



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102448980 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 15

(21) 申请号 201080024056. 0

(22) 申请日 2010. 03. 31

(30) 优先权数据

61/211, 700 2009. 04. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 12. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/002352 2010. 03. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/113495 EN 2010. 10. 07

(73) 专利权人 肿瘤疗法科学股份有限公司

地址 日本神奈川县

(72) 发明人 中村佑辅 醍醐弥太郎 角田卓也

大泽龙司 吉村祥子 渡边朝久

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.

C07K 7/06(2006. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

C07K 14/82(2006. 01)

C07K 16/32(2006. 01)

C12N 15/09(2006. 01)

C12Q 1/04(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/50(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2008/0207497 A1, 2008. 08. 28, 说明书第 0002 段, 0006 段, 0016 段, 0019-0020 段, 第 21 页表 2.

US 2008/0207497 A1, 2008. 08. 28, 说明书第 0002 段, 0006 段, 0016 段, 0019-0020 段, 第 21 页表 2.

CN 1694901 A, 2005. 11. 09, 说明书第 7 页第 2 段, 第 11 页第 1 段至第 12 页第 1 段.

W0 99/22243 A1, 1999. 05. 06, 全文.

审查员 武雪梅

权利要求书1页 说明书53页
序列表43页 附图17页

(54) 发明名称

C6ORF167 肽及包含它的疫苗

(57) 摘要

本文中描述了针对癌症的肽疫苗。特别地, 提供了自 C6orf167 基因衍生的引发 CTL 的表位肽。还提供了抗原呈递细胞和分离的靶向这样的肽的 CTL, 以及用于诱导抗原呈递细胞或 CTL 的方法。本发明进一步提供了含有自 C6orf167 衍生的肽或编码该等多肽的多核苷酸作为活性组分的药物组合物。另外, 本发明提供了使用本发明的自 C6orf167 衍生的肽、编码该等肽的多核苷酸、或呈递该等肽的抗原呈递细胞、或药物组合物来治疗和 / 或预防 (即防范) 癌症 (肿瘤)、和 / 或防止其手术后复发的方法、以及诱导 CTL 的方法、用于诱导抗肿瘤免疫的方法。

1. 一种分离的肽,由 SEQ ID NO:114 的氨基酸序列组成。
2. 一种分离的多核苷酸,其编码权利要求 1 中的分离的肽。
3. 一种用于诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的组合物,其中所述组合物包含权利要求 1 所述的肽或者权利要求 2 所述的多核苷酸。
4. 一种药物组合物,其中所述组合物包含权利要求 1 所述的肽或者权利要求 2 所述的多核苷酸。
5. 权利要求 4 的药物组合物,其配制为用于对 HLA 抗原为 HLA-A*0201 的受试者施用。
6. 一种用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞的体外方法,其包括选自下组的步骤:
 - (a) 在体外使抗原呈递细胞接触权利要求 1 所述的肽;和
 - (b) 将编码权利要求 1 所述的肽的多核苷酸导入抗原呈递细胞。
7. 一种用于诱导 CTL 的体外方法,其包括选自下组的步骤:
 - (a) 将 CD8 阳性 T 细胞与在其表面上呈递 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物的抗原呈递细胞共培养;
 - (b) 将 CD8 阳性 T 细胞与在其表面上呈递 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物的外来体共培养;和
 - (c) 将包含编码结合权利要求 1 的肽的 T 细胞受体亚单位多肽的多核苷酸的基因导入 T 细胞。
8. 一种分离的抗原呈递细胞,其在其表面上呈递 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物。
9. 权利要求 8 的抗原呈递细胞,其是通过权利要求 6 的方法诱导的。
10. 一种分离的 CTL,其靶向权利要求 1 的肽。
11. 权利要求 10 的 CTL,其是通过权利要求 7 的方法诱导的。
12. 一种抗体或其片段,其针对权利要求 1 所述的肽。
13. 一种载体,其包含编码权利要求 1 所述的肽的核苷酸序列。
14. 一种诊断试剂盒,其包含权利要求 1 所述的肽、权利要求 2 的多核苷酸或权利要求 12 的抗体。
15. 权利要求 1 的肽或编码权利要求 1 的肽的多核苷酸在制备用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞的组合物中的用途。
16. 权利要求 1 的肽或编码权利要求 1 的肽的多核苷酸或权利要求 8 的抗原呈递细胞在制备用于诱导 CTL 的组合物中的用途。
17. 权利要求 1 的肽或编码所述肽的多核苷酸在制备用于诱导针对表达 C6orf167 和 HLA-A*0201 二者的 COS 细胞的 CTL 活性的组合物中的用途。

C6ORF167 肽及包含它的疫苗

技术领域

[0001] 本申请要求 2009 年 4 月 1 日提交的美国临时申请 No. 61/211,700 的权益,通过述及其全部内容收入本文。

[0002] 本发明涉及生物科学领域,更具体的说是癌症治疗领域。特别地,本发明涉及作为癌症疫苗有效的新肽、用于治疗 and 预防肿瘤的药物、及用于诊断肿瘤的方法。

背景技术

[0003] 已经证明, CD8 阳性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 可识别在主要组织相容性复合物 (MHC) I 类分子上找到的肿瘤相关抗原 (TAA) 所衍生的表位肽,然后杀死肿瘤细胞。从 TAA 的第一个例子——黑素瘤抗原 (MAGE) 家族被发现起,人们主要通过免疫学手段已经发现了许多其它 TAA (NPL 1/Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2) :177-80 ;NPL 2/Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3) :725-9)。这些 TAA 中的一些目前正在作为免疫治疗靶标接受临床开发。

[0004] 能够诱导强力且特异性的抗肿瘤免疫应答的新 TAA 的鉴定保证了针对各种类型癌症的肽疫苗接种策略的进一步开发和临床应用 (NPL 3/Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20) :1442-55 ;NPL 4/Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13) :3134-42 ;NPL 5/Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21) :5554-9 ;NPL 6/van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9) :3308-14 ;NPL 7/Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20) :4465-8 ;NPL 8/Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2) :169-72 ;NPL 9/Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3) :459-66 ;NPL 10/Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3) :387-94)。迄今为止,已经有数份使用这些肿瘤相关抗原衍生肽进行的临床试验的报告。不幸的是,至今在这些癌症疫苗试验中只观察到低客观应答率 (NPL 11/Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20) :4169-80 ;NPL 12/Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188 :33-42 ;NPL 13/Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9) :909-15)。因此,仍然需要鉴定预期可用作免疫治疗靶的新 TAA。

[0005] 为此,使用基因组范围的 cDNA 微阵列经由基因表达谱分析鉴定了在小细胞肺癌 (SCLC) (PTL 1/W02007/013665) 和食管癌 (PTL 2/W02007/013671) 中上调的多种基因。人们已经对这些基因进行了大量的研究,希望从中鉴定优秀候选物作为免疫治疗靶。为了在免疫疗法中特异性靶向癌细胞,优选的 TAA 应当主要由癌细胞表达,而正常健康组织具有有限的表达或没有表达。

[0006] 已经通过哺乳动物基因收集的 cDNA 文库筛选鉴定了染色体 6 可读框 167 (C6orf167) (NPL 14/MGC Program Team, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24 ; 99(26) :16899-903)。C6orf167 在上述分析中被鉴定为上调的基因之一。然而,尚未证实它是否可用于癌症的诊断和 / 或治疗。

[0007] 本发明通过提供一种新的癌症标志物 (即 C6orf167) 和一种利用抗原性肽,特别

是靶向 C6orf167 的抗原性肽和癌症疫苗的新癌症疗法,致力于解决本领域对改良的癌症诊断和治疗的需要。

[0008] 引用表

[0009] 专利文献

[0010] [PTL 1]W02007/013665

[0011] [PTL 2]W02007/013671

[0012] 非专利文献

[0013] [NPL 1]Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2) :177-80

[0014] [NPL 2]Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3) :725-9

[0015] [NPL 3]Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20) :1442-55

[0016] [NPL 4]Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13) :3134-42

[0017] [NPL 5]Visser J et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21) :5554-9

[0018] [NPL 6]van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9) :3308-14

[0019] [NPL 7]Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20) :4465-8

[0020] [NPL 8]Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2) :169-72

[0021] [NPL 9]Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3) :459-66

[0022] [NPL 10]Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3) :387-94

[0023] [NPL 11]Bellini F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20) :4169-80

[0024] [NPL 12]Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188 :33-42

[0025] [NPL 13]Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9) :909-15

[0026] [NPL 14]MGC Program Team, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24 ;99(26) :16899-903

发明内容

[0027] 本发明涉及适合癌症治疗的新肽及用于检测和诊断癌症的方法。

[0028] 本发明至少部分地基于可充当免疫治疗靶标的新肽的发现。由于 TAA 一般被免疫系统察觉为“自身”并因此往往没有先天免疫原性,合适的靶标的发现是极为重要的。通过本发明,C6orf167(SEQ ID NO:159,其由 GenBank 登录号 NM_198468.2(SEQ ID NO:158) 的基因编码)被证明在癌细胞中特异性过表达,包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤、和睾丸肿瘤。因此,本发明聚焦于 C6orf167 作为适宜的癌症标志物和免疫治疗靶标候选者。

[0029] 本发明进一步涉及 C6orf167 的基因产物的拥有诱导对 C6orf167 特异性的 CTL 的能力的特定表位肽的鉴定。如下文详细讨论的,使用自 C6orf167 衍生的 HLA-A*2402 或 HLA-A*0201 结合候选肽刺激从健康供体获得的外周血单个核细胞(PBMC)。然后建立了具有针对经每一种候选肽刺激的 HLA-A24 或 HLA-A2 阳性靶细胞的特异性细胞毒性的 CTL 系。这些结果证明,这些肽是能诱导针对表达 C6orf167 的细胞的强力且特异性的免疫应答的 HLA-A24 或 HLA-A2 限制表位肽。另外,结果指明,C6orf167 具有强免疫原性,而且它的表位是肿瘤免疫疗法的有效靶标。

[0030] 因而,本发明的一个目标是提供分离的能与 HLA 抗原结合的肽,特别是那些包括 C6orf167(SEQ ID NO:158) 或其免疫原性片段的。这些肽预期具有 CTL 诱导能力且可用于离体诱导 CTL 或给受试者施用以诱导针对癌症的免疫应答,诸如但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病 (CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌 (ADC)、肺鳞状细胞癌 (SCC)、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。优选的肽是九肽或十肽,更优选地,那些具有选自 SEQ ID NO:1-61 和 63-151 的氨基酸序列的。这些中,具有选自 SEQ ID NO:2、4、7、8、9、14、16、18、22、25、26、30、33、34、35、36、38、39、41、43、44、45、47、48、49、53、65、66、76、79、84、101、110、111、112、113、114、117、118、121、122、123、和 124 的氨基酸序列的肽是最优选的。

[0031] 本发明的肽涵盖如下的肽,其中替代或添加了 1 个、2 个或更多个氨基酸,只要所得经过修饰的肽保留原始的 CTL 诱导能力。

[0032] 本发明还提供了分离的编码本发明任一肽的多核苷酸。这些多核苷酸与本发明的肽类似,可用于诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 或可给受试者施用以诱导针对癌症的免疫应答。

[0033] 当对受试者施用时,本发明的肽优选呈递在 APC 的表面上,从而诱导靶向相应肽的 CTL。因此,本发明的又一个方面是提供用于诱导 CTL 的组合物,所述组合物包含一种或多种本发明肽或编码所述肽的多核苷酸。本发明进一步涵盖包含一种或多种本发明肽或一种或多种编码所述肽的多核苷酸的药物组合物,其配制用于治疗 and / 或预防癌症,以及预防其手术后复发,所述癌症包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病 (CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌 (ADC)、肺鳞状细胞癌 (SCC)、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0034] 本发明的又一个目标是提供用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞 (APC) 的方法,所述方法包括使 APC 接触一种或多种本发明肽的步骤或将编码本发明任一肽的多核苷酸导入 APC 的步骤。

[0035] 本发明还提供用于诱导 CTL 的方法,其包括共培养 CD8 阳性细胞与在其表面上呈递 HLA 抗原和一种或多种本发明肽的复合物的 APC 的步骤,或共培养 CD8 阳性细胞与在其表面上呈递 HLA 抗原和一种或多种本发明肽的复合物的外来体的步骤,或导入包括一种或多种编码能与本发明肽结合的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸的基因的步骤。

[0036] 本发明的另一个目标是提供在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽的复合物的分离的 APC。本发明进一步提供针对本发明肽的分离的 CTL。这些 APC 和 CTL 可用于癌症免疫治疗。

[0037] 本发明的另一个目标是提供用于在有需要的受试者中诱导针对癌症的免疫应答的方法,所述方法包括对受试者施用包括本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸的组合物。

[0038] 本发明的又一个目标是提供用于在有需要的受试者中诊断癌症的方法,所述方法包括下述步骤:(a) 测定源自受试者的生物样品中 C6orf167 基因的表达水平,并 (b) 将步骤 (a) 中测定得到的表达水平与该基因的正常对照水平相比的升高与受试者中癌症的存在关联起来。优选地,C6orf167 基因的表达水平通过检测 C6orf167 的 mRNA 或蛋白质或 C6orf167 蛋白的生物学活性来测定。

[0039] 本发明的又一个目标是提供用于诊断癌症的试剂盒,所述试剂盒包括用于检测

C6orf167 mRNA 的试剂、用于检测 C6orf167 蛋白的试剂、或用于检测 C6orf167 蛋白的生物学活性的试剂。

[0040] 本发明的适用性延伸至任何多种涉及或源自 C6orf167 过表达的疾病中的任何一种,诸如癌症,它的例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0041] 在阅读下面的详细描述连同附图和实施例后,本发明在上文之外的其它目的和特征会变得更加显而易见。然而应当理解,上面的发明概述和下面的详细描述都是例示性的实施方案,而非限制本发明或本发明的其它备选实施方案。具体而言,虽然本文中参照多个具体实施方案描述了本发明,但是应理解所述描述是例示本发明而不构成本发明的限制。本领域技术人员可想到各种修改和应用,而不偏离如所附权利要求描述的本发明精神和范围。类似地,根据此概述和下文描述的某些实施方案很容易想到本发明的其它目的、特征、好处和优点,它们对于本领域技术人员会是显而易见的。根据上文连同所附实施例、数据、图及自它们得出的所有合理推论,单独地或与并入本文的参考文献一起考虑,容易想到这样的目的、特征、好处和优点。

[0042] 附图简述

[0043] 本领域技术人员在考虑了下文的附图简要说明及对本发明及其优选实施方案的详细说明后将清楚地得知本发明的各个方面和应用。

[0044] [图 1a-j] 图 1a-j 包括一系列照片,(a)-(j),描绘对用 C6orf167 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。下述孔号中的 CTL 显示与对照相比强的 IFN- γ 生成:用 C6orf167-A24-9-179(SEQ ID NO:2) 刺激的 1 号孔(a),用 C6orf167-A24-9-404(SEQ ID NO:4) 刺激的 1 号和 3 号孔(b),用 C6orf167-A24-9-236(SEQ ID NO:7) 刺激的 4 号孔(c),用 C6orf167-A24-9-480(SEQ ID NO:8) 刺激的 1 号和 7 号孔(d),用 C6orf167-A24-9-1170(SEQ ID NO:9) 刺激的 7 号孔(e),用 C6orf167-A24-9-9(SEQ ID NO:14) 刺激的 5 号孔(f),用 C6orf167-A24-9-530(SEQ ID NO:16) 刺激的 3 号和 4 号孔(g),用 C6orf167-A24-9-315(SEQ ID NO:18) 刺激的 5 号孔(h),用 C6orf167-A24-9-132(SEQ ID NO:22) 刺激的 3 号孔(i),及用 C6orf167-A24-9-851(SEQ ID NO:25) 刺激的 1 号和 7 号孔(j)。扩增用矩形框标示的孔中的细胞以建立 CTL 系。在图中,"+" 指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成,而 "-" 指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0045] [图 1k-t] 图 1k-t 包括一系列照片,(k)-(t),描绘对用 C6orf167 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。下述孔号中的 CTL 显示与对照相比强的 IFN- γ 生成:用 C6orf167-A24-9-55(SEQ ID NO:26) 刺激的 3 号和 6 号孔(k),用 C6orf167-A24-9-220(SEQ ID NO:30) 刺激的 1 号和 2 号孔(l),用 C6orf167-A24-10-626(SEQ ID NO:33) 刺激的 4 号和 8 号孔(m),用 C6orf167-A24-10-429(SEQ ID NO:34) 刺激的 1 号孔(n),用 C6orf167-A24-10-917(SEQ ID NO:35) 刺激的 1 号和 5 号孔(o),用 C6orf167-A24-10-474(SEQ ID NO:36) 刺激的 4 号和 5 号孔(p),用 C6orf167-A24-10-254(SEQ ID NO:38) 刺激的 4 号孔(q),用 C6orf167-A24-10-194(SEQ ID NO:39) 刺激的 2 号孔(r),用 C6orf167-A24-10-956(SEQ ID

NO:41) 刺激的 7 号孔 (s), 及用 C6orf167-A24-10-511 (SEQ ID NO:43) 刺激的 3 号孔 (t)。扩增用矩形框标示的孔中的细胞以建立 CTL 系。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0046] [图 1u-z] 图 1u-z 包括一系列照片, (u)-(z), 描绘对用 C6orf167 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。下述孔号中的 CTL 显示与对照相比强的 IFN- γ 生成: 用 C6orf167-A24-10-315 (SEQ ID NO:44) 刺激的 3 号孔 (u), 用 C6orf167-A24-10-598 (SEQ ID NO:45) 刺激的 2 号孔 (v), 用 C6orf167-A24-10-966 (SEQ ID NO:47) 刺激的 1 号和 3 号孔 (w), 用 C6orf167-A24-10-66 (SEQ ID NO:48) 刺激的 7 号孔 (x), 用 C6orf167-A24-10-914 (SEQ ID NO:49) 刺激的 3 号孔 (y), 及用 C6orf167-A24-10-851 (SEQ ID NO:53) 刺激的 2 号孔 (z)。扩增用矩形框标示的孔中的细胞以建立 CTL 系。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0047] [图 2a-h] 图 2a-h 包括一系列线图, (a)-(h), 描绘 IFN- γ ELISA 测定法的结果, 证明用 SEQ ID NO:2(a)、SEQ ID NO:4(b)、SEQ ID NO:7(c)、SEQ ID NO:8(d)、SEQ ID NO:9(e)、SEQ ID NO:16(f)、SEQ ID NO:22(g) 和 SEQ ID NO:25(h) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 系均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0048] [图 2i-n] 图 2i-n 包括一系列线图, (i)-(n), 描绘 IFN- γ ELISA 测定法的结果, 证明用 SEQ ID NO:26(i)、SEQ ID NO:30(j)、SEQ ID NO:33(k)、SEQ ID NO:35(l)、SEQ ID NO:44(m) 和 SEQ ID NO:49(n) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 系均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0049] [图 3] 图 3 包括一系列线图, (a)-(f), 描绘自用 SEQ ID NO:2(a)、SEQ ID NO:4(b)、SEQ ID NO:7(c)、SEQ ID NO:9(d)、SEQ ID NO:16(e) 和 SEQ ID NO:30(f) 刺激的 CTL 系通过有限稀释建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用 SEQ ID NO:2(a)、SEQ ID NO:4(b)、SEQ ID NO:7(c)、SEQ ID NO:9(d)、SEQ ID NO:16(e) 和 SEQ ID NO:30(f) 刺激而建立的 CTL 克隆均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经 SEQ ID NO:2(a)、SEQ ID NO:4(b)、SEQ ID NO:7(c)、SEQ ID NO:9(d)、SEQ ID NO:16(e) 和 SEQ ID NO:30(f) 刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0050] [图 4] 图 4 包括一系列线图, (a)-(d), 描绘针对外源表达 C6orf167 和 HLA-A*2402 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备用 HLA-A*2402 或用全长 C6orf167 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO:2) (a)、C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO:7) (b)、C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO:9) (c) 和 C6orf167-A24-10-626 (SEQ ID NO:33) (d) 建立的 CTL 系显示针对用 C6orf167 和 HLA-A*2402 二者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性 (黑色菱形)。另一方面, 没有检测到显著的针对表达 HLA-A*2402 (三角形) 或 C6orf167 (圆形) 任一靶细胞的特异性 CTL 活性。

[0051] [图 5] 图 5 描绘肿瘤组织、细胞系和正常组织中的 C6orf167 表达的分析结果。

小图 A 描绘 15 份临床肺癌样品 [肺腺癌 (ADC)、肺鳞状细胞癌 (SCC) 和肺的小细胞肺癌 (SCLC) ;顶部]、10 份临床食管癌样品 (上部小图)、15 种肺癌细胞系和 10 种食管癌细胞系 (下部小图) 中通过半定量 RT-PCR 分析检测的 C6orf167 表达。小图 B 描绘 16 种正常人组织中的 C6orf167 转录物的 Northern 印迹分析。只在睾丸和小肠中观察到阳性信号。

[0052] [图 6a-f] 图 6a-f 包括一系列照片, (a)-(f), 描绘对用 C6orf167 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。下述孔号中的 CTL 显示与对照相比强的 IFN- γ 生成: 用 C6orf167-A02-9-855 (SEQ ID NO :65) 刺激的 4 号孔 (a), 用 C6orf167-A02-9-131 (SEQ ID NO :66) 刺激的 6 号孔 (b), 用 C6orf167-A02-9-887 (SEQ ID NO :76) 刺激的 4 号孔 (c), 用 C6orf167-A02-9-261 (SEQ ID NO :79) 刺激的 6 号孔 (d), 用 C6orf167-A02-9-484 (SEQ ID NO :84) 刺激的 7 号孔 (e), 及用 C6orf167-A02-10-535 (SEQ ID NO :101) 刺激的 1 号、3 号和 6 号孔 (f)。扩增用矩形框标示的孔中的细胞以建立 CTL 系。相反, 作为典型的阴性数据, 对用 C6orf167-A02-9-918 (SEQ ID NO :62) 刺激的 CTL 没有观察到特异性 IFN- γ 生成 (s)。在图中, " + " 指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0053] [图 6g-l] 图 6g-l 包括一系列照片, (g)-(l), 描绘对用 C6orf167 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。下述孔号中的 CTL 显示与对照相比强的 IFN- γ 生成: 用 C6orf167-A02-10-527 (SEQ ID NO :110) 刺激的 1 号孔 (g), 用 C6orf167-A02-10-10 (SEQ ID NO :111) 刺激的 3 号孔 (h), 用 C6orf167-A02-10-577 (SEQ ID NO :112) 刺激的 5 号孔 (i), 用 C6orf167-A02-10-128 (SEQ ID NO :113) 刺激的 5 号和 7 号孔 (j), 用 C6orf167-A02-10-622 (SEQ ID NO :114) 刺激的 4 号孔 (k), 及用 C6orf167-A02-10-47 (SEQ ID NO :116) 刺激的 1 号孔 (l)。扩增用矩形框标示的孔中的细胞以建立 CTL 系。相反, 作为典型的阴性数据, 对用 C6orf167-A02-9-918 (SEQ ID NO :62) 刺激的 CTL 没有观察到特异性 IFN- γ 生成 (s)。在图中, " + " 指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0054] [图 6m-r] 图 6m-r 包括一系列照片, (m)-(r), 描绘对用 C6orf167 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。下述孔号中的 CTL 显示与对照相比强的 IFN- γ 生成: 用 C6orf167-A02-10-219 (SEQ ID NO :117) 刺激的 1 号孔 (m), 用 C6orf167-A02-10-1155 (SEQ ID NO :118) 刺激的 3 号孔 (n), 用 C6orf167-A02-10-606 (SEQ ID NO :121) 刺激的 7 号孔 (o), 用 C6orf167-A02-10-290 (SEQ ID NO :122) 刺激的 6 号孔 (p), 用 C6orf167-A02-10-262 (SEQ ID NO :123) 刺激的 6 号孔 (q), 及用 C6orf167-A02-10-965 (SEQ ID NO :124) 刺激的 8 号孔 (r)。扩增用矩形框标示的孔中的细胞以建立 CTL 系。相反, 作为典型的阴性数据, 对用 C6orf167-A02-9-918 (SEQ ID NO :62) 刺激的 CTL 没有观察到特异性 IFN- γ 生成 (s)。在图中, " + " 指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0055] [图 6s] 图 6s 包括一幅照片, 描绘对用 C6orf167 衍生的肽诱导的 CTL 进行的 IFN- γ ELISPOT 测定法的结果。作为典型的阴性数据, 对用 C6orf167-A02-9-918 (SEQ ID NO :62) 刺激的 CTL 没有观察到特异性 IFN- γ 生成 (s)。在图中, " + " 指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0056] [图 7a-d] 图 7a-d 包括一系列线图, (a)-(d), 描绘用 C6orf167-A02-9-855 (SEQ ID

NO :65) (a)、C6orf167-A02-9-131 (SEQ ID NO :66) (b)、C6orf167-A02-9-887 (SEQ ID NO :76) (c) 和 C6orf167-A02-9-261 (SEQ ID NO :79) (d) 刺激的 CTL 系通过 IFN- γ ELISA 测定法检测的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 系均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0057] [图 7e-j] 图 7e-j 包括一系列线图, (e)-(j), 描绘用 C6orf167-A02-9-484 (SEQ ID NO :84) (e)、C6orf167-A02-10-535 (SEQ ID NO :101) (f)、C6orf167-A02-10-527 (SEQ ID NO :110) (g)、C6orf167-A02-10-10 (SEQ ID NO :111) (h)、C6orf167-A02-10-577 (SEQ ID NO :112) (i) 和 C6orf167-A02-10-128 (SEQ ID NO :113) (j) 刺激的 CTL 系通过 IFN- γ ELISA 测定法检测的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 系均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0058] [图 7k-n] 图 7k-n 包括一系列线图, (k)-(n), 描绘用 C6orf167-A02-10-622 (SEQ ID NO :114) (k)、C6orf167-A02-10-219 (SEQ ID NO :117) (l)、C6orf167-A02-10-290 (SEQ ID NO :122) (m) 和 C6orf167-A02-10-262 (SEQ ID NO :123) (n) 刺激的 CTL 系通过 IFN- γ ELISA 测定法检测的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 系均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0059] [图 8a-f] 图 8a-f 包括一系列线图, (a) to (f), 描绘自用 C6orf167-A02-9-855 (SEQ ID NO :65) (a)、C6orf167-A02-9-131 (SEQ ID NO :66) (b)、C6orf167-A02-9-887 (SEQ ID NO :76) (c)、C6orf167-A02-9-261 (SEQ ID NO :79) (d)、C6orf167-A02-9-484 (SEQ ID NO :84) (e) 和 C6orf167-A02-10-535 (SEQ ID NO :101) (f) 刺激的 CTL 系通过有限稀释建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 克隆均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0060] [图 8g-j] 图 8g-j 包括一系列线图, (g)-(j), 描绘自用 C6orf167-A02-10-527 (SEQ ID NO :110) (g)、C6orf167-A02-10-10 (SEQ ID NO :111) (h)、C6orf167-A02-10-128 (SEQ ID NO :113) (i) 和 C6orf167-A02-10-622 (SEQ ID NO :114) (j) 刺激的 CTL 系通过有限稀释建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。结果证明了通过用每种肽刺激而建立的 CTL 克隆均显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中, " + " 指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成, 而 " - " 指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0061] [图 9] 图 9 包括线图 (a) 和 (b), 描绘针对外源表达 6orf167 和 HLA-A*0201 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备用 HLA-A*0201 或用全长 C6orf167 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 C6orf167-A02-9-261 (SEQ ID NO :79) 建立的 CTL 系 (a) 和用 C6orf167-A02-10-622 (SEQ ID NO :114) 建立的 CTL 克隆 (b) 显示针对用 C6orf167 和 HLA-A*0201 二者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性 (黑色菱形)。另一方面, 没有检测到显著的针对表达 HLA-A*0201 (三角形) 或 C6orf167 (圆形) 任一靶细胞的特异性 CTL 活性。

[0062] 实施方案的描述

[0063] 现在描述优选的方法、装置、和材料,不过在实施或检验本发明的实施方案时可使用与本文中描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料。然而,在描述本发明材料和方法之前,要理解本发明不限于特定大小、形状、尺度、材料、方法、规程等,因为它们可因循例行实验和优化而变化。还要理解,所述描述中使用的术语只是出于描述特定样式或实施方案的目的,而非意图限制本发明的范围,本发明的范围只会由所附权利要求来限制。

[0064] I. 定义

[0065] 如本文中使用的,词语“一个/种”、“该”、“和”、“所述”意味着“至少一个/种”,除非另有明确说明。

[0066] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是经过修饰的残基或非天然存在型残基(诸如相应的天然存在型氨基酸的人工化学模拟物)的氨基酸聚合物,以及天然存在型氨基酸聚合物。

[0067] 如本文中使用的,术语“氨基酸”指天然存在型和合成型氨基酸,以及与天然存在型氨基酸相似地发挥功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在型氨基酸指由遗传密码编码的氨基酸,以及在细胞中在翻译后被修饰的氨基酸(例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、和 O-磷酸丝氨酸)。短语“氨基酸类似物”指与天然存在型氨基酸具有相同的基础化学结构(α 碳与氢、羧基、氨基、和 R 基团结合)但具有经过修饰的 R 基团或经过修饰的主链的化合物(例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷)。短语“氨基酸模拟物”指与具有与一般氨基酸不同的结构但发挥与一般氨基酸相似的功能的化学化合物。

[0068] 氨基酸在本文中可以通过它们公知的三字母符号或 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。

[0069] 术语“基因”、“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用,而且除非另有明确说明,通过它们普遍接受的单字母代码来指称。

[0070] 如本文中使用的,术语“组合物”意图涵盖包括规定量的规定组分的产物,以及任何作为所述规定量的规定组分的组合的直接或间接结果的产物。所述术语在涉及药物组合物时意图涵盖包括活性组分和构成载体的惰性组分的产物,以及作为任何两种或更多种组分的组合、复合或聚集、或一种或多种组分的解离、或一种或多种组分的其它类型反应或相互作用的直接或间接结果的产物。因而,本发明的药物组合物涵盖任何通过混合本发明的化合物和药学或生理学可接受载体而制备的组合物。如本文中使用的,短语“药学可接受载体”或“生理学可接受载体”表示药学或生理学可接受的材料、组合物、物质或媒介,包括但不限于自一个器官或身体部分至另一个器官或身体部分携带或运输主题支架多聚药效团涉及的液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料。

[0071] 除非另有定义,术语“癌症”指过表达 C6orf167 基因的癌症或肿瘤,它的实例包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0072] 除非另有定义,术语“细胞毒性 T 淋巴细胞”、“细胞毒性 T 细胞”和“CTL”在本文中可互换使用,而且除非另有明确说明,指能够识别非自身细胞(例如肿瘤/癌细胞、病毒感染的细胞)并诱导此类细胞死亡的 T 淋巴细胞亚群。

[0073] 除非另有定义,术语“HLA-A24”指包含诸如 HLA-A*2402 等亚型的 HLA-A24 类型。

[0074] 除非另有定义,如本文中使用的,术语“HLA-A2”代表性指诸如 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206 等亚型。

[0075] 除非另有定义,如本文中使用的,术语“试剂盒”用于指试剂和其它材料的组合。本文中考虑,试剂盒可包括微阵列、芯片、标志物、等等。术语“试剂盒”并非意图限于试剂和/或材料的特定组合。

[0076] 以本发明的方法和组合物可用于癌症“治疗”的语境为限,当治疗导致临床效益,诸如受试者中 C6orf167 基因表达的减少、或癌症的尺寸、患病率 (prevalence)、或转移潜力的降低,认为该治疗是“有效”的。当预防性地应用治疗时,“有效”是指其延迟或防止癌症形成,或者预防或缓解癌症的临床症状。有效性结合特定肿瘤类型的任何公知的诊断或治疗方法来加以确定。

[0077] 就本发明的方法和组合物可用于癌症“预防”和“防范”的背景而言,所述术语在本文中可互换使用,指降低来自疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,而二级和三级预防和防范水平涵盖旨在预防和防范疾病进展和症状出现以及降低已建立的疾病的负面影响的的活动,这通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来实现。或者,预防和防范可包括广泛的预防疗法,它们旨在减轻特定病症的严重性,例如降低肿瘤的增殖和转移。

[0078] 在本发明的语境中,治疗和/或预防癌症和/或预防其手术后复发包括任何下述步骤,诸如手术清除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和遏制癌症发生、肿瘤消退、及降低或抑制转移。癌症的有效治疗和/或预防降低患癌个体的死亡率并改善其预后,降低血液中肿瘤标志物的水平,及减轻伴随癌症的可检测症状。例如,症状的减轻或改善构成有效治疗和/或预防包括 10%、20%、30% 或更多降低,或病情稳定。

[0079] 在本发明的语境中,术语“抗体”指能与指定的蛋白或其肽特异性反应的免疫球蛋白及其片段。抗体可以包括人抗体、灵长源化 (primatized) 抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、人源化抗体、与其它蛋白或放射性标记物融合的抗体、和抗体片段。另外,在本文中,抗体以最广义使用,而且具体涵盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们展现期望的生物学活性。“抗体”指示所有类别 (例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM)。

[0080] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员的普遍理解相同的含义。

[0081] II. 肽

[0082] 为了证明衍生自 C6ORF167 的肽发挥被 CTL 所识别的抗原的功能,对衍生自 C6ORF167 (SEQ ID NO :159) 的肽进行了分析以确定它们是否为 HLA-A24 或 A02 限制性的抗原表位,HLA-A2 (A*0201) 是经常遇到的 HLA 等位基因 (Date Y et al., Tissue Antigens 47 :93-101,1996 ;Kondo A et al., JImmunol 155 :4307-12,1995 ;Kubo RT et al., J Immunol 152 :3913-24,1994)。

[0083] 基于它们对 HLA-A24 的结合亲和力,鉴定了衍生自 C6ORF167 的 HLA-A24 结合肽的候选者。候选肽是下述肽 :C6orf167-A24-9-848 (SEQ IDNO :1), C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO :2), C6orf167-A24-9-641 (SEQ IDNO :3), C6orf167-A24-9-404 (SEQ ID NO :

4), C6orf167-A24-9-1171 (SEQ ID NO :5), C6orf167-A24-9-1219 (SEQ ID NO :6), C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO :7), C6orf167-A24-9-480 (SEQ ID NO :8), C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO :9), C6orf167-A24-9-580 (SEQ ID NO :10), C6orf167-A24-9-203 (SEQ ID NO :11), C6orf167-A24-9-254 (SEQ ID NO :12), C6orf167-A24-9-158 (SEQ ID NO :13), C6orf167-A24-9-9 (SEQ ID NO :14), C6orf167-A24-9-561 (SEQ ID NO :15), C6orf167-A24-9-530 (SEQ ID NO :16), C6orf167-A24-9-966 (SEQ ID NO :17), C6orf167-A24-9-315 (SEQ ID NO :18), C6orf167-A24-9-92 (SEQ ID NO :19), C6orf167-A24-9-95 (SEQ ID NO :20), C6orf167-A24-9-786 (SEQ ID NO :21), C6orf167-A24-9-132 (SEQ ID NO :22), C6orf167-A24-9-598 (SEQ ID NO :23), C6orf167-A24-9-827 (SEQ ID NO :24), C6orf167-A24-9-851 (SEQ ID NO :25), C6orf167-A24-9-55 (SEQ ID NO :26), C6orf167-A24-9-626 (SEQ ID NO :27), C6orf167-A24-9-908 (SEQ ID NO :28), C6orf167-A24-9-550 (SEQ ID NO :29), C6orf167-A24-9-220 (SEQ ID NO :30), C6orf167-A24-9-437 (SEQ ID NO :31), C6orf167-A24-10-1170 (SEQ ID NO :32), C6orf167-A24-10-626 (SEQ ID NO :33), C6orf167-A24-10-429 (SEQ ID NO :34), C6orf167-A24-10-917 (SEQ ID NO :35), C6orf167-A24-10-474 (SEQ ID NO :36), C6orf167-A24-10-514 (SEQ ID NO :37), C6orf167-A24-10-254 (SEQ ID NO :38), C6orf167-A24-10-194 (SEQ ID NO :39), C6orf167-A24-10-240 (SEQ ID NO :40), C6orf167-A24-10-956 (SEQ ID NO :41), C6orf167-A24-10-786 (SEQ ID NO :42), C6orf167-A24-10-511 (SEQ ID NO :43), C6orf167-A24-10-315 (SEQ ID NO :44), C6orf167-A24-10-598 (SEQ ID NO :45), C6orf167-A24-10-869 (SEQ ID NO :46), C6orf167-A24-10-966 (SEQ ID NO :47), C6orf167-A24-10-66 (SEQ ID NO :48), C6orf167-A24-10-914 (SEQ ID NO :49), C6orf167-A24-10-964 (SEQ ID NO :50), C6orf167-A24-10-143 (SEQ ID NO :51), C6orf167-A24-10-647 (SEQ ID NO :52), C6orf167-A24-10-851 (SEQ ID NO :53), C6orf167-A24-10-519 (SEQ ID NO :54), C6orf167-A24-10-97 (SEQ ID NO :55), C6orf167-A24-10-827 (SEQ ID NO :56), C6orf167-A24-10-389 (SEQ ID NO :57), C6orf167-A24-10-273 (SEQ ID NO :58), C6orf167-A24-10-670 (SEQ ID NO :59), C6orf167-A24-10-132 (SEQ ID NO :60), 和 C6orf167-A24-10-1112 (SEQ ID NO :61)。

[0084] 此外,用加载有这些肽的树突细胞 (DC) 体外刺激 T 细胞后,使用每个下述肽,成功地建立了 CTL:C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO :2), C6orf167-A24-9-404 (SEQ ID NO :4), C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO :7), C6orf167-A24-9-480 (SEQ ID NO :8), C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO :9), C6orf167-A24-9-9 (SEQ ID NO :14), C6orf167-A24-9-530 (SEQ ID NO :16), C6orf167-A24-9-315 (SEQ ID NO :18), C6orf167-A24-9-132 (SEQ ID NO :22), C6orf167-A24-9-851 (SEQ ID NO :25), C6orf167-A24-9-55 (SEQ ID NO :26), C6orf167-A24-9-220 (SEQ ID NO :30), C6orf167-A24-10-626 (SEQ ID NO :33), C6orf167-A24-10-429 (SEQ ID NO :34), C6orf167-A24-10-917 (SEQ ID NO :35), C6orf167-A24-10-474 (SEQ ID NO :36), C6orf167-A24-10-254 (SEQ ID NO :38), C6orf167-A24-10-194 (SEQ ID NO :39),

C6orf167-A24-10-956(SEQ ID NO:41), C6orf167-A24-10-511(SEQ ID NO:43), C6orf167-A24-10-315(SEQ ID NO:44), C6orf167-A24-10-598(SEQ ID NO:45), C6orf167-A24-10-966(SEQ ID NO:47), C6orf167-A24-10-66(SEQ ID NO:48), C6orf167-A24-10-914(SEQ ID NO:49),和 C6orf167-A24-10-851(SEQ IDNO:53)。

[0085] 基于它们对 HLA-A2 的结合亲和力,鉴定了衍生自 C6ORF167 的 HLA-A2 结合肽的候选者。认为下述肽是免疫疗法的候选肽:C6orf167-A2-9-202(SEQID NO:63), C6orf167-A2-9-227(SEQ ID NO:64), C6orf167-A2-9-855(SEQID NO:65), C6orf167-A2-9-131(SEQ ID NO:66), C6orf167-A2-9-533(SEQID NO:67), C6orf167-A2-9-858(SEQ ID NO:68), C6orf167-A2-9-290(SEQID NO:69), C6orf167-A2-9-647(SEQ ID NO:70), C6orf167-A2-9-929(SEQID NO:71), C6orf167-A2-9-219(SEQ ID NO:72), C6orf167-A2-9-904(SEQID NO:73), C6orf167-A2-9-648(SEQ ID NO:74), C6orf167-A2-9-133(SEQID NO:75), C6orf167-A2-9-887(SEQ ID NO:76), C6orf167-A2-9-319(SEQID NO:77), C6orf167-A2-9-667(SEQ ID NO:78), C6orf167-A2-9-261(SEQID NO:79), C6orf167-A2-9-965(SEQ ID NO:80), C6orf167-A2-9-964(SEQID NO:81), C6orf167-A2-9-578(SEQ ID NO:82), C6orf167-A2-9-623(SEQID NO:83), C6orf167-A2-9-484(SEQ ID NO:84), C6orf167-A2-9-457(SEQID NO:85), C6orf167-A2-9-253(SEQ ID NO:86), C6orf167-A2-9-671(SEQID NO:87), C6orf167-A2-9-283(SEQ ID NO:88), C6orf167-A2-9-1018(SEQID NO:89), C6orf167-A2-9-1091(SEQ ID NO:90), C6orf167-A2-9-1113(SEQID NO:91), C6orf167-A2-9-821(SEQ ID NO:92), C6orf167-A2-9-1116(SEQID NO:93), C6orf167-A2-9-528(SEQ ID NO:94), C6orf167-A2-9-1112(SEQID NO:95), C6orf167-A2-9-99(SEQ ID NO:96), C6orf167-A2-9-590(SEQ IDNO:97), C6orf167-A2-9-224(SEQ ID NO:98), C6orf167-A2-9-405(SEQ IDNO:99), C6orf167-A2-10-716(SEQ ID NO:100), C6orf167-A2-10-535(SEQ IDNO:101), C6orf167-A2-10-226(SEQ ID NO:102), C6orf167-A2-10-303(SEQID NO:103), C6orf167-A2-10-311(SEQ ID NO:104), C6orf167-A2-10-425(SEQ ID NO:105), C6orf167-A2-10-554(SEQ ID NO:106), C6orf167-A2-10-648(SEQ ID NO:107), C6orf167-A2-10-569(SEQ ID NO:108), C6orf167-A2-10-202(SEQ ID NO:109), C6orf167-A2-10-527(SEQ IDNO:110), C6orf167-A2-10-10(SEQ ID NO:111), C6orf167-A2-10-577(SEQID NO:112), C6orf167-A2-10-128(SEQ ID NO:113), C6orf167-A2-10-622(SEQ ID NO:114), C6orf167-A2-10-178(SEQ ID NO:115), C6orf167-A2-10-47(SEQ ID NO:116), C6orf167-A2-10-219(SEQ ID NO:117), C6orf167-A2-10-1155(SEQ ID NO:118), C6orf167-A2-10-227(SEQ IDNO:119), C6orf167-A2-10-253(SEQ ID NO:120), C6orf167-A2-10-606(SEQID NO:121), C6orf167-A2-10-290(SEQ ID NO:122), C6orf167-A2-10-262(SEQ ID NO:123), C6orf167-A2-10-965(SEQ ID NO:124), C6orf167-A2-10-1113(SEQ ID NO:125), C6orf167-A2-10-77(SEQ ID NO:126), C6orf167-A2-10-319(SEQ ID NO:127), C6orf167-A2-10-1022(SEQ IDNO:128), C6orf167-A2-10-910(SEQ ID NO:129),

C6orf167-A2-10-738 (SEQ ID NO :130), C6orf167-A2-10-482 (SEQ ID NO :131), C6orf167-A2-10-282 (SEQ ID NO :132), C6orf167-A2-10-442 (SEQ ID NO :133), C6orf167-A2-10-625 (SEQ ID NO :134), C6orf167-A2-10-1120 (SEQ ID NO :135), C6orf167-A2-10-640 (SEQ ID NO :136), C6orf167-A2-10-619 (SEQ ID NO :137), C6orf167-A2-10-747 (SEQ ID NO :138), C6orf167-A2-10-1131 (SEQ ID NO :139), C6orf167-A2-10-71 (SEQ ID NO :140), C6orf167-A2-10-614 (SEQ ID NO :141), C6orf167-A2-10-457 (SEQ ID NO :142), C6orf167-A2-10-1001 (SEQ ID NO :143), C6orf167-A2-10-397 (SEQ ID NO :144), C6orf167-A2-10-268 (SEQ ID NO :145), C6orf167-A2-10-1088 (SEQ ID NO :146), C6orf167-A2-10-528 (SEQ ID NO :147), C6orf167-A2-10-1049 (SEQ ID NO :148), C6orf167-A2-10-886 (SEQ ID NO :149), C6orf167-A2-10-411 (SEQ ID NO :150) 和 C6orf167-A2-10-579 (SEQ ID NO :151)。

[0086] 此外,用这些肽加载(冲激)的树突细胞(DC)体外刺激T细胞后,使用下述每个肽,成功地建立了CTL:C6orf167-A2-9-855 (SEQ ID NO :65), C6orf167-A2-9-131 (SEQ ID NO :66), C6orf167-A2-9-887 (SEQ ID NO :76), C6orf167-A2-9-261 (SEQ ID NO :79), C6orf167-A2-9-484 (SEQ ID NO :84), C6orf167-A2-10-535 (SEQ ID NO :101), C6orf167-A2-10-527 (SEQ ID NO :110), C6orf167-A2-10-10 (SEQ ID NO :111), C6orf167-A2-10-577 (SEQ ID NO :112), C6orf167-A2-10-128 (SEQ ID NO :113), C6orf167-A2-10-622 (SEQ ID NO :114), C6orf167-A2-10-219 (SEQ ID NO :117), C6orf167-A2-10-1155 (SEQ ID NO :118), C6orf167-A2-10-606 (SEQ ID NO :121), C6orf167-A2-10-290 (SEQ ID NO :122), C6orf167-A2-10-262 (SEQ ID NO :123) 和 C6orf167-A2-10-965 (SEQ ID NO :124)。

[0087] 这些建立的CTL针对经相应肽冲激的靶细胞显示强且特异性的CTL活性。本文中的这些结果证明C6ORF167是被CTL识别的抗原,且这些肽是C6ORF167的受HLA-A24或A2限制的表位肽。

[0088] 由于C6ORF167基因在癌细胞和组织(包括例如膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤的那些))中过表达且在大多数正常器官中不表达,它是良好的免疫治疗靶标。因此,本发明提供对应于来自C6ORF167的被CTL识别的表位的九肽(由九个氨基酸残基组成的肽)和十肽(由十个氨基酸残基组成的肽)。本发明的九肽和十肽的特别优选的例子包括那些具有选自SEQ ID NO :1-61和63-151的氨基酸序列的肽。

[0089] 一般而言,目前可以通过例如互联网获得的软件程序,如Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1,152(1):163-75及Nielsen M et al., Protein Sci 2003;12:1007-17描述的那些,可以用来在计算机上计算不同肽与HLA抗原之间的结合亲和力。与HLA抗原的结合亲和力可以按照例如Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1,152(1):163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001,98(6):1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31;8:424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003;12:1007-17, 及 Nielsen M et al. PLoS ONE 2007;2:e796(总结于例如 Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009,

15,3209-3220) 中描述的那样进行测定。用于测定结合亲和力的方法在例如 Journal of Immunological Methods, 1995, 185 : 181-190. ; Protein Science, 2000, 9 : 1838-1846 中有描述。因此, 可使用此类软件程序来选择与 HLA 抗原具有高结合亲和力的自 C60RF167 衍生的片段。因此, 本发明涵盖由通过这些已知程序确定可与 HLA 抗原结合的 C60RF167 衍生的任何片段构成的肽。另外, 这些肽可以包括由全长 C60RF167 组成的肽。

[0090] 本发明的九肽和十肽的侧翼可以具有额外的氨基酸残基, 只要所得的肽保持其 CTL 诱导能力即可。所述额外的氨基酸序列可以由任何种类的氨基酸构成, 只要它们不损害原来的肽的 CTL 诱导能力。因此, 本发明涵盖具有对 HLA 抗原的结合亲和力的肽, 包括自 C60RF167 衍生的肽。这样的肽例如少于约 40 个氨基酸, 经常少于约 20 个氨基酸, 且通常少于约 15 个氨基酸。

[0091] 一般而言, 肽中一个、两个、或更多个氨基酸的修饰不会影响肽的功能, 而且在有些情况下甚至会增强原始蛋白质的期望功能。事实上, 已知有经过修饰的肽 (即由与原始参照序列相比其中修饰 (即替换、添加或插入) 一个、两个或数个氨基酸残基的氨基酸序列构成的肽) 保留原始肽的生物学活性 (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81 : 5662-6 ; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10 : 6487-500 ; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79 : 6409-13)。因此, 在一个实施方案中, 本发明的肽既具有 CTL 诱导能力, 又具有选自 SEQ ID NO : 1-61 和 63-151 的氨基酸序列中添加和 / 或替换一个、两个或甚至更多个氨基酸而得到的氨基酸序列。

[0092] 本领域技术人员会认可, 改变氨基酸序列中的单个氨基酸或少数百分比氨基酸的个别添加或替换往往会导致原始氨基酸侧链的特性得以保留。因此, 它们经常称作“保守替换”或“保守修饰”, 其中对蛋白质的改变导致具有与原始蛋白质类似的功能的修饰蛋白质。提供功能上相似的氨基酸的保守替换表是本领域公知的。期望保留的氨基酸侧链特征的例子包括例如疏水性氨基酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、亲水性氨基酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、和具有下面的共同官能团或特征的侧链: 脂肪族侧链 (G, A, V, L, I, P); 含羟基侧链 (S, T, Y); 含硫原子侧链 (C, M); 含羧酸和酰胺侧链 (D, N, E, Q); 含碱侧链 (R, K, H); 和含芳香族侧链 (H, F, Y, W)。另外, 下面的八组各自含有本领域公认互为保守替换的氨基酸:

[0093] 1) 丙氨酸 (A), 甘氨酸 (G);

[0094] 2) 天冬氨酸 (D), 谷氨酸 (E);

[0095] 3) 天冬酰胺 (N), 谷氨酰胺 (Q);

[0096] 4) 精氨酸 (R), 赖氨酸 (K);

[0097] 5) 异亮氨酸 (I), 亮氨酸 (L), 甲硫氨酸 (M), 缬氨酸 (V);

[0098] 6) 苯丙氨酸 (F), 酪氨酸 (Y), 色氨酸 (W);

[0099] 7) 丝氨酸 (S), 苏氨酸 (T); 和

[0100] 8) 半胱氨酸 (C), 甲硫氨酸 (M) (参见例如 Creighton, Proteins 1984)。

[0101] 此类保守修饰肽也被视为本发明的肽。然而, 本发明的肽不限于此, 可包括非保守修饰, 只要该修饰的肽保留原始肽的 CTL 诱导能力。另外, 经过修饰的肽不应排除 C60RF167 的多态变体、种间同源物、和等位基因中的可诱导 CTL 的肽。

[0102] 为了保持所需的 CTL 诱导能力, 可以修饰 (插入、添加和 / 或替换) 少数 (例如, 1 个、2 个或数个) 或小百分比的氨基酸。这里, 术语“数个”意指 5 个或更少的氨基酸, 如 4

个或 3 个或更少。要被修饰的氨基酸的百分比优选为 20% 以下,更优选 15% 以下,甚至更优选 10% 以下或 1-5%。

[0103] 当在免疫疗法的语境中使用,本发明的肽应呈递在细胞或外来体的表面上,优选作为与 HLA 抗原的复合物。因此,优选选择不仅诱导 CTL 而且还拥有对 HLA 抗原的高结合亲和力的肽。为此,可对本发明的肽通过替换、插入、和 / 或添加氨基酸残基进行修饰以产生具有改良结合亲和力的修饰肽。除了天然被展示的肽之外,由于已经知道通过结合 HLA 抗原而被展示的肽的序列规律 (J Immunol 1994,152 :3913 ;Immunogenetics 1995,41 :178 ;J Immunol 1994,155 :4307),可将基于此类规律的修饰引入本发明的免疫原性肽。

[0104] 例如,可能希望进行替换,将自 N 端起的第二个氨基酸替换为亮氨酸或甲硫氨酸,和 / 或将位于 C 端的氨基酸替换为缬氨酸或亮氨酸,以提高 HLA-A24 结合亲和力。因此,具有选自 SEQ ID NO :1-61 的氨基酸序列,其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列中自 N 端起第二个氨基酸被替换为亮氨酸或苯丙氨酸和 / 或其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列中位于 C 端的氨基酸被替换为缬氨酸或亮氨酸的肽涵盖在本发明之内。

[0105] 或者,可能希望进行替换,将自 N 端起的第二个氨基酸替换为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸,和 / 或将位于 C 端的氨基酸替换为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、或甲硫氨酸,以提高 HLA-A2 结合亲和力。因此,具有选自 SEQ ID NO :63-151 的氨基酸序列,其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列中自 N 端起第二个氨基酸被替换为苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸和 / 或其中所述 SEQ ID NO 的氨基酸序列中位于 C 端的氨基酸被替换为苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、或甲硫氨酸的肽涵盖在本发明之内。

[0106] 不仅可以在肽的末端氨基酸处引入替换,而且可以在潜在的 T 细胞受体 (TCR) 识别位置处引入替换。数项研究证明了具有氨基酸替换的肽可等同于或好于原来,例如 CAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎、Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ 或 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res. 57,4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002)Feb 1 ;168(3) :1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003)52 :199-206 及 S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53,307-314)。

[0107] 本发明还考虑向本发明肽的 N 和 / 或 C 端添加一个、两个或数个氨基酸。此类具有高 HLA 抗原结合亲和力且保留 CTL 诱导能力的修饰肽也包含在本发明之内。

[0108] 然而,当肽序列与具有不同功能的内源或外源蛋白质的氨基酸序列的一部分相同时,可能诱导副作用,诸如自身免疫性病症和 / 或针对特定物质的变应性症状。因此,优选的是,首先利用可得的数据库实施同源性搜索,以避免肽的序列与另一种蛋白质的氨基酸序列匹配的情况。当根据同源性搜索清楚了即使与目标肽相比差 1 个或 2 个氨基酸的肽亦不存在时,可以修饰目标肽以提高其与 HLA 抗原的结合亲和力,和 / 或提高其 CTL 诱导能力,而没有任何发生此类副作用的危险。

[0109] 虽然预期如上所述的对 HLA 抗原具有高结合亲和力的肽是高度有效的,但还是对根据高结合亲和力的存在为指标选出的候选肽检查了 CTL 诱导能力的存在。这里,短语“CTL 诱导能力”指肽被呈递到抗原呈递细胞 (APC) 上时诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的能力。另外,“CTL 诱导能力”包括肽诱导 CTL 活化、CTL 增殖、促进 CTL 溶解靶细胞、和提高 CTL IFN- γ 生成的能力。

[0110] CTL 诱导能力的确认如下来实现,诱导携带人 MHC 抗原的 APC (例如 B- 淋巴细胞、

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

[0111] 作为如上所述检查肽的 CTL 诱导能力的结果, 发现选自 SEQ ID NO : 2、4、7、8、9、14、16、18、22、25、26、30、33、34、35、36、38、39、41、43、44、45、47、48、49、53、65、66、76、79、84、101、110、111、112、113、114、117、118、121、122、123、和 124 所示的氨基酸序列的九肽或十肽显示特别高的 CTL 诱导能力以及对 HLA 抗原的高亲和力。因此, 例举这些肽为本发明优选的实施方案。

[0112] 另外, 同源性的分析的结果显示了那些肽与自任何其它已知人基因产物衍生的肽没有显著的同源性。因而, 用于免疫疗法时发生未知的或不想要的免疫应答的可能性降低了。因此, 也是根据这个方面, 这些肽可用于在癌症患者中引发针对 C60RF167 的免疫力。因此, 本发明的肽, 优选具有选自 SEQ ID NO : 2、4、7、8、9、14、16、18、22、25、26、30、33、34、35、36、38、39、41、43、44、45、47、48、49、53、65、66、76、79、84、101、110、111、112、113、114、117、118、121、122、123、和 124 的氨基酸序列的肽。

[0113] 除了上文所述修饰之外, 也可将本发明的肽与其它肽连接, 只要使得连接的肽保留原始肽的所需 CTL 诱导能力。合适肽的例子包括: 本发明的肽或自其它 TAA 衍生的可诱导 CTL 的肽。合适的肽间接头是本领域公知的, 包括例如 AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5 : 26)、AAA、NKRK (R. P. M. Suttmüller et al., J Immunol. 2000, 165 : 7308-7315) 或 K (S. Ota et al., CanRes. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168 : 5709-5715)。

[0114] 例如, 还可基本上同时使用非 C60RF167 肿瘤相关抗原肽以提高经 I 类和 /II 类 HLA 的免疫应答。已经公认, 癌细胞能表达超过一种肿瘤相关基因。因此, 依照本发明确定特定受试者是否表达别的肿瘤相关基因, 然后在 C60RF167 组合物或疫苗中包括自此类基因的表达产物衍生的 I 类 HLA 和 / 或 II 类 HLA 结合肽, 这是本领域普通技术人员的例行实验的范围内的。

[0115] I 类 HLA 和 II 类 HLA 结合肽是本领域普通技术人员知道的 (例如参见 Coulie, Stem Cells 13 : 393-403, 1995), 而且可以以与本文公开类似的方式用于本发明。因此, 本领域普通技术人员能容易地使用分子生物学的标准规程来制备包括一种或多种 C60RF167 肽和一种或多种非 C60RF167 肽的多肽或编码此类多肽的核酸。

[0116] 上文所述连接肽在本文中称作“多表位” (polytope), 即两种或更多种可以以各种排列 (例如串联、交叠) 连接在一起的潜在免疫原性或免疫应答刺激性肽的组。该多表位 (或编码该多表位的核酸) 可以以标准免疫方案来施用于例如动物以测试该多表位在刺

激、增强和 / 或引起免疫应答的有效性。

[0117] 所述肽可直接地或使用侧翼序列连接在一起形成多表位,而且多表位作为疫苗的用途是本领域公知的(参见例如 Thomson et al., Proc. Natl. Acad. SciUSA 92(13):5845-5849,1995;Gilbert et al.,Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284,1997;Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826,1996;Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306,1990)。可制备含有不同表位数目和组合的多表位并测试 CTL 识别和提高免疫应答的功效。

[0118] 也可将本发明的肽连接至其它物质,只要所得的连接肽保留原始肽的所需 CTL 诱导能力。合适物质的例子包括例如:肽、脂质、糖和糖链、乙酰基、天然的和合成的聚合物、等。本发明肽可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化等,只要该修饰不破坏初始肽的生物学活性。可实施这些种类的修饰以赋予额外的功能(例如靶向功能和投递功能)或使肽稳定。

[0119] 例如,为了提高肽的体内稳定性,本领域已知引入 D-氨基酸、氨基酸模拟物或非天然氨基酸;此构思也可适用于本发明肽。可以以多种方式测定多肽的稳定性。例如,可使用肽酶和各种生物学介质(诸如人血浆和血清)来测试稳定性(参见例如 Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986,11:291-302)。

[0120] 此外,如上所述,在替代、删除或添加 1 个、2 个或数个氨基酸残基的经修饰肽中,可筛选或选择出具有与原始肽相比相同或更高活性的修饰肽。因此,本发明还提供了用于筛选或选择具有与原始肽相比相同或更高活性的修饰肽的方法。依照例示性方法包括下述步骤:

[0121] a:替代、删除或添加本发明肽中的至少一个氨基酸残基;

[0122] b:测定所述肽的活性;

[0123] c:选择具有与原始肽相比相同或更高活性的肽。

[0124] 在本文中,要测定的活性可包括 MHC 结合活性、APC 或 CTL 诱导能力和细胞毒性活性。

[0125] 在本文中,本发明的肽也可以记为“C60RF167 肽”或“C60RF167 多肽”。

[0126] III. C60RF167 肽的制备

[0127] 本发明的肽可使用公知技术来制备。例如,肽可以通过合成、使用重组 DNA 技术或化学合成来制备。本发明的肽可个别地合成,或合成为包括两个或更多个肽的较长多肽。然后可以分离,即纯化或分离所述肽,使得所述肽基本上不含其它天然存在的宿主细胞蛋白质及其片段或任何其它化学物质。

[0128] 本发明的肽可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化;只要该修饰不破坏初始肽的生物学活性。其它修饰包括掺入 D-氨基酸或其它氨基酸模拟物,其可用于例如延长肽的血清半衰期。

[0129] 可以根据选定的氨基酸序列,借助化学合成来获得本发明的肽。可适用于合成的常规肽合成法的例子包括:

[0130] (i)Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

[0131] (ii)The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

[0132] (iii)Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co., 1975;

[0133] (iv)Basics and Experiment of Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co.,

1985 ;

[0134] (v)Development of Pharmaceuticals(second volume)(in Japanese), Vol.14(peptide synthesis),Hirokawa,1991 ;

[0135] (vi)W099/67288 ;和

[0136] (vii)Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol.2, " Solid Phase PeptideSynthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118。

[0137] 或者,可应用任何已知的遗传工程肽生产方法来获得本发明的肽(例如 Morrison J, J Bacteriology 1977,132 :349-51 ;Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(eds.Wu et al.)1983,101 :347-62)。例如,首先,制备包含处于可表达形式(例如处于相当于启动子序列的调节序列下游)的编码目标肽的多核苷酸的合适载体,并转移入合适宿主细胞。然后培养宿主细胞以生成感兴趣的肽。也可以采用体外翻译系统在体外生产肽。

[0138] IV. 多核苷酸

[0139] 本发明还提供编码任何上述本发明肽的多核苷酸。这些包括由天然存在型 C60RF167 基因 (GenBank 登录号 NM_198468.2 (SEQ ID NO :158)) 衍生的多核苷酸及具有它们的经过保守修饰的核苷酸序列的多核苷酸。在本文中,短语“经过保守修饰的核苷酸序列”指编码相同或本质上相同的氨基酸序列的序列。由于遗传密码的简并性,对于任何给定蛋白质都有极其多种功能上相同的核酸来编码它。例如,密码子 GCA、GCC、GCG、和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子规定为丙氨酸的任何位置处,该密码子可改变成任何相应所述密码子,而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,是保守修饰变异的一种。本文中编码肽的每一种核酸序列也涵盖该核酸的每一种可能的沉默变异。本领域普通技术人员会认识到,可以修饰核酸中的每一个密码子 (AUG 和 TGG 除外, AUG 在正常情况下是甲硫氨酸的唯一密码子,而 TGG 在正常情况下是色氨酸的唯一密码子) 以产生功能上相同的分子。因而,每一种所公开的序列隐含涵盖了编码肽的核酸的每一种沉默变异。

[0140] 本发明的多核苷酸可以由 DNA、RNA、及其衍生物构成。合适地, DNA 分子由碱基诸如 A、T、C、和 G 构成,而 T 在 RNA 中被 U 替换。

[0141] 本发明的多核苷酸可编码多个本发明肽,其中有或无居间氨基酸序列存在。例如,居间氨基酸序列可提供多核苷酸的或所翻译的肽的切割位点(例如酶识别序列)。另外,多核苷酸除编码本发明肽的编码序列以外还可包括任何额外的序列。例如,多核苷酸可以是包括表达肽所需要的调节序列的重组多核苷酸,或者可以是具有标志基因等等的表达载体(质粒)。一般而言,此类重组多核苷酸可通过常规重组技术操作多核苷酸来制备,例如通过使用聚合酶和内切核酸酶。

[0142] 重组和化学合成技术都可用来生成本发明的多核苷酸。例如,可以通过插入在转染入感受态细胞后能表达的适宜载体来生成多核苷酸。或者,可借助 PCR 技术或通过合适宿主中的表达来扩增多核苷酸(参见例如 Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者,可使用固相技术来合成多核苷酸,如 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48 :2223-311 ; Matthes et al., EMBO J 1984, 3 :801-5 中记载的。

[0143] V. 外来体 (exosomes)

[0144] 本发明进一步提供了称作外来体的细胞内囊泡,这些外来体在它们的表面上呈递本发明肽与 HLA 抗原之间形成的复合物。外来体可以通过,例如在日本专利申请公报平 11-510507 和 W099/03499 中详细描述的方法来制备,并可以用从治疗和 / 或预防所针对的患者获得的 APC 制备。本发明的外来体可以作为疫苗以与本发明的肽相似的方式进行接种。

[0145] 复合物中包含的 HLA 抗原的类型必须与需要治疗和 / 或预防的受试者的类型匹配。在日本人群中,HLA-A24 和 HLA-A2,特别是 HLA-A*2402 和 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206,是普遍的,且因此可能适合于治疗日本人患者。使用在日本人和白种人中高表达的 A24 型有利于获得有效的结果,而且也可使用诸如 A2402、A*0201 和 A*0206 等亚型。典型的,在临床上,预先考察需要治疗的患者的 HLA 抗原类型,这样就能够合适地选择对此抗原具有高水平的结合亲和力、或者具有藉由抗原呈递的 CTL 诱导能力的肽。此外,为了获得具有高结合亲和力和 CTL 诱导能力二者的肽,可以在天然存在的 C60RF167 部分肽的氨基酸序列的基础上进行 1 个、2 个或几个氨基酸的取代、插入和 / 或添加。

[0146] 在将 A24 型 HLA 抗原用于本发明的外来体时,可使用具有选自 SEQ ID NO :1-61 的序列的肽。

[0147] 或者在将 A2 型 HLA 抗原用于本发明的外来体时,可使用具有选自 SEQ ID NO :63-151 的序列的肽。

[0148] VI. 抗原呈递细胞 (APC)

[0149] 本发明还提供在其表面上呈递在 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的分离的抗原呈递细胞 (APC)。APC 可衍生自要进行治疗和 / 或预防的患者,而且可作为疫苗以它们自身或与其它药物 (包括本发明的肽、外来体、或 CTL) 组合来施用。

[0150] APC 不限于特定种类的细胞,包括树突细胞 (DC)、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞识别。由于 DC 是 APC 中具有最强 CTL 诱导作用的代表性 APC,DC 可以用作本发明的 APC。

[0151] 例如,可通过自外周血单核细胞诱导 DC,然后在体外、离体或在体内用本发明的肽接触 (刺激) 它们来获得本发明的 APC。当对受试者施用本发明的肽时,在受试者的身体中诱导出呈递本发明肽的 APC。短语“诱导 APC”包括用本发明的肽或编码本发明肽的核苷酸接触 (刺激) 细胞,以在细胞的表面上呈递在 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物。因此,本发明的 APC 可通过将本发明的肽施用于受试者后自受试者收集 APC 来获得。或者,本发明的 APC 可通过使自受试者收集的 APC 接触本发明的肽来获得。

[0152] 可以将本发明的 APC 以它们自身或与其它药物 (包括本发明的肽、外来体或 CTL) 组合施用于受试者以在受试者中诱导针对癌症的免疫应答。例如,离体施用可包括下述步骤:

[0153] a:自受试者收集 APC;

[0154] b:使肽接触步骤 a 的 APC;并

[0155] c:对第二受试者施用步骤 b 的 APC。

[0156] 第一受试者和第二受试者可以是同一个体,或者可以是不同个体。或者,依照本发明,提供了本发明的肽制造用于诱导抗原呈递细胞的药物组合物的用途。另外,本发明提供了制造用于诱导抗原呈递细胞的药物组合物的方法或工艺。另外,本发明还提供了本发明

的肽,用于诱导抗原呈递细胞。通过步骤 b 获得的 APC 可作为疫苗用来治疗和 / 或预防癌症,诸如但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病 (CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌 (ADC)、肺鳞状细胞癌 (SCC)、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0157] 依照本发明的一个方面,APC 具有高水平的 CTL 诱导能力。在术语“高水平的 CTL 诱导能力”中,高水平是相对于未与肽接触或与不能诱导 CTL 的肽接触的 APC 的该水平而言的。这样的具有高水平 CTL 诱导能力的 APC 可通过上文所述方法以及下述方法来制备,该方法包括在体外将编码本发明肽的多核苷酸转移至 APC 的步骤。所导入的基因可以是 DNA 或 RNA 的形式。用于进行导入的方法的例子包括但不限于本领域中常规实施的各种方法,诸如可使用脂质体转染、电穿孔、和磷酸钙法。更具体的说,可以如 Cancer Res1996, 56:5672-7;J Immunol 1998,161:5607-13;J Exp Med 1996,184:465-72;国际公开文本 No. 2000-509281 的已公开日文翻译中所述来实施。通过将基因转移入 APC,基因在细胞中经历转录、翻译、等等,然后得到的蛋白质被 MHC I 类或 II 类加工,并经由呈递途径呈递给本发明的部分肽。

[0158] VII. 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)

[0159] 被诱导的针对任一本发明肽的 CTL 可在体内加强靶向癌细胞的免疫应答,并且因此可以以与肽本身相似的方式用作疫苗。因此,本发明提供由任一本发明肽特异性诱导或活化的、分离的 CTL。

[0160] 此类 CTL 可通过下述步骤来获得:(1) 对受试者施用本发明的肽;或(2) 在体外用本发明的肽接触(刺激)源自受试者的 APC 和 CD8 阳性细胞、或外周血单核白细胞;或(3) 在体外使 CD8- 阳性细胞或外周血单个核白细胞接触在其表面上呈递 HLA 抗原与肽之间形成的复合物的 APC 或外来体;或(4) 导入包括编码 T 细胞受体 (TCR) 亚单位的多核苷酸的基因,所述 TCR 亚单位能结合本发明的肽。上述 APC 或外来体可通过上文记载的方法来制备,而且(4) 之方法的详情记载于下文“VIII. T 细胞受体 (TCR)”部分。

[0161] 可以从要进行治疗和 / 或预防的患者获取本发明的 CTL,而且可以将它们单独施用,或者与其它药物(包括本发明的肽或外来体)组合施用以调节效果。所得到的 CTL 特异性针对呈递本发明的肽例如与用于诱导的肽相同的肽的靶细胞起作用。靶细胞可以是内源表达 C6ORF167 的细胞,诸如癌细胞,或被 C6ORF167 基因转染的细胞;而且因肽的刺激而在细胞表面上呈递本发明肽的细胞也可充当活化 CTL 攻击的靶标。

[0162] VIII. T 细胞受体 (TCR)

[0163] 本发明还提供包含编码能够形成 T 细胞受体 (TCR) 的亚单位的多肽的核酸的多核苷酸,及使用该组合物的方法。TCR 亚基具有形成赋予 T 细胞针对呈递 C6ORF167 的肿瘤细胞的特异性的 TCR 的能力。通过使用本领域已知的方法,可鉴定出用本发明的一种或多种肽诱导的 CTL 的 TCR 亚基 α 和 β 链的核酸 (WO2007/032255 及 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如,优选使用 PCR 方法来分析 TCR。用于分析的 PCR 引物可以是但不限于例如作为 5' 侧引物的 5' -R 引物 (5' -gtctaccaggcattcgcttcat-3') (SEQ ID NO:160) 和作为 3' 侧引物的对 TCR α 链 C 区特异性的 3-TRa-C 引物 (5' -tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO:161)、对 TCR β 链 C1 区特异性的 3-TRb-C1 引物 (5' -tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO:162) 或对 TCR β 链 C2 区

特异性的 3-TRbeta-C2 引物 (5' -ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ ID NO:163)。衍生的 TCR 能以高亲和力结合展示 C6ORF167 肽的靶细胞,且任选在体内和在体外介导有效的对呈递 C6ORF167 肽的靶细胞的杀伤。

[0164] 可以将编码 TCR 亚基的核酸掺入合适的载体,例如逆转录病毒载体。这些载体是本领域公知的。通常可将有用的核酸或含有它们的载体转移入 T 细胞,例如来自患者的 T 细胞。有利的是,本发明提供一种即配即用型 (off-the-shelf) 组合物,其容许快速修饰患者自己的 T 细胞 (或其他哺乳动物的 T 细胞) 以快速且容易地生成具有卓越的癌细胞杀伤特性的修饰型 T 细胞。

[0165] 可以将编码 TCR 亚基的核酸掺入合适的载体,例如逆转录病毒载体。这些载体是本领域公知的。通常可将有用的核酸或含有它们的载体转移入 T 细胞,例如来自患者的 T 细胞。有利的是,本发明提供一种即配即用型 (off-the-shelf) 组合物,其容许快速修饰患者自己的 T 细胞 (或其他哺乳动物的 T 细胞) 以快速且容易地生成具有卓越的癌细胞杀伤特性的修饰型 T 细胞。

[0166] 特异性 TCR 是一种能够特异性识别本发明肽和 HLA 分子形成的复合物的受体,当 TCR 在 T 细胞的表面上呈递时,给予 T 细胞针对靶细胞的特异性活性。对上述复合物的特异性识别可通过任何已知方法来确认,其优选例子包括使用 HLA 分子和本发明肽的 HLA 多聚体染色分析,及 ELISPOT 测定法。通过实施 ELISPOT 测定法,能确认在细胞表面上表达 TCR 的 T 细胞通过 TCR 来识别细胞,而且信号在细胞内传输。当上文所述复合物存在于 T 细胞表面上时,该复合物可给予 T 细胞以细胞毒性活性的确认也可通过已知方法来进行。一种优选的方法包括例如测定针对 HLA 阳性靶细胞的细胞毒性活性,诸如铬释放测定法。

[0167] 此外,本发明提供通过用编码 TCR 亚单位的核酸转导而制备的 CTL,所述 TCR 亚单位结合 C6ORF167 肽,例如在 HLA-A24 的背景下结合 SEQ ID NO:1-61 的肽;和在 HLA-A2 的背景下结合 SEQ ID NO:63-151 的肽。

[0168] 经过转导的 CTL 在体内能够归巢 (homing) 到癌细胞,并且可以利用公知的培养方法体外扩增 (例如 Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。可以利用本发明的 CTL 来形成免疫原性组合物,所述组合物可以用来在需要治疗或保护的患者中治疗或预防癌症 (参见 W02006/031221,通过述及而将其内容收入本文)。

[0169] 预防和防范包括降低来自疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,而二级和三级预防和防范水平涵盖旨在预防和防范疾病进展和症状出现以及降低已建立的疾病的负面影响的活动,这通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来实现。或者,预防和防范包括广泛的预防疗法,它们旨在减轻特定病症的严重性,例如降低肿瘤的增殖和转移、降低血管发生。

[0170] 治疗和 / 或预防癌症,和 / 或预防其手术后复发包括任何下述步骤,诸如手术清除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和遏制癌症发生、肿瘤消退、及降低或抑制转移。癌症的有效治疗和 / 或预防降低患癌个体的死亡率并改善其预后,降低血液中肿瘤标志物的水平,及减轻伴随癌症的可检测症状。例如,症状的减轻或改善构成有效治疗和 / 或预防包括 10%、20%、30% 或更多降低,或病情稳定。

[0171] IX. 药物组合物

[0172] 由于 C6ORF167 表达在癌症 (其例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、

慢性髓细胞性白血病 (CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌 (ADC)、肺鳞状细胞癌 (SCC)、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤) 中与正常组织相比特异性升高, 本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸可用于治疗和 / 或预防癌症, 和 / 或预防它们的手术后复发。因此, 本发明提供用于治疗和 / 或预防癌症, 和 / 或预防它们的手术后复发的药物组合物, 所述组合物包括一种或多种本发明的肽或多核苷酸作为活性组分。或者, 可以在任何上述外来体或细胞诸如 APC 的表面上表达本发明的肽, 以用作药物组合物。另外, 上述靶向任一本发明的肽的 CTL 也可用作本发明药物物质和组合物的活性组分。

[0173] 本发明的药物物质和组合物也可用作疫苗。在本发明的语境中, 短语“疫苗”(也称作“免疫原性组合物”) 指具有在接种入动物后诱导抗肿瘤免疫力的功能的物质。

[0174] 本发明的药物组合物可用于在受试者或患者(包括人和任何其它哺乳动物, 包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猫、犬、绵羊、山羊、猪、牛、马、猴、狒狒、和黑猩猩, 特别是商业上重要的动物或驯养的动物) 中治疗和 / 或预防癌症, 和 / 或预防其手术后复发。

[0175] 在另一个实施方案中, 本发明还提供选自下组的活性组分在制备用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或物质中的用途:

[0176] (a) 本发明的肽,

[0177] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸,

[0178] (c) 在其表面上呈递本发明肽的外来体或 APC, 和

[0179] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0180] 或者, 本发明进一步提供用于治疗或预防癌症或肿瘤的选自下组的活性组分:

[0181] (a) 本发明的肽,

[0182] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸,

[0183] (c) 在其表面上呈递本发明肽的外来体或 APC, 和

[0184] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0185] 或者, 本发明进一步提供一种制备用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或物质的方法或工艺, 其中该方法或工艺包括配制药学或生理学可接受载体与选自下组的活性组分作为活性组分的步骤:

[0186] (a) 本发明的肽,

[0187] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸,

[0188] (c) 在其表面上呈递本发明肽的外来体或 APC, 和

[0189] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0190] 在另一个实施方案中, 本发明还提供一种制备用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或物质的方法或工艺, 其中该方法或工艺包括混合活性组分与药学或生理学可接受载体的步骤, 其中所述活性组分选自下组:

[0191] (a) 本发明的肽,

[0192] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸,

[0193] (c) 在其表面上呈递本发明肽的外来体或 APC, 和

[0194] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0195] 依照本发明, 已经发现具有选自 SEQ ID NO:1-61 的氨基酸序列的肽是 HLA-A24 限

制性表位肽或能诱导强且特异性的免疫应答的候选者,而且已经发现具有选自 SEQ ID NO : 63-151 的氨基酸序列的肽是 HLA-A2 限制性表位肽或能诱导强且特异性的免疫应答的候选者。因此,包括任何这些具有 SEQID NO :1-61 和 63-151 的氨基酸序列的肽的本发明药物组合特别适合于对其 HLA 抗原分别为 HLA-A24 和 HLA-A2 的受试者施用。这同样适用于含有编码任何这些肽的多核苷酸(即本发明的多核苷酸)的药物药物组合。

[0196] 要用本发明的药物组合治疗的癌症不受限制,而且包括其中涉及 C60RF167 的所有种类的癌症,包括例如膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0197] 除上述活性组分之外,本发明的药物组合还可含有其它具有诱导针对癌性细胞的 CTL 的能力的肽、编码所述其它肽的其它多核苷酸、呈递所述其它肽的其它细胞等等。在本文中,其它具有诱导针对癌性细胞的 CTL 的能力的肽以癌症特异性抗原(例如已鉴定的 TAA)为例,但是不限于此。

[0198] 如果需要,本发明的药物组合可任选包括其它治疗性物质作为活性组分,只要该物质不抑制活性组分例如任何本发明肽的抗肿瘤效果。例如,配制剂可包括抗炎组合、镇痛剂、化疗剂、诸如此类。除了在药物自身中包括其它治疗性物质之外,本发明的药物还可以与一种或多种其它药理学组合顺序或同时施用。药物和药理学组合的量取决于例如所使用的药理学组合的类型、所治疗的疾病、及施用的时序安排和路径。

[0199] 应当理解,除在本文中具体提及的组分之外,本发明的药物组合可包括与所讨论的配制剂类型相关的本领域常规的其它组合。

[0200] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药物组合可包括在制品和试剂盒中,该制品和试剂盒含有可用于治疗要治疗的疾病(例如癌症)的病理状况的材料。制品可包括任何本发明药物组合的容器及标签。合适的容器包括瓶、管形瓶、和试管。容器可以用多种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器上的标签应指明该组合用于治疗或预防一种或多种疾病状况。标签还可指明关于施用的指导等等。

[0201] 除上文描述的容器之外,包括本发明药物组合的试剂盒还可任选进一步包括第二容器,其中装有药学可接受稀释剂。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头、注射器、和载有使用说明的包装插页。

[0202] 如果期望的话,药物组合可存在于药包或分配器装置中,该药包或分配器装置可装有一个或多个含有活性组分的单位剂型。例如,药包可包括金属或塑料箔,诸如泡罩包。药包或分配器装置可附有施用说明书。

[0203] (1) 含有肽作为活性组分的药物组合

[0204] 本发明的肽可以作为药物组合直接施用,或者如果必要,通过常规配制方法来配制。在后一种情况中,在本发明的肽之外,还可以视情况包括通常用于药物的载体、赋形剂、等等,没有特别限制。此类载体的例子有灭菌水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养基、等等。另外,药物组合可在必要时含有稳定剂、悬浮液、防腐剂、表面活性剂等等。本发明的药物组合可用于抗癌目的。

[0205] 本发明的肽可作为组合来制备,其包括两种或更多种本发明的肽,以在体内诱导 CTL。肽组合可采取鸡尾酒的形式,或者可使用标准技术彼此缀合。例如,可以将肽化学连

接或表达成为单一融合多肽序列。组合中的各个肽可以是相同的或不同的。通过施用本发明的肽,肽被 HLA 抗原以高密度呈递在 APC 上,然后诱导出与所展示的肽与 HLA 抗原之间形成的复合物特异性起反应的 CTL。或者,自受试者取出 APC(例如 DC),然后用本发明的肽刺激以获得在其细胞表面上呈递本发明肽的 APC。将这些 APC 再施用于受试者以在受试者中诱导 CTL,结果能提高针对肿瘤相关内皮的攻击性。

[0206] 包括本发明肽作为活性组分、用于治疗 and / 或预防癌症的药物组合物还可包括已知有效建立细胞免疫的佐剂。或者,药物组合物可以与其它活性组分一起施用,或者通过配制成颗粒来施用。佐剂指在与具有免疫学活性的蛋白质一起(或顺序)施用增强针对蛋白质的免疫应答的化合物。本文中涵盖的佐剂包括文献中记载的那些(Clin Microbiol Rev 1994,7:277-89)。合适佐剂的例子包括但不限于磷酸铝、氢氧化铝、明矾、霍乱毒素、沙门氏菌毒素、诸如此类。

[0207] 另外,可方便地使用脂质体制剂、其中肽结合至几微米直径的珠子的颗粒制剂、和其中脂质结合至肽的制剂。

[0208] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的肽也可以以药学可接受盐的形式施用。优选盐的例子包括与碱金属的盐、与金属的盐、与有机碱的盐、与有机酸的盐和与无机酸的盐。

[0209] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物可进一步包括引发(prime)CTL的成分。已经将脂质鉴定为能够在体内引发针对病毒抗原的 CTL 的组合物。例如,可将棕榈酸残基附着至赖氨酸残基的 ϵ -和 α -氨基,然后连接至本发明的肽。然后脂化肽可以在胶束或颗粒中直接施用,掺入脂质体,或在佐剂中乳化。作为脂质引发 CTL 应答的另一个例子,大肠杆菌(E. coli)脂蛋白,诸如三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酰-丝氨酰-丝氨酸(P3CSS),当共价附着至适宜的肽时,可用来引发 CTL(参见例如 Deres et al., Nature 1989,342:561-4)。

[0210] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等,及系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。本发明肽的剂量可以依照要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整,而且通常是 0.001mg 至 1,000mg,例如 0.001mg 至 1000mg,例如 0.1mg 至 10mg,而且可以每少数天施用一次至每少数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0211] (2) 含有多核苷酸作为活性组分的药物组合物

[0212] 本发明的药物组合物也可包括处于可表达形式的编码本文中公开的肽的核酸。在本文中,短语“处于可表达形式的”意味着多核苷酸在导入细胞时会在体内表达成能诱导抗肿瘤免疫力的多肽。在一个例示性的实施方案中,感兴趣的多核苷酸的核酸序列包括多核苷酸表达所必需的调节元件。多核苷酸可具有为实现稳定插入靶细胞的基因组所需的配置(关于同源重组盒载体的描述参见例如 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987,51:503-12)。参见例如 Wolff et al., Science 1990,247:1465-8;美国专利 Nos. 5,580,859;5,589,466;5,804,566;5,739,118;5,736,524;5,679,647;和 WO 98/04720。基于 DNA 的投递技术的例子包括“裸 DNA”、易化(布比卡因、聚合物、肽介导的)投递、阳离子脂质复合物、和颗粒介导的(“基因枪”)或压力介导的投递(参见例如美国专利 No. 5,922,687)。

[0213] 本发明的肽还可利用病毒或细菌载体来表达。表达载体的例子包括减毒病毒宿主,

诸如牛痘或禽痘。这种办法涉及使用例如牛痘病毒作为载体来表达编码肽的核苷酸序列。在导入宿主后,重组牛痘病毒表达表达免疫原性肽,并由此引发免疫应答。可用于免疫接种方案的牛痘载体和方法记载于例如美国专利 No. 4,722,848。另一种载体是 BCG(卡介苗)。BCG 载体记载于 Stover et al., Nature 1991,351:456-60。有很多种可用于治疗性施用或免疫接种的其它载体是显而易见的,例如腺病毒和腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 载体、去毒炭疽毒素载体、诸如此类。参见例如 Shata et al., Mol Med Today 2000,6:66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000,68:793-806; Hipp et al., In Vivo 2000,14:571-85。

[0214] 将多核苷酸投递入患者可以是直接的,在该情况中患者直接暴露于携带多核苷酸的载体,或者是间接的,在该情况中首先在体外用感兴趣多核苷酸转化细胞,然后将细胞移植入患者。这两种办法分别称作体内和离体基因疗法。

[0215] 关于基因疗法的方法的一般综述参见 Goldspiel et al., Clinical Pharmacology 1993,12:488-505; Wu 和 Wu, Biotherapy 1991,3:87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993,33:573-96; Mulligan, Science 1993,260:926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993,62:191-217; Trends in Biotechnology 1993,11(5):155-215。重组 DNA 技术领域普遍知道的也可用于本发明的方法记载于 eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; 和 Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990。

[0216] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等,而且可使用系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。可以依照要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当调整合适载体或经编码本发明肽的多核苷酸转化的细胞中的多核苷酸的剂量,而且通常是 0.001mg 至 1000mg,例如 0.001mg 至 1000mg,例如 0.1mg 至 10mg,而且可以每数天施用一次至每数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0217] X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL 的方法

[0218] 本发明的肽和多核苷酸可用于诱导 APC 和 CTL。本发明的外来体和 APC 也可用于诱导 CTL。肽、多核苷酸、外来体和 APC 可以与任何其它化合物组合使用,只要所述化合物不抑制它们的 CTL 诱导能力。因此,任何上述本发明药物组合物均可用于诱导 CTL,而且除它们之外,那些包括肽和多核苷酸的也可用于诱导 APC,如下文讨论的。

[0219] (1) 诱导抗原呈递细胞 (APC) 的方法

[0220] 本发明提供了使用本发明的肽或多核苷酸来诱导具有高 CTL 诱导能力的 APC 的方法。

[0221] 本发明的方法包括在体外、离体或在体内用本发明的肽接触 APC 的步骤。例如,离体用肽接触 APC 的方法可包括下述步骤:

[0222] a: 自受试者收集 APC; 并

[0223] b: 用肽接触步骤 a 的 APC。

[0224] APC 不限于特定种类的细胞,而且包括 DC、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞识

别。优选地,由于 DC 是 APC 中具有最强 CTL 诱导能力的,可使用 DC。任何本发明肽可以以它们自身或与其它本发明肽一起使用。

[0225] 另一方面,在将本发明肽施用于受试者时,APC 在体内接触肽,因此在受试者的身体中诱导出具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,本发明包括将本发明的肽施用于受试者。类似地,在将可表达形式的本发明多核苷酸施用于受试者时,本发明的肽在体内表达并与 APC 接触,因此在受试者的身体中诱导出具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,本发明还可涵盖将本发明的多核苷酸施用于受试者。“可表达形式”描述于上文“IX. 药物组合物 (2) 含有多核苷酸作为活性组分的药物组合物”部分。

[0226] 本发明还包括将本发明的多核苷酸导入 APC 以诱导具有 CTL 诱导能力的 APC。例如,该方法可包括下述步骤:

[0227] a:自受试者收集 APC;并

[0228] b:导入编码本发明肽的多核苷酸。

[0229] 步骤 b 可如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分中所述来实施。

[0230] (2) 诱导 CTL 的方法

[0231] 本发明还提供了使用本发明的肽、多核苷酸、或外来体或 APC 来诱导 CTL 的方法。

[0232] 当本发明的肽、多核苷酸、APC、或外来体被施用给受试者后,在受试者的身体中诱导出 CTL,并增强靶向癌细胞的免疫应答的强度。因此,本发明的方法包括将本发明的肽、多核苷酸、APC 或外来体施用于受试者的步骤。

[0233] 或者,也可通过离体使用它们来诱导 CTL,并在诱导 CTL 后,将活化的 CTL 返还受试者。例如,该方法可包括下述步骤:

[0234] a:自受试者收集 APC;

[0235] b:用肽接触步骤 a) 的 APC;并

[0236] c:将步骤 b 的 APC 与 CD8 阳性细胞共培养。

[0237] 上文步骤 c 中要与 CD8 阳性细胞共培养的 APC 也可通过将包括本发明多核苷酸的基因转移入 APC 来制备,如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分所述,但是本发明不限于此,而且涵盖任何在其表面上有效呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的 APC。

[0238] 作为此类 APC 的替代,也可使用在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的外来体。即,本发明可包括共培养在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的外来体的步骤。此类外来体可通过上文“V. 外来体”部分中描述的方法来制备。

[0239] 另外,可通过将包括编码能与本发明的肽结合的 TCR 亚单位的多核苷酸的基因导入 CD8 阳性细胞来诱导 CTL。此类转导可如上文“VIII. T 细胞受体 (TCR)”部分中所述来实施。

[0240] 另外,本发明提供了一种制造用于诱导 CTL 的药物组合物的方法或工艺,其中该方法包括混合或配制本发明的肽与药学可接受载体的步骤。

[0241] XI. 检测或诊断癌症的方法:

[0242] 本发明还提供了一种检测或诊断癌症的方法。发现 C60RF167 的表达在数类癌细胞系和临床癌组织中特异性升高(表 1 和图 5)。因此,通过测量 C60RF167 在细胞样品中的表达,本文中鉴定的基因以及它们的转录和翻译产物可在诊断上用作癌症标志物。

[0243] 具体地,本发明提供了一种检测在生物学样品和该生物学样品所来源的受试者中

癌症的存在的方法,其包括测定 C6ORF167 在生物学样品中的表达水平,并将测定得到的表达水平与在已知为癌性的样品(下文称作“癌症对照”)中测定得到的对照水平比较。要通过本发明的方法和组合物来检测的癌症可以是任何涉及 C6orf167 上调的癌症。所述癌症的例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0244] 在另一个方面,本发明还提供了用于在受试者中诊断癌症的方法。所述诊断可以基于通过上文所述用于检测癌症的方法获得的结果来进行。

[0245] 根据本发明,可提供用于检查受试者状况的中间结果。所述中间结果可与其它信息结合起来以协助医生、护士或其它从业人员诊断受试者可能罹患所述疾病。或者,本发明可用于检测源自受试者的组织中的癌性细胞,并给医生提供有用信息来诊断受试者患有所述疾病。

[0246] 具体地,本发明提供了下述方法[1]至[10]:

[0247] [1]一种检测或诊断癌症的方法,所述方法包括下述步骤:

[0248] (a)测定生物学样品中编码 C6ORF167 氨基酸序列的基因的表达水平;并

[0249] (b)将测定到的表达水平与该基因的正常对照水平的升高与疾病的存在关联起来。

[0250] [2][1]的方法,其中所述表达水平比正常对照水平高至少10%。

[0251] [3][1]的方法,其中所述表达水平通过选自下组的方法测定:

[0252] (a)检测 C6ORF167 基因的 mRNA;

[0253] (b)检测由 C6ORF167 基因编码的蛋白质;和

[0254] (c)检测由 C6ORF167 基因编码的蛋白质的生物学活性。

[0255] [4][1]的方法,其中所述癌症选自膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0256] [5][3]的方法,其中所述表达水平是通过检测探针与基因的基因转录物的杂交而确定的。

[0257] [6][3]的方法,其中所述表达水平是通过检测抗体与基因编码的蛋白的结合作为所述基因的表达水平检测的。

[0258] [7][1]的方法,其中所述生物学样品包括活检、痰、血液、胸腔积液或尿液。

[0259] [8][1]的方法,其中所述源自受试者的生物学样品包含上皮细胞。

[0260] [9][1]的方法,其中所述源自受试者的生物学样品包含癌细胞。

[0261] [10][1]的方法,其中所述源自受试者的生物学样品包含癌性上皮细胞。

[0262] 或者,本发明提供了一种用于检测或鉴定源自受试者的膀胱组织、宫颈组织、胆管组织(肝内胆管组织)、白细胞、食管组织、胃组织、肺组织、淋巴组织、骨组织、肾组织、肺组织、软组织、或睾丸组织样品中癌细胞的方法,所述方法包括测定源自受试者的生物学样品中 C6ORF167 基因表达水平的步骤,其中所述表达水平与所述基因的正常对照水平相比的升高指示组织中存在或怀疑存在癌细胞。

[0263] 此类结果可以与别的信息组合来帮助医生、护士、或其它保健从业人员诊断受试

者患有疾病。换言之,本发明可以给医生提供有用信息来诊断受试者患有疾病。例如,依照本发明,当关于自受试者获得的组织中癌细胞的存在有疑问时,通过考虑 C60RF167 基因的表达水平,加上疾病的不同方面,包括组织病理学、血液中的已知肿瘤标志物的水平、和受试者的临床过程等,能做出临床决策。例如,血液中一些公知的诊断性肿瘤标志物如下:

[0264] 膀胱癌:

[0265] IAP, SCC, NMP, BFP, 和 TPA

[0266] 宫颈癌:

[0267] SCC, CEA, CYFRA21-1, CEA, 或 CA125

[0268] 胆管细胞癌:

[0269] CEA, 或 CA19-9

[0270] 慢性髓细胞性白血病 (CML):

[0271] TK 活性

[0272] 食管癌:

[0273] CEA, DUPAN-2, IAP, NSE, SCC, SLX, 或 Span-1

[0274] 胃癌:

[0275] CEA, SLX, STN, 或 NCC-ST-439

[0276] 弥漫型胃癌:

[0277] CEA, SLX, STN, NCC-ST-439, hsCRP 或 PG I/II

[0278] 肺癌:

[0279] AP, ACT, BFP, CA19-9, CA50, CA72-4, CA130, CEA, KM0-1, NSE, SCC, SP1, Span-1, TPA, CSLEX, SLX, STN 或 CYFRA

[0280] 淋巴瘤:

[0281] IAP, Span-1, 或 TPA

[0282] 骨肉瘤:

[0283] CD44, 或 ALP

[0284] 肾癌:

[0285] BFP, 或 IAP

[0286] 肺腺癌 (ADC):

[0287] NCC-ST-439, CEA, 或 SLX

[0288] 肺鳞状细胞癌 (SCC):

[0289] SCC, 或 Cyfra

[0290] 小细胞肺癌 (SCLC):

[0291] Pro-GRP, 或 NSE

[0292] 非小细胞肺癌 (NSCLC):

[0293] NCC-ST-439, CEA, SLX, SCC, 或 Cyfra

[0294] 睾丸肿瘤:

[0295] AFP, 或 BFP

[0296] 就是说,在本发明的这个具体实施方案中,基因表达分析的结果作为中间结果,用于进一步诊断受试者的疾病状态。

[0297] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于检测癌症的诊断标志物的方法,所述方法包括检测 C60RF167 基因在源自受试者的生物学样品中的表达的步骤,其作为膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病 (CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌 (ADC)、肺鳞状细胞癌 (SCC)、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤的诊断标志物。

[0298] 检测或诊断癌症的方法将在下面更加详细的加以叙述。

[0299] 需用本方法诊断的受试者优选为哺乳动物。例示性的哺乳动物包括但不限于例如人类、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马、和牛。

[0300] 为实施诊断,优选从要诊断的受试者采集生物学样品。任何生物学材料均可作为生物学样品用于测定,只要其包括目标的 C60RF167 转录或翻译产物。所述生物学样品包括但不限于身体组织与体液,例如血液、痰与尿液。优选地,生物学样品含有这样的细胞群体,该群体包括上皮细胞,较优选癌性上皮细胞或源自怀疑为癌性的组织的上皮细胞。进一步,如果必要,可从所得的身体组织与体液中纯化所述细胞,然后将其用为生物学样品。

[0301] 根据本发明,测定在所述源自受试者的生物学样品中 C60RF167 的表达水平。表达水平可在转录产物 (即 mRNA) 水平确定,使用本领域已知方法。举例而言, C60RF167 的 mRNA 可通过杂交方法 (例如, Northern 杂交) 使用探针定量。可在芯片或阵列上实施所述检测。对检测多个基因 (例如,多种癌症特异性基因),包括 C60RF167 基因,的表达水平而言,优选使用阵列。本领域技术人员可利用 C60RF167 基因 (SEQ ID NO:158; GenBank 登录号: NM_198468.2) 的序列信息制备上述探针。举例而言, C60RF167 的 cDNA 可用作探针。如需要,所述探针可用合适的标记物来标志,例如染料、荧光和同位素,且所述基因的表达水平可以作为所杂交的标记物的强度检测。

[0302] 进一步, C60RF167 基因的转录产物可通过基于扩增的检测方法 (例如, RT-PCR) 使用引物定量。上述引物亦可基于所述基因的可得序列信息制备。举例而言,用于“实施例”的引物 (SEQ ID NO:154、155、156 和 157) 可用于通过 RT-PCR 或 Northern 印迹的检测,但本发明并不限于此。

[0303] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、中等条件或低严格条件下与 C60RF167 的 mRNA 杂交。如本文中所使用的,短语“严格 (杂交) 条件”是指这样的条件,在该条件下,探针或引物将与其靶序列杂交,但不与其它序列杂交。严格条件是依赖于序列的,而且在不同的环境下会不同。较长序列的特异杂交与较短序列相比在较高温度下观察到。一般地,严格条件的温度选择比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的热熔点 (T_m) 低大约 5°C 。 T_m 是 (在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下) 平衡状态下有 50% 的与靶序列互补的探针与靶序列杂交的温度。因为靶序列一般过量存在,因此在 T_m ,平衡时 50% 的探针被占据。典型地,严格条件会是这样的:其中盐浓度小于大约 1.0M 钠离子,典型地大约 0.01-1.0M 钠离子 (或其它盐), pH 7.0-8.3,温度对于较短的探针或引物 (例如 10-50 个核苷酸) 是至少大约 30°C ,用于较长的探针或引物是至少大约 60°C 。严格条件也可以通过添加去稳定组合物,例如甲酰胺,来实现。

[0304] 或者,可以检测翻译产物 (即蛋白质) 以进行本发明的诊断。例如,可以确定 C60RF167 蛋白的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括免疫测定法,此类方法使用特异识别所述蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰 (例

如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等) 均可用于检测, 只要该片段保留对 C6ORF167 蛋白的结合能力即可。制备这些种类的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的, 并且在本发明中可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0305] 作为另一种基于其翻译产物来检测 C6ORF167 基因表达水平的方法, 可利用针对 C6ORF167 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析观察其染色的强度。意即, 观察到强染色表明所述蛋白质存在增加, 且同时表明 C6ORF167 基因的高表达水平。

[0306] 而且, 翻译产物可以根据其生物学活性加以检测。例如, 在本文中, C6orf167 蛋白表现出涉及癌细胞的增殖。因此, C6orf167 蛋白的细胞增殖活性可用作生物学样品中存在 C6orf167 蛋白的指标。

[0307] 另外, 除了 C6ORF167 基因的表达水平外, 亦可测定其它癌症相关基因(例如已知在癌症中差异表达的基因) 的表达水平以提高所述诊断的准确度。

[0308] 如果癌症标志物基因(包括 C6orf167 基因) 在生物学样品中的表达水平超出相应癌症标志物基因的对照水平例如 10%, 25% 或 50% 的话, 或增加到超过 1.1 倍, 超过 1.5 倍, 超过 2.0 倍, 超过 5.0 倍, 超过 10 倍或者更多, 则可认为它是升高的。

[0309] 对照水平可以与测试生物学样品同时确定, 或使用先前从疾病状态(癌性或非癌性) 已知的受试者收集和保存的样品。或者, 对照水平可以借助统计方法, 根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 C6orf167 基因表达水平获得的结果加以确定。

[0310] 进一步, 对照水平可以是来自先前测试过的细胞的表达模式数据库。而且, 根据本发明的一个方面, 可以将生物学样品中 C6orf167 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用来自与源自受试者的生物学样品组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且, 优选地, 使用具有已知的疾病状态的群体中 C6orf167 基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如, 平均值 ± 2 S.D. 或平均值 ± 3 S.D. 的范围可以用作标准值。

[0311] 在本发明的语境下, 从已知非癌性的生物学样品确定的对照水平称作“正常对照水平”。另一方面, 对照水平从癌性生物学样品确定, 称作“癌性对照水平”。

[0312] 当 C6ORF167 基因的表达水平相比正常对照水平有所提高或与癌性对照水平相似, 则受试者可诊断为患有或有风险发生癌症。进一步, 在比较多种癌症相关基因的表达水平的情况中, 样品与癌性参照之间基因表达样式的相似性表明受试者患有或有风险形成癌症。

[0313] 测试生物学样品的表达水平与对照水平间的差异, 可以相对已知表达水平不会随着细胞的癌或非癌状态改变的对照核酸(例如管家基因) 的表达水平加以标准化。示例对照基因包括, 但不限于, β -肌动蛋白、甘油醛-3 磷酸脱氢酶和核糖体蛋白 P1。

[0314] XII. 用于检测或诊断癌症的试剂盒:

[0315] 本发明还提供了用于诊断或确定患有或怀疑患有癌症的受试者是否能用本发明 C6ORF167 多肽来治疗的诊断试剂盒, 其亦可用于评价癌症预后和/或监测癌症疗法(特别是癌症免疫疗法) 功效或实用性。要诊断或确定的癌症的例示性例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌

(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。更特别地,所述试剂盒优选可包含至少一种在源自受试者的细胞中检测 C6ORF167 基因表达的试剂,所述试剂选自下组:

[0316] (a) 检测 C6ORF167 基因的 mRNA 的试剂;

[0317] (b) 检测 C6ORF167 的蛋白质或其免疫学片段的试剂;和

[0318] (c) 检测 C6ORF167 的蛋白质的生物学活性的试剂。

[0319] 适于检测 C6ORF167 mRNA 的试剂的例子包括特异性结合或鉴定 C6ORF167 mRNA 的核酸,诸如具有与 C6ORF167 mRNA 的一部分互补的序列的寡核苷酸。这些种类的寡核苷酸以对 C6ORF167 mRNA 特异性的引物和探针为例。可基于本领域众所周知的方法制备这些种类的寡核苷酸。如果需要,检测 C6ORF167 mRNA 的试剂可固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 C6ORF167 mRNA 的试剂。

[0320] 另一方面,适于检测 C6ORF167 蛋白质的试剂的例子包括针对 C6ORF167 蛋白质的抗体。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步,所述抗体的任何片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等)均可用作所述试剂,只要所述片段保留与 C6ORF167 蛋白的结合能力。为检测蛋白制备这些种类的抗体的方法在本领域是众所周知的,且可在本发明中使用任何方法制备上述抗体及其等价物。进一步,所述抗体可用能产生信号的分子通过直接连接或非直接标记技术进行标记。标记物与标记抗体以及检测抗体与其靶结合的方法在本领域是众所周知的,且本发明可使用任何标记物与方法。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 C6ORF167 蛋白质的试剂。

[0321] 进一步,所述生物学活性可通过,例如,测量所述生物学样品中由于 C6orf167 蛋白质表达而导致的细胞增殖活性来确定。举例而言,可在生物学样品的存在下培养所述细胞,然后通过检测增殖的速度,或测量细胞周期或集落形成能力,可确定所述生物学样品的细胞增殖活性。如需要,检测 C6orf167 mRNA 的试剂可固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 C6orf167 蛋白生物学活性的试剂。

[0322] 所述试剂盒可包含多于一种前述的试剂。所述试剂盒可进一步包括用于结合针对 C6orf167 基因的探针或针对 C6orf167 蛋白的抗体的固体基质和试剂,用于培养细胞的培养基和容器,阳性和阴性对照试剂,及用于检测针对 C6orf167 蛋白的抗体的二抗。举例而言,从已知非癌性的受试者获取的组织样品可用作有用的对照试剂。本发明的试剂盒可进一步包括其它从商业或用户角度而言期望的材料,包括缓冲液、稀释液、滤纸、针头、注射器、和带有使用说明的包装插页(例如,书面的、磁带、CD-ROM 等等)。这些试剂之类的可与标签一起包含在容器中。合适的容器包括瓶、管形瓶和试管。所述容器可从多种材料制得,例如玻璃或塑料。

[0323] 作为本发明的一个实施方案,当所述试剂是针对 C6ORF167 mRNA 的探针时,所述试剂可固定化于固体基质上,例如多孔条,以形成至少一个检测位点。所述多孔条的测量或检测区域可包含多个位置,每个都包含核酸(探针)。测试条亦可包含阴性和/或阳性对照的位点。或者,对照位点可位于与测试条不同的条上。任选地,不同的检测位点可包含不同量的固定化核酸,即,在第一个检测位点上量较大而在接下来的位点上量较小。在添加测试样品之后,展示可检测信号位点的数目提供了在样品中存在的 C6ORF167mRNA 量的定量指征。所述检测位点可配置成任何合适可检测的形状,并通常是横跨测试条宽度的条状或点状。

[0324] 在又一个实施方案中,本发明进一步提供了一种诊断试剂盒,其包括能够特异性

识别本发明抗体的蛋白或其部分蛋白或其免疫原性片段。

[0325] 本文中涵盖的本发明的蛋白的部分肽和免疫原性片段的例子包括由本发明蛋白的氨基酸序列中的至少 8 个、优选 15 个、和更优选 20 个连续氨基酸构成的多肽。癌症可通过使用本发明的蛋白或肽（多肽）检测样品（例如血液、组织）中的抗体来诊断。上文描述了用于制备本发明肽或蛋白质的方法。

[0326] 本发明用于诊断癌症的方法可通过如上所述测定抗 C6ORF167 抗体量和相应对照样品中的量之间的差异来进行。若受试者的生物学样品含有针对该基因的表达产物（C6ORF167）的抗体和抗 C6ORF167 抗体的数量测定为大于截留值（与正常对照中的水平相比）的话，则该受试者怀疑患有癌症。

[0327] 在另一个实施方案中，本发明的诊断试剂盒可包括本发明的肽及与它结合的 HLA 分子。使用抗原性肽和 HLA 分子检测抗原特异性 CTL 的合适方法早已确立（例如 Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284) :94-6）。因此，本发明肽和 HLA 分子形成的复合物可用于检测方法来检测肿瘤抗原特异性 CTL，由此能够较早检测癌症的复发和 / 或转移。进一步，它可用于选择适合包含本发明肽作为活性组分的药物的受试者或评估该药物的治疗效果。

[0328] 特别地，依照已知方法（参见例如 Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284) :94-6），可制备放射性标记的 HLA 分子和本发明肽的寡聚物复合物，诸如四聚体。可使用该复合物来对源自怀疑患有癌症的受试者的外周血淋巴细胞中的抗原 - 肽特异性 CTL 定量。

[0329] 本发明进一步提供了如本文所述使用肽表位来评估受试者的免疫学应答的方法和诊断剂。在本发明的一个实施方案中，本文所述 HLA 限制肽可作为试剂用于评估或预测受试者的免疫应答。要评估的免疫应答可通过在体外或在体内使免疫原接触有免疫能力的细胞来诱导。在某些实施方案中，作为试剂采用的组合物可以是任何能导致识别和结合肽表位的抗原特异性 CTL 的生成的组合物。肽试剂无需用作免疫原。用于此类分析的测定系统包括相对较新的技术发展，诸如四聚体、胞内淋巴因子染色和干扰素释放测定法、或 ELISPOT 测定法。在一个优选的实施方案中，要用肽试剂接触的有免疫能力的细胞可以是抗原呈递细胞，包括树突细胞。

[0330] 例如，本发明的肽可用于四聚体染色测定法，在暴露于肿瘤细胞抗原或免疫原后，对外周血单个核细胞评估抗原特异性 CTL 的存在。HLA 四聚体复合物可用于直接显现抗原特异性 CTL（参见例如 Ogg et al., Science 279 :2103-2106, 1998 ;和 Altman et al., Science 174 :94-96, 1996）和测定抗原特异性 CTL 群体在外周血单个核细胞样品中的频率。使用本发明肽的四聚体试剂可如下所述来生成。

[0331] 与 HLA 分子结合的肽在相应 HLA 重链和 $\beta 2$ -微球蛋白存在下重折叠以生成三分子复合物。在该复合物中，重链的羧基末端在先前工程化到蛋白质中的位点处被生物素化。然后，将链霉亲和素添加至复合物以形成由三分子复合物和链霉亲和素组成的四聚体。借助荧光标记的链霉亲和素，四聚体能用于对抗原特异性细胞染色。然后可鉴定细胞，例如通过流式细胞术。此类分析可用于诊断或预后目的。通过该规程鉴定的细胞也可用于治疗目的。

[0332] 本发明还提供了包括本发明肽的用于免疫回忆应答的试剂（参见例如 Bertoni et al., J. Clin. Invest. 100 :503-513, 1997 和 Penna et al., J. Exp. Med. 174 :1565-1570,

1991)。例如,可使用特定肽对来自具有要治疗的癌症的个体的患者 PBMC 样品分析抗原特异性 CTL 的存在。含有单个核细胞的血液样品可如下评估,即培养 PBMC 并用本发明的肽刺激该细胞。适宜培养时段后,可对扩增的细胞群体分析例如 CTL 活性。

[0333] 肽还可作为试剂用于评估疫苗的功效。可使用例如上文所述方法来分析自疫苗接种免疫原的患者获得的 PBMC。测定患者的 HLA 型,并选择识别患者中存在的等位基因特异性分子的肽表位试剂进行分析。疫苗的免疫原性可通过 PBMC 样品中表位特异性 CTL 的存在来指示。本发明的肽还可用于制备抗体,使用本领域公知技术(参见例如 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; 和 Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989),其可作为试剂用于诊断、检测或监测癌症。此类抗体可包括识别 HLA 分子背景中的肽的抗体,即结合肽-MHC 复合物的抗体。

[0334] 本发明的肽和组合物还具有多种别的用途,本文中描述了其中一些。例如,本发明提供了一种用于诊断或检测以 C60RF167 免疫原性多肽表达呈递为特征的病症的方法。这些方法涉及测定 C60RF167 HLA 结合肽、或 C60RF167 HLA 结合肽和 I 类 HLA 分子形成的复合物在生物学样品中的表达或呈递。肽或肽和 I 类 HLA 分子形成的复合物的表达或呈递可通过用针对肽或复合物的结合配偶测定来测定或检测。在一个优选的实施方案中,针对肽或复合物的结合配偶可以是识别和特异性结合肽或复合物的抗体。C60RF167 在生物学样品诸如肿瘤活检中的表达也可使用 C60RF167 引物通过标准 PCR 扩增方案来测试。本文中呈现了肿瘤表达的一个例子,而且用于 C60RF167 扩增的例示性条件和引物的进一步公开内容可见于 W02003/27322。

[0335] 优选的诊断方法涉及使自受试者分离的生物学样品接触对 C60RF167HLA 结合肽特异性的物质以检测 C60RF167 HLA 结合肽在生物学样品中的存在。如本文中使用的,“接触”意味着放置生物学样品使其在适宜条件(例如浓度、温度、时间、离子强度)下足够接近试剂以容许试剂和生物学样品中存在的 C60RF167 HLA 结合肽之间的特异性相互作用。一般地,试剂接触生物学样品的条件是本领域普通技术人员知道的促进生物学样品中分子与其关联物(例如蛋白质与其受体关联物、抗体与其蛋白质抗原关联物、核酸与其互补序列关联物)之间的特异性相互作用的条件。用于促进分子与其关联物之间的特异性相互作用的例示性条件记载于授权给 Low 等人的美国专利 No. 5, 108, 921。

[0336] 本发明的诊断方法可以在体外和在体外任一或二者实施。因而,生物学样品在本发明中可位于体内或体外。例如,生物学样品可以是体内组织,而且可使用对 C60RF167 免疫原性多肽特异性的试剂来检测此类分子在组织中的存在。或者,可在体外收集或分离生物学样品(例如血液样品、肿瘤活检、组织提取物)。在一个特别优选的实施方案中,生物学样品可以是含有细胞的样品,更优选含有肿瘤细胞的样品,其是自要诊断或治疗的受试者收集的。

[0337] 或者,诊断可使用容许通过对荧光素标记的 HLA 多聚体复合物染色而直接定量抗原特异性 T 细胞的方法来进行(例如 Altman, J. D. et al., 1996, Science 274 :94 ;Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :10330)。还提供了对胞内淋巴因子的染色和干扰素- γ 释放测定法或 ELISPOT 测定法。多聚体染色、胞内淋巴因子染色和 ELISPOT 测定法都表现出比更常规的测定法灵敏至少 10 倍 (Murali-Krishna, K. et al., 1998,

Immunity 8:177;Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186:859;Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8:413)。也可使用五聚体(例如 US 2004-209295A)、Dextramers(e.g., WO 02/072631)、和 Streptamers(例如 Nature medicine 6.631-637(2002))。

[0338] XIII. 诱导免疫应答的方法

[0339] 此外,本发明提供了诱导针对涉及 C6orf167 的疾病的免疫应答的方法。合适的疾病包括癌症,其例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0340] 本发明的方法包括施用含有任何本发明肽或其编码多核苷酸的物质或组合物的步骤。本发明的方法还涵盖施用呈递任何本发明肽的外来体或 APC。关于详情参见“IX. 药物组合物”项,特别是描述本发明的药物组合物作为疫苗的用途的部分。另外,可用于诱导免疫应答的本发明方法的外来体和 APC 详细描述于上文“V. 外来体”、“VI. 抗原呈递细胞(APC)”和“X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL”的(1)和(2)部分。

[0341] 本发明还提供了一种制造用于诱导免疫应答的药物组合物或物质的方法或工艺,其中该方法可包括混合或配制本发明的肽与药学可接受载体的步骤。

[0342] 或者,本发明的方法可包括施用包含下述的疫苗或药物组合物或物质的步骤:

[0343] (a) 本发明的肽;

[0344] (b) 处于可表达形式的编码本文中公开的此类肽的核酸;

[0345] (c) 在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体;或

[0346] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0347] 在本发明的语境中,过表达 C6orf167 的癌症可用这些活性组分来治疗。所述癌症的例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。因而,在施用包括活性组分的疫苗或药物组合物或物质之前,优选确认要治疗的受试者中的 C6orf167 表达水平增强了。因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于在有需要的患者中治疗(过)表达 C6orf167 的癌症的方法,该方法可包括下述步骤:

[0348] i) 测定自具有要治疗的癌症的受试者获得的生物学样品中的 C6orf167 表达水平;

[0349] ii) 将 C6orf167 表达水平与正常对照比较;并

[0350] iii) 对具有与正常对照相比过表达 C6orf167 的癌症的受试者施用至少一种选自上文所述(a)至(d)的成分。

[0351] 或者,本发明还提供了包括至少一种选自上文所述(a)至(d)的成分的疫苗或药物组合物或物质,其要对具有过表达 C6orf167 的癌症的受试者施用。换言之,本发明进一步提供了用于鉴定要用本发明 C6orf167 多肽来治疗的受试者的方法,所述方法可包括测定源自受试者的生物学样品中的 C6orf167 表达水平的步骤,其中该水平与该基因的正常对照水平相比的升高指示该受试者可具有可用本发明 C6orf167 多肽来治疗的癌症。本发明的治疗癌症的方法将在下面更加详细的加以叙述。

[0352] 根据本发明,可测定在自受试者获得的生物学样品中 C6orf167 的表达水平。例

如,可依照上文“XI. 用于检测或诊断癌症的方法”中描述的方法来测定表达水平。

[0353] 在一个实施方案中,本发明提供了一种 (i) 诊断受试者是否具有要治疗的癌症,和 / 或 (ii) 选择受试者进行癌症治疗的方法,该方法包括下述步骤:

[0354] a) 测定 C6orf167 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的生物学样品中的表达水平;

[0355] b) 将 C6orf167 的表达水平与正常对照水平比较;

[0356] c) 若 C6orf167 的表达水平与正常对照水平相比升高的话,将受试者诊断为具有要治疗的癌症;并

[0357] d) 若在步骤 c) 中受试者被诊断为具有要治疗的癌症的话,选择受试者进行癌症治疗。

[0358] 或者,此类方法可包括下述步骤:

[0359] a) 测定 C6orf167 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的生物学样品中的表达水平;

[0360] b) 将 C6orf167 的表达水平与癌性对照水平比较;

[0361] c) 若 C6orf167 的表达水平与癌性对照水平相似或等同的话,将受试者诊断为具有要治疗的癌症;并

[0362] d) 若在步骤 c) 中受试者被诊断为具有要治疗的癌症的话,选择受试者进行癌症治疗。

[0363] XIV. 抗体

[0364] 本发明进一步提供了与本发明的肽结合的抗体。优选的抗体能特异性结合本发明的肽且不会结合(或会微弱结合)非本发明肽。或者,抗体能结合本发明的肽及其同源物。针对本发明肽的抗体可用于癌症诊断和预后测定法、及成像方法。类似地,此类抗体可用于其它癌症的治疗、针对、和 / 或预后,只要癌症患者中也表达或过表达 C6orf167。此外,胞内表达的抗体(例如单链抗体)在治疗上可用于治疗涉及 C6orf167 表达的癌症,例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0365] 本发明还提供了多种免疫学测定法,用于检测和 / 或定量 C6orf167 蛋白(SEQ ID NO:159)或其片段,包括由选自 SEQ ID NO:1-66 和 63-151 的氨基酸序列组成的多肽。此类测定法可根据需要包括一种或多种能够识别和结合 C6orf167 蛋白或其片段的抗 C6orf167 抗体。在本发明的语境中,能与 C6orf167 多肽结合的抗 C6orf167 抗体优选识别由选自 SEQ ID NO:1-61 和 63-151 的氨基酸序列组成的多肽。抗体的结合特异性可用抑制测试来确认。即,当抗体与所分析的全长 C6orf167 多肽之间的结合在任何由选自 SEQ ID NO:1-61 和 63-151 的氨基酸序列组成的片段多肽存在下受到抑制时,显示了此抗体特异性结合该片段。在本发明的语境中,此类免疫学测定法以本领域公知的各种免疫学测定形式内实施,包括但不限于各种类型的放射免疫测定法、免疫层析技术、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、酶联免疫荧光测定法(ELIFA)、等等。

[0366] 本发明的有关的免疫学的但非抗体的测定法也可包括 T 细胞免疫原性测定法(抑制性的或刺激性的)以及 MHC 结合测定法。另外,本发明涵盖能够检测表达 C6orf167 的癌

症的免疫学成像方法,例子包括但不限于使用经标记本发明抗体的放射闪烁成像方法。此类测定法在临床上可用于表达 C6orf167 的癌症的检测、监测、和预后,例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病 (CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌 (ADC)、肺鳞状细胞癌 (SCC)、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0367] 本发明还提供了能与本发明的肽结合的抗体。本发明的抗体可以以任何形式使用,例如单克隆或多克隆抗体,而且可进一步包括通过用本发明的肽免疫动物诸如家兔而获得的抗血清、所有种类的多克隆和单克隆抗体、及通过遗传重组生成的人抗体和人源化抗体。

[0368] 作为抗原用于获得抗体的本发明肽可衍生自任何动物物种,但优选源自哺乳动物,诸如人、小鼠或大鼠,更优选源自人。源自人的肽可以由本文所公开的核苷酸或氨基酸序列获得。

[0369] 根据本发明,用作免疫抗原的肽可以是完整的蛋白质或蛋白质的部分肽。部分肽可以包含例如本发明肽的氨基 (N) 末端或羧基 (C) 末端片段。

[0370] 在本文中,抗体定义为能与 C6orf167 肽的全长或片段起反应的蛋白质。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体能识别 C6orf167 的片段肽,其由选自 SEQ ID NO:1-61 和 63-151 的氨基酸序列组成。用于合成寡肽的方法是本领域公知的。合成后,可任选在作为免疫原使用之前纯化肽。在本发明的语境中,寡肽(例如 9 或 10 聚物)可缀合或连接有载体以增强免疫原性。匙孔螯血蓝蛋白 (KLH) 作为载体是公知的。用于缀合 KLH 和肽的方法也是本领域公知的。

[0371] 或者,可以将编码本发明肽或其片段的基因插入已知的表达载体,然后用该载体转化本文所述宿主细胞。可以通过任何标准方法从宿主细胞外部或内部回收所需肽或其片段,然后可将其用作抗原。或者,表达肽的完整细胞或其溶胞物或者化学合成的肽也可用作抗原。

[0372] 可以用抗原免疫任何哺乳动物,但优选考虑与用于细胞融合的亲本细胞的相容性。通常,可使用啮齿目 (Rodentia)、兔形目 (Lagomorpha) 或灵长目 (Primate) 的动物。啮齿目动物包括例如小鼠、大鼠和仓鼠。兔形目动物包括例如家兔。灵长目动物包括例如狭鼻猿 (Catarrhini) (东半球猴 (old world monkey)) 诸如食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)、恒河猴 (rhesus monkey)、狒狒 (sacred baboon) 和黑猩猩 (chimpanzee)。

[0373] 用抗原免疫动物的方法是本领域已知的。腹膜内注射或皮下注射抗原是免疫哺乳动物的标准方法。更具体的说,可以在适量的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、生理盐水等中稀释和悬浮抗原。如果需要,可将抗原悬浮液与适量的标准佐剂诸如弗氏 (Freund) 完全佐剂混合,制成乳状液,然后施用于哺乳动物。优选的是,其后每 4-21 天施用数次与适量弗氏不完全佐剂混合的抗原。还可使用适宜的载体进行免疫。如上所述进行免疫后,可通过标准方法检验血清中所需抗体的量的增加。

[0374] 可以如下制备针对本发明肽的多克隆抗体:从经过免疫的哺乳动物(该哺乳动物经检验其血清中所需抗体增加)收集血液,并通过任何常规方法从血液中分离血清。多克隆抗体可包括含有多克隆抗体的血清,并且可以从所述血清中分离含有该多克隆抗体的级分。可以使用例如偶联有本发明肽的亲合柱从仅识别本发明肽的级分中制备免疫球蛋白 G

或 M, 并进一步使用蛋白 A 或蛋白 G 柱纯化该级分。

[0375] 为了制备单克隆抗体, 从经过抗原免疫并如上所述检查出血清中所需抗体水平升高的哺乳动物收集免疫细胞, 并进行细胞融合。用于细胞融合的免疫细胞可优选获自脾。其它要与上述免疫细胞融合的优选亲本细胞包括例如哺乳动物骨髓瘤细胞, 更优选具有为了用药物选择融合细胞而获得的特性的骨髓瘤细胞。

[0376] 根据已知的方法, 例如 Milstein 等 (Galfre 和 Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)) 的方法, 可与将上述免疫细胞与骨髓瘤细胞进行融合。

[0377] 通过在标准选择培养基诸如 HAT 培养基 (含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基) 中进行培养, 可以选择出由细胞融合得到的杂交瘤。通常, 细胞培养在 HAT 培养基中连续进行数天至数周, 这段时间足以使除了所需杂交瘤之外的所有其它细胞 (非融合的细胞) 死亡。然后, 可进行标准有限稀释 (standard limiting dilution) 来筛选和克隆生成所需抗体的杂交瘤细胞。

[0378] 除了上述用抗原免疫非人动物来制备杂交瘤的方法外, 还可以在体外用肽、表达肽的细胞或其溶胞物免疫人淋巴细胞, 诸如那些感染了 EB 病毒的人淋巴细胞。然后, 使经过免疫的淋巴细胞与能够无限分裂的源自人的骨髓瘤细胞诸如 U266 融合, 以产生期望的生成能够与所述肽结合的人抗体的杂交瘤 (已公开但未审查的日本专利申请 No. Sho 63-17688)。

[0379] 随后将所得杂交瘤移植入小鼠腹腔, 并抽取腹水。所得单克隆抗体可通过例如硫酸铵沉淀、蛋白 A 或蛋白 G 柱、DEAE 离子交换层析或偶联有本发明肽的亲合柱进行纯化。本发明的抗体不仅可用于纯化和检测本发明的肽, 还可以用作本发明肽的激动剂和拮抗剂的候选物。

[0380] 或者, 可以通过癌基因使生成抗体的免疫细胞, 诸如经过免疫的淋巴细胞永生代, 并用于制备单克隆抗体。

[0381] 如此获得的单克隆抗体也可以使用遗传工程技术来重组制备 (参见例如 Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, 由 MacMillan Publishers LTD 在英国出版 (1990))。例如, 可以从生成抗体的免疫细胞诸如杂交瘤或经免疫淋巴细胞克隆编码抗体的 DNA, 将该 DNA 插入合适的载体, 并导入宿主细胞以制备重组抗体。本发明还提供了如上所述制备的重组抗体。

[0382] 此外, 本发明的抗体可以是抗体片段或经过修饰的抗体, 只要它能结合一种或多种本发明的肽。例如, 抗体片段可以是 Fab、F(ab')₂、Fv 或将来自 H 链和 L 链的 Fv 片段通过合适的接头连接而成的单链 Fv (scFv) (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-83 (1988))。更具体的说, 可以通过用酶诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体来生成抗体片段。或者, 可以构建编码抗体片段的基因, 将其插入表达载体, 并在合适的宿主细胞中表达 (参见例如 Co et al., *J Immunol* 152:2968-76 (1994); Better and Horwitz, *Methods Enzymol* 178:476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol* 178:497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121:652-63 (1986); Rousseaux et al., *Methods Enzymol* 121:663-9 (1986); Bird and Walker, *Trends Biotechnol* 9:132-7 (1991))。

[0383] 抗体可以通过与多种分子诸如聚乙二醇 (PEG) 缀合来修饰。本发明提供了经过这

样修饰的抗体。可通过化学修饰抗体来获得经过修饰的抗体。这些修饰方法是本领域常规的。

[0384] 或者,可以以衍生自非人抗体的可变区与衍生自人抗体的恒定区之间的嵌合抗体或者包含衍生自非人抗体的互补决定区(CDR)、衍生自人抗体的框架区(FR)及恒定区的人源化抗体的形式来获得本发明的抗体。此类抗体可依照已知技术来制备。人源化可通过用啮齿类的 CDR 或 CDR 序列替换人抗体的相应序列来进行(参见例如 Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988))。因而,此类人源化抗体是嵌合抗体,其中基本上小于整个人可变域已被来自非人物种的相应序列所替换。

[0385] 也可以使用除了人框架区和恒定区外还包含人可变区的完全人的抗体。此类抗体可使用本领域已知的多种技术来制备。例如,体外方法包括使用展示在噬菌体上的人抗体片段的重组文库(例如 Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381(1991))。类似的,可通过将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物,例如内源免疫球蛋白基因部分或完全灭活的小鼠,来生成抗体。该方法记载于例如美国专利 Nos. 6,150,584;5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016。

[0386] 可以将如上获得的抗体纯化至同质。例如,可依照用于一般蛋白质的分离和纯化方法进行抗体的分离和纯化。例如,可以通过适当选择和组合使用柱层析诸如亲和层析、过滤、超滤、盐析、透析、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦来分出和分离抗体(Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow 和 David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)),但并不局限于此。蛋白 A 柱和蛋白 G 柱可以用作亲和柱。例示性的可使用的蛋白 A 柱包括例如 HyperD、POROS 和 Sepharose F.F. (Pharmacia)。

[0387] 除亲和层析外的例示性层析包括例如离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤、反相层析、吸附层析、等等(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996))。可以通过液相层析来进行层析规程,诸如 HPLC 和 FPLC。

[0388] 例如,可使用吸光度测量、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、酶免疫测定法(EIA)、放射免疫测定法(RIA)和/或免疫荧光来测量本发明抗体的抗原结合活性。在 ELISA 中,将本发明的抗体固定化在板上,将本发明的肽施加到该板上,再施加含有所需抗体的样品,诸如生成抗体的细胞的培养物上清液或纯化的抗体。然后施加用酶(诸如碱性磷酸酶)标记的、识别第一抗体的第二抗体,并将板温育。接着,在洗涤后,向板中加入酶底物,诸如磷酸对硝基苯酯,并测量吸光度以评估样品的抗原结合活性。可以使用肽的片段,诸如 C-末端或 N-末端片段作为抗原来评估抗体的结合活性。可以使用 BIAcore (Pharmacia) 来评估本发明抗体的活性。

[0389] 上述方法允许通过将本发明的抗体暴露于假定含有本发明肽的样品,并检测或测量由抗体与肽形成的免疫复合物,来检测或测量本发明的肽。

[0390] 因为依照本发明的肽检测或测量方法可特异性的检测或测量肽,所以该方法可用于使用肽的各种实验。

[0391] XV. 载体和宿主细胞

[0392] 本发明还提供了导入有编码本发明肽的核苷酸的载体和宿主细胞。本发明的载体可用于在宿主细胞中维持本发明的核苷酸、尤其是 DNA,用于表达本发明的肽,或者用于施

用本发明的核苷酸以用于基因疗法。

[0393] 当宿主细胞为大肠杆菌且在大肠杆菌（例如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue）中大量扩增和生成载体时，载体应具有能在大肠杆菌中扩增的“（复制）起点”和用于选择经过转化的大肠杆菌的标志基因（例如通过药物诸如氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素等进行选择的药物抗性基因）。例如，可以使用 M13 系列载体、pUC 系列载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。另外，与上述载体一样，pGEM-T、pDIRECT 和 pT7 也可以用于亚克隆和提取 cDNA。当使用载体来生成本发明的蛋白质时，可使用表达载体。例如，要在大肠杆菌中表达的表达载体应具备上述在大肠杆菌中扩增的特征。当使用大肠杆菌诸如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue 作为宿主细胞时，载体应具有能在大肠杆菌中高效表达所需基因的启动子，例如 lacZ 启动子 (Wardet al., Nature 341:544-6(1989); FASEB J 6:2422-7(1992))、araB 启动子 (Betteret al., Science 240:1041-3(1988))、T7 启动子等。在这方面，可以使用例如 pGEX-5X-1 (Pharmacia)、“QIAexpress 系统” (Qiagen)、pEGFP 和 pET（在这种情况下，宿主优选为表达 T7 RNA 聚合酶的 BL21）来替代上述载体。另外，载体还可以包含用于多肽分泌的信号序列。指导肽分泌至大肠杆菌周质的例示性信号序列有 pelB 信号序列 (Lei et al., J Bacteriol 169:4379(1987))。用于将载体导入靶宿主细胞的手段包括例如氯化钙法和电穿孔法。

[0394] 除了大肠杆菌外，还可以使用例如源自哺乳动物的表达载体（例如 pcDNA3 (Invitrogen) 和 pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17):5322(1990))、pEF、pCDM8）、衍生自昆虫细胞的表达载体（例如“Bac-to-BAC 杆状病毒表达系统” (GIBCO BRL)、pBacPAK8）、衍生自植物的表达载体（例如 pMH1、pMH2）、衍生自动物病毒的表达载体（例如 pHSV、pMV、pAdexLcw）、衍生自逆转录病毒的表达载体（例如 pZIpneo）、衍生自酵母的表达载体（例如“毕赤酵母表达试剂盒” (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01）及衍生自枯草芽孢杆菌的表达载体（例如 pPL608、pKTH50）来生成本发明的多肽。

[0395] 为了在动物细胞诸如 CHO、COS 或 NIH3T3 细胞中表达载体，载体应具有在所述细胞中进行表达所必需的启动子，例如 SV40 启动子 (Mulligan et al., Nature 277:108(1979))、MLV-LTR 启动子、EF1 α 启动子 (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18:5322(1990))、CMV 启动子、等等，及优选用于选择转化子的标志基因（例如通过药物（例如新霉素、G418）进行选择的药物抗性基因）。具有这些特征的已知载体的例子包括例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 和 pOP13。

[0396] 虽然本文中参照其具体实施方案详细地描述了本发明，但是要理解，上面的描述本质上是例示性的和解释性的，而且意图例示本发明及其优选实施方案。经由常规实验，本领域技术人员会容易地认识到，可以对本发明进行各种变化和修饰，而不偏离本发明的精神和范围。因此，本发明意图并非由上文描述，而是由所附权利要求及其等同方案来限定。

实施例

[0397] 材料和方法

[0398] 实施例 1

[0399] 细胞系和临床样品

[0400] 23 种人肺癌细胞系包括 19 种 NSCLC (A427, A549, NCI-H1373, LC319, PC-14,

PC-3, PC-9, NCI-H1666, NCI-H1781, NCI-H647, NCI-H226, NCI-H1703, NCI-H520, LU61, RERF-LC-AI, SK-MES-1, EBC-1, LX1, 和 NCI-H2170) 和 4 种 SCLC (DMS114, DMS273, SBC-3, 和 SBC-5)。人食管癌细胞系包括 9 种鳞状细胞癌 (SCC :TE1, TE2, TE3, TE4, TE5, TE6, TE8, TE9, 和 TE10) 和 1 种腺癌 (ADC :TE7)。所有细胞在补充有 10% 胎牛血清 (FCS) 的适宜培养基中单层培养, 并维持于 37 摄氏度含 5% CO₂ 的湿润空气中。

[0401] 人小气道上皮细胞, SAEC (Cambrex Bio Science Inc., East Rutherford, NJ) 也包括在使用的细胞组中。原代 NSCLC 样品先前在知情同意下获得。

[0402] A24 类淋巴母细胞细胞系 (A24LCL) 是通过将埃巴二氏病毒转化入 HLA-A24 阳性人 B 淋巴细胞中而建立的。COS7 即非洲绿猴肾细胞系购自 ATCC。

[0403] 半定量 RT-PCR

[0404] 制备自临床肺和食管癌样品的 mRNA 制备的每份单链 cDNA 的适当稀释度, 以 β -肌动蛋白 (ACTB) 表达水平作为定量对照。用于扩增的引物组如下: ACTB-F (5' -GAG GTGATAGCATTGCTTTCG-3') (SEQ ID NO :152) 和 ACTB-R (5' -CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3') (SEQ ID NO :153) 用于 ACTB, C6orf167-F (5' -GTCTCACCTTGGACAGATGG-3') (SEQ ID NO :154) 和 C6orf167-R (5' -CCAAGGATCCTATTACACAGTTGC-3') (SEQ ID NO :155) 用于 C6orf167。

[0405] 所有反应均包括初始变性 95 摄氏度 5 分钟, 接着是 22 个循环 (对于 ACTB)、或 30 个循环 (对于 C6orf167) 的 95 摄氏度 30 秒、56 摄氏度 30 秒、和 72 摄氏度 60 秒, 在 GeneAmp PCR 系统 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 上进行。

[0406] Northern 印迹分析

[0407] 将人多组织印迹 (16 种正常组织, 包括心、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾、胰、脾、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠、白细胞; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 与 32P 标记的 C6orf167 PCR 产物杂交。使用引物 C6orf167-F1 (CTGGAAGAGGCAGTTGAAAA) (SEQ ID NO :156) 和 C6orf167-R1 (ATCGCCCAATATACTGCTCA) (SEQ ID NO :157) 通过 RT-PCR 制备 C6orf167 的部分长度 cDNA。预杂交、杂交、和清洗依照供应商的推荐来实施。用增强屏将印迹于 -80 摄氏度放射自显影 7 天。

[0408] C6orf167 衍生的肽的候选者的选择

[0409] 使用结合预测软件 "BIMAS" (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) 预测了 C6orf167 衍生的结合 HLA-A*2402 分子的 9 聚物和 10 聚物肽 (Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1) :163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6) :1872-81))。由 SIGMA (札幌, 日本) 依照标准固相合成法合成了这些肽, 并通过反相高效液相层析 (HPLC) 进行了纯化。分别通过分析性 HPLC 和质谱术分析测定了肽的纯度 (> 90%) 和身份。将肽以 20mg/ml 在二甲亚砜 (DMSO) 中溶解, 并保存于 -80°C。

[0410] 体外 CTL 诱导

[0411] 使用单核细胞衍生树突细胞 (DC) 作为抗原呈递细胞 (APC) 来诱导针对人白细胞抗原 (HLA) 上呈递的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。如别处 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14) :4112-8) 所述在体外生成 DC。具体而言, 将用 Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液自正常志愿者 (HLA-A*2402 阳性) 分离的外周血单个核细胞 (PBMC) 通过粘附至塑料组织培养皿 (Becton Dickinson) 来加以分离, 以将它们作为

单核细胞级分富集。在含有 2% 热灭活自体血清 (AS) 的 AIM-V 培养基 (Invitrogen) 中在 1,000U/ml 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) (R&D System) 和 1,000U/ml 白介素 (IL)-4 (R&D System) 存在下培养富集了单核细胞的群体。培养 7 天后,将经细胞因子诱导的 DC 在 AIM-V 培养基中在 3 微克 /ml β 2- 微球蛋白存在下用 20 微克 /ml 每一种合成肽于 37°C 冲激 3 小时。所生成的细胞表现上在它们的细胞表面上表达 DC 相关分子,诸如 CD80、CD83、CD86 和 HLA II 类 (数据未显示)。然后将这些经肽冲激的 DC 用 X 辐照 (20Gy) 灭活,并以 1 : 20 比例与用 CD8 阳性分离试剂盒 (Dyna1) 通过正选择获得的自体 CD8+T 细胞混合。在 48 孔板 (Corning) 中设立这些培养物;每个孔在 0.5ml AIM-V/2% AS 培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的 DC、 3×10^5 个 CD8+T 细胞和 10ng/ml IL-7 (R&D System)。3 天后,给这些培养物补充 IL-2 (CHIRON) 至终浓度 20IU/ml。在第 7 天和第 14 天,将 T 细胞用经肽冲激的自体 DC 进一步刺激。每次通过与上文所述相同的方式来制备 DC。在第 21 天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的 A24LCL 细胞的 CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1) :94-9;Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8) :1052-7;Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24) :8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5) :411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8) :498-506)。

[0412] CTL 扩增规程

[0413] 使用与 Riddell 等人 (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16) : 1038-44;Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2) :216-23) 记载的方法相似的方法在培养中扩增 CTL。将总共 5×10^4 个 CTL 在 25ml AIM-V/5% AS 培养基中悬浮,其中有在 40ng/ml 抗 CD3 单克隆抗体 (Pharmingen) 存在下经丝裂霉素 C 灭活的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系。启动培养后一天,向培养物添加 120IU/ml IL-2。在第 5 天、第 8 天和第 11 天给培养物补加新鲜的含有 30IU/ml IL-2 的 AIM-V/5% AS 培养基 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1) :94-9;Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8) : 1052-7;Uchida N et al., ClinCancer Res 2004 Dec 15, 10(24) :8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5) :411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8) :498-506)。

[0414] CTL 克隆的建立

[0415] 在 96 圆底微量滴定板 (Nalge Nunc International) 中进行稀释以获得 0.3、1 和 3 个 CTL/ 孔。在总体积为 150 微升 / 孔的含 5% AS 的 AIM-V 培养基中,将 CTL 与 1×10^4 个细胞 / 孔的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml 的抗 CD3 抗体,和 125U/ml 的 IL-2 一起培养。10 天后向培养基中加入 50 微升 / 孔的 IL-2 以达到终浓度 125U/ml 的 IL-2。在第 14 天测试 CTL 活性,并使用如上所述的相同方法扩增 CTL 克隆 (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24) :8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5) : 411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8) :498-506)。

[0416] 特异性 CTL 活性

[0417] 为了检查特异性 CTL 活性,实施了干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定法和 IFN- γ 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。具体而言,制备经肽冲激的 A24LCL (1×10^4 / 孔) 作为刺激细胞。使用 48 孔中培养的细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施 IFN- γ ELISPOT 测定法和 IFN- γ ELISA 测定法。

[0418] 质粒转染

[0419] 通过 PCR 来扩增编码靶基因可读框或 HLA-A*2402 的 cDNA。将 PCR 扩增产物克隆入 pCAGGS 载体。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照制造商推荐的规程将质粒转染入 COS7 (靶基因和 HLA-A24 阴性的细胞系)。自转染起 2 天后,用 Versene (Invitrogen) 收获经转染细胞,并用作 CTL 活性测定法的靶细胞 (5×10^4 个细胞 / 孔)。

[0420] 结果

[0421] 癌症中增强的 C6orf167 表达

[0422] 使用 cDNA 微阵列自多种癌症获得的广泛基因表达谱 (wide gene expression profile) 数据揭示了 C6orf167 (GenBank 登录号 NM_198468.2 ;SEQID No :158) 表达升高。C6orf167 表达在 17 例膀胱癌中的 13 例、2 例宫颈癌中的 2 例、11 例胆管细胞癌中的 8 例、33 例 CML 中的 20 例、15 例食管癌中的 11 例、8 例胃癌中的 5 例、2 例弥漫型胃癌中的 2 例、2 例肺癌中的 1 例、2 例淋巴瘤中的 2 例、3 例骨肉瘤中的 2 例、12 例肾癌中的 5 例、4 例 SCLC 中的 4 例、1 例软组织肿瘤中的 1 例和 2 例睾丸肿瘤中的 1 例中与相应的正常组织相比确实升高 (表 1)。

[0423] 表 1 :观察到 C6orf167 在癌性组织中与正常相应组织相比上调的病例的比例

[0424]

癌症 / 肿瘤	比例
膀胱癌	13/17
宫颈癌	2/2
胆管细胞癌	8/11
CML	20/33
食管癌	11/15
胃癌	5/8
弥漫型胃癌	2/2
肺癌	1/2
淋巴瘤	2/2
骨肉瘤	2/3
肾癌	5/12
SCLC	4/4
软组织肿瘤	1/1

睾丸肿瘤	1/2
------	-----

[0425] 自 C6orf167 衍生的 HLA-A24 结合肽的预测

[0426] 表 2a 和 2b 依高结合亲和力的次序显示 C6orf167 的 HLA-A24 结合 9 聚物和 10 聚物肽。选择并检查了总共 61 种具有潜在 HLA-A24 结合能力的肽以确定表位肽。

[0427] [表 2a]

[0428] 自 C6orf167 衍生的 HLA-A24 结合性 9 聚物肽

[0429]

肽名称	等级	起始位置	氨基酸序列	结合得分	SEQ ID NO.
C6orf167-A24-9聚物	1	848	EYMKQLVKL	330	1
	2	179	LYIGHLSEL	330	2
	3	641	LYPSHEKLL	300	3
	4	404	MYLHCCLTL	300	4
	5	1171	YYYQVYSIL	280	5
	6	1219	AYSKLLSHL	240	6
	7	236	VYGHQFMNL	240	7
	8	480	SYTIFLCIL	200	8
	9	1170	RYYYQVYSI	100	9
	10	580	MYAQKNLDI	50	10
	11	203	LFPPSWHLL	36	11
	12	254	LFEEHCETL	36	12
	13	158	PYEALEAQL	36	13
	14	9	TFLTDSLEL	33	14
	15	561	AFVTSQRAL	30	15
	16	530	NFFSLFLLL	28.8	16
	17	966	LFRIIDCCL	28	17
	18	315	SFWNWLNKL	26.4	18
	19	92	LFHLFRQQL	24	19
	20	95	LFRQQLYNL	20	20
	21	786	RYLSHVLQN	15	21
	22	132	LFLHYVKVF	15	22
	23	598	AFREKAKEF	13.2	23
	24	827	KNLSGPDDL	12	24
	25	851	KQLVKLTRL	12	25
	26	55	RLILNDPL	12	26
	27	626	IYIDGVQEV	11.88	27
	28	908	KSAMVTKSL	11.2	28
	29	550	HVLDLLNFL	10.368	29
	30	220	LVLEILYML	10.08	30
	31	437	SFSISWLPF	10	31

[0430] 起始位置指自 C6orf167 N 端起的氨基酸残基数。

[0431] 结合得分由“BIMAS”得出。

[0432] [表 2b]

[0433] 自 C6orf167 衍生的 HLA-A24 结合性 10 聚物肽

[0434]

肽名称	等级	起始位置	氨基酸序列	结合得分	SEQ ID NO.
C6orf167-A24-10聚物	1	1170	RYYYqVYSIL	560	32
	2	626	IYIDgVQEVF	252	33
	3	429	YYSKnLNSSF	120	34
	4	917	EYLGeVLKYI	105	35
	5	474	LYKSsSSYTI	50	36
	6	514	KFHQkRMEEL	44	37
	7	254	LFEEhCETLL	36	38
	8	194	AFVNqNQIKL	33	39
	9	240	QFMNIASDNL	30	40
	10	956	IFATsKAQKL	26.4	41
	11	786	RYLShVLQNS	25.2	42
	12	511	IYSKfHQKRM	25	43
	13	315	SFWNwLNKLL	24	44
	14	598	AFREkAKEFL	24	45
	15	869	IFSKaQVEYL	20	46
	16	966	LFRliDCLLL	20	47
	17	66	NFEEdTLEIF	18	48
	18	914	KSLEyLGEVL	17.28	49
	19	964	KLLFrIIDCL	16.8	50
	20	143	RYLKvQNAES	16.5	51
	21	647	KLLNdGFSML	14.4	52
	22	851	KQLVklTRLl	14.4	53
	23	519	RMEEITEVGL	14.4	54
	24	97	RQQLyNLETl	12	55
	25	827	KNLSgPDDLl	12	56
	26	389	KSISvQGVIL	12	57
	27	273	RYDKvRSSES	11	58
	28	670	SFLQaVLARl	10.5	59
	29	132	LFLHyVKVFI	10.5	60
	30	1112	LLLPgILKCL	10.08	61

[0435] 起始位置指自 C6orf167 N 端起的氨基酸残基数。

[0436] 结合得分由“BIMAS”得出。

[0437] 预测的来自 C6orf167 的 HLA-A*2402 限制肽的 CTL 诱导和 C6orf167 衍生肽刺激的 CTL 系的建立

[0438] 依照“材料和方法”中描述的方案产生了针对那些自 C6orf167 衍生的肽的 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法来测定肽特异性 CTL 活性(图 1a-z)。下述孔号展现出与对照孔相比强的 IFN- γ 生成:用 C6orf167-A24-9-179(SEQ ID NO:2) 刺激的 1 号孔(a),用 C6orf167-A24-9-404(SEQ ID NO:4) 刺激的 1 号和 3 号孔(b),用 C6orf167-A24-9-236(SEQ ID NO:7) 刺激的 4 号孔(c),用 C6orf167-A24-9-480(SEQ ID NO:8) 刺激的 1 号和 7 号孔(d),用 C6orf167-A24-9-1170(SEQ ID NO:9) 刺激的 7 号孔(e),用 C6orf167-A24-9-9(SEQ ID NO:14) 刺激的 5 号孔(f),用 C6orf167-A24-9-530(SEQ ID NO:16) 刺激的 3 号和 4 号孔(g),用 C6orf167-A24-9-315(SEQ ID NO:18) 刺激的 5 号孔(h),用 C6orf167-A24-9-132(SEQ ID NO:22) 刺激的 3 号孔(i),用 C6orf167-A24-9-851(SEQ ID NO:25) 刺激的 1 号和 7 号孔(j),用 C6orf167-A24-9-55(SEQ ID NO:26) 刺激的 3 号和 6 号孔(k),用 C6orf167-A24-9-220(SEQ ID NO:30) 刺激的 1 号和 2 号孔(l),用 C6orf167-A24-10-626(SEQ ID NO:33) 刺激的 4 号和 8 号孔(m),用 C6orf167-A24-10-429(SEQ ID NO:34) 刺激的 1 号孔(n),用 C6orf167-A24-10-917(SEQ ID NO:35) 刺激的 1 号和 5 号孔(o),用 C6orf167-A24-10-474(SEQ ID NO:36) 刺激的 4 号和 5 号孔(p),用 C6orf167-A24-10-254(SEQ ID NO:38) 刺激的 4 号孔(q),用 C6orf167-A24-10-194(SEQ ID NO:39) 刺激的 2 号孔(r),用 C6orf167-A24-10-956(SEQ ID NO:41) 刺激的 7 号孔(s),用 C6orf167-A24-10-511(SEQ ID NO:43) 刺激的 3 号孔(t),用 C6orf167-A24-10-315(SEQ ID NO:44) 刺激的 3 号孔(u),用 C6orf167-A24-10-598(SEQ ID NO:45) 刺激的 2 号孔(v),用 C6orf167-A24-10-966(SEQ ID NO:47) 刺激的 1 号和 3 号孔(w),用 C6orf167-A24-10-66(SEQ ID NO:48) 刺激的 7 号孔(x),用 C6orf167-A24-10-914(SEQ ID NO:49) 刺激的 3 号孔(y),及用 C6orf167-A24-10-851(SEQ ID NO:53) 刺激的 2 号孔(z)。另外,将用 C6orf167-A24-9-179(SEQ ID NO:2) 刺激的 1 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-404(SEQ ID NO:4) 刺激的 1 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-236(SEQ ID NO:7) 刺激的 4 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-480(SEQ ID NO:8) 刺激的 7 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-1170(SEQ ID NO:9) 刺激的 7 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-530(SEQ ID NO:16) 刺激的 3 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-132(SEQ ID NO:22) 刺激的 3 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-851(SEQ ID NO:25) 刺激的 1 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-55(SEQ ID NO:26) 刺激的 6 号阳性孔、用 C6orf167-A24-9-220(SEQ ID NO:30) 刺激的 2 号阳性孔、用 C6orf167-A24-10-626(SEQ ID NO:33) 刺激的 8 号阳性孔、用 C6orf167-A24-10-917(SEQ ID NO:35) 刺激的 1 号阳性孔、用 C6orf167-A24-10-315(SEQ ID NO:44) 刺激的 3 号阳性孔和用 C6orf167-A24-10-914(SEQ ID NO:49) 刺激的 3 号阳性孔中的细胞扩增并建立 CTL 系。通过 IFN- γ ELISA 测定法测定那些 CTL 系的 CTL 活性(图 2a-n)。其显示,与未经肽冲激的靶细胞相比,所有 CTL 系针对经相应肽冲激的靶细胞均展现出强的 IFN- γ 生成。另一方面,用其它表 2 所示肽刺激未能检测到强的 IFN- γ 生成,尽管那些肽可能具有对 HLA-A*2402 的结合活性(数据未显示)。结果表明 C6orf167 衍生的 26 种肽被筛选为能诱导强 CTL 的肽。

[0439] 针对 C6orf167 特异性肽的 CTL 克隆的建立

[0440] 如“材料和方法”中所述通过有限稀释自 CTL 系建立了 CTL 克隆,并通过 IFN- γ ELISA 测定法测定了 CTL 克隆针对经肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。在图 3 中确定了

经 C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO :2) (a)、C6orf167-A24-9-404 (SEQ ID NO :4) (b)、C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO :7) (c)、C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO :9) (d)、C6orf167-A24-9-530 (SEQ ID NO :16) (e) 和 C6orf167-A24-9-220 (SEQ ID NO :30) (f) 刺激的 CTL 克隆的强的 IFN- γ 生成。

[0441] 针对外源表达 C6orf167 和 HLA-A*2402 的靶细胞的特异性 CTL 活性

[0442] 针对这些肽产生的建成 CTL 系, 检查它们识别内源表达 C6orf167 和 HLA-A*2402 分子的靶细胞的能力。使用用相应肽产生的 CTL 系作为效应细胞测试了针对用全长 C6orf167 和 HLA-A*2402 分子基因同时转染的 COS7 细胞 (外源表达 C6orf167 和 HLA-A*2402 基因的靶细胞的一种特异性模型) 的特异性 CTL 活性。制备了用全长 C6orf167 基因或 HLA-A*2402 转染的 COS7 细胞作为对照。在图 4 中, 经 C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO :2)、C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO :7)、C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO :9) 和 C6orf167-A24-10-626 (SEQ ID NO :33) 刺激的 CTL 针对表达 C6orf167 和 HLA-A*2402 二者的 COS7 细胞显示出强的 CTL 活性。另一方面, 没有检测到显著的针对对照的特异性 CTL 活性。因此, 这些数据清楚地证明 C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO :2)、C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO :7)、C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO :9) 和 C6orf167-A24-10-626 (SEQ ID NO :33) 的肽被内源切割并与 HLA-A*2402 分子一起在靶细胞上表达, 并且被 CTL 识别。结果指示这些自 C6orf167 衍生的肽适合作为癌症疫苗, 供用于具有表达 C6orf167 的肿瘤的患者。

[0443] 对抗原肽的同源性分析

[0444] 经 C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO :2)、C6orf167-A24-9-404 (SEQ ID NO :4)、C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO :7)、C6orf167-A24-9-480 (SEQ ID NO :8)、C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO :9)、C6orf167-A24-9-9 (SEQ ID NO :14)、C6orf167-A24-9-530 (SEQ ID NO :16)、C6orf167-A24-9-315 (SEQ ID NO :18)、C6orf167-A24-9-132 (SEQ ID NO :22)、C6orf167-A24-9-851 (SEQ ID NO :25)、C6orf167-A24-9-55 (SEQ ID NO :26)、C6orf167-A24-9-220 (SEQ ID NO :30)、C6orf167-A24-10-626 (SEQ ID NO :33)、C6orf167-A24-10-429 (SEQ ID NO :34)、C6orf167-A24-10-917 (SEQ ID NO :35)、C6orf167-A24-10-474 (SEQ ID NO :36)、C6orf167-A24-10-254 (SEQ ID NO :38)、C6orf167-A24-10-194 (SEQ ID NO :39)、C6orf167-A24-10-956 (SEQ ID NO :41)、C6orf167-A24-10-511 (SEQ ID NO :43)、C6orf167-A24-10-315 (SEQ ID NO :44)、C6orf167-A24-10-598 (SEQ ID NO :45)、C6orf167-A24-10-966 (SEQ ID NO :47)、C6orf167-A24-10-66 (SEQ ID NO :48)、C6orf167-A24-10-914 (SEQ ID NO :49) 和 C6orf167-A24-10-851 (SEQ ID NO :53) 刺激的 CTL 显示出显著的且特异的 CTL 活性。这个结果可能是由于 C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO :2)、C6orf167-A24-9-404 (SEQ ID NO :4)、C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO :7)、C6orf167-A24-9-480 (SEQ ID NO :8)、C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO :9)、C6orf167-A24-9-9 (SEQ ID NO :14)、C6orf167-A24-9-530 (SEQ ID NO :16)、C6orf167-A24-9-315 (SEQ ID NO :18)、C6orf167-A24-9-132 (SEQ ID NO :22)、C6orf167-A24-9-851 (SEQ ID NO :25)、C6orf167-A24-9-55 (SEQ ID NO :26)、C6orf167-A24-9-220 (SEQ ID NO :30)、C6orf167-A24-10-626 (SEQ ID NO :33)、

C6orf167-A24-10-429 (SEQ ID NO :34)、C6orf167-A24-10-917 (SEQ ID NO :35)、C6orf167-A24-10-474 (SEQ ID NO :36)、C6orf167-A24-10-254 (SEQ ID NO :38)、C6orf167-A24-10-194 (SEQ ID NO :39)、C6orf167-A24-10-956 (SEQ ID NO :41)、C6orf167-A24-10-511 (SEQ ID NO :43)、C6orf167-A24-10-315 (SEQ ID NO :44)、C6orf167-A24-10-598 (SEQ ID NO :45)、C6orf167-A24-10-966 (SEQ ID NO :47)、C6orf167-A24-10-66 (SEQ ID NO :48)、C6orf167-A24-10-914 (SEQ ID NO :49) 和 C6orf167-A24-10-851 (SEQ ID NO :53) 的序列与其它已知可使人免疫系统致敏的分子衍生的肽同源。为了排除这种可能性,使用 BLAST 算法 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有发现具有显著同源性的序列。同源性分析的结果表明 C6orf167-A24-9-179 (SEQ ID NO :2)、C6orf167-A24-9-404 (SEQ ID NO :4)、C6orf167-A24-9-236 (SEQ ID NO :7)、C6orf167-A24-9-480 (SEQ ID NO :8)、C6orf167-A24-9-1170 (SEQ ID NO :9)、C6orf167-A24-9-9 (SEQ ID NO :14)、C6orf167-A24-9-530 (SEQ ID NO :16)、C6orf167-A24-9-315 (SEQ ID NO :18)、C6orf167-A24-9-132 (SEQ ID NO :22)、C6orf167-A24-9-851 (SEQ ID NO :25)、C6orf167-A24-9-55 (SEQ ID NO :26)、C6orf167-A24-9-220 (SEQ ID NO :30)、C6orf167-A24-10-626 (SEQ ID NO :33)、C6orf167-A24-10-429 (SEQ ID NO :34)、C6orf167-A24-10-917 (SEQ ID NO :35)、C6orf167-A24-10-474 (SEQ ID NO :36)、C6orf167-A24-10-254 (SEQ ID NO :38)、C6orf167-A24-10-194 (SEQ ID NO :39)、C6orf167-A24-10-956 (SEQ ID NO :41)、C6orf167-A24-10-511 (SEQ ID NO :43)、C6orf167-A24-10-315 (SEQ ID NO :44)、C6orf167-A24-10-598 (SEQ ID NO :45)、C6orf167-A24-10-966 (SEQ ID NO :47)、C6orf167-A24-10-66 (SEQ ID NO :48)、C6orf167-A24-10-914 (SEQ ID NO :49) 和 C6orf167-A24-10-851 (SEQ ID NO :53) 的序列是独特的,因此,就我们所知,这些分子产生对一些无关分子的不期望免疫学应答的可能性很小。

[0445] 总之,鉴定了自 C6orf167 衍生的新型 HLA-A24 表位肽。而且,证明了 C6orf167 的表位肽可用于癌症免疫疗法。

[0446] C6orf167 在肺癌、食管癌和正常组织中的表达

[0447] 使用 cDNA 微阵列来筛选在较大比例的肺癌 (W02007/013665) 和 / 或食管癌中高度转录的成分,将 C6orf167 基因鉴定为用于诊断和 / 或治疗癌症的较好候选物。此基因在大多数肺和食管癌中显示较高的表达水平。随后,通过半定量 RT-PCR 实验证实了它在 10 个 NSCLC 病例中的 7 个中 (5 例 ADC 中的 3 例和 5 例 SCC 中的 4 例) 及在所有 5 个 SCLC 病例中 (图 5A, 右上小图) 以及所有 10 种 NSCLC 细胞系和所有 5 种 SCLC 细胞系中 (图 5A, 右下小图) 的反式激活。还在 10 个食管癌病例中的 7 个及 10 种食管癌细胞系中的 9 种中检测到 C6orf167 的上调 (图 5A, 左上和左下小图)。

[0448] 在 16 种检查的人组织中,使用 C6orf167 cDNA 作为探针的 Northern 印迹分析只在睾丸和小肠中鉴定出 7.5-kb 转录物 (图 5B)。

[0449] 实施例 2

[0450] 细胞系

[0451] T2 即 HLA-A*0201 阳性 B 淋巴母细胞样细胞系和 COS7 即非洲绿猴肾细胞系购自

ATCC。

[0452] C6orf167 衍生的肽的候选者的选择

[0453] 使用结合预测软件 " BIMAS " (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) 预测了 C6orf167 衍生的结合 HLA-A*0201 分子的 9 聚物和 10 聚物肽 (Parker et al. (J Immunol 1994,152(1):163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001,98(6):1872-81))。由 Biosynthesis (Lewisville, Texas) 依照标准固相合成法合成了这些肽,并通过反相高效液相层析 (HPLC) 进行了纯化。分别通过分析性 HPLC 和质谱术分析测定了肽的纯度 (> 90%) 和身份。将肽以 20mg/ml 在二甲亚砜中溶解,并保存于 -80℃。

[0454] 体外 CTL 诱导

[0455] 使用单核细胞衍生树突细胞 (DC) 作为抗原呈递细胞来诱导针对人白细胞抗原 (HLA) 上呈递的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。如别处 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15,63(14):4112-8) 所述在体外生成 DC。具体而言,将用 Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液自正常志愿者 (HLA-A*0201 阳性) 分离的外周血单个核细胞 (PBMC) 通过粘附至塑料组织培养皿 (Becton Dickinson) 来加以分离,以将它们作为单核细胞级分富集。在含有 2% 热灭活自体血清 (AS) 的 AIM-V 培养基 (Invitrogen) 中在 1,000U/ml 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (R&D System) 和 1,000U/ml 白介素 (IL)-4 (R&D System) 存在下培养富集了单核细胞的群体。培养 7 天后,将经细胞因子诱导的 DC 在 AIM-V 培养基中在 3 微克 /ml β 2-微球蛋白存在下用 20 微克 /ml 每一种合成肽于 37℃ 冲激 3 小时。所生成的细胞表现上在它们的细胞表面上表达 DC 相关分子,诸如 CD80、CD83、CD86 和 HLA II 类 (数据未显示)。然后将这些经肽冲激的 DC 用 X 辐照 (20Gy) 灭活,并以 1 : 20 比例与用 CD8 阳性分离试剂盒 (Dynal) 通过正选择获得的自体 CD8+T 细胞混合。在 48 孔板 (Corning) 中设立这些培养物;每个孔在 0.5ml AIM-V/2% AS 培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的 DC、 3×10^5 个 CD8+T 细胞和 10ng/ml IL-7 (R&D System)。3 天后,给这些培养物补充 IL-2 (CHIRON) 至终浓度 20IU/ml。在第 7 天和第 14 天,将 T 细胞用经肽冲激的自体 DC 进一步刺激。每次通过与上文所述相同的方式来制备 DC。在第 21 天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的 T2 细胞的 CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5,84(1):94-9;Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20,84(8):1052-7;Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006 May,97(5):411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug,96(8):498-506)。

[0456] CTL 扩增规程

[0457] 使用与 Riddell 等人 (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19,333(16):1038-44;Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb,2(2):216-23) 记载的方法相似的方法在培养中扩增 CTL。将总共 5×10^4 个 CTL 在 25ml AIM-V/5% AS 培养基中悬浮,其中有在 40ng/ml 抗 CD3 单克隆抗体 (Pharmingen) 存在下经丝裂霉素 C 灭活的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系。启动培养后一天,向培养物添加 120IU/ml IL-2。在第 5 天、第 8 天和第 11 天给培养物补加新鲜的含有 30IU/ml IL-2 的 AIM-V/5% AS 培养基 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5,84(1):94-9;Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20,84(8):1052-7;Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006 May,97(5):411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug,

96(8):498-506)。

[0458] CTL 克隆的建立

[0459] 在 96 圆底微量滴定板 (Nalge Nunc International) 中进行稀释以获得 0.3、1 和 3 个 CTL/孔。在总体积为 150 微升/孔的含 5% AS 的 AIM-V 培养基中,将 CTL 与 1×10^4 个细胞/孔的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml 的抗 CD3 抗体,和 125U/ml 的 IL-2 一起培养。10 天后向培养基中加入 50 微升/孔的 IL-2 以达到终浓度 125U/ml 的 IL-2。在第 14 天测试 CTL 活性,并使用如上所述的相同方法扩增 CTL 克隆 (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

[0460] 特异性 CTL 活性

[0461] 为了检查特异性 CTL 活性,实施了干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定法和 IFN- γ 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。具体而言,制备经肽冲激的 T2 (1×10^4 /孔) 作为刺激细胞。使用 48 孔中培养 of 细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施 IFN- γ ELISPOT 测定法和 IFN- γ ELISA 测定法。

[0462] 强迫表达靶基因和 / 或 HLA-A02 的细胞的建立

[0463] 通过 PCR 来扩增编码靶基因可读框或 HLA-A*0201 的 cDNA。将 PCR 扩增产物克隆入 pCAGGS 载体和 pIRES 载体 (Clontech Laboratories, Inc., Cat. No. 631605)。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照制造商推荐的规程将质粒转染入 COS7 (无靶基因和 HLA-A*0201 的细胞系)。自转染起 2 天后,用 Versene (Invitrogen) 收获经转染细胞,并用作 CTL 活性测定法的靶细胞 (5×10^4 个细胞/孔)。

[0464] 结果

[0465] 自 C6orf167 衍生的 HLA-A02 结合肽的预测

[0466] 表 3a 和 3b 依高结合亲和力的次序显示 C6orf167 的 HLA-A02 结合 9 聚物和 10 聚物肽。选择并检查了总共 90 种具有潜在 HLA-A02 结合能力的肽以确定表位肽。

[0467] [表 3a]

[0468] 自 C6orf167 衍生的 HLA-A2 结合 9 聚物肽

[0469]

起始位置	氨基酸序列	结合得分	SEQ ID NO
918	YLGEVLKYI	2489.0	62
202	KLFPPSWHL	2074.8	63
227	MLGEKCLKQV	1115.0	64
855	KLTRLLENL	997.4	65
131	VLFLHYVKV	656.2	66
533	SLFLLAAV	591.9	67
858	RLLENLSEV	591.9	68
290	CLCIKELWV	382.5	69
647	KLLNDGFSM	373.1	70
929	YLGKKVFSA	304.9	71
219	WLVLEILYM	289.1	72
904	TLSDKSAMV	285.2	73
648	LLNDGFSML	282.9	74
133	FLHYVKVFI	264.0	75
887	ALVRFFEAV	246.1	76
319	WLNKLLKTL	226.0	77
667	TVLSFLQAV	196.8	78
261	TLLCDLISL	181.8	79
965	LLFRIIDCL	151.4	80
964	KLLFRIIDC	148.0	81
578	LLMYAQKNL	134.4	82
623	LLSIYIDGV	133.3	83
484	FLCILAKVV	131.2	84
457	SMLEMVKTC	125.2	85
253	SLFEEHCET	113.0	86
671	FLQAVLARI	110.4	87
283	LMSDQCPCCL	107.5	88
1018	YLNQLLGNV	95.7	89
1091	SILAFILQL	95.0	90
1113	LLPGILKCL	83.5	91
821	VLQMYIKNL	83.5	92
1116	GILKCLVLV	81.4	93
528	LQNFFSLFL	77.0	94
1112	LLPGILKC	71.9	95
99	QLYNLETLL	68.4	96
590	VLAЕКFSCA	65.8	97
224	ILYMLGEKL	56.9	98
405	YLHCCLTLC	52.6	99

[0470] [表 3b]

[0471] 自 C6orf167 衍生的 HLA-A2 结合 10 聚物肽

[0472]

起始位置	氨基酸序列	结合得分	SEQ ID NO
716	ALWRhFFSFL	7040.9	100
535	FLLLaAVAEV	2722.7	101
226	YMLGeKLKQV	1966.4	102
303	LLDHrSKWfV	1950.9	103
311	FVSEsFWNWl	1252.6	104
425	ILWEyYSKNL	1235.8	105
554	LLNFIKPAFV	650.3	106
648	LLNDgFSMLL	565.8	107
569	LIWKgHMAFL	524.3	108
202	KLFPpSWHLL	470.3	109
527	GLQNfFSLFL	446.5	110
10	FLTDsLELEL	402.9	111
577	FLLMyAQKNL	363.6	112
128	QQCVIFLHYV	339.0	113
622	TLLSiYIDGV	290.0	114
178	LLYIgHLSEL	267.3	115
47	YLCSgALKRL	226.0	116
219	WLVLeLYML	226.0	117
1155	QLTSvFRQFI	218.0	118
227	MLGEkLKQVV	198.8	119
253	SLFEeHCETL	158.8	120
606	FLVSkNEEMV	156.8	121
290	CLCIkELWVL	151.1	122
262	LLCDIISLSL	148.9	123
965	LLFRiIDCLL	134.4	124
1113	LLPGiLKCLV	118.2	125
77	IQWViETALV	99.5	126
319	WLNKILKTLL	98.3	127
1022	LLGNvIEQYI	97.5	128
910	AMVTkSLEYL	95.6	129
738	QLADaAADFT	82.3	130
482	TIFLcILAKV	81.4	131
282	SLMSdQCPCL	79.0	132
442	WLPFkGLANT	78.8	133
625	SIYIdGVQEV	70.4	134
1120	CLVLvSEPQV	69.6	135
640	CLYPsHEKLL	68.4	136
619	TIWTILSiYI	65.5	137

[0473]

747	TLLAmDMPST	63.4	138
1131	RLATeNLQYM	62.8	139
71	TLEIfGIQWV	56.3	140
614	MVQRqTIWTL	54.8	141
457	SMLEmVKTCC	54.4	142
1001	YLQGmCIVCC	52.6	143
397	ILEEqLRMYL	52.4	144
268	SLSLnRYDKV	51.1	145
1088	RLASiLAFIL	50.8	146
528	LQNfSLFLL	49.1	147
1049	VLLAIRNTAT	46.9	148
886	KALVrFFEAV	44.3	149
411	TLCDfWEPNI	42.8	150
579	LMYAqKNLDI	41.0	151

[0474] 预测的来自 C6orf167 的 HLA-A*0201 限制肽的 CTL 诱导

[0475] 依照“材料和方法”中描述的方案产生了针对那些自 C6orf167 衍生的肽的 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法来测定肽特异性 CTL 活性（图 6a-r）。下面的孔号展现出与对照孔相比强的 IFN- γ 生成：用 C6orf167-A02-9-855 (SEQ ID NO :65) 刺激的 4 号孔 (a)，用 C6orf167-A02-9-131 (SEQ ID NO :66) 刺激的 6 号孔 (b)，用 C6orf167-A02-9-887 (SEQ ID NO :76) 刺激的 4 号孔 (c)，用 C6orf167-A02-9-261 (SEQ ID NO :79) 刺激的 6 号孔 (d)，用 C6orf167-A02-9-484 (SEQ ID NO :84) 刺激的 7 号孔 (e)，用 C6orf167-A02-10-535 (SEQ ID NO :101) 刺激的 1 号、3 号和 6 号孔 (f)，用 C6orf167-A02-10-527 (SEQ ID NO :110) 刺激的 1 号孔 (g)，用 C6orf167-A02-10-10 (SEQ ID NO :111) 刺激的 3 号孔 (h)，用 C6orf167-A02-10-577 (SEQ ID NO :112) 刺激的 5 号孔 (i)，用 C6orf167-A02-10-128 (SEQ ID NO :113) 刺激的 5 号和 7 号孔 (j)，用 C6orf167-A02-10-622 (SEQ ID NO :114) 刺激的 4 号孔 (k)，用 C6orf167-A02-10-47 (SEQ ID NO :116) 刺激的 1 号孔 (l)，用 C6orf167-A02-10-219 (SEQ ID NO :117) 刺激的 1 号孔 (m)，用 C6orf167-A02-10-1155 (SEQ ID NO :118) 刺激的 3 号孔 (n)，用 C6orf167-A02-10-606 (SEQ ID NO :121) 刺激的 7 号孔 (o)，用 C6orf167-A02-10-290 (SEQ ID NO :122) 刺激的 6 号孔 (p)，用 C6orf167-A02-10-262 (SEQ ID NO :123) 刺激的 6 号孔 (q)，及用 C6orf167-A02-10-965 (SEQ ID NO :124) 刺激的 8 号孔 (r)。另一方面，用表 3a 和 3b 所示其它肽刺激没有观察到特异性 CTL 活性，尽管那些肽可能具有对 HLA-A*0201 的结合活性。作为阴性数据的一种典型情况，用 C6orf167-A02-9-918 (SEQ ID NO :62) 刺激的 CTL 没有显示出特异性 IFN- γ 生成 (s)。结果指示自 C6orf167 衍生的 18 种肽被筛选为能诱导强 CTL 的肽。

[0476] 针对 C6orf167 衍生肽的 CTL 系和克隆的建立

[0477] 将用 C6orf167-A02-9-855 (SEQ ID NO :65) 刺激的 4 号孔 (a)、用 C6orf167-A02-9-131 (SEQ ID NO :66) 刺激的 6 号孔 (b)、用 C6orf167-A02-9-887 (SEQ ID NO :76) 刺激的 4 号孔 (c)、用 C6orf167-A02-9-261 (SEQ ID NO :79) 刺激的 6 号孔 (d)、用

C6orf167-A02-9-484(SEQ ID NO:84) 刺激的 7 号孔 (e)、用 C6orf167-A02-10-535(SEQ ID NO:101) 刺激的 6 号孔 (f)、用 C6orf167-A02-10-527(SEQ ID NO:110) 刺激的 1 号孔 (g)、用 C6orf167-A02-10-10(SEQ ID NO:111) 刺激的 3 号孔 (h)、用 C6orf167-A02-10-577(SEQ ID NO:112) 刺激的 5 号孔 (i)、用 C6orf167-A02-10-128(SEQ ID NO:113) 刺激的 5 号孔 (j)、用 C6orf167-A02-10-622(SEQ ID NO:114) 刺激的 4 号孔 (k)、用 C6orf167-A02-10-219(SEQ ID NO:117) 刺激的 1 号孔 (l)、用 C6orf167-A02-10-290(SEQ ID NO:122) 刺激的 6 号孔 (m) 和用 C6orf167-A02-10-262(SEQ ID NO:123) 刺激的 6 号孔 (n) 中通过 IFN- γ ELISPOT 测定法检测显示出肽特异性 CTL 活性的细胞扩增并建立为 CTL 系。通过 IFN- γ ELISA 测定法测定这些 CTL 系中的 CTL 活性 (图 7a-n)。结果显示,与未经肽冲激的靶细胞相比,所有 CTL 系针对经相应肽冲激的靶细胞均展现出强的 IFN- γ 生成。另外,如“材料和方法”中所述通过有限稀释自 CTL 系建立了 CTL 克隆,并通过 IFN- γ ELISA 测定法测定了 CTL 克隆针对经肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。确定了经 C6orf167-A02-9-855(SEQ ID NO:65) (a)、C6orf167-A02-9-131(SEQ ID NO:66) (b)、C6orf167-A02-9-887(SEQ ID NO:76) (c)、C6orf167-A02-9-261(SEQ ID NO:79) (d)、C6orf167-A02-9-484(SEQ ID NO:84) (e)、C6orf167-A02-10-535(SEQ ID NO:101) (f)、C6orf167-A02-10-527(SEQ ID NO:110) (g)、C6orf167-A02-10-10(SEQ ID NO:111) (h)、C6orf167-A02-10-128(SEQ ID NO:113) (i) 和 C6orf167-A02-10-622(SEQ ID NO:114) (j) 刺激的 CTL 克隆的强的 IFN- γ 生成 (图 8a-j)。

[0478] 针对外源表达 C6orf167 和 HLA-A*0201 的靶细胞的特异性 CTL 活性

[0479] 对针对每种肽产生的建成 CTL 系和克隆,检查识别内源表达 C6orf167 和 HLA-A*0201 分子的靶细胞的能力。使用用相应肽产生的 CTL 系和克隆作为效应细胞测试了针对用全长 C6orf167 和 HLA-A*0201 基因同时转染的 COS7 细胞 (外源表达 C6orf167 和 HLA-A*0201 基因的靶细胞的一种特异性模型) 的特异性 CTL 活性。制备了用全长 C6orf167 或 HLA-A*0201 转染的 COS7 细胞作为对照。在图 9 中,经 C6orf167-A02-9-261(SEQ ID NO:79) (a) 刺激的 CTL 系和经 C6orf167-A02-10-622(SEQ ID NO:114) (b) 刺激的 CTL 克隆针对表达 C6orf167 和 HLA-A*0201 二者的 COS7 细胞显示出强的 CTL 活性。另一方面,没有检测到显著的针对对照的特异性 CTL 活性。因此,这些数据清楚地证明 C6orf167-A02-9-261(SEQ ID NO:79) 和 C6orf167-A02-10-622(SEQ ID NO:114) 的肽被内源加工并与 HLA-A*0201 分子一起在靶细胞上表达,并被 CTL 识别。这些结果指示这些自 C6orf167 衍生的这些肽可应用于癌症疫苗,用于具有表达 C6orf167 的肿瘤的患者。

[0480] 对抗原肽的同源性分析

[0481] 经 C6orf167-A02-9-855(SEQ ID NO:65)、C6orf167-A02-9-131(SEQ ID NO:66)、C6orf167-A02-9-887(SEQ ID NO:76)、C6orf167-A02-9-261(SEQ ID NO:79)、C6orf167-A02-9-484(SEQ ID NO:84)、C6orf167-A02-10-535(SEQ ID NO:101)、C6orf167-A02-10-527(SEQ ID NO:110)、C6orf167-A02-10-10(SEQ ID NO:111)、C6orf167-A02-10-577(SEQ ID NO:112)、C6orf167-A02-10-128(SEQ ID NO:113)、C6orf167-A02-10-622(SEQ ID NO:114)、C6orf167-A02-10-47(SEQ ID NO:116)、C6orf167-A02-10-219(SEQ ID NO:117)、C6orf167-A02-10-1155(SEQ ID NO:118)、C6orf167-A02-10-606(SEQ ID NO:121)、C6orf167-A02-10-290(SEQ ID NO:122)、C6orf167-A02-10-262(SEQ ID NO:123) 和 C6orf167-A02-10-965(SEQ ID NO:124) 刺激

的 CTL 显示出显著的且特异的 CTL 活性。这个结果可能是由于 C6orf167-A02-9-855 (SEQ ID NO:65)、C6orf167-A02-9-131 (SEQ ID NO:66)、C6orf167-A02-9-887 (SEQ ID NO:76)、C6orf167-A02-9-261 (SEQ ID NO:79)、C6orf167-A02-9-484 (SEQ ID NO:84)、C6orf167-A02-10-535 (SEQ ID NO:101)、C6orf167-A02-10-527 (SEQ ID NO:110)、C6orf167-A02-10-10 (SEQ ID NO:111)、C6orf167-A02-10-577 (SEQ ID NO:112)、C6orf167-A02-10-128 (SEQ ID NO:113)、C6orf167-A02-10-622 (SEQ ID NO:114)、C6orf167-A02-10-47 (SEQ ID NO:116)、C6orf167-A02-10-219 (SEQ ID NO:117)、C6orf167-A02-10-1155 (SEQ ID NO:118)、C6orf167-A02-10-606 (SEQ ID NO:121)、C6orf167-A02-10-290 (SEQ ID NO:122)、C6orf167-A02-10-262 (SEQ ID NO:123) 和 C6orf167-A02-10-965 (SEQ ID NO:124) 的序列与其它已知可使人免疫系统致敏的分子衍生的肽同源。为了排除这种可能性,使用 BLAST 算法 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 使用这种肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有发现具有显著同源性的序列。同源性分析的结果指示 C6orf167-A02-9-855 (SEQ ID NO:65)、C6orf167-A02-9-131 (SEQ ID NO:66)、C6orf167-A02-9-887 (SEQ ID NO:76)、C6orf167-A02-9-261 (SEQ ID NO:79)、C6orf167-A02-9-484 (SEQ ID NO:84)、C6orf167-A02-10-535 (SEQ ID NO:101)、C6orf167-A02-10-527 (SEQ ID NO:110)、C6orf167-A02-10-10 (SEQ ID NO:111)、C6orf167-A02-10-577 (SEQ ID NO:112)、C6orf167-A02-10-128 (SEQ ID NO:113)、C6orf167-A02-10-622 (SEQ ID NO:114)、C6orf167-A02-10-47 (SEQ ID NO:116)、C6orf167-A02-10-219 (SEQ ID NO:117)、C6orf167-A02-10-1155 (SEQ ID NO:118)、C6orf167-A02-10-606 (SEQ ID NO:121)、C6orf167-A02-10-290 (SEQ ID NO:122)、C6orf167-A02-10-262 (SEQ ID NO:123) 和 C6orf167-A02-10-965 (SEQ ID NO:124) 的序列是独特的,因此,就我们所知,这种分子产生对一些无关分子的不期望的免疫学应答的可能性很小。

[0482] 总之,鉴定了自 C6orf167 衍生的新型 HLA-A*0201 表位肽。另外,证明了 C6orf167 的表位肽可用于癌症免疫疗法。

[0483] 工业应用性

[0484] 本发明提供了新的 TAA,特别是自 C6orf167 衍生的新 TAA,它们可诱导强而特异性的抗肿瘤免疫应答,并且可应用于广泛的癌症类型。这样的 TAA 可用作针对与 C6orf167 相关的疾病的肽疫苗,这样的疾病例如癌症,例子包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、慢性髓细胞性白血病 (CML)、食管癌、胃癌、弥漫型胃癌、肺癌、淋巴瘤、骨肉瘤、肾癌、肺腺癌 (ADC)、肺鳞状细胞癌 (SCC)、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、软组织肿瘤和睾丸肿瘤。

[0001]

序列表

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

<120> C60RF167 肽及包含它的疫苗

<130> ONC-A0906P

<150> US 61/211,700

<151> 2009-04-01

<160> 163

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 1

Glu Tyr Met Lys Gln Leu Val Lys Leu
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 2

Leu Tyr Ile Gly His Leu Ser Glu Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 3

Leu Tyr Pro Ser His Glu Lys Leu Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 4

Met Tyr Leu His Cys Cys Leu Thr Leu
1 5

<210> 5

[0002]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 5

Tyr Tyr Tyr Gln Val Tyr Ser Ile Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 6

Ala Tyr Ser Lys Leu Leu Ser His Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 7

Val Tyr Gly His Gln Phe Met Asn Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 8

Ser Tyr Thr Ile Phe Leu Cys Ile Leu
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 9

Arg Tyr Tyr Tyr Gln Val Tyr Ser Ile
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT

[0003]

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 10

Met Tyr Ala Gln Lys Asn Leu Asp Ile
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 11

Leu Phe Pro Pro Ser Trp His Leu Leu
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 12

Leu Phe Glu Glu His Cys Glu Thr Leu
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 13

Pro Tyr Glu Ala Leu Glu Ala Gln Leu
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 14

Thr Phe Leu Thr Asp Ser Leu Glu Leu
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

[0004]

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 15

Ala Phe Val Thr Ser Gln Arg Ala Leu
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 16

Asn Phe Phe Ser Leu Phe Leu Leu Leu
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 17

Leu Phe Arg Ile Ile Asp Cys Leu Leu
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 18

Ser Phe Trp Asn Trp Leu Asn Lys Leu
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 19

Leu Phe His Leu Phe Arg Gln Gln Leu
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

[0005]

<400> 20

Leu Phe Arg Gln Gln Leu Tyr Asn Leu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 21

Arg Tyr Leu Ser His Val Leu Gln Asn
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 22

Leu Phe Leu His Tyr Val Lys Val Phe
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 23

Ala Phe Arg Glu Lys Ala Lys Glu Phe
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 24

Lys Asn Leu Ser Gly Pro Asp Asp Leu
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 25

[0006]

Lys Gln Leu Val Lys Leu Thr Arg Leu
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 26

Arg Leu Ile Leu Asn Leu Asp Pro Leu
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 27

Ile Tyr Ile Asp Gly Val Gln Glu Val
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 28

Lys Ser Ala Met Val Thr Lys Ser Leu
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 29

His Val Leu Asp Leu Leu Asn Phe Leu
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 30

Leu Val Leu Glu Ile Leu Tyr Met Leu

[0007]

1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 31

Ser Phe Ser Ile Ser Trp Leu Pro Phe
1 5

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 32

Arg Tyr Tyr Tyr Gln Val Tyr Ser Ile Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 33

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

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 34

Tyr Tyr Ser Lys Asn Leu Asn Ser Ser Phe
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 35

Glu Tyr Leu Gly Glu Val Leu Lys Tyr Ile
1 5 10

[0008]

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 36

Leu Tyr Lys Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Ile
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 37

Lys Phe His Gln Lys Arg Met Glu Glu Leu
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 38

Leu Phe Glu Glu His Cys Glu Thr Leu Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 39

Ala Phe Val Asn Gln Asn Gln Ile Lys Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 40

Gln Phe Met Asn Leu Ala Ser Asp Asn Leu
1 5 10

<210> 41

[0009]

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 41

Ile Phe Ala Thr Ser Lys Ala Gln Lys Leu
1 5 10

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 42

Arg Tyr Leu Ser His Val Leu Gln Asn Ser
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 43

Ile Tyr Ser Lys Phe His Gln Lys Arg Met
1 5 10

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 44

Ser Phe Trp Asn Trp Leu Asn Lys Leu Leu
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 45

Ala Phe Arg Glu Lys Ala Lys Glu Phe Leu
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT

[0010]

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 46

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

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 47

Leu Phe Arg Ile Ile Asp Cys Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 48

Asn Phe Glu Glu Asp Thr Leu Glu Ile Phe
1 5 10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 49

Lys Ser Leu Glu Tyr Leu Gly Glu Val Leu
1 5 10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 50

Lys Leu Leu Phe Arg Ile Ile Asp Cys Leu
1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

[0011]

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 51

Arg Tyr Leu Lys Val Gln Asn Ala Glu Ser
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 52

Lys Leu Leu Asn Asp Gly Phe Ser Met Leu
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 53

Lys Gln Leu Val Lys Leu Thr Arg Leu Leu
1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 54

Arg Met Glu Glu Leu Thr Glu Val Gly Leu
1 5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 55

Arg Gln Gln Leu Tyr Asn Leu Glu Thr Leu
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的肽序列

[0012]

<400> 56

Lys Asn Leu Ser Gly Pro Asp Asp Leu Leu
1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 57

Lys Ser Ile Ser Val Gln Gly Val Ile Leu
1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 58

Arg Tyr Asp Lys Val Arg Ser Ser Glu Ser
1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 59

Ser Phe Leu Gln Ala Val Leu Ala Arg Ile
1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 60

Leu Phe Leu His Tyr Val Lys Val Phe Ile
1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 61

[0013]

Leu Leu Leu Pro Gly Ile Leu Lys Cys Leu
1 5 10

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 62

Tyr Leu Gly Glu Val Leu Lys Tyr Ile
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 63

Lys Leu Phe Pro Pro Ser Trp His Leu
1 5

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 64

Met Leu Gly Glu Lys Leu Lys Gln Val
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 65

Lys Leu Thr Arg Leu Leu Phe Asn Leu
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 66

Val Leu Phe Leu His Tyr Val Lys Val

[0014]

1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 67

Ser Leu Phe Leu Leu Ala Ala Val
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 68

Arg Leu Leu Phe Asn Leu Ser Glu Val
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 69

Cys Leu Cys Ile Lys Glu Leu Trp Val
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 70

Lys Leu Leu Asn Asp Gly Phe Ser Met
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 71

Tyr Leu Gly Lys Lys Val Phe Ser Ala
1 5

[0015]

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 72

Trp Leu Val Leu Glu Ile Leu Tyr Met
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 73

Thr Leu Ser Asp Lys Ser Ala Met Val
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 74

Leu Leu Asn Asp Gly Phe Ser Met Leu
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 75

Phe Leu His Tyr Val Lys Val Phe Ile
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 76

Ala Leu Val Arg Phe Phe Glu Ala Val
1 5

<210> 77

[0016]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 77

Trp Leu Asn Lys Leu Leu Lys Thr Leu
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 78

Thr Val Leu Ser Phe Leu Gln Ala Val
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 79

Thr Leu Leu Cys Asp Leu Ile Ser Leu
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 80

Leu Leu Phe Arg Ile Ile Asp Cys Leu
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 81

Lys Leu Leu Phe Arg Ile Ile Asp Cys
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT

[0017]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 82

Leu Leu Met Tyr Ala Gln Lys Asn Leu
1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 83

Leu Leu Ser Ile Tyr Ile Asp Gly Val
1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 84

Phe Leu Cys Ile Leu Ala Lys Val Val
1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 85

Ser Met Leu Glu Met Val Lys Thr Cys
1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 86

Ser Leu Phe Glu Glu His Cys Glu Thr
1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0018]

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 87

Phe Leu Gln Ala Val Leu Ala Arg Ile
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 88

Leu Met Ser Asp Gln Cys Pro Cys Leu
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 89

Tyr Leu Asn Gln Leu Leu Gly Asn Val
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 90

Ser Ile Leu Ala Phe Ile Leu Gln Leu
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 91

Leu Leu Pro Gly Ile Leu Lys Cys Leu
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

[0019]

<400> 92

Val Leu Gln Met Tyr Ile Lys Asn Leu
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 93

Gly Ile Leu Lys Cys Leu Val Leu Val
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 94

Leu Gln Asn Phe Phe Ser Leu Phe Leu
1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 95

Leu Leu Leu Pro Gly Ile Leu Lys Cys
1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 96

Gln Leu Tyr Asn Leu Glu Thr Leu Leu
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 97

[0020]

Val Leu Ala Glu Lys Phe Ser Cys Ala
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 98

Ile Leu Tyr Met Leu Gly Glu Lys Leu
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 99

Tyr Leu His Cys Cys Leu Thr Leu Cys
1 5

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 100

Ala Leu Trp Arg His Phe Phe Ser Phe Leu
1 5 10

<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 101

Phe Leu Leu Leu Ala Ala Val Ala Glu Val
1 5 10

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 102

Tyr Met Leu Gly Glu Lys Leu Lys Gln Val

[0021]

1 5 10

<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 103

Leu Leu Asp His Arg Ser Lys Trp Phe Val
1 5 10

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 104

Phe Val Ser Glu Ser Phe Trp Asn Trp Leu
1 5 10

<210> 105
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 105

Ile Leu Trp Glu Tyr Tyr Ser Lys Asn Leu
1 5 10

<210> 106
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 106

Leu Leu Asn Phe Leu Lys Pro Ala Phe Val
1 5 10

<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 107

Leu Leu Asn Asp Gly Phe Ser Met Leu Leu
1 5 10

[0022]

<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 108
Leu Ile Trp Lys Gly His Met Ala Phe Leu
1 5 10

<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 109
Lys Leu Phe Pro Pro Ser Trp His Leu Leu
1 5 10

<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 110
Gly Leu Gln Asn Phe Phe Ser Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 111
Phe Leu Thr Asp Ser Leu Glu Leu Glu Leu
1 5 10

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 112
Phe Leu Leu Met Tyr Ala Gln Lys Asn Leu
1 5 10

<210> 113

[0023]

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 113

Gln Gln Cys Val Leu Phe Leu His Tyr Val
1 5 10

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 114

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

<210> 115
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 115

Leu Leu Tyr Ile Gly His Leu Ser Glu Leu
1 5 10

<210> 116
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 116

Tyr Leu Cys Ser Gly Ala Leu Lys Arg Leu
1 5 10

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 117

Trp Leu Val Leu Glu Ile Leu Tyr Met Leu
1 5 10

<210> 118
<211> 10
<212> PRT

[0024]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 118

Gln Leu Thr Ser Val Phe Arg Gln Phe Ile
1 5 10

<210> 119

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 119

Met Leu Gly Glu Lys Leu Lys Gln Val Val
1 5 10

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 120

Ser Leu Phe Glu Glu His Cys Glu Thr Leu
1 5 10

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 121

Phe Leu Val Ser Lys Asn Glu Glu Met Val
1 5 10

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 122

Cys Leu Cys Ile Lys Glu Leu Trp Val Leu
1 5 10

<210> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

[0025]

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 123

Leu Leu Cys Asp Leu Ile Ser Leu Ser Leu
1 5 10

<210> 124
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 124

Leu Leu Phe Arg Ile Ile Asp Cys Leu Leu
1 5 10

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 125

Leu Leu Pro Gly Ile Leu Lys Cys Leu Val
1 5 10

<210> 126
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 126

Ile Gln Trp Val Thr Glu Thr Ala Leu Val
1 5 10

<210> 127
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 127

Trp Leu Asn Lys Leu Leu Lys Thr Leu Leu
1 5 10

<210> 128
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

[0026]

<400> 128

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

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 129

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

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 130

Gln Leu Ala Asp Ala Ala Ala Asp Phe Thr
1 5 10

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 131

Thr Ile Phe Leu Cys Ile Leu Ala Lys Val
1 5 10

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 132

Ser Leu Met Ser Asp Gln Cys Pro Cys Leu
1 5 10

<210> 133

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 133

[0027]

Trp Leu Pro Phe Lys Gly Leu Ala Asn Thr
1 5 10

<210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 134

Ser Ile Tyr Ile Asp Gly Val Gln Glu Val
1 5 10

<210> 135
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 135

Cys Leu Val Leu Val Ser Glu Pro Gln Val
1 5 10

<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 136

Cys Leu Tyr Pro Ser His Glu Lys Leu Leu
1 5 10

<210> 137
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 137

Thr Ile Trp Thr Leu Leu Ser Ile Tyr Ile
1 5 10

<210> 138
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 138

Thr Leu Leu Ala Met Asp Met Pro Ser Thr

[0028]

1 5 10

<210> 139
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 139

Arg Leu Ala Thr Glu Asn Leu Gln Tyr Met
1 5 10

<210> 140
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 140

Thr Leu Glu Ile Phe Gly Ile Gln Trp Val
1 5 10

<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 141

Met Val Gln Arg Gln Thr Ile Trp Thr Leu
1 5 10

<210> 142
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 142

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

<210> 143
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 143

Tyr Leu Gln Gly Met Cys Ile Val Cys Cys
1 5 10

[0029]

<210> 144
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 144

Ile Leu Glu Glu Gln Leu Arg Met Tyr Leu
1 5 10

<210> 145
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 145

Ser Leu Ser Leu Asn Arg Tyr Asp Lys Val
1 5 10

<210> 146
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 146

Arg Leu Ala Ser Ile Leu Ala Phe Ile Leu
1 5 10

<210> 147
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 147

Leu Gln Asn Phe Phe Ser Leu Phe Leu Leu
1 5 10

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 148

Val Leu Leu Ala Leu Arg Asn Thr Ala Thr
1 5 10

<210> 149

[0030]

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 149

Lys Ala Leu Val Arg Phe Phe Glu Ala Val
1 5 10

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 150

Thr Leu Cys Asp Phe Trp Glu Pro Asn Ile
1 5 10

<210> 151
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 151

Leu Met Tyr Ala Gln Lys Asn Leu Asp Ile
1 5 10

<210> 152
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 152
gaggtgata g cattgcttc g

21

<210> 153
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 153
caagtcagtg tacaggtac g

21

<210> 154
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

[0031]

<400> 154 gtctcacctt ggacagatgg	20
<210> 155 <211> 24 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列	
<400> 155 ccaaggatcc tattacacag ttgc	24
<210> 156 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 用于制备探针的人工合成引物序列	
<400> 156 ctggaagagg cagttgaaaa	20
<210> 157 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 用于制备探针的人工合成引物序列	
<400> 157 atcgccaat atactgctca	20
<210> 158 <211> 8643 <212> DNA <213> 人	
<220> <221> CDS <222> (267)..(3998)	
<400> 158 gtttgcgggt tagaccccaa agattccigt tggtagctg ggtcacagga ggcaggtttc	60
gggagctgga aatgtgagcg ggtacgacag gcaccgcggg taaccgacgc cccgggtcct	120
tgtctcagcc gggtagcgg gataccggca ccccgccctc tccgcccgag tgcgtccagg	180
cgtgggcttg gaatctcttc acacctctc ttggagccc ttaatgatac gacgaacccc	240
aagtgtttca gaacatgaag taaaca atg gag aac tgt tct gct gca tcg acg	293
Met Glu Asn Cys Ser Ala Ala Ser Thr	
1 5	
ttc ctc act gac agc tta gag ctg gag ctg ggg acg gaa tgg tgc aaa	341
Phe Leu Thr Asp Ser Leu Glu Leu Glu Leu Gly Thr Glu Trp Cys Lys	
10 15 20 25	
cct cct tac ttt tct tgt gct gtt gac aac aga gga gga gga aaa cat	389
Pro Pro Tyr Phe Ser Cys Ala Val Asp Asn Arg Gly Gly Gly Lys His	
30 35 40	

[0032]

ttt tct gga gaa tcc tac ctc tgc agc gga gcc ctt aag cga ttg att Phe Ser Gly Glu Ser Tyr Leu Cys Ser Gly Ala Leu Lys Arg Leu Ile 45 50 55	437
ttg aat ctt gac cct tta cca act aat ttt gaa gaa gat acc ttg gaa Leu Asn Leu Asp Pro Leu Pro Thr Asn Phe Glu Glu Asp Thr Leu Glu 60 65 70	485
ata ttt ggc att cag tgg gtt act gaa aca gca tta gtg aat tca tct Ile Phe Gly Ile Gln Trp Val Thr Glu Thr Ala Leu Val Asn Ser Ser 75 80 85	533
aga gaa ctc ttt cat tta ttc agg caa caa ctg tac aac ttg gaa acc Arg Glu Leu Phe His Leu Phe Arg Gln Gln Leu Tyr Asn Leu Glu Thr 90 95 100 105	581
ttg tta cag tcc agt tgt gat ttt ggg aag gta tca act cta cac tgc Leu Leu Gln Ser Ser Cys Asp Phe Gly Lys Val Ser Thr Leu His Cys 110 115 120	629
aaa gca gac aat att agg cag cag tgt gta cta ttt ctc cat tat gtt Lys Ala Asp Asn Ile Arg Gln Gln Cys Val Leu Phe Leu His Tyr Val 125 130 135	677
aaa gtt ttc atc ttc agg tat ctg aaa gta cag aat gct gag agt cat Lys Val Phe Ile Phe Arg Tyr Leu Lys Val Gln Asn Ala Glu Ser His 140 145 150	725
gll ccl gtc cal ccl tal gag gcl ttg gag gcl cag ctt ccc tca gtg Val Pro Val His Pro Tyr Glu Ala Leu Glu Ala Gln Leu Pro Ser Val 155 160 165	773
ttg att gat gag ctt cat gga tta ctc ttg tat att gga cac cta tct Leu Ile Asp Glu Leu His Gly Leu Leu Leu Tyr Ile Gly His Leu Ser 170 175 180 185	821
gaa ctt ccc agt gtt aat ata gga gca ttt gta aat caa aac cag att Glu Leu Pro Ser Val Asn Ile Gly Ala Phe Val Asn Gln Asn Gln Ile 190 195 200	869
aag ctt ttt cca ccg tca tgg cat tta tta cat ctc cac ttg gat ata Lys Leu Phe Pro Pro Ser Trp His Leu Leu His Leu His Leu Asp Ile 205 210 215	917
cat tgg ctg gtg cta gaa att ctt tac atg ctg ggt gaa aaa ttg aaa His Trp Leu Val Leu Glu Ile Leu Tyr Met Leu Gly Glu Lys Leu Lys 220 225 230	965
caa gtt gta tat ggt cat cag ttt atg aat ctg gca agt gac aat tta Gln Val Val Tyr Gly His Gln Phe Met Asn Leu Ala Ser Asp Asn Leu 235 240 245	1013
acc aac atc agc cta ttt gaa gaa cat tgt gaa act ctc ctt tgt gat Thr Asn Ile Ser Leu Phe Glu Glu His Cys Glu Thr Leu Leu Cys Asp 250 255 260 265	1061
tta ala agc ctg tca ctc aac agg tac gac aag gll agg tcl tcl gaa Leu Ile Ser Leu Ser Leu Asn Arg Tyr Asp Lys Val Arg Ser Ser Glu 270 275 280	1109
tca tta atg agt gac cag tgt cca tgt tta tgc att aaa gaa tta tgg Ser Leu Met Ser Asp Gln Cys Pro Cys Leu Cys Ile Lys Glu Leu Trp 285 290 295	1157
gtt cta ctt att cat ctt cta gac cac aga agt aaa tgg ttt gtc tgc Val Leu Leu Ile His Leu Leu Asp His Arg Ser Lys Trp Phe Val Ser 300 305 310	1205
gaa tca ttt tgg aac tgg ttg aat aaa cta ctt aaa aca ctg ctt gaa Glu Ser Phe Trp Asn Trp Leu Asn Lys Leu Leu Lys Thr Leu Leu Glu 315 320 325	1253

[0033]

aaa tca agt gac cga aga aga tcc tct atg cct gta atc cag tcc agg Lys Ser Ser Asp Arg Arg Arg Ser Ser Met Pro Val Ile Gln Ser Arg 330 335 340 345	1301
gat cca tta ggt ttt agt tgg tgg att att act cat gta gca tca ttt Asp Pro Leu Gly Phe Ser Trp Trp Ile Ile Thr His Val Ala Ser Phe 350 355 360	1349
tac aag ttt gat cgc cat gga gta cca gat gaa atg aga aaa gtg gaa Tyr Lys Phe Asp Arg His Gly Val Pro Asp Glu Met Arg Lys Val Glu 365 370 375	1397
tca aat tgg aac ttt gta gaa gaa ctg ctg aaa aag tcc atc agt gtt Ser Asn Trp Asn Phe Val Glu Glu Leu Leu Lys Lys Ser Ile Ser Val 380 385 390	1445
cag ggt gtc att cta gaa gaa caa tta cga atg tat ctt cac tgt tgt Gln Gly Val Ile Leu Glu Glu Gln Leu Arg Met Tyr Leu His Cys Cys 395 400 405	1493
ttg aca ctt tgt gat ttc tgg gag cca aac att gca att gtt acc att Leu Thr Leu Cys Asp Phe Trp Glu Pro Asn Ile Ala Ile Val Thr Ile 410 415 420 425	1541
tta tgg gaa tat tat agt aag aac ctg aat agt tcc ttc agt att tct Leu Trp Glu Tyr Tyr Ser Lys Asn Leu Asn Ser Ser Phe Ser Ile Ser 430 435 440	1589
tgg ctt cct ttt aaa ggc ctt gct aat acc atg aag tca ccc ttg tct Trp Leu Pro Phe Lys Gly Leu Ala Asn Thr Met Lys Ser Pro Leu Ser 445 450 455	1637
atg ctt gaa atg gtg aag act tgc tgt tgc gat aaa caa gat cag gaa Met Leu Glu Met Val Lys Thr Cys Cys Cys Asp Lys Gln Asp Gln Glu 460 465 470	1685
cta tat aaa tcc agc agt agt tat act att ttt ctt tgt att ctg gca Leu Tyr Lys Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Ile Phe Leu Cys Ile Leu Ala 475 480 485	1733
aaa gtt gtt aaa aaa gca atg aag agc aat ggc cct cat cct tgg aaa Lys Val Val Lys Lys Ala Met Lys Ser Asn Gly Pro His Pro Trp Lys 490 495 500 505	1781
caa gtc aaa gga aga ata tat tca aaa ttc cat caa aaa aga atg gaa Gln Val Lys Gly Arg Ile Tyr Ser Lys Phe His Gln Lys Arg Met Glu 510 515 520	1829
gaa cta act gaa gtt ggt cta cag aac ttt ttt agc ctt ttt cta ctg Glu Leu Thr Glu Val Gly Leu Gln Asn Phe Phe Ser Leu Phe Leu Leu 525 530 535	1877
tta gca gct gtt gca gag gta gaa gat gtt gca agt cat gtt tta gac Leu Ala Ala Val Ala Glu Val Glu Asp Val Ala Ser His Val Leu Asp 540 545 550	1925
ctc ctg aat ttc ctc aag cct gct ttt gta acg tct cag aga gcc ctc Leu Leu Asn Phe Leu Lys Pro Ala Phe Val Thr Ser Gln Arg Ala Leu 555 560 565	1973
att tgg aag ggt cac atg gcc ttc ctc ttg atg tat gcc cag aaa aat Ile Trp Lys Gly His Met Ala Phe Leu Leu Met Tyr Ala Gln Lys Asn 570 575 580 585	2021
ctg gac att ggt gtt ttg gct gag aaa ttt tca tgt gct ttc cgg gag Leu Asp Ile Gly Val Leu Ala Glu Lys Phe Ser Cys Ala Phe Arg Glu 590 595 600	2069
aaa gca aag gaa ttc ttg gtg tct aag aat gag gaa atg gta cag aga Lys Ala Lys Glu Phe Leu Val Ser Lys Asn Glu Glu Met Val Gln Arg 605 610 615	2117

[0034]

cag act atc tgg acc ctt ctt tcc ata tac att gat ggt gtt caa gaa Gln Thr Ile Trp Thr Leu Leu Ser Ile Tyr Ile Asp Gly Val Gln Glu 620 625 630	2165
glg tll gag acc agc tat tgc ttg tat cct tcc cat gaa aaa ctg ctt Val Phe Glu Thr Ser Tyr Cys Leu Tyr Pro Ser His Glu Lys Leu Leu 635 640 645	2213
aat gat gga ttt agt atg ctt ctg cga gca tgt cga gaa tct gaa ctt Asn Asp Gly Phe Ser Met Leu Leu Arg Ala Cys Arg Glu Ser Glu Leu 650 655 660 665	2261
agg aca gta ttg agc ttc cta caa gct gtt ctg gcc aga atc agg agt Arg Thr Val Leu Ser Phe Leu Gln Ala Val Leu Ala Arg Ile Arg Ser 670 675 680	2309
atg cat caa caa ttg tgt cag gaa ctt caa agg gac aat gtg gac cta Met His Gln Gln Leu Cys Gln Glu Leu Gln Arg Asp Asn Val Asp Leu 685 690 695	2357
ttt gta cag tct tca tta tgg gct aaa gag cgc cac ctt gct gca gtt Phe Val Gln Ser Ser Leu Ser Ala Lys Glu Arg His Leu Ala Ala Val 700 705 710	2405
gcc agt gca ctg tgg aga cat ttc ttt tca ttt ttg aag agt cag aga Ala Ser Ala Leu Trp Arg His Phe Phe Ser Phe Leu Lys Ser Gln Arg 715 720 725	2453
atg tca cag gta gtg cct ttc tca caa ctt gcg gat gca gct gca gac Met Ser Gln Val Val Pro Phe Ser Gln Leu Ala Asp Ala Ala Ala Asp 730 735 740 745	2501
tlt act ttg cta gca atg gac atg cca agc aca gct cca tca gat ttt Phe Thr Leu Leu Ala Met Asp Met Pro Ser Thr Ala Pro Ser Asp Phe 750 755 760	2549
cag cct cag cca gtt ata tca att att caa ctt ttt ggt tgg gat gat Gln Pro Gln Pro Val Ile Ser Ile Ile Gln Leu Phe Gly Trp Asp Asp 765 770 775	2597
atc atc tgc cct caa gtt gta gca aga tat tta agt cat gtc cta caa Ile Ile Cys Pro Gln Val Val Ala Arg Tyr Leu Ser His Val Leu Gln 780 785 790	2645
aat agc aca tta tgt gaa gca ctt tct cat tca gcc tat gta tct ttt Asn Ser Thr Leu Cys Glu Ala Leu Ser His Ser Gly Tyr Val Ser Phe 795 800 805	2693
caa gcc tta acc gla aga tca tgg att cgl tgl gtt ttg caa alg tat Gln Ala Leu Thr Val Arg Ser Trp Ile Arg Cys Val Leu Gln Met Tyr 810 815 820 825	2741
att aaa aac ctc tct ggg cct gat gat ttg ctc ata gat aaa aat ctg Ile Lys Asn Leu Ser Gly Pro Asp Asp Leu Leu Ile Asp Lys Asn Leu 830 835 840	2789
gaa gag gca gtt gaa aaa gag tac atg aaa cag ttg gtc aaa ctg aca Glu Glu Ala Val Glu Lys Glu Tyr Met Lys Gln Leu Val Lys Leu Thr 845 850 855	2837
aga tta cta ttt aat ctc tca gaa gta aag agt att ttc tca aag gcc Arg Leu Leu Phe Asn Leu Ser Glu Val Lys Ser Ile Phe Ser Lys Ala 860 865 870	2885
caa gtt gaa tat tta tcc atc tca gaa gac cct aaa aaa gca ctt gtt Gln Val Glu Tyr Leu Ser Ile Ser Glu Asp Pro Lys Lys Ala Leu Val 875 880 885	2933
cga ttc ttt gag gct gtt ggt gta act tac ggg aac gtc cag aca ctt Arg Phe Phe Glu Ala Val Gly Val Thr Tyr Gly Asn Val Gln Thr Leu 890 895 900 905	2981

[0035]

tct gat aaa tct gcc atg gtc aca aag tcc ttg gaa tac ctt ggt gaa Ser Asp Lys Ser Ala Met Val Thr Lys Ser Leu Glu Tyr Leu Gly Glu 910 915 920	3029
gta tta aaa tat att aag cct tat ttg gga aaa aaa gtt ttc agt gca Val Leu Lys Tyr Ile Lys Pro Tyr Leu Gly Lys Lys Val Phe Ser Ala 925 930 935	3077
ggg ctg cag ctg act tat gga atg atg gga att ctt gtg aaa tca tgg Gly Leu Gln Leu Thr Tyr Gly Met Met Gly Ile Leu Val Lys Ser Trp 940 945 950	3125
gca caa atc ttt gcc act tct aaa gcc caa aaa tta cta ttc cgg atc Ala Gln Ile Phe Ala Thr Ser Lys Ala Gln Lys Leu Leu Phe Arg Ile 955 960 965	3173
ala gat tgt tta ctg ctg cca cat gca gla tta cag caa gag aag gaa Ile Asp Cys Leu Leu Leu Pro His Ala Val Leu Gln Gln Glu Lys Glu 970 975 980 985	3221
ctg cct gca cct atg ttg tca gca att cag aaa agt ctt cct ttg tat Leu Pro Ala Pro Met Leu Ser Ala Ile Gln Lys Ser Leu Pro Leu Tyr 990 995 1000	3269
ctc cag ggc atg tgt atc gtg tgt tgt caa tct caa aat ccg aat Leu Gln Gly Met Cys Ile Val Cys Cys Gln Ser Gln Asn Pro Asn 1005 1010 1015	3314
gcc tat ttg aat caa ttg cta ggg aat gtt att gag cag tat att Ala Tyr Leu Asn Gln Leu Leu Gly Asn Val Ile Glu Gln Tyr Ile 1020 1025 1030	3359
ggg cga ttt ctt cca gct tca cca tat gtt tca gat ctt gga caa Gly Arg Phe Leu Pro Ala Ser Pro Tyr Val Ser Asp Leu Gly Gln 1035 1040 1045	3404
cat cct gtt ttg ctg gca ttg aga aac aca gcc act att cca cca His Pro Val Leu Leu Ala Leu Arg Asn Thr Ala Thr Ile Pro Pro 1050 1055 1060	3449
ata tca tct cta aag aaa tgc att gtg caa gtc ata agg aaa tcc Ile Ser Ser Leu Lys Lys Cys Ile Val Gln Val Ile Arg Lys Ser 1065 1070 1075	3494
tac ctt gag tat aag ggg tcc tca cct cct cct cgc tta gca tcc Tyr Leu Glu Tyr Lys Gly Ser Ser Pro Pro Pro Arg Leu Ala Ser 1080 1085 1090	3539
att ctg gcc ttc atc ctc caa ctc ttc aag gaa act aac aca gac Ile Leu Ala Phe Ile Leu Gln Leu Phe Lys Glu Thr Asn Thr Asp 1095 1100 1105	3584
att tat gaa gtt gaa cta ctc ctc cct ggc att tta aaa tgc ttg Ile Tyr Glu Val Glu Leu Leu Leu Pro Gly Ile Leu Lys Cys Leu 1110 1115 1120	3629
gtg tta gtc agt gaa cca caa gtt aaa agg ctg gcc aca gag aac Val Leu Val Ser Glu Pro Gln Val Lys Arg Leu Ala Thr Glu Asn 1125 1130 1135	3674
ctg caa tac atg gla aaa gcc tgc caa gtg ggg tca gaa gaa gaa Leu Gln Tyr Met Val Lys Ala Cys Gln Val Gly Ser Glu Glu Glu 1140 1145 1150	3719
cct tcc tcc cag ctg act tct gtg ttt agg cag ttt atc cag gat Pro Ser Ser Gln Leu Thr Ser Val Phe Arg Gln Phe Ile Gln Asp 1155 1160 1165	3764
tat ggt atg agg tac tat tac cag gtt tac agc att tta gaa aca Tyr Gly Met Arg Tyr Tyr Tyr Gln Val Tyr Ser Ile Leu Glu Thr 1170 1175 1180	3809

[0036]

gta gca aca ttg gac cag cag gtt gtc atc cac ttg att tct acc Val Ala Thr Leu Asp Gln Gln Val Val Ile His Leu Ile Ser Thr 1185 1190 1195	3854
ctt act cag tct ctg aag gat tca gag cag aaa tgg ggc ctt ggc Leu Thr Gln Ser Leu Lys Asp Ser Glu Gln Lys Trp Gly Leu Gly 1200 1205 1210	3899
agg aat ata gca caa agg gaa gcc tat agc aaa ctt ttg tct cac Arg Asn Ile Ala Gln Arg Glu Ala Tyr Ser Lys Leu Leu Ser His 1215 1220 1225	3944
ctt gga cag atg gga caa gat gag atg cag aga ctg gaa aat gat Leu Gly Gln Met Gly Gln Asp Glu Met Gln Arg Leu Glu Asn Asp 1230 1235 1240	3989
aat act taa tataatttgt gattcatcct gcttattaat taccagtatc Asn Thr	4038
taaagccaca ttgtccact ctaattcccta cttttaatta attgtataat gttctgttta	4098
aaalaatttc taggaatttt ttccctttta tatctgtaag taaaaaatgt ataaataagg	4158
aactgaaggt taattagcaa ctgtgtaata ggatcccttg aactttttac aaaactgcat	4218
tctaccttga tgaattttta gttaaactaa attaaagaaa cattttctga gagtgttttc	4278
tgtgtgtgag taitaagcag atacttcac ctagactttt ttgtgtgtgt atgacttcct	4338
gcctccctgc ctgtgactg atttgtcatg ttatattttt atttttacia taatagttaa	4398
gttttaaaat gatacttttt caaagtacct ggctacccta tactgtgttt ttgggtgggg	4458
aaagggtgtt ggaaatgtga ctgtgtattt gttttcttt ttatatgtg tgaaggcaagt	4518
taacaagaaa aacctttaca aagcacactt aactgtgta ggaatgagac tgaatctggc	4578
taaaggatta tacagctgat atccaaaaag aagtgtaaac atgccaacag ggtttatatt	4638
taggttccaa gagtgtccaa attttttttt tattcatcct ttcttttgga gttgtcatta	4698
aaaaaaaaat catatcagga ggaggaaata aaggagactt taagaggaga gtaataaaaa	4758
atattctaga aaagtaacaa tagtagtggt ctgagaagtc agctgatcca tcttcttct	4818
ctttagccag agcttcttat aacttagcat ttatccaag aaacctgttt agtttcttt	4878
aacaacattg ttcttcaact ttgaactct taactcatcc agattgtttt accagtggga	4938
gcttgtcttt gactcctttt cctattgagc attatttggt tgaagagct ccagtcctag	4998
ttttgggaac ccacctgggt ctcaaacctc gctttgcttt atgacttga gctagttacg	5058
taacctttct cagtctagtt tcttcatgga gaagaaaaga agaatccctt tactatttga	5118
cagtgttgtt gtgagaatca atgggataat gtacgtgaaa atatttggtg gcccaaatc	5178
tgttgggaaa tgtacagaca cgattagttt attactctgt cacaattaag gcaaagaaca	5238
cctctcaatt ttatctttct ctaatgatat gtccagatg aatgatccca ctttccaatg	5298
ttttcttaca tcatgttttc taactttgaa gtactttgtt tcttcttgg gattatagtc	5358
tttatcatgg ttctactctt ccttcaagaa aacatttcaa ccttctctg gctcaaggag	5418
tatctttaaa aatgaatac ttgcaatca gtattctgtt gttaatagcg ttctcttaat	5478
tataatctgt gaaatccaaa ggagtgctgt ttatttctat aacataaaa tggctctct	5538
ctcaaatcag ctctatcaaa gggaataaat gaaagcttaa ggtgttttaa tagacttcat	5598

[0037]

aacactgaat ticttttcat catgatagtg acttactaaa caaataatgt atggcttgga	5658
aagtccagc agtactaag gagttttatc tatttaaggt gatgcctta aagaggttat	5718
ttatgtgat atgtgttttt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt	5778
gggttttttt ttccaaagg agatlgataa agalaccctt gagaalcctg ctcctlagag	5838
tatgaaaacg tttaaaggat aggaaaagct gctactgaat catgccttag gacatatatc	5898
tatagatact aagaataact aaattttgta cttagaatg gtaacaacaa agtgtgtaac	5958
aatatgtgtg tgtattatat gttttgtatt tatgtataag taactttttt taaagctttt	6018
ttttaaatg aaaaaagaag aaattttatg gctcagttcc ttttttttaa aatcttcact	6078
gaccttcac ttattactac aatcttgccc tcttctatc ccagacttgg agtcctttat	6138
acctgcttct ttaatagcca ctttccctaa ataccctgta atttctgagg ctgctgtctc	6198
laccagigia atacaagcca ttgtctttg gtcaaatctg agtttgtct cctttctcat	6258
gtttttgtc cttctgtga caattgtatt ttcttttate ttcccatcat ttccacaatg	6318
gtactgtccc ttctacata tacagtgtac ccttgagcaa cacaagtttg aactgtgcag	6378
gtccacttat atgtggatct aaaatacagt atttgtgga tgcaaaatct gagtatatgg	6438
aggaccaact tttgtagag gcaggttcct cagggttaac tgcaggactt gactaagtgc	6498
agattatggt atgcacaggg gatcctggaa ccagtcacca gacaaaaat gaccactgta	6558
tcttgagagc accttcattg tcttcttccc tgtccccagt cgttaagatac gaccttcat	6618
ctgctttgtc tcaacattct gttagtgtg aactgataac tccagctttt ctctctcttt	6678
tttttttttt tttttttttt gtgtgtgtgt ttgtgtgtgt ttgtgtgtgt agtctgtctc	6738
tgtgtgtgtg gctgtgtgtg agtgtgtgtg tctgtgtgtg ctgcaagctc tgcctctcgg	6798
gttcacgcca ttctctgccc ttagcctccc aagtagctgg gactacaggt gcccgcacc	6858
acgcccggct aatttttttt gtatttttag tagagacggg gtttcaccat gttgggctcg	6918
atctctgac ctcatgatcc gcccgcctcg gcttccaaa gtgctgggat tacaggcgtg	6978
atgagccacc tagtgctaat tcatctctaa acctctgtag ttggagtctc ctgaaatctc	7038
agactacctc ctgctttcat ttctaccca gggaatacac tattgtccta agttatttag	7098
cctlgaaatg ttagaggcat tttaggttct tcatgttct cccactttca gttgattacc	7158
attacaggat cttaggttcc tttttatctt ttgtcagtgc ctgcatcca ctgggtgttt	7218
gttttttctg ttgggcacta cttatttctt tacctctggt ttcttctctt acagcttaig	7278
ttctgaaatg tgtattctta aaatactgtt ttctcttgt tacttttctg ctgaggact	7338
tccagtaact taccattgtt tataagggtg tgttcaaacc cttcagtctg gagactttct	7398
gccacctatc tgcgtgtacc ttatcttca agcttctctc ttccaaaca agaggctcat	7458
ttagcagctt tctctgattg ccatgttcat cctacactca gctcattca gtttacgca	7518
tggaaactgt ataggacctc ttctctatag aaattgaaga cacttaata ggaagaaaat	7578
laaaalalac attlggatc atgagtlac caglcataa atactataa aalaccagat	7638
agagtataaa agacaactga aggacaacag agtgatgaaa ggactttatt aggcatttgg	7698
atttggttat gatttaaat tcaatttaat tagaacgttt ccatggcaag gaaggaaagca	7758

[0038]

```

tggaggactg tggaaaagtc attcagatall gagtccattt gcallagagg aatttcatag    7818
tttaaaactt gtatatcttt acctatccctt cgtatgtttt cttcttaagc atatttgact    7878
ttttctacct cagcatctgt ataagaaaat atttgtagt cagatgtttg tgggttttcc    7938
ttacctatta ttattttctt ccattgttta caacacattt tttaaaactac ctgtttctta    7998
aataattaca cggacctgct tctgtgtact ttacacagaat ctttgacagt taaaaattgt    8058
atgttatata aaaatttgac aagcttctac agttaggaaa agcctttaga aatctgcctt    8118
ccccaaccg tatgttatca tagcactcat gtctcccat gtctaaaagg taaatagata    8178
cagaaacctc accaaaagtt gaatcatctg tactaaacca ctgctttttt atccagactt    8238
tttatataaa tcttttatit tccaaaaaac tgatctttta cctaccctc ttagagttaa    8298
aaatatgtcc tgcaggcaa gagtatagta tgccaatata aataatatgc ttattttggt    8358
tagaaacagl tgglltggga agctagcaac atagcatall ctllacaaat ttaataaggt    8418
gtattttgat actgtgataa cctgcattgt aaattaccaa atggttggaa ttgaccagtt    8478
tatacttatt aaaatttttg atgtccaat ggctatccaa ttcattgcatt ttgtgaattg    8538
tgcilllaga aaaatttggg acattttagt ttatataca tatlatagag ttatttggc    8598
atatgataaa attatatata ataataaaag tatatatgta actta    8643

```

<210> 159
 <211> 1243
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 159

Met Glu Asn Cys Ser Ala Ala Ser Thr Phe Leu Thr Asp Ser Leu Glu
1 5 10 15

Leu Glu Leu Gly Thr Glu Trp Cys Lys Pro Pro Tyr Phe Ser Cys Ala
20 25 30

Val Asp Asn Arg Gly Gly Gly Lys His Phe Ser Gly Glu Ser Tyr Leu
35 40 45

Cys Ser Gly Ala Leu Lys Arg Leu Ile Leu Asn Leu Asp Pro Leu Pro
50 55 60

Thr Asn Phe Glu Glu Asp Thr Leu Glu Ile Phe Gly Ile Gln Trp Val
65 70 75 80

Thr Glu Thr Ala Leu Val Asn Ser Ser Arg Glu Leu Phe His Leu Phe
85 90 95

Arg Gln Gln Leu Tyr Asn Leu Glu Thr Leu Leu Gln Ser Ser Cys Asp
100 105 110

Phe Gly Lys Val Ser Thr Leu His Cys Lys Ala Asp Asn Ile Arg Gln
115 120 125

Gln Cys Val Leu Phe Leu His Tyr Val Lys Val Phe Ile Phe Arg Tyr
130 135 140

[0039]

```

Leu Lys Val Gln Asn Ala Glu Ser His Val Pro Val His Pro Tyr Glu
145                      150                      155                      160

Ala Leu Glu Ala Gln Leu Pro Ser Val Leu Ile Asp Glu Leu His Gly
                      165                      170                      175

Leu Leu Leu Tyr Ile Gly His Leu Ser Glu Leu Pro Ser Val Asn Ile
                      180                      185                      190

Gly Ala Phe Val Asn Gln Asn Gln Ile Lys Leu Phe Pro Pro Ser Trp
                      195                      200                      205

His Leu Leu His Leu His Leu Asp Ile His Trp Leu Val Leu Glu Ile
                210                      215                      220

Leu Tyr Met Leu Gly Glu Lys Leu Lys Gln Val Val Tyr Gly His Gln
225                      230                      235                      240

Phe Met Asn Leu Ala Ser Asp Asn Leu Thr Asn Ile Ser Leu Phe Glu
                      245                      250                      255

Glu His Cys Glu Thr Leu Leu Cys Asp Leu Ile Ser Leu Ser Leu Asn
                260                      265                      270

Arg Tyr Asp Lys Val Arg Ser Ser Glu Ser Leu Met Ser Asp Gln Cys
                275                      280                      285

Pro Cys Leu Cys Ile Lys Glu Leu Trp Val Leu Leu Ile His Leu Leu
                290                      295                      300

Asp His Arg Ser Lys Trp Phe Val Ser Glu Ser Phe Trp Asn Trp Leu
305                      310                      315                      320

Asn Lys Leu Leu Lys Thr Leu Leu Glu Lys Ser Ser Asp Arg Arg Arg
                325                      330                      335

Ser Ser Met Pro Val Ile Gln Ser Arg Asp Pro Leu Gly Phe Ser Trp
                340                      345                      350

Trp Ile Ile Thr His Val Ala Ser Phe Tyr Lys Phe Asp Arg His Gly
                355                      360                      365

Val Pro Asp Glu Met Arg Lys Val Glu Ser Asn Trp Asn Phe Val Glu
                370                      375                      380

Glu Leu Leu Lys Lys Ser Ile Ser Val Gln Gly Val Ile Leu Glu Glu
385                      390                      395                      400

Gln Leu Arg Met Tyr Leu His Cys Cys Leu Thr Leu Cys Asp Phe Trp
                405                      410                      415

Glu Pro Asn Ile Ala Ile Val Thr Ile Leu Trp Glu Tyr Tyr Ser Lys
                420                      425                      430

```

[0040]

Asn Leu Asn Ser Ser Phe Ser Ile Ser Trp Leu Pro Phe Lys Gly Leu
435 440 445

Ala Asn Thr Met Lys Ser Pro Leu Ser Met Leu Glu Met Val Lys Thr
450 455 460

Cys Cys Cys Asp Lys Gln Asp Gln Glu Leu Tyr Lys Ser Ser Ser Ser
465 470 475 480

Tyr Thr Ile Phe Leu Cys Ile Leu Ala Lys Val Val Lys Lys Ala Met
485 490 495

Lys Ser Asn Gly Pro His Pro Trp Lys Gln Val Lys Gly Arg Ile Tyr
500 505 510

Ser Lys Phe His Gln Lys Arg Met Glu Glu Leu Thr Glu Val Gly Leu
515 520 525

Gln Asn Phe Phe Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ala Ala Val Ala Glu Val
530 535 540

Glu Asp Val Ala Ser His Val Leu Asp Leu Leu Asn Phe Leu Lys Pro
545 550 555 560

Ala Phe Val Thr Ser Gln Arg Ala Leu Ile Trp Lys Gly His Met Ala
565 570 575

Phe Leu Leu Met Tyr Ala Gln Lys Asn Leu Asp Ile Gly Val Leu Ala
580 585 590

Glu Lys Phe Ser Cys Ala Phe Arg Glu Lys Ala Lys Glu Phe Leu Val
595 600 605

Ser Lys Asn Glu Glu Met Val Gln Arg Gln Thr Ile Trp Thr Leu Leu
610 615 620

Ser Ile Tyr Ile Asp Gly Val Gln Glu Val Phe Glu Thr Ser Tyr Cys
625 630 635 640

Leu Tyr Pro Ser His Glu Lys Leu Leu Asn Asp Gly Phe Ser Met Leu
645 650 655

Leu Arg Ala Cys Arg Glu Ser Glu Leu Arg Thr Val Leu Ser Phe Leu
660 665 670

Gln Ala Val Leu Ala Arg Ile Arg Ser Met His Gln Gln Leu Cys Gln
675 680 685

Glu Leu Gln Arg Asp Asn Val Asp Leu Phe Val Gln Ser Ser Leu Ser
690 695 700

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

[0041]

Phe Phe Ser Phe Leu Lys Ser Gln Arg Met Ser Gln Val Val Pro Phe
725 730 735

Ser Gln Leu Ala Asp Ala Ala Ala Asp Phe Thr Leu Leu Ala Met Asp
740 745 750

Met Pro Ser Thr Ala Pro Ser Asp Phe Gln Pro Gln Pro Val Ile Ser
755 760 765

Ile Ile Gln Leu Phe Gly Trp Asp Asp Ile Ile Cys Pro Gln Val Val
770 775 780

Ala Arg Tyr Leu Ser His Val Leu Gln Asn Ser Thr Leu Cys Glu Ala
785 790 795 800

Leu Ser His Ser Gly Tyr Val Ser Phe Gln Ala Leu Thr Val Arg Ser
805 810 815

Trp Ile Arg Cys Val Leu Gln Met Tyr Ile Lys Asn Leu Ser Gly Pro
820 825 830

Asp Asp Leu Leu Ile Asp Lys Asn Leu Glu Glu Ala Val Glu Lys Glu
835 840 845

Tyr Met Lys Gln Leu Val Lys Leu Thr Arg Leu Leu Phe Asn Leu Ser
850 855 860

Glu Val Lys Ser Ile Phe Ser Lys Ala Gln Val Glu Tyr Leu Ser Ile
865 870 875 880

Ser Glu Asp Pro Lys Lys Ala Leu Val Arg Phe Phe Glu Ala Val Gly
885 890 895

Val Thr Tyr Gly Asn Val Gln Thr Leu Ser Asp Lys Ser Ala Met Val
900 905 910

Thr Lys Ser Leu Glu Tyr Leu Gly Glu Val Leu Lys Tyr Ile Lys Pro
915 920 925

Tyr Leu Gly Lys Lys Val Phe Ser Ala Gly Leu Gln Leu Thr Tyr Gly
930 935 940

Met Met Gly Ile Leu Val Lys Ser Trp Ala Gln Ile Phe Ala Thr Ser
945 950 955 960

Lys Ala Gln Lys Leu Leu Phe Arg Ile Ile Asp Cys Leu Leu Leu Pro
965 970 975

His Ala Val Leu Gln Gln Glu Lys Glu Leu Pro Ala Pro Met Leu Ser
980 985 990

Ala Ile Gln Lys Ser Leu Pro Leu Tyr Leu Gln Gly Met Cys Ile Val
995 1000 1005

[0042]

Cys Cys Gln Ser Gln Asn Pro Asn Ala Tyr Leu Asn Gln Leu Leu
1010 1015 1020

Gly Asn Val Ile Glu Gln Tyr Ile Gly Arg Phe Leu Pro Ala Ser
1025 1030 1035

Pro Tyr Val Ser Asp Leu Gly Gln His Pro Val Leu Leu Ala Leu
1040 1045 1050

Arg Asn Thr Ala Thr Ile Pro Pro Ile Ser Ser Leu Lys Lys Cys
1055 1060 1065

Ile Val Gln Val Ile Arg Lys Ser Tyr Leu Glu Tyr Lys Gly Ser
1070 1075 1080

Ser Pro Pro Pro Arg Leu Ala Ser Ile Leu Ala Phe Ile Leu Gln
1085 1090 1095

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

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

Val Lys Arg Leu Ala Thr Glu Asn Leu Gln Tyr Met Val Lys Ala
1130 1135 1140

Cys Gln Val Gly Ser Glu Glu Glu Pro Ser Ser Gln Leu Thr Ser
1145 1150 1155

Val Phe Arg Gln Phe Ile Gln Asp Tyr Gly Met Arg Tyr Tyr Tyr
1160 1165 1170

Gln Val Tyr Ser Ile Leu Glu Thr Val Ala Thr Leu Asp Gln Gln
1175 1180 1185

Val Val Ile His Leu Ile Ser Thr Leu Thr Gln Ser Leu Lys Asp
1190 1195 1200

Ser Glu Gln Lys Trp Gly Leu Gly Arg Asn Ile Ala Gln Arg Glu
1205 1210 1215

Ala Tyr Ser Lys Leu Leu Ser His Leu Gly Gln Met Gly Gln Asp
1220 1225 1230

Glu Met Gln Arg Leu Glu Asn Asp Asn Thr
1235 1240

<210> 160
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0043]

<223> 人工序列

<400> 160

gtctaccagg cattcgcttc at

22

<210> 161

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 161

tcagctggac cacagccgca gcgt

24

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 162

tcagaaatcc tttctcttga c

21

<210> 163

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 163

ctagcctctg gaatcctttc tcct

24

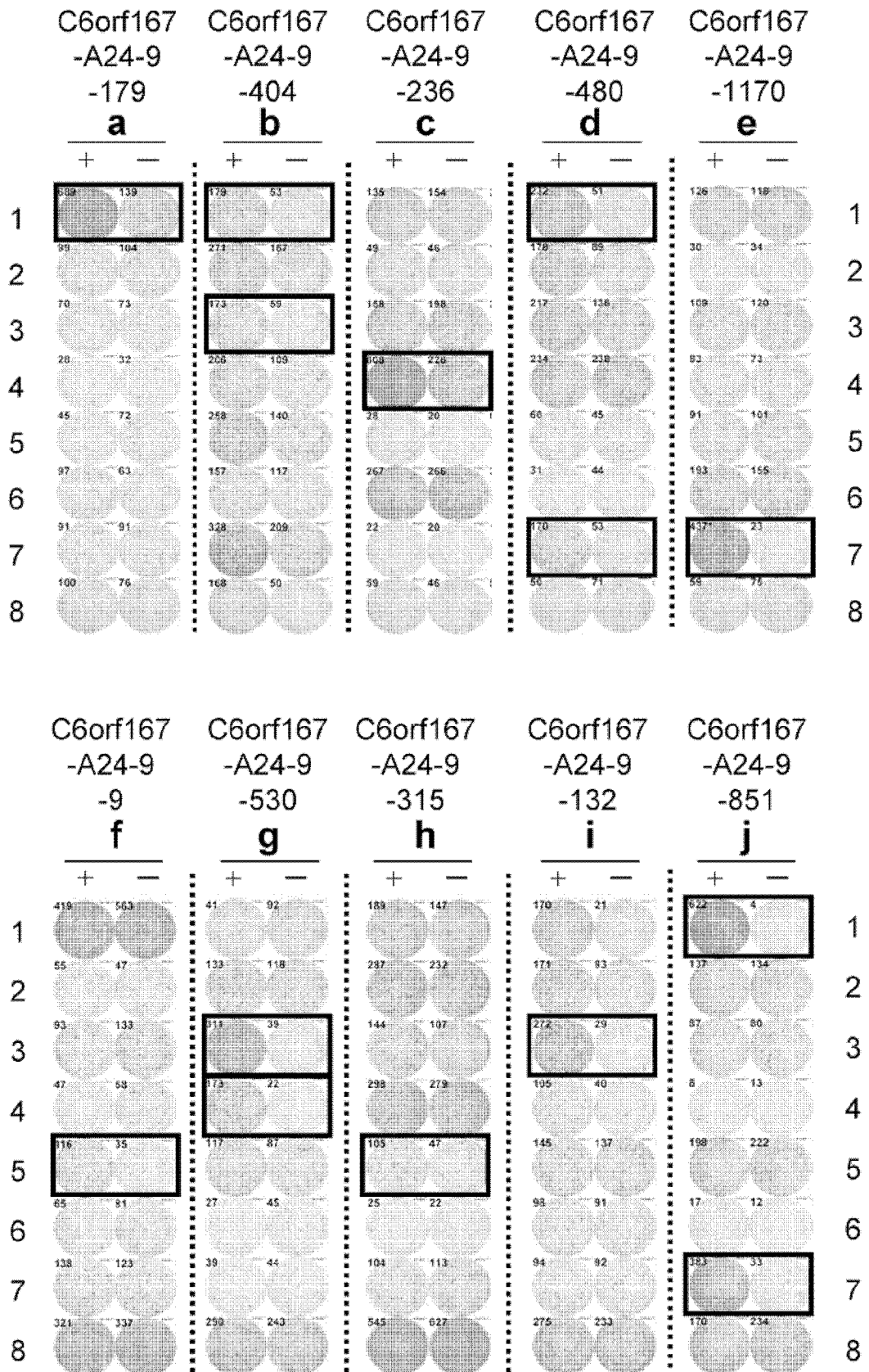


图 1a-j

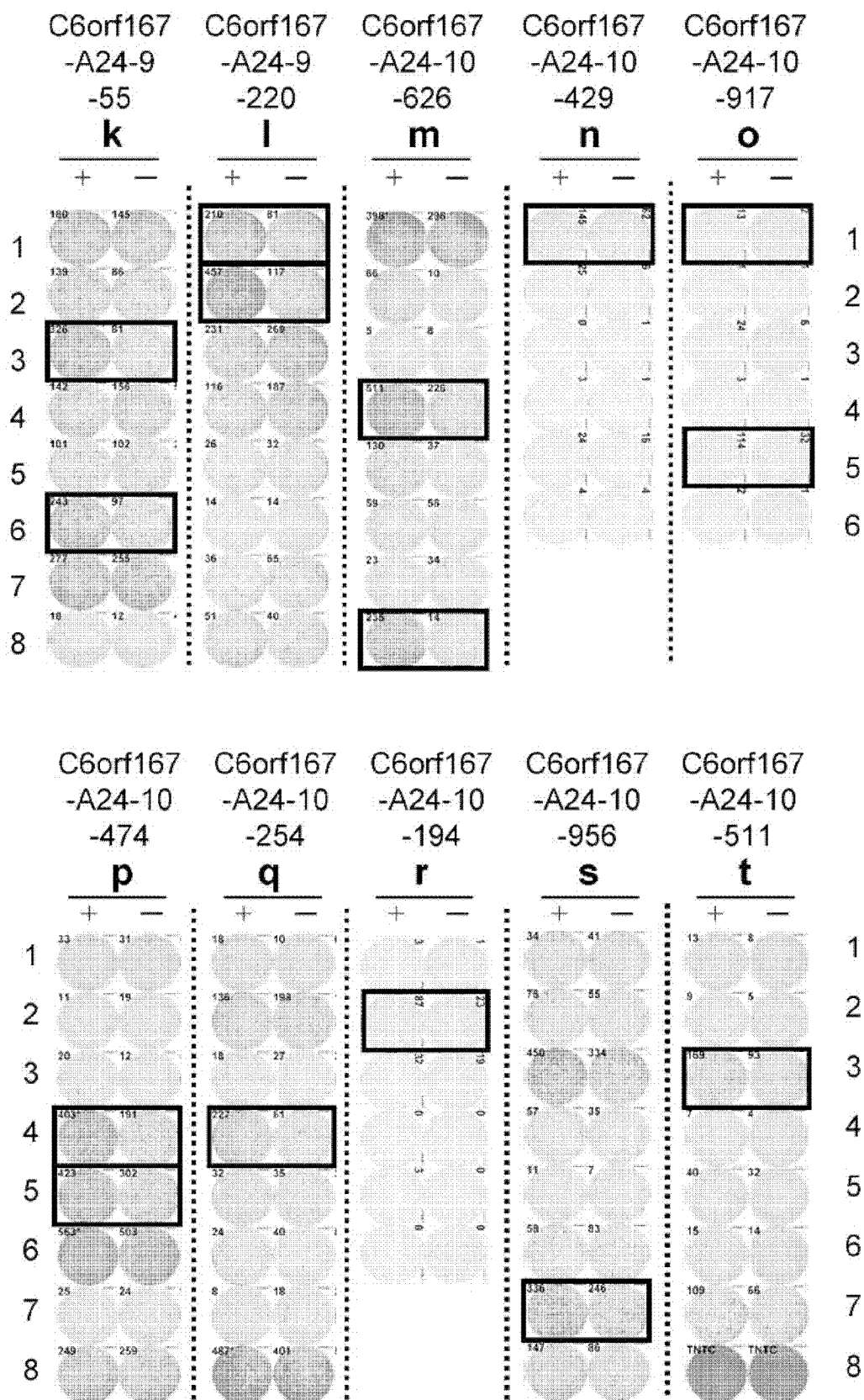


图 1k-t

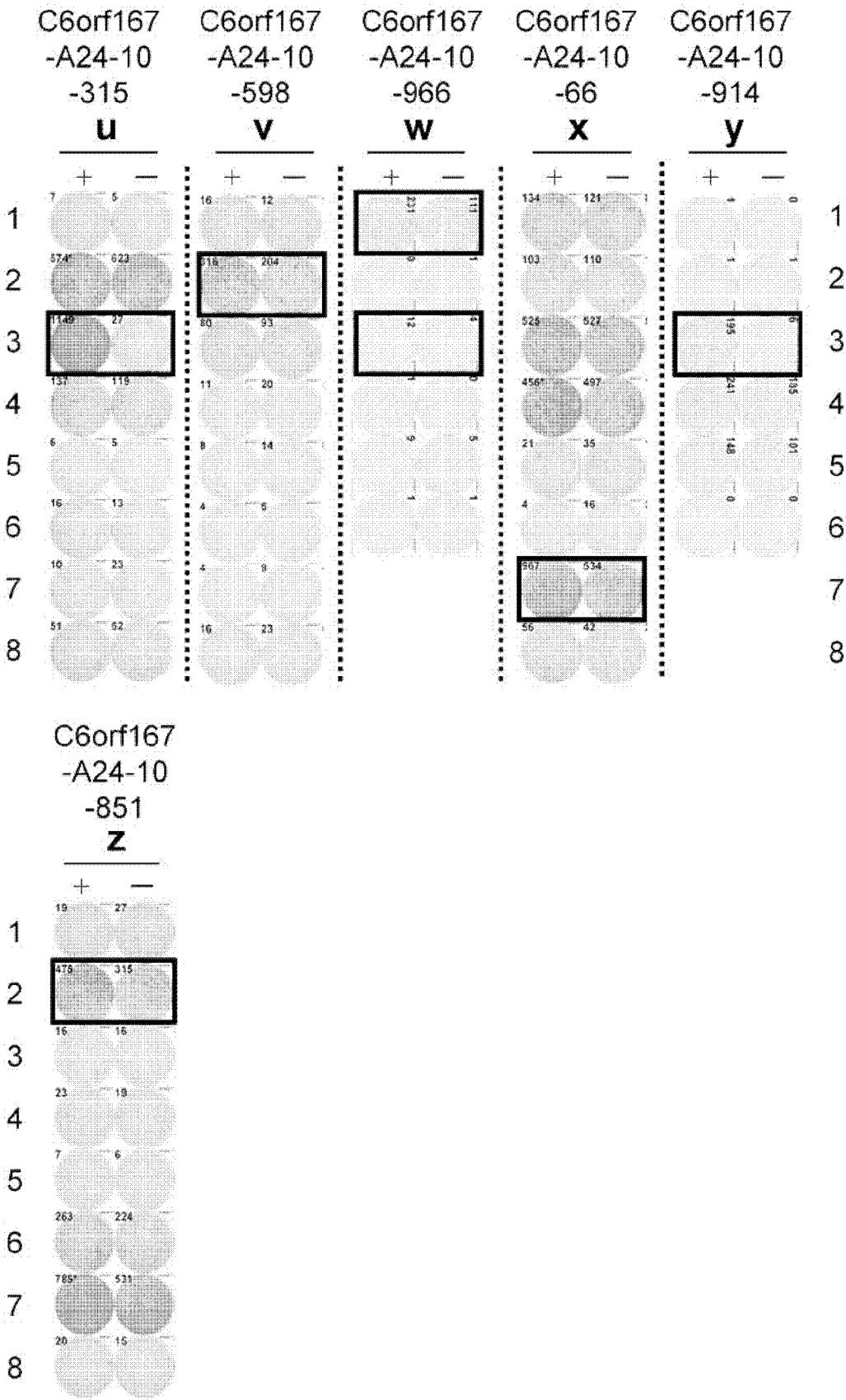


图 1u-z

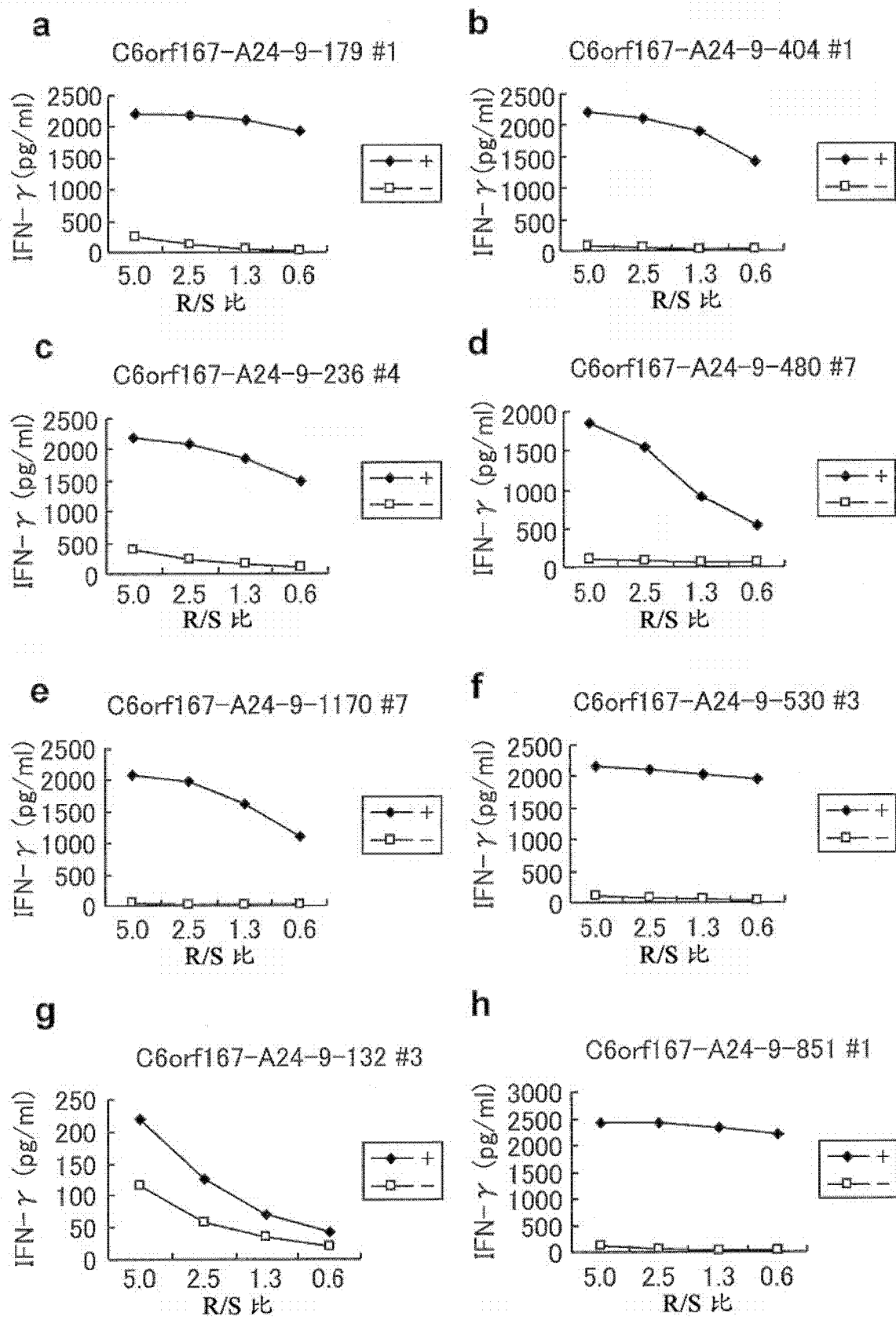


图 2a-h

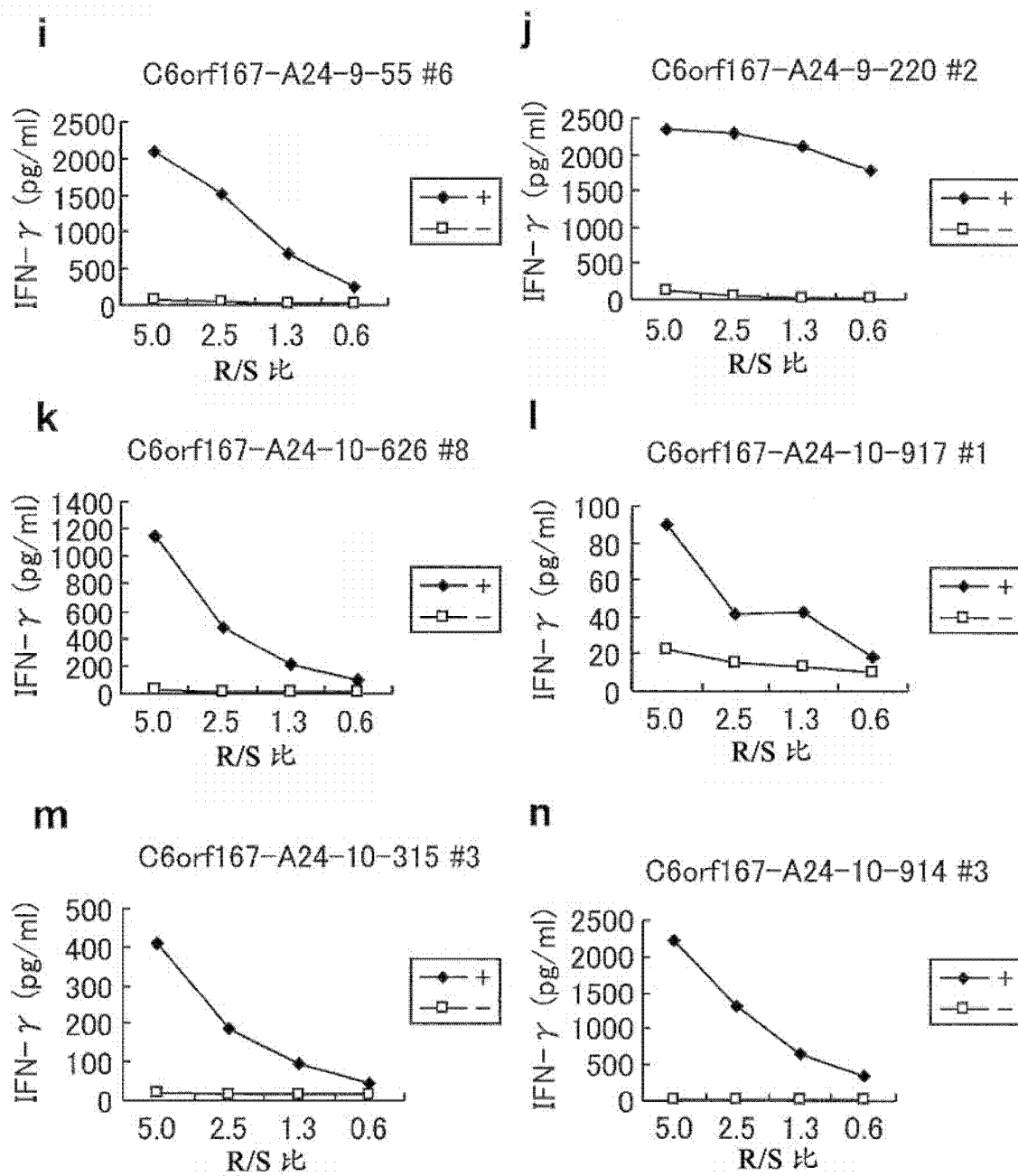


图 2i-n

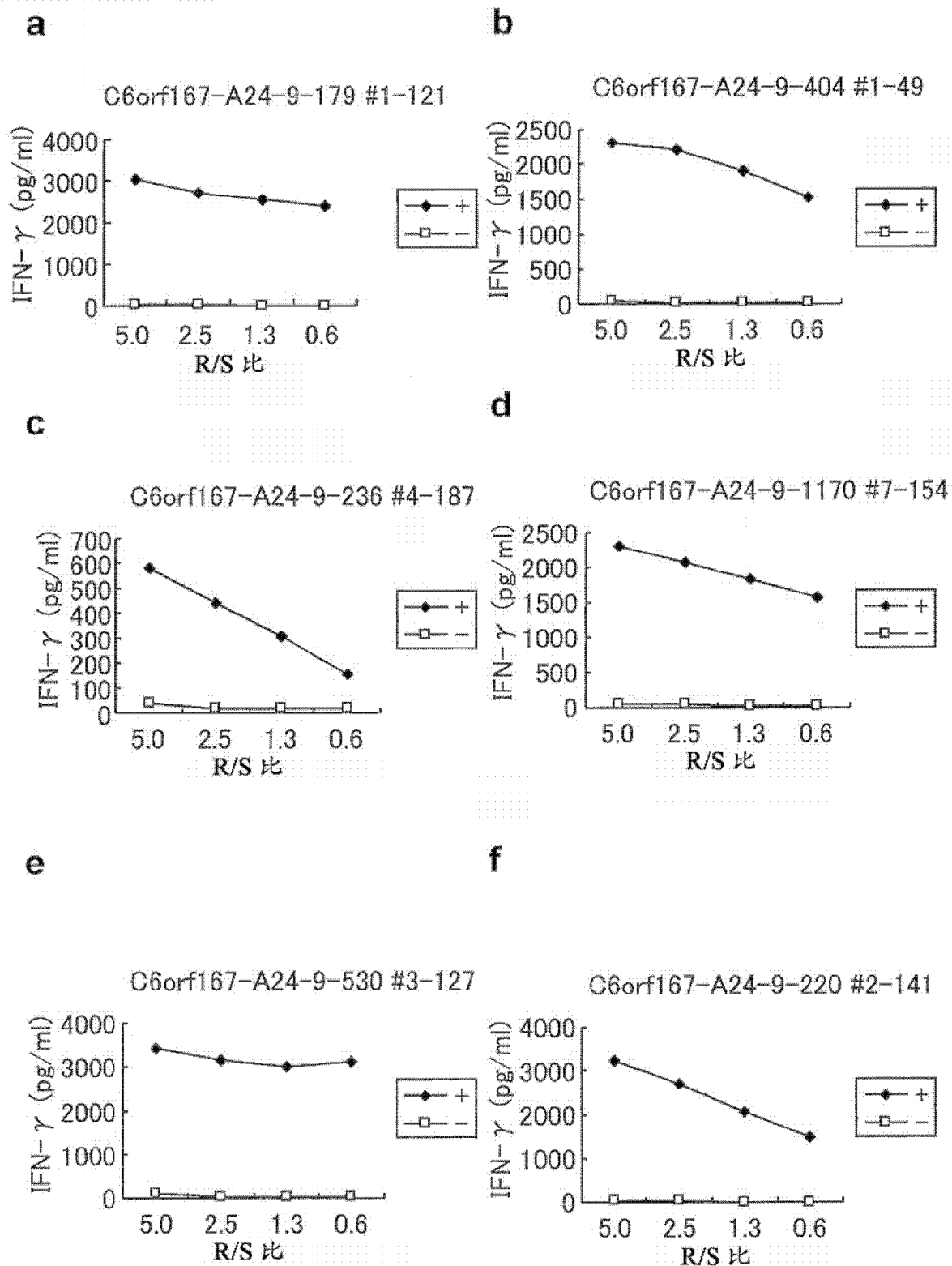


图 3

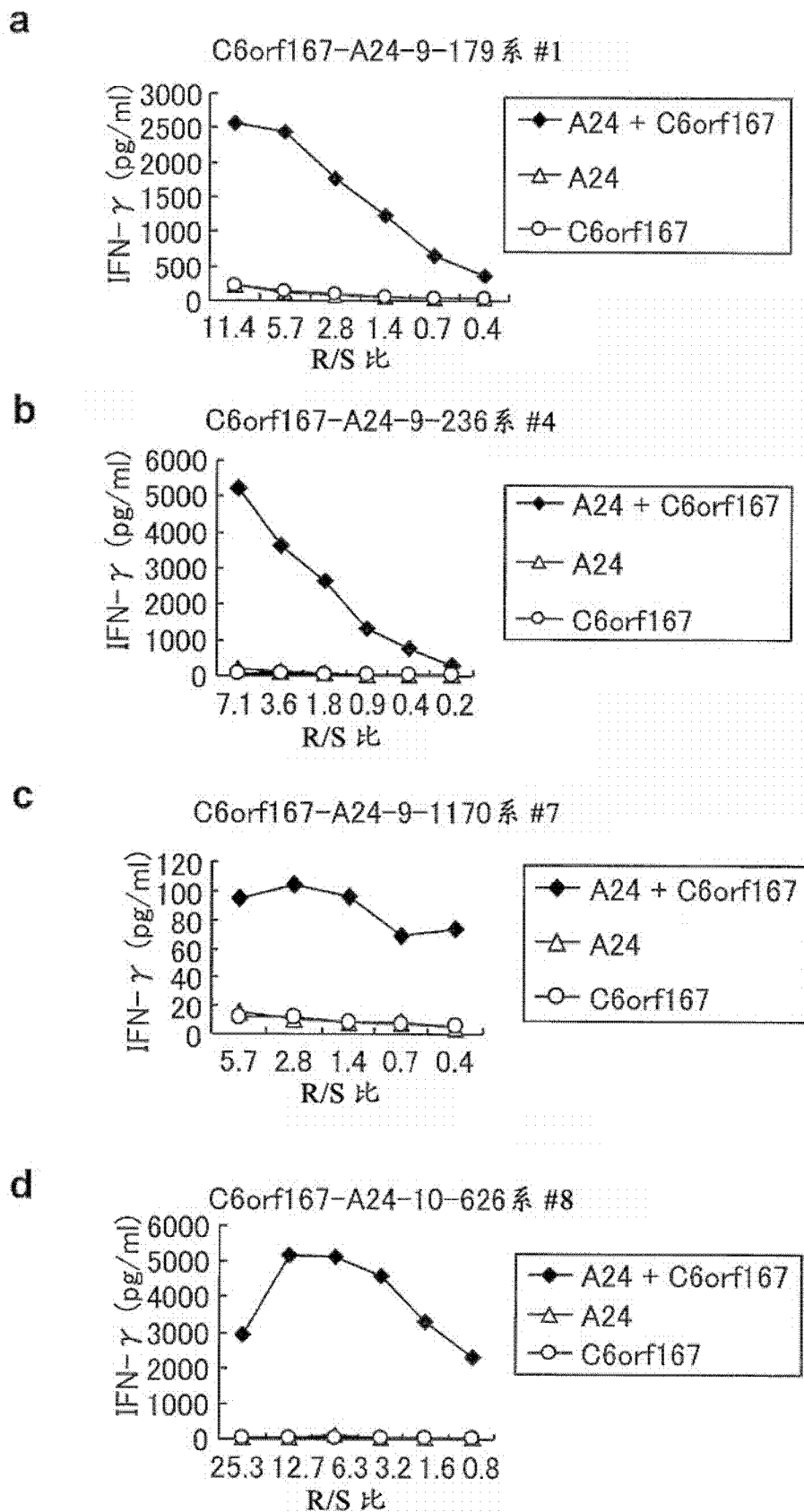


图 4

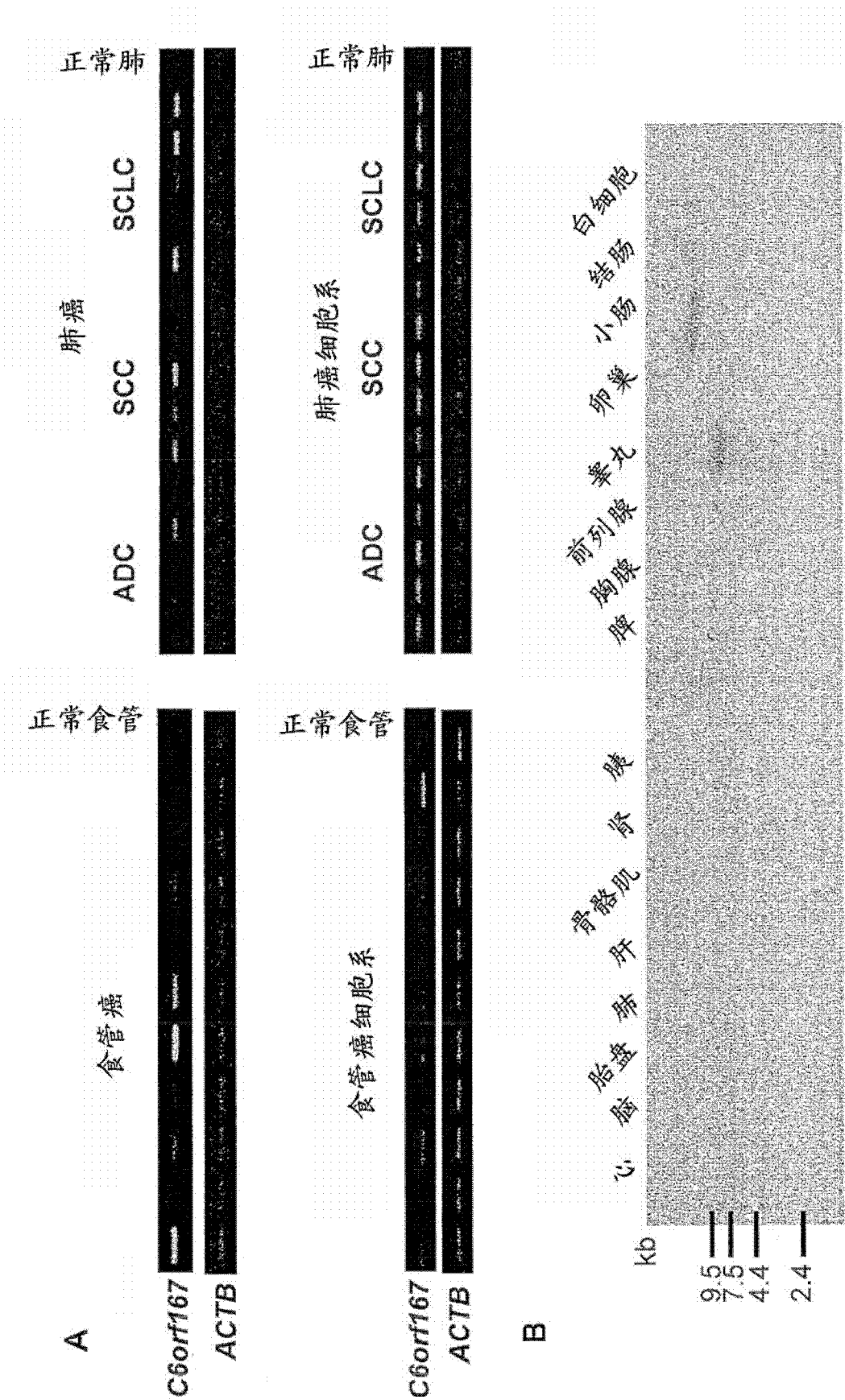


图 5

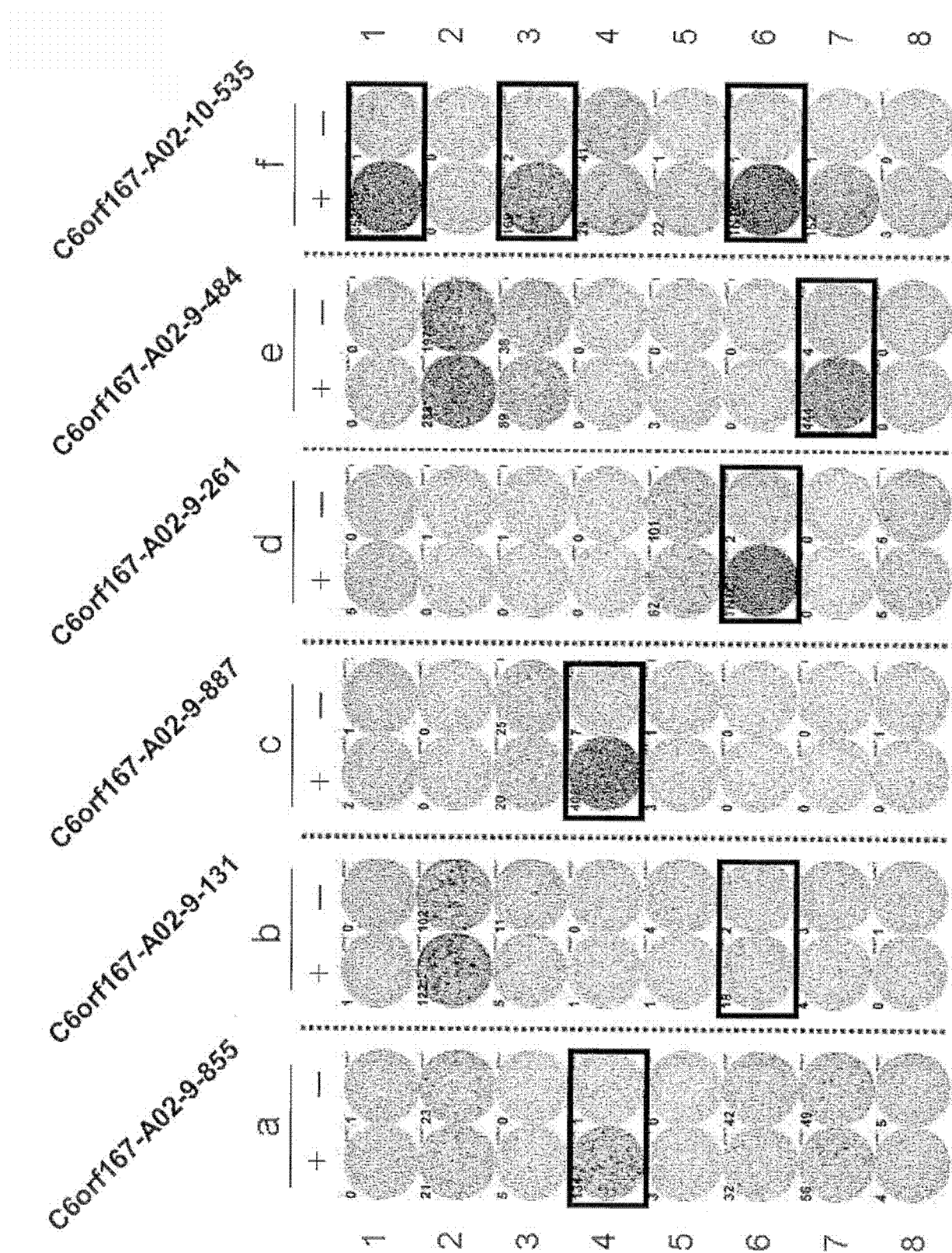


图 6a-f

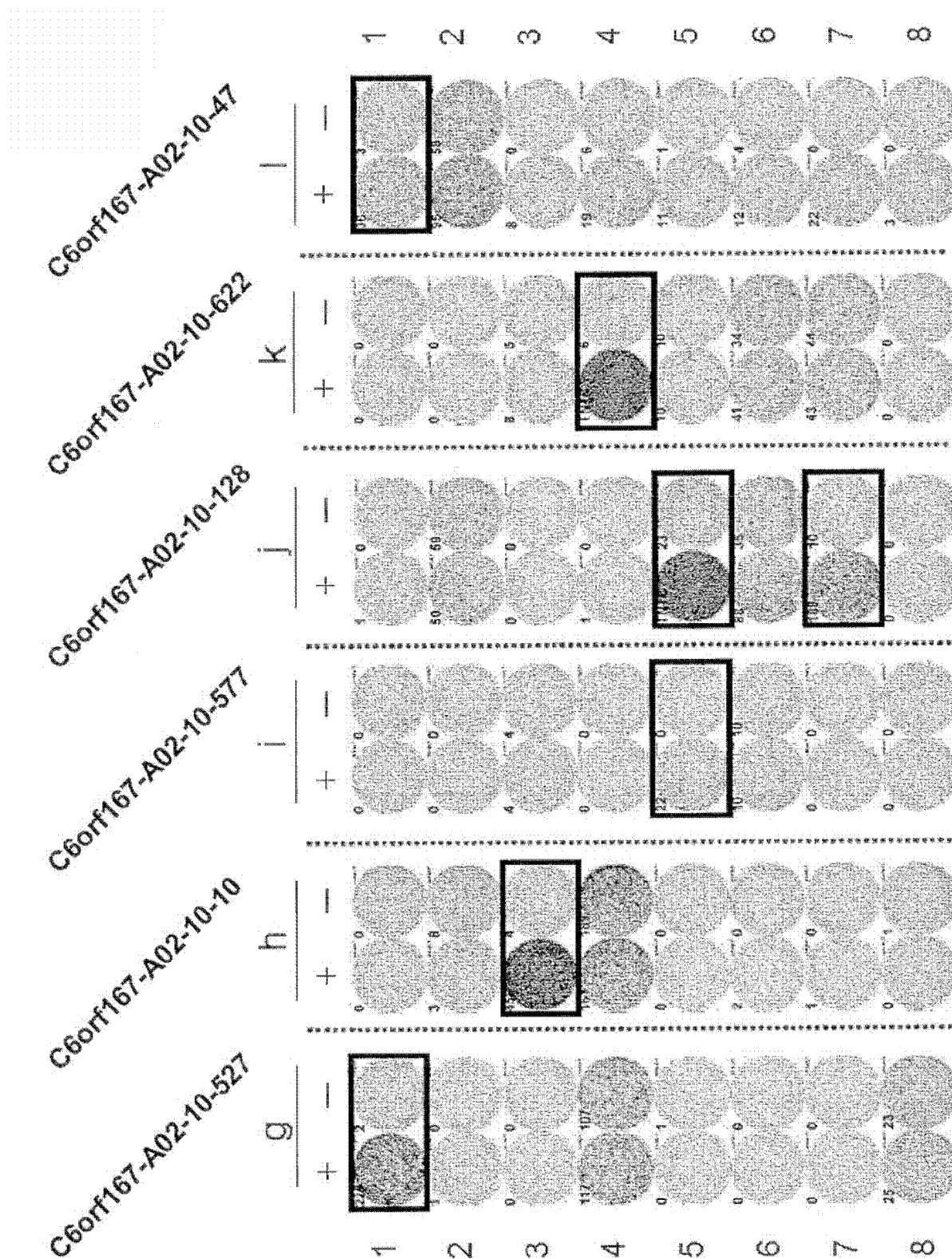


图 6g-1

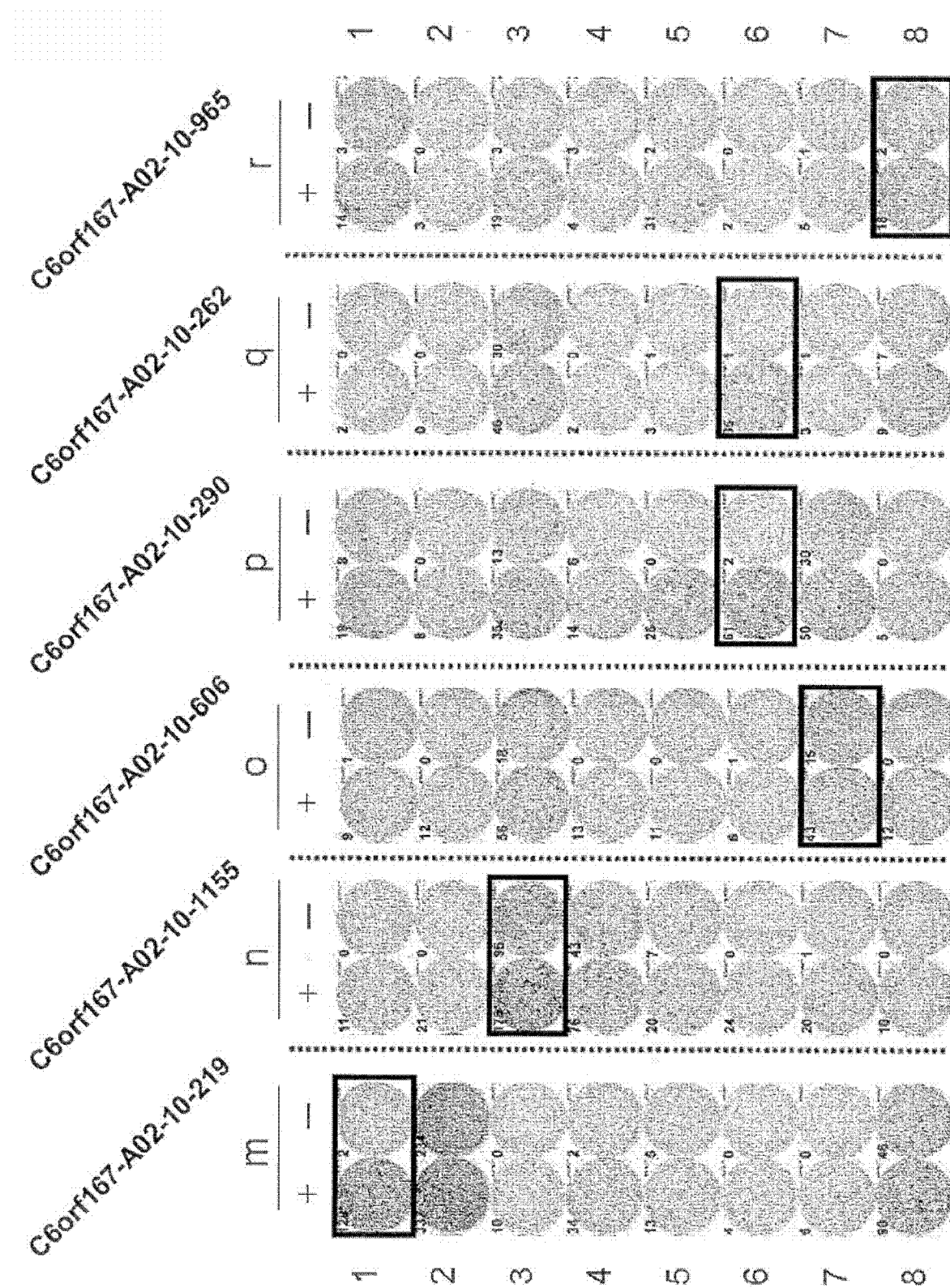


图 6m-r

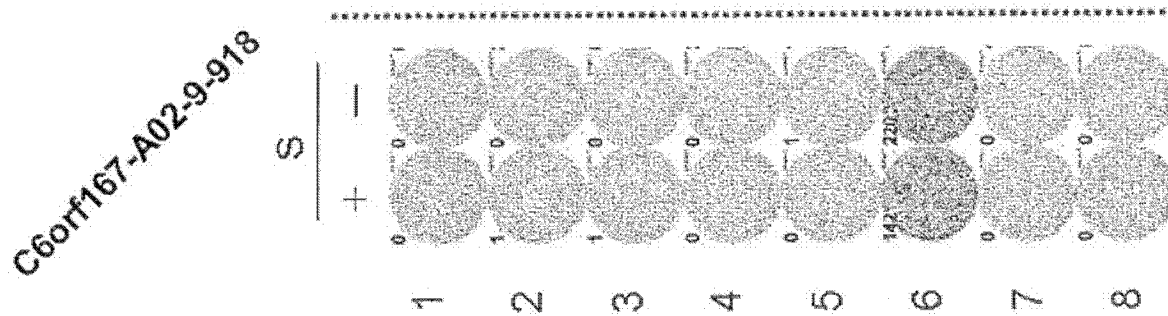


图 6s

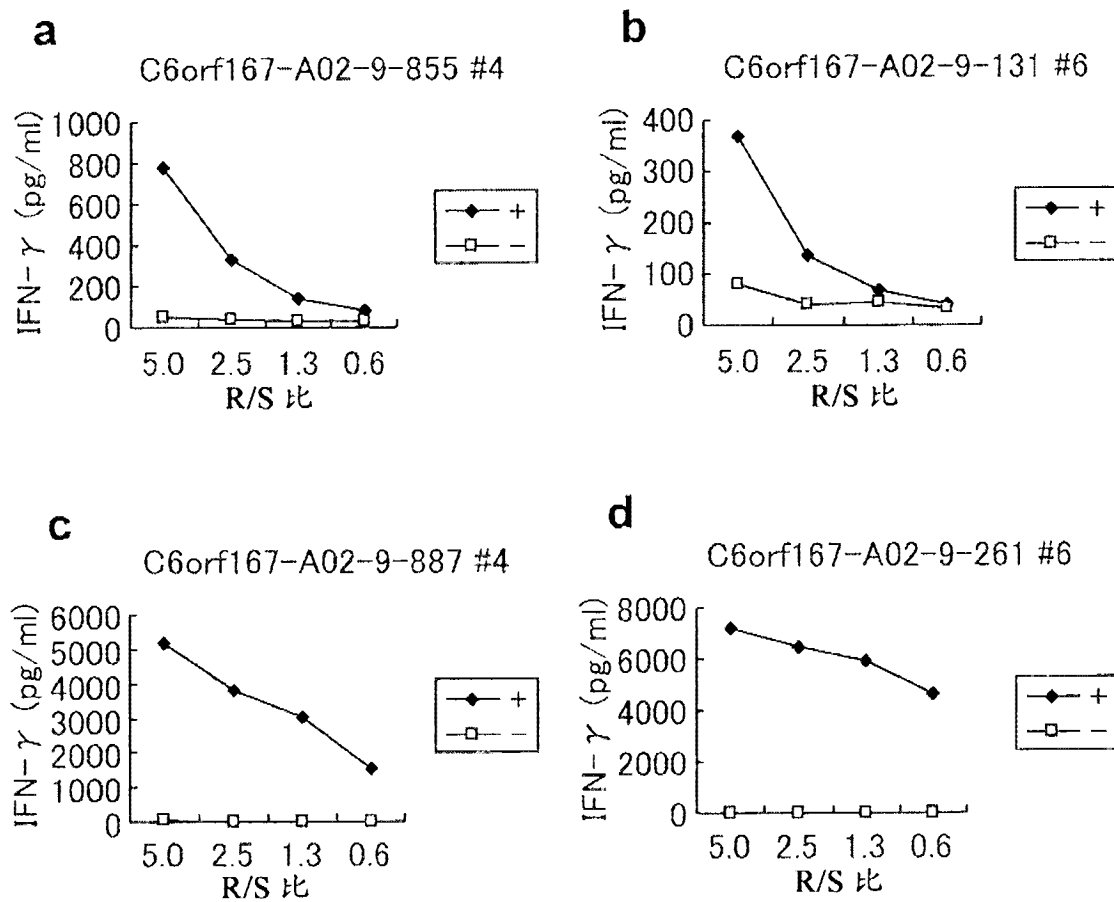


图 7a-d

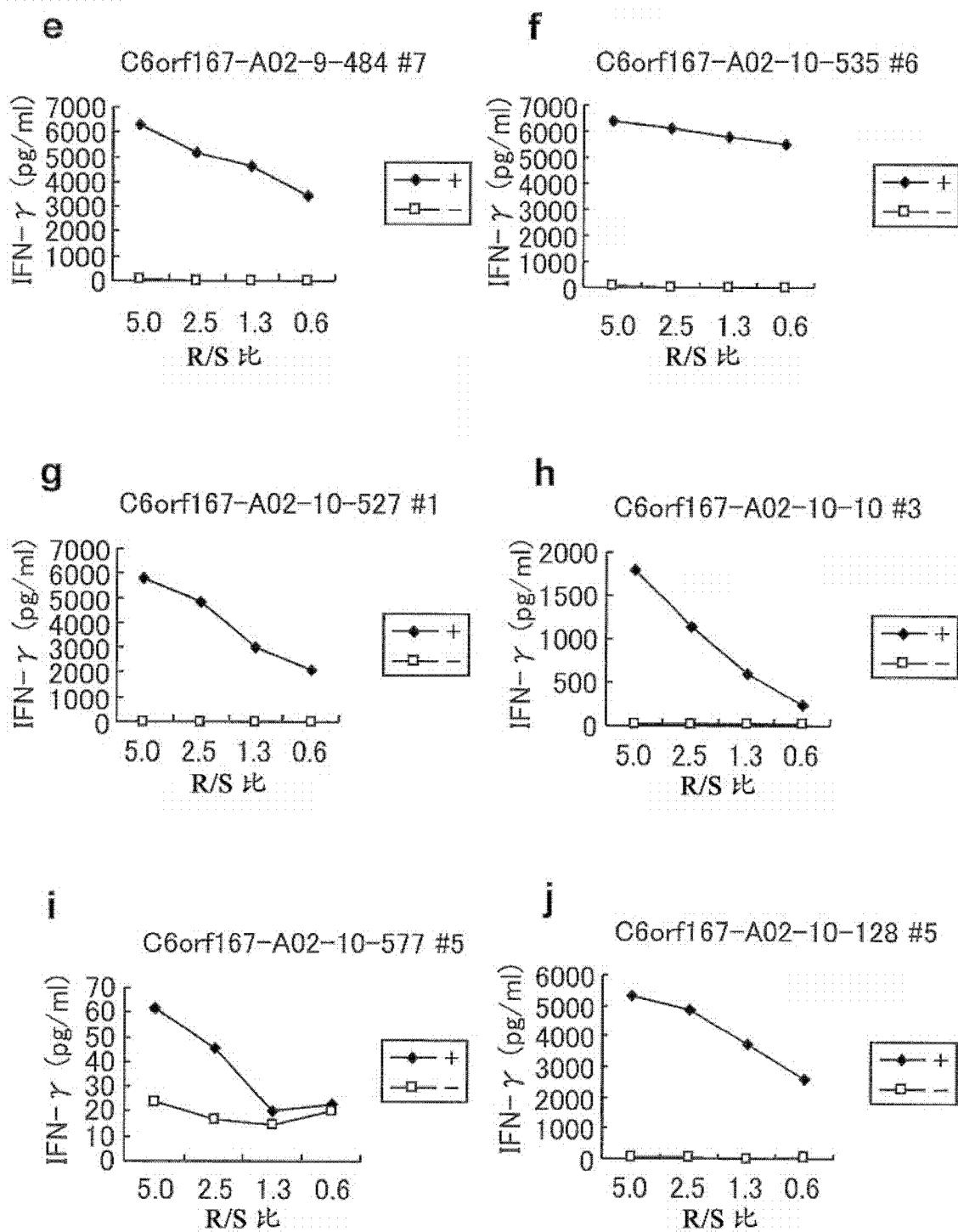


图 7e-j

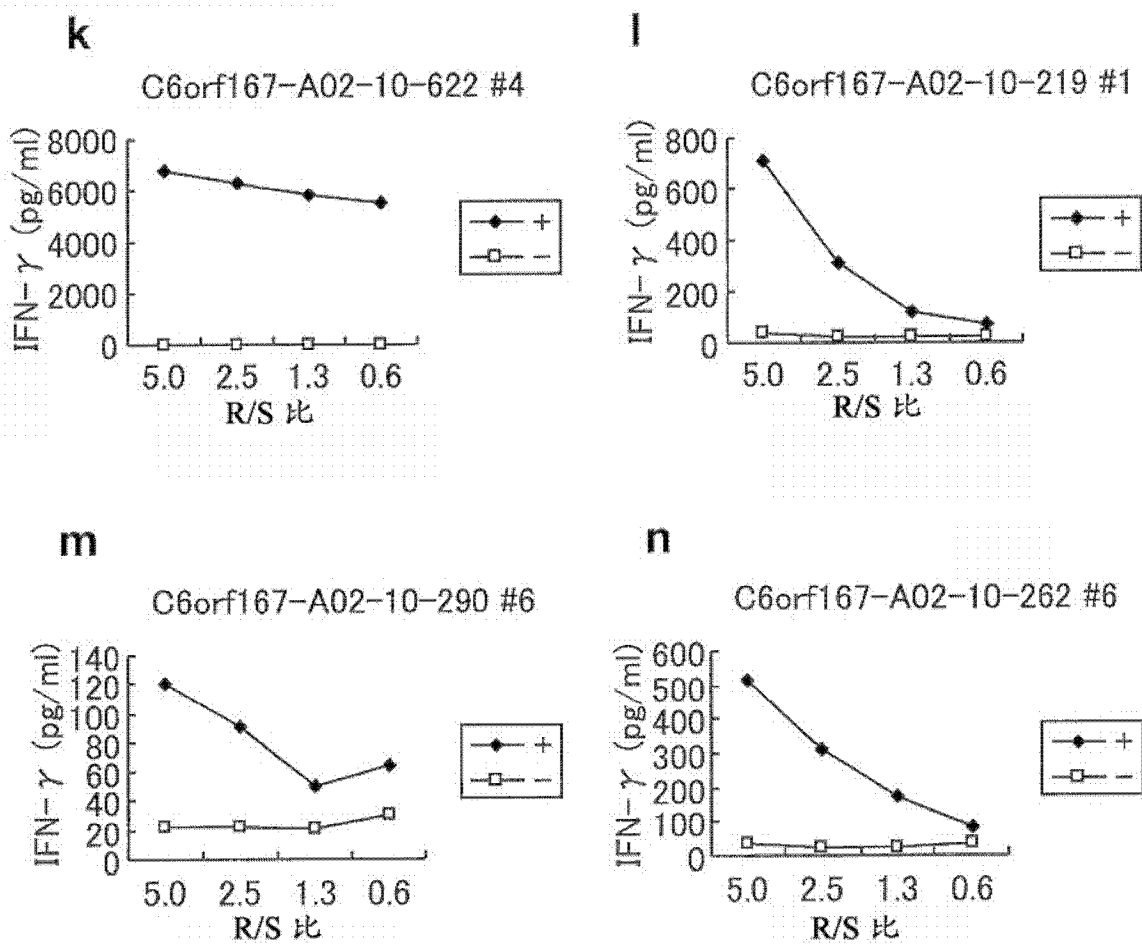


图 7k-n

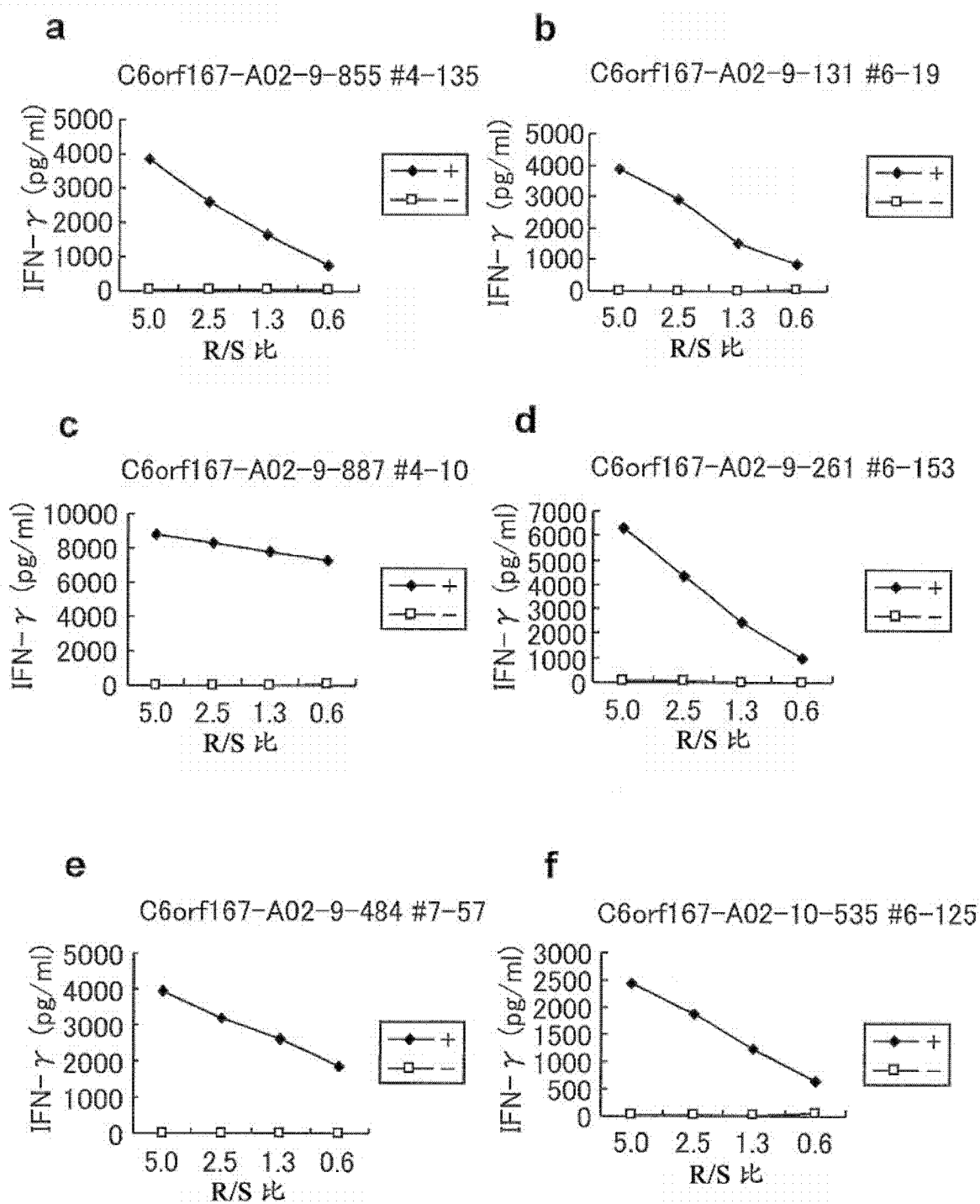


图 8a-f

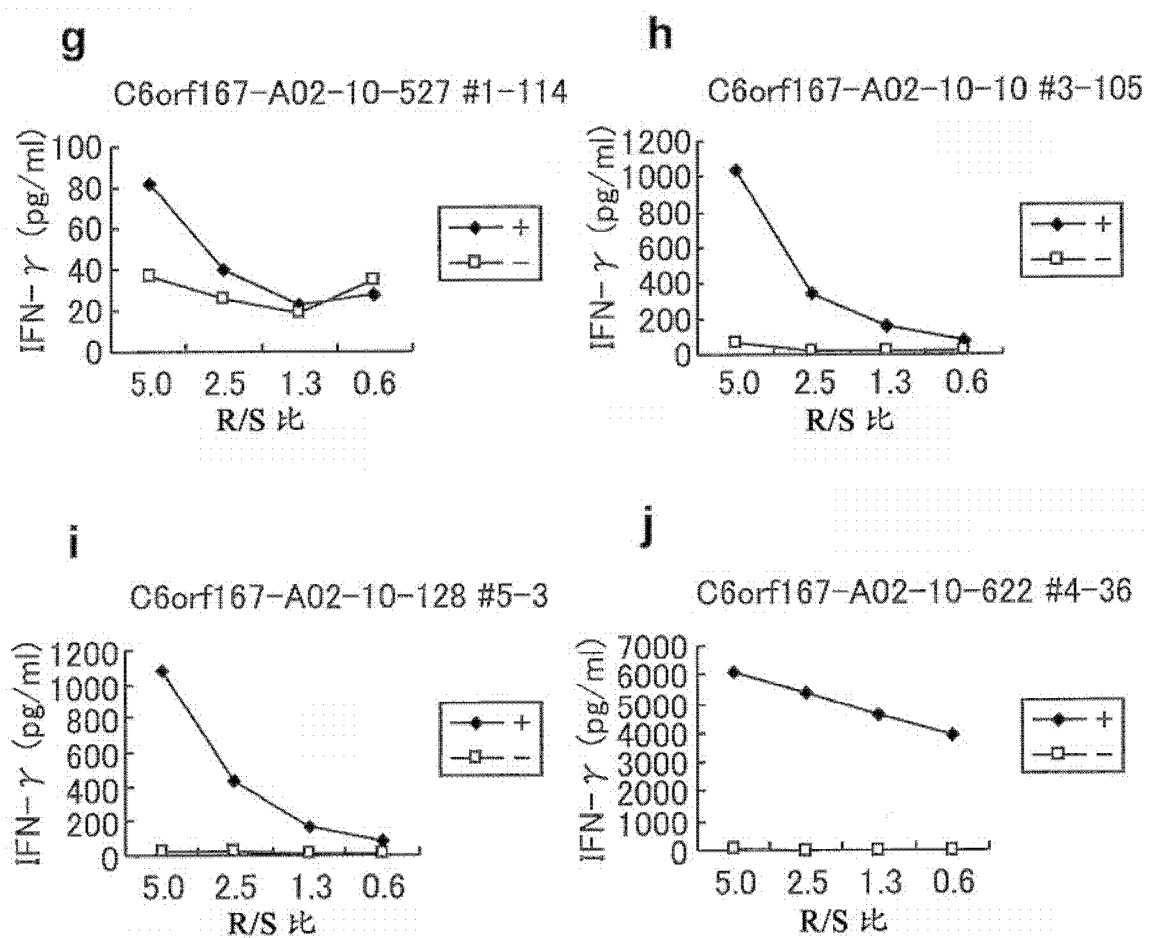


图 8g-j

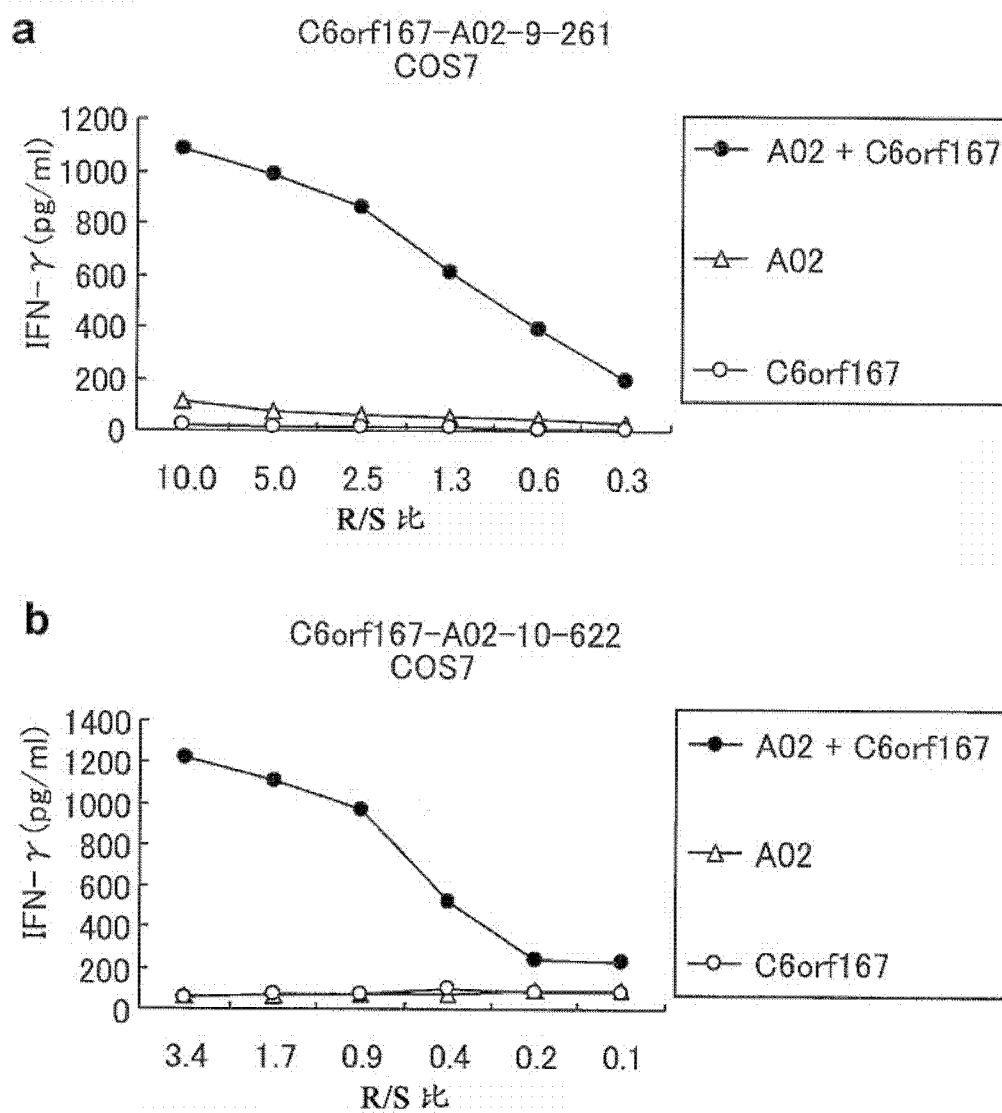


图 9