



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110022893 B

(45) 授权公告日 2023.12.29

(21) 申请号 201780074774.0

(22) 申请日 2017.10.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110022893 A

(43) 申请公布日 2019.07.16

(30) 优先权数据
16192948.4 2016.10.07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.03

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/075673 2017.10.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/065623 EN 2018.04.12

(73) 专利权人 恩特罗姆公司
地址 法国巴黎

(72) 发明人 L·钱 A·马修 M·披查德
F·斯特罗兹

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事
务所(普通合伙) 11413
专利代理师 王春伟 刘继富

(51) Int.Cl.
A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G07K 14/715 (2006.01)

G07K 14/705 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 1954217 A, 2007.04.25
David A. Rodeberg等. Recognition of Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate-Expressing Tumor Cells by Peptide Antigen-Induced Cytotoxic T Lymphocytes.《Clin Cancer Res》.2005,第11卷(第12期),第4545-4552页.
S Tourdot等. A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes.《Eur J Immunol》.2000,第30卷(第11期),第3411-3421页.
Wenxue Ma等. PLGA nanoparticle-mediated delivery of tumor antigenic peptides elicits effective immune responses.《Int J Nanomedicine》.2012,第1475-1487页.

审查员 马璐

权利要求书2页 说明书45页
序列表38页 附图3页

(54) 发明名称
用于癌症疗法的免疫原性化合物

(57) 摘要
本发明涉及包括与肿瘤抗原具有氨基酸相似性的抗原肽的免疫原性化合物,所述抗原肽选自在说明书中描述的序列。

1. 一种式(I)的抗原肽:
PepNt-CORE-PepCt (I), 其中:
 - “PepNt”由长度为1至50个氨基酸残基的多肽组成并且位于式(I)的多肽的N末端;
 - CORE由氨基酸序列如SEQ ID NO:100或101所示的多肽组成;和
 - “PepCt”由长度为1至50个氨基酸残基的多肽组成并且位于式(I)的多肽的C末端,其中所述抗原肽诱导针对STEAP1的免疫反应。
2. 一种抗原肽,其氨基酸序列如SEQ ID NO:100或101所示。
3. 一种纳米颗粒,其装载有
根据权利要求1或2所述的抗原肽中的至少一种;
和佐剂。
4. 一种包括多核苷酸的核酸,所述多核苷酸编码根据权利要求1或2所述的抗原肽。
5. 根据权利要求4所述的核酸,其中所述核酸是DNA分子或RNA分子。
6. 根据权利要求5所述的核酸,其中所述核酸选自cDNA、mRNA、载体及其组合。
7. 一种细胞,其包括根据权利要求4所述的核酸。
8. 根据权利要求7所述的细胞,其中所述核酸是载体。
9. 根据权利要求7所述的细胞,其中所述细胞是细菌细胞。
10. 根据权利要求9所述的细胞,其中所述细胞是肠道细菌细胞。
11. 根据权利要求7所述的细胞,其中所述细胞是抗原呈递细胞。
12. 根据权利要求11所述的细胞,其中所述细胞是树突细胞。
13. 一种免疫原性组合物,其包括
 - 根据权利要求1或2所述的抗原肽,
 - 根据权利要求3所述的纳米颗粒,
 - 根据权利要求4所述的核酸,或
 - 根据权利要求7所述的细胞;和一种或多种药学上可接受的赋形剂。
14. 根据权利要求13所述的免疫原性组合物,进一步包括一种或多种免疫刺激剂。
15. 根据权利要求14所述的免疫原性组合物,其中所述免疫刺激剂选自免疫佐剂和抗原呈递细胞。
16. 根据权利要求15所述的免疫原性组合物,其中所述抗原呈递细胞由树突细胞组成。
17. 根据权利要求13所述的免疫原性组合物,其中所述组合物包括包含第一抗原肽和第二抗原肽的两种不同的抗原肽,其中所述第一抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:100或101所示,所述第二抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-106中任一种所示,并且其中,当所述第一抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:100所示时,所述第二抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-99和101-106中任一种所示;当所述第一抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:101所示时,所述第二抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-100和102-106中任一种所示。
18. 根据权利要求1或2所述的抗原肽、根据权利要求3所述的纳米颗粒、根据权利要求4所述的核酸、根据权利要求7所述的细胞、或根据权利要求13所述的免疫原性组合物在制备用于预防或治疗表达前列腺六跨膜上皮抗原1基因的前列腺癌的药物中的用途。
19. 包含根据权利要求2的第一抗原肽和氨基酸序列如SEQ ID NO:1-106中任一种所示

的第二抗原肽的两种不同的抗原肽的联合剂,其用于预防和/或治疗前列腺癌,其中当所述第一抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:100所示时,所述第二抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-99和101-106中任一种所示;当所述第一抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:101所示时,所述第二抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-100和102-106中任一种所示。

20. 一种试剂盒,其包括

- 根据权利要求1或2所述的抗原肽,
- 根据权利要求3所述的纳米颗粒,
- 根据权利要求4所述的核酸,
- 根据权利要求7所述的细胞,或
- 根据权利要求13所述的免疫原性组合物。

21. 根据权利要求20所述的试剂盒,其进一步包括包装插页或说明传单,其具有通过使用所述抗原肽、所述纳米颗粒、所述核酸、所述细胞、或所述免疫原性组合物预防或治疗前列腺癌的指导。

22. 根据权利要求20所述的试剂盒,其中所述试剂盒包括包含根据权利要求2的第一抗原肽和氨基酸序列如SEQ ID NO:1-106中任一种所示的第二抗原肽的两种不同的抗原肽,其中当所述第一抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:100所示时,所述第二抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-99和101-106中任一种所示;当所述第一抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:101所示时,所述第二抗原肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-100和102-106中任一种所示。

用于癌症疗法的免疫原性化合物

技术领域

[0001] 本发明是癌症疗法的领域,更具体地涉及免疫治疗方法。

背景技术

[0002] 癌症是全世界死亡的主要原因之一。根据世界卫生组织,仅在2012年,全世界报告了1400万新病例和820万癌症相关死亡,并且预计未来二十年内新发癌症病例的数量将增加约70%。到目前为止,全世界总的新增年度病例的60%以上发生在非洲、亚洲和中南美洲。这些地区也占世界癌症死亡人数的70%。在男性中,五种最常见的癌症部位是肺、前列腺、结肠直肠、胃和肝;而在女性中,这些是乳房、结肠直肠、肺、宫颈和胃。

[0003] 癌症长期以来一直通过外科手术、放射疗法、细胞毒性化学疗法和内分泌治疗(endocrine manipulation)来管理,其通常按顺序组合以便最好地控制疾病。然而,这些标准疗法的真实功效的主要限制是它们的不精确特异性,其导致治疗引起的正常组织的附带损害、低治愈率和内在抗药性。

[0004] 在过去的几年中,癌症疗法的发展有了巨大的增长,这主要归功于肿瘤和正常细胞表达谱的巨大进步,并且免疫疗法或分子靶向疗法的最近研究和首次临床结果已经开始改变我们对这种疾病的看法。

[0005] 有希望的抗癌免疫疗法现已成为现实,并且宿主免疫系统能够识别肿瘤抗原的证据已导致抗癌药物的开发,其现已获得美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲药品管理局(EMA)等监管机构的批准。各种治疗方法包括离体扩增的肿瘤浸润淋巴细胞的过继转移、癌细胞疫苗、免疫刺激细胞因子及其变体、模式识别受体(PRR)激动剂和靶向肿瘤抗原或免疫检查点的免疫调节单克隆抗体(Galuzzi et al., Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 2014Dec 30;5(24):12472-508)。

[0006] 不幸的是,相当大比例的患者仍然可能对这些免疫疗法中的一些产生内在抗性,或甚至在治疗过程中获得抗性。例如,据报道,在不可切除的或转移性黑素瘤中利用抗-CTLA-4抗体伊普利姆玛(Ipilimumab)治疗的三年生存率约为20%(Snyder et al., Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014Dec 4;371(23):2189-2199;Schadendorf et al., Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2015Jun 10;33(17):1889-94),而利用另一种检查点抑制剂(靶向PD1的纳武单抗(Nivolumab))治疗的三年生存率被报道为在肾细胞癌(RCC)中为44%以及在NSCLC中为18%(Mc Dermott et al., Survival, Durable Response, and Long-Term Safety in Patients With Previously Treated Advanced Renal Cell Carcinoma Receiving Nivolumab. *J Clin Oncol*. 2015Jun 20;33(18):2013-20;Gettinger et al., Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin*

Oncol.2015Jun 20;33(18):2004-12)。因此,基础耐药性代表了这些免疫疗法功效的固定障碍。因此很清楚,需要一种不同的癌症治疗方法来打破这种障碍。

[0007] 在用这些免疫疗法治疗的大量受试者中没有应答可能与缺乏的抗肿瘤免疫应答相关(如通过APC的抗原呈递或通过T细胞的抗原识别中的缺陷)。换句话说,对免疫疗法的积极应答与免疫系统发展能够识别由人癌细胞表达的MHC I类限制性抗原的特定淋巴细胞亚群的能力相关(Kvistborg et al.,Human cancer regression antigens.Curr Opin Immunol.2013Apr;25(2):284-90)。这一假设得到了数据强有力的支持,数据显示对肿瘤浸润性淋巴细胞的过继转移的应答与注入患者的CD8⁺T细胞数量直接相关(Besser et al., Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma:intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies.Clin Cancer Res.2013Sep 1;19(17):4792-800)。因此,有效的抗肿瘤应答将取决于免疫反应性肽的呈递和足够数量的“训练”以识别这些抗原的反应性细胞的存在。

[0008] 基于肿瘤抗原的疫苗接种代表了已经获得相当大的兴趣的癌症治疗的独特途径,因为它可以使患者自身的免疫系统以特定且持久的方式识别、攻击和破坏肿瘤。实际上,已知肿瘤细胞表达大量易被免疫系统识别的肽抗原。因此,基于这些抗原的疫苗不仅提供了改善患者总体存活率,而且由于肿瘤抗原的低毒性和低分子量,还提供了监测免疫应答和制备GMP级产品的大好机会。肿瘤抗原的实例包括从正常沉默基因或过表达基因转录的蛋白质的副产物和来自肿瘤病毒表达的蛋白质的副产物(Kvistborg et al.,Human cancer regression antigens.Curr Opin Immunol.2013Apr;25(2):284-90),和新抗原(其由细胞蛋白质的点突变引起)等。后者特别令人感兴趣,因为它们已显示与用CTLA4抑制剂治疗的患者的总体生存率增加直接相关(Snyder et al.,Genetic basis for clinical response to CTLA-4blockade in melanoma.N Engl J Med.2014Dec 4;371(23):2189-2199;Brown et al.,.Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival.Genome Res.2014May;24(5):743-50)。

[0009] 然而,可以开发癌症疫苗的人肿瘤抗原的数量是有限的。特别地,衍生自突变或修饰的自身蛋白的抗原可以诱导免疫耐受和/或不期望的自身免疫副作用。

[0010] 因此,本领域需要鉴定替代的癌症治疗剂,其可以克服该领域中遇到的限制,特别是对目前可获得的免疫疗法的抗性。

[0011] 本发明的目标是满足上述需求。

发明内容

[0012] 本发明涉及与肿瘤抗原具有氨基酸相似性的抗原肽,该抗原肽选自SEQ ID N°1至106。换句话说,本发明涉及具有如在SEQ ID N°1至106中任一种中列出的氨基酸序列的抗原肽。根据本发明的抗原肽可以是免疫原性化合物的形式。

[0013] 因此,根据某些实施方式,本发明涉及免疫原性化合物,其包括与肿瘤抗原具有氨基酸相似性的抗原肽,该抗原肽选自SEQ ID N°1至106,特别地SEQ ID N°71。换句话说,本发明涉及包括具有如在SEQ ID N°1至106中任一种中列出的氨基酸序列的抗原肽的免疫原性化合物。

[0014] 更具体地,本发明涉及如上面所限定的免疫原性化合物,其中所述抗原肽连接至载体蛋白。

[0015] 本发明还涉及装载有根据本发明的至少抗原肽或根据本发明的至少一种免疫原性化合物(以及任选地装载有佐剂)的纳米颗粒。

[0016] 本发明还涉及包括如上面所限定的抗原肽或免疫原性化合物的组合物,所述组合物优选地进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0017] 因而,根据某些实施方式,本发明涉及包括如上面所限定的抗原肽或免疫原性化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂的免疫原性组合物。

[0018] 优选地,所述免疫原性组合物可以进一步包括一种或多种免疫调节剂。

[0019] 所述一种或多种免疫调节剂可以选自(或由其组成)免疫佐剂和抗原呈递细胞。

[0020] 所述抗原呈递细胞可以由树突细胞组成。

[0021] 根据其他实施方式,本发明涉及如上面所限定的抗原肽或如上面所限定的免疫原性化合物,其用于预防或治疗癌症。

[0022] 根据进一步实施方式,本发明涉及免疫原性组合物,其用于预防或治疗癌症。

[0023] 本发明还涉及如上面所限定的抗原肽或如上面所限定的免疫原性化合物用于制备用于治疗或预防癌症的药物的用途。

[0024] 本发明还涉及用于预防或治疗需要其的个体中的癌症的方法,其中所述方法包括给所述个体施用如上面所限定的抗原肽或如上面所限定的免疫原性化合物或如上面所限定的免疫原性组合物或根据本发明的纳米颗粒或根据本发明的核酸或根据本发明的联合物(combination)的步骤。

[0025] 根据又进一步实施方式,本发明涉及编码如上面所限定的抗原肽或免疫原性化合物的核酸。

[0026] 而且,本发明还涉及根据本发明的两种不同的免疫原性化合物的联合物,其用于预防和/或治疗癌症。而且,本发明还涉及根据本发明的两种不同的抗原肽的联合物,其用于预防和/或治疗癌症。而且,本发明还涉及根据本发明的两种不同的纳米颗粒的联合物,其用于预防和/或治疗癌症。而且,本发明还涉及根据本发明的两种不同的核酸的联合物,其用于预防和/或治疗癌症。

[0027] 在某些实施方式中,根据本发明使用的联合物的两种不同的组分包含在相同或不同的组合物中。

[0028] 在某些实施方式中,根据本发明使用的联合物的两种不同的组分经由相同或不同的施用途径施用。

[0029] 在某些实施方式中,根据本发明使用的联合物的两种不同的组分在大约相同时间或连续地被施用。

[0030] 而且,本发明还涉及包括下列的试剂盒

[0031] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0032] -根据本发明的抗原肽,

[0033] -根据本发明的纳米颗粒,

[0034] -根据本发明的核酸,或

[0035] -根据本发明的免疫原性组合物。

附图说明

[0036] 图1:用于确认基于肿瘤抗原的靶向IL13RA2的免疫疗法的概念验证的一般方案。

[0037] 图2:免疫方案的示意图。d:天。

[0038] 图3:组1(IL13RA2-B)和组2(IL13RA2-A)的ELISPOT-IFN γ 结果。图中表明了用于接种疫苗(在每个组下面的括号之间)的肽和在ELISPOT培养(X轴)中使用的刺激。(A)特异性ELISPOT-IFN γ 斑点的数目(减去培养基条件)。每个斑点表示来自相应条件一式四份的一个个体/小鼠的平均值。(B)对于每个个体,将特异性ELISPOT-IFN γ 应答的水平与ConA刺激(值:100%)比较。统计学分析:成对t检验(用于组内比较)和非成对t检验(用于组间比较);* $p < 0.05$ 。

具体实施方式

[0039] 本发明人已经鉴定了一组可以用于诱导针对肿瘤细胞的特异性免疫应答的抗原肽。

[0040] 那些抗原肽都共享与由在表1A和表1B中公开的基因组编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的性质。

[0041] 例如,白细胞介素-13受体亚基 α -2(IL-13R α 2或IL13RA2)是膜结合蛋白,其在人中由IL13RA2基因编码。以非穷举的方式,已报道IL13RA2是潜在的免疫治疗靶标(参见Beard et al.;Clin Cancer Res;72(11);2012)。IL13RA2的高表达进一步与结肠直肠癌的侵袭、肝转移和不良预后相关(Barderas et al.;Cancer Res;72(11);2012)。

[0042] 因此,本发明涉及与肿瘤抗原具有氨基酸相似性的抗原肽,该抗原肽选自SEQ ID N^o1至106。

[0043] 如本文所使用的表达“与肿瘤抗原具有氨基酸相似性”具体指的是(参考)肿瘤抗原的片段的序列变体,例如IL13RA2。

[0044] 序列变体,特别是在序列的整个长度上,与参考序列即(参考)肿瘤抗原的片段共享至少50%序列同一性。优选地,序列变体与参考序列,即(参考)肿瘤抗原的片段共享至少60%、优选至少70%、优选至少75%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、仍更优选至少90%、特别优选至少95%,和最优选至少99%序列同一性。可以如下所述计算序列同一性。优选地,序列变体保留参考序列的特定功能,例如其作为表位的功能。特别地,氨基酸序列变体具有改变的序列,其中参考序列中的一个或多个氨基酸缺失或被取代,或者一个或多个氨基酸被插入参考氨基酸序列的序列中。例如,至少90%同一的变体序列具有每参考序列的100个氨基酸不超过10个变更,即缺失、插入或取代的任何组合。

[0045] 用于比较两个或更多个序列的同一性(相似性)的方法是本领域熟知的。两个序列同一的百分比可以例如使用数学算法测定。可以使用的数学算法的优选的但非限制性实例是Karlin et al.(1993),PNAS USA,90:5873-5877的算法。这种算法集成在BLAST系列程序中,例如BLAST或NBLAST程序(还参见Altschul et al.,1990,J.Mol.Biol.215,403-410或Altschul et al.(1997),Nucleic Acids Res,25:3389-3402),可通过万维网网站ncbi.nlm.nih.gov通过NCBI的主页访问)和FASTA(Pearson(1990),Methods Enzymol.183,63-98;Pearson and Lipman(1988),Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A85,2444-2448)。通过这些程序可以鉴定在一定程度上与其他序列同一的序列。而且,在Wisconsin序列分析程序包,

版本9.1(Devereux et al.,1984,Nucleic Acids Res.,387-395)中可获得的程序,例如程序BESTFIT和GAP,也可以用于测定两个多核苷酸之间的%同一性和两个(多)肽序列之间的%同一性。BESTFIT使用Smith and Waterman(1981),J.Mol.Biol.147,195-197的“局部同源性”算法并且发现两个序列之间的相似性的最佳单一区。

[0046] 通常用作参考序列的(参考)肿瘤抗原的“片段”包含至少7个,优选至少8个,最优选(至少)9个氨基酸或10个氨基酸。

[0047] 有利地,那些抗原肽可以是免疫原性化合物的形式,特别地用于预防或治疗癌症。

[0048] 因此,本发明还涉及免疫原性化合物,其包含与肿瘤抗原具有氨基酸相似性的抗原肽,该抗原肽选自SEQ ID N°1至106。换句话说,本发明提供具有如在SEQ ID N°1至106中任一种中列出的氨基酸序列的抗原肽。优选地,本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 17、31、32、51、52、55、56、59、68、89、94、100、101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成。还优选本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 26、28、47、51、52、55、56、77、93、101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成。更优选地,本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 51、52、55、56、101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成。甚至更优选地,本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 51、52、55或56中任一种中列出的氨基酸序列组成。甚至还更优选本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成。

[0049] 如本文实施例中所示,根据本发明的所述特异性抗原肽允许针对其自身产生强烈的免疫应答,并且最重要的是,允许针对与其具有氨基酸相似性的包含在IL13RA2肿瘤抗原中的肽产生强烈的免疫应答,尽管IL13RA2肿瘤抗原中包含的所述肽本身是耐受原的。

[0050] 不希望受任何特定理论的束缚,发明人认为,在体内施用包含本文所述的抗原肽的免疫原性组合物后测量的 γ 干扰素的高表达说明了抗原肽特异性T细胞的活化,并且尤其是抗原肽特异性CTL的活化,该细胞在本领域中已知是抗癌免疫应答的相关免疫效应物。

[0051] 除非本文另有定义,否则结合本发明使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则本文使用的命名法以及细胞和组织培养技术是本领域公知和常用的那些。

[0052] 这些技术在文献中充分地解释,比如Owen et al.(Kuby Immunology,7th, edition,2013-W.H.Freeman)和Sambrook et al.(Molecular cloning:Alaboratory manual 4th edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press-Cold Spring Harbor,NY, USA,2012)。

[0053] 然而,关于在整个当前说明书中不同术语的使用,以下定义更具体地适用。

[0054] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文中是指通过肽键(-NHCO-)连接在一起的任何长度的连续氨基酸链,并且其可在体外和/或体内在细胞中发挥结构和/或功能作用。它包括大小范围为2至至少约1000个氨基酸残基的氨基酸链。术语“肽”优选包括大小小于约30个氨基酸的氨基酸链,而术语“多肽”和“蛋白质”优选包括大小至少30个氨基酸的氨基酸链。术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用。如本领域所熟知的,肽、多肽和蛋白质可以由核酸编码。

[0055] 术语“抗原肽”是指肽,其优选与肿瘤蛋白具有氨基酸相似性,并且在施用它的受

试者中倾向于诱导或维持针对所述肽的免疫应答。

[0056] 术语“免疫原性化合物”是指包含如上定义的抗原肽的化合物,其还能够从施用它的受试者中诱导或维持针对所述肽的免疫应答。

[0057] 在一些实施方式中,免疫原性化合物包含至少一种抗原肽,或者可选地至少一种包含这种抗原肽的与蛋白质连接的化合物,其包括载体蛋白。

[0058] 载体蛋白通常是一种蛋白质,其能够运输货物,例如根据本发明的抗原肽。例如,载体蛋白可以将其货物运输穿过膜。在本发明的上下文中,载体蛋白特别地(还)包括能够引发针对与其连接的抗原肽的免疫应答的肽或多肽。载体蛋白是本领域已知的。

[0059] 在一些实施方式中,如本文所述的抗原肽或包含所述抗原肽的多肽可以例如通过共价或非共价键与具有免疫佐剂性质的蛋白质连接,例如序列MAKTIAYDEEARRGLERGLN(SEQ ID N°144)的HHD-DR3肽。

[0060] 可选地,这种载体肽或多肽可以以免疫佐剂的形式共同施用。

[0061] 优选地,如本文所述的抗原肽或包含抗原肽的多肽可以共同施用或例如通过共价或非共价键与具有免疫佐剂性质的蛋白质/肽连接,例如提供CD4+Th1细胞的刺激。虽然如本文所述的抗原肽优选结合MHC I类,但CD4+辅助表位可另外用于提供有效的免疫应答。Th1辅助细胞能够通过分泌干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-2 (IL-2) 和增强共刺激信号在DC和T细胞上的表达来维持有效的树突细胞(DC)活化和特异性CTL活化(Galaine et al., Interest of Tumor-Specific CD4T Helper 1 Cells for Therapeutic Anticancer Vaccine. Vaccines (Basel). 2015 Jun 30; 3(3):490-502)。

[0062] 例如,佐剂肽/蛋白质可以优选是非肿瘤抗原,其回忆免疫记忆或提供非特异性帮助或可以是特定肿瘤衍生的辅助肽。文献中已经描述了几种辅助肽,用于提供非特异性T细胞帮助,例如破伤风辅助肽、匙孔血蓝蛋白肽或PADRE肽(Adotévi et al., Targeting antitumor CD4 helper T cells with universal tumor-reactive helper peptides derived from telomerase for cancer vaccine. Hum Vaccin Immunother. 2013 May; 9(5):1073-7, Slingsluff CL, The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? Cancer J. 2011 Sep-Oct; 17(5):343-50)。因此,破伤风辅助肽、匙孔血蓝蛋白肽和PADRE肽是这种佐剂肽/蛋白质的优选实例。此外,特定肿瘤衍生的辅助肽是优选的。特定肿瘤衍生的辅助肽通常由MHC II类,特别是HLA-DR、HLA-DP或HLA-DQ呈递。特定肿瘤衍生的辅助肽可以是共享的过表达的肿瘤抗原序列的片段,例如HER2、NY-ESO-1、hTERT或IL13RA2。这些片段优选具有至少10个氨基酸的长度,更优选至少11个氨基酸,甚至更优选至少12个氨基酸,和最优选至少13个氨基酸。特别地,优选具有13至24个氨基酸长度的共享的过表达的肿瘤抗原的片段,例如HER2、NY-ESO-1、hTERT或IL13RA2。优选的片段与MHC II类结合,并且因此可以使用例如IEDB的MHC II类结合预测工具鉴定(免疫表位数据库和分析资源;由国家过敏和传染病研究所(卫生和公众服务部中国国家卫生研究院的一个组成部分)的合同支持;URL: <http://www.iedb.org/>; <http://tools.iedb.org/mhcii/>)。

[0063] 如本文所定义的组合物,其包含如上定义的免疫原性化合物,并且其还包含一种或多种免疫佐剂物质,在本说明书中也可称为“免疫原性组合物”或在一些实施方式中称为“疫苗组合物”。

[0064] 如本文所用,术语“免疫原性组合物”是指当将其施用于哺乳动物时,特别是当将其施用于人个体时,能够诱导或维持免疫应答的组合物,特别是诱导免疫应答的组合物。

[0065] 术语“核酸”、“核酸分子”、“核酸序列”、“多核苷酸”、“核苷酸序列”,其在本文中可互换使用,是指天然核苷酸(例如,A、T、G、C和U)或合成核苷酸的精确连续,其对应于单链或双链DNA或RNA,如cDNA、基因组DNA、核糖体DNA和所述DNA的转录产物,如RNA、rRNA、mRNA;反义DNA、反义RNA;互补RNA和/或DNA序列;具有或不具有表达元件、调节元件和/或启动子的RNA和/或DNA序列;载体;及其组合。确定可编码特定氨基酸序列的核苷酸序列在本领域技术人员的能力范围内。

[0066] 根据本发明的(多)肽和/或核酸可以通过本领域任何已知的方法制备,包括但不限于任何合成方法、任何重组方法、任何离体产生方法等,以及其任何组合。在如上所述的文献中充分解释了这些技术。

[0067] 在本发明的上下文中,根据本发明的抗原肽包含与肿瘤抗原具有相似性的抗原。如本文所用,术语“肿瘤抗原”包括肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原。一般而言,术语“肿瘤抗原”或“肿瘤蛋白”在本文中表示在肿瘤细胞中产生,并且有时也在正常细胞中产生的抗原物质,并且其可以在受试者中施用后引发免疫应答。在人类中,那些已根据其表达模式、功能或遗传起源进行分类,并且包括但不限于过表达的自身抗原(例如HER2/neu及其变体dHER2、p53、Wilm's Tumor 1、肝配蛋白受体、蛋白酶-3、粘蛋白-1、间皮素、EGFR、CD20);癌症-睾丸(CT)抗原(如MAGE-1、BAGE、GAGE、NY-ESO-1);突变抗原,也称为新抗原(如来自MUM-1、bcr-abl、ras、b-raf、p53、CDK-4、CDC27、 β -连环蛋白、 α -辅肌动蛋白(actenin)-4的突变体);组织特异性分化抗原(如黑素瘤抗原Melan A/MART-1、酪氨酸酶、TRP1/pg75、TRP2、gp100和神经节苷脂GM3、GM2、GD2和GD3;前列腺癌抗原PSMA、PSA和PAP);肿瘤病毒表达的病毒抗原(如HPV、EBV);癌胚抗原(如甲胎蛋白AFP和癌胚抗原CEA);和通用抗原(端粒酶、hTERT、生存素、mdm-2、CYP-1B1)(Srinivasan and Wolchok, Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines. J Transl Med. 2004 Apr 16; 2(1):12)。

[0068] 根据本文所述的发明的不同方面和实施方式,“受试者”或“宿主”优选指哺乳动物,最优选指人。所述受试者可能已经怀疑患有癌症,或者有患癌症的风险,例如黑素瘤、结肠直肠癌或透明细胞肾细胞癌。

[0069] “药学上可接受的赋形剂”在本文中是指药物级的化合物,其改善活性剂的递送、稳定性或生物利用度,并且可以被施用其的受试者代谢,并且对该受试者无毒。根据本发明的优选赋形剂包括通常用于药物产品的任何赋形剂,例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等,以及其组合。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖,多元醇如甘露醇、山梨糖醇,或氯化钠。药学上可接受的赋形剂可进一步包含少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂,或防腐剂。

[0070] “疫苗”在本文中是指能够刺激活生物体的免疫系统的组合物,从而通过预防或通过治疗提供针对有害抗原的防护。

[0071] 如本文所用,术语“癌症”是指恶性肿瘤。特别地,术语“癌症”在本文中是指一类疾病或病症的任何成员,其特征在于细胞的不受控制的分裂和这些细胞侵入其他组织的能力,或者通过侵入直接生长到邻近组织中,或者通过转移植入远端部位。转移定义为癌细胞

通过血流或淋巴系统转运的阶段。其包括食道癌、胃癌、十二指肠癌、小肠癌、阑尾癌、大肠癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、肛门癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌、脾癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、子宫癌、子宫内膜癌、卵巢癌、阴道癌、外阴癌、乳腺癌、肺癌、甲状腺癌、胸腺癌、脑癌、神经系统癌、口腔癌、皮肤癌、血癌、淋巴瘤、眼癌、骨癌、骨髓癌、肌肉癌等。在本发明的上下文中、黑素瘤、头颈癌、乳腺癌、结直肠癌或透明细胞肾细胞癌是优选的。

[0072] 如本文所用,术语“预防(preventing, prevention, prophylaxis或prevent)”通常意指在疾病或病症发作之前避免或最小化疾病或病症的发作或发展,而术语“治疗(treating, treatment或treat)”包括在其发作后减轻、改善或治愈疾病或病症(或疾病或病症的症状)。在本发明的上下文中,癌症的预防和/或治疗可导致例如受试者内肿瘤细胞的不增殖、弱、减少或延迟增殖,或完全或几乎完全消除受试者内的肿瘤细胞。术语“预防”包括“降低发生的可能性”或《降低再次发生的可能性》。

[0073] 如本文所用的“有效量”或“有效剂量”是提供期望效果的量。出于治疗目的,有效量是足以提供有益或期望的临床结果的量。本领域技术人员可以容易地确定给定应用的优选有效量,例如,考虑到受试者的尺寸、年龄、体重,要预防或治疗的癌症的类型,以及自从癌症开始以来的时间量。在本发明的上下文中,就预防或治疗而言,组合物的有效量是足以诱导针对癌症的体液和/或细胞介导的免疫应答的量。

[0074] 如本文所用,术语“包括”涵盖“由……组成”。

[0075] 遍及本说明书提供了另外的定义。

[0076] 通过参考以下详细描述,包括本发明的优选实施方式和本文包括的实施例,可以更容易地理解本发明。

[0077] 因此,本发明涉及免疫原性化合物,其包含与肿瘤抗原具有氨基酸相似性的抗原肽,该抗原肽选自SEQ ID N°1至106。换句话说,本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其具有如在SEQ ID N°1至106中任一种中列出的氨基酸序列。优选地,本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 17、31、32、51、52、55、56、59、68、89、94、100、101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成。还优选本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 26、28、47、51、52、55、56、77、93、101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成。更优选地,本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 51、52、55、56、101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成。甚至更优选地,本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 51、52、55或56中任一种中列出的氨基酸序列组成。甚至还更优选本发明提供(免疫原性化合物,其包括)抗原肽,其包括或由在SEQ ID NO 101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成。

[0078] 根据示例性实施方式,如上面限定的抗原肽是序列SEQ ID N°71的肽。

[0079] 根据一个实施方式,如上面所限定的抗原肽或包括所述抗原肽的多肽连接至载体蛋白,例如通过共价键或非共价键。

[0080] 根据一些实施方式,本发明涉及如上面所限定的免疫原性化合物,其包括式(I)的抗原肽:

[0081] PepNt-CORE-PepCt (I), 其中:

[0082] -“PepNt”由具有从0至30个氨基酸残基变化的氨基酸长度的多肽组成并且位于式

(I)的多肽的N末端;

[0083] -CORE由多肽组成,该多肽包括或可选地由选自SEQ ID NO:1至106(其包括SEQ ID N°71)的氨基酸序列,特别地在SEQ ID NO 26、28、47、51、52、55、56、77、93、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,或在17、31、32、51、52、55、56、59、68、89、94、100、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,比如在SEQ ID NO 51、52、55、56、101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成;和

[0084] -“PepCt”由具有从0至30个氨基酸残基变化的氨基酸长度的多肽组成并且位于式(I)的多肽的C末端。

[0085] 优选地,式(I)的抗原肽是融合肽或融合蛋白,特别地重组融合肽或蛋白。术语“重组”意思是其不天然存在。

[0086] 本发明进一步涉及装载有下列的纳米颗粒

[0087] -根据本发明的免疫原性化合物的至少一种,或

[0088] -根据本发明的抗原肽的至少一种;

[0089] 和,任选地,佐剂。

[0090] 本发明进一步涉及包括下列的免疫原性组合物

[0091] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0092] -根据本发明的抗原肽,

[0093] -根据本发明的纳米颗粒,或

[0094] -根据本发明的核酸,

[0095] 和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0096] 免疫原性组合物可以进一步包括一种或多种免疫刺激剂。

[0097] 特别地,所述免疫刺激剂选自免疫佐剂和抗原呈递细胞。

[0098] 更特别地,抗原呈递细胞可以由树突细胞组成。

[0099] 特别地,免疫原性组合物可以包括

[0100] (i)根据本发明的两种不同的免疫原性化合物;

[0101] (ii)根据本发明的两种不同的抗原肽;

[0102] (iii)根据本发明的两种不同的纳米颗粒;或

[0103] (iv)根据本发明的两种不同的核酸。

[0104] 在该背景下,两种不同的组分具体指根据本发明的不同的抗原肽(其由免疫原性化合物、纳米颗粒和/或核酸组成)。这两种不同的组分,特别是根据本发明的两种不同的抗原肽(包含在两种不同的组分中),优选地涉及相同类型的癌症,例如与该癌症相关联的相同或不同的抗原和/或在与该癌症相关联的抗原内的相同或不同(参考)表位。更优选地,两种不同组分,特别是根据本发明的两种不同的抗原肽(包含在两种不同的组分中),涉及相同的肿瘤(相关或特异性)抗原。两种不同组分,特别是根据本发明的两种不同的抗原肽(包含在两种不同的组分中),还可以涉及相同或不同(参考)肿瘤(相关或特异性)抗原(一种或多种)。

[0105] 本发明进一步涉及下列的任一种

[0106] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0107] -根据本发明的抗原肽,

- [0108] -根据本发明的(宿主)细胞,
- [0109] -根据本发明的纳米颗粒,
- [0110] -根据本发明的核酸,或
- [0111] -根据本发明的免疫原性组合物,
- [0112] 其用于预防或治疗癌症。
- [0113] 在不同类型的癌症中,更特别考虑用于治疗 and/或预防的那些在下面的表1B中详述,特别考虑到靶向肿瘤抗原。
- [0114] 表1B:与每种基因相关联的治疗适应症的列表

基因名称 (表 1A)	涉及基因的癌症
PLIN2	与 PLIN2 相关联的疾病包括富脂质性癌、肠病性肢皮炎和结直肠癌
ALDH1A1	与 ALDH1A1 相关联的疾病包括肺癌(包括肺腺瘤)和乳腺癌
AFP	与 AFP 相关联的疾病包括肝癌、肝细胞癌
PTPRC	乳腺癌
CEACAM5	与 CEACAM5 相关联的疾病包括肠癌、结直肠癌、脐尿管癌、胃肠癌和胰腺癌
ENAH	乳腺癌
EZH2	与 EZH2 相关联的疾病包括许多形式的癌症, 包括肺癌和成淋巴细胞瘤
PMEL	黑素瘤
ERBB2	与 ERBB2 相关联的疾病包括许多癌症, 包括乳腺癌、胶质瘤和卵巢癌
IL13RA2	与 IL13RA2 相关联的疾病包括结直肠癌、卵巢癌、睾丸癌、肾细胞癌、前列腺癌、胶质瘤、头颈癌、星形细胞瘤、黑素瘤和乳腺癌转移
MAGEA1	与 MAGEA1 相关联的疾病包括黑素瘤和肝血管瘤、非小细胞肺癌、胃癌和黑素瘤
MAGEA3	与 MAGEA3 相关联的疾病包括许多癌症, 包括肾细胞癌、膀胱癌、黑素瘤、非小细胞肺癌、血液系统恶性肿瘤等
MAGEA4	与 MAGEA4 相关联的疾病包括黑色素瘤和睾丸白血病(testicular leukemia)、甲状腺癌、乳腺癌(包括雌激素受体阴性乳腺癌)和非小细胞肺癌
MAGEC1	与 MAGEC1 相关联的疾病包括乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌
MAGEC2	与 MAGEC2 相关联的疾病包括肝细胞癌、黑素瘤、胃肠道间质瘤、乳腺癌转移和前列腺癌
SCGB2A2	与 SCGB2A2 相关联的疾病包括乳腺癌
MLANA	与 MLANA 相关联的疾病包括黑素瘤
MDK	与 MDK 相关联的疾病包括许多癌症类型, 包括乳腺癌、甲状腺癌、胰腺癌、神经母细胞瘤、恶性胶质瘤、维尔姆斯瘤, 甲状腺乳头状癌、结直肠癌、肝癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、食道癌、胃癌和前列腺癌
MMP2	与 MMP2 相关联的疾病包括许多类型的癌症, 包括膀胱癌、结直肠癌、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌和前列腺癌
CTAG1B	与 CTAG1B 相关联的疾病包括许多癌症, 包括乳腺癌、甲状腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肉瘤、肺癌、头颈癌、前列腺癌和膀胱癌
ACPP	与 ACPP 相关联的疾病包括前列腺癌、卵巢癌和前列腺腺瘤
STEAP1	与 STEAP1 相关联的疾病包括乳腺癌
TAG1	与 TAG1 相关联的疾病包括脑癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、咽癌、舌癌、膀胱癌(包括膀胱尿路上皮癌)
TYR	与 TYR 相关联的疾病包括皮肤癌和黑素瘤

[0115]

[0116] 因此,根据一个实施方式,本发明涉及本文描述的抗原肽和免疫原性化合物中的任一种,以及本文描述的免疫原性组合物中的任一种,其用于预防或治疗选自表1B的癌症。

[0117] 本发明进一步涉及编码与肿瘤抗原具有氨基酸相似性的抗原肽的核酸,其中肽选自:

[0118] -选自SEQ ID N°1至106的抗原肽;和/或

[0119] -式(I)或(Ia)或(Ib)的抗原肽,如本文所描述的。

[0120] 特别地,如上面所限定的核酸可以编码抗原肽,其选自与IL13RA2具有氨基酸相似性的肽,其包括SEQ ID N°71。

[0121] 本发明还涉及在需要其的受试者中预防或治疗癌症或引发、增强或延长抗肿瘤应答的方法,包括向受试者施用根据本发明的抗原肽或根据本发明的免疫原性化合物或根据本发明的免疫原性组合物或根据本发明的纳米颗粒或根据本发明的核酸或根据本发明的联合物。

[0122] 而且,本发明涉及编码如上面所限定的抗原肽或免疫原性化合物的核酸。

[0123] 而且,本发明还涉及根据本发明的两种不同的免疫原性化合物的联合物,其用于预防和/或治疗癌症。

[0124] 而且,本发明还涉及根据本发明的两种不同的抗原肽的联合物,其用于预防和/或治疗癌症。

[0125] 而且,本发明还涉及根据本发明的两种不同的纳米颗粒的联合物,其用于预防和/或治疗癌症。

[0126] 而且,本发明还涉及根据本发明的两种不同的核酸的联合物,其用于预防和/或治疗癌症。

[0127] 在某些实施方式中,根据本发明使用的联合物的两种不同的组分包含在相同或不同的组合物中。

[0128] 在某些实施方式中,根据本发明使用的联合物的两种不同的组分经由相同或不同的施用途径施用。

[0129] 在某些实施方式中,根据本发明使用的联合物的两种不同的组分在大约相同时间(同时)或连续地被施用。

[0130] 而且,本发明还涉及包括下列的试剂盒

[0131] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0132] -根据本发明的抗原肽,

[0133] -根据本发明的(宿主)细胞,

[0134] -根据本发明的纳米颗粒,

[0135] -根据本发明的核酸,或

[0136] -根据本发明的免疫原性组合物。

[0137] 抗原肽、免疫原性化合物、核酸、纳米颗粒和细胞

[0138] 除非提及相反方面,否则涉及《抗原肽》的所有章节也适用于《免疫原性化合物》。

[0139] 下面的表1A中列出了根据本发明的抗原肽,其还提供了关于相应的“参考”人肿瘤抗原(表位)以及编码它们的基因的名称的信息,并以非限制性方式提供了它们在肿瘤中的报告的定位。N.A. = 没有得到。序列SEQ ID N°1至106指的是抗原肽。

[0140] 表1A. 根据本发明的抗原肽

[0141]

SEQ ID NO.	编码抗原的基因	抗原肽	参考	肿瘤定位
1	PLIN2	SLAGTITGV	SVASTITGV	脂肪细胞、巨噬细胞
2	ALDH1A1	LLMKLADLV	LLYKLADLI	粘膜、胶质细胞
3	ALDH1A1	LLYKIADLV	LLYKLADLI	粘膜、胶质细胞
4	AFP	SLALSIVLRV	QLAVSVILRV	肝脏
5	AFP	SLAVSVILRA	QLAVSVILRV	肝脏
6	PTPRC	KLLDAVISL	KFLDALISL	增殖细胞、睾丸、多种组织(低水平)
7	PTPRC	KLLDALLSL	KFLDALISL	增殖细胞、睾丸、多种组织(低水平)
8	PTPRC	KMLDALIDL	KFLDALISL	增殖细胞、睾丸、多种组织(低水平)
9	PTPRC	KILDSLISL	KFLDALISL	增殖细胞、睾丸、多种组织(低水平)
10	PTPRC	KFLDALIGV	KFLDALISL	增殖细胞、睾丸、多种组织(低水平)
11	PTPRC	KFLDSLISV	KFLDALISL	增殖细胞、睾丸、多种组织(低水平)
12	CEACAM5	GVLGVALV	GVLVGVALI	肠癌
13	CEACAM5	GMLVGVALI	GVLVGVALI	肠癌
14	CEACAM5	GLLMGVALI	GVLVGVALI	肠癌
15	CEACAM5	GVLVGLALV	GVLVGVALI	肠癌
16	CEACAM5	GVLGIALI	GVLVGVALI	肠癌
17	CEACAM5	GILVGVALV	GVLVGVALI	肠癌
18	CEACAM5	GLLIGVALI	GVLVGVALI	肠癌
19	CEACAM5	GVLLGVALV	GVLVGVALI	肠癌
20	CEACAM5	GVLTGIALI	GVLVGVALI	肠癌
21	CEACAM5	GILVGLALI	GVLVGVALI	肠癌
22	CEACAM5	GVIVGVALV	GVLVGVALI	肠癌
23	CEACAM5	GVFVGLALI	GVLVGVALI	肠癌
24	CEACAM5	GVLIGVALV	GVLVGVALI	肠癌
25	CEACAM5	YLFHGSWYK	HLFGYSWYK	肠癌
26	ENAH	TMNGKSSPV	TMNGSKSPV	乳房、前列腺基质和结直肠、胰腺、子宫内膜的上皮
27	EZH2	FMAEDELTL	FMVEDETVL	遍在的(低水平)
28	PMEL	ITSDVPFSV	ITDQVPFSV	黑素瘤
29	ERBB2	IMSAVIGIL	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
30	ERBB2	ILSAVIGIL	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
31	ERBB2	ILSAVVGVL	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
32	ERBB2	IMSAVVGIL	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
33	ERBB2	FISAVVGVL	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
34	ERBB2	ILSAVVGIL	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
35	ERBB2	IISAVIGIV	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
36	ERBB2	IISAIVGLL	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
37	ERBB2	IISAIVGIV	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
38	ERBB2	IISAVVGVV	IISAVVGIL	遍在的(低水平)

[0142]

SEQ ID NO.	编码抗原的基因	抗原肽	参考	肿瘤定位
39	ERBB2	IISAVVGIV	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
40	ERBB2	LISAVVGLL	IISAVVGIL	遍在的(低水平)
41	ERBB2	ILYGGAYSL	ILHNGAYSL	遍在的(低水平)
42	ERBB2	KLYGSLAFL	KIFGSLAFL	遍在的(低水平)
43	ERBB2	KIFGTLAFM	KIFGSLAFL	遍在的(低水平)
44	ERBB2	PLADIISAV	PLTSIISAV	遍在的(低水平)
45	ERBB2	PLASIFSAV	PLTSIISAV	遍在的(低水平)
46	ERBB2	PLSSILSAV	PLTSIISAV	遍在的(低水平)
47	ERBB2	RLLEETDLV	RLLQETELV	遍在的(低水平)
48	ERBB2	TLNDITGYL	TLEEITGYL	遍在的(低水平)
49	ERBB2	TLEEITNFL	TLEEITGYL	遍在的(低水平)
50	ERBB2	TVDEITGYL	TLEEITGYL	遍在的(低水平)
51	ERBB2	VMLGVVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
52	ERBB2	VLLGVVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
53	ERBB2	MVLGVVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
54	ERBB2	VMLGIVFGI	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
55	ERBB2	VMLGVVFGI	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
56	ERBB2	ILLGVVFGI	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
57	ERBB2	VLLGVIFGI	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
58	ERBB2	VLFGVVFGI	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
59	ERBB2	IVLGVVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
60	ERBB2	VVLGVLFVGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
61	ERBB2	VVLGVMFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
62	ERBB2	VVLGVIFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
63	ERBB2	VVLGAVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
64	ERBB2	VVLGLVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
65	ERBB2	VVIGVVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
66	ERBB2	VVLGIVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
67	ERBB2	TVLGVVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
68	ERBB2	VVLGVVFGV	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
69	ERBB2	AILGVVFGI	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
70	ERBB2	AVLGVMFGI	VVLGVVFGI	遍在的(低水平)
71	IL13RA2	FLPFGFILV	WLPFGFILI	NA
72	MAGEA1	KMLHYVIKV	KVLEYVIKV	NA
73	MAGEA3	EMNPIGHLV	EVDPIGHLV	NA
74	MAGEA3	RVDPIGNLY	EVDPIGHLV	NA
75	MAGEA3	VTELVNFLL	VAELVHFLL	NA
76	MAGEA4	HVDPATNTY	EVDPASNTY	NA
77	MAGEC1	KLVEWLAML	KVVEFLAML	NA
78	MAGEC1	SLSYALLSL	SFSYTLLSL	NA
79	MAGEC1	SISHTLLSL	SFSYTLLSL	NA
80	MAGEC1	VSSFFSYVF	VSSFFSYTL	NA
81	MAGEC2	ALNDVEEKV	ALKDVEERV	NA
82	MAGEC2	ALSDVEDRV	ALKDVEERV	NA
83	MAGEC2	ALSDAEERV	ALKDVEERV	NA
84	MAGEC2	ATSTLMLVF	ASSTLYLVF	NA
85	MAGEC2	TTSTLYLVF	ASSTLYLVF	NA
86	SCGB2A2	PLFESVISK	PLENVISK	乳腺癌
87	SCGB2A2	PLETTISK	PLENVISK	乳腺癌
88	MLANA	ILTAILGVL	ILTVILGVL	黑色素瘤

SEQ ID NO.	编码抗原的基因	抗原肽	参考	肿瘤定位
89	MLANA	ILTVILGVV	ILTVILGVL	黑素瘤
90	MDK	ALFAVTSAV	ALLALTSAV	遍在的(低水平)
91	MDK	ALFALTSAA	ALLALTSAV	遍在的(低水平)
92	MMP2	SLPPDVQEV	GLPPDVQRV	遍在的
93	MMP2	SLPPDVQQV	GLPPDVQRV	遍在的
94	CTAG1B	VAMPFATPV	LAMPFATPM	NA
95	ACPP	ALDVYSALL	ALDVYNGLL	前列腺癌
96	ACPP	ALDMYNALL	ALDVYNGLL	前列腺癌
97	ACPP	ALDIYNSLL	ALDVYNGLL	前列腺癌
98	ACPP	FLFFLFFFL	FLFLLFFWL	前列腺癌
99	ACPP	TLMSSMTNM	TLMSAMTNL	前列腺癌
100	STEAP1	MLAVFLPMV	MIAVFLPIV	前列腺癌
101	STEAP1	MLAVFLPLV	MIAVFLPIV	前列腺癌
102	STEAP1	YLAVFLPIV	MIAVFLPIV	前列腺癌
103	TAG1	SLGYLFLLM	SLGWLFLLL	NA
104	TAG1	SLGFLFLLM	SLGWLFLLL	NA
105	TAG1	SLGFLFLLF	SLGWLFLLL	NA
106	TYR	MLFAVLMCL	MLLAVLYCL	黑素瘤

[0144] 可以基于参考肿瘤抗原(比如衍生自IL13RA2的肿瘤抗原)的序列进一步限定那106个抗原肽序列。

[0145] 因而,本发明涉及包括与肿瘤抗原具有氨基酸相似性的抗原肽的免疫原性化合物,该抗原肽选自SEQ ID N°1至106,其包括:

[0146] -与由基因PLIN2编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°1;

[0147] -与由基因ALDH1A1编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°2-3;

[0148] -与由基因AFP编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°4-5;

[0149] -与由基因PTPRC编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°6-11;

[0150] -与由基因CEACAM5编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°12-25;

[0151] -与由基因ENAH编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°26;

[0152] -与由基因EZH2编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°27;

[0153] -与由基因PMEL编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°28;

[0154] -与由基因ERBB2编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°29-70;

[0155] -与由基因IL13RA2编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°71;

- [0156] -与由基因MAGEA1编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°72;
- [0157] -与由基因MAGEA3编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°73-75;
- [0158] -与由基因MAGEA4编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°76;
- [0159] -与由基因MAGEC1编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°77-80;
- [0160] -与由基因MAGEC2编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°81-85;
- [0161] -与由基因SCGB2A2编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°86-87;
- [0162] -与由基因MLANA编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°88-89;
- [0163] -与由基因MDK编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°90-91;
- [0164] -与由基因MMP2编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°92-93;
- [0165] -与由基因CTAG1B编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°94;
- [0166] -与由基因ACPP编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°95-99;
- [0167] -与由基因STEAP1编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°100-102;
- [0168] -与由基因TAG1编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°103-105;
- [0169] -与由基因TYR编码的肿瘤抗原具有氨基酸相似性的肽,所述抗原肽选自SEQ ID N°106。
- [0170] 因此,可以根据它们的参考肽将那106个抗原肽进一步分类在多个不同的家族中:
- [0171] -家族《SVASTITGV》(SEQ ID N°107),其家族包括SEQ ID N°1的氨基酸序列;
- [0172] -家族《LLYKLADLI》(SEQ ID N°108),其家族包括SEQ ID N°2-3的氨基酸序列;
- [0173] -家族《QLAVSVILRV》(SEQ ID N°109),其家族包括SEQ ID N°4-5的氨基酸序列;
- [0174] -家族《KFLDALISL》(SEQ ID N°110),其家族包括SEQ ID N°6-11的氨基酸序列;
- [0175] -家族《GVLVGVALI》(SEQ ID N°111),其家族包括SEQ ID N°12-24的氨基酸序列;
- [0176] -家族《HLFGYSWYK》(SEQ ID N°112),其家族包括SEQ ID N°25的氨基酸序列;
- [0177] -家族《TMNGSKSPV》(SEQ ID N°113),其家族包括SEQ ID N°26的氨基酸序列;
- [0178] -家族《FMVEDETVL》(SEQ ID N°114),其家族包括SEQ ID N°27的氨基酸序列;
- [0179] -家族《ITDQVPFSV》(SEQ ID N°115),其家族包括SEQ ID N°28的氨基酸序列;
- [0180] -家族《IISAVVGIL》(SEQ ID N°116),其家族包括SEQ ID N°29-40的氨基酸序列;

- [0181] -家族《ILHNGAYSL》(SEQ ID N°117),其家族包括SEQ ID N°41的氨基酸序列;
- [0182] -家族《KIFGSLAFL》(SEQ ID N°118),其家族包括SEQ ID N°42-43的氨基酸序列;
- [0183] -家族《PLTSIISAV》(SEQ ID N°119),其家族包括SEQ ID N°44-46的氨基酸序列;
- [0184] -家族《RLLQETELV》(SEQ ID N°120),其家族包括SEQ ID N°47的氨基酸序列;
- [0185] -家族《TLEEITGYL》(SEQ ID N°121),其家族包括SEQ ID N°48-50的氨基酸序列;
- [0186] -家族《VVLGVVFGI》(SEQ ID N°122),其家族包括SEQ ID N°51-70的氨基酸序列;
- [0187] -家族《WLPFGFILI》(SEQ ID N°123),包括序列SEQ ID N°71;
- [0188] -家族《KVLEYVIKV》(SEQ ID N°124),其家族包括SEQ ID N°72的氨基酸序列;
- [0189] -家族《EVDPIGHLY》(SEQ ID N°125),其家族包括SEQ ID N°73-74的氨基酸序列;
- [0190] -家族《VAELVHFLI》(SEQ ID N°126),其家族包括SEQ ID N°75的氨基酸序列;
- [0191] -家族《EVDPASNTY》(SEQ ID N°127),其家族包括SEQ ID N°76的氨基酸序列;
- [0192] -家族《KVVEFLAML》(SEQ ID N°128),其家族包括SEQ ID N°77的氨基酸序列。
- [0193] -家族《SFSYTLISL》(SEQ ID N°129),其家族包括SEQ ID N°78-79的氨基酸序列。
- [0194] -家族《VSSFFSYTL》(SEQ ID N°130),其家族包括SEQ ID N°80的氨基酸序列。
- [0195] -家族《ALKDVEERV》(SEQ ID N°131),其家族包括SEQ ID N°81-83的氨基酸序列。
- [0196] -家族《ASSTLYLVF》(SEQ ID N°132),其家族包括SEQ ID N°84-85的氨基酸序列。
- [0197] -家族《PLENVISK》(SEQ ID N°133),其家族包括SEQ ID N°86-87的氨基酸序列。
- [0198] -家族《ILTVILGVL》(SEQ ID N°134),其家族包括SEQ ID N°88-89的氨基酸序列。
- [0199] -家族《ALLALTSAV》(SEQ ID N°135),其家族包括SEQ ID N°90-91的氨基酸序列。
- [0200] -家族《GLPPDVQRV》(SEQ ID N°136),其家族包括SEQ ID N°92-93的氨基酸序列。
- [0201] -家族《LAMPFATPM》(SEQ ID N°137),其家族包括SEQ ID N°94的氨基酸序列。
- [0202] -家族《ALDVYNGLL》(SEQ ID N°138),其家族包括SEQ ID N°95-97的氨基酸序列。
- [0203] -家族《FLFLLFFWL》(SEQ ID N°139),其家族包括SEQ ID N°98的氨基酸序列。
- [0204] -家族《TLMSAMTNL》(SEQ ID N°140),其家族包括SEQ ID N°99的氨基酸序列。
- [0205] -家族《MIAVFLPIV》(SEQ ID N°141),其家族包括SEQ ID N°100-102的氨基酸序列。
- [0206] -家族《SLGWFLLLL》(SEQ ID N°142),其家族包括SEQ ID N°103-105的氨基酸序列。
- [0207] -家族《MLLAVLYCL》(SEQ ID N°143),其家族包括SEQ ID N°106的氨基酸序列。
- [0208] 根据优选的实施方式,本发明的抗原肽选自肽或多肽,其包括或由氨基酸序列SEQ ID NO:71组成。
- [0209] 根据示例性实施方式,本发明的抗原肽是肽或多肽,其包括或由SEQ ID NO:71的氨基酸序列组成。
- [0210] 更优选地,本发明的抗原肽选自肽或多肽,其包括或由根据SEQ ID NO 17、31、32、51、52、55、56、59、68、89、94、100、101或102中任一种的氨基酸序列组成。还更优选本发明的抗原肽选自肽或多肽,其包括或由根据SEQ ID NO 26、28、47、51、52、55、56、77、93、101或102中任一种的氨基酸序列组成。甚至更优选地,本发明的抗原肽选自肽或多肽,其包括或由根据SEQ ID NO 51、52、55、56、101或102中任一种的氨基酸序列组成。仍更优选地,本发明的抗原肽选自肽或多肽,其包括或由根据SEQ ID NO 51、52、55或56中任一种的氨基酸序

列组成。还仍更优选本发明的抗原肽选自肽或多肽,其包括或由根据SEQ ID NO 101或102中任一种的氨基酸序列组成。

[0211] 根据一些实施方式,免疫原性化合物包括或由式(I)的抗原肽组成:

[0212] PepNt-CORE-PepCt (I), 其中:

[0213] -“PepNt”由具有从0至500个氨基酸残基变化的氨基酸长度的多肽组成并且位于式(I)的多肽的N末端;

[0214] -CORE由多肽组成,该多肽包括或可选地由选自SEQ ID NO:1至106(其包括SEQ ID N°71)的氨基酸序列,特别地在SEQ ID NO 26、28、47、51、52、55、56、77、93、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,或在17、31、32、51、52、55、56、59、68、89、94、100、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,比如在SEQ ID NO 51、52、55、56、101或102中任一种中列出的氨基酸序列组成;和

[0215] -“PepCt”由具有从0至500个氨基酸残基变化的氨基酸长度的多肽组成并且位于式(I)的多肽的C末端。

[0216] 根据一个特别的实施方式,免疫原性化合物包括或由式(Ia)或(Ib)的抗原肽组成:

[0217] PepNt-CORE (Ia);或

[0218] CORE-PepCt (Ib)。

[0219] 其中“PepNt”和“PepCt”和CORE如上面所限定。

[0220] 根据一些甚至更特别的实施方式,如上面所限定的抗原肽或免疫原性化合物包括9至1000个氨基酸;其包括9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900和1000个氨基酸。

[0221] 根据所述实施方式,“PepNt”和“PepCt”的长度,如果适用,被相应地限定。

[0222] 因而,“PepNt”和“PepCt”,如上面所限定,可以包括0至500个氨基酸残基;其包括0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450和500个氨基酸残基。

[0223] 用于生成本发明的免疫原性化合物的载体分子的类型,例如包含与载体分子连接的式(I)的肽或由其组成的载体分子的类型,是本领域技术人员的一般知识。载体分子的功能是提供细胞因子辅助(或T细胞辅助)以增强针对肿瘤抗原的免疫应答。

[0224] 优选地,抗原肽与载体分子连接,特别地与载体蛋白连接,优选通过共价或非共价键连接。肽任选结合的载体分子可选自各种已知的载体。用于疫苗目的的载体分子的实例包括蛋白质,例如人或牛血清白蛋白和匙孔血蓝蛋白(KLH)和脂肪酸。式(I)的抗原肽可共价连接的载体分子的其他实施方式包括细菌毒素或类毒素,例如白喉、霍乱、大肠杆菌热不

稳定或破伤风类毒素,脑膜炎奈瑟氏球菌外膜蛋白(欧洲专利申请号EP0372501),合成肽(欧洲专利申请号EP0378881和EP0427347),热休克蛋白(PCT申请号W093/17712),百日咳蛋白质(PCT申请号W098/58668),来自流感嗜血杆菌的蛋白质D(PCT申请号W000/56360)和来自艰难梭状芽胞杆菌(*C.difficile*)的毒素A或B(国际专利申请W000/61761)。

[0225] 根据一个实施方式,载体蛋白或载体肽是HHD-DR3载体肽MAKTIAYDEEARRGLERGLN (SEQ ID N°144)。

[0226] 根据一个实施方式,“PepNt”和/或“PepCt”可以对应于载体蛋白或载体肽,比如HHD-DR3载体肽MAKTIAYDEEARRGLERGLN (SEQ ID N°144)。

[0227] 根据一个实施方式,免疫原性化合物包含序列SEQ ID N°144的载体肽或由其组成,该载体肽与序列SEQ ID N°71的抗原肽的N末端共价连接。

[0228] 更优选地,载体蛋白或载体肽是具有免疫佐剂性质的蛋白质/肽,例如提供如本文所述的CD4+Th1细胞的刺激。其优选实例是非肿瘤抗原,其回忆免疫记忆或提供非特异性辅助或可以是特定肿瘤衍生的辅助肽,例如破伤风辅助肽、匙孔血蓝蛋白肽或PADRE肽。另一个优选的实例是特定肿瘤衍生的辅助肽,其可以由MHC II呈递,特别是通过HLA-DR、HLA-DP或HLA-DQ,例如共享的过表达的肿瘤抗原的片段,例如,HER2、NY-ESO-1、hTERT或IL13RA2,如上所述。

[0229] 因此,“PepNt”和/或“PepCt”可以优选地对应于具有免疫佐剂性质的这种蛋白质/肽,例如提供如本文所述的CD4+Th1细胞的刺激。

[0230] 此外,免疫原性化合物包含或由具有免疫佐剂性质的这种蛋白质/肽组成,例如提供如本文所述的CD4+Th1细胞的刺激,这种蛋白质/肽与抗原肽的N末端共价连接,该抗原肽具有选自SEQ ID NO:1至106(其包括SEQ ID N°71)的氨基酸序列,特别地在SEQ ID NO 26、28、47、51、52、55、56、77、93、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,或在17、31、32、51、52、55、56、59、68、89、94、100、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,比如在SEQ ID NO 51、52、55、56、101或102中任一种中列出的氨基酸序列。

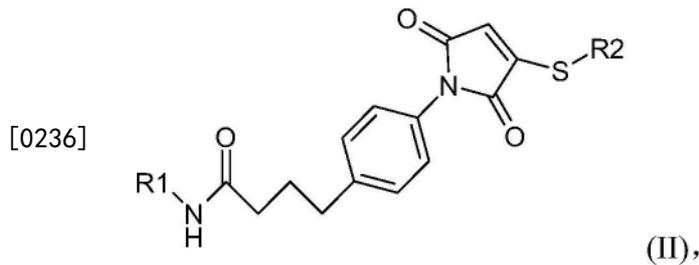
[0231] 根据一个实施方式,所述抗原肽通过接头部分与载体分子共价结合。

[0232] 所述受限制的接头剂家族包括或甚至由名为GMBS、硫代-GMBS、SMPB和硫代-SMPB的接头剂组成。

[0233] 在如上定义的免疫原性化合物的一些实施方式中,所述接头剂选自GMBS(N-[γ -马来酰亚胺基丁酰基-氧基]琥珀酰亚胺酯)、硫代-GMBS(N-[γ -马来酰亚胺基丁酰基-氧基]硫代琥珀酰亚胺酯)、SMPB(琥珀酰亚胺基4-[对马来酰亚胺基苯基]丁酸酯)和硫代-SMPB(硫代琥珀酰亚胺基4-[对马来酰亚胺基苯基]丁酸酯)。

[0234] 用一般接头剂,和更具体地用选自GMBS、硫代-GMBS、SMPB和硫代-SMPB的接头剂缀合两种蛋白质的方法是本领域技术人员熟知的。说明性地,这些方案公开在由Pierce Company (Illinois, USA) 公开提供的传单中。GMBS、硫代-GMBS、SMPB和硫代-SMPB由含有N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯基和马来酰亚胺基二者的异双功能接头剂组成。使用GMBS、硫代-GMBS、SMPB或硫代-SMPB的缀合通常通过两步程序进行。在第一步中,含胺的蛋白质与pH 7-9的几倍摩尔过量的接头剂反应以形成酰胺键,然后通常通过脱盐或透析除去过量的未反应的接头剂。在第二步中,加入含巯基的分子(例如式(I)的肽)以与已附着于第一蛋白质的马来酰亚胺基在pH 6.5-7.5下反应,以形成稳定的硫醚键。

[0235] 使用SMPB或硫代-SMPB作为接头剂将式(I)的肽与含胺的载体蛋白共价连接,得到下式(II)的缀合物:

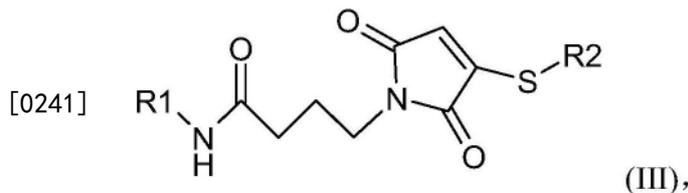


[0237] 其中:

[0238] -R1由含胺的载体蛋白的一个反应性基团组成,并且其中与其连接的NH基团衍生自(i)位于含胺的载体蛋白的N末端的 α 氨基或(ii)来自含胺的载体蛋白的赖氨酸(K)氨基酸残基的侧链氨基。

[0239] -R2由式(I)的肽组成,并且其中与其连接的硫(S)原子衍生自位于式(I)的肽的N末端或C末端的半胱氨酸残基的巯基(SH)基团。在一些实施方式中,巯基部分可以是非天然氨基酸的一部分,或存在于式(I)的肽末端的任何其他分子。

[0240] 使用GMBS或硫代-GMBS作为接头剂将式(I)的肽与含胺的载体蛋白(特别是CRM197载体蛋白)共价连接,得到下式(III)的缀合物:



[0242] 其中:

[0243] -R1由含胺的载体蛋白的一个反应性基团组成,并且其中与其连接的NH基团衍生自(i)位于含胺的载体蛋白的N末端的 α 氨基或(ii)来自含胺的载体蛋白的赖氨酸(K)氨基酸残基的侧链氨基。

[0244] -R2由式(I)的肽组成,并且其中与其连接的硫(S)原子衍生自位于式(I)的肽的N末端或C末端的半胱氨酸残基的巯基(SH)基团。在一些实施方式中,巯基部分可以是非天然氨基酸的一部分,或存在于式(I)的肽末端的任何其他分子。

[0245] 在进一步方面,本发明提供了装载有根据本发明的至少一种免疫原性化合物或根据本发明的至少一种抗原肽的细胞。优选的抗原肽是肽或多肽,其具有在SEQ ID NO 26、28、47、51、52、55、56、77、93、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,或在17、31、32、51、52、55、56、59、68、89、94、100、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,比如在SEQ ID NO 51、52、55、56、101或102中任一种中列出的氨基酸序列。其组合也是优选的,即,装载有根据本发明的不同的抗原肽(或装载有各自免疫原性化合物(一种或多种))的细胞。

[0246] 优选的细胞是抗原呈递细胞(APC),更优选地树突细胞(DC)。

[0247] 抗原呈递细胞(APC)是特别令人感兴趣的,因为它们的主要功能是处理抗原并将其在细胞表面上呈递给免疫系统的T细胞,从而在体内启动和调节T细胞应答。在本发明的上下文中,优选APC装载有根据本发明的抗原肽(一种或多种)和/或免疫原性化合物(一种或多种),这可以通过在体外用所述抗原肽(一种或多种)和/或免疫原性化合物(一种或多

种)暴露APC来完成(Rizzo MM,Alaniz L,Mazzolini G.Ex vivo loading of autologous dendritic cells with tumor antigens.Methods Mol Biol.2014;1139:41-4;Rolinski J,Hus I.Breaking immunotolerance of tumors:a new perspective for dendritic cell therapy.J Immunotoxicol.2014Oct;11(4):311-8)。

[0248] 根据本发明的优选的抗原呈递细胞是树突细胞(DC)。将根据本发明的至少一种抗原肽或免疫原性化合物与树突细胞组合确实可以是有利的,因为那些是最有效的抗原呈递细胞并且据报道在癌症患者中经常是功能缺陷的。本领域技术人员可以从健康的相容供体(即树突细胞是HLA相关的)或者患者本身容易地获得树突细胞,条件是它们是功能性的(即树突细胞是自体的),例如通过从外周血中直接分离,或通过从外周血细胞如CD14+单核细胞或CD34+造血前体衍生(Figdor CG,de Vries IJ,Lesterhuis WJ,Melief CJ.Dendritic cell immunotherapy:mapping the way.Nat Med.2004May;10(5):475-80)。实际上,树突细胞可以通过其表面标志物(例如S100、p55、CD83和/或OX62)与外周血的其他细胞区分开,并且因此可以使用本领域熟知的细胞培养技术基于所述标志物分离和纯化。

[0249] 在进一步方面,本发明提供了编码根据本发明的抗原肽或根据本发明的免疫原性化合物的核酸,其中免疫原性化合物是肽或蛋白质。优选地,抗原肽是肽或多肽,其具有在SEQ ID NO 26、28、47、51、52、55、56、77、93、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,或在17、31、32、51、52、55、56、59、68、89、94、100、101或102中任一种中列出的氨基酸序列,比如在SEQ ID NO 51、52、55、56、101或102中任一种中列出的氨基酸序列;和/或如上面描述的式(I)的抗原肽。

[0250] 核酸优选包含单链、双链或部分双链核酸,优选选自基因组DNA、cDNA、RNA、反义DNA、反义RNA、核酶、具有或不具有表达元件的互补RNA/DNA序列、小基因、基因片段、调节元件、启动子及其组合。核酸(分子)和/或多核苷酸的进一步优选的实例包括例如重组多核苷酸,载体,寡核苷酸,RNA分子如rRNA、mRNA或tRNA,或如上所述的DNA分子。因此,优选核酸(分子)是DNA分子或RNA分子;优选选自基因组DNA;cDNA;rRNA;mRNA;反义DNA;反义RNA;互补RNA和/或DNA序列;具有或不具有表达元件、调节元件和/或启动子的RNA和/或DNA序列;载体;及其组合。

[0251] 因此,核酸分子可以是载体。在本发明的上下文中使用的术语“载体”是指核酸分子,优选指人工核酸分子,即天然不存在的核酸分子。本发明上下文中的载体适于包含或包埋期望的核酸序列。这些载体可以是储存载体、表达载体、克隆载体、转移载体等。储存载体是允许方便地储存核酸分子的载体。因此,载体可以包含对应于例如根据本发明的期望抗原肽的序列。表达载体可用于产生表达产物,例如RNA,例如mRNA,或肽、多肽或蛋白质。例如,表达载体可包含转录载体序列段所需的序列,例如启动子序列。克隆载体通常是含有克隆位点的载体,其可用于将核酸序列掺入载体中。克隆载体可以是例如质粒载体或噬菌体载体。转移载体可以是适合于将核酸分子转移到细胞或生物体中的载体,例如病毒载体。在本发明的上下文中的载体可以是例如RNA载体或DNA载体。优选地,载体是DNA分子。例如,本申请意义上的载体包含克隆位点,选择标志物,例如抗生素抗性因子,和适于载体增殖的序列,例如复制起点。优选地,本申请上下文中的载体是质粒载体。优选地,本申请上下文中的载体是表达载体。优选的载体是用于在细菌细胞中表达的载体。更优选地,载体可用于在所谓的“活细菌疫苗载体”中表达,其中活细菌细胞(例如细菌或细菌孢子,例如内生孢子、外

生孢子或微生物孢囊)可用作疫苗。其优选实例描述于da Silva et al.,Live bacterial vaccine vectors:an overview;Braz J Microbiol.2015Mar4;45(4):1117-29中。

[0252] 编码根据本发明的抗原肽的核酸可以是裸核酸,或克隆到质粒或病毒载体中的核酸的形式(Tregoning and Kinnear,Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases.Microbiol Spectr.2014Dec;2(6).doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0028-2014),后者是特别优选的。根据本发明的合适病毒载体的实例包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、疱疹病毒和痘病毒载体。使用本领域的标准重组技术将核酸克隆到质粒或病毒载体中在本领域技术人员的能力范围内。

[0253] 在进一步方面,本发明还提供了包含根据本发明的核酸的宿主细胞,其中所述核酸优选是载体。优选地,宿主细胞是细菌细胞。这种宿主细胞可以优选用于产生根据本发明的抗原肽或根据本发明的免疫原性化合物。此外,这种宿主细胞也可以是疫苗中的活性成分。

[0254] 优选地,宿主细胞是细菌细胞,优选肠道细菌细胞。这种细菌宿主细胞可以用作“活细菌疫苗载体”,其中活细菌细胞(例如细菌或细菌孢子,例如内生孢子、外生孢子或微生物孢囊)可以用作疫苗。其优选的实例描述于da Silva et al.,Live bacterial vaccine vectors:an overview;Braz J Microbiol.2015Mar 4;45(4):1117-29中。

[0255] 细菌细胞(例如细菌或细菌孢子,例如内生孢子、外生孢子或微生物孢囊),特别是(整个)肠道细菌物种,可能是有利的,因为它们有可能引发比它们包含的(多)肽或核酸更强的免疫应答。

[0256] 可选地,根据本发明的细菌细胞,特别是肠道细菌可以是益生菌形式,即活肠道细菌的形式,其因此可以用作食品添加剂,因为它可以提供健康益处。这些可以例如冻干在颗粒剂、丸剂或胶囊剂中,或直接与乳制品混合食用。

[0257] 在进一步方面,本发明提供装载有下列的纳米颗粒

[0258] -根据本发明的免疫原性化合物的至少一种,或

[0259] -根据本发明的抗原肽的至少一种;

[0260] 和,任选地佐剂。

[0261] 纳米颗粒,特别是用作疫苗的纳米颗粒是本领域已知的,并且描述于例如Shao et al.,Nanoparticle-based immunotherapy for cancer,ACS Nano 2015,9(1):16-30;Zhao et al.,Nanoparticle vaccines,Vaccine 2014,32(3):327-37;和Gregory et al.,Vaccine delivery using nanoparticles,Front Cell Infect Microbiol.2013,3:13,doi:10.3389/fcimb.2013.00013.eCollection 2013,Review中。特别地,纳米颗粒用于递送抗原肽(或包含抗原肽的多肽/蛋白质/核酸),并且还可任选地充当佐剂。抗原肽(包含抗原肽的多肽/蛋白质/核酸)通常包封在纳米颗粒内或连接/结合(装饰到)纳米颗粒表面(“包衣”)。与常规方法相比,纳米颗粒可以保护有效负载(抗原/佐剂)免受周围生物环境的影响,增加半衰期,最小化全身毒性,促进向APC的递送,或甚至直接触发TAA特异性T-细胞的活化。优选地,纳米颗粒的尺寸(直径)不大于300nm,更优选不大于200nm,并且最优选不大于100nm。这样的纳米颗粒充分地避免吞噬细胞摄取,在循环中具有高结构完整性和长循环时间,能够在肿瘤生长的部位累积,并且能够深入渗透到肿瘤块中。

[0262] 纳米颗粒的实例包括聚合物纳米颗粒,例如聚(乙二醇)(PEG)和聚(D,L-乳酸-共

乙醇酸) (PLGA); 无机纳米颗粒, 如金纳米颗粒、氧化铁珠、氧化铁氧化锌纳米颗粒、碳纳米管和介孔二氧化硅纳米颗粒; 脂质体, 如阳离子脂质体; 免疫刺激复合物 (ISCOM); 病毒样颗粒 (VLP); 和自组装蛋白质。

[0263] 聚合物纳米颗粒是基于/包含聚合物的纳米颗粒, 例如聚 (d, l-丙交酯-共-乙交酯) (PLG)、聚 (d, l-乳酸-共-乙醇酸) (PLGA)、聚 (g-谷氨酸) (g-PGA)、聚 (乙二醇) (PEG) 和聚苯乙烯。聚合物纳米颗粒可以包埋抗原 (例如, 抗原肽或包含其的 (多) 肽) 或与抗原结合/缀合 (例如, 抗原肽或包含其的 (多) 肽)。聚合物纳米颗粒可用于递送, 例如, 至某些细胞, 或由于其缓慢的生物降解速率而维持抗原释放。例如, g-PGA 纳米颗粒可用于包封疏水性抗原。聚苯乙烯纳米颗粒可以与多种抗原结合, 因为它们可以用各种官能团进行表面修饰。聚合物例如聚 (L-乳酸) (PLA)、PLGA、PEG 和天然聚合物 (例如多糖) 也可用于合成水凝胶纳米颗粒, 其是一种纳米级亲水性三维聚合物网络。纳米凝胶具有有利的性质, 包括柔性网眼尺寸、用于多价缀合的大表面积、高含水量和抗原的高负载能力。因此, 优选的纳米颗粒是纳米凝胶, 例如壳聚糖纳米凝胶。优选的聚合物纳米颗粒是基于/包含聚 (乙二醇) (PEG) 和聚 (D, L-乳酸-共-乙醇酸) (PLGA) 的纳米颗粒。

[0264] 无机纳米颗粒是基于/包含无机物质的纳米颗粒, 并且这种纳米颗粒的实例包括金纳米颗粒、氧化铁珠、氧化铁氧化锌纳米颗粒、碳纳米颗粒 (例如碳纳米管) 和介孔二氧化硅纳米颗粒。无机纳米颗粒提供刚性结构和可控合成。例如, 金纳米颗粒可以容易地以不同的形状生产, 例如球形、棒形、立方体。无机纳米颗粒可以是表面改性的, 例如, 用碳水化合物。碳纳米颗粒提供良好的生物相容性, 并且可以例如作为纳米管或 (介孔) 球体生产。例如, 根据本发明的抗原肽的多个拷贝 (或包含其的 (多) 肽) 可以缀合到碳纳米颗粒上, 例如碳纳米颗粒。介孔碳纳米颗粒优选用于口服施用。二氧化硅基纳米颗粒 (SiNP) 也是优选的。SiNP 具有生物相容性, 并且在选择性肿瘤靶向和疫苗递送方面显示出优异的性质。SiNP 表面上丰富的硅烷醇基团可用于进一步修饰以引入额外的功能, 例如细胞识别、特定生物分子的吸收、改善与细胞的相互作用和增强细胞摄取。介孔二氧化硅纳米颗粒是特别优选的。

[0265] 脂质体通常由磷脂形成, 例如 1, 2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷 (DOTAP)。通常, 阳离子脂质体是优选的。脂质体是自组装的, 具有磷脂双层壳和水性核。脂质体可以作为单层囊泡 (具有单个磷脂双层) 或作为多层囊泡 (具有由水层分开的几个同心磷脂壳) 产生。因此, 抗原可以包封在核中或不同的层/壳之间。优选的脂质体系统是批准用于人类用途的那些, 例如 Inflexal® V 和 Epaxal®。

[0266] 免疫刺激复合物 (ISCOM) 是约 40nm (直径) 的笼状颗粒, 其是含有胶束的胶体皂苷, 例如由皂苷佐剂 Quil A、胆固醇、磷脂和 (多) 肽抗原 (例如抗原肽或包含其的多肽) 制成。这些球形颗粒可通过非极性相互作用捕获抗原。已经描述了两种类型的 ISCOM, 它们都由胆固醇、磷脂 (通常是磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱) 和皂苷 (例如 QuilA) 组成。

[0267] 病毒样颗粒 (VLP) 是通过生物相容性衣壳蛋白的自组装形成的自组装纳米颗粒。由于天然优化的纳米颗粒大小和重复的结构顺序, VLP 可以诱导有效的免疫应答。VLP 可以衍生自多种病毒, 其大小范围为 20nm 至 800nm, 通常在 20-150nm 的范围内。可以通过将这些肽/蛋白质融合到颗粒或通过表达多种抗原来改造 VLP 以表达另外的肽或蛋白质。此外, 抗原可以化学偶联到病毒表面以产生生物缀合物 VLP。

[0268] 自组装蛋白质的实例包括铁蛋白和穹窿体主蛋白 (major vault protein) (MVP)。

铁蛋白是一种可以自组装成近球形10nm结构的蛋白质。96个单位的MVP可以自组装成桶形穹窿体纳米颗粒,其尺寸约为40nm宽,70nm长。当与MVP混合时,通过自组装过程可以将与最小相互作用结构域遗传融合的抗原包装在穹窿体纳米颗粒内。因此,抗原(例如根据本发明的抗原肽或包含其的多肽)可以与自组装蛋白质或其片段/结构域融合,例如MVP的最小相互作用结构域。因此,本发明还提供了融合蛋白,其包含自组装蛋白(或其片段/结构域)和根据本发明的抗原肽。

[0269] 通常,纳米颗粒(NP)的优选实例包括氧化铁珠、聚苯乙烯微球、聚(γ -谷氨酸)(γ -PGA)NP、氧化铁-氧化锌NP、阳离子化明胶NP、普朗尼克稳定的聚(硫化丙烯)(PPS)NP、PLGA NP、(阳离子)脂质体、(pH响应)聚合物胶束、PLGA、癌细胞膜包被的PLGA、脂质-磷酸钙(LCP)NP、脂质体-鱼精蛋白-透明质酸(LPH)NP、聚苯乙烯乳胶珠、磁珠、铁-葡聚糖颗粒和量子点纳米晶体。

[0270] 优选地,纳米颗粒还包含佐剂,例如Toll样受体(TLR)激动剂。因此,抗原肽(包含抗原肽的多肽/蛋白质/核酸)可以与佐剂一起递送,例如递送至抗原呈递细胞(APC),例如树突细胞(DC)。佐剂可以通过纳米颗粒包封或结合/缀合至纳米颗粒的表面,优选类似于抗原肽。

[0271] 特别优选的佐剂是聚肌苷:聚胞苷酸(也称为“聚I:C”)和/或其衍生物聚-ICLC。聚I:C是错配的双链RNA,其中一条链是肌苷酸的聚合物,另一条链是胞苷酸的聚合物。聚I:C是已知与Toll样受体3(TLR3)相互作用的免疫刺激剂。聚I:C在结构上类似于双链RNA,其是TLR3的“天然”刺激物。因此,聚I:C可以被认为是双链RNA的合成类似物。聚-ICLC是羧甲基纤维素、聚肌苷-聚胞苷酸和聚-L-赖氨酸双链RNA的合成复合物。与聚I:C类似,聚-ICLC也是TLR3的配体。聚I:C和聚-ICLC通常刺激细胞毒性细胞因子的释放。聚-ICLC的优选实例是Hiltonol[®]。

[0272] 免疫原性组合物和试剂盒

[0273] 根据本发明的免疫原性组合物包括下列的至少一种:

[0274] -根据本发明的抗原肽,

[0275] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0276] -根据本发明的纳米颗粒,

[0277] -根据本发明的细胞,

[0278] -根据本发明的核酸,或

[0279] -根据本发明的宿主细胞。

[0280] 优选地,免疫原性组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。

[0281] 本发明的免疫原性组合物可以是适用于本发明目的的任何形式。例如,所述组合物可以是适于肠胃外、肠内或局部施用的形式,例如液体悬浮液、固体剂型(颗粒剂、丸剂、胶囊剂或片剂)、或糊剂或凝胶剂。为了预期目的选择合适形式的组合物在本领域技术人员的能力范围内。

[0282] 实际上,在本发明的上下文中,使用(多)肽或编码其的核酸可能是特别有利的,因为它们易于以低成本和相对安全性制造,不具有重配、感染或重组的可能性。

[0283] 本发明的抗原肽可以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的装载有其的细胞、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞和/或根据本发明的免疫原性组合物的形式施用。

[0284] 根据一个实施方式,它们可以以微生物比如肠道细菌物种的形式施用。

[0285] 整个肠道细菌物种也可能是有利的,因为它们有可能比它们含有的(多)肽或核酸引发更强的免疫应答。

[0286] 可选地,根据本发明的肠道细菌可以是益生菌形式,即活的肠道细菌形式,由于其可以提供健康益处,因此可以用作食品添加剂。这些可以例如冻干在颗粒剂、丸剂或胶囊剂中,或直接与乳制品混合食用。

[0287] 本领域技术人员将容易理解,可以基于待预防或治疗的癌症的性质和/或在所述癌症中涉及的人基因/人肿瘤抗原选择本发明的抗原肽。例如,如果希望预防或治疗涉及糖蛋白100(gp100)、TRP1、TRP2、酪氨酸酶和/或Melan A/MART1抗原的黑素瘤,可以选择如表1A中所述的任何相应的抗原肽(一种或多种)。

[0288] 应当理解,特别优选共同施用本发明的几种抗原肽,以增强免疫应答。

[0289] 因此,根据优选的实施方式,本发明的组合物包含至少2种如上定义的抗原肽(其可以是免疫原性化合物的形式),其包括至少3种抗原肽,或至少4种抗原肽,或至少5种抗原肽,或至少6种抗原肽,或至少7种抗原肽,或至少8种抗原肽,或至少9种抗原肽,或至少10种抗原肽,或至少11种抗原肽,或至少12种抗原肽,或至少13种抗原肽,或至少14种抗原肽,或至少15种抗原肽,或至少20种抗原肽,或至少25种抗原肽,或至少50种抗原肽,或至少100种抗原肽,或至少500种抗原肽,或至少1000种抗原肽,或至少1500种抗原肽。选择适合于预期目的的抗原肽和/或免疫原性化合物的组合在本领域技术人员的能力范围内。例如,如果希望预防或治疗涉及由根据表1B的基因编码的肿瘤抗原的黑素瘤,可以选择表1A中所述的相应抗原肽的任何组合。

[0290] 在特别优选的实施方式中,联合根据本发明的两种不同的抗原肽(例如,涉及相同类型的癌症和/或相同的参考抗原)。换句话说,根据本发明的组合物优选地包括

[0291] (i) 根据本发明的两种不同的免疫原性化合物;

[0292] (ii) 根据本发明的两种不同的抗原肽;

[0293] (iii) 根据本发明的两种不同的纳米颗粒;

[0294] (iv) 根据本发明的两种不同的核酸。

[0295] 根据本发明的组合物可以进一步包含其他活性剂,例如,可以增强抗原肽或免疫原性化合物的作用的活性剂。可选地,组合物可以不包含任何其他活性剂(即,除了根据本发明的抗原肽、根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、或根据本发明的宿主细胞)。

[0296] 根据优选的实施方式,所述组合物进一步包含至少一种免疫刺激剂,特别地以便于增强由抗原肽介导的免疫应答。根据本发明的优选免疫刺激剂包括但不限于免疫佐剂、抗原呈递细胞及其组合。优选地,免疫刺激剂是免疫佐剂或抗原呈递细胞(APC)。

[0297] 一些免疫佐剂确实能够有利于和延长抗原与免疫系统之间相互作用的持续时间,而其他免疫佐剂能够募集和激活细胞的天然免疫力以诱导适应性应答。属于前一类的佐剂包括但不限于无机化合物,例如明矾、氢氧化铝、磷酸铝、磷酸氢钙;和油基乳液,例如石蜡油、淀粉油、弗氏完全/不完全佐剂(FCA/FIA)、皂苷(例如来自植物皂树(Quillaja)、大豆、美远志(Polygala senega))。属于后一类的佐剂包括但不限于免疫刺激复合物(ISCOM),例如细胞因子(例如GM-CSF;白细胞介素例如IL-1、IL-2、IL6、IL8或IL12;肿瘤坏死因子

(TNF),如TNF α 或TNF β ;干扰素IFNS,如IFN α 、IFN β 、IFN γ 或IFN δ 等);Toll样受体(TLR)的配体,如咪喹莫特、瑞喹莫德或MPL;外来体,如衍生自树突细胞(DC)或肿瘤细胞的外来体;细菌产物如热休克蛋白(HSP如gp96、hsp90、hsp70、钙网蛋白、hsp110、hsp170)、病原体相关分子模式(PAMP)、海藻糖二萆酸酯(trehalose dimicolate)(TDM)、胞壁酰二肽(MDP)、多糖(PLS)如多糖-K。

[0298] 根据一个实施方式,免疫佐剂可以是HHD-DR3肽MAKTIAYDEEARRGLERGLN(SEQ ID N°144)。

[0299] 更优选地,免疫佐剂是具有免疫佐剂性质的蛋白质/肽,例如提供如本文所述的CD4+Th1细胞的刺激。其优选实例是非肿瘤抗原,其回忆免疫记忆或提供非特异性辅助或可以是特定肿瘤衍生的辅助肽,例如破伤风辅助肽、匙孔血蓝蛋白肽或PADRE肽,如本文所描述的。另一个优选的实例是特定肿瘤衍生的辅助肽,其可以由MHC II呈递,特别是通过HLA-DR、HLA-DP或HLA-DQ,例如共享的过表达的肿瘤抗原的片段,例如,HER2、NY-ESO-1、hTERT或IL13RA2,如上所述。

[0300] 特别优选的佐剂是聚肌苷:聚胞苷酸(也称为“聚I:C”)和/或其衍生物聚-ICLC。聚I:C是错配的双链RNA,其中一条链是肌苷酸的聚合物,另一条链是胞苷酸的聚合物。聚I:C是已知与tol1样受体3(TLR3)相互作用的免疫刺激剂。聚I:C在结构上类似于双链RNA,其是TLR3的“天然”刺激物。因此,聚I:C可以被认为是双链RNA的合成类似物。聚-ICLC是羧甲基纤维素、聚肌苷-聚胞苷酸和聚-L-赖氨酸双链RNA的合成复合物。与聚I:C类似,聚-ICLC也是TLR3的配体。聚I:C和聚-ICLC通常刺激细胞毒性细胞因子的释放。聚-ICLC的优选实例是Hiltonol[®]。

[0301] 抗原呈递细胞(APC)也是特别令人感兴趣的,因为它们的主要功能是处理抗原并将其在细胞表面上呈递给免疫系统的T细胞,从而在体内启动和调节T细胞应答。在本组合物中,优选APC装载有根据本发明的抗原肽(一种或多种)和/或免疫原性化合物(一种或多种),这可以通过在体外用所述抗原肽(一种或多种)和/或免疫原性化合物(一种或多种)暴露APC来完成(Rizzo et al.,Ex vivo loading of autologous dendritic cells with tumor antigens.Methods Mol Biol.2014;1139:41-4;Rolinski and Hus,Breaking immunotolerance of tumors:a new perspective for dendritic cell therapy.J Immunotoxicol.2014Oct;11(4):311-8)。

[0302] 根据本发明的优选的抗原呈递细胞是树突细胞(DC)。将根据本发明的至少一种抗原肽或免疫原性化合物与树突细胞组合确实可以是有利的,因为那些是最有效的抗原呈递细胞并且据报道在癌症患者中经常是功能缺陷的。本领域技术人员可以从健康的相容供体(即树突细胞是HLA相关的)或者患者本身容易地获得树突细胞,条件是它们是功能性的(即树突细胞是自体的),例如通过从外周血中直接分离,或通过从外周血细胞如CD14+单核细胞或CD34+造血前体衍生(Emens et al.,2008)。实际上,树突细胞可以通过其表面标志物(例如S100、p55、CD83和/或OX62)与外周血的其他细胞区分开,并且因此可以使用本领域熟知的细胞培养技术基于所述标志物分离和纯化。

[0303] 根据优选的实施方式,药物组合物可以进一步包含至少一种抗癌治疗剂。因此,所述治疗剂优选能够预防和/或治疗与使用根据本发明的抗原肽的癌症相同类型的癌症。根据本发明的特别优选的抗癌治疗剂包括但不限于抗体、肿瘤细胞裂解物、化学治疗剂、放射

治疗剂及其组合。最优选地,抗癌治疗剂选自抗体、肿瘤细胞裂解物、化学治疗剂、放射治疗剂、免疫检查点调节剂及其组合。

[0304] 抗体在癌症疗法中特别有利,因为它们可以与癌细胞表面上的特定抗原结合,从而将疗法引导至肿瘤(即,这些被称为肿瘤靶向抗体),或阻断癌症中失调的免疫检查点(即这些在本文中称为免疫调节抗体)。后一类抗体的目的是抑制癌症免疫抗性,这显著地可以观察到针对肿瘤抗原特异性的T细胞。实际上,如本领域所熟知的,在正常生理条件下,免疫检查点对于维持自身耐受性(即,预防自身免疫力)和在免疫系统对病原性感染作出应答时保护组织免受损害是至关重要的。然而,在癌症中,免疫检查点表达可能失调,成为免疫抗性的重要机制。关于PD-L1检查点,在黑素瘤、卵巢癌、肺癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌和胰腺癌中已经显著观察到所述抗性(Konishi et al., B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. Clin Cancer Res. 2004 Aug 1; 10(15):5094-100; Ghebeh et al., The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. Neoplasia. 2006 Mar; 8(3):190-8; Hino et al., Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. Cancer. 2010 Apr 1; 116(7):1757-66)。免疫检查点的其他实例包括但不限于PD-L2、PD1、CD80、CD86、CTLA4、B7H3、B7H4、PVR、TIGIT、GAL9、LAG-3、GITR、CD137、TIM3、VISTA、VISTA-R (Pico de Coaña et al., Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system. Trends Mol Med. 2015 Aug; 21(8):482-91; Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22; 12(4):252-64)。

[0305] 抗体通常以裸单克隆抗体(即非缀合的)的形式,或与另一种可能对细胞有毒或放射性的分子缀合用于上述目的。

[0306] 用于癌症免疫疗法的众所周知的单克隆肿瘤靶向抗体的实例包括但不限于阿仑单抗(慢性淋巴细胞白血病)、贝伐单抗(结直肠癌、多形性胶质母细胞瘤、宫颈癌、肺癌、肾癌)、本妥昔单抗/vedotin(淋巴瘤)、blinatumumab(急性淋巴细胞白血病)、卡妥索单抗(EPCAM+癌症中的恶性腹水)、西妥昔单抗(头颈癌、结直肠癌)、地诺单抗(乳腺癌、前列腺癌和骨癌)、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)/奥佐米星(ozogamicin)(急性髓性白血病)、替伊莫单抗(ibritumomab)/噻西坦(tiuxetan)(非霍奇金淋巴瘤)、帕尼单抗(结直肠癌)、帕妥珠单抗(乳腺癌)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)(慢性淋巴细胞白血病)、奥法木单抗(ofatumumab)(慢性淋巴细胞白血病)、opilimumab(黑素瘤)、雷莫芦单抗(胃癌和胃食管癌)、利妥昔单抗(慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤)、司妥昔单抗(siltuximab)(多中心的Catsleman病)、托西莫单抗(tositumomab)(非霍奇金淋巴瘤)和曲妥珠单抗(乳腺癌、胃癌和胃食管癌);而免疫调节抗体的实例包括但不限于阻断CTLA4依赖性免疫检查点的伊匹单抗(黑色素瘤)、阻断PDCD1依赖性免疫检查点的纳武单抗(黑色素瘤、肺癌)和prembrolizumab(黑素瘤),以及MPDL3280A、MEDI4736、MEDI0680和MSB0010718C,其均阻断PD-L1依赖性免疫检查点(Sharma and Allison, The future of immune checkpoint therapy. Science. 2015 Apr 3; 348(6230):56-61)。

[0307] 用于癌症免疫疗法的其他抗体已在Buqué et al., Trial Watch: Immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications. Oncoimmunology. 2015Mar2;4(4):e1008814.eCollection 2015Apr; Redman et al., Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. Mol Immunol. 2015Oct;67(2Pt A):28-45; Simpson and Caballero, Monoclonal antibodies for the therapy of cancer MC Proc. 2014;8(Suppl 4):06中以及抗体社会网站(在欧盟或美国批准或审查的治疗性单克隆抗体列表, 可得自网页链接http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php)上描述。

[0308] 肿瘤细胞裂解物也可以与根据本发明的抗原肽(一种或多种)联合。肿瘤细胞确实能够通过呈递内源肽-MHC复合物以及经由宿主的树突细胞(DC)来引发免疫应答, 所述宿主的树突细胞可以处理和呈递由所述裂解物递送的抗原。由此增加针对其可以诱导免疫应答的抗原范围。通过用热休克和/或化学处理治疗肿瘤细胞可以容易地获得肿瘤细胞裂解物, 并且可以是自体的(即从患者中分离), 或同种异体的(即从另一个受试者中分离)。

[0309] 本文不需要进一步描述标准化学治疗药物和放射治疗剂, 因为它们已在文献中广泛描述, 特别是由Baskar等人(Baskar et al., Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int J Med Sci. 2012;9(3):193-9)、Paci等人(Paci et al., Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1-- cytotoxics. Eur J Cancer. 2014Aug;50(12):2010-9)和Widmer等人(Widmer et al., Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two-- targeted therapies. Eur J Cancer. 2014Aug;50(12):2020-36)描述。此类药物和药剂的列表也可得自cancer.gov网站(<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs>)上。

[0310] 优选地, 与本文定义的抗原肽联合的免疫检查点调节剂是选自CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、GITR、TNFR和/或FasR/DcR3的一种或多种免疫检查点分子的激活剂或抑制剂;或其一种或多种配体的激活剂或抑制剂。

[0311] 更优选地, 免疫检查点调节剂是(共)刺激性检查点分子的激活剂或抑制性检查点分子的抑制剂或其组合。因此, 免疫检查点调节剂更优选是(i) CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR和/或ICOS的激活剂或(ii) A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PDL-1、PD-L2、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、TNFR和/或FasR/DcR3的抑制剂。

[0312] 甚至更优选地, 免疫检查点调节剂是抑制性检查点分子的抑制剂(但优选不是刺激性检查点分子的抑制剂)。因此, 免疫检查点调节剂甚至更优选是A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PDL-1、PD-L2、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、TNFR和/或DcR3或其配体的抑制剂。

[0313] 还优选免疫检查点调节剂是刺激性或共刺激性检查点分子的激活剂(但优选不是抑制性检查点分子的激活剂)。因此, 免疫检查点调节剂更优选是CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR和/或ICOS或其配体的激活剂。

[0314] 甚至更优选免疫检查点调节剂是CD40途径、IDO途径、LAG3途径、CTLA-4途径和/或PD-1途径的调节剂。特别地, 免疫检查点调节剂优选是CD40、LAG3、CTLA-4、PD-L1、PD-L2、

PD-1和/或IDO的调节剂,更优选免疫检查点调节剂是CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、LAG3和/或IDO的抑制剂,或CD40的激活剂,甚至更优选免疫检查点调节剂是CTLA-4、PD-L1、PD-1、LAG3和/或IDO的抑制剂,甚至更优选免疫检查点调节剂是LAG3、CTLA-4和/或PD-1的抑制剂,和最优选免疫检查点调节剂是CTLA-4和/或PD-1的抑制剂。

[0315] 因此,用于与抗原肽联合的检查点调节剂可选自CTLA-4途径或PD-1途径的已知调节剂。优选地,用于与本文定义的抗原肽联合的检查点调节剂可以选自CTLA-4途径或PD-1途径的已知调节剂。特别优选地,免疫检查点调节剂是PD-1抑制剂。CTLA-4途径和PD-1途径的优选抑制剂包括单克隆抗体 **Yervoy**[®] (伊匹单抗; Bristol Myers Squibb) 和 Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) 以及 **Opdivo**[®] (纳武单抗; Bristol Myers Squibb), **Keytruda**[®] (Pembrolizumab; Merck), 度伐单抗 (Durvalumab) (MedImmune/AstraZeneca), MEDI4736 (AstraZeneca; 参见W02011/066389A1), MPDL3280A (Roche/Genentech; 参见US 8, 217, 149B2), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), MSB-0010718C (Merck), MIH1 (Affymetrix) 和 Lambrolizumab (例如, 在W02008/156712; Hamid et al., 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144中公开为hPD109A及其人源化衍生物h409A11、h409A16和h409A17)。更优选的检查点抑制剂包括CTLA-4抑制剂 **Yervoy**[®] (伊匹单抗; Bristol Myers Squibb) 和 Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) 以及PD-1抑制剂 **Opdivo**[®] (纳武单抗; Bristol Myers Squibb), **Keytruda**[®] (Pembrolizumab; Merck), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), AMP-224和Lambrolizumab (例如在W02008/156712; Hamid O. et al., 2013; N. Engl. J. Med. 369: 134-144中公开为hPD109A及其人源化衍生物h409A11、h409A16和h409A17)。

[0316] 还优选用于与本文定义的抗原肽联合的免疫检查点调节剂选自Pembrolizumab、伊匹单抗、纳武单抗、MPDL3280A、MEDI4736、Tremelimumab、Avelumab、PDR001、LAG525、INCB24360、Varlilumab、Urelumab、AMP-224和CM-24。

[0317] 为了本发明的目的,选择合适的免疫抗癌治疗剂在本领域普通技术人员的能力范围内。例如,如果希望预防或治疗黑素瘤,可优选使用来自黑素瘤细胞的裂解物和/或抗体 opilimumab,以及表1A中所述的相应抗原肽。

[0318] 抗癌治疗剂还可以与本发明的组合物同时、分开或连续施用。如果组合物和治疗剂以分开或连续的方式施用,那些可以以不同的药物形式施用。

[0319] 因此,在另一方面,本发明涉及本发明的组合物和至少一种如上所述的抗癌治疗剂,作为用于同时、分开或连续施用的组合制剂。换句话说,本发明提出了联合使用本发明的组合物和至少一种如上所述的抗癌治疗剂,用于同时、分开或顺序施用。

[0320] 在进一步方面,本发明还涉及套装试剂盒 (kit-of-parts), 其优选地用于预防和/或治疗癌症,所述试剂盒包括下列的至少一种:

[0321] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0322] -根据本发明的抗原肽,

[0323] -根据本发明的纳米颗粒,

[0324] -根据本发明的细胞,

[0325] -根据本发明的核酸,

[0326] -根据本发明的宿主细胞,或

[0327] -根据本发明的免疫原性组合物。

[0328] 特别地,本发明的套装试剂盒可包含一种以上的上述组分。例如,根据本发明的套装试剂盒可包含至少两种不同的免疫原性化合物、至少两种不同的抗原肽、至少两种不同的纳米颗粒、至少两种不同的细胞、至少两种不同的核酸、至少两种不同的宿主细胞、和/或至少两种不同的免疫原性组合物。优选地,如上所述的套装试剂盒包含的这些不同组分的不同在于根据本发明的抗原肽,例如一种组分与第一抗原肽有关,一种组分与第二抗原肽(不同于第一抗原肽)有关。

[0329] 例如,试剂盒可以包括根据本发明的两种不同的免疫原性化合物。

[0330] 例如,试剂盒可以包括根据本发明的两种不同的抗原肽。

[0331] 例如,试剂盒可以包括根据本发明的两种不同的纳米颗粒。

[0332] 例如,试剂盒可以包括根据本发明的两种不同的核酸。

[0333] 套装试剂盒的各种组分可以包装在一个或多个容器中。上述组分可以以冻干或干燥形式提供或溶解在合适的缓冲液中。试剂盒还可以包含另外的试剂,包括例如防腐剂,生长培养基,和/或用于储存和/或重构上述组分的缓冲液,洗涤溶液等。此外,根据本发明的套装试剂盒可任选地包含使用说明。

[0334] 此外,本发明还提供用于治疗、预防和/或稳定癌症的疫苗接种试剂盒,其包含本文所述的免疫原性组合物或本文所述的疫苗以及所述免疫原性组合物或所述疫苗在预防和/或治疗癌症中的使用说明。

[0335] 优选地,这样的试剂盒还包括包装插页或说明传单,其具有通过使用根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的抗原肽、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物预防或治疗癌症的指导。

[0336] 还优选,除了上述组分的任一种之外,试剂盒包括如本文描述的抗癌治疗剂。

[0337] 药物治疗和用途

[0338] 如上面所陈述,本发明的组合物可以特别地用于治疗目的,尤其用于引发针对特定肿瘤抗原/蛋白质的特异性免疫应答,从而阻止或治疗需要其的患者中的癌症。

[0339] 在进一步方面,本发明提供根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的抗原肽、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物,其用于预防和/或治疗癌症。优选地,所述癌症涉及如上面所描述的抗原肽的(参考)抗原。

[0340] 因此,本发明提供了用于预防和/或治疗癌症或在需要其的受试者中引发、增强或延长抗肿瘤应答的方法,其包括向受试者施用

[0341] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0342] -根据本发明的抗原肽,

[0343] -根据本发明的纳米颗粒,

[0344] -根据本发明的细胞,

[0345] -根据本发明的核酸,

[0346] -根据本发明的宿主细胞,

[0347] -根据本发明的免疫原性组合物,或

[0348] -如本文描述的根据本发明的联合物。

[0349] 此外,本发明提供了在受试者中引发或改善针对一种或多种依赖于CD8⁺细胞毒性T细胞的表位的免疫应答的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用下列的至少一种:

[0350] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0351] -根据本发明的抗原肽,

[0352] -根据本发明的纳米颗粒,

[0353] -根据本发明的细胞,

[0354] -根据本发明的核酸,

[0355] -根据本发明的宿主细胞,

[0356] -根据本发明的免疫原性组合物,或

[0357] -如本文描述的根据本发明的联合物。

[0358] 通过评估炎症应答、促炎细胞因子应答,包括IFN- γ 、TNF- α 和IL-2mRNA或蛋白质中一种或多种相对于施用本发明化合物前的水平的表达增加,可以确定依赖于CD8⁺应答的免疫应答。其还可以通过由HLA-肽多聚体染色、ELISPOT测定和延迟型超敏试验测量的在施用本发明化合物后抗原特异性T细胞的频率或绝对数量的增加来测量。其还可以通过依赖于抗原特异性T辅助细胞的抗原特异性血清抗体的增加来间接测量。

[0359] 本发明还提供了在受试者中引发或改善受多种MHC I类分子限制的针对一种或多种抗原或抗原表位的免疫应答的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用下列的至少一种:

[0360] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0361] -根据本发明的抗原肽,

[0362] -根据本发明的纳米颗粒,

[0363] -根据本发明的细胞,

[0364] -根据本发明的核酸,

[0365] -根据本发明的宿主细胞,

[0366] -根据本发明的免疫原性组合物,或

[0367] -如本文描述的根据本发明的联合物。

[0368] 在受试者中引发或改善受多种MHC I类分子限制的针对如本文所述的多个表位的免疫应答的方法可通过评估细胞因子应答,包括在用结合抗原呈递细胞上的离散MHC I类分子的单个肽体外刺激T细胞后,IFN- γ 、TNF- α 和IL-2mRNA或蛋白质中一种或多种相对于施用本发明化合物前的水平的表达增加来确定。对MHC I类分子的限制也可以通过使用表达MHC I类分子的抗原呈递细胞或通过使用MHC I类阻断抗体来验证。其还可以通过使用与MHC I类分子组装的多聚体,通过HLA-肽多聚体染色测量的在施用本发明化合物后抗原特异性T细胞的频率或绝对数量的增加来测量。

[0369] 因而,在另一方面,本发明涉及如上面限定的组合物,其用作药物。而且,

[0370] -根据本发明的免疫原性化合物,

[0371] -根据本发明的抗原肽,

[0372] -根据本发明的纳米颗粒,

- [0373] -根据本发明的细胞，
- [0374] -根据本发明的核酸，
- [0375] -根据本发明的宿主细胞，
- [0376] -根据本发明的免疫原性组合物，或
- [0377] -如本文描述的根据本发明的联合物
- [0378] 可以用作药物。
- [0379] 本发明更具体地涉及如上面限定的组合物，其用作免疫疗法的疫苗。而且，
- [0380] -根据本发明的免疫原性化合物，
- [0381] -根据本发明的抗原肽，
- [0382] -根据本发明的纳米颗粒，
- [0383] -根据本发明的细胞，
- [0384] -根据本发明的核酸，
- [0385] -根据本发明的宿主细胞，
- [0386] -根据本发明的免疫原性组合物，或
- [0387] -如本文描述的根据本发明的联合物
- [0388] 可以用作疫苗，具体地用于(癌症)免疫疗法。
- [0389] 如在本发明的上下文中所使用的，术语“疫苗”是指提供先天性和/或适应性免疫力的生物制剂，通常针对特定疾病，优选癌症。因此，疫苗特别支持待治疗受试者的免疫系统的先天性和/或适应性免疫应答。例如，根据本发明的抗原肽通常在待治疗的患者中产生或支持适应性免疫应答。
- [0390] 在本发明的上下文中，疫苗(组合物)可以诱导针对肿瘤抗原的特异性免疫应答，因此优选用于预防或治疗癌症。它在本文中也可称为癌症疫苗。
- [0391] 因此，在优选的实施方式中，本发明涉及如上定义的组合物，其用于预防和/或治疗需要其的受试者中的癌症。更确切地说，本发明涉及本发明的组合物在制备预防或治疗需要其的受试者中的癌症的药物中的用途。
- [0392] 换句话说，本发明涉及用于预防或治疗需要其的受试者中的癌症的方法，包括向所述受试者施用有效量的本发明的组合物。
- [0393] 施用药物的方法是本领域技术人员公知的。关于本发明的组合物，它可以直接施用于受试者，受影响的器官(即局部施用)或全身施用(即肠内或肠胃外施用)，或甚至离体施用于源自受试者的细胞或随后施用至受试者的人细胞系，或甚至在体外用于选择源自受试者的免疫细胞亚群，然后将其再次施用于所述受试者。本文所用的肠内施用包括口服和直肠施用，以及通过胃饲管、十二指肠饲管或胃造口术施用，而肠胃外施用包括皮下、静脉内、肌肉内、动脉内、皮内、骨内、脑内、和鞘内注射等。施用方法通常将取决于组合物中存在的抗原肽(一种或多种)和/或免疫原性化合物(一种或多种)，以及待治疗的癌症类型和可包含在所述组合物中的其它活性剂。例如，如果免疫原性化合物是如上定义的核酸，则施用优选是肌内注射或皮内注射，如果将所述核酸克隆到病毒载体中，则口服/鼻腔施用是特别优选的。可选地，如果抗原肽和/或免疫原性化合物是如上定义的多肽或如果其装载到如本文所述的纳米颗粒中/上，则施用优选是肌内、皮内或口服施用。再者，仍可选地，如果抗原肽和/或免疫原性化合物以如上定义的肠道细菌的形式递送，尤其是如果肠道细菌是益

生菌形式,则施用优选是口服施用。

[0394] 根据本发明的抗原肽和/或免疫原性化合物可以进一步包封,以促进它们施用至需要其的受试者。例如,那些可以被包封到肽纳米载体(优选,如果免疫原性化合物是核酸或(多)肽),到病毒体中(优选地,如果免疫原性化合物是核酸或(多)肽),或者到基于脂质的载体系统,如脂质体-聚阳离子-DNA复合物(如果免疫原是核酸或(多)肽,则是优选的)(Trovato M,De Berardinis P.Novel antigen delivery systems.World J Virol.2015Aug 12;4(3):156-68;Saade F,Petrovsky N.Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines.Expert Rev Vaccines.2012Feb;11(2):189-209;Li et al., Peptide Vaccine:Progress and Challenges.Vaccines(Basel).2014Jul 2;2(3):515-36)。

[0395] 该组合物也可以被施用多于一次,以达到期望的效果。在一个优选的实施方式中,所述组合物被重复施用至少两次,优选多于两次。这可以在延长的时间段内完成,例如每周、每隔一周、每月、每年、或甚至在第一次施用后几年,以确保受试者被适当免疫。

[0396] 根据一个实施方式,根据本发明的抗原肽或免疫原性化合物可用于制备用于预防或治疗需要其的受试者中的癌症的组合物和/或免疫原性组合物。

[0397] 联合疗法

[0398] 根据本发明的抗原肽、根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞和根据本发明的免疫原性组合物,特别是在根据本发明的方法和用途中的施用,可以单独进行或与可用于治疗和/或预防癌症的助剂(例如,抗癌治疗剂)联合进行。

[0399] 因此,所述治疗剂优选能够预防和/或治疗与使用根据本发明的抗原肽的癌症相同类型的癌症。根据本发明的特别优选的抗癌治疗剂包括但不限于抗体、肿瘤细胞裂解物、化学治疗剂、放射治疗剂、免疫检查点调节剂及其组合。

[0400] 抗体在癌症疗法中特别有利,因为它们可以与癌细胞表面上的特定抗原结合,从而将疗法引导至肿瘤(即,这些被称为肿瘤靶向抗体),或阻断癌症中失调的免疫检查点(即这些在本文中称为免疫调节抗体)。后一类抗体的目的是抑制癌症免疫抗性,这显著地可以观察到针对肿瘤抗原特异性的T细胞。实际上,如本领域所熟知的,在正常生理条件下,免疫检查点对于维持自身耐受性(即,预防自身免疫力)和在免疫系统对病原性感染作出应答时保护组织免受损害是至关重要的。然而,在癌症中,免疫检查点表达可能失调,成为免疫抗性的重要机制。关于PD-L1检查点,在黑素瘤、卵巢癌、肺癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌和胰腺癌中已经显著观察到所述抗性(Konishi et al.,B7-H1expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1expression.Clin Cancer Res.2004Aug 1;10(15):5094-100;Ghebeh et al.,The B7-H1(PD-L1)T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in乳腺癌 patients with infiltrating ductal carcinoma:correlation with important high-risk prognostic factors.Neoplasia.2006Mar;8(3):190-8;Hino et al.,Tumor cell expression of programmed cell death-1ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma.Cancer.2010Apr 1;116(7):1757-66)。免疫检查点的其他实例包括但不限于PD-L2、PD1、CD80、CD86、CTLA4、B7H3、B7H4、PVR、TIGIT、GAL9、LAG-3、GITR、CD137、

TIM3、VISTA、VISTA-R (Pico de Coaña et al., Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system. Trends Mol Med. 2015 Aug; 21(8): 482-91; Pardoll DM1. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012 Mar 22; 12(4): 252-64)。

[0401] 抗体通常以裸单克隆抗体(即非缀合的)的形式,或与另一种可能对细胞有毒或放射性的分子缀合用于上述目的。

[0402] 用于癌症免疫疗法的众所周知的单克隆肿瘤靶向抗体的实例包括但不限于阿仑单抗(慢性淋巴细胞白血病)、贝伐单抗(结直肠癌、多形性胶质母细胞瘤、宫颈癌、肺癌、肾癌)、本妥昔单抗/vedotin(淋巴瘤)、blinatumumab(急性淋巴细胞白血病)、卡妥索单抗(EPCAM+癌症中的恶性腹水)、西妥昔单抗(头颈癌、结直肠癌)、地诺单抗(乳腺癌、前列腺癌和骨癌)、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)/奥佐米星(ozogamicin)(急性髓性白血病)、替伊莫单抗(ibritumomab)/噻西坦(tiuxetan)(非霍奇金淋巴瘤)、帕尼单抗(结直肠癌)、帕妥珠单抗(乳腺癌)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)(慢性淋巴细胞白血病)、奥法木单抗(ofatumumab)(慢性淋巴细胞白血病)、opilimumab(黑色素瘤)、雷莫芦单抗(胃癌和胃食管癌)、利妥昔单抗(慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤)、司妥昔单抗(siltuximab)(多中心的Castleman病)、托西莫单抗(tositumomab)(非霍奇金淋巴瘤)和曲妥珠单抗(乳腺癌、胃癌和胃食管癌);而免疫调节抗体的实例包括但不限于阻断CTLA4依赖性免疫检查点的伊匹单抗(黑色素瘤)、阻断PDCD1依赖性免疫检查点的纳武单抗(黑色素瘤、肺癌)和prembrolizumab(黑色素瘤),以及MPDL3280A、MEDI4736、MEDI0680和MSB0010718C,其均阻断PD-L1依赖性免疫检查点(Sharma and Allison, The future of immune checkpoint therapy. Science. 2015 Apr 3; 348(6230): 56-61)。

[0403] 用于癌症免疫疗法的其他抗体已在Buqué等人(Buqué et al., Trial Watch: Immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications. Oncoimmunology. 2015 Mar 2; 4(4): e1008814. eCollection 2015 Apr), Redman等人(Redman et al., Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. Mol Immunol. 2015 Oct; 67(2Pt A): 28-45), 和Simpson and Caballero, Monoclonal antibodies for the therapy of cancer MC Proc. 2014; 8(Suppl 4): 06中以及抗体社会网站(在欧盟或美国批准或审查的治疗性单克隆抗体列表,可得自网页链接http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php)上描述。

[0404] 肿瘤细胞裂解物也可以与根据本发明的抗原肽(一种或多种)联合。肿瘤细胞确实能够通过呈递内源肽-MHC复合物以及经由宿主的树突细胞(DC)来引发免疫应答,所述宿主的树突细胞可以处理和呈递由所述裂解物递送的抗原。由此增加针对其可以诱导免疫应答的抗原范围。通过用热休克和/或化学处理治疗肿瘤细胞可以容易地获得肿瘤细胞裂解物,并且可以是自体的(即从患者中分离),或同种异体的(即从另一个受试者中分离)。

[0405] 本文不需要进一步描述标准化学治疗药物和放射治疗剂,因为它们已在文献中广泛描述,特别是由Baskar等人(Baskar et al., Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int J Med Sci. 2012; 9(3): 193-9)、Paci等人(Paci et al., Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1-- cytotoxics. Eur J Cancer. 2014 Aug; 50(12): 2010-9)和Widmer等人(Widmer et al.,

Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two--targeted therapies. *Eur J Cancer*. 2014 Aug; 50(12):2020-36) 描述。此类药物和药剂的列表也可得自 cancer.gov 网站 (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs>) 上。

[0406] 优选地,与本文定义的抗原肽联合的免疫检查点调节剂是选自 CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、GITR、TNFR 和/或 FasR/DcR3 的一种或多种免疫检查点分子的激活剂或抑制剂;或其一种或多种配体的激活剂或抑制剂。

[0407] 更优选地,免疫检查点调节剂是(共)刺激性检查点分子的激活剂或抑制性检查点分子的抑制剂或其组合。因此,免疫检查点调节剂更优选是(i) CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR 和/或 ICOS 的激活剂或(ii) A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CD40、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PDL-1、PD-L2、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、TNFR 和/或 FasR/DcR3 的抑制剂。

[0408] 甚至更优选地,免疫检查点调节剂是抑制性检查点分子的抑制剂(但优选不是刺激性检查点分子的抑制剂)。因此,免疫检查点调节剂甚至更优选是 A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PDL-1、PD-L2、TIM-3、VISTA、CEACAM1、GARP、PS、CSF1R、CD94/NKG2A、TDO、TNFR 和/或 DcR3 或其配体的抑制剂。

[0409] 还优选免疫检查点调节剂是刺激性或共刺激性检查点分子的激活剂(但优选不是抑制性检查点分子的激活剂)。因此,免疫检查点调节剂更优选是 CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR 和/或 ICOS 或其配体的激活剂。

[0410] 甚至更优选免疫检查点调节剂是 CD40 途径、IDO 途径、LAG3 途径、CTLA-4 途径和/或 PD-1 途径的调节剂。特别地,免疫检查点调节剂优选是 CD40、LAG3、CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1 和/或 IDO 的调节剂,更优选免疫检查点调节剂是 CTLA-4、PD-L1、PD-L2、PD-1、LAG3 和/或 IDO 的抑制剂,或 CD40 的激活剂,甚至更优选免疫检查点调节剂是 CTLA-4、PD-L1、PD-1、LAG3 和/或 IDO 的抑制剂,甚至更优选免疫检查点调节剂是 LAG3、CTLA-4 和/或 PD-1 的抑制剂,和最优选免疫检查点调节剂是 CTLA-4 和/或 PD-1 的抑制剂。

[0411] 因此,用于与抗原肽联合的检查点调节剂可选自 CTLA-4 途径或 PD-1 途径的已知调节剂。优选地,用于与本文定义的抗原肽联合的检查点调节剂可以选自 CTLA-4 途径或 PD-1 途径的已知调节剂。特别优选地,免疫检查点调节剂是 PD-1 抑制剂。CTLA-4 途径和 PD-1 途径的优选抑制剂包括单克隆抗体 **Yervoy**[®] (伊匹单抗; Bristol Myers Squibb) 和 Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) 以及 **Opdivo**[®] (纳武单抗; Bristol Myers Squibb), **Keytruda**[®] (Pembrolizumab; Merck), 度伐单抗 (Durvalumab) (MedImmune/AstraZeneca), MEDI4736 (AstraZeneca; 参见 W02011/066389A1), MPDL3280A (Roche/Genentech; 参见 US 8, 217, 149B2), Pidilizumab (CT-011; CureTech), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca), MSB-0010718C (Merck), MIH1 (Affymetrix) 和 Lambrolizumab (例如,在 W02008/156712; Hamid et al., 2013; N. Engl. J. Med. 369:134-144 中公开为 hPD109A 及其人源化衍生物 h409A11、h409A16 和 h409A17)。更优选的检查点抑制剂包括 CTLA-4 抑制剂 **Yervoy**[®] (伊匹单抗; Bristol Myers Squibb) 和 Tremelimumab (Pfizer/MedImmune) 以及 PD-1 抑制剂 **Opdivo**[®] (纳武单抗; Bristol Myers Squibb), **Keytruda**[®] (Pembrolizumab; Merck), Pidilizumab (CT-

011;CureTech),MEDI0680(AMP-514;AstraZeneca),AMP-224和Lambrolizumab(例如在W02008/156712;Hamid O.et al.,2013;N.Engl.J.Med.369:134-144中公开为hPD109A及其人源化衍生物h409A11、h409A16和h409A17。

[0412] 还优选用于与本文定义的抗原肽联合的免疫检查点调节剂选自Pembrolizumab、伊匹单抗、纳武单抗、MPDL3280A、MEDI4736、Tremelimumab、Avelumab、PDR001、LAG525、INCB24360、Varlilumab、Urelumab、AMP-224和CM-24。

[0413] 为了本发明的目的,选择合适的免疫抗癌治疗剂在本领域普通技术人员的能力范围内。例如,如果希望预防或治疗黑素瘤,可优选使用来自黑素瘤细胞的裂解物和/或抗体opilimumab,以及如本文所述的根据本发明的相应抗原肽。

[0414] 抗癌治疗剂还可以与根据本发明的抗原肽、根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物联合施用,如本文描述的大约同时或连续地和以相同或不同的药物形式。

[0415] 因此,在另一方面,本发明涉及本发明的组合物和至少一种如上所述的抗癌治疗剂,作为用于同时、分开或连续施用的组合制剂。换句话说,本发明提出了联合使用本发明的组合物和至少一种如上所述的抗癌治疗剂,用于同时、分开或连续施用。

[0416] 此外,本发明还提供了如本文所述的根据本发明的(至少)两种不同抗原肽的联合物。在这种情况下,(至少)两种不同的抗原肽可以是任何形式,例如“裸的”,包含在免疫原性化合物、纳米颗粒、(免疫原性)组合物或装载有其的细胞中,或由核酸(例如,载体)编码。因此,(至少)两种不同的抗原肽可以包含在(至少)两种不同的(待联合的)组分中。因此,根据本发明的联合物的两种不同组分特别是指根据本发明的不同抗原肽(其由免疫原性化合物、纳米颗粒组成,由核酸编码等)。这两种不同的组分,特别是根据本发明的两种不同的抗原肽(包含在两种不同的组分中)优选涉及相同类型的癌症,例如涉及与该癌症相关的相同或不同的抗原和/或与该癌症相关的抗原内的相同或不同(参考)表位。更优选地,两种不同的组分,特别是根据本发明的两种不同的抗原肽(包含在两种不同的组分中)涉及相同的肿瘤(相关或特异性)抗原。两种不同的组分,特别是根据本发明的两种不同的抗原肽(包含在两种不同的组分中)也可以涉及相同或不同的(参考)肿瘤(相关或特异性)抗原(一种或多种)。

[0417] 而且,根据本发明的抗原肽还可以与相应的(人)肿瘤抗原表位(如上文关于肽“家族”所述)联合。因此,获得/支持对肿瘤非常有效的T细胞克隆的选择。特别地,可以共同施用根据本发明的抗原肽和相应的(人)肿瘤抗原表位。这种共同施用可以是大约相同时间(同时)或连续,其中在连续施用中,优选首先施用根据本发明的抗原肽,然后施用相应的(人)肿瘤抗原表位。特别地,可以首先施用根据本发明的抗原肽,并且相应的(人)肿瘤抗原表位可以用作(再)加强。例如,根据SEQ ID NO:47的抗原肽可以与根据SEQ ID NO:120的参考肽组合。在另一个实例中,根据SEQ ID NO:51、52、55或56的抗原肽可以与SEQ ID NO:122的参考肽联合。在另一个实例中,根据SEQ ID NO:77的抗原肽可以与SEQ ID NO:128的参考肽联合。在另一个实例中,根据SEQ ID NO:93的抗原肽可以与SEQ ID NO:136的参考肽联合。在另一个实例中,根据SEQ ID NO:28的抗原肽可以与SEQ ID NO:115的参考肽联合。在另一个实例中,根据SEQ ID NO:101或102的抗原肽可以与SEQ ID NO:141的参考肽联合。在

另一个实例中,根据SEQ ID NO:26的抗原肽可以与SEQ ID NO:113的参考肽联合。

[0418] 可以施用将要联合的两种肽,比如(a)根据本发明的抗原肽和相应的(人)肿瘤抗原表位或(b)根据本发明的两种不同的抗原肽

[0419] -在根据本发明的相同免疫原性化合物中或在根据本发明的不同免疫原性化合物中,

[0420] - (装载)在根据本发明的相同纳米颗粒中或在根据本发明的不同纳米颗粒中,

[0421] - (装载)在根据本发明的相同细胞中或在根据本发明的不同细胞中,

[0422] -由根据本发明的相同核酸或由根据本发明的不同核酸(编码),

[0423] -由根据本发明的相同宿主细胞或由根据本发明的不同宿主细胞(表达),或

[0424] - (包含)在根据本发明的相同免疫原性组合物中或在根据本发明的不同免疫原性组合物中。

[0425] 例如,本发明提供了下列的联合物

[0426] (i)包括根据本发明的第一抗原肽的根据本发明的免疫原性化合物,和

[0427] (ii)包括根据本发明的第二抗原肽的根据本发明的免疫原性化合物

[0428] 其用于预防和/或治疗癌症。

[0429] 例如,本发明提供了下列的联合物

[0430] (i)根据本发明的第一抗原肽,和

[0431] (ii)根据本发明的第二抗原肽

[0432] 其用于预防和/或治疗癌症。

[0433] 例如,本发明提供下列的联合物

[0434] (i)包括根据本发明的第一抗原肽的根据本发明的纳米颗粒,和

[0435] (ii)包括根据本发明的第二抗原肽的根据本发明的纳米颗粒

[0436] 其用于预防和/或治疗癌症。

[0437] 例如,本发明提供了下列的联合物

[0438] (i)根据本发明的核酸,其包括编码根据本发明的第一抗原肽的多核苷酸,和

[0439] (ii)根据本发明的核酸,其包括编码根据本发明的第一抗原肽的多核苷酸

[0440] 其用于预防和/或治疗癌症。

[0441] 优选地,两种待联合的肽,例如(a)根据本发明的抗原肽和相应的(人)肿瘤抗原表位或(b)根据本发明的两种不同的抗原肽,特别是组分(i)和(ii),在大约相同时间施用。更一般地,优选任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物的形式;在本文中称为“第一(抗原)肽组分”)中的第一(抗原)肽与任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物的形式;在本文中称为“第二(抗原)肽组分”)中的第二(抗原)肽大约相同时间施用,其中两种(抗原)肽优选以相同形式(即,在相同类型的制剂中,例如,都作为纳米颗粒、都作为免疫原性组合物等)施用。

[0442] “在大约相同时间”,如本文所用,具体指同时施用或就在施用(i)第一(抗原)肽组分之后施用(ii)第二(抗原)肽组分,或就在施用(ii)第二(抗原)肽组分之后施用(i)第一(抗原)肽组分。技术人员理解“就在……之后”包括准备第二次施用所需的时间-具体地暴

露和消毒第二次施用的位置所需的时间以及“施用装置”（例如注射器、泵等）的适当制备。同时施用还包括如果(i)第一(抗原)肽组分和(ii)第二(抗原)肽组分的施用时期重叠或者如果例如一种组分在较长时期内施用,例如30分钟、1小时、2小时或甚至更长时间,例如通过输注,并且在这样长的时期内的某个时间施用另一种成分。如果使用不同的施用途径和/或不同的施用部位,则特别优选在大约相同时间施用(i)第一(抗原)肽组分和(ii)第二(抗原)肽组分。

[0443] 还优选两种待联合的肽,例如(a)根据本发明的抗原肽和相应的(人)肿瘤抗原表位或(b)根据本发明的两种不同的抗原肽,特别是组分(i)和(ii),被连续施用。更一般地,优选任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物的形式;在本文中称为“第一(抗原)肽组分”)中的第一(抗原)肽与任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物的形式;在本文中称为“第二(抗原)肽组分”)中的第二(抗原)肽连续被施用,其中两种(抗原)肽优选以相同形式(即,在相同类型的制剂中,例如,都作为纳米颗粒、都作为免疫原性组合物等)施用。

[0444] 这意味着(i)第一(抗原)肽组分在(ii)第二(抗原)肽组分之前或之后施用。在连续施用中,第一组分的施用和第二组分的施用之间的时间优选不超过一周,更优选不超过3天,甚至更优选不超过2天,和最优选不超过24小时。特别优选的是,(i)第一(抗原)肽组分和(ii)第二(抗原)肽组分在同一天被施用,其中第一组分(第一或第二(抗原)肽)的施用与第二组分(第一或第二(抗原)肽中的另一种)的施用之间的时间优选不超过6小时,更优选不超过3小时,甚至更优选不超过2小时,和最优选不超过1小时。

[0445] 优选地,(i)第一(抗原)肽组分和(ii)第二(抗原)肽组分经由相同的施用途径被施用。更一般地,优选任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物的形式;在本文中称为“第一(抗原)肽组分”)中的第一(抗原)肽与任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物的形式;在本文中称为“第二(抗原)肽组分”)中的第二(抗原)肽经由相同的施用途径被施用,其中两种(抗原)肽优选以相同形式(即,在相同类型的制剂中,例如,都作为纳米颗粒、都作为免疫原性组合物等)施用。

[0446] 还优选组分(i)和(ii)经由不同施用途径被施用。更一般地,优选任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物的形式;在本文中称为“第一(抗原)肽组分”)中的第一(抗原)肽与任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、根据本发明的宿主细胞、或根据本发明的免疫原性组合物的形式;在本文中称为“第二(抗原)肽组分”)中的第二(抗原)肽经由不同施用途径被施用,其中两种(抗原)肽优选以相同形式(即,在相同类型的制剂中,例如,都作为纳米颗粒、都作为免疫原性组合物等)施用。

[0447] 优选地,组分(i)和(ii)包含在相同组合物中。更一般地,优选任何制剂(例如,以

根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、或根据本发明的宿主细胞的形式；在本文中称为“第一(抗原)肽组分”)中的第一(抗原)肽与任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、或根据本发明的宿主细胞的形式；在本文中称为“第二(抗原)肽组分”)中的第二(抗原)肽包含在相同组合物中,其中两种(抗原)肽优选以相同形式(即,在相同类型的制剂中,例如,都作为纳米颗粒等)施用。

[0448] 还优选组分(i)和(ii)包含在不同组合物中。更一般地,优选任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、或根据本发明的宿主细胞的形式；在本文中称为“第一(抗原)肽组分”)中的第一(抗原)肽与任何制剂(例如,以根据本发明的免疫原性化合物、根据本发明的纳米颗粒、根据本发明的细胞、根据本发明的核酸、或根据本发明的宿主细胞的形式；在本文中称为“第二(抗原)肽组分”)中的第二(抗原)肽包含在不同组合物中,其中两种(抗原)肽优选以相同形式(即,在相同类型的制剂中,例如,都作为纳米颗粒等)施用。

[0449] 实施例

[0450] 实施例1和2都与图1中描述的一般方案相关联。

[0451] 实施例1: 鉴定对HLA-A*0201等位基因具有优越亲和力的候选抗原肽。

[0452] 该实施例提供证据: 序列SEQ ID N°71的抗原肽(《FLPFGFILV》,在本文中还被称为IL13RA2-B)对HLA-A*0201等位基因具有高亲和力,而衍生自IL13RA2的相应参考人肽(《WLPGFILI》,SEQ ID N°123,在本文中还被称为IL13RA2-H)具有低亲和力。

[0453] A. 材料和方法

[0454] A1. 测量肽对T2细胞系的亲和力

[0455] 实验方案与对于由HLA-A*0201呈递的肽验证的实验方案类似(Tourdot et al., A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. Eur J Immunol. 2000Dec;30(12):3411-21)。肽的亲和力测量利用人肿瘤细胞T2实现,人肿瘤细胞T2表达HLA-A*0201分子,但是其是TAP1/2阴性的并且不能够呈递内源肽。

[0456] 利用从100 μ M至0.1 μ M的降低的肽浓度在补充有100ng/ μ l人 β 2m的AIMV培养基中在37 $^{\circ}$ C下培育T2细胞(2.10⁵细胞/孔)持续16小时。然后洗涤细胞两次并用偶联至PE(克隆BB7.2, BD Pharmagen)的抗-HLA-A2抗体标记。

[0457] 通过FACS(Guava Easy Cyte)实现分析。

[0458] 对于每种肽浓度,与感兴趣的肽相关联的标记的几何平均值减去背景噪声并报道为在100 μ M的浓度下对于参考肽HIV pol 589-597获得的HLA-A*0202标记的几何平均值的百分比。相对亲和力然后如下被测定:

[0459] 相对亲和力 = 引起HLA-A*0201的20%表达的每种肽的浓度 / 引起HLA-A*0201的20%表达的参考肽的浓度。

[0460] A2. 肽的溶解

[0461] 通过考虑氨基酸组成溶解每种肽。对于不包含任何半胱氨酸、甲硫氨酸或色氨酸的肽,DMSO的添加可能多达总体积的10%。将其他肽再悬浮在水或PBS pH7.4中。

[0462] B. 结果

[0463] 对于T2ATCC细胞:可变肽浓度的平均荧光强度:关于IL13RA2肽对(IL13RA2-H和IL13RA2-B),看起来人肽不结合至HLA-A*0201,与候选肽IL13RA2-B相反,候选肽IL13RA2-B强地结合至HLA-A*0201:在100 μ M下112.03vs 18.64;在10 μ M下40.77vs 11.61;在1 μ M下12.18vs 9.41;在0.1 μ M下9.9vs 7.46。

[0464] 而且,在4.4 μ M下的IL13RA2-B引起HLA-A*0201的20%表达(IL13RA2-H为100%)。

[0465] 由第二不同的T2细胞克隆获得类似结果。

[0466] 实施例2:利用候选抗原肽对小鼠接种疫苗引起ELISPOT-IFN γ 分析中改善的T细胞应答。

[0467] A. 材料和方法

[0468] A.1 小鼠模型

[0469] 表2中概述了使用的模型的特征。

[0470] 表2. 模型特征。

[0471]	小鼠模型	C57BL/6J B2m ^{tm1Unc} IAb ^{-/-} Tg(HLA-DRA Tg(HLA-A/H2-D/B2M)) ^{1Bpe} HLA-DRB1*0301) ^{#Gjh}
	缩写	β /A2/DR3
	描述	免疫活性的, 无小鼠 I 类和 II 类 MHC
	居住	SOPF 条件(ABSL3)
	小鼠数目	24 只成体小鼠(>8 周龄)

[0472] A.2. 免疫方案。

[0473] 图2中示出了免疫方案。简言之,将14只 β /A2/DR3小鼠随机分配(基于小鼠性别和年龄)为两个实验组,每只用结合至常见辅助肽(h-pAg)的特定接种疫苗肽(vacc-pAg)免疫(如在下面的表3中概述的)。成对比较vacc-pAg(第1组对第2组)。由此,在每个波动(wave)中比较单一肽的天然和优化的版本二者。

[0474] 表3. 实验组组成。h-pAg:‘辅助’肽;vacc-pAg:接种疫苗肽。加强注射的次数在括号中指出。

[0475]	组	肽(vacc-pAg)	辅助(h-pAg)	致敏	加强	动物数目
	1	IL13RA2-B(100 μ g)	HHD-DR3(150 μ g)	+	+(1 \times)	6
	2	IL13RA2-H(100 μ g)	HHD-DR3(150 μ g)	+	+(1 \times)	6

[0476] 如下提供肽:

[0477] • vacc-pAg对:IL13RA2-H和IL13RA2-B;所有都以4mg/ml(4mM)浓度产生和提供;

[0478] • h-pAg:HHD-DR3;冻干提供(50.6mg;Eurogentec批次1611166)并以10mg/mL浓度再悬浮于纯的蒸馏水中;

[0479] 在第0天(d0)用致敏注射,和在第14天用加强注射免疫小鼠。在尾巴基部用100 μ L的油性乳液皮下注射每只小鼠,该油性乳液包含:

[0480] • 100 μ g的vacc-pAg(25 μ L的4mg/mL原液/小鼠);

[0481] • 150 μ g的h-pAg(15 μ L的10mg/mL原液/小鼠);

[0482] • 10 μ L的PBS以达到50 μ L的总体积(每只小鼠);

[0483] • 以1:1(v:v)比添加的不完全弗氏佐剂(IFA)(50 μ L/小鼠)。

[0484] 如下为每种vacc-pAg制备单独的乳液:将IFA试剂加入到15mL管中的vacc-pAg/h-pAg/PBS混合物中并在涡旋下混合1分钟的重复循环直至形成稠乳液。

[0485] A.3. 小鼠分析

[0486] 加强注射后七天(即,第21天),使动物安乐死并收获脾脏。通过机械破碎器官,然后70 μ m过滤和菲可密度梯度纯化制备脾细胞。

[0487] 脾细胞立即用于ELISPOT-IFN γ 分析(表4)。一式四份重复实验条件,每孔使用 2×10^5 个总脾细胞,并在存在vacc-pAg (10 μ M)、伴刀豆球蛋白A (ConA, 2.5 μ g/mL)或仅培养基的情况下培养以评估它们分泌IFN γ 的能力。按照制造商的说明使用商业ELISPOT-IFN γ 试剂盒(Diaclone Kit Mujrine IFN γ ELISpot),并在培育约16小时后进行分析。

[0488] 表4. ELISPOT-IFN γ 分析的设置

组	刺激物	孔	动物	总
1	IL13RA2-B(10 μ M)	4	6	24
	IL13RA2-H(10 μ M)	4	6	24
	ConA(2.5 μ g/mL)	4	6	24
	培养基	4	6	24
2	IL13RA2-B(10 μ M)	4	6	24
	IL13RA2-H(10 μ M)	4	6	24
	ConA(2.5 μ g/mL)	4	6	24
	培养基	4	6	24

[0490] 在与ImmunoSpot 5.4软件(CTL-Europe)接合的Grand ImmunoSpot[®] S6Ultimate UV图像分析仪上计数斑点。利用Prism-5软件(GraphPad Software Inc.)进行数据绘图和统计学分析。

[0491] 也通过流式细胞术分析细胞悬浮物,用于T细胞计数标准化。在靶向鼠(1:10稀释的‘抗mCD16/CD32CF11克隆’-内源)Fc受体的Fc-阻断试剂存在下,将单克隆抗体混合物(数据未显示)应用于纯化的白细胞。在96孔板中进行培育,在黑暗中和在4 $^{\circ}$ C下进行15-20分钟。染色后通过离心洗涤细胞以除去过量的单克隆抗体混合物,并将其重悬于PBS中用于数据采集。

[0492] 所有数据采集均使用与FACS-Diva软件(BD Bioscience)接合的LSR-II Fortessa流式细胞仪进行。使用FlowJo-9软件(TreeStar Inc.)使用门控策略(未示出)进行分析。

[0493] 表5. FACS系列EXP-1。

靶标	标签	克隆	供应商	稀释
mCD3 ϵ γ	FITC	145-2C11	Biolegend	1/100
mCD4	PE	RM4-5	Biolegend	1/100
mCD8 α	APC	53-6,7	Biolegend	1/100

[0495] B. 结果

[0496] 总计14只 β /A2/DR3小鼠被用于该实验(参见表6)。在处死时,通过流式细胞术分析脾T细胞群,表明大多数属于CD4+T细胞子集。

[0497] 表6. 个体小鼠特征(组1&2)。通过独特的耳标ID号鉴定每只小鼠。^a接种疫苗方案开始时的年龄(以周计);^b总白细胞中T细胞的百分比;^c总T细胞中CD4+或CD8+T细胞的百分

比;^d板(P)数目。

小鼠 ID	性别	年龄 ^a (wks)	组 (pAg)	T 细胞 ^b (%)	T4 ^c (%)	T8 ^c (%)	注 ^d
826	M	14	1 (IL13RA2-B)	18.6	72.0	13.7	P1/2
827	M	14	1 (IL13RA2-B)	21.1	82.5	8.7	P1/2
828	M	14	1 (IL13RA2-B)	20.9	78.4	8.6	P1/2
829	F	15	1 (IL13RA2-B)	23.8	67.0	17.5	P1/2
830	F	15	1 (IL13RA2-B)	29.2	73.3	12.5	P1/2
831	F	15	1 (IL13RA2-B)	N.A.	N.A.	N.A.	ID 标签丢失(排除)
17	M	9	1 (IL13RA2-B)	8.3	83.7	10.4	P5
832	F	15	2 (IL13RA2-H)	28.3	83.4	5.7	P1/2
833	F	15	2 (IL13RA2-H)	N.A.	N.A.	N.A.	ID 标签丢失(排除)
834	F	15	2 (IL13RA2-H)	27.5	79.7	7.2	P1/2
835	M	13	2 (IL13RA2-H)	33.8	84.2	8.5	P1/2
836	M	13	2 (IL13RA2-H)	31.4	84.7	6.3	P1/2
837	M	15	2 (IL13RA2-H)	30.8	83.4	5.4	P1/2
18	M	9	2 (IL13RA2-H)	11.2	85.9	9.2	P5

[0499] 在用适当的刺激物平板接种和培育之后,释放并计数产IFN γ 的细胞。然后将数据标准化为每 10^6 个总T细胞中具体斑点(减去‘仅培养基’条件中获得的平均计数)的数目。

[0500] 接下来使用各个平均值(从一式四份获得)绘制组平均值(参见图3A)。由于T细胞的功能可能因个体而异,数据也表示为ConA应答/个体的百分比(见图3B)。

[0501] 总之,与IL13RA2-H pA(参考人)接种疫苗的动物(组2)相比,用IL13RA2-B pAg(候选)肽接种疫苗在ELISPOT-IFN γ 分析中诱导改善的T细胞应答。对于组1(IL13RA2-B),用IL13RA2-B pAg离体再刺激比IL13RA2-H pAg促进更高的应答。第2组(IL13RA2-H)不是这种情况。每种病症的ConA诱导的应答百分比(平均值 \pm SEM)如下:

[0502] • 组1(IL13RA2-B)/IL13RA2-B pAg:56.3% \pm 18.1

[0503] • 组1(IL13RA2-B)/IL13RA2-H pAg:32.3% \pm 11.8

[0504] • 组2(IL13RA2-H)/IL13RA2-B pAg:2.0% \pm 0.8

[0505] • 组2(IL13RA2-H)/IL13RA2-H pAg:1.1% \pm 0.8

[0506] 因此,那些结果提供了实验证据:靶向IL13RA2的肿瘤-抗原免疫疗法能够改善体内T细胞应答,并且IL13RA2-B候选肽(SEQ ID N°71)对于该目的特别有效。

[0507] 实施例3:对HLA-A*0201等位基因具有优越亲和力的进一步候选抗原肽的鉴定。

[0508] 该实施例提供证据:序列SEQ ID N°47(《RLLEETDLV》,在本文中还被称为ERBB2-1B);SEQ ID N°51(《VMLGVVFGV》,在本文中还被称为ERBB2-3B1);SEQ ID N°52(《VLLGVVFGV》,在本文中还被称为ERBB2-3B2);SEQ ID N°55(《VMLGVVFGI》,在本文中还被称为ERBB2-3B3);和SEQ ID N°56(《ILLGVVFGI》,在本文中还被称为ERBB2-3B4)的抗原肽与衍生自ERBB2(《RLLQETELV》,SEQ ID N°120,在本文中还被称为ERBB2-1H;《VLLGVVFGI》,SEQ ID N°122,在本文中还被称为ERBB2-3H)的相应参考人肽相比对HLA-A*0201等位基因具有更高亲和力。

[0509] A. 材料和方法

[0510] A1. 测量肽对T2细胞系的亲和力

[0511] 实验方案与对于由HLA-A*0201呈递的肽验证的实验方案类似(Tourdot et al., A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-

associated peptides:implication in the identification of cryptic tumor epitopes.Eur J Immunol.2000Dec;30(12):3411-21)。肽的亲和力测量利用人肿瘤细胞T2实现,人肿瘤细胞T2表达HLA-A*0201分子,但是其是TAP1/2阴性的并且不能够呈递内源肽。

[0512] 利用从100 μ M至0.1 μ M的降低的肽浓度在补充有100ng/ μ l人 β 2m的AIMV培养基中在37 $^{\circ}$ C下培育T2细胞(2.10⁵细胞/孔)持续16小时。然后洗涤细胞两次并用偶联至PE(克隆BB7.2,BD Pharmagen)的抗-HLA-A2抗体标记。

[0513] 通过FACS(Guava Easy Cyte)实现分析。

[0514] 对于每种肽浓度,与感兴趣的肽相关联的标记的几何平均值减去背景噪声并报道为在100 μ M的浓度下对于参考肽HIV pol 589-597获得的HLA-A*0202标记的几何平均值的百分比。相对亲和力然后如下被测定:

[0515] 相对亲和力=引起HLA-A*0201的20%表达的每种肽的浓度/引起HLA-A*0201的20%表达的参考肽的浓度。

[0516] A2. 肽的溶解

[0517] 通过考虑氨基酸组成溶解每种肽。对于不包含任何半胱氨酸、甲硫氨酸或色氨酸的肽,DMSO的添加可能多达总体积的10%。将其他肽再悬浮在水或PBS pH7.4中。

[0518] B. 结果

[0519] 结果在表7中示出:

肽	SEQ ID NO.	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0.1 μ M	引起 20%的 HLA-A2 表达的浓度[μ M]	相对亲和力
ERBB2-1B	47	296.97	26.39	2.86	-1.18	9.5	0.26
ERBB2-1H	120	108.74	15.63	-5.21	-5.88	16.3	0.45
[0520] ERBB2-3B1	51	122.18	26.72	-12.94	-15.97	9	0.25
ERBB2-3B2	52	335.97	56.97	1.51	-14.62	6.9	0.19
ERBB2-3B3	55	178.66	16.64	-10.59	-16.3	12.5	0.35
ERBB2-3B4	56	265.38	138.32	26.05	-11.6	0.9	0.03
ERBB2-3H	122	196.47	11.93	-24.03	-12.61	16.3	0.45
HIV pol 589-597		100	-3.03	-5.38	-9.24	36	

[0521] 如在表7中所示(具体地,参见如上面描述计算的“相对亲和力”),抗原肽ERBB2-1B与相应的人肽ERBB2-1H相比显示更高的亲和力(较低的值)。而且,抗原肽ERBB2-3B1、ERBB2-3B2、ERBB2-3B3和ERBB2-3B4与相应的人肽ERBB2-1B相比显示更高的亲和力(较低的值)。而且,较低浓度的抗原肽ERBB2-1B、ERBB2-3B1、ERBB2-3B2、ERBB2-3B3和ERBB2-3B4(与人参考肽相比)对于诱导HLA-A*0201的20%表达是需要的。

[0522] 由第二不同的T2细胞克隆获得类似结果。

[0523] 实施例4:对HLA-A*0201等位基因具有优越亲和力的进一步候选抗原肽的鉴定。

[0524] 该实施例提供证据:序列SEQ ID N^o77(《KLVEWLAML》,在本文中还被称为MAGE C1B);SEQ ID N^o93(《SLPPDVQQV》,在本文中还被称为MMP2-B);SEQ ID N^o28(《ITSDVPFSV》,在本文中还被称为PMEL-B);SEQ ID N^o101(《MLAVFLPLV》,在本文中还被称为STEAP-B1);和SEQ ID N^o102(《YLAVFLPIV》,在本文中还被称为STEAP-B2)的抗原肽与衍生自MAGE C1(《KVVEFLAML》,SEQ ID N^o128,在本文中还被称为MAGE C1H)、MMP2(《GLPPDVQRV》,SEQ ID N^o136,在本文中还被称为MMP2-H)、PMEL(《ITDQVPFSV》,SEQ ID N^o115,在本文中还被称为PMEL-H)和STEAP(《MIAVFLPIV》,SEQ ID N^o141,在本文中还被称为STEAP-H)的相应参考人

肽相对HLA-A*0201等位基因具有更高亲和力。

[0525] A. 材料和方法

[0526] A1. 测量肽对T2细胞系的亲和力

[0527] 实验方案与对于由HLA-A*0201呈递的肽验证的实验方案类似(Tourdot et al., A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. Eur J Immunol. 2000Dec;30(12):3411-21)。肽的亲和力测量利用人肿瘤细胞T2实现,人肿瘤细胞T2表达HLA-A*0201分子,但是其是TAP1/2阴性的并且不能够呈递内源肽。

[0528] 利用从100 μ M至0.1 μ M的降低的肽浓度在补充有100ng/ μ l人 β 2m的AIMV培养基中在37 $^{\circ}$ C下培育T2细胞(2.10⁵细胞/孔)持续16小时。然后洗涤细胞两次并用偶联至PE(克隆BB7.2, BD Pharmagen)的抗-HLA-A2抗体标记。

[0529] 通过FACS(Guava Easy Cyte)实现分析。

[0530] 对于每种肽浓度,与感兴趣的肽相关联的标记的几何平均值减去背景噪声并报道为在100 μ M的浓度下对于参考肽HIV pol 589-597获得的HLA-A*0202标记的几何平均值的百分比。相对亲和力然后如下被测定:

[0531] 相对亲和力=引起HLA-A*0201的20%表达的每种肽的浓度/引起HLA-A*0201的20%表达的参考肽的浓度。

[0532] A2. 肽的溶解

[0533] 通过考虑氨基酸组成溶解每种肽。对于不包含任何半胱氨酸、甲硫氨酸或色氨酸的肽,DMSO的添加可能多达总体积的10%。将其他肽再悬浮在水或PBS pH7.4中。

[0534] B. 结果

[0535] 结果在表8中示出:

[0536]

肽	SEQ ID NO.	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0.1 μ M	引起 20%的 HLA-A2 表达的浓度[μ M]	相对亲和力
MAGE C1B	77	108.8	21.4	3.97	2.45	30.91	0.31
MAGE C1H	128	32.27	7.84	7.12	5.77	60.07	1.94
MMP2-B	93	131.08	95.96	24.64	4.69	0.88	0.03
MMP2-H	136	154.17	66.31	17.81	5.41	1.76	0.06
PMEL-B	28	74.85	7.93	3.62	4.69	18.24	0.59
PMEL-H	115	112.58	9.09	5.32	1.01	23.94	0.77
STEAP-B1	101	131.62	45.12	8.92	6.67	5	0.16
STEAP-B2	102	97.93	27.69	4.87	-0.34	8.22	0.27
STEAP-H	141	101.98	14.93	-4.47	0.11	33.45	1.08
HIV pol 589-597		100	3.8	-2.54	2.58	30.91	

[0537] 如在表8中所示(具体地,参见如上面描述计算的“相对亲和力”),抗原肽MAGE C1B与相应的人肽MAGE C1H相比显示更高的亲和力(较低的值)。而且,抗原肽MMP2-B与相应的人肽MMP2-H相比显示更高的亲和力(较低的值)。而且,抗原肽PMEL-B与相应的人肽PMEL-H相比显示更高的亲和力(较低的值)。而且,抗原肽STEAP-B1和STEAP-B2与相应的人肽STEAP-H相比显示更高的亲和力(较低的值)。而且,较低浓度的抗原肽MAGE C1B、MMP2-B、PMEL-B、STEAP-B1和STEAP-B2(与它们的人参考肽相比)对于诱导HLA-A*0201的20%表达是需要的。

[0538] 由第二不同的T2细胞克隆获得类似结果。

[0539] 实施例5:对HLA-A*0201等位基因具有优越亲和力的进一步候选抗原肽的鉴定。

[0540] 该实施例提供证据:序列SEQ ID N°26的抗原肽(《TMNGKSSPV》,在本文中还被称为ENAH-B)对HLA-A*0201等位基因具有高亲和力,而衍生自ENAH的相应的参考人肽ENAH(《TMNGKSSPV》,SEQ ID N°113,在本文中还被称为ENAH-H)具有低亲和力。

[0541] A. 材料和方法

[0542] A1. 测量肽对T2细胞系的亲和力

[0543] 实验方案与对于由HLA-A*0201呈递的肽验证的实验方案类似(Tourdot et al., A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. Eur J Immunol. 2000Dec;30(12):3411-21)。肽的亲和力测量利用人肿瘤细胞T2实现,人肿瘤细胞T2表达HLA-A*0201分子,但是其是TAP1/2阴性的并且不能够呈递内源肽。

[0544] 利用从100 μ M至0.1 μ M的降低的肽浓度在补充有100ng/ μ l人 β 2m的AIMV培养基中在37 $^{\circ}$ C下培育T2细胞(2.10⁵细胞/孔)持续16小时。然后洗涤细胞两次并用偶联至PE(克隆BB7.2, BD Pharmagen)的抗-HLA-A2抗体标记。

[0545] 通过FACS(Guava Easy Cyte)实现分析。

[0546] 对于每种肽浓度,与感兴趣的肽相关联的标记的几何平均值减去背景噪声并报道为在100 μ M的浓度下对于参考肽HIV pol 589-597获得的HLA-A*0202标记的几何平均值的百分比。相对亲和力然后如下被测定:

[0547] 相对亲和力=引起HLA-A*0201的20%表达的每种肽的浓度/引起HLA-A*0201的20%表达的参考肽的浓度。

[0548] A2. 肽的溶解

[0549] 通过考虑氨基酸组成溶解每种肽。对于不包含任何半胱氨酸、甲硫氨酸或色氨酸的肽,DMSO的添加可能多达总体积的10%。将其他肽再悬浮在水或PBS pH7.4中。

[0550] B. 结果

[0551] 结果在表9中示出:

肽	SEQ ID NO.	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0.1 μ M	引起 20%的 HLA-A2 表达的浓度 [μ M]	相对亲和力
[0552] ENAH-1B	26	100.24	2.93	14.18	12.71	33.45	1.26
ENAH-1H	113	18.58	19.07	-2.93	8.31	ND	ND
HIV pol 589-597		100	8.8	4.65	5.62	26.48	

[0553] 如在表9中所示(具体地,参见如上面描述计算的“相对亲和力”),抗原肽ENAH-B与相应的人肽ENAH-H相比显示更高的亲和力(较低的值)。具体地,看起来人肽ENAH-H不结合至HLA-A*0201(ND...未测定)。

[0554] 而且,较低浓度的抗原肽ENAH-1B(与人参考肽相比)对于诱导HLA-A*0201的20%表达是需要的。

[0555] 由第二不同的T2细胞克隆获得类似结果。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 恩特罗姆公司
- [0003] <120> 用于癌症疗法的免疫原性化合物
- [0004] <130> EB01P002W0
- [0005] <150> EP16192948.4
- [0006] <151> 2016-10-07
- [0007] <160> 144
- [0008] <170> BiSSAP 1.3.2
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 9
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <223> “肽”
- [0014] <220>
- [0015] <223> 肽
- [0016] <400> 1
- [0017] Ser Leu Ala Gly Thr Ile Thr Gly Val
- [0018] 1 5
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 9
- [0021] <212> PRT
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <223> “肽”
- [0024] <220>
- [0025] <223> 肽
- [0026] <400> 2
- [0027] Leu Leu Met Lys Leu Ala Asp Leu Val
- [0028] 1 5
- [0029] <210> 3
- [0030] <211> 9
- [0031] <212> PRT
- [0032] <213> 人工序列
- [0033] <223> “肽”
- [0034] <220>
- [0035] <223> 肽
- [0036] <400> 3
- [0037] Leu Leu Tyr Lys Ile Ala Asp Leu Val
- [0038] 1 5

- [0039] <210> 4
[0040] <211> 10
[0041] <212> PRT
[0042] <213> 人工序列
[0043] <223> "肽"
[0044] <220>
[0045] <223> 肽
[0046] <400> 4
[0047] Ser Leu Ala Leu Ser Val Ile Leu Arg Val
[0048] 1 5 10
[0049] <210> 5
[0050] <211> 10
[0051] <212> PRT
[0052] <213> 人工序列
[0053] <223> "肽"
[0054] <220>
[0055] <223> 肽
[0056] <400> 5
[0057] Ser Leu Ala Val Ser Val Ile Leu Arg Ala
[0058] 1 5 10
[0059] <210> 6
[0060] <211> 9
[0061] <212> PRT
[0062] <213> 人工序列
[0063] <223> "肽"
[0064] <220>
[0065] <223> 肽
[0066] <400> 6
[0067] Lys Leu Leu Asp Ala Val Ile Ser Leu
[0068] 1 5
[0069] <210> 7
[0070] <211> 9
[0071] <212> PRT
[0072] <213> 人工序列
[0073] <223> "肽"
[0074] <220>
[0075] <223> 肽
[0076] <400> 7
[0077] Lys Leu Leu Asp Ala Leu Leu Ser Leu

[0078]	1	5
[0079]	<210> 8	
[0080]	<211> 9	
[0081]	<212> PRT	
[0082]	<213> 人工序列	
[0083]	<223> "肽"	
[0084]	<220>	
[0085]	<223> 肽	
[0086]	<400> 8	
[0087]	Lys Met Leu Asp Ala Leu Ile Asp Leu	
[0088]	1	5
[0089]	<210> 9	
[0090]	<211> 9	
[0091]	<212> PRT	
[0092]	<213> 人工序列	
[0093]	<223> "肽"	
[0094]	<220>	
[0095]	<223> 肽	
[0096]	<400> 9	
[0097]	Lys Ile Leu Asp Ser Leu Ile Ser Leu	
[0098]	1	5
[0099]	<210> 10	
[0100]	<211> 9	
[0101]	<212> PRT	
[0102]	<213> 人工序列	
[0103]	<223> "肽"	
[0104]	<220>	
[0105]	<223> 肽	
[0106]	<400> 10	
[0107]	Lys Phe Leu Asp Ala Leu Ile Gly Val	
[0108]	1	5
[0109]	<210> 11	
[0110]	<211> 9	
[0111]	<212> PRT	
[0112]	<213> 人工序列	
[0113]	<223> "肽"	
[0114]	<220>	
[0115]	<223> 肽	
[0116]	<400> 11	

- [0117] Lys Phe Leu Asp Ser Leu Ile Ser Val
[0118] 1 5
[0119] <210> 12
[0120] <211> 9
[0121] <212> PRT
[0122] <213> 人工序列
[0123] <223> "肽"
[0124] <220>
[0125] <223> 肽
[0126] <400> 12
[0127] Gly Val Leu Ala Gly Val Ala Leu Val
[0128] 1 5
[0129] <210> 13
[0130] <211> 9
[0131] <212> PRT
[0132] <213> 人工序列
[0133] <223> "肽"
[0134] <220>
[0135] <223> 肽
[0136] <400> 13
[0137] Gly Met Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
[0138] 1 5
[0139] <210> 14
[0140] <211> 9
[0141] <212> PRT
[0142] <213> 人工序列
[0143] <223> "肽"
[0144] <220>
[0145] <223> 肽
[0146] <400> 14
[0147] Gly Leu Leu Met Gly Val Ala Leu Ile
[0148] 1 5
[0149] <210> 15
[0150] <211> 9
[0151] <212> PRT
[0152] <213> 人工序列
[0153] <223> "肽"
[0154] <220>
[0155] <223> 肽

- [0156] <400> 15
[0157] Gly Val Leu Val Gly Leu Ala Leu Val
[0158] 1 5
[0159] <210> 16
[0160] <211> 9
[0161] <212> PRT
[0162] <213> 人工序列
[0163] <223> "肽"
[0164] <220>
[0165] <223> 肽
[0166] <400> 16
[0167] Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Leu Ile
[0168] 1 5
[0169] <210> 17
[0170] <211> 9
[0171] <212> PRT
[0172] <213> 人工序列
[0173] <223> "肽"
[0174] <220>
[0175] <223> 肽
[0176] <400> 17
[0177] Gly Ile Leu Val Gly Val Ala Leu Val
[0178] 1 5
[0179] <210> 18
[0180] <211> 9
[0181] <212> PRT
[0182] <213> 人工序列
[0183] <223> "肽"
[0184] <220>
[0185] <223> 肽
[0186] <400> 18
[0187] Gly Leu Leu Ile Gly Val Ala Leu Ile
[0188] 1 5
[0189] <210> 19
[0190] <211> 9
[0191] <212> PRT
[0192] <213> 人工序列
[0193] <223> "肽"
[0194] <220>

- [0195] <223> 肽
[0196] <400> 19
[0197] Gly Val Leu Leu Gly Val Ala Leu Val
[0198] 1 5
[0199] <210> 20
[0200] <211> 9
[0201] <212> PRT
[0202] <213> 人工序列
[0203] <223> "肽"
[0204] <220>
[0205] <223> 肽
[0206] <400> 20
[0207] Gly Val Leu Thr Gly Ile Ala Leu Ile
[0208] 1 5
[0209] <210> 21
[0210] <211> 9
[0211] <212> PRT
[0212] <213> 人工序列
[0213] <223> "肽"
[0214] <220>
[0215] <223> 肽
[0216] <400> 21
[0217] Gly Ile Leu Val Gly Leu Ala Leu Ile
[0218] 1 5
[0219] <210> 22
[0220] <211> 9
[0221] <212> PRT
[0222] <213> 人工序列
[0223] <223> "肽"
[0224] <220>
[0225] <223> 肽
[0226] <400> 22
[0227] Gly Val Ile Val Gly Val Ala Leu Val
[0228] 1 5
[0229] <210> 23
[0230] <211> 9
[0231] <212> PRT
[0232] <213> 人工序列
[0233] <223> "肽"

- [0234] <220>
[0235] <223> 肽
[0236] <400> 23
[0237] Gly Val Phe Val Gly Leu Ala Leu Ile
[0238] 1 5
[0239] <210> 24
[0240] <211> 9
[0241] <212> PRT
[0242] <213> 人工序列
[0243] <223> "肽"
[0244] <220>
[0245] <223> 肽
[0246] <400> 24
[0247] Gly Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Val
[0248] 1 5
[0249] <210> 25
[0250] <211> 9
[0251] <212> PRT
[0252] <213> 人工序列
[0253] <223> "肽"
[0254] <220>
[0255] <223> 肽
[0256] <400> 25
[0257] Tyr Leu Phe Gly His Ser Trp Tyr Lys
[0258] 1 5
[0259] <210> 26
[0260] <211> 9
[0261] <212> PRT
[0262] <213> 人工序列
[0263] <223> "肽"
[0264] <220>
[0265] <223> 肽
[0266] <400> 26
[0267] Thr Met Asn Gly Lys Ser Ser Pro Val
[0268] 1 5
[0269] <210> 27
[0270] <211> 9
[0271] <212> PRT
[0272] <213> 人工序列

- [0273] <223> "肽"
[0274] <220>
[0275] <223> 肽
[0276] <400> 27
[0277] Phe Met Ala Glu Asp Glu Thr Leu Leu
[0278] 1 5
[0279] <210> 28
[0280] <211> 9
[0281] <212> PRT
[0282] <213> 人工序列
[0283] <223> "肽"
[0284] <220>
[0285] <223> 肽
[0286] <400> 28
[0287] Ile Thr Ser Asp Val Pro Phe Ser Val
[0288] 1 5
[0289] <210> 29
[0290] <211> 9
[0291] <212> PRT
[0292] <213> 人工序列
[0293] <223> "肽"
[0294] <220>
[0295] <223> 肽
[0296] <400> 29
[0297] Ile Met Ser Ala Val Ile Gly Ile Leu
[0298] 1 5
[0299] <210> 30
[0300] <211> 9
[0301] <212> PRT
[0302] <213> 人工序列
[0303] <223> "肽"
[0304] <220>
[0305] <223> 肽
[0306] <400> 30
[0307] Ile Leu Ser Ala Val Ile Gly Ile Leu
[0308] 1 5
[0309] <210> 31
[0310] <211> 9
[0311] <212> PRT

- [0312] <213> 人工序列
[0313] <223> "肽"
[0314] <220>
[0315] <223> 肽
[0316] <400> 31
[0317] Ile Leu Ser Ala Val Val Gly Val Leu
[0318] 1 5
[0319] <210> 32
[0320] <211> 9
[0321] <212> PRT
[0322] <213> 人工序列
[0323] <223> "肽"
[0324] <220>
[0325] <223> 肽
[0326] <400> 32
[0327] Ile Met Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
[0328] 1 5
[0329] <210> 33
[0330] <211> 9
[0331] <212> PRT
[0332] <213> 人工序列
[0333] <223> "肽"
[0334] <220>
[0335] <223> 肽
[0336] <400> 33
[0337] Phe Ile Ser Ala Val Val Gly Val Leu
[0338] 1 5
[0339] <210> 34
[0340] <211> 9
[0341] <212> PRT
[0342] <213> 人工序列
[0343] <223> "肽"
[0344] <220>
[0345] <223> 肽
[0346] <400> 34
[0347] Ile Leu Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
[0348] 1 5
[0349] <210> 35
[0350] <211> 9

- [0351] <212> PRT
[0352] <213> 人工序列
[0353] <223> "肽"
[0354] <220>
[0355] <223> 肽
[0356] <400> 35
[0357] Ile Ile Ser Ala Val Ile Gly Ile Val
[0358] 1 5
[0359] <210> 36
[0360] <211> 9
[0361] <212> PRT
[0362] <213> 人工序列
[0363] <223> "肽"
[0364] <220>
[0365] <223> 肽
[0366] <400> 36
[0367] Ile Ile Ser Ala Ile Val Gly Leu Leu
[0368] 1 5
[0369] <210> 37
[0370] <211> 9
[0371] <212> PRT
[0372] <213> 人工序列
[0373] <223> "肽"
[0374] <220>
[0375] <223> 肽
[0376] <400> 37
[0377] Ile Ile Ser Ala Ile Val Gly Ile Val
[0378] 1 5
[0379] <210> 38
[0380] <211> 9
[0381] <212> PRT
[0382] <213> 人工序列
[0383] <223> "肽"
[0384] <220>
[0385] <223> 肽
[0386] <400> 38
[0387] Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Val Val
[0388] 1 5
[0389] <210> 39

- [0390] <211> 9
[0391] <212> PRT
[0392] <213> 人工序列
[0393] <223> "肽"
[0394] <220>
[0395] <223> 肽
[0396] <400> 39
[0397] Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Val
[0398] 1 5
[0399] <210> 40
[0400] <211> 9
[0401] <212> PRT
[0402] <213> 人工序列
[0403] <223> "肽"
[0404] <220>
[0405] <223> 肽
[0406] <400> 40
[0407] Leu Ile Ser Ala Val Val Gly Leu Leu
[0408] 1 5
[0409] <210> 41
[0410] <211> 9
[0411] <212> PRT
[0412] <213> 人工序列
[0413] <223> "肽"
[0414] <220>
[0415] <223> 肽
[0416] <400> 41
[0417] Ile Leu Tyr Gly Gly Ala Tyr Ser Leu
[0418] 1 5
[0419] <210> 42
[0420] <211> 9
[0421] <212> PRT
[0422] <213> 人工序列
[0423] <223> "肽"
[0424] <220>
[0425] <223> 肽
[0426] <400> 42
[0427] Lys Leu Tyr Gly Ser Leu Ala Phe Leu
[0428] 1 5

- [0429] <210> 43
[0430] <211> 9
[0431] <212> PRT
[0432] <213> 人工序列
[0433] <223> "肽"
[0434] <220>
[0435] <223> 肽
[0436] <400> 43
[0437] Lys Ile Phe Gly Thr Leu Ala Phe Met
[0438] 1 5
[0439] <210> 44
[0440] <211> 9
[0441] <212> PRT
[0442] <213> 人工序列
[0443] <223> "肽"
[0444] <220>
[0445] <223> 肽
[0446] <400> 44
[0447] Pro Leu Ala Asp Ile Ile Ser Ala Val
[0448] 1 5
[0449] <210> 45
[0450] <211> 9
[0451] <212> PRT
[0452] <213> 人工序列
[0453] <223> "肽"
[0454] <220>
[0455] <223> 肽
[0456] <400> 45
[0457] Pro Leu Ala Ser Ile Phe Ser Ala Val
[0458] 1 5
[0459] <210> 46
[0460] <211> 9
[0461] <212> PRT
[0462] <213> 人工序列
[0463] <223> "肽"
[0464] <220>
[0465] <223> 肽
[0466] <400> 46
[0467] Pro Leu Ser Ser Ile Leu Ser Ala Val

[0468]	1	5
[0469]	<210> 47	
[0470]	<211> 9	
[0471]	<212> PRT	
[0472]	<213> 人工序列	
[0473]	<223> "肽"	
[0474]	<220>	
[0475]	<223> 肽	
[0476]	<400> 47	
[0477]	Arg Leu Leu Glu Glu Thr Asp Leu Val	
[0478]	1	5
[0479]	<210> 48	
[0480]	<211> 9	
[0481]	<212> PRT	
[0482]	<213> 人工序列	
[0483]	<223> "肽"	
[0484]	<220>	
[0485]	<223> 肽	
[0486]	<400> 48	
[0487]	Thr Leu Asn Asp Ile Thr Gly Tyr Leu	
[0488]	1	5
[0489]	<210> 49	
[0490]	<211> 9	
[0491]	<212> PRT	
[0492]	<213> 人工序列	
[0493]	<223> "肽"	
[0494]	<220>	
[0495]	<223> 肽	
[0496]	<400> 49	
[0497]	Thr Leu Glu Glu Ile Thr Asn Phe Leu	
[0498]	1	5
[0499]	<210> 50	
[0500]	<211> 9	
[0501]	<212> PRT	
[0502]	<213> 人工序列	
[0503]	<223> "肽"	
[0504]	<220>	
[0505]	<223> 肽	
[0506]	<400> 50	

[0507] Thr Val Asp Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
[0508] 1 5
[0509] <210> 51
[0510] <211> 9
[0511] <212> PRT
[0512] <213> 人工序列
[0513] <223> "肽"
[0514] <220>
[0515] <223> 肽
[0516] <400> 51
[0517] Val Met Leu Gly Val Val Phe Gly Val
[0518] 1 5
[0519] <210> 52
[0520] <211> 9
[0521] <212> PRT
[0522] <213> 人工序列
[0523] <223> "肽"
[0524] <220>
[0525] <223> 肽
[0526] <400> 52
[0527] Val Leu Leu Gly Val Val Phe Gly Val
[0528] 1 5
[0529] <210> 53
[0530] <211> 9
[0531] <212> PRT
[0532] <213> 人工序列
[0533] <223> "肽"
[0534] <220>
[0535] <223> 肽
[0536] <400> 53
[0537] Met Val Leu Gly Val Val Phe Gly Val
[0538] 1 5
[0539] <210> 54
[0540] <211> 9
[0541] <212> PRT
[0542] <213> 人工序列
[0543] <223> "肽"
[0544] <220>
[0545] <223> 肽

- [0546] <400> 54
[0547] Val Met Leu Gly Ile Val Phe Gly Ile
[0548] 1 5
[0549] <210> 55
[0550] <211> 9
[0551] <212> PRT
[0552] <213> 人工序列
[0553] <223> "肽"
[0554] <220>
[0555] <223> 肽
[0556] <400> 55
[0557] Val Met Leu Gly Val Val Phe Gly Ile
[0558] 1 5
[0559] <210> 56
[0560] <211> 9
[0561] <212> PRT
[0562] <213> 人工序列
[0563] <223> "肽"
[0564] <220>
[0565] <223> 肽
[0566] <400> 56
[0567] Ile Leu Leu Gly Val Val Phe Gly Ile
[0568] 1 5
[0569] <210> 57
[0570] <211> 9
[0571] <212> PRT
[0572] <213> 人工序列
[0573] <223> "肽"
[0574] <220>
[0575] <223> 肽
[0576] <400> 57
[0577] Val Leu Leu Gly Val Ile Phe Gly Ile
[0578] 1 5
[0579] <210> 58
[0580] <211> 9
[0581] <212> PRT
[0582] <213> 人工序列
[0583] <223> "肽"
[0584] <220>

- [0585] <223> 肽
[0586] <400> 58
[0587] Val Leu Phe Gly Val Val Phe Gly Ile
[0588] 1 5
[0589] <210> 59
[0590] <211> 9
[0591] <212> PRT
[0592] <213> 人工序列
[0593] <223> "肽"
[0594] <220>
[0595] <223> 肽
[0596] <400> 59
[0597] Ile Val Leu Gly Val Val Phe Gly Val
[0598] 1 5
[0599] <210> 60
[0600] <211> 9
[0601] <212> PRT
[0602] <213> 人工序列
[0603] <223> "肽"
[0604] <220>
[0605] <223> 肽
[0606] <400> 60
[0607] Val Val Leu Gly Val Leu Phe Gly Val
[0608] 1 5
[0609] <210> 61
[0610] <211> 9
[0611] <212> PRT
[0612] <213> 人工序列
[0613] <223> "肽"
[0614] <220>
[0615] <223> 肽
[0616] <400> 61
[0617] Val Val Leu Gly Val Met Phe Gly Val
[0618] 1 5
[0619] <210> 62
[0620] <211> 9
[0621] <212> PRT
[0622] <213> 人工序列
[0623] <223> "肽"

- [0624] <220>
[0625] <223> 肽
[0626] <400> 62
[0627] Val Val Leu Gly Val Ile Phe Gly Val
[0628] 1 5
[0629] <210> 63
[0630] <211> 9
[0631] <212> PRT
[0632] <213> 人工序列
[0633] <223> "肽"
[0634] <220>
[0635] <223> 肽
[0636] <400> 63
[0637] Val Val Leu Gly Ala Val Phe Gly Val
[0638] 1 5
[0639] <210> 64
[0640] <211> 9
[0641] <212> PRT
[0642] <213> 人工序列
[0643] <223> "肽"
[0644] <220>
[0645] <223> 肽
[0646] <400> 64
[0647] Val Val Leu Gly Leu Val Phe Gly Val
[0648] 1 5
[0649] <210> 65
[0650] <211> 9
[0651] <212> PRT
[0652] <213> 人工序列
[0653] <223> "肽"
[0654] <220>
[0655] <223> 肽
[0656] <400> 65
[0657] Val Val Ile Gly Val Val Phe Gly Val
[0658] 1 5
[0659] <210> 66
[0660] <211> 9
[0661] <212> PRT
[0662] <213> 人工序列

- [0663] <223> “肽”
[0664] <220>
[0665] <223> 肽
[0666] <400> 66
[0667] Val Val Leu Gly Ile Val Phe Gly Val
[0668] 1 5
[0669] <210> 67
[0670] <211> 9
[0671] <212> PRT
[0672] <213> 人工序列
[0673] <223> “肽”
[0674] <220>
[0675] <223> 肽
[0676] <400> 67
[0677] Thr Val Leu Gly Val Val Phe Gly Val
[0678] 1 5
[0679] <210> 68
[0680] <211> 9
[0681] <212> PRT
[0682] <213> 人工序列
[0683] <223> “肽”
[0684] <220>
[0685] <223> 肽
[0686] <400> 68
[0687] Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Val
[0688] 1 5
[0689] <210> 69
[0690] <211> 9
[0691] <212> PRT
[0692] <213> 人工序列
[0693] <223> “肽”
[0694] <220>
[0695] <223> 肽
[0696] <400> 69
[0697] Ala Ile Leu Gly Val Val Phe Gly Ile
[0698] 1 5
[0699] <210> 70
[0700] <211> 9
[0701] <212> PRT

- [0702] <213> 人工序列
[0703] <223> "肽"
[0704] <220>
[0705] <223> 肽
[0706] <400> 70
[0707] Ala Val Leu Gly Val Met Phe Gly Ile
[0708] 1 5
[0709] <210> 71
[0710] <211> 9
[0711] <212> PRT
[0712] <213> 人工序列
[0713] <223> "肽"
[0714] <220>
[0715] <223> 肽
[0716] <400> 71
[0717] Phe Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Val
[0718] 1 5
[0719] <210> 72
[0720] <211> 9
[0721] <212> PRT
[0722] <213> 人工序列
[0723] <223> "肽"
[0724] <220>
[0725] <223> 肽
[0726] <400> 72
[0727] Lys Met Leu His Tyr Val Ile Lys Val
[0728] 1 5
[0729] <210> 73
[0730] <211> 9
[0731] <212> PRT
[0732] <213> 人工序列
[0733] <223> "肽"
[0734] <220>
[0735] <223> 肽
[0736] <400> 73
[0737] Glu Met Asn Pro Ile Gly His Leu Tyr
[0738] 1 5
[0739] <210> 74
[0740] <211> 9

- [0741] <212> PRT
[0742] <213> 人工序列
[0743] <223> "肽"
[0744] <220>
[0745] <223> 肽
[0746] <400> 74
[0747] Arg Val Asp Pro Ile Gly Asn Leu Tyr
[0748] 1 5
[0749] <210> 75
[0750] <211> 9
[0751] <212> PRT
[0752] <213> 人工序列
[0753] <223> "肽"
[0754] <220>
[0755] <223> 肽
[0756] <400> 75
[0757] Val Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Leu
[0758] 1 5
[0759] <210> 76
[0760] <211> 9
[0761] <212> PRT
[0762] <213> 人工序列
[0763] <223> "肽"
[0764] <220>
[0765] <223> 肽
[0766] <400> 76
[0767] His Val Asp Pro Ala Thr Asn Thr Tyr
[0768] 1 5
[0769] <210> 77
[0770] <211> 9
[0771] <212> PRT
[0772] <213> 人工序列
[0773] <223> "肽"
[0774] <220>
[0775] <223> 肽
[0776] <400> 77
[0777] Lys Leu Val Glu Trp Leu Ala Met Leu
[0778] 1 5
[0779] <210> 78

[0780] <211> 9
[0781] <212> PRT
[0782] <213> 人工序列
[0783] <223> "肽"
[0784] <220>
[0785] <223> 肽
[0786] <400> 78
[0787] Ser Leu Ser Tyr Ala Leu Leu Ser Leu
[0788] 1 5
[0789] <210> 79
[0790] <211> 9
[0791] <212> PRT
[0792] <213> 人工序列
[0793] <223> "肽"
[0794] <220>
[0795] <223> 肽
[0796] <400> 79
[0797] Ser Ile Ser His Thr Leu Leu Ser Leu
[0798] 1 5
[0799] <210> 80
[0800] <211> 9
[0801] <212> PRT
[0802] <213> 人工序列
[0803] <223> "肽"
[0804] <220>
[0805] <223> 肽
[0806] <400> 80
[0807] Val Ser Ser Phe Phe Ser Tyr Val Phe
[0808] 1 5
[0809] <210> 81
[0810] <211> 9
[0811] <212> PRT
[0812] <213> 人工序列
[0813] <223> "肽"
[0814] <220>
[0815] <223> 肽
[0816] <400> 81
[0817] Ala Leu Asn Asp Val Glu Glu Lys Val
[0818] 1 5

- [0819] <210> 82
[0820] <211> 9
[0821] <212> PRT
[0822] <213> 人工序列
[0823] <223> "肽"
[0824] <220>
[0825] <223> 肽
[0826] <400> 82
[0827] Ala Leu Ser Asp Val Glu Asp Arg Val
[0828] 1 5
[0829] <210> 83
[0830] <211> 9
[0831] <212> PRT
[0832] <213> 人工序列
[0833] <223> "肽"
[0834] <220>
[0835] <223> 肽
[0836] <400> 83
[0837] Ala Leu Ser Asp Ala Glu Glu Arg Val
[0838] 1 5
[0839] <210> 84
[0840] <211> 9
[0841] <212> PRT
[0842] <213> 人工序列
[0843] <223> "肽"
[0844] <220>
[0845] <223> 肽
[0846] <400> 84
[0847] Ala Thr Ser Thr Leu Met Leu Val Phe
[0848] 1 5
[0849] <210> 85
[0850] <211> 9
[0851] <212> PRT
[0852] <213> 人工序列
[0853] <223> "肽"
[0854] <220>
[0855] <223> 肽
[0856] <400> 85
[0857] Thr Thr Ser Thr Leu Tyr Leu Val Phe

[0858] 1 5
[0859] <210> 86
[0860] <211> 9
[0861] <212> PRT
[0862] <213> 人工序列
[0863] <223> "肽"
[0864] <220>
[0865] <223> 肽
[0866] <400> 86
[0867] Pro Leu Phe Glu Ser Val Ile Ser Lys
[0868] 1 5
[0869] <210> 87
[0870] <211> 9
[0871] <212> PRT
[0872] <213> 人工序列
[0873] <223> "肽"
[0874] <220>
[0875] <223> 肽
[0876] <400> 87
[0877] Pro Leu Leu Glu Thr Thr Ile Ser Lys
[0878] 1 5
[0879] <210> 88
[0880] <211> 9
[0881] <212> PRT
[0882] <213> 人工序列
[0883] <223> "肽"
[0884] <220>
[0885] <223> 肽
[0886] <400> 88
[0887] Ile Leu Thr Ala Ile Leu Gly Val Leu
[0888] 1 5
[0889] <210> 89
[0890] <211> 9
[0891] <212> PRT
[0892] <213> 人工序列
[0893] <223> "肽"
[0894] <220>
[0895] <223> 肽
[0896] <400> 89

[0897] Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Val
[0898] 1 5
[0899] <210> 90
[0900] <211> 9
[0901] <212> PRT
[0902] <213> 人工序列
[0903] <223> "肽"
[0904] <220>
[0905] <223> 肽
[0906] <400> 90
[0907] Ala Leu Phe Ala Val Thr Ser Ala Val
[0908] 1 5
[0909] <210> 91
[0910] <211> 9
[0911] <212> PRT
[0912] <213> 人工序列
[0913] <223> "肽"
[0914] <220>
[0915] <223> 肽
[0916] <400> 91
[0917] Ala Leu Phe Ala Leu Thr Ser Ala Ala
[0918] 1 5
[0919] <210> 92
[0920] <211> 9
[0921] <212> PRT
[0922] <213> 人工序列
[0923] <223> "肽"
[0924] <220>
[0925] <223> 肽
[0926] <400> 92
[0927] Ser Leu Pro Pro Asp Val Gln Glu Val
[0928] 1 5
[0929] <210> 93
[0930] <211> 9
[0931] <212> PRT
[0932] <213> 人工序列
[0933] <223> "肽"
[0934] <220>
[0935] <223> 肽

- [0936] <400> 93
[0937] Ser Leu Pro Pro Asp Val Gln Gln Val
[0938] 1 5
[0939] <210> 94
[0940] <211> 9
[0941] <212> PRT
[0942] <213> 人工序列
[0943] <223> "肽"
[0944] <220>
[0945] <223> 肽
[0946] <400> 94
[0947] Val Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Val
[0948] 1 5
[0949] <210> 95
[0950] <211> 9
[0951] <212> PRT
[0952] <213> 人工序列
[0953] <223> "肽"
[0954] <220>
[0955] <223> 肽
[0956] <400> 95
[0957] Ala Leu Asp Val Tyr Ser Ala Leu Leu
[0958] 1 5
[0959] <210> 96
[0960] <211> 9
[0961] <212> PRT
[0962] <213> 人工序列
[0963] <223> "肽"
[0964] <220>
[0965] <223> 肽
[0966] <400> 96
[0967] Ala Leu Asp Met Tyr Asn Ala Leu Leu
[0968] 1 5
[0969] <210> 97
[0970] <211> 9
[0971] <212> PRT
[0972] <213> 人工序列
[0973] <223> "肽"
[0974] <220>

- [0975] <223> 肽
[0976] <400> 97
[0977] Ala Leu Asp Ile Tyr Asn Ser Leu Leu
[0978] 1 5
[0979] <210> 98
[0980] <211> 9
[0981] <212> PRT
[0982] <213> 人工序列
[0983] <223> "肽"
[0984] <220>
[0985] <223> 肽
[0986] <400> 98
[0987] Phe Leu Phe Phe Leu Phe Phe Phe Leu
[0988] 1 5
[0989] <210> 99
[0990] <211> 9
[0991] <212> PRT
[0992] <213> 人工序列
[0993] <223> "肽"
[0994] <220>
[0995] <223> 肽
[0996] <400> 99
[0997] Thr Leu Met Ser Ser Met Thr Asn Met
[0998] 1 5
[0999] <210> 100
[1000] <211> 9
[1001] <212> PRT
[1002] <213> 人工序列
[1003] <223> "肽"
[1004] <220>
[1005] <223> 肽
[1006] <400> 100
[1007] Met Leu Ala Val Phe Leu Pro Met Val
[1008] 1 5
[1009] <210> 101
[1010] <211> 9
[1011] <212> PRT
[1012] <213> 人工序列
[1013] <223> "肽"

- [1014] <220>
[1015] <223> 肽
[1016] <400> 101
[1017] Met Leu Ala Val Phe Leu Pro Leu Val
[1018] 1 5
[1019] <210> 102
[1020] <211> 9
[1021] <212> PRT
[1022] <213> 人工序列
[1023] <223> "肽"
[1024] <220>
[1025] <223> 肽
[1026] <400> 102
[1027] Tyr Leu Ala Val Phe Leu Pro Ile Val
[1028] 1 5
[1029] <210> 103
[1030] <211> 9
[1031] <212> PRT
[1032] <213> 人工序列
[1033] <223> "肽"
[1034] <220>
[1035] <223> 肽
[1036] <400> 103
[1037] Ser Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Leu Met
[1038] 1 5
[1039] <210> 104
[1040] <211> 9
[1041] <212> PRT
[1042] <213> 人工序列
[1043] <223> "肽"
[1044] <220>
[1045] <223> 肽
[1046] <400> 104
[1047] Ser Leu Gly Phe Leu Phe Leu Leu Met
[1048] 1 5
[1049] <210> 105
[1050] <211> 9
[1051] <212> PRT
[1052] <213> 人工序列

- [1053] <223> "肽"
[1054] <220>
[1055] <223> 肽
[1056] <400> 105
[1057] Ser Leu Gly Phe Leu Phe Leu Leu Phe
[1058] 1 5
[1059] <210> 106
[1060] <211> 9
[1061] <212> PRT
[1062] <213> 人工序列
[1063] <223> "肽"
[1064] <220>
[1065] <223> 肽
[1066] <400> 106
[1067] Met Leu Phe Ala Val Leu Met Cys Leu
[1068] 1 5
[1069] <210> 107
[1070] <211> 9
[1071] <212> PRT
[1072] <213> 人工序列
[1073] <223> "肽"
[1074] <220>
[1075] <223> 肽
[1076] <400> 107
[1077] Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val
[1078] 1 5
[1079] <210> 108
[1080] <211> 9
[1081] <212> PRT
[1082] <213> 人工序列
[1083] <223> "肽"
[1084] <220>
[1085] <223> 肽
[1086] <400> 108
[1087] Leu Leu Tyr Lys Leu Ala Asp Leu Ile
[1088] 1 5
[1089] <210> 109
[1090] <211> 10
[1091] <212> PRT

- [1092] <213> 人工序列
[1093] <223> "肽"
[1094] <220>
[1095] <223> 肽
[1096] <400> 109
[1097] Gln Leu Ala Val Ser Val Ile Leu Arg Val
[1098] 1 5 10
[1099] <210> 110
[1100] <211> 9
[1101] <212> PRT
[1102] <213> 人工序列
[1103] <223> "肽"
[1104] <220>
[1105] <223> 肽
[1106] <400> 110
[1107] Lys Phe Leu Asp Ala Leu Ile Ser Leu
[1108] 1 5
[1109] <210> 111
[1110] <211> 9
[1111] <212> PRT
[1112] <213> 人工序列
[1113] <223> "肽"
[1114] <220>
[1115] <223> 肽
[1116] <400> 111
[1117] Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
[1118] 1 5
[1119] <210> 112
[1120] <211> 9
[1121] <212> PRT
[1122] <213> 人工序列
[1123] <223> "肽"
[1124] <220>
[1125] <223> 肽
[1126] <400> 112
[1127] His Leu Phe Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys
[1128] 1 5
[1129] <210> 113
[1130] <211> 9

- [1131] <212> PRT
[1132] <213> 人工序列
[1133] <223> "肽"
[1134] <220>
[1135] <223> 肽
[1136] <400> 113
[1137] Thr Met Asn Gly Ser Lys Ser Pro Val
[1138] 1 5
[1139] <210> 114
[1140] <211> 9
[1141] <212> PRT
[1142] <213> 人工序列
[1143] <223> "肽"
[1144] <220>
[1145] <223> 肽
[1146] <400> 114
[1147] Phe Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu
[1148] 1 5
[1149] <210> 115
[1150] <211> 9
[1151] <212> PRT
[1152] <213> 人工序列
[1153] <223> "肽"
[1154] <220>
[1155] <223> 肽
[1156] <400> 115
[1157] Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
[1158] 1 5
[1159] <210> 116
[1160] <211> 9
[1161] <212> PRT
[1162] <213> 人工序列
[1163] <223> "肽"
[1164] <220>
[1165] <223> 肽
[1166] <400> 116
[1167] Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
[1168] 1 5
[1169] <210> 117

- [1170] <211> 9
[1171] <212> PRT
[1172] <213> 人工序列
[1173] <223> "肽"
[1174] <220>
[1175] <223> 肽
[1176] <400> 117
[1177] Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu
[1178] 1 5
[1179] <210> 118
[1180] <211> 9
[1181] <212> PRT
[1182] <213> 人工序列
[1183] <223> "肽"
[1184] <220>
[1185] <223> 肽
[1186] <400> 118
[1187] Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
[1188] 1 5
[1189] <210> 119
[1190] <211> 9
[1191] <212> PRT
[1192] <213> 人工序列
[1193] <223> "肽"
[1194] <220>
[1195] <223> 肽
[1196] <400> 119
[1197] Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
[1198] 1 5
[1199] <210> 120
[1200] <211> 9
[1201] <212> PRT
[1202] <213> 人工序列
[1203] <223> "肽"
[1204] <220>
[1205] <223> 肽
[1206] <400> 120
[1207] Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val
[1208] 1 5

- [1209] <210> 121
[1210] <211> 9
[1211] <212> PRT
[1212] <213> 人工序列
[1213] <223> "肽"
[1214] <220>
[1215] <223> 肽
[1216] <400> 121
[1217] Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu
[1218] 1 5
[1219] <210> 122
[1220] <211> 9
[1221] <212> PRT
[1222] <213> 人工序列
[1223] <223> "肽"
[1224] <220>
[1225] <223> 肽
[1226] <400> 122
[1227] Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile
[1228] 1 5
[1229] <210> 123
[1230] <211> 9
[1231] <212> PRT
[1232] <213> 人工序列
[1233] <223> "肽"
[1234] <220>
[1235] <223> 肽
[1236] <400> 123
[1237] Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Ile
[1238] 1 5
[1239] <210> 124
[1240] <211> 9
[1241] <212> PRT
[1242] <213> 人工序列
[1243] <223> "肽"
[1244] <220>
[1245] <223> 肽
[1246] <400> 124
[1247] Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val

[1248]	1	5
[1249]	<210> 125	
[1250]	<211> 9	
[1251]	<212> PRT	
[1252]	<213> 人工序列	
[1253]	<223> "肽"	
[1254]	<220>	
[1255]	<223> 肽	
[1256]	<400> 125	
[1257]	Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr	
[1258]	1	5
[1259]	<210> 126	
[1260]	<211> 9	
[1261]	<212> PRT	
[1262]	<213> 人工序列	
[1263]	<223> "肽"	
[1264]	<220>	
[1265]	<223> 肽	
[1266]	<400> 126	
[1267]	Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu	
[1268]	1	5
[1269]	<210> 127	
[1270]	<211> 9	
[1271]	<212> PRT	
[1272]	<213> 人工序列	
[1273]	<223> "肽"	
[1274]	<220>	
[1275]	<223> 肽	
[1276]	<400> 127	
[1277]	Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr	
[1278]	1	5
[1279]	<210> 128	
[1280]	<211> 9	
[1281]	<212> PRT	
[1282]	<213> 人工序列	
[1283]	<223> "肽"	
[1284]	<220>	
[1285]	<223> 肽	
[1286]	<400> 128	

- [1287] Lys Val Val Glu Phe Leu Ala Met Leu
[1288] 1 5
[1289] <210> 129
[1290] <211> 9
[1291] <212> PRT
[1292] <213> 人工序列
[1293] <223> "肽"
[1294] <220>
[1295] <223> 肽
[1296] <400> 129
[1297] Ser Phe Ser Tyr Thr Leu Leu Ser Leu
[1298] 1 5
[1299] <210> 130
[1300] <211> 9
[1301] <212> PRT
[1302] <213> 人工序列
[1303] <223> "肽"
[1304] <220>
[1305] <223> 肽
[1306] <400> 130
[1307] Val Ser Ser Phe Phe Ser Tyr Thr Leu
[1308] 1 5
[1309] <210> 131
[1310] <211> 9
[1311] <212> PRT
[1312] <213> 人工序列
[1313] <223> "肽"
[1314] <220>
[1315] <223> 肽
[1316] <400> 131
[1317] Ala Leu Lys Asp Val Glu Glu Arg Val
[1318] 1 5
[1319] <210> 132
[1320] <211> 9
[1321] <212> PRT
[1322] <213> 人工序列
[1323] <223> "肽"
[1324] <220>
[1325] <223> 肽

- [1326] <400> 132
[1327] Ala Ser Ser Thr Leu Tyr Leu Val Phe
[1328] 1 5
[1329] <210> 133
[1330] <211> 9
[1331] <212> PRT
[1332] <213> 人工序列
[1333] <223> "肽"
[1334] <220>
[1335] <223> 肽
[1336] <400> 133
[1337] Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys
[1338] 1 5
[1339] <210> 134
[1340] <211> 9
[1341] <212> PRT
[1342] <213> 人工序列
[1343] <223> "肽"
[1344] <220>
[1345] <223> 肽
[1346] <400> 134
[1347] Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu
[1348] 1 5
[1349] <210> 135
[1350] <211> 9
[1351] <212> PRT
[1352] <213> 人工序列
[1353] <223> "肽"
[1354] <220>
[1355] <223> 肽
[1356] <400> 135
[1357] Ala Leu Leu Ala Leu Thr Ser Ala Val
[1358] 1 5
[1359] <210> 136
[1360] <211> 9
[1361] <212> PRT
[1362] <213> 人工序列
[1363] <223> "肽"
[1364] <220>

- [1365] <223> 肽
[1366] <400> 136
[1367] Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Val
[1368] 1 5
[1369] <210> 137
[1370] <211> 9
[1371] <212> PRT
[1372] <213> 人工序列
[1373] <223> "肽"
[1374] <220>
[1375] <223> 肽
[1376] <400> 137
[1377] Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
[1378] 1 5
[1379] <210> 138
[1380] <211> 9
[1381] <212> PRT
[1382] <213> 人工序列
[1383] <223> "肽"
[1384] <220>
[1385] <223> 肽
[1386] <400> 138
[1387] Ala Leu Asp Val Tyr Asn Gly Leu Leu
[1388] 1 5
[1389] <210> 139
[1390] <211> 9
[1391] <212> PRT
[1392] <213> 人工序列
[1393] <223> "肽"
[1394] <220>
[1395] <223> 肽
[1396] <400> 139
[1397] Phe Leu Phe Leu Leu Phe Phe Trp Leu
[1398] 1 5
[1399] <210> 140
[1400] <211> 9
[1401] <212> PRT
[1402] <213> 人工序列
[1403] <223> "肽"

- [1404] <220>
[1405] <223> 肽
[1406] <400> 140
[1407] Thr Leu Met Ser Ala Met Thr Asn Leu
[1408] 1 5
[1409] <210> 141
[1410] <211> 9
[1411] <212> PRT
[1412] <213> 人工序列
[1413] <223> "肽"
[1414] <220>
[1415] <223> 肽
[1416] <400> 141
[1417] Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val
[1418] 1 5
[1419] <210> 142
[1420] <211> 9
[1421] <212> PRT
[1422] <213> 人工序列
[1423] <223> "肽"
[1424] <220>
[1425] <223> 肽
[1426] <400> 142
[1427] Ser Leu Gly Trp Leu Phe Leu Leu Leu
[1428] 1 5
[1429] <210> 143
[1430] <211> 9
[1431] <212> PRT
[1432] <213> 人工序列
[1433] <223> "肽"
[1434] <220>
[1435] <223> 肽
[1436] <400> 143
[1437] Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu
[1438] 1 5
[1439] <210> 144
[1440] <211> 20
[1441] <212> PRT
[1442] <213> 人工序列

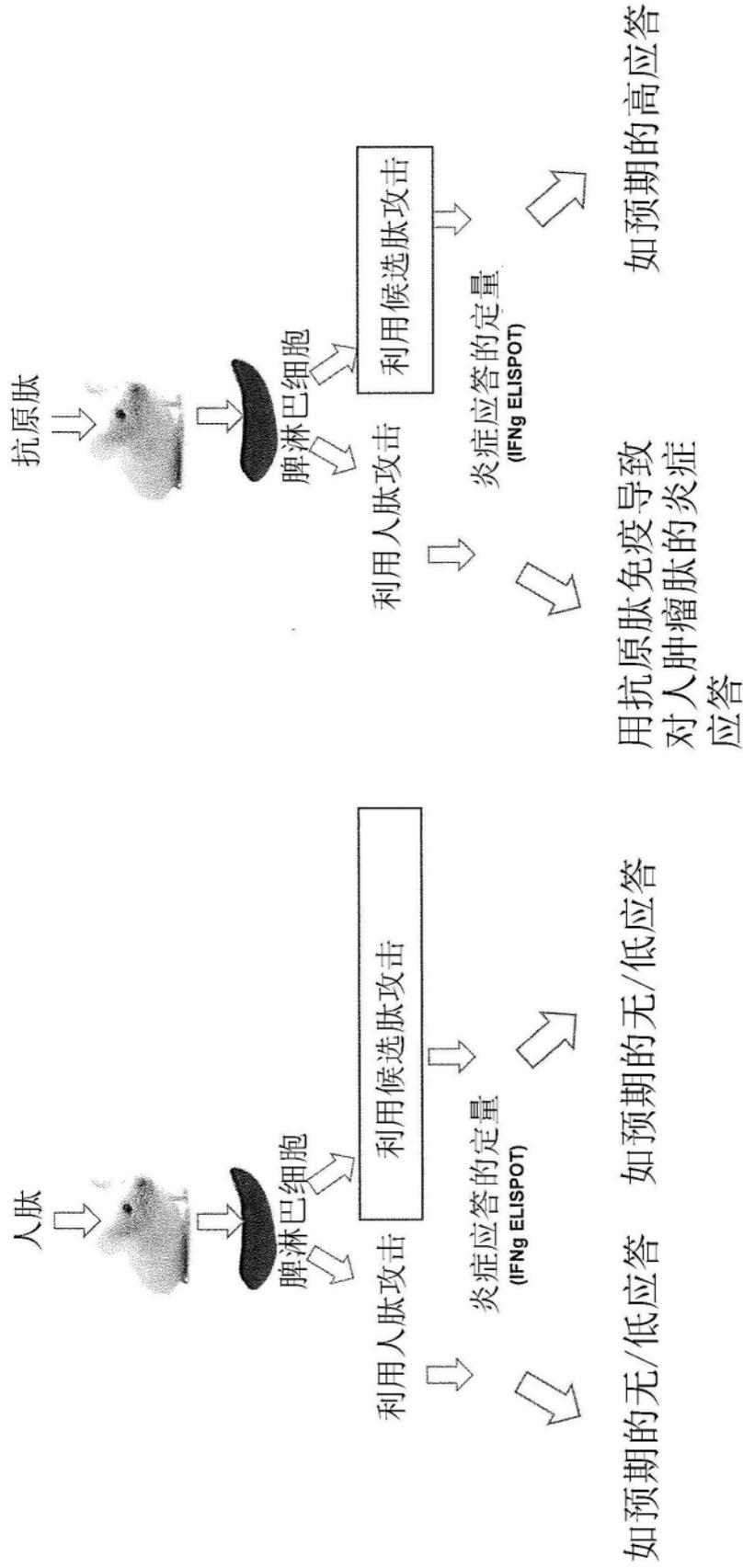


图1

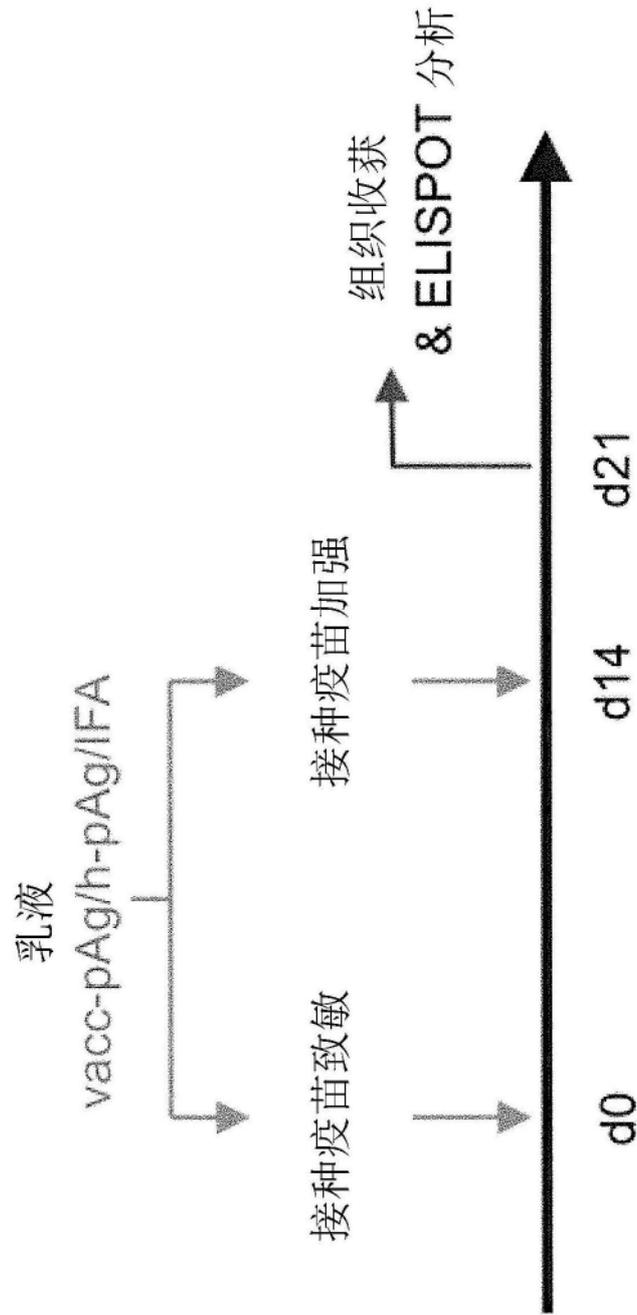


图2

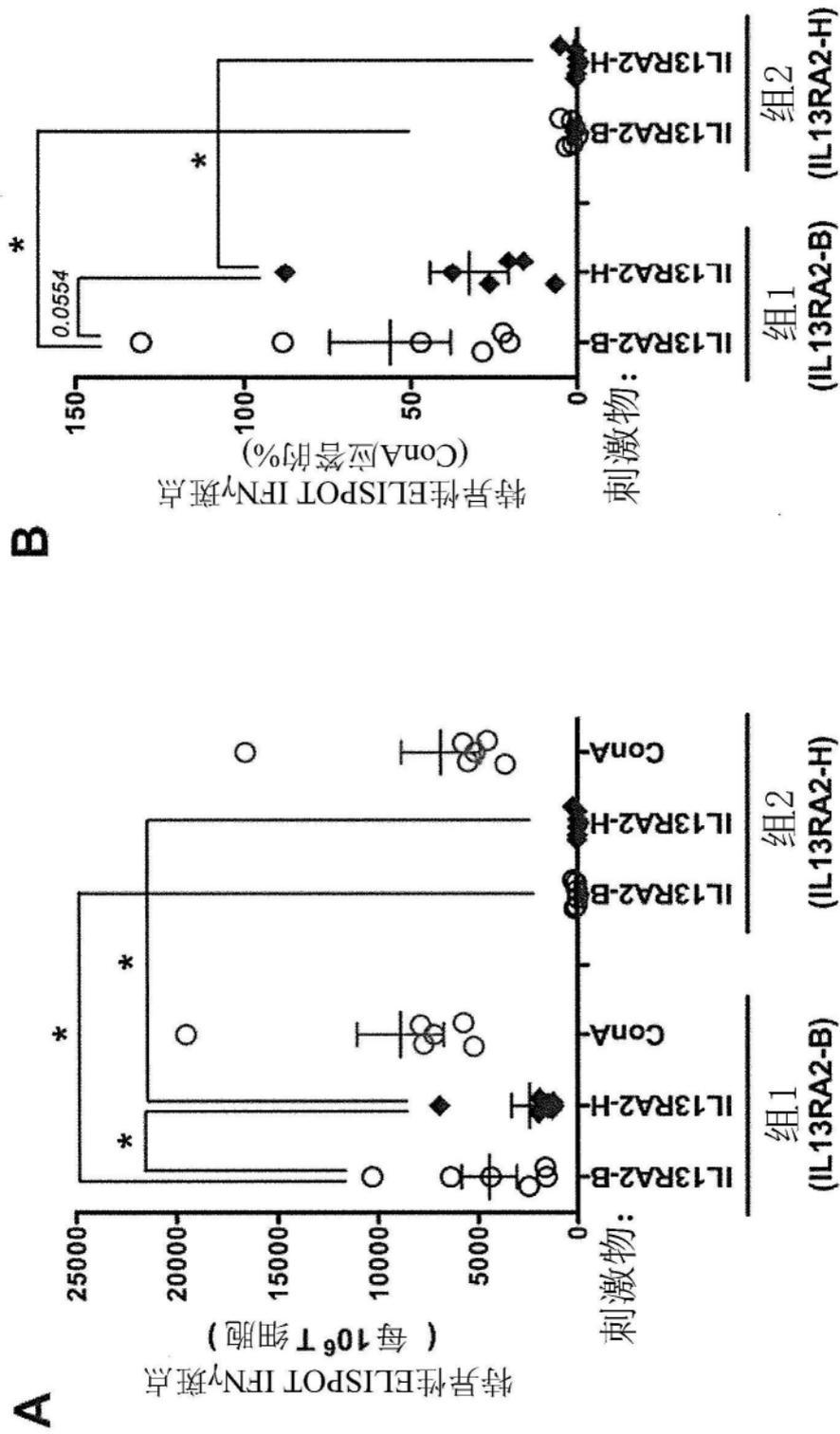


图3