



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107922469 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680041146.8

汉斯-格奥尔格·瑞明斯

(22)申请日 2016.07.14

(74)专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务
所(普通合伙) 31257

(30)优先权数据

1512369.8 2015.07.15 GB

62/192,670 2015.07.15 US

代理人 董红曼

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.01.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/066706 2016.07.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/009400 EN 2017.01.19

(71)申请人 伊玛提克斯生物技术有限公司
地址 德国蒂宾根

(72)发明人 海科·舒斯特 珍妮特·佩佩尔
菲利普·瓦格纳

权利要求书4页 说明书71页
序列表104页 附图8页

(54)发明名称

用于上皮性卵巢癌和其他癌症免疫治疗的
新型肽和肽组合物

(57)摘要

本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白、核酸和细胞。特别是,本发明涉及癌症的免疫疗法。本发明还涉及单独使用或与其他肿瘤相关肽(能够例如作为刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激T细胞并转入患者的疫苗组合物的活性药物成分)联合使用的肿瘤相关T细胞(CTL)肽表位。与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽或与此同类的肽也可以是抗体、可溶性T细胞受体和其他结合分子的靶标。

1. 一种肽及其药用盐,所述肽包括选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.549的氨基酸序列、以及与SEQ ID No.1至SEQ ID No.XXX具有至少88%同源性的其变体序列,其中变体肽与主要组织相容性复合体(MHC)结合和/或诱导T细胞与该变体肽发生交叉反应,其中所述肽不是全长多肽。

2. 根据权利要求1所述的肽,其中所述肽有能力与MHC-I或II类分子结合,其中所述肽与MHC结合时能够被CD4和/或CD8T细胞识别。

3. 根据权利要求1或2所述的肽或其变体,其中氨基酸序列包括任意SEQ ID No.1至SEQ ID No.549,尤其是SEQ ID No.1至SEQ ID No.319中任一个的连续氨基酸延伸区段。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的肽或其变体,其中所述肽或其变体的总长度为8至100个氨基酸、优选为8至30个氨基酸、更优选为8至16个氨基酸、最优选为该肽由或基本由SEQ ID No.1至SEQ ID No.549,尤其是SEQ ID No.1至SEQ ID No.319中任一个的氨基酸序列组成。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的肽或其变体,其中所述肽被修饰,和/或包含非肽键。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的肽或其变体,其中所述肽为融合蛋白的一部分,尤其包含HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N端氨基酸。

7. 一种核酸,编码权利要求1至6中任一项所述的肽或其变体,其任选地连接到异源激活子序列。

8. 一种表达载体,表达权利要求7所述的核酸。

9. 一种重组宿主细胞,其包括权利要求1至6所述的肽、权利要求7所述的核酸、权利要求8所述的表达载体,其中所述宿主细胞优选为抗原提呈细胞,例如树突状细胞。

10. 权利要求1至6任一项中所述的肽或其变体、权利要求7中所述的核酸、权利要求8中所述的表达载体、或权利要求9所述的宿主细胞在药物中的用途。

11. 一种制备权利要求1至6中任一项所述的肽或其变体的方法,该方法包括培养权利要求9所述的宿主细胞,该宿主细胞提呈权利要求1至6所述的肽、或表达权利要求7所述的核酸、或载有权利要求8所述的表达载体,以及从该宿主细胞或其培养基中分离出肽或其变体。

12. 一种体外制备激活的T淋巴细胞的方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人I或II类MHC分子体外接触一段时间,该时间足以以抗原特异性的方式激活T细胞,人I或II类MHC分子在合适的抗原提呈细胞表面或人工模拟的抗原提呈细胞结构表面上表达,其中所述抗原为权利要求1至4任一项中所述的肽。

13. 一种激活的T淋巴细胞,由权利要求12所述的方法制成,其有选择性地识别一种细胞,该细胞提呈含权利要求1至4任一项中给定氨基酸序列的多肽。

14. 一种杀灭患者中靶细胞的方法,其中该靶细胞提呈含有权利要求1至4中任一项给出的氨基酸序列的多肽,所述方法包括向患者施用有效量的权利要求13所述的激活的T细胞。

15. 一种抗体,特别是可溶性或膜结合性抗体,其特异性地识别权利要求1至5中所述的肽或其变体,优选为与MHC分子结合时的权利要求1至5中任一项所述的肽或变体。

16. 权利要求1至6任一项中所述的肽、权利要求7所述的核酸、权利要求8所述的表达载

体、权利要求9所述的细胞或权利要求13所述的激活的毒性T淋巴细胞或权利要求15所述的抗体在诊断和/或治疗癌症或制造抗癌药剂中的用途。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述癌症选自卵巢癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾癌、脑癌、结肠癌或直肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌和过度表达能够衍生得到SEQ ID No.1至SEQ ID No.549的肽的蛋白的其他肿瘤,尤其是卵巢癌。

18. 一种试剂盒,包括:

(a) 容器,包含药物组合物,该药物组合物含有权利要求1至6中任一项所述的肽或变体、权利要求7所述的核酸、权利要求8所述的表达载体、权利要求10所述的细胞、权利要求13所述的激活的T淋巴细胞、或权利要求15所述的抗体,以溶液或冻干的形式;

(b) 任选地,第二个容器,其含有冻干剂型的稀释液或重构液;

(c) 任选地,至少一种以上选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.549的肽,以及

(d) 任选地,(i) 使用溶液或(ii) 重构和/或使用冻干剂型的说明书。

19. 根据权利要求18所述的试剂盒,进一步包括一个或多个(iii) 缓冲剂,(iv) 稀释剂,(v) 过滤液,(vi) 针,或(v) 注射器。

20. 根据权利要求18或19所述的试剂盒,其中所述肽选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.549。

21. 一种用于生产个性化抗癌疫苗以用作个体患者的基于化合物的和/或细胞疗法,所述方法包括:

a) 识别个体患者的肿瘤样本所提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);

b) 将a) 中识别的肽与已经针对免疫原性和/或在肿瘤中相对正常组织过提呈进行预先筛选的肽库进行比较;

c) 选择库中的与在该患者中识别的TUMAP匹配的至少一种肽;以及

d) 基于步骤c) 制备个性化疫苗。

22. 根据权利要求21中所述的方法,其中所述TUMAP通过以下方法识别:

a1) 将肿瘤样本的表达数据与肿瘤样本组织类型相应的正常组织样本的表达数据进行比较,以识别在肿瘤样本中过表达或异常表达的蛋白;和

a2) 将表达数据与肿瘤样本中与MHC I类和/或II类分子结合的MHC配体的序列相关联,以识别源自于肿瘤过表达或异常表达的蛋白的MHC配体。

23. 根据权利要求21或22所述的方法,其中MHC配体的序列的识别是通过洗脱由肿瘤样本分离的MHC分子的结合肽,并对所洗脱的配体进行测序。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的方法,其中与肿瘤样本组织类型相应的正常组织样本获得自同一患者。

25. 根据权利要求21至24中任一项所述的方法,其中包含在库中的肽基于以下步骤进行识别:

aa. 通过高度平行的方法,例如微阵列或基于测序的表达谱,进行全基因组信使核糖核酸(mRNA)表达分析,其包括识别相较于正常组织在恶性组织中过表达的基因;

ab. 选择步骤aa检测到的有选择地表达或过表达的基因所编码的肽,以及

ac. 通过选定的肽确定体内T细胞反应的诱导,包括使用来自健康供体或所述患者的人

类T细胞而进行的体外免疫原性测定;或

ba. 用质谱法识别来自所述肿瘤样本的HLA配体;

bb. 通过高度平行的方法,例如微阵列或基于测序的表达谱,进行全基因组信使核糖核酸(mRNA)表达分析,其包括识别相较于正常组织在恶性组织中过表达的基因;

bc. 比较所识别的HLA配体与该基因表达数据;

bd. 选择步骤bc检测到的有选择地表达或过表达的基因所编码的肽;

be. 重新检测肿瘤组织上且在健康组织上缺乏或不经常检测到的由步骤bd选定的TUMAP,并确定在mRNA水平上过表达的相关性;以及

bf. 通过选定的肽确定体内T细胞反应的诱导,包括使用来自健康供体或所述患者的人类T细胞的体外免疫原性测定。

26. 根据权利要求21至25任一项所述的方法,其中包含在库中的肽的免疫原性通过包括体外免疫原性检测、针对个别HLA结合性的患者免疫监测、MHC多聚体染色、ELISPOT分析和/或细胞内细胞因子染色的方法而确定。

27. 根据权利要求21至26任一项所述的方法,其中所述库包括多个选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.549的肽。

28. 根据权利要求21至27任一项所述的方法,其还包括,识别该肿瘤样本与该个体患者的相应正常组织相比而独特具有的至少一种突变,以及选择与该突变相关的肽,使其包含于疫苗中或用于产生细胞疗法。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述至少一种突变通过全基因组测序而识别。

30. 一种T细胞受体,优选为与HLA配体反应的可溶性或膜结合的T细胞受体,其中所述配体与选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.549的氨基酸序列具有至少75%同源性。

31. 根据权利要求30所述的T细胞受体,其中所述氨基酸序列与SEQ ID No.1至SEQ ID No.549具有至少88%同源性。

32. 根据权利要求30或31所述的T细胞受体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID No.1至SEQ ID No.549中的任一个构成。

33. 根据权利要求30至32中任一项所述的T细胞受体,其中所述T细胞受体以可溶性分子提供并任选地具有其他效应子功能,如免疫刺激结构域或毒素。

34. 一种核酸,其编码权利要求30至33中任一项所述的TCR,并任选地连接到异源激活子序列。

35. 一种表达载体,其能够表达权利要求34所述的核酸。

36. 一种宿主细胞,其包括权利要求34所述的核酸、或编码权利要求15所述的抗体的核酸、或权利要求35所述的表达载体,其中所述宿主细胞优选为T细胞或NK细胞。

37. 一种制备权利要求30至33中任一项所述的T细胞受体的方法,所述方法包括培养权利要求36所述的宿主细胞,以及从宿主细胞和/或其培养基中分离出所述T细胞受体。

38. 一种药物组合物,其包括至少一种选自以下的活性成分:

a) 选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.549的肽或其药学可接受盐;

b) 与a)中的肽和/或肽MHC复合体反应的T细胞受体;

c) 包含a)中的肽以及HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的第1至80N端氨基酸的融合蛋白;

d) 编码a)至c)中任一项的核酸或包含该核酸的表达载体;

e) 包括d) 中表达载体的宿主细胞,

f) 一种激活的T淋巴细胞,通过包括将T细胞与a) 中的肽进行体外接触一段时间的方法以及将这些活化的T细胞转入自体或其他患者的方法而获得,其中接触的一段时间足以以抗原特异性的方式激活该T细胞,且该肽在合适的抗原提呈细胞表面表达;

g) 与a) 中的肽和/或肽MHC复合体、和/或提呈a) 中的肽的细胞反应,并有可能通过与例如免疫激活结构域或毒素融合而修饰的抗体或可溶性T细胞受体;

h) 一种适体,其识别选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.549的肽和/或选自SEQ ID No.1至SEQ ID No.549的肽与MHC分子的复合体;

i) 根据a) 至h) 中任一项的共轭或标记肽或支架、以及药学可接受的载体,以及任选地,药学可接受的赋形剂和/或稳定剂。

39. 一种适体,其特异性地识别权利要求1至5中任一项所述的肽或其变体,优选为权利要求1至5中任一项所述的与MHC分子结合的肽或其变体。

用于上皮性卵巢癌和其他癌症免疫治疗的新型肽和肽组合物

[0001] 本发明涉及用于免疫治疗方法的肽、蛋白质、核酸和细胞。特别是,本发明涉及癌症的免疫疗法。本发明还涉及单独使用或与其他肿瘤相关肽(刺激抗肿瘤免疫反应或体外刺激T细胞并转入患者的疫苗复合物的活性药物成分)联合使用的肿瘤相关T细胞(CTL)肽表位。与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的肽或与此同类的肽也可以是抗体、可溶性T细胞受体和其他结合分子的靶标。

[0002] 本发明涉及数种新型肽序列及其变体,它们源自人肿瘤细胞的HLA-I和HLA-II类分子,可用于引发抗肿瘤免疫反应的疫苗组合物中或作为开发药物/免疫活性化合物和细胞的目标物。

[0003] 发明背景

[0004] 上皮性卵巢癌(EOC)仍然是妇科恶性肿瘤死亡的主要原因,也是西方国家癌症相关死亡的第五大原因,2014年美国估计有22,000例新诊断病例和14,000例死亡病例(1)。唯一可用的治愈性治疗方案是未转移早期完全手术切除肿瘤。但是,大多数(>70%)患者由于缺乏特定的早期症状而被诊断为III或IV期疾病。尽管化疗方案取得了进展并且贝伐单抗最近获批作为一线治疗,但大多数患者在初始治疗后几个月或几年内复发(2,3)。

[0005] 考虑到治疗癌症相关的严重副作用和费用,通常有必要确定可用于治疗癌症的因子,尤其是卵巢癌。通常也有必要确定代表癌症生物标志物的因子,尤其是卵巢癌,从而更好地诊断癌症、评估预后和预测治疗成功性。

[0006] 癌症免疫治疗代表了癌症细胞特异性靶向作用的一个选项,同时最大限度地减少副作用。癌症免疫疗法利用存在的肿瘤相关抗原。

[0007] 肿瘤相关抗原(TAA)的目前分类主要包括以下几组:

[0008] a) 癌-睾丸抗原: T细胞能够识别的最先确认的TAA属于这一类抗原,由于其成员表达于组织学相异的人肿瘤中、正常组织中、仅在睾丸的精母细胞/精原细胞中、偶尔在胎盘中,因此,它最初被称为癌-睾丸(CT)抗原。由于睾丸细胞不表达HLA I类和II类分子,所以,在正常组织中,这些抗原不能被T细胞识别,因此在免疫学上可考虑为具有肿瘤特异性。CT抗原大家熟知的例子是MAGE家族成员和NY-ESO-1。

[0009] b) 分化抗原: 肿瘤和正常组织(肿瘤源自该组织)都含有TAA。大多数已知的分化抗原发现于黑色素瘤和正常黑色素细胞中。许多此类黑色素细胞谱系相关蛋白参与黑色素的生物合成,因此这些蛋白不具有肿瘤特异性,但是仍然被广泛用于癌症的免疫治疗。例子包括,但不仅限于,黑色素瘤的酪氨酸酶和Melan-A/MART-1或前列腺癌的PSA。

[0010] c) 过量表达的TAA: 在组织学相异的肿瘤中以及许多正常组织中都检测到了基因编码被广泛表达的TAA,一般表达水平较低。有可能许多由正常组织加工和潜在提呈的表位低于T细胞识别的阈值水平,而它们在肿瘤细胞中的过量表达能够透过打破先前确立的耐受性而引发抗癌反应。这类TAA的典型例子为Her-2/neu、生存素、端粒酶或WT1。

[0011] d) 肿瘤特异性抗原: 这些独特的TAA产生于正常基因(如 β -catenin、CDK4等)的突变。这些分子变化中有一些与致癌性转化和/或进展相关。肿瘤特异性抗原一般可在不对正常组织带来自体免疫反应风险的情况下诱导很强的免疫反应。另一方面,这些TAA在多数情

况下只与其上确认了有TAA的确切肿瘤相关,并且通常在许多个体肿瘤之间并不都共享TAA。在含有肿瘤特定(相关)同种型蛋白的情况下,如果肽源自肿瘤(相关)外显子也可能出现肽肿瘤特异性(或相关性)。

[0012] e) 由异常翻译后修饰产生的TAA:此类TAA可能由肿瘤中既不具有特异性也不过量表达的蛋白产生,但其仍然具有肿瘤相关性(该相关性由主要对肿瘤具有活性的翻译后加工所致)。此类TAA产生于变糖基化模式的改变,导致肿瘤产生针对MUC1的新型表位或在降解过程中导致诸如蛋白拼接的事件,这可能具有也可能不具有肿瘤特异性。

[0013] f) 肿瘤病毒蛋白:这些TTA是病毒蛋白,可在致癌过程中发挥关键作用,并且由于它们是外源蛋白(非人源蛋白),所以能够激发T细胞反应。这类蛋白的例子有人乳头状瘤16型病毒蛋白、E6和E7,它们在宫颈癌中表达。

[0014] 在过去的二十年里,基于不同的临床发现,E0C被认为是一种高度免疫原性肿瘤。E0C是最早显示频繁的免疫细胞浸润的癌症之一,其中可确定T细胞浸润与临床预后明确相关。在这些浸润T细胞群体内,已发现肿瘤反应性和抗原特异性T细胞。而肿瘤驻留调节性T细胞(Treg)与临床结果呈负相关。此外,免疫刺激性细胞因子已被证明可在个体患者中诱导明显的肿瘤反应。

[0015] 黑色素瘤治疗中免疫检查点抑制剂的最新开发和批准说明了免疫治疗方法对癌症治疗的有效性。而且,抗原特异性肽疫苗接种和过继性T细胞转移开始在黑色素瘤和其它免疫原性肿瘤(例如:肾细胞癌)中显示取得了成功。个性化免疫治疗甚至具有治愈的可能,并且对于个体患者表现出惊人的结果。

[0016] 基于T细胞的免疫治疗靶向作用于主要组织相容性复合体(MHC)分子提呈的来源于肿瘤相关蛋白或肿瘤特异性蛋白的肽表位。肿瘤特异性T淋巴细胞所识别的抗原,即其表位,可以是源自所有蛋白类型的分子,如酶、受体、转录因子等,它们在相应肿瘤的细胞中被表达,并且与同源未变的细胞相比,其表达通常上调。

[0017] MHC分子有两类:MHC I类和MHC II类。MHC I类分子由一条 α 重链和 β -2-微球蛋白,MHC II类分子由一条 α 和一条 β 链组成。其三位构造形成一个结合槽,用于与肽进行非共价相互作用。

[0018] 大部分有核细胞上都可发现MHC-I类分子。他们提呈主要为内源性的蛋白、缺陷核糖体产物(DRIP)和较大肽裂解生成的肽。然而,源自内体结构或外源性来源的肽也经常发现于MHC-I类分子上。这种I-类分子非经典提呈方式在文献中被称为交叉提呈(BroSart and Bevan,1997;Rock et al.,1990)。MHC II类分子主要发现于专业抗原提呈细胞(APC)上,并且主要提呈,例如,在内吞作用过程中由APC占据并且随后被加工的外源性或跨膜蛋白的肽。

[0019] 肽和MHC I类的复合体由负载相应T细胞受体(TCR)的CD8阳性T细胞进行识别,而肽和MHC II类分子的复合体由负载相应TCR的CD4阳性辅助T细胞进行识别。因此,TCR、肽和MHC按照1:1:1的化学计量呈现,这一点已是共识。

[0020] CD4阳性辅助T细胞在诱导和维持CD8阳性细胞毒性T细胞的有效反应中发挥重要作用。肿瘤相关抗原(TAA)衍生的CD4阳性T细胞表位的识别对开发能引发抗肿瘤免疫反应的药物产品可能非常重要(Gnjatic et al.,2003)。在肿瘤部位,T辅助细胞维持着对细胞毒性T细胞(CTL)友好的细胞因子环境(Mortara et al.,2006)并吸引效应细胞,如CTL、天

然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和粒细胞(Hwang et al.,2007)。

[0021] 在没有炎症的情况下,MHC II类分子的表达主要局限于免疫系统细胞,尤其是专业抗原提呈细胞(APC),例如,单核细胞、单核细胞源性细胞、巨噬细胞、树突状细胞。在癌症患者的肿瘤细胞中发现有MHC II类分子的表达(Dengjel et al.,2006)。

[0022] 本发明的拉长(较长)肽可作为MHC-II类活性表位。MHC-II类表位活化的辅助T细胞在编排抗肿瘤免疫的CTL效应子功能中发挥着重要作用。触发 T_H1 细胞反应的辅助T细胞表位支援CD8阳性杀伤T细胞的效应子功能,其中包括直接作用于肿瘤细胞的细胞毒性功能(该类肿瘤细胞表面显示有肿瘤相关肽/MHC复合体)。这样,肿瘤相关T辅助细胞表位单独使用或与其他肿瘤相关肽结合使用可作为刺激抗肿瘤免疫反应的疫苗化合物的活性药物成分。

[0023] 哺乳动物(如小鼠)模型显示,即使没有CD8阳性T淋巴细胞,CD4阳性T细胞也能通过分泌干扰素- γ (IFN γ)抑制血管生成而足以抑制肿瘤的表现(Beatty and Paterson, 2001;Mumberg et al.,1999)。没有CD4T细胞作为直接抗肿瘤效应因子的证据(Braumuller et al.,2013;Tran et al.,2014)。

[0024] 由于HLA II类分子的组成性表达通常仅限于免疫细胞,因此,直接从原发肿瘤中分离II类肽之前被认为是不可能的事。然而,Dengjel等人成功地在肿瘤中直接识别了多个MHC II类表位(WO 2007/028574,EP 1 760 088 B1)。

[0025] 由于CD8依赖型和CD4依赖型这两种反应共同并协同地促进抗肿瘤作用,因此,确定和表征由CD8+T细胞(配体:MHC I类分子+肽表位)或CD4阳性T辅助细胞(配体:MHC II类分子)识别的肿瘤相关抗原对开发肿瘤疫苗非常重要。

[0026] 对于MHC I类肽触发(引发)细胞免疫反应的肽,它也必须与MHC分子结合。这一过程依赖于MHC分子的等位基因以及肽氨基酸序列的特异性多态性。MHC-I类-结合肽的长度通常为8-12个氨基酸残基,并且在与其与MHC分子相应结合沟槽相互作用的序列中通常包含两个保守残基(“锚”)。这样,每个MHC的等位基因都有“结合基序”,从而确定哪些肽能与结合沟槽特异性结合。

[0027] 在MHC-I类依赖性免疫反应中,肽不仅能与肿瘤细胞表达的某些MHC-I类分子结合,而且它们之后还必须能被T细胞负载的特异性T细胞受体(TCR)识别。

[0028] 对于被T淋巴细胞识别为肿瘤特异性抗原或相关性抗原以及用于治疗蛋白质,必须具备特殊的条件。该抗原应主要由肿瘤细胞表达,而不由正常健康组织表达,或表达数量相对较少。在一个优选的实施方案中,与正常健康组织相比,所述肽应在肿瘤细胞中过度提呈。更为适宜的情况是,该相应抗原不仅出现于一种肿瘤中,而且浓度(即每个细胞的相应肽拷贝数目)高。肿瘤特异性抗原和肿瘤相关抗原往往是源自直接参与因细胞周期控制或凋亡抑制中的其功能而发生的正常细胞向肿瘤细胞转化的蛋白。另外,这些直接导致转化事件的蛋白的下游靶标可能会被上调,因此可能与肿瘤间接相关。这些间接肿瘤相关抗原也可能是预防接种方法的靶标(Singh-Jasuja et al.,2004)。至关重要的是,表位存在于抗原氨基酸序列中,以确保这种来自肿瘤相关抗原的肽(“免疫原性肽”)可导致体外或体内T细胞反应。

[0029] 基本上,任何能与MHC分子结合的肽都可能充当一个T细胞表位。诱导体外或体内T细胞反应的前提是存在具有相应TCR的T细胞并且不存在对该特定表位的免疫耐受性。

[0030] 因此,TAA是基于T细胞疗法(包括但不限于肿瘤疫苗)研发的起点。识别和表征TAA的方法通常基于对患者或健康受试者T细胞的使用情况,或基于肿瘤与正常组织肽之间差别转录特性或差别表达模式的产生。然而,对肿瘤组织或人肿瘤细胞株中过量表达或选择性表达的基因的识别并不提供在免疫疗法中使用这些基因所转录抗原的准确信息。这是因为,有着相应TCR的T细胞必须要存在而且对这个特定表位的免疫耐受性必须不存在或为最低水平,因此,这些抗原的表位只有一部分适合这种应用。因此,在本发明的一非常优选的实施例中,只选择那些针对可发现功能性和/或增殖性T细胞情况的过量提呈或选择性提呈肽,这一点非常重要。这种功能性T细胞被定义为在以特异性抗原刺激后能够克隆地扩展并能够执行效应子功能(“效应子T细胞”)的T细胞。

[0031] 在透过根据本发明的特定TCR(例如可溶性TCR)和抗体或其他结合分子(支架)靶向作用于肽-MHC的情况下,潜在肽的免疫原性是次要的。在这些情况下,提呈是决定因素。

[0032] 发明简介

[0033] 在本发明的第一方面,本发明涉及一种肽或其药用盐,包含选自SEQ ID NO:1 至SEQ ID NO:549的氨基酸序列、或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549具有至少77%,优选至少88%同源(优选至少77%或至少88%相同)的变体序列,其中变体与MHC结合和/或诱导T细胞与所述肽发生交叉反应,其中所述肽不是潜在的全长多肽。

[0034] 本发明进一步涉及本发明的肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549的序列、或与SEQ ID NO:1 至SEQ ID NO:549具有至少77%、优选至少88%同源性(优选为至少77%或至少88%相同)的变体,其中所述肽或其变体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸。

[0035] 下表显示了根据本发明的肽、它们各自的SEQ ID NO、以及这些肽的可能源(潜在)基因。表1和表2中的所有肽均与HLA-A*02结合。表2中的肽之前在大型列表中披露,作为高通量筛查结果,错误率高,或使用算法计算出,但之前与癌症毫无关联。表3中的肽是可与本发明其他肽组合使用的其他肽。表4中的肽还可用于诊断和/或治疗各种其他恶性疾病,这些疾病涉及过量表达或过度提呈各潜在多肽。

[0036] 表1:本发明中的肽。X=S、R或G

[0037]

序列 ID 号	序列	基因 ID	HLA 结合
1	QFITSTNTF	MUC16	A*24:02
2	STETSTVLY	MUC16	A*01
3	AHSKITTAM	MUC16	B*39:01
4	AVKTETSTSER	MUC16	A*31:01
5	AVTNVRTSI	MUC16	B*13
6	DALTPLVTI	MUC16	B*5101
7	DALVLKTV	MUC16	B*51
8	DPYKATSAV	MUC16	B*51
9	EPETTTSFITY	MUC16	B*35
10	ERSPVIQTL	MUC16	B*39:01
11	ETILTFHAF	MUC16	A*25
12	EVISSRGTSM	MUC16	A*25
13	EVITSSRTTI	MUC16	A*25
14	EVTSSGRTSI	MUC16	A*25
15	FPEKTTHSF	MUC16	B*35
16	FPHSEETTM	MUC16	B*35
17	FPHSEITTL	MUC16	B*35
18	FQRQQQTAL	MUC16	B*15:01
19	GDVPRPSSL	MUC16	B*08:01
20	GHESHSPAL	MUC16	B*39:01
21	GHTTVSTSM	MUC16	B*39:01
22	GTHSPVTQR	MUC16	A*31:01
23	GTSGETPVSK	MUC16	A*11
24	HPDPQSPGL	MUC16	B*35
25	IPIRVFTSSI	MUC16	B*51
26	ISDEVVTRL	MUC16	C*05
27	ISIGTIPRI	MUC16	B*15:17
28	ISKEDVTSI	MUC16	B*15:17
29	ITETSAVLY	MUC16	A*01

[0038]

30	ITRLPTSSI	MUC16	B*15:17
31	KDTAHEAM	MUC16	B*44:02
32	KEDSTALVM	MUC16	B*40/B*44
33	KEVTSSSSVL	MUC16	B*40/B*44/?
34	LPHSEITTL	MUC16	B*35
35	LTISTHKTI	MUC16	B*15:17
36	LTKSEERTI	MUC16	B*15:17
37	RDSLYVNGF	MUC16	B*44:02
38	RETSTSQKI	MUC16	B*18:01
39	RSSGVTF SR	MUC16	A*31:01
40	SAFESHSTV	MUC16	B*51
41	SATERSASL	MUC16	C*03/?
42	SENSETTAL	MUC16	B*40/B*44/?
43	SEQRTSPSL	MUC16	?
44	SESPSTIKL	MUC16	B*40/?
45	SPAGEAHS L	MUC16	B*07/B*56
46	SPAGEAHSLLA	MUC16	B*56:01
47	SPHPVSTTF	MUC16	B*07:02
48	SPHPVTALL	MUC16	B*07:02
49	SPLFQRSSL	MUC16	B*0702
50	SPQNLRNTL	MUC16	B*35/B*07:02
51	SPRLNTQGNTAL	MUC16	B*07:02
52	SPSEAITRL	MUC16	B*07:02
53	SPSKAFASL	MUC16	B*35/B*07:02
54	SPSSPTPKV	MUC16	B*07:02
55	SPSSQAPVL	MUC16	B*07:02
56	SQGFSHSQM	MUC16	B*15:01
57	SRTEVISSR	MUC16	B*27
58	SSAVSTTTI	MUC16	B*15:17
59	SSPLRV TSL	MUC16	n/a
60	STASSLSK	MUC16	A*11
61	STQRVTTSM	MUC16	B*07?
62	STSQEIH SATK	MUC16	A*11
63	SVLADLV TTK	MUC16	A*03:01
64	SVPDILSTSW	MUC16	A*24:02
65	TAGPTTHQF	MUC16	C*03
66	TEISSR TSI	MUC16	B*49:01
67	TENTGKEKL	MUC16	B*40/B*44
68	TETEAHVF	MUC16	B*18
69	TEVSRTEVI	MUC16	B*49:01
70	TE _x VLQGLL	MUC16	B*40/B*44/?
71	TPGGTRQSL	MUC16	B*07:02/B*35
72	TPGNRAISL	MUC16	B*07:02/B*35

[0039]

73	TPNSRGETSL	MUC16	B*07:02
74	TSGPVTEKY	MUC16	B*35
75	TSPAGEAHS	MUC16	?
76	VHESHSSVL	MUC16	B*39:01
77	VPRSAATTL	MUC16	B*07:02/B*35
78	VTSAPGRSI	MUC16	B*15:17
79	VTSSSRTSI	MUC16	B*15:17
80	YPDPSKASSAM	MUC16	B*35
81	AAWLRSA	MMP11	B*55/B*56
82	APAAWLRSA	MMP11	B*55/B*56
83	APAAWLRSA	MMP11	B*55/B*56
84	LPSPVDAAF	MMP11	B*35
85	RGVPSEIDAAF	MMP11	B*58
86	EAGPPAFYR	ESR1	A*66
87	STSSHSLQK	ESR1	A*03/A*11
88	APHLHLSA	KLK10	B*56:01
89	APHLHLSAA	KLK10	B*56:01
90	RALAKLLPL	KLK10	B*08/A*02
91	SAASGARAL	KLK10	C*03
92	VLVDQSWVL	KLK10	A*02
93	DYLKRFYLY	MMP7	A*24
94	SETKNANSL	MMP7	B*44/B*41/B*40
95	SSDPNAVMY	MMP7	A*01
96	YPFDGPGNTL	MMP7	B*35
97	YPFDGPGNTLAH	MMP7	B*35
98	NEIERVFW	EYA2	B*44:02
99	NVGGLIGTPK	EYA2	A*03
100	RVKEMYNTY	EYA2	A*30/A*32
101	SAPLRVSQL	EYA2	?
102	DTDEYVLKY	EFHC1	A*01
103	KDSTKTAF	EFHC1	B*44
104	SKAPVLTY	EFHC1	B*15:03
105	AEYTDVLQKI	EPS8L1	B*49
106	EYTDVLQKI	EPS8L1	A*24
107	RPHLTSDA	EPS8L1	B*56
108	RPHLTSDAV	EPS8L1	B*56
109	RPHLTSDAVA	EPS8L1	B*56
110	SAKSIYEQR	EPS8L1	A*31
111	SPEEGARVY	EPS8L1	B*35
112	SQYPVNHLV	EPS8L1	B*15
113	YPVNHLVTF	EPS8L1	B*35
114	AAASATKVI	ID01	C*12
115	IHDHVNPKAFF	ID01	B*38

[0040]

116	NPKAFFSVL	ID01	B*07
117	NPSVREFVL	ID01	B*35
118	RSYHLQIVTK	ID01	A*11/A*03
119	RYMPPAHRNF	ID01	A*24
120	TEFEQYLHF	SOX17	B*18/B*44
121	VSDASSAVVY	SOX17	A*01
122	AEIEADRSY	LAMC2	B*44
123	AQKVDTRAK	LAMC2	A*03
124	HPSAHDVIL	LAMC2	B*35:03
125	RIKQKADSL	LAMC2	B*08
126	SEGASRSLGL	LAMC2	B*37
127	SVDEEGLVLL	LAMC2	A*02
128	SVHKITSTF	LAMC2	A*25
129	TREATQAEI	LAMC2	B*39
130	VYFVAPAKF	LAMC2	A*24
131	APQSAHAAF	SGPL1	B*07
132	ETIIIFHSL	EYA3	A*25
133	TELLVKAY	SGPL1	B*18
134	WQEGRASCTVY	SGPL1	B*15
135	IRSENFEEEL	CRABP2	B*39
136	KIAVAAASK	CRABP2	A*03
137	NVMLRKIAV	CRABP2	B*08
138	RELTNDGELIL	CRABP2	B*40/B*44
139	VAAASKPAV	CRABP2	?
140	SPNAIFKAL	SOX9	B*07
141	SSKNKPHVKR	SOX9	A*31
142	TPASAGHVW	SOX9	B*07
143	YTDHQNSSSY	SOX9	A*01
144	AEVLLPRL	MSLN	B*40
145	AVLPLTVAEVQK	MSLN	A*03
146	LPTARPLL	MSLN	B*07
147	RVRELAVAL	MSLN	A*02
148	NLPIFLPRV	MLPH	A*02
149	RVHPEEQGW	MLPH	B*58
150	TVKPSGKPR	MLPH	A*31
151	YYEHVKARF	MLPH	A*24
152	AARPAGATL	ERBB2	B*07
153	MPNPEGRTYF	ERBB2	B*35
154	FYIKTSTTV	CRABP2	A*24
155	RTTEINFKV	CRABP2	A*02
156	YIKTSTTV	CRABP2	B*08
157	GQAAQGPTI	DDR1	B*15
158	HRFLAEDAL	DDR1	B*39:01

[0041]

159	EEVARFYAA	FOLR1	B*45
160	NPNEEVARF	FOLR1	B*35
161	NPNEEVARFY	FOLR1	B*35
162	KSQTLLGK	ULK1	A*11/A*03
163	DELISKSF	YPEL1	B*18
164	HDELISKSF	YPEL1	B*35
165	GRAYLFNSV	YPEL1	B*27
166	YLFNSVNV	YPEL1	A*02
167	APDNRPAL	MUC1	B*07/B*35
168	HHSPTPTTL	MUC1	B*38/B*39
169	HPMSEPTY	MUC1	B*35
170	LQRDISEM	MUC1	B*51
171	LQRDISEMF	MUC1	B*51
172	AIAEIGNQL	MMP9	A*02
173	DVAQVTGALR	MMP9	A*68
174	SEDLPRAVI	MMP9	B*49/B*40
175	APDAKSFVL	LGALS1	B*35
176	EVAPDAKSF	LGALS1	A*25
177	PPFQPGSVAEV	LGALS1	B*35
178	GEVAPDAKSFVL	LGALS1	B*40
179	LPDGYEFKF	LGALS1	B*35

[0042] 表2:本发明中的其他肽。X=S、R或G

序列 ID 号	序列	MHC 类型	基因
180	DKAFTAATTEVSR	II	MUC16
181	ELGPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
182	ELGPYTLDRNSLYVNG	II	MUC16
183	FDKAFTAATTEVSR	II	MUC16
184	GPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
185	LGPYTLDRDSLYVN	II	MUC16
186	LGPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
187	LGPYTLDRNSLYVNG	II	MUC16
188	STETITRLSTFPFVTG	II	MUC16
189	ELQWEQAQDYLR	II	MMP7
190	ELQWEQAQDYLRKRF	II	MMP7
191	GINFLYAATHELGHS	II	MMP7
192	LQWEQAQDYLR	II	MMP7
193	LQWEQAQDYLRKRF	II	MMP7
194	SELQWEQAQDYLR	II	MMP7
195	SELQWEQAQDYLRKRF	II	MMP7
196	VPYNILTPYPGPR	II	EPS8L1

[0043]

197	YVPYNILTPYPCPR	II	EPS8L1
198	GNWKIIRSENFEEL	II	CRABP2
199	GNWKIIRSENFEELLK	II	CRABP2
200	NWKIIRSENFEEL	II	CRABP2
201	PNFSGNWKIIRSENF	II	CRABP2
202	VMLRKIAVAAASKPA	II	CRABP2
203	WKIIRSENFEEL	II	CRABP2
204	LQRYSSDPTGALT	II	EGFR
205	NPTTYQMDVNPEGK	II	EGFR
206	NPTTYQMDVNPEGKY	II	EGFR
207	DDGGQFVVTNPVNNDG	II	CDH1
208	DKEGKVFYSITGQGADTPP	II	CDH1
209	DKEGKVFYSITGQGADTPPV	II	CDH1
210	DKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
211	DKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
212	DPELPDKNMFTINRNTG	II	CDH1
213	DPELPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
214	DPELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
215	DPELPDKNMFTINRNTGVISV	II	CDH1
216	DPELPDKNMFTINRNTGVISVV	II	CDH1
217	DPELPDKNMFTINRNTGVISVVT	II	CDH1
218	DVNTYNAAIAYTILS	II	CDH1
219	DVNTYNAAIAYTILSQ	II	CDH1
220	EGKVFYSITGQGADT	II	CDH1
221	EGKVFYSITGQGADTPP	II	CDH1
222	EGKVFYSITGQGADTPPV	II	CDH1
223	ELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
224	GGQFVVTNPVNN	II	CDH1
225	GKVFYSITGQGADT	II	CDH1
226	GPFPKNLVQIKSNKDK	II	CDH1
227	GPFPKNLVQIKSNKDKE	II	CDH1
228	GPFPKNLVQIKSNKDKEGK	II	CDH1
229	KNMFTINRNTGVI	II	CDH1
230	KNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
231	LPDKNMFTINRNTG	II	CDH1
232	LPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
233	LPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
234	PELPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
235	PELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
236	QDPELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
237	SQDPELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
238	SQDPELPDKNMFTINRNTGVISVVT	II	CDH1
239	SVPRYLPRPANPDE	II	CDH1

[0044]

240	TDGVITVKRPLRFHNPQ	II	CDH1
241	TRAELDREDFEHVK	II	CDH1
242	VPRYLPRPANPDE	II	CDH1
243	ALEFRALEPQGILL	II	AGRN
244	ALEFRALEPQGLLL	II	AGRN
245	DTRIFFVNPAPPY	II	AGRN
246	DTRIFFVNPAPPYL	II	AGRN
247	DTRIFFVNPAPPYLW	II	AGRN
248	DTRIFFVNPAPPYLWP	II	AGRN
249	DTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
250	EFRALEPQGLLL	II	AGRN
251	GAPVPAFEGRSFLAFPTL	II	AGRN
252	GDTRIFFVNPAPPYLWP	II	AGRN
253	GDTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
254	IVDVHFDPTTAFRAPD	II	AGRN
255	KVRVWRYLKGKDLVAR	II	AGRN
256	LALFRALEPQGLLL	II	AGRN
257	LEFRALEPQGLLL	II	AGRN
258	SGPFLADFNQFSH	II	AGRN
259	TGDTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
260	TRIFFVNPAPPYL	II	AGRN
261	VDVHFDPTTAFRAPD	II	AGRN
262	VDVHFDPTTAFRAPDV	II	AGRN
263	VRVWRYLKGKDLVAR	II	AGRN
264	APVPAFEGRSFLAFPT	II	AGRN
265	APVPAFEGRSFLAFPTL	II	AGRN
266	ALRGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
267	DLPGRFVAESAIEVLLP	II	MSLN
268	DLPGRFVAESAIEVLLPR	II	MSLN
269	GQPIIRSIPQGIV	II	MSLN
270	GQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
271	LGQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
272	LPAALACWGVRSGL	II	MSLN
273	LPGRFVAESAIEVLL	II	MSLN
274	LPGRFVAESAIEVLLP	II	MSLN
275	LPGRFVAESAIEVLLPR	II	MSLN
276	LRGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
277	PGRFVAESAIEVLLPR	II	MSLN
278	PGRFVAESAIEVLLPRL	II	MSLN
279	QPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
280	RGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
281	SRTLGETCQEAAPL	II	MSLN
282	STERVRELAVALAQK	II	MSLN

[0045]

283	TDAVLPLTVAEVQ	II	MSLN
284	VAEVQKLLGPHVEG	II	MSLN
285	VAEVQKLLGPHVEGLK	II	MSLN
286	VLGQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
287	VRGSLLSEADVRLG	II	MSLN
288	VRGSLLSEADVRLGG	II	MSLN
289	LPAALACWGVRSLL	II	MSLN
290	AIKVLRENTSPKANKE	II	ERBB2
291	DPSPLQRYSEDPTVPLPS	II	ERBB2
292	DPSPLQRYSEDPTVPLPSE	II	ERBB2
293	ELVSEFSRMARD	II	ERBB2
294	ELVSEFSRMARDPQ	II	ERBB2
295	IPVAIKVLRENTSPKANKE	II	ERBB2
296	RRLQETELVEPLTPS	II	ERBB2
297	SPQPEYVNQPDVRPQPP	II	ERBB2
298	VKPDLSYMPIWKFPDE	II	ERBB2
299	ASGMRYLATLNFVHR	II	DDR1
300	IASGMRYLATLNFVHR	II	DDR1
301	KEVKIMSRLKDPN	II	DDR1
302	LNQFLSAHQLEDK	II	DDR1
303	NPAYRLLLATYARPP	II	DDR1
304	NPAYRLLLATYARPPR	II	DDR1
305	SNPAYRLLLATYARPP	II	DDR1
306	SNPAYRLLLATYARPPR	II	DDR1
307	DPSTDYYQELQRDISE	II	MUC1
308	VETQFNQYKTEAASR	II	MUC1
309	GRQVWVYT GASVLGPR	II	MMP9
310	NQLYLFKDGKYWRFSEG	II	MMP9
311	RQVWVYT GASVLGPR	II	MMP9
312	SGRQVWVYT GASVLG	II	MMP9
313	SGRQVWVYT GASVLGP	II	MMP9
314	SGRQVWVYT GASVLGPR	II	MMP9
315	VDPRSASEVDRMFPG	II	MMP9
316	GEVAPDAKSFVLN	II	LGALS1
317	LTVKLPDGYEFKFPNRLNL	II	LGALS1
318	VRGEVAPDAKSFVLN	II	LGALS1
319	VRGEVAPDAKSFVLNLG	II	LGALS1

[0046] 表3:用于癌症疗法的其他肽。X=S、R或G

[0047]

序列 ID 号	序列	MHC 类型	基因
320	ATSKIPLAL	I	MUC16

[0048]

321	ITSSRTTI	I	MUC16
322	LNFTITNLQ	I	MUC16
323	TATSPMVPAS	I	MUC16
324	TTLPEsrPS	I	MUC16
325	VELRVLALP	I	LRFN4
326	AEDNLIHKF	I	NLRP2
327	REDLERLGV	I	NLRP7
328	DTKDPVTEW	I	TLR7
329	ILISKLLGA	I	TLR7
330	SESLRTLEF	I	TLR7
331	VLAELVAKL	I	TLR7
332	INTSILLIF	I	TLR3
333	ALQPLLHTV	I	IL17RD
334	RLMDNLPQL	I	IL17RD
335	LIISPTREL	I	DDX10
336	ADSKVLLF	I	WDR35
337	DSLLEQANNAI	I	WDR35
338	DYQGIKFVKR	I	WDR35
339	EVVGVEGRF	I	WDR35
340	KYVKGLISI	I	WDR35
341	SIGTPLDPK	I	WDR35
342	TASDKILIV	I	WDR35
343	GVIKVISGF	I	NOC3L
344	KVKLENKLK	I	NOC3L
345	SSSEPVHAK	I	NOC3L
346	SSSEPVHAKK	I	NOC3L
347	LSDQLAQAI	I	DNASE1
348	LSDIVIEKY	I	WDR27
349	SLDDHVAV	I	WDR27
350	SQIDQQNSV	I	LRIF1
351	STIDPSGTRSK	I	LRIF1
352	VFRDQEPKT	I	LRIF1
353	VLREKEAAL	I	LRIF1
354	TRLQQAQAL	I	POLR2J3
355	VAAPEHISY	I	POLR2J3
356	NSKKKVAL	I	DDX52
357	QNSKKKVAL	I	DDX52
358	RDNTVHSF	I	DDX52
359	KQVSEFMTW	I	RASGEF1B
360	KTKPQSIQR	I	RASGEF1B
361	THIELERL	I	RASGEF1B
362	LAPKILQL	I	RASGEF1B
363	DIASVSGRW	I	BICC1

[0049]

364	KPKQPSKSV	I	BICC1
365	MPAETIKEL	I	BICC1
366	SAVKEGTAM	I	BICC1
367	EEEEKLQAAF	I	COMMD10
368	DEFNLQKM	I	EMC1
369	DEYKVTAF	I	EMC1
370	ETNIGGLNW	I	EMC1
371	FPQTALVSF	I	EMC1
372	GEFGKKADGLL	I	EMC1
373	GSMGSFSEK	I	EMC1
374	IFLIDGVTGRI	I	EMC1
375	IPPEVQRI	I	EMC1
376	IPYSPDVQI	I	EMC1
377	QVAPPVLKR	I	EMC1
378	TEKNVIAAL	I	EMC1
379	VGKVKFASL	I	EMC1
380	VPFSHVNI	I	EMC1
381	VVYQYWNTK	I	EMC1
382	YPSKQFDVL	I	EMC1
383	AADDSADKV	I	ZNF217
384	HHKEKQTDV	I	ZNF217
385	KQTDVAAEV	I	ZNF217
386	KSAFPAQSK	I	ZNF217
387	NEVVQVHAA	I	ZNF217
388	SEDLNKHVL	I	ZNF217
389	GETIHIPTM	I	BCAT1
390	GPKLASRIL	I	BCAT1
391	GVKKPTKAL	I	BCAT1
392	KEKPDNNL	I	BCAT1
393	KVSERYLTM	I	BCAT1
394	LPVFDKEEL	I	BCAT1
395	LSKLTDIQY	I	BCAT1
396	DLSNIINKL	I	WDR12
397	RVWDVESGSLK	I	WDR12
398	SPTTSHVGA	I	WDR12
399	VEIEYVEKY	I	WDR12
400	VERNKVKAL	I	WDR12
401	REAVSKEDL	I	PANK2
402	IMGNSILHSA	I	STXBP6
403	KQFEGSTSF	I	STXBP6
404	EEFLRQEHF	I	OASL
405	ETIPSEIQVF	I	OASL
406	EVGEALKTVL	I	DMD

[0050]

407	KLEDLEEQL	I	DMD
408	LKIQSIAL	I	DMD
409	MNVLTEWLAAT	I	DMD
410	AIQDKLFQV	I	CHCHD6
411	FPNFDKQEL	I	SMARCAD1
412	GQTKEVLVI	I	SMARCAD1
413	KLIESTSTM	I	SMARCAD1
414	KPYQKVGL	I	SMARCAD1
415	KQESIVLKL	I	SMARCAD1
416	NANNRLLL	I	SMARCAD1
417	SEVPNGKEV	I	SMARCAD1
418	TNNIGSIAR	I	PANK2
419	DAKGRTVSL	I	GPX8
420	I IKKKEDL	I	GPX8
421	DVIDVVQAL	I	C20orf194
422	EEFKITSF	I	C20orf194
423	SDFEKTGF	I	C20orf194
424	DEDRLLVVF	I	USP34
425	HHSNIPMSL	I	USP34
426	LFPSLIKNL	I	USP34
427	NTNIPTGNK	I	USP34
428	SDQVADLR	I	USP34
429	THFSFPLRL	I	USP34
430	TYDSVTDKF	I	USP34
431	AESLYEIRF	I	TM9SF1
432	DEFLGLTHTY	I	TM9SF1
547	IITEVITRL	I	MUC16
548	KMISAIPTL	I	MUC16
549	TYSEKTLF	I	MUC16

[0051] 表4:用于癌症疗法的其他肽。X=S、R或G

[0052]

序列 ID 号	序列	MHC 类型	基因
433	ALDFFGNGPPVNY	II	IFI30
434	ALDFFGNGPPVNYKT	II	IFI30
435	DFFGNGPPVNYK	II	IFI30
436	DFFGNGPPVNYKT	II	IFI30
437	DFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30
438	DFFGNGPPVNYKTGNL	II	IFI30
439	DFFGNGPPVNYKTGNLY	II	IFI30
440	LQALDFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30
441	QALDFFGNGPPVNYK	II	IFI30

[0053]

442	QPPHEYVPWVTVNGKP	II	IFI30
443	SPLQALDFFGNGPPVNYKTG	II	IFI30
444	SPLQALDFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30
445	SPLQALDFFGNGPPVNYKTGNLY	II	IFI30
446	GPPFSSQSIPVVPR	II	GPR64
447	LPSSLMNNLPAHDM	II	GPR64
448	LPSSLMNNLPAHDME	II	GPR64
449	LPSSLMNNLPAHDMEL	II	GPR64
450	SPIGEIQPLSPQPSAPI	II	GPR64
451	DEVTQPFVIDEKTAEIR	II	PCDHB5
452	KYPELVLDKALDREER	II	PCDHB5
453	KYPELVLDKALDREERPE	II	PCDHB5
454	VTQPFVIDEKTAEIR	II	PCDHB5
455	DGRTIVDLEGTPVVSPD	II	FNDC1
456	DGRTIVDLEGTPVVSPDG	II	FNDC1
457	DKPILSLGGKPLVG	II	FNDC1
458	GDGRTIVDLEGTPVVSPD	II	FNDC1
459	GDGRTIVDLEGTPVVSPDG	II	FNDC1
460	GGDGRTIVDLEGTPVVSPD	II	FNDC1
461	GGDGRTIVDLEGTPVVSPDG	II	FNDC1
462	GRTIVDLEGTPVVSPD	II	FNDC1
463	KVKEYILSYAPALKPF	II	FNDC1
464	KVKEYILSYAPALKPFG	II	FNDC1
465	LGGDGRTIVDLEGTPVVSPDG	II	FNDC1
466	RTHEIKKLASESVYV	II	FNDC1
467	VKEYILSYAPALKPF	II	FNDC1
468	YSKTQYNQVPSEDFERTPQ	II	CXADR
469	AAPNLSRMGAIPVMIP	II	CXADR
470	AAPNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR
471	APNLSRMGAIPVMIP	II	CXADR
472	APNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR
473	GYSKTQYNQVPSEDFERTPQ	II	CXADR
474	SKTQYNQVPSEDFER	II	CXADR
475	SKTQYNQVPSEDFERTP	II	CXADR
476	SKTQYNQVPSEDFERTPQ	II	CXADR
477	VAAPNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR
478	VIIILYSGDKIYD	II	CXADR
479	YSKTQYNQVPSEDFER	II	CXADR
480	GHLFALRSLDYE	II	PCDHB3
481	AAEPGYLVTKVVAVDG	II	PCDHB3
482	AAEPGYLVTKVVAVDGD	II	PCDHB3
483	AAEPGYLVTKVVAVDGDS	II	PCDHB3
484	AAEPGYLVTKVVAVDGDSG	II	PCDHB3

[0054]

485	AEPGYLVTKVVAVDG	II	PCDHB3
486	AEPGYLVTKVVAVDGD	II	PCDHB3
487	AEPGYLVTKVVAVDGDS	II	PCDHB3
488	EPGYLVTKVVAVDG	II	PCDHB3
489	EPGYLVTKVVAVDGD	II	PCDHB3
490	EPGYLVTKVVAVDGDS	II	PCDHB3
491	AEPGYLVTKVVAVD	II	PCDHB3
492	ADSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
493	ADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
494	DADSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
495	DADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
496	DADSTEFRPNAPVPLVIDM	II	CTPS2
497	DADSTEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2
498	DADSTEFRPNAPVPLVIDMPE	II	CTPS2
499	DSTEFRPNAPVPL	II	CTPS2
500	DSTEFRPNAPVPLV	II	CTPS2
501	DSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
502	DSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
503	DSTEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2
504	DSTEFRPNAPVPLVIDMPE	II	CTPS2
505	KDADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
506	STEFRPNAPVPL	II	CTPS2
507	STEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
508	STEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
509	STEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2
510	AGDYTIANARKLIDE	II	RP2
511	ETLERLQEL		DMD
512	ADITYAIEADSESVK	II	FAT1
513	DITYAIEADSESVK	II	FAT1
514	KRDNYQIKVVASDHGE	II	FAT1
515	KRDNYQIKVVASDHGEK	II	FAT1
516	RDESFVIDRQSGRLK	II	FAT1
517	RDNYQIKVVASDHGE	II	FAT1
518	SPSELDRDPAYAIVT	II	FAT1
519	TPPQFSSVKVIHVTSPQ	II	FAT1
520	VPLPDIQEFPNY	II	FAT1
521	GPQLFHMDPSGTFVQ	II	PSMA5
522	DKNYFEGTGYARVPTQP	II	LAMA3
523	DKNYFEGTGYARVPTQPH	II	LAMA3
524	DSKPLYTPSSSFGVS	II	LAMA3
525	IQRQVKEINSLQSDFI	II	LAMA3
526	KNYFEGTGYARVPT	II	LAMA3
527	KNYFEGTGYARVPTQP	II	LAMA3

[0055]

528	KNYFEGTGYARVPTQPH	II	LAMA3
529	SPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
530	SPRVVPNESIPIIPD	II	PTPRG
531	SSPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
532	SSPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
533	SSPRVVPNESIPIIPD	II	PTPRG
534	DDKGYTLMHPSLTRPY	II	CACHD1
535	DVGGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
536	GAGYVVTISHTIH	II	CACHD1
537	GAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
538	GGAGYVVTISHTIH	II	CACHD1
539	GGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
540	VGGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
541	MTRTFHDLEGNVAVKRDSG	II	ERMP1
542	RTFHDLEGNVAVKR	II	ERMP1
543	RTFHDLEGNVAVKRDSG	II	ERMP1
544	SGTFFPYSSNPANPK	II	ERMP1
545	SGTFFPYSSNPANPKP	II	ERMP1
546	TRTFHDLEGNVAVKR	II	ERMP1

[0056] 本发明还一般涉及本发明的肽用于治疗增殖性疾病,例如,卵巢癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾癌、脑癌、结肠癌或直肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌和过量表达来源于 SEQ ID No.1至SEQ ID No.319肽的蛋白的其他肿瘤。

[0057] 特别优选的是本发明的肽(单独或组合),其选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549。更优选的是选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:319的肽(单独或组合)(见表1和表2),及其在卵巢癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾癌、脑癌、结肠癌或直肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、优选为卵巢癌的免疫治疗中的用途。

[0058] 因此,本发明的另一个方面涉及本发明中的肽在选自卵巢癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾癌、脑癌、结肠癌或直肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌组中的增殖性疾病的治疗-优选联合治疗中的用途。

[0059] 本发明还涉及本发明的肽,其具有与主要组织相容性复合体(MHC) I或以拉长形式存在的例如长度变化的-MHC-II类分子结合的能力。

[0060] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中所述肽(每种肽)由或基本由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549的氨基酸序列组成。

[0061] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽被修饰,和/或包含非肽键。

[0062] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽为融合蛋白的一部分,特别是与HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸融合,或与抗体(例如,树突状细胞特定抗体)融合,或融合到抗体的序列中。

[0063] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明的肽。本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。

[0064] 本发明进一步涉及一种能表达和/或表达本发明核酸的表达载体。

[0065] 本发明进一步涉及本发明的肽、本发明的核酸或本发明的表达载体在治疗疾病和制药中的用途,特别是在癌症治疗中的用途。

[0066] 本发明进一步涉及对本发明中的肽或本发明肽与MHC的复合体特定的抗体以及制造这些抗体的方法。

[0067] 本发明进一步涉及本发明的T细胞受体(TCR),特别是可溶性TCR(sTCRs)和加工为自体或异体T细胞的克隆TCR,以及制造这些TCR的方法,以及载有所述TCR或与所述TCR交叉反应的NK细胞。

[0068] 抗体和TCR是根据本发明的肽的免疫治疗用途的其他实施方案。

[0069] 本发明进一步涉及含本发明核酸或前述表达载体的宿主细胞。本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其为抗原提呈细胞,优选为树突细胞。

[0070] 本发明进一步涉及制备本发明一种肽的一种方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞,和从所述宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0071] 本发明进一步涉及本发明中的方法,其中通过使足量的抗原与抗原提呈细胞接触,抗原被载在表达于合适抗原提呈细胞或人工抗原呈递细胞表面的I或II类MHC分子上。

[0072] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中抗原提呈细胞包含能表达含SEQ ID NO.1至SEQ ID NO.549、优选为含SEQ ID No.1至SEQ ID No.319,或其变体氨基酸序列的肽的表达载体。

[0073] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的激活的T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞表达含本发明氨基酸序列的多肽。

[0074] 本发明进一步涉及一种杀伤患者中靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常地表达含本发明任意氨基酸序列的多肽,该方法包括对患者施用本发明方法制造的有效量T细胞。

[0075] 本发明进一步涉及任何所述肽、本发明的核酸、本发明的表达载体、本发明的细胞、本发明的激活的T淋巴细胞、T细胞受体或抗体或其他肽-和/或肽-MHC结合分子作为药物或在药物制备中的用途。所述药物优选为具有抗癌活性。

[0076] 优选情况为,所述药剂为基于可溶性TCR或抗体的细胞治疗药物、疫苗或蛋白质。

[0077] 本发明还一般涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为卵巢癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾癌、脑癌、结肠癌或直肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病、乳腺癌、梅克尔细胞癌、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、优选为卵巢癌细胞。

[0078] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的生物标志物,在此称为“靶标”,其可用于诊断癌症,优选为食管癌。所述标志物可以是肽本身的过度提呈,或相应基因的过度表达。标志物也可以用于预测治疗成功的可能性,优选为免疫疗法,最优选为靶向由该生物标志物识别的相同靶的免疫疗法。例如,抗体或可溶性TCR可用于对肿瘤切片进行染色以检测是否存在与MHC复合的相关肽。

[0079] 或者,抗体具有进一步的效应子功能,如免疫刺激域或毒素。

[0080] 本发明还涉及这些新靶点在癌症治疗中的用途。

[0081] 针对其他癌性疾病的治疗和诊断用途在本发明肽的基础表达产物(多肽)的以下更详细描述中进行披露。

[0082] 发明的详细说明

[0083] 是否能刺激免疫反应取决于是否存在被宿主免疫系统视为异物的抗原。发现肿瘤相关抗原的存在增加了运用宿主免疫系统干预肿瘤生长的可能性。目前,针对癌症免疫治疗,正在探索利用免疫系统的体液和细胞进行免疫的各种机制。

[0084] 细胞免疫反应的特定元素能特异性地识别和破坏肿瘤细胞。从肿瘤浸润细胞群或外周血中分离出的T细胞表明,这些细胞在癌症的天然免疫防御中发挥了重要作用。特别是CD8阳性T细胞在这种反应中发挥重要作用,TCR⁺能识别通常8至10个氨基酸残基源自蛋白或位于细胞质的缺损核糖体产物(DRIP)的主要组织相容性复合体(MHC)所载的肽中所含的I类分子。人MHC分子也称为人白细胞-抗原(HLA)。

[0085] 本发明进一步涉及本发明的一种肽,其中所述肽按下文所述被修饰和/或包含非肽键。

[0086] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中所述肽为融合蛋白的一部分,特别是与HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸融合,或与抗体(例如,树突状细胞特定抗体)融合,或融合到抗体的序列中。

[0087] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明的肽。本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。

[0088] 本发明进一步涉及一种能表达和/或提呈本发明的核酸的表达载体、。

[0089] 本发明进一步涉及本发明的肽、本发明的核酸或本发明的表达载体在制药中的用途。

[0090] 本发明进一步涉及下文进一步说明的抗体以及制造抗体的方法。优选抗体对本发明中的肽或本发明肽与MHC的复合体特定。优选的抗体可以是单克隆的。

[0091] 本发明进一步涉及T细胞受体(TCR),特别是靶向作用于本发明肽和/或肽-MHC复合体的可溶性TCR(sTCR),以及制造它们的方法。

[0092] 本发明进一步涉及靶向作用于本发明肽和/或肽-MHC复合体的抗体或其他结合分子,以及制造它们的方法。

[0093] 本发明进一步涉及含本发明核酸或前述表达载体的宿主细胞。本发明进一步涉及为抗原提呈细胞的本发明宿主细胞。本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其中抗原提呈细胞为树突细胞。

[0094] 本发明进一步涉及制备本发明肽的一种方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞和从宿主细胞和/或其培养基中分离肽。

[0095] 本发明进一步涉及一种体外制备激活的T细胞的方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人I或II类MHC分子体外接触一段时间,该时间足以以抗原特异性的方式激活T细胞,人I或II类MHC分子在合适的抗原提呈细胞表面上表达,其中所述抗原为本发明的至少一种肽。

[0096] 本发明进一步涉及一种方法,其中抗原通过将抗原与足够量的抗原提呈细胞接触而被载入表达于合适抗原提呈细胞表面的I或II类MHC分子。

[0097] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中该抗原提呈细胞包括表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549或变体氨基酸序列的肽。

[0098] 本发明进一步涉及以本发明方法制备的激活的T细胞,激活的T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞异常表达含一种本发明氨基酸序列的多肽。

[0099] 本发明进一步涉及一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明任何氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者本发明的有效量T细胞。

[0100] 本发明进一步涉及任何本发明的肽、核酸、本发明的表达载体、本发明的细胞、本发明的激活T细胞作为药剂或在制造药剂的中用途。

[0101] 本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中所述药剂为一种疫苗,一种细胞,一种细胞群,例如,一个细胞系,sTCR和单克隆抗体。

[0102] 本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0103] 本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中所述癌细胞为卵巢癌细胞。

[0104] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的特定标志物蛋白和生物标志物,其可用于诊断和/或判断卵巢癌的预后。

[0105] 本发明还涉及这些新靶点在癌症治疗中的用途。

[0106] 此外,本发明涉及一种使用预筛选的肿瘤相关肽的数据库(本文中也称为“存储库”)制备用于单个患者的个性化抗癌疫苗的方法。

[0107] 是否能刺激免疫反应取决于是否存在被宿主免疫系统视为异物的抗原。发现肿瘤相关抗原的存在增加了运用宿主免疫系统干预肿瘤生长的可能性。目前,针对癌症免疫治疗,正在探索利用免疫系统的体液和细胞进行免疫的各种机制。

[0108] 细胞免疫反应的特定元素能特异性地识别和破坏肿瘤细胞。从肿瘤浸润细胞群或外周血中分离出的T-细胞表明,这些细胞在癌症的天然免疫防御中发挥了重要作用。特别是CD8阳性T细胞在这种反应中发挥重要作用,TCR⁺能识别通常8至10个源自蛋白或位于细胞质的缺损核糖体产物(DRIP)的氨基酸残基的主要组织相容性复合体(MHC)所载的肽中所含的I类分子。人MHC分子也称为人白细胞-抗原(HLA)。

[0109] 在过去几年中,癌症免疫治疗领域取得了巨大进步,这使得免疫治疗作为标准化学治疗方法的潜在治愈性的添加或可选方法获得了广泛认可。数篇论文证明了HLA提呈的突变和野生型肿瘤相关抗原作为有价值的肿瘤排斥抗原的重要性。因此,大规模鉴定HLA提呈的癌症特异性肿瘤抗原成为我们理解免疫系统如何鉴定和识别肿瘤细胞难题的另一个重要部分。

[0110] 在本发明中,发明人专注于上皮性卵巢癌(EOC),目的是全面表征EOC的免疫肽组合,并评估HLA提呈的抗原在临床应用中的有用性。到目前为止,只有少数HLA提呈的抗原被确定为EOC,大多数临床研究依赖于非必要的预测或确定癌症睾丸抗原,其也经常由EOC提呈,这一事实可以通过我们的分析来证实。

[0111] 本发明人证实了与先前公开数据一致的卵巢肿瘤细胞的HLA I类分子的一致和高表达。此外,本发明人在单细胞水平证明EOC也显示HLA-DR分子的强表达。这种强表达通过鉴定来自卵巢肿瘤以及高度富集肿瘤细胞部分的大量MHC-II类配体得到进一步强调。

[0112] 与超过85种不同来源的良性来源相比,34种卵巢肿瘤的免疫肽组谱揭示了数百种EOC相关抗原。在我们的良性数据集中的任何组织上未提呈的前100HLA-I类EOC抗原中,MUC16显然是最特殊的。关于所鉴定HLA配体的数目(>80)和在患者组中的提呈频率(~80%),对于发明人迄今为止研究过的任何其他肿瘤抗原和肿瘤实体来说这是前所未有的。此外,本发明人可确定,70%以上源自MUC16的HLA配体具有免疫原性,并且能够在健康个体中引发T细胞,使粘蛋白16成为EOC免疫治疗的无与伦比的一流抗原。免疫肽组谱分析进一

步展示了对EOC的明显机制性见解,其反映在HLA-I类和II类配体的HLA配体组中。这里仅列举来自重要的激酶和磷酸酶(DDR1、EYA2)、转录因子(SOX9、SOX17)、免疫抑制相关蛋白(IDO1、半乳糖凝集素1)以及确定和可疑的EOC分子标志物(MUC1、KLK10、FOLR1)的几个HLA配体。值得注意的是,对于HLA II类,间皮素(MUC16确定的配体)被鉴定为首要的肿瘤相关抗原。几项研究已经证明了MUC16/MSLN轴在EOC以及其他肿瘤(如胰腺癌或间皮瘤)中的关键作用,表明这些抗原的T细胞表位应当在其他恶性肿瘤中进一步测试。本发明人可证明MSLN染色与MUC16染色直接相关,MSLN高表达在EOC中形成负预后因子。

[0113] 这种选择性免疫肽基因谱分析首次使用了几种不同的良性组织和细胞类型(PBMC、骨髓、肝、肾、结肠、卵巢)。由于可用于研究的不同组织数量的限制,发明人不能完全排除单个抗原也可能由其他器官中的HLA分子提呈。但是,这些抗原对于EOC确定的功能相关性,特别是在健康个体中各个肽的免疫原性,使得不可能在其他组织中提呈这些抗原。

[0114] 术语“T细胞反应”是指由一种肽在体外或体内诱导的效应子功能的特异性扩散和激活。对于MHC I类限制性细胞毒性T细胞,效应子功能可能为溶解肽脉冲的、肽前体脉冲的或天然肽提呈的靶细胞、分泌细胞因子,优选为肽诱导的干扰素- γ , TNF- α 或IL-2,分泌效应分子,优选为肽诱导的颗粒酶或穿孔素,或脱颗粒。

[0115] 本文所用“肽”这一术语,系指一系列氨基酸残基,通常透过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。这些肽的长度优选为9个氨基酸,但至短可为8个氨基酸长度,至长可为10、11或12个氨基酸或更长,如果为MHC-II类肽时(本发明肽的拉长变体),至长可为14、15、16、17、18、19或20个氨基酸长度。

[0116] 因此,“肽”这一术语应包括一系列氨基酸残基的盐,通常透过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。优选的情况是,盐为肽的药用盐,例如:氯化物或乙酸(三氟乙酸)盐。必须注意的是,本发明肽的盐与其体内状态的肽基本上不同,因为该不是体内的盐。

[0117] 术语“肽”应也包括“寡肽”。本文使用的术语“寡肽”是指一系列氨基酸残基,通常透过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。寡肽的长度对于本发明来说并不十分关键,只要在寡肽中保持正确的表位即可。通常,寡肽长度约小于30个氨基酸残基,约长于15个氨基酸。

[0118] “本发明的肽”这一术语还应包括由以上根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549定义的肽组成或由其组成的肽。

[0119] “多肽”这一术语是指一系列氨基酸残基,通常透过相邻氨基酸的 α -氨基和羰基之间的肽键来连接。多肽的长度对于本发明来说并不十分关键,只要保持正确的表位即可。与术语肽或寡肽相对,“多肽”这一术语是指包含多于约30个氨基酸残基的分子。

[0120] 一种肽、寡肽、蛋白质或编码该分子的核苷酸如果能诱导免疫反应,则具有“免疫原性”(因此是本发明中的一种“免疫原”)。在本发明的情况下,免疫原性的更具体定义是诱导T细胞反应的能力。因此,“免疫原”是一种能够诱导免疫反应的分子,并且在本发明的情况下,是一种能诱导T细胞反应的分子。在另一方面,所述免疫原可以是肽,肽与MHC的复合体、和/或用于提高特异性抗体或TCR抗性的蛋白。

[0121] I类T细胞“表位”要求的是一种结合至MHC I类受体上的短肽,从而形成一种三元复合体(MHC I类 α 链、 β -2-微球蛋白和肽),其可以透过T细胞负载匹配T细胞受体与具有适当亲和力的MHC/肽复合物结合来识别。结合至MHC I类分子的肽的典型长度为8-14个氨基

酸,最典型为9个氨基酸长度。

[0122] 在人类中,有三种编码MHC I类分子的不同基因位点(人MHC分子也是指定的人白细胞抗原(HLA)):HLA-A、HLA-B和HLA-C。HLA-A*01、HLA-A*02和HLA-B*07是可从这些基因位点表达的不同MHC I类等位基因的实例。

[0123] 表5:HLA-A*02和HLA-A*24和最常见HLA-DR血清类型的表达频率F。频率根据Mori等人(Mori et al.,1997)使用的Hardy-Weinberg公式 $F=1-(1-Gf)^2$ 改编,从美国人群范围内的单体型频率中推导出。由于连锁不平衡,某些HLA-DR等位基因内的A*02或A*24组合与其预期单一频率相比,可能是浓缩的或频率较低。有关详细信息,请参阅Chanock等人的文献(Chanock et al.,2004)。

[0124]

等位基因	人群	根据等位基因频率算得的显型
A*02	高加索人(北美)	49.1%
A*02	非裔美国人(北美)	34.1%
A*02	亚裔美国人(北美)	43.2%
A*02	拉丁美洲(北美)	48.3%
DR1	高加索人(北美)	19.4%
DR2	高加索人(北美)	28.2%
DR3	高加索人(北美)	20.6%
DR4	高加索人(北美)	30.7%
DR5	高加索人(北美)	23.3%
DR6	高加索人(北美)	26.7%
DR7	高加索人(北美)	24.8%
DR8	高加索人(北美)	5.7%
DR9	高加索人(北美)	2.1%
DR1	非裔(北)美人	13.20%
DR2	非裔(北)美人	29.80%
DR3	非裔(北)美人	24.80%
DR4	非裔(北)美人	11.10%
DR5	非裔(北)美人	31.10%
DR6	非裔(北)美人	33.70%
DR7	非裔(北)美人	19.20%
DR8	非裔(北)美人	12.10%

[0125]

等 位 基 因	人 群	根据等位基因频率算得的显 型
DR9	非裔（北）美人	5.80%
DR1	亚裔（北）美人	6.80%
DR2	亚裔（北）美人	33.80%
DR3	亚裔（北）美人	9.20%
DR4	亚裔（北）美人	28.60%
DR5	亚裔（北）美人	30.00%
DR6	亚裔（北）美人	25.10%
DR7	亚裔（北）美人	13.40%
DR8	亚裔（北）美人	12.70%
DR9	亚裔（北）美人	18.60%
DR1	拉丁裔（北）美人	15.30%
DR2	拉丁裔（北）美人	21.20%
DR3	拉丁裔（北）美人	15.20%
DR4	拉丁裔（北）美人	36.80%
DR5	拉丁裔（北）美人	20.00%
DR6	拉丁裔（北）美人	31.10%
DR7	拉丁裔（北）美人	20.20%
DR8	拉丁裔（北）美人	18.60%
DR9	拉丁裔（北）美人	2.10%
A*24	菲律宾	65%
A*24	俄罗斯涅涅茨人	61%
A*24:02	日本	59%
A*24	马来西亚	58%
A*24:02	菲律宾	54%
A*24	印度	47%
A*24	韩国	40%
A*24	斯里兰卡人	37%

[0126]

等位基因	人群	根据等位基因频率算得的显型
A*24	中国	32%
A*24:02	印度	29%
A*24	澳大利亚西部人	22%
A*24	美国	22%
A*24	俄罗斯萨马拉人	20%
A*24	南美	20%
A*24	欧洲	18%

[0127] 本发明的肽,优选当如本文描述纳入本发明的疫苗时与不同类型的HLA结合。疫苗还可能包括泛结合MHC II类肽、与其他等位基因结合的肽(将有助于开发个体化药物)。因此,本发明的疫苗可用于治疗A*02阳性患者中的癌症,但不因为这些肽的广泛结合性而必须选择II类MHC同种异型。

[0128] 在一项优选的实施方案中,术语“核苷酸序列”系指脱氧核苷酸的杂聚物。

[0129] 编码特定肽、寡肽或多肽的核苷酸序列可为天然核苷酸序列,也可为合成核苷酸序列。一般来说,编码肽、多肽以及本发明蛋白的DNA片段由cDNA片段和短寡核苷酸衔接物,或一系列寡核苷酸组成,以提供一种合成基因,该基因能够在包含源自微生物或病毒操纵子的调节元素的重组转录单元中被表达。

[0130] 如本文所用的术语“肽的核苷酸编码”系指对肽进行核苷酸序列编码,其中该肽包括与将用于产生TCR的树突细胞或另一细胞系统所表达该序列的生物系统兼容的人工(人造)激活和停止密码子。

[0131] 本文提到的核酸序列既包括单链核酸也包括双链核酸。因此,除非本文另有所指,否则,例如对于DNA,具体的序列是该序列的单链DNA、该序列与其互补序列的双工(双链DNA)以及该序列的互补序列。

[0132] “编码区”这一术语是指在基因的天然基因组环境中天然或正常编码该基因的表达产物的那部分基因,即,体内编码该基因的天然表达产物的区域。

[0133] 编码区可来自非突变(“正常”)基因、突变基因或异常基因,甚至还可以来自DNA序列,完全可在实验室中使用本领域熟知的DNA合成方法合成。

[0134] “表达产物”这一术语是指多肽或蛋白,它是基因和遗传码退化并因而编码同样的氨基酸所造成的任何核酸序列编码同等物的翻译产物。

[0135] “片断”这一术语,当指的是一种编码序列时,表示包含非完整编码区的DNA的一部分,其表达产物与完整编码区表达产物基本上具有相同的生物学功能或活性。

[0136] “DNA片段”这一术语是指一种DNA聚合物,以单独的片段形式或一种较大DNA结构的组分形式存在,它们从至少分离过一次的DNA中以基本纯净的形式获得,即不含污染性内源性材料,并且获得的数量或浓度能够使用标准生化方法,例如使用克隆载体,进行识别、操纵和回收该片段及其组分核苷酸序列。此类片段以开放阅读框架(未被内部未翻译序列

打断)或内含子(通常提呈于真核基因中)的形式存在。未翻译DNA序列可能存在于开放阅读框架的下游,在那里其不会干预编码区的操纵或表达。“引物”这一术语表示一种短核酸序列,其可与一个DNA链配对,并在DNA聚合酶开始合成脱氧核糖核酸链之处提供一个游离的3'-OH末端。

[0137] “激活子”这一术语表示参与RNA聚合酶的结合从而激活转录的DNA区域。

[0138] 术语“分离”表示一种物质从其原来的环境(例如,如果是天然发生的则是天然环境)中被移走。例如,活体动物中的天然核苷酸或多肽不是分离的,但是,从天然系统中一些或所有共存物质中分离出来的核苷酸或多肽是分离的。此类多核苷酸可能是载体的一部分和/或此类多核苷酸和多肽可能是一种组合物的一部分,并且由于该载体或组合物不是其天然环境的一部分,因此它仍然是分离的。

[0139] 本发明中披露的多核苷酸和重组或免疫原性多肽也可能以“纯化”的形式存在。术语“纯化”并非要求绝对的纯度;它只是一个相对的定义,可以包括高度纯化或部分纯化的制剂,相关领域技术人员能理解这些术语。例如,各个从已用传统方法纯化为具有电泳同构型的cDNA库中分离出的各种克隆物。明确考虑到将起始材料或天然物质纯化至少一个数量级,优选为两或三个数量级,更优选为四或五个数量级。此外,明确披露了所述多肽的纯度优选为99.999%,或至少为99.99%或99.9%;甚而适宜为以重量计99%或更高。

[0140] 根据本发明公开的核酸和多肽表达产物,以及包含此类核酸和/或多肽的表达载体可能以“浓缩的形式”存在。本文使用的术语“浓缩”是指材料的浓度至少是其自然浓度的大约2、5、10、100或1000倍,有优势的是,按重量计为0.01%,优选为至少0.1%。也明确考虑到,按重量计约为0.5%、1%、5%、10%和20%的浓缩制剂。序列、构型、载体、克隆物以及包含本发明的其他材料可有优势地以浓缩或分离的形式存在。

[0141] 本文使用的“部分”(portion)、“节段”(segment)、“片段”(fragment)这几个术语,当与多肽相关地使用时是指残基的连续序列,比如氨基酸残基,其序列形成一个较大序列的子集。例如,如果一个多肽以任一种肽链内切肽酶(如胰蛋白酶或糜蛋白酶)进行处理,则该处理获得的寡肽会代表起始多肽的部分、节段或片段。当与多核苷酸相关地使用时,这些术语系指用任何核酸内切酶处理所述多核苷酸产生的产物。

[0142] 根据本发明,术语“等同度百分比”或“等同百分比”,如果指的是序列,则表示在待对比序列(“被对比序列”)与所述序列或权利要求的序列(“参考序列”)对准之后将被对比序列与所述序列或权利要求的序列进行比较。然后根据下列公式计算等同度百分比:

[0143] 等同度百分比 = $100[1 - (C/R)]$

[0144] 其中C是参考序列与被对比序列之间对准长度上参考序列与被对比序列之间的差异数量,其中

[0145] (i) 参考序列中每个碱基或氨基酸序列在被对比序列中没有对应的对准碱基或氨基酸;

[0146] (ii) 参考序列中每个空隙,以及

[0147] (iii) 参考序列中每个对准碱基或氨基酸与被对比序列中对准碱基或氨基酸不同,即构成一个差异以及

[0148] (iiii) 必须在对准序列的第1位置开始对准;

[0149] 并且R是参考序列与被对比序列对准长度上在参考序列中产生任何空隙也计算为

一个碱基或氨基酸的参考序列中的碱基或氨基酸数目。

[0150] 如果“被对比序列”和“参考序列”之间存在的一个对准按上述计算的等同度百分比大致等于或大于指定的最低等同度百分比,则被对比序列与参考序列具有指定的最低等同度百分比,虽然可能存在按本文上述计算的等同度百分比低于指定等同度百分比的对准。

[0151] 因此,如上所述,本发明提出了一种肽,其包括选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549群组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549具有88%同源性的其变体、或诱导与该肽发生T细胞交叉反应的一个变体。本发明所述的肽具有与主要组织相容性复合体(MHC) I或所述肽拉长版本的II类分子结合的能力。

[0152] 在本发明中,“同源性”一词系指两个氨基酸序列之间的同一度(参见上文的等同度百分比,如肽或多肽序列。前文所述的“同源”是透过将理想条件下调整的两个序列与待比较序列进行比对后确定的。此类序列同源性可透过使用ClustalW等算法创建一个排列而进行计算。也可用使用一般序列分析软件,更具体地说,是Vector NTI、GENETYX或由公共数据库提供的其他工具。

[0153] 本领域技术人员能评估特定肽变体诱导的T细胞是否可与该肽本身发生交叉反应(Appay et al.,2006;Colombetti et al.,2006;Fong et al.,2001;Zaremba et al.,1997)。

[0154] 发明人用给定氨基酸序列的“变体”表示,一个或两个氨基酸残基等的侧链透过被另一个天然氨基酸残基的侧链或其他侧链取代而发生改变,这样,这种肽仍然能够以含有给定氨基酸序列(由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549组成)的肽大致同样的方式与HLA分子结合。例如,一种肽可能被修饰以便至少维持(如没有提高)其能与HLA-A*02或-DR等合适MHC分子的结合槽相互作用和结合,以及至少维持(如没有提高)其与激活T细胞的TCR结合的能力。

[0155] 随后,这些T细胞可与细胞和杀伤细胞发生交叉反应,这些细胞表达多肽(其中包含本发明中定义的同源肽的天然氨基酸序列)。正如科学文献和数据库(Rammensee et al.,1999;Godkin et al.,1997)中所述,HLA-A结合肽的某些位点通常为锚定残基,可形成一种与HLA结合槽的结合模序相称的核心序列,其定义由构成结合槽的多肽链的极性、电物理、疏水性和空间特性确定。因此,本领域技术人员能够透过保持已知的锚残基来修饰SEQ ID No:1至SEQ ID NO:549提出的氨基酸序列,并且能确定这些变体是否保持与MHC I或II类分子结合的能力。本发明的变体保持与激活T细胞的TCR结合的能力,随后,这些T细胞可与表达一种包含本发明定义的同源肽的天然氨基酸序列的多肽的细胞发生交叉反应并杀死该等细胞。

[0156] 如果无另有说明,那么本文公开的原始(未修饰)肽可以透过在肽链内的不同(可能为选择性)位点上取代一个或多个残基而被修饰。优选情况是,这些取代位于氨基酸链的末端。此取代可能是保守性的,例如,其中一个氨基酸被具有类似结构和特点的另一个氨基酸所取代,比如其中一个疏水性氨基酸被另一个疏水性氨基酸取代。更保守的取代是具有相同或类似的大小和化学性质的氨基酸间的取代,例如,亮氨酸被异亮氨酸取代。在天然同源蛋白质家族序列变异的研究中,某些氨基酸的取代往往比其他氨基酸更具有耐受性,这些氨基酸往往表现出与原氨基酸的大小、电荷、极性和疏水性之间的相似性相关,这是确定

“保守取代”的基础。

[0157] 在本文中,保守取代定义为在以下五种基团之一的内部进行交换:基团1-小脂肪族、非极性或略具极性的残基(Ala,Ser,Thr,Pro,Gly);基团2-极性、带负电荷的残基及其酰胺(Asp,Asn,Glu,Gln);基团3-极性、带正电荷的残基(His,Arg,Lys);基团4-大脂肪族非极性残基(Met,Leu,Ile,Val,Cys)以及基团5-大芳香残基(Phe,Tyr,Trp)。

[0158] 较不保守的取代可能涉及一个氨基酸被另一个具有类似特点但在大小上有所不同的氨基酸所取代,如:丙氨酸被异亮氨酸残基取代。高度不保守的取代可能涉及一个酸性氨基酸被另一个具有极性或甚至具有碱性性质的氨基酸所取代。然而,这种“激进”取代不能认为是无效的而不予考虑,因为化学作用是不完全可预测的,激进的取代可能会带来其简单化学原理中无法预见的偶然效果。

[0159] 当然,这种取代可能涉及普通L-氨基酸之外的其他结构。因此,D氨基酸可能被本发明的抗原肽中常见的L-氨基酸取代,也仍在本公开的范围之内。此外,非标准氨基酸(即,除了常见的天然蛋白原氨基酸)也可以用于取代之目的,以生产根据本发明的免疫原和免疫原性多肽。

[0160] 如果在一个以上位置上的取代发现导致肽的抗原活性基本上等于或大于以下定义值,则对这些取代的组合进行测试,以确定组合的取代是否产生对肽抗原性的迭加或协同效应。肽内被同时取代的位置最多不能超过4个。

[0161] 基本上由本文所指氨基酸序列组成的一种肽可能有一个或两个非锚定氨基酸(见下面锚基序相关内容)被交换,而不存在这种情况,即相比于未修饰的肽,与人类主要组织相容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。在另一实施方案中,在基本上由本文所述氨基酸序列组成的肽中,一个或两个氨基酸可与其保守交换伙伴交换(见下文),而不存在这种情况,即相比于未修饰的肽,与人类主要组织相容性复合体(MHC)-I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。

[0162] 这些基本不与T细胞受体互动的氨基酸残基可透过取代其他几乎不影响T细胞反应并不妨碍与相关MHC结合的氨基酸而得到修饰。因此,除了特定限制性条件外,本发明的肽可能为任何包括给定氨基酸序列或部分或其变体的肽(发明人所用的这个术语包括寡肽或多肽)。

[0163] 较长(拉长)的肽也可能适合。MHC I类表位(通常长度为8至11个氨基酸)可能由肽从较长的肽或包含实际表位的蛋白中加工而产生。两侧有实际表位的残基优选为在加工过程中几乎不影响暴露实际表位所需蛋白裂解的残基。

[0164] 本发明的肽可被拉长多达四个氨基酸,即1、2、3或4个氨基酸,可按照4:0与0:4之间的任何组合添加至任意一端。本发明的拉长组合可见表6。

[0165] 表6:本发明肽的拉长组合

[0166]

C-端	N-端
4	0
3	0或1
2	0或1或2
1	0或1或2或3

0	0或1或2或3或4
N-端	C-端
4	0
3	0或1
2	0或1或2
1	0或1或2或3
0	0或1或2或3或4

[0167] 拉伸/延长的氨基酸可以是所述蛋白或任何其他氨基酸的原序列肽。拉长可用于增强所述肽的稳定性或溶解性。

[0168] 因此,本发明所述的表位可能与天然肿瘤相关表位或肿瘤特异性表位相同,也可能包括来自参考肽的不超过四个残基的不同肽,只要它们有基本相同的抗原活性即可。

[0169] 在一项替代实施方案中,肽的一边或双边被拉长4个以上的氨基酸,优选30个氨基酸的总长度。这可形成MHC-II类结合肽。结合至MHC II类肽可透过本领域中已知的方法进行测试。

[0170] 因此,本发明提出了MHC I类表位的肽和变体,其中所述肽或抗体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸长度(即10、11、12、13、14个氨基酸,如果为拉长II类结合肽时,长度也可15、16、17、18、19、20、21或22个氨基酸)。

[0171] 当然,本发明的肽或变体能与人类主要组织相容性复合体(MHC) I或II类分子结合。肽或变体与MHC复合物的结合可用本领域内的已知方法进行测试。

[0172] 优选情况是,当本发明的肽特异性T细胞相比于取代肽受到检测时,如果取代肽在相对于背景肽溶解度增加达到最大值的一半,则该肽浓度不超过约1mM,优选为不超过约1 μ M,更优选为不超过约1nM,再优选为不超过约100pM,最优选为不超过约10pM。也优选为,取代肽被一个以上的T细胞识别,最少为2个,更优选为3个。

[0173] 在本发明的一个特别优选实施方案中,肽系由或基本系由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549所选的氨基酸序列组成。

[0174] 基本由“...组成”系指本发明的肽,除了根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549中的任一序列或其变体组成外,还含有位于其他N和/或C端延伸处的氨基酸,而它们不一定能形成作为MHC分子表位的肽。

[0175] 但这些延伸区域对有效将本发明中的肽引进细胞具有重要作用。在本发明的一实施例中,该肽为融合蛋白的一部分,含来自NCBI、GenBank登录号X00497的HLA-DR抗原相关不变链(p33,以下称为“Ii”)的80个N-端氨基酸等。在其他的融合中,本发明的肽可以被融合到本文所述的抗体、或其功能性部分,特别是融合入抗体的序列,以便所述抗体进行特异性靶向作用,或者,例如进入本文所述的树突状细胞特异性抗体。

[0176] 此外,该肽或变体可进一步修饰以提高稳定性和/或与MHC分子结合,从而引发更强的免疫反应。肽序列的该类优化方法是本领域内所熟知的,包括,例如,反式肽键和非肽键的引入。

[0177] 在反式肽键氨基酸中,肽(-CO-NH-)并未连接其残基,但是其肽键是反向的。这种逆向反向模拟肽(retro-inverso peptidomimetics)可透过本领域已知的方法制备,例如:Meziere等人在(Meziere et al.,1997)中所述的方法,以引用的方式并入本文。这种方法

涉及制备包含骨架(而并非侧链)改变的模拟肽。Meziere等人(Meziere et al.,1997)的研究显示,这些模拟肽有利于MHC的结合和辅助性T细胞的反应。以NH-CO键替代CO-NH肽键的逆向反向肽大大地提高了抗水解性能。

[0178] 非肽键为-CH₂-NH、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-和-CH₂SO-等。美国4897445号专利提出了多肽链中非肽键(-CH₂-NH)的非固相合成法,该方法涉及按标准程序合成的多肽以及透过氨基醛和一种含NaCNBH₃的氨基酸相互作用而合成的非肽键。

[0179] 含上述序列的肽可与其氨基和/或羧基末端的其他化学基团进行合成,从而提高肽的稳定性、生物利用度、和/或亲和力等。例如,苄氧羰基、丹酰基等疏水基团或叔丁氧羰基可加入肽的氨基末端。同样,乙酰基或9-芴甲氧羰基可能位于肽的氨基末端。此外,疏水基团、叔丁氧羰基或氨基团都可能被加入肽的羧基末端。

[0180] 另外,本发明中的所有肽都可能经合成而改变其空间构型。例如,可能使用这些肽的一个或多个氨基酸残基的右旋体,通常不是其左旋体。更进一步地,本发明中肽的至少一个氨基酸残基可被熟知的一个非天然氨基酸残基取代。诸如此类的改变可能有助于增加本发明肽的稳定性、生物利用度和/或结合作用。

[0181] 同样,本发明中的肽或变体可在合成肽之前或之后透过特异氨基酸的反应而进行化学修饰。此类修饰的实施例为本领域所熟知,例如,在R.Lundblad所著的《Chemical Reagents for Protein Modification》(3rd ed.CRC Press,2004)(Lundblad,2004)中有概述,以参考文献的方式并入本文。虽然氨基酸的化学修饰方法无限制,但其包括(但不限于)透过以下方法修饰:酰基化、胺基化、赖氨酸吡哆基化、还原烷基化、以2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)三硝基苯基化氨基团、透过将半胱氨酸过甲酸氧化为磺基丙氨酸而对羧基团和巯基进行氨基修饰、形成易变衍生物、与其他巯基化合物形成混合二硫化合物、与马来酰亚胺反应,与碘乙酸或碘乙酰胺羧甲基化、在碱性pH值下与氰酸盐甲氨酰化。在这方面,技术人员参考了《Current Protocols In Protein Science》(Eds.Coligan et al.(John Wiley and Sons NY1995-2000))(Coligan et al.,1995)中第15章所述的在蛋白质化学修饰相关的广泛方法。

[0182] 简言之,修饰蛋白质的精氨酸残基等往往基于于邻二羰基化合物(如苯甲酰甲醛、2,3-丁二酮以及1,2-烯丙二酮)的反应而形成加合物。另一个实施例是丙酮醛与精氨酸残基的反应。半胱氨酸可在赖氨酸和组氨酸等亲核位点不作随同修饰的情况下就得到修饰。因此,有大量试剂可进行半胱氨酸的修饰。Sigma-Aldrich(<http://www.sigma-aldrich.com>)等公司的网站含有具体试剂的信息。

[0183] 蛋白质中二硫键的选择性还原也很普遍。二硫键可在生物制药热处理中形成和氧化。伍德沃德氏试剂K可用于修饰特定的谷氨酸残基。N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基-碳二亚胺可用于形成赖氨酸残基和谷氨酸残基的分子内交联。例如:焦碳酸二乙酯是修饰蛋白质组氨酸残基的试剂。组氨酸也可使用4-羟基-2-壬烯醛进行修饰。赖氨酸残基与其他α-氨基团的反应,例如,有利于肽结合到蛋白/肽的表面或交联处。赖氨酸聚是多(乙烯)乙二醇的附着点,也是蛋白质糖基化的主要修饰位点。蛋白质的蛋氨酸残基可透过碘乙酰胺、溴乙胺、氯胺T等被修饰。

[0184] 四硝基甲烷和N-乙酰基咪唑可用于酪氨酸残基的修饰。经二酪氨酸形成的交联可

透过过氧化氢/铜离子完成。

[0185] 对色氨酸修饰的最近研究中使用了N-溴代琥珀酰亚胺、2-羟基-5-硝基苄溴或3-溴-3-甲基-2-(2-硝苯巯基)-3H-吡啶(BPNS-粪臭素)。

[0186] 当蛋白与戊二醛、聚乙二醇二丙烯酸酯和甲醛的交联用于配制水凝胶时,治疗性蛋白和含聚乙二醇的肽的成功修饰往往可延长循环半衰期。针对免疫治疗的变态反应原化学修饰往往透过氰酸钾的氨基甲酰化实现。

[0187] 一种肽或变体,其中肽被修饰或含非肽键,优选为本发明的实施例。一般来说,肽和变体(至少含氨基酸残基之间的肽联接)可使用Lukas等人(Lukas et al.,1981)以及此处引用的参考文献所披露的固相肽合成Fmoc-聚酰胺模式进行合成。芴甲氧羰基(Fmoc)团对N-氨基提供临时保护。使用N,N-二甲基甲酰胺中的20%二甲基胍啶中对这种碱高度敏感的保护基团进行重复分裂。由于它们的丁基醚(在丝氨酸苏氨酸和酪氨酸的情况下)、丁基酯(在谷氨酸和天门冬氨酸的情况下)、叔丁氧羰基衍生物(在赖氨酸和组氨酸的情况下)、三苯甲基衍生物(在半胱氨酸的情况下)及4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基衍生物(在精氨酸的情况下),侧链功能可能会受到保护。只要谷氨酰胺和天冬酰胺为C-末端残基,侧链氨基功能保护所使用的是由4,4'-二甲氧基二苯基团。固相支撑基于聚二甲基丙烯酸酯聚合物,其由三个单体二甲基丙烯酸酯(骨架单体)、双丙烯酸酯乙烯二胺(交联剂)和N-丙烯酰胺肌胺酸甲酯(功能剂)构成。使用的肽-树脂联剂为酸敏感的4-羟甲基苯氧乙酸衍生物。所有的氨基酸衍生物均作为其预制对称酸酐衍生物加入,但是天冬酰胺和谷氨酰胺除外,它们使用被逆转的N,N'-二乙基碳二亚胺/1-羟基苯并三唑介导的耦合程序而加入。所有的耦合和脱保护反应用茚三酮、硝基苯磺酸或isotin测试程序监测。合成完成后,用浓度为95%含50%清道夫混合物的三氟醋酸,从伴随去除侧链保护基团的树脂支承物中裂解肽。常用的清道夫混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水,准确的选择依据合成肽的氨基酸组成。此外,固相和液相方法结合使用对肽进行合成是可能的(例如,请参阅(Bruckdorfer et al.,2004)以及本文引用的参考文献)

[0188] 三氟乙酸用真空中蒸发、随后用承载粗肽的二乙基乙醚滴定进行去除。用简单萃取程序(水相冻干后,该程序制得不含清道夫混合物的肽)清除任何存在的清道夫混合物。肽合成试剂一般可从Calbiochem-Novabiochem(英国诺丁汉)获得。

[0189] 纯化可透过以下技术的任何一种或组合方法进行,如:再结晶法、体积排阻色谱法、离子交换色谱法、疏水作用色谱法以及(通常)反相高效液相色谱法(如使用乙腈/水梯度分离)。

[0190] 可以使用薄层色谱法、电泳特别是毛细管电泳、固相萃取(CSPE)、反相高效液相色谱法、酸解后的氨基酸分析、快原子轰击(FAB)质谱分析以及MALDI和ESI-Q-TOF质谱分析进行肽分析。

[0191] 为了选择过度提呈的肽,计算了提呈图,其显示样本中位提呈量以及复制变化。该特点使相关肿瘤实体的样本与正常组织样本的基线值并列。可透过计算调节线性混合效应模型(Pinheiro et al.,2015)的p值将以上每个特点并入过度提呈分数中,从而透过假发现率(Benjamini and Hochberg,1995)调整多项检验。

[0192] 对于透过质谱法对HLA配体的识别和相对定量,对来自冲击冷冻组织样本的HLA分子进行纯化并对HLA相关肽进行分离。分离的肽分开,并透过在线纳米-电喷雾-电离

(nanoESI)液相色谱-质谱(LC-MS)实验进行鉴定。由此产生的肽序列的验证方法是,将卵巢癌样本中记录的自然TUMAP的片段模式与相同序列相应合成参考肽的片段模式进行比较。由于这些肽被直接鉴定为原发肿瘤HLA分子的配体,因此这些结果为来自卵巢癌患者的原发性癌组织上确定肽的自然加工和提呈提供了直接证据。

[0193] 发现管道XPRESIDENT®v2.1(例如,参见US 2013-0096016,并在此透过引用将其整体并入本文)考虑到识别和选择相关过量提呈的候选肽疫苗,这基于与几种不同的非癌组织和器官相比癌症或其他受感染组织的HLA限制肽水平直接相对定量结果。这透过以下方法实现:使用专有数据分析管道处理的LC-MS采集数据、结合序列识别算法、谱聚类、计算离子、保留时间调整、充电状态卷积以及正态化而开发无标记差异化定量方法。

[0194] 为每种肽和样本确立了提呈水平,包括误差估计值。肿瘤组织大量提呈的肽以及肿瘤与非肿瘤组织和器官中过量提呈的肽已经得到确定。

[0195] 对来自卵巢癌组织样本的HLA肽复合物进行纯化,并且对HLA相关肽使用LC-MS进行分离和分析(见实施例)。本申请中包含的所有TUMAP使用原发性卵巢癌样本的方法进行鉴定,确认其在原发性卵巢癌上的提呈。

[0196] 在多个卵巢癌和正常组织上确定的TUMAP用无标记LC-MS数据的离子计数方法进行量化。该方法假定肽的LC-MS信号区域与样本中其丰度相关。各种LC-MS实验中肽的所有量化信号在集中趋势基础上进行正常化,根据每个样品进行平均,并合并入柱状图(被称为提呈图)。提呈图整合了不同分析方法,如:蛋白数据库检索、谱聚类、充电状态卷积(除电)和保留时间校准和正态化。

[0197] 本发明提出了有利于治疗癌肿/肿瘤,优选为治疗过量提呈或只提呈本发明肽的卵巢癌。这些肽由质谱分析法直接显示出,而由HLA分子自然提呈于原发性人卵巢癌样本中。

[0198] 与正常组织相比,癌症中高度过量表达肽来源的许多源基因/蛋白质(也指定为“全长蛋白”或“潜在蛋白”)—本发明相关的“正常组织”是健康卵巢细胞或其他正常组织细胞,这表明肿瘤与这些源基因的高度关联性(见实施例2)。此外,这些肽本身也在肿瘤组织中过度提呈(本发明相关的“肿瘤组织”是指来自卵巢癌患者的样本),但不在正常组织中过度提呈。

[0199] HLA结合肽能够被免疫系统识别,特别是T淋巴细胞。T细胞可破坏提呈被识别HLA/肽复合体的细胞(如:提呈衍生肽的卵巢癌细胞)。

[0200] 本发明的所有肽已被证明具有刺激T细胞反应的能力,并过量提呈,因而可用于制备本发明的抗体和/或TCR,例如可溶性TCR(参见实施例3和实施例4)。此外,肽与相应的MHC组合时,也可用于制备本发明的抗体和/或TCR,特别是sTCR。各个方法均为技术人员所熟知,并在各个文献中可找到。因此,本发明的肽可用于在患者中产生免疫反应,从而能够毁灭肿瘤细胞。患者的免疫反应能够透过直接给予患者所述肽或前体物质(如,加长肽、蛋白或编码这些肽的核酸),较理想是与加强免疫原性的制剂相结合,而进行诱导。源自该治疗性疫苗的免疫反应预期能够高度特异性地对抗肿瘤细胞,因为本发明的目标肽在正常组织上提呈的复制数目较少,防止患者发生对抗正常细胞的不良自体免疫反应的风险。

[0201] 本说明书还涉及包含一个 α 链和一个 β 链(“ α/β TCR”)的T细胞受体(TCR)。还提供了由MHC分子提呈时可与TCR和抗体结合的HAVCR1-001肽。本说明书还涉及核酸、载体和用

于表达TCR的宿主细胞和本说明书的肽;以及使用它们的方法。术语“T细胞受体”(缩写TCR)是指一种异二聚体分子,其包含一个 α 多肽链(α 链)和一个 β 多肽链(β 链),其中所述异二聚体受体能够结合由HLA分子提呈的肽抗原。该术语还包括所谓的 γ/δ TCR。

[0202] 在一个实施方案中,本说明书提供了如本文中所描述的产生TCR的方法,该方法包括在适于促进TCR表达的条件下培养能够表达TCR的宿主细胞。

[0203] 另一个方面,本说明书涉及一种根据本说明书的方法,其中所述抗原透过与足够量的含抗原提呈细胞的抗原结合被载入表达于合适抗原提呈细胞或人工抗原呈递细胞表面的I或II类MHC分子,或该抗原透过四聚化被加载I或II类MHC四聚体/I或II类MHC复合单体。

[0204] α/β TCR的 α 和 β 链和 γ/δ TCR的 γ 和 δ 链通常被视为各自有两个“结构域”,即可变和恒定结构域。可变结构域由可变区(V)和连接区(J)的组合。可变结构域还可能包括一个前导区(L)。 β 和 δ 链还可能包括一个多样区(D)。 α 和 β 恒定结构域还可能包括锚定 α 和 β 链至细胞膜的C末端跨膜(TM)结构域。相对于 γ/δ 的TCR,如本文所用的术语“TCR γ 可变域”是指无前导区(L)的TCR γ V (TRGV)区与TCR γ (TRGJ)区的组合,术语TCR γ 恒定结构域是指细胞外TRGC区域,或C-末端截短TRGC序列。同样地,“TCR δ 可变域”是指无前导区(L)的TCR δ V (TRDV)区与TCR δ D/J (TRDD/TRDJ)区的组合,术语“TCR δ 恒定结构域”是指细胞外TRDC区域,或C-末端截短TRDC序列。

[0205] 本说明书的TCR优选结合至发明肽HLA分子复合体,其具有约100 μ M或更小、约50 μ M或更小、约25 μ M或更小或约10 μ M或更小的结合亲和力(KD)。更为优选的情况是具有约1 μ M或更小、约100nM或更小、约50nM或更小或约25nM或更小结合亲和力的高亲和力TCR。本发明TCR优选结合亲和力范围的非限制性示例包括约1nM至约10nM;约10nM至约20nM;约20nM至约30nM;约30nM至约40nM;约40nM至约50nM;约50nM至约60nM;约60nM至约70nM;约70nM至约80nM;约80nM至约90nM;以及约90nM至约100nM。

[0206] 与本说明书TCR相关,本文使用的“特异性结合”及其语法变体用于表示对100 μ M或更小的HAVCR1-001肽-HLA分子复合体有结合亲和力(KD)的TCR。

[0207] 本说明书的 α/β 异二聚体TCR可能具有其恒定结构域之间的引入二硫键。这种类型的优选TCR包括那些具有一个TRAC恒定域序列和TRBC1或TRBC2恒定域序列的TCR,除非TRAC的苏氨酸48和TRBC1或TRBC2的丝氨酸57被半胱氨酸残基取代,所述半胱氨酸形成TRAC恒定域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定区序列之间的二硫键。

[0208] 不论具有或不具有上述的引入链间键,本说明书的 α/β 杂二聚体TCR可能具有一个TRAC恒定域序列和一个TRBC1或TRBC2恒定结构域序列,并且TRAC恒定结构域序列和TCR的TRBC1或TRBC2恒定结构域序列可能透过TRAC外显子2的Cys4和TRBC1或TRBC2外显子2的Cys4之间的天然二硫键相连。

[0209] 本说明书的TCR可能包括选自由放射性核素、荧光团和生物素组成组中的可检测标记。本说明书的TCR可能共轭至治疗活性剂,如放射性核素、化学治疗剂或毒素。

[0210] 在一个实施方案中,具有在 α 链中至少一个突变和/或具有在 β 链中至少一个突变的TCR与未突变的TCR相比,已经修改了糖基化。

[0211] 在一个实施方案中,在TCR α 链和/或TCR β 链中包括至少一个突变的TCR对发明肽HLA分子复合体有结合亲和力和/或结合半衰期,其是包含未突变TCR α 链和/或未突变TCR

β 链的TCR的结合亲和力的至少两倍。肿瘤特异性TCR亲和力增强及其开发依赖于存在最佳TCR亲和力的窗口。这样窗口的存在是根据观察结果：HLA-A2限制性病原体特异性TCR与HLA-A2限制性肿瘤相关自身抗原特异性TCR相比，KD值通常大约低10倍。现已知，尽管肿瘤抗原可能具有免疫原性，但是因为肿瘤来自个体自身的细胞，因此仅突变蛋白质或翻译加工改变的蛋白将被免疫系统视为外来物质。上调或过度表达（所谓的自体抗原）的抗原不一定诱导针对肿瘤的功能免疫应答：表达对这些抗原具有高度反应性的TCR的T细胞会在一种称为中枢耐受的程序中在胸腺内被不利选择，也就是说只有对自身抗原具有低亲和力TCR的细胞才仍然存在。因此，本说明书的TCR或变体对发明肽的亲和力可透过本领域熟知的方法来增强。本说明书还涉及一种识别和分离本发明TCR的一种方法，所述方法包括：用A2/发明肽单体从HLA-A*02阴性健康供体孵育PBMC，用四聚体-藻红蛋白（PE）孵育PBMC并透过荧光激活细胞分选（FACS）-Calibur方法分析分离高亲和力T细胞。

[0212] 本说明书还涉及一种识别和分离本发明TCR的一种方法，所述方法包括：获得含整个人体TCR α β 基因位点（1.1 and 0.7Mb）的转基因小鼠（其T细胞表达多样化人类TCR，用于补偿小鼠TCR缺乏），用发明肽对小鼠进行免疫处理，用四聚体-藻红蛋白（PE）孵育从转基因小鼠中获得的PBMC，并透过荧光激活细胞分选（FACS）-Calibur方法分析分离高亲和力T细胞。

[0213] 一方面，为了获得表达本说明书TCR的T细胞，编码本说明书TCR- α 和/或TCR- β 链的核酸被克隆入表达载体，诸如 γ 反转录病毒或慢病毒。重组病毒产生，然后测试功能，如抗原专一性和功能性亲合力。然后，最终产品的等分试样被用于转导靶T细胞群体（一般纯化自患者的PBMC），在输入患者前展开。另一方面，为了获得表达本说明书TCR的T细胞，TCR RNA透过本领域中已知的技术（例如，体外转录系统）合成。然后，体外合成的TCR RNA透过电穿孔来重新表达肿瘤特异性TCR- α 和/或TCR- β 链被引入获得自健康供体的初级CD8⁺T细胞。

[0214] 为了增加表达，编码本说明书TCR的核酸在操作上可连接到强激活子，例如逆转录病毒长末端重复序列（LTR）、巨细胞病毒（CMV）、鼠干细胞病毒（MSCV）U3、磷酸甘油酸激酶（PGK）、 β 肌动蛋白、泛素蛋白和猿猴病毒40（SV40）/CD43复合激活子、延伸因子（EF）-1a和脾脏病灶形成病毒（SFFV）激活子。在一优选实施方案中，激活子与被表达的核酸异源。除了强激活子外，本说明书的TCR表达盒可能含有附加的元素，可提高转基因表达，包括中枢多聚嘌呤区（CPPT），其促进了慢病毒构建体的核易位（Follerzi et al., 2000），和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元素（WPRE），其透过提高RNA稳定性增加转基因表达水平（Zufferey et al., 1999）。

[0215] 本发明TCR的 α 和 β 链可由位于分开的载体核酸进行编码，或者可透过位于同一载体的多核苷酸编码。

[0216] 实现高水平的TCR表面表达需要引入TCR的TCR- α 和TCR- β 链高水平转录。为了实现它，本说明书的TCR- α 和TCR- β 链可在单一的载体中被克隆入双顺反子构建体，其已被证明能够克服这一障碍。使用TCR- α 和TCR- β 链在之间的病毒核糖体间进入位点（IRES）导致两链的协同表达，因为TCR- α 和TCR- β 链均由在翻译过程中分成两个蛋白质的单一转录物产生，从而确保了产生TCR- α 和TCR- β 链的相等摩尔比。（Schmitt et al. 2009）。

[0217] 编码本说明书TCR的核酸可以是被优化以从宿主细胞增加表达的密码子。遗传密码冗余让一些氨基酸被一个以上的密码子编码，但某些密码子没有其他密码子”优化”，因

为匹配tRNA以及其他因子的相对可用性 (Gustafsson et al., 2004)。修改TCR- α 和TCR- β 基因序列使得每个氨基酸被用于哺乳动物基因表达的最佳密码子编码,以及消除mRNA不稳定性基序或隐蔽剪接位点,已显示可显著提高TCR- α 和TCR- β 基因表达 (Scholten et al., 2006)。

[0218] 此外,引入的和内源性TCR链之间的错配可能会导致获得特异性,其构成自身免疫的显著风险。例如,混合TCR二聚体的形成可能会减少可用以形成正确配对TCR复合体的CD3分子数目,因此,可以显著降低表达所引入TCR的细胞的功能性亲合力 (Kuball et al., 2007)。

[0219] 为了减少错配,本说明书引入的TCR链的C-末端结构域可以进行修改以促进链间亲和力,同时降低引入链与内源TCR配对的能力。这些策略可能包括用鼠配对物取代人类TCR- α 和TCR- β C端结构域(鼠化C端结构域);透过引入第二个半胱氨酸残基到引入TCR的TCR- α 和TCR- β 链产生C末端结构域的第二个链间二硫键(半胱氨酸修饰);交换TCR- α 和TCR- β 链C端结构域的相互作用残基(“杵臼结构”);直接融合TCR- α 和TCR- β 链可变结构域至CD3 ζ (CD3 ζ 融合) (Schmitt et al. 2009)。

[0220] 在一实施方案中,宿主细胞被改变结构以表达本说明书的TCR。在一优选实施方案中,宿主细胞为人T细胞或T细胞祖细胞。在一些实施方案中,T细胞或T细胞祖细胞从癌症患者中获得。在另一些实施方案中,T细胞或T细胞祖细胞从健康供体中获得。本说明书的宿主细胞相对于待治疗的患者可以为同种异体或自体的。在一实施方案中,宿主是被转化以表达 α/β TCR的 γ/δ T细胞。

[0221] “药物组合物”是指适合在医疗机构用于人体的组合物。优选地,药物组合物为无菌状态,并根据GMP指南生产。

[0222] 药物组合物包括游离形式或以一种药用盐形式存在的肽(也参见上文)。此处使用的“药用盐”系指所公开的肽的一种衍生物,其中该肽由制酸或药剂的碱盐进行改性。例如,用与适合的酸反应的游离碱(通常其中的中性药物有一个中性-NH₂基团)制备酸式盐。适合制备酸盐的酸包括有机酸,如:乙酸、丙酸、羧基酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、甲磺酸、苯磺酸、水杨酸等等、以及无机酸,如:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸等。相反,可在一种肽上提呈的酸性基团的碱盐制剂使用药用碱基进行制备,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等等。

[0223] 在特别优选的实施方案中,药物组合物包括乙酸(醋酸盐),三氟乙酸盐或盐酸(氯化物)形式的肽。

[0224] 本发明中所述的药剂优选为一种免疫治疗药剂,例如,一种疫苗。该疫苗可直接给到患者的受影响器官,也可i.d.、i.m.、s.c.、i.p.和i.v.注射方式全身给药,或体外应用到来自患者或其细胞株的细胞(随后再将这些细胞注入到患者中),或体外用于从来自患者的免疫细胞的一个细胞亚群(然后再将细胞重新给予患者)。如果核酸体外注入细胞,可能有益于细胞转染,以共同表达免疫刺激细胞因子(如白细胞介素2)。肽可完全单独给药,也可与免疫刺激佐剂相结合(见下文)、或与免疫刺激细胞因子联合使用、或以适当的输送系统给药(例如脂质体)。该肽也可共轭形成一种合适的载体(如钥孔虫血蓝蛋白(KLH)或甘露)到合适的载体(参阅W0 95/18145及(Longenecker et al., 1993))。肽也可能被标记,可

能是融合蛋白,或可能是杂交分子。在本发明中给出序列的肽预计能刺激CD4或CD8T细胞。然而,在有CD4⁺T-辅助细胞的帮助时,CD8T细胞刺激更加有效。因此,对于刺激CD8T细胞的MHC-I类表位,一种杂合分子的融合伙伴或片段提供了刺激CD4阳性T细胞的适当表位。CD4-和CD8刺激表位为本领域所熟知、并包括本发明中确定的表位。

[0225] 一方面,疫苗包括至少含有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549中提出的一种肽以及至少另外一种肽,优选为2至50个、更优选为2至25个、再优选为2至20个、最优选为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个肽。肽可能从一个或多个特定TAA中衍生,并且可能与MHC I类分子结合。

[0226] 另一方面,本发明提出了一种编码本发明中肽或肽变体的核酸(如多聚核苷酸)。多聚核苷酸可能为,例如,DNA、cDNA、PNA、RNA或其组合物,它们可为单链和/或双链、或多聚核苷酸的原生或稳定形式(如:具有硫代磷酸骨架的多聚核苷酸),并且只要它编码肽,就可能包含也可能不包含内含子。当然,多聚核苷酸只能编码加入天然肽键并含有天然氨基酸残基的肽。另一个方面,本发明提出了一种可根据本发明表达多肽的表达载体。

[0227] 对于连接多核苷酸,已经开发出多种方法,尤其是针对DNA,可透过向载体补充可连接性末端等方法进行连接。例如,可向DNA片段加入补充性均聚物轨道,之后DNA片段被插入到载体DNA。然后,透过补充性均聚物尾巴的氢键结合,将载体和DNA片段结合,从而形成重组DNA分子。

[0228] 含有一个或多个酶切位点的合成接头为DNA片段与载体连接提供了另一种方法。含各种限制性核酸内切酶的合成接头可透过多种管道购得,其中包括从国际生物技术公司(International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, 美国)购得。

[0229] 编码本发明多肽的DNA理想修饰方法是使用Saiki等人(Saiki et al., 1988)所采用的聚合酶链反应方法。此方法可用于将DNA引入合适的载体(例如,透过设计合适的酶切位点),也可用于本领域已知的其他有用方法修饰DNA。如果使用病毒载体,痘病毒载体或腺病毒载体为优选。

[0230] 之后,DNA(或在逆转录病毒载体情况下,RNA)可能表达于合适的宿主,从而制成含本发明肽或变体的多肽。因此,可根据已知技术使用编码本发明肽或变体的DNA,用本文所述方法适当修饰后,构建表达载体,然后表达载体用于转化合适宿主细胞,从而表达和产生本发明中的多肽。此类技术包括那些公开于,例如,美国专利4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075和4,810,648。

[0231] 编码含本发明化合物多肽的DNA(或在逆转录病毒载体情况下,RNA)可能被加入到其他多种DNA序列,从而引入到合适的宿主中。同伴DNA将取决于宿主的性质、DNA引入宿主的方式、以及是否需要保持为游离体还是要相互结合。

[0232] 一般来说,DNA可以适当的方向和正确的表达阅读框架附着到一种表达载体(如质粒)中。如有必要,该DNA可能与所需宿主所识别的相应转录和翻译调节控制核苷酸序列连接,尽管表达载体中一般存在此类控制功能。然后,该载体透过标准方法被引入宿主。一般来说,并不是所有的宿主都会被载体转化。因此,有必要选择转化过的宿主细胞。选择方法包括用任何必要的控制元素向表达载体插入一个DNA序列,该序列对转化细胞中的可选择性属性(如抗生素耐药性)进行编码。

[0233] 另外,有这种选择属性的基因可在另外一个载体上,该载体用来协同转化所需的

宿主细胞。

[0234] 然后,本发明中的重组DNA所转化的宿主细胞在本文中所述本领域技术人员熟悉的合适条件下培养足够长的时间,从而表达之后可回收的肽。

[0235] 有许多已知的表达系统,包括细菌(如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母(如酵母菌)、丝状真菌(如曲霉菌)、植物细胞、动物细胞及昆虫细胞。该系统可优选为哺乳动物细胞,如来自ATCC细胞生物学库(Cell Biology Collection)中的CHO细胞。

[0236] 典型的哺乳动物细胞组成型表达载体质粒包括CMV或含一个合适的多聚A尾巴的SV40激活子以及抗性标志物(如新霉素)。一个实例为从Pharmacia公司(Piscataway,新泽西,美国)获得的pSVL。一种可诱导型哺乳动物表达载体的例子是pMSG,也可以从Pharmacia公司获得。有用的酵母质粒载体是pRS403-406和pRS413-416,一般可从Stratagene Cloning Systems公司(La Jolla,CA 92037,美国)获得。质粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406是酵母整合型质粒(YIp),并插入了酵母可选择性标记物HIS3、TRP1、LEU2和URA3。pRS413-416质粒为酵母着丝粒质粒(Ycp)。基于CMV激活子的载体(如,来自于Sigma-Aldrich公司)提供了瞬时或稳定的表达、胞浆表达或分泌,以及FLAG、3xFLAG、c-myc或MATN不同组合物中的N-端或C-端标记。这些融合蛋白可用于检测、纯化及分析重组蛋白。双标融合为检测提供了灵活性。

[0237] 强劲的人巨细胞病毒(CMV)激活子调控区使得COS细胞中的组成蛋白表达水平高达1mg/L。对于较弱的细胞株,蛋白水平一般低于0.1mg/L。SV40复制原点的出现将导致DNA在SV40复制容纳性COS细胞中高水平复制。例如,CMV载体可包含细菌细胞中的pMB1(pBR322的衍生物)复制原点、细菌中进行氨苄青霉素抗性选育的钙-内酰胺酶基因、hGH polyA和f1的原点。含前胰岛素原引导(PPT)序列的载体可使用抗FLAG抗体、树脂和板引导FLAG融合蛋白分泌到进行纯化的培养基中。其他与各种宿主细胞一起应用的载体和表达系统是本领域熟知众所周知的。

[0238] 在另一个实施方案中,对本发明的两个或更多的肽或肽变体进行编码,因此,以一个连续顺序(类似于“一串珠子”的构建体)表达。在达到目标,所述肽或肽变体可能透过连接符氨基酸的延伸处(例如LLLLLL)连接或融合一起,也可能他们之间没有任何附加的肽而被连接。这些构建体也可用于癌症治疗,可诱导涉及MHC I和MHC II类分子的免疫应答。

[0239] 本发明还涉及一种宿主细胞,其以本发明的多核苷酸载体构建转化而来。宿主细胞可为原核细胞,也可为真核细胞。在有些情况下,细菌细胞为优选原核宿主细胞,典型为大肠杆菌株,例如,大肠杆菌菌株DH5(从Bethesda Research Laboratories公司(Bethesda,MD,美国)获得)和RR1(从美国菌种保藏中心(ATCC,Rockville,MD,美国),ATCC编号31343获得)。首选的真核宿主细胞包括酵母、昆虫和哺乳动物细胞,优选为脊椎动物细胞,如:小鼠、大鼠、猴子或人成纤维细胞和结肠癌细胞株中的细胞。酵母宿主细胞包括YPH499、YPH500和YPH501,一般可从Stratagene Cloning Systems公司(La Jolla,CA 92037,美国)获得。首选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞为ATCC中的CCL61细胞、NIH瑞士小鼠胚胎细胞NIH/3T3为ATCC中的CRL 1658细胞、猴肾源性COS-1细胞为ATCC中的CRL1650细胞以及人胚胎肾细胞的293号细胞。首选昆虫细胞为Sf9细胞,可用杆状病毒表达载体转染。有关针对表达选择合适宿主细胞的概要,可从教科书(Paulina Balbás and Argelia Lorence《Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression,

Reviews and Protocols》Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9) 和技术人员知道的其他文献中查到。

[0240] 含本发明DNA结构的适当宿主细胞的转化可使用大家熟知的方法完成,通常取决于使用载体的类型。关于原核宿主细胞的转化,请参见,例如,Cohen等人的文献(Cohen et al.,1972)和(Green and Sambrook,2012)。酵母细胞的转化在Sherman等人的文章(Sherman et al.,1986)中进行了描述。Beggs(Beggs,1978)中所述的方法也很有用。对于脊椎动物细胞,转染这些细胞的试剂等,例如,磷酸钙和DEAE-葡聚糖或脂质体配方,可从Stratagene Cloning Systems公司或Life Technologies公司(Gaithersburg,MD 20877,美国)获得。电穿孔也可用于转化和/或转染细胞,是本领域用于转化酵母细胞、细菌细胞、昆虫细胞和脊椎动物细胞大家熟知的方法。

[0241] 被成功转化的细胞(即含本发明DNA结构的细胞)可用大家熟知的方法(如PCR)进行识别。另外,上清液存在的蛋白可使用抗体进行检测。

[0242] 应了解,本发明中的某些宿主细胞用于制备本发明中的肽,例如细菌细胞、酵母细胞和昆虫细胞。但是,其他宿主细胞可能对某些治疗方法有用。例如,抗原提呈细胞(如树突状细胞)可用于表达本发明中的肽,使他们可以加载相应的MHC分子中。因此,本发明提出了含本发明中核酸或表达载体的一种宿主细胞。

[0243] 在一个优选实施方案中,宿主细胞为抗原提呈细胞,尤其是树突状细胞或抗原提呈细胞。2010年4月29日,美国食品和药物管理局(FDA)批准载有含前列腺酸性磷酸酶(PAP)的重组融合蛋白可用于治疗无症状或症状轻微的转移性HRPC(Rini et al.,2006;Small et al.,2006)。

[0244] 另一方面,本发明提出了一种配制一种肽及其变体的方法,该方法包括培养宿主细胞和从宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0245] 在另一个实施方案中,本发明中的肽、核酸或表达载体用于药物中。例如,肽或其变体可制备为静脉(i.v.)注射剂、皮下(s.c.)注射剂、皮内(i.d.)注射剂、腹膜内(i.p.)注射剂、肌肉(i.m.)注射剂。肽注射的优选方法包括s.c.、i.d.、i.p.、i.m.和i.v.注射。DNA注射的优选方法为i.d.、i.m.、s.c.、i.p.和i.v.注射。例如,给予50 μ g至1.5mg,优选为125 μ g至500 μ g的肽或DNA,这取决于具体的肽或DNA。上述剂量范围在以前的试验中成功使用(Walter et al.,2012)。用于主动免疫接种的多聚核苷酸可为基本纯化形式,也可包被于载体或输送系统。核酸可能为DNA、cDNA、PNA、RNA,也可能为其组合物。这种核酸的设计和引入方法为本领域所熟知。例如,文献中有其概述(Teufel et al.,2005)。多核苷酸疫苗很容易制备,但这些载体诱导免疫反应的作用模式尚未完全了解。合适的载体和输送系统包括病毒DNA和/或RNA,如基于腺病毒、牛痘病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、腺相关病毒或含一种以上病毒元素的混合病毒的系统。非病毒输送系统包括阳离子脂质体和阳离子聚合物,是DNA输送所属领域内熟知的系统。也可使用物理输送系统,如透过“基因枪”。肽或核酸编码的肽可以是一种融合蛋白,例如,含刺激T细胞进行上述CDR的表位。

[0246] 本发明的药剂也可能包括一种或多种佐剂。佐剂是那些非特异性地增强或加强免疫反应的物质(例如,透过CD8⁺阳性T细胞和辅助T(T_H)细胞介导的对一种抗原的免疫应答,因此被视为对本发明的药剂有用。适合的佐剂包括(但不仅限于)1018ISS、铝盐、AMPLIVAX[®]、AS15、BCG、CP-870,893、CPG7909、CyaA、dSLIM、鞭毛蛋白或鞭毛蛋白衍生的TLR5配体、FLT3

配体、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(ALDARA®)、resiquimod、ImuFact IMP321、白细胞介素 IL-2、IL-13、IL-21、干扰素 α 或 β 、或其聚乙二醇衍生物、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、JuvImmune®、LipoVac、MALP2、MF59、单磷酸脂A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、水包油和油包水乳状液、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、PepTel®载体系统、基于聚丙交酯复合乙交酯[PLG]和右旋糖苷微粒、重组人乳铁传递蛋白SRL172、病毒颗粒和其他病毒样颗粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys、源自皂角苷、分支杆菌提取物和细菌细胞壁合成模拟物的Aquila公司的QS21刺激子,以及其他专有佐剂,如:Ribi's Detox、Quil或Superfos。优选佐剂如:弗氏佐剂或GM-CSF。前人对一些树突状细胞特异性免疫佐剂(如MF59)及其制备方法进行了描述(Allison and Krummel,1995)。也可能使用细胞因子。一些细胞因子直接影响树突状细胞向淋巴组织迁移(如,TNF-),加速树突状细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原提呈细胞(如,GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国5849589号专利,特别以其完整引用形式并入本文),并充当免疫佐剂(如IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN- α 、IFN- β)(Gabrilovich et al.,1996)。

[0247] 据报告,CpG免疫刺激寡核苷酸可提高佐剂在疫苗中的作用。如果没有理论的约束,CpG寡核苷酸可透过Toll样受体(TLR)(主要为TLR9)激活先天(非适应性)免疫系统从而起作用。CpG引发的TLR9活化作用提高了对各种抗原的抗原特异性体液和细胞反应,这些抗原包括肽或蛋白抗原、活病毒或被杀死的病毒、树突状细胞疫苗、自体细胞疫苗以及预防性和治疗性疫苗中的多糖结合物。更重要的是,它会增强树突状细胞的成熟和分化,导致Th1细胞的活化增强以及细胞毒性T淋巴细胞(CTL)生成加强,甚至CD4T细胞说明的缺失。甚至有疫苗佐剂的存在也能维持TLR9活化作用诱发的Th1偏移,这些佐剂如:正常促进Th2偏移的明矾或弗氏不完全佐剂(IFA)。CpG寡核苷酸与以下其他佐剂或配方一起制备或联合给药时,表现出更强的佐剂活性,如微粒、纳米粒子、脂肪乳或类似制剂,当抗原相对较弱时,这些对诱发强反应尤为必要。他们还能加速免疫反应,使抗原剂量减少约两个数量级,在有些实验中,对不含CpG的全剂量疫苗也能产生类似的抗体反应(Krieg,2006)。美国6406705B1号专利对CpG寡核苷酸、非核酸佐剂和抗原结合使用促使抗原特异性免疫反应进行了描述。一种CpG TLR9拮抗剂为Mologen公司(德国柏林)的dSLIM(双干环免疫调节剂),这是本发明药物组合物的优选成分。也可使用其他如TLR结合分子,如:RNA结合TLR7、TLR8和/或TLR9。

[0248] 其他有用的佐剂例子包括(但不限于)化学修饰性CpG(如CpR、Idera)、dsRNA模拟物,如,Poly(I:C)及其衍生物(如:AmpliGen、Hiltonol、多聚-(ICLC)、多聚(IC-R)、多聚(I:C12U))、非CpG细菌性DNA或RNA以及免疫活性小分子和抗体,如:环磷酸胺、舒尼替单抗、贝伐单抗®、西乐葆、NCX-4016、西地那非、他达拉非、伐地那非、索拉非尼、替莫唑胺、temsirolimus、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗-CTLA4、免疫系统的其他抗体靶向性主要结构(如:抗-CD40、抗-TGF β 、抗-TNF α 受体)和SC58175,这些药物都可能有治疗作用和/或充当佐剂。技术人员无需过度进行不当实验就很容易确定本发明中有用的佐剂和添加剂的数量和浓度。

[0249] 首选佐剂是抗-CD40、咪喹莫特、瑞喹莫德、GM-CSF、环磷酸胺、舒尼替尼、贝伐单抗、干扰素 α 、CpG寡核苷酸及衍生物、多聚(I:C)及衍生物、RNA、西地那非和PLG或病毒颗粒的微粒制剂。

[0250] 本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂从含集落刺激因子制剂中选择,

如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特、resiquimod和干扰素- α 。

[0251] 本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂从含集落刺激因子制剂中选择,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)、环磷酰胺、咪喹莫特和resiquimod。在本发明药物组合物的一个优选实施方案中,佐剂为环磷酰胺、咪喹莫特或resiquimod。更优选的佐剂是Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、聚-ICLC(Hiltonol®)和抗CD40mAB或其组合物。

[0252] 此组合药物为非肠道注射使用,如皮下、皮内、肌肉注射,也可口服。为此,肽和其他选择性分子在药用载体中分解或悬浮,优选为水载体。此外,组合物可包含辅料,如:缓冲剂、结合剂、冲击剂、稀释剂、香料、润滑剂等。这些肽也可与免疫刺激物质合用,如:细胞因子。可用于此类组合物的更多辅料可在从A.Kibbe所著的Handbook of Pharmaceutical Excipients(Kibbe,2000)等书中获知。此组合药物可用于阻止、预防和/或治疗腺瘤或癌性疾病。例如,EP2112253中有示例制剂。

[0253] 重要的是要认识到,透过本发明的疫苗引发的免疫应答在不同的细胞阶段和开发的不同阶段攻击癌症。而且不同的癌症相关信号通路被攻击。这相对于其他疫苗的优势,这些疫苗只针对一个或几个靶标,这可能会导致肿瘤很容易适应于攻击(肿瘤逃逸)。此外,并非所有的个体肿瘤都表达相同模式的抗原。因此,几个肿瘤相关肽的组合确保了每个肿瘤都承担至少一些靶标。该组合物以这样的方式设计,预期每个肿瘤可表达几种抗原并覆盖肿瘤生长和维持所需要的几种独立的途径。因此,疫苗可易于“现成的”用于较大患者群体。这意味着,预选择接受疫苗治疗的患者可限制为HLA分型,无需抗原表达的任何额外的生物标志物评估,但仍然确保多个靶标同时被诱导的免疫应答攻击,这对于疗效很重要(Banchereau et al.,2001;Walter et al.,2012)。

[0254] 本文所用的“支架”一词是指与(如抗原)决定因子特异性结合的分子。在一项实施方案中,支架是能够引导其所连接的实体(例如,(第二)抗原结合部分)至目标靶点,例如,至特定类型的肿瘤细胞或承载抗原决定簇的肿瘤基质(如根据目前申请中肽和MHC的复合体)。在另一项实施例中,支架能够透过其靶抗原(例如T细胞受体复合体抗原)激活信号通路。支架包括但不限于抗体及其片段,抗体的抗原结合区,其包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区,结合的蛋白包括至少一个锚蛋白重复序列基元和单域抗原结合(SDAB)分子、适体、(可溶)TCR和(经修饰的)细胞,例如同种异体或自体T细胞。为了评估某个分子是否是结合至靶点的支架,可进行结合测定。

[0255] “特定”结合系指,与其他天然肽-MHC复合体相比,该支架与感兴趣的肽-MHC复合体更好地结合,结合程度为,拥有能够杀死承载特定靶点细胞的活性分子的支架不能够杀死无特定靶点但提呈一个或多个其他肽-MHC复合体的另一细胞。如果交叉反应性肽-MHC的肽并不是天然的,即,并非来自人HLA-多肽组,则结合至其他肽-MHC复合体是无关紧要的。评估靶细胞杀伤的测试在本领域中是公知的。它们应该含有未改变的肽-MHC提呈的靶细胞(原发细胞或细胞系)或载有肽的细胞进行,以便达到天然肽-MHC的水平。

[0256] 各支架可包括一个标记,其透过确定是否存在或不存在的信号可检测到结合支架。例如,该支架可用荧光染料或任何其他适用的细胞标记分子进行标记。此类标记分子是本领域中公知的。例如,透过荧光染料进行的荧光标记可透过荧光或激光扫描显

微术或流式细胞术提供结合适体的可视化。

[0257] 各支架可与第二个活性分子(例如IL-21、抗CD3、抗CD28)共轭。

[0258] 关于多肽支架的进一步信息,可参阅,例如,在WO 2014/071978A1背景技术部分,并作为参考文献引用。

[0259] 本发明还涉及适体。适体(例如,参见WO 2014/191359及其中引用的文献)是短的单链核酸分子,其可以折迭为所定义的三维结构并识别特定的靶标结构。它们似乎是开发靶向治疗的合适替代方法。适体已显示可选择性与具有高亲和力和特异性的复合体靶标相结合。

[0260] 识别细胞表面分子的适体在过去十年内已经确定,并为开发诊断和治疗方法提供了手段。由于适体已显示几乎无毒性和免疫原性,因此,它们是生物医学应用中有前景的候选物质。事实上适体,例如前列腺特异性膜抗原识别适体,已被成功地用于靶向治疗并在体内模型的异种移植物中显示出功能。此外,认识到特定肿瘤细胞系的适体也已确定。

[0261] 可选择DNA适体来揭示各种癌细胞的广谱标识属性,特别是那些来自于实体瘤的细胞,而非致瘤和主要健康细胞不被识别。如果所识别的适体不仅识别肿瘤特异性子类型,而且与一系列肿瘤相互作用,这使适体适用于作为所谓的广谱诊断和治疗手段。

[0262] 此外,用流式细胞仪对细胞结合行为的研究显示,适体在纳摩尔范围内显示出很好的亲和力。

[0263] 适体用于诊断和治疗目的。此外,也可能显示,一些适体被肿瘤细胞吸取,因而可作为抗癌剂靶向递送的分子赋形剂,例如siRNA进入肿瘤细胞。

[0264] 可选择适体针对复合体的靶标,如细胞和组织以及包含、优选包括根据任何SEQ ID NO 1至SEQ ID NO 549的一个序列、根据当前发明的肽复合体与MHC分子,使用细胞SELEX(透过指数富集的配体系统进化)技术。

[0265] 本发明中的肽可用于生成和开发出针对MHC/肽复合物的特定抗体。这些抗体可用于治疗,将毒素或放射性物质靶向病变组织。这些抗体的另一用途是为了成像之目的(如PET)将放射性核素靶向病变组织。这可有助于检测小转移灶或确定病变组织的大小和准确位置。

[0266] 因此,本发明的另一方面是提出产生特异性结合至与HLA限制性抗原络合的I或II类人主要组织相容性复合体(MHC)的一种重组抗体的方法,该方法包括:用可溶形式的与HLA限制性抗原络合的(MHC) I或II类分子对包含表达所述主要组织相容性说复合体(MHC) I或II类的基因工程非人哺乳动物进行免疫;将mRNA分子与产生所述非人哺乳动物细胞的抗体分离;产生一个噬菌体显示库,显示由所述mRNA分子编码的蛋白分子;以及将至少一个噬菌体与所述噬菌体显示库分离,所述的至少一个噬菌体显示所述抗体特异性地结合至与HLA限制性抗原络合的所述人主要组织相容性说复合体(MHC) I或II类。

[0267] 本发明的另一方面提出一种抗体,其特异性结合至与一种HLA限制性抗原络合的I或II类人主要组织相容性说复合体(MHC),其中该抗体优选为多克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体和/或嵌合抗体。

[0268] 产生这种抗体和单链I类主要组织相容性复合物的相应方法,以及产生这些抗体的其他工具在WO 03/068201、WO 2004/084798、WO 01/72768、WO 03/070752以及出版物(Cohen et al.,2003a;Cohen et al.,2003b;Denkberg et al.,2003)中进行了披露,为了

本发明之目的,所有参考文献透过引用被完整地并入本文。

[0269] 优选地,该抗体与复合体的结合亲和力低于20纳摩尔,优选为低于10纳摩尔,这在本发明情况下被视为具有“特异性”。

[0270] 本发明涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549的序列或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549具有88%同源性(优选为相同)的变体,或诱导与所述变异肽发生T细胞交叉反应的变体,其中,所述肽不是全长多肽。

[0271] 本发明进一步涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549的序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549具有至少88%同源性(优选为相同)的变体,其中所述肽或变体的总长度为8至100个、优选为8至30个、最优选为8至14个氨基酸。

[0272] 本发明进一步涉及本发明的肽,其具有与主要组织相容性复合体(MHC) I或II类分子结合的能力。

[0273] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中肽由或基本由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549的氨基酸序列组成。

[0274] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽(在化学上)被修饰和/或包含非肽键。

[0275] 本发明进一步涉及本发明的肽,其中该肽为融合蛋白的一部分,特别包括HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸,或其中该肽与抗体(例如,树突状细胞特定抗体)融合。

[0276] 本发明的另一实施方案涉及一种非天然肽,其中所述肽由或基本由根据SEQ ID No:1至SEQ ID No:48的氨基酸序列组成,并经合成产生(即,合成)为药用盐。合成产生肽的方法是本领域公知的。本发明肽的盐与其体内状态的肽基本上不同,因为这些体内产生的肽不是盐。该肽的非天然盐形式介导肽的溶解度,特别是包含所述肽的药物组合物的情况下,例如,本文所公开的肽疫苗。为了向需要治疗的受试者有效地提供肽,需要肽具有充分、至少基本的溶解度。优选地,盐为肽的药用盐。本发明的这些盐包括碱和碱土盐类,诸如Hofmeister系列的盐,包含阴离子 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 I^- 、 SCN^- 和阳离子 NH_4^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Ba^{2+} 。特别地,盐选自 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 、 NH_4Cl 、 NH_4Br 、 NH_4NO_3 、 NH_4ClO_4 、 NH_4I 、 NH_4SCN 、 Rb_3PO_4 、 Rb_2HPO_4 、 RbH_2PO_4 、 Rb_2SO_4 、 $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 、 Rb_4Cl 、 Rb_4Br 、 Rb_4NO_3 、 Rb_4ClO_4 、 Rb_4I 、 Rb_4SCN 、 K_3PO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2SO_4 、 KCH_3COO 、 KCl 、 KBr 、 KNO_3 、 KClO_4 、 KI 、 KSCN 、 Na_3PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 NaCH_3COO 、 NaCl 、 NaBr 、 NaNO_3 、 NaClO_4 、 NaI 、 NaSCN 、 $\text{ZnCl}_2\text{Cs}_3\text{PO}_4$ 、 Cs_2HPO_4 、 CsH_2PO_4 、 Cs_2SO_4 、 CsCH_3COO 、 CsCl 、 CsBr 、 CsNO_3 、 CsClO_4 、 CsI 、 CsSCN 、 Li_3PO_4 、 Li_2HPO_4 、 LiH_2PO_4 、 Li_2SO_4 、 LiCH_3COO 、 LiCl 、 LiBr 、 LiNO_3 、 LiClO_4 、 LiI 、 LiSCN 、 Cu_2SO_4 、 $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 Mg_2HPO_4 、 $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PQ}_4)_2$ 、 Mg_2SO_4 、 $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 MgCl_2 、 MgBr_2 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 、 MgI_2 、 $\text{Mg}(\text{SCN})_2$ 、 MnCl_2 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 Ca_2HPO_4 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 CaSO_4 、 $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 CaCl_2 、 CaBr_2 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ 、 CaI_2 、 $\text{Ca}(\text{SCN})_2$ 、 $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 Ba_2HPO_4 、 $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 BaSO_4 、 $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 、 BaCl_2 、 BaBr_2 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ 、 BaI_2 和 $\text{Ba}(\text{SCN})_2$ 。特别优选为NH₄乙酸盐、 MgCl_2 、 KH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 KCl 、 NaCl 和 CaCl_2 ,例如:氯化物或乙酸盐(三氟乙酸)盐。

[0277] 一般来说,肽和变体(至少含氨基酸残基之间的肽联接)可使用Lukas等人(Lukas et al., 1981)以及此处引用的参考文献所披露的固相肽合成Fmoc-聚酰胺模式进行合成。芴甲氧羰基(Fmoc)团对N-氨基提供临时保护。使用N,N-二甲基甲酰胺中的20%二甲基哌啶中对这种碱高度敏感的保护基团进行重复裂解。由于它们的丁基醚(在丝氨酸苏氨酸和酪

氨酸的情况下)、丁基酯(在谷氨酸和天门冬氨酸的情况下)、叔丁氧羰基衍生物(在赖氨酸和组氨酸的情况下)、三苯甲基衍生物(在半胱氨酸的情况下)及4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基衍生物(在精氨酸的情况下),侧链功能可能会受到保护。只要谷氨酰胺和天冬酰胺为C-末端残基,侧链氨基功能保护所使用的是由4,4'-二甲氧基二苯基团。固相支撑基于聚二甲基丙烯酸酰胺聚合物,其由三个单体二甲基丙烯酸酰胺(骨架单体)、双丙烯酸酰乙烯二胺(交联剂)和N-丙烯酸肌胺酸甲酯(功能剂)构成。使用的肽-树脂联剂为酸敏感的4-羟甲基苯氧乙酸衍生物。所有的氨基酸衍生物均作为其预制对称酸酐衍生物加入,但是天冬酰胺和谷氨酰胺除外,它们使用被逆转的N,N-二环己基碳二亚胺/1-羟基苯并三唑介导的耦合程序而加入。所有的耦合和脱保护反应应用茚三酮、硝基苯磺酸或isotin测试程序监测。合成完成后,用浓度为95%三氟醋酸含50%清道夫混合物,从树脂支承物裂解肽及伴随去除侧链保护基团。常用的清道夫混合物包括乙二硫醇、苯酚、苯甲醚和水,准确的选择依据合成肽的氨基酸组成。此外,固相和液相方法结合使用对肽进行合成是可能的(例如,请参阅(Bruckdorfer et al.,2004)以及本文引用的参考文献)。

[0278] 三氟乙酸用真空中蒸发、随后用乙醚研磨得到粗肽。任何存在的清除剂通过用简单萃取程序(水相冻干后制得不含清除剂的粗肽)清除。肽合成试剂一般可从Calbiochem-Novabiochem(英国诺丁汉)获得。

[0279] 纯化可通过以下技术的任何一种或组合方法进行,如:再结晶法、体积排阻色谱法、离子交换色谱法、疏水作用色谱法以及(通常)反相高效液相色谱法(如使用乙腈/水梯度分离)。

[0280] 本发明进一步涉及一种核酸,其编码本发明所述肽,前提是该肽并非完整(完全)的人蛋白。

[0281] 本发明进一步涉及一种本发明的核酸,为DNA、cDNA、PNA、RNA或其组合。

[0282] 本发明进一步涉及一种能表达本发明核酸的表达载体。

[0283] 本发明进一步涉及本发明的肽、本发明的核酸或本发明的表达载体在药物中的用途,特别是用于治疗卵巢癌。

[0284] 本发明进一步涉及含本发明核酸或本发明表达载体的宿主细胞。

[0285] 本发明进一步涉及本发明的宿主细胞,其为抗原提呈细胞,优选为树突细胞。

[0286] 本发明进一步涉及制备本发明肽的方法,所述方法包括培养本发明的宿主细胞,和从所述宿主细胞或其培养基中分离肽。

[0287] 本发明进一步涉及本发明中的方法,其中通过使足量的抗原与抗原提呈细胞接触,抗原被载入表达于合适抗原提呈细胞表面的I或II类MHC分子上。

[0288] 本发明进一步涉及本发明的方法,其中该抗原提呈细胞包括一个表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549或变体氨基酸序列的肽。

[0289] 本发明进一步涉及以本发明方法制造的激活的T细胞,其中所述T细胞有选择性地识别一种细胞,该细胞异常表达含本发明氨基酸序列的多肽。

[0290] 本发明进一步涉及一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明任意氨基酸序列的多肽,该方法包括对患者施用本发明的有效量T细胞。

[0291] 本发明进一步涉及任何所述肽、本发明的核酸、本发明的表达载体、本发明的细胞、本发明的激活的细胞毒性T淋巴细胞作为药剂或在药剂制造中的用途。本发明进一步涉

及本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0292] 本发明进一步涉及本发明的用途,其中该药剂为一种疫苗。本发明进一步涉及一种本发明的用途,其中药剂可有效抗癌。

[0293] 本发明还一般涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为卵巢癌细胞或其他实体或血液肿瘤细胞,如:胰腺癌、脑癌、肾癌、直肠或结肠癌、白血病。

[0294] 本发明进一步涉及一种基于本发明肽的特定标志物蛋白和生物标志物,在此称为“靶标”,其可用于诊断和/或判断卵巢癌的预后。本发明还涉及这些供癌症治疗使用的新靶点。

[0295] 本文中术语“抗体”为广义上的定义,既包括多克隆也包括单克隆抗体。除了完整或“全部”的免疫球蛋白分子,“抗体”这一术语还包括这些免疫球蛋白分子和人源化免疫球蛋白分子的片段(如,CDR、Fv、Fab和Fc片段)或聚合物,只要它们表现出本发明的任何期望属性(例如,卵巢癌标志物多肽的特异性结合、将毒素传递给癌症标志物基因表达水平增加时的卵巢癌细胞和/或抑制卵巢癌标志物多肽的活性)。

[0296] 只要有可能,本发明的抗体可从商业来源购买。本发明的抗体也可能使用已知的方法制得。技术人员会了解全长卵巢癌标志物多肽或其片段可用于制备本发明的抗体。用于产生本发明抗体的多肽可部分或全部地由天然源经纯化而得,也可利用重组DNA技术生产。

[0297] 例如,本发明的编码肽的cDNA,例如,该肽为根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549多肽的肽,或其中一个变体或片段,可在原核细胞中(如:细菌)或真核细胞(如:酵母、昆虫或哺乳动物细胞)中表达,之后,可纯化重组蛋白,并用于产生一种特异性结合用于产生本发明抗体的卵巢癌标志物多肽的单克隆或多克隆抗体制剂。

[0298] 本领域的技术人员会认识到,两种或两种以上不同集合的单克隆抗体或多克隆抗体能最大限度地增加获得一种含预期用途所需的特异性和亲和力(例如,ELISA法、免疫组织化学、体内成像、免疫毒素疗法)的抗体的可能性。根据抗体的用途,用已知的方法对其期望活性进行测试(例如,ELISA法、免疫组织化学、免疫治疗等;要获取产生和测试抗体的进一步指导,请参阅,例如,Greenfield,2014(Greenfield,2014))。例如,该抗体可用ELISA法或免疫印迹法、免疫组织化学染色福尔马林固定的癌组织或冰冻的组织切片进行检测。在初次体外表征后,用于治疗或体内诊断用途的抗体根据已知的临床测试方法进行检测。

[0299] 此处使用的术语“单克隆抗体”系指从大量同质抗体中获得的一种抗体,即,由相同的抗体组成的抗体群,但可能少量提呈的自然突变除外。此处所述的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中一部分重链和/或轻链与从特定物种中获得的抗体或属于特定抗体类型和分类型抗体的相应序列相同(同质),同时,剩余链与从其他物种中获得的抗体或属于特定抗体类型和子类型抗体的相应序列以及这些抗体的片段相同(同质),只要他们表现出预期的拮抗活性(美国4816567号专利,其在此以其整体并入)。

[0300] 本发明的单克隆抗体可能使用杂交瘤方法制得。在杂交瘤方法中,老鼠或其他适当的宿主动物,通常用免疫制剂以引发生成或能产生将特异性结合至免疫制剂的抗体。或者,淋巴细胞可在体外进行免疫。

[0301] 单克隆抗体也可由DNA重组方法制得,如:美国4816567号专利所述。编码本发明单克隆抗体的DNA可很容易地使用传统程序进行分离和测序(例如:透过使用能与编码鼠抗体

重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0302] 体外方法也适用于制备单价抗体。抗体消化以产生抗体的片段,尤其是Fab片段,可以透过使用本领域已知的常规技术完成。例如,可以透过使用木瓜蛋白酶完成消化。木瓜蛋白酶消化的实施例在WO 94/29348和美国4342566号专利中有描述。抗体的木瓜蛋白酶消化通常产生两种相同的抗原结合性片段,称为Fab片段(每个片段都有一个抗原结合点)和残余Fc片段。胃蛋白酶处理产生一个F(ab')₂片段和一个pFc'片段。

[0303] 抗体片段,不论其是否附着于其他序列,均可包括特定区域或特定氨基酸残基的插入、删除、替换、或其他选择性修饰,但前提是,片段的活性与非修饰的抗体或抗体片段相比没有显著的改变或损害。这些修饰可提供一些额外的属性,如:删除/添加可与二硫键结合的氨基酸,以增加其生物寿命、改变其分泌特性等。在任何情况下,抗体片段必须拥有生物活性的特性,如:结合活性、调节结合域的结合力等。抗体的功能性或活性区域可透过蛋白特定区域的基因突变、随后表达和测试所表达的多肽进行确定。这些方法为本行业技术人员所熟知,可包括编码抗体片段的核酸的特定位置基因突变。

[0304] 本发明的抗体可进一步包括人源化抗体或人抗体。非人(如:鼠)抗体的人源化形式为嵌合抗体免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如:Fv、Fab、Fab'或抗体的其他抗原结合序列),其中包含从非人免疫球蛋白中获得的最小序列。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)(如具有与其特异性、亲和力和能力的小鼠、大鼠或兔子)CDR的残基取代。在某些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架(FR)残基被相应的非人残基取代。人源化抗体可能还包括既非受体抗体、也非输入CDR或框架序列中发现的残基。一般来说,人源化抗体将包括几乎所有的至少一个、通常为二个可变域,其中,全部或几乎全部的CDR区域均对应于非人免疫球蛋白的区域并且全部或几乎全部的FR区域均为免疫球蛋白相同序列的区域。理想情况是,人源化抗体还将包括至少免疫球蛋白恒定区(Fc)的一部分,通常是免疫球蛋白的恒定区的一部分。

[0305] 人源化非人抗体的方法为本行业所熟知。一般来说,人源化抗体具有一个或多个从非人源头引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基往往被称为"输入"残基,通常从"输入"可变域中获得。人源化基本上可以透过将啮齿动物CDR或CDR序列取代为相应的人抗体序列而完成。因此,这种"人源化"抗体为嵌合抗体(美国4816567号专利),其中大大少于完整的人可变域被来自于非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常为人抗体,其中有些CDR残基以及可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0306] 可使用免疫后在内源性免疫球蛋白产生缺失时能产生完整人抗体的转基因动物(如:小鼠)。例如,它被描述为,嵌合和种系突变小鼠中的抗体重链连接区域基因的纯合性缺失导致内源性抗体生成的完全抑制。在此种系变种小鼠中人种系免疫球蛋白基因数组的转移在抗原挑战后将导致人抗体的生成。人抗体也可在噬菌体展示库中产生。

[0307] 本发明的抗体优选为透过药用载体的形式给予受试者。通常,在制剂中使用适量的药用盐,以使制剂等渗。药用载体的例子包括生理盐水、林格氏液和葡萄糖溶液。溶液的pH值优选为约5至8,更优选为约7至7.5。此外,载体还包括缓释制剂,如:含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,其中基质为有形物品形式,如:薄膜、脂质体或微粒。本行业的技术人员熟知,某些载体可能为更优选,取决于例如,抗体的给药途径和浓度。

[0308] 该抗体可透过注射(如:静脉内、腹腔内、皮下、肌肉内)或透过输注等其他方法给

予受试者、患者或细胞,确保其以有效的形式传输到血液中。这些抗体也可以透过瘤内或瘤周途径给予,从而发挥局部和全身的治疗作用。局部或静脉注射为优选。

[0309] 抗体给药的有效剂量和时间表可根据经验确定,并且作出此类决定属本行业的技术范围内。本行业的技术人员会明白,必须给予的抗体剂量根据以下因素会有所不同,例如:接受抗体的受试者、给药途径、使用的抗体以及其他正在使用的药物的特定类型。单独使用的抗体的通常日剂量可能为约1 μ g/kg至最多100mg/kg体重或更多,这取决于上述因素。给予抗体,优选为治疗卵巢癌后,治疗抗体的疗效可透过技术人员熟知的不同方法评估。例如:接受治疗的受试者肺癌的大小、数量和/或分布可使用标准肿瘤成像技术进行监测。因治疗而给予的抗体与不给予抗体时的病程相比,可阻止肿瘤生长、导致肿瘤缩小、和/或阻止新肿瘤的发展,这样的抗体是一种有效治疗肺癌的抗体。

[0310] 本发明的另一方面提出了制备识别特异性肽-MHC复合物的可溶性T细胞受体(sTCR)的一种方法。这种可溶性T细胞受体可从特异性T细胞克隆中产生,并且它们的亲和力可以透过互补决定区靶向诱变而增加。为了T细胞受体选择之目的,可以使用噬菌体展示(美国2010/0113300, (Liddy et al., 2012))。为了在噬菌体展示期间以及实际使用为药物时稳定T细胞受体之目的,可透过非天然二硫键、其他共价键(单链T细胞受体)或透过二聚化结构域连接 α 和 β 链(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T细胞受体可以连接到毒素、药物、细胞因子(参见US 2013/0115191)、域招募效应细胞,如抗CD3域等,以便对靶细胞执行特定的功能。此外,它可能表达于用于过继转移的T细胞。进一步的信息可在WO 2004/033685A1和WO 2004/074322A1中找到。sTCR的组合在WO 2012/056407A1中进行了描述。WO 2013/057586A1中公开了制备的进一步的方法。

[0311] 此外,可用本发明的肽和/或TCR或抗体或其他结合分子在活检样本的基础上验证病理师对癌症的诊断。

[0312] 该抗体或TCR也可用于体内诊断实验。一般来说,抗体用放射性核素标记(如: ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S),从而可免疫闪烁扫描法使肿瘤局限化。在一实施方案中,其中的抗体或片段与两个或两个以上选自包括上述蛋白的组的蛋白质靶目标细胞外域结合,并且亲和力值(Kd)低于 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 。

[0313] 诊断用抗体可透过各种影像学方法使用适合检测的探针进行标记。探针检测方法包括但不限于,荧光、光、共聚焦和电镜方法;磁共振成像和光谱学技术;透视、计算机断层扫描和正电子发射断层扫描。合适的探针包括但不限于,荧光素、罗丹明、曙红及其它荧光团、放射性同位素、黄金、钆和其他稀土、顺磁铁、氟-18和其他正电子发射放射性核素。此外,探针可能是双功能或多功能的,并且用一种以上的上述方法可进行检测。这些抗体可用所述的探针直接或间接进行标记。抗体探针的连接,包括探针的共价连接、将探针融合入抗体、以及螯合化合物的共价连接从而结合探针、以及其他本行业熟知的方法。对于免疫组织化学方法,疾病组织样本可能是新鲜或冷冻或可能包埋于石蜡中以及用福尔马林等防腐剂固定。固定或包埋的切片包括与标记一抗和二抗接触的样本,其中该抗体用于检测原位蛋白的表达。

[0314] 本发明的另一方面包括一种体外制备激活的T细胞的方法,该方法包括将T细胞与载有抗原的人MHC分子进行体外连接,这些分子在合适的抗原提呈细胞表面表达足够的一段时间从而以抗原特异性方式激活T细胞,其中所述抗原为根据本发明所述的一种肽。优选

情况是足够量的抗原与抗原提呈细胞一同使用。

[0315] 优选情况是,哺乳动物细胞的TAP肽转载体缺乏或水平下降或功能降低。缺乏TAP肽转运载体的适合细胞包括T2、RMA-S和果蝇细胞。TAP是与抗原加工相关的转载体。

[0316] 人体肽载入的缺陷细胞株T2从属美国菌种保藏中心(ATCC,12301 Parklawn Drive,Rockville,Maryland 20852,美国)目录号CRL1992;果蝇细胞株Schneider 2号株从属ATCC目录CRL 19863;小鼠RMA-S细胞株Ljunggren等人描述过(Ljunggren and Karre, 1985)。

[0317] 优选情况是,宿主细胞在转染前基本上不表达MHC I类分子。刺激因子细胞还优选为表达对T细胞共刺激信号起到重要作用的分子,如,B7.1、B7.2、ICAM-1和LFA 3中的任一种分子。大量MHC I类分子和共刺激分子的核酸序列可从GenBank和EMBL数据库中公开获得。

[0318] 当MHC I类表位用作一种抗原时,T细胞为CD8阳性T细胞。

[0319] 如果抗原提呈细胞受到转染而表达这种表位,则优选的细胞包括一个表达载体,该载体有能力表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:549的肽或变体氨基酸序列。

[0320] 可使用其他一些方法来体外生成T细胞。例如,自体肿瘤浸润性淋巴细胞可用于生成CTL。Plebanski等人在(Plebanski et al.,1995)使用自体外周血淋巴细胞(PLB)制得T细胞。另外,也可能用肽或多肽脉冲处理树突状细胞或透过与重组病毒感染而制成自体T细胞。此外,B细胞可用于制备自体T细胞。此外,用肽或多肽脉冲处理或用重组病毒感染的巨噬细胞可用于配制自体T细胞。S.Walter等人在(Walter et al.,2003)中描述了透过使用人工抗原提呈细胞(aAPC)体外激活T细胞,这也是生成作用于所选肽的T细胞的一种合适方法。在本发明中,根据生物素:链霉素生物化学方法透过将预制的MHC:肽复合物耦合到聚苯乙烯颗粒(微球)而生成aAPC。该系统实现了对aAPC上的MHC密度进行精确调节,这使得可以在血液样本中选择地引发高或低亲合力的高效抗原特异性T细胞反应。除了MHC:肽复合物外,aAPC还应携运含共刺激活性的其他蛋白,如耦合至表面的抗-CD28抗体。此外,此类基于aAPC的系统往往需要加入适当的可溶性因子,例如,诸如白细胞介素12的细胞因子。

[0321] 也可用同种异体细胞制得T细胞,在WO 97/26328中详细描述了一种方法,以参考文献方式并入本文。例如,除了果蝇细胞和T2细胞,也可用其他细胞来提呈肽,如CHO细胞、杆状病毒感染的昆虫细胞、细菌、酵母、牛痘感染的靶细胞。此外,也可使用植物病毒(例如,参阅Porta等人在(Porta et al.,1994)中描述了将豇豆花叶病毒开发为一种提呈外来肽的高产系统。

[0322] 被激活的T细胞直接针对本发明中的肽,有助于治疗。因此,本发明的另一方面提出了用本发明前述方法制得的激活T细胞。

[0323] 按上述方法制成的激活T细胞将会有选择性地识别异常表达含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO 549氨基酸序列的多肽。

[0324] 优选情况是,T细胞透过与其含HLA/肽复合物的TCR相互作用(如,结合)而识别该细胞。T细胞是杀伤患者靶细胞方法中有用的细胞,其靶细胞异常表达含本发明中氨基酸序列的多肽。此类患者给予有效量的激活T细胞。给予患者的T细胞可能源自该患者,并按上述方法激活(即,它们为自体T细胞)。或者,T细胞不是源自该患者,而是来自另一个人。当然,优选情况是该供体为健康人。发明人使用“健康个人”系指一个人一般状况良好,优选为免

疫系统合格,更优选为无任何可很容易测试或检测到的疾病。

[0325] 根据本发明,CD8-阳性T细胞的体内靶细胞可为肿瘤细胞(有时表达MHC-II类抗原)和/或肿瘤周围的基质细胞(肿瘤细胞)(有时也表达MHC-II类抗原;(Dengjel et al., 2006))。

[0326] 本发明所述的T细胞可用作治疗性组合物中的活性成分。因此,本发明也提出了一种杀伤患者靶细胞的方法,其中患者的靶细胞异常表达含本发明中氨基酸序列的多肽,该方法包括给予患者上述有效量的T细胞。

[0327] 发明人所用的“异常表达”的意思还包括,与正常表达水平相比,多肽过量表达,或该基因在来自肿瘤的组织中沉寂,但在肿瘤中表达。“过量表达”系指多肽水平至少为正常组织中的1.2倍;优选为至少为正常组织中的2倍,更优选为至少5或10倍。

[0328] T细胞可用本领域已知的方法制得(如,上述方法)。

[0329] T细胞继转移方案为本领域所熟知的方案。综述可发现于:Gattioni et al.和Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006)。

[0330] 本发明的另一个方面包括使用与MHC复合的肽,以生成T细胞受体,其核酸被克隆并被引入至宿主细胞,优选为T细胞。然后,该通过基因工程改变的T细胞可转给患者用于癌症治疗。

[0331] 本发明的任一分子(即肽、核酸、抗体、表达载体、细胞,激活T细胞、T细胞受体或编码核酸)都有益于治疗疾病,这些疾病的特点在于细胞逃避免疫反应的打击。因此,本发明的任一分子都可用作药剂或用于制造药剂。这种分子可单独使用也可与本发明中的其他分子或已知分子联合使用。

[0332] 由于本发明上述表格中提及肽的潜在多肽在卵巢癌中呈高表达,而在正常细胞中表达极低,因此来源于以下基因的蛋白质产物的靶向肽优选为可融入到治疗策略中:

[0333] 本发明进一步提出了一种药剂,其用于治疗癌症,特别是卵巢癌和其他恶性肿瘤。

[0334] 本发明还涉及一种试剂盒,其包括:

[0335] (a) 一个容器,包含上述溶液或冻干粉形式的药物组合物;

[0336] (b) 可选的第二个容器,其含有冻干粉剂型的稀释剂或重构液;和

[0337] (c) 可选的(i) 溶液使用或(ii) 重构和/或使用冻干制剂的说明。

[0338] 该试剂盒还进一步包括一个或多个(iii) 缓冲剂, (iv) 稀释剂, (v) 过滤液, (vi) 针, 或(v) 注射器。容器最好是瓶子、小瓶、注射器或试管,可以为多用途容器。药物组合物最好是冻干的。

[0339] 本发明中的试剂盒优选包含一种置于合适容器中的冻干制剂以及重组和/或使用说明。适当的容器包括,例如瓶子、西林瓶(如双室瓶)、注射器(如双室注射器)和试管。该容器可能由多种材料制成,如玻璃或塑料。试剂盒和/或容器最好有容器或关于容器的说明书,指明重组和/或使用方向。例如,标签可能表明冻干剂型将重组为上述肽浓度。该标签可进一步表明制剂用于皮下注射。

[0340] 存放制剂的容器可使用多用途西林瓶,使得可重复给予(例如,2-6次)重组剂型。该试剂盒可进一步包括装有合适稀释剂(如碳酸氢钠溶液)的第二个容器。

[0341] 稀释液和冻干制剂混合后,重组制剂中的肽终浓度优选为至少0.15mg/mL/肽(=75μg),不超过3mg/mL/肽(=1500μg)。该试剂盒还可包括商业和用户角度来说可取的其他

材料,包括其他缓冲剂、稀释剂,过滤液、针头、注射器和带有使用说明书的包装插页。

[0342] 本发明中的试剂盒可能有一个单独的容器,其中包含本发明所述的药物组合物制剂,该制剂可有其他成分(例如,其他化合物或及其药物组合物),也可无其他成分,或者每种成分都有其不同容器。

[0343] 优选情况是,本发明的试剂盒包括与本发明的一种制剂,包装后与第二种化合物(如佐剂(例如GM-CSF)、化疗药物、天然产品、激素或拮抗剂、抗血管生成剂或抑制剂、凋亡诱导剂或螯合剂)或其药物组合物联合使用。该试剂盒的成分可进行预络合或每种成分在给予患者之前可放置于单独的不同容器。该试剂盒的成分可以是一种或多种溶液,优选为水溶液,更优选为无菌水溶液。该试剂盒的成分也可作为固体形式,加入合适的溶剂后转换为液体,最好放置于另一个不同的容器中。

[0344] 治疗试剂盒的容器可能为西林瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器、或任何其他盛装固体或液体的工具。通常,当成分不只一种时,试剂盒将包含第二个西林瓶或其他容器,使之可以单独定量。该试剂盒还可能包含另一个装载药用液体的容器。优选情况是,治疗试剂盒将包含一个设备(如,一个或多个针头、注射器、滴眼器、吸液管等),使得可注射本发明的药物(本试剂盒的组合物)。

[0345] 本发明的药物配方适合以任何可接受的途径进行给药,如口服(肠道)、鼻内、眼内、皮下、皮内、肌内,静脉或经皮给药。优选为皮下给药,最优选为皮内给药,也可透过输液泵给药。

[0346] 由于本发明的肽从卵巢癌中分离而得,因此,本发明的药剂优选用于治疗卵巢癌。

[0347] 本发明进一步涉及为个体患者制备个体化药物的一种方法,其中包括:制造含选自预筛选TUMAP存储库至少一种肽的药物组合物,其中药物组合物中所用的至少一种肽选择为适合于个体患者。在一项实施方案中,药物组合物为一种疫苗。该方法也可以改动以产生下游应用的T细胞克隆物,如:TCR隔离物或可溶性抗体和其他治疗选择。“个体化药物”系指专门针对个体患者的治疗,将仅用于该等个体患者,包括个体化活性癌症疫苗以及使用自体组织的过继细胞疗法。

[0348] 如本文所述,“存储库”应指已经接受免疫原性预筛查和/或在特定肿瘤类型中过量提呈的一组或一系列肽。“存储库”一词并不暗示,疫苗中包括的特定肽已预先制造并储存于物理设备中,虽然预期有这种可能性。明确预期所述肽可以用于新制造每种个体化疫苗,也可能被预先制造和储存。存储库(例如,数据库形式)由肿瘤相关肽组成,其在各种HLA-A HLA-B和HLA-C等位基因卵巢癌患者的肿瘤组织中高度过度表达。其可能含有包括MHC I类和MHC II类肽或拉长的MHC I类肽。除了从几种卵巢癌组织中采集的肿瘤相关肽外,存储库还可能包含HLA-A*02和HLA-A*24以及较低丰度HLA的标记肽。这些肽可对TUMAP诱导的T细胞免疫进行量化比较,从而可得出疫苗抗肿瘤反应能力的重要结论。其次,在没有观察到来自患者“自身”抗原TUMAP的任何疫苗诱导的T细胞反应时,它们可作为来自“非自身”抗原的重要阳性对照肽。第三,它还可对患者的免疫功能状态得出结论。

[0349] 存储库的TUMAP通过使用一种功能基因组学方法进行鉴定,该方法结合了基因表达分析、质谱法和T细胞免疫学(XPresident[®])。该方法确保了只选择真实存在于高百分比肿瘤但在正常组织中不表达或仅很少量表达的TUMAP用于进一步分析。对于初始肽的选择,患者食管癌样本和健康供体的血液以循序渐进的方法进行分析:

- [0350] 1. 恶性材料的HLA配体用质谱法确定；
- [0351] 2. 使用全基因组信使核糖核酸 (mRNA) 表达分析法用于确定恶性肿瘤组织 (食管癌) 与一系列正常器官和组织相比过度表达的基因；
- [0352] 3. 确定的HLA配体与基因表达数据进行比较。将肿瘤组织上过度提呈或选择性提呈的肽, 优选为第2步中检测到的选择性表达或过量表达基因所编码的肽, 考虑作为多肽疫苗的合适候选TUMAP；
- [0353] 4. 文献检索以确定更多证据以支持确认为TUMAP的肽的相关性；
- [0354] 5. mRNA水平过度表达的相关性通过由第3步选定的在肿瘤组织上的TUMAP的重新检测以及在健康组织上的缺乏 (或低频率) 而确定；
- [0355] 6. 为了评估所选定的肽是否诱导体内T细胞反应, 使用健康供体以及食管癌患者的人T细胞进行体外免疫原性测定。
- [0356] 一方面, 在将所述肽加入存储库之前, 对其进行筛查以了解免疫原性。举例来说 (但不限于此), 纳入存储库的肽的免疫原性的确定方法包括体外T细胞激活, 具体为: 用装载肽/MHC复合物和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞反复刺激来自健康供体的CD8+T细胞。
- [0357] 这种方法优选用于罕见癌症以及有罕见表达谱的患者。与含目前开发为固定组分的多肽鸡尾酒相反的是, 存储库可将肿瘤中抗原的实际表达于疫苗进行更高程度的匹配。在多目标方法中, 每名患者将使用几种“现成”肽的选定单一肽或组合。理论上来说, 基于从50抗原肽库中选择例如5种不同抗原肽的一种方法可提供大约170万种可能的药物产品 (DP) 组分。
- [0358] 在一方面, 选择所述肽用于疫苗, 其基于个体患者的适合性, 并使用本发明此处或后文所述的方法。
- [0359] HLA表型、转录和肽组学资料从患者的肿瘤材料和血液样本中收集, 以确定最合适每名患者且含有“存储库”和患者独特 (即突变) TUMAP的肽。将选择的那些肽选择性地或过度表达于患者肿瘤中, 并且可能的情况下, 如果用患者个体PBMC进行检测, 则表现出很强的体外免疫原性。
- [0360] 优选的情况是, 疫苗所包括的肽的一种确定方法包括: (a) 识别由来自个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽 (TUMAP); (b) 将 (a) 中鉴定的肽与上述肽的存储库 (数据库) 进行比对; 且 (c) 从存储库 (数据库) 中选择与患者中确定的肿瘤相关肽相关的至少一种肽。例如, 肿瘤样本提呈的TUMAP的鉴定方法有: (a1) 将来自肿瘤样本的表达数据与所述肿瘤样本组织类型相对应的正常组织样本的表达数据相比对, 以识别肿瘤组织中过量表达或异常表达的蛋白; 以及 (a2) 将表达数据与结合到肿瘤样本中I类MHC和/或II类分子的MHC配体序列相关联, 以确定来源于肿瘤过量表达或异常表达的蛋白质的MHC配体。优选情况是, MHC配体的序列的确定方法是: 洗脱来自肿瘤样本分离的MHC分子结合肽, 并对洗脱配体进行测序。优选情况是, 肿瘤样本和正常组织从同一患者获得。
- [0361] 除了使用存储库 (数据库) 模型选择肽以外, 作为一种替代方法, TUMAP可以在患者中进行体外鉴定, 然后包含在疫苗中。作为一种例子, 患者中的候选TUMAP可通过以下方法进行鉴定: (a1) 将来自肿瘤样本的表达数据与所述肿瘤样本组织类型相对应的正常组织样本的表达数据相比对, 以识别肿瘤组织中过量表达或异常表达的蛋白; 以及 (a2) 将表达数据与结合到肿瘤样本中I类MHC和/或II类分子的MHC配体序列相关联, 以确定来源于肿瘤过

量表达或异常表达的蛋白质的MHC配体。作为另一例子,蛋白可以鉴定为包含突变,相对于个体患者的相应正常组织,其对于肿瘤样本是独特的,并且TUMAP可以认定为特异性地靶向变异。例如,肿瘤以及相应正常组织的基因组可通过全基因组测序方法进行测序:为了发现基因蛋白质编码区域的非同义突变,从肿瘤组织中萃取基因组DNA和RNA,从外周血单核细胞(PBMC)中提取正常非突变基因组种系DNA。运用的NGS方法只限于蛋白编码区的重测序(外显子组重测序)。为了这一目的,使用供货商提供的靶序列富集试剂盒来捕获来自人样本的外显子DNA,随后使用HiSeq2000(Illumina公司)进行测序。此外,对肿瘤的mRNA进行测序,以直接定量基因表达,并确认突变基因在患者肿瘤中表达。得到的数以百万计的序列读数通过软件算法处理。输出列表中包含突变和基因表达。肿瘤特异性体突变通过与PBMC衍生的种系变化比较来确定,并进行优化。然后,为了存储库可能测试新确定的肽了解如上所述的免疫原性,并且选择具有合适免疫原性的候选TUMAP用于疫苗。

[0362] 在一个示范实施方案中,疫苗中所含肽通过以下方法确定:(a)用上述方法识别由个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);(b)将(a)中鉴定的肽与肿瘤中(与相应的正常组织相比)经过免疫原性和过量提呈预筛查的肽库进行比对;(c)从存储库中选择与患者中确定的肿瘤相关肽相关的至少一种肽;及(d)可选地选择至少一种在(a)中新确定的肽,确认其免疫原性。

[0363] 在一个示范实施方案中,疫苗中所含肽通过以下方法确定:(a)识别由个体患者肿瘤样本提呈的肿瘤相关肽(TUMAP);以及(b)选择至少一种在(a)中新确定的肽,并确认其免疫原性。

[0364] 一旦选定了用于个体化肽疫苗的肽时,则产生疫苗。该疫苗优选为一种液体制剂,包括溶解于20-40%DMSO之间,优选为约30-35%DMSO,例如,约33%DMSO中的个体肽。

[0365] 列入产品的每种肽都溶于DMSO中。单个肽溶液浓度的选择取决于要列入产品中的肽的数量。单肽-DMSO溶液均等混合,以实现一种溶液中包含所有的肽,且浓度为每肽~2.5mg/ml。然后该混合溶液按照1:3比例用注射用水进行稀释,以达到在33%DMSO中每肽0.826mg/ml的浓度。稀释的溶液透过0.22 μ m无菌筛检程序进行过滤。从而获得最终本体溶液。

[0366] 最终本体溶液填充到小瓶中,在使用前储存于-20 $^{\circ}$ C下。一个小瓶包含700 μ L溶液,其中每种肽含有0.578mg。其中的500 μ L(每种肽约400 μ g)将用于皮内注射。

[0367] 本发明的肽除了用于治疗癌症,也可用于诊断。由于肽由卵巢癌细胞产生,并且已确定这些肽在正常组织中不存在或水平较低,因此这些肽可用于诊断癌症是否存在。

[0368] 血液样本中组织活检物含权利要求的肽,可有助于病理师诊断癌症。用抗体、质谱或其他本领域内已知的方法检测某些肽可使病理师判断该组织样本为恶性的还是炎症或一般病变,也可用作卵巢癌的生物标志物。肽基团的提呈使得能对病变组织进行分类或进一步分成子类。

[0369] 对病变标本中肽的检测使得能对免疫系统治疗方法的利益进行判断,特别是如果T-淋巴细胞已知或预计与作用机制有关。MHC表达的缺失是一种机制,充分说明了哪些受感染的恶性细胞逃避了免疫监视。因此,肽的提呈表明,分析过的细胞并没有利用这种机制。

[0370] 本发明的肽可用于分析淋巴细胞对肽的反应(如T细胞反应),或抗体对肽或MHC分子络合的肽发生的反应。这些淋巴细胞反应可以作为预后指标,决定是否采取进一步的治

疗。这些反应也可以用作免疫疗法中的替代反应指标,旨在以不同方式诱导淋巴细胞反应,如接种蛋白疫苗、核酸、自体材料、淋巴细胞过继转移。基因治疗中,淋巴细胞对肽发生的反应可以在副作用的评估中考虑。淋巴细胞反应监测也可能成为移植疗法随访检查中的一种有价值的工具,如,用于检测移植抗宿主和宿主抗移植疾病。

[0371] 下列描述优选方案的实施例(但是不仅限于此)将对本发明进行说明。考虑到本发明的目的,文中引用的所有参考文献透过引用的方式并入在本文中。

附图说明

[0372] 图1显示了不同细胞亚群在卵巢癌和良性卵巢组织中的HLA-A、B、C (a) 和HLA-DR (b) 表达。对于图1,由于两个比较组之间的方差不等,使用了Welch修正的双尾不配对Student t检验。对于酶解法分离后,HLA-I (A) 和HLA-DR (B) 类在EOC和良性卵巢组织内不同细胞类型上的表达,其特征是有不同的细胞表面标志物(白细胞区室:CD45+,肿瘤细胞/上皮细胞区室:CD45-EpCam+,内皮细胞区室:CD45-CD31+)。每个数据点表示针对每个样本进行的三重实验的平均值。使用双侧t检验来检验显著性(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

[0373] 图2A至D显示了EOC与良性组织的免疫肽组比较谱分析。(A) EOC ($n = 34$) 和良性组织中表达的HLA-I类配体源蛋白的比较谱分析。EOC (x轴上方) 和良性来源 (x轴下方) 的源蛋白HLA限制性提呈的频率分别在y轴上表示。根据EOC特异性表达的频率将来源蛋白质从左至右排列。左边方框突出显示了由EOC专门提呈的前100HLA配体源蛋白。(B) 前100EOC特异性HLA-I类配体来源蛋白(uniprot建议的基因名称)的词云。字体大小(5-26)与提呈各个源蛋白HLA配体的癌症患者的绝对数量相关。(C) EOC ($n = 22$) 和良性组织中表达的HLA-II类配体源蛋白的比较谱分析。(D) 前100 EOC特异性HLA-II类配体来源蛋白(uniprot建议的基因名称)的词云。字体大小(3-11)与提呈各个源蛋白HLA配体的癌症患者的绝对数量相关。

[0374] 图3显示了前100EOC相关HLA-I类配体的细胞来源。通过无标记定量分析的OvCa 84富集细胞群的I类免疫肽组中的HLA配体相对丰度的火山图。图左侧显示(A) 肿瘤浸润性白细胞(CD45+) 对比肿瘤细胞(CD45-Epcam+), 右侧显示(B) 基质细胞(CD45-EpCam-) 对比肿瘤细胞。水平虚线表示显著性阈值($p < 0.05$)。强调了前100位EOC专有配体(MUC16 (红色)、DDR1、EYA2、SOX9、TLR7、OASL) 以及源自白细胞相关抗原(CD132、CD8、LSP1) 和基质(内皮细胞) 相关抗原(vWF) 的配体。图4显示免疫组织化学染色和血清水平作为配体提呈的替代标志物。低(IRS4)、中(IRS6) 和高(IRS12) 免疫反应性评分的MUC16 (CA-125) 的高级浆液性卵巢癌免疫组织化学染色(A)。间皮素(右, IRS8) 和ID01 (左, IRS12; 全部放大200倍) 的免疫组织化学染色(B)。选定前100 EOC相关抗原的HLA配体提呈与源蛋白表达的相关性。MUC16 ($n = 23$)、ID01 ($n = 23$) 和MSLN ($n = 16$) 的表达通过免疫组织化学染色分析(C) 或在手术当天通过CA-125血清标志物分析($n = 30$) 分析(D)。对于MSLN, 仅纳入可得到HLA-II类免疫肽组数据的病例。采用非参数Mann-Whitney检验统计学显著性($p < 0.05$ 视为具有显著性)。

[0375] 图5显示了MUC16和MSLN的预后相关性。对TMA进行了免疫组织化学染色,使用来自明确接受过最佳肿瘤减灭术患者的71份高等级浆液EOC样本。(A) Kaplan Meier图,描绘了MUC16表达(左图,低表达评分 < 7 , $n = 41$; 高表达评分 ≥ 7 , $n = 30$) 和MSLN表达(右图,低表达 < 6 , $n = 15$; 高表达 ≥ 6 , $n = 52$) 对总生存率的影响。(B) CD3T细胞浸润至上皮内隔壁(左图, CD3E, 低浸润 < 7 个细胞/HPF, $n = 13$; 高浸润 ≥ 7 , $n = 57$) 或纤维血管基质(右图, CD3S, 低浸

润 <7 个细胞/HPF, $n=40$; 高浸润 ≥ 7 , $n=30$) 对患者总生存率的影响。(C) 对于上皮内CD3 T细胞(上图, 低MSLN/高CD3E, $n=11$; 低MSLN/低CD3E, $n=40$; 高MSLN/低CD3E, $n=14$; 高MSLN/高CD3E, $n=1$) 或纤维血管CD3 T细胞(下图, 低MSLN/高CD3S, $n=30$; 高MSLN/低CD3S, $n=7$; 低MSLN/低CD3S, $n=21$; 高MSLN/高CD3S, $n=8$) 的CD3和MLN组合染色的分组分析。

[0376] 图6显示了EOC和良性卵巢组织的流式细胞术分析。OvCa48的门控策略的示例性介绍, 其显示了CD45+白细胞、CD45-CD31+内皮细胞和CD45-EpCam+肿瘤或上皮细胞的选择。

[0377] 图7显示了EOC的HLA配体来源蛋白质鉴定的饱和度分析。针对HLA-I类(A) 和HLA-II类(B) 配体蛋白分别描述了源蛋白鉴定的饱和度分析。已经通过来自34个EOC来源的1000份随机样本计算了每个源计数的独特源蛋白的平均数目。针对EOC, 使用指数回归来确定所算得的源蛋白序号的最大可实现覆盖率(虚线)。

[0378] 图8显示了EOC样本中HLA配体提呈的频率和数量。针对I类(顶部) 和II类(底部) 抗原的每个单独的EOC(每列顶部的患者编号) 可见所选EOC相关抗原的HLA提呈以及不同HLA提呈肽的数目(颜色编码)。

实施例

[0379] 材料与方法

[0380] 组织样本

[0381] 根据赫尔辛基宣言的原则, 所有组织样本均在获得患者知情同意后于蒂宾根大学医院收集。所有研究方案均获得了当地机构审查委员会的批准。除非另有说明, 否则样本在使用前储存在 -80°C 下。使用HLA-Ready基因系统(Innotrain, Kronberg, 德国) 通过序列特异性引物(SSP) PCR进行两位数HLA分型, 并由蒂宾根大学医院输血医学科使用评分软件(Olerup, 斯德哥尔摩, 瑞典) 进行评估。使用GS GType HLA引物包(罗氏公司, 巴塞尔, 瑞士) 在GS初级测序仪上进行下一代测序, 进行高分辨率四位数字HLA分型。正常组织获得自Bio-Options Inc., CA, USA、BioServe, Beltsville, MD, USA、Capital BioScience Inc., Rockville, MD, USA、Geneticist Inc., Glendale, CA, USA、日内瓦大学医院、海德堡大学医院、慕尼黑大学医院、ProteoGenex Inc., Culver City, CA, USA、蒂宾根大学医院。所有患者的书面知情同意均在手术或尸检前获得。组织在切除后立即进行速冻处理, 在分离TUMAP前储存于 -70°C 或以下。

[0382] 组织解离

[0383] EOC以及良性卵巢和输卵管组织从进行肿瘤切除术/减瘤术或输卵管切除术的患者中新鲜采集。将组织切碎成 $<2\text{mm}^3$ 的小块, 并转移到含有400U/ml IV型胶原酶、5u/ml分散酶(两家生命技术公司, Carlsbad, CA) 和0.1mg/ml DNase(罗氏公司, 巴塞尔, 瑞士) 的酶解离溶液, 溶于含10%胎牛血清(Lonza, 巴塞尔, 瑞士) 的DMEM(生命技术公司) 中。在 37°C 下在旋转振荡器(Infors HT, 巴塞尔, 瑞士) 上解离3小时。使用100 μm 细胞过滤器(BD, Franklin Lakes, NJ) 去除剩余的组织碎片(通常小于初始重量的1%)。单细胞悬浮液用PBS洗涤两次, 红细胞用氯化铵裂解缓冲液裂解。

[0384] HLA表面分子量化

[0385] HLA表面表达使用QIFIKIT定量流式细胞测定方法(Dako, Glostrup, 丹麦) 根据制造商的说明进行确定。细胞用泛HLA I类特异性单克隆抗体W6/32、HLA-DR特异性mAb L243

或各自的同种型对照物进行染色。细胞类型的区分基于针对CD45 (AmCyan克隆2D1, BD)、CD31 (PeCy7, 克隆WM59, Biolegend, San Diego, CA)、EpCam (APC, 克隆HEA125, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, 德国) 和CD34 (APCCy7, 克隆581, Biolegend) 荧光标记的抗体进行的表面标志物染色。7-AAD (BioLegend) 添加为活力标志物, 之后紧接着在LSR SORP Fortessa仪器 (BD) 上进行分析。每份样本以一式三份记录, 中位荧光强度用于计算表面分子表达。

[0386] 细胞分离:

[0387] 根据制造商的说明 (Miltenyi) 使用两个连续磁性活化细胞分离 (MACS) 方案进行细胞分离。使用XS柱和superMACS分离器 (均来自Miltenyi) 进行分离。第一次分离旨在阳性选择CD45⁺白细胞。随后, EpCam⁺肿瘤细胞的阴性部分富集。剩余的CD45⁻EpCam⁻部分被认为代表基质细胞部分。

[0388] HLA配体分离

[0389] HLA I类和II类分子采用前面所述的标准免疫亲和纯化方法进行分离⁴²。泛HLA-I类特异性mAb W6/32用于HLA-I类分离, 泛HLA-II类mAb Tü39以及HLA-DR特异性mAb L243用于HLA-II类分离。

[0390] 通过LC-MS/MS进行免疫肽组分析

[0391] 在LTQ OrbitrapXL质谱仪 (Thermo Fisher, Waltham, MA) 上进行免疫肽组分析, 所述LTQ OrbitrapXL质谱仪配备有纳米电子喷雾离子源, 并与Ultimate 3000 RSLC纳米UHPLC系统 (Dionex, Sunnyvale, CA) 偶联。在2cm PepMap 100 C18Nanotrap柱 (Dionex) 上以4μL/min的流速将肽样本加载3%的溶剂B (20% H₂O, 80% 乙腈和0.04% 甲酸) 10分钟。分离在装载到50℃下运行的柱式烘箱中具有2μm粒度的50cm PepMap C18柱 (Dionex) 上进行。在175nL/min的流速下, 在140分钟内所施加的梯度范围为3-30% 溶剂B。(溶剂A: 质谱分析采用前五种方法 (即在每次调查扫描中选择五种最丰富的前体离子用于破碎) 以数据依赖性采集模式进行。调查扫描以60,000分辨率记录于Orbitrap中。通过碰撞诱导解离 (CID, 归一化碰撞能量35%、活化时间30ms、分离宽度1.3m/z) 进行MS/MS分析, 随后在线性阱四极杆 (LTQ) 中进行分析。对于HLA-I类配体, 质量范围限于400-650m/z, 破碎选定的可能电荷状态为2+和3+。对于HLA-II类配体, 质量范围设置为300-1500m/z, 允许正电荷状态≥2的碎片化处理。

[0392] 对HLA-I类样本以5次技术重复进行分析, 而HLA-II类样本通常需要3次技术重复。初始运行在没有动态排除下进行, 而对于连续运行则启用了动态排除5s。

[0393] 质谱数据处理和分析

[0394] MS数据分析使用蛋白质组发现者 (Proteome discoverer) 1.3 (ThermoFisher) 进行。使用Mascot搜索引擎 (Mascot 2.2.04, Matrix Science, Boston, MA), 对包含在Swiss-Prot数据库 (www.uniprot.org, 2013年9月27日发布; 包括20,279个经审查的蛋白质序列) 中的人类蛋白质组进行峰值列表搜索。前体离子的处理质量公差为5ppm, 碎片离子为0.5Da。未选择裂解特异性, 并且唯一允许的动态修饰是氧化的甲硫氨酸。使用渗滤器算法确定肽置信度, 目标值 $q \leq 0.05$ (5% FDR)。其他的后处理过滤参数为Mascot Ionscore ≥ 20、搜索引擎等级 = 1、HLA-I类配体的肽长度为8-12个氨基酸、HLA-II类配体的肽长度为12-25个氨基酸。如果序列由于保守而映射到多个蛋白质, 则蛋白质分组被禁用以确保多次注释肽。使用SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) 和NETMHC 3.4 (<http://www.cbs.dtu.dk/>)

services/NetMHC/) 中的HLA预测算法进行HLA注释。在模糊结果的情况下,提到了多个等位基因。对于比较分析仅在一个PSM计数 ≤ 5 的来源上提呈的“昙花一现”的肽从两个数据集中移除。

[0395] 使用Sieve 2.1 (Thermo Fisher) 对肿瘤与CD45⁺和肿瘤与基质细胞上的肽进行无标记定量。每个细胞富集级分的MS原始文件的至少3次复制结果以及来自全组织MHC沉淀的结果一起排列,最大保留时间(RT) 偏移为2.5分钟。基于MS²扫描事件产生帧,最大RT宽度为3.5分钟,质量公差为5ppm。使用Mascot搜索结果从蛋白质组发现者中导入标识(见上文)。使用总离子流色谱归一化来适应样本强度的差异。

[0396] HLA-I类配体的免疫原性分析

[0397] 使用涉及人造抗原呈递细胞(aAPC) 的已建立的方案激活肽特异性细胞毒性淋巴细胞(CTL) (30)。aAPC由链霉亲和素包被的聚苯乙烯珠粒(直径5.6 μ m Bangs Laboratories, Fishers, IN) 组成。将小珠以 2×10^6 颗粒/ml重悬,并在环境温度下用10nM生物素化肽-MHC复合体和10nM刺激性抗-CD28抗体(克隆9.3,源自ATCC, Manassas, VA) 各自温育30分钟。使用CD8磁性细胞分离试剂盒(Miltenyi) 从健康供体的全血中分离T细胞。将每孔100万个T细胞在96孔板(Corning, Corning, NY, USA) 中培养,并在存在5ng/ml IL-12 (PromoCell, Heidelberg, Germany) 的情况下用相同数量的加载aAPC进行刺激。总共刺激T细胞3次,每次间隔一周。在每次刺激后2天加入40U/ml IL-2。在最后一轮刺激后一周,通过MHC多聚体染色评估T细胞激活情况。

[0398] 组织微阵列(TMA) 的构建

[0399] 1999年至2008年在蒂宾根大学妇科医院接受手术的至少有FIGO II-III期卵巢或输卵管高级浆液性癌(EOC) 患者的连续石蜡包埋肿瘤样本从病理学研究所的档案中获得。根据公布的标准确认组织学亚型和分级(43)。最初154例病例被纳入研究。如前所述构建组织微阵列(TMA) (44)。我们使用了每个患者直径0.6mm的六个芯片(最大三个芯片每个均来自两个不同部位的原发肿瘤-至少两个独立芯片)。此外,我们使用来自前瞻性收集病例的原发性肿瘤的石蜡包埋组织构建了TMA,用于进行配体组分析。3 μ m厚切片、再水合并进行免疫组织化学的特定预处理。共有23例病例的免疫评分与免疫肽组数据的相关性可进行评估。

[0400] 免疫组织化学

[0401] 以下初级抗体和稀释液用于免疫组织化学:CD3 (1:100, 大鼠单克隆SP7, DCS, 汉堡, 德国)、CD8 (1:200, 小鼠单克隆C8/144B, DAKO)、MUC16 (1:450, 小鼠单克隆M11, DAKO, Glostrup, 丹麦)、ID01 (1:25, 小鼠单克隆, ABCAM, Cambridge, UK) 和MSLN (1:100, 小鼠单克隆SPM143, GeneTex, Irvine, CA, USA)。将组织切片在95 $^{\circ}$ C下用EDTA-缓冲溶液(pH8.6) 预处理36分钟。使用iView DAB检测试剂盒根据制造商的说明在自动免疫染色器上进行免疫组织化学染色(均来自Ventana, Tucson, AZ, USA)。

[0402] 免疫评分

[0403] 首先通过计算每个芯片的至少2个HPF来评估每个高倍视野(HPF=400 $\times$) 的免疫染色细胞的平均数量以进行TIL定量。在第二步中,计算左右三重芯片组每个HPF的平均淋巴细胞数,并且计算所有芯片的平均淋巴细胞数。该双向平均数用于进一步的计算。分别评估纤维血管肿瘤基质(CD3S和CD8S) 和肿瘤上皮内隔室(CD3E和CD8E)。

[0404] 对于CA 125的表达,将IDO1和MSLN染色强度分为0-3级,乘以1-4的分数以获得肿瘤细胞百分比(1:0-10%;2:10-50%;3:50-80%;4:80-100%)。对于所有参数,这些病例以四分位数分隔,两个四分位数之间的最佳分隔定义为高表达与低表达之间的截止值。在TMA的154例患者中,71例患者接受了最佳的肿瘤减灭术(残留肿瘤<1cm),可以成功地评估TIL和蛋白的表达。免疫评分和临床数据分析由独立的研究者进行。

[0405] 统计分析/可视化

[0406] 除非有特殊说明,否则所有数字和统计分析都是使用Graphpad Prism 6.0 (Graphpad软件,La Jolla,CA,USA)或Microsoft Office 2010 (Microsoft)生成的。词云是使用在线小程序(www.wordle.net)创建的。使用SPSS统计软件(版本21,IBM Corp., Armonk,NY,USA)进行了Kaplan-Meier分析。除非另有规定,否则进行双尾不配对student t检验。P值小于0.05视为具有统计学显著性。使用D'Agostino-Pearson综合检验来验证正态性,并使用F检验来验证相等方差。对于图1,由于两个比较组之间的方差不等,使用了Welch修正的双尾不配对Student t检验。图4中使用了非参数Mann-Whitney检验,因为由于样本量较小,无法对所有情况进行正态分布评估。Spearman相关性用于关联MSLN和MUC16的IHC评分,因为数据集未显示正态分布。使用Graphpad Prism中的对数秩(Mantel-Cox)检验来计算比较图5中两个Kaplan-Meier生存曲线的P值。

[0407] 实施例1:细胞表面的HLA计数和HLA分型

[0408] 开发T细胞介导的免疫疗法的主要先决条件是MHC分子在肿瘤细胞表面上表达。因此,本发明人通过流式细胞术对卵巢肿瘤(n=11)的不同细胞亚组以及通过酶解离获得的来自卵巢和输卵管的良性组织(n=8)分析和量化HLA-A、B、C以及HLA-DR分子的数量。该分析旨在分离定量白细胞(CD45⁺)、肿瘤/上皮细胞(Epcam⁺)和内皮细胞(CD31⁺;后者仅存在7个卵巢肿瘤的子集中)的细胞类型特异性HLA表达。对于完整的门控策略,参见图6。不同细胞类型和个体患者中,每个细胞的HLA分子的中位数不同,范围从约5,000至150,000个HLA I类和约500至330,000个HLA-DR分子。从肿瘤与良性组织分离的白细胞中HLA-A、B和C分子的数目明显更高(p=0.0205),表明肿瘤内正在发生炎症反应。当肿瘤细胞与来源于良性组织的上皮细胞进行比较时,也观察到HLA I类表达的强烈差异。HLA I类分子在肿瘤细胞上的表达(约75,000个分子/细胞)明显更高(p=0.0021),但保持与其他基质细胞(例如内皮细胞)的范围内(约95,000个分子/细胞)。令人惊讶的是,本发明人证明在EOC细胞(>300,000个分子/细胞)上表现出HLA-DR的异常高表达(~105,000个分子/细胞),而良性上皮细胞上HLA-DR实际上为阴性(p=0.0108)。总之,本发明人可以观察到肿瘤内MHC I类和II类表达增加。

[0409] HLA配体组分析和比较分析揭示了EOC特异性抗原提呈。为了绘制EOC的HLA配体库,本发明人分离了来自大量肿瘤组织的HLA分子,并且进行质谱分析以表征总共34个EOC的HLA配体组(患者特征和HLA分型参见表7)。

[0410] 表7

[0411]

OvCa ID	年龄	肿瘤类型	TNM 分期	HLA 分型 MHC I 类	HLA 分型 MHC II 类
	65	浆液性卵巢癌		A*02:01, A*03:01, B*07:02, B*40:02, C*07:02, C*12:01	DQB1*03:01, DQA1*03:01, DQA1*05:01, DRB1*11:01, DRB1*04:01, DRB3*02:02, DRB4*01:01, DPB1*02:01, DPB1*13:01
OvCa 10	60	浆液性卵巢癌	T3bN1M1G2R1	A*02:01, A*11:01, B*44:05, B*51:01, C*02:02, C*15:02	DQB1*02:02, DQB1*05:01, DQA1*01:01, DQA1*03:01, DRB1*01:01, DRB1*09:01, DRB4*01:01, DPB1*04:01, DPB1*05:01
OvCa 12	62	浆液性卵巢癌	T3cN0G2R0	A*24:02, A*31:01, B*35:03, B*49:01, C*07:01, C*12:03	DQB1*03:01, DQB1*05:04, DQA1*01:02, DQA1*03:01, DRB1*01:01, DRB1*04:01, DRB4*01:01, DPB1*02:01, DPB1*05:01
OvCa 13	62	浆液性卵巢癌	T1cN1G3R0	A*02, B*35, B*40, C*03, C*04	DQB1*04, DQB1*06, DRB1*08, DRB1*13
OvCa 15	75	浆液性卵巢癌	T3cN0G3R0	A*11:01, A*24:02, B*07:02, B*55:01, C*03:03, C*07:02	DQB1*03:01, DQA1*05:01, DRB1*11:01, DRB1*03:17, DRB3*02:02, DPB1*03:01
OvCa 16	45	浆液性卵巢癌	T3bN1G3R0	A*02, B*40, B*44, C*03, C*05	DQB1*06, DRB1*08, DRB1*13, DRB1*14, DRB3
OvCa 23	29	浆液性卵巢癌	T3aN1G3R0	A*01, A*03, B*08, B*35, C*04, C*07	DQB1*02, DQB1*03, DRB1*03, DRB1*12, DRB3
OvCa 28	66	浆液性卵巢癌	T2bN0G3R0	A*01:01, A*02:01, B*27:05, B*52:01, C*01:02, C*02:02	DQB1*05:01, DQB1*06:01, DQA1*01:01, DQA1*03:01, DRB1*01:03, DRB1*15:02, DRB5*01:02, DPB1*04:01
OvCa	45	浆液	T3cN1G3R1	A*25:01,	DQB1*06:02, DQA1*01:02, D

[0412]

39		性卵巢癌		A*31:01, B*07:02, B*18:01, C*12:03, C*07:02	RB1*15:01, DRB1*16:09, DRB5*01:01, DRB5*01:11, DPB1*04:01, DPB1*04:02
OvCa 41	66	浆液性和子宫内膜卵巢癌		A*02, A*24, B*18, B*51, C*02, C*12	DQB1*03, DQ7, DRB1*11, DRB3
OvCa 43	61	浆液性卵巢癌	T3cN1G3R2	A*02, A*32, B*18, B*35, C*04, C*07	DQB1*03, DQB1*05, DQ9, DRB1*01, DRB1*07, DRB4
OvCa 45	63	混合分化型 (主要是子宫内膜样)卵巢癌		A*01, A*23, B*08, B*44, C*04, C*07	DQB1*02, DRB1*03, DRB1*07, DRB3, DRB4
OvCa 48	71	浆液性卵巢癌	T3cN1G3R0	A*02:01, A*25:01, B*15:01, B*41:02, C*03:04, C*17:01	DQB1*03:02, DQB1*03:04, DQA1*03:01, DRB1*04:01, DRB1*13:03, DRB3*01:01, DRB4*01:01, DPB1*02:01
OvCa 53	48	浆液性卵巢癌	T3bN1G3R0	A*02, A*03, B*27, B*35, C*02, C*04	DQB1*02, DQB1*03, DQ7, DRB1*03, DRB1*11, DRB3
OvCa 54	66	浆液性卵巢癌	T3cN1M1G3R2	A*02:01, A*11:01, B*35:01, B*35:03, C*04:01, C*12:03	DQB1*05:01, DQB1*05:03, DQA1*01:01, DRB1*01:03, DRB1*14:01, DRB3*02:02, DPB1*04:01, DPB1*02:01
OvCa 57	58	子宫内膜样卵巢癌		A*25, A*32, B*15, B*18, C*03, C*12	DQB1*05, DQB1*06, DRB1*01, DRB1*15, DRB5

[0413]

OvCa 58	74	浆液 性卵 巢癌	T3cN1G3R1	A*02, A*03, B*35, C*03, C*04	DQB1*05, DRB1*01
OvCa 59	47	浆液 性卵 巢癌	T3cN1G3R2	A*03, A*30, B*13, C*06	DQB1*02, DRB1*07, DRB4
OvCa 60	50	浆液 性卵 巢癌	T3cN1G3R1	A*24:02, A*25:01, B*13:02, B*18:01, C*12:03, C*06:02	DRB1*08:01, DRB1*13:01, D QB1*04:02, DQB1*06:03, DQ A1*04:01, DQA1*01:03, DPB 1*02:01, DPB1*03:01
OvCa 64	56	浆液 性卵 巢癌	T3cN1G3R1	A*01, A*25, B*08, C*07	DQB1*02, DRB1*03, DRB3
OvCa 65	55	浆液 性卵 巢癌	T3cN1M1G3R1	A*01, A*24, B*15, B*35, C*04, C*14	DQB1*03, DQB1*05, DRB1*10 , DRB1*11, DRB3
OvCa 66	73	浆液 性卵 巢癌	T2bN0G3R0	A*11:01, A*29:02, B*18:01, B*44:03, C*05:01, C*16:01	DRB1*03, DRB*0701, DRB3*0 202, DRB4*0101, DQB1*02:01 , DQB1*02:02, DQA1*02:01, DQA1*05:01, DPB1*02:02, DP B1*03:01
OvCa 68	69	浆液 性卵 巢癌	T3cN1G3R1	A*02:01, A*01:01, B*44:02, B*37:01, C*06:02, C*05:01	DRB1*10:01, DRB1*04:01, D RB4*04:01, DQB1*05:01, DQ B1*03:01, DQA1*01:01, DPB 1*04:01
OvCa 69	68	浆液 性卵 巢癌	T3cN0G1R1	n/a	n/a
OvCa 70	48	浆液 性卵 巢癌	T3cN1M1G1R1	A*01, A*02, B*07, C*07	DQB1*03, DQB1*05, DRB1*09 , DRB1*14, DRB3, DRB4
OvCa 72	53	浆液 性卵 巢癌	T3bN1G3R0	A*03:01, A*01:01, B*08:01, B*07:02, C*07:02, C*07:01	DRB1*01:01, DRB1*03:01, D RB3*01:01, DQB1*05:01, DQ B1*02:01, DQA1*01:01, DPB 1*04:01
OvCa 73	69	浆液 性卵	T3cN1G3R0	A*01:01, B*08:01,	DRB1*03:01, DRB1*03:42, D RB3*01:01, DRB3*01:14, DQ

[0414]

		巢癌		C*07:01	B1*02:01, DQA1*05:01, DPB1*04:01
OvCa 74	79	子宫内膜样卵巢癌	T3bNxG1R1	A*02:01, B*18:01, B*51:01, C*07:02, C*15:02	DRB1*11:04, DRB1*07:01, DRB3*02:02, DRB4*01:01, DQB1*03:01, DQB1*02:02, DQA1*02:01, DQA1*05:01, DPB1*04:02, DPB1*02:01
OvCa 79	57	子宫内膜样卵巢癌	T2bN0G2R0	A*01:01, A*31:01, B*08:01, B*51:01, C*07:01, C*15:02	DQB1*03:03, DQA1*02:01, DRB1*07:01, DRB1*09:01, DRB4*01:01, DPB1*13:01, DPB1*02:01
OvCa 80	93	浆液性卵巢癌	T3cNxG3R2	A*25:01, A*32:01, B*18:01, B*39:01, C*12:03	DRB1*01:01, DRB1*12:01, DRB3*02:02, DQB1*03:01, DQB1*05:01, DQA1*01:01, DQA1*05:01, DPB1*04:01
OvCa 81	78	浆液性卵巢癌	T3cNxG3R2	A*02:01, B*45:01, B*56:01, C*07:02, C*01:02	DRB1*04:02, DRB1*11:01, DRB4*01:01, DRB3*02:02, DQB1*03:01, DQB1*03:02
OvCa 82	48	浆液性卵巢癌	T3cN1G3R0	A*01:01, A*03:01, B*08:01, B*38:01, C*07:01, C*12:03	DRB1*04:02, DRB1*03:01, DRB4*01:01, DRB3*01:01, DQB1*02:01, DQB1*03:02, DQA1*03:01, DQA1*05:01, DPB1*04:01, DPB1*13:01
OvCa 83	50	浆液性卵巢癌	T1cN0G2R0	A*02, A*11, B*51, B*55, C*03, C*15	DQB1*03, DQB1*05, DRB1*09, DRB1*14, DRB3, DRB4
OvCa 84	70	浆液性卵巢癌	T3cN1G3R1	A*02:01, B*07:02, B*44:02, C*07:02, C*05:01	DRB1*15:01, DRB5*01:01, DQB1*06:02, DQA1*01:02, DPB1*04:01, DPB1*04:02

[0415] 对于I类MHC,本发明人可以鉴定来自9,136种不同来源蛋白(平均值1,239个蛋白/样本)的22,920种独特肽(平均值为1,263个肽/样本)达到估计的最大可获得范围的>90%(参见图7a)。

[0416] 实施例2:癌症相关顶级HLA配体的鉴定

[0417] 为了从这个庞大的数据目录中提取最具特异性的EOC HLA配体,本发明人将HLA配体来源蛋白质与由来自PBMC (n=30)、骨髓(n=10)、肝脏(n=15)、结肠(n=12)、卵巢(n=4)和肾脏(n=16)组成的良性来源内部数据库(“HLA良性配体组数据库”)进行了比较。HLA良性配体体数据库含有代表10,012个来源蛋白质的31,032个肽,并使用来自健康供体的血

液或骨髓以及经组织病理学评估正常组织建立,全部使用与用于EOC的管道完全相同的管道进行分析。对于比较分析仅在一个低PSM计数的来源上提呈的“昙花一现”的肽从两个数据集中移除,以适应假阳性命中。两个数据集(参见图2A)的比较分析揭示了379个MHC I类来源蛋白在至少三个测试患者中仅通过EOC提呈,突出显示了EOC特异性HLA肽库。根据其提呈频率排列前100位EOC特异性源蛋白在图2B中可见。通过该分析得到的最重要的EOC特异性HLA配体源蛋白为粘蛋白16 (MUC16),也称为癌抗原125 (CA-125)。近80%的患者(26/34)中提呈总共80多种不同MUC16来源的HLA配体(见表8)。

[0418] 表8

序列	ID 号	来源	HLA
AHSKITTAM	3	0vCa 80	B*39:01
AVKTETSTSER	4	0vCa 12, 0vCa 79	A*31:01
AVTNVRTSI	5	0vca 59, 0vCa 60	B*13
DALTPLVTI	6	0vCa 74	B*51:01
DALVLKTV	7	0vCa 41, 0vCa 74, 0vCa 79, 0vCa 83	B*51
DPYKATSAV	8	0vCa 10, 0vCa 41, 0vCa 69, 0vCa 74, 0vCa 79, 0vCa 83	B*51
EPETTISFITY	9	0vCa 65	B*35
ERSPVIQTL	10	0vCa 80	B*39:01
ETILTFHAF	11	0vCa 48, 0vCa 64, 0vCa 80	A*25
EVISSRGTSM	12	0vCa 48, 0vCa 60, 0vCa 64, 0vCa 80	A*25
EVITSSRTTI	13	0vCa 60, 0vca 64	A*25
EVTSSGRTSI	14	0vCa 60, 0vca 64, 0vCa 80	A*25
FPEKTHSF	15	0vCa 65	B*35
FPHSEETTM	16	0vCa 13, 0vCa 65	B*35
FPHSEITTL	17	0vCa 12, 0vCa 13, 0vCa 53	B*35
FQRQGQTAL	18	0vCa 48	B*15:01

[0419]

[0420]

GDVPRPSSL	19	0vCa 72	B*08:01
GHESHSPAL	20	0vCa 80	B*39:01
GHTTVSTSM	21	0vCa 80	B*39:01
GTHSPVTQR	22	0vCa 39, 0vCa 79	A*31:01
GTSGTPVSK	23	0vCa 83	A*11
HPDPQSPGL	24	0vCa 65	B*35
IITEVITRL	547	0vCa 83	A*02
IPRVFTSSI	25	0vCa 41, 0vCa 74	B*51
ISDEVVTRL	26	0vCa 16	C*05
ISIGTIPRI	27	0vCa 65	B*15:17
ISKEDVTSI	28	0vCa 65	B*15:17
ITETSAVLY	29	0vCa 65	A*01
ITRLPTSSI	30	0vCa 65	B*15:17
KDTAHTeam	31	0vCa 68	B*44:02
KEDSTALVM	32	0vCa 16	B*40/B*44
KEVTSSSVL	33	0vCa 16, 0vCa 70	B*40/B*44/?
KMISAIPTL	548	0vCa 81, 0vCa 83	A*02
LPHSEITTL	34	0vCa 12, 0vCa 13	B*35
LTISTHKTl	35	0vCa 65	B*15:17
LTKSEERTI	36	0vCa 65	B*15:17
QFITSTNTF	1	0vCa 60	A*24:02
RDSLIVNGF	37	0vCa 68	B*44:02
RETSTSQKI	38	0vCa 60	B*18:01
RSSGVIFSR	39	0vCa 79	A*31:01
SAFESHSTV	40	0vCa 41, 0vCa 74, 0vCa 79, 0vCa 83	B*51
SATERSASL	41	0vCa 13, 0vCa 16, 0vCa 70	C*03/?
SENSETTAL	42	0vCa 16, 0vCa 70	B*40/B*44/?
SEQRTSPSL	43	0vCa 70	n. a.
SESPSTIKL	44	0vCa 13, 0vCa 70	B*40/?
SPAGEAHSL	45	0vCa 72, 0vCa 81, 0vCa 84	B*07/B*56
SPAGEAHSLA	46	0vCa 81	B*56:01
SPHPVSTTF	47	0vCa 84	B*07:02
SPHPVTALL	48	0vCa 9, 0vCa 72, 0vCa 84	B*07:02
SPLFQRSSL	49	0vca 72	B*0702
SPQNLRLNTL	50	0vCa 23, 0vCa 72, 0vCa 84	B*35/B*07:02
SPRLNTQGNL	51	0vCa 72, 0vca 84	B*07:02
SPSEAITRL	52	0vca 84	B*07:02
SPSKAFASL	53	0vCa 9, 0vCa 23, 0vCa 39, 0vCa 69, 0vCa 72, 0vCa 84	B*35/B*07:02

[0421]

SPSSPTPKV	54	0vCa 72	B*07:02
SPSSQAPVL	55	0vCa 84	B*07:02
SQGFSHSQM	56	0vCa 48	B*15:01
SRTEVISSR	57	0vCa 53	B*27
SSAVSTTTI	58	0vCa 65	B*15:17
SSPLRVTSI	59	0vCa 69	n. a.
STASSLSK	60	0vCa 83	A*11
STETSTVLY	2	0vCa 64, 0vCa 65, 0vCa 68	A*01
STQRTTSM	61	0vCa 72	n. a.
STSQEIHSATK	62	0vCa 83	A*11
SVLADLVTK	63	0vCa 72	A*03:01
SVPDILSTSW	64	0vCa 60	A*24:02
TAGPTTHQF	65	0vCa 58	C*03
TEISSSRISI	66	0vCa 12	B*49:01
TENTGKEKL	67	0vCa 16	B*40/B*44
TETEAHVVF	68	0vCa 41, 0vCa 80	B*18
TEVSRTEVI	69	0vCa 12	B*49:01
TEVLQGLL	70	0vCa 16, 0vCa 66, 0vCa 70	B*40/B*44/?
TPGGTRQSL	71	0vCa 9, 0vCa 23, 0vCa 39, 0vCa 72, 0vCa 84	B*07:02/B*35
TPGNRAISL	72	0vCa 23, 0vCa 72, 0vCa 84	B*07:02/B*35
TPNSRGETSL	73	0vCa 72	B*07:02
TSGPVTEKY	74	0vCa 58	B*35
TSPAGEAHSI	75	0vCa 81	n. a.
TTLPESRPS	324	0vCa 70	n. a.
TYSEKTTLF	549	0vCa 12, 0vCa 41, 0vCa 60, 0vCa 65	A*24
VHESHSSVL	76	0vCa 80	B*39:01
VPRSAATTL	77	0vCa 23, 0vCa 72, 0vCa 84	B*07:02/B*35
VTSAPGRSI	78	0vCa 65	B*15:17
VTSSSRISI	79	0vCa 65	B*15:17
YPDPSKASSAM	80	0vCa 65	B*35

[0422] 这些数据强调了任何其他EOC特异性抗原无法比拟的且仅由经常(>95%)提呈的管家蛋白(例如β肌动蛋白)反映的多种不同HLA同种异型对MUC16的频繁加工和提呈(总共鉴定了149种不同的肽)。在前100位EOC特异性源蛋白中,鉴定了其它已确立的肿瘤相关抗原(如:MUC1或KLK10)以及具有确切良好免疫逃避功能的抗原(如:吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO1)或半乳糖凝集素1(LGALS1))。

[0423] 由于CD4⁺ T细胞具有支持或驱动抗肿瘤免疫应答的能力,发明人使用了相同的方法进一步分析EOC中的II类MHC提呈肽(n=22),产生9,162个肽(平均值598肽/样本),代表了2,330个源蛋白(平均值319个蛋白/样本),达到可获得范围的80%以上(见图7B)。MHC II类的HLA良性配体数据集包含来自骨髓(n=5)、PBMC(n=13)、结肠(n=2)、肝脏(n=7)和肾

脏 (n=17) 的 1719 个源蛋白质的 7,267 个肽。对前 100 位 MHC II 类抗原的分析揭示了更异质和复杂的图像 (图 2C)。值得注意的是, 间皮素 (MSLN) —— 已确立的 MUC16 配体 —— 的 MHC 提呈肽可在近 50% 的患者中鉴定 (10/22; 图 2D)。MUC16 本身不是前 100 位 II 类抗原中的一种, 但是可在四名患者中检测到相应的配体。

[0424] 除了前 100 位的 EOC 特异性 HLA 配体源蛋白之外, 本发明人进一步寻找了已确立的之前用于临床应用以确认其丰度的癌-睾丸和肿瘤相关抗原 (Her2neu、WT1、NY-ESO-1、hTert 和 p53)。尽管本发明人可以鉴定除了 NY-ESO-1 以外的所有抗原的 HLA 提呈肽, 但是它们中的任何一个都不是专门提呈在 EOC 上 (表 9)。显示 EOC 特异性提呈的唯一配体 (尽管频率较低 (3/34)) 是来自 Her2neu 的 HLA I 类配体 (但不是 HLA II 类)。

[0425] 表 9

SEQ ID	Her2neu	HLA 限制	提呈来源
	ERBB2 (受体酪氨酸蛋白激酶 erbB-2)		
153	MPNPEGRYTF	B*35	1x OvCa
152	AARPAGATL	B*07	1x OvCa
291	AIKVLRENTSPKANKE	HLA II 类	
292	DPSPLQRYSEDPTVPLPS	HLA II 类	2x OvCa
293	DPSPLQRYSEDPTVPLPSE	HLA II 类	1x OvCa
294	ELVSEFSRMARD	HLA II 类	2x PBMCs
295	ELVSEFSRMARDPQ	HLA II 类	2x PBMCs, 1x 肾
296	IPVAIKVLRENTSPKANKE	HLA II 类	1x OvCa

[0427]

297	RRLQETELVEPLTPS	HLA II 类	2x Liver
298	SPQPEYVNQPDVRPQPP	HLA II 类	1x OvCa
291	VKPDLSYMPITWKFPDE	HLA II 类	1x OvCa
	WT-1		
	Wilms 肿瘤蛋白		
558		A*02	8x PBMCs, 1x 肝
557	QRNMTKLQL	B*13	2x OvCa, 1x 肝, 1x PBMCs
555	GVFRGIQDV	B*13	2x OvCa
550	ALLPAVPSL	A*02	1x OvCa
	hTert		
	端粒酶逆转录酶		
556		A*02	2x PBMCs
	p53		
	细胞肿瘤抗原 p53		
552	RPILTIITL	B*07	4x PBMCs, 2x Liver, 2x 肾, 3x OvCa
553	TYSPALNKM	A*24	1x PBMCs, 1x 肝, 2x OvCa
551	GRNSFEVRV	B*27	1x PBMC, 1x 肝, 1x 肾, 1x OvCa

[0428] 实施例3:EOC相关HLA提呈肽的细胞来源

[0429] 由于EOC不仅体现癌细胞,而且代表不同细胞类型的异质混合物,发明人提出了MHC I类前100位抗原是否最初由癌细胞提供的疑问。为此目的,本发明人整理了EOC并分离了CD45⁺白细胞、EpCam⁺肿瘤细胞以及两种标志物呈阴性的基质细胞(富集效率参见表10),随后本发明人针对每个亚组分别进行了HLA配体组学分析。

[0430] 表10:细胞富集效率:

[0431] 细胞百分比在MACSorting之前(PreSort)和之后在每个部分中给出

[0432]

	PreSort			CD45 ⁺ 部分			EpCam ⁺ 部分			EpCam ⁻ 部分		
Ovca	CD45 ⁺	EpCam ⁺	活力	CD45 ⁺	EpCam ⁺	活力	CD45 ⁺	EpCam ⁺	活力	CD45 ⁺	EpCam ⁺	活力
84	74.7	18.3	80.2	93.5	6.2	71.6	10.7	85.7	88.2	4.5	22.1	64.0
73	23.1	12.3	81.2	95.7	1.7	77.2	3.4	73.3	87.6	1.7	3.2	87.4

[0433]

70	76.2	8.83	78.9	96	1.3	82.7	3.4	94	66.4	3.1	4.5	65.4
60	77.4	5.2	92.3	94.8	1.7	90.2	5.2	79.7	88.7	3.8	10.7	89.5
57	31.9	50.5	94.1	93.6	5.0	90.6	1.4	95.3	96.7	0.8	7.2	95.3

[0434] 本发明人使用了无标记定量方法确定总共5种EOC中每种得到鉴定的HLA配体的来

源(代表性实施例参见图3)。正如预期的那样,总是发现在(4/5)EOC样本上鉴定的MUC16衍生HLA配体在富集的癌细胞上过度表达,中位值5倍过量提呈(范围1.8-135倍),取决于富集的效率。DDR1、SOX9、CRABP1/2、EYA2、LAMC2、MUC1或KLK10等多种其他经常提呈的前100位抗原也是如此。但是许多其他抗原,特别是已知被干扰素上调的那些抗原,如:Toll样受体(TLR3、TLR7)或2'-5'-寡腺苷酸合成酶样蛋白合酶(OASL)不能明确地显示出由肿瘤细胞提呈,但在CD45+白细胞和/或基质细胞上表现出强烈的过度提呈。除了肿瘤相关抗原之外,本发明人还从具有细胞类型特异性表达的来源蛋白中识别了配体。例如,来自CD8、CD132或淋巴细胞特异性蛋白1(LSP1)的配体被发现在CD45+细胞中高度过量表达,并且最可能由基质中的内皮细胞表达的van Willebrand因子(vWF)在基质子集内高度过表达,强调了这种细胞类型特定方法的强度。

[0435] 实施例4:MUC16衍生配体的免疫原性分析

[0436] 对于肽疫苗的适用性,免疫原性是主要的必要条件。为了评估所鉴定的HLA配体的免疫原性潜力,本发明人使用了涉及从健康供体的血液中分离的人造抗原提呈细胞和T细胞的T细胞激活方案。表11列出了对于头号EOC相关抗原MUC16这种分析的结果。到目前为止测试的23种不同的肽中,18种显示在至少1/3的供体中具有免疫原性。这种接近80%的识别率验证了人群中存在天然MUC16识别T细胞。其他前100位抗原(例如:IDO1、LGALS1)也得到了类似的结果。

[0437] 表11:来自MUC16/CA-125的EOC提呈HLA配体的免疫原性分析

[0438]	HLA	序列	SEQ ID	阳性/测试供体
	A*01	STETSTVLY	2	0 / 2
	A*02	ITEVITRL	547	3 / 10
	A*02	KMISAIPTL	548	4 / 6
	A*03	SVLADLVTTK	63	0 / 1

[0439]

A*11	STSQEIHSATK	62	2 / 6
A*11	GTSGTPVSK	23	0 / 5
A*24	TYSEKTLF	549	2 / 2
A*24	AVTNVRTSI	5	1 / 3
A*25	ETILTFHAF	11	2 / 2
A*25	EVITSSRTTI	13	1 / 1
A*25	EVTSSGRTSI	14	2 / 3
A*25	EVISSRGTSM	12	1 / 3
B*07	SPHPVTALL	48	0 / 1
B*07	SPQNLRLTL	50	1 / 1
B*07	LPHSEITTL	34	0 / 2
B*07	SPSKAFASL	53	2 / 2
B*07	VPRSAATTL	77	1 / 2
B*07	TPGNRAISL	72	2 / 2
B*15	SQGFSHSQM	56	4 / 5
B*15	FQRQGQTAL	18	1 / 6
B*27	ERSPVIQTL	10	1 / 2
B*51	DALVLKTV	7	1 / 3
B*51	DPYKATSAV	8	3 / 3
8 / 10 同种异	18/23 HLA 配体		34 / 73

[0440] 实施例5:HLA配体提呈的生物标志物

[0441] 抗原特异性癌症免疫疗法(例如:肽疫苗接种、过继性T细胞转移)需要在短时间内严格筛选候选抗原。但是,由于缺乏合适的材料,HLA配体基因组分析并不总是可行。一项可行的选择是使用生物标志物来预测肿瘤细胞上是否存在HLA配体。为了评估通过免疫组织化学(免疫反应性评分,IRS)分析的蛋白质表达是否可以作为HLA配体提呈的替代标志物,本发明人通过免疫组织化学方法分析了前100位MHC I类抗原MUC16和ID01以及前100位MHC II类抗原MSLN,并将染色强度(图4A)与相同肿瘤上存在或不存在HLA配体相关联。对于MUC16和MSLN,肿瘤的染色评分明显更高,其提呈了各自源蛋白的HLA配体(图4C)。在手术当天确定的CA-125血清水平也是如此(图4D),表明这些参数可用于正确选择进行肽疫苗接种的候选抗原。相比之下,ID01未显示与配体提呈具有显著相关性。

[0442] 实施例6:MUC16/MSLN轴的预后相关性

[0443] 由于它们作为免疫疗法靶标的重要性,本发明人希望评估MSLN和MUC16是否对与我们的免疫肽集相似的患者具有预后相关性。为此目的,本发明人通过免疫组织化学分析了在高级别浆液性卵巢癌(FIGO分期II-III期)的组织微阵列(TMA)中两种抗原的表达以及T细胞浸润程度。为了避免发生预后相关的混杂因素,本发明人将我们的分析限制在71名接受癌症最佳减瘤术(病灶残余量<1cm)的患者。

[0444] 虽然本发明人未观察到对MUC16染色的任何预后影响,但是,强MSLN染色与50至28

个月中值总生存率明显的临界值显著 ($p=0.0572$) 下降相关 (图5A)。尽管MUC16和MSLN具有不同的预后相关性,但MUC16和MSLN的染色评分呈直接和高度显著相关性 (Spearman相关系数 $r=0.5237$;95% c.i.=0.3159-0.6835,双尾显著性 $p<0.001$)。

[0445] 为了评估T细胞浸润,本发明人分别评估了肿瘤上皮内隔室 (CD3E) 和纤维血管间质 (CD3S) 中的CD3 T细胞数量。值得注意的是,只有上皮内T细胞的数量显示出显著的预后影响 ($p<0.0063$),而单独的周围基质浸润无预后相关性 (图5B)。只有在结合MSLN和CD3染色的亚组分析中,才可在低MSLN和高T细胞浸润的肿瘤中观察到对于CD3E ($p<0.001$) 和CD3S ($p<0.0049$) 的显著预后益处 (图5C)。最显著的是,瘤内T细胞高度浸润 (CD3E) 和低MSLN染色结合确定了长期癌症存活者 (10/11患者证实存活超过3年) 的子集。

[0446] 参考文献

- [0447] Allison, J.P. et al., Science 270 (1995)
- [0448] Andersen, R.S. et al., Nat. Protoc. 7 (2012)
- [0449] Appay, V. et al., Eur. J. Immunol. 36 (2006)
- [0450] Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001)
- [0451] Beatty, G. et al., J. Immunol. 166 (2001)
- [0452] Beggs, J.D., Nature 275 (1978)
- [0453] Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), Vol. 57 (1995)
- [0454] Boulter, J.M. et al., Protein Eng 16 (2003)
- [0455] Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- [0456] Brossart, P. et al., Blood 90 (1997)
- [0457] Bruckdorfer, T. et al., Curr. Pharm. Biotechnol. 5 (2004)
- [0458] Card, K.F. et al., Cancer Immunol. Immunother. 53 (2004)
- [0459] Chanock, S.J. et al., Hum. Immunol. 65 (2004)
- [0460] Cohen, C.J. et al., J. Mol. Recognit. 16 (2003a)
- [0461] Cohen, C.J. et al., J. Immunol. 170 (2003b)
- [0462] Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 69 (1972)
- [0463] Coligan JE et al., (1995)
- [0464] Colombetti, S. et al., J. Immunol. 176 (2006)
- [0465] Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res 12 (2006)
- [0466] Denzberg, G. et al., J. Immunol. 171 (2003)
- [0467] Falk, K. et al., Nature 351 (1991)
- [0468] Fong, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98 (2001)
- [0469] Gabrilovich, D.I. et al., Nat. Med 2 (1996)
- [0470] Gattinoni, L. et al., Nat. Rev. Immunol. 6 (2006)
- [0471] Gnajatic, S. et al., Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A 100 (2003)
- [0472] Godkin, A. et al., Int. Immunol 9 (1997)
- [0473] Green MR et al., 4th, (2012)
- [0474] Greenfield EA, 2nd, (2014)

- [0475] Hwang,M.L.et al.,JImmunol.179 (2007)
- [0476] Jung,G.et al.,Proc Natl Acad Sci U S A 84(1987)
- [0477] Kibbe AH,rd, (2000)
- [0478] Krieg,A.M.,Nat.Rev.Drug Discov.5 (2006)
- [0479] Liddy,N.et al.,Nat.Med.18 (2012)
- [0480] Ljunggren,H.G.et al.,J Exp.Med 162 (1985)
- [0481] Longenecker,B.M.et al.,Ann N.Y.Acad.Sci.690 (1993)
- [0482] Lukas,T.J.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78 (1981)
- [0483] Lundblad RL,3rd, (2004)
- [0484] Meziere,C.et al.,J Immunol 159 (1997)
- [0485] Morgan,R.A.et al.,Science 314 (2006)
- [0486] Mori,M.et al.,Transplantation 64 (1997)
- [0487] Mortara,L.et al.,Clin Cancer Res.12 (2006)
- [0488] Mueller,L.N.et al.,J Proteome.Res.7 (2008)
- [0489] Mueller,L.N.et al.,Proteomics.7 (2007)
- [0490] Mumberg,D.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 (1999)
- [0491] Pinheiro J et al., (2015)
- [0492] Plebanski,M.et al.,Eur.J Immunol 25 (1995)
- [0493] Porta,C.et al.,Virology 202 (1994)
- [0494] Rammensee,H.G.et al.,Immunogenetics 50 (1999)
- [0495] Rini,B.I.et al.,Cancer 107 (2006)
- [0496] Rock,K.L.et al.,Science 249 (1990)
- [0497] Rodenko,B.et al.,Nat.Protoc.1 (2006)
- [0498] Saiki,R.K.et al.,Science 239 (1988)
- [0499] Seeger,F.H.et al.,Immunogenetics 49 (1999)
- [0500] Sherman F et al., (1986)
- [0501] Singh-Jasuja,H.et al.,Cancer Immunol.Immunother.53 (2004)
- [0502] Small,E.J.et al.,J Clin Oncol.24 (2006)
- [0503] Sturm,M.et al.,BMC.Bioinformatics.9 (2008)
- [0504] Teufel,R.et al.,Cell Mol.Life Sci.62 (2005)
- [0505] Tran,E.et al.,Science 344 (2014)
- [0506] Walter,S.et al.,J.Immunol.171 (2003)
- [0507] Walter,S.et al.,Nat Med.18 (2012)
- [0508] Willcox,B.E.et al.,Protein Sci.8 (1999)
- [0509] Zaremba,S.et al.,Cancer Res.57 (1997)
- [0510] Siegel,R.,Ma,J.,Zou,Z.&Jemal,CA Cancer J.Clin.64,9-29 (2014) .
- [0511] Coleman,R.L.et al Nat.Rev.Clin.Oncol.10,211-224 (2013) .
- [0512] Herzog,T.J.&Pothuri,B..Na t.Clin.Pract.Oncol.3,604-611 (2006) .
- [0513] Kandalaft,L.E.,Powell,D.J.,Jr.,Singh,N.&Coukos,G.J.Clin.Oncol.29,925-

933 (2011) .

[0514] Zhang,L.,et al.N.Engl.J.Med.348,203-213 (2003) .

[0515] Schlienger,K.,et al.Clin.Cancer Res.9,1517-1527 (2003) .

[0516] Matsuzaki,J.,et al.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.107,7875-7880 (2010) .

[0517] Fisk,B.,Blevins,T.L.,Wharton,J.T.&Ioannides,C.G.J.Exp.Med.181,2109-2117 (1995) .

[0518] Curiel,T.J.,et al.Nat.Med.10,942-949 (2004) .

[0519] Vlad,A.M.,et al.Cancer Immunol.Immunother.59,293-301 (2010) .

[0520] Hodi,F.S.,et al.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.105,3005-3010 (2008) .

[0521] Robert,C.,et al.Lancet 384,1109-1117 (2014) .

[0522] Wolchok,J.D.,et al.N.Engl.J.Med.369,122-133 (2013) .

[0523] Rosenberg,S.A.,et al..Clin.Cancer Res.17,4550-4557 (2011) .

[0524] Walter,S.,et al.Nat.Med.18,1254-1261 (2012) .

[0525] Rosenberg,S.A.Sci.Transl.Med.4,127ps128 (2012) .

[0526] Tran,E.,et al..Science 344,641-645 (2014) .

[0527] Mantia-Smaldone,G.M.,Corr,B.&Chu,C.S.Hum.Vaccin.Immunother.8,1179-1191 (2012) .

[0528] Haridas,D.,et al.FASEB J.28,4183-4199 (2014) .

[0529] Deng,J.,et al.Cancer Metastasis Rev.32,535-551 (2013) .

[0530] Luo,L.Y.,et al.Cancer Res.63,807-811 (2003) .

[0531] Uyttenhove,C.,et al.Nat.Med.9,1269-1274 (2003) .

[0532] Sorensen,R.B.,et al..PLoS One 4,e6910 (2009) .

[0533] van den Brule,F.,et al.Lab.Invest.83,377-386 (2003) .

[0534] Rubinstein,N.,et al.Cancer Cell5,241-251 (2004) .

[0535] Perez-Diez,A.,et al.Blood 109,5346-5354 (2007) .

[0536] Braumuller,H.,et al.Nature 494,361-365 (2013) .

[0537] HaSsan,R.&Ho,M.Eur.J.Cancer 44,46-53 (2008) .

[0538] Schoggins,J.W.,et al.Nature 472,481-485 (2011) .

[0539] Walter,S.,et al.J.Immunol.171,4974-4978 (2003) .

[0540] Couzin-Frankel,J.Cancer immunotherapy.Science 342,1432-1433 (2013) .

[0541] Mellman,I.,Coukos,G.&Dranoff,G.Nature 480,480-489 (2011) .

[0542] Perez,S.A.,et al.Cancer 116,2071-2080 (2010) .

[0543] Matsushita,H.,et al.Nature 482,400-404 (2012) .

[0544] Robbins,P.F.,et al.Nat.Med.19,747-752 (2013) .

[0545] Gubin,M.M.,et al.Nature 515,577-581 (2014) .

[0546] Andersen,R.S.,et al.Cancer Res.72,1642-1650 (2012) .

[0547] Lu,Y.C.,et al.Clin.Cancer Res.20,3401-3410 (2014) .

[0548] Rolland,P.,Deen,S.,Scott,I.,Durrant,L.&Spendlove,I.Clin.Cancer Res.13,3591-3596 (2007) .

-
- [0549] Cheng,W.F.,et al.Br.J.Cancer 100,1144-1153 (2009) .
- [0550] Berlin,C.,et al.Leukemia (2014) .
- [0551] Blaustein,A.&Kurman,R.J.Blaustein's pathology of the female genital tract, (Springer,New York,NY,2011) .
- [0552] Pham,D.L.,et al.Int.J.Gynecol.Pathol.32,358-367 (2013) .

序列表

<110> 伊玛提克斯生物技术有限公司

<120> 用于上皮性卵巢癌和其他癌症免疫治疗的新型肽和肽组合物

<130> I32745W0

<150> GB1512369.8

<151> 2015-07-15

<150> US62/192,670

<151> 2015-07-15

<160> 558

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Gln Phe Ile Thr Ser Thr Asn Thr Phe

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Ser Thr Glu Thr Ser Thr Val Leu Tyr

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Ala His Ser Lys Ile Thr Thr Ala Met

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Ala Val Lys Thr Glu Thr Ser Thr Ser Glu Arg

1 5 10

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 5
Ala Val Thr Asn Val Arg Thr Ser Ile
1 5
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 6
Asp Ala Leu Thr Pro Leu Val Thr Ile
1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 7
Asp Ala Leu Val Leu Lys Thr Val
1 5
<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 8
Asp Pro Tyr Lys Ala Thr Ser Ala Val
1 5
<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 9
Glu Pro Glu Thr Thr Thr Ser Phe Ile Thr Tyr
1 5 10
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

Glu Arg Ser Pro Val Ile Gln Thr Leu

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 11

Glu Thr Ile Leu Thr Phe His Ala Phe

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12

Glu Val Ile Ser Ser Arg Gly Thr Ser Met

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 13

Glu Val Ile Thr Ser Ser Arg Thr Thr Ile

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14

Glu Val Thr Ser Ser Gly Arg Thr Ser Ile

1 5 10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

Phe Pro Glu Lys Thr Thr His Ser Phe

1 5

<210> 16

<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 16
Phe Pro His Ser Glu Glu Thr Thr Thr Met
1 5 10
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 17
Phe Pro His Ser Glu Ile Thr Thr Leu
1 5
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 18
Phe Gln Arg Gln Gly Gln Thr Ala Leu
1 5
<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 19
Gly Asp Val Pro Arg Pro Ser Ser Leu
1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 20
Gly His Glu Ser His Ser Pro Ala Leu
1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 21

Gly His Thr Thr Val Ser Thr Ser Met

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

Gly Thr His Ser Pro Val Thr Gln Arg

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 23

Gly Thr Ser Gly Thr Pro Val Ser Lys

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 24

His Pro Asp Pro Gln Ser Pro Gly Leu

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

Ile Pro Arg Val Phe Thr Ser Ser Ile

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 26

Ile Ser Asp Glu Val Val Thr Arg Leu

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 27
Ile Ser Ile Gly Thr Ile Pro Arg Ile
1 5
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 28
Ile Ser Lys Glu Asp Val Thr Ser Ile
1 5
<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 29
Ile Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Tyr
1 5
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 30
Ile Thr Arg Leu Pro Thr Ser Ser Ile
1 5
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 31
Lys Asp Thr Ala His Thr Glu Ala Met
1 5
<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 32
Lys Glu Asp Ser Thr Ala Leu Val Met

1 5
<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 33
Lys Glu Val Thr Ser Ser Ser Ser Val Leu
1 5 10
<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 34
Leu Pro His Ser Glu Ile Thr Thr Leu
1 5
<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 35
Leu Thr Ile Ser Thr His Lys Thr Ile
1 5
<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 36
Leu Thr Lys Ser Glu Glu Arg Thr Ile
1 5
<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 37
Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe
1 5
<210> 38
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 38
Arg Glu Thr Ser Thr Ser Gln Lys Ile
1 5
<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 39
Arg Ser Ser Gly Val Thr Phe Ser Arg
1 5
<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 40
Ser Ala Phe Glu Ser His Ser Thr Val
1 5
<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 41
Ser Ala Thr Glu Arg Ser Ala Ser Leu
1 5
<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 42
Ser Glu Asn Ser Glu Thr Thr Ala Leu
1 5
<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 43
Ser Glu Gln Arg Thr Ser Pro Ser Leu
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 44
Ser Glu Ser Pro Ser Thr Ile Lys Leu
1 5
<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 45
Ser Pro Ala Gly Glu Ala His Ser Leu
1 5
<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 46
Ser Pro Ala Gly Glu Ala His Ser Leu Leu Ala
1 5 10
<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 47
Ser Pro His Pro Val Ser Thr Thr Phe
1 5
<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 48
Ser Pro His Pro Val Thr Ala Leu Leu
1 5
<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 49

Ser Pro Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 50

Ser Pro Gln Asn Leu Arg Asn Thr Leu

1 5

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 51

Ser Pro Arg Leu Asn Thr Gln Gly Asn Thr Ala Leu

1 5 10

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 52

Ser Pro Ser Glu Ala Ile Thr Arg Leu

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 53

Ser Pro Ser Lys Ala Phe Ala Ser Leu

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 54

Ser Pro Ser Ser Pro Thr Pro Lys Val

1 5

<210> 55

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 55
Ser Pro Ser Ser Gln Ala Pro Val Leu
1 5
<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 56
Ser Gln Gly Phe Ser His Ser Gln Met
1 5
<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 57
Ser Arg Thr Glu Val Ile Ser Ser Arg
1 5
<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 58
Ser Ser Ala Val Ser Thr Thr Thr Ile
1 5
<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 59
Ser Ser Pro Leu Arg Val Thr Ser Leu
1 5
<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 60

Ser Thr Ala Ser Ser Ser Leu Ser Lys

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 61

Ser Thr Gln Arg Val Thr Thr Ser Met

1 5

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 62

Ser Thr Ser Gln Glu Ile His Ser Ala Thr Lys

1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 63

Ser Val Leu Ala Asp Leu Val Thr Thr Lys

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 64

Ser Val Pro Asp Ile Leu Ser Thr Ser Trp

1 5 10

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 65

Thr Ala Gly Pro Thr Thr His Gln Phe

1 5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 66
Thr Glu Ile Ser Ser Ser Arg Thr Ser Ile
1 5 10
<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 67
Thr Glu Asn Thr Gly Lys Glu Lys Leu
1 5
<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 68
Thr Glu Thr Glu Ala Ile His Val Phe
1 5
<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 69
Thr Glu Val Ser Arg Thr Glu Val Ile
1 5
<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<220>
<221> misc_feature
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa can be Ser, Arg or Gly
<400> 70
Thr Glu Xaa Val Leu Gln Gly Leu Leu
1 5
<210> 71
<211> 9

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 71
Thr Pro Gly Gly Thr Arg Gln Ser Leu
1 5
<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 72
Thr Pro Gly Asn Arg Ala Ile Ser Leu
1 5
<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 73
Thr Pro Asn Ser Arg Gly Glu Thr Ser Leu
1 5 10
<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 74
Thr Ser Gly Pro Val Thr Glu Lys Tyr
1 5
<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 75
Thr Ser Pro Ala Gly Glu Ala His Ser Leu
1 5 10
<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 76
Val His Glu Ser His Ser Ser Val Leu

1 5
<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 77
Val Pro Arg Ser Ala Ala Thr Thr Leu
1 5
<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 78
Val Thr Ser Ala Pro Gly Arg Ser Ile
1 5
<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 79
Val Thr Ser Ser Ser Arg Thr Ser Ile
1 5
<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 80
Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Ala Ser Ser Ala Met
1 5 10
<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 81
Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala
1 5
<210> 82
<211> 10
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 82

Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala

1 5 10

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 83

Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 84

Leu Pro Ser Pro Val Asp Ala Ala Phe

1 5

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 85

Arg Gly Val Pro Ser Glu Ile Asp Ala Ala Phe

1 5 10

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 86

Glu Ala Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 87

Ser Thr Ser Ser His Ser Leu Gln Lys

1 5

<210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 88
Ala Pro His Leu His Leu Ser Ala
1 5
<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 89
Ala Pro His Leu His Leu Ser Ala Ala
1 5
<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 90
Arg Ala Leu Ala Lys Leu Leu Pro Leu
1 5
<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 91
Ser Ala Ala Ser Gly Ala Arg Ala Leu
1 5
<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 92
Val Leu Val Asp Gln Ser Trp Val Leu
1 5
<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 93

Asp Tyr Leu Lys Arg Phe Tyr Leu Tyr

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 94

Ser Glu Thr Lys Asn Ala Asn Ser Leu

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 95

Ser Ser Asp Pro Asn Ala Val Met Tyr

1 5

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 96

Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Asn Thr Leu

1 5 10

<210> 97

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 97

Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Asn Thr Leu Ala His

1 5 10

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 98

Asn Glu Ile Glu Arg Val Phe Val Trp

1 5

<210> 99

<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 99
Asn Val Gly Gly Leu Ile Gly Thr Pro Lys
1 5 10
<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 100
Arg Val Lys Glu Met Tyr Asn Thr Tyr
1 5
<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 101
Ser Ala Pro Leu Arg Val Ser Gln Leu
1 5
<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 102
Asp Thr Asp Glu Tyr Val Leu Lys Tyr
1 5
<210> 103
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 103
Lys Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe
1 5
<210> 104
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 104

Ser Lys Ala Pro Val Leu Thr Tyr

1 5

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 105

Ala Glu Tyr Thr Asp Val Leu Gln Lys Ile

1 5 10

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 106

Glu Tyr Thr Asp Val Leu Gln Lys Ile

1 5

<210> 107

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 107

Arg Pro His Leu Thr Ser Asp Ala

1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 108

Arg Pro His Leu Thr Ser Asp Ala Val

1 5

<210> 109

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 109

Arg Pro His Leu Thr Ser Asp Ala Val Ala

1 5 10

<210> 110

<211> 9

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 110
Ser Ala Lys Ser Ile Tyr Glu Gln Arg
1 5
<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 111
Ser Pro Glu Glu Gly Ala Arg Val Tyr
1 5
<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 112
Ser Gln Tyr Pro Val Asn His Leu Val
1 5
<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 113
Tyr Pro Val Asn His Leu Val Thr Phe
1 5
<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 114
Ala Ala Ala Ser Ala Ile Lys Val Ile
1 5
<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 115
Ile His Asp His Val Asn Pro Lys Ala Phe Phe

1	5	10
---	---	----

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 116
Asn Pro Lys Ala Phe Phe Ser Val Leu

1	5
---	---

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 117
Asn Pro Ser Val Arg Glu Phe Val Leu

1	5
---	---

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 118
Arg Ser Tyr His Leu Gln Ile Val Thr Lys

1	5	10
---	---	----

<210> 119
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 119
Arg Tyr Met Pro Pro Ala His Arg Asn Phe

1	5	10
---	---	----

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 120
Thr Glu Phe Glu Gln Tyr Leu His Phe

1	5
---	---

<210> 121
<211> 10
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 121
Val Ser Asp Ala Ser Ser Ala Val Tyr Tyr
1 5 10

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 122

Ala Glu Ile Glu Ala Asp Arg Ser Tyr
1 5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 123

Ala Gln Lys Val Asp Thr Arg Ala Lys
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 124

His Pro Ser Ala His Asp Val Ile Leu
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 125

Arg Ile Lys Gln Lys Ala Asp Ser Leu
1 5

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 126

Ser Glu Gly Ala Ser Arg Ser Leu Gly Leu
1 5 10

<210> 127
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 127
Ser Val Asp Glu Glu Gly Leu Val Leu Leu
1 5 10
<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 128
Ser Val His Lys Ile Thr Ser Thr Phe
1 5
<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 129
Thr Arg Glu Ala Thr Gln Ala Glu Ile
1 5
<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 130
Val Tyr Phe Val Ala Pro Ala Lys Phe
1 5
<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 131
Ala Pro Gln Ser Ala His Ala Ala Phe
1 5
<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 132

Glu Thr Ile Ile Ile Phe His Ser Leu

1 5

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 133

Thr Glu Leu Leu Val Lys Ala Tyr

1 5

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 134

Trp Gln Glu Gly Arg Ala Ser Gly Thr Val Tyr

1 5 10

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 135

Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 136

Lys Ile Ala Val Ala Ala Ala Ser Lys

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 137

Asn Val Met Leu Arg Lys Ile Ala Val

1 5

<210> 138

<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 138
Arg Glu Leu Thr Asn Asp Gly Glu Leu Ile Leu
1 5 10
<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 139
Val Ala Ala Ala Ser Lys Pro Ala Val
1 5
<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 140
Ser Pro Asn Ala Ile Phe Lys Ala Leu
1 5
<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 141
Ser Ser Lys Asn Lys Pro His Val Lys Arg
1 5 10
<210> 142
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 142
Thr Pro Ala Ser Ala Gly His Val Trp
1 5
<210> 143
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 143

Tyr Thr Asp His Gln Asn Ser Ser Ser Tyr

1 5 10

<210> 144

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 144

Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu

1 5

<210> 145

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 145

Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys

1 5 10

<210> 146

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 146

Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu

1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 147

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu

1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 148

Asn Leu Pro Ile Phe Leu Pro Arg Val

1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 149
Arg Val His Pro Glu Glu Gln Gly Trp
1 5
<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 150
Thr Val Lys Pro Ser Gly Lys Pro Arg
1 5
<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 151
Tyr Tyr Glu His Val Lys Ala Arg Phe
1 5
<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 152
Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu
1 5
<210> 153
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 153
Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe
1 5 10
<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 154
Phe Tyr Ile Lys Thr Ser Thr Thr Val

1 5
<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 155
Arg Thr Thr Glu Ile Asn Phe Lys Val
1 5
<210> 156
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 156
Tyr Ile Lys Thr Ser Thr Thr Val
1 5
<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 157
Gly Gln Ala Ala Gln Gly Pro Thr Ile
1 5
<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 158
His Arg Phe Leu Ala Glu Asp Ala Leu
1 5
<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 159
Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala
1 5
<210> 160
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 160
Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe
1 5
<210> 161
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 161
Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr
1 5 10
<210> 162
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 162
Lys Ser Gln Thr Leu Leu Gly Lys
1 5
<210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 163
Asp Glu Leu Ile Ser Lys Ser Phe
1 5
<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 164
His Asp Glu Leu Ile Ser Lys Ser Phe
1 5
<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 165
Gly Arg Ala Tyr Leu Phe Asn Ser Val
1 5

<210> 166
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 166
Tyr Leu Phe Asn Ser Val Val Asn Val
1 5
<210> 167
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 167
Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu
1 5
<210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 168
His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu
1 5
<210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 169
His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr
1 5
<210> 170
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 170
Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met
1 5
<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 171

Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe

1 5

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 172

Ala Ile Ala Glu Ile Gly Asn Gln Leu

1 5

<210> 173

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 173

Asp Val Ala Gln Val Thr Gly Ala Leu Arg

1 5 10

<210> 174

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 174

Ser Glu Asp Leu Pro Arg Ala Val Ile

1 5

<210> 175

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 175

Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu

1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 176

Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe

1 5

<210> 177

<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 177
Phe Pro Phe Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val
1 5 10
<210> 178
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 178
Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu
1 5 10
<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 179
Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe
1 5
<210> 180
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 180
Asp Lys Ala Phe Thr Ala Ala Thr Thr Glu Val Ser Arg
1 5 10
<210> 181
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 181
Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn
1 5 10 15
<210> 182
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 182

Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly
1 5 10 15
<210> 183
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 183
Phe Asp Lys Ala Phe Thr Ala Ala Thr Thr Glu Val Ser Arg
1 5 10
<210> 184
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 184
Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn
1 5 10
<210> 185
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 185
Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn
1 5 10
<210> 186
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 186
Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn
1 5 10
<210> 187
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 187
Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly
1 5 10 15
<210> 188
<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 188

Ser Thr Glu Thr Ile Thr Arg Leu Ser Thr Phe Pro Phe Val Thr Gly

1 5 10 15

<210> 189

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 189

Glu Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg

1 5 10

<210> 190

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 190

Glu Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg Phe

1 5 10

<210> 191

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 191

Gly Ile Asn Phe Leu Tyr Ala Ala Thr His Glu Leu Gly His Ser

1 5 10 15

<210> 192

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 192

Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg

1 5 10

<210> 193

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 193

Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg Phe

1	5	10
<210> 194		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 194		
Ser Glu Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg		
1	5	10
<210> 195		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 195		
Ser Glu Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg Phe		
1	5	10 15
<210> 196		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 196		
Val Pro Tyr Asn Ile Leu Thr Pro Tyr Pro Gly Pro Arg		
1	5	10
<210> 197		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 197		
Tyr Val Pro Tyr Asn Ile Leu Thr Pro Tyr Pro Gly Pro Arg		
1	5	10
<210> 198		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<400> 198		
Gly Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu		
1	5	10
<210> 199		
<211> 16		
<212> PRT		

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 199

Gly Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu Leu Lys

1 5 10 15

<210> 200

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 200

Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu

1 5 10

<210> 201

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 201

Pro Asn Phe Ser Gly Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe

1 5 10 15

<210> 202

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 202

Val Met Leu Arg Lys Ile Ala Val Ala Ala Ala Ser Lys Pro Ala

1 5 10 15

<210> 203

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 203

Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu

1 5 10

<210> 204

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 204

Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr

1 5 10

<210> 205

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys

1 5 10

<210> 206

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 206

Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr

1 5 10 15

<210> 207

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 207

Asp Asp Gly Gly Gln Phe Val Val Thr Thr Asn Pro Val Asn Asn Asp

1 5 10 15

Gly

<210> 208

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 208

Asp Lys Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp

1 5 10 15

Thr Pro Pro

<210> 209

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 209

Asp Lys Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp

1 5 10 15

Thr Pro Pro Val

20

<210> 210

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 210

Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile

1 5 10

<210> 211

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 211

Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile Ser

1 5 10 15

<210> 212

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 212

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 213

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 213

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr

1 5 10 15

Gly Val Ile

<210> 214

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 214

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr

1 5 10 15

Gly Val Ile Ser

20

20

20

20

<400> 219

Asp Val Asn Thr Tyr Asn Ala Ala Ile Ala Tyr Thr Ile Leu Ser Gln
 1 5 10 15
 <210> 220
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 220
 Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp Thr
 1 5 10 15
 <210> 221
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 221
 Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp Thr Pro
 1 5 10 15
 Pro
 <210> 222
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 222
 Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp Thr Pro
 1 5 10 15
 Pro Val
 <210> 223
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 223
 Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val
 1 5 10 15
 Ile Ser
 <210> 224
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 224
 Gly Gly Gln Phe Val Val Thr Thr Asn Pro Val Asn Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 225
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 225
Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp Thr

1	5	10
---	---	----

<210> 226
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 226
Gly Pro Phe Pro Lys Asn Leu Val Gln Ile Lys Ser Asn Lys Asp Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 227
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 227
Gly Pro Phe Pro Lys Asn Leu Val Gln Ile Lys Ser Asn Lys Asp Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu
<210> 228
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 228
Gly Pro Phe Pro Lys Asn Leu Val Gln Ile Lys Ser Asn Lys Asp Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Gly Lys
<210> 229
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 229
Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile

1	5	10
---	---	----

<210> 230

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 230

Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile Ser

1 5 10

<210> 231

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 231

Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly

1 5 10

<210> 232

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 232

Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile

1 5 10 15

<210> 233

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 233

Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile

1 5 10 15

Ser

<210> 234

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 234

Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly

1 5 10 15

Val Ile

<210> 235

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 235

Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly

1 5 10 15

Val Ile Ser

<210> 236

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 236

Gln Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn

1 5 10 15

Thr Gly Val Ile Ser

20

<210> 237

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 237

Ser Gln Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg

1 5 10 15

Asn Thr Gly Val Ile Ser

20

<210> 238

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 238

Ser Gln Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg

1 5 10 15

Asn Thr Gly Val Ile Ser Val Val Thr

20

25

<210> 239

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 239

Ser Val Pro Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp Glu

1 5 10

<210> 240

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 240

Thr Asp Gly Val Ile Thr Val Lys Arg Pro Leu Arg Phe His Asn Pro

1 5 10 15

Gln

<210> 241

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 241

Thr Arg Ala Glu Leu Asp Arg Glu Asp Phe Glu His Val Lys

1 5 10

<210> 242

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 242

Val Pro Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp Glu

1 5 10

<210> 243

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 243

Ala Leu Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu

1 5 10

<210> 244

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 244

Ala Leu Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu Leu

1 5 10

<210> 245

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 245

Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr

1 5 10

<210> 246

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 246

Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu

1 5 10

<210> 247

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 247

Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp

1 5 10 15

<210> 248

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 248

Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp Pro

1 5 10 15

<210> 249

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 249

Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp Pro

1 5 10 15

Ala

<210> 250

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 250

Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu Leu

1 5 10
 <210> 251
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 251
 Gly Ala Pro Val Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ser Phe Leu Ala Phe Pro
 1 5 10 15
 Thr Leu
 <210> 252
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 252
 Gly Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro
 <210> 253
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 253
 Gly Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Ala
 <210> 254
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 254
 Ile Val Asp Val His Phe Asp Pro Thr Thr Ala Phe Arg Ala Pro Asp
 1 5 10 15
 <210> 255
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 255
 Lys Val Arg Val Trp Arg Tyr Leu Lys Gly Lys Asp Leu Val Ala Arg

<210> 256

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 256

Leu Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu Leu

1 5 10

<210> 257

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 257

Ser Gly Pro Phe Leu Ala Asp Phe Asn Gly Phe Ser His

1 5 10

<210> 258

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 258

Thr Gly Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu

1 5 10 15

Trp Pro Ala

<210> 259

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 259

Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu

1 5 10

<210> 260

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 260

Val Asp Val His Phe Asp Pro Thr Thr Ala Phe Arg Ala Pro Asp

1 5 10 15

<210> 261

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 261

Val Asp Val His Phe Asp Pro Thr Thr Ala Phe Arg Ala Pro Asp Val

1 5 10 15

<210> 262

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 262

Val Arg Val Trp Arg Tyr Leu Lys Gly Lys Asp Leu Val Ala Arg

1 5 10 15

<210> 263

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 263

Ala Pro Val Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ser Phe Leu Ala Phe Pro Thr

1 5 10 15

<210> 264

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 264

Ala Pro Val Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ser Phe Leu Ala Phe Pro Thr

1 5 10 15

Leu

<210> 265

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 265

Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg

1 5 10 15

<210> 266

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 266

Asp Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro

1	5	10	15
<210> 267			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 267			
Asp Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro			
1	5	10	15
Arg			
<210> 268			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 268			
Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val			
1	5	10	
<210> 269			
<211> 14			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 269			
Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala			
1	5	10	
<210> 270			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 270			
Leu Ala Leu Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu Leu			
1	5	10	15
<210> 271			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 271			
Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala			
1	5	10	15
<210> 272			
<211> 14			

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 272

Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu

1 5 10

<210> 273

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 273

Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu

1 5 10

<210> 274

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 274

Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro

1 5 10 15

<210> 275

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 275

Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg

1 5 10 15

<210> 276

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 276

Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg

1 5 10

<210> 277

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 277

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg

1	5	10	15
<210> 278			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 278			
Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu			
1	5	10	15
<210> 279			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 279			
Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala			
1	5	10	
<210> 280			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 280			
Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg			
1	5	10	
<210> 281			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 281			
Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu			
1	5	10	15
<210> 282			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 282			
Ser Thr Glu Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys			
1	5	10	15
<210> 283			
<211> 13			
<212> PRT			

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 283

Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln

1 5 10

<210> 284

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 284

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly

1 5 10

<210> 285

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 285

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys

1 5 10 15

<210> 286

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 286

Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala

1 5 10 15

<210> 287

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 287

Val Arg Gly Ser Leu Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly

1 5 10 15

<210> 288

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 288

Val Arg Gly Ser Leu Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly

1 5 10 15

<210> 289

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 289

Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu Leu

1 5 10 15

<210> 290

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 290

Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu

1 5 10 15

<210> 291

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 291

Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu

1 5 10 15

Pro Ser

<210> 292

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 292

Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu

1 5 10 15

Pro Ser Glu

<210> 293

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 293

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp

1 5 10

<210> 294

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 294

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln

1 5 10

<210> 295

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 295

Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala

1 5 10 15

Asn Lys Glu

<210> 296

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 296

Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser

1 5 10 15

<210> 297

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 297

Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro

1 5 10 15

Pro

<210> 298

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 298

Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu

1 5 10 15

<210> 299

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 299

Ala Ser Gly Met Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Asn Phe Val His Arg

1 5 10 15

<210> 300

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 300

Ile Ala Ser Gly Met Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Asn Phe Val His Arg

1 5 10 15

<210> 301

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 301

Lys Glu Val Lys Ile Met Ser Arg Leu Lys Asp Pro Asn

1 5 10

<210> 302

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 302

Leu Asn Gln Phe Leu Ser Ala His Gln Leu Glu Asp Lys

1 5 10

<210> 303

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 303

Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Tyr Ala Arg Pro Pro

1 5 10 15

<210> 304

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 304

Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Tyr Ala Arg Pro Pro Arg

1 5 10 15

<210> 305

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 305

Ser Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Tyr Ala Arg Pro Pro

1 5 10 15

<210> 306

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 306

Ser Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Tyr Ala Arg Pro Pro

1 5 10 15

Arg

<210> 307

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 307

Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu

1 5 10 15

<210> 308

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 308

Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg

1 5 10 15

<210> 309

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 309

Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly Pro Arg

1 5 10 15

<210> 310

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 310

Asn Gln Leu Tyr Leu Phe Lys Asp Gly Lys Tyr Trp Arg Phe Ser Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 311

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 311

Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly Pro Arg

1 5 10 15

<210> 312

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 312

Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly

1 5 10 15

<210> 313

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 313

Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly Pro

1 5 10 15

<210> 314

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 314

Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly Pro

1 5 10 15

Arg

<210> 315

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 315

Val Asp Pro Arg Ser Ala Ser Glu Val Asp Arg Met Phe Pro Gly

1	5	10	15
<210> 316			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 316			
Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu Asn			
1	5	10	
<210> 317			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 317			
Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg			
1	5	10	15
Leu Asn Leu			
<210> 318			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 318			
Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu Asn			
1	5	10	15
<210> 319			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 319			
Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu Asn Leu			
1	5	10	15
Gly			
<210> 320			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 320			
Ala Thr Ser Lys Ile Pro Leu Ala Leu			
1	5		
<210> 321			

<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 321
Ile Thr Ser Ser Arg Thr Thr Ile
1 5
<210> 322
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 322
Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln
1 5
<210> 323
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 323
Thr Ala Thr Ser Pro Met Val Pro Ala Ser
1 5 10
<210> 324
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 324
Thr Thr Leu Pro Glu Ser Arg Pro Ser
1 5
<210> 325
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 325
Val Glu Leu Arg Val Leu Ala Leu Pro
1 5
<210> 326
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 326

Ala Glu Asp Asn Leu Ile His Lys Phe

1 5

<210> 327

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 327

Arg Glu Asp Leu Glu Arg Leu Gly Val

1 5

<210> 328

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 328

Asp Thr Lys Asp Pro Ala Val Thr Glu Trp

1 5 10

<210> 329

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 329

Ile Leu Ile Ser Lys Leu Leu Gly Ala

1 5

<210> 330

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 330

Ser Glu Ser Leu Arg Thr Leu Glu Phe

1 5

<210> 331

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 331

Val Leu Ala Glu Leu Val Ala Lys Leu

1 5

<210> 332

<211> 9

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 332
Ile Asn Thr Ser Ile Leu Leu Ile Phe
1 5
<210> 333
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 333
Ala Leu Gln Pro Leu Leu His Thr Val
1 5
<210> 334
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 334
Arg Leu Met Asp Asn Leu Pro Gln Leu
1 5
<210> 335
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 335
Leu Ile Ile Ser Pro Thr Arg Glu Leu
1 5
<210> 336
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 336
Ala Asp Ser Lys Val Leu Leu Phe
1 5
<210> 337
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 337
Asp Ser Leu Leu Glu Gln Ala Asn Asn Ala Ile

1	5	10
---	---	----

<210> 338
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 338
Asp Tyr Gln Gly Ile Lys Phe Val Lys Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 339
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 339
Glu Val Val Gly Tyr Phe Gly Arg Phe

1	5
---	---

<210> 340
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 340
Lys Tyr Val Lys Gly Leu Ile Ser Ile

1	5
---	---

<210> 341
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 341
Ser Ile Gly Thr Pro Leu Asp Pro Lys

1	5
---	---

<210> 342
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 342
Thr Ala Ser Asp Lys Ile Leu Ile Val

1	5
---	---

<210> 343
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 343
Gly Val Ile Lys Val Ile Ser Gly Phe
1 5
<210> 344
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 344
Lys Val Lys Leu Glu Asn Lys Leu Lys
1 5
<210> 345
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 345
Ser Ser Ser Glu Pro Val His Ala Lys
1 5
<210> 346
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 346
Ser Ser Ser Glu Pro Val His Ala Lys Lys
1 5 10
<210> 347
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 347
Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile
1 5
<210> 348
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 348
Leu Ser Asp Ile Val Ile Glu Lys Tyr
1 5

<210> 349
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 349
Ser Leu Asp Asp His Val Val Ala Val
1 5
<210> 350
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 350
Ser Gln Ile Asp Gln Gln Asn Ser Val
1 5
<210> 351
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 351
Ser Thr Ile Asp Pro Ser Gly Thr Arg Ser Lys
1 5 10
<210> 352
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 352
Val Phe Arg Asp Gln Glu Pro Lys Ile
1 5
<210> 353
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 353
Val Leu Arg Glu Lys Glu Ala Ala Leu
1 5
<210> 354
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 354

Thr Arg Leu Gln Gln Ala Gln Ala Leu

1 5

<210> 355

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 355

Val Ala Ala Pro Glu His Ile Ser Tyr

1 5

<210> 356

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 356

Asn Ser Lys Lys Lys Val Ala Leu

1 5

<210> 357

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 357

Gln Asn Ser Lys Lys Lys Val Ala Leu

1 5

<210> 358

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 358

Arg Asp Asn Thr Val His Ser Phe

1 5

<210> 359

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 359

Lys Gln Val Ser Glu Phe Met Thr Trp

1 5

<210> 360

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 360
Lys Thr Lys Pro Gln Ser Ile Gln Arg
1 5
<210> 361
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 361
Thr His Ile Glu Leu Glu Arg Leu
1 5
<210> 362
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 362
Ile Ala Pro Lys Ile Leu Gln Leu
1 5
<210> 363
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 363
Asp Ile Ala Ser Val Ser Gly Arg Trp
1 5
<210> 364
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 364
Lys Pro Lys Gln Pro Ser Lys Ser Val
1 5
<210> 365
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 365

Met Pro Ala Glu Thr Ile Lys Glu Leu

1 5

<210> 366

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 366

Ser Ala Val Lys Glu Gly Thr Ala Met

1 5

<210> 367

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 367

Glu Glu Glu Lys Leu Gln Ala Ala Phe

1 5

<210> 368

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 368

Asp Glu Phe Asn Leu Gln Lys Met

1 5

<210> 369

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 369

Asp Glu Tyr Lys Val Thr Ala Phe

1 5

<210> 370

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 370

Glu Thr Asn Ile Gly Gly Leu Asn Trp

1 5

<210> 371

<211> 9

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 371
Phe Pro Gln Thr Ala Leu Val Ser Phe
1 5
<210> 372
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 372
Gly Glu Phe Gly Lys Lys Ala Asp Gly Leu Leu
1 5 10
<210> 373
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 373
Gly Ser Met Gly Ser Phe Ser Glu Lys
1 5
<210> 374
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 374
Ile Phe Leu Ile Asp Gly Val Thr Gly Arg Ile
1 5 10
<210> 375
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 375
Ile Pro Pro Glu Val Gln Arg Ile
1 5
<210> 376
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 376
Ile Pro Tyr Ser Pro Asp Val Gln Ile

1 5
<210> 377
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 377
Gln Val Ala Pro Pro Val Leu Lys Arg
1 5
<210> 378
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 378
Thr Glu Lys Asn Val Ile Ala Ala Leu
1 5
<210> 379
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 379
Val Gly Lys Val Lys Phe Ala Ser Leu
1 5
<210> 380
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 380
Val Pro Phe Ser His Val Asn Ile
1 5
<210> 381
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 381
Val Val Tyr Gln Tyr Trp Asn Thr Lys
1 5
<210> 382
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 382
Tyr Pro Ser Lys Gln Phe Asp Val Leu
1 5
<210> 383
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 383
Ala Ala Asp Asp Ser Ala Asp Lys Val
1 5
<210> 384
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 384
His His Lys Glu Lys Gln Thr Asp Val
1 5
<210> 385
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 385
Lys Gln Thr Asp Val Ala Ala Glu Val
1 5
<210> 386
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 386
Lys Ser Ala Phe Pro Ala Gln Ser Lys
1 5
<210> 387
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 387
Asn Glu Val Val Gln Val His Ala Ala
1 5

<210> 388
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 388
Ser Glu Asp Leu Asn Lys His Val Leu
1 5
<210> 389
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 389
Gly Glu Thr Ile His Ile Pro Thr Met
1 5
<210> 390
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 390
Gly Pro Lys Leu Ala Ser Arg Ile Leu
1 5
<210> 391
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 391
Gly Val Lys Lys Pro Thr Lys Ala Leu
1 5
<210> 392
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 392
Lys Glu Lys Pro Asp Pro Asn Asn Leu
1 5
<210> 393
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 393

Lys Val Ser Glu Arg Tyr Leu Thr Met

1 5

<210> 394

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 394

Leu Pro Val Phe Asp Lys Glu Glu Leu

1 5

<210> 395

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 395

Leu Ser Lys Leu Thr Asp Ile Gln Tyr

1 5

<210> 396

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 396

Asp Leu Ser Asn Ile Ile Asn Lys Leu

1 5

<210> 397

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 397

Arg Val Trp Asp Val Glu Ser Gly Ser Leu Lys

1 5 10

<210> 398

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 398

Ser Pro Thr Thr Ser His Val Gly Ala

1 5

<210> 399

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 399
Val Glu Ile Glu Tyr Val Glu Lys Tyr
1 5
<210> 400
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 400
Val Glu Arg Asn Lys Val Lys Ala Leu
1 5
<210> 401
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 401
Arg Glu Ala Val Ser Lys Glu Asp Leu
1 5
<210> 402
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 402
Ile Met Gly Gly Asn Ser Ile Leu His Ser Ala
1 5 10
<210> 403
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 403
Lys Gln Phe Glu Gly Ser Thr Ser Phe
1 5
<210> 404
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 404

Glu Glu Phe Leu Arg Gln Glu His Phe

1 5

<210> 405

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 405

Glu Thr Ile Pro Ser Glu Ile Gln Val Phe

1 5 10

<210> 406

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 406

Glu Val Gly Glu Ala Leu Lys Thr Val Leu

1 5 10

<210> 407

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 407

Lys Leu Glu Asp Leu Glu Glu Gln Leu

1 5

<210> 408

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 408

Leu Lys Ile Gln Ser Ile Ala Leu

1 5

<210> 409

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 409

Met Asn Val Leu Thr Glu Trp Leu Ala Ala Thr

1 5 10

<210> 410

<211> 9

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 410
Ala Ile Gln Asp Lys Leu Phe Gln Val
1 5
<210> 411
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 411
Phe Pro Asn Phe Asp Lys Gln Glu Leu
1 5
<210> 412
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 412
Gly Gln Thr Lys Glu Val Leu Val Ile
1 5
<210> 413
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 413
Lys Leu Ile Glu Ser Thr Ser Thr Met
1 5
<210> 414
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 414
Lys Pro Tyr Gln Lys Val Gly Leu
1 5
<210> 415
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 415
Lys Gln Glu Ser Ile Val Leu Lys Leu

1 5
<210> 416
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 416
Asn Ala Asn Asn Arg Leu Leu Leu
1 5
<210> 417
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 417
Ser Glu Val Pro Asn Gly Lys Glu Val
1 5
<210> 418
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 418
Thr Asn Asn Ile Gly Ser Ile Ala Arg
1 5
<210> 419
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 419
Asp Ala Lys Gly Arg Thr Val Ser Leu
1 5
<210> 420
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 420
Ile Ile Lys Lys Lys Glu Asp Leu
1 5
<210> 421
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 421
Asp Val Ile Asp Val Val Gln Ala Leu
1 5
<210> 422
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 422
Glu Glu Phe Lys Ile Thr Ser Phe
1 5
<210> 423
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 423
Ser Asp Phe Glu Lys Thr Gly Phe
1 5
<210> 424
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 424
Asp Glu Asp Arg Leu Leu Val Val Phe
1 5
<210> 425
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 425
His His Ser Asn Ile Pro Met Ser Leu
1 5
<210> 426
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 426
Leu Phe Pro Ser Leu Ile Lys Asn Leu
1 5

<210> 427
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 427
Asn Thr Asn Ile Pro Ile Gly Asn Lys
1 5
<210> 428
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 428
Ser Asp Gln Val Ala Asp Leu Arg
1 5
<210> 429
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 429
Thr His Phe Ser Phe Pro Leu Arg Leu
1 5
<210> 430
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 430
Thr Tyr Asp Ser Val Thr Asp Lys Phe
1 5
<210> 431
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 431
Ala Glu Ser Leu Tyr Glu Ile Arg Phe
1 5
<210> 432
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 432

Asp Glu Phe Leu Gly Leu Thr His Thr Tyr

1 5 10

<210> 433

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 433

Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr

1 5 10

<210> 434

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 434

Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys Thr

1 5 10 15

<210> 435

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 435

Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys

1 5 10

<210> 436

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 436

Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys Thr

1 5 10

<210> 437

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 437

Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys Thr Gly Asn

1 5 10 15

<210> 438

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 438

Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys Thr Gly Asn Leu

1 5 10 15

<210> 439

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 439

Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys Thr Gly Asn Leu

1 5 10 15

Tyr

<210> 440

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 440

Leu Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys

1 5 10 15

Thr Gly Asn

<210> 441

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 441

Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys

1 5 10 15

<210> 442

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 442

Gln Pro Pro His Glu Tyr Val Pro Trp Val Thr Val Asn Gly Lys Pro

1 5 10 15

<210> 443

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 443

Ser Pro Leu Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn

1 5 10 15

Tyr Lys Thr Gly

20

<210> 444

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 444

Ser Pro Leu Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn

1 5 10 15

Tyr Lys Thr Gly Asn

20

<210> 445

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 445

Ser Pro Leu Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn

1 5 10 15

Tyr Lys Thr Gly Asn Leu Tyr

20

<210> 446

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 446

Gly Pro Pro Phe Ser Ser Ser Gln Ser Ile Pro Val Val Pro Arg

1 5 10 15

<210> 447

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 447

Leu Pro Ser Ser Leu Met Asn Asn Leu Pro Ala His Asp Met

1 5 10

<210> 448

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 448

Leu Pro Ser Ser Leu Met Asn Asn Leu Pro Ala His Asp Met Glu

1 5 10 15

<210> 449

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 449

Leu Pro Ser Ser Leu Met Asn Asn Leu Pro Ala His Asp Met Glu Leu

1 5 10 15

<210> 450

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 450

Ser Pro Ile Gly Glu Ile Gln Pro Leu Ser Pro Gln Pro Ser Ala Pro

1 5 10 15

Ile

<210> 451

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 451

Asp Glu Val Thr Gln Pro Phe Val Ile Asp Glu Lys Thr Ala Glu Ile

1 5 10 15

Arg

<210> 452

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 452

Lys Tyr Pro Glu Leu Val Leu Asp Lys Ala Leu Asp Arg Glu Glu Arg

1 5 10 15

Pro Glu

<210> 453

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 453

Val Thr Gln Pro Phe Val Ile Asp Glu Lys Thr Ala Glu Ile Arg

1 5 10 15

<210> 454

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 454

Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val Ser Pro

1 5 10 15

Asp

<210> 455

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 455

Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val Ser Pro

1 5 10 15

Asp Gly

<210> 456

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 456

Asp Lys Pro Ile Leu Ser Leu Gly Gly Lys Pro Leu Val Gly

1 5 10

<210> 457

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 457

Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val Ser

1 5 10 15

Pro Asp

<210> 458

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 458

Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val Ser

1 5 10 15

Pro Asp Gly

<210> 459

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 459

Gly Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val

1 5 10 15

Ser Pro Asp

<210> 460

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 460

Gly Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val

1 5 10 15

Ser Pro Asp Gly

20

<210> 461

<211> 11

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 461

grtvdgtvvs d 11

<210> 462

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 462

Lys Val Lys Glu Tyr Ile Leu Ser Tyr Ala Pro Ala Leu Lys Pro Phe

1 5 10 15

<210> 463

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 463

Lys Val Lys Glu Tyr Ile Leu Ser Tyr Ala Pro Ala Leu Lys Pro Phe
1 5 10 15

Gly

<210> 464

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 464

Leu Gly Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val
1 5 10 15
Val Ser Pro Asp Gly
20

<210> 465

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 465

Arg Thr His Glu Ile Lys Lys Leu Ala Ser Glu Ser Val Tyr Val
1 5 10 15

<210> 466

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 466

Val Lys Glu Tyr Ile Leu Ser Tyr Ala Pro Ala Leu Lys Pro Phe
1 5 10 15

<210> 467

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 467

Tyr Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg
1 5 10 15
Thr Pro Gln

<210> 468

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 468

Ala Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile Pro
1 5 10 15

<210> 469

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 469

Ala Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile Pro
1 5 10 15

Ala

<210> 470

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 470

Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile Pro
1 5 10 15

<210> 471

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 471

Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile Pro Ala
1 5 10 15

<210> 472

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 472

Gly Tyr Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu
1 5 10 15

Arg Thr Pro Gln
20

<210> 473

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 473

Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg
1 5 10 15

<210> 474

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 474

Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg Thr
1 5 10 15

Pro

<210> 475

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 475

Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg Thr
1 5 10 15

Pro Gln

<210> 476

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 476

Val Ala Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile
1 5 10 15

Pro Ala

<210> 477

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 477

Val Ile Ile Leu Tyr Ser Gly Asp Lys Ile Tyr Asp
1 5 10

<210> 478

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 478

Tyr Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg

1	5	10	15
<210> 479			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 479			
Lys Tyr Pro Glu Leu Val Leu Asp Lys Ala Leu Asp Arg Glu Glu Arg			
1	5	10	15
<210> 480			
<211> 12			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 480			
Gly His Leu Phe Ala Leu Arg Ser Leu Asp Tyr Glu			
1	5	10	
<210> 481			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 481			
Ala Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly			
1	5	10	15
<210> 482			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 482			
Ala Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly			
1	5	10	15
Asp			
<210> 483			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 智人(Homo sapiens)			
<400> 483			
Ala Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly			
1	5	10	15
Asp Ser			
<210> 484			

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 484

Ala Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly

1 5 10 15

Asp Ser Gly

<210> 485

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 485

Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly

1 5 10 15

<210> 486

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 486

Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly Asp

1 5 10 15

<210> 487

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 487

Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly Asp

1 5 10 15

Ser

<210> 488

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 488

Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly

1 5 10

<210> 489

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 489

Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly Asp

1 5 10 15

<210> 490

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 490

Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly Asp Ser

1 5 10 15

<210> 491

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 491

Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp

1 5 10

<210> 492

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 492

Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile

1 5 10 15

<210> 493

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 493

Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile

1 5 10 15

Asp

<210> 494

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 494

Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile
<210> 495
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 495
Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Asp
<210> 496
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 496
Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Asp Met
<210> 497
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 497
Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Asp Met Pro
20
<210> 498
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 498
Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Asp Met Pro Glu
20
<210> 499
<211> 13
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 499

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu

1 5 10

<210> 500

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 500

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val

1 5 10

<210> 501

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 501

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile

1 5 10 15

<210> 502

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 502

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile Asp

1 5 10 15

<210> 503

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 503

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile Asp

1 5 10 15

Met Pro

<210> 504

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 504

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile Asp

1	5	10	15
Met Pro Glu			
<210> 505			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 505			
Lys Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu			
1	5	10	15
Val Ile Asp			
<210> 506			
<211> 12			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 506			
Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu			
1	5	10	
<210> 507			
<211> 14			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 507			
Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile			
1	5	10	
<210> 508			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 508			
Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile Asp			
1	5	10	15
<210> 509			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 509			
Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile Asp Met			
1	5	10	15
Pro			

<210> 510

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 510

Ala Gly Asp Tyr Thr Ile Ala Asn Ala Arg Lys Leu Ile Asp Glu

1 5 10 15

<210> 511

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 511

Glu Thr Leu Glu Arg Leu Gln Glu Leu

1 5

<210> 512

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 512

Ala Asp Ile Thr Tyr Ala Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser Val Lys

1 5 10 15

<210> 513

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 513

Asp Ile Thr Tyr Ala Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser Val Lys

1 5 10

<210> 514

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 514

Lys Arg Asp Asn Tyr Gln Ile Lys Val Val Ala Ser Asp His Gly Glu

1 5 10 15

<210> 515

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 515

Lys Arg Asp Asn Tyr Gln Ile Lys Val Val Ala Ser Asp His Gly Glu

1 5 10 15

Lys

<210> 516

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 516

Arg Asp Glu Ser Phe Val Ile Asp Arg Gln Ser Gly Arg Leu Lys

1 5 10 15

<210> 517

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 517

Arg Asp Asn Tyr Gln Ile Lys Val Val Ala Ser Asp His Gly Glu

1 5 10 15

<210> 518

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 518

Ser Pro Ser Glu Leu Asp Arg Asp Pro Ala Tyr Ala Ile Val Thr

1 5 10 15

<210> 519

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 519

Thr Pro Pro Gln Phe Ser Ser Val Lys Val Ile His Val Thr Ser Pro

1 5 10 15

Gln

<210> 520

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 520

Val Pro Leu Pro Asp Ile Gln Glu Phe Pro Asn Tyr

1 5 10
<210> 521
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 521
Gly Pro Gln Leu Phe His Met Asp Pro Ser Gly Thr Phe Val Gln
1 5 10 15
<210> 522
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 522
Asp Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr Gln
1 5 10 15
Pro
<210> 523
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 523
Asp Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr Gln
1 5 10 15
Pro His
<210> 524
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 524
Asp Ser Lys Pro Leu Tyr Thr Pro Ser Ser Ser Phe Gly Val Ser
1 5 10 15
<210> 525
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 525
Ile Gln Arg Gln Val Lys Glu Ile Asn Ser Leu Gln Ser Asp Phe Thr
1 5 10 15
<210> 526

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 526

Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr

1 5 10

<210> 527

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 527

Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr Gln Pro

1 5 10 15

<210> 528

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 528

Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr Gln Pro

1 5 10 15

His

<210> 529

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 529

Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro Ile Pro

1 5 10 15

<210> 530

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 530

Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro Ile Pro

1 5 10 15

Asp

<210> 531

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 531

Ser Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro
1 5 10 15

<210> 532

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 532

Ser Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro Ile
1 5 10 15
Pro

<210> 533

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 533

Ser Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro Ile
1 5 10 15
Pro Asp

<210> 534

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 534

Asp Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Met His Pro Ser Leu Thr Arg Pro Tyr
1 5 10 15

<210> 535

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 535

Asp Val Gly Gly Ala Gly Tyr Val Val Thr Ile Ser His Thr Ile His
1 5 10 15
Ser

<210> 536

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 536

Gly Ala Gly Tyr Val Val Thr Ile Ser His Thr Ile His

1 5 10

<210> 537

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 537

Gly Ala Gly Tyr Val Val Thr Ile Ser His Thr Ile His Ser

1 5 10

<210> 538

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 538

Gly Gly Ala Gly Tyr Val Val Thr Ile Ser His Thr Ile His

1 5 10

<210> 539

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 539

Gly Gly Ala Gly Tyr Val Val Thr Ile Ser His Thr Ile His Ser

1 5 10 15

<210> 540

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 540

Val Gly Gly Ala Gly Tyr Val Val Thr Ile Ser His Thr Ile His Ser

1 5 10 15

<210> 541

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 541

Met Thr Arg Thr Phe His Asp Leu Glu Gly Asn Ala Val Lys Arg Asp

1 5 10 15

Ser Gly

<210> 542

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 542

Arg Thr Phe His Asp Leu Glu Gly Asn Ala Val Lys Arg

1 5 10

<210> 543

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 543

Arg Thr Phe His Asp Leu Glu Gly Asn Ala Val Lys Arg Asp Ser Gly

1 5 10 15

<210> 544

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 544

Ser Gly Thr Phe Phe Pro Tyr Ser Ser Asn Pro Ala Asn Pro Lys

1 5 10 15

<210> 545

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 545

Ser Gly Thr Phe Phe Pro Tyr Ser Ser Asn Pro Ala Asn Pro Lys Pro

1 5 10 15

<210> 546

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 546

Thr Arg Thr Phe His Asp Leu Glu Gly Asn Ala Val Lys Arg

1 5 10

<210> 547

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 547

Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu

1 5

<210> 548

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 548

Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu

1 5

<210> 549

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 549

Thr Tyr Ser Glu Lys Thr Thr Leu Phe

1 5

<210> 550

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 550

Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

1 5

<210> 551

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 551

Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val

1 5

<210> 552

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 552

Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu

1 5

<210> 553

<211> 10
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 553
Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe
1 5 10
<210> 554
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 554
Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe
1 5 10
<210> 555
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 555
Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val
1 5
<210> 556
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 556
Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu
1 5
<210> 557
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 557
Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu
1 5
<210> 558
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 558

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

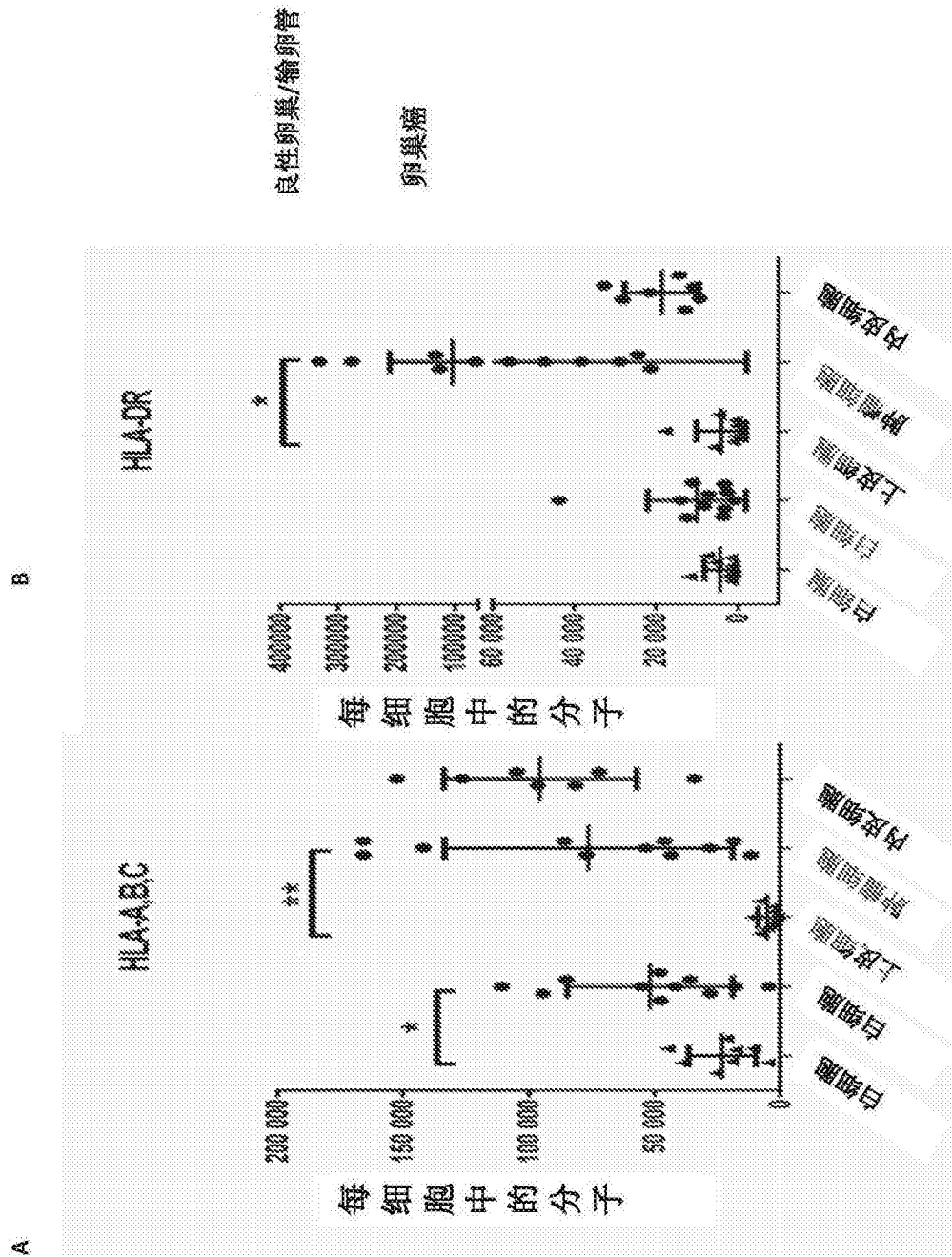


图1

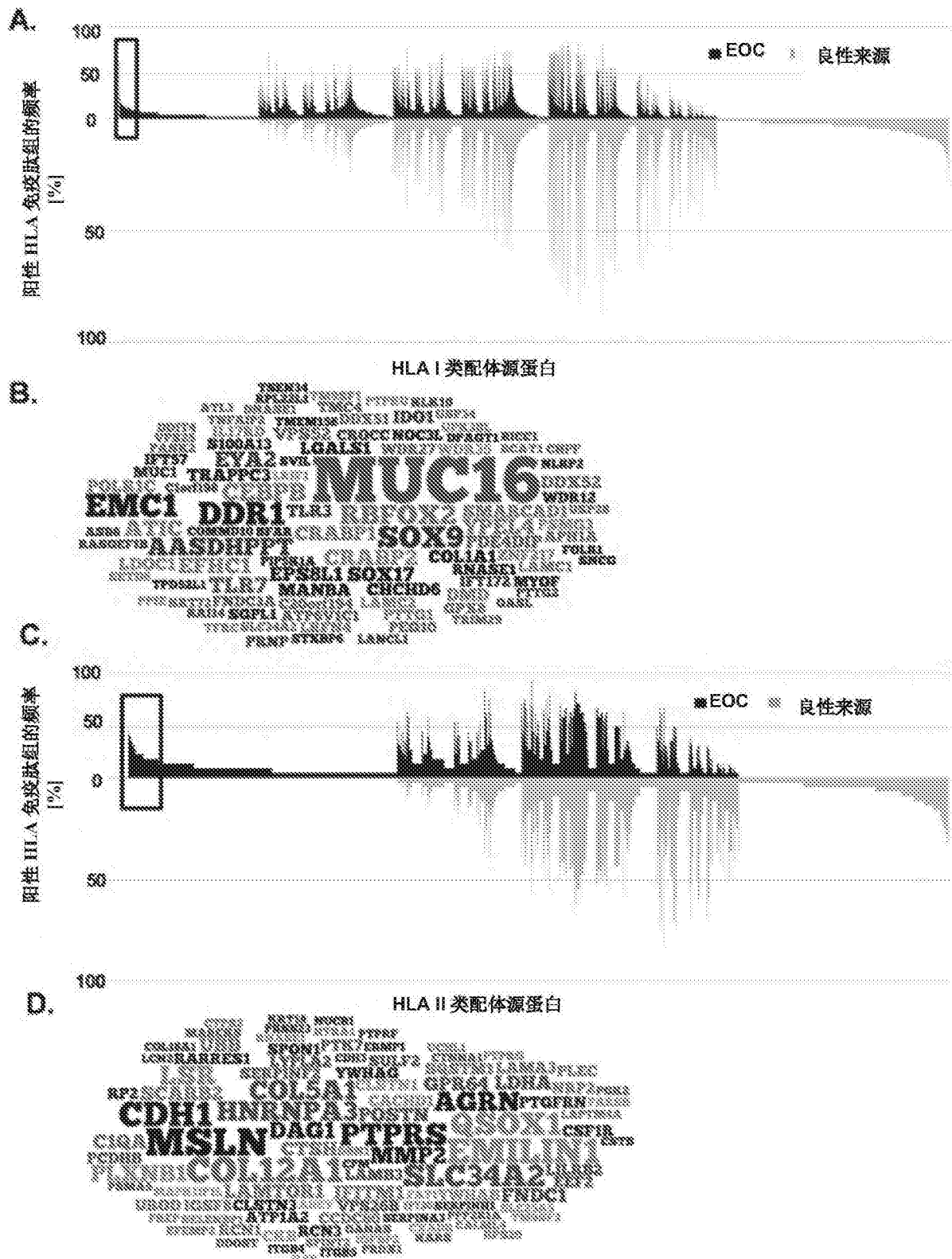


图2

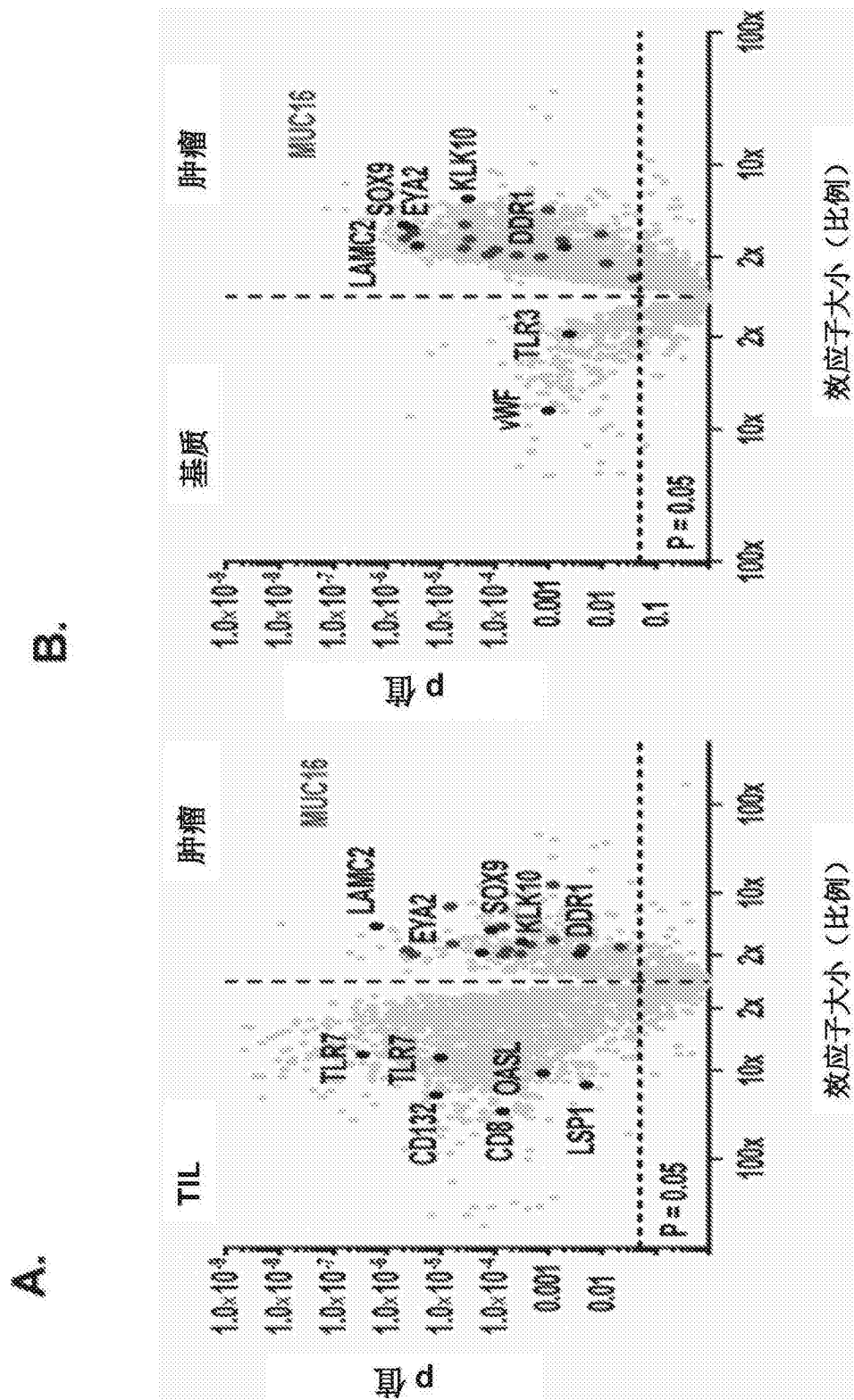


图3

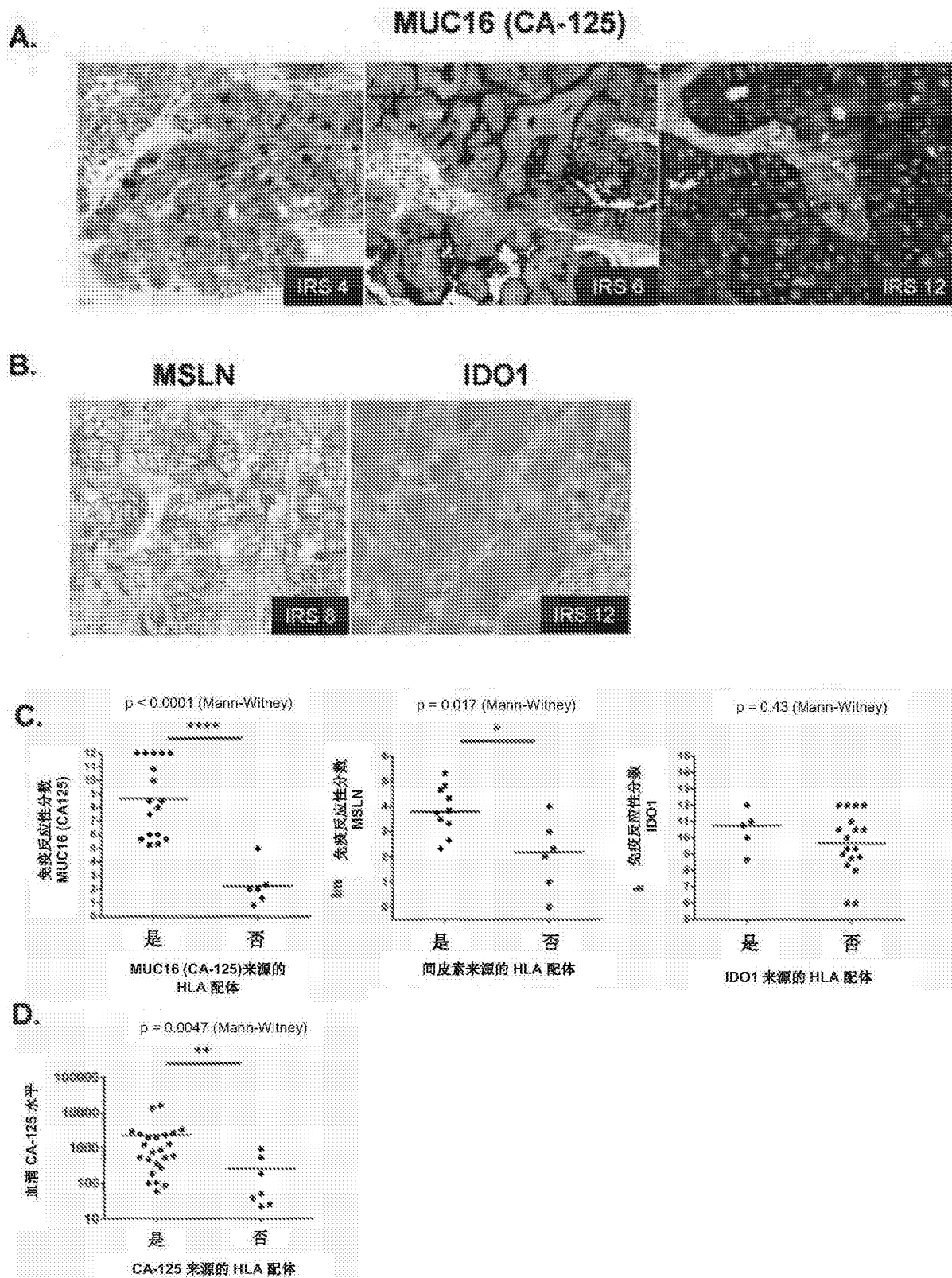


图4

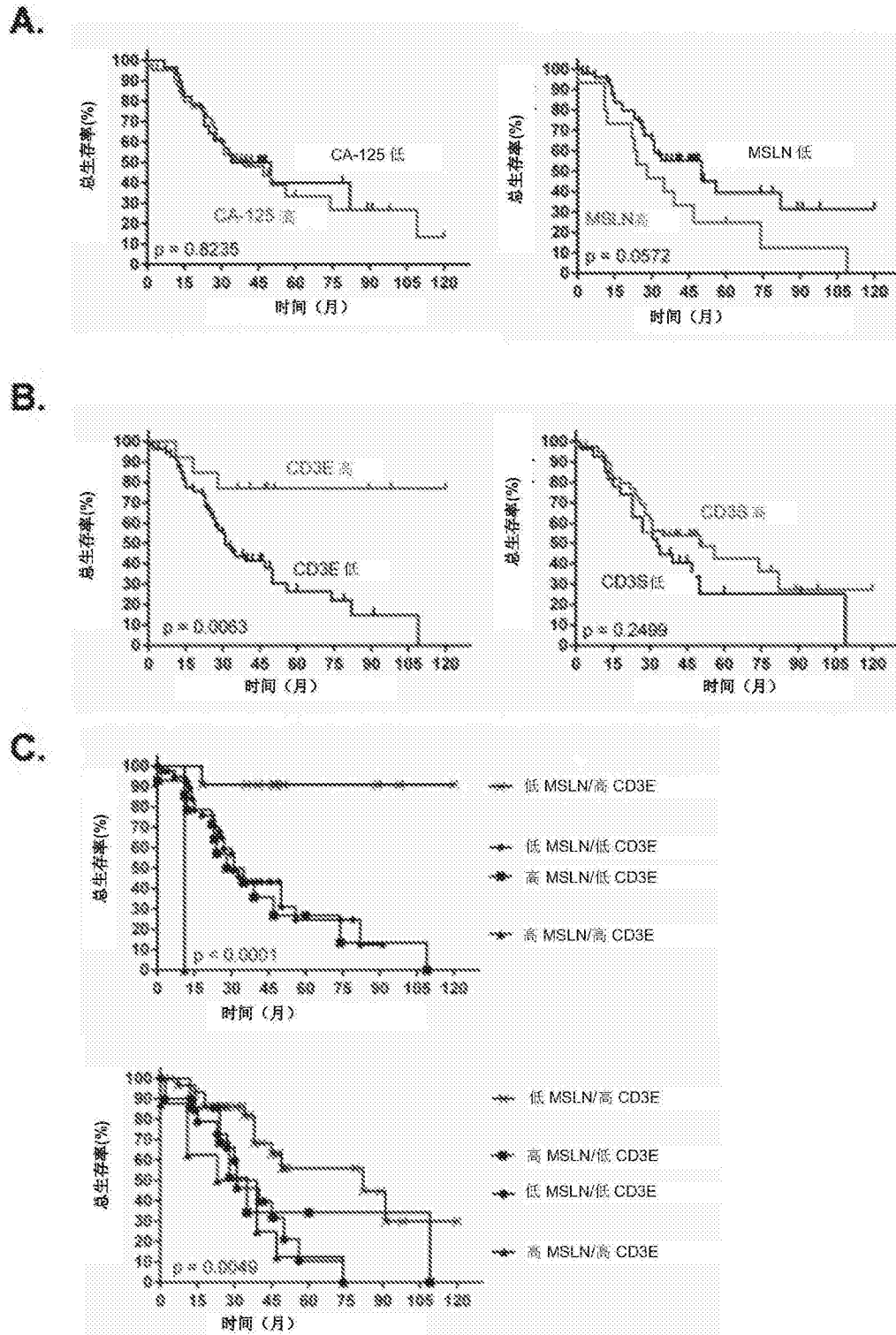


图5

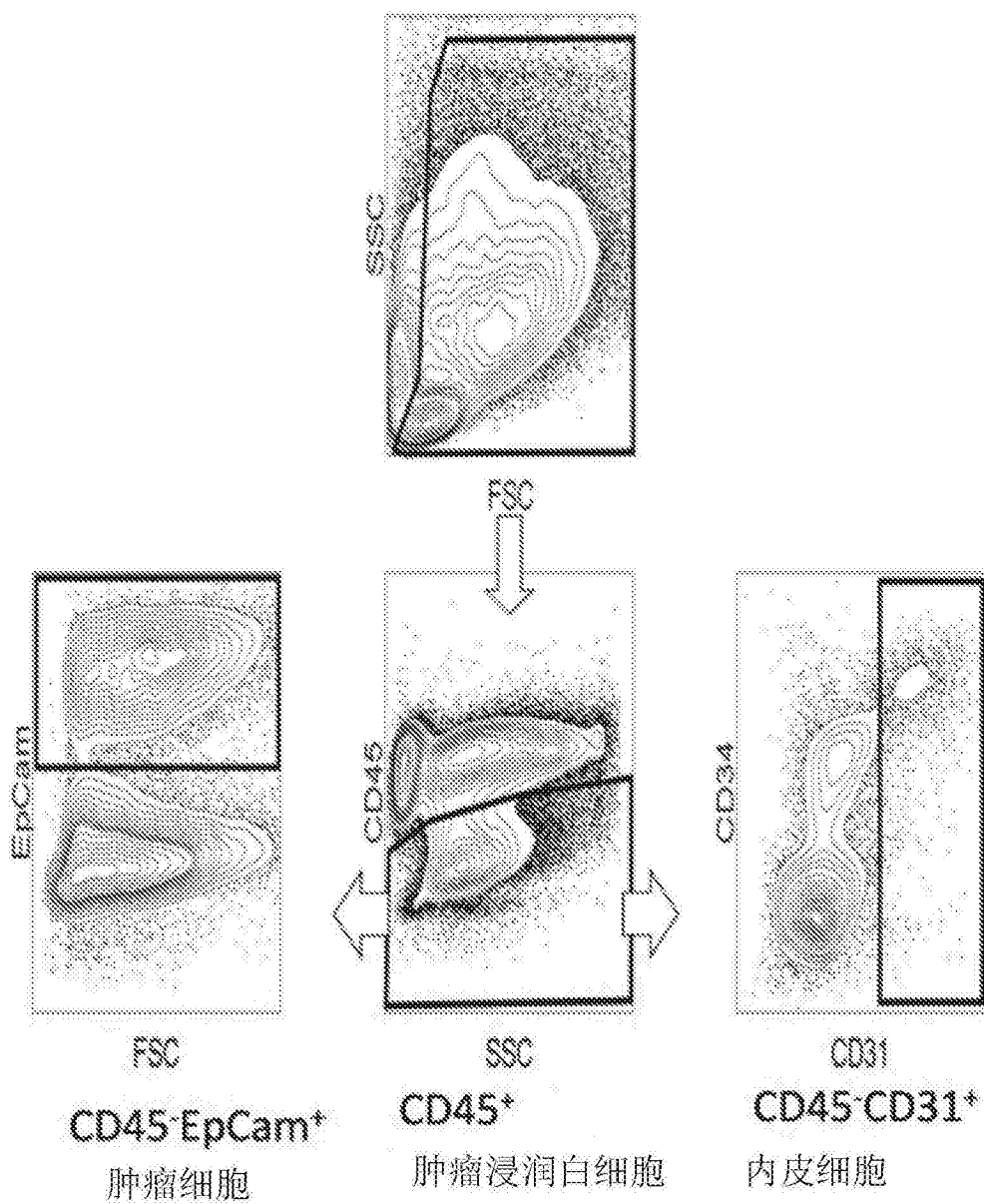


图6

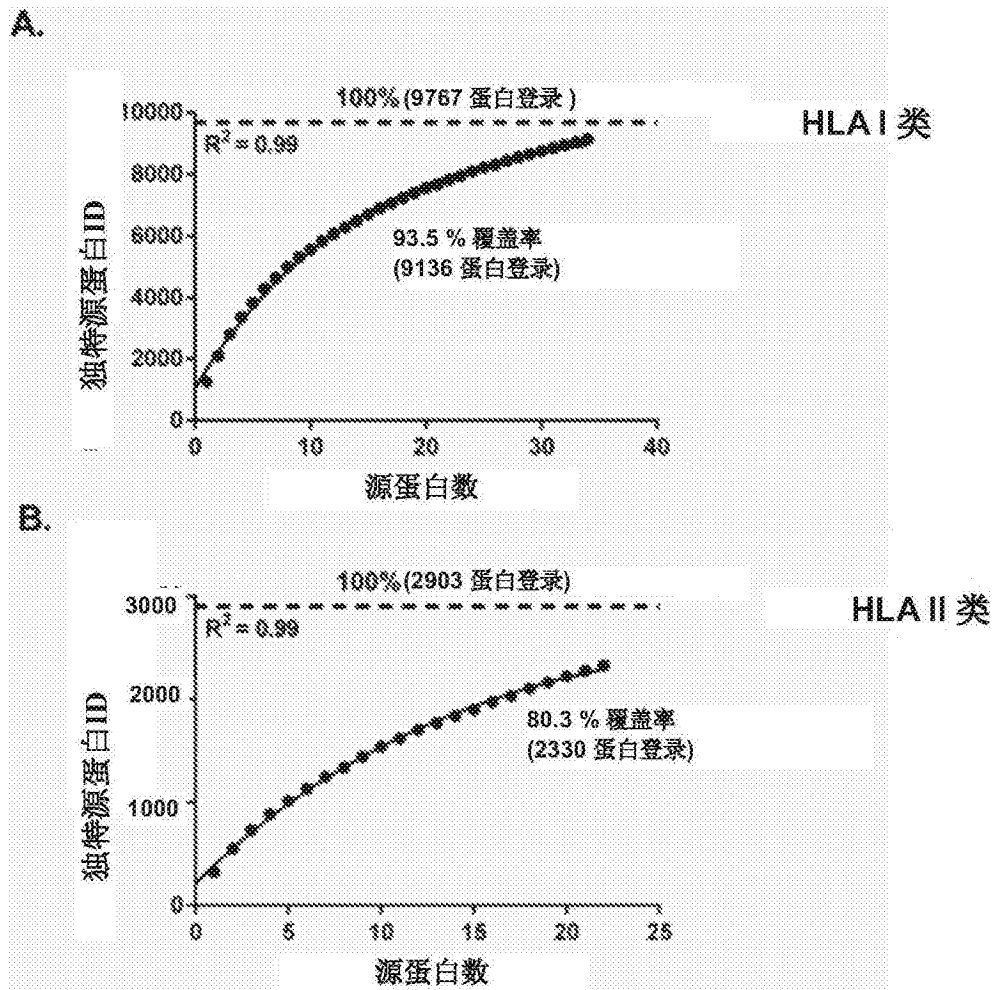


图7

