



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104958753 B

(45)授权公告日 2018.09.25

(21)申请号 201510236002.5

(22)申请日 2009.08.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104958753 A

(43)申请公布日 2015.10.07

(30)优先权数据

61/089,972 2008.08.19 US

(62)分案原申请数据

200980141320.6 2009.08.14

(73)专利权人 肿瘤疗法科学股份有限公司

地址 日本神奈川县

(72)发明人 角田卓也 大泽龙司 吉村祥子

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

A61K 38/08(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

C12N 5/0786(2010.01)

C12N 5/0784(2010.01)

C12N 5/0783(2010.01)

C07K 14/47(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 2007029778 A1,2007.03.15,

CN 1882698 A,2006.12.20,

WO 2006090810 A2,2006.08.31,

JP 2007246451 A,2007.09.27,

审查员 孙谦

权利要求书1页 说明书20页

序列表7页 附图6页

(54)发明名称

HIG2和URLC表位肽及包含它们的疫苗

(57)摘要

本发明提供药物制剂或组合物,所述药物制剂或组合物含有一种或多种具有氨基酸序列SEQ ID NO:1或2的肽或一种或多种编码此类肽的多核苷酸,配制为用于治疗和/或预防其HLA-A抗原为HLA-0206的受试者体内的癌症。此外,本发明提供利用此类肽、多核苷酸或药物制剂诱导CTL和抗原呈递细胞的方法。

1. 制剂在制造用于选自下组的的目的的药物中的用途：

- (i) 治疗其HLA-A抗原是HLA-A0206的受试者中的表达HIG2的癌症，
- (ii) 预防其HLA-A抗原是HLA-A0206的受试者中的表达HIG2的癌症，
- (iii) 防止其HLA-A抗原是HLA-A0206的受试者中的表达HIG2的癌症的手术后复发，和
- (iv) 其组合，

其中该制剂包含具有细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 诱导能力的肽，其中所述肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成，

或者一种或多种编码这样的肽的多核苷酸，与药理学可接受的载体组合。

2. 如权利要求1所述的用途，其中所述表达HIG2的癌症选自膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、骨肉瘤、胰腺癌、肾癌和软组织肿瘤。

3. 一种诱导具有高的CTL诱导能力的抗原呈递细胞的体外方法，其中所述方法包括选自下组的步骤：

- (a) 使抗原呈递细胞与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽接触；和
- (b) 将编码由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽的多核苷酸导入抗原呈递细胞，其中所述抗原呈递细胞表达HLA-A0206抗原。

4. 一种使用由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽诱导CTL的体外方法，其中所述CTL识别HLA-A0206抗原与所述肽的复合物。

5. 一种分离的抗原呈递细胞，该细胞在其表面上呈递HLA-A0206抗原与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽的复合物。

6. 一种分离的CTL，其识别HLA-A0206抗原与由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽的复合物。

7. 具有CTL诱导能力且由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽；编码这样的肽的多核苷酸；权利要求5的分离的抗原呈递细胞；或权利要求6的分离的CTL用于制造用于在其HLA抗原为HLA-A0206的受试者中诱导抗表达HIG2的癌症免疫应答的制剂的用途。

8. 权利要求7的用途，其中所述表达HIG2的癌症选自膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、骨肉瘤、胰腺癌、肾癌和软组织肿瘤。

9. 下述 (a) 或 (b) 的肽或多核苷酸用于制造用于诱导具有高的CTL诱导能力的抗原呈递细胞的药物组合物的用途：

- (a) 由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽；和
- (b) 编码由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽的多核苷酸，其中所述抗原呈递细胞表达HLA-A0206抗原。

10. 由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的肽用于制造用于诱导CTL的药物组合物的用途，其中所述CTL识别HLA-A0206抗原和所述肽的复合物。

HIG2和URLC表位肽及包含它们的疫苗

[0001] 本申请是申请日为2009年08月14日,申请号为200980141320.6,发明名称为“HIG2和URLC表位肽及包含它们的疫苗”的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 优先权

[0003] 本申请要求2008年8月19日提交的美国临时申请No.61/089,972的权益,通过述及将其全部内容收入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及生物科学领域,更具体的说是癌症治疗领域。具体而言,本发明涉及作为癌症疫苗极其有效的新肽,及用于治疗 and 预防肿瘤的药物。

[0005] 发明背景

[0006] 已经证明,CD8阳性CTL可识别主要组织相容性复合物(MHC) I类分子上出现的肿瘤相关抗原(TAA)衍生的表位肽,然后杀死肿瘤细胞。从TAA的第一个例子——黑素瘤抗原(MAGE)家族被发现起,人们主要通过免疫学手段(NPL 1:Boon T, Int J Cancer 1993May 8,54(2):177-80;NPL 2:Boon T&van der Bruggen P, J Exp Med 1996Mar 1,183(3):725-9)已经发现了许多其它TAA。人们正在将这些TAA中的一些作为免疫治疗的靶标进行临床开发。

[0007] 能够诱导强力且特异性的抗肿瘤免疫应答的新TAA的鉴定保证了针对各种类型癌症的肽疫苗接种策略的进一步开发和临床应用(NPL 3:Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996Oct 16,88(20):1442-55;NPL 4:Butterfield LH et al., Cancer Res 1999Jul 1,59(13):3134-42;NPL 5:Vissers JL et al., Cancer Res 1999Nov 1,59(21):5554-9;NPL 6:van der Burg SH et al., J Immunol 1996May 1,156(9):3308-14;NPL 7:Tanaka F et al., Cancer Res 1997Oct 15,57(20):4465-8;NPL 8:Fujie T et al., Int J Cancer 1999Jan 18,80(2):169-72;NPL 9:Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999May 5,81(3):459-66;NPL 10:Oiso M et al., Int J Cancer 1999May 5,81(3):387-94)。迄今为止,已经有数项使用这些肿瘤相关抗原衍生的肽进行临床试验的报告。不幸的是,迄今为止在这些癌症疫苗试验中只观察到较低的客观应答率(NPL 11:Belli F et al., J Clin Oncol 2002Oct 15,20(20):4169-80;NPL 12:Coulie PG et al., Immunol Rev 2002Oct,188:33-42;NPL 13:Rosenberg SA et al., Nat Med 2004Sep,10(9):909-15)。

[0008] 世界上有数种类型的HLA-A。在已知的HLA基因型中,已知HLA-A0201、HLA-A0206、HLA-A1101、HLA-A2402、HLA-A2601、HLA-A3101及HLA-A3303等基因型具有比其他类型更高的表达频率(NPL 14:Lee K W, et al., Tissue Antigens 2005:65:437-447)。然而,各种基因型具有不同的氨基酸序列以及对表位肽的不同的亲和力(NPL 15:Journal of Immunological Methods, (1995), Vol.185, pp.181-190)。例如,HLA-A0206基因型的 α -1域的氨基酸残基与HLA-A0201基因型不同(即SEQ ID NO:8的第33个氨基酸——酪氨酸残基

被换成了苯丙氨酸)。考虑到这些不同,HLA-A0201限制性的表位肽对于拥有HLA-A0206基因型的患者而言不大可能有用。因此,对不同类型的患者有用的肽仍然是本领域的目标。

[0009] 已通过微阵列分析确认了HIG2(低氧诱导型基因2)和URLC10(又称LY6K;淋巴细胞抗原6复合物,座位K)在数种癌症组织如肾癌和肺癌中上调(PTL 1:W02005/019475,PTL 2:W02004/031413)。因此,HIG2和URLC10是癌症免疫治疗的令人感兴趣的靶标,从它们衍生的表位肽是本领域技术人员追求的对象。

[0010] 引用列表

[0011] 非专利文献

[0012] [NPL 1]:Boon T,Int J Cancer 1993May 8,54(2):177-80

[0013] [NPL 2]:Boon T&van der Bruggen P,J Exp Med 1996Mar 1,183(3):725-9

[0014] [NPL 3]:Harris CC,J Natl Cancer Inst 1996Oct 16,88(20):1442-55

[0015] [NPL 4]:Butterfield LH et al.,Cancer Res 1999Jul 1,59(13):3134-42

[0016] [NPL 5]:Vissers JL et al.,Cancer Res 1999Nov 1,59(21):5554-9

[0017] [NPL 6]:van der Burg SH et al.,J Immunol 1996May 1,156(9):3308-14

[0018] [NPL 7]:Tanaka F et al.,Cancer Res 1997Oct 15,57(20):4465-8

[0019] [NPL 8]:Fujie T et al.,Int J Cancer 1999Jan 18,80(2):169-72

[0020] [NPL 9]:Kikuchi M et al.,Int J Cancer 1999May 5,81(3):459-66

[0021] [NPL 10]:Oiso M et al.,Int J Cancer 1999May 5,81(3):387-94

[0022] [NPL 11]:Bellì F et al.,J Clin Oncol 2002Oct 15,20(20):4169-80

[0023] [NPL 12]:Coulie PG et al.,Immunol Rev 2002Oct,188:33-42

[0024] [NPL 13]:Rosenberg SA et al.,Nat Med 2004Sep,10(9):909-15

[0025] [NPL 14]:Lee K W,et al.,Tissue Antigens 2005:65:437-447

[0026] [NPL 15]:Journal of Immunological Methods,(1995),Vol.185,pp.181-190

[0027] 专利文献

[0028] [PTL 1]:W02005/019475

[0029] [PTL 2]:W02004/031413

[0030] 发明概述

[0031] 本发明部分基于具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的两种肽的新应用的发现。在本发明的语境下,使用自HIG2或URLC10衍生的候选肽刺激从健康供体获得的外周血单个核细胞(PBMC)。建立了可特异性识别经相应候选肽刺激的HLA-A0206阳性靶细胞的CTL,而且鉴定了能诱导针对呈递在靶细胞表面上的HIG2或URLC10的强而特异性的免疫应答的HLA-A0206限制表位肽。

[0032] 因而,本发明的一个目的是提供具有CTL诱导能力、且具有氨基酸序列SEQ ID NO:1或2的肽。此外,本发明涵盖修饰的肽的用途,其中替代、删除、插入和/或添加了一个、两个或更多个氨基酸,只要所得的修饰的肽保留CTL诱导能力。

[0033] 当对其HLA抗原是HLA-A0206的受试者施用,本发明的肽呈递在抗原呈递细胞的表面上,然后诱导靶向相应肽的CTL。因此,本发明的一个目的是提供与HLA-A0206抗原一起呈递任何本发明肽的抗原呈递细胞和外来体,以及用于诱导抗原呈递细胞的方法。

[0034] 施用本发明的HIG2或URLC10多肽或编码该多肽的多核苷酸、以及呈递HIG2或

URLC10多肽的外来体和抗原呈递细胞诱导抗肿瘤免疫应答。因此,本发明的又一个目的是提供含有所述多肽或编码它们的多核苷酸,以及外来体和抗原呈递细胞作为其活性成分的、意图施用于其HLA抗原是HLA-A0206的受试者的药物制剂。本发明的药物制剂可用作疫苗。

[0035] 此外,本发明的另一个目的是提供治疗和/或预防(即防范)癌症(肿瘤),和/或预防其手术后复发的方法,以及用于诱导CTL的方法、用于诱导针对癌症(肿瘤)的免疫应答及抗肿瘤免疫的方法,其中受试者具有HLA-A0206抗原,此类方法包括施用SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的肽、呈递SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的外来体或抗原呈递细胞,或本发明的药物制剂的步骤。另外,本发明的CTL还可用作针对癌症的疫苗。目标癌症的例子包括但不限于肾癌、膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌和软组织肿瘤。

[0036] 本发明包括:

[0037] 1.一种药物制剂,其中该制剂包含一种或多种具有细胞毒性T淋巴细胞(CTL)诱导能力的肽,其中所述肽包含选自下组的氨基酸序列:

[0038] (a) SEQ ID NO:1和2;和

[0039] (b) SEQ ID NO:1和2,其中替代、插入、缺失和/或添加了1个、2个或几个氨基酸,

[0040] 或者一种或多种编码这样的肽的多核苷酸,与药理学可接受的载体组合,该制剂配制为用于选自下组的目的:

[0041] (i) 治疗其HLA-A抗原是HLA-A0206的受试者中的癌症,

[0042] (ii) 预防其HLA-A抗原是HLA-A0206的受试者中的癌症,

[0043] (iii) 防止其HLA-A抗原是HLA-A0206的受试者中的癌症的手术后复发,和(iv) 上述的组合。

[0044] 2.如项1所述的药物制剂,其中所述癌症选自膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、骨肉瘤、胰腺癌、肾癌和软组织肿瘤。

[0045] 3.项1的药物制剂,其配制成疫苗。

[0046] 4.一种诱导具有高的CTL诱导能力的抗原呈递细胞的方法,其中所述方法包括选自下组的步骤:

[0047] (a) 使抗原呈递细胞与包含选自SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列的肽、或其中有至少一个氨基酸添加、插入、缺失或替换为其他氨基酸的这样的肽接触,和

[0048] (b) 将编码包含选自SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列的肽、或其中有至少一个氨基酸添加、插入、缺失或替换为其他氨基酸的这样的肽的多核苷酸导入抗原呈递细胞,

[0049] 其中所述抗原呈递细胞表达HLA-A0206抗原。

[0050] 5.一种使用包含选自SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列的肽、或其中有至少一个氨基酸添加、插入、缺失或替换为其他氨基酸的这样的肽诱导CTL的方法,其中所述CTL识别HLA-A0206抗原与所述肽的复合物。

[0051] 6.一种分离的抗原呈递细胞,该细胞在其表面上呈递HLA-A0206抗原与包含选自SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列的肽、或其中有至少一个氨基酸添加、插入、缺失或替换为其他氨基酸的这样的肽的复合物。

[0052] 7.一种分离的CTL,其识别HLA-A0206抗原与包含选自SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列的肽、或其中有至少一个氨基酸添加、插入、缺失或替换为其他氨基酸的这样的肽的复合

物。

[0053] 8. 一种用于诱导具有高的CTL诱导能力的抗原呈递细胞的作用剂,其中所述作用剂包含:

[0054] (a) 一种或多种具有CTL诱导能力的肽,其中所述肽包含选自下组的氨基酸序列:

[0055] (i) SEQ ID NO:1和2;和

[0056] (ii) SEQ ID NO:1和2,其中替代、插入、缺失和/或添加了1个、2个或几个氨基酸,

[0057] (b) 一种或多种编码这样的肽的多核苷酸。

[0058] 9. 一种在其HLA抗原为HLA0206的受试者中诱导抗癌症免疫应答的方法,其中所述方法包括对受试者施用包含下述物质的作用剂的步骤:具有CTL诱导能力且具有选自SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列的肽;其中有至少一个氨基酸添加、插入、缺失或替换为其他氨基酸的这样的肽;编码这样的肽的多核苷酸;项6的分离的抗原呈递细胞;或项7的分离的CTL。

[0059] 10. 项9的方法,其中所述癌症选自膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、骨肉瘤、胰腺癌、肾癌和软组织肿瘤。

[0060] 11. 一种用于在其HLA抗原为HLA0206的受试者中诱导抗癌症免疫应答的作用剂,其中所述作用剂包含与药理学可接受载体组合的:

[0061] (a) 一种或多种具有CTL诱导能力的肽,其中所述肽包含选自下组的氨基酸序列:

[0062] (i) SEQ ID NO:1和2,和

[0063] (ii) SEQ ID NO:1和2,其中替代、插入、缺失和/或添加了1个、2个或几个氨基酸;

[0064] (b) 一种或多种编码这样的肽的多核苷酸;

[0065] (c) 一种或多种项6的分离的抗原呈递细胞;

[0066] (d) 一种或多种项7的分离的CTL;或

[0067] (e) 上述的组合。

[0068] 要理解,上面的发明概述和下面的详细描述都是例示性的实施方案,而非限制本发明或本发明的其它备选实施方案。

[0069] 附图简述

[0070] 在考虑本发明的附图简述和后面的详细描述及优选实施方案后,本发明的各方面和应用对于熟练技术人员会变得显而易见。

[0071] 图1包括一系列照片,描绘用HIG2衍生肽诱导的CTL的IFN- γ ELISPOT测定的结果。用HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 刺激的1、2、5、7、8、10、13和14号孔中的CTL均显示与对照相比强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示利用靶细胞用适宜的肽冲激过,而“-”指示靶细胞没有用任何肽冲激。

[0072] 图2描绘了一系列线图,呈现用IFN- γ ELISA测定法得到的用HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 刺激的CTL系的建立结果。表明用HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 刺激而建立的CTL系显示了与对照相比强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示靶细胞用适宜的肽冲激过,而“-”指示靶细胞没有用任何肽冲激过。

[0073] 图3描绘了一幅线图,呈现用IFN- γ ELISA测定法得到的用HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 刺激的CTL克隆的建立结果。结果表明用HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 刺激而建立的CTL系显示了与对照相比强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示靶细胞用适宜的肽冲激过,而“-”指示靶细胞没有用任何肽冲激过。

[0074] 图4描绘了一幅线图,显示针对表达HIG2与HLA-A*0206的靶细胞的特异性CTL活性。制备用HLA-A*0206单独转染并用衍生自HIG2的非适宜肽冲激的COS7细胞,或者用HIG2单独转染的COS7细胞作为对照。用HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 建立的CTL克隆针对用HIG2与HLA-A*0206二者转染的COS7细胞显示了高的特异性CTL活性(黑色菱形标记)。另一方面,没有检测到针对表达HLA-A0206的靶细胞(空心三角形标记)或表达HIG2的靶细胞(空心圆)的显著的特异性CTL活性。

[0075] 图5包括一系列照片,描绘用URLC10衍生肽诱导的CTL的IFN- γ ELISPOT测定的结果。用URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) 刺激的7号孔中的CTL分别显示与对照相比强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示靶细胞用适宜的肽冲激过,而“-”指示靶细胞没有用任何肽冲激。

[0076] 图6描绘了一系列线图,呈现用IFN- γ ELISA测定法得到的用URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) 刺激的CTL系的建立结果。结果表明用URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) 刺激而建立的CTL系显示了与对照相比强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示靶细胞用适宜的肽冲激过,而“-”指示靶细胞没有用任何肽冲激过。

[0077] 图7描绘了一幅线图,呈现用IFN- γ ELISA测定法得到的用URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) 刺激的CTL克隆的建立结果。结果表明URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) 刺激而建立的CTL系显示了与对照相比强的IFN- γ 生成。在图中,“+”指示靶细胞用适宜的肽冲激过,而“-”指示靶细胞没有用任何肽冲激过。

[0078] 图8描绘了一幅线图,显示针对表达URLC10与HLA-A*0206的靶细胞的特异性CTL活性。制备用全长URLC10基因单独转染或者用HLA-A*0206基因单独转染的COS7细胞作为对照。用URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) 建立的CTL克隆针对用HIG2与HLA-A*0206二者转染的COS7细胞显示了高的特异性CTL活性(黑色菱形标记)。另一方面,没有检测到针对表达HLA-A0206的靶细胞(空心三角形标记)或表达URLC10的靶细胞(空心圆)的显著的特异性CTL活性,在图中,“R”表示应答细胞,“S”表示刺激细胞。

[0079] 实施方案的描述

[0080] 现在描述优选的方法、装置、和材料,不过在实施或检验本发明的实施方案时可使用与本文中描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料。然而,在描述本发明材料和方法之前,要理解本发明不限于特定大小、性状、尺度、材料、方法、方案等,因为它们可依照例行实验和优化而变化。还要理解,所述描述中使用的术语只是出于描述特定样式或实施方案的目的,而非意图限制本发明的范围,本发明的范围只会由所附权利要求来限制。

[0081] 通过述及明确将本说明书中提到的每一篇出版物、专利或专利申请的公开文本完整收入本文。然而,本文中无一处可解释为承认本发明没有资格凭借发明在先而早于此类公开文本。

[0082] 如果有冲突,以本说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实例仅为举例说明而不构成限制。

[0083] I. 定义

[0084] 如本文中使用的,词语“一个/种”、“该”、和“所述”意味着“至少一个/种”,除非另有明确说明。

[0085] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术

语适用于其中一个或多个氨基酸残基是经过修饰的残基或非天然存在型残基(诸如相应的天然存在型氨基酸的人工化学模拟物)的氨基酸聚合物,以及天然存在型氨基酸聚合物。

[0086] 如本文中使用的,术语“氨基酸”指天然存在型和合成型氨基酸,以及与天然存在型氨基酸发挥相似功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在型氨基酸指由遗传密码编码的氨基酸,以及在细胞中在翻译后被修饰的氨基酸(例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、和O-磷酸丝氨酸)。短语“氨基酸类似物”指与天然存在型氨基酸具有相同的基础化学结构(α 碳与氢、羧基、氨基、和R基团结合)但具有经过修饰的R基团或经过修饰的主链的化合物(例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷)。短语“氨基酸模拟物”指与具有与一般氨基酸不同的结构但发挥与一般氨基酸相似的功能的化学化合物。

[0087] 氨基酸在本文中可以通过它们公知的三字母符号或IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。

[0088] 术语“基因”、“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”在本文中除非另有明确说明可互换使用,而且与氨基酸类似地通过它们普遍接受的单字母代码来指称。

[0089] 除非另有定义,术语“癌症”指过表达HIG2或URLC10基因的癌症,过表达HIG2基因的癌症的实例包括但不限于肾癌和软组织肿瘤;过表达URLC10基因的癌症包括但不限于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、骨肉瘤、胰腺癌和软组织肿瘤。

[0090] 除非另有定义,术语“细胞毒性T淋巴细胞”、“细胞毒性T细胞”和“CTL”在本文中可互换使用,而且除非另有明确说明,指能够识别非自身细胞(例如肿瘤细胞、病毒感染的细胞)并诱导此类细胞死亡的T淋巴细胞亚群。

[0091] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员的普遍理解相同的含义。

[0092] II. 肽

[0093] 为了证明HIG2-A0206-9-4(SEQ ID NO:1)和URLC10-A0206-10-211(SEQ ID NO:2)的肽发挥被细胞毒性T淋巴细胞(CTL)所识别的抗原的功能,对这些肽进行了分析以确定它们是否为HLA-A0206限制性的抗原表位。通过加载了这些肽的树突细胞(DC)来体外刺激T细胞后,使用HIG2-A0206-9-4(SEQ ID NO:1)和URLC10-A0206-10-211(SEQ ID NO:2)的肽分别成功地建立了CTL。

[0094] 这些建立的CTL显示针对经相应肽冲激的、表达HLA-A0206抗原的靶细胞的强且特异性的CTL活性。本文中的这些结果证明这些肽可能是受HLA-A0206限制的HIG2或URLC10表位肽。由于这些肽也可能是受HLA-A0201限制的HIG2或URLC10表位肽(WO2008/102557, PCT/JP2008/000290, 通过提述并入本文),因此,包含这些肽的药物制剂或组合物可能适用于HLA-A0201阳性受试者和HLA-A0206阳性受试者。

[0095] 由于HIG2或URLC10基因在大多数癌症组织中过表达,例如膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、肾癌和软组织肿瘤,它是良好的免疫治疗靶标。具体地说,过表达HIG2的癌症的例子包括肾癌和软组织肿瘤。同时,过表达URLC10的癌症的例子包括膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌和软组织肿瘤。因此,本发明提供与HIG2或URLC10的HLA-A0206限制性表位肽对应的九肽(由九个氨基酸残基组成的肽)和十肽(由十个氨基酸残基组成的肽)。本发明的九肽和十肽的特别优选例子

包括那些具有选自SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列的肽。更具体地说,HLA-A0206限制的HIG2表位肽的例子包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽,而HLA-A0206限制的URLC10表位肽的例子包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽。

[0096] 一般而言,蛋白质中一个、两个、或更多个氨基酸的修饰不会影响蛋白质的功能,而且在有些情况下甚至会增强原始蛋白质的期望功能。事实上,已知有经过修饰的肽(即由与原始参照序列相比其中修饰(即替代、删除、添加或插入)一个、两个或数个氨基酸残基的氨基酸序列构成的肽)保留原始肽的生物学活性(Mark et al.,Proc Natl Acad Sci USA 1984,81:5662-6;Zoller and Smith,Nucleic Acids Res 1982,10:6487-500;Dalbadie-McFarland et al.,Proc Natl Acad Sci USA 1982,79:6409-13)。因此,在一个实施方案中,本发明的肽可既具有CTL诱导能力,又具有选自SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列中插入、删除、添加和/或替代一个、两个或甚至更多个氨基酸而得到的氨基酸序列。

[0097] 本领域技术人员认可,改变氨基酸序列中的单个氨基酸或少数百分比氨基酸的个别添加或替换往往会导致原始氨基酸侧链的特性得以保留。因此,它们常规上称作“保守替代”或“保守修饰”,其中对蛋白质的改变导致具有与原始蛋白质类似的性质和功能的修饰蛋白质。提供功能上相似的氨基酸的保守替代是本领域公知的。期望保留的氨基酸侧链特征的例子包括例如疏水性氨基酸(A,I,L,M,F,P,W,Y,V)、亲水性氨基酸(R,D,N,C,E,Q,G,H,K,S,T)、和具有下面的共同官能团或特征的侧链:脂肪族侧链(G,A,V,L,I,P);含羟基侧链(S,T,Y);含硫原子侧链(C,M);含羧酸和酰胺侧链(D,N,E,Q);含碱侧链(R,K,H);和含芳香族侧链(H,F,Y,W)。另外,下面的八组各自含有本领域公认互为保守替代的氨基酸:

[0098] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0099] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0100] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0101] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0102] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0103] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0104] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0105] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(参见例如Creighton,Proteins 1984)。

[0106] 此类保守修饰肽也被视为本发明的肽。然而,本发明的肽不限于此,可包括非保守修饰,只要该肽保留原始肽的CTL诱导能力。另外,经过修饰的肽不应排除HIG2或URLC10的多态变体、种间同源物、和等位基因中的可诱导CTL的肽。

[0107] 当在免疫疗法的语境中使用,本发明的肽应呈递在细胞或外来体的表面上,优选作为与HLA-A0206抗原的复合物。因此,优选选择不仅诱导CTL而且拥有对HLA-A0206抗原的高结合亲和力的肽。为此,可通过替代、插入、删除和/或添加氨基酸残基来对肽进行修饰,产生具有改良的结合亲和力的修饰肽。除了天然被展示的肽之外,由于已经知道通过结合HLA抗原而被展示的肽的序列规律(J Immunol 1994,152:3913;Immunogenetics 1995,41:178;J Immunol 1994,155:4307),可将基于此类规律的修饰引入本发明的免疫原性肽。不仅可以在肽的末端氨基酸处引入替代,而且可以在潜在TCR识别位置处引入替代。数项研究证明了肽中的氨基酸替代可等同于或好于原来,例如CAP1、p53⁽²⁶⁴⁻²⁷²⁾、Her-2/neu⁽³⁶⁹⁻³⁷⁷⁾或gp100⁽²⁰⁹⁻²¹⁷⁾(Zaremba et al.Cancer Res.57,4570-4577,1997,T.K.Hoffmann et al.J

Immunol. (2002) Feb 1;168 (3):1338-47., S.O.Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52:199-206及S.O.Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

[0108] 本发明还考虑,还可向本发明的肽的N和/或C端添加一个至两个氨基酸。本发明也包括此类具有高HLA抗原结合亲和力且保留CTL诱导能力的经过修饰的肽。

[0109] 然而,当肽序列与具有不同功能的内源或外源蛋白质的氨基酸序列的一部分相同时,可能诱导副作用,诸如自身免疫性病症和/或针对特定物质的变应性症状。因此,优选的是,首先利用可得的数据库实施同源性搜索,以避免肽的序列与另一种蛋白质的氨基酸序列匹配的情况。当根据同源性搜索清楚了即使与目标肽相比差1个或2个氨基酸的肽亦不存在时,可以修饰目标肽以提高其与HLA抗原的结合亲和力,和/或提高其CTL诱导能力,而没有此类副作用的任何危险。

[0110] 虽然预期如上所述经修饰的肽是高度有效的,但还是对候选肽检查了CTL诱导能力的存在以选择有效性更高的肽。在本文中,短语“CTL诱导能力”指肽在抗原呈递细胞上呈递时诱导细胞毒性淋巴细胞(CTL)的能力。另外,“CTL诱导能力”包括肽诱导CTL活化、CTL增殖、促进CTL溶解靶细胞、和提高CTL IFN- γ 生成的能力。

[0111] CTL诱导能力的确认如下来实现,用肽进行刺激来诱导携带人MHC抗原的抗原呈递细胞(例如B-淋巴细胞、巨噬细胞、和树突细胞(DC)),或者更具体地说,衍生自人外周血单核白细胞的DC,并且在用肽诱导后,与CD8阳性细胞混合,然后测量由CTL针对靶细胞生成和释放的IFN- γ 。作为反应系统,可使用已经制成的表达人HLA A0206抗原的转基因动物(例如BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61 (8):764-79)。例如,可以用⁵¹Cr等放射性标记靶细胞,并且可以自HLA抗原为HLA-A0206的靶细胞释放的放射性计算细胞毒性活性。或者,CTL诱导能力可以如下评估:测量在携带固定化肽的抗原呈递细胞(APC)存在下由CTL生成和释放的IFN- γ ,并使用抗IFN- γ 单克隆抗体显现培养基上的抑制区。

[0112] 除上文所述修饰之外,还可将本发明的肽连接至其它物质,只要所得的连接肽保留原始肽的必需的CTL诱导能力。合适物质的例子包括但不限于:肽、脂质、糖和糖链、乙酰基、天然的和合成的聚合物、等。肽可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化等,前提是该修饰不破坏原始肽的生物学活性。可实施这些种类的修饰以赋予额外的功能(例如靶向功能和投递功能)或稳定多肽。

[0113] 例如,为了提高多肽的体内稳定性,本领域已知引入D-氨基酸、氨基酸模拟物或非天然氨基酸;此构思也可适用于本发明多肽。可以以多种方式测定多肽的稳定性。例如,可使用肽酶和各种生物学介质(诸如人血浆和血清)来测试稳定性(参见例如Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11:291-302)。

[0114] 此外,本发明的肽可以藉由接头(linker)或间隔物(spacers)与其他的肽相连。所述其他的肽的例子包括但不限于从其他TAA衍生的能诱导CTL的肽。或者,两个或更多个本发明的肽可以藉由接头或间隔物连接起来。这些由接头或间隔物连接起来的肽可以是彼此相同或不同的。接头或间隔物没有特殊限制,但优选的是肽,更优选的是具有一个或多个能够被酶(如肽酶、蛋白酶和蛋白酶体等)切割的切割位点的肽。接头或间隔物的例子包括但不限于:AAY(P.M.Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK

(R.P.M.Sutmuller et al., J Immunol.2000,165:7308-7315) 或一个到数个赖氨酸残基 (S.Ota et al., Can Res.62,1471-1476, K.S.Kawamura et al., J Immunol.2002,168:5709-5715)。本发明的肽涵盖那些肽藉由间隔物或接头与其他的肽相连而成的肽。

[0115] 本发明的肽可以作为与MHC分子结合而成的复合物存在于携带人MHC抗原的细胞(例如抗原呈递细胞)或外来体的表面上。然后诱导CTL。所述的细胞和外来体可以依照本领域公知的技术来制备,例如,所述细胞可以通过与本发明的肽接触来制备,而外来体可以通过从与本发明的肽接触过的细胞收集含有外来体的级分来制备(参见例如日本专利申请特表平11-510507和W099/03499)。本发明的肽涵盖那些作为与MHC分子结合而成的复合体存在于细胞或外来体表面的肽。

[0116] 本文中,本发明的肽也可以称为“HIG2或URLC10肽”或“HIG2或URLC10多肽”。

[0117] III. 肽的制备

[0118] 本发明的肽可使用公知技术来制备。例如,肽可以通过合成、使用重组DNA技术或化学合成来制备。可个别地合成本发明的肽,或作为由两个或更多个肽构成的较长多肽来合成本发明的肽。然后可以分离,即纯化所述肽,使其基本上不含其它天然存在的宿主细胞蛋白质及其片段或任何其它化学物质。

[0119] 可以根据选定的氨基酸序列,借助化学合成来获得本发明的肽。可适用于合成的常规肽合成法的例子包括但不限于:

[0120] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

[0121] (ii) The Proteins, Vol.2, Academic Press, New York, 1976;

[0122] (iii) Peptide Synthesis (日文), Maruzen Co., 1975;

[0123] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (日文), Maruzen Co., 1985;

[0124] (v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (in Japanese), Vol.14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

[0125] (vi) W099/67288; 和

[0126] (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol.2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118。

[0127] 或者,可借助任何已知的遗传工程肽生产方法来获得本发明的肽(例如Morrison J., J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101:347-62)。例如,首先,制备包含处于可表达形式(例如处于相当于启动子序列的调节序列下游)的编码目标肽的多核苷酸的合适载体,并转移入合适宿主细胞。然后培养宿主细胞以生成感兴趣的肽。也可以采用体外翻译系统在体外生产肽。

[0128] IV. 多核苷酸

[0129] 本发明还提供编码上述本发明肽的多核苷酸。这些包括由天然存在型HIG2或URLC10基因 (SEQ ID NO:3或5, GenBank登录号NM_013332或NM_017527) 衍生的多核苷酸以及具有它们的经过保守修饰的核苷酸序列的多核苷酸。在本文中,短语“经过保守修饰的核苷酸序列”指编码相同或本质上相同的氨基酸序列的序列。由于遗传密码的简并性,对于任何给定蛋白质都有极其多种功能上相同的核酸来编码它。例如,密码子GCA、GCC、GCG、和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子规定为丙氨酸的任何位置处,该密码子可改变成任

何相应所述密码子,而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,是保守修饰变异的一种。本文中编码肽的每一种核酸序列也涵盖该核酸的每一种可能的沉默变异。本领域普通技术人员会认识到,可以修饰核酸中的每一个密码子(AUG和TGG除外,AUG在正常情况下是甲硫氨酸的唯一密码子,而TGG在正常情况下是色氨酸的唯一密码子)以产生功能上相同的分子。因而,每一种所公开的序列隐含涵盖了编码肽的核酸的每一种沉默变异。

[0130] 本发明的多核苷酸可以由DNA、RNA、及其衍生物构成。DNA由碱基诸如A、T、C、和G合适地构成,而T在RNA中被U替换。

[0131] 本发明的多核苷酸可编码多个本发明肽,其中它们之间有或无居间氨基酸序列存在。例如,居间氨基酸序列可提供多核苷酸的或所翻译的肽的切割位点(例如酶识别序列)。另外,多核苷酸除编码本发明肽的编码序列以外还可包括任何额外的序列。例如,多核苷酸可以是包括表达肽所需要的调节序列的重组多核苷酸,或者可以是具有标志基因等等的表达载体(质粒)。一般而言,此类重组多核苷酸可通过常规重组技术操作多核苷酸来制备,例如通过使用聚合酶和内切核酸酶。

[0132] 重组和化学合成技术都可用来生成本发明的多核苷酸。例如,可以通过插入在转染入感受态细胞后能表达的适宜载体来生成多核苷酸。或者,可借助PCR技术或通过在合适宿主中的表达来扩增多核苷酸(参见例如Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1989)。或者,可使用固相技术来合成多核苷酸,如Beaucage SL&Iyer RP,Tetrahedron 1992,48:2223-311;Matthes et al.,EMBO J 1984,3:801-5中记载的。

[0133] 含有本发明的多核苷酸的载体以及携带所述载体的宿主细胞也包含在本发明之内。

[0134] V. 外来体(exosomes)

[0135] 本发明进一步提供了称作外来体的细胞内囊泡,这些外来体在它们的表面上呈递本发明肽与HLA抗原之间形成的复合体。外来体可以通过,例如在日本专利申请公报平11-510507和W099/03499中详细描述的方法来制备,并可以用从治疗和/或预防针对的患者获得的APC制备。本发明的外来体可以作为疫苗以与本发明的肽相似的方式进行接种。

[0136] 在本发明的语境下,所述复合物中包含的HLA抗原的类型应为HLA-A0206,并且接种所述外来体的受试者必须具有HLA-A0206抗原。通常,在临床上,预先对需要治疗的患者的HLA抗原类型进行检查,这样就能够合适地选择预期将受益于用本发明的外来体治疗的患者。

[0137] VI. 抗原呈递细胞(APC)

[0138] 本发明还提供在其表面上呈递在HLA-A0206抗原与本发明肽之间形成的复合物的分离的APC。通过接触本发明的肽或导入处于可表达形式的编码本发明肽的核苷酸而获得的APC可衍生自要进行治疗和/或预防的患者,而且可作为疫苗以它们自身或与其它药物(包括本发明的肽、外来体、或细胞毒性T细胞)组合来施用。

[0139] APC不限于特定种类的细胞,包括树突细胞(DC)、Langerhans细胞、巨噬细胞、B细胞、和活化的T细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞识别。由于DC是APC中具有最强CTL诱导作用的代表性APC,本发明的APC优选是DC。

[0140] 例如,可通过自外周血单核细胞诱导DC,然后在体外、离体或在体内用本发明的肽

接触(刺激)它们来获得APC。当对HLA-A抗原是HLA-A0206的受试者施用本发明的肽时,在受试者的身体中诱导出呈递本发明肽的APC。短语“诱导APC”包括用本发明的肽或编码本发明肽的核苷酸接触(刺激)细胞,以在细胞的表面上呈递在HLA-A0206抗原与本发明肽之间形成的复合物。或者,在将本发明的肽给予APC以容许APC呈递该肽后,可以将这些APC作为疫苗施用给受试者。例如,离体施用可包括下述步骤:

[0141] a:自HLA-A抗原是HLA-A0206的第一受试者收集APC;

[0142] b:用肽接触步骤a的APC;并

[0143] c:对HLA-A抗原是HLA-A0206的第二受试者施用加载了所述肽的APC。

[0144] 第一受试者和第二受试者可以是同一个体,或者可以是不同个体。或者,依照本发明,提供本发明的肽在制备用于诱导抗原呈递细胞的药物组合物中的用途。另外,本发明提供一种制备用于诱导抗原呈递细胞的药物组合物的方法或工艺,其中所述方法包括将本发明的肽与药学可接受的载体混合或配制的步骤。另外,本发明还提供用于诱导抗原呈递细胞的本发明肽。通过步骤b获得的APC可作为疫苗施用于受试者。

[0145] 依照本发明的一个方面,APC具有高水平的CTL诱导能力。在术语“高水平的CTL诱导能力”中,高水平是相对于未与肽接触或与不能诱导CTL的肽接触的APC的该水平而言的。这样的具有高水平CTL诱导能力的APC可通过下述方法来制备,该方法包括在体外将含有编码本发明肽的多核苷酸的基因转移至APC的步骤。所导入的基因可以是DNA或RNA的形式。用于进行导入的方法的例子包括但不限于本领域中常规实施的各种方法,诸如可使用脂质体转染、电穿孔、和磷酸钙法。更具体的说,可以如Cancer Res 1996,56:5672-7;J Immunol 1998,161:5607-13;J Exp Med 1996,184:465-72;国际公开文本No.2000-509281的已公开日文翻译中所述来实施。通过将基因转移入APC,基因在细胞中经历转录、翻译、等等,然后得到的蛋白质被MHC I类或II类加工,并经由呈递途径呈递给本发明的肽。

[0146] VII.细胞毒性T细胞(CTL)

[0147] 被诱导的针对任何本发明肽的细胞毒性T细胞可在体内加强靶向肿瘤相关内皮的免疫应答,并且因此可以以与肽本身相似的方式用作疫苗。因此,本发明还提供由任何本发明肽特异性诱导或活化的、分离的细胞毒性T细胞。

[0148] 此类细胞毒性T细胞可通过下述步骤来获得:(1)对受试者施用本发明的肽然后从该受试者收集细胞毒性T细胞,或(2)在体外用本发明的肽接触(刺激)受试者衍生的APC和CD8阳性细胞、或外周血单核白细胞。

[0149] 通过刺激从呈递本发明肽的APC诱导的细胞毒性T细胞可衍生自要进行治疗和/或预防且具有HLA-A0206抗原的患者,而且可以单独施用,或者与其它药物(包括本发明的肽或外来体)组合施用以调节效果。所得到的细胞毒性T细胞特异性针对呈递本发明的肽或例如与用于诱导的肽相同的肽的靶细胞起作用。换言之,细胞毒性T细胞可以通过T细胞受体来识别(即结合)靶细胞表面上的HLA-A0206与本发明肽之间形成的复合物,然后攻击该靶细胞以诱导该靶细胞死亡。靶细胞可以是内源表达HIG2或URLC10的细胞,或被HIG2或URLC10基因转染的细胞;而且因肽的刺激而在细胞表面上呈递本发明肽的细胞也可充当活化CTL攻击的靶标。

[0150] VIII.T细胞受体(TCR)

[0151] 本发明还提供包含编码能够形成T细胞受体(TCR)的亚单位的多肽的核酸序列的

多核苷酸,及使用该组合物的方法。所述TCR亚单位具有形成赋予T细胞针对呈递HIG2肽或URLC10肽与HLA-A0206抗原的肿瘤细胞的特异性的TCR的能力。通过使用本领域已知的方法,可鉴定出用本发明的肽诱导的CTL中表达的TCR的 α 和 β 链的核酸序列(WO2007/032255及Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。衍生的TCR在体内和在体外能以高亲和力结合展示在靶细胞上的HIG2或URLC10肽,且任选可介导对呈递HIG2肽或URLC10肽与HLA-A0206抗原的靶细胞的有效杀伤。

[0152] 可将编码TCR亚单位的核酸序列掺入合适载体,例如逆转录病毒载体。这些载体是本领域公知的。有用的是,可将核酸或含有它们的载体转移入T细胞,例如来自HLA-A抗原为HLA-A0206患者的T细胞。有利的是,本发明提供一种即配即用型(off-the-shelf)组合物,其容许快速修饰患者自己的T细胞(或其他哺乳动物的T细胞)以快速且容易地生成具有卓越的癌细胞杀伤特性的修饰型T细胞。

[0153] 还有,本发明提供通过用具有这样的核酸序列的多核苷酸转导而制备的CTL,该核酸编码在HLA-A0206背景下结合HIG2或URLC10肽与HLA-A0206抗原之间形成的复合物的TCR亚单位多肽。经过转导的CTL能够在体内归巢(homing)至癌细胞,而且能在体外通过公知培养方法来扩增(例如Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。本发明的T细胞可用于形成在需要治疗或防护的患者中治疗或预防癌症方面有用的免疫原性组合物(WO2006/031221)。

[0154] IX. 药物制剂或药物组合物

[0155] 术语“预防”和“防范”在本文中可互换使用,指降低来自疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,而二级和三级预防和防范水平涵盖旨在预防和防范疾病进展和症状出现以及降低已建立的疾病的负面影响的的活动,这通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来实现。或者,预防和防范可包括广泛的预防疗法,它们旨在减轻特定病症的严重性,例如降低肿瘤的增殖和转移。

[0156] 治疗和/或预防癌症或肿瘤,和/或预防其手术后复发包括任何下述步骤,诸如手术清除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和遏制癌症发生、肿瘤消退、及降低或抑制转移。癌症的有效治疗和/或预防降低患癌个体的死亡率并改善其预后,降低血液中肿瘤标志物的水平,及减轻伴随癌症的可检测症状。例如,症状的减轻或改善构成有效治疗和/或预防包括10%、20%、30%或更多降低,或病情稳定。

[0157] 由于HIG2或URLC10表达在数种癌症中与正常组织相比上调,本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸可用于治疗和/或预防癌症,和/或预防它们的手术后复发。因此,本发明提供用于治疗和/或预防癌症,和/或预防它们的手术后复发的药物制剂或组合物,其包括一种或多种本发明肽或编码所述肽的多核苷酸作为活性组分。或者,可以在任何上述外来体或细胞诸如APC的表面上表达本发明的肽,以用作药物制剂或组合物。另外,上述靶向任何本发明的肽的细胞毒性T细胞也可用作本发明药物制剂或组合物的活性组分。在本发明的语境中,短语“靶向某个肽”是指通过T细胞受体识别(即结合)靶细胞上的HLA-A0206抗原与肽之间形成的复合物,然后攻击该靶细胞以诱导该靶细胞的死亡。

[0158] 在另一个实施方案中,本发明还提供选自下组的活性组分在制备用于治疗癌症的药物组合物或药物制剂中的用途:

- [0159] (a) 本发明的肽，
- [0160] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸，
- [0161] (c) 本发明的APC，和
- [0162] (d) 本发明的细胞毒性T细胞。
- [0163] 或者，本发明进一步提供用于治疗癌症的选自下组的活性组分：
- [0164] (a) 本发明的肽，
- [0165] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸，
- [0166] (c) 本发明的APC，和
- [0167] (d) 本发明的细胞毒性T细胞。
- [0168] 或者，本发明进一步提供一种制备用于治疗癌症的药物组合物或制剂的方法或工艺，其中该方法或工艺包括配制药学或生理学可接受载体与选自下组的活性组分作为活性组分的步骤：
- [0169] (a) 本发明的肽，
- [0170] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸，
- [0171] (c) 本发明的APC，和
- [0172] (d) 本发明的细胞毒性T细胞。
- [0173] 在另一个实施方案中，本发明还提供一种制备用于治疗癌症的药物组合物或制剂的方法或工艺，其中该方法或工艺包括混合活性组分与药学或生理学可接受载体的步骤，其中所述活性组分选自下组：
- [0174] (a) 本发明的肽，
- [0175] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸，
- [0176] (c) 本发明的APC，和
- [0177] (d) 本发明的细胞毒性T细胞。
- [0178] 或者，本发明的药物组合物或制剂可用于防范癌症和/或预防其手术后复发。
- [0179] 本发明的药物制剂或组合物可用作疫苗。在本发明的语境中，短语“疫苗”（也称作“免疫原性组合物”）指具有在接种入动物后诱导抗肿瘤免疫力的功能的物质。
- [0180] 本发明的药物制剂或组合物可用于在受试者或患者（包括人和任何其它哺乳动物，包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猫、犬、绵羊、山羊、猪、牛、马、猴、狒狒、和黑猩猩，特别是商业上重要的动物或驯养的动物）中治疗和/或预防癌症，和/或预防其手术后复发。
- [0181] 依照本发明，已经发现具有选自SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列的多肽是能诱导针对表达HIG2或URLC10以及HLA-A0206的靶细胞的强且特异性免疫应答的HLA-A0206限制性表位肽。因此，包括任何这些具有选自SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列的多肽的本发明药物制剂或组合物特别适合于对其HLA抗原为HLA-A0206的受试者施用。这同样适用于含有编码任何这些多肽的多核苷酸的药物制剂或组合物。
- [0182] 要用本发明的药物制剂或组合物治疗的癌症不受限制，包括其中涉及HIG2或URLC10的所有种类的癌症，包括例如膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、肾癌和软组织肿瘤。特别是，靶向HIG2的药物制剂或组合物优选地可适用于肾癌和软组织肿瘤，而靶向URLC10的药物制剂或组合物优选地可适用于膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌和软组织肿瘤。

[0183] 除上述活性组分之外,本发明的药物制剂或组合物还可含有其它具有诱导针对癌性细胞的CTL的能力的肽、编码所述其它肽的其它多核苷酸、呈递所述其它肽的其它细胞等等。在本文中,其它具有诱导针对癌性细胞的CTL的能力的肽以癌症特异性抗原(例如已鉴定的TAA)为例,但是不限于此。

[0184] 如果需要,本发明的药物制剂或组合物可任选包括其它治疗性物质作为活性组分,只要该物质不抑制活性组分例如任何本发明肽的抗肿瘤效果。例如,配制剂可包括抗炎剂或组合物、镇痛剂、化疗剂、诸如此类。除了在药物自身中包括其它治疗性物质之外,本发明的药物还可以与一种或多种其它药理学作用剂或组合物顺序或同时施用。药物和药理学作用剂或组合物的量取决于例如所使用的药理学作用剂或组合物的类型、所治疗的疾病、及施用的时序安排和路径。

[0185] 应当理解,除在本文中具体提及的组分之外,本发明的药物制剂或组合物可包括与所讨论的配制剂类型相关的本领域常规的其它制剂或组合物。

[0186] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药物制剂或组合物可包括在制品和试剂盒中,该制品和试剂盒含有可用于治疗要治疗的疾病(例如癌症)的病理状况的材料。制品可包括任何本发明药物制剂或组合物的容器及标签。合适的容器包括瓶、管形瓶、和试管。容器可以用多种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器上的标签应指明该药剂或组合物用于治疗或预防一种或多种疾病状况。标签还可指明关于施用的指导等等。

[0187] 除上文描述的容器之外,包括本发明药物制剂或组合物的试剂盒还可任选进一步包括第二容器,其中装有药学可接受稀释剂。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头、注射器、和载有使用说明书的包装插页。

[0188] 如果期望的话,药物组合物可存在于药包或分配器装置中,该药包或分配器装置可装有一个或多个含有活性组分的单位剂型。例如,药包可包括金属或塑料箔,诸如泡罩包。药包或分配器装置可附有施用说明书。

[0189] (1) 含有肽作为活性组分的药物制剂或组合物

[0190] 本发明的肽可以作为药物制剂或组合物直接施用,或者如果必要,通过常规配制方法来配制。在后一种情况中,除本发明的肽之外,还可以视情况包括通常用于药物的载体、赋形剂、等等,没有特别限制。此类载体的例子有灭菌水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养基、等等。另外,药物制剂或组合物可在必要时含有稳定剂、悬浮液、防腐剂、表面活性剂等等。本发明的药物制剂或组合物可用于抗癌目的。

[0191] 本发明的肽可制备成由两种或更多种本发明肽构成的组合以在体内诱导CTL。肽组合可采取鸡尾酒的形式,或者可使用标准技术彼此缀合。例如,可以将各个肽化学连接或表达成为单一融合多肽序列。组合中的各个肽可以是相同的或不同的。通过施用本发明的肽,肽被HLA-A0206抗原以高密度展示在APC上,然后诱导出与所展示的肽与HLA-A0206抗原之间形成的复合物特异性起反应的CTL。或者,可以给其HLA抗原为HLA-A0206的受试者施用这样的APC:它们在其细胞表面上展示任何本发明的肽,可以通过用本发明的肽刺激来源于受试者的APC(如DC)而获得;结果在受试者中诱导CTL,从而可提高针对癌细胞,诸如膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、骨肉瘤、胰腺癌、肾癌和软组织肿瘤的攻击性。

[0192] 包括本发明的肽作为活性组分、用于治疗 and/或预防癌症的药物制剂或组合物还

可包括已知可有效建立细胞免疫的佐剂。或者,它们可以与其它活性组分一起施用,而且它们可以通过配制成颗粒来施用。佐剂指在与具有免疫学活性的蛋白质一起(或顺序)施用时增强针对该蛋白质的免疫应答的化合物。本文中涵盖的佐剂包括文献中记载的那些(Clin Microbiol Rev 1994,7:277-89)。合适佐剂的例子包括但不限于磷酸铝、氢氧化铝、明矾、霍乱毒素、沙门氏菌毒素、诸如此类,但不限于此。

[0193] 另外,可方便地使用脂质体制制剂、其中肽结合至几微米直径的珠子的颗粒配制剂、和其中脂质结合至肽的配制剂。

[0194] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂或组合物可进一步包括引发(prime)CTL的成分。已经确认脂质是能够在体内引发针对病毒抗原的CTL的作用剂或组合物。例如,可将棕榈酸残基连接至赖氨酸残基的 ϵ -和 α -氨基,然后连接至本发明的肽。然后脂化肽可以在胶束或颗粒中直接施用,掺入脂质体,或在佐剂中乳化。作为脂质引发CTL应答的另一个例子,大肠杆菌(*E. coli*)脂蛋白,诸如三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酰丝氨酰-丝氨酸(P3CSS),当与适宜的肽共价连接时,可用来引发CTL(参见例如Deres et al., Nature 1989, 342:561-4)。

[0195] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等,及系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。本发明肽的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整,通常是0.001mg至1000mg,例如0.001mg至1000mg,例如0.1mg至10mg,而且可以每少数天施用一次至每少数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0196] (2) 含有多核苷酸作为活性组分的药物制剂或组合物

[0197] 本发明的药物制剂或组合物也可含有处于可表达形式的编码本文中公开的肽的核酸。在本文中,短语“处于可表达形式的”意味着多核苷酸在导入细胞时会在体内表达成诱导抗肿瘤免疫力的多肽。在一个例示性的实施方案中,感兴趣的多核苷酸的核酸序列包括多核苷酸表达所必需的调节元件。多核苷酸可具有为实现稳定插入靶细胞的基因组所需的配置(关于同源重组盒载体的描述参见例如Thomas KR&Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12)。参见例如Wolff et al., Science 1990, 247:1465-8; 美国专利No. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 及WO 98/04720。基于DNA的投递技术的例子包括“裸DNA”、易化(布比卡因、聚合物、肽介导的)投递、阳离子脂质复合物、和颗粒介导的(“基因枪”)或压力介导的投递(参见例如美国专利No. 5,922,687)。

[0198] 本发明的肽还可用于病毒或细菌载体来表达。表达载体的例子包括减毒病毒宿主,诸如牛痘或禽痘。这种办法涉及使用例如痘苗病毒作为载体来表达编码肽的核苷酸序列。在导入宿主后,重组牛痘病毒表达表达免疫原性肽,并由此引发免疫应答。可用于免疫接种方案的牛痘载体和方法记载于例如美国专利No. 4,722,848。另一种载体的例子包括卡介苗(BCG, Bacille Calmette Guerin)。BCG载体记载于Stover et al., Nature 1991, 351:456-60。有很多种可用于治疗性施用或免疫接种的其它载体是显而易见的,例如腺病毒和腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)载体、去毒炭疽毒素载体、诸如此类。参见例如Shata et al., Mol Med Today 2000, 6:66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68:793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14:571-85。

[0199] 将多核苷酸投递入受试者可以是直接的,其中受试者直接暴露于携带多核苷酸的

载体,或者是间接的,其中首先在体外用感兴趣多核苷酸转化细胞,然后将细胞移植入受试者。这两种办法分别称作体内和离体基因疗法。

[0200] 关于基因疗法的方法的一般综述参见Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12:488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3:87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33:573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260:926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62:191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11 (5): 155-215。在eds. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; 及 Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990中描述的重组DNA技术领域的公知方法也可用于本发明。

[0201] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等,而且可使用系统施用或局部施用到靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当调整合适载体或经编码本发明肽的多核苷酸转化的细胞中的多核苷酸的剂量,而且通常是0.001mg至1000mg,例如0.001mg至1000mg,例如0.1mg至10mg,而且可以每数天施用一次至每数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0202] X. 使用肽、外来体、APC和CTL的方法

[0203] 本发明的肽和编码此类肽的多核苷酸可用于诱导APC和CTL。本发明的外来体和APC也可用于诱导CTL。肽、多核苷酸、外来体和APC可以与任何其它化合物组合使用,只要该化合物不抑制它们的CTL诱导能力。因此,任何前文所述的本发明药物制剂或组合物均可用于诱导CTL,而且除它们之外,那些包括肽和多核苷酸的也可用于诱导APC,如下文讨论的。

[0204] (1) 诱导抗原呈递细胞 (APC) 的方法

[0205] 本发明提供了使用本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸来诱导APC的方法。诱导APC可以如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分所述来实施。本发明还提供了用于诱导具有高水平CTL诱导能力的APC的方法,上文“VI. 抗原呈递细胞”项目下也提到了其诱导。

[0206] 优选的是,诱导APC的方法包括选自下组的至少一个步骤:

[0207] a: 使其HLA抗原为HLA-A0206的APC与本发明的肽接触,和

[0208] b: 将本发明的肽以可表达的形式导入其HLA抗原为HLA-A0206的APC。

[0209] 这样的APC诱导方法优选地以体外或离体的方式实施。当以体外或离体方式实施所述方法时,要诱导的APC可以从待治疗的受试者或者其HLA抗原为HLA-A0206的其他个体获得。

[0210] (2) 诱导CTL的方法

[0211] 另外,本发明提供了使用本发明的肽、编码所述肽的多核苷酸、或呈递所述肽的外来体或APC来诱导CTL的方法。

[0212] 本发明还提供了使用编码能形成T细胞受体 (TCR) 亚单位的多肽的多核苷酸来诱导CTL的方法,所述TCR亚单位识别(即结合)细胞表面上的本发明的肽与HLA-A0206抗原之间形成的复合物。优选地,所述诱导CTL的方法包括选自下组的至少一个步骤:

[0213] (a) 使CD8-阳性T细胞与抗原呈递细胞和/或外来体接触,所述抗原呈递细胞和外来体在其表面上呈递HLA-A0206抗原与本发明的肽之间形成的复合物;和

[0214] (b) 向CD8-阳性T细胞中导入编码能够形成TCR亚单位的多肽的多核苷酸,所述TCR

亚单位可识别HLA-A0206抗原与本发明的肽之间形成的复合物。

[0215] 当本发明的肽被施用给受试者后,受试者的身体中诱导出CTL,而且靶向癌细胞的免疫应答的强度增强。或者,肽和编码肽的多核苷酸可用于离体治疗方法,其中在体外用本发明的肽接触(刺激)受试者衍生的APC和CD8阳性细胞或外周血单核白细胞,并在诱导CTL后,将活化的CTL细胞返还给受试者。例如,该方法可包括下述步骤:

[0216] a:自其HLA抗原为HLA-A0206的受试者收集APC;

[0217] b:用本发明的肽接触步骤a的APC;

[0218] c:将步骤b的APC与其HLA抗原为HLA-A0206的CD⁸⁺T细胞混合,并共培养以诱导CTL;并

[0219] d:自步骤c的共培养物收集CD⁸⁺T细胞。

[0220] 或者,依照本发明,提供了本发明的肽在制备用于诱导CTL的药物组合物中的用途。另外,本发明提供了一种制备用于诱导CTL的药物制剂或药物组合物的方法或工艺,其中所述方法包括将本发明的肽与药学可接受的载体混合或配制的步骤。另外,本发明还提供了用于诱导CTL的本发明的肽。

[0221] 通过步骤d获得的具有细胞毒性活性的CD⁸⁺T细胞可作为疫苗施用于受试者。上文步骤c中要与CD⁸⁺T细胞混合的APC也可通过将编码本发明肽的基因转移入APC来制备,如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分中详述的;但是不限于此,任何将本发明的肽有效呈递给T细胞的APC或外来体均可用于本发明的方法。

[0222] 提供下面的实施例来例示本发明及帮助本领域普通技术人员来制备和使用本发明。实施例并非意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0223] 材料和方法

[0224] 细胞系

[0225] PSCCA0922 (HLA-A0206) 购自Pharma SNP Consortium;PSC。人B-淋巴母细胞样细胞系和COS7均购自ATCC。

[0226] 自HIG2或URLC10衍生的候选肽

[0227] 自HIG2或URLC10衍生的9聚物和10聚物肽由Sigma (札幌,日本) 或Biosynthesis Inc. (Lewisville, TX) 依照标准固相合成法合成,并通过反相高效液相层析 (HPLC) 进行了纯化。分别通过分析性HPLC和质谱术分析测定了肽的纯度(>90%) 和身份。将肽以20mg/ml在二甲亚砜(DMSO)中溶解,并保存于-80℃。

[0228] 体外CTL诱导

[0229] 使用单核细胞的衍生树突细胞(DC)作为抗原呈递细胞(APC)来诱导针对人白细胞抗原(HLA)上呈递的肽的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答。如别处(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63 (14): 4112-8)所述在体外生成DC。具体而言,将用Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液自正常志愿者(HLA-A0206阳性)分离的外周血单个核细胞(PBMC)通过粘附至塑料组织培养皿(Becton Dickinson)来加以分离,以将它们作为单核细胞级分富集。在含有2%热灭活自体血清(AS)的AIM-V培养基(Invitrogen)中在1000U/ml粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) (R&D System) 和1000U/ml白介素(IL)-4 (R&D System) 存

在下培养富集了单核细胞的群体。培养7天后,将经细胞因子诱导的DC在AIM-V培养基中在3微克/ml β 2-微球蛋白存在下用20微克/ml每一种合成肽于37℃冲激3小时。所生成的细胞表观上在它们的细胞表面上表达DC相关分子,诸如CD80、CD83、CD86和HLA II类(数据未显示)。然后将这些经肽冲激的DC用丝裂霉素C(MMC)灭活(30微克/ml,30min),并以1:20比例与用CD8阳性分离试剂盒(Dyna1)通过正选择获得的自体CD8+T细胞混合。在48孔板(Corning)中设立这些培养物;每个孔在0.5ml AIM-V/2%AS培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的DC、 3×10^5 个CD8+T细胞和10ng/ml IL-7(R&D System)。3天后,给这些培养物补充IL-2(CHIRON)至终浓度20IU/ml。在第7天和第14天,用自体肽冲激过的DC进一步刺激T细胞。每次通过与上文所述相同的方式来制备DC。在第21天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的PSCCA0922细胞的CTL(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

[0230] CTL扩增规程

[0231] 使用与Riddell等人(Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16):1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2):216-23)记载的方法相似的方法在培养中扩增CTL。将总共 5×10^4 个CTL在25ml AIM-V/5%AS培养基中悬浮,其中有在40ng/ml抗CD3单克隆抗体(Pharminogen)存在下经MMC灭活的两种人B-淋巴母细胞样细胞系。启动培养后一天,向培养物添加120IU/ml IL-2。在第5天、第8天和第11天给培养物补加新鲜的含有30IU/ml IL-2的AIM-V/5%AS培养基(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umamo Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

[0232] CTL克隆的建立

[0233] 在96圆底微量滴定板(Nalge Nunc International)中进行稀释以获得0.3、1和3个CTL/孔。在总体积为150微升/孔的含5%AS的AIM-V中,将CTL与 7×10^4 个细胞/孔的两种人B-淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml的抗CD3抗体,和125U/ml的IL-2一起培养。10天后向培养基中加入50微升/孔的IL-2以使得IL-2的终浓度成为125U/ml。在第14天测试CTL的CTL活性,并使用上述的相同方法扩增CTL克隆。

[0234] 特异性CTL活性

[0235] 为了检查特异性CTL活性,实施了干扰素(IFN)- γ 酶联免疫斑点(ELISPOT)测定法和IFN- γ 酶联免疫吸附测定法(ELISA)。具体而言,制备经肽冲激的PSCCA0922(1×10^4 /孔)作为刺激细胞。使用48孔中培养的细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施IFN- γ ELISPOT测定法和IFN- γ ELISA测定法。

[0236] 强迫表达靶基因和/或HLA-A0206基因的细胞的建立

[0237] 通过PCR扩增了编码靶基因(HIG2; SEQ ID NO:3和URLC10; SEQ ID NO:5)或HLA-A0206(SEQ ID NO:7)的可读框的cDNA。将PCR扩增产物克隆到pcDNA3.1myc-His载体(Invitrogen)中。利用脂质转染试剂(lipofectamine)(Invitrogen)依照制造商推荐的程序将含有靶基因和/或HLA-A0206的质粒转染到COS7中。简单地说,用10微克质粒以140V、

1000 μ F冲激 2.5×10^6 个COS7细胞。转染起2天后,用细胞解离溶液处理经转染的细胞,然后用作CTL活性测定的靶细胞。

[0238] 结果

[0239] HIG2和URLC10在癌症中表达增强

[0240] 利用cDNA微阵列获得的不同癌症中的全局基因表达谱数据揭示,HIG2 (GenBank Accession No.NM_013332;SEQ ID No.3) 和URLC10 (GenBank Accession No.NM_017527;SEQ ID No:5) 表达上升。HIG表达在20例肾癌中的19例、9例软组织肿瘤中的7例中与相应的正常组织相比有效升高。URLC10表达在29例膀胱癌中的29例、16例宫颈癌中的15例、7例胆管细胞癌中的7例、19食道癌中的7例、3例胃癌中的3例、27例NSCLC中的24例、19例骨肉瘤中的15例、5例胰腺癌中的4例、和43例软组织肿瘤中的33例中与相应的正常组织相比有效升高。

[0241] 使用来自HIG2的HLA-A0206限制型肽刺激T细胞和经HIG2衍生肽刺激的CTL系的建立

[0242] 依照上文“材料和方法”一节中描述的方案产生了针对HIG2衍生的肽的CTL。用IFN- γ ELISPOT测定法测定了肽特异性CTL活性(图1)。此处的结果显示HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 相比于对照孔显示出强有力的IFN- γ 生成。此外,对用SEQ ID NO:1刺激的1、2、5、7、8、10、13和14号阳性孔中的细胞进行了扩增以建立CTL系。用IFN- γ ELISA测定法测定了那些CTL系的CTL活性(图2)。这里的结果显示,相比于未经肽冲激的靶细胞,所有的CTL系针对经相应肽冲激的靶细胞均显示出强有力的IFN- γ 生成。因此,HIG2-A0206-9-4可诱导针对表达HLA-A0206的靶细胞的强有力的CTL系。

[0243] 用HIG2衍生的肽刺激的CTL克隆的建立

[0244] 依照上文“材料和方法”部分中所述的规程自这些CTL系进行有限稀释。图3显示了从HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) CTL系建立CTL克隆的情况。相比于针对未经肽冲激的靶物的活性,这些CTL克隆针对经肽冲激的靶物均显示出强有力而特异性的CTL活性。

[0245] 针对表达HIG2和HLA-A0206的靶细胞的特异性CTL活性

[0246] 对针对HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 产生的建成CTL克隆,检查它们识别表达HIG2和HLA-A0206的靶细胞的能力。使用利用HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 生成的CTL克隆作为效应细胞,测试了针对用全长HIG2基因和HLA-A0206分子二者转染的COS7 (其充当内源表达HIG2和HLA-A0206的靶细胞的特异性模型) 的特异性CTL活性。制备用全长HIG2但未用HLA-A0206转染、且用其他肽 (HIG2-9-8:YLLGVVLT) 冲激过的COS7、以及用HLA-A0206但未用全长HIG2转染的COS7作为对照。显示最高的针对COS7的特异性CTL活性的CTL克隆,是那些用HIG2和HLA-A0206二者转染的CTL克隆(图4)。

[0247] 此处的结果清楚地表明HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 被天然地加工并与HLA-A0206一起呈递在靶细胞表面上,并识别CTL。因此,HIG2-A0206-9-4可充当癌症疫苗,靶向其HLA抗原为HLA-A0206的受试者中表达HIG的癌细胞。

[0248] 使用来自URLC10的HLA-A0206限制肽诱导CTL和经URLC10衍生肽刺激的CTL系的建立

[0249] 依照上文“材料和方法”中描述的方案产生了针对自URLC10衍生的肽的CTL。用IFN- γ ELISPOT测定法测定了肽特异性CTL活性(图5)。此处的结果显示URLC10-A0206-10-

211 (SEQ ID NO:2) 与对照孔相比显示出强有力的IFN- γ 生成。此外,对用SEQ ID NO:2刺激的7号阳性孔中的细胞进行了扩增并建立了CTL系。用IFN- γ ELISA测定法测定了该CTL系的CTL活性(图6)。这里的结果显示,相比于未经肽冲激的靶细胞,该CTL系针对经相应肽冲激的靶细胞显示出强有力的IFN- γ 生成。因此,URLC10-A0206-10-211可诱导强有力的CTL系。

[0250] 用HIG2衍生的肽刺激的CTL克隆的建立

[0251] 依照上文“材料和方法”部分中所述的规程自这些CTL系进行有限稀释。图7显示了从URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) CTL系建立CTL克隆的情况。相比于针对未经肽冲激的靶物的活性,该CTL克隆针对经肽冲激的靶物显示出强有力而特异性的CTL活性。

[0252] 针对表达URLC10和HLA-A0206的靶细胞的特异性CTL活性

[0253] 针对URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) 产生的建成CTL克隆,检查它们识别表达URLC10和HLA-A0206的靶细胞的能力。使用利用URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2) 生成的CTL克隆作为效应细胞,测试了针对用全长URLC10基因和HLA-A0206分子二者转染的COS7 (其充当内源表达URLC10和HLA-A0206的靶细胞的特异性模型) 的特异性CTL活性。制备用全长URLC10但未用HLA-A0206转染的COS7、以及用HLA-A0206但未用全长URLC10转染的COS7作为对照。显示最高的针对COS7的特异性CTL活性的CTL克隆,是那些用URLC10和HLA-A0206二者转染的CTL克隆(图8)。

[0254] 此处的结果清楚地表明URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:16) 被天然地加工并与HLA-A0206一起呈递在靶细胞表面上,并识别CTL。因此,URLC10-A0206-10-211可充当癌症疫苗,靶向其HLA抗原为HLA-A0206的受试者中表达URLC10的癌细胞。

[0255] 总之,鉴定了新的HLA-A0206表位肽HIG2-A0206-9-4 (SEQ ID NO:1) 和URLC10-A0206-10-211 (SEQ ID NO:2),并证明它们适用于在其HLA抗原为HLA-A0206的受试者中的癌症免疫治疗。

[0256] 工业实用性

[0257] 本发明描述了新的TAA,特别是那些HIG2或URLC10衍生的,它们诱导强有力且特异性的抗肿瘤免疫应答,而且可以应用于极其多种癌症类型。此类TAA保证了进一步开发针对与HIG2或URLC10有关的疾病的肽疫苗,所述疾病例如癌症,如膀胱癌、宫颈癌、胆管细胞癌、食道癌、胃癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、骨肉瘤、胰腺癌、肾癌和软组织肿瘤。

[0258] 虽然本文中参照具体实施方案详细地描述了本发明,但是要理解,上面的描述本质上是例示性的和解释性的,而且意图例示本发明及其优选实施方案。经由常规实验,本领域技术人员会容易地认识到,可以对本发明进行各种变化和修饰,而不偏离本发明的精神和范围,本发明的边界和范围由所附权利要求来限定。

序列表

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

<120> HIG2 和 URLC 表位肽及包含它们的疫苗

<130> ONC-A0815P

<150> US 61/089,972

<151> 2008-08-19

<160> 8

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成多肽

<400> 1

Val Leu Asn Leu Tyr Leu Leu Gly Val
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0001]

<223> 人工合成多肽

<400> 2

Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 1372

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (206).. (397)

<400> 3

gcacgagggc gcttttgtct ccggtagatt ttgiggcggg aagcttctgc gctggtgctt 60

aglaaccgac ttctctccgg aelctgcac gacctgcctc tacagecggc gatecacctc 120

cggtctgtcc cccggagggt ccagaggcct ttcagaagga gaaggcagct ctgtttctct 180

gcagaggagt aggttccttt cagcc atg aag cat gtg ttg aac ctc tac ctg 232
Met Lys His Val Leu Asn Leu Tyr Leu
1 5

tta ggt gtg gta ctg acc cta ctc tcc atc ttc gtt aga gtg atg gag 280
Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu Ser Ile Phe Val Arg Val Met Glu
10 15 20 25

tcc cta gaa ggc tta cta gag agc cca tgg cct ggg acc tcc tgg acc 328
Ser Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ser Pro Ser Pro Gly Thr Ser Trp Thr
30 35 40

	acc aga agc caa cta gcc aac aca gag ccc acc aag ggc ctt cca gac	376
	Thr Arg Ser Gln Leu Ala Asn Thr Glu Pro Thr Lys Gly Leu Pro Asp	
	45 50 55	
	cat cca tcc aga agc atg tga taagacctcc ttcatactg gccatatttt	427
	His Pro Ser Arg Ser Met	
	60	
	ggaacaciga cctagacatg tccagatggg agtccattc ctacgagaca agctgagcac	487
	cgttgttaacc agagaactat tactaggect tgaagaacct gtetaactgg atgctcattg	547
	ccctgggcaag gccctgtttag gccggttgcg gtggctcatg cctgtaatec tagcactttg	607
	ggaggctgag gtgggtggat cacctgaggt caggagtctg agaccagcct cgccaacatg	667
	gcgaaacccc atctctacta aaaatacaaa agttagctgg gtgtggtggc agaggcctgt	727
	aatcccagtt ccttgggagg ctgaggcggg agaattgcct gaacccgggg acggaggttg	787
	cagtgaaccg agatgcact gctgtaccca gccctgggcca cagtgaaga ctccatctca	847
	aaaaaaaaa gaaaagaaaa agccigitta atgcacaggt gtgagtggtat tgcctatggc	907
	tatgagatag gttgatctcg cctttacccc ggggtctggt gtatgctgtg ctttcctcag	967
	cagtatggct ctgacatctc ttagatgtcc caacttcagc tgttgggaga tggatgatt	1027
	ttaaacctta cttcctaaac atctgtctgg ggttccttta gtcttgaatg tcttatgtc	1087
	aattatttgg tgttgagcct ctcttcaca agagctctc catgtttgga tagcagttga	1147
	agaggtttgt tgggtgggct gtggggagtg aggatggagt gttcagtgcc cattctcat	1207
	tttacatttt aaagtcgtc ctccaacata gtgtgtattg gtctgaaggg gggtgtggga	1267
[0002]	tgccaaagcc tgcctcaagt atggacattg tggccacat gtgcttaaa tgatttttc	1327
	taactaataa agtggaaat atatttcaaa aaaaaaaaaa aaaaa	1372
	<210> 4	
	<211> 63	
	<212> PRT	
	<213> 人	
	<400> 4	
	Met Lys His Val Leu Asn Leu Tyr Leu Leu Gly Val Val Leu Thr Leu	
	1 5 10 15	
	Leu Ser Ile Phe Val Arg Val Met Glu Ser Leu Glu Gly Leu Leu Glu	
	20 25 30	
	Ser Pro Ser Pro Gly Thr Ser Trp Thr Thr Arg Ser Gln Leu Ala Asn	
	35 40 45	
	Thr Glu Pro Thr Lys Gly Leu Pro Asp His Pro Ser Arg Ser Met	
	50 55 60	
	<210> 5	
	<211> 1735	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<220>	
	<221> CDS	

<222>	(242).. (913)	
<400>	5	
ggtatcagag gtagagccgt gctcttcage ggagaagatc cctacctgg ccgcccgcga	60	
ctttctgttg gccgtgggt cctcaaggag acggcccttg ggctcagggg ctgcgtttcc	120	
acacgcgcct tttccagggc tccgcgcgc gttcttgcct ggccgcccgc cgcaccaaca	180	
gcagcacaag gcgggactca gaaccggcgt tcagggcgcg cagcgccgcg gaggccctga	240	
g atg agg ctc caa aga ccc cga cag gcc ccg gcg ggt ggg agg cgc gcg	289	
Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala		
1 5 10 15		
ccc cgg ggc ggg cgg ggc tcc ccc tac cgg cca gac ccg ggg aga ggc	337	
Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly		
20 25 30		
gcg cgg agg ctg cga agg ttc cag aag ggc ggg gag ggg gcg ccg cgc	385	
Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg		
35 40 45		
gct gac cct ccc tgg gca ccg ctg ggg acg atg gcg ctg ctc gcc ttg	433	
Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu		
50 55 60		
ctg ctg gtc gtg gcc cta ccg cgg gtg tgg aca gac gcc aac ctg act	481	
Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr		
65 70 75 80		
gcg aga caa cga gat cca gag gac tcc cag cga acg gac gag ggt gac	529	
Ala Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp		
85 90 95		
[0003] aat aga gtg tgg tgt cat gtt tgt gag aga gaa aac act ttc gag tgc	577	
Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys		
100 105 110		
cag aac cca agg agg tgc aaa tgg aca gag cca tac tgc gtt ata gcg	625	
Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala		
115 120 125		
gcc gtg aaa ata ttt cca cgt ttt ttc atg gtt gcg aag cag tgc tcc	673	
Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser		
130 135 140		
gct ggt tgt gca gcg atg gag aga ccc aag cca gag gag aag cgg ttt	721	
Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe		
145 150 155 160		
ctc ctg gaa gag ccc atg ccc ttc ttt tac ctc aag tgt tgt aaa att	769	
Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile		
165 170 175		
cgc tac tgc aat tta gag ggg cca cct atc aac tca tca gtg ttc aaa	817	
Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys		
180 185 190		
gaa tat gct ggg agc atg ggt gag agc tgt ggt ggg ctg tgg ctg gcc	865	
Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala		
195 200 205		
atc ctc ctg ctg ctg gcc tcc att gca gcc ggc ctc agc ctg tct tga	913	
Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser		
210 215 220		
gccacgggac tgccacagac tgagccttcc ggagcatgga ctcgctccag accgtttgca	973	
ccgtgtgcat taaacttgtt ttctgttgat tacctcttgg ttgacttcc cagggtcttg	1033	
ggatgggaga gtggggatca ggtgcagttg gctcttaacc ctcaagggtt ctttaactca	1093	

```

cattcagagg aagtcagat ctctgagta gtgattttgg tgacaagttt ttctctttga 1153
aatcaaacct tgtaactcat ttattgctga tggccactct tttccttgac tccccctcgc 1213
ctctgagggc ttcagtattg atggggaggg aggcctaagt accactcatg gagagtatgt 1273
gctgagatgc ttcgacctt tcaggtagcg caggaacact gggggagict gaatgatigg 1333
ggigaagaca tccctggagi gaaggactcc tcagcatggg gggcagtgga gcacacgtta 1393
gggctgcccc cattccagtg gaggagcgcg tgggatggc tgcctttcct caacctttcc 1453
taccagattc caggaggcag aagataacta attgtgttga agaaacttag acttacccea 1513
ccagctggca caggtgcaca gattcataaa ttcccacacg tgtgtgttca acatctgaaa 1573
cttaggccaa gtagagagca tcagggtaaa tggcgttcat ttctctgtta agatgcagcc 1633
atccatgggg agctgagaaa tcagactcaa agttccacca aaaacaaala caaggggaat 1693
tcaaaagttc acgaaaaaat tgaattaaaa gataaaaatt aa 1735

```

```

<210> 6
<211> 223
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 6

```

```

Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala
1           5           10          15

```

[0004]

```

Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly
20          25          30

```

```

Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg
35          40          45

```

```

Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu
50          55          60

```

```

Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr
65          70          75          80

```

```

Ala Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp
85          90          95

```

```

Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys
100         105         110

```

```

Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala
115         120         125

```

```

Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser
130         135         140

```

```

Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe
145         150         155         160

```

```

Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile

```

	165	170	175	
	Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys			
	180	185	190	
	Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala			
	195	200	205	
	Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220	
	<210> 7			
	<211> 1098			
	<212> DNA			
	<213> 人			
	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1).. (1098)			
	<400> 7			
	atg gcc gtc atg gcg ccc cga acc ctc gtc ctg cta ctc tgc ggg gct			48
	Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala			
	1 5 10 15			
	ctg gcc ctg acc cag acc tgg gcg ggc tct cac tcc atg agg tat ttc			96
	Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe			
	20 25 30			
	tac acc tcc gtg tcc cgg ccc ggc cgc ggg gag ccc cgc ttc atc gca			144
[0005]	Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala			
	35 40 45			
	gtg ggc tac gtg gac gac acg cag ttc gtg cgg ttc gac agc gac gcc			192
	Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala			
	50 55 60			
	ggc agc cag agg atg gag cgc cgg ggc cgc tgg ata gag cag gag ggt			240
	Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly			
	65 70 75 80			
	cgc gag tat tgg gac ggg gag aca cgg aaa gtg aag gcc cac tca cag			288
	Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln			
	85 90 95			
	act cac cga gtg gac ctg ggg acc ctg cgc ggc tac tac aac cag agc			336
	Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser			
	100 105 110			
	gag gcc ggt tct cac acc gtc cag agg atg tat ggc tgc gac gtg ggg			384
	Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly			
	115 120 125			
	tgc gac tgg cgc ttc ctc cgc ggg tac cac cag tac gcc tac gac gcc			432
	Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly			
	130 135 140			
	aag gat tac atc gcc ctg aaa gag gac ctg cgc tct tgg acc gcg gcg			480
	Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala			
	145 150 155 160			
	gac atg gca gct cag acc acc aag cac aag tgg gag gcg gcc cat gtg			528
	Asp Met Ala Ala Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val			
	165 170 175			
	gcg gag cag tgg aga gcc tac ctg gag ggc acg tgc gtg gag tgg ctc			576
	Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu			

	180	185	190	
	cgc aga tac ctg gag aac ggg aag gag acg ctg cag cgc acg gac gcc Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala 195 200 205	624		
	ccc aaa acg cat atg act cac cac gct gtc tet gac cat gaa gcc acc Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr 210 215 220	672		
	ctg agg tgc tgg gcc ctg agc ttc tac cct gcg gag atc aca ctg acc Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr 225 230 235 240	720		
	tgg cag cgg gat ggg gag gac cag acc cag gac acg gag ctc gtg gag Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu 245 250 255	768		
	acc agg cct gca ggg gat gga acc ttc cag aag tgg gcg gct gtg gtg Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val 260 265 270	816		
	gtg cct tct gga cag gag cag aga tac acc tgc cat gtg cag cat gag Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu 275 280 285	864		
	ggt ttg ccc aag ccc ctc acc ctg aga tgg gag ccg tct tcc cag ccc Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro 290 295 300	912		
	acc atc ccc atc gtg ggc atc att get ggc ctg gtt ctc ttt gga gct Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala 305 310 315 320	960		
[0006]	gtg atc act gga gct gtg gtc get get gtg atg tgg agg agg aag agc Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser 325 330 335	1008		
	tea gat aga aaa gga ggg agc tac tct cag gct gca agc agt gac agt Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser 340 345 350	1056		
	gcc cag ggc tct gat gtg tct ctc aca gct tgt aaa gtg tga Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val 355 360 365	1098		
	<210> 8 <211> 365 <212> PRT <213> 人			
	<400> 8			
	Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala 1 5 10 15			
	Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe 20 25 30			
	Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala 35 40 45			
	Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala 50 55 60			
	Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly 65 70 75 80			

Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln
 85 90 95
 Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
 100 105 110
 Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly
 115 120 125
 Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val
 165 170 175
 Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
 180 185 190
 Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
 195 200 205
 Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
 210 215 220
 Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
 225 230 235 240
 Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
 245 250 255
 Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
 260 265 270
 Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
 275 280 285
 Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
 290 295 300
 Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
 325 330 335
 Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
 340 345 350
 Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
 355 360 365

[0007]

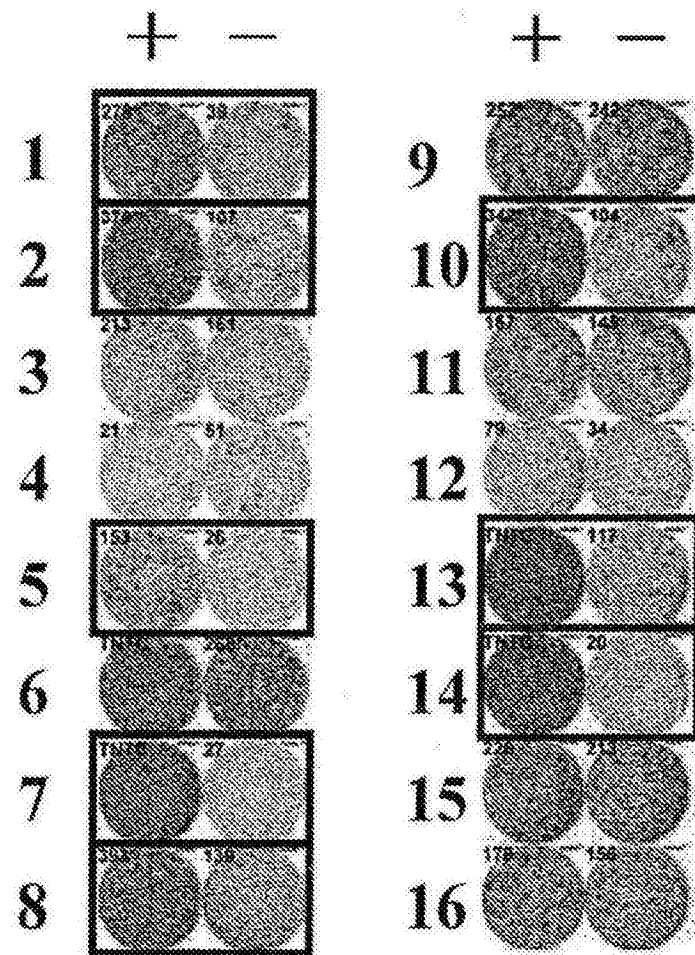


图1

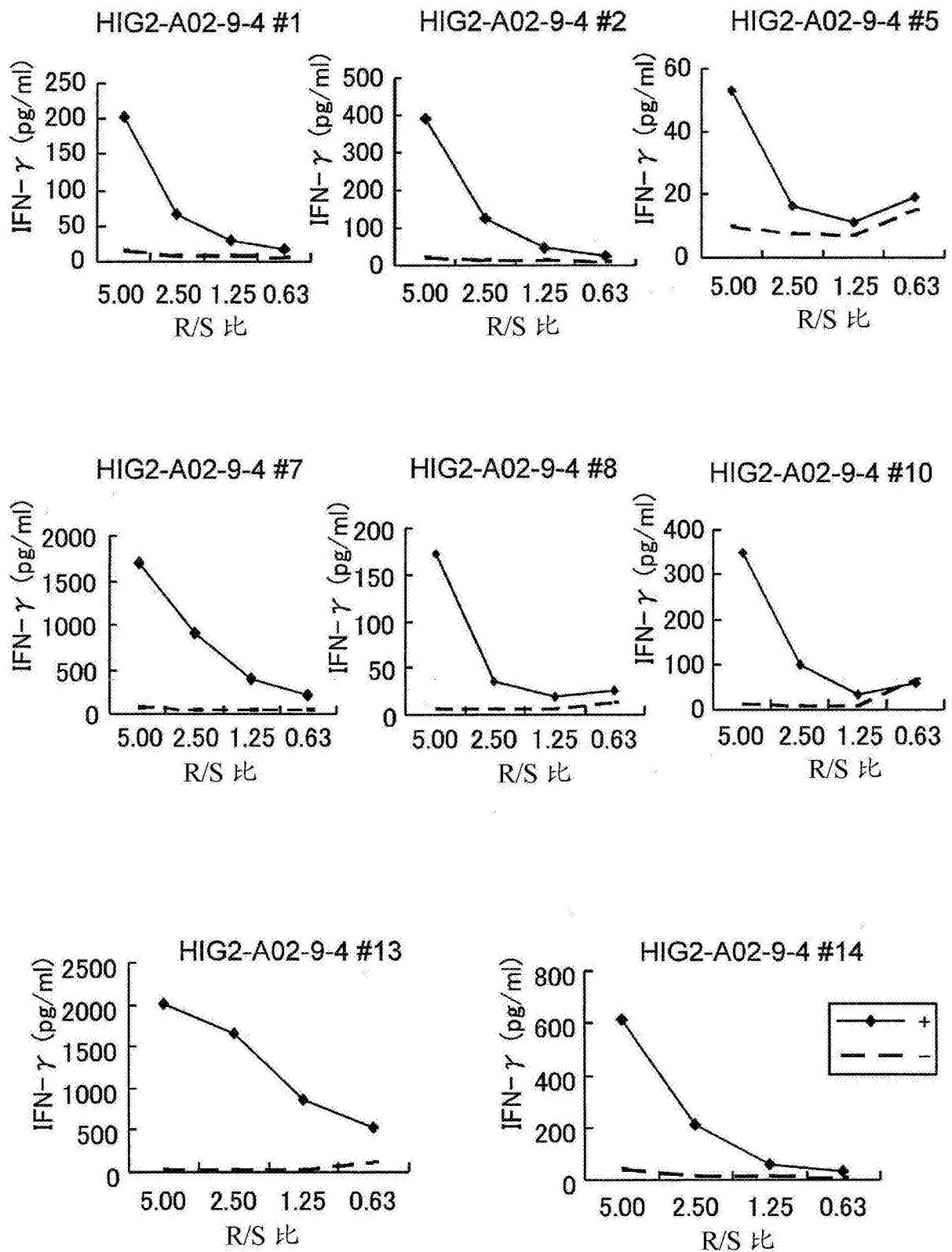


图2

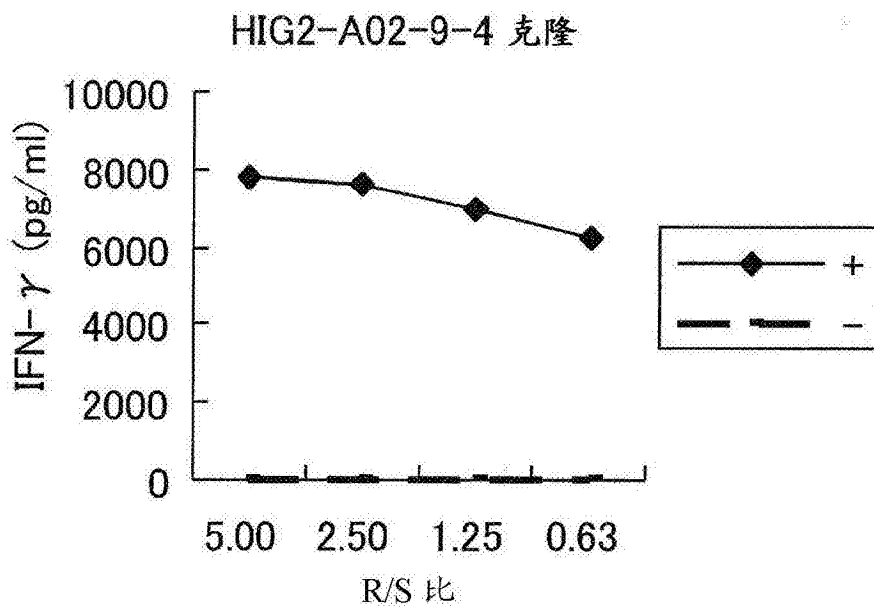


图3

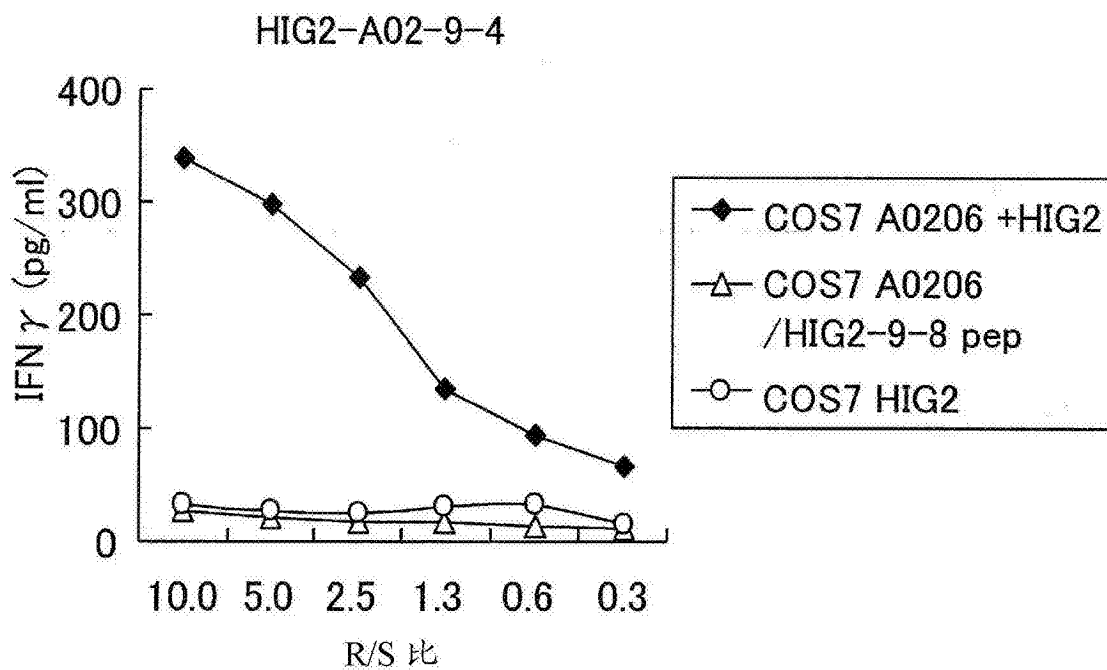


图4

URLC10-A02-10-211

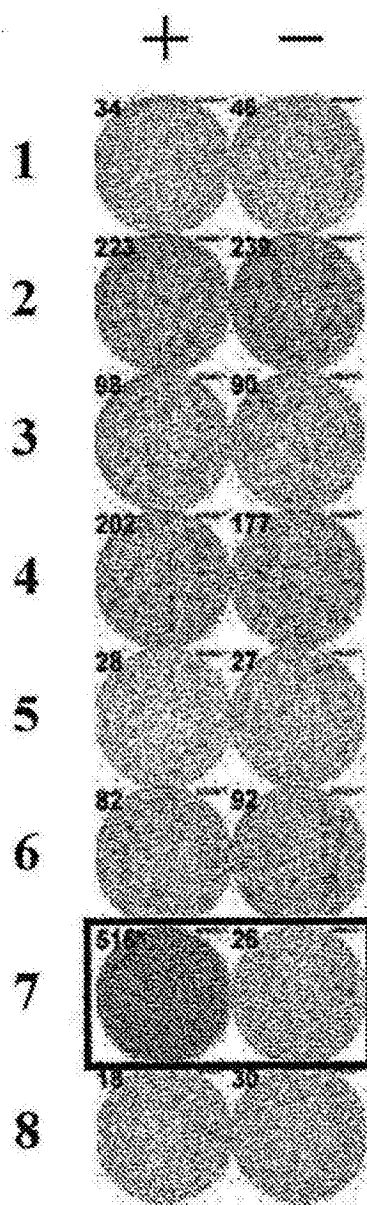


图5

URLC10-A02-10-211 系

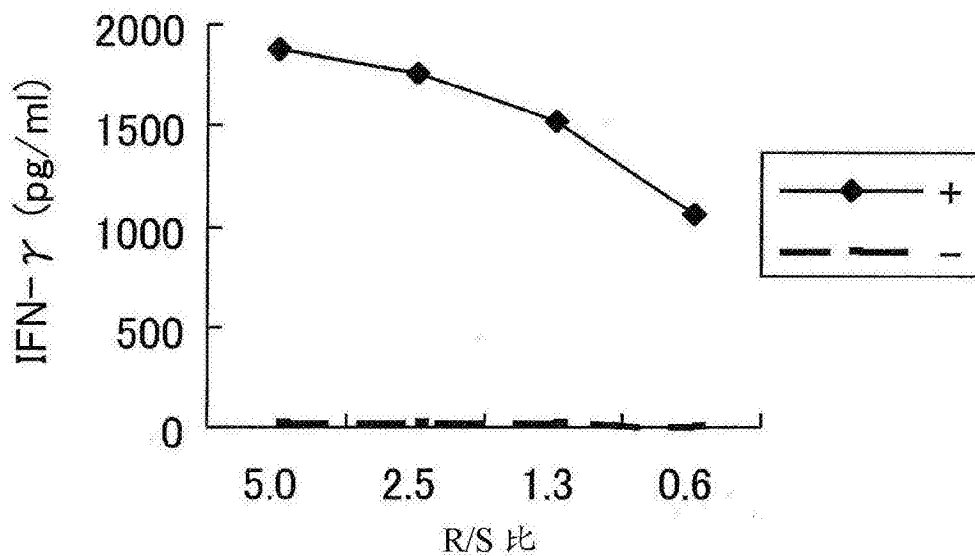


图6

URLC10-A02-10-211 克隆

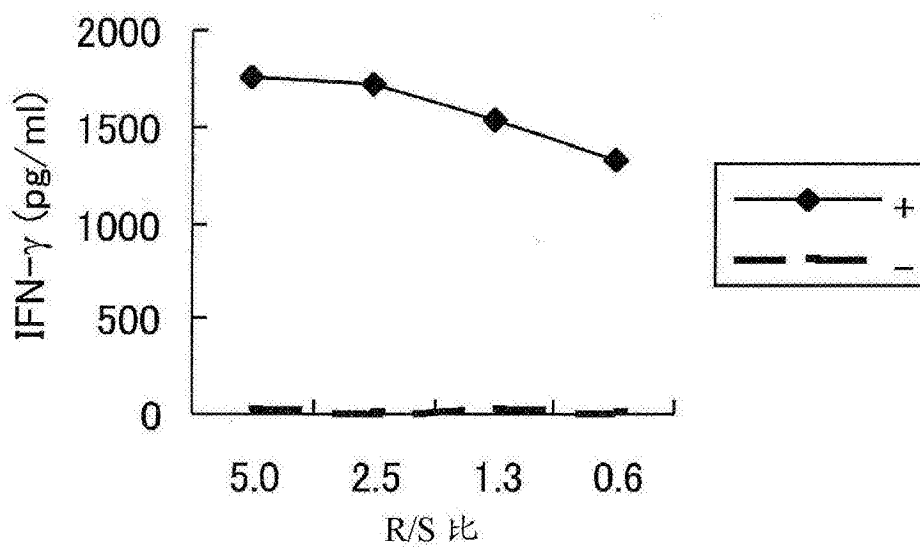


图7

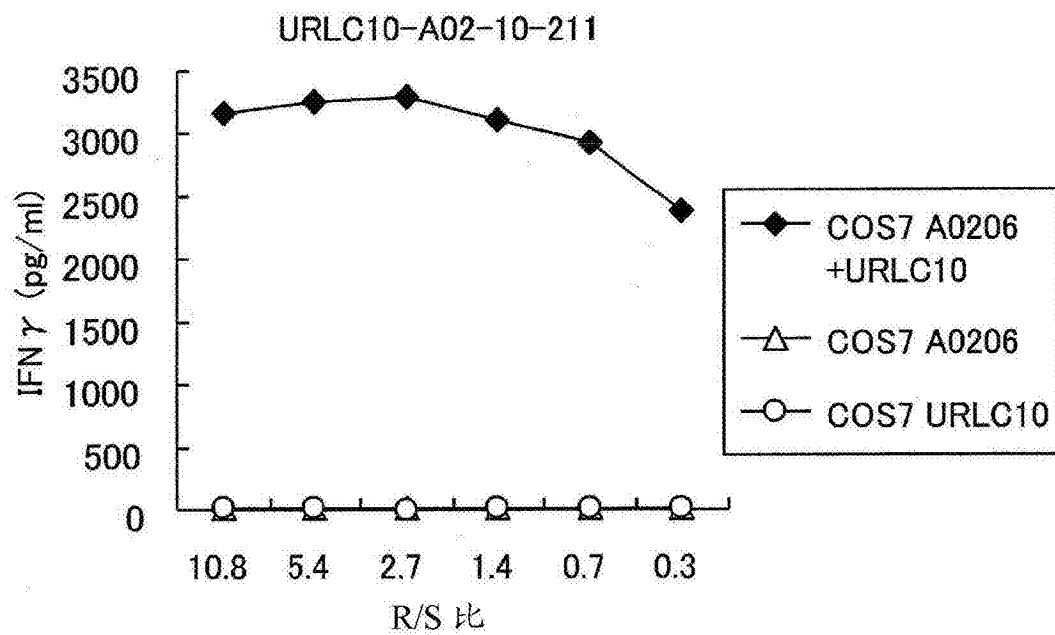


图8