



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119384291 A

(43) 申请公布日 2025.01.28

(21) 申请号 202380041568.5

(22) 申请日 2023.05.18

(30) 优先权数据

63/343252 2022.05.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/018618 2023.05.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/224096 JA 2023.11.23

(71) 申请人 国立研究开发法人国立癌症研究中心

地址 日本东京都

(72) 发明人 中面哲也 竹之内一政 塚本信夫
下村真菜美 铃木利宙

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 张桂霞 林毅斌

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

权利要求书4页 说明书82页
序列表(电子公布) 附图48页

(54) 发明名称

利用通用癌抗原鸡尾酒的癌症疫苗、TCR/CAR-T细胞治疗药、伴随诊断方法和基于血中循环癌细胞检测的癌症发病风险诊断方法

(57) 摘要

本发明的课题在于提供:利用通用癌抗原鸡尾酒的癌症疫苗、TCR/CAR-T细胞治疗药、伴随诊断方法和基于血中循环癌细胞检测的癌症发病风险诊断方法。根据本发明,提供癌症疫苗,其包含:(1)含有选自GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的通用癌抗原;(2)上述3种以上的通用癌抗原的部分肽,其具有CTL诱导能力;(3)用上述部分肽刺激的树突状细胞;或(4)编码上述通用癌抗原或上述部分肽的mRNA。

1. 癌症疫苗,其包含:
 - (1) 含有选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的通用癌抗原;
 - (2) 上述3种以上的通用癌抗原的部分肽,其具有CTL诱导能力;
 - (3) 用上述部分肽刺激的树突状细胞;或
 - (4) 编码上述通用癌抗原或上述部分肽的mRNA。
2. 权利要求1所述的癌症疫苗,其中,上述通用癌抗原进一步包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上。
3. 权利要求1所述的癌症疫苗,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。
4. 权利要求1所述的癌症疫苗,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部。
5. 权利要求1~4中任一项所述的癌症疫苗,其中,上述部分肽为具有SEQ ID NO:1~80中任一项所记载的氨基酸序列的肽。
6. 癌症疫苗,其包含:
 - (1) 包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的3种以上的通用癌抗原;
 - (2) 上述3种以上的通用癌抗原的部分肽,其具有CTL诱导能力;
 - (3) 用上述部分肽刺激的树突状细胞;或
 - (4) 编码上述通用癌抗原或上述部分肽的mRNA。
7. 肽,其具有SEQ ID NO:5、7~10、14~22、24~38、40、42、48、49、52~80中任一项所记载的氨基酸序列。
8. CAR-T细胞治疗剂,其包含具有针对通用癌抗原的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的混合物,该通用癌抗原包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上。
9. 权利要求8所述的CAR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原进一步包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上。
10. 权利要求8所述的CAR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。
11. 权利要求8所述的CAR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部。
12. CAR-T细胞治疗剂,其包含具有针对通用癌抗原的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的混合物,该通用癌抗原包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的3种以上。
13. TCR-T细胞治疗剂,其包含具有可识别来自通用癌抗原的MHC I类结合性抗原肽的T细胞受体(TCR)的T细胞的混合物,该通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上。
14. 权利要求13所述的TCR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原进一步包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上。
15. 权利要求13所述的TCR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。

16. 权利要求13所述的TCR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部。

17. TCR-T细胞治疗剂,其包含具有可识别来自通用癌抗原的MHC I类结合性抗原肽的T细胞受体(TCR)的T细胞的混合物,该通用癌抗原包含GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的3种以上。

18. 权利要求13~17中任一项所述的TCR-T细胞治疗剂,其中,T细胞受体(TCR)为以下的任一种异源二聚体:

- 由SEQ ID NO:103的蛋白与SEQ ID NO:104的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:105的蛋白与SEQ ID NO:106的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:107的蛋白与SEQ ID NO:108的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:109的蛋白与SEQ ID NO:110的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:111的蛋白与SEQ ID NO:112的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:123的蛋白与SEQ ID NO:124的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:125的蛋白与SEQ ID NO:126的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:127的蛋白与SEQ ID NO:128的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:129或130的蛋白与SEQ ID NO:131的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:132的蛋白与SEQ ID NO:133的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:134的蛋白与SEQ ID NO:135的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:136的蛋白与SEQ ID NO:137的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:138或139的蛋白与SEQ ID NO:140的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:141的蛋白与SEQ ID NO:142的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:143的蛋白与SEQ ID NO:144的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:145的蛋白与SEQ ID NO:146的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:147的蛋白与SEQ ID NO:148的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:177的蛋白与SEQ ID NO:178的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:179的蛋白与SEQ ID NO:180的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:181的蛋白与SEQ ID NO:182的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:183的蛋白与SEQ ID NO:184的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:193的蛋白与SEQ ID NO:194的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:195的蛋白与SEQ ID NO:196的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:197的蛋白与SEQ ID NO:198的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:199或200的蛋白与SEQ ID NO:201的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:202的蛋白与SEQ ID NO:203的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- 由SEQ ID NO:216的蛋白与SEQ ID NO:217的蛋白的组合构成的异源二聚体;或
- 由SEQ ID NO:218的蛋白与SEQ ID NO:219的蛋白的组合构成的异源二聚体。

19. 蛋白,其具有SEQ ID NO:103~112、123~148、177~184、193~203、215~219中任一项所记载的氨基酸序列。

20. T细胞受体(TCR),其为以下的任一种异源二聚体:

- 由SEQ ID NO:103的蛋白与SEQ ID NO:104的蛋白的组合构成的异源二聚体;

由SEQ ID NO:105的蛋白与SEQ ID NO:106的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:107的蛋白与SEQ ID NO:108的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:109的蛋白与SEQ ID NO:110的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:111的蛋白与SEQ ID NO:112的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:123的蛋白与SEQ ID NO:124的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:125的蛋白与SEQ ID NO:126的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:127的蛋白与SEQ ID NO:128的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:129或130的蛋白与SEQ ID NO:131的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:132的蛋白与SEQ ID NO:133的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:134的蛋白与SEQ ID NO:135的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:136的蛋白与SEQ ID NO:137的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:138或139的蛋白与SEQ ID NO:140的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:141的蛋白与SEQ ID NO:142的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:143的蛋白与SEQ ID NO:144的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:145的蛋白与SEQ ID NO:146的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:147的蛋白与SEQ ID NO:148的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:177的蛋白与SEQ ID NO:178的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:179的蛋白与SEQ ID NO:180的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:181的蛋白与SEQ ID NO:182的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:183的蛋白与SEQ ID NO:184的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:193的蛋白与SEQ ID NO:194的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:195的蛋白与SEQ ID NO:196的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:197的蛋白与SEQ ID NO:198的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:199或200的蛋白与SEQ ID NO:201的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:202的蛋白与SEQ ID NO:203的蛋白的组合构成的异源二聚体；
由SEQ ID NO:216的蛋白与SEQ ID NO:217的蛋白的组合构成的异源二聚体；或
由SEQ ID NO:218的蛋白与SEQ ID NO:219的蛋白的组合构成的异源二聚体。

21. 基因,其具有SEQ ID NO:113~122、149~176、185~192、204~214、220~224中任一项的核苷酸序列。

22. 伴随诊断方法,其包括以下步骤:步骤1,通过多重荧光免疫染色同时测定来自对象的样品中的GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的表达是否存在和HLA I类的细胞膜表达;以及步骤2,根据上述表达的是否存在判定癌症的免疫疗法的适用。

23. 权利要求22所述的伴随诊断方法,其中,在步骤1中进一步测定AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上的表达是否存在。

24. 权利要求22所述的伴随诊断方法,其中,在步骤1中测定GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部的表达是否存在。

25. 权利要求22所述的伴随诊断方法,其中,在步骤1中测定GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部的表达是否存在。

26. 癌症发病风险的诊断方法,其包括:针对来自对象的血液样品中的细胞,对GPC3、

ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的表达进行分析。

27. 权利要求26所述的癌症发病风险的诊断方法,其进一步包括:对AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上的表达进行分析。

28. 权利要求26所述的癌症发病风险的诊断方法,其中,对GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部的表达进行分析。

29. 权利要求26所述的癌症发病风险的诊断方法,其中,对GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部的表达进行分析。

利用通用癌抗原鸡尾酒的癌症疫苗、TCR/CAR-T细胞治疗药、 伴随诊断方法和基于血中循环癌细胞检测的癌症发病风险诊 断方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用了通用癌抗原鸡尾酒的癌症疫苗。本发明还涉及TCR/CAR-T细胞治疗药、伴随诊断方法和基于血中循环癌细胞检测的癌症发病风险诊断方法。

背景技术

[0002] 被诊断为癌症,即使接受了根治性切除手术,也有很多无法存活10年以上的患者。日本每年有100万人罹患癌症,40万人死亡。如果开发以癌症为对象的癌症疫苗、TCR/CAR-T细胞治疗药、伴随诊断方法和基于血中循环癌细胞检测的癌症发病风险诊断方法,则认为每年的100万患病者中的多数会成为对象。另外,如果将来还可作为采血中的癌症发病风险诊断或针对发病风险者的癌症预防疫苗使用,则全体国民可成为对象。

[0003] 然而,迄今为止针对癌症的疫苗疗法的开发均以失败而告终。TCR/CAR-T细胞治疗也作为实体瘤的治疗方法,而有希望的方法尚未出现。另外,捕捉CTC的技术也谈不上已完成,将认为是CTC的细胞可靠地证明为癌细胞而关系到癌症的复发/发病风险诊断的技术尚不存在。利用受到关注的新生抗原的疫苗或TCR-T细胞治疗也是个性化治疗,开发成本或管制的难度高。

发明内容

[0004] 发明所要解决的课题

[0005] 为了开发多数人适合的癌症疫苗或TCR基因引入T细胞疗法,在靶标癌细胞中表达的抗原很重要。作为抗原,难以使用个别对应的新生抗原,在癌症中频繁表达、而在大部分的正常脏器中不表达的所谓通用癌抗原很重要。另外,为了CAR-T细胞疗法或抗体治疗、或捕获血中循环癌细胞,特别需要在细胞膜上表达的通用癌抗原。如以往所报道的癌睾丸抗原等有名的癌抗原的多数不在细胞膜上表达,存在表达频率低、或也在正常组织中表达的问题。

[0006] 本发明以提供利用了通用癌抗原鸡尾酒的癌症疫苗、TCR/CAR-T细胞治疗药、伴随诊断方法和基于血中循环癌细胞检测的癌症发病风险诊断方法作为所要解决的课题。

[0007] 用于解决课题的手段

[0008] 为了解决上述课题,本发明人进行了深入研究,结果通过免疫组织化学分析鉴定了在各种实体瘤中频繁表达、而在正常组织中几乎不表达的10种通用癌抗原。其中5种为膜蛋白抗原,在迄今为止所研究的头颈部癌、肺癌、肝癌、胆道癌、胰腺癌、大肠癌这样的实体瘤中,这5种抗原中的至少一种以上在大部分病例的癌症中表达,证明了这些通用癌抗原鸡尾酒可涵盖所有的实体瘤。本发明是基于上述见解而完成的。

[0009] 即,根据本发明,提供以下的发明。

[0010] <1>癌症疫苗,其包含:

- [0011] (1) 含有选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1 (SLC7A5) 中的3种以上的通用癌抗原;
- [0012] (2) 上述3种以上的通用癌抗原的部分肽,其具有CTL诱导能力;
- [0013] (3) 用上述部分肽刺激的树突状细胞;或
- [0014] (4) 编码上述通用癌抗原或上述部分肽的mRNA。
- [0015] <2><1>所述的癌症疫苗,其中,上述通用癌抗原进一步包含AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α (HSPH1) 和FOXMI中的1种以上。
- [0016] <3><1>所述的癌症疫苗,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。
- [0017] <4><1>所述的癌症疫苗,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部。
- [0018] <5><1>~<4>中任一项所述的癌症疫苗,其中,上述部分肽为具有SEQ ID NO:1~80中任一项所记载的氨基酸序列的肽。
- [0019] <6>癌症疫苗,其包含:
- [0020] (1) 包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的3种以上的通用癌抗原;
- [0021] (2) 上述3种以上的通用癌抗原的部分肽,其具有CTL诱导能力;
- [0022] (3) 用上述部分肽刺激的树突状细胞;或
- [0023] (4) 编码上述通用癌抗原或上述部分肽的mRNA。
- [0024] <7>肽,其具有SEQ ID NO:5、7~10、14~22、24~38、40、42、48、49、52~80中任一项所记载的氨基酸序列。
- [0025] <8>CAR-T细胞治疗剂,其包含具有针对通用癌抗原的嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞的混合物,该通用癌抗原包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上。
- [0026] <9><8>所述的CAR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原进一步包含AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上。
- [0027] <10><8>所述的CAR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。
- [0028] <11><8>所述的CAR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部。
- [0029] <12>CAR-T细胞治疗剂,其包含具有针对通用癌抗原的嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞的混合物,该通用癌抗原包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的3种以上。
- [0030] <13>TCR-T细胞治疗剂,其包含具有可识别来自通用癌抗原的MHC I类结合性抗原肽的T细胞受体 (TCR) 的T细胞的混合物,该通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上。
- [0031] <14><13>所述的TCR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原进一步包含AFP、TGFB1、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上。
- [0032] <15><13>所述的TCR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。

[0033] <16><13>所述的TCR-T细胞治疗剂,其中,上述通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXM1的全部。

[0034] <17>TCR-T细胞治疗剂,其包含具有可识别来自通用癌抗原的MHC I类结合性抗原肽的T细胞受体(TCR)的T细胞的混合物,该通用癌抗原包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXM1中的3种以上。

[0035] <18><13>~<17>中任一项所述的TCR-T细胞治疗剂,其中,T细胞受体(TCR)为以下的任一种异源二聚体:

[0036] 由SEQ ID NO:103的蛋白与SEQ ID NO:104的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0037] 由SEQ ID NO:105的蛋白与SEQ ID NO:106的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0038] 由SEQ ID NO:107的蛋白与SEQ ID NO:108的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0039] 由SEQ ID NO:109的蛋白与SEQ ID NO:110的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0040] 由SEQ ID NO:111的蛋白与SEQ ID NO:112的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0041] 由SEQ ID NO:123的蛋白与SEQ ID NO:124的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0042] 由SEQ ID NO:125的蛋白与SEQ ID NO:126的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0043] 由SEQ ID NO:127的蛋白与SEQ ID NO:128的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0044] 由SEQ ID NO:129或130的蛋白与SEQ ID NO:131的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0045] 由SEQ ID NO:132的蛋白与SEQ ID NO:133的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0046] 由SEQ ID NO:134的蛋白与SEQ ID NO:135的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0047] 由SEQ ID NO:136的蛋白与SEQ ID NO:137的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0048] 由SEQ ID NO:138或139的蛋白与SEQ ID NO:140的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0049] 由SEQ ID NO:141的蛋白与SEQ ID NO:142的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0050] 由SEQ ID NO:143的蛋白与SEQ ID NO:144的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0051] 由SEQ ID NO:145的蛋白与SEQ ID NO:146的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0052] 由SEQ ID NO:147的蛋白与SEQ ID NO:148的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0053] 由SEQ ID NO:177的蛋白与SEQ ID NO:178的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0054] 由SEQ ID NO:179的蛋白与SEQ ID NO:180的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0055] 由SEQ ID NO:181的蛋白与SEQ ID NO:182的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0056] 由SEQ ID NO:183的蛋白与SEQ ID NO:184的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0057] 由SEQ ID NO:193的蛋白与SEQ ID NO:194的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0058] 由SEQ ID NO:195的蛋白与SEQ ID NO:196的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0059] 由SEQ ID NO:197的蛋白与SEQ ID NO:198的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0060] 由SEQ ID NO:199或200的蛋白与SEQ ID NO:201的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0061] 由SEQ ID NO:202的蛋白与SEQ ID NO:203的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0062] 由SEQ ID NO:216的蛋白与SEQ ID NO:217的蛋白的组合构成的异源二聚体;或

[0063] 由SEQ ID NO:218的蛋白与SEQ ID NO:219的蛋白的组合构成的异源二聚体。

[0064] <19>蛋白,其具有SEQ ID NO:103~112、123~148、177~184、193~203、215~219

中任一项所记载的氨基酸序列。

[0065] <20>T细胞受体 (TCR), 其为以下的任一种异源二聚体:

[0066] 由SEQ ID NO:103的蛋白与SEQ ID NO:104的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0067] 由SEQ ID NO:105的蛋白与SEQ ID NO:106的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0068] 由SEQ ID NO:107的蛋白与SEQ ID NO:108的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0069] 由SEQ ID NO:109的蛋白与SEQ ID NO:110的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0070] 由SEQ ID NO:111的蛋白与SEQ ID NO:112的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0071] 由SEQ ID NO:123的蛋白与SEQ ID NO:124的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0072] 由SEQ ID NO:125的蛋白与SEQ ID NO:126的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0073] 由SEQ ID NO:127的蛋白与SEQ ID NO:128的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0074] 由SEQ ID NO:129或130的蛋白与SEQ ID NO:131的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0075] 由SEQ ID NO:132的蛋白与SEQ ID NO:133的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0076] 由SEQ ID NO:134的蛋白与SEQ ID NO:135的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0077] 由SEQ ID NO:136的蛋白与SEQ ID NO:137的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0078] 由SEQ ID NO:138或139的蛋白与SEQ ID NO:140的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0079] 由SEQ ID NO:141的蛋白与SEQ ID NO:142的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0080] 由SEQ ID NO:143的蛋白与SEQ ID NO:144的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0081] 由SEQ ID NO:145的蛋白与SEQ ID NO:146的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0082] 由SEQ ID NO:147的蛋白与SEQ ID NO:148的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0083] 由SEQ ID NO:177的蛋白与SEQ ID NO:178的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0084] 由SEQ ID NO:179的蛋白与SEQ ID NO:180的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0085] 由SEQ ID NO:181的蛋白与SEQ ID NO:182的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0086] 由SEQ ID NO:183的蛋白与SEQ ID NO:184的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0087] 由SEQ ID NO:193的蛋白与SEQ ID NO:194的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0088] 由SEQ ID NO:195的蛋白与SEQ ID NO:196的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0089] 由SEQ ID NO:197的蛋白与SEQ ID NO:198的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0090] 由SEQ ID NO:199或200的蛋白与SEQ ID NO:201的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0091] 由SEQ ID NO:202的蛋白与SEQ ID NO:203的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0092] 由SEQ ID NO:216的蛋白与SEQ ID NO:217的蛋白的组合构成的异源二聚体;或

[0093] 由SEQ ID NO:218的蛋白与SEQ ID NO:219的蛋白的组合构成的异源二聚体。

[0094] <21>基因, 其具有SEQ ID NO:113~122、149~176、185~192、204~214、220~224中任一项的核苷酸序列。

[0095] <22>伴随诊断方法, 其包括以下步骤: 步骤1, 通过多重荧光免疫染色同时测定来自对象的样品中的GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的表达是否存在和HLA I类的细胞膜表达; 以及步骤2, 根据上述表达的是否存在判定癌症的免疫疗法的适用。

[0096] <23><22>所述的伴随诊断方法, 其中, 在步骤1中进一步测定AFP、TGFB1、SPARC、

HSP105 α 和FOXMI中的1种以上的表达是否存在。

[0097] <24><22>所述的伴随诊断方法,其中,在步骤1中测定GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部的表达是否存在。

[0098] <25><22>所述的伴随诊断方法,其中,在步骤1中测定GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部的表达是否存在。

[0099] <26>癌症发病风险的诊断方法,其包括:针对来自对象的血液样品中的细胞,对GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的表达进行分析。

[0100] <27><26>所述的癌症发病风险的诊断方法,其进一步包括:对AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上的表达进行分析。

[0101] <28><26>所述的癌症发病风险的诊断方法,其中,对GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部的表达进行分析。

[0102] <29><26>所述的癌症发病风险的诊断方法,其中,对GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部的表达进行分析。

[0103] 发明效果

[0104] 根据本发明,提供利用了通用癌抗原鸡尾酒的癌症疫苗、TCR/CAR-T细胞治疗药、伴随诊断方法和基于血中循环癌细胞检测的癌症发病风险诊断方法。

附图说明

[0105] [图1]图1显示为了确认肝细胞癌等中的10种通用癌抗原的表达而使用石蜡包埋组织切片实施免疫组织化学染色的结果。

[0106] [图2]图2显示GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROBO1的细胞膜表达型通用癌抗原在各癌症种类中的表达。

[0107] [图3]图3显示神经母细胞瘤、肾母细胞瘤、绒毛膜癌的儿童癌症中的通用癌抗原的表达和HLA-I类的表达。

[0108] [图4]图4显示确认在肝细胞癌人临床样本的非癌部中的各通用癌抗原的的表达的结果。

[0109] [图5]图5是使用人正常组织微阵列将GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROBO1在31个正常组织中的细胞膜表达型通用癌抗原的表达显示于表。

[0110] [图6]图6显示适用诊断系统开发的概念,其中,为了在TCR-T、CAR-T、癌症疫苗等免疫疗法中判定以哪种通用癌抗原为靶标时有效,而利用了多重荧光免疫染色。

[0111] [图7]图7中,PDX为来自肝细胞癌和肺癌患者的标本,人临床样本使用肝细胞癌、肝内胆管癌、口咽癌(HPV-)患者的标本,显示了以GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROBO1的细胞膜表达型通用癌抗原和HLA-I类为对象进行多重荧光免疫染色的结果。

[0112] [图8]图8显示肝细胞癌以及原发性大肠癌中的各癌抗原的基因表达。

[0113] [图9]图9显示进行了抗原预测的肝细胞癌以及大肠癌肝转移中的各癌抗原的基因表达。

[0114] [图10]图10显示来自癌抗原的表位肽的预测流程(predicted pipeline)。

[0115] [图11]图11显示肝细胞癌中的来自各癌抗原的肽的SCOREadj的分布。

[0116] [图12]图12显示在肝细胞癌的7个病例中预测的癌抗原肽的总数。

[0117] [图13]图13显示可诱导抗原特异性T细胞的来自通用癌抗原的表位肽的鉴定法。显示利用与Brightpath Bio公司共同研究而建立的算法,由10种通用癌抗原氨基酸序列预测72种HLA-A*24:02限制性表位肽、73种HLA-A*02:01限制性表位肽,并用所合成的肽对转基因小鼠进行疫苗接种,通过ELISpot法评价抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0118] [图14]图14显示由10种通用癌抗原蛋白全长的氨基酸序列合成预测在HLA-A*02:01上呈递的肽,对在全身细胞中表达人的HLA-A*02:01的小鼠每周1次、共计3次给予肽疫苗,通过筛选鉴定出多个可在脾细胞中诱导与肽反应的CD8阳性杀伤T细胞(CTL)的肽的结果。

[0119] [图15]图15显示由10种通用癌抗原蛋白全长的氨基酸序列合成预测在HLA-A*24:02上呈递的肽,对在全身细胞中表达人的HLA-A*24:02的小鼠每周1次、共计3次给予肽疫苗,通过筛选鉴定出多个可在脾细胞中诱导与肽反应的CD8阳性杀伤T细胞(CTL)的肽的结果。

[0120] [图16]图16显示使用引入了各HLA基因的转基因小鼠对通过将确认到诱导CTL的来自通用癌抗原的短肽致敏树突状细胞(DC)对转基因小鼠进行疫苗接种是否诱导抗原特异性T细胞进行评价的方法。

[0121] [图17]图17显示将确认到诱导CTL的来自通用癌抗原的短肽致敏树突状细胞(DC)对HLA-A*24:02转基因小鼠进行疫苗接种,并使用引入了各HLA基因的转基因小鼠评价是否诱导抗原特异性T细胞的结果。

[0122] [图18]图18显示将确认到诱导CTL的来自通用癌抗原的短肽致敏树突状细胞(DC)对HLA-A*02:01转基因小鼠进行疫苗接种,并使用引入了各HLA基因的转基因小鼠评价是否诱导抗原特异性T细胞的结果。

[0123] [图19]图19显示为了使用长肽确认肽实际上是否在细胞内加工并呈递在HLA上,而使用HLA-A*02:01 Tgm或HLA-A*24:02 Tgm进行验证的结果,该长肽包含确认到诱导CTL的来自通用癌抗原的短肽序列。

[0124] [图20]图20显示3次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA的给药方法。

[0125] [图21]图21显示3次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0126] [图22]图22显示3次给予LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0127] [图23]图23显示3次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA或LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0128] [图24]图24显示3次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0129] [图25]图25显示3次给予LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0130] [图26]图26显示3次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA或LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0131] [图27]图27显示2次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA的给药方法。

[0132] [图28]图28显示2次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾

细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0133] [图29]图29显示2次给予LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0134] [图30]图30显示2次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA或LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0135] [图31]图31显示2次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0136] [图32]图32显示2次给予LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0137] [图33]图33显示2次给予LNP-Covid-19 Spike mRNA或LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞内的Spike抗原特异性IFN- γ 产生的结果。

[0138] [图34]图34显示针对Spike蛋白的抗体测定的结果。

[0139] [图35]图35显示3回给予LNP-hGPC3 mRNA的给药方法。

[0140] [图36]图36是显示对HLA-A*02:01 Tg小鼠给予LNP-hGPC3mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0141] [图37]图37是显示对HLA-A*02:01 Tg小鼠给予LNP-荧光素酶mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0142] [图38]图38是显示对HLA-A*24:02 Tg小鼠给予LNP-hGPC3mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0143] [图39]图39是显示对HLA-A*24:02 Tg小鼠给予LNP-荧光素酶mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0144] [图40]图40显示3次给予LNP-hROB01 mRNA的给药方法。

[0145] [图41]图41是显示对HLA-A*02:01 Tg小鼠给予LNP-hROB01mRNA或LNP-eGFP mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0146] [图42]图42是显示对HLA-A*24:02 Tg小鼠给予LNP-hROB01mRNA或LNP-eGFP mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0147] [图43]图43显示3次给予LNP-hCLDN1 mRNA或LNP-hEPHB4mRNA的给药方法。

[0148] [图44]图44是显示对HLA-A*02:01 Tg小鼠给予LNP-hCLDN1 mRNA、LNP-hEPHB4 mRNA或LNP-eGFP mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0149] [图45]图45是显示对HLA-A*24:02 Tg小鼠给予LNP-hCLDN1mRNA、LNP-hEPHB4 mRNA或LNP-eGFP mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0150] [图46]图46显示3次给予LNP-hTGFB1 mRNA或LNP-hSPARC mRNA的给药方法。

[0151] [图47]图47是显示对HLA-A*02:01 Tg小鼠给予LNP-hTGFB1 mRNA、LNP-hSPARC mRNA或LNP-eGFP mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0152] [图48]图48是显示对HLA-A*24:02 Tg小鼠给予LNP-hTGFB1 mRNA、LNP-hSPARC mRNA或LNP-eGFP mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

果。

[0153] [图49]图49显示3次给予LNP-hAFP mRNA或LNP-hHSP105 α mRNA的给药方法。

[0154] [图50]图50是显示对HLA-A*02:01 Tg小、鼠给予LNP-hAFP mRNA、LNP-hHSP105 α mRNA或LNP-eGFP mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0155] [图51]图51是显示对HLA-A*24:02 Tg小鼠给予LNP-hAFP mRNA、LNP-hHSP105 α mRNA或LNP-eGFP mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞内的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0156] [图52]图52显示3次给予LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA的给药方法。

[0157] [图53]图53是显示对HLA-A*02:01 Tg小鼠给予LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA或LNP-荧光素酶mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞中的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0158] [图54]图54是显示对HLA-A*02:01 Tg小鼠给予LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA或LNP-荧光素酶mRNA,并通过ELISPOT法评价腹股沟淋巴结中的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0159] [图55]图55是显示对HLA-A*24:02 Tg小鼠给予LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA或LNP-荧光素酶mRNA,并通过ELISPOT法评价脾细胞中的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0160] [图56]图56是显示对HLA-A*24:02 Tg小鼠给予LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA或LNP-荧光素酶mRNA,并通过ELISPOT法评价腹股沟淋巴结中的抗原特异性IFN- γ 的产生的结果。

[0161] [图57]图57显示通过抑制CD8分子与MHC的结合而进行的高亲和性T细胞克隆的选择方法。

[0162] [图58]图58显示由接受GPC3肽疫苗的患者外周血建立肽特异性CTL克隆。

[0163] [图59]图59显示由接受FOXM1肽疫苗的患者外周血建立肽特异性CTL克隆。

[0164] [图60]图60显示由接受HSP105肽疫苗的患者外周血建立肽特异性CTL克隆。

[0165] [图61]图61显示使用人HLA基因引入小鼠的肽反应性TCR基因的鉴定。

[0166] [图62]图62显示通过电穿孔法制作识别通用癌抗原(FOXM1)的TCR-T细胞。

[0167] [图63]图63显示克服癌症的多样性的鸡尾酒TCR-T细胞的开发方案。

[0168] [图64]图64显示利用CAR-T细胞进行的体外细胞毒性评价。

[0169] [图65]图65显示利用CAR-T细胞进行的体内细胞毒性评价。

[0170] [图66]图66显示鸡尾酒CAR-T治疗的开发。

[0171] [图67]图67显示各种癌细胞株中的膜蛋白通用癌抗原的表达分析的结果。

[0172] [图68]图68显示各种癌细胞株中的膜蛋白通用癌抗原的表达分析的结果。

[0173] [图69]图69显示在肝细胞癌病例的采血样本中在细胞膜上表达膜蛋白通用癌抗原GPC3、ROBO1、CLDN1、EPHB4中的任一种的CTC样细胞的检测结果。

具体实施方式

[0174] 以下,更详细地对本发明进行说明。

[0175] 本发明人通过免疫组织化学分析,鉴定了在各种实体瘤中频繁表达、而在正常组织中几乎不表达的10种通用癌抗原。其中5种为膜蛋白抗原,在迄今为止所研究的头颈部癌、肺癌、肝癌、胆道癌、胰腺癌、大肠癌这样的实体瘤中,这5种抗原的至少一种以上在大部分的病例的癌症中表达,证实了这些通用癌抗原鸡尾酒可涵盖所有的实体瘤。根据这些结

果,显示了利用这些通用癌抗原鸡尾酒的癌症疫苗、TCR-T细胞治疗、CAR-T细胞治疗、它们的伴随诊断和基于血中循环癌细胞检测的癌症发病风险诊断均可实现。

[0176] 日本人口的85%、世界人口的50%具有HLA-A24或-A2。在本发明中,由10种通用癌抗原蛋白全长的氨基酸序列合成预测在HLA-A24上呈递的肽和预测在HLA-A2上呈递的肽,对在全身细胞中表达人的HLA-A24或-A2的小鼠每周1次、共计3次给予肽疫苗,证明了在脾细胞中诱导与肽反应的CD8阳性杀伤T细胞(CTL)。这些肽的CTL诱导能力优异,通过肽疫苗或添加了肽的树突状细胞疫苗,可应用于癌症的治疗、复发预防或预防。另外,10种通用癌抗原包含可诱导CTL的多个肽序列,也可用作mRNA疫苗。

[0177] 而且,通过克隆T细胞受体(TCR),可开发基因引入了该TCR的T细胞疗法(TCR-T治疗),该TCR位于通过给予来自10种通用癌抗原的肽疫苗而诱导的、特异性地与肽反应的CTL的细胞表面,并识别癌细胞表面的HLA与肽的复合物。通过增加可与各通用癌抗原肽反应的TCR库(TCR repertoire),可实现最适合于每位患者或可适合于各种癌症的鸡尾酒TCR-T治疗。10种膜蛋白通用癌抗原中的任一种均在大部分的癌组织中表达。这意味着针对它们的鸡尾酒抗体疗法或鸡尾酒CAR-T治疗可用作大部分实体瘤的治疗方法。

[0178] <通用癌抗原>

[0179] GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXM1分别为已知的蛋白。在后述的实施例中,可使用由记载如下的氨基酸序列表示的蛋白、其同种型、或其同源物:

[0180] hGPC3_同工型_2_NP_004475

[0181] hROB01_同工型_X5_XP_006713340(hROB01的细胞质内型)

[0182] hROB01_同工型_a_NP_002932(hROB01的膜定位型)

[0183] hEPHB4_NP_004435

[0184] hCLDN1_NP_066924

[0185] hSLC7A5_NP_003477

[0186] hAFP_同工型_1_NP_001125

[0187] hTGFBI_NP_000349

[0188] hSPARC_同工型_1_NP_003109

[0189] hFOXM1_同工型_2_NP_068772

[0190] hHSPH1_同工型_1_NP_006635。

[0191] 作为同种型,例如可列举:剪接变体、基于个体差异的SNP等变体等。具体而言,可列举:(1)由在上述实施例所记载的氨基酸序列中具有优选95%以上、进一步优选98%以上的序列同一性的氨基酸序列构成的蛋白;(2)由在上述实施例所记载的氨基酸序列中有1个或多个、优选1个~数个、进一步优选1个~10个、1个~5个、1个~3个、1个或2个氨基酸被取代、缺失、添加或插入而得的氨基酸序列构成的蛋白。

[0192] <肽和蛋白>

[0193] 本发明中的肽和蛋白可通过包括基于编码其的基因的核苷酸序列信息的DNA克隆、质粒构建、宿主转染、转化体的培养和从培养物中回收蛋白等操作的普通基因工程技术,使用表达载体或克隆载体等来制造。

[0194] 重组载体可通过将多核苷酸插入至适当的载体来制造。载体可根据宿主的种类和

使用目的适当选择。作为载体,例如可列举:来自染色体、附加体(episome)或病毒等的载体。具体而言,例如可列举:来自细菌质粒、噬菌体、转座子、酵母附加体、插入元件、酵母染色体元件、病毒(例如杆状病毒、乳多空病毒(papovavirus)、SV40、痘苗病毒、腺病毒和逆转录病毒等)等的载体和它们组合而成的载体、来自质粒和噬菌体的遗传学元件的载体(例如,粘粒和噬菌粒等)。

[0195] 通过利用已知方法将多核苷酸插入至载体,可得到包含多核苷酸的重组载体。

[0196] 插入有多核苷酸的重组载体通过已知方法引入至已知的宿主、例如大肠杆菌、芽孢杆菌属细菌这样的细菌、酵母、昆虫细胞或动物细胞(例如,COS-7细胞、Vero细胞、CHO细胞等)等,从而得到引入有重组载体的转化体。

[0197] 基因引入可通过本领域技术人员所已知的方法进行。具体而言,可列举:磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转染、感染等。

[0198] <癌症疫苗>

[0199] 本发明的癌症疫苗包含:

[0200] (1) 包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的通用癌抗原;

[0201] (2) 上述3种以上的通用癌抗原的部分肽,其具有CTL诱导能力;

[0202] (3) 用上述部分肽刺激的树突状细胞;或

[0203] (4) 编码上述通用癌抗原或上述部分肽的mRNA。

[0204] 通用癌抗原可包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上,也可包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种、4种或5种。优选地,通用癌抗原可包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。

[0205] 除选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的物质以外,通用癌抗原还可包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上。即,通用癌抗原可进一步包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种、2种、3种、4种或5种。

[0206] 优选地,通用癌抗原可包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部。

[0207] 本发明中,可使用上述3种以上的通用癌抗原的部分肽、且具有CTL诱导能力的部分肽作为癌症疫苗。即,作为部分肽,使用至少3种以上的部分肽。

[0208] 具体而言,作为部分肽,可包含选自GPC3的部分肽、ROB01的部分肽、EPHB4的部分肽、CLDN1的部分肽和LAT1的部分肽中的3种以上,也可包含选自GPC3的部分肽、ROB01的部分肽、EPHB4的部分肽、CLDN1的部分肽和LAT1的部分肽中的3种、4种或5种。优选地,作为部分肽,可包含GPC3的部分肽、ROB01的部分肽、EPHB4的部分肽、CLDN1的部分肽和LAT1的部分肽的全部。

[0209] 除选自GPC3的部分肽、ROB01的部分肽、EPHB4的部分肽、CLDN1的部分肽和LAT1的部分肽中的部分肽以外,部分肽还可包含AFP的部分肽、TGFBI的部分肽、SPARC的部分肽、HSP105 α 的部分肽和FOXMI的部分肽中的1种以上。即,通用癌抗原可进一步包含AFP的部分肽、TGFBI的部分肽、SPARC的部分肽、HSP105 α 的部分肽和FOXMI的部分肽中的1种、2种、3种、4种或5种。

[0210] 优选地,部分肽可包含GPC3的部分肽、ROB01的部分肽、EPHB4的部分肽、CLDN1的部分肽、LAT1的部分肽、AFP的部分肽、TGFBI的部分肽、SPARC的部分肽、HSP105 α 的部分肽和

FOXMI的部分肽的全部。

[0211] 上述的部分肽为表位肽,其是与MHC(人中为HLA)结合以向细胞表面呈递抗原、且具有抗原性(可被T细胞识别)的肽。作为表位肽,有与MHC I类结合以呈递抗原、且被CD8阳性T细胞识别的表位肽即CTL表位肽、以及与MHC II类结合以呈递抗原、且被CD4阳性T细胞识别的表位肽即辅助性表位肽。本发明中的部分肽优选为与MHC I类结合以呈递抗原、且被CD8阳性T细胞识别的表位肽即CTL表位肽。

[0212] 本发明中的部分肽是来自在肿瘤细胞中特异性地表达的蛋白的肽,是肿瘤抗原肽。抗原呈递是指细胞内存在的肽与MHC结合、且该MHC/抗原肽复合物定位于细胞表面的现象。呈递至细胞表面的抗原被T细胞等识别后,激活细胞免疫或体液免疫。呈递给MHC I类的抗原激活细胞免疫,同时被幼稚T细胞的T细胞受体识别,将幼稚T细胞诱导成具有细胞毒活性的CTL,因此作为用于免疫疗法的肿瘤抗原肽,优选与MHC I类结合、且呈递抗原的肽。

[0213] 如上所述,本发明中的部分肽是GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 或FOXMI的部分肽,是与MHC、特别是与HLA结合的肽,优选为通过MHC、特别是通过HLA呈递抗原的肽,进一步优选为通过MHC、特别是通过HLA呈递抗原以可诱导CTL的肽。部分肽优选可与HLA I类结合,更优选可与HLA-A02和/或HLA-A24结合。

[0214] 部分肽只要是包含表位的氨基酸序列的序列,则对氨基酸长度没有特别限定,通常氨基酸长度优选约8~14个氨基酸左右,更优选约8~11个氨基酸左右,特别优选约9~11个氨基酸左右。

[0215] 已知与人的MHC I类即HLA I类结合的表位肽为约8~14个氨基酸长度、优选约9~11个氨基酸长度,其序列中具有所结合的HLA特有的结合基序。例如,与HLA-A02结合的肽可具有从N末端起第2位的氨基酸可以是亮氨酸、异亮氨酸或蛋氨酸和/或C末端的氨基酸可以是缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸的结合基序,与HLA-A24结合的肽可具有从N末端起第2位的氨基酸可以是酪氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸或色氨酸和/或C末端的氨基酸可以是亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸的结合基序,但并不限于上述。

[0216] 因此,部分肽优选包含表位肽,该表位肽为GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 或FOXMI的部分肽,可以是由上述蛋白的氨基酸序列中的连续的8~14个氨基酸构成、且从N末端起第2位的氨基酸可以是亮氨酸、异亮氨酸或蛋氨酸和/或C末端的氨基酸可以是缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸的肽。或者,部分肽优选为GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 或FOXMI的部分肽,其是由上述蛋白的氨基酸序列中的连续的8~14个氨基酸构成,且从N末端起第2位的氨基酸可以是酪氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸或色氨酸和/或C末端的氨基酸可以是亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸的肽,但并不限于上述。

[0217] 部分肽的N末端和/或C末端可被修饰。作为修饰,具体而言,可列举:N-烷酰化(例如,乙酰化)、N-烷基化(例如,甲基化)、C末端烷基酯(例如,乙基酯)和C末端酰胺(例如,甲酰胺)等。

[0218] 关于部分肽的合成,可依据通常在肽化学中使用的已知方法进行。

[0219] 作为上述的部分肽,可使用具有SEQ ID NO:1~80中的任一个所记载的氨基酸序列的肽。

[0220] 上述肽中,具有SEQ ID NO:5、7~10、14~22、24~38、40、42、48、49、52~80中的任

一个所记载的氨基酸序列的肽为新型肽。

[0221] 上述的部分肽具有CTL诱导活性,作为肿瘤抗原肽,可用作CTL诱导剂。即,从HLA-A02抗原或HLA-A24抗原为阳性的人分离外周血淋巴细胞,在体外添加上述的部分肽进行刺激,从而可诱导特异性地识别呈递上述部分肽的HLA-A02抗原阳性细胞或HLA-A24抗原阳性细胞的CTL。CTL的诱导是否存在例如可通过利用例如ELISA法等测定CTL与抗原肽呈递细胞反应而产生的各种细胞因子(例如IFN- γ)的量来确认。另外,也可通过测定CTL对用⁵¹Cr标记的抗原肽呈递细胞的毒性的方法进行确认。

[0222] 本发明中,可使用经部分肽刺激的树突状细胞作为癌症疫苗。即,通过使部分肽与树突状细胞在体外接触,可制造在细胞表面呈递HLA-A02抗原或HLA-A24抗原与本发明的部分肽的复合物的抗原呈递细胞。优选地,作为树突状细胞,可使用来自癌症患者的经分离的细胞。关于树突状细胞,例如可通过Ficoll法从癌症患者的外周血分离淋巴细胞,之后去除非粘附细胞,在GM-CSF和IL-4存在下培养粘附细胞来诱导树突状细胞。通过使如上操作从癌症患者分离的树突状细胞与本发明的部分肽在体外接触,可制造在细胞表面呈递HLA-A02抗原或HLA-A24抗原与部分肽的复合物的抗原呈递细胞。

[0223] 本发明中,可使用编码上述通用癌抗原或上述部分肽的mRNA作为癌症疫苗。作为编码通用癌抗原或部分肽的mRNA,可使用串联编码多个部分肽的mRNA。这种情况下,在1条mRNA上编码多个部分肽。

[0224] 本发明的癌症疫苗对癌症患者有效,特别是对HLA-A02或HLA-A24阳性的癌症患者有效。具体而言,例如对肝细胞癌、大肠癌、口咽癌、食道癌、子宫癌、肾母细胞瘤、肺癌、乳腺癌、舌癌、肝内胆管癌、肾癌、神经母细胞瘤、绒毛膜癌等的患者有效。

[0225] 本发明的癌症疫苗可用于癌症的预防或治疗。作为癌症的预防,不仅包括预防患者罹患癌症,还包括:预防通过手术切除了原发灶的肿瘤的患者们的复发;防止无法通过手术、放射线疗法或药物疗法等癌症治疗完全去除的肿瘤的转移等。癌症的治疗不仅包括使癌缩小的癌症的治愈/症状改善,还包括抑制癌细胞的增殖、肿瘤的增大或癌细胞从原发灶转移的恶化防止等。

[0226] 本发明的癌症疫苗可以以药物组合物的形态提供。

[0227] 本发明的癌症疫苗的剂型可以是口服给药剂或胃肠外给药剂中的任一种,通常优选胃肠外给药剂。作为胃肠外给药剂,可列举:皮下注射剂、肌肉内注射剂、静脉内注射剂、栓剂等。

[0228] 在本发明的癌症疫苗为口服给药剂的情况下,可将上述的有效成分和药学上可接受的赋形剂一起配制成癌症疫苗。作为赋形剂,例如可列举:淀粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸镁、纤维素、聚合氨基酸(polymerization amino acid)和白蛋白等。

[0229] 在本发明的癌症疫苗为胃肠外给药剂的情况下,可将上述的有效成分和药学上可接受的载体一起配制成癌症疫苗。作为载体,例如可列举:水、食盐、葡萄糖、乙醇、甘油和DMSO等。

[0230] 本发明的癌症疫苗根据需要可进一步包含白蛋白、润湿剂和/或乳化剂等。

[0231] 另外,为了激活细胞免疫,上述的有效成分可与适当的佐剂一起使用。本发明的癌症疫苗可含有该佐剂。

[0232] 作为佐剂,可适用本领域已知的佐剂,具体而言,可列举:以下物质。作为凝胶型,

可列举:氢氧化铝、磷酸铝和磷酸钙等。作为菌体型,可列举:CpG、单磷酰脂质A、霍乱毒素、大肠杆菌易热毒素、百日咳毒素和胞壁酰二肽等。作为油乳浊液型(乳液制剂),可列举:弗氏不完全佐剂。作为高分子纳米颗粒型,可列举:脂质体、生物降解性微球和来自皂甙的QS-21等。作为合成型,可列举:非离子性嵌段共聚物、胞壁酰肽类似物、聚磷腈和合成多核苷酸等。作为细胞因子型,可列举:IFN- γ 、IL-2和IL-12等。

[0233] 对本发明的癌症疫苗(药物组合物)的剂型没有特别限定,可列举:油乳浊液(乳液制剂)、高分子纳米颗粒、脂质体制剂、与直径为数 μm 的珠粒结合而成的颗粒状制剂、结合有脂质的制剂、微球制剂、微囊制剂等。

[0234] 作为本发明的癌症疫苗(药物组合物)的给药方法,可列举:皮内给药、皮下给药、肌肉内给药、静脉内给药等。癌症疫苗中的有效成分的给药量可根据治疗靶标疾病、患者的年龄、体重等适当调整,成人(体重50kg)每人通常为0.0001mg~1000mg、优选为0.001mg~1000mg、更优选为0.1mg~10mg,优选将其数天~数月给药1次。

[0235] 另外,在使用经部分肽刺激的树突状细胞作为癌症疫苗的情况下,为了稳定地维持上述的树突状细胞,优选包含生理盐水、磷酸缓冲生理盐水(PBS)、培养基等。作为给药方法,可列举:静脉内给药、皮下给药、皮内给药等。通过将含有这样的用部分肽刺激的树突状细胞作为有效成分的癌症疫苗返回到患者体内,在罹患癌症的患者体内高效地诱导对表达本发明的通用癌抗原的癌细胞呈特异性的CTL,其结果,可预防或治疗癌症。

[0236] <CAR-T细胞治疗剂>

[0237] 本发明的CAR-T细胞治疗剂包含具有针对包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的通用癌抗原的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的混合物。

[0238] 通用癌抗原只要包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上即可,也可包含选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种、4种或5种。优选地,通用癌抗原可包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。

[0239] 除选自GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的物质以外,通用癌抗原还可包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上。即,通用癌抗原可进一步包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种、2种、3种、4种或5种。

[0240] 优选地,通用癌抗原可包含GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部。

[0241] CAR-T细胞疗法是指,向来自患者的T细胞内基因引入对肿瘤抗原特异性的单克隆抗体的一部分实施基因操作而修饰的嵌合抗原受体(CAR),在体外扩增培养该基因修饰T细胞后输注至患者内的免疫细胞疗法。具体而言,通过在抗CD3抗体和IL-2等的存在下培养从患者采集的外周血单核细胞而激活T细胞后,使用逆转录病毒载体或慢病毒载体等转化用载体将编码CAR的基因引入至T细胞内,从而制作基因修饰T细胞。

[0242] 嵌合抗原受体是设计成在N末端侧具有识别存在于癌细胞的细胞表面的分子的抗体的抗体可变区的轻链和重链串联合而成的单链抗体(scFv)、C末端侧具有构成T细胞受体(TCR)/CD3复合物的分子中的CD3 ζ 链的嵌合蛋白分子。该嵌合抗原受体若在scFv区识别特定的抗原,则经由CD3 ζ 链发生T细胞的激活。为了增强T细胞的激活,可在scFv和 ζ 链之间插入1个或2个以上的共刺激分子(例如CD28、4-1BB、ICOS等)。作为scFv,可使用TCR样抗体(包括可由TCR样抗体设计的抗体分子或其片段)来制作CAR。识别来自肿瘤抗原的肽与MHC

的复合物的CAR可识别呈递CTL所能标靶的肿瘤抗原肽的癌细胞、吞噬癌细胞以在MHC I类上呈递肿瘤抗原肽的树突状细胞等,因此引入有上述CAR的基因修饰T细胞与人工CTL一样可用作对上述肿瘤抗原特异性的癌症的预防和/或治疗药。

[0243] 具有嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR-T细胞)可直接或与各种载体一起配制成CAR-T细胞治疗剂。

[0244] CAR-T细胞治疗剂的剂型可以是口服给药剂或胃肠外给药剂中的任一种。通常优选胃肠外给药剂。作为胃肠外给药剂,可列举:皮下注射剂、肌肉内注射剂、静脉内注射剂、栓剂等。

[0245] 在CAR-T细胞治疗剂为口服给药剂的情况下,可将所得到的CAR-T细胞与药学上可接受的赋形剂一起配制成CAR-T细胞治疗剂。作为该赋形剂,例如可列举:淀粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸镁、纤维素、聚合氨基酸和白蛋白等。

[0246] 在CAR-T细胞治疗剂为胃肠外给药剂的情况下,可将所得到的CAR-T细胞与药学上可接受的载体一起配制成CAR-T细胞治疗剂。作为该赋形剂,例如可列举:水、食盐、葡萄糖、乙醇、甘油和DMSO等。

[0247] <TCR-T细胞治疗剂>

[0248] 本发明的TCR-T细胞治疗剂包含具有T细胞受体(TCR)的T细胞的混合物,该T细胞受体可识别来自包含GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上的通用癌抗原的MHC I类结合性抗原肽。

[0249] 通用癌抗原只要包含选自GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上即可,可包含选自GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种、4种或5种。优选地,通用癌抗原可包含GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部。

[0250] 除选自GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1和LAT1中的物质以外,通用癌抗原还可包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种以上。即,通用癌抗原可进一步包含AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI中的1种、2种、3种、4种或5种。

[0251] 优选地,通用癌抗原可包含GPC3、ROBO1、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXMI的全部。

[0252] 可识别来自通用癌抗原的MHC I类结合性抗原肽的T细胞受体(TCR)可识别本发明的部分肽(抗原肽)与HIA的复合物。

[0253] T细胞受体(TCR)通常为TRA与TRB的异源二聚体。

[0254] 作为T细胞受体(TCR)的具体例,可使用后述实施例中的表2~表11中记载的T细胞受体。即,作为具体的T细胞受体(TCR),可列举:

[0255] 由SEQ ID NO:103的蛋白与SEQ ID NO:104的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0256] 由SEQ ID NO:105的蛋白与SEQ ID NO:106的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0257] 由SEQ ID NO:107的蛋白与SEQ ID NO:108的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0258] 由SEQ ID NO:109的蛋白与SEQ ID NO:110的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0259] 由SEQ ID NO:111的蛋白与SEQ ID NO:112的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0260] 由SEQ ID NO:123的蛋白与SEQ ID NO:124的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0261] 由SEQ ID NO:125的蛋白与SEQ ID NO:126的蛋白的组合构成的异源二聚体;

[0262] 由SEQ ID NO:127的蛋白与SEQ ID NO:128的蛋白的组合构成的异源二聚体;

- [0263] 由SEQ ID NO:129或130的蛋白与SEQ ID NO:131的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0264] 由SEQ ID NO:132的蛋白与SEQ ID NO:133的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0265] 由SEQ ID NO:134的蛋白与SEQ ID NO:135的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0266] 由SEQ ID NO:136的蛋白与SEQ ID NO:137的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0267] 由SEQ ID NO:138或139的蛋白与SEQ ID NO:140的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0268] 由SEQ ID NO:141的蛋白与SEQ ID NO:142的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0269] 由SEQ ID NO:143的蛋白与SEQ ID NO:144的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0270] 由SEQ ID NO:145的蛋白与SEQ ID NO:146的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0271] 由SEQ ID NO:147的蛋白与SEQ ID NO:148的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0272] 由SEQ ID NO:177的蛋白与SEQ ID NO:178的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0273] 由SEQ ID NO:179的蛋白与SEQ ID NO:180的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0274] 由SEQ ID NO:181的蛋白与SEQ ID NO:182的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0275] 由SEQ ID NO:183的蛋白与SEQ ID NO:184的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0276] 由SEQ ID NO:193的蛋白与SEQ ID NO:194的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0277] 由SEQ ID NO:195的蛋白与SEQ ID NO:196的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0278] 由SEQ ID NO:197的蛋白与SEQ ID NO:198的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0279] 由SEQ ID NO:199或200的蛋白与SEQ ID NO:201的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0280] 由SEQ ID NO:202的蛋白与SEQ ID NO:203的蛋白的组合构成的异源二聚体;
- [0281] 由SEQ ID NO:216的蛋白与SEQ ID NO:217的蛋白的组合构成的异源二聚体;或
- [0282] 由SEQ ID NO:218的蛋白与SEQ ID NO:219的蛋白的组合构成的异源二聚体。
- [0283] 上述T细胞受体 (TCR) 的氨基酸序列和核苷酸序列均为新型序列。
- [0284] 根据本发明,提供具有SEQ ID NO:103~112、123~148、177~184、193~203、215~219中任一个所记载的氨基酸序列的蛋白。
- [0285] 根据本发明,提供具有SEQ ID NO:113~122、149~176、185~192、204~214、220~224中的任一个的核苷酸序列的基因。
- [0286] 通过使本发明的通用癌抗原的部分肽与外周血淋巴细胞在体外接触,可诱导具有T细胞受体 (TCR) 的T细胞。所得到的具有T细胞受体 (TCR) 的T细胞可特异性地伤害呈递本发明的通用癌抗原的细胞。优选地,可使用本发明的通用癌抗原的部分肽在体外刺激患者外周血淋巴细胞以增加具有T细胞受体 (TCR) 的T细胞(即,肿瘤特异性CTL),之后将该具有T细胞受体 (TCR) 的T细胞返回至患者。
- [0287] 如上所述,具有T细胞受体 (TCR) 的T细胞可成为癌症的治疗药或预防药的有效成分,可用作TCR-T细胞治疗剂。TCR-T细胞治疗剂优选包含生理盐水、磷酸缓冲生理盐水(PBS)、培养基等以稳定地维持TCR-T细胞。作为给药方法,可列举:静脉内给药、皮下给药、皮内给药等。通过将这样的含有TCR-T细胞作为有效成分而形成的癌症的治疗或预防药返回至患者的体内,在罹患了本发明的通用癌抗原为阳性的癌症的患者体内通过TCR-T细胞促进癌细胞的毒性作用,破坏癌细胞,从而可治疗癌症。

[0288] 本发明的TCR-T细胞可以以抗原呈递于肿瘤细胞的部分肽与HLA的复合物作为靶标而发挥细胞毒活性。即,本发明的TCR-T细胞的T细胞受体(TCR)识别本发明的部分肽与HLA的复合物。

[0289] 具有T细胞受体(TCR)的T细胞(TCR-T细胞)可直接或与各种载体一起配制成TCR-T细胞药。

[0290] TCR-T细胞治疗剂的剂型可以是口服给药剂或胃肠外给药剂中的任一种。通常优选胃肠外给药剂。作为胃肠外给药剂,可列举:皮下注射剂、肌肉内注射剂、静脉内注射剂、栓剂等。

[0291] 在TCR-T细胞治疗剂为口服给药剂的情况下,可将所得到的TCR-T细胞治疗剂与药学上可接受的赋形剂一起配制成TCR-T细胞治疗剂。作为该赋形剂,例如可列举:淀粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸镁、纤维素、聚合氨基酸和白蛋白等。

[0292] 在TCR-T细胞治疗剂为胃肠外给药剂的情况下,可将所得到的TCR-T细胞治疗剂与药学上可接受的载体一起配制成TCR-T细胞治疗剂。作为该赋形剂,例如可列举:水、食盐、葡萄糖、乙醇、甘油和DMSO等。

[0293] <伴随诊断方法>

[0294] 本发明的伴随诊断方法包括以下步骤:步骤1,通过多重荧光免疫染色同时测定来自对象的样品中的GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上(即3种、4种或5种)的表达是否存在和HLA I类的细胞膜表达;以及步骤2,根据上述表达的是否存在判定癌症免疫疗法的适用。

[0295] 优选地,在步骤1中可进一步测定AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXM1中的1种以上(即1种、2种、3种、4种或5种)的表达是否存在。

[0296] 优选地,在步骤1中可测定GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部的表达是否存在。

[0297] 优选地,在步骤1中可测定GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXM1的全部的表达是否存在。

[0298] 对来自对象的样品没有特别限定,可列举:肝脏、大肠、口咽、食道、子宫、肾脏、肺、乳房、舌、肝内胆管、神经、血液等。

[0299] 本发明的通用癌抗原的表达是否存在和HLA I类的细胞膜表达通过多重荧光免疫染色同时测定。多重荧光免疫染色可以是直接法或间接法中的任一种。在直接法中,使用多个直接标记荧光的一次抗体,不使用标记二次抗体。在直接法中,可避免由二次抗体引起的交叉反应,另外,系统简单、操作时间短。在间接法中,使用多个一次抗体,使用针对这些一次抗体的标记二次抗体。通过并用扩增法等,具有能够以高于直接法的灵敏度进行检测的优点。

[0300] 多重荧光免疫染色中使用的荧光色素可考虑激发波长和荧光波长的荧光光谱来选择。

[0301] 在本发明的伴随诊断方法中,患有癌症的患者中,在为了治疗癌症而给予治疗药的情况下,可检查或诊断是否有改善或其程度。而且,本发明的伴随诊断方法也可用于可有效适用本发明的癌症疫苗、TCR-T细胞治疗药或CAR-T细胞治疗药的治疗对象患者的选择、或本发明的癌症疫苗、TCR-T细胞治疗药或CAR-T细胞治疗药的治疗效果的预测或判定。

[0302] <癌症发病风险的诊断方法>

[0303] 本发明的癌症发病风险的诊断方法包括:对于来自对象的血液样品中的细胞,对GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上(即3种、4种或5种)的表达进行分析。

[0304] 优选地,可对AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXM1中的1种以上(即1种、2种、3种、4种或5种)的表达进行分析。

[0305] 优选地,可对GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1的全部的表达进行分析。

[0306] 优选地,可对GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1、LAT1、AFP、TGFBI、SPARC、HSP105 α 和FOXM1的全部的表达进行分析。

[0307] 在本发明的癌症发病风险的诊断方法中,典型的是,从对象采集血液,对于其中所含的细胞,对GPC3、ROB01、EPHB4、CLDN1和LAT1中的3种以上(即3种、4种或5种)的表达进行分析。通过检测或测定上述通用癌抗原的表达量,可检测、检查或诊断是否罹患癌症或其程度。

[0308] 实施例

[0309] 实施例1:基于免疫组织化学分析的通用癌抗原的表达分析、多重荧光免疫染色系统中的伴随诊断方法的开发

[0310] <方法>

[0311] 由各种人癌症组织的福尔马林固定石蜡块制作了4 μ m的石蜡切片。正常组织的微阵列载玻片使用市售品(BioChain公司)。用二甲苯和乙醇进行脱石蜡,使用0.3% H_2O_2 /甲醇使内源性过氧化物酶失活。抗原活化是利用微波或高压锅在Target Retrieval Solution、pH9(Agilent公司)或AR6(AKOYA BIOSCIENCES公司)灭活缓冲液中进行热处理。用猪血清进行封闭后,使针对各抗原的一次抗体反应。GPC3(BIOMOSICS公司、300倍稀释)、AFP(Agikent公司、即用型)、ROB01(PROTEINTECH公司、300倍稀释)、EPHB4(Cell Signaling Technology公司、300倍稀释)、CLDN1(Cell Signaling Technology公司、300倍稀释)、FOXM1(abcam公司、150倍稀释)、HSP105 α (abcam公司、200倍稀释)、SPARC(Santa Cruz Biotechnology公司、250倍稀释)、TGFBI(abcam公司、100倍稀释)、HLA-ABC(Hokudo公司、200倍稀释)、LAT1(abcam公司、200倍稀释)。在二次抗体中使用聚合物试剂(EnVision+System-HRP标记的聚合物抗兔或EnVision+System-HRP标记的聚合物抗小鼠)。显色使用液体DAB+底物显色系统。用苏木精进行对比染色后,用乙醇和二甲苯进行脱水、透明处理。标本通过NanoZoomer(Hamamatsu Photonics K.K.)制成虚拟载玻片。

[0312] 在多重荧光免疫组织化学染色的实施中,用二甲苯和乙醇进行脱石蜡,使用0.3% H_2O_2 /甲醇使内源性过氧化物酶失活。抗原活化是利用微波在Target Retrieval Solution、pH9(Agilent公司)或AR6(AKOYA BIOSCIENCES公司)灭活缓冲液中进行热处理。用猪血清进行封闭后,使针对各抗原的一次抗体反应。GPC3(BIOMOSICS公司、600倍稀释)、ROB01(PROTEINTECH公司、600倍稀释)、EPHB4(Cell Signaling Technology公司、300倍稀释)、CLDN1(Cell Signaling Technology公司、1200倍稀释)、HLA-ABC(Hokudo公司、600倍稀释)、LAT1(abcam公司、800倍稀释)。在二次抗体中使用聚合物试剂(EnVision+System-HRP标记的聚合物抗兔或EnVision+System-HRP标记的聚合物抗小鼠)。荧光色素是将Opal 520、540、570、620、650、690(AKOYA BIOSCIENCES公司)分别稀释100倍来使用。用DAPI进行核染色后,用水溶性密封剂进行密封,使用Vectra3(PerkinElmer)观察标本。

[0313] <结果>

[0314] 图1显示为了确认肝细胞癌等中的10种通用癌抗原的表达而使用石蜡包埋组织切片实施免疫组织化学染色的结果。在肝细胞癌的癌部观察到GPC3、AFP、ROB01、TGFBI、EPHB4、CLDN1为中度~高度的表达,在非癌部表达为阴性~弱度。另外,在大部分病例中观察到HLA-I类在细胞膜上的表达,由此显示:在肝细胞癌中表达的通用癌抗原作为TCR-T、CAR-T和癌症疫苗疗法的靶标优异。在大肠癌肝转移、口咽癌(HPV-)、大肠癌、食道癌、子宫癌中确认到:SPARC、HSP105 α 、FOXM1、TGFBI、EPHB4、CLDN1、LAT1同样地呈中度~高度的表达。

[0315] 图2显示GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROB01的细胞膜表达型通用癌抗原在各癌症类型中的表达。观察到GPC3在肝细胞癌和儿童癌症的肾母细胞瘤中共表达,而在肺癌、食道癌这样的扁平上皮癌中观察到弱~中度的表达。观察到EPHB4、CLDN1、ROB01在肺癌、大肠癌、乳腺癌、舌癌、肝内胆管癌、肾癌、食道癌中为中度~高度的表达,LAT1在扁平上皮癌中处于强表达的倾向。

[0316] 图3显示神经母细胞瘤、肾母细胞瘤、绒毛膜癌的儿童癌症中的通用癌抗原的表达和HLA-I类的表达。以细胞核表达型的FOXM1为代表,虽然观察到各通用癌抗原的中度~高度的表达,但无法确认到HLA-I类在细胞膜中的表达。另一方面,GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROB01的细胞膜表达型通用癌抗原在神经母细胞瘤、肾母细胞瘤、绒毛膜癌的癌细胞的细胞膜中均呈中度~高度的表达,可知利用HLA-ClassI非限制性的性质,有可能可应用于CAR-T疗法。

[0317] 图4显示确认在肝细胞癌人临床样本的非癌部中的各通用癌抗原的表达的结果。GPC3、AFP、ROB01、FOXM1、CLDN1为阴性,观察到EPHB4和TGFBI在肝实质部的血窦内为弱度的表达。可见HLA-I类在肝实质细胞的细胞膜内为弱度表达。

[0318] 图5是使用人正常组织微阵列将GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROB01在31个正常组织中的细胞膜表达型通用癌抗原的表达显示于表。尽管在各种组织中检测到微弱的EPHB4和ROB01的信号,但无法确认到清楚的细胞膜表达。仅在一部分组织中观察到GPC3、CLDN1、LAT1的明确表达。

[0319] 图6显示适用诊断系统开发的概念,其中,为了在TCR-T、CAR-T、癌症疫苗等免疫疗法中判定以哪种通用癌抗原为靶标时有效,而利用了多重荧光免疫染色。

[0320] 图7中,PDX为来自肝细胞癌和肺癌患者的标本,人临床样本使用肝细胞癌、肝内胆管癌、口咽癌(HPV-)患者的标本,以GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1、ROB01的细胞膜表达型通用癌抗原和HLA-I类为对象进行多重荧光免疫染色。在肝细胞癌PDX中GPC3强表达,其次确认到了CLDN1、EPHB4的表达。在肺癌PDX中,GPC3、EPHB4、CLDN1、LAT1在任意组合中均呈中度~高度的表达。在人临床样本中,在肝细胞癌患者和口咽癌(HPV-)患者中不仅观察到GPC3、CLDN1、LAT1、还观察到HLA-I类的表达,显示了不仅适用于CAR-T、还可适用于TCR-T、癌症疫苗的可能性。在肝内胆管癌症患者中确认到LAT1、其次是EPHB4、CLDN1为可适用的抗原。

[0321] 实施例2:通用癌抗原的基因表达和HLA结合肽的预测**[0322] <方法>**

[0323] 图8显示肝细胞癌以及原发性大肠癌中的各癌抗原的基因表达。在TCGA(<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>)中注册的371例肝细胞癌(左

图)以及478例原发性大肠癌(右图)中的各癌抗原的基因表达用热图表示。各基因的表达量通过 $\log_2(\text{FPKM}+1)$ 标准化并进行评价。关于各癌抗原的名称,呈高频率或高度表达的抗原用红色显示,呈中等频率或中度表达的抗原用绿色显示,呈低频率或低表达的抗原用蓝色显示,在大部分病例中未观察到表达的抗原用红色显示。

[0324] 图9显示进行了抗原预测的肝细胞癌以及原发性大肠癌中的各癌抗原的基因表达。将从2016年到2023年在日本国立癌症研究中心东医院接受了外科切除的43例肝细胞癌以及24例来自大肠癌的转移性肝癌中的各癌抗原的基因表达用热图表示。各基因的表达量通过 $\log_2(\text{TPM}+1)$ 标准化并进行评价。将肝细胞癌分为HBV阳性(5例)、HCV阳性(10例)、非病毒性(28例)来显示。

[0325] 图10显示来自癌抗原的表位肽的预测流程。由已注册的病例的外科切除样本收集肿瘤以及正常肝组织,提取DNA以及RNA,通过全外显子测序以及RNA测序选择在癌症中高度表达的新生抗原以及通用癌抗原。根据全外显子测序分析确定各病例的HLA单倍型,预测对MHC I类(HLA-A、B、C)具有高结合力的肽。构建加入了对MHC的结合力和各自抗原的表达量作为因子的预测器,以SCOREadj的形式算出来自癌抗原的肽的抗原性。

[0326] 图11显示肝细胞癌中的来自各癌抗原的肽的SCOREadj分布。将在1例肝细胞癌中预测到的来自各癌抗原的肽根据SCOREadj进行分类(1~2:浅蓝色、2~3:橙色、3~4:灰色、4~5:黄色、5~6:蓝色和6以上:绿色),显示其数量(上段、棒图)。各癌抗原基因的表达用红色($\text{Log}_2\text{TPM}=10$)~蓝($\text{Log}_2\text{TPM}=1$)显示。下段的棒图为来自各自癌抗原的肽,仅提取SCOREadj为6以上的肽并显示。

[0327] 图12显示在肝细胞癌的7个病例中预测到的癌抗原肽的总数。对于肝细胞癌的7个病例,使用同样的预测器预测来自各癌抗原的肽的抗原性。将所预测的肽的总数(预测来自癌抗原且与HLA-A、B以及C结合的肽的总数)根据SCOREadj进行分类,每个病例用棒图显示。

[0328] <结果>

[0329] 利用登记在TCGA中的元数据(肝细胞癌:TCGA-LIHC、大肠癌:TCGA-COAD)确认肝细胞癌以及大肠癌中的12种通用癌抗原的基因表达。结果是,CLDN1、SPARC以及TGF β I在大部分病例中确认到了表达。观察到LAT1、FOXM1、EPHB4以及HSP105在大肠癌中的大部分病例中表达,虽然在肝细胞癌中可见以高频率表达,但在大肠癌中呈较低的表达。另一方面,在肝细胞癌中观察到GPC3或AFP呈高度表达的病例,相对于此,在大肠癌中这些癌抗原的表达呈低值或无法确认。ROBO1常见在肝细胞癌中观察到低表达的病例,但在大肠癌中大部分呈低表达。NY-ESO-1和WT1在肝细胞癌以及大肠癌中几乎没有观察到表达。接下来,对于我们收集的肝细胞癌以及转移性大肠癌的各病例,使用从肿瘤和正常组织提取的DNA或RNA,通过全外显子分析以及RNA测序分析,对来自基因突变的新生抗原和这些通用癌抗原的表达进行评价,研究能否成为癌症疫苗的候选。其结果显示,与使用TCGA的元数据的分析同样,在肝细胞癌中CLDN1、GPC3、SPARC以及TGF β I以高频率表达。关于AFP,很少观察到高度表达的病例。在转移性大肠癌中,CLDN1、LAT1、HSP105、SPARC以及TGF β I以高频率表达,相对于此,几乎未观察到ROBO1、GPC3、AFP这样的肝细胞癌特异性癌抗原表达,呈与原发性大肠癌同样的倾向。另一方面,观察到EPHB4以及FOXM1在转移性大肠癌中的仅一部分病例中表达,显示了癌抗原表达与原发性大肠癌存在差异的可能性。根据以上结果,认为除NY-ESO-1以及WT1以外的这10种癌抗原在肝细胞癌或包括转移灶在内的大肠癌病例中可成为克服实体

瘤中的多样性 (heterogeneity) 的革新性免疫疗法的有希望的靶标。

[0330] 接着,验证了在实际上以这些癌抗原为靶标的情况下各病例中可存在多大程度的来自作为损害、排除癌症的CD8+T细胞的靶标的癌抗原的表位。迄今为止,我们通过与Brightpath Bio株式会社的共同研究开发了预测器,该预测器将netMHCpan (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/>) 以及MHCFlurry (<https://github.com/openvax/mhcflurry>) 这样的现有的HLA结合预测与蛋白的蛋白酶体切割预测算法即NetChop (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetChop-3.1/>) 组合,还加入了癌抗原的表达信息。该预测器利用线性预测函数将这些多个因子优化,作为SCOREadj进行评价。迄今为止,我们使用自由46个肝细胞癌或转移性大肠癌病例预测的新生抗原的278个肽,验证我们的预测器的有效性,并在国际期刊(Cancer Sci.2022Apr;113(4):1113-1124.) 上进行报道。在这一系列的预测中,可获得各病例中的基因表达信息,因此不仅可评价新生抗原,还可同时评价通用癌抗原的表达。因此,对于实际上表达高的癌抗原,验证了在各病例中观察到何种程度的预测为抗原性高的肽。在对1个肝细胞癌病例进行预测时,可提取预测对任何抗原均进行HLA结合的肽组。在对SCOREadj高的肽进行提取的情况下,也如预期的那样,对于GPC3或ROBO1、FOXN1、EPHB4等癌抗原也可预测30~40个左右可期待成为表位的肽。在以新生抗原为靶标的验证中,可知若考虑呈强免疫原性的肽为预测中的50%左右,则可选择足以作为癌症疫苗的候选的数量的来自通用癌抗原的肽。另外,在像SPARC那样表达高但预测的肽数少的情况下、或反之表达程度相同但ROBO1中肽数多、相反CLDN1中少,暗示了所预测的SCOREadj高的肽的数量不只依赖于抗原的表达量,与HLA的结合亲和性所产生的影响也很大。同样,对6个肝细胞癌病例进行验证的结果,预测在任何病例中均有100个左右的来自通用癌抗原的肽可用作癌症肽疫苗的候选。

[0331] 不仅因为癌抗原的表达量或表达模式的多样性,在各病例中HLA单倍型也不同,所以作为针对每位患者配制所预测的最佳肽组合的个性化癌症疫苗,希望开发以多个癌抗原为靶标的鸡尾酒疫苗。另一方面,在个性化医疗中其成本或为了准备或检查而需要的时间往往会成为问题,除了预测可期待来自多个通用癌抗原的效果的肽以外,还可安装确认了来自这10种通用癌抗原的免疫原性的肽文库并以现货供应,从而能以低成本且在短期内提供更高效的鸡尾酒肽疫苗。

[0332] 实施例3:来自通用癌抗原的CTL诱导肽的鉴定、肽疫苗/肽脉冲树突状细胞疫苗的开发

[0333] <方法>

[0334] 在图13中,利用与Brightpath Bio公司共同研究而建立的算法,由10种通用癌抗原氨基酸序列预测、合成了72种HIA-A*24:02限制性表位肽、73种HLA-A*02:01限制性表位肽。利用下一代测序仪进行全外显子分析和RNA测序分析,根据得到的基因突变及其表达数据,用in silico预测可与这些HLA结合的肽。使用引入了HLA基因的转基因小鼠评价所预测的抗原肽能否诱导CTL。各肽用二甲基亚砜(DMSO,Wako)溶解至10mg/ml,与佐剂一起对HLA转基因小鼠每周免疫3次。1周后再摘出脾脏,通过IFN- γ ELISpot测定评价IFN- γ 的产生。

[0335] 图16中,关于通过将来自确认到诱导CTL的通用癌抗原的短肽致敏树突状细胞(DC)对转基因小鼠进行疫苗接种是否诱导抗原特异性T细胞,使用引入了各HLA基因的转基因小鼠进行评价。各肽用二甲基亚砜(DMSO,Wako)溶解至10mg/ml,每个肽制作 1×10^5 个用

各肽致敏的DC,用PBS调制液量,使用27G注射针/1ml注射器(Terumo)以100 μ l的液量在HLA-A*02:01 Tgm或HLA-A*24:02 Tgm的尾根部皮内进行免疫。每周共计免疫3次,从第3次疫苗接种起1周后摘出脾脏,通过IFN- γ ELISpot测定评价IFN- γ 的产生。

[0336] DC使用从HLA-A*02:01 Tgm或HLA-A*24:02 Tgm的大腿骨采集的DC。将 2×10^6 个DC悬浮于10ml的最终培养基(10%FBS/1%L-谷氨酰胺/链霉素-青霉素/NEAA/10mM HEPES/丙酮酸钠/2-ME(Gibco))+2-ME(1000倍稀释)+20ng/ml rmGM-CSF(PeproTech)中,接种于低粘附的10cm皮氏培养皿(AS ONE),开始培养。从开始培养起第3天添加10ml最终培养基+20ng/ml rmGM-CSF。第6天取半量培养基到锥形管中,以1,500rpm离心5分钟以去除上清,将颗粒用新的10ml最终培养基悬浮,返回到相同的培养皿中。第8天时与第6天同样进行半量培养基交换。第9天采集10mL培养基至锥形管。轻轻地移液,回收非粘附细胞和松散粘附的细胞,采集到相同的锥形管中。以1500rpm离心5分钟后,舍弃上清。用10mL的无血清RPMI悬浮,以1500rpm离心分离5分钟。重复该操作2次(以去除FBS),舍弃上清,用10mL无血清RPMI悬浮,加入成熟细胞因子(20ng/mL TNF α 、1 μ g/mL PGE2、20ng/mL IL-4、0.1 μ M Zometa、10 μ g/mL用于阴性对照的抗原肽或无肽),培养过夜。第10天用PBS洗涤由各肽致敏的DC 2次,悬浮成 1×10^5 /100 μ l,将其对小鼠给药。

[0337] ELISpot测定中,将已免疫的小鼠的脾细胞通过MACS分离成CD8阳性T细胞,以 1×10^5 个细胞/孔悬浮后用作效应细胞。对未免疫小鼠的脾细胞进行辐射(100kV、10mA、100Gy),用以20ug/ml的浓度添加有各肽的最终培养基悬浮成 2×10^6 个细胞/孔的浓度后用作靶细胞。

[0338] <结果>

[0339] 在图14、图15、表1中,由10种通用癌抗原蛋白全长的氨基酸序列合成预测在HLA-A*24:02或HLA-A*02:01上呈递的肽,对在全身细胞中表达人HLA-A*24:02或HLA-A*02:01的小鼠每周1次、共计3次给予肽疫苗,通过筛选在脾细胞中鉴定了多个可诱导与肽反应的CD8阳性杀伤T细胞(CTL)的肽。该与肽反应的CTL诱导率如下:在HLA-A*24:02限制性通用癌抗原短肽中为30个/72个,在HLA-A*02:01限制性通用癌抗原短肽中为38个/73个,共计68个/145个。这些肽的CTL诱导能力比临床试验中使用的GPC3肽疫苗的肽优异,以后可应用于各种癌症的复发预防、预防。

[0340] [表1]

限制性HLA类型	基因名称	肽-ID	序列	长度(mer)	CTL诱导	长肽反应	序列(三字母版)	长肽序列
HLA-A*02:01	GPC3	CA02 11	FLAELAYDL	9	○	○	Phe-Leu-Ala-Glu-Leu-Ala-Tyr-Asp-Leu (SEQ ID NO: 1)	VKNQLR[FLAELAYDL]DVDDAP (SEQ ID NO: 69)
HLA-A*02:01	GPC3	CA02 12	ELFDSLFPV	9	○	-	Glu-Leu-Phe-Asp-Ser-Leu-Phe-Pro-Val (SEQ ID NO: 2)	
HLA-A*02:01	GPC3	CA02 13	TIHDSIQYV	9	○	○	Thr-Ile-His-Asp-Ser-Ile-Gln-Tyr-Val (SEQ ID NO: 3)	LLGLFS[TIHDSIQYV]QKNAG (SEQ ID NO: 70)
HLA-	GPC3	CA02 15	VLLGLFSTI	9	○	○	Val-Leu-Leu-Gly-	DMEN[VLLGLF

[0341]

[0342]

A*02:01							Leu-Phe-Ser-Thr-Ile (SEQ ID NO: 4)	STI]HDSIQY (SEQ ID NO: 71)
HLA-A*02:01	GPC3	A02-GPC3-10	RIYDMENVL L	10	○	-	Arg-Ile-Tyr-Asp-Met- Glu-Asn-Val-Leu-Leu (SEQ ID NO: 5)	
HLA-A*02:01	GPC3	A02-GPC3-12	FLIQNAAV	9	○	×	Phe-Leu-Ile-Ile-Gln- Asn-Ala-Ala-Val (SEQ ID NO: 6)	
HLA-A*02:01	GPC3	A02-GPC3-14	STIHDSIQYV	10	○	○	Ser-Thr-Ile-His-Asp- Ser-Ile-Gln-Tyr-Val (SEQ ID NO: 7)	LLGLF[STIHDSI QYV]QKNAG (SEQ ID NO: 72)
HLA-A*02:01	GPC3	A02-GPC3-18	FFTDVSLYI	9	○	-	Phe-Phe-Thr-Asp- Val-Ser-Leu-Tyr-Ile (SEQ ID NO: 8)	
HLA-A*02:01	HSPH1	CA02 21	FLRRGPFEL	9	○	-	Phe-Leu-Arg-Arg- Gly-Pro-Phe-Glu-Leu (SEQ ID NO: 9)	
HLA-A*02:01	HSPH1	CA02 24	LLQKIEVPL	9	○	-	Leu-Leu-Gln-Lys-Ile- Glu-Val-Pro-Leu (SEQ ID NO: 10)	
HLA-A*02:01	FOXMI	CA0233	KMKPLLPRV	9	○	-	Lys-Met-Lys-Pro- Leu-Leu-Pro-Arg-Val (SEQ ID NO: 11)	
HLA-A*02:01	FOXMI	CA0235	TMNDSLSKI	9	○	×	Thr-Met-Asn-Asp- Ser-Leu-Ser-Lys-Ile (SEQ ID NO: 12)	
HLA-A*02:01	SPARC	CA02 52	RLEAGDHPV	9	○	×	Arg-Leu-Glu-Ala- Gly-Asp-His-Pro-Val (SEQ ID NO: 13)	
HLA-A*02:01	SPARC	CA02 56	FLLCLAGRAL	10	○	×	Phe-Leu-Leu-Cys- Leu-Ala-Gly-Arg- Ala-Leu (SEQ ID NO: 14)	
HLA-A*02:01	TGFBI	CA02 81	VLDSLVS NV	9	○	-	Val-Leu-Asp-Ser- Leu-Val-Ser-Asn-Val (SEQ ID NO: 15)	
HLA-A*02:01	TGFBI	CA02 82	HLIDKVISTI	10	○	-	His-Leu-Ile-Asp-Lys- Val-Ile-Ser-Thr-Ile (SEQ ID NO: 16)	
HLA-A*02:01	TGFBI	CA02 83	SLVSNVNIEL	10	○	○	Ser-Leu-Val-Ser-Asn- Val-Asn-Ile-Glu-Leu (SEQ ID NO: 17)	EVLDS[SLVSNV NIEL]LNAL (SEQ ID NO: 73)
HLA-A*02:01	TGFBI	CA02 86	MLVAAIQSA	9	○	×	Met-Leu-Val-Ala- Ala-Ile-Gln-Ser-Ala (SEQ ID NO: 18)	
HLA-A*02:01	ROBO1	CA02 91	YIIEAFSHA	9	○	-	Tyr-Ile-Ile-Glu-Ala- Phe-Ser-His-Ala (SEQ ID NO: 19)	
HLA-A*02:01	ROBO1	CA02 92	TVDGSTFSV	9	○	-	Thr-Val-Asp-Gly-Ser- Thr-Phe-Ser-Val (SEQ ID NO: 20)	
HLA-A*02:01	ROBO1	CA02 95	ILMVFSIWL	9	○	○	Ile-Leu-Met-Val-Phe- Ser-Ile-Trp-Leu (SEQ ID NO: 21)	[ILMVFSIWL]Y RHRK (SEQ ID NO: 74)
HLA-A*02:01	ROBO1	CA02 97	VIADRPPPV	9	○	○	Val-Ile-Ala-Asp-Arg- Pro-Pro-Pro-Val (SEQ ID NO: 22)	YLEVTD[VIAD RPPPV]IRQGP (SEQ ID NO: 75)
HLA-A*02:01	AFP	CA02 101	FIFHKDLCQA	10	○	×	Phe-Ile-Phe-His-Lys- Asp-Leu-Cys-Gln-Ala (SEQ ID NO: 23)	
HLA-A*02:01	AFP	CA02 103	FIFHKDLCQ	9	○	×	Phe-Ile-Phe-His-Lys- Asp-Leu-Cys-Gln (SEQ ID NO: 24)	
HLA-A*02:01	AFP	CA02 104	DFSGLLEKC	9	○	×	Asp-Phe-Ser-Gly- Leu-Leu-Glu-Lys-Cys (SEQ ID NO: 25)	

[0343]

HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 121	GLDEEQHSV	9	○	○	Gly-Leu-Asp-Glu-Gln-His-Ser-Val (SEQ ID NO: 26)	LS[GLDEEQHSV]RTYE (SEQ ID NO: 76)
HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 122	YLIGHGTKV	9	○	-	Tyr-Leu-Ile-Gly-His-Gly-Thr-Lys-Val (SEQ ID NO: 27)	
HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 123	RLNDGQFTV	9	○	○	Arg-Leu-Asn-Asp-Gly-Gln-Phe-Thr-Val (SEQ ID NO: 28)	ALDSFL[RLNDGQFTV]IQ (SEQ ID NO: 77)
HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 126	GQFTVIQLV	9	○	-	Gly-Gln-Phe-Thr-Val-Ile-Gln-Leu-Val (SEQ ID NO: 29)	
HLA-A*02:01	EPHB4	CA02 127	FTYEDPNEA V	10	○	-	Phe-Thr-Tyr-Glu-Asp-Pro-Asn-Glu-Ala-Val (SEQ ID NO: 30)	
HLA-A*02:01	CLDN1	CLDN1-A02-2	ALFTGWAAA	9	○	×	Ala-Leu-Phe-Thr-Gly-Trp-Ala-Ala-Ala (SEQ ID NO: 31)	
HLA-A*02:01	CLDN1	CLDN1-A02-5	YSYAGDNIV	9	○	-	Tyr-Ser-Tyr-Ala-Gly-Asp-Asn-Ile-Val (SEQ ID NO: 32)	
HLA-A*02:01	CLDN1	CLDN1-A02-6	LQLLGFILA	9	○	-	Leu-Gln-Leu-Leu-Gly-Phe-Ile-Leu-Ala (SEQ ID NO: 33)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1-A02-1	QLLTPVPSL	9	○	×	Gln-Leu-Leu-Thr-Pro-Val-Pro-Ser-Leu (SEQ ID NO: 34)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1-A02-2	LLTPVPSLV	9	○	-	Leu-Leu-Thr-Pro-Val-Pro-Ser-Leu-Val (SEQ ID NO: 35)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1-A02-3	KLDVGNIVL	9	○	-	Lys-Leu-Asp-Val-Gly-Asn-Ile-Val-Leu (SEQ ID NO: 36)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1-A02-4	ILSMIHPQL	9	○	×	Ile-Leu-Ser-Met-Ile-His-Pro-Gln-Leu (SEQ ID NO: 37)	
HLA-A*02:01	LAT1	LAT1-A02-5	YMLEVYGSL	9	○	×	Tyr-Met-Leu-Glu-Val-Tyr-Gly-Ser-Leu (SEQ ID NO: 38)	
HLA-A*24:02	GPC3	A24-GPC3-06	KYWREYILSL	10	○	×	Lys-Tyr-Trp-Arg-Glu-Tyr-Ile-Leu-Ser-Leu (SEQ ID NO: 39)	
HLA-A*24:02	GPC3	A24-GPC3-10	FFTDVSLYI	9	○	-	Phe-Phe-Thr-Asp-Val-Ser-Leu-Tyr-Ile (SEQ ID NO: 40)	
HLA-A*24:02	GPC3	A24-GPC3-11	AYYPEDLFI	9	○	×	Ala-Tyr-Tyr-Pro-Glu-Asp-Leu-Phe-Ile (SEQ ID NO: 41)	
HLA-A*24:02	GPC3	A24-GPC3-17	AFEFVGEFF	9	○	×	Ala-Phe-Glu-Phe-Val-Gly-Glu-Phe-Phe (SEQ ID NO: 42)	
HLA-A*24:02	HSPH1	CA24 21	HYAKIAADF	9	○	×	His-Tyr-Ala-Lys-Ile-Ala-Ala-Asp-Phe (SEQ ID NO: 43)	
HLA-A*24:02	FOXMI	CA24 31	RYLTLDQVF	9	○	×	Arg-Tyr-Leu-Thr-Leu-Asp-Gln-Val-Phe (SEQ ID NO: 44)	
HLA-A*24:02	FOXMI	CA24 32	IYTWIEDHF	9	○	×	Ile-Tyr-Thr-Trp-Ile-Glu-Asp-His-Phe (SEQ ID NO: 45)	
HLA-A*24:02	FOXMI	CA24 34	SYMAMIQFAI	10	○	×	Ser-Tyr-Met-Ala-Met-Ile-Gln-Phe-Ala-Ile (SEQ ID NO: 46)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 51	MYIFPVHWQ F	10	○	×	Met-Tyr-Ile-Phe-Pro-Val-His-Trp-Gln-Phe	

[0344]

							(SEQ ID NO: 47)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 52	YIFPVHWQF	9	o	x	Tyr-Ile-Phe-Pro-Val-His-Trp-Gln-Phe (SEQ ID NO: 48)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 53	TFDSSCHFF	9	o	x	Thr-Phe-Asp-Ser-Ser-Cys-His-Phe-Phe (SEQ ID NO: 49)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 54	DYIGPCKYI	9	o	-	Asp-Tyr-Ile-Gly-Pro-Cys-Lys-Tyr-Ile (SEQ ID NO: 50)	
HLA-A*24:02	SPARC	CA24 55	HFFATKCTL	9	o	-	His-Phe-Phe-Ala-Thr-Lys-Cys-Thr-Leu (SEQ ID NO: 51)	
HLA-A*24:02	TGFBI	CA24 85	KYFTNCKQW	9	o	-	Lys-Tyr-Phe-Thr-Asn-Cys-Lys-Gln-Trp (SEQ ID NO: 52)	
HLA-A*24:02	ROBO1	CA24 91	AYLEVTDVI	9	o	-	Ala-Tyr-Leu-Glu-Val-Thr-Asp-Val-Ile (SEQ ID NO: 53)	
HLA-A*24:02	ROBO1	CA24 95	KYVCVGTNM	9	o	-	Lys-Tyr-Val-Cys-Val-Gly-Thr-Asn-Met (SEQ ID NO: 54)	
HLA-A*24:02	ROBO1	CA24 97	YYICQTLNV	9	o	x	Tyr-Tyr-Ile-Cys-Gln-Thr-Leu-Asn-Val (SEQ ID NO: 55)	
HLA-A*24:02	ROBO1	CA24 98	ILPYCRPTF	9	o	o	Ile-Leu-Pro-Tyr-Cys-Arg-Pro-Thr-Phe (SEQ ID NO: 56)	LIQED[ILPYCRP TF]PTSN (SEQ ID NO: 78)
HLA-A*24:02	AFP	CA24 102	DFSGLLEKC	9	o	x	Asp-Phe-Ser-Gly-Leu-Leu-Glu-Lys-Cys (SEQ ID NO: 57)	
HLA-A*24:02	AFP	CA24 105	ADFSGLLEKC	10	o	x	Ala-Asp-Phe-Ser-Gly-Leu-Leu-Glu-Lys-Cys (SEQ ID NO: 58)	
HLA-A*24:02	EPHB4	CA24 123	AWSYGIVM W	9	o	-	Ala-Trp-Ser-Tyr-Gly-Ile-Val-Met-Trp (SEQ ID NO: 59)	
HLA-A*24:02	EPHB4	CA24 124	SYGIVMWEV	9	o	o	Ser-Tyr-Gly-Ile-Val-Met-Trp-Glu-Val (SEQ ID NO: 60)	[SYGIVMWEV] MSFGER (SEQ ID NO: 79)
HLA-A*24:02	EPHB4	CA24 127	IVMWEVMSF	9	o	-	Ile-Val-Met-Trp-Glu-Val-Met-Ser-Phe (SEQ ID NO: 61)	
HLA-A*24:02	CLDN1	CLDN1-A24-2	WYGNRIVQE F	10	o	x	Trp-Tyr-Gly-Asn-Arg-Ile-Val-Gln-Glu-Phe (SEQ ID NO: 62)	
HLA-A*24:02	CLDN1	CLDN1-A24-4	YGNRIVQEF	9	o	x	Tyr-Gly-Asn-Arg-Ile-Val-Gln-Glu-Phe (SEQ ID NO: 63)	
HLA-A*24:02	CLDN1	CLDN1-A24-5	EFGQALFTG W	10	o	x	Glu-Phe-Gly-Gln-Ala-Leu-Phe-Thr-Gly-Trp (SEQ ID NO: 64)	
HLA-A*24:02	CLDN1	CLDN1-A24-7	GWAAASLCL	9	o	x	Gly-Trp-Ala-Ala-Ala-Ser-Leu-Cys-Leu (SEQ ID NO: 65)	
HLA-A*24:02	LAT1	LAT1-A24-2	CYAELGTTI	9	o	o	Cys-Tyr-Ala-Glu-Leu-Gly-Thr-Thr-Ile (SEQ ID NO: 66)	VGAL[CYAELG TTI]SKSG (SEQ ID NO: 80)
HLA-A*24:02	LAT1	LAT1-A24-5	AYMLEVYGS L	10	o	x	Ala-Tyr-Met-Leu-Glu-Val-Tyr-Gly-Ser-Leu (SEQ ID NO: 67)	
HLA-A*24:02	LAT1	LAT1-A24-6	VMSWIIPVF	9	o	-	Val-Met-Ser-Trp-Ile-Ile-Pro-Val-Phe (SEQ ID NO: 68)	

[0345]

[0346] 图17和图18中,将来自已确认诱导CTL的通用癌抗原的短肽致敏树突状细胞(DC)对HLA-A*24:02或HLA-A*02:01转基因小鼠进行疫苗接种,使用引入有各HLA基因的转基因小鼠评价是否诱导抗原特异性T细胞。其结果,在多数肽中,可通过IFN- γ ELISpot测定确认通用癌抗原肽致敏树突状细胞疫苗诱导抗原特异性CTL。关于使用的肽,每个抗原选择3个在主要在肝细胞癌中看到高度表达的抗原中通过肽疫苗高度诱导CTL的肽。用选择的肽致敏DC,对转基因小鼠进行疫苗接种,利用IFN- γ ELISpot测定对抗原特异性CTL的诱导能力进行评价。

[0347] 在图19中,使用包含来自已确认诱导CTL的通用癌抗原的短肽序列的长肽,为了确认肽实际上是否在细胞内被加工并呈递在HLA上,使用HLA-A*02:01 Tgm或HLA-A*24:02 Tgm进行验证。长肽是指设计成包含由可诱导与肽反应的CTL的9-10mer构成短肽的氨基酸序列的长链的肽(15-21mer),关于通过将该长肽进行疫苗接种,实际上是否在细胞内被加工并与MHC分子结合、且呈递到HLA上以诱导肽特异性CTL,利用IFN- γ ELISpot测定进行了评价。在HLA-A*24:02限制性通用癌抗原长肽疫苗中,在合成的21个长肽中有3个可确认到诱导与其序列中所含的短肽反应的CTL。在HLA-A*02:01限制性通用癌抗原长肽疫苗中,在合成的21个长肽中有9个可确认到诱导与其序列中所含的短肽反应的CTL。

[0348] 实施例4:通用癌抗原mRNA疫苗的开发

[0349] 给予LNP-Covid-19 Spike mRNA,评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0350] 将2 μ g或10 μ g的mRNA疫苗对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的股直肌进行肌肉内给药(i.m.)、或对尾根部进行皮内给药(i.d.),该mRNA疫苗是将编码Covid-19(SARS-CoV-2)的Spike蛋白全长的mRNA封入LNP(脂质纳米颗粒)内而得的(ARCTURUS therapeutics公司、非专利文献(de Alwis R.等人,A single dose of self-transcribing and replicating RNA-based SARS-CoV-2 vaccine produces protective adaptive immunity in mice.Mol Ther.2021;29:1970-1983.)的常规mRNA、关于以下的mRNA疫苗也同样地制作)。在3次给药方案中,在第0天、第7天、第14天共计给药3次,HLA-A*24:02 Tg小鼠在第20天解剖,HLA-A*02:01 Tg小鼠在第21天解剖。在2次给药方案中,在第0天、第28天给药,HLA-A*24:02 Tg小鼠在第35天解剖,HLA-A*02:01 Tg小鼠在第36天解剖。由脾脏和腹股沟淋巴结(LN)调制细胞,从由心脏采集的血液中采集血清。使用BD ELISPOT小鼠IFN- γ 组和BD ELISPOT AEC底物组(均为BD),通过依照推荐方案的ELISPOT法对来自T细胞的抗原特异性IFN- γ 的产生进行评价。在包被有抗mIFN- γ 抗体的96孔板上,以 2×10^6 个细胞/孔接种脾细胞、以 2×10^5 个细胞/孔接种LN细胞,分别加入PMA(25ng/mL)+离子霉素(1 μ g/mL)、网罗Covid-19 Spike蛋白的肽的鸡尾酒(在3次给药实验中为PepMix S(jpt公司、PM-WCPV-S-1)、在2次给药实验中为PepTivator SARC-CoV-2 Prot_S(Miltenyi Biotech、130-127-953)、各肽均为1 μ g/mL)、使用上述段落中记载的预测器由Covid-19 Spike蛋白序列预测后在对HLA-A*02:01 Tg小鼠或HLA-A*24:02 Tg小鼠的肽免疫中确认产生肽特异性IFN- γ 的肽的鸡尾酒即POOL1(各肽均为5 μ g/mL)、由对应的HLA Tg小鼠的幼稚小鼠的骨髓在小鼠GM-CSF(20ng/mL)中分化诱导且在使用前1天加入小鼠TNF- α (20ng/mL)、小鼠IL-4(20ng/mL)、PGE2(1 μ g/mL)而成熟化的来自骨髓的树突状细胞(BMDC)(2×10^5 个细胞/孔)、在同样成熟化的同时每 1×10^6 个细胞加入了10 μ g的LNP-Spike mRNA的BMDC(2×10^5 个细胞/孔),进行20小时的共培养,评价IFN- γ 的产生。斑点(spot)用ELISPOT计数仪AT-X

(Minervatech) 拍摄,计数斑点数。在各孔的左下方记录斑点数。

[0351] 图20显示给予3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的给药方法。

[0352] 通过对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的股直肌的肌肉内给药(i.m.)、或对尾根部的皮内给药(i.d.),在第0天、第7天、第14天共计给予3次2 μ g或10 μ g的mRNA疫苗(ARCTURUS therapeutics公司),该mRNA疫苗是将编码Covid-19的Spike蛋白全长的mRNA封入LNP内而得的,HLA-A*24:02 Tg小鼠在第20天解剖,HLA-A*02:01 Tg小鼠在第21天解剖,通过ELISPOT法评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0353] 图21和图22显示在给予了3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中产生Spike抗原特异性IFN- γ 的结果。

[0354] 在给予了3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中,针对加入了PepMix S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC,通过i.m.和i.d.均诱导了产生IFN- γ 的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,几乎没有观察到针对加入了PepMix S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-Covid-19 Spike mRNA而特异性地诱导的。

[0355] 图23显示在给予了3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞中产生Spike抗原特异性IFN- γ 的结果。

[0356] 在给予了3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞中,针对加入了PepMix S、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC,通过i.m.和i.d.均诱导了产生IFN- γ 的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,几乎没有观察到针对加入了PepMix S、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-Covid-19 Spike mRNA而特异性地诱导的。

[0357] 图24和图25显示在给予了3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞中产生Spike抗原特异性IFN- γ 的结果。

[0358] 在给予了3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞中,针对在每 1×10^6 个细胞中加入了1 μ g或10 μ g的PepMix S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC,通过i.m.和i.d.均强烈诱导了产生IFN- γ 的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠中,针对加入了PepMix S、P00L1、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生为少量,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-Covid-19 Spike mRNA而特异性地诱导的。

[0359] 图26显示在给予了3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞中产生Spike抗原特异性IFN- γ 的结果。

[0360] 在给予了3次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞中,针对PepMixS、P00L1,通过i.m.和i.d.均诱导了产生IFN- γ 的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠中,几乎没有观察到针对PepMix S、P00L1的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-Covid-19 Spike mRNA而特异性地诱导的。

[0361] 图27显示给予2次LNP-Covid-19 Spike mRNA的给药方法。

[0362] 通过对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的股直肌的肌肉内给药(i.m.)或对尾根部的皮内给药(i.d.),在第0天、第28天给予2 μ g或10 μ g的将编码Covid-19的Spike蛋白全长的mRNA封入LNP内而得的mRNA疫苗,HLA-A*24:02 Tg小鼠在第35天解剖,HLA-A*02:01 Tg小鼠在第36天解剖,通过ELISPOT法评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0363] 图28和图29显示在给予了2次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中产生Spike抗原特异性IFN- γ 的结果。

[0364] 在给予了2次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中,针对加入了PepTi S、POOL1、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC,通过i.m.和i.d.均诱导了产生IFN- γ 的T细胞。在同样地给予了2次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,仅观察到少量的针对加入了PepTi S、POOL1、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-Covid-19 Spike mRNA而特异性地诱导的。

[0365] 图30显示在给予了2次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞中产生Spike抗原特异性IFN- γ 的结果。

[0366] 在给予了2次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞中,针对加入了PepTi S、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC,通过i.m.和i.d.均诱导了产生IFN- γ 的T细胞。特别是在i.d.中观察到高的诱导。在同样地给予了3回次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,几乎没有观察到针对加入了PepTi S、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-Covid-19 Spike mRNA而特异性地诱导的。

[0367] 图31和图32显示在给予了2次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞中产生Spike抗原特异性IFN- γ 的结果。

[0368] 在给予了2次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞中,针对加入了PepTi S、POOL1、LNP-Covid-19Spike mRNA的BMDC,通过i.m.和i.d.均强烈诱导了产生IFN- γ 的T细胞。在同样地给予了2次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01Tg小鼠中,仅观察到少量的针对加入了PepTi S、POOL1、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-Covid-19 Spike mRNA而特异性地诱导的。

[0369] 图33显示在给予了2次LNP-Covid-19 Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞中产生Spike抗原特异性IFN- γ 的结果。

[0370] 在给予了2次LNP-Covid-19Spike mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的腹股沟淋巴结细胞中,针对加入了PepTi S、LNP-Covid-19Spike mRNA的BMDC,通过i.m.和i.d.均诱导了产生IFN- γ 的T细胞。特别是在i.d.中观察到高的诱导。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠中,几乎没有观察到针对加入了PepTi S、LNP-Covid-19 Spike mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-Covid-19 Spike mRNA而特异性地诱导的。

[0371] 图34显示针对Spike蛋白的抗体测定的结果。

[0372] <方法>

[0373] 在MaxiSorp板(ThermoFisher)上,用100ng/50 μ L的PBS包被Covid-19 Spike重组蛋

白(Sino Biological、40589-V08B1)。用含有0.05%Tween20的PBS(PBS-T)洗涤1次后,用3%脱脂牛奶在室温下封闭1小时。加入用含有1%脱脂牛奶的PBS稀释后的血清,在37°C下培养1小时。用PBS-T洗涤3次,在含有1%脱脂牛奶的PBS-T中与辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG(SouthernBiotech、6000倍稀释)在室温下培养1小时。用PBS-T洗涤3次后,加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)底物溶液(Pierce)进行显色,在1.3NH₂SO₄下停止反应,测定450nm的吸光度。

[0374] <结果>

[0375] 在给予作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA时没有诱导抗体,但在LNP-Covid-19 Spike mRNA的2μg或10μg的任一种情况下、另外在i.m.和i.d.的任一种情况下、在3次给药、2次给药的任一种情况下,均诱导了针对Covid-19 Spike蛋白的IgG抗体。通常,在10μg下比在2μg下、以及在i.d.下比在i.m.下诱导的IgG抗体处于更高的倾向。特别是,在10μgi.d.的2次给药中观察到高的抗体诱导。

[0376] 实施例5:通用癌抗原mRNA疫苗的开发

[0377] 给予LNP-hGPC3 mRNA、LNP-hROB01 mRNA、LNP-hCLDN1 mRNA、LNP-hEphB4 mRNA、LNP-hTGFBI mRNA、LNP-hSPARC mRNA、LNP-hAFP mRNA、LNP-hHSP105α mRNA、LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA,评价抗原特异性IFN-γ的产生。

[0378] 将编码hGPC3同工型2(RefSeq:NP_004475)、hROB01同工型X5(RefSeq:XP_006713340)、hCLDN1(RefSeq:NP_066924)、hEphB4(RefSeq:NP_004435)、TGFBI(RefSeq:NP_000349)、hSPARC同工型1(NP_003109)、hAFP同工型1(NP_001125)、hHSPH1同工型1(NP_006635)各自的蛋白全长的mRNA、编码hCLDN1(RefSeq:NP_066924)蛋白全长的mRNA和编码hEphB4(RefSeq:NP_004435)蛋白全长的mRNA的等质量混合物、编码荧光素酶蛋白全长的mRNA、编码eGFP蛋白全长的mRNA封入LNP(脂质纳米颗粒、ARCTURUS therapeutics公司)内而得的mRNA疫苗(ARCTURUS therapeutics公司)对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的股直肌进行肌肉内给药(i.m.)、或对尾根部进行皮内给药(i.d.)。由脾脏和腹股沟淋巴结(LN)调制细胞。使用BD ELISPOT小鼠IFN-γ组和BD ELISPOT AEC底物组(均为BD),通过依据推荐方案的ELISPOT法评价来自T细胞的抗原特异性IFN-γ的产生。在包被有抗mIFN-γ抗体的96孔板上以2×10⁶个细胞/孔接种脾细胞、以2×10⁵个细胞/孔接种LN细胞,分别加入PMA(25ng/mL)+离子霉素(1μg/mL)、在对应的HLA Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN-γ的短链肽的鸡尾酒(各肽均10μg/mL)、在对应的HLA Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN-γ的长链肽的鸡尾酒(各肽均10μg/mL)、表达对应的HLA的HLA-HHD(hβ2M-接头-[HLA的α1+α2结构域]-[H-2Db的α3~C末端结构域]的嵌合蛋白)的小鼠癌细胞(MC38或MCA205、2×10⁵个细胞/孔)、表达对应的HLA的HLA-HHD和对应的癌抗原的小鼠癌细胞(MC38或MCA205、2×10⁵个细胞/孔)、由对应的HLA Tg小鼠的幼稚小鼠的骨髓在小鼠GM-CSF(20ng/mL)中分化诱导且在使用前1天加入小鼠TNF-α(20ng/mL)、小鼠IL-4(20ng/mL)、PGE2(1μg/mL)而成熟化的来自骨髓的树突状细胞(BMDC)(2×10⁵个细胞/孔)、在同样成熟化的同时每5×10⁶个细胞转染了11μg对应的癌抗原mRNA的BMDC(2×10⁵个细胞/mL),进行20小时的共培养,评价IFN-γ的产生。斑点用ELISPOT计数仪AT-X(Minervatech)拍摄。加入以下的肽作为短链肽的鸡尾酒。

[0379] hGPC3 HLA-A*02:01:CA02 11、CA02 13、CA02 15、A02-GPC3-10、A02-GPC3-12、

A02-GPC3-14、A02-GPC3-18;

[0380] hGPC3 HLA-A*24:02:A24-GPC3-06、A24-GPC3-10、A24-GPC3-11、A24-GPC3-17;

[0381] hROB01 HLA-A*02:01:CA02 91、CA02 92、CA02 95、CA02 97;

[0382] hROB01 HLA-A*24:02:CA24 95、CA24 97、CA24 98;

[0383] hCLDN1 HLA-A*02:01:CLDN1-A02-2、CLDN1-A02-5、CLDN1-A02-6;

[0384] hCLDN1HLA-A*24:02:CLDN1-A24-2、CLDN1-A24-4、CLDN1-A24-5、CLDN1-A24-7;

[0385] hEPHB4 HLA-A*02:01:CA02 121、CA02 122、CA02 123、CA02 126、CA02 127;

[0386] hEPHB4 HLA-A*24:02:CA24 123、CA24 124、CA24 127;

[0387] hTGFB1 HLA-A*02:01:CA02 81、CA02 82、CA02 83、CA02 86;

[0388] hTGFB1 HLA-A*24:02:CA24 85;

[0389] hSPARC HLA-A*02:01:CA02 52、CA02 56;

[0390] hSPARC HLA-A*24:02:CA24 51、CA24 52、CA24 53;

[0391] hAFP HLA-A*02:01:CA02 101、CA02 103、CA02 104;

[0392] hAFP HLA-A*24:02:CA24 102、CA24 105;

[0393] hHSP105 α HLA-A*02:01:CA02 21、CA02 24;

[0394] hHSP105 α HLA-A*24:02:CA24 22、CA24 23、CA24 24、CA24 25;

[0395] hHSP105 α HLA-A*24:02短肽;

[0396] CA24 22:PFSKVLTFI;

[0397] CA24 23:KLCGPYEKF;

[0398] CA24 24:PYPEAKIGRF;

[0399] CA24 25:NYGIYKQDL。

[0400] 加入了以下的肽作为长链肽的鸡尾酒。

[0401] hGPC3 HLA-A*02:01:CA02 11_L、CA02 15_L、A02-GPC3-14_L;

[0402] hGPC3 HLA-A*24:02:A24-GPC3-06_L、A24-GPC3-11_L、A24-GPC3-17_L;

[0403] hROB01 HLA-A*02:01:CA02 95_L、CA02 97_L;

[0404] hROB01 HLA-A*24:02:CA24 97_L、CA24 98_L;

[0405] hCLDN1 HLA-A*02:01:CLDN1-A02-2_L、CLDN1-A02-5_L;

[0406] hCLDN1 HLA-A*24:02:CLDN1-A24-2_L、CLDN1-A24-4_L、CLDN1-A24-5_L、CLDN1-A24-7_L;

[0407] hEPHB4 HLA-A*02:01:CA02 121_L、CA02 123_L;

[0408] hEPHB4 HLA-A*24:02:CA24 124_L;

[0409] hTGFB1 HLA-A*02:01:CA02 83_L、CA02 86_L;

[0410] hSPARC HLA-A*02:01:CA02 56_L;

[0411] hSPARC HLA-A*24:02:CA24 51_L、CA24 53_L;

[0412] hAFP HLA-A*02:01:02 103_L;

[0413] hAFP HLA-A*24:02:24 105_L;

[0414] hHSP105 α HLA-A*02:01:A2-7_L;

[0415] hHSP 105 α HLA-A*24:02:A24-1_L、A24-7_L;

[0416] hHSP105 α HLA-A*02:01长肽;

[0417] A2-7_L:VGLNCL[RLMNDMTAV]ALNYG;

[0418] hHSP105 α HLA-A*24:02长肽;

[0419] A24-1_L:KNAVE[EYVYEFDRDKL]CGPYE;

[0420] A24-7_L:AVAL[NYGIYKQDL]PSLDEK。

[0421] 图35显示给予3次LNP-hGPC3 mRNA的给药方法。

[0422] 通过对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的股直肌的i.m.或对尾根部的i.d.,在第0天、第7天、第14天共计给予3次2 μ g或10 μ g的LNP-hGPC3 mRNA或10 μ g的LNP-荧光素酶mRNA,HLA-A*24:02 Tg小鼠在第20天解剖,而HLA-A*02:01 Tg小鼠在第22天解剖,通过ELISPOT法评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0423] 图36~图39显示上述的结果。

[0424] 如图36和图37所示,在给予了3次LNP-hGPC3 mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中,针对在对HLA-A*02:01 Tg小鼠的肽免疫中可见肽特异性IFN- γ 产生的hGPC3短链肽的鸡尾酒、在对HLA-A*02:01 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hGPC3长链肽的鸡尾酒、表达HLA-A*02:01HHD和hGPC3的癌细胞MC38、转染hGPC3 mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与i.m.相比,在i.d.的情况下产生的IFN- γ 多,特别是以2 μ g通过3次i.d.,观察到强的IFN- γ 诱导。与针对引入了HLA-A*02:01HHD和空载体的癌细胞MC38A02HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*02:01HHD和hGPC3的癌细胞MC38 A02HHD hGPC3的IFN- γ 产生明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hGPC3的癌细胞并进行攻击的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-荧光素酶mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,针对任一者均只观察到少量的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hGPC3 mRNA而特异性地诱导的。

[0425] 如图38和图39所示,在给予了3次LNP-hGPC3 mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞中,针对在对HLA-A*24:02 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hGPC3短链肽的鸡尾酒、在对HLA-A*24:02 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hGPC3长链肽的鸡尾酒、表达HLA-A*24:02HHD和hGPC3的癌细胞MC38、转染hGPC3 mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与i.m.相比,在i.d.的情况下产生的IFN- γ 有多的倾向,特别是以10 μ g通过3次i.d.,观察到强的IFN- γ 诱导。与针对引入了HLA-A*24:02HHD和空载体的癌细胞MC38 A24HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*24:02HHD和hGPC3的癌细胞MC38 A24HHD hGPC3的IFN- γ 产生明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hGPC3的癌细胞并进行攻击的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-荧光素酶mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠中,针对任一者均只观察到少量的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hGPC3 mRNA而特异性地诱导的。

[0426] 实施例6:通用癌抗原mRNA疫苗的开发

[0427] 图40显示给予3次LNP-hROB01 mRNA的给药方法。

[0428] 通过对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的股直肌的肌肉内给药(i.m.)或对尾根部的皮内给药(i.d.),在第0天、第7天、第14天共计给予3次10 μ g的LNP-hROB01 mRNA或LNP-eGFP mRNA,第21天解剖,通过ELISPOT法评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0429] 图41和图42显示上述的结果。

[0430] 如图41所示,在给予了3次LNP-hROB01 mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中,针对在对HLA-A*02:01 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hROB01短链肽的鸡尾酒、在对HLA-A*02:01 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hROB01长链肽的鸡尾酒、表达HLA-A*02:01HHD和hROB01的癌细胞MC38、转染hROB01 mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*02:01HHD和空载体的癌细胞MC38 A02HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,在i.m.、i.d.中针对表达HLA-A*02:01HHD和hROB01的癌细胞MC38 A02HHD hROB01的IFN- γ 产生均明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hROB01的癌细胞并进行攻击的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,针对任一者均只观察到少量的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hROB01 mRNA而特异性地诱导的。

[0431] 如图42所示,在给予了3次LNP-hROB01 mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞中,针对在对HLA-A*24:02 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hROB01短链肽的鸡尾酒、在对HLA-A*24:02 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hROB01长链肽的鸡尾酒、表达HLA-A*24:02HHD和hROB01的癌细胞MC38、转染hROB01 mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*24:02HHD和空载体的癌细胞MC38 A24HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,在i.m.、i.d.中针对表达HLA-A*24:02HHD和hROB01的癌细胞MC38 A24HHD hROB01的IFN- γ 产生均明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hROB01的癌细胞并进行攻击的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠中,针对任一者均只观察到少量的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hROB01 mRNA而特异性地诱导的。

[0432] 实施例7:通用癌抗原mRNA疫苗的开发

[0433] 图43显示给予3次LNP-hCLDN1 mRNA和LNP-hEPHB4 mRNA的给药方法。

[0434] 通过对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的尾根部的皮内给药(i.d.),在第0天、第7天、第14天共计给予3次10 μ g的LNP-hCLDN1 mRNA、LNP-hEPHB4 mRNA或LNP-eGFP mRNA,第21天解剖,通过ELISPOT法评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0435] 图44和图45显示上述的结果。

[0436] 如图44所示,在给予了3次LNP-hCLDN1 mRNA或LNP-hEPHB4 mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中,针对在对HLA-A*02:01 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hCLDN1或hEPHB4的短链肽的鸡尾酒、在对HLA-A*02:01 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hCLDN1或hEPHB4的长链肽的鸡尾酒、表达HLA-A*02:01HHD和hCLDN1的癌细胞MC38或表达HLA-A*02:01HHD和hEPHB4的癌细胞MCA205、转染hCLDN1 mRNA或hEPHB4 mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*02:01HHD和空载体的癌细胞MC38 A02HHD模拟物或MCA205 A02HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*02:01HHD和hCLDN1的癌细胞MC38 A02HHD hCLDN1或表达HLA-A*02:01HHD和hEPHB4的癌细胞MCA205 A02HHD hEPHB4的IFN- γ 产生明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hCLDN1或hEPHB4的癌细胞并进行攻击的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,针对任一者均只观察到少量的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hCLDN1 mRNA或LNP-hEPHB4 mRNA而特异性地诱导的。

[0437] 如图45所示,在给予了3次LNP-hCLDN1 mRNA或LNP-hEPHB4 mRNA的HLA-A*24:02

Tg小鼠的脾细胞中,针对在对HLA-A*24:02Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hCLDN1或hEPHB4的短链肽的鸡尾酒、在对HLA-A*24:02 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hCLDN1或hEPHB4的长链肽的鸡尾酒、表达HLA-A*24:02HHD和hCLDN1的癌细胞MC38或表达HLA-A*24:02HHD和hEPHB4的癌细胞MCA205、转染hCLDN1 mRNA或hEPHB4 mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*24:02HHD和空载体的癌细胞MC38 A24HHD模拟物或MCA205 A24HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*24:02HHD和hCLDN1的癌细胞MC38 A24HHD hCLDN1或表达HLA-A*24:02HHD和hEPHB4的癌细胞MCA205 A24HHD hEPHB4的IFN- γ 产生为高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hCLDN1或hEPHB4的癌细胞并进行攻击的T细胞。认为针对MC38 A24HHD模拟物或MCA205 A24HHD模拟物的IFN- γ 的产生是由于来自小鼠的CLDN1或EPHB4的肽呈递在HLA-A*24:02HHD上。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠中,针对任一者均只观察到少量的IFN- γ 的产生,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hCLDN1 mRNA或LNP-hEPHB4 mRNA而特异性地诱导的。

[0438] 实施例8:通用癌抗原mRNA疫苗的开发

[0439] 图46显示给予3次LNP-hTGFBI mRNA和LNP-hSPARC mRNA的给药方法。

[0440] 通过对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的尾根部的皮内给药(i.d.),第0天、第7天、第14天共计给予3次10 μ g的LNP-hTGFBI mRNA、LNP-hSPARC mRNA或LNP-eGFP mRNA,第21天解剖,通过ELISPOT法评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0441] 图47和图48显示上述的结果。

[0442] 如图47所示,在给予了3次LNP-hTGFBI mRNA或LNP-hSPARC mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中,针对在对HLA-A*02:01Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hTGFBI或hSPARC的短链肽的鸡尾酒、在对HLA-A*02:01 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hTGFBI或hSPARC的长链肽的鸡尾酒、表达HLA-A*02:01HHD和hTGFBI的癌细胞MCA205或表达HLA-A*02:01HHD和hSPARC的癌细胞MCA205、转染hTGFBI mRNA或hSPARC mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*02:01HHD和空载体的癌细胞MCA205 A02HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*02:01HHD和hTGFBI的癌细胞MCA205 A02HHD hTGFBI或表达HLA-A*02:01HHD和hSPARC的癌细胞MCA205 A02HHD hSPARC的IFN- γ 产生明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hTGFBI或hSPARC的癌细胞并进行攻击的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,针对任一者IFN- γ 的产生均少,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hTGFBI mRNA或LNP-hSPARC mRNA而特异性地诱导的。

[0443] 如图48所示,在给予了3次LNP-hTGFBI mRNA或LNP-hSPARC mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞中,针对在对HLA-A*24:02Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hTGFBI或hSPARC的短链肽的鸡尾酒、在对HLA-A*24:02 Tg小鼠的肽免疫中可见产生肽特异性IFN- γ 的hTGFBI或hSPARC的长链肽的鸡尾酒、表达HLA-A*24:02HHD和hTGFBI的癌细胞MCA205或表达HLA-A*24:02HHD和hSPARC的癌细胞MCA205、转染hTGFBI mRNA或hSPARC mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*02:01HHD和空载体的癌细胞MCA205 A02HHD模拟物的情况相比,表达HLA-A*02:01HHD和hTGFBI的癌细胞MCA205 A02HHD hTGFBI明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hTGFBI的癌细胞并进行攻击的T细胞。

认为LNP-hSPARC mRNA给药小鼠中的针对MCA205A24HHD模拟物的IFN- γ 产生是由于来自小鼠的SPARC的肽呈递在HLA-A*24:02HHD上。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,针对任一者IFN- γ 的产生均少,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hTGFBI mRNA或LNP-hSPARC mRNA而特异性地诱导的。

[0444] 实施例9:通用癌抗原mRNA疫苗的开发

[0445] 图49显示给予3次LNP-hAFP mRNA和LNP-hHSP105 α mRNA的给药方法。

[0446] 通过对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的尾根部的皮内给药(i.d.),第0天、第7天、第14天共计给予3次10 μ g的LNP-hAFP mRNA、LNP-hHSP105 α mRNA或LNP-eGFP mRNA,第21天解剖,通过ELISPOT法评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0447] 图50和图51显示上述的结果。

[0448] 如图50所示,在给予了3次LNP-hAFP mRNA或LNP-hHSP105 α mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞中,针对表达HLA-A*02:01HHD和hAFP的癌细胞MC38或表达HLA-A*02:01HHD和hHSP105 α 的癌细胞MC38、转染hAFP mRNA或hHSP105 α mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*02:01HHD和空载体的癌细胞MC38 A02HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*02:01HHD和hAFP的癌细胞MC38 A02HHD hAFP或表达HLA-A*02:01HHD和hHSP105 α 的癌细胞MC38 A02HHD hHSP105 α 的IFN- γ 产生明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hAFP或hHSP105 α 的癌细胞并进行攻击的T细胞。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,1个个体中针对MC38的IFN- γ 的产生高,而针对转染抗原mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生少,认为针对转染抗原mRNA的BMDC的IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hAFP mRNA或LNP-hHSP105 α mRNA而特异性地诱导的。

[0449] 如图51所示,在给予了3次LNP-hAFP mRNA或LNP-hHSP105 α mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞中,针对表达HLA-A*24:02HHD和hAFP的癌细胞MC38或表达HLA-A*24:02HHD和hHSP105 α 的癌细胞MC38、转染hAFP mRNA或hHSP105 α mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*24:02HHD和空载体的癌细胞MC38 A24HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*24:02HHD和hAFP的癌细胞MC38 A24HHD hAFP的IFN- γ 产生明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hAFP的癌细胞并进行攻击的T细胞。与针对表达HLA-A*24:02HHD和hHSP105 α 的癌细胞MC38 A24HHD hHSP105 α 的IFN- γ 产生相同程度地观察到针对MC38 A24HHD模拟物的IFN- γ 产生,认为这是由于来自小鼠的HSP105 α 的肽呈递在HLA-A*24:02HHD上。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-eGFP mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠中,针对任一者IFN- γ 的产生均少,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-hAFP mRNA或LNP-hHSP105 α mRNA而特异性地诱导的。

[0450] 实施例10:通用癌抗原mRNA疫苗的开发

[0451] 图52显示给予3次LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA的给药方法。

[0452] 通过对HLA-A*02:01 Tg小鼠和HLA-A*24:02 Tg小鼠的尾根部的皮内给药(i.d.),第0天、第7天、第14天共计给予3次10 μ g或20 μ g的LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA、或20 μ g的LNP-荧光素酶mRNA,第21天解剖,通过ELISPOT法评价抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0453] 图53~图56显示上述的结果。

[0454] 如图53和图54所示,在给予了3次LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠的脾细胞和腹股沟淋巴结中,针对表达HLA-A*02:01HHD和hCLDN1的癌细胞MCA205或表达

HLA-A*02:01HHD和hEPHB4的癌细胞MCA205、转染hCLDN1 mRNA或hEPHB4 mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*02:01HHD和空载体的癌细胞MCA205 A02HHD模拟物的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*02:01HHD和hEPHB4的癌细胞MCA205A02HHD hEPHB4的IFN- γ 产生明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hEPHB4的癌细胞并进行攻击的T细胞。与针对表达HLA-A*02:01HHD和hCLDN1的癌细胞MCA205 A02HHD hCLDN1的IFN- γ 产生相同程度地观察到针对MCA205 A02HHD模拟物的IFN- γ 产生,认为这是由于来自小鼠的CLDN1或EPHB4的肽呈递在HLA-A*02:01HHD上。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-荧光素酶mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,针对任一者IFN- γ 的产生均较低,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA而特异性地诱导的。

[0455] 如图55和图56所示,在给予了3次LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA的HLA-A*24:02 Tg小鼠的脾细胞和腹股沟淋巴结中,针对表达HLA-A*24:02HHD和hCLDN1的癌细胞MCA205或表达HLA-A*24:02HHD和hEPHB4的癌细胞MCA205、转染hCLDN1 mRNA或hEPHB4 mRNA的BMDC诱导了产生IFN- γ 的T细胞。与针对引入了HLA-A*24:02HHD和空载体的癌细胞MCA205 A24HHD mock的IFN- γ 产生相比,针对表达HLA-A*24:02HHD和hEPHB4的癌细胞MCA205 A24HHDhEPHB4的IFN- γ 产生明显高,由此可知:诱导了特异性地识别表达hEPHB4的癌细胞并进行攻击的T细胞。与针对表达HLA-A*24:02HHD和hCLDN1的癌细胞MCA205 A24HHD hCLDN1的IFN- γ 产生相同程度地观察到针对MCA205 A02HHD模拟物的IFN- γ 产生,认为这是由于来自小鼠的CLDN1或EPHB4的肽呈递在HLA-A*24:02HHD上。在同样地给予了3次作为阴性对照的LNP-荧光素酶mRNA的HLA-A*02:01 Tg小鼠中,针对任一者IFN- γ 的产生均较低,由此可知:上述IFN- γ 的产生是通过给予LNP-(hCLDN1+hEPHB4)mRNA而特异性地诱导的。

<mRNA用氨基酸序列>

>hGPC3_同工型_2_NP_004475 (SEQ ID NO: 81)

MAGTVRTACLVVAMLLSLDFPGQAQPPPPPDATCHQVRSFFQRLQPGL
KWVPETPVPGSDLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLNMEQLLQSASMELK
FLIIQNAAVFQEAFEIVVRHAKNYTNAMFKNNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLY
ILGSDINVDDMVNELFDSLFPVIYTQLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFG
NFPKLIMTQVSKSLQVTRIFLQALNLGIEVINTTDHLKFSKDCGRMLTRMWYC
SYCQGLMMVKPCGGYCNVVMQGC MAGVVEIDKYWREYILSLEELVNGMYR
IYDMENVLLGLFSTIHDSIQYVQKNAGKLT TTIGKLC AHSQQRQYRSA YYPED
[0456] LFIDKKVLKVAHVEHEETLSSRRRELIQKLSFISFYSALPGYICSHSPVAENDT
LCWNGQELVERY SQKAARNGMKNQFNLHELKMKGPEPVVSQIIDKCLKHINQL
LRTMSMPKGRVLDKNLDEEGFESGDCGDEDEDECIGGSGDGMIVKNQLRFLA
ELAYDL DVDDAPGNSQQATPKDNEISTFHNLGNVHSPLKLLTSMASVVCFF
LVH

>hROBO1_同工型_X5_XP_006713340 (hROBO1的细胞质内型)
(SEQ ID NO: 82)

MIAEPAHFYLFGLICLCSGSRLRQEDFPPRIVEHPSDLIVSKGEPATLNCKA
EGRPTPTIEWYKGGERVETDKDDPRSHRMLLPSGSLFFLRIVHGRKSRPDEGV
YVCVARNYLGEAVSHNASLEVAILRDDFRQNPSDVMVAVGEPAVMECQPPR

GHPEPTISWKKDGSPLDDKDERITIRGGKLMITYTRKSDAGKYVCVGTNMVGE
 RESEVAELTVLERPSFVKRPSNLAVTVDDSAEFKCEARGDPVPTVRWRKDDG
 ELPKSRYEIRDDHTLKIRKVTAGDMGSYTCVAENMVGKAEASATLTVQVGSE
 PPHFVVKPRDQVVALGRTVTFQCEATGNPQPAIFWRREGSQNLLFSYQPPQSS
 SRFSVSQTGDLTITNVQRSVDVGYICQTLNVAGSIITKAYLEVTDVIADRPPPVI
 RQGPVNQTVAVDGTFLSCVATGSPVPTILWRKDGVLVSTQDSRIKQLENGVL
 QIRYAKLGDGTGRYTCIASTPSGEATWSAYIEVQEFQVVPVQPPRPTDPNLIPSAPS
 KPEVTDVSRNTVTLVSWQPNLNSGATPTSIIIEAFSHASGSSWQTVAEENVKTETS
 AIKGLKPNAIYFLVRAANAYGISDPSQISDPVKTQDVLPTSQGVVDHKQVQREL
 GNAVLHLHNPTVLSSSSIEVHWTVDQSQYIQGYKILYRPSGANHGESDWLVF
 EVRTPAKNSVVIPDLRKGVNVEIKARPPFNEFQGADSEIKFAKTLEEAPSAPPQ
 GVTVSKNDGNGTAILVSWQPPPEDTQNGMVQEYKVVWCLGNETRYHINKTVD
 GSTFSVIPFLVPGIRYSVEVAASTGAGSGVKSEPQFIQLDAHGNPVSPEQVSL
 AQQISDVVKQPAFIAGIGAACWILMVFSIWL YRHRKKRNGLTSTYAGIRKVPS
 [0457] FTFTPTV TYQRGGEAVSSGGRPGLLNISEPAAQPWLADTWPNTGNNHNDCSIS
 CCTAGNGNSDSNLTTYSRPADCIANYNNQLDNKQTNLMLPESTVYGDVDLSN
 KINEMKTFNSPNLKDGRFVNPSGQPTPYATTQLIQSNLSNNMNGSGDSGEKH
 WKPLGQQKQEVAPVQYNIVEQNKLNDYRANDTVPPTIPYNQSYDQNTGGS
 YNSSDRGSSTSGSQGHKKGARTPKVVKQGGMNWADLLPPPAHPPPHSNSEE
 YNISVDESVDQEMPCPVPPARMYLQQDELEEEEDERGPTPPVIRGAASSPAAVS
 YSHQSTATLTSPQEELQPMLQDCPEETGHMQHQPDRRRQPVSPPPPRPISPP
 HTYGYISGPLVSDMDTDAPEEEDEADMEVAKMQTRLLLRGLEQTPASSVG
 DLESSVTGSMINGWGSASEEDNISSGRSSVSSSDGSFFTDADFAQAVAAAAEY
 AGLKVARRQMQDAAGRRHFHASQCPRPTSPVSTDSNMSAAVMQKTRPAKKL
 KHQPGLRRETYTDDLPPPPVPPPAIKSPTAQSKTQLEVRPVVVPKLPMDART
 DRSSDRKGSSYKGREVL DGRQVDMRTNPGDPREAEQQNDGKGRGNKAA
 KRDLPPAKTHLIQEDILPYCRPTFPTSNNPRDPSSSSSMSSRGSRSRQREQANVG
 RRNIAEMQVLGGYERGEDNNEELEETES

DNISSGRSSVSSSDGSFFTDADFAQAVAAAAEYAGLKVARRQMQDAAGRRHF
HASQCPRPTSPVSTDSNMSAAVMQKTRPAKCLKHQPGHLRRETYTDDLPPPP
VPPPAIKSPTAQSKTQLEVRPVVVPKLPMSDARTDRSSDRKGSSYKGREVLGD
RQVVDMRTNPGDPREAEQEQNDGKGRGNKAAKRDLPKATHLIQEDILPYCR
PTFPTSNNPRDPSSSSSMSSRGSRSRQREQANVGRRNIAEMQVLGGYERGEDN
NEELEETES

>hEPHB4_NP_004435 (SEQ ID NO: 84)

MELRVLLCWASLAAALEETLLNTKLETADLKWVTFPQVDGQWEELSGL
DEEQHSVRTYEVCQVQRAPGQAHWLRTGWVPRRGAVHVYATLRFTMLECLS
LPRAGRCKETFTVFYYESDADTATALTPAWMENPYIKVDTVAAEHLTRKRP
GAEATGKVNKTLRLGPLSKAGFYLAQDQGACMALLSLHLFYKKCAQLTV
NLTRFPETVPRELVVPVAGSCVVDVAVPAPGPSPLYCREDGQWAEQVPTGCSC
APGFEEAEGNTKCRACAQGTFKPLSGEGSCQPCPANSHTIGSAVCQCRVGY
FRARTDPRGAPCTTPPSAPRSVVSRLNGSSLHLEWSAPLES GGREDLTYALRCR
[0459] ECRPGGSCAPCGDLTFDPGPRDLVEPWVVVRGLRPDFTYTFEVTALNGVSSL
ATGPVPFEPVNVTTDREVPPAVSDIRVTRSSPSSLAWAVPRAPSGAVLDYEV
KYHEKGAEGPSSVRFLKTSENRAELRGLKRGASYLVQVRARSEAGYGPFGQE
HHSQTQLDESEGWREQLALIAGTAVVGVVLVLLVIVVAVLCLRKQSNGREAE
YSDKHGQYLIGHGTVYIDPFTYEDPNEAVREFAKEIDVS YVKIEEVIGAGEFG
EVCGRGLKAPGKKECVAIKTLKGGYTERQRREFLSEASIMGQFEHPNIIRLEG
VVTNSMPVMILTEFMENGALDSFLRLNDGQFTVIQLVGMLRGIASGMRYLAE
MSYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRFLEENSSDPTYTSSLGGKIPRWT
APEAIAFRKFTSASDAWSYGIVMWEVMSFGERPYWDMSNQDVINAIEQDYRL
PPPPDCPTSLHQLMLDCWQKDRNARPRFPQVVSALDKMIRNPASLKIVARENG
GASHPLLDQRQPHYSAFGSVGEWLRAIKMGRYEESFAAAGFGSFELVSQISAE
DLLRIGVTLAGHQKKILASVQHMKSQAKPGTPGGTGGPAPQY

>hCLDN1_NP_066924 (SEQ ID NO: 85)

MANAGLQLLGFILAF LGWIGAI VSTALPQWRIYSYAGDNIVTAQAMY EGL

WMSCVSQSTGQIQCKVFDSLNLSSSTLQATRALMVVGGILLGVIAIFVATVGMK
CMKCLEDDDEVQKMRMAVIGGAIFLLAGLAILVATAWYGNRIVQEYDPMTPV
NARYEFGQALFTGWAAASLCLLGGALLCCSCPRKTTSYPTPRPYPKPAPSSGK
DYV

>hSLC7A5_NP_003477 (SEQ ID NO: 86)

MAGAGPKRRALAAPAAEEKEEAREKMLAAKSADGSAPAGEGEGVTLQR
NITLLNGVAIIVGTIIGSGIFVTPTGVLKEAGSPGLALVVWAACGVFSIVGALCY
AELGTTISKSGGDYAYMLEVYGSLPAFLKLWIELLIIRPSSQYIVALVFATYLLK
PLFPTCPVPEEAAKLVACLCLVLLLTAVNCYSVKAATRVDFAAAKLLALALI
ILLGFVQIGKGDVSNLDPNFSFEGTKLDVGNIVLALYSGLFAYGGWNYLNFVT
EEMINPYRNLPLAIIISLPIVTLVYVLTNLA YFTTLSTEQMLSSEAVA VDFGNYH
LGVMSWIIPVVFVGLSCFGSVNGSLFTSSRLFFVGSREGHLPSILSMIHPQLLTPVP
SLVFTCVMTLLYAFSKDIFSVINFFSFFNWLCVALAIGMIWLRHRKPELERPIK
VNLALPVFFILACLFLIAVSFWKTPVECGIGFTIILSGLPVYFFGVWWKNKPKW
LLQGIFSTTVLCQKLMQVVPQET

[0460]

>hAFP_同工型_1_NP_001125 (SEQ ID NO: 87)

MKWVESIFLIFLLNFTESTRTLHRNEYGIASILDSYQCTAEISLADLATIFFAQ
FVQEATYKEVSKMVKDALTAIEKPTGDEQSSGCLENQLPAFLEELCHEKEILE
KYGHSDCCSQSEEGRHNCFLAHKKPTPASIFLQVPEPVTSCAEAYEEDRETFMN
KFIYEIARRHPFLYAPTILLWAARYDKIIPSCCKAENAVECFQTKAATVTKELR
ESSLLNQHACAVMKNFGTRTFQAITVTKLSQKFTKVNFTETIQKLVLDVAHVHE
HCCRGDVLDCLDQGEKIMSYICSQQDTLSNKITECCKLTTLERGQCIIHAENDE
KPEGLSPNLNRFLGDRDFNQFSSGEKNIFLASFVHEYSRRHPQLAVSVILRVAK
GYQELLEKCFQTENPLECQDKGEEELQKYIQESQALAKRSCGLFQKLGEYYLQ
NAFLVAYTKKAPQLTSSELMAITRKMAATAATCCQLSEDKLLACGEGAADIII
GHL CIRHEMTPVNPVGVGQCCTSSYANRRPCFSSLVDETYVPPAFSDDKFIFHK
DLCQAQGVVALQTMKQEFNLNLVKQKPKQITEEQLEAVIADFSGLLEKCCQGQEQ
EVCFAEEGQKLISKTRAALGV

>hTGFBI_NP_000349 (SEQ ID NO: 88)

MALFVRLALALALALGPAATLAGPAKSPYQLVLQHSRLRGRQHGPNC
 AVQKVIGTNRKYFTNCKQWYQRKICGKSTVISYECCPGYEKVPGEKGCPAAL
 PLSNLYETLGVVGSTTTQLYTDRTKLRPEMEGPGSFTIFAPSNEAWASLPAEV
 LDSLVSNVNIELLNALRYHMGVRRVLTDELKHGMLTSMYQNSNIQIHHYPN
 GIVTVNCARLLKADHHATNGVVHLIDKVISTITNNIQQIIEIEDTFETLRAAVAA
 SGLNTMLEGNGQYTLAPTNEAFEKIPSETLNRILGDPEALRDLNHNILKSAM
 CAEAIVAGLSVETLEGTTLVGCSDMLTINGKAIISNKDILATNGVIHYIDELL
 IPDSAKTLFELAAESDVSTAILDFRQAGLGNHLSGSERLTLLAPLNSVFKDGTTP
 IDAHTRNLLRNHIKDQLASKYLYHGQTLETGGKLRVYRNSLCIENSCIA
 AHDKRGRYGTFTMDRVLTTPMGTVMVLDKGNRFSMLVAAIQSAGLTETL
 NREGVYTVFAPTNEAFRALPPRERSRLLDGAKELANILKYHIGDEILVSGGIGA
 LVRLKSLQGDKLEVSLKNNVSVNKEPVAEPDIMATNGVVHVITNVLQPPAN
 RPQERGDELADSALEIFKQASAFSRASQRSVRLAPVYQKLLERMKH

[0461]

>hSPARC_同工型_1_NP_003109 (SEQ ID NO: 89)

MRAWIFFLLCLAGRALAAPQQEALPDETEVVEETVAEVTEVSVGANPVQ
 VEVGEFDDGAEETEEVVAENPCQNHCKHGKVCELDENNTPMCVCQDPTS
 CPAPIGEFEKVCSDNKTFDSSCHFFATKCTLEGTKKGHLHLDYIGPCKYIPP
 CLDSELTEFPLMRDWLKNVLVTLYERDEDNLLTEKQKLRVKKIHENEKRL
 EAGDHPVELLARDFEKNYNMYIFPVHWQFGQLDQHPIDGYLSHTELAPLRAPL
 IPMEHCTTRFFETCDLDNDKYIALDEWAGCFGIKQKDIDKDLVI

>hFOXMI_同工型_2_NP_068772 (SEQ ID NO: 90)

MKTSPRRPLILKRRRLPLPVQNAPSETSEEPKRSPAQQESNQAEASKEVA
 ESNSCKFPAGIKIINHPTMPNTQVVAIPNNANIHSIITALTAKGKESGSSGPNKFI
 LISCGGAPTQPPGLRPQTQTSYDAKRTEVTLETLPKPAARDVNLPRPPGALCE
 QKRETCADGEAAGCTINNSLSNIQWLRKMSSDGLGSRSIKQEMEEKENCHLEQ
 RQVKVEEPSRPSASWQNSVSRPPYSYMIQFAINSTERKRMTLKDIIYTWIE
 DHFPYFKHIAKPGWKN SIRHNLSLHDMFVRETSANGKVSFWTIHPSANRYLTL

DQVFKPLDPGSPQLPEHLESQQKRPNPPELRRNMTIKTELPLGARRKMKPLLPR
 VSSYLVPFIQFPVNQSLVLQPSVKVPLPLAASLMSEELARHRSKRVRAPKVLLAE
 EGIAPLSSAGPGKEEKLLFGGFSPLLVPQTIKEEEIQPGEEMPHLARPIKVESPP
 LEEWSPAPSFKEESSHSWEDSSQSPTPRPKKSYGLRSPTRCVSEMLVIQHRER
 RERSRSRKQHLLPPCVDEPELLFSEGPSTSRWAAELPPADSSDPASQLSYSQE
 VGGPFKTPIKETLPISSTPSKSVLPRTPESWRLTPPAKVGGGLDFSPVQTSQGASD
 PLPDPLGLMDLSTTPLQSAPPLESPQRLLSSEPLDLISVFPNGNSSPSDIDVPKPGSP
 EPQVSGLAANRSLTEGLVLDTMNDSLKILLDISFPGLDEDPLGPDNINWSQFIP
 ELQ

>hHSPH1_同工型_1_NP_006635 (SEQ ID NO: 91)

[0462]

MSVVGLDVGSQSCYIAVARAGGIETIANEFSDRCTPSVISFGSKNRTIGVA
 AKNQQITHANNTVSNFKRFHGRAFNDFPIQKEKENLSYDLVPLKNGGVGIV
 MYMGEEHLFSVEQITAMLLTKLKETAENSLKKPVTDCVISVPSFFTDAERRSV
 LDAAQIVGLNCLRLMNDMTAVALNYGIYKQDLPSLDEKPRIVVFVDMGHSAF
 QVSACAFNKGKLVLTGTAFFLGGKNFDEKLVHFCAEFKTKYKLDASKI
 RALLRLYQECEKLLKLMSSNSTDLPLNIECFMNDKDVSGKMNRSQFEELCAEL
 LQKIEVPLYSLLEQTHLKVEDVSAVEIVGGATRIPAVKERIAKFFGKDISTLNA
 DEAVARGCALQCAILSPAFAKVFREFSVTDAVFPISLIWNHDSSETEGVHEVFSR
 NHAAPFSKVLTFLLRRGPFLEAFYSQPQGVPEAKIGRFVQNVSAQKDGEK
 SRVKVKVRVNTHGIFTISTASMVEKVPTEENEMSSEADMECLNQRPPENPDTD
 KNVQQDNSEAGTQPQVQTDAQQTSSPPELTSEENKIPDADKANEEKVDQP
 PEAKKPKIKVVNVELPIEANLVWQLGKDLLNMYIETEGKMIMQDKLEKERND
 AKNAVEEYVYEFKDKLCPYEKFKICEQDHQNFLLTETEDWLYEEGEDQAK
 QAYVDKLEELMKIGTPVKVRFQEAERPKMFEELGQRLQHYAKIAADFRNKD
 EKYNHIDESEMKKVEKSVNEVMEWMNVMNAQAKKSLDQDPVVRAQEIKT
 KIKELNNTCEPVVTQPKPKIESPKLERTPNGPNIDKKEEDLEDKNNFGAEPHQ
 NGECYPNEKNSVNMDLD

<mRNA疫苗 密码子优化前原始序列>

>hGPC3_var2_NM_004484 (SEQ ID NO: 92)

ATGGCCGGGACCGTGCGCACCGCGTGCTTGGTGGTGGCGATGCTGCTC
AGCTTGGACTTCCCGGGACAGGCGCAGCCCCGCCGCCGCCGGACGC
CACCTGTCACCAAGTCCGCTCCTTCTTCCAGAGACTGCAGCCCGGACTCAA
GTGGGTGCCAGAACTCCCGTGCCAGGATCAGATTTGCAAGTATGTCTCCC
TAAGGGCCCAACATGCTGCTCAAGAAAGATGGAAGAAAAATACCAACTAA
CAGCACGATTGAACATGGAACAGCTGCTTCAGTCTGCAAGTATGGAGCTCA
AGTTCTTAATTATTCAGAATGCTGCGGTTTTTCCAAGAGGCCTTTGAAATTGT
TGTTCCGCATGCCAAGAACTACACCAATGCCATGTTCAAGAACAACACTACCC
AAGCCTGACTCCACAAGCTTTTGAGTTTGTGGGTGAATTTTTTACAGATGT
GTCTCTCTACATCTTGGGTTCTGACATCAATGTAGATGACATGGTCAATGA
ATTGTTTGACAGCCTGTTTCCAGTCATCTATACCCAGCTAATGAACCCAGG
CCTGCCTGATTCAGCCTTGGACATCAATGAGTGCCTCCGAGGAGCAAGACG
TGACCTGAAAGTATTTGGGAATTTCCCAAGCTTATTATGACCCAGGTTTC
CAAGTCACTGCAAGTCACTAGGATCTTCCTTCAGGCTCTGAATCTTGGAA
TGAAGTGATCAACACAACACTGATCACCTGAAGTTCAGTAAGGACTGTGGCC
GAATGCTCACCAGAATGTGGTACTGCTCTTACTGCCAGGGACTGATGATGG
TTAAACCCTGTGGCGGTTACTGCAATGTGGTCATGCAAGGCTGTATGGCAG
GTGTGGTGGAGATTGACAAGTACTGGAGAGAATACATTCTGTCCCTTGAAG
AACTTGTGAATGGCATGTACAGAATCTATGACATGGAGAACGTAAGTCTTG
GTCTCTTTTCAACAATCCATGATTCTATCCAGTATGTCCAGAAGAATGCAG
GAAAGCTGACCACCACTATTGGCAAGTTATGTGCCATTCTCAACAACGCC
AATATAGATCTGCTTATTATCCTGAAGATCTCTTTATTGACAAGAAAGTATT
AAAAGTTGCTCATGTAGAACATGAAGAAACCTTATCCAGCCGAAGAAGGG
AACTAATTCAGAAGTTGAAGTCTTTCATCAGCTTCTATAGTGCTTTGCCTGG
CTACATCTGCAGCCATAGCCCTGTGGCGGAAAACGACACCCTTTGCTGGAA
TGGACAAGAACTCGTGGAGAGATACAGCCAAAAGGCAGCAAGGAATGGA
ATGAAAAACCAGTTCAATCTCCATGAGCTGAAAATGAAGGGCCCTGAGCC

[0463]

AGTGGTCAGTCAAATTATTGACAAACTGAAGCACATTAACCAGCTCCTGAG
AACCATGTCTATGCCCAAAGGTAGAGTTCTGGATAAAAACCTGGATGAGG
AAGGGTTTGAAAGTGGAGACTGCGGTGATGATGAAGATGAGTGCATTGGA
GGCTCTGGTGTGGAATGATAAAAGTGAAGAATCAGCTCCGCTTCCTTGCA
GAACTGGCCTATGATCTGGATGTGGATGATGCGCCTGGAAACAGTCAGCA
GGCAACTCCGAAGGACAACGAGATAAGCACCTTTCACAACCTCGGGAACG
TTCATTCCCCGCTGAAGCTTCTCACCAGCATGGCCATCTCGGTGGTGTGCTT
CTTCTTCCTGGTGCCTGA

>hROBO1_varX6_cloned_from_SW480 (细胞质内型) (SEQ ID NO:
93)

[0464]

ATGATTGCGGAGCCCGCTCACTTTTACCTGTTTGGATTAATATGTCTCT
G TTCAGGCTCCCGTCTTCGTCAGGAAGATTTTCCACCTCGCATTGTTGAACA
CCCTTCAGACCTGATTGTCTCAAAGGAGAACCTGCAACTTTGAACTGCAA
AGCTGAAGGCCGCCCCACACCCACTATTGAATGGTACAAAGGGGGAGAGA
GAGTGGAGACAGACAAAGATGACCCTCGCTCACACCGAATGTTGCTGCCG
AGTGGATCTTTATTTTTCTTACGTATAGTACATGGACGGAAAAGTAGACCT
GATGAAGGAGTCTATGTCTGTGTAGCAAGGAATTACCTTGGAGAGGCTGTG
AGCCACAATGCATCGCTGGAAGTAGCCATACTTCGGGATGACTTCAGACA
AAACCTTCGGATGTCATGGTTGCAGTAGGAGAGCCTGCAGTAATGGAAT
GCCAACCTCCACGAGGCCATCCTGAGCCCACCATTTCATGGAAGAAAGAT
GGCTCTCCACTGGATGATAAAGATGAAAGAATAACTATACGAGGAGGAAA
GCTCATGATCACTTACACCCGTAAGAGTGACGCTGGCAAATATGTTTGTGT
TGGTACCAATATGGTTGGGGAACGTGAGAGTGAAGTAGCCGAGCTGACTG
TCTTAGAGAGACCATCATTGTGAAGAGACCCAGTAACTTGGCAGTAACTG
TGGATGACAGTGCAGAATTTAAATGTGAGGCCCGAGGTGACCCTGTACCTA
CAGTACGATGGAGGAAAGATGATGGAGAGCTGCCCAAATCCAGATATGAA
ATCCGAGATGATCATACTTGAAAATTAGGAAGGTGACAGCTGGTGCAT
GGGTTCCATACACTTGTGTTGCAGAAAATATGGTGGGCAAAGCTGAAGCATC

[0465]

TGCTACTCTGACTGTTCAAGTTGGGTCTGAACCTCCACATTTTGTGTGAAA
CCCCGTGACCAGGTTGTTGCTTTGGGACGGACTGTAACTTTTTCAGTGTGAA
GCAACCGGAAATCCTCAACCAGCTATTTTCTGGAGGAGAGAAGGGAGTCA
GAATCTACTTTTCTCATATCAACCACCACAGTCATCCAGCCGATTTTCAGTC
TCCCAGACTGGCGACCTCACAATTACTAATGTCCAGCGATCTGATGTTGGT
TATTACATCTGCCAGACTTTAAATGTTGCTGGAAGCATCATCACAAAGGCA
TATTTGGAAGTTACAGATGTGATTGCAGATCGGCCTCCCCAGTTATTCGA
CAAGGTCCTGTGAATCAGACTGTAGCCGTGGATGGCACTTTCGTCCTCAGC
TGTGTGGCCACAGGCAGTCCAGTGCCACCATTCTGTGGAGAAAGGATGG
AGTCCTCGTTTCAACCCAAGACTCTCGAATCAAACAGTTGGAGAATGGAGT
ACTGCAGATCCGATATGCTAAGCTGGGTGATACTGGTCCGTACACCTGCAT
TGCATCAACCCCCAGTGGTGAAGCAACATGGAGTGCTTACATTGAAGTTCA
AGAATTTGGAGTTCAGTTCAGCCTCCAAGACCTACTGACCCAAATTTAAT
CCCTAGTGCCCCATCAAACCTGAAGTGACAGATGTCAGCAGAAATACAG
TCACATTATCGTGGCAACCAAATTTGAATTCAGGAGCAACTCCAACATCTT
ATATTATAGAAGCCTTCAGCCATGCATCTGGTAGCAGCTGGCAGACCGTAG
CAGAGAATGTGAAAACAGAAACATCTGCCATTAAAGGACTCAAACCTAAT
GCAATTTACCTTTTCTTGTGAGGGCAGCTAATGCATATGGAATTAGTGAT
CCAAGCCAAATATCAGATCCAGTGAAAACACAAGATGTCCTACCAACAAG
TCAGGGGGTGGACCACAAGCAGGTCCAGAGAGAGCTGGGAAATGCTGTTC
TGCACCTCCACAACCCACCGTCCTTTCTTCTTCCATCGAAGTGCCTG
GACAGTAGATCAACAGTCTCAGTATATAACAAGGATATAAAATTCTCTATCG
GCCATCTGGAGCCAACCACGGAGAATCAGACTGGTTAGTTTTTGAAGTGAG
GACGCCAGCCAAAAACAGTGTGGTAATCCCTGATCTCAGAAAGGGAGTCA
ACTATGAAATTAAGGCTCGCCCTTTTTTTAATGAATTTCAAGGAGCAGATA
GTGAAATCAAGTTTGCCAAAACCCTGGAAGAAGCACCCAGTGCCCCACCC
CAAGGTGTAACGTATCCAAGAATGATGGAAACGGAAGTCAATTCTAGTT
AGTTGGCAGCCACCTCCAGAAGACACTCAAATGGAATGGTCCAAGAGTA

[0466]

TAAGGTTTGGTGTCTGGGCAATGAAACTCGATACCACATCAACAAAACAGT
GGATGGTTCCACCTTTTCCGTGGTCATTCCCTTTCTTGTTCCCTGGAATCCGA
TACAGTGTGGAAGTGGCAGCCAGCACTGGGGCTGGGTCTGGGGTAAAGAG
TGAGCCTCAGTTCATCCAGCTGGATGCCATGGAAACCCTGTGTCACCTGA
GGACCAAGTCAGCCTCGCTCAGCAGATTTTCAGATGTGGTGAAGCAGCCGG
CCTTCATAGCAGGTATTGGAGCAGCCTGTTGGATCATCCTCATGGTCTTCA
GCATCTGGCTTTATCGACACCGCAAGAAGAGAAACGGACTTACTAGTACCT
ACGCGGGTATCAGAAAAGTCCCGTCTTTTACCTTCACACCAACAGTAACTT
ACCAGAGAGGAGGCGAAGCTGTCAGCAGTGGAGGGAGGCCTGGACTTCTC
AACATCAGTGAACCTGCCGCGCAGCCATGGCTGGCAGACACGTGGCCTAA
TACTGGCAACAACCACAATGACTGCTCTATCAGCTGCTGCACGGCAGGCAA
TGAAACAGCGACAGCAACCTCACTACCTACAGTCGCCCAGCTGATTGTAT
AGCAAATTATAACAACCAACTGGATAACAAACAAACAAATCTGATGCTCC
CTGAGTCAACTGTTTATGGTGATGTGGACCTTAGTAACAAAATCAATGAGA
TGAAAACCTTCAATAGCCCAAATCTGAAGGATGGGCGTTTTGTCAATCCAT
CAGGGCAGCCTACTCCTTACGCCACCACTCAGCTCATCCAGTCAAACCTCA
GCAACAACATGAACAATGGCAGCGGGGACTCTGGCGAGAAGCACTGGAAA
CCACTGGGACAGCAGAAACAAGAAGTGGCACCAGTTCAGTACAACATCGT
GGAGCAAAACAAGCTGAACAAAGATTATCGAGCAAATGACACAGTTCTC
CAACTATCCCATAACAACCAATCATAACGACCAGAACACAGGAGGATCCTAC
AACAGCTCAGACCGGGGACAGTAGTACATCTGGGAGTCAGGGGCACAAGAA
AGGGGCAAGAACACCCAAGGTACCAAAACAGGGTGGCATGAACTGGGCA
GACCTGCTTCCTCCTCCCCAGCACATCCTCCTCCACACAGCAATAGCGAA
GAGTACAACATTTCTGTAGATGAAAGCTATGACCAAGAAATGCCATGTCCC
GTGCCACCAGCAAGGATGTATTTGCAACAAGATGAATTAGAAGAGGAGGA
AGATGAACGAGGCCCCACTCCCCCTGTTCCGGGAGCAGCTTCTTCTCCAGC
TGCCGTGTCTATAGCCATCAGTCCACTGCCACTCTGACTCCCTCCCCACAG
GAAGAACTCCAGCCCATGTTACAGGATTGTCCAGAGGAGACTGGCCACAT

GCAGCACCAGCCCGACAGGAGACGGCAGCCTGTGAGTCCTCCTCCACCAC
CACGGCCGATCTCCCCTCCACATACCTATGGCTACATTTTCAGGACCCCTGG
TCTCAGATATGGATACGGATGCGCCAGAAGAGGAAGAAGACGAAGCCGAC
ATGGAGGTAGCCAAGATGCAAACCAGAAGGCTTTTGTACGTGGGCTTGA
GCAGACACCTGCCTCCAGTGTTGGGGACCTGGAGAGCTCTGTCACGGGGTC
CATGATCAACGGCTGGGGCTCAGCCTCAGAGGAGGACAACATTTCCAGCG
GACGCTCCAGTGTTAGTTCTTCGGACGGCTCCTTTTTTCACTGATGCTGACTT
TGCCAGGCAGTCGCAGCAGCGGCAGAGTATGCTGGTCTGAAAGTAGCAC
GACGGCAAATGCAGGATGCTGCTGGTCGTCGACATTTTCATGCGTCTCAGT
GCCCTAGGCCACAAGTCCCGTGTCTACAGACAGCAACATGAGTGCCGCC
GTAATGCAGAAAACCAGACCAGCCAAGAACTGAAACACCAGCCAGGAC
ATCTGCGCAGAGAAACCTACACAGATGATCTTCCACCACCTCCTGTGCCGC
CACCTGCTATAAAGTCACCTACTGCCCAATCCAAGACACAGCTGGAAGTAC
[0467] GACCTGTAGTGGTGCCAAAACCTCCTTCTATGGATGCAAGAACAGACAGAT
CATCAGACAGAAAAGGAAGCAGTTACAAGGGGAGAGAAGTGTTGGATGG
AAGACAGGTTGTTGACATGCGAACAATCCAGGTGATCCCAGAGAAGCAC
AGGAACAGCAAAATGACGGGAAAGGACGTGGAAACAAGGCAGCAAAACG
AGACCTTCCACCAGCAAAGACTCATCTCATCCAAGAGGATATTCTACCTTA
TTGTAGACCTACTTTTCCAACATCAAATAATCCCAGAGATCCCAGTTCCTC
AAGCTCAATGTCATCAAGAGGATCAGGAAGCAGACAAAGAGAACAAGCA
AATGTAGGTCGAAGAAATATTGCAGAAATGCAGGTACTIONTGGAGGATATGA
AAGAGGAGAAGATAATAATGAAGAATTAGAGGAAACTGAAAGCTGA

>hROBO1_var1_NM_002941 (膜定位型) (SEQ ID NO: 94)

ATGAAATGGAAACATGTTCCTTTTTGGTCATGATATCACTCCTCAGCT
TATCCCCAAATCACCTGTTTCTGGCCAGCTTATTCCAGACCCTGAAGATGT
AGAGAGGGGGAACGACCACGGGACGCCAATCCCCACCTCTGATAACGATG
ACAATTCGCTGGGCTATACAGGCTCCCGTCTTCGTCAGGAAGATTTTCCAC
CTCGCATTGTTGAACACCCTTCAGACCTGATTGTCTCAAAGGAGAACCCTG

[0468]

CAACTTTGAACTGCAAAGCTGAAGGCCGCCACACCCACTATTGAATGGT
ACAAAGGGGGAGAGAGAGTGGAGACAGACAAAGATGACCCTCGCTCACA
CCGAATGTTGCTGCCGAGTGGATCTTTATTTTCTTACGTATAGTACATGGA
CGGAAAAGTAGACCTGATGAAGGAGTCTATGTCTGTGTAGCAAGGAATTA
CCTTGGAGAGGCTGTGAGCCACAATGCATCGCTGGAAGTAGCCATACTTCG
GGATGACTTCAGACAAAACCCTTCGGATGTCATGGTTGCAGTAGGAGAGC
CTGCAGTAATGGAATGCCAACCTCCACGAGGCCATCCTGAGCCCACCATT
CATGGAAGAAAGATGGCTCTCCACTGGATGATAAAGATGAAAGAATAACT
ATACGAGGAGGAAAGCTCATGATCACTTACACCCGTA AAAAGTGACGCTGG
CAAATATGTTTGTGTTGGTACCAATATGGTTGGGGAACGTGAGAGTGAAGT
AGCCGAGCTGACTGTCTTAGAGAGACCATCATTTGTGAAGAGACCCAGTA
ACTTGGCAGTAACTGTGGATGACAGTGCAGAATTTAAATGTGAGGCCCGA
GGTGACCCTGTACCTACAGTACGATGGAGGAAAGATGATGGAGAGCTGCC
CAAATCCAGATATGAAATCCGAGATGATCATACCTTGAAAATTAGGAAGG
TGACAGCTGGTGACATGGGTTTCATACACTTGTGTTGCAGAAAATATGGTGG
GCAAAGCTGAAGCATCTGCTACTCTGACTGTTCAAGAACCTCCACATTTTG
TTGTGAAACCCCGTGACCAGGTTGTTGCTTTGGGACGGACTGTAACTTTTC
AGTGTGAAGCAACCGGAAATCCTCAACCAGCTATTTTCTGGAGGAGAGAA
GGGAGTCAGAATCTACTTTTCTCATATCAACCACCACAGTCATCCAGCCGA
TTTTCAGTCTCCAGACTGGCGACCTCACAATTACTAATGTCCAGCGATCT
GATGTTGGTTATTACATCTGCCAGACTTTAAATGTTGCTGGAAGCATCATC
ACAAAGGCATATTTGGAAGTTACAGATGTGATTGCAGATCGGCCTCCCCCA
GTTATTCGACAAGGTCCTGTGAATCAGACTGTAGCCGTGGATGGCACTTTC
GTCTCAGCTGTGTGGCCACAGGCAGTCCAGTGCCACCATTCTGTGGAGA
AAGGATGGAGTCCTCGTTTCAACCCAAGACTCTCGAATCAAACAGTTGGAG
AATGGAGTACTGCAGATCCGATATGCTAAGCTGGGTGATACTGGTTCGGTAC
ACCTGCATTGCATCAACCCCCAGTGGTGAAGCAACATGGAGTGCTTACATT
GAAGTTCAAGAATTTGGAGTTCCAGTTCAGCCTCCAAGACCTACTGACCCA

[0469]

AATTTAATCCCTAGTGCCCCATCAAACCTGAAGTGACAGATGTCAGCAGA
AATACAGTCACATTATCGTGGCAACCAAATTTGAATTCAGGAGCAACTCCA
ACATCTTATATTATAGAAGCCTTCAGCCATGCATCTGGTAGCAGCTGGCAG
ACCGTAGCAGAGAATGTGAAAACAGAAACATCTGCCATTAAGGACTCAA
ACCTAATGCAATTTACCTTTTCCTTGTGAGGGCAGCTAATGCATATGGAAT
TAGTGATCCAAGCCAAATATCAGATCCAGTGAAAACACAAGATGTCCTAC
CAACAAGTCAGGGGGTGGACCACAAGCAGGTCCAGAGAGAGCTGGGAAA
TGCTGTTCTGCACCTCCACAACCCACCGTCCCTTTCTTCCCTCTTCCATCGAA
GTGCACTGGACAGTAGATCAACAGTCTCAGTATATACAAGGATATAAAAATT
CTCTATCGGCCATCTGGAGCCAACCACGGAGAATCAGACTGGTTAGTTTTT
GAAGTGAGGACGCCAGCCAAAAACAGTGTGGTAATCCCTGATCTCAGAAA
GGGAGTCAACTATGAAATTAAGGCTCGCCCTTTTTTTAATGAATTTCAAGG
AGCAGATAGTGAAATCAAGTTTGCCAAAACCCTGGAAGAAGCACCCAGTG
CCCCACCCAAGGTGTAAGTGTATCCAAGAATGATGGAAACGGAAGTCA
ATTCTAGTTAGTTGGCAGCCACCTCCAGAAGACACTCAAATGGAATGGTC
CAAGAGTATAAGGTTTGGTGTCTGGGCAATGAAACTCGATACCACATCAAC
AAAACAGTGGATGGTTCCACCTTTTCCGTGGTCATTCCCTTTCTTGTTCCTG
GAATCCGATACAGTGTGGAAGTGGCAGCCAGCACTGGGGCTGGGTCTGGG
GTAAAGAGTGAGCCTCAGTTCATCCAGCTGGATGCCATGGAAACCCTGTG
TCACCTGAGGACCAAGTCAGCCTCGCTCAGCAGATTTAGATGTGGTGAAG
CAGCCGGCCTTCATAGCAGGTATTGGAGCAGCCTGTTGGATCATCCTCATG
GTCTTCAGCATCTGGCTTTATCGACACCGCAAGAAGAGAAACGGACTTACT
AGTACCTACGCGGGTATCAGAAAAGTCCCGTCTTTTACCTTCACACCAACA
GTAAGTTACCAGAGAGGAGGCGAAGCTGTCAGCAGTGGAGGGAGGCCTGG
ACTTCTCAACATCAGTGAACCTGCCGCGCAGCCATGGCTGGCAGACACGTG
GCCTAATACTGGCAACAACCACAATGACTGCTCCATCAGCTGCTGCACGGC
AGGCAATGGAAACAGCGACAGCAACCTCACTACCTACAGTCGCCAGCTG
ATTGTATAGCAAATTATAACAACCAACTGGATAACAAACAAACAAATCTG

[0470]

ATGCTCCCTGAGTCAACTGTTTATGGTGTGATGTGGACCTTAGTAACAAAATC
AATGAGATGAAAACCTTCAATAGCCCAAATCTGAAGGATGGGCGTTTTGTC
AATCCATCAGGGCAGCCTACTCCTTACGCCACCACTCAGCTCATCCAGTCA
AACCTCAGCAACAACATGAACAATGGCAGCGGGGACTCTGGCGAGAAGCA
CTGGAAACCACTGGGACAGCAGAAACAAGAAGTGGCACCAGTTCAGTACA
ACATCGTGGAGCAAAACAAGCTGAACAAAGATTATCGAGCAAATGACACA
GTTCTCCAACCTATCCCATACAACCAATCATACGACCAGAACACAGGAGG
ATCCTACAACAGCTCAGACCGGGGCAGTAGTACATCTGGGAGTCAGGGGC
ACAAGAAAGGGGCAAGAACACCCAAGGTACCAAACAGGGTGGCATGAA
CTGGGCAGACCTGCTTCCTCCTCCCCAGCACATCCTCCTCCACACAGCAA
TAGCGAAGAGTACAACATTTCTGTAGATGAAAGCTATGACCAAGAAATGC
CATGTCCCGTGCCACCAGCAAGGATGTATTTGCAACAAGATGAATTAGAA
GAGGAGGAAGATGAACGAGGCCCACTCCCCCTGTTCCGGGGAGCAGCTTC
TTCTCCAGCTGCCGTGTCCTATAGCCATCAGTCCACTGCCACTCTGACTCCC
TCCCCACAGGAAGAACTCCAGCCCATGTTACAGGATTGTCCAGAGGAGAC
TGGCCACATGCAGCACCAGCCCGACAGGAGACGGCAGCCTGTGAGTCCTC
CTCCACCACCACGGCCGATCTCCCCTCCACATACCTATGGCTACATTTAG
GACCCCTGGTCTCAGATATGGATACGGATGCGCCAGAAGAGGAAGAAGAC
GAAGCCGACATGGAGGTAGCCAAGATGCAAACCAGAAGGCTTTTGTACG
TGGGCTTGAGCAGACACCTGCCTCCAGTGTTGGGGACCTGGAGAGCTCTGT
CACGGGGTCCATGATCAACGGCTGGGGCTCAGCCTCAGAGGAGGACAACA
TTTCCAGCGGACGCTCCAGTGTTAGTTCTTCGGACGGCTCCTTTTTCACTGA
TGCTGACTTTGCCAGGCAGTCGCAGCAGCGGCAGAGTATGCTGGTCTGAA
AGTAGCACGACGGCAAATGCAGGATGCTGCTGGCCGTCGACATTTTCATGC
GTCTCAGTGCCCTAGGCCACAAGTCCCGTGTCTACAGACAGCAACATGAG
TGCCGCCGTAATGCAGAAAACCAGACCAGCCAAGAACTGAAACACCAGC
CAGGACATCTGCGCAGAGAAACCTACACAGATGATCTTCCACCACCTCCTG
TGCCGCCACCTGCTATAAAGTCACCTACTGCCCAATCCAAGACACAGCTGG

AAGTACGACCTGTAGTGGTGCCAAAACCTCCCTTCTATGGATGCAAGAACAG
ACAGATCATCAGACAGAAAAGGAAGCAGTTACAAGGGGAGAGAAGTGTT
GGATGGAAGACAGGTTGTTGACATGCGAACAAATCCAGGTGATCCCAGAG
AAGCACAGGAACAGCAAAATGACGGGAAAGGACGTGGAAACAAGGCAGC
AAAACGAGACCTTCCACCAGCAAAGACTCATCTCATCCAAGAGGATATTCT
ACCTTATTGTAGACCTACTTTTCCAACATCAAATAATCCCAGAGATCCCAG
TTCCTCAAGCTCAATGTCATCAAGAGGATCAGGAAGCAGACAAAGAGAAC
AAGCAAATGTAGGTCTGAAGAAATATTGCAGAAATGCAGGTACTIONTGGAGGA
TATGAAAGAGGAGAAGATAATAATGAAGAATTAGAGGAAACTGAAAGCT
GA

>hEPHB4_cloned_from_SKmel23 (SEQ ID NO: 95)

[0471] ATGGAGCTCCGGGTGCTGCTCTGCTGGGCTTCGTTGGCCGACGCTTTG
GAAGAGACCCTGCTGAACACAAAATTGGAAACTGCTGATCTGAAGTGGGT
GACATTCCCTCAGGTGGACGGGCAGTGGGAGGAACTGAGCGGCCTGGATG
AGGAACAGCACAGCGTGCGCACCTACGAAGTGTGTGACGTGCAGCGTGCC
CCGGGCCAGGCCCACTGGCTTCGCACAGGTTGGGTCCCACGGCGGGGCGC
CGTCCACGTGTACGCCACGCTGCGCTTACCATGCTCGAGTGCCTGTCCCT
GCCTCGGGCTGGGCGCTCCTGCAAGGAGACCTTACCAGTCTTCTACTATGA
GAGCGATGCGGACACGGCCACGGCCCTCACGCCAGCCTGGATGGAGAACC
CCTACATCAAGGTGGACACGGTGGCCGCGGAGCATCTCACCCGGAAGCGC
CCTGGGGCCGAGGCCACCGGGAAGGTGAATGTCAAGACGCTGCGTCTGGG
ACCGCTCAGCAAGGCTGGCTTCTACCTGGCCTTCCAGGACCAGGGTGCCTG
CATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTCTTCTACAAAAGTGCGCCAGCTGAC
TGTGAACCTGACTCGATTCCCGGAGACTGTGCCTCGGGAGCTGGTTGTGCC
CGTGGCCGGTAGCTGCGTGGTGGATGCCGTCCCCGCCCTGGCCCCAGCCC
CAGCCTCTACTGCCGTGAGGATGGCCAGTGGGCCGAACAGCCGGTCACGG
GCTGCAGCTGTGCTCCGGGGTTCGAGGCAGCTGAGGGGAACACCAAGTGC
CGAGCCTGTGCCAGGGCACCTTCAAGCCCCTGTCAGGAGAAGGGTCTCTGC

[0472]

CAGCCATGCCAGCCAATAGCCACTCTAACACCATTGGATCAGCCGTCTGC
CAGTGCCGCGTCGGGTACTTCCGGGCACGCACAGACCCCGGGGTGCACC
CTGCACCACCCCTCCTTCGGCTCCGCGGAGCGTGGTTTCCCGCCTGAACGG
CTCCTCCCTGCACCTGGAATGGAGTGCCCCCTGGAGTCTGGTGGCCGAGA
GGACCTCACCTACGCCCTCCGCTGCCGGGAGTGCCGACCCGGAGGCTCCTG
TGCGCCCTGCGGGGAGACCTGACTTTTGACCCCGGCCCGGGACCTGGT
GGAGCCCTGGGTGGTGGTTCGAGGGCTACGTCCTGACTTCACCTATACCTT
TGAGGTCACTGCATTGAACGGGGTATCCTCCTTAGCCACGGGGCCCGTCCC
ATTTGAGCCTGTCAATGTCACCACTGACCGAGAGGTACCTCCTGCAGTGTC
CGACATCCGGGTGACGCGGTCTCACCCAGCAGCTTGAGCCTGGCCTGGGC
TGTTCCCGGGCACCCAGTGGGGCTGTGCTGGACTACGAGGTCAAATACCA
TGAGAAGGGCGCCGAGGGTCCAGCAGCGTGCGGTTCTGAAGACGTCAG
AAAACCGGGCAGAGCTGCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCAGCTACCTGGTG
CAGGTACGGGCGCGCTCTGAGGCCGGCTACGGGCCCTTCGGCCAGGAACA
TCACAGCCAGACCCAACCTGGATGAGAGCGAGGGCTGGCGGGAGCAGCTGG
CCCTGATTGCGGGCACGGCAGTCGTGGGTGTGGTCCTGGTCCTGGTGGTCA
TTGTGGTCGCAGTTCTCTGCCTCAGGAAGCAGAGCAATGGGAGAGAAGCA
GAATATTCGGACAAACACGGACAGTATCTCATCGGGCATGGTACTAAGGT
CTACATCGACCCCTTCACTTATGAAGACCCTAATGAGGCTGTGAGGGAATT
TGCAAAGAGATCGATGTCTCCTACGTCAAGATTGAAGAGGTGATTGGTGC
AGGTGAGTTTGGCGAGGTGTGCCGGGGGCGGCTCAAGGCCCCAGGGAAGA
AGGAGAGCTGTGTGGCAATCAAGACCCTGAAGGGTGGCTACACGGAGCGG
CAGCGGCGTGAGTTTCTGAGCGAGGCCTCCATCATGGGCCAGTTCGAGCAC
CCCAATATCATCCGCCTGGAGGGCGTGGTCACCAACAGCATGCCCGTCATG
ATTCTCACAGAGTTCATGGAGAACGGCGCCCTGGACTCCTTCTGCGGCTA
AACGACGGACAGTTCACAGTCATCCAGCTCGTGGGCATGCTGCGGGGCAT
CGCCTCGGGCATGCGGTACCTTGCCGAGATGAGCTACGTCCACCGAGACCT
GGCTGCTCGCAACATCCTAGTCAACAGCAACCTCGTCTGCAAAGTGTCTGA

CTTTGGCCTTTCCCGATTCTGAGGAGAACTCTTCCGATCCCACCTACACG
AGCTCCCTGGGAGGAAAGATTCCCATCCGATGGACTGCCCCGGAGGCCATT
GCCTTCCGGAAGTTCACCTCCGCCAGTGATGCCTGGAGTTACGGGATTGTG
ATGTGGGAGGTGATGTCATTTGGGGAGAGGCCGTACTGGGACATGAGCAA
TCAGGACGTGATCAATGCCATTGAACAGGACTACCGGCTGCCCCGCCCC
AGACTGTCCCACCTCCCTCCACCAGCTCATGCTGGACTGTTGGCAGAAAGA
CCGGAATGCCCGGCCCGCTTCCCCAGGTGGTCAGCGCCCTGGACAAGAT
GATCCGGAACCCCGCCAGCCTCAAATCGTGGCCCGGGAGAATGGCGGGG
CCTCACACCCTCTCCTGGACCAGCGGCAGCCTCACTACTCAGCTTTTGGCTC
TGTGGGCGAGTGGCTTCGGGCCATCAAATGGGAAGATACGAAGAAAGTT
TCGCAGCCGCTGGCTTTGGCTCCTTCGAGCTGGTCAGCCAGATCTCTGCTG
AGGACCTGCTCCGAATCGGAGTCACTCTGGCGGGACACCAGAAGAAAATC
TTGGCCAGTGTCCAGCACATGAAGTCCCAGGCCAAGCCGGGAACCCCGGG
TGGGACAGGAGGACCGGCCCGCAGTACTGA

[0473]

>hCLDN1_NM_021101 (SEQ ID NO: 96)

ATGGCCAACGCGGGGCTGCAGCTGTTGGGCTTCATTCTCGCCTTCCTG
GGATGGATCGGCGCCATCGTCAGCACTGCCCTGCCCCAGTGGAGGATTTAC
TCCTATGCCGGCGACAACATCGTGACCGCCAGGCCATGTACGAGGGGCT
GTGGATGTCCTGCGTGTGCGAGAGCACCGGGCAGATCCAGTGCAAAGTCTT
TGACTCCTTGCTGAATCTGAGCAGCACATTGCAAGCAACCCGTGCCTTGAT
GGTGGTTGGCATCCTCCTGGGAGTGATAGCAATCTTTGTGGCCACCGTTGG
CATGAAGTGTATGAAGTGCTTGAAGACGATGAGGTGCAGAAGATGAGGA
TGGCTGTCATTGGGGGTGCGATATTTCTTCTTGCAGGTCTGGCTATTTAGT
TGCCACAGCATGGTATGGCAATAGAATCGTTCAAGAATTCTATGACCCTAT
GACCCAGTCAATGCCAGGTACGAATTTGGTCAGGCTCTCTTCACTGGCTG
GGCTGCTGCTTCTCTCTGCCTTCTGGGAGGTGCCCTACTTTGCTGTTCTGT
CCCCGAAAACAACCTCTTACCCAACACCAAGGCCCTATCCAAAACCTGCA
CCTTCCAGCGGGAAAGACTACGTGTGA

>hSLC7A5_NM_003486 (SEQ ID NO: 97)

ATGGCGGGTGCGGGCCCGAAGCGGCGCGCTAGCGGGCGCCGGCGGC
CGAGGAGAAGGAAGAGGGCGCGGGAGAAGATGCTGGCCGCCAAGAGCGCG
GACGGCTCGGCGCCGGCAGGGCGAGGGCGTGACCCTGCAGCGGAA
CATCACGCTGCTCAACGGCGTGGCCATCATCGTGGGGACCATTATCGGCTC
GGGCATCTTCGTGACGCCACGGGCGTGCTCAAGGAGGCAGGCTCGCCGG
GGCTGGCGCTGGTGGTGTGGGCCGCGTGCGGCGTCTTCTCCATCGTGGGCG
CGCTCTGCTACGCGGAGCTCGGCACCACCATCTCCAAATCGGGCGGCGACT
ACGCCTACATGCTGGAGGTCTACGGCTCGCTGCCCGCCTTCTCAAGCTCT
GGATCGAGCTGCTCATCATCCGGCCTTCATCGCAGTACATCGTGGCCCTGG
TCTTCGCCACCTACCTGCTCAAGCCGCTCTTCCCCACCTGCCCGGTGCCCGA
GGAGGCAGCCAAGCTCGTGGCCTGCCTCTGCGTGCTGCTGCTCACGGCCGT
GAACTGCTACAGCGTGAAGGCCGCCACCCGGGTCCAGGATGCCTTTGCCGC
CGCCAAGCTCCTGGCCCTGGCCCTGATCATCCTGCTGGGCTTCGTCCAGAT
[0474] CGGGAAGGGTGATGTGTCCAATCTAGATCCCAACTTCTCATTTGAAGGCAC
CAAACCTGGATGTGGGGAACATTGTGCTGGCATTATACAGCGGCCTCTTTGC
CTATGGAGGATGGAATTACTTGAATTTTCGTCACAGAGGAAATGATCAACCC
CTACAGAAACCTGCCCCTGGCCATCATCATCTCCCTGCCCATCGTGACGCT
GGTGTACGTGCTGACCAACCTGGCCTACTTCACCACCCTGTCCACCGAGCA
GATGCTGTCGTCCGAGGCCGTGGCCGTGGACTTCGGGAACTATCACCTGGG
CGTCATGTCCTGGATCATCCCCGTCTTCGTGGGCCTGTCTGCTTCGGCTCC
GTCAATGGGTCCCTGTTACATCCTCCAGGCTCTTCTTCGTGGGGTCCC
AAGGCCACCTGCCCTCCATCCTCTCCATGATCCACCACAGCTCCTCACCC
CCGTGCCGTCCCTCGTGTTACGTGTGTGATGACGCTGCTCTACGCCTTCTC
CAAGGACATCTTCTCCGTCATCAACTTCTTCAGCTTCTTCAACTGGCTCTGC
GTGGCCCTGGCCATCATCGGCATGATCTGGCTGCGCCACAGAAAGCCTGAG
CTTGAGCGGCCATCAAGGTGAACCTGGCCCTGCCTGTGTTCTTCATCCTG
GCCTGCCTCTTCTGATCGCCGTCTCCTTCTGGAAGACACCCGTGGAGTGT

GGCATCGGCTTCACCATCATCCTCAGCGGGCTGCCCGTCTACTTCTTCGGG
GTCTGGTGGAAAAACAAGCCCAAGTGGCTCCTCCAGGGCATCTTCTCCACG
ACCGTCCTGTGTCAGAAGCTCATGCAGGTGGTCCCCCAGGAGACATAG

>hAFP_var1_BC027881 (SEQ ID NO: 98)

ATGAAGTGGGTGGAATCAATTTTTTTAATTTTCCTACTAAATTTTACTG
AATCCAGAACACTGCATAGAAATGAATATGGAATAGCTTCCATATTGGATT
CTTACCAATGTACTGCAGAGATAAGTTTAGCTGACCTGGCTACCATATTTTT
TGCCAGTTTGTTCAGAAGCCACTTACAAGGAAGTAAGCAAATGGTGA
AAGATGCATTGACTGCAATTGAGAAACCCACTGGAGATGAACAGTCTTCA
GGGTGTTTAGAAAACCAGCTACCTGCCTTTCTGGAAGAACTTTGCCATGAG
AAAGAAATTTTGGAGAAGTACGGACATTCAGACTGCTGCAGCCAAAGTGA
AGAGGGAAGACATAACTGTTTTCTTGCACACAAAAGCCCACTCCAGCATC
GATCCCACTTTTCCAAGTTCAGAACCTGTCACAAGCTGTGAAGCATATGA
AGAAGACAGGGAGACATTCATGAACAAATTCATTTATGAGATAGCAAGAA
[0475] GGCATCCCTTCCTGTATGCACCTACAATTCTTCTTTGGGCTGCTCGCTATGA
CAAATAATTCCATCTTGCTGCAAAGCTGAAAATGCAGTTGAATGCTTCCA
AACAAAGGCAGCAACAGTTACAAAAGAATTAAGAGAAAGCAGCTTGTTAA
ATCAACATGCATGTGCAGTAATGAAAAATTTTGGGACCCGAACCTTCCAAG
CCATAACTGTTACTAACTGAGTCAGAAGTTTACCAAAGTTAATTTTACTG
AAATCCAGAACTAGTCCTGGATGTGGCCCATGTACATGAGCACTGTTGCA
GAGGAGATGTGCTGGATTGTCTGCAGGATGGGGAAAAAATCATGTCCTAC
ATATGTTCTCAACAAGACACTCTGTCAAACAAAATAACAGAATGCTGCAA
ACTGACCACGCTGGAACGTGGTCAATGTATAATTCATGCAGAAAATGATG
AAAAACCTGAAGGTCTATCTCAAATCTAAACAGGTTTTTAGGAGATAGAG
ATTTTAACCAATTTTCTTCAGGGGAAAAAATATCTTCTTGGCAAGTTTTGT
TCATGAATATTCAAGAAGACATCCTCAGCTTGCTGTCTCAGTAATTCTAAG
AGTTGCTAAAGGATACCAGGAGTTATTGGAGAAGTGTTCAGACTGAAA
ACCCTCTGAATGCCAAGATAAAGGAGAAGAAGAATTACAGAAATACATC

CAGGAGAGCCAAGCATTGGCAAAGCGAAGCTGCGGCCTCTTCCAGAACT
AGGAGAATATTACTTACAAAATGCGTTTCTCGTTGCTTACACAAAGAAAGC
CCCCAGCTGACCTCGTCGGAGCTGATGGCCATCACCAGAAAAATGGCAG
CCACAGCAGCCACTTGTTGCCAACTCAGTGAGGACAACTATTGGCCTGTG
GCGAGGGAGCGGCTGACATTATTATCGGACACTTATGTATCAGACATGAA
ATGACTCCAGTAAACCCTGGTGTGGCCAGTGCTGCACTTCTTCATATGCC
AACAGGAGGCCATGCTTCAGCAGCTTGGTGGTGGATGAAACATATGTCCT
CCTGCATTCTCTGATGACAAGTTCATTTCCATAAGGATCTGTGCCAAGCTC
AGGGTGTAGCGCTGCAAACGATGAAGCAAGAGTTTCTCATTAACCTTGTGA
AGCAAAGCCACAAATAACAGAGGAACAACCTTGAGGCTGTCATTGCAGAT
TTCTCAGGCCTGTTGGAGAAATGCTGCCAAGGCCAGGAACAGGAAGTCTG
CTTTGCTGAAGAGGGACAAAACTGATTTCAAAAACCTCGTGCTGCTTTGGG
AGTTTAA

>hTGFBI_M77349 (SEQ ID NO: 99)

[0476]

ATGGCGCTCTTCGTGCGGCTGCTGGCTCTCGCCCTGGCTCTGGCCCTGG
GCCCCGCCGCGACCCTGGCGGGTCCCGCCAAGTCGCCCTACCAGCTGGTGC
TGCAGCACAGCAGGCTCCGGGGCCGCCAGCACGGCCCCAACGTGTGTGCT
GTGCAGAAGGTTATTGGCACTAATAGGAAGTACTTCACCAACTGCAAGCA
GTGGTACCAAAGGAAAATCTGTGGCAAATCAACAGTCATCAGCTACGAGT
GCTGTCCTGGATATGAAAAGGTCCCTGGGGAGAAGGGCTGTCCAGCAGCC
CTACCACTCTCAAACCTTTACGAGACCCTGGGAGTCGTTGGATCCACCACC
ACTCAGCTGTACACGGACCGCACGGAGAAGCTGAGGCCTGAGATGGAGGG
GCCCCGGCAGCTTCACCATCTTCGCCCTAGCAACGAGGCCTGGGCCTCCTT
GCCAGCTGAAGTGCTGGACTCCCTGGTCAGCAATGTCAACATTGAGCTGCT
CAATGCCCTCCGCTACCATATGGTGGGCAGGCGAGTCCTGACTGATGAGCT
GAAACACGGCATGACCCTCACCTCTATGTACCAGAATTCCAACATCCAGAT
CCACCACTATCCTAATGGGATTGTAAGTGTGAACTGTGCCCGGCTCCTGAA
AGCCGACCACCATGCAACCAACGGGGTGGTGCACCTCATCGATAAGGTCA

TCTCCACCATCACCAACAACATCCAGCAGATCATTGAGATCGAGGACACCT
TTGAGACCCTTCGGGCTGCTGTGGCTGCATCAGGGCTCAACACGATGCTTG
AAGGTAACGGCCAGTACACGCTTTTGGCCCCGACCAATGAGGCCTTCGAG
AAGATCCCTAGTGAGACTTTGAACCGTATCCTGGGCGACCCAGAAGCCCTG
AGAGACCTGCTGAACAACCACATCTTGAAGTCAGCTATGTGTGCTGAAGCC
ATCGTTGCGGGGCTGTCTGTAGAGACCCTGGAGGGCACGACACTGGAGGT
GGGCTGCAGCGGGGACATGCTCACTATCAACGGGAAGGCGATCATCTCCA
ATAAAGACATCCTAGCCACCAACGGGGTGATCCACTACATTGATGAGCTAC
TCATCCCAGACTCAGCCAAGACACTATTTGAATTGGCTGCAGAGTCTGATG
TGTCCACAGCCATTGACCTTTTCAGACAAGCCGGCCTCGGCAATCATCTCT
CTGGAAGTGAGCGGTTGACCCTCCTGGCTCCCCTGAATTCTGTATTCAAAG
ATGGAACCCCTCCAATTGATGCCATACAAGGAATTTGCTTCGGAACCACA
TAATTAAGACCAGCTGGCCTCTAAGTATCTGTACCATGGACAGACCCTGG
AAACTCTGGGCGGCAAAAACTGAGAGTTTTTGTATTATCGTAATAGCCTCT
[0477] GCATTGAGAACAGCTGCATCGCGGCCACGACAAGAGGGGGAGGTACGGG
ACCCTGTTACGATGGACCGGGTGCTGACCCCCCAATGGGGACTGTCATG
GATGTCCTGAAGGGAGACAATCGCTTTAGCATGCTGGTAGCTGCCATCCAG
TCTGCAGGACTGACGGAGACCCTCAACCGGGAAGGAGTCTACACAGTCTTT
GCTCCCACAAATGAAGCCTTCCGAGCCCTGCCACCAAGAGAACGGAGCAG
ACTCTTGGGAGATGCCAAGGAACCTGCCAACATCCTGAAATACCACATTGG
TGATGAAATCCTGGTTAGCGGAGGCATCGGGGCCCTGGTGCGGCTAAAGT
CTCTCCAAGGTGACAAGCTGGAAGTCAGCTTGAAAAACAATGTGGTGAGT
GTCAACAAGGAGCCTGTTGCCGAGCCTGACATCATGGCCACAAATGGCGT
GGTCCATGTCATACCAATGTTCTGCAGCCTCCAGCCAACAGACCTCAGGA
AAGAGGGGATGAACTTGCAGACTCTGCGCTTGAGATCTTCAAACAAGCAT
CAGCGTTTTCCAGGGCTTCCAGAGGTCTGTGCGACTAGCCCCTGTCTATC
AAAAGTTATTAGAGAGGATGAAGCATTAG

>hSPARC_var1_NM_003118 (SEQ ID NO: 100)

ATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGGAGGGCCTTG
GCAGCCCCTCAGCAAGAAGCCCTGCCTGATGAGACAGAGGTGGTGGAAGA
AACTGTGGCAGAGGTGACTGAGGTATCTGTGGGAGCTAATCCTGTCCAGGT
GGAAGTAGGAGAATTTGATGATGGTGCAGAGGAAACCGAAGAGGAGGTG
GTGGCGGAAAATCCCTGCCAGAACCACCTGCAAACACGGCAAGGTGTG
CGAGCTGGATGAGAACAACACCCCATGTGCGTGTGCCAGGACCCACCA
GCTGCCAGCCCCATTGGCGAGTTTGAGAAGGTGTGCAGCAATGACAAC
AAGACCTTCGACTCTTCCTGCCACTTCTTTGCCACAAAGTGCACCCTGGAG
GGCACCAAGAAGGGCCACAAGCTCCACCTGGACTACATCGGGCCTTGCAA
ATACATCCCCCTTGCTGGACTCTGAGCTGACCGAATCCCCCTGCGCAT
GCGGGACTGGCTCAAGAACGTCCTGGTCACCCTGTATGAGAGGGATGAGG
ACAACAACCTTCTGACTGAGAAGCAGAAGCTGCGGGTGAAGAAGATCCAT
GAGAATGAGAAGCGCCTGGAGGCAGGAGACCACCCCGTGGAGCTGCTGGC
CCGGGACTTCGAGAAGA ACTATAACATGTACATCTTCCCTGTACACTGGCA
[0478] GTTCGGCCAGCTGGACCAGCACCCCATGACGGGTACCTCTCCACACCGA
GCTGGCTCCACTGCGTGCTCCCCTCATCCCCATGGAGCATTGCACCACCCG
CTTTTTCGAGACCTGTGACCTGGACAATGACAAGTACATCGCCCTGGATGA
GTGGGCCGGCTGCTTCGGCATCAAGCAGAAGGATATCGACAAGGATCTTG
TGATCTAA

>hFOXMI_var2_cloned_from_AspC1 (SEQ ID NO: 101)

ATGAAAAGTAGCCCCGTCGGCCACTGATTCTCAAAGACGGAGGCT
GCCCCTTCCTGTTCAAATGCCCAAGTGAAACATCAGAGGAGGAACCTA
AGAGATCCCCTGCCAACAGGAGTCTAATCAAGCAGAGGCCTCCAAGGAA
GTGGCAGAGTCCAACCTTGCAAGTTTCCAGCTGGGATCAAGATTATTAAC
CACCCACCATGCCAACACGCAAGTAGTGGCCATCCCCAACAAATGCTAAT
ATTCACAGCATCATCACAGCACTGACTGCCAAGGGAAAAGAGAGTGGCAG
TAGTGGGCCCAACAAATTCATCCTCATCAGCTGTGGGGGAGCCCCAACTCA
GCCTCCAGGACTCCGGCCTCAAACCCAAACCAGCTATGATGCCAAAAGGA

[0479]

CAGAAGTGACCCTGGAGACCTTGGGACCAAACCTGCAGCTAGGGATGTG
AATCTTCCTAGACCACCTGGAGCCCTTTGCGAGCAGAAACGGGAGACCTGT
GCAGATGGTGAGGCAGCAGGCTGCACTATCAACAATAGCCTATCCAACAT
CCAGTGGCTTCGAAAGATGAGTTCTGATGGACTGGGCTCCCGCAGCATCAA
GCAAGAGATGGAGGAAAAGGAGAATTGTCACCTGGAGCAGCGACAGGTTA
AGGTTGAGGAGCCTTCGAGACCATCAGCGTCCTGGCAGAACTCTGTGTCTG
AGCGGCCACCCTACTCTTACATGGCCATGATAACAATTCGCCATCAACAGCA
CTGAGAGGAAGCGCATGACTTTGAAAGACATCTATACGTGGATTGAGGAC
CACTTTCCCTACTTTAAGCACATTGCCAAGCCAGGCTGGAAGAACTCCATC
CGCCACAACCTTTCCCTGCACGACATGTTTGTCCGGGAGACGTCTGCCAAT
GGCAAGGTCTCCTTCTGGACCATTCACCCCAGTGCCAACCGCTACTTGACA
TTGGACCAGGTGTTTAAGCCACTGGACCCAGGGTCTCCACAATTGCCCGAG
CACTTGGAATCACAGCAGAAACGACCGAATCCAGAGCTCCGCCGGAACAT
GACCATCAAACCGAACTCCCCCTGGGCGCACGGCGGAAGATGAAGCCAC
TGCTACCACGGGTCAGCTCATACCTGGTACCTATCCAGTTCCCGGTGAACC
AGTCACTGGTGTTGCAGCCCTCGGTGAAGGTGCCATTGCCCTGGCGGCTT
CCCTCATGAGCTCAGAGCTTGCCCGCCATAGCAAGCGAGTCCGCATTGCC
CCAAGGTGCTGCTAGCTGAGGAGGGGATAGCTCCTCTTTCTTCTGCAGGAC
CAGGGAAAGAGGAGAAACTCCTGTTTGGAGAAGGGTTTTCTCCTTTGCTTC
CAGTTCAGACTATCAAGGAGGAAGAAATCCAGCCTGGGGAGGAAATGCCA
CACTTAGCGAGACCCATCAAAGTGGAGAGCCCTCCCTTGAAGAGTGGCC
CTCCCCGGCCCCATCTTTCAAAGAGGAATCATCTCACTCCTGGGAGGATTC
GTCCAATCTCCCACCCCAAGACCCAAGAAGTCCTACAGTGGGCTTAGGTC
CCCAACCCGGTGTGTCTCGGAAATGCTTGTGATTCAACACAGGGAGAGGA
GGGAGAGGAGCCGGTCTCGGAGGAAACAGCATCTACTGCCTCCCTGTGTG
GATGAGCCGGAGCTGCTCTTCTCAGAGGGGCCAGTACTTCCCGCTGGGCC
GCAGAGCTCCCGTTCCAGCAGACTCCTCTGACCCTGCCTCCAGCTCAGC
TACTCCAGGAAGTGGGAGGACCTTTTAAGACACCCATTAAGGAAACGCT

GCCCATCTCCTCCACCCCGAGCAAATCTGTCCTCCCAGAACCCCTGAATC
CTGGAGGCTCACGCCCCAGCCAAAGTAGGGGGACTGGATTTTCAGCCCAG
TACAAACCCCCAGGGTGCCTCTGACCCCTTGCTGACCCCTGGGGCTGA
TGGATCTCAGCACCCTCCCTTGCAAAGTGCTCCCCCCTTGAATCACCGC
AAAGGCTCCTCAGTTCAGAACCCTTAGACCTCATCTCCGTCCCCTTTGGCA
ACTCTTCTCCCTCAGATATAGACGTCCCAAGCCAGGCTCCCCGGAGCCAC
AGGTTTCTGGCCTTGACAGCCAATCGTTCTCTGACAGAAGGCCTGGTCCTGG
ACACAATGAATGACAGCCTCAGCAAGATCCTGCTGGACATCAGCTTTCCTG
GCCTGGACGAGGACCCACTGGGCCCTGACAACATCAACTGGTCCCAGTTTA
TTCCTGAGCTACAGTAG

>hHSPH1_var1_NM_006644 (SEQ ID NO: 102)

[0480] ATGTCGGTGGTGGGGTTGGACGTGGGCTCGCAGAGCTGCTACATCGCG
GTAGCCCGGGCCGGGGGCATCGAGACCATCGCCAATGAGTTCAGCGACCG
GTGCACCCCGTCAGTCATATCATTGGATCAAAAATAGAACAATCGGAGT
TGCAGCCAAAATCAGCAAATCACTCATGCAAACAATACGGTGTCTAACTT
CAAAAGATTTTCATGGCCGAGCATTCAATGACCCCTTCATTCAAAGGAGAA
GGAAAACCTTGAGTTACGATTTGGTTCCATTGAAAAATGGTGGAGTTGGAAT
AAAGGTAATGTACATGGGTGAAGAACATCTATTTAGTGTGGAGCAGATAA
CAGCCATGTTGTTGACTAAGCTGAAGGAAACTGCTGAAAACAGCCTCAAG
AAACCAGTAACAGATTGTGTTATTTTCAGTCCCCTCCTTCTTTACAGATGCTG
AGAGGCGATCTGTGTTAGATGCTGCACAGATTGTTGGCCTAAACTGTTTAA
GACTTATGAATGACATGACAGCTGTTGCTTTGAATTACGGAATTTATAAGC
AGGATCTCCAAGCCTGGATGAGAAACCTCGGATAGTGGTTTTTTGTTGATA
TGGGACATTCAGCTTTTCAAGTGTCTGCTTGTGCTTTTAACAAGGGAAAAT
TGAAGGTAAGTGGGAACAGCTTTTGATCCTTTCTTAGGAGGAAAAAACTTCG
ATGAAAAGTTAGTGGAACATTTTTGTGCAGAATTTAAAATAAGTACAAGT
TGGATGCAAATCCAAAATACGAGCACTCCTACGTCTGTATCAGGAATGTG
AAAAACTGAAAAGCTAATGAGCTCTAACAGCACAGACCTTCCACTGAAT

[0481]

ATCGAATGCTTTATGAATGATAAAGATGTTTCCGGAAAGATGAACAGGTCA
CAATTTGAAGAACTCTGTGCTGAACTTCTGCAAAAGATAGAAGTACCCCTT
TATTCAGTGTGGAACAACTCATCTCAAAGTAGAAGATGTGAGTGCAGTT
GAGATTGTTGGAGGCGCTACACGAATTCCAGCTGTGAAGGAAAGAATTGC
CAAATTCCTTTGGAAAAGATATTAGCACAACTCAATGCAGATGAAGCAG
TAGCCAGAGGATGTGCATTACAGTGTGCAATACTTTCCCCGGCATTAAAG
TTAGAGAATTTTCCGTCACAGATGCAGTTCCTTTTCCAATATCTCTGATCTG
GAACCATGATTCAGAAGATACTGAAGGTGTTTCATGAAGTCTTTAGTCGAAA
CCATGCTGCTCCTTTCTCCAAAGTTCTCACCTTTCTGAGAAGGGGGCCTTTT
GAGCTAGAAGCTTTCTATTCTGATCCCCAAGGAGTTCATATCCAGAAGCA
AAAATAGGCCGCTTTGTAGTTCAGAATGTTTCTGCACAGAAAGATGGAGA
AAAATCTAGAGTAAAAGTCAAAGTGCGAGTCAACACCCATGGCATTTTCA
CCATCTCTACGGCATCTATGGTGGAGAAAGTCCCAACTGAGGAGAATGAA
ATGTCTTCTGAAGCTGACATGGAGTGTCTGAATCAGAGACCACCAGAAAA
CCCAGACACTGATAAAAATGTCCAGCAAGACAACAGTGAAGCTGGAACAC
AGCCCCAGGTACAACTGATGCTCAACAAACCTCACAGTCTCCCCCTTCAC
CTGAACTTACCTCAGAAGAAAACAAAATCCCAGATGCTGACAAAGCAAAT
GAAAAAAAAGTTGACCAGCCTCCAGAAGCTAAAAAGCCCAAAATAAAGGT
GGTGAATGTTGAGCTGCCTATTGAAGCCAACCTTGGTCTGGCAGTTAGGGAA
AGACCTTCTTAACATGTATATTGAGACAGAGGGTAAGATGATAATGCAAG
ATAAATTGGAAAAAGAAAGGAATGATGCTAAAAATGCAGTTGAGGAATAT
GTGTATGAGTTCAGAGACAAGCTGTGTGGACCATATGAAAAATTTATATGT
GAGCAGGATCATCAAAATTTTTTGAGACTCCTCACAGAACTGAAGACTGG
CTGTATGAAGAAGGAGAGGACCAAGCTAAACAAGCATATGTTGACAAGTT
GGAAGAATTAATGAAAATTGGCACTCCAGTTAAAGTTCGGTTTCAGGAAG
CTGAAGAACGGCCAAAAATGTTTGAAGAACTAGGACAGAGGCTGCAGCAT
TATGCCAAGATAGCAGCTGACTTCAGAAATAAGGATGAGAAATACAACCA
TATTGATGAGTCTGAAATGAAAAAAGTGGAGAAGTCTGTTAATGAAGTGA

TGGAATGGATGAATAATGTCATGAATGCTCAGGCTAAAAAGAGTCTTGATC
 AGGATCCAGTTGTACGTGCTCAGGAAATTTAAAACAAAAATCAAGGAATTG
 AACAAACACATGTGAACCCGTTGTAACACAACCGAAACCAAAAATTGAATC
 ACCCAAACCTGGAAAGAACTCCAAATGGCCCAAATATTGATAAAAAGGAAG
 AAGATTTAGAAGACAAAAACAATTTTGGTGCTGAACCTCCACATCAGAAT
 GGTGAATGTTACCCTAATGAGAAAAATTCTGTTAATATGGACTTGGACTAG

[0482]

[0483] 实施例11:以来自通用癌抗原的肽为靶标的TCR-T细胞疗法、鸡尾酒TCR-T细胞疗法的开发

[0484] <方法>

[0485] 图57显示通过抑制CD8分子与MHC的结合来选择高亲和性T细胞克隆的方法。

[0486] 图57的A显示在抗CD8抗体的存在下Dextramer与TCR分子的相互作用。在结合于Dextramer的MHC分子/癌抗原肽复合物与TCR分子结合的情况下,通过事先加入抗CD8抗体,防止肽非特异性的CD8分子与MHC分子的结合,仅使具有结合力更强的TCR分子的T细胞克隆染色。

[0487] 图57的B显示基于是否抑制CD8结合的Dextramer染色的比较。T细胞克隆A和B在未进行CD8结合阻碍的情况下显示出几乎相等的Dextramer染色性,若阻碍CD8分子的结合,则克隆A显示出比克隆B强的染色性。

[0488] 图57的C是通过抑制CD8结合来选择高亲和性克隆。利用上述原理,通过Dextramer染色纯化识别癌抗原肽的T细胞,从而可建立具有对癌抗原肽具有更高亲和性的TCR基因的T细胞克隆。

[0489] <结果>

[0490] 已知在MHC/肽复合物与TCR的结合中,T细胞上的CD8分子辅助性地发挥作用,增强其结合。该方法中,在进行Dextramer染色前使用抗CD8抗体阻碍CD8分子与MHC分子的结合,从而减弱依赖于CD8分子的结合的非特异性染色,并且成功检测出具有TCR基因的克隆,该TCR基因单独时具有强结合力。实际上,在未阻碍CD8的条件下对与GPC3肽反应的2种T细胞克隆进行Dextramer染色的情况下,克隆A和克隆B的染色强度相同,但在阻碍CD8的条件下观察到明显的染色性的不同。本课题中,根据同样的原理,为了从患者外周血中选择表达具有抗亲和性的肽反应性TCR基因的T细胞,采用了并用CD8阻碍的基于Dextramer的染色法。

[0491] 图58显示来自接受了GPC3肽疫苗的患者外周血的肽特异性CTL克隆的建立。在CD8结合阻碍条件下,从接受了使用来自GPC3的肽的癌症肽疫苗的患者外周血中单一分选Dextramer阳性T细胞,在同种异体饲养细胞上培养,建立了T细胞克隆。

[0492] 图60的A和B显示通过HLA-A2限制性GPC3特异性T细胞克隆的Dextramer染色评价TCR的结合力。A.不存在CD8结合阻碍。B.在CD8结合阻碍的存在下进行比较、研究。

[0493] 图60的C和D显示通过HLA-A24限制性GPC3特异性T细胞克隆的Dextramer染色评价TCR的结合力。C.不存在CD8结合阻碍。D.在CD8结合阻碍的存在下进行比较、研究。

[0494] 图60的E显示HLA-A24限制性GPC3特异性T细胞克隆的抗原特异性IFN- γ 产生能力的评价。将所建立的T细胞克隆与GPC3阳性HepG2肝癌细胞株、GPC3阴性SK-Hep细胞株(SK-

vec) 以及GPC3强制表达细胞株 (SK-GPC3) 共培养20小时,通过ELISPOT法评价IFN- γ 的产生。以使肽疫苗中使用的来自GPC3的肽 (GPC3 A24 prp.) 与TAP缺失细胞株即T2-A24细胞外源性地结合而得的细胞作为阳性对照,以结合有来自HIV的肽的细胞作为阴性对照,评价抗原特异性。

[0495] <结果>

[0496] 为了分离GPC3肽特异性TCR基因,将由接受了GPC3肽疫苗的HLA-A2单倍型患者以及HLA-A24单倍型患者提供的外周血淋巴细胞用肽刺激培养后,通过并用CD8阻碍的基于Dextramer的染色法选择抗亲和性T细胞,建立了T细胞克隆。在是否存在CD8阻碍下比较所建立的各克隆的Dextramer结合性时,虽然A2限制性克隆整体上染色强度降低,但在任一种克隆中均维持染色性,相对于此,在A24限制性克隆中,如在e1D8克隆中所见,确认到染色性显著降低的克隆。根据以上结果,认为通过选择不受是否存在CD8阻碍的影响且显示更高的Dextramer染色性的T细胞克隆,可高效鉴定亲和性高的TCR基因。接着,评价所建立的HLA-A24限制性T细胞克隆的IFN- γ 产生能力。任一种T细胞克隆在与外源性地结合有肽的T2-A24细胞共培养的情况下均显示强的IFN- γ 产生。另一方面,在将内源地表达GPC3的强制表达细胞株 (SK-GPC3) 和HepG2细胞株共培养的情况下,在各克隆中明显看到反应性的差异。另外,其IFN- γ 产生能力未必与Dextramer染色一致,之前所述的e1D8虽然Dextramer染色性低,但对内源性GPC3表达细胞显示强的IFN- γ 的产生,eC7克隆虽然Dextramer染色强度高,但结果是通过与内源性GPC3表达细胞株共培养而产生的IFN- γ 产生能力低。认为这是由于:T细胞的IFN- γ 产生能力不仅由TCR的结合力决定,还由每个克隆的细胞内的各种功能的差异来决定。在选择识别内源性抗原且可排除肿瘤的TCR基因时,需要构建用于治疗用的TCR-T细胞,并再次评价其功能。表中显示由各克隆分离的TCR基因的氨基酸序列以及基因序列。

[0497] [表2]

[0498] 表2:识别来自GPC3的肽 (FVGEFFTDV) 的HLA-A2限制性T细胞受体的氨基酸序列

克隆	序列TRA	序列TRB	TR A (bp)	TR B (bp)
[0499] ②B11	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVE QDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFM WYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPDSATYLC AQR IVMEYGNKLVFGAGTILRVKS (SEQ ID NO: 103)	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSH QVTQMGQEVILRCVPISNHLFYFYWRQIL GQKVEFLVSFYNN EISEKSEIFDDQFSVER PDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSEGA EAFFGQGTRLTVV (SEQ ID NO: 104)	135	130
②D9	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQN SGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWY RQYSGKSP ELIMFIYSNGDKEDGRFTAQL NKASQYVSLIRDSQPDSATYLC AVNMD GNNRLAFGKGNQVVVIP (SEQ ID NO: 105)	MRSWPGPEMGTRLFYVALCLLWTGHM DAGITQSPRHKVTETGTPVTLRCHQ TENH RYMYWYRQDPGHGLRLIHYSYGVKDTD KGEVSDGYSVRSKTEDFLLTLESATSSQT SVYFCASVYGSEAFFGQGTRLTVV (SEQ ID NO: 106)	132	137

	i2B7	MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSVAPEDQ VNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWYVQ YPNRGLQFLK YITGDNLVKGSYGFEAEF NKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFCVNP GGGNKLTFTGTQLKVEL (SEQ ID NO: 107)	MATRLCCVVLCLLGEELIDARVTQTPRD KVTEMGQEVMTMRCQPILGHNTVFWYRQ TMMQGLELLAYFRNRAPLDDSGMPKDRF SAEMPDATLTKIQPSEPRDSAVYFCASG LGGNQPHFGDGTLSIL (SEQ ID NO: 108)	133	132
[0500]	②2C7	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQKQVEQN SGPLSVPEGAIASLNTYSDRGSQFFWY RQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQL NKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCVAKGT GRRALTFGSGTRLQVQP (SEQ ID NO: 109)	MGCRLCCAVLCLLGAVIDTEVTQTPKH LVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYK QKAKKPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSP ECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCASSQ SGVGNTEAFFGQGTRLTVV (SEQ ID NO: 110)	132	133
	⑤5C6	MLELIPLLGIHFVLRRTARAQSVTQPDIIHT VSEGASLELRNYSYGATPYLFWYVQSP GQGLQLLLKYFSGDTLVQGIKGFEEAFKR SQSSFNLKPSVHWSDAEYFCVAVGSPSG YSTLTFGKGTMLLVSP (SEQ ID NO: 111)	MGPQLLGYVVVLLCLLGAQPLEAQVTQNP YLITVTGKCLTVTCSQNMNHEYMSWYRQ DPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYK VSRKEKRNFPLESPSPNQTSLYFCASSPT RFYEQYFGPTRLTVT (SEQ ID NO: 112)	133	131

[0501] [表3]

[0502] 表3: 识别来自GPC3的肽 (FVGEFFTDV) 的HLA-A2限制性T细胞受体的基因序列

克隆	序列TRA	序列TRB	TRA (bp)	TRB (bp)	
[0503]	⑤2B11	ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTGG TGATCCTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTT TGGAGCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAG GATCCTGGACCACTCAGTGTCCAGAGG GAGCCATTGTTCTCTCAACTGCACTTAC AGCAACAGTGCTTTTCAATACTTCATGTG GTACAGACAGTATCCAGAAAAGCCCT GAGTTGCTGATGTACACATACTCCAGTG GTAACAAAGAAGATGGAAGGTTACAGC ACAGGTCGATAAATCCAGCAAGTATATC TCCTTGTCATCAGAGACTCACAGCCCA GTGATTCAGCCACCTACCTCTGTGCCA AAGAATTGTCATGGAATATGAAACAAG CTGGTCTTTGGCGCAGGAACCATTCTGA GAGTCAAGTCC (SEQ ID NO: 113)	ATGGATACCTGGCTCGTATGCTGGGC AATTTTTAGTCTCTTGAAAGCAGGAC TCACAGAACCTGAAGTCACCCAGAC TCCCAGCCATCAGGTCACACAGATG GGACAGGAAGTGATCTTGCCTGTGT CCCCATCTCTAATCACTTATACTTCT ATTGGTACAGACAAATCTGGGCA GAAAGTCGAGTTTCTGGTTCTTTT ATAATAATGAAATCTCAGAGAAGTC TGAAATATTCGATGATCAATTCTCAG TTGAAAGGCCTGATGGATCAAATTC ACTCTGAAGATCCGGTCCACAAAGCT GGAGGACTCAGCCATGTACTTCTGTG CCAGCAGTGAGGGGGCTGAAGCTTT CTTTGGACAAGGCACCAGACTCACA GTTGTA (SEQ ID NO: 114)	405	390
	⑧2D9	ATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGA TCCTGTGGCTTCAGTTGAGCTGGGTTTGG AGCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAGAAT TCTGGACCCCTCAGTGTCCAGAGGGAG CCATTGCCTCTCTCAACTGCACTTACAGT GACCGAGGTTCCAGTCCTTCTTCTGGTA CAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAG TTGATAATGTTTCATATACTCCAATGGTGA CAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACA GCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCT CTGCTCATCAGAGACTCCCAGCCAGTG ATTCAGCCACCTACCTCTGTGCCGTGAA CATGGACGGGAACAACAGACTCGCTTTT GGGAAGGGGAACCAAGTGGTGGTCATA CCA (SEQ ID NO: 115)	ATGAGATCCTGGCCTGGACCTGAAAT GGGCACAAGGTTGTTCTTCTATGTGG CCCTTTGTCCTGTGGACAGGACAC ATGGATGCTGGAATCACCCAGAGCC CAAGACACAAGGTCACAGAGACAGG AACACCAGTGACTGTGAGATGTCATC AGACTGAGAACCACCGCTATATGTA CTGGTATCGACAAGACCCGGGCAT GGGCTGAGGCTGATCCATTACTCATA TGGTGTAAAGATACTGACAAAGGA GAAGTCTCAGATGGCTATAGTGTCTC TAGATCAAAGACAGAGGATTTCCCTCC TCACTCTGGAGTCCGCTACCAGCTCC CAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAG CGTTTACGGGTCTGAAGCTTTCTTTG GACAAGGCACCAGACTCACAGTTGT A (SEQ ID NO: 116)	396	411

i2B7	ATGGCCTCTGCACCCATCTCGATGCTTGC GATGCTCTTACATTGAGTGGCTGAGA GCTCAGTCAGTGGCTCAGCCGGAAGATC AGGTCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTCT GACTGTGAAATGCACCTATTCAGTCTCT GGAAACCCCTTATCTTTTTGGTATGTTCA ATACCCCAACCGAGGCCTCCAGTTCCTT CTGAAATACATCACAGGGGATAACCTGG TTAAGGCAGCTATGGCTTTGAAGCTGA ATTTAACAAGAGCCAAACCTCCTTCCAC CTGAAGAAACCATCTGCCCTTGTGAGCG ACTCCGCTTTGACTTCTGTGCTGTGAAC CCCACGGGAGGAGGAAACAAACTCACCT TTGGGACAGGCACTCAGCTAAAAGTGG ACTC (SEQ ID NO: 117)	ATGGCCACCAGGCTCCTCTGCTGTGT GGTTCTTTGTCTCCTGGGAGAAGAGC TTATAGATGCTAGAGTCACCCAGACA CCAAGGGACAAGGTGACAGAGATGG GACAAGAAGTAACAATGAGATGTCA GCCAATTTTAGGCCACAATACTGTTT TCTGGTACAGACAGACCATGATGCA AGGACTGGAGTTGCTGGCTTACTTCC GCAACCGGGCTCCTCTAGATGATTCC GGGATGCCGAAGGATCGATTCTCAG CAGAGATGCCTGATGCAACTTTAGCC ACTCTGAAGATCCAGCCCTCAGAACC CAGGGACTCAGCTGTGTATTTTGTG CTAGTGGTTTGGGGGAAATCAGCC CCAGCATTTTGGTGTGAGGACTCGAC TCTCCATCCTA (SEQ ID NO: 118)	399	396
⑤2C7	ATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGA TCCTGTGGCTCAGTTGAGCTGGGTTTGG AGCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAGAAT TCTGGACCCCTCAGTGTCCAGAGGGAG CCATTGCCTCTCTCAACTGCATTACAGT GACCGAGGTTCCCAGTCTTCTTCTGGTA CAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAG TTGATAATGTTTCATATACTCCAATGGTGA CAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACA GCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCT CTGCTCATCAGAGACTCCCAGCCAGTG ATTCAGCCACCTACCTCTGTGCCGTGAA GGGGACGGGCAGGAGAGCACTTACTTTT GGGAGTGGAACAAGACTCCAAGTGCAA CCA (SEQ ID NO: 119)	ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGC GGTTCTCTGTCTCCTGGGAGCAGTTC CCATAGACACTGAAGTTACCCAGAC ACCAAAACACCTGGTCATGGGAATG ACAATAAGAAGTCTTTGAAATGTG AACAACATATGGGGCACAGGGCTAT GTATTGGTACAAGCAGAAAAGCTAAG AAGCCACCGGAGCTCATGTTTGTCTA CAGCTATGAGAAACTCTATAAAATG AAAGTGTGCCAAGTCGTTCTCACCT GAATGCCCAACAGCTCTCTTTAAA CCTTACCTACACGCCCTGCAGCCAG AAGACTCAGCCCTGTATCTCTGCGCC AGCAGCCAAAGTGGGGTCCGGAACA CTGAAGCTTTCTTTGACAAGGCACC AGACTCACAGTTGTA (SEQ ID NO: 120)	396	399
⑤5C6	ATGCTCCTGGAGCTTATCCCACTGCTGG GGATACATTTTGTCTGAGAAGTCCAG AGCCAGTCAGTGACCCAGCCTGACATC CACATCACTGTCTCTGAAGGAGCCTCAC TGGAGTTGAGATGTAAGTATTCCTATGG GGCAACACCTTATCTCTTCTGGTATGTC AGTCCCCCGCCAAGGCCTCCAGCTGCT CCTGAAGTACTTTTTCAGGAGACTCTG GTTCAAGGCATTAAGGCTTTGAGGCTG AATTTAAGAGGAGTCAATCTTCTTCAA TCTGAGGAAACCTCTGTGCATTGGAGT GATGCTGCTGAGTACTTCTGTGCTGTGG GTTCGCCTTCAGGATACAGCACCTCAC CTTTGGGAAGGGGACTATGCTTCTAGTC TCTCCA (SEQ ID NO: 121)	ATGGGCCCCCAGCTCCTTGGCTATGT GGTCCTTTGCCCTTCTAGGAGCAGGCC CCTGGAAGCCCAAGTGACCCAGAA CCCAAGATACCTCATCACAGTGACTG GAAAGAAGTTAACAGTGACTTGTCT CAGAATATGAACCATGAGTATATGTC CTGGTATCGACAAGACCCAGGGCTG GGCTTAAGGCAGATCTACTAATTCAAT GAATGTTGAGGTGACTGATAAGGGA GATGTTCTGAAGGGTACAAAAGTCTC TCGAAAAGAGAAGAGGAATTTCCCC CTGATCCTGGAGTCGCCAGCCCCAA CCAGACCTCTCTGTACTTCTGTGCCA GCAGCCCCACTAGGTTCTACGAGCA GTACTTCGGGCCCGGCACCCAGGCTC ACGGTCACA (SEQ ID NO: 122)	399	393

[0504]

[0505]

[表4]

[0506]

表4: 识别来自GPC3的肽 (EYILSLEEL) 的HLA-A24限制性T细胞受体的氨基酸序列

[0507]

克隆	序列TRA	序列TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
8	MVLKFSVSILWIQLAWVSTQLLEQSPQFL SIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPG EGPVLLVTVVTGGEVKKLRLTFQFGDA RKDSSLHITAAQPGDTGLYLCAGRYSSAS KIIFSGTRLSIRP (SEQ ID NO: 123)	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYNGEERAKGNILE RFSAQFPDLHSELNLSLELGDSALYF CASSVGGGAPNEQFFPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 124)	129	133

[0508]

G9	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTPQIPAA LSVPEGENLVLNCSTDSAIYNLQWFRQD PGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLDKS SGRSTLYIAASQPGDSATYLCVTRRALTF GSGTRLQVQP (SEQ ID NO: 125)	MGRLLCWVLLCCLLGGAPVVKAGVTQT PRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRVSVWY QQTTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGNFPG RFSGRQFNSRSEMNVSTLELGDSALYL CASSVTSGRTHTDQYFGPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 126)	128	135
(46)2A6	MMISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQ DPGFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFW YRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQ LNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCCKISGG YNKLIFGAGTRLAVHP (SEQ ID NO: 127)	MGFRLCCVAFCLLGGAPVDSGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILE RFSAQFPDLHSELNLSSELELGDSALYF CASSVGGGLGTEAFFGQGTTRTLTVV (SEQ ID NO: 128)	131	133
i12G6	MRQVARVIVFLTLSTLSLAKTTQPISMDSY EGQEVNITCSHNNIATNDYITWYQQFPSQ GPRFIIQGYKTKVTNEVASLFIADRKSST LSLPRVSLSDTAVYYCLVGHSGNTPLVFG KGTRLSVIA (SEQ ID NO: 129)	MGFRLCCVAFCLLGGAPVDSGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILE RFSAQFPDLHSELNLSSELELGDSALYF CASSVGGGAGNTTYFGEESWLTVV (SEQ ID NO: 131)	127	133
	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQD PGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWY RQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQL NRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVTG RRALTFGSGTRLQVQP (SEQ ID NO: 130)		130	
eC1	MAGIRALFMYLWLQLDWVSRGESVGLH LPTLSVQEGDNSIINCAYSNSASDYFIWYK QESGKGPQFIIDIRSNMDKRQGRVTVLL NKTVKHLSLQIAATQPGDSAVYFCAGRTG FQKLVFGTGRLLVSP (SEQ ID NO: 132)	MGFRLCCVAFCLLGGAPVDSGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILE RFSAQFPDLHSELNLSSELELGDSALYF CASSVGGGLYNEQFFGPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 133)	131	133
eC7	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDP QALSIQEGENATMNCYSYKTSINNLOWYR QNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGLRVTL DTSKSSSLLITASRAADTASYFCAVRYSS ASKIIFGSGTRLSIRP (SEQ ID NO: 134)	MGFRLCCVAFCLLGGAPVDSGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILE RFSAQFPDLHSELNLSSELELGDSALYF CASSAGGGSNNEQFFGPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 135)	131	133
eD3	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQD PGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWY RQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQL NRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVKGG NNFNKFFYFGSGTKLNVKP (SEQ ID NO: 136)	MSIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQTPK FQVLKTGQSMTLQCAQDMNHNSMYW YRQDPGMGLRLIYYSAEGTTDKGEVP NGYNVSRNLKREFSLRLESAAPSQTSV YFCASSHRVNSNQPHFGDGTRLSIL (SEQ ID NO: 137)	132	133
i7E6	MKPTLISVLVIFILRGTRAQRVTQPEKLLS VFKGAPVELKCNYSYSGPELFWYVQYS RQRLQLLLRHISRESIKGFTADLNKGETSF HLKKPFAQEEDSAMYYCALANQAGTALI FGKGTTLVSS (SEQ ID NO: 138)	MGFRLCCVAFCLLGGAPVDSGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILE RFSAQFPDLHSELNLSSELELGDSALYF CASSPGGGASSPLHFGNGTRTLTVT (SEQ ID NO: 140)	128	133
	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTPQIPAA LSVPEGENLVLNCSTDSAIYNLQWFRQD PGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLDKS SGRSTLYIAASQPGDSATYLCVARRAAG NKLTFGGGTRVLVVP (SEQ ID NO: 139)		132	
i2F3	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQD PGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWY RQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQL NRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNKS WGKLQFGAGTQVVVTP (SEQ ID NO: 141)	MGFRLCCVAFCLLGGAPVDSGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILE RFSAQFPDLHSELNLSSELELGDSALYF CASSAGTSGNEQFFGPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 142)	130	132
i3C2	MWGVFLLYVSMKMGTTGQNDQPTM TATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHA GEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLRSK GYSYLLKELQMKDSASYLCAVRVWKA AGNKLTFFGGGTRVLVVP (SEQ ID NO: 143)	MLLLLLLGPGSGLGAVVSQHPVSWVIC KSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFP KQSLMLMATSNEGSKATYEQGVKDKF LINHASLTLTLVTSAPHPEDSSFYCSA RRLAGGNEQFFGPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 144)	129	131

[0509]	i6E9	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQD PGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWY RQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQL NRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNLG NYGQNFVFGPGTRLSVLP (SEQ ID NO: 145)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILE RFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYF CASSVGGGLSNEQFFGPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 146)	132	133
	e1D8	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDEVS LFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYK QEPGAGLQLLYIFSNMDMKQDQRLTVL LNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAENH SSASKIIFRCGCGPAE (SEQ ID NO: 147)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDGVTQTP KHLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWY QQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILE RFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYF CASSVGSGRNQEYFVFGPGTRTLTVT (SEQ ID NO: 148)	130	133

[0510] [表5]

[0511] 表5:识别来自GPC3的肽 (EYILSLEEL) 的HLA-A24限制性T细胞受体的基因序列

克隆	序列 TRA	序列 TRB	TRA (bp)	TRB (bp)	
	8	ATGGTCCTGAAATCTCCGTGTCCATTC TTTGGATTCAAGTTGGCATGGGTGAGCA CCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGT TTCTAAGCATCCAAGAGGGAGAAAATC TCACTGTGTACTGCAACTCCTCAAGTG TTTTTCCAGCTTACAATGGTACAGAC AGGAGCCTGGGGAAGGTCTGTCTCTCC TGGTGACAGTAGTTACGGGTGGAGAAG TGAAGAAGCTGAAGAGACTAACCTTTC AGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTT CTCTCCACATCACTGCAGCCCAGCCTG GTGATACAGGCCCTTACCTCTGTGCAG GCCGATACAGCAGTGTCCAAGATAA TCTTTGGATCAGGGACCAGACTCAGCA TCCGGCAA (SEQ ID NO: 149)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCC AGTTCCTCATTCAAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTTCCTT GACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCGTAGGCGGG GGGGCACCCAATGAGCAGTTCCTCGGG CCAGGGACACGGCTCACCGTGCTA (SEQ ID NO: 150)	388	399
[0512]	G9	ATGGAGACCCTCTTGGGCCTGCTTATC CTTTGGCTGCAGCTGCAATGGGTGAGC AGCAAACAGGAGGTGACACAGATTCTT GCAGCTCTGAGTGTCCAGAAGGAGAA AACTTGGTTCTCAACTGCAGTTTCACTG ATAGCGCTATTTACAACCTCCAGTGGT TTAGGCAGGACCCCTGGGAAAGGTCTCA CATCTCTGTTGCTTATTCAGTCAAGTCA GAGAGAGCAAACAAGTGAAGACTTA ATGCCTCGCTGGATAAATCATCAGGAC GTAGTACTTTATACATTGCAGCTTCTCA GCCTGGTGACTCAGCCACCTACCTCTG TGCTGTTACCAGGAGAGCACTTACTTT TGGGAGTGAACAAGACTCCAAGTGC AACCAA (SEQ ID NO: 151)	ATGGGCTCCAGGCTGCTCTGTTGGGTG CTGCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTAAAGGCTGGAGTCACTCAAACCTCCA AGATATCTGATCAAAACGAGAGGACA GCAAGTGACACTGAGCTGCTCCCCTAT CTCTGGGCATAGGAGTGTATCCTGGTA CCAACAGACCCCAGGACAGGGCCTTC AGTTCCTCTTTGAATACTTCAGTGAGA CACAGAGAAACAAGGAAACTTCCCT GGTCGATTCTCAGGGGCCAGTTCCTT AACTCTCGCTCTGAGATGAATGTGAGC ACCTTGGAGCTGGGGGACTCGGCCCTT TATCTTTGCGCCAGCAGCGTAACTAGC GGGAGAACACACACAGATACGCAGTA TTTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGT GCTC (SEQ ID NO: 152)	385	405
	(46)2A6	ATGATGATATCCTTGAGAGTTTTACTG GTGATCCTGTGGCTTCAGTTAAGCTGG GTTTGGAGCCAACGGAAGGAGGTGGA GCAGGATCCTGGACCCTCAATGTTCC AGAGGGAGCCACTGTCGCTTTCAACTG TACTTACAGCAACAGTGCTTCTCAGTC TTTCTTCTGGTACAGACAGGATTGCAG GAAAGAACCTAAGTTGCTGATGTCCGT ATACTCCAGTGGTAATGAAGATGGAAG GTTTACAGCACAGCTCAATAGAGCCAG CCAGTATATTTCCCTGCTCATCAGAGA	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCC AGTTCCTCATTCAAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTTCCTT GACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAGC	394	399

	CTCCAAGCTCAGTGATTCAGCCACCTA CCTCTGTAAGATTTCTGGTGGCTACAA TAAGCTGATTTTGGAGCAGGGACCAG GCTGGCTGTACACCCAT (SEQ ID NO: 153)	TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCGTAGGTGGG GGTTTAGGGACTGAAGCTTTCTTTGGA CAAGGCACCAGACTCACAGTTGTA (SEQ ID NO: 154)		
i12Gb-1	ATGAGGCAAGTGGCGAGAGTGATCGT GTTCTGACCCTGAGTACTTTGAGCCTT GCTAAGACCACCCAGCCATCTCCATG GACTCATATGAAGGACAAGAAGTGAA CATAACCTGTAGCCACAACAACATTGC TACAAATGATTATATCACGTGGTACCA ACAGTTTCCCAGCCAAGGACCACGATT TATTATTCAAGGATACAAGACAAAAGT TACAAACGAAAGTGGCCTCCCTGTTTAT CCCTGCCGACAGAAAGTCCAGCACTCT GAGCCTGCCCGGGTTCCCTGAGCGA CACTGCTGTGTACTACTGCCTCGTGGG ACATTGAGGAAACACACCTCTTGTCTT TGGAAAGGGACAAGACTTTCTGTGAT TGCAA (SEQ ID NO: 155)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCC AGTTCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTTCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCGTAGGAGGG GGAGCTGGAAACACCATATATTTGGA GAGGGAAGTTGGCTCACTGTTGTA (SEQ ID NO: 156)	382	399
i12Gb-2	ATGATATCCTTGAGAGTTTTACTGGTG ATCCTGTGGCTTCAAGTAAAGCTGGGTT GGAGCCAACGGAAGGAGGTGGAGCAG GATCCTGGACCTTCAATGTTCCAGAG GGAGCCTGTCGCTTCAACTGTACT TACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTTCT TCTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAG AACCTAAGTTGCTGATGTCCGTATACT CCAGTGGTAATGAAGATGGAAGGTTTA CAGCACGCTCAATAGAGCCAGCCAGT ATATTTCCCTGCTCATCAGAGACTCCA AGCTCAGTGATTGAGCCACCTACCTCT GTGTGGTGAACACGGGCAGGAGAGCA CTTACTTTTGGGAGTGAACAAGACTC CAAGTGCAACCA (SEQ ID NO: 157)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCC AGTTCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTTCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCGTAGGAGGG GGAGCTGGAAACACCATATATTTGGA GAGGGAAGTTGGCTCACTGTTGTA (SEQ ID NO: 158)	390	399
eC1	ATGGCAGGCATTGAGCTTTATTTATG TACTTGTGGCTGCAGCTGGACTGGGTG AGCAGAGGAGAGAGTGTGGGGCTGCA TCTTCCACCCTGAGTGTCCAGGAGGG TGACAACCTCTATTATCAACTGTGCTTAT TCAAACAGCGCCTCAGACTACTTCATT TGGTACAAGCAAGAATCTGAAAAGG TCCTCAATTCATTATAGACATTCGTTCA AATATGGACAAAAGGCAAGGCCAAAAG AGTCAACGTTTTATTGAATAAGACAGT GAAACATCTCTCTGCAAATTGCAGC TACTCAACCTGGAGACTCAGCTGTCTA CTTTTGTGACAGGGCGAACAGGCTTCA GAAACTTGTATTTGAACTGGCACCCG ACTTCTGGTCAGTCCA (SEQ ID NO: 159)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCC AGTTCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTTCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCGTAGGAGGG GGGCTCTACAATGAGCAGTCTTCGGG CCAGGGACACGGCTCACCGTGCTA (SEQ ID NO: 160)	393	399
eC7	ATGGAAACTCTCCTGGGAGTGTCTTTG GTGATTCTATGGCTTCAACTGGCTAGG GTGAACAGTCAACAGGGAGAAGAGGA TCCTCAGGCCTTGAGCATCCAGGAGGG TGAAAATGCCACCATGAACTGCAGTTA CAAACTAGTATAAACAATTTACAGTG GTATAGACAAAATTCAGGTAGAGGCCT TGTCCACCTAATTTAATACGTTCAAAT GAAAAGAGAAAACACAGTGGAAAGATT AAGAGTCACGCTTGACACTTCCAAGAA AAGCAGTTCCTTGTGATCACGGCTTC CCGGGCAGCAGACACTGCTTCTTACTT	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCCTCC AGTTCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTTCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCGTAGGAGGG GGGCTCTACAATGAGCAGTCTTCGGG CCAGGGACACGGCTCACCGTGCTA (SEQ ID NO: 160)	394	399

[0513]

	CTGTGCTGTGAGGTACAGCAGTGCTTC CAAGATAATCTTTGGATCAGGGACCAG ACTCAGCATCCGGCCAA (SEQ ID NO: 161)	TATTTCTGTGCCAGCAGCGCAGGAGGG GGTAGTAACAATGAGCAGTTCTTCGGG CCAGGGACACGGCTCACCGTGCTA (SEQ ID NO: 162)		
eD3	ATGATATCCTTGAGAGTTTTACTGGTG ATCCTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTT GGAGCCAACGGAAGGAGGTGGAGCAG GATCCTGGACCCCTCAATGTTCCAGAG GGAGCCACTGTCGCTTTCAACTGTACT TACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTTCT TCTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAG AACCTAAGTTGCTGATGTCCGTATACT CCAGTGGTAATGAAGATGGAAGGTTA CAGCACAGCTCAATAGAGCCAGCCAGT ATATTTCCCTGCTCATCAGAGACTCCA AGCTCAGTGATTACAGCCACCTACCTCT GTGTGGTGAAGGTGGGAACAACCTCA ACAAATTTTACTTTGGATCTGGGACCA AACTCAATGTAAAACCA (SEQ ID NO: 163)	ATGAGCATCGGGCTCCTGTGCTGTGTG GCCTTTTCTCTCCTGTGGGCAAGTCCA GTGAATGCTGGTGTCACTCAGACCCCA AAATTCAGGTCCTGAAGACAGGACA GAGCATGACACTGCAGTGTGCCAGG ATATGAACCATAAATCCATGTACTGGT ATCGACAAGACCCAGGCATGGGACTG AGGCTGATTTACTCAGCTTCTGAG GGTACCACTGACAAAGGAGAAAGTCC CAATGGCTACAATGTCTCCAGATTA CAAACGGGAGTTCTCGCTCAGGCTGGA GTCGGCTGCTCCCTCCAGACATCTGT GTACTTCTGTGCCAGCAGCCACAGGGT TAATAGCAATCAGCCCCAGCATTTTGG TGATGGGACTCGACTCTCCATCCTA (SEQ ID NO: 164)	397	399
i7E6-1	ATGAAGCCCACCTCATCTCAGTGCTT GTGATAATATTTATACTCAGAGGAACA AGAGCCCAGAGAGTGACTCAGCCCGA GAAGCTCCTCTCTGTCTTTAAAGGGGC CCAGTGGAGCTGAAGTGAACATTTT CTATTCTGGGAGTCCCTGAACCTTCTGG TATGTCCAGTACTCCAGACAACGCCTC CAGTACTCTTGAGACACATCTCTAGA GAGAGCATCAAAGGCTTCACTGTGAC CTTAACAAAGGCGAGACATCTTTCCAC CTGAAGAAACCATTTGCTCAAGAGGAA GACTCAGCCATGTATTACTGTGCTCTG CCAACCAGGCAGGAACCTGCTGATCT TTGGGAAGGGAACCACTTATCAGTGA GTTCCA (SEQ ID NO: 165)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCTCC AGTTCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTCCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCCCGGTGGA GGGGCGAGTTCACCCCTCCACTTTGGG AATGGGACCAGGCTCACTGTGACA (SEQ ID NO: 166)	385	399
i7E6-2	ATGGAGACCCTCTTGGGCTGCTTATC CTTTGGCTGCAGCTGCAATGGGTGAGC AGCAAAACAGGAGGTGACACAGATTCCT GCAGCTCTGAGTGTCCAGAAGGAGAA AACTTGGTTCTCAACTGCAGTTTCACTG ATAGCGCTATTTACAACCTCCAGTGGT TTAGGCAGGACCCTGGGAAAGGTCTCA CATCTCTGTTGCTTATTCAGTCAAGTCA GAGAGACAAACAAGTGGAAAGACTTA ATGCCTCGCTGGATAAATCATCAGGAC GTAGTACTTTATACATTGCAGCTTCTCA GCCTGGTGAAGCAGCCACCTACCTCTG TGCTGTGAAACGACGAGCTGCAGGCAA CAAGCTAACTTTTGGAGGAGGAACCA GGTCTAGTTAAACCA (SEQ ID NO: 167)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCTCC AGTTCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTCCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCCCGGTGGA GGGGCGAGTTCACCCCTCCACTTTGGG AATGGGACCAGGCTCACTGTGACA (SEQ ID NO: 168)	397	399
i2F3	ATGATATCCTTGAGAGTTTTACTGGTG ATCCTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTT GGAGCCAACGGAAGGAGGTGGAGCAG GATCCTGGACCCCTCAATGTTCCAGAG GGAGCCACTGTCGCTTTCAACTGTACT TACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTTCT TCTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAG AACCTAAGTTGCTGATGTCCGTATACT CCAGTGGTAATGAAGATGGAAGGTTA CAGCACAGCTCAATAGAGCCAGCCAGT ATATTTCCCTGCTCATCAGAGACTCCA AGCTCAGTGATTACAGCCACCTACCTCT	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGGCTCC AGTTCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTCCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCCCGGTGGA GGGGCGAGTTCACCCCTCCACTTTGGG AATGGGACCAGGCTCACTGTGACA (SEQ ID NO: 168)	391	396

[0514]

	GTGTGGTGAACAAGAGCTGGGGAAA TTGCAGTTTGGAGCAGGGACCCAGGTT GTGGTCACCCCAG (SEQ ID NO: 169)	TATTTCTGTGCCAGCAGCGCCGGGACT AGCGGAAATGAGCAGTTCTTCGGGCCA GGGACACGGCTCACCGTGCTA (SEQ ID NO: 170)		
i3C2	ATGTGGGGAGTTTTCCTTCTTTATGTTT CCATGAAGATGGGAGGCACTACAGGA CAAAACATTGACCAGCCACTGAGATG ACAGTACGGAAGGTGCCATTGTCCAG ATCAACTGCACGTACCAGACATCTGGG TTCAACGGGCTGTTCTGGTACCAGCAA CATGCTGGCGAAGCACCCACATTTCTG TCTTACAATGTTCTGGATGGTTTGGAG GAGAAAGGTCGTTTTTCTTCATTCTTA GTCCGTCTAAAGGGTACAGTTACCTCC TTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAGACT CTGCCTCTTACCTCTGTGCTGTGAGAGT GTGAAAGCTGCAGGCAACAAGCTAA CTTTTGGAGGAGGAACCAGGGTGTAG TAAACCAA (SEQ ID NO: 171)	ATGCTGCTGCTTCTGCTGCTTCTGGGG CCAGGCTCCGGGCTTGGTGTCTGCTC TCTCAACATCCGAGCTGGGTTATCTGT AAGAGTGAACCTCTGTGAAGATCGA GTGCCGTCCCTGGACTTTCAGGCCAC AACTATGTTTGGTATCGTCAGTTCCC GAAACAGAGTCTCATGCTGATGGCAAC TTCCAATGAGGGCTCCAAGGCCACATA CGAGCAAGGCGTCGAGAAGGACAAGT TTCTCATCAACCATGCAAGCCTGACCT TGTCCACTCTGACAGTGACCAGTGCCC ATCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCT GCAGTGCTAGAAGGCTAGCGGGAGGA GGGAATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGG GACACGGCTCACCGTGCTA (SEQ ID NO: 172)	388	393
i6E9	ATGATATCCTTGAGAGTTTACTGGTG ATCCTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTT GGAGCCAACGGAAGGAGGTGGAGCAG GATCCTGGACCTTCAATGTTCCAGAG GGAGCCACTGTCGCTTTCAACTGTA TACAGCAACAGTGCTTCTCAGTCTTCT TTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAG AACCTAAGTTGCTGATGTCCGTATACT CCAGTGGTAATGAAGATGGAAGGTTA CAGCACAGCTCAATAGAGCCAGCCAGT ATATTTCCCTGCTCATCAGAGACTCCA AGCTCAGTGATTCAGCCACCTACCTCT GTGTGGTGAACCTCGGGAACATGGTC AGAATTTTGTCTTTGGTCCCAGAACCA GATGTCCGTGCTGCCCT (SEQ ID NO: 173)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGCTCC AGTTCCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTTCCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCGTAGGGGGG GGCCTAAGCAATGAGCAGTTCTTCGGG CCAGGGACACGGCTCACCGTGCTA (SE Q ID NO: 174)	397	399
E1D8	ATGAAGACATTTGCTGGATTTTCGTTCC TGTTTTTGTGGCTGCAGCTGGACTGTAT GAGTAGAGGAGAGGATGTGGAGCAGA GTCTTTTCCCTGAGTGTCCGAGAGGGAG ACAGTCCGTTATAAACTGCACTTACA CAGACAGCTCCTCCACTACTTATACT GGTATAAGCAAGAACCTGGAGCAGGT CTCCAGTTGCTGACGTATATTTTTTCAA ATATGGACATGAAACAAGACCAAAGA CTCACTGTTCTATTGAATAAAAAGGAT AAACATCTGTCTCTGCGCATTGCAGAC ACCCAGACTGGGGACTCAGCTATCTAC TTCTGTGCAGAGAACCACAGCAGTGCT TCCAAGATAATCTTTGCTGCGGCTGT GGTCCAGCTGAA (SEQ ID NO: 175)	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTG GCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCA GTGGATTCTGGAGTCACACAAACCCCA AAGCACCTGATCACAGCAACTGGACA GCGAGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAG GTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGTA CCAACAGAGCCTGGACCAGGCTCC AGTTCCCTCATTAGTATTATAATGGAG AAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTT GAACGATTCTCCGCACAACAGTTCCCT GACTTGCCTCTGAACTAAACCTGAGC TCTCTGGAGCTGGGGACTCAGCTTTG TATTTCTGTGCCAGCAGCGTAGGGTCCG GGACGAAATTACGAGCAGTACTTCGG GCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA (SEQ ID NO: 176)	390	399

[0515]

[0516] 图59显示由接受了FOXM1肽疫苗的患者外周血建立肽特异性CTL克隆。在CD8结合阻碍条件下,从接受了使用来自FOXM1的肽的癌症肽疫苗的患者外周血中单一分选Dextramer阳性T细胞,在同种异体饲养细胞上培养,建立了T细胞克隆。

[0517] 图59的A和B显示通过HLA-A24限制性FOXM1特异性T细胞克隆的Dextramer染色评价TCR的结合力。A.不存在CD8结合阻碍。B.在CD8结合阻碍的存在下进行比较、研究。

[0518] <结果>

[0519] 在肽存在下刺激培养接受了FOXM1肽疫苗的患者外周血,通过HLA-A24 Dextramer染色建立了反应性克隆。对通过Dextramer染色建立的FOXM1特异性反应性T细胞克隆的TCR

的结合力进行评价的结果,4个克隆中,有3个克隆在CD8阻碍条件下也可确认到良好的染色性,但观察到21E7克隆因CD8阻碍而染色性显著降低。表中显示由各克隆分离的TCR基因的氨基酸序列以及基因序列。

[0520] [表6]

[0521] 表6:识别来自FOXM1的肽(IYTWIEDHF)的HLA-A24限制性T细胞受体的氨基酸序列

[0522]

克隆	序列TRA	序列TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
F5	MALQSTLGAVWLGLLLNSLWKVAESKD QVFQPSTVASSEGAVVEIFCNHSVSNAYN FFWYLFHFGPCAPRLLVKGSKPSQQGRYN MTYERFSSLLILQVREADAAVYYCAVN QAGTALIFGKGTLSVSS (SEQ ID NO: 177)	MGCRIILCCAIVLCLLGAVIDTEVTQTPK HLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYW YKQKAKKPELMFVYSYEKLSINESVPSR FSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCA SSQERTSGRSADTQYFGPGTRLLTVLE (SEQ ID NO: 178)	130	137
②1E7	MLLLIPVLGMIFALRDARAQSVSQHNH HVILSEAASLELGCNYSYGGTVNLFWYV QYPGQHLQLLLKYFSGDPLVKGIKGFEA EFIKSKFSFNLRKPSVQWSDTAEYFCAVR HGGTGTASKLTFGTGTRLQVTL (SEQ ID NO: 179)	MLLLLLLPGISLLLPGLAGSGLGAVV SQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTM FWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQ GVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDS SFYIC SARALGGYTFGSGTRLLTVVE (SEQ ID NO: 180)	135	139
②1D5	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQKQKEVE QDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFM WYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRF TAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCA MSGHFNKFYFGSGTKLNVKP (SEQ ID NO: 181)	MGSRLCWVLLCLLGAIVKAGVTQTP RYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRVSWYQQ TPGQGLQFLFEYFSETQRNKGNFGRFSG RQFSNSRSEMNVSTLELGDSALYLCASSL RAGELFFGEGSRLTVLE (SEQ ID NO: 182)	132	131
1F5	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQ SPEALRLQEGESSLNCSYTVSGLRGLFW YRQDPGKGPFLFTLVSAGEEKEKERLK ATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAASN SGGSNYKLTFGKGTLLTVNP (SEQ ID NO: 183)	MGFRIILCCVAFCLLGAIVDSDGVTQTPK HLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYVYQQ SLDQGLQFLIQYNGEERAKGNILERFSA QQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSV DGKGTQYFGPGTRLLVLE (SEQ ID NO: 184)	133	132

[0523] [表7]

[0524] 表7:识别来自FOXM1的肽(IYTWIEDHF)的HLA-A24限制性T细胞受体的基因序列

克隆	序列TRA	序列TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
F5	ATGGCTTTGCAGAGCACTCTGGGGGCG GTGTGGCTAGGGCTTCTCCTCAACTCTC TCTGGAAGGTTGCAGAAAGCAAGGAC CAAGTGTTCAGCCTTCCACAGTGGCA TCTTCAGAGGGAGCTGTGGTGAAATC TTCTGTAATCACTCTGTGTCCAATGCTT ACAACCTTCTTCTGGTACCTTCACTTCCC GGGATGTGCACCAAGACTCCTTGTTAA AGGCTCAAAGCCTTCTCAGCAGGGACG ATACAACATGACCTATGAACGGTTCTC TTCATCGCTGCTCATCCTCCAGGTGCG GGAGGCAGATGCTGCTGTTTACTACTG TGCTGTTAACCAGGCAGGAAGTCTCT GATCTTTGGGAAGGGAACACCTTATC AGTGAGTTCCA (SEQ ID NO: 185)	ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCG GTTCTCTGTCTCCTGGGAGCAGTTCCCA TAGACACTGAAGTTACCCAGACACCAA AACACCTGGTCAATGGGAATGACAAATA AGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATA TGGGGCACAGGGCTATGTATTGGTACA AGCAGAAAGCTAAGAAGCCACCGGAG CTCATGTTTGTCTACAGCTATGAGAAAC TCTCTATAAATGAAAGTGTGCCAAGTC GCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCTC TCTCTTAAACCTTACCTACACGCCCTG CAGCCAGAAGACTCAGCCCTGTATCTC TGCGCCAGCAGCCAAGAGCGGACTAGC GGGAGGTCGGCAGATACGCAGTATTTT GGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTC (SEQ ID NO: 186)	391	408
②IE7	ATGCTCCTGTTGCTCATACCAGTGCTG GGGATGATTTTTGCCCTGAGAGATGCC AGAGCCCAGTCTGTGAGCCAGCATAAC CACCACGTAATTCTCTCTGAAGCAGCC TCACTGGAGTTGGGATGCAACTATTCC TATGGTGGAACTGTTAATCTCTTCTGGT ATGTCCAGTACCCTGGTCAACACCTTC AGCTTCTCCTCAAGTACTTTTCAGGGG ATCCACTGGTTAAAGGCATCAAGGGCT TTGAGGCTGAATTTATAAAGAGTAAAT TCTCCTTTAATCTGAGGAAACCCTCTGT GCAGTGGAGTGACACAGCTGAGTACTT CTGTGCCGTGAGGCACGGCGGTACCGG CACTGCCAGTAAACTCACCTTTGGGAC TGGAACAAGACTTCAGGTCACGCTCG (SEQ ID NO: 187)	ATGCTGCTGCTTCTGCTGCTTCTGGGGC CAGGTATAAGCCTCCTTCTACCTGGGA GCTTGGCAGGCTCCGGGCTTGGTGTGT CGTCTCTCAACATCCGAGCTGGGTATC TGTAAGAGTGGAACTCTGTGAAGATC GAGTGCCGTTCCTGGACTTTCAGGCCA CAACTATGTTTTGGTATCGTCAGTTCCC GAAACAGAGTCTCATGCTGATGGCAAC TTCCAATGAGGGCTCCAAGGCCACATA CGAGCAAGGCGTCGAGAAGGACAAGTT TCTCATCAACCATGCAAGCCTGACCTTG TCCACTCTGACAGTGACCAGTGCCCATC CTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCA GTGCTAGAGCTTTAGGAGGCTACACCT TCGGTTTCGGGGACCAGGTTAACCCTTG TA (SEQ ID NO: 188)	406	414
②ID5	ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTG GTGATCCTGTGGCTTCAGTTAAGCTGG GTTTGGAGCCAACAGAAGGAGGTGGA GCAGGATCCTGGACCACTCAGTGTTC AGAGGGAGCCATTGTTTCTCTCAACTG CACTTACAGCAACAGTGCTTTTCAATA CTTCATGTGGTACAGACAGTATTCCAG AAAAGGCCCTGAGTTGCTGATGTACAC ATACTCCAGTGGAACAAAGAAGATGG AAGGTTTACAGCACAGGTCGATAAATC CAGCAAGTATATCTCCTTGTTTCATCAG AGACTCACAGCCCAGTGATTCAGCCAC CTACCTCTGTGCAATGAGCGGTCACTT CAACAAATTTTACTTTGGATCTGGGAC CAAACCTCAATGTAACCAAA (SEQ ID NO: 189)	ATGGGCTCCAGGCTGCTCTGTTGGGTGC TGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGT AAAGGCTGGAGTCACTCAAACCTCAAAG ATATCTGATCAAAACGAGAGGACAGCA AGTGACACTGAGCTGCTCCCCTATCTCT GGGCATAGGAGTGTATCCTGGTACCAA CAGACCCCAGGACAGGGCTTCAGTTC CTCTTTGAATACTTCAGTGACACAG AGAAACAAAGGAAACTTCCCTGGTCTGA TTCTCAGGGCGCCAGTTCTTAACTCTC GCTCTGAGATGAATGTGAGCACCTTGG AGCTGGGGGACTCGGCCCTTATCTTTG CGCCAGCAGCTTGCAGGCGGGGAGCT GTTTTTTGGAGAAGGCTCTAGGCTGACC GTACTG (SEQ ID NO: 190)	397	390
1F5	ATGGAGAAAATGTTGGAGTGTGCATTC ATAGTCTTGTGGCTTCAGCTTGGCTGGT TGAGTGGAGAAGACCAGGTGACGCAG AGTCCCAGGCCCTGAGACTCCAGGAG GGAGAGAGTAGCAGTCTCAACTGCAGT TACACAGTCAGCGGTTAAGAGGGGCTG TTCTGGTATAGGCAAGATCCTGGGAAA GGCCCTGAATTCCTTTCACCCTGTATT CAGCTGGGGAAGAAAAGGAGAAAGAA AGGCTAAAAGCCACATTAACAAAGAA GGAAAGCTTTCTGCACATCACAGCCCC TAAACCTGAAGACTCAGCCACTTATCT CTGTGCTGCCTCCAATAGTGGAGGTAG CAACTATAAACTGACATTTGGAAAAGG	ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGG CCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGT GGATTCTGGAGTACACAAAACCCCAAA GCACCTGATCACAGCAACTGGACAGCG AGTGACGCTGAGATGCTCCCCTAGGTC TGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACCAA CAGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTC CTCATTCAAGTATTATAATGGAGAAGAG AGAGCAAAAAGGAAACATTCTTGAACGA TTCTCCGCACAACAGTTCCCTGACTTGC ACTCTGAACTAAACCTGAGCTCTCTGG AGCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTTCTG TGCCAGCAGCGTAGACGGGAAGGGGAC CCAGTACTTCGGGCCAGGCACGCGGCT	400	393

[0525]

[0526]	AACTCTCTTAACCGTGAATCCAA (SEQ ID NO: 191)	CCTGGTGCTC (SEQ ID NO: 192)	
--------	--	-----------------------------	--

[0527] 图60显示由接受了HSP105肽疫苗的患者外周血建立肽特异性CTL克隆。HSP105-HLA-A2 Dextramer染色性不充分,无法用于检测显示结合的T细胞。因此,在抗原存在下对接受了使用来自HSP105的肽的癌症肽疫苗的患者外周血进行刺激,通过CD107a测定检测显示脱颗粒反应的CD8T细胞。单分选CD107a阳性CD8T细胞,在同种异体饲养细胞上培养,建立了T细胞克隆。

[0528] 图60的A显示通过ELISPOT法评价HLA-A2限制性HSP105特异性T细胞克隆对产生IFN- γ 的反应性。将所建立的各T细胞克隆与外源地结合有来自HSP105的肽的靶标细胞(T2细胞)共培养20小时,评价抗原刺激依赖性的IFN- γ 的产生。以结合有来自HIV的肽的细胞作为阴性对照,评价抗原特异性。

[0529] 图60的B和C显示HLA-A2限制性HSP105特异性T细胞克隆的细胞毒活性。用荧光色素(钙黄绿素)标记靶标细胞,与T细胞克隆共培养4小时,以荧光的衰减为指标,评价对靶标细胞的细胞毒活性。B.以外源地结合有肽的T2细胞为靶标。以使肽疫苗中使用的来自HSP105的肽(HSPA-7)与TAP缺失细胞株即T2细胞外源地结合而得的细胞作为阳性对照,以结合有来自HIV的肽(HIVA2)的细胞作为阴性对照,评价抗原特异性。C.以内源地表达HSP105的癌细胞株为靶标,评价细胞毒活性。Caski细胞和SiHa-A2细胞用作HSP105阳性细胞株,SW620细胞株和HepG2细胞株用作HSP105阴性细胞株。11B9克隆的细胞毒活性未作评价。

[0530] <结果>

[0531] 由接受了HSP105的肽疫苗的具有HLA-A2单倍型的患者建立具有HSP105肽反应性的T细胞克隆。HLA-A2-HSP105 Dextramer的染色性不充分,难以通过Dextramer染色检测反应性克隆,因此在本研究将事先用肽刺激培养的患者外周血单核细胞再次于肽存在下与表达A2的K562细胞株共培养,通过分选分离收集识别抗原且显示脱颗粒(在显示脱颗粒的情况下,通常基于利用了细胞内存在的CD107a分子暴露在细胞表面的脱颗粒评价法)的T细胞,建立了反应性T细胞克隆。在评价所建立的5个T细胞克隆的抗原特异性IFN- γ 产生能力时,在所有克隆中在肽存在下通过与HLA-A2 T2细胞的共培养观察到IFN- γ 的产生,特别是7B9、10G7、10C9显示强的IFN- γ 产生能力。11B9克隆与其他克隆相比反应性明显低,因此对7B9、8D4、10G7以及10C9,接着实施细胞毒性试验。这4个克隆均对外源地结合有肽的T2细胞显示毒活性,特别是7B9、8D4克隆显示强的毒活性。进一步对内源地表达HSP105的这些克隆对癌细胞株的细胞毒活性进行评价,结果是7B9、10G7以及10C9克隆对CasKi细胞株均显示出显著的细胞毒活性。关于对SiHaA2以及SW620细胞株的毒活性,与HSP105阴性HepG2细胞株相比,没有观察到显著的细胞毒活性。对8D4、11B9克隆未实施评价,以后再行评价。表中显示从各克隆分离的氨基酸序列以及TCR基因的基因序列。

[0532] [表8]

[0533] 表8:识别来自HSP105的肽(RLMNDMTAV或KLMSSNSTDL)的HLA-A2限制性T细胞受体

的氨基酸序列

克隆	序列 TRA	序列 TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
[0534] 11B9	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQP EMSVQEAEVTLSTYDTSSESYLFWY KQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSV NFKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYR IPGAGSYQLTFGKGTKLSVIP (SEQ ID NO: 193)	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVVSQSPR YKVAKRQDVALRCDPISGHVSLFWYQQ ALGQGPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFF AERPEGSVSTLKIQRTOQEDSAVYLCASSP GLAGGAQETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID NO: 194)	136	136
[0534] 7B9	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQ ALSIQEGENATMNCYSYKTSINNQLWYRQN SGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDT KKSSSLITASRAADTASYFCATDTGGAQK LVFQGQTRLTNP (SEQ ID NO: 195)	MDSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRH EVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQT MMRGLLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS KMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPD RGETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID NO: 196)	131	132
[0534] 10G7	MWGVFLLYVSMKMGTTGQNIQPTM TATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHA GEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLSRSG	MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTOPTPSH QVTQMGEVILRCVPISNHLYFYWYRQIL GQKVEFLVSFYNNSEISEKSEIFDDQFSVER	129	131
	YSYLLKELQMKDSASYLCAVRALREAGT ALIFGKGTTLVS (SEQ ID NO: 197)	PDGNSFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSQNR EAFFGQGTRTLTVV (SEQ ID NO: 198)		
[0535] 8D4	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDP GPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQFFWYR QDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLN RASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVSARVF GSGTRLSIRP (SEQ ID NO: 199)	MGTSLLCWMLCCLLGADHDTGVSQDP RHKITKRGQNVTFRCDPSEHNRLYWYRQ TLGQGPEFLTYFQNEAQLKSRLLSDRFS ERPKGFSSTLEIQRTEQGD SAMYLCASSPL AGVRYEQYFGPGTRTLTVT (SEQ ID NO: 201)	126	134
[0535]	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQ DPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFMW YRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTA QVDKSSK YISLFIRDSQPSDSATYLCAMSV RGSAGSYQLTFGKGTKLSVIP (SEQ ID NO: 200)		137	
[0535] 10C9	MSLSSLLKVVVTASLWLGPGIAQKITQTPG MFVQEKEAVTLDCTYDTSYGLFWYK QPSSGEMIFLIYQGSYDQQNATEGRYSLNF QKARKSANLVISASQLGDSAMYFCAMRD RNTGNQYFYGTTGSLTVIP (SEQ ID NO: 202)	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPK HLITATGQRVTLRCSRSGDLSVYWYQSS LDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILRFSAQ QFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVEV YNEQFFGPGTRTLTVL (SEQ ID NO: 203)	135	131

[0536] [表9]

[0537] 表9: 识别来自HSP105的肽 (RLMNDMTAV或KLMSSNSTDL) 的HLA-A2限制性T细胞受体的基因序列

[0538]

克隆	序列 TRA	序列 TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
11B9	ATGGCATGCCCTGGCTTCTGTGGGCA CTTGTGATCTCCACCTGTCTTGAATTTA GCATGGCTCAGACAGTCACTCAGTCTC AACCAGAGATGTCTGTGCAGGAGGCA GAGACCGTGACCCGTGAGCTGCACATAT GACACCAGTGAGAGTGATTATTATTTA TTCTGGTACAAGCAGCCTCCAGCAGG CAGATGATTCTCGTTATTCGCCAAGAA GCTTATAAGCAACAGAATGCAACAGA GAATCGTTTCTCTGTGAACTTCCAGAA AGCAGCCAAATCCTTCAGTCTCAAGAT CTCAGACTCACAGCTGGGGGATGCCGC GATGATTTTCTGTGCTTATAGGATCCCG GGTGCTGGGAGTTACCAACTCACTTTC GGGAAGGGGACCAAACTCTCGGTCTATA CCAA (SEQ ID NO: 204)	ATGGGCACCAGGCTCCTCTGCTGGGTGG TCC TGGGTTCCTAGGGACAGATCACAC AGGTGCTGGAGTCTCCAGTCCCCTAGG TACAAAGTCGCAAAGAGAGGACAGGAT GTAGCTCTCAGGTGTGATCCAATTTTCGG GTCATGTATCCCTTTTTTGGTACCAACA GGCCCTGGGGCAGGGGCCAGAGTTTCT GACTTATTTCCAGAATGAAGCTCAACTA GACAAATCGGGGCTGCCAGTGATCGC TTC TTTGCAGAAAGGCCTGAGGGATCCG TCTCCACTCTGAAGATCCAGCGCACACA GCAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGT GCCAGCAGCCCGGGTTTAGCGGGAGGG GCCCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCA GGCACGCGGCTCCTGGTGCTC (SEQ ID NO: 205)	409	408
7B9	ATGGAAACTCTCCTGGGAGTGTCTTTG GTGATTCTATGGCTTCAACTGGCTAGG GTGAACAGTCAACAGGGAGAAGAGGA TCCTCAGGCCTTGAGCATCCAGGAGGG TGAAAATGCCACCATGAACTGCAGTTA CAAAACTAGTATAAACAATTTACAGTG GTATAGACAAAATTCAGGTAGAGGCCT TGTCACCTAATTTAATACGTTCAAAT GAAAGAGAGAAACACAGTGGAAAGATT AAGAGTCACGCTTGACACTTCCAAGAA AAGCAGTTCCTTGTTGATCACGGCTTC CCGGGCAGCAGACACTGCTTCTTACTT CTGTGCTACGGACACGGGGGGAGCCCA GAAGCTGGTATTTGGCCAAGGAACCAAG GCTGACTATCAACCCAA (SEQ ID NO: 206)	ATGGACTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGT CCCTTTGCATCCTGGTAGCAAAGCACAC AGATGCTGGAGTTATCCAGTCAACCCCGG CACGAGGTGACAGAGATGGGACAAGAA GTGACTCTGAGATGTAACCAATTTTCAG GACACGACTACCTTTTCTGGTACAGACA GACCATGATGCGGGGACTGGAGTTGCT CATTTACTTTAACAACAACGTTCCGATA GATGATTCAGGGATGCCCGAGGATCGA TTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCAT TCTCCACTCTGAAGATCCAGCCCTCAGA ACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCTGT GCCAGCAGCCCGGACAGGGGGGAGACC CAGTACTTCGGGCCAGGCACGCGGCTC CTGGTGCTC (SEQ ID NO: 207)	394	396

10G7	<p>ATGTGGGGAGTTTTCCTTCTTTATGTTT CCATGAAGATGGGAGGCACTACAGGA CAAAACATTGACCAGCCACTGAGATG ACAGCTACGGAAGGTGCCATTGTCCAG ATCAACTGCACGTACCAGACATCTGGG TTCAACGGGCTGTTCTGGTACCAGCAA CATGCTGGCGAAGCACCCACATTTCTG TCTTACAATGTTCTGGATGGTTTGGAG GAGAAAGTCTGTTTTCTTCATTCTTA GTCGGTCTAAAGGGTACAGTTACCTCC TTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAGACT CTGCCTTTACCTCTGTGCTGTGAGAGC CCTCCGGGAGGCAGGAACTGCTCTGAT CTTTGGGAAGGGAACCACCTTATCAGT GAGTTCCA (SEQ ID NO: 208)</p>	<p>ATGGATACCTGGCTCGTATGCTGGGCAA TTTTAGTCTCTTGAAAGCAGGACTCAC AGAACCTGAAGTCACCCAGACTCCCAG CCATCAGGTCACACAGATGGGACAGGA AGTGATCTTGGCGTGTGTCCCCATCTCT AATCACTTATACTTCTATTGGTACAGAC AAATCTTGGGGCAGAAAAGTCGAGTTTCT GGTTTCCTTTTATAATAATGAAATCTCA GAGAAGTCTGAAATATTGATGATCAA TTCTCAGTTGAAAGGCCTGATGGATCAA ATTTCACTCTGAAGATCCGGTCCACAAA GCTGGAGGACTCAGCCATGTACTTCTGT GCCAGCAGTCAAATCGGGAAAGCTTTC TTTGGACAAGGCACCAGACTCACAGTT GTA (SEQ ID NO: 209)</p>	388	391
8D4	<p>ATGATATCCTTGAGAGTTTACTGGTG ATCCTGTGGCTTCAGTTAAGCTGGGTTT GGAGCCAACGGAAGGAGGTGGAGCAG GATCCTGGACCTTCAATGTTCCAGAG GGAGCCACTGTCGCTTCAACTGTACT TACAGCAACAGTGCCTTCTCAGTCTTCT TCTGGTACAGACAGGATTGCAGGAAAG AACCTAAGTTGCTGATGTCGGTACT CCAGTGGTAATGAAGATGGAAGGTTTA CAGCACAGCTCAATAGAGCCAGCCAGT ATATTTCCCTGCTCATCAGAGACTCCA AGCTCAGTGATTCAGCCACTACCTCT GTGTGGTGAGCGCCGGGTCTTTGGAT CAGGGACCAGACTCAGCATCCGGCCAA (SEQ ID NO: 210)</p>	<p>ATGGGCACCAGCCTCCTCTGCTGGATGG CCCTGTGTCTCCTGGGGGCAGATCACGC AGATACTGGAGTCTCCAGGACCCAG ACACAAGATCACAAAGAGGGGACAGAA TGTAACCTTTCAGGTGTGATCCAATTTCT GAACACAACCGCCTTTATTGGTACCAGC AGACCCTGGGGCAGGGCCCAGAGTTTC TGACTTACTTCCAGAATGAAGCTCACT AGAAAATCAAGGCTGCTCAGTGATCG GTTCTCTGCAGAGAGGCCTAAGGGATCT TTCTCCACCTTGGAGATCCAGCGCACAG AGCAGGGGGACTCGGCCATGTATCTCT GTGCCAGCAGCCCCCTAGCGGGGGTCA GGTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCA CCAGGCTCACGGTCACA (SEQ ID NO: 212)</p>	379	402
[0539]	<p>ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTACTG GTGATCCTGTGGCTTCAGTTAAGCTGG GTTTGGAGCCAACAGAAGGAGGTGGA GCAGGATCCTGGACCACTCAGTGTTCC AGAGGGAGCCATTGTTTCTCTCAACTG CACTTACAGCAACAGTGCCTTTCAATA CTTCATGTGGTACAGACAGTATTCCAG AAAAGGCCCTGAGTTGCTGATGTACAC ATACTCCAGTGGTAACAAAGAAGATGG AAGGTTTACAGCACAGGTCGATAAATC CAGCAAGTATATCTCCTTGTTCATCAG AGACTCACAGCCAGTGATTCAGCCAC CTACCTCTGTGCAATGAGCGTCAGAGG CTCTGGGGCTGGGAGTTACCAACTCAC TTTCGGGAAGGGGACCAACTCTCGGT CATAACAA (SEQ ID NO: 211)</p>		412	
10C9	<p>ATGTCACTTCTAGCCTGCTGAAGGTG GTCACAGCTTCACTGTGGCTAGGACCT GGCATTGCCAGAAGATAACTCAAACC CAACCAGGAATGTTTCGTGCAGGAAAA GGAGGCTGTGACTCTGGACTGCACATA TGACACCAGTGATCCAAGTTATGGTCT ATTCTGGTACAAGCAGCCAGCAGTGG GGAAATGATTTTCTTATTTATCAGGG GTCTTATGACCAGCAAAAATGCAACAGA AGGTCTACTCATTGAATTTCCAGAA GGCAAGAAAATCCGCCAACCTTGTCAT CTCCGCTTCACAACTGGGGACTCAGC AATGTACTTCTGTGCAATGAGAGATAG GAACACCGGTAACCAGTTCTATTTTGG GACAGGGACAAGTTGACGGTCATTC AA (SEQ ID NO: 213)</p>	<p>ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGG CCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGT GGATTCTGGAGTCACACAAACCCAAA GCACCTGATCACAGCAACTGGACAGCG AGTGACGCTGAGATGCTCCCTAGGTCT GGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACCAAC AGAGCCTGGACCAGGGCCTCCAGTTCT CATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAG AGCAAAAGGAAACATTCTTGAACGATT CTCCGCACAACAGTTCCCTGACTTGCAC TCTGAACTAAACCTGAGCTCTCTGGAGC TGGGGGACTCAGCTTTGTATTTCTGTGC CAGCAGCGTAGAGGTTTACAATGAGCA GTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACC GTGCTA (SEQ ID NO: 214)</p>	406	393

[0540] 图61显示使用引入了人HLA基因的小鼠鉴定肽反应性TCR基因。

[0541] 图61的A和B显示针对引入了人HLA基因的小鼠的肽疫苗及其在脾脏内的肽反应性的评价。将50ug来自作为候选的癌抗原的肽与作为佐剂的polyI:CLC混合,对小鼠的尾根部

皮内每周进行3次给药。之后,摘出脾脏,在体外添加用于疫苗的肽,培养20小时,通过ELISPOT法检测抗原特异性IFN- γ 的产生。

[0542] 图61的C显示肽反应性TCR基因的分选和通过报告基因测定对抗原反应性的评价。将进行了疫苗接种的小鼠的脾脏在抗原肽以及抗CD107a抗体的存在下培养4小时,对发生脱颗粒的细胞(CD107a阳性细胞)进行单一细胞分选,回收至96孔板。使用逆转录和TCR特异性引物,由回收的细胞扩增TCR基因,构建了各自的插入了TCR基因的TAP片段。将所构建的各TCR基因的TAP片段和NFAT转录因子反应性萤光素酶表达载体对Jurkat细胞进行基因引入。培养16小时后,将引入了基因的Jurkat细胞和外源性地结合有抗原肽的表达HLA-A24的COS-7细胞进行共培养,通过萤光素酶测定对来自重构的TCR的刺激依赖性萤光素酶的表达进行测定。图摘自富山大学滨名等人的论文(Biochem Biophys Res Commun.2016,10;474(4):709-714.)。

[0543] 图61的D显示由引入了人HLA基因的小鼠分离的EPHB4肽反应性TCR的反应性评价。使用所制作的表达TCR的Jurnakt细胞,以萤光素酶活性(RLU)的形式显示对来自EPHB4的肽的反应性。使用已知的NY-ESO-1肽特异性TCR(1G4 TCR)作为阳性对照。与结合有EPHB4肽的Cos-7细胞共培养的情形用白(□)显示,与结合有NY-ESO-1肽的Cos-7细胞共培养的情形用黑(■)显示。

[0544] <结果>

[0545] 迄今为止,在本课题中显示:通过使用引入了人HLA基因的小鼠,关于新型癌抗原,也能以高通量鉴定表位肽。同样,为了研究通过使用引入了人HLA基因的小鼠能否鉴定识别新型癌抗原的TCR基因,将来自EPHB4的肽和佐剂一起对HLA-A24Tg小鼠反复免疫,诱导肽应答性CD8T细胞后,通过单一细胞分选由脾脏进行EPHB4反应性TCR基因的分选。在体外于肽存在下对已疫苗接种的小鼠的脾细胞进行再刺激,通过分选回收发生脱颗粒且呈CD107a阳性的T细胞。迄今为止,T细胞克隆的建立是在饲养细胞存在下再次培养来建立T细胞克隆,但增殖稳定需要时间,且未必能够由分选的所有细胞建立。因此,引入了富山大学滨名等人开发的高通量的来自单一细胞的TCR基因的检测以及功能评价方法。在滨名等人的方法中,不是重新培养所分选的细胞,而是通过直接PCR法扩增分离TCR基因,将通过Gibson组装分离的TCR基因与含有基因表达启动子的直链DNA连接,构建TCR基因表达载体,将所构建的TCR基因表达载体对来自T细胞淋巴瘤的Jurkat细胞株进行基因引入,重构TCR分子,评价其反应性。因未进行培养,故短期内不会丢失所分选的细胞,可进行评价。在通过分选从疫苗接种的小鼠的脾细胞中分离的39个CD107a阳性T细胞中,对21个细胞可鉴定其TCR基因,重构省略了相同TCR基因的8个T细胞的TCR基因,评价其抗原反应性。在重构TCR的Jurkat细胞株中,插入由事先在TCR信号下游激活的转录因子NFAT诱导萤光素酶基因表达的报告基因,在重构的TCR分子识别抗原的情况下,通过依赖于其激活信号强度的萤光素酶反应测定发光,可定量地评价反应性。在来自EPHB4的肽或来自NY-ESO-1的肽的存在下评价重构TCR的Jurkat细胞的反应性时,8个TCR基因中有7个观察到对EPHB4肽的反应性,在TCR_07基因中可确认到最强的抗原特异性反应性。表中显示从各克隆中分离的氨基酸序列以及TCR基因的基因序列。

[0546] [表10]

[0547] 表10:识别来自EPHB4的肽(RLNDGQFTV)的HLA-A2限制性T细胞受体的氨基酸序列

[0548]	克隆	序列TRA	序列TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
	5,6	未测定	MRVRLISAVVLCFLGTGLVDMKVTQMPR YLIKRMGENVLLECGQDMSHETMYWYR QDPGLGLQLIYISYDVSNSSEGDIPKGYRV SRKKREHFSLILDSAKTNQTSVYFCASSPR QTNTEVFFGKGTRLTVVE (SEQ ID NO: 215)	-	133
[0549]	4,7,34	MKTVTGPLFLCFWLQLNCSVSRGEQVEQ RPPHLSVREGDSAFIICTYTDSATAYFYW YKQEPGAGLQLLMSVFSNVDRKEEQGL TVLLNKKDKRLSLNLTAHPGDSAVYFC AVGNSNNRIFFGDGTQLVVKP (SEQ ID NO: 216)	MNTKITQSPRYLILGRANKSLECEQHLGH NAMYWYKQSAEKPELMFLYNLKLQIRN ETVPSRFIPECPDSSKLLHISAVDPEDSAV YFCASSQLGSSAETLYFGSGTRLTVLE (SEQ ID NO: 217)	132	115
	35, 37	MRPVTCSVLVLLMLRRSNGDSVQTQTEG LVTVTEGLPVKLNCTYQTTYLTIAFFWY VQYLNEAPQVLLKSSTDNKRTEHQGFHA TLHKSSSFHLQSSAQLSDSALYYCAL DYSNNRLTLGKGTQVVVLP (SEQ ID NO: 218)	MGSRLFLVLSLLCTKHMEAAVTQSPRKN VTVTGGNVTLSCRQTNSHNYMYWYRQD TGHGLRLIHYSYGAGNLQIGDVPDGYKAT RTTQEDFFLLELASPSQTSLYFCASSDLG GYNSPLYFAAGTRLTVTE (SEQ ID NO: 219)	132	132

[0550] [表11]

[0551] 表11: 识别来自EPHB4的肽 (RLNDGQFTV) 的HLA-A2限制性T细胞受体的基因序列

[0552]	克隆	序列TRA	序列 TRB	TRA (bp)	TRB (bp)
	5,6	未测定	ATGAACACTAAAATTACTCAGTCACCAA GATATCTAATCCTGGGAAGAGCAAATA AGTCTTTGGAATGTGAGCAACATCTGGG ACATAATGCTATGTACTGGTATAAACAG AGCGCTGAGAAGCCGCCAGAGCTCATG TTTCTCTACAATCTTAAACAGTTGATTC GAAATGAGACGGTGCCAGTCGTTTAT ACCTGAATGCCAGACAGCTCCAAGCTA CTTTTACATATATCTGCCGTGGATCCAG AAGACTCAGCTGTCTATTTTGTGCCAG CAGCCAACGGGGTCTAGTGCAGAAAC GCTGTATTTGGCTCAGGAACCAGACTG ACTGTTCTCG (SEQ ID NO: 220)	-	344
	4,7,34	ATGCGTCCTGTACACCTGCTCAGTTCTCG TGCTCCTCCTAATGCTCAGAAGGAGCAA TGGAGACTCCGTGACCCAGACAGAAGG CCTGGTCACTGTCACCGAGGGGTTGCCT GTGAAGTGAACCTGCACCTATCAGACTA CTTATTTAACTATTGCCTTTTTCTGGTAT GTGCAATATCTCAACGAAGCCCCTCAGG TACTCCTGAAGAGCTCCACAGACAACA AGAGGACCGAGACCAAGGGTCCACG CCACTCTCCATAAGAGCAGCAGCTCCTT CCATCTGCAGAAGTCCTCAGCGCAGCTG TCAGACTCTGCCCTGTACTACTGTGCTC TGAGTGACTIONACAGCAACAACAGACTTA CTTTGGGGAAGGGAACCCAGGTGGTGG TGTTACCAA (SEQ ID NO: 221)	ATGGGCTCCAGGCTCTTTCTGGTCTTGA GCCTCCTGTGTACAAAACACATGGAGGC TGCAGTCACCCAAAGCCCTAGAAACAA GGTGACAGTAACAGGAGGAAACGTGAC ATTGAGCTGTCGCCAGACTAATAGCCAC AACTACATGTACTGGTATCGGCAGGACA CTGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTA CTCATATGGTGTGCTGGCAACCTTCAAATA GGAGATGTCCCTGATGGGTACAAGGCC ACCAGAACAACGCAAGAAGACTTCTTC CTCCTGCTGGAATTGGCTTCTCCCTTCA GACATCTTTGTACTTCTGTGCCAGCAGT GATCTGGGGGGCTATAATTCGCCCTCT ACTTTCGCGCAGGCACCCGGCTCACTGT GACAG (SEQ ID NO: 222)	397	394
	35, 37	ATGCGTCCTGACACCTGCTCAGTTCTTG TGCTCCTCTTAATGCTCAGAAGGAACAA TGGAGACTCTGTGACCCAGACAGAAGG CCTGGTCACTCTACCGAGGGGTTGCCT GTGATGCTGAACTGCACCTATCAGAGTA CTTACTCACCTTCTCTTTCTGGTATGTG CAACATCTCAACGAAGCCCCTAAGTAC TTTTGAAGAGCTTCACAGACAACAAGA GCCCCGAGACCAAGGGTTCACGCCA	ATGAGAGTTAGGCTCATCTCTGCTGTGG TGCTGTGTTTCTTAGGAACAGGCCTTGT GGACATGAAAGTAACCCAGATGCCAAG ATACCTGATCAAAAGAATGGGAGAGAA TGTTTTGCTGGAAATGTGGACAGGACATG AGCCATGAAACAATGTACTGTATTCGAC AAGACCCTGGTCTGGGGCTCAGCTGAT TTATATCTCATACGATGTTGATAGTAA AGCGAAGGAGACATCCCTAAAGGATAC	397	397

[0553]	CTCTCCATAAGAGCAGCAGCTCCTTCCA TCTGCAGAAAGTCCTCAGCGCAGCTGTCA GACTCTGCCCTGTACTACTGTGCTTTGA GTGATCGGTCGGGAAATGAGAAAATAA CTTTTGGGGCTGGAACCAAACCTCACCAT TAAACCCA (SEQ ID NO: 223)	AGGGTCTCACGGAAGAAGCGGGAGCAT TTCTCCCTGATTCTGGATTCTGCTAAAA CAAACCAGACATCTGTGTACTTCTGTGC TAGCAGTCCAAGACAAAACAAACACAGA AGTCTTCTTTGGTAAAGGAACCAGACTC ACAGTTGTAG (SEQ ID NO: 224)	
--------	--	--	--

[0554] 图62显示通过电穿孔法制作识别通用癌抗原 (FOX M1) 的TCR-T细胞。

[0555] 图62的A显示通过电穿孔法制作TCR-T细胞。在抗CD3抗体和IL2存在下培养外周血单核细胞后,通过电穿孔法将特异性的sgRNA和Cas9蛋白一同引入至TCR的恒定区,制作了内源性TCR缺失的T细胞 (TCR DKO供体细胞)。培养后,接着通过电穿孔法引入用P2A序列连接TCR α 链基因和TCR β 链基因而得的单链TCR基因的mRNA,制作了TCR-T细胞。

[0556] 图62的B显示所制作的TCR-T细胞的细胞表面的TCR分子的表达。将所制作的TCR-T细胞用抗CD3抗体以及抗TCR $\alpha\beta$ 抗体染色,评价细胞表面的TCR分子的表达。直方图分别显示CD3和TCR $\alpha\beta$ 分子在细胞表面的表达 (红:TCR-T细胞、蓝:供体细胞)。

[0557] 图62的C显示所制作的TCR-T细胞通过抗原刺激产生IFN- γ 。将所制作的TCR-T细胞与外源性地结合有癌抗原肽 (FOX M1 pep.) 的T2-A24细胞共培养20小时,通过ELISPOT法检测IFN- γ 的产生。

[0558] <结果>

[0559] 对重构所鉴定的癌抗原反应性TCR基因的TCR-T细胞进行构建。本课题中,合成经由P2A序列连接TCR的 α 链和 β 链而得的人工单链TCR基因,将由合成的人工基因通过体外转录制作的TCR mRNA通过电穿孔法引入至用抗CD3抗体刺激培养的来自外周血的CD8阳性T细胞中。另外,事先利用CRISPR-Cas9系统敲除内源性TCR分子,从而仅有外源性地引入、重构的TCR分子在细胞表面高效表达。对迄今为止鉴定的FOX M1特异性TCR基因进行研究时,确认了F5、(21) 1D5以及1F5克隆中的任一种的TCR均在细胞表面高度表达。另外,在以IFN- γ 的产生为指标评价所制作的TCR-T细胞的抗原反应性时,如预期的那样,所有TCR-T细胞均对来自FOX M1的肽显示强反应性。1F5克隆的TCR虽然表达充分,但与其他2个相比反应性低,而(21) 1D5显示了最高的反应性,由此可知:这些FOX M1反应性TCR中,(21) 1D5克隆的TCR基因最有希望。以后,通过这种方法对获取的TCR基因的抗原特异性或在TCR-T细胞疗法中的有效性进行评价。

[0560] 图63显示克服癌症的多样性的鸡尾酒TCR-T细胞的开发方案。构建10种癌抗原的表位肽的文库,从接受了使用这些肽的癌症疫苗的癌症患者的外周血或反复疫苗接种了肽的人HLA基因引入小鼠中分离特异性地识别这些肽的HLA-A2或A24限制性TCR基因,构建癌抗原特异性TCR文库。筛选各癌抗原的表达,试验对肽疫苗的反应性后,针对多个癌抗原肽分别选择特异性的TCR基因,制作TCR-T细胞。将所制作的多个癌抗原特异性TCR-T细胞混合,以“鸡尾酒TCR-T细胞”制剂的形式给药,从而可针对癌症的多样性确立有效的T细胞疗法。

[0561] <结果>

[0562] 通过鉴定10种癌抗原的表位肽并构建癌抗原肽文库,不仅使现成的癌症肽疫苗成为可能,同时通过鉴定识别这些肽的强效TCR并制作癌抗原特异性TCR文库,还可实现“鸡尾酒TCR-T细胞”疗法,该疗法打破了由以多个癌抗原为靶标的癌症多样性引起的免疫逃逸。

实施例12:以膜蛋白通用癌抗原为靶标的CAR-T细胞疗法、鸡尾酒CAR-T细胞疗法的开发

[0563] <方法>

[0564] 图64(a)在CAR-T细胞的体外细胞毒性评价中,使用横纹肌肉瘤细胞株Rh30和肝内胆管癌细胞株SSP25作为靶细胞。向细胞株中添加10 μ g/ml浓度的钙黄绿素-AM(Dojindo),在37 $^{\circ}$ C下静置30分钟,进行染色。将作为效应细胞的EPHB4 CAR-T细胞和染色的靶细胞在96孔半区、平底板(Corning)内以E/T=1、E/T=3、E/T=10或E/T=30的比例共培养4-6小时,使用Terascan VPC2(Minerva Tech)测定培养前和培养后的荧光值。钙黄绿素的自然游离是共培养灭活PBMC(在设定为80 $^{\circ}$ C的热块上加热15分钟以上)以代替效应细胞。同样最大游离使用在灭活PBMC中以6%的浓度加入了IGEPAL CA-630(MP Biomedicals)(NonidetP-40等效物)而得的鸡尾酒。细胞毒性率通过以下的计算方法算出。

[0565] 细胞毒性率(%) = (实验组的游离量 - 实验组的自然游离量) / (实验组的最大游离量 - 实验组的自然游离) \times 100

[0566] (b)GPC3 CAR-T细胞使用所制作的GC33 CAR γ δ T细胞作为效应细胞。该细胞使用表达CAR的逆转录病毒载体,该CAR来自中外罗氏集团开发的针对GPC3的特异性抗体GC33,向唑来膦酸刺激培养第6天的健康人PBMC中引入CAR,通过阳性细胞的单一分选,制作了表达CAR的Vg9阳性 γ δ T细胞的克隆。靶细胞使用在不表达GPC3的肝癌细胞株SK-Hep-1细胞株中强制表达人GPC3全长序列基因(hGPC3)的细胞株SK/hGPC3,使用经空载体转化的细胞株(SK/vec)作为阴性对照。靶细胞的钙黄绿素染色、毒性率的计算按照与上述相同的方法进行。

[0567] (c)按照与(a)、(b)相同的方法将细胞染色,进行测量。摘出在免疫缺陷小鼠中维持/肿大的PDX作为靶细胞,用剪刀尽可能地剪切组织后,用人肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec)分散后,进行红细胞的去除处理后使用。

[0568] (d)对与(c)同样地调整的来自PDX的细胞和EPHB4 CAR-T细胞或事先通过PHA刺激激活的母细胞进行共培养后,对CD8阳性细胞中的CD107a阳性细胞进行流式细胞术分析。

[0569] 图65(a)PDX模型是向SCID/Beige小鼠(大肠癌肝转移PDX)和NSG小鼠(头颈癌PDX模型)中移植调整为5mm见方的各PDX而制作的。关于肿瘤的大小,使用卡尺测量长径以及短径,以面积(b)或体积(d)的形式算出。(c)、(e)在免疫组织学分析中,如上所述制作了FFPE薄切标本。简而言之,采集各脏器后,在4%PFA中浸泡18-24小时,之后用PBS(-)洗涤PFA。在70%乙醇中浸泡一夜以上,之后进行石蜡包埋,制作了石蜡块。将块薄切至4 μ m后贴在载玻片上,干燥后,进行各种染色。DAB染色使用适合于一次抗体的聚合物试剂(聚合物试剂:EnVision+System-HRP标记聚合物抗兔或EnVision+System-HRP标记聚合物抗小鼠)以及显色试剂(液体DAB+底物显色系统)。用苏木精进行对比染色后,标本通过NanoZoomer(Hamamatsu Photonics K.K.)制成虚拟载玻片。多重荧光免疫组织化学染色也是依据上述方法,使用针对各抗原的抗体EPHB4(Cell Signaling Technology公司)、人CD8(Leica Biosystems公司)、CD3(abcam公司)、Cleaved Caspase-3(Cell Signaling Technology公司)、作为二次抗体的聚合物试剂(EnVision+System-HRP标记聚合物抗兔或EnVision+System-HRP标记聚合物抗小鼠),荧光色素使用Opal 520、540、570、620、650、690(AKOYA BIOSCIENCES公司),用Vectra3(PerkinElmer)进行观察。

[0570] <结果>

[0571] 图64显示CAR-T细胞的体外细胞毒性评价。

[0572] (a) EPHB4 CAR-T细胞对EPHB4阳性肿瘤细胞株的细胞毒性。确认了:对于表达EPHB4的横纹肌肉瘤细胞株(Rh30)和肝内胆管癌细胞株(SSP25),细胞毒性均依赖于E:T比而增加。

[0573] (b) GPC3 CAR-T的细胞毒性评价。对于强制表达人GPC3全长序列基因(hGPC3)的细胞株SK/hGPC3, GPC3 CAR-T细胞的细胞毒性依赖于E:T比而增加。

[0574] (c) EPHB4 CAR-T细胞对EPHB4阳性PDX细胞的细胞毒性。以EPHB4 CAR-T细胞为效应细胞、以PDX细胞为靶细胞,比较了以各E:T比反应8小时后的细胞毒性率。通过提高E:T比,细胞毒性率提高,在E/T=10时显示出最强的细胞毒性率。右侧的图表示E/T=10时的内窥镜照片。

[0575] (d) 确认EPHB4 CAR-T细胞对EPHB4阳性PDX细胞的细胞毒性应答。将EPHB4 CAR-T细胞和通过PHA刺激激活的母细胞分别与EPHB4阳性PDX细胞共培养,测定识别抗原并显示脱颗粒的CD107a分子在细胞表面的暴露。仅在EPHB4 CAR-T细胞中观察到CD107a的暴露,因此可知抗原特异性地诱导了细胞毒活性。

[0576] 图65显示CAR-T细胞的体内细胞毒性评价。

[0577] (a) 通过移植EPHB4阳性PDX制作模型动物(大肠癌肝转移/头颈癌)。在移植各模型PDX后7天移入EPHB4 CAR-T细胞,再于第二天(大肠癌肝转移模型)/第三天(头颈癌模型)追加移入。对照组移入生理盐水。

[0578] (b) 大肠癌肝转移PDX模型的肿瘤尺寸(面积)的变化。在CAR-T细胞移入组肿瘤的肿大得到抑制。(c) 确认EPHB4在大肠癌肝转移PDX模型的PDX区的表达。在移入CAR-T细胞后6天采集肿瘤部(PDX),之后在FFPE薄切样品中通过DAB染色确认EPHB4的表达。在CAR-T细胞移入组观察到EPHB4的消失。(d) 头颈癌PDX模型的肿瘤尺寸(面积)的变化。在CAR-T细胞移入组肿瘤的肿大得到抑制。(e) 头颈癌PDX模型中的PDX区的免疫组织学分析。除右下图以外,通过DAB染色和苏木精染色进行评价。在CAR-T细胞移入组第15天仍可确认到hCD3、hCD8,暗示CAR-T细胞的存在。另外,在移入组EPHB4的表达消失,与对照相比,还可强烈确认到作为细胞凋亡标志物的激活型Caspase 3(C-Caspase 3)的表达(上图)。左下图中,在确认到hCD8的区域EPHB4的表达降低,在进行多重免疫组织染色的右下图中也确认到C-Caspase3的表达(*部)。

[0579] 图66显示鸡尾酒CAR-T治疗的开发。

[0580] 利用5种膜蛋白通用癌抗原中的任一种在大部分癌组织中表达的事实,我们制作了表达多个CAR分子的鸡尾酒CAR-T细胞,旨在开发组合或比例最优化的鸡尾酒CAR-T治疗。由此,对于癌症异质性或患者间差异等问题,可在多个方面进行应对,可有效且高效地抑制癌的生长或诱导T细胞的浸润等。

[0581] 实施例13:通过各种癌细胞株中的膜蛋白通用癌抗原的表达分析/利用针对膜蛋白通用癌抗原的抗体检测血中循环癌细胞来开发癌症发病风险诊断方法

[0582] <方法>

[0583] 用0.05%胰蛋白酶-EDTA剥离肝细胞癌细胞株(HepG2、Hep3B、HuH-7、PLC/PRF/5、JHH-2、JHH-4、JHH-5、JHH-6、JHH-7)、肝内胆管癌细胞株(RBE、SSP-25)、大肠癌细胞株(HCT116、Lovo、colo201、HT29、WiDr、SW480、CaC02)、胰腺癌细胞株(Panc1、AsPC1、PK1、PK9)、肺癌细胞株(RERF-LC-AI、LK-2、II-18、A549、LU99、H1975、Lu-135、NCI-H446)、乳腺癌

细胞株 (MDA-MB-231、MCF7)、宫颈癌细胞株 (HeLa)、卵巢癌细胞株 (KOC-7C、NOY1、NOY2、RMG-II、RMUG-S)、肾细胞癌细胞株 (Caki-1、ACHN、RCC7)、恶性黑色素瘤细胞株 (A375m1、SKmel23)、口腔癌细胞株 (SAS、Ca9-22、HSC2、HSC3)、胃癌细胞株 (MKN74、MKN45、KATO-3)、淋巴瘤细胞株 (Raji、K562) 后,在FACS缓冲液 (PBS+2%FCS) 中用Fc block (BD Biosciences、10倍稀释) 处理20分钟,再用PE标记的抗EpCAM抗体 (Miltenyi、100倍稀释)、PE标记的抗细胞表面Vimentin (CSV) 抗体 (Abnova、克隆:84-1、100倍稀释)、APC标记的抗人GPC3抗体 (Sino Biological、克隆:024、10倍稀释)、AF647标记的抗人ROB01抗体 (R&D、克隆:770502、50倍稀释)、AF647标记的抗人Claudin-1抗体 (R&D、克隆:421203、25倍稀释)、AF647标记的抗人EphB4抗体 (Miltenyi、克隆:REA923、50倍稀释) 分别染色20分钟,用FACS Canto (BD Biosciences) 进行分析。

[0584] <结果>

[0585] 上述结果见图67和图68。

[0586] 肝细胞癌细胞株HepG2除表达EpCAM、CSV以外,还表达所有4种膜蛋白通用癌抗原GPC3、ROB01、CLDN1、EPHB4。

[0587] 将来自各种癌症类型的50种细胞株用针对这些抗原的抗体染色时,作为现有CTC标志物的EpCAM或CSV几乎不表达的7种细胞株在细胞膜上表达4种膜蛋白通用癌抗原GPC3、ROB01、CLDN1、EPHB4中的任一种。这显示了通过并用这4种膜蛋白通用癌抗原原来捕获在现有的CTC标志物中逃逸的CTC的可能性。

[0588] <方法>

[0589] 使用EDTA-2K采血管从肿瘤摘出手术的3天后的肝细胞癌患者采集了约5mL的外周血。向悬浮于PBS的肝细胞癌细胞株HepG2和大肠癌细胞株HCT116中加入1/2体积量的用PBS调节至0.1 μ g/mL的钙黄绿素-AM (DOJINDO),在37°C下标记15分钟。向患者的一半的外周血中各添加 1×10^3 个钙黄绿素标记的HepG2和HCT116。向添加有癌细胞株的外周血和未添加外周血中加入3倍体积量的RBC裂解缓冲液 (GBIOSCIENCES),在室温下溶血10分钟。将剩下的细胞悬浮于1mL的MACS缓冲液 (PBS+0.5%BSA+2mM EDTA),加入250 μ L的CD45 Dynabeads和250 μ L的CD15 Dynabeads,在4°C下搅拌1小时后,利用磁石去除CD45阳性细胞和CD15阳性细胞。将剩下的细胞在室温下用经PBS稀释了1200倍的zombie-NIR染色15分钟后,在FACS缓冲液中用Fc block (BD Biosciences、10倍稀释) 处理20分钟,再用PerCP标记的抗CD45抗体 (Miltenyi、50倍稀释)、PE标记的抗EpCAM抗体 (Miltenyi、100倍稀释)、PE标记的抗细胞表面Vimentin (CSV) 抗体 (Abnova、100倍稀释)、APC标记的抗人GPC3抗体 (Sino Biological、10倍稀释)、AF647标记的抗人ROB01抗体 (R&D、50倍稀释)、AF647标记的抗人Claudin-1抗体 (R&D、50倍稀释)、AF647标记的抗人EphB4抗体 (Miltenyi、50倍稀释)、Hoechst33342 (DOJINDO、30 μ g/mL) 染色20分钟,用FACS Melody (BD Biosciences) 进行分析。

[0590] <结果>

[0591] 上述结果见图69。

[0592] 在肝细胞癌或大肠癌的多个病例中,在切除手术的术前或术后 (第1天或第3天) 采集的5-10mL血液样本中检测到了不使现有的CTC标志物即EpCAM和CSV表达、而在细胞膜上表达4种膜蛋白通用癌抗原GPC3、ROB01、CLDN1、EPHB4中的任一种的CTC样细胞,由此显示:通过除现有的CTC标志物以外还加入了GPC3、ROB01、CLDN1、EPHB4,CTC样细胞的检测灵敏度

增加。

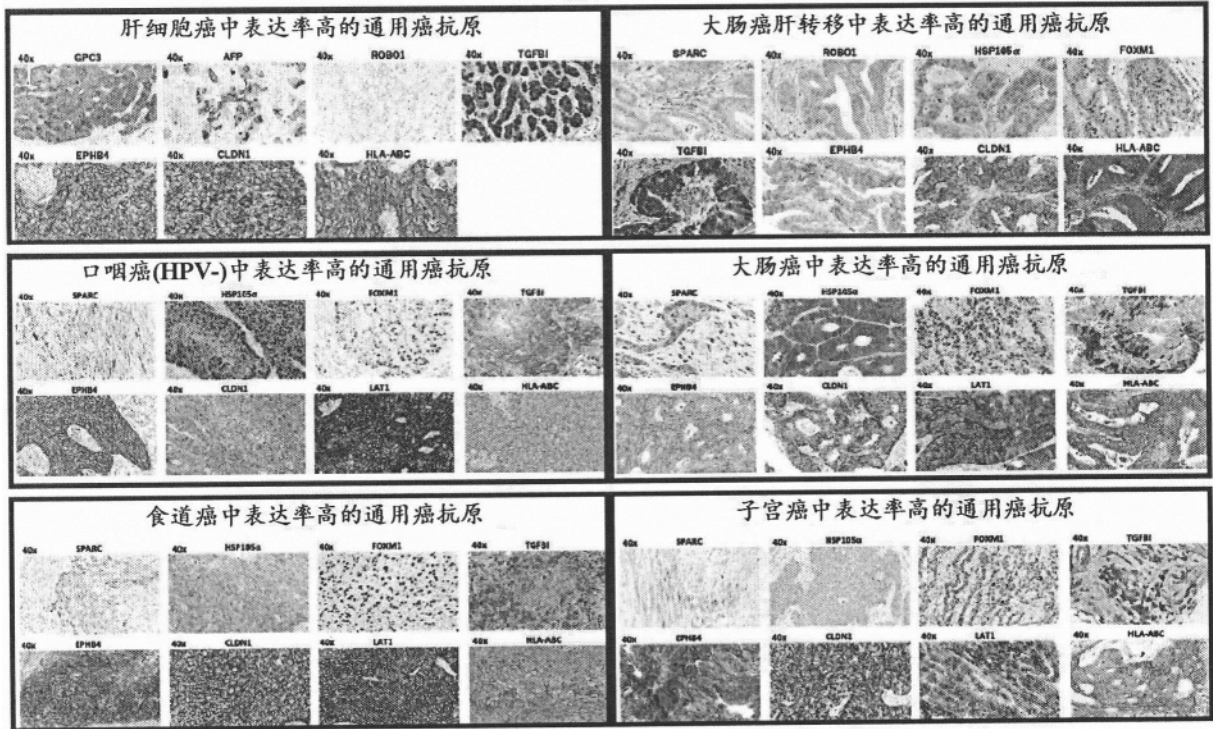


图1

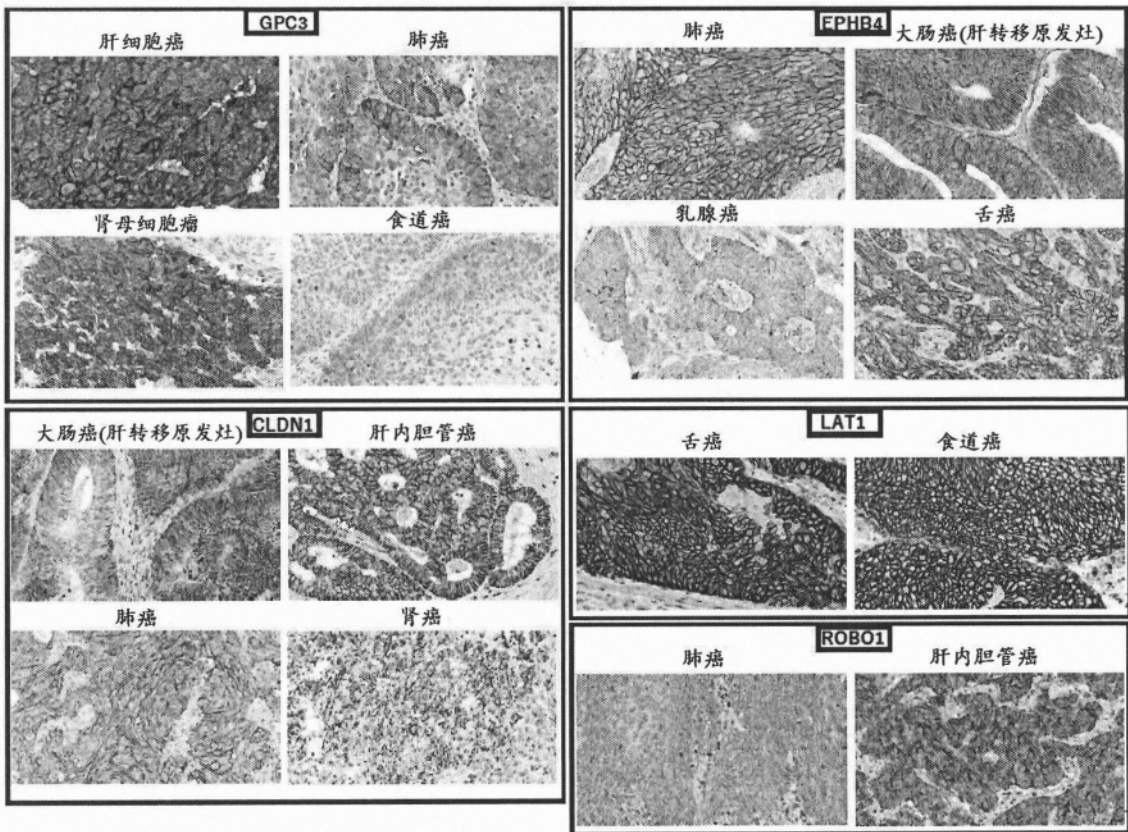


图2

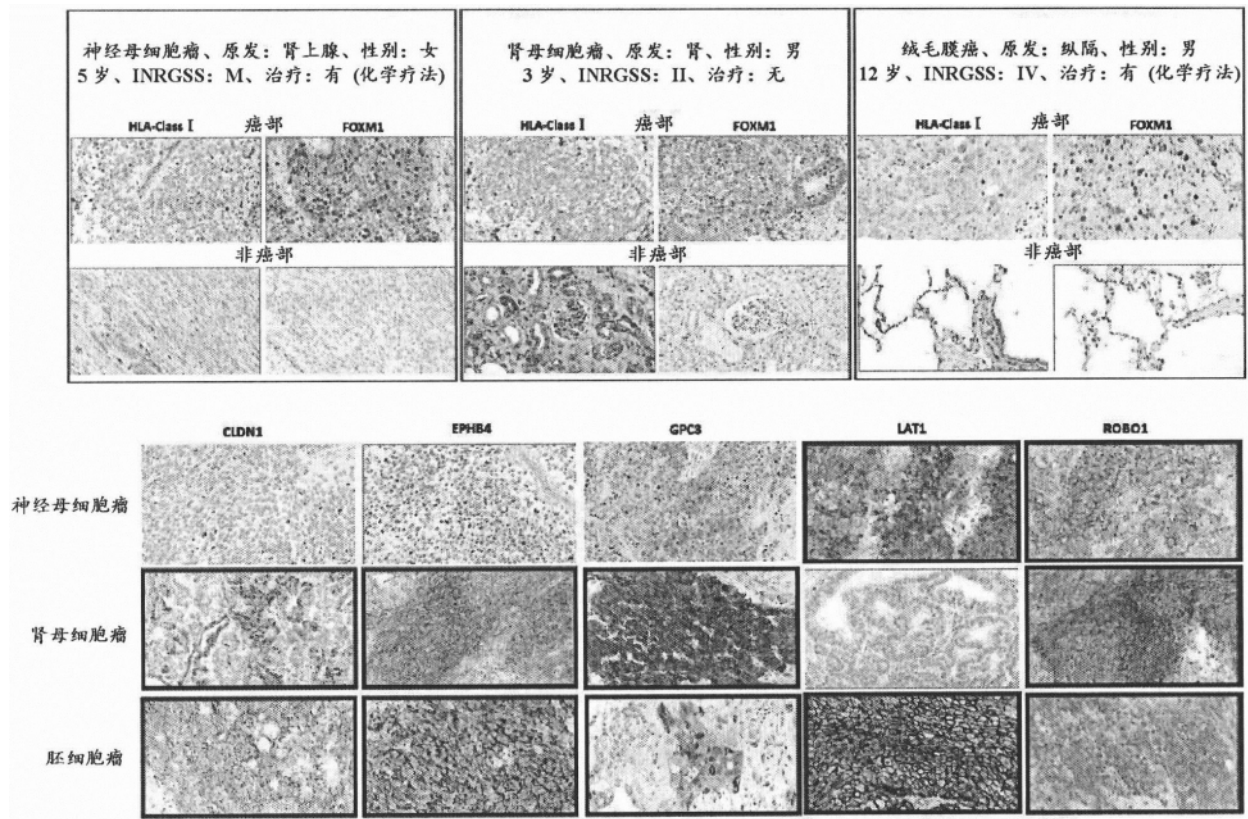


图3

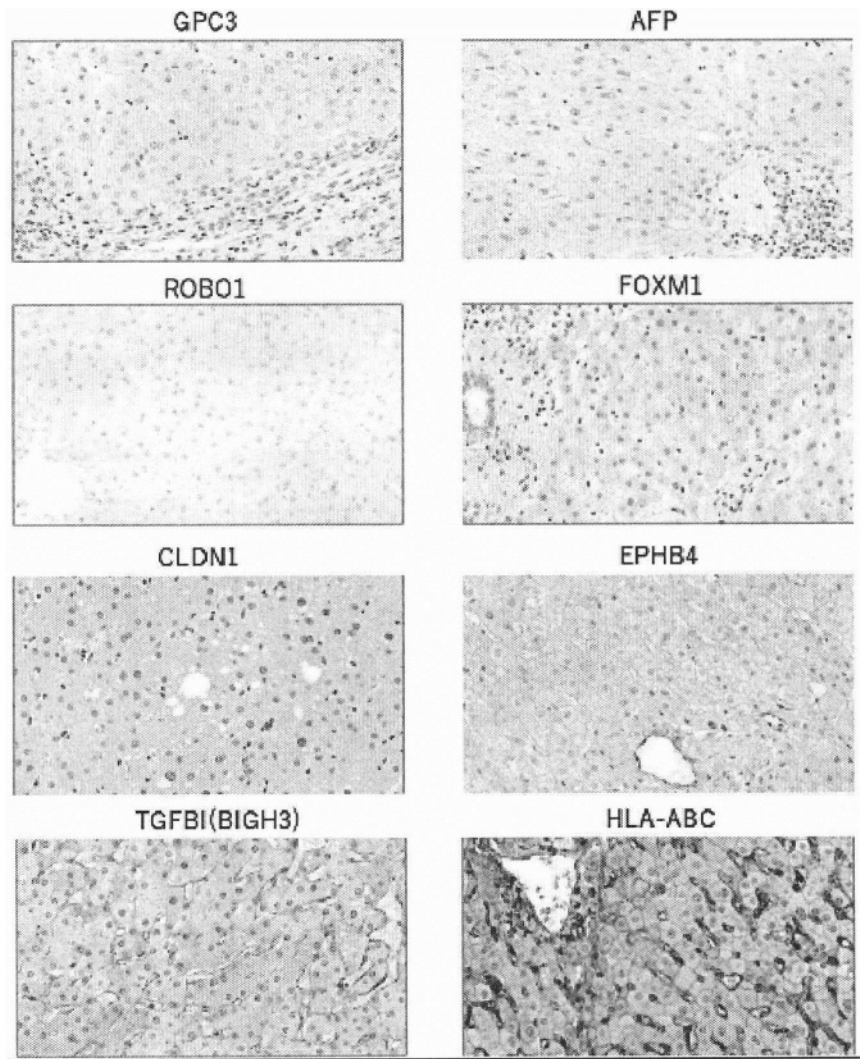


图4

通过 BioChain 公司制造的人正常组织微阵列得到的
细胞膜表达型通用癌抗原的正常组织表达一览表

No.	脏器	GPC3	ROBO1	CLDN1	EPHB4	LAT1
1	胎盘	+	+	-	+	+
2	食道	-	-	-	-	+
3	直肠	-	-	-	+	?
4	胆囊	-	+	-	+	?
5	皮肤	-	+	+	+	+
6	脂肪	-	-	-	-	-
7	心脏	-	-	-	-	-
8	骨骼肌	-	-	-	-	-
9	膀胱	-	-	-	+	-
10	回肠	-	-	-	+	-
11	脾脏	-	-	-	+	-
12	脑	-	-	-	+	+
13	空肠	-	-	+	+	-
14	胃	-	-	-	+	-
15	乳房	-	-	-	+	?
16	肾脏	+	+	-	+	-
17	睾丸	-	+	-	+	+
18	小脑	-	+	-	+	+
19	肝脏	-	-	-	-	-
20	胸腺	-	-	-	+	-
21	颈部	-	-	-	+	-
22	肺	-	-	-	-	-
23	平滑肌	-	-	-	-	-
24	结肠	-	-	-	+	-
25	卵巢	-	-	-	+	-
26	扁桃体	-	+	-	-	+
27	横膈膜	-	-	-	-	-
28	胰腺	-	+	+	+	-
29	子宫	-	-	?	+	-
30	十二指肠	-	+	-	+	-
31	甲状腺	-	+	?	-	-

-: 明确的阴性

+: 观察到某个信号

?: 因在染色过程中剥离而表达不明确

图5

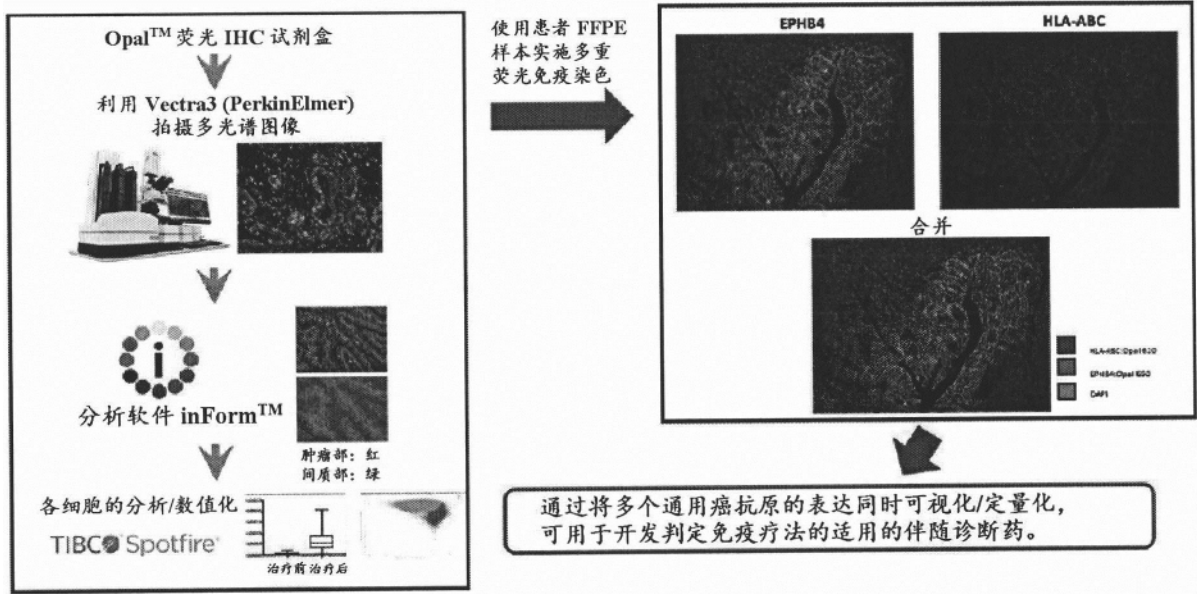


图6

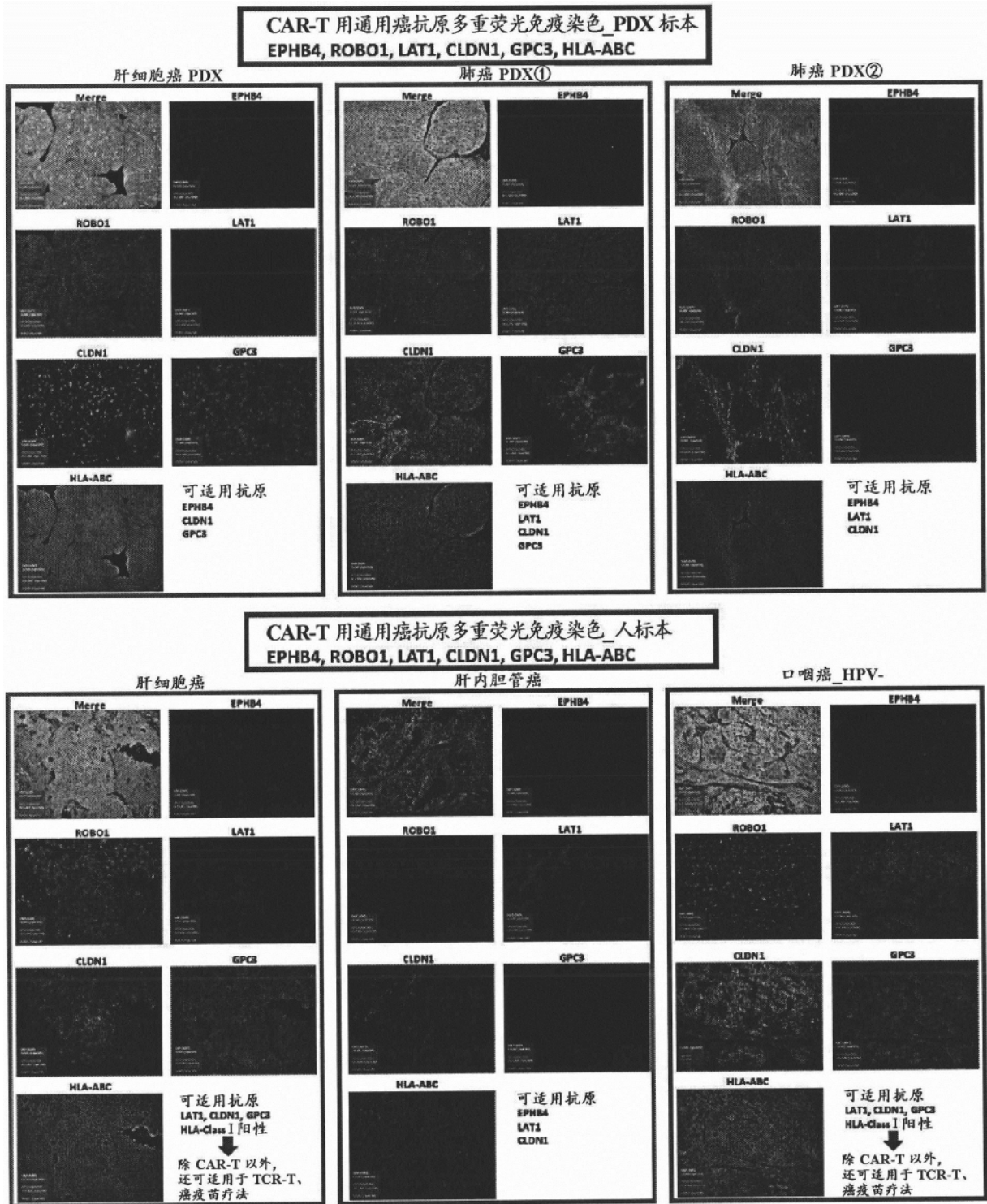


图7

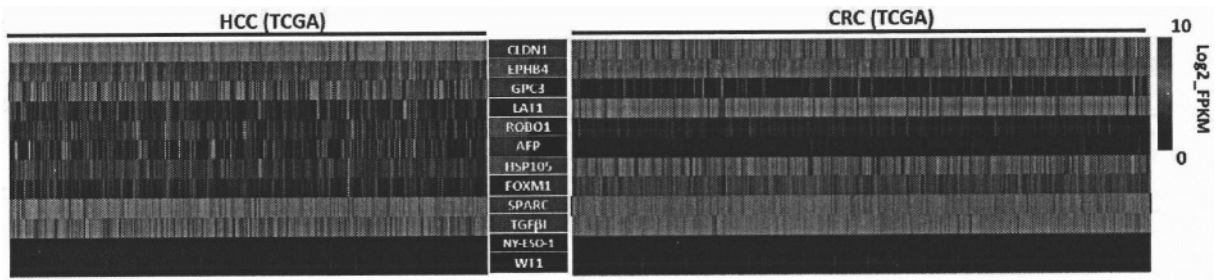


图8

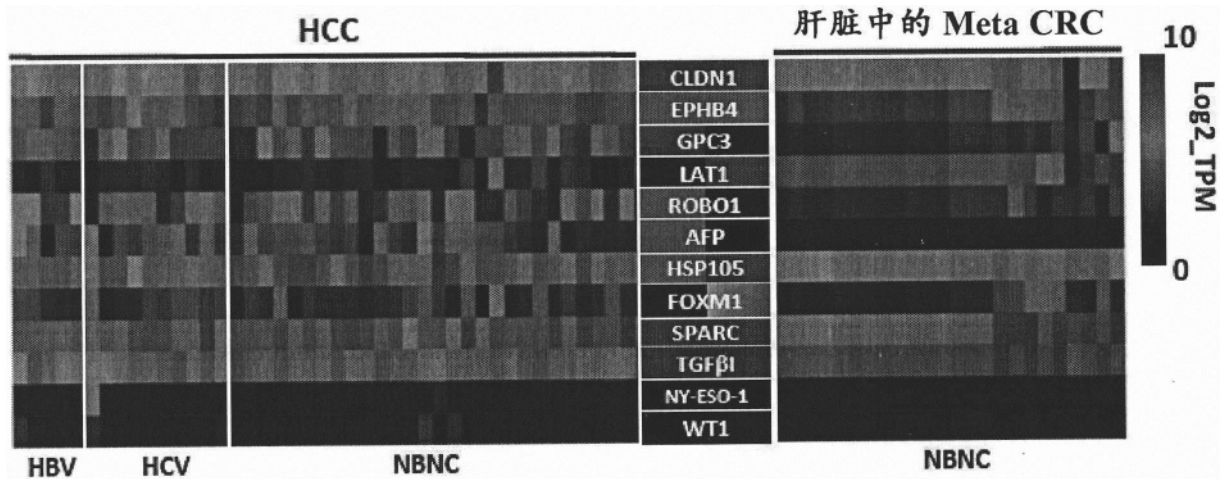


图9

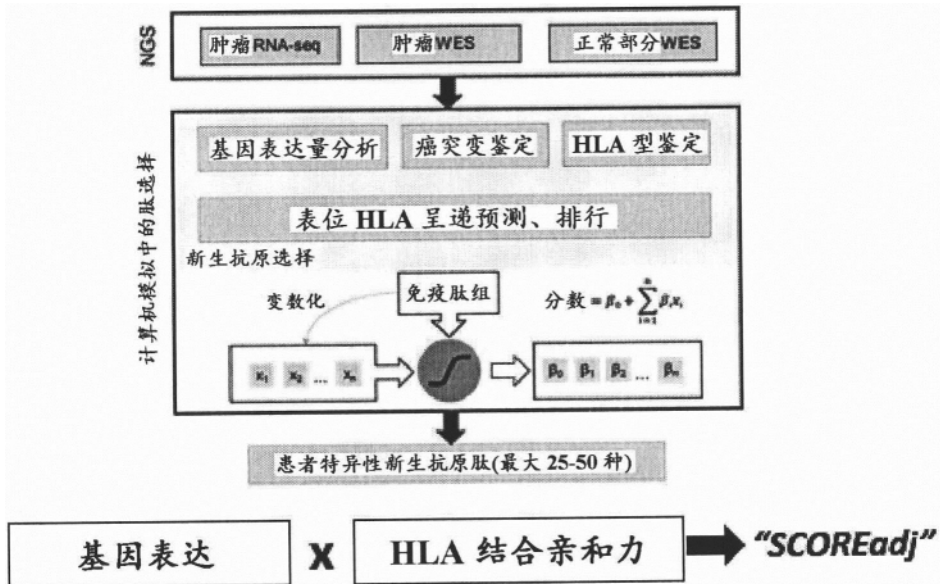


图10

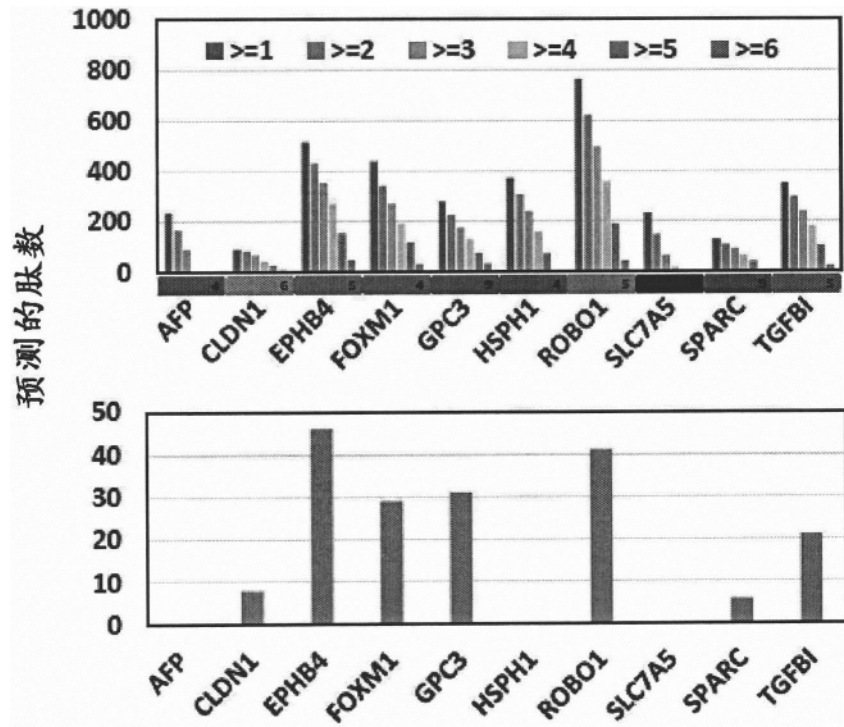


图11

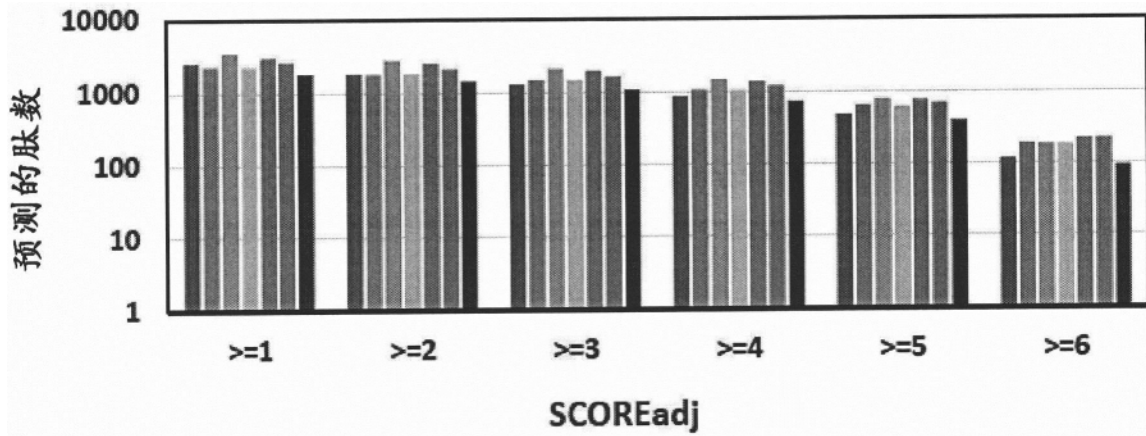


图12

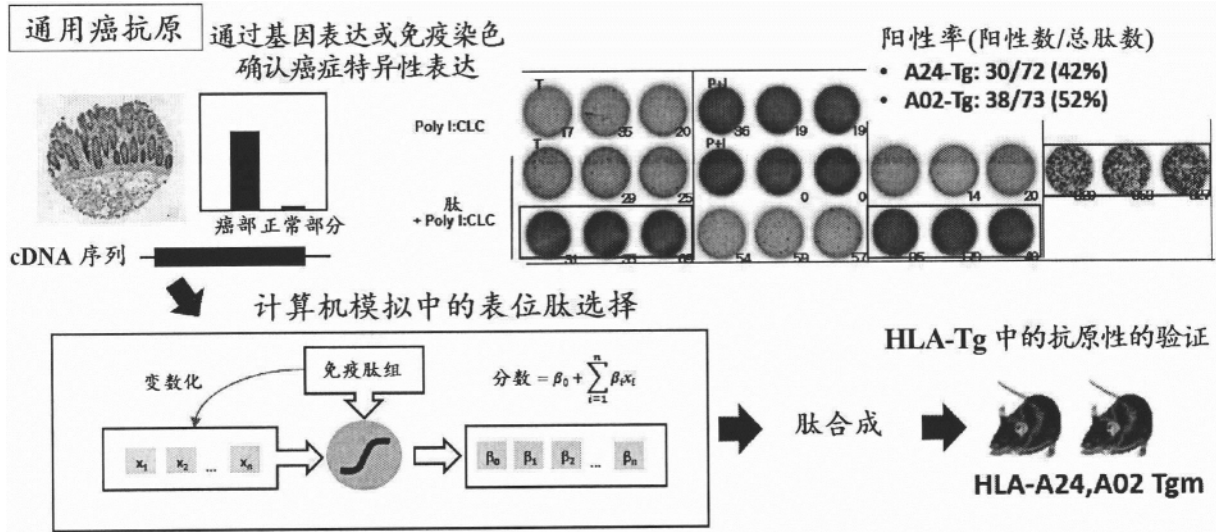


图13

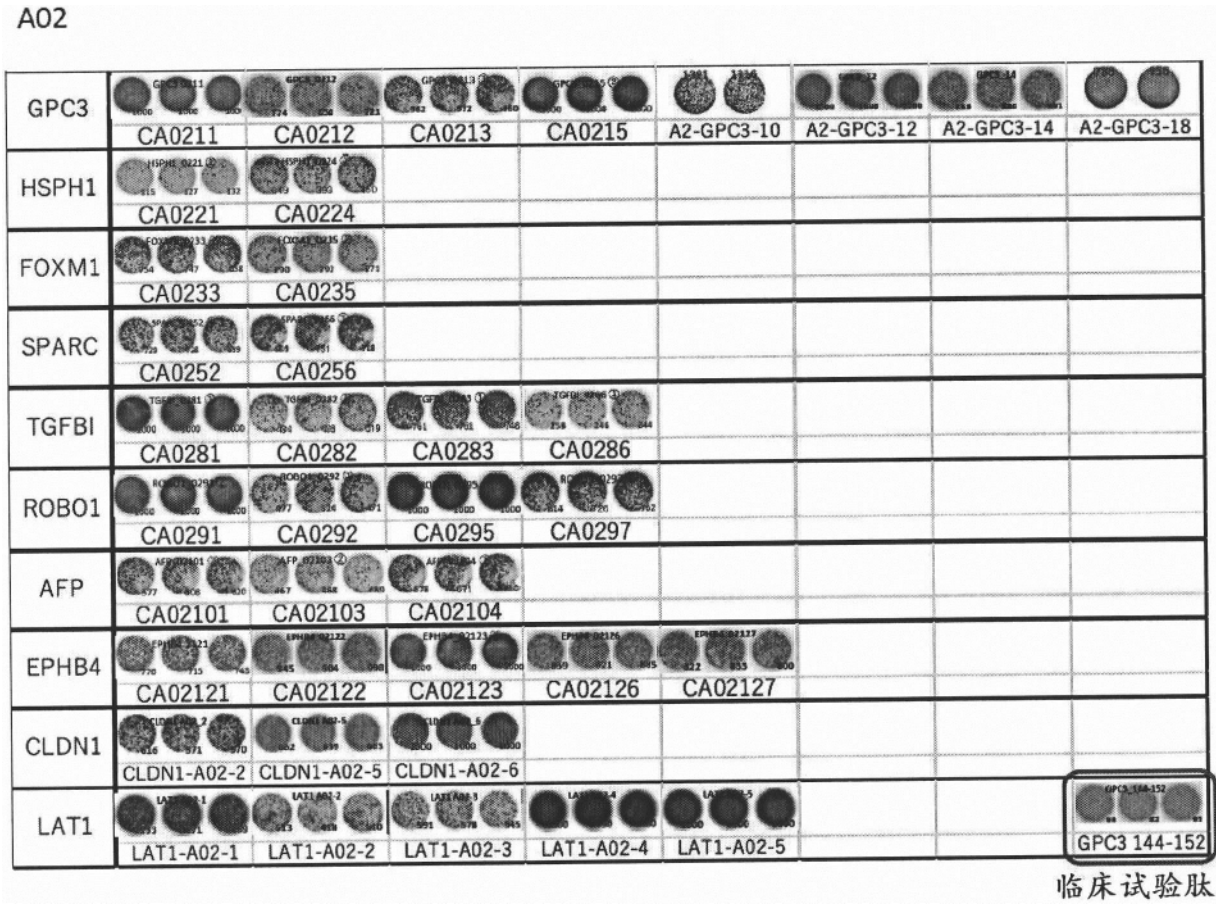










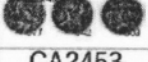
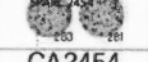
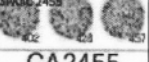
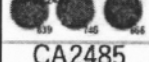
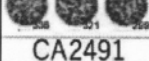



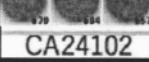

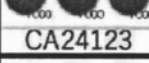
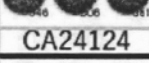
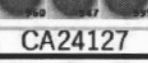
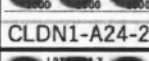
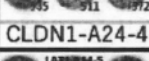
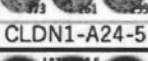
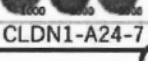
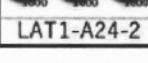
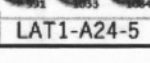
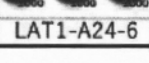
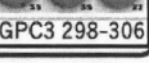


图14

A24

GPC3	 A24-GPC3-06	 A24-GPC3-10	 A24-GPC3-11	 A24-GPC3-17	
HSPH1	 CA2421				
FOXM1	 CA2431	 CA2432	 CA2434		
SPARC	 CA2451	 CA2452	 CA2453	 CA2454	 CA2455
TGFBI	 CA2485				
ROBO1	 CA2491	 CA2495	 CA2497	 CA2498	
AFP	 CA24102	 CA24105			
EPHB4	 CA24123	 CA24124	 CA24127		
CLDN1	 CLDN1-A24-2	 CLDN1-A24-4	 CLDN1-A24-5	 CLDN1-A24-7	
LAT1	 LAT1-A24-2	 LAT1-A24-5	 LAT1-A24-6	 GPC3 298-306	

临床试验肽

图15

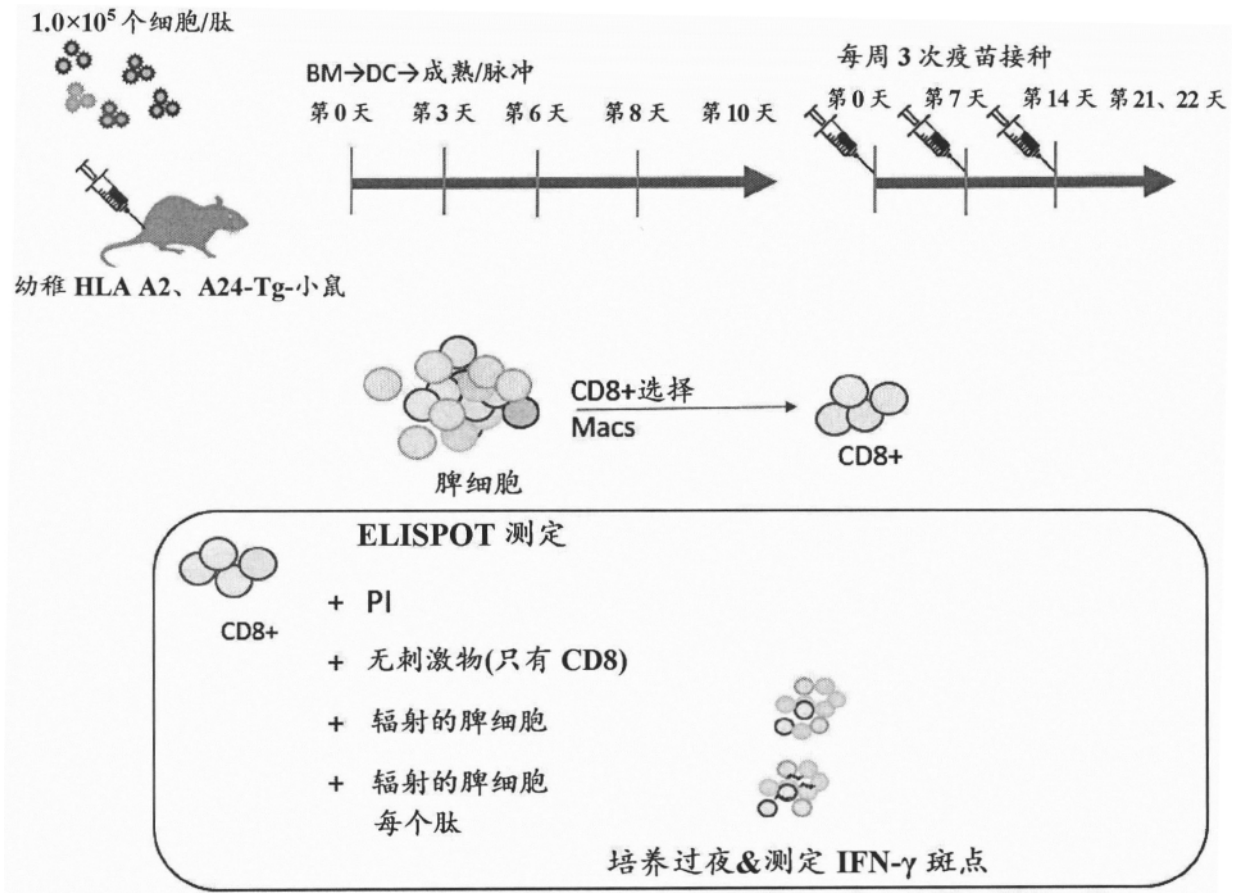


图16

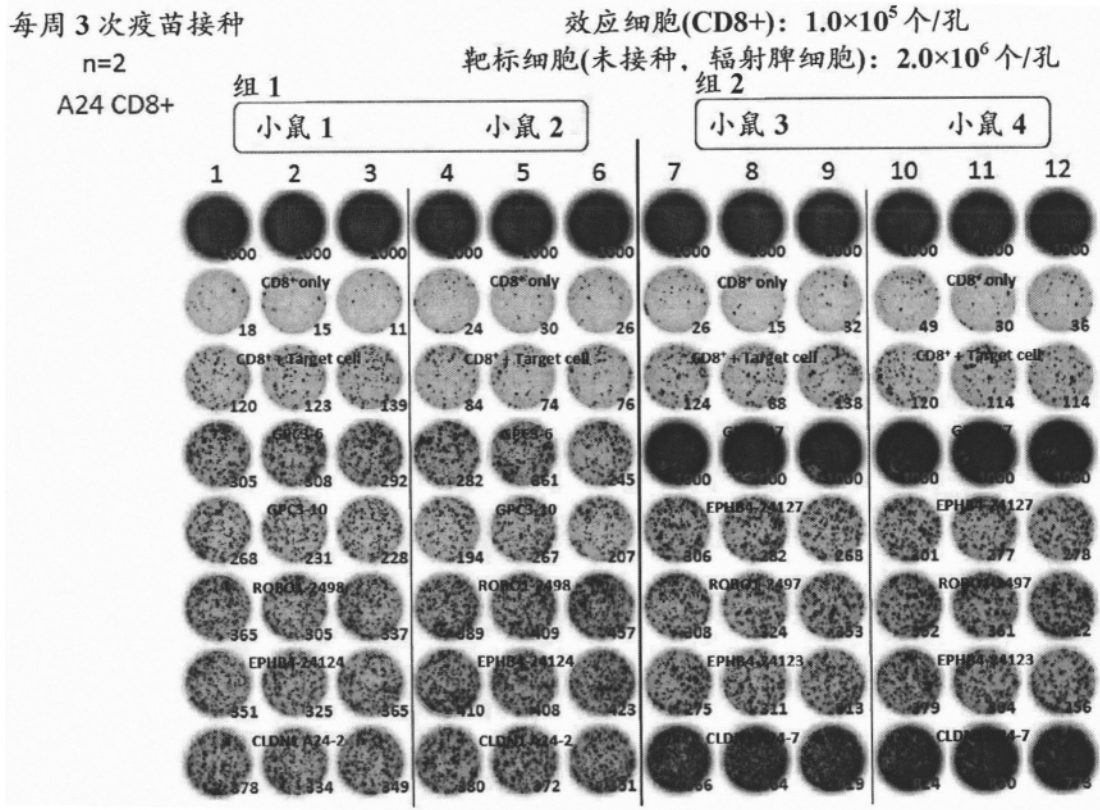


图17

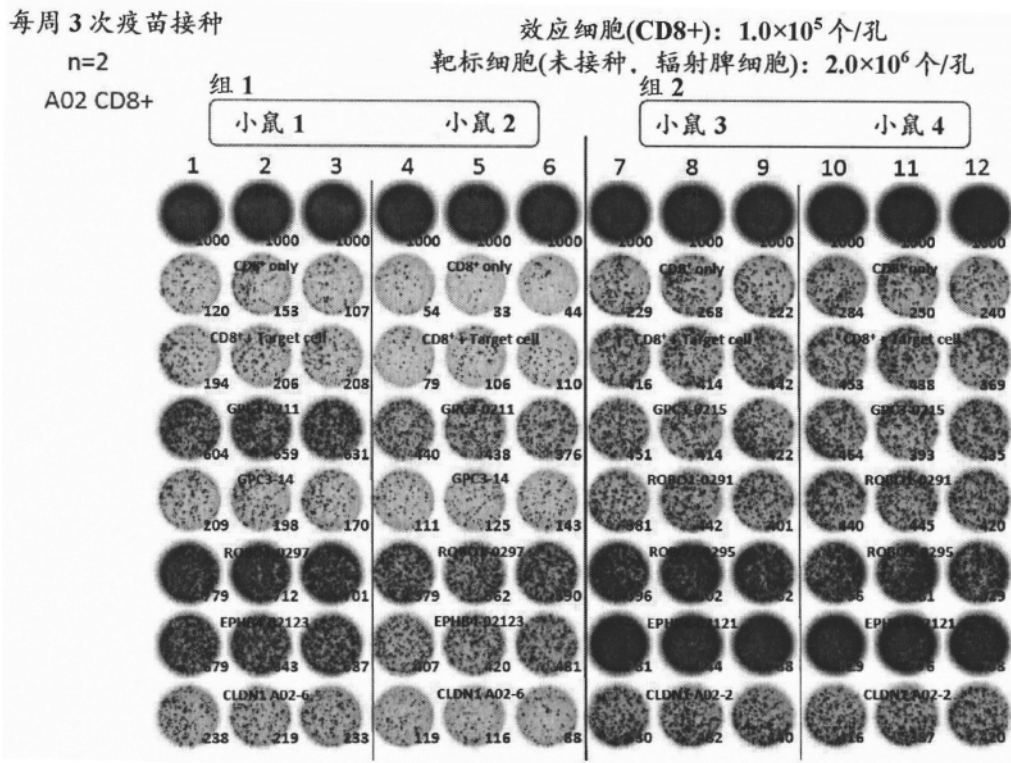


图18

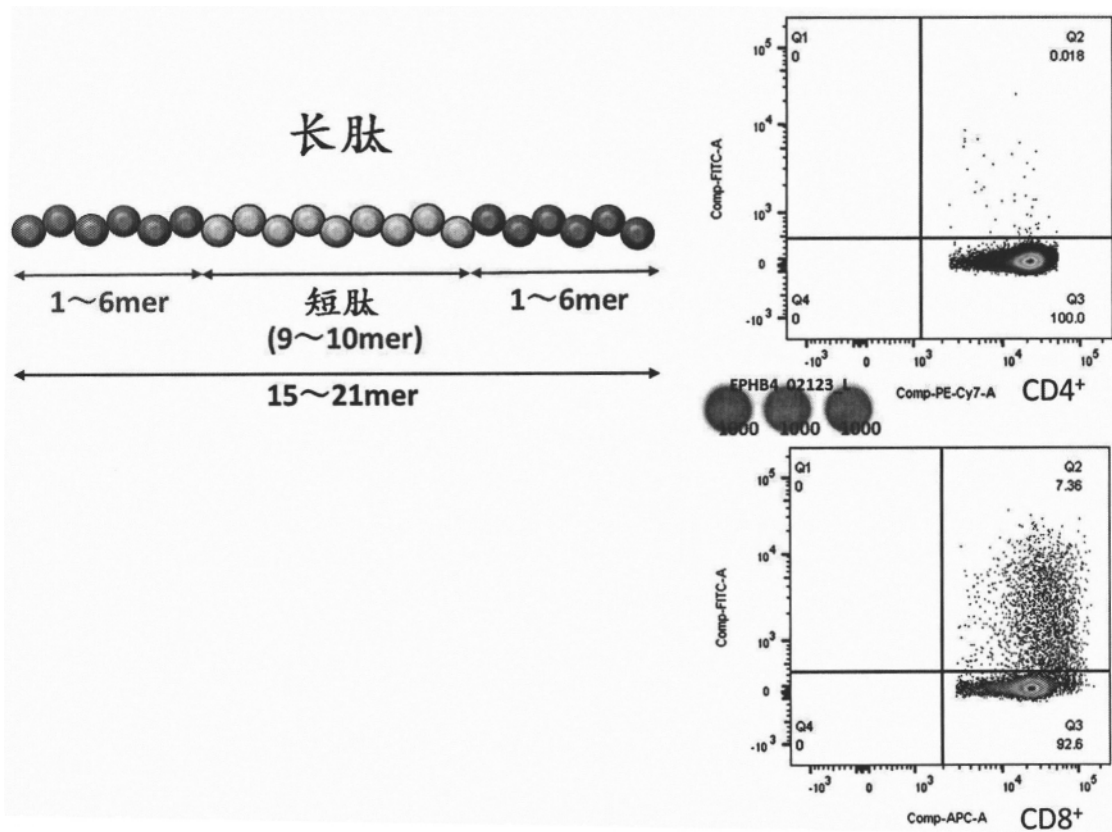


图19

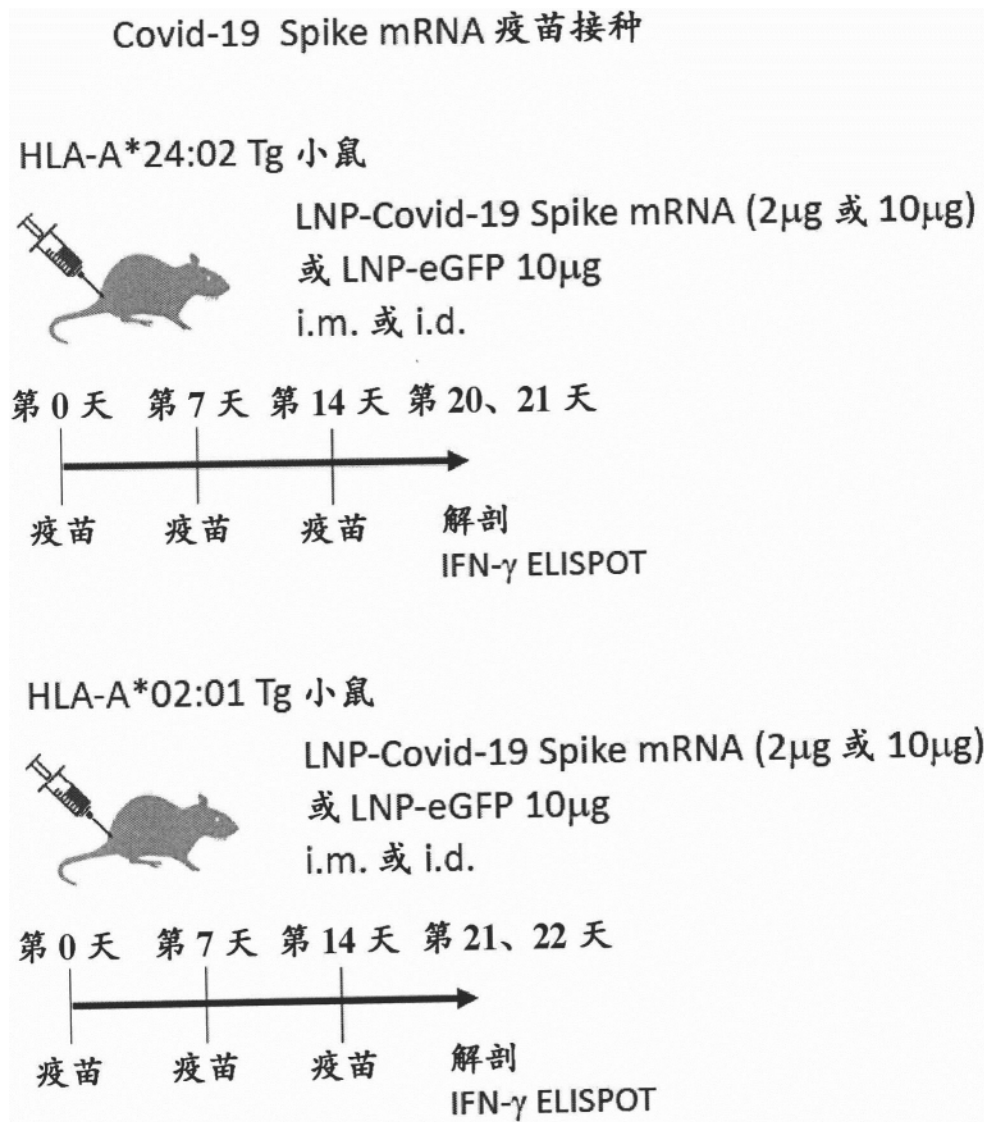


图20

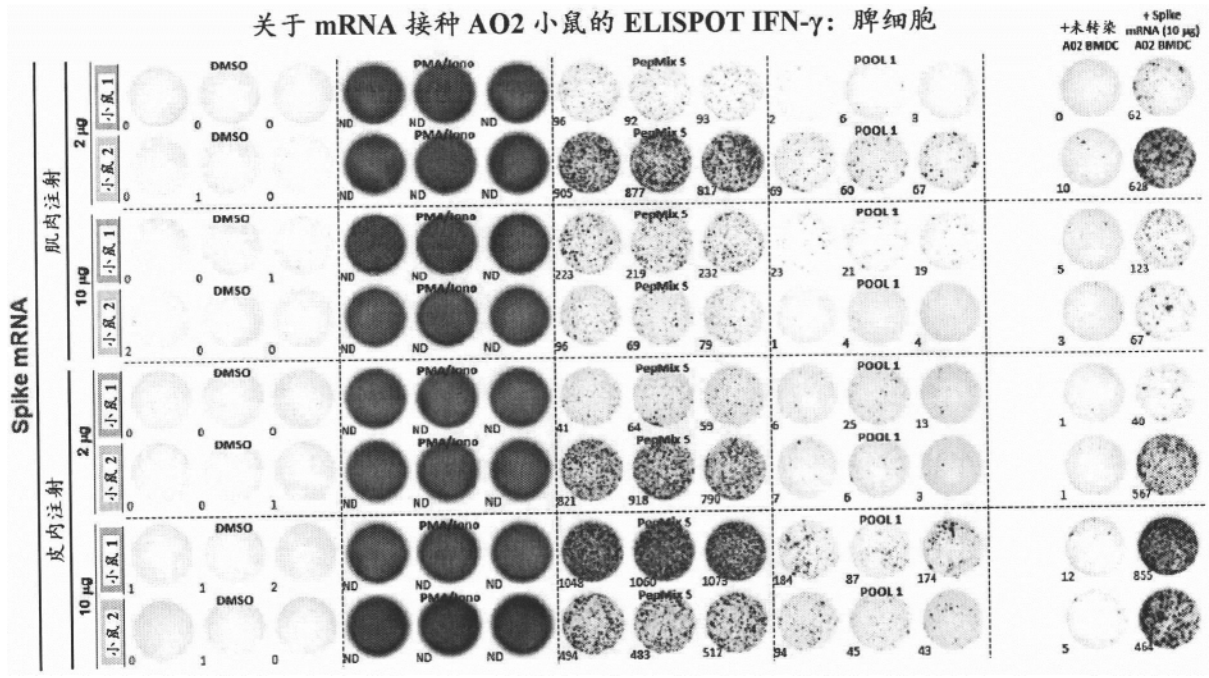


图21

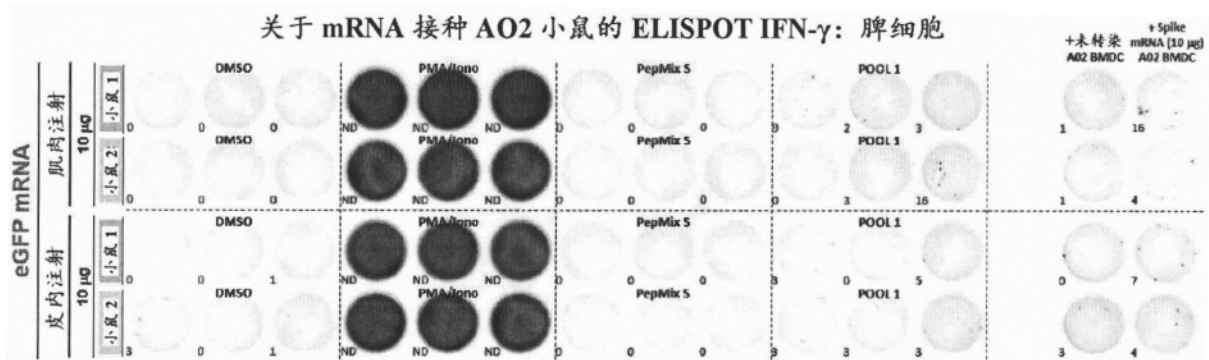


图22

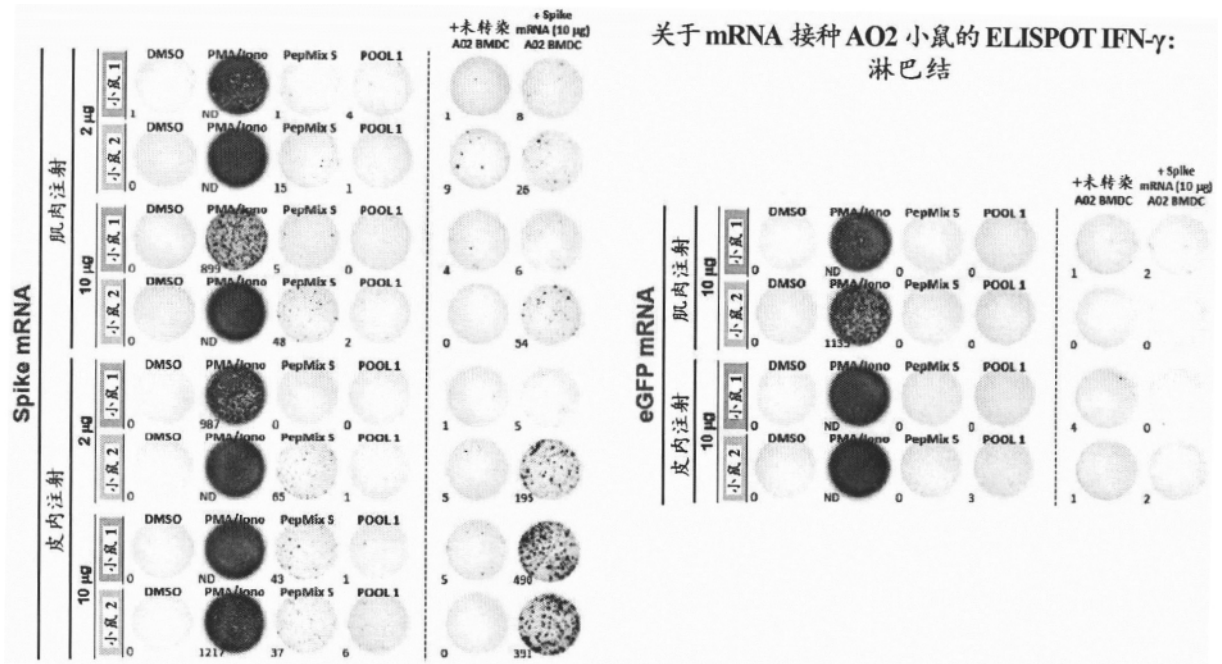


图23

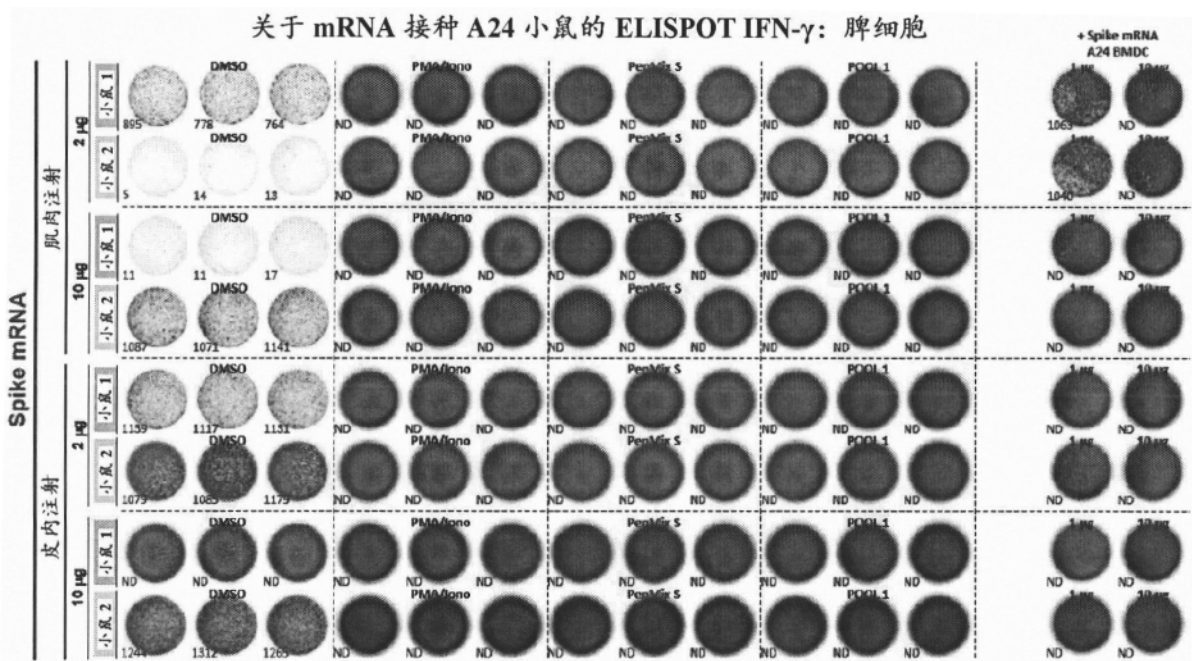


图24

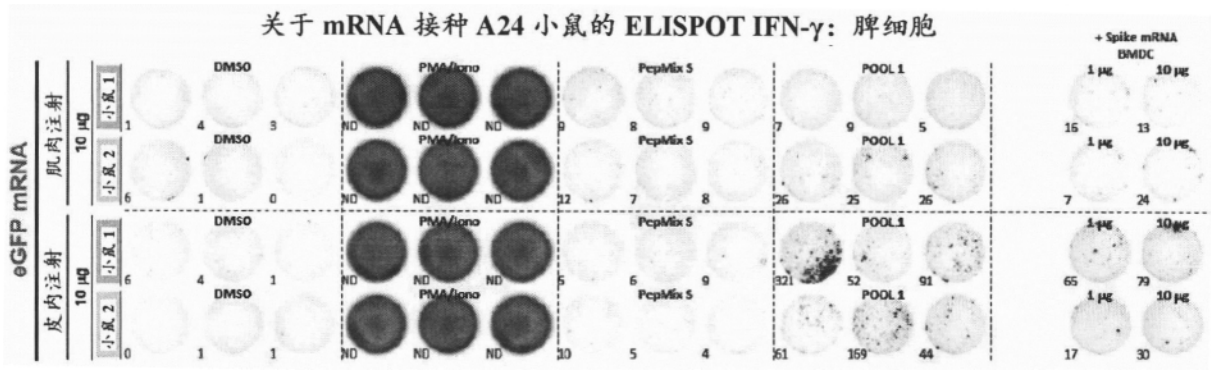


图25

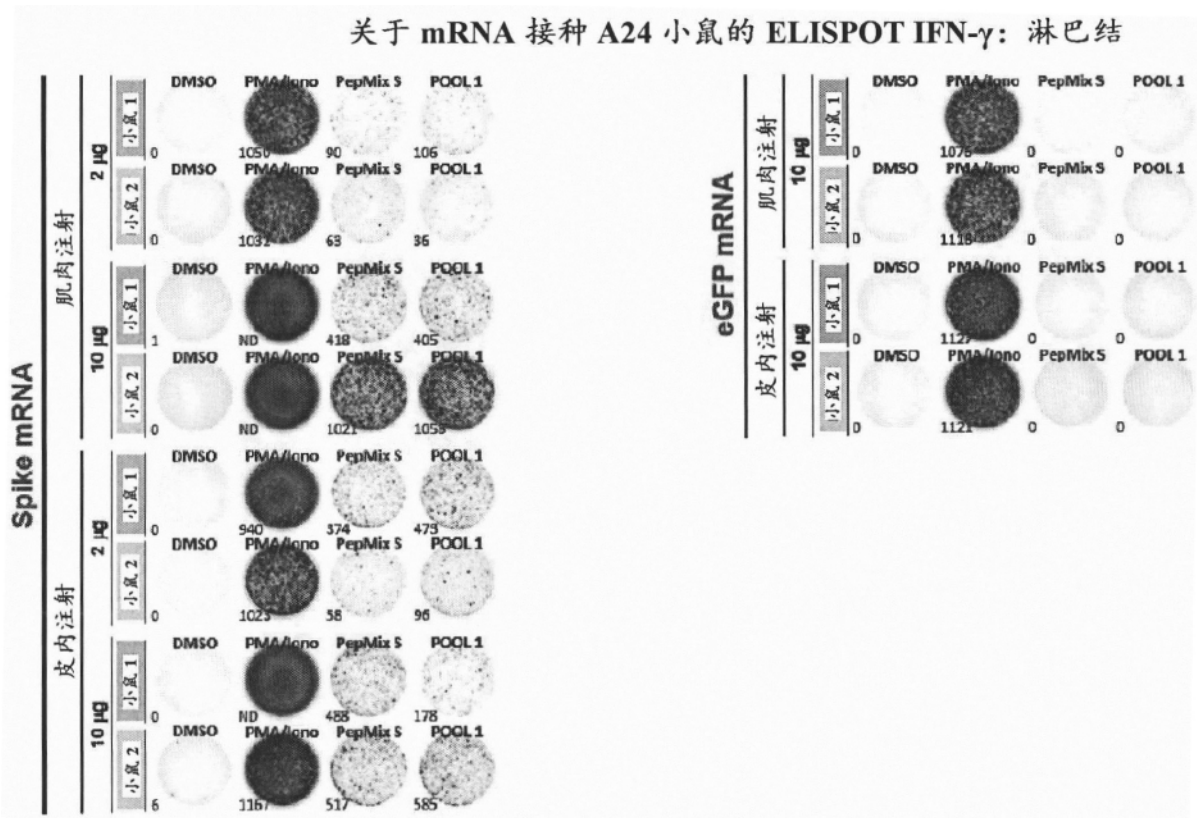


图26

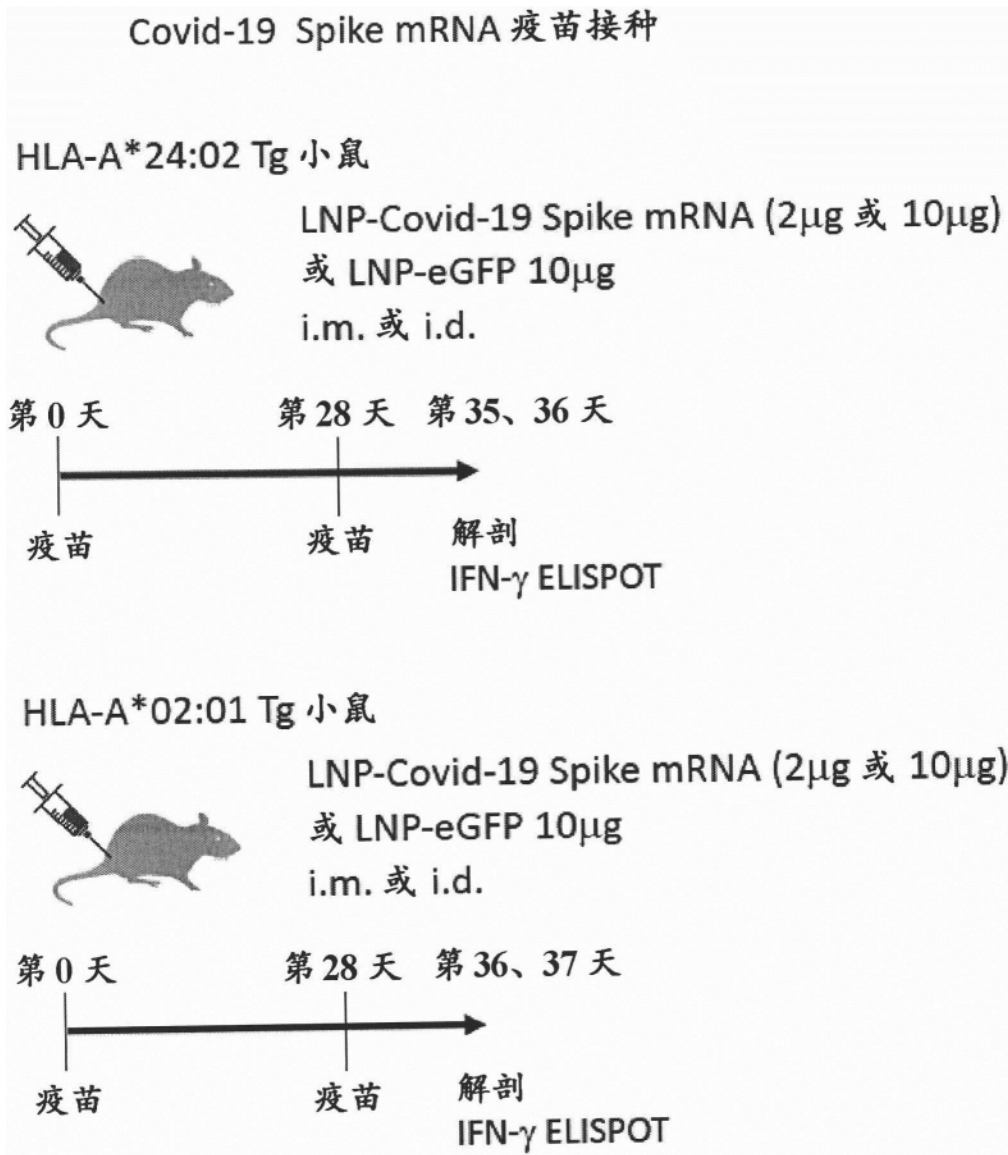


图27

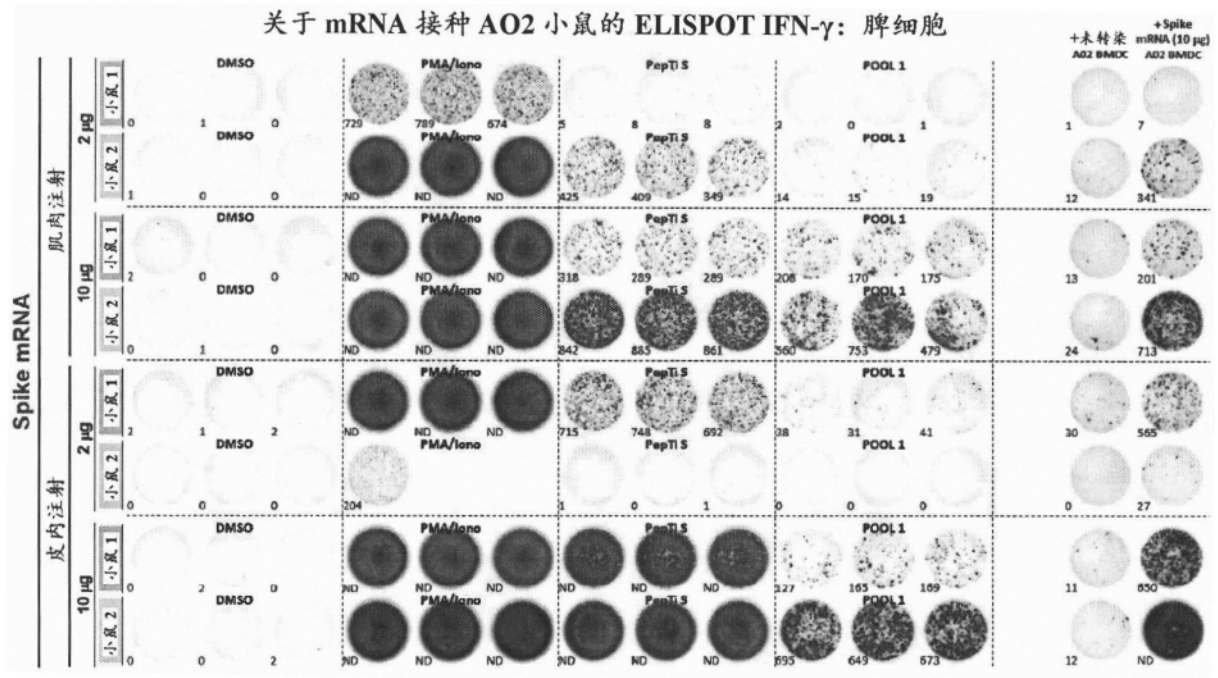


图28

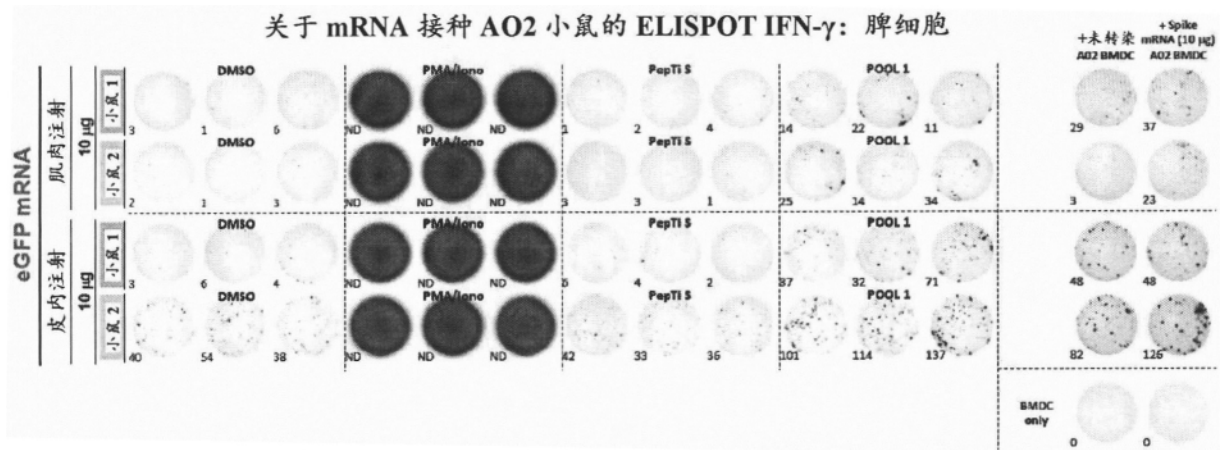


图29

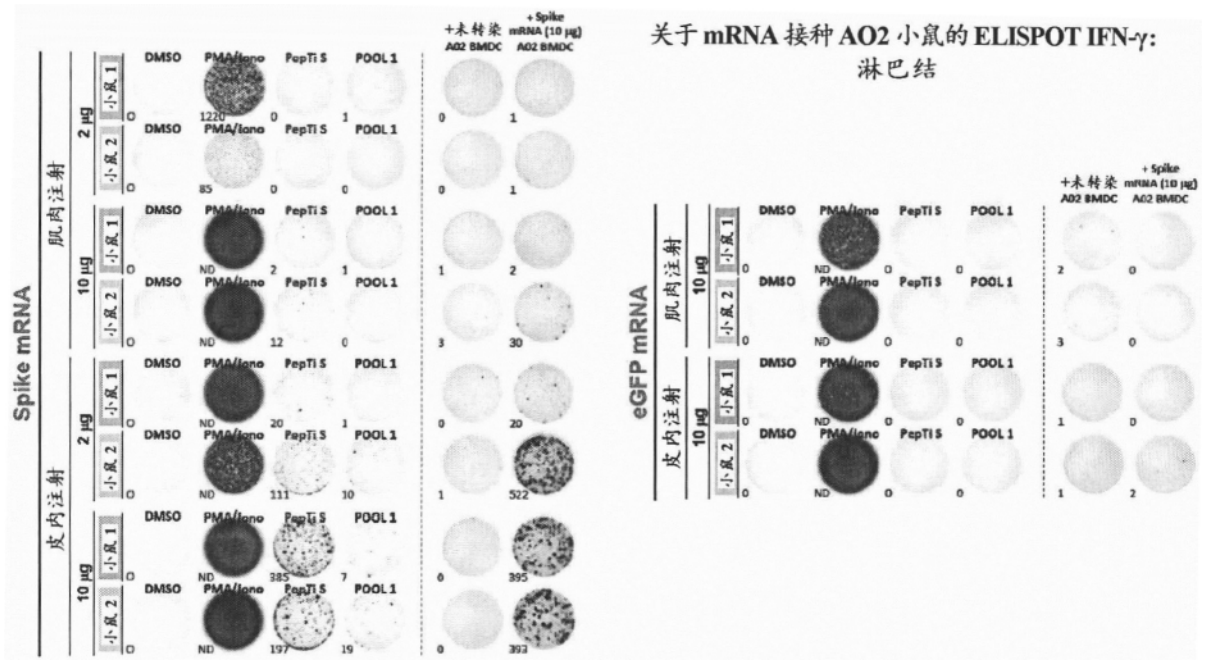


图30

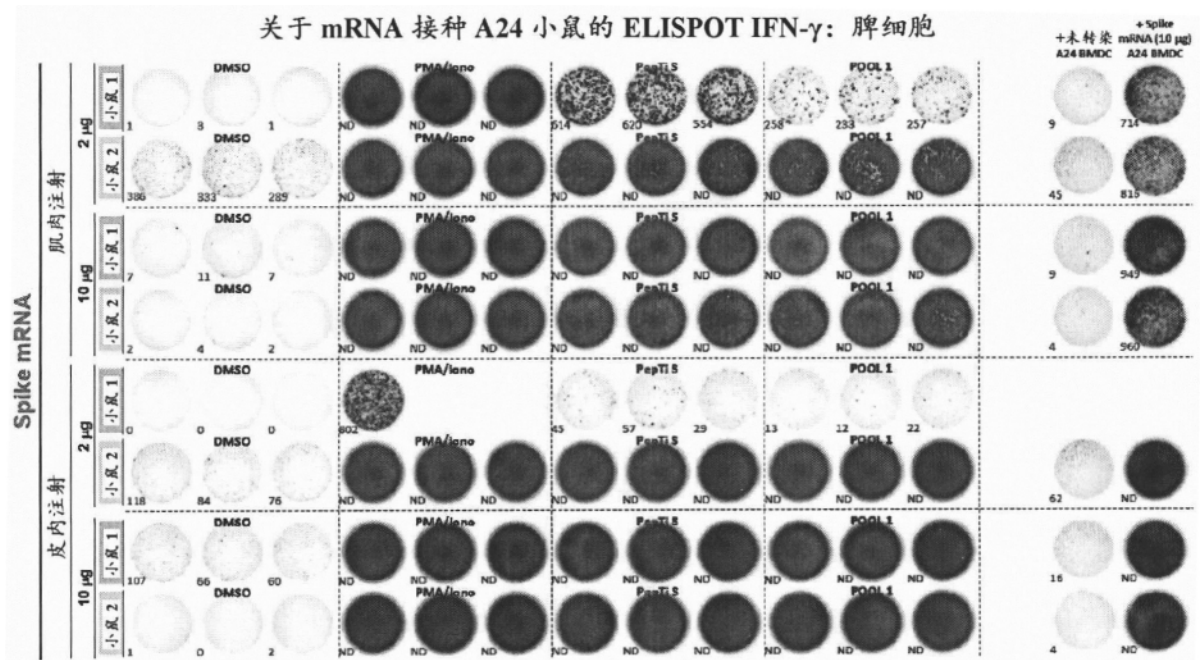


图31

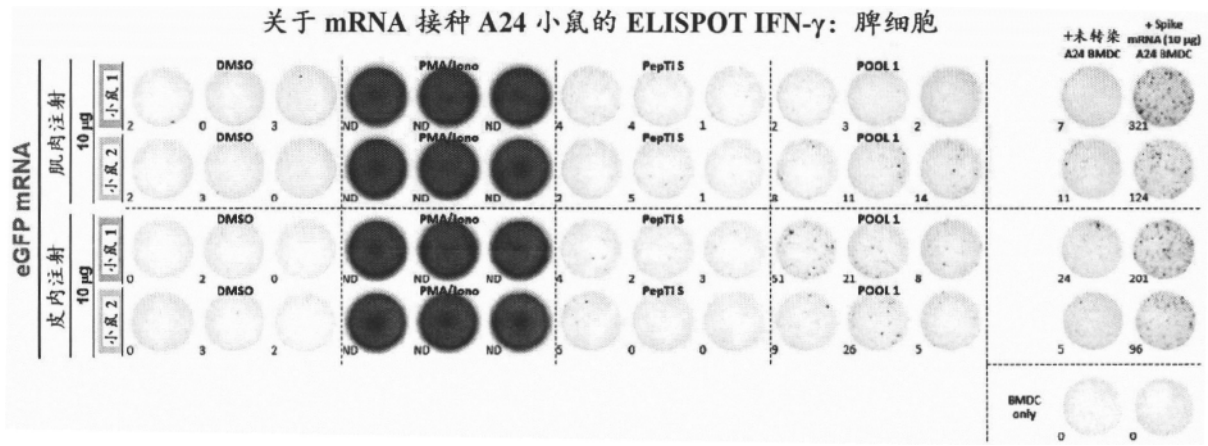


图32

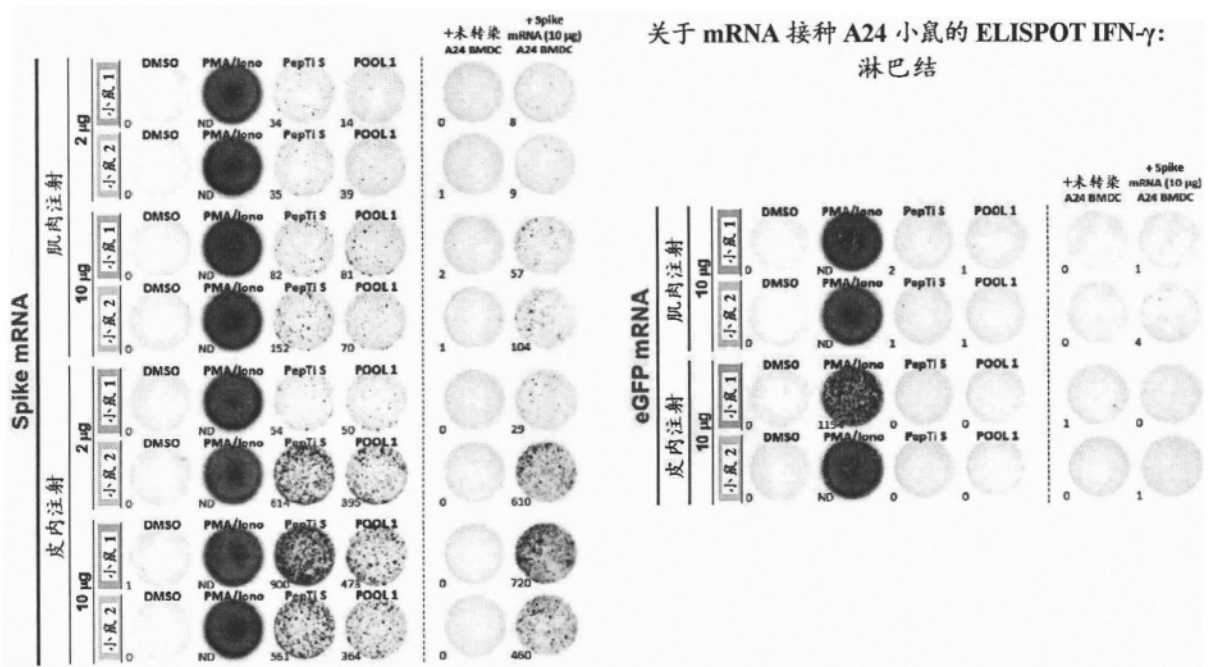


图33

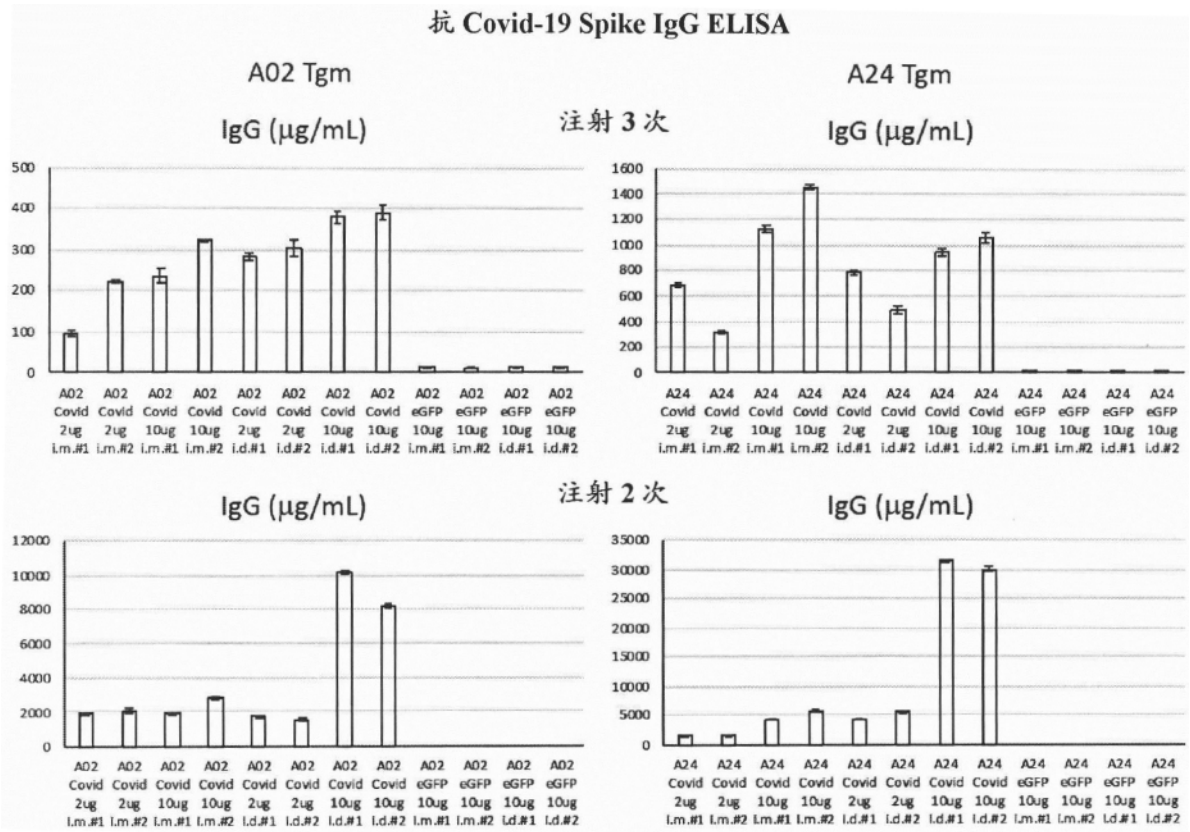


图34

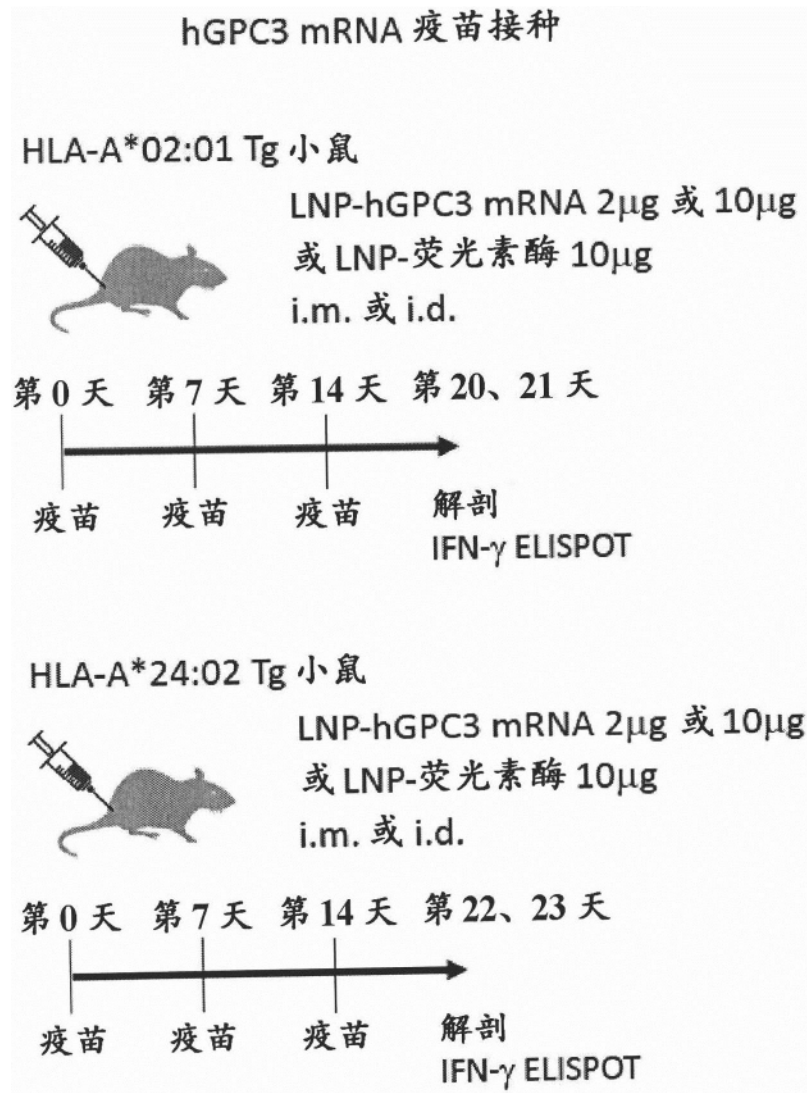


图35

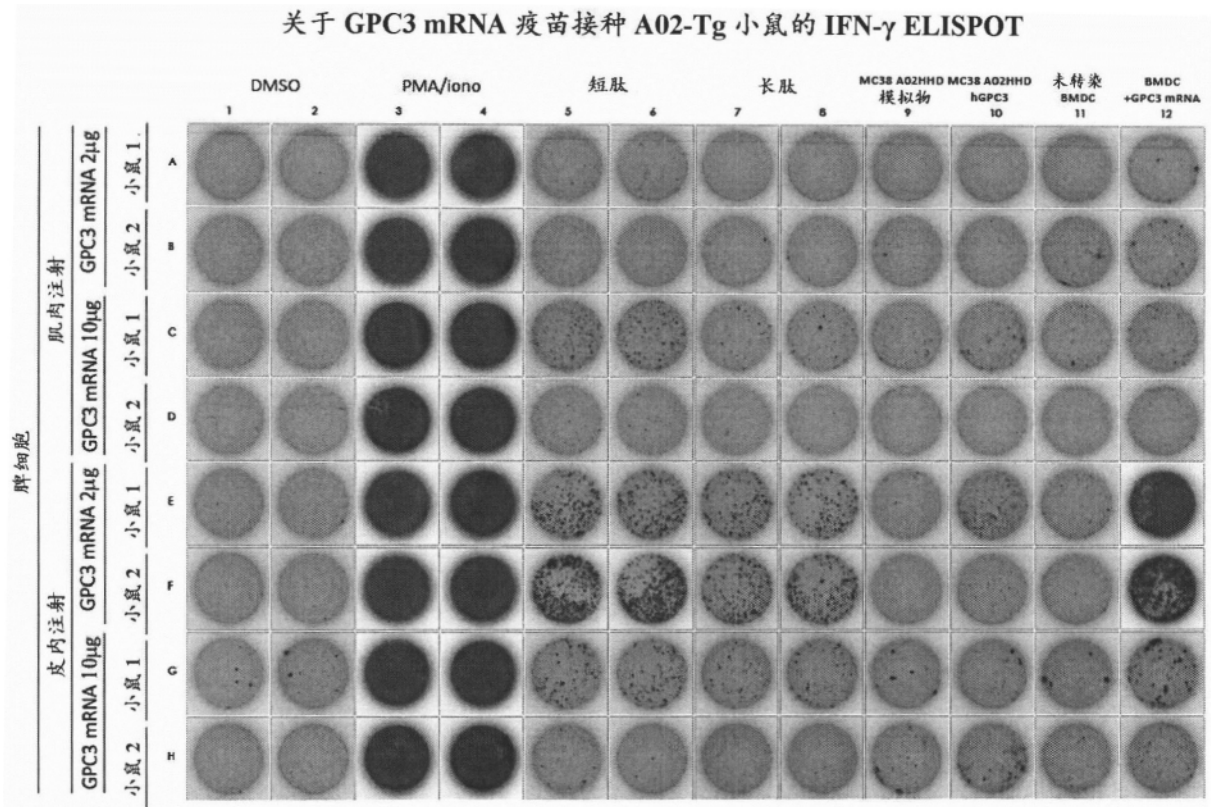


图36

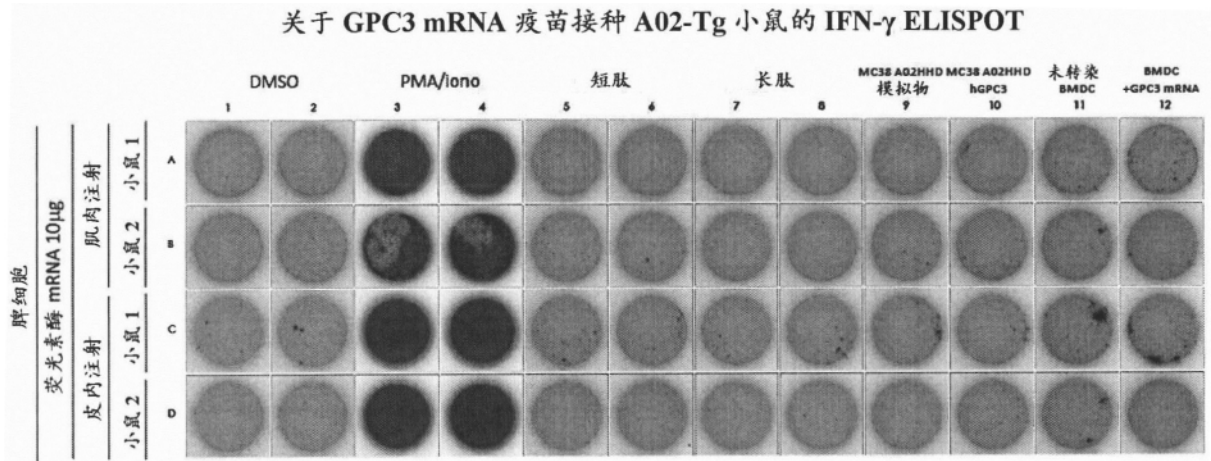


图37

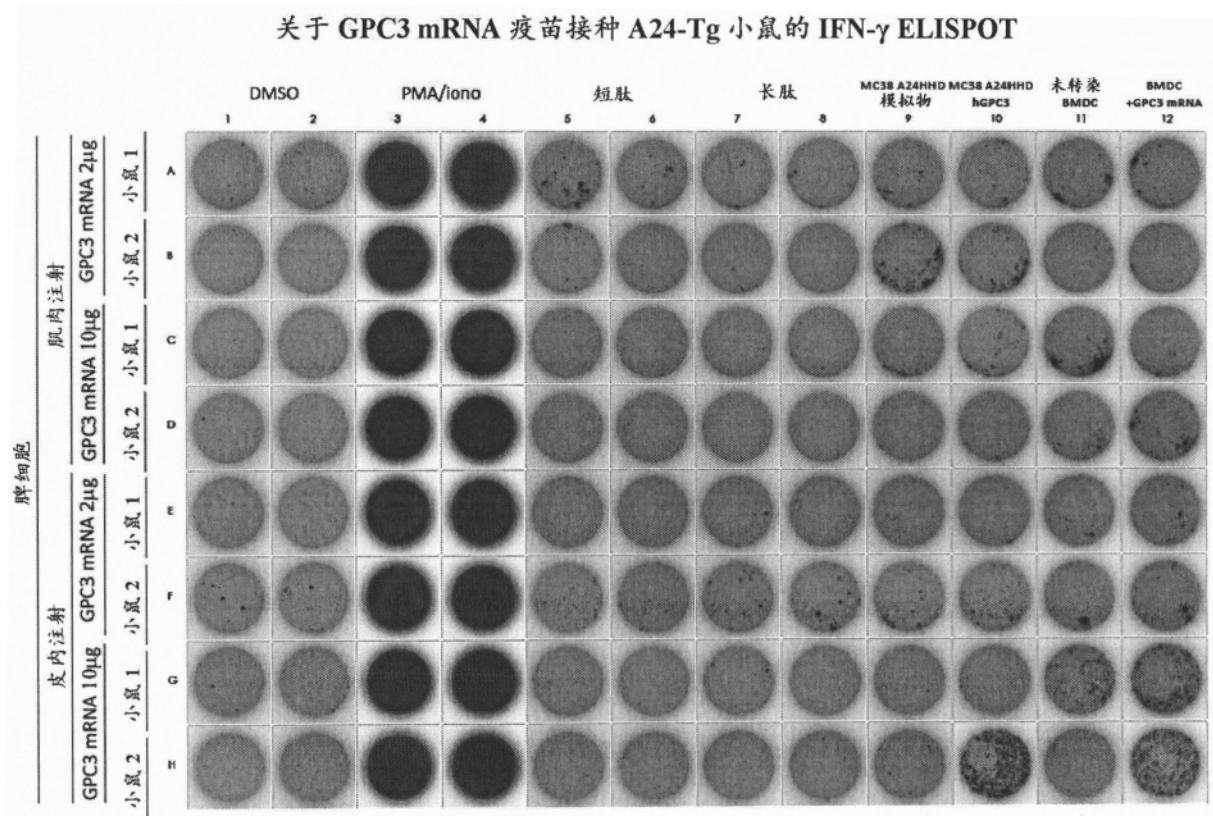


图38

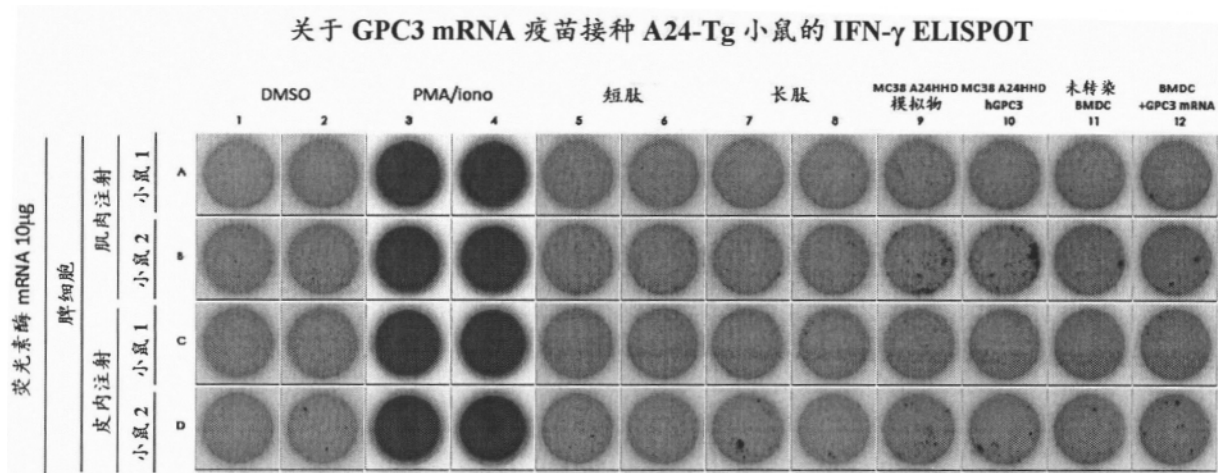


图39

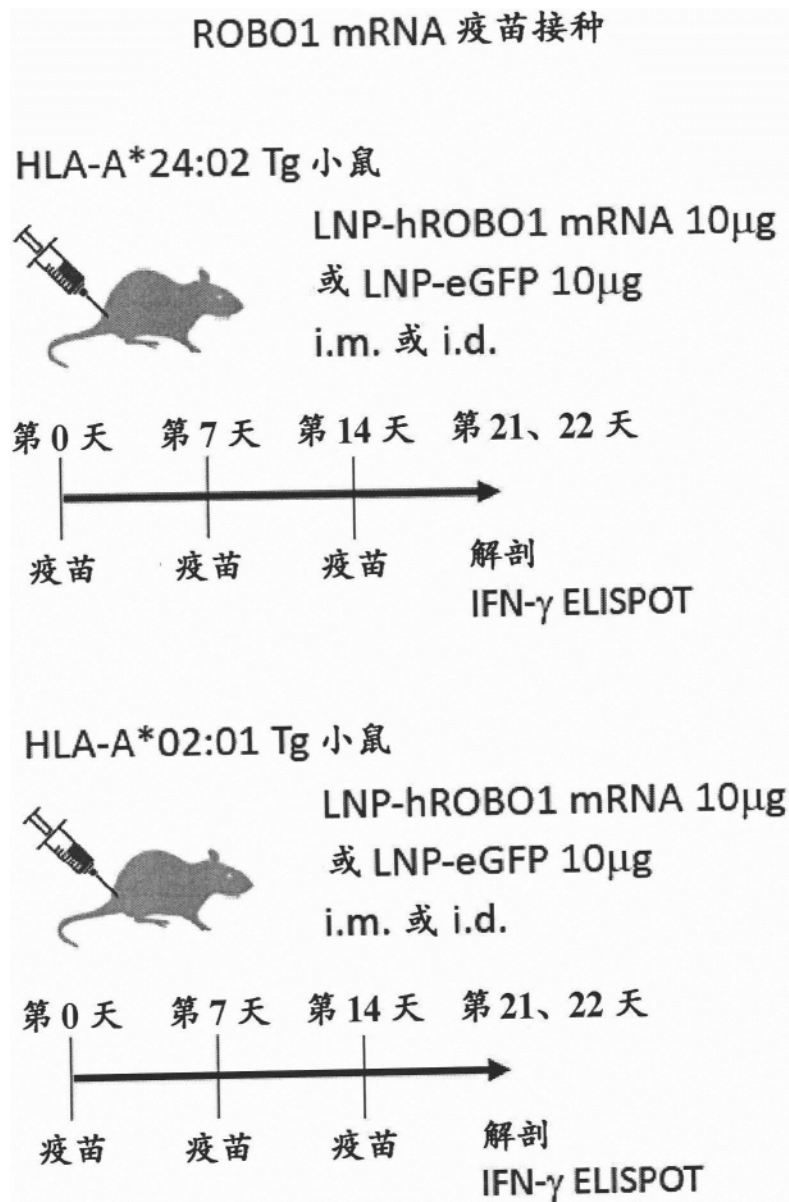


图40

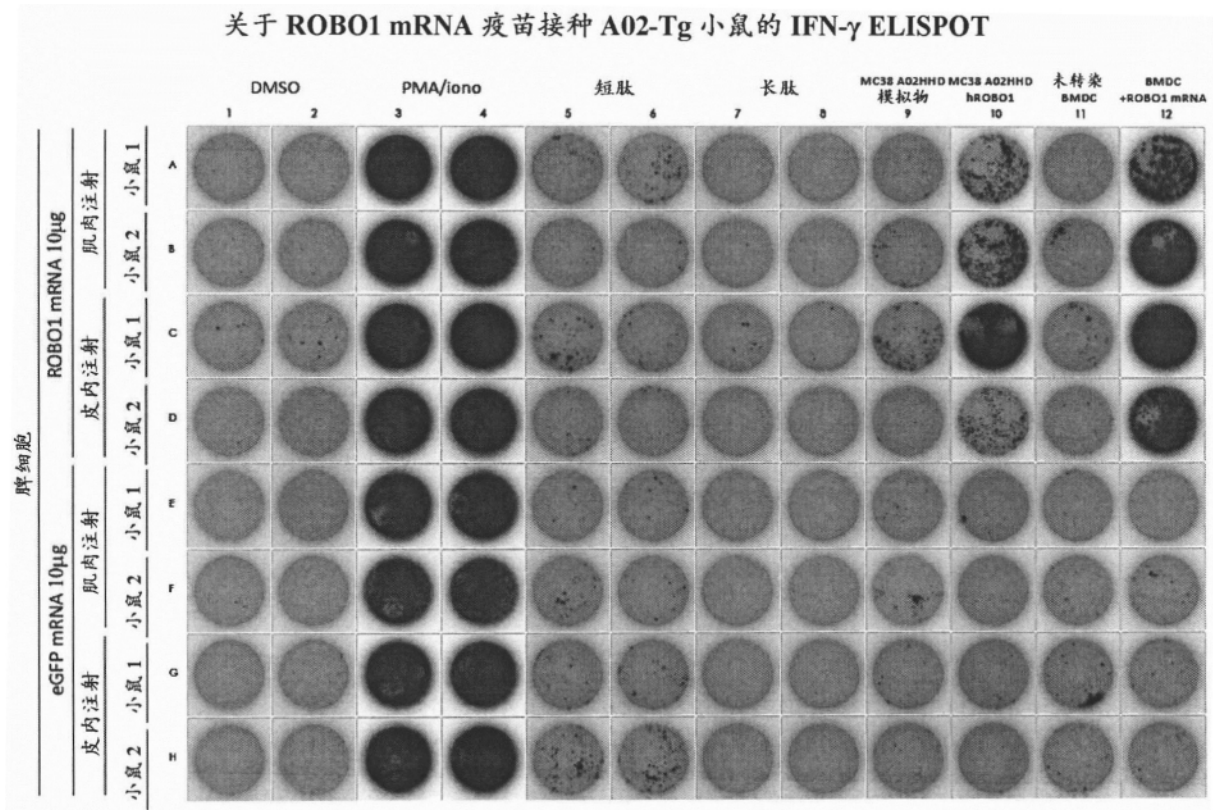


图41

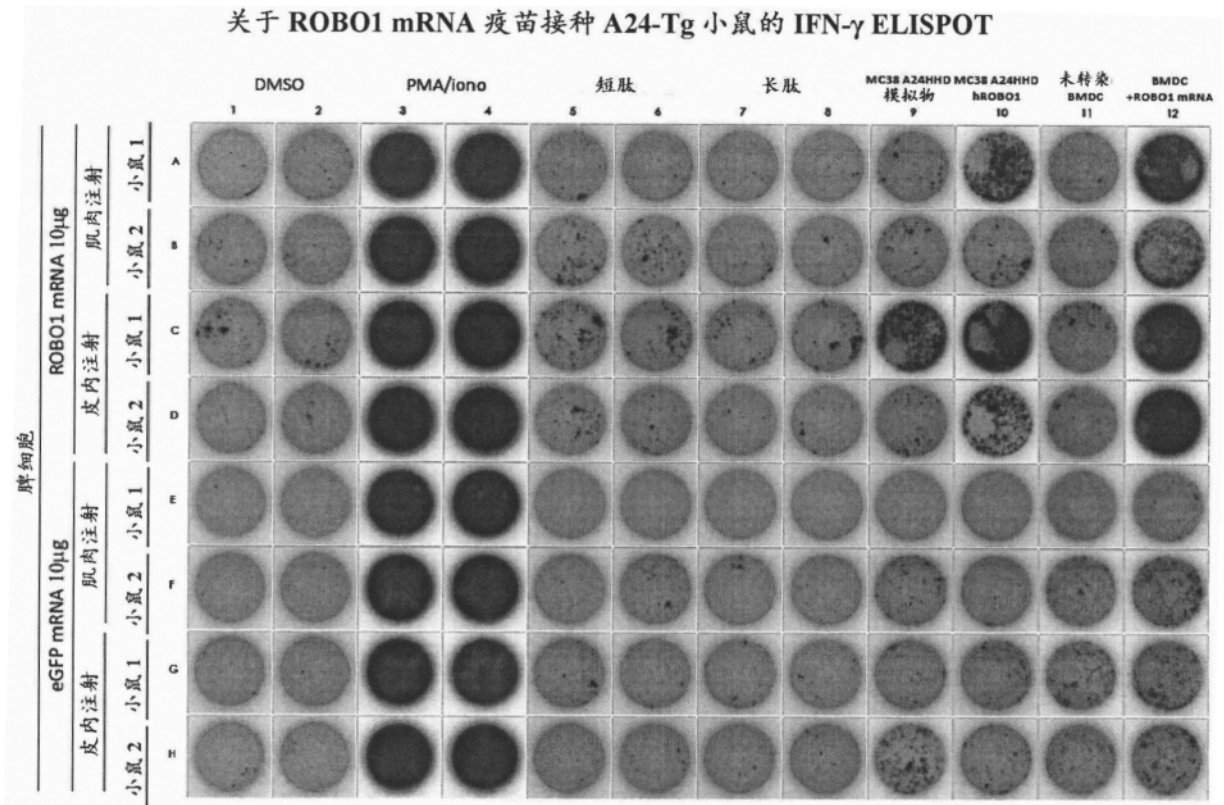


图42

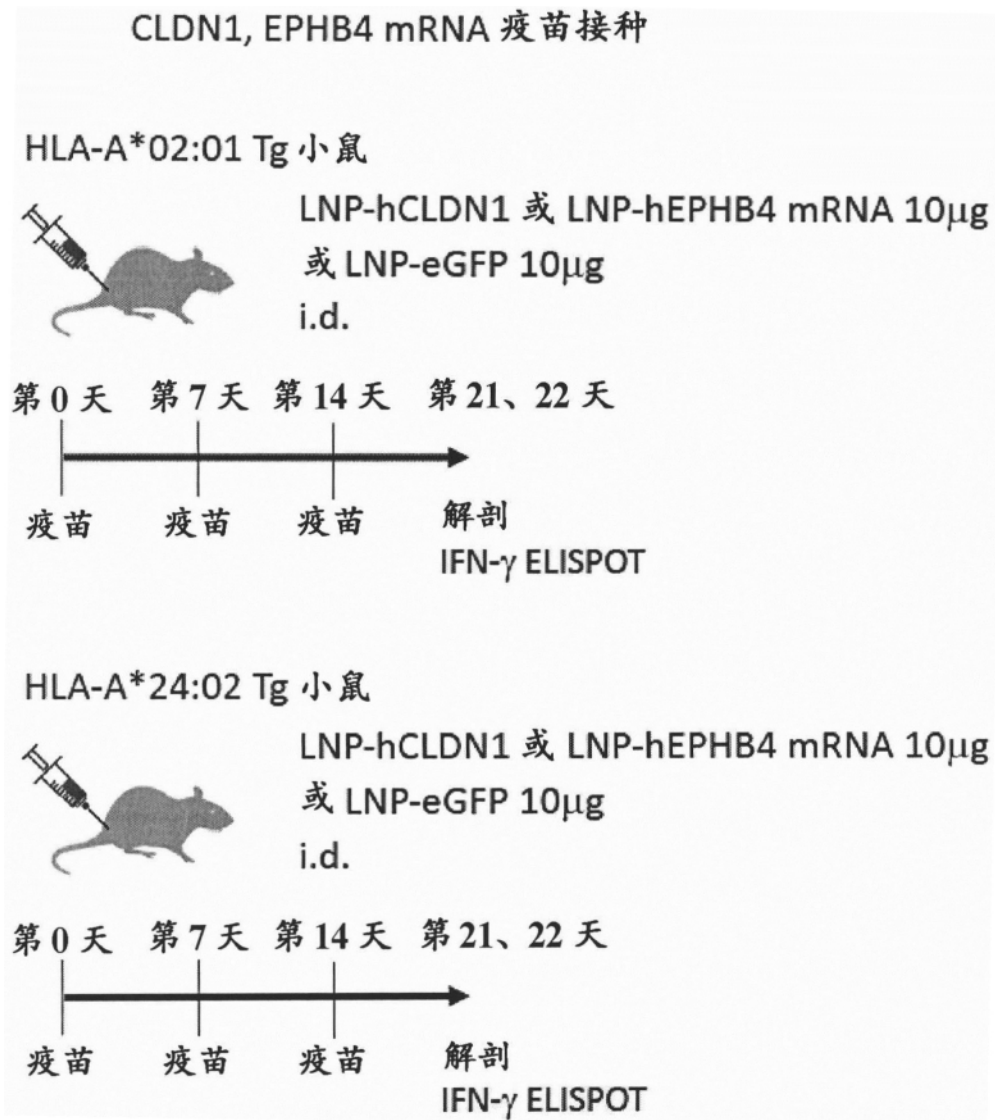


图43

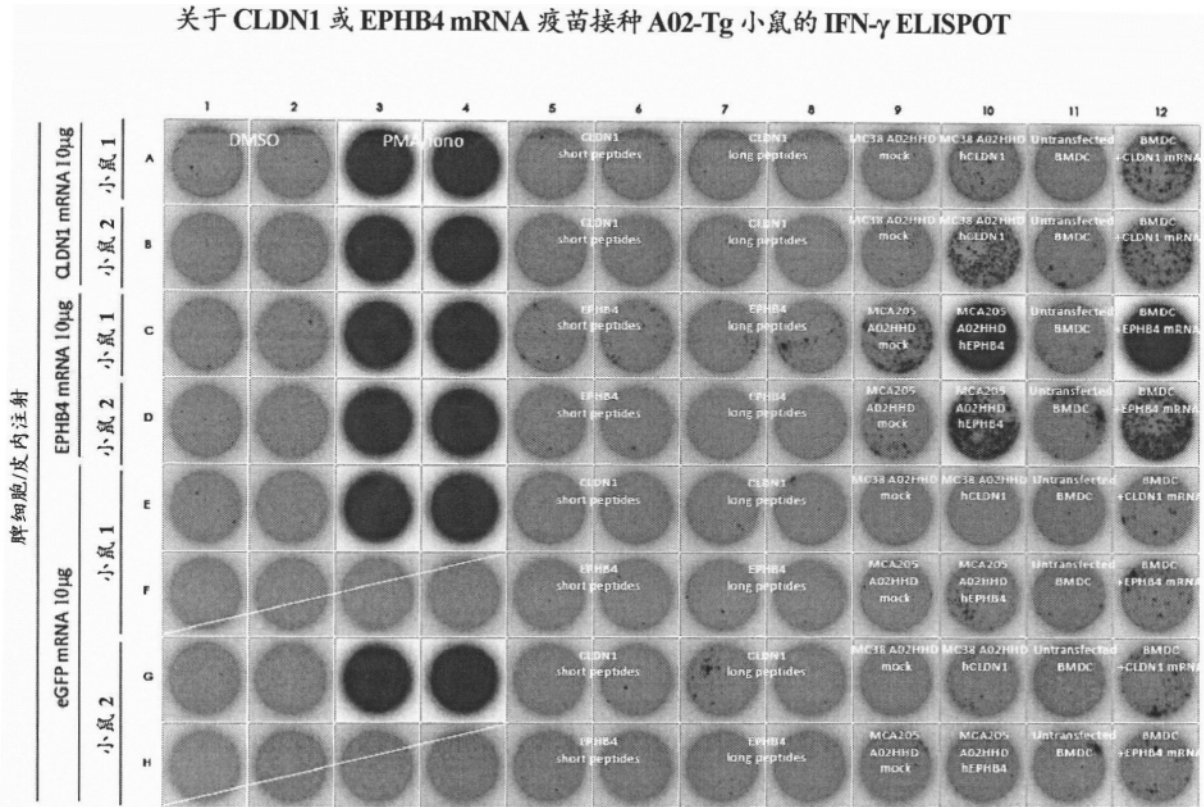


图44

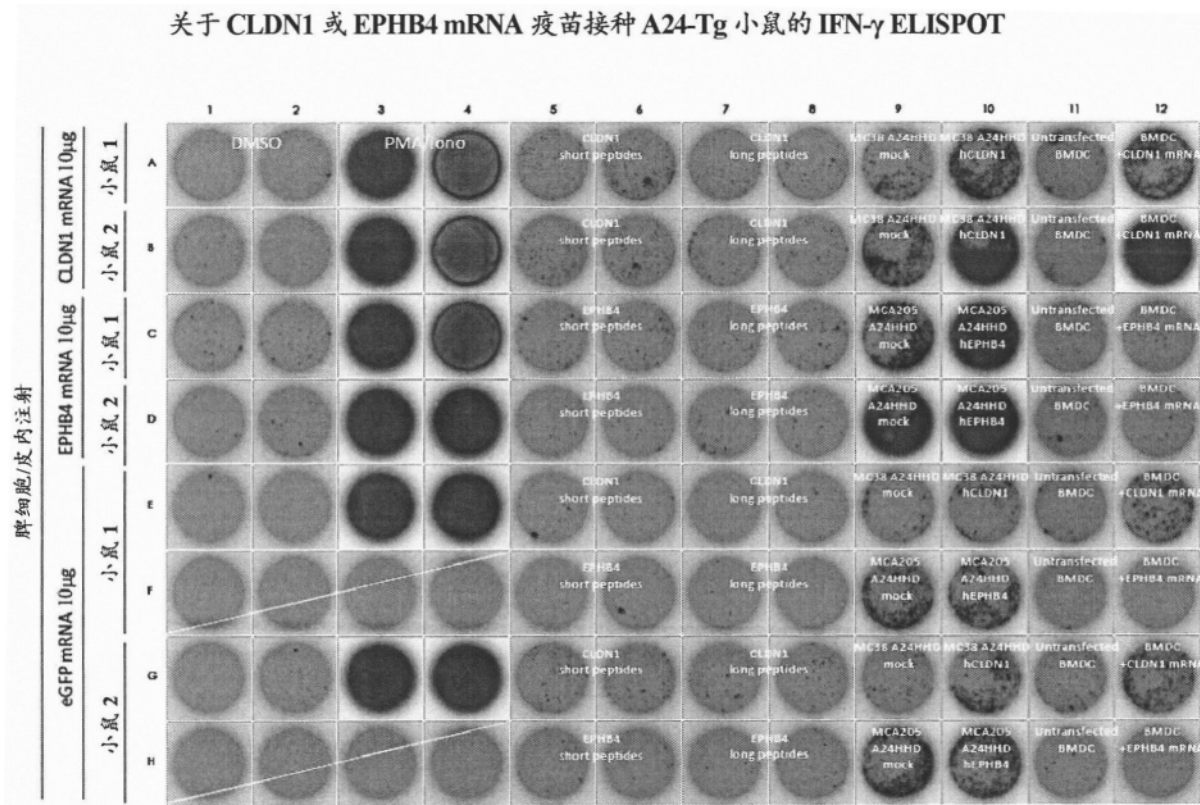


图45

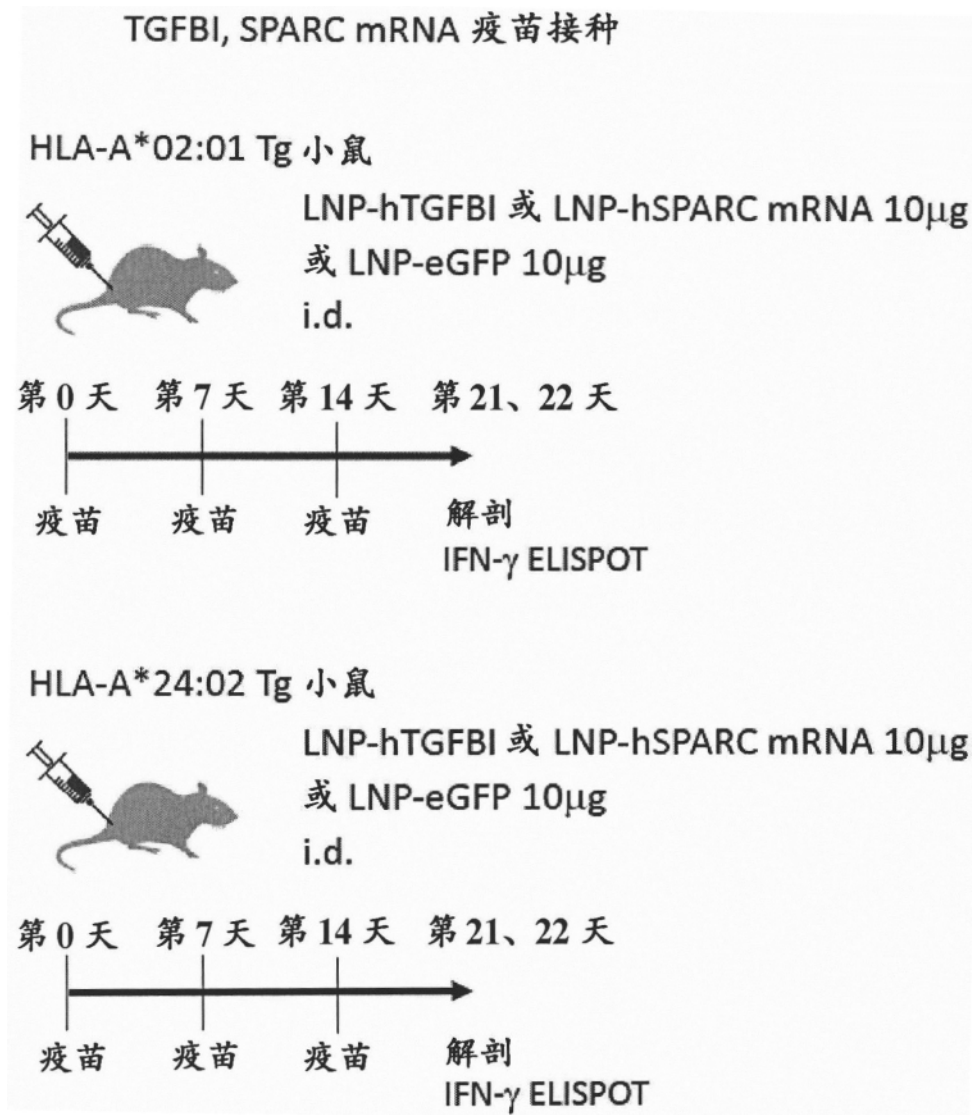


图46

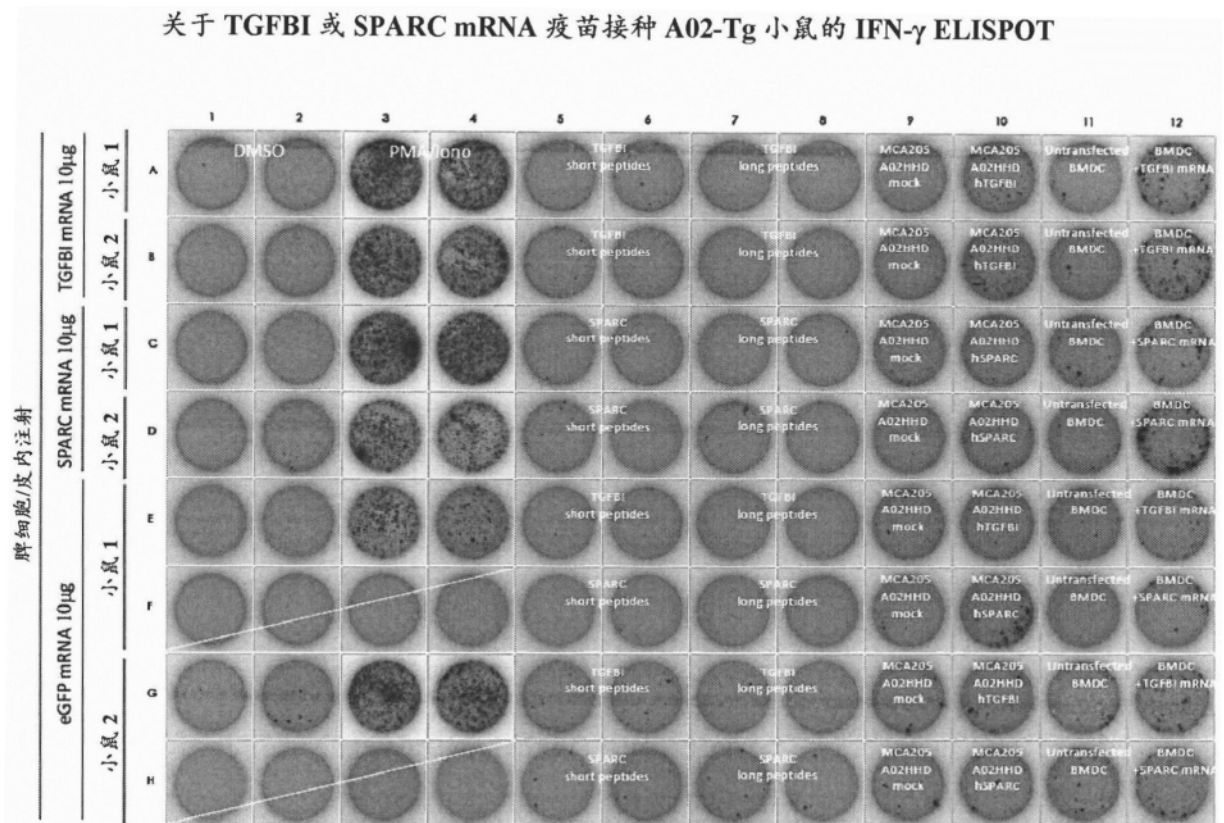


图47

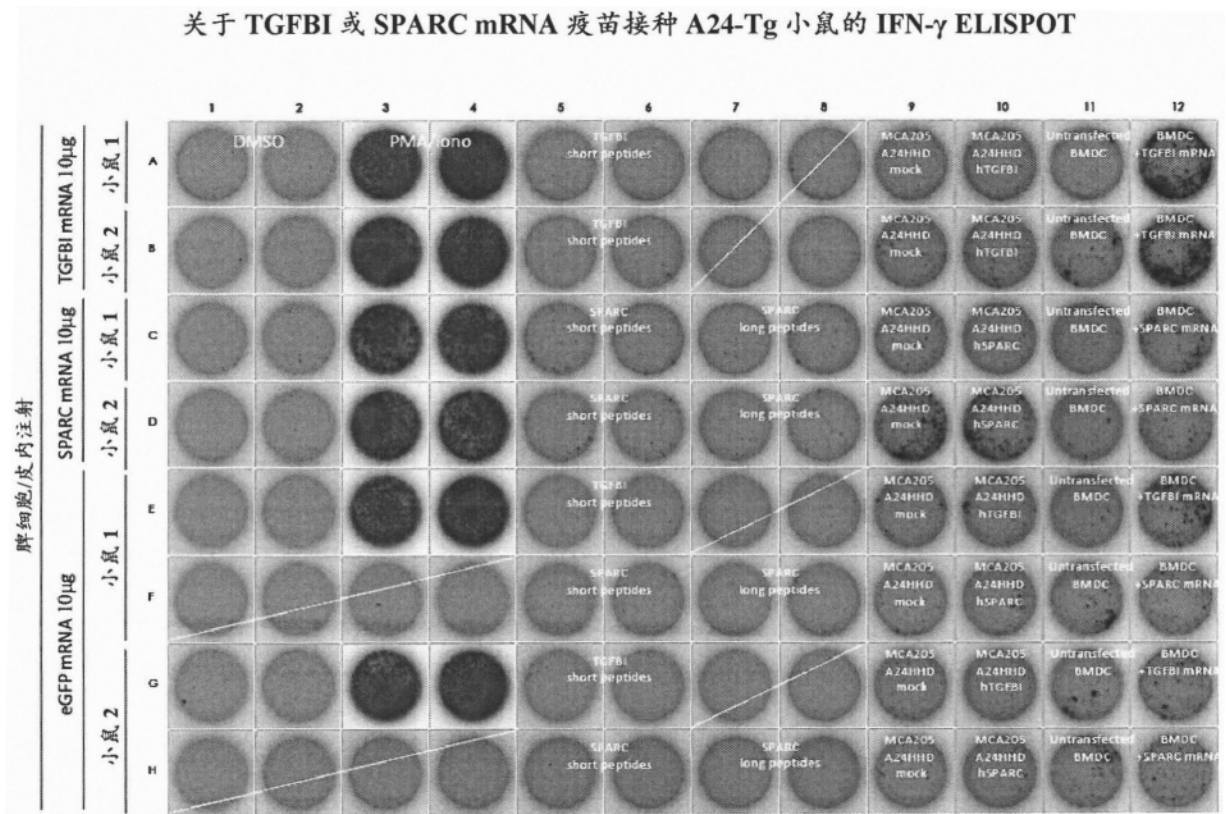


图48



图49

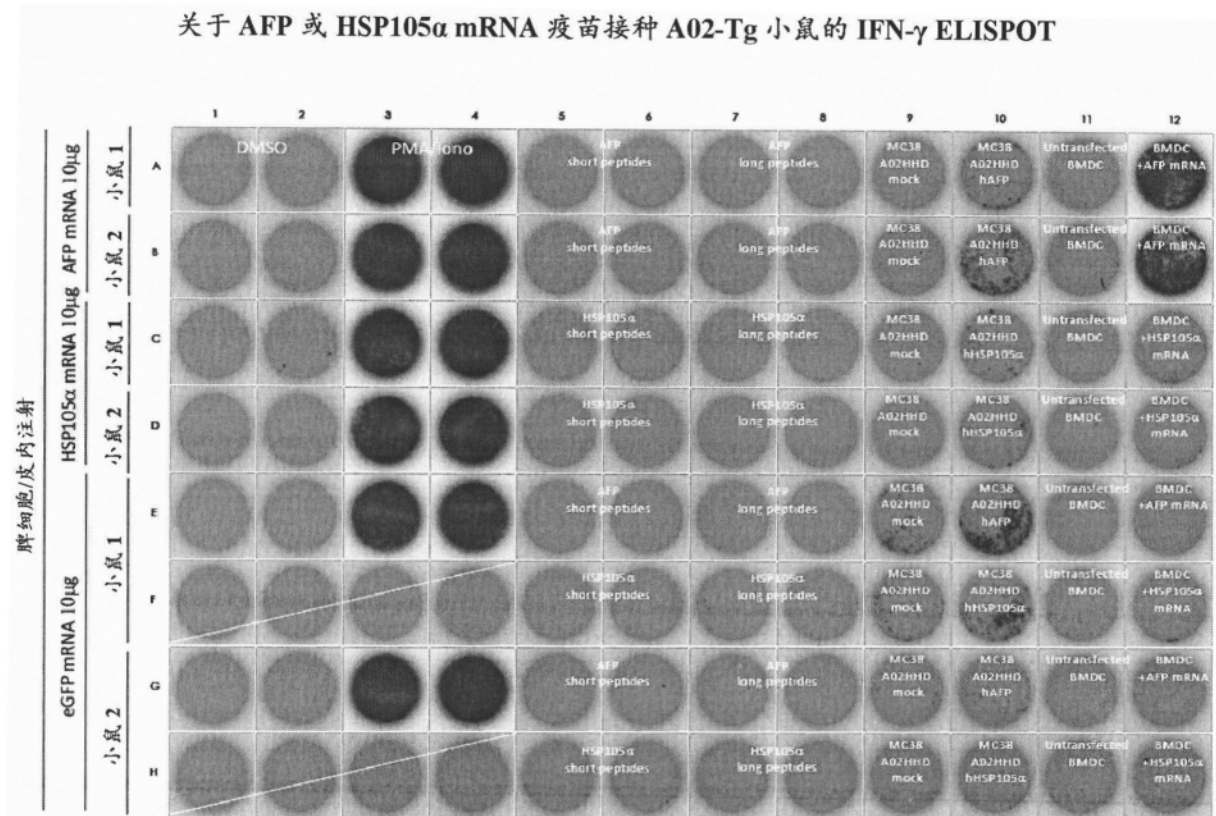


图50

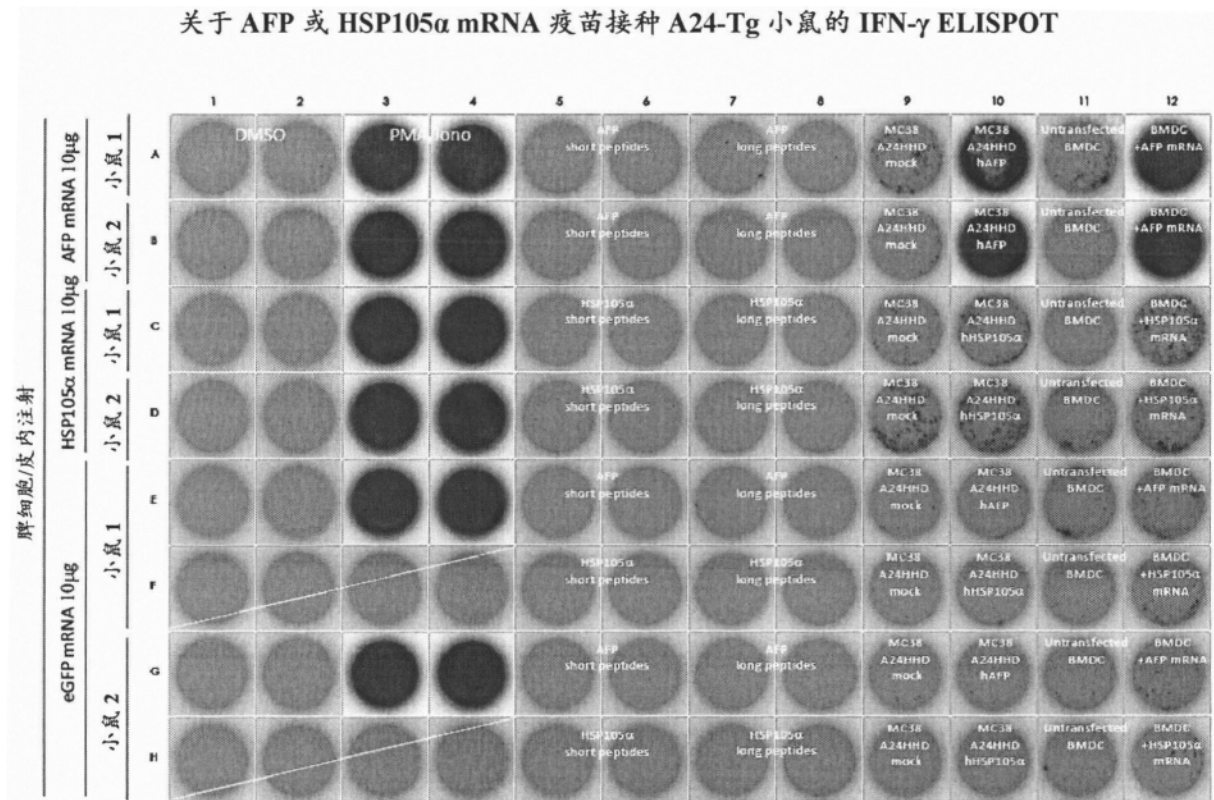


图51

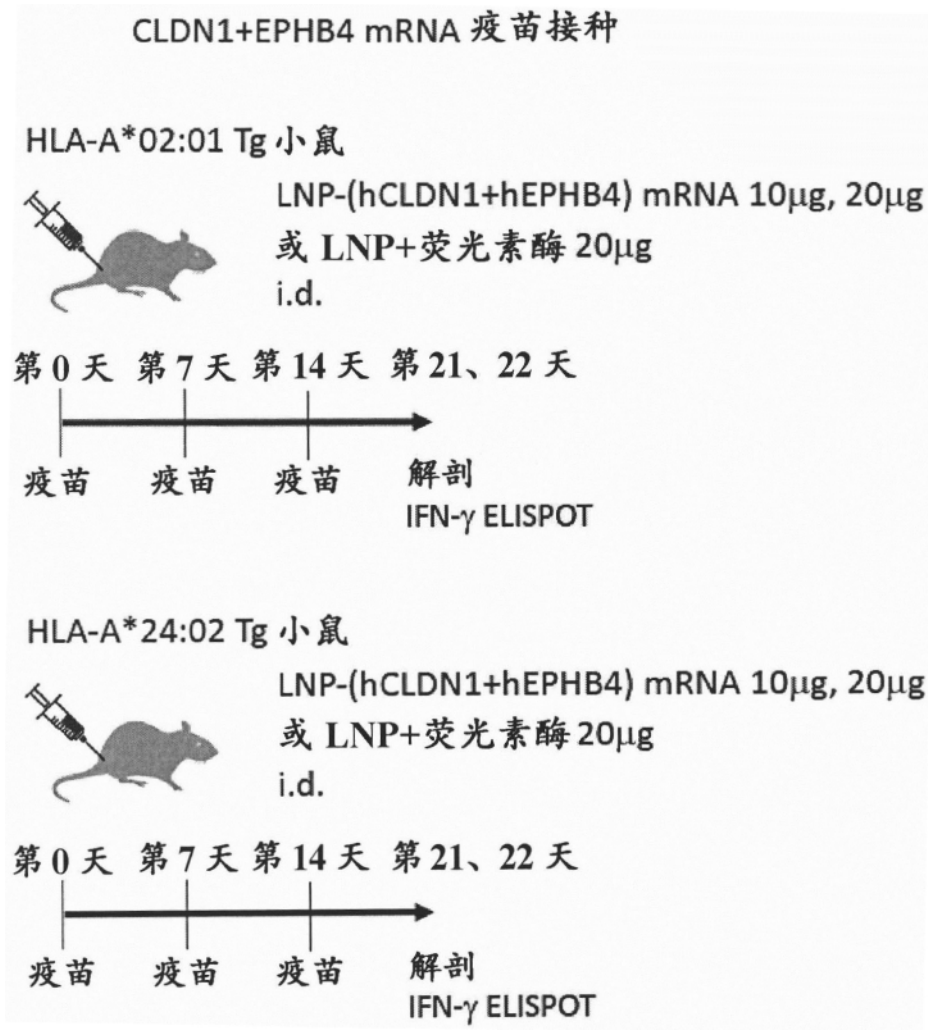


图52

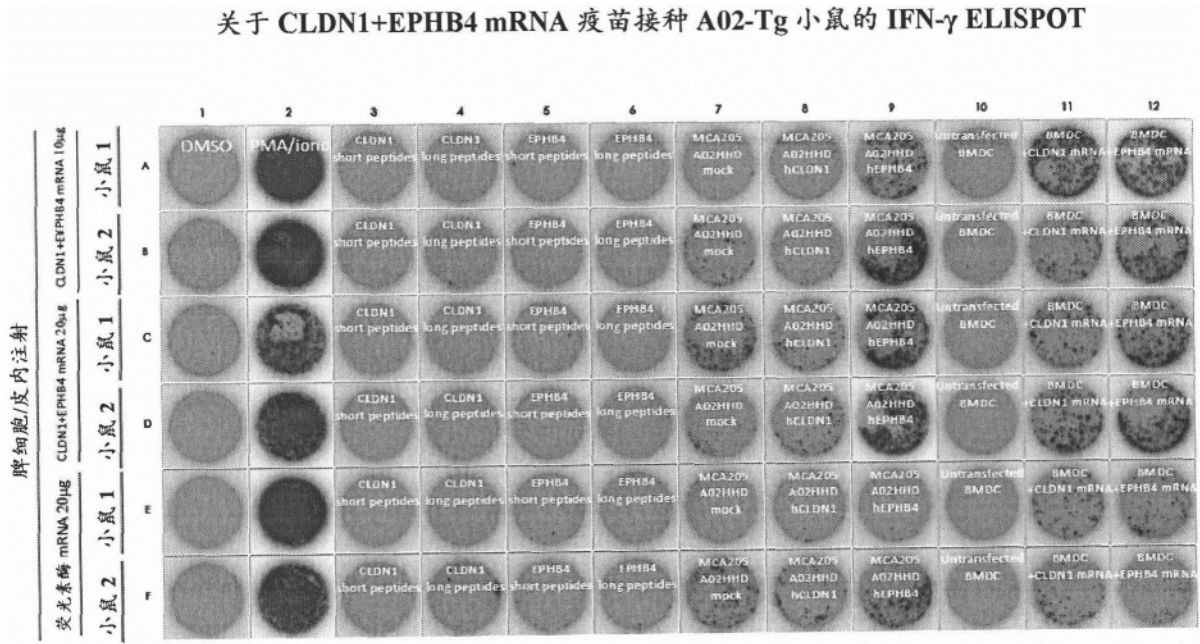


图53

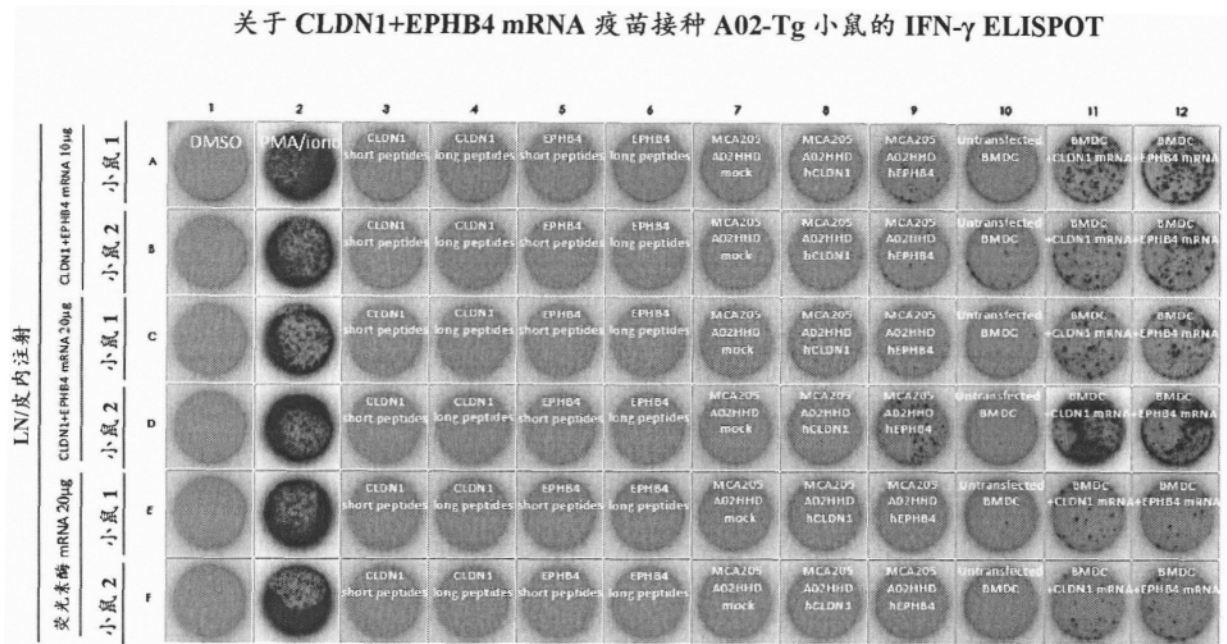


图54

关于 CLDN1+EPHB4 mRNA 疫苗接种 A24-Tg 小鼠的 IFN- γ ELISPOT

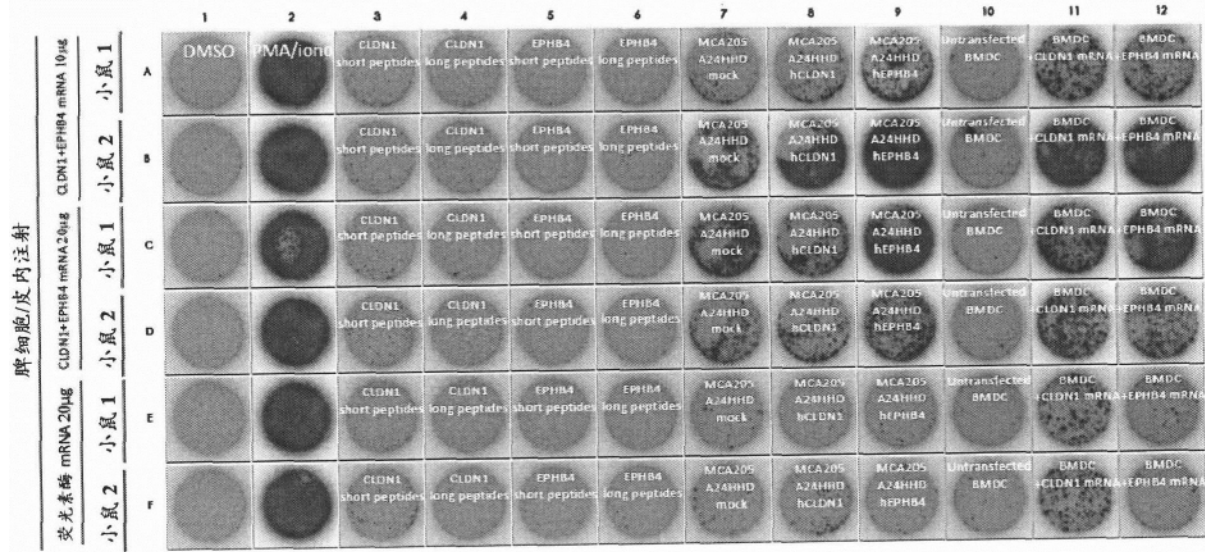


图55

关于 CLDN1+EPHB4 mRNA 疫苗接种 A24-Tg 小鼠的 IFN- γ ELISPOT

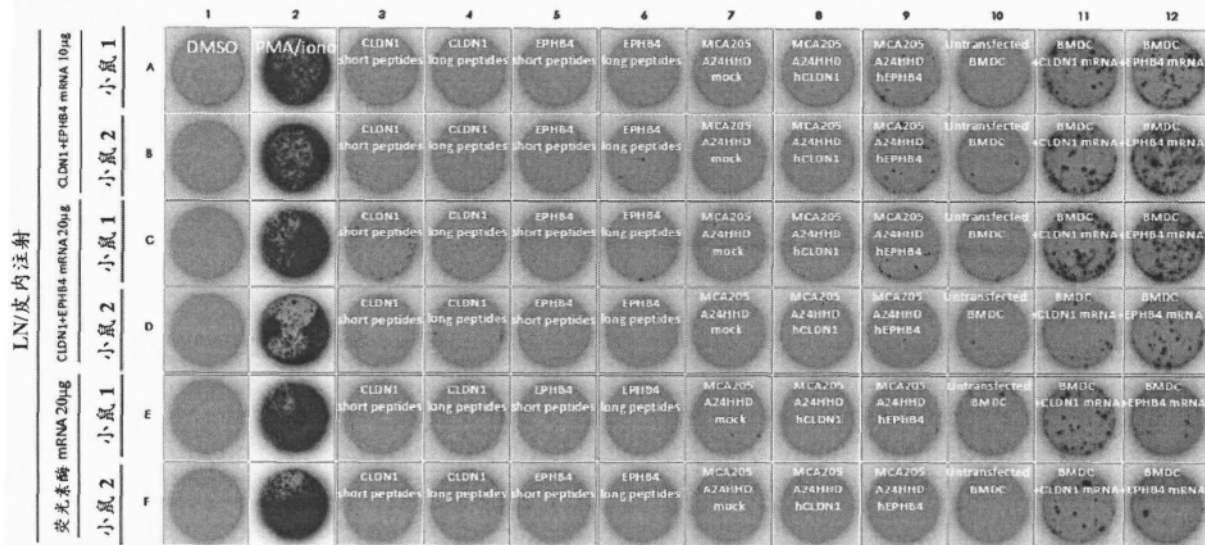


图56

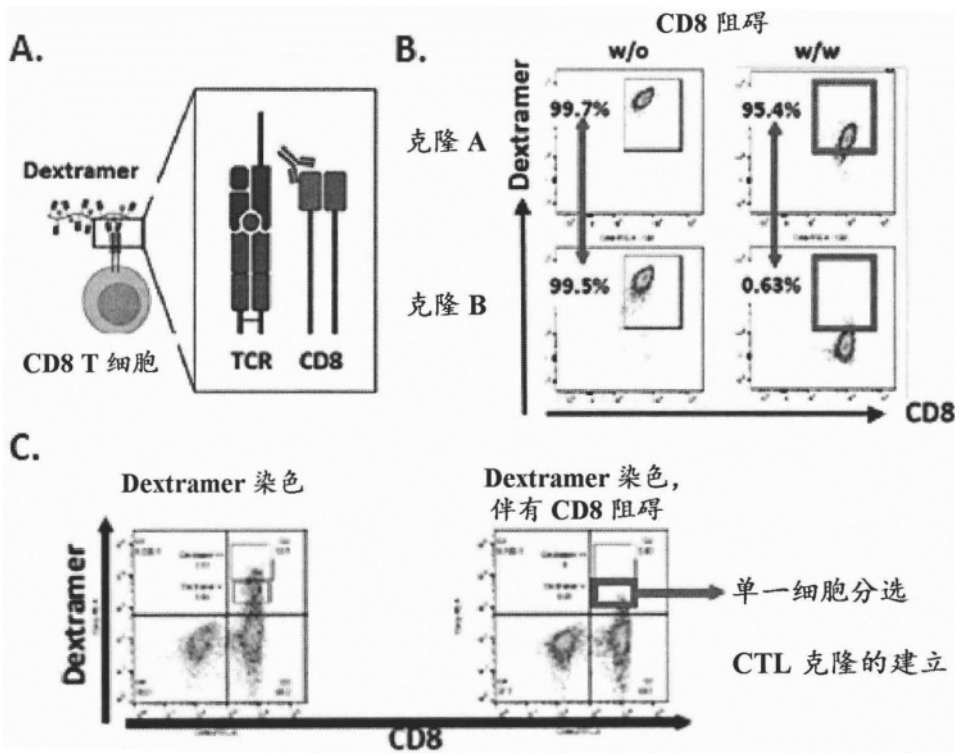


图57

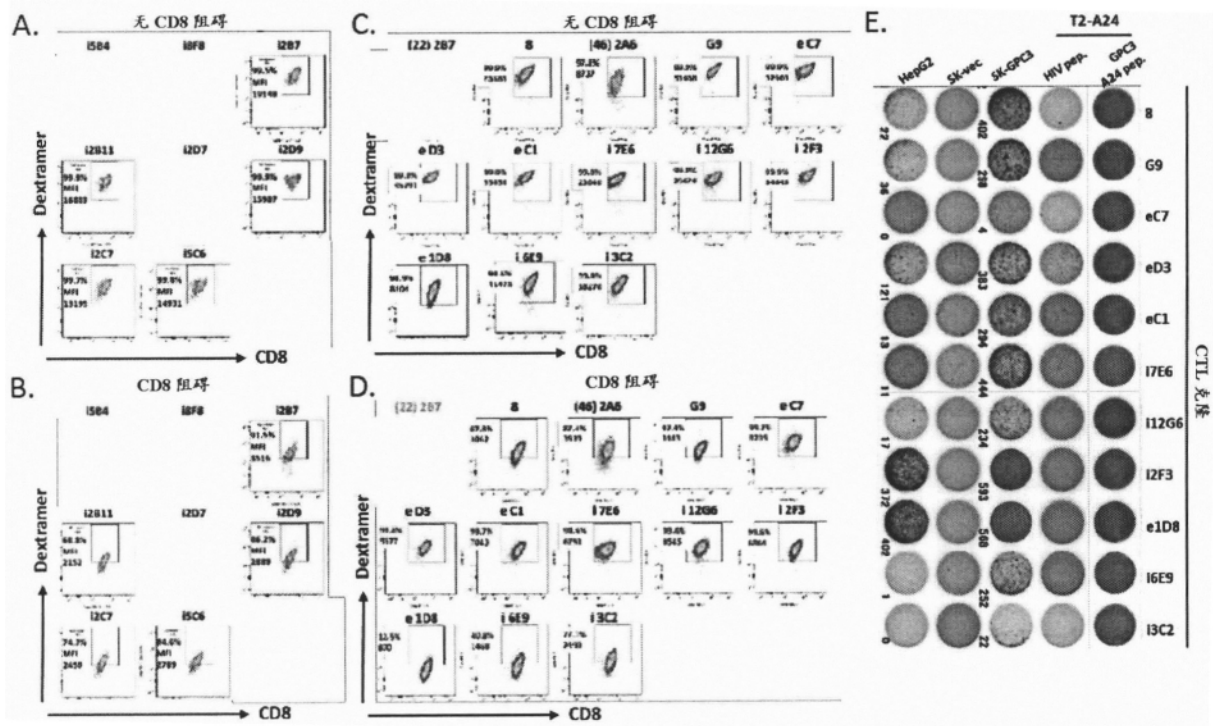


图58

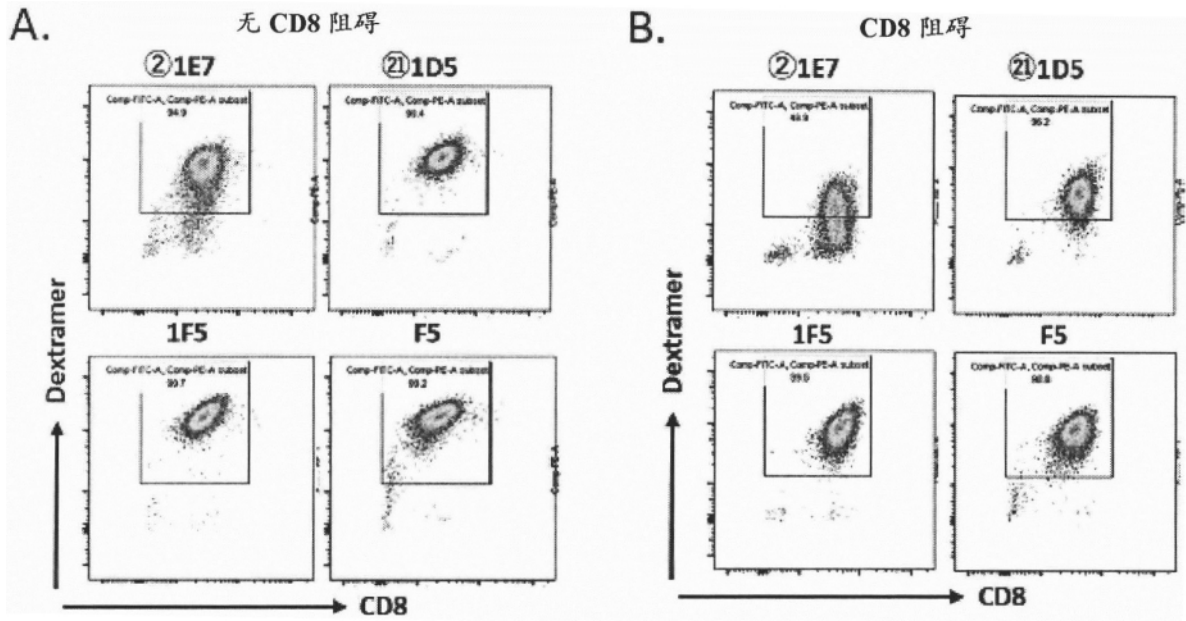


图59

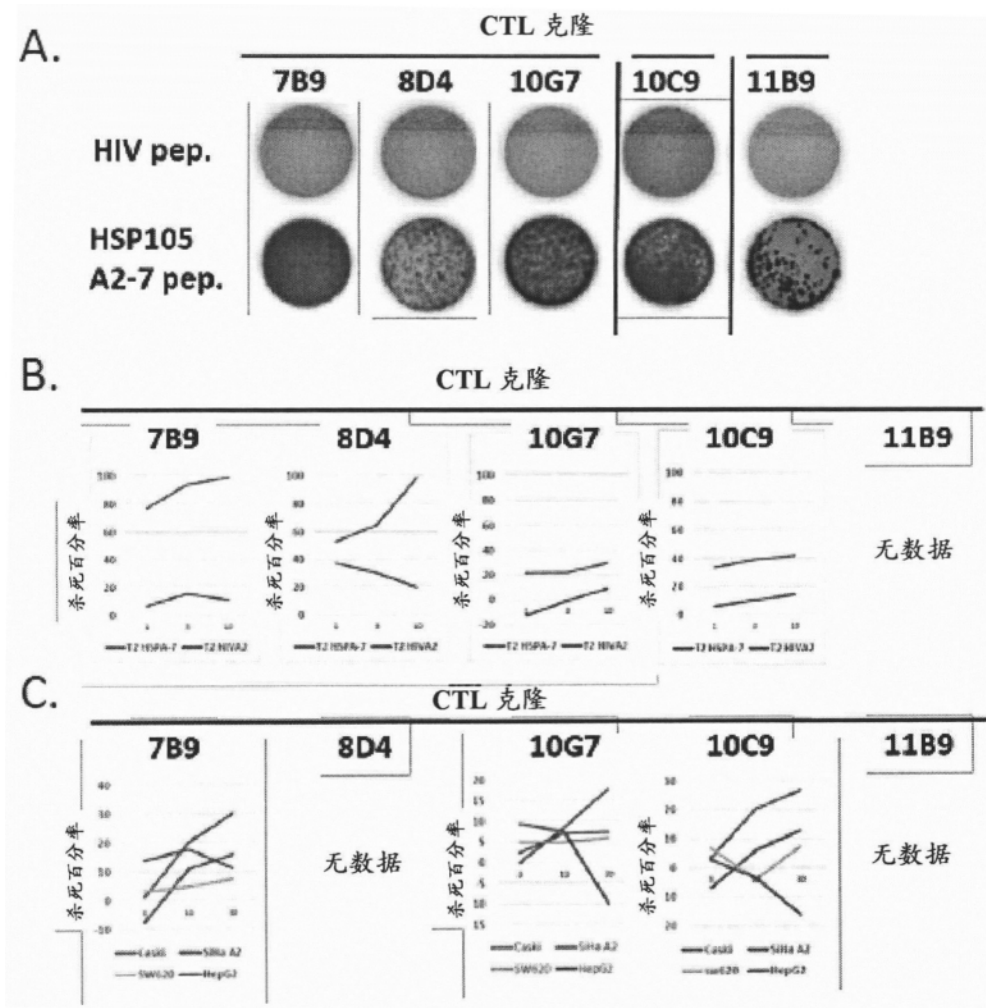


图60

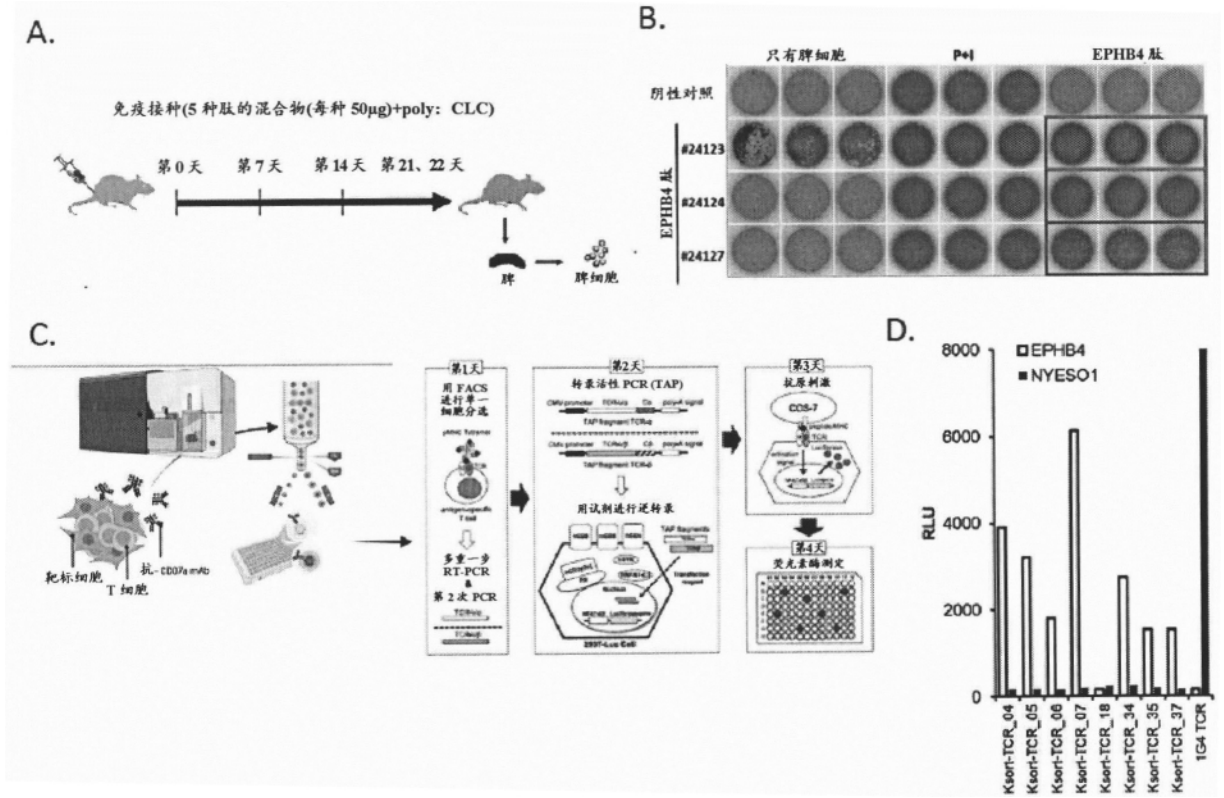


图61

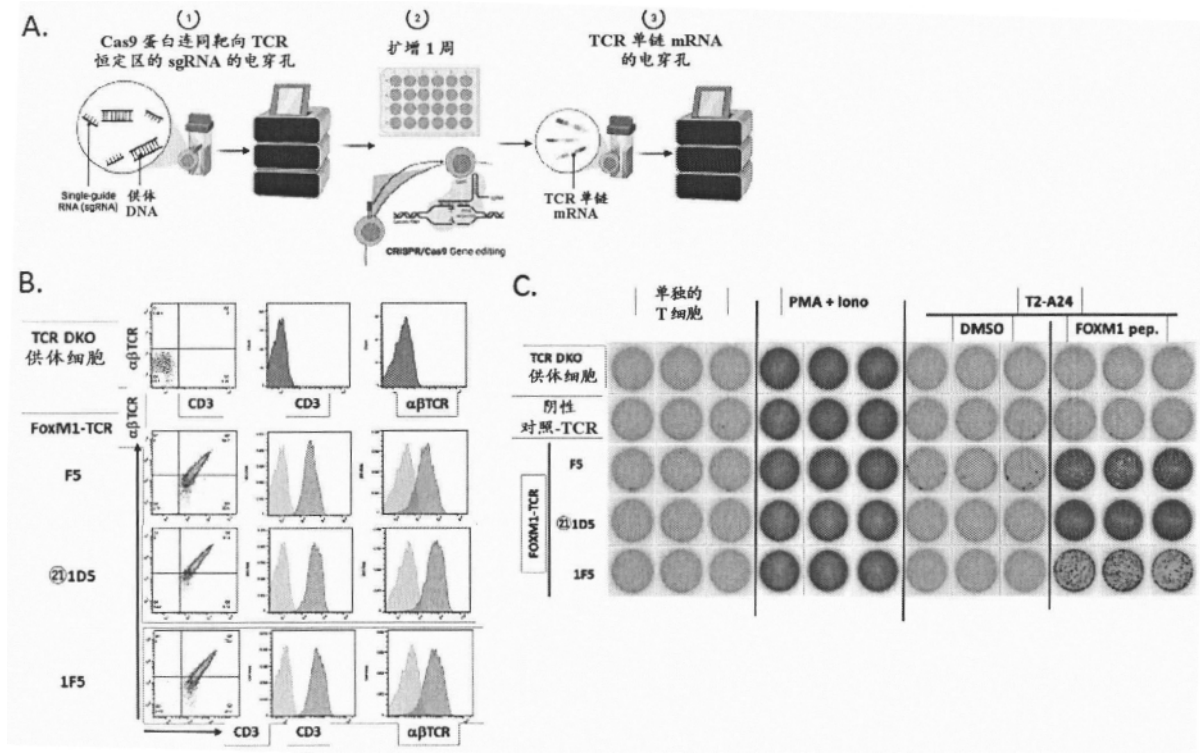


图62

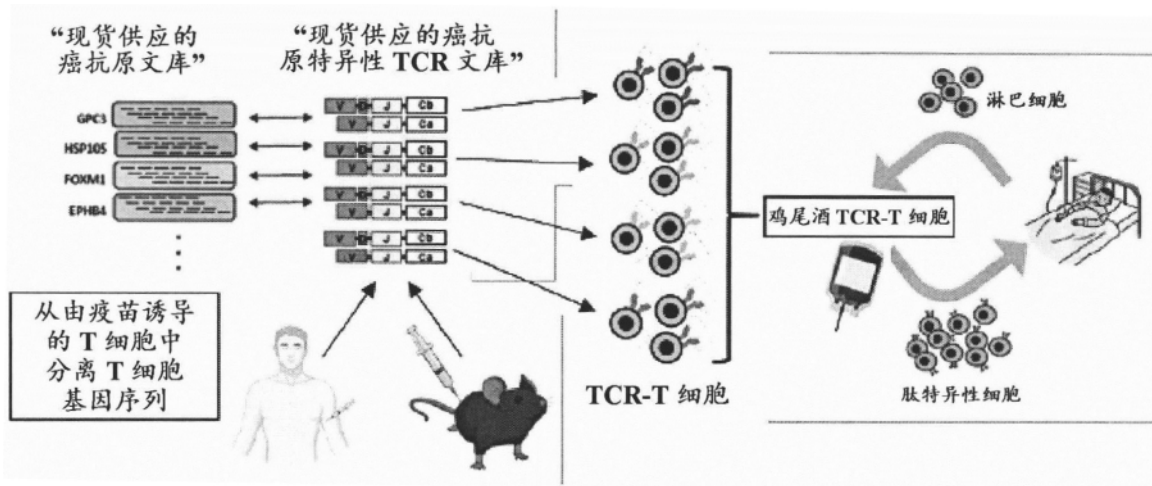


图63

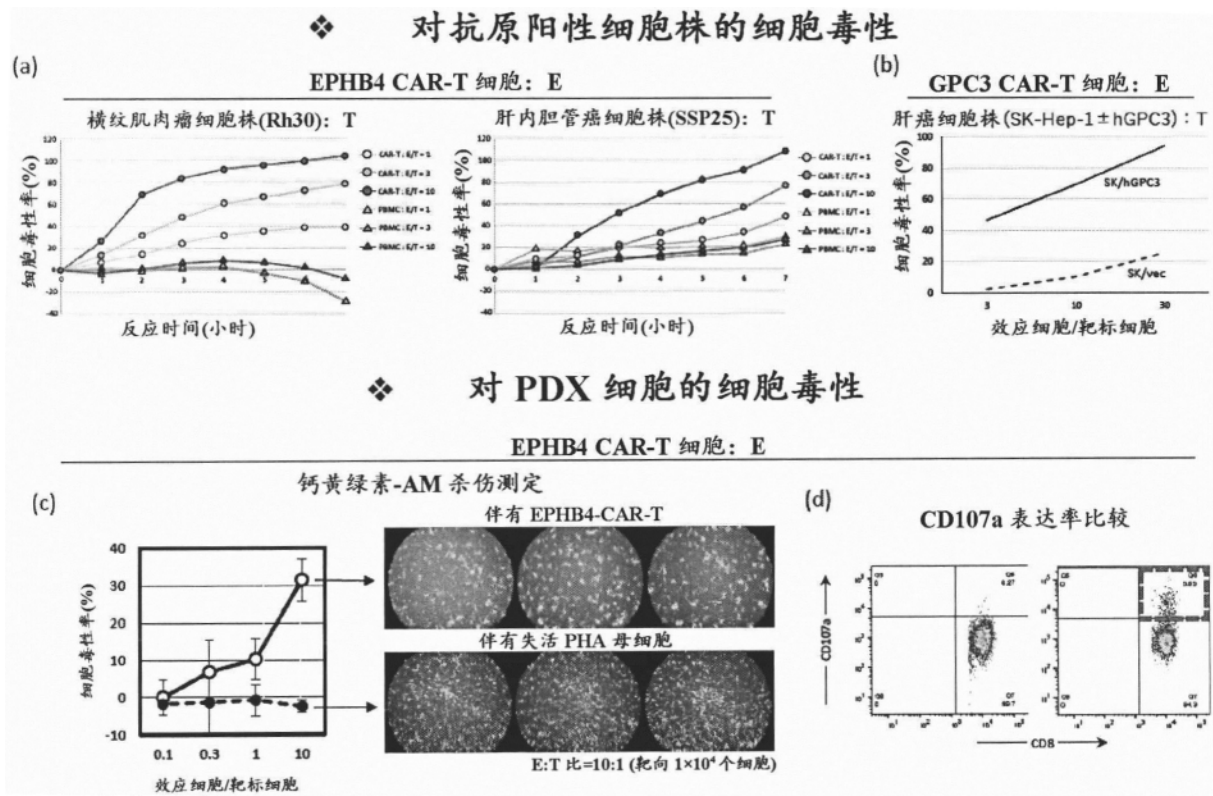


图64

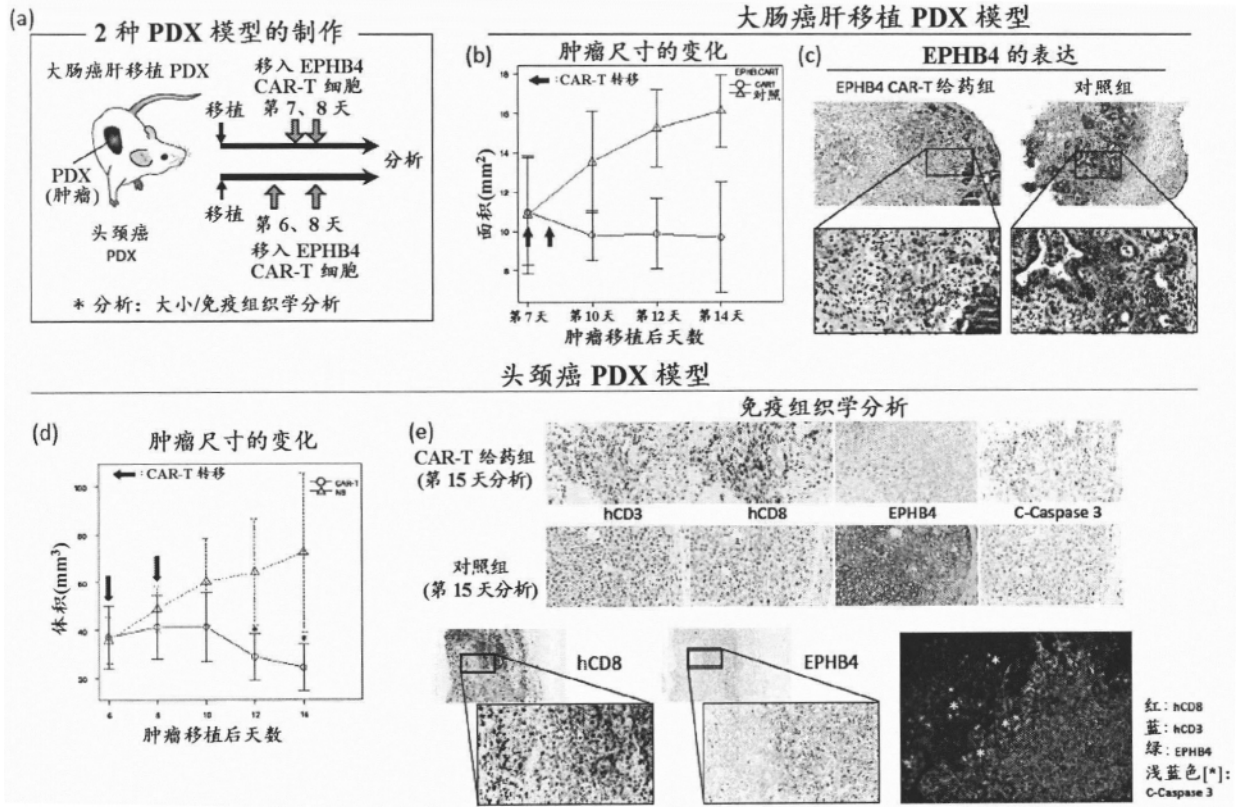


图65

移植表达5种膜蛋白通用癌抗原的全部/一部分的肿瘤细胞株和PDX

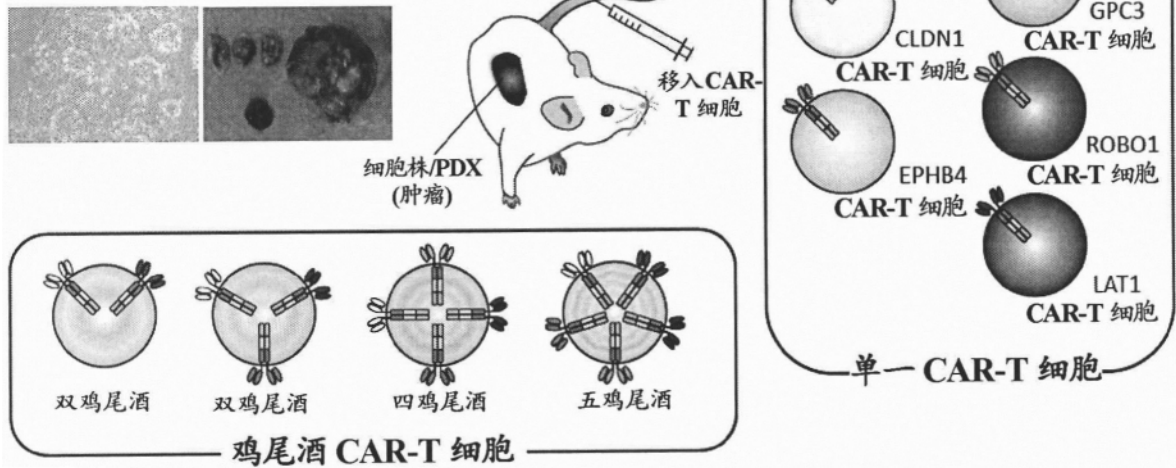


图66

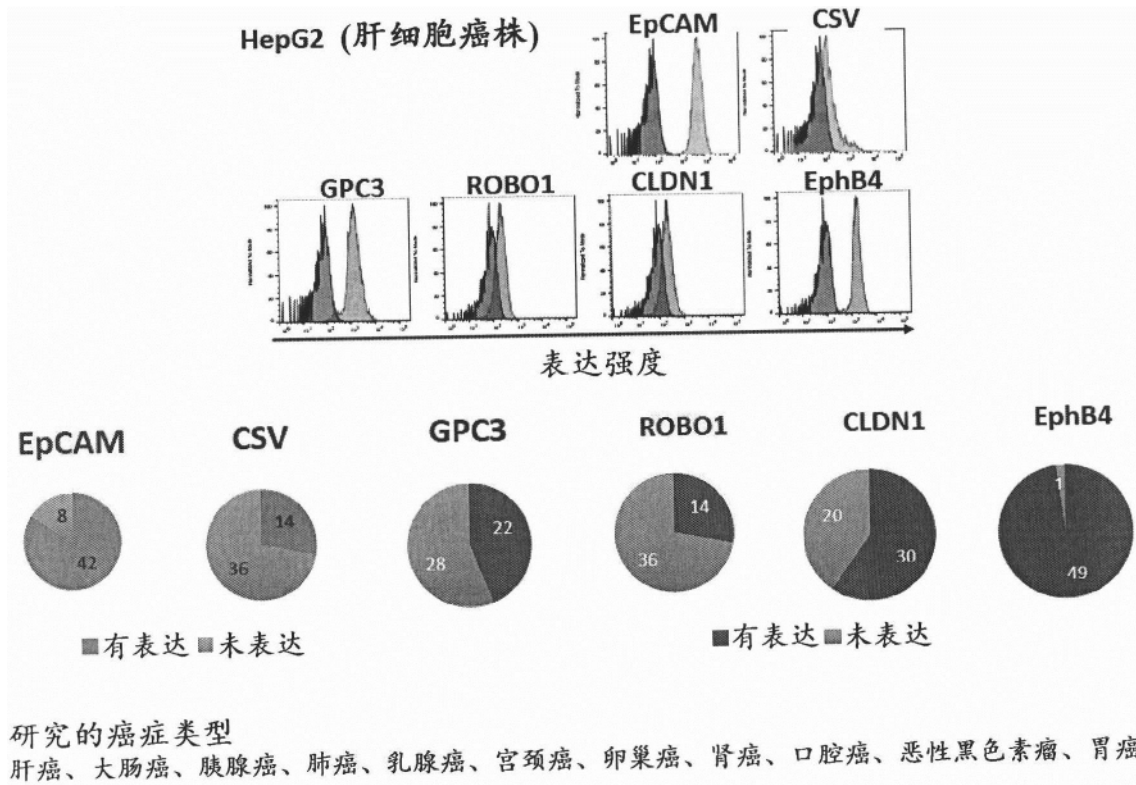


图67

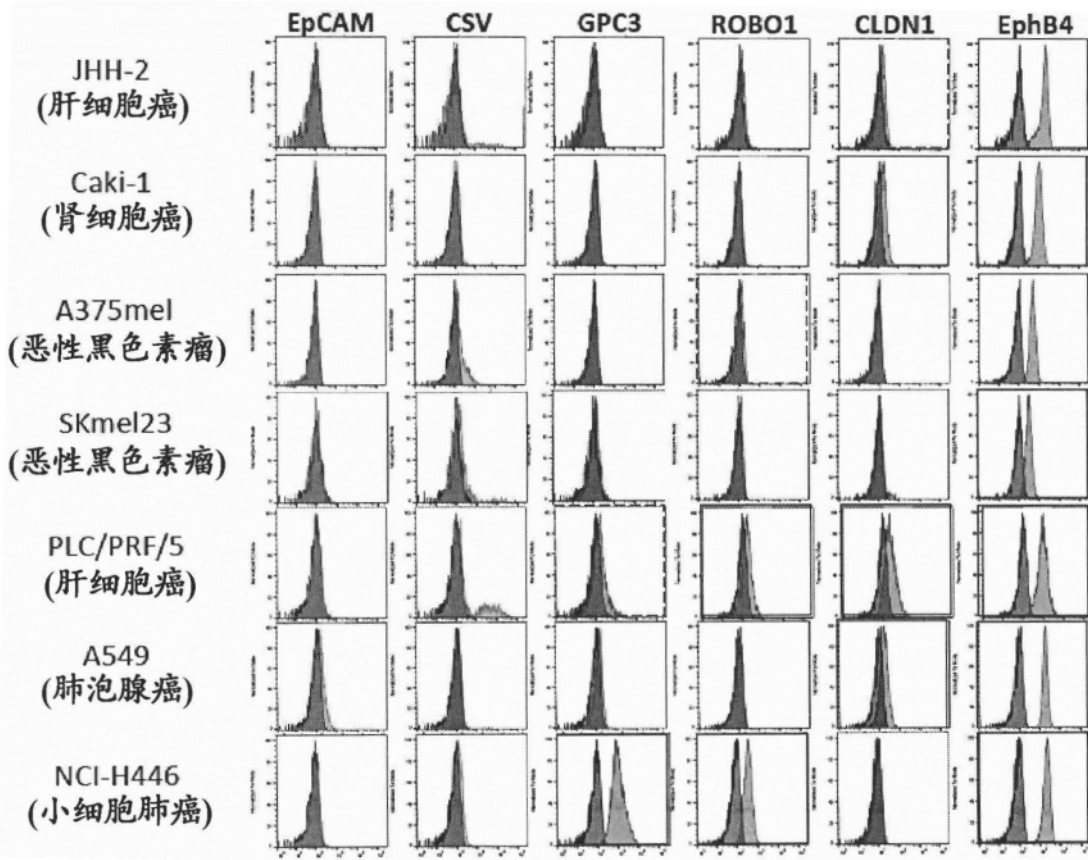


图68

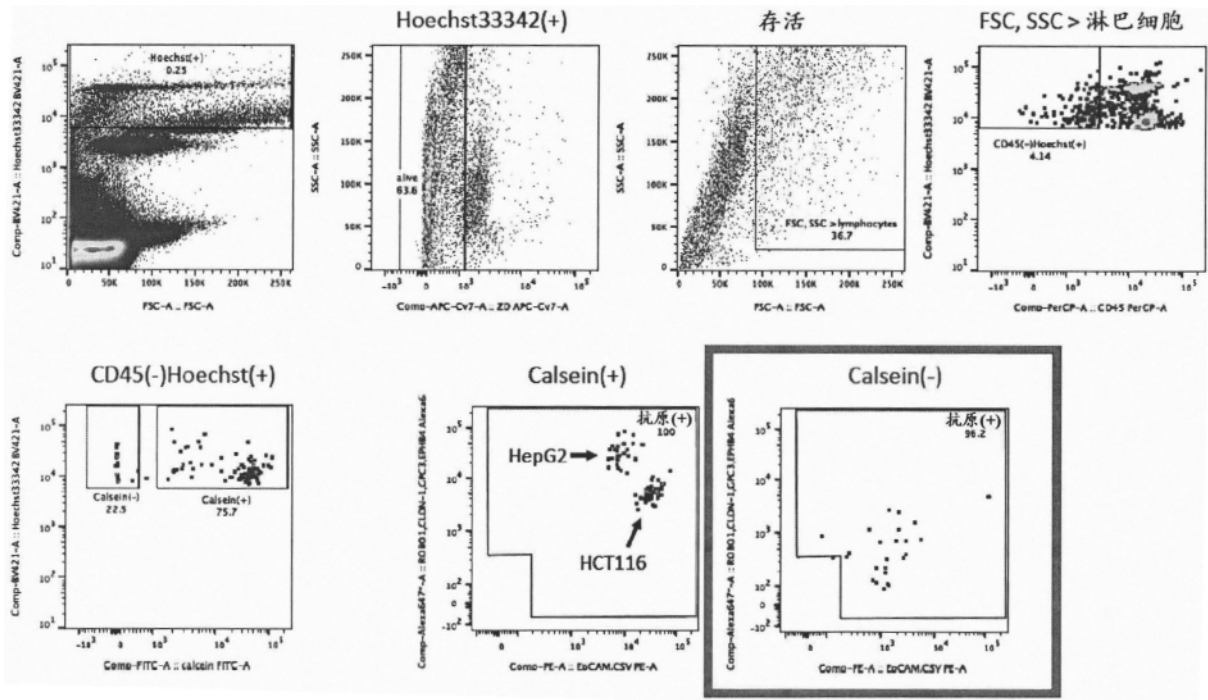


图69