



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107531754 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 15

(21) 申请号 201680018847.X
(22) 申请日 2016.03.24
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107531754 A
(43) 申请公布日 2018.01.02
(30) 优先权数据
 1505305.1 2015.03.27 GB
 62/139,189 2015.03.27 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.09.27
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2016/056557 2016.03.24
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/156202 EN 2016.10.06
(73) 专利权人 伊玛提克斯生物技术有限公司
 地址 德国蒂宾根
(72) 发明人 安德里亚·马尔 莉·斯蒂夫
 托尼·温斯切尼克 奥利弗·施尔
 延斯·弗里切 哈普瑞特·辛格
(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
 专利代理师 黄爱娇

(51) Int.Cl.
 C07K 7/02 (2006.01)
 C07K 7/06 (2006.01)
 C07K 14/47 (2006.01)
 C07K 14/725 (2006.01)
 C07K 14/74 (2006.01)
 C07K 16/18 (2006.01)
 C07K 16/28 (2006.01)
 C07K 16/30 (2006.01)
 C12N 5/0783 (2010.01)
 C12N 9/64 (2006.01)
 C12Q 1/6886 (2018.01)
 A61K 38/08 (2019.01)
 A61K 39/00 (2006.01)
 A61K 45/06 (2006.01)
 G01N 33/566 (2006.01)
 C12N 15/115 (2010.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
(56) 对比文件
 W0 2015018805 A1,2015.02.12
 CN 102027006 A,2011.04.20
 审查员 曲肖男
 权利要求书2页 说明书101页
 序列表53页 附图66页

(54) 发明名称
 用于各种肿瘤免疫治疗的新型肽和肽组合物

(57) 摘要
 本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白质、核酸和细胞。特别是,本发明涉及癌症的免疫疗法。本发明还涉及单独使用或与其他肿瘤相关肽(刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激T细胞和转入患者的疫苗复合物的活性药物成分)联合使用的肿瘤相关T细胞(CTL)肽表位。与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽或与此同类的肽也可能是抗体、可溶性T细胞受体和其他结合分子的靶标。

CN 107531754 B

1. 一种肽,其由氨基酸序列SEQ ID No. 157组成;或其一种药用盐。
2. 一种核酸,其编码根据权利要求1所述的肽。
3. 根据权利要求2所述的核酸,其连接到一个异源启动子序列。
4. 一种表达载体,其表达根据权利要求2或3所述的核酸。
5. 一种重组宿主细胞,其包括根据权利要求1所述的肽、根据权利要求2或3所述的核酸、或根据权利要求4所述的表达载体。
6. 根据权利要求5所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞为抗原提呈细胞。
7. 根据权利要求6所述的重组宿主细胞,其中所述抗原提呈细胞为树突状细胞。
8. 一种制备根据权利要求1所述的肽的方法,该方法包括培养根据权利要求5或6所述的宿主细胞、以及从所述宿主细胞或其培养基中分离出所述肽,所述宿主细胞提呈根据权利要求1所述的肽或表达根据权利要求2或3所述的核酸或包括根据权利要求4所述的表达载体。
9. 一种制备激活的T淋巴细胞的体外方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人I类MHC分子进行体外接触一段时间,该时间足以以抗原特异性的方式激活所述T细胞,人I类MHC分子在合适的抗原提呈细胞表面或人工模拟的抗原提呈细胞结构表面上表达,其中所述抗原为权利要求1所述的肽。
10. 根据权利要求1所述的肽、根据权利要求2或3中所述的核酸、根据权利要求4所述的表达载体或根据权利要求5至7中任一项所述的重组宿主细胞在制备用于诊断和/或治疗肝癌、膀胱癌、或非小细胞肺癌的药物中的用途。
11. 一种药物组合物,其包括至少一种活性成分,该成分选自根据权利要求1所述的肽或其盐、根据权利要求2或3所述的核酸、根据权利要求4所述的表达载体或根据权利要求5至7中任一项所述的重组宿主细胞,以及药用载体。
12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中(i)所述药物组合物进一步包含佐剂,(ii)所述药物组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂和/或稳定剂,和/或(iii)所述药物组合物是疫苗或细胞治疗剂。
13. 根据权利要求12所述的药物组合物,其中所述佐剂是白介素。
14. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述白介素是IL-2、IL-15或其组合。
15. 一种药盒,包括:
 - (a) 容器包含溶液或冻干形式的药物组合物,其含有根据权利要求1所述的肽或其盐、根据权利要求2或3所述的核酸、根据权利要求4所述的表达载体或根据权利要求5至7中任一项所述的重组宿主细胞中的至少一种;
 - (b) 第二容器,其含有冻干粉剂型的稀释剂或重组溶液;
 - (c) 至少一种另外的肽,选自由SEQ ID No. 1至SEQ ID No. 288组成的组,以及
 - (d) 用于(i)使用溶液或(ii)重组和/或使用冻干粉剂型的说明书。
16. 根据权利要求15所述的药盒,进一步包括(iii)缓冲剂,(iv)稀释剂,(v)过滤液,(vi)针,或(v)注射器中的一个或多个。
17. 根据权利要求15或16所述的药盒,其中所述药物组合物进一步包括佐剂。
18. 一种用于生产个性化抗癌疫苗或过继性细胞治疗剂的方法,所述方法包括:
 - a) 识别个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);

b) 将a)中识别的肽与已经针对免疫原性进行预先筛选和/或与正常组织相比在肿瘤中过度提呈的肽库进行比较,所述库包括由SEQ ID No.157序列组成的肽;

c) 选择库中与患者中识别的TUMAP匹配的至少一种肽;和

d) 基于步骤c) 配制所述个性化疫苗或过继性细胞治疗剂。

19.根据权利要求18中所述的方法,其中所述TUMAP透过以下方法识别:

a1) 将来自肿瘤样本的表达数据与来自对应于肿瘤样本组织类型的正常组织样本的表达数据进行比较,以识别在肿瘤样本中过度表达或异常表达的蛋白;和

a2) 将表达数据与肿瘤样本中I类MHC分子结合的MHC配体的序列相关联,以识别衍生自所述肿瘤过度表达或异常表达的蛋白质的MHC配体。

20.根据权利要求18或19所述的方法,其中MHC配体的序列是通过从自肿瘤样本分离的MHC分子中洗脱结合肽,并对所洗脱的配体进行测序识别的。

21.根据权利要求18或19所述的方法,其中对应于肿瘤样本组织类型的正常组织获得自同一患者。

22.根据权利要求18或19所述的方法,其中库中包含的肽是基于以下步骤进行识别的:

aa. 透过高度并行的方法,包括微数组或基于测序的表达谱,进行全基因组信使核糖核酸(mRNA)表达分析,其包括识别相较于一种或多种正常组织在恶性组织中过度表达的基因;

ab. 选择步骤aa中检测到的选择性表达或过度表达的基因所编码的肽,以及

ac. 透过选定的肽确定诱导体内T细胞反应,包括使用健康供体或所述患者的人类T细胞而进行的体外免疫原性测定;或

ba. 用质谱法识别来自所述肿瘤样本的HLA配体;

bb. 透过高度并行的方法,包括微数组或基于测序的表达谱,进行全基因组信使核糖核酸(mRNA)表达分析,其包括识别相较于一种或多种正常组织在恶性组织中过度表达的基因;

bc. 比较识别的HLA配体与所述基因表达数据;

bd. 选择步骤bc检测到的选择性表达或过度表达的基因所编码的肽;

be. 重新检测肿瘤组织上且在健康组织上缺乏或不经常检测到的步骤bd的选定TUMAP,并确定在mRNA水平上过度表达的相关性;以及

bf. 透过选定的肽确定诱导体内T细胞反应,包括使用健康供体或所述患者的人类T细胞进行的体外免疫原性测定。

23.根据权利要求18或19所述的方法,其中所述库中包括的肽的免疫原性通过包括体外免疫原性检测、针对个别HLA结合性的患者免疫监测、MHC多聚体染色、ELISPOT分析和/或细胞内细胞因子染色的方法而确定。

24.根据权利要求18或19所述的方法,其进一步包括:识别与该个体患者相应正常组织相比对所述肿瘤样本具有唯一性的至少一种突变,以及选择与突变相关并包含于疫苗或用于产生细胞治疗剂的肽。

25.根据权利要求24中所述的方法,其中所述至少一种突变透过全基因组测序鉴定。

用于各种肿瘤免疫治疗的新型肽和肽组合物

[0001] 本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白质、核酸和细胞。特别是,本发明涉及癌症的免疫疗法。本发明还涉及单独使用或与其他肿瘤相关肽(刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激T细胞和转入患者的疫苗复合物的活性药物成分)联合使用的肿瘤相关T细胞(CTL)肽表位。与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽或与此同类的肽也可能是抗体、可溶性T细胞受体和其他结合分子的靶标。

[0002] 本发明涉及数种新型肽序列及其变体,它们源自人肿瘤细胞的HLA-I类分子,可用于引发抗肿瘤免疫反应的疫苗组合物中或作为开发药物/免疫活性化合物和细胞的目标。

[0003] 发明背景

[0004] 根据世界卫生组织(WHO)的资料,癌症是2012年全球范围内四大非传染性致命疾病之一。同年,结直肠癌、乳腺癌和呼吸道癌症在高收入国家被列为前10位死亡原因内(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>)。

[0005] 流行病学

[0006] 2012年,估计全球有1410万新增癌症病例,3260万癌症患者(5年之内确诊),820万癌症死亡病例(Ferlay et al.,2013;Bray et al.,2013)。

[0007] 在脑癌、白血病和肺癌群体内,本发明特别分别着重于胶质母细胞瘤(GB)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)和急性骨髓性白血病(AML)、非小细胞和小细胞肺癌(NSCLC和SCLC)。

[0008] GB是最常见的中枢神经系统恶性肿瘤,在美国,年龄调整的发病率为每10万居民3.19名。GB的预后极差,1年生存率为35%,5年生存率低于5%。男性性别、较大年龄和种族似乎是GB的危险因素(Thakkar et al.,2014)。

[0009] CLL是西方世界最常见的白血病,其中大约占全部白血病病例的三分之一。美国和欧洲的发病率相似,估计每年新发病例约有16,000名。CLL在白种人中比非洲人更常见,在西班牙裔和土著美国人中较罕见,在亚洲人中很少见。在亚洲血统的人群中,CLL的发生率比白种人低3倍(Gunawardana et al.,2008)。CLL患者的五年总生存率约为79%(<http://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/statistics>)。

[0010] 肺癌是全球范围内最常见的癌症类型,在很多国家是癌症死亡的首要原因。肺癌分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌。NSCLC包括组织学类型腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌,在美国,约占所有肺癌病例的85%。NSCLC的发生与吸烟史密切相关,包括目前和之前吸烟者,据报告,五年生存率为15%(World Cancer Report,2014;Molina et al.,2008)。

[0011] 治疗

[0012] 乳腺癌

[0013] 乳腺癌患者的标准治疗取决于不同的参数:肿瘤分期、激素受体状态和HER2表达模式。标准治疗包括肿瘤手术完全切除,随后放射治疗。在切除之前或之后可能启动以蒽环类和紫杉烷类为主的化疗。HER2阳性肿瘤患者除了化疗药物外,还接受抗HER2抗体曲妥单抗(S3-Leitlinie Mammakarzinom,2012)。乳腺癌是一种免疫原性肿瘤实体,原发肿瘤中不同类型的浸润免疫细胞表现出不同的预后和预测意义。在乳腺癌患者中进行过大量的早期免疫试验。对于在乳腺癌患者中使用易普利姆玛和其他T细胞活化抗体进行免疫步骤调制

作用的临床数据正在出现 (Emens, 2012)。

[0014] 慢性淋巴细胞白血病

[0015] 虽然目前CLL不可治愈,但是很多患者只显示缓慢的病情进展或症状恶化。对于有症状或疾病进展迅速的患者,有几种治疗方案可供选择。这些包括化学疗法、靶向治疗、基于免疫的疗法(如单克隆抗体、嵌合抗原受体(CARS)和主动免疫疗法)和干细胞移植。

[0016] 一些已完成和正在进行的试验是基于具有CD19特异性的工程自体嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞(Maus et al., 2014)。到目前为止,只有少数患者显示出可检测到或持续性的CAR。Porter等人和Kalos等人在CAR T细胞试验中检测到了一例部分反应(PR)和2例完全反应(CR)(Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011)。

[0017] 主动免疫治疗包括以下策略:基因治疗、整体修饰的肿瘤细胞疫苗、基于DC的疫苗和肿瘤相关抗原(TAA)衍生肽疫苗。

[0018] 几种TAA在CLL中呈过度表达并适于接种。这些包括纤维调节素(Mayr et al., 2005)、RHAMM/CD168(Giannopoulos et al., 2006)、MDM2(Mayr et al., 2006)、hTERT(Counter et al., 1995)、癌胚抗原未成熟层粘连蛋白受体蛋白质(OFaILRP)(Siegel et al., 2003)、脂肪分化相关蛋白(Schmidt et al., 2004)、生存素(Granziero et al., 2001)、KW1至KW14(Krackhardt et al., 2002)以及肿瘤衍生IgVHCDR3区域(Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012)。一项I期临床试验使用RHAMM衍生的R3肽作为疫苗。6名患者中有5名可检测到R3特异性CD8+T细胞应答(Giannopoulos et al., 2010)。

[0019] 结直肠癌

[0020] 根据所述结直肠癌(CRC)期别,有不同的标准疗法可用于结肠癌和直肠癌。标准方法包括外科手术、放射治疗、化学治疗和靶向治疗CRC(Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b)。

[0021] 最新临床试验分析了主动免疫疗法作为CRC的一种治疗选择。这些治疗策略包括用肿瘤相关抗原(TAA)的肽、全肿瘤细胞、树突状细胞(DC)疫苗和病毒载体进行疫苗接种(Koido et al., 2013)。

[0022] 迄今为止的肽疫苗针对癌胚抗原(CEA)、粘蛋白1、EGFR、T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3(SART3)、 β -人绒毛膜促性腺激素(β -hCG)、肾母细胞瘤抗原1(WT1)、生存素-2B、MAGE3、p53、环指蛋白43和线粒体外膜移位酶34(TOMM34)或突变KRAS。在几项I期和II期临床试验中,患者表现为抗原特异性CTL反应或产生抗体。与免疫反应相反,许多患者没有从肽疫苗中获得临床水平上的益处(Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011)。

[0023] 树突细胞疫苗包括用TAA衍生肽、肿瘤细胞裂解物、凋亡肿瘤细胞脉冲处理的DC或肿瘤RNA或DC肿瘤细胞融合产物。虽然I/II期试验的许多患者表现出特异性免疫反应,但只有少数人获得临床益处(Koido et al., 2013)。

[0024] 食管癌

[0025] 食管癌的主要治疗策略取决于肿瘤分期和位置、组织学类型和患者病情。化疗方案包括奥沙利铂+氟尿嘧啶,卡铂+紫杉醇,顺铂+氟尿嘧啶,FOLFOX和顺铂+伊立替康。肿瘤HER2阳性的患者应当根据胃癌治疗指南进行治疗,这是因为食管癌靶向治疗的随机化数据非常有限(Stahl et al., 2013)。

[0026] 食管癌免疫治疗方法的数据很少,这是因为只进行了数量很有限的早期阶段临床试验。在一项I期试验中,晚期食管癌患者被给予一种疫苗,其包含来自三个不同癌症-睾丸抗原(TTK蛋白激酶、淋巴细胞抗原6复合体基因座K和胰岛素样生长因子(IGF)-II mRNA结合蛋白3),结果一般。在一项I/II期研究中,11名患者中有4名患者自体肿瘤细胞在体外刺激后肿瘤内注入激活的T细胞引起完全或部分肿瘤反应(Toomey et al.,2013)。

[0027] 胃癌

[0028] 胃癌(GC)首先发生于粘膜层内壁,随着生长而扩散至外层。有四种标准治疗方法可治疗胃癌。胃癌治疗方法包括内窥镜或手术切除、化疗、放疗或放化疗(Leitlinie Magenkarzinom,2012)。

[0029] 对于晚期胃癌,当前治疗方案的疗效都较差,导致5年生存率低。免疫疗法可能是改善胃癌患者生存期的另一种方法。在胃癌临床试验中,肿瘤相关淋巴细胞和细胞因子诱导的杀伤细胞、基于肽的HER2/neu靶向疫苗、MAGE-3或血管内皮生长因子受体1和2以及基于树突状细胞的HER2/neu靶向疫苗的过继转移显示出有希望的结果。免疫步骤抑制和工程T细胞可能代表了更多的治疗选择,目前正在临床前研究和临床研究中进行评估(Matsueda and Graham,2014)。

[0030] 胶质母细胞瘤

[0031] 胶质母细胞瘤(WHO IV级)的治疗选择非常有限。不同免疫治疗方法针对胶质母细胞瘤(GB)进行了研究,包括免疫步骤抑制、疫苗接种和工程化T细胞过继转移。

[0032] GB患者的不同疫苗接种策略目前正在研究,包括基于肽的疫苗、热休克蛋白疫苗、自体肿瘤细胞疫苗、基于树突状细胞的疫苗以及基于病毒蛋白的疫苗。在这些方法中,来自GB相关蛋白衍生的肽,如表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)或热休克蛋白或用自体肿瘤细胞裂解物或巨细胞病毒组分刺激的树突细胞用于诱导GB患者的抗肿瘤免疫应答。其中一些研究显示出良好的安全性和耐受性以及有前景的疗效数据。

[0033] 转基因T细胞的过继转移是GB治疗的另一个免疫治疗方法。不同的临床试验目前评估嵌合抗原受体的安全性和有效性,其载有针对HER2、IL-13受体 $\alpha 2$ 和EGFRvIII的T细胞(Ampie et al.,2015)。

[0034] 肝癌

[0035] 疾病管理取决于诊断时肿瘤的阶段以及肝脏的整体状况。HCC的化疗包括用于全身治疗的多柔比星、5-氟尿嘧啶和顺铂的组合以及用于肝动脉输注的多柔比星、氟尿苷和丝裂霉素C。但是,大多数HCC病例均于对化疗药物表现出很高的耐药性(Enguita-German and Fortes,2014)。

[0036] 晚期不可切除HCC的治疗选项仅限于索拉非尼(一种多酪氨酸激酶抑制剂)(Chang et al.,2007;Wilhelm et al.,2004)。索拉非尼被证实可延长生存期大约3个月的唯一的全身药物,目前是此类患者的唯一实验性治疗方案(Chapiro et al.,2014;Llovet et al.,2008)。

[0037] 最近,对于HCC进行了少量的免疫疗法试验。细胞因子已被用于激活免疫细胞的亚群和/或增加肿瘤免疫原性(Reinisch et al.,2002;Sangro et al.,2004)。其他的试验主要关注肿瘤浸润性淋巴细胞或活化外周血淋巴细胞的输注(Shi et al.,2004;Takayama et al.,1991;Takayama et al.,2000)。

[0038] 到目前为止,已经进行了少量的治疗性疫苗接种试验。Butterfield等人使用源自甲胎蛋白(AFP)的肽或载有AFP肽的DC进行了两项体外试验(Butterfield et al.,2003; Butterfield et al.,2006)。在两项不同的研究中,自体树突细胞(DC)用自体肿瘤裂解物(Lee et al.,2005)或肝母细胞瘤细胞系HepG2的裂解物(Palmer et al.,2009)进行体外冲击。到目前为止,疫苗接种试验仅显示临床结果的有限改善。

[0039] 黑色素瘤

[0040] 黑色素瘤的标准疗法是手术完全切除并且切除周围健康组织。治疗选项包括单药化疗、多药化疗和特异性抑制剂靶向治疗(S3-Leitlinie Melanom,2013)。

[0041] 几种不同的疫苗接种方法已经在晚期黑色素瘤中进行了评估。到目前为止,第III期临床试验显示相当令人失望的结果,疫苗接种策略显然需要加以改进。因此,新的临床试验,如OncoVEX GM-CSF试验或DERMA试验均针对提高临床疗效而不降低耐受性(<http://www.cancerresearchuk.org>)。

[0042] T细胞过继转移显示了晚期黑色素瘤治疗的巨大潜力。浸润淋巴细胞的体外增大自体肿瘤以及含有对癌症-睾丸抗原NY-ESO-1具有高亲和力的T细胞受体的T细胞在转移到黑色素瘤患者时具有显著有益的和较低的毒性作用。不幸的是,含有对黑素细胞特异性抗原MART1和gp100以及癌症-睾丸抗原MAGEA3具有高亲和力T细胞受体的T细胞在临床试验中诱导相当的毒性作用。因此,T细胞过继转移具有较高的治疗潜力,但这些治疗的安全性和耐受性需要进一步提高(Phan and Rosenberg,2013;Hinrichs and Restifo,2013)。

[0043] 非小细胞肺癌

[0044] 治疗选择根据癌症的类型(小细胞和非小细胞肺癌)和阶段进行确定,包括手术、放疗、化疗、靶向生物治疗,如贝伐单抗、埃罗替尼和吉非替尼(S3-Leitlinie Lungenkarzinom,2011)。

[0045] 为了扩大NSCLC的治疗方案,已经研究了或正在研究不同的免疫治疗方法。虽然用L-BLP25或MAGEA3进行疫苗接种未能证明在NSCLC患者中疫苗介导的生存优势,但是同种异体细胞源性疫苗在临床研究中表现出有希望的结果。此外,针对神经节苷脂、表皮生长因子受体和其他几个抗原的进一步接种试验目前正在进行中。增强患者抗肿瘤T细胞反应的另一策略包括使用特异性抗体阻断抑制性T细胞受体或其配体。目前,正在临床试验中评估上述几种抗体(包括ipilimumab、nivolumab、pembrolizumab、MPDL3280A和MEDI-4736)在NSCLC中的治疗潜力(Reinmuth et al.,2015)。

[0046] 卵巢癌

[0047] 手术切除是早期和晚期卵巢癌的主要治疗方法(S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore,2013)。

[0048] 免疫疗法似乎是改善卵巢癌患者治疗的一种有前景的策略,因为存在促炎性肿瘤浸润淋巴细胞,尤其是CD8阳性T细胞与良好的预后相关,肿瘤相关肽特异性T细胞可从癌组织中分离。

[0049] 因此,大量的科学工作均投入到卵巢癌不同免疫疗法的研究中。已经进行了相当多的临床前研究和临床研究,进一步的研究目前正在进行中。对于细胞因子疗法、接种疫苗、单克隆抗体治疗、细胞过继转移和免疫调节,目前有临床资料。

[0050] 使用来自几种肿瘤相关蛋白(HER2/neu、NY-ESO-1、p53、Wilms肿瘤-1)的单个或多

个肽或来自自体肿瘤细胞的全肿瘤抗原的I期和II期疫苗接种研究显示了良好的安全性和耐受性特性,但临床效果仅为低至中等。

[0051] 免疫细胞的过继转移实现了临床试验中的异质结果。自体、体外增大的肿瘤浸润性T细胞的过继转移在中试试验中被证明是一种有希望的方法。相反,转移含有叶酸受体 α 特异性嵌合抗原受体的T细胞在I期试验中不会诱导显著临床反应。用肿瘤细胞裂解物或肿瘤相关蛋白体外刺激的树突细胞显示可在转移后增强抗肿瘤T细胞反应,但T细胞活化的程度与临床效果无关。在II期研究中,自然杀伤细胞的转移造成明显的毒性。

[0052] 内在抗肿瘤免疫性以及免疫治疗受免疫抑制肿瘤微环境影响。为了克服这个障碍,免疫调节药物(如环磷酰胺、抗CD25抗体和聚乙二醇化脂质体多柔比星)与免疫疗法组合进行了测试。增强T细胞活性的易普利姆玛、抗CTLA4抗体目前有最可靠的资料。易普利姆玛被证明可在卵巢癌患者中产生显著的抗肿瘤效果(Mantia-Smaldone et al.,2012)。

[0053] 胰腺癌

[0054] 胰腺癌患者的治疗选择非常有限。有效治疗的一个主要问题是在确诊时通常处于肿瘤晚期。

[0055] 已对疫苗接种策略进行了研究,其作为胰腺癌治疗的进一步创新和有前途的替代方法。靶向作用于KRAS突变、活性端粒酶、胃泌素、存活蛋白、CEA和MUC1已经在临床试验中进行评估,部分显示有希望的结果。此外,针对胰腺癌患者的树突状细胞疫苗、异基因GM-CSF分泌疫苗和algenpantucel-L临床试验还显示了免疫疗法的有益效果。进一步研究不同疫苗接种方案效率的临床试验目前正在进行中(Salman et al.,2013)。

[0056] 前列腺癌

[0057] 前列腺癌的治疗策略主要取决于癌症的分期。对于局部限制非转移性前列腺癌,治疗方案包括主动监测(等待和观察)、手术完全切除前列腺及局部高剂量放射治疗联合或不联合近距离放疗(S3-Leitlinie Prostatakarzinom,2014)。

[0058] 基于树突状细胞的疫苗sipuleucel-T是FDA批准的第一个抗癌疫苗。由于其对CRPC患者的生存有积极效果,许多努力被投入到进一步免疫疗法的开发上。关于疫苗接种策略,肽疫苗前列腺特异性抗原(PSA)-TRICOM、个性化肽疫苗PPV、DNA疫苗pTVG-HP以及表达GM-CSF GVAX的全细胞疫苗在不同的临床试验中均表现出有希望的结果。此外,除了sipuleucel-T外,基于树突状细胞的疫苗,即BPX-101和DCVAC/Pa被证明可引起前列腺癌患者的临床反应。免疫步骤抑制剂,如易普利姆玛和nivolumab目前正在临床研究中作为单一疗法以及与其他治疗(包括雄激素剥夺疗法、局部放射治疗、PSA-TRICOM和GVAX)联合进行评估。在II期临床试验中显著放缓进展和增加无进展生存期的免疫调节物质tasquinimod目前正在III期临床试验中进行进一步的研究。另一种免疫调节剂来那度胺在早期临床研究中诱导出有前途的作用,但在III期临床试验中未能改善生存。尽管有这些令人失望的结果,但是来那度胺的进一步试验正在进行中(Quinn et al.,2015)。

[0059] 肾细胞癌

[0060] 初始治疗最常见是部分或完全切除患病肾脏,仍然是主要的有效治疗方法(Rini et al.,2008)。对于预后得分较差患者的一线治疗,数个癌症组织和协会制定的指南推荐受体酪氨酸激酶抑制剂(TKI)舒尼替尼和帕唑帕尼、单克隆抗体贝伐单抗与干扰素 α (IFN- α)和mTOR抑制剂temsirolimus组合。根据美国NCCN以及欧洲EAU和ESMO指定的指南,TKI索

拉非尼、帕唑帕尼或最近的阿西替尼被推荐作为之前细胞因子 (IFN- α 、IL-2) 治疗失败的 RCC 患者的二线治疗。NCCN 指南还建议舒尼替尼用于此情况 (根据 NCCN 分类 I 的高水平证据)。

[0061] RCC 的已知免疫原性代表了支持在晚期 RCC 中使用免疫治疗和癌症疫苗的基础。淋巴细胞 PD-1 表达和 RCC 晚期分期、分级和预后以及 RCC 肿瘤细胞选择性 PD-L1 表达之间的有趣相关性, 以及其与较差临床结果的潜在关联性导致新抗 PD-1/PD-L1 制剂的开发, 单独使用或与抗血管生成药物或其他免疫治疗方法联合使用治疗 RCC (Massari et al., 2015)。在晚期 RCC 中, 一项名为 TRIST 研究的 III 期癌症疫苗试验评估了 TroVax (使用肿瘤相关抗原 5T4 的疫苗, 和痘病毒载体) 加入到一线标准治疗后是否延长局部晚期或 mRCC 患者的生存期。两组均未达到平均生存期, 399 名患者 (54%) 继续参加研究, 但是资料分析证实了之前的临床效果, 这表明 TroVax 具有免疫活性, 5T4-特异性抗体反应强度与生存期改善存在相关性。另外, 有几项研究寻找在 RCC 中过度表达的使用表位的肽疫苗。

[0062] 肿瘤疫苗的各种方法已在研究中。采用全肿瘤方法 (包括肿瘤细胞裂解物, 与肿瘤细胞的树突状细胞融合体或整个肿瘤 RNA) 的研究在 RCC 患者中完成, 在一些试验中报告了肿瘤病灶的缓解 (Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001)。

[0063] 小细胞肺癌

[0064] 小细胞肺癌 (SCLC) 的治疗和预后非常依赖确诊癌症分期。基于临床结果的 SCLC 分期比病理分期更常见。临床分期使用体检、各种成像测试和活检的结果。SCLC 的标准化学治疗使用依托泊苷或伊立替康联合顺铂或卡铂 (American Cancer Society, 2015; S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011)。

[0065] 免疫疗法是癌症治疗的过度研究领域。对于 SCLC 的治疗研究了各种方法。其中一种方法靶向阻断 CTLA-4, 这是一种天然的人免疫抑制物。CTLA-4 的抑制旨在增强对抗癌症的免疫系统。最近, 开始研发用于治疗 SCLC 的有前景的免疫步骤抑制剂。另一种方法基于防癌疫苗, 这是目前可用于临床研究的 SCLC 治疗方法 (American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute, 2015)。

[0066] 急性髓性白血病

[0067] AML 的治疗分为两个阶段: 诱导治疗和缓解后/“巩固治疗”。诱导治疗是诱导缓解和包括联合化疗。巩固治疗包括额外的化疗或造血干细胞移植 (HCT) (Showel and Levis, 2014)。

[0068] 对于属于不利和中等-2 预后组的患者推荐临床试验。治疗选择包括去甲基化药物 (HMA), 如阿扎胞苷或地西他滨、CPX-351 (柔红霉素和阿糖胞苷以 1:5 “最优” 摩尔比制成的脂质体制剂) 以及 volasertib (一种 Polo 激酶抑制剂)。Volasertib 与 LDAC (低剂量阿糖胞苷) 联合给药。几种不同的 FLT3 抑制剂可在 FLT3 突变的情况下给药。这些包括索拉非尼 (与 3+7 联合给药)、quizartinib (FLT3 ITD 的一种更具选择性的抑制剂, 也抑制 CKIT)、crenolanib 和米哚妥林 (一种非选择性 FLT3 ITD 抑制剂)。另一种治疗选择是用抗体-药物偶联物 (抗 CD33+calicheamicin、SGN-CD33a、抗 CD33+铜-225)、双特异性抗体 (识别 CD33+CD3 (AMG 330) 或 CD33+CD16) 和嵌合抗原受体 (CAR) 靶向作用 CD33 (Estey, 2014)。

[0069] 非霍奇金淋巴瘤

[0070] 非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 有60多种亚型。三种最常见的亚型为弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL, 最常见的亚型)、滤泡性淋巴瘤 (FL, 第二最常见的亚型) 和小淋巴细胞淋巴瘤/慢性淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL/CLL, 第三最常见的亚型)。DLBCL、FL和SLL/CLL占NHL的85%左右 (Li et al., 2015)。NHL的治疗取决于组织学类型和阶段 (National Cancer Institute, 2015)。

[0071] 在淋巴瘤患者中可观察到肿瘤自发消退。因此, 主动免疫疗法是一种治疗选择 (Palomba, 2012)。

[0072] 一种重要的疫苗接种方案包括Id疫苗。B淋巴细胞表达在其重链和轻链可变区以特定的氨基酸序列表达表面免疫球蛋白, 每个细胞克隆都是独特的 (=个体基因型, Id)。个体基因型作为肿瘤相关抗原。

[0073] 主动免疫包括注射偶联至佐剂 (KLH) 的重组蛋白 (Id), 其与GM-CSF一起作为免疫佐剂给予。肿瘤特异性Id透过杂交瘤培养物或使用重组DNA技术 (质粒) 透过细菌、昆虫或哺乳动物细胞培养物产生。

[0074] 子宫癌

[0075] 80%以上的子宫内膜癌发生形式为子宫内膜腺癌 (I型), 这与雌激素暴露有关, 并且分化为良好至中度。子宫内膜癌和宫颈癌的治疗与分期相关 (World Cancer Report, 2014)。

[0076] 目前也正在测试一些免疫治疗方法。在一项I/II期临床试验中, 子宫癌患者采用Wilms肿瘤基因1 (WT1) mRNA电穿孔的自体树突状细胞 (DC) 接种。除了一例对佐剂局部过敏反应的病例, 没有观察到不良反应, 6名患者中有3名表现出免疫应答 (Coosemans et al., 2013)。

[0077] 胆囊腺癌及胆管癌

[0078] 胆管癌 (CCC) 难以治疗, 通常是致命的。唯一的有效治疗方法是完全切除 (R0)。胆道癌生物疗法的疗效好坏参半。对于治疗CCC, 现在研究了血管生长的靶向药物, 如索拉非尼、贝伐单抗、帕唑帕尼和regorafenib。此外, 靶向作用于EGFR的药物, 如西妥昔单抗和帕尼单抗药物在临床研究中与化学疗法联合使用 (American Cancer Society, 2015)。对于至今测试的大多数药物, 疾病控制和总生存期没有显著改善, 但进一步的临床试验正在进行。

[0079] 胆囊癌 (GBC) 是世界范围内最常见和侵袭性最强的胆道恶性肿瘤。由于胆道癌较罕见, 总体上只有少数GBC或CCC特定的研究, 而其中大多数包括所有胆道癌。这就是为什么过去几十年中治疗没有改善的原因, R0切除仍是唯一的有效治疗选择。

[0080] 膀胱癌

[0081] 膀胱癌的标准治疗包括手术、放射疗法、化学疗法和免疫疗法 (National Cancer Institute, 2015)。

[0082] 一种有效的免疫治疗方法在治疗侵袭性非肌层浸润性膀胱癌 (NMIBC) 中得到确定。由此, 一种弱化形式的细菌牛型分枝杆菌 (卡介苗 = BCG) 作为一种膀胱内解决方案。BCG治疗的主要作用很长期 (长达10年) 阻止癌症复发并降低进展率。原则上, 用BCG治疗可诱导局部炎症反应, 其刺激细胞免疫应答。BCG免疫应答基于以下关键步骤: 透过BCG感染尿路上皮和膀胱癌细胞, 之后增加抗原呈递分子的表达, 透过细胞因子释放介导而诱导免疫应答, 透过各种免疫细胞 (细胞毒性T淋巴细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞) 的参与诱

导抗肿瘤活性 (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013)。

[0083] 考虑到严重的副作用及与治疗癌症相关的费用,有必要确定可用于总体上治疗癌症,尤其是治疗肝细胞癌(HCC)、结直肠癌(CRC)、胶质母细胞瘤(GB)、胃癌(GC)、食管癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、胰腺癌(PC)、肾细胞癌(RCC)、良性前列腺增生(BPH)、前列腺癌(PCA)、卵巢癌(OC)、黑色素瘤、乳腺癌、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、梅克尔细胞癌(MCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、急性骨髓性白血病(AML)、胆囊癌和胆管癌(GBC、CCC)、膀胱癌(UBC)、子宫癌(UEC)的因子。通常也有必要确定代表癌症生物标志物的因子,尤其是上述癌症类型,从而更好地诊断癌症、评估预后和预测治疗成功性。

[0084] 癌症免疫治疗代表了癌症细胞特异性靶向作用的一个选项,同时最大限度地减少副作用。癌症免疫疗法利用存在的肿瘤相关抗原。

[0085] 肿瘤相关抗原(TAA)的目前分类主要包括以下几组:

[0086] a) 癌-睾丸抗原:T细胞能够识别的最先确认的TAA属于这一类抗原,由于其成员表达于组织学相异的人肿瘤中、正常组织中、仅在睾丸的精母细胞/精原细胞中、偶尔在胎盘中,因此,它最初被称为癌-睾丸(CT)抗原。由于睾丸细胞不表达HLA I类和II类分子,所以,在正常组织中,这些抗原不能被T细胞识别,因此在免疫学上可考虑为具有肿瘤特异性。CT抗原大家熟知的例子是MAGE家族成员和NY-ESO-1。

[0087] b) 分化抗原:肿瘤和正常组织(肿瘤源自该组织)都含有TAA。大多数已知的分化抗原发现于黑色素瘤和正常黑色素细胞中。许多此类黑色素细胞谱系相关蛋白参与黑色素的生物合成,因此这些蛋白不具有肿瘤特异性,但是仍然被广泛用于癌症的免疫治疗。例子包括,但不仅限于,黑色素瘤的酪氨酸酶和Melan-A/MART-1或前列腺癌的PSA。

[0088] c) 过度表达的TAA:在组织学相异的肿瘤中以及许多正常组织中都检测到了基因编码被广泛表达的TAA,一般表达水平较低。有可能许多由正常组织加工和潜在提呈的表位低于T细胞识别的阈值水平,而它们在肿瘤细胞中的过度表达能够透过打破先前确立的耐受性而引发抗癌反应。这类TAA的典型例子为Her-2/neu、生存素、端粒酶或WT1。

[0089] d) 肿瘤特异性抗原:这些独特的TAA产生于正常基因(如 β -catenin、CDK4等)的突变。这些分子变化中有一些与致癌性转化和/或进展相关。肿瘤特异性抗原一般可在不对正常组织带来自体免疫反应风险的情况下诱导很强的免疫反应。另一方面,这些TAA在多数情况下只与其上确认了有TAA的确切肿瘤相关,并且通常在许多个体肿瘤之间并不都共享TAA。在含有肿瘤特定(相关)同种型蛋白的情况下,如果肽源自肿瘤(相关)外显子也可能出现肽肿瘤特异性(或相关性)。

[0090] e) 由异常翻译后修饰产生的TAA:此类TAA可能由肿瘤中既不具有特异性也不过度表达的蛋白产生,但其仍然具有肿瘤相关性(该相关性由主要对肿瘤具有活性的翻译后加工所致)。此类TAA产生于变糖基化模式的改变,导致肿瘤产生针对MUC1的新型表位或在降解过程中导致诸如蛋白拼接的事件,这可能具有也可能不具有肿瘤特异性。

[0091] f) 肿瘤病毒蛋白:这些TTA是病毒蛋白,可在致癌过程中发挥关键作用,并且由于它们是外源蛋白(非人源蛋白),所以能够激发T细胞反应。这类蛋白的例子有人乳头状瘤16型病毒蛋白、E6和E7,它们在宫颈癌中表达。

[0092] 基于T细胞的免疫治疗靶向作用于主要组织相容性复合体(MHC)分子提呈的来源于肿瘤相关蛋白或肿瘤特异性蛋白的肽表位。肿瘤特异性T淋巴细胞所识别的抗原,即其表

位,可以是源自所有蛋白类型的分子,如酶、受体、转录因子等,它们在相应肿瘤的细胞中被表达,并且与同源未变的细胞相比,其表达通常上调。

[0093] MHC分子有两类:MHC I类和MHC II类。MHC I类分子由一条 α 重链和 β -2-微球蛋白,MHC II类分子由一条 α 和一条 β 链组成。其三位构造形成一个结合槽,用于与肽进行非共价相互作用。

[0094] 大部分有核细胞上都可发现MHC-I类分子。他们提呈主要为内源性的蛋白、缺陷核糖体产物(DRIP)和较大肽裂解生成的肽。然而,源自内体结构或外源性来源的肽也经常在MHC-I类分子上发现。这种I-类分子非经典提呈方式在文献中被称为交叉提呈(Brossart and Bevan,1997;Rock et al.,1990)。MHC II类分子主要发现于专业抗原提呈细胞(APC)上,并且主要提呈,例如,在内吞作用过程中由APC占据并且随后被加工的外源性或跨膜蛋白的肽。

[0095] 肽和MHC I类的复合体由负载相应T细胞受体(TCR)的CD8阳性T细胞进行识别,而肽和MHC II类分子的复合体由负载相应TCR的CD4阳性辅助T细胞进行识别。因此,TCR、肽和MHC按照1:1:1的化学计量呈现,这一点已是共识。

[0096] CD4阳性辅助T细胞在诱导和维持CD8阳性细胞毒性T细胞的有效反应中发挥重要作用。肿瘤相关抗原(TAA)衍生的CD4阳性T细胞表位的识别对开发能引发抗肿瘤免疫反应的药物产品可能非常重要(Gnjatic et al.,2003)。在肿瘤部位,T辅助细胞维持着对细胞毒性T细胞(CTL)友好的细胞因子环境(Mortara et al.,2006)并吸引效应细胞,如CTL、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和粒细胞(Hwang et al.,2007)。

[0097] 在没有炎症的情况下,MHC II类分子的表达主要局限于免疫系统细胞,尤其是专业抗原提呈细胞(APC),例如,单核细胞、单核细胞源性细胞、巨噬细胞、树突状细胞。在癌症患者的肿瘤细胞中发现有MHC II类分子的表达(Dengjel et al.,2006)。

[0098] 本发明的拉长肽可作为MHC-II类活性表位。

[0099] MHC-II类表位活化的辅助T细胞在编排抗肿瘤免疫的CTL效应子功能中发挥着重要作用。触发 TH_1 细胞反应的辅助T细胞表位支援CD8阳性杀伤T细胞的效应子功能,其中包括直接作用于肿瘤细胞的细胞毒性功能(该类肿瘤细胞表面显示有肿瘤相关肽/MHC复合体)。这样,肿瘤相关T辅助细胞表位单独使用或与其他肿瘤相关肽结合使用可作为刺激抗肿瘤免疫反应的疫苗化合物的活性药物成分。

[0100] 哺乳动物(如小鼠)模型显示,即使没有CD8阳性T淋巴细胞,CD4阳性T细胞也能通过分泌干扰素- γ (IFN γ)抑制血管生成而足以抑制肿瘤的表现(Beatty and Paterson,2001;Mumberg et al.,1999)。没有CD4 T细胞作为直接抗肿瘤效应因子的证据(Braumuller et al.,2013;Tran et al.,2014)。

[0101] 由于HLA II类分子的组成性表达通常仅限于免疫细胞,因此,直接从原发肿瘤中分离II类肽之前被认为是不可能的事。然而,Dengjel等人成功地在肿瘤中直接识别了多个MHC II类表位(WO 2007/028574,EP 1 760 088 B1)。

[0102] 由于CD8依赖型和CD4依赖型这两种反应共同并协同地促进抗肿瘤作用,因此,确定和表征由CD8+ T细胞(配体:MHC I类分子+肽表位)或CD4阳性T辅助细胞(配体:MHC II类分子)识别的肿瘤相关抗原对开发肿瘤疫苗非常重要。

[0103] 对于MHC I类肽触发(引发)细胞免疫反应的肽,它也必须与MHC分子结合。这一过

程依赖于MHC分子的等位基因以及肽氨基酸序列的特异性多态性。MHC-I类-结合肽的长度通常为8-12个氨基酸残基,并且在与其与MHC分子相应结合沟槽相互作用的序列中通常包含两个保守残基(“锚”)。这样,每个MHC的等位基因都有“结合基序”,从而确定哪些肽能与结合沟槽特异性结合。

[0104] 在MHC-I类依赖性免疫反应中,肽不仅能与肿瘤细胞表达的某些MHC-I类分子结合,而且它们之后还必须能被T细胞负载的特异性T细胞受体(TCR)识别。

[0105] 对于被T淋巴细胞识别为肿瘤特异性抗原或相关性抗原以及用于治疗蛋白质,必须具备特殊的条件。该抗原应主要由肿瘤细胞表达,而不由正常健康组织表达,或表达数量相对较少。在一个优选的实施方案中,与正常健康组织相比,所述肽应在肿瘤细胞中过度提呈。更为适宜的情况是,该相应抗原不仅出现于一种肿瘤中,而且浓度(即每个细胞的相应肽拷贝数目)高。肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原往往是源自直接参与因细胞周期控制或凋亡抑制中的其功能而发生的正常细胞向肿瘤细胞转化的蛋白。另外,这些直接导致转化学事件的蛋白的下游靶标可能会被上调,因此可能与肿瘤间接相关。这些间接肿瘤相关抗原也可能是预防接种方法的靶标(Singh-Jasuja et al., 2004)。至关重要的是,表位存在于抗原氨基酸序列中,以确保这种来自肿瘤相关抗原的肽(“免疫原性肽”)可导致体外或体内T细胞反应。

[0106] 基本上,任何能与MHC分子结合的肽都可能充当一个T细胞表位。诱导体外或体内T细胞反应的前提是存在具有相应TCR的T细胞并且不存在对该特定表位的免疫耐受性。

[0107] 因此,TAA是基于T细胞疗法(包括但不限于肿瘤疫苗)研发的起点。识别和表征TAA的方法通常基于对患者或健康受试者T细胞的使用情况,或基于肿瘤与正常组织肽之间差别转录特性或差别表达模式的产生。然而,对肿瘤组织或人肿瘤细胞株中过度表达或选择性表达的基因的识别并不提供在免疫疗法中使用这些基因所转录抗原的准确信息。这是因为,有着相应TCR的T细胞必须要存在而且对这个特定表位的免疫耐受性必须不存在或为最低水平,因此,这些抗原的表位只有一部分适合这种应用。因此,在本发明的一非常优选的实施例中,只选择那些针对可发现功能性和/或增殖性T细胞情况的过量提呈或选择性提呈肽,这一点非常重要。这种功能性T细胞被定义为在以特异性抗原刺激后能够克隆地扩展并能够执行效应子功能(“效应子T细胞”)的T细胞。

[0108] 在透过根据本发明的特定TCR(例如可溶性TCR)和抗体或其他结合分子(支架)靶向作用于肽-MHC的情况下,潜在肽的免疫原性是次要的。在这些情况下,提呈是决定因素。

[0109] 发明简介

[0110] 在本发明的第一方面,本发明涉及一种肽,包含选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288的组的一个氨基酸序列、或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288具有至少77%,优选至少88%同源(优选至少77%或至少88%相同)的一种变体序列(其中所述变体与MHC结合和/或诱导T细胞与所述肽发生交叉反应),或其药用盐(其中所述肽不是潜在全长多肽)。

[0111] 虽然作为癌症治疗靶目标肽最重要的标准是其在原发性肿瘤组织中相比于正常组织过度提呈,但是,相应基因的RNA表达谱也可有助于选择适当的肽。特别是,由于它们的化学性质或在细胞上的低拷贝数,部分肽很难透过质谱检测,侧重于肽提呈检测的筛选方法可能无法识别这些靶标。然而,这些靶标可透过另一种方法来检测,开始分析正常组织的基

因表达,其次评估肿瘤肽提呈和基因表达。这种方法在本发明中使用来自公开可用的数据库 (Lonsdale, 2013) 的 mRNA 数据结合进一步的基因表达数据 (包括肿瘤样本) 以及肽提呈数据实现。如果一个基因的 mRNA 在正常组织中几乎不存在,特别是在重要器官系统中不存在,透过很有效的策略 (例如双特异性亲和力优化的抗体或 T 细胞受体) 靶向作用于相应肽更可能是安全的。虽然此类肽仅在一小部分肿瘤组织中被发现,但其代表了令人关注的靶标。常规质谱分析不够敏感,无法在肽水平上评估靶标范围。相反,肿瘤 mRNA 表达可用于评估靶标范围。为了检测肽本身,比在常规筛选中敏感度更高的靶向质谱方法可能是必要的,并可能更好地在肽提呈水平上评估靶标范围。

[0112] 本发明进一步涉及本发明的一种肽,包含选自包括 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 的组的一个序列、或与 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:288 具有至少 77%、优选至少 88% 同源性 (优选为至少 77% 或 88% 相同) 的一种变体,其中所述肽或其变体的总长度为 8 至 100 个、优选为 8 至 30 个、最优选为 8 至 14 个氨基酸。

[0113] 下表显示了根据本发明的肽、它们各自的 SEQ ID NO、以及这些肽的可能源 (潜在) 基因。表 1 和表 2 中的所有肽均与 HLA-A*02 结合。表 2 中的肽之前在大型列表中披露,作为高通量筛查结果,错误率高,或使用算法计算出,但之前与癌症毫无关联。

[0114] 表 1: 本发明中的肽

[0115]	序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
	1	KLQEKIQEL	1062	CENPE
	2	SVLEKEIYSI	127602	DNAH14
	3	RVIDDSL VVG V	2187	FANCB
	4	VLFGELPAL	8701	DNAH11
	5	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
	6	FLNAIETAL	8701	DNAH11

[0116]

7	ALLQALMEL	51236,728071	FAM203A,FAM203B
8	ALSSSQAEV	3833	KIFC1
9	SLITGQDLLSV	51804	SIX4
10	QLIEKNWLL	56992	KIF15
11	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	26762	HAVCR1
13	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
14	YTFSGDVQL	4312	MMP1
15	GLPSATTTV	94025	MUC16
16	SLADLSLLL	134391	GPR151
17	GLLPSAESIKL	132989	C4orf36
18	KTASINQNV	81930	KIF18A
19	KVFELDLVTL	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	1063	CENPF
21	YLMDDFSSL	1293	COL6A3
22	LMYPYIYHV	54954	FAM120C
23	ALLSPLSLA	4017,9583	LOXL2,ENTPD4
24	KVWSDVTPL	4320,4322	MMP11,MMP13
25	LLWGHPRVALA	25878	MXRA5
26	VLDGKVAVV	6660	SOX5
27	GLLGKVTSTV	51297	BPIFA1
28	IKVTDQPQLLEL	51297	BPIFA1
29	KMISAIPTL	94025	MUC16
30	IITEVITRL	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	94025	MUC16
32	VVMVLVLML	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	94025	MUC16
35	VIKGLEEI	3832	KIF11
36	TVLQELINV	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	3832	KIF11
38	VLQQESNFL	63967	CLSPN
39	YLEDGFAYV	5558	PRIM2
40	KIWEELSVLEV	4102,4105	MAGEA3,MAGEA6
41	IVTEIISEI	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	64151	NCAPG
43	LLIPFTIFM	1237	CCR8
44	AVFNLVHV	56923	NMUR2
45	FLPVSVVYV	56923	NMUR2
46	ISLDEVAVSL	144455	E2F7

[0117]

47	GLNGFNVLL	144455	E2F7
48	KISDFGLATV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	8532	CPZ
51	LDSEALLTL	84467	FBN3
52	TIGIPFPNV	83990	BRIP1
53	AQHLSTLLL	1469	CST1
54	YLVPGLVAA	64180	DPEP3
55	HLFDKIHKI	654463	FER1L6
56	VLQENSSDYQSNL	3188	HNRNPH2
57	TLYPGRFDYV	338322	NLRP10
58	HLLGEGAFAQV	699	BUB1
59	ALADGIKSFL	5296	PIK3R2
60	YLFSQGLQGL	2491	CENPI
61	ALYPKEITL	203102	ADAM32
62	SLVENIHVL	675	BRCA2
63	KLLPMVIQL	246	ALOX15
64	SLYAGSNNQV	246	ALOX15
65	SLSEKSPEV	158511,728461	CSAG1,CSAG2
66	AMFPDTIPRV	285220	EPHA6
67	FLIENLLAA	3166	HMX1
68	QLMNLIRSV	51124	IER3IP1
69	LKVLKADVVL	259307	IL4I1
70	GLTEKTVLV	24137,285643	KIF4A,KIF4B
71	HMSGKLTNV	55771	PRR11
72	VLSTRVTNV	55771	PRR11
73	SVPKTLGV	11280	SCN11A
74	GLAFLPASV	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	6570	SLC18A1
76	FTAEFLEKV	79801	SHCBP1
77	ALYGNVQQV	91646	TDRD12
78	LFQSRIAGV	7579	ZSCAN20
79	TVLEEIGNRV	9133	CCNB2
80	VLTGQVHEL	10715	CERS1
81	ILAEPIYI	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	55655	NLRP2
83	GLLENSPHL	25788	RAD54B
84	FLLEREQLL	165055	CCDC138
85	KLLDKPEQFL	342184	FMN1
86	SLFSNIESV	54848	ARHGEF38

[0118]

87	KLLSLLEEA	54848	ARHGEF38
88	LLLPLELSLA	374946	DRAXIN
89	SLAETIFIV	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	3359	HTR3A
92	RLFEEVLGV	9816	URB2
93	RLYGYFHDA	6790	AURKA
94	YLDEVAFML	1238	CCBP2
95	KLIDEDPLFL	1767	DNAH5
96	ALDTTRHEL	93323	HAUS8
97	KLFESTGL	23421	ITGB3BP
98	FVQEKIPEL	84944	MAEL
99	TLFGIQLTEA	84944	MAEL
100	ALQSFEFRV	56130	PCDHB6
101	SLLEVNEASSV	149628	PYHIN1
102	GLYPVTLVGV	83696	TRAPPC9
103	YLADTVQKL	100526761,54937	CCDC169-SOHLH2,SOHLH2
104	DLPTQEPALGTT	354	KLK3
105	AMLASQTEA	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	4477	MSMB
107	RVLPGQAVTGV	55247	NEIL3
108	FIANLPPELKA	6013	RLN1
109	ILGSFELQL	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	7047	TGM4
111	AQLEGKLVSI	3161	HMMR
112	ILAQDVAQL	24137	KIF4A
113	FLFLKEVKV	54596	L1TD1
114	LLFPSDVQTL	23397	NCAPH
115	ILHGEVNKV	54830	NUP62CL
116	ALLSSVAEA	9048	ARTN
117	TLLEGISRA	26256	CABYR
118	IAYNPNGNAL	3824	KLRD1
119	SLIEESEEL	284217	LAMA1
120	LQLJPLKGLSL	6241	RRM2
121	ALYVQAPTV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	150737,92104	TTC30B,TTC30A
124	ALLRLFTI	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	11130	ZWINT

[0119]

126	QLREAFEQL	11130	ZWINT
127	IMKATGLGIQL	154664	ABCA13
128	SILTNISEV	24	ABCA4
129	KMASKVTQV	132612	ADAD1
130	QLYGSAITL	158067	AK8
131	SLYPHFTLL	440138	ALG11
132	ALLNNVIEV	57101	ANO2
133	FLDGRPLTL	83734	ATG10
134	SLYKSFLQL	527	ATP6V0C
135	HLDTVKIEV	135152	B3GAT2
136	LLWDAPAKC	192134	B3GNT6
137	KLIYKDLVSV	85016	C11orf70
138	GIINKLVTV	440087	C12orf69
139	IILENIQSL	55732	C1orf112
140	FLDSQITTV	255119	C4orf22
141	NIDINNNEL	57082	CASC5
142	LLDAAHASI	284992	CCDC150
143	MLWESIMRV	166979	CDC20B
144	FLISQTPLL	60437	CDH26
145	ALEEKLENV	79172	CENPO
146	VVA AHLAGA	148113	CILP2
147	GLLSALENV	1269	CNR2
148	YLILSSHQL	1269	CNR2
149	NMADGQLHQV	728577,79937	CNTNAP3B,CNTNAP3
150	VLLDMVHSL	100507170,2553 13,653282,72803 6,728042,728049 ,728062,728072, 728075,728082,7 28090,728096	CT47A12,CT47A11,CT47A7 ,CT47A10,CT47A9,CT47A8, CT47A6,CT47A5,CT47A4,C T47A3,CT47A2,CT47A1
151	DISKRIQSL	100128553,2204 29,341689,4253, 64693	CTAGE4,CTAGE10P,CTAG E16P,CTAGE5,CTAGE1
152	ILVTSIFFL	643	CXCR5
153	KLVELEHTL	203413	CXorf61
154	AIKEIQTV	1588	CYP19A1
155	TLDSYLKAV	163720,199974	CYP4Z2P,CYP4Z1
156	VILTSSPFL	10800	CYSLTR1
157	ILQDGQFLV	138009	DCAF4L2
158	YLDPLWHQL	2072	ERCC4

[0120]

159	QLGPVPVTI	285966	FAM115C
160	TLQEWLTEV	167555	FAM151B
161	NLLDENVCL	26290	GALNT8
162	GLLGNNLTSL	51608	GET4
163	GLEERLYTA	29933	GPR132
164	MLIIRVPSV	80000	GREB1L
165	SLLDYEVS	116444	GRIN3B
166	LLGDSSFFL	283254	HARB11
167	LVVDEGSLVSV	92797	HELB
168	VIFEGEPMYL	84072	HORMAD1
169	ALADLSVAV	3363	HTR7
170	FIAAVVEKV	203100	HTRA4
171	LLLLDVPTA	10437	IFI30
172	SLYLQMNSLRTE	28426	IGHV3-43
173	RLIDIYKNV	338567	KCNK18
174	ALYSGDLHAA	157855	KCNU1
175	SLLDLVQSL	57536	KIAA1328
176	VQSGLRILL	57650	KIAA1524
177	ALINVLNAL	146909	KIF18B
178	SLVSWQLLL	3814	KISS1
179	TLGEIIKGV	402569	KPNA7
180	RLYEEEIRI	3887,3889	KRT81,KRT83
181	LLWAPTAQA	389812	LCN15
182	GLQDGFQITV	284194,654346	LGALS9B,LGALS9C
183	ALSYILPYL	147172	LRRC37BP1
184	ALDSTIAHL	149499	LRRC71
185	TLYQGLPAEV	80131	LRRC8E
186	SLLSLESRL	57408	LRTM1
187	SILKEDPFL	346389	MACC1
188	VLGEEQEGV	4108,728269	MAGEA9,MAGEA9B
189	MAVSDLLIL	2862	MLNR
190	SLSTELFKV	4622,4626	MYH4,MYH8
191	AAIEIFEKV	55728	N4BP2
192	TLLPSSGLVTL	344148	NCKAP5
193	ALFHMNILL	126206	NLRP5
194	KLLEEVQLL	126206	NLRP5
195	VIIQNLPAL	387129	NPSR1
196	TLHQWIYYL	120406	NXPE2
197	LGGPTSLHVV	390038	OR51D1
198	ILTNKVVS	119678	OR52E2

[0121]

199	SVADLAHVL	27334	P2RY10
200	IMPTFDLTKV	203569,389860	PAGE2,PAGE2B
201	LLFSLCEA	51050	PI15
202	ALAKDELSL	120379	PIH1D2
203	FLFVDPELV	146850	PIK3R6
204	SEWGSPHAAVP	5539	PPY
205	LAFGYDDEL	391004,654348	PRAMEF17,PRAMEF16
206	GLDAFRIFL	431704	RGS21
207	KLFETVEEL	6121	RPE65
208	HLNNDRNPL	6406	SEMG1
209	VLQTEELVAN	6406	SEMG1
210	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
211	LLTTVLINA	6582	SLC22A2
212	MTLSEIHAV	9153	SLC28A2
213	ILAVDGVLSV	169026	SLC30A8
214	ALFETLIQL	139420	SMEK3P
215	QIADIVTSV	139420	SMEK3P
216	ALSTVTPRI	166378	SPATA5
217	LLWPSSVPA	246777,79400	SPESP1,NOX5
218	SLTGANITV	83932	SPRTN
219	GVVPTIQKV	64220	STRA6
220	ALSELERVL	51298	THEG
221	IMLNSVEEI	387357	THEMIS
222	LLTGVFAQL	388564	TMEM238
223	ALHPVQFYL	93587	TRMT10A
224	LLFDWSGTGRADA	79465	ULBP3
225	FLPQPVPLSV	57695	USP37
226	SLAGNLQEL	11023	VAX1
227	SEMEELPSV	26609,425054,51481	VCX,VCX3B,VCX3A
228	SLLELDGINLRL	221806	VWDE
229	YLYELEHAL	80217	WDR96
230	KLLNMIFSI	2829	XCR1
231	LLDDIFIRL	143570	XRRA1
232	LVVGGIATV	84614	ZBTB37
233	SLFESLEYL	132625	ZFP42

[0122] 表2:本发明中的其他肽,之前与癌症无已知的关联

[0123]	序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
--------	---------	----	-------	--------

[0124]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
234	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
235	SLLNQPKAV	63967	CLSPN
236	KMSELQTYV	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMSL	1063	CENPF
238	HLQEKQLSL	1063	CENPF
239	VIIKGLEEITV	3832	KIF11
240	SVQENIQK	3832	KIF11
241	KQFEGTVEI	675	BRCA2
242	KLQEEIPVL	1062	CENPE
243	GLAEFQENV	57405	SPC25
244	NVAEIVIH	83540	NUF2
245	ALLEEEGV	4103	MAGEA4
246	ALAGIVTNV	11077	HSF2BP
247	NLLIDDKGTIKL	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	983	CDK1
249	YLYQILQGI	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	983	CDK1
251	LLWGNLPEI	653820,729533	FAM72B,FAM72A
252	SLMEKNQSL	24137,285643	KIF4A,KIF4B
253	KLLAVIH	25788	RAD54B
254	ALGDKFLRV	4608	MYBPH
255	FLMKNSDLYGA	79801	SHCBP1
256	FLNDIFERI	337873,337874	HIST2H2BC,HIST2H2BD
257	KLIDHQGLYL	7579	ZSCAN20
258	QLVQRVASV	5683	PSMA2
259	GPGIFPPPPQP	10879	SMR3B
260	ALNESLVEC	55165	CEP55
261	GLAALAVHL	2175	FANCA
262	LLLEAVVHL	2175	FANCA
263	SIIEYLPTL	79915	ATAD5
264	TLHDQVHLL	2099	ESR1
265	FLLDKPQDLSI	346389	MACC1
266	FLLDKPQDL	346389	MACC1
267	YLLDMPLWYL	7153	TOP2A
268	SLDKDIAL	7153	TOP2A
269	GLLDCPIFL	2177	FANCD2
270	TLLTFFHEL	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	55215	FANCI

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
272	FVMEGEPPKL	348654	GEN1
273	SLNKQIETV	57650	KIAA1524
274	TLYNPERTITV	10642,10643	IGF2BP1,IGF2BP3
275	AVPPPPSSV	10642	IGF2BP1
276	RMPTVLQCV	9622	KLK4
277	KLQEELNKV	3161	HMMR
278	VLEDKVLSV	128239	IQGAP3
279	VLMDEGAVLTL	54596	L1TD1
280	HLWGHALFL	89866	SEC16B
281	LLLESDPKVYSL	6491	STIL
282	SLYALHVKA	79001	VKORC1
283	ALSELLQQV	9816	URB2
284	KLMDPGSLPPL	2118	ETV4
285	MLLDTVQKV	54892	NCAPG2
286	FLTEMVHFI	93517	SDR42E1
287	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
288	SLYKGLLSV	25788	RAD54B

[0126] J=磷酸丝氨酸

[0127] 特别优选的是本发明的肽(单独或组合),其选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288的组。更优选的是所述肽(单独或组合)选自包括SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:126的组(见表1)并且其用于免疫治疗肝细胞癌(HCC)、结直肠癌(CRC)、胶质母细胞瘤(GB)、胃癌(GC)、食道癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、胰腺癌(PC)、肾细胞癌(RCC)、良性前列腺增生(BPH)、前列腺癌(PCA)、卵巢癌(OC)、黑色素瘤、乳腺癌、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、梅克尔细胞癌(MCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性骨髓性白血病(AML)、胆囊癌和胆管癌(GBC、CCC)、膀胱癌(UBC)、子宫癌(UEC)。

[0128] 最优选的是所述单独或组合的肽-选自由SEQ ID NO:274、14、21、23、25、157、168、11、253、85、89、40、264、155、233和245组成的组(见表1、2和10)以及它们在HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL免疫治疗中的用途。

[0129] 本发明还涉及本发明的肽,其具有与主要组织相容性复合体(MHC)I或以拉长形式存在的例如长度变化的-MHC-II类分子结合的能力。

[0130] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中所述肽(每种肽)系由或基本系由根据SEQ ID NO 1至SEQ ID NO 288的一个氨基酸序列组成。

[0131] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽被修饰和/或包含非肽键。

[0132] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽为融合蛋白的一部分,特别是与HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸融合,或与抗体(例如,树突状细胞特定抗体)或抗体的序列融合。

[0133] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明的肽。本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。

[0134] 本发明进一步涉及一种能表达和/或表达本发明核酸的表达载体。

[0135] 本发明进一步涉及本发明的一种肽、本发明的一种核酸或本发明的一种治疗疾病的药用表达载体,特别是用于治疗癌症。

[0136] 本发明进一步涉及本发明中肽或本发明中所述肽复合体(含有MHC)的特定抗体以及制造这些抗体的方法。

[0137] 本发明进一步涉及本发明的T细胞受体(TCR),特别是可溶性TCR(sTCRs)和加工为自体或异体T细胞的克隆TCR,以及制造这些TCR的方法和载有所述TCR或所述TCR交叉反应的NK细胞的制造方法。

[0138] 抗体和TCR是根据本发明的肽现有免疫治疗用途的另外实施方案。

[0139] 本发明进一步涉及含本发明核酸或前述表达载体的一种宿主细胞。本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其为抗原提呈细胞,优选为树突细胞。

[0140] 本发明进一步涉及配制本发明一种肽的一种方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞和从所述宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0141] 本发明进一步涉及本发明中的所述方法,其中抗原透过与足够量的含抗原提呈细胞的抗原结合被载入表达于合适抗原提呈细胞或人工抗原呈递细胞表面的I或II类MHC分子。

[0142] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中抗原提呈细胞由能表达含SEQ ID NO.1至SEQ ID NO.288、优选为含SEQ ID No.1至SEQ ID No.126所述肽的一个表达载体、或一个变体氨基酸序列组成。

[0143] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的激活T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞表达含一种本发明氨基酸序列的多肽。

[0144] 本发明进一步涉及一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明任何氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者按本发明方法制造的有效量T细胞。

[0145] 本发明进一步涉及任何所述肽、本发明的核酸、本发明的表达载体、本发明的细胞、本发明的作为药剂或制造药剂的激活T淋巴细胞、T细胞受体或抗体或其他肽-和/或肽-MHC结合分子的用途。所述药剂优选为具有抗癌活性。

[0146] 优选情况为,所述药剂适合用于基于可溶性TCR或抗体的细胞治疗药物、疫苗或蛋白质。

[0147] 本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中所述癌细胞为HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL细胞。

[0148] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的生物标志物,在此成为“靶标”,其可用于诊断癌症,优选为HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL。所述标志物可以肽本身过度提呈或相应基因过度表达。标志物也可以用于预测治疗成功的可能性,优选为免疫疗法,最优选为靶向作用于该生物标志物识别的相同靶目标免疫疗法。例如,抗体或可溶性TCR可用于染色肿瘤切片以检测是否存在相关肽与MHC复合。

[0149] 或者,抗体具有进一步的效应子功能,如免疫刺激域或毒素。

[0150] 本发明还涉及这些癌症治疗中新靶点的用途。

[0151] CABYR编码位于纤维鞘相关的精子鞭毛主段的一种蛋白,在获能过程中当被磷酸化时表现出钙结合性(RefSeq,2002)。在非小细胞肺癌细胞系NCI-H460和A549中CABYR亚型CABYR-a和CABYR-b的敲除被证明可导致增殖的抑制和组成型活性Akt磷酸的衰减(Qian et al.,2014)。CABYR表达的沉寂被证明可影响Akt途径的下游组件,如磷酸化GSK-3 β 以及p53和p27蛋白(Qian et al.,2014)。此外,CABYR的敲除被证明可显著增加敏感性,以在体内外回应于化疗药物和药物诱导的细胞凋亡,因而可能是改善肺癌凋亡反应和化学敏感性的一种新方法(Qian et al.,2014)。CABYR被描述为一种初始睾丸特异性蛋白,随后显示存在于脑肿瘤、胰腺癌和肺癌(Hsu et al.,2005;Luo et al.,2007;Li et al.,2012)。CABYR被证明在肝细胞癌中上调,可能在肝癌形成及其进展中起到致癌作用(Li et al.,2012)。

[0152] COL6A3编码胶原、VI型、 α 3,即VI型胶原蛋白的三种 α 链之一,这是在大多数结缔组织中发现的一种珠状丝胶原,对于基质组分组织很重要(RefSeq,2002)。COL6A3编码VI型胶原蛋白的 α -3链,这是在大多数结缔组织中发现的一种珠状丝胶原,在基质组分的组织中起着重要作用(RefSeq,2002)。COL6A3在结肠癌、膀胱癌和前列腺癌中可变剪接。COL6A3的长同种型几乎在癌症样本中特有表达,可潜在地作为新的癌症标志物(Thorsen et al.,2008)。COL6A3在胰腺导管腺癌组织中高度表达,并进行肿瘤特异性选择性剪接(Kang et al.,2014)。COL6A3已被证明与高级别的卵巢癌相关,并有助于顺铂抗性的形成。COL6A3被观察到在胃癌组织中频繁过度表达(Xie et al.,2014)。COL6A3突变可明显预测结直肠癌患者具有更好的整体生存率,与肿瘤分化和TNM分期无关(Yu et al.,2015)。据报告,COL6A3表达在胰腺癌、结肠癌、胃癌、粘液表皮样癌和卵巢癌中增加。在结肠癌、膀胱癌、前列腺癌和胰腺癌中检测到包括外显子3、4和6的癌症相关转录物变体(Arafat et al.,2011;Smith et al.,2009;Yang et al.,2007;Xie et al.,2014;Leivo et al.,2005;Sherman-Baust et al.,2003;Gardina et al.,2006;Thorsen et al.,2008)。在卵巢癌中,COL6A3水平与较高的肿瘤分级相关,在胰腺癌中,COL6A3被证明可提呈一种合适的诊断血清生物标志物(Sherman-Baust et al.,2003;Kang et al.,2014)。

[0153] CXorf61,也被称为CT83,编码癌症/睾丸抗原83,位于染色体Xq23上(RefSeq,2002)。CXorf61的表达已在不同癌症类型中描述,包括乳腺癌和肺癌(Yao et al.,2014;Hanagiri et al.,2013;Baba et al.,2013)。CXorf61被证明是肺癌的免疫原性癌-睾丸抗原。因此,它可能代表了抗肿瘤免疫治疗的有希望的候选(Fukuyama et al.,2006)。

[0154] CYP4Z1编码酶细胞色素P450超家族的一员。细胞色素P450蛋白是单加氧酶,其催化涉及药物代谢和胆固醇、类固醇和其他脂质合成的许多反应(RefSeq,2002)。在乳腺癌中,CYP4Z1过度表达与较高的肿瘤分级和较差的预后相关。从功能上来说,CYP4Z1部分透过PI3/Akt和ERK1/2信号传导促进乳腺癌的肿瘤血管生成和生长(Yu et al.,2012;Murray et al.,2010)。此外,CYP4Z1被描述可在非小细胞肺癌进展中发挥作用(Bankovic et al.,2010)。在前列腺癌和卵巢癌中,CYP4Z1已被确定为独立预测标志物(Tradonsky et al.,2012;Downie et al.,2005)。CYP4Z2P是位于染色体1p33上的一种假基因(RefSeq,2002)。

[0155] DCAF4L2编码DDB1和CUL4相关因子4样2。此蛋白的特定功能尚待阐明;不过DCAF4L2基因被证明与视盘形态和唇裂发育有关(Springelkamp et al.,2015;Beaty et al.,2013)。

[0156] ESR1编码一种雌激素受体,是一种配体激活的转录因子,对于激素结合、DNA结合

和转录活化非常重要,是对性发育和生殖功能必不可少的(RefSeq,2002)。ESR1的突变和单核苷酸多态性与不同癌症类型的风险相关,包括肝癌、前列腺癌、胆囊和乳腺癌。ESR1表达的上调与细胞增殖和肿瘤生长相关,但是,ESR1阳性肿瘤患者由于使用选择性雌激素受体调节剂成功治疗总体生存更好(Sun et al.,2015;Hayashi et al.,2003;Bogush et al.,2009;Miyoshi et al.,2010;Xu et al.,2011;Yakimchuk et al.,2013;Fuqua et al.,2014)。ESR1信令干扰负责细胞转化、生长和存活的不同途径,如EGFR/IGFR、PI3K/Akt/mTOR、p53、HER2、NF κ B和TGF- β 途径(Frasor et al.,2015;Band and Laiho,2011;Berger et al.,2013;Skandalis et al.,2014;Mehta and Tripathy,2014;Ciruelos Gil,2014)。

[0157] FMN1编码甲精1,这是一种在粘附结形成和线性肌动蛋白素聚合作用中起作用的蛋白质(RefSeq,2002)。FMN1的单核苷酸多态性与前列腺癌的风险增加有关(Lisitskaia et al.,2010)。

[0158] HAVCR1,也被称为甲型肝炎病毒细胞受体1或KIM-1,编码人类甲肝病毒和TIMD4的一种膜受体蛋白,并可能参与哮喘和过敏性疾病的稳定(RefSeq,2002)。HAVCR1被描述为与卵巢透明细胞癌和肾细胞癌相关的新候选生物标志物(Bonventre,2014;Kobayashi et al.,2015)。HAVCR1被证明可激活透明细胞肾细胞癌来源细胞系中的IL-6/STAT-3/HIF-1A轴,并确定肿瘤进展和患者结果(Cuadros et al.,2014)。HAVCR1在肾脏中组成型表达被描述为透明细胞肾细胞癌发生的一个潜在的敏感性特征(Cuadros et al.,2013)。此外,增强的HAVCR1外生域脱落被证明可促进体外浸润性表型和体内更具侵袭性的肿瘤(Cuadros et al.,2013)。HAVCR1被描述为在肾癌、卵巢透明细胞癌和结直肠癌中上调(Wang et al.,2013b)。HAVCR1上调被描述为结直肠癌的一个潜在诊断生物标志物,是手术后较长无病间隔(可能也涉及结直肠癌转移级联)的预后标记(Wang et al.,2013b)。HAVCR1被证明与T细胞大颗粒淋巴细胞白血病有关(Wlodarski et al.,2008)。

[0159] HORMAD1(也称为CT46)编码一种可能在减数分裂中发挥作用的含HORMA结构域的蛋白。HORMA结构域参与染色质结合和细胞周期调节(RefSeq,2002)。HORMAD1是一种癌症/睾丸抗原,在不同癌症类型(包括乳腺癌、胃癌和卵巢癌)中过度表达,从而成为潜在的生物标志物和免疫治疗靶标(Yao et al.,2014;Shahzad et al.,2013;Chen et al.,2005;Aung et al.,2006;Adelaide et al.,2007)。HORMAD1下调导致浸润、迁移的减少和肿瘤重量下降,以及VEGF蛋白水平降低(Shahzad et al.,2013)。

[0160] HSF2BP编码与HSF2相关的HSF2结合蛋白,可能参与调节HSF2活化(RefSeq,2002)。

[0161] HSF4编码热休克转录因子4,其激活热或其他应力条件下的热休克反应基因(RefSeq,2002)。HSF4被证明在胶质母细胞瘤中下调(Mustafa et al.,2010)。

[0162] HTR3A编码属于配体-门控离子通道受体超家族的一种5-羟色胺(血清素)受体,其导致神经元在激活后快速去极化反应(RefSeq,2002)。HTR3A(也称为5-HT3)在几种癌症类型中失调,例如,在套细胞淋巴瘤中下调,在不同的B细胞肿瘤中差异表达,在乳腺癌细胞系中表达降低(Pai et al.,2009;Rinaldi et al.,2010;Ek et al.,2002)。

[0163] IGF2BP1,也称为CRD-BP,编码胰岛素样生长因子2mRNA结合蛋白家族中的一员,其透过结合到某些基因的mRNA和调节它们的翻译发挥作用(RefSeq,2002)。IGF2mRNA结合蛋白家族的两个成员,包括IGF2BP1被描述为真正的癌胚蛋白,在各种人类癌症中重新合成,并且可能是肿瘤生长、耐药性和转移的强大的转录后癌基因(Lederer et al.,2014)。据报

告,IGF2BP1的表达与各种人类癌症的总体预后差和转移相关(Lederer et al.,2014)。因此,IGF2BP1被认为是一种有力的生物标志物,是癌症治疗的候选靶标(Lederer et al.,2014)。IGF2BP家族成员被描述为与癌症转移和致癌因子(如KRAS、MYC和MDR1)表达高度相关(Bell et al.,2013)。IGF2BP1被证明与C-MYC相互作用,并被发现在绝大多数结肠和乳腺肿瘤和肉瘤以及良性肿瘤(如乳房纤维腺瘤和脑膜瘤)中表达(Ioannidis et al.,2003)。IGF2BP1被证明在肝细胞癌和基底细胞癌中上调(Noubissi et al.,2014;Zhang et al.,2015a)。IGF2BP1和其他基因的上调被证明与肝细胞癌手术后预后差显著相关(Zhang et al.,2015a)。IGF2BP1被证明分别是肝细胞癌和肾细胞癌中miR-9和miR-372肿瘤抑制因子的一个靶标(Huang et al.,2015;Zhang et al.,2015a)。基质IGF2BP1的减少被证明可促进结肠中致癌微环境,这表明IGF2BP1在结肠基质细胞中起着肿瘤抑制作用(Hamilton et al.,2015)。IGF2BP1被证明与4期肿瘤、患者生存期降低以及神经母细胞瘤MYCN基因扩增相关,因此可能是神经母细胞瘤的一种潜在致癌基因和一种独立的负预后因子(Bell et al.,2015)。IGF2BP1被描述为WNT/ β -连环蛋白信号通路的直接靶标,其在基底细胞癌的发展中调节GLI1表达和活性(Noubissi et al.,2014)。

[0164] IGF2BP3编码胰岛素样生长因子II mRNA结合蛋白3,这是一种癌胚蛋白,其压制胰岛素样生长因子II的翻译(RefSeq,2002)。几项研究表明,IGF2BP3在细胞功能的各个重要方面发挥作用,例如细胞极化、迁移、形态、代谢、增殖和分化。体外研究表明,IGF2BP3促进肿瘤细胞的增殖、粘附和侵袭。此外,IGF2BP3已经显示与侵袭性和晚期癌症相关(Bell et al.,2013;Gong et al.,2014)。IGF2BP3过度表达在许多肿瘤类型中均已有阐述,并与预后较差、肿瘤期别高和转移相关,例如在神经母细胞瘤、结直肠癌、肝内胆管癌、肝细胞癌、前列腺癌和肾细胞癌中过度表达(Bell et al.,2013;Findeis-Hosey and Xu,2012;Hu et al.,2014;Szarvas et al.,2014;Jeng et al.,2009;Chen et al.,2011;Chen et al.,2013;Hoffmann et al.,2008;Lin et al.,2013;Yuan et al.,2009)。

[0165] MAGEA3编码黑素瘤相关抗原家族成员A3。MAGEA3被广泛地称为癌-睾丸抗原(RefSeq,2002;Pineda et al.,2015;De et al.,1994)。长期以来,MAGEA3已知用于转移性黑色素瘤的治疗性疫苗接种试验中。用晚期黑色素瘤患者的MAGEA3和4个其他抗原目前进行的经肽免疫已被证明与不完全应答者相比显著有助于延长完全应答者的总生存期(Coulie et al.,2002;Fujiyama et al.,2014)。在NSCLC中,MAGEA3被证明频繁表达。MAGEA3的表达与NSCLC组织样本中较高数目的肿瘤坏死相关,并显示可抑制增殖和侵袭并促进肺癌细胞系的细胞凋亡。对于腺癌患者,MAGEA3的表达与更好的生存期相关。目前,全细胞抗MAGEA3疫苗正在有前途的III期临床试验中进行研究,用于治疗NSCLC(Perez et al.,2011;Reck,2012;Hall et al.,2013;Grah et al.,2014;Liu et al.,2015)。MAGEA3与其他4个基因被证明在HCC中频繁表达。那些基因的表达与HCC患者的循环肿瘤细胞数量、高肿瘤分级和较晚期别相关。肝转移的频率被证明在表达MAGE3的肿瘤样本的病例中显著高于那些不表达该基因的病例(Bahnassy et al.,2014;Hasegawa et al.,1998)。从膀胱癌细胞系以及肺癌、结肠癌或乳腺癌细胞系分离出来的癌干细胞样侧群细胞显示表达其他癌症-睾丸抗原中的MAGEA3。总体来说,癌症干细胞已知为对当前癌症治疗产生抗性,并导致治疗后癌症复发和进展。因此,MAGEA3可作为免疫治疗特别是膀胱癌治疗的新靶点(Yamada et al.,2013;Yin et al.,2014)。在头颈部鳞状细胞癌中,MAGEA3的表达被证明

与更好的无病生存期相关 (Zamuner et al., 2015)。此外, MAGEA3可用作卵巢癌的预后标志物 (Szajnik et al., 2013)。

[0166] MAGEA4, 也被称为MAGE4, 编码MAGEA基因家族的一员, 位于染色体Xq28上 (RefSeq, 2002)。MAGEA4被描述为一种癌症睾丸抗原, 发现于在一小部分典型精原细胞瘤中表达, 但不在非精睾丸生殖细胞肿瘤中表达, 在乳腺癌、霍奇金淋巴瘤EB病毒阴性病例、食管癌、肺癌、膀胱癌、头颈部癌、结直肠癌、口腔鳞状细胞癌和肝细胞癌中表达 (Ries et al., 2005; Bode et al., 2014; Li et al., 2005; Ottaviani et al., 2006; Hennard et al., 2006; Chen et al., 2003)。MAGEA4被证明在头颈部原发性粘膜黑色素瘤中频繁表达, 因此可能是基于癌症睾丸抗原的免疫治疗的潜在靶标 (Prasad et al., 2004)。MAGEA4被证明在来自LHK2肺腺癌细胞的癌干细胞样细胞、SW480结肠腺癌细胞和MCF7乳腺癌细胞中优先表达 (Yamada et al., 2013)。MAGEA4在自发转化的正常口腔角质中过度表达表明可透过阻止细胞周期阻滞和透过抑制p53转录靶标BAX和CDKN1A介导的细胞凋亡而促进生长 (Bhah et al., 2012)。MAGEA4被证明在丙型肝炎病毒感染的肝硬化和晚期肝细胞癌患者中比早期肝细胞癌患者中更频繁表达, 从而使MAGEA4转录物的检测潜在有助于预测预后 (Hussein et al., 2012)。MAGEA4被证明是几种癌症/睾丸抗原之一, 其在肺癌中表达并可作为肺癌患者的多价免疫治疗的潜在候选抗原 (Kim et al., 2012)。MAGEA4被描述为在食管癌和肝细胞癌中上调 (Zhao et al., 2002; Wu et al., 2011)。称为p286-1Y2L9L的MAGEA4衍生原生肽类似物被描述为适用于开发针对食管癌肽疫苗的一个新候选表位 (Wu et al., 2011)。MAGE基因家族的几个成员, 包括MAGEA4, 均显示在黑色素瘤中经常发生突变 (Caballero et al., 2010)。

[0167] MAGEA6编码黑色素瘤相关抗原家族成员A6。MAGEA3被广泛地称为癌-睾丸抗原 (RefSeq, 2002; Pineda et al., 2015; De et al., 1994)。MAGEA6被证明在黑色素瘤、晚期骨髓瘤、儿童横纹肌肉瘤、肉瘤、肺癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌、头颈部鳞状上皮细胞癌、食管鳞状细胞癌、口腔鳞状细胞癌中频繁表达 (Ries et al., 2005; Hasegawa et al., 1998; Gibbs et al., 2000; Dalerba et al., 2001; Otte et al., 2001; van der Bruggen et al., 2002; Lin et al., 2004; Tanaka et al., 1997)。MAGEA6表达与多发性骨髓瘤患者较短的无进展生存期有关。相比较而言, 在头颈部鳞状细胞癌中, MAGEA6的表达被证明与更好的无病生存期相关 (van et al., 2011; Zamuner et al., 2015)。MAGEA6是在耐紫杉醇卵巢癌细胞系中过度表达的一组基因中的一员。此外, MAGEA6转染也增加了紫杉醇敏感性细胞的耐药性 (Duan et al., 2003)。MAGEA6可用作卵巢癌的预后标志物 (Szajnik et al., 2013)。从肺、结肠或乳腺癌细胞系分离出来的癌干细胞样侧群细胞显示表达其他癌症-睾丸抗原中的MAGEA6 (Yamada et al., 2013)。

[0168] MAGEA9, 也被称为MAGE9或MAGE-A9, 编码MAGEA基因家族的一员, 位于染色体Xq28上 (RefSeq, 2002)。非小细胞肺癌肿瘤和基质细胞中MAGEA9的高表达与存活差相关 (Zhang et al., 2015b)。MAGEA9表达被描述为非小细胞肺癌患者五年生存率的一个独立预后因素 (Zhang et al., 2015b)。多发性骨髓瘤的新诊断病例中存在MAGEA9显示与较短的总生存期相关 (van et al., 2011)。MAGEA9被描述为一种肾细胞癌抗原, 其在BALB/c小鼠树突状细胞疫苗接种中的应用被证明可导致低剂量RENCA-MAGEA9肾细胞癌移植的排斥反应 (Herbert et al., 2010)。MAGEA9肽特异性细胞毒性T淋巴细胞系被证明对肽负载T2细胞和天然

MAGEA9表达肾细胞癌细胞系表现出高细胞毒性活性,这使得MAGEA9成为肾细胞癌免疫治疗的一种潜在合适的靶标(Oehlrich et al.,2005)。MAGEA9被证明是在子宫癌最常表达的癌睾丸抗原之一(Risinger et al.,2007)。MAGEA9被描述为一个MAGE家族成员,在睾丸癌中表达(Zhan et al.,2015)。MAGEA9高表达被证明与结直肠癌的静脉侵袭和淋巴结转移相关(Zhan et al.,2015)。MAGEA9表达被证明与结直肠癌的较低生存率相关,MAGEA9高表达被描述为结直肠癌患者的不良预后因素(Zhan et al.,2015)。因此,MAGEA9有望成为结直肠癌治疗的新靶点(Zhan et al.,2015)。MAGEA9过度表达被证明可预测上皮性卵巢癌、乳腺浸润性导管癌、喉鳞状细胞癌和肝细胞癌的较差预后(Gu et al.,2014;Han et al.,2014;Xu et al.,2014;Xu et al.,2015)。MAGEA9被证明在喉鳞状细胞癌、乳腺浸润性导管癌、上皮卵巢癌、结肠癌和肝细胞癌中上调(Gu et al.,2014;Han et al.,2014;Xu et al.,2014;Xu et al.,2015;Zhan et al.,2015)。

[0169] MAGEA9B编码X染色体上MAGEA9蛋白的复制物。肿瘤分期Ib期非小细胞肺癌中MAGEA9B的表达与患者生存期相关(Urgard et al.,2011)。

[0170] MMP1编码基质金属蛋白酶(MMP)肽酶M10家族的一员。此家族的蛋白在正常生理过程(如胚胎发育、生殖和组织重塑)以及疾病过程(如关节炎和转移)中参与细胞外基质的破坏(RefSeq,2002)。许多作者已经证明MMP表达模式与肿瘤侵袭和转移性之间正相关,包括:直肠癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、甲状腺癌和脑瘤(Velinov et al.,2010)。MMP1被确定为喉鳞状细胞癌的一种生物标志物,呈肿瘤期别相关表达(Hui et al.,2015)。外周血中循环肿瘤细胞存在上皮-间质转化(CTC_EMT)的乳腺癌患者与没有CTC_EMT的患者相比,肿瘤细胞($p=0.02$)和肿瘤相关基质($p=0.05$)中MMP1的表达显著增加(Cierna et al.,2014)。在小鼠模型中,MMP1的表达和分泌被特定抗FGFR3单克隆抗体阻断,其基本上阻止了肿瘤进展(Du et al.,2014)。

[0171] 基质金属蛋白酶(MMP)家族的蛋白在正常生理过程(如胚胎发育、生殖和组织重塑)以及疾病过程(如关节炎和转移)中参与细胞外基质的破坏。但是,由该基因编码的酶在细胞内透过组成型分泌途径中的弗林蛋白酶被激活。另外,相对于其他的MMP,这种酶裂解 α 1-蛋白酶抑制剂,但较弱降解细胞外基质的结构蛋白(RefSeq,2002)。MMP-11,也称为基质溶素-3,为属于蛋白酶超家族基质溶素子亚组的一员,这已在癌症细胞、基质细胞和邻近微环境中检测到。不同的是,MMP-11对肿瘤具有双重作用。一方面,MMP-11透过抑制细胞凋亡以及增强癌细胞的迁移和侵袭促进癌症进展;另一方面,在动物模型中,MMP-11透过抑制转移而对癌症发展起着负作用。与正常对照组相比,MMP-11在癌症患者的血清中发现呈过度表达,在多种肿瘤组织样本(如胃癌、乳腺癌和胰腺癌)中也呈过度表达(Zhang et al.,2016)。MMP-11被证明与相应的正常粘膜相比在CRC组织在mRNA水平和蛋白水平呈过度表达。此外,MMP-11的表达与CRC淋巴结转移、远处转移和TNM分期相关(Tian et al.,2015)。MMP-11过度表达与上尿路尿道上皮细胞癌(UTUC)和膀胱尿道上皮细胞癌(UBUC)的侵袭性肿瘤表现型和不良临床结果相关,这表明它可作为一种新的预后和治疗靶标(Li et al.,2016)。

[0172] MXRA5编码基质重塑相关蛋白,其包含与基底膜蛋白多糖相关的7个富含亮氨酸重复序列以及12个免疫球蛋白样C2型结构域(RefSeq,2002)。一项中国的研究确定MXRA5为非小细胞肺癌中第二最常见的突变基因(Xiong et al.,2012)。在结肠癌中,MXRA5被证明过

度表达,并可能作为早期诊断和网膜转移的生物标志物(Zou et al.,2002;Wang et al.,2013a)。

[0173] RAD54编码属于DEAD样解旋酶家族的一种蛋白质。酿酒酵母RAD54和RDH54具有相似性,两者均参与DNA同源重组和修复。该蛋白结合至双链DNA,并在存在DNA时显示ATP酶活性。该基因在睾丸和脾脏中高度表达,这表明在减数分裂和有丝分裂重组中具有活性作用(RefSeq,2002)。在原发性淋巴瘤和结肠癌中观察到了RAD54B的纯合突变(Hiramoto et al.,1999)。RAD54B抵消了人类肿瘤细胞中RAD51直接结合至dsDNA的基因组不稳定影响(Mason et al.,2015)。

[0174] ZFP42(也称为REX1)编码一种锌指蛋白,其作为干细胞标志物并对于多能性和重新编程很关键(Son et al.,2013;Mongan et al.,2006)。ZFP42表达在前列腺癌细胞和肾细胞癌中下调,但与此相反在鳞状细胞癌中上调(Raman et al.,2006;Lee et al.,2010;Reinisch et al.,2011)。ZFP42经由SOCS3表达的调节抑制JAK/STAT信号通路,从而调节细胞分化(Xu et al.,2008)。

[0175] 是否能刺激免疫反应取决于是否存在被宿主免疫系统视为异物的抗原。发现肿瘤相关抗原的存在增加了运用宿主免疫系统干预肿瘤生长的可能性。目前,针对癌症免疫治疗,正在探索利用免疫系统的体液和细胞进行免疫的各种机制。

[0176] 细胞免疫反应的特定元素能特异性地识别和破坏肿瘤细胞。从肿瘤浸润细胞群或外周血中分离出的T-细胞表明,这些细胞在癌症的天然免疫防御中发挥了重要作用。特别是CD8阳性T细胞在这种反应中发挥重要作用,TCR⁺能识别通常8至10个源自蛋白或位于细胞质的缺损核糖体产物(DRIP)的氨基酸残基的主要组织相容性复合体(MHC)所载的肽中所含的I类分子。人MHC分子也称为人白细胞-抗原(HLA)。

[0177] 术语“T细胞反应”是指由一种肽在体外或体内诱导的效应子功能的特异性扩散和激活。对于MHC I类限制性细胞毒性T细胞,效应子功能可能为溶解肽脉冲的、肽前体脉冲的或天然肽提呈的靶细胞、分泌细胞因子,优选为肽诱导的干扰素- γ ,TNF- α 或IL-2,分泌效应分子,优选为肽诱导的颗粒酶或穿孔素,或脱颗粒。

[0178] 本文所用“肽”这一术语,系指一系列氨基酸残基,通常透过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。这些肽的长度优选为9个氨基酸,但至短可为8个氨基酸长度,至长可为10、11、12或13个氨基酸长度或更长,如果为MHC-II类肽时(本发明肽的拉长变体),至长可为14、15、16、17、18、19或20个氨基酸长度或更长。

[0179] 因此,“肽”这一术语应包括一系列氨基酸残基的盐,通常透过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。优选的情况是,盐为肽的药用盐,例如:氯化物或乙酸(三氟乙酸)盐。必须注意的是,本发明肽的盐与其体内状态的肽基本上不同,因为该不是体内的盐。

[0180] 术语“肽”应也包括“寡肽”。本文使用的术语“寡肽”是指一系列氨基酸残基,通常透过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。寡肽的长度对于本发明来说并不十分关键,只要在寡肽中保持正确的表位即可。通常,寡肽长度约小于30个氨基酸残基,约长于15个氨基酸。

[0181] “多肽”这一术语是指一系列氨基酸残基,通常透过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。多肽的长度对于本发明来说并不十分关键,只要保持正确的表位即可。与术语肽或寡肽相对,“多肽”这一术语是指包含多于约30个氨基酸残基的分子。

[0182] 一种肽、寡肽、蛋白质或编码该分子的核苷酸如果能诱导免疫反应,则具有“免疫原性”(因此是本发明中的一种“免疫原”)。在本发明的情况下,免疫原性的更具体定义是诱导T细胞反应的能力。因此,“免疫原”是一种能够诱导免疫反应的分子,并且在本发明的情况下,是一种能诱导T细胞反应的分子。在另一方面,所述免疫原可以是肽,肽与MHC的复合体、和/或用于提高特异性抗体或TCR抗性的蛋白。

[0183] I类T细胞“表位”要求的是一种结合至MHC I类受体上的短肽,从而形成一种三元复合体(MHC I类 α 链、 β -2-微球蛋白和肽),其可以透过T细胞负载匹配T细胞受体与具有适当亲和力的MHC/肽复合物结合来识别。结合至MHC I类分子的肽的典型长度为8-14个氨基酸,最典型为9个氨基酸长度。

[0184] 在人类中,有三种编码MHC I类分子的不同基因位点(人MHC分子也是指定的人白细胞抗原(HLA)):HLA-A、HLA-B和HLA-C。HLA-A*01、HLA-A*02和HLA-B*07是可从这些基因位点表达的不同MHC I类等位基因的实例。

[0185] 表1:HLA-A*02和HLA-A*24和最常见HLA-DR血清类型的表达频率F。频率根据Mori等人(Mori et al.,1997)使用的Hardy-Weinberg公式 $F=1-(1-G_f)^2$ 改编,从美国人群范围内的单体型频率中推导出。由于连锁不平衡,某些HLA-DR等位基因内的A*02或A*24组合与其预期单一频率相比,可能是浓缩的或频率较低。有关详细信息,请参阅Chanock等人的文献(Chanock et al.,2004)。

[0186]

等位基 因	人群	根据等位基因频率算得的显 型
A*02	高加索人（北美）	49.1%
A*02	非裔美国人（北美）	34.1%
A*02	亚裔美国人（北美）	43.2%
A*02	拉丁美洲（北美）	48.3%
DR1	高加索人（北美）	19.4%
DR2	高加索人（北美）	28.2%
DR3	高加索人（北美）	20.6%
DR4	高加索人（北美）	30.7%
DR5	高加索人（北美）	23.3%
DR6	高加索人（北美）	26.7%
DR7	高加索人（北美）	24.8%
DR8	高加索人（北美）	5.7%
DR9	高加索人（北美）	2.1%
DR1	非裔（北）美人	13.20%
DR2	非裔（北）美人	29.80%
DR3	非裔（北）美人	24.80%
DR4	非裔（北）美人	11.10%
DR5	非裔（北）美人	31.10%
DR6	非裔（北）美人	33.70%
DR7	非裔（北）美人	19.20%
DR8	非裔（北）美人	12.10%
DR9	非裔（北）美人	5.80%
DR1	亚裔（北）美人	6.80%
DR2	亚裔（北）美人	33.80%
DR3	亚裔（北）美人	9.20%
DR4	亚裔（北）美人	28.60%
DR5	亚裔（北）美人	30.00%
DR6	亚裔（北）美人	25.10%
DR7	亚裔（北）美人	13.40%
DR8	亚裔（北）美人	12.70%
DR9	亚裔（北）美人	18.60%
DR1	拉丁裔（北）美人	15.30%
DR2	拉丁裔（北）美人	21.20%
DR3	拉丁裔（北）美人	15.20%
DR4	拉丁裔（北）美人	36.80%
DR5	拉丁裔（北）美人	20.00%
DR6	拉丁裔（北）美人	31.10%
DR7	拉丁裔（北）美人	20.20%

[0187]	等位基因	人群	根据等位基因频率算得的显型
	DR8	拉丁裔(北)美人	18.60%
	DR9	拉丁裔(北)美人	2.10%
	A*24	菲律宾	65%
	A*24	俄罗斯涅涅茨人	61%
	A*24:02	日本	59%
	A*24	马来西亚	58%
	A*24:02	菲律宾	54%
	A*24	印度	47%
	A*24	韩国	40%
	A*24	斯里兰卡人	37%
	A*24	中国	32%
	A*24:02	印度	29%
	A*24	澳大利亚西部人	22%
	A*24	美国	22%
	A*24	俄罗斯萨马拉人	20%
	A*24	南美	20%
	A*24	欧洲	18%

[0188] 本发明的肽,优选当如本文描述纳入本发明的疫苗时与A*02结合。疫苗还可能包括泛结合MHC II类肽。因此,本发明的疫苗可用于治疗A*02阳性患者中的癌症,但不因为这些肽的广泛结核性而必须选择II类MHC同种异型。

[0189] 如果本发明的A*02肽与结合至另一个等位基因的肽(例如,A*24)组合,与单独的MHC I类等位基因相比,可治疗更高比例的患者群体。虽然在大多数人群中,低于50%的患者可由单独的等位基因来解决问题,但是本发明中一种含HLA-A*24和HLA-A*02表位的疫苗可以治疗任何相关人群中至少60%的患者。具体来说,各区域中,以下比例的患者这些等位基因中的至少一个有肯定效果:美国61%、西欧62%、中国75%、韩国77%、日本86%(根据www.allele frequencies.net计算)。

[0190] 在一项优选的实施方案中,术语“核苷酸序列”系指脱氧核苷酸的杂聚物。

[0191] 编码特定肽、寡肽或多肽的核苷酸序列可为天然核苷酸序列,也可合成核苷酸序列。一般来说,编码肽、多肽以及本发明蛋白的DNA片段由cDNA片段和短寡核苷酸衔接物,或一系列寡核苷酸组成,以提供一种合成基因,该基因能够在包含源自微生物或病毒操纵子的调节元素的重组转录单元中被表达。

[0192] 如本文所用的术语“肽的核苷酸编码”系指对肽进行核苷酸序列编码,其中该肽包括与将用于产生TCR的树突细胞或另一细胞系统所表达该序列的生物系统兼容的人工(人造)启动和停止密码子。

[0193] 本文提到的核酸序列既包括单链核酸也包括双链核酸。因此,除非本文另有所指,否则,例如对于DNA,具体的序列是该序列的单链DNA、该序列与其互补序列的双工(双链DNA)以及该序列的互补序列。

[0194] “编码区”这一术语是指在基因的天然基因组环境中天然或正常编码该基因的表达产物的那部分基因,即,体内编码该基因的天然表达产物的区域。

[0195] 编码区可来自非突变(“正常”)基因、突变基因或异常基因,甚至还可以来自DNA序列,完全可在实验室中使用本领域熟知的DNA合成方法合成。

[0196] “表达产物”这一术语是指多肽或蛋白,它是基因和遗传码退化并因而编码同样的氨基酸所造成的任何核酸序列编码同等物的翻译产物。

[0197] “片断”这一术语,当指的是一种编码序列时,表示包含非完整编码区的DNA的一部分,其表达产物与完整编码区表达产物基本上具有相同的生物学功能或活性。

[0198] “DNA片段”这一术语是指一种DNA聚合物,以单独的片段形式或一种较大DNA结构的组分形式存在,它们从至少分离过一次的DNA中以基本纯净的形式获得,即不含污染性内源性材料,并且获得的数量或浓度能够使用标准生化方法,例如使用克隆载体,进行识别、操纵和回收该片段及其组分核苷酸序列。此类片段以开放阅读框架(未被内部未翻译序列打断)或内含子(通常提呈于真核基因中)的形式存在。未翻译DNA序列可能存在于开放阅读框架的下游,在那里其不会干预编码区的操纵或表达。

[0199] “引物”这一术语表示一种短核酸序列,其可与一个DNA链配对,并在DNA聚合酶开始合成脱氧核糖核酸链之处提供一个游离的3'-OH末端。

[0200] “启动子”这一术语表示参与RNA聚合酶的结合从而启动转录的DNA区域。

[0201] 术语“分离”表示一种物质从其原来的环境(例如,如果是天然发生的则是天然环境)中被移走。例如,活体动物中的天然核苷酸或多肽不是分离的,但是,从天然系统中一些或所有共存物质中分离出来的核苷酸或多肽是分离的。此类多核苷酸可能是载体的一部分和/或此类多核苷酸和多肽可能是一种组合物的一部分,并且由于该载体或组合物不是其天然环境的一部分,因此它仍然是分离的。

[0202] 本发明中披露的多核苷酸和重组或免疫原性多肽也可能以“纯化”的形式存在。术语“纯化”并非要求绝对的纯度;它只是一个相对的定义,可以包括高度纯化或部分纯化的制剂,相关领域技术人员能理解这些术语。例如,各个从已用传统方法纯化为具有电泳同构型的cDNA库中分离出的各种克隆物。明确考虑到将起始材料或天然物质纯化至少一个数量级,优选为两或三个数量级,更优选为四或五个数量级。此外,明确涵盖所述多肽的纯度优选为99.999%,或至少为99.99%或99.9%;甚而适宜为以重量计99%或更高。

[0203] 根据本发明公开的核酸和多肽表达产物,以及包含此类核酸和/或多肽的表达载体可能以“浓缩的形式”存在。本文使用的术语“浓缩”是指材料的浓度至少是其自然浓度的大约2、5、10、100或1000倍,有优势的是,按重量计为0.01%,优选为至少0.1%。也明确考虑到,按重量计约为0.5%、1%、5%、10%和20%的浓缩制剂。序列、构型、载体、克隆物以及包含本发明的其他材料可有优势地以浓缩或分离的形式存在。“活性片段”这一术语是指产生免疫反应的片段(即具有免疫原性活性),通常是一种肽、多肽或核酸序列的片段,不论是单独或可选地与合适的佐剂一起或在载体中给予一种动物,比如哺乳动物,例如兔子或小鼠,也包括人;这种免疫反应采用的形式是在接受动物(如:人)体内刺激T细胞反应。或者,“活性片段”也可用于诱导体外T细胞反应。

[0204] 本文使用的“部分”(portion)、“节段”(segment)、“片段”(fragment)这几个术语,当与多肽相关地使用时是指残基的连续序列,比如氨基酸残基,其序列形成一个较大序列的子集。例如,如果一个多肽以任一种肽链内切肽酶(如胰蛋白酶或糜蛋白酶)进行处理,则该处理获得的寡肽会代表起始多肽的部分、节段或片段。当与多核苷酸相关地使用时,这些术语系指用任何核酸内切酶处理所述多核苷酸产生的产物。

[0205] 根据本发明,术语“等同度百分比”或“等同百分比”,如果指的是序列,则表示在待

对比序列(“被对比序列”)与所述序列或权利要求的序列(“参考序列”)对准之后将被对比序列与所述序列或权利要求的序列进行比较。然后根据下列公式计算等同度百分比:等同度百分比=100[1-(C/R)]

[0206] 其中C是参考序列与被对比序列之间对准长度上参考序列与被对比序列之间的差异数量,其中

[0207] (i) 参考序列中每个碱基或氨基酸序列在被对比序列中没有对应的对准碱基或氨基酸;

[0208] (ii) 参考序列中每个空隙,以及

[0209] (iii) 参考序列中每个对准碱基或氨基酸与被对比序列中对准碱基或氨基酸不同,即构成一个差异以及

[0210] (iiii) 必须在对准序列的第1位置开始对准;

[0211] 并且R是参考序列与被对比序列对准长度上在参考序列中产生任何空隙也计算为一个碱基或氨基酸的参考序列中的碱基或氨基酸数目。

[0212] 如果“被对比序列”和“参考序列”之间存在的一个对准按上述计算的等同度百分比大致等于或大于指定的最低等同度百分比,则被对比序列与参考序列具有指定的最低等同度百分比,虽然可能存在按本文上述计算的等同度百分比低于指定等同度百分比的对准。

[0213] 因此,如上所述,本发明提出了一种肽,其包括选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288群组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288具有88%同源性的其变体、或诱导与该肽发生T细胞交叉反应的一个变体。本发明所述的肽具有与主要组织相容性复合体(MHC) I或所述肽拉长版本的II类分子结合的能力。

[0214] 在本发明中,“同源性”一词系指两个氨基酸序列之间的同一度(参见上文的等同度百分比,如肽或多肽序列。前文所述的“同源”是透过将理想条件下调整的两个序列与待比较序列进行比对后确定的。此类序列同源性可透过使用ClustalW等算法创建一个排列而进行计算。也可用使用一般序列分析软件,更具体地说,是Vector NTI、GENETYX或由公共数据库提供的其他工具。

[0215] 本领域技术人员能评估特定肽变体诱导的T细胞是否可与该肽本身发生交叉反应(Appay et al.,2006;Colombetti et al.,2006;Fong et al.,2001;Zaremba et al.,1997)。

[0216] 发明人用给定氨基酸序列的“变体”表示,一个或两个氨基酸残基等的侧链透过被另一个天然氨基酸残基的侧链或其他侧链取代而发生改变,这样,这种肽仍然能够以含有给定氨基酸序列(由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288组成)的肽大致同样的方式与HLA分子结合。例如,一种肽可能被修饰以便至少维持(如没有提高)其能与HLA-A*02或-DR等合适MHC分子的结合槽相互作用和结合,以及至少维持(如没有提高)其与激活T细胞的TCR结合的能力。

[0217] 随后,这些T细胞可与细胞和杀伤细胞发生交叉反应,这些细胞表达多肽(其中包含本发明中定义的同源肽的天然氨基酸序列)。正如科学文献和数据库(Rammensee et al.,1999;Godkin et al.,1997)中所述,HLA-A结合肽的某些位点通常为锚定残基,可形成一种与HLA结合槽的结合模序相称的核心序列,其定义由构成结合槽的多肽链的极性、电物

理、疏水性和空间特性确定。因此,本领域技术人员能够透过保持已知的锚残基来修饰SEQ ID No:1至SEQ ID NO:288提出的氨基酸序列,并且能确定这些变体是否保持与MHC I或II类分子结合的能力。本发明的变体保持与激活T细胞的TCR结合的能力,随后,这些T细胞可与表达一种包含本发明定义的同源肽的天然氨基酸序列的多肽的细胞发生交叉反应并杀死该等细胞。

[0218] 如果无另有说明,那么本文公开的原始(未修饰)肽可以透过在肽链内的不同(可能为选择性)位点上取代一个或多个残基而被修饰。优选情况是,这些取代位于氨基酸链的末端。此取代可能是保守性的,例如,其中一个氨基酸被具有类似结构和特点的另一个氨基酸所取代,比如其中一个疏水性氨基酸被另一个疏水性氨基酸取代。更保守的取代是具有相同或类似的大小和化学性质的氨基酸间的取代,例如,亮氨酸被异亮氨酸取代。在天然同源蛋白质家族序列变异的研究中,某些氨基酸的取代往往比其他氨基酸更具有耐受性,这些氨基酸往往表现出与原氨基酸的大小、电荷、极性和疏水性之间的相似性相关,这是确定“保守取代”的基础。

[0219] 在本文中,保守取代定义为在以下五种基团之一的内部进行交换:基团1-小脂肪族、非极性或略具极性的残基(Ala,Ser,Thr,Pro,Gly);基团2-极性、带负电荷的残基及其酰胺(Asp,Asn,Glu,Gln);基团3-极性、带正电荷的残基(His,Arg,Lys);基团4-大脂肪族非极性残基(Met,Leu,Ile,Val,Cys)以及基团5-大芳香残基(Phe,Tyr,Trp)。

[0220] 较不保守的取代可能涉及一个氨基酸被另一个具有类似特点但在大小上有所不同的氨基酸所取代,如:丙氨酸被异亮氨酸残基取代。高度不保守的取代可能涉及一个酸性氨基酸被另一个具有极性甚至具有碱性性质的氨基酸所取代。然而,这种“激进”取代不能认为是无效的而不予考虑,因为化学作用是不完全可预测的,激进的取代可能会带来其简单化学原理中无法预见的偶然效果。

[0221] 当然,这种取代可能涉及普通L-氨基酸之外的其他结构。因此,D-氨基酸可能被本发明的抗原肽中常见的L-氨基酸取代,也仍在本文公开的范围之内。此外,非标准氨基酸(即,除了常见的天然蛋白原氨基酸)也可以用于取代之目的,以生产根据本发明的免疫原和免疫原性多肽。

[0222] 如果在一个以上位置上的取代发现导致肽的抗原活性基本上等于或大于以下定义值,则对这些取代的组合进行测试,以确定组合的取代是否产生对肽抗原性的迭加或协同效应。肽内被同时取代的位置最多不能超过4个。

[0223] 基本上由本文所指氨基酸序列组成的一种肽可能有一个或两个非锚定氨基酸(见下面锚基序相关内容)被交换,而不存在这种情况,即相比于未修饰的肽,与人类主要组织相容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。在另一实施方案中,在基本上由本文所述氨基酸序列组成的肽中,一个或两个氨基酸可与其保守交换伙伴交换(见下文),而不存在这种情况,即相比于未修饰的肽,与人类主要组织相容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。

[0224] 这些基本不与T细胞受体互动的氨基酸残基可透过取代其他几乎不影响T细胞反应并不妨碍与相关MHC结合的氨基酸而得到修饰。因此,除了特定限制性条件外,本发明的肽可能为任何包括给定氨基酸序列或部分或其变体的肽(发明人所用的这个术语包括寡肽或多肽)。

[0225] 表2:根据SEQ ID NO:4、13和15的肽变体和基序。

[0226]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 4	V	L	F	G	E	L	P	A	L
变体									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I

[0227]

		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 15	G	L	P	S	A	T	T	T	V
变体		I							L
		I							I
		I							
		I							A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		V							L
		V							I
		V							
		V							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							

[0228]

		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 13	R	L	H	D	E	N	I	L	L
变体									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

[0229] 较长(拉长)的肽也可能适合。MHC I类表位(通常为8至11个氨基酸)可能由肽从较长的肽或包含实际表位的蛋白中加工而产生。两侧有实际表位的残基优选为在加工过程中几乎不影响暴露实际表位所需蛋白裂解的残基。

[0230] 本发明的肽可被拉长多达四个氨基酸,即1、2、3或4个氨基酸,可按照4:0与0:4之间的任何组合添加至任意一端。本发明的拉长组合可见表3。

[0231] 表3:本发明肽的拉长组合

[0232]	C-端	N-端
	4	0
	3	0 或 1
	2	0 或 1 或 2
	1	0 或 1 或 2 或 3
	0	0 或 1 或 2 或 3 或 4
	N-端	C-端
	4	0
	3	0 或 1
	2	0 或 1 或 2
	1	0 或 1 或 2 或 3
	0	0 或 1 或 2 或 3 或 4

[0233] 拉伸/延长的氨基酸可以是所述蛋白或任何其他氨基酸的原序列肽。拉长可用于增强所述肽的稳定性或溶解性。

[0234] 因此,本发明所述的表位可能与天然肿瘤相关表位或肿瘤特异性表位相同,也可能包括来自参考肽的不超过四个残基的不同肽,只要它们有基本相同的抗原活性即可。

[0235] 在一项替代实施方案中,肽的一边或双边被拉长4个以上的氨基酸,优选最多30个氨基酸的总长度。这可形成MHC-II类结合肽。结合至MHC II类肽可透过本领域中已知的方法进行测试。

[0236] 因此,本发明提出了MHC I类表位的肽和变体,其中所述肽或抗体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸长度(即10、11、12、13、14个氨基酸,如果为拉长II类结合肽时,长度也可为15、16、17、18、19、20、21或22个氨基酸)。

[0237] 当然,本发明的肽或变体能与人类主要组织相容性复合体(MHC) I或II类分子结合。肽或变体与MHC复合物的结合可用本领域内的已知方法进行测试。

[0238] 优选情况是,当本发明的肽特异性T细胞相比于取代肽受到检测时,如果取代肽在相对于背景肽溶解度增加达到最大值的一半,则该肽浓度不超过约1mM,优选为不超过约1 μ M,更优选为不超过约1nM,再优选为不超过约100pM,最优选为不超过约10pM。也优选为,取代肽被一个以上的T细胞识别,最少为2个,更优选为3个。

[0239] 在本发明的一个特别优选实施方案中,肽系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288所选的氨基酸序列组成。

[0240] 基本由“...组成”系指本发明的肽,除了根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288中的任一序列或其变体组成外,还含有位于其他N和/或C端延伸处的氨基酸,而它们不一定能形成作为MHC分子表位的肽。

[0241] 但这些延伸区域对有效将本发明中的肽引进细胞具有重要作用。在本发明的一实施例中,该肽为融合蛋白的一部分,含来自NCBI、GenBank登录号X00497的HLA-DR抗原相关不变链(p33,以下称为“Ii”)的80个N-端氨基酸等。在其他的融合中,本发明的肽可以被融合到本文所述的抗体、或其功能性部分,特别是融合入抗体的序列,以便所述抗体进行特异性靶向作用,或者,例如进入本文所述的树突状细胞特异性抗体。

[0242] 此外,该肽或变体可进一步修饰以提高稳定性和/或与MHC分子结合,从而引发更强的免疫反应。肽序列的该类优化方法是本领域内所熟知的,包括,例如,反式肽键和非肽

键的引入。

[0243] 在反式肽键氨基酸中,肽(-CO-NH-)并未连接其残基,但是其肽键是反向的。这种逆向反向模拟肽(retro-inverso peptidomimetics)可透过本领域已知的方法制备,例如:Meziere等人在(Meziere et al.,1997)中所述的方法,以引用的方式并入本文。这种方法涉及制备包含骨架(而并非侧链)改变的模拟肽。Meziere等人(Meziere et al.,1997)的研究显示,这些模拟肽有利于MHC的结合和辅助性T细胞的反应。以NH-CO键替代CO-NH肽键的逆向反向肽大大地提高了抗水解性能。

[0244] 非肽键为-CH₂-NH、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-和-CH₂SO-等。美国4897445号专利提出了多肽链中非肽键(-CH₂-NH)的非固相合成法,该方法涉及按标准程序合成的多肽以及透过氨基醛和一种含NaCNBH₃的氨基酸相互作用而合成的非肽键。

[0245] 含上述序列的肽可与其氨基和/或羧基末端的其他化学基团进行合成,从而提高肽的稳定性、生物利用度、和/或亲和力等。例如,苄氧羰基、丹酰基等疏水基团或叔丁氧羰基团可加入肽的氨基末端。同样,乙酰基或9-芴甲氧羰基可能位于肽的氨基末端。此外,疏水基团、叔丁氧羰基团或氨基团都可能被加入肽的羧基末端。

[0246] 另外,本发明中的所有肽都可能经合成而改变其空间构型。例如,可能使用这些肽的一个或多个氨基酸残基的右旋体,通常不是其左旋体。更进一步地,本发明中肽的至少一个氨基酸残基可被熟知的一个非天然氨基酸残基取代。诸如此类的改变可能有助于增加本发明肽的稳定性、生物利用度和/或结合作用。

[0247] 同样,本发明中的肽或变体可在合成肽之前或之后透过特异氨基酸的反应而进行化学修饰。此类修饰的实施例为本领域所熟知,例如,在R.Lundblad所著的《Chemical Reagents for Protein Modification》(3rd ed.CRC Press,2004)(Lundblad,2004)中有概述,以参考文献的方式并入本文。虽然氨基酸的化学修饰方法无限制,但其包括(但不限于)透过以下方法修饰:酰基化、脒基化、赖氨酸吡哆基化、还原烷基化、以2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)三硝基苯基化氨基团、透过将半胱氨酸过甲酸氧化为磺基丙氨酸而对羧基团和巯基进行氨基修饰、形成易变衍生物、与其他巯基化合物形成混合二硫化合物、与马来酰亚胺反应,与碘乙酸或碘乙酰胺羧甲基化、在碱性pH值下与氰酸盐甲氨酰化。在这方面,技术人员参考了《Current Protocols In Protein Science》(Eds.Coligan et al.(John Wiley and Sons NY 1995-2000))(Coligan et al.,1995)中第15章所述的在蛋白质化学修饰相关的广泛方法。

[0248] 简言之,修饰蛋白质的精氨酸残基等往往基于于邻二羰基化合物(如苯甲酰甲醛、2,3丁二酮以及1,2-烯己二酮)的反应而形成加合物。另一个实施例是丙酮醛与精氨酸残基的反应。半胱氨酸可在赖氨酸和组氨酸等亲核位点不作随同修饰的情况下就得到修饰。因此,有大量试剂可进行半胱氨酸的修饰。Sigma-Aldrich(<http://www.sigma-aldrich.com>)等公司的网站含有具体试剂的信息。

[0249] 蛋白质中二硫键的选择性还原也很普遍。二硫键可在生物制药热处理中形成和氧化。伍德沃德氏试剂K可用于修饰特定的谷氨酸残基。N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基-碳二亚胺可用于形成赖氨酸残基和谷氨酸残基的分子内交联。例如:焦碳酸二乙酯是修饰蛋白质组氨酸残基的试剂。组氨酸也可使用4-羟基-2-壬烯醛进行修饰。赖氨酸残基与其他羧-

氨基团的反应,例如,有利于肽结合到蛋白/肽的表面或交联处。赖氨酸聚是多(乙烯)乙二醇的附着点,也是蛋白质糖基化的主要修饰位点。蛋白质的蛋氨酸残基可透过碘乙酰胺、溴乙胺、氯胺T等被修饰。

[0250] 四硝基甲烷和N-乙酰基咪唑可用于酪氨酸残基的修饰。经二酪氨酸形成的交联可透过过氧化氢/铜离子完成。

[0251] 对色氨酸修饰的最近研究中使用了N-溴代琥珀酰亚胺、2-羟基-5-硝基苄溴或3-溴-3-甲基-2-(2-硝基苄基)-3H-吡啶(BPNS-粪臭素)。

[0252] 当蛋白与戊二醛、聚乙二醇二丙烯酸酯和甲醛的交联用于配制水凝胶时,治疗性蛋白和含聚乙二醇的肽的成功修饰往往可延长循环半衰期。针对免疫治疗的变态反应原化学修饰往往透过氰酸钾的氨基甲酰化实现。

[0253] 一种肽或变体,其中肽被修饰或含非肽键,优选为本发明的实施例。一般来说,肽和变体(至少含氨基酸残基之间的肽联接)可使用Lukas等人(Lukas et al.,1981)以及此处引用的参考文献所披露的固相肽合成Fmoc-聚酰胺模式进行合成。芴甲氧羰基(Fmoc)团对N-氨基提供临时保护。使用N,N-二甲基甲酰胺中的20%二甲基胍啶中对这种碱高度敏感的保护基团进行重复分裂。由于它们的丁基醚(在丝氨酸苏氨酸和酪氨酸的情况下)、丁基酯(在谷氨酸和天门冬氨酸的情况下)、叔丁氧羰基衍生物(在赖氨酸和组氨酸的情况下)、三苯甲基衍生物(在半胱氨酸的情况下)及4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基衍生物(在精氨酸的情况下),侧链功能可能会受到保护。只要谷氨酰胺和天冬酰胺为C-末端残基,侧链氨基功能保护所使用的是由4,4'-二甲氧基二苯基团。固相支撑基于聚二甲基丙烯酸酰胺聚合物,其由三个单体二甲基丙烯酸酰胺(骨架单体)、双丙烯酸乙烯二胺(交联剂)和N-丙烯酰胺肌酸甲酯(功能剂)构成。使用的肽-树脂联剂为酸敏感的4-羟甲基苯氧乙酸衍生物。所有的氨基酸衍生物均作为其预制对称酸酐衍生物加入,但是天冬酰胺和谷氨酰胺除外,它们使用被逆转的N,N'-二环己基碳二亚胺/1-羟基苯并三唑介导的耦合程序而加入。所有的耦合和脱保护反应用茚三酮、硝基苯磺酸或isotin测试程序监测。合成完成后,用浓度为95%含50%清道夫混合物的三氟醋酸,从伴随去除侧链保护基团的树脂支承物中裂解肽。常用的清道夫混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水,准确的选择依据合成肽的氨基酸组成。此外,固相和液相方法结合使用对肽进行合成是可能的(例如,请参阅(Bruckdorfer et al.,2004)以及本文引用的参考文献)。

[0254] 三氟乙酸用真空中蒸发、随后用承载粗肽的二乙基乙醚滴定进行去除。用简单萃取程序(水相冻干后,该程序制得不含清道夫混合物的肽)清除任何存在的清道夫混合物。肽合成试剂一般可从Calbiochem-Novabiochem(英国诺丁汉)获得。

[0255] 纯化可透过以下技术的任何一种或组合方法进行,如:再结晶法、体积排阻色谱法、离子交换色谱法、疏水作用色谱法以及(通常)反相高效液相色谱法(如使用乙腈/水梯度分离)。

[0256] 可以使用薄层色谱法、电泳特别是毛细管电泳、固相萃取(CSPE)、反相高效液相色谱法、酸解后的氨基酸分析、快原子轰击(FAB)质谱分析以及MALDI和ESI-Q-TOF质谱分析进行肽分析。

[0257] 为了识别本发明的肽,对可公开获得的约3000个正常组织样本的RNA表达数据库(Lonsdale,2013)进行了筛选在重要器官系统中近乎无表达而在其他重要器官系统中低表

达的基因。在第二步骤中,从这些基因的蛋白质产物衍生的癌相关肽透过使用如本文所述的XPRESIDENT™平台质谱法识别。

[0258] 详细地说,为了使用来自所述数据库中的RNASeq数据选择相关基因,考虑的重要器官系统为:脑、心脏、血管、肺和肝。基因选择时,重要器官的每百万读数每千碱基读数中值(RPKM)要求小于2,75%百分位数要求小于5RPKM。如果器官系统被多个样本类型涵盖,例如,单独分析的不同脑区,则多个样本类型的最大中位值和最大75%百分位数用于计算。考虑的其他重要器官系统为:皮肤、神经、垂体、结肠、肾脏、脂肪组织、肾上腺、膀胱、全血、食管、肌肉、胰腺、唾液腺、小肠、胃、乳腺、脾、甲状腺。在选择基因时,这些器官的最大中位RPKM要求小于10。其他器官被视为非重要的,因此不应用基因表达的截止值。这些器官是宫颈和子宫、输卵管、阴道、前列腺、睾丸和卵巢。使用这种筛选方法,选择约14,000个候选基因。接着,分析相应蛋白衍生的肽的提呈特征。如果肽提呈于所分析的一组超过170个正常(即非癌性)样本中少于五个正常样本,以及如果正常组织最高提呈低于中位数肿瘤信号的30%(所有肿瘤样本),则该肽视为相关肽。

[0259] 为了选择过度提呈的肽,计算了提呈图,其显示样本中位提呈量以及复制变化。该特点使相关肿瘤实体的样本与正常组织样本的基线值并列。可透过计算调节线性混合效应模型(Pinheiro et al., 2015)的p值将以上每个特点并入过度提呈分数中,从而透过假发现率(Benjamini and Hochberg, 1995)调整多项检验。

[0260] 对于透过质谱法对HLA配体的识别和相对定量,对来自冲击冷冻组织样本的HLA分子进行纯化并对HLA相关肽进行分离。分离的肽分开,并透过在线纳米-电喷雾-电离(nanoESI)液相色谱-谱(LC-MS)实验进行鉴定。由此产生的肽序列的验证方法是,将原发肿瘤样本中记录的天然TUMAP的片段模式与相同序列相应合成参考肽的片段模式进行比较。由于这些肽被直接鉴定为原发性肿瘤HLA分子的配体,因此这些结果为原发性癌症组织上确定肽的天然加工和提呈提供了直接证据。

[0261] 样本数分别为(全部/透过QC的样本):PC N=39(36)、RCC N=22(18)、CRC N=31(28)、食管癌N=14(11)、BPH和前列腺癌N=53(43)、HCC N=15(15)、NSCLC N=96(87)、GC N=35(33)、GB N=38(27)、乳腺癌N=2(2)、黑色素瘤N=5(2)、卵巢癌N=21(20)、CLL N=5(4)、SCLC N=18(17)、NHL N=18(18)、AML N=23(18)、GBC、CCC N=18(17)、UBC N=17(15)、UEC N=19(16)。如果采集5次质谱重复或样本被完全消耗,则透过QC,用于计算归一化因子的肽(即发生于同一样本技术重复且变异少于50%,以及发生于2个独立样本)是样本中所测量所有肽的至少30%。亚型分型后亚型样本很少的样本(如A*02:05、A*02:06)被排除于本发明肽的选择。

[0262] 发现管道XPRESIDENT®v2.1(例如,参见US 2013-0096016,并在此透过引用将其整体并入本文)考虑到识别和选择相关过量提呈的候选肽疫苗,这基于与几种不同的非癌组织和器官相比癌症或其他受感染组织的HLA限制肽水平直接相对定量结果。这透过以下方法实现:使用专有数据分析管道处理的LC-MS采集数据、结合序列识别算法、谱聚类、计算离子、保留时间调整、充电状态卷积以及正态化而开发无标记差异化定量方法。

[0263] 为每种肽和样本确立了提呈水平,包括误差估计值。肿瘤组织大量提呈的肽以及肿瘤与非肿瘤组织和器官中过量提呈的肽已经得到确定。

[0264] 对来自原发性HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素

瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL样本的HLA肽复合物进行纯化,并且对HLA相关肽使用LC-MS进行分离和分析(见实施例)。本申请中包含的所有TUMAP使用HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL样本的方法进行鉴定,确认其在这些肿瘤上的提呈。

[0265] 在多个肿瘤和正常组织上确定的TUMAP用无标记LC-MS数据的离子计数方法进行量化。该方法假定肽的LC-MS信号区域与样本中其丰度相关。各种LC-MS实验中肽的所有量化信号在集中趋势基础上进行正常化,根据每个样品进行平均,并合并入柱状图(被称为提呈图)。提呈图整合了不同分析方法,如:蛋白数据库检索、谱聚类、充电状态卷积(除电)和保留时间校准和正态化。

[0266] 此外,发现管道XPRESIDENT® v2.x可对癌症或其他感染组织上的MHC-肽(优选为HLA限制性肽)进行直接的绝对定量。简言之,总细胞计数根据被分析的组织样本的总DNA含量来计算。组织样本中TUMAP的总肽量用nanoLC-MS/MS测定为天然TUMAP的比率以及TUMAP同位素标记版本的已知量,称为内部标准。TUMAP分离效率确定方法:把肽:所有选定TUMAP的MHC在TUMAP分离程序尽早的时间点加入组织裂解液,并在肽分离成后完成后透过nanoLC-MS/MS检测。总细胞计数和总肽量根据每份组织样本三次测量值来计算。所述肽特异性隔离效率计算为三次测量10次加标实验的平均值(见实施例6和表11)。

[0267] RNA表达和质谱分析数据的这种组合分析获得本发明的288种肽。在许多情况下,该肽仅在少量的肿瘤上发现。但是,由于常规质谱分析灵敏度有限,RNA数据为范围评估提供了更好的基础(见实施例2)。

[0268] 本发明提出了有利于治疗癌肿/肿瘤,优选为治疗过量提呈或只提呈本发明肽的HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL。这些肽由质谱分析法直接显示出,而由HLA分子自然提呈于人原发性人HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL样本和/或PC样本。

[0269] 与正常组织相比,癌症中高度过度表达肽来源的许多源基因/蛋白质(也指定为“全长蛋白”或“潜在蛋白”)-本发明相关的“正常组织”是肿瘤相应类型的健康组织(肝、结肠/直肠、脑、胃、食管、肺、胰、肾、前列腺、卵巢、皮肤、乳腺和白细胞)或其他正常组织细胞,这表明肿瘤与这些源基因的高度关联性(见实施例2)。此外,这些肽本身也在肿瘤组织中过度提呈(本发明相关的“肿瘤组织”是指来自HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL患者的样本),但不在正常组织中过度提呈(见实施例1)。

[0270] HLA结合肽能够被免疫系统识别,特别是T淋巴细胞。T细胞可破坏提呈被识别HLA/肽复合体的细胞(如:提呈衍生肽的HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL细胞)。

[0271] 本发明的所有肽已被证明具有刺激T细胞反应的能力,并过量提呈,因而可用于制备本发明的抗体和/或TCR,例如可溶性TCR(参见实施例3和实施例4)。此外,肽与相应的MHC组合时,也可用于制备本发明的抗体和/或TCR,特别是sTCR。各个方法均为技术人员所熟知,并在各个文献中可找到。因此,本发明的肽可用于在患者中产生免疫反应,从而能够毁灭肿瘤细胞。患者的免疫反应能够透过直接给予患者所述肽或前体物质(如,加长肽、蛋白

或编码这些肽的核酸),较理想是与加强免疫原性的制剂相结合,而进行诱导。源自该治疗性疫苗的免疫反应预期能够高度特异性地对抗肿瘤细胞,因为本发明的目标肽在正常组织上提呈的复制数目较少,防止患者发生对抗正常细胞的不良自体免疫反应的风险。

[0272] 本说明书还涉及包含一个 α 链和一个 β 链(“ α/β TCR”)的T细胞受体(TCR)。还提供了由MHC分子提呈时可与TCR和抗体结合的肽。本说明书还涉及核酸、载体和用于表达TCR的宿主细胞和本说明书的肽;以及使用它们的方法。

[0273] 术语“T细胞受体”(缩写TCR)是指一种异二聚体分子,其包含一个 α 多肽链(α 链)和一个 β 多肽链(β 链),其中所述异二聚体受体能够结合由HLA分子提呈的肽抗原。该术语还包括所谓的 γ/δ TCR。

[0274] 在一个实施方案中,该说明书提供了如本文中所描述的产生TCR的方法,该方法包括在适于促进TCR表达的条件下培养能够表达TCR的宿主细胞。

[0275] 另一个方面,本说明书涉及一种根据本说明书的方法,其中所述抗原透过与足够量的含抗原提呈细胞的抗原结合被载入表达于合适抗原提呈细胞或人工抗原呈递细胞表面的I或II类MHC分子,或该抗原透过四聚化被加载I或II类MHC四聚体/I或II类MHC复合单体。

[0276] α/β TCR的 α 和 β 链和 γ/δ TCR的 γ 和 δ 链通常被视为各自有两个结构“域”,即可变和恒定结构域。可变结构域由可变区(V)和连接区(J)的组合。可变结构域还可能包括一个前导区(L)。 β 和 δ 链还可能包括一个多样区(D)。 α 和 β 恒定结构域还可能包括锚定 α 和 β 链至细胞膜的C末端跨膜(TM)结构域。

[0277] 相对于 γ/δ 的TCR,如本文所用的术语“TCR γ 可变域”是指无前导区(L)的TCR γ V (TRGV)区与TCR γ (TRGJ)区的组合,术语TCR γ 恒定结构域是指细胞外TRGC区域,或C-末端截短TRGC序列。同样地,“TCR δ 可变域”是指无前导区(L)的TCR δ V (TRDV)区与TCR δ D/J (TRDD/TRDJ)区的组合,术语“TCR δ 恒定结构域”是指细胞外TRDC区域,或C-末端截短TRDC序列。

[0278] 本说明书的TCR优选结合至肽HLA分子复合体,其具有约100 μ M或更小、约50 μ M或更小、约25 μ M或更小或约10 μ M或更小的结合亲和力(KD)。更为优选的情况是具有约1 μ M或更小、约100nM或更小、约50nM或更小或约25nM或更小结合亲和力的高亲和力TCR。本发明TCR优选结合亲和力范围的非限制性示例包括约1nM至约10nM;约10nM至约20nM;约20nM至约30nM;约30nM至约40nM;约40nM至约50nM;约50nM至约60nM;约60nM至约70nM;约70nM至约80nM;约80nM至约90nM;以及约90nM至约100nM。

[0279] 与本说明书TCR相关,本文使用的“特异性结合”及其语法变体用于表示对100 μ M或更小的肽-HLA分子复合体有结合亲和力(KD)的TCR。

[0280] 本说明书的 α/β 异二聚体TCR可能具有其恒定结构域之间的引入二硫键。这种类型的优选TCR包括那些具有一个TRAC恒定域序列和TRBC1或TRBC2恒定域序列的TCR,除非TRAC的那苏氨酸48和TRBC1或TRBC2的丝氨酸57被半胱氨酸残基取代,所述半胱氨酸形成TRAC恒定域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定区序列之间的二硫键。

[0281] 不论具有或不具有上述的引入链间键,本说明书的 α/β 杂二聚体TCR可能具有一个TRAC恒定域序列和一个TRBC1或TRBC2恒定结构域序列,并且TRAC恒定结构域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定结构域序列可能透过TRAC外显子2的Cys4和TRBC1或TRBC2外显子2的Cys4之间的天然二硫键相连。

[0282] 本说明书的TCR可能包括选自由放射性核素、荧光团和生物素组成组中的可检测标记。本说明书的TCR可能共轭至治疗活性剂,如放射性核素、化学治疗剂或毒素。

[0283] 在一个实施方案中,具有在 α 链中至少一个突变和/或具有在 β 链中至少一个突变的TCR与未突变的TCR相比,已经修改了糖基化。

[0284] 在一个实施方案中,在TCR α 链和/或TCR β 链中包括至少一个突变的TCR对肽HLA分子复合体有结合亲和力和/或结合半衰期,其是包含未突变TCR α 链和/或未突变TCR β 链的TCR的结合亲和力的至少两倍。肿瘤特异性TCR亲和力增强及其开发依赖于存在最佳TCR亲和力的窗口。这样窗口的存在是根据观察结果:HLA-A2限制性病原体特异性TCR与HLA-A2限制性肿瘤相关自身抗原特异性TCR相比,KD值通常大约低10倍。现已知,尽管肿瘤抗原可能具有免疫原性,但是因为肿瘤来自个体自身的细胞,因此仅突变蛋白质或翻译加工改变的蛋白将被免疫系统视为外来物质。上调或过度表达(所谓的自体抗原)的抗原不一定诱导针对肿瘤的功能免疫应答:表达对这些抗原具有高度反应性的TCR的T细胞会在一种称为中枢耐受的程序中在胸腺内被不利选择,也就是说只有对自身抗原具有低亲和力TCR的细胞才仍然存在。因此,本说明书的TCR或变体对根据本发明肽的亲和力可透过本领域熟知的方法来增强。

[0285] 本说明书还涉及一种识别和分离本发明TCR的一种方法,所述方法包括:用A2/肽单体从HLA-A*02阴性健康供体孵育PBMC,用四聚体-藻红蛋白(PE)孵育PBMC并透过荧光激活细胞分选(FACS)方法Calibur分析分离高亲和力T细胞。

[0286] 本说明书还涉及一种识别和分离本发明TCR的一种方法,所述方法包括:获得含整个人体TCR $\alpha\beta$ 基因位点(1.1and 0.7Mb)的转基因小鼠(其T细胞表达多样化人类TCR,用于补偿小鼠TCR缺乏),用相关肽对小鼠进行免疫处理,用四聚体-藻红蛋白(PE)孵育从转基因小鼠中获得的PBMC,并透过荧光激活细胞分选(FACS)方法-Calibur分析分离高亲和力T细胞。

[0287] 一方面,为了获得表达本说明书TCR的T细胞,编码本说明书TCR- α 和/或TCR- β 链的核酸被克隆入表达载体,诸如 γ 反转录病毒或慢病毒。重组病毒产生,然后测试功能,如抗原专一性和功能性亲合力。然后,最终产品的等分试样被用于转导靶T细胞群体(一般纯化自患者的PBMC),在输入患者前展开。

[0288] 另一方面,为了获得表达本说明书TCR的T细胞,TCR RNA透过本领域中已知的技术(例如,体外转录系统)合成。然后,体外合成的TCR RNA透过电穿孔来重新表达肿瘤特异性TCR- α 和/或TCR- β 链被引入获得自健康供体的初级CD8⁺ T细胞。

[0289] 为了增加表达,编码本说明书TCR的核酸在操作上可连接到强启动子,例如逆转录病毒长末端重复序列(LTR)、巨细胞病毒(CMV)、鼠干细胞病毒(MSCV)U3、磷酸甘油酸激酶(PGK)、 β 肌动蛋白、泛素蛋白和猿猴病毒40(SV40)/CD43复合启动子、延伸因子(EF)-1a和脾脏病灶形成病毒(SFFV)启动子。在一优选实施方案中,启动子与被表达的核酸异源。

[0290] 除了强启动子外,本说明书的TCR表达盒可能含有附加的元素,可提高转基因表达,包括中枢多聚嘌呤区(CPPT),其促进了慢病毒构建体的核易位(Follenzi et al., 2000),和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元素(WPRE),其透过提高RNA稳定性增加转基因表达水平(Zufferey et al., 1999)。

[0291] 本发明TCR的 α 和 β 链可由位于分开的载体核酸进行编码,或者可透过位于同一载体的多核苷酸编码。

[0292] 实现高水平的TCR表面表达需要引入TCR的TCR- α 和TCR- β 链高水平转录。为了实现它,本说明书的TCR- α 和TCR- β 链可在单一的载体中被克隆入双顺反子构建体,其已被证明能够克服这一障碍。使用TCR- α 和TCR- β 链在之间的病毒核糖体间进入位点(IRES)导致两链的协同表达,因为TCR- α 和TCR- β 链均由在翻译过程中分成两个蛋白质的单一转录物产生,从而确保了产生TCR- α 和TCR- β 链的相等摩尔比。(Schmitt et al.2009)。

[0293] 编码本说明书TCR的核酸可以是被优化以从宿主细胞增加表达的密码子。遗传密码冗余让一些氨基酸被一个以上的密码子编码,但某些密码子没有“优化”,因为匹配tRNA以及其他因子的相对可用性(Gustafsson et al.,2004)。修改TCR- α 和TCR- β 基因序列使得每个氨基酸被用于哺乳动物基因表达的最佳密码子编码,以及消除mRNA不稳定性基序或隐蔽剪接位点,已显示可显著提高TCR- α 和TCR- β 基因表达(Scholten et al.,2006)。

[0294] 此外,引入的和内源性TCR链之间的错配可能会导致获得特异性,这些特异性对自身免疫构成显著风险。例如,混合TCR二聚体的形成可能会减少可用以形成正确配对TCR复合体的CD3分子数目,因此,可以显著降低表达所引入TCR的细胞的功能性亲和力(Kuball et al.,2007)。

[0295] 为了减少错配,本说明书引入的TCR链的C-末端结构域可以进行修改以促进链间亲和力,而降低引入链与内源TCR配对的能力。这些策略可能包括用鼠配对物取代人类TCR- α 和TCR- β C端结构域(鼠化C端结构域);透过引入第二半胱氨酸残基到引入TCR的TCR- α 和TCR- β 链产生C末端结构域的第二间二硫键(半胱氨酸修饰);交换TCR- α 和TCR- β 链C端结构域的相互作用残基(“杵臼结构”“knob-in-hole”);直接融合TCR- α 和TCR- β 链可变结构域至CD3 ζ (CD3 ζ 融合)。(Schmitt et al.2009)。

[0296] 在一实施方案中,宿主细胞被改变结构以表达本说明书的TCR。在一优选实施方案中,宿主细胞为人T细胞或T细胞祖细胞。在一些实施方案中,T细胞或T细胞祖细胞从癌症患者中获得。在另一些实施方案中,T细胞或T细胞祖细胞从健康供体中获得。本说明书的宿主细胞相对于待治疗的患者可以为同种异体或自体的。在一实施方案中,宿主是被转化以表达 α/β TCR的 γ/δ T细胞。

[0297] “药物组合物”是指适合在医疗机构用于人体的组合物。优选地,药物组合物为无菌状态,并根据GMP指南生产。

[0298] 药物组合物包括游离形式或以一种药用盐形式存在的肽(也参见上文)。此处使用的“药用盐”系指所公开的肽的一种衍生物,其中该肽由制酸或药剂的碱盐进行改性。例如,用与适合的酸反应的游离碱(通常其中的中性药物有一个中性-NH₂基团)制备酸式盐。适合制备酸盐的酸包括有机酸,如:乙酸、丙酸、羧基酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、甲磺酸、苯磺酸、水杨酸等等、以及无机酸,如:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸等。相反,可在一种肽上提呈的酸性基团的碱盐制剂使用药用碱基进行制备,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等等。

[0299] 在特别优选的实施方案中,药物组合物包括乙酸(醋酸盐),三氟乙酸盐或盐酸(氯化物)形式的肽。

[0300] 本发明中所述的药剂优选为一种免疫治疗药剂,例如,一种疫苗。该疫苗可直接给

到患者的受影响器官,也可i.d.、i.m.、s.c.i.p.和i.v注射方式全身给药,或体外应用到来自患者或其细胞株的细胞(随后再将这些细胞注入到患者中),或体外用于从来自患者的免疫细胞的一个细胞亚群(然后再将细胞重新给予患者)。如果核酸体外注入细胞,可能有益于细胞转染,以共同表达免疫刺激细胞因子(如白细胞介素-2)。肽可完全单独给药,也可与免疫刺激佐剂相结合(见下文)、或与免疫刺激细胞因子联合使用、或以适当的输送系统给药(例如脂质体)。该肽也可共轭形成一种合适的载体(如钥孔虫血蓝蛋白(KLH)或甘露)到合适的载体(参阅WO 95/18145及(Longenecker et al.,1993))。肽也可能被标记,可能是融合蛋白,或可能是杂交分子。在本发明中给出序列的肽预计能刺激CD4或CD8 T细胞。然而,在有CD4 T-辅助细胞的帮助时,CD8 T细胞刺激更加有效。因此,对于刺激CD8 T细胞的MHC-I类表位,一种杂合分子的融合伙伴或片段提供了刺激CD4阳性T细胞的适当表位。CD4-和CD8刺激表位为本领域所熟知、并包括本发明中确定的表位。

[0301] 一方面,疫苗包括至少含有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288中提出的一种肽以及至少另外一种肽,优选为2至50个、更优选为2至25个、再优选为2至20个、最优选为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个肽。肽可能从一个或多个特定TAA中衍生,并且可能与MHC I类分子结合。

[0302] 另一方面,本发明提出了一种编码本发明中肽或肽变体的核酸(如多聚核苷酸)。多聚核苷酸可能为,例如,DNA、cDNA、PNA、RNA或其组合物,它们可为单链和/或双链、或多聚核苷酸的原生或稳定形式(如:具有硫代磷酸骨架的多聚核苷酸),并且只要它编码肽,就可能包含也可能不包含内含子。当然,多聚核苷酸只能编码加入天然肽键并含有天然氨基酸残基的肽。另一个方面,本发明提出了一种可根据本发明表达多肽的表达载体。

[0303] 对于连接多核苷酸,已经开发出多种方法,尤其是针对DNA,可透过向载体补充可连接性末端等方法进行连接。例如,可向DNA片段加入补充性均聚物轨道,之后DNA片段被插入到载体DNA。然后,透过补充性均聚物尾巴的氢键结合,将载体和DNA片段结合,从而形成重组DNA分子。

[0304] 含有一个或多个酶切位点的合成接头为DNA片段与载体连接提供了另一种方法。含各种限制性核酸内切酶的合成接头可透过多种管道购得,其中包括从国际生物技术公司(International Biotechnologies Inc,New Haven,CN,美国)购得。

[0305] 编码本发明多肽的DNA理想修饰方法利用Saiki RK等人(Saiki et al.,1988)披露的聚合酶链反应方法。此方法可用于将DNA引入合适的载体(例如,透过设计合适的酶切位点),也可用于本领域已知的其他有用方法修饰DNA。如果使用病毒载体,痘病毒载体或腺病毒载体为优选。

[0306] 之后,DNA(或在逆转录病毒载体情况下,RNA)可能表达于合适的宿主,从而制成含本发明肽或变体的多肽。因此,可根据已知技术使用编码本发明肽或变体的DNA,用本文所述方法适当修饰后,构建表达载体,然后表达载体用于转化合适宿主细胞,从而表达和产生本发明中的多肽。此类技术包括那些公开于,例如,美国专利4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075和4,810,648。

[0307] 编码含本发明化合物多肽的DNA(或在逆转录病毒载体情况下,RNA)可能被加入到其他多种DNA序列,从而引入到合适的宿主中。同伴DNA将取决于宿主的性质、DNA引入宿主的方式、以及是否需要保持为游离体还是要相互结合。

[0308] 一般来说,DNA可以适当的方向和正确的表达阅读框架附着到一种表达载体(如质粒)中。如有必要,该DNA可能与所需宿主所识别的相应转录和翻译调节控制核苷酸序列连接,尽管表达载体中一般存在此类控制功能。然后,该载体透过标准方法被引入宿主。一般来说,并不是所有的宿主都会被载体转化。因此,有必要选择转化过的宿主细胞。选择方法包括用任何必要的控制元素向表达载体插入一个DNA序列,该序列对转化细胞中的可选择性属性(如抗生素耐药性)进行编码。

[0309] 另外,有这种选择属性的基因可在另外一个载体上,该载体用来协同转化所需的宿主细胞。

[0310] 然后,本发明中的重组DNA所转化的宿主细胞在本文中所述本领域技术人员熟悉的合适条件下培养足够长的时间,从而表达之后可回收的肽。

[0311] 有许多已知的表达系统,包括细菌(如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母(如酵母菌)、丝状真菌(如曲霉菌)、植物细胞、动物细胞及昆虫细胞。该系统可优选为哺乳动物细胞,如来自ATCC细胞生物学库(Cell Biology Collection)中的CHO细胞。

[0312] 典型的哺乳动物细胞组成型表达载体质粒包括CMV或含一个合适的多聚A尾巴的SV40启动子以及抗性标志物(如新霉素)。一个实例为从Pharmacia公司(Piscataway,新泽西,美国)获得的pSVL。一种可诱导型哺乳动物表达载体的例子是pMSG,也可以从Pharmacia公司获得。有用的酵母质粒载体是pRS403-406和pRS413-416,一般可从Stratagene Cloning Systems公司(La Jolla,CA 92037,美国)获得。质粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406是酵母整合型质粒(YIp),并插入了酵母可选择性标记物HIS3、TRP1、LEU2和URA3。pRS413-416质粒为酵母着丝粒质粒(Ycp)。基于CMV启动子的载体(如,来自于Sigma-Aldrich公司)提供了瞬时或稳定的表达、胞浆表达或分泌,以及FLAG、3xFLAG、c-myc或MATN不同组合物中的N-端或C-端标记。这些融合蛋白可用于检测、纯化及分析重组蛋白。双标融合为检测提供了灵活性。

[0313] 强劲的人巨细胞病毒(CMV)启动子调控区使得COS细胞中的组成蛋白表达水平高达1mg/L。对于较弱的细胞株,蛋白水平一般低于0.1mg/L。SV40复制原点的出现将导致DNA在SV40复制容纳性COS细胞中高水平复制。例如,CMV载体可包含细菌细胞中的pMB1(pBR322的衍生物)复制原点、细菌中进行氨苄青霉素抗性选育的钙-内酰胺酶基因、hGH polyA和f1的原点。含前胰岛素原引导(PPT)序列的载体可使用抗FLAG抗体、树脂和板引导FLAG融合蛋白分泌到进行纯化的培养基中。其他与各种宿主细胞一起应用的载体和表达系统是本领域熟知众所周知的。

[0314] 在另一个实施方案中,对本发明的两个或更多的肽或肽变体进行编码,因此,以一个连续顺序(类似于“一串珠子”的构建体)表达。在达到目标,所述肽或肽变体可能透过连接氨基酸的延伸处(例如LLLLLL)连接或融合一起,也可能他们之间没有任何附加的肽而被连接。这些构建体也可用于癌症治疗,可诱导涉及MHC I和MHC II类分子的免疫应答。

[0315] 本发明还涉及一种宿主细胞,其以本发明的多核苷酸载体构建转化而来。宿主细胞可为原核细胞,也可为真核细胞。在有些情况下,细菌细胞为优选原核宿主细胞,典型为大肠杆菌株,例如,大肠杆菌菌株DH5(从Bethesda Research Laboratories公司(Bethesda,MD,美国)获得)和RR1(从美国菌种保藏中心(ATCC,Rockville,MD,美国),ATCC编号31343获得)。首选的真核宿主细胞包括酵母、昆虫和哺乳动物细胞,优选为脊椎动物细

胞,如:小鼠、大鼠、猴子或人成纤维细胞和结肠癌细胞株中的细胞。酵母宿主细胞包括YPH499、YPH500和YPH501,一般可从Stratagene Cloning Systems公司(La Jolla,CA 92037,美国)获得。首选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞为ATCC中的CCL61细胞、NIH瑞士小鼠胚胎细胞NIH/3T3为ATCC中的CRL 1658细胞、猴肾源性COS-1细胞为ATCC中的CRL 1650细胞以及人胚胎肾细胞的293号细胞。首选昆虫细胞为Sf9细胞,可用杆状病毒表达载体转染。有关针对表达选择合适宿主细胞的概要,可从教科书(Paulina Balbás and Argelia Lorence《Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols》Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9)和本领域技术人员知道的其他文献中查到。

[0316] 含本发明DNA结构的适当宿主细胞的转化可使用大家熟知的方法完成,通常取决于使用载体的类型。关于原核宿主细胞的转化,请参见,例如,Cohen等人的文献(Cohen et al., 1972)和(Green and Sambrook, 2012)。酵母细胞的转化在Sherman等人的文章(Sherman et al., 1986)中进行了描述。Beggs (Beggs, 1978)中所述的方法也很有用。对于脊椎动物细胞,转染这些细胞的试剂等,例如,磷酸钙和DEAE-葡聚糖或脂质体配方,可从Stratagene Cloning Systems公司或Life Technologies公司(Gaithersburg, MD 20877, 美国)获得。电穿孔也可用于转化和/或转染细胞,是本领域用于转化酵母细胞、细菌细胞、昆虫细胞和脊椎动物细胞大家熟知的方法。

[0317] 被成功转化的细胞(即含本发明DNA结构的细胞)可用大家熟知的方法(如PCR)进行识别。另外,上清液存在的蛋白可使用抗体进行检测。

[0318] 应了解,本发明中的某些宿主细胞用于制备本发明中的肽,例如细菌细胞、酵母细胞和昆虫细胞。但是,其他宿主细胞可能对某些治疗方法有用。例如,抗原提呈细胞(如树突状细胞)可用于表达本发明中的肽,使他们可以加加载相应的MHC分子中。因此,本发明提出了含本发明中核酸或表达载体的一种宿主细胞。

[0319] 在一个优选实施方案中,宿主细胞为抗原提呈细胞,尤其是树突状细胞或抗原提呈细胞。2010年4月29日,美国食品和药物管理局(FDA)批准载有含前列腺酸性磷酸酶(PAP)的重组融合蛋白可用于治疗无症状或症状轻微的转移性HRPC(Rini et al., 2006; Small et al., 2006)。

[0320] 另一方面,本发明提出了一种配制一种肽及其变体的方法,该方法包括培养宿主细胞和从宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0321] 在另一个实施方案中,本发明中的肽、核酸或表达载体用于药物中。例如,肽或其变体可制备为静脉(i.v)注射剂、皮下(s.c)注射剂、皮内(i.d.)注射剂、腹膜内(i.p.)注射剂、肌肉(i.m)注射剂。肽注射的优选方法包括s.c、i.d.、i.p.、i.m.和i.v注射。DNA注射的优选方法为i.d.、i.m.、s.c、i.p.和i.v注射。例如,给予50 μ g至1.5mg,优选为125 μ g至500 μ g的肽或DNA,这取决于具体的肽或DNA。上述剂量范围在以前的试验中成功使用(Walter et al., 2012)。

[0322] 用于主动免疫接种的多聚核苷酸可为基本纯化形式,也可包被于载体或输送系统。核酸可能为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。这种核酸的设计和引入方法为本领域所熟知。例如,文献中有其概述(Teufel et al., 2005)。多核苷酸疫苗很容易制备,但这些载体诱导免疫反应的作用模式尚未完全了解。合适的载体和输送系统包括病毒DNA和/或

RNA,如基于腺病毒、牛痘病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、腺相关病毒或含一种以上病毒元素的混合病毒的系统。非病毒输送系统包括阳离子脂质体和阳离子聚合物,是DNA输送所属领域内熟知的系统。也可使用物理输送系统,如透过“基因枪”。肽或核酸编码的肽可以是一种融合蛋白,例如,含刺激T细胞进行上述CDR的表位。

[0323] 本发明的药剂也可能包括一种或多种佐剂。佐剂是那些非特异性地增强或加强免疫反应的物质(例如,透过CD8-阳性T细胞和辅助T(T_H)细胞介导的对一种抗原的免疫应答,因此被视为对本发明的药剂有用。适合的佐剂包括(但不仅限于)1018ISS、铝盐、AMPLIVAX[®]、AS15、BCG、CP-870,893、CPG7909、CyaA、dSLIM、鞭毛蛋白或鞭毛蛋白衍生的TLR5配体、FLT3配体、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(ALDARA[®])、resiquimod、ImuFact IMP321、白细胞介素IL-2、IL-13、IL-21、干扰素 α 或 β ,或其聚乙二醇衍生物、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、JuvImmune[®]、LipoVac、MALP2、MF59、单磷脂A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、水包油和油包水乳状液、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、PepTel[®]载体系统、基于聚丙交酯复合乙交酯[PLG]和右旋糖苷微粒、重组人乳铁传递蛋白SRL172、病毒颗粒和其他病毒样颗粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys、源自皂角苷、分支杆菌提取物和细菌细胞壁合成模拟物的Aquila公司的QS21刺激子,以及其他专有佐剂,如:Ribi's Detox、Quil或Superfos。优选佐剂如:弗氏佐剂或GM-CSF。前人对一些树突状细胞特异性免疫佐剂(如MF59)及其制备方法进行了描述(Allison and Krummel,1995)。也可能使用细胞因子。一些细胞因子直接影响树突状细胞向淋巴组织迁移(如,TNF-),加速树突状细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原提呈细胞(如,GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国5849589号专利,特别以其完整引用形式并入本文),并充当免疫佐剂(如IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN- α 、IFN- β)(Gabrilovich et al., 1996)。

[0324] 据报告,CpG免疫刺激寡核苷酸可提高佐剂在疫苗中的作用。如果没有理论的约束,CpG寡核苷酸可透过Toll样受体(TLR)(主要为TLR9)激活先天(非适应性)免疫系统从而起作用。CpG引发的TLR9活化作用提高了对各种抗原的抗原特异性体液和细胞反应,这些抗原包括肽或蛋白抗原、活病毒或被杀死的病毒、树突状细胞疫苗、自体细胞疫苗以及预防性和治疗性疫苗中的多糖结合物。更重要的是,它会增强树突状细胞的成熟和分化,导致 T_H 细胞的活化增强以及细胞毒性T淋巴细胞(CTL)生成加强,甚至CD4 T细胞说明的缺失。甚至有疫苗佐剂的存在也能维持TLR9活化作用诱发的 T_H 偏移,这些佐剂如:正常促进 T_H 偏移的明矾或弗氏不完全佐剂(IFA)。CpG寡核苷酸与以下其他佐剂或配方一起制备或联合给药时,表现出更强的佐剂活性,如微粒、纳米粒子、脂肪乳或类似制剂,当抗原相对较弱时,这些对诱发强反应尤为必要。他们还能加速免疫反应,使抗原剂量减少约两个数量级,在有些实验中,对不含CpG的全剂量疫苗也能产生类似的抗体反应(Krieg,2006)。美国6406705 B1号专利对CpG寡核苷酸、非核酸佐剂和抗原结合使用促使抗原特异性免疫反应进行了描述。一种CpG TLR9拮抗剂为Mologen公司(德国柏林)的dSLIM(双干环免疫调节剂),这是本发明药物组合物的优选成分。也可使用其他如TLR结合分子,如:RNA结合TLR7、TLR8和/或TLR9。

[0325] 其他有用的佐剂例子包括(但不限于)化学修饰性CpG(如CpR、Idera)、dsRNA模拟物,如,Poly(I:C)及其衍生物(如:AmpliGen、Hiltonol、多聚-(ICLC)、多聚(IC-R)、多聚(I:C12U))、非CpG细菌性DNA或RNA以及免疫活性小分子和抗体,如:环磷酸胺、舒尼替单抗、

贝伐单抗®、西乐葆、NCX-4016、西地那非、他达拉非、伐地那非、索拉非尼、替莫唑胺、temsirolimus、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗-CTLA4、免疫系统的其他抗体靶向性主要结构(如:抗-CD40、抗-TGF β 、抗-TNF α 受体)和SC58175,这些药物都可能有治疗作用和/或充当佐剂。技术人员无需过度进行不当实验就很容易确定本发明中有用的佐剂和添加剂的数量和浓度。

[0326] 首选佐剂是抗-CD40、咪喹莫特、瑞喹莫德、GM-CSF、环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐单抗、干扰素 α 、CpG寡核苷酸及衍生物、多聚(I:C)及衍生物、RNA、西地那非和PLG或病毒颗粒的微粒制剂。

[0327] 本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂从含集落刺激因子制剂中选择,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特、resiquimod和干扰素- α 。

[0328] 本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂从含集落刺激因子制剂中选择,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特和resiquimod。在本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂为环磷酰胺、咪喹莫特或resiquimod。更优选的佐剂是Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、聚-ICLC(Hiltonol®)和抗CD40 mAB或其组合物。

[0329] 此组合药物为非肠道注射使用,如皮下、皮内、肌肉注射,也可口服。为此,肽和其他选择性分子在药用载体中分解或悬浮,优选为水载体。此外,组合物可包含辅料,如:缓冲剂、结合剂、冲击剂、稀释剂、香料、润滑剂等。这些肽也可与免疫刺激物质合用,如:细胞因子。可用于此类组合物的更多辅料可在从A.Kibbe所著的Handbook of Pharmaceutical Excipients(Kibbe,2000)等书中获知。此组合药物可用于阻止、预防和/或治疗腺瘤或癌性疾病。例如,EP2112253中有示例制剂。

[0330] 重要的是要认识到,透过本发明的疫苗引发的免疫应答在不同的细胞阶段和开发的不同阶段攻击癌症。而且不同的癌症相关信号通路被攻击。这相对于其他疫苗的优势,这些疫苗只针对一个或几个靶标,这可能会导致肿瘤很容易适应于攻击(肿瘤逃逸)。此外,并非所有的个体肿瘤都表达相同模式的抗原。因此,几个肿瘤相关肽的组合确保了每个肿瘤都承担至少一些靶标。该组合物以这样的方式设计,预期每个肿瘤可表达几种抗原并覆盖肿瘤生长和维持所需要的几种独立的途径。因此,疫苗可易于“现成的”用于较大患者群体。这意味着,预选择接受疫苗治疗的患者可限制为HLA分型,无需抗原表达的任何额外的生物标志物评估,但仍然确保多个靶标同时被诱导的免疫应答攻击,这对于疗效很重要(Banchereau et al.,2001;Walter et al.,2012)。

[0331] 本文所用的“支架”一词是指与(如抗原)决定因子特异性结合的分子。在一项实施方案中,支架是能够引导其所连接的实体(例如,(第二)抗原结合部分)至目标靶点,例如,至特定类型的肿瘤细胞或承载抗原决定簇的肿瘤基质(如根据目前申请中肽和MHC的复合体)。在另一项实施例,支架能够透过其靶抗原(例如T细胞受体复合体抗原)激活信号通路。支架包括但不限于抗体及其片段,抗体的抗原结合区,其包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区,结合的蛋白包括至少一个锚蛋白重复序列基元和单域抗原结合(SDAB)分子、适体、(可溶)TCR和(经修饰的)细胞,例如同种异体或自体T细胞。为了评估某个分子是否是结合至靶点的支架,可进行结合测定。

[0332] “特定”结合系指,与其他天然肽-MHC复合体相比,该支架与感兴趣的肽-MHC复合体更好地结合,结合程度为,拥有能够杀死承载特定靶点细胞的活性分子的支架不能够杀死无特定靶点但提呈一个或多个其他肽-MHC复合体的另一细胞。如果交叉反应性肽-MHC的肽并不是天然的,即,并非来自人HLA-多肽组,则结合至其他肽-MHC复合体是无关紧要的。评估靶细胞杀伤的测试在本领域中是公知的。它们应该含有未改变的肽-MHC提呈的靶细胞(原发细胞或细胞系)或载有肽的细胞进行,以便达到天然肽-MHC的水平。

[0333] 各支架可包括一个标记,其透过确定是否存在或不存在卷标所提供的信号可检测到结合支架。例如,该支架可用荧光染料或任何其他适用的细胞标记分子进行标记。此类标记分子是本领域中公知的。例如,透过荧光染料进行的荧光标记可透过荧光或激光扫描显微术或流式细胞术提供结合适体的可视化。

[0334] 各支架可与第二个活性分子(例如IL-21、抗CD3、抗CD28)共轭。

[0335] 关于多肽支架的进一步信息,可参阅,例如,在WO 2014/071978A1背景技术部分,并作为参考文献引用。

[0336] 本发明还涉及适体。适体(例如,参见WO 2014/191359及其中引用的文献)是短的单链核酸分子,其可以折迭为所定义的三维结构并识别特定的靶标结构。它们似乎是开发靶向治疗的合适替代方法。适体已显示可选择性与具有高亲和力和特异性的复合体靶标相结合。

[0337] 识别细胞表面分子的适体在过去十年内已经确定,并为开发诊断和治疗方法提供了手段。由于适体已显示几乎无毒性和免疫原性,因此,它们是生物医学应用中有前景的候选物质。事实上适体,例如前列腺特异性膜抗原识别适体,已被成功地用于靶向治疗并在体内模型的异种移植瘤中显示出功能。此外,认识到特定肿瘤细胞系的适体也已确定。

[0338] 可选择DNA适体来揭示各种癌细胞的广谱标识属性,特别是那些来自于实体瘤的细胞,而非致瘤和主要健康细胞不被识别。如果所识别的适体不仅识别肿瘤特异性子类型,而且与一系列肿瘤相互作用,这使适体适用于作为所谓的广谱诊断和治疗手段。

[0339] 此外,用流式细胞仪对细胞结合行为的研究显示,适体在纳摩尔范围内显示出很好的亲和力。

[0340] 适体用于诊断和治疗目的。此外,也可能显示,一些适体被肿瘤细胞吸取,因而可作为抗癌剂靶向递送的分子赋形剂,例如siRNA进入肿瘤细胞。

[0341] 可选择适体针对复合体的靶标,如细胞和组织以及包含、优选包括根据任何SEQ ID NO 1至SEQ ID NO 288的一个序列、根据当前发明的肽复合体与MHC分子,使用细胞SELEX(透过指数富集的配体系统进化)技术。

[0342] 本发明中的肽可用于生成和开发出针对MHC/肽复合物的特定抗体。这些抗体可用于治疗,将毒素或放射性物质靶向病变组织。这些抗体的另一用途是为了成像之目的(如PET)将放射性核素靶向病变组织。这可有助于检测小转移灶或确定病变组织的大小和准确位置。

[0343] 因此,本发明的另一方面是提出产生特异性结合至与HLA限制性抗原络合的I或II类人主要组织相容性复合体(MHC)的一种重组抗体的方法,该方法包括:用可溶形式的与HLA限制性抗原络合的(MHC)I或II类分子对包含表达所述主要组织相容性复合体(MHC)I或II类的基因工程非人哺乳动物进行免疫;将mRNA分子与产生所述非人哺乳动物细胞的抗

体分离;产生一个噬菌体显示库,显示由所述mRNA分子编码的蛋白分子;以及将至少一个噬菌体与所述噬菌体显示库分离,所述的至少一个噬菌体显示所述抗体特异性地结合至与HLA限制性抗原络合的所述人主要组织相容性说复合体(MHC)I或II类。

[0344] 本发明的另一方面提出一种抗体,其特异性结合至与一种HLA限制性抗原络合的I或II类人主要组织相容性说复合体(MHC),其中该抗体优选为多克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体和/或嵌合抗体。

[0345] 产生这种抗体和单链I类主要组织相容性复合物的相应方法,以及产生这些抗体的其他工具在WO 03/068201、WO 2004/084798、WO 01/72768、WO 03/070752以及出版物(Cohen et al.,2003a;Cohen et al.,2003b;Denkberg et al.,2003)中进行了披露,为了本发明之目的,所有参考文献透过引用被完整地并入本文。

[0346] 优选地,该抗体与复合体的结合亲和力低于20纳摩尔,优选为低于10纳摩尔,这在本发明情况下也被视为具有”特异性”。

[0347] 本发明涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288的组的一个序列或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288具有88%同源性(优选为相同)的一种变体,或诱导与所述变异肽发生T细胞交叉反应的一种变体,其中,所述肽不是基本的全长多肽。

[0348] 本发明进一步涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288的组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288具有至少88%同源性(优选为相同)的一种变体,其中所述肽或变体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸。

[0349] 本发明进一步涉及本发明的肽,其具有与主要组织相容性复合体(MHC)I或II类分子结合的能力。

[0350] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中肽系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288的一个氨基酸序列组成。

[0351] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽(在化学上)被修饰和/或包含非肽键。

[0352] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽为融合蛋白的一部分,特别包括HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸,或其中该肽与一种抗体(例如,树突状细胞特定抗体)融合。

[0353] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明所述肽,前提是该肽并非完整(完全)的人蛋白。

[0354] 本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。

[0355] 本发明进一步涉及一种能表达本发明核酸的表达载体。

[0356] 本发明进一步涉及本发明的一种肽、本发明的一种核酸或本发明的一种药用表达载体,特别是用于治疗HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL。

[0357] 本发明进一步涉及含本发明核酸或本发明表达载体的一种宿主细胞。

[0358] 本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其为抗原提呈细胞,优选为树突细胞。

[0359] 本发明进一步涉及配制本发明一种肽的一种方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞和从所述宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0360] 本发明进一步涉及本发明中的方法,其中抗原透过与足够量的含抗原提成细胞的抗原结合被载入表达于合适抗原提呈细胞表面的I或II类MHC分子。

[0361] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中该抗原提呈细胞包括一个表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288的肽或所述变体氨基酸序列。

[0362] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的激活T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞异常表达含一种本发明氨基酸序列的多肽。

[0363] 本发明进一步涉及一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明任何氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者本发明的有效量T细胞。

[0364] 本发明进一步涉及任何所述肽、本发明的一种核酸、本发明的一种表达载体、本发明的一种细胞、本发明一种作为药剂或制造药剂的激活细胞毒性T淋巴细胞的用途。本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0365] 本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中该药剂为一种疫苗。本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0366] 本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中所述癌细胞为HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL细胞。

[0367] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的特定标志物蛋白和生物标志物,在此成为“靶标”,其可用于诊断和/或判断HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL的预后。本发明还涉及这些供癌症治疗使用的新靶点。

[0368] 本文中术语“抗体”为广义上的定义,既包括多克隆也包括单克隆抗体。除了完整或“全部”的免疫球蛋白分子,“抗体”这一术语还包括这些免疫球蛋白分子和人源化免疫球蛋白分子的片段(如,CDR、Fv、Fab和Fc片段)或聚合物,只要它们表现出本发明的任何期望属性(例如,HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL标志物(多)肽的特异性结合、将毒素传递给癌细胞标志物基因表达水平增加时的HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL细胞和/或抑制HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL标志物多肽的活性)。

[0369] 只要有可能,本发明的抗体可从商业来源购买。本发明的抗体也可能使用已知的方法制得。技术人员会了解全长HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL标志物多肽或其片段可用于制备本发明的抗体。用于产生本发明抗体的多肽可部分或全部地由天然源经纯化而得,也可利用重组DNA技术生产。

[0370] 例如,本发明的编码肽的cDNA,例如,该肽为根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288多肽的肽,或其中一个变体或片段,可在原核细胞中(如:细菌)或真核细胞(如:酵母、昆虫或哺乳动物细胞)中表达,之后,可纯化重组蛋白,并用于产生一种特异性结合用于产生本发明抗体的HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL标志物多肽的单克隆或多克隆抗体制剂。

[0371] 本领域的技术人员会认识到,两种或两种以上不同集合的单克隆抗体或多克隆抗体能最大限度地增加获得一种含预期用途所需的特异性和亲和力(例如,ELISA法、免疫组

织化学、体内成像、免疫毒素疗法)的抗体的可能性。根据抗体的用途,用已知的方法对其期望活性进行测试(例如,ELISA法、免疫组织化学、免疫治疗等;要获取产生和测试抗体的进一步指导,请参阅,例如,Greenfield,2014 (Greenfield,2014)。例如,该抗体可用ELISA法或免疫印迹法、免疫组织化学染色福尔马林固定的癌组织或冰冻的组织切片进行检测。在初次体外表征后,用于治疗或体内诊断用途的抗体根据已知的临床测试方法进行检测。

[0372] 此处使用的术语“单克隆抗体”系指从大量同质抗体中获得的一种抗体,即,由相同的抗体组成的抗体群,但可能少量提呈的自然突变除外。此处所述的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中一部分重链和/或轻链与从特定物种中获得的抗体或属于特定抗体类型和分类型抗体的相应序列相同(同质),同时,剩余链与从其他物种中获得的抗体或属于特定抗体类型和子类型抗体的相应序列以及这些抗体的片段相同(同质),只要他们表现出预期的拮抗活性(美国4816567号专利,其在此以其整体并入)。

[0373] 本发明的单克隆抗体可能使用杂交瘤方法制得。在杂交瘤方法中,老鼠或其他适当的宿主动物,通常用免疫制剂以引发生成或能产生将特异性结合至免疫制剂的抗体。或者,淋巴细胞可在体外进行免疫。

[0374] 单克隆抗体也可由DNA重组方法制得,如:美国4816567号专利所述。编码本发明单克隆抗体的DNA可很容易地使用传统程序进行分离和测序(例如:透过使用能与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0375] 体外方法也适用于制备单价抗体。抗体消化以产生抗体的片段,尤其是Fab片段,可以透过使用本领域已知的常规技术完成。例如,可以透过使用木瓜蛋白酶完成消化。木瓜蛋白酶消化的实施例在WO 94/29348和美国4342566号专利中有描述。抗体的木瓜蛋白酶消化通常产生两种相同的抗原结合性片段,称为Fab片段(每个片段都有一个抗原结合点)和残余Fc片段。胃蛋白酶处理产生aF(ab')₂片段和pFc'片段。

[0376] 抗体片段,不论其是否附着于其他序列,均可包括特定区域或特定氨基酸残基的插入、删除、替换、或其他选择性修饰,但前提是,片段的活性与非修饰的抗体或抗体片段相比没有显著的改变或损害。这些修饰可提供一些额外的属性,如:删除/添加可与二硫键结合的氨基酸,以增加其生物寿命、改变其分泌特性等。在任何情况下,抗体片段必须拥有生物活性的特性,如:结合活性、调节结合域的结合力等。抗体的功能性或活性区域可透过蛋白特定区域的基因突变、随后表达和测试所表达的多肽进行确定。这些方法为本行业技术人员所熟知,可包括编码抗体片段的核酸的特定定位点基因突变。

[0377] 本发明的抗体可进一步包括人源化抗体或人抗体。非人(如:鼠)抗体的人源化形式为嵌合抗体免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如:Fv、Fab、Fab'或抗体的其他抗原结合序列),其中包含从非人免疫球蛋白中获得的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)(如具有与其特异性、亲和力和能力的小鼠、大鼠或兔子)CDR的残基取代。在某些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架(FR)残基被相应的非人残基取代。人源化抗体可能还包括既非受体抗体、也非输入CDR或框架序列中发现的残基。一般来说,人源化抗体将包括几乎所有的至少一个、通常为二个可变域,其中,全部或几乎全部的CDR区域均对应于非人免疫球蛋白的区域并且全部或几乎全部的FR区域均为人免疫球蛋白相同序列的区域。理想情况是,人源化抗体还将包括至少免疫球蛋白恒定区(Fc)的一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的一部分。

[0378] 人源化非人抗体的方法为本行业所熟知。一般来说,人源化抗体具有一个或多个从非人源头引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基往往被称为”输入”残基,通常从”输入”可变域中获得。人源化基本上可以透过将啮齿动物CDR或CDR序列取代为相应的人抗体序列而完成。因此,这种”人源化”抗体为嵌合抗体(美国4816567号专利),其中大大少于完整的人可变域被来自于非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常为人抗体,其中有些CDR残基以及可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0379] 可使用免疫后在内源性免疫球蛋白产生缺失时能产生完整人抗体的转基因动物(如:小鼠)。例如,它被描述为,嵌合和种系突变小鼠中的抗体重链连接区域基因的纯合性缺失导致内源性抗体生成的完全抑制。在此种系变种小鼠中人种系免疫球蛋白基因数组的转移在抗原挑战后将导致人抗体的生成。人抗体也可在噬菌体展示库中产生。

[0380] 本发明的抗体优选为透过药用载体的形式给予受试者。通常,在制剂中使用适量的药用盐,以使制剂等渗。药用载体的例子包括生理盐水、林格氏液和葡萄糖溶液。溶液的pH值优选为约5至8,更优选为约7至7.5。此外,载体还包括缓释制剂,如:含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,其中基质为有形物品形式,如:薄膜、脂质体或微粒。本行业的技术人员熟知,某些载体可能为更优选,取决于例如,抗体的给药途径和浓度。

[0381] 该抗体可透过注射(如:静脉内、腹腔内、皮下、肌肉内)或透过输注等其他方法给予受试者、患者或细胞,确保其以有效的形式传输到血液中。这些抗体也可以透过瘤内或瘤周途径给予,从而发挥局部和全身的治疗作用。局部或静脉注射为优选。

[0382] 抗体给药的有效剂量和时间表可根据经验确定,并且作出此类决定属本行业的技术范围内。本行业的技术人员会明白,必须给予的抗体剂量根据以下因素会有所不同,例如:接受抗体的受试者、给药途径、使用的抗体以及其他正在使用的药物的特定类型。单独使用的抗体的通常日剂量可能为约1 μ g/kg至最多100mg/kg体重或更多,这取决于上述因素。给予抗体,优选为治疗HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL后,治疗抗体的疗效可透过技术人员熟知的不同方法评估。例如:接受治疗的受试者癌症的大小、数量和/或分布可使用标准肿瘤成像技术进行监测。因治疗而给予的抗体与不给予抗体时的病程相比,可阻止肿瘤生长、导致肿瘤缩小、和/或阻止新肿瘤的发展,这样的抗体是一种有效治疗癌症的抗体。

[0383] 本发明的另一方面提出了制备识别特异性肽-MHC复合物的可溶性T细胞受体(sTCR)的一种方法。这种可溶性T细胞受体可从特异性T细胞克隆中产生,并且它们的亲和力可以透过互补决定区靶向诱变而增加。为了T细胞受体选择之目的,可以使用噬菌体展示(美国2010/0113300, (Liddy et al., 2012))。为了在噬菌体展示期间以及实际使用为药物时稳定T细胞受体之目的,可透过非天然二硫键、其他共价键(单链T细胞受体)或透过二聚化结构域连接 α 和 β 链(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T细胞受体可以连接到毒素、药物、细胞因子(参见US 2013/0115191)、域招募效应细胞,如抗CD3域等,以便对靶细胞执行特定的功能。此外,它可能表达于用于过继转移的T细胞。进一步的信息可在WO 2004/033685A1和WO 2004/074322A1中找到。sTCR的组合在WO 2012/056407A1中进行了描述。WO 2013/057586A1中公开了制备的进一步的方法。

[0384] 此外,可用本发明的肽和/或TCR或抗体或其他结合分子在活检样本的基础上验证病理师对癌症的诊断。

[0385] 该抗体或TCR也可用于体内诊断实验。一般来说,抗体用放射性核素标记(如: ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S),从而可免疫闪烁扫描法使肿瘤局限化。在一实施方案中,其中的抗体或片段与两个或两个以上选自包括上述蛋白的组的蛋白质靶目标细胞外域结合,并且亲和力值(Kd)低于 $1 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ 。

[0386] 诊断用抗体可透过各种影像学方法使用适合检测的探针进行标记。探针检测方法包括但不限于,荧光、光、共聚焦和电镜方法;磁共振成像和光谱学技术;透视、计算机断层扫描和正电子发射断层扫描。合适的探针包括但不限于,荧光素、罗丹明、曙红及其它荧光团、放射性同位素、黄金、钆和其他稀土、顺磁铁、氟-18和其他正电子发射放射性核素。此外,探针可能是双功能或多功能的,并且用一种以上的上述方法可进行检测。这些抗体可用所述的探针直接或间接进行标记。抗体探针的连接,包括探针的共价连接、将探针融合入抗体、以及螯合化合物的共价连接从而结合探针、以及其他本行业熟知的方法。对于免疫组织化学方法,疾病组织样本可能是新鲜或冷冻或可能包埋于石蜡中以及用福尔马林等防腐剂固定。固定或包埋的切片包括与标记一抗和二抗接触的样本,其中该抗体用于检测原位蛋白的表达。

[0387] 本发明的另一方面包括一种体外制备激活的T细胞的方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人MHC分子进行体外连接,这些分子在合适的抗原提呈细胞表面表达足够的一段时间从而以抗原特异性方式激活T细胞,其中所述抗原为根据本发明所述的一种肽。优选情况是足够量的抗原与抗原提呈细胞一同使用。

[0388] 优选情况是,哺乳动物细胞的TAP肽转载体缺乏或水平下降或功能降低。缺乏TAP肽转运载体的适合细胞包括T2、RMA-S和果蝇细胞。TAP是与抗原加工相关的转载体。

[0389] 人体肽载入的缺陷细胞株T2从属美国菌种保藏中心(ATCC,12301 Parklawn Drive,Rockville,Maryland 20852,美国)目录号CRL1992;果蝇细胞株Schneider 2号株从属ATCC目录CRL 19863;小鼠RMA-S细胞株Ljunggren等人描述过(Ljunggren and Karre, 1985)。

[0390] 优选情况是,宿主细胞在转染前基本上不表达MHC I类分子。刺激因子细胞还优选为表达对T细胞共刺激信号起到重要作用的分子,如,B7.1、B7.2、ICAM-1和LFA 3中的任一分子。大量MHC I类分子和共刺激分子的核酸序列可从GenBank和EMBL数据库中公开获得。

[0391] 当MHC I类表位用作一种抗原时,T细胞为CD8阳性T细胞。

[0392] 如果抗原提呈细胞受到转染而表达这种表位,则优选的细胞包括一个表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:288的肽或变体氨基酸序列。

[0393] 可使用其他一些方法来体外生成T细胞。例如,自体肿瘤浸润性淋巴细胞可用于生成CTL。Plebanski等人在(Plebanski et al.,1995)使用自体外周血淋巴细胞(PLB)制得T细胞。另外,也可能用肽或多肽脉冲处理树突状细胞或透过与重组病毒感染而制成自体T细胞。此外,B细胞可用于制备自体T细胞。此外,用肽或多肽脉冲处理或用重组病毒感染的巨噬细胞可用于配制自体T细胞。S.Walter等人在(Walter et al.,2003)中描述了透过使用人工抗原提呈细胞(aAPC)体外激活T细胞,这也是生成作用于所选肽的T细胞的一种合适方法。在本发明中,根据生物素:链霉素生物化学方法透过将预制的MHC:肽复合物耦合到聚苯乙烯颗粒(微球)而生成aAPC。该系统实现了对aAPC上的MHC密度进行精确调节,这使得可以

在血液样本中选择地引发高或低亲合力的高效抗原特异性T细胞反应。除了MHC:肽复合物外,aAPC还应携运含共刺激活性的其他蛋白,如耦合至表面的抗-CD28抗体。此外,此类基于aAPC的系统往往需要加入适当的可溶性因子,例如,诸如白细胞介素-12的细胞因子。

[0394] 也可用同种异体细胞制得T细胞,在WO 97/26328中详细描述了一种方法,以参考文献方式并入本文。例如,除了果蝇细胞和T2细胞,也可用其他细胞来提呈肽,如CHO细胞、杆状病毒感染的昆虫细胞、细菌、酵母、牛痘感染的靶细胞。此外,也可使用植物病毒(例如,参阅Porta等人在(Porta et al.,1994)中描述了将豇豆花叶病毒开发为一种提呈外来肽的高产系统。

[0395] 被激活的T细胞直接针对本发明中的肽,有助于治疗。因此,本发明的另一方面提出了用本发明前述方法制得的激活T细胞。

[0396] 按上述方法制成的激活T细胞将会有选择性地识别异常表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO288氨基酸序列的多肽。

[0397] 优选情况是,T细胞透过与其含HLA/肽复合物的TCR相互作用(如,结合)而识别该细胞。T细胞是杀伤患者靶细胞方法中有用的细胞,其靶细胞异常表达含本发明中氨基酸序列的多肽。此类患者给予有效量的激活T细胞。给予患者的T细胞可能源自该患者,并按上述方法激活(即,它们为自体T细胞)。或者,T细胞不是源自该患者,而是来自另一个人。当然,优选情况是该供体为健康人。发明人使用“健康个人”系指一个人一般状况良好,优选为免疫系统合格,更优选为无任何可很容易测试或检测到的疾病。

[0398] 根据本发明,CD8-阳性T细胞的体内靶细胞可为肿瘤细胞(有时表达MHC-II类抗原)和/或肿瘤周围的基质细胞(肿瘤细胞)(有时也表达MHC-II类抗原;(Dengjel et al.,2006))。

[0399] 本发明所述的T细胞可用作治疗性组合物中的活性成分。因此,本发明也提出了一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明中氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者上述有效量的T细胞。

[0400] 发明人所用的“异常表达”的意思还包括,与正常表达水平相比,多肽过度表达,或该基因在源自肿瘤的组织中未表达,但是在该肿瘤中却表达。”过度表达”系指多肽水平至少为正常组织中的1.2倍;优选为至少为正常组织中的2倍,更优选为至少5或10倍。

[0401] T细胞可用本领域已知的方法制得(如,上述方法)。

[0402] T细胞继转移方案为本领域所熟知的方案。综述可发现于:Gattinoni et al.和Morgan et al.(Gattinoni et al.,2006;Morgan et al.,2006)。

[0403] 本发明的另一个方面包括使用与MHC复合的肽,以生成T细胞受体,其核酸被克隆并被引入至宿主细胞,优选为T细胞。然后,该透过基因工程改变的T细胞可转给患者用于癌症治疗。

[0404] 本发明的任一分子(即肽、核酸、抗体、表达载体、细胞,激活T细胞、T细胞受体或编码核酸)都有益于治疗疾病,其特点在于细胞逃避免疫反应的打击。因此,本发明的任一分子都可用作药剂或用于制造药剂。这种分子可单独使用也可与本发明中的其他分子或已知分子联合使用。

[0405] 本发明进一步提出了一种药剂,其用于治疗癌症,特别是HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL

和其他恶性肿瘤。

[0406] 本发明还涉及一种套件,其包括:

[0407] (a) 一个容器,包含上述溶液或冻干粉形式的药物组合物;

[0408] (b) 可选的第二个容器,其含有冻干粉剂型的稀释剂或重组溶液;和

[0409] (c) 可选的(i) 溶液使用或(ii) 重组和/或冻干制剂使用的说明。

[0410] 该套件还步包括一个或多个(iii) 缓冲剂, (iv) 稀释剂, (v) 过滤液, (vi) 针, 或 (v) 注射器。容器最好是瓶子、小瓶、注射器或试管,可以为多用途容器。药物组合物最好是冻干的。

[0411] 本发明中的套件优选包含一种置于合适容器中的冻干制剂以及重组和/或使用说明。适当的容器包括,例如瓶子、西林瓶(如双室瓶)、注射器(如双室注射器)和试管。该容器可能由多种材料制成,如玻璃或塑料。试剂盒和/或容器最好有容器或关于容器的说明书,指明重组和/或使用的方向。例如,标签可能表明冻干剂型将重组为上述肽浓度。该标签可进一步表明制剂用于皮下注射。

[0412] 存放制剂的容器可使用多用途西林瓶,使得可重复给予(例如,2-6次)重组剂型。该套件可进一步包括装有合适稀释剂(如碳酸氢钠溶液)的第二个容器。

[0413] 稀释液和冻干制剂混合后,重组制剂中的肽终浓度优选为至少0.15mg/mL/肽(=75 μ g),不超过3mg/mL/肽(=1500 μ g)。该套件还可包括商业和用户角度来说可取的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂,过滤液、针头、注射器和带有使用说明书的包装插页。

[0414] 本发明中的套件可能有一个单独的容器,其中包含本发明所述的药物组合物制剂,该制剂可有其他成分(例如,其他化合物或及其药物组合物),也可无其他成分,或者每种成分都有其不同容器。

[0415] 优选情况是,本发明的套件包括与本发明的一种制剂,包装后与第二种化合物(如佐剂(例如GM-CSF)、化疗药物、天然产品、激素或拮抗剂、抗血管生成剂或抑制剂、凋亡诱导剂或螯合剂)或其药物组合物联合使用。该套件的成分可进行预络合或每种成分在给予患者之前可放置于单独的不同容器。该套件的成分可以是一种或多种溶液,优选为水溶液,更优选为无菌水溶液。该套件的成分也可为固体形式,加入合适的溶剂后转换为液体,最好放置于另一个不同的容器中。

[0416] 治疗套件的容器可能为西林瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器、或任何其他盛装固体或液体的工具。通常,当成分不只一种时,套件将包含第二个西林瓶或其他容器,使之可以单独定量。该套件还可能包含另一个装载药用液体的容器。优选情况是,治疗套件将包含一个设备(如,一个或多个针头、注射器、滴眼器、吸液管等),使得可注射本发明的药物(本套件的组合物)。

[0417] 本发明的药物配方适合以任何可接受的途径进行肽给药,如口服(肠道)、鼻内、眼内、皮下、皮内、肌内,静脉或经皮给药。优选为皮下给药,最优选为皮内给药,也可透过输液泵给药。

[0418] 由于本发明的肽从HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL中分离而得,因此,本发明的药剂优选用于治疗HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC和CLL。

[0419] 本发明进一步涉及为个体患者制备个体化药物的一种方法,其中包括:制造含选自预筛选TUMAP存储库至少一种肽的药物组合物,其中药物组合物中所用的至少一种肽选择为适合于个体患者。在一项实施方案中,药物组合物为一种疫苗。该方法也可以改动以产生下游应用的T细胞克隆物,如:TCR隔离物或可溶性抗体和其他治疗选择。

[0420] “个体化药物”系指专门针对个体患者的治疗,将仅用于该等个体患者,包括个体化活性癌症疫苗以及使用自体组织的过继细胞疗法。

[0421] 如本文所述,“存储库”应指已经接受免疫原性预筛查和/或在特定肿瘤类型中过量提呈的一组或一系列肽。“存储库”一词并不暗示,疫苗中包括的特定肽已预先制造并储存于物理设备中,虽然预期有这种可脂性。明确预期所述肽可以用于新制造每种个体化疫苗,也可能被预先制造和储存。存储库(例如,数据库形式)由肿瘤相关肽组成,其在各种HLA-A HLA-B和HLA-C等位基因HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL患者的肿瘤组织中高度过度表达。其可能含有包括MHC I类和MHC II类肽或拉长的MHC I类肽。除了从几种肿瘤组织中采集的肿瘤相关肽外,存储库还可能包含HLA-A*02和HLA-A*24标记肽。这些肽可对TUMAP诱导的T细胞免疫进行量化比较,从而可得出疫苗抗肿瘤反应能力的重要结论。其次,在没有观察到来自患者“自身”抗原TUMAP的任何疫苗诱导的T细胞反应时,它们可作为来自“非自身”抗原的重要阳性对照肽。第三,它还可对患者的免疫功能状态得出结论。

[0422] 本发明和存储库的TUMAP透过使用一种功能基因组学方法进行鉴定,该方法结合了基因表达分析、质谱法和T细胞免疫学(XPresident®)。该方法确保了只选择真实存在于高百分比肿瘤但在正常组织中不表达或仅很少量表达的TUMAP用于进一步分析。对于初始肽的选择,患者的HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL样本和健康供体的血液以循序渐进的方法进行分析:

[0423] 1. 使用全基因组信使核糖核酸(mRNA)表达分析法用于确定在重要正常(非癌性)组织中以非常低水平表达的基因。评估这些基因在恶性肿瘤组织(HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC、CLL)与一系列正常器官和组织相比是否过度表达。

[0424] 2. 恶性材料(HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC、CLL)的HLA配体用质谱法测定。

[0425] 3. 确定的HLA配体与基因表达数据进行比较。肿瘤组织上过度提呈或选择性提呈的肽,优选为第2步中检测到的选择性表达或过度表达基因所编码的考虑为多肽疫苗的合适候选TUMAP。

[0426] 4. 文献检索以确定更多证据以支持确认为TUMAP的肽的相关性

[0427] 5. 过度表达在mRNA水平的相关性由肿瘤组织第3步选定的TUMAP重新检测而确定,并且在健康组织上缺乏(或不经常)检测。

[0428] 6. 为了评估透过选定的肽诱导体内T细胞反应是否可行,使用健康供体以及HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC或CLL患者的人T细胞进行体外免疫原性测定。

[0429] 一方面,在将所述肽加入存储库之前,对其进行筛查以了解免疫原性。举例来说

(但不限于此),纳入存储库的肽的免疫原性的确定方法包括体外T细胞激活,具体为:用装载肽/MHC复合物和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞反复刺激来自健康供体的CD8⁺ T细胞。

[0430] 这种方法优选用于罕见癌症以及有罕见表达谱的患者。与含目前开发为固定组分的多肽鸡尾酒相反的是,存储库可将肿瘤中抗原的实际表达于疫苗进行更高层次的匹配。在多目标方法中,每名患者将使用几种“现成”肽的选定单一肽或组合。理论上来说,基于从50抗原肽库中选择例如5种不同抗原肽的一种方法可提供大约170万种可能的药物产品(DP)组分。

[0431] 在一方面,选择所述肽用于疫苗,其基于个体患者的适合性,并使用本发明此处或后文所述的方法。

[0432] HLA表型、转录和肽组学资料从患者的肿瘤材料和血液样本中收集,以确定最合适每名患者且含有“存储库”和患者独特(即突变)TUMAP的肽。将选择的那些肽选择性地或过度表达于患者肿瘤中,并且可能的情况下,如果用患者个体PBMC进行检测,则表现出很强的体外免疫原性。

[0433] 优选的情况是,疫苗所包括的肽的一种确定方法包括:(a)识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);(b)将(a)中鉴定的肽与上述肽的存储库(数据库)进行比对;且(c)从与患者中确定的肿瘤相关肽相关的存储库(数据库)中选择至少一种肽。例如,肿瘤样本提呈的TUMAP的鉴定方法有:(a1)将来自肿瘤样本的表达数据与所述肿瘤样本组织类型相对应的正常组织样本的表达数据相比对,以识别肿瘤组织中过度表达或异常表达的蛋白;以及(a2)将表达数据与结合到肿瘤样本中I类MHC和/或II类分子的MHC配体序列想关联,以确定来源于肿瘤过度表达或异常表达的蛋白质的MHC配体。优选情况是,MHC配体的序列的确定方法是:洗脱来自肿瘤样本分离的MHC分子结合肽,并测序洗脱配体。优选情况是,肿瘤样本和正常组织从同一患者获得。

[0434] 除了使用存储库(数据库)模型选择肽以外,或作为一种替代方法,TUMAP可能在新患者中进行鉴定,然后列入疫苗中。作为一种实施例,患者中的候选TUMAP可透过以下方法进行鉴定:(a1)将来自肿瘤样本的表达数据与所述肿瘤样本组织类型相对应的正常组织样本的表达数据相比对,以识别肿瘤组织中过度表达或异常表达的蛋白;以及(a2)将表达数据与结合到肿瘤样本中I类MHC和/或II类分子的MHC配体序列想关联,以确定来源于肿瘤过度表达或异常表达的蛋白质的MHC配体。作为另一实施例,蛋白的鉴定方法为可包含突变,其对于肿瘤样本相对于个体患者的相应正常组织是独特的,并且TUMAP可透过特异性靶向作用于变异来鉴定。例如,肿瘤以及相应正常组织的基因组可透过全基因组测序方法进行测序:为了发现基因蛋白质编码区域的非同义突变,从肿瘤组织中萃取基因组DNA和RNA,从外周血单核细胞(PBMC)中提取正常非突变基因组种系DNA。运用的NGS方法只限于蛋白编码区的重测序(外显子组重测序)。为了这一目的,使用供货商提供的靶序列富集试剂盒来捕获来自人样本的外显子DNA,随后使用HiSeq2000(Illumina公司)进行测序。此外,对肿瘤的mRNA进行测序,以直接定量基因表达,并确认突变基因在患者肿瘤中表达。得到的数以百万计的序列读数透过软件算法处理。输出列表中包含突变和基因表达。肿瘤特异性体突变透过与PBMC衍生的种系变化比较来确定,并进行优化。然后,为了存储库可能测试新确定的肽了解如上所述的免疫原性,并且选择具有合适免疫原性的候选TUMAP用于疫苗。

[0435] 在一个示范实施方案中,疫苗中所含肽透过以下方法确定:(a)用上述方法识别由

来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽 (TUMAP) ; (b) 将 (a) 中鉴定的肽与进行肿瘤 (与相应的正常组织相比) 免疫原性和过量提呈预筛查肽的存储库进行比对; (c) 从与患者中确定的肿瘤相关肽相关的存储库中选择至少一种肽; 及 (d) 可选地在 (a) 中选择至少一种新确定的肽, 确认其免疫原性。

[0436] 在一个示范实施方案中, 疫苗中所含肽透过以下方法确定: (a) 识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽 (TUMAP) ; 以及 (b) 在 (a) 中选择至少一种新确定的肽, 并确认其免疫原性。

[0437] 一旦选定了用于个体化肽疫苗的肽时, 则产生疫苗。该疫苗优选为一种液体制剂, 包括溶解于 20-40% DMSO 之间, 优选为约 30-35% DMSO, 例如, 约 33% DMSO 中的个体肽。

[0438] 列入产品的每种肽都溶于 DMSO 中。单个肽溶液浓度的选择取决于要列入产品中的肽的数量。单肽-DMSO 溶液均等混合, 以实现一种溶液中包含所有的肽, 且浓度为每肽 ~ 2.5mg/ml。然后该混合溶液按照 1:3 比例用注射用水进行稀释, 以达到在 33% DMSO 中每肽 0.826mg/ml 的浓度。稀释的溶液透过 0.22 μ m 无菌筛检程序进行过滤。从而获得最终本体溶液。

[0439] 最终本体溶液填充到小瓶中, 在使用前储存于 -20 $^{\circ}$ C 下。一个小瓶包含 700 μ L 溶液, 其中每种肽含有 0.578mg。其中的 500 μ L (每种肽约 400 μ g) 将用于皮内注射。

[0440] 本发明的肽除了用于治疗癌症, 也可用于诊断。由于肽由 HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 细胞产生, 并且已确定这些肽在正常组织中不存在或水平较低, 因此这些肽可用于诊断癌症是否存在。

[0441] 血液样本中组织活检物含权利要求的肽, 可有助于病理师诊断癌症。用抗体、质谱或其他本领域内已知的方法检测某些肽可使病理师判断该组织样本为恶性的还是炎症或一般病变, 也可用作 HCC、CRC、GB、GC、食管癌、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA、OC、MCC、黑色素瘤、乳腺癌、SCLC、NHL、AML、GBC、CCC、UBC、UEC 或 CLL 的生物标志物。肽基团的提呈使得能对病变组织进行分类或进一步分成子类。

[0442] 对病变标本中肽的检测使得能对免疫系统治疗方法的利益进行判断, 特别是如果 T-淋巴细胞已知或预计与作用机制有关。MHC 表达的缺失是一种机制, 充分说明了哪些受感染的恶性细胞逃避了免疫监视。因此, 肽的提呈表明, 分析过的细胞并没有利用这种机制。

[0443] 本发明的肽可用于分析淋巴细胞对肽的反应 (如 T 细胞反应), 或抗体对肽或 MHC 分子络合的肽发生的反应。这些淋巴细胞反应可以作为预后指标, 决定是否采取进一步的治疗。这些反应也可以用作免疫疗法中的替代反应指标, 旨在以不同方式诱导淋巴细胞反应, 如接种蛋白疫苗、核酸、自体材料、淋巴细胞过继转移。基因治疗中, 淋巴细胞对肽发生的反应可以在副作用的评估中考虑。淋巴细胞反应监测也可能成为移植疗法随访检查中的一种有价值的工具, 如, 用于检测移植抗宿主和宿主抗移植疾病。

[0444] 下列描述优选方案的实施例将对本发明进行说明, 并参照随附图表 (但是不仅限于此)。考虑到本发明的目的, 文中引用的所有参考文献透过引用的方式并人在本文中。

[0445] 图表

[0446] 图 1 显示了与正常组织相比各种肽在不同癌症组织中的过度提呈。分析包括来自 170 多个正常组织样本以及 376 个癌症样本的数据。显示的仅是被发现提呈肽的样本。图 1A)

基因:CENPE,肽:KLQEKIQL (SEQ ID NO.:1) -从左至右的组织:4白细胞癌细胞系,1胰腺癌细胞系,1黑色素瘤细胞系,2个正常组织样本(1肾上腺,1脾),31原发癌组织样本(1脑癌,4结肠癌,1食管癌,1肾癌,2肝癌,16肺癌,4卵巢癌,1直肠癌,1胃癌),图1B) 基因:KIF15,肽:QLIEKNWLL (SEQ ID NO.:10) -从左至右的组织:5白细胞癌细胞系,1胰腺癌细胞系,1粒细胞白血病细胞系,1个正常组织样本(1肾上腺),29个癌组织样本(4结肠癌,2食管癌,1白细胞癌,1肝癌,10肺癌,11卵巢癌),图1C) 基因:HAVCR1,肽:LLDPKTIFL (SEQ ID NO.:11) -从左至右的组织:1肾癌细胞系,13个癌组织样本(8肾癌,1肝癌,2肺癌,2直肠癌),图1D) 基因:RPGRIPI1L,肽:RLHDENILL (SEQ ID NO.:13) -从左至右的组织:1肾癌细胞系,1前列腺癌细胞系,1黑色素瘤细胞系,50个癌组织样本(4脑癌,1结肠癌,2食管癌,3肾癌,2肝癌,23肺癌,7卵巢癌,2胰腺癌,2前列腺癌,3直肠癌,1胃癌),图1E-J显示了与正常组织相比各种肽在不同癌症组织中过度提呈。分析包括来自320多个正常组织样本以及462个癌症样本的数据。显示的仅是被发现提呈肽的样本。图1E) 基因:DNAH14,肽:SVLEKEIYSI (SEQ ID NO.:2) -从左至右的组织:4细胞系(3血细胞,1胰腺),2正常组织(1淋巴结,1气管),52癌组织(2胆管癌症,1骨髓细胞癌,3白细胞白血病癌症,5乳腺癌,1食管癌,1食管和胃癌,1胆囊癌,4结肠癌,7肺癌,6淋巴结癌,7卵巢癌,4前列腺癌,4皮肤癌,2膀胱癌,4子宫癌),图1F) 基因:MAGEA3、MAGEA6,肽:KIWEELSVLEV (SEQ ID NO.:40) -从左至右的组织:8癌组织(1肝癌,3肺癌,2皮肤癌,1胃癌,1膀胱癌),图1G) 基因:HMX1,肽:FLIENLLAA (SEQ ID NO.:67) -从左至右的组织:7癌组织(4脑癌,2肺癌,1子宫癌),图1H) 基因:CCDC138,肽:FLLEREQLL (SEQ ID NO.:84) -从左至右的组织:3细胞系(2血细胞,1皮肤),24癌组织(1骨髓细胞癌,3白细胞白血病癌症,1骨髓癌,1乳腺癌,1肾癌,2结肠癌,3直肠癌,1肺癌,7淋巴结癌,3膀胱癌,1子宫癌),图1I) 基因:CLSPN,肽:SLLNQPKAV (SEQ ID NO.:235) -从左至右的组织:13细胞系(3血细胞,2肾,8胰腺),30癌组织(1骨髓细胞癌,1白细胞白血病癌症,2脑癌,2乳腺癌,2食管癌,1胆囊癌,1直肠癌,2肝癌,4肺癌,5淋巴结癌,2卵巢癌,2皮肤癌,4膀胱癌,1子宫癌),图1J) 基因:SPC25,肽:GLAEFQENV (SEQ ID NO.:243) -从左至右的组织:3细胞系(1血细胞,1肾,1胰腺),67癌组织(1胆管癌,4白细胞白血病癌症,1骨髓细胞癌,2脑癌,3乳腺癌,4食管癌,2胆囊癌,2结肠癌,1直肠癌,2肝癌,15肺癌,8淋巴结癌,9卵巢癌,3皮肤癌,4膀胱癌,6子宫癌)。

[0447] 图2显示了本发明的源基因的代表性表达特征(与正常肾脏相比的相对表达),这些基因在与一系列正常组织相比在不同癌症中高度过度表达或专门表达。图2A) PRIM2,从左到右的组织:肾上腺、动脉、骨髓、脑(全部)、乳腺、结肠、食管、心脏、肾(三份)、白细胞、肝、肺、淋巴结、卵巢、胰腺、胎盘、前列腺、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、膀胱、宫颈、子宫、静脉(每个正常样本代表几个供体的库)、22个前列腺癌样本,图2B) CHEK1-从左到右的组织:肾上腺、动脉、骨髓、脑(全部)、乳腺、结肠、食管、心脏、肾(三份)、白细胞、肝、肺、淋巴结、卵巢、胰腺、胎盘、前列腺、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、膀胱、宫颈、子宫、静脉(每个正常样本代表几个供体的库)、3个正常结肠样本,10个结直肠癌样本,图2C) TTC30A-从左到右的组织:肾上腺、动脉、骨髓、脑(全部)、乳腺、结肠、食管、心脏、肾(三份)、白细胞、肝、肺、淋巴结、卵巢、胰腺、胎盘、前列腺、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、膀胱、宫颈、子宫、静脉(每个正常样本代表几个供体的库)、30个脑癌样本,图2D) TRIP13-从左到右的组织:肾上腺、动脉、骨髓、

脑(全部)、乳腺、结肠、食管、心脏、肾(三份)、白细胞、肝、肺、淋巴结、卵巢、胰腺、胎盘、前列腺、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、膀胱、宫颈、子宫、静脉(每个正常样本代表几个供体的库)、1个正常肺样本,38个肺癌样本,图2E)MXRA5-从左到右的组织:肾上腺、动脉、骨髓、脑(全部)、乳腺、结肠、食管、心脏、肾(三份)、白细胞、肝、肺、淋巴结、卵巢、胰腺、胎盘、前列腺、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、膀胱、宫颈、子宫、静脉(每个正常样本代表几个供体的库)、9个胰腺癌样本。图2F至H显示了本发明的源基因的代表性表达特征,这些基因在一系列正常组织(白色柱)的癌症中以及不同癌症样本(黑色柱)中高度过度表达或专门表达。图2F)MMP11,MMP13(Seq ID No 24)-从左至右的组织:80正常组织样本(6动脉,2血细胞,2大脑,1心脏,2肝,3肺,2静脉,1脂肪组织,1肾上腺,5骨髓,1软骨,1结肠,1食管,2眼,2胆囊,1肾脏,6淋巴结,4胰腺,2末梢神经,2脑下垂体,1直肠,2唾液腺,2骨骼肌肉,1皮肤,1小肠,1脾脏,1胃,1甲状腺,7气管,1膀胱,1乳腺,5卵巢,5胎盘,1前列腺,1睾丸,1胸腺,1子宫),50癌样本(10乳腺癌,4胆管癌,6胆囊癌,11食管癌,10膀胱癌,10子宫癌),图2G)HORMAD1(SEQ ID NO 168)-从左到右的组织:80正常组织样本(6动脉,2血细胞,2大脑,1心脏,2肝,3肺,2静脉,1脂肪组织,1肾上腺,5骨髓,1软骨,1结肠,1食管,2眼,2胆囊,1肾脏,6淋巴结,4胰腺,2末梢神经,2脑下垂体,1直肠,2唾液腺,2骨骼肌肉,1皮肤,1小肠,1脾脏,1胃,1甲状腺,7气管,1膀胱,1乳腺,5卵巢,5胎盘,1前列腺,1睾丸,1胸腺,1子宫),41癌样本(10乳腺癌,10皮肤癌,11非小细胞肺癌,10小细胞肺癌),图2H)IGF2BP1,IGF2BP3(Seq ID No 274)-从左到右的组织:80正常组织样本(6动脉,2血细胞,2大脑,1心脏,2肝,3肺,2静脉,1脂肪组织,1肾上腺,5骨髓,1软骨,1结肠,1食管,2眼,2胆囊,1肾脏,6淋巴结,4胰腺,2末梢神经,2脑下垂体,1直肠,2唾液腺,2骨骼肌肉,1皮肤,1小肠,1脾脏,1胃,1甲状腺,7气管,1膀胱,1乳腺,5卵巢,5胎盘,1前列腺,1睾丸,1胸腺,1子宫),53癌样本(4胆管癌,6胆囊癌,10淋巴结癌,12卵巢癌,11食管癌,10肺癌)。

[0448] 图3显示了示例性的免疫原性资料:肽特定多聚体染色后流式细胞仪结果。

[0449] 图4A-R显示上部分:根据技术重复测量值的中值MS信号强度绘制为彩色点,单一HLA-A*02阳性正常组织为绿色或灰色点,检测到该肽的肿瘤样本为红色点。肿瘤和正常样本按照器官起源分组,箱须图代表了多个样本归一化信号强度的中位数,第25和第75百分位(箱)以及最小值和最大值(须)。正常器官根据风险类别排列顺序(血细胞、心血管系统、脑、肝、肺:高风险,深绿色点;生殖器官、乳腺、前列腺:低风险,灰色点;所有其他器官:中等风险;浅绿色点)。下部分:每个器官的相对肽检测频率显示为脊柱图。图表下面的数字表示每个器官分析的总样本数中检测到肽的样本数(正常样本N=298,肿瘤样本N=461)。如果在一个样本上检测到肽,但因技术原因无法量化,则该样本纳入检测频率图中,但图表上部分不显示任何点。组织(从左到右):正常样本:动脉;血细胞;脑;心;肝;肺;静脉;脂肪:脂肪组织;adren.gl.:肾上腺;BM:骨髓;colorect:结肠和直肠;duod:十二指肠;esoph:食管;gallb:胆囊;LN:淋巴结;panc:胰腺;parathy:甲状旁腺;perit:腹膜;pituit:垂体;sal.gland:唾液腺;skel.mus:骨骼肌;皮肤;sm.mt:小肠;脾;胃;甲状腺;气管;输尿管;膀胱;乳房;卵巢;胎盘;前列腺;睾丸;胸腺;子宫。肿瘤样本AML:急性髓性白血病;PCA:前列腺癌;BRCA:乳腺癌;CLL:慢性淋巴细胞白血病;CRC:结直肠癌;GALB:胆囊癌;HCC:肝细胞癌;MEL:黑色素瘤;NHL:非霍奇金淋巴瘤;OC:卵巢癌;OSCAR:食管癌;OSC_GC:食管/胃癌;PC:胰腺癌;GB:胶质母细胞瘤;GC:胃癌;NSCLC:非小细胞肺癌;RCC:肾细胞癌;SCLC:小细胞肺癌;

UBC:膀胱癌;UEC:子宫和子宫内膜癌。

[0450] 图5A-R显示本发明的源基因的代表性表达特征,其不同癌症样本中过度表达。肿瘤(红色点)和正常(绿色或灰色点)样本按照器官起源分组,箱须图代表了中位数、第25和第75百分位(箱)以及最小和最大(须)RPKM值。正常器官根据风险类别排列顺序。RPKM=每百万映射读数每千碱基读数。正常样本:动脉;血细胞;脑;心;肝;肺;静脉;脂肪;脂肪组织;adren.gl.:肾上腺;BM:骨髓;软骨;colorect:结肠和直肠;esoph:食管;眼睛;gallb:胆囊;肾脏;LN:淋巴结;神经;panc:胰腺;pitmt:垂体;sal.gland:唾液腺;skel.mus:骨骼肌;皮肤;sm.mt:小肠;脾;胃;甲状腺;气管;膀胱;乳房;卵巢;胎盘;前列腺;睾丸;胸腺;子宫。肿瘤样本AML:急性髓性白血病;PCA:前列腺癌;BRCA:乳腺癌;CLL:慢性淋巴细胞白血病;CRC:结直肠癌;GALB:胆囊癌;HCC:肝细胞癌;MEL:黑色素瘤;NHL:非霍奇金淋巴瘤;OC:卵巢癌;OSCAR:食管癌;PC:胰腺癌;GB:胶质母细胞瘤;GC:胃癌;NSCLC:非小细胞肺癌;RCC:肾细胞癌;SCLC:小细胞肺癌;UBC:膀胱癌;UEC:子宫和子宫内膜癌。

[0451] 图6A至M显示了健康HLA-A*02+供体的肽特异性CD8+ T细胞体外反应的示例性结果。CD8+ T细胞制备的方法为:使用抗CD28 mAb和HLA-A*02涂层的人工APC分别与例如SeqID No 11肽(A,左图)或SeqID No 14肽(B,左图)合成(SeqID No 157(C)、233(D)、85(E)、89(F)、155(G)、153(H)、264(I)、117(J)、253(K)、39(L)和203(M))。经过3个周期的刺激后,用相关多聚体,例如,A*02/SeqID No 11(A)或A*02/SeqID No 14(B)的2D多聚体染色法对肽反应性细胞进行检测。右图(例如,A和B)显示用不相关A*02/肽复合体刺激的细胞对照染色。活单细胞在CD8+淋巴细胞上得到门控。Boolean门控帮助排除用不同肽特定的多聚体检测的假阳性事件。提示了特异性多聚体+细胞和CD8+淋巴细胞的频率。

[0452] 图7A-C显示了与正常组织相比各种肽在不同癌症组织中的过度提呈。分析包括来自320多个正常组织样本以及462个癌症样本的数据。显示的仅是被发现提呈肽的样本。图7A)基因:CCR8,肽:LLIPFTIFM(SEQ ID NO.:43)-从左至右的组织:16癌组织(1胆管癌,1乳腺癌,1结肠癌,7肺癌,2淋巴结癌,3卵巢癌,1皮肤癌);图7B)基因:CXCR5,肽:ILVTSIFFL(SEQ ID NO.:152)-从左至右的组织:6正常组织(1淋巴结,5脾),16癌组织(8白细胞白血病癌症,8淋巴结癌);图7C)基因:CYSLTR1,肽:VILTSSPFL(SEQ ID NO.:156)-从左至右的组织:3正常组织(1肺,1淋巴结,1脾),11癌组织(2乳腺癌,5白细胞白血病癌症,3淋巴结癌,1骨髓细胞癌)。

实施例

[0453] 实施例1

[0454] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的识别和定量

[0455] 组织样本

[0456] 患者肿瘤组织获得自Asterand(Detroit,USA and Royston,Herts,UK)、Val d'Hebron大学医院(Barcelona)、BioServe(Beltsville,MD,USA)、癌症免疫治疗中心(CCIT)、Herlev医院(Herlev);Geneticist Inc.(Glendale,CA,USA)、日内瓦大学医院、海德堡大学医院、慕尼黑大学医院、京都府立医科大学(KPUM)、大阪市立大学(OCU)、ProteoGenex Inc.,(Culver City,CA,USA)、蒂宾根大学医院。正常组织获得自Bio-Options Inc.,CA,USA、BioServe,Beltsville,MD,USA、Capital BioScience Inc.,Rockville,MD,USA、

Geneticist Inc., Glendale, CA, USA、日内瓦大学医院、海德堡大学医院、慕尼黑大学医院、ProteoGenex Inc., Culver City, CA, USA、蒂宾根大学医院。所有患者在手术或尸检前都获得了书面知情同意。切除后组织立即进行冷休克处理,在分离TUMAP前储存于-70℃或以下。

[0457] 从组织样本中分离HLA肽

[0458] 根据方案(Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999)略加修改,使用HLA-A*02特异性抗体BB7.2、HLA-A、HLA-B、HLA-C特异性抗体W6/32、CNBr活化的琼脂糖凝胶、酸处理和超滤方法以固体组织的免疫沉淀法获得了冷休克组织样本的HLA肽库。

[0459] 质谱分析

[0460] 获得的HLA肽库根据其疏水性用反相色谱(nanoAcquity UPLC system, Waters)分离,洗脱肽用装有电喷雾源的LTQ-velos融合杂交质谱(ThermoElectron)进行了分析。肽库被直接加载填充有1.7 μ m C18反相材料(Waters)的分析用熔炼石英微毛细管柱(75 μ m内径x250mm),应用流速为400nL每分钟。随后,使用来自流速为300nL每分钟、浓度为10%至33%溶剂B中的两步180分钟二元梯度法对肽进行分离。梯度由溶剂A(含0.1%甲酸的水)和溶剂B(含0.1%甲酸的乙腈)。金镀膜玻璃毛细管(PicoTip, New Objective)用于引入到纳升电喷雾源。使用前5(TOP5)策略在数据依赖模式下操作LTQ-Orbitrap质谱仪。简言之,首先以高精度质量完全扫描在orbitrap开始一个扫描周期(R=30000),之后用先前选定离子的动态排除技术在orbitrap中对5种含量最为丰富的前体离子进行MS/MS扫描(R=7500)。串联质谱以SEQUEST和另一种手动控制器进行解读。生成的自然肽破碎模式与合成序列相同参考肽的破碎模式进行比较后,确保了被识别的肽序列。

[0461] 无标记相对LC-MS定量透过离子计数(即透过LC-MS功能提取和分析)来进行(Mueller et al., 2007)。该方法假定肽的LC-MS信号区域与样本中其丰度相关。提取的特征透过充电状态去卷积和保留时间校准进行进一步处理(Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008)。最后,所有的LC-MS特征与序列鉴定结果交叉引用,以将不同样本和组织的定量数据与肽呈递特征结合。定量数据根据集中数据以两层方式进行正态化处理,以说明技术和生物学复制变异。因此,每个被识别的肽均可与定量资料相关,从而可得出样本和组织之间的相对定量。此外,对候选肽获得的所有定量数据进行手动检查,以确保数据的一致性,并验证自动化分析的准确度。对于每种肽,计算了提呈图,其显示样本平均提呈量以及复制变化。这些特征使胰腺癌样本与正常组织样本的基线值并列。示范性过度提呈肽的提呈谱示于图1中。选定肽在各种实体中提呈概述见表4。

[0462] 表4: 选定肽在各种实体中提呈概述。如果一种肽相比于正常组织在一种实体癌样本上过度提呈,则认为与该实体相关。MEL=黑色素瘤, BRCA=乳腺癌, OSCAR=食管癌。BPH包括良性前列腺增生以及胰腺癌。

[0463]

序列 ID 号	序列	特定相关实体
1	KLQEKIQEL	GB, GC, NSCLC, HCC, OC, RCC, CRC, PC, OSCAR
2	SVLEKEIYSI	NSCLC, HCC, BPH, OC, CRC, PC
3	RVIDDSL VVG V	NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC, OSCAR
4	VLFGELPAL	GB, NSCLC, BRCA, RCC, PC, OC, PC

[0464]

序列 ID 号	序列	特定相关实体
5	GLVDIMVHL	NSCLC,RCC, OC
7	ALLQALMEL	GC,NSCLC,RCC,CRC,PC
8	ALSSSQAEV	GB,NSCLC,OC,CRC,PC
9	SLITGQDLLSV	NSCLC,BPH,OC,MEL,PC, OSCAR
10	QLIEKNWLL	NSCLC,OC,CRC,PC, HCC, CLL, OSCAR
11	LLDPKTIFL	NSCLC,HCC,RCC,CRC
12	RLLDPKTIFL	NSCLC,RCC
13	RLHDENILL	GB,GC,NSCLC,HCC,BPH,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR
14	YTFSGDVQL	GC,NSCLC,CRC,PC, OSCAR
15	GLPSATTTV	GC, NSCLC, OC, PC
16	SLADLSLLL	NSCLC,HCC,PC
17	GLLPSAESIKL	NSCLC,BPH,OC, OSCAR
18	KTASINQNV	NSCLC,CRC,PC, OSCAR, OC
19	KVFELDLVTL	GC,NSCLC,CRC, OSCAR
21	YLMDDFSSL	PC, NSCLC
22	LMYPYIYHV	GB, NSCLC, OC, OSCAR
23	ALLSPLSLA	PC
24	KVWSDVTPL	PC, NSCLC
25	LLWGHPRVALA	CRC, PC, NSCLC
26	VLDGKVAVV	HCC, MEL, OC, GB, GC, NSCLC
27	GLLGKVTSTV	NSCLC,BRCA
29	KMISAIPTL	NSCLC,OC
34	TLNTLDINL	OC, PC
35	VIKGLEEI	GC,NSCLC, OSCAR
36	TVLQELINV	NSCLC,PC, OSCAR
37	QIVELIEKI	GC,NSCLC, OSCAR
39	YLEDGFAYV	GB,NSCLC,HCC,PC
40	KIWEELSVLEV	GC,NSCLC,HCC,MEL
43	LLIPFTIFM	NSCLC,MEL,CRC, OC
44	AVFNLVHV	GC,NSCLC,PC
46	ISLDEVAVSL	GB,NSCLC,HCC, OC
47	GLNGFNVLL	PC, OSCAR
48	KISDFGLATV	GB,NSCLC,PC, OSCAR
49	KLIGNIHGNEV	GB,NSCLC,OC
50	ILLSVLHQL	NSCLC,CRC
51	LDSEALLTL	GB,NSCLC,HCC
52	TIGIPFPNV	NSCLC,PC, OC
53	AQHLSTLLL	GC,NSCLC

[0465]

序列 ID 号	序列	特定相关实体
54	YLVPGLVAA	NSCLC,OC
55	HLFDKIIKI	GC,CRC
56	VLQENSSDYQSNL	NSCLC,HCC
57	TLYPGRFDYV	NSCLC,PC
58	HLLGEGAFAQV	NSCLC,PC
59	ALADGIKSFLL	NSCLC,PC
60	YLFSQGLQGL	NSCLC,PC
61	ALYPKEITL	NSCLC,CRC
63	KLLPMVIQL	NSCLC,PC
65	SLSEKSPEV	NSCLC,OC, OSCAR, MEL
66	AMFPDTIPRV	NSCLC,OC
67	FLIENLLAA	GB,NSCLC
68	QLMNLIRSV	HCC,PC
69	LKVLKADVVL	GC,NSCLC
70	GLTEKTVLV	NSCLC,PC
71	HMSGKLTNV	NSCLC,PC
73	SVPKTLGV	GB,RCC
74	GLAFLPASV	GC,CRC
76	FTAEFLEKV	NSCLC,PC, GB, OSCAR
77	ALYGNVQQV	NSCLC,OC
82	ILAEPIYIRV	NSCLC,PC, OSCAR, OC
83	GLENPHL	NSCLC, OC
84	FLLEREQLL	NSCLC,MEL,RCC,CRC,PC
85	KLLDKPEQFL	NSCLC,OC,MEL,CRC
86	SLFSNIESV	NSCLC,BPH,CRC
88	LLLPLELSLA	GB,NSCLC,PC
89	SLAETIFIV	GC,NSCLC,OC
92	RLFEEVLGV	NSCLC,HCC,OC, OC
93	RLYGYFHDA	NSCLC,PC
94	YLDEVAFML	NSCLC,HCC, OC
95	KLIDEDPLFL	NSCLC,OC
96	ALDTTRHEL	NSCLC,PC
97	KLFKSTGL	NSCLC,CRC
98	FVQEKIPEL	GC,CRC
100	ALQSFEFRV	OC,RCC
101	SLLEVNEASSV	GC,CLL
102	GLYPVTLVG	BPH,OC
114	LLFPSDVQTL	PC, OSCAR

[0466]

序列 ID 号	序列	特定相关实体
116	ALLSSVAEA	NSCLC, OSCAR, OC
117	TLLEGISRA	NSCLC, OC
134	SLYKSFLQL	NSCLC, OSCAR, OC
137	KLIYKDLVSV	NSCLC, OC, PC
146	VVA AHLAGA	NSCLC, OSCAR, OC
158	YLDPLWHQL	PC, OC
165	SLLDYEYSI	NSCLC, OSCAR, OC
166	LLGDSSFFL	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, PC
170	FIAAVVEKV	NSCLC, OC
175	SLLDLVQSL	PC, OC
176	VQSGLRILL	NSCLC, OSCAR
184	ALDSTIAHL	NSCLC, OC
191	AAIEIFEKV	NSCLC, OSCAR, OC
203	FLFVDPELV	NSCLC, GC, OC
229	YLYELEHAL	NSCLC, OC
233	SLFESLEYL	NSCLC, OSCAR, OC
234	VLLNEILEQV	GC, NSCLC, HCC, OC, MEL, RCC, CRC, PC, OSCAR
235	SLLNQPKAV	GB, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC, OSCAR
236	KMSELQTYV	GB, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC
237	ALLEQTGDMSL	NSCLC, OC, MEL, CRC
239	VIKGLEEITV	GC, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC
241	KQFEGTVEI	NSCLC, MCC, OC, CRC, PC, OSCAR
242	KLQEEIPVL	GB, NSCLC, CRC
243	GLAEFQENV	GB, NSCLC, HCC, OC, CRC, PC, OSCAR
244	NVAEIVIHI	GC, NSCLC
246	ALAGIVTNV	NSCLC, HCC, OC, MEL, RCC
247	NLLIDDKGTIKL	NSCLC, HCC, MEL, CRC, PC
248	VLMQDSRLYL	NSCLC, CRC, PC
251	LLWGNLPEI	NSCLC, MEL, CRC, PC, OC
252	SLMEKNQSL	NSCLC, OC, CRC, OSCAR, RCC
253	KLLAVIHEL	NSCLC, RCC, CRC, PC, OSCAR, OC
254	ALGDKFLLRV	NSCLC, HCC, MEL, OC
255	FLMKNSDLYGA	NSCLC, HCC, MEL, PC, OSCAR
256	FLNDIFERI	NSCLC, HCC, CLL, OC
257	KLIDHQGLYL	NSCLC, OC, CRC, OSCAR
258	QLVQRVASV	NSCLC, OC
259	GPGIFPPPPQP	NSCLC, BPH, OSCAR, OC
260	ALNESLVEC	NSCLC, MEL, OSCAR, OC

[0467]

序列 ID 号	序列	特定相关实体
261	GLAALAVHL	NSCLC,OC,MEL,CRC,PC, OSCAR
262	LLLEAVVHL	NSCLC,CRC
263	SIIEYLPTL	NSCLC,MEL,PC
264	TLHDQVHLL	NSCLC,BPH,OC
265	FLLDKPQDLSI	NSCLC,OC,RCC
266	FLLDKPQDL	RCC, OC
267	YLLDMPLWYL	NSCLC,RCC,CRC, OC, MEL
269	GLLDCPIFL	NSCLC,CRC, OSCAR, OC
270	TLLTFFHEL	GB,PC
271	VLIEYNFSI	NSCLC, OC
272	FVMEGEPPKL	NSCLC,OC
273	SLNKQIETV	NSCLC,OC
274	TLYNPERTITV	NSCLC, PC, HCC
277	KLQEELNKV	HCC, OC
281	LLLESDPKVYSL	PC, OC
284	KLMDPGSLPPL	NSCLC, OC
287	KIQEILTQV	GB,GC,NSCLC,HCC,CLL,OC,MEL,RCC,CRC,PC, OSCAR
288	SLYKGLLSV	GB,NSCLC,HCC,BPH,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR

[0468] 表4B:选定肽在各种实体中提呈概述。

[0469] GB=胶质母细胞瘤,BRCA=乳腺癌,CRC=结直肠癌,RCC=肾细胞癌,CLL=慢性淋巴细胞性白血病,HCC=肝细胞癌,NSCLC=非小细胞肺癌,SCLC=小细胞肺癌,NHL=非霍奇金淋巴瘤,AML=急性骨髓性白血病,OC=卵巢癌,PC=胰腺癌,BPH=前列腺癌和良性前列腺增生,OSCAR=食管癌,包括胃食管交界处癌,GBC_CCC=胆囊腺癌和胆管癌,MEL=黑色素瘤,GC=胃癌,UBC=膀胱癌,UTC=子宫癌。

[0470]

序列 ID 号	序列	特定相关实体
1	KLQEKIQEL	MEL, AML, NHL
2	SVLEKEIYSI	GC, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
3	RVIDDSL VVG V	UBC
4	VLF GEL PAL	SCLC, UBC, UTC
5	GLVDIMVHL	SCLC, UBC, BRCA, MEL, PC
6	FLNAIETAL	RCC
7	ALLQALMEL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL

[0471]

8	ALSSSQAEV	BPH, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
9	SLITGQDLLSV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC
10	QLIEKNWLL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
11	LLDPKTIFL	GBC_CCC
13	RLHDENILL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, MEL, AML, NHL
14	YTFSGDVQL	SCLC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL
15	GLPSATTTV	UBC, UTC, MEL
16	SLADLSLLL	GB, GC, BPH, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, RCC, CRC, AML, NHL
17	GLLPSAESIKL	UBC
18	KTASINQNV	SCLC, UBC, UTC, MEL
19	KVFELDLVTL	AML, NHL
21	YLMDDFSSL	OSCAR, OC, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
22	LMYPYIYHV	HCC, CLL, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, CRC, NHL
24	KVWSDVTPL	BRCA
26	VLDGKVAVV	CLL, UTC, NHL
27	GLLGKVTSV	SCLC, UBC
28	IKVTDQPQLEL	NSCLC, MEL
29	KMISAIPTL	UTC
30	IITEVITRL	OC, UTC
31	GLLETTGLLAT	OC
33	TLDRNSLYV	OC, UTC
34	TLNTLDINL	UTC
35	VIIKGLEEI	OC
36	TVLQELINV	UBC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
38	VLQQESNFL	AML
39	YLEDGFAYV	CLL, UBC, UTC, MEL, NHL
40	KIWEELSVLEV	SCLC, UBC
41	IVTEIISEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
43	LLIPFTIFM	SCLC, GBC_CCC, NHL
46	ISLDEVAVSL	BRCA
47	GLNGFNVLL	SCLC, UTC, GBC_CCC, MEL, CRC, AML, NHL
48	KISDFGLATV	OC, MEL
51	LDSEALLTL	BRCA
52	TIGIPFPNV	MEL, NHL
53	AQHLSTLLL	SCLC, GBC_CCC
56	VLQENSSDYQSNL	UTC

[0472]

57	TLYPGRFDYV	OSCAR, UBC
59	ALADGIKSFL	BRCA, MEL
64	SLYAGSNNQV	NSCLC
65	SLSEKSPEV	HCC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, NHL
67	FLIENLLAA	UTC
68	QLMNLIRSV	UBC, AML
70	GLTEKTVLV	CRC, AML, NHL
75	ALLDGALQL	GC, CRC
76	FTAEFLEKV	UBC, MEL, AML, NHL
77	ALYGNVQQV	BRCA, NHL
78	LFQSRIAGV	BPH
80	VLTGQVHEL	GB
83	GLLENSPHL	BRCA, MEL, AML, NHL
84	FLLEREQLL	CLL, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
85	KLLDKPEQFL	NHL
86	SLFSNIESV	SCLC, BRCA, GBC_CCC
87	KLLSLLEEA	NSCLC, BPH
89	SLAETIFIV	SCLC, GBC_CCC, RCC, NHL
90	AILNVDEKNQV	OC
91	LLPSIFLMV	OC
92	RLFEEVLGV	OSCAR, SCLC, UBC, BRCA, AML
94	YLDEVAFML	UBC, BRCA, GBC_CCC
95	KLIDEDEPLFL	SCLC, UTC, GBC_CCC
96	ALDTTRHEL	OSCAR, UBC, UTC
98	FVQEKIPEL	GBC_CCC
99	TLFGIQLTEA	GC, GBC_CCC
101	SLLEVNEASSV	NHL
102	GLYPVTLVGV	SCLC, BRCA, AML
103	YLADTVQKL	NSCLC
104	DLPTQEPALGTT	BPH
106	VLLGSVVIFA	BPH
108	FIANLPPELKA	BPH
109	ILGSFELQL	BPH
110	QIQGQVSEV	BPH
112	ILAQDVAQL	MEL, AML, NHL
113	FLFLKEVKV	CRC
116	ALLSSVAEA	SCLC, BRCA, CRC
117	TLLEGISRA	BRCA
118	IAYNPNGNAL	NSCLC, CLL, AML
119	SLIEESEEL	OC, UTC

[0473]

121	ALYVQAPTV	NSCLC, UTC, NHL
122	SIIDTELKV	AML
124	ALLRLFTI	NSCLC
128	SILTNISEV	NSCLC
129	KMASKVTQV	HCC
130	QLYGSAITL	HCC
132	ALLNNVIEV	HCC, BRCA
133	FLDGRPLTL	UTC, MEL
135	HLDTVKIEV	GB
136	LLWDAPAKC	CRC
139	IILENIQSL	UBC, BRCA, AML
140	FLDSQITTV	MEL
142	LLDAAHASI	NSCLC
143	MLWESIMRV	NSCLC, UTC
144	FLISQTPLL	NSCLC, SCLC, UBC
145	ALEEKLENV	NSCLC
146	VVAAHLAGA	GC, MEL
147	GLLSALENV	CLL, NHL
148	YLILSSHQL	CLL, NHL
150	VLLDMVHSL	HCC, UTC
151	DISKRIQSL	NSCLC
152	ILVTSIFFL	CLL, NHL
153	KLVELEHTL	GC, NSCLC, OSCAR
154	AIKEIQTV	GB, NSCLC, HCC, UBC, MEL
155	TLDSYLKAV	OC, BRCA
156	VILTSSPFL	CLL, BRCA, AML, NHL
157	ILQDGQFLV	HCC, UBC
158	YLDPLWHQL	CLL, MEL, NHL
159	QLGPVPVTI	UBC, RCC, NHL
160	TLQEWLTEV	NSCLC, GBC_CCC
161	NLLDENVCL	CRC
162	GLLGNNLTS	NSCLC
163	GLEERLYTA	NSCLC, CLL, AML, NHL
164	MLIIRVPSV	NSCLC
165	SLLDYEVS	GBC_CCC
166	LLGDSSFFL	CLL, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML
167	LVVDEGSLVSV	OC, SCLC
168	VIFEGEPMYL	NSCLC, BRCA, NHL
169	ALADLSVAV	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL, AML

[0474]

170	FIAAVVEKV	SCLC, NHL
171	LLLLDVPTA	NSCLC, UTC, BRCA, CRC, NHL
172	SLYLQMNSLRTE	NSCLC
173	RLIDIYKNV	OC
174	ALYSGDLHAA	HCC
175	SLLDLVQSL	BRCA, AML, NHL
177	ALINVLNAL	AML
179	TLGEIHKGV	NSCLC
180	RLYEEEIRI	NSCLC
181	LLWAPTAQA	GB, NSCLC, RCC, CRC
182	GLQDGFQITV	GC
183	ALSYILPYL	NSCLC, SCLC, UTC, BRCA, CRC, AML, NHL
184	ALDSTIAHL	UTC, MEL
185	TLYQGLPAEV	GC, NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, BRCA, RCC, CRC
186	SLLSLESRL	GC
187	SILKEDPFL	NSCLC
188	VLGEEQEGV	NSCLC
189	MAVSDLLIL	GB
190	SLSTELFKV	HCC
192	TLLPSSGLVTL	BRCA
193	ALFHMNILL	NSCLC
194	KLLEEVQLL	NSCLC
195	VIIQNLPAL	CRC
196	TLHQWIYYL	CRC
198	ILTNKVVS	OC
199	SVADLAHVL	GC
200	IMPTFDLTKV	HCC
201	LLFSLCEA	BPH
203	FLFVDPELV	CRC, AML, NHL
204	SEWGSPHAAVP	PC
205	LAFGYDDEL	HCC
206	GLDAFRIFL	CRC
207	KLFETVEEL	GB
208	HLNNDRNPL	BPH
210	GLAGDNIYL	RCC
211	LLTTVLINA	RCC
212	MTLSEIHAV	CRC
213	ILAVDGVLSV	NSCLC, BRCA, MEL
214	ALFETLIQL	HCC

[0475]

215	QIADIVTSV	HCC
216	ALSTVTPRI	HCC
217	LLWPSSVPA	GB, MEL, AML
220	ALSELERVL	BPH, UTC
221	IMLNSVEEI	BPH, NHL
222	LLTGVFAQL	CLL, UTC, BRCA, CRC, NHL
223	ALHPVQFYL	OC, CRC
224	LLFDWSGTGRADA	GBC_CCC
225	FLPQVPPLSV	CLL, MEL, NHL
226	SLAGNLQEL	GB
227	SEMEELPSV	HCC
228	SLLELDGINLRL	NSCLC
230	KLLNMIFSI	BPH
231	LLDDIFIRL	MEL
233	SLFESLEYL	UTC, RCC
234	VLLNEILEQV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
235	SLLNQPKAV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
236	KMSELQTYV	GC, BPH, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, RCC, AML, NHL
237	ALLEQTGDMSL	SCLC, UBC, BRCA, AML, NHL
238	HLQEKLQSL	HCC
239	VIKGLEEITV	CLL, SCLC, UBC, UTC, AML, NHL
240	SVQENIQQK	RCC, NHL
241	KQFEGTVEI	CLL, NHL
242	KLQEEIPVL	BRCA, MEL, NHL
243	GLAEFQENV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
244	NVAEIVIH	GB
245	ALLEEEGV	NSCLC, UBC, GBC_CCC
246	ALAGIVTNV	GB, CLL, SCLC, BRCA, GBC_CCC, AML
248	VLMQDSRLYL	CLL, UBC, UTC, AML, NHL
251	LLWGNLPEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
252	SLMEKNQSL	AML
253	KLLAVIHEL	UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
254	ALGDKFLLRV	NHL
255	FLMKNSDLYGA	UBC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
256	FLNDIFERI	UTC, MEL, AML, NHL
258	QLVQRVASV	UBC, NHL
260	ALNESLVEC	SCLC, UBC, UTC, CRC, AML, NHL
261	GLAALAVHL	GC, CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL

[0476]

262	LLLEAVVHL	BRCA, NHL
263	SIIEYLPTL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, GBC_CCC, AML, NHL
264	TLHDQVHLL	UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL
265	FLLDKPQDLSI	GBC_CCC
267	YLLDMPLWYL	AML, NHL
269	GLLDCPIFL	CLL, UTC, AML, NHL
270	TLLTFFHEL	UTC, GBC_CCC, AML, NHL
271	VLIEYNFSI	CLL, SCLC, MEL, AML, NHL
272	FVMEGEPPKL	CLL, UTC
273	SLNKQIETV	AML
275	AVPPPPSSV	NSCLC, HCC
276	RMPTVLQCV	BPH
277	KLQEELNKV	NSCLC, OSCAR, UBC, BRCA, NHL
279	VLMDEGAVLTL	CLL, CRC, NHL
280	HLWGHALFL	HCC
281	LLLEDPKVYSL	OSCAR, SCLC
282	SLYALHVKA	OC, SCLC
283	ALSELLQQV	NSCLC, HCC, OC, SCLC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
285	MLLDTVQKV	NSCLC
286	FLTEMVHFI	NSCLC, CLL, SCLC, UBC, NHL

[0477] 实施例2

[0478] 编码本发明肽的基因的表达谱

[0479] 与正常细胞相比在肿瘤细胞上一种肽过度提呈或特定提呈足够其在免疫治疗中有效使用,一些肽为肿瘤特异性的,尽管存在其源蛋白也存在于正常组织中。但是,mRNA表达谱增加了免疫治疗目标肽选择中其他级别的安全性。特别是对于具有高安全性风险的治疗选择,诸如亲和力成熟的TCR,理想的目标肽将来源于对该肿瘤独一无二且不出现在正常组织中的蛋白。对于本发明,根据上述涵盖大约3000个正常组织样本RNA表达数据的数据库,所有源基因的正常组织表达被证明是最小的。在一些癌症实体病例(HCC、CRC、GB、GC、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA)中加入正常组织和肿瘤组织的进一步RNA分析以估算各癌症患者群体的靶标范围。

[0480] RNA来源与制备

[0481] 手术切除组织标本按如上所述(参见实施例1)在获得每名患者的书面知情同意后提供。手术后立即速冻肿瘤组织标本,之后在液态氮中用杵臼匀浆。使用TRI试剂(Ambion公司,Darmstadt,德国)之后用RNeasy(QIAGEN公司,Hilden,德国)清理从这些样本中制备总RNA;这两种方法都根据制造商的方案进行。

[0482] 健康人体组织中的总RNA从商业途径获得(Ambion公司,Huntingdon,英国;Clontech公司,海德堡,德国;Stratagene公司,阿姆斯特丹,荷兰;BioChain公司,Hayward,CA,美国)。混合数个人(2至123个人)的RNA,从而使每个人的RNA得到等加权。

[0483] 所有RNA样本的质量和数量都在Agilent 2100 Bioanalyzer分析仪(Agilent公司,Waldbronn,德国)上使用RNA 6000 Pico LabChip Kit试剂盒(Agilent公司)进行评估。

[0484] 健康人体组织中的总RNA从商业途径获得(Ambion公司,Huntingdon,英国;Clontech公司,海德堡,德国;Stratagene公司,阿姆斯特丹,荷兰;BioChain公司,Hayward,CA,美国)。混合数个人(2至123个人)的RNA,从而使每个人的RNA得到等加权。所有RNA样本

的质量和数量都在Agilent 2100 Bioanalyzer分析仪(Agilent公司,Waldbronn,德国)上使用RNA 6000 Pico LabChip Kit试剂盒(Agilent公司)进行评估。

[0485] 用于RNASeq实验来自健康人体组织的总RNA获得自:Asterand (Detroit,MI,USA&Royston,Herts,UK)、BioCat GmbH (Heidelberg,Germany)、BioServe (Beltsville,MD,USA)、Capital BioScience Inc. (Rockville,MD,USA)、Geneticist Inc. (Glendale,CA,USA)、Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Naples,Italy)、ProteoGenex Inc. (Culver City,CA,USA)、海德堡大学医院 (Heidelberg,Germany)。

[0486] 用于RNASeq实验来自肿瘤组织的总RNA获得自:Asterand (Detroit,MI,USA&Royston,Herts,UK)、Bio-Options Inc. (Brea,CA,USA)、BioServe (Beltsville,MD,USA)、Geneticist Inc. (Glendale,CA,USA)、ProteoGenex Inc. (Culver City,CA,USA)、Tissue Solutions Ltd (Glasgow,UK)、波恩大学医院 (Bonn,Germany)、海德堡大学医院 (Heidelberg,Germany)、蒂宾根大学医院 (Tübingen,Germany)。

[0487] 微数组实验

[0488] 范围透过分分析30GB、16CRC、56RCC、12HCC、38NSCLC、11PC、34GC和20个前列腺癌样本的RNA表达谱(Affymetrix微阵列)进行估计。

[0489] 所有肿瘤和正常组织的RNA样本都使用Affymetrix Human Genome (HG) U133A或HG-U133 Plus 2.0 Affymetrix寡核苷酸芯片(Affymetrix公司,Santa Clara,CA,美国)进行基因表达分析。所有步骤都根据Affymetrix手册进行。简言之,如手册中所述,使用SuperScript RTII (Invitrogen公司)以及oligo-dT-T7引物(MWG Biotech公司,Ebersberg,德国)从58µg RNA中合成双链cDNA。用BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics公司,Farmingdale,NY,美国)进行U133A测定或用GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix公司)进行U133 Plus 2.0测定,之后用链霉亲和素-藻红蛋白和生物素化抗链霉素蛋白抗体 (Molecular Probes公司,Leiden,荷兰)进行破碎、杂交和染色,这样完成体外转录。用Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A)或Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0)对图像进行扫描,用GCOS软件(Affymetrix公司)在所有参数默认设置情况下对数据进行分析。为了实现标准化,使用了Affymetrix公司提供的100种管家基因(housekeeping gene)。相对表达值用软件给定的signal log ratio进行计算,正常肾组织样本的值任意设置为1.0。本发明的代表性源基因在HCC、CRC、GB、GC、NSCLC、PC、RCC、BPH/PCA中高度过度表达的表达式如图2所示。选定肽源基因的目标范围概述见表。

[0490] 表5A:选定肽源基因的目标范围。过度表达被定义为相比最高表达该基因的相关正常组织,在肿瘤上的表达超过1.5倍。 $<19\%$ 过度表达=I, $20-49\%$ =II, $50-69\%$ =III, $>70\%$ =IV。如果一种肽能够从多个源基因获得,最少范围的基因则是决定性的。

[0491]

SEQ ID NO.	序列	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	基因 ID	正式基因符号
116	ALLSSVAEA	I	II	I	I	II	I	I	I	9048	ARTN
263	SIIEYLPTL	I	II	I	I	I	I	I	I	79915	ATAD5
93	RLYGYFHDA	II	III	I	II	II	II	I	III	6790	AURKA
27	GLLGKVTSV	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
28	IKVTDQPQLEL	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
62	SLVENIHVL	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
241	KQFEGTVEI	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
52	TIGIPFPNV	III	I	I	II	II	I	I	II	83990	BRIP1
58	HLLGEGAFAQV	III	III	I	I	III	II	I	III	699	BUB1
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	II	II	I	I	26256	CABYR
94	YLDEVAFML	I	I	I	I	I	II	I	I	1238	CCBP2
103	YLADTVQKL	II	I	I	I	I	I	I	I	100526761, 54937	CCDC169- SOHLH2,SOHLH2
79	TVLEEIGNRV	II	IV	I	I	II	I	I	II	9133	CCNB2
247	NLLIDDKGTIKL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
249	YLYQILQGI	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
1	KLQEKIQEL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
242	KLQEEIPVL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
19	KVFELDLVTL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
236	KMSELQTYV	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
238	HLQEKLQSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
60	YLFSQGLQGL	III	IV	I	III	III	II	I	III	2491	CENPI
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	I	II	55165	CEP55
48	KISDFGLATV	IV	IV	II	II	IV	II	I	IV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
284	KLMDPGSLPPL	I	IV	I	I	II	I	I	II	2118	ETV4
261	GLAALAVHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA

[0492]

SEQ ID NO.	序列	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	基因 ID	正式基因符号
262	LLLEAVWHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA
270	TLLTFFHEL	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
11	LLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
111	AQLEGKLVSI	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
277	KLQEELNKV	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
67	FLIENLLAA	I	I	I	II	I	I	I	I	3166	HMX1
56	VLQENSSDYQSNL	II	III	I	I	I	I	I	I	3188	HNRNPH2
89	SLAETIFIV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
287	KIQEILTQV	IV	II	II	III	IV	IV	I	II	10643	IGF2BP3
97	KLFEKSTGL	IV	IV	II	II	I	II	III	II	23421	ITGB3BP
35	VIKGLEEI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
36	TVLQELINV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
239	VIKGLEEITV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
240	SVQENIQQK	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
10	QLIEKNWLL	IV	IV	I	II	III	II	I	IV	56992	KIF15
112	ILAQDVAQL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24137	KIF4A
70	GLTEKTVLV	III	IV	I	I	II	II	I	III	24,137,285, 643	KIF4A, KIF4B
252	SLMEKNQSL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24,137,285, 643	KIF4A, KIF4B
104	DLPTQEPALGTT	I	I	I	I	I	I	IV	I	354	KLK3
118	IAYNPNGNAL	I	I	I	I	I	II	I	I	3824	KLRD1
113	FLFLKEVKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
279	VLMDEGAVLTL	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
119	SLIEESEEL	I	II	I	I	I	I	I	I	284217	LAMA1
105	AMLASQTEA	II	I	I	II	I	IV	I	I	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	I	I	I	I	I	I	IV	II	4477	MSMB

[0493]

SEQ ID NO.	序列	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	基因 ID	正式基因符号
29	KMISAIPTL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
30	IITEVITRL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
32	VVMVLVLMML	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
41	IVTEIISEI	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
234	VLLNEILEQV	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
285	MLLDTVQKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54892	NCAPG2
114	LLFPSDVQTL	II	III	I	I	III	I	I	III	23397	NCAPH
107	RVLPGQAVTGV	I	III	I	I	I	I	I	I	55247	NEIL3
81	ILAEPIYI	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
115	ILHGEVNKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54830	NUP62CL
39	YLEDGFAYV	II	IV	I	I	III	II	IV	IV	5558	PRIM2
83	GLLENSPHL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
253	KLLAVIHEL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
288	SLYKGLLSV	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
108	FIANLPPELKA	I	II	I	I	I	I	IV	I	6013	RLN1
13	RLHDENILL	III	II	II	I	I	I	I	I	23322	RPGRIP1L
120	LQLJPLKGLSL	II	IV	I	II	III	II	I	III	6241	RRM2
76	FTAEFLEKV	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
255	FLMKNSDLYGA	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
74	GLAFLPASV	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
243	GLAEFQENV	II	I	I	I	II	II	I	II	57405	SPC25
281	LLLESDPKVYSL	I	III	I	I	I	I	I	I	6491	STIL
109	ILGSFELQL	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
267	YLLDMPLWYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A
268	SLDKDIVAL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A

[0494]

SEQ ID NO.	序列	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/ PCA (%)	GC (%)	基因 ID	正式基因符号
121	ALYVQAPTV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	IV	II	III	III	III	II	IV	III	15,073,792, 104	TTC30B, TTC30A
124	ALLLRLFTI	III	IV	II	II	IV	IV	I	IV	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT

[0495] RNAseq实验

[0496] 透过新一代测序技术(RNAseq)由CeGaT(Tübingen, Germany)对肿瘤和正常组织的RNA样本进行基因表达分析。简言之,根据供货商的方案(Illumina Inc., San Diego, CA, USA),其中包括RNA碎片化、cDNA转化和测序适配器的加入,利用Illumina HiSeq v4试剂盒准备测序文库。从多个样本获得的文库根据制造商的说明等摩尔混合并在Illumina HiSeq 2500序列发生器上测序,产生50bp的单端读数。处理的读数使用STAR软件映像至人类基因组(GRCh38)。根据ENSEMBL序列数据库的说明(Ensembl77),表达资料在转录水平设置为RPKM(每百万映射读数每千碱基读数,由Cufflinks软件生成)并在外显子水平上设置(总读数,由Bedtools软件生成)。外显子读数被归为外显子长度和校准尺寸,以获得RPKM值。

[0497] 本发明的代表性源基因在NHL、BRCA、GBC、CCC、MEL、OC、OSCAR、SCLC、UBC、UEC中高度过量表达的表达谱如图2F-H所示。进一步代表性基因的表达分数见表5B。

[0498] 表5B:选定肽源基因的目标范围。

[0499] 过度表达被定义为相比最高表达该基因的相关正常组织,在肿瘤上的表达超过1.5倍。 $<19\%$ 过度表达=I, $20-49\%$ =II, $50-69\%$ =III, $>70\%$ =IV。如果一种肽能够从多个源基因获得,最少范围的基因则是决定性的。基线包括以下相关正常组织:脂肪组织、肾上腺、动脉、骨髓、脑、软骨、结肠、食管、胆囊、心脏、肾、肝、肺、淋巴结、胰腺、垂体、直肠、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、胸腺、甲状腺、气管、膀胱和静脉。如果获得同一组织类型几个样本的表达数据,则使用各样本的算术平均值进行计算。AML=急性骨髓性白血病,NHL=非霍奇金淋巴瘤,BRCA=乳腺癌,CLL=慢性淋巴细胞白血病,GBC_CCC=胆囊腺癌和胆管癌,MEL=黑素瘤,OC=卵巢癌,OSCAR=食管癌,包括胃-食管交界处癌症,SCLC=小细胞肺癌,UBC=膀胱癌,UTC=子宫癌。

[0500]

SEQ ID NO.	序列	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
1	KLQEKIQEL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
2	SVLEKEIYSI	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
3	RVIDDSL VVG V	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
4	VLF GEL PAL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
5	GLVDIMVHL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
7	ALLQALMEL	I	II	II	I	II	III	II	II	I	II	I
8	ALSSSQAEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
9	SLITGQDLLSV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
10	QLIEKNWLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
11	LLDPKTIFL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I
13	RLHDENILL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
14	YTFSGDVQL	I	I	I	I	I	II	I	IV	I	III	I
17	GLLPSAESIKL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
18	KTASINQNV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
21	YLMDDFSSL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
22	LMYPYIYHV	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I
24	KVWSDVTPL	I	I	IV	I	IV	II	II	IV	II	IV	IV
39	YLEDGFAYV	I	II	II	I	II	II	III	I	III	I	I
40	KIWEELSVLEV	I	I	II	I	III	IV	I	III	IV	III	II
41	IVTEIISEI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
43	LLIPFTIFM	I	II	II	I	II	II	I	IV	I	II	I

[0501]

SEQ ID NO.	序列	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
46	ISLDEVAVSL	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
47	GLNGFNVLL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	II
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
67	FLIENLLAA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
76	FTAEFLEKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
83	GLLENSPHL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
84	FLLEREQLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	II
85	KLLDKPEQFL	I	I	I	I	I	IV	I	I	I	I	I
86	SLFSNIESV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
88	LLLPLELSLA	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
89	SLAETIFIV	I	III	I	I	I	I	II	I	II	I	I
92	RLFEEVLGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
95	KLIDEDEPLFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
96	ALDTRHEL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
102	GLYPVTLVGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
116	ALLSSVAEA	I	I	II	I	I	I	I	IV	I	II	I
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
147	GLLSALENV	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
148	YLILSSHQL	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
152	ILVTSIFFL	I	II	I	II	I	I	I	I	I	I	I
153	KLVELEHTL	I	I	II	I	II	II	I	II	I	II	I
155	TLDSYLKAV	I	I	III	I	I	I	I	I	I	I	I
156	VILTSSPFL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
157	ILQDGQFLV	I	I	I	II	I	III	I	I	II	I	I
158	YLDPLWHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
166	LLGDSSFFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
169	ALADLSVAV	I	I	I	I	I	I	I	II	I	III	I
170	FIAAVVEKV	I	I	I	I	I	II	II	I	I	I	I
181	LLWAPTAQA	I	I	I	I	II	I	I	I	II	I	I
185	TLYQGLPAEV	I	I	II	I	I	I	III	IV	I	II	IV
203	FLFVDPELV	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
220	ALSELERVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
222	LLTGVFACL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	II	I
233	SLFESLEYL	I	I	II	I	II	II	II	II	I	I	I

[0502]

SEQ ID NO.	序列	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
234	VLLNEILEQV	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
235	SLLNQPKAV	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
236	KMSELQTYV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
237	ALLEQTGDMSL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
241	KQFEGTVEI	I	II	II	I	I	I	I	I	II	I	I
242	KLQEEIPVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
243	GLAEFQENV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
245	ALLEEEEGV	I	I	I	I	I	II	I	II	II	II	I
246	ALAGIVTNV	I	I	II	I	II	I	III	I	I	II	I
248	VLMQDSRLYL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
251	LLWGNLPEI	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
252	SLMEKNQSL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
253	KLLAVIHEL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
255	FLMKNSDLYGA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
257	KLIDHQGLYL	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	II	IV	II	II	II
261	GLAALAVHL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
263	SIIEYLPTL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
264	TLHDQVHLL	I	I	IV	I	I	I	IV	I	I	I	IV
265	FLLDKPQDL SI	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	I
267	YLLDMPLWYL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
269	GLLDCPIFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
270	TLLTFFHEL	I	I	I	I	I	II	I	II	II	I	I
271	VLIEYNFSI	I	I	I	I	I	II	I	III	II	I	I
274	TLYNPERTITV	II	IV	II	III	IV	IV	IV	IV	IV	II	II
277	KLQEELNKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
279	VLMDEGAVLTL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
283	ALSELLQQV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
286	FLTEMVHFI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	II	I

[0503] 实施例3

[0504] MHC-1类提呈肽的体外免疫原性

[0505] 为了获得关于本发明TUMAP的免疫原性信息,发明人使用体外T细胞扩增分析方法进行了研究,其中该分析方法基于使用装载肽/MHC复合物和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞(aAPC)进行反复刺激。用这种方法,发明人可显示出本发明目前为止47种HLA-A*0201限制TUMAP具有免疫原性,这表明这些肽为对抗人CD8+前体T细胞的T细胞表位(表6A和B)。

[0506] CD8+ T细胞体外激活

[0507] 为了用载有肽-MHC复合物(pMHC)和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞进行体外刺激,发明人首先从University clinics Mannheim,Germany中获取健康供体CD8微珠(Miltenyi Biotec,Bergisch-Gladbach,Germany)透过积极选择白细胞清除术后新鲜HLA-A*02产物而分离出CD8+ T细胞。

[0508] PBMC和分离出的CD8+淋巴细胞使用前在T细胞培养基(TCM)中培养,培养基包括

RPMT-Glutamax (Invitrogen公司, Karlsruhe, 德国) 并补充10%热灭活人AB血清 (PAN-Biotech公司, Aidenbach, 德国)、100U/ml青霉素/100µg/ml链霉素 (Cambrex公司, Cologne, 德国)、1mM丙酮酸钠 (CC Pro公司, Oberdorf, 德国) 和20µg/ml庆大霉素 (Cambrex公司)。在此步骤, 2.5ng/ml的IL-7 (PromoCell公司, Heidelberg, 德国) 和10U/ml的IL-2 (Novartis Pharma公司, Nürnberg, 德国) 也加入TCM。对于pMHC/抗-CD28涂层珠的生成、T细胞的刺激和读出, 使用每刺激条件四个不同pMHC分子以及每个读出条件8个不同的pMHC分子在高度限定的体外系统中进行。

[0509] 纯化的共刺激小鼠IgG2a抗人CD28抗体9.3 (Jung et al., 1987) 使用制造商 (Perbio公司, 波恩, 德国) 推荐的N-羟基琥珀酰亚胺生物素进行化学生物素化处理。所用珠为5.6µm的链霉抗生物素蛋白包裹的多聚苯乙烯颗粒 (Bangs Laboratories, 伊利诺伊州, 美国)。用于阳性和阴性对照刺激物的pMHC分别为A*0201/MLA-001 (从Melan-A/MART-1中修饰制得的肽ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 289)) 和A*0201/DDX5-001 (从DDX5中获得的YLLPAIVHI (SEQ ID NO: 290))。

[0510] 800.000珠/200µl包裹于含有4x12.5ng不同生物素-pMHC的96孔板、进行洗涤, 随后加入体积为200µl的600ng生物素抗-CD28。在37°C下, 在含5ng/ml IL-12 (PromoCell) 的200µl TCM中共培养 1×10^6 CD8+T细胞与 2×10^5 的清洗涂层珠3天, 从而激活刺激。之后, 一半培养基与补充80U/ml IL-2的新鲜TCM进行交换, 并且培养在37°C下持续4天。这种刺激性周期总共进行3次。对于使用每条件8种不同pMHC分子的pMHC多聚体读出, 二维组合编码方法如前述使用 (Andersen et al., 2012), 稍作修饰, 涵盖耦合至5种不同的荧光染料。最后, 用Live/dead near IR染料 (Invitrogen公司, Karlsruhe, 德国)、CD8-FITC抗体克隆SK1 (BD公司, Heidelberg, 德国) 和荧光pMHC多聚体而执行多聚体分析。对于分析, 使用了配有合适激光仪和筛检程序的BD LSRII SORP细胞仪。肽特异性细胞以占总CD8+细胞的百分比形式进行计算。多聚体分析结果使用FlowJo软件 (Tree Star公司, Oregon, 美国) 进行评估。特定多聚体+CD8+淋巴细胞的体外填充用与阴性对照刺激组比较而进行检测。如果健康供体中的至少一个可评价的体外刺激孔在体外刺激后发现含有特异性CD8+ T细胞株 (即该孔包含至少1%特定多聚体+CD8+ T细胞, 并且特定多聚体+的百分比至少为阴性对照刺激中位数的10倍), 则检测给定抗原的免疫原性。

[0511] 胰腺癌肽体外免疫原性

[0512] 对于受到测试的HLA-I类肽, 可透过肽特异性T细胞株的生成证明其体外免疫原性。TUMAP特异性多聚体对本发明的15种肽染色后流式细胞仪检测的典型结果如图3和图6所示, 同时也含有相应的阴性对照信息。本发明2种肽的结果汇总于表6A和B。

[0513] 表6A: 本发明中HLA I类肽的体外免疫原性

[0514] 申请人对本发明的肽所做的体外免疫原性实验的示例性结果。<20% = +; 21% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; ≥70% = ++++

[0515]

序列号	孔	供体
288	SLYKGLLSV	++
287	KIQEILTQV	+

[0516] 表6B: 本发明中HLA I类肽的体外免疫原性。

[0517] 申请人对本发明的HLA-A*02限制肽所做的体外免疫原性实验的示例性结果。提示

了体外免疫原性实验的结果。阳性孔和供体 (其他可评价) 的百分比概括为 $<20\% = +$;
 $20\% - 49\% = ++$; $50\% - 69\% = +++$; $\geq 70\% = ++++$

[0518]

序列 ID 号	序列	阳性孔 [%]
4	VLFGELPAL	+
7	ALLQALMEL	++
9	SLITGQDLLSV	+
11	LLDPKTIFL	++
14	YTFSGDVQL	+
17	GLLPSAESIKL	+
18	KTASINQNV	+++
27	GLLGKVTSV	+
29	KMISAIPTL	+
34	TLNTLDINL	++++
35	VIIKGLEEI	+
39	YLEDGFAYV	++++
48	KISDFGLATV	++
50	ILLSVLHQL	+
66	AMFPDTIPRV	+
77	ALYGNVQQV	+
82	ILAEPIYIRV	+++
89	SLAETIFIV	+
92	RLFEEVLGV	++
97	KLF EKSTGL	+
101	SLLEVNEASSV	+
102	GLYPVTLVGV	+

[0519]	117	TLLEGISRA	++
	121	ALYVQAPTV	+
	157	ILQDGQFLV	+
	166	LLGDSSFFL	++
	183	ALSYILPYL	+++
	203	FLFVDPELV	+++
	233	SLFESLEYL	+
	234	VLLNEILEQV	++
	236	KMSELQTYV	+
	242	KLQEEIPVL	+
	246	ALAGIVTNV	+
	248	VLMQDSRLYL	++
	251	LLWGNLPEI	++
	253	KLLAVIHEL	++
	254	ALGDKFLLRV	+
	255	FLMKNSDLYGA	+
	257	KLIDHQGLYL	+
	260	ALNESLVEC	+
	261	GLAALAVHL	++
	263	SIIEYLPTL	+
	264	TLHDQVHLL	+
	267	YLLDMPLWYL	+
	275	AVPPPPSSV	++

[0520] 实施例4

[0521] 肽的合成

[0522] 所有的肽透过使用Fmoc策略以标准、广为接受的固相肽合成法合成。每个肽的身份和纯度已使用质谱和RP-HPLC分析法确定。用冻干法(三氟乙酸盐)获得白色至类白色的肽,纯度为>50%。所有的TUMAP优选作为三氟乙酸盐或乙酸盐进行给药,其他盐形式也可以。

[0523] 实施例5

[0524] MHC结合测定

[0525] 本发明基于T细胞疗法的候选肽进一步测试其MHC结合能力(亲和性)。单个肽-MHC复合体透过UV-配体交换产生,其中,紫外线敏感肽经紫外线照射后裂解,与分析的相关肽交换。只有能够有效地结合并稳定肽接受MHC分子的候选肽才能阻止MHC复合物的解离。为了确定交换反应的产率,将基于稳定MHC复合物轻链($\beta 2m$)的检测进行ELISA测定。检测总体上按照Rodenko等人(Rodenko et al., 2006)中描述的方法进行。

[0526] 96孔Maxisorp板(NUNC)在室温下在PBS中以2 μ g/ml链霉包被过夜,用4倍洗涤并在37°C下在含封闭缓冲液的2%BSA中封闭1小时。折迭的HLA-A*02:01/MLA-001单体作为标准品,涵盖15-500ng/ml的范围。紫外线交换反应的肽-MHC单体在封闭缓冲液中稀释100倍。样

本在37℃下孵育1小时,洗涤四次,在37℃下以2ug/ml HRP缀合抗-β2m温育1小时,再次洗涤,并以NH₂SO₄封堵的TMB溶液进行检测。在450nm处测量吸收。在生成和产生抗体或其片段时和/或T细胞受体或其片段时,通常优选显示为高交换产率(优选为高于50%,最优选为高于75%)的候选肽,这是因为它们对MHC分子表现出足够的亲合力,并能防止MHC复合物的解离。

[0527] 表7:MHC-I类结合分数。

[0528] HLA-I类限制肽与HLA-A*02:01的结合根据肽交换产量评估:≥10%=+;≥20%=+;20%-49%=++;% =++;≥50%-=+++;≥75%=+++;>=75%=++++

[0529]

序列 ID 号	序列	肽交换
1	KLQEKIQEL	++++
3	RVIDDSL VVG V	+++
4	VLFGELPAL	+++
5	GLVDIMVHL	+++
6	FLNAIETAL	++++
7	ALLQALMEL	+++
9	SLITGQDLLSV	+++
10	QLIEKNWLL	+++
11	LLDPKTIFL	+++
12	RLLDPKTIFL	+++
13	RLHDENILL	+++
14	YTFSGDVQL	+++
16	SLADLSLLL	+++

[0530]

17	GLLPSAESIKL	++++
18	KTASINQNV	++
19	KVFELDLVTL	++
20	ALVEKGEFAL	++
21	YLMDDFSSL	+++
22	LMYPYIYHV	+++
23	ALLSPLSLA	+++
24	KVWSDVTPL	+++
25	LLWGHPRVALA	+++
26	VLDGKVAVV	+++
27	GLLGKVTSV	+++
28	IKVTDPQLEL	++
29	KMISAIPTL	++
30	IITEVITRL	+++
31	GLLETTGLLAT	+++
33	TLDRNSLYV	++
34	TLNTLDINL	+++
35	VIKGLEEI	++
36	TVLQELINV	+++
37	QIVELIEKI	++
38	VLQQESNFL	++
39	YLEDGFAYV	+++
40	KIWEELSVLEV	+++
41	IVTEIISEI	+++
42	KQMSISTGL	++
44	AVFNLVHV	+++
45	FLPVSVVYV	+++
47	GLNGFNVLL	+++
48	KISDFGLATV	+++
49	KLIGNIHGNEV	++
50	ILLSVLHQL	+++
51	LDSEALLTL	++
52	TIGIPFPNV	++
53	AQHLSTLLL	+
54	YLPGLVAA	+++
55	HLFDKIIKI	+++
57	TLYPGRFDYV	++
58	HLLGEGAFAQV	+++
59	ALADGIKSFLL	+++
60	YLFSQGLQGL	+++

[0531]

61	ALYPKEITL	+++
62	SLVENIHVL	+++
63	KLLPMVIQL	+++
64	SLYAGSNNQV	++
65	SLSEKSPEV	++
66	AMFPDTIPRV	++
67	FLIENLLAA	+++
68	QLMNLIRSV	+++
69	LKVLKADVVL	++
70	GLTEKTVLV	++
71	HMSGKLTNV	++
72	VLSTRVTNV	++
74	GLAFLPASV	++
75	ALLDGALQL	+++
76	FTAEFLEKV	+++
77	ALYGNVQQV	+++
79	TVLEEIGNRV	++
80	VLTGQVHEL	+++
81	ILAEPIYI	++
82	ILAEPIYIRV	+++
83	GLLENSPHL	++
84	FLLEREQLL	++++
85	KLLDKPEQFL	++
86	SLFSNIESV	+++
87	KLLSLLEEA	+++
88	LLLPLELSLA	+++
89	SLAETIFIV	+++
90	AILNVDEKNQV	++
91	LLPSIFLMV	++
92	RLFEEVLGV	++++
93	RLYGYFHDA	++
94	YLDEVAFML	+++
95	KLIDEDEPLFL	+++
96	ALDTTRHEL	++
97	KLF EKSTGL	+++
98	FVQEKIPEL	+++
99	TLFGIQLTEA	+++
100	ALQSFEFRV	+++
101	SLLEVNEASSV	+++
102	GLYPVTLVGV	+++

[0532]

103	YLADTVQKL	++
105	AMLASQTEA	++
106	VLLGSVVIFA	++
107	RVLPGQAVTGV	++
108	FIANLPPELKA	+++
109	ILGSFELQL	+++
110	QIQGQVSEV	++
111	AQLEGKLVSI	+++
112	ILAQDVAQL	+++
113	FLFLKEVKV	++
114	LLFPSDVQTL	++
115	ILHGEVNKV	++
116	ALLSSVAEA	++
117	TLLEGISRA	++
119	SLIEESEEL	++
121	ALYVQAPTV	++
122	SIIDTELKV	+++
123	QTAPEEAFIKL	+
124	ALLRLFTI	++
125	AALEVLAEV	+++
126	QLREAFEQL	+++
128	SILTNISEV	++
129	KMASKVTQV	++
130	QLYGSAITL	+++
131	SLYPHFLL	+++
132	ALLNNVIEV	+++
133	FLDGRPLTL	++
134	SLYKSFLQL	++
136	LLWDAPAKC	+++
137	KLIYKDLVSV	++
138	GIINKLVTV	++
139	IILENIQSL	+++
140	FLDSQITTV	+++
141	NIDINNEL	++
142	LLDAAHASI	++
143	MLWESIMRV	+++
144	FLISQTPLL	+++
145	ALEEKLENV	+++
146	VVAAHLAGA	++
147	GLLSALENV	+++

[0533]

148	YLILSSHQL	+++
149	NMADGQLHQV	++
150	VLLDMVHSL	+++
151	DISKRIQSL	++
153	KLVELEHTL	+++
154	AIKEIQTV	++
155	TLDSYLKAV	++
157	ILQDGQFLV	++
158	YLDPLWHQL	+++
159	QLGPPVPTI	+++
160	TLQEWLTEV	+++
161	NLLDENVCL	++++
162	GLLGNLLTSL	+++
163	GLEERLYTA	++
164	MLIIRVPSV	+++
165	SLLDYEVS	+++
166	LLGDSSFFL	+++
167	LVVDEGSLVSV	+++
168	VIFEGEPMYL	+++
169	ALADLSVAV	+++
170	FIAAVVEKV	++
171	LLLLDVPTA	++
173	RLIDIYKNV	+++
174	ALYSGDLHAA	++
175	SLLDLVQSL	+++
176	VQSGLRILL	++
177	ALINVLNAL	+++
178	SLVSWQLLL	++++
179	TLGEIHKGV	+++
180	RLYEEEIRI	+++
181	LLWAPTAQA	+++
182	GLQDGFQITV	+++
183	ALSYILPYL	+++
184	ALDSTIAHL	++
185	TLYQGLPAEV	++
187	SILKEDPFL	++
188	VLGEEQEGV	++
190	SLSTELFKV	+++
191	AAIEIFEKV	+++
192	TLLPSSGLVTL	++

[0534]

193	ALFHMNILL	+++
194	KLLEEVQLL	++
195	VIIQNLPAL	+++
198	ILTNKVVS	++
199	SVADLAHVL	++
200	IMPTFDLTKV	+++
203	FLFVDPELV	++
204	SEWGSPHAAVP	+++
206	GLDAFRIFL	++++
207	KLFETVEEL	+++
208	HLNNDRNPL	++
210	GLAGDNIYL	+++
211	LLTTVLINA	+++
212	MTLSEIHAV	++
213	ILAVDGVLSV	+++
214	ALFETLIQL	+++
215	QIADIVTSV	++
216	ALSTVTPRI	++
217	LLWPSSVPA	+++
218	SLTGANITV	+++
219	GVVPTIQKV	++
220	ALSELERVL	+++
221	IMLNSVEEI	++
222	LLTGVFAQL	++
223	ALHPVQFYL	+++
224	LLFDWSGTGRADA	+++
225	FLPQPVPLSV	+++
226	SLAGNLQEL	+++
227	SEMEELPSV	+
228	SLELDGINLRL	+++
229	YLYELEHAL	++
230	KLLNMIFSI	+++
231	LLDDIFIRL	+++
233	SLFESLEYL	+++
234	VLLNEILEQV	++++
235	SLLNQPKAV	++
236	KMSELQTYV	+++
237	ALLEQTGDMSL	+++
238	HLQEKLQSL	++
239	VIKGLEEITV	+++

[0535]

241	KQFEGTVEI	+++
242	KLQEEIPVL	+++
243	GLAEFQENV	++
244	NVAEIVIHI	+++
245	ALLEEEEGV	++
246	ALAGIVTNV	+++
247	NLLIDDKGTIKL	++
248	VLMQDSRLYL	+++
249	YLYQILQGI	+++
250	LMQDSRLYL	+++
251	LLWGNLPEI	+++
252	SLMEKNQSL	++
253	KLLAVIHEL	+++
254	ALGDKFLLRV	++
255	FLMKNSDLYGA	+++
256	FLNDIFERI	+++
257	KLIDHQGLYL	+++
258	QLVQRVASV	++
259	GPGIFPPPPQP	+
260	ALNESLVEC	+++
261	GLAALAVHL	+++
262	LLLEAVWHL	+++
263	SIIEYLPTL	+++
264	TLHDQVHLL	++
265	FLLDKPQDLSI	+++
266	FLLDKPQDL	++
267	YLLDMPLWYL	+++
268	SLDKDIVAL	++
269	GLLDCPIFL	++++
270	TLLTFFHEL	+++
271	VLIEYNFSI	+++
272	FVMEGEPPKL	++
273	SLNKQIETV	++
274	TLYNPERTITV	+++
275	AVPPPPSSV	++
276	RMPTVLQCV	+++
277	KLQEELNKV	+++
278	VLEDKVLSV	+++
279	VLMDEGAVLTL	++
280	HLWGHALFL	+++

[0536]

281	LLLESDPKVYSL	++
282	SLYALHVKA	++
283	ALSELLQQV	+++
284	KLMDPGSLPPL	++
285	MLLDTVQKV	+++
286	FLTEMVHFI	+++

[0537] 实施例6

[0538] 表8:本发明中的优选肽

[0539]

序列ID号	序列	肽代码
11	LLDPKTIFL	HAVCR1-001
14	YTFSGDVQL	MMP1-003
21	YLMDDFSSL	COL6A3-015
24	KVWSDVTPL	MMP-002
25	LLWGHPRVALA	MXRA5-003
40	KIWEELSVLEV	MAGEA3-003
85	KLLDKPEQFL	FMN1-001
89	SLAETIFIV	HTR3A-001
117	TLLEGISRA	CABY-001
153	KLVELEHTL	CT83-001
155	TLDSYLKAV	CYP4Z-001
157	ILQDGQFLV	DCAF4L2-001
168	VIFEGEPMYL	HORMAD1-001
233	SLFESLEYL	ZFP42-001
245	ALLEEEEGV	MAGEA4-003
253	KLLAVIHEL	RAD54B-002
264	TLHDQVHLL	ESR1-001
274	TLYNPERTITV	IGF-004

[0540] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的绝对定量

[0541] 粘合剂例如抗体和/或TCR的产生是一个费力的过程,其可以仅针对一些选定靶标进行。在肿瘤相关和特异性肽的情况下,选择标准包括但不限于排除提呈于细胞表面上肽的提呈和浓度。除了本文所述肽的分离和相对定量,发明人也分析了所述每个细胞的绝对肽拷贝数。实体肿瘤样本中每个细胞的TUMAP拷贝数定量需要分离TUMAP的绝对定量、TUMAP分离效率和分析的组织样本细胞计数。

[0542] NanoLC-MS/MS肽定量

[0543] 对于透过质谱法对肽的准确定量,使用内标法生成每种肽的校准曲线。内标是每种肽的双同位素标记的变体,即,TUMAP合成中纳入2个同位素标记的氨基酸。它与肿瘤相关肽仅在质量上不同,但在其他的物理化学性质方面无差异(Anderson et al., 2012)。内标被掺入到每个MS样本,所有MS信号均标准化为内标MS信号,以平衡MS实验之间潜在的技术差异。

[0544] 校准曲线用至少三种不同的矩阵绘制,即,来自于类似于常规MS样本的天然样本的HLA肽洗脱液,并且每个制备品以重复MS运行进行测量。对于评价,MS信号被标准化为内标信号,校准曲线透过logistic回归计算。

[0545] 对于来自组织样本的肿瘤相关肽的定量,各样本也掺有内标;MS信号标准化为内标并使用该肽校正曲线进行定量。

[0546] 肽/MHC分离的效率

[0547] 对于任何蛋白质纯化过程,来自组织样本蛋白的分离与相关蛋白的一定损失相关联。为了确定TUMAP分离的效率,针对选定为绝对定量的所有TUMAP产生了肽/MHC复合体。为了能够天然肽MHC/复合体与加样物,使用了单同位素标记版本的TUMAP,即TUMAP合成期间纳入1个同位素标记的氨基酸。这些复合物被掺入新制备的组织裂解物中,例如,在TUMAP分离过程中最早可能时间点,然后在之后的亲和纯化中像天然肽MHC/复合物被获取。因此,测量单标记TUMAP的恢复可得到个体TUMAP分离效率相关的结论。

[0548] 分离效率使用少量样本进行分析,且这些组织样本可比较。与此相反,个体肽之间的分离效率不同。这表明,分离效率虽然只在有限数量的样本中进行测定,但可外推至任何其他组织制备品中。但是,由于分离效率不能从一种肽外推至其他肽,因此,有必要单独分析每个TUMAP。

[0549] 固体、冷冻组织中细胞计数的测定

[0550] 为了确定经过绝对肽定量的组织样本的细胞数,发明人采用了DNA含量分析。此方法适用于不同来源的广泛样本,且最重要的是,冷冻样本(Alcoser et al.,2011;Forsey and Chaudhuri,2009;Silva et al.,2013)。在肽分离方案期间,组织样本被加工为均匀的裂解物,从中取一小等份裂解物。样本等分为三份,从中分离DNA(QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen,Hilden,德国)。每次DNA分离的总DNA含量至少重复两次使用基于荧光的DNA定量测定法(Qubit dsDNA HS Assay Kit,Life Technologies,Darmstadt,德国)进行定量。

[0551] 为了计算细胞数,生成了来自单个健康血细胞等分试样的DNA标准曲线,使用一系列指定的细胞数。标准曲线用于计算每次DNA分离总DNA含量的总细胞含量。用于肽分离的组织样本的平均总细胞计数,在考虑裂解物等份的已知体积和总裂解物体积的情况下进行推算。

[0552] 每个细胞的肽拷贝数

[0553] 使用前述实验的数据,发明人以总肽量除以样本总细胞计数计算得出每个细胞的TUMAP拷贝数,随后除以分离效率。选定肽的细胞拷贝数如表9所示。

[0554] 表9:绝对拷贝数。该表列出了肿瘤样本中绝对肽定量的结果。针对每种肽,每个细胞的中位拷贝数表示:<100=+; >=100=++; >=1,000+++; >=10,000=++++。提示样本数量,其中提供评估的高质量MS数据。

	序列 ID 号	肽代码	每细胞拷贝数 (中位数)	样本数 量
[0555]	11	HAVCR1-001	+	22
	14	MMP1-003	++	10
	21	COL6A3-015	+	35
	24	MMP-002	+	33
	85	FMN1-001	+	18
	89	HTR3A-001	+++	17
	117	CABY-001	+	17
	155	CYP4Z-001	++	18
	157	DCAF4L2-001	++	16
[0556]	245	MAGEA4-003	+	33
	253	RAD54B-002	+++	6
	264	ESR1-001	+	16
	274	IGF-004	+	6
[0557]	参考文献列表			
[0558]	Adelaide,J.et al.,Cancer Res 67(2007):11565-11575			
[0559]	Alcoser,S.Y.et al.,BMC.Biotechnol.11(2011):124			
[0560]	Allison,J.P.et al.,Science 270(1995):932-933			
[0561]	American Cancer Society,(2015),www.cancer.org			
[0562]	Ampie,L.et al.,Front Oncol.5(2015):12			
[0563]	Andersen,R.S.et al.,Nat.Protoc.7(2012):891-902			
[0564]	Anderson,N.L.et al.,J Proteome.Res 11(2012):1868-1878			
[0565]	Appay,V.et al.,Eur.J Immunol.36(2006):1805-1814			
[0566]	Arafat,H.et al.,Surgery 150(2011):306-315			
[0567]	Aung,P.P.et al.,Oncogene 25(2006):2546-2557			
[0568]	Avigan,D.et al.,Clin Cancer Res.10(2004):4699-4708			
[0569]	Baba,T.et al.,Eur.J Cardiothorac.Surg.43(2013):759-764			
[0570]	Bahnassy,A.A.et al.,World J Gastroenterol.20(2014):18240-18248			
[0571]	Banchereau,J.et al.,Cell 106(2001):271-274			
[0572]	Band,A.M.et al.,J Mammary.Gland.Biol Neoplasia.16(2011):109-115			
[0573]	Bankovic,J.et al.,Lung Cancer 67(2010):151-159			
[0574]	Beatty,G.et al.,J Immunol 166(2001):2276-2282			
[0575]	Beaty,T.H.et al.,Hum.Genet.132(2013):771-781			
[0576]	Beggs,J.D.,Nature 275(1978):104-109			
[0577]	Bell,J.L.et al.,J Clin Oncol 33(2015):1285-1293			
[0578]	Bell,J.L.et al.,Cell Mol Life Sci.70(2013):2657-2675			
[0579]	Benjamini,Y.et al.,Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological),57(1995):289-300			
[0580]	Berger,C.et al.,Curr.Mol.Med.13(2013):1229-1240			

- [0581] Berman,R.S.et al.,National Cancer Institute:PDQ (R) Colon Cancer Treatment(2015a)
- [0582] Berman,R.S.et al.,National Cancer Institute:PDQ (R) Rectal Cancer Treatment(2015b)
- [0583] Bhan,S.et al.,Oncol Rep.28(2012):1498-1502
- [0584] Bode,P.K.et al.,Mod.Pathol.27(2014):899-905
- [0585] Bogush,T.A.et al.,Antibiot.Khimioter.54(2009):41-49
- [0586] Bonventre,J.V.,Trans.Am.Clin Climatol.Assoc.125(2014):293-299
- [0587] Boulter,J.M.et al.,Protein Eng 16(2003):707-711
- [0588] Braumuller,H.et al.,Nature(2013)
- [0589] Bray,F.et al.,Int J Cancer 132(2013):1133-1145
- [0590] Brossart,P.et al.,Blood 90(1997):1594-1599
- [0591] Bruckdorfer,T.et al.,Curr.Pharm.Biotechnol.5(2004):29-43
- [0592] Butterfield,L.H.et al.,Clin Cancer Res 12(2006):2817-2825
- [0593] Butterfield,L.H.et al.,Clin Cancer Res 9(2003):5902-5908
- [0594] Caballero,O.L.et al.,PLoS.One.5(2010)
- [0595] Carballido,E.et al.,Cancer Control 19(2012):54-67
- [0596] Card,K.F.et al.,Cancer Immunol Immunother.53(2004):345-357
- [0597] Chang,Y.S.et al.,Cancer Chemother.Pharmacol.59(2007):561-574
- [0598] Chanock,S.J.et al.,Hum.Immunol.65(2004):1211-1223
- [0599] Chapiro,J.et al.,Radiol.Med.119(2014):476-482
- [0600] Chen,H.S.et al.,Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi11(2003):145-148
- [0601] Chen,S.T.et al.,Cancer Sci.102(2011b):2191-2198
- [0602] Chen,Y.L.et al.,Int J Surg.11(2013c):85-91
- [0603] Chen,Y.T.et al.,Cancer Immun.5(2005):9
- [0604] Cierna,Z.et al.,BMC.Cancer 14(2014):472
- [0605] Ciruelos Gil,E.M.,Cancer Treat.Rev 40(2014):862-871
- [0606] Cohen,C.J.et al.,J Mol Recognit.16(2003a):324-332
- [0607] Cohen,C.J.et al.,J Immunol 170(2003b):4349-4361
- [0608] Cohen,S.N.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69(1972):2110-2114
- [0609] Coligan,J.E.et al.,Current Protocols in Protein Science(1995)
- [0610] Colombetti,S.et al.,J Immunol.176(2006):2730-2738
- [0611] Coosemans,A.et al.,Anticancer Res 33(2013):5495-5500
- [0612] Coulie,P.G.et al.,Immunol.Rev 188(2002):33-42
- [0613] Counter,C.M.et al.,Blood 85(1995):2315-2320
- [0614] Cuadros,T.et al.,Cancer Res 74(2014):1416-1428
- [0615] Cuadros,T.et al.,Eur.J Cancer 49(2013):2034-2047
- [0616] Dalerba,P.et al.,Int.J Cancer 93(2001):85-90
- [0617] De,Plaen E.et al.,Immunogenetics 40(1994):360-369

- [0618] Dengjel,J.et al.,Clin Cancer Res 12(2006):4163-4170
- [0619] Denksberg,G.et al.,J Immunol 171(2003):2197-2207
- [0620] Downie,D.et al.,Clin Cancer Res.11(2005):7369-7375
- [0621] Du,X.et al.,Clin Cancer Res 20(2014):6324-6335
- [0622] Duan,Z.et al.,Clin Cancer Res 9(2003):2778-2785
- [0623] Ek,S.et al.,Cancer Res 62(2002):4398-4405
- [0624] Emens,L.A.,Expert.Rev.Anticancer Ther.12(2012):1597-1611
- [0625] Enguita-German,M.et al.,World J Hepatol.6(2014):716-737
- [0626] Estey,E.H.,Am.J Hematol.89(2014):1063-1081
- [0627] Falk,K.et al.,Nature 351(1991):290-296
- [0628] Ferlay et al.,GLOBOCAN 2012 v1.0,Cancer Incidence and Mortality Worldwide:IARC CancerBase No.11[Internet],(2013),<http://globocan.iarc.fr>
- [0629] Findeis-Hosey,J.J.et al.,Biotech.Histochem.87(2012):24-29
- [0630] Fong,L.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98(2001):8809-8814
- [0631] Forsey,R.W.et al.,Biotechnol.Lett.31(2009):819-823
- [0632] Frasor,J.et al.,Mol.Cell Endocrinol.418 Pt 3(2015):235-239
- [0633] Fuge,O.et al.,Res Rep.Urol.7(2015):65-79
- [0634] Fujiyama,T.et al.,J Dermatol.Sci.75(2014):43-48
- [0635] Fukuyama,T.et al.,Cancer Res.66(2006):4922-4928
- [0636] Fuqua,S.A.et al.,Breast Cancer Res Treat.144(2014):11-19
- [0637] Gabrilovich,D.I.et al.,Nat Med.2(1996):1096-1103
- [0638] Gandhi,A.V.et al.,Ann Surg.Oncol 20 Suppl 3(2013):S636-S643
- [0639] Gardina,P.J.et al.,BMC.Genomics 7(2006):325
- [0640] Gattinoni,L.et al.,Nat Rev.Immunol 6(2006):383-393
- [0641] Giannopoulos,K.et al.,Leukemia 24(2010):798-805
- [0642] Giannopoulos,K.et al.,Int.J Oncol 29(2006):95-103
- [0643] Gibbs,P.et al.,Melanoma Res 10(2000):259-264
- [0644] Gnjjatic,S.et al.,Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100(2003):8862-8867
- [0645] Godkin,A.et al.,Int.Immunol 9(1997):905-911
- [0646] Gong,Y.et al.,Adv.Anat.Pathol.21(2014):191-200
- [0647] Grah,J.J.et al.,Tumori 100(2014):60-68
- [0648] Granziero,L.et al.,Blood 97(2001):2777-2783
- [0649] Green,M.R.et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual 4th(2012)
- [0650] Greenfield,E.A.,Antibodies:A Laboratory Manual 2nd(2014)
- [0651] Gu,X.et al.,Sci.Rep.4(2014):6625
- [0652] Gunawardana,C.et al.,Br.J Haematol.142(2008):606-609
- [0653] Hall,R.D.et al.,Cancer Control 20(2013):22-31
- [0654] Hamilton,K.E.et al.,Mol.Cancer Res 13(2015):1478-1486
- [0655] Han,L.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014):6734-6742

- [0656] Hanagiri,T.et al.,Anticancer Res.33(2013):2123-2128
- [0657] Harig,S.et al.,Blood 98(2001):2999-3005
- [0658] Hasegawa,H.et al.,Arch.Pathol.Lab Med.122(1998):551-554
- [0659] Hayashi,S.I.et al.,Endocr.Relat Cancer 10(2003):193-202
- [0660] Hennard,C.et al.,J Pathol.209(2006):430-435
- [0661] Herbert,N.et al.,J Immunol.185(2010):902-916
- [0662] Hinrichs,C.S.et al.,Nat.Biotechnol.31(2013):999-1008
- [0663] Hiramoto,T.et al.,Oncogene 18(1999):3422-3426
- [0664] Hoffmann,N.E.et al.,Cancer 112(2008):1471-1479
- [0665] Holtl,L.et al.,Clin.Cancer Res.8(2002):3369-3376
- [0666] Hsu,H.C.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.329(2005):1108-1117
- [0667] Hu,S.et al.,J Cancer Res Clin Oncol 140(2014):883-893
- [0668] Huang,X.et al.,Cell Prolif.48(2015b):593-599
- [0669] Hui,L.et al.,Oncol Rep.34(2015):2627-2635
- [0670] Hussein,Y.M.et al.,Med.Oncol 29(2012):3055-3062
- [0671] Hwang,M.L.et al.,J Immunol.179(2007):5829-5838
- [0672] Ioannidis,P.et al.,Anticancer Res 23(2003):2179-2183
- [0673] Jeng,Y.M.et al.,Br.J Surg.96(2009):66-73
- [0674] Jung,G.et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 84(1987):4611-4615
- [0675] Kalos,M.et al.,Sci.Transl.Med.3(2011):95ra73
- [0676] Kang,C.Y.et al.,J Gastrointest.Surg.18(2014):7-15
- [0677] Kibbe,A.H.,Handbook of Pharmaceutical Excipients rd(2000)
- [0678] Kim,Y.D.et al.,Int.J Mol.Med.29(2012):656-662
- [0679] Kobayashi,H.et al.,Oncol Lett.10(2015):612-618
- [0680] Koido,S.et al.,World J Gastroenterol.19(2013):8531-8542
- [0681] Krackhardt,A.M.et al.,Blood 100(2002):2123-2131
- [0682] Krieg,A.M.,Nat Rev.Drug Discov.5(2006):471-484
- [0683] Lederer,M.et al.,Semin.Cancer Biol 29(2014):3-12
- [0684] Lee,M.Y.et al.,J Cell Physiol 224(2010):17-27
- [0685] Lee,W.C.et al.,J Immunother.28(2005):496-504
- [0686] Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie,030/099,
(2014)
- [0687] Leivo,I.et al.,Cancer Genet.Cytogenet.156(2005):104-113
- [0688] Leonetti,M.D.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 109(2012):19274-19279
- [0689] Li,H.et al.,Bull.Cancer 99(2012):E26-E33
- [0690] Li,M.et al.,Clin Cancer Res 11(2005):1809-1814
- [0691] Li,W.M.et al.,J Surg.Oncol(2016)
- [0692] Li,Y.et al.,Cancer Epidemiol.39(2015):8-13
- [0693] Liddy,N.et al.,Nat Med.18(2012):980-987

- [0694] Lin,J.et al.,Clin Cancer Res 10(2004):5708-5716
- [0695] Lin,L.et al.,Oncol Lett.6(2013):740-744
- [0696] Lisitskaia,K.V.et al.,Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol.(2010):34-37
- [0697] Liu,X.et al.,Int.Immunopharmacol.25(2015):416-424
- [0698] Ljunggren,H.G.et al.,J Exp.Med.162(1985):1745-1759
- [0699] Llovet,J.M.et al.,N.Engl.J Med.359(2008):378-390
- [0700] Longenecker,B.M.et al.,Ann N.Y.Acad.Sci.690(1993):276-291
- [0701] Lonsdale,J.,Nat.Genet.45(2013):580-585
- [0702] Lukas,T.J.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78(1981):2791-2795
- [0703] Lundblad,R.L.,Chemical Reagents for Protein Modification 3rd(2004)
- [0704] Luo,C.et al.,Clin Cancer Res 13(2007):1288-1297
- [0705] Mantia-Smaldone,G.M.et al.,Hum.Vaccin.Immunother.8(2012):1179-1191
- [0706] Marten,A.et al.,Cancer Immunol.Immunother.51(2002):637-644
- [0707] Mason,J.M.et al.,Nucleic Acids Res.43(2015):3180-3196
- [0708] Massari,F.et al.,Cancer Treat.Rev.41(2015):114-121
- [0709] Matsueda,S.et al.,World J Gastroenterol.20(2014):1657-1666
- [0710] Maus,M.V.et al.,Blood 123(2014):2625-2635
- [0711] Mayr,C.et al.,Exp.Hematol.34(2006):44-53
- [0712] Mayr,C.et al.,Blood 105(2005):1566-1573
- [0713] Mehta,A.et al.,Breast 23(2014):2-9
- [0714] Meziere,C.et al.,J Immunol 159(1997):3230-3237
- [0715] Miyagi,Y.et al.,Clin Cancer Res 7(2001):3950-3962
- [0716] Miyoshi,Y.et al.,Med.Mol.Morphol.43(2010):193-196
- [0717] Molina,J.R.et al.,Mayo Clin Proc.83(2008):584-594
- [0718] Mongan,N.P.et al.,Mol.Carcinog 45(2006):887-900
- [0719] Morgan,R.A.et al.,Science 314(2006):126-129
- [0720] Mori,M.et al.,Transplantation 64(1997):1017-1027
- [0721] Mortara,L.et al.,Clin Cancer Res.12(2006):3435-3443
- [0722] Moulton,H.M.et al.,Clin Cancer Res 8(2002):2044-2051
- [0723] Mueller,L.N.et al.,J Proteome.Res 7(2008):51-61
- [0724] Mueller,L.N.et al.,Proteomics.7(2007):3470-3480
- [0725] Mumberg,D.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96(1999):8633-8638
- [0726] Murray,G.I.et al.,Histopathology 57(2010):202-211
- [0727] National Cancer Institute,(5-6-2015),www.cancer.gov
- [0728] Noubissi,F.K.et al.,J Invest Dermatol.134(2014):1718-1724
- [0729] Oehlrich,N.et al.,Int.J Cancer 117(2005):256-264
- [0730] Okuno,K.et al.,Exp.Ther Med.2(2011):73-79
- [0731] Ottaviani,S.et al.,Cancer Immunol.Immunother.55(2006):867-872
- [0732] Otte,M.et al.,Cancer Res 61(2001):6682-6687

- [0733] Ozeki,N.et al.,Int.J Mol.Sci.17(2016)
- [0734] Pai,V.P.et al.,Breast Cancer Res 11(2009):R81
- [0735] Palmer,D.H.et al.,Hepatology 49(2009):124-132
- [0736] Palomba,M.L,Curr.Oncol Rep.14(2012):433-440
- [0737] Perez,C.A.et al.,Expert.Rev Anticancer Ther.11(2011):1599-1605
- [0738] Phan,G.Q.et al.,Cancer Control 20(2013):289-297
- [0739] Pineda,C.T.et al.,Cell 160(2015):715-728
- [0740] Pinheiro,J.et al.,nlme:Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- [0741] Plebanski,M.et al.,Eur.J Immunol 25(1995):1783-1787
- [0742] Porta,C.et al.,Virology 202(1994):949-955
- [0743] Porter,D.L.et al.,N.Engl.J Med.365(2011):725-733
- [0744] Prasad,M.L.et al.,Head Neck 26(2004):1053-1057
- [0745] Qian,Z.et al.,Mol.Cancer Res 12(2014):335-347
- [0746] Quinn,D.I.et al.,Urol.Oncol. (2015)
- [0747] Raman,J.D.et al.,Carcinogenesis 27(2006):499-507
- [0748] Rammensee,H.G.et al.,Immunogenetics 50(1999):213-219
- [0749] Reck,M.,Ann.Oncol 23 Suppl 8(2012):viii28-viii34
- [0750] RefSeq,The NCBI handbook[Internet],Chapter 18,(2002),<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- [0751] Reinisch,C.M.et al.,Int.J Exp.Pathol.92(2011):326-332
- [0752] Reinisch,W.et al.,J Immunother.25(2002):489-499
- [0753] Reinmuth,N.et al.,Dtsch.Med.Wochenschr.140(2015):329-333
- [0754] Ries,J.et al.,Int.J Oncol 26(2005):817-824
- [0755] Rinaldi,A.et al.,Pathobiology 77(2010):129-135
- [0756] Rini,B.I.et al.,Curr.Opin.Oncol.20(2008):300-306
- [0757] Rini,B.I.et al.,Cancer 107(2006):67-74
- [0758] Risinger,J.I.et al.,Clin Cancer Res 13(2007):1713-1719
- [0759] Rock,K.L.et al.,Science 249(1990):918-921
- [0760] Rodenko,B.et al.,Nat Protoc.1(2006):1120-1132
- [0761] S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom,032-0100L, (2013)
- [0762] S3-Leitlinie Lungenkarzinom,020/007, (2011)
- [0763] S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore,032-0350L, (2013)
- [0764] S3-Leitlinie Mammakarzinom,032-0450L, (2012)
- [0765] S3-Leitlinie Melanom,032-0240L, (2013)
- [0766] S3-Leitlinie Prostatakarzinom,043/0220L, (2014)
- [0767] Saiki,R.K.et al.,Science 239(1988):487-491
- [0768] Salman,B.et al.,Oncoimmunology.2(2013):e26662
- [0769] Sangro,B.et al.,J Clin Oncol 22(2004):1389-1397

- [0770] Schmidt,S.M.et al.,Cancer Res 64(2004):1164-1170
- [0771] Seeger,F.H.et al.,Immunogenetics 49(1999):571-576
- [0772] Shahzad,M.M.et al.,Cancer Lett.330(2013):123-129
- [0773] Sherman,F.et al.,Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics(1986)
- [0774] Sherman-Baust,C.A.et al.,Cancer Cell 3(2003):377-386
- [0775] Shi,M.et al.,World J Gastroenterol.10(2004):1146-1151
- [0776] Showel,M.M.et al.,F1000Prime.Rep.6(2014):96
- [0777] Siegel,S.et al.,Blood 102(2003):4416-4423
- [0778] Silva,L.P.et al.,Anal.Chem.85(2013):9536-9542
- [0779] Singh-Jasuja,H.et al.,Cancer Immunol.Immunother.53(2004):187-195
- [0780] Skandalis,S.S.et al.,Matrix Biol 35(2014):182-193
- [0781] Small,E.J.et al.,J Clin Oncol.24(2006):3089-3094
- [0782] Smith,M.J.et al.,Br.J Cancer 100(2009):1452-1464
- [0783] Son,M.Y.et al.,Stem Cells 31(2013):2374-2387
- [0784] Springelkamp,H.et al.,Genet.Epidemiol.39(2015):207-216
- [0785] Stahl,M.et al.,Ann.Oncol.24 Suppl 6(2013):vi51-vi56
- [0786] Sturm,M.et al.,BMC.Bioinformatics.9(2008):163
- [0787] Su,Z.et al.,Cancer Res.63(2003):2127-2133
- [0788] Sun,H.et al.,J BUON.20(2015):296-308
- [0789] Szajnik,M.et al.,Gynecol.Obstet. (Sunnyvale.)Suppl 4(2013):3
- [0790] Szarvas,T.et al.,Int J Cancer 135(2014):1596-1604
- [0791] Takayama,T.et al.,Cancer 68(1991):2391-2396
- [0792] Takayama,T.et al.,Lancet 356(2000):802-807
- [0793] Tanaka,F.et al.,Int.J Oncol 10(1997):1113-1117
- [0794] Teufel,R.et al.,Cell Mol Life Sci.62(2005):1755-1762
- [0795] Thakkar,J.P.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.23(2014):1985-1996
- [0796] Thorsen,K.et al.,Mol Cell Proteomics.7(2008):1214-1224
- [0797] Tian,X.et al.,J Transl.Med.13(2015):337
- [0798] Toomey,P.G.et al.,Cancer Control 20(2013):32-42
- [0799] Tradonsky,A.et al.,Am.J Clin Pathol.137(2012):918-930
- [0800] Tran,E.et al.,Science 344(2014):641-645
- [0801] Urgard,E.et al.,Cancer Inform.10(2011):175-183
- [0802] van der Bruggen,P.et al.,Immunol.Rev 188(2002):51-64
- [0803] van,Duin M.et al.,Haematologica 96(2011):1662-1669
- [0804] Velinov,N.et al.,Khirurgiia(Sofiia) (2010):44-49
- [0805] Walter,S.et al.,J Immunol 171(2003):4974-4978
- [0806] Walter,S.et al.,Nat Med.18(2012):1254-1261

- [0807] Wang,G.H.et al.,Oncol Lett.5(2013):544-548
- [0808] Wang,Y.et al.,Anticancer Res 33(2013):207-214
- [0809] Wilhelm,S.M.et al.,Cancer Res 64(2004):7099-7109
- [0810] Willcox,B.E.et al.,Protein Sci.8(1999):2418-2423
- [0811] Wittig,B.et al.,Hum.Gene Ther.12(2001):267-278
- [0812] Wlodarski,M.W.et al.,J Leukoc.Biol 83(2008):589-601
- [0813] World Cancer Report,(2014)
- [0814] Wu,Z.Y.et al.,Scand.J Immunol.74(2011):561-567
- [0815] Xie,X.et al.,Oncol Lett.7(2014):1537-1543
- [0816] Xiong,D.et al.,Carcinogenesis 33(2012):1797-1805
- [0817] Xu,J.et al.,J Mol.Biol 377(2008):28-46
- [0818] Xu,L.et al.,Zhongguo Fei.Ai.Za Zhi.14(2011):727-732
- [0819] Xu,X.et al.,Exp.Mol.Pathol.97(2014):579-584
- [0820] Xu,Y.et al.,Sci.Rep.5(2015):12104
- [0821] Yakimchuk,K.et al.,Mol.Cell Endocrinol.375(2013):121-129
- [0822] Yamada,R.et al.,Tissue Antigens 81(2013):428-434
- [0823] Yang,S.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1772(2007):1033-1040
- [0824] Yao,J.et al.,Cancer Immunol.Res.2(2014):371-379
- [0825] Yin,B.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014a):2934-2941
- [0826] Yu,J.et al.,Gut 64(2015):636-645
- [0827] Yu,W.et al.,Toxicol.Appl.Pharmacol.264(2012):73-83
- [0828] Yuan,R.H.et al.,Ann Surg.Oncol 16(2009):1711-1719
- [0829] Zamuner,F.T.et al.,Mol.Cancer Ther.14(2015):828-834
- [0830] Zaremba,S.et al.,Cancer Res.57(1997):4570-4577
- [0831] Zhan,W.et al.,Clin Res Hepatol.Gastroenterol.(2015)
- [0832] Zhang,H.et al.,Carcinogenesis 35(2014):1863-1871
- [0833] Zhang,J.et al.,Oncotarget.6(2015):42040-42052
- [0834] Zhang,S.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.8(2015):541-550
- [0835] Zhang,X.et al.,Int.J Oncol(2016)
- [0836] Zhao,H.et al.,Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi10(2002):100-102
- [0837] Zou,T.T.et al.,Oncogene 21(2002):4855-4862
- [0838] Follenzi A,et al.Nat Genet.2000 Jun;25(2):217-22.
- [0839] Zufrerey R,et al.J Virol.1999 Apr;73(4):2886-92.
- [0840] Scholten KB,et al.Clin Immunol.2006May;119(2):135-45.
- [0841] Gustafsson C,et al.Trends Biotechnol.2004Jul;22(7):346-53.Review.
- [0842] Kuball,J.,et al.(2007).B/ood 109,2331-2338.
- [0843] Schmitt,T.M.,et al.(2009).Hum.Gene Ther.20,1240-1248

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 伊玛提克斯生物技术有限公司
- [0003] <120> 用于各种肿瘤免疫治疗的新型肽和肽组合物
- [0004] <130> I32799W0
- [0005] <150> GB1505305.1
- [0006] <151> 2015-03-27
- [0007] <150> US62/139,189
- [0008] <151> 2015-03-27
- [0009] <160> 290
- [0010] <170> PatentIn version 3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 9
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0015] <400> 1
- [0016] Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu
- [0017] 1 5
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 10
- [0020] <212> PRT
- [0021] <213> 智人
- [0022] <400> 2
- [0023] Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile
- [0024] 1 5 10
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 11
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 智人
- [0029] <400> 3
- [0030] Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Val Val Gly Val
- [0031] 1 5 10
- [0032] <210> 4
- [0033] <211> 9
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 智人
- [0036] <400> 4
- [0037] Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu
- [0038] 1 5

[0039] <210> 5
[0040] <211> 9
[0041] <212> PRT
[0042] <213> 智人
[0043] <400> 5
[0044] Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu
[0045] 1 5
[0046] <210> 6
[0047] <211> 9
[0048] <212> PRT
[0049] <213> 智人
[0050] <400> 6
[0051] Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu
[0052] 1 5
[0053] <210> 7
[0054] <211> 9
[0055] <212> PRT
[0056] <213> 智人
[0057] <400> 7
[0058] Ala Leu Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu
[0059] 1 5
[0060] <210> 8
[0061] <211> 9
[0062] <212> PRT
[0063] <213> 智人
[0064] <400> 8
[0065] Ala Leu Ser Ser Ser Gln Ala Glu Val
[0066] 1 5
[0067] <210> 9
[0068] <211> 11
[0069] <212> PRT
[0070] <213> 智人
[0071] <400> 9
[0072] Ser Leu Ile Thr Gly Gln Asp Leu Leu Ser Val
[0073] 1 5 10
[0074] <210> 10
[0075] <211> 9
[0076] <212> PRT
[0077] <213> 智人

[0078]	<400> 10
[0079]	Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu
[0080]	1 5
[0081]	<210> 11
[0082]	<211> 9
[0083]	<212> PRT
[0084]	<213> 智人
[0085]	<400> 11
[0086]	Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
[0087]	1 5
[0088]	<210> 12
[0089]	<211> 10
[0090]	<212> PRT
[0091]	<213> 智人
[0092]	<400> 12
[0093]	Arg Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
[0094]	1 5 10
[0095]	<210> 13
[0096]	<211> 9
[0097]	<212> PRT
[0098]	<213> 智人
[0099]	<400> 13
[0100]	Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu
[0101]	1 5
[0102]	<210> 14
[0103]	<211> 9
[0104]	<212> PRT
[0105]	<213> 智人
[0106]	<400> 14
[0107]	Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu
[0108]	1 5
[0109]	<210> 15
[0110]	<211> 9
[0111]	<212> PRT
[0112]	<213> 智人
[0113]	<400> 15
[0114]	Gly Leu Pro Ser Ala Thr Thr Thr Val
[0115]	1 5
[0116]	<210> 16

[0117] <211> 9
[0118] <212> PRT
[0119] <213> 智人
[0120] <400> 16
[0121] Ser Leu Ala Asp Leu Ser Leu Leu Leu
[0122] 1 5
[0123] <210> 17
[0124] <211> 11
[0125] <212> PRT
[0126] <213> 智人
[0127] <400> 17
[0128] Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu
[0129] 1 5 10
[0130] <210> 18
[0131] <211> 9
[0132] <212> PRT
[0133] <213> 智人
[0134] <400> 18
[0135] Lys Thr Ala Ser Ile Asn Gln Asn Val
[0136] 1 5
[0137] <210> 19
[0138] <211> 10
[0139] <212> PRT
[0140] <213> 智人
[0141] <400> 19
[0142] Lys Val Phe Glu Leu Asp Leu Val Thr Leu
[0143] 1 5 10
[0144] <210> 20
[0145] <211> 10
[0146] <212> PRT
[0147] <213> 智人
[0148] <400> 20
[0149] Ala Leu Val Glu Lys Gly Glu Phe Ala Leu
[0150] 1 5 10
[0151] <210> 21
[0152] <211> 9
[0153] <212> PRT
[0154] <213> 智人
[0155] <400> 21

[0156] Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu
[0157] 1 5
[0158] <210> 22
[0159] <211> 9
[0160] <212> PRT
[0161] <213> 智人
[0162] <400> 22
[0163] Leu Met Tyr Pro Tyr Ile Tyr His Val
[0164] 1 5
[0165] <210> 23
[0166] <211> 9
[0167] <212> PRT
[0168] <213> 智人
[0169] <400> 23
[0170] Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala
[0171] 1 5
[0172] <210> 24
[0173] <211> 9
[0174] <212> PRT
[0175] <213> 智人
[0176] <400> 24
[0177] Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu
[0178] 1 5
[0179] <210> 25
[0180] <211> 11
[0181] <212> PRT
[0182] <213> 智人
[0183] <400> 25
[0184] Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
[0185] 1 5 10
[0186] <210> 26
[0187] <211> 9
[0188] <212> PRT
[0189] <213> 智人
[0190] <400> 26
[0191] Val Leu Asp Gly Lys Val Ala Val Val
[0192] 1 5
[0193] <210> 27
[0194] <211> 9

[0195] <212> PRT
[0196] <213> 智人
[0197] <400> 27
[0198] Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr Ser Val
[0199] 1 5
[0200] <210> 28
[0201] <211> 11
[0202] <212> PRT
[0203] <213> 智人
[0204] <400> 28
[0205] Ile Lys Val Thr Asp Pro Gln Leu Leu Glu Leu
[0206] 1 5 10
[0207] <210> 29
[0208] <211> 9
[0209] <212> PRT
[0210] <213> 智人
[0211] <400> 29
[0212] Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu
[0213] 1 5
[0214] <210> 30
[0215] <211> 9
[0216] <212> PRT
[0217] <213> 智人
[0218] <400> 30
[0219] Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu
[0220] 1 5
[0221] <210> 31
[0222] <211> 11
[0223] <212> PRT
[0224] <213> 智人
[0225] <400> 31
[0226] Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala Thr
[0227] 1 5 10
[0228] <210> 32
[0229] <211> 9
[0230] <212> PRT
[0231] <213> 智人
[0232] <400> 32
[0233] Val Val Met Val Leu Val Leu Met Leu

[0234] 1 5
[0235] <210> 33
[0236] <211> 9
[0237] <212> PRT
[0238] <213> 智人
[0239] <400> 33
[0240] Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val
[0241] 1 5
[0242] <210> 34
[0243] <211> 9
[0244] <212> PRT
[0245] <213> 智人
[0246] <400> 34
[0247] Thr Leu Asn Thr Leu Asp Ile Asn Leu
[0248] 1 5
[0249] <210> 35
[0250] <211> 9
[0251] <212> PRT
[0252] <213> 智人
[0253] <400> 35
[0254] Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile
[0255] 1 5
[0256] <210> 36
[0257] <211> 9
[0258] <212> PRT
[0259] <213> 智人
[0260] <400> 36
[0261] Thr Val Leu Gln Glu Leu Ile Asn Val
[0262] 1 5
[0263] <210> 37
[0264] <211> 9
[0265] <212> PRT
[0266] <213> 智人
[0267] <400> 37
[0268] Gln Ile Val Glu Leu Ile Glu Lys Ile
[0269] 1 5
[0270] <210> 38
[0271] <211> 9
[0272] <212> PRT

[0273] <213> 智人
[0274] <400> 38
[0275] Val Leu Gln Gln Glu Ser Asn Phe Leu
[0276] 1 5
[0277] <210> 39
[0278] <211> 9
[0279] <212> PRT
[0280] <213> 智人
[0281] <400> 39
[0282] Tyr Leu Glu Asp Gly Phe Ala Tyr Val
[0283] 1 5
[0284] <210> 40
[0285] <211> 11
[0286] <212> PRT
[0287] <213> 智人
[0288] <400> 40
[0289] Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val
[0290] 1 5 10
[0291] <210> 41
[0292] <211> 9
[0293] <212> PRT
[0294] <213> 智人
[0295] <400> 41
[0296] Ile Val Thr Glu Ile Ile Ser Glu Ile
[0297] 1 5
[0298] <210> 42
[0299] <211> 9
[0300] <212> PRT
[0301] <213> 智人
[0302] <400> 42
[0303] Lys Gln Met Ser Ile Ser Thr Gly Leu
[0304] 1 5
[0305] <210> 43
[0306] <211> 9
[0307] <212> PRT
[0308] <213> 智人
[0309] <400> 43
[0310] Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met
[0311] 1 5

[0312] <210> 44
[0313] <211> 9
[0314] <212> PRT
[0315] <213> 智人
[0316] <400> 44
[0317] Ala Val Phe Asn Leu Val His Val Val
[0318] 1 5
[0319] <210> 45
[0320] <211> 9
[0321] <212> PRT
[0322] <213> 智人
[0323] <400> 45
[0324] Phe Leu Pro Val Ser Val Val Tyr Val
[0325] 1 5
[0326] <210> 46
[0327] <211> 10
[0328] <212> PRT
[0329] <213> 智人
[0330] <400> 46
[0331] Ile Ser Leu Asp Glu Val Ala Val Ser Leu
[0332] 1 5 10
[0333] <210> 47
[0334] <211> 9
[0335] <212> PRT
[0336] <213> 智人
[0337] <400> 47
[0338] Gly Leu Asn Gly Phe Asn Val Leu Leu
[0339] 1 5
[0340] <210> 48
[0341] <211> 10
[0342] <212> PRT
[0343] <213> 智人
[0344] <400> 48
[0345] Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val
[0346] 1 5 10
[0347] <210> 49
[0348] <211> 11
[0349] <212> PRT
[0350] <213> 智人

[0351] <400> 49
[0352] Lys Leu Ile Gly Asn Ile His Gly Asn Glu Val
[0353] 1 5 10
[0354] <210> 50
[0355] <211> 9
[0356] <212> PRT
[0357] <213> 智人
[0358] <400> 50
[0359] Ile Leu Leu Ser Val Leu His Gln Leu
[0360] 1 5
[0361] <210> 51
[0362] <211> 9
[0363] <212> PRT
[0364] <213> 智人
[0365] <400> 51
[0366] Leu Asp Ser Glu Ala Leu Leu Thr Leu
[0367] 1 5
[0368] <210> 52
[0369] <211> 9
[0370] <212> PRT
[0371] <213> 智人
[0372] <400> 52
[0373] Thr Ile Gly Ile Pro Phe Pro Asn Val
[0374] 1 5
[0375] <210> 53
[0376] <211> 9
[0377] <212> PRT
[0378] <213> 智人
[0379] <400> 53
[0380] Ala Gln His Leu Ser Thr Leu Leu Leu
[0381] 1 5
[0382] <210> 54
[0383] <211> 9
[0384] <212> PRT
[0385] <213> 智人
[0386] <400> 54
[0387] Tyr Leu Val Pro Gly Leu Val Ala Ala
[0388] 1 5
[0389] <210> 55

[0390] <211> 9
[0391] <212> PRT
[0392] <213> 智人
[0393] <400> 55
[0394] His Leu Phe Asp Lys Ile Ile Lys Ile
[0395] 1 5
[0396] <210> 56
[0397] <211> 13
[0398] <212> PRT
[0399] <213> 智人
[0400] <400> 56
[0401] Val Leu Gln Glu Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Asn Leu
[0402] 1 5 10
[0403] <210> 57
[0404] <211> 10
[0405] <212> PRT
[0406] <213> 智人
[0407] <400> 57
[0408] Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Phe Asp Tyr Val
[0409] 1 5 10
[0410] <210> 58
[0411] <211> 11
[0412] <212> PRT
[0413] <213> 智人
[0414] <400> 58
[0415] His Leu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Ala Gln Val
[0416] 1 5 10
[0417] <210> 59
[0418] <211> 11
[0419] <212> PRT
[0420] <213> 智人
[0421] <400> 59
[0422] Ala Leu Ala Asp Gly Ile Lys Ser Phe Leu Leu
[0423] 1 5 10
[0424] <210> 60
[0425] <211> 10
[0426] <212> PRT
[0427] <213> 智人
[0428] <400> 60

[0429] Tyr Leu Phe Ser Gln Gly Leu Gln Gly Leu
[0430] 1 5 10
[0431] <210> 61
[0432] <211> 9
[0433] <212> PRT
[0434] <213> 智人
[0435] <400> 61
[0436] Ala Leu Tyr Pro Lys Glu Ile Thr Leu
[0437] 1 5
[0438] <210> 62
[0439] <211> 9
[0440] <212> PRT
[0441] <213> 智人
[0442] <400> 62
[0443] Ser Leu Val Glu Asn Ile His Val Leu
[0444] 1 5
[0445] <210> 63
[0446] <211> 9
[0447] <212> PRT
[0448] <213> 智人
[0449] <400> 63
[0450] Lys Leu Leu Pro Met Val Ile Gln Leu
[0451] 1 5
[0452] <210> 64
[0453] <211> 10
[0454] <212> PRT
[0455] <213> 智人
[0456] <400> 64
[0457] Ser Leu Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Gln Val
[0458] 1 5 10
[0459] <210> 65
[0460] <211> 9
[0461] <212> PRT
[0462] <213> 智人
[0463] <400> 65
[0464] Ser Leu Ser Glu Lys Ser Pro Glu Val
[0465] 1 5
[0466] <210> 66
[0467] <211> 10

[0468] <212> PRT
[0469] <213> 智人
[0470] <400> 66
[0471] Ala Met Phe Pro Asp Thr Ile Pro Arg Val
[0472] 1 5 10
[0473] <210> 67
[0474] <211> 9
[0475] <212> PRT
[0476] <213> 智人
[0477] <400> 67
[0478] Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala
[0479] 1 5
[0480] <210> 68
[0481] <211> 9
[0482] <212> PRT
[0483] <213> 智人
[0484] <400> 68
[0485] Gln Leu Met Asn Leu Ile Arg Ser Val
[0486] 1 5
[0487] <210> 69
[0488] <211> 10
[0489] <212> PRT
[0490] <213> 智人
[0491] <400> 69
[0492] Leu Lys Val Leu Lys Ala Asp Val Val Leu
[0493] 1 5 10
[0494] <210> 70
[0495] <211> 9
[0496] <212> PRT
[0497] <213> 智人
[0498] <400> 70
[0499] Gly Leu Thr Glu Lys Thr Val Leu Val
[0500] 1 5
[0501] <210> 71
[0502] <211> 9
[0503] <212> PRT
[0504] <213> 智人
[0505] <400> 71
[0506] His Met Ser Gly Lys Leu Thr Asn Val

[0507]	1	5
[0508]	<210> 72	
[0509]	<211> 9	
[0510]	<212> PRT	
[0511]	<213> 智人	
[0512]	<400> 72	
[0513]	Val Leu Ser Thr Arg Val Thr Asn Val	
[0514]	1	5
[0515]	<210> 73	
[0516]	<211> 8	
[0517]	<212> PRT	
[0518]	<213> 智人	
[0519]	<400> 73	
[0520]	Ser Val Pro Lys Thr Leu Gly Val	
[0521]	1	5
[0522]	<210> 74	
[0523]	<211> 9	
[0524]	<212> PRT	
[0525]	<213> 智人	
[0526]	<400> 74	
[0527]	Gly Leu Ala Phe Leu Pro Ala Ser Val	
[0528]	1	5
[0529]	<210> 75	
[0530]	<211> 9	
[0531]	<212> PRT	
[0532]	<213> 智人	
[0533]	<400> 75	
[0534]	Ala Leu Leu Asp Gly Ala Leu Gln Leu	
[0535]	1	5
[0536]	<210> 76	
[0537]	<211> 9	
[0538]	<212> PRT	
[0539]	<213> 智人	
[0540]	<400> 76	
[0541]	Phe Thr Ala Glu Phe Leu Glu Lys Val	
[0542]	1	5
[0543]	<210> 77	
[0544]	<211> 9	
[0545]	<212> PRT	

[0546] <213> 智人
[0547] <400> 77
[0548] Ala Leu Tyr Gly Asn Val Gln Gln Val
[0549] 1 5
[0550] <210> 78
[0551] <211> 9
[0552] <212> PRT
[0553] <213> 智人
[0554] <400> 78
[0555] Leu Phe Gln Ser Arg Ile Ala Gly Val
[0556] 1 5
[0557] <210> 79
[0558] <211> 10
[0559] <212> PRT
[0560] <213> 智人
[0561] <400> 79
[0562] Thr Val Leu Glu Glu Ile Gly Asn Arg Val
[0563] 1 5 10
[0564] <210> 80
[0565] <211> 9
[0566] <212> PRT
[0567] <213> 智人
[0568] <400> 80
[0569] Val Leu Thr Gly Gln Val His Glu Leu
[0570] 1 5
[0571] <210> 81
[0572] <211> 9
[0573] <212> PRT
[0574] <213> 智人
[0575] <400> 81
[0576] Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile
[0577] 1 5
[0578] <210> 82
[0579] <211> 11
[0580] <212> PRT
[0581] <213> 智人
[0582] <400> 82
[0583] Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val
[0584] 1 5 10

[0585] <210> 83
[0586] <211> 9
[0587] <212> PRT
[0588] <213> 智人
[0589] <400> 83
[0590] Gly Leu Leu Glu Asn Ser Pro His Leu
[0591] 1 5
[0592] <210> 84
[0593] <211> 9
[0594] <212> PRT
[0595] <213> 智人
[0596] <400> 84
[0597] Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu
[0598] 1 5
[0599] <210> 85
[0600] <211> 10
[0601] <212> PRT
[0602] <213> 智人
[0603] <400> 85
[0604] Lys Leu Leu Asp Lys Pro Glu Gln Phe Leu
[0605] 1 5 10
[0606] <210> 86
[0607] <211> 9
[0608] <212> PRT
[0609] <213> 智人
[0610] <400> 86
[0611] Ser Leu Phe Ser Asn Ile Glu Ser Val
[0612] 1 5
[0613] <210> 87
[0614] <211> 9
[0615] <212> PRT
[0616] <213> 智人
[0617] <400> 87
[0618] Lys Leu Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ala
[0619] 1 5
[0620] <210> 88
[0621] <211> 10
[0622] <212> PRT
[0623] <213> 智人

[0624] <400> 88
[0625] Leu Leu Leu Pro Leu Glu Leu Ser Leu Ala
[0626] 1 5 10
[0627] <210> 89
[0628] <211> 9
[0629] <212> PRT
[0630] <213> 智人
[0631] <400> 89
[0632] Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val
[0633] 1 5
[0634] <210> 90
[0635] <211> 11
[0636] <212> PRT
[0637] <213> 智人
[0638] <400> 90
[0639] Ala Ile Leu Asn Val Asp Glu Lys Asn Gln Val
[0640] 1 5 10
[0641] <210> 91
[0642] <211> 9
[0643] <212> PRT
[0644] <213> 智人
[0645] <400> 91
[0646] Leu Leu Pro Ser Ile Phe Leu Met Val
[0647] 1 5
[0648] <210> 92
[0649] <211> 9
[0650] <212> PRT
[0651] <213> 智人
[0652] <400> 92
[0653] Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val
[0654] 1 5
[0655] <210> 93
[0656] <211> 9
[0657] <212> PRT
[0658] <213> 智人
[0659] <400> 93
[0660] Arg Leu Tyr Gly Tyr Phe His Asp Ala
[0661] 1 5
[0662] <210> 94

[0663] <211> 9
[0664] <212> PRT
[0665] <213> 智人
[0666] <400> 94
[0667] Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe Met Leu
[0668] 1 5
[0669] <210> 95
[0670] <211> 11
[0671] <212> PRT
[0672] <213> 智人
[0673] <400> 95
[0674] Lys Leu Ile Asp Glu Asp Glu Pro Leu Phe Leu
[0675] 1 5 10
[0676] <210> 96
[0677] <211> 9
[0678] <212> PRT
[0679] <213> 智人
[0680] <400> 96
[0681] Ala Leu Asp Thr Thr Arg His Glu Leu
[0682] 1 5
[0683] <210> 97
[0684] <211> 9
[0685] <212> PRT
[0686] <213> 智人
[0687] <400> 97
[0688] Lys Leu Phe Glu Lys Ser Thr Gly Leu
[0689] 1 5
[0690] <210> 98
[0691] <211> 9
[0692] <212> PRT
[0693] <213> 智人
[0694] <400> 98
[0695] Phe Val Gln Glu Lys Ile Pro Glu Leu
[0696] 1 5
[0697] <210> 99
[0698] <211> 10
[0699] <212> PRT
[0700] <213> 智人
[0701] <400> 99

[0702]	Thr Leu Phe Gly Ile Gln Leu Thr Glu Ala
[0703]	1 5 10
[0704]	<210> 100
[0705]	<211> 9
[0706]	<212> PRT
[0707]	<213> 智人
[0708]	<400> 100
[0709]	Ala Leu Gln Ser Phe Glu Phe Arg Val
[0710]	1 5
[0711]	<210> 101
[0712]	<211> 11
[0713]	<212> PRT
[0714]	<213> 智人
[0715]	<400> 101
[0716]	Ser Leu Leu Glu Val Asn Glu Ala Ser Ser Val
[0717]	1 5 10
[0718]	<210> 102
[0719]	<211> 10
[0720]	<212> PRT
[0721]	<213> 智人
[0722]	<400> 102
[0723]	Gly Leu Tyr Pro Val Thr Leu Val Gly Val
[0724]	1 5 10
[0725]	<210> 103
[0726]	<211> 9
[0727]	<212> PRT
[0728]	<213> 智人
[0729]	<400> 103
[0730]	Tyr Leu Ala Asp Thr Val Gln Lys Leu
[0731]	1 5
[0732]	<210> 104
[0733]	<211> 12
[0734]	<212> PRT
[0735]	<213> 智人
[0736]	<400> 104
[0737]	Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr
[0738]	1 5 10
[0739]	<210> 105
[0740]	<211> 9

[0741] <212> PRT
[0742] <213> 智人
[0743] <400> 105
[0744] Ala Met Leu Ala Ser Gln Thr Glu Ala
[0745] 1 5
[0746] <210> 106
[0747] <211> 10
[0748] <212> PRT
[0749] <213> 智人
[0750] <400> 106
[0751] Val Leu Leu Gly Ser Val Val Ile Phe Ala
[0752] 1 5 10
[0753] <210> 107
[0754] <211> 11
[0755] <212> PRT
[0756] <213> 智人
[0757] <400> 107
[0758] Arg Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val
[0759] 1 5 10
[0760] <210> 108
[0761] <211> 11
[0762] <212> PRT
[0763] <213> 智人
[0764] <400> 108
[0765] Phe Ile Ala Asn Leu Pro Pro Glu Leu Lys Ala
[0766] 1 5 10
[0767] <210> 109
[0768] <211> 9
[0769] <212> PRT
[0770] <213> 智人
[0771] <400> 109
[0772] Ile Leu Gly Ser Phe Glu Leu Gln Leu
[0773] 1 5
[0774] <210> 110
[0775] <211> 9
[0776] <212> PRT
[0777] <213> 智人
[0778] <400> 110
[0779] Gln Ile Gln Gly Gln Val Ser Glu Val

[0780]	1	5	
[0781]	<210>	111	
[0782]	<211>	10	
[0783]	<212>	PRT	
[0784]	<213>	智人	
[0785]	<400>	111	
[0786]	Ala Gln Leu Glu Gly Lys Leu Val Ser Ile		
[0787]	1	5	10
[0788]	<210>	112	
[0789]	<211>	9	
[0790]	<212>	PRT	
[0791]	<213>	智人	
[0792]	<400>	112	
[0793]	Ile Leu Ala Gln Asp Val Ala Gln Leu		
[0794]	1	5	
[0795]	<210>	113	
[0796]	<211>	9	
[0797]	<212>	PRT	
[0798]	<213>	智人	
[0799]	<400>	113	
[0800]	Phe Leu Phe Leu Lys Glu Val Lys Val		
[0801]	1	5	
[0802]	<210>	114	
[0803]	<211>	10	
[0804]	<212>	PRT	
[0805]	<213>	智人	
[0806]	<400>	114	
[0807]	Leu Leu Phe Pro Ser Asp Val Gln Thr Leu		
[0808]	1	5	10
[0809]	<210>	115	
[0810]	<211>	9	
[0811]	<212>	PRT	
[0812]	<213>	智人	
[0813]	<400>	115	
[0814]	Ile Leu His Gly Glu Val Asn Lys Val		
[0815]	1	5	
[0816]	<210>	116	
[0817]	<211>	9	
[0818]	<212>	PRT	

[0819]	<213>	智人	
[0820]	<400>	116	
[0821]	Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala		
[0822]	1	5	
[0823]	<210>	117	
[0824]	<211>	9	
[0825]	<212>	PRT	
[0826]	<213>	智人	
[0827]	<400>	117	
[0828]	Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala		
[0829]	1	5	
[0830]	<210>	118	
[0831]	<211>	10	
[0832]	<212>	PRT	
[0833]	<213>	智人	
[0834]	<400>	118	
[0835]	Ile Ala Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu		
[0836]	1	5	10
[0837]	<210>	119	
[0838]	<211>	9	
[0839]	<212>	PRT	
[0840]	<213>	智人	
[0841]	<400>	119	
[0842]	Ser Leu Ile Glu Glu Ser Glu Glu Leu		
[0843]	1	5	
[0844]	<210>	120	
[0845]	<211>	11	
[0846]	<212>	PRT	
[0847]	<213>	智人	
[0848]	<400>	120	
[0849]	Leu Gln Leu Ser Pro Leu Lys Gly Leu Ser Leu		
[0850]	1	5	10
[0851]	<210>	121	
[0852]	<211>	9	
[0853]	<212>	PRT	
[0854]	<213>	智人	
[0855]	<400>	121	
[0856]	Ala Leu Tyr Val Gln Ala Pro Thr Val		
[0857]	1	5	

[0858] <210> 122
[0859] <211> 9
[0860] <212> PRT
[0861] <213> 智人
[0862] <400> 122
[0863] Ser Ile Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val
[0864] 1 5
[0865] <210> 123
[0866] <211> 11
[0867] <212> PRT
[0868] <213> 智人
[0869] <400> 123
[0870] Gln Thr Ala Pro Glu Glu Ala Phe Ile Lys Leu
[0871] 1 5 10
[0872] <210> 124
[0873] <211> 9
[0874] <212> PRT
[0875] <213> 智人
[0876] <400> 124
[0877] Ala Leu Leu Leu Arg Leu Phe Thr Ile
[0878] 1 5
[0879] <210> 125
[0880] <211> 9
[0881] <212> PRT
[0882] <213> 智人
[0883] <400> 125
[0884] Ala Ala Leu Glu Val Leu Ala Glu Val
[0885] 1 5
[0886] <210> 126
[0887] <211> 9
[0888] <212> PRT
[0889] <213> 智人
[0890] <400> 126
[0891] Gln Leu Arg Glu Ala Phe Glu Gln Leu
[0892] 1 5
[0893] <210> 127
[0894] <211> 11
[0895] <212> PRT
[0896] <213> 智人

[0897] <400> 127
[0898] Ile Met Lys Ala Thr Gly Leu Gly Ile Gln Leu
[0899] 1 5 10
[0900] <210> 128
[0901] <211> 9
[0902] <212> PRT
[0903] <213> 智人
[0904] <400> 128
[0905] Ser Ile Leu Thr Asn Ile Ser Glu Val
[0906] 1 5
[0907] <210> 129
[0908] <211> 9
[0909] <212> PRT
[0910] <213> 智人
[0911] <400> 129
[0912] Lys Met Ala Ser Lys Val Thr Gln Val
[0913] 1 5
[0914] <210> 130
[0915] <211> 9
[0916] <212> PRT
[0917] <213> 智人
[0918] <400> 130
[0919] Gln Leu Tyr Gly Ser Ala Ile Thr Leu
[0920] 1 5
[0921] <210> 131
[0922] <211> 9
[0923] <212> PRT
[0924] <213> 智人
[0925] <400> 131
[0926] Ser Leu Tyr Pro His Phe Thr Leu Leu
[0927] 1 5
[0928] <210> 132
[0929] <211> 9
[0930] <212> PRT
[0931] <213> 智人
[0932] <400> 132
[0933] Ala Leu Leu Asn Asn Val Ile Glu Val
[0934] 1 5
[0935] <210> 133

[0936] <211> 9
[0937] <212> PRT
[0938] <213> 智人
[0939] <400> 133
[0940] Phe Leu Asp Gly Arg Pro Leu Thr Leu
[0941] 1 5
[0942] <210> 134
[0943] <211> 9
[0944] <212> PRT
[0945] <213> 智人
[0946] <400> 134
[0947] Ser Leu Tyr Lys Ser Phe Leu Gln Leu
[0948] 1 5
[0949] <210> 135
[0950] <211> 9
[0951] <212> PRT
[0952] <213> 智人
[0953] <400> 135
[0954] His Leu Asp Thr Val Lys Ile Glu Val
[0955] 1 5
[0956] <210> 136
[0957] <211> 9
[0958] <212> PRT
[0959] <213> 智人
[0960] <400> 136
[0961] Leu Leu Trp Asp Ala Pro Ala Lys Cys
[0962] 1 5
[0963] <210> 137
[0964] <211> 10
[0965] <212> PRT
[0966] <213> 智人
[0967] <400> 137
[0968] Lys Leu Ile Tyr Lys Asp Leu Val Ser Val
[0969] 1 5 10
[0970] <210> 138
[0971] <211> 9
[0972] <212> PRT
[0973] <213> 智人
[0974] <400> 138

[0975] Gly Ile Ile Asn Lys Leu Val Thr Val
[0976] 1 5
[0977] <210> 139
[0978] <211> 9
[0979] <212> PRT
[0980] <213> 智人
[0981] <400> 139
[0982] Ile Ile Leu Glu Asn Ile Gln Ser Leu
[0983] 1 5
[0984] <210> 140
[0985] <211> 9
[0986] <212> PRT
[0987] <213> 智人
[0988] <400> 140
[0989] Phe Leu Asp Ser Gln Ile Thr Thr Val
[0990] 1 5
[0991] <210> 141
[0992] <211> 9
[0993] <212> PRT
[0994] <213> 智人
[0995] <400> 141
[0996] Asn Ile Asp Ile Asn Asn Asn Glu Leu
[0997] 1 5
[0998] <210> 142
[0999] <211> 9
[1000] <212> PRT
[1001] <213> 智人
[1002] <400> 142
[1003] Leu Leu Asp Ala Ala His Ala Ser Ile
[1004] 1 5
[1005] <210> 143
[1006] <211> 9
[1007] <212> PRT
[1008] <213> 智人
[1009] <400> 143
[1010] Met Leu Trp Glu Ser Ile Met Arg Val
[1011] 1 5
[1012] <210> 144
[1013] <211> 9

[1014] <212> PRT
[1015] <213> 智人
[1016] <400> 144
[1017] Phe Leu Ile Ser Gln Thr Pro Leu Leu
[1018] 1 5
[1019] <210> 145
[1020] <211> 9
[1021] <212> PRT
[1022] <213> 智人
[1023] <400> 145
[1024] Ala Leu Glu Glu Lys Leu Glu Asn Val
[1025] 1 5
[1026] <210> 146
[1027] <211> 9
[1028] <212> PRT
[1029] <213> 智人
[1030] <400> 146
[1031] Val Val Ala Ala His Leu Ala Gly Ala
[1032] 1 5
[1033] <210> 147
[1034] <211> 9
[1035] <212> PRT
[1036] <213> 智人
[1037] <400> 147
[1038] Gly Leu Leu Ser Ala Leu Glu Asn Val
[1039] 1 5
[1040] <210> 148
[1041] <211> 9
[1042] <212> PRT
[1043] <213> 智人
[1044] <400> 148
[1045] Tyr Leu Ile Leu Ser Ser His Gln Leu
[1046] 1 5
[1047] <210> 149
[1048] <211> 10
[1049] <212> PRT
[1050] <213> 智人
[1051] <400> 149
[1052] Asn Met Ala Asp Gly Gln Leu His Gln Val

[1053]	1	5	10
[1054]	<210>	150	
[1055]	<211>	9	
[1056]	<212>	PRT	
[1057]	<213>	智人	
[1058]	<400>	150	
[1059]	Val Leu Leu Asp Met Val His Ser Leu		
[1060]	1	5	
[1061]	<210>	151	
[1062]	<211>	9	
[1063]	<212>	PRT	
[1064]	<213>	智人	
[1065]	<400>	151	
[1066]	Asp Ile Ser Lys Arg Ile Gln Ser Leu		
[1067]	1	5	
[1068]	<210>	152	
[1069]	<211>	9	
[1070]	<212>	PRT	
[1071]	<213>	智人	
[1072]	<400>	152	
[1073]	Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu		
[1074]	1	5	
[1075]	<210>	153	
[1076]	<211>	9	
[1077]	<212>	PRT	
[1078]	<213>	智人	
[1079]	<400>	153	
[1080]	Lys Leu Val Glu Leu Glu His Thr Leu		
[1081]	1	5	
[1082]	<210>	154	
[1083]	<211>	9	
[1084]	<212>	PRT	
[1085]	<213>	智人	
[1086]	<400>	154	
[1087]	Ala Ile Ile Lys Glu Ile Gln Thr Val		
[1088]	1	5	
[1089]	<210>	155	
[1090]	<211>	9	
[1091]	<212>	PRT	

[1092] <213> 智人
[1093] <400> 155
[1094] Thr Leu Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Val
[1095] 1 5
[1096] <210> 156
[1097] <211> 9
[1098] <212> PRT
[1099] <213> 智人
[1100] <400> 156
[1101] Val Ile Leu Thr Ser Ser Pro Phe Leu
[1102] 1 5
[1103] <210> 157
[1104] <211> 9
[1105] <212> PRT
[1106] <213> 智人
[1107] <400> 157
[1108] Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val
[1109] 1 5
[1110] <210> 158
[1111] <211> 9
[1112] <212> PRT
[1113] <213> 智人
[1114] <400> 158
[1115] Tyr Leu Asp Pro Leu Trp His Gln Leu
[1116] 1 5
[1117] <210> 159
[1118] <211> 9
[1119] <212> PRT
[1120] <213> 智人
[1121] <400> 159
[1122] Gln Leu Gly Pro Val Pro Val Thr Ile
[1123] 1 5
[1124] <210> 160
[1125] <211> 9
[1126] <212> PRT
[1127] <213> 智人
[1128] <400> 160
[1129] Thr Leu Gln Glu Trp Leu Thr Glu Val
[1130] 1 5

[1131]	<210>	161	
[1132]	<211>	9	
[1133]	<212>	PRT	
[1134]	<213>	智人	
[1135]	<400>	161	
[1136]	Asn Leu Leu Asp Glu Asn Val Cys Leu		
[1137]	1	5	
[1138]	<210>	162	
[1139]	<211>	10	
[1140]	<212>	PRT	
[1141]	<213>	智人	
[1142]	<400>	162	
[1143]	Gly Leu Leu Gly Asn Leu Leu Thr Ser Leu		
[1144]	1	5	10
[1145]	<210>	163	
[1146]	<211>	9	
[1147]	<212>	PRT	
[1148]	<213>	智人	
[1149]	<400>	163	
[1150]	Gly Leu Glu Glu Arg Leu Tyr Thr Ala		
[1151]	1	5	
[1152]	<210>	164	
[1153]	<211>	9	
[1154]	<212>	PRT	
[1155]	<213>	智人	
[1156]	<400>	164	
[1157]	Met Leu Ile Ile Arg Val Pro Ser Val		
[1158]	1	5	
[1159]	<210>	165	
[1160]	<211>	9	
[1161]	<212>	PRT	
[1162]	<213>	智人	
[1163]	<400>	165	
[1164]	Ser Leu Leu Asp Tyr Glu Val Ser Ile		
[1165]	1	5	
[1166]	<210>	166	
[1167]	<211>	9	
[1168]	<212>	PRT	
[1169]	<213>	智人	

[1170]	<400> 166
[1171]	Leu Leu Gly Asp Ser Ser Phe Phe Leu
[1172]	1 5
[1173]	<210> 167
[1174]	<211> 11
[1175]	<212> PRT
[1176]	<213> 智人
[1177]	<400> 167
[1178]	Leu Val Val Asp Glu Gly Ser Leu Val Ser Val
[1179]	1 5 10
[1180]	<210> 168
[1181]	<211> 10
[1182]	<212> PRT
[1183]	<213> 智人
[1184]	<400> 168
[1185]	Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu
[1186]	1 5 10
[1187]	<210> 169
[1188]	<211> 9
[1189]	<212> PRT
[1190]	<213> 智人
[1191]	<400> 169
[1192]	Ala Leu Ala Asp Leu Ser Val Ala Val
[1193]	1 5
[1194]	<210> 170
[1195]	<211> 9
[1196]	<212> PRT
[1197]	<213> 智人
[1198]	<400> 170
[1199]	Phe Ile Ala Ala Val Val Glu Lys Val
[1200]	1 5
[1201]	<210> 171
[1202]	<211> 9
[1203]	<212> PRT
[1204]	<213> 智人
[1205]	<400> 171
[1206]	Leu Leu Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala
[1207]	1 5
[1208]	<210> 172

[1209]	<211>	12	
[1210]	<212>	PRT	
[1211]	<213>	智人	
[1212]	<400>	172	
[1213]	Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu		
[1214]	1	5	10
[1215]	<210>	173	
[1216]	<211>	9	
[1217]	<212>	PRT	
[1218]	<213>	智人	
[1219]	<400>	173	
[1220]	Arg Leu Ile Asp Ile Tyr Lys Asn Val		
[1221]	1	5	
[1222]	<210>	174	
[1223]	<211>	10	
[1224]	<212>	PRT	
[1225]	<213>	智人	
[1226]	<400>	174	
[1227]	Ala Leu Tyr Ser Gly Asp Leu His Ala Ala		
[1228]	1	5	10
[1229]	<210>	175	
[1230]	<211>	9	
[1231]	<212>	PRT	
[1232]	<213>	智人	
[1233]	<400>	175	
[1234]	Ser Leu Leu Asp Leu Val Gln Ser Leu		
[1235]	1	5	
[1236]	<210>	176	
[1237]	<211>	9	
[1238]	<212>	PRT	
[1239]	<213>	智人	
[1240]	<400>	176	
[1241]	Val Gln Ser Gly Leu Arg Ile Leu Leu		
[1242]	1	5	
[1243]	<210>	177	
[1244]	<211>	9	
[1245]	<212>	PRT	
[1246]	<213>	智人	
[1247]	<400>	177	

[1248] Ala Leu Ile Asn Val Leu Asn Ala Leu
[1249] 1 5
[1250] <210> 178
[1251] <211> 9
[1252] <212> PRT
[1253] <213> 智人
[1254] <400> 178
[1255] Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu
[1256] 1 5
[1257] <210> 179
[1258] <211> 9
[1259] <212> PRT
[1260] <213> 智人
[1261] <400> 179
[1262] Thr Leu Gly Glu Ile Ile Lys Gly Val
[1263] 1 5
[1264] <210> 180
[1265] <211> 9
[1266] <212> PRT
[1267] <213> 智人
[1268] <400> 180
[1269] Arg Leu Tyr Glu Glu Glu Ile Arg Ile
[1270] 1 5
[1271] <210> 181
[1272] <211> 9
[1273] <212> PRT
[1274] <213> 智人
[1275] <400> 181
[1276] Leu Leu Trp Ala Pro Thr Ala Gln Ala
[1277] 1 5
[1278] <210> 182
[1279] <211> 10
[1280] <212> PRT
[1281] <213> 智人
[1282] <400> 182
[1283] Gly Leu Gln Asp Gly Phe Gln Ile Thr Val
[1284] 1 5 10
[1285] <210> 183
[1286] <211> 9

[1287]	<212>	PRT
[1288]	<213>	智人
[1289]	<400>	183
[1290]	Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Pro Tyr Leu	
[1291]	1	5
[1292]	<210>	184
[1293]	<211>	9
[1294]	<212>	PRT
[1295]	<213>	智人
[1296]	<400>	184
[1297]	Ala Leu Asp Ser Thr Ile Ala His Leu	
[1298]	1	5
[1299]	<210>	185
[1300]	<211>	10
[1301]	<212>	PRT
[1302]	<213>	智人
[1303]	<400>	185
[1304]	Thr Leu Tyr Gln Gly Leu Pro Ala Glu Val	
[1305]	1	5 10
[1306]	<210>	186
[1307]	<211>	9
[1308]	<212>	PRT
[1309]	<213>	智人
[1310]	<400>	186
[1311]	Ser Leu Leu Ser Leu Glu Ser Arg Leu	
[1312]	1	5
[1313]	<210>	187
[1314]	<211>	9
[1315]	<212>	PRT
[1316]	<213>	智人
[1317]	<400>	187
[1318]	Ser Ile Leu Lys Glu Asp Pro Phe Leu	
[1319]	1	5
[1320]	<210>	188
[1321]	<211>	9
[1322]	<212>	PRT
[1323]	<213>	智人
[1324]	<400>	188
[1325]	Val Leu Gly Glu Glu Gln Glu Gly Val	

[1326]	1	5
[1327]	<210> 189	
[1328]	<211> 9	
[1329]	<212> PRT	
[1330]	<213> 智人	
[1331]	<400> 189	
[1332]	Met Ala Val Ser Asp Leu Leu Ile Leu	
[1333]	1	5
[1334]	<210> 190	
[1335]	<211> 9	
[1336]	<212> PRT	
[1337]	<213> 智人	
[1338]	<400> 190	
[1339]	Ser Leu Ser Thr Glu Leu Phe Lys Val	
[1340]	1	5
[1341]	<210> 191	
[1342]	<211> 9	
[1343]	<212> PRT	
[1344]	<213> 智人	
[1345]	<400> 191	
[1346]	Ala Ala Ile Glu Ile Phe Glu Lys Val	
[1347]	1	5
[1348]	<210> 192	
[1349]	<211> 11	
[1350]	<212> PRT	
[1351]	<213> 智人	
[1352]	<400> 192	
[1353]	Thr Leu Leu Pro Ser Ser Gly Leu Val Thr Leu	
[1354]	1	5 10
[1355]	<210> 193	
[1356]	<211> 9	
[1357]	<212> PRT	
[1358]	<213> 智人	
[1359]	<400> 193	
[1360]	Ala Leu Phe His Met Asn Ile Leu Leu	
[1361]	1	5
[1362]	<210> 194	
[1363]	<211> 9	
[1364]	<212> PRT	

[1365]	<213>	智人
[1366]	<400>	194
[1367]	Lys Leu Leu Glu Glu Val Gln Leu Leu	
[1368]	1	5
[1369]	<210>	195
[1370]	<211>	9
[1371]	<212>	PRT
[1372]	<213>	智人
[1373]	<400>	195
[1374]	Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala Leu	
[1375]	1	5
[1376]	<210>	196
[1377]	<211>	9
[1378]	<212>	PRT
[1379]	<213>	智人
[1380]	<400>	196
[1381]	Thr Leu His Gln Trp Ile Tyr Tyr Leu	
[1382]	1	5
[1383]	<210>	197
[1384]	<211>	10
[1385]	<212>	PRT
[1386]	<213>	智人
[1387]	<400>	197
[1388]	Leu Gly Gly Pro Thr Ser Leu Leu His Val	
[1389]	1	5 10
[1390]	<210>	198
[1391]	<211>	9
[1392]	<212>	PRT
[1393]	<213>	智人
[1394]	<400>	198
[1395]	Ile Leu Thr Asn Lys Val Val Ser Val	
[1396]	1	5
[1397]	<210>	199
[1398]	<211>	9
[1399]	<212>	PRT
[1400]	<213>	智人
[1401]	<400>	199
[1402]	Ser Val Ala Asp Leu Ala His Val Leu	
[1403]	1	5

[1404]	<210>	200	
[1405]	<211>	10	
[1406]	<212>	PRT	
[1407]	<213>	智人	
[1408]	<400>	200	
[1409]	Ile Met Pro Thr Phe Asp Leu Thr Lys Val		
[1410]	1	5	10
[1411]	<210>	201	
[1412]	<211>	9	
[1413]	<212>	PRT	
[1414]	<213>	智人	
[1415]	<400>	201	
[1416]	Leu Leu Phe Ser Leu Leu Cys Glu Ala		
[1417]	1	5	
[1418]	<210>	202	
[1419]	<211>	9	
[1420]	<212>	PRT	
[1421]	<213>	智人	
[1422]	<400>	202	
[1423]	Ala Leu Ala Lys Asp Glu Leu Ser Leu		
[1424]	1	5	
[1425]	<210>	203	
[1426]	<211>	9	
[1427]	<212>	PRT	
[1428]	<213>	智人	
[1429]	<400>	203	
[1430]	Phe Leu Phe Val Asp Pro Glu Leu Val		
[1431]	1	5	
[1432]	<210>	204	
[1433]	<211>	11	
[1434]	<212>	PRT	
[1435]	<213>	智人	
[1436]	<400>	204	
[1437]	Ser Glu Trp Gly Ser Pro His Ala Ala Val Pro		
[1438]	1	5	10
[1439]	<210>	205	
[1440]	<211>	9	
[1441]	<212>	PRT	
[1442]	<213>	智人	

[1443] <400> 205
[1444] Leu Ala Phe Gly Tyr Asp Asp Glu Leu
[1445] 1 5
[1446] <210> 206
[1447] <211> 9
[1448] <212> PRT
[1449] <213> 智人
[1450] <400> 206
[1451] Gly Leu Asp Ala Phe Arg Ile Phe Leu
[1452] 1 5
[1453] <210> 207
[1454] <211> 9
[1455] <212> PRT
[1456] <213> 智人
[1457] <400> 207
[1458] Lys Leu Phe Glu Thr Val Glu Glu Leu
[1459] 1 5
[1460] <210> 208
[1461] <211> 9
[1462] <212> PRT
[1463] <213> 智人
[1464] <400> 208
[1465] His Leu Asn Asn Asp Arg Asn Pro Leu
[1466] 1 5
[1467] <210> 209
[1468] <211> 10
[1469] <212> PRT
[1470] <213> 智人
[1471] <400> 209
[1472] Val Leu Gln Thr Glu Glu Leu Val Ala Asn
[1473] 1 5 10
[1474] <210> 210
[1475] <211> 9
[1476] <212> PRT
[1477] <213> 智人
[1478] <400> 210
[1479] Gly Leu Ala Gly Asp Asn Ile Tyr Leu
[1480] 1 5
[1481] <210> 211

[1482] <211> 9
[1483] <212> PRT
[1484] <213> 智人
[1485] <400> 211
[1486] Leu Leu Thr Thr Val Leu Ile Asn Ala
[1487] 1 5
[1488] <210> 212
[1489] <211> 9
[1490] <212> PRT
[1491] <213> 智人
[1492] <400> 212
[1493] Met Thr Leu Ser Glu Ile His Ala Val
[1494] 1 5
[1495] <210> 213
[1496] <211> 10
[1497] <212> PRT
[1498] <213> 智人
[1499] <400> 213
[1500] Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val
[1501] 1 5 10
[1502] <210> 214
[1503] <211> 9
[1504] <212> PRT
[1505] <213> 智人
[1506] <400> 214
[1507] Ala Leu Phe Glu Thr Leu Ile Gln Leu
[1508] 1 5
[1509] <210> 215
[1510] <211> 9
[1511] <212> PRT
[1512] <213> 智人
[1513] <400> 215
[1514] Gln Ile Ala Asp Ile Val Thr Ser Val
[1515] 1 5
[1516] <210> 216
[1517] <211> 9
[1518] <212> PRT
[1519] <213> 智人
[1520] <400> 216

[1521] Ala Leu Ser Thr Val Thr Pro Arg Ile
[1522] 1 5
[1523] <210> 217
[1524] <211> 9
[1525] <212> PRT
[1526] <213> 智人
[1527] <400> 217
[1528] Leu Leu Trp Pro Ser Ser Val Pro Ala
[1529] 1 5
[1530] <210> 218
[1531] <211> 9
[1532] <212> PRT
[1533] <213> 智人
[1534] <400> 218
[1535] Ser Leu Thr Gly Ala Asn Ile Thr Val
[1536] 1 5
[1537] <210> 219
[1538] <211> 9
[1539] <212> PRT
[1540] <213> 智人
[1541] <400> 219
[1542] Gly Val Val Pro Thr Ile Gln Lys Val
[1543] 1 5
[1544] <210> 220
[1545] <211> 9
[1546] <212> PRT
[1547] <213> 智人
[1548] <400> 220
[1549] Ala Leu Ser Glu Leu Glu Arg Val Leu
[1550] 1 5
[1551] <210> 221
[1552] <211> 9
[1553] <212> PRT
[1554] <213> 智人
[1555] <400> 221
[1556] Ile Met Leu Asn Ser Val Glu Glu Ile
[1557] 1 5
[1558] <210> 222
[1559] <211> 9

[1560] <212> PRT
[1561] <213> 智人
[1562] <400> 222
[1563] Leu Leu Thr Gly Val Phe Ala Gln Leu
[1564] 1 5
[1565] <210> 223
[1566] <211> 9
[1567] <212> PRT
[1568] <213> 智人
[1569] <400> 223
[1570] Ala Leu His Pro Val Gln Phe Tyr Leu
[1571] 1 5
[1572] <210> 224
[1573] <211> 13
[1574] <212> PRT
[1575] <213> 智人
[1576] <400> 224
[1577] Leu Leu Phe Asp Trp Ser Gly Thr Gly Arg Ala Asp Ala
[1578] 1 5 10
[1579] <210> 225
[1580] <211> 10
[1581] <212> PRT
[1582] <213> 智人
[1583] <400> 225
[1584] Phe Leu Pro Gln Pro Val Pro Leu Ser Val
[1585] 1 5 10
[1586] <210> 226
[1587] <211> 9
[1588] <212> PRT
[1589] <213> 智人
[1590] <400> 226
[1591] Ser Leu Ala Gly Asn Leu Gln Glu Leu
[1592] 1 5
[1593] <210> 227
[1594] <211> 9
[1595] <212> PRT
[1596] <213> 智人
[1597] <400> 227
[1598] Ser Glu Met Glu Glu Leu Pro Ser Val

[1599]	1	5
[1600]	<210> 228	
[1601]	<211> 12	
[1602]	<212> PRT	
[1603]	<213> 智人	
[1604]	<400> 228	
[1605]	Ser Leu Leu Glu Leu Asp Gly Ile Asn Leu Arg Leu	
[1606]	1	5 10
[1607]	<210> 229	
[1608]	<211> 9	
[1609]	<212> PRT	
[1610]	<213> 智人	
[1611]	<400> 229	
[1612]	Tyr Leu Tyr Glu Leu Glu His Ala Leu	
[1613]	1	5
[1614]	<210> 230	
[1615]	<211> 9	
[1616]	<212> PRT	
[1617]	<213> 智人	
[1618]	<400> 230	
[1619]	Lys Leu Leu Asn Met Ile Phe Ser Ile	
[1620]	1	5
[1621]	<210> 231	
[1622]	<211> 9	
[1623]	<212> PRT	
[1624]	<213> 智人	
[1625]	<400> 231	
[1626]	Leu Leu Asp Asp Ile Phe Ile Arg Leu	
[1627]	1	5
[1628]	<210> 232	
[1629]	<211> 9	
[1630]	<212> PRT	
[1631]	<213> 智人	
[1632]	<400> 232	
[1633]	Leu Val Val Gly Gly Ile Ala Thr Val	
[1634]	1	5
[1635]	<210> 233	
[1636]	<211> 9	
[1637]	<212> PRT	

[1638]	<213>	智人	
[1639]	<400>	233	
[1640]	Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu		
[1641]	1	5	
[1642]	<210>	234	
[1643]	<211>	10	
[1644]	<212>	PRT	
[1645]	<213>	智人	
[1646]	<400>	234	
[1647]	Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val		
[1648]	1	5	10
[1649]	<210>	235	
[1650]	<211>	9	
[1651]	<212>	PRT	
[1652]	<213>	智人	
[1653]	<400>	235	
[1654]	Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val		
[1655]	1	5	
[1656]	<210>	236	
[1657]	<211>	9	
[1658]	<212>	PRT	
[1659]	<213>	智人	
[1660]	<400>	236	
[1661]	Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val		
[1662]	1	5	
[1663]	<210>	237	
[1664]	<211>	11	
[1665]	<212>	PRT	
[1666]	<213>	智人	
[1667]	<400>	237	
[1668]	Ala Leu Leu Glu Gln Thr Gly Asp Met Ser Leu		
[1669]	1	5	10
[1670]	<210>	238	
[1671]	<211>	9	
[1672]	<212>	PRT	
[1673]	<213>	智人	
[1674]	<400>	238	
[1675]	His Leu Gln Glu Lys Leu Gln Ser Leu		
[1676]	1	5	

[1677] <210> 239
[1678] <211> 11
[1679] <212> PRT
[1680] <213> 智人
[1681] <400> 239
[1682] Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile Thr Val
[1683] 1 5 10
[1684] <210> 240
[1685] <211> 9
[1686] <212> PRT
[1687] <213> 智人
[1688] <400> 240
[1689] Ser Val Gln Glu Asn Ile Gln Gln Lys
[1690] 1 5
[1691] <210> 241
[1692] <211> 9
[1693] <212> PRT
[1694] <213> 智人
[1695] <400> 241
[1696] Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile
[1697] 1 5
[1698] <210> 242
[1699] <211> 9
[1700] <212> PRT
[1701] <213> 智人
[1702] <400> 242
[1703] Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu
[1704] 1 5
[1705] <210> 243
[1706] <211> 9
[1707] <212> PRT
[1708] <213> 智人
[1709] <400> 243
[1710] Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val
[1711] 1 5
[1712] <210> 244
[1713] <211> 9
[1714] <212> PRT
[1715] <213> 智人

[1716]	<400>	244	
[1717]	Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile		
[1718]	1	5	
[1719]	<210>	245	
[1720]	<211>	9	
[1721]	<212>	PRT	
[1722]	<213>	智人	
[1723]	<400>	245	
[1724]	Ala Leu Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val		
[1725]	1	5	
[1726]	<210>	246	
[1727]	<211>	9	
[1728]	<212>	PRT	
[1729]	<213>	智人	
[1730]	<400>	246	
[1731]	Ala Leu Ala Gly Ile Val Thr Asn Val		
[1732]	1	5	
[1733]	<210>	247	
[1734]	<211>	12	
[1735]	<212>	PRT	
[1736]	<213>	智人	
[1737]	<400>	247	
[1738]	Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu		
[1739]	1	5	10
[1740]	<210>	248	
[1741]	<211>	10	
[1742]	<212>	PRT	
[1743]	<213>	智人	
[1744]	<400>	248	
[1745]	Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu		
[1746]	1	5	10
[1747]	<210>	249	
[1748]	<211>	9	
[1749]	<212>	PRT	
[1750]	<213>	智人	
[1751]	<400>	249	
[1752]	Tyr Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile		
[1753]	1	5	
[1754]	<210>	250	

[1755]	<211>	9	
[1756]	<212>	PRT	
[1757]	<213>	智人	
[1758]	<400>	250	
[1759]	Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu		
[1760]	1	5	
[1761]	<210>	251	
[1762]	<211>	9	
[1763]	<212>	PRT	
[1764]	<213>	智人	
[1765]	<400>	251	
[1766]	Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile		
[1767]	1	5	
[1768]	<210>	252	
[1769]	<211>	9	
[1770]	<212>	PRT	
[1771]	<213>	智人	
[1772]	<400>	252	
[1773]	Ser Leu Met Glu Lys Asn Gln Ser Leu		
[1774]	1	5	
[1775]	<210>	253	
[1776]	<211>	9	
[1777]	<212>	PRT	
[1778]	<213>	智人	
[1779]	<400>	253	
[1780]	Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu		
[1781]	1	5	
[1782]	<210>	254	
[1783]	<211>	10	
[1784]	<212>	PRT	
[1785]	<213>	智人	
[1786]	<400>	254	
[1787]	Ala Leu Gly Asp Lys Phe Leu Leu Arg Val		
[1788]	1	5	10
[1789]	<210>	255	
[1790]	<211>	11	
[1791]	<212>	PRT	
[1792]	<213>	智人	
[1793]	<400>	255	

[1794]	Phe Leu Met Lys Asn Ser Asp Leu Tyr Gly Ala
[1795]	1 5 10
[1796]	<210> 256
[1797]	<211> 9
[1798]	<212> PRT
[1799]	<213> 智人
[1800]	<400> 256
[1801]	Phe Leu Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile
[1802]	1 5
[1803]	<210> 257
[1804]	<211> 10
[1805]	<212> PRT
[1806]	<213> 智人
[1807]	<400> 257
[1808]	Lys Leu Ile Asp His Gln Gly Leu Tyr Leu
[1809]	1 5 10
[1810]	<210> 258
[1811]	<211> 9
[1812]	<212> PRT
[1813]	<213> 智人
[1814]	<400> 258
[1815]	Gln Leu Val Gln Arg Val Ala Ser Val
[1816]	1 5
[1817]	<210> 259
[1818]	<211> 12
[1819]	<212> PRT
[1820]	<213> 智人
[1821]	<400> 259
[1822]	Gly Pro Gly Ile Phe Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro
[1823]	1 5 10
[1824]	<210> 260
[1825]	<211> 9
[1826]	<212> PRT
[1827]	<213> 智人
[1828]	<400> 260
[1829]	Ala Leu Asn Glu Ser Leu Val Glu Cys
[1830]	1 5
[1831]	<210> 261
[1832]	<211> 9

[1833] <212> PRT
[1834] <213> 智人
[1835] <400> 261
[1836] Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu
[1837] 1 5
[1838] <210> 262
[1839] <211> 9
[1840] <212> PRT
[1841] <213> 智人
[1842] <400> 262
[1843] Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu
[1844] 1 5
[1845] <210> 263
[1846] <211> 9
[1847] <212> PRT
[1848] <213> 智人
[1849] <400> 263
[1850] Ser Ile Ile Glu Tyr Leu Pro Thr Leu
[1851] 1 5
[1852] <210> 264
[1853] <211> 9
[1854] <212> PRT
[1855] <213> 智人
[1856] <400> 264
[1857] Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu
[1858] 1 5
[1859] <210> 265
[1860] <211> 11
[1861] <212> PRT
[1862] <213> 智人
[1863] <400> 265
[1864] Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu Ser Ile
[1865] 1 5 10
[1866] <210> 266
[1867] <211> 9
[1868] <212> PRT
[1869] <213> 智人
[1870] <400> 266
[1871] Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu

[1872]	1	5
[1873]	<210> 267	
[1874]	<211> 10	
[1875]	<212> PRT	
[1876]	<213> 智人	
[1877]	<400> 267	
[1878]	Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu	
[1879]	1	5 10
[1880]	<210> 268	
[1881]	<211> 9	
[1882]	<212> PRT	
[1883]	<213> 智人	
[1884]	<400> 268	
[1885]	Ser Leu Asp Lys Asp Ile Val Ala Leu	
[1886]	1	5
[1887]	<210> 269	
[1888]	<211> 9	
[1889]	<212> PRT	
[1890]	<213> 智人	
[1891]	<400> 269	
[1892]	Gly Leu Leu Asp Cys Pro Ile Phe Leu	
[1893]	1	5
[1894]	<210> 270	
[1895]	<211> 9	
[1896]	<212> PRT	
[1897]	<213> 智人	
[1898]	<400> 270	
[1899]	Thr Leu Leu Thr Phe Phe His Glu Leu	
[1900]	1	5
[1901]	<210> 271	
[1902]	<211> 9	
[1903]	<212> PRT	
[1904]	<213> 智人	
[1905]	<400> 271	
[1906]	Val Leu Ile Glu Tyr Asn Phe Ser Ile	
[1907]	1	5
[1908]	<210> 272	
[1909]	<211> 10	
[1910]	<212> PRT	

[1911]	<213>	智人
[1912]	<400>	272
[1913]	Phe Val Met Glu Gly Glu Pro Pro Lys Leu	
[1914]	1	5 10
[1915]	<210>	273
[1916]	<211>	9
[1917]	<212>	PRT
[1918]	<213>	智人
[1919]	<400>	273
[1920]	Ser Leu Asn Lys Gln Ile Glu Thr Val	
[1921]	1	5
[1922]	<210>	274
[1923]	<211>	11
[1924]	<212>	PRT
[1925]	<213>	智人
[1926]	<400>	274
[1927]	Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val	
[1928]	1	5 10
[1929]	<210>	275
[1930]	<211>	9
[1931]	<212>	PRT
[1932]	<213>	智人
[1933]	<400>	275
[1934]	Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Val	
[1935]	1	5
[1936]	<210>	276
[1937]	<211>	9
[1938]	<212>	PRT
[1939]	<213>	智人
[1940]	<400>	276
[1941]	Arg Met Pro Thr Val Leu Gln Cys Val	
[1942]	1	5
[1943]	<210>	277
[1944]	<211>	9
[1945]	<212>	PRT
[1946]	<213>	智人
[1947]	<400>	277
[1948]	Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asn Lys Val	
[1949]	1	5

[1950]	<210>	278	
[1951]	<211>	9	
[1952]	<212>	PRT	
[1953]	<213>	智人	
[1954]	<400>	278	
[1955]	Val Leu Glu Asp Lys Val Leu Ser Val		
[1956]	1	5	
[1957]	<210>	279	
[1958]	<211>	11	
[1959]	<212>	PRT	
[1960]	<213>	智人	
[1961]	<400>	279	
[1962]	Val Leu Met Asp Glu Gly Ala Val Leu Thr Leu		
[1963]	1	5	10
[1964]	<210>	280	
[1965]	<211>	9	
[1966]	<212>	PRT	
[1967]	<213>	智人	
[1968]	<400>	280	
[1969]	His Leu Trp Gly His Ala Leu Phe Leu		
[1970]	1	5	
[1971]	<210>	281	
[1972]	<211>	12	
[1973]	<212>	PRT	
[1974]	<213>	智人	
[1975]	<400>	281	
[1976]	Leu Leu Leu Glu Ser Asp Pro Lys Val Tyr Ser Leu		
[1977]	1	5	10
[1978]	<210>	282	
[1979]	<211>	9	
[1980]	<212>	PRT	
[1981]	<213>	智人	
[1982]	<400>	282	
[1983]	Ser Leu Tyr Ala Leu His Val Lys Ala		
[1984]	1	5	
[1985]	<210>	283	
[1986]	<211>	9	
[1987]	<212>	PRT	
[1988]	<213>	智人	

[1989]	<400> 283
[1990]	Ala Leu Ser Glu Leu Leu Gln Gln Val
[1991]	1 5
[1992]	<210> 284
[1993]	<211> 11
[1994]	<212> PRT
[1995]	<213> 智人
[1996]	<400> 284
[1997]	Lys Leu Met Asp Pro Gly Ser Leu Pro Pro Leu
[1998]	1 5 10
[1999]	<210> 285
[2000]	<211> 9
[2001]	<212> PRT
[2002]	<213> 智人
[2003]	<400> 285
[2004]	Met Leu Leu Asp Thr Val Gln Lys Val
[2005]	1 5
[2006]	<210> 286
[2007]	<211> 9
[2008]	<212> PRT
[2009]	<213> 智人
[2010]	<400> 286
[2011]	Phe Leu Thr Glu Met Val His Phe Ile
[2012]	1 5
[2013]	<210> 287
[2014]	<211> 9
[2015]	<212> PRT
[2016]	<213> 智人
[2017]	<400> 287
[2018]	Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
[2019]	1 5
[2020]	<210> 288
[2021]	<211> 9
[2022]	<212> PRT
[2023]	<213> 智人
[2024]	<400> 288
[2025]	Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val
[2026]	1 5
[2027]	<210> 289

[2028]	<211>	10	
[2029]	<212>	PRT	
[2030]	<213>	智人	
[2031]	<400>	289	
[2032]	Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val		
[2033]	1	5	10
[2034]	<210>	290	
[2035]	<211>	9	
[2036]	<212>	PRT	
[2037]	<213>	智人	
[2038]	<400>	290	
[2039]	Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile		
[2040]	1	5	

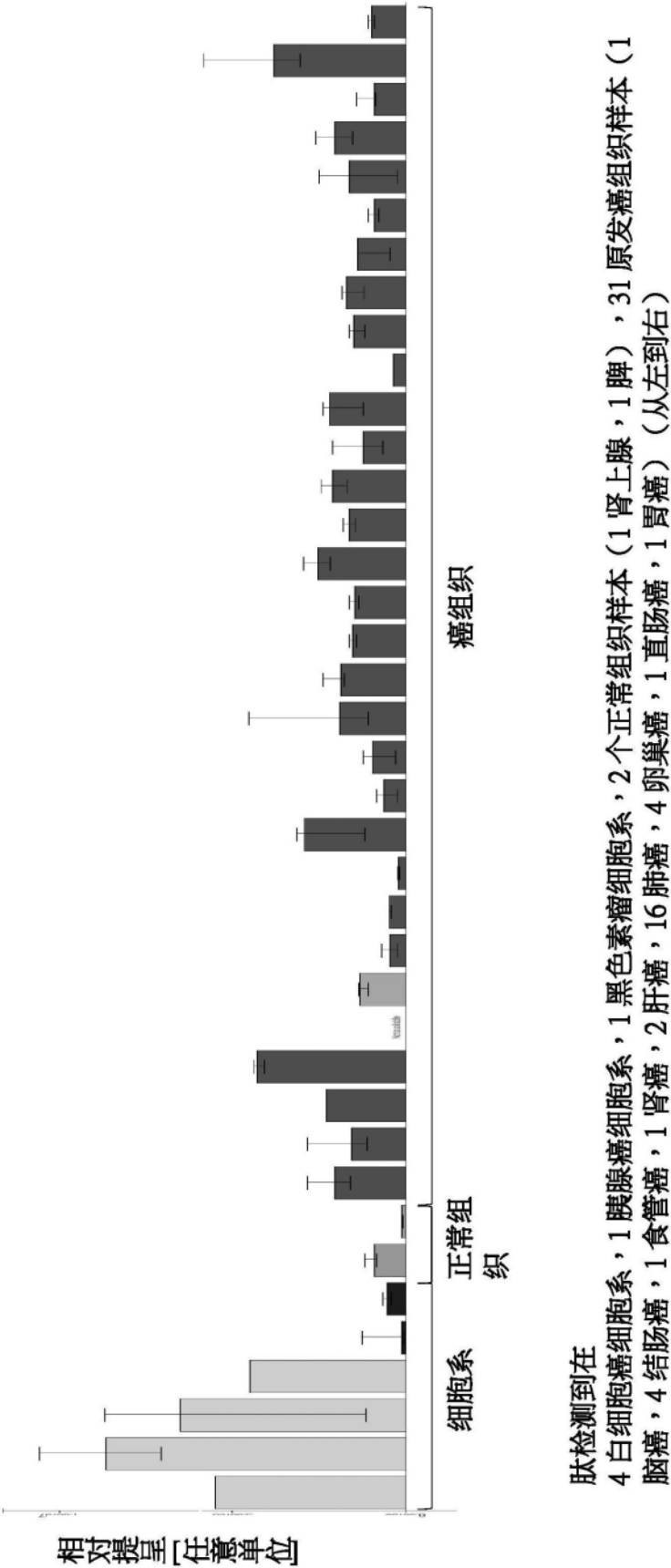
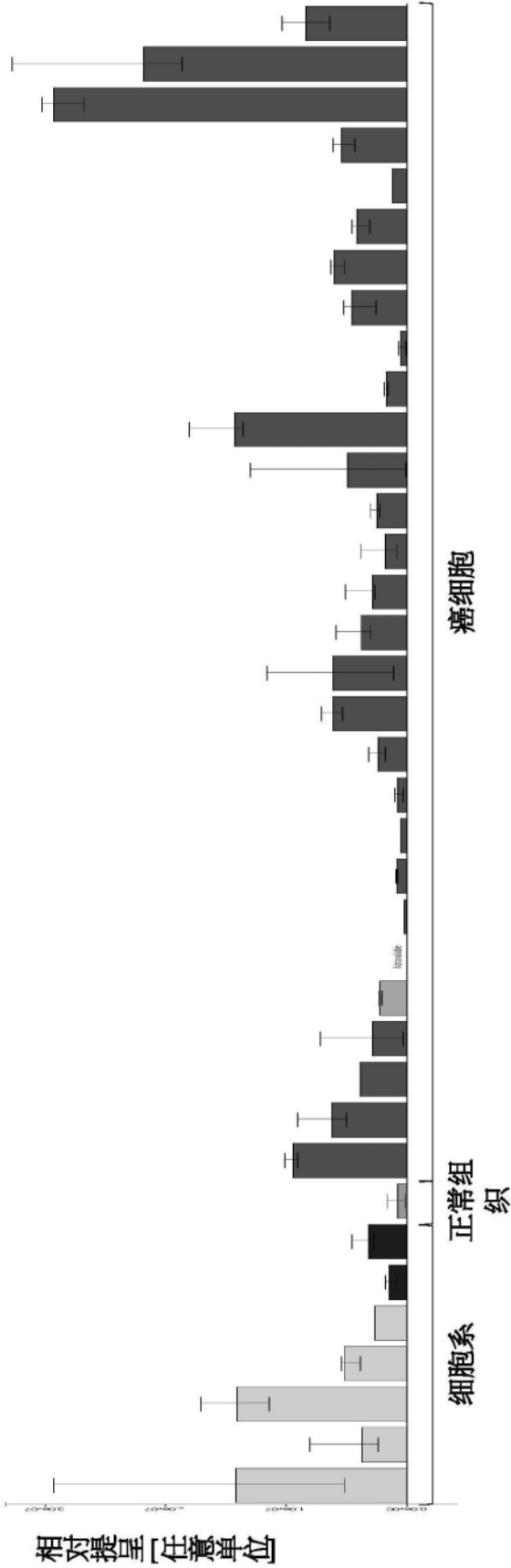


图1A-肽:KLQEKIQL (A * 02:01)



肽检测到在
5 白细胞癌细胞系，1 胰腺癌细胞系，1 粒细胞白血病细胞系，1 个正常组织样本（1 肾上腺），29 个癌组织样本（4 结肠癌，2 食管癌，1 白细胞癌，1 肝癌，10 肺癌，11 卵巢癌）（从左到右）

图1B-肽:QLIEKNWLL (A * 02:01)

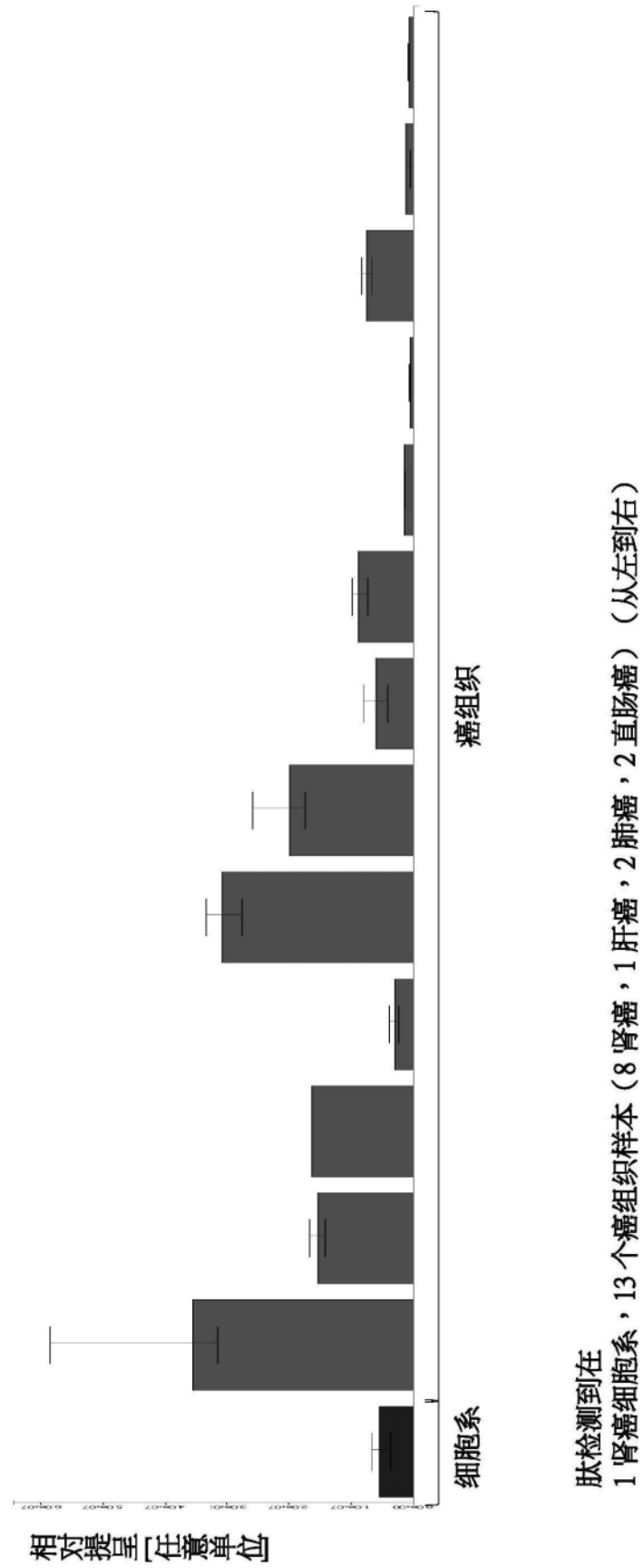


图1C-肽:LLDPKTIFL(A*02:01)

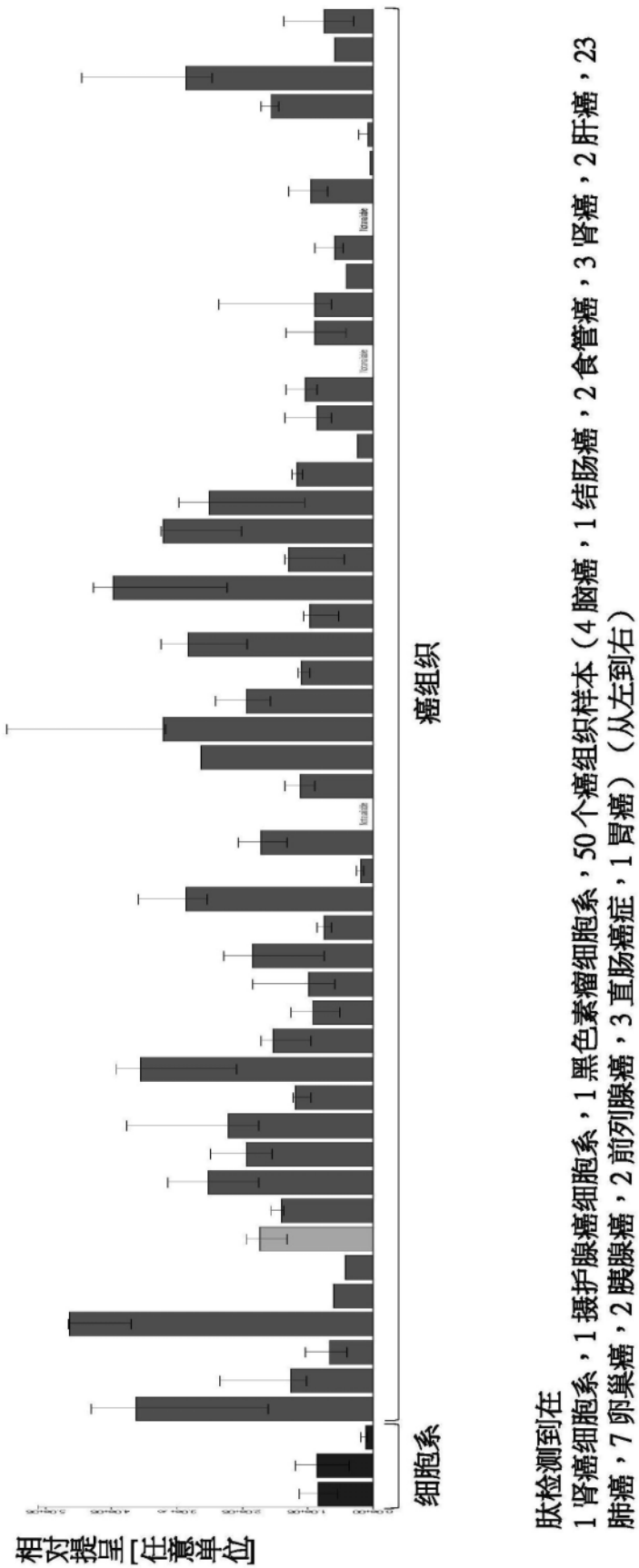


图1D-肽:RLHDENILL (A * 02:01)

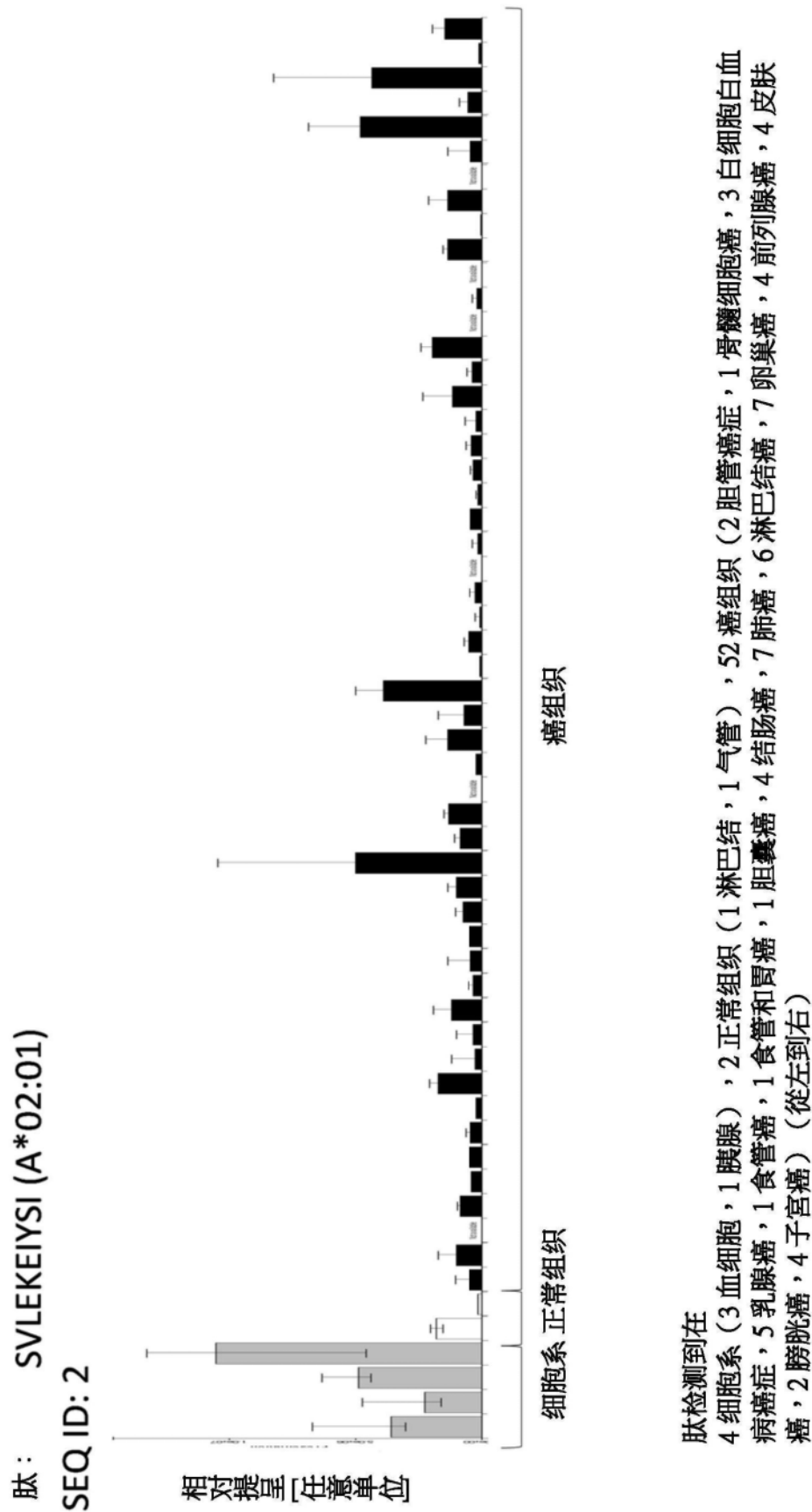
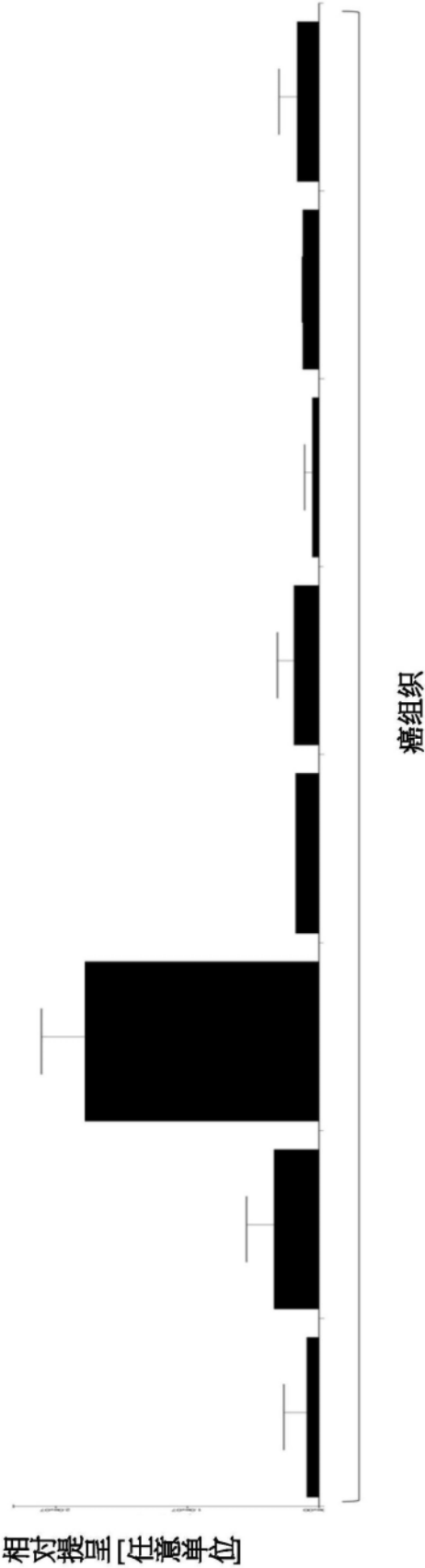


图1E

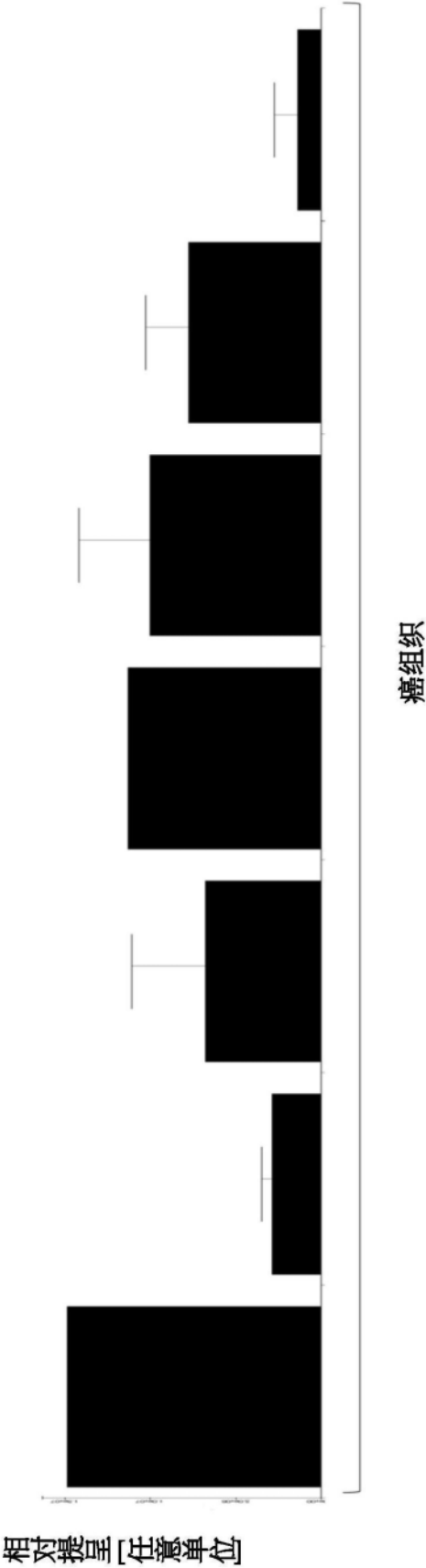
肽： KIWEELSVLEV (A*02:01)
SEQ ID: 40



肽检测到在
8 癌组织 (1 肝, 3 肺, 2 皮肤, 1 胃, 1 膀胱, 1 胰腺) (从左到右)

图1F

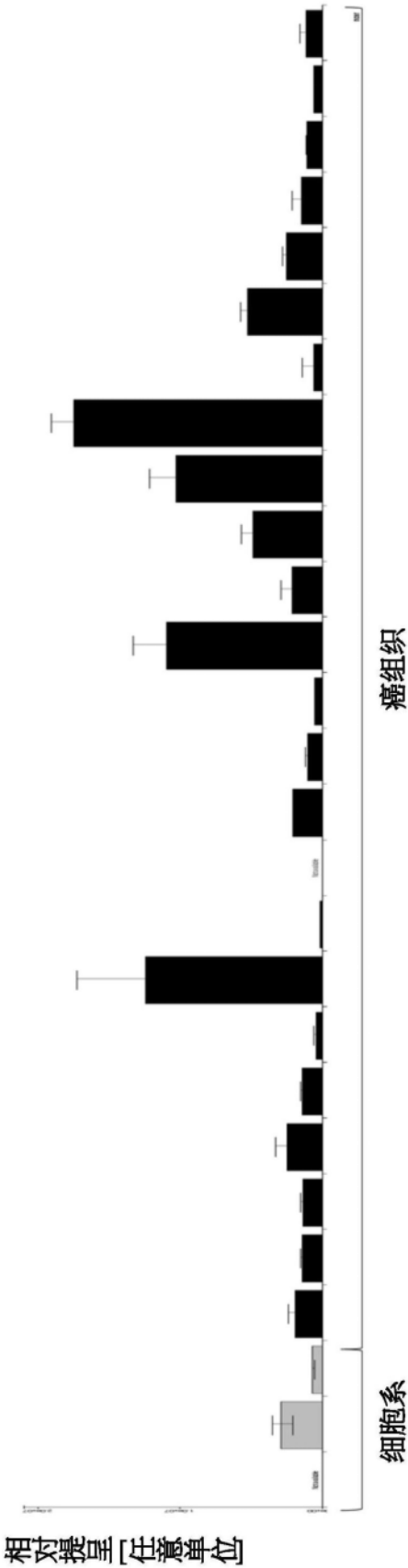
肽： FLIENLLAA (A*02:01)
SEQ ID: 67



肽检测到在
7 癌组织 (4 脑癌, 2 肺癌, 1 子宫癌) (从左到右)

图1G

肽： FLLEREQLL (A*02:01)
SEQ ID: 84

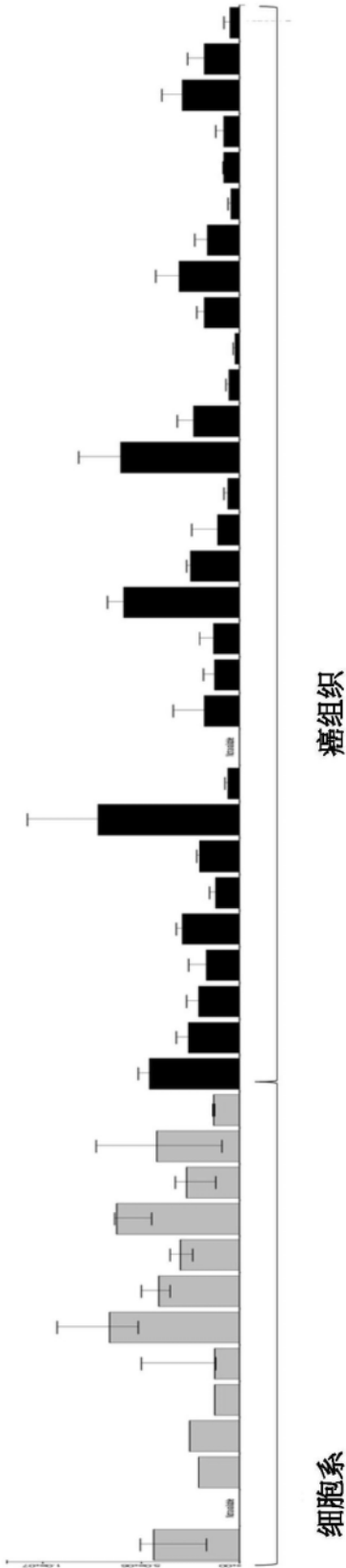


肽检测到在
3 细胞系 (2 血细胞, 1 皮肤), 24 癌组织 (1 骨髓细胞癌, 3 白细胞白血病癌症, 1 骨髓癌, 1 乳腺癌, 1 肾癌, 2 结肠癌, 3 直肠癌, 1 肺癌, 7 淋巴瘤, 3 膀胱癌, 1 子宫癌) (从左到右)

图1H
165

肽： SLLNQPKAV (A*02:01)
SEQ ID: 235

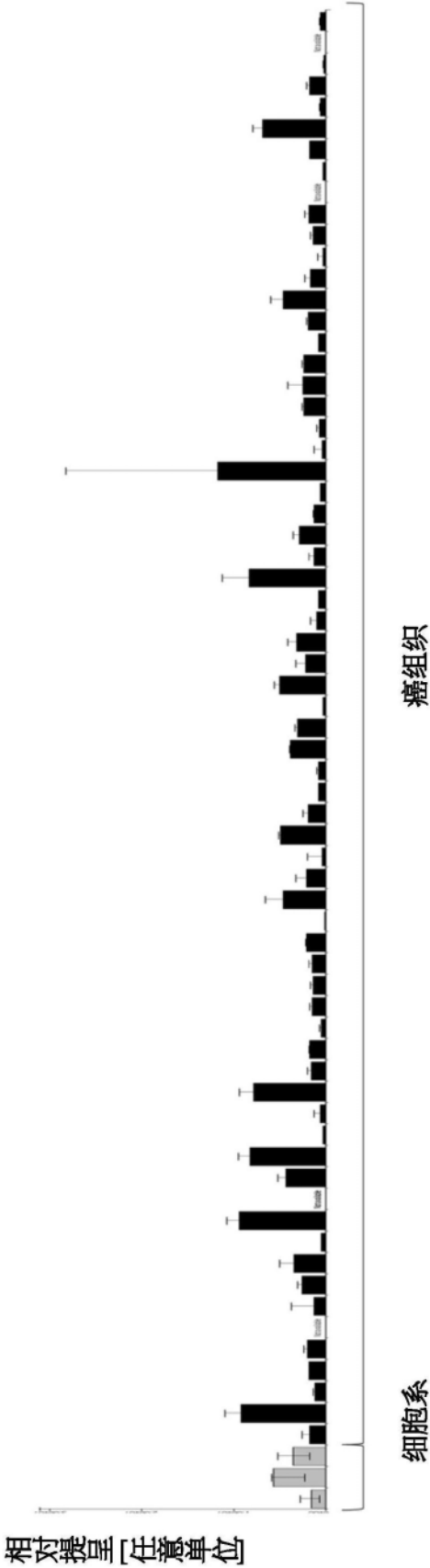
相对提呈[任意单位]



肽检测到在
13 细胞系 (3 血细胞, 2 肾, 8 胰腺), 30 癌组织 (1 骨髓细胞癌, 1 白细胞白血病癌症, 2 脑癌, 2 乳腺癌, 2 食管癌, 1 胆囊癌, 1 直肠癌, 2 肝癌, 4 肺癌, 5 淋巴瘤, 2 卵巢癌, 2 皮肤癌, 4 膀胱癌, 1 子宫癌) (从左到右)

图1I

肽： GLAEFQENV (A*02:01)
SEQ ID: 243

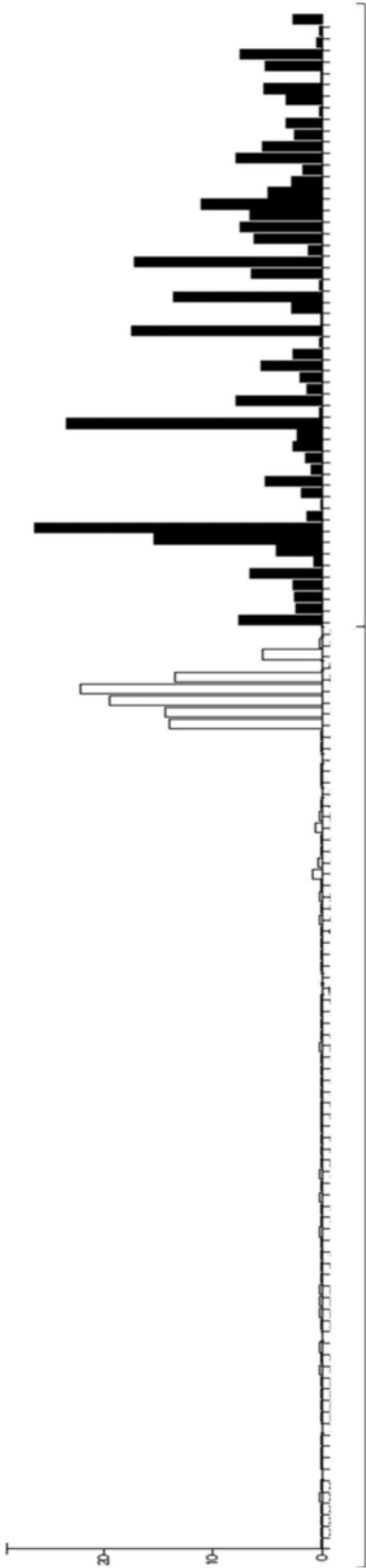


肽检测到在
3 细胞系 (1 血细胞, 1 肾, 1 胰腺), 67 癌组织 (1 胆管癌, 4 白细胞白血病癌症, 1 骨髓细胞癌, 2 脑癌, 3 乳腺癌, 4 食管癌, 2 胆囊癌, 2 结肠癌, 1 直肠癌, 2 肝癌, 15 肺癌, 8 淋巴瘤, 9 卵巢癌, 3 皮肤癌, 4 膀胱癌, 6 子宫癌) (从左到右)

图1J
167

基因: IGF2BP1, IGF2BP3
肽: TLYNPERTITV
SEQ ID: 274

相对 FPKM 转录物组 TLYNPERTITV



80正常组织样本

6动脉, 2血细胞, 2大脑, 1心脏, 2肝, 3肺, 2静脉, 1脂肪组
织, 1肾上腺, 5骨髓, 1软骨, 1结肠, 1食管, 2眼, 2胆囊, 1肾
脏, 6淋巴结, 4胰腺, 2末梢神经, 2脑下垂体, 1直肠, 2唾液
腺, 2骨骼肌肉, 1皮肤, 1小肠, 1脾脏, 1胃, 1甲状腺, 7气
管, 1膀胱, 1乳腺, 5卵巢, 1前腺, 1睾丸, 1胸腺, 1
子宫

53癌样本

4胆管癌, 6胆囊癌, 10淋巴瘤, 12卵
巢癌, 11食管癌, 10肺癌

图2H

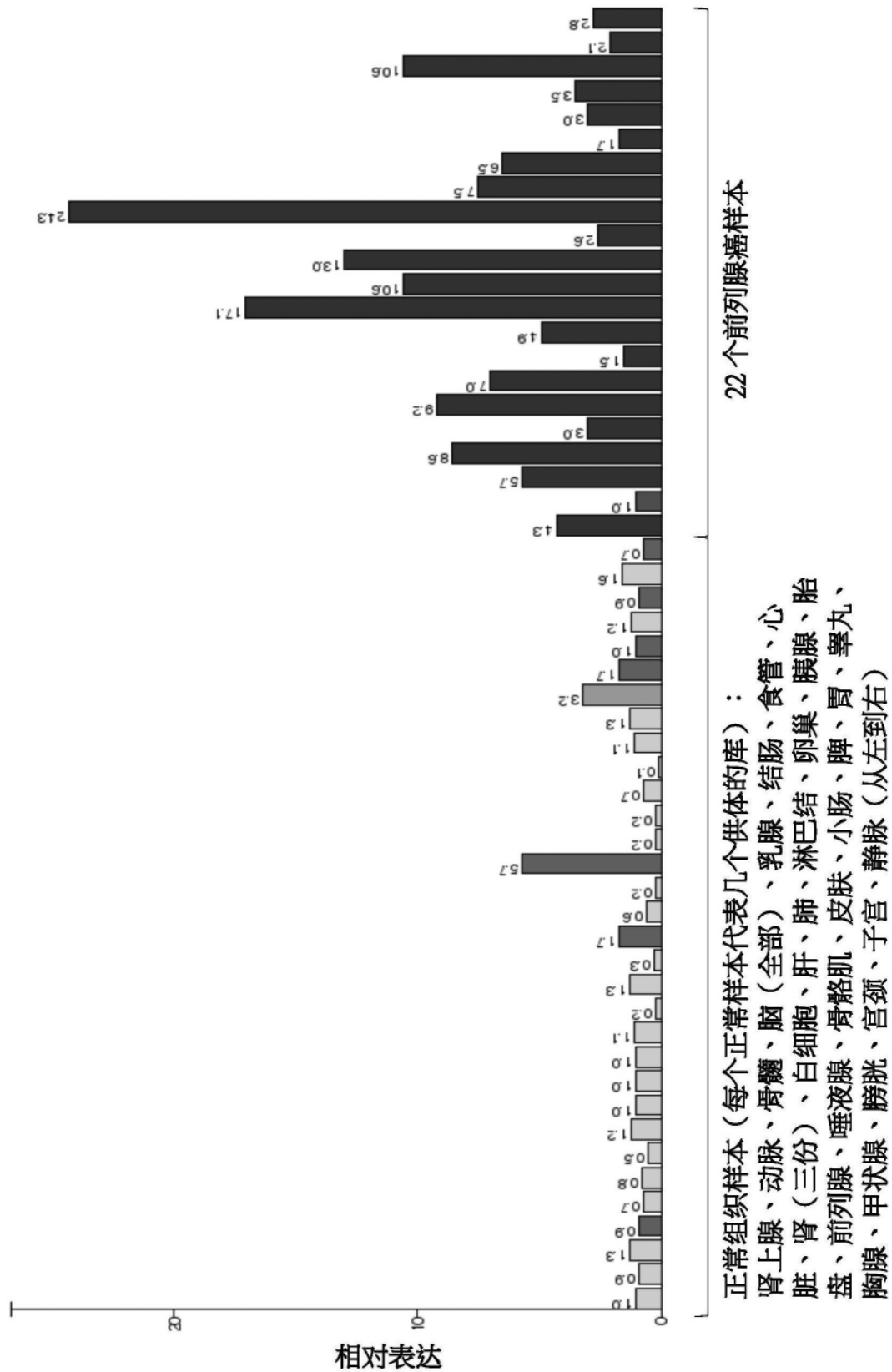


图2A基因:PRIM2

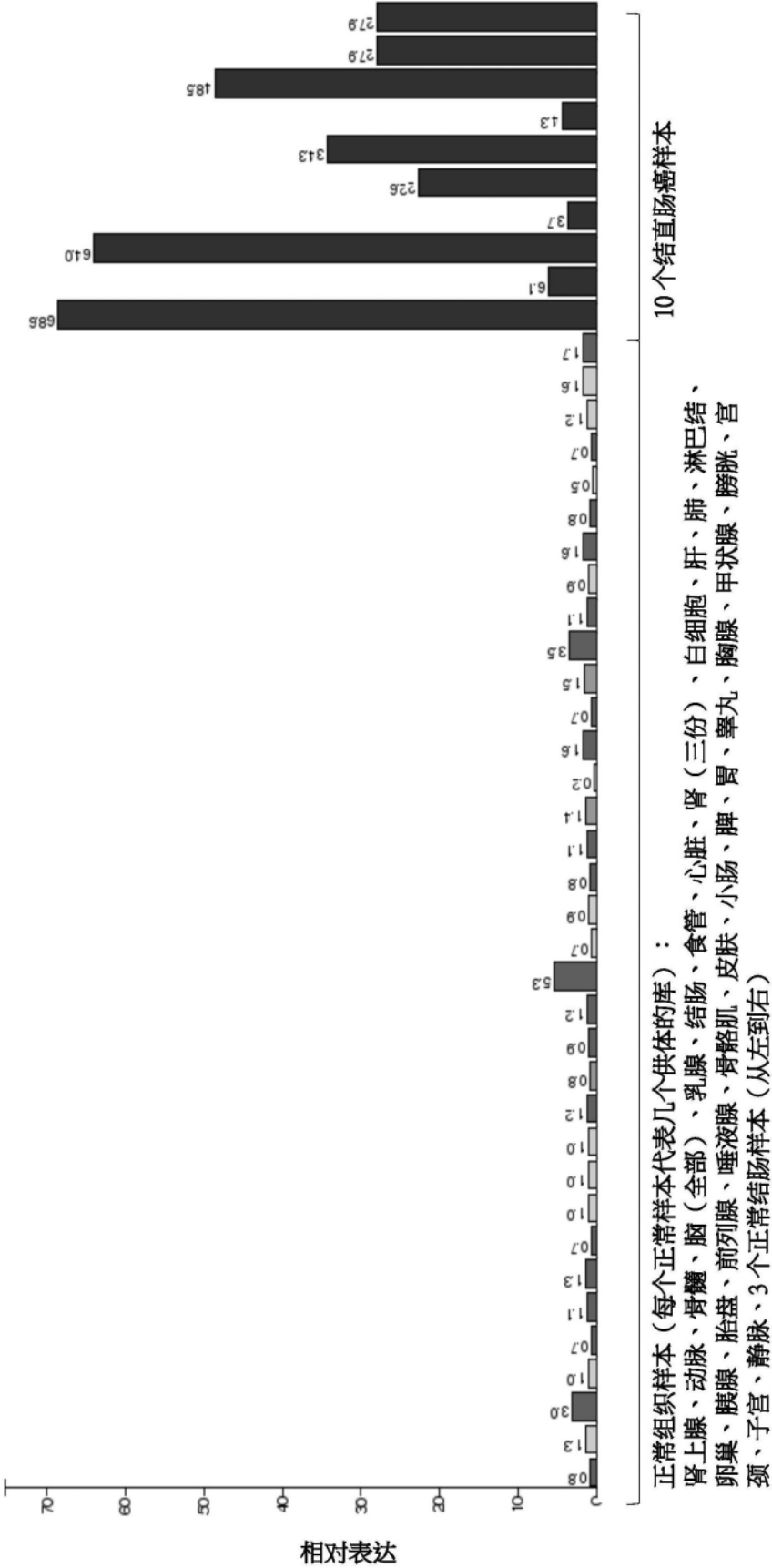


图2B基因:CHEK1

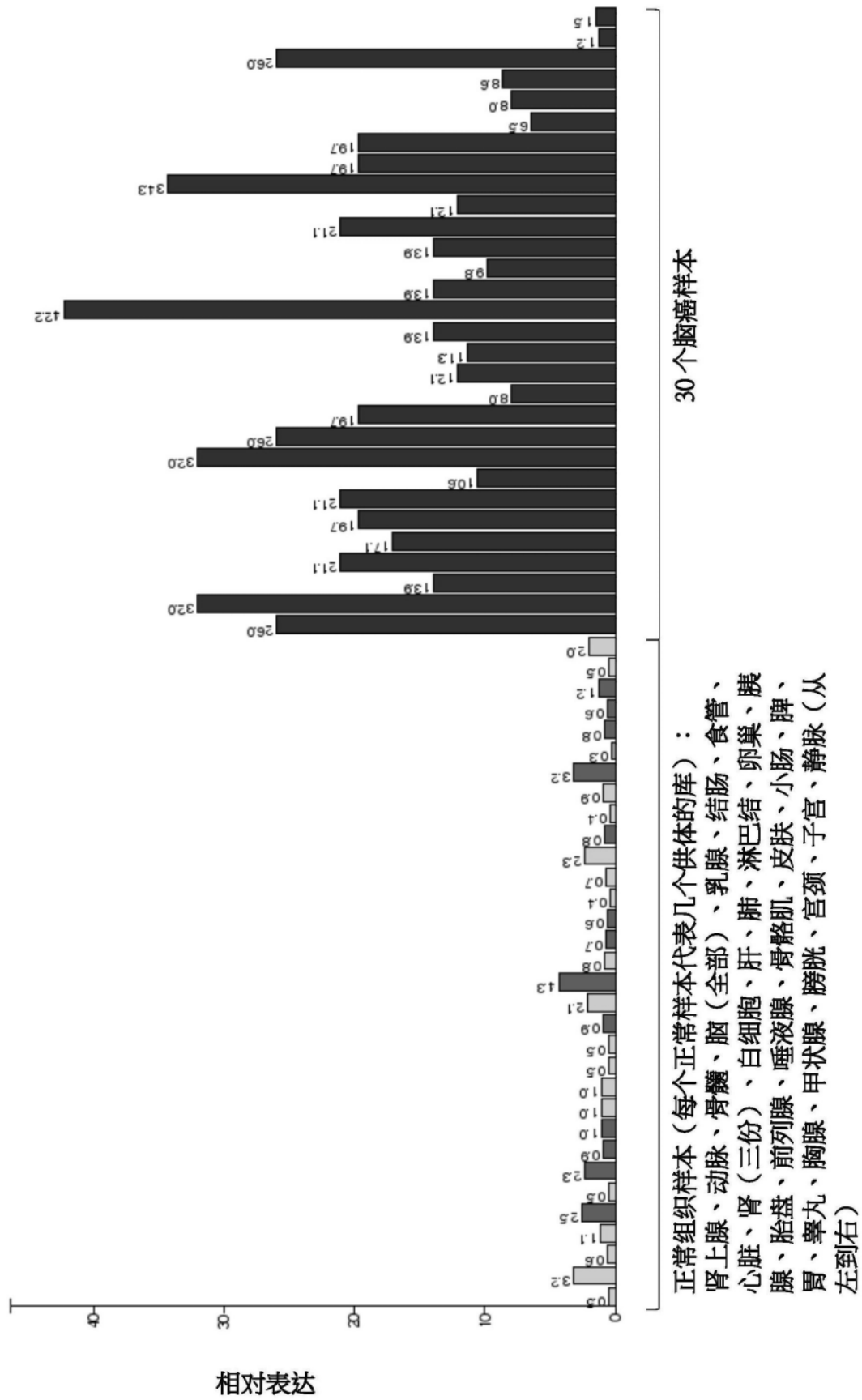


图2C基因:TTC30A

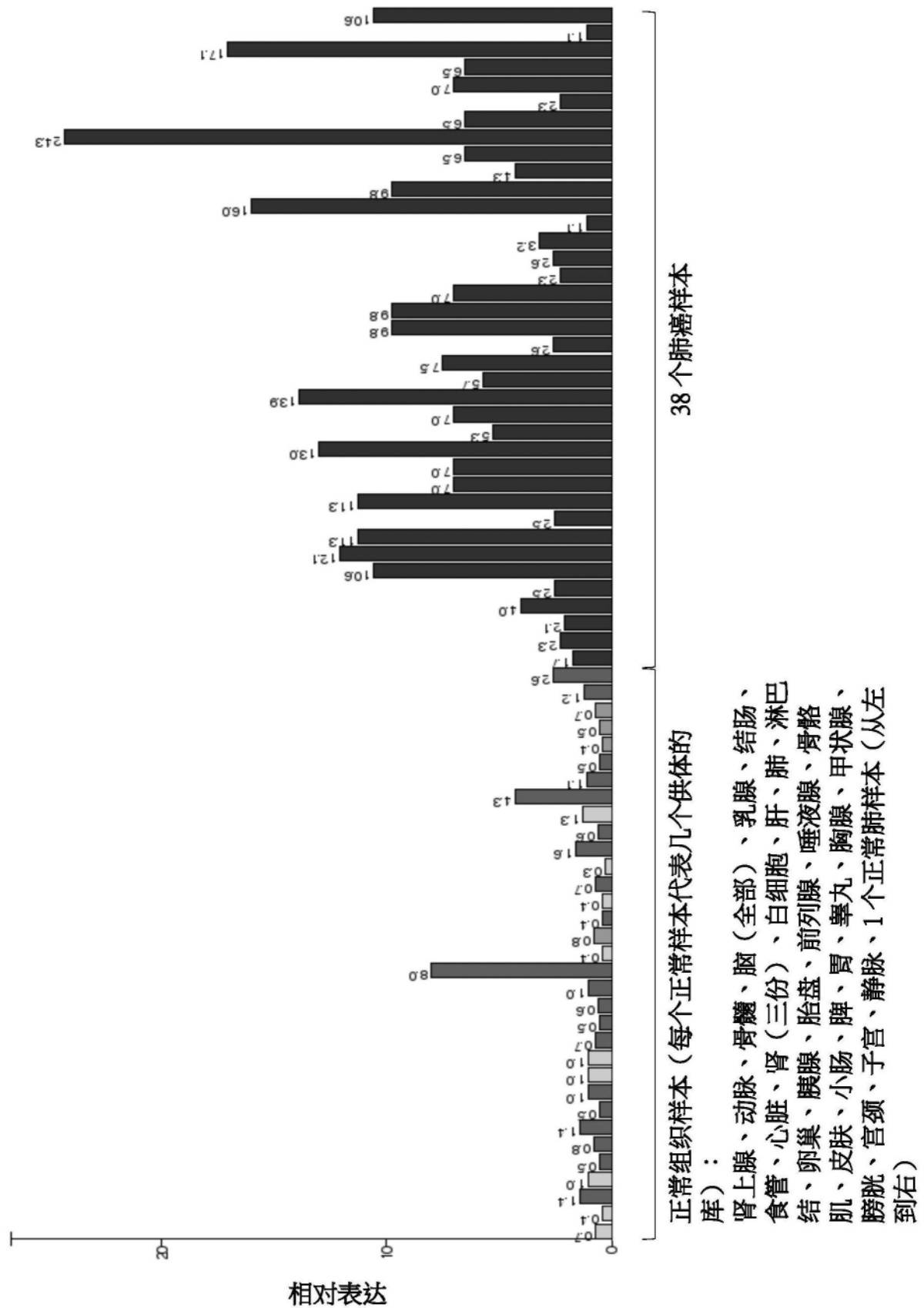


图2D基因:TRIP13

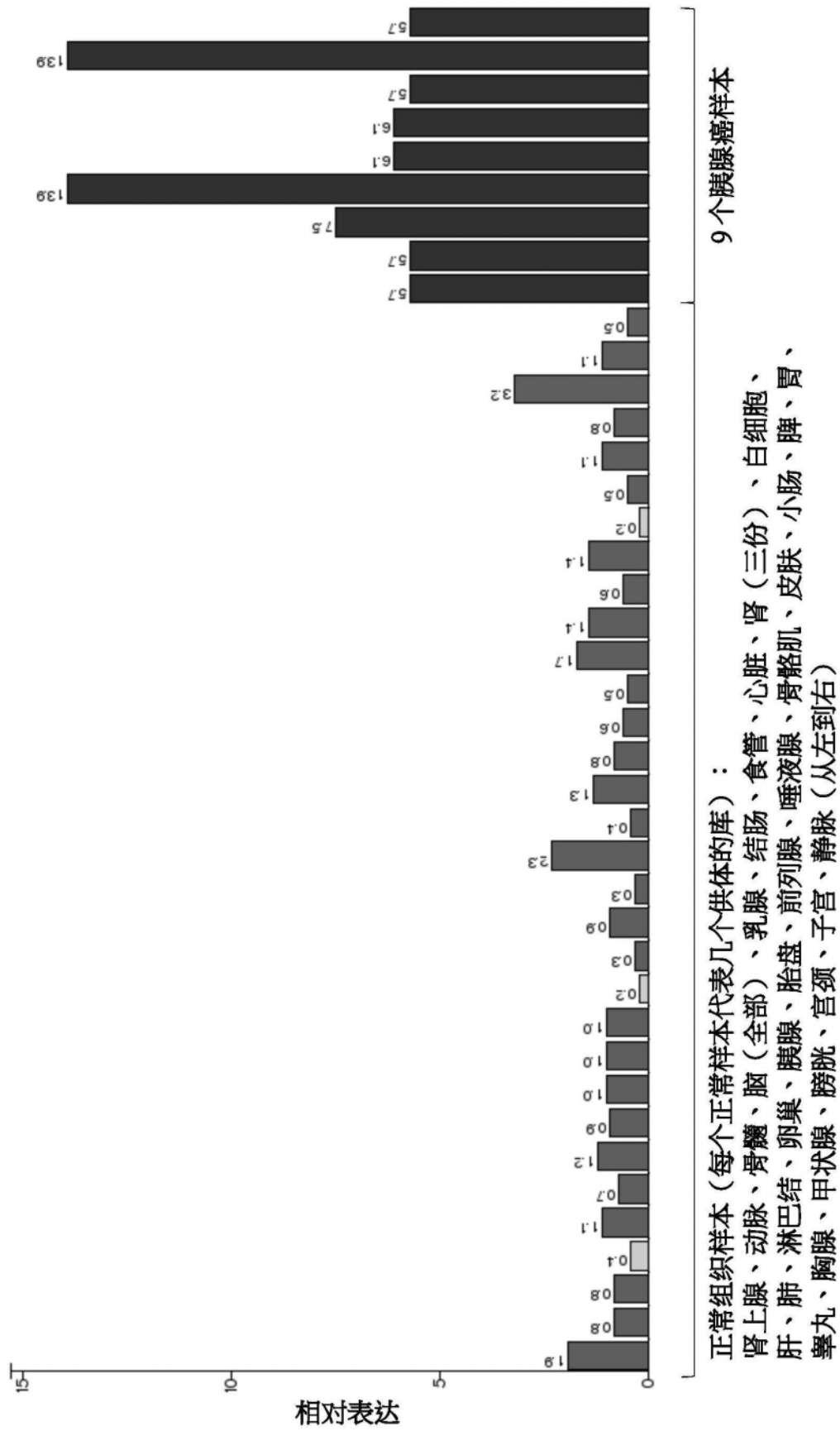


图2E基因:MXRA5

基因 MMP11, MMP13
肽: K V W S D V T P L
SEQ ID: 24

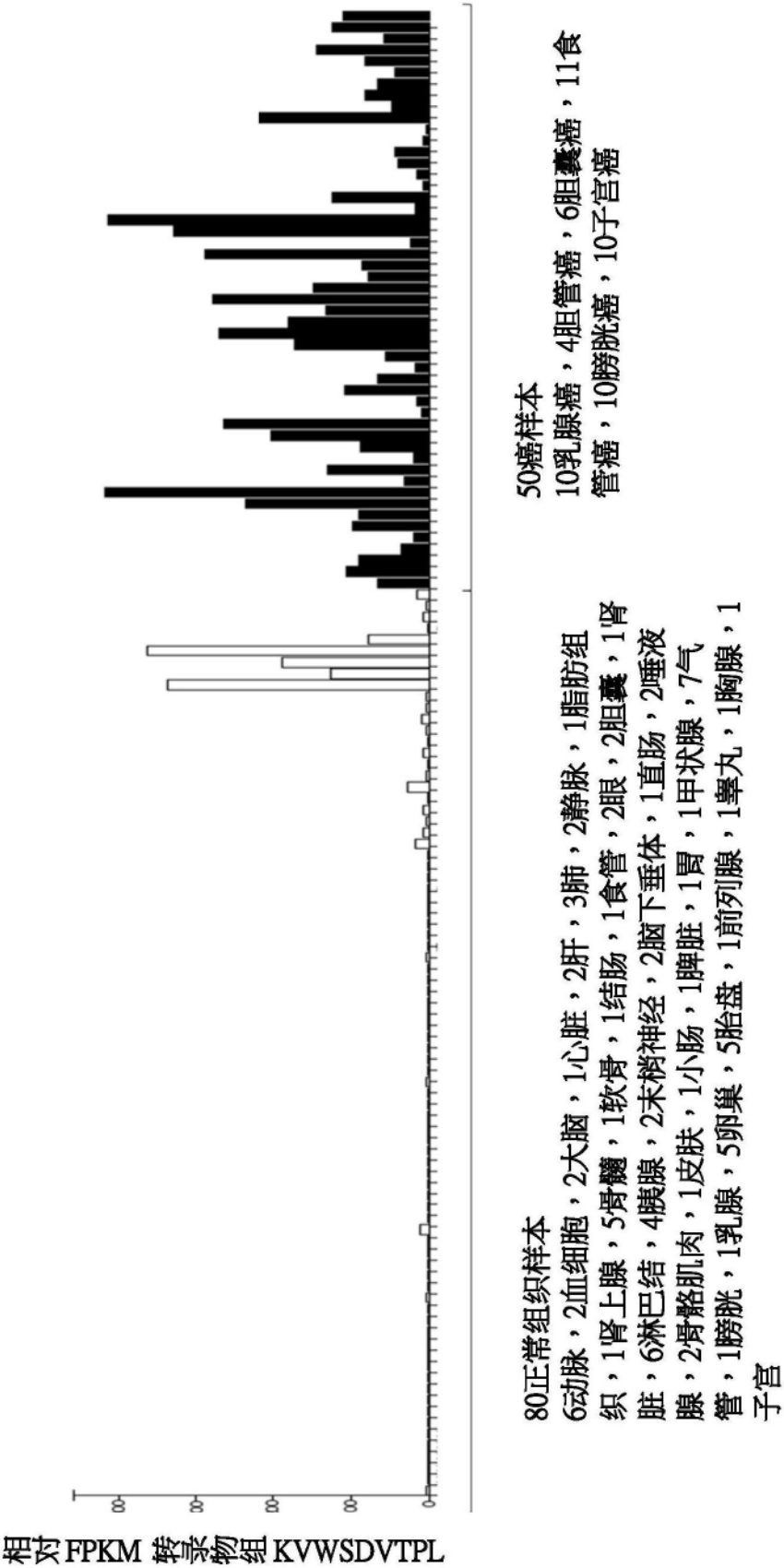
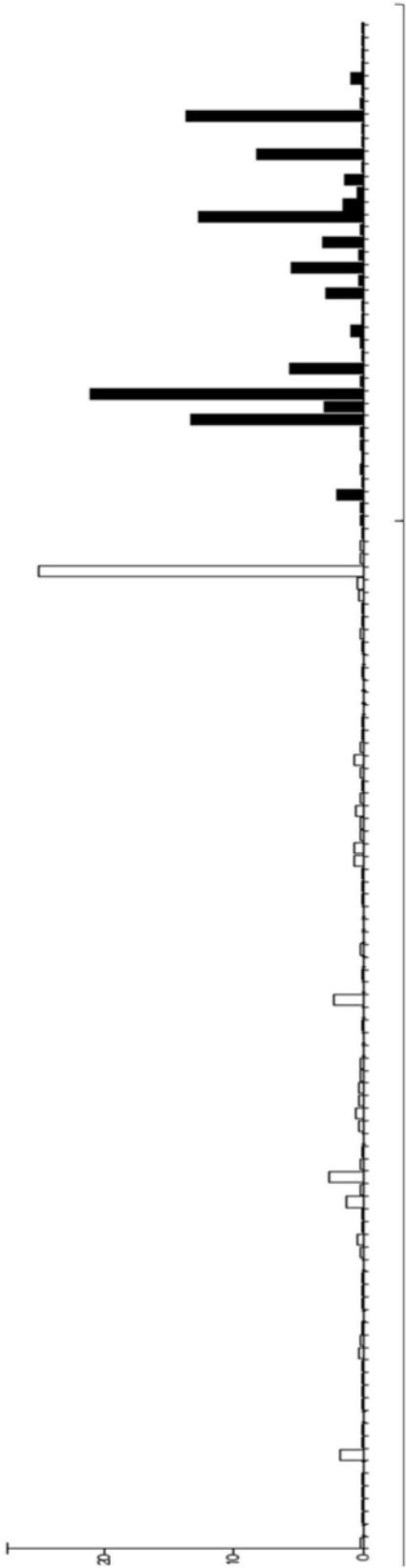


图2F

基因 HORMAD1
肽: VIFEGEPMYL
SEQ ID: 168

相对 FPKM 转录物组 VIFEGEPMYL



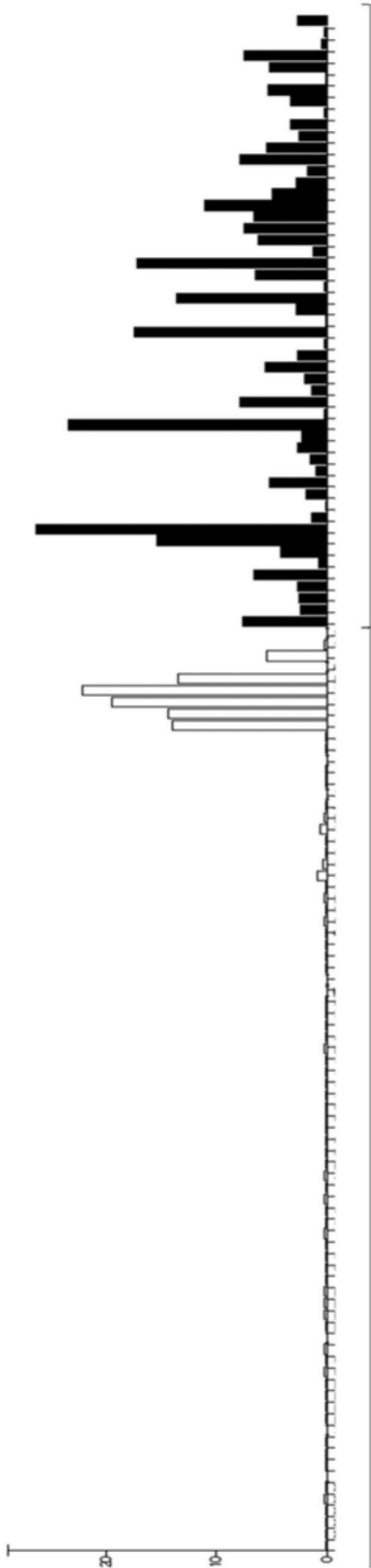
80正常组织样本
6动脉, 2血细胞, 2大脑, 1心脏, 2肝, 3肺, 2静脉, 1脂肪组
织, 1肾上腺, 5骨髓, 1软骨, 1结肠, 1食管, 2眼, 2胆囊, 1肾
脏, 6淋巴结, 4胰腺, 2末梢神经, 2脑下垂体, 1直肠, 2唾液
腺, 2骨骼肌肉, 1皮肤, 1小肠, 1脾脏, 1胃, 1甲状腺, 7气
管, 1膀胱, 1乳腺, 5卵巢, 5胎盘, 1前列腺, 1睾丸, 1胸腺, 1
子宫

41癌样本
10乳腺癌, 10皮肤癌, 11非小细胞
肺癌, 10小细胞肺癌

图2G

基因 IGF2BP1, IGF2BP3
肽: TLYNPERTITV
SEQ ID: 274

相对 FPKM 转录物组 TLYNPERTITV



80正常组织样本
80正常组织样本
6动脉, 2血细胞, 2大脑, 1心脏, 2肝, 3肺, 2静脉, 1脂肪组织, 1肾上腺, 5骨髓, 1软骨, 1结肠, 1食管, 2眼, 2胆囊, 1肾脏, 6淋巴结, 4胰腺, 2末梢神经, 2脑下垂体, 1直肠, 2唾液腺, 2骨髓肌肉, 1皮肤, 1小肠, 1脾脏, 1胃, 1甲状腺, 7气管, 1膀胱, 1乳腺, 5卵巢, 5胎盘, 1前列腺, 1睾丸, 1胸腺, 1子宫

53癌样本
53癌样本
4胆管癌, 6胆囊癌, 10淋巴瘤, 12卵巢癌, 11食管癌, 10肺癌

图2H

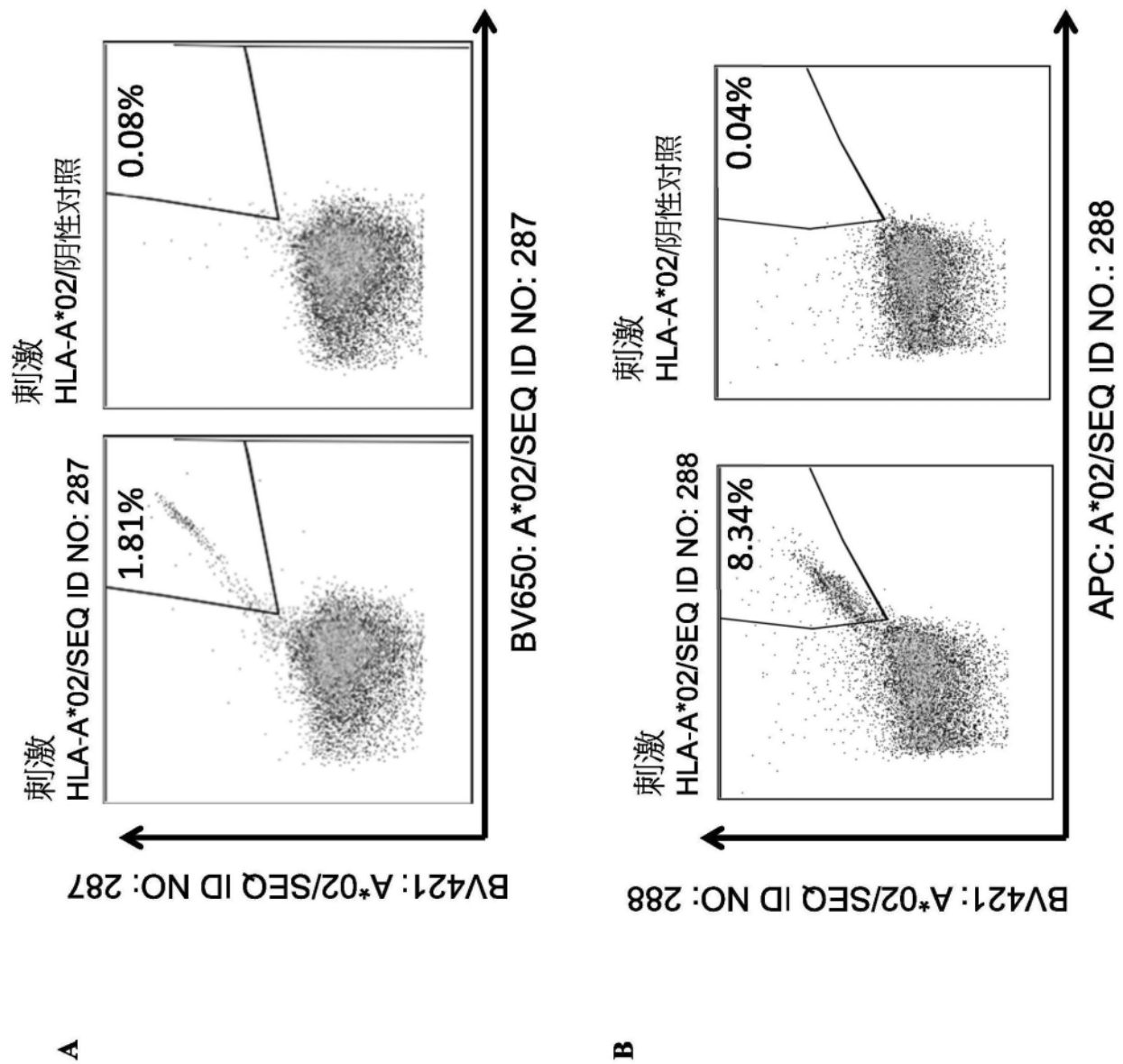


图3

SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001

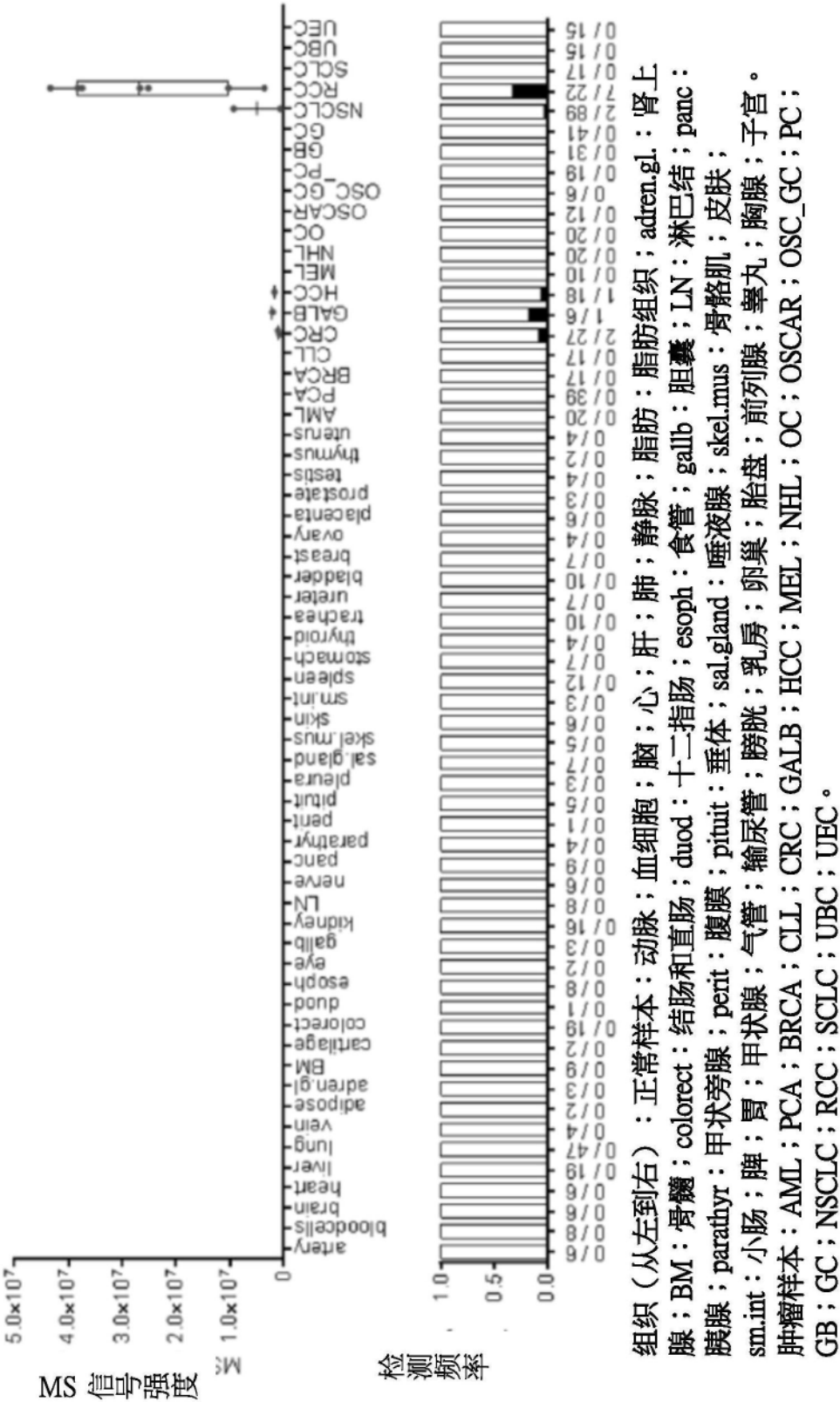


图4A

SEQ ID NO: 14: MMP1-003

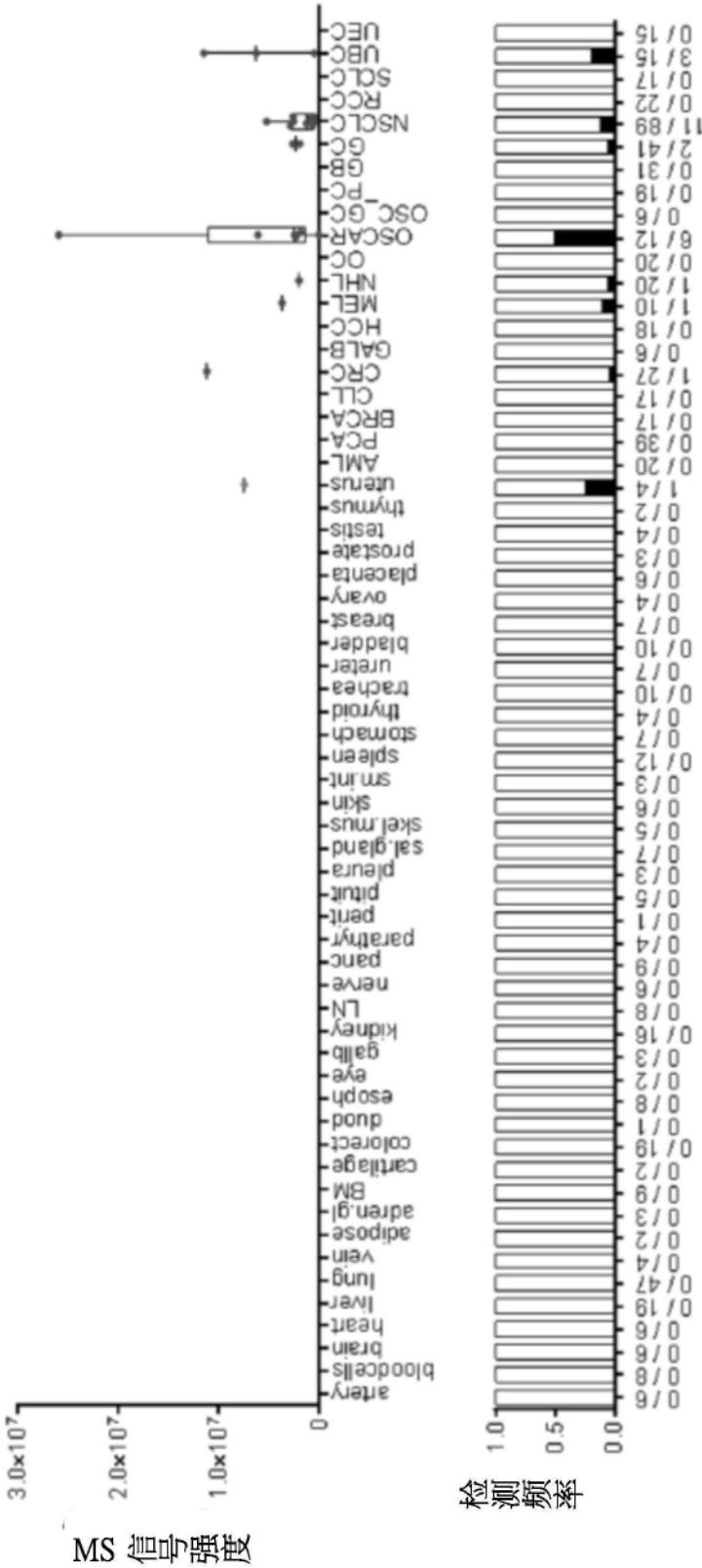


图4B

SEQ ID NO: 21: COL6A3-015

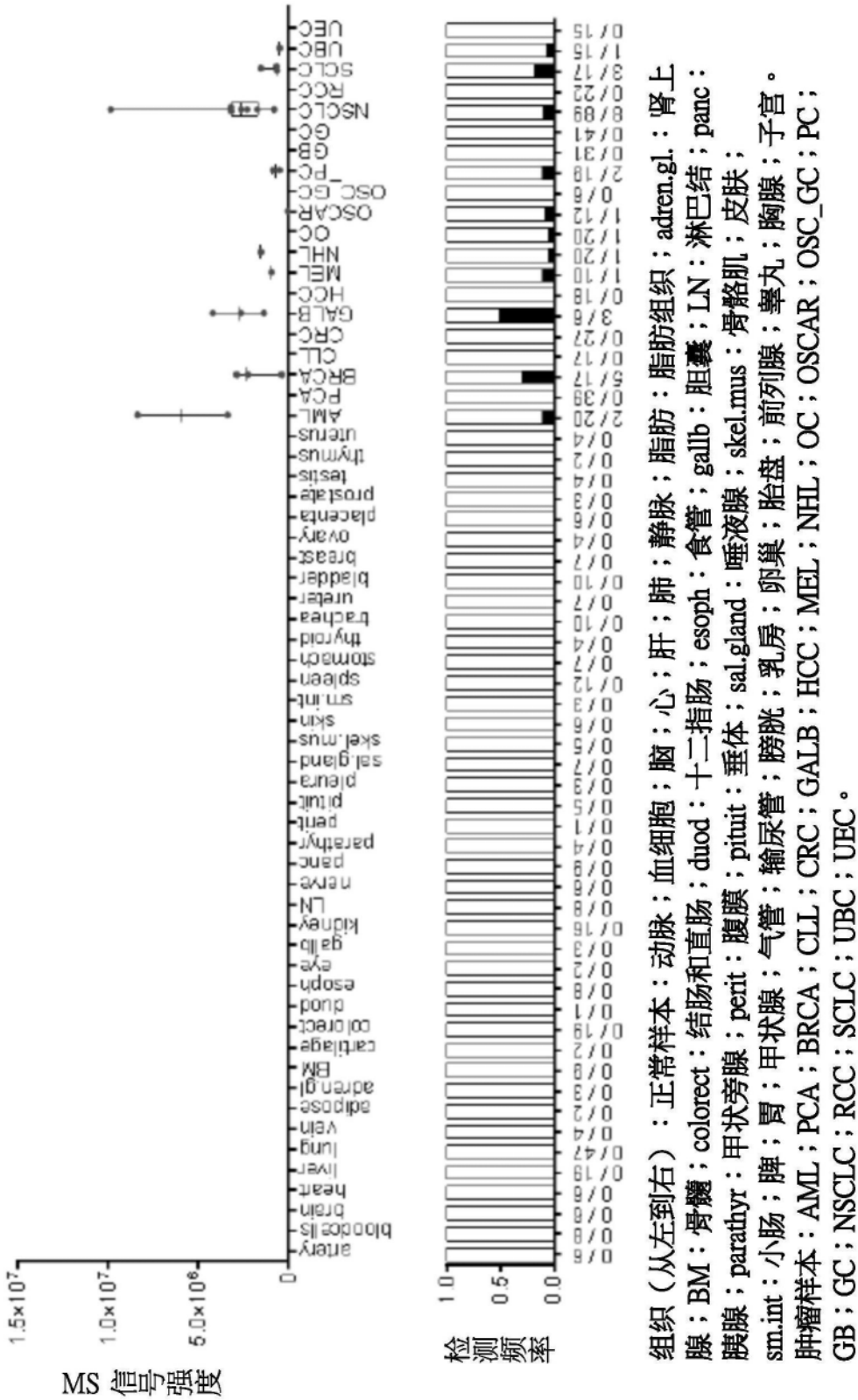
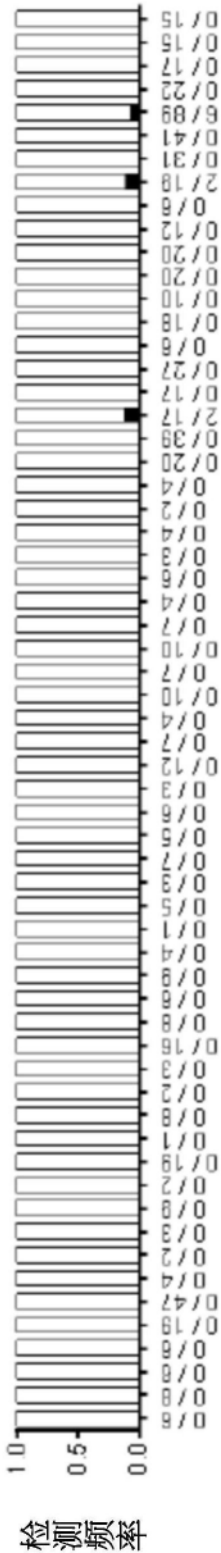
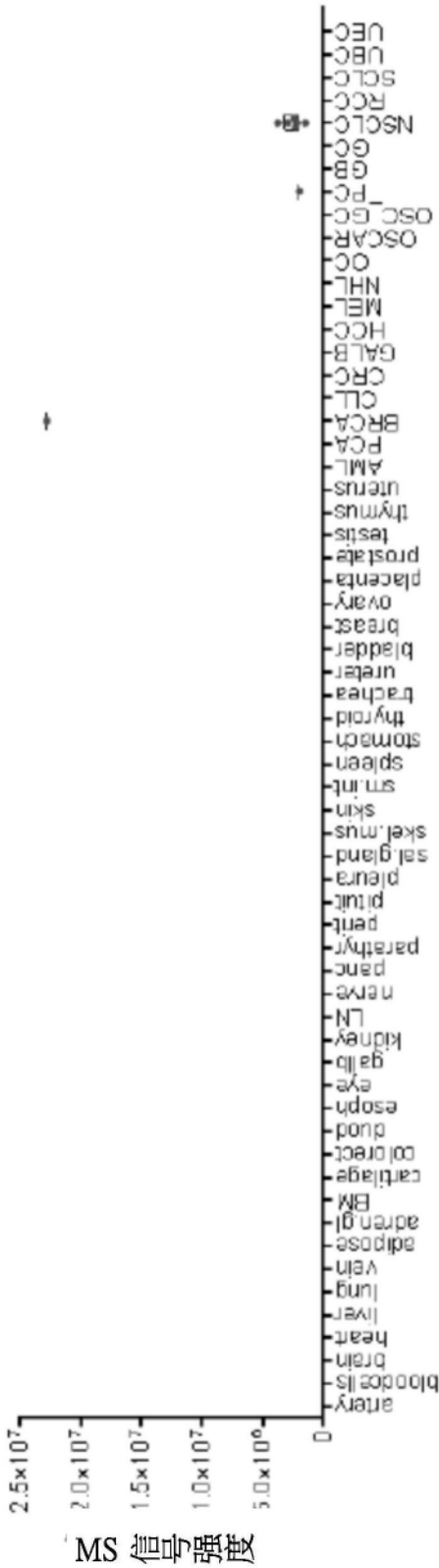


图4C

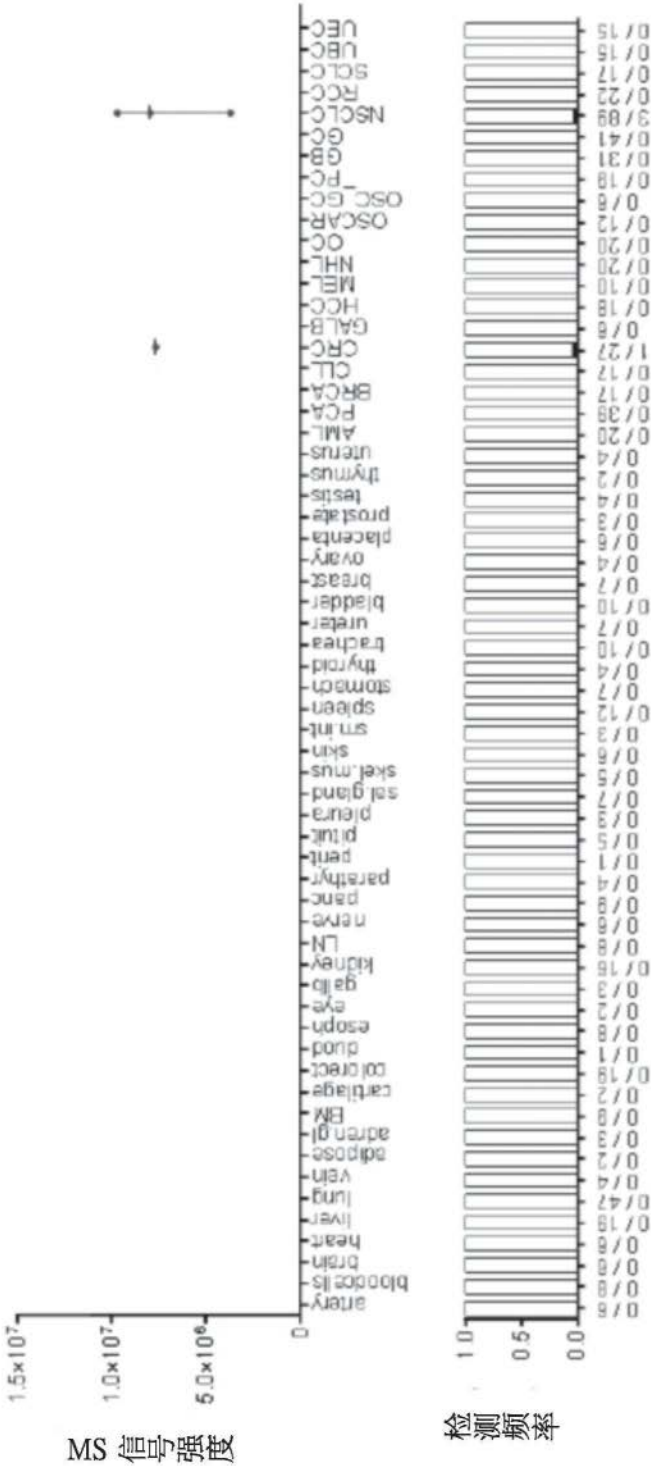
SEQ ID NO: 24: MMP-002



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl：肾上腺；BM：骨髓；colorect：结肠和直肠；duod：十二指肠；esoph：食管；galb：胆囊；LN：淋巴结；panc：胰腺；parathyr：甲状旁腺；perit：腹膜；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；输尿管；膀胱；乳房；卵巢；前腺；睾丸；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；OSC_GC；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UEC。

图4D

SEQ ID NO: 25: MXRA5-003



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；colorect：结肠和直肠；duod：十二指肠；esoph：食管；gallb：胆囊；LN：淋巴结；panc：胰腺；parathyr：甲状旁腺；perit：腹膜；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；输尿管；膀胱；乳房；卵巢；前列腺；睾丸；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；OSC_GC；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图4E

SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



图4F

SEQ ID NO: 85: FMN1-001

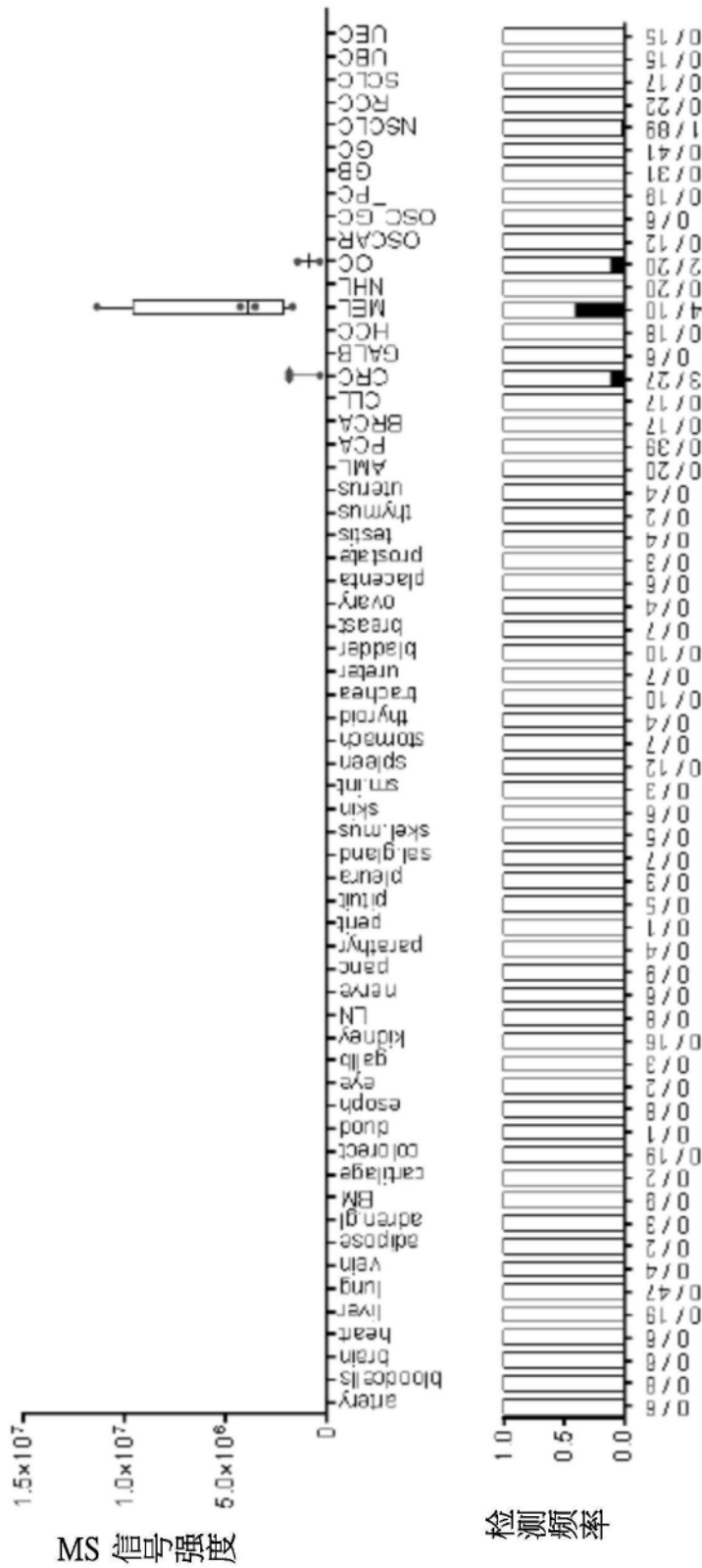


图4G

SEQ ID NO: 89: HTR3A-001

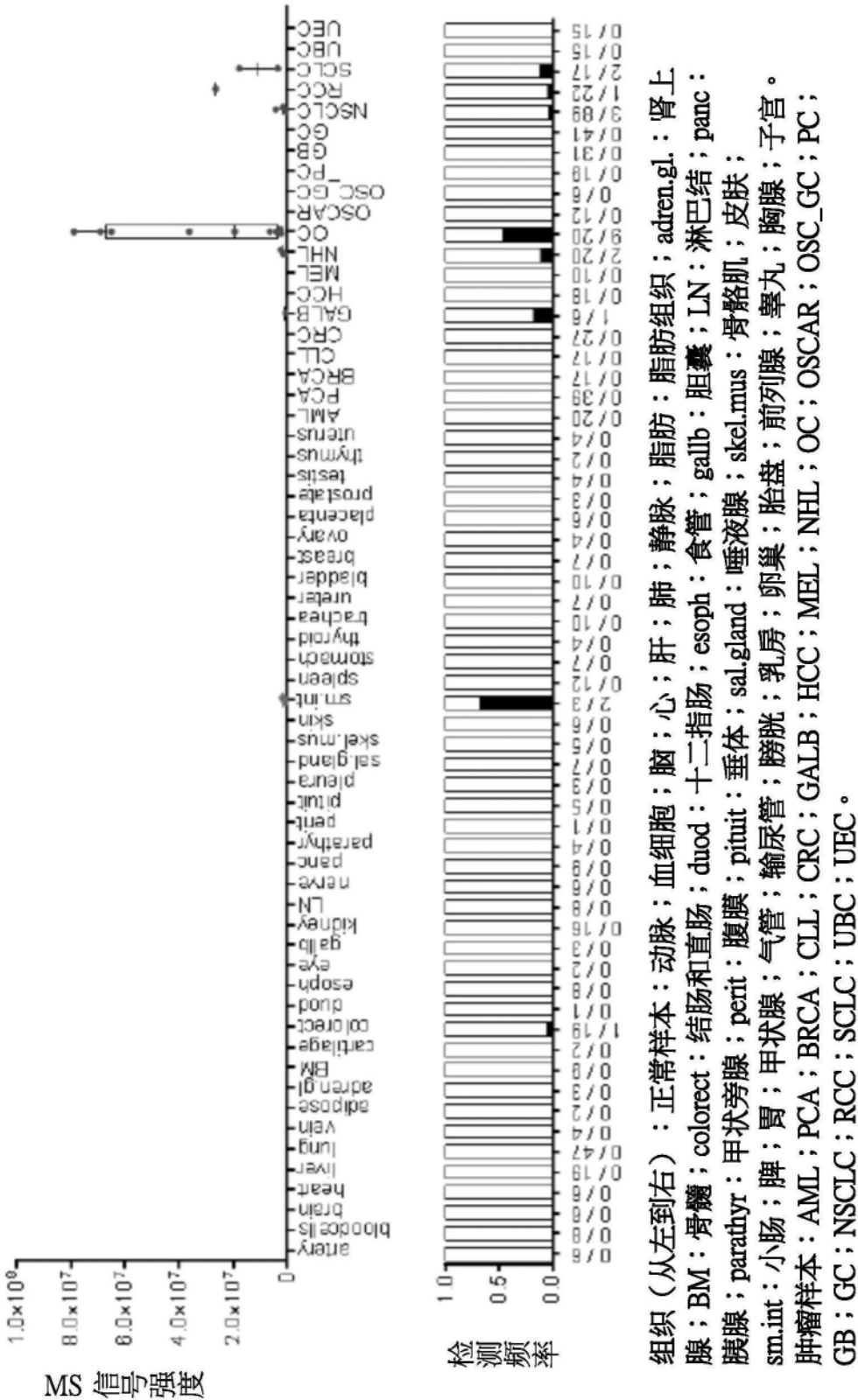


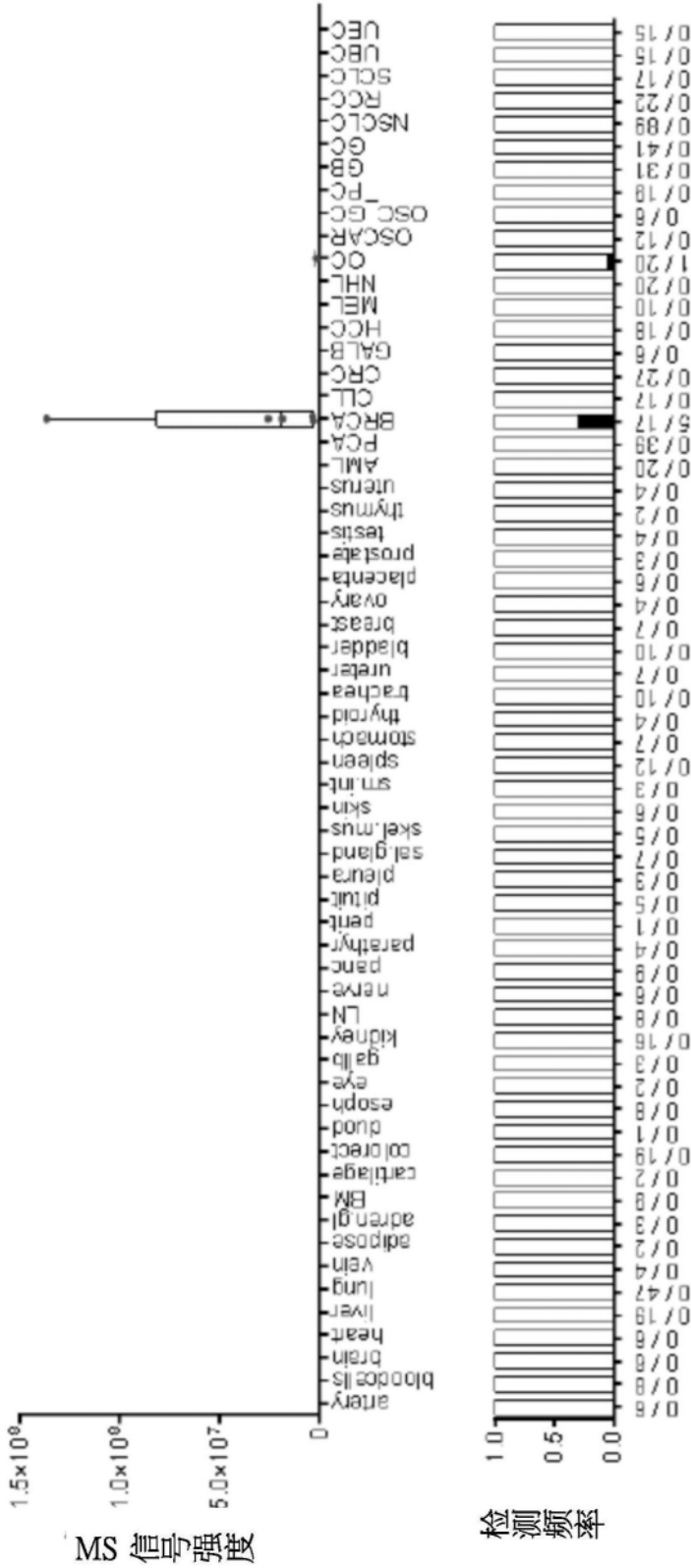
图4H

SEQ ID NO: 117: CABY-001



图4I

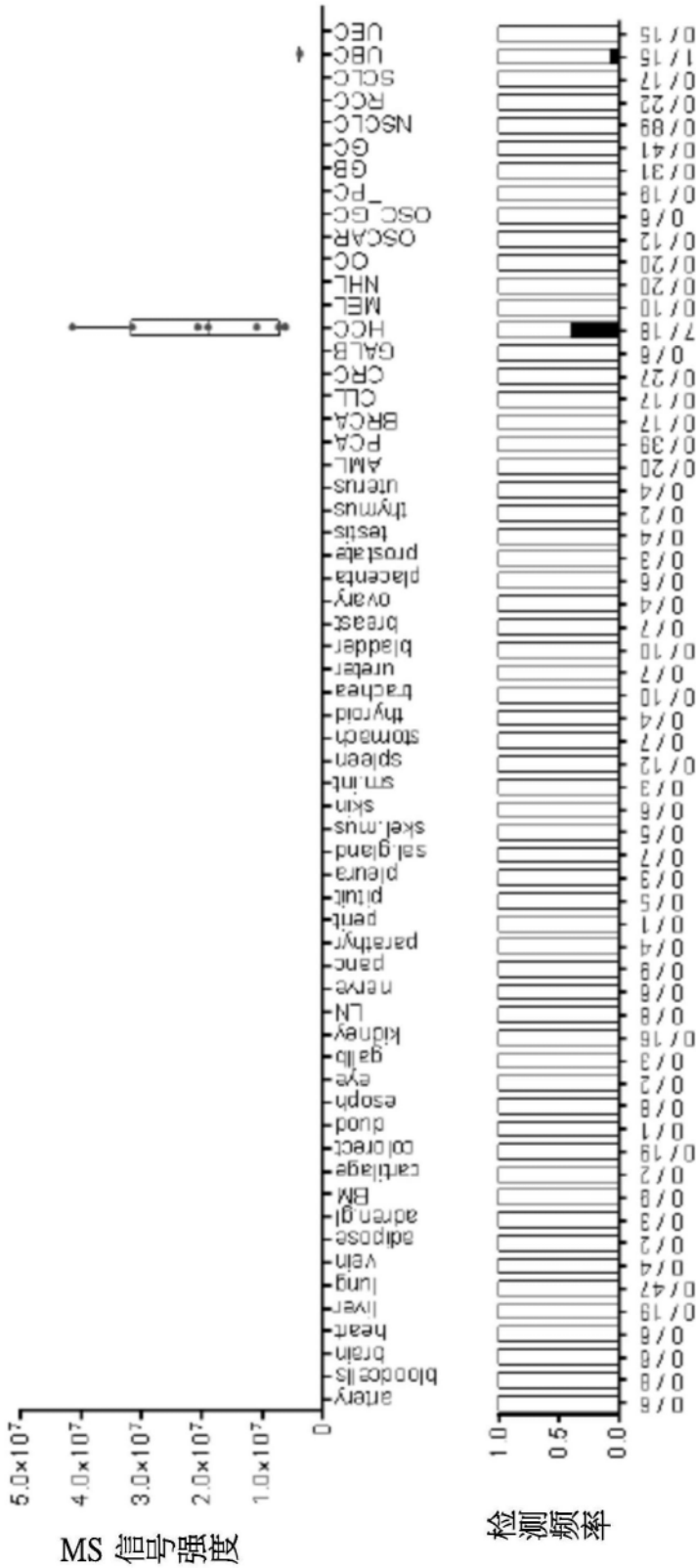
SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；colorect：结肠和直肠；duod：十二指肠；esoph：食管；gallb：胆囊；LN：淋巴结；panc：胰腺；parathyr：甲状旁腺；perit：腹膜；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；输尿管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；前列腺；睾丸；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；OSC_GC；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图4K

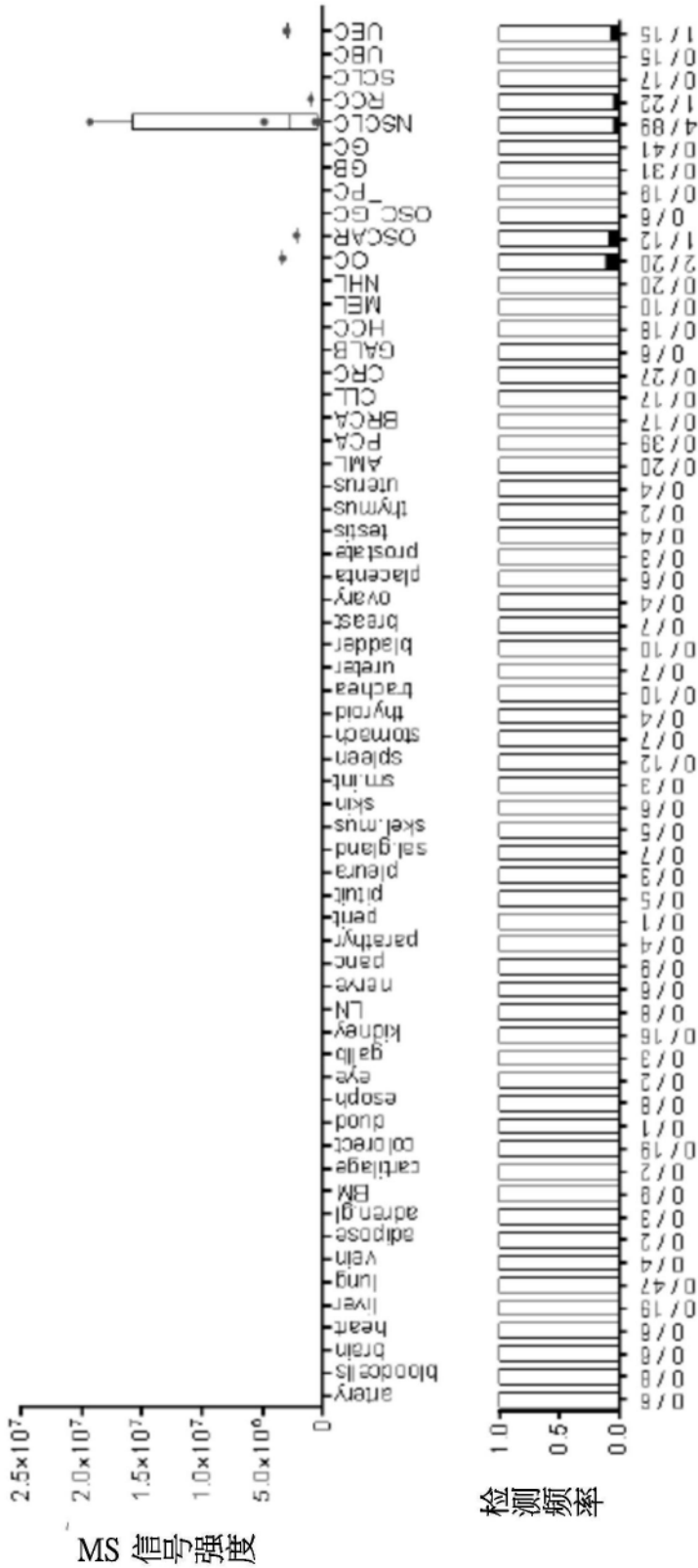
SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl：肾上腺；BM：骨髓；colorect：结肠和直肠；duod：十二指肠；esoph：食管；gallb：胆囊；LN：淋巴结；panc：胰腺；parathyr：甲状旁腺；perit：腹膜；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；输尿管；膀胱；卵巢；子宫；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；OSC_GC；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UEC。

图4L

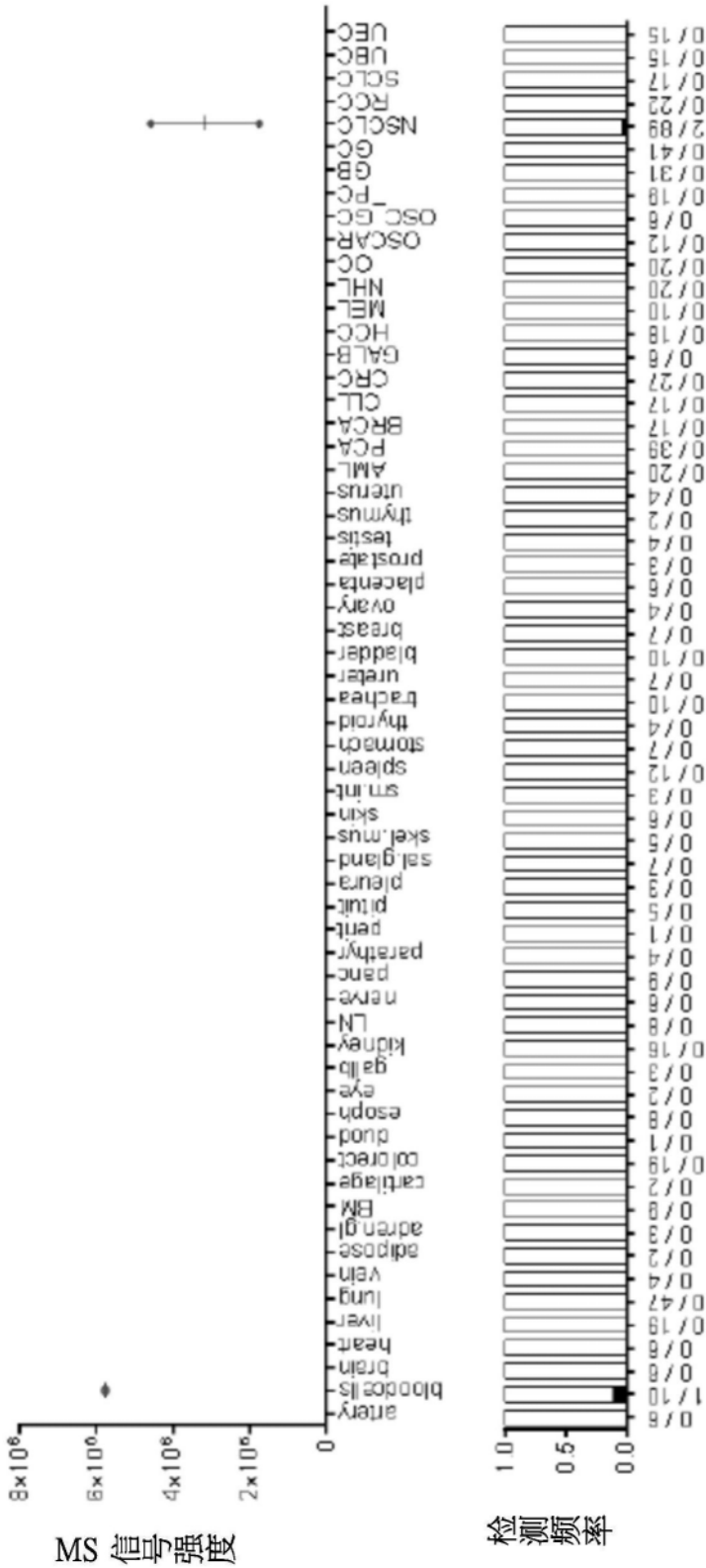
SEQ ID NO: 233: ZFP42-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；colorect：结肠和直肠；duod：十二指肠；esoph：食管；gallb：胆囊；LN：淋巴结；panc：胰腺；parathy：甲状旁腺；perit：腹膜；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；输尿管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；前列腺；睾丸；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；OSC_GC；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图4N

SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.；肾上腺；BM；骨髓；colorect；结肠和直肠；duod；十二指肠；esoph；食管；gallb；胆囊；LN；淋巴结；panc；胰腺；parathy；甲状旁腺；perit；腹膜；pituit；垂体；skel.mus；骨骼肌；皮肤；sm.int；小肠；脾；胃；甲状腺；气管；输尿管；膀胱；乳房；卵巢；前腺；睾丸；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；OSC_GC；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图40

SEQ ID NO: 253: RAD54B-002

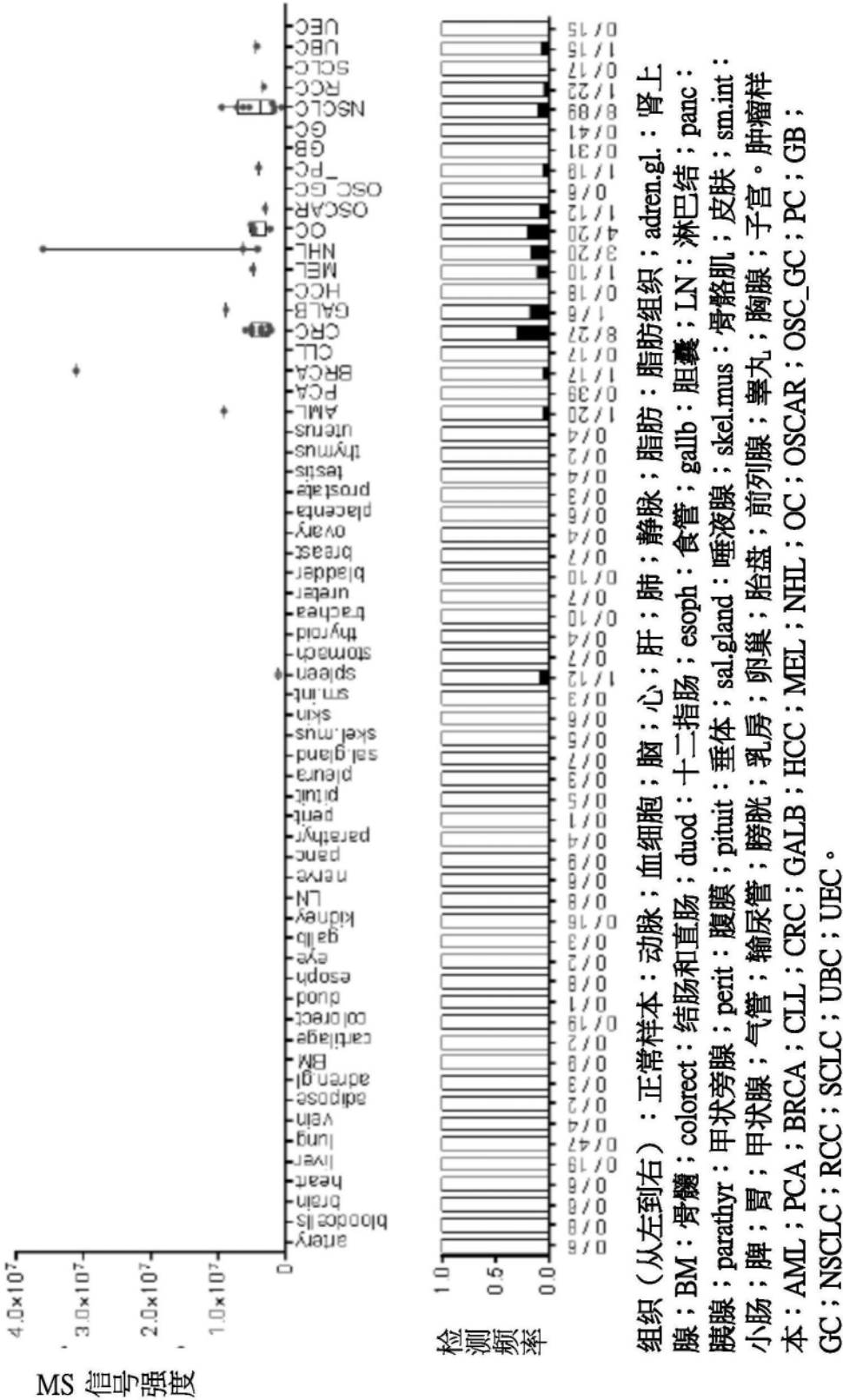


图4P

SEQ ID NO: 264: ESR1-001

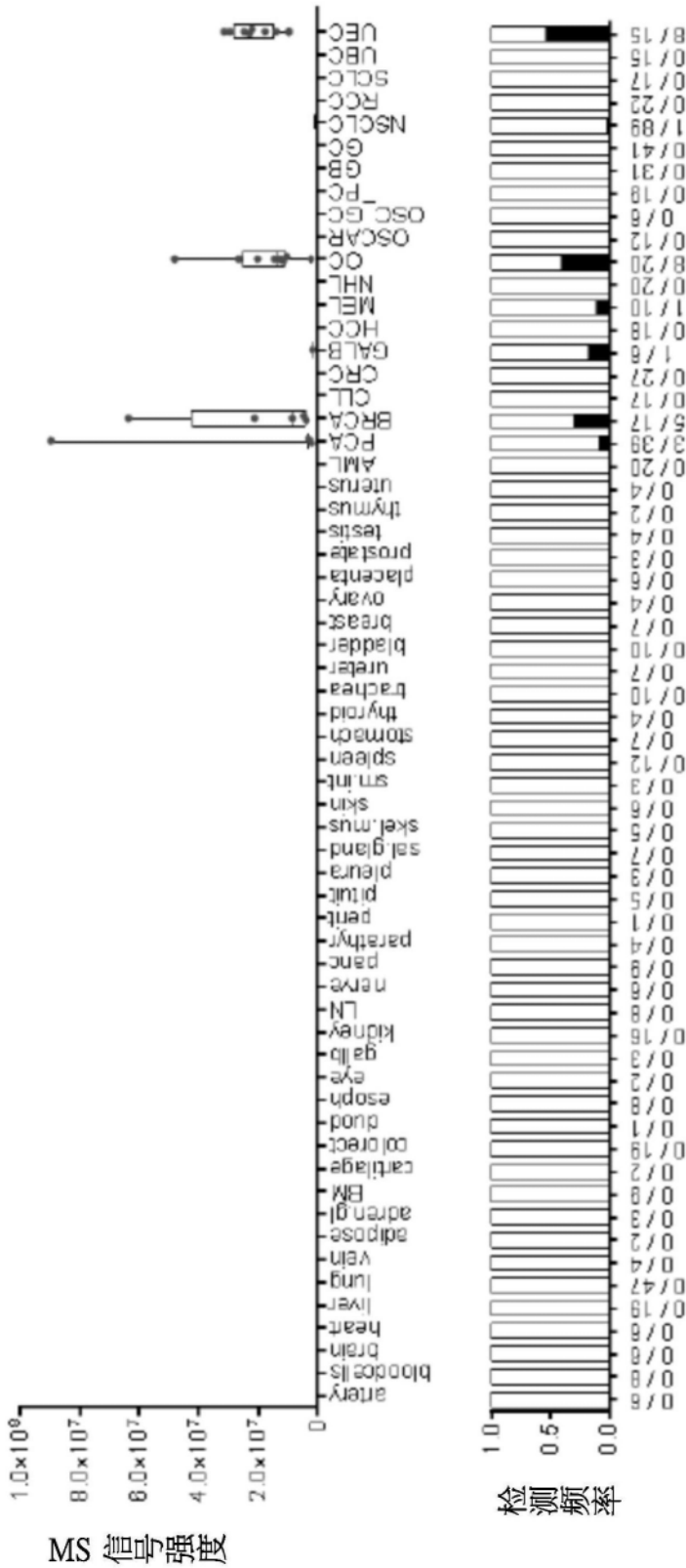


图4Q

SEQ ID NO: 274: IGF-004

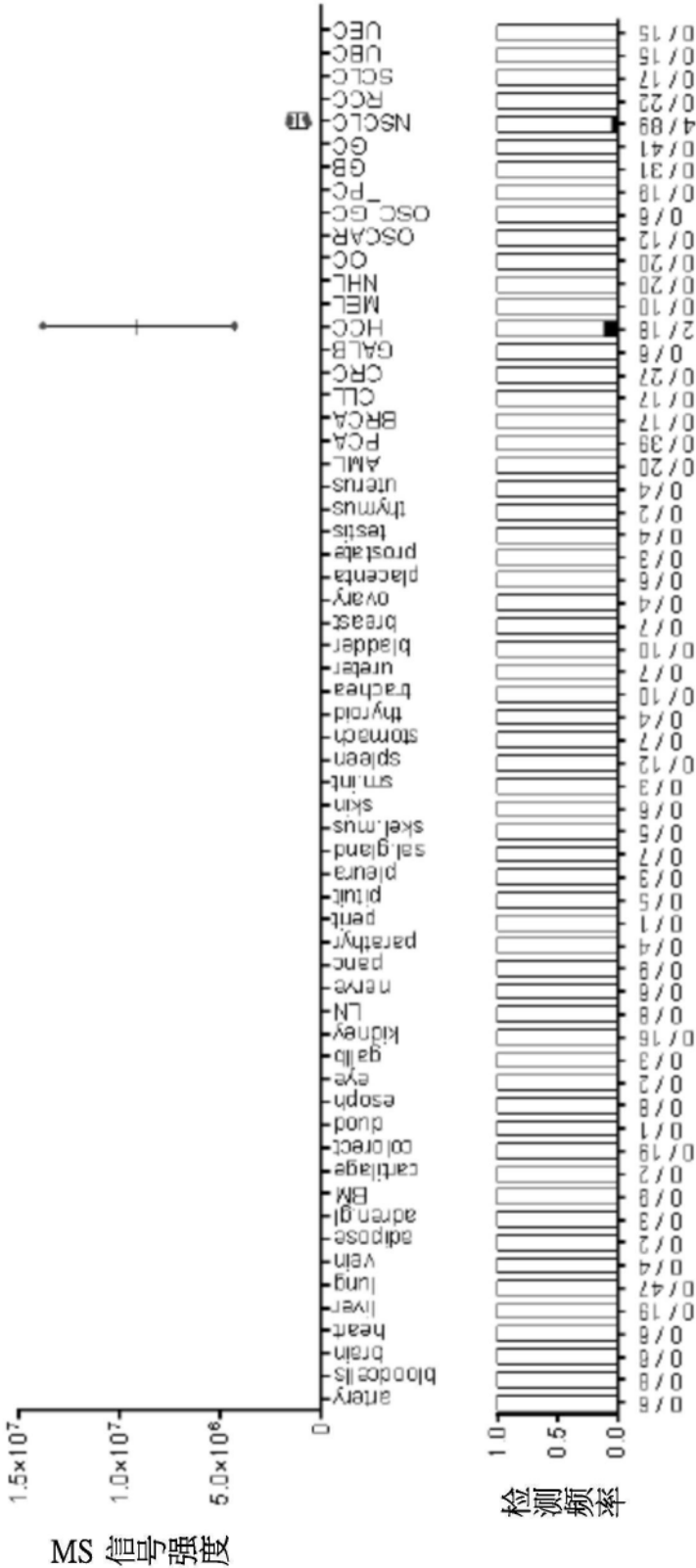


图4R

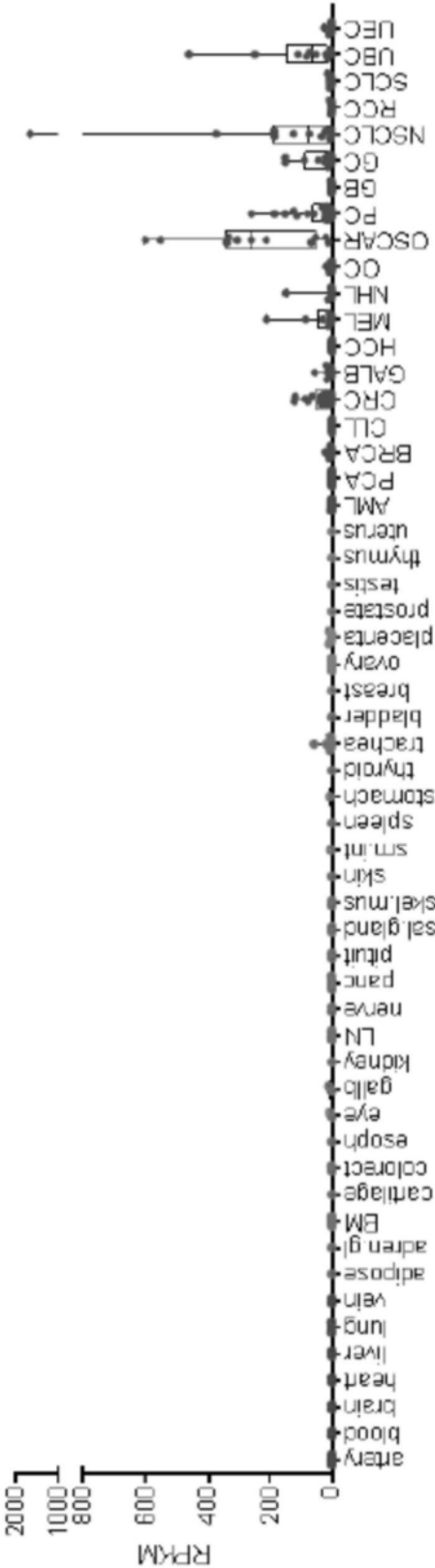
SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5A

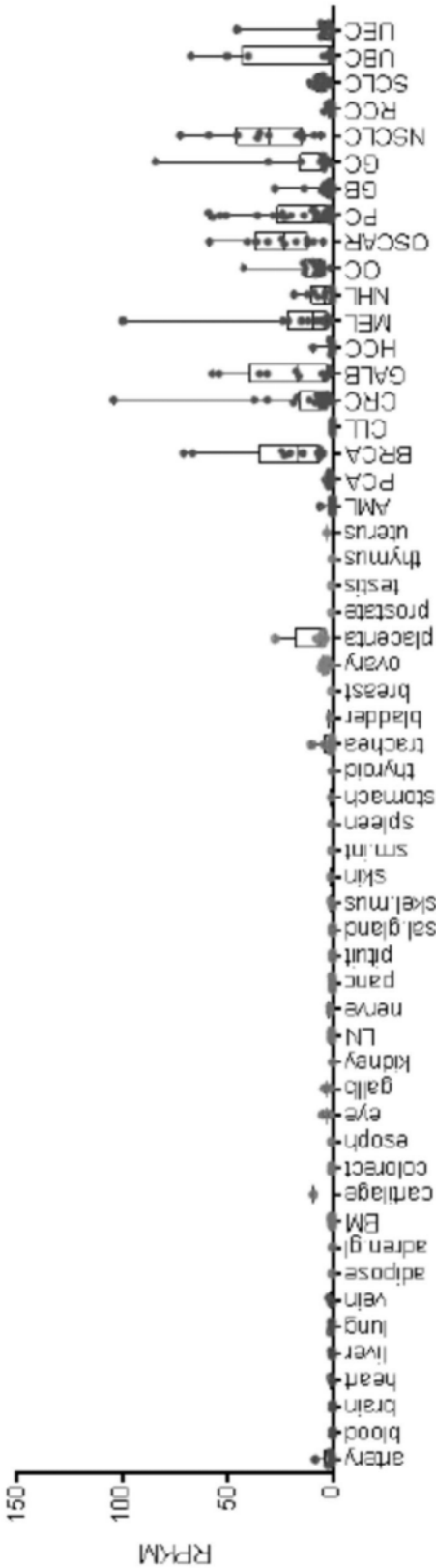
SEQ ID NO: 14: MMP1-003



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；肋骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；胎盘；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UEC。

图5B

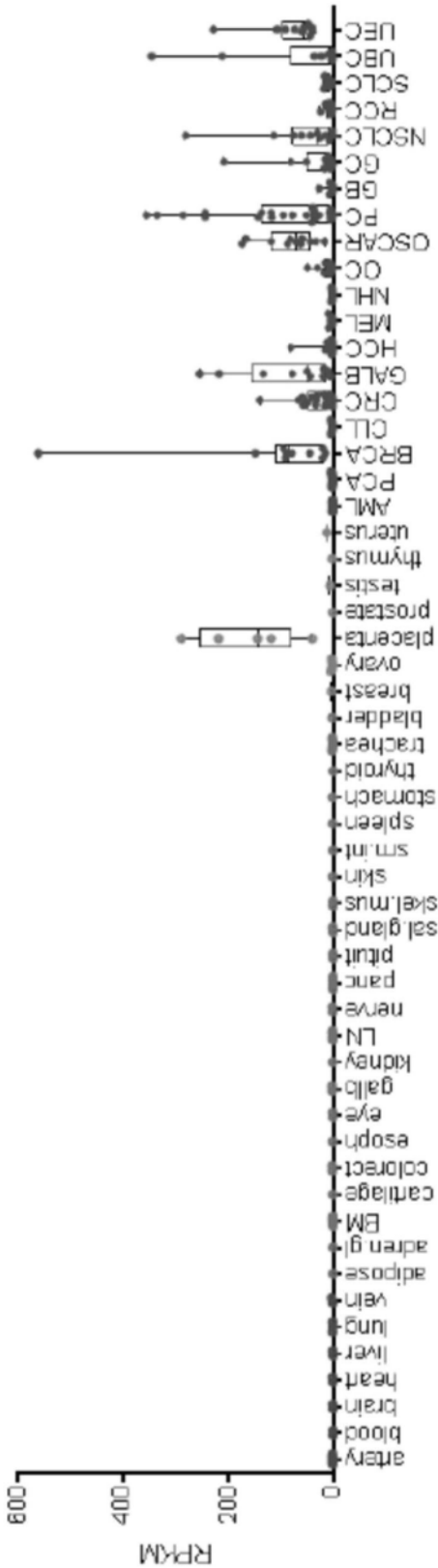
SEQ ID NO: 21: COL6A3-015



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；前腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UEC。

图5C

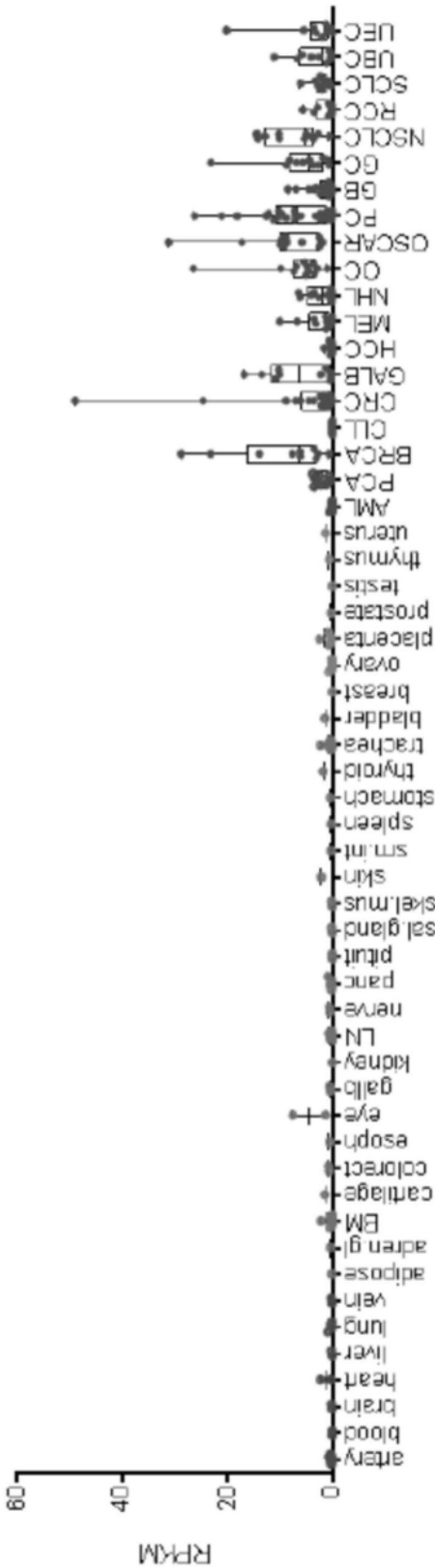
SEQ ID NO: 24: MMP-002



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；睾丸；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5D

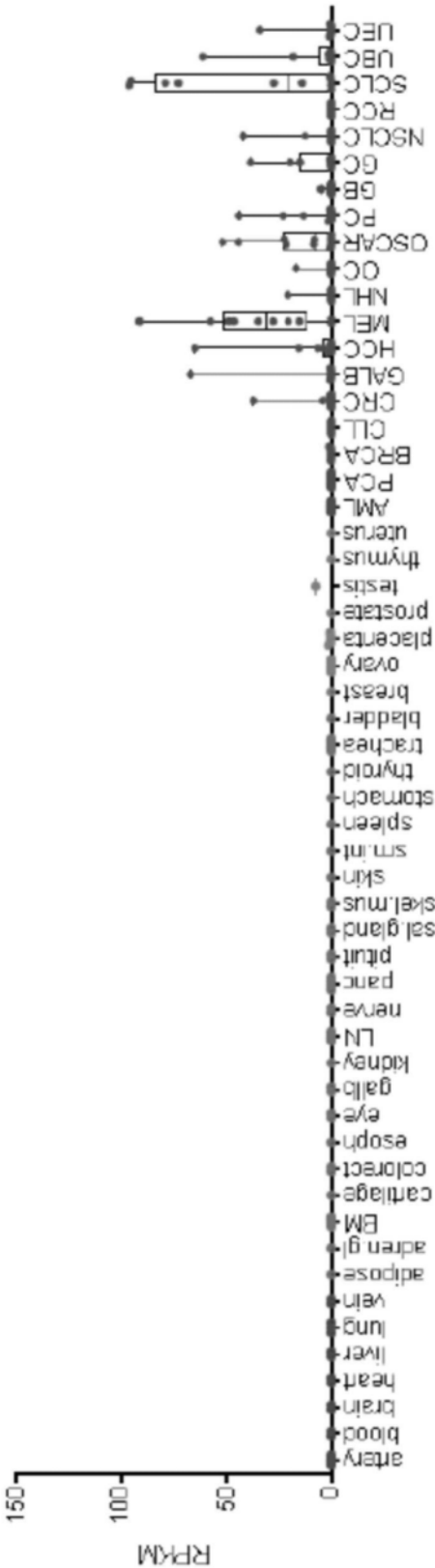
SEQ ID NO: 25: MXRA5-003



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5E

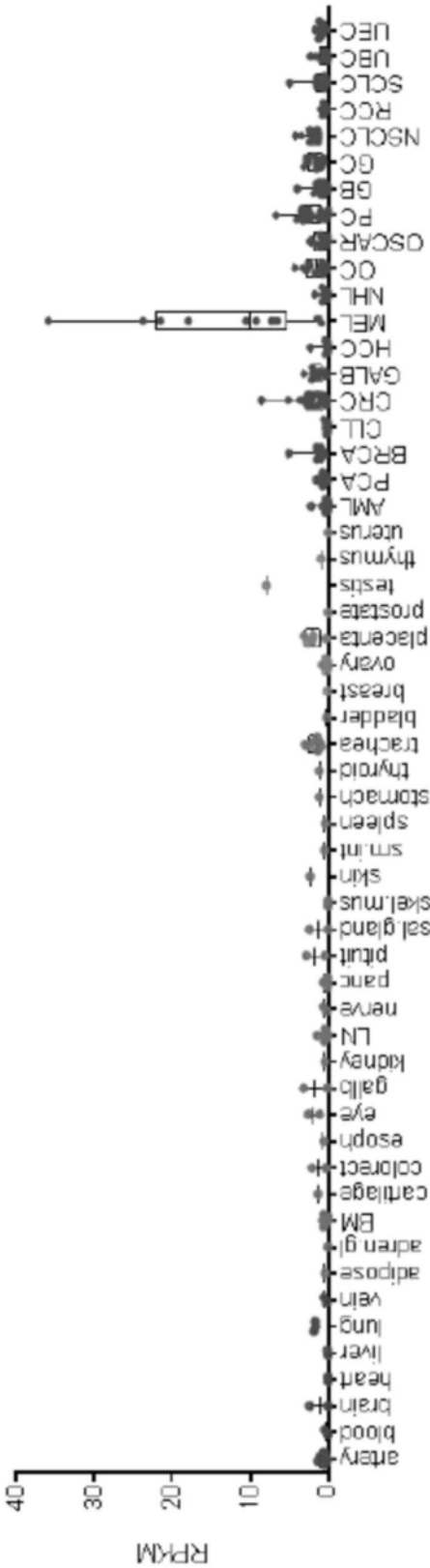
SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；前列腺；睾丸；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5F

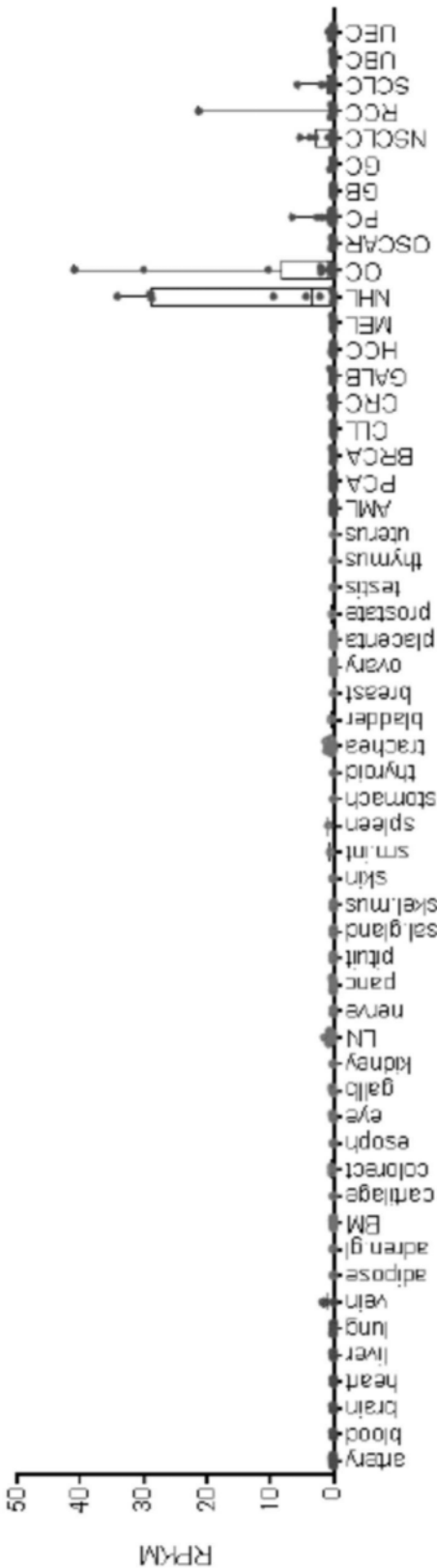
SEQ ID NO: 85: FMN1-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；前列腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5G

SEQ ID NO: 89: HTR3A-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；前列腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5H

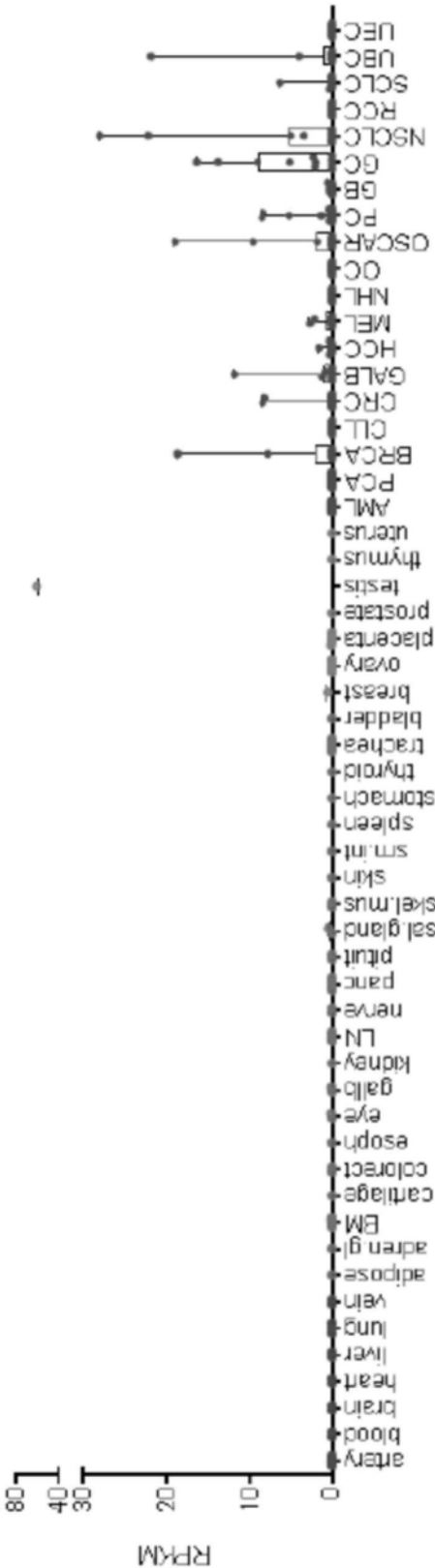
SEQ ID NO: 117: CABY-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；前列腺；睾丸；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UEC；UEC。

图5I

SEQ ID NO: 153: CT83-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5J

SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；前列腺；睾丸；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5K

SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl：肾上腺；BM：骨髓；软骨；结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；前列腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5L

SEQ ID NO: 168: HORMAD1-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UEC。

图5M

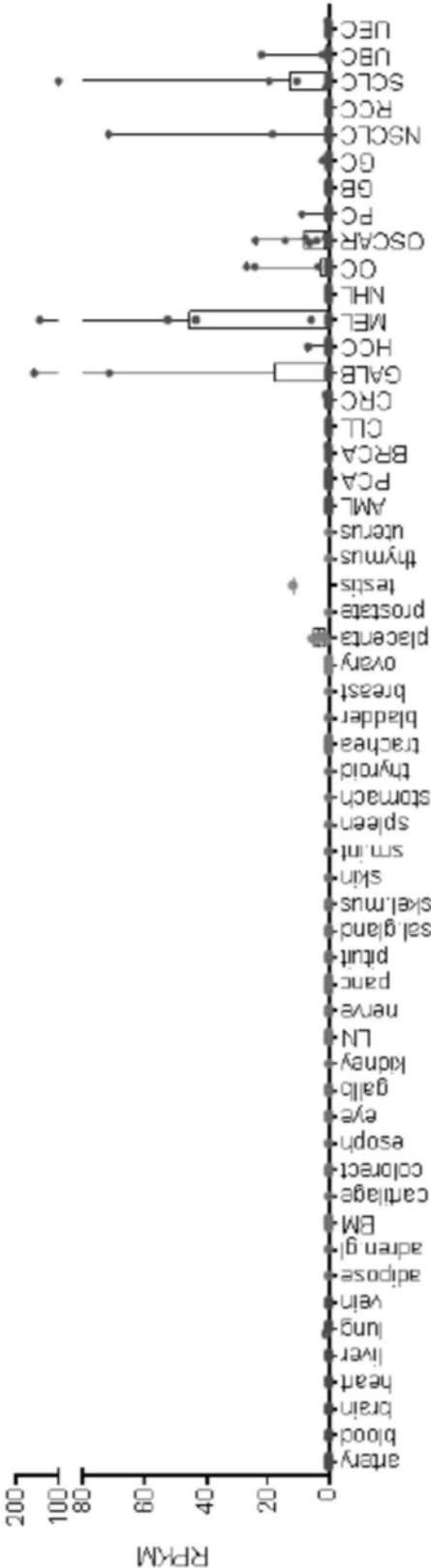
SEQ ID NO: 233: ZFP42-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl：肾上腺；BM：骨髓；软骨；结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；睾丸；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5N

SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图50

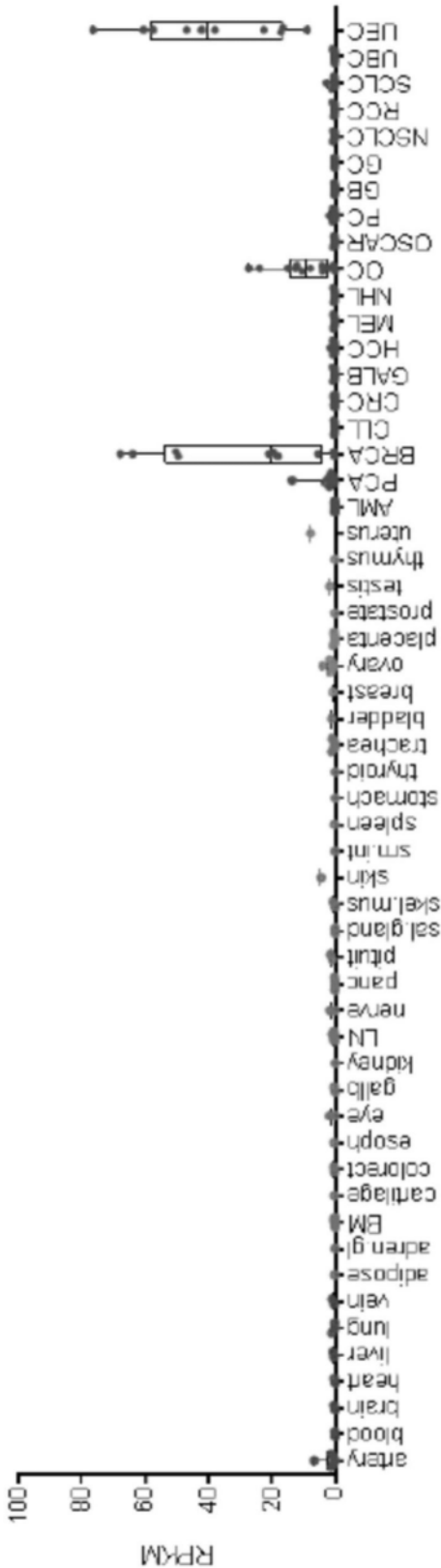
SEQ ID NO: 253: RAD54B-002



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl：肾上腺；BM：骨髓；软骨；colorect：结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5P

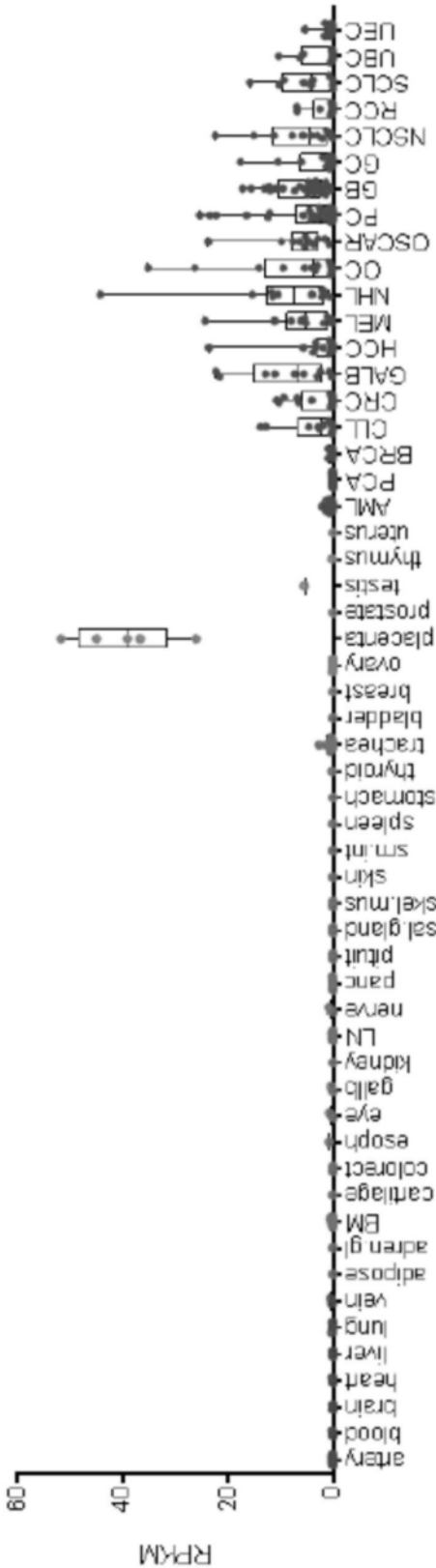
SEQ ID NO: 264: ESR1-001



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；gallb：胆囊；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；pituit：垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；肾上腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5Q

SEQ ID NO: 274: IGF-004



组织（从左到右）：正常样本：动脉；血细胞；脑；心；肝；肺；静脉；脂肪；脂肪组织；adren.gl.：肾上腺；BM：骨髓；软骨；结肠和直肠；esoph：食管；眼睛；胆囊；肾脏；LN：淋巴结；神经；panc：胰腺；垂体；垂体；sal.gland：唾液腺；skel.mus：骨骼肌；皮肤；sm.int：小肠；脾；胃；甲状腺；气管；膀胱；乳房；卵巢；胎盘；胸腺；子宫。肿瘤样本：AML；PCA；BRCA；CLL；CRC；GALB；HCC；MEL；NHL；OC；OSCAR；PC；GB；GC；NSCLC；RCC；SCLC；UBC；UEC。

图5R

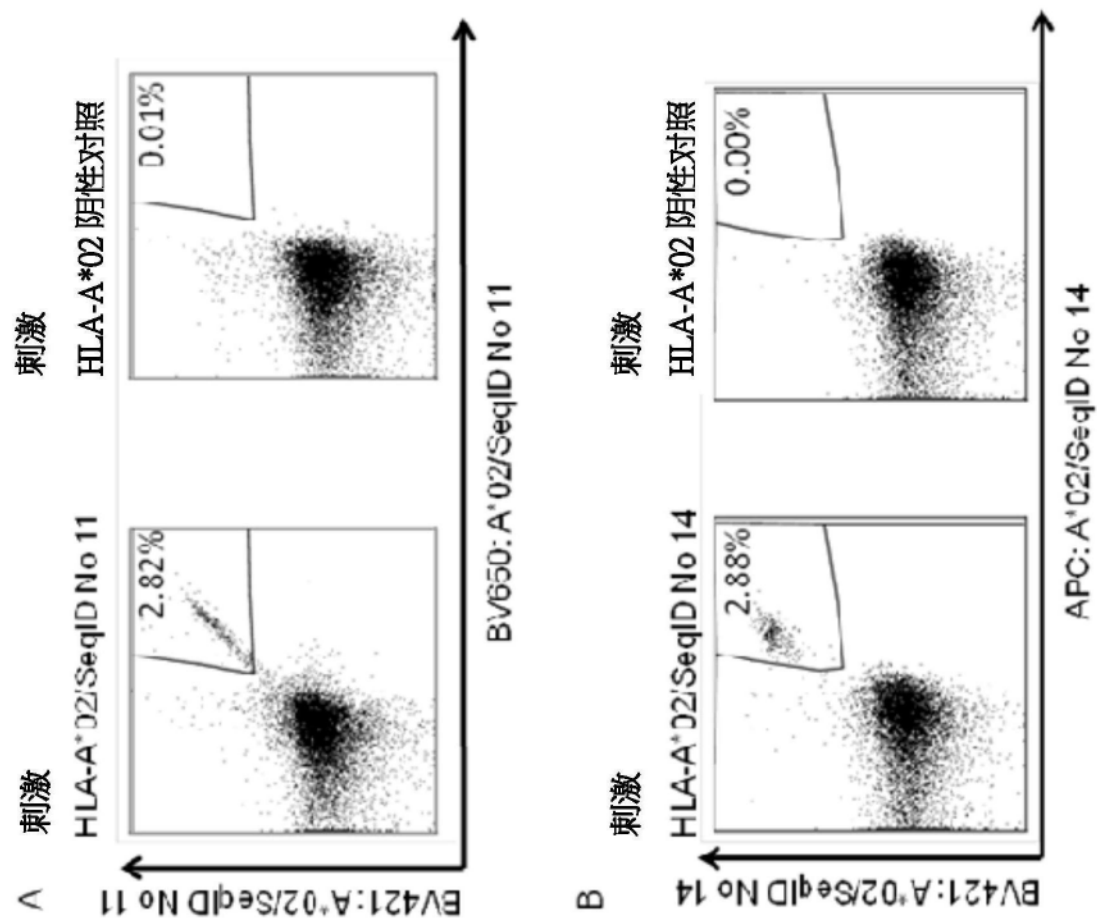


图6

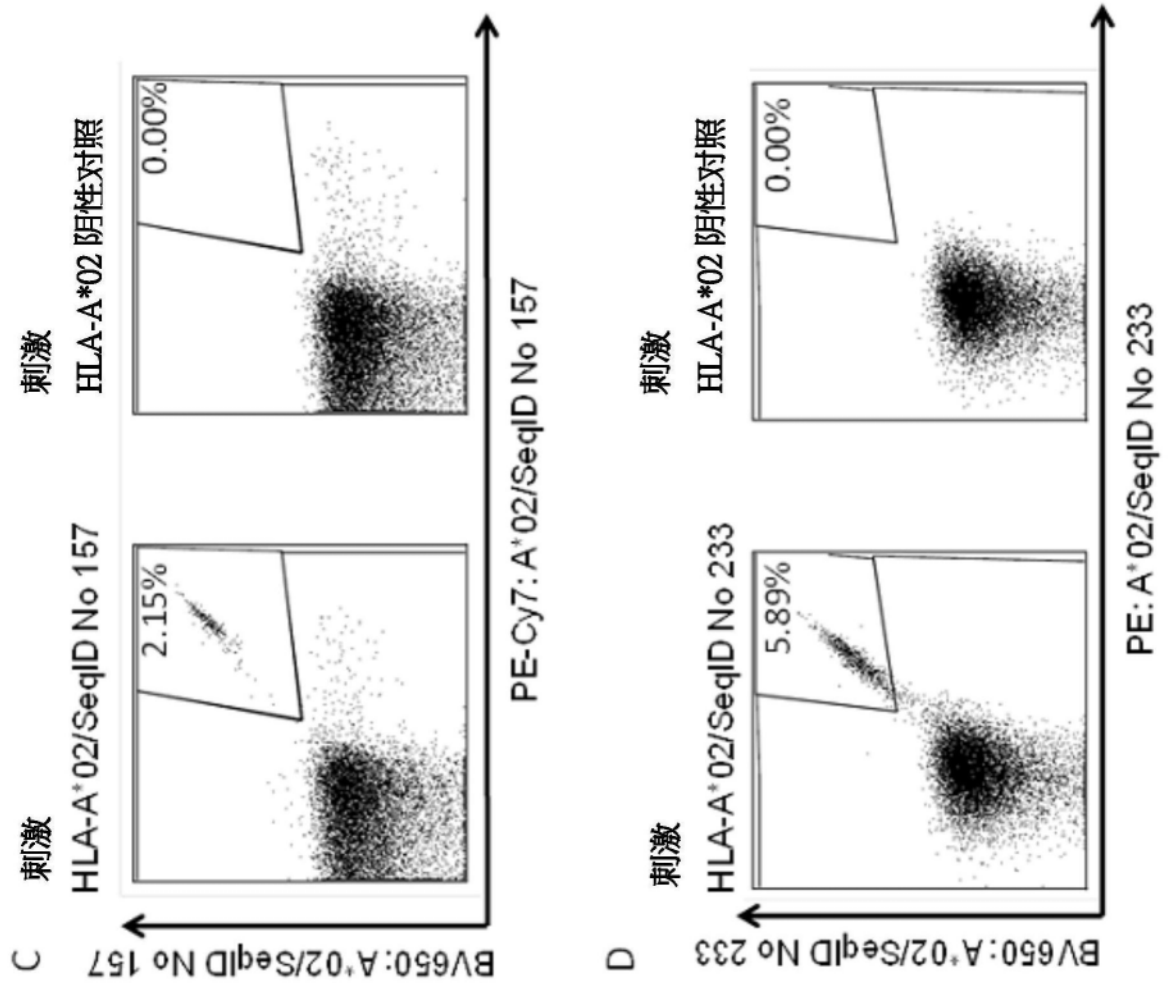


图6 (续)

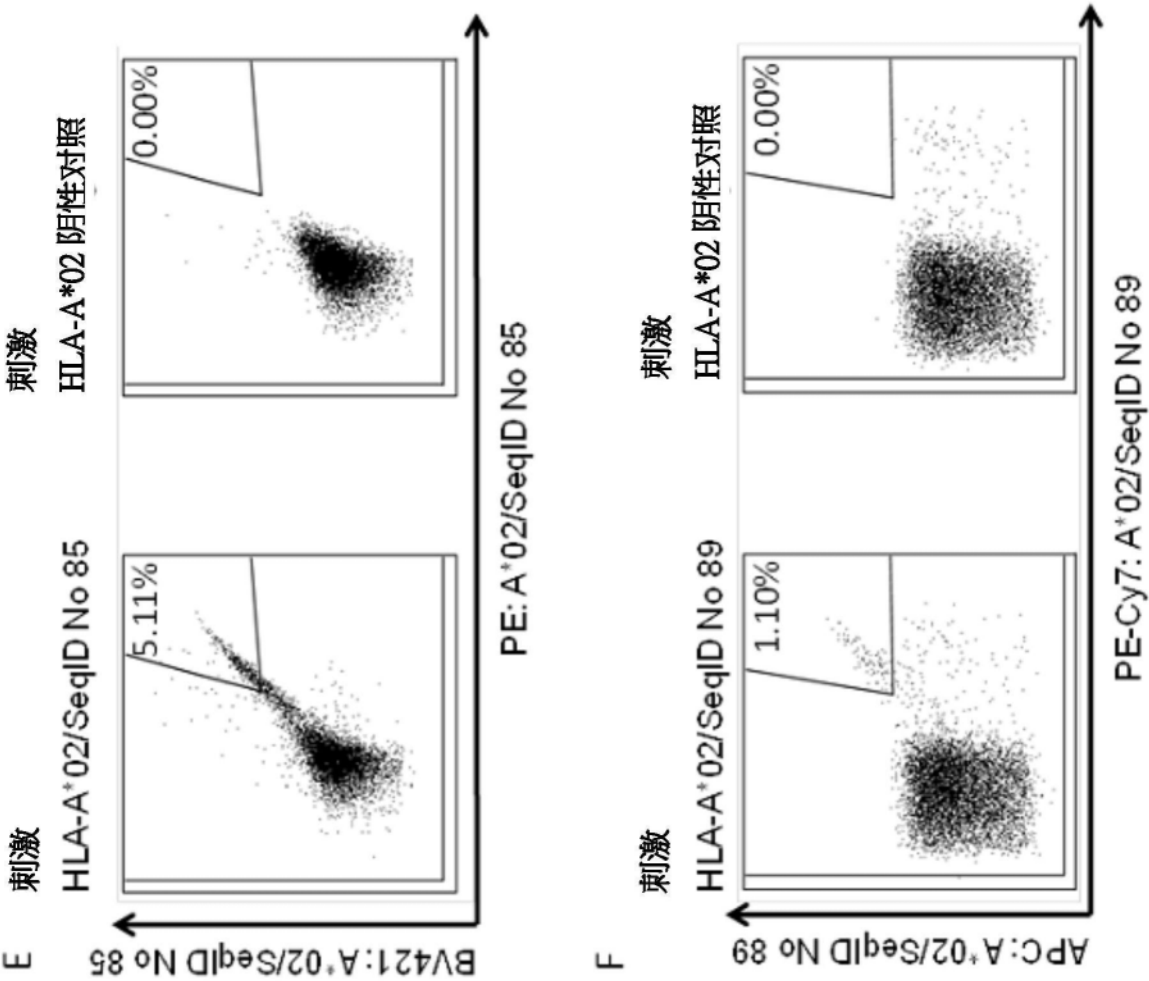


图6(续)

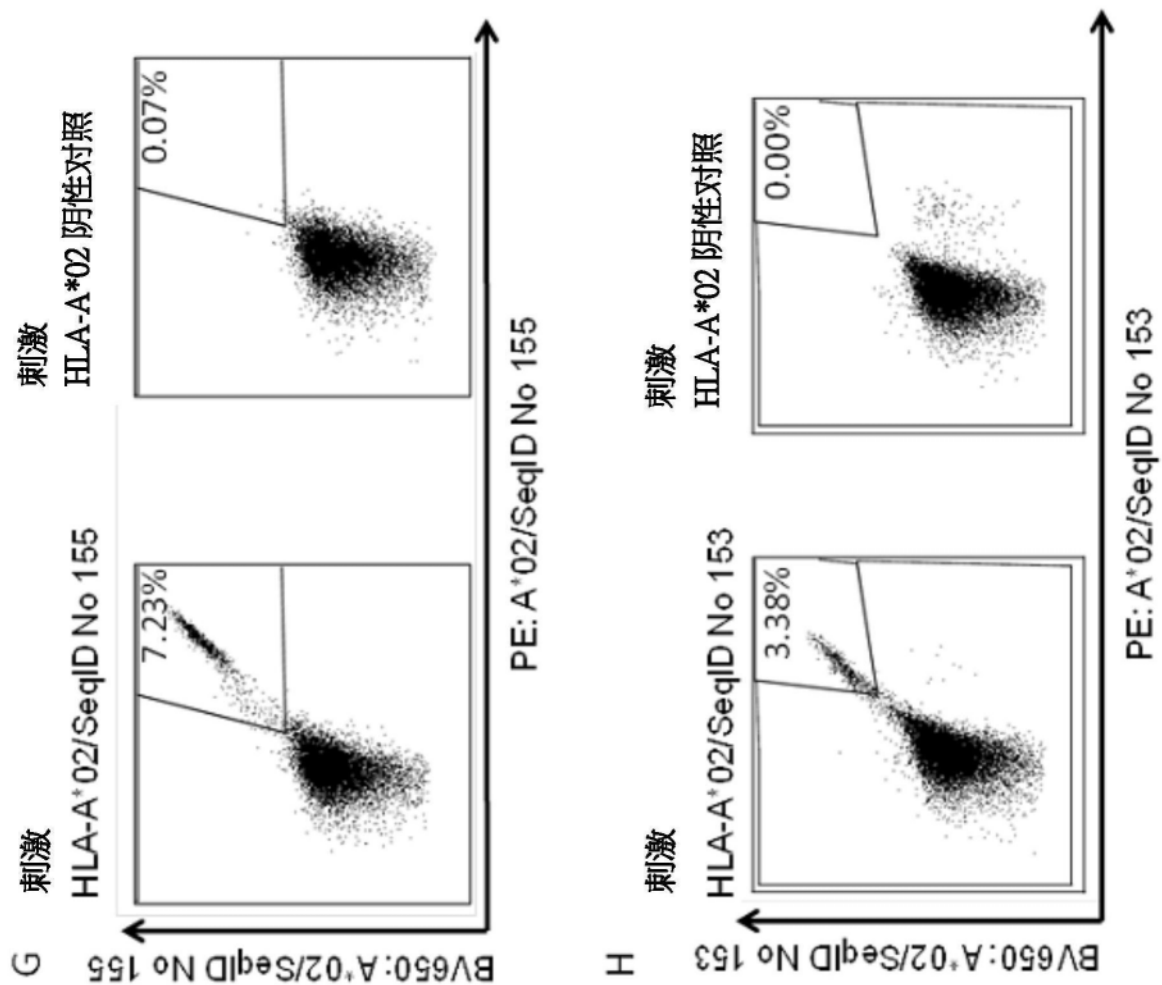


图6(续)

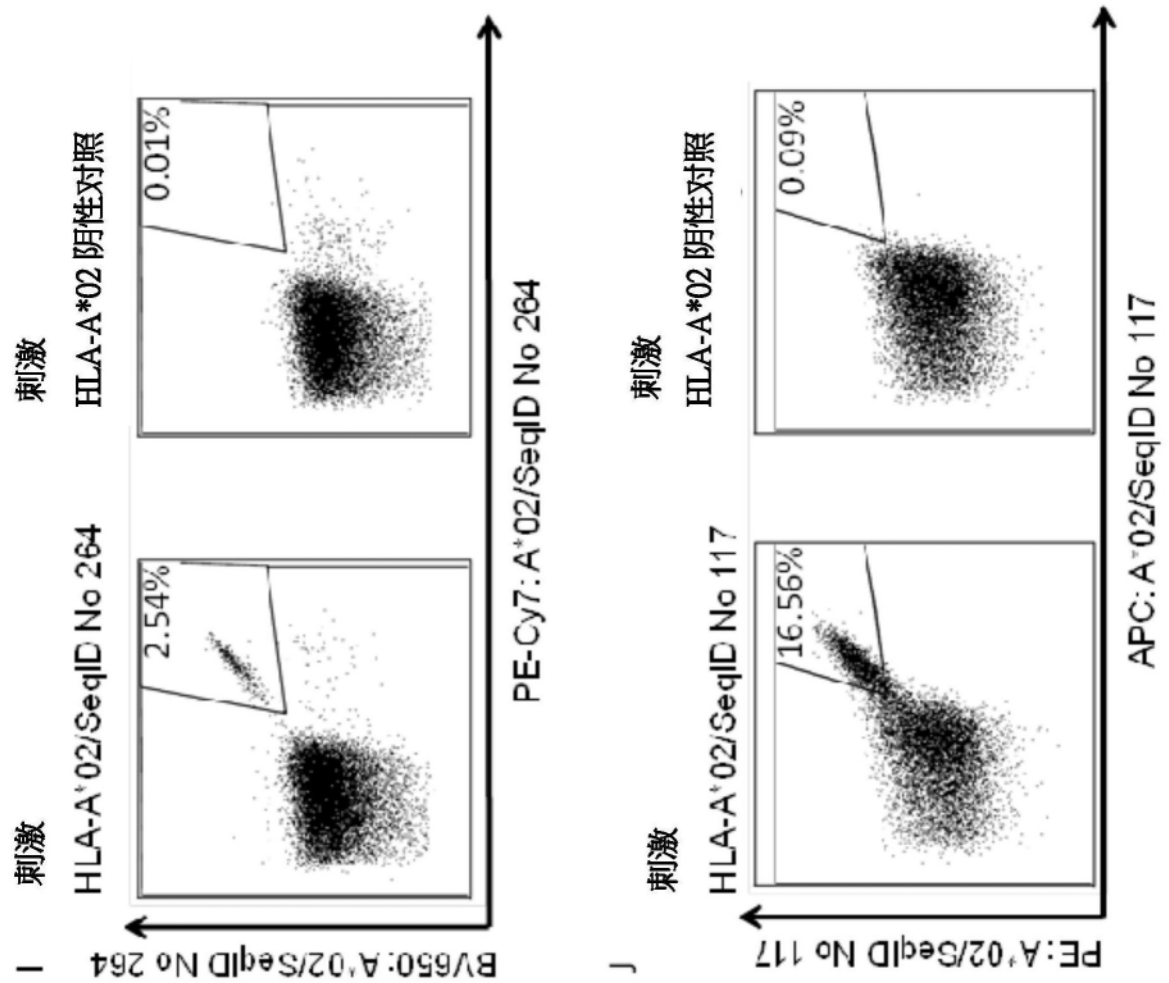


图6(续)

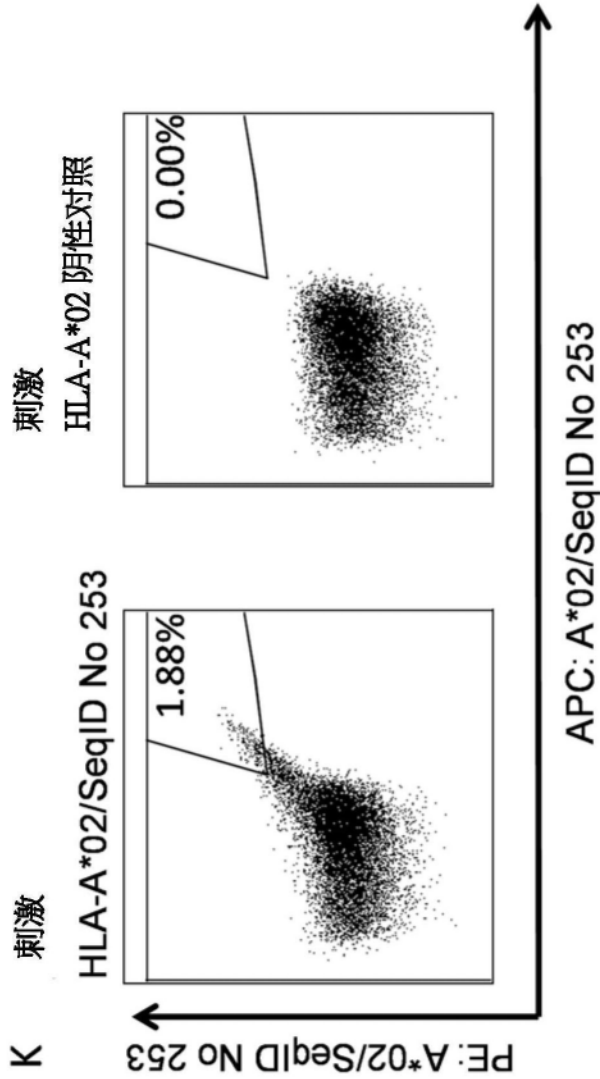


图6 (续)

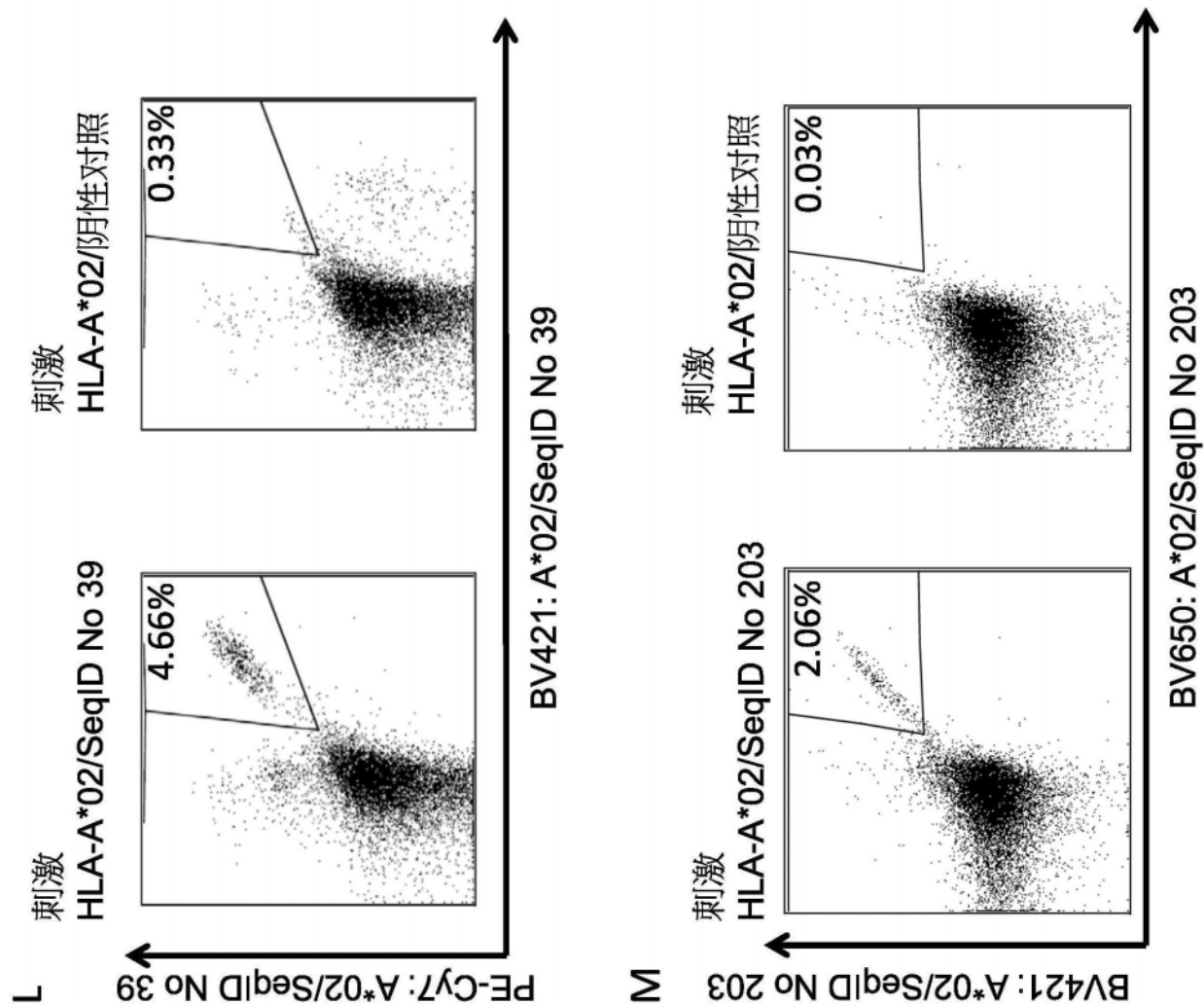
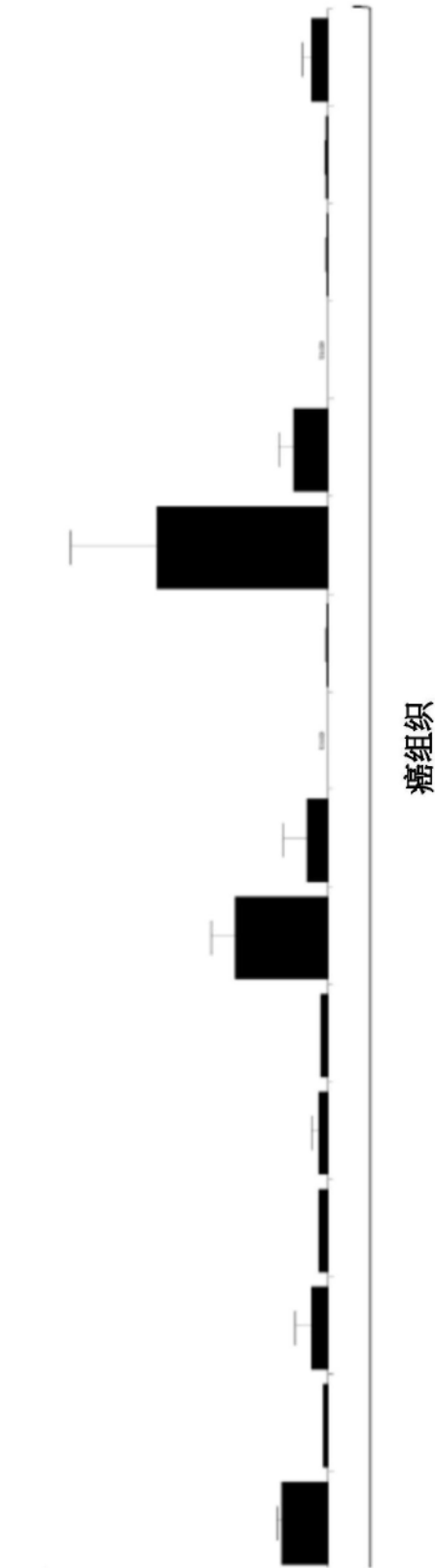


图9(续)

肽： LLIPFTIFM (A*02)
SEQ ID NO: 43

相对提量任意单位

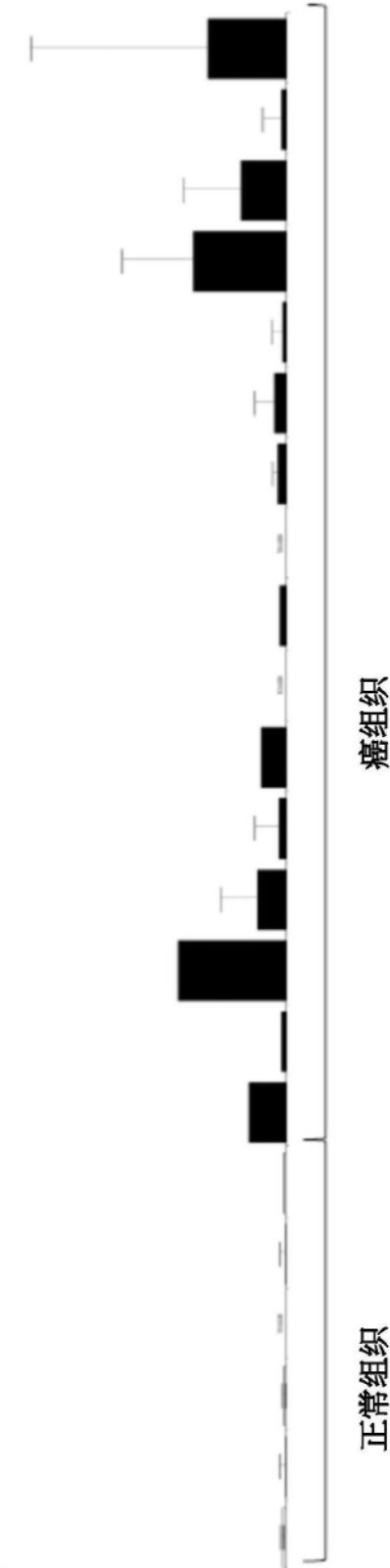


肽检测到在
16癌组织（1胆管癌，1乳腺癌，1结肠癌，1肺癌，1淋巴瘤，1卵巢癌，1皮肤癌，1胰腺癌，1肝癌，1胃癌，1食管癌，1宫颈癌，1前列腺癌，1膀胱癌，1肾癌，1肝癌，1肺癌）（从左到右）

图7A

肽： ILVTSIFFL (A*02)
SEQ ID NO: 152

相对含量任意单位

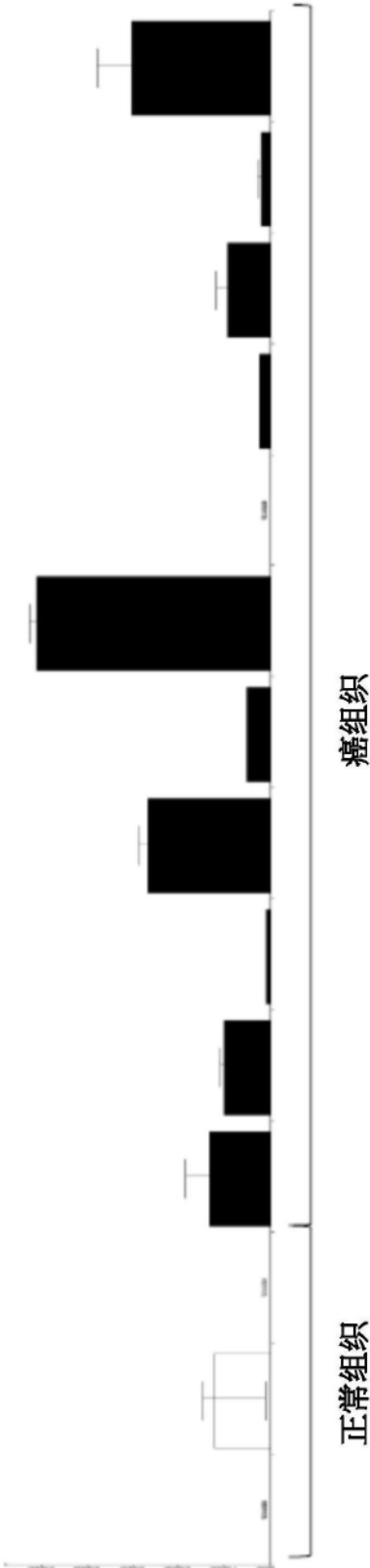


肽检测到在
6 正常组织 (1淋巴结, 5脾), 16癌组织 (8白细胞白血病癌症, 8淋巴结癌) (从左到右)

图7B

肽： VILTSSPFL (A*02)
SEQ ID NO: 156

相对提呈任意单位



肽检测到在
3正常组织（1肺，1淋巴结，1脾），11癌组织（2乳腺癌，5白细胞白血病癌症，3淋巴瘤，1骨髓细胞癌）（从左到右）

图7C