



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101495501 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 13

(21) 申请号 200780026211. 0

(22) 申请日 2007. 07. 12

(30) 优先权数据

PCT/IB2006/002937 2006. 07. 12 WO

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 01. 12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2007/003054 2007. 07. 12

(87) PCT申请的公布数据

WO2008/010098 EN 2008. 01. 24

(73) 专利权人 瓦克松生物技术公司

地址 法国埃夫里

(72) 发明人 科斯坦提努斯(科斯塔斯)·科斯马托普洛斯

斯特凡妮·格拉夫-迪布瓦

让娜·梅内-雅梅

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司 72003

代理人 高龙鑫 吴小瑛

(51) Int. Cl.

C07K 7/04 (2006. 01)

A61P 31/12 (2006. 01)

A61K 38/04 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005/0003483 A1, 2005. 01. 06, 全文.

CN 1650012 A, 2005. 08. 03, 全文.

Hans-Georg Rammensee et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. 《Immunogenetics》. 1999, 第 50 卷全文.

Vanda Turcanova et al. Sustained CD8+ T-Cell Immune Response to a Novel Immunodominant HLA-B\*0702-Associated Epitope Derived From an Epstein-Barr Virus Helicase-Primase-Associated Protein. 《Journal of Medical virology》. 2004, 第 71 卷第 641 页左栏第 2 段, 第 642 页左栏第 1 段.

Valerie pasquetto et al. HLA-A\*0201, HLA-A\*1101, and HLA-B\*0702 Transgenic Mice Recognize Numerous Poxvirus Determinants from a Wide Variety of Viral Gene Products. 《The Journal of immunology》. 2005, 第 175 卷全文.

Olivier Adotevi et al. Immunogenic HLA-B\*0702-Restricted Epitopes Derived from Human Telomerase Reverse Transcriptase That Elicit Antitumor Cytotoxic T-Cell Responses. 《Clinical cancer research》. 2006, 第 12 卷 (第 10 期), 全文.

审查员 黎舒婷

权利要求书2页 说明书18页  
序列表23页 附图6页

(54) 发明名称

用于免疫治疗的 HLA-B7 隐性表位的鉴定、优化与应用

(57) 摘要

本发明涉及肽免疫治疗的领域。特别地, 本发明涉及鉴定抗原中 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的方法以及提高该隐性表位免疫原性的方法。本发明还提供了用于有效治疗具有 HLA-B\*0702 表型的患者的新型方法和材料。

CN 101495501 B

1. HLA-B\*0702 限制性隐性表位,其选自由 APRSPLAPS (SEQ ID NO:2)、SPKANKEIL (SEQ ID NO:3)、GPKHSDCLA (SEQ ID NO:4)、DPRRLVQLL (SEQ ID NO:1) 组成的组。

2. 具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位,其通过用亮氨酸取代 HLA-B\*0702 限制性隐性表位 APRSPLAPS (SEQ ID NO:2) 的 C 末端氨基酸而获得。

3. 如权利要求 2 所述的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位,其为 APRSPLAPL (SEQ ID NO:6)。

4. 具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位,其通过用丙氨酸取代 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的 N 末端氨基酸而获得,所述 HLA-B\*0702 限制性隐性表位选自由 SPKANKEIL (SEQ ID NO:3)、GPKHSDCLA (SEQ ID NO:4)、DPRRLVQLL (SEQ ID NO:1) 组成的组。

5. 如权利要求 4 所述的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位,其从 SPKANKEIL (SEQ ID NO:3)、GPKHSDCLA (SEQ ID NO:4)、DPRRLVQLL (SEQ ID NO:1) 之中选择。

6. 分离的核酸分子,其编码权利要求 1 所述的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位或权利要求 2-5 任一项所述的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位。

7. 药物组合物,其至少包含作为活性组分的肽,所述肽为权利要求 1 所述的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位或权利要求 2-5 任一项所述的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位,或权利要求 6 所述的分离的核酸分子,所述核酸分子经设计引起权利要求 1 所述的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位或权利要求 2-5 任一项所述的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位的表达。

8. 如权利要求 7 所述的药物组合物,其是疫苗。

9. 如权利要求 8 所述的药物组合物,其中,所述疫苗的肽含量为 1 ~ 5mg。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的药物组合物,其中,所述疫苗经配制以用于皮下注射。

11. 试剂盒,其包含以单独制剂形式存在的第一肽和第二肽,其中所述第一肽具有 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的序列,所述第二肽为对应于其同族的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位,其中所述第一肽和所述第二肽选自以下肽对:SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7;和 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8。

12. 如权利要求 11 所述的试剂盒,其是接种疫苗试剂盒,其中所述第一肽和第二肽以单独的疫苗单位剂量形式存在。

13. 如权利要求 12 所述的试剂盒,其包含 2 个或 3 个单位剂量的第二肽和 3 个、4 个、5 个、6 个或多达 50 个单位剂量的第一肽。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的试剂盒,其中每个单位剂量的肽含量为 1 ~ 5mg。

15. 如权利要求 12 或 13 所述的试剂盒,其中所述接种疫苗单位剂量经配制以用于皮下注射。

16. 如权利要求 14 所述的试剂盒,其中所述接种疫苗单位剂量经配制以用于皮下注射。

17. 权利要求 1 所述的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位或权利要求 2-5 任一项所述的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位或权利要求 6 所述的核酸分子在制备用于预防性或治疗性免疫治疗的组合物中的应用,其中所述核酸分子经设计引起权利要求 1 所述的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位或权利要求 2-5 任一项所述的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限

制性表位的表达。

18. 如权利要求 17 所述的应用,其是在制备用于抗病毒或抗癌免疫治疗的组合物中的应用。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的应用,是在制备疫苗中的应用。

20. 具有 HLA-B\*0702 限制性隐性表位序列的肽在制备用于保持由其同族优化肽引发的 CTL 免疫应答的药物组合物中的应用,其中所述具有隐性表位序列的肽和优化肽选自以下肽对:SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5 ;SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6 ;SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8。

21. 具有免疫原性的肽在制备用于引发抗所述 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的 CTL 免疫应答的药物组合物中的应用,其中所述具有免疫原性的肽具有衍生自 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的 HLA-B\*0702 限制性优化表位序列,其中 HLA-B\*0702 限制性隐性表位和具有免疫原性的肽选自以下肽对:SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5 ;SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6 ;SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8。

## 用于免疫治疗的 HLA-B\*0702 隐性表位的鉴定、优化与应用

[0001] 本发明涉及肽的免疫治疗领域。特别地,本发明提供了用于有效治疗具有 HLA-B\*0702 表型的患者的新型方法和材料。

[0002] 在目前癌症治疗中,免疫治疗是极其引人注意的治疗方法。其原理是基于利用可使肿瘤抗原 T 细胞表位再生的肽进行免疫,该表位可以被在肿瘤细胞的清除中起重要作用的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 识别。

[0003] 经回顾可知,CTL 识别的并不是全蛋白抗原,而是全蛋白抗原的肽片段,该肽片段通常包含 8 ~ 11 个氨基酸并由表达在细胞表面的 I 型主要组织相容性复合体 (MHC I) 分子提呈。这些肽的提呈是抗原加工的结果,包括三个步骤:

[0004] (1) 由被称为蛋白酶体的多酶复合体对抗原进行胞质降解;

[0005] (2) 来自上述降解的肽被 TAP 转运体转移至内质网 (ER) 中;

[0006] (3) 使这些抗原与 MHC I 分子结合,并把所述肽 /MHC I 复合体转运到细胞表面。

[0007] 所述肽 /MHC I 复合体与 CTL 上的特异性 T 细胞受体 (TCR) 相互作用,诱导这些 CTL 的刺激和扩增,以使其能够攻击表达衍生出所述肽的抗原的靶细胞。

[0008] 在抗原加工的过程中发生肽选择,从而引起肽提呈的层级 (hierarchy)。被 MHC I 分子优先提呈的肽被称为免疫显性肽,而较少被 MHC I 分子提呈的肽则被称为隐性肽。免疫显性肽对 MHC I 具有高亲和力并且具有免疫原性,而隐性肽则对 MHC I 具有低亲和力并且不具有免疫原性。

[0009] 已经在临床前和临床研究中使用肿瘤疫苗靶向大量的免疫显性肽,然而结果令人失望 (Bowne et al.,1999 ;Colella et al.,2000 ;Gross et al.,2004 ;Hawkins et al.,2000 ;Naftzger et al.,1996 ;Overwijk et al.,1998 ;Vierboom et al.,1997 ;Weber et al.,1998)。

[0010] 肿瘤抗原通常为在肿瘤中过量表达而在正常细胞和组织中以低水平表达的自身蛋白 (selfproteins)。因为自身耐受的过程,免疫系统不会与这些自身抗原发生反应。自身耐受主要针对免疫显性肽 (Cibotti et al.,1992 ;Gross et al.,2004 ;Hernandez et al.,2000 ;Theobald et al.,1997),由此解释了这些肽不能诱导肿瘤免疫的原因。

[0011] 隐性肽较少参与自身耐受过程 (Anderton et al.,2002 ;Boisgérault et al.,2000 ;Cibotti et al.,1992 ;Friedman et al.,2004 ;Gross et al.,2004 ;Moudgil et al.,1999 ;Overwijk et al.,2003 ;Sinha et al.,2004) 并由此能够诱导有效的肿瘤免疫,但前提是它们的免疫原性得到了增强 (Disis et al.,2002 ;Dyall et al.,1998 ;Engelhorn et al.,2006 ;Gross et al.,2004 ;Grossmann et al.,2001 ;Lally et al.,2001 ;Moudgil 和 Sercarz,1994a ;Moudgil 和 Sercarz,1994b ;Palomba et al.,2005)。

[0012] 因为隐性肽不具有免疫原性的原因是其 MHC I 亲和力低下,所以增强隐性肽免疫原性的常见策略是通过氨基酸取代提高其对 MHC I 分子的亲和力。肽对 MHC I 分子的亲和力主要依赖于在明确界定的位点 (初级锚定位点) 存在被称为“初级锚定残基”的残基。这些残基具有 MHC I 等位基因特异性。虽然初级锚定残基的存在通常都是必须的,但这并不足以保证对 MHC I 的高亲和力。已经表明位于初级锚定位点之外的残基 (次级锚定残基) 可

以对肽与MHC I的亲合力发挥有利或不利影响(Parker et al.,1994;Rammensee H et al.,1999)。这些次级锚定残基的存在使得人们有可能对具有初级锚定基序的肽在结合亲和力上存在的巨大可变性做出解释。

[0013] 以增强对MHC I分子的亲和力为目的的氨基酸取代应保持此种优化肽的抗原性。由优化肽产生的CTL应与相应的天然肽发生交叉反应。

[0014] 很多研究小组已经成功地通过提高已经具有免疫原性的肽与HLA-A\*0201的亲合力从而进一步增强了该肽的免疫原性(Bakker et al.,1997;Parkhurst et al.,1996;Sarobe et al.,1998;Valmori et al.,1998)。本发明人先阐述了增强HLA-A\*0201限制性隐性肽的亲合力和免疫原性的一般性策略(Scardino et al.,2002;Tourdot et al.,2000)。

[0015] HLA-B\*0702是表达频率较高的分子(在25%的人群中都有表达)。因此,应该对HLA-B\*0702限制性肿瘤隐性肽进行鉴定和优化以开发出有效的肿瘤疫苗用于HLA-B\*0702产生表达的患者。

[0016] 截止目前,对由HLA-B\*0702提呈的肿瘤肽阐述极少。已经鉴定出衍生自CEA(CEA<sub>632</sub>)(Lu et al.2000)和TERT(TERT<sub>1123</sub>)(Cortez-Gonzales et al.2006)抗原的两种肽,这两种肽对HLA-B\*0702的结合亲和力高并在HLA-B\*0702转基因小鼠和人类细胞的体外试验中都具有免疫原性。这些试验结果表明这两种肽是免疫显性肽。

[0017] 另外鉴定出衍生自MAGE-A1(MAGE-A1<sub>289</sub>)(Luiten et al.,2000)和RU2(由肾细胞瘤表达的新型抗原)(Van den Eynde et al.1999)的两种肽是从癌症患者体内分离的HLA-B\*0702 CTL的靶标。虽然还没有关于这两种肽与HLA-B\*0702的亲合力信息,我们也能认为它们是免疫显性的,原因是癌症患者体内形成的CTL总是靶向免疫显性肽。

[0018] 如在以下试验部分所述,本发明人发现了增强HLA-B\*0702限制性隐性肽的亲合力和免疫原性的一般性策略。

[0019] 第一方面,本发明提供了提高HLA-B\*0702限制性隐性表位(HLA-B\*0702-restricted cryptic epitope)的免疫原性的方法,其包括用丙氨酸(A)取代所述表位的N末端残基,或用亮氨酸(L)取代所述表位的C末端残基的步骤。

[0020] 在下文中,短语“HLA-B\*0702限制性隐性表位”用于表示具有8~11个氨基酸,更优选具有9或10个氨基酸,对HLA-B\*0702具有低亲和力,不具有免疫原性,并具有序列X<sub>1</sub>PX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>(SEQ ID NO:58)的肽,其中P是脯氨酸;X<sub>3</sub>是R(精氨酸)或K(赖氨酸)或H(组氨酸)或M(蛋氨酸);X<sub>1</sub>和X<sub>4</sub>~X<sub>7</sub>分别为任意的氨基酸;X<sub>8</sub>~X<sub>10</sub>分别为任意的氨基酸或者不存在;C末端氨基酸X<sub>11</sub>可以为任意氨基酸,但必须遵从以下条件:如果N末端氨基酸X<sub>1</sub>是A(丙氨酸)那么X<sub>11</sub>不能是L(亮氨酸)也不能是A或I(异亮氨酸)或V(缬氨酸)或M,而如果X<sub>1</sub>是除A以外的氨基酸,那么X<sub>11</sub>是L或A或I或V或M。

[0021] 在本文中,术语“肽”不仅表示通过肽连接键(-CO-NH-)将氨基酸残基连接而成的分子,还表示肽键被修饰的合成假肽或肽模拟物,特别是所述修饰使该肽更能抵抗蛋白水解的作用,前提是这种修饰不会破坏该肽的免疫原性。

[0022] 在本文中,氨基酸残基用其一个字母的代码表示。

[0023] 将本文所使用的词“取代”理解为当所述隐性表位的氨基酸序列不包含合适的氨基酸时,无论使用何种技术,通过所述取代从所述HLA-B\*0702限制性隐性表位序列获得衍

生的肽。例如,可以通过人工肽合成或通过重组表达产生所述肽。

[0024] 可以通过本领域已知的方法测定肽对 HLA-B\*0702 的亲合力,例如通过 Rohrllich 等人 2003 阐述的测定方法。结果表示为与参照肽相比的相对亲合力 (RA)。根据这种方法,当 RA 大于 10 时,可以说这个肽对 HLA-B\*0702 具有低亲合力。因此,RA 大于 10 的肽被认为是隐性肽(或隐性表位)。

[0025] 本文所使用的术语“不具有免疫原性”(non immunogenic)是指在施用到表达 HLA-B\*0702 的受试者(包括 HLA-B\*0702 转基因动物)时,不能引发 HLA-B\*0702 限制性 CTL 免疫应答的肽。

[0026] 在另一个实施方案中,对于第 2 和第 3 位氨基酸残基为 PR 或 PK 或 PH 或 PM 且最后一位残基是 L 或 A 或 I 或 V 或 M 的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位,可以使用 A(丙氨酸)取代 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的第 1 位氨基酸来提高该隐性表位的免疫原性。实际上,当所选择的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的序列是  $X_1PX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  (SEQ ID NO :59) 时,其中所述序列的 N 末端氨基酸  $X_1$  为除 A 以外的任意氨基酸, $X_3$  是 R 或 K 或 H 或 M,C 末端氨基酸  $X_{11}$  是 L 或 A 或 I 或 V 或 M,  $X_4 \sim X_7$  分别为任意氨基酸,  $X_8 \sim X_{10}$  分别为任意氨基酸或者不存在,此时用 A 取代  $X_1$  足以提高该限制性隐性表位的免疫原性。

[0027] 在再一个实施方案中,对于前 3 位氨基酸残基是  $APX_3$  (其中,  $X_3$  是 R 或 K 或 H 或 M) 的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位,可以通过用 L 取代 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的最后一位氨基酸(或通过在其 C 末端加入亮氨酸,前提是在加入亮氨酸后所述表位的氨基酸序列不超过 11 个氨基酸)来提高其免疫原性。实际上,当所选择的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的序列是  $APX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  (SEQ ID NO :60) 时,其中所述序列的  $X_3$  是 R 或 K 或 H 或 M,  $X_4 \sim X_7$  分别为任意氨基酸,  $X_8 \sim X_{10}$  分别为任意氨基酸或者不存在,C 末端氨基酸  $X_{11}$  是除 L 或 A 或 I 或 V 或 M 以外的氨基酸,此时用 L 取代  $X_{11}$  足以提高该限制性隐性表位的免疫原性。

[0028] 在下文中,“优化肽”的表述表示通过以上方法由 HLA-B\*0702 限制性隐性表位衍生而来,且具有免疫原性的肽,并且该肽具有  $APX_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  (SEQ ID No :61) 的通用序列,其中  $X_3$  是 R 或 K 或 H 或 M,  $X_4 \sim X_7$  分别为任意氨基酸,  $X_8 \sim X_{10}$  分别为任意氨基酸或者不存在,C 末端氨基酸  $X_{11}$  是 L 或 A 或 I 或 V 或 M。

[0029] 本发明人已经鉴定出许多 HLA-B\*0702 限制性隐性表位,其中一些公开于下表 I 中。因此,本发明的另一方面是提供选自公开于表 I 的 SEQ ID NO :1 ~ 4 的肽中的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位。

[0030] 表 I :所选择的 HLA-B\*0702 限制性隐性肽

[0031]

抗原	肽	序列号
TERT <sub>444</sub>	DPRRLVQLL	1
HER-2/neu	APRSPLAPS	2
	SPKANKEIL	3
	GPKHSDCLA	4

[0032] 根据本发明方法获取的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位为, 通过用 A(丙氨酸) 取代 HLA-B\*0702 限制性隐性表位 SEQ ID NO:1、3、4 的 N 末端氨基酸而衍生的那些表位, 以及通过用 L(亮氨酸) 取代 HLA-B\*0702 限制性隐性表位 SEQ ID NO:2 的 C 末端氨基酸而衍生的那些表位。

[0033] 因此, 本发明还涉及通过本发明的方法由隐性肽 SEQ ID NO:1 ~ 4 衍生而来的优化肽。优化肽的优选实例为 APRSPLAPL(SEQ ID NO:6)、APKANKEIL(SEQ ID NO:7)、APKHSDCLA(SEQ ID NO:8) 和 APRRLVQLL(SEQ ID NO:5)。

[0034] 本发明还涉及嵌合多肽, 其包含两个、三个或更多个 HLA-B\*0702 限制性隐性表位, 或两个、三个或更多个如上所述具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性表位。在本发明的一个嵌合多肽中, 所述表位可以彼此不同, 或者相同表位可以重复出现数次(2 次、3 次或更多次)。本领域技术人员能够选择任何已知技术来产生此类多肽。例如, 通过化学合成或通过使用基因工程技术来获取所述多肽。

[0035] 本发明的另一个方面是分离的核酸分子, 该分子经设计可以引起如上所述 HLA-B\*0702 限制性隐性表位、具有免疫原性的表位或者嵌合多肽的表达。在本文中, “经设计可以引起……的表达” 表示当将核酸引入到合适的细胞中时使分离自全抗原的所述肽得到表达, 其中所述肽的序列选自所述全抗原(并且在适当的情况下, 为如上所述优化的序列)。表位或嵌合多肽的编码区通常位于由合适启动子控制的多核苷酸中。细菌启动子优选用于细菌内表达, 从而能够在体外或在体内(在特定情况下)产生多肽。可用于在体内直接产生本发明肽或多肽的细菌的一个实例是单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*), 这是可以通过主动吞噬作用进入专门的抗原提呈细胞中的兼性细胞内细菌(Paterson 和 Maciag, 2005)。也可以利用合适的载体直接施用本发明的核酸。在这种情况下, 可以使用组织特异性启动子、强组成型启动子或内源启动子以控制所述肽的表达。合适的载体系统包括裸 DNA 质粒、促进递送的脂质体组合物以及引起瞬时表达的病毒载体。示例性实例为腺病毒载体或牛痘病毒载体以及疱疹病毒家族载体(尤其是非复制的形式)。

[0036] 本发明的另一个实施方案是药物组合物, 该组合物至少包含作为活性组分的上述 HLA-B\*0702 限制性隐性表位, 或者衍生自上述 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的具有免疫原性的表位多肽, 或者本发明的嵌合多肽, 或者编码这些肽的核酸, 和/或携带所述核酸的载体。药物组合物的配制将根据当前的标准和技术进行。旨在施用于人类的药物将在完全无菌的条件下配制, 其中将活性成分与等渗溶液或其它适合于所推荐的治疗性应用的药用载体(carrier) 组合。合适的配制方法和技术通常阐述于最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences(Maack Publishing Co, Easton PA)。

[0037] 特别地, HLA-B\*0702 限制性隐性表位, 或者衍生自所述 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的具有免疫原性的表位多肽, 或者携带数个所述具有免疫原性的表位或隐性表位的嵌合多肽, 或者包含于或不包含于载体中的编码这些肽的核酸, 都可以用于制备用于预防性或治疗性免疫治疗, 尤其是用于抗病毒或抗肿瘤免疫治疗的组合物。

[0038] 在一个特定实施方案中, 本发明的药物组合物是疫苗。在这种情况下, 本发明的药物组合物可以与佐剂组合以增强免疫应答。典型的佐剂包括如弗氏不完全佐剂的油乳剂和如明矾的粘性表面(adherent surfaces)。特别有用的是尤其通过 TLR(例如细菌 DNA 或源

自细菌细胞膜的蛋白质)来募集并激活树突细胞的佐剂或帮助诱发细胞毒 T 细胞的佐剂。增强免疫应答或者促进癌细胞的凋亡或清除的其它因子也可以包含在本组合物中。

[0039] 本发明的具有免疫原性的组合物的多个单位剂量和 / 或各种组合可单独包装也可包装在一起配售。每种组合物或每套组合物(例如以下阐述的试剂盒)都配有书面说明书(以宣传材料或包装内附的形式),该说明书用于说明所述组合物或组合在引发免疫应答和 / 或癌症治疗中的应用。

[0040] 在先前的专利申请(PCT/EP2006/005325)中,申请人阐述了接种疫苗的方案,该方案能够引发并保持靶向隐性表位的 T 细胞应答。PCT/EP2006/005325 中报道的结果证明注射与隐性表位相对应的天然肽,然后用该天然肽的同族优化肽进行疫苗接种,就能够保持由所述优化肽引发的免疫应答。

[0041] 因此根据本发明,HLA-B\*0702 限制性隐性表位可以用于制备药物组合物,用于保持由该隐性表位的同族优化肽引发的 CTL 免疫应答。也可以将具有免疫原性的肽用于制备引发抗 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的 CTL 免疫应答的药物组合物,其中所述免疫原性肽具有衍生自 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的 HLA-B\*0702 限制性优化表位序列。本发明还包含给患者接种抗肿瘤或抗病毒抗原的疫苗的方法,其中所述方法包括:第一步,用与所述抗原的天然 HLA-B\*0702 限制性隐性表位同族的优化肽进行疫苗接种;第二步,用所述天然肽进行疫苗接种。在这种方法中,可以使用嵌合多肽而不是单表位肽进行第一步和 / 或第二步,其中该嵌合多肽包含两个、三个或更多个上述优化肽或隐性肽。

[0042] 本发明还涉及试剂盒,该试剂盒包含以单独制剂形式存在的第一肽和第二肽,其中所述第一肽具有 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的序列,所述第二肽是具有免疫原性的同族 HLA-B\*0702 限制性表位。可以作为本发明试剂盒的一部分的肽的实例为可以构成第一肽的 SEQ ID NO :1 ~ 4,然后通过上述提高其免疫原性的方法从所述第一肽衍生出第二肽。

[0043] 本发明的其它试剂盒至少包含嵌合多肽。本发明设计了此类试剂盒的数个变体:在第一个实施方案中,试剂盒包含以单独制剂形式存在的第一嵌合多肽和第二嵌合多肽,其中所述第一嵌合多肽包含两个、三个或更多个 HLA-B\*0702 限制性隐性表位,所述第二嵌合多肽是具有免疫原性的对应于其同族的 HLA-B\*0702 限制性嵌合多肽(即,所述第二嵌合多肽包含的具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性优化表位与包含于第一嵌合多肽的隐性表位为同族)。在第二个实施方案中,试剂盒包含第一嵌合多肽和以一个或数个其它单独制剂形式存在的肽,其中所述第一嵌合多肽包含两个、三个或更多个 HLA-B\*0702 限制性隐性表位,所述以一个或数个其它单独制剂形式存在的肽对应于与所述第一嵌合多肽包含的隐性表位同族且具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性优化表位。在第三个实施方案中,试剂盒包含对应于不同 HLA-B\*0702 限制性隐性表位的两个、三个或更多个肽,其中所述肽混合于单个制剂中,或者分别存在于数个制剂中,还包含以单独制剂存在的,包含与所述隐性肽同族的、具有免疫原性的 HLA-B\*0702 限制性优化表位的嵌合多肽。

[0044] 在以下关于本发明试剂盒的阐述中,提及的仅是肽(天然的或优化的肽),可以理解,可以包含在试剂盒中的可以是嵌合多肽(包含天然隐性表位或优化表位)而不仅是单表位的肽。

[0045] 在本发明的特定实施方案中,试剂盒是接种疫苗试剂盒,其中所述第一肽(天然肽)和第二肽(同族优化肽)以单独的接种疫苗单位剂量(vaccinationdose)的形式存在。

在优选实施方案中,接种疫苗试剂盒包含 2 或 3 个单位剂量 (dose) 的优化肽以及 3、4、5 或 6 个单位剂量的天然肽。本发明的一个具体接种疫苗试剂盒适合于 6 次注射第一接种疫苗序列,其包含 2 或 3 个单位剂量的优化肽以及 4 或 3 个单位剂量的天然肽。在长期疾病的情况下,优选通过常规的免疫记忆功能保持首次接种疫苗后获取的免疫力。这可以通过例如每 1.5 至 6 个月进行的注射来完成。因此,包含至少 2 个单位剂量且多达 40 至 50 个单位剂量的天然肽的补充试剂盒 (complementary kit) 也可以是本发明的一部分。接种疫苗试剂盒也可以包含 2 ~ 3 个单位剂量的优化肽,以及 3 ~ 40 或达 50 个单位剂量的天然肽。当然,所述试剂盒中具有所述天然肽和优化肽如上所述。

[0046] 每个单位剂量包含 0.5 ~ 10mg 肽,优选 1 ~ 5mg 肽,或 1 ~ 20mg 多肽。在优选实施方案中,各个单位剂量经配制以用于皮下注射。例如,每个单位剂量都可以配制在 0.3 ~ 1.5ml 乳剂中,所述乳剂是用 Montanide 作为佐剂使水溶液乳化的使用。技术人员可以选择任意其它佐剂来取代 Montanide (或者和 Montanide 一起使用)。在一个具体实施方案中,所述单位剂量以水溶液的形式存在。或者,所述剂量可以以冻干肽的形式存在,用于即时制备的注射用液体溶液。所述试剂盒的其它可能成分是在施用之前加入到肽组合物的一种或多种辅料,以及阐述如何使用所述试剂盒的介绍。

[0047] 通过以下附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0048] 图 1 :HLA-B \* 0702 限制性肽的免疫原性。测试 CTL 针对负载所示肽的 RMA-B7 靶标的作用。

[0049] 图 2 :HLA-B \* 0702 隐性优化肽的免疫原性。测试 CTL 针对负载所示肽的 RMA-B7 靶标的作用。

[0050] 图 3 :HLA-B \* 0702 转基因小鼠中 HLA-B \* 0702 Her2/neu<sub>1069L9</sub> (A) 和 Her2/neu<sub>1069</sub> (B) 优化肽在体内的免疫原性。测试 CTL 针对负载所示肽的 RMA-B7 靶标的作用。把所诱导的 CTL 群稀释 3 (1)、10 (2)、30 (3) 和 100 (4) 倍。

[0051] 图 4 :TERT<sub>4</sub> 在 HLA-B7 小鼠和健康供体中诱导 TERT 特异性 CTL。(A) TERT<sub>4</sub> 在 HLA-B \* 0702 转基因小鼠中的免疫原性。测试 CTL 针对负载剂量降低的 TERT<sub>4</sub> 肽的 RMA-B7 靶标的作用。(B) TERT<sub>4</sub> 特异性小鼠 CTL 对内源性 TERT 的识别。测试 CTL 针对 HLA-B\*0702 和 TERT 转染的 COS 细胞的作用。(C) 人的 TERT<sub>4</sub> 特异性 CTL 的诱导。利用所示效应物 / 靶标比 (左图) 测试 CTL 针对负载 TERT<sub>4</sub> 肽 (■) 或无关肽 (●) 的 T2-B7 靶标的作用,以及针对 HLA-B\*0702 阳性且 TERT 阳性的 SK-MES-1 (■)、HBL-100 (●), 和 HLA-B\*0702 阴性且 TERT 阳性的 SW-480 (□)、HSS (○) 人肿瘤细胞系的作用 (右图)。

[0052] 图 5 :TERT<sub>444</sub> 特异性小鼠 CTL 对内源性 TERT 的识别。(A) 测试 CTL 针对负载所示剂量降低的 TERT<sub>444</sub> 或 TERT<sub>444A1</sub> 肽的 RMA-B7 靶标的作用。(B) 测试 CTL 针对所示用 HLA-B\*0702 和 / 或 TERT 转染的 COS 细胞的作用。

[0053] 图 6 :TERT<sub>444A1</sub> 特异性人 CTL 的诱导。测试 CTL 针对负载所示肽的 T2-B7 靶标的作用。通过 PMA/ionomycin 处理获得 CTL 的最大激活。

[0054] 实施例

[0055] 用以下材料和方法完成所述实施例:

[0056] 转基因小鼠 HLA-B7 H-2 I 型敲除小鼠如前述 (Rohrlich et al., 2003)。

[0057] 细胞转染 HLA-B\*0702 的小鼠 RMA-B7 细胞和人 T2-B7 细胞如前述 (Rohrlich et

al., 2003)。COS-7 与 WEHI-164c clone 13 细胞由 F. Jotereau (INSERM 463, Nantes, 法国) 提供。使用 HLA-B\*0702 阳性的 SK-MES-1 (肺癌)、HBL-100 (乳腺癌) 以及 HLA-B\*0702 阴性的 SW-480 (结肠癌) 和 HSS (黑素瘤) 细胞系作为人 CTL 的靶标。所有细胞系都生长在补充有 10% FCS 的 RPMI1640 培养基中。

[0058] 肽和质粒通过 Epytop (Nîmes, 法国) 合成肽。HLA-B\*0702 质粒由 Dr. Lemonnier (Institut Pasteur, 法国巴黎) (Rohrlich et al., 2003) 提供, TERT 质粒由 Dr Weinberg (MIT, Boston, MA) (Meyerson et al, 1997) 提供。

[0059] 测量肽对 HLA-B \* 0702 的相对亲和力所使用的方法如前述 (Rohrlich et al., 2003)。简要而言, 将 T2-B7 细胞和浓度在  $100 \mu\text{M} \sim 0.1 \mu\text{M}$  范围内的肽一起在  $37^\circ\text{C}$  孵育 16 小时, 然后用 ME-1 单克隆抗体 (mAb) 染色以对 HLA-B\*0702 的表面表达进行定量。以相对于  $100 \mu\text{M}$  参考肽  $\text{CMV}_{265-274}$  (R10V ; RPHERNGFTV, SEQ ID NO :9) 所得染色的百分比来计算各个肽浓度的 HLA-B\*0702 特异性染色。相对亲和力 (RA) 的测定 :  $\text{RA} = (\text{诱导 } 20\% \text{ HLA-B*0702 表达的每个肽的浓度}) / (\text{诱导 } 20\% \text{ HLA-B*0702 表达的参考肽的浓度})$ 。

[0060] 在 HLA-B \* 0702 转基因小鼠体内诱导 CTL 用在弗氏不完全佐剂 (IFA) 中乳化的  $100 \mu\text{g}$  肽皮下注射小鼠, 其中所述佐剂中含  $150 \mu\text{g}$   $\text{I-A}^b$  限制性  $\text{HBVcore}_{128}$  T 辅助性表位 (TPPAYRPPNAPIL, SEQ ID NO :10)。11 天后, 用肽 ( $10 \mu\text{M}$ ) 在体外刺激  $5 \times 10^7$  个脾细胞。在培养的第 6 天, 检测大量应答群体的特异性细胞毒性。

[0061] COS-7 转染细胞上的肽处理试验将  $2.2 \times 10^4$  个猿猴 COS-7 细胞铺在含 DMEM+10% FCS 的 96 孔平底平板中, 每个浓度一式三份。18 小时后, 利用 DEAE Dextran 向细胞转染 DNA 质粒 (每种质粒 100ng)。转染 4 小时后, 加入 PBS+10% DMSO 持续 2 分钟。将转染的 COS 细胞在 DMEM+10% FCS 中孵育 40 小时, 然后用于在  $\text{TNF } \alpha$  分泌试验中刺激小鼠 CTL。

[0062]  $\text{TNF } \alpha$  分泌试验在第 4 天将转染的 COS-7 细胞悬浮在  $50 \mu\text{l}$  RPMI+10% FCS 中并用作刺激细胞。然后加入含  $5 \times 10^4$  个小鼠 T 细胞的  $50 \mu\text{l}$  RPMI+10% FCS, 并孵育 6 小时。每个条件进行三次重复。收集  $50 \mu\text{l}$  上清用于测量  $\text{TNF } \alpha$ 。制备标准稀释液  $50 \mu\text{l}$ , 在该稀释液中  $\text{TNF } \alpha$  的终剂量为  $10^4 \sim 0 \text{pg/ml}$ 。向所述上清和标准稀释液中都加入含  $3 \times 10^4$  个  $\text{TNF } \alpha$  敏感性 WEHI-164c13 细胞的  $50 \mu\text{l}$  溶液。将其在  $37^\circ\text{C}$  孵育 16 小时。通过 MTT 比色法 (Espevik 和 Nissen-Meyer, 1986) 计算对细胞增殖的抑制。

[0063] 由人 PBMC 产生 CTL 通过白细胞去除法从健康的 HLA-B\*0702 志愿者收集 PMBC。由培养 7 天的贴壁细胞 ( $2 \times 10^6$  个细胞 /ml) 产生树突细胞 (DC), 其中所述贴壁细胞培养在含  $500 \text{IU/ml}$  GM-CSF 和  $500 \text{IU/ml}$  IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的完全培养基 (补充有 10% 热灭活的人 AB 血清、 $2 \mu\text{M}$  L- 谷氨酰胺和抗生素的 RPMI-1640) 中。在第 7 天, 用  $10 \mu\text{M}$  肽冲击 DC 2 小时; 向该培养物中加入成熟试剂  $100 \text{ng/ml}$  的 Poly I:C (Sigma, Oakville, Canada) 和  $2 \mu\text{g/ml}$  的抗 CD40mAb (clone G28-5, ATCC, Manassas, VA), DC 在  $37^\circ\text{C}$  孵育过夜或达 48 小时。然后对成熟的 DC 进行照射 (3500 拉德)。根据制造商的说明利用 CD8 微珠 (MicroBeads, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 通过阳性选择纯化  $\text{CD8}^+$  细胞。在含补充有  $1000 \text{IU/ml}$  IL-6 和  $5 \text{IU/ml}$  IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的完全培养基的 96 孔圆底平板中, 使用被肽冲击的  $2 \times 10^4$  个 DC 刺激  $2 \times 10^5$  个  $\text{CD8}^+$  细胞 +  $6 \times 10^4$  个  $\text{CD8}^-$  细胞。从第 7 天开始, 在存在  $20 \text{IU/ml}$  IL-2 (Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, CA) 和  $10 \text{ng/ml}$  IL-7 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的情况下用负载肽的 DC 再刺激培养物, 每

周一。在第三次体外再刺激后,检测大量细胞培养物的细胞毒性 (TERT<sub>4</sub>) 或 IFN  $\gamma$  细胞内染色 (TERT<sub>444A1</sub>)。

[0064] 细胞毒性检测用 100  $\mu$  Ci Cr<sup>51</sup> 标记靶标 60 分钟,将其铺在 96 孔 V 底平板中 (每孔 100  $\mu$  L RPMI 1640 培养基中含  $3 \times 10^3$  细胞),如果需要,用肽 (1  $\mu$  M) 在 37°C 冲击 2 小时。然后向孔中加入效应物并在 37°C 孵育 4 小时。特异性裂解的百分数计算为:裂解百分数 = (试验释放 - 自发释放) / (最大释放 - 自发释放)  $\times$  100。

[0065] IFN  $\gamma$  细胞内染色在存在 20  $\mu$  g/ml Brefeldin-A (Sigma, Oakville, Canada) 的情况下,使 T 细胞 ( $10^5$  个) 与负载刺激肽的  $2 \times 10^5$  个 T2 细胞一起孵育。6 小时后洗涤上述细胞并用包含结合有 r-藻红蛋白的抗 CD8 抗体 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) 的 PBS 溶液在 4°C 染色 25 分钟,再次洗涤,并用 4% PFA 固定。然后使用含 0.5% BSA 和 0.2% 皂角苷 (Sigma, Oakville, Canada) 的 PBS 使细胞透性化,并用结合有别藻蓝蛋白的抗 IFN  $\gamma$  mAb (PharMingen, Mississauga, Canada) 在 4°C 标记 25 分钟,然后用 FACSCalibur® 流式细胞仪进行分析。

[0066] 实施例 1:肽的亲合力

[0067] 检测具有 HLA-B\*0702 特异性锚定基序 (即 P2,并优选 C 末端位点为 L/V, Sidney et al., 1996) 的 8 个肽,即 Hsp70 (Hsp70<sub>115</sub>、Hsp70<sub>137</sub>、Hsp70<sub>397</sub>)、TERT (TERT<sub>4</sub> 和 TERT<sub>444</sub>) 以及 MAGE-A (MAGE-A<sub>121.1</sub>、MAGE-A<sub>121.2</sub> 和 MAGE-A<sub>121.4</sub>) 抗原,与 HLA-B\*0702 的结合能力。仅 TERT<sub>4</sub> 以高亲合力与 HLA-B\*0702 结合,其它 7 个肽结合力非常弱或不结合 (表 II)。这证明锚定基序的存在不足以保证与 HLA-B\*0702 的高结合亲合力。考虑到上述 7 种肽的低亲合力,认为 Hsp70<sub>115</sub>、Hsp70<sub>137</sub>、Hsp70<sub>397</sub>、TERT<sub>444</sub>、MAGE-A<sub>121.1</sub>、MAGE-A<sub>121.2</sub>、MAGE-A<sub>121.4</sub> 是隐性肽。

[0068] 表 II:肽对 HLA-B\*0702 的亲合力

[0069]

	肽	序列	RA	序列号
1	Hsp70 115	YP EEISSMVL	>10	11
	Hsp70 115A1	Apeeissmvl	>10	12
2	Hsp70 137 (10)	YPVTNAVITV	>10	13
3	Hsp70 397	APLSLGLET	>10	14
4	TERT4	APRCRAVRSL	0.74	15
5	TERT444	DPRRLVQLL	>10	1
	TERT 444A1	APRRLVQLL	1.4	5
6	MAGE-A121.1	EPVTKAEML	>10	16
	MAGE-121.1 A1	APVTKAEML	>10	17
7	MAGE-A121.2	EPFTKAEML	>10	18
8	MAGE-A121.4	EPITKAEIL	>10	19

[0070] 实施例 2:所选择的肽的免疫原性

[0071] 检测了具有低亲和力的肽 Hsp<sub>137</sub>、Hsp<sub>115</sub>、Hsp<sub>397</sub>、TERT<sub>444</sub> 和具有高亲和力的肽 TERT<sub>4</sub> 在 HLA-B\*0702 转基因小鼠中诱导特异性 CTL 免疫应答的能力。仅具有高亲和力的 TERT<sub>4</sub> 具有免疫原性,这也证明肽的免疫原性与其对 HLA 的亲合力高度相关(图 1)。

[0072] 实施例 3:增强具有低亲和力肽的亲合力

[0073] 由于所有这些隐性肽都具有有利的初级锚定基序,因此增强其亲合力是使它们具有免疫原性的先决条件。需要鉴定不利的次级锚定基序并用有利的基序对其进行取代。然而这些取代必须保持与 TCR 相互作用的肽片段(第 4 至第 8 位)的构象。因此,关注点就集中到次级锚定位第 1 位和第 3 位:第 1 位是脂肪族氨基酸时是有利基序(Sidney, Southwood et al., 1996)。然而,第 1 位是 Y(酪氨酸)的肽 Hsp70<sub>115</sub> 和 Hsp70<sub>137</sub> 不具有结合力。另外,用 A(丙氨酸)取代第 1 位的氨基酸对该位点也是有利的。(Parker et al, 1994) 增强了肽 TERT<sub>444</sub> 而没有增强肽 Hsp70<sub>115</sub> 和 MAGE-A<sub>121.1</sub> 的亲合力(表 II)。这表明仅在第 1 位和锚定位第 2 位和第 9/10 位存在有利氨基酸不能保证所有肽的高结合亲合力。另一方面,已经阐述了带正电荷的肽(R/H/K)在第 3 位是有利的(Sidney et al., 1996),鉴定的 26 个衍生自肿瘤和 HIV 的具有免疫原性的肽中有 10 个在第 3 位是 R/K/H(表 III)。

[0074] 表 III:衍生自肿瘤和 HIV 的 HLA-B\*0702 限制性表位

[0075]

抗原	序列	序列号	参考
NY-ESO-1	APRGVRMAV	20	Slager et al, 2004
ICE	SPRWWPTCL	21	Ronsin et al., 1999
RAGE-1	SPSSNRIRNT	22	Gaugler et al., 1996
RU2AS	LPRWPPPQL	23	Van Den Eynde et al., 1999
RBAF500	RPHVPESAF	24	Lennerz et al., 2005
SSX2 融合蛋白	QPRYGYDQIM	25	Worley et al, 2001
HIVp17	RPGGKKRYKL	26	HIV Molecular Immunology Database (由美国洛斯阿拉莫斯国家实验室 (Los Alamos National Security, LLC) 为美国能源部国家核安全管理局 (U.S. Energy's National Nuclear Security Administration) 运行的 HIV 分子免疫学数据库) <a href="http://hivweb.lanl.gov/content/immunology/tables/ctl_summary.html">http://hivweb.lanl.gov/content/immunology/tables/ctl_summary.html</a>
HIVp24	SPRTLNAWV	27	
HIVp24	HPVHAGPIA	28	
HIVp24	PPIPVGEIY	29	
HIVp24	GPGHKARVL	30	
HIV-RT	SPIETVPVKL	31	
HIV-RT	GPKVKQWPLT	32	
HIV-RT	SPAIFQSSM	33	
HIV-RT	IPLTEEAEL	34	
HIV-RT	QPKSESELV	35	
HIV-Vif	HPRISSEVHI	36	
HIV-Vif	KPPLPSVKKL	37	
HIV-Vif	FPRTWLHGL	38	
HIVgp160	KPCVKLTPLC	39	
HIVgp160	KVVSTQLLL	40	
HIVgp160	RPWNNTRKSI	41	
HIVgp160	IPRRIRQGL	42	
HIVnef	FPVTPQVPL	43	
HIVnef	TPQVPLRPM	44	

[0076] 根据上述观察结果,具有序列 APX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub> (SEQ ID N 61) 的肽应该对 HLA-B\*0702 具有高亲和力。这与表 IV 中显示的结果一致。具有上述序列的所有 18 个肽都具有高亲和力且 / 或在 HLA-B\*0702 转基因小鼠中具有免疫原性。

[0077] 表 IV :APX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>HLA-B \* 0702 限制性肽的亲合力和免疫原性

[0078]

序列	序列号	RA	免疫原性
APRRLVQLL	5	+	+
APRSPLAPL	6	++	+
APKANKEIL	7	ND	+
APKHSDCLA	8	ND	+
APRCRAVRSL	15	+	+
APRMHCAVDL	45	++	+
APRVSIRLPL	46	++	ND
APREYVNAL	47	+	+
APRGVPQIEL	48	ND	+
APRALVETL	49	+	+
APRMPEAAL	50	ND	+
APRRRLGCEL	51	+	+
APRPWTPCL	52	+	+
APRAS SPLL	53	ND	+
APRQLGREL	54	ND	+
ApReissmv1	55	+	+
APRSLGLEL	56	++	+
APRTKAEML	57	+	+

[0079]  $- = RA > 10, + = 1 < RA < 10, ++ = RA < 1$ ; 按照实施例 2 测定免疫原性; + : 表示至少在一只 HLA-B\*0702 转基因小鼠中产生免疫应答, ND : 未测定

[0080] 实施例 4: 亲和力增强的肽在体内的免疫原性以及天然对应物的识别

[0081] 用所选择的肽对 HLA-B7 转基因小鼠进行疫苗接种, 11 天后, 用该肽在体外刺激上述小鼠的脾细胞。

[0082] 因此在本实施例中, 在第 1 位 (用 A 取代此位点的氨基酸) 和 / 或第 3 位 (用 R 取代此位点的氨基酸) 对 Hsp70<sub>115</sub>、Hsp70<sub>397</sub> 和 TERT<sub>444</sub> 进行修饰。对于肽 Hsp70<sub>397</sub>, 另外在 C 末端位点引入了额外的修饰 (用 L 取代 T)。修饰的肽, 即 Hsp70<sub>115A1R3</sub> (SEQ ID NO : 55)、

Hsp70<sub>397R3L9</sub> (SEQ ID NO :56)、TERT<sub>444A1</sub> (SEQ ID NO :5) 对 HLA-B\*0702 具有强的亲和力 (表 IV), 并且在大多数接种疫苗的小鼠中都可以诱导免疫应答 (图 2)。但是, 对于除 TERT<sub>444A1</sub> 以外的所有肽产生的 CTL 都识别优化肽而不识别相应天然肽 (图 2)。这强烈表明用 R 取代第 3 位氨基酸可改变与 TCR 相互作用并保证 TCR 交叉识别的肽片段构象。

[0083] 由于 a) 具有 APX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub> 的所有被检测肽都有高亲和力并且具有免疫原性 (表 IV 和图 1, 图 2), 并且 b) 用 R 取代第 3 位氨基酸可以破坏天然肽的交叉识别, 本发明人选择了在第 2 位和第 3 位分别是 P 和 R 的天然肽, 并且如果末位氨基酸是有利的 (L、A、I、V 或 M) 则用 A 取代第 1 位的氨基酸。考虑到第 3 位对 HLA-B\*0702 限制性肽的亲和力和 CTL 识别的重要性, 发明人选择了具有 X<sub>1</sub>PX<sub>3</sub> (其中 X<sub>1</sub> 是任意氨基酸, X<sub>3</sub> 是 K、R、H 或 M; 这些氨基酸在 3 位为有利残基) 的序列, 并且在 C 末端位点具有有利氨基酸 (A/I/L/V) 的肽。通过用 A 取代第 1 位的残基对具有该序列和对 HLA-B\*0702 具有低亲和力的肽进行修饰, 如 TERT<sub>444</sub>、Her-2/neu<sub>760</sub> 和 Her-2/neu<sub>246</sub>。发明人还选择了具有 APX<sub>3</sub> (其中 X<sub>3</sub> 为 K、R、H 或 M) 的序列并且在 C 末端位点为非有利残基 (即, 非 L、A、I、V 或 M 氨基酸) 的肽。通过用 L 取代 C 末端位点的残基对具有此类序列并对 HLA-B\*0702 具有低亲和力的肽进行修饰, 如 Her-2/neu<sub>1069</sub>。所有这些修饰肽对 HLA-B\*0702 都具有强的亲和力。

[0084] 实施例 5: 优化肽的免疫原性以及天然对应物的交叉识别

[0085] 天然肽 Her2/neu<sub>246</sub>、Her2/neu<sub>760</sub>、Her2/neu<sub>1069</sub> 和 TERT<sub>444</sub> 不具有免疫原性, 但是优化肽在 HLA-B\*0702 转基因小鼠中具有免疫原性。另外, 被所有这些优化肽诱导的 CTL 能够与相应的天然肽进行交叉反应 (图 3 和表 V)

[0086] 表 V: 天然的和优化的 HLA-B\*0702 限制性肽的免疫原性

[0087]

肽	序列	序列号	免疫原性	相应天然肽的交叉识别
TERT <sub>444</sub>	DPRRLVQLL	1	-	
TERT <sub>444A1</sub>	APRRLVQLL	5	+	+
Her2/neu <sub>760</sub>	SPKANKEIL	3	-	
Her2/neu <sub>760A1</sub>	APKANKEIL	7	+	+
Her2/neu <sub>246</sub>	GPKHSDCLA	4	-	
Her2/neu <sub>246A1</sub>	APKHSDCLA	8	+	+
Her2/neu <sub>1069</sub>	APRSPLAPS	2	-	
Her2/neu <sub>1069L9</sub>	APRSPLAPL	6	+	+

[0088] + : 在免疫原性和天然肽的交叉识别中表示该肽可在至少一只 HLA-B\*0702 转基因小鼠中诱导特异性应答, 能够识别相应的天然肽。

[0089] 总之, 本发明人阐述了优化 HLA-B\*0702 限制性隐性肽的免疫原性 (和亲和力) 的

方法。该方法由以下组成 :a) 用 A 取代所有肽第 1 位的残基,其中所述肽包含  $X_1PX_3$  序列 (其中  $X_1$  是除 A 的任意氨基酸,  $X_3$  是 R 或 K 或 H 或 M), 在 C 末端位点为有利氨基酸 (即, L 或 A 或 I 或 V 或 M) 并且对 HLA-B\*0702 具有低亲和力 ;或者 b) 用 L 取代肽 C 末端位点的残基,其中所述肽包含  $APX_3$  序列 ( $X_3$  如上定义), 在 C 末端位点为非有利残基 (即, 除 L 或 A 或 I 或 V 或 M 的氨基酸) 并且对 HLA-B\*0702 具有低亲和力。

[0090] 实施例 6 :TERT<sub>4</sub> 免疫显性肽诱导 TERT 特异性 CTL

[0091] 然后,用 TERT<sub>4</sub>(SEQ ID NO :15) 免疫 HLA-B7 转基因小鼠,11 天后用所述肽在体外刺激其脾细胞。产生的 CTL 可杀死其中所负载的 TERT<sub>4</sub> 肽浓度降低的 RMA-B7 靶标 (图 4A)。获取负载 TERT<sub>4</sub> 的靶标的半数最大裂解浓度为 1.5nM (图 4A)。然后检测 CTL 识别表达 HLA-B\*0702 和内源性 TERT 的 COS-7 细胞的能力。表 4B 的结果表明 CTL 识别同时转染了 HLA-B\*0702 和 TERT 的 COS-7 细胞,但不识别转染了 HLA-B\*0702 或 TERT 的 COS-7 细胞,这证明 TERT<sub>4</sub> 显性肽是内源性 TERT 经天然加工而得的 HLA-B\*0702 限制性表位。

[0092] 另外,用负载 TERT<sub>4</sub> 肽的自体树突细胞在体外刺激来自健康供体的 CD8 细胞。4 次刺激后,检测 CTL 针对负载 TERT<sub>4</sub> 的 T2-B7 靶标的细胞毒性。检测了 3 个供体,在其中两个供体中诱导了 CTL。图 4C 显示了来自一个应答供体的结果。CTL 将提呈 TERT<sub>4</sub> 的 T2-B7 靶标杀死而未杀死提呈无关 Nef 肽的 T2-B7 (左图)。令人感兴趣的是,CTL 杀死 HLA-B\*0702 TERT+SK-MES-1 和 HBL-100 而非 HLA-B\*0702-TERT+SW-480 和 HSS 人肿瘤细胞系,这证明了 TERT<sub>4</sub> 表位的 HLA-B\*0702 限制性提呈和内源性处理 (右图)。

[0093] 实施例 7 :由 TERT<sub>444A1</sub> 肽诱导的 CTL 识别内源性 TERT

[0094] 检测 TERT<sub>444A1</sub>(SEQ ID NO :5) 诱导能够识别内源性 TERT 的 CTL 的能力以及在健康供体中诱导 CTL 的能力 (实施例 6)。然后,用 TERT<sub>444A1</sub> 免疫 HLA-B\*0702 转基因小鼠,并在 11 天后用 TERT<sub>444</sub> 肽 (SEQ ID NO :1) 在体外刺激其脾细胞。产生的 CTL 可杀死负载浓度降低的 TERT<sub>444A1</sub> 和 TERT<sub>444</sub> 肽的 RMA-B7 靶标 (图 4A)。获取负载 TERT<sub>444</sub> 和负载 TERT<sub>444A1</sub> 的靶标半最大裂解的浓度分别为 5.5nM 和 1nM (图 5A)。然后检测 CTL 识别表达 HLA-B\*0702 和内源性 TERT 的 COS-7 细胞的能力。表 5B 的结果表明 CTL 识别同时转染了 HLA-B\*0702 和 TERT 的 COS-7 细胞,但不识别转染了 HLA-B\*0702 或 TERT 的 COS-7 细胞,这证明 TERT<sub>444</sub> 是内源性 TERT 经天然加工而得的 HLA-B\*0702 限制性隐性表位。

[0095] 实施例 8 :TERT<sub>444A1</sub> 刺激来自健康供体的 CTL

[0096] 用负载 TERT<sub>444A1</sub> 肽的自体树突细胞在体外刺激来自健康供体的 CD8 细胞。4 次刺激后,增殖细胞被分成 4 组。随后检测用负载优化 TERT<sub>444A1</sub> 或天然 TERT<sub>444</sub> 的 T2-B7 细胞刺激时,每组细胞内 IFN $\gamma$  的产生。图 6 显示了来自 D5609 应答供体的结果。在用负载 TERT<sub>444</sub> 或 TERT<sub>444A1</sub> 的 T2B7 细胞刺激第 2 组和第 4 组后,检测这两组中产生 IFN $\gamma$  的 CTL (图 6)。

[0097] 参考文献

[0098] Anderton, S. M., Viner, N. J., Matharu, P., Lowrey, P. A., and Wraith, D. C. (2002). Influence of a dominant cryptic epitope on autoimmune T cell tolerance. *Nat Immunol* 3,175-181.

[0099] Bakker, A. B., van der Burg, S. H., Huijbens, R. J., Drijfhout, J. W., Melief, C. J., Adema, G. J., and Figdor, C. G. (1997). Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild-type

epitope. *Int J Cancer* 70,302-309.

[0100] Boisgérault, F., Anosova, N. G., Tam, R. C., Illigens, B. M., Fedoseyeva, E. V., and Benichou, G. (2000). Induction of T-cell response to cryptic MHCdeterminants during allograft rejection. *Hum Immunol* 61,1352-1362.

[0101] Bowne, W. B., Srinivasan, R., Wolchok, J. D., Hawkins, W. G., Blachere, N. E., Dyall, R., Lewis, J. J., and Houghton, A. N. (1999). Coupling and uncoupling of tumor immunity and autoimmunity. *J Exp Med* 190,1717-1722.

[0102] Cibotti, R., Kanellopoulos, J. M., Cabaniols, J. P., Halle-Panenko, O., Kosmatopoulos, K., Sercarz, E., and Kourilsky, P. (1992). Tolerance to a self-protein involves its immunodominant but does not involve its subdominant determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89,416-420.

[0103] Colella, T. A., Bullock, T. N., Russell, L. B., Mulliins, D. W., Overwijk, W. W., Luckey, C. J., Pierce, R. A., Restifo, N. P., and Engelhard, V. H. (2000). Self-tolerance to the murine homologue of a tyrosinase-derived melanoma antigen: implications for tumor immunotherapy. *J Exp Med* 191,1221-1232.

[0104] Cortez-Gonzalez, X., Sidney, J., Adotevi O., Sette, A., Millard, F., Lemonnier, F., Langlade-Demoyen, P., Zanetti, M. (2006). Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTRT. *Int Immunol* 18,1707-1718.

[0105] Disis, M. L., Gooley, T. A., Rinn, K., Davis, D., Piepkorn, M., Cheever, M. A., Knutson, K. L., and Schiffman, K. (2002). Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol* 20,2624-2632.

[0106] Dyall, R., Bowne, W. B., Weber, L. W., LeMaoult, J., Szabo, P., Moroi, Y., Piskun, G., Lewis, J. J., Houghton, A. N., and Nikolic-Zugic, J. (1998). Heteroclitic immunization induces tumor immunity. *J Exp Med* 188,1553-1561.

[0107] Engelhorn, M. E., Guevara-Patino, J. A., Noffz, G., Hooper, A. T., Lou, O., Gold, J. S., Kappel, B. J., and Houghton, A. N. (2006). Autoimmunity and tumor immunity induced by immune responses to mutations in self. *Nat Med* 12,198-206.

[0108] Espevik, T., and Nissen-Meyer, J. (1986). A highly sensitive cell line, WEHI164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95,99-105.

[0109] Friedman, R. S., Spies, A. G., and Kalos, M. (2004). Identification of naturally processed CD8 T cell epitopes from prostein, a prostate tissue-specific vaccine candidate. *Eur J Immunol* 34. 1091-1101.

[0110] Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J. P., Van der Spek, C. W., Patard, J. J., Boon, T., Schrier, P., Van den Eynde, B. J. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. (1996) *Immunogenetics* 44,323-30

[0111] Gross, D. A., Graff-Dubois, S., Opolon, P., Cornet, S., Alves, P.,

Bennaceur-GrisCELLI, A., Faure, O., Guillaume, P., Firat, H., Chouaib, S., et al. (2004). High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 113,425-433.

[0112] Grossmann, M. E., Davila, E., and Celis, E. (2001). Avoiding Tolerance Against Prostatic Antigens With Subdominant Peptide Epitopes. *J Immunother* 24,237-241.

[0113] Hawkins, W. G., Gold, J. S., Dyall, R., Wolchok, J. D., Hoos, A., Bowne, W. B., Srinivasan, R., Houghton, A. N., and Lewis, J. J. (2000). Immunization with DNA coding for gp100 results in CD4 T-cell independent antitumor immunity. *Surgery* 128, 273-280.

[0114] Hernandez, J., Lee, P. P., Davis, M. M., and Sherman, L. A. (2000). The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire. *J Immunol* 164,5 96-602.

[0115] Lally, K. M., Mocellin, S., Ohnmacht, G. A., Nielsen, M. B., Bettinotti, M., Panelli, M. C., Monsurro, V., and Marincola, F. M. (2001). Unmasking cryptic epitopes after loss of immunodominant tumor antigen expression through epitope spreading. *Int J Cancer* 93,841-847.

[0116] Lennerz V., Fatho M., Gentilini C., Frye R. A., Lifke A., Ferel D., **Wölfel** C., Huber C., **Wölfel** T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *PNAS U. S. A.* 102,16013-8

[0117] Lu, J., Celis, E. (2000). Use of two predictive algorithms of the world wide web for the identification of tumor-reactive T-cell epitopes. *Cancer Res.* 60, 5223-5227.

[0118] Luiten, R., van der Bruggen, P. (2000). A MAGE-A1 peptide is recognized on HLA-B7 human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue antigens* 55,149-152.

[0119] Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., et al. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90,785-795.

[0120] Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (1994a). Can antitumor immuneresponses discriminate between self and nonself? *Immunol Today* 15,353-355.

[0121] Moudgil, K. D., and Sercarz, E. E. (1994b). The T cell repertoire against cryptic self determinants and its involvement in autoimmunity and cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 73,283-289.

[0122] Moudgil, K. D., Southwood, S., Ametani, A., Kim, K., Sette, A., and Sercarz, E. E. (1999). The self-directed T cell repertoire against mouse lysozyme reflects the influence of the hierarchy of its own determinants and can be engaged by a foreign lysozyme. *J Immunol* 163,4232-4237.

[0123] Naftzger, C., Takechi, Y., Kohda, H., Hara, I., Vijayasaradhi, S., and Houghton, A. N. (1996). Immune response to a differentiation antigen induced by altered

antigen :a study of tumor rejection and autoimmunity. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 14809-14814.

[0124] Overwijk, W. W. , Theoret, M. R. , Finkelstein, S. E. , Surman, D. R. , de Jong, L. A. , Vyth-Dreese, F. A. , DelleMijn, T. A. , Antony, P. A. , Spiess, P. J. , Palmer, D. C. , et al. (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+T cells. J Exp Med 198,569-580.

[0125] Overwijk, W. W. , Tsung, A. , Irvine, K. R. , Parkhurst, M. R. , Goletz, T. J. , Tsung, K. , Carroll, M. W. , Liu, C. , Moss, B. , Rosenberg, S. A. , and Restifo, N. P. (1998). gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of " self" -reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. J Exp Med 188, 277-286.

[0126] Palomba, M. L. , Roberts, W. K. , Dao, T. , Manukian, G. , Guevara-Patino, J. A. , Wolchok, J. D. , Scheinberg, D. A. , and Houghton, A. N. (2005). CD8+T-cell-dependent immunity following xenogeneic DNA immunization against CD20 in a tumor challenge model of B-cell lymphoma. Clin Cancer Res 11,370-379.

[0127] Parker, K. C. , Bednarek, M. A. , Coligan J. E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J Immunol 152,163-175.

[0128] Parkhurst, M. R. , Salgaller, M. L. , Southwood, S. , Robbins, P. F. , Sette, A. , Rosenberg, S. A. , and Kawakami, Y. (1996). Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues. J Immunol 157,2539-2548.

[0129] Paterson, Y. , and Maciag, P. C. (2005). Listeria-based vaccines for cancer treatment. Curr Opin Mol Ther 7,454-460.

[0130] Rammensee, H. , Bachmann, J. , Emmerich, N. P. , Bachor, O. A. , Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI : database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 50,213-219.

[0131] Rohrllich, P. S. , Cardinaud, S. , Firat, H. , Lamari, M. , Briand, P. , Escriou, N. , and Lemonnier, F. A. (2003). HLA-B\*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice : phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. Int Immunol 15,765-772.

[0132] Ronsin, C. , Chung-Scott, V. , Poullion, I. , Aknouche, N. , Gaudin, C. , Triebel, F. (1999). A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ. J Immunol 163, 483-90

[0133] Sarobe, P. , Pendleton, C. D. , Akatsuka, T. , Lau, D. , Engelhard, V. H. , Feinstone, S. M. , and Berzofsky, J. A. (1998). Enhanced in vitro potency and in vivo immunogenicity of a CTL epitope from hepatitis C virus core protein following

amino acid replacement at secondary HLA-A2.1 binding positions. *J Clin Invest* 102,1239-1248.

[0134] Scardino, A. , Gross, D. A. , Alves, P. , Schultze, J. L. , Graff-Dubois, S. , Faure, O. , Tourdot, S. , Chouaib, S. , Nadler, L. M. , Lemonnier, F. A. , et al. (2002). HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol* 168,5900-5906.

[0135] Sidney, J. , Southwood, S. , del Guercio, M. F. , Grey, H. M. , Chesnut, R. W. , Kubo, R. T. , and Sette, A. (1996). Specificity and degeneracy in peptide binding to HLA-B7-like class I molecules. *J Immunol* 157,3480-3490.

[0136] Sinha, P. , Chi, H. H. , Kim, H. R. , Clausen, B. E. , Pederson, B. , Sercarz, E. E. , Forster, I. , and Moudgil, K. D. (2004). Mouse lysozyme-M knockout mice reveal how the self-determinant hierarchy shapes the T cell repertoire against this circulating self antigen in wild-type mice. *J Immunol* 173,1763-1771.

[0137] Slager, E. H. , van der Minne, C. E. , Goudsmit, J. , van Oers J. , M. , Kostense, S. , Havenga, M. J. , Osanta, S. , and Griffioen, M. (2004). Induction of CAMEL/NY-ESO-ORF2-specific CD8+T cells upon stimulation with dendritic cells infected with a modified Ad5 vector expressing a chimeric Ad5/35 fiber. *Cancer Gene Ther* 11,227-236.

[0138] Theobald, M. , Biggs, J. , Hernandez, J. , Lustgarten, J. , Labadie, C. , and Sherman, L. A. (1997). Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 185,833-841.

[0139] Tourdot, S. , Scardino, A. , Saloustrou, E. , Gross, D. A. , Pascolo, S. , Cordopatis, P. , Lemonnier, F. A. , and Kosmatopoulos, K. (2000). A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes. *Eur J Immunol* 30,3411-3421.

[0140] Valmori, D. , Fonteneau, J. F. , Lizana, C. M. , Gervois, N. , Lienard, D. , Rimoldi, D. , Jongeneel, V. , Jotereau, F. , Cerottini, J. C. , and Romero, P. (1998). Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* 160,1750-1758.

[0141] Van Den Eynde, B. J. , Gaugler, B. , Probst-Kepper, M. , Michaux, L. , Devuyt, O. , Lorge, F. , Weynants, P. , Boon, T. (1999). A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. *J. Exp. Med* 190,1793-1800.

[0142] Vierboom, M. P. , Nijman, H. W. , Offringa, R. , van der Voort, E. I. , van Hall, T. , van den Broek, L. , Fleuren, G. J. , Kenemans, P. , Kast, W. M. , and Melief, C. J. (1997). Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 186,695-704.

[0143] Weber, L. W. , Bowne, W. B. , Wolchok, J. D. , Srinivasan, R. , Qin, J. , Moroi,

Y., Clynes, R., Song, P., Lewis, J. J., and Houghton, A. N. (1998). Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA. *J Clin Invest* 102, 1258-1264.

[0144] Worley, B. S., van den Broeke, L. T., Goletz, T. J., Pendleton C. D., Daschbach, E. M., Thomas E. K., Marincola, F. M., Helman L. J., and Berzofsky, J. A. (2001). Antigenicity of fusion proteins from sarcoma-associated chromosomal translocations. *Cancer Res* 61, 6868-6875.

## 序列表

<110> 瓦克松生物技术公司 (VAXON BIOTECH)

科斯坦提努斯 (科斯塔斯)·科斯马托普洛斯 (KOSMATOPOULOS, Kostantinos (Kostas))

让娜·梅内 - 雅梅 (GRAFF-DUBOIS, Stéphanie)

斯特凡妮·格拉夫 - 迪布瓦 (MENEZ-JAMET, Jeanne)

<120> 用于免疫治疗的 HLA-B7 隐性表位的鉴定、优化与应用

<130>VMA/bv-F1788/3PCT

<150>PCT/IB2006/002937

<151>2006-07-12

<160>61

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>TERT

<400>1

Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu

1

5

<210>2

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HER-2/neu









Ala Pro Leu Ser Leu Gly Leu Glu Thr  
1 5

<210>15

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>TERT4

<400>15

Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu  
1 5 10

<210>16

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A121. 1

<400>16

Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu  
1 5

<210>17

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>121. 1 A1

<400>17

Ala Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu

1                      5

<210>18

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A121. 2

<400>18

Glu Pro Phe Thr Lys Ala Glu Met Leu

1                      5

<210>19

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A121. 4

<400>19

Glu Pro Ile Thr Lys Ala Glu Ile Leu

1                      5

<210>20

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>NY-ES0-1

<400>20

Ala Pro Arg Gly Val Arg Met Ala Asn  
1 5

<210>21

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>ICE

<400>21

Ser Pro Arg Trp Trp Pro Thr Cys Leu  
1 5

<210>22

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>RAGE-1

<400>22

Ser Pro Ser Ser Asn Arg Ile Arg Asn Thr  
1 5 10

<210>23

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>RU2AS

<400>23

Leu Pro Arg Trp Pro Pro Pro Gln Leu  
1 5

<210>24

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>RBAF500

<400>24

Arg Pro His Val Pro Glu Ser Ala Phe  
1 5

<210>25

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>SSX2 融合蛋白

<400>25

Gln Pro Arg Tyr Gly Tyr Asp Gln Ile Met  
1 5 10

<210>26

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIVp17

<400>26



1 5

<210>30

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIVp24

<400>30

Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu

1 5

<210>31

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIV-RT

<400>31

Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu

1 5 10

<210>32

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIV-RT

<400>32

Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr

1 5 10



<210>36

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIV-Vif

<400>36

His Pro Arg Ile Ser Ser Glu Val His Ile  
1                    5                    10

<210>37

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIV-Vif

<400>37

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

<210>38

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIV-Vif

<400>38

Phe Pro Arg Thr Trp Leu His Gly Leu  
1                    5

<210>39

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIVgp160

<400>39

Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys  
1                   5                   10

<210>40

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIVgp160

<400>40

Lys Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu  
1                   5

<210>41

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HIVgp160

<400>41

Arg Pro Trp Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile  
1                   5                   10







<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>TERT

<400>51

Ala Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Leu

1                    5                    10

<210>52

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工肽

<400>52

Ala Pro Arg Pro Trp Thr Pro Cys Leu

1                    5

<210>53

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工肽

<400>53

Ala Pro Arg Ala Ser Ser Pro Leu Leu

1                    5

<210>54

<211>9



<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>121.1 A1R3

<400>57

Ala Pro Arg Thr Lys Ala Glu Met Leu

1

5

<210>58

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HLA-B\*0702 限制性隐性表位

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(1)..(1)

<223>Xaa 是任意天然存在的氨基酸

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(3)..(3)

<223>Xaa 是 Arg 或 Lys 或 His 或 Met

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(4)..(7)

<223> 各 Xaa 分别为任意天然存在的氨基酸

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(8)..(10)

<223> 各 Xaa 分别为任意天然存在的氨基酸或不存在

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(11)..(11)

<223>Xaa 是任意天然存在的氨基酸,其前提是如果 Xaa(1)..(1) 是 Ala, 则 Xaa(11)..(11) 既不是 Leu 或 Ala 或 Ile 或 Val, 也不是 Met ;如果 Xaa(1)..(1) 不是 Ala, 则 Xaa(11)..(11) 是 Leu 或 Ala 或 Ile 或 Val 或 Met ;

<400>58

Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1			5						10	

<210>59

<211>11

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>HLA-B\*0702 限制性隐性表位

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(1)..(1)

<223>Xaa 是除 Ala 之外任意天然存在的氨基酸

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(3)..(3)

<223>Xaa 是 Arg 或 Lys 或 His 或 Met

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(4)..(7)

<223>各 Xaa 分别为任意天然存在的氨基酸

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(8)..(10)

<223> 各 Xaa 分别为任意天然存在的氨基酸或不存在

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(11).. (11)

<223>Xaa 是 Leu 或 Ala 或 Ile 或 Val 或 Met

<400>59

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

<210>60

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>HLA-B\*0702 限制性隐性表位

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(3).. (3)

<223>Xaa 是 Arg 或 Lys 或 His 或 Met

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(4).. (7)

<223> 各 Xaa 分别为任意天然存在的氨基酸

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(8).. (10)

<223> 各 Xaa 分别为任意天然存在的氨基酸或不存在

<220>

<221>MISC\_FEATURE

<222>(11).. (11)

<223>Xaa 是除 Leu 或 Ala 或 Ile 或 Val 或 Met 之外任意天然存在的氨基酸



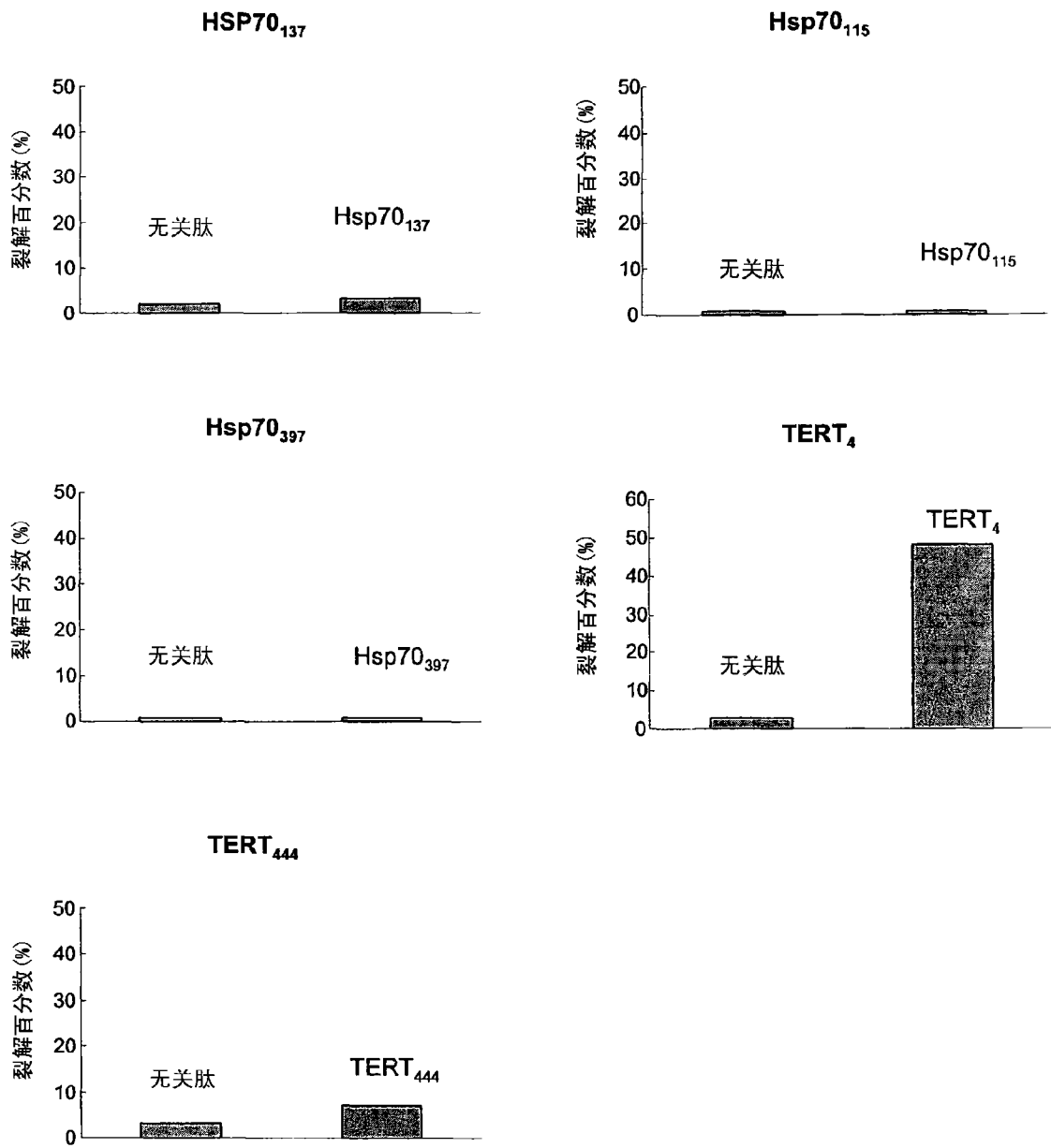


图 1

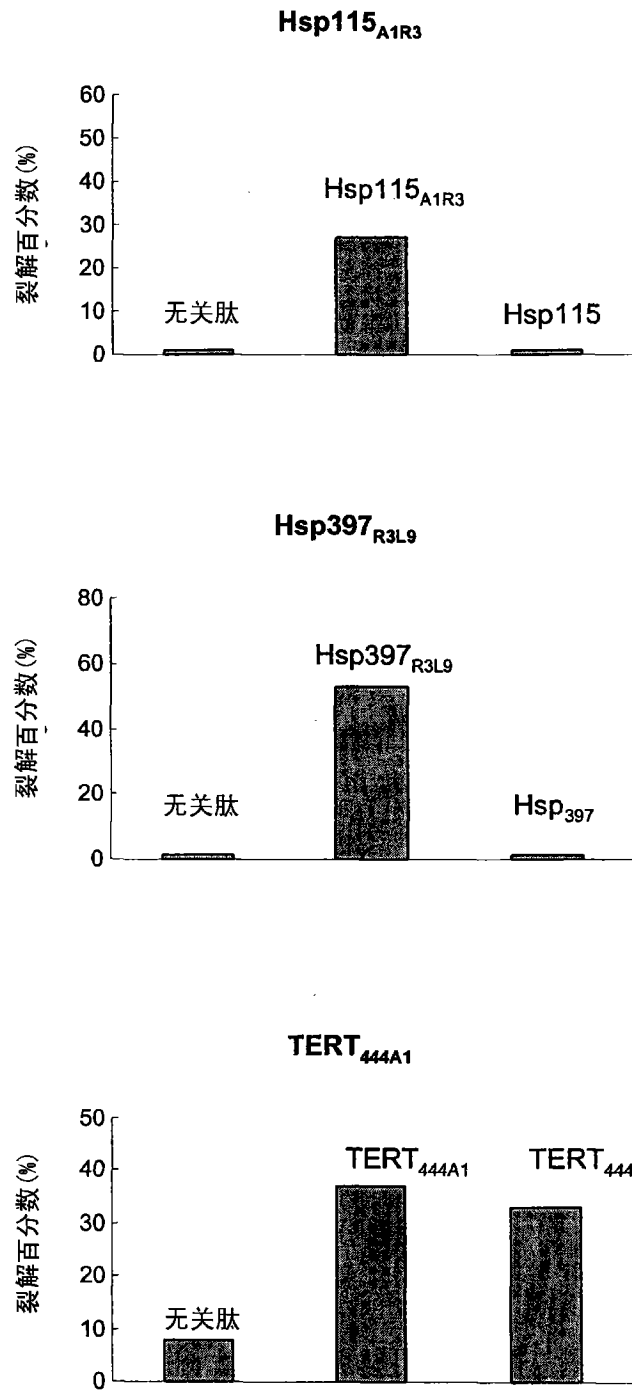


图 2

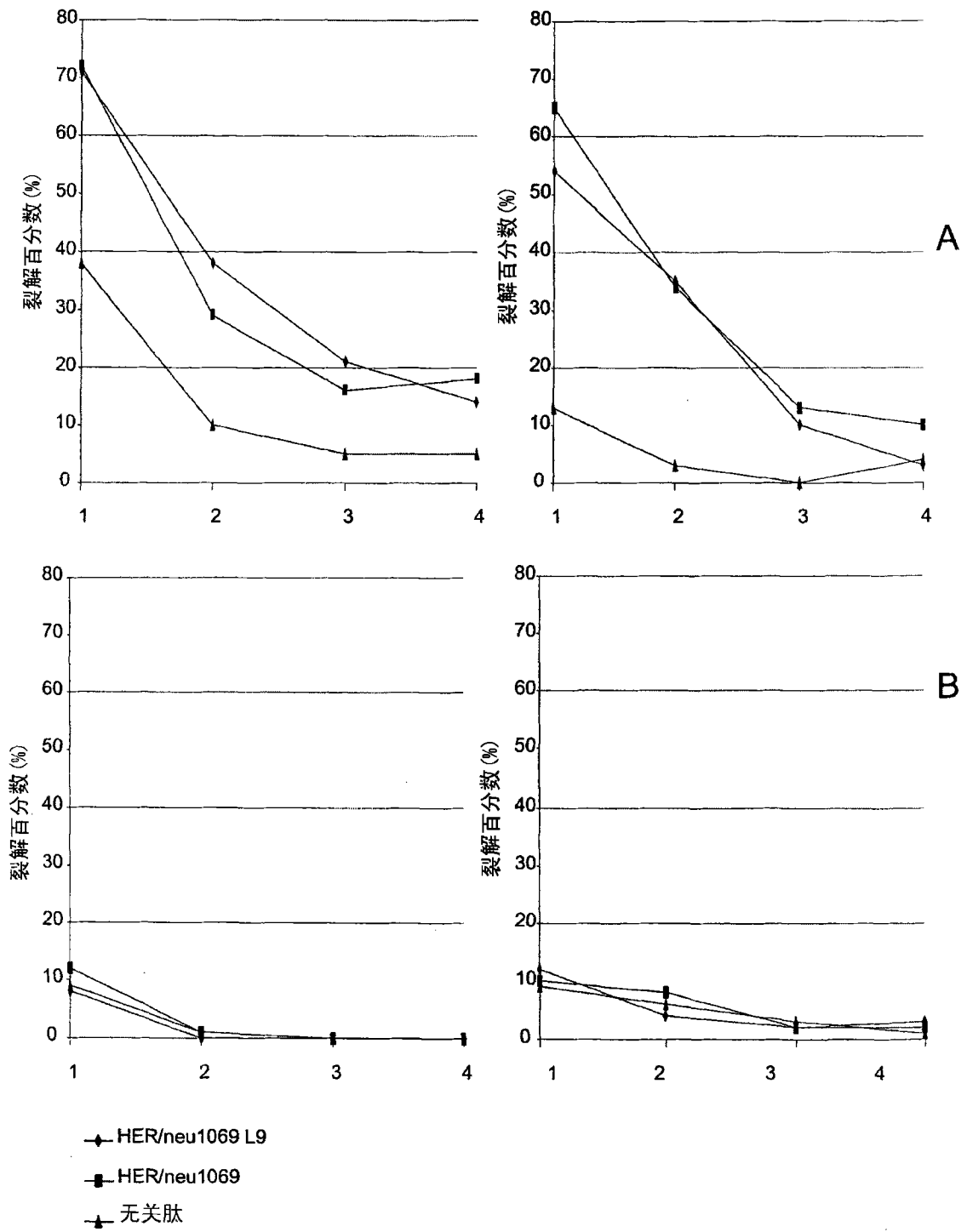


图 3

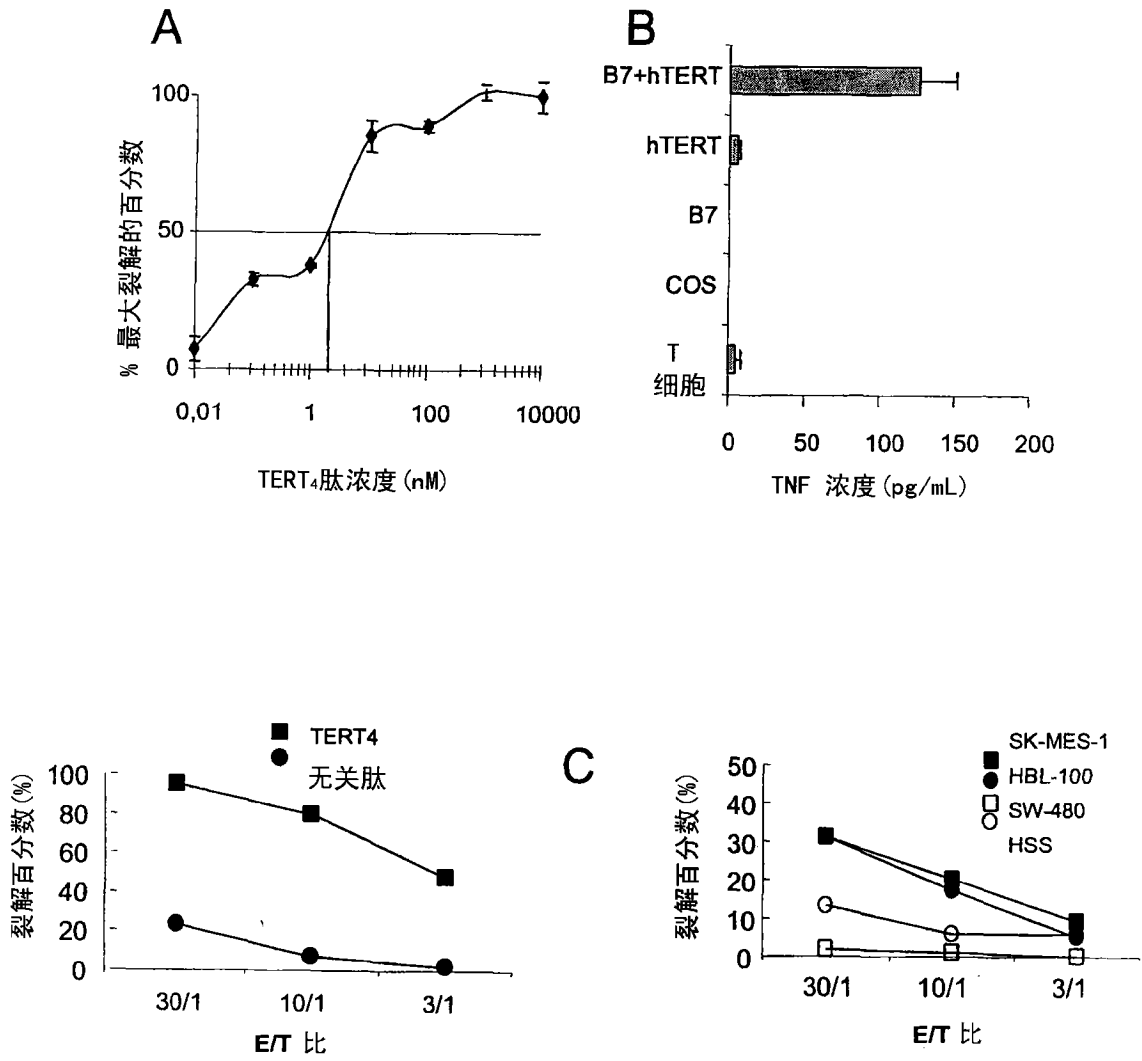
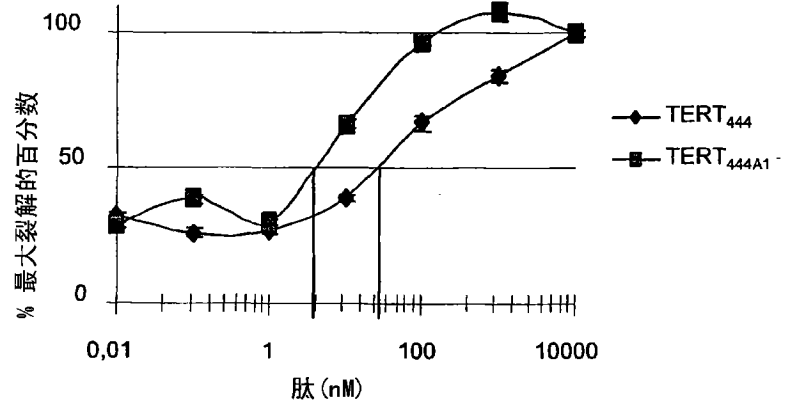


图 4

A



B

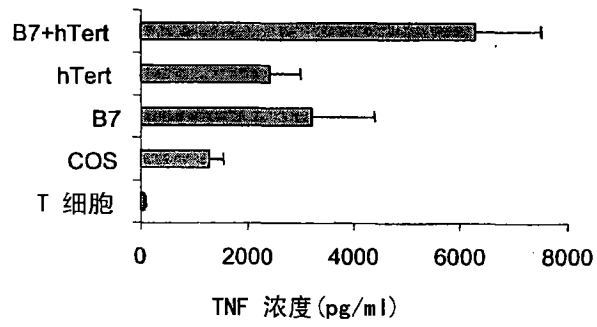


图 5

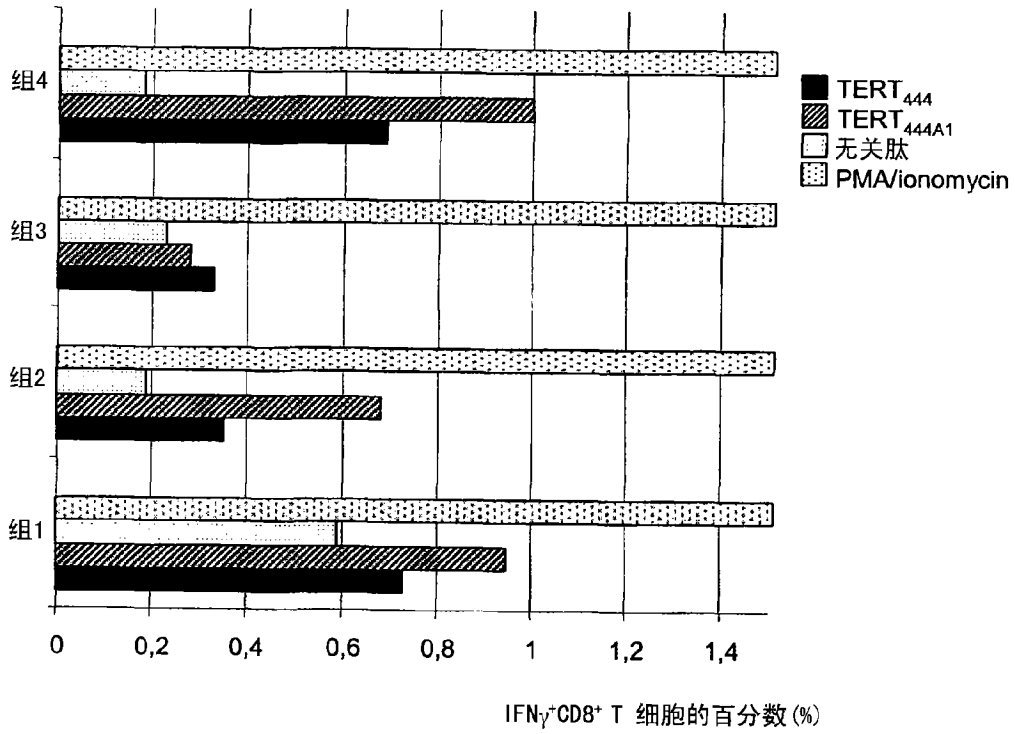


图 6