



(21) 申请号 201680038852.7

(22) 申请日 2016.07.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107912043 A

(43) 申请公布日 2018.04.13

(30) 优先权数据
1511792.2 2015.07.06 GB
62/188,870 2015.07.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/065812 2016.07.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/005733 EN 2017.01.12

(73) 专利权人 伊玛提克斯生物技术有限公司
地址 德国图宾根市

(72) 发明人 安德烈·马尔 托尼·温斯切尼克
科莱特·宋 奥利弗·施尔
延斯·弗里切 哈普瑞特·辛格

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 14/74 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/115 (2010.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2008013934 A2, 2008.01.31

CN 102971003 A, 2013.03.13

CN 102170900 A, 2011.08.31

WO 2007028573 A1, 2007.03.15

Fabio Rizzolo 等. Conventional and microwave-assisted SPPS approach: a comparative synthesis of PTHrP (1-34) NH₂. 《Journal of Peptide Science》. 2011, 第708-714页.

审查员 周振威

权利要求书1页 说明书96页
序列表19页 附图29页

(54) 发明名称

用于食管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,所述肽的氨基酸序列由SEQ ID NO.9组成,其中所述肽有能力与主要组织相容性复合体(MHC) I类分子结合,其中所述肽与该MHC结合时能够被CD4和/或CD8 T细胞识别。

2. 根据权利要求1所述的肽或其盐,其中所述肽包含非肽键。

3. 一种融合蛋白,其包含根据权利要求1或2所述的肽,和HLA-DR抗原相关不变链(Ii)的N-端氨基酸。

4. 一种核酸,其编码权利要求1所述的肽。

5. 一种表达载体,其表达权利要求4所述的核酸。

6. 一种重组宿主细胞,其包括根据权利要求1所述的肽、根据权利要求4所述的核酸或根据权利要求5所述的表达载体。

7. 根据权利要求6所述的重组宿主细胞,其中所述宿主细胞为抗原提呈细胞,所述抗原提呈细胞包括树突状细胞。

8. 一种制备权利要求1所述的肽的方法,该方法包括培养权利要求6所述的宿主细胞,该宿主细胞提呈权利要求1或2所述的肽、权利要求3所述的融合蛋白、或表达权利要求4所述的核酸、或载有权利要求5所述的表达载体,以及从该宿主细胞或其培养基中分离出该肽。

9. 一种激活的T淋巴细胞,由一种方法制成,该方法包括将T细胞与载有抗原的人I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,该人I类MHC分子在合适的抗原提呈细胞表面上提呈,其中所述抗原为权利要求1所述的肽,其中该激活的T淋巴细胞有选择性地识别提呈权利要求1所述的肽的细胞。

10. 有效量的权利要求9所定义的激活的T细胞在制备用于杀灭患者中靶细胞的药物中的用途,其中该靶细胞提呈权利要求1所述的肽。

11. 一种药物组合物,其包括至少一种选自以下的活性成分:权利要求1或2所述的肽、权利要求3所述的融合蛋白、权利要求4所述的核酸、权利要求5所述的表达载体、权利要求6或7所述的重组宿主细胞、权利要求9所述的激活的T淋巴细胞,以及药学上可接受的载体。

12. 权利要求1或2所述的肽、权利要求3所述的融合蛋白、权利要求4所述的核酸、权利要求5所述的表达载体、权利要求6或7所述的重组宿主细胞、权利要求9所述的激活的T淋巴细胞、或权利要求11所述的药物组合物在制造抗食管癌和非小细胞肺癌的药物中的用途。

13. 权利要求12所述的用途,其中所述药物包含激活的T淋巴细胞,该用途包括将T细胞与载有抗原的人I类MHC分子接触一段时间,该时间足以以抗原特异性的方式激活T细胞,人I类MHC分子在合适的抗原提呈细胞表面或模拟抗原提呈细胞的人工结构表面上表达。

14. 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或2所述的肽或其盐、权利要求3所述的融合蛋白、权利要求4所述的核酸、权利要求5所述的表达载体、权利要求6或7所述的重组宿主细胞、权利要求9所述的激活的T淋巴细胞,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;和

(c) 任选地,至少一种另外的肽,其选自SEQ ID No.1至8和10至101。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒,进一步包括以下中的一个或多个:(i) 缓冲剂,(ii) 稀释剂,(iii) 过滤液,(iv) 针,或(v) 注射器。

用于食管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] 食管癌是全球第八大最常见的癌症,2012年5年发病人数为464063患者。死亡率与发病率非常相似(2012年为400169对比455784),提示食管癌死亡率很高(World Cancer Report,2014;Ferlay et al.,2013;Bray et al.,2013)。

[0005] 鳞状细胞癌和腺癌代表着食管癌两种最常见的亚型。这两种亚型在男性中比女性多见,但他们表现出明显不同的地域分布。鳞状细胞癌在资源匮乏的地区更为普遍,特别是伊朗伊斯兰共和国、中国部分地区和津巴布韦发病率很高。腺癌是白种人和社会经济状况好的人群中最常见的食管癌类型,英国、澳大利亚、荷兰和美国处于领先地位。发生食管鳞状细胞癌的最大风险因素包括酒精和抽烟,而食管腺癌主要与肥胖和胃食管反流病有关。食管腺癌发病率在高收入国家稳步上升,这可能归因于肥胖和胃食管反流病的发病率上升以及胃食管交界处肿瘤分类的变化。神经内分泌癌、腺样囊性癌、腺鳞癌、粘液表皮样癌、混合型腺神经内分泌癌、各种肉瘤和黑色素瘤代表着食管癌罕见的亚型(World Cancer Report,2014)。

[0006] 食管癌的主要治疗策略取决于肿瘤分期和位置、组织学类型和患者病情。单纯手术是不够的,除非用于一小部分的鳞状细胞癌患者。一般情况下,手术应该术前和术后化疗或术前放化疗相结合,而单纯的术前或术后放疗被证明不能带来生存获益。化疗方案包括奥沙利铂+氟尿嘧啶,卡铂+紫杉醇,顺铂+氟尿嘧啶,FOLFOX和顺铂+伊立替康。肿瘤HER2阳性的患者应当根据胃癌治疗指南使用顺铂、氟尿嘧啶和曲妥珠单抗联合进行治疗,这是因为食管癌靶向治疗的随机化数据非常有限(Stahl et al.,2013;Leitlinie Magenkarzinom,2012)。

[0007] 在一般情况下,大多数类型的食管癌如果是早期肿瘤可很好地治疗,而对于晚期治疗成功非常有限。因此,开发新的筛选方案对于降低食管癌相关的死亡率可能非常有效(World Cancer Report,2014)。

[0008] 免疫疗法可能是治疗晚期食管癌有前途的一种新方法。几个癌症相关基因和癌症-睾丸抗原被证明在食管癌中过度表达,包括不同的MAGE基因、NY-ESO-1和EpCAM(Kimura et al.,2007;Liang et al.,2005b;Inoue et al.,1995;Buja et al.,2011;Tanaka et al.,1997;Quillien et al.,1997)。这些基因代表着免疫治疗非常有趣的靶标,其中大部分正在接受研究用于治疗其他恶性肿瘤(ClinicalTrials.gov,2015)。此外,

PD-L1和PD-L2被描述在食管癌中上调,这与较差预后相关。因此,肿瘤呈PD-L1阳性的食管癌患者可能会从抗PD-L1免疫治疗中获益(Ohigashi et al.,2005)。

[0009] 目前,食管癌免疫治疗方法的临床资料仍然相对较少,这是因为只完成了数量有限的早期阶段临床试验(Toomey et al.,2013)。在一项I期试验中,晚期食管癌患者被给予一种疫苗,其包含来自三个不同癌症-睾丸抗原(TTK蛋白激酶、淋巴细胞抗原 6复合体基因座K和胰岛素样生长因子(IGF)-II mRNA结合蛋白3),结果一般(Kono et al.,2009)。在一项I/II期研究中,11名患者中有4名患者自体肿瘤细胞和白细胞介素2在体外刺激后肿瘤内注入激活的T细胞引起完全或部分肿瘤反应(Toh et al.,2000;Toh et al.,2002)。目前正在进一步的临床试验,以评估不同免疫疗法对食管癌的影响,包括继细胞治疗(NCT01691625、NCT01691664、NCT01795976、NCT02096614、NCT02457650)疫苗接种策略(NCT01143545、NCT01522820)和抗PD-L1疗法(NCT02340975)(ClinicalTrials.gov,2015)。

[0010] 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,尤其是食管癌。通常也有必要确定代表癌症生物标志物的因子,尤其是食管癌,从而更好地诊断癌症、评估预后和预测治疗成功性。

[0011] 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。

[0012] 肿瘤相关抗原(TAA)的目前分类主要包括以下几组:

[0013] 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。

[0014] 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。

[0015] 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通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。

[0016] 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)。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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在MHC-I类分子上发现。这种I-类分子非经典提呈方式在文献中被称为交叉提呈(Brossart 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。

[0022] 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。

[0023] 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)。

[0024] 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)。

[0025] 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。

[0026] 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CD4 T细胞作为直接抗肿瘤效应因子的证据(Braumuller et al.,2013;Tran et al.,2014)。

[0027] 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)。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 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。

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 在通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。

[0035] 发明简介

[0036] 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:93的氨基酸序列、或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93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。

[0037] 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:93的序列、或与 SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93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。

[0038] 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。

[0039] 表1:本发明中的肽

[0040]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
1	STYGGGLSV	3861, 3868	KRT14, KRT16
2	SLYNLGGSKRISI	3852	KRT5
3	TASAITPSV	3852	KRT5
4	ALFGTILEL	2769	GNA15
5	NLMASQPQL	5317	PKP1
6	LLSGDLIFL	2709	GJB5
7	SIFEGLLSGV	2709	GJB5
8	ALLDGGSEAYWRV	84985	FAM83A
9	HLIAEIHTA	5744	PTHLH
10	SLDENSDQQV	6273	S100A2
11	ALWLPTDSATV	3914	LAMB3
12	GLASRILDA	3914	LAMB3
13	SLSPVILGV	26525	IL36RN
14	RLPNAGTQV	3655	ITGA6
15	LLANGVYAA	55107	ANO1
16	VLAEGGEGV	10630	PDPN
17	MISRTPEV	2155, 28396, 3500, 3501, 3502, 3503, 3507	F7, IGHV4-31, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHM
18	FLLDQVQLGL	83882	TSPAN10
19	GLAPFLNAV	101060689, 154761, 285966	FAM115C
20	IIIEVDPDTKEML	100505503, 402057, 442216, 6218	RPS17L, RPS17P16, RPS17P5, RPS17
21	IVREFLTAL	27297	CRCP
22	KLNDTYVNV	23306	TMEM194A
23	KLSDSATYL		无相关基因
24	LLFAGTMTV	29785	CYP2S1
25	LLPPPPPPA	9509	ADAMTS2
26	MLAEKLLQA	2195	FAT1
27	NLREGDQLL	113146	AHNAK2
28	SLDGFTIQV	4939	OAS2
29	SLDGTELQL	284114	TMEM102
30	SLNGNQVTV	79832	QSER1
31	VLPKLYVKL	100996747, 441502, 6231, 643003, 644928, 728937, 729188	RPS26P11, RPS26, RPS26P28, RPS26P15, RPS26P25, RPS26P58

[0041]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
32	YMLDIFHEV	3038	HAS3
33	GLDVTSLRPFDL	2316	FLNA
34	SLVSEQLEPA	11187	PKP3
35	LLRFSQDNA	51056	LAP3
36	FLLRFSQDNA	51056	LAP3
37	YTQPFSHYGQAL	6051	RNPEP
38	IAAIRGFLV	83451	ABHD11
39	LVRDTQSGSL	871	SERPINH1
40	GLAFSLYQA	871	SERPINH1
41	GLESEELEPEEL	8106	PABPN1
42	TQTAVITRI	81610	FAM83D
43	KVVGKDYLL	832	CAPZB
44	ATGNDRKEAAENSL	7531	YWHAE
45	MLTELEKAL	6279	S100A8
46	YTAQIGADIAL	64499, 7177	TPSB2, TPSAB1
47	VLASGFLTV	79183	TTPAL
48	SMHQMLDQTL	7168	TPM1
49	GLMKDIVGA	8942	KYNU
50	GMNPHQTPAQL	471	ATIC
51	KLFGHLTSA	57157	PHTF2
52	VAIGGVGDGNVRL	9948	WDR1
53	VVVTGLTLV	396	ARHGDIA
54	YQDLLNVKM	1674, 4741, 4744, 4747, 7431, 9118	DES, NEFM, NEFH, NEFL, VIM, INA
55	GAIDLLHNV	115362	GBP5
56	ALVEVTEHV	54972	TMEM132A
57	GLAPNTPGKA	9055	PRC1
58	LILESIPVV	5597	MAPK6
59	SLLDTLREV	9989	PPP4R1
60	VVMEELLKV	23191	CYFIP1
61	TQTTHELTI	5093	PCBP1
62	ALYEQPLQI	4331	MNAT1
63	LAYTLGVKQL	158078, 1915, 1917	EEF1A1P5, EEF1A1, EEF1A2
64	GLTDVIRDV	80028	FBXL18
65	YVVGGFYQRL	4074	M6PR
66	LLDEKVQSV	57616	TSHZ3
67	SMNGGVFAV	23657	SLC7A11
68	PAVLQSSGLYSL	28396, 3500, 3501, 3502, 3503, 3507	IGHV4-31, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHG4, IGHM
69	GLLVGSEKVTM	3861, 3868, 644945	KRT14, KRT16, KRT16P3
70	FVLDTSESV	1291, 1292	COL6A1, COL6A2

[0042]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
71	ASDPILYRPVAV	5315	PKM
72	FLPPAQVTV	65083	NOL6
73	KITEAIQYV	6095	RORA
74	ILASLATSV	10844	TUBGCP2
75	GLMDDVDFKA	10525	HYOU1
76	KVADYIPQL	2744	GLS

[0043] 表2:本发明中的其他肽,之前与癌症无已知的关联

[0044]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
77	VLVPYEPPQV	8626	TP63
78	KVANI IAEV	5910	RAP1GDS1
79	GQDVGRYQV	6748	SSR4
80	ALQEALENA	9631	NUP155
81	AVLPHVDQV	23379	KIAA0947
82	HLLGHLEQA	63977	PRDM15
83	ALADGVVSQA	27238	GPKOW
84	SLAESLDQA	22894	DIS3
85	NIIELVHGV	6850	SYK
86	GLLTEIRAV	9263	STK17A
87	FLDNGPKTI	1982	EIF4G2
88	GLWEQENHL	79768	KATNBL1
89	SLADSLYNL	23271	CAMSAP2
90	SIYEYHAL	3091	HIF1A
91	KLIDDVHRL	6734	SRPR
92	SILRHVAEV	1965	EIF2S1
93	VLINTSVTL	23036	ZNF292

[0045] 表3:用于例如个性化癌症疗法的肽

[0046]

序列 ID 号	序列	基因 ID	正式基因符号
94	TLLQEQGTKTV	286887, 3852, 3853, 3854	KRT6C, KRT5, KRT6A, KRT6B
95	LIQDRVAEV	3914	LAMB3
96	GAAVRIGSVL	9150	CTDP1
97	ELDRTPEV	23450	SF3B3
98	VLFPNLKTV	646	BNC1
99	RVAPEEHPVL	440915, 60, 641455, 71, 728378	POTEKP, ACTB, POTE, ACTG1, POTEF
100	GLYPDAFAPV	1991	ELANE
101	AMTQLLAGV	3371	TNC

[0047] 本发明还涉及本发明的肽在治疗增殖性疾病中的用途,例如,肺癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、子宫癌、肝细胞癌、肾细胞癌、脑癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、前列腺癌和白血病。

[0048] 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:93。更优选的是所述肽(单独或组合)选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:76(见表1),并且其用于食管

癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、子宫癌、肝细胞癌、肾细胞癌、脑癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、前列腺癌和白血病、优选为食管癌的免疫治疗。

[0049] 特别优选的是本发明的肽(单独或组合),其选自SEQ ID No.1、2、3、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、25、26、30、32、34、37、40、51、55、57、58、59、62、81和82,且其用于食管癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、子宫癌、肝细胞癌、肾细胞癌、脑癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、前列腺癌和白血病、优选食管癌的免疫治疗。进一步特别优选的是根据 SEQ ID NO:9的肽。

[0050] 如示下面的表4A所示,其中本发明的许多肽也发现于其他肿瘤中,因此也可用于其他适应症的免疫治疗。另请参阅图1和实施例1。

[0051] 表4A:本发明的肽及其在其他增殖性疾病(特别是其他癌性疾病)中的特定用途。该表显示,对于其他肿瘤类型的选定肽,发现他们过量提呈(特定提呈)于5%以上测定的肿瘤样本,或提呈于5%以上测定的肿瘤样本且几何学平均值肿瘤与正常组织的比值大于3。过度提呈定义为与最高提呈的正常样本相比,肿瘤样本中的提呈更高。对比过度提呈组织检测的正常组织有:脂肪组织、肾上腺、动脉、骨髓、脑、中枢神经、结肠、十二指肠、食道、胆囊、心脏、肾、肝、肺、淋巴结、单核白细胞、胰腺、外周神经、腹膜、垂体、胸膜、直肠、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、胸腺、甲状腺、气管、输尿管、膀胱、静脉。

[0052]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
2	SLYNLGGSKRISI	NSCLC
3	TASAITPSV	NSCLC、膀胱癌
4	ALFGTILEL	NSCLC
7	SIFEGLLSGV	膀胱癌
8	ALLDGGSEAYWRV	NSCLC、OC
9	HLIAEIHTA	NSCLC
11	ALWLPTDSATV	NSCLC、黑色素瘤
12	GLASRILDA	膀胱癌
13	SLSPVILGV	子宫癌
15	LLANGVYAA	HCC
17	MISRTPEV	NSCLC、RCC、HCC
22	KLNDTYVNV	SCLC、脑癌、HCC
26	MLAEKLLQA	CRC
29	SLDGTELQL	BRCA
31	VLPKLYVKL	GC
32	YMLDIFHEV	膀胱癌
33	GLDVTSLRPFDL	GC
34	SLVSEQLEPA	CRC、膀胱癌
35	LLRFSQDNA	GC、HCC
36	FLLRFSQDNA	GC
37	YTQPFSHYQAL	GC、PC
38	IAAIRGFLV	GC
39	LVRDTQSGSL	GC
40	GLAFSLYQA	NSCLC、PC、BRCA、膀胱癌
41	GLESEELEPEEL	GC
42	TQTAVITRI	GC
45	MLTELEKAL	GC
46	YTAQIGADIAL	GC
47	VLASGFLTV	膀胱癌
49	GLMKDIVGA	HCC
50	GMNPHQTPAQL	GC
51	KLFGHLTSA	胆囊癌、胆管癌
52	VAIGGVDGNVRL	GC
54	YQDLLNVKM	RCC、GC
55	GAIDLLHNV	GC
56	ALVEVTEHV	BRCA
57	GLAPNTPGKA	NSCLC、SCLC、BRCA、黑色素瘤
58	LILESIPVV	NSCLC、黑色素瘤
61	TQTTHELTI	SCLC、白血病
62	ALYEQPLQI	NSCLC、HCC、膀胱癌
63	LAYTLGVKQL	GC
66	LLDEKVQSV	脑癌、黑色素瘤

[0053]

序列 ID 号	序列	其他相关器官/疾病
67	SMNGGVFAV	脑癌、HCC
68	PAVLQSSGLYSL	GC、PC
69	GLLVGSEKVTM	PC
70	FVLDTSESV	GC、HCC、黑色素瘤、OC
71	ASDPILYRPVAV	GC、PC
72	FLPPAQVTV	NSCLC、GC、HCC、白血病、黑色素瘤
73	KITEAIQYV	BRCA
74	ILASLTSV	CRC、HCC、膀胱癌
75	GLMDDVDFKA	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌
76	KVADYIPQL	NSCLC、SCLC
77	VLVPYEPPQV	NSCLC、膀胱癌
78	KVANIIEV	PC、白血病、OC
80	ALQEALENA	NSCLC、SCLC、脑癌、CRC、HCC、白血病、BRCA、OC
81	AVLPHVDQV	脑癌
82	HLLGHLEQA	NSCLC、HCC、白血病、BRCA
83	ALADGVVSQA	脑癌、GC、黑色素瘤、膀胱癌
85	NIIELVHQV	白血病
86	GLLTEIRAV	脑癌、膀胱癌
87	FLDNGPKTI	脑癌、PC、OC
88	GLWEQENHL	NSCLC、BRCA
89	SLADSLYNL	脑癌、BRCA、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌
91	KLIDDVHRL	PC、PrC
92	SILRHVAEV	NSCLC、CRC、HCC、胆囊癌、胆管癌
94	TLLQEQGTKTV	NSCLC
NSCLC=非小细胞肺癌, SCLC=小细胞肺癌, RCC=肾癌, CRC =结肠或直肠癌, GC =胃癌, HCC = 肝癌, PC =胰腺癌, PrC=前列腺癌, 白血病, BrCa=乳腺癌		

[0054] 表4B:本发明的肽及其在其他增殖性疾病(特别是其他癌性疾病)中的特定用途(表4修订版)。该表(如表4A)显示,对于其他肿瘤类型的选定肽,发现他们过量提呈(特定提呈)于5%以上测定的肿瘤样本,或提呈于5%以上测定的肿瘤样本且几何学平均值肿瘤与正常组织的比值大于3。过度提呈定义为与最高提呈的正常样本相比,肿瘤样本中的提呈更高。经过度提呈的正常组织有:脂肪组织、肾上腺、动脉、骨髓、脑、中枢神经、结肠、十二指肠、食道、胆囊、心脏、肾、肝、肺、淋巴结、单核白细胞、胰腺、外周神经、腹膜、垂体、胸膜、直肠、唾液腺、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、胸腺、甲状腺、气管、输尿管、膀胱、静脉。

[0055]

序列 ID 号	序列	其他其他实体
1	STYGGGLSV	NSCLC、黑色素瘤、HNSCC
2	SLYNLGGSKRISI	膀胱癌、HNSCC
3	TASAITPSV	HNSCC
4	ALFGTILEL	膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、AML、HNSCC
5	NLMASQPQL	HNSCC
6	LLSGDLIFL	HNSCC
7	SIFEGLLSGV	NSCLC、胆囊癌、胆管癌、HNSCC
8	ALLDGGSEAYWRV	膀胱癌、HNSCC
10	SLDENSDQQV	膀胱癌、HNSCC
11	ALWLPTDSATV	胆囊癌、胆管癌
13	SLSPVILGV	NSCLC、黑色素瘤、膀胱癌、HNSCC
14	RLPNAGTQV	黑色素瘤
15	LLANGVYAA	膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
16	VLAEGGEGV	脑癌、黑色素瘤、胆囊癌、胆管癌、HNSCC
17	MISRTPEV	膀胱癌
18	FLLDQVQLGL	黑色素瘤、NHL、HNSCC
19	GLAPFLLNAV	黑色素瘤、NHL、HNSCC
20	IIEVDPDTKEML	HNSCC
22	KLNDTYVNV	BRCA
23	KLSDSATYL	黑色素瘤
25	LLPPPPPPA	胆囊癌、胆管癌、NHL、HNSCC
28	SLDGFTIQV	BRCA、黑色素瘤、AML
29	SLDGTQL	子宫癌、NHL
30	SLNGNQVTV	BRCA、黑色素瘤、膀胱癌、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、HNSCC
32	YMLDIFHEV	胆囊癌、胆管癌、HNSCC
34	SLVSEGLEPA	HNSCC
40	GLAFSLYQA	CRC、黑色素瘤、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、HNSCC
42	TQTAVITRI	HNSCC
48	SMHQMLDQTL	GC
51	KLFGHLTSA	胆囊癌、胆管癌
53	VVVTGLTLV	GC、膀胱癌
55	GAIDLHNV	SCLC、黑色素瘤、NHL
56	ALVEVTEHV	RCC、子宫癌、胆囊癌、胆管癌
57	GLAPNTPGKA	膀胱癌、子宫癌、HNSCC
58	LILESIPVV	SCLC、CLL、膀胱癌、子宫癌、NHL、HNSCC
59	SLLDTLREV	HNSCC
62	ALYEQPLQI	SCLC、BRCA、黑色素瘤、OC、胆囊癌、胆管癌、NHL
66	LLDEKVQSV	膀胱癌、HNSCC
67	SMNGGVFAV	NSCLC、胆囊癌、胆管癌、HNSCC
68	PAVLQSSGLYSL	NHL

[0056]

序列 ID 号	序列	其他其他实体
69	GLLVGSEKVTM	HNSCC
72	FLPPAQTV	CLL、膀胱癌、胆囊癌、胆管癌、HNSCC
74	ILASLTSV	BRCA、HNSCC
75	GLMDDVDFKA	GC、HCC、胆囊癌、胆管癌、NHL、HNSCC
76	KVADYIPQL	RCC、BRCA、黑色素瘤、胆囊癌、胆管癌、NHL
77	VLVPYEPPQV	NHL、HNSCC
78	KVANIIEV	膀胱癌、HNSCC
79	GQDVGRYQV	SCLC、PC、PrC、CLL、BRCA、OC、膀胱癌、AML、NHL
80	ALQEALENA	黑色素瘤、子宫癌、胆囊癌、胆管癌、HNSCC
81	AVLPHVDQV	子宫癌、NHL
82	HLLGHLEQA	RCC
83	ALADGVVSQA	子宫癌
84	SLAESLDQA	黑色素瘤、子宫癌、AML、NHL、HNSCC
85	NIIELVHQV	CLL
86	GLLTEIRAV	黑色素瘤、胆囊癌、胆管癌、AML、NHL、HNSCC
87	FLDNGPKTI	膀胱癌、HNSCC
88	GLWEQENHL	CRC、子宫癌、AML、HNSCC
89	SLADSLYNL	黑色素瘤
90	SIYEYHAL	NHL、HNSCC
92	SILRHVAEV	BRCA、黑色素瘤、AML、NHL

[0057] NSCLC=非小细胞肺癌,SCLC=小细胞肺癌,RCC=肾癌,CRC=结肠或直肠癌,GC=胃癌,HCC=肝癌,PC=胰腺癌,PrC=前列腺癌,BRCA=乳腺癌,OC=卵巢癌,NHL=非霍奇金淋巴瘤,AML=急性骨髓性白血病,CLL=慢性淋巴细胞白血病,HNSCC=头颈部鳞状细胞癌

[0058] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号1、2、3、4、7、8、9、11、13、17、40、57、58、62、67、72、76、77、80、82、88、92和94中任一项所述的本发明的至少一种肽在治疗非小细胞肺癌中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在非小细胞肺癌的联合治疗中的用途。

[0059] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号18、19、25、29、55、58、62、68、75、76、77、79、81、84、86、90和92中任一项所述的本发明的至少一种肽在治疗淋巴瘤中的用途,在一个优选实施方案中,上述肽在淋巴瘤的联合治疗中的用途。因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号22、55、58、62、57、61、76、79和80中任一项所述的本发明的至少一种肽在小细胞肺癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在小细胞肺癌的联合治疗中的用途。

[0060] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号17、56、76、82和54中任一项所述的本发明的至少一种肽在肾细胞癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在肾细胞癌的联合治疗中的用途。

[0061] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号16、22、66、67、80、81、83、86、87和89中任一项所述的本发明的至少一种肽在脑癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在脑癌的联合治疗中的用途。

[0062] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号31、33、35、36、37、38、39、41、42、

45、46、48、50、52、53、54、55、63、68、70、75和71中任一项所述的本发明的至少一种肽与在胃癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在胃癌的联合治疗中的用途。

[0063] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号26、34、40、74、80、88和92中任一项所述的本发明的至少一种肽在结直肠癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在结直肠癌的联合治疗中的用途。

[0064] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号15、17、22、35、49、62、67、70、72、74、75、80、82和92中任一项所述的本发明的至少一种肽在肝细胞癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在肝细胞癌的联合治疗中的用途。

[0065] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ ID No. 37、40、68、69、71、78、79、87 和91中任一项所述的本发明的至少一种肽在胰腺癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在胰腺癌的联合治疗中的用途。

[0066] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号79和91中任一项所述的本发明的至少一种肽在前列腺癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在前列腺癌的联合治疗中的用途。

[0067] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号4、28、58、61、72、78、79、80、82、84、86、88、92和85中任一项所述的本发明的至少一种肽在白血病治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在白血病的联合治疗中的用途。

[0068] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号22、28、29、30、40、56、57、62、73、74、75、76、79、80、82、88、92和89中任一项所述的本发明的至少一种肽在乳腺癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在乳腺癌的联合治疗中的用途。

[0069] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号1、13、14、11、16、18、19、23、28、30、40、55、57、58、62、66、70、72、75、76、80、84、86、89、92和83中任一项所述的本发明的至少一种肽在黑色素瘤治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在黑色素瘤的联合治疗中的用途。

[0070] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号8、62、70、78、79、80和87中任一项所述的本发明的至少一种肽在卵巢癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在卵巢癌的联合治疗中的用途。

[0071] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号2、3、4、7、8、10、12、13、15、17、30、32、34、40、47、53、57、58、62、66、72、74、75、77、78、79、83、86、87和89中任一项所述的本发明的至少一种肽在膀胱癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在膀胱癌的联合治疗中的用途。

[0072] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号13、15、29、30、40、56、57、58、80、81、83、84和88中任一项所述的本发明的至少一种肽在子宫癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在子宫癌的联合治疗中的用途。

[0073] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号4、7、11、15、16、25、30、32、40、51、56、62、67、72、75、76、80、86、89和92中任一项所述的本发明的至少一种肽在胆囊癌和胆管癌治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在胆囊癌和胆管癌的联合治疗中的用途。

[0074] 因此,本发明的另一个方面涉及根据SEQ序列号1、2、3、4、5、6、7、8、10、13、16、18、19、20、25、30、32、34、40、42、57、58、59、66、67、69、72、74、75、77、78、80、84、86、87、88和90

中任一项所述的本发明的至少一种肽在HNSCC 治疗中的用途,在一个优选实施方案中,上述在HNSCC的联合治疗中的用途。

[0075] 因此,本发明的另一个方面涉及本发明中肽在选自食管癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、子宫癌、肝细胞癌、肾细胞癌、脑癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、前列腺癌和白血病中的增殖性疾病的治疗-优选联合治疗-中的用途。

[0076] 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。

[0077] 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SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93的氨基酸序列组成。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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.93、优选为含SEQ ID No.1至SEQ ID No.76,或其变体氨基酸序列的肽的表达载体。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 优选地,所述药物为基于可溶性TCR或抗体的细胞治疗药物、疫苗或蛋白。

[0094] 本发明还涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为食管癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、子宫癌、肝细胞癌、肾细胞癌、脑癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、前列腺癌和白血病、优选为食管癌细胞。

[0095] 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。

[0096] 任选地,抗体具有进一步的效应子功能,如免疫刺激功能域或毒素。

[0097] 本发明还涉及这些新靶点在癌症治疗中的用途。

[0098] ABHD11反义RNA 1 (ABHD11-AS1) 被描述为长链非编码RNA,这被证明在胃癌中上调,与分化和Lauren组织学分类相关。因此,ABHD11-AS1可能是胃癌诊断的一个潜在生物标志物 (Lin et al.,2014)。ABHD11活性显示与在肺腺癌远处转移的发生相关,因此可能是一种潜在的新生物标志物 (Wiedl et al.,2011)。

[0099] ADAMTS2被证明在T/髓性混合型急性白血病患者中失调 (Tota et al.,2014)。ADAMTS2被描述为通过骨肉瘤细胞IL-6在上调后与JNK信号通路相关 (Alper and Kockar, 2014)。ADAMTS2可能是滤泡甲状腺癌一种潜在的诊断标志物 (Fontaine et al.,2009)。ADAMTS2被描述为舌鳞状细胞癌转移一种潜在的标志物 (Carinci et al.,2005)。ADAMTS2被证明在肾细胞癌中上调,与较短的患者生存期相关 (Roemer et al.,2004)。ADAMTS2被证明通过细胞增殖相关转化生长因子- β 1调节 (Wang et al.,2003)。

[0100] AHNK2编码支架蛋白AHNAK核蛋白2 (Marg et al.,2010)。AHNAK2是参与肿瘤生长和侵袭的成纤维细胞生长因子1 (FGF1) 非经典分泌途径的重要元素 (Kirov et al.,2015)。

[0101] ANO1编码anoctamin 1,这是与小肠肉瘤和口腔癌相关的一种钙激活氯离子通道 (RefSeq,2002)。ANO1在食管鳞状细胞癌 (ESCC)、胃肠道间质瘤 (GIST)、头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、胰腺癌和乳腺癌中扩增 (Qu et al.,2014)。

[0102] ARHGDIA被证明在肝细胞癌中以及乳腺癌发生时下调 (Liang et al.,2014;Bozza et al.,2015)。ARHGDIA被证明是与肝细胞癌的肿瘤侵犯、转移、总体生存和至复发时间有关。因此,ARHGDIA可提供肝细胞癌的潜在治疗靶标 (Liang et al.,2014)。ARHGDIA被证明经杠柳素治疗后在肺癌细胞系A549中下调。因此,杠柳素抑制肺癌细胞的生长可能与ARHGDIA有关 (Lu et al.,2014)。ARHGDIA敲减被证明与肺源性正常和培养肿瘤细胞的凋亡增加相关。因此,ARHGDIA被描述为细胞凋亡的负调节剂,这可能代表一种潜在的治疗靶标 (Gordon et al.,2011)。ARHGDIA被描述为与卵巢透明细胞和高级别浆液性癌分期有关 (Canet et al.,2011)。ARHGDIA被描述为一种凋亡途径相关基因,该基因显示在TRAIL介导的细胞凋亡后在纤维肉瘤HT1080细胞中失调 (Daigeler et al.,2008)。ARHGDIA被证明在奥沙利铂耐药性结肠癌细胞系 THC8307/L-OHP中上调,被描述为一种参与抗凋亡的基因。因此,ARHGDIA可能是与奥沙利铂敏感性相关的潜在标志物 (Tang et al.,2007)。ARHGDIA过度表达被证明由假定的肿瘤抑制因子ACVR2 (癌症相关TGFB2家族的一员) 来调节,发生

于携带 ACVR2移码突变的野生型ACVR2转染MSI-H结肠癌细胞系(Deacu et al.,2004)。ARHGDIA被描述为Rho GTP酶的关键调节因子。ARHGDIA耗竭被证明可诱导Rho GTP 酶和COX-2途径的组成型活化,这些途径与乳腺癌异种移植动物模型中的乳腺癌进展相关(Bozza et al.,2015)。ARHGDIA信令被证明在结直肠癌中失调(Sethi et al., 2015)。ARHGDIA被证明在SUMO化后靶向作用于MEK1/2-ERK,这与c-Jun/AP-1的抑制、细胞周期蛋白d1转录和细胞周期进程相关。因此,ARHGDIA与癌细胞生长抑制有关(Cao et al.,2014)。ARHGDIA被描述为前列腺癌的一种新型抑制因子,可能在调节雄激素受体信号传导和前列腺癌生长和进展中起着关键作用(Zhu et al., 2013b)。

[0103] ATIC被描述为间变性大细胞淋巴瘤中癌症相关间变性淋巴瘤激酶的一种潜在基因融合伴侣(Cheuk and Chan,2001)。ATIC被证明在膀胱炎性肌纤维母肿瘤中表现为与ALK一起的嵌合体融合基因(Debiec-Rychter et al.,2003)。乳腺癌细胞系模型中 ATIC氨基咪唑甲酰胺转甲酰胺酶(AICAR)活性的抑制显示可导致细胞数和细胞分裂速率的剂量依赖性降低。因此,ATIC可能是癌症治疗的潜在靶标(Spurr et al.,2012)。

[0104] 据报告,CAPZB在人乳头瘤病毒18阳性口腔鳞状细胞癌中过度表达,被确定为前列腺癌易感基因(Lo et al.,2007;Nwosu et al.,2001)。

[0105] COL6A1在去势抵抗前列腺癌的反应基质中上调,促进肿瘤生长(Zhu et al., 2015)。COL6A1在CD166-胰腺癌细胞中过度表达,这些细胞比CD166+癌细胞显示出更强的侵袭和迁移活性(Fujiwara et al.,2014)。COL6A1在骨转移瘤中高表达(Blanco et al., 2012)。COL6A1被发现在宫颈癌和卵巢癌中上调(Zhao et al.,2011;Parker et al., 2009)。COL6A1在星形细胞瘤和胶质母细胞瘤中中差异性表达(Fujita et al.,2008)。

[0106] COL6A2与子宫颈癌、高级别浆液性卵巢癌整体存活差、B-前体急性淋巴细胞白血病、肝细胞癌、原发性和转移性脑肿瘤、肺鳞状上皮细胞癌、头颈部鳞状细胞癌相关,且被描述为子宫颈癌的潜在DNA甲基化(Cheon et al.,2014;Chen et al.,2014d;Vachani et al.,2007;Liu et al.,2010;Seong et al.,2012;Hogan et al., 2011)。

[0107] CYFIP1被证明在上皮性肿瘤侵袭期间下调(Silva et al.,2009)。CYFIP1下调与上皮肿瘤的预后不良相关(Silva et al.,2009)。

[0108] CYP2S1被证明可通过与 β -catenin信号通路的PGE2-介导的活化相关联而调节细胞系HCT116中结直肠癌的生长(Yang et al.,2015b)。CYP2S1被描述为在多种上皮衍生癌症中和在低氧肿瘤细胞中上调(Nishida et al.,2010;Madanayake et al., 2013)。支气管上皮细胞系中CYP2S1耗竭被证明可导致主要途径中调节改变,这些通路涉及细胞增殖和迁移,诸如mTOR信号通路(Madanayake et al.,2013)。CYP2S1 耗竭被证明与结直肠癌和乳腺癌的药物敏感度相关(Tan et al.,2011)。CYP2S1被证明与乳腺癌存活有关,并与结直肠癌预后不良相关(Murray et al.,2010; Kumarakulasingham et al.,2005)。CYP2S1被证明可将BaP-7,8-二醇代谢为高度诱变和致癌的苯并[a]芘-r-7,叔-8-二氢二醇-叔-9,10-环氧,因此,可能在苯并[a]芘-诱发的癌变中发挥重要作用(Bui et al.,2009)。与原发性卵巢癌相比,CYP2S1被证明在卵巢癌转移中显著上调(Downie et al.,2005)。

[0109] DES在结直肠癌间质中的表达与晚期疾病相关(Arentz et al.,2011)。DES被证明在结直肠癌中上调(Ma et al.,2009)。DES被证明与结直肠癌的严重程度和分化以及生存率下降有关(Ma et al.,2009)。DES被描述为结直肠癌的一种潜在的癌胚血清肿瘤标志物

(Ma et al., 2009)。DES被证明是横纹肌肉瘤的一种特异性标志物 (Altmannsberger et al., 1985)。DES被描述为一组蛋白质三个成员中其中之一, 这些蛋白质可能有助于通过使用免疫组织化学对膀胱癌进行分期 (Council and Hameed, 2009)。

[0110] DIS3被证明在多发性骨髓瘤中经常突变, 在急性髓细胞白血病中反复突变 (Ding et al., 2012; Lohr et al., 2014)。多发性骨髓瘤中DIS3突变被证明与总体生存期较短相关。与主要亚克隆DIS3突变的患者相比, 次要亚克隆突变被证明与对治疗较差的反应有关 (Weissbach et al., 2015)。DIS3被证明通过13q增加在结直肠癌中上调。DIS3沉默被证明可影响重要的肿瘤发生特征, 例如生存能力、迁移和侵袭性。因此, DIS3可能是有助于结直肠癌进展的新型候选基因 (de Groen et al., 2014)。DIS3被描述为属于可与基于血浆蛋白生物标志物联合使用以便较早诊断上皮性卵巢癌的基因系列 (Pils et al., 2013)。DIS3可能是乳腺癌易感的潜在候选基因, 因为乳腺癌突变筛查检测出众多多态性 (Rozenblum et al., 2002)。

[0111] EEF1A1被证明在多种癌症实体中上调, 包括结直肠癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤和鳞状细胞癌, 被描述为前列腺癌的潜在血清生物标志物 (Lim et al., 2011; Qi et al., 2005; Matassa et al., 2013; Vui-Kee et al., 2012; Kuramitsu et al., 2010; Kido et al., 2010; Scrideli et al., 2008; Relman et al., 2012)。从机理上来看, EEF1A1通过与p53和p73相互作用而抑制细胞凋亡, 通过细胞周期抑制剂p21基因转录抑制促进增殖并参与上皮-间质转化的调节 (Blanch et al., 2013; Choi et al., 2009; Hussey et al., 2011)。

[0112] EEF1A2被描述为在乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌和TFE3易位肾细胞癌中上调 (Pflueger et al., 2013; Sun et al., 2014; Yang et al., 2015c; Zang et al., 2015; Abbas et al., 2015)。EEF1A2被证明与卵巢癌、胃癌、胰腺导管腺癌和肺腺癌的不良预后相关 (Duanmin et al., 2013; Yang et al., 2015c; Li et al., 2006; Lee and Surh, 2009)。EEF1A2被描述为与肿瘤发生相关, 因为它刺激磷脂信令并激活Akt依赖性细胞迁移和肌动蛋白重塑, 这最终有利于肿瘤发生 (Abbas et al., 2015)。EEF1A2被描述可通过MDM4的PI3K/AKT/mTOR依赖性稳定而抑制肝细胞癌中的p53功能。EEF1A2/PI3K/AKT/mTOR/MDM4信号通路的强活化被证明与肝细胞癌的生存期短有关, 因此, 可能是一些患者的治疗靶标 (Longerich, 2014)。EEF1A2被证明与胰腺癌患者的TNM分期、侵袭性和生存期相关。因此, EEF1A2可能是胰腺癌治疗的一个潜在靶标 (Zang et al., 2015)。EEF1A2被证明通过促进细胞增殖和凋亡抑制与前列腺癌发展相关, 因此, 可作为前列腺癌的潜在治疗靶标 (Sun et al., 2014)。EEF1A2被证明与肿瘤抑制蛋白p16相互作用, 这导致EEF1A2的下调, 并与癌细胞生长抑制相关 (Lee et al., 2013)。EEF1A2被证明与胰腺导管腺癌的淋巴结转移和神经浸润有关 (Duanmin et al., 2013)。EEF1A2被证明与乳腺癌生存相关 (Kulkarni et al., 2007)。EEF1A2被描述为肺腺癌细胞系和卵巢癌的一种假定癌基因和肿瘤抑制基因 (Lee, 2003; Zhu et al., 2007a)。

[0113] EIF2S1被描述为磷酸化后的肿瘤进展和治疗抗性的激活子。但是, EIF2S1也被描述牵涉肿瘤发生的抑制效果 (Zheng et al., 2014)。EIF2S1被描述为mTOR的下游效应因子, 在过度磷酸化降低癌细胞的生存期, 因此可作为药物开发的靶标 (Tuval-Kochen et al., 2013)。

[0114] EIF4G2被描述为一组核心基因中的一个基因,这些基因被证明与儿童胶质瘤CD133+ 细胞肿瘤形成的消除有关(Baxter et al.,2014)。EIF4G2显示在通过miR-520c-3p下调后与弥漫性大B细胞淋巴瘤的发展抑制有关(Mazan-Mamczarz et al.,2014)。EIF4G2被证明可通过调节细胞周期蛋白的合成促进蛋白质合成和细胞增殖(Lee and McCormick, 2006)。EIF4G2被证明在膀胱肿瘤中下调,且下调与侵入性肿瘤相关(Buim et al.,2005)。EIF4G2被描述为参与MycN/IFN γ 诱导的细胞凋亡以及神经母细胞瘤细胞的生存能力和死亡(Wittke et al.,2001)。

[0115] 组织因子复合物中的F7与被描述在癌细胞(包括卵巢癌)的表面异常表达。复合物被进一步描述为与卵巢癌的恶性表型诱导相关(Koizume and Miyagi,2015)。F7-组织因子复合物通路被描述为乳腺癌进展的介导因子,其可刺激乳腺癌细胞中大量恶性表型的表达。因此,F7-组织因子途径是乳腺癌治疗的一个有吸引力的潜在靶标(Koizume and Miyagi,2014)。F7被证明在乳腺癌中由雄激素受体调节(Naderi, 2015)。F7被证明与通过肝癌细胞系中的mTOR信号传到而调节自噬作用(Chen et al.,2014a)。F7被证明与结直肠癌和卵巢癌的肿瘤浸润和转移有关(Tang et al., 2010;Koizume et al.,2006)。F7被证明在结直肠癌中异位上调(Tang et al.,2009)。组织因子复合物中的F7被证明与神经母细胞瘤的化疗耐药相关(Fang et al.,2008a)。

[0116] FAM115C在非小细胞肺癌缺氧时上调(Leithner et al.,2014)。

[0117] FAM83A被描述为肺癌的潜在生物标志物(Li et al.,2005)。FAM83A被描述为可与NPY1R和KRT19一起用于检测乳腺癌患者循环肿瘤细胞的标记基因(Liu et al., 2014d)。乳腺癌细胞FAM83A消融显示可导致MAPK信号传导减弱,显著抑制体外生长和体内致瘤性(Cipriano et al.,2014)。另外,FAM83蛋白家族被描述为一个新颖的癌基因家族,其调节癌症中的MAPK信号传导,因此适用于开发旨在抑制MAPK 信号传导的癌症治疗方法(Cipriano et al.,2014)。FAM83A被证明与HER2阳性乳腺癌细胞系的曲妥单抗耐药性相关(Boyer et al.,2013)。一般情况下,FAM83A被证明是与乳腺癌EGFR酪氨酸激酶抑制剂抗性相关的候选基因(Lee et al.,2012)。FAM83A被描述为与乳腺癌预后不良相关(Lee et al.,2012)。FAM83A被证明在非小细胞肺癌中上调(Qu et al.,2010)。FAM83A被证明是一个潜在的特异性和敏感性标志物,用以检测非小细胞肺癌患者外周血中的循环肿瘤细胞(Qu et al.,2010)。

[0118] FAM83D的上调影响肝细胞癌细胞的增殖和侵袭(Wang et al.,2015a;Liao et al., 2015b)。FAM83D在乳腺癌细胞系和原发性人类乳腺癌中显著升高(Wang et al., 2013b)。

[0119] FAT1被描述为在头颈部鳞状细胞癌中明显突变,在宫颈腺癌、膀胱癌、早期T细胞前体急性淋巴细胞白血病、氟达拉滨难治慢性淋巴细胞性白血病、胶质母细胞瘤和结直肠癌中频繁突变,在食管鳞状细胞癌中突变(Gao et al.,2014;Neumann et al., 2013; Morris et al.,2013;Messina et al.,2014;Mountzios et al.,2014; Cazier et al., 2014;Chung et al.,2015)。FAT1被描述为在口腔癌中被压抑,在浸润性乳腺癌中优先下调(Katoh,2012)。FAT1被描述为在白血病中上调,其与前B 急性淋巴细胞白血病的不良预后相关(Katoh,2012)。FAT1被证明在胰腺癌和肝细胞癌中上调(Valletta et al.,2014; Wojtalewicz et al.,2014)。FAT1被描述可通过河马信号传导的激活来抑制肿瘤生长,并

通过肌动蛋白聚合诱导来促进肿瘤转移 (Katoh, 2012)。FAT1被证明是皮肤鳞状细胞癌的一种候选癌症驱动基因 (Pickering et al., 2014)。FAT1被描述为与Wnt信号传导和肿瘤发生相关的一种肿瘤抑制因子 (Morris et al., 2013)。

[0120] 根据其亚细胞定位,细丝蛋白A在癌症中起双重作用:在细胞质中,细丝蛋白A除了参与细胞迁移和粘附通路外,还在不同的生长信号通路中发挥作用。因此,其过度表达有肿瘤促进作用。相比全长细丝蛋白A,C端片段(蛋白质蛋白水解后释放)定位于细胞核,在那里,它与转录因子相互作用,从而抑制肿瘤生长和转移 (Savoy and Ghosh, 2013)。

[0121] GBP5的肿瘤特异性C-末端截短被描述为可能负责淋巴瘤细胞中GBP5失调 (Wehner and Herrmann, 2010)。GBP5被描述为因为皮肤T细胞淋巴瘤肿瘤组织和细胞系以及黑色素瘤细胞系中三种GBP5剪接变体的限制性表达模式可处理可能的癌症相关功能 (Fellenberg et al., 2004)。

[0122] GJB5被证明在非小细胞肺癌细胞系、喉癌和头颈部鳞状细胞癌中下调 (Zhang et al., 2012; Broghammer et al., 2004; Al Moustafa et al., 2002)。GJB5被描述为在非小细胞肺癌细胞系通过抑制细胞增殖和转移而充当肿瘤抑制因子 (Zhang et al., 2012)。GJB5被证明在无梗锯齿状腺瘤/息肉、癌前病变(可能占结肠癌的20-30%)中上调 (Delker et al., 2014)。GJB5表达被描述为在小鼠模型中皮肤肿瘤促进和发展期间显著改变 (Slaga et al., 1996)。

[0123] GLS被描述为由MYC基因间接调节,以增加癌细胞的谷氨酰胺代谢 (Dang et al., 2009)。GLS显示被结直肠癌中的肿瘤抑制因子NDRG2抑制 (Xu et al., 2015)。GLS被描述为在胰腺导管腺癌、三阴性乳腺癌、肝细胞癌、口腔鳞状细胞癌、结直肠癌和恶性胶质细胞源性肿瘤中上调 (van Geldermalsen et al., 2015; Szeliga et al., 2014; Huang et al., 2014a; Cetindis et al., 2015; Yu et al., 2015a; Chakrabarti et al., 2015)。GLS被证明与肝细胞癌的存活相关,也被描述为肝细胞癌病理诊断和预后的一种敏感和特异的生物标志物 (Yu et al., 2015a)。GLS拷贝的损失被证明可推迟肝细胞癌免疫相关MYC介导小鼠模型中的肿瘤进展 (Xiang et al., 2015)。GLS被证明是肿瘤发生和肿瘤特异性抑制所需的, GLS被描述为癌症治疗的一种潜在方法 (Xiang et al., 2015)。GLS被证明与乳腺癌紫杉醇耐药性有关 (Fu et al., 2015a)。GLS过度表达被证明与前列腺癌患者的肿瘤分期和进展高度相关 (Pan et al., 2015)。GLS表达与较深的肿瘤浸润和结肠癌肿瘤发生中管状腺癌的病理类型有关。GLS可作为结直肠癌治疗的靶标 (Huang et al., 2014a)。GLS同工酶KGA的沉寂被证明可导致神经胶质瘤细胞系SFxL和LN229存活率下降 (Martin-Rufian et al., 2014)。神经胶质瘤细胞系SFxL和LN229中GLS的沉寂也被证明可通过引起较低水平的c-myc和bcl-2表达以及更高的促凋亡表达从而导致诱导细胞凋亡 (Martin-Rufian et al., 2014)。ErbB2活化被证明可通过NF- κ B通路上调GLS表达,这促进了乳腺癌细胞增殖 (Qie et al., 2014)。乳腺癌细胞GLS的敲减或抑制以及高水平GLS被证明可导致增殖显著降低 (Qie et al., 2014)。

[0124] GNA15被证明在原发性和转移性小肠神经内分泌肿瘤中上调 (Zanini et al., 2015)。GNA15表达增加被证明与较差生存期相关,这表明GNA15在小肠神经内分泌瘤形成中可能具有病理生物学作用,从而可能是一个潜在的治疗靶标 (Zanini et al., 2015)。GNA15被描述为在许多非小细胞肺癌细胞系中下调 (Avasarala et al., 2013)。正常核型急

性骨髓性白血病中GNA15高表达被证明与显著较差的总体存活相关(de Jonge et al., 2011)。GNA15被证明是非经典Wnt信号传导的关键下游效应因子以及非小细胞肺癌细胞增殖和锚定非依赖性细胞生长的调节因子。因此,GNA15是非小细胞肺癌的一个潜在治疗靶标(Avasarala et al., 2013)。GNA15被证明与胰腺癌的瘤信令相关(Giovinazzo et al., 2013)。GNA15被证明在人类胚胎肾293细胞中组成性活化后经c-Src/JAK和ERK依赖性机制刺激STAT3(Lo et al., 2003)。

[0125] HAS3表达不足被证明与上尿路和膀胱尿路上皮癌的晚期肿瘤分期、淋巴结转移、血管浸润和较差特定疾病生存期和无转移生存期相关(Chang et al., 2015)。因此,HAS3可用作尿路上皮癌的潜在预后生物标志物和新型治疗靶标(Chang et al., 2015)。HAS3被证明通过透明质酸积累而有利于胰腺癌的生长(Kultti et al., 2014)。HAS3抑制被证明可降低结直肠腺癌细胞系SW620的存活能力(Heffler et al., 2013)。HAS3抑制被证明与涉及SW620结直肠肿瘤细胞存活调节的数种基因的差异表达相关(Heffler et al., 2013)。HAS3被证明通过抑制凋亡与结肠癌生长的介导相关(Teng et al., 2011)。HAS3被证明在食管鳞状细胞癌、腺癌、肺鳞状细胞癌和结节性基底细胞癌中上调(Tzellos et al., 2011; Twarock et al., 2011; de Sa et al., 2013)。HAS3被描述为乳腺癌的一种独立的预后因子,因为乳腺癌患者间质细胞中HAS3表被证明与高复发率和较短的总体存活相关(Auvinen et al., 2014)。HAS3被证明与浆液性卵巢癌、肾透明细胞癌、子宫内膜癌和骨肉瘤有关(Nykopp et al., 2010; Weiss et al., 2012; Cai et al., 2011; Tofuku et al., 2006)。

[0126] HIF1A被证明与侵袭性子宫内膜癌的肿瘤坏死相关。HIF1A被进一步描述为治疗这种疾病的潜在靶标(Bredholt et al., 2015)。HIF1A被证明与肝癌发生、肉瘤转移和鼻咽癌相关(Chen et al., 2014c; El-Naggar et al., 2015; Li et al., 2015b)。HIF1A的单核苷酸多态性被证明与手术后侵袭性肝癌患者的临床结果显著相关(Guo et al., 2015)。异常HIF1A活性伴随异常STAT3活性被证明可推动恶性神经鞘瘤细胞系中的肿瘤进展。因此,抑制STAT3/HIF1A/VEGF-A信号传导轴被描述为一种可行的治疗策略(Rad et al., 2015)。HIF1A被描述为多发性骨髓瘤缺氧驱动耐药性的一个重要靶标(Maiso et al., 2015)。HIF1A被证明在三种不同细胞系中不对称表达,这三种细胞系对应于多发性骨髓瘤发病的不同阶段,这表明HIF1A参与多发性骨髓瘤的肿瘤发生和转移(Zhao et al., 2014b)。长非编码HIF1A反义RNA-2被描述为在非乳头状透明细胞肾癌和胃癌中上调,与胃癌的肿瘤细胞增殖和不良预后相关(Chen et al., 2015b)。通过HIF1A的PI3K/AKT/mTOR途径去调节被描述为对前列腺癌干细胞的静止、维护和存活至关重要(Marhold et al., 2015)。HIF1A被描述为4-基因分类中的一个基因,可预测I期肺腺癌(Okayama et al., 2014)。HIF1A的多态性被证明与亚洲人群消化道癌的易感性增加相关(Xu et al., 2014)。HIF1A描述为散发性男性乳腺癌的预后标志物(Deb et al., 2014)。

[0127] 细胞内HYOU1蛋白的活性已被证实在肿瘤进展或转移过程中为癌细胞存活提供益处。细胞外HYOU1蛋白通过促进递送肿瘤抗原进行交叉提呈而在抗肿瘤免疫应答的产生中起重要作用(Fu and Lee, 2006; Wang et al., 2014)。HYOU1蛋白已经被引入癌症免疫治疗中,并呈现积极的免疫调节作用(Yu et al., 2013; Chen et al., 2013; Yuan et al., 2012; Wang and Subjeck, 2013)。

[0128] 研究显示,与相邻非癌组织相比,IGHG1在人类胰腺癌组织中过度表达。与此相反,IGHG1蛋白在浸润性导管癌组织中下调(Kabbage et al.,2008;Li et al.,2011b)。IGHG1的siRNA靶向沉寂能够抑制细胞活力,促进细胞凋亡(Pan et al.,2013)。

[0129] 研究人员发现,IGHG3在受乳腺癌影响的沙特女性中表达。同样,在前列腺癌非洲裔男性中检测到拷贝数提高以及IGHG3水平升高。另一份报告显示,IGHG3表达发现于鳞状非小细胞肺癌、恶性间皮瘤以及肿瘤细胞上,这些细胞偶尔见于MALT淋巴瘤并显示有分化成浆细胞的倾向(Remmelink et al.,2005;Bin Amer et al.,2008;Ledet et al.,2013;Zhang et al.,2013c;Sugimoto et al.,2014)。

[0130] IGHG4编码免疫球蛋白重链恒定伽玛4(G4m标志物),位于染色体14q32.33上(RefSeq,2002)。最近的工作检测到,在原发性睾丸弥漫性大B细胞淋巴瘤中涉及 IGHG4的重排(Twa et al.,2015)。

[0131] IGHM编码免疫球蛋白重链恒定 μ (RefSeq,2002)。研究发现IGHM在受横纹肌肉瘤影响的中国患者中下调。其他人检测到弥漫性大B细胞淋巴瘤中的IGHM表达。另一组发现,在弥漫性大B细胞淋巴瘤中,IGHM基因只在大多数IgM+肿瘤中有效IGH 等位基因上保存。此外,上皮错构瘤样本对结合到IGHM增强因子3的转录因子或转录因子EB显示任何反应性(Kato et al.,2009;Blenk et al.,2007;Ruminy et al.,2011;Liu et al.,2014b)。

[0132] IL36RN被描述为可显著区分III期和I、II期胰腺癌的标志物(Liang et al.,2015)。

[0133] INA表达降低与胰腺神经内分泌肿瘤的转移、复发和较短的总生存期相关。因此,INA 可能是胰腺神经内分泌肿瘤侵袭性的一个有用的预后生物标志物(Liu et al.,2014a)。INA被描述为在少突胶质细胞表型胶质瘤中上调,INA表达被证明与少突胶质母细胞瘤和胶质母细胞瘤的无进展生存相关(Suh et al.,2013)。INA被描述为神经母细胞瘤的标志物,可用于儿童期小圆形细胞肿瘤的鉴别诊断工作(Willoughby et al.,2008)。

[0134] ITGA6表达在不同癌症实体(乳腺癌、前列腺、结肠癌、胃癌)中上调,并与肿瘤进展和细胞侵袭有关(Mimori et al.,1997;Lo et al.,2012;Haraguchi et al.,2013;Rabinovitz et al.,1995;Rabinovitz and Mercurio,1996)。ITGA6的 Abeta4变体的增殖作用似乎通过Wnt/ β -连环蛋白通路来介导(Groulx et al.,2014)。ITGA6的Abeta4变体导致PI3K/Akt/mTOR途径的VEGF依赖性活化。此途径在转移癌细胞的存活中具有重要作用(Chung et al.,2002)。

[0135] KRT14在各种鳞状细胞癌(如食管癌、肺癌、喉癌、宫颈癌)以及腺瘤牙源性肿瘤中高度表达。但是,在膀胱小细胞癌中不存在,在肺腺癌、胃腺癌、结直肠癌、肝细胞癌、胰腺导管腺癌、乳腺浸润性导管癌、甲状腺乳头状癌和子宫内膜样腺癌中较弱(Xue et al.,2010;Terada,2012;Vasca et al.,2014;Hammam et al.,2014;Shruthi et al.,2014)。在膀胱癌中,KRT14表达与较差生存期强烈相关(Volkmer et al.,2012)。

[0136] KRT16过度表达发现于基底样乳腺癌细胞系以及原位癌中。其他人未发现非复发性成釉细胞瘤和复发性成釉细胞瘤之间KRT16免疫组化表达的显著差异(Joosse et al.,2012;Ida-Yonemochi et al.,2012;Safadi et al.,2016)。此外,硅片分析表明了转移性乳腺癌中KRT16表达与较短无复发生存之间相关(Joosse et al.,2012)。

[0137] KRT5被证明年轻女性的乳腺癌中上调(Johnson et al.,2015)。KRT5被证明与年

轻女性乳腺癌的较差无病生存以及激素受体阳性乳腺癌绝经前患者的临床结果相关 (Johnson et al., 2015; Sato et al., 2014)。KRT5被证明通过乳腺癌细胞系 HCC1937和 T47D中的肿瘤抑制因子BRCA1调节 (Gorski et al., 2010)。KRT5被证明在恶性胸膜间皮瘤中失调 (Melaiu et al., 2015)。KRT5被描述为恶性间皮瘤的诊断性间皮标志物 (Arif and Husain, 2015)。KRT5被证明与子宫内膜癌进展有关 (Zhao et al., 2013)。KRT5被证明在疣状癌患者的浸润性肿瘤区域下调 (Schumann et al., 2012)。KRT5被证明属于四个蛋白质系列的一部分, 与正常组织样本相比, 其在结直肠癌活检物中差异表达 (Yang et al., 2012)。KRT5和四个蛋白系列的其他三个蛋白被描述为新型标志物以及结直肠癌治疗的潜在靶 (Yang et al., 2012)。KRT5被描述为与基底细胞癌有关 (Depianto et al., 2010)。KRT5被描述为确定尿路上皮癌干细胞的候选基因 (Hatina and Schulz, 2012)。

[0138] 涉及KYN的犬尿氨酸途径的激活被证明在胶质母细胞瘤中显著较高, 表明犬尿氨酸途径参与神经胶质瘤的病理生理学 (Adams et al., 2014)。KYN被描述为癌症联基因, 其表达时在MDA-MB-231乳腺癌细胞系中芳香烃受体敲减后改变 (Goode et al., 2014)。KYN被证明在高度和非侵袭性骨肉瘤细胞系中差异表达, 这表明它可能在骨肉瘤肿瘤形成的过程中具有重要作用。因此, KYN也可能代表未来治疗靶目标一个候选基因 (Lauvrak et al., 2013)。KYN被证明与非致瘤性HeLa和人皮肤成纤维细胞的混合细胞的致瘤性再表达相关。因此, KYN可为致瘤表达的调节提供一个相关候选 (Tsujimoto et al., 1999)。

[0139] LAMB3与其他两个基因的组合转录分析被证明有利于甲状腺乳头状癌的诊断和淋巴结转移风险的预测 (Barros-Filho et al., 2015)。LAMB3被证明与口腔鳞状细胞癌、前列腺癌、胃癌、结直肠癌、尤文家族肿瘤、肺癌、乳腺癌和卵巢癌的癌症实体相关 (Volpi et al., 2011; Li et al., 2011; Reis et al., 2013; Stull et al., 2005; Irifune et al., 2005; Tanis et al., 2014)。LAMB3被证明在宫颈鳞状细胞癌、肺癌、胃癌、鼻咽癌和食管鳞状细胞癌中上调 (Kwon et al., 2011; Wang et al., 2013a; Yamamoto et al., 2013; Kita et al., 2009; Fang et al., 2008b)。LAMB3 被描述为一种蛋白, 其已知可影响细胞分化、迁移、粘附、增殖和存活并充当宫颈鳞状细胞癌的癌基因 (Yamamoto et al., 2013)。LAMB3的敲减被证明可抑制肺癌细胞体外和体内侵袭和转移。因此, LAMB3是在肺癌发生和转移中起重要作用的关键基因 (Wang et al., 2013a)。LAMB3被证明通过头颈部鳞状细胞癌中的肿瘤抑制因子miR-218调节 (Kinoshita et al., 2012)。头颈部鳞状细胞癌中LAMB3的沉默被证明可导致细胞迁移和侵袭的抑制 (Kinoshita et al., 2012)。LAMB3表达与食管鳞状细胞癌的浸润深度和静脉浸润相关 (Kita et al., 2009)。LAMB3的甲基化被证明与膀胱癌预后不良的几个参数相关 (Sathyanarayana et al., 2004)。

[0140] LAP3的抑制被证明可通过fascin和MMP-2/9的下调导致卵巢癌细胞系ES-2中侵袭抑制。因此, LAP3可以充当潜在的抗转移治疗靶标 (Wang et al., 2015d)。LAMB3 的高表达被证明与恶性肿瘤的分级和胶质瘤患者的预后不良相关 (He et al., 2015)。LAP3被证明可通过调节细胞生长、迁移和侵袭而促进神经胶质瘤的进展, 因而可能是一个新的预测因子 (He et al., 2015)。在高微卫星不稳定性的胃癌和结直肠癌中检测到涉及氨基酸代谢的基因 (包括LAP3) 的移码突变 (Oh et al., 2014)。LAP3 被证明在肝细胞癌、食管鳞状细胞癌和前列腺癌中上调 (Zhang et al., 2014; Tian et al., 2014; Lexander et al., 2005)。LAP3被证明通过调节细胞周期和晚期细胞迁移的G1/S期检查点, 以促进肝癌细胞增殖

(Tian et al.,2014)。LAP3的表达进一步显示与肝细胞癌的预后和恶性发展相关(Tian et al.,2014)。食管鳞状细胞癌细胞系ECA109中LAP3的沉寂被证明可降低细胞增殖和集落形成,而LAP3敲减导致细胞周期停滞(Zhang et al.,2014)。食管鳞状细胞癌细胞系TE1中LAP3过度表达被证明有利于细胞增殖和侵袭(Zhang et al.,2014)。因此,LAP3被证明在食管鳞状细胞癌的恶性发展中发挥作用(Zhang et al.,2014)。

[0141] 研究人员报告,M6PR在结肠癌细胞系以及绒毛膜细胞中有表达(Braulke et al.,1992;O' Gorman et al.,2002)。在乳腺癌中,M6PR低水平表达与患者预后较差相关(Esseghir et al.,2006)。此外,M6PR过度表达导致在体外细胞生长率降低以及裸鼠中肿瘤生长下降(O' Gorman et al.,2002)。

[0142] MAPK6被证明在调节乳腺癌细胞系MDA-MB-231的细胞形态和迁移中起作用(A1-Mahdi et al.,2015)。MAPK6被描述为癌症相关MAPK信号传导途径的一部分,与黑色素瘤的BRAF和MEK1/2信号相关(Lei et al.,2014;Hoeftlich et al.,2006)。MAPK6被证明在肺癌、胃癌和口腔癌中上调(Long et al.,2012;Rai et al.,2004;Liang et al.,2005a)。MAPK6被证明可通过致癌基因SRC-3的磷酸化促进肺癌细胞侵袭。因此,MAPK6可能是侵袭性肺癌治疗的一个有吸引力的靶标(Long et al.,2012)。MAPK6被描述为耐药性乳腺癌细胞抗癌药物开发的潜在靶标(Yang et al.,2010)。MAPK6在胃癌中过度表达被证明与TNM分期、浆膜浸润和淋巴结累及相关(Liang et al.,2005a)。MAPK6被证明是核心细胞周期机械组件细胞周期蛋白D3的结合伴侣,表明MAPK6在细胞增殖中具有潜在活性(Sun et al.,2006)。

[0143] MNAT1被证明与雌激素受体阳性/HER2阴性乳腺癌的不良预后相关(Santarpia et al.,2013)。粒细胞生成期间MNAT1内在碎片损失被证明可促进白血病骨髓细胞的生长和转移(Lou et al.,2013)。MNAT1被证明在推定的癌基因ADRM1敲减后在卵巢癌细胞系OAW42中失调(Fejzo et al.,2013)。siRNA介导的MNAT1基因沉寂被证明可在体外抑制胰腺癌细胞系BxPC3的细胞生长,并在体内实现对皮下移植胰腺肿瘤的抗肿瘤作用(Liu et al.,2007a)。MNAT1的遗传变体被描述与肺癌的易感性相关(Li et al.,2007)。用重组腺病毒编码的反义MNAT1感染胰腺癌细胞系BxPC3显示可导致MNAT1表达下降以及G0/G1期细胞的比例增加。因此,表明MNAT1在胰腺癌细胞系BxPC3中细胞周期G1到S期转变的调节中起重要作用(Zhang et al.,2005)。MNAT1调节周期蛋白依赖性激酶激活激酶活性被证明可交叉调节神经母细胞瘤细胞G1期阻滞,并在神经母细胞瘤的增殖到分化的转变中发挥关键作用(Zhang et al.,2004)。

[0144] 乳腺癌中NEFH的DNA甲基化相关沉寂被证明是频繁的、具有癌症特异性,并与疾病进展的临床特征相关(Calmon et al.,2015)。NEFH被进一步描述通过胰腺癌、胃癌和结肠癌的DNA甲基化而失活,从而也可能有助于这些恶性肿瘤的进展(Calmon et al.,2015)。NEFH CpG岛甲基化被证明与肾细胞癌的晚期疾病、远处转移和预后相关(Dubrowinskaja et al.,2014)。因此,NEFH甲基化可能是肾细胞癌预后的候选后生标志物(Dubrowinskaja et al.,2014)。NEFH被证明在外阴外黏液样软组织肉瘤中上调(Dotlic et al.,2014)。肝癌细胞系中NEFH过度表达被证明可减少细胞增殖,而NEFH的敲减促进体外细胞侵袭和迁移并增加在小鼠中形成肿瘤的能力。因此,NEFH充当肝细胞癌的肿瘤抑制因子(Revill et al.,2013)。NEFH被证明在尤文肉瘤中频繁甲基化,因此可能与肿瘤发生相关(Alholle et

al.,2013)。

[0145] NEFL的DNA甲基化介导的沉寂被证明是乳腺癌中的频繁事件,可能有助于乳腺癌的和其他恶性肿瘤(如,胰腺癌、胃癌和结肠癌)的进展(Calmon et al.,2015)。NEFL被描述为一种潜在的肿瘤抑制基因,其与几个器官的癌症相关(Huang et al., 2014c)。NEFL被描述为可能在头颈部鳞状细胞癌细胞系的癌细胞凋亡和侵袭中发挥作用(Huang et al., 2014c)。NEFL甲基化被描述为一种新机制,其通过与mTOR信号通路相互作用在头颈部癌细胞系中产生顺铂耐药性(Chen et al.,2012)。NEFL被描述为可预测头颈部肿瘤化疗疗效和生存期的候选生物标志物(Chen et al.,2012)。NEFL高表达被描述与幕上室管膜瘤较好的临床效果相关(Hagel et al.,2013)。NEFL被证明在乳腺癌中异位表达,与淋巴结阴性的癌症相比,在淋巴结转移的原发性乳腺癌中下降(Li et al.,2012)。NEFL低表达被证明可提示早期乳腺癌患者的5 年无病生存期较差,因此可能是早期乳腺癌患者的潜在预后因素(Li et al.,2012)。NEFL被证明在多形性胶质母细胞瘤中下调(Khalil,2007)。NEFL所在的染色体 8p21-23处等位基因缺失被描述为癌症形成和肺癌发展的早期和频繁事件,也被描述为与乳腺癌、前列腺癌和乙型肝炎病毒阳性肝细胞癌有关(Seitz et al.,2000; Becker et al.,1996;Haggman et al.,1997;Kurimoto et al.,2001)。

[0146] NEFM被描述为与肿瘤进展相关和转移参与过程有关的基因(Singh et al., 2015)。NEFM被证明在食管癌中低甲基化和上调(Singh et al.,2015)。NEFM被描述为一个候选肿瘤抑制基因,该基因经常在胶质母细胞瘤中下调(Lee et al.,2015a)。乳腺癌中NEFM的DNA甲基化相关沉寂被证明是频繁的、具有癌症特异性,并与疾病进展的临床特征相关(Calmon et al.,2015)。NEFM被进一步描述通过胰腺癌、胃癌和结肠癌的DNA甲基化而失活,从而也可能有助于这些恶性肿瘤的进展(Calmon et al., 2015)。NEFM被证明与前列腺癌和星形细胞瘤有关(Wu et al.,2010;Penney et al.,2015)。NEFM被描述为在肾细胞瘤中甲基化的新型候选肿瘤抑制基因(Ricketts et al.,2013)。NEFM的甲基化被证明与肾细胞瘤的预后相关(Ricketts et al., 2013)。NEFM被描述为一种潜在的诊断标志物,与非神经内分泌肿瘤细胞系相比,其被证明在神经内分泌肿瘤细胞系中差异表达(Hofsli et al.,2008)。

[0147] NUP155被描述为与乳腺癌易感性相关的白血细胞DNA的一个潜在后生生物标志物(Khakpour et al.,2015)。NUP155被描述为NUP214-ABL1阳性T细胞急性淋巴细胞白血细胞系的增殖和存活严格需要的,并由此构成了该疾病的一个潜在的药物靶标(De et al., 2014)。

[0148] OAS2被证明与通过胱天蛋白酶-3激活的CD3- ζ 链表达损害有关。CD3- ζ 链的缺乏被描述为在口腔癌中可以经常观察到(Dar et al.,2015)。OAS2被描述为涉及晚期前列腺癌风险相关的先天免疫和炎症通路的子通路(Kazma et al.,2012)。子通路分析显示,OAS2名义上与晚期前列腺癌风险相关(Kazma et al.,2012)。

[0149] 非小细胞肺癌中PABPN1的较低表达与预后不良相关(Ichinose et al.,2014)。PABPN1的损失被描述可通过从非小细胞肺癌微RNA介导的基因调控中释放癌细胞,从而可能促进肿瘤侵袭性(Ichinose et al.,2014)。PABPN1的N-末端聚丙氨酸扩张变体被证明通过HeLa和HEK-293细胞系中的p53途径与细胞凋亡诱导相关(Bhattacharjee et al., 2012)。

[0150] PCBP1被描述为前列腺癌细胞的癌症干细胞富集和功能特别重要 (Chen et al., 2015a)。PCBP1被描述为胃癌发病机制的抑制因子,其下调与培养和异种移植胃癌细胞中的恶性表型有关 (Zhang et al., 2015e)。基于卵巢浆液性腺癌患者的良性和恶性血清和组织样本之间的差异表达,表明PCBP1在卵巢癌的病理生理学中发挥作用 (Wegdam et al., 2014)。PCBP1被证明是TGF- β 诱导的上皮间质转化(胆囊癌细胞系GBC-SD中肿瘤转移的先决条件)的重要介质 (Zhang and Dou, 2014)。PCBP1 表达水平被证明可调节胆囊癌细胞系GBC-SD的体外迁移和侵袭能力 (Zhang and Dou, 2014)。因此,PCBP1可能是胆囊癌转移的潜在预后标志物 (Zhang and Dou, 2014)。PCBP1下调被描述为可能涉及与子宫颈癌的发病机制 (Pathak et al., 2014)。PCBP1被描述为肿瘤抑制相关转录因子p63的调节因子 (Cho et al., 2013)。完全性葡萄胎中PCBP1高表达被证明与发展为妊娠滋养细胞肿瘤的较低风险有关,而 PCBP1表达在恶性转化癌中显著降低 (Shi et al., 2012)。因此,表明PCBP1在妊娠滋养细胞肿瘤的发病机制中起重要作用 (Shi et al., 2012)。PCBP1过度表达被证明可导致转移相关PRL-3蛋白翻译和AKT失活的抑制,而PCBP1的敲减被证明可引起 AKT的激活和促进肿瘤发生 (Wang et al., 2010)。PCBP1被描述在肝癌细胞系 HepG2的肿瘤侵袭中发挥负作用 (Zhang et al., 2010)。人肝肿瘤中PCBP1的损失被描述为有助于转移表型的形成 (Zhang et al., 2010)。

[0151] PDPN被描述为在鳞状细胞癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤和骨肉瘤中上调 (Fujita and Takagi, 2012)。PDPN被描述为肿瘤侵袭和转移的调节因子,因为PDPN与参与上皮间质转化、集体细胞迁移、血小板活化、聚集和淋巴管形成的几个途径有关 (Dang et al., 2014)。PDPN被描述为口腔癌和上皮间皮瘤的标志物 (Swain et al., 2014; Ordonez, 2005)。PDPN上调被描述为与上呼吸道鳞状细胞癌的淋巴结转移和预后差有关 (Chuang et al., 2013)。PDPN被描述为在血管肿瘤、恶性间皮瘤、中枢神经系统肿瘤、生殖细胞肿瘤、鳞状细胞癌和侵袭性和转移可能性更高的侵袭性肿瘤中表达 (Raica et al., 2008)。因此,PDPN可被视为肿瘤细胞具有吸引力的治疗靶标 (Raica et al., 2008)。

[0152] PHTF2被证明在舌鳞状细胞癌中下调 (Huang et al., 2007)。

[0153] PKM2被证明对癌细胞增殖和肿瘤生长很关键 (Chen et al., 2014b; Li et al., 2014; DeLaBarre et al., 2014)。N-myc基因作为髓母细胞瘤中PKM2的转录调节因子 (Tech et al., 2015)。PKM2似乎在肝癌发病、上皮间质转变和血管生成中发挥作用 (Nakao et al., 2014)。PKM2是肿瘤学中Warburg效应的两个关键因子之一 (Tamada et al., 2012; Warner et al., 2014; Ng et al., 2015)。PKM2表达在癌细胞中上调 (Chaneton and Gottlieb, 2012; Luo and Semenza, 2012; Wu and Le, 2013)。在恶性细胞中,PKM2具有糖酵解功能,作为转录辅激活物和蛋白激酶。在后一种功能中,它易位至细胞核并磷酸化组蛋白3,最终导致胶质母细胞瘤的细胞周期进展 (Semenza, 2011; Luo and Semenza, 2012; Tamada et al., 2012; Venneti and Thompson, 2013; Yang and Lu, 2013; Gupta et al., 2014; Iqbal et al., 2014; Chen et al., 2014b; Warner et al., 2014)。低活性二聚体PKM2不是活性四聚体形式可能在癌症中发挥作用 (Mazurek, 2011; Wong et al., 2015; Iqbal et al., 2014; Mazurek, 2007)。

[0154] PKP1被证明在前列腺癌和食管腺癌中下调 (Kaz et al., 2012; Yang et al., 2015a)。非肿瘤、前列腺BPH-1细胞系中PKP1的敲减导致细胞凋亡减少和基因(如,前列腺

癌相关SPOCK1基因) 差异表达 (Yang et al., 2015a)。总体来说, PKP1和 SPOCK1表达改变似乎是前列腺癌中的频繁和严重事件, 表明PKP1具有肿瘤抑制功能 (Yang et al., 2015a)。PKP1表达下降被证明与口腔鳞状细胞癌中显著更短的至远处转移发生时间有关 (Harris et al., 2015)。通过激活子甲基化导致的PKP1损失被描述为与Barrett食管进展为食管腺癌相关 (Kaz et al., 2012)。PKP1被证明在非小细胞肺癌中上调, 可能是区分鳞状细胞癌样本的良好标志物 (Sanchez-Palencia et al., 2011)。PKP1被证明在分化良好的脂肪肉瘤细胞系GOT3中上调 (Persson et al., 2008)。PKP1表达下降被描述为可促进头颈部鳞状细胞癌的活动性增加 (Sobolik-Delmaire et al., 2007)。PKP1损失被证明与宫颈癌发生有关 (Schmitt- Graeff et al., 2007)。PKP1被证明与口咽鳞状细胞癌患者的局部复发或转移以及不良预后有关 (Papagerakis et al., 2003)。

[0155] PKP3 mRNA在胃肠道肿瘤患者的血液中增加可作为生物标志物和疾病预后预测因素 (Valladares-Ayerbes et al., 2010)。PKP3过度表达与乳腺癌、肺癌和前列腺癌的预后不良相关, 而膀胱癌的下调与侵袭性行为有关 (Furukawa et al., 2005; Breuninger et al., 2010; Demirag et al., 2012; Takahashi et al., 2012)。PKP3丧失导致MMP7和PRL3蛋白质水平增加, 这是细胞迁移和肿瘤形成所需要的 (Khapare et al., 2012; Basu et al., 2015)。

[0156] PPP4R1的敲减被证明可抑制乳腺癌细胞系ZR-75-30的细胞增殖 (Qi et al., 2015)。因此, PPP4R1可促进乳腺癌细胞的增殖, 并可能在乳腺癌的发生中起着至关重要的作用 (Qi et al., 2015)。肝细胞癌细胞系HepG2中PPP4R1敲减被证明可导致细胞增殖、集落形成和细胞周期在G2/M期停滞 (Wu et al., 2015)。PPP4R1敲减被进一步证明可导致HepG2细胞中p38和c-Jun N-末端激酶信号级联失活, 这提示 PPP4R1可促进细胞增殖 (Wu et al., 2015)。因此, PPP4R1在促进肝细胞癌细胞生长中起着关键作用 (Wu et al., 2015)。PPP4R1被描述为淋巴细胞NF- κ B激酶活性抑制剂的负调节因子, 其下调促进T细胞淋巴瘤亚组中的致癌NF- κ B信号传导 (Brechmann et al., 2012)。

[0157] PRC1被描述为与宫颈癌辐射抗性相关, 因为宫颈癌组织辐射后显示PRC1高差异表达 (Fu et al., 2015b)。PRC1内含子14中的遗传基因座被描述为与乳腺癌易感性相关 (Cai et al., 2014)。PRC1被描述为五基因标签的一个基因, 可作为乳腺癌患者无病生存期的预后标签 (Mustacchi et al., 2013)。PRC1被证明在卵巢癌、宫颈癌和膀胱癌中上调 (Espinosa et al., 2013; Ehrlichova et al., 2013; Kanehira et al., 2007)。PRC1被证明在乳腺上皮细胞系MCF-10A的4-羟基雌二醇介导的恶性转化期间被上调 (Okoh et al., 2013)。PRC1被描述为在肿瘤发病中具有显著生物学意义的基因, 其可用于基因群来预测肿瘤可切除的非小细胞肺癌患者辅助化疗后的预后 (Tang et al., 2013)。表明PRC1通过细胞周期相关激酶Plk1被负调节 (Hu et al., 2012)。膀胱癌细胞系NIH3T3中PRC1的敲减被证明可导致多核细胞和随后的细胞死亡显著增加 (Kanehira et al., 2007)。此外, PRC1被证明与膀胱癌细胞中的新型癌症-睾丸抗原MPHOSPH1相互作用, 并且MPHOSPH1/PRC1复合体表明在膀胱癌形成中发挥关键作用, 可能是一种新的治疗靶标 (Kanehira et al., 2007)。PRC1被证明被p53调节 (Li et al., 2004)。

[0158] 表达序列标签分析确定PRDM15为淋巴瘤中的上调基因 (Giallourakis et al., 2013)。PRDM15被描述为一个候选肿瘤抑制基因, 其可能有助于胰腺癌的发生或进展

(Bashyam et al.,2005)。

[0159] PTHLH的不同多态性被证明与肺癌的风险和预后有关(Manenti et al.,2000)。自发性转移性乳腺癌C57BL/6小鼠衍生的模型中PTHLH上调被描述为可能参与乳腺癌的转移性传播(Johnstone et al.,2015)。PTHLH被证明在口腔鳞状细胞癌、软骨瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤和肾透明细胞癌中上调(Bellon et al.,2013;Yang et al.,2013a;Yao et al.,2014;Lv et al.,2014)。PTHLH上调被证明与头颈部鳞状细胞癌患者的较差病理学分化和较差预后有关(Lv et al.,2014)。PTHLH被证明通过p38信令上调,其通过在肺微脉管系统内皮细胞的胱天蛋白酶非依赖性死亡促进肺部结肠癌细胞外渗(Urosevic et al.,2014)。与正常皮肤相比,PTHLH被证明在鳞状细胞癌中显著差异表达(Prasad et al.,2014)。PTHLH被描述为四基因标签的一部分,其与早期非小细胞肺癌患者的生存期有关(Chang et al.,2012)。通过 PTHLH移码突变对抗增殖作用的破坏被描述为可促进遗传性非息肉性结直肠癌患者的早期结直肠癌的发展(Yamaguchi et al.,2006)。PTHLH上调被证明与接受肾切除的肾透明细胞癌患者的总生存期和无病生存期较差结果相关(Yao et al.,2014)。PTHLH被证明可正调节细胞周期进程,并通过结直肠腺癌细胞系Caco-2的ERK1/2、p38、MAPK和PI3K信号通路参与细胞周期调控的蛋白表达(Calvo et al.,2014)。RAP1GDS1被证明可促进胰腺癌细胞增殖(Schuld et al.,2014)。小鼠非小细胞肺癌细胞系NCI-H1703异种移植物中RAP1GDS1两种剪接变体同时损失被证明可导致肿瘤发生降低(Schuld et al.,2014)。RAP1GDS1被证明可促进多种类型癌症的细胞周期进程,使其成为癌症治疗有价值的靶标(Schuld et al.,2014)。RAP1GDS1被证明在乳腺癌、前列腺癌和非小细胞肺癌中上调(Hauser et al.,2014;Tew et al.,2008;Zhi et al.,2009)。RAP1GDS1的SmgGDS-558剪接变体被证明是RhoA和NF- κ B 活性的独特激活子,其在乳腺癌恶性中起着功能性作用(Hauser et al.,2014)。RAP1GDS1高表达被证明与乳腺癌较差的临床结果相关(Hauser et al.,2014)。RAP1GDS1被证明可调节非小细胞肺癌的细胞增殖、迁移和NF- κ B转录活性,因此促进该疾病的恶性表型。因此,RAP1GDS1是非小细胞肺癌的令人感兴趣的治疗靶标 (Tew et al.,2008)。RAP1GDS1被证明在T细胞急性淋巴细胞白血病中被融合至 NUP98(Romana et al.,2006)。

[0160] RNPEP活性被证明在结直肠腺瘤、乳头状甲状腺癌、乳腺癌和肾透明细胞癌中上调(Ramirez-Exposito et al.,2012;Larrinaga et al.,2013;Perez et al.,2015; Varona et al.,2007)。RNPEP被证明与皮下区域植入的大鼠C6神经胶质瘤的肿瘤生长相关(Mayas et al.,2012)。

[0161] RORA被描述为潜在的肺癌基因(Wang et al.,2015e)。RORA被证明与结肠癌中潜在的肿瘤抑制基因OPCML的表达相关(Li et al.,2015a)。RORA两个单核苷酸多态性被证明与乳腺癌相关(Truong et al.,2014)。RORA被描述为乳腺癌的潜在肿瘤抑制因子和治疗靶标(Du and Xu,2012)。RORA被证明在结直肠腺瘤和乳腺癌中下调 (Kottorou et al.,2012;Du and Xu,2012)。肝细胞癌细胞系HepG2中RORA稳定过度表达被证明可影响参与葡萄糖代谢和肝癌形成基因的表达,这表明RORA与肝来源细胞内的癌形成有关(Chauvet et al.,2011)。与正常胃粘膜相比,RORA被证明在胃癌中差异甲基化(Watanabe et al.,2009)。RORA被描述为与细胞生长和分化控制以及雄激素非依赖性前列腺癌细胞系DU 145的转移行为控制相关(Moretti et al.,2002)。

[0162] RPS17被证明在正常全血转移性葡萄膜黑色素瘤中以及容易因葡萄膜黑色素瘤发生转移的组织中差异表达,这表明RPS17可能在葡萄膜黑色素瘤转移的趋向性中发挥作用(Demirci et al.,2013)。RPS17被证明在肝细胞癌中上调(Liu et al.,2007b)。

[0163] RPS26敲减被证明可诱导p53稳定化和活化,导致p53依赖性细胞生长抑制(Cui et al.,2014)。RPS26进一步显示通过直接影响p53的转录活性在DNA损伤应答中发挥作用(Cui et al.,2014)。

[0164] S100A2被证明与非小细胞肺癌相关,并被描述为肺鳞癌患者较差总体生存期的一个预测标志物(Hountis et al.,2014;Zhang et al.,2015d)。S100A2被描述为癌基因KRAS的下游靶标,是肺癌肿瘤进展的激活子(Woo et al.,2015)。S100A2被描述为预测胰腺导管腺癌总生存期的一个有希望的标志物(Jamieson et al.,2011)。通过亚硝胺N-亚硝基吡咯烷的S100A2表达改变被描述为南非黑人食管鳞状细胞癌肿瘤进展的潜在原因(Pillay et al.,2015)。S100A2被证明在早期非小细胞肺癌、鼻咽癌患者的血浆、喉癌、胃癌和表皮肿瘤中上调(Zhu et al.,2013a;Lin et al.,2013; Zhang et al.,2015a;Zha et al.,2015;Wang et al.,2015c)。S100A2的甲基化相关失活被证明在头颈部和膀胱癌中频繁发生,因此可能是这些疾病肿瘤发生中的重要事件(Lee et al.,2015c)。S100A2细胞质表达被证明在口腔鳞状细胞癌中上调,而核表达下调(Kumar et al.,2015)。S100A2细胞质上调被证明是口腔鳞状细胞癌患者复发风险在的潜在预测因子(Kumar et al.,2015)。S100A2被描述为在乳腺癌转移中发挥作用(Naba et al.,2014)。S100A2被证明是一种BRCA1/p63共同调节肿瘤抑制基因,其通过调节突变p53与HSP90结合而在突变p53稳定性调节中发挥作用(Buckley et al.,2014)。S100A2被描述为一种候选肿瘤抑制基因,该基因在复发鼻咽癌中下调,因此可能在复发性鼻咽癌的发生中起重要作用(Huang et al.,2014b)。S100A2被证明在胃癌中下调,且下调被证明与浸润深度、淋巴结转移、无复发概率降低和总生存期下降相关(Liu et al.,2014e)。因此,S100A2下调可能是胃癌独立的负预后生物标志物(Liu et al.,2014e)。S100A2进一步显示可负调节MGC-803癌细胞的MEK/ERK信号传导途径(Liu et al.,2014e)。在免疫缺陷小鼠中,S100A2过度表达被证明可诱导A549肺癌细胞的上皮-间质转化,随后增加侵袭性、增强Akt磷酸化和加快肿瘤生长(Naz et al.,2014)。S100A2的原致癌基因行为被进一步描述为参与PI3/Akt信号传导调节以及与TGF- β 信号途径蛋白Smad3的功能性相互作用(Naz et al.,2014)。S100A2表达被证明与肺门周围和肝外胆管癌患者的组织学分级、淋巴结转移、临床分期和较差的生存期相关(Sato et al.,2013)。因此,S100A2可充当胆管癌患者的预后标志物(Sato et al.,2013)。

[0165] S100A8被描述为急性和慢性炎症的重要介质,其与髓源抑制细胞在正反馈回路中相互作用,以促进肿瘤的发展和转移(Zheng et al.,2015)。S100A8被描述为非小细胞肺癌的潜在的诊断标志物、预后指针和治疗靶标(Lim and Thomas,2013)。S100A8 过度表达被证明与膀胱癌的期别进展、侵袭、转移和较差生存有关(Yao et al.,2007)。S100A8被证明是浸润性膀胱癌的诊断标志物(Ismail et al.,2015)。S100A8被证明在未分化甲状腺癌、骨巨细胞瘤和结直肠癌中上调(Reeb et al.,2015;Zhang et al.,2015b;Liao et al.,2015a)。使用S100A8敲减的未分化甲状腺癌细胞在小鼠中的体内分析提示,肿瘤生长和肺转移减少,动物生存期显著延长(Reeb et al.,2015)。S100A8被证明可通过与RAGE相互作用促进未分化甲状腺癌细胞的增殖,这激活肿瘤细胞中的p38、ERK1/2和JNK信号传导途径

(Reeb et al., 2015)。因此,S100A8可能代表未分化甲状腺癌的相关治疗靶标(Reeb et al.,2015)。S100A8被证明与高风险慢性淋巴细胞性白血病相关(Alsagaby et al., 2014)。S100A8被证明与肾脏癌进展相关,并且被描述为肾癌的潜在生物标志物和治疗靶标(Mirza et al.,2014)。S100A8被描述为钙卫蛋白的一部分,这是非炎症驱动肝肿瘤的进展所需的异源二聚体,可能代表肝细胞癌的治疗靶标(De et al.,2015)。S100A8被证明可通过ID3表达的诱导来调节结肠癌细胞周期和增殖,同时抑制p21(Zhang et al., 2015b)。

[0166] SERPINH1编码丝氨酸蛋白酶抑制剂,分化体H(热激蛋白47)成员1,(胶原结合蛋白1),是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂。SERPINH1作为内质网的胶原特定分子伴侣(RefSeq, 2002)。SERPINH1在许多人类癌症,包括胃癌、肺癌、胰腺导管腺癌、神经胶质瘤和溃疡性结肠炎相关癌中过度表达(Zhao et al.,2014a)。SERPINH1在肝细胞癌、食管鳞状细胞癌、胆管细胞癌、胃癌、肺癌、胰腺导管腺癌、溃疡性结肠炎相关癌症和神经胶质瘤中上调(Zhao et al.,2014a;Padden et al.,2014;Lee et al.,2015b;Naboulsi et al.,2015)。SERPINH1过度表达被证明与食管鳞状细胞癌患者的不良预后相关,SERPINH1的免疫染色水平和病理分期被证明与总体和无复发生存期显著相关(Lee et al.,2015b)。因此,SERPINH1可能是食管鳞状细胞癌的一个潜在预后标志物(Lee et al.,2015b)。神经胶质瘤细胞中SERPINH1敲减被证明可体外抑制胶质瘤细胞生长、迁移和侵袭,而SERPINH1体内敲减被证明可抑制肿瘤生长和诱导细胞凋亡(Zhao et al.,2014a)。因此,SERPINH1可能是胶质瘤的治疗靶标(Zhao et al.,2014a)。与具有多个淋巴结受累的口咽鳞状细胞癌原发肿瘤相比,SERPINH1被证明在转移癌中下调,这提示SERPINH1可能与这些肿瘤的转移可能性相关(Nikitakis et al.,2003)。

[0167] SLC7A11被证明是在W1卵巢癌细胞系的耐药变种中下调,从而可能在癌细胞药物抗性中发挥作用(Januchowski et al.,2013)。SLC7A11被描述为可调节肿瘤微环境,导致癌症生长优势(Savaskan and Eyupoglu,2010)。SLC7A11被描述为参与胶质瘤的神经变性过程,使SLC7A11称为癌症治疗的潜在主要靶标(Savaskan et al.,2015)。SLC7A11被证明在铁死亡的情况下通过p53抑制,p53-SLC7A11轴被描述为保留于p53(3KR)突变体,并有助于其在不存在经典肿瘤抑制机制时抑制肿瘤发生(Jiang et al.,2015)。SLC7A11被描述为系统Xc-的功能性亚基,其功能在侵袭性乳腺癌细胞中增加(Linher-Melville et al., 2015)。顺铂耐药性膀胱癌中SLC7A11高膜染色被证明与较差的临床结果相关,并且SLC7A11抑制被描述为本病一种有前景的治疗方法(Drayton et al.,2014)。SLC7A11被证明在已被暴露于苯和其代谢物的人早幼粒白血病细胞系HL-60中差异表达,因而强调了SLC7A11与白血病发生的潜在关联性(Sarma et al.,2011)。SLC7A11破坏被描述为可导致多种癌症(包括淋巴瘤、神经胶质瘤、前列腺癌和乳腺癌)的生长抑制(Chen et al.,2009)。SLC7A11抑制被证明可在体外抑制食管癌细胞系KYSE150的细胞浸润和裸鼠的实验性转移,从而确立了SLC7A11在肿瘤转移中的作用(Chen et al.,2009)。

[0168] SRPR被证明在含双微染色体的急性髓性白血病情况下被扩增(Crossen et al., 1999)。

[0169] SSR4的人类直系同源物被证明在负鼠黑色素瘤细胞系TD6b和TD15L2中差异表达,在晚期肿瘤中上调,提示SSR4是一种候选基因,潜在的功能是可能与紫外线诱导黑色素瘤

和转移相关 (Wang and VandeBerg, 2004)。相比正常成骨细胞, SSR4的mRNA 水平被证明在骨肉瘤细胞系OHS、SAOS-2和KPDXM中富集 (Olstad et al., 2003)。

[0170] STK17A表达失调与不同癌症类型相关。宫颈癌和结直肠癌中表达降低与肿瘤进展相关 STK17A的促凋亡特征有关。胶质母细胞瘤和头颈部癌的STK17A以级别依赖性过度表达, 可能通过对其他肿瘤相关途径 (如, TGF- β) 的影响引起 (Mao et al., 2013a; Thomas et al., 2013; Park et al., 2015; Bandres et al., 2004)。STK17A是肿瘤抑制基因p53的直接靶标, 是活性氧 (ROS) 的调节剂 (Kerley-Hamilton et al., 2005; Mao et al., 2011)。

[0171] SYK被描述为肿瘤发生的调节因子, 通过提供生存功能在一些细胞中充当肿瘤激活子, 并通过限制上皮-间充质转换和抑制迁移在另一些细胞中充当肿瘤抑制因子 (Krisenko and Geahlen, 2015)。SYK被描述为与B细胞淋巴瘤中的B细胞受体 (BCR) 活化相关 (Seda and Mraz, 2015)。BCR途径关键激酶 (如SYK) 的抑制已在临床前模型中发现可减少慢性淋巴细胞性白血病细胞活力 (Davids and Brown, 2012)。SYK被证明在慢性淋巴细胞性白血病中上调 (Feng and Wang, 2014)。SYK被描述为与慢性淋巴细胞性白血病的发病机制相关, 可能在评估治疗效果和这种疾病的预后中具有价值 (Feng and Wang, 2014)。SYK描述为乳腺癌的潜在肿瘤抑制因子, 其在原发性乳腺肿瘤缺乏与不良结果相关 (Navara, 2004)。SYK被证明在卵巢癌中的紫杉醇抗性发挥关键作用 (Yu et al., 2015b)。SYK下调被描述为与多种癌症 (包括结直肠癌) 的发展有关 (Peng et al., 2015)。SYK激活子不同的基因多态性被证明是中国南方汉族人群结直肠癌发展的独立危险因素 (Peng et al., 2015)。SYK被证明在肝细胞癌频繁甲基化, SYK甲基化被证明可确定预后不良的肝细胞癌子集 (Shin et al., 2014)。

[0172] TP63易位被描述为间变性淋巴瘤激酶阳性间变性大细胞淋巴瘤子集中的一个事件, 其与疾病的侵袭过程相关 (Hapgood and Savage, 2015)。TP63被描述为由于其参与上皮细胞分化、细胞周期停滞和细胞凋亡而在癌症中发挥复杂的作用 (Lin et al., 2015)。TP63异构体TAp63被描述为在恶性血液病中过度表达, 而TP63错义突变报告发生于淋巴瘤和一些肺腺癌中的鳞状癌和TP63易位处 (Orzoi et al., 2015)。导致TP63异构体 δ Np63过度表达的异常剪接在人类癌症 (如, 皮肤鳞状细胞癌) 中经常发现, 其很可能有利于肿瘤发生和发展 (Missero and Antonini, 2014; Inoue and Fry, 2014)。

[0173] TPM1被证明在肾细胞癌、食管癌细胞系鳞状细胞癌、转移性犬乳腺癌和成神经细胞瘤细胞系中下调 (Klopfleisch et al., 2010; Yager et al., 2003; Zare et al., 2012; Wang et al., 2015b)。TPM1表达被证明与肾细胞癌患者的肿瘤大小、Fuhrman 分级和预后有关。肾细胞癌细胞系OSRC-2和786-0的TPM1转染显示可降低迁移和侵袭能力, 同时增强细胞凋亡 (Wang et al., 2015b)。因此, TPM1被描述为可显示肿瘤抑制基因的特征, 同时在肾细胞癌细胞中过度表达 (Wang et al., 2015b)。RAS/PI3K/AKT和RAS/MEK信号通路被描述为参与肝内胆管癌细胞系HuCCT1和食管鳞状细胞癌细胞系中TPM1调节和抑制 (Zare et al., 2012; Yang et al., 2013b)。TPM1被描述为一种肿瘤抑制因子, 其乳腺癌细胞系MCF-7中过度表达抑制了锚定非依赖性细胞生长 (Zhu et al., 2007b)。TPM1的后生抑制被描述为与改变的TGF β 肿瘤抑制功能相关, 并且可能有助于形成肿瘤细胞的转移特性 (Varga et al., 2005)。

[0174] 类胰蛋白酶被证明在某些急性骨髓性白血病患者中上调 (Jin et al., 2014)。类

胰蛋白酶的表达被描述为经由ERK1/2和p38MAPK途径被SCF/c-KIT信令调节(Jin et al., 2014)。肥大细胞类胰蛋白酶被描述为参与结直肠癌血管生成,被证明在结直肠癌患者的血清中根治性手术切除之前较之后呈更高的表达(Ammendola et al., 2014)。

[0175] 相比于非致瘤性细胞系OKF6-TERT1RTSHZ3,TSHZ3被证明在口腔鳞状细胞癌细胞系 SCC-9中下调(Marcinkiewicz and Gudas,2014)。TSHZ3被描述为一种转录调节基因,其发现在高级别浆液性卵巢癌的一些病例中被反复地重新排列(McBride et al., 2012)。TSHZ3被描述为在乳腺癌和前列腺癌下调表达的候选肿瘤抑制基因(Yamamoto et al., 2011)。

[0176] TSPAN10被证明是在转移性黑色素瘤样本和正常皮肤样本之间差异表达的基因,其可能是转移性黑色素瘤治疗的潜在生物标志物(Liu et al.,2014c)。在其他基因中,与原发平滑肌肉瘤相比,TSPAN10被证明在子宫平滑肌肉瘤转移中上调,因此有助于辨别这些疾病并且可能有助于理解该癌症的肿瘤进展(Davidson et al.,2014)。

[0177] TTPAL被描述为在微卫星不稳定性结直肠癌中显示突变的候选癌基因(Tuupanen et al.,2014)。

[0178] TUBGCP2被证明在紫杉醇耐药卵巢癌细胞系中上调,并被描述为与非小细胞肺癌细胞系NCI-H1155对紫杉醇的敏感性有关(Huang and Chao,2015)。TUBGCP2被证明在胶质母细胞瘤中上调,其过度表达拮抗CDK5调节亚基相关肿瘤抑制蛋白3对DNA 损伤G2/M检查点活性的抑制作用(Draberova et al.,2015)。

[0179] VIM被描述为STAT3的下游靶标,其在通过STAT3失调节后与乳腺肿瘤进展有关(Banerjee and Resat,2015)。VIM被描述为潜在的鼻咽癌相关蛋白(Chen et al., 2015c)。波形蛋白的阴性甲基化状态被证明可预测胰腺癌患者预后改善(Zhou et al., 2014)。VIM被证明通过C6orf106在非小细胞肺癌中上调,并被描述与癌细胞侵袭性增强随后相关(Zhang et al.,2015c)。VIM被描述为肺鳞癌患者总生存期的独立预测因子(Che et al.,2015)。VIM被描述为一种生物标志物,可以潜在区分黑色素瘤亚型,并可能预测黑色素瘤不同亚组中黑色素瘤的侵袭性(Qendro et al.,2014)。VIM被证明在透明细胞肾细胞癌上调(Shi et al.,2015)。VIM高表达被描述为透明细胞肾细胞癌的独立预测指标(Shi et al.,2015)。VIM被证明充当一种支架以募集 Slug至ERK并促进Slug磷酸化,其被描述为激活上皮-间质转变、促进转移能力的肿瘤发生期间采用的发展过程所需要的(Virtakoivu et al.,2015)。

[0180] 与预后良好的低级别肥大细胞瘤相比,WDR1被证明在来自于卵巢癌的间质液和预后不良的高级别犬皮肤肥大细胞瘤中上调(Schlieben et al.,2012;Haslene-Hox et al.,2013)。WDR1被证明在化疗耐药晚期浆液性上皮性卵巢癌中下调(Kim et al., 2011)。化疗耐药晚期浆液性上皮性卵巢癌中WDR1下调被证明与总生存期差相关(Kim et al., 2011)。WDR1被证明在乳腺癌侵袭性肿瘤前面和正常组织之间的区域(接口区)上调,因此,可能与乳腺癌的进展和转移有关(Kang et al.,2010)。

[0181] YWHAE与NUTM2B/NUTM2E融合被描述为在少数肾透明细胞肉瘤中观察到的事件(Karlsson et al.,2015)。YWHAE-NUTM2融合被描述为高级别子宫内膜间质肉瘤中的常见事件(Ali et al.,2014)。含YWHAE-NUTM2融合的高级别子宫内膜间质肉瘤被描述为子宫内膜间质肉瘤的一个子集,其具有侵袭性临床行为和较差预后(Kruse et al.,2014)。三个位

点(包括YWHAE)的破损被描述为是子宫肉瘤发生的潜在因素(Suzuki et al., 2014)。YWHAE被证明在胃癌中下调,YWHAE水平下降与弥漫型胃癌和该病理早发性相关,这表明YWHAE可能在胃癌发生过程中发挥作用(Leal et al., 2012)。YWHAE被证明在有和没有复发的乳腺癌患者组织中差异表达,并被证明与无病生存期和总生存期均相关(Cimino et al., 2008)。因此,YWHAE可用作乳腺癌的独立预后标志物和潜在的药物靶标(Cimino et al., 2008)。

[0182] ZNF292的变化被描述为慢性淋巴细胞性白血病驱动改变(Puente et al., 2015)。ZNF292被描述为结直肠癌的肿瘤抑制基因(Takeda et al., 2015)。ZNF292被描述为在头颈部鳞状细胞癌中具有临床相关性的免疫原性抗原(Heubeck et al., 2013)。

[0183] 发明的详细说明

[0184] 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。

[0185] 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)。

[0186] 除非另有说明,否则本文使用的所有术语定义如下。

[0187] 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。

[0188] 本文所用“肽”这一术语,系指一系列氨基酸残基,通常通过相邻氨基酸的 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、12、13或14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个氨基酸长度或更长。

[0189] 因此,“肽”这一术语应包括一系列氨基酸残基的盐,通常通过相邻氨基酸的 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。

[0190] 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,通常通过相邻氨基酸的 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。

[0191] “多肽”这一术语是指一系列氨基酸残基,通常通过相邻氨基酸的 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。

[0192] 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。

[0193] 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),其可以通过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。

[0194] 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。

[0195] 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)。

[0196]

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%

[0197]

等 位 基 因	人 群	根据等位基因频率算得的显 型
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%
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%

[0198]

等位基因	人群	根据等位基因频率算得的显型
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%
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%

[0199] 本发明的肽，优选当如本文描述纳入本发明的疫苗时与A*02。疫苗还可能包括泛结合 MHC II类肽。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核性而必须选择II类MHC同种异型。

[0200] 如果本发明的A*02肽与结合至另一等位基因例如A*24的肽组合，与单独的MHC I类等位基因相比，可治疗更高比例的患者群体。虽然在大多数人群中，低于50%的患者可由单独的等位基因来解决问题，但是本发明中一种含HLA-A*24和HLA-A*02表位的疫苗可以治疗任何相关人群中至少60%的患者。具体来说，各区域中，以下比例的患者这些等位基因中的至少一个有肯定效果：美国61%、西欧62%、中国75%、韩国77%、日本86%（根据www.allelefrequencies.net计算）。

[0201] 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。

[0202] 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。

[0203] 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。

[0204] 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。

[0205] “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。

[0206] 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。

[0207] “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。

[0208] “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。

[0209] “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。

[0210] “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。

[0211] “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。

[0212] 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。

[0213] 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,明确涵盖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。

[0214] 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。“活性片段”这一术语是指产生免疫反应的片段(即具有免疫原性活性),通常是一种肽、多肽或核酸序列的片段,不论是单独或可选地与合适的佐剂一起或在载体中给予一种动物,比如哺乳动物,例如兔子或小鼠,

也包括人;这种免疫反应采用的形式是在接受动物(如:人)体内刺激T细胞反应。或者,“活性片段”也可用于诱导体外T细胞反应。

[0215] 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。

[0216] 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:

[0217] $\text{等同度百分比} = 100[1 - (C/R)]$

[0218] 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

[0219] (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;

[0220] (ii) 参考序列中每个空隙,以及

[0221] (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

[0222] (iiii) 必须在对准序列的第1位置开始对准;

[0223] 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。

[0224] 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。

[0225] 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:93群组的一个序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93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。

[0226] 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”是通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。此类序列同源性可通过使用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。

[0227] 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)。

[0228] 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通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:93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。

[0229] 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结合槽的结合模式相称的核心序列,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通过保持已知的锚残基来修饰SEQ ID No:1至SEQ ID NO:93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。

[0230] 如果无另有说明,那么本文公开的原始(未修饰)肽可以通过在肽链内的不同(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。

[0231] 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)。

[0232] 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。

[0233] 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。

[0234] 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。

[0235] 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

兼容性复合体 (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,与人类主要组织兼容性复合体 (MHC) -I或II类分子的能力基本上被改变或受到不利影响。

[0236] 这些基本不与T细胞受体互动的氨基酸残基可通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)。

[0237] 表6:根据SEQ ID NO:4、9和18的肽的变体和基序

[0238]

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID No. : 4	A	L	F	G	T	I	L	E	L	
变体									V	
									I	
									A	
		M							V	
		M							I	
		M								
		M							A	
		A							V	
		A							I	

[0239]

		A								
		A							A	
		V							V	
		V							I	
		V								
		V							A	
		T							V	
		T							I	
		T								
		T							A	
		Q							V	
		Q							I	
		Q								
		Q							A	
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID No. : 9	H	L	I	A	E	I	H	T	A	
变体									V	
									I	
									L	
		M							V	
		M							I	
		M							L	
		M								
		A							V	
		A							I	
		A							L	
		A								
		V							V	
		V							I	
		V							L	
		V								
		T							V	
		T							I	
		T							L	
		T								
		Q							V	
		Q							I	
		Q							L	
		Q								
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID No. :18	F	L	L	D	Q	V	Q	L	G	L
变体										V
										I

[0240]

									A
	M								V
	M								I
	M								
	M								A
	A								V
	A								I
	A								
	A								A
	V								V
	V								I
	V								
	V								A
	T								V
	T								I
	T								
	T								A
	Q								V
	Q								I
	Q								
	Q								A

[0241] 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。

[0242] 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7。

[0243] 表7:本发明肽的拉长组合

[0244]

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

[0245]	C-端	N-端
	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

[0246] 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。

[0247] 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。

[0248] 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,优选最多30个氨基酸的总长度。这可形成MHC-II类结合肽。结合至MHC II类肽可通过本领域中已知的方法进行测试。

[0249] 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)。

[0250] 当然,本发明的肽或变体能与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。

[0251] 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1μM,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。

[0252] 在本发明的一个特别优选实施方案中,肽由或基本由根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93所选的氨基酸序列组成。

[0253] 基本由“...组成”系指本发明的肽,除了根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93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。

[0254] 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。

[0255] 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。

[0256] 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) 可通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。

[0257] 非肽键为 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 等。美国 4897445 号专利提出了多肽链中非肽键 ($-\text{CH}_2-\text{NH}$) 的非固相合成法, 该方法涉及按标准程序合成的多肽以及通过氨基醛和一种含 NaCNBH_3 的氨基酸相互作用而合成的非肽键。

[0258] 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团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、叔丁氧羰基团或氨基团都可能被加入肽的羧基末端。

[0259] 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。

[0260] 同样, 本发明中的肽或变体可在合成肽之前或之后通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) 通过以下方法修饰: 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、通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 NY 1995-2000)) (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。

[0261] 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-烯己二酮) 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。

[0262] 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通过碘乙酰胺、溴乙

胺、氯胺T等被修饰。

[0263] 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通过过氧化氢/铜离子完成。

[0264] 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-硝基苄基)-3H-吡啶(BPNS-粪臭素)。

[0265] 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通过氰酸钾的氨基甲酰化实现。

[0266] 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)、双丙烯酸乙烯二胺(交联剂)和N-丙烯酰胺肌氨酸甲酯(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)

[0267] 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。

[0268] 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)。

[0269] 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。

[0270] 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。可通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,从而通过假发现率(Benjamini and Hochberg,1995)调整多项检验(参见实施例1)。

[0271] 对于通过质谱法对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,并在线通过纳米-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,将食管癌样本(N=16个A*02阳性样本)中记录的自然肿瘤相关肽(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性肿瘤HLA分子的配体,因此这些结果为来自16名食管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。

[0272] 发现管道XPRESIDENT® v2.1(例如,参见US 2013-0096016,并在此通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。这通过以下方法实现: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。

[0273] 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。

[0274] 对来自食管癌组织样本的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使用原发性食管癌样本的方法进行鉴定,确认其在原发性食管癌上的提呈。

[0275] 在多个食管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。

[0276] 除了过量提呈肽之外,也测试了潜在基因的mRNA表达。mRNA数据通过RNA测序分析正常组织和癌组织获得(见实施例2)。正常组织数据的额外来源是从3000个正常组织样本中公开获得的RNA表达数据的数据库(Lonsdale,2013)。获得自蛋白编码mRNA的肽在癌组织中高表达,但是在重要正常组织中非常低或不存在,这些肽被优选纳入本发明。

[0277] 此外,发现管道XPRESIDENT® v2.x可对癌症或其他感染组织上的MHC-肽(优选为HLA限制性肽)进行直接的绝对定量。简言之,总细胞计数根据被分析的组织样本的总DNA含量来计算。组织样本中TUMAP的总肽量用nanoLC-MS/MS测定为天然TUMAP的比率以及TUMAP同位素标记版本的已知量,称为内部标准。TUMAP分离效率确定方法:把肽:所有选定TUMAP的MHC在TUMAP分离程序尽早的时间点加入组织裂解液,并在肽分离完成后通过nanoLC-MS/MS检测。总细胞计数和总肽量根据每份组织样本三次测量值来计算。所述肽特异性隔离效率计算为三次测量10次加标实验的平均值(见实施例6和表12)。

[0278] 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食管癌。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食管癌样本中。

[0279] 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”是健康食管细胞或其他正常细胞,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”是指来自食管癌患者的样本),但不在正常组织中过度提呈(见实施例1)。

[0280] 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:提呈衍生肽的食管癌细胞)。

[0281] 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通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。

[0282] 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。

[0283] 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。

[0284] 另一个方面,本说明书涉及一种根据本说明书的方法,其中所述抗原通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,或该抗原通过四聚化被加载I或II类MHC四聚体/I或II类MHC复合单体。

[0285] 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性区(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。

[0286] 本说明书的TCR优选结合至HAVCR1-001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100 nM或更小、约50 nM或更小或约25 nM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1 nM至约10 nM;约10 nM至约20 nM;约20nM至约30nM;约30 nM至约40 nM;约40 nM至约50 nM;约50 nM至约60 nM;约60 nM至约70 nM;约70 nM至约80 nM;约80 nM至约90 nM;以及约90 nM至约100 nM。

[0287] 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。

[0288] 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。

[0289] 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通过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。

[0290] 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。

[0291] 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与非突变TCR相比,已经修改了糖基化。

[0292] 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HAVCR1-001肽HLA分子复合体有结合亲和力和/或结合半衰期,其是包含非突变TCR α 链和/或非突变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HAVCR1-001的亲和力可通过本领域熟知的方法来增强。

[0293] 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/HAVCR1-001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并通过荧光激活细胞分选(FACS)-Calibur方法分析分离高亲和力T细胞。

[0294] 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 0.7 Mb)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HAVCR1-001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,并通过荧光激活细胞分选(FACS)-Calibur方法分析分离高亲和力T细胞。

[0295] 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和力。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通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通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。

[0296] 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)-1 α 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(Follenzi et al.,2000),和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元素(WPRE),其通过提高RNA稳定性增加转基因表达水平(Zufferey et al.,1999)。

[0297] 本发明TCR的 α 和 β 链可由位于分开的载体核酸进行编码,或者可通过位于同一载体的多核苷酸编码。

[0298] 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)。

[0299] 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)。

[0300] 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的细胞的功能性亲和力(Kuball et al.,2007)。

[0301] 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和,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);通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)。

[0302] 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。

[0303] “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。

[0304] 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、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。

[0305] 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。

[0306] 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WO 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CD8 T细胞。然而,在有CD4 T-辅助细胞的帮助时,CD8 T细胞刺激更加有效。因此,对于刺激CD8 T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。

[0307] 一方面,疫苗包括至少含有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93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。

[0308] 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。

[0309] 对于连接多核苷酸,已经开发出多种方法,尤其是针对DNA,可通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,通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。

[0310] 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通过多种管道购得,其中包括从国际生物技术公司(International Biotechnologies Inc,New Haven,CN,美国)购得。

[0311] 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,通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。

[0312] 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。

[0313] 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。

[0314] 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,该载体通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。

[0315] 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。

[0316] 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。

[0317] 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。

[0318] 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。

[0319] 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。

[0320] 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通过连接氨基酸的延伸处(例如LLLLL)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。

[0321] 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CRL 1650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。

[0322] 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。

[0323] 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。

[0324] 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。

[0325] 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)。

[0326] 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。

[0327] 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)。

[0328] 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,如通过“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。

[0329] 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,通过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)。

[0330] 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寡核苷酸可通过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 T_{H1} 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CD4 T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 T_{H1} 偏移,这些佐剂如:正常促进 T_{H2} 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6406705 B1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。

[0331] 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:环磷酰胺、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-TGFβ、抗-TNFα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。

[0332] 首选佐剂是抗-CD40、咪喹莫特、瑞喹莫德、GM-CSF、环磷酰胺、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。

[0333] 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。

[0334] 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CD40 mAB或其组合物。

[0335] 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。

[0336] 重要的是要认识到,通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)。

[0337] 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,支架能够通过其靶抗原(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。

[0338] “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。

[0339] 各支架可包括一个标记,其通过确定是否存在或不存卷标所提供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,通过荧光染料进行的荧光标记可通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。

[0340] 各支架可与第二个活性分子(例如IL-21、抗CD3、抗CD28)共轭。

[0341] 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。

[0342] 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。

[0343] 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。

[0344] 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。

[0345] 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。

[0346] 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。

[0347] 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 93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(通过指数富集的配体系统进化)技术。

[0348] 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。

[0349] 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。

[0350] 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。

[0351] 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,所有参考文献通过引用被完整地并入本文。

[0352] 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,这在本发明情况下也被视为具有“特异性”。

[0353] 本发明涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93组成的组的序列或该序列的与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93具有88%同源性(优选为相同)的变体,或诱导T细胞与所述变异肽发生交叉反应的变体,其中,所述肽不是全长多肽。

[0354] 本发明进一步涉及一种肽,包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93的序列、或与SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93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。

[0355] 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。

[0356] 本发明进一步涉及本发明中的肽,其中肽由或基本由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:93 的氨基酸序列组成。

[0357] 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。

[0358] 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。

[0359] 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 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 、 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 、 ZnCl_2 、 Cs_3PO_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 、 $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 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 NH_4 乙酸、 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。

[0360] 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% 二甲基吡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-丙烯酸酰胺甲酯(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)。

[0361] 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。

[0362] 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)。

[0363] 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。

[0364] 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。

[0365] 本发明进一步涉及一种能表达本发明核酸的表达载体。

[0366] 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,特别是用于治疗食管癌。

[0367] 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。

[0368] 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。

[0369] 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。

[0370] 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。

[0371] 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:93或变体氨基酸序列的肽。

[0372] 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。

[0373] 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。

[0374] 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。

[0375] 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。

[0376] 本发明还一般涉及本发明的用途,其中所述癌细胞为食管癌细胞或其他实体或血液肿瘤细胞,如:肺癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤、子宫癌、肝细胞癌、肾细胞癌、脑癌、结直肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、前列腺癌和白血病。

[0377] 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/或判断食管癌的预后。本发明还涉及这些供癌症治疗使用的新靶点。

[0378] 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,食管癌标志物(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食管癌细胞和/或抑制食管癌标志物多肽的活性)。

[0379] 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食管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。

[0380] 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:93 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食管癌标志物多肽的单克隆或多克隆抗体制剂。

[0381] 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。

[0382] 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)。

[0383] 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产生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。

[0384] 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:通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)。

[0385] 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,可以通过使用本领域已知的常规技术完成。例如,可以通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。

[0386] 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通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点基因突变。

[0387] 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区域均为人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,通常是人免疫球蛋白的恒定区的一部分。

[0388] 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。人源化基本上可以通过将啮齿动物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。

[0389] 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。

[0390] 本发明的抗体优选为通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。

[0391] 该抗体可通过注射(如:静脉内、腹腔内、皮下、肌肉内)或通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。这些抗体也可以通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。

[0392] 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,优选为治疗食管癌后,治疗抗体的疗效可通过技术人员熟知的不同方法评估。例如:接受治疗的受试者癌症的大小、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癌症的抗体。

[0393] 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通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,可通过非天然二硫键、其他共价键(单链T细胞受体)或通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。

[0394] 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。

[0395] 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:¹¹¹In、⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、³H、³²P或³⁵S),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1x 10 μ M。

[0396] 诊断用抗体可通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。

[0397] 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分子进行体外接触,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。

[0398] 优选情况是,哺乳动物细胞的TAP肽转运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运载体。

[0399] 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)。

[0400] 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。

[0401] 当MHC I类表位用作一种抗原时,T细胞为CD8阳性T细胞。

[0402] 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:93的肽或变体氨基酸序列。

[0403] 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通过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)中描述了通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通过将预制的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。

[0404] 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。

[0405] 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。

[0406] 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 93氨基酸序列的多肽。

[0407] 优选情况是,T细胞通过与其含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。

[0408] 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))。

[0409] 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。

[0410] 发明人所用的“异常表达”的意思还包括,与正常(健康)组织表达水平相比,多肽过量表达,或该基因在来自肿瘤的组织中未表达,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。

[0411] T细胞可用本领域已知的方法制得(如,上述方法)。

[0412] 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)。

[0413] 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。

[0414] 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。

[0415] 本发明还涉及一种试剂盒,其包括:

[0416] (a) 一个容器,包含上述溶液或冻干粉形式的药物组合物;

[0417] (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

[0418] (c) 可选的(i)溶液使用或(ii)重构和/或使用冻干制剂的说明。

[0419] 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。

[0420] 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。

[0421] 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。

[0422] 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(=75 μ g),不超过3mg/mL/肽(=1500 μ g)。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。

[0423] 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。

[0424] 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。

[0425] 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)。

[0426] 本发明的药物配方适合以任何可接受的途径进行肽给药,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,也可通过输液泵给药。

[0427] 由于本发明的肽从食管癌中分离而得,因此,本发明的药剂优选用于治疗食管癌。

[0428] 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。

[0429] “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。

[0430] 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等位基因食管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。除了从几种食管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。

[0431] 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:

[0432] 1. 恶性材料的HLA配体用质谱法确定;

[0433] 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;

[0434] 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;

[0435] 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;

[0436] 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;

[0437] 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。

[0438] 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。

[0439] 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。

[0440] 在一方面,选择所述肽以包含在疫苗中,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。

[0441] 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。

[0442] 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。

[0443] 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。

[0444] 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。

[0445] 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。

[0446] 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。

[0447] 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。稀释的溶液通过0.22 μ m无菌筛检程序进行过滤。从而获得最终本体溶液。

[0448] 最终本体溶液填充到小瓶中,在使用前储存于-20℃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。

[0449] 本发明的肽除了用于治疗癌症,也可用于诊断。由于肽由食管癌细胞产生,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。

[0450] 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,也可用作食管癌的生物标志物。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。

[0451] 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。

[0452] 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,用于检测移植物抗宿主和宿主抗移植物疾病。

[0453] 下列描述优选方案的实施例将对本发明进行说明,并参照随附图表(但是不限于此)。考虑到本发明的目的,文中引用的所有参考文献通过引用的方式并入在本文中。

附图说明

[0454] 图1A至1V显示了正常组织(白色柱)和食管癌(黑色柱)中各种肽的过量提呈。A) 基因符号:KRT14/KRT16,肽:STYGGGLSV (SEQ ID NO:1) 从左至右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,8动脉,5骨髓,7大脑,5乳腺,2软骨,1中枢神经,13结肠,1十二指肠,2胆囊,5心脏,14肾脏,21肝脏,44肺,4淋巴结,4白细胞样本,3卵巢, 8胰腺,5末梢神经,1腹膜,3脑垂体,4胎盘,3胸膜,3前列腺,6直肌,7唾液腺,4骨骼肌,6皮肤,2小肠,4脾,5胃,6睾丸,3胸腺,3甲状腺,7气管,2 输尿管,6膀胱,2子宫,2静脉,6食管,16食管癌标本。该肽还在4/91肺癌中检测出。图1B) 基因符号:GJB5,肽:SIFEGLLSGV (SEQ ID NO:7)。从左到右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,8动脉,5骨髓,7大脑,5乳腺,2软骨,1中枢神经,13结肠,1十二指肠,2胆囊,5心脏,14肾脏,21肝脏,44肺,4淋巴结,4白细胞样本, 3卵巢,8胰腺,5末梢神经,1腹膜,3脑垂体,4胎盘,3胸膜,3前列腺,6直肌, 7唾液腺,4骨骼肌,6皮肤,2小肠,4脾,5胃,6睾丸,3胸腺,3甲状腺,7气管,2输尿管,6膀胱,2子宫,2静脉,6食管,16食管癌标本。该肽还在1/43前列腺癌,

1/3胆囊癌,1/20卵巢癌,5/91肺癌和1/4膀胱癌中检测出。图2C) 基因符号:PKP3,肽:SLVSEQLEPA (SEQ ID NO:34)。从左到右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,8动脉,5骨髓,7大脑,5乳腺,2软骨,1中枢神经,13结肠,1十二指肠,2 胆囊,5心脏,14肾脏,21肝脏,44肺,4淋巴结,4白细胞样本,3卵巢,8胰腺, 5末梢神经,1腹膜,3脑垂体,4胎盘,3胸膜,3前列腺,6直肌,7唾液腺,4骨骼肌,6皮肤,2小肠,4脾,5胃,6睾丸,3胸腺,3甲状腺,7气管,2输尿管,6 膀胱,2子宫,2静脉,6食管,16食管癌标本。该肽还在8/24结直肠癌,1/20卵巢癌,1/46胃癌,5/91肺癌和2/4膀胱癌中检测出。图2D) 基因符号:RNPEP,肽:YTQPFSHYGQAL (SEQ ID NO:37)。从左到右的组织:1脂肪组织,3肾上腺,8动脉,5 骨髓,7大脑,5乳腺,2软骨,1中枢神经,13结肠,1十二指肠,2胆囊,5心脏, 14肾脏,21肝脏,44肺,4淋巴结,4白细胞样本,3卵巢,8胰腺,5末梢神经,1 腹膜,3脑垂体,4胎盘,3胸膜,3前列腺,6直肌,7唾液腺,4骨骼肌,6皮肤, 2小肠,4脾,5胃,6睾丸,3胸腺,3甲状腺,7气管,2输尿管,6膀胱,2子宫, 2静脉,6食管,16食管癌标本。该肽还在1/19胰腺癌,7/46胃癌和1/91肺癌中检测出。图4E) 基因符号:NUP155,肽:ALQEALENA (SEQ ID NO:80)。从左到右的样本: 4细胞系(1肾脏,1胰腺,1前列腺,1髓细胞性白血病),3正常组织(1肺,1前列腺,1小肠),47癌组织(5脑癌,2乳腺癌,1结肠癌,2食管癌,1慢性白细胞白血病,2肝癌,22肺癌,7卵巢癌,4前列腺癌,1直肠癌)。图5F) 基因符号:KRT5,肽:SLYNLGGSKRISI (SEQ ID NO:2)。从左到右的组织:20癌组织(9头颈部癌, 2食管癌,1食管和胃癌,7肺癌,1膀胱癌)。图6G) 基因符号:KRT5,肽: TASAITPSV (SEQ ID NO:3)。从左到右的组织:17癌组织(2食管癌,6头颈癌,7肺癌,2膀胱癌)。图7H) 基因符号:S100A2,肽:SLDENSDDQQV (SEQ ID NO:10)。从左到右的组织:7癌组织(3头颈部癌,2食管癌,1肺癌,1膀胱癌)。图8I) 基因符号:LAMB3,肽:ALWLPTDSATV (SEQ ID NO:11)。从左到右的组织:12癌组织(2食管癌,1胆囊癌,8肺癌,1皮肤癌)。图9J) 基因符号:IL36RN,肽:SLSPVILGV (SEQ ID NO:13)。从左到右的组织:26癌组织(8头颈癌,3食管癌,10肺癌,3皮肤癌,1膀胱癌,1子宫癌)。图10K) 基因符号:AN01,肽:LLANGVYAA (SEQ ID NO:15)。从左到右的组织:8癌组织(2食管癌,1胆囊癌,1肝癌,1肺癌,1胃癌, 1膀胱癌,1子宫癌)。图11L) 基因符号:F7,IGHV4-31,IGHG1,IGHG2,IGHG3, IGHG4,IGHM,肽:MISRTPEV (SEQ ID NO:17)。从左到右的组织:19癌组织(2食管癌,2肾癌,2肝癌,9肺癌,1淋巴结癌,1睾丸癌,2膀胱癌)。图12M) 基因符号:QSER1,肽:SLNGNQVTV (SEQ ID NO:30)。从左到右的组织:1细胞系(1胰腺),14 癌组织(1头颈部癌,1胆管癌,1脑癌,1乳腺癌,1食管癌,1肾癌,1肺癌,2皮肤癌,3膀胱癌,2子宫癌)。图13N) 基因符号:HAS3,肽:YMLDIFHEV (SEQ ID NO:32)。从左到右的组织:1正常组织(1子宫), 15癌组织(1脑癌,2食管癌,1 胆囊癌,3头颈癌,4肺癌,4膀胱癌)。图14O) 基因符号:PKP3,肽:SLVSEQLEPA (SEQ ID NO:34)。从左到右的组织:1细胞系(1胰腺),1正常组织(1结肠), 28 癌组织(6头颈部癌,1乳腺癌,1盲肠癌,3结肠癌,1结直肠癌,3食管癌,6肺癌, 1卵巢癌,3直肠癌,3膀胱癌)。图15P) 基因符号:SERPINH1,肽:GLAFSLYQA (SEQ ID NO:40)。从左到右的组织:3细胞系(1肾脏,2胰腺),4正常组织(1肾上腺,1肺,2胎盘),41癌组织(3头颈部癌,3乳腺癌,2结肠癌,2食管癌,1胆囊癌,1肝癌,15肺癌,1卵巢癌,1胰腺癌,3直肠癌,2皮肤癌,1胃癌,4膀胱癌, 2子宫癌)。图16Q) 基因符号:TMEM132A,肽:ALVEVTEHV (SEQ ID NO:56)。从左到右的组织:7正常组织(5肺,1甲状腺,1气管),64癌组织(6头颈癌,12脑癌, 4乳腺癌,3食管癌,1胆囊癌,5肾癌,21肺癌,1淋巴结癌,7卵巢癌,1胰腺癌, 1皮肤癌,2子宫癌)。图17R) 基因符号:PRC1,肽:GLAPNTPGKA (SEQ ID NO:57) 。从左到右的组织:14癌组织(1头颈

部癌,1乳腺癌,2食管癌,6肺癌,1卵巢癌,1皮肤癌,1膀胱癌,1子宫癌)。图18S) 基因符号: MAPK6, 肽: LILESIPVV (SEQ ID NO:58)。从左到右的组织:2细胞系(1血细胞,1皮肤),25癌组织(5头颈部癌,1结肠癌,2食管癌,1白细胞白血病癌,8肺癌,2淋巴结癌,3皮肤癌,2膀胱癌,1子宫癌)。图19T) 基因符号: PPP4R1, 肽: SLLDTLREV (SEQ ID NO:59)。从左到右的组织:1正常组织(1小肠),8癌组织(1头颈部癌,2食管癌,4肺癌,1 卵巢癌)。图12U) 基因符号: TP63, 肽: VLVPYEPPQV (SEQ ID NO:77)。从左到右的组织:2正常组织(1食管,1气管),47癌组织(8头颈部癌,4食管癌,1胆囊癌,14肺癌,7淋巴结癌,2前列腺癌,1皮肤癌,8膀胱癌)。图21V) 基因符号: KIAA0947, 肽: AVLPHVDQV (SEQ ID NO:81)。从左到右的组织:3细胞系(1血细胞,1胰腺),12癌组织(5脑癌,2食管癌,1肺癌,3淋巴结癌,1子宫癌)。

[0455] 图2A至2D显示了本发明的源基因的代表性表达特征,这些基因在一系列正常组织(白色柱)的食管癌中以及11个食管癌症样本(黑色柱)中高度过度表达或专门表达。从左到右的组织:7动脉,1脑,1心脏,2肝,2肺,2静脉,1脂肪组织,1肾上腺,4骨髓,1结肠,2食管,2胆囊,1肾,6淋巴结,1胰腺,1脑垂体,1直肠,1骨骼肌,1皮肤,1小肠,1脾,1胃,1胸腺,1甲状腺,5气管,1膀胱,1乳腺,3卵巢,3胎盘,1前列腺,1睾丸,1子宫,11个食管癌样本。图2A) CT45A1、CT45A3、CT45A5、CT45A6、CT45A2、RP11-342L5.1,基因符号: PTHLH;图2B) CLDN16, 基因符号: KRT14;图2C) ESR1,基因符号: FAM83A;图2D) IDO1,基因符号: PDPN。

[0456] 图3A至E显示了健康HLA-A*02+供体的肽特异性CD8+T细胞体外反应的示例性结果,即,示例性免疫原性资料:肽特定多聚体染色后流式细胞仪结果。图3A) 基因符号: SF3B3, 肽: ELDRTPPEV (SEQ ID NO:97);图3B) 基因符号: TNC, 肽: AMTQLLAGV (SEQ ID NO:101)。另外,CD8+T细胞制备的方法为:使用抗CD28mAb 和HLA-A*02涂层的人工APC分别与SEQ ID NO:5肽(C,左图)、SEQ ID NO:2肽(D,左图)和SEQ ID NO:77肽(E,左图)合成。经过3个周期的刺激后,用A*02/SeqID No 5(C)、A*02/SeqID No 2(D)、A*02/SeqID No 77(E)的2D多聚体染色法对肽反应性细胞进行检测。右图(C、D和E)显示用不相关A*02/肽复合体刺激的细胞对照染色。活单细胞在CD8+淋巴细胞上得到门控。Boolean门控帮助排除用不同肽特定的多聚体检测的假阳性事件。提示了特异性多聚体+细胞和CD8+淋巴细胞的频率。

实施例

[0457] 实施例1

[0458] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的识别和定量

[0459] 组织样本

[0460] 患者的肿瘤组织获得自Asterand (Detroit, USA and Royston, Herts, UK)、ProteoGenex Inc., (Culver City, CA, USA)、Tissue Solutions Ltd. (Glasgow, UK)、蒂宾根大学医院。正常组织获得自Asterand (Detroit, USA和Royston, Herts, UK)、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、京都府立医科大学 (KPUM)、慕尼黑大学医院、ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, USA)、德国蒂宾根大学医院、Tissue Solutions Ltd. (Glasgow, UK)。所有患者在手术或尸检前都获得了书面知情同意。切除后组织立即进行冷休克处理,在分离TUMAP前储存于-70℃或以下。

[0461] 从组织样本中分离HLA肽

[0462] 根据方案(Falk et al.,1991;Seeger et al.,1999)略加修改,使用HLA-A*02特异性抗体BB7.2、HLA-A、HLA-B、HLAC特异性抗体W6/32、CNBr活化的琼脂糖凝胶、酸处理和超滤方法以免疫沉淀法从实体组织中获得了冷冻组织样本的HLA肽库。

[0463] 质谱分析

[0464] 获得的HLA肽库根据其疏水性用反相色谱(nanoAcquity UPLC system,Waters)分离,洗脱肽用装有电喷雾源的LTQ-velos融合杂交质谱(ThermoElectron)进行了分析。肽库被直接加载填充有1.7 μ mC18反相材料(Waters)的分析用熔炼石英微毛细管柱(75 μ m内径x250mm),应用流速为400nL每分钟。随后,使用来自流速为300nL每分钟、浓度为10%至33%溶剂B中的两步180分钟二元梯度法对肽进行分离。梯度由溶剂A(含0.1%甲酸的水)和溶剂B(含0.1%甲酸的乙腈)。金镀膜玻璃毛细管(PicoTip,New Objective)用于引入到纳升电喷雾源。使用前5 (TOP5)策略在数据依赖模式下操作LTQ-Orbitrap质谱仪。简言之,首先以高精度质量完全扫描在orbitrap开始一个扫描周期(R=30 000),之后用先前选定离子的动态排除技术在orbitrap中对5种含量最为丰富的前体离子进行MS/MS扫描(R= 7500)。串联质谱以SEQUEST和另一种手动控制器进行解读。生成的自然肽破碎模式与合成序列相同参考肽的破碎模式进行比较后,确保了被识别的肽序列。

[0465] 无标记相对LC-MS定量通过离子计数(即通过LC-MS功能提取和分析)来进行(Mueller et al.,2007)。该方法假定肽的LC-MS信号区域与样本中其丰度相关。提取的特征通过充电状态去卷积和保留时间校准进行进一步处理(Mueller et al., 2008;Sturm et al.,2008)。最后,所有的LC-MS特征与序列鉴定结果交叉引用,以将不同样本和组织的定量数据与肽呈递特征结合。定量数据根据集中数据以两层方式进行正态化处理,以说明技术和生物学复制变异。因此,每个被识别的肽均可与定量资料相关,从而可得出样本和组织之间的相对定量。此外,对候选肽获得的所有定量数据进行手动检查,以确保数据的一致性,并验证自动化分析的准确度。对于每种肽,计算了提呈图,其显示样本平均提呈量以及复制变化。这些特征使食管癌样本与正常组织样本的基线值并列。

[0466] 示范性过度提呈肽的提呈谱示于图1中。示范性肽的提呈分数见表8。

[0467] 表8:提呈分数。该表列出了与一系列正常组织相比在肿瘤上非常高度过量提呈(++)、与一系列正常组织相比在肿瘤上高度过量提呈(++)或与一系列正常组织相比在肿瘤上过量提呈(+)的肽。系列正常组织包括:脂肪组织、肾上腺、动脉、静脉、骨髓、脑、中枢和周围神经、结肠、直肠、小肠(包括十二指肠)、食道、胆囊、心脏、肾、肝、肺、淋巴结、单核白细胞、胰腺、腹膜、垂体、胸膜、唾液腺、骨骼肌、皮肤、脾、胃、胸腺、甲状腺、气管、输尿管、膀胱。

[0468]

序列 ID 号	序列	肽提呈
1	STYGGGLSV	+++
2	SLYNLGSKRISI	+++
3	TASAITPSV	+++
4	ALFGTILEL	++
5	NLMASQPQL	+++
6	LLSGDLIFL	+++
7	SIFEGLLSGV	+++
8	ALLDGGSEAYWRV	+++
9	HLIAEIHTA	+++
10	SLDENSQQV	+++
11	ALWLPTDSATV	+++
12	GLASRILDA	+++
13	SLSPVILGV	+++
14	RLPNAGTQV	+++
15	LLANGVYAA	+++
16	VLAEGGEGV	+++
17	MISRTPEV	+++
18	FLLDQVQLGL	+++
19	GLAPFLNAV	+++
20	IIEVDPDTKEML	+++
21	IVREFLTAL	+++
22	KLNDTYVNV	+++

[0469]

23	KLSDSATYL	+++
24	LLFAGTMTV	+++
25	LLPPPPPPA	+++
26	MLAEKLLQA	+++
27	NLREGDQLL	+++
28	SLDGFTIQV	+++
29	SLDGTELQL	+++
30	SLNGNQVTV	+++
32	YMLDIFHEV	+++
33	GLDVTSLRPFDL	+++
34	SLVSEQLEPA	+
35	LLRFSQDNA	+++
36	FLLRFSQDNA	+++
37	YTQPFSHYQAL	+++
38	IAAIRGFLV	+++
39	LVRDTQSGSL	+++
40	GLAFSLYQA	+++
41	GLESEELEPEEL	+
44	ATGNDRKEAAENSL	+++
45	MLTELEKAL	+++
47	VLASGFLTV	+++
48	SMHQMLDQTL	+++
50	GMNPHQTPAQL	+++
51	KLFGHLTSA	+++
52	VAIGGVDGNVRL	+++
55	GAIDLLHNV	+++
57	GLAPNTPGKA	+++
58	LILESIPVV	+++
59	SLLDTLREV	+++
61	TQTTHELTI	+++
62	ALYEQPLQI	+++

[0470]

63	LAYTLGVKQL	+++
64	GLTDVIRDV	++
65	YVVGGLYQRL	+++
66	LLDEKVQSV	+
68	PAVLQSSGLYSL	+++
70	FVLDTSESV	+
71	ASDPILYRPVAV	+
72	FLPPAQVTV	+
73	KITEAIQYV	+
75	GLMDDVDFKA	+
77	VLVPYEPPQV	++
78	KVANIIEV	+
80	ALQEALENA	++
81	AVLPHVDQV	+++
82	HLLGHLEQA	+++
84	SLAESLDQA	+
86	GLLTEIRAV	+
87	FLDNGPKTI	+
88	GLWEQENHL	+
89	SLADSLYNL	+
91	KLIDDVHRL	+
92	SILRHVAEV	+
94	TLLQEKGTKTV	+

[0471] 实施例2

[0472] 编码本发明肽的基因的表达谱

[0473] 与正常细胞相比在肿瘤细胞上一种肽过度提呈或特定提呈足够其在免疫治疗中有效使用,一些肽为肿瘤特异性的,尽管存在其源蛋白也存在于正常组织中。但是,mRNA表达谱增加了免疫治疗目标肽选择中其他级别的安全性。特别是对于具有高安全性风险的治疗选择,诸如亲和力成熟的TCR,理想的目标肽将来源于对该肿瘤独一无二且不出现于正常组织中的蛋白。

[0474] RNA来源与制备

[0475] 手术切除组织标本按如上所述(参见实施例1)在获得每名患者的书面知情同意后提供。手术后立即速冻肿瘤组织标本,之后在液态氮中用杵臼匀浆。使用TRI试剂(Ambion公司,Darmstadt,德国)之后用RNeasy(QIAGEN公司,Hilden,德国)清理从这些样本中制备总RNA;这两种方法都根据制造商的方案进行。

[0476] 用于RNASeq实验来自肿瘤组织的总RNA获得自:ProteoGenex Inc. (Culver City,

CA,USA)、Tissue Solutions Ltd. (Glasgow,UK)。

[0477] 用于RNASeq实验来自健康人体组织的总RNA获得自:Asterand (Detroit,USA and Royston,Herts,UK)、ProteoGenex Inc. (Culver City,CA,USA)、Geneticist Inc. (Glendale,CA,USA)、Istituto Nazionale Tumori"Pascale", Molecular Biology and Viral Oncology Unit (IRCCS) (Naples,Italy)、德国海德堡大学医院、BioCat GmbH (Heidelberg,Germany)。

[0478] 所有RNA样本的质量和数量都在Agilent 2100 Bioanalyzer分析仪 (Agilent公司, Waldbronn,德国)上使用RNA 6000 Pico LabChip Kit试剂盒 (Agilent公司)进行评估。

[0479] RNAseq实验

[0480] 通过新一代测序技术 (RNAseq) 由CeGaT (Tübingen,Germany) 对肿瘤和正常组织的RNA样本进行基因表达分析。简言之,根据供货商的方案 (Illumina Inc., San Diego,CA, USA), 其中包括RNA碎片化、cDNA转化和测序适配器的加入,利用 Illumina HiSeq v4试剂盒准备测序文库。从多个样本获得的文库根据制造商的说明等摩尔混合并在Illumina HiSeq 2500序列发生器上测序,产生50bp的单端读数。处理的读数使用STAR软件映像至人类基因组 (GRCh38)。根据ENSEMBL序列数据库的说明 (Ensembl77),表达数据在转录水平设置为RPKM (每百万映射读数每千碱基读数,由Cufflinks软件生成) 并在外显子水平上设置 (总读数,由Bedtools软件生成)。外显子读数被归为外显子长度和校准尺寸,以获得RPKM值。

[0481] 本发明的代表性源基因在食管癌中高度过量表达的表达谱如图2所示。进一步代表性基因的表达分数见表9。

[0482] 表9 :表达分数。该表列出了与一系列正常组织相比在肿瘤上非常高度过量表达 (+++)、与一系列正常组织相比在肿瘤上高度过量表达 (++) 或与一系列正常组织相比在肿瘤上过量表达 (+) 的基因的肽。本得分基线根据以下正常组织的测量值计算:脂肪组织、肾上腺、动脉、骨髓、脑、结肠、食道、胆囊、心脏、肾、肝、肺、淋巴结、胰腺、垂体、直肠、骨骼肌、皮肤、小肠、脾、胃、胸腺、甲状腺、气管、膀胱、静脉。

[0483]

序列 ID 号	序列	基因表达
1	STYGGGLSV	+++
2	SLYNLGGSKRISI	+++
3	TASAITPSV	+++
4	ALFGTILEL	++
5	NLMASQPQL	+++
6	LLSGDLIFL	+++
7	SIFEGLLSGV	+++
8	ALLDGGSEAYWRV	+++
9	HLIAEIHTA	+++
10	SLDENSQQV	+++
11	ALWLPTDSATV	+++
12	GLASRILDA	+++
13	SLSPVILGV	+++
14	RLPNAGTQV	+++
15	LLANGVYAA	+++
16	VLAEGGEGV	+++
17	MISRTPEV	+++
18	FLLDQVQLGL	+++
24	LLFAGTMTV	+++
25	LLPPPPPPA	+
26	MLAEKLLQA	++
27	NLREGDQLL	+++
32	YMLDIFHEV	+++
49	GLMKDIVGA	+
55	GAIDLLHNV	++
57	GLAPNTPGKA	+
67	SMNGGVFAV	++

[0484]

序列 ID 号	序列	基因表达
69	GLLVGSEKVTM	+++
71	ASDPILYRPVAV	+
77	VLVPYEPPQV	+++
80	ALQEALENA	+
94	TLLQEQGTKTV	+++

[0485] 实施例3

[0486] MHC-I类提呈肽的体外免疫原性

[0487] 为了获得关于本发明TUMAP的免疫原性信息,发明人使用体外T细胞扩增分析方法进行了研究,其中该分析方法基于使用装载肽/MHC复合物和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞(aAPC)进行反复刺激。用这种方法,发明人可显示出本发明HLA-A*0201 限制TUMAP具有免疫原性,这表明这些肽为对抗人CD8+前体T细胞的T细胞表位(表10)。

[0488] CD8+T细胞体外激活

[0489] 为了用载有肽-MHC复合物(pMHC)和抗CD28抗体的人工抗原提呈细胞进行体外刺激,发明人首先从University clinics Mannheim,Germany中获取健康供体CD8微珠

(Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) 通过积极选择白细胞清除术后新鲜HLA-A*02产物而分离出CD8⁺T细胞。

[0490] PBMC和分离出的CD8⁺淋巴细胞使用前在T细胞培养基(TCM)中培养,培养基包括RPMI-Glutamax (Invitrogen公司, Karlsruhe, 德国) 并补充10%热灭活人AB 血清(PAN-Biotech公司, Aidenbach, 德国)、100U/ml青霉素/100μg/ml链霉素 (Cambrex公司, Cologne, 德国), 1mM丙酮酸钠(CC Pro公司, Oberdorf, 德国) 和20μg/ml庆大霉素(Cambrex公司)。在此步骤, 2.5 ng/ml的IL-7 (PromoCell公司, Heidelberg, 德国) 和10U/ml的IL-2 (Novartis Pharma 公司, Nürnberg, 德国) 也加入TCM。

[0491] 对于pMHC/抗-CD28涂层珠的生成、T细胞的刺激和读出, 使用每刺激条件四个不同pMHC分子以及每个读出条件8个不同的pMHC分子在高度限定的体外系统中进行。纯化的共刺激小鼠IgG2a抗人CD28抗体9.3 (Jung et al., 1987) 使用制造商 (Perbio公司, 波恩, 德国) 推荐的N-羟基琥珀酰亚胺生物素进行化学生物素化处理。所用珠为5.6μm的链霉抗生物素蛋白包裹的多聚苯乙烯颗粒 (Bangs Laboratories, 伊利诺伊州, 美国)。

[0492] 用于阳性和阴性对照刺激物的pMHC分别为A*0201/MLA-001 (从Melan-A/MART-1中修饰制得的肽ELAGIGILTV (SEQ ID NO.102)) 和A*0201/DDX5-001 (从DDX5中获得的YLLPAIVHI (SEQ ID NO.103))。

[0493] 800,000珠/200μl包裹于含有4 x 12.5ng不同生物素-pMHC的96孔板、进行洗涤, 随后加入体积为200μl的600ng生物素抗-CD28。在37℃下, 在含5ng/ml IL-12 (PromoCell) 的200μl TCM中共培养1x10⁶CD8⁺T细胞与2x10⁵的清洗涂层珠3天, 从而激活刺激。之后, 一半培养基与补充80U/ml IL-2的新鲜TCM进行交换, 并且培养在37℃下持续4天。这种刺激性周期总共进行3次。对于使用每条件8种不同pMHC分子的pMHC多聚体读出, 二维组合编码方法如前述使用 (Andersen et al., 2012), 稍作修饰, 涵盖耦合至5种不同的荧光染料。最后, 用 Live/dead near IR染料 (Invitrogen公司, Karlsruhe, 德国)、CD8-FITC抗体克隆SK1 (BD公司, Heidelberg, 德国) 和荧光pMHC多聚体而执行多聚体分析。对于分析, 使用了配有合适激光仪和筛检程序的BD LSRII SORP细胞仪。肽特异性细胞以占总CD8⁺细胞的百分比形式进行计算。多聚体分析结果使用FlowJo软件 (Tree Star公司, Oregon, 美国) 进行评估。特定多聚体+CD8⁺淋巴细胞的体外填装用与阴性对照刺激组比较而进行检测。如果健康供体中的至少一个可评价的体外刺激孔在体外刺激后发现含有特异性CD8⁺T细胞株 (即该孔包含至少1%特定多聚体+CD8⁺T 细胞, 并且特定多聚体+的百分比至少为阴性对照刺激中位数的10倍), 则检测给定抗原的免疫原性。

[0494] 食管癌肽体外免疫原性

[0495] 对于受到测试的HLA-I类肽, 可通过肽特异性T细胞株的生成证明其体外免疫原性。TUMAP特异性多聚体对本发明的2种肽 (SEQ ID No 97和SEQ ID No 101) 染色后流式细胞仪检测的典型结果如图3所示, 同时也含有相应的阴性对照信息。本发明 5种肽的结果汇总于表10A。

[0496] 表10A: 本发明中HLA I类肽的体外免疫原性。申请人对本发明的肽所做的体外免疫原性实验的示例性结果。<20%=+; 20%-49%=++; 50%-69%=+++; ≥70 %=++++

[0497]

SEQ ID NO:	序列	孔	供体
94	TLLQEQGTKTV	+	++

95	LIQDRVAEV	+	++
97	ELDRTPPEV	++	++++
98	VLFPNLKTV	+	++++
101	AMTQLLAGV	++	+++

[0498] 表10B: 本发明HLA-I类肽的体外免疫原性。

[0499] 申请人对本发明的肽所做的体外免疫原性实验的示例性结果。提示了体外免疫原性实验的结果。阳性孔和供体(其他可评价)的百分比概括为<20%=+; 20%-49%= ++; 50%-69%=+++; >=70%=++++

序列ID号	序列	阳性孔[%]
1	STYGGGLSV	+
2	SLYNLGGSKRISI	+
5	NLMASQPQL	+++
6	LLSGDLIFL	++
12	GLASRILDA	+
19	GLAPFLNAV	+
29	SLDGTELQL	+
47	VLASGFLTV	+++
69	GLLVGSEKVTM	+
77	VLVPYEPPQV	+

[0501] 实施例4

[0502] 肽的合成

[0503] 所有的肽通过使用Fmoc策略以标准、广为接受的固相肽合成法合成。每个肽的身份和纯度已使用质谱和RP-HPLC分析法确定。用冻干法(三氟乙酸盐)获得白色至类白色的肽,纯度为>50%。所有的TUMAP优选作为三氟乙酸盐或乙酸盐进行给药,其他药用盐形式也可以。

[0504] 实施例5

[0505] MHC结合测定

[0506] 本发明基于T细胞疗法的候选肽进一步测试其MHC结合能力(亲和性)。单个肽-MHC复合体通过UV-配体交换产生,其中,紫外线敏感肽经紫外线照射后裂解,与分析的相关肽交换。只有能够有效地结合并稳定肽接受MHC分子的候选肽才能阻止MHC复合物的解离。为了确定交换反应的产率,将基于稳定MHC复合物轻链($\beta 2m$)的检测结果进行ELISA测定。检测总体上按照Rodenko等人在(Rodenko et al., 2006)中描述的方法进行。

[0507] 96孔Maxisorp板(NUNC)在室温下在PBS中以2ug/ml链霉包被过夜,用4倍洗涤并在37℃下在含封闭缓冲液的2%BSA中封闭1小时。折迭的HLA-A*02:01/MLA-001单体作为标准品,涵盖15500ng/ml的范围。紫外线交换反应的肽-MHC单体在封闭缓冲液中稀释100倍。样本在37℃下孵育1小时,洗涤四次,在37℃下以2ug/ml HRP缀合抗- $\beta 2m$ 温育1小时,再次洗涤,并以NH₂SO₄封堵的TMB溶液进行检测。在450nm处测量吸收。在生成和产生抗体或其片段时和/或T细胞受体或其片段时,通常优选显示为高交换产率(优选为高于50%,最优选为高于75%)的候选肽,这是因为它们对MHC分子表现出足够的亲合力,并能防止MHC复合物

的解离。

[0508] 表11:MHC-I类结合分数。HLA-I类限制肽与HLA-A*02:01的结合根据肽交换产量分类: $\geq 10\% = +$; $\geq 20\% = ++$; $\geq 50 = +++$; $\geq 75\% = ++++$

[0509]

序列 ID	肽代码	肽交换
1	STYGGGLSV	+++
2	SLYNLGGSKRISI	++++
3	TASAITPSV	+++
5	NLMASQPQL	+++
6	LLSGDLIFL	+++

[0510]

序列 ID	肽代码	肽交换
7	SIFEGLLSGV	++
8	ALLDGGSEAYWRV	+++
9	HLIAEIHTA	+++
10	SLDENSDQQV	+++
11	ALWLPTDSATV	+++
12	GLASRILDA	+++
13	SLSPVILGV	++++
14	RLPNAGTQV	++++
15	LLANGVYAA	+
16	VLAEGGEGV	+++
17	MISRTPEV	++
18	FLLDQVQLGL	+++
19	GLAPFLNAV	+++
21	IVREFLTAL	+++
22	KLNDTYVNV	+++
23	KLSDSATYL	+++
24	LLFAGTMTV	++
25	LLPPPPPPA	+++
26	MLAEKLLQA	+
27	NLREGDQLL	+++
28	SLDGFTIQV	++
29	SLDGTELQL	+++
30	SLNGNQVTV	+
31	VLPKLYVKL	++
32	YMLDIFHEV	++
33	GLDVTSLRPFDL	+++
34	SLVSEQLEPA	+++
35	LLRFSQDNA	+++
36	FLLRFSQDNA	++
37	YTQPFSHYQQAL	+++
38	IAAIRGFLV	+++
39	LVRDTQSGSL	++
40	GLAFSLYQA	++
41	GLESEELEPEEL	++
42	TQTAVITRI	+
43	KVVGKDYLL	+
44	ATGNDRKEAAENSL	+++
45	MLTELEKAL	++
46	YTAQIGADIAL	+++
47	VLASGFLTV	++++
48	SMHQMLDQTL	++

[0511]

序列 ID	肽代码	肽交换
49	GLMKDIVGA	+++
51	KLFGHLTSA	++
52	VAIGGVDGNVRL	++
53	VVVTGLTLV	++
54	YQDLLNVKM	+++
55	GAIDLLHNV	++
56	ALVEVTEHV	++
57	GLAPNTPGKA	+++
58	LILESIPVV	++
59	SLLDTLREV	+++
60	VVMEELLKV	++
61	TQTTHELTI	+++
62	ALYEQPLQI	++
63	LAYTLGVKQL	+++
64	GLTDVIRDV	++++
65	YVVGGLYQRL	+++
66	LLDEKVQSV	+++
67	SMNGGVFAV	++
68	PAVLQSSGLYSL	++
69	GLLVGSEKVTM	+++
70	FVLDTSSEV	+++
71	ASDPILYRPVAV	+++
72	FLPPAQVTV	++
73	KITEAIQYV	+++
74	ILASLATSV	+++
76	KVADYIPQL	+++
77	VLVPYEPPQV	++
78	KVANIIEV	++
79	GQDVGRYQV	++
80	ALQEALENA	++
81	AVLPHVDQV	+++
82	HLLGHLEQA	+++
83	ALADGVVSQA	+++
84	SLAESLDQA	+++
85	NIELVHQV	++++
87	FLDNGPKTI	+++
89	SLADSLYNL	++
90	SIYEYHAL	+++
91	KLIDDVHRL	++++
92	SILRHVAEV	++
93	VLINTSVTL	+++

[0512] 实施例6

[0513] 细胞表面提呈的肿瘤相关肽的绝对定量

[0514] 黏合剂例如抗体和/或TCR的产生是一个费力的过程,其可以仅针对一些选定靶标

进行。在肿瘤相关和特异性肽的情况下,选择标准包括但不限于排除提呈于细胞表面上肽的提呈和浓度。实体肿瘤样本中每个细胞的TUMAP拷贝数定量需要分离TUMAP的绝对定量、TUMAP分离效率和分析的组织样本细胞计数。

[0515] nanoLC-MS/MS肽定量

[0516] 对于通过质谱法对肽的准确定量,使用内标法生成每种肽的校准曲线。内标是每种肽的双同位素标记的变体,即,TUMAP合成中纳入2个同位素标记的氨基酸。它与肿瘤相关肽仅在质量上不同,但在其他的物理化学性质方面无差异(Anderson et al., 2012)。内标被掺入到每个MS样本,所有MS信号均标准化为内标MS信号,以平衡 MS实验之间潜在的技术差异。

[0517] 校准曲线用至少三种不同的矩阵绘制,即,来自于类似于常规MS样本的天然样本的HLA肽洗脱液,并且每个制备品以重复MS运行进行测量。对于评价,MS信号被标准化为内标信号,校准曲线通过logistic回归计算。

[0518] 对于来自组织样本的肿瘤相关肽的定量,各样本也掺有内标;MS信号标准化为内标并使用该肽校正曲线进行定量。

[0519] 肽/MHC分离的效率

[0520] 对于任何蛋白质纯化过程,来自组织样本蛋白的分离与相关蛋白的一定损失相关联。为了确定TUMAP分离的效率,针对选定为绝对定量的所有TUMAP产生了肽/MHC复合物。为了能够天然肽MHC/复合物与加样物,使用了单同位素标记版本的TUMAP,即TUMAP合成期间纳入1个同位素标记的氨基酸。这些复合物被掺入新制备的组织裂解物中,例如,在TUMAP分离过程中最早可能时间点,然后在之后的亲和纯化中像天然肽MHC/复合物被获取。因此,测量单标记TUMAP的恢复可得到个体TUMAP分离效率相关的结论。

[0521] 分离效率使用少量样本进行分析,且这些组织样本可比较。与此相反,个体肽之间的分离效率不同。这表明,分离效率虽然只在有限数量的样本中进行测定,但可外推至任何其他组织制备品中。但是,由于分离效率不能从一种肽外推至其他肽,因此,有必要单独分析每个TUMAP。

[0522] 固体、冷冻组织中细胞计数的测定

[0523] 为了确定经过绝对肽定量的组织样本的细胞数,发明人采用了DNA含量分析。此方法适用于不同来源的广泛样本,最重要的是,冷冻样本(Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013)。在肽分离方案期间,组织样本被加工为均匀的裂解物,从中取一小等份裂解物。样本等分为三份,从中分离DNA被分离(QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, 德国)。每次DNA分离的总DNA含量至少重复两次使用基于荧光的DNA定量测定法(Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, 德国)进行定量。

[0524] 为了计算细胞数,生成了来自单个健康血细胞等分试样的DNA标准曲线,使用一系列指定的细胞数。标准曲线用于计算每次DNA分离总DNA含量的总细胞含量。用于肽分离的组织样本的平均总细胞计数,在考虑裂解物等份的已知体积和总裂解物体积的情况下进行推算。

[0525] 每细胞的肽拷贝数

[0526] 使用前述实验的数据,发明人以总肽量除以样本总细胞计数计算得出每个细胞的TUMAP拷贝数,随后除以分离效率。选定肽的细胞拷贝数如表12所示。

[0527] 表12:绝对拷贝数。该表列出了NSCLC肿瘤样本中绝对肽定量的结果。针对每种肽,每个细胞的中位拷贝数表示:<100=+; ≥100=++; ≥1,000+++; ≥10,000=++++. 提示样本数量,其中提供评估的高质量MS资料。

[0528]	序列号	序列	每个细胞的拷贝数	样本数量
[0529]	9	PTHL-001	+	31

[0530] 参考文献列表

- [0531] Abbas,W.et al.,Front Oncol 5(2015):75
- [0532] Adams,S.et al.,PLoS.One.9(2014):e112945
- [0533] Al Moustafa,A.E.et al.,Oncogene 21(2002):2634-2640
- [0534] Al-Mahdi,R.et al.,Cell Adh.Migr.(2015):0
- [0535] Alcoser,S.Y.et al.,BMC.Biotechnol.11(2011):124
- [0536] Alholle,A.et al.,Epigenetics.8(2013):1198-1204
- [0537] Ali,R.H.et al.,Hum.Pathol.45(2014):2453-2462
- [0538] Allison,J.P.et al.,Science 270(1995):932-933
- [0539] Alper,M.et al.,Mol.Cell Biochem.393(2014):165-175
- [0540] Alsagaby,S.A.et al.,J Proteome.Res 13(2014):5051-5062
- [0541] Altmannsberger,M.et al.,Am.J Pathol.118(1985):85-95
- [0542] Ammendola,M.et al.,PLoS.One.9(2014):e99512
- [0543] Andersen,R.S.et al.,Nat.Protoc.7(2012):891-902
- [0544] Anderson,N.L.et al.,J Proteome.Res 11(2012):1868-1878
- [0545] Appay,V.et al.,Eur.J Immunol.36(2006):1805-1814
- [0546] Arentz,G.et al.,Clin Proteomics.8(2011):16
- [0547] Arif,Q.et al.,Arch.Pathol.Lab Med.139(2015):978-980
- [0548] Auvinen,P.et al.,Breast Cancer Res Treat.143(2014):277-286
- [0549] Avasarala,S.et al.,PLoS.One.8(2013):e76895
- [0550] Banchereau,J.et al.,Cell 106(2001):271-274
- [0551] Bandres,E.et al.,Oncol Rep.12(2004):287-292
- [0552] Banerjee,K.et al.,Int.J Cancer(2015)
- [0553] Barros-Filho,M.C.et al.,J Clin Endocrinol.Metab 100(2015):E890-E899
- [0554] Bashyam,M.D.et al.,Neoplasia.7(2005):556-562
- [0555] Basu,S.et al.,PLoS.One.10(2015):e0123979
- [0556] Baxter,P.A.et al.,Acta Neuropathol.Commun.2(2014):160
- [0557] Beatty,G.et al.,J Immunol 166(2001):2276-2282
- [0558] Becker,S.A.et al.,Cancer Res 56(1996):5092-5097
- [0559] Beggs,J.D.,Nature 275(1978):104-109
- [0560] Bellon,M.et al.,Blood 121(2013):5045-5054
- [0561] Benjamini,Y.et al.,Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological),Vol.57(1995):289-300

- [0562] Bhattacharjee,R.B.et al.,Cell Biol Int.36(2012):697-704
- [0563] Bin Amer,S.M.et al.,Saudi.Med.J 29(2008):507-513
- [0564] Blanch,A.et al.,PLoS.One.8(2013):e66436
- [0565] Blanco,M.A.et al.,Cell Res 22(2012):1339-1355
- [0566] Blenk,S.et al.,Cancer Inform.3(2007):399-420
- [0567] Boulter,J.M.et al.,Protein Eng 16(2003):707-711
- [0568] Boyer,A.P.et al.,Mol.Cell Proteomics.12(2013):180-193
- [0569] Bozza,W.P.et al.,Oncotarget.6(2015):32723-32736
- [0570] Braulke,T.et al.,Arch.Biochem.Biophys.298(1992):176-181
- [0571] Braumuller,H.et al.,Nature(2013)
- [0572] Bray,F.et al.,Int J Cancer 132(2013):1133-1145
- [0573] Brechmann,M.et al.,Immunity.37(2012):697-708
- [0574] Bredholt,G.et al.,Oncotarget.6(2015):39676-39691
- [0575] Breuninger,S.et al.,Am.J Pathol.176(2010):2509-2519
- [0576] Brezinova,J.et al.,Cancer Genet.Cytogenet.173(2007):10-16
- [0577] Broghammer,M.et al.,Cancer Lett.214(2004):225-229
- [0578] Brossart,P.et al.,Blood 90(1997):1594-1599
- [0579] Bruckdorfer,T.et al.,Curr.Pharm.Biotechnol.5(2004):29-43
- [0580] Buckley,N.E.et al.,Cell Death.Dis.5(2014):e1070
- [0581] Bui,P.H.et al.,Mol.Pharmacol.76(2009):1044-1052
- [0582] Buim,M.E.et al.,Oncology 69(2005):445-454
- [0583] Bujas,T.et al.,Eur.J Histochem.55(2011):e7
- [0584] Cai,J.L.et al.,Chin J Cancer Res 23(2011):59-63
- [0585] Cai,Q.et al.,Nat Genet.46(2014):886-890
- [0586] Calmon,M.F.et al.,Epigenetics.10(2015):622-632
- [0587] Calvo,N.et al.,Biochem.Cell Biol 92(2014):305-315
- [0588] Canet,B.et al.,Hum.Pathol.42(2011):833-839
- [0589] Cao,Z.et al.,Mol.Oncol 8(2014):285-296
- [0590] Card,K.F.et al.,Cancer Immunol Immunother.53(2004):345-357
- [0591] Carinci,F.et al.,Int.J Immunopathol.Pharmacol.18(2005):513-524
- [0592] Cazier,J.B.et al.,Nat Commun.5(2014):3756
- [0593] Cetindis,M.et al.,Eur.Arch.Otorhinolaryngol.(2015)
- [0594] Chakrabarti,G.et al.,Cancer Metab 3(2015):12
- [0595] Chaneton,B.et al.,Trends Biochem.Sci.37(2012):309-316
- [0596] Chang,I.W.et al.,Tumour.Biol 36(2015):5441-5450
- [0597] Chang,J.W.et al.,Anticancer Res 32(2012):1259-1265
- [0598] Chanock,S.J.et al.,Hum.Immunol.65(2004):1211-1223
- [0599] Chauvet,C.et al.,PLoS.One.6(2011):e22545
- [0600] Che,J.et al.,Tumour.Biol 36(2015):6559-6568

- [0601] Chen,B.et al.,Mol.Cancer Res 10(2012):305-315
- [0602] Chen,K.D.et al.,Cell Death.Dis.5(2014a):e1244
- [0603] Chen,L.et al.,Int.J Mol.Sci.15(2014b):11435-11445
- [0604] Chen,Q.et al.,Cell Physiol Biochem.35(2015a):1052-1061
- [0605] Chen,R.S.et al.,Oncogene 28(2009):599-609
- [0606] Chen,S.et al.,Cancer Epidemiol.37(2013):172-178
- [0607] Chen,W.M.et al.,Dig.Dis.Sci.60(2015b):1655-1662
- [0608] Chen,Y.et al.,Med.Oncol 31(2014c):304
- [0609] Chen,Y.C.et al.,Int.J Cancer 135(2014d):117-127
- [0610] Chen,Z.T.et al.,Int.J Mol.Sci.16(2015c):15497-15530
- [0611] Cheon,D.J.et al.,Clin Cancer Res 20(2014):711-723
- [0612] Cheuk,W.et al.,Pathology 33(2001):7-12
- [0613] Cho,S.J.et al.,PLoS.One.8(2013):e71724
- [0614] Choi,W.I.et al.,Cell Physiol Biochem.23(2009):359-370
- [0615] Chuang,W.Y.et al.,Histol.Histopathol.28(2013):293-299
- [0616] Chung,J.et al.,J Cell Biol 158(2002):165-174
- [0617] Chung,T.K.et al.,Int.J Cancer 137(2015):776-783
- [0618] Cimino,D.et al.,Int.J Cancer 123(2008):1327-1338
- [0619] Cipriano,R.et al.,Mol.Cancer Res 12(2014):1156-1165
- [0620] ClinicalTrials.gov, (2015), <http://www.clinicaltrials.gov>
- [0621] Cohen,C.J.et al.,J Mol Recognit.16(2003a):324-332
- [0622] Cohen,C.J.et al.,J Immunol 170(2003b):4349-4361
- [0623] Cohen,S.N.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69(1972):2110-2114
- [0624] Coligan,J.E.et al.,Current Protocols in Protein Science(1995)
- [0625] Colombetti,S.et al.,J Immunol.176(2006):2730-2738
- [0626] Council,L.et al.,Mod.Pathol.22(2009):639-650
- [0627] Crossen,P.E.et al.,Cancer Genet.Cytogenet.113(1999):126-133
- [0628] Cui,D.et al.,Oncogene 33(2014):2225-2235
- [0629] Daigeler,A.et al.,J Exp.Clin Cancer Res 27(2008):82
- [0630] Dang,C.V.et al.,Clin Cancer Res 15(2009):6479-6483
- [0631] Dang,Q.et al.,Med.Oncol 31(2014):24
- [0632] Dar,A.A.et al.,Immunology (2015)
- [0633] Davids,M.S.et al.,Leuk.Lymphoma 53(2012):2362-2370
- [0634] Davidson,B.et al.,Hum.Pathol.45(2014):691-700
- [0635] de Groen,F.L.et al.,Genes Chromosomes.Cancer 53(2014):339-348
- [0636] de Jonge,H.J.et al.,Leukemia 25(2011):1825-1833
- [0637] de Sa,V.K.et al.,Braz.J Med.Biol Res 46(2013):21-31
- [0638] De,Keersmaecker K.et al.,Haematologica 99(2014):85-93
- [0639] De,Ponti A.et al.,Cancer Lett.369(2015):396-404

- [0640] Deacu,E.et al.,Cancer Res 64 (2004) :7690-7696
- [0641] Deb,S.et al.,Mod.Pathol.27 (2014) :1223-1230
- [0642] Debiec-Rychter,M.et al.,Genes Chromosomes.Cancer 38 (2003) :187-190
- [0643] DeLaBarre,B.et al.,Chem Biol 21 (2014) :1143-1161
- [0644] Delker,D.A.et al.,PLoS.One.9 (2014) :e88367
- [0645] Demirag,G.G.et al.,Med.Oncol 29 (2012) :1518-1522
- [0646] Demirci,H.et al.,J Ophthalmic Vis.Res 8 (2013) :303-307
- [0647] Dengjel,J.et al.,Clin Cancer Res 12 (2006) :4163-4170
- [0648] Denkberg,G.et al.,J Immunol 171 (2003) :2197-2207
- [0649] Depianto,D.et al.,Nat Genet.42 (2010) :910-914
- [0650] Ding,L.et al.,Nature 481 (2012) :506-510
- [0651] Dotlic,S.et al.,Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.22 (2014) :537-542
- [0652] Downie,D.et al.,Clin Cancer Res.11 (2005) :7369-7375
- [0653] Draberova,E.et al.,J Neuropathol.Exp.Neurol.74 (2015) :723-742
- [0654] Drayton,R.M.et al.,Clin Cancer Res 20 (2014) :1990-2000
- [0655] Du,J.et al.,Int.J Mol.Sci.13 (2012) :15755-15766
- [0656] Duanmin,H.et al.,Hepatogastroenterology 60 (2013) :870-875
- [0657] Dubrowinskaja,N.et al.,Cancer Med.3 (2014) :300-309
- [0658] Ehrlichova,M.et al.,Genomics 102 (2013) :96-101
- [0659] El-Naggar,A.M.et al.,Cancer Cell 27 (2015) :682-697
- [0660] Espinosa,A.M.et al.,PLoS.One.8 (2013) :e55975
- [0661] Esseghir,S.et al.,J Pathol.210 (2006) :420-430
- [0662] Falk,K.et al.,Nature 351 (1991) :290-296
- [0663] Fang,J.et al.,BMC.Cancer 8 (2008a) :69
- [0664] Fang,W.et al.,J Transl.Med.6 (2008b) :32
- [0665] Fejzo,M.S.et al.,Int.J Mol.Sci.14 (2013) :3094-3109
- [0666] Fellenberg,F.et al.,J Invest Dermatol.122 (2004) :1510-1517
- [0667] Feng,G.et al.,Leuk.Lymphoma 55 (2014) :2699-2705
- [0668] Ferlay et al.,GLOBOCAN 2012 v1.0,Cancer Incidence and Mortality Worldwide:IARC CancerBase No.11[Internet], (2013) ,<http://globocan.iarc.fr>
- [0669] Fong,L.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98 (2001) :8809-8814
- [0670] Fontaine,J.F.et al.,PLoS.One.4 (2009) :e7632
- [0671] Forsey,R.W.et al.,Biotechnol.Lett.31 (2009) :819-823
- [0672] Fu,A.et al.,Mol.Med.Rep.11 (2015a) :4727-4733
- [0673] Fu,Y.et al.,Cancer Biol.Ther 5 (2006) :741-744
- [0674] Fu,Z.C.et al.,Med.Sci.Monit.21 (2015b) :1276-1287
- [0675] Fujita,A.et al.,Genet.Mol.Res 7 (2008) :371-378
- [0676] Fujita,N.et al.,J Biochem.152 (2012) :407-413
- [0677] Fujiwara,K.et al.,PLoS.One.9 (2014) :e107247

- [0678] Furukawa,C.et al.,Cancer Res 65(2005):7102-7110
- [0679] Gabrilovich,D.I.et al.,Nat Med.2(1996):1096-1103
- [0680] Gao,Y.B.et al.,Nat Genet.46(2014):1097-1102
- [0681] Gattinoni,L.et al.,Nat Rev.Immunol 6(2006):383-393
- [0682] Giallourakis,C.C.et al.,J Immunol.190(2013):5578-5587
- [0683] Giovinazzo,F.et al.,Cell Signal.25(2013):651-659
- [0684] Gkika,D.et al.,J Cell Biol 208(2015):89-107
- [0685] Gnjjatic,S.et al.,Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100(2003):8862-8867
- [0686] Godkin,A.et al.,Int.Immunol 9(1997):905-911
- [0687] Goode,G.et al.,PLoS.One.9(2014):e100103
- [0688] Gordon,G.J.et al.,BMC.Cancer 11(2011):169
- [0689] Gorski,J.J.et al.,Breast Cancer Res Treat.122(2010):721-731
- [0690] Green,M.R.et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual 4th(2012)
- [0691] Greenfield,E.A.,Antibodies:A Laboratory Manual 2nd(2014)
- [0692] Groulx,J.F.et al.,Carcinogenesis 35(2014):1217-1227
- [0693] Guo,X.et al.,Sci.Rep.5(2015):11846
- [0694] Gupta,V.et al.,Curr.Pharm.Des 20(2014):2595-2606
- [0695] Hagel,C.et al.,J Neurooncol.112(2013):191-197
- [0696] Haggman,M.J.et al.,Urology 50(1997):643-647
- [0697] Hammam,O.et al.,J Egypt.Soc.Parasitol.44(2014):733-740
- [0698] Hapgood,G.et al.,Blood 126(2015):17-25
- [0699] Haraguchi,N.et al.,Int.J Oncol 43(2013):425-430
- [0700] Harris,T.M.et al.,Arch.Pathol.Lab Med.139(2015):494-507
- [0701] Haslene-Hox,H.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1834(2013):2347-2359
- [0702] Hatina,J.et al.,Neoplasma 59(2012):728-736
- [0703] Hauser,A.D.et al.,Mol.Cancer Res 12(2014):130-142
- [0704] He,X.et al.,Int.J Biol Macromol.72(2015):1081-1089
- [0705] Heffler,M.et al.,Anticancer Agents Med.Chem 13(2013):584-594
- [0706] Heubeck,B.et al.,Eur.J Cancer 49(2013):e1-e7
- [0707] Hoeflich,K.P.et al.,Int.J Oncol 29(2006):839-849
- [0708] Hofslie,E.et al.,Br.J Cancer 99(2008):1330-1339
- [0709] Hogan,L.E.et al.,Blood 118(2011):5218-5226
- [0710] Hountis,P.et al.,Tumour.Biol 35(2014):7327-7333
- [0711] Hu,C.K.et al.,Mol.Biol Cell 23(2012):2702-2711
- [0712] Huang,F.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014a):1093-1100
- [0713] Huang,S.L.et al.,Cancers (Basel) 7(2015):1052-1071
- [0714] Huang,Y.D.et al.,Hua Xi.Kou Qiang.Yi.Xue.Za Zhi.25(2007):500-503
- [0715] Huang,Z.et al.,Indian J Otolaryngol.Head Neck Surg.66(2014b):120-125
- [0716] Huang,Z.et al.,J Oral Pathol.Med.43(2014c):191-198

- [0717] Hussey,G.S.et al.,Mol Cell 41(2011):419-431
- [0718] Hwang,M.L.et al.,J Immunol.179(2007):5829-5838
- [0719] Ichinose,J.et al.,Cancer Sci.105(2014):1135-1141
- [0720] Ida-Yonemochi,H.et al.,Mod.Pathol.25(2012):784-794
- [0721] Ii,M.et al.,Int.J Oncol 39(2011):593-599
- [0722] Inoue,H.et al.,Int.J Cancer 63(1995):523-526
- [0723] Inoue,K.et al.,Subcell.Biochem.85(2014):17-40
- [0724] Iqbal,M.A.et al.,FEBS Lett.588(2014):2685-2692
- [0725] Irifune,H.et al.,Cancer Biol Ther.4(2005):449-455
- [0726] Ismail,M.F.et al.,Tumour.Biol(2015)
- [0727] Israelsen,W.J.et al.,Semin.Cell Dev.Biol 43(2015):43-51
- [0728] Jamieson,N.B.et al.,Clin Cancer Res 17(2011):3316-3331
- [0729] Januchowski,R.et al.,Biomed.Pharmacother.67(2013):240-245
- [0730] Jiang,L.et al.,Cell Cycle 14(2015):2881-2885
- [0731] Jin,J.et al.,Int.J Hematol.99(2014):750-757
- [0732] Johnson,R.H.et al.,Oncotarget.(2015)
- [0733] Johnstone,C.N.et al.,Dis.Model.Mech.8(2015):237-251
- [0734] Joosse,S.A.et al.,Clin Cancer Res 18(2012):993-1003
- [0735] Jung,G.et al.,Proc Natl Acad Sci USA 84(1987):4611-4615
- [0736] Kabbage,M.et al.,J Biomed.Biotechnol.2008(2008):564127
- [0737] Kanehira,M.et al.,Cancer Res 67(2007):3276-3285
- [0738] Kang,S.et al.,J Proteome.Res 9(2010):5638-5645
- [0739] Kao,C.J.et al.,Oncogene 27(2008):1397-1403
- [0740] Karlsson,J.et al.,Cancer Lett.357(2015):498-501
- [0741] Kato,I.et al.,Pathol.Int.59(2009):38-43
- [0742] Katoh,M.,Int.J Oncol 41(2012):1913-1918
- [0743] Kaz,A.M.et al.,Genes Chromosomes.Cancer 51(2012):384-393
- [0744] Kazma,R.et al.,PLoS.One.7(2012):e51680
- [0745] Kerley-Hamilton,J.S.et al.,Oncogene 24(2005):6090-6100
- [0746] Khakpour,G.et al.,Tumour.Biol 36(2015):4905-4912
- [0747] Khalil,A.A.,Cancer Sci.98(2007):201-213
- [0748] Khapare,N.et al.,PLoS.One.7(2012):e38561
- [0749] Kibbe,A.H.,Handbook of Pharmaceutical Excipients rd(2000)
- [0750] Kido,T.et al.,Genes(Basel)1(2010):283-293
- [0751] Kim,S.W.et al.,OMICS.15(2011):281-292
- [0752] Kimura,H.et al.,Int.J Oncol 30(2007):171-179
- [0753] Kinoshita,T.et al.,Oncotarget.3(2012):1386-1400
- [0754] Kirov,A.et al.,J Cell Biochem.(2015)
- [0755] Kita,Y.et al.,Eur.J Surg.Oncol 35(2009):52-58

- [0756] Klopffleisch,R.et al.,J Proteome.Res 9(2010):6380-6391
- [0757] Koizume,S.et al.,Cancer Res 66(2006):9453-9460
- [0758] Koizume,S.et al.,World J Clin Oncol 5(2014):908-920
- [0759] Koizume,S.et al.,Biomark.Cancer 7(2015):1-13
- [0760] Kono,K.et al.,Cancer Sci.100(2009):1502-1509
- [0761] Kottorou,A.E.et al.,Acta Histochem.114(2012):553-561
- [0762] Krieg,A.M.,Nat Rev.Drug Discov.5(2006):471-484
- [0763] Krisenko,M.O.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1853(2015):254-263
- [0764] Kruse,A.J.et al.,Int.J Gynecol.Cancer 24(2014):1616-1622
- [0765] Kulkarni,G.et al.,Breast Cancer Res Treat.102(2007):31-41
- [0766] Kultti,A.et al.,Biomed.Res Int.2014(2014):817613
- [0767] Kumar,M.et al.,J Transl.Med.13(2015):8
- [0768] Kumarakulasingham,M.et al.,Clin Cancer Res 11(2005):3758-3765
- [0769] Kuramitsu,Y.et al.,Anticancer Res 30(2010):4459-4465
- [0770] Kurimoto,F.et al.,Int.J Mol.Med.8(2001):89-93
- [0771] Kwon,O.H.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.406(2011):539-545
- [0772] Larrinaga,G.et al.,Dis.Markers 35(2013):825-832
- [0773] Lauvrak,S.U.et al.,Br.J Cancer 109(2013):2228-2236
- [0774] Leal,M.F.et al.,World J Gastroenterol.18(2012):1531-1537
- [0775] Ledet,E.M.et al.,Prostate 73(2013):614-623
- [0776] Lee,E.J.et al.,J Genet.Genomics 42(2015a):355-371
- [0777] Lee,H.W.et al.,Dis.Esophagus.(2015b)
- [0778] Lee,J.et al.,Oncoscience.2(2015c):410-418
- [0779] Lee,J.M.,Reprod.Biol Endocrinol.1(2003):69
- [0780] Lee,M.H.et al.,J Cell Sci.126(2013):1744-1752
- [0781] Lee,M.H.et al.,Ann.N.Y.Acad.Sci.1171(2009):87-93
- [0782] Lee,S.H.et al.,EMBO J 25(2006):4008-4019
- [0783] Lee,S.Y.et al.,J Clin Invest 122(2012):3211-3220
- [0784] Lei,Y.Y.et al.,Asian Pac.J Cancer Prev.15(2014):8539-8548
- [0785] Leithner,K.et al.,BMC.Cancer 14(2014):40
- [0786] Leitlinie Magenkarzinom,032-0090L,(2012)
- [0787] Lexander,H.et al.,Anal.Quant.Cytol.Histol.27(2005):263-272
- [0788] Li,C.et al.,Oncogene 23(2004):9336-9347
- [0789] Li,C.et al.,Am.J Cancer Res 5(2015a):1635-1648
- [0790] Li,R.et al.,Oncogene 25(2006):2628-2635
- [0791] Li,X.et al.,Pancreas 40(2011):753-761
- [0792] Li,X.Q.et al.,PLoS.One.7(2012):e31146
- [0793] Li,Y.et al.,Neoplasia.7(2005):1073-1080
- [0794] Li,Y.et al.,Cell Rep.12(2015b):388-395

- [0795] Li,Y.et al.,Lung Cancer 58(2007):171-183
- [0796] Li,Z.et al.,Biochim.Biophys.Acta 1846(2014):285-296
- [0797] Liang,B.et al.,World J Gastroenterol.11(2005a):623-628
- [0798] Liang,J.et al.,Tumour.Biol 36(2015):6391-6399
- [0799] Liang,L.et al.,Int.J Oncol 45(2014):659-666
- [0800] Liang,Z.et al.,Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.27(2005b):534-537
- [0801] Liao,J.S.et al.,Zhejiang.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.44(2015a):329-334
- [0802] Liao,W.et al.,Oncotarget.6(2015b):24132-24147
- [0803] Liddy,N.et al.,Nat Med.18(2012):980-987
- [0804] Lim,M.Y.et al.,Int.J Chronic.Dis.2013(2013):578613
- [0805] Lim,R.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.406(2011):408-413
- [0806] Lin,C.et al.,Oncotarget.6(2015):8434-8453
- [0807] Lin,S.J.et al.,J Proteomics.94(2013):186-201
- [0808] Lin,X.et al.,Med.Oncol 31(2014):42
- [0809] Linher-Melville,K.et al.,Mol.Cell Biochem.405(2015):205-221
- [0810] Liu,B.et al.,J Clin Endocrinol.Metab 99(2014a):E786-E795
- [0811] Liu,C.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014b):690-698
- [0812] Liu,D.et al.,Genet.Mol.Res 13(2014c):8153-8162
- [0813] Liu,J.P.et al.,Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.87(2007a):2719-2723
- [0814] Liu,L.et al.,Oncol Lett.7(2014d):2192-2198
- [0815] Liu,Y.et al.,J Neurooncol.99(2010):13-24
- [0816] Liu,Y.et al.,Cell Death.Dis.6(2015):e1630
- [0817] Liu,Y.et al.,Oncol Rep.18(2007b):943-951
- [0818] Liu,Y.F.et al.,Tumour.Biol 35(2014e):3731-3741
- [0819] Ljunggren,H.G.et al.,J Exp.Med.162(1985):1745-1759
- [0820] Lo,P.K.et al.,Oncogene 31(2012):2614-2626
- [0821] Lo,R.K.et al.,J Biol Chem 278(2003):52154-52165
- [0822] Lo,W.Y.et al.,J Proteome.Res 6(2007):2143-2151
- [0823] Lohr,J.G.et al.,Cancer Cell 25(2014):91-101
- [0824] Long,W.et al.,J Clin Invest 122(2012):1869-1880
- [0825] Longenecker,B.M.et al.,Ann N.Y.Acad.Sci.690(1993):276-291
- [0826] Longerich,T.,Pathologe 35 Suppl 2(2014):177-184
- [0827] Lonsdale,J.,Nat.Genet.45(2013):580-585
- [0828] Lou,S.et al.,Stem Cells 31(2013):1942-1953
- [0829] Lu,Z.et al.,Cell Physiol Biochem.33(2014):859-868
- [0830] Lukas,T.J.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 78(1981):2791-2795
- [0831] Lundblad,R.L.,Chemical Reagents for Protein Modification 3rd(2004)
- [0832] Luo,W.et al.,Trends Endocrinol.Metab 23(2012):560-566
- [0833] Lv,Z.et al.,J Exp.Clin Cancer Res 33(2014):100

- [0834] Ma,Y.et al.,Mol.Cell Proteomics.8(2009):1878-1890
- [0835] Madanayake,T.W.et al.,BMC.Genomics 14(2013):833
- [0836] Maiso,P.et al.,Cancer Res 75(2015):2071-2082
- [0837] Manenti,G.et al.,Toxicol.Lett.112-113(2000):257-263
- [0838] Mao,P.et al.,J Biol Chem 286(2011):19381-19391
- [0839] Mao,P.et al.,PLoS.One.8(2013):e81803
- [0840] Marcinkiewicz,K.M.et al.,Exp.Cell Res 320(2014):128-143
- [0841] Marg,A.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.401(2010):143-148
- [0842] Marhold,M.et al.,Mol.Cancer Res 13(2015):556-564
- [0843] Martin-Rufian,M.et al.,J Mol.Med. (Berl) 92(2014):277-290
- [0844] Matassa,D.S.et al.,Cell Death.Dis.4(2013):e851
- [0845] Mayas,M.D.et al.,Anticancer Res 32(2012):3675-3682
- [0846] Mazan-Mamczarz,K.et al.,PLoS.Genet.10(2014):e1004105
- [0847] Mazurek,S.,Ernst.Schering.Found.Symp.Proc. (2007):99-124
- [0848] Mazurek,S.,Int.J Biochem.Cell Biol 43(2011):969-980
- [0849] McBride,D.J.et al.,J Pathol.227(2012):446-455
- [0850] Melaiu,O.et al.,Mutat.Res 771(2015):6-12
- [0851] Messina,M.et al.,Blood 123(2014):2378-2388
- [0852] Meziere,C.et al.,J Immunol 159(1997):3230-3237
- [0853] Mimori,K.et al.,Int.J Oncol 11(1997):959-964
- [0854] Mirza,Z.et al.,Anticancer Res 34(2014):1873-1884
- [0855] Missero,C.et al.,Exp.Dermatol.23(2014):143-146
- [0856] Moretti,R.M.et al.,Oncol Rep.9(2002):1139-1143
- [0857] Morgan,R.A.et al.,Science 314(2006):126-129
- [0858] Mori,M.et al.,Transplantation 64(1997):1017-1027
- [0859] Morris,L.G.et al.,Nat Genet.45(2013):253-261
- [0860] Mortara,L.et al.,Clin Cancer Res.12(2006):3435-3443
- [0861] Mountzios,G.et al.,Ann.Oncol 25(2014):1889-1900
- [0862] Mueller,L.N.et al.,J Proteome.Res 7(2008):51-61
- [0863] Mueller,L.N.et al.,Proteomics.7(2007):3470-3480
- [0864] Mumberg,D.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96(1999):8633-8638
- [0865] Murray,G.I.et al.,Histopathology 57(2010):202-211
- [0866] Mustacchi,G.et al.,Int.J Mol.Sci.14(2013):9686-9702
- [0867] Naba,A.et al.,Elife.3(2014):e01308
- [0868] Naboulsi,W.et al.,J Proteome.Res (2015)
- [0869] Naderi,A.,Exp.Cell Res 331(2015):239-250
- [0870] Nakao,K.et al.,J Gastroenterol.49(2014):589-593
- [0871] Navara,C.S.,Curr.Pharm.Des 10(2004):1739-1744
- [0872] Naz,S.et al.,Carcinogenesis 35(2014):14-23

- [0873] Neumann,M.et al.,Blood 121 (2013) :4749-4752
- [0874] Ng,S.K.et al.,Clin Experiment.Ophthalmol.43 (2015) :367-376
- [0875] Nikitakis,N.G.et al.,Am.J Clin Pathol.119 (2003) :574-586
- [0876] Nishida,C.R.et al.,Mol.Pharmacol.78 (2010) :497-502
- [0877] Nwosu,V.et al.,Hum.Mol Genet.10 (2001) :2313-2318
- [0878] Nykopp,T.K.et al.,BMC.Cancer 10 (2010) :512
- [0879] O' Gorman,D.B.et al.,Endocrinology 143 (2002) :4287-4294
- [0880] Oh,H.R.et al.,Cell Oncol (Dordr.) 37 (2014) :455-461
- [0881] Ohigashi,Y.et al.,Clin Cancer Res.11 (2005) :2947-2953
- [0882] Okayama,H.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.23 (2014) :2884-2894
- [0883] Okoh,V.O.et al.,PLoS.One.8 (2013) :e54206
- [0884] Olstad,O.K.et al.,Anticancer Res 23 (2003) :2201-2216
- [0885] Ordonez,N.G.,Arch.Pathol.Lab Med.129 (2005) :1407-1414
- [0886] Orzol,P.et al.,Histol.Histopathol.30 (2015) :503-521
- [0887] Padden,J.et al.,Mol.Cell Proteomics.13 (2014) :2661-2672
- [0888] Pan,B.et al.,Mol.Biol Rep.40 (2013) :27-33
- [0889] Pan,T.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.456 (2015) :452-458
- [0890] Papagerakis,S.et al.,Hum.Pathol.34 (2003) :565-572
- [0891] Park,Y.et al.,Oncogene 34 (2015) :5037-5045
- [0892] Parker,L.P.et al.,Cancer Genomics Proteomics.6 (2009) :189-194
- [0893] Pathak,S.et al.,Nutr.Cancer 66 (2014) :818-824
- [0894] Peng,H.et al.,Cell Oncol (Dordr.) 38 (2015) :165-172
- [0895] Penney,K.L.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.24 (2015) :255-260
- [0896] Perez,I.et al.,Int.J Med.Sci.12 (2015) :458-467
- [0897] Persson,F.et al.,Cancer Lett.260 (2008) :37-47
- [0898] Pflueger,D.et al.,Neoplasia.15 (2013) :1231-1240
- [0899] Pickering,C.R.et al.,Clin Cancer Res 20 (2014) :6582-6592
- [0900] Pillay,V.et al.,S.Afr.Med.J 105 (2015) :656-658
- [0901] Pils,D.et al.,BMC.Cancer 13 (2013) :178
- [0902] Pinheiro,J.et al.,nlme:Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- [0903] Plebanski,M.et al.,Eur.J Immunol 25 (1995) :1783-1787
- [0904] Porta,C.et al.,Virology 202 (1994) :949-955
- [0905] Prasad,N.B.et al.,Mod.Pathol.27 (2014) :945-957
- [0906] Puente,X.S.et al.,Nature 526 (2015) :519-524
- [0907] Qendro,V.et al.,J Proteome.Res 13 (2014) :5031-5040
- [0908] Qi,Y.et al.,Proteomics.5 (2005) :2960-2971
- [0909] Qi,Y.et al.,J Breast Cancer 18 (2015) :218-224
- [0910] Qie,S.et al.,J Cell Biochem.115 (2014) :498-509

- [0911] Qu,Y.M.et al.,Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.90(2010):1958-1962
- [0912] Qu,Z.et al.,Cancer Med.3(2014):453-461
- [0913] Quillien,V.et al.,Anticancer Res.17(1997):387-391
- [0914] Rabinovitz,I.et al.,Biochem.Cell Biol 74(1996):811-821
- [0915] Rabinovitz,I.et al.,Clin Exp.Metastasis 13(1995):481-491
- [0916] Rad,E.et al.,Mol.Cancer Res 13(2015):1149-1160
- [0917] Rai,R.et al.,Oral Oncol 40(2004):705-712
- [0918] Raica,M.et al.,Anticancer Res 28(2008):2997-3006
- [0919] Ramirez-Exposito,M.J.et al.,Maturitas 72(2012):79-83
- [0920] Rammensee,H.G.et al.,Immunogenetics 50(1999):213-219
- [0921] Reeb,A.N.et al.,J Clin Endocrinol.Metab 100(2015):E232-E242
- [0922] RefSeq,The NCBI handbook[Internet],Chapter 18,(2002),<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- [0923] Rehman,I.et al.,PLoS.One.7(2012):e30885
- [0924] Reis,S.T.et al.,Clinics.(Sao Paulo)68(2013):652-657
- [0925] Remmelink,M.et al.,Int.J Oncol 26(2005):247-258
- [0926] Revill,K.et al.,Gastroenterology 145(2013):1424-1435
- [0927] Ricketts,C.J.et al.,Clin Epigenetics.5(2013):16
- [0928] Rini,B.I.et al.,Cancer 107(2006):67-74
- [0929] Rock,K.L.et al.,Science 249(1990):918-921
- [0930] Rodenko,B.et al.,Nat Protoc.1(2006):1120-1132
- [0931] Roemer,A.et al.,J Urol.172(2004):2162-2166
- [0932] Romana,S.P.et al.,Leukemia 20(2006):696-706
- [0933] Rozenblum,E.et al.,Hum.Genet.110(2002):111-121
- [0934] Ruminy,P.et al.,Leukemia 25(2011):681-688
- [0935] Safadi,R.A.et al.,Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.121(2016):402-411
- [0936] Saiki,R.K.et al.,Science 239(1988):487-491
- [0937] Sanchez-Palencia,A.et al.,Int.J Cancer 129(2011):355-364
- [0938] Santarpia,L.et al.,Oncologist.18(2013):1063-1073
- [0939] Sarma,S.N.et al.,Environ.Toxicol.Pharmacol.32(2011):285-295
- [0940] Sathyanarayana,U.G.et al.,Cancer Res 64(2004):1425-1430
- [0941] Sato,T.et al.,Oncogene 33(2014):2215-2224
- [0942] Sato,Y.et al.,J Gastroenterol.Hepatol.28(2013):1422-1429
- [0943] Savaskan,N.E.et al.,Ann.Anat.192(2010):309-313
- [0944] Savaskan,N.E.et al.,Curr.Neuropharmacol.13(2015):258-265
- [0945] Savoy,R.M.et al.,Endocr.Relat Cancer 20(2013):R341-R356
- [0946] Schlieben,P.et al.,Vet.J 194(2012):210-214
- [0947] Schmitt-Graeff,A.et al.,Histopathology 51(2007):87-97

- [0948] Schuld,N.J.et al.,Cell Cycle 13(2014):941-952
- [0949] Schumann,H.et al.,Br.J Dermatol.167(2012):929-936
- [0950] Scrideli,C.A.et al.,J Neurooncol.88(2008):281-291
- [0951] Seda,V.et al.,Eur.J Haematol.94(2015):193-205
- [0952] Seeger,F.H.et al.,Immunogenetics 49(1999):571-576
- [0953] Seitz,S.et al.,Eur.J Cancer 36(2000):1507-1513
- [0954] Semenza,G.L.,Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol 76(2011):347-353
- [0955] Seong,J.et al.,Mol.Biol.Rep.39(2012):3597-3601
- [0956] Sethi,M.K.et al.,J Proteomics.126(2015):54-67
- [0957] Sherman,F.et al.,Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- [0958] Shi,Z.et al.,Int.J Gynecol.Cancer 22(2012):1125-1129
- [0959] Shi,Z.G.et al.,Clin Transl.Oncol 17(2015):65-73
- [0960] Shibano,T.et al.,PLoS.One.10(2015):e0127271
- [0961] Shin,S.H.et al.,Lab Invest 94(2014):1396-1405
- [0962] Shruthi,D.K.et al.,J Oral Maxillofac.Pathol.18(2014):365-371
- [0963] Silva,J.M.et al.,Cell 137(2009):1047-1061
- [0964] Silva,L.P.et al.,Anal.Chem.85(2013):9536-9542
- [0965] Singh,V.et al.,OMICS.19(2015):688-699
- [0966] Singh-Jasuja,H.et al.,Cancer Immunol.Immunother.53(2004):187-195
- [0967] Slaga,T.J.et al.,J Investig.Dermatol.Symp.Proc.1(1996):151-156
- [0968] Small,E.J.et al.,J Clin Oncol.24(2006):3089-3094
- [0969] Sobolik-Delmaire,T.et al.,Cell Commun.Adhes.14(2007):99-109
- [0970] Spurr,I.B.et al.,Chembiochem.13(2012):1628-1634
- [0971] Stahl,M.et al.,Ann.Oncol.24 Suppl 6(2013):vi51-vi56
- [0972] Stull,R.A.et al.,BMC.Genomics 6(2005):55
- [0973] Sturm,M.et al.,BMC.Bioinformatics.9(2008):163
- [0974] Sugimoto,K.J.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014):8980-8987
- [0975] Suh,J.H.et al.,J Korean Med.Sci.28(2013):593-601
- [0976] Sun,M.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.340(2006):209-214
- [0977] Sun,Y.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.450(2014):1-6
- [0978] Suzuki,S.et al.,Pathol.Res Pract.210(2014):130-134
- [0979] Swain,N.et al.,Tumour.Biol 35(2014):8407-8413
- [0980] Szeliga,M.et al.,Tumour.Biol 35(2014):1855-1862
- [0981] Takabe,P.et al.,Exp.Cell Res 337(2015):1-15
- [0982] Takahashi,H.et al.,Urology 79(2012):240-248
- [0983] Takeda,H.et al.,Nat Genet.47(2015):142-150
- [0984] Tamada,M.et al.,Cl in Cancer Res 18(2012):5554-5561
- [0985] Tan,B.S.et al.,Mol.Cancer Ther.10(2011):1982-1992

- [0986] Tanaka,F.et al.,Int.J Oncol 10(1997):1113-1117
- [0987] Tang,H.et al.,Anticancer Drugs 18(2007):633-639
- [0988] Tang,H.et al.,Clin Cancer Res 19(2013):1577-1586
- [0989] Tang,J.Q.et al.,Beijing Da.Xue.Xue.Bao.41(2009):531-536
- [0990] Tang,J.Q.et al.,Chin Med.J (Engl.) 123(2010):3559-3565
- [0991] Tanis,T.et al.,Arch.Oral Biol 59(2014):1155-1163
- [0992] Tech,K.et al.,Cancer Lett.356(2015):268-272
- [0993] Teng,B.P.et al.,Anticancer Agents Med.Chem 11(2011):620-628
- [0994] Terada,T.,Int.J Clin Exp.Pathol.5(2012):596-600
- [0995] Teufel,R.et al.,Cell Mol Life Sci.62(2005):1755-1762
- [0996] Tew,G.W.et al.,J Biol Chem 283(2008):963-976
- [0997] Thomas,A.et al.,Cancer Med.2(2013):836-848
- [0998] Tian,S.Y.et al.,Int.J Clin Exp.Pathol.7(2014):3752-3762
- [0999] Tofuku,K.et al.,Int.J Oncol 29(2006):175-183
- [1000] Toh,U.et al.,Int.J Clin Oncol 7(2002):372-375
- [1001] Toh,U.et al.,Clin Cancer Res.6(2000):4663-4673
- [1002] Toomey,P.G.et al.,Cancer Control 20(2013):32-42
- [1003] Tota,G.et al.,BMC.Cancer 14(2014):963
- [1004] Tran,E.et al.,Science 344(2014):641-645
- [1005] Truong,T.et al.,Endocr.Relat Cancer 21(2014):629-638
- [1006] Tsujimoto,H.et al.,Mol.Carcinog 26(1999):298-304
- [1007] Tuupanen,S.et al.,Br.J Cancer 111(2014):1657-1662
- [1008] Tuval-Kochen,L.et al.,PLoS.One.8(2013):e77260
- [1009] Twa,D.D.et al.,J Pathol.236(2015):136-141
- [1010] Twarock,S.et al.,Mol.Cancer 10(2011):30
- [1011] Tzellos,T.G.et al.,J Eur.Acad.Dermatol.Venereol.25(2011):679-687
- [1012] Urošević,J.et al.,Nat Cell Biol 16(2014):685-694
- [1013] Vachani,A.et al.,Clin Cancer Res.13(2007):2905-2915
- [1014] Valladares-Ayerbes,M.et al.,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.19(2010):1432-1440
- [1015] Valletta,D.et al.,Carcinogenesis 35(2014):1407-1415
- [1016] van,Geldermalsen M.et al.,Oncogene(2015)
- [1017] Varga,A.E.et al.,Oncogene 24(2005):5043-5052
- [1018] Varona,A.et al.,Am.J Physiol Renal Physiol 292(2007):F780-F788
- [1019] Vasca,V.et al.,Oncol Lett.8(2014):2501-2504
- [1020] Venneti,S.et al.,Brain Pathol.23(2013):217-221
- [1021] Virtakoivu,R.et al.,Cancer Res 75(2015):2349-2362
- [1022] Volkmer,J.P.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 109(2012):2078-2083
- [1023] Volpi,A.et al.,G.Chir 32(2011):59-63

- [1024] Vui-Kee,K.et al.,Kaohsiung.J Med.Sci.28(2012):243-250
- [1025] Walter,S.et al.,J Immunol 171(2003):4974-4978
- [1026] Walter,S.et al.,Nat Med.18(2012):1254-1261
- [1027] Wang,D.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.458(2015a):313-320
- [1028] Wang,H.et al.,Front Oncol 4(2014):377
- [1029] Wang,H.et al.,Cancer Cell 18(2010):52-62
- [1030] Wang,J.et al.,Oncol Rep.33(2015b):1326-1334
- [1031] Wang,T.et al.,Tumour.Biol(2015c)
- [1032] Wang,W.M.et al.,J Biol Chem 278(2003):19549-19557
- [1033] Wang,X.et al.,Eur.J Pharmacol.768(2015d):116-122
- [1034] Wang,X.M.et al.,PLoS.One.8(2013a):e55714
- [1035] Wang,X.Y.et al.,Int J Hyperthermia 29(2013):364-375
- [1036] Wang,Y.et al.,Neoplasma 62(2015e):966-973
- [1037] Wang,Z.et al.,Oncotarget.4(2013b):2476-2486
- [1038] Wang,Z.et al.,Melanoma Res 14(2004):107-114
- [1039] Warner,S.L.et al.,Future.Med.Chem 6(2014):1167-1178
- [1040] Watanabe,Y.et al.,Gastroenterology 136(2009):2149-2158
- [1041] Wegdam,W.et al.,PLoS.One.9(2014):e108046
- [1042] Wehner,M.et al.,FEBS J 277(2010):1597-1605
- [1043] Weiss,I.et al.,Int.J Mol.Sci.13(2012):12925-12938
- [1044] Weissbach,S.et al.,Br.J Haematol.169(2015):57-70
- [1045] Wiedl,T.et al.,J Proteomics.74(2011):1884-1894
- [1046] Willcox,B.E.et al.,Protein Sci.8(1999):2418-2423
- [1047] Willoughby,V.et al.,Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.16(2008):344-348
- [1048] Wittke,I.et al.,Cancer Lett.162(2001):237-243
- [1049] Wojtalewicz,N.et al.,PLoS.One.9(2014):e90461
- [1050] Wong,N.et al.,Cancer Lett.356(2015):184-191
- [1051] Woo,T.et al.,PLoS.One.10(2015):e0142642
- [1052] World Cancer Report,(2014)
- [1053] Wu,G.et al.,Onco.Targets.Ther.8(2015):2067-2074
- [1054] Wu,S.et al.,Acta Biochim.Biophys.Sin. (Shanghai) 45(2013):27-35
- [1055] Wu,X.et al.,Cancer Res 70(2010):2718-2727
- [1056] Xiang,Y.et al.,J Clin Invest 125(2015):2293-2306
- [1057] Xu,J.et al.,Genet.Mol.Res 13(2014):5732-5744
- [1058] Xu,X.et al.,Oncotarget.6(2015):26161-26176
- [1059] Xue,L.Y.et al.,Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi.32(2010):838-844
- [1060] Yager,M.L.et al.,Br.J Cancer 89(2003):860-863
- [1061] Yamaguchi,T.et al.,Dis.Colon Rectum 49(2006):399-406

- [1062] Yamamoto,M.et al.,PLoS.One.6 (2011) :e17149
- [1063] Yamamoto,N.et al.,Int.J Oncol 42 (2013) :1523-1532
- [1064] Yang,C.et al.,Tumour.Biol (2015a)
- [1065] Yang,C.et al.,Exp.Cell Res 331 (2015b) :377-386
- [1066] Yang,H.Y.et al.,J Proteomics.75 (2012) :3639-3653
- [1067] Yang,J.Y.et al.,BMC.Cancer 10 (2010) :388
- [1068] Yang,S.et al.,J Cancer Res Clin Oncol 141 (2015c) :1265-1275
- [1069] Yang,W.et al.,Cancer Lett.339 (2013) :153-158
- [1070] Yang,W.et al.,Nature 499 (2013a) :491-495
- [1071] Yang,W.et al.,Int.J Oncol 42 (2013b) :690-698
- [1072] Yao,M.et al.,Cancer Med.3 (2014) :845-854
- [1073] Yao,R.et al.,Histol.Histopathol.22 (2007) :1025-1032
- [1074] Yu,D.et al.,Oncotarget.6 (2015a) :7619-7631
- [1075] Yu,X.et al.,Cancer Res 73 (2013) :2093-2103
- [1076] Yu,Y.et al.,Cancer Cell 28 (2015b) :82-96
- [1077] Yuan,B.et al.,Immunobiology 217 (2012) :738-742
- [1078] Zang,W.et al.,Mol.Cancer 14 (2015) :37
- [1079] Zanini,S.et al.,Cell Signal.27 (2015) :899-907
- [1080] Zare,M.et al.,Mol.Carcinog 51 (2012) :796-806
- [1081] Zaremba,S.et al.,Cancer Res.57 (1997) :4570-4577
- [1082] Zha,C.et al.,PLoS.One.10 (2015) :e0122322
- [1083] Zhang,D.et al.,J Cell Mol.Med.16 (2012) :1047-1059
- [1084] Zhang,H.Y.et al.,Mol.Biol Rep.41 (2014) :5519-5524
- [1085] Zhang,Q.et al.,J Cancer Res Clin Oncol 141 (2015a) :691-703
- [1086] Zhang,S.et al.,Cancer Res 64 (2004) :2977-2983
- [1087] Zhang,S.et al.,J Mol.Histol.45 (2014) :283-292
- [1088] Zhang,S.N.et al.,Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.85 (2005) :1348-1351
- [1089] Zhang,T.et al.,Mol.Cancer 9 (2010) :72
- [1090] Zhang,X.et al.,Int.J Cancer 137 (2015b) :2803-2814
- [1091] Zhang,X.et al.,Tumour.Biol 36 (2015c) :5979-5985
- [1092] Zhang,X.et al.,PLoS.One.8 (2013) :e72458
- [1093] Zhang,Y.et al.,Cancer Metastasis Rev 34 (2015d) :249-264
- [1094] Zhang,Z.Z.et al.,Mol.Cancer Ther.14 (2015e) :1162-1170
- [1095] Zhao,D.et al.,J Neurooncol.118 (2014a) :39-47
- [1096] Zhao,G.et al.,Biochem.Biophys.Res Commun.408 (2011) :154-159
- [1097] Zhao,H.et al.,Gene 548 (2014b) :234-243
- [1098] Zhao,L.J.et al.,Chin Med.J (Engl.) 126 (2013) :4260-4264
- [1099] Zheng,Q.et al.,Tumour.Biol 35 (2014) :6255-6264
- [1100] Zheng,R.et al.,Int.Immunopharmacol.29 (2015) :919-925

- [1101] Zhi,H.et al.,J Pathol.217 (2009) :389-397
- [1102] Zhou,Y.F.et al.,World J Gastroenterol.20 (2014) :13172-13177
- [1103] Zhu,H.et al.,Cancer Lett.245 (2007a) :303-314
- [1104] Zhu,L.et al.,J Dermatol.Sci.72 (2013a) :311-319
- [1105] Zhu,S.et al.,J Biol Chem 282 (2007b) :14328-14336
- [1106] Zhu,Y.et al.,Prostate 73 (2013b) :1614-1622
- [1107] Zhu,Y.P.et al.,Oncotarget.6 (2015) :14488-14496。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 伊玛提克斯生物技术有限公司
- [0003] <120> 用于食管癌和其他癌症免疫治疗的新型肽和肽组合物
- [0004] <130> I32873W0
- [0005] <140> PCT/EP2016/065812
- [0006] <141> 2016-07-05
- [0007] <150> US62/188,870
- [0008] <151> 2015-07-06
- [0009] <150> GB1511792.2
- [0010] <151> 2015-07-06
- [0011] <160> 103
- [0012] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0013] <210> 1
- [0014] <211> 9
- [0015] <212> PRT
- [0016] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0017] <400> 1
- [0018] Ser Thr Tyr Gly Gly Gly Leu Ser Val
- [0019] 1 5
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 13
- [0022] <212> PRT
- [0023] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0024] <400> 2
- [0025] Ser Leu Tyr Asn Leu Gly Gly Ser Lys Arg Ile Ser Ile
- [0026] 1 5 10
- [0027] <210> 3
- [0028] <211> 9
- [0029] <212> PRT
- [0030] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0031] <400> 3
- [0032] Thr Ala Ser Ala Ile Thr Pro Ser Val
- [0033] 1 5
- [0034] <210> 4
- [0035] <211> 9
- [0036] <212> PRT
- [0037] <213> 智人 (Homo sapiens)
- [0038] <400> 4

[0039] Ala Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu
[0040] 1 5
[0041] <210> 5
[0042] <211> 9
[0043] <212> PRT
[0044] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0045] <400> 5
[0046] Asn Leu Met Ala Ser Gln Pro Gln Leu
[0047] 1 5
[0048] <210> 6
[0049] <211> 9
[0050] <212> PRT
[0051] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0052] <400> 6
[0053] Leu Leu Ser Gly Asp Leu Ile Phe Leu
[0054] 1 5
[0055] <210> 7
[0056] <211> 10
[0057] <212> PRT
[0058] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0059] <400> 7
[0060] Ser Ile Phe Glu Gly Leu Leu Ser Gly Val
[0061] 1 5 10
[0062] <210> 8
[0063] <211> 13
[0064] <212> PRT
[0065] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0066] <400> 8
[0067] Ala Leu Leu Asp Gly Gly Ser Glu Ala Tyr Trp Arg Val
[0068] 1 5 10
[0069] <210> 9
[0070] <211> 9
[0071] <212> PRT
[0072] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0073] <400> 9
[0074] His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr Ala
[0075] 1 5
[0076] <210> 10
[0077] <211> 10

[0078] <212> PRT
[0079] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0080] <400> 10
[0081] Ser Leu Asp Glu Asn Ser Asp Gln Gln Val
[0082] 1 5 10
[0083] <210> 11
[0084] <211> 11
[0085] <212> PRT
[0086] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0087] <400> 11
[0088] Ala Leu Trp Leu Pro Thr Asp Ser Ala Thr Val
[0089] 1 5 10
[0090] <210> 12
[0091] <211> 9
[0092] <212> PRT
[0093] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0094] <400> 12
[0095] Gly Leu Ala Ser Arg Ile Leu Asp Ala
[0096] 1 5
[0097] <210> 13
[0098] <211> 9
[0099] <212> PRT
[0100] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0101] <400> 13
[0102] Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val
[0103] 1 5
[0104] <210> 14
[0105] <211> 9
[0106] <212> PRT
[0107] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0108] <400> 14
[0109] Arg Leu Pro Asn Ala Gly Thr Gln Val
[0110] 1 5
[0111] <210> 15
[0112] <211> 9
[0113] <212> PRT
[0114] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0115] <400> 15
[0116] Leu Leu Ala Asn Gly Val Tyr Ala Ala

[0117]	1	5	
[0118]	<210>	16	
[0119]	<211>	9	
[0120]	<212>	PRT	
[0121]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0122]	<400>	16	
[0123]	Val Leu Ala Glu Gly Gly Glu Gly Val		
[0124]	1	5	
[0125]	<210>	17	
[0126]	<211>	8	
[0127]	<212>	PRT	
[0128]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0129]	<400>	17	
[0130]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
[0131]	1	5	
[0132]	<210>	18	
[0133]	<211>	10	
[0134]	<212>	PRT	
[0135]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0136]	<400>	18	
[0137]	Phe Leu Leu Asp Gln Val Gln Leu Gly Leu		
[0138]	1	5	10
[0139]	<210>	19	
[0140]	<211>	10	
[0141]	<212>	PRT	
[0142]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0143]	<400>	19	
[0144]	Gly Leu Ala Pro Phe Leu Leu Asn Ala Val		
[0145]	1	5	10
[0146]	<210>	20	
[0147]	<211>	12	
[0148]	<212>	PRT	
[0149]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0150]	<400>	20	
[0151]	Ile Ile Glu Val Asp Pro Asp Thr Lys Glu Met Leu		
[0152]	1	5	10
[0153]	<210>	21	
[0154]	<211>	9	
[0155]	<212>	PRT	

[0156] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0157] <400> 21
[0158] Ile Val Arg Glu Phe Leu Thr Ala Leu
[0159] 1 5
[0160] <210> 22
[0161] <211> 9
[0162] <212> PRT
[0163] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0164] <400> 22
[0165] Lys Leu Asn Asp Thr Tyr Val Asn Val
[0166] 1 5
[0167] <210> 23
[0168] <211> 9
[0169] <212> PRT
[0170] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0171] <400> 23
[0172] Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu
[0173] 1 5
[0174] <210> 24
[0175] <211> 9
[0176] <212> PRT
[0177] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0178] <400> 24
[0179] Leu Leu Phe Ala Gly Thr Met Thr Val
[0180] 1 5
[0181] <210> 25
[0182] <211> 9
[0183] <212> PRT
[0184] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0185] <400> 25
[0186] Leu Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala
[0187] 1 5
[0188] <210> 26
[0189] <211> 9
[0190] <212> PRT
[0191] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0192] <400> 26
[0193] Met Leu Ala Glu Lys Leu Leu Gln Ala
[0194] 1 5

[0195] <210> 27
[0196] <211> 9
[0197] <212> PRT
[0198] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0199] <400> 27
[0200] Asn Leu Arg Glu Gly Asp Gln Leu Leu
[0201] 1 5
[0202] <210> 28
[0203] <211> 9
[0204] <212> PRT
[0205] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0206] <400> 28
[0207] Ser Leu Asp Gly Phe Thr Ile Gln Val
[0208] 1 5
[0209] <210> 29
[0210] <211> 9
[0211] <212> PRT
[0212] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0213] <400> 29
[0214] Ser Leu Asp Gly Thr Glu Leu Gln Leu
[0215] 1 5
[0216] <210> 30
[0217] <211> 9
[0218] <212> PRT
[0219] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0220] <400> 30
[0221] Ser Leu Asn Gly Asn Gln Val Thr Val
[0222] 1 5
[0223] <210> 31
[0224] <211> 9
[0225] <212> PRT
[0226] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0227] <400> 31
[0228] Val Leu Pro Lys Leu Tyr Val Lys Leu
[0229] 1 5
[0230] <210> 32
[0231] <211> 9
[0232] <212> PRT
[0233] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0234]	<400> 32
[0235]	Tyr Met Leu Asp Ile Phe His Glu Val
[0236]	1 5
[0237]	<210> 33
[0238]	<211> 12
[0239]	<212> PRT
[0240]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0241]	<400> 33
[0242]	Gly Leu Asp Val Thr Ser Leu Arg Pro Phe Asp Leu
[0243]	1 5 10
[0244]	<210> 34
[0245]	<211> 10
[0246]	<212> PRT
[0247]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0248]	<400> 34
[0249]	Ser Leu Val Ser Glu Gln Leu Glu Pro Ala
[0250]	1 5 10
[0251]	<210> 35
[0252]	<211> 9
[0253]	<212> PRT
[0254]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0255]	<400> 35
[0256]	Leu Leu Arg Phe Ser Gln Asp Asn Ala
[0257]	1 5
[0258]	<210> 36
[0259]	<211> 10
[0260]	<212> PRT
[0261]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0262]	<400> 36
[0263]	Phe Leu Leu Arg Phe Ser Gln Asp Asn Ala
[0264]	1 5 10
[0265]	<210> 37
[0266]	<211> 12
[0267]	<212> PRT
[0268]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0269]	<400> 37
[0270]	Tyr Thr Gln Pro Phe Ser His Tyr Gly Gln Ala Leu
[0271]	1 5 10
[0272]	<210> 38

[0273] <211> 9
[0274] <212> PRT
[0275] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0276] <400> 38
[0277] Ile Ala Ala Ile Arg Gly Phe Leu Val
[0278] 1 5
[0279] <210> 39
[0280] <211> 10
[0281] <212> PRT
[0282] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0283] <400> 39
[0284] Leu Val Arg Asp Thr Gln Ser Gly Ser Leu
[0285] 1 5 10
[0286] <210> 40
[0287] <211> 9
[0288] <212> PRT
[0289] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0290] <400> 40
[0291] Gly Leu Ala Phe Ser Leu Tyr Gln Ala
[0292] 1 5
[0293] <210> 41
[0294] <211> 12
[0295] <212> PRT
[0296] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0297] <400> 41
[0298] Gly Leu Glu Ser Glu Glu Leu Glu Pro Glu Glu Leu
[0299] 1 5 10
[0300] <210> 42
[0301] <211> 9
[0302] <212> PRT
[0303] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0304] <400> 42
[0305] Thr Gln Thr Ala Val Ile Thr Arg Ile
[0306] 1 5
[0307] <210> 43
[0308] <211> 9
[0309] <212> PRT
[0310] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0311] <400> 43

[0312]	Lys Val Val Gly Lys Asp Tyr Leu Leu
[0313]	1 5
[0314]	<210> 44
[0315]	<211> 14
[0316]	<212> PRT
[0317]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0318]	<400> 44
[0319]	Ala Thr Gly Asn Asp Arg Lys Glu Ala Ala Glu Asn Ser Leu
[0320]	1 5 10
[0321]	<210> 45
[0322]	<211> 9
[0323]	<212> PRT
[0324]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0325]	<400> 45
[0326]	Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu
[0327]	1 5
[0328]	<210> 46
[0329]	<211> 11
[0330]	<212> PRT
[0331]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0332]	<400> 46
[0333]	Tyr Thr Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Ala Leu
[0334]	1 5 10
[0335]	<210> 47
[0336]	<211> 9
[0337]	<212> PRT
[0338]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0339]	<400> 47
[0340]	Val Leu Ala Ser Gly Phe Leu Thr Val
[0341]	1 5
[0342]	<210> 48
[0343]	<211> 10
[0344]	<212> PRT
[0345]	<213> 智人 (Homo sapiens)
[0346]	<400> 48
[0347]	Ser Met His Gln Met Leu Asp Gln Thr Leu
[0348]	1 5 10
[0349]	<210> 49
[0350]	<211> 9

[0351] <212> PRT
[0352] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0353] <400> 49
[0354] Gly Leu Met Lys Asp Ile Val Gly Ala
[0355] 1 5
[0356] <210> 50
[0357] <211> 11
[0358] <212> PRT
[0359] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0360] <400> 50
[0361] Gly Met Asn Pro His Gln Thr Pro Ala Gln Leu
[0362] 1 5 10
[0363] <210> 51
[0364] <211> 9
[0365] <212> PRT
[0366] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0367] <400> 51
[0368] Lys Leu Phe Gly His Leu Thr Ser Ala
[0369] 1 5
[0370] <210> 52
[0371] <211> 12
[0372] <212> PRT
[0373] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0374] <400> 52
[0375] Val Ala Ile Gly Gly Val Asp Gly Asn Val Arg Leu
[0376] 1 5 10
[0377] <210> 53
[0378] <211> 9
[0379] <212> PRT
[0380] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0381] <400> 53
[0382] Val Val Val Thr Gly Leu Thr Leu Val
[0383] 1 5
[0384] <210> 54
[0385] <211> 9
[0386] <212> PRT
[0387] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0388] <400> 54
[0389] Tyr Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met

[0390]	1	5	
[0391]	<210>	55	
[0392]	<211>	9	
[0393]	<212>	PRT	
[0394]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0395]	<400>	55	
[0396]	Gly Ala Ile Asp Leu Leu His Asn Val		
[0397]	1	5	
[0398]	<210>	56	
[0399]	<211>	9	
[0400]	<212>	PRT	
[0401]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0402]	<400>	56	
[0403]	Ala Leu Val Glu Val Thr Glu His Val		
[0404]	1	5	
[0405]	<210>	57	
[0406]	<211>	10	
[0407]	<212>	PRT	
[0408]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0409]	<400>	57	
[0410]	Gly Leu Ala Pro Asn Thr Pro Gly Lys Ala		
[0411]	1	5	10
[0412]	<210>	58	
[0413]	<211>	9	
[0414]	<212>	PRT	
[0415]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0416]	<400>	58	
[0417]	Leu Ile Leu Glu Ser Ile Pro Val Val		
[0418]	1	5	
[0419]	<210>	59	
[0420]	<211>	9	
[0421]	<212>	PRT	
[0422]	<213>	智人 (Homo sapiens)	
[0423]	<400>	59	
[0424]	Ser Leu Leu Asp Thr Leu Arg Glu Val		
[0425]	1	5	
[0426]	<210>	60	
[0427]	<211>	9	
[0428]	<212>	PRT	

[0429] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0430] <400> 60
[0431] Val Val Met Glu Glu Leu Leu Lys Val
[0432] 1 5
[0433] <210> 61
[0434] <211> 9
[0435] <212> PRT
[0436] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0437] <400> 61
[0438] Thr Gln Thr Thr His Glu Leu Thr Ile
[0439] 1 5
[0440] <210> 62
[0441] <211> 10
[0442] <212> PRT
[0443] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0444] <400> 62
[0445] Ala Leu Tyr Glu Tyr Gln Pro Leu Gln Ile
[0446] 1 5 10
[0447] <210> 63
[0448] <211> 10
[0449] <212> PRT
[0450] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0451] <400> 63
[0452] Leu Ala Tyr Thr Leu Gly Val Lys Gln Leu
[0453] 1 5 10
[0454] <210> 64
[0455] <211> 9
[0456] <212> PRT
[0457] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0458] <400> 64
[0459] Gly Leu Thr Asp Val Ile Arg Asp Val
[0460] 1 5
[0461] <210> 65
[0462] <211> 11
[0463] <212> PRT
[0464] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0465] <400> 65
[0466] Tyr Val Val Gly Gly Phe Leu Tyr Gln Arg Leu
[0467] 1 5 10

[0468] <210> 66
[0469] <211> 9
[0470] <212> PRT
[0471] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0472] <400> 66
[0473] Leu Leu Asp Glu Lys Val Gln Ser Val
[0474] 1 5
[0475] <210> 67
[0476] <211> 9
[0477] <212> PRT
[0478] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0479] <400> 67
[0480] Ser Met Asn Gly Gly Val Phe Ala Val
[0481] 1 5
[0482] <210> 68
[0483] <211> 12
[0484] <212> PRT
[0485] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0486] <400> 68
[0487] Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
[0488] 1 5 10
[0489] <210> 69
[0490] <211> 11
[0491] <212> PRT
[0492] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0493] <400> 69
[0494] Gly Leu Leu Val Gly Ser Glu Lys Val Thr Met
[0495] 1 5 10
[0496] <210> 70
[0497] <211> 9
[0498] <212> PRT
[0499] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0500] <400> 70
[0501] Phe Val Leu Asp Thr Ser Glu Ser Val
[0502] 1 5
[0503] <210> 71
[0504] <211> 12
[0505] <212> PRT
[0506] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0507] <400> 71
 [0508] Ala Ser Asp Pro Ile Leu Tyr Arg Pro Val Ala Val
 [0509] 1 5 10
 [0510] <210> 72
 [0511] <211> 9
 [0512] <212> PRT
 [0513] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0514] <400> 72
 [0515] Phe Leu Pro Pro Ala Gln Val Thr Val
 [0516] 1 5
 [0517] <210> 73
 [0518] <211> 9
 [0519] <212> PRT
 [0520] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0521] <400> 73
 [0522] Lys Ile Thr Glu Ala Ile Gln Tyr Val
 [0523] 1 5
 [0524] <210> 74
 [0525] <211> 9
 [0526] <212> PRT
 [0527] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0528] <400> 74
 [0529] Ile Leu Ala Ser Leu Ala Thr Ser Val
 [0530] 1 5
 [0531] <210> 75
 [0532] <211> 10
 [0533] <212> PRT
 [0534] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0535] <400> 75
 [0536] Gly Leu Met Asp Asp Val Asp Phe Lys Ala
 [0537] 1 5 10
 [0538] <210> 76
 [0539] <211> 9
 [0540] <212> PRT
 [0541] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0542] <400> 76
 [0543] Lys Val Ala Asp Tyr Ile Pro Gln Leu
 [0544] 1 5
 [0545] <210> 77

[0546] <211> 10
[0547] <212> PRT
[0548] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0549] <400> 77
[0550] Val Leu Val Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val
[0551] 1 5 10
[0552] <210> 78
[0553] <211> 9
[0554] <212> PRT
[0555] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0556] <400> 78
[0557] Lys Val Ala Asn Ile Ile Ala Glu Val
[0558] 1 5
[0559] <210> 79
[0560] <211> 9
[0561] <212> PRT
[0562] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0563] <400> 79
[0564] Gly Gln Asp Val Gly Arg Tyr Gln Val
[0565] 1 5
[0566] <210> 80
[0567] <211> 9
[0568] <212> PRT
[0569] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0570] <400> 80
[0571] Ala Leu Gln Glu Ala Leu Glu Asn Ala
[0572] 1 5
[0573] <210> 81
[0574] <211> 9
[0575] <212> PRT
[0576] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0577] <400> 81
[0578] Ala Val Leu Pro His Val Asp Gln Val
[0579] 1 5
[0580] <210> 82
[0581] <211> 9
[0582] <212> PRT
[0583] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0584] <400> 82

[0585] His Leu Leu Gly His Leu Glu Gln Ala
[0586] 1 5
[0587] <210> 83
[0588] <211> 10
[0589] <212> PRT
[0590] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0591] <400> 83
[0592] Ala Leu Ala Asp Gly Val Val Ser Gln Ala
[0593] 1 5 10
[0594] <210> 84
[0595] <211> 9
[0596] <212> PRT
[0597] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0598] <400> 84
[0599] Ser Leu Ala Glu Ser Leu Asp Gln Ala
[0600] 1 5
[0601] <210> 85
[0602] <211> 9
[0603] <212> PRT
[0604] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0605] <400> 85
[0606] Asn Ile Ile Glu Leu Val His Gln Val
[0607] 1 5
[0608] <210> 86
[0609] <211> 9
[0610] <212> PRT
[0611] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0612] <400> 86
[0613] Gly Leu Leu Thr Glu Ile Arg Ala Val
[0614] 1 5
[0615] <210> 87
[0616] <211> 9
[0617] <212> PRT
[0618] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0619] <400> 87
[0620] Phe Leu Asp Asn Gly Pro Lys Thr Ile
[0621] 1 5
[0622] <210> 88
[0623] <211> 9

[0624] <212> PRT
[0625] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0626] <400> 88
[0627] Gly Leu Trp Glu Gln Glu Asn His Leu
[0628] 1 5
[0629] <210> 89
[0630] <211> 9
[0631] <212> PRT
[0632] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0633] <400> 89
[0634] Ser Leu Ala Asp Ser Leu Tyr Asn Leu
[0635] 1 5
[0636] <210> 90
[0637] <211> 9
[0638] <212> PRT
[0639] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0640] <400> 90
[0641] Ser Ile Tyr Glu Tyr Tyr His Ala Leu
[0642] 1 5
[0643] <210> 91
[0644] <211> 9
[0645] <212> PRT
[0646] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0647] <400> 91
[0648] Lys Leu Ile Asp Asp Val His Arg Leu
[0649] 1 5
[0650] <210> 92
[0651] <211> 9
[0652] <212> PRT
[0653] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0654] <400> 92
[0655] Ser Ile Leu Arg His Val Ala Glu Val
[0656] 1 5
[0657] <210> 93
[0658] <211> 9
[0659] <212> PRT
[0660] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0661] <400> 93
[0662] Val Leu Ile Asn Thr Ser Val Thr Leu

[0663]	1	5
[0664]	<210> 94	
[0665]	<211> 11	
[0666]	<212> PRT	
[0667]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0668]	<400> 94	
[0669]	Thr Leu Leu Gln Glu Gln Gly Thr Lys Thr Val	
[0670]	1	5 10
[0671]	<210> 95	
[0672]	<211> 9	
[0673]	<212> PRT	
[0674]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0675]	<400> 95	
[0676]	Leu Ile Gln Asp Arg Val Ala Glu Val	
[0677]	1	5
[0678]	<210> 96	
[0679]	<211> 10	
[0680]	<212> PRT	
[0681]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0682]	<400> 96	
[0683]	Gly Ala Ala Val Arg Ile Gly Ser Val Leu	
[0684]	1	5 10
[0685]	<210> 97	
[0686]	<211> 9	
[0687]	<212> PRT	
[0688]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0689]	<400> 97	
[0690]	Glu Leu Asp Arg Thr Pro Pro Glu Val	
[0691]	1	5
[0692]	<210> 98	
[0693]	<211> 9	
[0694]	<212> PRT	
[0695]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0696]	<400> 98	
[0697]	Val Leu Phe Pro Asn Leu Lys Thr Val	
[0698]	1	5
[0699]	<210> 99	
[0700]	<211> 10	
[0701]	<212> PRT	

[0702] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0703] <400> 99
[0704] Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu
[0705] 1 5 10
[0706] <210> 100
[0707] <211> 10
[0708] <212> PRT
[0709] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0710] <400> 100
[0711] Gly Leu Tyr Pro Asp Ala Phe Ala Pro Val
[0712] 1 5 10
[0713] <210> 101
[0714] <211> 9
[0715] <212> PRT
[0716] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0717] <400> 101
[0718] Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val
[0719] 1 5
[0720] <210> 102
[0721] <211> 10
[0722] <212> PRT
[0723] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0724] <400> 102
[0725] Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
[0726] 1 5 10
[0727] <210> 103
[0728] <211> 9
[0729] <212> PRT
[0730] <213> 智人 (Homo sapiens)
[0731] <400> 103
[0732] Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
[0733] 1 5

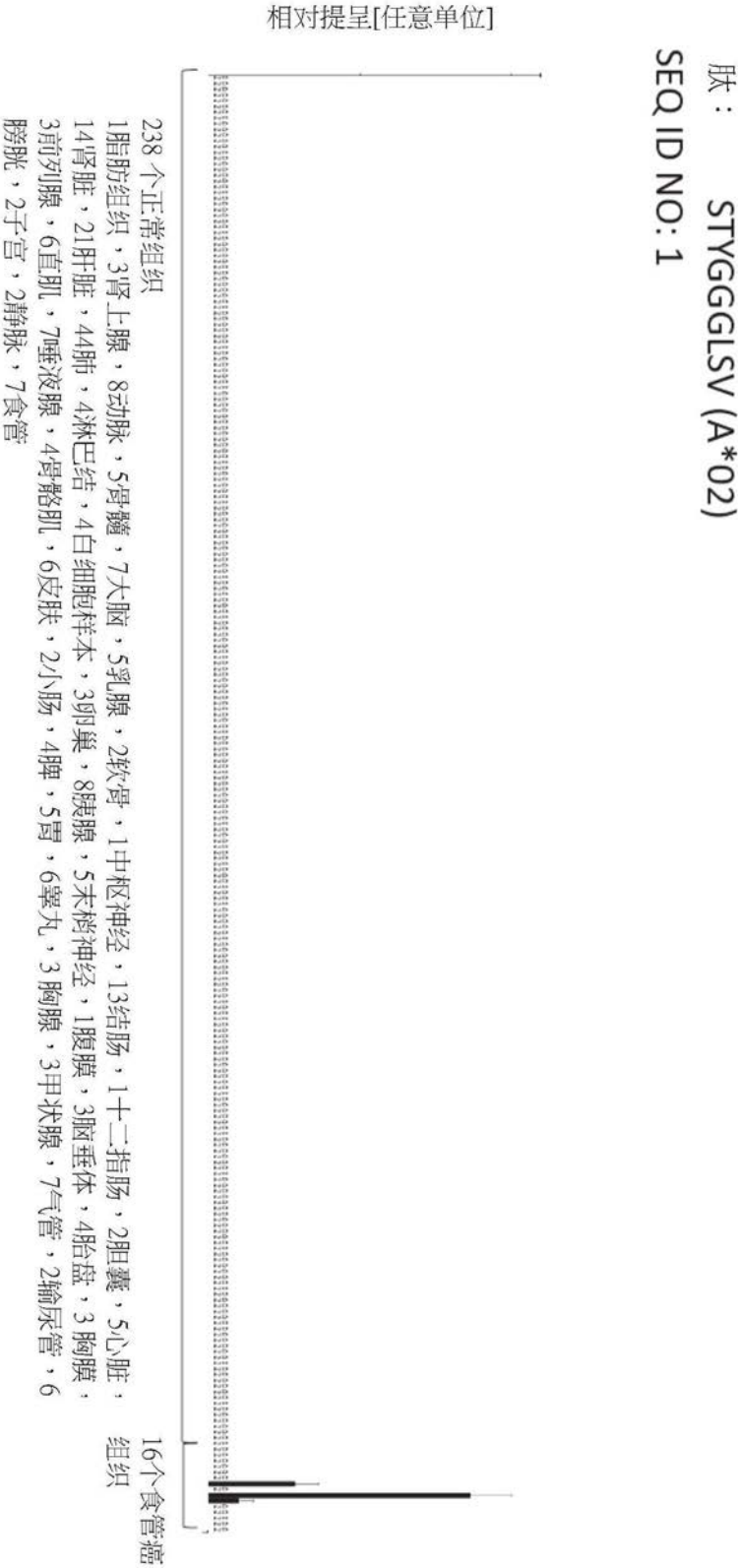


图1A

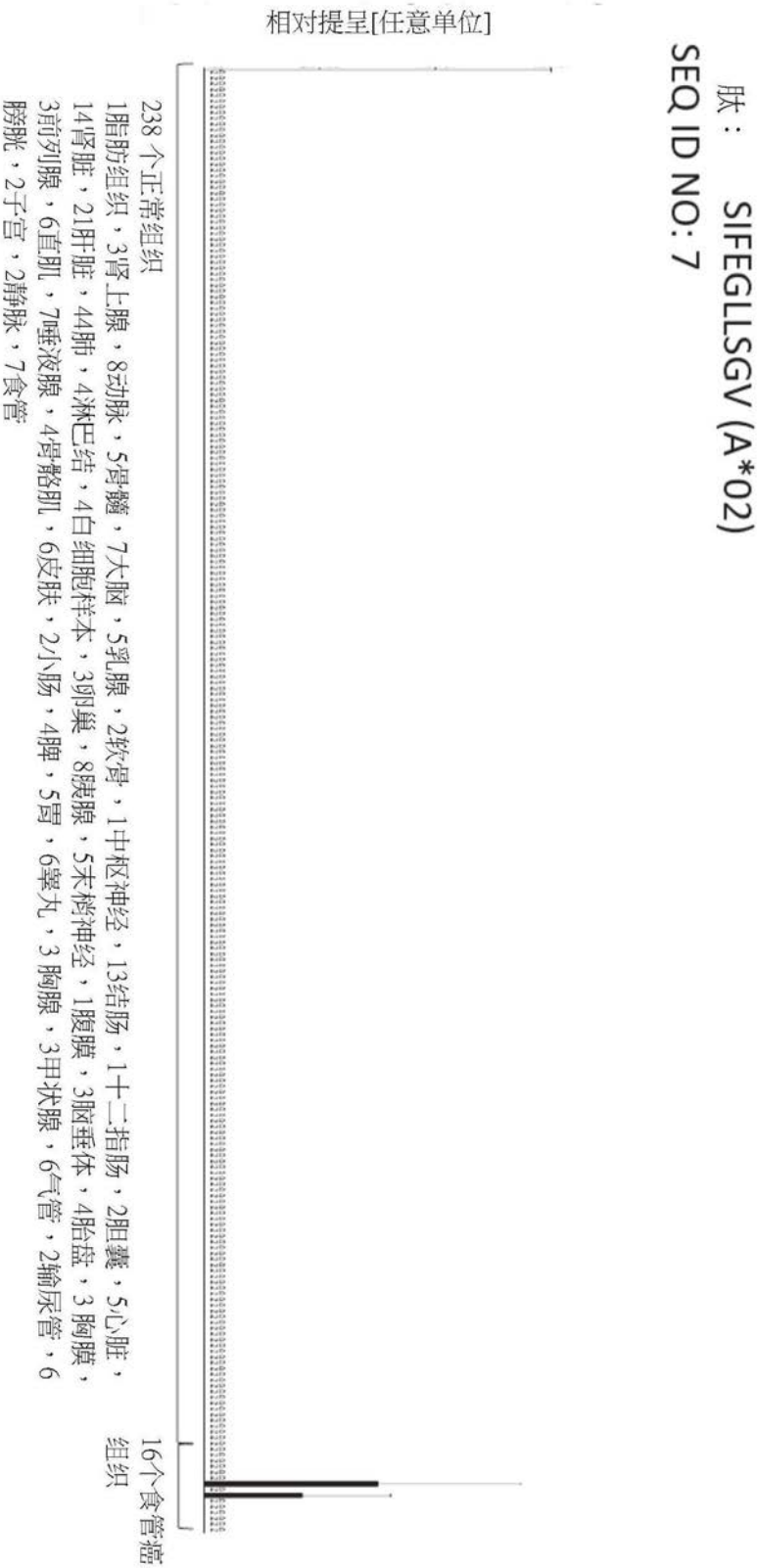


图1B

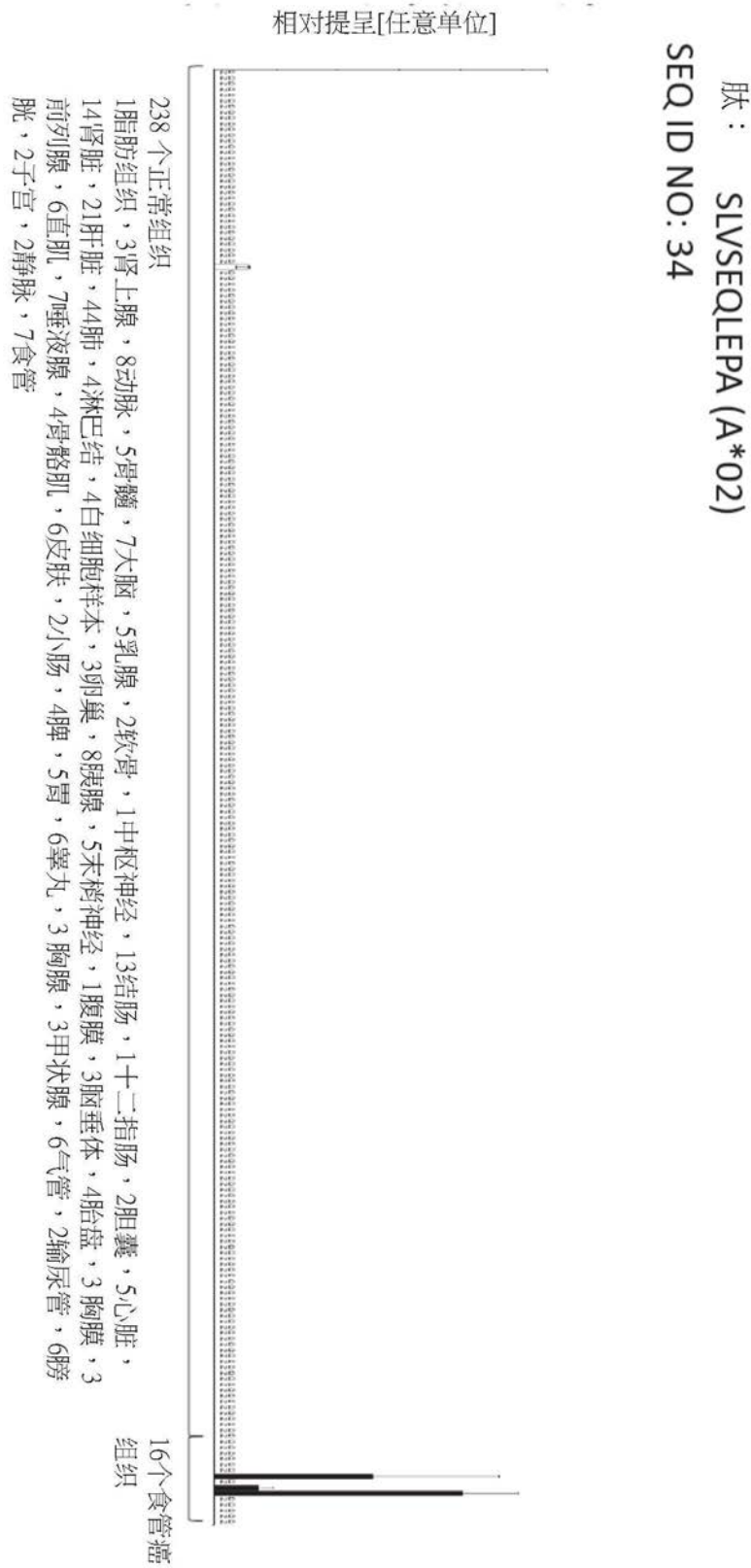


图1C

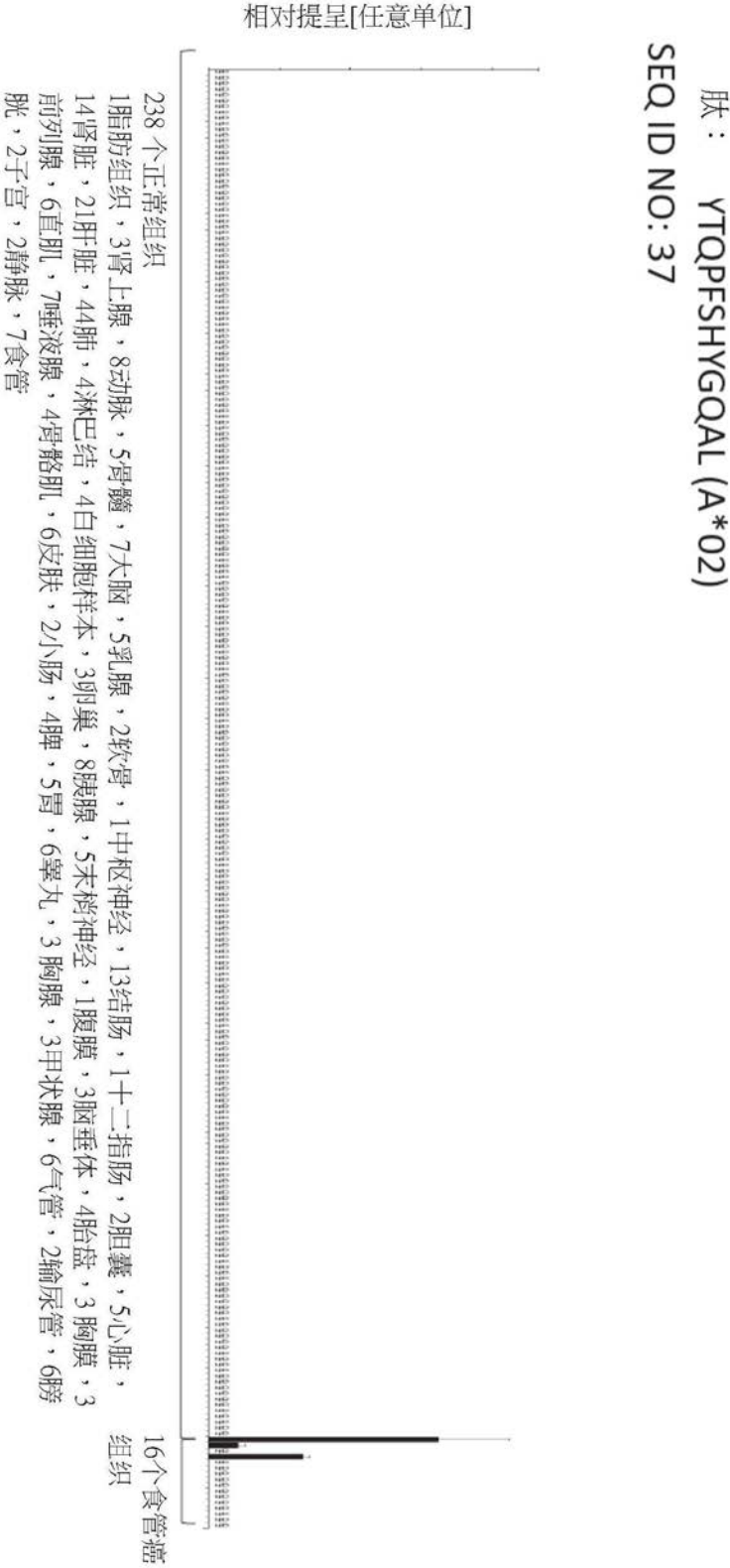


图1D

肽： ALQEALENA (A*02)
SEQ ID NO: 80

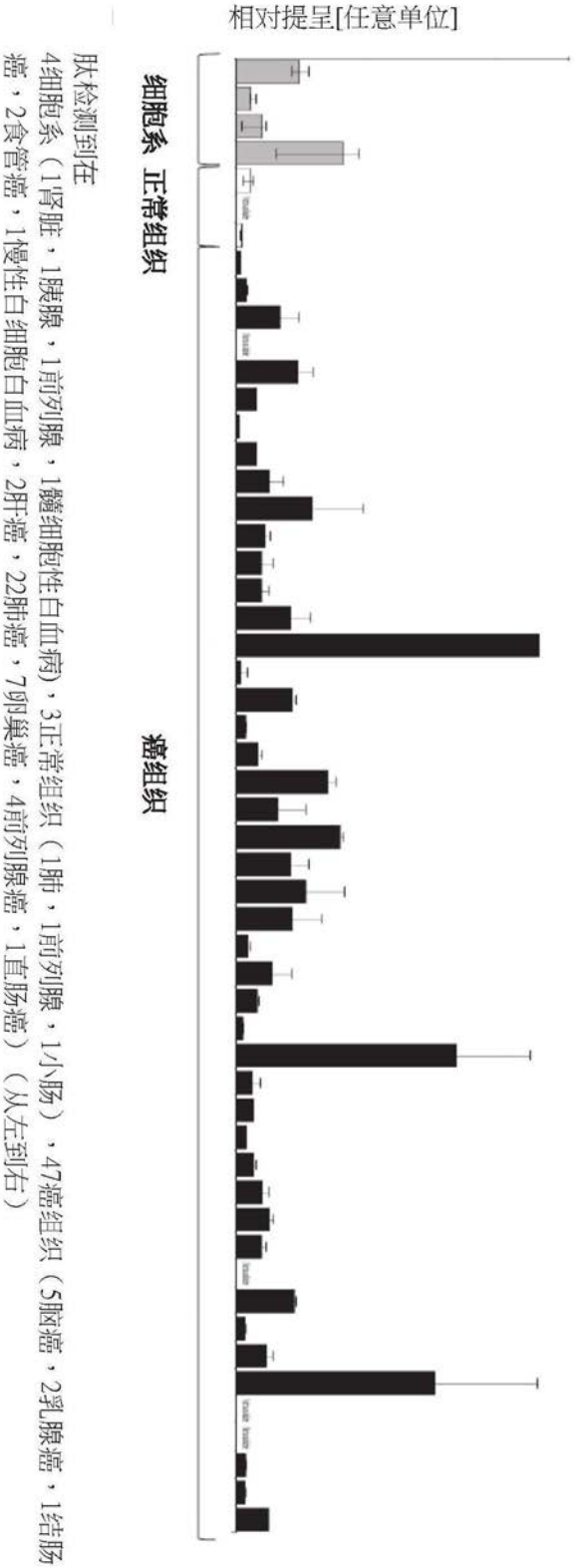


图1E

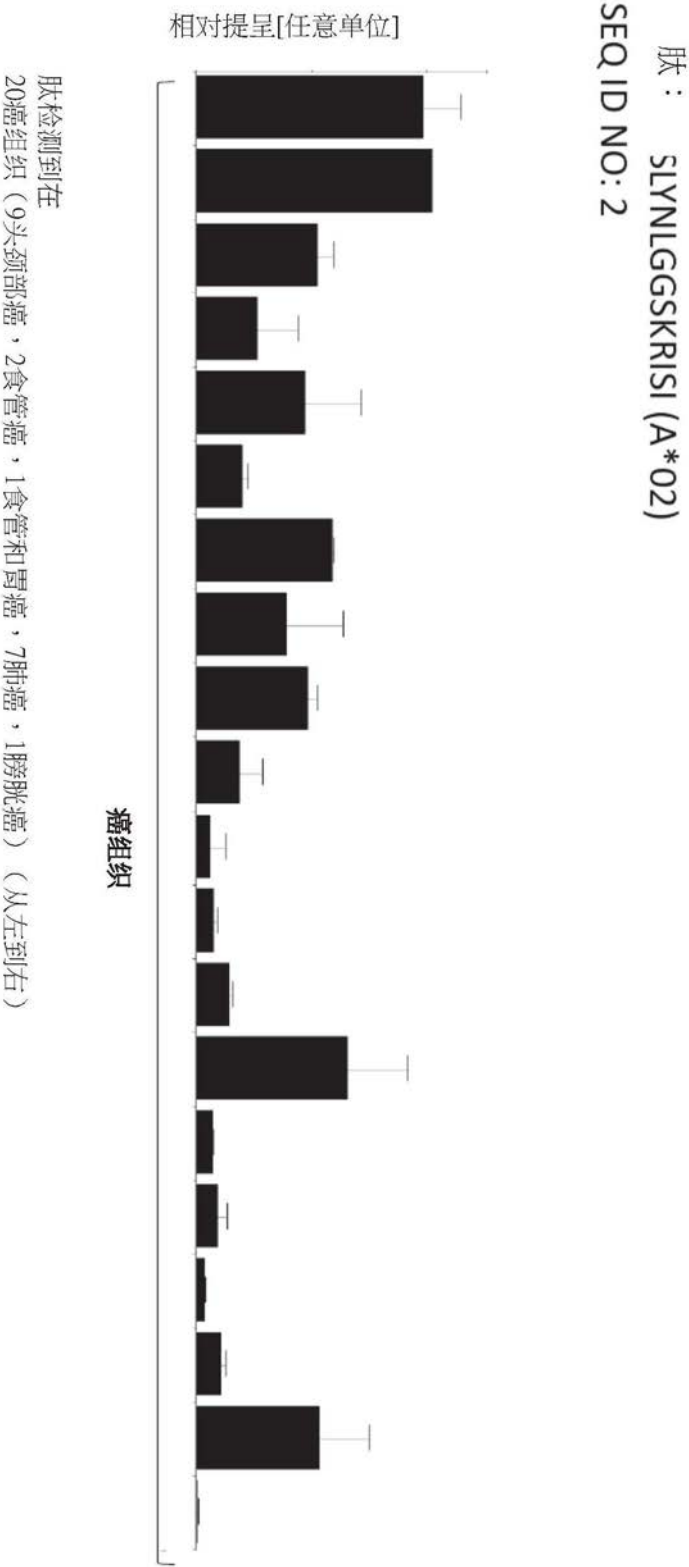


图1F

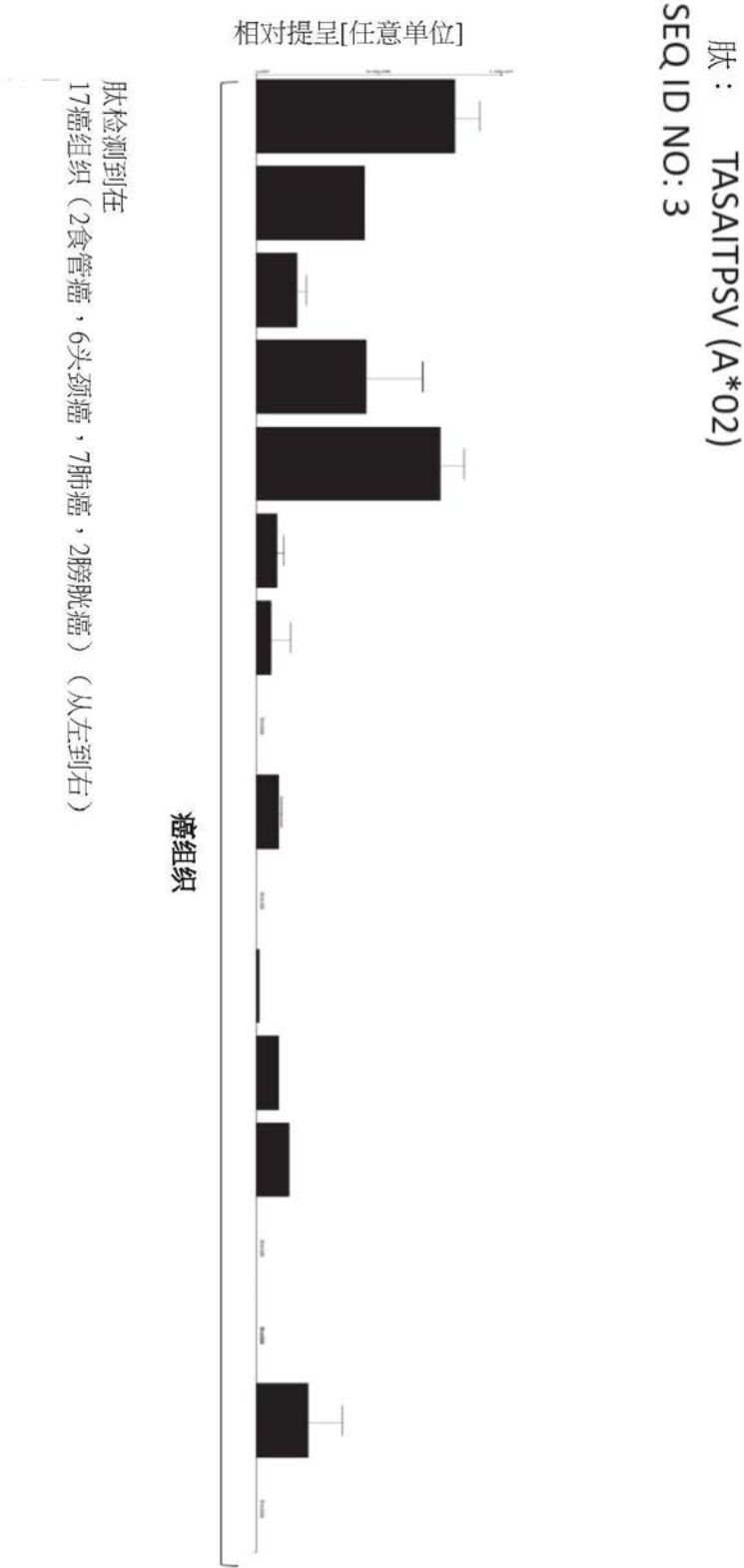


图1G

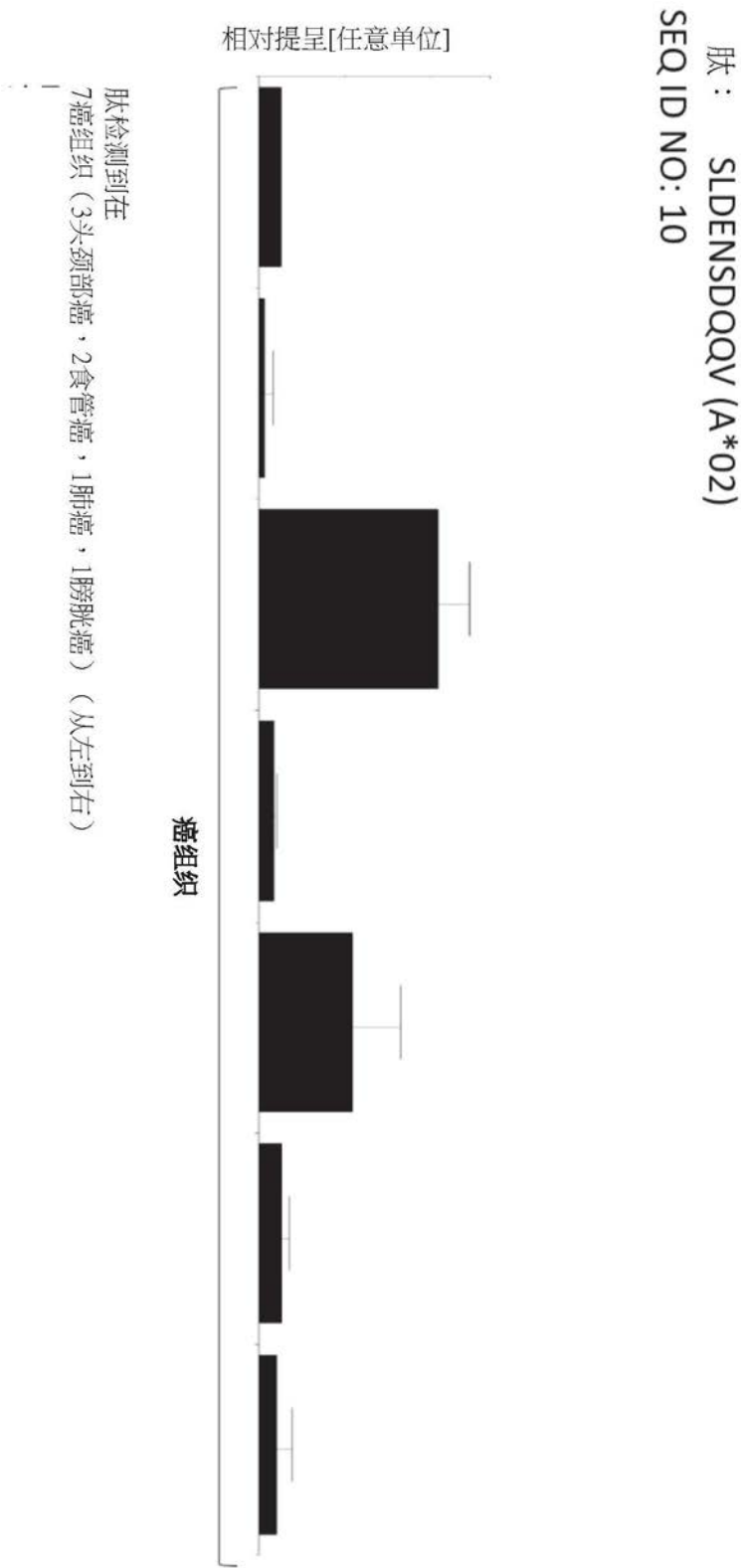


图1H

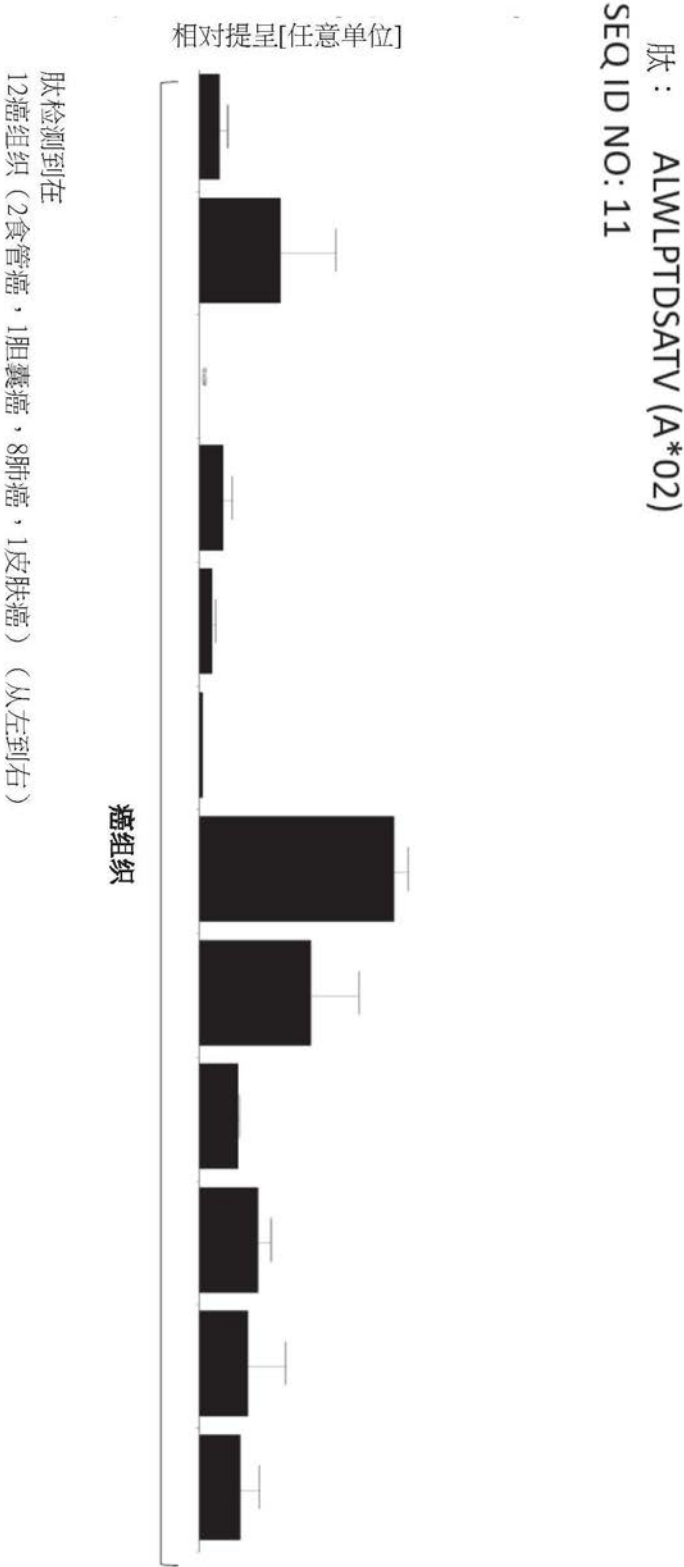


图11

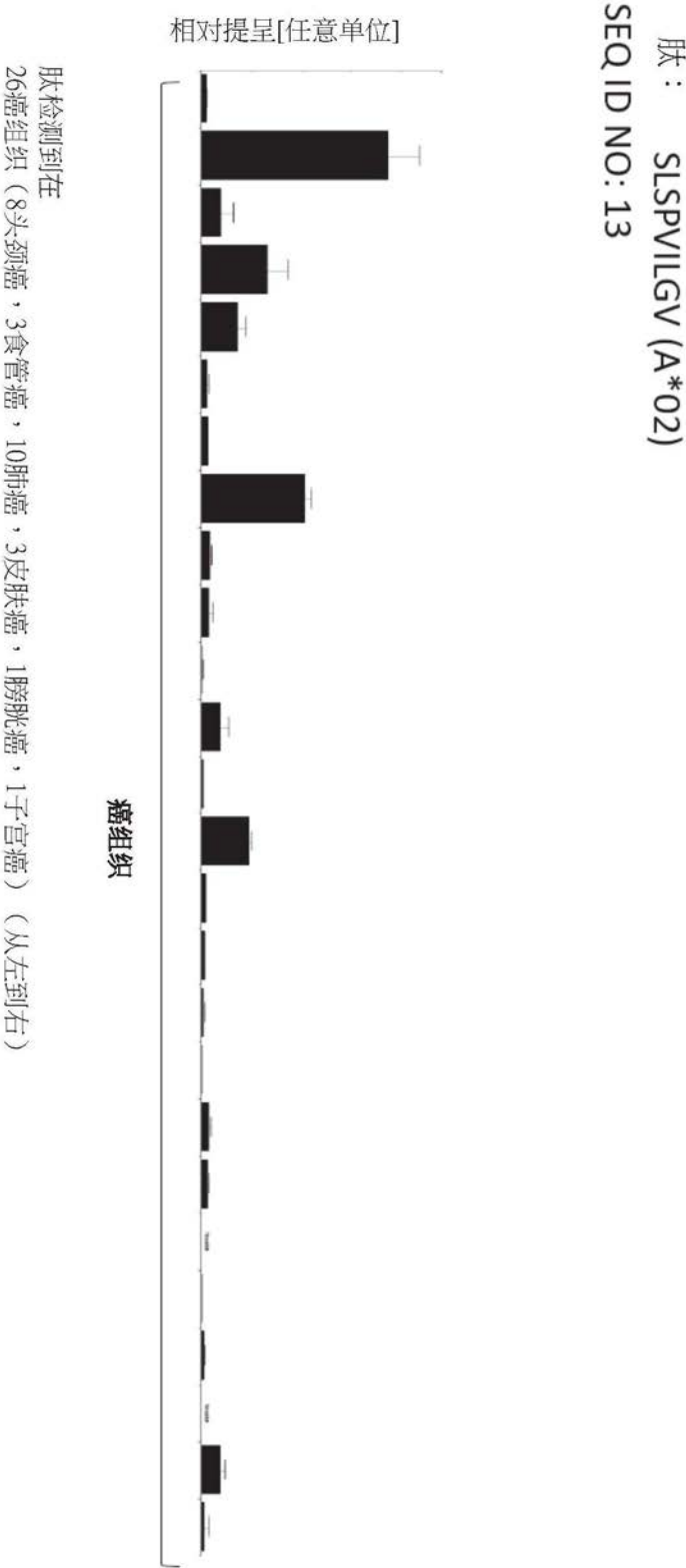


图1J

肽： LANGVYAA (A*02)
SEQ ID NO: 15

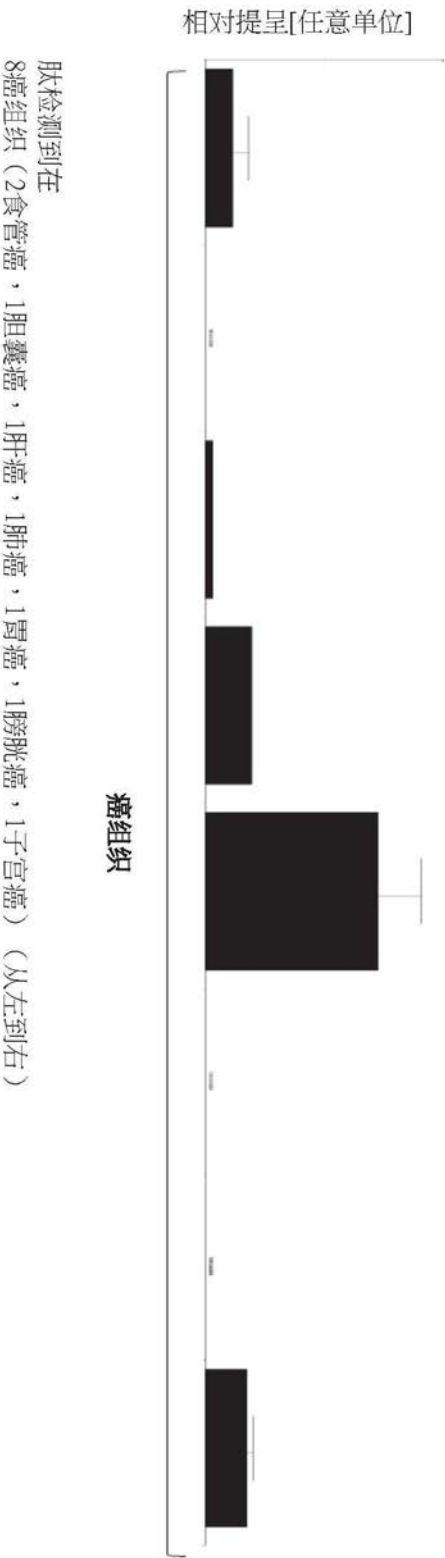


图1K

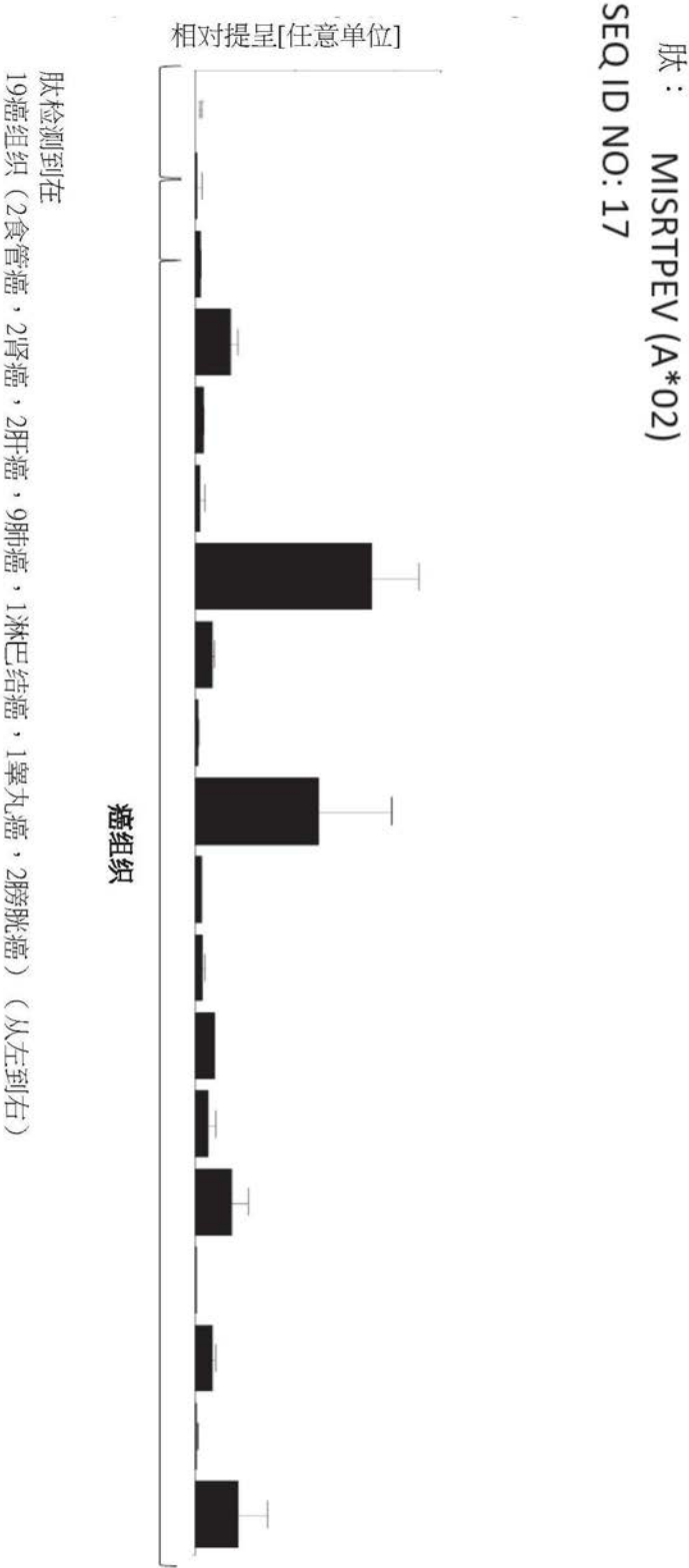


图1L

肽： SLINGNQVTV (A*02)
SEQ ID NO: 30

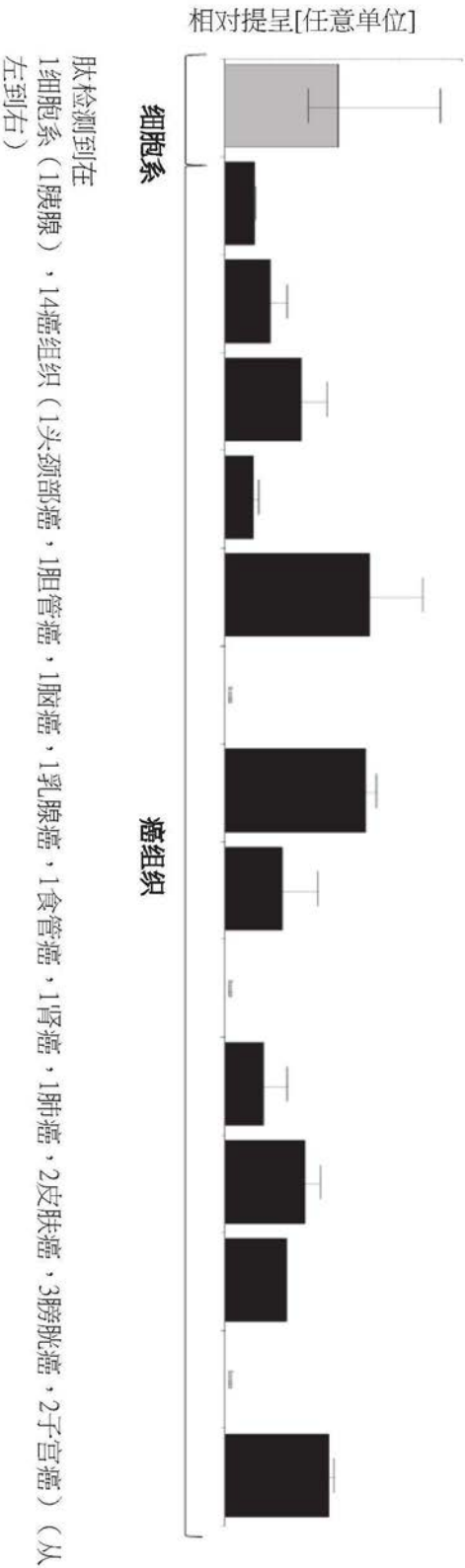


图1M

肽： YMLDIFHEV (A*02)
SEQ ID NO: 32

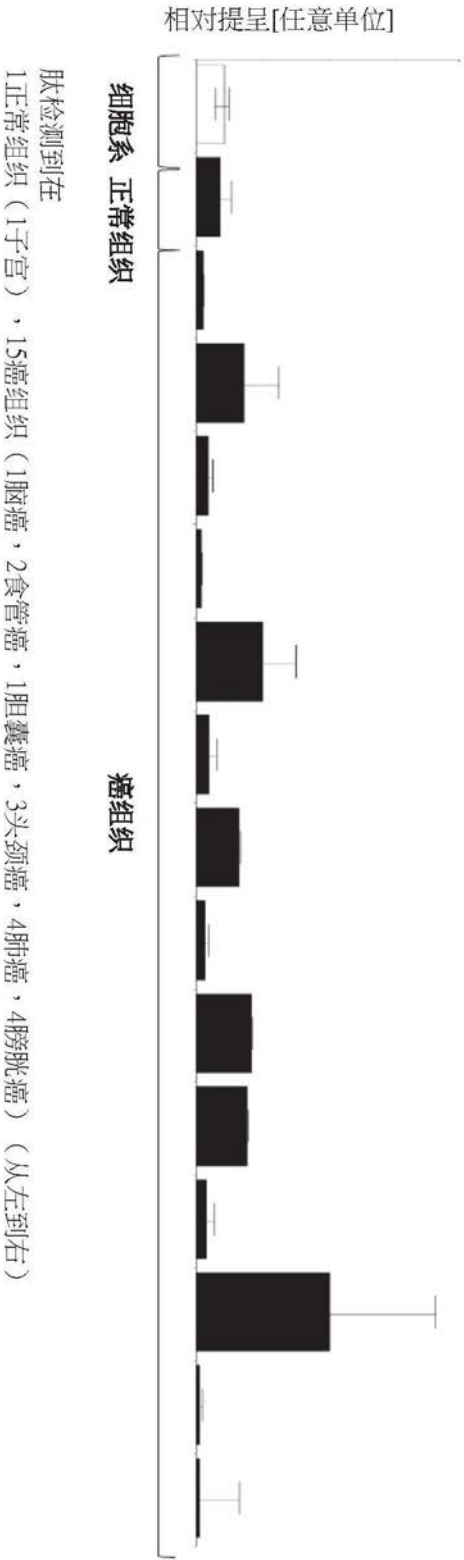


图1N

肽： SLVSEQLLEPA (A*02)
SEQ ID NO: 34

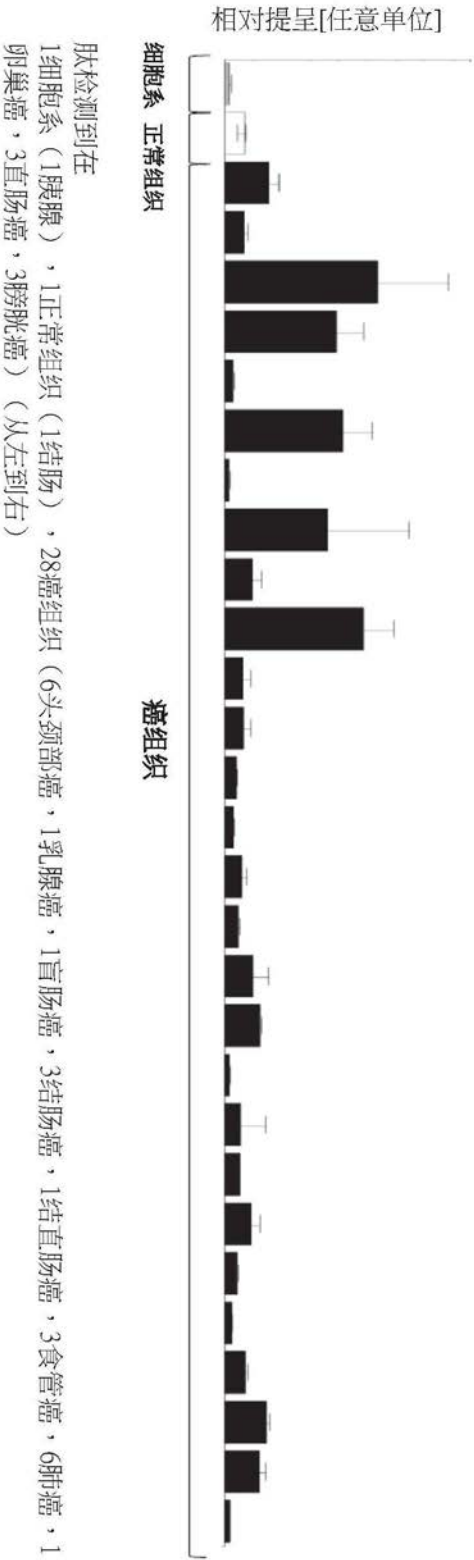


图10

肽： GLAFLSYQA (A*02)
SEQ ID NO: 40

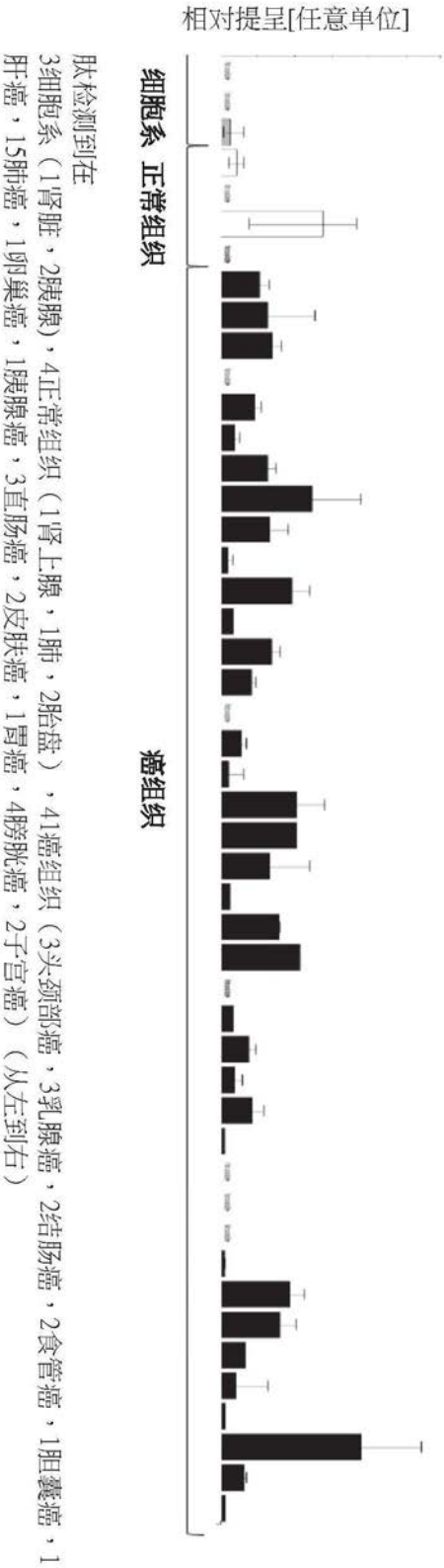


图1P

肽： ALVEVTEHV (A*02)
SEQ ID NO: 56

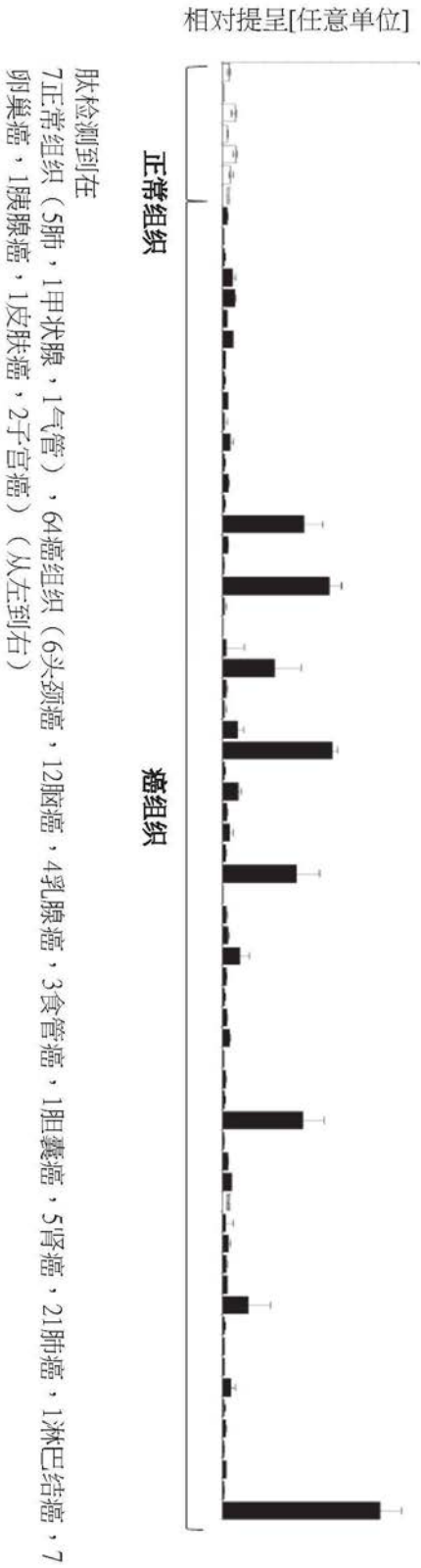


图1Q

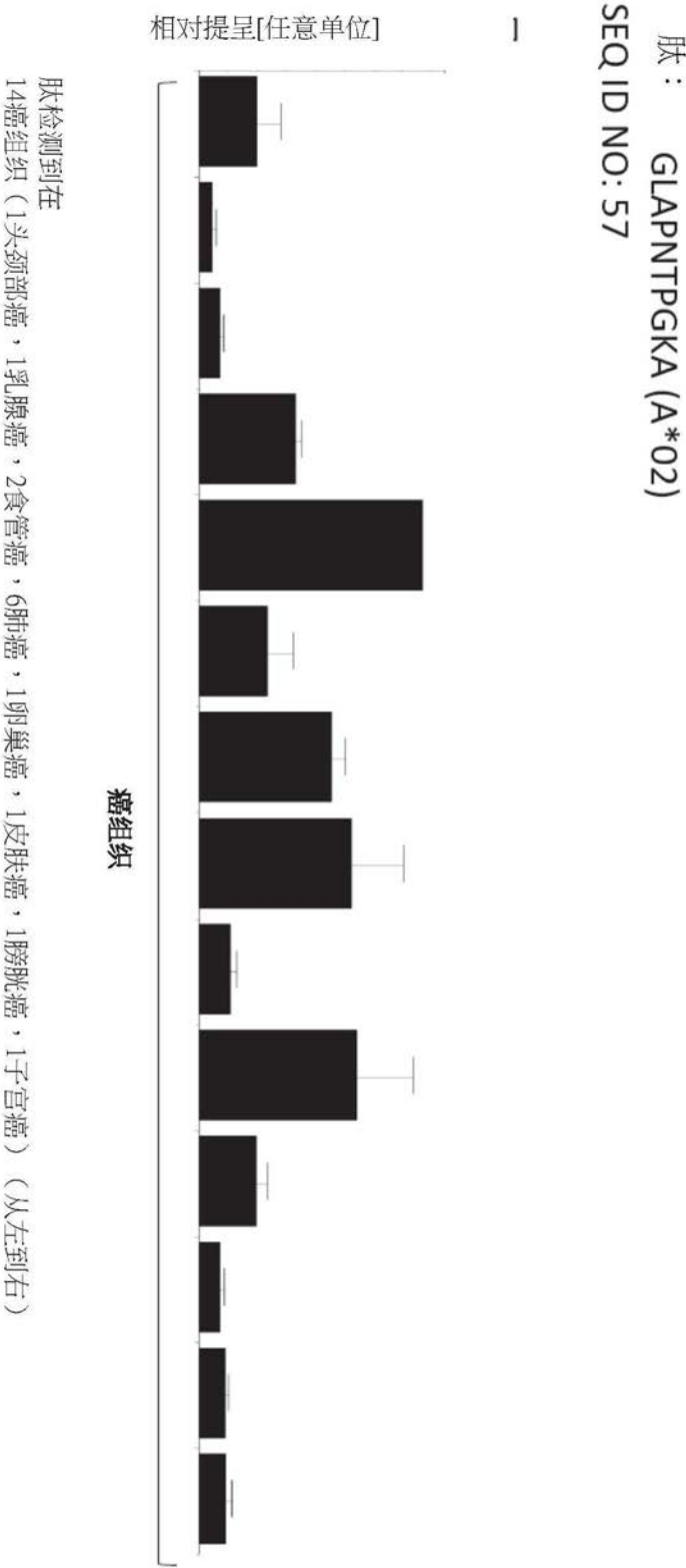


图1R

肽： LLESIPVV (A*02)
SEQ ID NO: 58

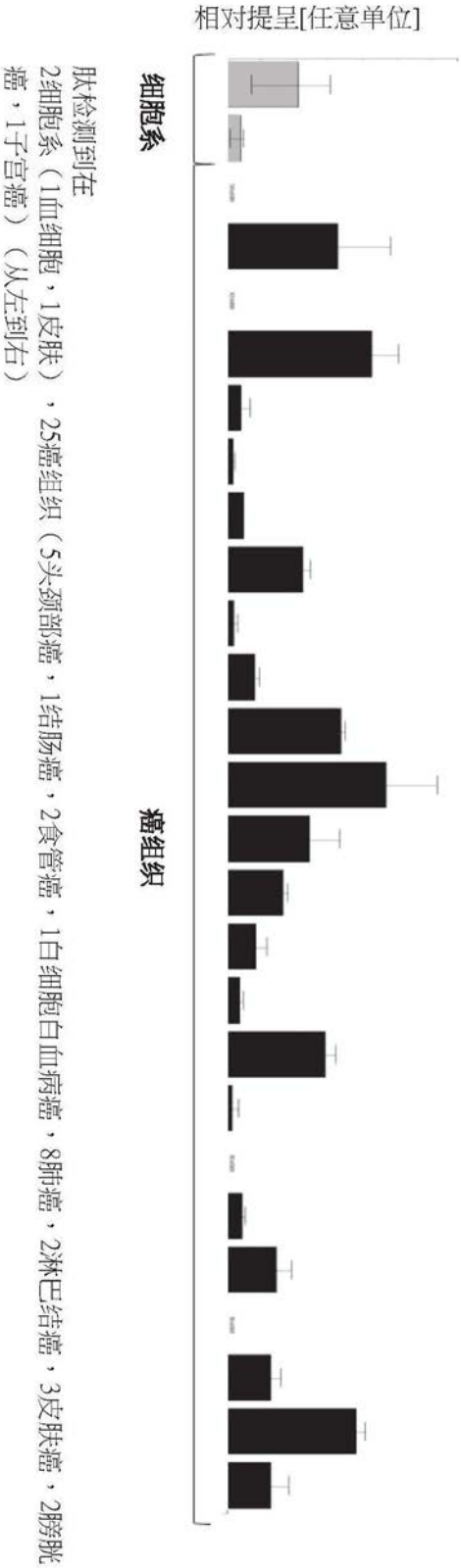


图1S

肽： SLDTLREV (A*02)
SEQ ID NO: 59

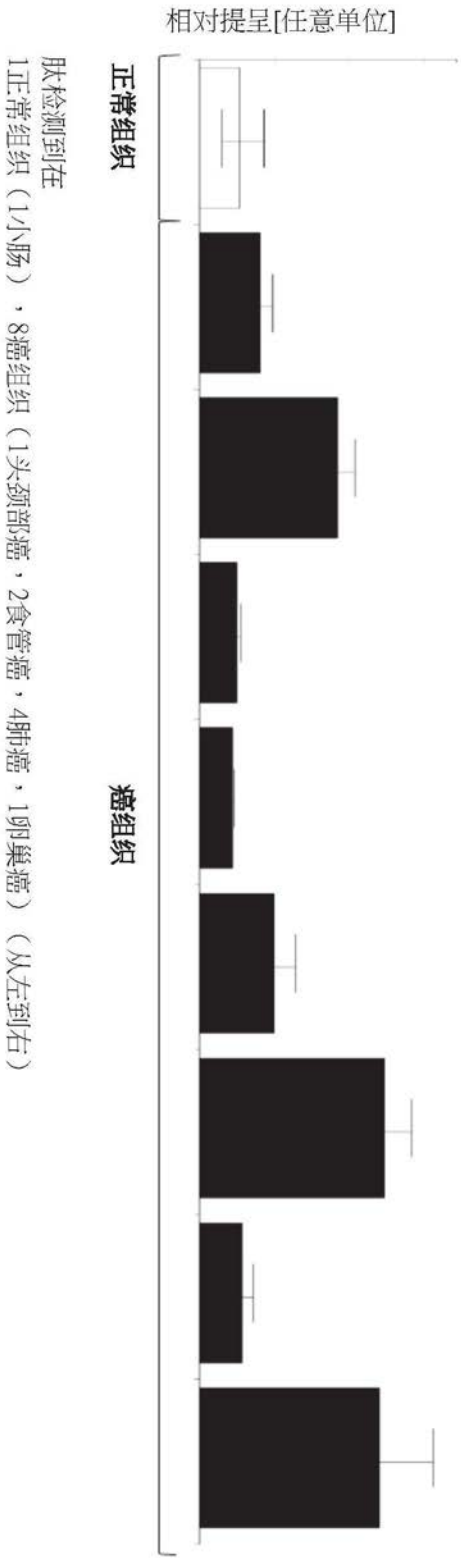


图1T

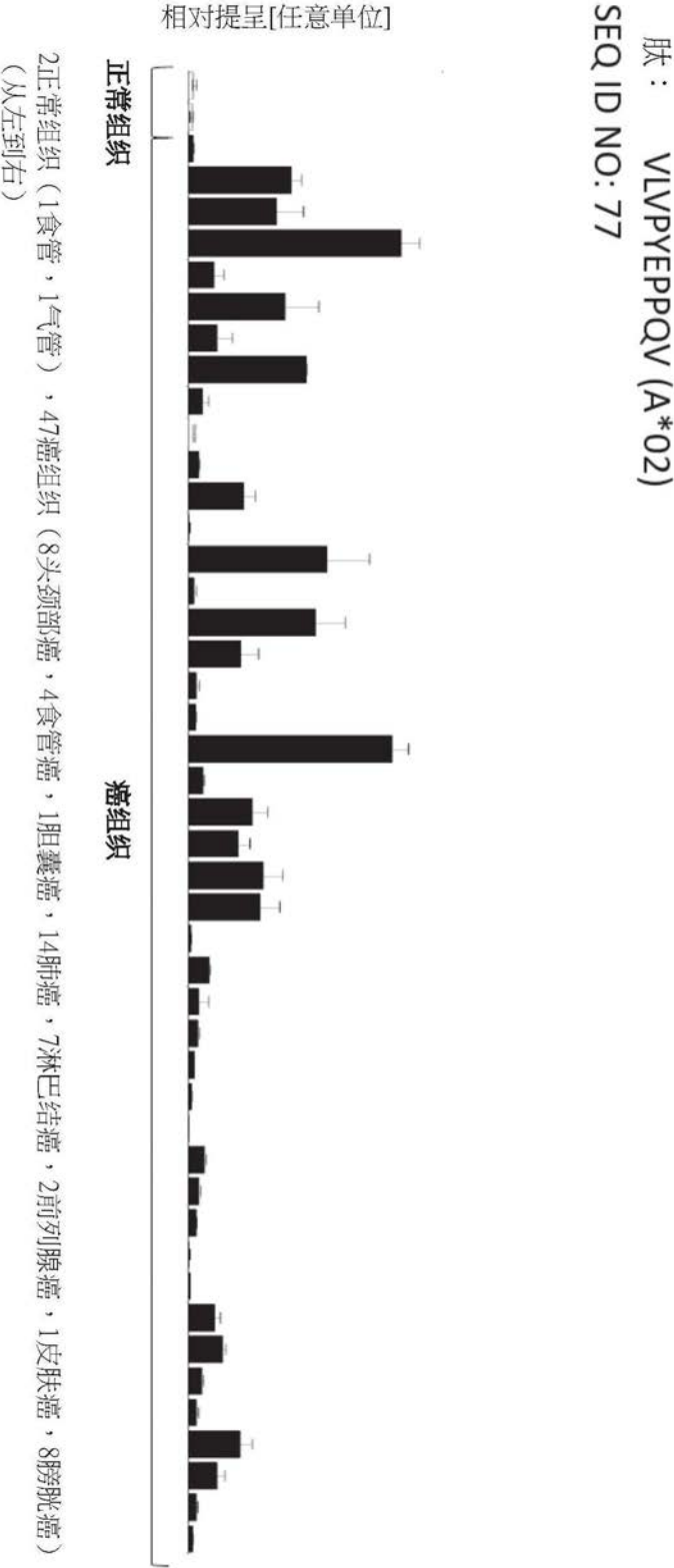


图1U

肽： AVLPHVDQV (A*02)
SEQ ID NO: 81

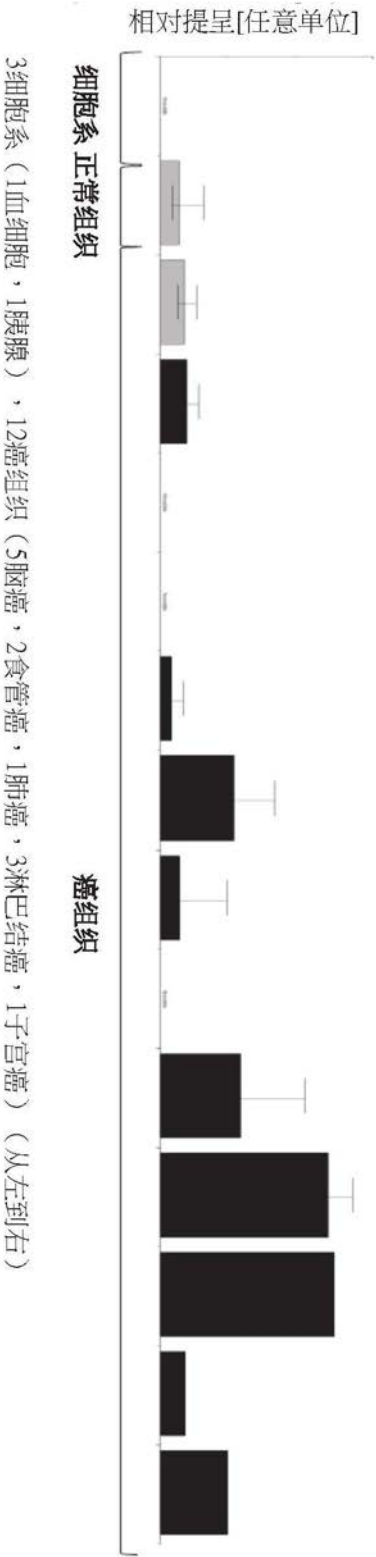


图1V

基因： PTHLH
肽： HLI AEIHTA
SEQ ID NO: 9

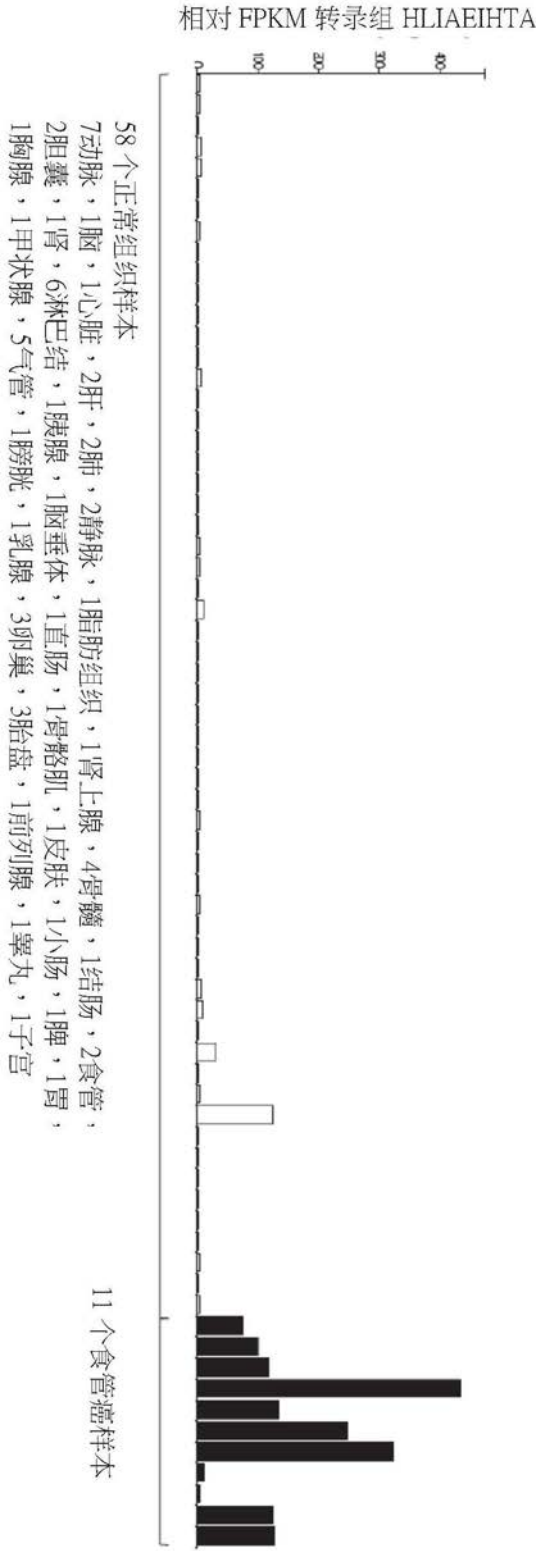


图2A

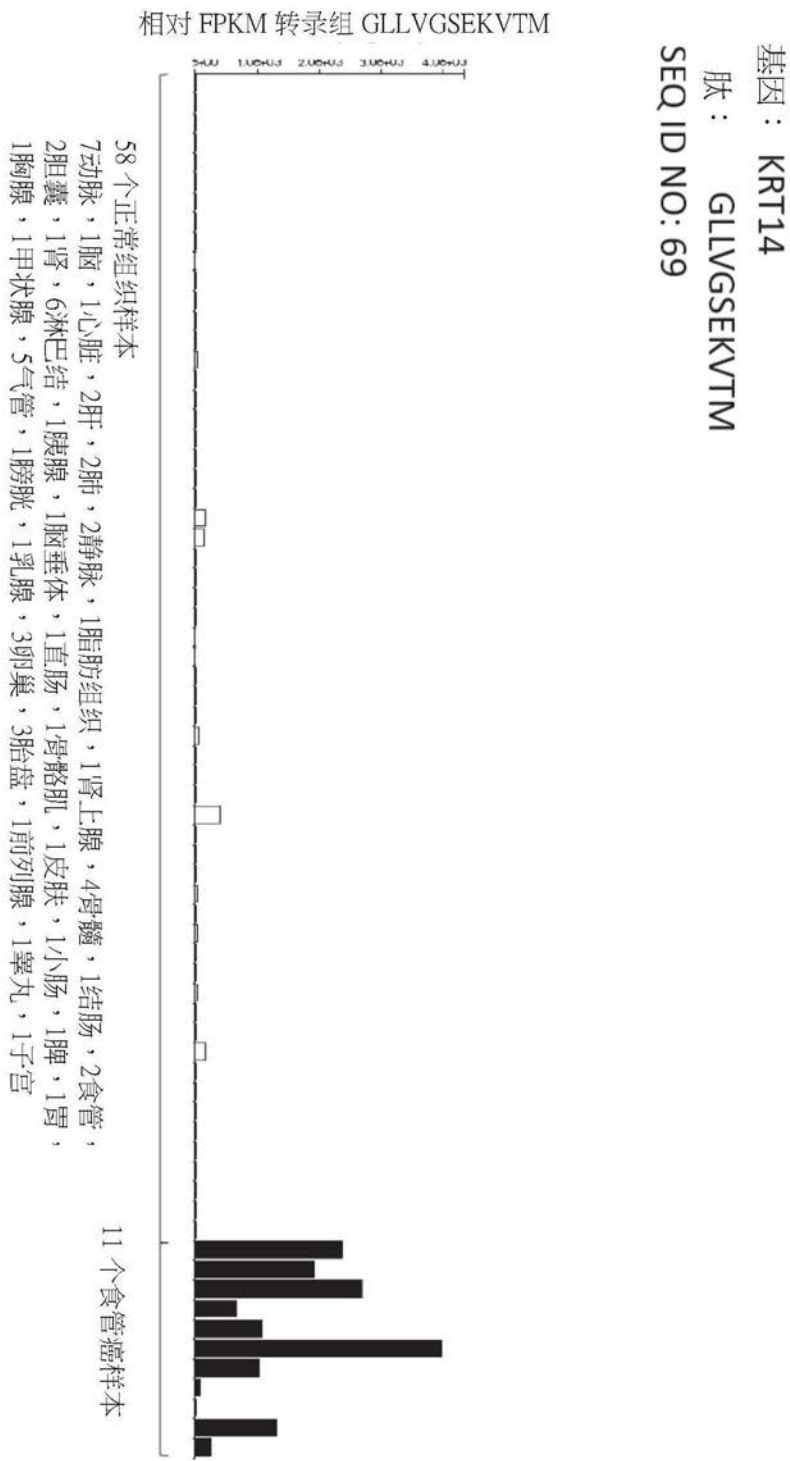


图2B

基因：FAM83A
肽：ALDGGSEAYWRV
SEQ ID NO: 8

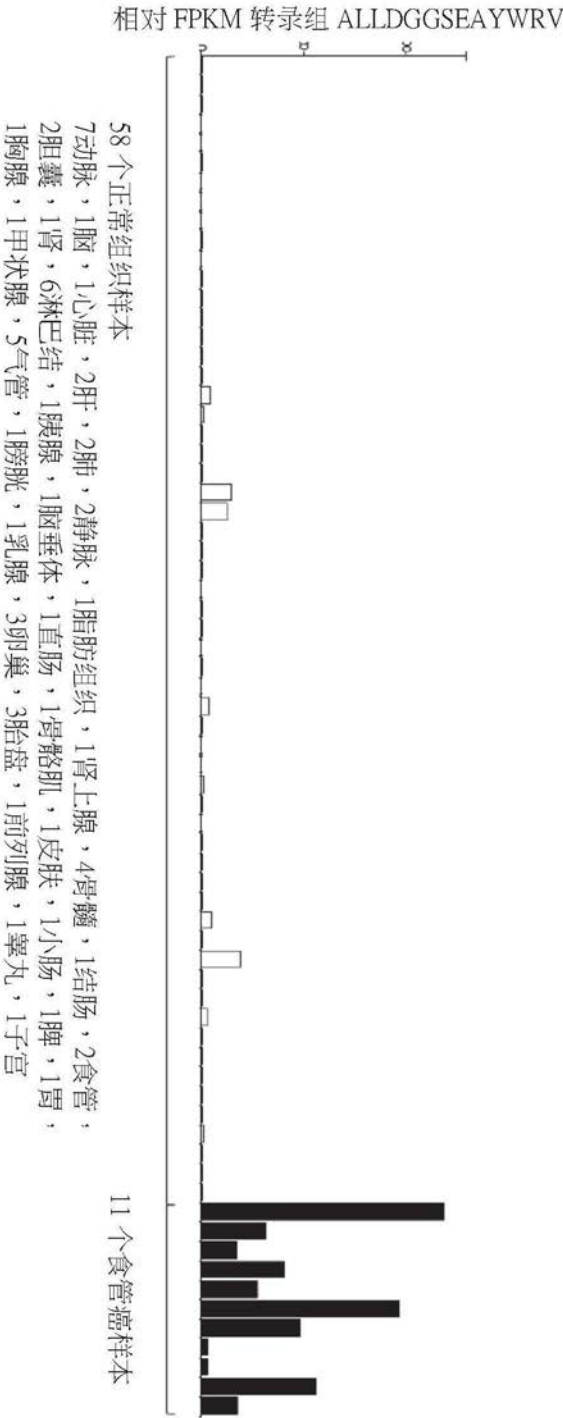


图2C

基因：PDPN

肽: VLAEGGEGV

SEQ ID NO: 16

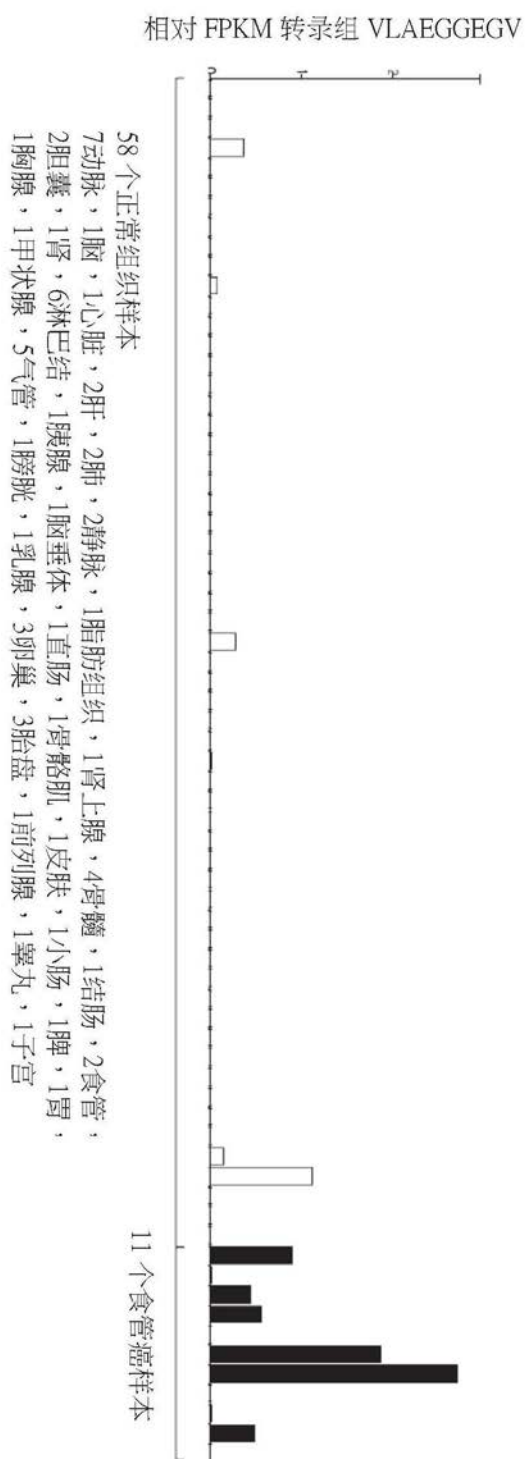


图2D

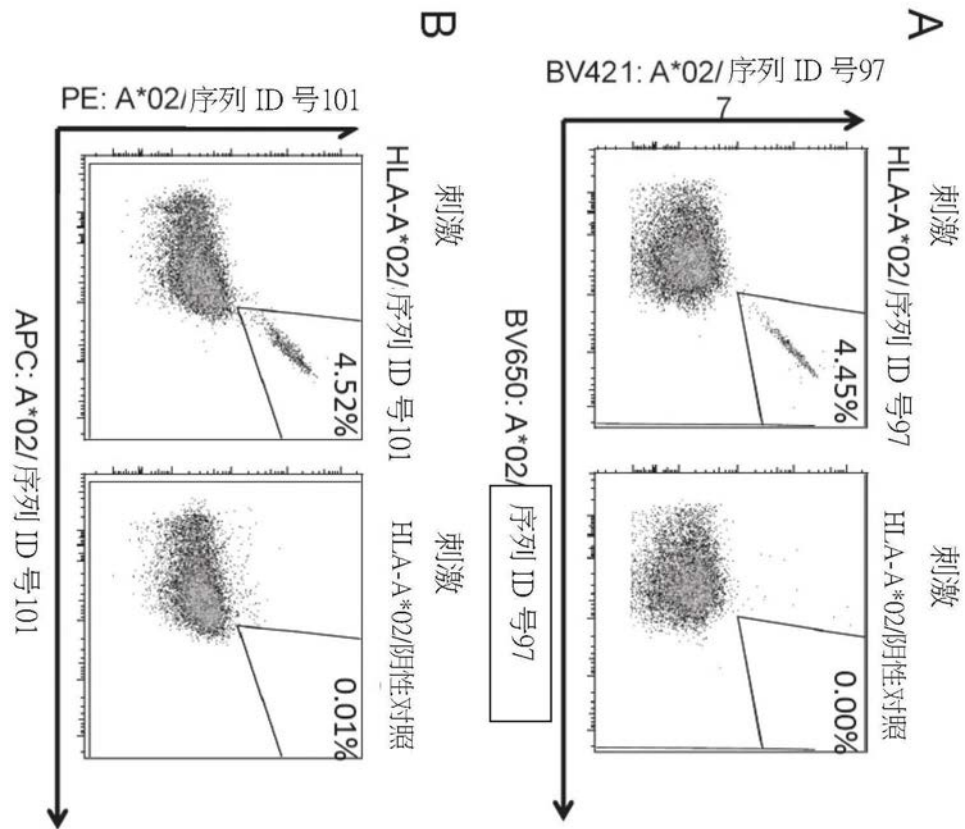


图3

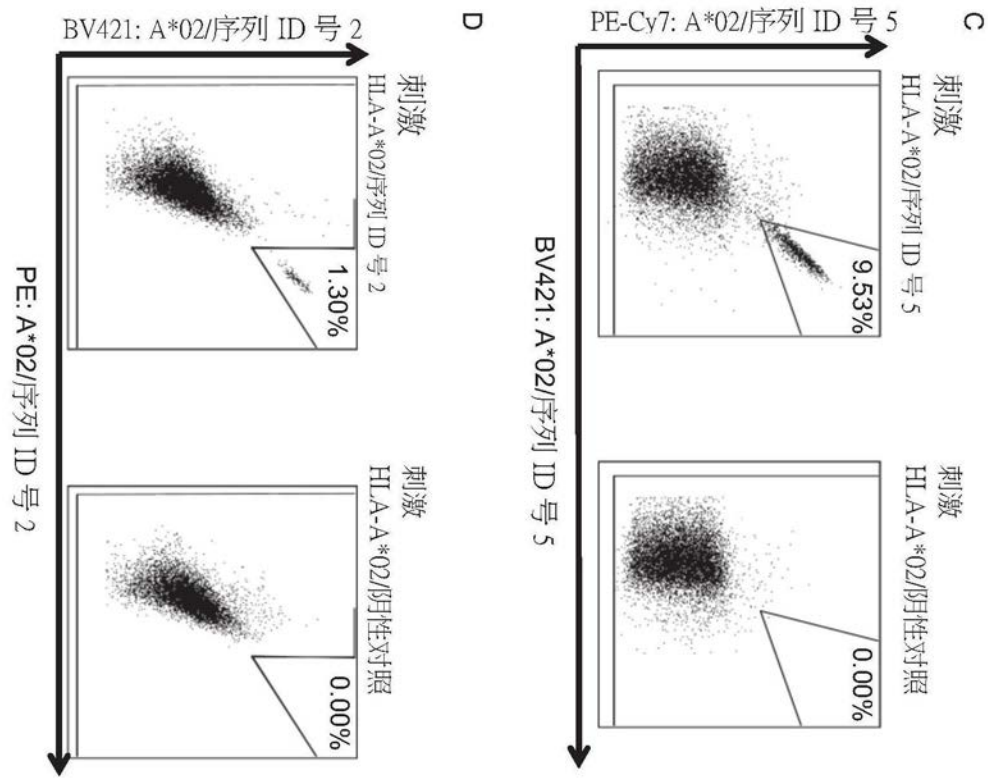


图3(续)

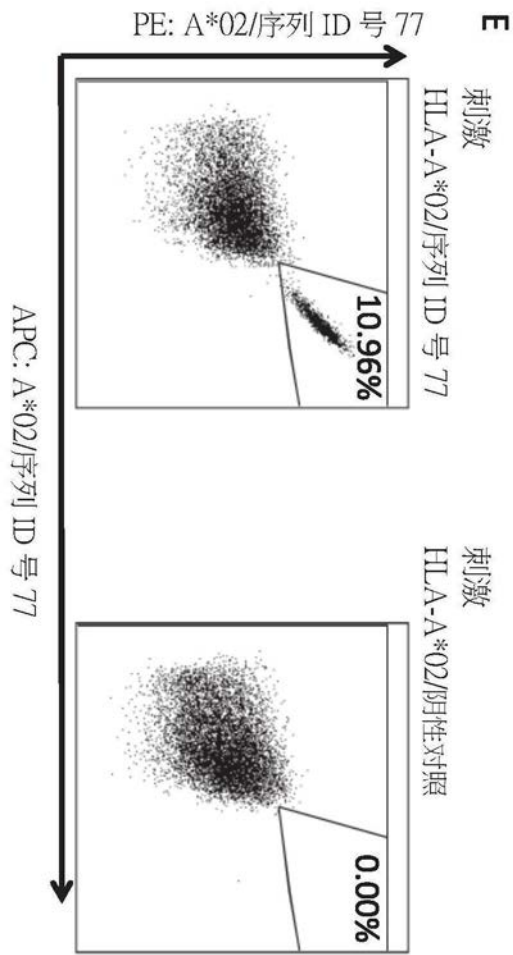


图3 (续)