HLA-A*0201 或用全长 TTLL4 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (a) 建立的 CTL 克隆和用 TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) (b) 建立的 CTL 系显示了针对用 TTLL4 和 HLA-A*0201 二者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性（黑色菱形）。另一方面，没有检测到显著的针对表达 HLA-A*0201（三角形）或 TTLL4（圆形）的靶细胞的特异性 CTL 活性。

[0052] 实施方案的描述

[0053] 在上文的概述的基础上，本发明的一个目的是提供：

[0054] [1] 具有 CTL 诱导能力的分离的肽，其中所述肽由 TTLL4 的氨基酸序列或其免疫学活性片段组成。

[0055] [2] [1] 的分离的肽，其中所述肽包含选自 SEQ ID NO:1, 6, 11, 12, 16, 20, 21, 22, 28

, 29, 32, 37, 38, 39, 44 和 59 的氨基酸序列。

[0056] [3] 一种分离的肽,其包含在选自 SEQ ID NO:1, 6, 11, 12, 16, 20, 21, 22, 28, 29, 32, 37, 38, 39, 44 和 59 的氨基酸序列中取代、缺失、插入和 / 或添加 1 个、2 个或几个氨基酸的氨基酸序列,且所述肽具有细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 诱导能力。

[0057] [4] [1]-[3] 中任一项的分离的肽,其中所述肽结合 HLA 抗原。

[0058] [5] [4] 的分离的肽,其中所述 HLA 抗原是 HLA-A24 或 HLA-A2。

[0059] [6] [5] 的肽,其中所述肽具有下述特征之一或二者:

[0060] (a) 选自 SEQ ID NO:1, 6, 11, 12, 16, 20, 21, 22, 28, 29, 32 和 37 的氨基酸序列的自 N 端起的第二个氨基酸选自苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸;和

[0061] (b) 选自 SEQ ID NO:1, 6, 11, 12, 16, 20, 21, 22, 28, 29, 32 和 37 的氨基酸序列的 C 末端氨基酸选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸。

[0062] [7] [5] 的肽,其中所述肽具有下述特征之一或二者:

[0063] (a) 选自 SEQ ID NO:38, 39, 44 和 59 的氨基酸序列的自 N 端起的第二个氨基酸选自亮氨酸和甲硫氨酸;和

[0064] (b) 选自 SEQ ID NO:38, 39, 44 和 59 的氨基酸序列的 C 末端氨基酸选自缬氨酸和亮氨酸。

[0065] [8] [1]-[7] 任一项的分离的肽,其中所述肽是九肽或十肽。

[0066] [9] 分离的多核苷酸,其编码 [1]-[8] 中任一项的分离的肽。

[0067] [10] 一种用于诱导 CTL 的组合物,其中所述组合物包含一种或多种 [1]-[8] 中任一项的肽,或者一种或多种 [9] 的多核苷酸。

[0068] [11] 一种用于治疗 and / 或预防癌症、和 / 或防止其手术后复发的药物组合物,其中所述组合物包含一种或多种 [1]-[8] 中任一项的肽,或者一种或多种 [9] 的多核苷酸。

[0069] [12] [11] 的药物组合物,其中所述组合物配制为供施用于 HLA 抗原为 HLA-A24 或 A2 的受试者。

[0070] [13] 一种用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞 (APC) 的方法,其包括选自下组的步骤:

[0071] (a) 在体外、离体或在体内使 APC 与 [1]-[8] 中任一项的肽接触,和

[0072] (b) 将编码 [1]-[8] 中任一项的肽的多核苷酸导入 APC。

[0073] [14] 一种诱导 CTL 的方法,其包含选自下组的步骤:

[0074] (a) 将 CD8 阳性 T 细胞与在表面上呈递 HLA 抗原与 [1]-[8] 中任一项的肽的复合物的 APC 共培养;

[0075] (b) 将 CD8 阳性 T 细胞与在表面上呈递 HLA 抗原与 [1]-[8] 中任一项的肽的复合物的外来体共培养;和

[0076] (c) 将包含编码结合 [1]-[8] 中任一项的肽的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸的基因导入 T 细胞。

[0077] [15] 一种分离的 APC,所述 APC 在其表面上呈递 HLA 抗原与 [1]-[8] 中任一项的肽的复合物。

[0078] [16] [15] 的 APC,其是通过 [13] 的方法诱导的。

[0079] [17] 一种分离的 CTL,其靶向 [1]-[8] 中任一项的肽。

[0080] [18][17] 的 CTL,其是通过 [14] 的方法诱导的。

[0081] [19] 一种在有需要的受试者中诱导针对癌症的免疫应答的方法,所述方法包括对受试者施用包含 [1]-[8] 中任一项的肽、其免疫学活性片段、或编码所述肽或所述片段的多核苷酸的组合物。

[0082] [20] 针对 [1]-[8] 中任一项的肽的抗体或其免疫学活性片段。

[0083] [21] 一种载体,其包含编码 [1]-[8] 中任一项的肽的核苷酸序列。

[0084] [22] 经根据权利要求 [21] 的表达载体转化或转染的宿主细胞。

[0085] [23] 一种诊断试剂盒,其包含 [1]-[8] 中任一项的肽、[9] 的核苷酸、或 [20] 的抗体。

[0086] [24] [1]-[8] 中任一项的分离的肽,其选自 SEQ ID NO:1, 6, 11, 12, 16, 20, 21, 22, 28, 29, 32, 37, 38, 39, 44 和 59。

[0087] 或者,在另一个实施方案中,本发明还提供下述的肽及其用途:

[0088] [1] 具有 CTL 诱导能力的分离的肽,其中所述肽由 TTLL4 或其免疫学活性片段的氨基酸序列组成,或者具有 CTL 诱导能力的分离的肽,其中所述肽包含由 SEQ ID NO:80 的氨基酸序列组成的肽的免疫学活性片段的氨基酸序列或由该序列组成。

[0089] [2] [1] 的分离的肽,其中所述肽包含选自 SEQ ID NO:1、3-37 和 38-73 的氨基酸序列。

[0090] [3] [1] 或 [2] 的分离的肽,其中取代、插入、缺失或添加了 1 个、2 个或几个氨基酸而产生保持原始肽的 CTL 诱导能力的修饰肽。

[0091] [4] [1]-[3] 的分离的肽,其中所述肽结合 HLA 抗原。

[0092] [5] [4] 的分离的肽,其中所述 HLA 抗原为 HLA-A24 或 HLA-A2。

[0093] [6] [3]-[5] 的分离的肽,其中,在 HLA-A24 的背景下,所述肽具有下述特征之一或二者:

[0094] (a) 自 N 末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸的氨基酸,和

[0095] (b) C 末端氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸的氨基酸。

[0096] [7] [3]-[5] 的分离的肽,其中,在 HLA-A2 的背景下,所述肽具有下述特征之一或二者:

[0097] (a) 自 N 末端起的第二个氨基酸选自亮氨酸和甲硫氨酸,和

[0098] (b) C 末端氨基酸选自亮氨酸和缬氨酸。

[0099] [8] [1]-[7] 中任一项的分离的肽,其中所述肽是九肽或十肽。

[0100] 现在描述优选的方法、装置和材料,不过在实施或检验本发明的实施方案时可使用与本文中描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料。然而,在描述本发明材料和方法之前,应理解这些描述都是说明性的,并不意图限制,还要理解的是本发明不限于特定大小、性状、尺度、材料、方法学、方案等,因为它们可因循例行实验和优化而变化。此外,所述描述中使用的术语只是出于描述特定样式或实施方案的目的,而非意图限制本发明的范围,本发明的范围只会由所附权利要求来限制。

[0101] 通过提述明确地将本说明书中提到的每一篇出版物、专利或专利申请的公开文本

完整收入本文。然而，本文中无一处可解释为承认本发明没有资格凭借发明在先而早于此类公开文本。

[0102] 除非另有定义，本文中使用的所有技术和科学术语均具有本发明相关领域的技术人员通常知晓的意义。如果有冲突，以本说明书（包括定义）为准。此外，材料、方法和实例仅为举例说明而不构成限制。

[0103] I. 定义

[0104] 如本文中使用的，词语“一个 / 种”、“该”和“所述”意味着“至少一个 / 种”，除非另有明确说明。

[0105] 术语“分离的”和“纯化的”与物质（例如多肽、抗体、多核苷酸等）相关联使用时，指该物质基本上不含至少一种原本会包括在天然来源中的物质。因此，分离的或纯化的抗体指基本上不含细胞材料（例如来自所述蛋白质（抗体）的细胞或组织来源的碳水化合物、脂质或其它污染性蛋白质）或者在化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品的抗体。术语“基本上不含细胞材料”包括多肽的制备物，其中所述多肽与分离出该多肽的或重组产生该多肽的细胞的细胞组分是分离的。如此，基本上不含细胞材料的多肽包括多肽制备物，其具有小于约 30%、20%、10% 或 5%（以干重计）的异源蛋白质（在本文中也称为“污染蛋白质”）。在多肽以重组方式生成时，在一些实施方案中，它也基本上不含培养基，包括多肽的其中培养基小于蛋白质制备物体积的约 20%、10% 或 5% 的制备物。当多肽系通过化学合成生成时，它优选基本上不含化学前体或其它化学品，包括多肽的这样的制备物，其中多肽合成涉及的化学前体或其它化学品小于多肽制备物体积的约 30%、20%、10%、5%（以干重计）。特定蛋白质制备物含有经分离或纯化的多肽的事实可以例如通过在蛋白质制备物的十二烷基硫酸钠（SDS）聚丙烯酰胺凝胶电泳和对凝胶进行考马斯亮蓝染色等处理后出现单一条带来示明。在一个优选实施方案中，本发明的肽和多核苷酸是分离的或纯化的。

[0106] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是经过修饰的残基或非天然存在型残基（诸如相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物）的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物。

[0107] 本说明书中有时使用的术语“寡肽”用于指长度为 20 个残基或更少，典型地为 15 个残基或更少的本发明的肽，通常由约 8 个 - 约 11 个残基，经常为 9 个或 10 个残基组成。后者在本文中分别称为“九肽”和“十肽”。

[0108] 如本文中使用的，术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸，以及具有与天然存在的氨基酸相似的功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸指由遗传密码编码的氨基酸，以及在细胞中在翻译后被修饰的氨基酸（例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、和 O-磷酸丝氨酸）。短语“氨基酸类似物”指与天然存在型氨基酸具有相同的基础化学结构（ α 碳与氢、羧基、氨基、和 R 基团结合）但具有经过修饰的 R 基团或经过修饰的主链的化合物（例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷）。短语“氨基酸模拟物”指与具有与一般氨基酸不同的结构但发挥与一般氨基酸相似的功能的化学化合物。

[0109] 氨基酸在本文中可以通过它们公知的三字母符号或 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。

[0110] 术语“基因”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”在本文中除非另有明确说明可互换使用,并用它们普遍接受的单字母代码来指称它们。

[0111] 术语“(作用)剂”和“组合物”和在本文中可以互换使用,指包含规定量的规定成分的产品,以及通过所述规定量的规定成分的组合直接或间接地得到的任何产品。这些术语当与“药物”组合物关联使用时,意在涵盖:包括活性成分以及组成担载体的惰性成分的产品,以及通过所述任何两种或更多种成分的组合、复合或聚集,或通过一种或多种组分的解离,或通过一种或多种成分的其他类型的反应或相互作用而直接或间接地得到的产品。相应地,本发明的药物组合物涵盖任何通过混合本发明的化合物与药学或生理学上可接受的担载体而制成的组合物。

[0112] 术语“活性成分”在本文中意指作用剂或组合物中具有生物学活性或生理学活性的物质。尤其是,在药剂或药物组合物的语境中,术语“活性成分”是指显示客观的药理学效果的物质。例如,在用于治疗或预防癌症的药剂或药物组合物的场合,作用剂或组合物中的活性成分可直接或间接地导致对于癌细胞和/或组织的至少一种生物学或生理学作用。优选地,这样的作用可包括减少或抑制癌细胞生长、破坏或杀死癌细胞和/或癌组织,等等。典型地,活性成分的间接效果是诱导识别或杀死癌细胞的 CTL。在配制之前,“活性成分”又可称“原料药”(bulk)、“药物物质”(drug substance)或“技术产品”(technical product)。

[0113] 本文中所用的短语“药学上可接受的担载体”或“生理学上可接受的担载体”意思是药学上或生理学上可接受的材料、组合物、物质或媒介,包括但不限于液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包埋材料。

[0114] 本发明的某些药剂或药物组合物特别可以用作疫苗。在本发明的语境中,短语“疫苗”(又称“免疫原性组合物”)是指在接种到动物体内后具有改善、增强和/或诱导抗肿瘤免疫功能的作用剂或组合物。

[0115] 除非另有定义,术语“癌症”指过表达 TTLL4 基因的癌症或肿瘤,其实例包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。

[0116] 除非另有定义,术语“细胞毒性 T 淋巴细胞”、“细胞毒性 T 细胞”和“CTL”在本文中可互换使用,而且除非另有明确说明,指能够识别非自身细胞(例如肿瘤/癌细胞、病毒感染的细胞)并诱导此类细胞死亡的 T 淋巴细胞亚群。

[0117] 除非另有定义,本文中使用的术语“HLA-A24”包含亚型的 HLA-A24 型,亚型的例子包括但不限于 HLA-A*2401, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2404, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2420, HLA-A*2425 和 HLA-A*2488。

[0118] 除非另有定义,本文中使用的术语“HLA-A2”代表性地指亚型,其例子包括但不限于 HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 和 HLA-A*0250。

[0119] 除非另有定义,如本文中所用的术语“试剂盒”是指试剂及其他材料的组合。考虑术语“试剂盒”可包括微阵列、芯片、标记物、等等。术语“试剂盒”不意图限于某种特定的试剂和/或材料组合。

[0120] 如本文中使用的,在受试者或者患者的语境中,短语“受试者的(或患者的)HLA 抗原为 HLA A24 或 HLA-A2”是指受试者或患者纯合地或者杂合地拥有 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原基因作为 MHC(主要组织相容性复合物)I 类分子,并且 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原在受试者或患者的细胞中作为 HLA 抗原表达。

[0121] 以本发明的材料和方法在“治疗”癌症的语境中为限,如果治疗导致临床上的收益,例如受试者体内 TTLL4 基因表达的减少、或者癌症的尺寸、普遍性(prevalence)或转移潜力的降低,则认为治疗是“有效的”。当预防性地进行治疗时,“有效的”意思是其阻碍或阻止癌症的形成,或者阻止或减轻癌症的临床症状。“有效性”结合用于诊断或治疗特定肿瘤类型的任何已知方法来确定。

[0122] 以本发明的方法和组合物可用于“预防”和“防范”的语境为限,此类术语在本文中可互换使用,指降低缘于疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,而二级和三级预防和防范水平涵盖旨在预防和防范疾病的进展与症状的出现、以及通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来降低已建立的疾病的负面影响的活动的。或者,预防和防范可包括旨在减轻特定病症的严重性(例如降低肿瘤的增殖和转移等)的多种多样的预防性疗法。

[0123] 在本发明的语境中,治疗和/或预防癌症和/或预防其手术后复发包括任何下述步骤,诸如手术去除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和阻抑癌症发生、及降低或抑制转移。癌症的有效治疗和/或预防可降低患癌个体死亡率及改善其预后,降低其血液中肿瘤标志物的水平,及减轻其伴随癌症的可检测症状。例如,症状的减轻或改善构成有效治疗和/或预防,包括 10%、20%、30%或更多降低,或实现病情稳定。

[0124] 在本发明的语境中,术语“抗体”指可以与指定的蛋白或其肽具有特异性反应性的免疫球蛋白及其片段。抗体可以包括人抗体、灵长源化(primatized)抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、人源化抗体、与其它蛋白或放射性标记物融合的抗体、和抗体片段。另外,在本文中,抗体以最广义使用,具体涵盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们展现期望的生物学活性。“抗体”指示所有类别(例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM)。

[0125] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语的意义均与本发明所属技术领域普通技术人员通常理解的含义相同。

[0126] II. 肽

[0127] 下面详细描述的本发明的肽可称为“TTLL4 肽”或“TTLL4 多肽”。

[0128] 为了证明源自 TTLL4 的肽发挥被 CTL 所识别的抗原的功能,对源自 TTLL4(SEQ ID NO:80)的肽进行了分析以确定它们是否为 HLA-A24 或 A2 限制性的抗原表位,HLA-A24 或 A2 是经常遇到的 HLA 等位基因(Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994)。

[0129] 基于它们对 HLA-A24 的结合亲和力,鉴定了源自 TTLL4 的 HLA-A24 结合肽的候选者。鉴定了下述候选肽:TTLL4-A24-9-750(SEQ ID NO:1), TTLL4-A24-9-994(SEQ ID NO:3), TTLL4-A24-9-769(SEQ ID NO:4), TTLL4-A24-9-755(SEQ ID NO:5), TTLL4-A24-9-79(SEQ ID NO:6), TTLL4-A24-9-684(SEQ ID NO:7), TTLL4-A24-9-689(SEQ ID NO:8), TTLL4-A24-9-779(SEQ ID

NO:9), TTLL4-A24-9-304 (SEQ ID NO:10), TTLL4-A24-9-793 (SEQ ID NO:11), TTLL4-A24-9-691 (SEQ ID NO:12), TTLL4-A24-9-41 (SEQ ID NO:13), TTLL4-A24-9-1086 (SEQ ID NO:14), TTLL4-A24-9-1186 (SEQ ID NO:15), TTLL4-A24-9-103 (SEQ ID NO:16), TTLL4-A24-9-362 (SEQ ID NO:17), TTLL4-A24-9-1037 (SEQ ID NO:18), TTLL4-A24-9-773 (SEQ ID NO:19), TTLL4-A24-10-103 (SEQ ID NO:20), TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21), TTLL4-A24-10-883 (SEQ ID NO:22), TTLL4-A24-10-127 (SEQ ID NO:23), TTLL4-A24-10-684 (SEQ ID NO:24), TTLL4-A24-10-1043 (SEQ ID NO:25), TTLL4-A24-10-223 (SEQ ID NO:26), TTLL4-A24-10-122 (SEQ ID NO:27), TTLL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO:28), TTLL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO:29), TTLL4-A24-10-689 (SEQ ID NO:30), TTLL4-A24-10-804 (SEQ ID NO:31), TTLL4-A24-10-994 (SEQ ID NO:32), TTLL4-A24-10-993 (SEQ ID NO:33), TTLL4-A24-10-1105 (SEQ ID NO:34), TTLL4-A24-10-696 (SEQ ID NO:35), TTLL4-A24-10-665 (SEQ ID NO:36) 和 TTLL4-A24-10-891 (SEQ ID NO:37)。

[0130] 此外,用加载有这些肽的树突细胞 (DC) 体外刺激 T 细胞后,通过用下述每一种肽成功地建立了 CTL:

[0131] TTLL4-A24-9-750 (SEQ ID NO:1), TTLL4-A24-9-79 (SEQ ID NO:6), TTLL4-A24-9-793 (SEQ ID NO:11), TTLL4-A24-9-691 (SEQ ID NO:12), TTLL4-A24-9-103 (SEQ ID NO:16), TTLL4-A24-10-103 (SEQ ID NO:20), TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21), TTLL4-A24-10-883 (SEQ ID NO:22), TTLL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO:28), TTLL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO:29), TTLL4-A24-10-994 (SEQ ID NO:32) 和 TTLL4-A24-10-891 (SEQ ID NO:37)。

[0132] 基于它们对 HLA-A2 的结合亲和力,鉴定了源自 TTLL4 的 HLA-A2 结合肽的候选者。认为下述肽是用于免疫治疗的候选肽:

[0133] TTLL4-A2-9-222 (SEQ ID NO:38), TTLL4-A2-9-805 (SEQ ID NO:39), TTLL4-A2-9-610 (SEQ ID NO:40), TTLL4-A2-9-1163 (SEQ ID NO:41), TTLL4-A2-9-575 (SEQ ID NO:42), TTLL4-A2-9-1189 (SEQ ID NO:43), TTLL4-A2-9-66 (SEQ ID NO:44), TTLL4-A2-9-864 (SEQ ID NO:45), TTLL4-A2-9-899 (SEQ ID NO:46), TTLL4-A2-9-147 (SEQ ID NO:47), TTLL4-A2-9-578 (SEQ ID NO:48), TTLL4-A2-9-697 (SEQ ID NO:49), TTLL4-A2-9-1088 (SEQ ID NO:50), TTLL4-A2-9-988 (SEQ ID NO:51), TTLL4-A2-9-423 (SEQ ID NO:52), TTLL4-A2-9-852 (SEQ ID NO:53), TTLL4-A2-9-128 (SEQ ID NO:54), TTLL4-A2-9-107 (SEQ ID NO:55), TTLL4-A2-9-605 (SEQ ID NO:56), TTLL4-A2-9-356 (SEQ ID NO:57), TTLL4-A2-10-363 (SEQ ID NO:58), TTLL4-A2-10-574 (SEQ ID NO:59), TTLL4-A2-10-895 (SEQ ID NO:60), TTLL4-A2-10-605 (SEQ ID NO:61), TTLL4-A2-10-578 (SEQ ID NO:62), TTLL4-A2-10-756 (SEQ ID NO:63), TTLL4-A2-10-550 (SEQ ID NO:64), TTLL4-A2-10-610 (SEQ ID NO:65), TTLL4-A2-10-107 (SEQ ID NO:66), TTLL4-A2-10-933 (SEQ ID NO:67)。

NO:67), TTLL4-A2-10-1163 (SEQ ID NO:68), TTLL4-A2-10-871 (SEQ ID NO:69), TTLL4-A2-10-863 (SEQ ID NO:70), TTLL4-A2-10-852 (SEQ ID NO:71), TTLL4-A2-10-62 (SEQ ID NO:72), TTLL4-A2-10-804 (SEQ ID NO:73), TTLL4-A2-10-70 (SEQ ID NO:74), TTLL4-A2-10-1092 (SEQ ID NO:75), TTLL4-A2-10-1113 (SEQ ID NO:76), TTLL4-A2-10-778 (SEQ ID NO:77) 和 TTLL4-A2-10-86 (SEQ ID NO:78)。

[0134] 此外,用经过这些肽冲激(加载)的树突细胞(DC)体外刺激T细胞后,通过用下述每一种肽成功地建立了CTL:

[0135] TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38), TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39), TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) 和 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59)。

[0136] 这些建立的CTL针对用相应肽冲激过的靶细胞显示了强的特异性CTL活性。此处的这些结果显示TTLL4是被CTL识别的抗原,且被测试的肽是TTLL4的受HLA-A24或HLA-A2限制的表位肽。

[0137] 由于TTLL4基因在癌细胞或组织,包括例如膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤的细胞和组织中过表达,而在大多数正常器官中不表达,它代表了一种良好的免疫治疗靶标。因此,本发明提供与来自TTLL4的被CTL识别的表位对应的九肽(由九个氨基酸残基组成的肽)和十肽(由十个氨基酸残基组成的肽)。本发明的九肽和十肽的尤其优选的例子包括具有选自SEQ ID NO:1、3-37和38-73的氨基酸序列的肽。

[0138] 一般而言,目前可以通过例如互联网访问的软件程序,如Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1):163-75 和 Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004) 等中描述的那些,可以用来在计算机上计算不同肽与HLA抗原之间的结合亲和力。与HLA抗原的结合亲和力可以按照例如下列文献中描述的那样进行测定:Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1):163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6):1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007; 8:424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12:1007-17, 和 Nielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2:e796, 这些在例如 Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, (2009, 15, 3209-3220 中有总结。用于测定结合亲和力的方法在例如 Journal of Immunological Methods, (1995, 185:181-190); 和 Protein Science, (2000, 9:1838-1846) 中有描述。因而可以容易地利用这样的软件程序来选择具有高度的HLA抗原结合亲和力的源自TTLL4的片段,利用这样的软件程序。因此,本发明涵盖由任何可通过这些已知程序被确定为与HLA抗原结合的TTLL4片段构成的肽。此外,这样的肽可包括由TTLL4序列全长构成的肽。

[0139] 本发明的肽,尤其是本发明的九肽和十肽,在其侧翼可以具有额外的氨基酸残基,只要所得的肽保持其CTL诱导能力即可。具体的额外氨基酸残基可以由任何种类的氨基酸构成,只要其不损害原来的肽的CTL诱导能力。因此,本发明涵盖具有对HLA抗原的结合亲和力的肽,尤其是源自TTLL4的肽。这样的肽例如少于约40个氨基酸,经常少于约20个氨基酸,且通常少于约15个氨基酸。

[0140] 一般而言,肽中一个、两个或更多个氨基酸的修饰不会影响肽的功能,而且在有

些情况下甚至会增强原蛋白质的期望功能。事实上,已知有经过修饰的肽(即由与原始参照序列相比已有一个、两个或数个氨基酸残基修饰(即取代、添加、缺失或插入)的氨基酸序列构成的肽)保留原始肽的生物学活性(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10:6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79:6409-13)。因此,在一个实施方案中,本发明的肽既具有 CTL 诱导能力,又具有选自 SEQ ID NO:1、3-37 和 38-73 的氨基酸序列,其中添加和 / 或取代了一个、两个或甚至更多个氨基酸的肽构成。

[0141] 本领域技术人员认可,对氨基酸序列进行改变全部氨基酸序列中的单个氨基酸或少数百分比氨基酸的个别修饰(例如缺失、插入、添加和 / 或取代)倾向于导致原始氨基酸侧链的特性的保留;因此其被称作“保守替代”或“保守修饰”,其中对蛋白质的改变导致具有与原始蛋白质类似的功能的修饰蛋白质。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域公知的。期望保留的氨基酸侧链特征的例子包括例如疏水性氨基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、亲水性氨基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、和具有下面的共同官能团或特征的侧链:脂肪族侧链(G, A, V, L, I, P);含羟基侧链(S, T, Y);含硫原子侧链(C, M);含羧酸和酰胺侧链(D, N, E, Q);含碱侧链(R, K, H);和含芳香侧链(H, F, Y, W)。另外,下面的八组各自含有本领域认可互为保守替代的氨基酸:

[0142] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0143] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0144] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0145] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0146] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0147] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0148] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0149] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(参见例如 Creighton, Proteins 1984)。

[0150] 此类保守修饰肽也被视为本发明的肽。然而,本发明的肽不限于此,可包括非保守修饰,只要该肽保留原始未修饰肽的 CTL 诱导能力。另外,经过修饰的肽不应排除源自 TLL4 的多态变体、种间同源物、和等位基因的可诱导 CTL 的肽。

[0151] 可以对本发明的肽插入、取代或添加氨基酸残基,或者,可以从本发明的肽缺失氨基酸残基,以实现更高的结合亲和力。为了保持所需的 CTL 诱导能力,可以修饰(即缺失、插入、添加和 / 或取代)少数(例如,1 个、2 个或数个)或小百分比的氨基酸。这里,术语“数个”意指 5 个以下的氨基酸,如 4 个或 3 个以下。要被修饰的氨基酸的百分比优选为 20% 以下,更优选 15% 以下,进一步更优选 10% 以下,例如 1-5%。

[0152] 当在免疫疗法的语境中使用,本发明的肽应呈递在细胞或外来体的表面上,优选作为与 HLA 抗原的复合物。因此,优选选择不仅诱导 CTL 而且具有对 HLA 抗原的高结合亲和力的肽。为此目的,可以对肽通过取代、插入、缺失和 / 或添加氨基酸残基来加以修饰以产生具有更好的结合亲和力的修饰肽。除了天然被展示的肽之外,由于通过结合 HLA 抗原而被展示的肽的序列规律是已知的(J Immunol 1994, 152:3913; Immunogenetics 1995, 41:178; J Immunol 1994, 155:4307),可将基于此类规律的修饰引入本发明的免疫原性肽。

[0153] 例如,具有高的 HLA-A24 结合亲和力的肽的自 N 端起的第二个氨基酸倾向于被取代为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸。类似地, C 端氨基酸被取代为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸的肽。由此,可能期望将自 N 端起的第二个氨基酸取代为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸,和 / 或将 C 端氨基酸取代为亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸或甲硫氨酸,以增加 HLA-A24 结合亲和力。因此,具有选自 SEQ ID NOs:1 和 3-37 的氨基酸序列,其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列的自 N 端起的第二个氨基酸被取代为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸或色氨酸,和 / 或其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列的 C 端被取代为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、或甲硫氨酸的肽涵盖在本发明之内。

[0154] 类似地,具有高的 HLA-A2 结合亲和力的肽的自 N 端起的第二个氨基酸倾向于被取代为亮氨酸或甲硫氨酸和 / 或 C 端氨基酸被取代为缬氨酸或亮氨酸。由此,可能期望将自 N 端起的第二个氨基酸取代为亮氨酸或甲硫氨酸,和 / 或将 C 端氨基酸取代为缬氨酸或亮氨酸,以增加 HLA-A2 结合亲和力。因此,具有选自 SEQ ID NOs:38-73 的氨基酸序列,其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列的自 N 端起的第二个氨基酸被取代为亮氨酸或甲硫氨酸,和 / 或其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列的 C 端被取代为缬氨酸或亮氨酸的肽涵盖在本发明之内。

[0155] 不仅可以在肽的末端氨基酸处引入取代,而且可以在肽的潜在 TCR 识别位置处引入取代。数项研究已证明了具有氨基酸取代的肽可等同于或好于原来,例如 CAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎、Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ 或 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) ;168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52:199-206 及 S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

[0156] 本发明还考虑也可以向本发明的肽的 N 和 / 或 C 端添加 1 个、2 个或数个氨基酸。此类具有高 HLA 抗原结合亲和力且保留 CTL 诱导能力的修饰肽也包含在本发明之内。

[0157] 例如,本发明提供长度少于 14、13、12、11 或 10 个氨基酸的分离的肽,其具有 CTL 诱导能力并且包含选自下组的氨基酸序列:

[0158] (i) 在选自 SEQ ID NO:1-19 和 38-57 的氨基酸序列中修饰了 1、2 或几个氨基酸,其中所述肽结合 HLA 抗原并诱导细胞毒性 T 淋巴细胞,和

[0159] (ii) (i) 的氨基酸序列,其中,在 HLA-A24 的背景下,该氨基酸序列具有所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者:

[0160] (a) 所述 SEQ ID NO 的自 N 末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸和色氨酸的氨基酸;和

[0161] (b) 所述 SEQ ID NO 的 C 末端氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸和甲硫氨酸的氨基酸;和

[0162] (iii) (i) 的氨基酸序列,其中,在 HLA-A2 的背景下,该氨基酸序列具有所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者:

[0163] (a) 所述 SEQ ID NO 的自 N 末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自亮氨酸和甲硫氨酸的氨基酸;和

[0164] (b) 所述 SEQ ID NO 的 C 末端氨基酸为或被修饰为选自缬氨酸和亮氨酸的氨基酸。

[0165] 此外,本发明提供长度少于 15、14、13、12、11 或 10 个氨基酸的分离的肽,其具有

CTL 诱导能力并且包含选自下组的氨基酸序列：

[0166] (i') 在选自 SEQ ID NO:20-37 和 58-78 的氨基酸序列中修饰了 1、2 或几个氨基酸,其中所述肽结合 HLA 抗原并诱导细胞毒性 T 淋巴细胞,和

[0167] (ii')(i) 的氨基酸序列,其中,在 HLA-A24 的背景下,该氨基酸序列具有所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者：

[0168] (a) 所述 SEQ ID NO 的自 N 末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸和色氨酸的氨基酸；和

[0169] (b) 所述 SEQ ID NO 的 C 末端氨基酸为或被修饰为选自苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸和甲硫氨酸的氨基酸。

[0170] (iii')(i') 的氨基酸序列,其中,在 HLA-A2 的背景下,该氨基酸序列具有所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者：

[0171] (a) 所述 SEQ ID NO 的自 N 末端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自亮氨酸和甲硫氨酸的氨基酸；和

[0172] (b) 所述 SEQ ID NO 的 C 末端氨基酸为或被修饰为选自缬氨酸和亮氨酸的氨基酸。

[0173] 当这些肽与 APC 接触或者被导入 APC 时,这些肽在 APC 中被加工,从而在 APC 上呈递 (i)、(ii)、(iii)、(i') 和 (ii') 的肽。

[0174] 然而,当肽序列与具有不同功能的内源或外源蛋白质的氨基酸序列的一部分相同时,可能诱导副作用,诸如自身免疫性病症和 / 或针对特定物质的变应性症状。因此,优选首先利用可用的数据库实施同源性搜索,以避免肽的序列与另一种蛋白质的氨基酸序列匹配的情况。当根据同源性搜索清楚了即使与目标肽相比仅有 1 个或 2 个氨基酸差异的肽亦不存在时,可以修饰目标肽以提高其与 HLA 抗原的结合亲和力,和 / 或提高其 CTL 诱导能力,而没有任何发生此类副作用的危险。

[0175] 虽然如上所述的对 HLA 抗原具有高结合亲和力的肽预期是高度有效的,但还是对根据高结合亲和力的存在为指标选出的候选肽检查了 CTL 诱导能力的存在。这里,短语“CTL 诱导能力”指肽被呈递到抗原呈递细胞 (APC) 上时诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的能力。另外,“CTL 诱导能力”包括肽诱导 CTL 活化、CTL 增殖、促进 CTL 溶解靶细胞、和提高 CTL 的 IFN- γ 生成的能力。

[0176] CTL 诱导能力的确认如下来实现,诱导携带人 MHC 抗原的 APC (例如 B- 淋巴细胞、巨噬细胞、和树突细胞 (DC)), 或者更具体地说,源自人外周血单核白细胞的 DC, 并且在用测试肽刺激 APC 后,将 APC 与 CD8 阳性细胞混合以诱导 CTL, 然后测量由 CTL 针对靶细胞生成和释放的 IFN- γ 。作为反应系统,可使用已经制成的表达人 HLA 抗原的转基因动物 (例如 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000, 61(8):764-79 Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response 中描述的那些)。或者, 可以用 ^{51}Cr 等放射性标记靶细胞, 并且可以自靶细胞释放的放射性计算 CTL 的细胞毒性活性。或者, CTL 诱导能力可以如下评估: 测量在携带固定化肽的抗原呈递细胞 (APC) 存在下由 CTL 生成和释放的 IFN- γ , 并使用抗 IFN- γ 单克隆抗体显现培养基上的抑制区。

[0177] 作为如上所述检查肽的 CTL 诱导能力的结果,发现选自由 SEQ ID NO:1, 6, 11, 12, 1

6, 20, 21, 22, 28, 29, 32, 37, 38, 39, 44 和 59 所示的氨基酸序列的九肽或十肽不但具有对 HLA 抗原的高亲和力,还具有特别高的 CTL 诱导能力。因此,例举这些肽为本发明优选的实施方案。

[0178] 另外,同源性分析的结果显示了该肽与自任何其它已知人基因产物衍生的肽没有显著的同源性。因此,降低了用于免疫疗法时发生未知的或不想要的免疫应答的可能性。因此,也是根据这个方面,这些肽可用于在癌症患者中引发针对 TTLL4 的免疫力。因此,本发明的优选的肽,优选地,具有选自 SEQ ID NO:1, 6, 11, 12, 16, 20, 21, 22, 28, 29, 32, 37, 38, 39, 44 和 59 的氨基酸序列的肽,为本发明所涵盖。

[0179] 除上述的修饰之外,还可将本发明的肽连接至其它肽,只要所得的连接肽保留原始肽所需的 CTL 诱导能力,并且,优选地,还保留所需的 HLA 结合。合适的“其他”肽的例子包括:从其他 TAA 衍生的能诱导 CTL 的肽。本发明的肽可以通过接头直接或间接地连接于“其他”肽。合适的肽间接头是本领域公知的,且包括例如 AAY(P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK(R. P. M. Suttmuller et al., J Immunol. 2000, 165:7308-7315) 或 K(S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168:5709-5715)。

[0180] 例如,也可以基本上同时地使用非 TTLL4 肿瘤相关抗原肽,来增加藉由 HLA I 类和/或 HLA II 类的免疫应答。公认癌细胞能表达多于一种肿瘤相关基因。故而,确定特定的受试者是否表达其他肿瘤相关基因,并进一步将源自这样的基因的表达产物的 HLA I 类和/或 HLA II 类结合肽包含在根据本发明的 TTLL4 组合物或疫苗中,是本领域技术人员常规实验的范围之内的。

[0181] 本领域普通技术人员知晓 I 类 HLA I 和 II 类 HLA 结合肽的例子(例如参见 Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995),而且可以以与本文公开类似的方式用于本发明。因此,本领域普通技术人员能使用分子生物学的标准规程来容易地制备包括一种或多种 TTLL4 肽和一种或多种非 TTLL4 肽的多肽,或编码此类多肽的核酸。

[0182] 上文所述的连接的肽在本文中被称作“多表位”(polytope),即两个或更多个潜在免疫原性或免疫应答刺激性肽构成的组,这些肽可以以各种排列方式(例如串联、交叠)连接在一起。该多表位(或编码该多表位的核酸)可以以标准免疫方案来施用,例如施用于动物,以测试该多表位刺激、增强和/或引起免疫应答的有效性。

[0183] 肽可直接地或经使用侧翼序列连接在一起以形成多表位,而且多表位作为疫苗的用途是本领域公知的(参见例如 Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990)。可制备含有不同数目和组合的表位的多表位并测试它们被 CTL 识别的情况及提高免疫应答的功效。

[0184] 本发明的肽还可连接至其它物质,只要所得的连接肽保留原始肽的所需的 CTL 诱导能力。合适的物质的例子包括例如:肽、脂质、糖和糖链、乙酰基、天然的和合成的聚合物等。肽还可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化等等,条件是该修饰不破坏如原始肽的生物学活性。可进行这些类型的修饰可赋予额外的功能(例如靶向功能和投递功能)或使肽稳定。

[0185] 例如,为了提高肽的体内稳定性,本领域已知引入 D-氨基酸、氨基酸模拟物或非天然氨基酸;此构思也可适用于此处的肽。肽的稳定性可以以多种方式测定。例如,可使用肽酶和各种生物学介质(诸如人血浆和血清)来测试稳定性(参见例如 Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11:291-302)。

[0186] 此外,如上文所述,在上述取代、缺失、插入或添加了 1 个、2 个或数个氨基酸残基的修饰肽中,可以筛选或选择与原始肽相比活性相同或更高者。因此,本发明还提供由于筛选或选择与原始肽相比活性相同或更高的修饰肽的方法。一种示例的方法包括下述步骤:

[0187] a: 对本发明的肽取代、缺失、插入或添加至少一个氨基酸残基,

[0188] b: 测定肽的活性,和

[0189] c: 选择具有与原始肽相比相同或更高活性的肽。

[0190] 本文中,要测定的活性可包括 MHC 结合活性,APC 或 CTL 诱导能力,和细胞毒活性。

[0191] III. TTLL4 肽的制备

[0192] 本发明的肽可使用公知技术来制备。例如,肽可以通过合成、使用重组 DNA 技术或化学合成来制备。本发明的肽可个别地合成,或合成为包括两个或更多个肽的较长多肽。然后可以分离,即纯化或分离所述肽,以使其基本上没有其它天然存在的宿主细胞蛋白质及其片段或任何其它化学物质。

[0193] 本发明的肽可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化等,前提是该修饰不破坏原始肽的生物学活性。其他示例性的修饰包括掺入 D-氨基酸或其他可用的氨基酸模拟物,以便例如增加肽的血清半寿期。

[0194] 可以根据选定的氨基酸序列,借助化学合成来获得本发明的肽。可适用于合成的常规肽合成法的例子包括:

[0195] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

[0196] (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

[0197] (iii) Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co., 1975;

[0198] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co., 1985;

[0199] (v) Development of Pharmaceuticals(second volume)(日文), Vol. 14(peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

[0200] (vi) W099/67288;和

[0201] (vii) Barany G. & Merrifield R. B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118。

[0202] 或者,可适用任何已知的遗传工程肽生产方法来获得本发明的肽(例如 Morrison J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(eds. Wu et al.) 1983, 101:347-62)。例如,首先,制备包含处于可表达形式(例如处于相当于启动子序列的调节序列下游)的编码目标肽的多核苷酸的合适载体,并转化入合适的宿主细胞。然后培养宿主细胞以生成感兴趣的肽。也可以采用体外翻译系统在体外生产肽。

[0203] IV. 多核苷酸

[0204] 本发明还提供编码任何上述本发明肽的多核苷酸。这些包括源自天然存在型

TTLL4 基因 (GenBank Accession No. NM_014640 (SEQ ID NO:79)) 的多核苷酸, 以及具有它们的经过保守修饰的核苷酸序列的多核苷酸。在本文中, 短语“经过保守修饰的核苷酸序列”指编码相同或本质上相同的氨基酸序列的序列。由于遗传密码的简并性, 对于任何给定蛋白质都有极其多种功能上相同的核酸来编码它。例如, 密码子 GCA、GCC、GCG、和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此, 在由密码子规定为丙氨酸的任何位置处, 该密码子可改变成任何相应所述密码子, 而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”, 是保守修饰变异的一种。本文中编码肽的每一种核酸序列也描述该核酸的每一种可能的沉默变异。本领域普通技术人员会认识到, 核酸中的每一个密码子 (AUG 和 TGG 除外, AUG 在正常情况下是甲硫氨酸的唯一密码子, 而 TGG 在正常情况下是色氨酸的唯一密码子) 都可以被修饰以产生功能上相同的分子。因而, 每一种所公开的序列隐含涵盖了编码肽的核酸的每一种沉默变异。

[0205] 本发明的多核苷酸可以由 DNA、RNA、及其衍生物构成。如本领域公知的, DNA 由碱基诸如 A、T、C、和 G 合适地构成, 而 T 在 RNA 中被 U 取代。本领域技术人员会认识到非天然存在的碱基也包括在多核苷酸中。

[0206] 本发明的多核苷酸可编码多个本发明肽, 其中它们之间有或无居间氨基酸序列。例如, 居间氨基酸序列可提供多核苷酸的或所翻译的肽的切割位点 (例如酶识别序列)。另外, 多核苷酸除编码本发明肽的编码序列以外还可包括任何额外的序列。例如, 多核苷酸可以是包括表达肽所需要的调节序列的重组多核苷酸, 或者可以是具有标志基因等等的表达载体 (质粒)。一般而言, 此类重组多核苷酸可通过常规重组技术操作多核苷酸来制备, 例如通过使用聚合酶和内切核酸酶。

[0207] 重组和化学合成技术都可用来生成本发明的多核苷酸。例如, 可以通过插入在转染入感受态细胞后能表达的适宜载体来生成多核苷酸。或者, 可借助 PCR 技术或通过在合适宿主中的表达来扩增多核苷酸 (参见例如 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者, 可使用固相技术来合成多核苷酸, 如 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48:2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3:801-5 中记载的。

[0208] V. 外来体 (exosomes)

[0209] 本发明进一步提供了称作外来体的细胞内囊泡, 这些外来体在它们的表面上呈递本发明肽与 HLA 抗原之间形成的复合体。外来体可以通过, 例如在日本专利申请公表公报平 11-510507 和 W099/03499 中详细描述的方法来制备, 并可以用从作为治疗和 / 或预防对象的患者获得的 APC 制备。本发明的外来体可以作为疫苗以与本发明的肽相似的方式进行接种。

[0210] 复合体中包含的 HLA 抗原的类型必须与需要治疗和 / 或预防的受试者的类型匹配。例如, 在日本人群中, HLA-A24 和 HLA-A2 (尤其是 HLA-A*2402 和 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206) 是普遍存在的, 因此对于日本人患者的治疗可能是适合的。使用在日本人和白种人中高度表达的 A24 型对于获得有效的结果是有利的, 而且也可以使用 A2402、A*0201 和 A*0206 等亚型。典型地, 在临床上, 预先考察需要治疗的患者的 HLA 抗原类型, 这样就能够合适地选择对该特定抗原具有高水平的结合亲和力、或者具有藉由抗原呈递的 CTL 诱导能力的肽。此外, 为了获得同时具有高结合亲和力和 CTL 诱导能力的肽, 可以在天然存在的 TTLL4 部分肽的氨基酸序列的基础上进行 1 个、2 个或数个氨基酸的取代、插入、缺失和 / 或

添加。

[0211] 当使用 A24 型 HLA 抗原用于本发明的外来体时,具有选自 SEQ ID NO:1 和 3-37 中的任一序列的肽是特别有用的。

[0212] 或者,当使用 A2 型 HLA 抗原用于本发明的外来体时,具有选自 SEQ ID NO:38-73 中的序列的肽是特别有用的。

[0213] 在一些实施方案中,本发明的外来体是在它们的表面上呈递本发明的肽与 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原的复合物的外来体。

[0214] VI. 抗原呈递细胞 (APC)

[0215] 本发明还提供在其表面上呈递在 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的分离的抗原呈递细胞 (APC)。所述 APC 可源自作为治疗和 / 或预防对象的患者,而且可作为疫苗单独地或与其它药物 (包括本发明的肽、外来体、或 CTL) 组合来施用。

[0216] APC 不限于特定种类的细胞,包括树突细胞 (DC)、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞,已知这些细胞可在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,以供淋巴细胞识别。由于 DC 是 APC 中具有最强 CTL 诱导作用的代表性 APC,DC 可以用作本发明的 APC。

[0217] 例如,可通过自外周血单核细胞诱导 DC,然后在体外、离体或在体内用本发明的肽接触 (刺激) 它们来获得 APC。当对受试者施用本发明的肽时,在受试者的身体中诱导出呈递本发明肽的 APC。短语“诱导 APC”包括使本发明的肽,或编码本发明的肽的核苷酸接触 (刺激) 细胞细胞,以将 HLA 抗原与本发明的肽之间形成的复合物呈递到细胞表面。因此,可以通过对受试者使用本发明的肽,然后从受试者收集 APC,来获得本发明的 APC。或者,可以通过使从受试者收集的 APC 与本发明的肽接触来获得本发明的 APC。

[0218] 本发明的 APC 可以单独或者与其他药物,包括本发明的肽、外来体或 CTL 组合施用于受试者,以在受试者体内诱导针对癌症的免疫应答。例如,离体施用可包括下述步骤:

[0219] a:自第一受试者收集 APC;

[0220] b:使步骤 a 的 APC 接触肽;并

[0221] c:对第二受试者步骤 b 的 APC。

[0222] 第一受试者和第二受试者可以是同一个体,或者可以是不同个体。

[0223] 在本发明的语境中,可以利用本发明的肽来制造能够诱导抗原呈递细胞的药物组合物。本文中提供了制备用于诱导抗原呈递细胞的药物组合物的方法或工艺,其优选包括将本发明的肽与药学上可接受的担载体混合或配制的步骤。

[0224] 本发明还提供本发明的肽用于诱导抗原呈递细胞的用途。通过步骤 b 获得的 APC 可以配制为疫苗并施用来治疗和 / 或预防癌症,诸如膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤,但不限于此。

[0225] 依照本发明的一个方面,本发明的 APC 具有高水平的 CTL 诱导能力。在术语“高水平的 CTL 诱导能力”中,高水平是相对于未与肽接触或与不能诱导 CTL 的肽接触的 APC 的该水平而言的。这样的具有高水平 CTL 诱导能力的 APC 除了用上文描述的方法外,还包括在体外将含有编码本发明肽的多核苷酸的基因转移至 APC 的步骤的方法来制备。所导入的基因可以是 DNA 或 RNA 的形式。用于进行导入的方法的例子包括但不限于本领域中常规

实施的各种方法,例如可使用脂质体转染、电穿孔、或磷酸钙法。更具体的说,可以如 Cancer Res 1996, 56:5672-7 ;J Immunol 1998, 161:5607-13 ;J Exp Med 1996, 184:465-72 ;国际公开文本 No. 2000-509281 的已公开日文翻译中所述来实施。通过将基因转移入 APC,基因在细胞中经历转录、翻译、等等,然后得到的蛋白质被 MHC I 类或 II 类加工,并经由呈递途径呈递给本发明的部分肽。

[0226] 在一些实施方案中,本发明的 APC 是在它们的表面上呈递 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原与本发明的肽的复合物的 APC。

[0227] VII. 细胞毒性 T 细胞 (CTL)

[0228] 诱导出的针对任何一种本发明肽的 CTL 可在体内加强靶向癌细胞的免疫应答,并且因此可以以与肽本身相似地用作疫苗。因此,本发明提供由任何一种本发明肽特异性诱导或活化的、分离的 CTL。

[0229] 此类 CTL 可通过下述步骤来获得:(1) 对受试者施用本发明的肽;或(2) 在体外用本发明的肽接触(刺激)源自受试者的 APC,以及 CD8 阳性细胞或外周血单核白细胞;或(3) 在体外使 CD8 阳性细胞或外周血单核白细胞接触在其表面上呈递 HLA 抗原与肽之间形成的复合物的 APC 或外来体;或(4) 向 CTL 中导入包括编码能结合本发明的肽的 T 细胞受体(TCR)亚单位的多核苷酸的基因。上述 APC 或外来体可通过上文记载的方法来制备,而且(4)之方法的详情记载于下文“VIII. T 细胞受体(TCR)”部分。

[0230] 本发明的 CTL 可以从要进行治疗和/或预防的患者获取,而且可以将它们单独施用,或者与其它药物(包括本发明的肽或外来体)组合施用以产生调节效果。所得到的 CTL 特异性针对呈递本发明的肽(例如与用于诱导的肽相同的肽)的靶细胞起作用。靶细胞可以是内源表达 TTLL4 的细胞,例如癌细胞,或者或被 TTLL4 基因转染的细胞;而且因本发明肽的刺激而在细胞表面上呈递本发明肽的细胞也可充当活化 CTL 攻击的靶标。

[0231] 在一些实施方案中,本发明的 CTL 是这样的 CTL,其识别呈递 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原与本发明的肽的复合物的细胞。在 CTL 的语境中,短语“识别细胞”是指通过其 TCR 结合 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原与本发明的肽的复合物并显示针对该细胞的特异性细胞毒活性。这里,“特异性细胞毒活性”是指针对呈递 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原与本发明的肽的复合物的细胞,但不针对其他细胞显示细胞毒活性。

[0232] VIII. T 细胞受体 (TCR)

[0233] 本发明还提供包含编码能够形成 T 细胞受体(TCR)的亚单位的多肽的核酸的组合物,及使用该组合物的方法。这些 TCR 亚基能够形成 TCR,后者赋予 T 细胞以针对呈递 TTLL4 的肿瘤细胞的特异性。通过使用本领域已知的方法,可鉴定出在用本发明的一种或多种肽诱导的 CTL 中表达作为 TCR 亚基的 α 和 β 链的核酸序列(WO2007/032255 及 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288(2003))。例如,优选用 PCR 方法分析 TCR。用于分析的 PCR 引物可以是,例如,作为 5' 侧引物的 5' -R 引物(5'-gtctaccaggcatttcgcttcat-3')(SEQ ID NO:81),以及作为 3' 侧引物的对 TCR α 链 C 区特异的 3-TRa-C 引物(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3')(SEQ ID NO:82),对 TCR β 链 C1 区特异的 3-TRb-C1 引物(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3')(SEQ ID NO:83),或对 TCR β 链 C2 区特异的 3-TRbeta-C2 引物(5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3')(SEQ ID NO:84),但不限于此。衍生的 TCR 能够以高亲和力结合展示 TTLL4 肽的靶细胞,并任选地在体内和体外介导针对呈

递 TTLL4 肽的靶细胞的高效杀伤。

[0234] 可以将编码 TCR 亚单位的核酸掺入合适的载体,例如逆转录病毒载体中。这些载体是本领域公知的。可以将所述核酸或者包含它们的载体有用地转入 T 细胞,例如来自患者的 T 细胞中。有利的是,本发明提供一种即配即用型组合物,其容许快速修饰患者自己的 T 细胞(或其他哺乳动物的 T 细胞)以快速且容易地生成具有卓越的癌细胞杀伤特性的修饰型 T 细胞。

[0235] 特异性的 TCR 是这样的受体,它能够特异性地识别本发明的肽与 HLA 分子的复合物,当 TCR 呈递于 T 细胞的表面上时给予 T 细胞针对靶细胞的特异性。上述复合物的特异性识别可以通过任何已知方法来确认,所述方法的优选例子包括:利用 HLA 分子和本发明的肽的 HLA 多聚体染色分析、以及 ELISPOT 测定。通过实施 ELISPOT 测定,可以确认在细胞表面上表达 TCR 的 T 细胞借助 TCR 识别细胞,且信号在细胞内被传递。也可以通过已知方法来确认上述复合物当存在于 T 细胞表面时能够给予 T 细胞以细胞毒活性。优选的方法包括,例如,测定针对 HLA 阳性靶细胞的细胞毒活性,例如铬释放测定。

[0236] 此外,本发明提供通过用编码 TCR 亚单位多肽的核酸转导而制备的 CTL,所述 TCR 亚单位多肽在 HLA-A24 的背景下结合 TTLL4 肽,例如 SEQ ID NO:1 及 3-37,并且在 HLA-A2 的背景下结合 SEQ ID NO:38-73 的肽。

[0237] 经过转导的 CTL 在体内能够归巢(homing)到癌细胞,并且可以利用公知的培养方法体外扩增(例如 Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461(1989))。可以利用本发明的 T 细胞来形成免疫原性组合物,所述组合物可以用来在需要治疗或保护的患者中治疗或预防癌症(参见 W02006/031221,通过提述并入其全部内容)。

[0238] IX. 药物组合物

[0239] 由于 TTLL4 表达在癌症(如膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤)中与正常组织相比上调,本发明的肽或多核苷酸可用于治疗和/或预防癌症,和/或用于预防它们的手术后复发。因此,本发明提供配制为用于治疗和/或预防癌症,和/或预防它们的手术后复发的药物组合物或药剂,此组合物或剂包括一种或多种本发明的肽或多核苷酸作为活性成分。或者,可以在任何上述外来体或细胞诸如 APC 的表面上表达本发明的肽,以用作药物组合物。另外,上述靶向任何一种本发明的肽的 CTL 也可用作本发明的药物组合物的活性成分。

[0240] 相应地,本发明提供包含选自下组的至少一种活性成分的作用剂或组合物:

[0241] (a) 一种或多种本发明的肽,

[0242] (b) 一种或多种处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的多核苷酸,

[0243] (c) 一种或多种本发明的 APC 或外来体,和

[0244] (d) 一种或多种本发明的 CTL。

[0245] 本发明药物组合物也可以用作疫苗。在本发明的语境中,短语“疫苗”(又称“免疫原性组合物”)是指在接种到动物体内后具有改善、增强和/或诱导抗肿瘤免疫功能的作用剂或组合物。换言之,本发明提供了本发明的药剂或组合物用于在受试者中诱导针对癌症的免疫应答。

[0246] 本发明的药物组合物可用于在受试者或患者(包括人和任何其它哺乳动物,包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猫、犬、绵羊、山羊、猪、牛、马、猴、狒狒、和黑猩猩,特别是

商业上重要的动物或驯养的动物) 中治疗和 / 或预防癌症, 和 / 或预防其手术后复发。在一些实施方案中, 本发明的药剂或药物组合物可以配制为用于施用给 HLA 抗原为 HLA-A24 或 HLA-A2 的受试者。

[0247] 在另一实施方案中, 本发明还提供活性成分在制备用于治疗癌症或肿瘤的药物组合物或药剂中的用途, 所述活性成分选自:

[0248] (a) 本发明的肽;

[0249] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的此类肽的多核苷酸;

[0250] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体; 和

[0251] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0252] 或者, 本发明进一步提供用于治疗 and / 或预防癌症或肿瘤的活性成分, 所述活性成分选自下组:

[0253] (a) 本发明的肽;

[0254] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的此类肽的多核苷酸;

[0255] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体; 和

[0256] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0257] 或者, 本发明进一步提供一种制备用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或药物物质的方法或工艺, 其中该方法或工艺包括配制药学或生理学上可接受的担载体与选自下组的活性成分的步骤:

[0258] (a) 本发明的肽;

[0259] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的此类肽的多核苷酸;

[0260] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体; 和

[0261] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0262] 在另一个实施方案中, 本发明还提供一种制备用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或药剂的方法或工艺, 其中该方法或工艺包括混合活性成分与药学或生理学可接受的担载体的步骤, 其中所述活性成分选自下组:

[0263] (a) 本发明的肽;

[0264] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的此类肽的多核苷酸;

[0265] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体; 和

[0266] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0267] 依照本发明, 已经发现具有选自 SEQ ID NOs:1 和 3-37 中的氨基酸序列的肽是能诱导强且特异性的免疫应答的 HLA-A24 限制性表位肽或候选者, 且具有选自 SEQ ID NOs:38-73 的肽已经被发现是能在受试者中诱导针对表达 HLA-A24 或 HLA-A2 与 TTLL4 的癌症的强且特异性的免疫应答的 HLA-A2 限制型表位肽或候选者。因此, 包括任何这些具有 SEQ ID NOs:1、3-37 和 38-73 的氨基酸序列的肽的本发明药剂、药物物质或药物组合物特别适合于对其 HLA 抗原分别为 HLA-A24 和 HLA-A2 的受试者施用。对于包含编码这些肽中的任一个的多核苷酸 (即本发明的多核苷酸) 的药物组合物和药剂也是如此。

[0268] 要用本发明的药物组合物或药剂治疗的癌症或肿瘤不受限制, 包括其中涉及 (例如过表达) TTLL4 的任何癌症, 包括例如膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。

[0269] 本发明的药物组合物或药剂除上述活性成分之外还可含有其它具有诱导针对癌性细胞的 CTL 的能力的肽、编码所述其它肽的其它多核苷酸、呈递所述其它肽的其它细胞，等等。在本文中，其它具有诱导针对癌性细胞的 CTL 的能力的肽以癌症特异性抗原（例如已鉴定的 TAA）为例，但是不限于此。

[0270] 如果需要，本发明的药物组合物或药剂可任选包括其它治疗性物质作为活性成分，只要该物质不抑制活性成分（例如任何本发明肽）的抗肿瘤效果。例如，配制剂可包括抗炎组合物、镇痛剂、化疗剂、诸如此类。除了在药物自身中包括其它治疗性物质之外，本发明的药物还可以与一种或多种其它药理学组合物顺序或同时施用。药物和药理学组合物的量取决于例如所使用的药理学组合物的类型、所治疗的疾病、及施用的时序安排和路径。

[0271] 应当理解，除在本文中具体提及的组分之外，本发明的药物组合物或药剂可包括与所讨论的配制剂类型相关的本领域常规的其它组合物。

[0272] 在本发明的一个实施方案中，本发明的药物组合物或药剂可包括在制品和试剂盒中，该制品和试剂盒含有可用于治疗要治疗的疾病（例如癌症）的病理状况的材料。制品可包括任何本发明药物组合物或药剂的容器及标签。合适的容器包括瓶、管形瓶、和试管。容器可以用多种材料制成，诸如玻璃或塑料。容器上的标签应指明该组合物或剂用于治疗或预防疾病的一种或多种状况。标签还可指明关于施用的指导等等。

[0273] 除上文描述的容器之外，包括本发明药物组合物或药剂的试剂盒还可任选进一步包括第二容器，其中装有药学可接受的稀释剂。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料，包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头、注射器、和载有使用说明的包装插页。

[0274] 如果期望的话，药物组合物或药剂可在药包或分配器装置中提供，该药包或分配器装置可装有一个或多个含有活性成分的单位剂型。例如，药包可包括金属或塑料箔，诸如泡罩包。药包或分配器装置可附有施用说明书。

[0275] (1) 含有肽作为活性成分的药物组合物

[0276] 本发明的肽可以作为药物组合物或药剂直接施用，或者如果必要，通过常规配制方法来配制。在后一种情况中，除本发明的肽之外，还可以视情况包括通常用于药物的担载体、赋形剂、等等，没有特别限制。此类担载体的例子有灭菌水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养液、等等。另外，药物组合物或药剂可在必要时含有稳定剂、悬浮液、防腐剂、表面活性剂等等。本发明的药物组合物或药剂可用于抗癌目的。

[0277] 本发明的肽可制备成组合，由两种或更多种本发明的肽组成，以在体内诱导 CTL。肽组合可以采取鸡尾酒的形式，或者可使用标准技术彼此缀合。例如，可以将各个肽化学连接或表达成为单一融合多肽序列。组合中的各个肽可以是相同的或不同的。通过施用本发明的肽，肽被 HLA 抗原以高密度展示在 APC 上，然后诱导出与所展示的肽与 HLA 抗原之间形成的复合物特异性起反应的 CTL。或者，从受试者分离 APC（例如 DC），然后用本发明的肽刺激它们，来获得在其细胞表面上展示任何所述本发明肽的 APC，将这些 APC 重新施用给受试者而在受试者体内诱导出 CTL，结果，可提高针对肿瘤相关内皮的攻击性。

[0278] 任何本发明的肽作为活性成分的用于治疗和 / 或预防癌症的药物组合物或药剂还可包括已知可有效地建立细胞免疫的佐剂。或者，所述药物组合物或药剂可以与其它活性成分一起施用，或者通过配制成颗粒来施用。佐剂指在与具有免疫学活性的蛋白质一起（或顺序）施用时增强针对该蛋白质的免疫应答的化合物。此处考虑到的佐剂包括文献中

记载的那些 (Clin Microbiol Rev 1994, 7:277-89)。合适佐剂的例子包括但不限于磷酸铝、氢氧化铝、明矾、霍乱毒素、沙门氏菌毒素、IFA (不完全弗氏佐剂)、CFA (完全弗氏佐剂) 等等。

[0279] 另外,可方便地使用脂质体制制剂、其中肽结合至几微米直径的珠子的颗粒制剂、和其中脂质结合至肽的配制剂。

[0280] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的肽还可以作为可药用盐的形式施用。优选的盐的实例包括与碱金属的盐、与金属的盐、与有机碱的盐、与有机酸的盐、和与无机酸的盐。本文中所用的“可药用盐”是指保留所述化合物的生物学有效性和性质,通过与无机酸或碱(如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等)反应所得到的盐。

[0281] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物或药剂还可进一步包括引发 (prime) CTL 的成分。已经确认脂质是能够在体内引发针对病毒抗原的 CTL 的组合物。例如,可将棕榈酸残基连接至赖氨酸残基的 ϵ -和 α -氨基,然后连接至本发明的肽。然后脂化肽可以在胶束或颗粒中直接施用,掺入脂质体,或在佐剂中乳化。作为脂质引发 CTL 应答的另一个例子,大肠杆菌 (E. coli) 脂蛋白,诸如三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酰丝氨酰-丝氨酸 (P3CSS),当与适宜的肽共价连接时,可用来引发 CTL (参见例如 Deres et al., Nature 1989, 342:561-4)。

[0282] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等,及系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。本发明肽的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整,通常是 0.001mg 至 1000mg,例如 0.01mg 至 100mg,例如 0.1mg 至 10mg,而且可以每少数天施用一次至每少数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0283] (2) 含有多核苷酸作为活性成分的药物组合物

[0284] 本发明的药物组合物或药剂也可含有处于可表达形式的编码本文中公开的肽的核酸。在本文中,短语“处于可表达形式的”意味着多核苷酸在导入细胞时会在体内表达成诱导抗肿瘤免疫力的多肽。在一个例示性的实施方案中,感兴趣的多核苷酸的核酸序列包括多核苷酸表达所必需的调节元件。多核苷酸可具有为实现稳定插入靶细胞的基因组所需的配置(关于同源重组盒载体的描述参见例如 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51:503-12)。参见例如 Wolff et al., Science 1990, 247:1465-8; 美国专利 No. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 及 WO 98/04720。基于 DNA 的投递技术的例子包括“裸 DNA”、易化(布比卡因、聚合物、肽介导的)投递、阳离子脂质复合物、和颗粒介导的(“基因枪”)或压力介导的投递(参见例如美国专利 No. 5,922,687)。

[0285] 本发明的肽还可用于病毒或细菌载体来表达。表达载体的例子包括减毒病毒宿主,诸如牛痘或禽痘。这种办法涉及使用例如牛痘病毒作为载体来表达编码肽的核苷酸序列。在导入宿主后,重组牛痘病毒表达表达免疫原性肽,并由此引发免疫应答。可用于免疫接种方案的牛痘载体和方法记载于例如美国专利 No. 4,722,848。另一种载体是卡介苗 (BCG, Bacille Calmette Guerin)。BCG 载体记载于 Stover et al., Nature 1991, 351:456-60。有很多种可用于治疗性施用或免疫接种的其它载体是容易想到的,例如

腺病毒和腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 载体、去毒炭疽毒素载体、诸如此类。参见例如 Shata et al., *Mol Med Today* 2000, 6:66-71; Shedlock et al., *J Leukoc Biol* 2000, 68:793-806; Hipp et al., *In Vivo* 2000, 14:571-85。

[0286] 将多核苷酸投递入患者可以是直接的, 其中使患者直接暴露于携带多核苷酸的载体, 或者是间接的, 其中首先在体外用感兴趣的多核苷酸转化细胞, 然后将细胞移植入患者。这两种办法分别称作体内和离体基因疗法。

[0287] 关于基因疗法的方法的一般综述参见 Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12:488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3:87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33:573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260:926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62:191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5):155-215。在 eds. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, NY, 1993); 及 Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990 中描述了可应用于本发明的重组 DNA 技术领域的公知方法。

[0288] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等, 而且可使用系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施, 或者通过多次施用来强化。合适的担载体或经编码本发明肽的多核苷酸转化的细胞中的多核苷酸的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整, 通常是 0.001mg 至 1000mg, 例如 0.01mg 至 100mg, 例如 0.1mg 至 10mg, 而且可以每数天施用一次至每数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0289] X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL 的方法

[0290] 本发明的肽和编码此类肽的多核苷酸可用于诱导 APC 和 CTL。本发明的外来体和 APC 也可用于诱导 CTL。以及用于诱导针对癌症或肿瘤的免疫应答。肽、多核苷酸、外来体和 APC 可以与任何其它化合物组合使用, 只要该其他的化合物不抑制 CTL 诱导能力。因此, 任何前文所述的本发明的药物组合物或药剂均可用于诱导 CTL。除它们之外, 那些包括肽和多核苷酸的也可用于诱导 APC, 如下文讨论的。

[0291] (1) 诱导抗原呈递细胞 (APC) 的方法

[0292] 本发明提供了使用本发明的肽或多核苷酸来诱导具有高 CTL 诱导能力的 APC 的方法。

[0293] 本发明的方法包括在体外、离体或体内使 APC 与本发明的肽接触的步骤。例如, 离体将 APC 与肽接触的方法可包括下述步骤:

[0294] a: 从受试者收集 APC; 和

[0295] b: 使步骤 a 的 APC 与肽接触。

[0296] APC 不限于特定种类的细胞, 而且包括 DC、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞, 已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原, 从而被淋巴细胞识别。优选地可使用 DC, 因为它们在 APC 中具有最强的 CTL 诱导能力。任何一种本发明肽均可以单独或其它本发明的肽或源自 TTLL4 之外的 TAA 的 CTL 可诱导肽组合使用。

[0297] 另一方面, 当将本发明的肽施用给受试者时, APC 在体内接触到所述肽, 结果, 在受试者的身体中诱导出具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此, 本发明的方法包括将本发明的肽施

用于受试者以在该受试者的身体中诱导具有 CTL 诱导能力的 APC。类似地,当将处于可表达形式的本发明的多核苷酸施用于受试者时,本发明的肽在体内表达并与 APC 接触,结果,在受试者的身体中诱导出具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,本发明还可包括将本发明的多核苷酸施用于受试者以在该受试者的身体中诱导具有 CTL 诱导能力的 APC。短语“可表达的形式”描述于上文“IX. 药物组合物 (2) 含有多核苷酸作为活性组分的药物组合物”部分。

[0298] 本发明还包括将本发明的多核苷酸导入 APC 以诱导具有 CTL 诱导能力的 APC。例如,该方法可包括下述步骤:

[0299] a:自受试者收集 APC;并

[0300] b:导入编码本发明肽的多核苷酸。

[0301] 步骤 b 可如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分中所述来实施。

[0302] 或者,本发明提供了一种用于制备特异性诱导针对 TTLL4 的 CTL 活性的抗原呈递细胞 (APC) 的方法,其中所述方法可包括下述步骤之一:

[0303] (a) 在体外、离体或体内使 APC 与本发明的肽接触;和

[0304] (b) 将编码本发明的肽的多核苷酸导入 APC 中。

[0305] 或者,本发明提供用于诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 的方法,其中所述方法包括选自下组的步骤:

[0306] (a) 使 APC 与本发明的肽接触;和

[0307] (b) 将编码本发明的肽的多核苷酸导入 APC 中。

[0308] 本发明的方法可以在体外、离体或体内实施。优选地,本发明的方法可以在体外或离体实施。用于诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 的 APC 可以优选地是表达 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原的 APC。这样的 APC 可以通过本领域公知的方法从获自 HLA 抗原为 HLA-A24 或 HLA-A2 的受试者的外周血单核细胞 (PBMC) 制备。通过本发明的方法诱导的 APC 可以在其表面中呈递本发明的肽与 HLA 抗原 (HLA-A24 或 HLA-A2 抗原) 的复合物的 APC。当将通过本发明的方法诱导的 APC 施用给受试者以在该受试者中诱导针对癌症的免疫应答时,该受试者优选是 APC 所来源的同一受试者。不过,受试者可以不同于 APC 供体,只要该受试者具有与 APC 供体相同的 HLA 类型即可。

[0309] 在另一个实施方案中,本发明提供用于在诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 中使用的作用剂或组合物,此类作用剂或组合物包括一种或多种本发明的肽或多核苷酸。

[0310] 在另一个实施方案中,本发明提供本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸在制备配制为用于诱导 APC 的作用剂或组合物中的用途。

[0311] 或者,本发明还提供本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸用于在诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 中使用。

[0312] (2) 诱导 CTL 的方法

[0313] 本发明还提供了使用本发明的肽、多核苷酸、或外来体或 APC 来诱导 CTL 的方法。

[0314] 本发明还提供了使用编码能形成 T 细胞受体 (TCR) 亚单位的多肽的多核苷酸来诱导 CTL 的方法,所述 TCR 亚单位识别本发明的肽与 HLA 抗原的复合物。优选地,所述诱导 CTL 的方法包括选自下组的至少一个步骤:

[0315] a) 使 CD8 阳性 T 细胞与抗原呈递细胞和 / 或外来体接触,所述抗原呈递细胞和外来体在其表面上呈递 HLA 抗原与本发明的肽之间形成的复合物;和

[0316] b) 向 CD8 阳性 T 细胞中导入编码能够形成 TCR 亚单位的多肽的多核苷酸, 所述 TCR 亚单位可识别 HLA 抗原与本发明的肽之间形成的复合物。

[0317] 当本发明的肽、多核苷酸、APC 或外来体被施用给受试者后, 受试者的身体中诱导出 CTL, 而且靶向表达 TTLL4 的癌细胞的免疫应答的强度增强。因此, 本发明的方法包括将本发明的肽、多核苷酸、APC 或外来体施用于受试者的步骤。

[0318] 或者, 也可通过离体或体内使用它们来诱导 CTL, 并且在诱导 CTL 后, 将活化的 CTL 返还给受试者。例如, 所述方法可包括下述步骤:

[0319] a: 自受试者收集 APC;

[0320] b: 用肽接触步骤 a 的 APC; 并

[0321] c: 将步骤 b 的 APC 与 CD8 阳性 T 细胞共培养。

[0322] 上文步骤 c 中要与 CD8 阳性 T 细胞共培养的 APC 也可通过将包括本发明多核苷酸的基因转移入 APC 来制备, 如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分所述, 但是本发明不限于此, 而且涵盖任何在其表面上有效呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的 APC。

[0323] 作为此类 APC 的取代, 也可使用在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的外来体。即, 本发明还可包括将在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的外来体与 CD8 阳性细胞共培养的步骤。此类外来体可通过上文“V. 外来体”部分中描述的方法来制备。

[0324] 另外, 可通过将包括编码能与本发明的肽结合的 TCR 亚单位的多核苷酸的基因导入 CD8 阳性细胞来诱导 CTL。此类转导可如上文“VIII. T 细胞受体 (TCR)”部分中所述来实施。

[0325] 本发明的方法可以在体外、离体或体内实施。优选地, 本发明的方法可以在体外或离体实施。用于诱导 CTL 的 CD8 阳性 T 细胞可以通过本领域公知的方法从获自的受试者的 PBMC 制备。在优选的实施方案中, CD8 阳性 T 细胞的供体可以是其 HLA 抗原为 HLA-A24 或 HLA-A2 抗原的受试者。通过本发明的方法诱导的 CTL 可以是识别在其表面上呈递本发明的肽与 HLA 抗原的复合物的细胞的 CTL。当将通过本发明的方法诱导的 CTL 施用给受试者以在该受试者中诱导针对癌症的免疫应答时, 该受试者优选是 CD8 阳性 T 细胞所来源的同一受试者。不过, 受试者可以不同于 CD8 阳性 T 细胞供体, 只要该受试者具有与 CD8 阳性 T 细胞供体相同的 HLA 类型即可。

[0326] 另外, 本发明提供了一种制造用于诱导 CTL 的药物组合物或药剂的方法或工艺, 其中该方法包括混合或配制本发明的肽与药学可接受的运载体的步骤。

[0327] 在另一个实施方案中, 本发明提供用于诱导 CTL 的作用剂或组合物, 其中所述作用剂或组合物包括本发明的一种或多种肽、一种或多种多核苷酸、或一种或多种 APC 或外来体。

[0328] 在另一个实施方案中, 本发明提供本发明的肽、多核苷酸、或 APC 或外来体在制备配制为用于诱导 CTL 的作用剂或组合物中的用途。

[0329] 或者, 本发明还提供本发明的肽、多核苷酸、或 APC 或外来体用于在诱导 CTL 中使用。

[0330] XI. 诱导免疫应答的方法

[0331] 此外, 本发明提供了诱导针对涉及 TTLL4 的疾病的免疫应答的方法。合适的疾病

包括癌症,其例子包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。

[0332] 本发明的方法可包括施用含有任何本发明肽或编码它们的多核苷酸的物质或组合物的步骤。本发明的方法还考虑施用呈递任何本发明肽的外来体或 APC。关于详情参见“IX. 药物组合物”项,特别是描述本发明的药物组合物作为疫苗的用途的部分。另外,可用于本发明诱导免疫应答的方法的外来体和 APC 详细描述于上文“V. 外来体”、“VI. 抗原呈递细胞 (APC)”和“X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL 的方法”的 (1) 和 (2) 部分。

[0333] 本发明还提供了一种制造用于诱导免疫应答的药物组合物或药物物质的方法或工艺,其中该方法可包括混合或配制本发明的肽与药学可接受的担载体的步骤。

[0334] 或者,本发明的方法可包括施用本发明的疫苗或药物组合物或药物物质的步骤,所述疫苗或药物组合物或药物物质包含:

[0335] (a) 本发明的肽;

[0336] (b) 处于可表达的形式编码如本文公开的此类肽的核酸;

[0337] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体;或

[0338] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0339] 在本发明的语境中,过表达 TTLL4 的癌症可用这些活性组分来治疗。所述癌症的例子包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。因而,在施用包括活性组分的疫苗或药物组合物或药物物质之前,优选确认要治疗的受试者中 TTLL4 表达水平是否提高了。因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于在有需要的患者中治疗(过)表达 TTLL4 的癌症的方法,该方法包括下述步骤:

[0340] i) 测定自具有要治疗的癌症的受试者获得的生物学样品中的 TTLL4 表达水平;

[0341] ii) 将 TTLL4 表达水平与正常对照比较;并

[0342] iii) 对具有与正常对照相比过表达 TTLL4 的癌症的受试者施用至少一种选自上文所述 (a) 至 (d) 的成分。

[0343] 或者,本发明提供包括至少一种选自上文所述 (a) 至 (d) 的成分的疫苗或药物组合物,用于对具有过表达 TTLL4 的癌症的受试者施用。换言之,本发明进一步提供了用于鉴定要用本发明 TTLL4 多肽来治疗的受试者的方法,所述方法包括测定源自受试者的生物学样品中的 TTLL4 表达水平的步骤,其中该水平与该基因的正常对照水平相比的升高指示该受试者可能具有可用本发明 TTLL4 多肽来治疗的癌症。本发明的治疗癌症的方法将在下面更加详细的加以叙述。

[0344] 任何源自受试者的细胞或组织均可用于测定 TTLL4 表达水平,只要其包括目标的 TTLL4 转录或翻译产物。合适样品的例子包括但不限于身体组织与体液,例如血液、痰与尿液。优选地,源自受试者的细胞或组织样品含有这样的细胞群体,该群体包括上皮细胞,更优选癌性上皮细胞或源自怀疑为癌性的组织的上皮细胞。进一步,如果必要,可从所得的身体组织与体液中纯化所述细胞,然后将其用作源自受试者的样品。

[0345] 需用本方法治疗的受试者优选为哺乳动物。例示性的哺乳动物包括但不限于例如人类、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马、和牛。

[0346] 根据本发明,可以测定在自受试者获得的生物学样品中 TTLL4 的表达水平。表达

水平可在转录（核酸）产物水平确定，使用本领域已知方法。举例而言，TTLL4 的 mRNA 可通过杂交方法（例如，Northern 杂交）使用探针定量。检测可在芯片或阵列上实施。对检测 TTLL4 的表达水平而言，可优选使用阵列。本领域技术人员可利用 TTLL4 的序列信息制备上述探针。举例而言，TTLL4 的 cDNA 可用作探针。如需要，所述探针可用合适的标记物来标记，例如染料、荧光物质和同位素，且所述基因的表达水平可以作为所杂交的标记物的强度检测。

[0347] 此外，TTLL4 的转录产物还可通过基于扩增的检测方法（例如，RT-PCR）使用引物定量。此类引物也可基于所述基因的可得序列信息制备。

[0348] 具体而言，本方法所用的探针或引物在严格条件、中等严格条件或低严格条件下与 TTLL4 的 mRNA 杂交。如本文中所使用的，短语“严格（杂交）条件”是指这样的条件，在该条件下，探针或引物将与其靶序列杂交，但不与其它序列杂交。严格条件是依赖于序列的，而且在不同的环境下会不同。较长序列的特异杂交与较短序列相比在较高温度下观察到。一般地，严格条件的温度选择比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的热熔点（ T_m ）低大约 5 摄氏度。 T_m 是（在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下）平衡状态下有 50% 的与其靶序列互补的探针与靶序列杂交的温度。因为靶序列一般过量存在，因此在 T_m ，平衡时 50% 的探针被占据。典型地，严格条件会是这样的：其中盐浓度小于大约 1.0M 钠离子，典型地大约 0.01–1.0M 钠离子（或其它盐），pH 7.0–8.3，温度对于较短的探针或引物（例如 10–50 个核苷酸）是至少大约 30 摄氏度，用于较长的探针或引物是至少大约 60 摄氏度。严格条件也可以通过添加去稳定物质，例如甲酰胺，来实现。

[0349] 本发明的探针或引物典型地是基本上纯化的寡核苷酸。寡核苷酸典型地包括这样的核苷酸序列区域，其在严格条件下与包括 TTLL4 序列的核酸的至少大约 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 或 25 个连续有义链核苷酸序列，或者包括 TTLL4 序列的核酸的反义链核苷酸序列，或者些序列的天然存在的突变体杂交。尤其是，例如，在优选的实施方案中，可以使用长度为 5–50 的寡核苷酸作为引物来扩增要检测的基因。更优选地，可以用特定大小，一般是长度 15–30b 的寡核苷酸探针或引物来检测 TTLL4 基因的 mRNA 或 cDNA。大小范围可以是至少 10 个核苷酸，至少 12 个核苷酸，至少 15 个核苷酸，至少 20 个核苷酸，至少 25 个核苷酸，至少 30 个核苷酸，且探针和引物的大小范围可为 5–10 个核苷酸，10–15 个核苷酸，15–20 个核苷酸，20–25 个核苷酸，和 25–30 个核苷酸。在优选的实施方案中，寡核苷酸探针或引物的长度可以从 15–25 中选择。使用此类寡核苷酸探针或引物检测基因的测定程序、装置或试剂是公知的（例如寡核苷酸微阵列或 PCR）。在这些测定中，探针或引物也可以包括标签或接头序列。此外，可以使用可检测的标记物或待捕捉的亲合配体来修饰探针或引物。或者，在基于杂交的检测程序中，也可以使用长度为数百个（例如约 100–200 个）碱基至数千个（例如约 1000–2000 个）碱基的多核苷酸用于探针（例如 Northern 印迹测定或 cDNA 微阵列分析）。

[0350] 或者，可以检测翻译产物以进行本发明的诊断。例如，可以确定 TTLL4 蛋白（SEQ ID NO:80）或其免疫学活性片段的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括免疫测定法，此类方法使用特异识别所述蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且，抗体的任何片段或修饰（例如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等）均可用于检测，只要该片段或经修饰抗体保留对 TTLL4 蛋白的结合能力即可。本发明也提供这样的针对本发明的肽的抗

体或其片段。制备这些类型的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的,并且在本发明中可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0351] 作为另一种基于 TTLL4 的翻译产物检测 TTLL4 基因的表达水平的方法,可利用针对 TTLL4 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析测量其染色的强度。意即,在这种测量中,强染色表明所述蛋白质存在 / 水平增加,且同时表明 TTLL4 基因的高表达水平。

[0352] 对于癌细胞中的靶基因(例如 TTLL4 基因),如果其较之靶基因的对照水平(例如正常细胞中的水平)增加了例如 10%, 25% 或 50% 的话,或增加到超过 1.1 倍,超过 1.5 倍,超过 2.0 倍,超过 5.0 倍,超过 10 倍或者更多,则可以认为其在癌细胞中的表达水平增加了。

[0353] 对照水平可以与癌细胞同时确定,使用先前从疾病状态(患癌或未患癌)已知的受试者 / 受试者们收集和保存的样品。另外,自具有要治疗的癌症的器官的非癌性区获得的正常细胞可用作正常对照。或者,对照水平可以借助统计方法,根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 TTLL4 基因表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以是来自先前测试过的细胞的表达模式数据库。而且,根据本发明的一个方面,可以将生物样品中 TTLL4 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用来自与源自受试者的样品的组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中 TTLL4 基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm 2S.D.$ 或平均值 $\pm 3S.D.$ 的范围可以用作标准值。

[0354] 在本发明的语境中,从已知非癌性的生物样品确定的对照水平称作“正常对照水平”。另一方面,如果对照水平从癌性生物样品确定,则会称作“癌性对照水平”。样品表达水平与对照水平间的差异可以相对已知表达水平不会随着细胞的癌或非癌状态改变的对照核酸(例如管家基因)的表达水平加以标准化。示例的对照基因包括,但不限于, β -肌动蛋白、甘油醛-3 磷酸脱氢酶和核糖体蛋白 P1。

[0355] 当 TTLL4 基因的表达水平相比正常表达水平有所提高,或与癌性对照水平相似 / 等同,则受试者可诊断为具有要治疗的癌症。

[0356] 本发明还提供了一种 (i) 诊断受试者是否疑似具有要治疗的癌症,和 / 或 (ii) 选择受试者进行癌症治疗的方法,该方法包括下述步骤:

[0357] a) 测定 TTLL4 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的生物学样品中的表达水平;

[0358] b) 将 TTLL4 的表达水平与正常对照水平比较;

[0359] c) 若 TTLL4 的表达水平与正常对照水平相比升高的话,将受试者诊断为具有要治疗的癌症;并

[0360] d) 若在步骤 c) 中受试者被诊断为具有要治疗的癌症的话,选择受试者进行癌症治疗。

[0361] 或者,此类方法可包括下述步骤:

[0362] a) 测定 TTLL4 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的生物学样品中的表达水平;

[0363] b) 将 TTLL4 的表达水平与癌性对照水平比较;

[0364] c) 若 TTLL4 的表达水平与癌性对照水平相似或等同的话,将受试者诊断为具有要治疗的癌症;并

[0365] d) 若在步骤 c) 中受试者被诊断为具有要治疗的癌症的话,选择受试者进行癌症治疗。

[0366] 本发明还提供了用于诊断或确定患有或疑似患有能用本发明的 TTLL4 多肽来治疗的癌症的受试者的诊断试剂盒,其亦可用于评价和 / 或监测癌症免疫疗法的功效或适用性。优选地,癌症包括,但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。更特别地,所述试剂盒优选可包含至少一种在源自受试者的细胞中检测 TTLL4 基因表达的试剂,所述试剂可选自下组:

[0367] (a) 用于检测 TTLL4 基因的 mRNA 的试剂;

[0368] (b) 用于检测 TTLL4 蛋白或其免疫学活性片段的试剂;和

[0369] (c) 用于检测 TTLL4 蛋白的生物学活性的试剂。

[0370] 适于检测 TTLL4 基因 mRNA 的试剂的例子可包括特异性结合或识别 TTLL4mRNA 的核酸,诸如具有与 TTLL4mRNA 的一部分互补的序列的寡核苷酸。这类寡核苷酸的例子有对 TTLL4mRNA 特异性的引物与探针。这类寡核苷酸可基于本领域众所周知的方法制备。如果需要,用于检测 TTLL4mRNA 的试剂可固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 TTLL4mRNA 的试剂。

[0371] 另一方面,适于检测 TTLL4 蛋白或其免疫学活性片段的试剂可包括针对 TTLL4 蛋白或其免疫学活性片段的抗体。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步,任何所述抗体的片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等)均可用作所述试剂,只要所述片段或经修饰抗体保留与 TTLL4 蛋白或其免疫学活性片段的结合能力。为检测蛋白制备此类抗体的方法在本领域是众所周知的,且可在本发明中使用任何方法制备上述抗体及其等价物。进一步,所述抗体可用能产生信号的分子通过直接连接或间接标记技术进行标记。标记物与标记抗体以及检测抗体与其靶的结合的方法在本领域是众所周知的,且本发明可使用任何标记物与方法。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种用于检测 TTLL4 蛋白的试剂。

[0372] 所述试剂盒可包含多于一种前述的试剂。所述试剂盒还可包含用于结合针对 TTLL4 基因的探针或者针对 TTLL4 肽的抗体的固体基质和试剂、用于培养细胞的培养基和容器、阳性和阴性对照试剂、和用于检测针对 TTLL4 肽的抗体的第二抗体。举例而言,从没有癌症或患有癌症的受试者获取的组织样品可用作有用的对照试剂。本发明的试剂盒可进一步包括其它从商业或用户角度而言期望的材料,包括缓冲液、稀释液、滤器、针头、注射器和带有使用说明书(例如,书面的、磁带、CD-ROM 等等)的装箱单。这些试剂之类的可标上标签包含在容器中。合适的容器包括瓶、管状瓶(vials)和试管。所述容器可用多种材料制造,例如玻璃或塑料。

[0373] 在本发明的一个实施方案中,当所述试剂是针对 TTLL4mRNA 的探针时,所述试剂可固定化于固体基质例如多孔条上,以形成至少一个检测位置。所述多孔条的测量或检测区域可包含多个位置,每个都包含核酸(探针)。测试条亦可包含阴性和 / 或阳性对照的位置。或者,对照位置可位于与测试条不同的条上。任选地,不同的检测位置可包含不同量的

固定化核酸,即,在第一个检测位置上量较大而在后面的位置上量较小。在加入测试样品之后,显示可检测信号位置的数目提供了在样品中存在的 TTLL4mRNA 量的定量指征。所述检测位置可设置成具有任何合适可检测的形状,通常是横跨测试条宽度的条状或点状。

[0374] 本发明所述试剂盒可进一步包括阳性对照样品或 TTLL4 标准样品。本发明的所述阳性对照样品可通过收集 TTLL4 阳性样品,随后测定其 TTLL4 水平来制备。或者,可将纯化的 TTLL4 蛋白或多核苷酸添加到不表达 TTLL4 的细胞中以形成所述阳性样品或 TTLL4 标准样品。在本发明中,纯化的 TTLL4 可以是重组蛋白。例如,阳性对照样品的 TTLL4 水平大于截留值。

[0375] 在一个实施方案中,本发明进一步提供了一种诊断试剂盒,其包括被本发明抗体特异性识别的蛋白或其部分蛋白或其免疫原性片段。

[0376] 本发明的蛋白的部分肽的例子包括由本发明蛋白的氨基酸序列中的至少 8 个、优选 15 个、和更优选 20 个连续氨基酸组成的多肽。癌症可通过使用本发明的蛋白或肽(多肽)检测样品(例如血液、组织)中的抗体来诊断。上文描述了用于制备本发明的肽或蛋白质的方法。

[0377] 本发明用于诊断癌症的方法可通过如上所述测定抗 TTLL4 抗体量和相应对照样品中的量之间的差异来进行。若受试者的细胞或组织含有针对该基因的表达产物(TTLL4)的抗体并且测得的抗 TTLL4 抗体的量大于截留值(与正常对照中的水平相比)的话,则该受试者怀疑患有癌症。

[0378] 在另一个实施方案中,本发明的诊断试剂盒可包括本发明的肽及与它结合的 HLA 分子。使用抗原性肽和 HLA 分子检测抗原特异性 CTL 的合适方法早已确立(例如 Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284):94-6)。因此,本发明肽和 HLA 分子形成的复合物可用于检测方法来检测肿瘤抗原特异性 CTL,由此能够较早检测癌症的复发和/或转移。进一步,它可用于选择适合包含本发明肽作为活性组分的药物的受试者或评估该药物的治疗效果。

[0379] 特别地,依照已知方法(参见例如 Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284):94-6),可制备放射性标记的 HLA 分子和本发明肽的寡聚物复合物,诸如四聚体。使用该复合物,可通过例如来对源自怀疑患有癌症的受试者的外周血淋巴细胞中的抗原-肽特异性 CTL 定量来进行诊断。

[0380] 本发明进一步提供了使用如本文所述的肽表位来评估受试者的免疫学应答的方法或诊断剂。在本发明的一个实施方案中,使用本文所述的 HLA-A24 或 HLA-A24 限制肽作为试剂来评估或预测受试者的免疫应答。要评估的免疫应答是通过在体外或在体内使免疫原接触免疫活性细胞来诱导的。在优选的实施方案中,用于评估免疫应答的免疫活性细胞可以选自外周血、外周血淋巴细胞(PBL)、和外周血单个核细胞(PBMC)。用于收集或分离此类免疫活性细胞的方法是本领域公知的。在一些实施方案中,任何可导致识别和结合肽表位的抗原特异性 CTL 的生成的作用剂均可用作所述试剂。肽试剂无需用作免疫原。用于此类分析的测定系统包括相对较新的技术发展,诸如四聚体、胞内淋巴因子染色和干扰素释放测定法、或 ELISPOT 测定法。在一个优选的实施方案中,要与肽试剂接触的免疫活性细胞可以是抗原呈递细胞,包括树突细胞。

[0381] 例如,本发明的肽可用于四聚体染色测定法,评估外周血单个核细胞在暴露于肿

瘤细胞抗原或免疫原后抗原特异性 CTL 的存在。HLA 四聚体复合物可用于直接显现抗原特异性 CTL (参见例如 Ogg et al., Science 279:2103-2106, 1998 ;和 Altman et al, Science 174:94-96, 1996) 和测定抗原特异性 CTL 群体在外周血单个核细胞样品中的频率。使用本发明肽的四聚体试剂可如下所述来生成。

[0382] 与 HLA 分子结合的肽在相应 HLA 重链和 β 2- 微球蛋白存在下重折叠以生成三分子复合物。在该复合物中,重链的羧基末端在先前工程化到蛋白质中的位点处被生物素化。然后,将链霉亲和素添加至复合物以形成由三分子复合物和链霉亲和素组成的四聚体。借助荧光标记的链霉亲和素,四聚体能用于对抗原特异性细胞染色。然后可鉴定细胞,例如通过流式细胞术。此类分析可用于诊断或预后目的。通过该规程鉴定的细胞也可用于治疗目的。

[0383] 本发明还提供了包括本发明肽的用于免疫回忆应答的试剂 (参见例如 Bertoni et al, J. Clin. Invest. 100:503-513, 1997 和 Penna et al., J Exp. Med. 174:1565-1570, 1991)。例如,使用特定肽对来自具有要治疗的癌症的个体的患者 PBMC 样品分析抗原特异性 CTL 的存在。含有单个核细胞的血液样品可如下评估:培养 PBMC,并用本发明的肽刺激该细胞。适宜培养时段后,可对扩增的细胞群体进行分析,例如分析 CTL 活性。

[0384] 肽还可作为试剂用于评估疫苗的功效。可使用例如上文所述方法来分析自疫苗接种免疫原的患者获得的 PBMC。测定患者的 HLA 型,并选择识别该患者中存在的等位基因特异性分子的肽表位试剂进行分析。疫苗的免疫原性可通过 PBMC 样品中表位特异性 CTL 的存在来指示。本发明的肽还可用于制备抗体,使用本领域公知技术 (参见例如 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY ;和 Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 其可作为试剂用于诊断或监测癌症。此类抗体可包括识别 HLA 分子背景中的肽的抗体,即结合肽-MHC 复合物的抗体。

[0385] 本发明的肽和组合物还具有多种其他应用,本文中描述了其中一些。例如,本发明提供了一种用于诊断或检测以 TTLL4 免疫原性多肽表达或呈递为特征的病症的方法。这些方法涉及测定 TTLL4 HLA 结合肽、或 TTLL4 HLA 结合肽与 I 类 HLA 分子形成的复合物在生物学样品中的表达。肽或肽和 I 类 HLA 分子形成的复合物的表达可通过用针对肽或复合物的结合配偶测定来测定或检测。在一个优选的实施方案中,针对肽或复合物的结合配偶是识别和特异性结合所述肽的抗体。TTLL4 在生物学样品诸如肿瘤活检中的表达也可使用 TTLL4 引物通过标准 PCR 扩增方案来测试。本文中呈递了肿瘤表达的一个例子,而且用于 TTLL4 扩增的例示性条件和引物的进一步公开内容可见于 W02003/27322。

[0386] 优选地,诊断方法涉及使自受试者分离的生物学样品接触对 TTLL4 HLA 结合肽特异性的作用剂以检测 TTLL4 HLA 结合肽在生物学样品中的存在。如本文中使用的,“接触”意味着在适宜条件 (例如浓度、温度、时间、离子强度) 下放置生物学样品使其足够接近所述作用剂,以容许作用剂和生物学样品中存在的 TTLL4 HLA 结合肽之间的特异性相互作用。一般地,作用剂接触生物学样品的条件是本领域普通技术人员知道的可促进生物学样品中分子与其关联物 (例如蛋白质与其受体关联物、抗体与其蛋白质抗原关联物、核酸与其互补序列关联物) 之间的特异性相互作用的条件下。用于促进分子与其关联物之间的特异性相

相互作用的例示性条件记载于授权给 Low 等人的美国专利 No. 5, 108, 921。

[0387] 本发明的诊断方法可以在体内和 / 或在体外实施。因而, 生物学样品在本发明中可位于体内或体外。例如, 生物学样品可以是体内组织, 而且可使用对 TTLL4 免疫原性多肽特异性的作用剂来检测此类分子在组织中的存在。或者, 可在体外收集或分离生物学样品 (例如血液样品、肿瘤活检、组织提取物)。在一个特别优选的实施方案中, 生物学样品可以是含有细胞的样品, 更优选自要诊断或治疗的受试者收集的含有肿瘤细胞的样品。

[0388] 或者, 诊断可使用容许通过对荧光素标记的 HLA 多聚体复合物染色而直接定量抗原特异性 T 细胞的方法来进行 (例如 Altman, J. D. et al., 1996, Science 274:94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330)。还提供了对胞内淋巴因子的染色和干扰素- γ 释放测定法或 ELISPOT 测定法。四聚体染色、胞内淋巴因子染色和 ELISPOT 测定法都表现出比更常规的测定法灵敏至少 10 倍 (Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8:177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186:859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8:413;)。也可使用五聚体 (例如 US 2004-209295A)、Dextramers (例如 WO 02/072631)、和 Streptamers (例如 Nature medicine 6.631-637 (2002))。

[0389] 例如, 在一些实施方案中, 本发明提供一种用于诊断或评价被施用了至少一种本发明的 TTLL4 肽的受试者的免疫应答的方法, 所述方法包括下述步骤:

[0390] (a) 在适合诱导对免疫原特异性的 CTL 的条件下使免疫原与具免疫活性细胞接触;

[0391] (b) 检测或测定步骤 (a) 中诱导的 CTL 的诱导水平; 和

[0392] (c) 将所述受试者的免疫应答与所述 CTL 诱导水平相关联。

[0393] 在本发明中, 免疫原是下述中至少一种: (a) 选自 SEQ ID NO:1、3-37 和 38-73 中的氨基酸序列的 TTLL4 肽, 具有所述氨基酸序列的肽, 和具有所述氨基酸序列中已经过 1 个、2 个或更多个氨基酸取代而修饰的氨基酸序列的肽。同时, 适合诱导免疫原特异性 CTL 的条件是本领域公知的。例如, 可以在体外在免疫原存在下培养具免疫活性细胞来诱导免疫原特异性 CTL。为了诱导免疫原特异性 CTL, 可以将任何刺激因子添加至细胞培养物。例如, IL-2 是用于 CTL 诱导的优选的刺激因子。

[0394] 在一些实施方案中, 对要用肽癌症疗法治疗的受试者的免疫应答的监测或评价步骤可以在治疗之前、之中和 / 或之后进行。一般而言, 在癌症治疗规程中, 反复地对要治疗的受试者施用免疫原性肽。例如, 可以每周施用免疫原性肽 3-10 周。相应地, 可以在整个癌症治疗程序中评价或监测受试者的免疫应答。或者, 评价或监测免疫应答的步骤可以在治疗程序完成时进行。

[0395] 根据本发明, 免疫原特异性 CTL 的诱导相对于对照增强, 表明要评价或诊断的受试者对已施用的免疫原免疫应答。用于评价免疫应答的合适的对照可包括, 例如, 具免疫活性细胞未接触肽时的 CTL 诱导水平, 或者与具有 TTLL4 肽之外的氨基酸序列 (例如随机氨基酸序列) 的对照肽接触时的 CTL 诱导水平。在一个优选的实施方案中, 以序列特异性的方式评价受试者的免疫应答, 方法是在施用给受试者的各种免疫原之间比较免疫应答。具体地, 即使当数种 TTLL4 肽的混合物被施用给受试者时, 免疫应答也会依赖于肽而改变。在这种情况下, 通过比较每种肽的免疫应答, 可以鉴定出受试者对其显示更高应答的肽。

[0396] XI. 抗体

[0397] 本发明进一步提供了与本发明的肽结合的抗体。优选的抗体特异性结合本发明的肽且不会结合（或会微弱结合）非本发明的肽。或者，抗体能结合本发明的肽及其同源物。针对本发明肽的抗体可用于癌症诊断和预后测定法、及成像方法学。类似地，此类抗体可用于其它癌症的治疗、诊断、和 / 或预后，只要癌症患者中也表达或过表达 TTLL4。此外，胞内表达的抗体（例如单链抗体）在治疗上可用于治疗涉及 TTLL4 表达的癌症，这样的癌症的例子包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。

[0398] 本发明还提供了多种免疫学测定法，用于检测和 / 或定量 TTLL4 蛋白 (SEQ ID NO:80) 或其片段，包括具有选自 SEQ ID NO:1、3-37 和 38-73 的氨基酸序列的多肽。此类测定法可根据需要包括一种或多种能够识别和结合 TTLL4 蛋白或其片段的抗 TTLL4 抗体。在本发明的语境中，与 TTLL4 多肽结合的抗 TTLL4 抗体优选识别由选自 SEQ ID NO:1、3-37 和 38-73 的氨基酸序列组成的多肽。抗体的结合特异性可用抑制测试来确认。即，当要分析的抗体与全长 TTLL4 多肽之间的结合在任何由选自 SEQ ID NO:1、3-37 和 38-73 的氨基酸序列组成的片段多肽存在下受到抑制时，显示此抗体特异性结合该片段。在本发明的语境中，此类免疫学测定法以本领域公知的各种免疫学测定形式实施，包括但不限于各种类型的放射免疫测定法、免疫层析技术、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、酶联免疫荧光测定法 (ELIFA)、等等。

[0399] 本发明的相关免疫学的但非抗体的测定法也包括 T 细胞免疫原性测定法（抑制性的或刺激性的）以及 MHC 结合测定法。另外，本发明考虑能够检测表达 TTLL4 的癌症的免疫学成像方法，其例子包括但不限于使用经标记的本发明抗体的放射闪烁成像方法。此类测定法在临床上可用于表达 TTLL4 的癌症的检测、监测、和预后，表达 TTLL4 的癌症的例子包括但不限于膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。

[0400] 本发明还提供了与本发明的肽结合的抗体。本发明的抗体可以以任何形式使用，例如单克隆或多克隆抗体，而且还可包括通过用本发明的肽免疫动物（诸如家兔）而获得的抗血清、所有种类的多克隆和单克隆抗体、及通过遗传重组生成的人抗体和人源化抗体。

[0401] 本发明的作为抗原用于获得抗体的肽可来源于任何动物物种，但优选来源于哺乳动物，诸如人、小鼠或大鼠，更优选来源于人。来源于人的肽可以由本文所公开的核苷酸或氨基酸序列获得。

[0402] 根据本发明，用作免疫抗原的肽可以是完整的蛋白质或蛋白质的部分肽。部分肽可以包含例如本发明肽的氨基 (N) 末端或羧基 (C) 末端片段。

[0403] 在本文中，抗体定义为能与 TTLL4 肽的全长或片段起反应的蛋白质。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体可识别具有选自 SEQ ID NO:1、3-37 和 38-73 的氨基酸序列的 TTLL4 的片段肽。用于合成寡肽的方法是本领域公知的。合成后，可任选在作为免疫原使用之前纯化肽。在本发明的语境中，寡肽（例如 9 或 10 聚物）可与担载体缀合或连接以增强免疫原性。匙孔虫血蓝蛋白 (KLH) 作为担载体是公知的。用于缀合 KLH 和肽的方法也是本领域公知的。

[0404] 或者，可以将编码本发明肽或其片段的基因插入已知的表达载体，然后用该载体转化本文所述宿主细胞。可以通过任何标准方法从宿主细胞外部或内部回收所需肽或其片

段,然后可将其用作抗原。或者,表达肽的完整细胞或其溶胞物或者化学合成的肽也可用作抗原。

[0405] 可以用抗原免疫任何哺乳动物,但优选考虑与用于细胞融合的亲本细胞的相容性。通常,可使用啮齿目(Rodentia)、兔形目(Lagomorpha)或灵长目(Primate)的动物。啮齿科动物包括例如小鼠、大鼠和仓鼠。兔形科动物包括例如家兔。灵长科动物包括例如狭鼻猿(Catarrhini)(东半球猴(old world monkey))诸如食蟹猴(Macaca fascicularis)、恒河猴(rhesus monkey)、狒狒(sacred baboon)和黑猩猩(chimpanzee)。

[0406] 用抗原免疫动物的方法是本领域已知的。腹膜内注射或皮下注射抗原是免疫哺乳动物的标准方法。更具体的说,可以在适量的磷酸盐缓冲盐水(PBS)、生理盐水等中稀释和悬浮抗原。如果需要,可将抗原悬浮液与适量的标准佐剂诸如弗氏(Freund)完全佐剂混合,制成乳状液,然后施用于哺乳动物。优选的是,其后每4-21天施用数次与适量弗氏不完全佐剂混合的抗原。还可使用适宜的担载体进行免疫。如上所述进行免疫后,可通过标准方法检验血清中所需抗体的量的增加。

[0407] 可以如下制备针对本发明肽的多克隆抗体:从经过免疫的哺乳动物(该哺乳动物经检验其血清中所需抗体增加)收集血液,并通过任何常规方法从血液中分离血清。多克隆抗体可包括含有多克隆抗体的血清,以及可以从所述血清中分离的、含有该多克隆抗体的级分。可以使用例如偶联有本发明肽的亲合柱从仅识别本发明肽的级分中制备免疫球蛋白G或M,并进一步使用蛋白A或蛋白G柱纯化该级分。

[0408] 为了制备单克隆抗体,从经过抗原免疫并如上所述检查出血清中所需抗体水平升高的哺乳动物收集免疫细胞,并进行细胞融合。用于细胞融合的免疫细胞可优选获自脾。其它要与上述免疫细胞融合的优选亲本细胞包括例如哺乳动物的骨髓瘤细胞,更优选具有为了用药物选择融合细胞而获得的特性的骨髓瘤细胞。

[0409] 可根据已知的方法,例如Milstein等(Galfre和Milstein,Methods Enzymol73:3-46(1981))的方法,将上述免疫细胞与骨髓瘤细胞进行融合。

[0410] 对于由细胞融合得到的杂交瘤,可在标准选择培养基诸如HAT培养基(含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基)中培养以进行选择。通常,细胞培养在HAT培养基中连续进行数天至数周,培养的时间足以使除了所需杂交瘤之外的所有其它细胞(非融合的细胞)死亡。然后,可进行标准有限稀释(standard limiting dilution)来筛选和克隆生成所需抗体的杂交瘤细胞。

[0411] 除了上述用抗原免疫非人动物来制备杂交瘤的方法外,还可以在体外用肽、表达肽的细胞或其溶胞物免疫人淋巴细胞,诸如那些感染了EB病毒的人淋巴细胞。然后,使经过免疫的淋巴细胞与能够无限分裂的源自人的骨髓瘤细胞诸如U266融合,以产生期望的生成能够与所述肽结合的人抗体的杂交瘤(已公开但未审查的日本专利申请No. Sho 63-17688)。

[0412] 随后将所得杂交瘤移植入小鼠腹腔,并抽取腹水。所得的单克隆抗体可通过例如硫酸铵沉淀、蛋白A或蛋白G柱、DEAE离子交换层析或偶联有本发明肽的亲合柱进行纯化。本发明的抗体不仅可用于纯化和检测本发明的肽,还可以用作本发明肽的激动剂和拮抗剂的候选物。

[0413] 或者,可以通过癌基因使生成抗体的免疫细胞(诸如经过免疫的淋巴细胞)永生

化,并用于制备单克隆抗体。

[0414] 如此获得的单克隆抗体也可以使用遗传工程技术来重组制备(参见例如 Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, 由 MacMillan Publishers LTD 在英国出版(1990))。例如,可以从生成抗体的免疫细胞诸如杂交瘤或经免疫淋巴细胞克隆编码抗体的 DNA,将该 DNA 插入合适的载体,并导入宿主细胞以制备重组抗体。本发明还提供如上所述制备的重组抗体。

[0415] 此外,本发明的抗体可以是抗体片段或经过修饰的抗体,只要它结合一种或多种本发明的肽。例如,抗体片段可以是 Fab、F(ab')₂、Fv 或将来自 H 链和 L 链的 Fv 片段通过合适的接头连接而成的单链 Fv(scFv) (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-83(1988))。更具体的说,可以通过用酶诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体来生成抗体片段。或者,可以构建编码抗体片段的基因,将其插入表达载体,并在合适的宿主细胞中表达(参见例如 Co et al., *J Immunol* 152:2968-76(1994); Better and Horwitz, *Methods Enzymol* 178:476-96(1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol* 178:497-515(1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121:652-63(1986); Rousseaux et al., *Methods Enzymol* 121:663-9(1986); Bird and Walker, *Trends Biotechnol* 9:132-7(1991))。

[0416] 抗体可以通过与多种分子诸如聚乙二醇(PEG)缀合来修饰。本发明提供了经过这样修饰的抗体。可通过化学修饰抗体来获得经过修饰的抗体。这些修饰方法是本领域常规的。

[0417] 或者,可以以源自非人抗体的可变区与源自人抗体的恒定区之间的嵌合抗体或者包含源自非人抗体的互补决定区(CDR)、源自人抗体的框架区(FR)及恒定区的人源化抗体的形式来获得本发明的抗体。此类抗体可依照已知技术来制备。人源化可通过用啮齿类的 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的相应序列来进行(参见例如 Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536(1988))。因而,此类人源化抗体是嵌合抗体,其中人可变域的一小部分已被来自非人物种的相应序列所取代。

[0418] 也可以使用完全的人抗体,这样的抗体除了人框架区和恒定区外还包含人可变区。此类抗体可使用本领域已知的多种技术来制备。例如,体外方法包括使用展示在噬菌体上的人抗体片段的重组文库(例如 Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991))。类似的,可通过将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物,例如内源免疫球蛋白基因部分或完全灭活的小鼠,来生成抗体。该方法记载于例如美国专利 Nos. 6,150,584; 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

[0419] 可以将如上获得的抗体纯化至同质。例如,可依照用于一般蛋白质的分离和纯化方法进行抗体的分离和纯化。例如,可以通过适当选择和组合使用柱层析诸如亲和层析、过滤、超滤、盐析、透析、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦来分出和分离抗体 (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)),但并不局限于此。蛋白 A 柱和蛋白 G 柱可以用作亲和柱。例示性的可使用的蛋白 A 柱包括例如 Hyper D、POROS 和 Sepharose F.F. (Pharmacia)。

[0420] 除亲和层析外的例示性层析包括例如离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤、反相层析、吸附层析、等等 (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A*

Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。可以通过液相层析来进行层析规程, 诸如 HPLC 和 FPLC。

[0421] 例如, 可使用吸光度测量、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、酶免疫测定法 (EIA)、放射免疫测定法 (RIA) 和 / 或免疫荧光来测量本发明抗体的抗原结合活性。在 ELISA 中, 将本发明的抗体固定化在板上, 将本发明的肽施加到该板上, 再施加含有所需抗体的样品, 诸如生成抗体的细胞的培养物上清液或纯化的抗体。然后施加用酶 (诸如碱性磷酸酶) 标记的、识别第一抗体的第二抗体, 并将板温育。接着, 在洗涤后, 向板中加入酶底物, 诸如磷酸对硝基苯酯, 并测量吸光度以评估样品的抗原结合活性。可以使用肽的片段, 诸如 C- 末端或 N- 末端片段作为抗原来评估抗体的结合活性。可以使用 BIAcore (Pharmacia) 来评估本发明抗体的活性。

[0422] 上述方法允许通过将本发明的抗体暴露于假定含有本发明肽的样品, 并检测或测量由抗体与肽形成的免疫复合物, 来检测或测量本发明的肽。

[0423] 因为依照本发明的肽检测或测量方法可特异性的检测或测量肽, 所以该方法可用于使用肽的各种实验。

[0424] XII. 载体和宿主细胞

[0425] 本发明还提供了导入有编码本发明肽的核苷酸的载体和宿主细胞。本发明的载体可用于在宿主细胞中维持本发明的核苷酸、尤其是 DNA, 用于表达本发明的肽, 或者用于施用本发明的核苷酸以用于基因疗法。

[0426] 当宿主细胞为大肠杆菌且在大肠杆菌 (例如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue) 中大量扩增和生成载体时, 载体应具有能在大肠杆菌中扩增的“(复制) 起点”和用于选择经过转化的大肠杆菌的标志基因 (例如通过药物诸如氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素等进行选择的药物抗性基因)。例如, 可以使用 M13 系列载体、pUC 系列载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。另外, 与上述载体一样, pGEM-T、pDIRECT 和 pT7 也可以用于亚克隆和提取 cDNA。当使用载体来生成本发明的蛋白质时, 表达载体是有用的。例如, 要在大肠杆菌中表达的表达载体应具备上述在大肠杆菌中扩增的特征。当使用大肠杆菌诸如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue 作为宿主细胞时, 载体应具有能在大肠杆菌中高效表达所需基因的启动子, 例如 lacZ 启动子 (Ward et al., Nature 341:544-6 (1989); FASEB J 6:2422-7 (1992))、araB 启动子 (Better et al., Science 240:1041-3 (1988))、T7 启动子等。在这方面, 可以使用例如 pGEX-5X-1 (Pharmacia)、“QIAexpress 系统” (Qiagen)、pEGFP 和 pET (在这种情况下, 宿主优选为表达 T7RNA 聚合酶的 BL21) 来取代上述载体。另外, 载体还可以包含用于肽分泌的信号序列。指导肽分泌至大肠杆菌周质的例示性信号序列有 pelB 信号序列 (Lei et al., J Bacteriol 169:4379 (1987))。用于将载体导入靶宿主细胞的手段包括例如氯化钙法和电穿孔法。

[0427] 除了大肠杆菌外, 还可以使用例如源自哺乳动物的表达载体 (例如 pcDNA3 (Invitrogen) 和 pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18 (17):5322 (1990))、pEF、pCDM8)、源自昆虫细胞的表达载体 (例如 “Bac-to-BAC 杆状病毒表达系统” (GIBCO BRL)、pBacPAK8)、源自植物的表达载体 (例如 pMH1、pMH2)、源自动物病毒的表达载体 (例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、源自逆转录病毒的表达载体 (例如 pZIpneo)、源自酵母的表达载体 (例如 “毕赤酵母表达试剂盒” (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01) 及源自枯草芽孢杆菌的表达

载体（例如 pPL608、pKTH50）来生成本发明的多肽。

[0428] 为了在动物细胞诸如 CHO、COS 或 NIH3T3 细胞中表达载体，载体应具有在所述细胞中进行表达所必需的启动子，例如 SV40 启动子 (Mulligan et al., Nature 277:108(1979))、MLLV-LTR 启动子、EF1 α 启动子 (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18:5322(1990))、CMV 启动子、等等，及优选用于选择转化子的标志基因（例如通过药物（例如新霉素、G418）进行选择的药物抗性基因）。具有这些特征的已知载体的例子包括例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 和 pOP13。

[0429] 虽然与本文中描述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明的实施或测试，但还是描述了合适的方法和材料。本文通过提述并入本文中提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献的全部内容。在有冲突时，以本说明书包括定义为准。此外，材料、方法和实施例仅为例示而不意在限定。

实施例

[0430] 实验 1

[0431] 材料和方法

[0432] 细胞系

[0433] HLA-A*2402 阳性 B- 淋巴母细胞样细胞系 TISI 购自 IHWG Cell and Gene Bank (Seattle WA)。非洲绿猴肾细胞系 COS7 购自 ATCC。

[0434] 源自 TTLL4 的肽的候选者选择

[0435] 使用 “NetMHC3.0” 结合预测服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004)) 预测了源自 TTLL4 的结合 HLA-A*2402 分子的 9 聚体和 10 聚体肽。这些肽由 Biosynthesis (Lewisville, Texas) 根据标准固相合成法合成，并通过反相高效液相色谱 (HPLC) 纯化。分别通过分析型 HPLC 和质谱分析来确定肽的纯度 (>90%) 和身份。将肽以 20mg/ml 溶解在二甲基亚砜中并保存于 -80°C。

[0436] 体外 CTL 诱导

[0437] 使用单核细胞衍生的树突细胞 (DC) 作为抗原呈递细胞来诱导针对呈递在人白细胞抗原 (HLA) 上的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。如他处所述 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63(14):4112-8) 体外制备 DC。具体地说，对于用 Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液从正常志愿者 (HLA-A*2402 阳性) 分离的外周血单个核细胞，通过粘附塑料组织培养盘 (Becton Dickinson) 加以分离，以将它们作为单核细胞级分加以富集。将富集了单核细胞的群体在含 2% 热灭活的自体血清 (AS) 的 AIM-V 培养基 (Invitrogen) 中，在 1000U/ml 的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (R&D System) 和 1000U/ml 白介素 (IL)-4 (R&D System) 的存在下培养。培养 7 天后，将经细胞因子诱导的 DC 在 AIM-V 培养基中在 3 微克 /ml β 2- 微球蛋白存在下用 20 微克 /ml 每一种合成肽于 37°C 冲激 3 小时。所生成的细胞表现上在它们的细胞表面上表达 DC 相关分子，诸如 CD80、CD83、CD86 和 HLA II 类（数据未显示）。然后将这些经肽冲激的 DC 用 X 辐照 (20Gy) 灭活，并以 1:20 比例与用 CD8 阳性分离试剂盒 (Dyna1) 通过正选择获得的自体 CD8+T 细胞混合。在 48

孔板 (Corning) 中设立这些培养物;每个孔在 0.5ml AIM-V/2% AS 培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的 DC、 3×10^5 个 CD8+T 细胞和 10ng/ml IL-7 (R&D System)。3 天后,给这些培养物补充 IL-2 (CHIRON) 至终浓度 20IU/ml。在第 7 天和第 14 天,将 T 细胞用经肽冲激的自体 DC 进一步刺激。每次通过与上文所述相同的方式来制备 DC。在第 21 天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的 TISI 细胞的 CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1):94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

[0438] CTL 扩增规程

[0439] 使用与 Riddell 等人 (Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16):1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2):216-23) 记载的方法相似的方法在培养中扩增 CTL。将总共 5×10^4 个 CTL 在 25ml AIM-V/5% AS 培养基中悬浮,其中有在 40ng/ml 抗 CD3 单克隆抗体 (Pharmingen) 存在下经丝裂霉素 C 灭活的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系。启动培养后一天,向培养物添加 120IU/ml IL-2。在第 5 天、第 8 天和第 11 天给培养物补加新鲜的含有 30IU/ml IL-2 的 AIM-V/5% AS 培养基 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1):94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

[0440] CTL 克隆的建立

[0441] 在 96 圆底微量滴定板 (Nalge Nunc International) 中进行稀释以获得 0.3、1 和 3 个 CTL/ 孔。在总共 150 微升 / 孔的含 5% AS 的 AIM-V 培养基中,将 CTL 与 1×10^4 个细胞 / 孔的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml 的抗 CD3 抗体,和 125U/ml 的 IL-2 一起培养。10 天后向培养基中加入 50 微升 / 孔的 IL-2 以达到终浓度 125U/ml 的 IL-2。在第 14 天测试 CTL 活性,并使用如上所述的相同方法扩增 CTL 克隆 (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

[0442] 特异性 CTL 活性

[0443] 为了检查特异性 CTL 活性,实施了干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定法和 IFN- γ 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。具体而言,制备经肽冲激的 TISI (1×10^4 / 孔) 作为刺激细胞。使用 48 孔中培养的培养细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施 IFN- γ ELISPOT 测定法和 IFN- γ ELISA 测定法。

[0444] 强迫表达靶基因和 / 或 HLA-A24 的细胞的建立

[0445] 通过 PCR 来扩增编码靶基因可读框或 HLA-A*2402 的 cDNA。将 PCR 扩增产物克隆入载体。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照制造商推荐的规程将质粒转染入 COS7 (靶基因和 HLA-A*2402 阴性的细胞系)。自转染起 2 天后,用 Versene (Invitrogen) 收获经转染的细胞,并用作 CTL 活性测定法的靶细胞 (5×10^4 个细胞 / 孔)。

[0446] 结果

[0447] 源自 TTLL4 的 HLA-A24 结合肽的预测

[0448] 表 1a 和 1b 以高结合亲和力的顺序显示了 TTLL4 的 HLA-A24 结合性 9 聚体和 10

聚体肽。选择并检查了总共 37 种具有潜在 HLA-A2 结合能力的肽,以确定表位肽。

[0449] 表 1a

[0450] 源自 TTLL4 的 HLA-A24 结合性 9 聚体肽

[0451]

起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)	SEQ ID NO
750	RYLHKPYLI	5	1
579	LFPNVPPTI	21	2
994	FYASVLDVL	24	3
769	VYVTSYDPL	37	4
755	PYLISGSKF	43	5
79	AYFFCPSTL	54	6
684	RFGKKEFSF	68	7
689	EFSFPQSF	77	8
779	IYLFSDGLV	119	9
304	WYNRRNLAM	229	10
793	KYSPSMKSL	284	11
691	SFFPQSFIL	325	12
41	VWPQAHQQV	387	13
1086	VWSLPTSLL	399	14
1186	TFQSISDSL	473	15
103	CYLHSLPDL	492	16
362	SFLNPSFQW	754	17
1037	RFFEQPRYF	800	18
773	SYDPLRIYL	1501	19

[0452] 表 1b

[0453] 源自 TTLL4 的 HLA-A24 结合性 10 聚体肽

[0454]

起始位置	氨基酸序列	Kd(nM)	SEQ ID NO
103	CYLHSLPDLF	11	20
773	SYDPLRIYLF	21	21
883	PYSHELFGF	47	22
127	PYQQLESFCL	67	23
684	RFGKKEFSFF	70	24
1043	RYFNILTTQW	148	25
223	MWPNSTPVPL	181	26
122	SYRQKPYYQL	210	27
1186	TFQSISDSLL	323	28
1022	QFERIFPSHI	561	29
689	EFSFFPQSFI	584	30
804	KFMHLTNYSV	836	31
994	FYASVLDVLT	860	32
993	DFYASVLDVL	3998	33
1105	AFSKSETSKL	5879	34
696	SFILPQDAKL	7815	35
665	SFQIGRKDRL	18177	36
891	GFDIMLDENL	24816	37

[0455] 起始位置表示自 TTLL4 的 N 末端起的氨基酸残基数。

[0456] 解离常数 [Kd(nM)] 由“NetMHC3.0”得出。

[0457] 使用预测的来自 TTLL4 的 HLA-A*2402 限制型肽诱导 CTL

[0458] 使用“材料和方法”中描述的规程制备了针对源自 TTLL4 的肽的 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法测定了肽特异性 CTL 活性 (图 1a-1)。显示用 TTLL4-A24-9-750 (SEQ ID NO:1) (a) 刺激的 7 号孔, 用 TTLL4-A24-9-79 (SEQ ID NO:6) (b) 刺激的 8 号孔、用 TTLL4-A24-9-793 (SEQ ID NO:11) (c) 刺激的 8 号孔、用 TTLL4-A24-9-691 (SEQ ID NO:12) (d) 刺激的 5 号孔、用 TTLL4-A24-9-103 (SEQ ID NO:16) (e) 刺激的 1 号孔、用

TTLL4-A24-10-103(SEQ ID NO:20) (f) 刺激的 3 号孔、用 TTLL4-A24-10-773(SEQ ID NO:21) (g) 刺激的 3 号孔、用 TTLL4-A24-10-883(SEQ ID NO:22) (h) 刺激的 8 号孔、用 TTLL4-A24-10-1186(SEQ ID NO:28) (i) 刺激的 2 号孔、用 TTLL4-A24-10-1022(SEQ ID NO:29) (j) 刺激的 3 号孔、用 TTLL4-A24-10-994(SEQ ID NO:32) (k) 刺激的 1 号孔,和用 TTLL4-A24-10-891(SEQ ID NO:37) (l) 刺激的 6 号孔中的 CTL 分别与对照相比显示了强的 IFN- γ 生成。另一方面,用表 1a 和 1b 所示的其他肽刺激没有检测到特异性 CTL 活性,尽管那些肽具有可能的 HLA-A*2402 结合活性。作为典型的阴性数据的例子,没有观察到来自用 TTLL4-A24-9-579(SEQ ID NO:2) (m) 刺激的 CTL 的特异性 IFN- γ 生成。结果,表明 12 种衍生自 TTLL4 的肽作为能够诱导强的 CTL 的肽被筛选出来。

[0459] 针对源自 TTLL4 的肽的特异性 CTL 系和克隆的建立

[0460] 对于使用 TTLL4-A24-9-750(SEQ ID NO:1) (a) 的 7 号孔、使用 TTLL4-A24-9-79(SEQ ID NO:6) (b) 的 8 号孔、使用 TTLL4-A24-9-691(SEQ ID NO:12) (c) 的 5 号孔、使用 TTLL4-A24-9-103(SEQ ID NO:16) (d) 的 1 号孔、使用 TTLL4-A24-10-103(SEQ ID NO:20) (e) 的 3 号孔和使用 TTLL4-A24-10-773(SEQ ID NO:21) (f) 的 3 号孔中通过 IFN- γ ELISPOT 测定法检测显示出肽特异性 CTL 活性的细胞进行扩增,并如上文“材料和方法”一节中所述建立 CTL 系。通过 IFN- γ ELISA 测定法测定这些 CTL 系的 CTL 活性(图 2a-f)。与未经肽刺激的靶细胞相比,所有 CTL 系针对经相应肽刺激的靶细胞均展现出强的 IFN- γ 生成。此外,如“材料和方法”中所述从 CTL 系通过有限稀释建立 CTL 克隆,并通过 IFN- γ ELISA 测定法测定这些 CTL 克隆针对用肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。从用 TTLL4-A24-9-750(SEQ ID NO:1) (a), TTLL4-A24-9-79(SEQ ID NO:6) (b), TTLL4-A24-10-103(SEQ ID NO:20) (c) 和 TTLL4-A24-10-773(SEQ ID NO:21) (d) 刺激的 CTL 克隆测得了强的 IFN- γ 生成(图 3a-d)。

[0461] 针对表达 TTLL4 和 HLA-A*2402 的靶细胞的特异性 CTL 活性

[0462] 针对对每种肽产生的建成 CTL 系和克隆,检查它们识别表达 TTLL4 和 HLA-A*2402 分子的靶细胞的能力。使用用相应肽产生的 CTL 系和克隆作为刺激细胞,测试了针对用全长 TTLL4 和 HLA-A*2402 基因同时转染的 COS7 细胞(内源表达 TTLL4 和 HLA-A*2402 基因的应答细胞的一种特异性模型)的特异性 CTL 活性。制备了用全长 TTLL4 或 HLA-A*2402 转染的 COS7 细胞作为对照。在图 4 中,经 TTLL4-A24-9-103(SEQ ID NO:16) (a) 刺激的 CTL 系和经 TTLL4-A24-10-103(SEQ ID NO:20) (b) 和 TTLL4-A24-10-773(SEQ ID NO:21) (c) 刺激的 CTL 克隆针对表达 TTLL4 和 HLA-A*2402 二者的 COS7 细胞显示出强的 CTL 活性。另一方面,没有检测到显著的针对对照的特异性 CTL 活性。因此,这些数据清楚地证明 TTLL4-A24-9-103(SEQ ID NO:16) (a), TTLL4-A24-10-103(SEQ ID NO:20) (b) 和 TTLL4-A24-10-773(SEQ ID NO:21) (c) 的肽被内源地加工并与 HLA-A*2402 分子一起被呈递在靶细胞上,并被 CTL 识别。这些结果表明这些从 TTLL4 衍生的肽可适合作为癌症疫苗用于治疗具有表达 TTLL4 的肿瘤的患者。

[0463] 对抗原肽的同源性分析

[0464] 经 TTLL4-A24-9-750(SEQ ID NO:1), TTLL4-A24-9-79(SEQ ID NO:6), TTLL4-A24-9-793(SEQ ID NO:11), TTLL4-A24-9-691(SEQ ID NO:12), TTLL4-A24-9-103(SEQ ID NO:16), TTLL4-A24-10-103(SEQ ID

NO:20), TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21), TTLL4-A24-10-883 (SEQ ID NO:22), TTLL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO:28), TTLL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO:29), TTLL4-A24-10-994 (SEQ ID NO:32) 和 TTLL4-A24-10-891 (SEQ ID NO:37) 刺激的 CTL 显示出显著的且特异的 CTL 活性。这个结果可能是由于 TTLL4-A24-9-750 (SEQ ID NO:1), TTLL4-A24-9-79 (SEQ ID NO:6), TTLL4-A24-9-793 (SEQ ID NO:11), TTLL4-A24-9-691 (SEQ ID NO:12), TTLL4-A24-9-103 (SEQ ID NO:16), TTLL4-A24-10-103 (SEQ ID NO:20), TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21), TTLL4-A24-10-883 (SEQ ID NO:22), TTLL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO:28), TTLL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO:29), TTLL4-A24-10-994 (SEQ ID NO:32) 和 TTLL4-A24-10-891 (SEQ ID NO:37) 的序列与其它已知可使人免疫系统致敏的分子衍生的肽同源。为了排除这种可能性,使用 BLAST 算法 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) 使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有发现具有显著同源性的序列。同源性分析的结果指示 TTLL4-A24-9-750 (SEQ ID NO:1), TTLL4-A24-9-79 (SEQ ID NO:6), TTLL4-A24-9-793 (SEQ ID NO:11), TTLL4-A24-9-691 (SEQ ID NO:12), TTLL4-A24-9-103 (SEQ ID NO:16), TTLL4-A24-10-103 (SEQ ID NO:20), TTLL4-A24-10-773 (SEQ ID NO:21), TTLL4-A24-10-883 (SEQ ID NO:22), TTLL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO:28), TTLL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO:29), TTLL4-A24-10-994 (SEQ ID NO:32) 和 TTLL4-A24-10-891 (SEQ ID NO:37) 的序列是独特的,因此,就我们所知,这些分子产生对一些无关分子的不期望的免疫学应答的可能性很小。

[0465] 总之,鉴定了新的源自 TTLL4 的 HLA-A*2402 表位肽,并证明了它们适用于癌症免疫治疗。

[0466] 实验 2

[0467] 材料和方法

[0468] 细胞系

[0469] HLA-A*0201 阳性 B- 淋巴母细胞样细胞系 T2 (HLA-A2) 和非洲绿猴肾细胞系 COS7 购自 ATCC。

[0470] 源自 TTLL4 的肽的候选者选择

[0471] 使用“NetMHC 3.0”结合预测服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004)) 预测了源自 TTLL4 的结合 HLA-A*0201 分子的 9 聚体和 10 聚体肽。这些肽由 BioSynthesis (Lewisville, Texas) 根据标准固相合成法合成,并通过反相高效液相色谱 (HPLC) 纯化。分别通过分析型 HPLC 和质谱分析来确定肽的纯度 (>90%) 和身份。将肽以 20mg/ml 溶解在二甲基亚砜 (DMSO) 中并保存于 -80℃。

[0472] 体外 CTL 诱导

[0473] 使用单核细胞衍生的树突细胞 (DC) 作为抗原呈递细胞来诱导针对呈递在人白细胞抗原 (HLA) 上的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。如他处所述 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63(14):4112-8) 体外制备 DC。具体地说,对于用

Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液从正常志愿者 (HLA-A*0201 阳性) 分离的外周血单个核细胞, 通过粘附塑料组织培养盘 (Becton Dickinson) 加以分离, 以将它们作为单核细胞级分加以富集。将富集了单核细胞的群体在含 2% 热灭活的自体血清 (AS) 的 AIM-V 培养基 (Invitrogen) 中, 在 1000U/ml 的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (R&D System) 和 1000U/ml 白介素 (IL)-4 (R&D System) 的存在下培养。培养 7 天后, 将经细胞因子诱导的 DC 在 AIM-V 培养基中在 3 微克 /ml β 2- 微球蛋白存在下用 20 微克 /ml 每一种合成肽于 37℃ 冲激 3 小时。所生成的细胞表现上在它们的细胞表面上表达 DC 相关分子, 诸如 CD80、CD83、CD86 和 HLA II 类 (数据未显示)。然后将这些经肽冲激的 DC 用 X 辐照 (20Gy) 灭活, 并以 1:20 比例与用 CD8 阳性分离试剂盒 (Dynal) 通过正选择获得的自体 CD8+T 细胞混合。在 48 孔板 (Corning) 中设立这些培养物; 每个孔在 0.5ml AIM-V/2% AS 培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的 DC、 3×10^5 个 CD8+T 细胞和 10ng/ml IL-7 (R&D System)。3 天后, 给这些培养物补充 IL-2 (CHIRON) 至终浓度 20IU/ml。在第 7 天和第 14 天, 将 T 细胞用经肽冲激的自体 DC 进一步刺激。每次通过与上文所述相同的方式来制备 DC。在第 21 天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的 T2 细胞的 CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1):94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

[0474] CTL 扩增规程

[0475] 使用与 Riddell 等人 (Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16):1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2):216-23) 记载的方法相似的方法在培养中扩增 CTL。将总共 5×10^4 个 CTL 在 25ml AIM-V/5% AS 培养基中悬浮, 其中有在 40ng/ml 抗 CD3 单克隆抗体 (Pharmingen) 存在下经丝裂霉素 C 灭活的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系。启动培养后一天, 向培养物添加 120IU/ml IL-2。在第 5 天、第 8 天和第 11 天给培养物补加新鲜的含有 30IU/ml IL-2 的 AIM-V/5% AS 培养基 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1):94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

[0476] CTL 克隆的建立

[0477] 在 96 圆底微量滴定板 (Nalge Nunc International) 中进行稀释以获得 0.3、1 和 3 个 CTL/ 孔。在总共 150 微升 / 孔的含 5% AS 的 AIM-V 培养基中, 将 CTL 与 1×10^4 个细胞 / 孔的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml 的抗 CD3 抗体, 和 125U/ml 的 IL-2 一起培养。10 天后向培养基中加入 50 微升 / 孔的 IL-2 以达到终浓度 125U/ml 的 IL-2。在第 14 天测试 CTL 活性, 并使用如上所述的相同方法扩增 CTL 克隆 (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

[0478] 特异性 CTL 活性

[0479] 为了检查特异性 CTL 活性, 实施了干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定法和 IFN- γ 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。具体而言, 制备经肽冲激的 T2 (1×10^4 / 孔) 作为刺激细胞。使用 48 孔中培养的培养细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施 IFN- γ ELISPOT

测定法和 IFN- γ ELISA 测定法。

[0480] 强迫表达靶基因和 / 或 HLA-A*02 的细胞的建立

[0481] 通过 PCR 来扩增编码靶基因可读框或 HLA-A*0201 的 cDNA。将 PCR 扩增产物克隆入载体。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照制造商推荐的规程将质粒转染入 COS7 (靶基因和 HLA-A*0201 阴性的细胞系)。自转染起 2 天后,用 Versene (Invitrogen) 收获经转染的细胞,并用作 CTL 活性测定法的靶细胞 (5×10^4 个细胞 / 孔)。

[0482] 结果

[0483] 源自 TTLL4 的 HLA-A02 结合肽的预测

[0484] 表 2a 和 2b 以高结合亲和力的顺序显示了 TTLL4 的 HLA-A02 结合性 9 聚体和 10 聚体肽。选择并检查了总共 41 种具有潜在 HLA-A02 结合能力的肽,以确定表位肽。

[0485] 表 2a

[0486] 源自 TTLL4 的 HLA-A02 结合性 9 聚体肽

[0487]

起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)	SEQ ID NO
222	FMWPNSTPV	2	38
805	FMHLTNYSV	6	39
610	KMSTVTPNI	7	40
1163	SLSTQTLPV	10	41
575	LIYSLFPNV	15	42
1189	SISDSLLAV	16	43
66	GLGPGLLG	32	44
864	TIISSEPYV	37	45
899	NLKPWLEV	48	46
147	SLPQKSLPV	49	47
578	SLFPNVPPT	51	48
697	FILPQDAKL	52	49
1088	SLPTSLLTI	70	50
988	KIPDQDFYA	79	51
423	LLASHASGL	163	52

852	SIWEKIKDV	200	53
128	YQQLSFCL	265	54
107	SLPDLFNST	278	55
605	KLLRWKMST	325	56
356	CQLEQSSFL	1503	57

[0488] 表 2b

[0489] 源自 TTL4 的 HLA-A02 结合性 10 聚体肽

[0490]

起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)	SEQ ID NO
363	FLNPSFQWNV	3	58
574	ALIYSLFPNV	4	59
895	MLDENLKPWV	10	60
605	KLLRWKMSTV	16	61
578	SLFPNVPTI	19	62
756	YLISGSKFDL	37	63
550	AMISRSCMEI	39	64
610	KMSTVTPNIV	42	65
107	SLPDLFNSTL	46	66
933	NLAGFVLPNA	56	67
1163	SLSTQTLPIVI	59	68
871	YVTSLLKMYV	94	69
863	KTIISSEPYV	118	70
852	SIWEKIKDVV	150	71
62	TLSAGLGPGI	188	72
804	KFMHLTNYSV	192	73

70	GLLGVPQPA	230	74
1092	SLLTISKDDV	292	75
1113	KLKGQSSCEV	324	76
778	RIYLFSDGLV	358	77
86	TLCSSGTTAV	421	78

[0491] 起始位置表示自 TTLL4 的 N 末端起的氨基酸残基数。

[0492] 解离常数 [Kd(nM)] 由“NetMHC3.0”得出。

[0493] 使用预测的来自 TTLL4 的 HLA-A*0201 限制型肽诱导 CTL

[0494] 使用“材料和方法”中描述的规程制备了针对源自 TTLL4 的肽的 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法测定了肽特异性 CTL 活性 (图 5a-d)。使用 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38) (a) 的 3 号孔、使用 TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (b) 的 7 号孔、使用 TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) (c) 的 8 号孔和使用 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) (d) 的 7 号孔与对照孔相比显示了强的 IFN- γ 生成。另一方面,用表 2a 和 2b 所示的其他肽刺激没有检测到特异性 CTL 活性,尽管那些肽具有可能的 HLA-A*0201 结合活性。这些结果表明 4 种衍生自 TTLL4 的肽作为能够诱导强的 CTL 的肽被筛选出来。

[0495] 针对源自 TTLL4 的肽的特异性 CTL 系和克隆的建立

[0496] 对于使用 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38) (a) 的 3 号孔、TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (b) 的 7 号孔、TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) (c) 的 8 号孔、和 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) (d) 的 7 号孔中通过 IFN- γ ELISPOT 测定法检测显示出肽特异性 CTL 活性的细胞进行扩增,并如上文“材料和方法”一节中所述建立 CTL 系。通过 IFN- γ ELISA 测定法测定该 CTL 系的 CTL 活性 (图 6a-d)。与未经肽刺激的靶细胞相比,所有 CTL 系针对经相应肽刺激的靶细胞均展现出强的 IFN- γ 生成。此外,如“材料和方法”中所述从 CTL 系通过有限稀释建立 CTL 克隆,并通过 IFN- γ ELISA 测定法测定这些 CTL 克隆针对用肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。从 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38) (a), TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (b) 和 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) (c) 刺激的 CTL 克隆测得了强的 IFN- γ 生成 (图 7a-c)。

[0497] 针对表达 TTLL4 和 HLA-A*0201 的靶细胞的特异性 CTL 活性

[0498] 对针对每种肽产生的建成 CTL 系和克隆,检查它们识别表达 TTLL4 和 HLA-A*0201 分子的靶细胞的能力。使用用相应肽产生的 CTL 系和克隆作为刺激细胞,测试了针对用全长 TTLL4 和 HLA-A*0201 基因同时转染的 COS7 细胞 (表达 TTLL4 和 HLA-A*0201 基因的应答细胞的一种特异性模型) 的特异性 CTL 活性。制备了用全长 TTLL4 基因或 HLA-A*0201 转染的 COS7 细胞作为对照。在图 8 中,经 TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (a) 刺激的 CTL 克隆和 TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) (b) 刺激的 CTL 系针对表达 TTLL4 和 HLA-A*0201 二者的 COS7 细胞显示出强的 CTL 活性。另一方面,没有检测到显著的针对对照的特异性 CTL 活性。因此,这些数据清楚地证明 TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) (a) 和 TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) (b) 被内源地加工并与 HLA-A*0201 分子一起被呈递在靶细胞上,并被 CTL 识别。

这些结果表明这些从 TTLL4 衍生的肽可适合作为癌症疫苗用于治疗具有表达 TTLL4 的肿瘤的患者。

[0499] 对抗原肽的同源性分析

[0500] 经 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38), TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39), TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) 和 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) 刺激的 CTL 显示出显著的且特异的 CTL 活性。这个结果可能是由于 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38), TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39), TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) 和 TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) 的序列与其它已知可使人免疫系统致敏的分子衍生的肽同源。为了排除这种可能性,使用 BLAST 算法 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) 使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有发现具有显著同源性的序列。同源性分析的结果指示 TTLL4-A02-9-222 (SEQ ID NO:38), TTLL4-A02-9-66 (SEQ ID NO:44) and TTLL4-A02-10-574 (SEQ ID NO:59) 的序列是独特的,因此,就我们所知,这些分子产生对一些无关分子的不期望的免疫学应答的可能性很小。虽然 TTLL4-A02-9-805 (SEQ ID NO:39) 的序列与 TTLL5 同源,但在我们的微阵列数据中 TTLL5 的表达谱显示 TTLL5 在正常组织中的表达低,且这种肽适用于癌症治疗。

[0501] 总之,鉴定了新的源自 TTLL4 的 HLA-A*0201 表位肽,并证明了它们适用于癌症免疫治疗。

[0502] 工业应用性

[0503] 本发明提供了新的 TAA,特别是源自 TTLL4 的新 TAA,它们可诱导强而特异性的抗肿瘤免疫应答,并且可应用于广泛的癌症类型。这样的 TAA 可作为肽疫苗用于 TTLL4 相关疾病,例如癌症,癌症的例子包括但不限于,膀胱癌、胆管细胞癌、CML、结肠和直肠癌、食道癌、肝癌、淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC、软组织肿瘤和骨肉瘤。

[0504] 虽然本文中参照其具体实施方案详细地描述了本发明,但是要理解,上面的描述本质上是例示性的和解释性的,而且意图例示本发明及其优选实施方案。经由常规实验,本领域技术人员会容易地认识到,可以对本发明进行各种变化和修饰,而不偏离本发明的精神和范围,本发明的边界和范围由所附权利要求来限定。

[0001]

序列表

<110> 肿瘤疗法科学股份有限公司 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.)

<120> TLL4 肽及包含它们的疫苗

<130> ONC-A1031P

<150> US 61/380,611

<151> 2010-09-07

<160> 84

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 1

Arg Tyr Leu His Lys Pro Tyr Leu Ile
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 2

Leu Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr Ile
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 3

Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 4

Val Tyr Val Thr Ser Tyr Asp Pro Leu
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 5

[0002]

Pro Tyr Leu Ile Ser Gly Ser Lys Phe
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 6

Ala Tyr Phe Phe Cys Pro Ser Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 7

Arg Phe Gly Lys Lys Glu Phe Ser Phe
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 8

Glu Phe Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 9

Ile Tyr Leu Phe Ser Asp Gly Leu Val
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 10

Trp Tyr Asn Arg Asn Asn Leu Ala Met
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0003]

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 11
Lys Tyr Ser Pro Ser Met Lys Ser Leu
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 12

Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe Ile Leu
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 13

Val Trp Pro Gln Ala His Gln Gln Val
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 14

Val Trp Ser Leu Pro Thr Ser Leu Leu
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 15

Thr Phe Gln Ser Ile Ser Asp Ser Leu
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 16

Cys Tyr Leu His Ser Leu Pro Asp Leu
1 5

<210> 17

[0004]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 17
Ser Phe Leu Asn Pro Ser Phe Gln Trp
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 18
Arg Phe Phe Glu Gln Pro Arg Tyr Phe
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 19
Ser Tyr Asp Pro Leu Arg Ile Tyr Leu
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 20
Cys Tyr Leu His Ser Leu Pro Asp Leu Phe
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 21
Ser Tyr Asp Pro Leu Arg Ile Tyr Leu Phe
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 22
Pro Tyr Ser Cys His Glu Leu Phe Gly Phe

[0005]

1	5	10
<210> 23		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 23		
Pro Tyr Gln Gln Leu Glu Ser Phe Cys Leu		
1	5	10
<210> 24		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 24		
Arg Phe Gly Lys Lys Glu Phe Ser Phe Phe		
1	5	10
<210> 25		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 25		
Arg Tyr Phe Asn Ile Leu Thr Thr Gln Trp		
1	5	10
<210> 26		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 26		
Met Trp Pro Asn Ser Thr Pro Val Pro Leu		
1	5	10
<210> 27		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 27		
Ser Tyr Arg Gln Lys Pro Tyr Gln Gln Leu		
1	5	10
<210> 28		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		

[0006]

<400> 28

Thr Phe Gln Ser Ile Ser Asp Ser Leu Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 29

Gln Phe Glu Arg Ile Phe Pro Ser His Ile
1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 30

Glu Phe Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe Ile
1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 31

Lys Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 32

Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu Thr
1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 33

Asp Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

[0007]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 34

Ala Phe Ser Lys Ser Glu Thr Ser Lys Leu
1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 35

Ser Phe Ile Leu Pro Gln Asp Ala Lys Leu
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 36

Ser Phe Gln Ile Gly Arg Lys Asp Arg Leu
1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 37

Gly Phe Asp Ile Met Leu Asp Glu Asn Leu
1 5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 38

Phe Met Trp Pro Asn Ser Thr Pro Val
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 39

Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val
1 5

[0008]

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 40
Lys Met Ser Thr Val Thr Pro Asn Ile
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 41
Ser Leu Ser Thr Gln Thr Leu Pro Val
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 42
Leu Ile Tyr Ser Leu Phe Pro Asn Val
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 43
Ser Ile Ser Asp Ser Leu Leu Ala Val
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 44
Gly Leu Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 45

[0009]

Thr Ile Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Val
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 46

Asn Leu Lys Pro Trp Val Leu Glu Val
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 47

Ser Leu Pro Gln Lys Ser Leu Pro Val
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 48

Ser Leu Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 49

Phe Ile Leu Pro Gln Asp Ala Lys Leu
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 50

Ser Leu Pro Thr Ser Leu Leu Thr Ile
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0010]

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 51
Lys Ile Pro Asp Gln Asp Phe Tyr Ala
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 52

Leu Leu Ala Ser His Ala Ser Gly Leu
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 53

Ser Ile Trp Glu Lys Ile Lys Asp Val
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 54

Tyr Gln Gln Leu Glu Ser Phe Cys Leu
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 55

Ser Leu Pro Asp Leu Phe Asn Ser Thr
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 56

Lys Leu Leu Arg Trp Lys Met Ser Thr
1 5

<210> 57

[0011]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 57
Cys Gln Leu Glu Gln Ser Ser Phe Leu
1 5

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 58
Phe Leu Asn Pro Ser Phe Gln Trp Asn Val
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 59
Ala Leu Ile Tyr Ser Leu Phe Pro Asn Val
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 60
Met Leu Asp Glu Asn Leu Lys Pro Trp Val
1 5 10

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 61
Lys Leu Leu Arg Trp Lys Met Ser Thr Val
1 5 10

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 62
Ser Leu Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr Ile

[0012]

1	5	10
<210> 63		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 63		
Tyr Leu Ile Ser Gly Ser Lys Phe Asp Leu		
1	5	10
<210> 64		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 64		
Ala Met Ile Ser Arg Ser Cys Met Glu Ile		
1	5	10
<210> 65		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 65		
Lys Met Ser Thr Val Thr Pro Asn Ile Val		
1	5	10
<210> 66		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 66		
Ser Leu Pro Asp Leu Phe Asn Ser Thr Leu		
1	5	10
<210> 67		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		
<400> 67		
Asn Leu Ala Gly Phe Val Leu Pro Asn Ala		
1	5	10
<210> 68		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工合成的肽序列		

[0013]

<400> 68

Ser Leu Ser Thr Gln Thr Leu Pro Val Ile
1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 69

Tyr Val Thr Ser Leu Leu Lys Met Tyr Val
1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 70

Lys Thr Ile Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Val
1 5 10

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 71

Ser Ile Trp Glu Lys Ile Lys Asp Val Val
1 5 10

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 72

Thr Leu Ser Ala Gly Leu Gly Pro Gly Leu
1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 73

Lys Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val
1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

[0014]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 74

Gly Leu Leu Gly Val Pro Pro Gln Pro Ala
1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 75

Ser Leu Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asp Val
1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 76

Lys Leu Gly Lys Gln Ser Ser Cys Glu Val
1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 77

Arg Ile Tyr Leu Phe Ser Asp Gly Leu Val
1 5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 78

Thr Leu Cys Ser Ser Gly Thr Thr Ala Val
1 5 10

<210> 79

<211> 4997

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (371).. (3970)

<400> 79

agactctcgg tctgtccgct gggggcgcgc gcggtgtgtg gcaggcggca gcggcgctgg -60

[0015]

cggccgagtg cgcttgtcac gcgiggcggc gcgtgggtgc taggggcgcc tgaggctgcc	120
gggtagccca gcagggcgag ggaggagta gcgtggagcc ggtgccgagc cagggcgaag	180
ctggatcccc tagatagact gtcttcaage tcaatgalat ttctctctgc ttgatccatt	240
gtgtgtgtga gagcctctag taaatttttc agactgacag acttcaagga tgcagctgct	300
actaccggag gtgtgtggca ccttacctca gcaaggccat gagaaccgtg egccatgaig	360
tgggcccctc atg gcc tca gca gga aca cag cac tat agt att ggc ctc	409
Met Ala Ser Ala Gly Thr Gln His Tyr Ser Ile Gly Leu	
1 5 10	
cgc cag aaa aac agc ttc aag cag agt ggt ccc tca ggc aca gta cct	457
Arg Gln Lys Asn Ser Phe Lys Gln Ser Gly Pro Ser Gly Thr Val Pro	
15 20 25	
gcc acg cca cct gag aaa ccc tgc gag ggc aga gtc tgg cct cag gcc	505
Ala Thr Pro Pro Glu Lys Pro Ser Glu Gly Arg Val Trp Pro Gln Ala	
30 35 40 45	
cat cag caa gtg aag cca atc tgg aag ctg gaa aag aag caa gtg gag	553
His Gln Gln Val Lys Pro Ile Trp Lys Leu Glu Lys Lys Gln Val Glu	
50 55 60	
aca ctg tca gca ggg ttg ggc cca ggc ctc ttg ggc gtc cca ccc cag	601
Thr Leu Ser Ala Gly Leu Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Pro Pro Gln	
65 70 75	
cca gca tat ttc ttt tgc ccc agc act tta tgt agc tct ggg acc acg	649
Pro Ala Tyr Phe Phe Cys Pro Ser Thr Leu Cys Ser Ser Gly Thr Thr	
80 85 90	
gct gtc att gca ggc cac agc agt tcc tgt tac cta cac tct ctc ccg	697
Ala Val Ile Ala Gly His Ser Ser Ser Cys Tyr Leu His Ser Leu Pro	
95 100 105	
gac ttg ttc aac agc acc ctg cta iac cgc cgc tcc agc tat agg caa	745
Asp Leu Phe Asn Ser Thr Leu Leu Tyr Arg Arg Ser Ser Tyr Arg Gln	
110 115 120 125	
aaa ccg tac cag caa ctg gag tct ttc tgc ttg cgt tgc agc ccg tca	793
Lys Pro Tyr Gln Gln Leu Glu Ser Phe Cys Leu Arg Ser Ser Pro Ser	
130 135 140	
gaa aaa agc cct ttt tct ctc cct caa aag agc ctc cct gtc agt ctc	841
Glu Lys Ser Pro Phe Ser Leu Pro Gln Lys Ser Leu Pro Val Ser Leu	
145 150 155	
act gcc aac aag gcc act tct tcc atg gtc ttc tcc atg gcc cag ccc	889
Thr Ala Asn Lys Ala Thr Ser Ser Met Val Phe Ser Met Ala Gln Pro	
160 165 170	
atg gcc tcc tca tcc aca gaa cca tac ctc tgc ttg gca gcg gct ggg	937
Met Ala Ser Ser Ser Thr Glu Pro Tyr Leu Cys Leu Ala Ala Ala Gly	
175 180 185	
gaa aac cct tca ggg aag agc ctg gcc tct gcc atc tca ggg aag atc	985
Glu Asn Pro Ser Gly Lys Ser Leu Ala Ser Ala Ile Ser Gly Lys Ile	
190 195 200 205	
cca tct cca ctc tct tcc tcc tat aag ccc atg ctg aat aat aat tcc	1033
Pro Ser Pro Leu Ser Ser Ser Tyr Lys Pro Met Leu Asn Asn Asn Ser	
210 215 220	
ttc atg tgg cca aat agc acg cca gtg cct tta ttg cag acc aca cag	1081
Phe Met Trp Pro Asn Ser Thr Pro Val Pro Leu Leu Gln Thr Thr Gln	
225 230 235	
ggc ctg aag cca gta tgc cca ccc aag atc cag cct gtc tcc tgg cat	1129
Gly Leu Lys Pro Val Ser Pro Pro Lys Ile Gln Pro Val Ser Trp His	
240 245 250	
cat tca ggg ggt act gga gac tgt gca ccg cag cct gtt gac cat aag	1177
His Ser Gly Gly Thr Gly Asp Cys Ala Pro Gln Pro Val Asp His Lys	
255 260 265	
gtg ccc aaa agc att ggc act gtc cca get gai gcc agt gcc cat atc	1225
Val Pro Lys Ser Ile Gly Thr Val Pro Ala Asp Ala Ser Ala His Ile	

270	275	280	285	
gcc ttg tct acc gct agc tcc cac gac aca tcc acc acc agt gtt gcc				1273
Ala Leu Ser Thr	Ala Ser Ser His Asp	Thr Ser Thr Thr	Ser Val Ala	
	290	295	300	
tct tcc tgg tat aac egg aat aac tta gcc atg agg gca gag cca ctt				1321
Ser Ser Trp Tyr Asn Arg Asn Asn Leu	Ala Met Arg Ala	Glu Pro Leu		
	305	310	315	
tcc tgt gct ctg gat gac agc tct gat tcc cag gat cca act aag gag				1369
Ser Cys Ala Leu Asp Asp Ser Ser Asp	Ser Gln Asp	Pro Thr Lys Glu		
	320	325	330	
att cgg ttc act gag gcc gtg agg aaa ttg acc gca aga ggc ttt gag				1417
Ile Arg Phe Thr Glu Ala Val Arg Lys	Leu Thr Ala Arg Gly Phe Glu			
	335	340	345	
aag atg ccg agg caa ggc tgc cag ctt gaa cag tct agt ttc ctg aac				1465
Lys Met Pro Arg Gln Gly Cys Gln Leu	Glu Gln Ser Ser Phe Leu Asn			
	350	355	360	365
ccc agc ttc cag tgg aat gtc ctg aac agg agc agg cgg tgg aaa cct				1513
Pro Ser Phe Gln Trp Asn Val Leu Asn	Arg Ser Arg Arg Trp Lys Pro			
	370	375	380	
cct gcg gta aat cag cag ttt cct cag gag gat gct gga tcg gtc agg				1561
Pro Ala Val Asn Gln Gln Phe Pro Gln	Glu Asp Ala Gly Ser Val Arg			
	385	390	395	
egg gtc ctg cct ggt gcc tca gat acc ttg ggg ttg gac aat aca gtc				1609
Arg Val Leu Pro Gly Ala Ser Asp Thr	Leu Gly Leu Asp Asn Thr Val			
	400	405	410	
ttc tgt acc aag cgt atc agc att cac ctg ctt gcc tca cat gcc agt				1657
Phe Cys Thr Lys Arg Ile Ser Ile His	Leu Leu Ala Ser His Ala Ser			
	415	420	425	
ggg ctg aat cac aac cct gcc tgt gaa tct gta att gac tcc tca gca				1705
Gly Leu Asn His Asn Pro Ala Cys Glu	Ser Val Ile Asp Ser Ser Ala			
	430	435	440	445
ttt gga gaa ggc aaa gct cca ggt ccc cct ttt cct caa act ctt ggc				1753
Phe Gly Glu Gly Lys Ala Pro Gly Pro	Pro Phe Pro Gln Thr Leu Gly			
	450	455	460	
ata gcc aac gtg gcc acc cgc ctg tct tcc atc cag ctg ggc cag tct				1801
Ile Ala Asn Val Ala Thr Arg Leu Ser	Ser Ile Gln Leu Gly Gln Ser			
	465	470	475	
gag aag gag aga cct gag gag gcc agg gag ctg gac tca tct gat agg				1849
Glu Lys Glu Arg Pro Glu Glu Ala Arg	Glu Leu Asp Ser Ser Asp Arg			
	480	485	490	
gat att agt tca gct act gac ctg cag cca gat cag gct gag act gaa				1897
Asp Ile Ser Ser Ala Thr Asp Leu Gln	Pro Asp Gln Ala Glu Thr Glu			
	495	500	505	
gat aca gaa gaa gaa cta gta gat ggt ttg gaa gac tgt tgt agc cgt				1945
Asp Thr Glu Glu Glu Leu Val Asp Gly	Leu Glu Asp Cys Cys Ser Arg			
	510	515	520	525
gat gag aat gaa gag gag gag gga gac tca gag tgc tcc tca tta agt				1993
Asp Glu Asn Glu Glu Glu Glu Gly Asp	Ser Glu Cys Ser Ser Leu Ser			
	530	535	540	
gct gtc tcc ccc agc gaa tgg gtg gcc atg atc tct aga agc tgt atg				2041
Ala Val Ser Pro Ser Glu Ser Val Ala	Met Ile Ser Arg Ser Cys Met			
	545	550	555	
gaa att ctg acc aaa ccc ctt tcc aat cat gag aaa gtt gtc oga cca				2089
Glu Ile Leu Thr Lys Pro Leu Ser Asn	His Glu Lys Val Val Arg Pro			
	560	565	570	
gcc ctg atc tac agt ctg ttt ccc aac gtt ccc cct acc atc tat ttt				2137
Ala Leu Ile Tyr Ser Leu Phe Pro Asn	Val Pro Pro Thr Ile Tyr Phe			
	575	580	585	
ggc act cgg gat gag aga gtg gag aaa ctt ccc tgg gaa cag agg aag				2185
Gly Thr Arg Asp Glu Arg Val Glu Lys	Leu Pro Trp Glu Gln Arg Lys			

[0017]

590	595	600	605	
ttg ctc cga tgg aag atg agc aca gtg acc ccc aac att gtc aag cag				2233
Leu Leu Arg Trp Lys Met Ser Thr Val Thr Pro Asn Ile Val Lys Gln				
610	615	620		
acc att gga cgg tcc cac ttc aaa atc agc aaa aga aac gat gac tgg				2281
Thr Ile Gly Arg Ser His Phe Lys Ile Ser Lys Arg Asn Asp Asp Trp				
625	630	635		
ctg ggc tgc tgg ggt cac cac atg aag tct cct agt ttc cga tcc att				2329
Leu Gly Cys Trp Gly His His Met Lys Ser Pro Ser Phe Arg Ser Ile				
640	645	650		
cga gag cat cag aag cta aac cat ttc cca ggc tca ttc cag att ggg				2377
Arg Glu His Gln Lys Leu Asn His Phe Pro Gly Ser Phe Gln Ile Gly				
655	660	665		
agg aag gac cgg cta tgg cgg aac ctg tca cgt atg cag agc cgc ttt				2425
Arg Lys Asp Arg Leu Trp Arg Asn Leu Ser Arg Met Gln Ser Arg Phe				
670	675	680	685	
ggc aag aag gag ttc agt ttc ttc ccc cag tcc ttt atc ctg ccc cag				2473
Gly Lys Lys Glu Phe Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe Ile Leu Pro Gln				
690	695	700		
gac gcc aag ctc ctg cgc aaa gcg tgg gag agc agc agc cgc caa aag				2521
Asp Ala Lys Leu Leu Arg Lys Ala Trp Glu Ser Ser Ser Arg Gln Lys				
705	710	715		
tgg att gtg aag cca cca gca tca gct cga ggc att ggc atc cag gtt				2569
Trp Ile Val Lys Pro Pro Ala Ser Ala Arg Gly Ile Gly Ile Gln Val				
720	725	730		
att cac aag tgg agt cag ctc ccc aag cga agg ccc ctc ctg gta cag				2617
Ile His Lys Trp Ser Gln Leu Pro Lys Arg Arg Pro Leu Leu Val Gln				
735	740	745		
agg tat cta cac aaa ccc tac ctc atc agc ggc agc aag ttt gac ctg				2665
Arg Tyr Leu His Lys Pro Tyr Leu Ile Ser Gly Ser Lys Phe Asp Leu				
750	755	760	765	
cgg atc tat gtt tat gtc act tcc tac gat cct ctg cgg att tac ctc				2713
Arg Ile Tyr Val Tyr Val Thr Ser Tyr Asp Pro Leu Arg Ile Tyr Leu				
770	775	780		
ttt tca gat gga ctg gtc cgc ttt gcc agt tgc aag tat tgc cct tcc				2761
Phe Ser Asp Gly Leu Val Arg Phe Ala Ser Cys Lys Tyr Ser Pro Ser				
785	790	795		
atg aag agc ctt ggc aat aag ttc atg cac ctg acc aac tac agt gtc				2809
Met Lys Ser Leu Gly Asn Lys Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val				
800	805	810		
aat aaa aag aat gcc gag tac cag gcc aat gca gat gaa atg gct tgc				2857
Asn Lys Lys Asn Ala Glu Tyr Gln Ala Asn Ala Asp Glu Met Ala Cys				
815	820	825		
cag ggc cac aaa tgg gca ctg aag gct ttg tgg aac tac ctg agc cag				2905
Gln Gly His Lys Trp Ala Leu Lys Ala Leu Trp Asn Tyr Leu Ser Gln				
830	835	840	845	
aag gga gtc aat agc gac gcc atc tgg gag aag ata aag gat gtt gtt				2953
Lys Gly Val Asn Ser Asp Ala Ile Trp Glu Lys Ile Lys Asp Val Val				
850	855	860		
gtc aaa act atc atc tgc tca gag ccc tat gtg acc agc ctg ctc aag				3001
Val Lys Thr Ile Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Val Thr Ser Leu Leu Lys				
865	870	875		
atg tai gtg cga cgg ccc tat agc tgc cat gaa ctc ttt ggt ttt gac				3049
Met Tyr Val Arg Arg Pro Tyr Ser Cys His Glu Leu Phe Gly Phe Asp				
880	885	890		
atc atg cta gac gaa aac ctc aag ccc tgg gtc ctg gaa gtc aac att				3097
Ile Met Leu Asp Glu Asn Leu Lys Pro Trp Val Leu Glu Val Asn Ile				
895	900	905		
tcc cca agc ctc cac tcc agc tct cca ctg gai atc agc atc aaa ggc				3145
Ser Pro Ser Leu His Ser Ser Ser Pro Leu Asp Ile Ser Ile Lys Gly				

[0018]

910	915	920	925	
cag atg att cgt gac ctt ctg aat ctg gca ggt ttt gtc ctg ccc aat Gln Met Ile Arg Asp Leu Leu Asn Leu Ala Gly Phe Val Leu Pro Asn 930 935 940				3193
gca gag gat atc att tcc agc ccc agc agc tgc agc agc tcc acc acc Ala Glu Asp Ile Ile Ser Ser Pro Ser Ser Cys Ser Ser Ser Thr Thr 945 950 955				3241
agc ctg ccc acc tcc cct ggg gac aaa tgt cga atg get cca gag cat Ser Leu Pro Thr Ser Pro Gly Asp Lys Cys Arg Met Ala Pro Glu His 960 965 970				3289
gtc act gca cag aag atg aag aaa gcc tat tat ctg acc cag aaa att Val Thr Ala Gln Lys Met Lys Lys Ala Tyr Tyr Leu Thr Gln Lys Ile 975 980 985				3337
cct gat cag gac ttc tat gca tct gtg ctg gat gtc ctg aca cca gat Pro Asp Gln Asp Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu Thr Pro Asp 990 995 1000 1005				3385
gat gtt cgg att ctg gtt gag atg gaa gat gag ttt tct cgc cgt Asp Val Arg Ile Leu Val Glu Met Glu Asp Glu Phe Ser Arg Arg 1010 1015 1020				3430
ggc cag ttt gaa cga att ttt cct tct cat atc tcc tct cgc tat Gly Gln Phe Glu Arg Ile Phe Pro Ser His Ile Ser Ser Arg Tyr 1025 1030 1035				3475
ctc cgc ttt ttt gag cag cca cga tat ttc aac att ctc acc acc Leu Arg Phe Phe Glu Gln Pro Arg Tyr Phe Asn Ile Leu Thr Thr 1040 1045 1050				3520
caa tgg gaa cag aaa tac cat ggc aac aag ctt aaa gga gta gat Gln Trp Glu Gln Lys Tyr His Gly Asn Lys Leu Lys Gly Val Asp 1055 1060 1065				3565
ctg ctg cgg agt tgg tgc tac aaa ggg ttc cac atg gga gtt gtc Leu Leu Arg Ser Trp Cys Tyr Lys Gly Phe His Met Gly Val Val 1070 1075 1080				3610
tct gat tct get cca gtg tgg tct ctc ccg aca tca ctt ctg act Ser Asp Ser Ala Pro Val Trp Ser Leu Pro Thr Ser Leu Leu Thr 1085 1090 1095				3655
atc tca aag gat gac gtc ata ctc aat gcc ttc agc aaa tca gag Ile Ser Lys Asp Asp Val Ile Leu Asn Ala Phe Ser Lys Ser Glu 1100 1105 1110				3700
act agc aag ctg gga aaa caa agc tcc tgt gag gtt agc cta cta Thr Ser Lys Leu Gly Lys Gln Ser Ser Cys Glu Val Ser Leu Leu 1115 1120 1125				3745
ctc tct gaa gac ggg acc acg ccc aaa tcc aag aag act caa get Leu Ser Glu Asp Gly Thr Thr Pro Lys Ser Lys Lys Thr Gln Ala 1130 1135 1140				3790
ggc ctt tcc cct tat ccc cag aaa ccc agt tcc tca aag gac agt Gly Leu Ser Pro Tyr Pro Gln Lys Pro Ser Ser Ser Lys Asp Ser 1145 1150 1155				3835
gag gac acc agc aaa gag ccc agc ctt tct acc cag acg tta cct Glu Asp Thr Ser Lys Glu Pro Ser Leu Ser Thr Gln Thr Leu Pro 1160 1165 1170				3880
gtg atc aag tgc tct ggg cag acf tca aga ctt tct get tcc tcc Val Ile Lys Cys Ser Gly Gln Thr Ser Arg Leu Ser Ala Ser Ser 1175 1180 1185				3925
act ttc cag tca atc agt gac tcc ctc ctg get gtg agc cca taa Thr Phe Gln Ser Ile Ser Asp Ser Leu Leu Ala Val Ser Pro 1190 1195				3970
ctggcctctc tccaaaagcc tctgcccagg agcatgggca tcagetacct cacgggaacc				4030
agcctgcgtc tcagaccagt ctgacccctt acccccttca cctgtccct cctcagagta				4090
ttttttgaag tggitgcatt atagagatgg gtattttagt ggccggaggg atggtagtga				4150

[0019]

```

tggggagaag gtagggaagg gtcacctct gtcacctgtc tgcctggctg gcacctcata 4210
tcicagcaga gaagccagig gaggccacgc agccctataa agcagggttt ggttictacc 4270
ttaagttagc catgttgggt ttgtctgggg gccctgggtt ggttgcctag ttgtagctca 4330
agaggagaaa acatacagaa catatttga ccggaatcc tttgttcga attgagggg 4390
gtcttctgag gtcccttact ccttaggtct ttcctcacc cctccacc gctgtcctga 4450
ggagaaaccc tgaacttcc tcaatagaca ggcggagagg ccacaacaig ccgaacccat 4510
ttcctgtcat cctagtcttg ggtcttacc gcttcttcc aaataccac cctgccagca 4570
gccctaggtc ttctgttct gacccccat cactgctcgt tcagccttct agatgtctct 4630
ctcgtggaca tctgttctt agcgtgtgc ttctctgag gttgagagg gctatgaac 4690
tttgtgaatt tcccatggcc ccagigaagg agcccagata atccagtag ctgttacctg 4750
tctccatgta tcaanagaca cagtcaggg gagggttga aggagatgtg gtttctctat 4810
agtgcaacaa acatggttcc tcaatgttct gcctgcagc aagcagggtc tgccggcttg 4870
gtagggtgggt ttccaggaca gtcactattg taggatgggc ttccaatcaa acctcagact 4930
aaactcttgi actgaactga ttctacctcc ctctctaga ctctagtaac agtgactait 4990
caataaa 4997

```

<210> 80
 <211> 1199
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 80

Met Ala Ser Ala Gly Thr Gln His Tyr Ser Ile Gly Leu Arg Gln Lys
 1 5 10 15

Asn Ser Phe Lys Gln Ser Gly Pro Ser Gly Thr Val Pro Ala Thr Pro
 20 25 30

Pro Glu Lys Pro Ser Glu Gly Arg Val Trp Pro Gln Ala His Gln Gln
 35 40 45

Val Lys Pro Ile Trp Lys Leu Glu Lys Lys Gln Val Glu Thr Leu Ser
 50 55 60

Ala Gly Leu Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Pro Pro Gln Pro Ala Tyr
 65 70 75 80

Phe Phe Cys Pro Ser Thr Leu Cys Ser Ser Gly Thr Thr Ala Val Ile
 85 90 95

Ala Gly His Ser Ser Ser Cys Tyr Leu His Ser Leu Pro Asp Leu Phe
 100 105 110

Asn Ser Thr Leu Leu Tyr Arg Arg Ser Ser Tyr Arg Gln Lys Pro Tyr
 115 120 125

Gln Gln Leu Glu Ser Phe Cys Leu Arg Ser Ser Pro Ser Glu Lys Ser
 130 135 140

Pro Phe Ser Leu Pro Gln Lys Ser Leu Pro Val Ser Leu Thr Ala Asn
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Ser Ser Met Val Phe Ser Met Ala Gln Pro Met Ala Ser
 165 170 175

[0020]

```

Ser Ser Thr Glu Pro Tyr Leu Cys Leu Ala Ala Ala Gly Glu Asn Pro
      180                185                190

Ser Gly Lys Ser Leu Ala Ser Ala Ile Ser Gly Lys Ile Pro Ser Pro
      195                200                205

Leu Ser Ser Ser Tyr Lys Pro Met Leu Asn Asn Asn Ser Phe Met Trp
      210                215                220

Pro Asn Ser Thr Pro Val Pro Leu Leu Gln Thr Thr Gln Gly Leu Lys
      225                230                235                240

Pro Val Ser Pro Pro Lys Ile Gln Pro Val Ser Trp His His Ser Gly
      245                250                255

Gly Thr Gly Asp Cys Ala Pro Gln Pro Val Asp His Lys Val Pro Lys
      260                265                270

Ser Ile Gly Thr Val Pro Ala Asp Ala Ser Ala His Ile Ala Leu Ser
      275                280                285

Thr Ala Ser Ser His Asp Thr Ser Thr Thr Ser Val Ala Ser Ser Trp
      290                295                300

Tyr Asn Arg Asn Asn Leu Ala Met Arg Ala Glu Pro Leu Ser Cys Ala
      305                310                315                320

Leu Asp Asp Ser Ser Asp Ser Gln Asp Pro Thr Lys Glu Ile Arg Phe
      325                330                335

Thr Glu Ala Val Arg Lys Leu Thr Ala Arg Gly Phe Glu Lys Met Pro
      340                345                350

Arg Gln Gly Cys Gln Leu Gln Gln Ser Ser Phe Leu Asn Pro Ser Phe
      355                360                365

Gln Trp Asn Val Leu Asn Arg Ser Arg Arg Trp Lys Pro Pro Ala Val
      370                375                380

Asn Gln Gln Phe Pro Gln Glu Asp Ala Gly Ser Val Arg Arg Val Leu
      385                390                395                400

Pro Gly Ala Ser Asp Thr Leu Gly Leu Asp Asn Thr Val Phe Cys Thr
      405                410                415

Lys Arg Ile Ser Ile His Leu Leu Ala Ser His Ala Ser Gly Leu Asn
      420                425                430

His Asn Pro Ala Cys Glu Ser Val Ile Asp Ser Ser Ala Phe Gly Glu
      435                440                445

Gly Lys Ala Pro Gly Pro Pro Phe Pro Gln Thr Leu Gly Ile Ala Asn
      450                455                460

Val Ala Thr Arg Leu Ser Ser Ile Gln Leu Gly Gln Ser Glu Lys Glu
      465                470                475                480

Arg Pro Glu Glu Ala Arg Glu Leu Asp Ser Ser Asp Arg Asp Ile Ser
      485                490                495

```

[0021]


```

Ser Ala Thr Asp Leu Gln Pro Asp Gln Ala Glu Thr Glu Asp Thr Glu
500                      505                      510

Glu Glu Leu Val Asp Gly Leu Glu Asp Cys Cys Ser Arg Asp Glu Asn
515                      520                      525

Glu Glu Glu Glu Gly Asp Ser Glu Cys Ser Ser Leu Ser Ala Val Ser
530                      535                      540

Pro Ser Glu Ser Val Ala Met Ile Ser Arg Ser Cys Met Glu Ile Leu
545                      550                      555                      560

Thr Lys Pro Leu Ser Asn His Glu Lys Val Val Arg Pro Ala Leu Ile
565                      570                      575

Tyr Ser Leu Phe Pro Asn Val Pro Pro Thr Ile Tyr Phe Gly Thr Arg
580                      585                      590

Asp Glu Arg Val Glu Lys Leu Pro Trp Glu Gln Arg Lys Leu Leu Arg
595                      600                      605

Trp Lys Met Ser Thr Val Thr Pro Asn Ile Val Lys Gln Thr Ile Gly
610                      615                      620

Arg Ser His Phe Lys Ile Ser Lys Arg Asn Asp Asp Trp Leu Gly Cys
625                      630                      635                      640

Trp Gly His His Met Lys Ser Pro Ser Phe Arg Ser Ile Arg Glu His
645                      650                      655

Gln Lys Leu Asn His Phe Pro Gly Ser Phe Gln Ile Gly Arg Lys Asp
660                      665                      670

Arg Leu Trp Arg Asn Leu Ser Arg Met Gln Ser Arg Phe Gly Lys Lys
675                      680                      685

Glu Phe Ser Phe Phe Pro Gln Ser Phe Ile Leu Pro Gln Asp Ala Lys
690                      695                      700

Leu Leu Arg Lys Ala Trp Glu Ser Ser Ser Arg Gln Lys Trp Ile Val
705                      710                      715                      720

Lys Pro Pro Ala Ser Ala Arg Gly Ile Gly Ile Gln Val Ile His Lys
725                      730                      735

Trp Ser Gln Leu Pro Lys Arg Arg Pro Leu Leu Val Gln Arg Tyr Leu
740                      745                      750

His Lys Pro Tyr Leu Ile Ser Gly Ser Lys Phe Asp Leu Arg Ile Tyr
755                      760                      765

Val Tyr Val Thr Ser Tyr Asp Pro Leu Arg Ile Tyr Leu Phe Ser Asp
770                      775                      780

Gly Leu Val Arg Phe Ala Ser Cys Lys Tyr Ser Pro Ser Met Lys Ser
785                      790                      795                      800

Leu Gly Asn Lys Phe Met His Leu Thr Asn Tyr Ser Val Asn Lys Lys
805                      810                      815

```

[0022]

```

Asn Ala Glu Tyr Gln Ala Asn Ala Asp Glu Met Ala Cys Gln Gly His
      820                      825                      830

Lys Trp Ala Leu Lys Ala Leu Trp Asn Tyr Leu Ser Gln Lys Gly Val
      835                      840                      845

Asn Ser Asp Ala Ile Trp Glu Lys Ile Lys Asp Val Val Val Lys Thr
      850                      855                      860

Ile Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Val Thr Ser Leu Leu Lys Met Tyr Val
      865                      870                      875                      880

Arg Arg Pro Tyr Ser Cys His Glu Leu Phe Gly Phe Asp Ile Met Leu
      885                      890                      895

Asp Glu Asn Leu Lys Pro Trp Val Leu Glu Val Asn Ile Ser Pro Ser
      900                      905                      910

Leu His Ser Ser Ser Pro Leu Asp Ile Ser Ile Lys Gly Gln Met Ile
      915                      920                      925

Arg Asp Leu Leu Asn Leu Ala Gly Phe Val Leu Pro Asn Ala Glu Asp
      930                      935                      940

Ile Ile Ser Ser Pro Ser Ser Cys Ser Ser Ser Thr Thr Ser Leu Pro
      945                      950                      955                      960

Thr Ser Pro Gly Asp Lys Cys Arg Met Ala Pro Glu His Val Thr Ala
      965                      970                      975

Gln Lys Met Lys Lys Ala Tyr Tyr Leu Thr Gln Lys Ile Pro Asp Gln
      980                      985                      990

Asp Phe Tyr Ala Ser Val Leu Asp Val Leu Thr Pro Asp Asp Val Arg
      995                      1000                      1005

Ile Leu Val Glu Met Glu Asp Glu Phe Ser Arg Arg Gly Gln Phe
      1010                      1015                      1020

Glu Arg Ile Phe Pro Ser His Ile Ser Ser Arg Tyr Leu Arg Phe
      1025                      1030                      1035

Phe Glu Gln Pro Arg Tyr Phe Asn Ile Leu Thr Thr Gln Trp Glu
      1040                      1045                      1050

Gln Lys Tyr His Gly Asn Lys Leu Lys Gly Val Asp Leu Leu Arg
      1055                      1060                      1065

Ser Trp Cys Tyr Lys Gly Phe His Met Gly Val Val Ser Asp Ser
      1070                      1075                      1080

Ala Pro Val Trp Ser Leu Pro Thr Ser Leu Leu Thr Ile Ser Lys
      1085                      1090                      1095

Asp Asp Val Ile Leu Asn Ala Phe Ser Lys Ser Glu Thr Ser Lys
      1100                      1105                      1110

Leu Gly Lys Gln Ser Ser Cys Glu Val Ser Leu Leu Leu Ser Glu
      1115                      1120                      1125

```

[0023]

Asp Gly Thr Thr Pro Lys Ser Lys Lys Thr Gln Ala Gly Leu Ser
1130 1135 1140

Pro Tyr Pro Gln Lys Pro Ser Ser Ser Lys Asp Ser Glu Asp Thr
1145 1150 1155

Ser Lys Glu Pro Ser Leu Ser Thr Gln Thr Leu Pro Val Ile Lys
1160 1165 1170

Cys Ser Gly Gln Thr Ser Arg Leu Ser Ala Ser Ser Thr Phe Gln
1175 1180 1185

Ser Ile Ser Asp Ser Leu Leu Ala Val Ser Pro
1190 1195

<210> 81
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 81
gtctaccagg cattccttc at 22

<210> 82
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 82
tcagctggac cacagccgca gctt 24

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 83
tcagaaatcc ttctcttga c 21

<210> 84
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 84
ctagcctctg gaatccttct tctt 24

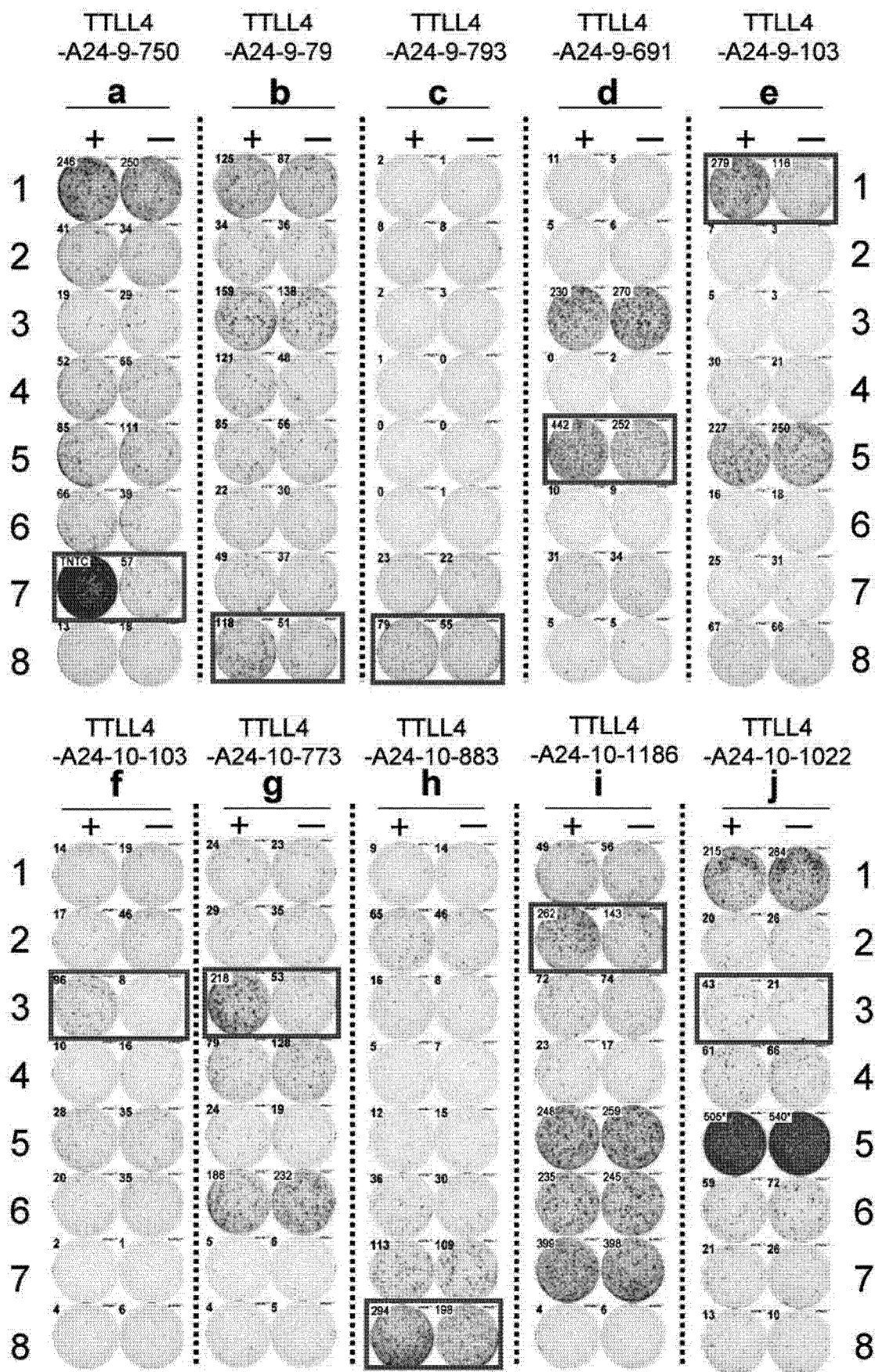


图 1-1

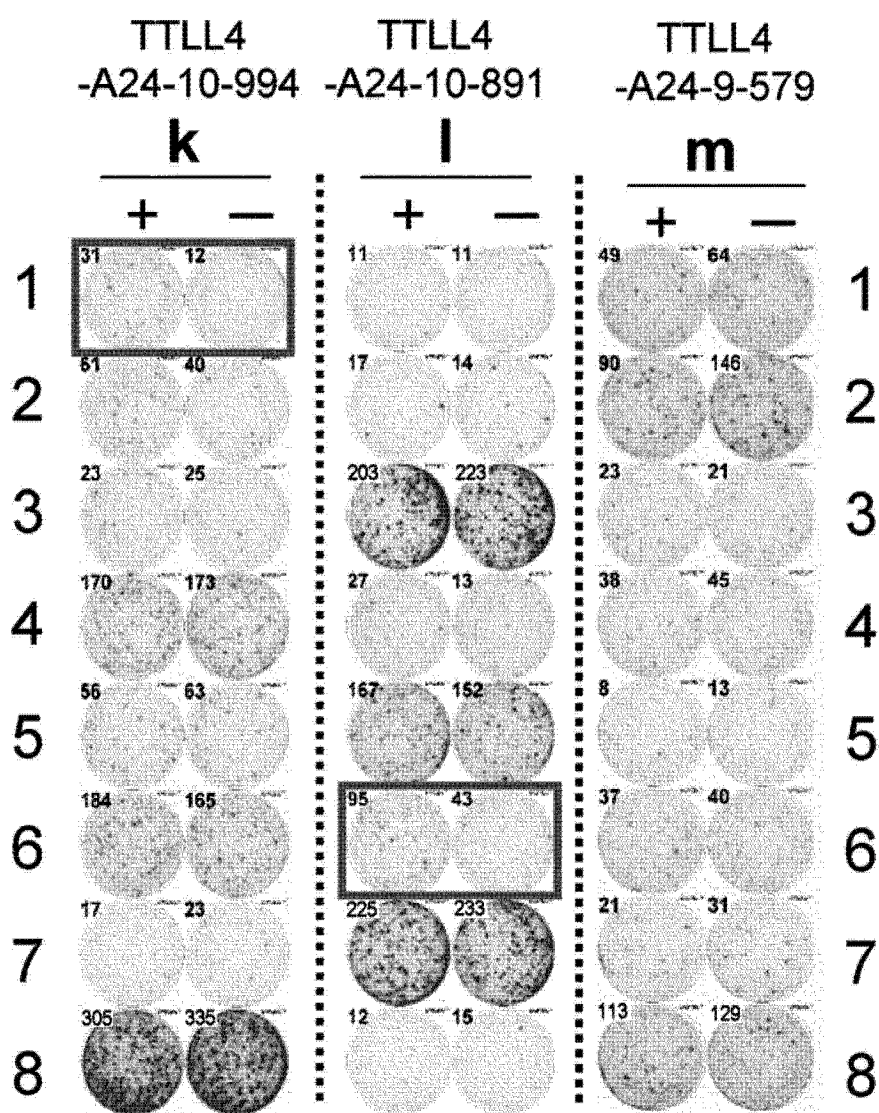


图 1-2

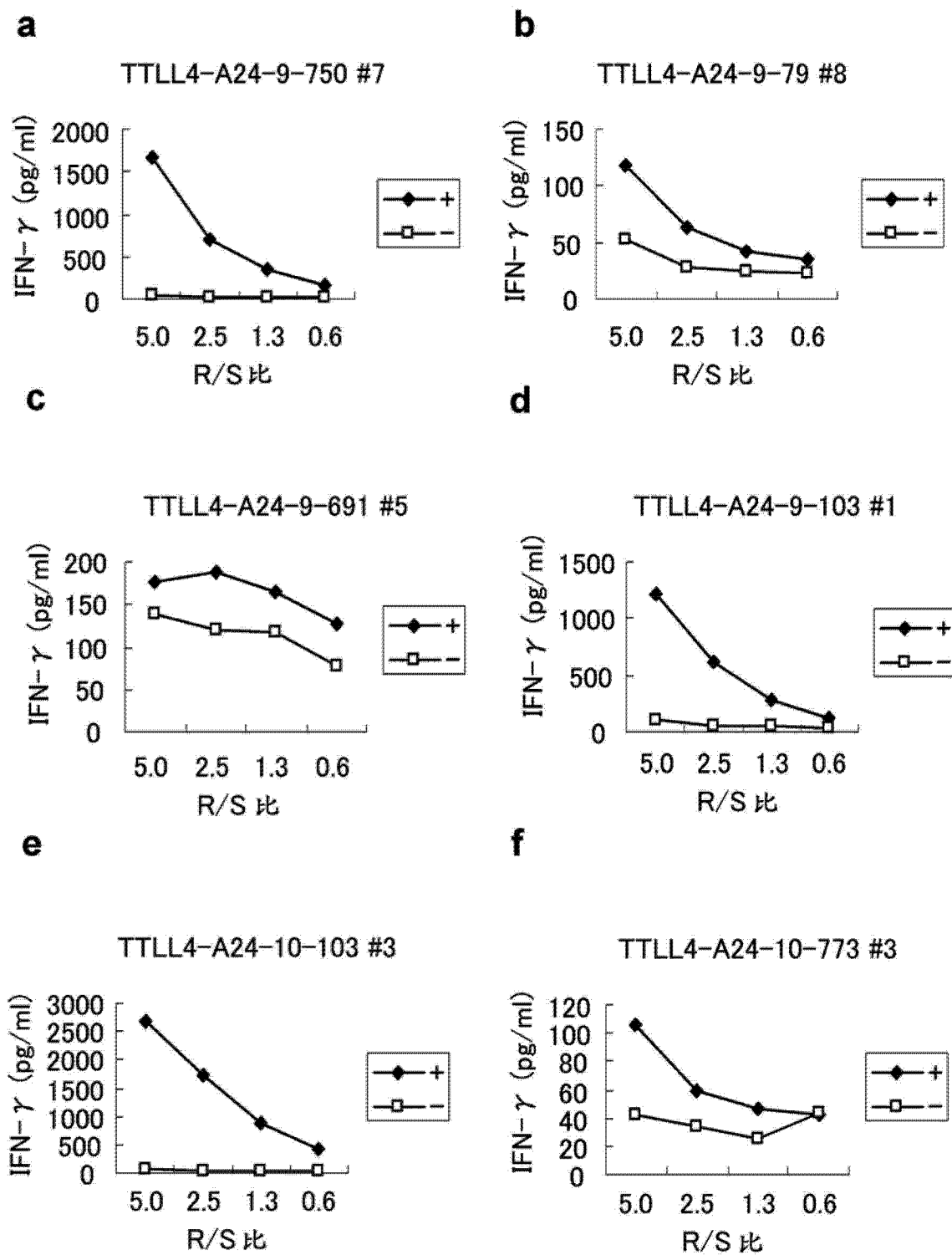


图 2

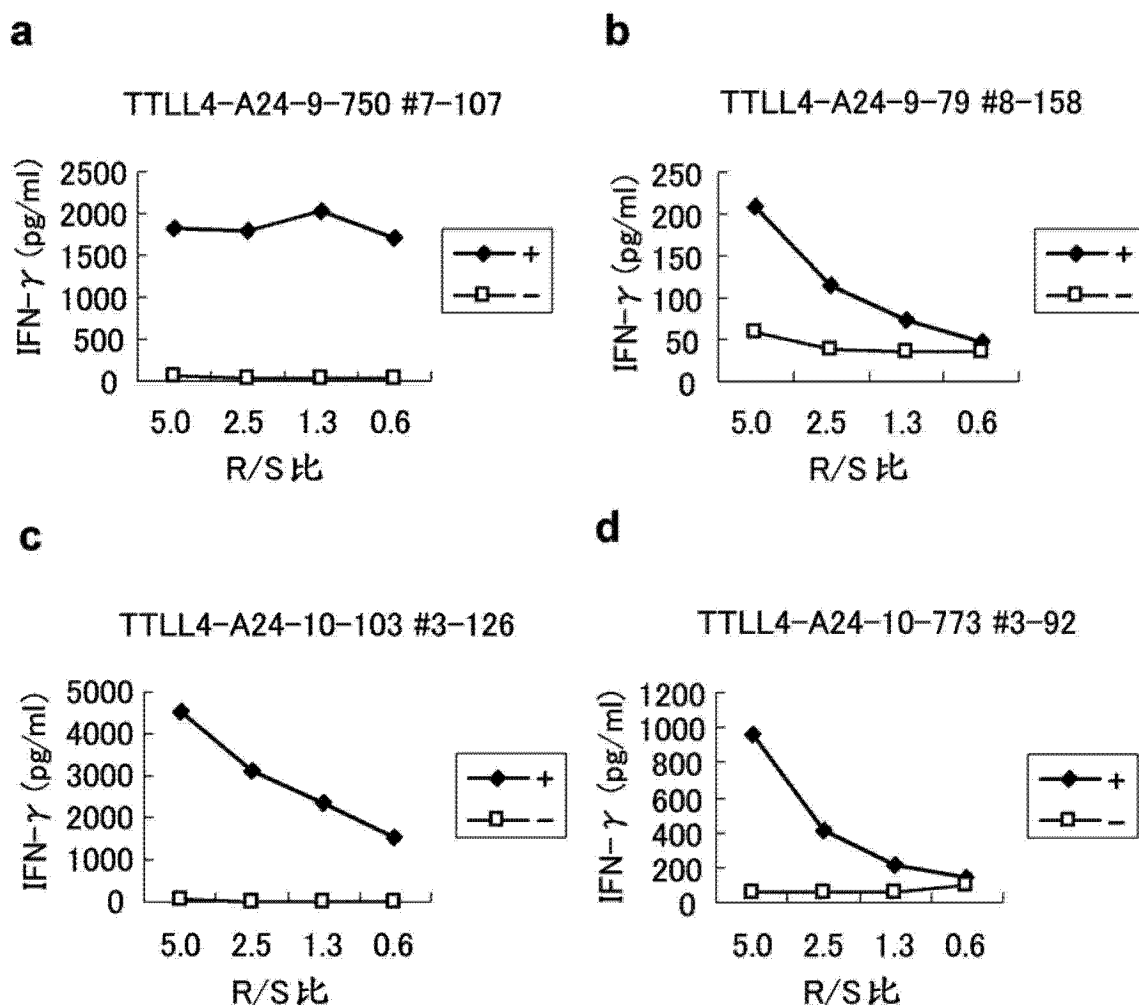


图 3

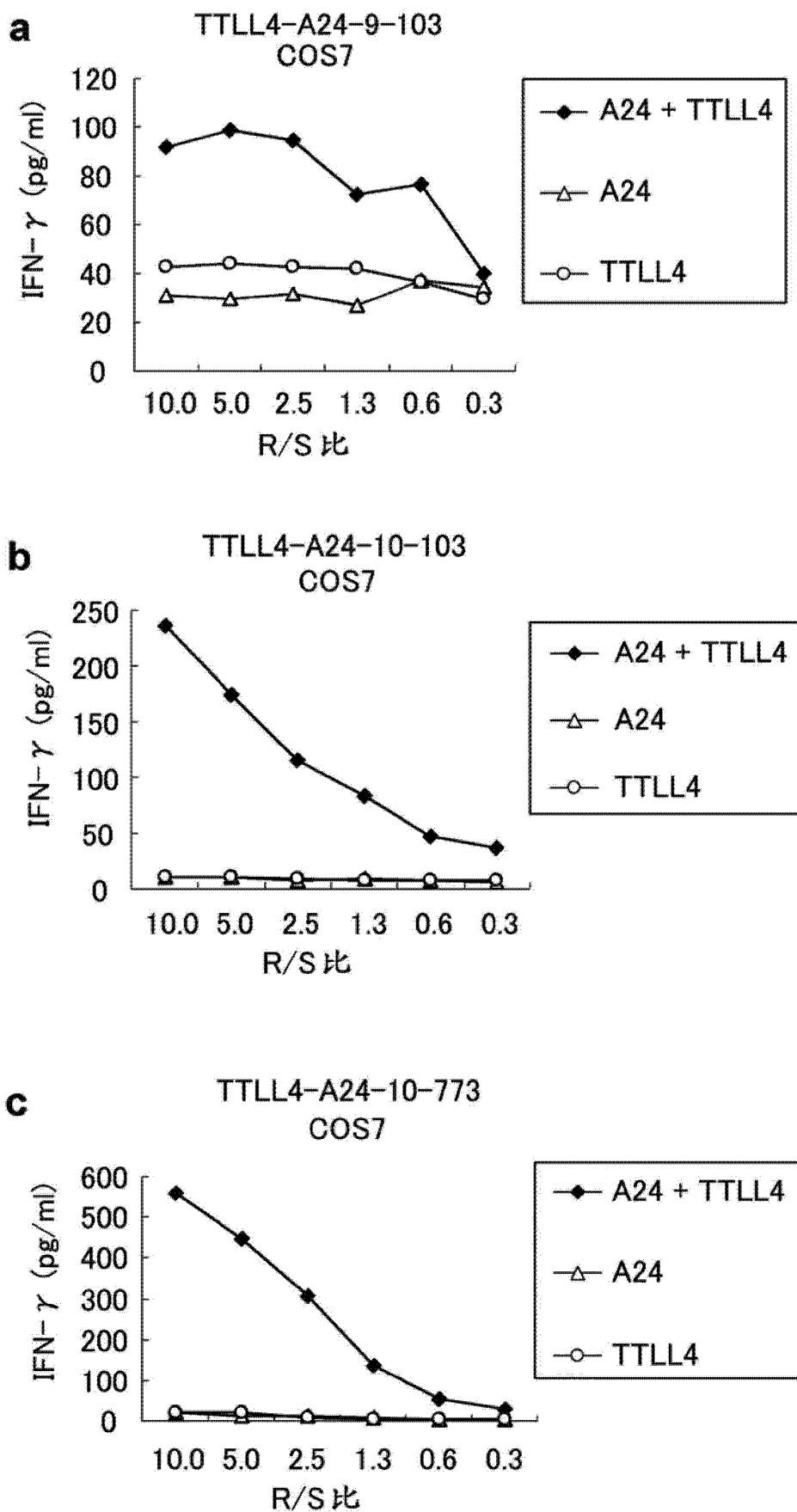


图 4

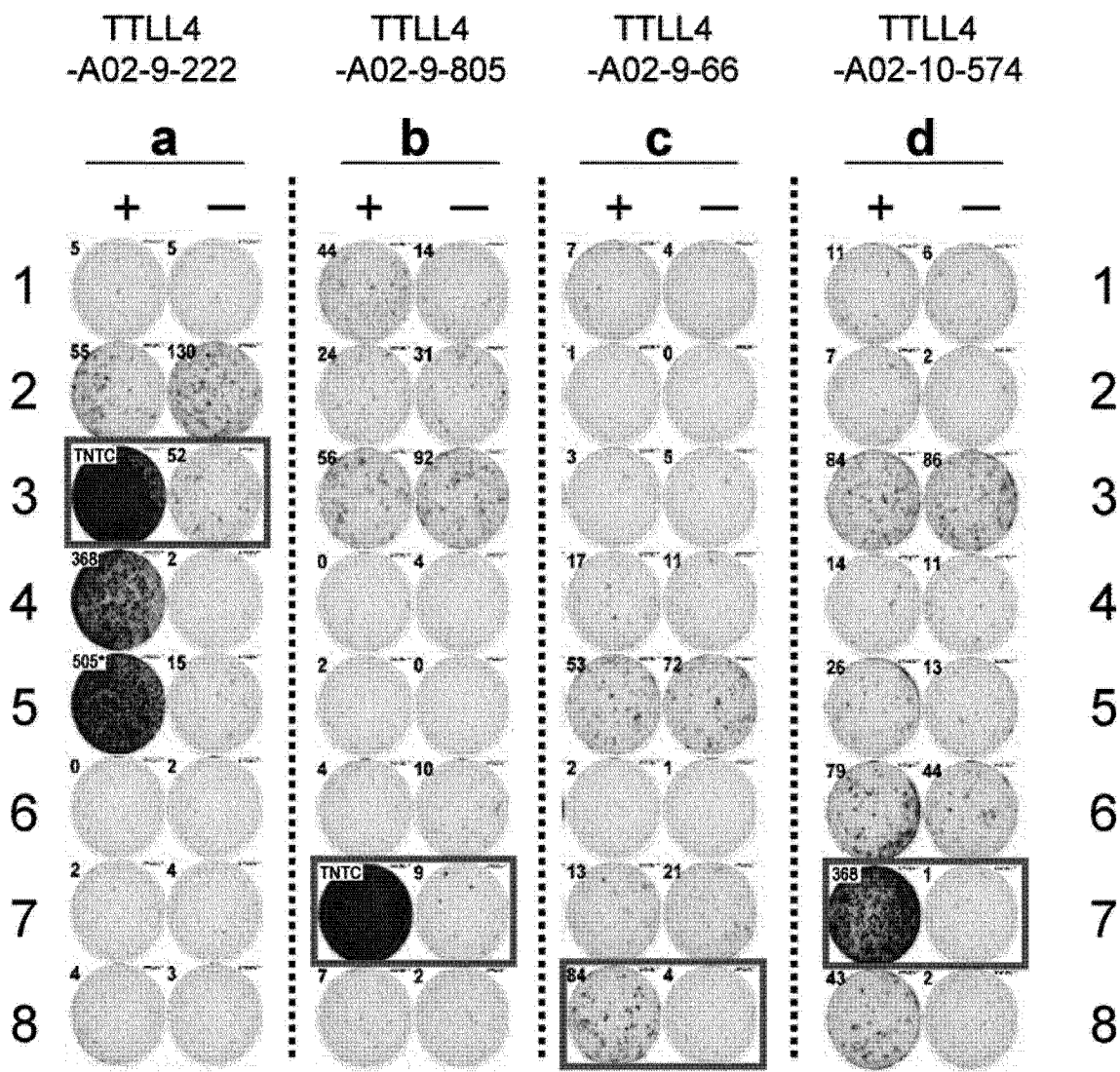


图 5

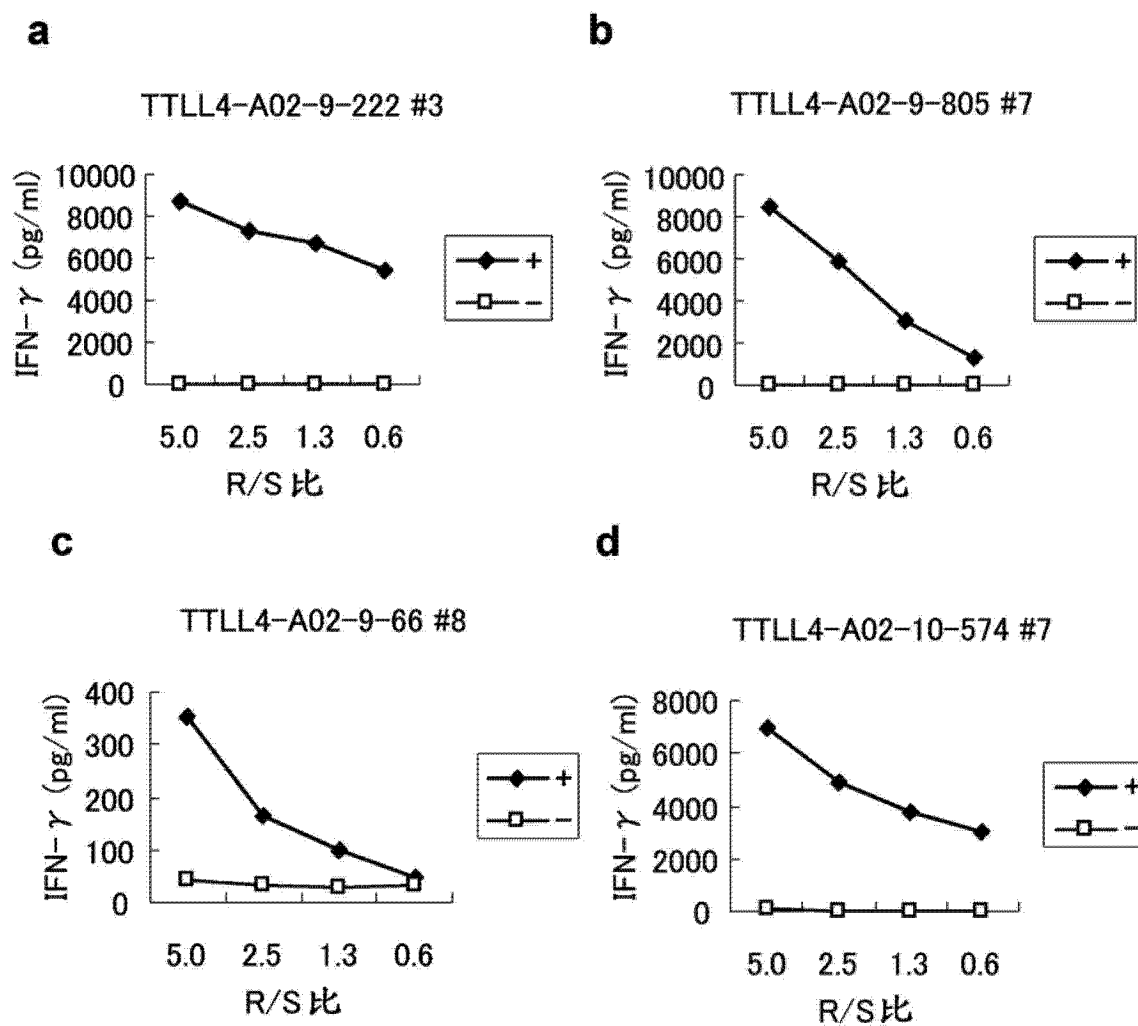


图 6

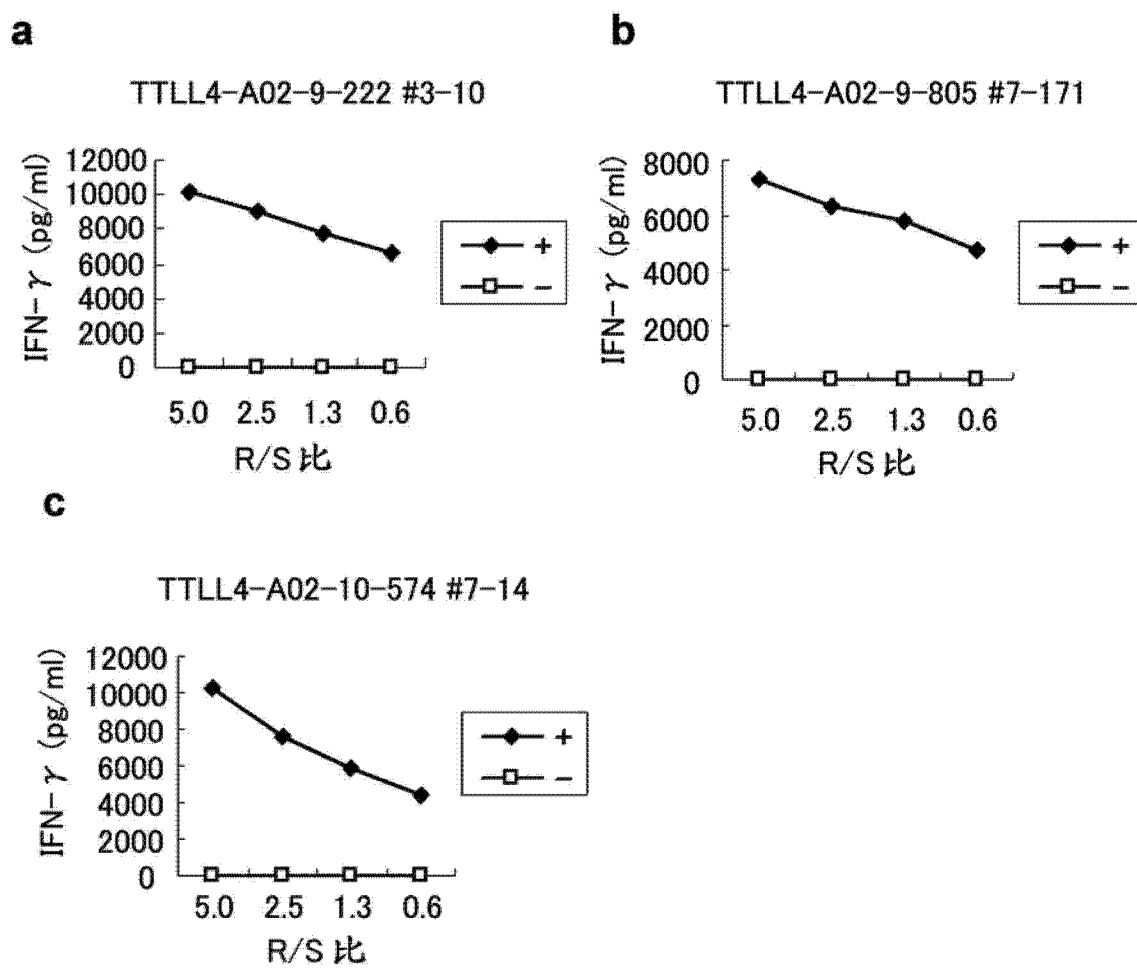


图 7

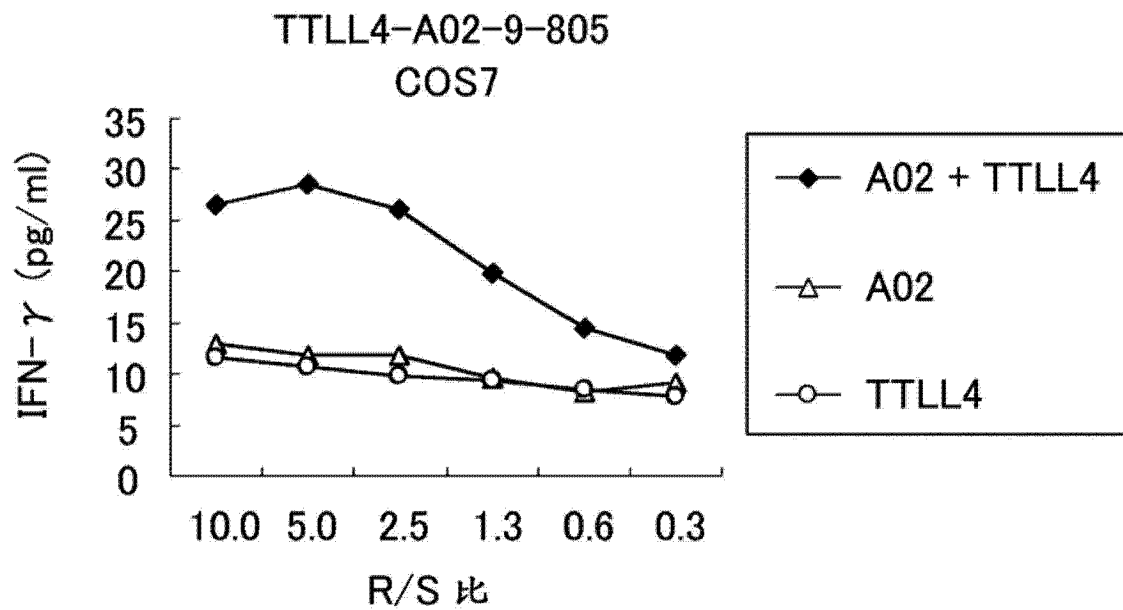
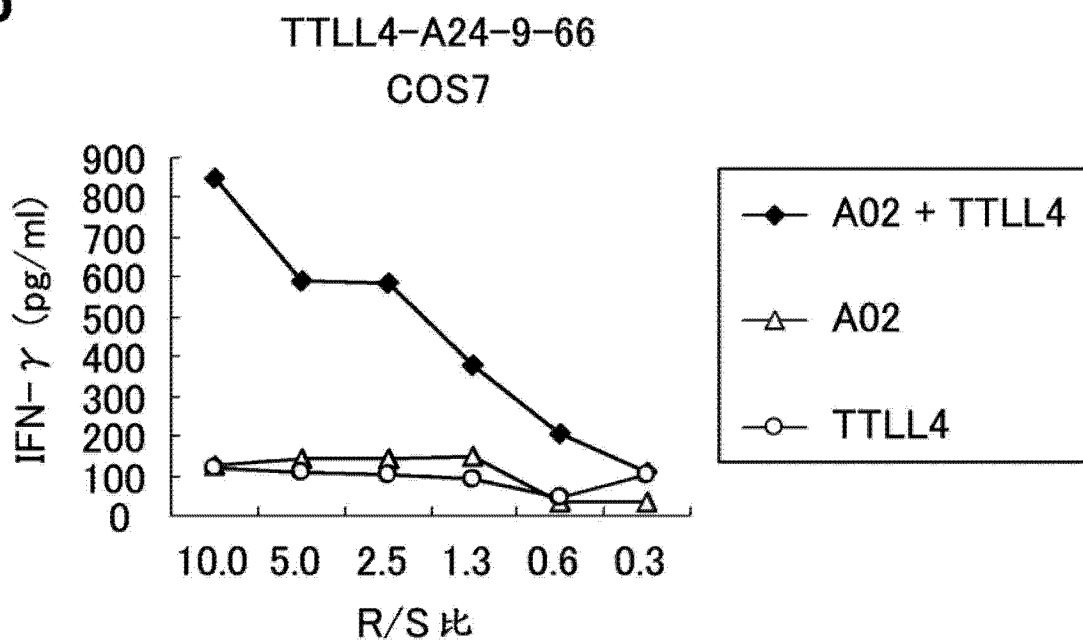
a**b**

图 8