



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103339253 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201180066777. 2

(22) 申请日 2011. 11. 25

(30) 优先权数据

61/419, 181 2010. 12. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 08. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2011/006551 2011. 11. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/073459 EN 2012. 06. 07

(73) 专利权人 肿瘤疗法科学股份有限公司

地址 日本神奈川县

(72) 发明人 中村佑辅 角田卓也 大泽龙司

吉村祥子 渡边朝久 中山岳

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.

C12N 15/00(2006. 01)

A61K 38/00(2006. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/04(2006. 01)

A61P 37/04(2006. 01)

C07K 7/06(2006. 01)

C07K 16/32(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/0783(2006. 01)

C12N 5/0784(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2007/013576 A1, 2007. 02. 01, 参见对比文件 1 第 3-4 页, 第 40-41 页, 摘要部分.

W0 2003/104275 A2, 2003. 12. 18, 全文.

W0 2004/024766 A1, 2004. 03. 25, 全文.

W0 2008/126413 A1, 2008. 10. 23, 全文.

审查员 张锦广

权利要求书2页 说明书42页

序列表11页 附图2页

(54) 发明名称

TOMM34 肽及包含它们的疫苗

(57) 摘要

本发明中提供了衍生自 SEQ ID NO: 42 的结合 HLA 抗原并诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的分离的肽或片段。所述肽可包含所述氨基酸序列之一及 1 个、2 个或几个氨基酸序列的取代、缺失、或添加。本发明还提供了包含这些肽的药物组合物。本发明的肽可用于治疗癌症。

1. 一种分离的肽,其由 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列组成。
2. 一种分离的多核苷酸,其编码权利要求 1 的肽。
3. 一种用于诱导 CTL 的组合物,其中所述组合物包含权利要求 1 的肽,或者权利要求 2 的多核苷酸。
4. 一种药物组合物,其包含:
 - (a) 权利要求 1 的肽;
 - (b) 权利要求 2 的多核苷酸;
 - (c) 一种或多种在其表面上呈递有权利要求 1 的肽与 HLA 抗原的复合物的 APC 或外来体;或
 - (d) 一种或多种识别在其表面上呈递有权利要求 1 的肽与 HLA 抗原的复合物的细胞的 CTL,与药学上可接受的载体组合,配制为选自下组的目的:
 - (i) 治疗现存的癌症,
 - (ii) 预防癌症,
 - (iii) 防止癌症的手术后复发,和
 - (vi) 它们的组合。
5. 权利要求 4 的药物组合物,其配制为供施用于 HLA 抗原为 HLA-A2 的受试者。
6. 一种用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞 (APC) 的体外方法,其中所述方法包括选自下组的步骤:
 - (a) 在体外使 APC 与权利要求 1 的肽接触,和
 - (b) 将编码权利要求 1 的肽的多核苷酸导入 APC。
7. 一种用于诱导 CTL 的体外方法,其包括选自下组的步骤:
 - (a) 将 CD8 阳性 T 细胞与在其表面上呈递有 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物的 APC 共培养;
 - (b) 将 CD8 阳性 T 细胞与在其表面上呈递有 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物的外来体共培养;和
 - (c) 将编码 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸导入 T 细胞,其中由所述 TCR 亚单位多肽形成的 TCR 能够结合细胞表面上的 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物。
8. 一种分离的 APC,所述 APC 在其表面上呈递有 HLA 抗原与权利要求 1 的肽的复合物。
9. 权利要求 8 的 APC,其是通过用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞 (APC) 的体外方法诱导的,其中所述方法包括选自下组的步骤:
 - (a) 在体外使 APC 与权利要求 1 的肽接触,和
 - (b) 将编码权利要求 1 的肽的多核苷酸导入 APC。
10. 权利要求 1 的肽、或编码所述肽的多核苷酸在制备用于在有需要的受试者中诱导针对 TOMM34 表达细胞的免疫应答的组合物中的用途。
11. 一种载体,其包含编码权利要求 1 的肽的核苷酸序列。
12. 一种宿主细胞,其经过权利要求 11 的表达载体转化或转染。
13. 一种外来体,其呈递有包含权利要求 1 的肽以及 HLA 抗原的复合物。
14. 一种诊断试剂盒,其包含权利要求 1 的肽、或权利要求 2 的多核苷酸。

15. 权利要求 1 的肽、或权利要求 2 的多核苷酸在制备用于诱导 APC 的组合物中的用途。

16. 下组 (a)-(d) 中的任一项在制备用于诱导 CTL 的组合物中的用途：

- (a) 权利要求 1 的肽；
- (b) 权利要求 2 的多核苷酸；
- (c) 一种或多种权利要求 8 的 APC；和
- (d) 一种或多种权利要求 13 的外来体。

TOMM34 肽及包含它们的疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及生物科学领域,更具体的说是癌症治疗领域。具体而言,本发明涉及作为癌症疫苗极为有用的新肽,以及用于治疗 and 预防肿瘤的药物。

[0002] 优先权

[0003] 本申请要求 2010 年 12 月 2 日提交的美国临时申请 61/419,181 的权益,通过述及将其全部内容收入本文。

背景技术

[0004] 已经证明,CD8 阳性 CTL 可识别主要组织相容性复合物 (MHC) I 类分子上出现的肿瘤相关抗原 (TAA) 所衍生的表位肽,然后杀死肿瘤细胞。从 TAA 的第一个例子——黑素瘤抗原 (MAGE) 家族被发现起,人们主要通过免疫学手段 (NPL1、2) 已经发现了许多其它 TAA,并且这些 TAA 中的一些目前正在作为免疫治疗靶标接受临床开发。

[0005] 作为免疫治疗的靶标,有利的 TAA 对于癌细胞的扩增和存活而言是不可或缺的,因为使用这样的 TAA 可以最大程度的减小人们熟知的癌细胞免疫逃逸的风险。癌细胞免疫逃逸可归因于治疗驱动的免疫选择 (therapeutically driven immune selection) 而导致的 TAA 删除、突变或下调。因此,能够诱导强力且特异性的抗肿瘤免疫应答的新 TAA 的鉴定保证了进一步开发,因此针对各种类型癌症的肽疫苗接种策略的临床应用正在进行中 (NPL3-10)。迄今为止,已经有数项使用这些 TAA 衍生肽进行临床试验的报告。不幸的是,当前进行的癌症疫苗试验很多只观察到较低的客观应答率 (NPL11-13)。因此,仍然需要鉴定能作为免疫治疗靶的新 TAA。

[0006] TOMM34 基因 (GenBank Accession No. NM_006809),线粒体外膜移位酶 34,已经自人 EST 和 cDNA 数据库鉴定出来且预测编码一种含有变性 34 肽重复 (TPR) 基序的蛋白质 (NPL14)。由这种基因编码的蛋白质涉及前体蛋白输入线粒体。这种蛋白质具有伴侣蛋白样活性,结合未折叠蛋白的成熟部分并帮助它们输入线粒体 (NPL15)。

[0007] 一项最近的研究通过使用由 23040 种基因组成的 cDNA 微阵列进行的基因表达概况分析指出 TOMM34 在结肠直肠癌中频繁上调。而且,在结肠癌细胞系中通过 siRNA 敲低 TOMM34 削弱结肠癌细胞的生长 (NPL16)。

[0008] 引用表

[0009] 专利文献

[0010] [PTL1]PCT/JP2006/314947

[0011] 非专利文献

[0012] [NPL1]Boon T, Int J Cancer1993, 54(2):177-80

[0013] [NPL2]Boon T&van der Bruggen P, J Exp Med1996, 183(3):725-9

[0014] [NPL3]Harris CC, J Natl Cancer Inst1996, 88(20):1442-55

[0015] [NPL4]Butterfield LH et al., Cancer Res1999, 59(13):3134-42

[0016] [NPL5]Vissers JL et al., Cancer Res1999, 59(21):5554-9

- [0017] [NPL6]van der Burg SH et al., J Immunol1996, 156(9):3308-14
- [0018] [NPL7]Tanaka F et al., Cancer Res1997, 57(20):4465-8
- [0019] [NPL8]Fujie T et al., Int J Cancer1999, 80(2):169-72
- [0020] [NPL9]Kikuchi M et al., Int J Cancer1999, 81(3):459-66
- [0021] [NPL10]Oiso M et al., Int J Cancer1999, 81(3):387-94
- [0022] [NPL11]Belli F et al., J Clin Oncol2002, 20(20):4169-80
- [0023] [NPL12]Coulie PG et al., Immunol Rev2002, 188:33-42
- [0024] [NPL13]Rosenberg SA et al., Nat Med2004, 10(9):909-15
- [0025] [NPL14]Nuttal SD et al., DNA Cell Biol. 1997Sep;16(9):1067-74
- [0026] [NPL15]Mukhopadhyay A et al., Arch Biochem Biophys. 2002Apr1;400(1):97-104
- [0027] [NPL16]Shimokawa et al., Int J Oncol. 2006Aug;29(2):381-6

发明内容

[0028] 本发明至少部分地基于可作为免疫疗法的合适靶标的新肽的发现。由于 TAA 一般被免疫系统察觉为“自身”并因此常常没有免疫原性，适宜靶标的发现是极其重要的。如上所述，TOMM34(例如 SEQ ID NO:41 和 42, 又示于 GenBank Accession No. NM_006809) 已经被鉴定为在癌症中上调，所述癌症包括但不限于急性髓细胞性白血病 (AML)、慢性髓细胞性白血病 (CML)、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC) 和软组织肿瘤。因此，本发明聚焦于 TOMM34 作为合适的癌症标志物和免疫疗法靶标的候选者。

[0029] 本发明进行的过程中，鉴定了 TOMM34 的基因产物中具有诱导针对 TOMM34 的 CTL 的能力的特异性表位肽。如下文进一步详细讨论的，使用源自 TOMM34 的 HLA-A*0201 结合性候选肽刺激从健康供体获得的外周血单个核细胞 (PBMC)。然后建立了具有针对经每种候选肽刺激的 HLA-A2 阳性靶细胞的特异性细胞毒性的 CTL 系。本文中的结果证明这些肽是可诱导针对表达 TOMM34 的细胞的强而特异性的免疫应答的 HLA-A2 限制型表位肽。这些结果提示 TOMM34 具有强免疫原性，而且它的表位是肿瘤免疫疗法的有效靶标。

[0030] 因此，本发明的一个目的是提供分离的肽，其结合 HLA 抗原并包括 TOMM34(SEQ ID NO:42) 及其免疫学活性片段。这些肽可望具有 CTL 诱导能力，因此可以用来体外或离体诱导 CTL 或者用来施用给受试者以诱导针对癌症的免疫应答，癌症的例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。优选的那些肽是九肽或十肽，更优选地是由选自 SEQ ID NO:1-20 和 22-40 的氨基酸序列组成的九肽或十肽。在这些之中，具有选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列的肽显示特别强的 CTL 诱导能力，因此是特别优选的。

[0031] 本发明还考虑修饰的肽，它们具有 TOMM34 的免疫学活性片段的氨基酸序列，其中替换、缺失、插入或添加了一个、两个或更多个氨基酸，只要所述的修饰的肽保留所需的原始的未修饰肽的 CTL 诱导能力。在这些之中，具有 SEQ ID NO:1, 5, 31 或 32 的氨基酸序列，其中替换、缺失、插入或添加了一个、两个或更多个氨基酸的肽是尤其优选的。

[0032] 本发明还涵盖编码任何本发明的肽的分离的多核苷酸。这些多核苷酸可以用来诱

导或制备具有 CTL 诱导能力的 APC。和本发明的肽一样,这样的 APC 可以施用给受试者以诱导针对癌症的免疫应答。

[0033] 当施用给受试者时,本发明的肽被呈递在抗原呈递细胞的表面上,以诱导靶向相应肽的 CTL。因此,本发明的一个目的是提供用于诱导 CTL 的组合物或作用剂,其包括任何本发明提供的肽或者多核苷酸。这样的组合物或作用剂,包括任何肽或多核苷酸,可以用来治疗和 / 或预防癌症或防止癌症的手术后复发,所述癌症的例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤,和 / 或防止其手术后复发。

[0034] 本发明还考虑药剂或药物组合物,其包含或纳入一种或多种本发明的肽或多核苷酸,配制为用于治疗和 / 或预防癌症,尤其是原发性癌症,或者防止癌症的手术后复发。作为此处的肽或多核苷酸的取代或补充,此处的药剂或药物组合物可以包含呈递任何此处的肽的 APC 或外来体作为活性成分。

[0035] 本发明的肽或多核苷酸可以用来诱导在它们的表面上呈递 HLA 抗原与此处的肽的复合物的 APC,例如通过使来源于受试者的 APC 与所述肽接触或者将编码本发明的肽的多核苷酸导入 APC 中。这样的 APC 具有针对靶肽的高的 CTL 诱导能力并且能够用于癌症免疫治疗。因此,本发明涵盖用于诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 的方法,以及通过此类方法获得的 APC。

[0036] 本发明的另一个目标是提供用于诱导 CTL 的方法,此类方法包括将 CD8 阳性细胞与在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体共培养的步骤,或者导入编码 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的一种或多种多核苷酸的步骤,其中通过这样的亚单位多肽形成的 TCR 能够结合细胞表面上的 HLA 抗原与此处的肽的复合物。通过此类方法获得的 CTL 可以用来治疗和预防癌症,癌症的例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。

[0037] 本发明的还有一个目的是提供分离的 APC,其在表面上呈递有 HLA 抗原与本发明的抗体的复合物。本发明还提供靶向本发明的肽的分离的 CTL。这些 APC 和 CTL 可以用于癌症免疫治疗。

[0038] 本发明还有一个目的是提供用于在有需要的受试者体内诱导针对癌症的免疫应答的方法,所述方法包括施用包括一种或多种本发明的肽编码本发明的肽的多核苷酸、或呈递本发明的肽的 APC 或外来体的组合物或作用剂的步骤。

[0039] 本发明的应用延及多种与 TOMM34 过表达相关,或者源于 TOMM34 过表达的疾病中的任何一种,诸如癌症,癌症的例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。

[0040] 更具体而言,本发明涉及下述的 [1]-[20] :

[0041] [1] 下述 (a) 或 (b) 的分离的肽 :

[0042] (a) 分离的肽,其包含选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列 ;

[0043] (b) 分离的肽,其包含对选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列取代、缺失、插入或添加 1 个、2 个或几个氨基酸的氨基酸序列,从而产生保留结合 HLA 抗原和诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 诱导能力的修饰肽 ;

[0044] [2] [1] 的分离的肽,其中所述 HLA 抗原是 HLA-A2 ;

- [0045] [3][1] 或 [2] 的分离的肽,其中所述肽是九肽或十肽;
- [0046] [4][1]-[3] 中任一项的肽,其具有选自下组的至少一种取代:
- [0047] (a) 自 N 端起的第二个氨基酸为或被修饰为选自亮氨酸和甲硫氨酸的氨基酸;和
- [0048] (b) C 末端氨基酸为或被修饰为选自缬氨酸和亮氨酸的氨基酸;
- [0049] [5] 一种分离的多核苷酸,其编码 [1]-[4] 中任一项的肽;
- [0050] [6] 一种用于诱导 CTL 的组合物,其中所述组合物包含一种或多种 [1]-[4] 中任一项的肽,或者一种或多种 [5] 的多核苷酸;
- [0051] [7] 一种药物组合物,其包含:
- [0052] (a) 一种或多种 [1]-[4] 中任一项的肽,
- [0053] (b) 一种或多种 [5] 的多核苷酸;
- [0054] (c) 一种或多种在其表面上呈递有 [1]-[4] 中任一项的肽与 HLA 的复合物的 APC 或外来体;或
- [0055] (d) 一种或多种识别在其表面上呈递有 [1]-[4] 中任一项的肽与 HLA 的复合物的细胞的 CTL,
- [0056] 与药学上可接受的载体组合,配制为选自下组的目的:
- [0057] (i) 治疗现存的癌症,
- [0058] (ii) 预防癌症,
- [0059] (iii) 防止癌症的手术后复发,和
- [0060] (vi) 它们的组合;
- [0061] [8][7] 的药物组合物,其配制为供施用于 HLA 抗原为 HLA-A2 的受试者;
- [0062] [9] 一种用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞 (APC) 的方法,其包括选自下组的步骤:
- [0063] (a) 在体外、离体或在体内使 APC 与 [1]-[4] 中任一项的肽接触,和
- [0064] (b) 将编码 [1]-[4] 中任一项的肽的多核苷酸导入 APC;
- [0065] [10] 一种用于诱导 CTL 的方法,包含选自下组的步骤:
- [0066] (a) 将 CD8 阳性 T 细胞与在表面上呈递有 HLA 抗原与 [1]-[4] 中任一项的肽的复合物的 APC 共培养;
- [0067] (b) 将 CD8 阳性 T 细胞与在表面上呈递有 HLA 抗原与 [1]-[4] 中任一项的肽的复合物的外来体共培养;和
- [0068] (c) 将编码 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸导入 T 细胞,其中由所述 TCR 亚单位多肽形成的 TCR 能够结合细胞表面上的 HLA 抗原与 [1]-[4] 中任一项的肽的复合物;
- [0069] [11] 一种分离的 APC,所述 APC 在其表面上呈递有 HLA 抗原与 [1]-[4] 中任一项的肽的复合物;
- [0070] [12][11] 的 APC,其是通过用于诱导具有 CTL 诱导能力的抗原呈递细胞 (APC) 的方法诱导的,其中所述方法包含选自下组的步骤:
- [0071] (a) 在体外、离体或在体内使 APC 与 [1]-[4] 中任一项的肽接触,和
- [0072] (b) 将编码 [1]-[4] 中任一项的肽的多核苷酸导入 APC;
- [0073] [13] 一种分离的 CTL,其靶向 [1]-[4] 中任一项的肽;

[0074] [14] [13] 的 CTL,其是通过用于诱导 CTL 的方法诱导的,其中所述方法包含选自下组的步骤:

[0075] (a) 将 CD8 阳性 T 细胞与在表面上呈递有 HLA 抗原与 [1]-[4] 中任一项的肽的复合物的 APC 共培养;

[0076] (b) 将 CD8 阳性 T 细胞与在表面上呈递有 HLA 抗原与 [1]-[4] 中任一项的肽的复合物的外来体共培养;和

[0077] (c) 将包含编码 T 细胞受体 (TCR) 亚单位多肽的多核苷酸导入 T 细胞,其中由所述 TCR 亚单位多肽形成的 TCR 能够结合细胞表面上的 HLA 抗原与 [1]-[4] 中任一项的肽的复合物;

[0078] [15] 一种在受试者中诱导针对癌症的免疫应答的方法,所述方法包括对受试者施用 [1]-[4] 中的肽或其免疫学活性片段、或编码所述肽或所述片段的多核苷酸的步骤;

[0079] [16] 一种载体,其包含编码 [1]-[4] 中任一项的肽的核苷酸序列;

[0080] [17] 一种宿主细胞,其经过 [16] 的表达载体转化或转染;

[0081] [18] 一种外来体,其呈递有包含 [1]-[4] 中任一项的肽以及 HLA 抗原的复合物;

[0082] [19] 针对 [1]-[4] 中任一项的肽的抗体,或其免疫学活性片段;和

[0083] [20] 一种诊断试剂盒,其包含 [1]-[4] 中任一项的肽、[5] 的多核苷酸、或 [19] 的抗体或免疫学活性片段。

[0084] 在联系附图和实施例阅读下面的详细说明时,本发明的目的和特征将变得更加显而易见。应当理解,前面的发明概要和后面的详细说明都仅仅提出了示例性的实施方案,并不对本发明或本发明的其它可替换实施方案构成限制。尤其是,虽然在本文中就若干具体的实施方案对本发明进行了说明,应当理解这些描述对本发明而言是示例说明性的,不解释成对本发明的限制。在不背离如随附的权利要求所描述的本发明的精神和范围的前提下本领域技术人员将容易地想到本发明的多种修改和应用。类似地,本发明的其它目的、特征、好处和优势是从此处的概要和下文描述的特定实施方案可以容易地想到的,并且是本领域技术人员可以显见的。根据上文的内容并结合随附的实施例、数据、附图以及从中能够合理推断的内容,或者进一步考虑本文中引用的参考文献,这样的目的、特征、好处和优势是容易想到的。

[0085] 附图简述

[0086] 本领域技术人员在考虑了下文的附图简要说明及对本发明及其优选实施方案的详细说明后将清楚地得知本发明的各个方面的应用。

[0087] [图 1] 图 1 由一组照片 (a)-(e) 组成,描绘显示对用源自 TOMM34 的肽诱导的 CTL 进行的干扰素 (IFN)- γ 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定法的结果。在用 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) (a) 刺激的 4 号孔、用 TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO:5) (b) 刺激的 2 号孔、用 TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO:31) (c) 刺激的 4 号孔、和用 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO:32) (d) 刺激的 2 号孔中的 CTL 分别与对照相比分别显示了强的 IFN- γ 生成。这些图片上孔上的方框表示来自相应孔中的细胞被扩增以建立 CTL 系。对比地,作为典型的阴性数据,用 TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO:21) (e) 刺激的 CTL 未显示特异性 IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经适宜肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽冲激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0088] [图 2] 图 2 是一幅线图,描绘用 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) 刺激的 CTL 系的 IFN- γ 生成。CTL 生成的 IFN- γ 的数量通过 IFN- γ 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 来测量。结果显示用这种肽刺激而建立的 CTL 系与对照相比显示了强的 IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0089] [图 3] 图 3 是一幅线图,描绘从用 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) 刺激的 CTL 系通过有限稀释而建立的 CTL 克隆的 IFN- γ 的生成。结果证明了通过用这种肽刺激而建立的 CTL 克隆显示与对照相比强的 IFN- γ 生成。在图中,“+”指示针对经适宜肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成,而“-”指示针对未经任何肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。

[0090] [图 4] 图 4 是描绘针对外源表达 TOMM34 和 HLA-A*0201 的靶细胞的特异性 CTL 活性的线图。制备用 HLA-A*0201 或用全长 TOMM34 基因转染的 COS7 细胞作为对照。用 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) 建立的 CTL 系显示针对用 TOMM34 和 HLA-A*0201 二者转染的 COS7 细胞的特异性 CTL 活性(黑色菱形)。另一方面,没有检测到显著的针对表达 HLA-A*0201 (三角形) 或 TOMM34 (圆形) 任一靶细胞的特异性 CTL 活性。

[0091] 实施方案的描述

[0092] 现在描述优选的材料、装置、和方法,不过在实施或检验本发明的实施方案时可使用与本文中描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料。然而,在描述本发明材料和方法之前,要理解这些描述只是说明性的,并不意图限定。还要理解的是,本发明不限于特定大小、性状、尺度、材料、方法学、方案等,因为它们可因循例行实验和 / 或优化而变化。还要理解,所述描述中使用的术语只是出于描述特定样式或实施方案的目的,而非意图限制本发明的范围,本发明的范围只会由所附权利要求来限制。

[0093] 通过提述明确地将本说明书中提到的所有出版物、专利或专利申请的公开文本完整收入本文。然而,本文中无一处可解释为承认本发明没有资格凭借发明在先而早于此类公开文本。

[0094] I. 定义

[0095] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语均具有本发明相关领域的技术人员通常知晓的意义。如果有冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0096] 此外,材料、方法和实例仅为举例说明而不构成限制。

[0097] 如本文中使用的,词语“一个 / 种”、“该”、“和”、“所述”意味着“至少一个 / 种”,除非另有明确说明。

[0098] 与物质(例如肽、抗体、多核苷酸等)联用的术语“分离的”和“纯化的”表示该物质基本上不含至少一种可能包括于天然来源中的其他物质。因此,分离的或纯化的肽指这样的肽,其基本上不含来自该肽所来源的细胞或组织的细胞物质例如碳水化合物、脂质或其他污染性蛋白,或当其为化学合成时,基本上不含化学前体或其他化学品的抗体。术语“基本上不含细胞物质”包括其中肽与来自其被分离或重组产生的细胞的细胞组分相分离的肽制备物。因此,基本上不含细胞物质的肽包括具有少于约 30%、20%、10% 或 5% (按干重计) 的异源蛋白质(在此也称为“污染蛋白质”)的多肽制备物。当肽系重组产生时,其还优选基本上不含培养基,包括含有少于约 20%、10% 或 5% 肽制备物体积的培养基的肽制备物。当多通过化学合成产生时,其优选基本上不含化学前体或其他化学品,包括具有少于约 30%、20%、

10%、5%（按干重计）的与肽合成有关的化学前体或其他化学药品的肽制备物。特定肽制备物含有分离的或纯化的肽可以通过，例如在蛋白质制备物的十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳及凝胶的考马斯亮蓝染色等之后单一条带的出现来显示。在一个优选的实施方案中，本发明的肽和多核苷酸是分离的或纯化的。

[0099] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是经过修饰的残基或非天然存在型残基（诸如相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物）的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物。

[0100] 本说明书中有时使用的术语“寡肽”用于指长度为 20 个残基或更少，典型地为 15 个残基或更少的本发明的肽，通常由约 8 个 - 约 11 个残基，经常为 9 个或 10 个残基组成。

[0101] 如本文中使用的，术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸，以及具有与天然存在的氨基酸相似的功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。氨基酸可以是 L-氨基酸或 D-氨基酸。天然存在的氨基酸指由遗传密码编码的氨基酸，以及在细胞中在翻译后被修饰的氨基酸（例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、和 O-磷酸丝氨酸）。短语“氨基酸类似物”指与天然存在型氨基酸具有相同的基础化学结构（ α 碳与氢、羧基、氨基、和 R 基团结合）但具有经过修饰的 R 基团或经过修饰的主链的化合物（例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷）。短语“氨基酸模拟物”指与具有与一般氨基酸不同的结构但发挥与一般氨基酸相似的功能的化学化合物。

[0102] 氨基酸在本文中可以通过它们公知的三字母符号或 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。

[0103] 术语“基因”、“多核苷酸”和“核酸”在本文中除非另有明确说明可互换使用，而且与氨基酸类似地通过它们普遍接受的单字母代码来指称。

[0104] 本文中所用的术语“组合物”意图涵盖包含规定量的规定成分的产品，以及通过所述规定量的规定成分的组合直接或间接地得到的任何产品。该术语与“药物组合物”相关时，意在涵盖：包括活性成分以及任何组成载体的惰性成分的产品，以及通过所述任何两种或更多种成分的组合、复合或聚集，或通过一种或多种组分的解离，或通过一种或多种成分的其他类型的反应或相互作用而直接或间接地得到的任何产品。相应地，在本发明的语境中，术语“药物组合物”指任何通过混合本发明的化合物或物质与药学或生理学上可接受的载体而制成的产品。本文中所用的短语“药学上可接受的载体”或“生理学上可接受的载体”意思是药学上或生理学上可接受的材料、组合物、物质、化合物或媒介，包括但不限于担载或运输主题的支架多聚药效团从一个器官或身体部分到另一个器官或身体部分所涉及的液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包埋材料。

[0105] 术语“活性成分”在本文中意指组合物中具有生物学活性或生理学活性的物质。尤其是，在药物组合物的语境中，术语“活性成分”是指显示客观的药理学效果的物质。例如，在用于治疗或预防癌症的药物组合物的场合，组合物中的活性成分可直接或间接地导致对于癌细胞和 / 或组织的至少一种生物学或生理学作用。优选地，这样的作用可包括减少或抑制癌细胞生长、破坏或杀死癌细胞和 / 或癌组织，等等。典型地，活性成分的间接效果包括诱导可识别或杀死癌细胞的 CTL。在配制之前，“活性成分”又可称“原料药”（bulk）、“药物物质”（drug substance）或“技术产品”（technical product）。

[0106] 除非另有定义,术语“癌症”指过表达 TOMM34 基因的癌症,过表达 TOMM34 的癌症的实例包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。

[0107] 除非另有定义,术语“细胞毒性 T 淋巴细胞”、“细胞毒性 T 细胞”和“CTL”在本文中可互换使用,而且除非另有明确说明,指能够识别非自身细胞(例如肿瘤细胞、病毒感染的细胞)并诱导此类细胞死亡的 T 淋巴细胞亚群。

[0108] 除非另有定义,术语“HLA-A2”指包含亚型的 HLA-A2 类型,其例子包括但不限于 HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 和 HLA-A*0250。

[0109] 除非另有定义,如本文中所用的术语“试剂盒”是指试剂及其他材料的组合。考虑术语“试剂盒”可包括微阵列、芯片、标记物、等等。术语“试剂盒”不意图限于某种特定的试剂和 / 或材料组合。

[0110] 如本文中使用的,在受试者或者患者的语境中,短语“受试者(或患者)的 HLA 抗原是 HLA-A2”是指受试者或患者纯合地或者杂合地拥有 HLA-A2 抗原基因作为 MHC(主要组织相容性复合物)I 类分子,且 HLA-A2 抗原在受试者或患者的细胞中作为 HLA 抗原表达。

[0111] 以本发明的方法和组合物在“治疗”癌症的语境中为限,如果治疗导致临床上的收益,例如受试者体内 TOMM34 基因表达的减少、或者癌症的尺寸、普遍性(prevalence)或转移潜力的降低,则认为治疗是“有效的”。当预防性地进行治疗时,“有效的”意思是其阻碍或阻止癌症的形成,或者阻止或减轻癌症的临床症状。“有效性”结合用于诊断或治疗特定肿瘤类型的任何已知方法来确定。

[0112] 以本发明的材料和方法可用于“预防”和“防范”癌症的语境为限,此类术语在本文中可互换使用,指降低缘于疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,而二级和三级水平的预防和防范涵盖旨在预防和防范疾病的进展与症状的出现、以及通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来降低已建立的疾病的负面影响的的活动。或者,预防和防范可包括旨在减轻特定病症的严重性(例如降低肿瘤的增殖和转移等)的多种多样的预防性疗法。

[0113] 在本发明的语境中,治疗和 / 或预防癌症和 / 或预防其手术后复发包括任何下述步骤,诸如手术去除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和阻抑癌症发生、及降低或抑制转移。癌症的有效治疗和 / 或预防可降低患癌个体死亡率及改善其预后,降低其血液中肿瘤标志物的水平,及减轻其伴随癌症的可检测症状。例如,症状的减轻或改善构成有效治疗和 / 或预防,包括 10%、20%、30% 或更多降低,或实现病情稳定。

[0114] 在本发明的语境中,术语“抗体”指可以与指定的蛋白或其肽具有特异性反应性的免疫球蛋白及其片段。抗体可以包括人抗体、灵长源化(primatized)抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、人源化抗体、与其它蛋白或放射性标记物融合的抗体、和抗体片段。另外,在本文中,抗体以最广义使用,具体涵盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们展现期望的生物学活性。“抗体”指示所有类别(例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM)。

[0115] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的普

通技术人员所知晓的相同涵义。

[0116] II. 肽

[0117] 下文详述的本发明的肽可称为 TOMM34 肽。

[0118] 为了证明源自 TOMM34 的肽发挥被 CTL 所识别的抗原的功能,对源自 TOMM34 (SEQ ID NO:42) 的肽进行了分析以确定它们是否为 HLA-A2 限制性的抗原表位,HLA-A2 是经常遇到的 HLA 等位基因 (Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994)。基于有关它们对 HLA-A2 的结合亲和力的信息,鉴定了源自 TOMM34 的 HLA-A2 结合肽的候选者。鉴定出了下列候选肽:

- [0119] TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1),
- [0120] TOMM34-A02-9-77 (SEQ ID NO:2),
- [0121] TOMM34-A02-9-52 (SEQ ID NO:3),
- [0122] TOMM34-A02-9-110 (SEQ ID NO:4),
- [0123] TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO:5),
- [0124] TOMM34-A02-9-230 (SEQ ID NO:6),
- [0125] TOMM34-A02-9-103 (SEQ ID NO:7),
- [0126] TOMM34-A02-9-80 (SEQ ID NO:8),
- [0127] TOMM34-A02-9-255 (SEQ ID NO:9),
- [0128] TOMM34-A02-9-23 (SEQ ID NO:10),
- [0129] TOMM34-A02-9-195 (SEQ ID NO:11),
- [0130] TOMM34-A02-9-111 (SEQ ID NO:12),
- [0131] TOMM34-A02-9-238 (SEQ ID NO:13),
- [0132] TOMM34-A02-9-1 (SEQ ID NO:14),
- [0133] TOMM34-A02-9-113 (SEQ ID NO:15),
- [0134] TOMM34-A02-9-253 (SEQ ID NO:16),
- [0135] TOMM34-A02-9-239 (SEQ ID NO:17),
- [0136] TOMM34-A02-9-144 (SEQ ID NO:18),
- [0137] TOMM34-A02-9-142 (SEQ ID NO:19),
- [0138] TOMM34-A02-9-279 (SEQ ID NO:20),
- [0139] TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO:21),
- [0140] TOMM34-A02-10-97 (SEQ ID NO:22),
- [0141] TOMM34-A02-10-79 (SEQ ID NO:23),
- [0142] TOMM34-A02-10-237 (SEQ ID NO:24),
- [0143] TOMM34-A02-10-135 (SEQ ID NO:25),
- [0144] TOMM34-A02-10-219 (SEQ ID NO:26),
- [0145] TOMM34-A02-10-238 (SEQ ID NO:27),
- [0146] TOMM34-A02-10-127 (SEQ ID NO:28),
- [0147] TOMM34-A02-10-113 (SEQ ID NO:29),
- [0148] TOMM34-A02-10-241 (SEQ ID NO:30),

[0149] TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO:31),
[0150] TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO:32),
[0151] TOMM34-A02-10-195 (SEQ ID NO:33),
[0152] TOMM34-A02-10-112 (SEQ ID NO:34),
[0153] TOMM34-A02-10-194 (SEQ ID NO:35)
[0154] TOMM34-A02-10-299 (SEQ ID NO:36)
[0155] TOMM34-A02-10-141 (SEQ ID NO:37)
[0156] TOMM34-A02-10-160 (SEQ ID NO:38)
[0157] TOMM34-A02-10-175 (SEQ ID NO:39) 和
[0158] TOMM34-A02-10-186 (SEQ ID NO:40)。

[0159] 此外,用经过这些肽加载了的树突细胞 (DC) 体外刺激 T 细胞后,通过使用下述每一种肽成功地建立了 CTL:

[0160] TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1),
[0161] TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO:5),
[0162] TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO:31) 和
[0163] TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO:32)。

[0164] 这些建立的 CTL 针对经相应肽冲激的靶细胞显示强且特异性的 CTL 活性。这些结果证明 TOMM34 是被 CTL 识别的抗原,且这些被测试的肽是 TOMM34 的受 HLA-A2 限制的表位肽。

[0165] 由于 TOMM34 基因在大多数癌细胞和组织,包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤的细胞和组织中过表达,而在大多数正常器官中不表达,它是良好的免疫治疗靶标。因此,本发明提供来源于 TOMM34 的被 CTL 识别的表位的九肽(由九个氨基酸残基组成的肽)和十肽(由十个氨基酸残基组成的肽)。或者,本发明提供结合 HLA 抗原且诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的分离的肽,其中所述肽具有 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列或者是其免疫学活性片段。具体地,本发明提供包含选自 SEQ ID NOs:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列的肽。更具体地,在一些实施方案中,本发明提供由选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列组成的肽。

[0166] 一般而言,目前可以通过例如互联网访问的软件程序,如 Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1):163-75 等中描述的那些,可以用来在计算机上计算不同肽与 HLA 抗原之间的结合亲和力。与 HLA 抗原的结合亲和力可以按照例如下列文献中描述的那样进行测定:Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1):163-75 和 Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6):1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007; 8:424, 和 Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003。用于测定结合亲和力的方法在例如 Journal of Immunological Methods, 1995, 185:181-190; 和 Protein Science 2000, 9:1838-1846 中有描述。因而可以容易地利用这样的软件程序来选择具有高度的 HLA 抗原结合亲和力的源自 TOMM34 的片段。因此,本发明涵盖由任何通过这些已知程序被确定为与 HLA 抗原结合的 TOMM34 片段构成的肽。此外,这样的肽可包括 TOMM34 的全长序列 (SEQ ID NO:42)。

[0167] 本发明的肽,尤其是本发明的九肽和十肽,在其侧翼可以具有额外的氨基酸残基,

只要该肽保持其 CTL 诱导能力即可。具体的额外氨基酸残基可以由任何种类的氨基酸构成,只要其不损害原来的肽的 CTL 诱导能力。因此,本发明涵盖具有对 HLA 抗原的结合亲和力的肽,尤其包括源自 TOMM34 的肽。这样的肽例如少于约 40 个氨基酸,经常少于约 20 个氨基酸,通常少于约 15、14、13、12、11、或 10 个氨基酸。

[0168] 一般而言,已知肽中一个或多个氨基酸的修饰不影响肽的功能,或者在有些情况下甚至会增强原蛋白质的期望功能。事实上,已知有经过修饰的肽(即由与原始参照序列相比其中修饰(即由通过对原参考序列取代、缺失、插入、或添加一个、两个或数个氨基酸残基而修饰的氨基酸序列构成的肽)保留原始肽的生物学活性(Mark et al.,Proc Natl Acad Sci USA1984,81:5662-6;Zoller and Smith,Nucleic Acids Res1982,10:6487-500;Dalbadié-McFarland et al.,Proc Natl Acad Sci USA1982,79:6409-13)。因此,根据本发明的一个实施方案,本发明的具有 CTL 诱导能力的肽可以由这样的肽构成,所述由选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列组成,其中添加、缺失、插入、和 / 或取代了一个、两个或甚至更多个氨基酸。

[0169] 本领域技术人员会认识到,改变全体氨基酸序列中的单个氨基酸或少数百分比氨基酸的个别修饰(即缺失、插入、添加或取代)导致原始氨基酸侧链的特性得以保留;因此其被称作“保守取代”或“保守修饰”,其中对蛋白质的改变导致具有类似的功能的蛋白质。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域公知的。氨基酸侧链特征的例子包括例如疏水性氨基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、亲水性氨基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、和具有下面的共同官能团或特征的侧链:脂肪族侧链(G, A, V, L, I, P);含羟基侧链(S, T, Y);含硫原子侧链(C, M);含羧酸和酰胺侧链(D, N, E, Q);含碱侧链(R, K, H);和含芳香族侧链(H, F, Y, W)。另外,下面的八组各自含有互为保守取代的氨基酸:

[0170] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0171] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0172] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0173] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0174] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0175] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0176] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0177] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(参见例如 Creighton,Proteins1984)。

[0178] 此类保守修饰肽也被视为本发明的肽。然而,本发明的肽不限于此,可包括非保守修饰,只要该肽保留原始的未修饰肽的 CTL 诱导能力。另外,经过修饰的肽不排除 TOMM34 的多态变体、种间同源物、和等位基因中的可诱导 CTL 的肽。

[0179] 可以对本发明的肽插入、取代或添加氨基酸残基,或者,可以从本发明的肽缺失氨基酸残基,以实现更高的结合亲和力。为了保持所需的 CTL 诱导能力,可以修饰(即插入、缺失、添加和 / 或取代)少数(例如,1 个、2 个或数个)或小百分比的氨基酸。这里,术语“数个”意指 5 个以下的氨基酸,如 3 个以下。要被修饰的氨基酸的百分比优选为 20% 以下,例如 15% 以下,更优选 10% 以下,进一步更优选或 1-5%。

[0180] 此外,可在肽中替代或添加氨基酸残基以实现更高的结合亲和力。当在免疫疗法中使用,本发明的肽作为与 HLA 抗原的复合物被呈递在细胞或外来体的表面上。除了天

然被展示的肽之外,由于已经知道通过结合 HLA 抗原而被展示的肽的序列规律(J Immunol1994, 152:3913;Immunogenetics1995, 41:178;J Immunol1994, 155:4307),可将基于此类规律的修饰引入本发明的免疫原性肽。

[0181] 例如,具有高的 HLA-A2 结合亲和力的肽的自 N 端起的第二个氨基酸倾向于被取代为亮氨酸或甲硫氨酸。类似地, C 端被取代为缬氨酸或亮氨酸的肽也可以优选地使用。因此,具有选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列,其中所述 SEQ ID No 的氨基酸序列的自 N 端起的第二个氨基酸被取代为亮氨酸或甲硫氨酸,和 / 或所述 SEQ ID No 的氨基酸序列的 C 端被取代为缬氨酸或亮氨酸的肽涵盖在本发明之内。不仅可以在肽的末端氨基酸处引入替换,而且可以在肽的潜在 T 细胞受体 (TCR) 识别位置处引入替换。数项研究已证明了具有氨基酸取代的肽可等同于或好于原来的,例如 CAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎、Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎或 gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎(Zaremba et al.Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002); 168(3):1338-47., S. O. Dionne et al.Cancer Immunol immunother. (2003)52:199-206 及 S. O. Dionne et al.Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

[0182] 本发明还考虑向本发明的肽的 N 和 / 或 C 端添加一个、两个或数个氨基酸。此类具有高 HLA 抗原结合亲和力且保留 CTL 诱导能力的修饰肽也包含在本发明之内。

[0183] 例如,本发明提供长度少于 14、13、12、11 或 10 个氨基酸的分离的肽,其结合 HLA 抗原,具有 CTL 诱导能力,并包含选自以下的氨基酸序列:

[0184] (i) 选自 SEQ ID NO:1 和 5 的氨基酸序列,

[0185] (ii) 选自 SEQ ID NO:1 和 5 的氨基酸序列中修饰了 1、2 或几个氨基酸的氨基酸序列,和

[0186] (iii) (ii) 的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者:

[0187] (a) 所述 SEQ ID NO 的自 N 端起的第二个氨基酸选自亮氨酸和甲硫氨酸;和

[0188] (b) 所述 SEQ ID NO 的 C 末端氨基酸选自缬氨酸和亮氨酸。

[0189] 此外,本发明还提供长度少于 15、14、13、12 或 11 个氨基酸的分离的肽,其结合 HLA 抗原,具有 CTL 诱导能力,并包含选自下组的氨基酸序列:

[0190] (i') 选自 SEQ ID NO:31 和 32 的氨基酸序列,

[0191] (ii') 选自 SEQ ID NO:31 和 32 的氨基酸序列中修饰了 1、2 或几个氨基酸的氨基酸序列,和

[0192] (iii') (ii') 的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列具有下述特征之一或二者:

[0193] (a) 所述 SEQ ID NO 的自 N 端起的第二个氨基酸选自亮氨酸和甲硫氨酸;和

[0194] (b) 所述 SEQ ID NO 的 C 末端氨基酸选自缬氨酸和亮氨酸。

[0195] 当这些肽与 APC 接触时,这些肽结合 APC 上的 HLA 抗原,从而作为与 HLA 抗原的复合物呈递在 APC 上。或者,那些肽被导入 APC 中并在 APC 中被加工成由选自 (i)-(iii) 和 (i')-(iii') 的氨基酸序列组成的肽,从而作为与 HLA 抗原的复合物呈递在 APC 上。结果,诱导出针对此类肽特异性的 CTL。

[0196] 然而,当肽序列与具有不同功能的内源或外源蛋白质的氨基酸序列的一部分相同时,可能诱导副作用,诸如自身免疫性疾病或针对特定物质的变应性症状。因此,可以利用可用的数据库实施同源性搜索,以避免肽的序列与另一种蛋白质的氨基酸序列匹配的情

况。当根据同源性搜索清楚了即使对目标肽仅有 1 个或 2 个氨基酸差异的肽亦不存在时，可以修饰目标肽以提高其与 HLA 抗原的结合亲和力，和 / 或提高其 CTL 诱导能力，而没有任何发生此类副作用的危险。

[0197] 虽然如上所述的对 HLA 抗原具有高结合亲和力的肽预期是高度有效的，但还是对根据高结合亲和力的存在为指标选出的候选肽检查了 CTL 诱导能力的存在。这里，短语“CTL 诱导能力”指肽被呈递到抗原呈递细胞 (APC) 上时诱导 CTL 的能力。另外，“CTL 诱导能力”包括肽诱导 CTL 活化、CTL 增殖、促进 CTL 溶解靶细胞、和提高 CTL IFN- γ 生成的能力。

[0198] CTL 诱导能力的确认可如下来实现，诱导携带人 MHC 抗原的 APC (例如 B- 淋巴细胞、巨噬细胞、和树突细胞 (DC))，或者更具体地说，源自人外周血单核白细胞的 DC，并且在用肽刺激后，与 CD8- 阳性 T 细胞混合，然后测量由 CTL 针对靶细胞生成和释放的 IFN- γ 。作为反应系统，可使用已经制成的表达人 HLA 抗原的转基因动物 (例如 BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000, 61(8):764-79 Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on HLA class II restricted T(H) response 中描述的那些)。例如，可以用 ^{51}Cr 等放射性标记靶细胞，并且可以自靶细胞释放的放射性计算细胞毒性活性。或者，它可以如下评估：测量在携带固定化肽的 (APC 存在下由 CTL 生成和释放的 IFN- γ ，并使用抗 IFN- γ 单克隆抗体显现培养基上的抑制区。

[0199] 通过如上所述检查肽的 CTL 诱导能力，发现选自具有选自 SEQ ID NO: 1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列的九肽或十肽不但具有对 HLA 抗原的高结合亲和力，还具有特别高的 CTL 诱导能力。因此，例举这些肽为本发明优选的实施方案。

[0200] 另外，同源性分析显示了该肽与自任何其它已知人基因产物衍生的肽不具有显著的同源性。因此，可能降低用于免疫疗法时发生未知的或不想要的免疫应答的可能性。因此，也是根据这个方面，这些肽可用于在癌症患者中引发针对 TOMM34 的免疫力。因此，本发明的优选的肽是由选自 SEQ ID NOs: 1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列组成的那些肽。

[0201] 除上文讨论的对本发明的肽的修饰之外，还可将本发明的肽连接至其它肽，只要它们保留 CTL 诱导能力，并且，优选地，还保留所需的 HLA 结合。合适的“其他肽”的例子包括：本发明的肽或者从其他 TAA 衍生的能诱导 CTL 的肽。肽间的接头是本领域公知的，例如 AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Suttmüller et al., J Immunol. 2000, 165:7308-7315) 或 K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168:5709-5715)。

[0202] 例如，还可以基本上同时地使用非 TOMM34 的肿瘤相关抗原肽，来增加藉由 HLA I 类和 / 或 HLA II 类的免疫应答。公认癌细胞能表达多于一种肿瘤相关基因。因此，确定特定的受试者是否表达其他肿瘤相关基因，然后将源自这样的基因的表达产物的 HLA I 类和 / 或 HLA II 类结合肽包含在 TOMM34 组合物或疫苗中，是本领域技术人员常规实验的范围之内的。

[0203] 本领域普通技术人员会知晓 I 类 HLA I 和 II 类 HLA 结合肽的例子 (例如参见 Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995)，并且因此可以以与本文公开类似的方式用于本发

明。因此,本领域普通技术人员能容易地依照分子生物学的标准规程来制备包括一种或多种 TOMM34 肽和一种或多种非 TOMM34 肽的多肽,或编码此类多肽的核酸。

[0204] 上文描述的肽在本文中被称为“多表位”(polytope),即两个或更多个潜在免疫原性或免疫应答刺激性肽构成的组,这些肽可以以各种排列方式(例如串联、交叠)连接在一起。该多表位(或编码该多表位的核酸)可以在标准免疫方案中施用,例如施用于动物,以测试该多表位刺激、增强和/或引起免疫应答的有效性。

[0205] 肽可直接地或经使用侧翼序列连接在一起以形成多表位,而且多表位作为疫苗的用途是本领域公知的(参见例如 Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J. Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J. Exp. Med. 171(1):299-306, 1990)。可制备含有不同数目和组合的表位的多表位并测试它们被 CTL 识别的情况及提高免疫应答的功效。

[0206] 可将本发明的肽进一步连接至其它物质,只要它们保留原始肽的 CTL 诱导能力。合适的物质的例子可包括:肽、脂质、糖和糖链、乙酰基、天然的和合成的聚合物等。肽还可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化;前提是该修饰不破坏如肽的本文所述的生物学活性。可以进行这些类型的修饰以赋予额外的功能(例如靶向功能和投递功能)或使多肽稳定。

[0207] 例如,为了提高多肽的体内稳定性,本领域已知引入 D-氨基酸、氨基酸模拟物或非天然氨基酸;此构思也可适用于本发明多肽。可以以多种方式测定多肽的稳定性。例如,可使用肽酶和各种生物学介质(诸如人血浆和血清)来测试稳定性(参见例如 Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin. 1986, 11:291-302)。

[0208] 此外,如上文所述,在取代、缺失、插入、或添加了一个、两个或数个氨基酸残基的修饰肽中,可以筛选或选择与原始肽相比活性相同或更高者。因此,本发明还提供由于筛选或选择与原始肽相比活性相同或更高的修饰肽的方法。例如,所述方法可包括下述步骤:

[0209] a: 对本发明的肽取代、缺失、插入、或添加至少一个氨基酸残基,

[0210] b: 测定所述肽的活性,和

[0211] c: 选择具有与原始肽相比相同或更高活性的肽。

[0212] 本文中,所述的活性可包括 MHC 结合活性, APC 或 CTL 诱导能力,和细胞毒活性。

[0213] 当本发明的肽包含半胱氨酸残基时,所述肽趋于经所述半胱氨酸残基的 SH 基团之间的二硫键形成二聚体。因此,本发明肽的二聚体也包括在本发明的肽之中。

[0214] III. TOMM34 肽的制备

[0215] 本发明的肽可使用公知技术来制备。例如,肽可以通过合成、使用重组 DNA 技术或化学合成来制备。本发明的肽可个别地合成,或合成为包括两个或更多个肽的较长多肽。然后可以分离,即纯化或分离所述肽,使其基本上不含其它天然存在的宿主细胞蛋白质及其片段或任何其它化学物质。

[0216] 本发明的肽可含有修饰,诸如糖基化、侧链氧化、或磷酸化等,前提是该修饰不破坏原始肽的生物学活性。其他示例性的修饰包括掺入 D-氨基酸或其他可用的氨基酸模拟物,以便例如增加肽的血清半寿期。

[0217] 可以根据选定的氨基酸序列,借助化学合成来获得本发明的肽。可适用于合成的

常规肽合成法的例子包括：

[0218] (i)Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966；

[0219] (ii)The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976；

[0220] (iii)Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co., 1975；

[0221] (iv)Basics and Experiment of Peptide Synthesis(日文), Maruzen Co., 1985；

[0222] (v)Development of Pharmaceuticals(second volume)(日文), Vol. 14(peptide synthesis), Hirokawa, 1991；

[0223] (vi)W099/67288；和

[0224] (vii)Barany G.&Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118。

[0225] 或者, 可适用任何已知的遗传工程肽生产方法来获得本发明的肽(例如 Morrison J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss&Curtiss, Methods in Enzymology(eds. Wu et al.) 1983, 101:347-62)。例如, 首先, 制备包含处于可表达形式(例如处于相当于启动子序列的调节序列下游)的编码目标肽的多核苷酸的合适载体, 并转化入合适的宿主细胞。本发明也提供这样的载体和宿主细胞。然后培养宿主细胞以生成感兴趣的肽。也可以采用体外翻译系统在体外生产肽。

[0226] IV. 多核苷酸

[0227] 本发明还提供编码任何上述本发明肽的多核苷酸。这些包括源自天然存在型 TOMM34 基因(例如, SEQ ID NO:42(GenBank Accession No. NM_006809))的多核苷酸以及具有它们的经过保守修饰的核苷酸序列的多核苷酸。在本文中, 短语“经过保守修饰的核苷酸序列”指编码相同或本质上相同的氨基酸序列的序列。由于遗传密码的简并性, 对于任何给定蛋白质都有极其多种功能上相同的核酸来编码它。例如, 密码子 GCA、GCC、GCG、和 GCU 都编码氨基酸丙氨酸。因此, 在由密码子规定为丙氨酸的任何位置处, 该密码子可改变成所述的任何相应密码子, 而不改变所编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”, 是保守修饰变异的一种。本文中的编码肽的每一种核酸序列也描述该核酸的每一种可能的沉默变异。本领域普通技术人员很容易认识到, 核酸中的每一个密码子(AUG 和 TGG 除外, AUG 在正常情况下是甲硫氨酸的唯一密码子, 而 TGG 在正常情况下是色氨酸的唯一密码子)都可以被修饰以产生功能上相同的分子。因而, 编码肽的核酸的每一种沉默变异都在每条公开的序列中得以描述。

[0228] 本发明的多核苷酸可以由 DNA、RNA、及其衍生物构成。如本领域公知的, DNA 分子由碱基诸如天然存在的碱基 A、T、C、和 G 构成, 而 T 在 RNA 中被 U 替换。本领域技术人员会认识到非天然存在的碱基也包括在多核苷酸中。

[0229] 本发明的多核苷酸可编码多个本发明肽, 其中有或无居间氨基酸序列存在。例如, 居间氨基酸序列可提供多核苷酸的或所翻译的肽的切割位点(例如酶识别序列)。另外, 多核苷酸除编码本发明肽的编码序列以外还可包括任何额外的序列。例如, 多核苷酸可以是包括表达肽所需要的调节序列的重组多核苷酸, 或者可以是具有标志基因等等的表达载体(质粒)。一般而言, 此类重组多核苷酸可通过常规重组技术操作多核苷酸来制备, 例如通过使用聚合酶和内切核酸酶。

[0230] 重组和化学合成技术都可用来生成本发明的多核苷酸。例如,可以通过插入在转染入感受态细胞后能表达的适宜载体来生成多核苷酸。或者,可借助 PCR 技术或通过合适宿主中的表达来扩增多核苷酸(参见例如 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。或者,可使用固相技术来合成多核苷酸,如 Beaucage SL&Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48:2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3:801-5 中记载的。

[0231] V. 外来体 (exosomes)

[0232] 本发明进一步提供了称作外来体的细胞内囊泡,这些外来体在它们的表面上呈递有本发明肽与 HLA 抗原之间形成的复合物。外来体可以通过,例如在日本专利申请公报平 11-510507 和 W099/03499 中详细描述的方法来制备,并可以用从作为治疗和 / 或预防对象的患者获得的 APC 制备。本发明的外来体可以作为疫苗以与本发明的肽相似的方式进行接种。

[0233] 复合物中包含的 HLA 抗原的类型必须与需要治疗和 / 或预防的受试者的类型匹配。例如,在日本人群中,HLA-A2, 尤其是 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206, 是非常普遍的,因此对日本人患者的治疗可能是合适的。使用在日本人和白种人群中高度表达的 HLA-A2 型对于获得有效的结果是有利的,而且可以使用 HLA-A*0201 和 HLA-A*0206 等亚型。典型地,在临床上,预先考察需要治疗的患者的 HLA 抗原类型,这样就能够合适地选择对这种抗原具有高水平的结合亲和力、或者具有藉由抗原呈递的 CTL 诱导能力的肽。此外,为了获得显示高结合亲和力和 CTL 诱导能力的肽,可以在天然存在的 TOMM34 部分肽的氨基酸序列的基础上进行 1 个、2 个或数个氨基酸的取代、缺失、插入或添加。

[0234] 当本发明的外来体具有 HLA-A2 型作为 HLA 抗原时,包含选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 中的序列的肽是特别有用的。

[0235] VI. 抗原呈递细胞 (APC)

[0236] 本发明还提供在其表面上呈递在 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的分离的抗原呈递细胞 (APC)。所述 APC 可源自作为治疗和 / 或预防对象的患者,而且可作为疫苗单独地或与其它药物(包括本发明的肽、外来体、或 CTL)组合来施用。

[0237] APC 不限于特定种类的细胞,包括树突细胞 (DC)、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞,已知这些细胞可在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,以供淋巴细胞识别。由于 DC 是 APC 中具有最强 CTL 诱导作用的代表性 APC,DC 可以用作本发明的 APC。

[0238] 例如,可通过自外周血单核细胞诱导 DC,然后在体外、离体或在体内用本发明的肽接触(刺激)它们来获得 APC。当对受试者施用本发明的肽时,在受试者的身体中诱导出呈递本发明肽的 APC。短语“诱导 APC”包括用本发明的肽接触(刺激)细胞,或者将编码本发明的肽的多核苷酸导入细胞中,以将 HLA 抗原与本发明的肽之间形成的复合物呈递在该细胞表面上。因此,可以通过对受试者使用本发明的肽,然后从受试者收集 APC,来获得本发明的 APC。或者,可以通过使从受试者收集的 APC 与本发明的肽接触来获得本发明的 APC。

[0239] 本发明的 APC 可以单独或者与其他药物,包括本发明的肽、外来体或 CTL 组合施用给受试者,以在受试者体内诱导针对癌症的免疫应答。例如,离体施用可包括下述步骤:

[0240] a: 自第一受试者收集 APC;

[0241] b:使肽接触步骤 a 的 APC;并

[0242] c:对第二受试者步骤 b 的 APC。

[0243] 第一受试者和第二受试者可以是同一个体,或者可以是不同个体。步骤 b 获得的 APC 可充当疫苗来治疗和 / 或预防癌症,癌症的例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。

[0244] 在本发明的语境中,可以使用本发明的肽来制造能够诱导抗原呈递细胞的药物组合物或药剂。本文提供了用于治疗用于诱导抗原呈递细胞的药物组合物或药剂的方法或工艺,其优选包括将本发明的肽与药学上可接受的载体混合或配制的步骤。

[0245] 本发明还提供本发明的肽用于诱导抗原呈递细胞的用途。

[0246] 依照本发明的一个方面,本发明的 APC 具有高水平的 CTL 诱导能力。在短语“高水平的 CTL 诱导能力”中,高水平意味着与未和肽接触的 APC 中检测到的水平相比 CTL 诱导能力相对高。这样的具有高水平 CTL 诱导能力的 APC 除了用上文描述的方法外,还包括在体外将含有编码本发明肽的多核苷酸的基因转移至 APC 的步骤的方法来制备。所导入的多核苷酸可以是 DNA 或 RNA 的形式。用于进行导入的方法的例子包括但不限于本领域中常规实施的各种方法,诸如可以使用脂质体转染、电穿孔、和磷酸钙法。更具体的说,可以如 Cancer Res1996, 56:5672-7;J Immunol1998, 161:5607-13;J Exp Med1996, 184:465-72;国际公开文本 No. 2000-509281 的已公开日文翻译中所述来实施。通过将编码本发明的肽的基因转移入 APC,基因在细胞中经历转录、翻译、等等,然后得到的蛋白质被 MHC I 类或 II 类加工,并经由呈递途径呈递给本发明的肽。

[0247] 或者,本发明的 APC 可以通过包含将 APC 与本发明的肽接触的步骤的方法来制备。

[0248] 在一些实施方案中,本发明的 APC 在它们的表面上呈递 HLA-A2 抗原与本发明的肽的复合物。

[0249] VII. 细胞毒性 T 细胞 (CTL)

[0250] 诱导出的针对任何本发明肽的 CTL 可在体内加强靶向癌细胞的免疫应答,因此可以以与所述肽相似的方式用作疫苗。因此,本发明提供由任何本发明肽特异性诱导或活化的、分离的 CTL。

[0251] 此类 CTL 可通过下述步骤来获得:(1) 对受试者施用本发明的肽;(2) 在体外用本发明的肽接触(刺激)源自受试者的 APC 以及 CD8⁻ 阳性 T 细胞或外周血单核白细胞;或(3) 在体外使 CD8⁻ 阳性 T 细胞或外周血单核白细胞接触在其表面上呈递有 HLA 抗原与本发明肽之间形成的复合物的 APC 或外来体;或(4) 导入编码 T 细胞受体 (TCR) 亚单位的多核苷酸,其中由此类 TCR 亚单位形成的 TCR 能够结合细胞表面上的 HLA 抗原与本发明的肽的复合物。此类用于(3)的方法的 APC 或外来体可通过上文记载的方法来制备。(4)的方法的详情在下文“VIII. T 细胞受体 (TCR)”部分中记载。

[0252] 本发明的 CTL 可以从要进行治疗和 / 或预防的患者获取,而且可以将它们单独施用,或者与其它药物(包括本发明的肽或外来体)组合施用以产生调节效果。所得到的 CTL 特异性针对呈递本发明的肽(例如与用于诱导的肽相同的肽)的靶细胞起作用。靶细胞可以是内源表达 TOMM34 的细胞,例如癌细胞,或者或被 TOMM34 基因转染的细胞;而且因本发明肽的刺激而在细胞表面上呈递有本发明肽的细胞也可充当活化 CTL 攻击的靶标。

[0253] 在某些实施方案中,本发明的 CTL 是识别在其表面上呈递有 HLA-A2 抗原与本发明

的肽的复合物的细胞的 CTL。在该 CTL 的语境中,短语“识别细胞”是指通过其 TCR 结合细胞表面上 HLA-A2 抗原与本发明的肽的复合物,并显示针对该细胞的特异性细胞毒活性。本文中,“特异性细胞毒活性”是指针对呈递 HLA-A2 抗原和本发明的肽的复合物的细胞,而不针对其他细胞显示细胞毒活性。

[0254] VIII. T 细胞受体 (TCR)

[0255] 本发明还提供包含编码能够形成 T 细胞受体 (TCR) 的亚单位的多肽的多核苷酸的组合物,及使用该组合物的方法。此类 TCR 亚基具有形成这样的 TCR 的能力,所述 TCR 赋予 T 细胞以针对表达 TOMM34 的肿瘤细胞的特异性。通过使用本领域已知的方法,可鉴定出分别编码用本发明的肽诱导出的 CTL 的 TCR 亚基的 α 和 β 链的多核苷酸 (W02007/032255 及 Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例如,优选使用 PCR 方法分析 TCR。用于分析的 PCR 引物可以是,例如,作为 5' 侧引物的 5' -R 引物 (5' -gtctaccaggcattcgcttcat-3') (SEQ ID NO:43),以及作为 3' 侧引物的对 TCR α 链 C 区特异的 3-TRa-C 引物 (5' -tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (SEQ ID NO:44),对 TCR β 链 C1 区特异的 3-TRb-C1 引物 (5' -tcagaaatcctttctcttgac-3') (SEQ ID NO:45),或对 TCR β 链 C2 区特异的 3-TRbeta-C2 引物 (5' -ctagcctctggaatcctttctctt-3') (SEQ ID NO:46),但不限于此。衍生的 TCR 能够以高亲和力结合呈递有 TOMM34 肽的靶细胞,并任选地在体内和体外介导针对呈递本发明的 TOMM34 肽的靶细胞的高效杀伤。

[0256] 可以将编码 TCR 亚单位的多核苷酸 (即编码两个 TCR 亚单位的多核苷酸或编码 TCR 亚单位之一的多核苷酸) 掺入合适的载体,例如逆转录病毒载体中。这些载体是本领域公知的。可以将所述多核苷酸或者包含它们的载体有用地转入 T 细胞 (例如,CD8- 阳性 T 细胞),例如来自患者的 T 细胞中。有利的是,本发明提供一种即配即用型组合物,其容许快速修饰患者自己的 T 细胞 (或其他哺乳动物的 T 细胞) 以快速且容易地生成具有卓越的癌细胞杀伤特性的修饰型 T 细胞。

[0257] 针对本发明的肽的特异性的 TCR 是这样的受体,它能够特异性地识别本发明的肽与 HLA 抗原的复合物,当该 TCR 被表达在 T 细胞的表面上时给予 T 细胞针对呈递本发明的肽与 HLA 抗原的复合物的靶细胞的特异性。可以通过任何已知方法来确认通过导入编码此类 TCR 亚单位的多肽而制备的 CTL 能够特异性识别此类靶细胞。此类方法的优选例子包括,例如,利用 HLA 分子和本发明的肽的四聚体染色分析、以及 ELISPOT 测定。通过 ELISPOT 测定,可以确认通过该方法制备的 CTL 能够特异性 TCR 识别细胞,且该识别作用所产生的信号能够在细胞内传递。此外,也可以通过已知方法来确认通过上述的方法制备的 CTL 具有针对靶细胞的特异性细胞毒活性。此类方法的例子包括,例如,使用表达 HLA-A2 抗原与 TOMM34 二者的铬释放测定。

[0258] 在一个方面,本发明提供通过用编码 TCR 亚单位多肽的多核苷酸 (即编码两个 TCR 亚单位的多核苷酸或者编码每一个 TCR 亚单位的多核苷酸) 转导而制备的 CTL,其中由这样的 TCR 亚单位形成的 TCR 能够结合细胞表面上的由具有选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 氨基酸序列的 TOMM34 肽与 HLA-A2 抗原的复合物。

[0259] 经过转导的 CTL 在体内能够归巢 (homing) 到癌细胞,并且可以利用公知的体外培养方法扩增 (例如 Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。可以利用本发明的 T 细胞来形成免疫原性组合物,所述组合物可以用来在需要治疗或保护的患者中治疗

和 / 或预防癌症 (W02006/031221)。

[0260] IX. 药剂或药物组合物

[0261] 由于 TOMM34 表达在癌症 (例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤) 中与正常组织相比上调, 本发明的肽或多核苷酸可用于治疗和 / 或预防癌症, 和 / 或预防其手术后复发。因此, 本发明提供用于治疗和 / 或预防癌症, 和 / 或预防其手术后复发的药剂或药物组合物, 所述组合物包括一种或多种本发明肽或多核苷酸作为活性组分。或者, 可以在任何上述外来体或细胞 (诸如 APC) 的表面上表达本发明的肽, 以用作药剂或药物组合物。另外, 上述靶向任何本发明的肽的 CTL 也可用作本发明药剂或药物组合物的活性成分。

[0262] 本发明的药物组合物还可用作疫苗。在本发明的语境中, 短语“疫苗”(也称作“免疫原性组合物”) 指具有在接种入动物后改善、增加和 / 或诱导抗肿瘤免疫力的功能的组合物。

[0263] 本发明的药物组合物可用于在受试者或患者 (包括人和任何其它哺乳动物, 包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猫、犬、绵羊、山羊、猪、牛、马、猴、狒狒、和黑猩猩, 特别是商业上重要的动物或驯养的动物) 中治疗和 / 或预防癌症, 和 / 或预防其手术后复发。

[0264] 在另一个实施方案中, 本发明还提供活性成分在制备配制为用于治疗和 / 或预防肿瘤的药物组合物或药剂中的用途, 所述活性成分选自下组:

[0265] (a) 本发明的肽;

[0266] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸;

[0267] (c) 在其表面上呈递有本发明的肽的 APC 或外来体; 和

[0268] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0269] 或者, 本发明进一步提供用于治疗和 / 或预防癌症或肿瘤的活性成分, 所述活性成分选自下组:

[0270] (a) 本发明的肽;

[0271] (b) 处于可表达形式的编码此类肽的核酸;

[0272] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体; 和

[0273] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0274] 或者, 本发明进一步提供一种制备用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或药剂的方法或工艺, 其中该方法或工艺包括配制药学或生理学上可接受的载体与选自下组的活性成分作为活性成分的步骤:

[0275] (a) 本发明的肽;

[0276] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸;

[0277] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体; 和

[0278] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0279] 在另一个实施方案中, 本发明还提供一种制备用于治疗或预防癌症或肿瘤的药物组合物或药剂的方法或工艺, 其中该方法或工艺包括混合活性成分与药学或生理学可接受的载体的步骤, 其中所述活性成分选自下组:

[0280] (a) 本发明的肽;

[0281] (b) 处于可表达形式的编码如本文中公开的肽的核酸;

[0282] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体 ;和

[0283] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0284] 本发明的药剂或药物组合物可以用于治疗和 / 或预防受试者或患者中的癌症, 和 / 或防止其手术后复发, 所述受试者或患者包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、猫、犬、绵羊、山羊、猪、牛、马、猴、狒狒、和黑猩猩, 特别是商业上重要的动物或驯养的动物。

[0285] 依照本发明, 已经发现包含选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 中的氨基酸序列的肽是可能诱导强且特异性的免疫应答的 HLA-A2 限制性表位肽或候选者。因此, 包括任何这些具有 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列的肽的本发明药剂或药物组合物特别适合于对其 HLA 抗原为 HLA-A2 的受试者施用。对于包含编码这些肽中的任一个的多核苷酸 (即本发明的多核苷酸) 的药剂或药物组合物也是如此。

[0286] 要用本发明的药剂或药物组合物治疗的癌症或肿瘤不受限制, 包括其中涉及 (例如过表达) TOMM34 的任何癌症, 包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。

[0287] 本发明的药剂或药物组合物除上述活性成分之外还可含有其它具有诱导针对癌性细胞的 CTL 的能力的肽、编码所述其它肽的其它多核苷酸、呈递所述其它肽的其它细胞, 等等。此类“其它”具有诱导针对癌性细胞的 CTL 的能力的肽包括, 但不限于癌症特异性抗原 (例如已鉴定的 TAA)。

[0288] 如果必要, 本发明的药剂或药物组合物可任选包括其它治疗性物质作为活性成分, 只要该物质不抑制活性成分 (例如任何本发明肽) 的抗肿瘤效果。例如, 配制剂可包括抗炎物质或组合物、镇痛剂、化疗剂、诸如此类。除了包括药物自身中的其它治疗性物质之外, 本发明的药物还可以与一种或多种其它药理学组合物顺序或同时施用。药物和药理学组合物的量取决于例如所使用的药理学组合物的类型、所治疗的疾病、及施用的时序安排和路径。

[0289] 本领域技术人员会认识到, 除在本文中具体提及的组分之外, 本发明的药剂或药物组合物可进一步包括与所讨论的配制剂类型相关的本领域常规的其它物质 (例如, 填充剂、粘合剂、稀释剂等)。

[0290] 在本发明的一个实施方案中, 本发明的药剂或药物组合物可包装在制品中, 例如作为含有可用于治疗要治疗的疾病 (例如癌症) 的病理状况的材料的试剂盒。制品可包括任何本发明药剂或药物组合物的容器及标签。合适的容器包括瓶、管形瓶、和试管。容器可以用多种材料制成, 诸如玻璃或塑料。容器上的标签应指明该剂或组合物用于治疗或预防疾病的一种或多种状况。标签还可指明关于施用的指导等等。

[0291] 除上文描述的容器之外, 包括本发明药剂或药物组合物的试剂盒还可任选进一步包括第二容器, 其中装有药学可接受的稀释剂。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料, 包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头、注射器、和载有使用说明的包装插页。

[0292] 如果期望的话, 药物物质或药物组合物可在药包或分配器装置中提供, 该药包或分配器装置可装有一个或多个含有活性成分的单位剂型。例如, 药包可包括金属或塑料箔, 诸如泡罩包。药包或分配器装置可附有施用说明书。

[0293] (1) 含有肽作为活性成分的药剂或药物组合物

[0294] 本发明的肽可以作为药剂或药物组合物直接施用, 或者如果必要, 通过常规配制

方法来配制。在后一种情况中,除本发明的肽之外,还可以视情况包括通常用于药物的载体、赋形剂、等等,没有特别限制。此类载体的例子有灭菌水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养液、等等。另外,药剂或药物组合物可在必要时含有稳定剂、悬浮液、防腐剂、表面活性剂等等。本发明的药剂或药物组合物可用于抗癌目的。

[0295] 本发明的肽可制备成组合,其包含两种或更多种本发明肽,以在体内诱导 CTL。肽可以形成鸡尾酒,或者可使用标准技术彼此缀合。例如,可以将各个肽化学连接或表达成为单一融合多肽序列,该序列可具有一个或数个氨基酸作为接头(例如赖氨酸接头: K. S. Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168:5709-5715)。组合中的各个肽可以是相同的或不同的。通过施用本发明的肽,肽被 HLA 抗原以高密度展示在 APC 上,然后诱导出与所展示的肽与 HLA 抗原之间形成的复合物特异性起反应的 CTL。或者,从受试者分离 APC(例如 DC),然后用本发明的肽刺激它们,来获得在其细胞表面上展示任何所述本发明肽的 APC,将这些 APC 重新施用给受试者而在受试者体内诱导出 CTL,结果,可提高针对肿瘤相关内皮的攻击性。

[0296] 包括任何本发明的肽作为活性成分、用于治疗 and / 或预防癌症的药剂或药物组合物可额外地包括佐剂,以便有效地建立细胞免疫,或者,它们可以与其它活性成分一起施用,而且它们可以通过配制成颗粒来施用。佐剂指在与具有免疫学活性的蛋白质一起(或顺序)施用增强针对该蛋白质的免疫应答的化合物。可以应用的佐剂包括文献中记载的那些(Clin Microbiol Rev 1994, 7:277-89)。示例性的佐剂包括但不限于磷酸铝、氢氧化铝、明矾、霍乱毒素、沙门氏菌毒素、不完全弗氏佐剂(IFA)、完全弗氏佐剂(CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF, CpG, O/W 乳液等等,但不限于此。

[0297] 另外,可方便地使用脂质体制剂、其中肽结合至几微米直径的珠子的颗粒配制剂、和其中脂质结合至肽的配制剂。

[0298] 在本发明的另一个实施方案中,本发明的肽还可以作为可药用盐的形式施用。所述盐的优选实例包括与碱金属的盐、与金属的盐、与有机碱的盐、与有机酸的盐、和与无机酸的盐。如本文中使用的,短语“可药用盐”指这样的盐,它们保留化合物的生物学有效性和性质,并且是通过与无机酸或碱,如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等反应而获得。

[0299] 在一些实施方案中,本发明的药物物质或药物组合物可进一步包括引发(prime) CTL 的成分。已经确认脂质是能够在体内引发针对病毒抗原的 CTL 的物质或组合物。例如,可将棕榈酸残基连接至赖氨酸残基的 ϵ - 和 α - 氨基,然后连接至本发明的肽。然后该脂化肽可以在胶束或颗粒中直接施用,掺入脂质体,或在佐剂中乳化。作为脂质引发 CTL 应答的另一个例子,大肠杆菌(E. coli) 脂蛋白,诸如三棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酰丝氨酸-丝氨酸(P3CSS),当与适宜的肽共价连接时,可用来引发 CTL(参见例如 Deres et al., Nature 1989, 342:561-4)。

[0300] 合适的施用方法的例子包括,但不一定限于,口服、皮内、皮下、肌肉内、骨内、腹膜、和静脉内注射等等,及系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。本发明肽的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整,通常是 0.001mg 至 1000mg,例如 0.01mg 至 100mg,例如 0.1mg 至 10mg,例如 0.5mg 至 5mg,而且可以每少数天施用一次至每少数月施用一次。本领域

域技术人员能恰当选择合适的剂量。

[0301] (2) 含有多核苷酸作为活性成分的药剂或药物组合物

[0302] 本发明的药剂或药物组合物也可含有处于可表达形式的编码本文中公开的肽的核酸。在本文中,短语“处于可表达形式的”意味着多核苷酸在导入细胞时会在体内表达成诱导抗肿瘤免疫力的多肽。在一个例示性的实施方案中,感兴趣的多核苷酸的核酸序列包括多核苷酸表达所必需的调节元件。多核苷酸可具有为实现稳定插入靶细胞的基因组所需的配置(关于同源重组盒载体的描述参见例如 Thomas KR&Capecchi MR, Cell 1987, 51:503-12)。还参见例如 Wolff et al., Science 1990, 247:1465-8; 美国专利 No. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 及 W098/04720)。基于 DNA 的投递技术的例子包括“裸 DNA”、易化(布比卡因、聚合物、肽介导的)投递、阳离子脂质复合物、和颗粒介导的(“基因枪”)或压力介导的投递(参见例如美国专利 No. 5,922,687)。

[0303] 本发明的肽还可用于病毒或细菌载体来表达。表达载体的例子包括减毒病毒宿主,诸如牛痘或禽痘。这种办法涉及使用例如牛痘病毒作为载体来表达编码肽的核苷酸序列。在导入宿主后,重组牛痘病毒表达表达免疫原性肽,并由此引发免疫应答。可用于免疫接种方案的牛痘载体和方法记载于例如美国专利 No. 4,722,848。另一种载体是卡介苗(BCG, Bacille Calmette Guerin)。BCG 载体记载于 Stover et al., Nature 1991, 351:456-60。有很多种可用于治疗性施用或免疫接种的其它载体是容易想到的,例如腺病毒和腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)载体、去毒炭疽毒素载体、诸如此类。参见例如 Shata et al., Mol Med Today 2000, 6:66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68:793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14:571-85。

[0304] 将多核苷酸投递入患者可以是直接的,其中使受试者直接暴露于携带多核苷酸的载体,或者是间接的,其中首先在体外用感兴趣的多核苷酸转化细胞,然后将细胞移植入患者。这两种办法分别称作体内和离体基因疗法。

[0305] 关于基因疗法的方法的一般综述参见 Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3:87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33:573-96; Mulligan, Science 1993, 260:926-32; Morgan&Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62:191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5):155-215。在 eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY, 1993; 及 Krieger, 于 Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990 中描述的重组 DNA 技术领域的公知方法可应用于本发明。

[0306] 和施用肽一样,多核苷酸的施用可以通过口服、皮内、皮下、骨内、腹膜、和/或静脉内注射等等来进行,例如可使用系统施用或局部施用至靶位点附近。施用可以通过单次施用来实施,或者通过多次施用来强化。合适的载体或经编码本发明肽的多核苷酸转化的细胞中的多核苷酸的剂量可以依据要治疗的疾病、患者的年龄、重量、施用的方法等等恰当加以调整,通常是 0.001mg 至 1000mg,例如 0.01mg 至 100mg,例如 0.1mg 至 10mg,例如,0.5mg 至 5mg,而且可以每数天施用一次至每数月施用一次。本领域技术人员能恰当选择合适的

剂量。

[0307] X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL 的方法

[0308] 本发明的肽和多核苷酸可用于制备或诱导 APC 和 CTL。本发明的外来体和 APC 也可用于诱导 CTL。以及用于诱导针对癌症或肿瘤的免疫应答。所述肽、多核苷酸、外来体和 APC 可以与任何其它化合物组合使用,只要该其他的化合物不抑制它们的 CTL 诱导能力。因此,任何前文所述的本发明的药剂或药物组合物均可用于诱导 CTL。除它们之外,那些包括肽和多核苷酸的也可用于诱导 APC,如下文解释的。

[0309] (1) 诱导抗原呈递细胞 (APC) 的方法

[0310] 本发明提供了使用本发明的肽或多核苷酸来诱导具有高 CTL 诱导能力的 APC 的方法。

[0311] 本发明的方法包括在体外、离体或体内使 APC 与本发明的肽接触的步骤。例如,离体将 APC 与肽接触的方法可包括下述步骤:

[0312] a:从受试者收集 APC ;和

[0313] b:使步骤 a 的 APC 与本发明的肽接触。

[0314] APC 不限于特定种类的细胞。APC 的例子包括但不限于 DC、Langerhans 细胞、巨噬细胞、B 细胞、和活化的 T 细胞,已知它们在它们的细胞表面上呈递蛋白质性质的抗原,从而被淋巴细胞识别。优选地,可使用 DC,因为 DC 是 APC 中具有最强 CTL 诱导能力的。任何本发明肽都可以单独或与其它本发明的肽一起使用。

[0315] 另一方面,当将本发明的肽施用给受试者时,APC 在体内接触到所述肽,结果,在受试者的身体中诱导出具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,本发明的方法可包括将本发明的肽施用于受试者。类似地,当将处于可表达形式的本发明的多核苷酸施用于受试者时,本发明的肽在体内表达并与 APC 接触,结果,在受试者的身体中诱导出具有高 CTL 诱导能力的 APC。因此,作为上述步骤的替代,本发明的方法可包括将本发明的多核苷酸施用于受试者。“可表达的形式”描述于上文“IX. 药剂或药物组合物,(2) 含有多核苷酸作为活性组分的药剂或药物组合物”部分。

[0316] 或者,本发明的方法可包括将本发明的多核苷酸导入 APC 以诱导具有 CTL 诱导能力的 APC。例如,该方法可包括下述步骤:

[0317] a:自受试者收集 APC ;并

[0318] b:导入编码本发明肽的多核苷酸。

[0319] 步骤 b 可如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分中所述来实施。

[0320] 或者,本发明提供了一种用于制备特异性诱导针对 TOMM34 的 CTL 活性的抗原呈递细胞 (APC) 的方法,其中所述方法包括下述步骤之一:

[0321] (a) 在体外、离体或体内使 APC 与本发明的肽接触 ;和

[0322] (b) 将编码本发明的肽的多核苷酸导入 APC 中。

[0323] 或者,本发明提供用于诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 的方法,其中所述方法包括选自下组的步骤:

[0324] (a) 使 APC 与本发明的肽接触 ;和

[0325] (b) 将编码本发明的肽的多核苷酸导入 APC。

[0326] 本发明的方法可以在体外、离体在体内实施。优选地,本发明的方法可以在体外

或离体实施。用于诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 的 APC 可以优选地为表达 HLA-A2 抗原的 APC。这样的 APC 可以通过从 HLA 抗原为 HLA-A2 的受试者获得的外周血单核细胞 (PBMC) 用本领域公知的方法制备。用本发明的方法诱导出的 APC 可以是在其表面上呈递本发明的肽与 HLA 抗原 (HLA-A2 抗原) 的复合物的 APC。当将通过本发明的方法诱导出的 APC 施用给受试者以在该受试者中诱导针对癌症的免疫应答时, 该受试者优选是 APC 所来源的同一受试者。然而, 受试者可以不同于 APC 供体, 只要受试者与 APC 供体的 HLA 型相同。

[0327] 在另一实施方案中, 本发明提供用于在诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 中使用的药剂或组合物, 且此类药剂或组合物包括一种或多种本发明的肽或多核苷酸。

[0328] 在另一实施方案中, 本发明提供本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸在制备配制为用于诱导 APC 的药剂或组合物中的用途。

[0329] 或者, 本发明还提供本发明的肽或编码所述肽的多核苷酸, 其用于在诱导具有 CTL 诱导能力的 APC 中使用。

[0330] (2) 诱导 CTL 的方法

[0331] 本发明还提供了使用本发明的肽、多核苷酸、或外来体或 APC 来诱导 CTL 的方法。

[0332] 本发明还提供了使用编码能形成 T 细胞受体 (TCR) 亚单位的多肽 (即 TCR 亚单位) 的多核苷酸 (一种或多种) 来诱导 CTL 的方法, 所述 TCR 亚单位能够识别本发明的肽与 HLA 抗原的复合物。优选地, 所述诱导 CTL 的方法可包括选自下组的至少一个步骤:

[0333] a) 使 CD8- 阳性 T 细胞与抗原呈递细胞和 / 或外来体接触, 所述抗原呈递细胞和外来体在其表面上呈递有 HLA 抗原与本发明的肽之间形成的复合物; 和

[0334] b) 向 CD8- 阳性 T 细胞中导入编码能够形成 TCR 亚单位的多肽的多核苷酸 (一种或多种), 所述 TCR 亚单位可识别 HLA 抗原与本发明的肽之间形成的复合物。

[0335] 当本发明的肽、多核苷酸、APC 或外来体被施用给受试者后, 受试者的身体中诱导出 CTL, 而且靶向癌细胞的免疫应答的强度增强。因此, 作为上述步骤的替代, 本发明的方法可包括将本发明的肽、多核苷酸、APC 或外来体施用于受试者的步骤。

[0336] 或者, 也可通过离体使用它们来诱导 CTL, 并且在诱导 CTL 后, 将活化的 CTL 返还受试者。例如, 该方法可包括下述步骤:

[0337] a: 自受试者收集 APC;

[0338] b: 用本发明的肽接触步骤 a 的 APC; 并

[0339] c: 将步骤 b 的 APC 与 CD8 阳性细胞共培养。

[0340] 上文步骤 c 中要与 CD8- 阳性细胞共培养的 APC 也可通过将包含本发明的多核苷酸的基因转移入如上文“VI. 抗原呈递细胞”部分所述的 APC 来制备, 但是本发明不限于此, 而且涵盖任何在表面上有效呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的 APC。

[0341] 任选地可使用在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的外来体来替代上述的 APC。即, 本发明可包括将在其表面上呈递 HLA 抗原和本发明肽形成的复合物的外来体共培养的步骤。此类外来体可通过上文“V. 外来体”部分中描述的方法来制备。

[0342] 另外, 可通过将编码 TCR 亚单位的多核苷酸 (一个或多个) 导入 CD8- 阳性 T 细胞来诱导 CTL, 其中由此类 TCR 亚单位形成的 TCR 能够结合细胞表面上 HLA 抗原与本发明的肽的复合物。此类转导可如上文“VIII. T 细胞受体 (TCR)”部分中所述来实施。

[0343] 本发明的方法可以在体外、离体在体内实施。优选地, 本发明的方法可以在体外或

离体实施。用于诱导 CTL 的 CD8⁺ 阳性 T 细胞可以通过从受试者获得 PBMC 用本领域公知的方法制备。在优选的实施方案中, CD8⁺ 阳性 T 细胞的供体可以是 HLA 抗原为 HLA-A2 的受试者。用本发明的方法诱导出的 CTL 可以是在其表面上呈递有本发明的肽与 HLA 抗原的复合物的 CTL。当将通过本发明的方法诱导出的 CTL 施用给受试者以在该受试者中诱导针对癌症的免疫应答时, 该受试者优选是 CD8⁺ 阳性 T 细胞所来源的同一受试者。然而, 受试者可以不同于 CD8⁺ 阳性 T 细胞供体, 只要受试者与 CD8⁺ 阳性 T 细胞供体的 HLA 型相同。

[0344] 另外, 本发明提供了一种制造用于诱导 CTL 的药物组合物的方法或工艺, 其中该方法包括混合或配制本发明的肽与药学可接受的载体的步骤。

[0345] 在另一实施方案中, 本发明提供用于诱导 CTL 的药剂或组合物, 其中所述药剂或组合物包含一种或多种本发明的肽、一种或多种本发明的多核苷酸、或一种或多种本发明的 APC 或外来体。

[0346] 在另一实施方案中, 本发明提供本发明的肽、多核苷酸或 APC 或外来体用于制备配制为用于诱导 CTL 的药剂或组合物中的用途。

[0347] 或者, 本发明提供本发明的肽、多核苷酸、或 APC 或外来体用于诱导 CTL。

[0348] (3) 诱导免疫应答的方法

[0349] 此外, 本发明提供了诱导针对涉及 TOMM34 的疾病的免疫应答的方法。合适的疾病可包括癌症, 其例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。

[0350] 本发明的方法可包括施用含有任何本发明肽或编码它们的多核苷酸的物质或组合物的步骤。或者, 本发明的方法可包括施用呈递有任何本发明肽的外来体或 APC。关于详情参见“IX. 药剂或药物组合物”项, 特别是描述本发明的药剂或药物组合物作为疫苗的用途的部分。另外, 可用于本发明诱导免疫应答的方法的外来体和 APC 详细描述于上文“V. 外来体”、“VI. 抗原呈递细胞 (APC)”和“X. 使用肽、外来体、APC 和 CTL 的方法”的 (1) 和 (2) 部分。

[0351] 本发明还提供了一种制造用于诱导免疫应答的药剂或药物组合物的方法或工艺, 其中该方法包括混合或配制本发明的肽与药学可接受的载体的步骤。

[0352] 或者, 本发明的方法可包括施用本发明的疫苗或药物组合物的步骤, 所述疫苗或药物组合物包含:

[0353] (a) 本发明的肽;

[0354] (b) 处于可表达的形式编码如本文公开的此类肽的核酸;

[0355] (c) 在其表面上呈递本发明的肽的 APC 或外来体; 或

[0356] (d) 本发明的细胞毒性 T 细胞。

[0357] 在本发明的语境中, 过表达 TOMM34 的癌症可用这些活性组分来治疗。所述癌症的例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。因而, 在施用包括所述活性组分的疫苗或药物组合物之前, 优选确认要治疗的细胞或组织中的 TOMM34 表达水平与同一器官的正常细胞相比是否增强了。因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了用于治疗 (过) 表达 TOMM34 的癌症的方法, 该方法可包括下述步骤:

[0358] i) 测定自具有要治疗的癌症的受试者获得的细胞或组织中的 TOMM34 表达水平;

[0359] ii) 将该 TOMM34 表达水平与正常对照比较 ;并

[0360] iii) 对具有与正常对照相比过表达 TOMM34 的癌症的受试者施用至少一种选自上文所述 (a) 至 (d) 的成分。

[0361] 或者,本发明提供包括至少一种选自上文所述 (a) 至 (d) 的成分的疫苗或药物组合物,其用于对具有过表达 TOMM34 的癌症的受试者施用。换言之,本发明进一步提供了用于鉴定要用本发明 TOMM34 多肽来治疗的受试者的方法,所述方法包括测定源自受试者的癌细胞或组织中的 TOMM34 表达水平的步骤,其中该水平与该基因的正常对照水平相比的升高指示该受试者可能具有可用本发明 TOMM34 多肽来治疗的癌症。本发明的治疗癌症的方法在下面更加详细的加以叙述。

[0362] 任何源自受试者的细胞或组织均可用于测定 TOMM34 表达水平,只要其包括目标的 TOMM34 转录或翻译产物。合适样品的例子包括但不限于身体组织与体液,例如血液、痰与尿液。优选地,源自受试者的细胞或组织样品含有这样的细胞群体,该群体包括上皮细胞,更优选癌性上皮细胞或源自怀疑为癌性的组织的上皮细胞。进一步,如果必要,可从所得的身体组织与体液中纯化所述细胞,然后将其用作源自受试者的样品。

[0363] 需用本方法治疗的受试者优选为哺乳动物。例示性的哺乳动物包括但不限于例如人类、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马、和牛。

[0364] 根据本发明,可以测定在自受试者获得的细胞或组织中 TOMM34 的表达水平。表达水平可在转录(核酸)产物水平确定,使用本领域已知方法。举例而言,TOMM34 的 mRNA 可通过杂交方法(例如,Northern 杂交)使用探针定量。检测可在芯片、阵列等等上实施。对检测 TOMM34 的表达水平而言,可优选使用阵列。本领域技术人员可利用 TOMM34 的序列信息制备上述探针。举例而言,TOMM34 的 cDNA 可用作探针。如需要,所述探针可用合适的标记物来标记,例如染料、荧光物质和同位素,且所述基因的表达水平可以作为所杂交的标记物的强度检测。

[0365] 此外,TOMM34 的转录产物还可通过基于扩增的检测方法(例如,RT-PCR)使用引物定量。此类引物可基于所述基因的可得序列信息制备。

[0366] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、中等严格条件或低严格条件下与 TOMM34 的 mRNA 杂交。如本文中所使用的,短语“严格(杂交)条件”是指这样的条件,在该条件下,探针或引物将与其靶序列杂交,但不与其它序列杂交。严格条件是依赖于序列的,而且在不同的环境下会不同。较长序列的特异杂交与较短序列相比在较高温度下观察到。一般地,严格条件的温度选择比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的热熔点(T_m) 低大约 5 摄氏度。 T_m 是(在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下)平衡状态下有 50% 的与其靶序列互补的探针与靶序列杂交的温度。因为靶序列一般过量存在,因此在 T_m ,平衡时 50% 的探针被占据。典型地,严格条件会是这样的:其中盐浓度小于大约 1.0M 钠离子,典型地大约 0.01-1.0M 钠离子(或其它盐),pH 7.0-8.3,温度对于较短的探针或引物(例如 10-50 个核苷酸)是至少大约 30 摄氏度,用于较长的探针或引物是至少大约 60 摄氏度。严格条件也可以通过添加去稳定物质,例如甲酰胺,来实现。

[0367] 本发明的探针或引物典型地是基本上纯化的寡核苷酸。寡核苷酸典型地包括这样的核苷酸序列区域,其在严格条件下与包括 TOMM34 序列的核酸的至少大约 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 或 25 个连续有义链核苷酸序列,或者包括 TOMM34 序

列的核酸的反义链核苷酸序列,或者这些序列的天然存在的突变体杂交。尤其是,例如,在优选的实施方案中,可以使用长度为5-50的寡核苷酸作为引物来扩增要检测的基因。更优选地,可以用特定大小,一般是长度15-30b的寡核苷酸探针或引物来检测 TOMM34 基因的 mRNA 或 cDNA。大小可以在至少10个核苷酸,至少12个核苷酸,至少15个核苷酸,至少20个核苷酸,至少25个核苷酸,至少30个核苷酸的范围,且探针和引物的大小可以为5-10个核苷酸,10-15个核苷酸,15-20个核苷酸,20-25个核苷酸和25-30个核苷酸。在优选的实施方案中,寡核苷酸探针或引物的长度可以从15-25中选择。使用此类寡核苷酸探针或引物检测基因的测定程序、装置或试剂是公知的(例如寡核苷酸微阵列或PCR)。在这些测定中,探针或引物也可以包括标签或接头序列。此外,可以使用可检测的标记物或待捕捉的亲和配体来修饰探针或引物。或者,在基于杂交的检测程序中,也可以使用长度为数百个(例如约100-200个)碱基至数千个(例如约1000-2000个)碱基的多核苷酸用于探针(例如 Northern 印迹测定或 cDNA 微阵列分析)。

[0368] 或者,可以检测翻译产物以进行本发明的诊断。例如,可以确定 TOMM34 蛋白(SEQ ID NO:42)或其免疫学活性片段的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括免疫测定方法,此类方法使用特异识别所述蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰(例如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv等)均可用于检测,只要该片段或经修饰抗体保留对 TOMM34 蛋白的结合能力即可。本发明也提供这样的针对本发明的肽及的抗体及其片段。制备这些类型的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的,并且在本发明中可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0369] 作为另一种基于 TOMM34 的翻译产物检测 TOMM34 基因的表达水平的方法,可利用针对 TOMM34 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析测量其染色的强度。意即,在这种测量中,强染色表明所述蛋白质存在/水平增加,且同时表明 TOMM34 基因的高表达水平。

[0370] 对于癌细胞中的靶基因(例如 TOMM34 基因),如果其较之靶基因的对照水平(例如正常细胞中的水平)增加了例如10%,25%或50%的话,或增加到超过1.1倍,超过1.5倍,超过2.0倍,超过5.0倍,超过10.0倍或者更多,则可以认为其在癌细胞中的表达水平增加了。

[0371] 在本发明的语境中,从已知为非癌性的生物学样品测得的对照水平称为“正常对照水平”。另一方面,如果对照水平是从癌性生物学样品测得的,则称其为“癌性对照水平”。样品表达水平与对照水平间的差异可以相对已知表达水平不会随着细胞的癌或非癌状态改变的对照核酸(例如管家基因)的表达水平加以标准化。示例的对照基因包括,但不限于, β -肌动蛋白、甘油醛-3磷酸脱氢酶和核糖体蛋白P1。

[0372] 对照水平可以与癌细胞同时确定,使用先前从疾病状态(患癌或未患癌)已知的受试者(一名或多名)收集和保存的样品。另外,自具有要治疗的癌症的器官的非癌性区获得的正常细胞可用作正常对照。或者,对照水平可以借助统计方法,根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 TOMM34 基因表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以是来自先前测试过的细胞的表达模式数据库。而且,根据本发明的一个方面,可以将生物样品中 TOMM34 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用从来自与源自受试者的样品的组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中 TOMM34 基因表达水平的标准

值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm 2S.D.$ 或平均值 $\pm 3S.D.$ 的范围可以用作标准值。

[0373] 在本发明的语境中,从已知非癌性的生物样品确定的对照水平称作“正常对照水平”。另一方面,如果对照水平从癌性生物样品确定,则会称作“癌性对照水平”。

[0374] 当 TOMM34 基因的表达水平相比正常表达水平有所提高,或与癌性对照水平相似/等同,则受试者可诊断为具有要治疗的癌症。

[0375] 本发明还提供了一种 (i) 诊断受试者是否具有要治疗的癌症,和 / 或 (ii) 选择受试者进行癌症治疗的方法,该方法包括下述步骤:

[0376] a) 测定 TOMM34 在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的癌细胞或组织中的表达水平;

[0377] b) 将 TOMM34 的表达水平与正常对照水平比较;

[0378] c) 若 TOMM34 的表达水平与正常对照水平相比升高的话,将受试者诊断为具有要治疗的癌症;并

[0379] d) 若在步骤 c) 中受试者被诊断为具有要治疗的癌症的话,选择受试者进行癌症治疗。

[0380] 或者,此类方法包括下述步骤:

[0381] a) 测定在自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的细胞或组织中 TOMM34 的表达水平;

[0382] b) 将 TOMM34 的表达水平与癌性对照水平比较;

[0383] c) 若 TOMM34 的表达水平与癌性对照水平相似或等同的话,将受试者诊断为具有要治疗的癌症;并

[0384] d) 若在步骤 c) 中受试者被诊断为具有要治疗的癌症的话,选择受试者进行癌症治疗。

[0385] 本发明还提供了用于诊断或确定患有或疑似患有能用本发明的 TOMM34 多肽来治疗的癌症的受试者的诊断试剂盒,其亦可用于评价癌症的预后和 / 或监测癌症疗法,尤其是癌症免疫疗法的功效或适用性。合适的癌症的示例包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。更特别地,所述试剂盒优选包含至少一种在源自受试者的细胞中检测 TOMM34 基因表达的试剂,所述试剂选自下组:

[0386] (a) 用于检测 TOMM34 基因的 mRNA 的试剂;

[0387] (b) 用于检测 TOMM34 蛋白或其免疫学活性片段的试剂;和

[0388] (c) 用于检测 TOMM34 蛋白的生物学活性的试剂。

[0389] 适于检测 TOMM34 基因 mRNA 的试剂可包括特异性结合或识别 TOMM34mRNA 的核酸,诸如具有与 TOMM34mRNA 的一部分互补的序列的寡核苷酸。这类寡核苷酸的例子有对 TOMM34mRNA 特异性的引物与探针。这类寡核苷酸可基于本领域众所周知的方法制备。如果需要,用于检测 TOMM34mRNA 的试剂可固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 TOMM34mRNA 的试剂。

[0390] 另一方面,适于检测 TOMM34 蛋白或其免疫学活性片段的试剂可包括针对 TOMM34 蛋白或其免疫学活性片段的抗体。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步,任何所述

抗体的片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等)均可用作所述试剂,只要所述片段或经修饰抗体保留与 TOMM34 蛋白或其免疫学活性片段的结合能力。为检测蛋白制备此类抗体的方法在本领域是众所周知的,且可在本发明中使用任何方法制备上述抗体及其等价物。进一步,所述抗体可用能产生信号的分子通过直接连接或间接标记技术进行标记。标记物与标记抗体以及检测抗体与其靶的结合的方法在本领域是众所周知的,且本发明可使用任何标记物与方法。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种用于检测 TOMM34 蛋白的试剂。

[0391] 所述试剂盒可包含多于一种前述的试剂。所述试剂盒还可包含用于结合针对 TOMM34 基因的探针或者针对 TOMM34 肽的抗体的固体基质和试剂、用于培养细胞的培养基和容器、阳性和阴性对照试剂、和用于检测针对 TOMM34 肽的抗体的第二抗体。举例而言,从没有癌症或患有癌症的受试者获取的组织样品可用作有用的对照试剂。本发明的试剂盒可进一步包括其它从商业或用户角度而言期望的材料,包括缓冲液、稀释液、滤器、针头、注射器和带有使用说明书(例如,书面的、磁带、CD-ROM 等等)的装箱单。这些试剂之类的可标上标签包含在容器中。合适的容器包括瓶、管状瓶(vials)和试管。所述容器可用多种材料制造,例如玻璃或塑料。

[0392] 在本发明的一个实施方案中,当所述试剂是针对 TOMM34mRNA 的探针时,所述试剂可固定化于固体基质例如多孔条上,以形成至少一个检测位置。所述多孔条的测量或检测区域可包含多个位置,每个都包含核酸(探针)。测试条亦可包含阴性和/或阳性对照的位置。或者,对照位置可位于与测试条不同的条上。任选地,不同的检测位置可包含不同量的固定化核酸,即,在第一个检测位置上量较大而在后面的位置上量较小。在加入测试样品之后,显示可检测信号位置的数目提供了在样品中存在的 TOMM34mRNA 量的定量指征。所述检测位置可设置成具有任何合适可检测的形状,通常是横跨测试条宽度的条状或点状。

[0393] 本发明所述试剂盒可进一步包括阳性对照样品或 TOMM34 标准样品。本发明的所述阳性对照样品可通过收集 TOMM34 阳性样品,随后测定其 TOMM34 水平来制备。此外,可将纯化的 TOMM34 蛋白或多核苷酸添加到不表达 TOMM34 的细胞中以形成所述阳性样品或 TOMM34 标准样品。在本发明中,纯化的 TOMM34 可以是重组蛋白。例如,阳性对照样品的 TOMM34 水平大于截留值。

[0394] 在一个实施方案中,本发明进一步提供了一种诊断试剂盒,其包括被本发明抗体特异性识别的蛋白或其部分蛋白或其免疫原性片段。

[0395] 本发明的蛋白质的部分肽的例子包括由本发明蛋白的氨基酸序列中的至少 8 个、优选 15 个、和更优选 20 个连续氨基酸构成的多肽。癌症可通过使用本发明的蛋白或肽(多肽)检测样品(例如血液、组织)中的抗体来诊断。上文描述了用于制备本发明的肽或蛋白质的方法。

[0396] 本发明提供用于诊断癌症的方法,其可通过如上所述测定抗 TOMM34 抗体量和相应对照样品中的量之间的差异来进行。若受试者的细胞或组织含有针对该基因的表达产物(TOMM34)的抗体并且测得的抗 TOMM34 抗体的量大于截留值(与正常对照中的水平相比)的话,则该受试者怀疑患有癌症。

[0397] 在另一个实施方案中,本发明的诊断试剂盒可包括本发明的肽及与它结合的 HLA 分子。使用抗原性肽和 HLA 分子检测抗原特异性 CTL 的合适方法早已确立(例如 Altman

JD et al., Science. 1996, 274(5284):94-6)。因此,本发明肽和 HLA 分子形成的复合物可用于检测方法来检测肿瘤抗原特异性 CTL,由此能够较早检测癌症的复发和 / 或转移。进一步,它可用于选择适用包含本发明肽作为活性组分的药物的受试者或评估该药物的治疗效果。

[0398] 特别地,依照已知方法(参见例如 Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284):94-6),可制备放射性标记的 HLA 分子和本发明肽的寡聚物复合物,诸如四聚体。可例如通过使用该复合物来对源自怀疑患有癌症的受试者的外周血淋巴细胞中的抗原-肽特异性 CTL 定量来进行诊断。

[0399] 本发明进一步提供了使用如本文所述的肽表位来评估受试者的免疫学应答的方法或诊断试剂。在本发明的一个实施方案中,可使用本文所述的 HLA-A2 限制肽作为试剂来评估或预测受试者的免疫应答。要评估的免疫应答是通过在体外或在体内使免疫原接触免疫活性细胞来诱导的。在优选的实施方案中,用于评估免疫应答的免疫活性细胞可以选自外周血、外周血淋巴细胞(PBL)、和外周血单个核细胞(PBMC)。用于收集或分离此类免疫活性细胞的方法是本领域公知的。在一些实施方案中,任何可导致识别和结合肽表位的抗原特异性 CTL 的生成的作用剂均可用作所述试剂。肽试剂无需用作所述免疫原。用于此类分析的测定系统包括相对较新的技术发展,诸如四聚体、胞内淋巴因子染色和干扰素释放测定法、或 ELISPOT 测定法。在优选的实施方案中,要与肽试剂接触的免疫活性细胞可以为抗原呈递细胞,包括树突细胞。

[0400] 例如,本发明的肽可用于四聚体染色测定法,评估外周血单个核细胞在暴露于肿瘤细胞抗原或免疫原后抗原特异性 CTL 的存在。HLA 四聚体复合物可用于直接显现抗原特异性 CTL(参见例如 Ogg et al., Science 279:2103-2106, 1998; 和 Altman et al., Science 274:94-96, 1996) 和测定抗原特异性 CTL 群体在外周血单个核细胞样品中的频率。使用本发明肽的四聚体试剂可如下所述来生成:

[0401] 与 HLA 分子结合的肽在相应 HLA 重链和 $\beta 2$ -微球蛋白存在下重折叠以生成三分子复合物。在该复合物中,重链的羧基末端在先前工程化到蛋白质中的位点处被生物素化。然后,将链亲和素添加至复合物以形成由三分子复合物和链亲和素组成的四聚体。借助荧光标记的链亲和素,可利用该四聚体对抗原特异性细胞染色。然后可例如通过流式细胞术鉴定细胞。此类分析可用于诊断或预后目的。通过该规程鉴定的细胞也可用于治疗目的。

[0402] 本发明还提供了包括本发明肽的用于免疫回忆应答的试剂(参见例如 Bertoni et al., J. Clin. Invest. 100:503-513, 1997 和 Penna et al., J. Exp. Med. 174:1565-1570, 1991)。例如,使用特定肽对来自具有要治疗的癌症的个体的患者 PBMC 样品分析抗原特异性 CTL 的存在。含有单个核细胞的血液样品可如下评估:培养 PBMC,并用本发明的肽刺激该细胞。适宜培养时段后,可对扩增的细胞群体进行分析,例如分析 CTL 活性。

[0403] 肽还可作为试剂用于评估疫苗的功效。可使用例如上文所述方法来分析自疫苗接种免疫原的患者获得的 PBMC。测定患者的 HLA 型,并选择识别患者中存在的等位基因特异性分子的肽表位试剂进行分析。疫苗的免疫原性可通过 PBMC 样品中表位特异性 CTL 的存在来指示。

[0404] 本发明的肽还可用于制备抗体,使用本领域公知技术(参见例如 CURRENT

PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; 和 Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 其可作为试剂用于诊断、检测或监测癌症。此类抗体可包括识别 HLA 分子背景中的肽的抗体, 即结合肽-MHC 复合物的抗体。

[0405] 本发明的肽和组合物还具有多种其他应用, 本文中描述了其中一些。例如, 本发明提供了一种用于诊断或检测以 TOMM34 免疫原性多肽表达为特征的病症的方法。这些方法包括测定在生物学样品本发明肽与 I 类 HLA 分子形成的复合物或本发明肽的表达水平的步骤。肽或肽和 I 类 HLA 分子形成的复合物的表达可通过用针对肽或复合物的结合配偶测定来测定或检测。在一个优选的实施方案中, 针对肽或复合物的结合配偶可以是识别和特异性结合该肽的抗体。TOMM34 在生物学样品诸如肿瘤活检中的表达也可使用 TOMM34 引物通过标准 PCR 扩增方案来测试。本文中呈现了肿瘤表达的一个例子, 而且用于 TOMM34 扩增的例示性条件和引物的进一步公开内容可见于 WO2003/27322。

[0406] 优选地, 诊断方法包括使自受试者分离的生物学样品接触对本发明肽特异性的作用剂以检测本发明肽在该生物学样品中的存在的步骤。如本文中使用的, “接触”意味着在适宜条件(例如浓度、温度、时间、离子强度)下放置生物学样品使其足够接近所述作用剂, 以容许作用剂和生物学样品中存在的本发明肽之间的特异性相互作用。一般地, 作用剂接触生物学样品的条件是本领域普通技术人员知道的可促进生物学样品中分子与其关联物(例如蛋白质与其受体、抗体与其蛋白质抗原、核酸与其互补链)之间的特异性相互作用的条件。用于促进分子与其关联物之间的特异性相互作用的最优条件记载于授权给 Low 等人的美国专利 No. 5, 108, 921。

[0407] 本发明的诊断方法可以在体内和 / 或在体外实施。因而, 生物学样品在本发明中可位于体内或体外。例如, 生物学样品可以是体内组织, 而且可使用对 TOMM34 免疫原性多肽特异性的作用剂来检测此类分子在组织中的存在。或者, 可在体外收集或分离生物学样品(例如血液样品、肿瘤活检标本、组织提取物)。在一个特别优选的实施方案中, 生物学样品可以是含有细胞的样品, 更优选自要诊断或治疗的受试者收集的含有肿瘤细胞的样品。

[0408] 或者, 诊断可使用容许通过对荧光素标记的 HLA 多聚体复合物染色而直接定量抗原特异性 T 细胞的方法来进行(例如 Altman, J. D. et al., 1996, Science 274:94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330)。还提供了对胞内淋巴因子的染色和干扰素- γ 释放测定法或 ELISPOT 测定法。四聚体染色、胞内淋巴因子染色和 ELISPOT 测定法都表现出比更常规的测定法灵敏至少 10 倍(Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8:177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186:859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8:413)。也可使用五聚体(例如 US2004-209295A)、Dextramers(例如 W002/072631)、和 Streptamers(例如 Nature medicine 6:631-637(2002))。

[0409] 例如, 在一些实施方案中, 本发明提供一种用于诊断或评价被施用了至少一种本发明的 TOMM34 肽的受试者的免疫应答的方法, 所述方法包括下述步骤:

[0410] (a) 在适合诱导对免疫原特异性的 CTL 的条件下使免疫原与具免疫活性细胞接触;

[0411] (b) 检测或测定步骤 (a) 中诱导的 CTL 的诱导水平; 和

[0412] (c) 将所述受试者的免疫应答与所述 CTL 诱导水平相关联。

[0413] 在本发明的语境中,免疫原优选包括下述中至少一种本发明的 TOMM34 肽,例如具有选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列的肽及其修饰肽(具有所述氨基酸序列的肽,和在所述氨基酸序列中具有已经过 1 个、2 个或更多个氨基酸取代的肽)。同时,适合诱导免疫原特异性 CTL 的条件是本领域公知的。例如,可以在体外在免疫原存在下培养具免疫活性细胞来诱导免疫原特异性 CTL。为了诱导免疫原特异性 CTL,可以将任何刺激因子添加至细胞培养物。例如,IL-2 是用于 CTL 诱导的优选的刺激因子。在一些实施方案中,对要用肽癌症疗法治疗的受试者的免疫应答的监测或评价步骤可以在治疗之前、之中和 / 或之后进行。一般而言,在癌症治疗规程中,反复地对要治疗的受试者施用免疫原性肽。例如,可以每周施用免疫原性肽 3-10 周。相应地,可以在整个癌症治疗程序中评价或监测受试者的免疫应答。或者,评价或监测免疫应答的步骤可以在治疗程序完成时进行。根据本发明,免疫原特异性 CTL 的诱导相对于对照增强,表明要评价或诊断的受试者对已施用的免疫原免疫应答。用于评价免疫应答的合适的对照可包括,例如,免疫活性细胞未与肽接触时的 CTL 诱导水平,或者与具有 TOMM34 肽之外的氨基酸序列(例如随机氨基酸序列)的对照肽接触时的 CTL 诱导水平。在一个优选的实施方案中,以序列特异性的方式评价受试者的免疫应答,方法是在施用给受试者的各种免疫原之间比较免疫应答。具体地,即使当数种 TOMM34 肽的混合物被施用给受试者时,免疫应答也会依赖于肽而改变。在这种情况下,通过比较每种肽的免疫应答,可以鉴定出受试者对其显示更高应答的肽。

[0414] XI. 抗体

[0415] 本发明提供了与本发明的肽结合的抗体。优选的抗体特异性结合本发明的肽且不会结合(或会微弱结合)非本发明的肽。或者,抗体能结合本发明的肽及其同源物。

[0416] 针对本发明肽的抗体可用于癌症诊断和预后测定法、及成像方法学。类似地,此类抗体可用于其它癌症的治疗、诊断、和 / 或预后,只要癌症患者中也表达或过表达 TOMM34。此外,胞内表达的抗体(例如单链抗体)在治疗上可用于治疗涉及 TOMM34 表达的癌症,这样的癌症的例子包括但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。

[0417] 本发明还提供了多种免疫学测定法,用于检测和 / 或定量 TOMM34 蛋白(SEQ ID NO:42) 或其片段,包括本发明的肽。此类测定法可根据需要包括一种或多种能够识别和结合 TOMM34 蛋白或其片段的抗 TOMM34 抗体。在本发明的语境中,与 TOMM34 多肽结合的抗 TOMM34 抗体优选识别本发明的肽。抗体的结合特异性可用抑制测试来确认。即,当要分析的抗体与全长 TOMM34 多肽之间的结合在本发明的肽存在下受到抑制时,证明此抗体特异性结合该片段。在本发明的语境中,此类免疫学测定法以本领域公知的各种免疫学测定形式实施,包括但不限于各种类型的放射免疫测定法、免疫层析技术、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、酶联免疫荧光测定法(ELIFA)、等等。

[0418] 本发明的相关免疫学的但非抗体的测定法也包括 T 细胞免疫原性测定法(抑制性的或刺激性的)以及主要组织相容性复合物(MHC) 结合测定法。另外,本发明还提供能够检测表达 TOMM34 的癌症的免疫学成像方法,包括但不限于使用经标记的本发明抗体的放射闪烁成像方法。此类测定法在临床上可用于表达 TOMM34 的癌症的检测、监测、和预后,所述癌症但不限于 AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤。

[0419] 本发明还提供了与本发明的肽结合的抗体。本发明的抗体可以以任何形式使用，例如单克隆或多克隆抗体，而且包括通过用本发明的肽免疫动物（诸如家兔）而获得的抗血清、所有种类的多克隆和单克隆抗体、及通过遗传重组生成的人抗体和人源化抗体。

[0420] 本发明的作为抗原用于获得抗体的肽可来源于任何动物物种，但优选来源于哺乳动物，诸如人、小鼠或大鼠，更优选来源于人。来源于人的肽可以由本文所公开的核苷酸或氨基酸序列获得。

[0421] 根据本发明，用作免疫抗原的肽可以是完整的蛋白质或蛋白质的部分肽。部分肽可以包含例如本发明肽的氨基 (N) 末端或羧基 (C) 末端片段。

[0422] 在本文中，本发明的抗体定义为能与 TOMM34 肽的全长或片段起反应的蛋白质。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体识别具有选自 SEQ ID NO:1, 5, 31 和 32 的氨基酸序列的 TOMM34 的片段肽。用于合成寡肽的方法是本领域公知的。合成后，可任选在作为免疫原使用之前纯化肽。在本发明的语境中，寡肽（例如 9 或 10 聚物）可与载体缀合或连接以增强免疫原性。匙孔虫凝血蓝蛋白 (KLH) 作为载体是公知的。用于缀合 KLH 和肽的方法也是本领域公知的。

[0423] 或者，可以将编码本发明肽或其片段的基因插入已知的表达载体，然后用该载体转化本文所述宿主细胞。可以通过任何标准方法从宿主细胞外部或内部回收所需肽或其片段，然后可将其用作抗原。或者，表达肽的完整细胞或其溶胞物或者化学合成的肽也可用作抗原。

[0424] 可以用抗原免疫任何哺乳动物，但优选考虑与用于细胞融合的亲本细胞的相容性。通常，可使用啮齿目 (Rodentia)、兔形目 (Lagomorpha) 或灵长类 (Primates) 的动物。啮齿目动物包括例如小鼠、大鼠和仓鼠。兔形目动物包括例如家兔。灵长类包括例如狨猴 (Catarrhini) (东半球猴 (old world monkey)) 诸如食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)、恒河猴 (rhesus monkey)、狒狒 (sacred baboon) 和黑猩猩 (chimpanzee)。

[0425] 用抗原免疫动物的方法是本领域已知的。腹膜内注射或皮下注射抗原是免疫哺乳动物的标准方法。更具体的说，可以在适量的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、生理盐水等中稀释和悬浮抗原。如果需要，可将抗原悬浮液与适量的标准佐剂诸如弗氏 (Freund) 完全佐剂混合，制成乳状液，然后施用于哺乳动物。优选的是，其后每 4-21 天施用数次与适量弗氏不完全佐剂混合的抗原。还可使用适宜的载体进行免疫。如上所述进行免疫后，通过标准方法检验血清中所需抗体的量的增加。

[0426] 可以如下制备针对本发明肽的多克隆抗体：从经过免疫的哺乳动物（该哺乳动物经检验其血清中所需抗体增加）收集血液，并通过任何常规方法从血液中分离血清。多克隆抗体可包括含有多克隆抗体的血清，以及可以从所述血清中分离的、含有该多克隆抗体的级分。可以使用例如偶联有本发明肽的亲合柱从仅识别本发明肽的级分中制备免疫球蛋白 G 或 M，并进一步使用蛋白 A 或蛋白 G 柱纯化该级分。

[0427] 为了制备单克隆抗体，从经过抗原免疫并如上所述检查出血清中所需抗体水平升高的哺乳动物收集免疫细胞，并进行细胞融合。用于细胞融合的免疫细胞优选获自脾。其它要与上述免疫细胞融合的优选亲本细胞包括例如哺乳动物的骨髓瘤细胞，更优选具有为了用药物选择融合细胞而获得的特性的骨髓瘤细胞。

[0428] 可根据已知的方法，例如 Milstein 等 (Galfre 和 Milstein, Methods

Enzymol73:3-46(1981)) 的方法,将上述免疫细胞与骨髓瘤细胞进行融合。

[0429] 对于由细胞融合得到的杂交瘤,可在标准选择培养基诸如 HAT 培养基(含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基)中培养以进行选择。通常,细胞培养在 HAT 培养基中连续进行数天至数周,培养的时间足以使除了所需杂交瘤之外的所有其它细胞(非融合的细胞)死亡。然后,进行标准有限稀释(standard limiting dilution)来筛选和克隆生成所需抗体的杂交瘤细胞。

[0430] 除了上述用抗原免疫非人动物来制备杂交瘤的方法外,还可以在体外用肽、表达肽的细胞或其溶胞物免疫人淋巴细胞,诸如那些感染了 EB 病毒的人淋巴细胞。然后,使经过免疫的淋巴细胞与能够无限分裂的源自人的骨髓瘤细胞诸如 U266 融合,以产生期望的生成能够与所述肽结合的人抗体的杂交瘤(已公开但未审查的日本专利申请 No. (JP-A) Sho63-17688)。

[0431] 随后将所得杂交瘤移植入小鼠腹腔,并抽取腹水。所得的单克隆抗体可通过例如硫酸铵沉淀、蛋白 A 或蛋白 G 柱、DEAE 离子交换层析或偶联有本发明肽的亲合柱进行纯化。本发明的抗体不仅可用于纯化和检测本发明的肽,还可以用作本发明肽的激动剂和拮抗剂的候选物。

[0432] 或者,可以通过癌基因使生成抗体的免疫细胞(诸如经过免疫的淋巴细胞)永生代,并用于制备单克隆抗体。

[0433] 如此获得的单克隆抗体也可以使用遗传工程技术来重组制备(参见例如 Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, 由 MacMillan Publishers LTD 在英国出版(1990))。例如,可以从生成抗体的免疫细胞诸如杂交瘤或经免疫淋巴细胞克隆编码抗体的 DNA,将该 DNA 插入合适的载体,并导入宿主细胞以制备重组抗体。本发明还提供如上所述制备的重组抗体。

[0434] 此外,本发明的抗体可以是抗体片段或经过修饰的抗体,只要它结合一种或多种本发明的肽。例如,抗体片段可以是 Fab、F(ab')₂、Fv 或将来自 H 链和 L 链的 Fv 片段通过合适的接头连接而成的单链 Fv(scFv)(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA85:5879-83(1988))。更具体的说,可以通过用酶诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体来生成抗体片段。或者,可以构建编码抗体片段的基因,将其插入表达载体,并在合适的宿主细胞中表达(参见例如 Co et al., J Immunol152:2968-76(1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol178:476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol178:497-515(1989); Lamoyi, Methods Enzymol121:652-63(1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol121:663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol9:132-7(1991))。

[0435] 抗体可以通过与多种分子诸如聚乙二醇(PEG)缀合来修饰。本发明提供了经过这样修饰的抗体。可通过化学修饰抗体来获得经过修饰的抗体。这些修饰方法是本领域常规的。

[0436] 或者,可以以源自非人抗体的可变区与源自人抗体的恒定区之间的嵌合抗体或者包含源自非人抗体的互补决定区(CDR)、源自人抗体的框架区(FR)及恒定区的人源化抗体的形式来获得本发明的抗体。此类抗体可依照已知技术来制备。人源化可通过用啮齿类的 CDR 或 CDR 序列替换人抗体的相应序列来进行(参见例如 Verhoeyen et

al., Science 239:1534-1536 (1988))。因而,此类人源化抗体是嵌合抗体,其中人可变域的一小部分已被来自非人物种的相应序列所替换。

[0437] 也可以使用完全的人抗体,这样的抗体除了人框架区和恒定区外还包含人可变区。此类抗体可使用本领域已知的多种技术来制备。例如,体外方法包括使用展示在噬菌体上的人抗体片段的重组文库(例如 Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991))。类似的,可通过将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物,例如内源免疫球蛋白基因部分或完全灭活的小鼠,来生成抗体。该方法记载于例如美国专利 Nos. 6,150,584 ;5,545,807 ;5,545,806 ;5,569,825 ;5,625,126 ;5,633,425 ;5,661,016。

[0438] 可以将如上获得的抗体纯化至同质。例如,可依照用于一般蛋白质的分离和纯化方法进行抗体的分离和纯化。例如,可以通过适当选择和组合使用柱层析诸如亲和层析、过滤、超滤、盐析、透析、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦来分出和分离抗体 (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow 和 David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)),但并不局限于此。蛋白 A 柱和蛋白 G 柱可以用作亲和柱。例示性的可使用的蛋白 A 柱包括例如 Hyper D、POROS 和 Sepharose F.F. (Pharmacia)。

[0439] 除亲和层析外的合适的层析方法的例子包括例如离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤、反相层析、吸附层析、等等 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。可以通过液相层析来进行层析规程,诸如 HPLC 和 FPLC。

[0440] 例如,可使用吸光度测量、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、酶免疫测定法 (EIA)、放射免疫测定法 (RIA) 和 / 或免疫荧光来测量本发明抗体的抗原结合活性。在 ELISA 中,将本发明的抗体固定化在板上,将本发明的肽施加到该板上,再施加含有期望的抗体的样品,诸如生成抗体的细胞的培养物上清液或纯化的抗体。然后施加用酶(诸如碱性磷酸酶)标记的、识别所述第一抗体的第二抗体,并将板温育。接着,在洗涤后,向板中加入酶底物,诸如磷酸对硝基苯酯,并测量吸光度以评估样品的抗原结合活性。可以使用肽的片段,诸如 C-末端或 N-末端片段作为抗原来评估抗体的结合活性。可以使用 BIAcore (Pharmacia) 来评估本发明抗体的活性。

[0441] 上述方法允许通过将本发明的抗体暴露于假定含有本发明肽的样品,并检测或测量由抗体与肽形成的免疫复合物,来检测或测量本发明的肽。

[0442] 因为依照本发明的肽检测或测量方法可特异性的检测或测量肽,所以该方法可用于使用肽的各种实验。

[0443] XII. 载体和宿主细胞

[0444] 本发明还提供了导入有编码本发明肽的核苷酸的载体和宿主细胞。本发明的载体可用于在宿主细胞中维持本发明的核苷酸、尤其是 DNA,用于表达本发明的肽,或者用于施用本发明的核苷酸以用于基因疗法。

[0445] 当宿主细胞为大肠杆菌且在大肠杆菌(例如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue)中大量扩增和生成载体时,载体应具有能在大肠杆菌中扩增的“(复制)起点”和用于选择经过转化的大肠杆菌的标志基因(例如通过药物诸如氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素等进行选择的药物抗性基因)。例如,可以使用 M13 系列载体、pUC 系列载体、pBR322、

pBluescript、pCR-Script 等。另外,与上述载体一样,pGEM-T、pDIRECT 和 pT7 也可以用于亚克隆和提取 cDNA。当使用载体来生成本发明的蛋白质时,表达载体是特别有用的。例如,要在大肠杆菌中表达的表达载体应具备上述在大肠杆菌中扩增的特征。当使用大肠杆菌诸如 JM109、DH5 α 、HB101 或 XL1Blue 作为宿主细胞时,载体应具有能在大肠杆菌中高效表达所需基因的启动子,例如 lacZ 启动子 (Ward et al., Nature341:544-6 (1989); FASEB J6:2422-7 (1992))、araB 启动子 (Better et al., Science240:1041-3 (1988))、T7 启动子等。在这方面,可以使用例如 pGEX-5X-1 (Pharmacia)、“QIAexpress 系统”(Qiagen)、pEGFP 和 pET(在这种情况下,宿主优选为表达 T7RNA 聚合酶的 BL21)来取代上述载体。另外,载体还可以包含用于肽分泌的信号序列。指导肽分泌至大肠杆菌周质的例示性信号序列有 pelB 信号序列 (Lei et al., J Bacteriol169:4379 (1987))。用于将载体导入靶宿主细胞的手段包括例如氯化钙法和电穿孔法。

[0446] 除了大肠杆菌外,还可以使用例如源自哺乳动物的表达载体(例如 pcDNA3 (Invitrogen) 和 pEGF-BOS (Nucleic Acids Res18(17):5322 (1990))、pEF、pCDM8)、源自昆虫细胞的表达载体(例如“Bac-to-BAC 杆状病毒表达系统”(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、源自植物的表达载体(例如 pMH1、pMH2)、源自动物病毒的表达载体(例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、源自逆转录病毒的表达载体(例如 pZIpneo)、源自酵母的表达载体(例如“毕赤酵母表达试剂盒”(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)及源自枯草芽孢杆菌的表达载体(例如 pPL608、pKTH50)来生成本发明的多肽。

[0447] 为了在动物细胞诸如 CHO、COS 或 NIH3T3 细胞中表达载体,载体应具有在所述细胞中进行表达所必需的启动子,例如 SV40 启动子 (Mulligan et al., Nature277:108 (1979))、MMLV-LTR 启动子、EF1 α 启动子 (Mizushima et al., Nucleic Acids Res18:5322 (1990))、CMV 启动子、等等,及优选用于选择转化子的标志基因(例如通过药物(例如新霉素、G418)进行选择的药物抗性基因)。具有这些特征的已知载体的例子包括例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV 和 pOP13。

[0448] 描述了合适的方法和材料,但与本文中描述的方法和材料类似或等同的方法和材料也可以用于实施或检验本发明。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均全部通过援引并入本申请。在有冲突时,以本说明书包括定义为准。材料、方法和实施例是示例性的,不意在限制。提供下面的实施例来例示本发明及帮助本领域普通技术人员来制备和使用本发明。实施例并非意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0449] 材料和方法

[0450] 细胞系

[0451] HLA-A*0201 阳性 B- 淋巴母细胞样细胞系 T2 和非洲绿猴肾细胞系 COS7 购自 ATCC。

[0452] 源自 TOMM34 的肽的候选者选择

[0453] 使用结合预测软件“BIMAS”(http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al. (J Immunol1994, 152(1):163-75), Kuzushima et al. (Blood2001, 98(6):1872-81)) 预测了源自 TOMM34 的结合 HLA-A*0201 分子的 9 聚体和 10 聚体肽。这些肽由 BioSynthesis (Lewisville, Texas) 根据标准固相合成法合成,并通过

反相高效液相色谱 (HPLC) 纯化。分别通过分析型 HPLC 和质谱分析来确定肽的纯度 (>90%) 和身份。将肽以 20mg/ml 溶解在二甲基亚砷中并保存于 -80℃。

[0454] 体外 CTL 诱导

[0455] 使用单核细胞衍生的树突细胞 (DC) 作为抗原呈递细胞来诱导针对呈现在人白细胞抗原 (HLA) 上的肽的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。如他处所述 (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14):4112-8) 体外制备 DC。具体地说, 对于用 Ficoll-Plaque plus (Pharmacia) 溶液从正常志愿者 (HLA-A*0201 阳性) 分离的外周血单个核细胞, 通过粘附塑料组织培养盘 (Becton Dickinson) 加以分离, 以将它们作为单核细胞级分加以富集。将富集了单核细胞的群体在含 2% 热灭活的自体血清 (AS) 的 AIM-V 培养基 (Invitrogen) 中, 在 1000U/ml 的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (R&D System) 和 1000U/ml 白介素 (IL)-4 (R&D System) 的存在下培养。培养 7 天后, 将经细胞因子诱导的 DC 在 AIM-V 培养基中在 3 微克/ml β 2-微球蛋白存在下用 20 微克/ml 每一种合成肽于 37℃ 冲激 3 小时。所生成的细胞表现上在它们的细胞表面上表达 DC 相关分子, 诸如 CD80、CD83、CD86 和 HLA II 类 (数据未显示)。然后将这些经肽冲激的 DC 用 X 射线辐照 (20Gy) 灭活, 并以 1:20 比例与用 CD8 阳性分离试剂盒 (Dyna1) 通过正选择获得的自体 CD8+T 细胞混合。在 48 孔板 (Corning) 中设立这些培养物; 每个孔在 0.5ml AIM-V/2%AS 培养基中含有 1.5×10^4 个经肽冲激的 DC、 3×10^5 个 CD8+T 细胞和 10ng/ml IL-7 (R&D System)。3 天后, 给这些培养物补充 IL-2 (CHIRON) 至终浓度 20IU/ml。在第 7 天和第 14 天, 将 T 细胞用经肽冲激的自体 DC 进一步刺激。每次通过与上文所述相同的方式来制备 DC。在第 21 天在第三轮肽刺激后测试针对经肽冲激的 T2 细胞的 CTL (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

[0456] CTL 扩增规程

[0457] 使用与 Riddell 等人 (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16):1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2):216-23) 记载的方法相似的方法在培养中扩增 CTL。将总共 5×10^4 个 CTL 在 25ml AIM-V/5%AS 培养基中悬浮, 其中有在 40ng/ml 抗 CD3 单克隆抗体 (PharMingen) 存在下经丝裂霉素 C 灭活的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系。启动培养后一天, 向培养物添加 120IU/ml IL-2。在第 5 天、第 8 天和第 11 天给培养物补加新鲜的含有 30IU/ml IL-2 的 AIM-V/5%AS 培养基 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

[0458] CTL 克隆的建立

[0459] 在 96 圆底微量滴定板 (Nalge Nunc International) 中进行稀释以获得 0.3、1 和 3 个 CTL/孔。在总共 150 微升/孔的含 5%AS 的 AIM-V 培养基中, 将 CTL 与 1×10^4 个细胞/孔的两种人 B- 淋巴母细胞样细胞系、30ng/ml 的抗 CD3 抗体, 和 125U/ml 的 IL-2 一起培养。10 天后向培养基中加入 50 微升/孔的 IL-2 以达到终浓度 125U/ml 的 IL-2。在第 14 天测试 CTL 活性, 并使用如上所述的相同方法扩增 CTL 克隆 (Uchida N et al., Clin Cancer Re

s2004Dec15, 10(24):8577-86;Suda T et al., Cancer Sci2006May, 97(5):411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci2005Aug, 96(8):498-506)。

[0460] 特异性 CTL 活性

[0461] 为了检查特异性 CTL 活性,实施了 IFN- γ ELISPOT 测定法和 IFN- γ ELISA。制备经肽冲激的 T2(1×10^4 /孔)作为刺激细胞。使用 48 孔中培养的细胞作为应答细胞。依照制造商的规程实施 IFN- γ ELISPOT 测定法和 IFN- γ ELISA 测定法。

[0462] 强迫表达靶基因和 / 或 HLA-A02 的细胞的建立

[0463] 通过 PCR 来扩增编码靶基因可读框或 HLA-A*0201 的 cDNA。将 PCR 扩增产物克隆入表达载体。使用 Lipofectamine2000(Invitrogen) 依照制造商推荐的规程将质粒转染入 COS7(靶基因和 HLA-A*0201 阴性的细胞系)。自转染起 2 天后,用 Versene(Invitrogen) 收获经转染的细胞,并用作 CTL 活性测定法的刺激细胞(5×10^4 个细胞 / 孔)。

[0464] 结果 1

[0465] 癌症中 TOMM34 表达提高

[0466] 利用 cDNA 微阵列从不同癌症中获得的全局基因表达谱数据显示 TOMM34(GenBank Accession No. NM_006809, 例如 SEQ ID No:42) 表达升高。TOMM34 表达在 28 例 AML 中的 4 例、14 例 CML 中的 4 例、11 例膀胱癌中的 8 例、4 例乳腺癌中的 1 例、5 例宫颈癌中的 1 例、12 例结肠直肠癌中的 12 例、17 例食道癌中的 5 例、6 例肝癌中的 6 例、10 例骨肉瘤中的 1 例、26 例前列腺癌中的 1 例、19 例肾癌中的 1 例、14 例 SCLC 中的 2 例、20 例 NSCLC 中的 5 例、和 51 例软组织肿瘤中的 10 例中与相应的正常组织相比有效升高(表 1)。

[0467] 表 1

[0468] 在癌性组织中与相应正常组织相比观察到 TOMM34 上调的病例的比例

[0469]

癌症	比例
AML	4/28
CML	4/14
膀胱癌	8/11
乳腺癌	1/4
宫颈癌	1/5
结肠直肠癌	12/12
食道癌	5/17
肝癌	6/6
骨肉瘤	1/10

前列腺癌	1/26
肾癌	1/19
SCLC	2/14
NSCLC	5/20
软组织肿瘤	10/51

[0470] 结果 2

[0471] 源自 TOMM34 的 HLA-A02 结合肽的预测

[0472] 表 2a 和 2b 以高结合亲和力的顺序显示了 TOMM34 的 HLA-A02 结合性 9 聚体和 10 聚体肽。选择并检查了总共 40 种具有潜在 HLA-A02 结合能力的肽,以确定表位肽。

[0473] 表 2a

[0474] 源自 TOMM34 的 HLA-A02 结合性 9 聚体肽

[0475]

起始位置	氨基酸序列	得分	SEQ ID NO
30	ALYGRALRV	222.566	1
77	ALALVPFSI	60.51	2
52	VLYSNRAAC	27.026	3
110	TVLQIDDNV	11.034	4
220	LLCSNLESA	9.518	5
230	YSNRALCYL	8.115	6
103	MAYVDYKTV	7.883	7
80	LVPFSIKPL	7.309	8
255	KLDGKNVKA	6.955	9
23	GQYAEASAL	6.931	10
195	VLKEEGNEL	5.211	11
111	VLQIDDNVT	5.194	12
238	LVLKQYTEA	4.101	13

1	MAPKFPDSV	3.058	14
113	QIDDNVTSA	2.577	15
253	ALKLDGKNV	2.434	16
239	VLKQYTEAV	2.028	17
144	LPSIPLVPV	1.775	18
142	LKLPSIPLV	1.398	19
279	SSFADISNL	1.187	20

[0476] 表 2b

[0477] 源自 TOMM34 的 HLA-A02 结合性 10 聚体肽

[0478]

起始位置	氨基酸序列	得分	SEQ ID NO
143	KLPSiPLVPV	559.894	21
97	ALEKyPMAYV	56.309	22
79	ALVPfSIKPL	49.134	23
237	YLVlkQYTEA	34.279	24
135	SLGPeWRLKL	21.362	25
219	SLLCsNLESA	20.716	26
238	LVLKqYTEAV	18.757	27
127	RMTRaLMDSL	17.388	28
113	QIDDnVTSaV	15.684	29
241	KQYTeAVKDC	12.975	30
30	ALYGrALRVL	12.893	31
220	LLCSnLESAT	12.668	32
195	VLKEeGNELV	8.314	33
112	LQIDdNVTSA	8.075	34

194	RVLKeEGNEL	6.916	35
299	KLRQeVKQNL	5.682	36
141	RLKLpSIPLV	5.599	37
160	SLPSeNHKEM	4.968	38
175	KETTATKNRV	4.733	39
186	SAGDvEKARV	3.961	40

[0479] 起始位置表示自 TOMM34 的 N 末端起的氨基酸残基个数

[0480] 结合得分由“BIMAS”得出。

[0481] 使用预测的来自 TOMM34 的 HLA-A*0201 限制型肽诱导 CTL

[0482] 使用“材料和方法”中描述的规程制备了那些针对源自 TOMM34 的肽的 CTL。通过 IFN- γ ELISPOT 测定法检测了肽特异性 CTL 活性（图 1a-d）。下列孔号与对照孔相比显示了强的 IFN- γ 生成：用 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) (a) 刺激的 4 号孔、用 TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO:5) (b) 刺激的 2 号孔、用 TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO:31) (c) 刺激的 4 号孔、和用 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO:32) (d) 刺激的 4 号孔。另一方面，用表 2a 和 2b 中其他的肽刺激未能检测到特异性 CTL，尽管这些肽具有对 HLA-A*0201 的可能的结合活性。作为典型的阴性数据实例，从用 TOMM34-A02-10-143 (SEQ ID NO:21) (e) 刺激的 CTL 未观察到特异性 IFN- γ 生成。结果显示，4 种衍生自 TOMM34 的肽作为能够诱导强的 CTL 的肽被诱导出来。

[0483] 针对源自 TOMM34 的肽的 CTL 系和克隆的建立

[0484] 对于 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) 刺激的 4 号孔中通过 IFN- γ ELISPOT 测定法检测显示出肽特异性 CTL 活性的细胞进行扩增，并通过如上文“材料和方法”一节中所述的扩增规程建立 CTL 系。通过 IFN- γ ELISA 测定法测量这种 CTL 系的 CTL 活性（图 2）。与未经肽刺激的靶细胞相比，这种 CTL 系针对经相应肽刺激的靶细胞均展现出强的 IFN- γ 生成。此外，从这种 CTL 系如“材料和方法”中所述通过有限稀释建立 CTL 克隆，并通过 IFN- γ ELISA 测定法测量这种 CTL 克隆针对用肽刺激的靶细胞的 IFN- γ 生成。从用 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) 刺激的 CTL 克隆观察到强的 IFN- γ 生成（图 3）。

[0485] 针对表达 TOMM34 和 HLA-A*0201 的靶细胞的特异性 CTL 活性

[0486] 对针对 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) 肽产生的建成 CTL 系，检查它识别表达 TOMM34 和 HLA-A*0201 分子的靶细胞的能力。制备用全长 TOMM34 和 HLA-A*0201 基因二者转染的 COS7 细胞（表达 TOMM34 和 HLA-A*0201 基因的靶细胞的一种特异性模型）作为刺激细胞，并使用用全长 TOMM34 或 HLA-A*0201 转染的 COS7 细胞作为对照。在图 4 中，经 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) 刺激的 CTL 系针对表达 TOMM34 和 HLA-A*0201 二者的 COS7 细胞显示出强的 CTL 活性。另一方面，没有检测到显著的针对对照的特异性 CTL 活性。因此，这些数据清楚地证明 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1) 肽被内源地加工并与 HLA-A*0201 分子一起被呈递在靶细胞上，并被 CTL 识别。这些结果表明这种从 TOMM34 衍生的肽可适合

作为癌症疫苗用于具有表达 TOMM34 的肿瘤的患者。

[0487] 对抗原肽的同源性分析

[0488] 经 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO:5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO:31) 和 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO:32) 刺激的 CTL 显示出显著的且特异的 CTL 活性。这个结果可能是由于 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO:5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO:31) 和 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO:32) 的序列与其它已知可使人免疫系统致敏的分子衍生的肽同源。为了排除这种可能性,使用 BLAST 算法 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) 使用这些肽序列作为检索项实施了同源性分析,没有发现具有显著同源性的序列。同源性分析的结果指示 TOMM34-A02-9-30 (SEQ ID NO:1), TOMM34-A02-9-220 (SEQ ID NO:5), TOMM34-A02-10-30 (SEQ ID NO:31) 和 TOMM34-A02-10-220 (SEQ ID NO:32) 的序列是独特的,因此,就我们所知,这些分子产生对一些无关分子的不期望的免疫学应答的可能性很小。

[0489] 总之,我们鉴定了新的源自 TOMM34 的 HLA-A*0201 表位肽。另外,这里的结果证明了 TOMM34 的表位肽可能适合用于癌症免疫疗法。

[0490] 工业应用性

[0491] 本发明提供了新的 TAA,特别是源自 TOMM34 的新 TAA,它们可诱导强而特异性的抗肿瘤免疫应答,并且可应用于广泛的癌症类型。这样的 TAA 为其作为针对 TOMM34 相关疾病,例如癌症,更具体地说,AML、CML、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食道癌、肝癌、骨肉瘤、前列腺癌、肾癌、SCLC、NSCLC 和软组织肿瘤的肽疫苗的进一步开发提供了依据。

[0492] 虽然本文中参照其具体实施方案详细地描述了本发明,但是要理解,上面的描述本质上是例示性的和解释性的,而且意图例示本发明及其优选实施方案。经由常规实验,本领域技术人员会容易地认识到,可以对本发明进行各种变化和修饰,而不偏离本发明的精神和范围,本发明的边界和范围由下面的权利要求及其等同物来限定。

[0001]

序列表

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

<120> TOMM34 肽及包含它们的疫苗

<130> ONC-A1035P

<150> US 61/419,181

<151> 2010-12-02

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 1

Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 2

Ala Leu Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 3

Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 4

Thr Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val
1 5

[0002]

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 5
Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 6
Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 7
Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 8
Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 9
Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala
1 5

<210> 10
<211> 9

[0003]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 10

Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 11

Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 12

Val Leu Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 13

Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 14

Met Ala Pro Lys Phe Pro Asp Ser Val
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 15

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 16

Ala Leu Lys Leu Asp Gly Lys Asn Val
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 17

Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 18

Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 19

Leu Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0005]

<223> 人工合成的肽序列

<400> 20

Ser Ser Phe Ala Asp Ile Ser Asn Leu
1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 21

Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val
1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 22

Ala Leu Glu Lys Tyr Pro Met Ala Tyr Val
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 23

Ala Leu Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu
1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 24

Tyr Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

[0006]

<400> 25

Ser Leu Gly Pro Glu Trp Arg Leu Lys Leu
1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 26

Ser Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 27

Leu Val Leu Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 28

Arg Met Thr Arg Ala Leu Met Asp Ser Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 29

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala Val
1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 30

[0007]

Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val Lys Asp Cys
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 31

Ala Leu Tyr Gly Arg Ala Leu Arg Val Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 32

Leu Leu Cys Ser Asn Leu Glu Ser Ala Thr
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 33

Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu Val
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 34

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

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

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 35

Arg Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu
1 5 10

[0008]

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 36

Lys Leu Arg Gln Glu Val Lys Gln Asn Leu
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 37

Arg Leu Lys Leu Pro Ser Ile Pro Leu Val
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 38

Ser Leu Pro Ser Glu Asn His Lys Glu Met
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 39

Lys Glu Thr Thr Ala Thr Lys Asn Arg Val
1 5 10

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

<220>
<223> 人工合成的肽序列

<400> 40

Ser Ala Gly Asp Val Glu Lys Ala Arg Val
1 5 10

[0009]

```

<210> 41
<211> 2066
<212> DNA
<213> 人

<400> 41
aggctctcgca ggcceccgcc cctcgccgcg ggctcgtgt tggcgcgaga taitcgccgc      60
cggcgcctgc gcccggaagg igtgccgcac cacacggggg aggaaggaa ggcctccaa      120
ctcgccggcg tggccacggg atggcccca aattccaga ctctgtggag gagctccgc      180
ccgccggcaa tgagagtct cgcacggcc agtacgccga ggctccgcg ctctacggcc      240
gcgcgtcgcg ggctgtcag gcgaagggt ctacagacc agaagaaga agtgtctct      300
actccaaacc agcagcagt cacttgaagg atgaaacig cagagactgc atcaaagat      360
gcacttcagc actggccttg gtcccttca gcattagcc cctgtcggc cgagcctcg      420
cttatgagcg tctggagaag taccctatgg cctatgttg ctataagact gtcttcaga      480
ttgatgataa tgtacgtca gccgtgaag gcataacag aatgaccaga gctctcattg      540
actcgtcttg gccgtgagg cgcctgaag tgcctcaat ccccttggt cctgttctc      600
ctcagaagag gtggaattcc ttgccttcg agaaccaca agagtggct aaaagcaat      660
ccaaagaaac cacagctaca aagaacagag tgccttctg tggggaigt gagaaagcca      720
gagttctgaa ggaagaagcg aatgagctt taaagaagg aaaccaatg aagctattg      780
agaagtacag tgaagcctc ttgtgtagt acctggaac tgcacgtac agcaacagag      840
cactctgcta ttgtgtctg aagcagta cagaagcagt gaaggactgc acagaagccc      900
tcaagctgga tggaaagaac gtgaaggcat tctacagac ggtcaagcc cacaagcac      960
tcaaggacia taaatccagc ttgcagaca tcagcaacc cctacagatt gagcctagga      1020
atgttctcgc acagaagtgc cggcaggaag tgaagcaga cctacactaa aaaccaaca      1080
gggcaacttg aacctctgc tgacctacc cagagaagcc atgggccacc tgcctctgc      1140
ccgtcctga aacctagat gcccaagtg agctctgaag cccctctc aatcccttga      1200
tggcctccca cctgttaaga ggtttgtct gtcaaatg aatcagtg agtcaaac      1260
agacatggtt gttgcaccag aaaggtccc actagagcta agcgtgaagc tgaagctct      1320
tcctattcc cccagccag ctagctgac acaaccaag atccatca gcaagcatt      1380
tggtttgtc ctgccaagt ggcctcaga ctgagtcct ccttctgac tccccagac      1440
cccaactcac tgcagttcat ctgaacaacc tgagctctg ggcgggggt gaaggaggg      1500
gataaaccta agccctgat ccaagcagc ctgttagct ggtctccag ggtgcagtc      1560
ctccagggt tacagctgt gtccctgcc tctctgtcc ttgcacagc tctatgtct      1620
gagcccaagt gccttctgt cgggccctc ttgtgtgga aggcagagcc ctgaccttg      1680
aatggtgtc ctgactctg tctctctgc ttctgcagag aggcacctaa gctgtttaa      1740
gagccagtg attgtgctc ctctctag aggtggagg ggcgaaggc cctcttggt      1800
cagtgccat gccttctgag cagggaactt gtttttgtt ccaacagtg cctctccgg      1860
gttctatagt tctttgta atgtgaagt taattgaat tgactgatt tgtgaactg      1920
tgttttaag ctgttcatt aaaaagctt ctctacac aatactgt gtcttcat      1980

```

[0010]

ttatgccttt tcagctttgc accitggaact ctgtagtant aataaaagtt attgcttatt 2040
gggcattcaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2066

<210> 42
<211> 309
<212> PRT
<213> 人

<400> 42

Met Ala Pro Lys Phe Pro Asp Ser Val Glu Glu Leu Arg Ala Ala Gly
1 5 10 15

Asn Glu Ser Phe Arg Asn Gly Gln Tyr Ala Glu Ala Ser Ala Leu Tyr
20 25 30

Gly Arg Ala Leu Arg Val Leu Gln Ala Gln Gly Ser Ser Asp Pro Glu
35 40 45

Glu Glu Ser Val Leu Tyr Ser Asn Arg Ala Ala Cys His Leu Lys Asp
50 55 60

Gly Asn Cys Arg Asp Cys Ile Lys Asp Cys Thr Ser Ala Leu Ala Leu
65 70 75 80

Val Pro Phe Ser Ile Lys Pro Leu Leu Arg Arg Ala Ser Ala Tyr Glu
85 90 95

Ala Leu Glu Lys Tyr Pro Met Ala Tyr Val Asp Tyr Lys Thr Val Leu
100 105 110

Gln Ile Asp Asp Asn Val Thr Ser Ala Val Glu Gly Ile Asn Arg Met
115 120 125

Thr Arg Ala Leu Met Asp Ser Leu Gly Pro Glu Trp Arg Leu Lys Leu
130 135 140

Pro Ser Ile Pro Leu Val Pro Val Ser Ala Gln Lys Arg Trp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Pro Ser Glu Asn His Lys Glu Met Ala Lys Ser Lys Ser Lys Glu
165 170 175

Thr Thr Ala Thr Lys Asn Arg Val Pro Ser Ala Gly Asp Val Glu Lys
180 185 190

Ala Arg Val Leu Lys Glu Glu Gly Asn Glu Leu Val Lys Lys Gly Asn
195 200 205

His Lys Lys Ala Ile Glu Lys Tyr Ser Glu Ser Leu Leu Cys Ser Asn
210 215 220

Leu Glu Ser Ala Thr Tyr Ser Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu Val Leu
225 230 235 240

[0011]

Lys Gln Tyr Thr Glu Ala Val Lys Asp Cys Thr Glu Ala Leu Lys Leu
 245 250 255
 Asp Gly Lys Asn Val Lys Ala Phe Tyr Arg Arg Ala Gln Ala His Lys
 260 265 270
 Ala Leu Lys Asp Tyr Lys Ser Ser Phe Ala Asp Ile Ser Asn Leu Leu
 275 280 285
 Gln Ile Glu Pro Arg Asn Gly Pro Ala Gln Lys Leu Arg Gln Glu Val
 290 295 300
 Lys Gln Asn Leu His
 305

<210> 43
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 43
 gtctaccagg cattcgcttc at

22

<210> 44
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 44
 tcagctggac cacagccgca gcgt

24

<210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 45
 tcagaaatcc ttctcttga c

21

<210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 46
 ctagectctg gaatccttcc tctt

24

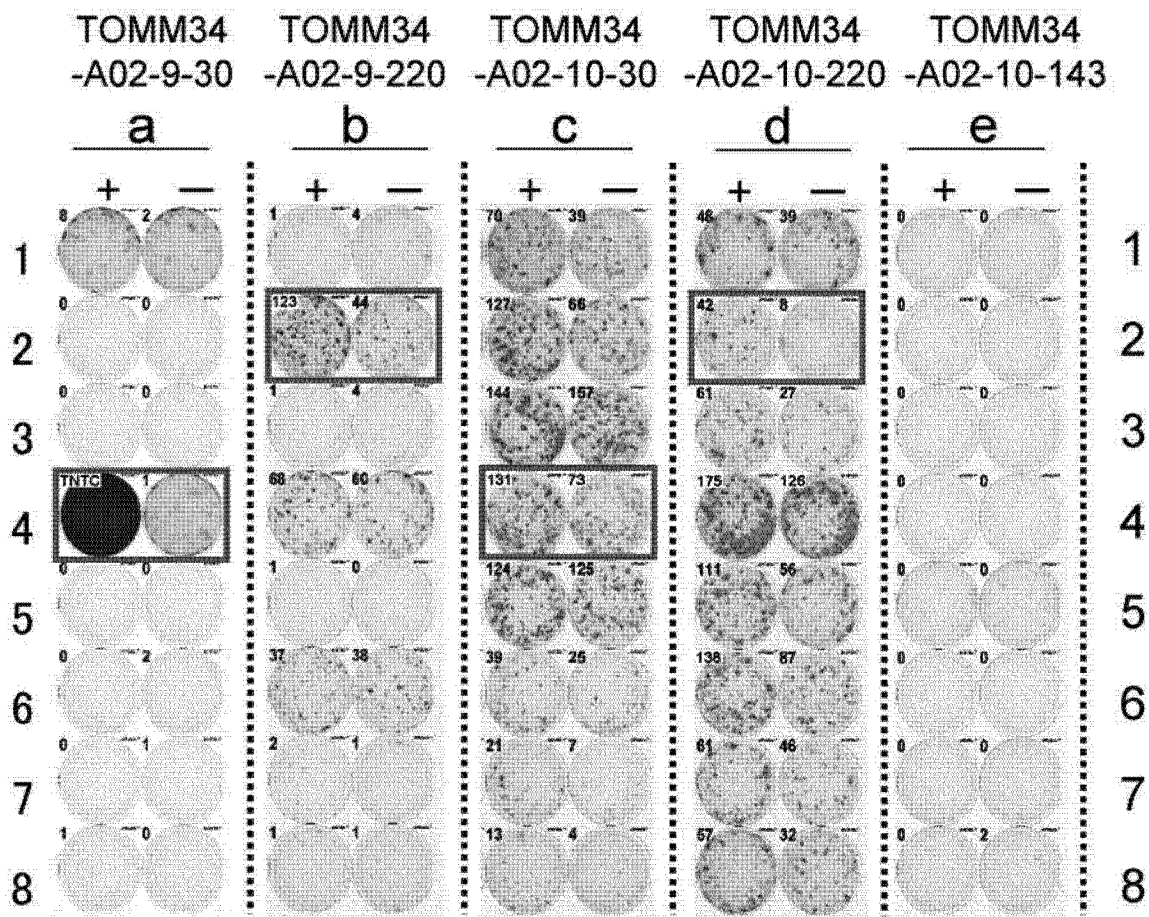


图 1

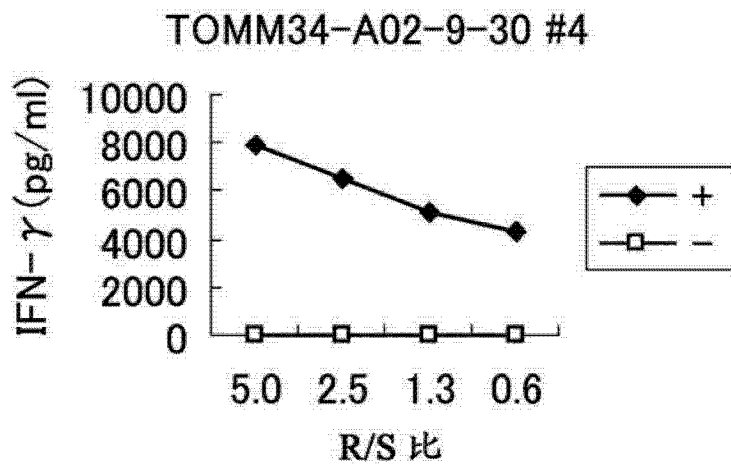


图 2

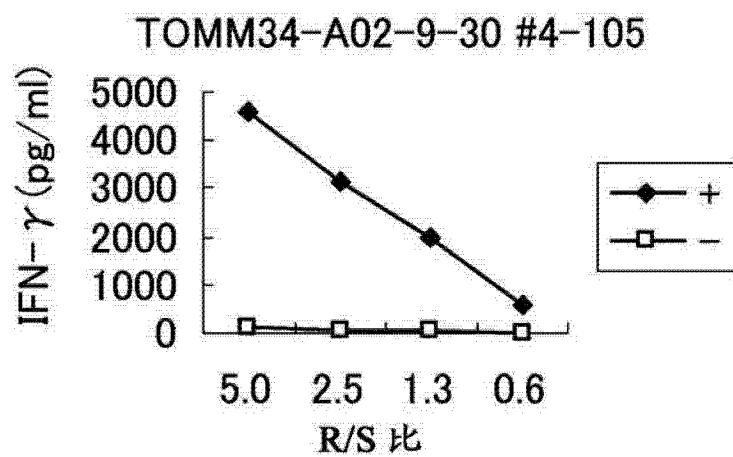


图 3

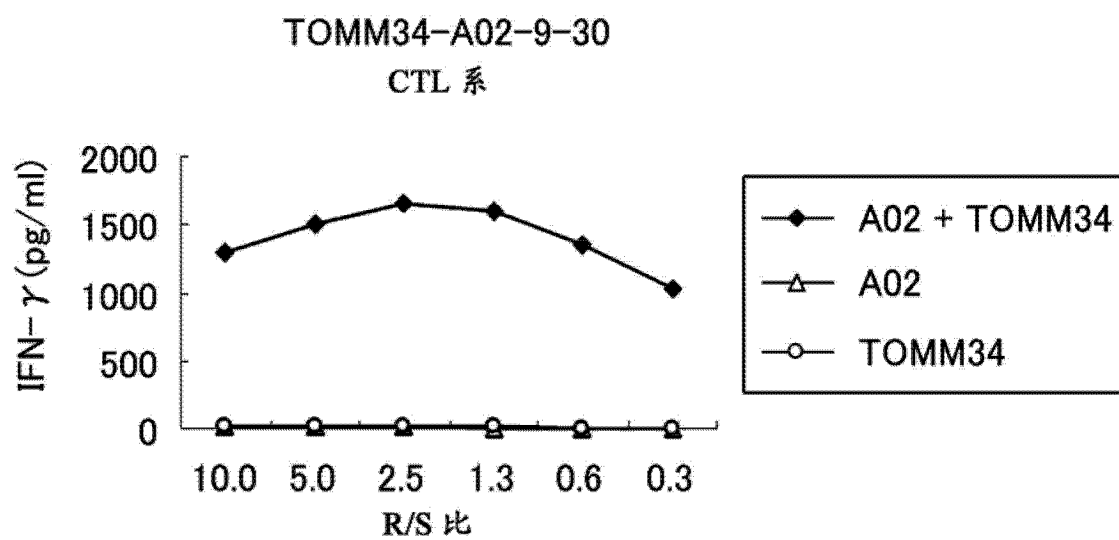


图 4