



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102356155 B

(45) 授权公告日 2016.02.24

(21) 申请号 201080012575.5

(22) 申请日 2010.03.15

(30) 优先权数据

61/210,512 2009.03.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.09.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/001808 2010.03.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/106770 EN 2010.09.23

(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

渡边朝久 中村佑辅 古川洋一

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.

C12N 15/09(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101139392 A, 2008.03.12,

A Kauffmann et al..High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients.

《Oncogene》.2008, Pages 565 - 573.

NCBI.Accession No.NM_018248.

《GenBank》.2007, 全文.

审查员 管冰

权利要求书1页 说明书42页

序列表15页 附图10页

(54) 发明名称

NEIL3 肽及包含它的疫苗

(57) 摘要

本发明提供了分离的自 SEQ ID NO:45 衍生的肽或片段,其结合 HLA 抗原和诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。这样的肽可包括上文所述氨基酸序列中替代、删除或添加一个、两个、或数个氨基酸而得到的序列。本发明还提供了包含这些肽的药物组合物。本发明的肽可用于诊断或治疗癌症。

1. 一种分离的肽,其由选自 SEQ ID NO :24 和 41 的氨基酸序列组成。
2. 一种分离的多核苷酸,其编码权利要求 1 的肽。
3. 一种用于诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的组合物,其中该组合物包含一种或多种权利要求 1 的肽或一种或多种权利要求 2 的多核苷酸。
4. 一种用于治疗癌症的药物组合物,其中该组合物包含一种或多种权利要求 1 的肽或一种或多种权利要求 2 的多核苷酸。
5. 一种诱导具有细胞毒性 T 淋巴细胞诱导能力的抗原呈递细胞的体外方法,包括选自下组的步骤:
 - (a) 使抗原呈递细胞接触权利要求 1 的肽,和
 - (b) 将编码权利要求 1 的肽的多核苷酸导入抗原呈递细胞。
6. 一种通过包括选自下组的步骤的方法来诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的体外方法:
 - (a) 将 CD8 阳性 T 细胞与在其表面上呈递 HLA 抗原与权利要求 1 的肽形成的复合物的抗原呈递细胞共培养;和
 - (b) 将 CD8 阳性 T 细胞与在其表面上呈递 HLA 抗原与权利要求 1 的肽形成的复合物的外来体共培养。
7. 一种分离的抗原呈递细胞,该抗原呈递细胞包含呈递在其表面上的 HLA 抗原与权利要求 1 的肽形成的复合物。
8. 权利要求 7 的抗原呈递细胞,其是通过权利要求 5 的方法诱导的。
9. 一种分离的细胞毒性 T 淋巴细胞,其靶向权利要求 1 的肽。
10. 权利要求 9 的细胞毒性 T 淋巴细胞,其是通过权利要求 6 的方法诱导的。
11. 权利要求 1 的肽或编码该肽的多核苷酸在制备用于诱导针对表达 NEIL3 和 HLA-A24 抗原二者的靶细胞的细胞毒性 T 淋巴细胞的药物组合物中的用途。
12. 一种外来体,其呈递包含权利要求 1 的肽与 HLA 抗原的复合物。
13. 一种载体,其包含编码权利要求 1 的肽的核苷酸序列。
14. 一种宿主细胞,其经过权利要求 13 的表达载体转化或转染。
15. 权利要求 1 的肽或编码权利要求 1 的肽的多核苷酸在制备用于诱导具有细胞毒性 T 淋巴细胞诱导能力的抗原呈递细胞的组合物中的用途。
16. 权利要求 1 的肽在制备用于诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的组合物中的用途。

NEIL3 肽及包含它的疫苗

技术领域

[0001] 本申请要求 2009 年 3 月 18 日提交的美国临时申请 No. 61/210,512 的权益,通过述及将其全部内容收入本文。

[0002] 本发明涉及生物科学领域,更具体的说是癌症治疗领域。具体而言,本发明涉及新的肽(它们作为癌症疫苗极其有效)和用于治疗 and 预防肿瘤的药物。

背景技术

[0003] 已经证明,CD8 阳性 CTL 能识别自主要组织相容性复合物(MHC)I 类分子上的肿瘤相关抗原(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,通过免疫学手段已经发现了许多其它 TAA(NPL 1/Boon T, Int J Cancer 1993 May 8,54(2):177-80;NPL2/Boon T&van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1,183(3):725-9),而且这些 TAA 中的一些目前正处于作为免疫治疗靶标的临床开发过程中。

[0004] 能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临床应用的进一步开发(NPL 3/Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16,88(20):1442-55;NPL 4/Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13):3134-42;NPL 5/Vissers JL et al., Cancer Res 1999Nov 1,59(21):5554-9;NPL 6/van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May1,156(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 1999 Jan 18,80(2):169-72;NPL9/Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5,81(3):459-66;NPL 10/Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5,81(3):387-94)。迄今为止,已经报告了数项使用这些肿瘤相关抗原衍生的肽进行的临床试验。不幸的是,迄今为止在这些癌症疫苗试验中只能观察到较低的客观响应率(NPL 11/Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15,20(20):4169-80;NPL 12/Coulie PG et al., Immunol Rev2002 Oct,188:33-42;NPL 13/Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep,10(9):909-15)。

[0005] 癌细胞增殖和存活不可缺少的 TAA 适合作为免疫疗法的靶标,因为使用此类 TAA 可使广为记载的癌细胞免疫逃避的风险最小化,癌细胞的免疫逃避可归于因治疗驱动的免疫选择而发生的 TAA 删除、突变、或下调。

[0006] 另一方面,Nei 内切核酸酶 VIII 样 3(NEIL3)已经作为属于一类与细菌 Fpg/Nei 家族同源的 DNA 糖基化酶的成员得到分离(NPL 14/Bandararu et al., DNA Repair(Amst). 2002Jul 17;1(7):517-29)。这些糖基化酶通过经关联裂合酶反应切割受反应性氧种类损害的碱基并引入 DNA 链断裂来启动碱基切除修复中的第一步。NEIL3 有可能在 DNA 修复机制中发挥作用,然而,尚未阐明它与致癌作用的关系。

[0007] 引用表

[0008] 非专利文献

[0009] [NPL 1]Boon T, Int J Cancer 1993 May 8,54(2):177-80

- [0010] [NPL 2]Boon T&van der Bruggen P, J Exp Med 1996Mar 1,183(3) :725-9
- [0011] [NPL 3]Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16,88(20) :1442-55
- [0012] [NPL 4]Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1,59(13) :3134-42
- [0013] [NPL 5]Visser J et al., Cancer Res 1999 Nov 1,59(21) :5554-9
- [0014] [NPL 6]van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1,156(9) :3308-14
- [0015] [NPL 7]Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15,57(20) :4465-8
- [0016] [NPL 8]Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18,80(2) :169-72
- [0017] [NPL 9]Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5,81(3) :459-66
- [0018] [NPL 10]Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5,81(3) :387-94
- [0019] [NPL 11]Bellini F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15,20(20) :4169-80
- [0020] [NPL 12]Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct,188 :33-42
- [0021] [NPL 13]Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep,10(9) :909-15
- [0022] [NPL 14]Bandaru et al., DNA Repair (Amst). 2002 Jul 17 ;1(7) :517-29
- [0023] 发明概述

[0024] 本发明至少部分基于适用的免疫疗法靶标的发现。由于 TAA 一般被免疫系统视为“自身”，因此常常没有免疫原性，所以发现适宜的靶标是极其重要的。如上所述，NEIL3 (由 GenBank 登录号 NM_018248 (例如 SEQ ID NO:44) 的基因编码的 SEQ ID NO:45) 已经被鉴定为在癌症，诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌 (SCLC)、软组织肿瘤、急性髓样白血病 (AML) 和慢性髓样白血病 (CML)，中上调。因此，NEIL3 是癌症 / 肿瘤免疫疗法的候选靶标。

[0025] 本发明至少部分基于 NEIL3 的基因产物的拥有诱导对 NEIL3 特异性的 CTL 的能力的特定表位肽的鉴定。如下文详细讨论的，使用自 NEIL3 衍生的 HLA-A*2402 或 HLA-A*0201 结合候选肽刺激从健康供体获得的外周血单个核细胞 (PBMC)。然后建立了具有针对经每一种候选肽刺激的 HLA-A24 或 HLA-A2 阳性靶细胞的特异性细胞毒性的 CTL 系。这些结果证明，这些肽是能诱导针对表达 NEIL3 的细胞的强力且特异性的免疫应答的 HLA-A24 或 HLA-A2 限制表位肽。另外，它指明，NEIL3 具有强免疫原性，而且它的表位是癌症 / 肿瘤免疫疗法的有效靶标。

[0026] 因而，本发明提供了分离的能与 HLA 抗原结合的肽，该肽由 NEIL3 (SEQ ID NO:45) 或其免疫学活性片段组成。这些肽预期具有 CTL 诱导能力且可用于离体诱导 CTL 或用于施用给受试者以诱导针对癌症的免疫应答，所述癌症诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、子宫内膜异位症、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、SCLC 和 AML。优选地，那些肽是九肽或十肽，更优选地，由选自 SEQ ID NO:1 至 43 的氨基酸序列组成。特别地，由选自 SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 和 43 的氨基酸序列组成的肽显示强 CTL 诱导能力。

[0027] 本发明的肽涵盖如下的肽，其中替代、删除或添加了 1 个、2 个或数个氨基酸，只要经过修饰的肽保留原始的 CTL 诱导能力。

[0028] 另外，本发明提供了编码任何本发明肽的分离的多核苷酸。这些多核苷酸可用于诱导或制备具有 CTL 诱导能力的 APC 或用于施用给受试者以诱导针对本发明的肽以及癌症的免疫应答。

[0029] 当施用给受试者时,本发明的肽呈递在 APC 的表面上,然后诱导靶向相应肽的 CTL。因此,依照本发明的一个方面,还提供了用于诱导 CTL 的、包含任何本发明的肽或多核苷酸的组合物或物质。另外,包含任何本发明肽或多核苷酸的组合物或物质可用于治疗和/或预防癌症,诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML,和/或预防其手术后复发。因此,本发明还提供用于治疗和/或预防癌症,和/或预防其手术后复发的药物组合物或药用物质,其包含任何本发明肽或多核苷酸。本发明的药物组合物或药用物质可包含呈递任何本发明肽的 APC 或外来体作为活性组分,作为本发明的肽或多核苷酸的替代或补充。

[0030] 本发明的肽或多核苷酸能诱导在其表面上呈递 HLA 抗原与本发明肽形成的复合物的 APC,例如通过使源自受试者的 APC 接触本发明的肽或将编码本发明肽的多核苷酸导入 APC 来实现。此类 APC 具有针对靶肽的高 CTL 诱导能力,可用于癌症免疫疗法。因此,本发明涵盖诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 的方法和通过该方法获得的 APC。

[0031] 本发明还提供了诱导 CTL 的方法,其包括共培养 CD8 阳性细胞与在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体的步骤,或导入包括编码能与本发明肽结合的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸的基因的步骤。通过该方法获得的 CTL 可用于治疗和/或预防癌症,诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。因此,本发明涵盖通过本发明方法获得的 CTL。

[0032] 此外,本发明提供了用于诱导针对癌症的免疫应答的方法,其包括施用包含该 NEIL3 多肽或其免疫学活性片段、编码 NEIL3 多肽的多核苷酸、呈递 NEIL3 多肽的外来体或 APC 的组合物或物质的步骤。

[0033] 本发明还提供了诊断癌症的方法,所述癌症包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。

[0034] 本发明可用于任何涉及 NEIL3 过表达的疾病,诸如癌症,例示性的癌症包括膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。

[0035] 附图简述

[0036] 图 1 描绘一系列照片,显示了用 NEIL3 衍生肽诱导的 CTL 的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果。用 NEIL3-A2-9-585 (SEQ ID NO:3) 刺激的 8 号孔 (a)、用 NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO:4) 刺激的 2 号孔 (b)、用 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5) 刺激的 4 号和 5 号孔 (c)、用 NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO:6) 刺激的 3 号孔 (d)、用 NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO:11) 刺激的 1 号孔 (e)、用 NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO:15) 刺激的 3 号孔 (f)、用 NEIL3-A2-10-340 (SEQ ID NO:17) 刺激的 1 号孔 (g)、用 NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO:21) 刺激的 2 号和 3 号孔 (h)、用 NEIL3-A2-10-378 (SEQ ID NO:22) 刺激的 6 号孔 (i) 及用 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5) 刺激的 9 号、10 号、12 号和 13 号孔 (用于 HLA-A0206) (j) 中的 CTL 分别显示与对照相比强力的 IFN- γ 生成。这些图片的孔上的方框指示来自相应孔的细胞被扩增以建立 CTL 系。在图中, " + " 指示针对经过适宜的肽刺激过的靶细胞的

IFN- γ 生成,而" -" 指示针对未经任何肽冲激过的细胞的 IFN- γ 生成。

[0037] 图 2-1 描绘的线图显示通过 IFN- γ ELISA 测定法检测的经过 NEIL3-A2-585 (SEQ ID NO :3) (a)、NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO :4) (b)、NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (c) (d)、和 NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO :6) (e) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。证明了用每一种肽刺激而建立的 CTL 系显示与对照相比强力的 IFN- γ 生成。在图中," + " 指示针对经过适宜的肽冲激过的靶细胞的 IFN- γ 生成,而" - " 指示针对未经任何肽冲激过的细胞的 IFN- γ 生成。

[0038] 图 2-2 描绘的线图显示了通过 IFN- γ ELISA 测定法检测的经过 NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO :11) (f)、NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO :15) (g)、NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO :21) (h) (i) 和 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (用于 HLA-A0206) (j) (k) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。证明用每一种肽刺激建立的 CTL 系均显示了与对照相比强力的 IFN- γ 生成。在图中," + " 指示针对经过适宜的肽冲激过的靶细胞的 IFN- γ 生成,而" - " 指示针对未经任何肽冲激过的细胞的 IFN- γ 生成。

[0039] 图 3 显示自经过 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (a)、NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO :6) (b)、NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO :15) (c)、NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO :21) (d) 和 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (e) (用于 HLA-A0206) 刺激的 CTL 系通过有限稀释而建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。证明用 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (a)、NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO :6) (b)、NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO :15) (c)、NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO :21) (d) 和 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (e) (用于 HLA-A0206) 刺激而建立的 CTL 克隆显示了与对照相比强力的 IFN- γ 生成。在图中," + " 指示针对经过 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (a)、NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO :6) (b)、NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO :15) (c)、NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO :21) (d) 和 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (用于 HLA-A0206) (e) 冲激过的靶细胞的 IFN- γ 生成,而" - " 指示针对未经任何肽冲激过的细胞的 IFN- γ 生成。

[0040] 图 4-1 描绘的线图显示了针对外源表达 NEIL3 和 HLA-A*0201 或 HLA-A*0206 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备用 HLA-A*0201、用 HLA-A*0206 或用全长 NEIL3 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (a)、NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO :6) (b)、和 NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO :15) (c) 建立的 CTL 克隆显示了针对经 NEIL3 和 HLA-A*0201 二者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性 (黑色菱形)。另一方面,没有检测到显著的针对表达 HLA 的靶细胞 (三角形) 或表达 NEIL3 的靶细胞 (圆形) 的特异性 CTL 活性。

[0041] 图 4-2 描绘的线图显示了针对外源表达 NEIL3 和 HLA-A*0201 或 HLA-A*0206 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备用 HLA-A*0201、用 HLA-A*0206 或用全长 NEIL3 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5) (d) (用于 HLA-A0206) 建立的 CTL 克隆显示了针对经 NEIL3 和 HLA-A*0206 二者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性 (黑色菱形)。另一方面,没有检测到显著的针对表达 HLA 的靶细胞 (三角形) 或 NEIL3 的靶细胞 (圆形) 的特异性 CTL 活性。

[0042] 图 5 :显示 NEIL3 在肝癌中的表达的照片。A 部分显示了 NEIL3 在临床肝癌组织中的表达,通过半定量 RT-PCR 来检查。B 部分显示了 NEIL3 在 HCC 细胞系中的表达,通过半定

量 RT-PCR 来检查。

[0043] 图 6 :显示用 NEIL3 衍生肽诱导的 CTL 的 IFN- γ ELISPOT 测定的结果的照片。用 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24) 刺激的 7 号孔 (a)、用 NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO :33) 刺激的 6 号孔 (b)、用 NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35) 刺激的 2 号和 8 号孔 (c)、用 NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41) 刺激的 8 号孔 (d)、用 NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO :43) 刺激的 1 号和 4 号孔 (e) 中的 CTL 分别显示与对照相比强力的 IFN- γ 生成。这些图片的孔上的方框指示扩增来自相应孔的细胞以建立 CTL 系。相反,作为阴性数据的一种典型情况,经 NEIL3-A24-9-364 (SEQ ID NO :25) (f) 刺激的 CTL 针对经肽冲激的靶细胞没有显示特异性 IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经过适宜的肽冲激过的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽冲激过的细胞的 IFN- γ 生成。

[0044] 图 7 描绘的线图显示了通过 IFN- γ ELISA 测定法检测的经过 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24) (a)、NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO :33) (b)、NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35) (c)、NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41) (d) 和 NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO :43) (e) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。它证明了用每一种肽刺激而建立的 CTL 系均显示与对照相比强力的 IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经过适宜的肽冲激过的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽冲激过的细胞的 IFN- γ 生成。

[0045] 图 8 描绘的线图显示通过有限稀释自经过 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24) (a)、NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35) (b) 和 NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41) (c) 刺激的 CTL 系建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 生成。证明了用每一种肽刺激而建立的 CTL 克隆均显示与对照相比强力的 IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经过适宜的肽冲激过的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽冲激过的细胞的 IFN- γ 生成。

[0046] 图 9 描绘的线图显示了针对外源表达 NEIL3 和 HLA-A*2402 的靶细胞的特异性 CTL 活性。制备用 HLA-A*2402 或用全长 NEIL3 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24) 建立的 CTL 克隆显示了针对经 NEIL3 和 HLA-A*2402 二者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性 (黑色菱形)。另一方面,没有检测到显著的针对表达 HLA-A*2402 的靶细胞 (三角形) 或表达 NEIL3 的靶细胞 (圆形) 的特异性 CTL 活性。

[0047] 实施方案的描述

[0048] 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本文中描述的特定大小、形状、尺度、材料、方法、方案等,因为它们可依照例行实验和 / 或优化而变化。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。

[0049] I. 定义

[0050] 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。

[0051] 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可以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,以及天然存在的氨基酸聚合物。

[0052] 如本文中使用的,术语“氨基酸”指天然存在型的和合成的氨基酸,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。氨基酸可以是 L-氨基酸或 D-氨基酸。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)但具有一个或多个经过修饰的 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。

[0053] 氨基酸在本文中可以通过它们公知的由 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的三字母符号或单字母符号来指称。

[0054] 术语“基因”、“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用,而且除非另有明确说明,与氨基酸类似,通过它们普遍接受的单字母符号来指称。

[0055] 除非另有定义,术语“癌症”指过表达 NEIL3 基因的癌症,它的例子包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。

[0056] 除非另有定义,术语“细胞毒性 T 淋巴细胞”、“细胞毒性 T 细胞”和“CTL”在本文中可互换使用,而且除非另有明确说明,指能够识别非自身细胞(例如肿瘤/癌细胞、病毒感染的细胞)并诱导此类细胞死亡的 T 淋巴细胞亚群。

[0057] 除非另有定义,术语“HLA-A24”指包括亚型,诸如 HLA-A*2402 的 HLA-A24 型。

[0058] 除非另有定义,如本文中使用的,术语“HLA-A2”代表性地指 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206 等亚型。

[0059] 除非另有定义,如本文中使用的,术语“试剂盒”用于指试剂和其它材料的组合。本文中考虑到试剂盒可包括微阵列、芯片、标志物、等等。术语“试剂盒”并非意图限于试剂和/或材料的特定组合。

[0060] 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。

[0061] II. 肽

[0062] 为了证明 NEIL3 衍生的肽发挥被 CTL 所识别的抗原的功能,对 NEIL3(SEQ ID NO: 45)衍生的肽进行分析以确定它们是否为 HLA-A24 或 A2(它们是常见的 HLA 等位基因)限制性的抗原表位(Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994)。

[0063] 利用它们对 HLA-A2 的结合亲和力来鉴定 NEIL3 衍生的 HLA-A2 结合肽的候选者。候选肽是选自 SEQ ID NO: 1 至 23 的肽。

[0064] 此外,用经这些肽冲激(加载)的树突细胞(DC)体外刺激 T 细胞后,使用下述每一种肽成功地建立了 CTL:

[0065] NEIL3-A2-9-585(SEQ ID NO: 3),

[0066] NEIL3-A2-9-127(SEQ ID NO: 4),

[0067] NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5),

[0068] NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO :6),

[0069] NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO :11),

[0070] NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO :15),

[0071] NEIL3-A2-10-340 (SEQ ID NO :17),

[0072] NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO :21), 和

[0073] NEIL3-A2-10-378 (SEQ ID NO :22)。

[0074] 基于它们对 HLA-A24 的结合亲和力来鉴定 NEIL3 衍生的 HLA-A24 结合肽的候选者。候选肽是选自 SEQ ID NO :24 至 43 的肽。

[0075] 此外,用经这些肽冲激(加载)的树突细胞(DC)体外刺激 T 细胞后,使用下述每一种肽成功地建立了 CTL:

[0076] NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24),

[0077] NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO :33),

[0078] NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35),

[0079] NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41), 和

[0080] NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO :43)。

[0081] 这些建立的 CTL 显示针对经相应肽冲激的靶细胞的强力且特异性的 CTL 活性。这些结果证明 NEIL3 是被 CTL 识别的抗原,而且所测试的肽是受 HLA-A24 或 HLA-A2 限制的 NEIL3 表位肽。

[0082] 由于 NEIL3 基因在癌细胞中过表达,诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML,而且在大多数正常器官中不表达,它是良好的癌症免疫疗法靶标。因此,本发明提供了来自 NEIL3 的 CTL 识别表位九肽(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)。或者,本发明提供了结合 HLA 抗原和诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的分离的肽,其中所述肽由 SEQ ID NO :45 的氨基酸序列组成或是它的免疫学活性片段。更具体地,在一些实施方案中,本发明提供了由选自 SEQ ID NO :3,4,5,6,11,15,17,21,22,24,33,35,41 和 43 的氨基酸序列组成的肽。

[0083] 一般而言,可使用当前例如在互联网上可得的软件程序,诸如 Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1,152(1):163-75 和 Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12:1007-17 中记载的软件程序,在计算机上(in silico)计算各种肽与 HLA 抗原之间的结合亲和力。可以按照例如 Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009,15,3209-3220 中总结的 Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1,152(1):163-75;Kuzushima K et al., Blood 2001,98(6):1872-81;Larsen MV et al., BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31;8:424;Buus S et al., Tissue Antigens.,62:378-84, 2003;Nielsen M et al., Protein Sci 2003,12:1007-17; 和 Nielsen M et al., PLoS ONE 2007,2:e796 中所述地那样测量与 HLA 抗原的结合亲和力。例如 Journal of Immunological Methods,1995,185:181-190;Protein Science,2000,9:1838-1846 中记载了用于测定结合亲和力的方法。因此,可使用此类软件程序来选择对 HLA 抗原具有高结合亲和力的 NEIL3 衍生片段。因此,本发明涵盖由任何 NEIL3 衍生片段组成的、可被确定结

合使用此类已知程序鉴定的 HLA 抗原的肽。另外,此类肽可包括由全长 NEIL3 组成的肽。

[0084] 本发明的肽的侧翼可以有额外的氨基酸残基,只要该肽保留它们的 CTL 诱导能力。额外的氨基酸残基可以由任何种类的氨基酸构成,只要它们不妨碍原始肽的 CTL 诱导能力。因此,本发明涵盖对 HLA 抗原具有结合亲和力的肽,包括 NEIL3 衍生肽。此类肽例如小于约 40 个氨基酸,常常小于约 20 个氨基酸,通常小于约 15 个氨基酸。

[0085] 一般而言,已知肽中 1 个、2 个、或数个氨基酸的修饰不会影响肽的功能,或者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(即由通过对原始参照序列替代、删除或添加 1 个、2 个或数个氨基酸残基而修饰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,依照本发明的一个实施方案,本发明的具有 CTL 诱导能力的肽可以由如下的肽构成:所述肽由选自 SEQ ID NO:3,4,5,6,11,15, 17,21,22,24,33,35,41 和 43 的氨基酸序列组成,其中添加、删除和/或替代 1 个、2 个或甚至数个氨基酸。

[0086] 本领域技术人员会认可,改变氨基酸序列中的单个氨基酸或少数百分比氨基酸的对氨基酸序列的个别添加、删除或替代导致原始氨基酸侧链的特性得以保留;因此,它常常被称作“保守替代”或“保守修饰”,其中对蛋白质的改变导致具有相似功能的蛋白质。提供功能上相似的氨基酸的保守替代是本领域公知的。氨基酸侧链的特性的例子有疏水性氨基酸(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)、和具有下述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互为保守替代的氨基酸:

[0087] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0088] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0089] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0090] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0091] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0092] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0093] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0094] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(参见例如 Creighton, Proteins 1984)。

[0095] 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,而且可包括非保守修饰,只要该肽保留 CTL 诱导能力。另外,经过修饰的肽不排除 NEIL3 的多态变体、种间同源物、和等位基因中的可诱导 CTL 的肽。

[0096] 为了保留必需的 CTL 诱导能力,可修饰(添加或替代)少数(例如 1 个、2 个或数个)或小百分比的氨基酸。在本文中,术语“数个”意味着 5 个或更少的氨基酸,例如 3 个或更少。要修饰的氨基酸的百分比可以是 20%或更少,例如 15%或更少,例如 10%或者 1 至 5%。

[0097] 此外,可在肽中替代或添加氨基酸残基以实现更高的结合亲和力。当在癌症免疫疗法中使用,本发明的肽作为与 HLA 抗原形成的复合物呈递在细胞或外来体的表面

上。在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;Immunogenetics1995,41:178;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。

[0098] 例如,在显示高 HLA-A2 结合亲和力的肽中,它们 N 端起第二个氨基酸已被亮氨酸或甲硫氨酸替代,而且也可以有利地使用 C 端氨基酸已被缬氨酸或亮氨酸替代的肽。因此,本发明涵盖如下的肽,其具有选自 SEQ ID NO:3,4,5,6,11,15,17,21 和 22 的氨基酸序列,其中该 SEQ ID NO 的氨基酸序列的 N 端起第二个氨基酸被亮氨酸或甲硫氨酸替代,和 / 或如下的肽,其中该 SEQ IDNO 的氨基酸序列的 C 端氨基酸被缬氨酸或亮氨酸替代。

[0099] 另一方面,在拥有高 HLA-A24 结合亲和力的肽中,它们 N 端起第二个氨基酸已被苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸替代,而且 C 端氨基酸已被苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、或甲硫氨酸替代。因此,本发明涵盖如下的肽,其具有 SEQ ID NO:24,33,35,41 和 43 的氨基酸序列,其中 N 端起第二个氨基酸被苯丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、或色氨酸替代,和 / 或其中 C 端氨基酸被苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、或甲硫氨酸替代。

[0100] 不仅可以在肽的末端氨基酸处引入替代,而且可以在其潜在的 T 细胞受体 (TCR) 识别位置处引入替代。数项研究证明了具有氨基酸替代的肽可具有等同于或好于原始的功能,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 和 S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

[0101] 另外,也可向本发明肽的 N 和 / 或 C 端添加 1 个、2 个或数个氨基酸。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。

[0102] 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,可诱导副作用,诸如自身免疫性病症或针对特定物质的变应性症状。因此,可使用可得的数据实施同源性搜索,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。

[0103] 虽然预期如上所述对 HLA 抗原具有高结合亲和力的肽是高度有效的,但还是对以高结合亲和力的存在作为指标而选出的候选肽进一步检查 CTL 诱导能力的存在。在本文中,短语“CTL 诱导能力”指肽在抗原呈递细胞 (APC) 上呈递时诱导 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。

[0104] CTL 诱导能力的确认通过如下方式来实现:诱导携带人 MHC 抗原的 APC (例如 B-淋巴细胞、巨噬细胞、和树突细胞 (DC)),或更具体地,自人外周血单个核淋巴细胞衍生的 DC,并在用肽进行刺激后,与 CD8 阳性细胞混合,然后测量由 CTL 针对靶细胞生成和释放的 IFN- γ 。作为反应系统,可使用已经制成的表达人 HLA 抗原的转基因动物 (例如 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8):764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC (HLA)

class II restricted T(H)response 中记载的那些)。例如,可以用⁵¹Cr 等放射性标记靶细胞,并且可以自靶细胞释放的放射性计算细胞毒性活性。或者,可如下来进行检验:测量在携带固定化肽的 APC 存在下由 CTL 生成和释放的 IFN- γ , 并使用抗 IFN- γ 单克隆抗体显现培养基上的抑制区。

[0105] 作为如上所述地对肽的 CTL 诱导能力进行检验的结果,选自由 SEQ ID NO:3,4,5,6,11,15,17,21,22,24,33,35,41 和 43 所示氨基酸序列组成的肽的九肽或十肽显示特别高的 CTL 诱导能力以及对 HLA 抗原的高结合亲和力。因此,这些肽是本发明的例示性实施方案。

[0106] 另外,同源性分析的结果显示了那些肽与自任何其它已知人基因产物衍生的肽没有显著同源性。这降低了在用于免疫疗法时未知的或不期望的免疫应答的可能性。因此,同样来自这个方面,这些肽可用于在癌症患者中引发针对 NEIL3 的免疫力。因此,本发明的肽优选由选自 SEQ ID NO:3,4,5,6,11,15,17,21,22,24,33,35,41 和 43 的氨基酸序列组成的肽。

[0107] 除了如上文所述的对本发明肽的修饰之外,还可将本发明的肽连接至其它肽,只要它们保留 CTL 诱导能力。其它肽的例子包括:本发明的肽或自其它 TAA 衍生的 CTL 可诱导肽。肽之间的接头是本领域公知的,例如 AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5: 26)、AAA、NKRK (R. P. M. Suttmuller et al., J Immunol. 2000, 165:7308-7315) 或 K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476; K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168:5709-5715)。

[0108] 例如,还可基本上同时使用非 NEIL3 肿瘤相关抗原肽以提高藉由 I 类和 /II 类 HLA 的免疫应答。公认癌细胞能表达超过一种肿瘤相关基因。确定特定受试者是否表达别的肿瘤相关基因,然后在依照本发明的 NEIL3 组合物或疫苗中包括自此类基因的表达产物衍生的 I 类 HLA 和 / 或 II 类 HLA 结合肽,均系本领域普通技术人员的例行实验的范围内。

[0109] 本领域普通技术人员会知晓 I 类 HLA I 和 II 类 HLA 结合肽的例子(例如参见 Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995),而且可以以与本文公开类似的方式用于本发明。本领域普通技术人员能依照分子生物学的标准规程来制备包括一种或多种 NEIL3 肽和一种或多种非 NEIL3 肽的多肽或编码此类多肽的核酸。

[0110] 因此,此类“多表位”(polytope)为两个或更多个潜在免疫原性或免疫应答刺激性肽构成的组,这些肽可以以各种排列方式(例如串联、交叠)连接在一起。该多表位(或编码该多表位的核酸)可以以标准免疫方案来施用,例如施用于动物,以测试该多表位刺激、增强和 / 或引起免疫应答的有效性。

[0111] 该肽可直接地或经使用侧翼序列连接在一起以形成多表位,而且多表位作为疫苗的用途是本领域公知的(参见例如 Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13): 5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990)。可制备含有不同数目和组合的表位的多表位并测试它们被 CTL 识别的情况及提高免疫应答的功效。

[0112] 另外,可将本发明的肽连接至其它物质,只要它们保留 CTL 诱导能力。此类物质可包括: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;只要该修饰不破坏本文所述肽的生物学活性。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）或稳定化多肽。

[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。多肽的稳定性可以以多种方式加以测定。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，如上所述，在替代、删除或添加 1 个、2 个或数个氨基酸残基的经修饰肽中，可筛选或选择具有与原始肽相比相同或更高活性的修饰肽。因此，本发明还提供了用于筛选或选择具有与原始肽相比相同或更高的活性的修饰肽的方法。例如，该方法可包括下述步骤：

[0115] a：对本发明的肽替代、删除或添加至少一个氨基酸残基；

[0116] b：测定该肽的活性；并

[0117] c：选择具有与原始肽相比相同或更高活性的肽。

[0118] 在本文中，该活性可包括 MHC 结合活性、APC 或 CTL 诱导能力和细胞毒性活性。

[0119] 在本文中，本发明的肽也可以称为“NEIL3 肽”或“NEIL3 多肽”。

[0120] III. NEIL3 肽的制备

[0121] 本发明的肽可使用公知技术来制备。例如，肽可以通过合成、通过重组 DNA 技术或化学合成来制备。本发明的肽可个别地合成，或作为包括两个或更多个肽的较长多肽来合成。可以分离，即纯化该肽，或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。

[0122] 本发明的肽可含有修饰，诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化；只要该修饰不破坏本文所述的肽的生物学活性。其它修饰包括掺入 D-氨基酸或其它氨基酸模拟物，其可用于例如延长肽的血清半衰期。

[0123] 可以根据选定的氨基酸序列经由化学合成来获得本发明的肽。例如，可适用于合成的常规肽合成法包括：

[0124] (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966；

[0125] (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976；

[0126] (iii) Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1975；

[0127] (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1985；

[0128] (v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (in Japanese), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991；

[0129] (vi) W099/67288；和

[0130] (vii) Barany G. & Merrifield R. B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118。

[0131] 或者，可采用任何已知的遗传工程肽生产方法来获得本发明的肽（例如 Morrison J, J Bacteriology 1977, 132:349-51；Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101:347-62）。例如，首先，制备包含处于可表达形式（例如处于相当于启动子序列的调节序列的下游）的编码目标肽的多核苷酸的合适载体，并转化入合适的宿主细胞。本发明也提供此类载体和宿主细胞。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。

[0132] IV. 多核苷酸

[0133] 本发明提供编码任何上述本发明肽的多核苷酸。这些包括自天然存在的 NEIL3 基因 (GenBank 登录号 NM_018248 (例如 SEQ ID NO:44)) 衍生的多核苷酸及具有它们的经过保守修饰的核苷酸序列的多核苷酸。在本文中,短语“经过保守修饰的核苷酸序列”指编码相同或本质上相同的氨基酸序列的序列。由于遗传密码的简并性,对于任何给定蛋白质都有极其多种功能上相同的核酸来编码它。例如,密码子 GCA、GCC、GCG、和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子规定为丙氨酸的任何位置处,该密码子可改变成任何相应所述密码子,而不改变所编码的多肽。此类核酸变异是“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。本领域技术人员会认识到,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) 都可以加以修饰以产生功能上相同的分子。因而,每一种所公开的序列均隐含涵盖了编码肽的核酸的每一种沉默变异。

[0134] 本发明的多核苷酸可以由 DNA、RNA、或其衍生物构成。正如本领域公知的, DNA 分子由碱基诸如天然存在的碱基 A、T、C、和 G 构成,而 T 在 RNA 中被 U 替换。技术人员会认识到,多核苷酸中也包括非天然存在的碱基。

[0135] 本发明的多核苷酸可编码多个本发明肽,其中有或无居间氨基酸序列。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,例如使用聚合酶和内切核酸酶。

[0136] 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,可使用 PCR 技术或通过合适宿主中的表达来扩增多核苷酸 (参见例如 Sambrook et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者,可使用固相技术来合成多核苷酸,如 Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48 :2223-311 ; Matthes et al., EMBO J 1984, 3 :801-5 中记载的。

[0137] V. 外来体 (exosomes)

[0138] 本发明进一步提供了称作外来体的细胞内囊泡,这些外来体在它们的表面上呈递本发明肽与 HLA 抗原之间形成的复合物。外来体可以通过,例如使用在日本专利申请 Kohyo 公开号 Hei 11-510507 和 W099/03499 中详细描述的方法来制备,而且可以使用自作为治疗和 / 或预防受试者的患者获得的 APC 来制备。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。

[0139] 复合物中包括的 HLA 抗原的类型必须与需要治疗和 / 或预防的受试者的 HLA 抗原类型匹配。例如,对于日本人, HLA-A24 和 HLA-A2, 特别是 HLA-A*2402 和 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206 常常是适宜的。使用在日本人和高加索人中高表达的 A24 型或 A2 型对获得有效的结果是有利的,而且可使用亚型诸如 A*2402, A*0201 和 A*0206。通常,在临床中,预先调查需要治疗的患者的 HLA 抗原类型,这能够合适地选择对此抗原具有高水平的结合亲和

力,或通过抗原呈递具有 CTL 诱导能力的肽。而且,为了获得显示高结合亲和力和 CTL 诱导能力的肽,可以在天然存在 NEIL3 部分肽的氨基酸序列的基础上进行 1 个、2 个或数个氨基酸的替代、删除、或添加。

[0140] 在将 A2 型 HLA 抗原用于本发明的外来体的情况中,可使用包括 SEQ ID NO :3,4,5,6,11,15,17,21 和 22 的序列的肽。

[0141] 或者,在将 A24 型 HLA 抗原用于本发明的外来体的情况中,可使用具有 SEQ ID NO :24,33,35,41 和 43 和 61 中任一的序列的肽。

[0142] VI. 抗原呈递细胞 (APC)

[0143] 本发明还提供在其表面上呈递在 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的分离的 APC。APC 可衍生自作为治疗和 / 或预防受试者的患者,而且可作为疫苗以它们自身或其它药物 (包括本发明的肽、外来体、或 CTL) 组合来施用。

[0144] APC 不限于特定种类的细胞,包括 DC、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞识别。由于 DC 是 APC 中具有最强 CTL 诱导活性的代表性 APC,DC 可用作本发明的 APC。

[0145] 例如,可通过自外周血单核细胞诱导 DC,然后在体外、离体或在体内用本发明的肽接触 (刺激) 它们来获得本发明的 APC。当对受试者施用本发明的肽时,在受试者的身体中诱导出呈递本发明肽的 APC。因此,可以通过在对受试者施用本发明的肽后自受试者收集 APC 来获得本发明的 APC。或者,可以通过用本发明的肽接触自受试者收集的 APC 来获得本发明的 APC。

[0146] 可以将本发明的 APC 自身或其它药物 (包括本发明的肽、外来体或 CTL) 组合施用于受试者以在受试者中来诱导针对癌症的免疫应答。例如,离体施用可包括下述步骤:

[0147] a:自第一受试者收集 APC;

[0148] b:用肽接触步骤 a 的 APC;并

[0149] c:对第二受试者施用步骤 b 的 APC。

[0150] 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。通过步骤 b 获得的 APC 可作为疫苗施用来治疗和 / 或预防癌症,诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。

[0151] 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 所实现的该水平而言的。此类具有高水平 CTL 诱导能力的 APC 可通过上文所述方法以及包括在体外将编码本发明肽的多核苷酸转移至 APC 的步骤的方法来制备。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此领域中常规实施的各种方法,诸如可使用脂质体转染、电穿孔、和磷酸钙法。更具体的说,可以如 Cancer Res1996,56:5672-7;J Immunol 1998,161:5607-13;J Exp Med 1996,184:465-72;国际公开文本 No. 2000-509281 的已公开日文翻译中所述来实施。通过将基因转移入 APC,基因在细胞中经历转录、翻译、等等,然后得到的蛋白质被 I 类或 II 类 MHC 加工并经由呈递途径呈递以呈递部分肽。

[0152] VII. 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)

[0153] 被诱导的针对任何本发明肽的 CTL 在体内加强靶向癌细胞的免疫应答,因此可以以与肽相似的方式用作疫苗。因此,本发明提供由任何本发明肽特异性诱导或活化的、分离的 CTL。

[0154] 此类 CTL 可通过下述步骤来获得:(1) 对受试者施用本发明的肽或(2) 在体外用本发明的肽接触(刺激)源自受试者的 APC 和 CD8 阳性细胞、或外周血单个核白细胞,或(3) 在体外用在其表面上呈递 HLA 抗原与肽形成的复合物的 APC 或外来体接触 CD8 阳性细胞或外周血单个核白细胞或(4) 导入包括编码能与本发明肽结合的 T 细胞受体(TCR) 亚单位的多核苷酸的基因。此类 APC 或外来体可通过上文所述方法来制备,而且方法(4) 的详情在下文“VIII. T 细胞受体(TCR)”一节下详述。

[0155] 本发明的 CTL 可衍生自作为治疗和/或预防对象的患者,而且可以以它们自身或者与其它药物(包括本发明的肽或外来体)组合施用以实现调节效果的目的。所得到的 CTL 特异性针对呈递本发明的肽,例如与用于诱导的肽相同的肽的靶细胞起作用。靶细胞可以是内源表达 NEIL3 的细胞,诸如癌细胞,或被 NEIL3 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。

[0156] VIII. T 细胞受体(TCR)

[0157] 本发明还提供了含有编码能够形成 T 细胞受体(TCR) 亚单位的多肽的核酸的组合物,及使用该组合物的方法。TCR 亚单位具有形成赋予 T 细胞针对呈递 NEIL3 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 TCR 的 α 和 β 链(其作为用本发明的一种或多种肽诱导的 CTL 的 TCR 亚单位)的核酸(WO2007/032255 和 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如,优选 PCR 方法来分析 TCR。用于分析的 PCR 引物可以是例如但不限于作为 5' 侧引物的 5' -R 引物(5' -gtctaccaggcattcgcttcac-3') (SEQ ID NO:48) 和对 TCR α 链 C 区特异性的 3-TRa-C 引物(5' -tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO:49),对 TCR β 链 C1 区特异性的 3-TRb-C1 引物(5' -tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO:50) 或作为 3' 侧引物的对 TCR β 链 C2 区特异性的 3-TRbeta-C2 引物(5' -ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ ID NO:51)。衍生的 TCR 在体内和在体外能以高亲和力结合展示 NEIL3 肽的靶细胞,且任选介导对呈递 NEIL3 肽的靶细胞的有效杀伤。

[0158] 可将编码 TCR 亚单位的核酸掺入合适载体,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(或其它哺乳动物的 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 T 细胞。

[0159] 特异性 TCR 是一种能够特异性识别本发明肽和 HLA 分子形成的复合物的受体,当 TCR 在 T 细胞的表面上呈递时,给予 T 细胞针对靶细胞的特异性活性。对上述复合物的特异性识别可通过任何已知方法来确认,优选的方法包括例如使用 HLA 分子和本发明肽的 HLA 多聚体染色分析,及 ELISPOT 测定法。通过实施 ELISPOT 测定法,能确认在细胞表面上表达 TCR 的 T 细胞通过 TCR 来识别细胞,而且信号在细胞内传输。当上文所述复合物存在于 T 细胞表面上时该复合物可给予 T 细胞以细胞毒性活性的确认,也可通过已知方法进行。一种优选的方法包括例如测定针对 HLA 阳性靶细胞的细胞毒性活性,诸如铬释放测定法。

[0160] 还有,本发明提供通过用如下的核酸转导而制备的 CTL,该核酸编码能结合 HLA-A2 背景下的 NEIL3 肽(例如 SEQ ID NO:3,4,5,6,11,15,17,21 和 22)及 HLA-A24 背景下的 SEQ ID NO:24,33,35,41 和 43 的肽的 TCR 亚单位多肽。

[0161] 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 CTL 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)。

[0162] IX. 药用物质或药物组合物

[0163] 预防和防范包括降低来自疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,二级和三级预防和防范水平涵盖旨在通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来预防和防范疾病进展和症状出现以及降低已建立的疾病的负面影响的活动的。或者,预防和防范包括广泛的预防疗法,它们旨在减轻特定病症的严重性,例如降低肿瘤的增殖和转移、降低血管发生。

[0164] 治疗和/或预防癌症,和/或预防其手术后复发包括任何下述步骤,诸如手术清除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和遏制癌症发生、肿瘤消退、及降低或抑制转移。癌症的有效治疗和/或预防降低具有癌症的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,构成有效治疗和/或预防的症状减轻或改善包括 10%、20%、30%或更多降低,或病情稳定。

[0165] 由于 NEIL3 表达在癌症诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML 中与正常组织相比特异性升高,本发明的肽或多核苷酸可用于治疗和/或预防癌症,和/或预防其手术后复发。因此,本发明提供用于治疗和/或预防癌症,和/或预防其手术后复发的药用物质或药物组合物,其包括一种或多种本发明的肽或多核苷酸作为活性组分。或者,可以在任何上述外来体或细胞(诸如 APC)的表面上表达本发明的肽,以用作药用物质或药物组合物。另外,上述靶向任何本发明的肽的 CTL 也可用作本发明的药用物质或药物组合物的活性组分。

[0166] 本发明的药用物质或药物组合物可用作疫苗。在本发明中,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。

[0167] 本发明的药剂或药物组合物可用于在受试者或患者(包括人和任何其它哺乳动物,包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猫、犬、绵羊、山羊、猪、牛、马、猴、狒狒、和黑猩猩,特别是商业上重要的动物或驯养的动物)中治疗和/或预防癌症,和/或预防其手术后复发。

[0168] 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造用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或药用物质中的用途:

[0169] (a) 本发明的肽,

[0170] (b) 处于可表达形式的编码本文中公开的此类肽的核酸,

[0171] (c) 在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体,和

[0172] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0173] 或者,本发明进一步提供用于治疗或预防癌症或肿瘤的选自下组的活性组分:

[0174] (a) 本发明的肽,

[0175] (b) 处于可表达形式的编码本文中公开的此类肽的核酸,

[0176] (c) 在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体, 和

[0177] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0178] 或者, 本发明进一步提供一种制造用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或药用物质的方法或工艺, 其中该方法或工艺包括配制药学或生理学可接受载体与选自下组的活性组分作为活性组分的步骤:

[0179] (a) 本发明的肽,

[0180] (b) 处于可表达形式的编码本文中公开的此类肽的核酸,

[0181] (c) 在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体, 和

[0182] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0183] 在另一个实施方案中, 本发明还提供一种制造用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或药用物质的方法或工艺, 其中该方法或工艺包括混合活性组分与药学或生理学可接受载体的步骤, 其中该活性组分选自下组:

[0184] (a) 本发明的肽,

[0185] (b) 处于可表达形式的编码本文中公开的此类肽的核酸,

[0186] (c) 在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体, 和

[0187] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0188] 依照本发明, 已经发现包含 SEQ ID NO :3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 和 43 的氨基酸序列的肽是分别能诱导强力且特异性免疫应答的 HLA-A24 或 HLA-A2 限制表位肽或候选者。因此, 包括任何这些具有 SEQ IDNO :3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 和 43 的氨基酸序列的肽的本发明的药用物质或药物组合物特别适合于对其 HLA 抗原为 HLA-A24 或 HLA-A2 的受试者施用。对于包括编码任何这些肽的多核苷酸 (即本发明的多核苷酸) 的药用物质或药物组合物也是如此。

[0189] 要用本发明的药用物质或药物组合物治疗的癌症不受限制, 包括任何其中涉及 (例如过表达) NEIL3 的癌症, 例如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。

[0190] 除了上述活性组分之外, 本发明的药用物质或药物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。

[0191] 如果需要, 本发明的药用物质或药物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, 配制剂可包括抗炎物质或组合物、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物质或组合物顺序或同时施用。药物和药理学物质或组合物的量取决于例如所使用的药理学物质或组合物的类型、所治疗的疾病、及施用的时序安排和路径。

[0192] 应当理解, 除了本文中具体提及的组分之外, 参照所讨论的配制剂的类型, 本发明

的药用物质或药物组合物还可包括的本领域常规的其它物质或组合物。

[0193] 在本发明的一个实施方案中,本发明的药用物质或药物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用物质或药物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物质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。

[0194] 除了上文描述的容器之外,包括本发明药用物质或药物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的稀释剂。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头、注射器、和载有使用说明的包装插页。

[0195] 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量形式。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。

[0196] (1) 含有肽作为活性组分的药用物质或药物组合物

[0197] 本发明的肽可以作为药用物质或药物组合物直接施用,或者如果必要,通过常规配制方法来配制。在后一种情况中,除了本发明的肽之外,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、培养液、等等。另外,药用物质或药物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。本发明的药用物质或药物组合物可用于抗癌目的。

[0198] 本发明的肽可制备成组合,其包括两种或更多种本发明肽,以在体内诱导 CTL。肽可采取鸡尾酒的形式,或者可使用标准技术彼此缀合。例如,可以将肽化学连接或表达成为单一融合多肽序列,其可具有一个或数个氨基酸作为接头(例如赖氨酸接头: K. S. Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168 :5709-5715)。组合中的各个肽可以是相同的或不同的。通过施用本发明的肽,肽被 HLA 抗原以高密度呈递在 APC 上,然后诱导出与所展示的肽与 HLA 抗原之间形成的复合物特异性起反应的 CTL。或者,自受试者取出 APC(例如 DC),然后用本发明的肽刺激以获得在其细胞表面上呈递任何所述的本发明肽的 APC。将这些 APC 再施用于受试者以在受试者中诱导 CTL,结果能提高针对肿瘤相关内皮的攻击性。

[0199] 对于包括任何本发明肽作为活性组分、用于治疗 and / 或预防癌症的药用物质或药物组合物,可包括佐剂以便有效建立细胞免疫,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。佐剂指任何在与具有免疫学活性的蛋白质一起(或顺序)施用增强针对蛋白质的免疫应答的化合物、物质或组合物。可应用的佐剂包括文献中记载的那些(Clin Microbiol Rev 1994, 7 :277-89)。例示性的佐剂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、不完全弗氏佐剂(IFA)、完全弗氏佐剂(CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/W 乳液、诸如此类。

[0200] 另外,可方便地使用脂质体制剂、其中肽结合至数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。

[0201] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的肽也可以以药学可接受盐的形式施用。盐的优选例子包括与碱金属的盐、与金属的盐、与有机碱的盐、与有机酸的盐和与无机酸的盐。

[0202] 在一些实施方案中,本发明的药用物质或药物组合物包括引发 (prime)CTL 的成分。已经将脂质鉴定为能够在体内引发针对病毒抗原的 CTL 的物质或组合物。例如,可将棕榈酸残基附着至赖氨酸残基的 ϵ - 和 α - 氨基,然后连接于本发明的肽。然后脂化肽可以在胶束或颗粒中直接施用,掺入脂质体施用,或在佐剂中乳化后施用。作为脂质引发 CTL 应答的另一个例子,大肠杆菌 (*E. coli*) 脂蛋白,诸如三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酰-丝氨酰-丝氨酸 (P3CSS),当共价附着至适宜的肽时,可用来引发 CTL (参见例如 Deres et al., *Nature* 1989,342:561-4)。

[0203] 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。本发明的肽的剂量可以依照要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整,而且通常是 0.001mg 至 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。

[0204] (2) 含有多核苷酸作为活性组分的药用物质或药物组合物

[0205] 本发明的药用物质或药物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能诱导抗肿瘤免疫力的多肽。在一个例示性的实施方案中,感兴趣的多核苷酸的核酸序列包括多核苷酸表达所必需的调节元件。多核苷酸可具有为实现稳定插入靶细胞的基因组所需的配置 (关于同源重组盒载体的描述参见例如 Thomas KR&Capecchi MR, *Cell* 1987,51:503-12。还参见例如 Wolff et al., *Science* 1990,247:1465-8;美国专利号 5,580,859;5,589,466;5,804,566;5,739,118;5,736,524;5,679,647;和 W098/04720)。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 (参见例如美国专利号 5,922,687)。

[0206] 本发明的肽还可使用病毒或细菌载体来表达。表达载体的例子包括减毒病毒宿主,诸如牛痘或禽痘。这种办法涉及使用例如牛痘病毒作为载体来表达编码肽的核苷酸序列。在导入宿主后,重组牛痘病毒表达表达免疫原性肽,并由此引发免疫应答。可用于免疫接种方案的牛痘载体和方法记载于例如美国专利 4,722,848。另一种载体是 BCG (卡介苗)。BCG 载体记载于 Stover et al., *Nature* 1991,351:456-60。有很多种可用于治疗性施用或免疫接种的其它载体是显而易见的,例如腺病毒和腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 载体、去毒炭疽毒素载体、诸如此类。参见例如 Shataet 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。

[0207] 将多核苷酸投递入患者可以是直接的,在该情况中使患者直接暴露于携带多核苷酸的载体,或者是间接的,在该情况中首先在体外用感兴趣的多核苷酸转化细胞,然后将细胞移植入患者。这两种办法分别称作体内和离体基因疗法。

[0208] 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 和 Wu, *Biotherapy* 1991,3:87-95;Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993,33:573-96;Mulligan, *Science* 1993,260:926-32;Morgan&Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993,62:191-217;Trends in Biotechnology 1993,

11(5):155-215。重组 DNA 技术领域普遍知道的也可用于本发明的方法记载于 eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY, 1993; 和 Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990。

[0209] 施用的方法可以是口服、皮内、皮下、静脉内注射等等,而且可使用系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。合适的载体中的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可以依照要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等来恰当加以调整,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。

[0210] X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL 的方法

[0211] 本发明的肽和多核苷酸可用于制备或诱导 APC 和 CTL。本发明的外来体和 APC 也可用于诱导 CTL。肽、多核苷酸、外来体和 APC 可以与任何其它化合物组合使用,只要所述化合物不抑制它们的 CTL 诱导能力。因此,任何上述本发明药用物质或药物组合物均可用于诱导 CTL,而且在它们之外,那些包括肽和多核苷酸的也可用于诱导 APC,如下文解释的。

[0212] (1) 诱导抗原呈递细胞 (APC) 的方法

[0213] 本发明提供了使用本发明的肽或多核苷酸来诱导具有高 CTL 诱导能力的 APC 的方法。本发明的方法包括在体外、离体或在体内使本发明的肽接触 APC 的步骤。例如,离体使肽接触 APC 的方法可包括下述步骤:

[0214] a:自受试者收集 APC;并

[0215] b:用肽接触步骤 a 的 APC。

[0216] APC 不限于特定种类的细胞,而且包括 DC、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞识别。优选地,由于 DC 是 APC 中具有最强 CTL 诱导能力的,可使用 DC。任何本发明肽均可以单独或与其它本发明肽一起使用。

[0217] 另一方面,在将本发明肽施用于受试者时,APC 在体内接触所述肽,因此在受试者的身体中诱导出具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,本发明包括将本发明的肽施用于受试者。类似地,在将可表达形式的本发明多核苷酸施用于受试者时,本发明的肽在体内表达并与 APC 接触,因此在受试者的身体中诱导出具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,本发明还可包括将本发明的多核苷酸施用于受试者。“可表达的形式”描述于上文“IX. 药用物质或药物组合物 (2) 含有多核苷酸作为活性组分的药用物质或药物组合物”部分。

[0218] 另外,本发明可包括将本发明的多核苷酸导入 APC 以诱导具有 CTL 诱导能力的 APC。例如,该方法可包括下述步骤:

[0219] a:自受试者收集 APC;并

[0220] b:导入编码本发明肽的多核苷酸。

[0221] 步骤 b 可如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分中所述来实施。

[0222] 或者,本发明提供一种用于制备能特异性诱导针对 NEIL3 的 CTL 活性的抗原呈递细胞 (APC) 的方法,其中该方法可包括下述步骤之一:

[0223] (a) 在体外、离体或在体内使 APC 接触本发明的肽;和

[0224] (b) 将编码本发明肽的多核苷酸导入 APC。

[0225] (2) 诱导 CTL 的方法

[0226] 另外,本发明提供了使用本发明的肽、多核苷酸、或外来体或 APC 来诱导 CTL 的方法。

[0227] 本发明还提供了使用编码能够形成如下的 T 细胞受体 (TCR) 亚单位的肽的多核苷酸来诱导 CTL 的方法,其中该 T 细胞受体 (TCR) 亚单位识别本发明的肽和 HLA 抗原形成的复合物。优选地,用于诱导 CTL 的方法可包括至少一个选自下组的步骤:

[0228] a) 使 CD8 阳性 T 细胞接触在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的抗原呈递细胞和 / 或外来体 ;和

[0229] b) 将编码能够形成如下的 TCR 亚单位的多肽的多核苷酸导入 CD8 阳性细胞,其中该 TCR 亚单位识别本发明的肽和 HLA 抗原形成的复合物。

[0230] 当本发明的肽、多核苷酸、APC、或外来体被施用给受试者后,在受试者的身体中诱导出 CTL,且靶向癌细胞的免疫应答的强度得以增强。因此,本发明的方法包括将本发明的肽、多核苷酸、APC 或外来体施用于受试者的步骤。

[0231] 或者,也可通过离体使用它们来诱导 CTL,并在诱导 CTL 后,可将活化的 CTL 返还受试者。例如,该方法可包括下述步骤:

[0232] a :自受试者收集 APC ;

[0233] b :用肽接触步骤 a 的 APC ;并

[0234] c :将步骤 b 的 APC 与 CD8 阳性细胞共培养。

[0235] 上文步骤 c 中要与 CD8 阳性细胞共培养的 APC 也可通过将包括本发明多核苷酸的基因转移入 APC 来制备,如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分所述 ;但是不限于此,而且任何在其表面上有效呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的 APC 均可用于本发明的方法。

[0236] 作为此类 APC 的替代,也可使用在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明的肽形成的复合物的外来体。即,本发明用可包括共培养在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的外来体的步骤。此类外来体可通过上文“V. 外来体”部分中描述的方法来制备。

[0237] 另外,可通过将包括编码能与本发明的肽结合的 TCR 亚单位的多核苷酸的基因导入 CD8 阳性细胞来诱导 CTL。此类转导可如上文“VIII. T 细胞受体 (TCR)”部分中所述来实施。

[0238] 另外,本发明提供了一种用于制造诱导 CTL 的药用物质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载体混合或配制的步骤。

[0239] (3) 诱导免疫应答的方法

[0240] 此外,本发明提供了诱导针对 NEIL3 相关的疾病的免疫应答的方法。合适的疾病可包括癌症,例如但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。

[0241] 所述方法可包括施用含有任何本发明肽或其编码多核苷酸的物质或组合物的步骤。本发明的方法还可涵盖施用呈递任何本发明肽的外来体或 APC。关于详情参见“IX. 药用物质或药物组合物”部分,特别是描述本发明的药用物质或药物组合物作为疫苗的用途的部分。另外,可用于诱导免疫应答的本发明方法的外来体和 APC 详细描述于上文“V. 外来体”、“VI. 抗原呈递细胞 (APC)”和“X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL”的 (1) 和 (2) 部分。

[0242] 本发明还提供了一种制造用于诱导免疫应答的药用物质或药物组合物的方法或工艺,其中该方法可包括混合或配制本发明的肽与药学可接受载体的步骤。

[0243] 或者,本发明的方法可包括施用疫苗或药物组合物的步骤,所述疫苗或药物组合物包含:

[0244] (a) 本发明的肽;

[0245] (b) 处于可表达形式的编码本文中公开的此类肽的核酸;

[0246] (c) 在其表面上呈递本发明肽的 APC 或外来体;或

[0247] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0248] 在本发明中,过表达 NEIL3 的癌症可用这些活性组分来治疗。所述癌症包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。因而,在施用包含所述活性组分的疫苗或药物组合物之前,优选确认要治疗的细胞或组织中的 NEIL3 表达水平与相同器官的正常细胞相比是否增强了。因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗(过)表达 NEIL3 的癌症的方法,该方法可包括下述步骤:

[0249] i) 测定自患有要治疗的癌症的受试者获得的细胞或组织中的 NEIL3 表达水平;

[0250] ii) 将该 NEIL3 表达水平与正常对照进行比较;并

[0251] iii) 对具有与正常对照相比过表达 NEIL3 的癌症的受试者施用至少一种选自上文所述(a)至(d)的成分。

[0252] 或者,本发明还提供了包括至少一种选自上文所述(a)至(d)的成分的疫苗或药物组合物,其用于对具有过表达 NEIL3 的癌症的受试者施用。换言之,本发明进一步提供了用于鉴定要用本发明的 NEIL3 多肽来治疗的受试者的方法,所述方法可包括测定源自受试者的细胞或组织中的 NEIL3 表达水平的步骤,其中该水平与该基因的正常对照水平相比的升高指示该受试者可具有可用本发明 NEIL3 多肽来治疗的癌症。本发明的治疗癌症的方法将在下面更加详细的加以叙述。

[0253] 在本发明的语境下,从已知非癌性的生物样品确定的对照水平称作“正常对照水平”。另一方面,如果对照水平系从癌性生物样品确定,则称作“癌性对照水平”。

[0254] 要用本方法治疗的受试者优选为哺乳动物。例示性的哺乳动物包括但不限于例如人类、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马、和牛。

[0255] 根据本发明,可测定在自受试者获得的细胞或组织中 NEIL3 的表达水平。表达水平可在转录(核酸)产物水平确定,使用本领域已知方法。举例而言,NEIL3 的 mRNA 可通过杂交方法(例如,Northern 杂交)使用探针定量。所述检测可在芯片、阵列等等上实施。对检测 NEIL3 的表达水平而言,可优选使用阵列。本领域技术人员可利用 NEIL3 的序列信息制备上述探针。举例而言,NEIL3 的 cDNA 可用作探针。如需要,所述探针可用合适的标记物(例如染料、荧光物质和同位素)来标记,且所述基因的表达水平可以作为发生了杂交的标记物的强度来加以检测。

[0256] 进一步,NEIL3 的转录产物(例如 SEQ ID NO:45)可通过基于扩增的检测方法(例如,RT-PCR)使用引物定量。上述引物亦可基于所述基因的可得序列信息制备。

[0257] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、中等条件或低严格条件下与 NEIL3 的 mRNA 杂交。如本文中所使用的,短语“严格(杂交)条件”是指这样的条件,在

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

[0258] 或者,可以检测翻译产物以进行本发明的诊断。例如,可以确定 NEIL3 蛋白 (SEQ ID NO:45) 或其免疫学片段的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括免疫测定法,其使用特异识别所述蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰 (例如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等) 均可用于检测,只要该片段或经修饰抗体保留对 NEIL3 蛋白的结合能力即可。本发明还提供此类针对本发明肽的抗体及其片段。制备这些种类的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的,并且在本发明中可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0259] 作为另一种基于 NEIL3 的翻译产物检测 NEIL3 基因表达水平的方法,可利用针对 NEIL3 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析测量染色的强度。意即,在此测量中,强染色表明所述蛋白质存在 / 水平增加,且同时表明 NEIL3 的高表达水平。

[0260] 就靶基因例如 NEIL3 基因在癌细胞中的表达水平而言,如果该水平较之靶基因的对照水平 (例如在正常细胞中的水平) 增加了例如 10%、25% 或 50% 的话,或增加到超过 1.1 倍、超过 1.5 倍、超过 2.0 倍、超过 5.0 倍、超过 10.0 倍或者更多的话,可确定该水平是增加的。

[0261] 对照水平可以使用先前从疾病状态 (癌性或非癌性) 已知的受试者收集和保存的样品与癌细胞同时确定。另外,可以利用从具有要治疗的癌症的器官中的非癌性区域获得的正常细胞作为正常对照。或者,对照水平可以借助统计方法,根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 NEIL3 基因表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以从来自先前测试过的细胞的表达样式的数据库获得。而且,根据本发明的一个方面,可以将生物样品中 NEIL3 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用从来自与源自受试者的生物样品的组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中 NEIL3 基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm 2\text{S.D.}$ 或平均值 $\pm 3\text{S.D.}$ 的范围可以用作标准值。

[0262] 当 NEIL3 基因的表达水平相比正常对照水平有所提高或与癌性对照水平相似 / 等同时,受试者可诊断为具有要治疗的癌症。

[0263] 更具体地,本发明提供了一种 (i) 诊断受试者是否怀疑具有要治疗的癌症,和 / 或 (ii) 选择受试者进行癌症治疗的方法,该方法可包括下述步骤:

[0264] a) 测定 NEIL3 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的细胞或组织中的表达水平;

[0265] b) 将 NEIL3 的表达水平与正常对照水平比较；

[0266] c) 若 NEIL3 的表达水平与正常对照水平相比升高的话, 将受试者诊断为具有要治疗的癌症; 并

[0267] d) 若在步骤 c) 中受试者被诊断为具有要治疗的癌症的话, 选择受试者进行癌症治疗。

[0268] 或者, 此类方法可包括下述步骤:

[0269] a) 测定 NEIL3 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的细胞或组织中的表达水平;

[0270] b) 将 NEIL3 的表达水平与癌性对照水平比较;

[0271] c) 若 NEIL3 的表达水平与癌性对照水平相似或等同的话, 诊断受试者具有要治疗的癌症; 并

[0272] d) 若在步骤 c) 中受试者被诊断为具有要治疗的癌症的话, 选择受试者进行癌症治疗。

[0273] 本发明还提供了用于诊断或受试者是否确定患有或疑似患有能用本发明 NEIL3 多肽来治疗的癌症的诊断试剂盒, 其亦可用于评价和 / 或监测癌症免疫疗法的功效或适用性。优选地, 所述癌症包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。更具体地, 所述试剂盒优选可包含至少一种用于检测源自受试者的细胞中 NEIL3 基因的表达的试剂, 所述试剂可选自下组:

[0274] (a) 检测 NEIL3 基因的 mRNA 的试剂;

[0275] (b) 检测 NEIL3 蛋白或其免疫学片段的试剂; 和

[0276] (c) 检测 NEIL3 蛋白的生物学活性的试剂。

[0277] 适于检测 NEIL3 基因 mRNA 的试剂可包括特异性结合或鉴定 NEIL3mRNA 的核酸, 诸如具有与 NEIL3 mRNA 的一部分互补的序列的寡核苷酸。这些种类的寡核苷酸以对 NEIL3 mRNA 特异性的引物和探针为例。这些种类的寡核苷酸可基于本领域众所周知的方法制备。如果需要, 检测 NEIL3mRNA 的试剂可固定化在固体基质上。另外, 在所述试剂盒中可包括多于一种检测 NEIL3 mRNA 的试剂。

[0278] 另一方面, 适于检测 NEIL3 蛋白质或其免疫学片段的试剂可包括针对 NEIL3 蛋白或其免疫学片段的抗体。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步, 所述抗体的任何片段或修饰 (例如, 嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等) 均可用作所述试剂, 只要所述片段或经修饰抗体保留与 NEIL3 蛋白或其免疫学片段的结合能力。为了蛋白的检测而制备这些种类的抗体的方法在本领域是众所周知的, 且可在本发明中使用任何方法制备上述抗体及其等价物。进一步, 所述抗体可用能产生信号的分子通过直接连接或间接标记技术进行标记。标记物与标记抗体以及检测抗体与其靶的结合的方法在本领域是众所周知的, 且本发明可使用任何标记物与方法。另外, 在所述试剂盒中可包括多于一种检测 NEIL3 蛋白质的试剂。

[0279] 所述试剂盒可包含多于一种前述的试剂。举例而言, 从没有癌症或患有癌症的受试者获取的组织样品可用作有用的对照试剂。本发明的试剂盒可进一步包括其它从商业和用户角度而言期望的材料, 包括缓冲液、稀释液、滤器、针头、注射器、和带有使用说明的包

装插页（例如，书面的、磁带、CD-ROM 等等）。这些试剂之类的可与标签一起包含在容器中。合适的容器可包括瓶、管形瓶和试管。所述容器可从多种材料制得，例如玻璃或塑料。

[0280] 在本发明的一个实施方案中，当所述试剂是针对 NEIL3 mRNA 的探针时，所述试剂可固定化于固体基质上，例如多孔条，以形成至少一个检测位点。所述多孔条的测量或检测区域可包含多个位点，每个都包含核酸（探针）。测试条亦可包含阴性和 / 或阳性对照的位点。或者，对照位点可位于与测试条不同的条上。任选地，不同的检测位点可包含不同量的固定化核酸，即，在第一个检测位点上量较大而在接下来的位点上量较小。在添加测试样品之后，展示可检测信号位点的数目提供了在样品中存在的 NEIL3 mRNA 量的定量指征。所述检测位点可配置成任何合适可检测的形状，并通常是横跨测试条宽度的条状或点状。

[0281] 本发明所述试剂盒可进一步包括阳性对照样品或 NEIL3 标准样品。本发明的所述阳性对照样品可通过收集 NEIL3 阳性样品，随后测定其 NEIL3 水平来制备。或者，可将纯化的 NEIL3 蛋白或多核苷酸添加到不表达 NEIL3 的细胞中以形成所述阳性样品，或 NEIL3 标准样品。在本发明中，纯化的 NEIL3 可以是重组蛋白。例如，阳性对照样品的 NEIL3 水平大于截留值。

[0282] 在一个实施方案中，本发明进一步提供了一种诊断试剂盒，其包括能够特异性识别本发明抗体或其片段的蛋白或其部分蛋白。

[0283] 本发明的蛋白的部分肽的例子包括由本发明蛋白的氨基酸序列中的至少 8 个、优选 15 个、更优选 20 个连续氨基酸组成的多肽。癌症可通过使用本发明的蛋白或肽（多肽）检测样品（例如血液、组织）中的抗体来诊断。上文描述了用于制备本发明的蛋白和肽的方法。

[0284] 用于癌症的诊断方法可通过如上所述测定抗 NEIL3 抗体量和相应的对照样品中的量之间的差异来进行。若测定受试者的细胞或组织所含的针对该基因的表达产物（NEIL3）的抗体和抗 NEIL3 抗体的量大于截留值（与正常对照中的水平相比）的话，则怀疑该受试者患有癌症。

[0285] 在另一个实施方案中，本发明的诊断试剂盒可包括本发明的肽及与它结合的 HLA 分子。使用抗原性肽和 HLA 分子检测抗原特异性 CTL 的方法早已确立（例如 Altman JD et al., Science. 1996, 274 (5284) :94-6）。因此，本发明肽和 HLA 分子形成的复合物可应用于检测方法，来检测肿瘤抗原特异性 CTL，由此使得癌症的复发和 / 或转移的早期检出成为可能。进一步，它可用于选择适合包含本发明肽作为活性组分的药物的受试者或评估该药物的治疗效果。

[0286] 特别地，依照已知方法（参见例如 Altman JD et al., Science. 1996, 274 (5284) : 94-6），可制备放射性标记的 HLA 分子和本发明肽的寡聚物复合物，诸如四聚体。利用该复合物，可例如通过定量源自疑似患有癌症的受试者的外周血淋巴细胞中的抗原 - 肽特异性 CTL 来进行诊断。

[0287] 本发明进一步提供了如本文所述使用肽表位来评估受试者的免疫学应答的方法或诊断剂。在本发明的一个实施方案中，可利用本文所述中 HLA 限制性肽作为试剂来评估或预测受试者的免疫应答。要评估的免疫应答可通过在体外或在体内使免疫原接触有免疫能力的细胞来诱导。在一些实施方案中，任何能导致识别和结合肽表位的抗原特异性 CTL 生成的物质或组合物均可采用作为试剂。肽试剂可无需用作免疫原。用于此类分析的测

定系统包括相对较新的技术发展,诸如四聚体、胞内淋巴因子染色和干扰素释放测定法、或 ELISPOT 测定法。在一个优选的实施方案中,要用肽试剂接触的有免疫能力的细胞可以是抗原呈递细胞,包括树突细胞。

[0288] 例如,本发明的肽可用于四聚体染色测定法,评估外周血单个核细胞在暴露于肿瘤细胞抗原或免疫原后抗原特异性 CTL 的存在。HLA 四聚体复合物可用于直接显现抗原特异性 CTL(参见例如 Ogg et al., Science 279 :2103-2106,1998 ;和 Altman et al, Science 174 :94-96,1996) 和测定抗原特异性 CTL 群体在外周血单个核细胞样品中的频率。使用本发明肽的四聚体试剂可如下文所述来生成。

[0289] 与 HLA 分子结合的肽在相应 HLA 重链和 β 2- 微球蛋白存在下重折叠,生成三分子复合物。在该复合物中,重链的羧基末端在早先引入该蛋白质中的工程化位点处被生物素化。然后,将链霉亲和素添加至复合物以形成由三分子复合物和链霉亲和素组成的四聚体。借助荧光标记的链霉亲和素,四聚体能被用来对抗原特异性细胞染色。然后可例如通过流式细胞术鉴定细胞。此类分析可用于诊断或预后目的。通过该规程鉴定的细胞也可用于治疗目的。

[0290] 本发明还提供了用于免疫回忆应答的试剂(参见例如 Bertoni et al, J. Clin. Invest. 100 :503-513,1997 和 Penna et al., J Exp. Med. 174 :1565-1570,1991),其包括本发明的肽。例如,可使用特定的肽对来自具有要治疗的癌症的个体的患者 PBMC 样品分析抗原特异性 CTL 的存在。含有单个核细胞的血液样品可如下评估:培养 PBMC,并用本发明的肽刺激该细胞。经过适宜的培养期后,可分析扩增的细胞群体的例如 CTL 活性。

[0291] 肽还可作为试剂用于评估疫苗的功效。可使用例如上文所述方法来分析从接种免疫原的患者获得的 PBMC。对患者测定 HLA 型,并选择识别患者中存在的等位基因特异性分子的肽表位试剂进行分析。疫苗的免疫原性可通过 PBMC 样品中表位特异性 CTL 的存在来指示。还可利用本发明的肽,使用本领域公知技术制备抗体(参见例如 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; 和 Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989),所述抗体可作为试剂用于诊断、检测或监测癌症。此类抗体可包括识别 HLA 分子背景中的肽的抗体,即结合肽-MHC 复合物的抗体。

[0292] 或者,本发明还提供了多种用途,本文中描述了其中一些。例如,本发明提供了一种用于诊断或检测以 NEIL3 免疫原性多肽的表达为特征的病症的方法。这些方法涉及测定生物学样品中 NEIL3 HLA 结合肽、或 NEIL3 HLA 结合肽与 I 类 HLA 分子形成的复合物的表达。肽或肽与 I 类 HLA 分子形成的复合物的表达可通过用针对肽或复合物的结合配偶实施测定来测定或检测。在一个优选的实施方案中,针对肽或复合物的结合配偶可以是识别和特异性结合肽的抗体。也可使用 NEIL3 引物通过标准 PCR 扩增程序来测试 NEIL3 在生物学样品(诸如肿瘤活检)中的表达。本文中提供了肿瘤表达的一个例子,而且用于 NEIL3 扩增的例示性条件和引物的进一步公开内容可见于 WO2003/27322。

[0293] 优选地,诊断方法涉及使自受试者分离的生物学样品接触对 NEIL3 HLA 结合肽特异性的试剂以检测 NEIL3 HLA 结合肽在生物学样品中的存在。如本文中使用的,“接触”意味着在适宜的条件(例如浓度、温度、时间、离子强度)下将生物学样品置于足够接近试剂处,以容许试剂和生物学样品中存在的 NEIL3 HLA 结合肽之间的特异性相互作用。一般地,

试剂接触生物学样品的条件是本领域普通技术人员知道的促进生物学样品中分子与其关联物（例如蛋白质与其关联受体、抗体与其关联蛋白抗原、核酸与其关联互补序列）之间的特异性相互作用的条件。用于促进分子与其关联物之间的特异性相互作用的例示性条件记载于授权给 Low 等人的美国专利 No. 5, 108, 921。

[0294] 本发明的诊断方法可以在体外和 / 或在体外实施。因而，生物学样品在本发明中可位于体内或体外。例如，生物学样品可以是体内组织，而且可使用对 NEIL3 免疫原性多肽特异性的试剂来检测此类分子在组织中的存在。或者，可在体外收集或分离生物学样品（例如血液样品、肿瘤活检、组织提取物）。在一个特别优选的实施方案中，生物学样品可以是含有细胞的样品，更优选自要诊断或治疗的受试者收集的含有肿瘤细胞的样品。

[0295] 或者，诊断可借助能够通过荧光素标记的 HLA 多聚体复合物染色直接定量抗原特异性 T 细胞的方法来进行（例如 Altman, J. D. et al., 1996, Science 274:94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330）。还提供了对胞内淋巴因子的染色和干扰素- γ 释放测定法或 ELISPOT 测定法。多聚体染色、胞内淋巴因子染色和 ELISPOT 测定法都表现出比更常规的测定法灵敏至少 10 倍 (Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8:177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186:859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8:413)。也可使用五聚体（例如 US 2004-209295A）、Dextramers (e. g., WO 02/072631)、和 Streptamers（例如 Nature medicine 6. 631-637 (2002)）。

[0296] XI. 抗体

[0297] 本发明进一步提供了能与本发明的肽结合的抗体。优选的抗体特异性地结合本发明的肽且不会结合（或会微弱结合）非本发明的肽。或者，抗体结合本发明的肽及其同源物。针对本发明肽的抗体可用于癌症诊断和预后测定法、及成像方法。类似地，此类抗体可用于其它癌症的治疗、诊断、和 / 或预后，只要癌症患者中也表达或过表达 NEIL3。此外，胞内表达的抗体（例如单链抗体）可在治疗上用于治疗涉及 NEIL3 表达的癌症，诸如例如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。

[0298] 本发明还提供了多种免疫学测定法，用于检测和 / 或定量 NEIL3 蛋白 (SEQ ID NO: 45) 或其片段，包括由选自 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 和 43 的氨基酸序列组成的多肽。此类测定法可根据需要包括一种或多种能够识别和结合 NEIL3 蛋白或其片段的抗 NEIL3 抗体。在本发明中，能与 NEIL3 多肽结合的抗 NEIL3 抗体优选识别由选自 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 和 43 的氨基酸序列组成的多肽。抗体的结合特异性可用抑制测试来确认。即，当抗体与所分析的全长 NEIL3 多肽之间的结合在任何由选自 SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 和 43 的氨基酸序列组成的片段多肽存在下受到抑制时，证明此抗体特异性结合该片段。在本发明中，此类免疫学测定法遵照本领域公知的各种免疫学测定形式来实施，包括但不限于各种类型的放射免疫测定法、免疫层析技术、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、酶联免疫荧光测定法 (ELIFA)、等等。

[0299] 本发明的有关的免疫学的但非抗体的测定法也可包括 T 细胞免疫原性测定法（抑制性的或刺激性的）以及 MHC 结合测定法。另外，本发明还提供了能够检测表达 NEIL3 的癌症的免疫学成像方法，包括但不限于使用经标记本发明抗体的放射闪烁成像方法。此类测定法可用于表达 NEIL3 的癌症的检测、监测、和预后，诸如膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细

胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。

[0300] 本发明还提供了与本发明的肽结合的抗体。本发明的抗体可以以任何形式使用，诸如单克隆或多克隆抗体，而且包括通过用本发明的肽免疫动物诸如家兔而获得的抗血清、所有种类的多克隆和单克隆抗体、及通过遗传重组生成的人抗体和人源化抗体。

[0301] 作为抗原用于获得抗体的本发明的肽可源自任何动物物种，但优选源自哺乳动物，诸如人、小鼠或大鼠，更优选源自人。源自人的肽可以由本文所公开的核苷酸或氨基酸序列获得。

[0302] 根据本发明，用作免疫抗原的肽可以是完整的蛋白质或蛋白质的部分肽。部分肽可以包含例如本发明肽的氨基 (N) 末端或羧基 (C) 末端片段。

[0303] 在本文中，抗体定义为能与 NEIL3 肽的全长或片段起反应的蛋白质。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体能识别 NEIL3 的片段肽，其由选自 SEQID NO :3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 21, 22, 24, 33, 35, 41 和 43 的氨基酸序列组成。用于合成寡肽的方法是本领域公知的。合成后，可任选在作为免疫原使用之前纯化肽。在本发明中，寡肽（例如 9 或 10 聚物）可缀合或连接有载体以增强免疫原性。匙孔螯血蓝蛋白 (KLH) 作为载体是公知的。用于缀合 KLH 和肽的方法也是本领域公知的。

[0304] 或者，可以将编码本发明肽或其片段的基因插入已知的表达载体，然后用该载体转化本文所述的宿主细胞。可以通过任何标准方法从宿主细胞外部或内部回收所需肽或其片段，然后可将其用作抗原。或者，表达肽的完整细胞或其溶胞物或者化学合成的肽也可用作抗原。

[0305] 可以用抗原免疫任何哺乳动物，但优选考虑与用于细胞融合的亲本细胞的相容性。通常可使用啮齿目 (Rodentia)、兔形目 (Lagomorpha) 或灵长目 (Primate) 的动物。啮齿目动物包括例如小鼠、大鼠和仓鼠。兔形目动物包括例如家兔。灵长目动物包括例如狹鼻猿 (Catarrhini) (东半球猴 (old world monkey)) 诸如食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)、恒河猴 (rhesus monkey)、狒狒 (sacred baboon) 和黑猩猩 (chimpanzee)。

[0306] 用抗原免疫动物的方法是本领域已知的。腹膜内注射或皮下注射抗原是免疫哺乳动物的标准方法。更具体的说，可以在适量的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、生理盐水等中稀释和悬浮抗原。如果需要，可将抗原悬浮液与适量的标准佐剂诸如弗氏 (Freund) 完全佐剂混合，制成乳状液，然后施用于哺乳动物。优选的是，其后每 4-21 天施用数次与适量弗氏不完全佐剂混合的抗原。还可使用适宜的载体进行免疫。如上所述进行免疫后，通过标准方法检验血清中所需抗体的量的增加。

[0307] 可以如下制备针对本发明肽的多克隆抗体：从经过免疫的哺乳动物（该哺乳动物经检验其血清中所需抗体增加）收集血液，并通过任何常规方法从血液中分离血清。多克隆抗体包括含有多克隆抗体的血清，以及可从所述血清中分离的、含有该多克隆抗体的级分。可以使用例如偶联有本发明肽的亲合柱从仅识别本发明肽的级分中制备免疫球蛋白 G 或 M，并进一步使用蛋白 A 或蛋白 G 柱纯化该级分。

[0308] 为了制备单克隆抗体，从经过抗原免疫并如上所述检查出血清中所需抗体水平升高的哺乳动物收集免疫细胞，并进行细胞融合。用于细胞融合的免疫细胞可优选获自脾。其它要与上述免疫细胞融合的优选的亲本细胞包括例如哺乳动物的骨髓瘤细胞，更优选具有

为了用药物选择融合细胞而获得的特性的骨髓瘤细胞。

[0309] 根据已知的方法,例如 Milstein 等 (Galfre 和 Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46(1981)) 的方法,可与将上述免疫细胞与骨髓瘤细胞进行融合。

[0310] 通过在标准选择培养基诸如 HAT 培养基 (含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基) 中进行培养,可以选择出由细胞融合得到的杂交瘤。通常,细胞培养在 HAT 培养基中连续进行数天至数周,这段时间足以使除了所需杂交瘤之外的所有其它细胞 (非融合的细胞) 死亡。然后,可进行标准有限稀释 (standard limiting dilution) 来筛选和克隆生成所需抗体的杂交瘤细胞。

[0311] 除了上述用抗原免疫非人动物来制备杂交瘤的方法外,还可以在体外用肽、表达肽的细胞或其溶胞物免疫人淋巴细胞,诸如那些感染了 EB 病毒的人淋巴细胞。然后,使经过免疫的淋巴细胞与能够无限分裂的人衍生骨髓瘤细胞诸如 U266 融合,以产生生成所需的能够与所述肽结合的人抗体的杂交瘤 (已公开但未审查的日本专利申请 No. Sho 63-17688)。

[0312] 随后将所得杂交瘤移植入小鼠腹腔,并抽取腹水。所得单克隆抗体可通过例如硫酸铵沉淀、蛋白 A 或蛋白 G 柱、DEAE 离子交换层析或偶联有本发明肽的亲合柱进行纯化。本发明的抗体不仅可用于纯化和检测本发明的肽,还可以用作本发明肽的激动剂和拮抗剂的候选物。

[0313] 或者,可以通过癌基因使生成抗体的免疫细胞,诸如经过免疫的淋巴细胞永生代,并用于制备单克隆抗体。

[0314] 如此获得的单克隆抗体也可以使用遗传工程技术来重组制备 (参见例如 Borrebaeck and Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, published in the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD(1990))。例如,可以从生成抗体的免疫细胞诸如杂交瘤或经免疫淋巴细胞克隆编码抗体的 DNA,将该 DNA 插入合适的载体,并导入宿主细胞以制备重组抗体。本发明还提供了如上所述制备的重组抗体。

[0315] 此外,本发明的抗体可以是抗体片段或经过修饰的抗体,只要它能结合一种或多种本发明的肽。例如,抗体片段可以是 Fab、F(ab')₂、Fv 或将来自 H 链和 L 链的 Fv 片段通过合适的接头连接而成的单链 Fv(scFv) (Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-83(1988))。更具体的说,可以通过用酶诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体来生成抗体片段。或者,可以构建编码抗体片段的基因,将其插入表达载体,并在合适的宿主细胞中表达 (参见例如 Co et al., *J Immunol* 152:2968-76(1994); Better and Horwitz, *Methods Enzymol* 178:476-96(1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol* 178:497-515(1989); Lamoyi, *Methods Enzymol* 121:652-63(1986); Rousseaux et al., *Methods Enzymol* 121:663-9(1986); Bird and Walker, *Trends Biotechnol* 9: 132-7(1991))。

[0316] 抗体可以通过与多种分子诸如聚乙二醇 (PEG) 缀合来修饰。本发明提供了这样的修饰抗体。可通过化学修饰抗体来获得修饰抗体。这些修饰方法是本领域常规的。

[0317] 或者,可以以衍生自非人抗体的可变区与衍生自人抗体的恒定区之间的嵌合抗体或者包含衍生自非人抗体的互补决定区 (CDR)、衍生自人抗体的框架区 (FR) 及恒定区的人源化抗体的形式来获得本发明的抗体。此类抗体可依照已知技术来制备。人源化可通过

用啮齿类的 CDR 或 CDR 序列替换人抗体的相应序列来进行（参见例如 Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)）。因而，此类人源化抗体是嵌合抗体，其中完整人可变域的一小部分已被来自非人物种的相应序列所替换。

[0318] 也可以使用在人框架区和恒定区外还包含人可变区的完全人的抗体。此类抗体可使用本领域已知的多种技术来制备。例如，体外方法涉及使用展示在噬菌体上的人抗体片段的重组文库（例如 Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)）。类似地，可通过将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物，例如内源免疫球蛋白基因已被部分或完全灭活的小鼠，来生成抗体。该方法记载于例如美国专利 Nos. 6,150,584; 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016。

[0319] 可以将如上获得的抗体纯化至同质。例如，可依照用于一般蛋白质的分离和纯化方法进行抗体的分离和纯化。例如，可以通过适当选择和组合使用柱层析诸如亲和层析、过滤、超滤、盐析、透析、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦来分出和分离抗体 (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow 和 David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))，但并不局限于此。蛋白 A 柱和蛋白 G 柱可以用作亲和柱。例示性的可使用的蛋白 A 柱包括例如 Hyper D、POROS 和 Sepharose F.F. (Pharmacia)。

[0320] 除亲和层析外的例示性层析包括例如离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤、反相层析、吸附层析、等等 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。可以通过液相层析来进行层析规程，诸如 HPLC 和 FPLC。

[0321] 例如，可使用吸光度测量、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、酶免疫测定法 (EIA)、放射免疫测定法 (RIA) 和 / 或免疫荧光来测量本发明抗体的抗原结合活性。在 ELISA 中，将本发明的抗体固定化在板上，将本发明的肽施加到该板上，再施加含有所需抗体的样品，诸如生成抗体的细胞的培养物上清液或纯化的抗体。然后施加用酶（诸如碱性磷酸酶）标记的、识别第一抗体的第二抗体，并将板温育。接着，在洗涤后，向板中加入酶底物，诸如磷酸对硝基苯酯，并测量吸光度以评估样品的抗原结合活性。可以使用肽的片段，诸如 C- 末端或 N- 末端片段作为抗原来评估抗体的结合活性。可以使用 BIAcore (Pharmacia) 来评估本发明抗体的活性。

[0322] 上述方法允许通过将本发明的抗体暴露于认为含有本发明肽的样品，并检测或测量由抗体与肽形成的免疫复合物，来检测或测量本发明的肽。

[0323] 因为依照本发明的肽检测或测量方法可特异性的检测或测量肽，所以该方法可用于使用肽的各种实验。

[0324] XII. 载体和宿主细胞

[0325] 本发明还提供了导入有编码本发明肽的核苷酸的载体和宿主细胞。本发明的载体可用于在宿主细胞中维持本发明的核苷酸、尤其是 DNA，用于表达本发明的肽，或者用于施用本发明的核苷酸以用于基因疗法。

[0326] 当宿主细胞为大肠杆菌且在大肠杆菌（例如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue）中大量扩增和生成载体时，载体应具有能在大肠杆菌中扩增的“（复制）起点”和用于选择经过转化的大肠杆菌的标志基因（例如通过药物诸如氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素等进行选择的药物抗性基因）。例如，可以使用 M13 系列载体、pUC 系列载体、pBR322、

pBluescript、pCR-Script 等。另外,除了上述载体,pGEM-T、pDIRECT 和 pT7 也可以用于亚克隆和提取 cDNA。当使用载体来生成本发明的蛋白质时,可使用表达载体。例如,要在大肠杆菌中表达的载体应具备上述在大肠杆菌中扩增的特征。当使用大肠杆菌诸如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue 作为宿主细胞时,载体应具有能在大肠杆菌中高效表达所需基因的启动子,例如 lacZ 启动子 (Ward et al., Nature 341:544-6(1989);FASEB J 6:2422-7(1992))、araB 启动子 (Better et al., Science 240:1041-3(1988))、T7 启动子等。在这方面,可以使用例如 pGEX-5X-1 (Pharmacia)、“QIAexpress 系统”(Qiagen)、pEGFP 和 pET(在这种情况下,宿主优选为表达 T7RNA 聚合酶的 BL21) 来替代上述载体。另外,载体还可以包含用于肽分泌的信号序列。指导肽分泌至大肠杆菌周质的例示性信号序列有 pelB 信号序列 (Lei et al., J Bacteriol 169:4379(1987))。用于将载体导入靶宿主细胞的手段包括例如氯化钙法和电穿孔法。

[0327] 除了大肠杆菌外,可以使用例如衍生自哺乳动物的表达载体(例如 pcDNA3 (Invitrogen) 和 pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17):5322(1990))、pEF、pCDM8)、衍生自昆虫细胞的表达载体(例如“Bac-to-BAC 杆状病毒表达系统”(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、衍生自植物的表达载体(例如 pMH1、pMH2)、衍生自动物病毒的表达载体(例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、衍生自逆转录病毒的表达载体(例如 pZIpneo)、衍生自酵母的表达载体(例如“毕赤酵母表达试剂盒”(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)及衍生自枯草芽孢杆菌的表达载体(例如 pPL608、pKTH50)来生成本发明的多肽。

[0328] 为了在动物细胞诸如 CHO、COS 或 NIH3T3 细胞中表达载体,载体应具有在所述细胞中进行表达所必需的启动子,例如 SV40 启动子 (Mulligan et al., Nature 277:108(1979))、MLLV-LTR 启动子、EF1 α 启动子 (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18:5322(1990))、CMV 启动子、等等,及优选用于选择转化子的标志基因(例如通过药物(例如新霉素、G418)进行选择的药物抗性基因)。具有这些特征的已知载体的例子包括例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 和 pOP13。

[0329] XIII. 诊断癌症的方法

[0330] 本发明还提供了一种诊断癌症的方法。发现 NEIL3 的表达在数类癌细胞中特异性升高(表 1 和图 5)。因此,本文中鉴定的基因以及它们的转录和翻译产物可在诊断上用作癌症标志物,而且通过测量 NEIL3 在生物学样品(例如细胞样品)中的表达,能诊断癌症。具体地,本发明提供了一种通过测定 NEIL3 在受试者中的表达水平来诊断癌症的方法。通过本发明方法能诊断的癌症包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。进一步,NSCLC(包括肺的腺癌和肺的鳞状细胞癌(SCC))也可利用本发明来诊断或检测。

[0331] 根据本发明,可提供用于检查受试者状况的中间结果。所述中间结果可与其它信息结合起来以协助医生、护士或其它从业人员诊断受试者罹患所述疾病。或者,本发明可用于检测源自受试者的组织中的癌性细胞,并给医生提供有用信息来诊断受试者患有所述疾病。

[0332] 具体地,本发明提供了下述方法 [1] 至 [10]:

[0333] [1] 一种诊断癌症的方法,所述方法包括下述步骤:

- [0334] (a) 检测生物学样品中编码 NEIL3 氨基酸序列的基因的表达水平 ;并
- [0335] (b) 将检测到的表达水平相比于该基因的正常对照水平的升高与疾病的存在关联起来。
- [0336] [2][1] 的方法,其中所述表达水平比正常对照水平高至少 10%。
- [0337] [3][1] 的方法,其中所述表达水平通过选自下组的方法检测 :
- [0338] (a) 检测包含 NEIL3 序列的 mRNA ;
- [0339] (b) 检测包含 NEIL3 氨基酸序列的蛋白质 ;和
- [0340] (c) 检测包含 NEIL3 氨基酸序列的蛋白质的生物学活性。
- [0341] [4][1] 的方法,其中所述癌症选自膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML。
- [0342] [5][3] 的方法,其中所述表达水平是通过检测探针与基因的基因转录物的杂交确定的。
- [0343] [6][3] 的方法,其中检测所述表达水平是通过检测抗体与基因编码的蛋白的结合作为所述基因的表达水平。
- [0344] [7][1] 的方法,其中所述生物样品包括活检、痰、血液、胸腔积液或尿液。
- [0345] [8][1] 的方法,其中所述源自受试者的生物样品包含上皮细胞。
- [0346] [9][1] 的方法,其中所述源自受试者的生物样品包含癌细胞。
- [0347] [10][1] 的方法,其中所述源自受试者的生物样品包含癌性上皮细胞。
- [0348] 或者,本发明提供了一种用于检测或鉴定源自受试者的组织样品中癌细胞的方法,所述方法包括测定源自受试者的生物样品中 NEIL3 基因表达水平的步骤,其中所述表达水平与所述基因的正常对照水平相比的升高指示组织中存在或怀疑存在癌细胞。
- [0349] 此类结果可以与别的信息组合来帮助医生、护士、或其它卫生从业人员诊断受试者患有疾病。换言之,本发明可以给医生提供有用信息来诊断受试者患有疾病。例如,依照本发明,当关于自受试者获得的组织中癌细胞的存在有疑问时,通过考虑 NEIL3 基因的表达水平,加上疾病的不同方面,包括组织病理学、血液中的已知肿瘤标志物的水平、和受试者的临床过程等,能做出临床决策。
- [0350] 例如,血液中一些公知的膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML 诊断标志物如下 :
- [0351] 膀胱癌 :SCC, TPA 或 IAP
- [0352] 乳腺癌 :BCA225, TPA, CEA, IAP 或 CA15-3
- [0353] 宫颈癌 :SCC, TPA 或 CA125
- [0354] 胆管细胞癌 :CA19-9 或 CEA
- [0355] 结肠直肠癌 :CEA
- [0356] 子宫内膜异位症 :CA125
- [0357] 食道癌 :CEA, DUPAN-2, IAP, NSE, SCC, SLX 或 Span-1
- [0358] 肝癌 :AFP 或 ICDH
- [0359] NSCLC :CEA

[0360] 骨肉瘤 :ALP

[0361] 胰腺癌 :BFP, CA19-9, CA125 或 CEA

[0362] 前列腺癌 :PSA 或 PAP

[0363] 肾细胞癌 :IAP

[0364] SCLC :ProGRP 或 NSE

[0365] AML :TK 活性

[0366] CML :TK 活性

[0367] 就是说,在本发明的这个具体实施方案中,基因表达分析的结果作为中间结果,用于进一步诊断受试者的疾病状态。

[0368] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于检测癌症的诊断标志物的方法,所述方法包括检测 NEIL3 基因作为膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜异位症、食道癌、肝癌、NSCLC、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、SCLC、软组织肿瘤、AML 和 CML(但不限于此)的诊断标志物在源自受试者的生物样品中的表达的步骤。

[0369] 诊断癌症的方法将在下面更加详细的加以叙述。

[0370] 需用本方法诊断的受试者优选为哺乳动物。例示性的哺乳动物包括但不限于例如人类、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马、和牛。

[0371] 为实施诊断,优选从要诊断的受试者采集生物样品。任何生物学材料均可作为生物样品用于测定,只要其包括目标的 NEIL3 转录或翻译产物。所述生物样品包括但不限于身体组织与体液,例如血液、痰与尿液。在一些实施方案中,生物样品含有这样的细胞群体,该群体包括上皮细胞,较优选癌性上皮细胞或源自怀疑为癌性的组织的上皮细胞。进一步,如果必要,可从所得的身体组织与体液中纯化所述细胞,并将其用为生物样品。

[0372] 根据本发明,测定在所述源自受试者的生物样品中 NEIL3 的表达水平。表达水平可在转录(核酸)产物水平确定,使用本领域已知方法。举例而言,NEIL3 的 mRNA 可通过杂交方法(例如,Northern 杂交)使用探针定量。可在芯片或阵列上实施所述检测。对检测多个基因(例如,多种癌症特异性基因),包括 NEIL3,的表达水平而言,优选使用阵列。本领域技术人员可利用 NEIL3(SEQ ID NO:44;GenBank 登录号:NM_018248)的序列信息制备上述探针。举例而言,NEIL3 的 cDNA 可用作探针。如需要,所述探针可用合适的标记物来标志,例如染料、荧光和同位素,且所述基因的表达水平可以作为发生了杂交的标记物的强度来检测。

[0373] 进一步,NEIL3 的转录产物可通过基于扩增的检测方法(例如,RT-PCR)使用引物定量。上述引物亦可基于所述基因的可得序列信息制备。举例而言,用于实施例的引物(SEQ ID NO:46 和 47)可用于通过 RT-PCR 或 Northern 印迹的检测,但本发明并不限于此。

[0374] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、中等条件或低严格条件下与 NEIL3 的 mRNA 杂交。

[0375] 或者,可以检测翻译产物以进行本发明的诊断。例如,可以确定 NEIL3 蛋白的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括使用特异识别所述蛋白的抗体的免疫测定法。所述抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰(例如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)均可用于检测,只要该片段保留对 NEIL3 蛋白的结合能力即可。制备这些种类的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的,并且在本发明中可以使用任何方

法制备这些抗体和它们的等价物。

[0376] 作为另一种基于其翻译产物来检测 NEIL3 基因表达水平的方法,可利用针对 NEIL3 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析观察其染色的强度。意即,观察到强染色表明所述蛋白质的存在增加,同时表明 NEIL3 基因的高表达水平。

[0377] 另外,除了 NEIL3 基因的表达水平外,亦可确定其它癌症相关基因(例如已知在癌症中差异表达的基因)的表达水平以提高所述诊断的准确度。

[0378] 癌症标志物基因包括 NEIL3 基因在生物样品中的表达水平如果较之相应癌症标志物的对照水平增加了例如 10%、25% 或 50% 的话,或增加到超过 1.1 倍、超过 1.5 倍、超过 2.0 倍、超过 5.0 倍、超过 10.0 倍或者更多,可确定该水平是增加的。

[0379] 对照水平可以与测试生物样品同时确定,使用先前从疾病状态(癌性或非癌性)已知的受试者收集和保存的样品。或者,对照水平可以借助统计方法,根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 NEIL3 基因表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以是来自先前测试过的细胞的表达样式数据库。而且,根据本发明的一个方面,可以将生物样品中 NEIL3 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用从来自与源自患者的生物样品组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中 NEIL3 基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm 2S.D.$ 或平均值 $\pm 3S.D.$ 的范围可以用作标准值。

[0380] 当 NEIL3 基因的表达水平相比正常对照水平有所提高或与癌性对照水平相似,则受试者可诊断为患有或有风险发生癌症。进一步,在比较多种癌症相关基因的表达水平的情况中,样品与癌性参照之间基因表达样式的相似性表明受试者患有或有风险形成癌症。

[0381] 测试生物样品的表达水平与对照水平间的差异,可以相对于已知表达水平不会随着细胞的癌性或非癌性状态改变的对照核酸(例如持家基因)的表达水平加以标准化。例示性的对照基因包括但不限于 β -肌动蛋白、甘油醛-3 磷酸脱氢酶、和核糖体蛋白 P1。

[0382] 下文描述了合适的方法和材料,尽管在实施或检验本发明时可以使用与本文中描述的方法和材料相似或等同的方法和材料。通过述及完整收录本文中提及的所有出版物、专利申请、专利、和其它参考文献。若有冲突,以本说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法、和实施例只是例示性的,而且并非意图为限制性的。

[0383] 在下述实施例中会进一步描述本发明,它们不限制在权利要求书中描述的发明范围。

[0384] 实施例

[0385] 材料和方法

[0386] 细胞系

[0387] T2(HLA-A2)、人 B- 淋巴母细胞样细胞系、COS7 和非洲绿猴肾细胞系购自 ATCC,而 PSCCA0922(HLA-*A0206) 购自日本健康科学基金会。TISI,HLA-A*2402 阳性 B- 淋巴母细胞样细胞系购自 IHWG Cell and Gene Bank(Seattle, WA)。

[0388] NEIL3 衍生肽的候选者的选择

[0389] 使用结合预测软件" BIMAS" (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) 预测了 NEIL3 衍生的结合 HLA-A*0201 分子的 9 聚物和 10 聚物肽 (Parker et al. (JImmunol

1994,152(1):163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001,98(6):1872-81))。使用 " NetMHC3.0 " 结合预测服务器 (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) 预测了 NEIL3 衍生的结合 HLA-A*2402 分子的 9 聚物和 10 聚物肽 (Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84,2003), Nielsen et al. (Protein Sci.,12:1007-17,2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97,2004))。由 Biosynthesis Inc. (Lewisville, TX) 依照标准固相合成法合成了这些肽,并通过反相高效液相层析 (HPLC) 进行了纯化。分别通过分析性 HPLC 和质谱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℃。

[0390] 体外 CTL 诱导

[0391] 使用单核细胞衍生树突细胞 (DC) 作为抗原呈递细胞 (APC) 来诱导针对人白细胞抗原 (HLA) 上呈递的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。如别处 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15,63(14):4112-8) 所述在体外生成 DC。具体而言,将用 Ficoll-Plaque (Pharmacia) 溶液自正常志愿者 (HLA-A*0201 或 HLA-A*0206 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,将细胞因子诱导的 DC 在 AIM-V 培养基中在 3 微克/ml β 2-微球蛋白存在下用 20 微克/ml 每一种合成肽于 37℃ 冲激 3 小时。所生成的细胞表现上在它们的细胞表面上表达 DC 相关分子,诸如 CD80、CD83、CD86 和 II 类 HLA (数据未显示)。然后将这些经肽冲激的 DC 通过 X 辐照 (20Gy) 灭活,并以 1:20 比例与用 CD8 阳性分离试剂盒 (Dyna1) 通过正选择获得的自体 CD8+T 细胞混合。在 48 孔板 (Corning) 中设立这些培养物;每个孔在 0.5ml AIM-V/2% AS 培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的 DC、 3×10^5 个 CD8+T 细胞和 10ng/ml IL-7 (R&D System)。3 天后,给这些培养物补充 IL-2 (CHIRON) 至终浓度 20IU/ml。在第 7 天和第 14 天,将 T 细胞用自体肽冲激的 DC 进一步刺激。每次以与上文所述相同的方式来制备 DC。在第 21 天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的 T2 或 PSCCA0922 细胞的 CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5,84(1):94-9;Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20,84(8):1052-7;Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006 May,97(5):411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug,96(8):498-506)。

[0392] CTL 扩增规程

[0393] 使用与 Riddell 等人 (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19,333(16):1038-44;Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb,2(2):216-23) 记载的方法相似的方法在培养中扩增 CTL。将总共 5×10^4 个 CTL 在 25ml AIM-V/5% AS 培养基中悬浮,其中有在 40ng/ml 抗 CD3 单克隆抗体 (Pharmingen) 存在下经 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;Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20,84(8):1052-7;Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15,10(24):8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006

May,97(5):411-9;Watanabe T et al.,Cancer Sci 2005 Aug,96(8):498-506)。

[0394] CTL 克隆的建立

[0395] 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。在总共 150 微升/孔的含 5% AS 的 AIM-V 培养基中,将 CTL 与 1×10^4 个细胞/孔的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml 的抗 CD3 抗体、和 125U/ml 的 IL-2 一起培养。10 天后向培养基中加入 50 微升/孔的 IL-2 以达到终浓度 125U/ml 的 IL-2。在第 14 天测试 CTL 活性,并使用如上所述的相同方法扩增 CTL 克隆 (Uchida N et al.,Clin Cancer Res 2004Dec 15,10(24):8577-86;Suda T et al.,Cancer Sci 2006 May,97(5):411-9;Watanabe T et al.,Cancer Sci 2005Aug,96(8):498-506)。

[0396] 特异性 CTL 活性

[0397] 为了检查特异性 CTL 活性,实施了干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定法和 IFN- γ 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。具体而言,制备经肽冲激的 T2 (1×10^4 /孔) 作为刺激细胞。使用 48 孔中培养细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施 IFN- γ ELISPOT 测定法和 IFN- γ ELISA 测定法。

[0398] 质粒转染

[0399] 通过 PCR 来扩增编码靶基因可读框、HLA-A*0201、HLA-A*0206 或 HLA-A*2402 的 cDNA。将 PCR 扩增产物克隆入载体。使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 依照制造商推荐的规程将质粒转染入 COS7,一种靶基因和 HLA-A2 和 A24 阴性细胞系。自转染起 2 天后,用 Versene (Invitrogen) 收获经转染的细胞,并用作 CTL 活性测定法的靶细胞 (5×10^4 个细胞/孔)。

[0400] 半定量 RT-PCR 分析

[0401] 用 Qiagen RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 或 Trizol 试剂 (Life Technologies, Inc.) 依照制造商的方案提取总 RNA。使用 poly dT12-18 引物 (Amersham Pharmacia Biotech) 及 Superscript II 逆转录酶 (Life Technologies) 将 10 微克等份的总 RNA 逆转录成单链 cDNA。稀释每一份单链 cDNA 制备物供后续 PCR 扩增,PCR 扩增遵照标准 RT-PCR 实验,在 12 微升体积的 PCR 缓冲液 (TAKARA) 中进行。在 GeneAmp PCR 系统 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA) 中进行扩增,4min94℃变性,接着是 28 个循环的 94℃ 30s、60℃ 30s、和 72℃ 60s。用于 NEIL3 的引物序列为正向:5' -TTGGTCCTCCTCTGTTTCATAGA-3' (SEQ ID NO:46);反向:5' -GCTTCTCCCCAGTTACAAGAGAC-3' (SEQ ID NO:47)。

[0402] 结果

[0403] 癌症中增强的 NEIL3 表达

[0404] 使用 cDNA 微阵列自多种癌症获得的全局基因表达谱数据揭示了 NEIL3 (GenBank 登录号 NM_018248;SEQ ID No:44) 的表达升高。NEIL3 表达在 4/20 例 AML、5/6 例膀胱癌、10/11 例乳腺癌、8/8 例宫颈癌、1/1 例胆管细胞癌、12/12 例 CML、3/6 例结肠直肠癌、1/1 例子宫内膜异位症、4/8 例食道癌、6/10 例肝癌、7/7 例 NSCLC、16/16 例骨肉瘤、1/1 例胰腺癌、10/10 例前列腺癌、2/2 例肾癌、12/12 例 SCLC 和 12/12 例软组织肿瘤中与相应正常组织相比确实升高了 (表 1)。

[0405] 表 1

[0406] 在癌性组织中与正常相应组织相比观察到 NEIL3 上调的病例之比

[0407]

癌症	比
AML	4/20
膀胱癌	5/6
乳腺癌	10/11
宫颈癌	8/8
胆管细胞癌	1/1
CML	12/12
结肠直肠癌	3/6
子宫内膜异位症	1/1
食道癌	4/8
肝癌	6/10
NSCLC	7/7
骨肉瘤	16/16
胰腺癌	1/1
前列腺癌	10/10
肾癌	2/2
SCLC	12/12
软组织肿瘤	12/12

[0408] (实验 1)

[0409] NEIL3 衍生的 HLA-A2 结合肽的预测

[0410] 表 2 以高结合亲和力的次序显示 NEIL3 的 HLA-A2 结合肽。选择并检查了总共 23 种具有潜在 HLA-A2 结合能力的肽以确定表位肽 (表 2)。

[0411] 表 2

[0412] 衍生自 NEIL3 的 HLA-A2 结合性肽

[0413]

	起始位置	序列	得分	SEQ ID NO.
NEIL3-A2-9聚物	64	VLSLFNGYV	321.3	1
	84	FMYFGPKAL	227.1	2
	585	KQC�FFQWA	70.0	3
	127	LICFFDSSV	61.8	4
	416	FQNSPPASV	32.4	5
	71	YVYSGVETL	31.0	6
	41	RLAASTVVV	28.5	7
	34	SLQGRALRL	21.4	8
	298	IISWTSSRV	16.3	9
	291	KLPTNTII	15.0	10
	271	RMTYFCPHC	13.6	11
	492	NMTDGPRTL	12.7	12
NEIL3-A2-10聚物	18	VLPGQAVTGV	271.9	13
	212	QLTDEQIHHL	201.4	14
	198	ALFDSGLHPA	173.3	15
	181	LMDQNVLPV	78.6	16
	340	CLTSRPIDSV	78.4	17
	239	GLALSKHYKV	69.6	18
	55	ALNNDSSQNV	69.6	19
	63	NVLSLFNGYV	61.2	20
	590	FQWAENGPGI	40.4	21
	378	KINRKTAFGT	20.8	22
	569	GPNNGKNFFV	14.5	23

[0414] 起始位置指自 NEIL3N 端起的氨基酸残基数。

[0415] 结合得分来自“BIMAS”

[0416] 来自 NEIL3 的预测的 HLA-A*0201 或 0206 限制型肽的 CTL 诱导和经 NEIL3 衍生肽刺激的 CTL 系的建立

[0417] 依照“材料和方法”中描述的方案为那些自 NEIL3 衍生的肽产生了 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法来测定肽特异性 CTL 活性 (图 1a-j)。显示了用 NEIL3-A2-9-585 (SEQ ID NO:3) 刺激的 8 号孔 (a)、用 NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO:4) 刺激的 2 号孔 (b)、用 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5) 刺激的 4 号和 5 号孔 (c)、用 NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO:6) 刺激的 3 号孔 (d)、用 NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO:11) 刺激的 1 号孔 (e)、用 NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO:15) 刺激的 3 号孔 (f)、用 NEIL3-A2-10-340 (SEQ ID NO:17) 刺激的 1 号孔 (g)、用 NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO:21) 刺激的 2 和 3 号孔 (h) 及用 NEIL3-A2-10-378 (SEQ ID NO:22) 刺激的 6 号孔 (i) 展现出与对照孔相比强力的 IFN- γ 生成。另外,用 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5) 刺激的 9 号、10 号、12 号和 13 号孔 (j) 展现出针对肽刺激的 A0206 阳性 PSCCA0922 细胞强力的 IFN- γ 生成。另外,将

用 NEIL3-A2-9-585 (SEQ ID NO:3) 刺激的 8 号阳性孔、用 NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO:4) 刺激的 2 号阳性孔、用 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5) 刺激的 4 号和 5 号阳性孔、用 NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO:6) 刺激的 3 号阳性孔、用 NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO:11) 刺激的 1 号阳性孔、用 NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO:15) 刺激的 3 号阳性孔及用 NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO:21) 刺激的 2 号和 3 号阳性孔中的细胞扩增并建立为 CTL 系, 并且还将用 NEIL3-A2-9-416 (对 A0206) (SEQ ID NO:5) 刺激的 10 号和 12 号阳性孔中的细胞扩增并建立为 CTL 系。通过 IFN- γ ELISA 测定法测定了那些 CTL 系的 CTL 活性 (图 2a-k)。显示了与未经肽冲激的靶细胞相比所有 CTL 系针对经相应肽冲激的靶细胞均展现出强力的 IFN- γ 生成。另一方面, 用表 2 中显示的其它肽刺激未能建立 CTL 系, 尽管那些肽可能具有对 HLA-A*0201 的结合活性 (数据未显示)。结果, 指示了 7 种 NEIL3 衍生肽被筛选为能诱导强 CTL 系的肽。

[0418] 针对 NEIL3 特异性肽的 CTL 克隆的建立

[0419] 如“材料和方法”中所述, 通过有限稀释自 CTL 系建立了 CTL 克隆, 并通过 IFN- γ ELISA 测定法测定了来自 CTL 克隆的针对经肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。在图 3 中确定了来自经 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:21 刺激的 CTL 克隆的强力的 IFN- γ 生成。

[0420] 针对外源表达 NEIL3 与 HLA-A*0201 或 HLA-A*0206 的靶细胞的特异性 CTL 活性

[0421] 检查针对这些肽产生的建成 CTL 系识别内源表达 NEIL3 和 HLA-A*0201 或 HLA-A*0206 分子的靶细胞的能力。使用用相应肽产生的 CTL 系作为效应细胞测试了针对用全长 NEIL3 和 HLA-A*0201 或 HLA-A*0206 分子基因二者转染的 COS7 细胞 (一种外源表达 NEIL3 和 HLA-A*0201 或 HLA-A*0206 基因的靶细胞的特异性模型) 的特异性 CTL 活性。制备了用全长 NEIL3、HLA-A*0201 或 HLA-A*0206 基因中任一者转染的 COS7 细胞作为对照。在图 4 中, 经 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:15 刺激的 CTL 针对表达 NEIL3 和 HLA-A*0201 二者的 COS7 细胞显示出强的 CTL 活性, 而且经 SEQ ID NO:5 刺激的 CTL 针对表达 NEIL3 和 HLA-A*0206 二者的 COS7 细胞也显示出强的 CTL 活性。另一方面, 没有检测到显著的针对对照的特异性 CTL 活性。因此, 这些数据清楚地证明 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5)、NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO:6) 和 NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO:15) 与 HLA-A*0201 分子一起在靶细胞上天然表达, 并被 CTL 识别, 而且 NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5) 也与 HLA-A*0206 分子一起在靶细胞上天然表达, 并被 CTL 识别。这些结果指示这些 NEIL3 衍生肽可适用于癌症疫苗用于具有表达 NEIL3 的肿瘤的患者。

[0422] 对抗原肽的同源性分析

[0423] 经 NEIL3-A2-9-585 (SEQ ID NO:3)、NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO:4)、NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5)、NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO:6)、NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO:11)、NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO:15)、NEIL3-A2-10-340 (SEQ ID NO:17)、NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO:21) 和 NEIL3-A2-10-378 (SEQ ID NO:22) 刺激的 CTL 显示出显著的且特异性的 CTL 活性。这个结果可能是由于 NEIL3-A2-9-585 (SEQ ID NO:3)、NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO:4)、NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO:5)、NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO:6)、NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO:11)、NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO:15)、NEIL3-A2-10-340 (SEQ ID NO:17)、NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO:21) 和

NEIL3-A2-10-378 (SEQ ID NO :22) 的序列与自其它已知可使人免疫系统致敏的分子的衍生的肽同源而导致的。为了排除这种可能性,使用 BLAST 算法 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有揭示具有显著同源性的序列。同源性分析的结果指示 NEIL3-A2-9-585 (SEQ ID NO :3)、NEIL3-A2-9-127 (SEQ ID NO :4)、NEIL3-A2-9-416 (SEQ ID NO :5)、NEIL3-A2-9-71 (SEQ ID NO :6)、NEIL3-A2-9-271 (SEQ ID NO :11)、NEIL3-A2-10-198 (SEQ ID NO :15)、NEIL3-A2-10-340 (SEQ ID NO :17)、NEIL3-A2-10-590 (SEQ ID NO :21) 和 NEIL3-A2-10-378 (SEQ ID NO :22) 的序列是独特的,而且,因此,就我们所知,这些分子产生不期望的对一些无关分子的免疫学应答的可能性很小。

[0424] 总之,鉴定了自 NEIL3 衍生的新型 HLA-A2 表位肽。另外,证明了 NEIL3 的表位肽可应用于癌症免疫疗法。

[0425] NEIL3 在广泛的人类癌症中升高的表达

[0426] 后续的半定量 RT-PCR 分析揭示了 8 份进行微阵列分析的 ICC 中 7 份有增强的 NEIL3 表达 (图 5a)。

[0427] 为了确认这种基因在肝癌中的表达样式,发明人使用临床肝癌标本和正常人组织 (包括正常肝细胞) 实施了半定量 RT-PCR 分析。结果,发明人发现了与 NEIL3 在 7/8 份临床肝癌标本 (分化较差的损害) 中的表达与正常肝细胞相比升高 (图 5a),而且在 5/5 种 HCC 细胞系中过表达且在其它正常组织中不表达 (图 5b)。

[0428] (实验 2)

[0429] NEIL3 衍生的 HLA-A24 结合肽的预测

[0430] 表 3a 和 3b 以高结合亲和力的次序显示 NEIL3 的 HLA-A24 结合 9 聚物和 10 聚物肽。选择并检查了总共 21 种具有潜在的 HLA-A24 结合能力的肽以确定表位肽。

[0431] 表 3

[0432] 自 NEIL3 衍生的 HLA-A24 结合性 9 聚物肽

[0433]

起始位置	氨基酸序列	Kd (nM)	SEQ ID NO
545	EWADLSFPF	10	24
364	KYPCNTFGK	314	25
320	HWTCVVCTL	456	26
86	YFGPKALRI	779	27
60	SSQNVLSLF	878	28
591	QWAENPGI	1038	29
560	STMKTVLKI	1250	30

192	NIIKNEALF	3681	31
186	VLPGVGNII	7297	32
362	LMKYPCNTF	9549	33
445	SKVNISPTI	10676	34

[0434] 表 3b

[0435] 自 NEIL3 衍生的 HLA-A24 结合性 10 聚物肽

[0436]

起始位置	氨基酸序列	Kd(nM)	SEQ ID NO
320	HWTCVVCTLI	195	35
361	HLMKYPCNTF	6226	36
257	CHCRITVCRF	10173	37
319	EHWTCVVCTL	13366	38
568	IGPNNGKNFF	14846	39
122	QLTKDLICFF	15324	40
544	FEWADLSFPF	18029	41
534	PLPREAQCGF	19346	42
87	FGPKALRIHF	21307	43

[0437] 起始位置指自 NEIL3N 端起的氨基酸残基数。

[0438] 解离常数 [Kd(nM)] 由“NetMHC3.0”导出

[0439] 源自 NEIL3 的预测的 HLA-A*2402 限制肽的 CTL 诱导

[0440] 依照“材料和方法”中描述的方案为自 NEIL3 衍生的肽产生了 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法来测定肽特异性 CTL 活性 (图 6a-e)。显示了用 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO:24) 刺激的 7 号孔 (a)、用 NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO:33) 刺激的 6 号孔 (b)、用 NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO:35) 刺激的 2 号和 8 号孔 (c)、用 NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO:41) 刺激的 8 号孔 (d) 及用 NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO:43) 刺激的 1 号和 4 号孔 (e) 展现出与对照孔相比强力的 IFN- γ 生成。另一方面,用表 3a 和 3b 中显示的其它肽刺激未能测定到特异性的 CTL 活性,尽管那些肽可能具有对 HLA-A*2402 的结合活性。例如,用 NEIL3-A24-9-364 (SEQ ID NO:25) 刺激的 CTL 针对经肽冲激的靶细胞的应答的典型阴性数据 (f)。结果,指示了 5 种 NEIL3 衍生肽被筛选为能诱导强力 CTL 的肽。

[0441] 针对 NEIL3 衍生肽的 CTL 系和克隆的建立

[0442] 对用 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24) 刺激的 7 号孔 (a)、用 NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO :33) 刺激的 6 号孔 (b)、用 NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35) 刺激的 8 号孔 (c)、用 NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41) 刺激的 8 号孔 (d) 和用 NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO :43) 刺激的 1 号孔 (e) 中通过 IFN- γ ELISPOT 测定法检测出显示肽特异性 CTL 活性的细胞进行扩增并建立为 CTL 系。通过 IFN- γ ELISA 测定法来测定那些 CTL 系的 CTL 活性 (图 7a-e)。显示了与未经肽冲激的靶细胞相比,所有 CTL 系均展现出针对经相应肽冲激的靶细胞的强力的 IFN- γ 生成。另外,通过有限稀释自 CTL 系建立了 CTL 克隆,并通过 IFN- γ ELISA 测定法测定了来自 CTL 克隆的针对经肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。在图 8 中确定了来自经 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24) (a)、NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35) (b) 和 NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41) (c) 刺激的 CTL 克隆的强力的 IFN- γ 生成。

[0443] 针对外源表达 NEIL3 和 HLA-A*2402 的靶细胞的特异性 CTL 活性

[0444] 对针对每种肽产生的建成 CTL 系和克隆,检查它们识别内源表达 NEIL3 和 HLA-A*2402 基因的靶细胞的能力。使用用相应肽产生的 CTL 系和克隆作为效应细胞测试了针对用全长 NEIL3 和 HLA-A*2402 基因二者转染的 COS7 细胞 (外源表达 NEIL3 和 HLA-A*2402 基因的靶细胞的一种特异性模型) 的特异性 CTL 活性。制备了用全长 NEIL3 基因或 HLA-A*2402 转染的 COS7 细胞作为对照。在图 9 中,经 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24) 刺激的 CTL 针对表达 NEIL3 和 HLA-A*2402 二者的 COS7 细胞显示出强力的 CTL 活性。另一方面,没有检测到显著的针对对照的特异性 CTL 活性。因此,这些数据清楚地证明 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24) 与 HLA-A*2402 分子一起在靶细胞上天然表达,并被 CTL 识别。这些结果指示这种 NEIL3 衍生肽可适用于癌症疫苗用于具有表达 NEIL3 的肿瘤的患者。

[0445] 对抗原肽的同源性分析

[0446] 经 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24)、NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO :33)、NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35)、NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41) 和 NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO :43) 刺激的 CTL 显示出显著的且特异性的 CTL 活性。这个结果可能是由于 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24)、NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO :33)、NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35)、NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41) 和 NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO :43) 的序列与自其它已知可使人免疫系统致敏的分子的衍生的肽同源而造成的。为了排除这种可能性,使用 BLAST 算法 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) 使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有揭示具有显著同源性的序列。同源性分析的结果指示 NEIL3-A24-9-545 (SEQ ID NO :24)、NEIL3-A24-9-362 (SEQ ID NO :33)、NEIL3-A24-10-320 (SEQ ID NO :35)、NEIL3-A24-10-544 (SEQ ID NO :41) 和 NEIL3-A24-10-87 (SEQ ID NO :43) 的序列是独特的,而且,因此,就我们所知,这些分子产生不期望的对一些无关分子的免疫学应答的可能性很小。

[0447] 总之,鉴定了自 NEIL3 衍生的新型 HLA-A*2402 表位肽。另外,证明了 NEIL3 可应用于癌症免疫疗法。

[0448] 工业实用性

[0449] 本发明提供了新的 TAA,特别是那些 NEIL3 衍生的 TAA,它们可诱导强力且特异性的抗肿瘤免疫应答,而且可应用于广泛的癌症类型。此类 TAA 可用于癌症的诊断和治疗。

[0001]

序列表

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

<120> NEIL3 肽及包含它的疫苗

<130> ONC-A0905P

<150> US 61/210,512

<151> 2009-03-18

<160> 51

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 1

Val Leu Ser Leu Phe Asn Gly Tyr Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 2

Phe Met Tyr Phe Gly Pro Lys Ala Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 3

Lys Gln Cys Asn Phe Phe Gln Trp Ala
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 4

Leu Ile Cys Phe Phe Asp Ser Ser Val
1 5

<210> 5

[0002]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 5

Phe Gln Asn Ser Pro Pro Ala Ser Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 6

Tyr Val Tyr Ser Gly Val Glu Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 7

Arg Leu Ala Ala Ser Thr Val Val Val
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 8

Ser Leu Gln Gly Arg Ala Leu Arg Leu
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 9

Ile Ile Ser Trp Thr Ser Ser Arg Val
1 5

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

[0003]

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 10

Lys Leu Pro Thr Arg Asn Thr Ile Ile
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 11

Arg Met Thr Tyr Phe Cys Pro His Cys
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 12

Asn Met Thr Asp Gly Pro Arg Thr Leu
1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 13

Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 14

Gln Leu Thr Asp Glu Gln Ile His His Leu
1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

[0004]

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 15

Ala Leu Phe Asp Ser Gly Leu His Pro Ala
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 16

Leu Met Asp Gln Asn Val Leu Pro Gly Val
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 17

Cys Leu Thr Ser Arg Pro Ile Asp Ser Val
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 18

Gly Leu Ala Leu Ser Lys His Tyr Lys Val
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 19

Ala Leu Asn Asn Asp Ser Ser Gln Asn Val
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成肽序列

[0005]

<400> 20

Asn Val Leu Ser Leu Phe Asn Gly Tyr Val
1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 21

Phe Gln Trp Ala Glu Asn Gly Pro Gly Ile
1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 22

Lys Ile Asn Arg Lys Thr Ala Phe Gly Thr
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 23

Gly Pro Asn Asn Gly Lys Asn Phe Phe Val
1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 24

Glu Trp Ala Asp Leu Ser Phe Pro Phe
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成肽序列

<400> 25

[0006]

Lys Tyr Pro Cys Asn Thr Phe Gly Lys
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 26

His Trp Thr Cys Val Val Cys Thr Leu
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 27

Tyr Phe Gly Pro Lys Ala Leu Arg Ile
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 菊苣斑皱病毒(Artichoke mottled crinkle virus)

<400> 28

Ser Ser Gln Asn Val Leu Ser Leu Phe
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 29

Gln Trp Ala Glu Asn Gly Pro Gly Ile
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 30

Ser Thr Met Lys Thr Val Leu Lys Ile
1 5

[0007]

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 31

Asn Ile Ile Lys Asn Glu Ala Leu Phe
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 32

Val Leu Pro Gly Val Gly Asn Ile Ile
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 33

Leu Met Lys Tyr Pro Cys Asn Thr Phe
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 34

Ser Lys Val Asn Ile Ser Pro Thr Ile
1 5

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 35

His Trp Thr Cys Val Val Cys Thr Leu Ile
1 5 10

<210> 36
<211> 10

[0008]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 36

His Leu Met Lys Tyr Pro Cys Asn Thr Phe
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 37

Cys His Cys Arg Ile Thr Val Cys Arg Phe
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 38

Glu His Trp Thr Cys Val Val Cys Thr Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 39

Ile Gly Pro Asn Asn Gly Lys Asn Phe Phe
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成肽序列

<400> 40

Gln Leu Thr Lys Asp Leu Ile Cys Phe Phe
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0009]

<220>
 <223> 人工合成肽序列

 <400> 41

 Phe Glu Trp Ala Asp Leu Ser Phe Pro Phe
 1 5 10

 <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工合成肽序列

 <400> 42

 Pro Leu Pro Arg Glu Ala Gln Cys Gly Phe
 1 5 10

 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工合成肽序列

 <400> 43

 Phe Gly Pro Lys Ala Leu Arg Ile His Phe
 1 5 10

 <210> 44
 <211> 2402
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

 <220>
 <221> CDS
 <222> (118)..(1935)

 <400> 44
 gacgcgcgcg agatttgaat ttcctctgcg tgcggtcagt gcccgcgag cgttgagttg 60

 cacagcggta tctcaccag gccctgcaat cggtagggcca cagtgcgggc cacagag 117

 atg gig gaa gga cca ggc tgt act ctg aat gga gag aag att cgc gcg 165
 Met Val Glu Gly Pro Gly Cys Thr Leu Asn Gly Glu Lys Ile Arg Ala
 1 5 10 15

 cgg gig ctc ccg ggc cag gcg gig acc ggc gig cgg gga agc gct ctg 213
 Arg Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val Arg Gly Ser Ala Leu
 20 25 30

 cgg agt ctg cag ggc cgc gcc ttg cgg ctc gca gcc tcc acg gtt gig 261
 Arg Ser Leu Gln Gly Arg Ala Leu Arg Leu Ala Ala Ser Thr Val Val
 35 40 45

 gtc tcc ccg cag gct gct gca ctg aat aat gat tcc agc cag aat gtc 309
 Val Ser Pro Gln Ala Ala Ala Leu Asn Asn Asp Ser Ser Gln Asn Val
 50 55 60

 ttg agc ctg ttt aat gga tat gtt tac agt ggc gtg gaa act ttg ggg 357
 Leu Ser Leu Phe Asn Gly Tyr Val Tyr Ser Gly Val Glu Thr Leu Gly
 65 70 75 80

[0010]

aag gag ctc ttt atg tac ttt gga cca aaa gct tta cgg att cat ttc Lys Glu Leu Phe Met Tyr Phe Gly Pro Lys Ala Leu Arg Ile His Phe 85 90 95	405
gga atg aaa ggc ttc atc atg att aat cca ctt gag tat aaa tat aaa Gly Met Lys Gly Phe Ile Met Ile Asn Pro Leu Glu Tyr Lys Tyr Lys 100 105 110	453
aal gga gct tct cct glu ttg gaa gtg cag ctc acc aaa gat ttg att Asn Gly Ala Ser Pro Val Leu Glu Val Gln Leu Thr Lys Asp Leu Ile 115 120 125	501
tgt ttc ttt gac tca tca gta gaa ctc aga aac tca atg gaa agc caa Cys Phe Phe Asp Ser Ser Val Glu Leu Arg Asn Ser Met Glu Ser Gln 130 135 140	549
cag aga ata aga atg atg aaa gaa tta gat gta tgt tca cct gaa ttt Gln Arg Ile Arg Met Met Lys Glu Leu Asp Val Cys Ser Pro Glu Phe 145 150 155 160	597
agt ttc ttg aga gca gaa agt gaa gtt aaa aaa cag aaa ggc cgg atg Ser Phe Leu Arg Ala Glu Ser Glu Val Lys Lys Gln Lys Gly Arg Met 165 170 175	645
cta ggt gat gtg cta atg gat cag aac gta ttg cct gga gta ggg aac Leu Gly Asp Val Leu Met Asp Gln Asn Val Leu Pro Gly Val Gly Asn 180 185 190	693
atc atc aaa aat gaa gct ctc ttt gac agt ggt ctc cac cca gct gtt Ile Ile Lys Asn Glu Ala Leu Phe Asp Ser Gly Leu His Pro Ala Val 195 200 205	741
aaa gtt tgt caa tta aca gat gaa cag atc cat cac ctc atg aaa atg Lys Val Cys Gln Leu Thr Asp Glu Gln Ile His His Leu Met Lys Met 210 215 220	789
ata cgt gat ttc agc att ctc ttt tac agg tgc cgt aaa gca gga ctt Ile Arg Asp Phe Ser Ile Leu Phe Tyr Arg Cys Arg Lys Ala Gly Leu 225 230 235 240	837
gct ctc tct aaa cac tat aag gtt tac aag cgt cct aat tgt ggt cag Ala Leu Ser Lys His Tyr Lys Val Tyr Lys Arg Pro Asn Cys Gly Gln 245 250 255	885
tgc cac tgc aga ata act gtg tgc cgc ttt ggg gac aat aac aga atg Cys His Cys Arg Ile Thr Val Cys Arg Phe Gly Asp Asn Asn Arg Met 260 265 270	933
aca tat ttc tgt cct cac tgt caa aaa gaa aat cct caa cat gtt gac Thr Tyr Phe Cys Pro His Cys Gln Lys Glu Asn Pro Gln His Val Asp 275 280 285	981
ata tgc aag cta ccg act aga aat act ata atc agt tgg aca tct agc Ile Cys Lys Leu Pro Thr Arg Asn Thr Ile Ile Ser Trp Thr Ser Ser 290 295 300	1029
agg gtg gat cat gtt atg gac tcc gtg gct cgg aag tgc gaa gag cac Arg Val Asp His Val Met Asp Ser Val Ala Arg Lys Ser Glu Glu His 305 310 315 320	1077
tgg acc tgt gtg gtg tgt act tta atc aat aag ccc tct tct aag gca Trp Thr Cys Val Val Cys Thr Leu Ile Asn Lys Pro Ser Ser Lys Ala 325 330 335	1125
tgt gat gct tgc ttg acc tca agg cct att gat tca gtg ctc aag agt Cys Asp Ala Cys Leu Thr Ser Arg Pro Ile Asp Ser Val Leu Lys Ser 340 345 350	1173
gaa gaa aat tct act gtc ttt agc cac tta atg aag tac ccg tgt aat Glu Glu Asn Ser Thr Val Phe Ser His Leu Met Lys Tyr Pro Cys Asn 355 360 365	1221

[0011]

act ttt gga aaa cct cat aca gaa gtc aag atc aac aga aaa act gca Thr Phe Gly Lys Pro His Thr Glu Val Lys Ile Asn Arg Lys Thr Ala 370 375 380	1269
ttt gga act aca act ctt gtc ttg act gat ttt agc aat aaa tcc agt Phe Gly Thr Thr Thr Leu Val Leu Thr Asp Phe Ser Asn Lys Ser Ser 385 390 395 400	1317
act ttg gaa aga aaa aca aag caa aac cag ata cta gal gag gag ttt Thr Leu Glu Arg Lys Thr Lys Gln Asn Gln Ile Leu Asp Glu Glu Phe 405 410 415	1365
caa aac tct cct cct gct agt gtt tgt ttg aat gat ata cag cac ccc Gln Asn Ser Pro Pro Ala Ser Val Cys Leu Asn Asp Ile Gln His Pro 420 425 430	1413
tcc aag aag aca aca aac gat ata act caa cca tcc agc aaa gta aac Ser Lys Lys Thr Thr Asn Asp Ile Thr Gln Pro Ser Ser Lys Val Asn 435 440 445	1461
ata tca cct aca atc agt tca gaa tct aaa tta ttt agt cca gca cat Ile Ser Pro Thr Ile Ser Ser Glu Ser Lys Leu Phe Ser Pro Ala His 450 455 460	1509
aaa aaa ccg aaa aca gcc caa tac tca tca cca gag ctt aaa agc tgc Lys Lys Pro Lys Thr Ala Gln Tyr Ser Ser Pro Glu Leu Lys Ser Cys 465 470 475 480	1557
aac cct gga tat tct aac agt gaa ctt caa att aat atg aca gat ggc Asn Pro Gly Tyr Ser Asn Ser Glu Leu Gln Ile Asn Met Thr Asp Gly 485 490 495	1605
cct cgt acc tta aat cct gac agc cct cgc tgc agt aaa cac aac cgc Pro Arg Thr Leu Asn Pro Asp Ser Pro Arg Cys Ser Lys His Asn Arg 500 505 510	1653
ctc tgc att ctc cga gtt gtg agg aag gat ggg gaa aac aag ggc agg Leu Cys Ile Leu Arg Val Val Arg Lys Asp Gly Glu Asn Lys Gly Arg 515 520 525	1701
cag ttt tat gcc tgt cct cta cct aga gaa gca caa tgt gga ttt ttt Gln Phe Tyr Ala Cys Pro Leu Pro Arg Glu Ala Gln Cys Gly Phe Phe 530 535 540	1749
gaa tgg gca gat ttg tcc ttc cca ttc tgc aac cat ggc aag cgt tcc Glu Trp Ala Asp Leu Ser Phe Pro Phe Cys Asn His Gly Lys Arg Ser 545 550 555 560	1797
acc atg aaa aca gta ttg aag att gga cct aac aat gga aag aat ttt Thr Met Lys Thr Val Leu Lys Ile Gly Pro Asn Asn Gly Lys Asn Phe 565 570 575	1845
ttt glg tgt cct ctt ggg aag gaa aaa caa tgc aat ttt ttc cag tgg Phe Val Cys Pro Leu Gly Lys Glu Lys Gln Cys Asn Phe Phe Gln Trp 580 585 590	1893
gca gaa aat ggg cca gga ata aaa att att cct gga tgc taa Ala Glu Asn Gly Pro Gly Ile Lys Ile Ile Pro Gly Cys 595 600 605	1935
tatctgtaga ttctctggca tttagtctct tcaaacgttg tataatgttt ggctcctctc	1995
tgtttcatag aaaagtcata gaatatctat gatacattga aaagttactg caatatattga	2055
gaactgtttct ttttttttct tgtgtgtgcc atctttccat tgttggctac gtctttttct	2115
ttgccttgat gaacgtttcta tgtatttcat cggatataca gcataattcca tttaggatgt	2175
gtatttaaig catttagtaa tgacgataaa gtgttttttag tatgctttta gtctcttgta	2235
actggggaga agcagtgttt tttttttagg aaaggattat gcgacacaat aaaataagat	2295

[0012]

```

attctgtcig tagigaatac atttctcatg tactaacact atttataata tatgattaa    2355

gatatttcit gttttattaa ataataagaa ataagatctc ctittaig                2402

<210> 45
<211> 605
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 45

Met Val Glu Gly Pro Gly Cys Thr Leu Asn Gly Glu Lys Ile Arg Ala
1                    5                    10                    15

Arg Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val Arg Gly Ser Ala Leu
20                    25                    30

Arg Ser Leu Gln Gly Arg Ala Leu Arg Leu Ala Ala Ser Thr Val Val
35                    40                    45

Val Ser Pro Gln Ala Ala Ala Leu Asn Asn Asp Ser Ser Gln Asn Val
50                    55                    60

Leu Ser Leu Phe Asn Gly Tyr Val Tyr Ser Gly Val Glu Thr Leu Gly
65                    70                    75                    80

Lys Glu Leu Phe Met Tyr Phe Gly Pro Lys Ala Leu Arg Ile His Phe
85                    90                    95

Gly Met Lys Gly Phe Ile Met Ile Asn Pro Leu Glu Tyr Lys Tyr Lys
100                   105                   110

Asn Gly Ala Ser Pro Val Leu Glu Val Gln Leu Thr Lys Asp Leu Ile
115                   120                   125

Cys Phe Phe Asp Ser Ser Val Glu Leu Arg Asn Ser Met Glu Ser Gln
130                   135                   140

Gln Arg Ile Arg Met Met Lys Glu Leu Asp Val Cys Ser Pro Glu Phe
145                   150                   155                   160

Ser Phe Leu Arg Ala Glu Ser Glu Val Lys Lys Gln Lys Gly Arg Met
165                   170                   175

Leu Gly Asp Val Leu Met Asp Gln Asn Val Leu Pro Gly Val Gly Asn
180                   185                   190

Ile Ile Lys Asn Glu Ala Leu Phe Asp Ser Gly Leu His Pro Ala Val
195                   200                   205

Lys Val Cys Gln Leu Thr Asp Glu Gln Ile His His Leu Met Lys Met
210                   215                   220

Ile Arg Asp Phe Ser Ile Leu Phe Tyr Arg Cys Arg Lys Ala Gly Leu
225                   230                   235                   240

```

[0013]

Ala	Leu	Ser	Lys	His	Tyr	Lys	Val	Tyr	Lys	Arg	Pro	Asn	Cys	Gly	Gln	
				245					250					255		
Cys	His	Cys	Arg	Ile	Thr	Val	Cys	Arg	Phe	Gly	Asp	Asn	Asn	Arg	Met	
			260					265					270			
Thr	Tyr	Phe	Cys	Pro	His	Cys	Gln	Lys	Glu	Asn	Pro	Gln	His	Val	Asp	
		275					280					285				
Ile	Cys	Lys	Leu	Pro	Thr	Arg	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Trp	Thr	Ser	Ser	
	290					295					300					
Arg	Val	Asp	His	Val	Met	Asp	Ser	Val	Ala	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	His	
305					310					315					320	
Trp	Thr	Cys	Val	Val	Cys	Thr	Leu	Ile	Asn	Lys	Pro	Ser	Ser	Lys	Ala	
			325						330					335		
Cys	Asp	Ala	Cys	Leu	Thr	Ser	Arg	Pro	Ile	Asp	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	
		340						345					350			
Glu	Glu	Asn	Ser	Thr	Val	Phe	Ser	His	Leu	Met	Lys	Tyr	Pro	Cys	Asn	
		355					360					365				
Thr	Phe	Gly	Lys	Pro	His	Thr	Glu	Val	Lys	Ile	Asn	Arg	Lys	Thr	Ala	
	370					375					380					
Phe	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Val	Leu	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn	Lys	Ser	Ser	
385					390				395						400	
Thr	Leu	Glu	Arg	Lys	Thr	Lys	Gln	Asn	Gln	Ile	Leu	Asp	Glu	Glu	Phe	
			405					410						415		
Gln	Asn	Ser	Pro	Pro	Ala	Ser	Val	Cys	Leu	Asn	Asp	Ile	Gln	His	Pro	
		420						425					430			
Ser	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Asp	Ile	Thr	Gln	Pro	Ser	Ser	Lys	Val	Asn	
		435				440						445				
Ile	Ser	Pro	Thr	Ile	Ser	Ser	Glu	Ser	Lys	Leu	Phe	Ser	Pro	Ala	His	
	450				455						460					
Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	Ala	Gln	Tyr	Ser	Ser	Pro	Glu	Leu	Lys	Ser	Cys	
465					470				475					480		
Asn	Pro	Gly	Tyr	Ser	Asn	Ser	Glu	Leu	Gln	Ile	Asn	Met	Thr	Asp	Gly	
			485					490						495		
Pro	Arg	Thr	Leu	Asn	Pro	Asp	Ser	Pro	Arg	Cys	Ser	Lys	His	Asn	Arg	
		500					505						510			
Leu	Cys	Ile	Leu	Arg	Val	Val	Arg	Lys	Asp	Gly	Glu	Asn	Lys	Gly	Arg	
		515					520					525				

[0014]

Gln Phe Tyr Ala Cys Pro Leu Pro Arg Glu Ala Gln Cys Gly Phe Phe
 530 535 540
 Glu Trp Ala Asp Leu Ser Phe Pro Phe Cys Asn His Gly Lys Arg Ser
 545 550 555 560
 Thr Met Lys Thr Val Leu Lys Ile Gly Pro Asn Asn Gly Lys Asn Phe
 565 570 575
 Phe Val Cys Pro Leu Gly Lys Glu Lys Gln Cys Asn Phe Phe Gln Trp
 580 585 590
 Ala Glu Asn Gly Pro Gly Ile Lys Ile Ile Pro Gly Cys
 595 600 605

<210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工合成引物序列 (an artificially synthesized primer sequence)

<400> 46
 ttggtcctcc tctgtttcat aga 23

<210> 47
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工合成引物序列 (an artificially synthesized primer sequence)

<400> 47
 gcttctcccc agttacaaga gac 23

<210> 48
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 48
 gtctaccagg cattcgttc at 22

<210> 49
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 49
 tcagctggac cacagccgca gcgt 24

<210> 50
 <211> 21
 <212> DNA

[0015]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 50

tcagaaatcc ttctcttga c

21

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 51

ctagcctctg gaatccttgc tctt

24

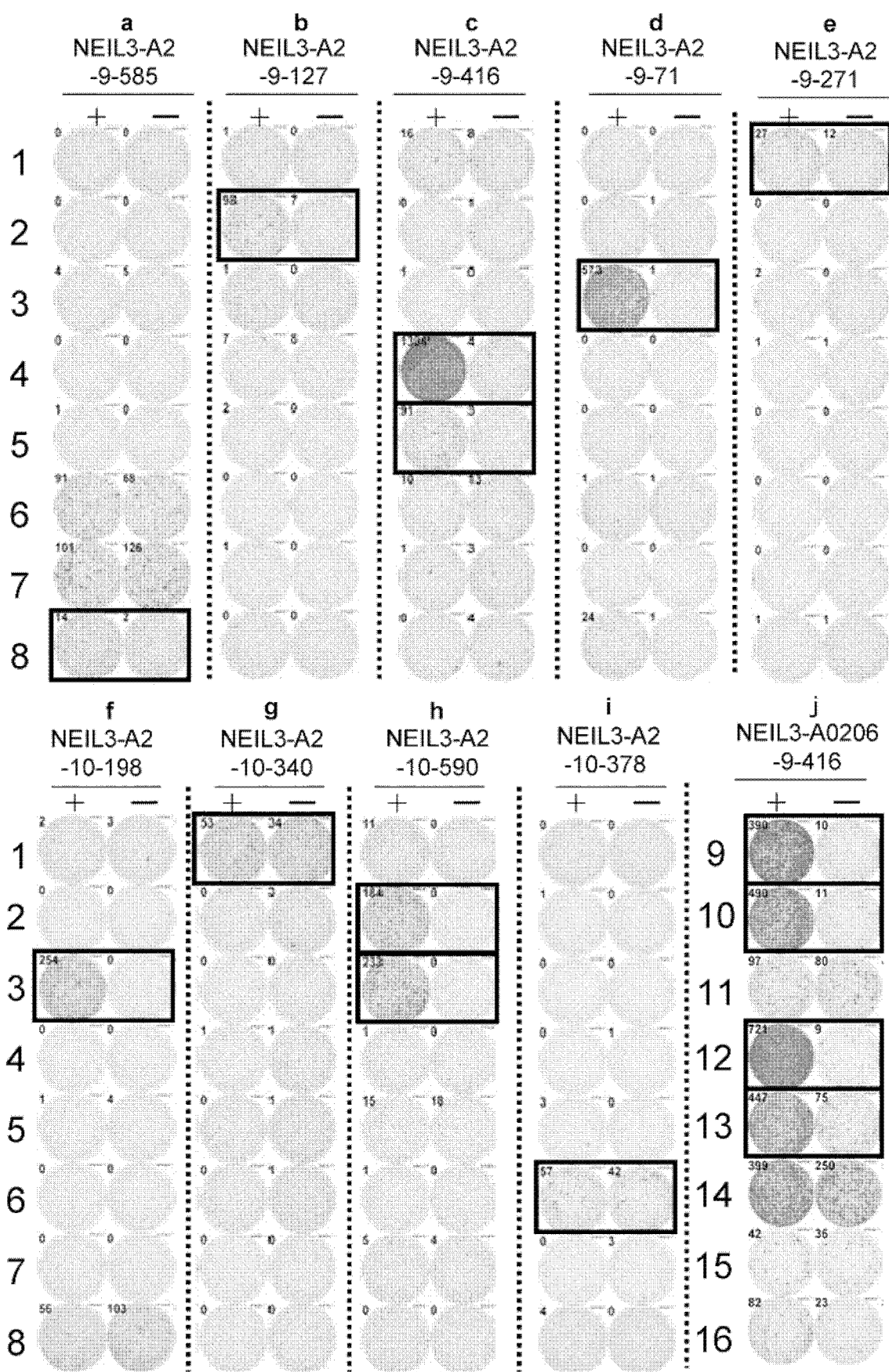


图 1

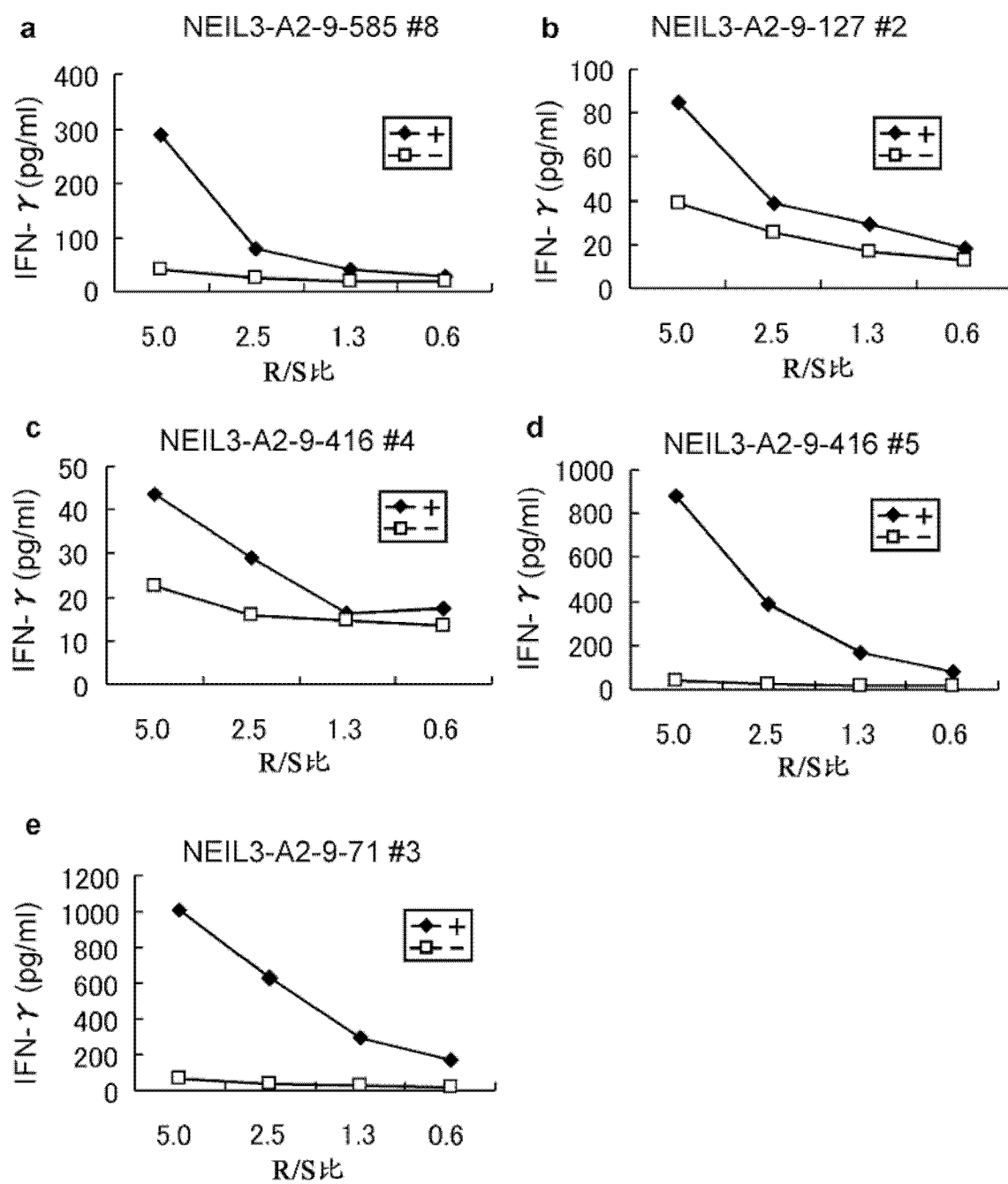


图 2-1

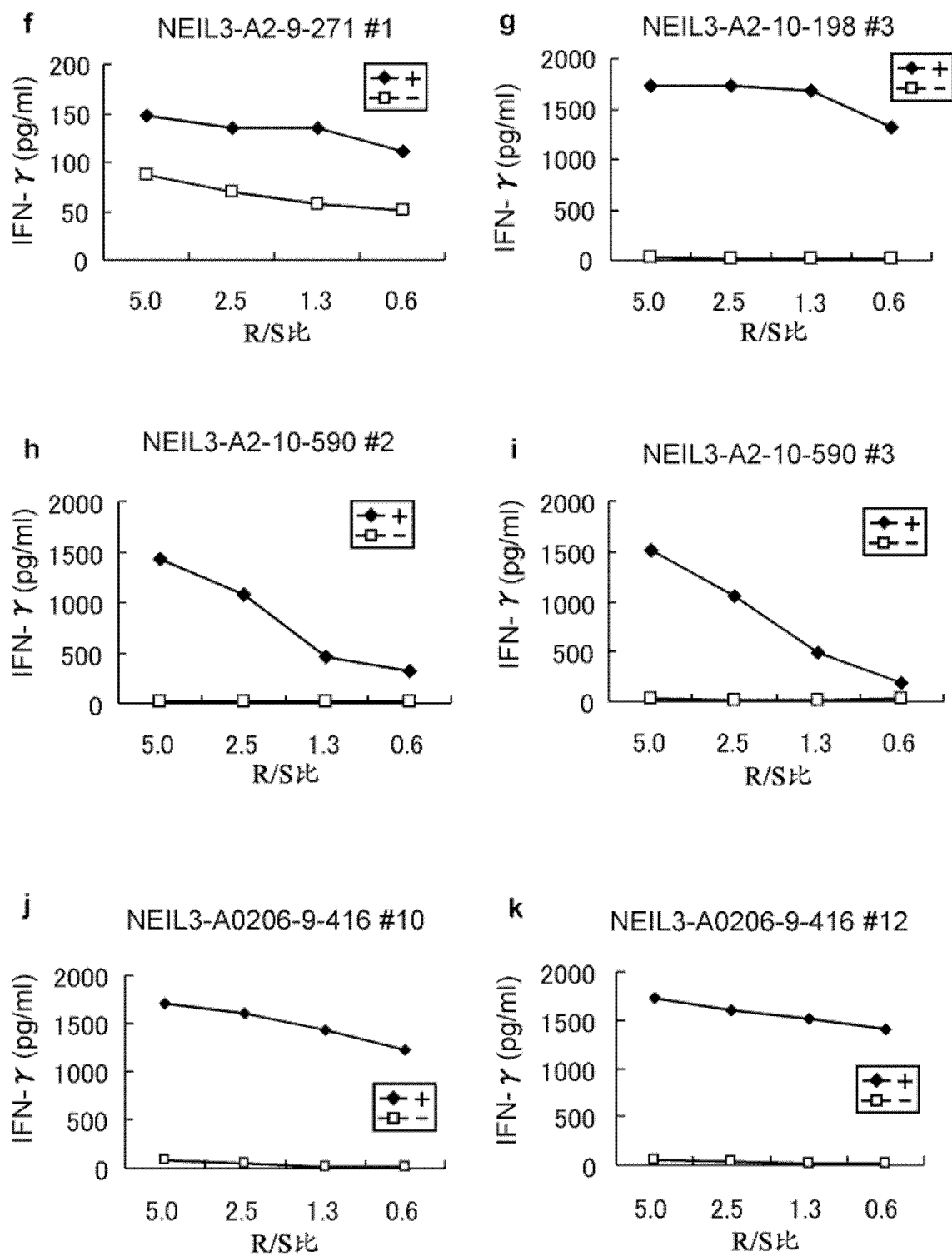


图 2-2

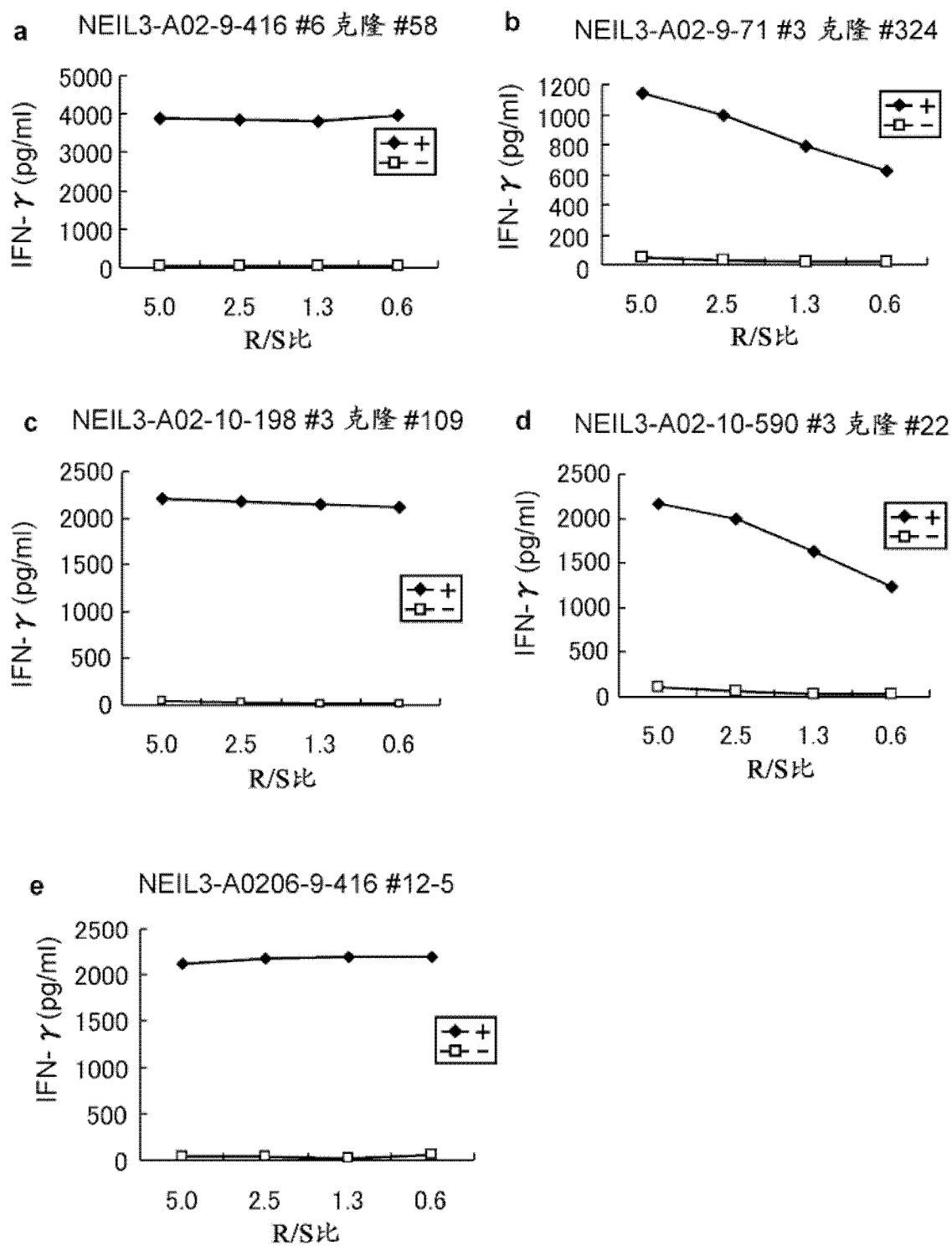


图 3

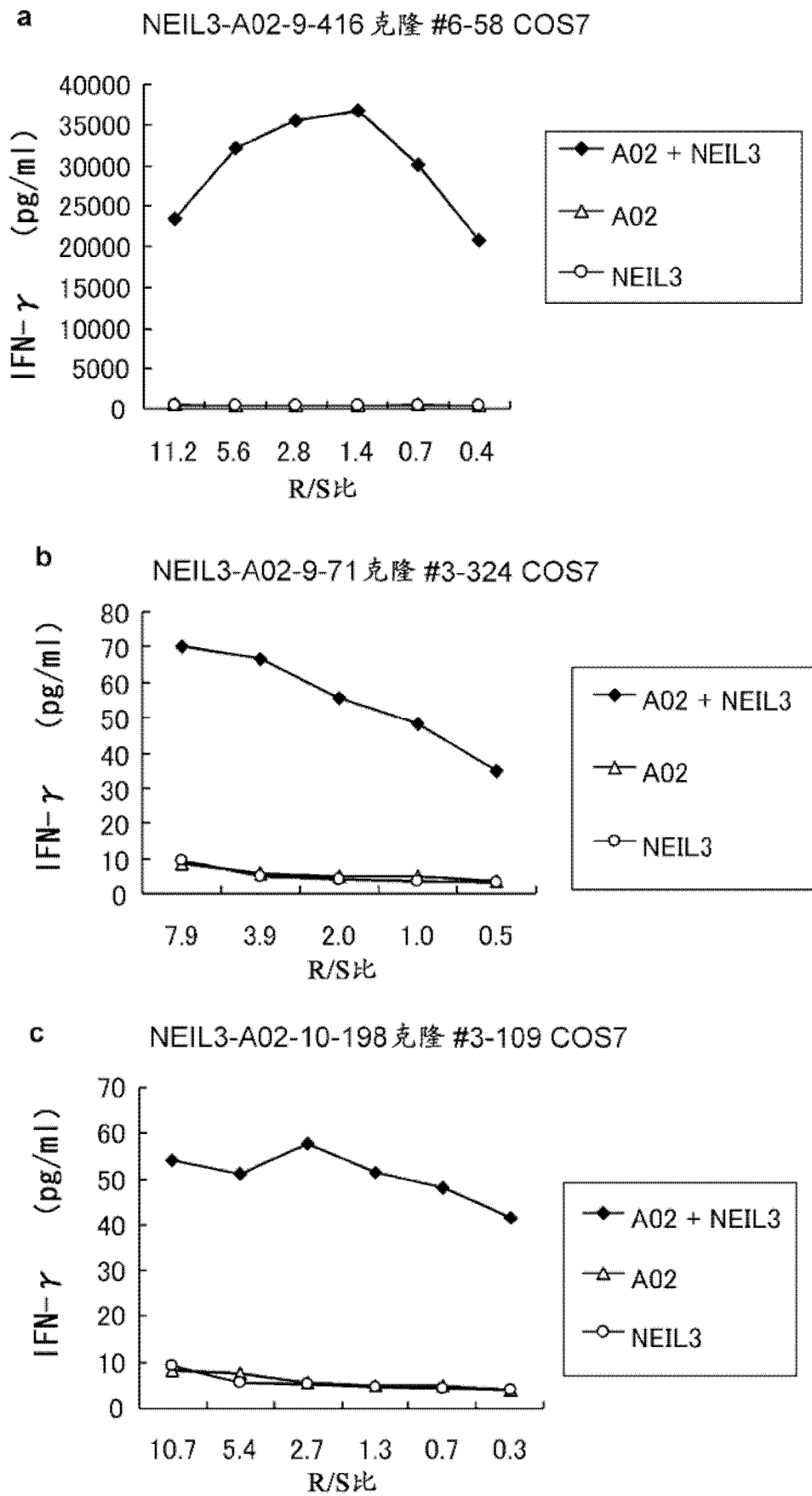


图 4-1

d

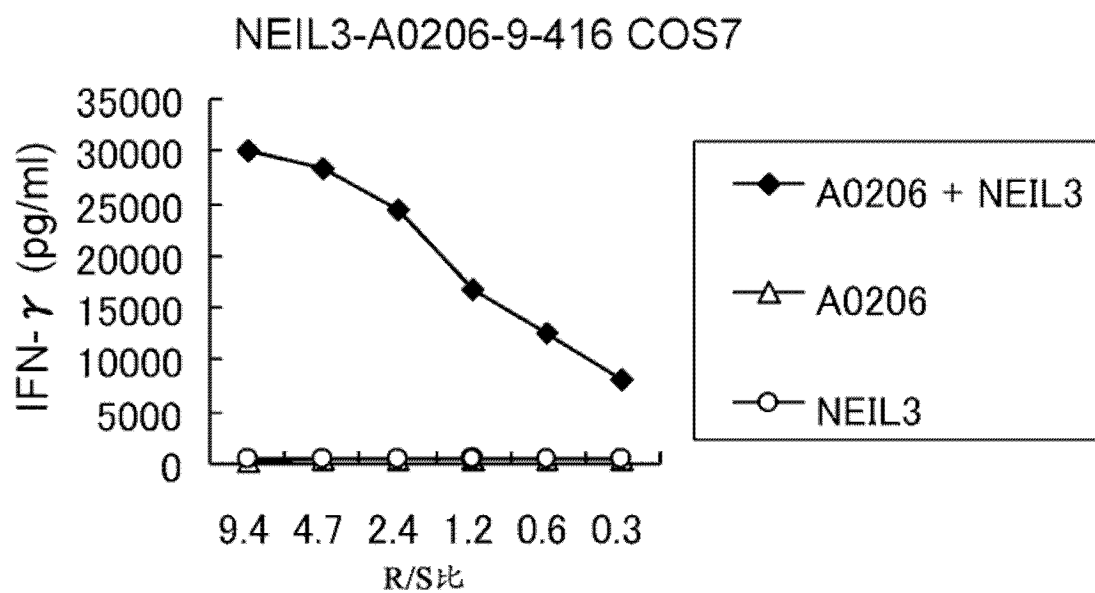
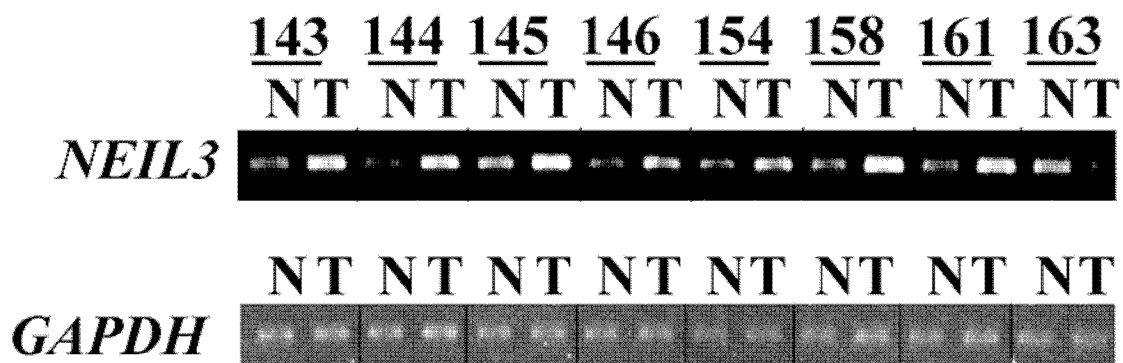


图 4-2

a

半定量RT-PCR



T>N 7/8

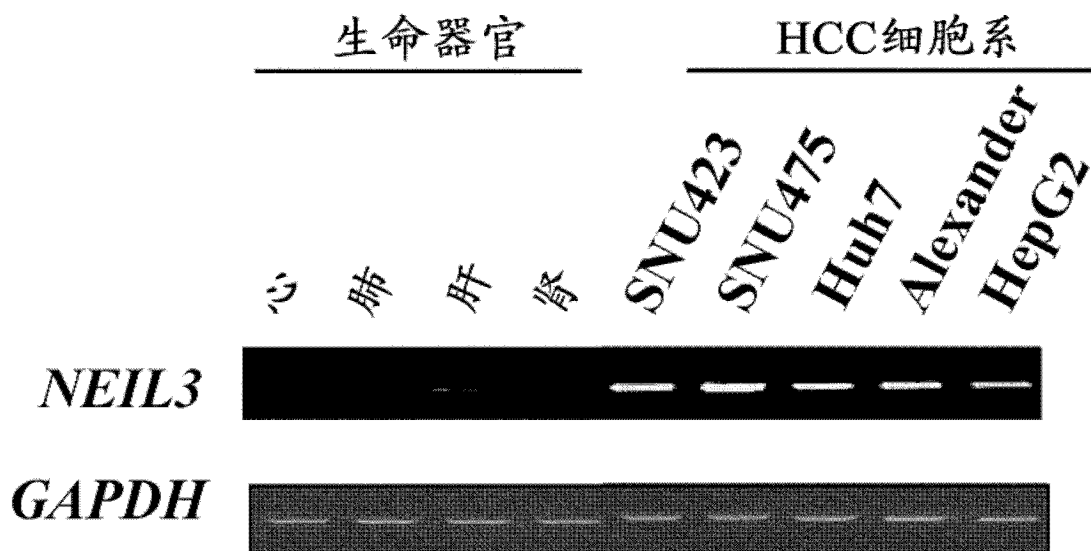
b半定量RT-PCR
(polyA纯化的RNA)

图 5

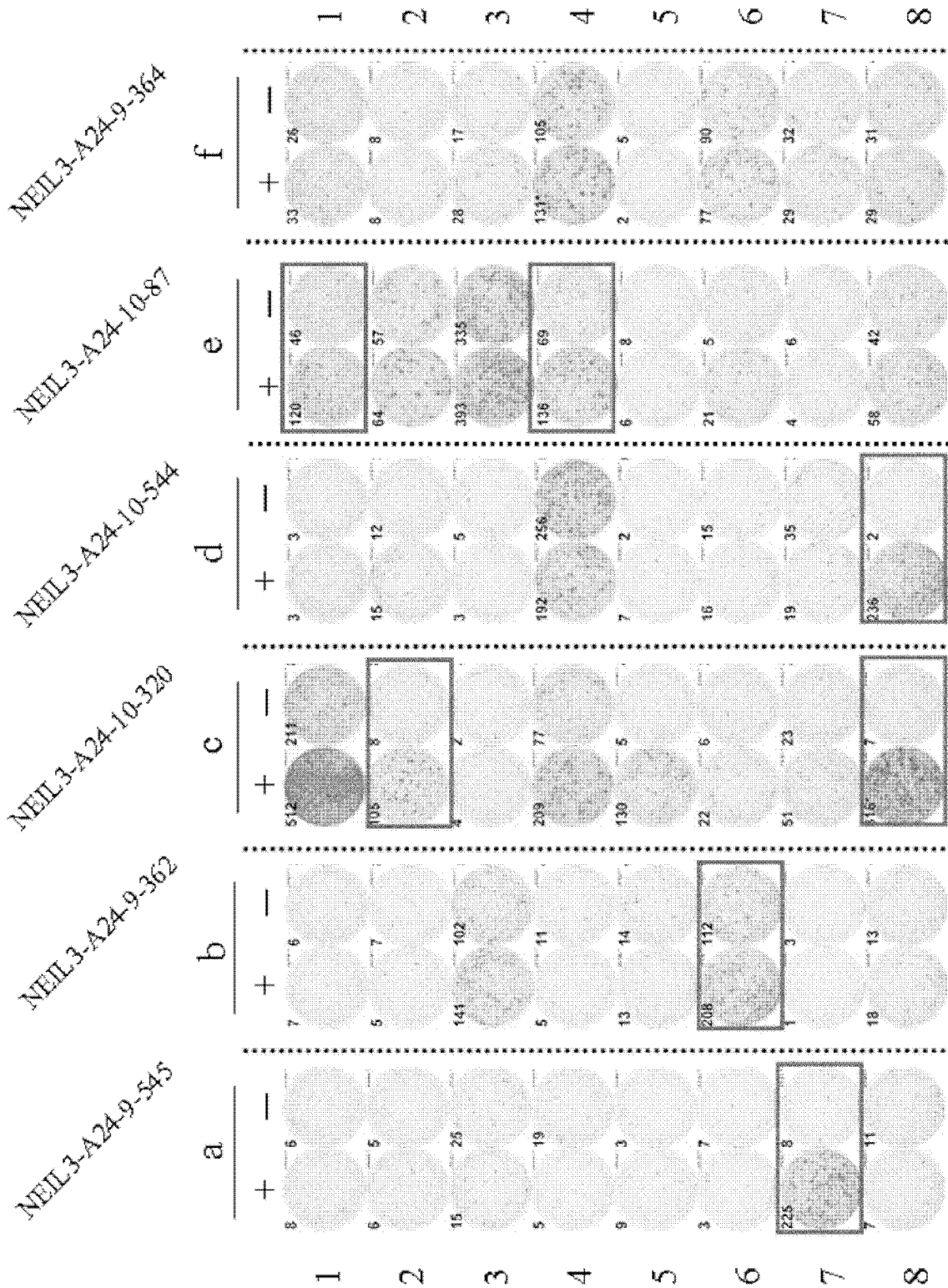


图 6

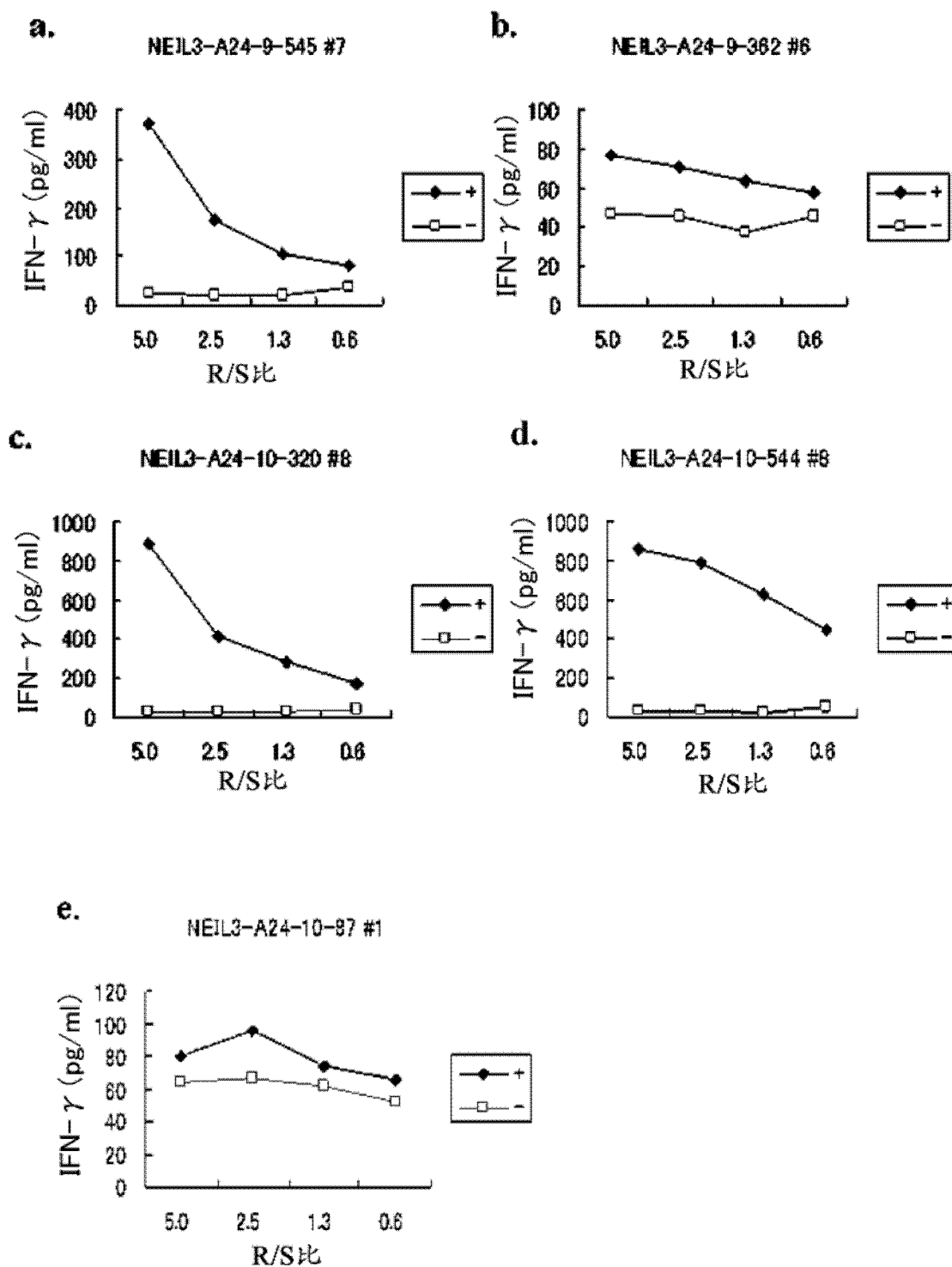


图 7

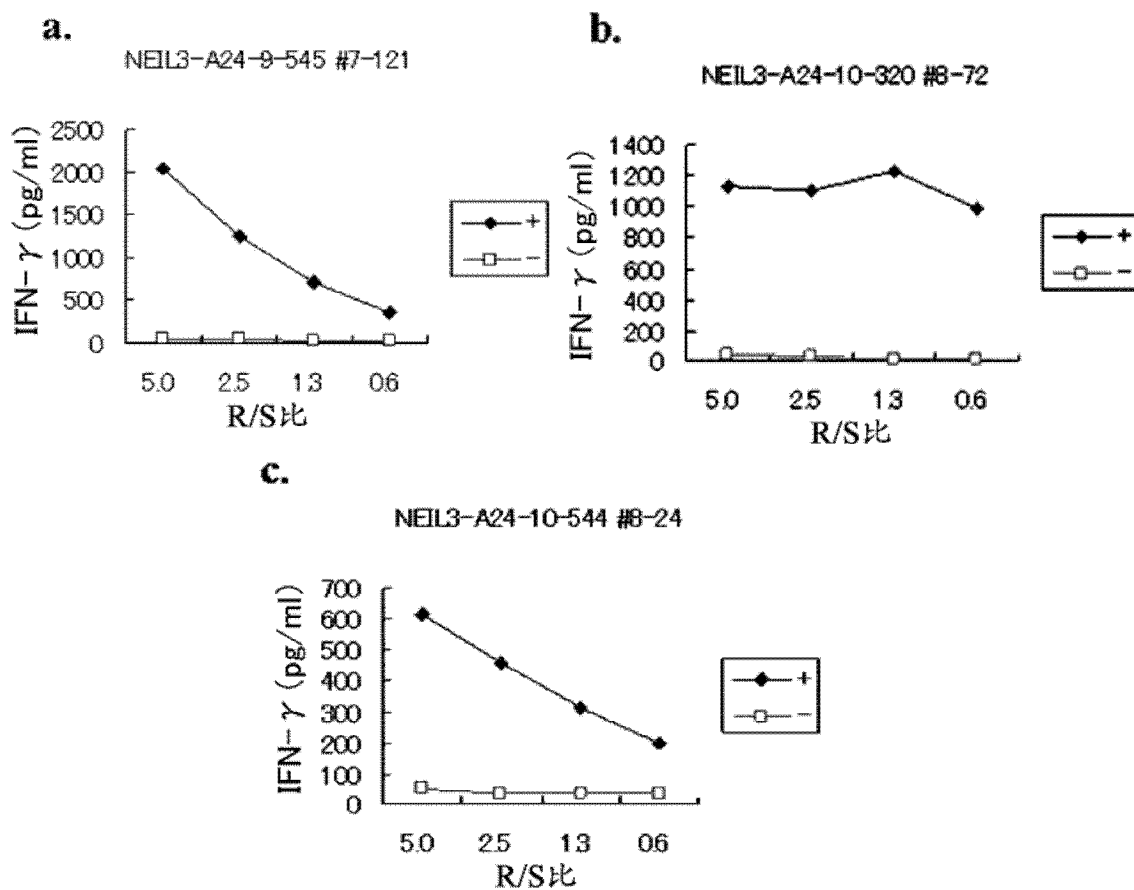


图 8

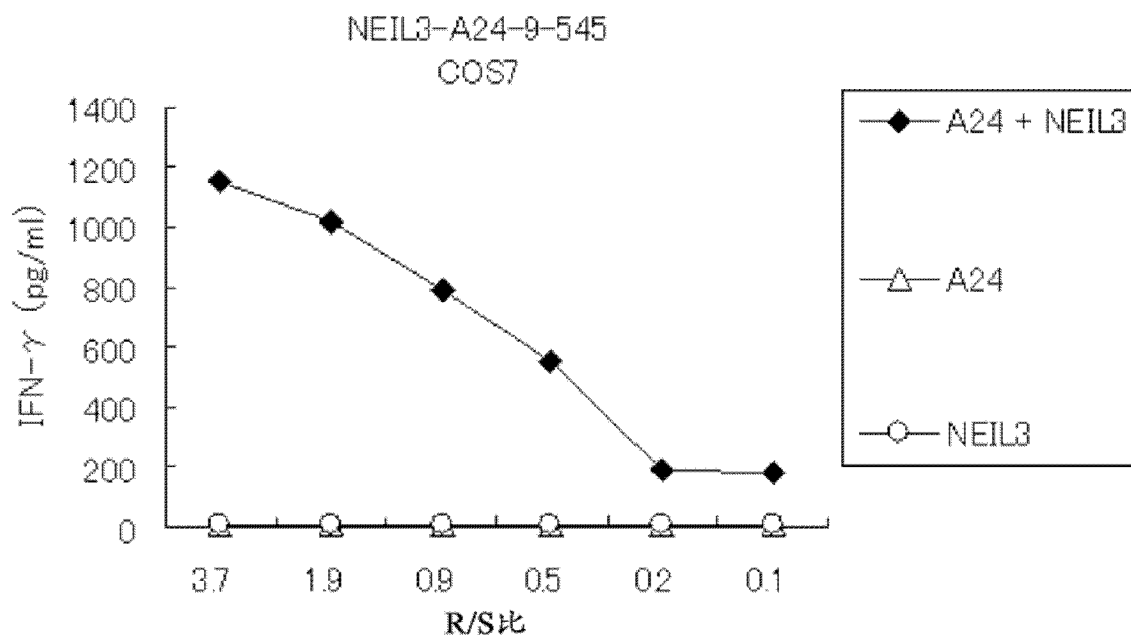


图 9