

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018年6月7日 (07.06.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/098636 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 7/06 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/22 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/107751

(22) 国际申请日: 2016年11月29日 (29.11.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大基因研究院(BGI SHENZHEN)
[CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业
区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 唐云霞(TANG, Yunxia); 中国广东省深圳
市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083
(CN)。 李波(LI, Bo); 中国广东省深圳市盐田
区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
侯勇(HOU, Yong); 中国广东省深圳市盐田区北
山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 罗
顺涛(LUO, Shuntao); 中国广东省深圳市盐田区北
山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 黄
英(HUANG, Ying); 中国广东省深圳市盐田区北
山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 刘
耿(LIU, Geng); 中国广东省深圳市盐田区北山
工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 李冬
丽(LI, Dongli); 中国广东省深圳市盐田区北山工
业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 林秀妹
(LIN, Xiumei); 中国广东省深圳市盐田区北山工
业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务
所(普通合伙)(TSINGYIHUA INTELLECTUAL

PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华
大学照澜院商业楼301室, Beijing 100084 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP,
KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,
RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: POLYPEPTIDE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 多肽及其应用

(57) Abstract: The present invention provides a polypeptide. The present invention further provides a nucleic acid encoding the polypeptide, a nucleic acid construct comprising the nucleic acid, an expression vector, a host cell, and an antigen-presenting cell presenting the polypeptide on the surface of the cell as well as an immune effector cell thereof. The present invention further provides a pharmaceutical composition, a vaccine and an antibody comprising the polypeptide, a therapeutic method, a diagnosis method, and a diagnosis device. The present invention further provides use of the polypeptide in preparing a vaccine, a kit for tumor diagnosis or a pharmaceutical composition, and the use of the polypeptide and the nucleic acid serving as detection targets in tumor diagnosis.

(57) 摘要: 本发明提供了一种多肽。本发明还提供了编码所述多肽的核酸、包含该核酸的核酸构建体、表达载体、宿主细胞, 以及在细胞表面呈递该多肽的抗原呈递细胞及其免疫效应细胞。本发明还提供了包含该多肽的药物组合物、疫苗、抗体以及治疗方法、诊断方法和诊断装置。本发明还提供了所述多肽在用于制备疫苗、诊断肿瘤试剂盒或药物组合物中的用途, 以及所述多肽、核酸作为检查靶标在肿瘤诊断中的用途。



WO 2018/098636 A1

多肽及其应用

优先权信息

无。

5

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体而言，本发明涉及多肽及其应用，更具体地，本发明涉及多肽及其在制备试剂盒、药物、疫苗中的用途，涉及多肽在预防或治疗受试者中与 PIK3CA 基因突变相关的疾病的用途，涉及核酸、核酸构建体、表达载体、宿主细胞、药物组合物、抗原呈递细胞、免疫效应细胞、疫苗、抗体，涉及治疗方法、诊断方法和诊断系统。

10

背景技术

癌症，由于细胞内基因突变导致细胞增殖失控的一种疾病。目前已成为人类健康的重大威胁，是导致人类死亡的主要原因之一。世界卫生组织（WHO）在发表的《全球癌症报告 2014》中指出，2012 年全球癌症患者和死亡病例都在迅速增加，而新增癌症病例有近一半出现在亚洲，其中大部分在中国，中国新增癌症病例高居第一位。《2012 年中国肿瘤登记年报》数据显示，中国每年新增癌症病例约 350 万，约有 250 万人因此死亡。因此，寻找高效特异的癌症治疗方法具有重大的临床价值。

15

传统的肿瘤治疗方法主要包括手术、放疗和化疗，但这几种方法都具有较大的局限性，比如由于癌细胞的近端入侵或远端转移，手术切除后的肿瘤转移复发率较高，而放疗和化疗对于机体自身的正常细胞尤其是造血系统和免疫系统会造成严重的损害，因此对于已发生肿瘤转移的患者也很难达到较好的远期疗效。随着肿瘤分子机制的深入研究和生物技术的进一步发展，靶向药物治疗和免疫治疗在肿瘤的综合治疗中发挥着愈来愈大的作用。靶向疗法主要包括单克隆抗体（有时归为被动免疫疗法）和小分子靶向药物，而免疫疗法主要包括细胞因子疗法、免疫检查点抑制剂、过继细胞回输和肿瘤疫苗等。免疫疗法通过调节机体的免疫系统，增强肿瘤微环境抗肿瘤免疫力，从而控制和杀伤肿瘤细胞，因此有效率高，特异性强，耐受性好的优点，在肿瘤治疗中具有广阔的前景。

20

25

肿瘤免疫治疗疫苗主要包括肿瘤细胞疫苗、树突状细胞（DC 细胞）疫苗、蛋白&多肽疫苗、核酸疫苗和基因工程疫苗。这些疫苗能够杀伤肿瘤的主要机制即是通过引起患者针对于肿瘤特异性抗原免疫反应，包括抗原抗体反应和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)特异性杀伤等，其中 CTL 特异性杀伤在肿瘤免疫反应中起了很大的作用。肿瘤特异性多肽是一种肿瘤特异性抗原，主要引起 CTL 特异性杀伤，它包括肿瘤突变的多肽以及肿瘤特异性高表达多肽。其中肿瘤突变的多肽由于其只存在于患者肿瘤组织，是肿瘤免疫治疗的一个特异性靶点，具有安全性好，及副作用小等特点。靶向肿瘤突变多肽的免疫治疗，以多肽特异性 DC-CTL，以及肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)过继回输等方法为代表，具有良好的治疗效果。

30

肿瘤特异性多肽能够被 CTL 或 TIL 细胞识别，需要人类白细胞抗原 HLA 的抗原呈递功能。人白细胞抗原主要分为 I 和 II 两种亚型，I 型 HLA 又主要分为 A，B，C 三种亚型，其中每种亚型，

35

又根据其序列的不同，A，B，C 三种亚型又可以分为多种亚型，HLA-A0201 是 HLA-A 亚型中的一种，在中国人群中占比 13%，具有较高的比例。不同的多肽与 HLA-A0201 亚型的结合力是不同的。在特定 HLA 亚型的肿瘤患者体内，HLA 亚型决定了只能有部分突变多肽能与其 HLA 具有结合能力，并被其 HLA 递呈给 CTL 或 TIL 细胞。

5 然而，肿瘤免疫治疗仍有待进一步深入研究和开发。

发明内容

本发明是基于发明人对下列事实和问题的发现而提出的：

10 野生型 PIK3CA 基因编码的蛋白，在丝氨酸苏氨酸激酶中发挥磷酸转移酶功能。发明人经过大量的筛选实验，发现 PIK3CA 基因的突变导致其编码的 453 位点的氨基酸由谷胺酸(Glu, E)突变为赖氨酸(Lys, K)。突变后的 PIK3CA 基因能够在肿瘤组织中特异性高水平表达，该突变基因编码的突变多肽具有肿瘤组织特异性。并且，发明人通过实验验证了该突变多肽序列与 HLA-A0201 具有高亲和力。

15 基于上述的研究发现，在本发明的第一方面，本发明提出了一种分离的多肽。根据本发明的实施例，所述多肽选自：（1）具有 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的多肽；或（2）与（1）相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%同一性的多肽；或（3）与（1）相比具有一个或者多个氨基酸的取代、缺失和/或添加的多肽。任选地，所述至少一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加为如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 2 位和/或第 9 位氨基酸的取代。任选地，所述至少一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加为如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的第 2 位氨基酸取代为 M，和/或第 9 位氨基酸取代为 L。任选地，所述多肽具有如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。其中，（2）所述多肽或（3）所述多肽具有和（1）所述多肽相同的功能。

GLKDLLNPI (SEQ ID NO:1)。

GLKDLLNPL (SEQ ID NO:2)。

GMKDLLNPL (SEQ ID NO:3)。

GMKDLLNPI (SEQ ID NO:4)。

25 根据本发明的实施例，所述多肽具有与 HLA-A0201 高亲和能力，具有激活特异性 T 细胞免疫的能力。

30 在本发明的第二方面，本发明提出了检测上述多肽的试剂在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于诊断肿瘤，任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，优选地，所述肿瘤为乳腺癌。基于发明人的实验研究发现，上述多肽在肿瘤组织中特异性高表达，进而发明人通过进一步的实验验证并提出，使用检测上述多肽的试剂制备的试剂盒可有效地用于诊断肿瘤；同时，发明人惊奇地发现，上述多肽与 HLA-A0201 有高亲和力，进而可被表达 HLA-A0201 的呈递细胞递呈给 CTL 或 TIL 细胞而激活特异性 T 细胞免疫，当所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和上述多肽时，该试剂盒诊断的安全性和有效性显著提高；同时，发明人发现乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤组织特异

35

性高表达上述多肽，进而当肿瘤为上述肿瘤时，尤其是乳腺癌时，该试剂盒诊断的有效性和灵敏性可进一步提高。

在本发明的第三方面，本发明提出了上述多肽在制备药物中的用途，所述药物用于预防或治疗肿瘤，任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，优选地，所述肿瘤为乳腺癌。如前所述，发明人发现，上述多肽在肿瘤组织中特异性高表达，进而发明人通过进一步的实验验证并提出，上述多肽所制备的药物可有效用于预防或治疗肿瘤；当所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和上述多肽时，其治疗或预防的安全性和有效性显著提高；当肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤时，尤其是乳腺癌，其治疗或预防的有效性和灵敏性可进一步提高。

在本发明的第四方面，本发明提出了一种分离的核酸。根据本发明的实施例，所述核酸为编码上述多肽的核酸或其互补序列。所述核酸能够特异性编码上述多肽，如前所述，上述多肽具有与 HLA-A0201 高亲和能力，具有激活特异性 T 细胞免疫的能力，进而，本发明实施例所提出的核酸在合适条件下表达的多肽能够用于预防或治疗肿瘤，尤其是肿瘤同时表达 HLA-A0201 和上述多肽时，其治疗或预防的安全性和有效性更高。

在本发明的第五方面，本发明提出了一种核酸构建体。根据本发明的实施例，所述核酸构建体包含编码序列，所述编码序列为上述的核酸，以及可选的控制序列，所述控制序列与所述编码序列可操作地连接。其中，所述控制序列为可指导多肽在宿主中表达的一个或多个控制序列。本发明实施例所提出的核酸构建体可在适合条件下，与表达载体连接后，在适合的宿主细胞中高效表达上述多肽，进而可有效用于对肿瘤，特别是同时表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤的特异性治疗或预防。

在本发明的第六方面，本发明提出了一种表达载体。根据本发明的实施例，所述载体包含上述的核酸构建体。本发明实施例所述的表达载体可在适合条件下，在表达宿主中高效表达上述多肽，所述表达载体可有效用于对肿瘤，特别是同时表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤的特异性治疗或预防。

在本发明的第七方面，本发明提出了一种宿主细胞。根据本发明的实施例，所述细胞携带上述的核酸构建体或表达载体，可选地，是通过转染或者转化所述核酸构建体或表达载体获得的。根据本发明的实施例，所述宿主细胞在合适条件下可高效表达上述多肽，所述宿主细胞可有效用于对肿瘤，特别是同时表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤的特异性治疗或预防。

在本发明的第八方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，所述药物组合物包括：前面所述的多肽；以及药学上可接受的佐剂。发明人通过大量的实验发现，包括前面所述多肽和药学上可接受佐剂的药物组合物可显著刺激 CTL 或 TIL 的增殖和分泌，可显著杀伤呈递上述多肽抗原的肿瘤细胞，具有显著治疗或预防肿瘤，尤其是特异性高表达上述多肽抗原的肿瘤的功效。

在本发明的第九方面，本发明提出了前面所述的多肽在制备疫苗中的用途，所述疫苗用于预防或治疗肿瘤，任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，优选地，所述肿瘤为乳腺癌，如前所述，发明人发现，上述多肽在肿瘤组织中特异性高表达，进而发明人通过进一步的实验验证并提出，上述多肽所制备的疫苗可有效用于预防或治疗肿瘤，其安全性

更高，副作用更小；当所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和上述多肽时，其治疗或预防的安全性和有效性显著提高；当肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，尤其为乳腺癌时，其治疗或预防的有效性和灵敏性可进一步提高。

5 在本发明的第十方面，本发明提出了一种抗原呈递细胞。根据本发明的实施例，所述抗原呈递细胞可呈递前面所述的多肽。根据本发明的实施例，呈递前面所述多肽的抗原呈递细胞可有效引起患者针对肿瘤特异性抗原-上述多肽的免疫反应，进而激活 CTL 特异性杀伤功能，本发明实施例所提出的抗原呈递细胞具有显著的治疗表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤的功效，其治疗的效果显著，安全性高。

10 在本发明的第十一方面，本发明提出了一种免疫效应细胞。根据本发明的实施例，所述免疫效应细胞可识别前面所述多肽或者识别在细胞表面呈递前面所述多肽的抗原呈递细胞。根据本发明的实施例，所述免疫效应细胞可特异性杀伤共表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤细胞。

15 在本发明的第十二方面，本发明提出了一种疫苗。根据本发明的实施例，所述疫苗包含前面所述的核酸，或前面所述的核酸构建体，或前面所述的表达载体，或前面所述的宿主细胞，或前面所述的抗原呈递细胞，或前面所述的免疫效应细胞。如前所述，本发明实施例的核酸或核酸构建体或表达载体在合适的条件下表达前面所述的多肽，本发明实施例的核酸或核酸构建体或表达载体可用于治疗或预防表达前面所述多肽的肿瘤，本发明实施例所提出的抗原呈递细胞具有显著的治疗表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤的功效，本发明实施例所提出的免疫效应细胞具有显著的特异性杀伤呈递抗原-所述多肽的靶细胞的作用。本发明实施例所提出的疫苗具有显著的治疗或预防表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤的作用，其安全性更高、副作用更小。

20 在本发明的第十三方面，本发明提出了一种抗体。根据本发明的实施例，所述抗体特异性识别前面所述的多肽。本发明实施例所提出的抗体可特异结合所述多肽，进而可特异性识别特异性高表达所述多肽的肿瘤细胞，本发明实施例所提出的抗体在肿瘤诊断、治疗或预防中发挥巨大的作用。

25 在本发明的第十四方面，本发明提出了一种治疗方法。根据本发明的实施例，所述治疗方法包括：对患者给予治疗有效量的前面所述的多肽、前面所述的核酸、前面所述的核酸构建体、前面所述的表达载体、前面所述的宿主细胞、前面所述的药物组合物、前面所述的抗原呈递细胞、前面所述的免疫效应细胞、前面所述的疫苗或者前面所述的抗体。如前所述，本发明实施例所提出的治疗方法，包括给予任一种有效量的前面所述的多肽等，均可有效治疗或预防表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤。

30 在本发明的第十五方面，本发明提出了前面所述的多肽用于预防或治疗受试者中与 PIK3CA 基因突变相关的疾病的用途。本发明实施例的多肽用于预防或治疗受试者中与 PIK3CA 基因突变相关的疾病，效果显著。

35 在本发明的第十六方面，本发明提出了一种诊断方法。根据本发明的实施例，所述诊断方法包括：检测患者来源的生物样品是否携带前面所述的多肽；基于所述生物样品是否携带所述多肽，确定所述患者是否患有肿瘤，任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，优选地，所述肿瘤为乳腺癌。发明人发现，所述多肽在肿瘤组织中特异性高表达，而正常组织中不存在所述多肽。本发明实施例所提出的诊断方法可有效诊断出特异性高表达所述多肽的肿瘤

患者。其中，发明人发现，乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤特异性高表达所述多肽，进而，本发明实施例所提出的方法对上述肿瘤的诊断准确性进一步提高。同时，发明人发现，HLA-A0201 在中国人群中具有较高的比例，HLA-A0201 与所述多肽有着较强的亲和力，所述多肽通过与细胞表面 HLA-A0201 结合进而激发一系列的免疫反应。因此本发明实施例所提出的诊断方法诊断出同时表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤患者的几率更高。

在本发明的第十七方面，本发明提出了一种诊断系统。根据本发明的实施例，所述诊断系统包括：多肽检测装置，所述多肽检测装置用于检测患者来源的生物样品是否携带前面所述的多肽；诊断结果确定装置，所述诊断结果确定装置与所述多肽检测装置相连，用于基于所述生物样品是否携带所述多肽，确定所述患者是否患有肿瘤，任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，优选地，所述肿瘤为乳腺癌。发明人发现，所述多肽在肿瘤组织中特异性高表达，而正常组织中不存在所述多肽。本发明实施例所提出的诊断系统可用于有效确定特异性高表达所述多肽的肿瘤患者。其中，发明人发现，乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，尤其是乳腺癌特异性高表达所述多肽，本发明实施例所提出的诊断系统对上述肿瘤的诊断准确性进一步提高。同时，发明人发现，HLA-A0201 在中国人群中具有较高的比例，HLA-A0201 与所述多肽有着较强的亲和力，所述多肽通过与细胞表面 HLA-A0201 结合进而激发一系列的免疫反应。因而，本发明实施例所提出的诊断系统诊断出同时表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤患者的几率更高。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 是根据本发明实施例的诊断系统的结构示意图；

图 2 是根据本发明实施例的负载多肽的 T2 细胞与 HLA-A0201 亲和力的流式细胞仪检测结果图；

图 3 是根据本发明实施例的 ELISPOTs 方法验证多肽激活 CD8⁺T 细胞免疫反应的结果图；

图 4 是根据本发明实施例的激活的 CD8⁺T 细胞对负载多肽的靶细胞的特异性杀伤的结果图；其中，T cell 指代 T 细胞，T2 指代 T2 细胞。

图 5 是根据本发明实施例的多肽免疫治疗的结果图，

其中，A 显示了进行佐剂、佐剂+野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽组、GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其可变形多肽 (SEQ ID NO: 2~4 任一序列所示) 各组+佐剂治疗后抑制肿瘤生长效果图，

B 显示了进行佐剂、佐剂+野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽组、GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其可变形多肽 (SEQ ID NO: 2~4 任一序列所示) 各组+佐剂治疗后小鼠生存率的结果图；

图 6 显示了根据本发明实施例的多肽免疫治疗的结果图，

其中, A 显示了进行 DC-负载野生型 (GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)) 多肽、DC-负载 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 突变多肽或其可变形形式(SEQ ID NO: 2~4 任一序列所示)多肽治疗后, 抑制肿瘤生长效果图,

5 B 显示了进行 DC-负载野生型 (GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽、DC-负载 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 突变多肽或其可变形形式(SEQ ID NO:2~4 任一序列所示)多肽治疗后, 小鼠生存率的结果图;

图 7 显示了多肽免疫治疗的结果图,

其中, A 显示了携带编码野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 或突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 的核酸序列, 或编码突变多肽可变形形式多肽 SEQ ID NO:2~4 的核酸序列的慢病毒载体转染 DC 后用于免疫治疗, 抑制肿瘤生长效果图,

10 B 显示了携带编码野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 或突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 的核酸序列, 或编码突变多肽可变形形式多肽 SEQ ID NO:2~4 的核酸序列的慢病毒载体转染 DC 后用于免疫治疗, 小鼠生存率的结果图; 以及

图 8 显示了多肽免疫治疗的结果图,

15 其中, A 显示了进行 DC-负载野生型 (GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)) 多肽+CTL、DC 负载突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 或其可变形形式(SEQ ID NO:2~4 任一序列所示)+CTL 治疗后, 抑制肿瘤生长效果图,

B 显示了进行 DC-负载野生型 (GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)) 多肽+CTL、DC 负载突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 或其可变形形式(SEQ ID NO:2~4 任一序列所示)+CTL 治疗后, 小鼠生存率的结果图。

20

发明详细描述

下面详细描述本发明的实施例, 所述实施例的示例在附图中示出, 其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的, 仅用于解释本发明, 而不能理解为对本发明的限制。

25 需要说明的是, 术语“第一”、“第二”仅用于描述目的, 而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此, 限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地, 在本发明的描述中, 除非另有说明, “多个”的含义是两个或两个以上。

多肽

30 在本发明的第一方面, 本发明提出了一种分离的多肽。根据本发明的实施例, 该多肽选自: (1) 具有 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的多肽; 或 (2) 与 (1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的多肽; 或 (3) 与 (1) 相比具有一个或者多个氨基酸的取代、缺失和/或添加的多肽。本发明实施例所提出的多肽来源于肿瘤突变多肽, 在未发生该突变的人体内不存在, 且只存在于发生该突变的患者的肿瘤组织, 正常组织不包含该突变。由于其只发现存在于患者肿瘤组织, 而不存在正常组织, 因此其特异性更高, 引起的免疫反应的特异性也更高。利用本发明实施例所提出的多肽刺激机体产生的 CTL 只会对肿瘤细胞和组织有杀伤作用, 而不会影响到正常组

35

织, 从而实现对肿瘤的精准化靶向治疗。利用本发明实施例所提出的多肽进行肿瘤免疫治疗, 不仅具有良好的治疗效果, 还具有安全性好, 副作用小等特点。

具体地, 根据本发明的实施例, 上述至少一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加为如 SEQ ID NO: 1 所述氨基酸序列的第 2 位和/或第 9 位氨基酸的取代。发明人发现, SEQ ID NO: 1 所述氨基酸序列的第 2 位和/或第 9 位氨基酸的取代不改变氨基酸序列与 T 细胞之间的特异性, 不改变多肽的免疫原性。

更具体地, 根据本发明的实施例, 上述至少一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加为如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的第 2 位氨基酸取代为 M, 和/或第 9 位氨基酸取代为 L。例如, 上述多肽具有如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。根据本发明的实施例, GLKDLLNPI (SEQ ID NO:1)、GLKDLLNPL (SEQ ID NO:2)、GMKDLLNPL (SEQ ID NO:3)、GMKDLLNPI (SEQ ID NO:4)、均与 HLA-A0201 具有高亲和能力, 均具有激活特异性 T 细胞免疫的能力。发明人发现, 多肽的可变形式 GLKDLLNPL (SEQ ID NO:2)、GMKDLLNPL (SEQ ID NO:3)、GMKDLLNPI (SEQ ID NO:4) 改变了多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO:1) 的第 2 位和/或第 9 位位点, 其中第 2 位氨基酸取代为 M, 和/或第 9 位氨基酸取代为 L, 这种取代增强了多肽与 HLA-A0201 的结合力, 而不改变其与 T 细胞之间的特异性, 不改变多肽的免疫原性。因此, SEQ ID NO:2~4 多肽与 SEQ ID NO:1 多肽均具有激活特异性 T 细胞免疫的能力。

用途

在应用方面, 本发明一方面提出了检测上述多肽的试剂在制备试剂盒中的用途, 上述多肽在制备药物中的用途以及上述多肽在制备疫苗中的用途, 该试剂盒、药物或疫苗用于诊断、预防或治疗肿瘤。任选地, 所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽。任选地, 所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤, 优选地, 所述肿瘤为乳腺癌。基于发明人的实验研究发现, 上述多肽在肿瘤组织中特异性高表达, 进而发明人通过进一步的实验验证并提出, 检测上述多肽的试剂所制备的试剂盒或上述多肽制备药物或疫苗可有效用于诊断肿瘤, 其安全性更高, 副作用更小; 同时, 发明人惊奇地发现, 上述多肽与 HLA-A0201 有高亲和力和, 进而可被表达 HLA-A0201 的呈递细胞递呈给 CTL 或 TIL 细胞而激活特异性 T 细胞免疫, 当所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和上述多肽时, 该试剂盒、药物或疫苗诊断或治疗的安全性和有效性显著提高; 同时, 发明人发现肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤组织特异性高表达上述多肽, 进而当肿瘤为上述肿瘤时, 尤其为乳腺癌, 该试剂盒、药物或疫苗诊断、治疗的有效性可进一步提高。

另一方面, 本发明提出了上述多肽在预防或治疗受试者中与 PIK3CA 基因突变相关的疾病的用途。发明人经过大量的筛选实验, 发现 PIK3CA 基因的突变导致其编码的 453 位点的氨基酸由谷氨酸(Glu, E)突变为赖氨酸(Lys, K)。本发明实施例所述的多肽具有与 PIK3CA 突变基因编码多肽相同的抗原特性, 所述多肽所引起的特异性免疫反应, 其效应细胞对于 PIK3CA 基因突变细胞的特异性识别和杀伤效果显著, 进而本发明实施例的多肽可用 PIK3CA 基因突变相关疾病的预防或治疗。且发明人通过实验发现, 所述多肽用于预防或治疗 PIK3CA 基因突变相关疾病的效果显著。

治疗组合物

一方面, 本发明提出了一种分离的核酸。根据本发明的实施例, 所述核酸为编码上述多肽的核酸或

其互补序列。所述核酸能够特异性编码上述多肽，如前所述，上述多肽具有与 HLA-A0201 高亲和能力，具有激活特异性 T 细胞免疫的能力，进而，本发明实施例所提出的核酸在合适条件下表达的多肽能够用于预防或治疗肿瘤，尤其是肿瘤同时表达 HLA-A0201 和上述多肽时，其治疗或预防的安全性和有效性更高。

5 需要说明的是，对于本发明说明书和权利要求书中所提及的核酸，本领域技术人员应当理解，实际包括互补双链的任意一条，或者两条。为了方便，在本说明书和权利要求书中，虽然多数情况下只给出了一条链，但实际上也公开了与之互补的另一条链。另外，本申请中的基因序列包括 DNA 形式或 RNA 形式，公开其中一种，意味着另一种也被公开。

10 相应地，另一方面，本发明提出了一种核酸构建体。根据本发明的实施例，所述核酸构建体包含编码序列，所述编码序列为上述的核酸，以及可选的控制序列，所述控制序列与所述编码序列可操作地连接。其中，所述控制序列为可指导多肽在宿主中表达的一个或多个控制序列。根据本发明的实施例，控制序列包括但不限于 U6, H1, CMV, EF-1, LTR 或 RSV 启动子。本发明实施例所提出的核酸构建体可在适合条件下，与表达载体连接后，在适宜的宿主细胞中高效表达上述多肽，进而可有效用于对肿瘤，特别是同时表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤的特异性治疗或预防。

15 相应地，另一方面，本发明提出了一种表达载体。根据本发明的实施例，所述载体包含上述的核酸构建体。所述表达载体的类型不受特别限制，只要能够实现前面所述的核酸构建体在受体细胞中高效表达即可，表达载体包括但不限于反转录病毒载体、慢病毒载体和/或腺病毒相关病毒载体。本发明实施例所述提出的表达载体可在适合条件下，在表达宿主中高效表达上述多肽，所述表达载体可有效用于对肿瘤，特别是同时表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤的特异性治疗或预防。

20 相应地，另一方面，本发明提出了一种宿主细胞。根据本发明的实施例，所述细胞携带上述的核酸构建体或表达载体，可选地，是通过转染或者转化所述核酸构建体或表达载体获得的。转化或转染可采用电转、病毒转染或感受态细胞转化的方式进行。采用何种转染或转化的方式是根据宿主细胞的性质以及待转核酸构建体或表达载体的性质所决定的，只要能够在所述宿主细胞中实现前面所述多肽的高效表达并对宿主细胞的良好细胞状态不产生较大影响即可。根据本发明的实施例，所述宿主细胞在合适条件下可高效表达上述多肽，所述宿主细胞可有效用于对肿瘤，特别是同时表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤的特异性治疗或预防。

25 需要说明的是，本申请说明书中所述的“适合条件”，是指适合本申请所述多肽表达的条件。本领域技术人员容易理解的是，适合多肽表达的条件包括但不限于合适的转化或转染方式、合适的转化或转染条件、健康的宿主细胞状态、合适的宿主细胞密度、适宜的细胞培养环境、适宜的细胞培养时间。“适合条件”不受特别限制，本领域技术人员可根据实验室的具体环境，优化最适的所述多肽表达的条件。

30 再一方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，该药物组合物包括：前面所述的多肽；以及药学上可接收的佐剂。发明人通过大量的实验发现，包括前面所述多肽和药学上可接受佐剂的药物组合物可显著刺激 CTL 或 TIL 的增值和分泌，可显著杀伤呈递上述多肽抗原的肿瘤细胞，具有显著治疗或预防肿瘤，尤其是特异性高表达上述多肽抗原的肿瘤的功效。

35 另一方面，本发明提出了一种抗原呈递细胞。根据本发明的实施例，该抗原呈递细胞可呈递前面所述的多肽。根据本发明的实施例，呈递前面所述的多肽的抗原呈递细胞可有效引起患者针对肿瘤特异

性抗原-上述多肽的免疫反应，进而激活 CTL 特异性杀伤功能，本发明实施例所提出的抗原呈递细胞具有显著的治疗表达 HLA-A0201 和上述多肽的肿瘤的功效，其治疗的效果显著，安全性高。

5 根据本发明的具体示例，所述抗原呈递细胞通过下列至少之一的方式获得：将具有抗原呈递能力的细胞与上述多肽接触；或将前面所述的核酸、或者前面所述的核酸构建体、或者前面所述的表达载体导入所述具有抗原呈递能力的细胞。发明人通过实验发现，抗原呈递细胞通过上述方式任何一种或几种，可有效呈递前面所述的多肽，将前面所述的多肽暴露在呈递细胞的表面，呈递了前面所述多肽的抗原呈递细胞可有效引起患者对肿瘤特异性抗原-上述多肽的免疫反应，进而激活 CTL 特异性杀伤功能。

10 根据本发明的具体实施例，所述抗原呈递细胞为树突细胞。树突细胞具有极强的抗原内吞和加工处理能力，可将抗原呈递在细胞的表面。发明人选择树突细胞作为抗原呈递细胞，抗原呈递细胞在机体内启动、调节和维持针对所述多肽的免疫反应更加强烈。

再一方面，本发明提出了一种免疫效应细胞。根据本发明的实施例，所述免疫效应细胞可识别前面所述的多肽或识别在细胞表面呈递前面所述多肽的抗原呈递细胞。根据本发明的实施例，该免疫效应细胞是通过前面所述的抗原呈递细胞与具有免疫效应能力的细胞进行接触获得的。发明人发现，通过呈递前面所述的多肽的抗原呈递细胞与具有免疫效应能力的细胞接触，抗原呈递细胞可活化具有免疫效应能力的未激活细胞，递呈抗原-前面所述的多肽，进而激活具有免疫效应能力的细胞，大量产生免疫效应细胞，该免疫效应细胞具有特异性杀伤呈递抗原-所述多肽的靶细胞的作用。根据本发明的再一具体示例，具有免疫效应能力的细胞为 T 淋巴细胞，发明人发现，优选 CD8⁺T 细胞，CD8⁺T 细胞接受抗原呈递细胞激活作用的能力更强，获得的 CD8⁺T 细胞的特异性杀伤呈递抗原-所述多肽的靶细胞的作用更强。

20 再一方面，本发明提出了一种疫苗。根据本发明的实施例，该疫苗包含前面所述的核酸、核酸构建体、表达载体、宿主细胞、前面所述的抗原呈递细胞，或前面所述的免疫效应细胞。如前所述，本发明实施例的核酸、核酸构建体、表达载体、宿主细胞能够用于高表达所述多肽的肿瘤的特异性杀伤，本发明实施例所提出的抗原呈递细胞具有显著的治疗表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤的功效，另外，本发明实施例所提出的免疫效应细胞具有显著的特异性杀伤呈递抗原-所述多肽的靶细胞的作用。本发明实施例所提出的疫苗包含前面所述的核酸、核酸构建体、表达载体、宿主细胞、抗原呈递细胞或免疫效应细胞，其具有显著的治疗或预防表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤的作用，其安全性更高、副作用更小。

30 再一方面，本发明提出了一种抗体。根据本发明的实施例，该抗体特异性识别前面所述的多肽。本发明实施例所提出的抗体可特异结合所述多肽，进而可特异性识别特异性高表达所述多肽的肿瘤细胞，本发明实施例所提出的抗体在肿瘤诊断、治疗或预防中发挥巨大的作用。另外，根据本发明的实施例，所述抗体可通过如下方式获得：采集使用前面所述的多肽进行免疫接种的动物的血清；以及从所述血清中纯化出目的抗体。利用根据本发明实施例的制备抗体的方法，可方便、快捷、有效地制备出具有特异性识别所述多肽的抗体，所制备的抗体可有效用于肿瘤的诊断、治疗和预防。

35 综上，本发明实施例所提出的多肽由于其只发现存在于患者肿瘤组织，而不存在正常组织，因此其特异性更高，引起的免疫反应的特异性也更高，与其他肿瘤多肽疫苗相比，具有更为安全，副作用小，很少引起严重的免疫反应的优点，又因其结构简单、易于人工合成，可作为疫苗、药物组合物等，引起针对肿瘤的免疫反应。具有 SEQ ID NO:1 所示序列的多肽或其可变形式可以被作为靶点或者疫苗应用于

针对于同时表达 HLA-A0201 和该突变多肽的肿瘤生物治疗，具有引起机体免疫反应。可以采用多肽+佐剂，或多肽负载的抗原呈递细胞疫苗，或多肽特异性 DC-CTL, DC-CIK 疫苗等方式，特异性杀伤肿瘤细胞，预防以及治疗癌症，包括表达该多肽序列的肺癌，黑色素瘤，乳腺癌，鼻咽癌，肝癌，胃癌，食道癌，结直肠癌，胰腺癌，皮肤癌，前列腺癌，宫颈癌，白血病，脑肿瘤等癌症类型。

5 治疗方法

更进一步，本发明提出了一种治疗方法。根据本发明的实施例，该治疗方法包括：对患者给予治疗有效量的前面所述的多肽、前面所述的核酸、前面所述的核酸构建体、前面所述的表达载体、前面所述的宿主细胞、前面所述的药物组合物、前面所述的抗原呈递细胞、前面所述的免疫效应细胞、前面所述的疫苗或者前面所述的抗体。如前所述，本发明实施例所提出的治疗方法，包括给予任一种有效量的前面所述的多肽等，均可有效治疗或预防表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤。

在本文中所使用的术语“给予”指将预定量的物质通过某种适合的方式引入病人。本发明实施例中的多肽、核酸、核酸构建体、表达载体、宿主细胞、药物组合物、抗原呈递细胞、免疫效应细胞、疫苗或抗体可以通过任何常见的途径给药，只要它可以到达预期的组织。给药的各种方式是可以预期的，包括腹膜，静脉，肌肉，皮下，皮层，口服，局部，鼻腔，肺部和直肠，但是本发明不限于这些已举例的给药方式。然而，由于口服给药时，口服给药的组合物的活性成分应该被包被或被配制以防止其在胃部被降解。优选地，本发明的组合物可以注射制剂给药。此外，本发明的药物组合物可以使用将活性成分传送到靶细胞的特定器械来给药。

本发明实施例中的多肽、核酸、核酸构建体、表达载体、宿主细胞、药物组合物、抗原呈递细胞、疫苗或抗体的给药频率和剂量可以通过多个相关因素被确定，该因素包括要被治疗的疾病类型，给药途径，病人年龄，性别，体重和疾病的严重程度以及作为活性成分的药物类型。根据本发明的一些实施例，日剂量可分为适宜形式的 1 剂、2 剂或多剂，以在整个时间段内以 1 次、2 次或多次给药，只要达到治疗有效量即可。

术语“治疗有效量”是指足以显著改善某些与疾病或病症相关的症状的量，也即为给定病症和给药方案提供治疗效果的量。术语“治疗”用于指获得期望的药理学和/或生理学效果。本文使用的“治疗”涵盖将本发明实施例中的多肽、核酸、核酸构建体、表达载体、宿主细胞、药物组合物、抗原呈递细胞、免疫效应细胞、疫苗或抗体给予个体以治疗，包括但不限于将含本文所述的给予有需要的个体。

诊断方法

另外，本发明提出了一种诊断方法。根据本发明的实施例，该诊断方法包括：检测患者来源的生物样品是否携带前面所述的多肽；基于所述生物样品是否携带所述多肽，确定所述患者是否患有肿瘤。由于本发明实施例所提出的多肽仅发现于癌组织中，进而可以通过质谱的方式检测到血清中存在的该游离多肽，所述多肽作为肿瘤标志物应用于癌症的诊断，确定患者是否患有癌症。发明人发现，所述多肽在肿瘤组织中特异性高表达，本发明实施例所提出的诊断方法可有效诊断出特异性高表达所述多肽的肿瘤患者。

其中，发明人发现，肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，尤其是乳腺癌特异性高表达所述多肽，进而，本发明实施例所提出的方法对上述肿瘤，尤其是乳腺癌的诊断准确性进一步提高。

同时，发明人发现，HLA-A0201 在中国人群中具有较高的比例，从而，本发明实施例所提出的诊断方法诊断出同时表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤患者的几率更高。

诊断系统

最后，本发明提出了一种诊断系统。根据本发明的实施例，参考图 1，该诊断系统包括：多肽检测装置 100；诊断结果确定装置 200。其中，多肽检测装置 100 用于检测患者来源的生物样品是否携带前面所述的多肽，诊断结果确定装置 200 与所述多肽检测装置 100 相连，用于基于生物样品是否携带所述多肽，确定所述患者是否患有肿瘤。根据本发明具体实施例，可以采用质谱仪检测患者血清中是否存在的该游离多肽，进而通过质谱数据分析装置确定患者血清中是否存在该游离多肽，确定所述患者是否患有肿瘤。发明人发现，所述多肽在肿瘤组织中特异性高表达，本发明实施例所提出的诊断系统可用于有效确定特异性高表达所述多肽的肿瘤患者。

另外，发明人发现，肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，尤其是乳腺癌特异性高表达所述多肽，本发明实施例所提出的诊断系统对上述肿瘤，尤其是乳腺癌的诊断准确性进一步提高。

同时，发明人发现，HLA-A0201 在中国人群中具有较高的比例，HLA-A0201 与所述多肽有着较强的亲和力，所述多肽通过与细胞表面 HLA-A0201 结合进而激发一系列的免疫反应。因而，本发明实施例所提出的诊断系统诊断出同时表达 HLA-A0201 和所述多肽的肿瘤患者的几率更高。

需要说明的是，根据本发明实施例的多肽及其用途、编码所述多肽的核酸、核酸构建体、表达载体、宿主细胞、药物组合物、抗原呈递细胞、免疫效应细胞、疫苗、抗体、治疗和诊断癌症的方法和系统是本发明的发明人经过艰苦的创造性劳动和优化工作才发现和完成的。

20

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品，例如可以采购自 Illumina 公司。

25

实施例 1 多肽的亲和力预测

根据选定的 HLA 等位基因分型，利用自主开发的“基于肿瘤 DNA 和 RNA 测序的突变多肽结合能力预测软件”（软件著作权号：2016SR002835）对多肽分别进行亲和力预测。预测结果用 IC_{50} 分值表示， IC_{50} 小于 500 nM 表示该多肽有亲和力， IC_{50} 小于 50 nM 表示该多肽具有高亲和力。发明人对野生型（GLEDLLNPI（SEQ ID NO: 5））多肽、突变多肽 GLKDLLNPI（SEQ ID NO: 1）及其可变形式（SEQ ID NO: 2~4）多肽进行亲和力预测，最后筛选突变多肽及其可变形式多肽 IC_{50} 得分小于 500 nM，并且突变多肽及其可变形式多肽的 IC_{50} 得分小于野生型（GLEDLLNPI（SEQ ID NO: 5））多肽。多肽的亲和力预测结果见表 1。根据该结果，进行下一步 T2 亲和力验证。

30

表 1：多肽与 HLA-A0201 的亲和力预测结果

突变多肽及其可变形形式多肽序列	IC ₅₀ (nM)	野生型多肽序列	IC ₅₀ (nM)
GLKDLLNPI (SEQ ID NO:1)	2.57	GLEDLLNPI(SEQ ID NO:5)	6.68
GLKDLLNPL (SEQ ID NO:2)	2.24	GLEDLLNPI(SEQ ID NO:5)	6.68
GMKDLLNPL (SEQ ID NO:3)	3.01	GLEDLLNPI(SEQ ID NO:5)	6.68
GMKDLLNPI (SEQ ID NO:4)	2.89	GLEDLLNPI(SEQ ID NO:5)	6.68

经计算机软件预测，突变多肽及其可变形形式多肽的 IC₅₀ 均低于 50nM，说明突变多肽及其可变形形式多肽经预测，均为高亲和力的多肽。且突变多肽及其可变形形式多肽的 IC₅₀ 小于野生型 (GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)) 多肽。因此，经预测可知突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 及其可变形形式 (SEQ ID NO: 2~4) 多肽的亲和力高于野生型 (GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)) 多肽。

5

实施例 2 多肽 T2 亲和力验证

(一)、多肽的合成与纯化

依照标准固相合成方法合成本发明实施例中所涉及的各种类型多肽，并通过反相 HPLC 进行纯化。多肽的纯度(>90%)和身份分别通过 HPLC 和质谱测定。

10 (二)、亲和力验证

T2 细胞是 HLA-A2 阳性的 T、B 淋巴细胞杂交瘤细胞，其细胞表面可表达 HLA-A0201，但因其内源性抗原呈递途径中必需的抗原多肽转运蛋白(TAP)缺陷，故不能转运内源性抗原。T2 细胞购自 ATCC (编号: CRL-1992)。

15 取 2×10^5 个 T2 细胞，用 500 μ l 含有人类 β 2 微球蛋白 (最终浓度, 3 μ g/ml) 的 IMDM 无血清培养基重悬到 24 孔板里，加入合成的野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽、GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其 3 种可变形形式多肽 (最终浓度 100 μ M)，在培养箱(37 °C, 5%CO₂)，培养过夜。每个组 2 个复孔；没有加多肽的 T2 细胞被用作背景对照，加入 CMV 多肽(NLVPMVATV (SEQ ID NO: 6)) 作为阳性对照。将细胞 200g 离心 5 分钟收集细胞。细胞用 PBS 洗涤两次后，将细胞直接用抗 HLA-A*02:01 的 FITC 单克隆抗体孵育，4°C 维持 30 分钟。然后用流式细胞仪 (BD FACSJazz™) 及其软件检测并分析
20 其平均荧光强度。荧光指数 (FI) 用下列公式计算: $FI = [\text{平均荧光强度 (MFI) 样品} - \text{MFIbackground}] / \text{MFIbackground}$ ，其中 MFIbackground 代表不含肽的值。 $FI > 1.5$ 表明该肽对 HLA-A * 0201 分子具有高

亲和性, $1.0 < FI < 1.5$ 表明该肽对 HLA-A*02:01 分子具有中等亲和力, 以及 $0.5 < FI < 1.0$ 表明该肽为 HLA-A*0201 分子低亲和力。多肽的亲和力检测结果见表 2 和图 2。

表 2: 多肽与 HLA-A0201 亲和力的检测结果

样本	加入多肽浓度	平均荧光强度	FI	结论
GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)	100 μ M	780	2.24	高亲和力
GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1)	100 μ M	752	2.12	高亲和力
GLKDLLNPL (SEQ ID NO: 2)	100 μ M	712	1.95	高亲和力
GMKDLLNPL (SEQ ID NO: 3)	100 μ M	761	2.16	高亲和力
GMKDLLNPI (SEQ ID NO: 4)	100 μ M	730	2.03	高亲和力
背景对照	0 μ M	241	0.00	无亲和力
CMV 阳性对照	100 μ M	658	1.73	高亲和力

经实验预测, 背景对照的 FI 为 0, CMV 的阳性多肽 FI 为 1.73, 两个均正常。而野生型 (GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)) 多肽和突变多肽及其 3 种可变形式多肽的 FI 都大于 1.5, 进一步证明野生型 (GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)) 多肽、突变多肽及其可变形式多肽对 HLA-A0201 分子都是具有高亲和力的。

10 实施例 3 多肽体外刺激 CD8⁺T 细胞

取 HLA-A0201 亚型阳性的健康志愿者的外周血 100ml, 采用 Ficoll 淋巴细胞分离液, 分离外周血单个核细胞 (PBMC), 将 PBMC 用贴壁法获取单核细胞, 并用 CD8 磁珠筛选 PBMC 细胞中的 CD8⁺ 的 T 细胞。采用 GM-CSF (1000U/ml), IL-4 (1000U/ml), 诱导贴壁单核细胞为未成熟 DC, 再加入 IFN-gamma (100U/ml), LPS (10ng/ml), 最后分别加入突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 及其 3 种可变形式多肽诱导贴壁细胞为多肽特异性成熟 DC 细胞。将负载过多肽的成熟 DC 细胞与志愿者的 CD8⁺T 细胞共培养, 并加入 IL-21, 3 天后, 补加 IL-2 和 IL-7, 以后于第 5, 7 天补加一次 IL-2 和 IL-7, 第 10 天取共培养的细胞进行计数, 和后续的 ELISPOTs 以及 LDH 检测。计数结果表 3 所示:

表 3: 培养后计数结果

	培养前细胞总数	培养后细胞总数
--	---------	---------

GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)	2.0×10^6	8.6×10^6
GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1)	2.0×10^6	9.6×10^6
GLKDLLNPL (SEQ ID NO: 2)	2.0×10^6	7.6×10^6
GMKDLLNPL (SEQ ID NO: 3)	2.0×10^6	8.9×10^6
GMKDLLNPI (SEQ ID NO: 4)	2.0×10^6	8.1×10^6

培养 10 天后, 细胞有明显增殖, 总的细胞数目扩增倍数在 3-5 倍之间。

实施例 4 ELISPOTs 方法验证多肽激活 CD8⁺T 细胞免疫反应

实施例 3 中共培养的细胞分别与负载过突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1)、野生型

- 5 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽的 T2 细胞加入到人 γ 干扰素 ELISPOTs 板中培养与检测。最终对 ELISPOT 实验产生的斑点进行计数。突变多肽具有免疫原性的要求如下: 斑点数(突变多肽)/斑点数(野生型)多肽>2, 即突变多肽引起的斑点数超过野生型多肽斑点数目的两倍以上是多肽具有免疫原性的要求。

结果见表 4 和图 3。其中, 负载突变多肽为实验孔, 负载野生型多肽的为对照孔。

- 10 其中, ELISPOTs 检测方法原理是: CD8⁺T 细胞能够特异性识别 HLA-A0201 与多肽的复合物, 多肽序列的不同, 识别多肽与 HLA-A0201 的复合物的 T 细胞的群体也不同。由于 T2 细胞表达 HLA-A0201, 因此, CD8⁺T 细胞能够特异性识别负载了突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 的 T2 细胞, 而不能识别野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽负载的 T2 细胞。在特异识别 HLA-A0201 和多肽的复合物之后, 多肽特异性 CD8⁺T 细胞能再次激活并分泌 IFN- γ 干扰素。而 CD8⁺T 细胞被激活分泌的
- 15 IFN- γ 干扰素可以被 ELISPOTs 板子上的抗体所捕获, 最终识别 IFN- γ 的抗体可以通过偶联在抗体上的酶, 催化底物显色, 最终产生斑点。斑点的数目代表了被激活分泌 IFN- γ 干扰素的细胞数目。

表 4: 多肽刺激特异性 CD8⁺T 细胞分泌 IFN- γ 干扰素结果

激活 T 细胞的突变多肽及其可 变形式多肽序列	突变多肽斑 点数	野生型多肽斑 点数	倍数(突变/ 野生型)	结论
GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1)	361	81	4.4	具有免疫原性
GLKDLLNPL (SEQ ID NO: 2)	327	60	5.5	具有免疫原性
GMKDLLNPL (SEQ ID NO: 3)	389	79	4.9	具有免疫原性
GMKDLLNPI (SEQ ID NO: 4)	359	77	4.7	具有免疫原性

实施例 5 LDH 释放实验证明 CD8⁺T 细胞杀伤活性

实施例 3 中共培养的细胞分别与负载过突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 或其 3 种可变形式多肽 (SEQ ID NO: 2-4)、野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽、未负载多肽的 T2 细胞进行共培养, 实验中设置最大释放孔, 体积校正孔, 培养基对照孔, 自发释放孔, 不同效靶比 (即效应细胞 (T 细胞) 与靶细胞 (T2 细胞) 的数目比) 等对照, 每组设置 3 个复孔, 4h 后, 取出共培养的细胞上清 50 μ l, 并加入到 50 μ l LDH 底物混合液中, 使细胞上清催化 LDH 底物反应, 最终读取 490nm 波长和 680nm 参考波长, 并根据对照孔, 计算 CD8⁺T 细胞杀伤 T2 的杀伤活性。

杀伤活性计算公式为:

$$\text{杀伤效率(\%)} = \frac{\text{实验孔-效应细胞自发释放-靶细胞自发释放+培养基孔}}{\text{靶细胞最大释放-体积校正孔-靶细胞自发释放+培养基孔}} \times 100\%$$

其中, LDH 释放试验的原理是: 乳酸脱氢酶 (LDH) 是活细胞胞浆内含酶之一, 在正常情况下, 不能透过细胞膜。当靶细胞受到效应细胞的攻击而损伤时, 细胞膜通透性改变, LDH 可释放至介质中。释放出来的 LDH 在催化乳酸生成丙酮酸的过程中, 使氧化型辅酶 I (NAD⁺) 变成还原型辅酶 I (NADH), 后者再通过递氢体-吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS) 还原碘硝基氯化氮唑蓝 (INT) 或硝基氯化四氮唑蓝 (T) 形成有色的甲臞类化合物, 在 490nm 或 570nm 波长处有一高吸收峰, 利用读取的 OD 值, 经过计算即可得知效应细胞活性。

结果见表 5 和图 4。

表 5: T 细胞特异性识别并杀伤负载实验多肽的靶细胞

组别	效靶比 (1: 1)	效靶比 (10: 1)
T 细胞(GLKDLLNPI) (SEQ ID NO: 1) +T2 细胞 (GLKDLLNPI) (SEQ ID NO: 1)	3.93%	40.60%
T 细胞(GLKDLLNPI) (SEQ ID NO: 1) +T2 细胞 (GLEDLLNPI) (SEQ ID NO: 5)	2.73%	4.83%
T 细胞(GLKDLLNPL) (SEQ ID NO: 2) +T2 细胞 (GLKDLLNPL) (SEQ ID NO: 2)	3.85%	32.13%
T 细胞(GLKDLLNPL) (SEQ ID NO: 2) +T2 细胞 (GLEDLLNPI) (SEQ ID NO: 5)	3.43%	3.56%
T 细胞(GMKDLLNPL) (SEQ ID NO: 3) +T2 细胞 (GMKDLLNPL) (SEQ ID NO: 3)	3.57%	45.73%
T 细胞(GMKDLLNPL) (SEQ ID NO: 3) +T2 细胞	4.56%	5.82%

(GLEDLLNPI) (SEQ ID NO: 5)		
T 细胞(GMKDLLNPI) (SEQ ID NO: 4) +T2 细胞 (GMKDLLNPI) (SEQ ID NO: 4)	4.93%	35.06%
T 细胞(GMKDLLNPI) (SEQ ID NO: 4) +T2 细胞 (GLEDLLNPI) (SEQ ID NO: 5)	3.52%	5.21%

从上表 5 以及图 4 中可看出，在效靶比 1:1 或 10:1 时，突变多肽及其可变形式多肽激活的 T 细胞，能够杀伤负载了突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 或其 3 种可变形式多肽 (SEQ ID NO: 2~4) 的 T2 细胞，而不能杀伤负载野生型多肽 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 的 T2 细胞，这进一步验证实验组多肽 (SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的多肽及其可变形式多肽) 激活的 T 细胞能特异性杀伤负载突变多肽 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 或其 3 种可变形式多肽 (SEQ ID NO: 2~4) 的靶细胞。

实施例 6 MCF7- GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其可变形式多肽的皮下移植瘤模型的建立

(一) 构建并包装 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其可变形式多肽的重组慢病毒

合成 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽的 DNA 序列如 SEQ ID NO:7 所示，
 10 ATGGATTAGAAGATTTGCTGAACCCTA (SEQ ID NO:7)，
 及其可变形式 GLKDLLNPL (SEQ ID NO: 2) 多肽的 DNA 序列如 SEQ ID NO:8 所示，
 ATGGATTAGAAGATTTGCTGAACCTTA (SEQ ID NO:8)，
 及其可变形式 GMKDLLNPL (SEQ ID NO: 3) 多肽的 DNA 序列如 SEQ ID NO:9 所示，
 ATGATGTAGAAGATTTGCTGAACCT (SEQ ID NO:9)，
 15 及其可变形式 GMKDLLNPI (SEQ ID NO: 4) 的多肽 DNA 序列如 SEQ ID NO:10 所示，
 ATGGATTAGAAGATTTGCTGAACCGTA (SEQ ID NO:10)，
 及野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽对应的 DNA 序列如 SEQ ID NO:11 所示，
 ATGGATGAAAAGATTTGCTGAACCCTA (SEQ ID NO:11)。

分别构建表达野生型多肽 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)、GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 的多肽及其可变形式多肽的慢病毒载体 pHBLV-Puro。并分别命名为 pHBLV-Puro- GLEDLLNPI，
 20 pHBLV-Puro-GLKDLLNPI，pHBLV-Puro- GLKDLLNPL，pHBLV-Puro-GMKDLLNPL，pHBLV-Puro-GMKDLLNPI。再分别将这 5 个慢病毒质粒与 pSPAX2 和 pMD2G 辅助质粒共同转染 293T 细胞，包装出表达野生型多肽 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5)、GMKDLLNPL (SEQ ID NO: 1) 多肽及其 3 种可变形式多肽 (SEQ ID NO: 2~4) 的慢病毒。

(二) 表达 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽的人乳腺癌细胞系的建立

人乳腺癌细胞系 MCF7 购买于 ATCC (编号: HTB-22), 其 HLA 亚型为 HLA-A*0201 阳性。细胞培养于含 10%胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中。37°C, 5% CO₂ 的孵箱中培养。将包装好的 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 慢病毒转染 MCF7 细胞系, 并采用 Puromycin 抗生素 (嘌呤霉素), 持续筛选存活的 MCF7 细胞系, 最终建立表达 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽的 MCF7 细胞系。例如可命名为 MCF7- GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 细胞系。

(三) NOD SCID 小鼠人免疫重建

采集健康志愿者抗凝外周血 600~900 ml。Ficoll 分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear, PBMC), 收集细胞待用。300 只排除免疫渗漏的 NOD SCID 小鼠, 每只腹腔注射 PBMC $2 \times 10^7/0.5\text{ml}$, 对 NOD SCID 小鼠进行人免疫重建。进而选取 4 周后的小鼠准备接种人乳腺癌细胞系模型。

(四) 人乳腺癌肿瘤模型的构建

已建系的人乳腺癌细胞系 MCF7- GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1), 培养于含 10%胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中。37°C, 5% CO₂ 的孵箱中培养。收集如 MCF7- GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 肿瘤细胞, 3000 转离心, 用无菌生理盐水洗涤肿瘤细胞 3 次。做适当稀释, 取 40 微升细胞悬液加入 10 微升 0.4%台盼蓝染色并镜检计数, 制成浓度为 1×10^8 个/ml 的肿瘤细胞悬液, 选取免疫重建后的 NOD/SCID 小鼠, 每只小鼠皮下接种肿瘤细胞悬液 100 μl 。接种完成后, 逐日观察接种部位有无感染, 肿瘤生长后有无自然消退, 用游标卡尺, 每 2-3 天测量肿瘤长径 a (长) 和短径 b (宽), 并计算肿瘤的大小= $a \times b \times b/2$ 。7 天后, 小鼠皮下瘤可摸到约米粒大小肿瘤。对免疫重建 4 周的 MCF7- GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 皮下瘤模型 NOD/SCID 小鼠分别进行多肽+完全弗氏佐剂疫苗, 或多肽+DC 疫苗, 或慢病毒感染 DC 细胞疫苗、以及 DC-CTL 疫苗治疗, 并每 2 天记录肿瘤的体积和小鼠的生存率。

实施例 7 多肽疫苗的制备及治疗方案

将免疫重建 4 周的 MCF7- GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 皮下瘤模型 NOD/SCID 小鼠随机分为 6 组: 佐剂+野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽组、佐剂组、佐剂+ GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 组或 3 种可变性形式多肽组, 每组各 6 只。野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽、GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽及其 3 种可变性形式多肽的首次免疫剂量为 100 μg /只。上述多肽用 PBS 重悬后, 与 150 μl / 只弗氏完全佐剂混匀后, 用 PBS 调整至 300 μl /只, 于背部皮下双点注射。2 周后, 使用相同剂量进行加强免疫 (第 1 次使用完全弗氏佐剂, 以后均用不完全弗氏佐剂), 共免疫 4 次。每天观察小鼠的一般特征, 包括精神状态、活动力、反应、饮食、体重及肿瘤的生长情况等。每 2 天用游标卡尺测量肿瘤最长径 (长) 和最短径 (宽)。其中, 肿瘤体积的计算公式为: $1/2 \times \text{长} \times \text{宽}^2$; 生存期计算公式为: 一定时间内生存率= $\frac{\text{该时间内存活小鼠}}{\text{该时间内存活小鼠} + \text{该时间内死亡小鼠}} \times 100\%$ 。结果见图 5。

结果显示,相对于单纯佐剂组和野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽组,“GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其可变形式+弗氏佐剂”组均能够有效的抑制肿瘤的生长,并延长小鼠的生存期。

实施例 8 DC 多肽疫苗的制备及治疗方案

5 采集健康志愿者抗凝外周血 100~150 ml。Ficoll 分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear, PBMC), 收集 PBMC 细胞, 按 $2\sim 3\times 10^6/\text{ml}$ 重悬于 RPMI 1640 培养基中, 37°C 孵育 2h, 贴壁细胞即为 DC, 吸取未贴壁细胞即是外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL), 备用。采用 GM-CSF (1000U/ml), IL-4 (1000U/ml), 诱导贴壁单核细胞为未成熟 DC, 再加入 IFN- γ (100U/ml), LPS (10ng/ml), 最后分别加入野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽、GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽及其 3 种可变形式多肽 (浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$), 诱导贴壁单核细胞为成熟 DC 细胞, 10 收获成熟 DC, 用生理盐水洗涤 3 次。用生理盐水将负载多肽后的 DC 调整为 $(4.0\pm 0.5)\times 10^7/\text{ml}$, 用于后续实验。将小鼠随机分为 5 组: DC-负载野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽组、DC-负载 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽、以及 DC-负载 3 种可变形式 (SEQ ID NO: 2-4) 多肽组, 每组各 6 只。制备 DC-负载野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽, DC-负载 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽及 15 其任意一种的可变形式的多肽细胞悬液。对小鼠近股沟大腿内侧进行皮内注射, 每侧注射 0.1ml, 每周注射 1 次。剂量为 $(4.0\pm 0.5)\times 10^6$ 细胞/次, 共注射 2 次。注射结束后观察小鼠生命体征, 每 2 天用游标卡尺测量肿瘤纵横大小。肿瘤体积计算为: 肿瘤体积 = $1/2\times \text{长}\times \text{宽}^2$ 。同时, 记录小鼠体重变化情况和小鼠生存情况。结果见图 6。

结果显示,相对于野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽负载的 DC 疫苗组, GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其可变形式 (SEQ ID NO: 2~4 任一项) 负载的 DC 疫苗可以明显的延长小鼠的生存期, 以及减缓小鼠肿瘤的生长。

实施例 9 慢病毒感染的 DC 细胞疫苗的制备及治疗方案

采集健康志愿者抗凝外周血 100~150 ml。Ficoll 分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear, PBMC), 收集 PBMC 细胞, 37°C 孵育 2h, 洗去未贴壁细胞, 经重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白介-4 (rhIL-4) 培养 DC 细胞。培养至第五天, 更换半适量的培养基及调整细胞密度为 1×10^6 个/ml; 分别加入实施例 6 中构建表达的含有适量野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽、GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽及其可变形式多肽的慢病毒液。24h 后去除病毒培养液, 加入含有 50ng/ml rhIL-4、100ng/ml rhGM-CSF, 100U/ml 的 IFN- γ 和 100ng/ml LPS 的培养液, 置 25 于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。48-72h 后荧光显微镜下观察慢病毒感染 DC 细胞, 收集成熟 DC 细胞, 30

用于小鼠肿瘤模型治疗。用生理盐水洗3次，并将DC调整为 $(4.0\pm 0.5)\times 10^7$ 个/ml，用于后续实验。将小鼠随机分为5组：野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽-DC 组、GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽-DC 组、及其3种可变性形式 (SEQ ID NO: 2~4 任一序列所示) 多肽-DC 组，每组各6只。制备DC-负载野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽，DC-负载 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其3种可变形式 (SEQ ID NO: 2~4 任一序列所示) 多肽细胞悬液。对小鼠近腹股沟大腿内侧进行皮内注射，每侧注射0.1 ml，每周注射1次。剂量为 $(4.0\pm 0.5)\times 10^6$ 细胞/次，共注射2次。注射结束后观察小鼠生命体征，每2天用游标卡尺测量肿瘤纵横大小。肿瘤体积计算为：肿瘤体积=1/2×长×宽²。同时，记录小鼠体重变化情况和小鼠生存情况。结果如图7所示。

结果显示，相对于野生型多肽对照组，表达 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其可变形式 (SEQ ID NO: 2~4 任一序列所示) 多肽基因包装的慢病毒感染的 DC 疫苗，具有明显的肿瘤抑制效果，并且能够显著延长小鼠的生存期。

实施例 10 多肽特异性 DC-CTL 疫苗的制备及治疗方案

实施例 8 收集的 PBL 经过磁珠分选获得 CD8⁺T 与负载野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽的 DC，负载 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其3种可变形式 (SEQ ID NO: 2~4 任一序列所示) 多肽的 DC 共同孵育致敏，细胞比例为 DC:CD8⁺T=1: 10。培养液中加入 500 IU /ml IL-2 和 50 ng/ml IL-7，37 °C 5% CO₂ 培养箱共同孵育，培养1周后进行细胞计数；第2周再用负载 GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽的 DC 或其3种可变形式多肽 DC、负载野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽的 DC 和 500 IU /ml IL-2 进行第二轮刺激。共刺激三轮，培养期间适当添加培养基。于培养第 0, 7, 14 和 21 天分别计数淋巴细胞数量，计算细胞增殖指数 (proliferation index , PI)。其中，PI=扩增后细胞数/接种细胞数。第3次刺激后第7天收获细胞，即为细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL)。将细胞用生理盐水重悬，重悬体积为 0.2ml，经尾静脉回输，每只肿瘤模型小鼠回输细胞数约为 1×10^8 细胞。注射结束后留心观察小鼠生命体征，每2天用游标卡尺测量肿瘤纵横大小。结果如图8所示。

结果显示，相对于野生型 GLEDLLNPI (SEQ ID NO: 5) 多肽对照组，GLKDLLNPI (SEQ ID NO: 1) 多肽或其可变形式 (SEQ ID NO: 2~4 任一序列所示) 多肽激活的 DC-CTL 疫苗，具有明显的肿瘤抑制效果，并且能够显著延长小鼠的生存期。

工业实用性

本发明的多肽，能够有效地应用于制备试剂盒、药物或疫苗，该药物或疫苗引起的免疫反应的特异性也更高，与其他肿瘤多肽疫苗相比，具有更为安全，副作用小，很少引起严重的免疫反应的优点，又因其结构简单、易于人工合成，可作为疫苗、药物组合物等，引起针对肿瘤的免疫反应。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

- 5 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示意性实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

10

权利要求书

- 1、一种分离的多肽，其特征在于，所述多肽选自：
- (1) 具有 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的多肽；或
- 5 (2) 与 (1) 相比具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 同一性的多肽；或
- (3) 与 (1) 相比具有一个或者多个氨基酸的取代、缺失和/或添加的多肽；
- 任选地，所述至少一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加为如 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 2 位和/或第 9 位氨基酸的取代，
- 10 任选地，所述至少一个或多个氨基酸的取代、缺失和/或添加为如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的第 2 位氨基酸取代为 M，和/或第 9 位氨基酸取代为 L，
- 任选地，所述多肽具有如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。
- 2、检测权利要求 1 所述多肽的试剂在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于诊断肿瘤，
- 任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，
- 15 任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，
- 优选地，所述肿瘤为乳腺癌。
- 3、权利要求 1 所述的多肽在制备药物中的用途，所述药物用于预防或治疗肿瘤，
- 任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，
- 20 任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，
- 优选地，所述肿瘤为乳腺癌。
- 4、一种分离的核酸，其特征在于，所述核酸为：
- 编码权利要求 1 所述多肽的核酸或其互补序列。
- 25 5、一种核酸构建体，其特征在于，包含：
- 编码序列，所述编码序列为权利要求 4 所述的核酸，以及
- 可选的控制序列，所述控制序列与所述编码序列可操作地连接。
- 6、一种表达载体，其特征在于，所述载体包含权利要求 5 所述的核酸构建体。
- 7、一种宿主细胞，其特征在于，所述细胞携带权利要求 5 所述的核酸构建体或权利要求 6 所述的表
- 30 达载体，
- 可选地，所述宿主细胞是通过转染或者转化所述核酸构建体或表达载体获得。
- 8、一种药物组合物，其特征在于，包括：
- 权利要求 1 所述的多肽；以及
- 药学上可接收的佐剂。
- 35 9、权利要求 1 所述的多肽在制备疫苗中的用途，所述疫苗用于预防或治疗肿瘤，
- 任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，

任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，

优选地，所述肿瘤为乳腺癌。

10、一种抗原呈递细胞，其特征在于，所述细胞可呈递权利要求 1 所述的多肽。

5 11、根据权利要求 10 所述的抗原呈递细胞，其特征在于，所述抗原呈递细胞是通过下列至少之一获得的：

将具有抗原呈递能力的细胞与所述多肽接触；或

将权利要求 4 所述的核酸、或者权利要求 5 所述的核酸构建体、或者权利要求 6 所述的表达载体导入所述具有抗原呈递能力的细胞，

10 任选地，所述具有抗原呈递能力的细胞为树突细胞。

12、一种免疫效应细胞，其特征在于，所述免疫效应细胞可识别权利要求 1 所述的多肽或者识别在细胞表面呈递权利要求 1 所述的多肽的抗原呈递细胞。

13、根据权利要求 12 所述的免疫效应细胞，其特征在于，所述免疫效应细胞是通过下列方式获得的：

将权利要求 10 所述的抗原呈递细胞与具有免疫效应能力的细胞接触，

15 任选地，所述具有免疫效应能力的细胞为 T 细胞，优选为 CD8⁺T 细胞。

14、一种疫苗，其特征在于，包含权利要求 4 所述的核酸，或包含权利要求 5 所述的核酸构建体，或包含权利要求 6 所述的表达载体，或包含权利要求 7 所述的宿主细胞，或包含权利要求 10~11 任一项所述的抗原呈递细胞，或包含权利要求 12~13 任一项所述的免疫效应细胞。

15、一种抗体，其特征在于，所述抗体特异性识别权利要求 1 所述的多肽。

20 16、根据权利要求 15 所述的抗体，其特征在于，所述抗体是通过以下方式获得的：

采集使用权利要求 1 所述的多肽进行免疫接种的动物的血清；以及

从所述血清中纯化出目的抗体。

17、一种治疗方法，其特征在于，包括：

25 对患者给予治疗有效量的权利要求 1 所述的多肽、权利要求 4 所述的核酸、权利要求 5 所述的核酸构建体、权利要求 6 所述的表达载体、权利要求 7 所述的宿主细胞、权利要求 8 所述的药物组合物、权利要求 10~11 任一项所述的抗原呈递细胞、权利要求 12~13 任一项所述的免疫效应细胞、权利要求 14 所述的疫苗或者权利要求 15~16 任一项所述的抗体。

18、权利要求 1 所述的多肽用于预防或治疗受试者中与 PIK3CA 基因突变相关的疾病的用途。

19、一种诊断方法，其特征在于，包括：

30 检测患者来源的生物样品是否携带权利要求 1 所述的多肽；

基于所述生物样品是否携带所述多肽，确定所述患者是否患有肿瘤，

任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，

任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，

优选地，所述肿瘤为乳腺癌。

20、一种诊断系统，其特征在于，包括：

多肽检测装置，所述多肽检测装置用于检测患者来源的生物样品是否携带权利要求 1 所述的多肽；

5 诊断结果确定装置，所述诊断结果确定装置与所述多肽检测装置相连，用于基于所述生物样品是否携带所述多肽，确定所述患者是否患有肿瘤，

任选地，所述肿瘤同时表达 HLA-A0201 和所述多肽，

任选地，所述肿瘤为乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌、食道癌、结直肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、前列腺癌、宫颈癌、白血病或脑肿瘤，

优选地，所述肿瘤为乳腺癌。

10

15

20

25

30

35

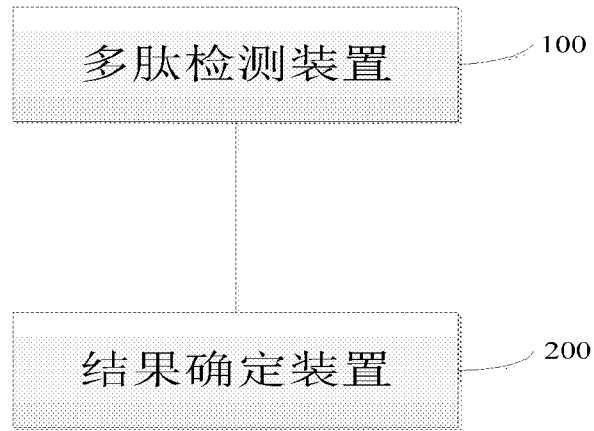


图 1

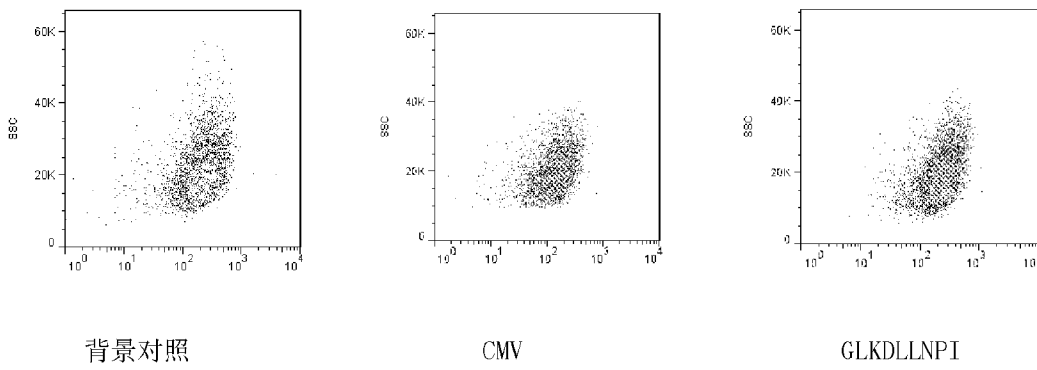
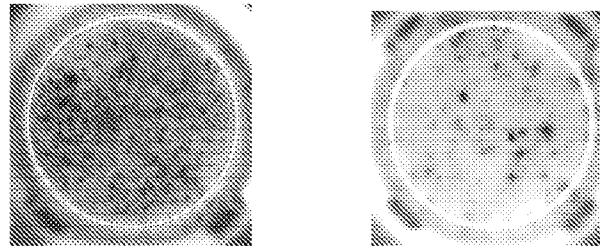


图 2



实验孔 (GLKDLLNPI)

对照孔

图 3

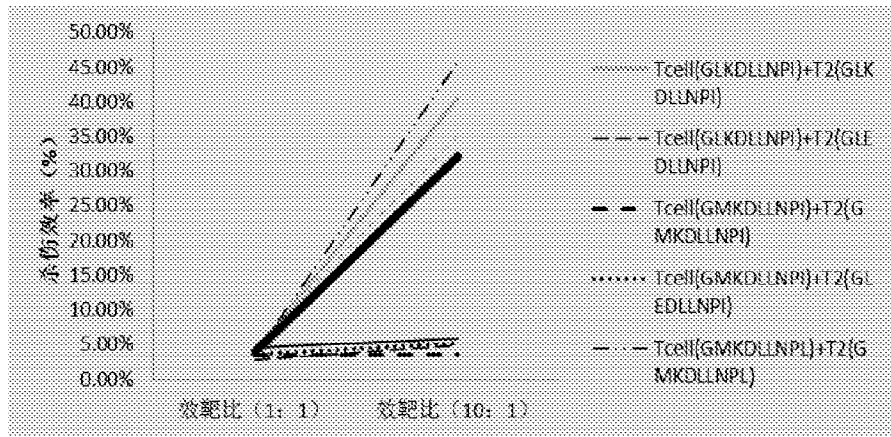


图 4

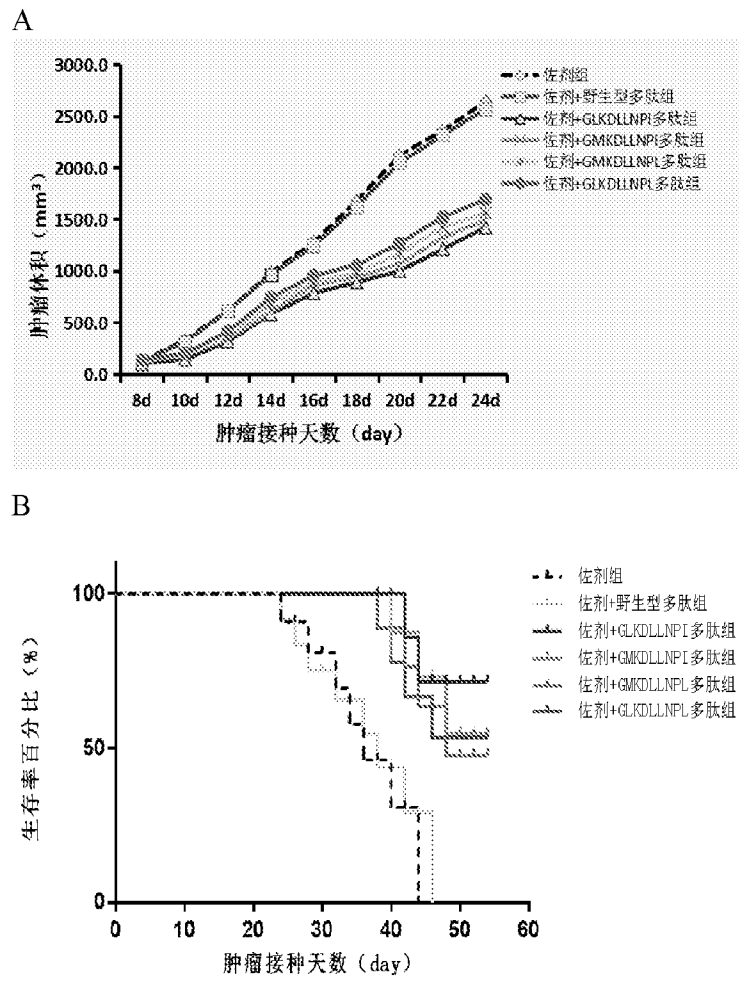


图 5

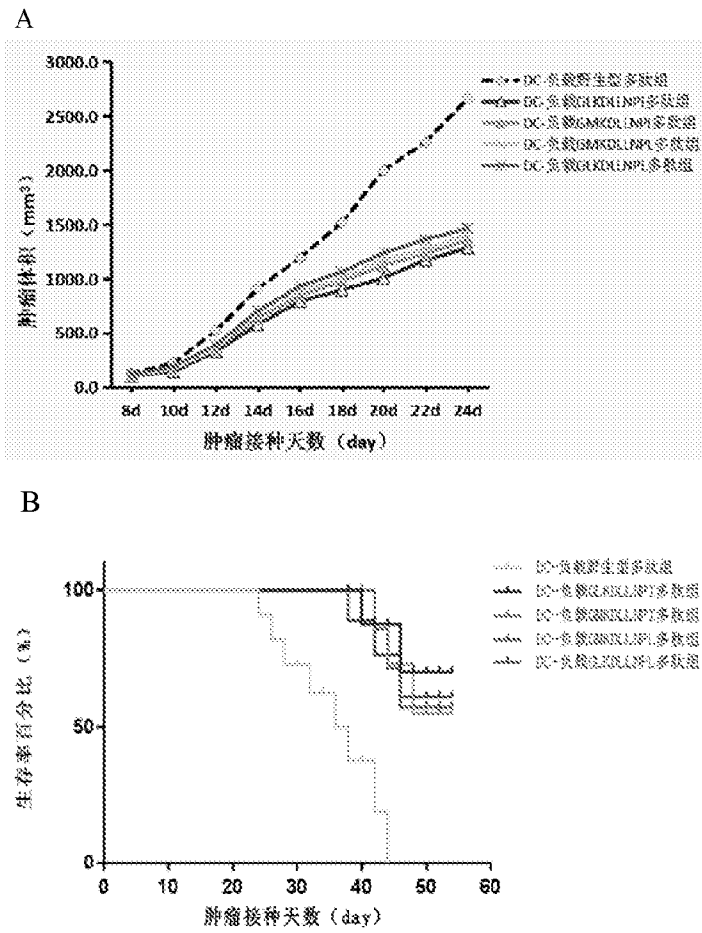


图 6

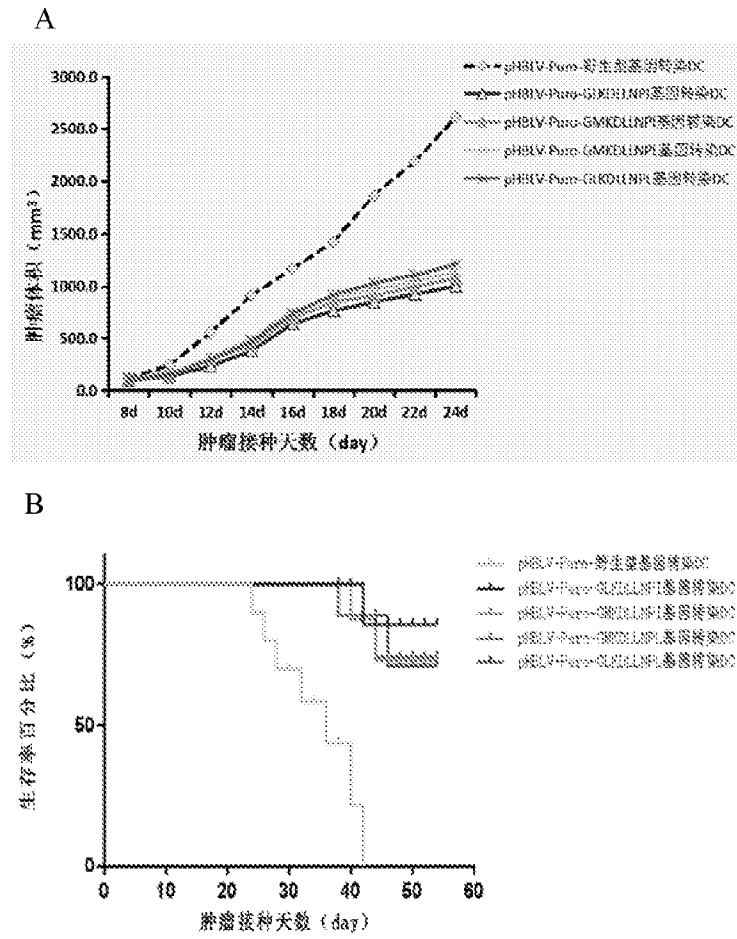


图 7

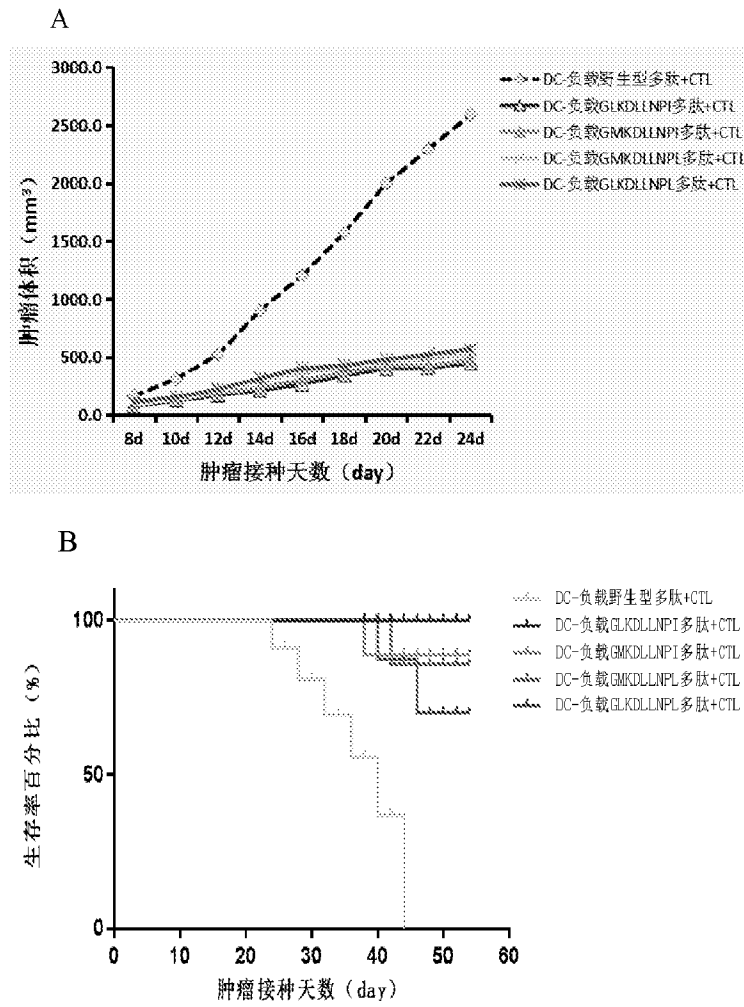


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/107751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06 (2006.01) i; C12N 15/52 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 5/22 (2006.01) i; C07K 16/00 (2006.01) i; A61K 38/08 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED and key words: 丝氨酸苏氨酸激酶, 磷酸转移酶, PIK3CA, PI3KCA, 突变, 谷胺酸, 赖氨酸, HLA-A0201, 肿瘤, 癌, serine-threonline kinase, AKT, phosphotransferase, mutation, Glu, E, Lys, K, tumor, cancer etc.; Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Genbank; EMBL and sequence of search: SEQ ID NOs: 1-11

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102459314 A (ONCOTHERAPY SCIENCE INC.) 16 May 2012 (16.05.2012), see claims 1-21, and description, paragraph [0344]	10, 11, 14, 17
X	WO 2015161274 A1 (BLUEPRINT MEDICINES CORP.) 22 October 2015 (22.10.2015), see entire document, especially claim 37	15-17
A	CN 102459314 A (ONCOTHERAPY SCIENCE INC.) 16 May 2012 (16.05.2012), see claims 1-21, and description, paragraph [0344]	1-9, 12, 13, 15, 16, 18-20
A	WO 2015161274 A1 (BLUEPRINT MEDICINES CORP.) 22 October 2015 (22.10.2015), see entire document, especially claim 37	1-14, 18-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 17 August 2017	Date of mailing of the international search report 25 August 2017
---	--

<p>Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer WANG, Ying Telephone No. (86-10) 62412197</p>
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2016/107751

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105238799 A (KUNMING UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 13 January 2016 (13.01.2016), see entire document, especially claims 1-5, and description, page 1, paragraphs [0004]	1-20
A	US 2010120039 A1 (FUQUA SUZANNE) 13 May 2010 (13.05.2010), see entire document	1-20
A	CN 105431738 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 23 March 2016 (23.03.2016), see entire document	1-20
A	WO 2016187508 A2 (BROAD INSTITUTE INC. et al.) 24 November 2016 (24.11.2016), see entire document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/107751

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/107751

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 17 and 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv)-methods for treatment of human or animal body by surgery or therapy. The reasonably expected subject of the claims: "17. Application of the polypeptide of claim 1, the nucleic acid of claim 4, the nucleic acid construct of claim 5, the expression vector of claim 6, the host cell of claim 7, the pharmaceutical composition of claim 8, the antigen-presenting cell according to either claim 10 or claim 11, the immune effector cell of either claim 12 or claim 13, the vaccine of claim 14, [See extra sheet]
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/107751

Continuation of Box No. II

or the antibody of either claim 15 or claim 16 in the preparation of drugs for treating diseases”; “18. Use of a polypeptide in claim 1 in the preparation of a medicament for preventing or treating a disease associated with a PIK3CA gene mutation among subjects.”

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/107751

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102459314 A	16 May 2012	CN 102459314 B	20 January 2016
		AU 2010248702 A1	17 November 2011
		RU 2011150283 A	20 June 2013
		US 8530430 B2	10 September 2013
		WO 2010131452 A1	18 November 2010
		EP 2430039 A1	21 March 2012
		JP 2012526519 A	01 November 2012
		MX 2011012013 A	23 February 2012
		TW 201102081 A	16 January 2011
		RU 2531348 C2	20 October 2014
		EP 2430039 A4	05 December 2012
		KR 20120029394 A	26 March 2012
		JP 5786178 B2	30 September 2015
		US 2012135020 A1	31 May 2012
WO 2015161274 A1	22 October 2015	CA 2761393 A1	18 November 2010
		SG 175998 A1	29 December 2011
		EP 3132056 A1	22 February 2017
CN 105238799 A	13 January 2016	US 2017044622 A1	16 February 2017
		None	
US 2010120039 A1	13 May 2010	None	
CN 105431738 A	23 March 2016	KR 101501826 B1	13 March 2015
		US 2016040253 A1	11 February 2016
		EP 2982986 A1	10 February 2016
		JP 2016515390 A	30 May 2016
		EP 2982986 A4	07 December 2016
		WO 2014163445 A1	09 October 2014
		KR 20140121524 A	16 October 2014
		None	
WO 2016187508 A2	24 November 2016	WO 2016187508 A3	12 January 2017

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 7/06(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/22(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 38/08(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CPRABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED 和关键词: 丝氨酸苏氨酸激酶, 磷酸转移酶, PIK3CA, PI3KCA, 突变, 谷胺酸, 赖氨酸, HLA-A0201, 肿瘤, 癌, serine-threonline kinase, AKT, phosphotransferase, mutation, Glu, E, Lys, K, tumor, cancer等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs:1-11。</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102459314 A (肿瘤疗法科学股份有限公司) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 见权利要求1-21, 说明书第[0344]段</td> <td>10, 11, 14, 17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015161274 A1 (BLUEPRINT MEDICINES CORP) 2015年 10月 22日 (2015 - 10 - 22) 见全文, 尤其权利要求37</td> <td>15-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102459314 A (肿瘤疗法科学股份有限公司) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 见权利要求1-21, 说明书第[0344]段</td> <td>1-9, 12-13, 15-16, 18-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015161274 A1 (BLUEPRINT MEDICINES CORP) 2015年 10月 22日 (2015 - 10 - 22) 见全文, 尤其权利要求37</td> <td>1-14, 18-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105238799 A (昆明理工大学) 2016年 1月 13日 (2016 - 01 - 13) 见全文尤其权利要求1-5, 说明书第1页第[0004]段</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010120039 A1 (FUQUA SUZANNE) 2010年 5月 13日 (2010 - 05 - 13) 见全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105431738 A (延世大学产学协力团) 2016年 3月 23日 (2016 - 03 - 23) 见全文</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102459314 A (肿瘤疗法科学股份有限公司) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 见权利要求1-21, 说明书第[0344]段	10, 11, 14, 17	X	WO 2015161274 A1 (BLUEPRINT MEDICINES CORP) 2015年 10月 22日 (2015 - 10 - 22) 见全文, 尤其权利要求37	15-17	A	CN 102459314 A (肿瘤疗法科学股份有限公司) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 见权利要求1-21, 说明书第[0344]段	1-9, 12-13, 15-16, 18-20	A	WO 2015161274 A1 (BLUEPRINT MEDICINES CORP) 2015年 10月 22日 (2015 - 10 - 22) 见全文, 尤其权利要求37	1-14, 18-20	A	CN 105238799 A (昆明理工大学) 2016年 1月 13日 (2016 - 01 - 13) 见全文尤其权利要求1-5, 说明书第1页第[0004]段	1-20	A	US 2010120039 A1 (FUQUA SUZANNE) 2010年 5月 13日 (2010 - 05 - 13) 见全文	1-20	A	CN 105431738 A (延世大学产学协力团) 2016年 3月 23日 (2016 - 03 - 23) 见全文	1-20
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
X	CN 102459314 A (肿瘤疗法科学股份有限公司) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 见权利要求1-21, 说明书第[0344]段	10, 11, 14, 17																								
X	WO 2015161274 A1 (BLUEPRINT MEDICINES CORP) 2015年 10月 22日 (2015 - 10 - 22) 见全文, 尤其权利要求37	15-17																								
A	CN 102459314 A (肿瘤疗法科学股份有限公司) 2012年 5月 16日 (2012 - 05 - 16) 见权利要求1-21, 说明书第[0344]段	1-9, 12-13, 15-16, 18-20																								
A	WO 2015161274 A1 (BLUEPRINT MEDICINES CORP) 2015年 10月 22日 (2015 - 10 - 22) 见全文, 尤其权利要求37	1-14, 18-20																								
A	CN 105238799 A (昆明理工大学) 2016年 1月 13日 (2016 - 01 - 13) 见全文尤其权利要求1-5, 说明书第1页第[0004]段	1-20																								
A	US 2010120039 A1 (FUQUA SUZANNE) 2010年 5月 13日 (2010 - 05 - 13) 见全文	1-20																								
A	CN 105431738 A (延世大学产学协力团) 2016年 3月 23日 (2016 - 03 - 23) 见全文	1-20																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																										
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																									
2017年 8月 17日	2017年 8月 25日																									
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																									
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	王颖																									
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62412197																									

C. 相关文件		
类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2016187508 A2 (BROAD INST INC等) 2016年 11月 24日 (2016 - 11 - 24) 见全文	1-20

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- 纸件形式
- 电子形式
- b. (提交时间)
- 含在申请提交时的国际申请中
- 以电子形式与国际申请一起提交
- 为检索之用随后提交本单位
2. 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 17-18
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv) — 处置人体或者动物体的外科方法或治疗方法。上述权利要求合理预期的主题为：“17. 权利要求1所述的多肽、权利要求4所述的核酸、权利要求5所述的核酸构建体、权利要求6所述的表达载体、权利要求7所述的宿主细胞、权利要求8所述的药物组合物、权利要求10-11任一项所述的抗原呈递细胞、权利要求12-13任一项所述的免疫效应细胞、权利要求14所述的疫苗或者权利要求15-16任一项所述的抗体在制备治疗疾病的药物中的应用”；“18. 权利要求1所述的多肽在制备预防或治疗受试者中与PIK3CA基因突变相关的疾病的药物中的用途。”
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/107751

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102459314	A	2012年 5月 16日	CN	102459314	B	2016年 1月 20日
				AU	2010248702	A1	2011年 11月 17日
				RU	2011150283	A	2013年 6月 20日
				US	8530430	B2	2013年 9月 10日
				WO	2010131452	A1	2010年 11月 18日
				EP	2430039	A1	2012年 3月 21日
				JP	2012526519	A	2012年 11月 1日
				MX	2011012013	A	2012年 2月 23日
				TW	201102081	A	2011年 1月 16日
				RU	2531348	C2	2014年 10月 20日
				EP	2430039	A4	2012年 12月 5日
				KR	20120029394	A	2012年 3月 26日
				JP	5786178	B2	2015年 9月 30日
				US	2012135020	A1	2012年 5月 31日
				CA	2761393	A1	2010年 11月 18日
				SG	175998	A1	2011年 12月 29日
WO	2015161274	A1	2015年 10月 22日	EP	3132056	A1	2017年 2月 22日
				US	2017044622	A1	2017年 2月 16日
CN	105238799	A	2016年 1月 13日	无			
US	2010120039	A1	2010年 5月 13日	无			
CN	105431738	A	2016年 3月 23日	KR	101501826	B1	2015年 3月 13日
				US	2016040253	A1	2016年 2月 11日
				EP	2982986	A1	2016年 2月 10日
				JP	2016515390	A	2016年 5月 30日
				EP	2982986	A4	2016年 12月 7日
				WO	2014163445	A1	2014年 10月 9日
				KR	20140121524	A	2014年 10月 16日
WO	2016187508	A2	2016年 11月 24日	WO	2016187508	A3	2017年 1月 12日